

발간등록번호

11-1543000-000641-01

초임계 유체 미립자제형기술을 이용한 벼
도정부산물의
두발건강용 고부가가치 소재 개발

(Development of High Value Material for Hair Health
from Rice By-product using Supercritical Fluid
Nano-particle Production Technique)

신라대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “초임계 유체 미립자제형기술을 이용한 벼 도정부산물의 두발건강용 고부가가치 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 11 월 12 일

주관연구기관명 : 신라대학교

주관연구책임자 : 김 미 령

세부연구책임자 : 김 미 령

연 구 원 : 최 재 석

연 구 원 : 천 은 진

연 구 원 : 김 태 욱

연 구 원 : 표 상 은

협동연구기관명 : (주)에코마인

협동연구책임자 : 문 외 숙

위탁연구기관명 : 고려대 안산병원

위탁연구책임자 : 손 상 욱

요 약 문

I. 제 목

초임계 유체 미립자제형기술을 이용한 벼 도정 부산물의 두발건강용 고부가가치소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 우리나라 쌀 산업의 현황을 살펴보면, 쌀 공급량 초과사태에 기인한 농가소득의 감소로 우리나라 쌀산업의 위기 상황이라 할 수 있다. 따라서 쌀을 이용한 다양한 고부가 가치의 상품의 개발은 우리나라 쌀산업을 살릴 수 있는 최소한의 노력이 될 수 있을 것이다. 특히 벼의 도정부산물인 미강은 최근 그 영양적 생리기능적 가치가 재평가되면 새로운 고부가 소재로의 가능성을 제시하고 있다.
- 한편, 최근 급속히 증가하는 현대인의 탈모 현상은 사회적 문제로 크게 대두되고 있는 실정이며, 탈모에 대한 의약품 및 두발 화장품에 대한 시장은 급격히 성장하고 있다. 그러나 탈모 증세에 대한 치료제는 매우 제한적이며, 그나마 양모제로 미국 FDA 인증을 획득한 의약품인 미녹시딜이나 프로페시아, 피나스테라이드 등은 그 효과에 비해 많은 부작용을 나타내고 있다.
- 최근 미강의 여러 생리기능성이 밝혀지면서, 항산화, 항염증, 항고혈압, 항당뇨, 항암 활성이 알려졌으며, 세포실험 결과 5 α -reductase 저해 활성이 보고되면서 양모제로서의 가능성이 대두되었다.
- 본 연구과제에서는 미강의 생리기능성분을 추출할 수 있는 안전하고 친환경적인 추출법인 초임계 이산화탄소 추출공정을 적용하여 초임계 미강 추출물을 개발하고 이를 이용 두발 건강용 고부가 소재와 제품을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 친환경 초임계 추출 공정을 이용한 미강의 두발 건강 소재 개발

- 초임계 추출 미강유의 기능성 성분을 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo* system에서 다양한 생리기능성 및 양모활성을 검색하여 유효성분을 확인한다.
- 초임계 추출 미강유의 양모활성을 나타내는 다양한 기능의 메커니즘을 항염증, 항산화, 5 α -reductase 저해 활성, NMR 분석을 통한 metabolomics 분석 등으로 진행한다.
- 양모효과를 확인한 초임계 추출 미강유의 세포독성 및 안전성 평가를 실시한다.
- 유효성분의 초임계 최적 추출공정을 개발하고 최적 추출 미강유의 물리화학적 특성을 규명한다.
- 초임계 대량 추출 공정의 확립을 위한 기준 및 시험방법을 개발한다.

2. 초임계 미강 추출물을 이용한 두발건강 화장품 및 의약품의 개발

- 초임계 추출미강의 유효성분의 수율을 향상시키기 위하여 효소반응을 이용한 에스테르 교환반응을 유도하는 효소반응 공정과 추출미강유의 가용화를 위한 미립자제형화 공정을 개발한다.
- 초임계 추출물의 안정성을 확보하기 위한 저장실험을 실시한다.
- 초임계 추출물을 이용한 두발 건강용 화장품과 의약품(에센스)을 개발하기 위한 제형 시험을 실시하여 처방을 확정한다.
- 두발 건강용 화장품 및 에센스의 생산공정을 개발하고 제품의 기준 및 시험방법을 확립한다.
- 임상시험 및 간이임상시험을 위한 임상시험용 시제품을 생산하고 임상시험을 실시한다.
- 제품화를 위해 두발 건강용 화장품과 에센스의 안정성 시험을 실시한다.

3. 초임계 미강 추출물을 이용한 두발건강 화장품 및 의약품의 상품화와 인증 체계 구축

- 두발 건강용 화장품(샴푸, 트리트먼트, 토닉)의 별규성분으로 초임계 추출물을 등록하고 식약처 인정허가를 신청한다.
- 국외 미국 FDA, 중국 위생허가 등 국외 공인 인증을 신청한다.
- 상품화 및 마케팅 인프라를 구축한다.

IV. 연구개발결과

1. 친환경 초임계 추출 공정을 이용한 미강의 두발 건강 소재 개발

- 초임계 추출 미강유에 대한 동물 실험결과, 양모제 의약품인 미녹시딜에 비해 뛰어난 양모효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- 초임계 추출 미강유의 성분분석 결과 생리기능성분으로 확인된 리놀렌산과 감마오리자놀, 감마토코트리에놀, 폴리코사놀 등의 기능성 성분을 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo* system에서 다양한 생리기능성 및 양모활성을 검색한 결과, 감마오리자놀과 리놀레산, 감마토코트리에놀이 *in vitro* 항산화, 항염증 활성을 나타냄을 알 수 있었으며, **리놀레산과 감마오리자놀이 양모효과에 대한 유효성분임을** 확인할 수 있었다.
- 초임계 추출 미강유의 양모활성은 지루성 피부염, 홍반 부종 등에 대한 항염활성과 및 비듬균 등에 대한 항균활성을 통해 일차적으로 양모효과의 가능성을 나타내며, 비타민 E에 비해 36배 높은 DPPH 소거능을 나타내었다. 또한 RAW 264.7 macrophage cell에서 LPS에 의해 활성화된 염증관련 효소인 **iNOS와 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 저해시켜서 항염증의 기작으로 양모효과를 나타냄을** 증명하였다.
- 초임계 추출 미강유의 주요 유효성분인 γ -tocotrienol은 COX-2와 iNOS를 농도 의존적으로 감소시켰으며, γ -oryzanol을 처리군에서는 iNOS 단백질 발현 농도는 농도 의존적으로 감소하여 iNOS 저해 활성이 뛰어난 것을 알수 있었다.
- 초임계 추출 미강유는 남성호르몬인 testosterone을 DHT로 전환시켜서 탈모를 유발하는 **5 α -reductase의 활성을 54.7% 저해함으로써 탈모 방지 효과를 나타냄을** 확인할 수 있었다.

수 있었다. 또한 초임계 추출 미강유를 처리하여 양모효과를 나타낸 조직에 대한 NMR 분석결과, 높은 농도의 타우린 함량이 확인되었고, 모낭의 활성화를 위해 타우린 생합성 기작이 관여하는 것으로 예측되었다.

- 양모효과를 확인한 초임계 추출 미강유의 세포독성 및 안전성 평가를 GLP 기관인 (주)캠온에서 실시한 결과, **매우 안전한 소재임을 확인**할 수 있었다.
- 유효성분 및 오일 수율을 위한 최적 초임계 추출공정을 개발하기 위해 온도 및 압력에 따른 추출조건을 시험한 결과, **32℃, 270 bar에서 최적의 추출수율**을 보임을 확인할 수 있었으며, 대량 추출공정을 위한 기초 조건으로 확립하였다.
- 초임계 대량 추출 공정의 확립을 위한 기준을 설정하여 시험방법을 개발하고, 시험방법에 대한 Method validation을 실시하여 그 분석 방법을 검증하였다.

2. 초임계 미강 추출물을 이용한 두발건강 화장품 및 의약외품의 개발

- 초임계 추출미강의 유효성분의 수율을 향상시키기 위하여 효소반응을 이용한 에스테르 교환반응을 유도하는 효소반응 공정과 미립자제형화 공정을 개발하였으나 투입되는 공정에 비해 얻는 이득은 그다지 높지 않아 초임계 추출물을 원료 소재로 사용하기로 결정하였다.
- 초임계 추출물은 제품의 원료소재로서 주로 -20℃에서 보관예정이며, 6개월간의 저장 실험 결과 산도, 감마오리자놀 함량, 리놀레산 함량 등에서 그 안정성은 확보된다고 할 수 있었다.
- 초임계 추출물을 이용한 두발 건강용 화장품과 의약외품(에센스)을 개발하기 위한 다양한 배합에 의한 제형시험을 실시하여 처방을 확정하였으며, **3종의 개의 두발 건강용 화장품과 1종의 두발 건강용 의약외품 에센스 제품을 개발 완료**하였다.
- 두발 건강용 화장품 및 에센스의 생산공정을 (주)콜마와 함께 개발하고 두발건강 화장품 및 의약외품 시제품을 생산하였다. 이와 더불어 시제품의 기준 및 시험방법을 확립하였으며, 제품화를 위해 두발 건강용 화장품과 에센스의 안정성 시험을 실시하여 1년간의 안정성을 확보하였다.
- 시제품에 대해 간이 임상시험 및 임상시험을 실시한 결과 16주 후 탈모증 개선 효과를 확인할 수 있었다.

3. 초임계 미강 추출물을 이용한 두발건강 화장품 및 의약외품의 상품화와 인증 체계 구축

- 상품화를 위한 브랜드 및 용기를 개발하고, 각종 박람회에서 시제품을 활용한 사전 마케팅 및 각종 온라인 마케팅 인프라를 구축하였다.
- 두발 건강용 화장품(샴푸, 트리트먼트, 토닉)의 별규성분으로 초임계 미강 추출물을 등록하고 식약처 의약외품 품목허가를 신청하였으며, 국제 화장품 원료규격집 ICID에 등록완료하였다. 또한 국외 미국 FDA-OTC 및 중국 위생허가 등 국외 공인 인증을 신청하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 총 2편의 SCI급 논문에, 2편이 SCIE 및 SCOPUS급 논문에 게재되었으며, 총 3편이 현재 SCIE 급 논문에 투고되었으며, 2편이 SCI급에 투고 예정으로 준비 중이다. 총 7번의 학술대회 발표에 참가하였으며, 1건의 특허등록, 1건의 특허출원을 완료하였다.
- 총 3종의 두발건강용 화장품이 상품화가 되었으며, 1건의 두발건강용 에센스가 식약처 의약품 품목인증 신청 중에 있다.
- 석사 1명, 학사 8명의 인력이 본 과제와 관련하여 배출되었으며, 현재 2명의 석사과정 학생이 연구에 참여중이다.
- 본 과제 참여업체인 (주)에코마인에 기술이전 1건이 완료되었다.

2. 성과활용 계획

- 연구결과를 통한 특허기술을 (주)에코마인으로 기술이전을 완료하였고, 3종의 두발건강용 화장품의 별규 등록을 통한 사업화를 추진중이며, 1종의 헤어 에센스 제품에 대해서는 식약처 의약품 품목허가를 통해 사업화 할 예정이다.

SUMMARY (영문 요약문)

Rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in Korea. Rice bran is the major by-product of rice milling process and accounts for nearly 8% of milled rice. It has recently been reported that rice bran extract has various health beneficial effects, including antioxidant, anticancer, and anti-hyperlipidemia activities. In addition, rice bran extract shows 5- α -reductase inhibitory activities *in vitro* cell lines. However, it is unknown whether rice-bran extract is effective for treating hair loss *in vivo*.

Although hair loss is not a mortal disorder, it has a great impact on a person's self-respect, mental health, and overall quality of life. Androgenetic alopecia is the most common type of hair loss, affecting millions of both men and women. Topical minoxidil and oral finasteride approved by the Food and Drug Administration (USA) are typically used to treat androgenetic alopecia. However, there are significant adverse dermatological effects and drug-related sexual disorders. Therefore, there remains a demand for highly effective pharmacotherapy for treating androgenetic alopecia with an excellent safety and efficacy profile.

Supercritical fluid extraction has been introduced as an environmental friendly, non-toxic, nonflammable, and inexpensive method for oil extraction. Extraction of oil at the critical point minimizes the thermal degradation of proteins, antioxidants, and other nutritionally valuable components.

In the present study, we evaluated the potential hair growth-promoting activity of rice bran by comparing histological results and expression levels of cell growth factors from the skin of C57BL/6 mice treated with crude rice bran-supercritical carbon dioxide fluid extracts (RB-SCE) and its major components.

RB-SCE showed hair growth-promoting potential to a similar extent as 3% minoxidil, showing that the hair follicles were induced to be in the anagen stage. The numbers of the hair follicles were significantly increased. In addition, mRNA expression levels of VEGF, IGF-1, and KGF were also significantly increased and that of TGF- β decreased in RB-SCE-treated groups. Among the major components of RB-SCE, linoleic acid and γ -oryzaol induced the formation of hair follicles according to examination of histological morphology and mRNA expression levels of cell growth factors. In conclusion, our results demonstrate that RB-SCE, particularly linoleic acid and γ -oryzanol, promotes hair growth and suggests RB-SCE can be applied as hair loss treatment.

The mechanism of hair growth-promoting potential of RB-SCE was elucidated with higher anti-oxidative activity with about 36 times ($SC_{50}=35\mu\text{g/ml}$) than vitamine E ($SC_{50}=1.25\text{mg/ml}$), and anti-inflammatory effect via the inhibition of iNOS and COX2 level

and 55% of 5- α -reductase inhibition.

Then, we evaluated the optimal condition for SC-CO₂ extraction yield of rice bran oil and active components, linoleic acid and gamma-oryzanol, was determined as 270 bar and 32°C by response surface methodology (RSM). The 3 kinds of cosmetics (shampoo, hair treatment and hair tonic) and 1 kind of quasi-drug (hair essence) containing RB-SCE were developed and submitted to Korea Ministry of Food and Drug safety for approval and review for quasi drugs manufacturing.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Introductions	-----	1
Chapter 2 Current status	-----	14
Chapter 3 Results	-----	18
Chapter 4 Contribution	-----	270
Chapter 5 Achievement and Application of Results	-----	277
Chapter 6 References	-----	283

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 1 절	국내외 관련분야에 대한 기술개발현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
	(주관기관-신라대)	
제 1 절	기술개발 선행연구	18
제 2 절	초임계 이산화탄소 추출 공정 개발 및 최적화	20
제 3 절	추출물의 <i>in vitro</i> 생리활성 및 안전성 test	43
제 4 절	효소반응 공정 개발	58
제 5 절	초임계 추출물의 대량생산 공정개발	72
제 6 절	초임계 추출물의 지표물질 설정 및 분석방법 확립	78
제 7 절	생리활성 메커니즘 규명	86
제 8 절	식약청 인증준비	127
	(위탁기관 -고려대 안산병원)	
제 1 절	미강 초임계 추출물 및 미강에센스의 <i>in vivo</i> 생리활성 검증	162
제 2 절	임상시험	164
	(협동기관- (주)에코마인)	
제 1 절	미강추출물의 초임계 유체 미립자제형 공정 개발	189
제 2 절	식약처 인증 절차준비	195
제 3 절	대량생산체제 설계 및 구축	224
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	270
제 1 절	목표 달성도	270
제 2 절	관련분야에의 기여도	275
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	277
제 6 장	참고문헌	283

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

○ 본 연구는 초임계 이산화탄소 추출공정 및 유체 기술을 이용하여 벼 도정부산물(미강)로부터 두발건강용 고부가 소재 개발 및 산업화를 최종목표로 한다.

가. 초임계 이산화탄소 추출공정 개발 및 벼 도정 부산물(미강)로부터 두발 건강용고부가 소재 개발

나. 벼 도정 부산물(미강) 유래 초임계 추출물의 가공적성 및 생리활성 평가

다. *In vitro, in vivo* 활성, 임상평가 (유효성, 안전성 검증)

라. 벼 도정 부산물(미강) 유래 두발건강용 고부가 의약외품 개발 및 생산

2. 연구개발의 필요성

가. 우리나라 쌀 산업의 현황

- (1) 향후 지구에 닥칠 위험요인들을 보면 선정 기관별로 차이가 있으나 그 내용은 비슷하다. 식량부족, 열대우림 손실, 생물의 멸종, 인구 증가, 수자원 부족, 수산자원 고갈, 보건의 위협, 기후 변화, 산성비, 에너지 위기 등이 그것이다. 이 위협들을 실제적인 위기로 정리하면 식량문제로 귀결된다.
- (2) 식량위기에 있어 가장 큰 문제는 인구 증가세가 앞으로도 계속될 가능성이 크다는 것이다. 2025년 세계 인구는 지금보다 28억 명이 늘어난 85억 명으로 전망되고 있으며, 이러한 인구 증가의 대부분이 식량 부족에 시달리는 개발도상국에서 일어나고 있다.
- (3) 개도국의 폭발적인 인구 증가와 신흥공업국의 육류소비 증가에 의한 사료용 곡물소비량 증가, 선진국의 화석연료 대체에너지 개발 이용육구 증대로 인한 추가적인 곡물 수요의 폭발적 증가 등으로 인해 곡류 소비 형태는 큰 변화를 겪고 있다. 이에 반해 지구기상환경 악화, 세계 식량토지자원의 감소, 경제성장에 따른 소비자들의 농산물 품질고급화에 대한 요구도의 증대 등에 따른 단위생산성둔화, 식량생산의 기술적 지역적 불균형 등으로 곡물 생산량은 지속적으로 감소하고 있다.
- (4) 세계 곡물의 연간 소비량은 약 21억 톤 수준인데 반해 총생산량은 약 20억 톤 수준으로 소비량에 미치지 못하고 있으며 곡물 재고량도 감소추세로 안정적인 식량수급에 대한 위기감이 고조되고 있다.

- (5) 이러한 상황에서 세계 곡류 시장을 주도하는 농업국가의 힘이 막강시대로 도래하였다. 만성적 식량 부족시대에서 식량 수입국들의 식량 확보는 더욱 힘들어지고 머지않아 **식량의 무기화라는 무서운 상황에 직면**하게 된다.
- (6) 우리나라 곡류의 식량 자급율은 약 26.7%로서 1970년 약 81%, 90년 43% 수준에서 최근 10여 년 동안 30% 미만으로 떨어져 OECD 국가 중 최하위 수준이다. 곡물자급률이 26.7%라는 것은 국내의 필요 곡물 2,000만 톤 중에 약 3/4을 수입에 의존하여야 한다는 것이다.

표 1. 한국 곡물자급률 및 식량자급률 추이

구분	1990	1995	2000	2003	2005	2006	2007	2008	2009
식량자급률(%)	70.3	55.7	55.6	53.3	53.4	52.7	51.6	51.7	51.4
곡물자급률(%)	43.1	29.1	29.7	27.8	29.4	27.7	27.2	27.8	26.7

자료: 농림수산식품부 2010

- (7) 그나마도 쌀을 제외하면 나머지 식량자급률은 5%에 불과하다. 쌀이 98.0%, 보리쌀이 41.1%일 뿐, 밀(0.5%), 옥수수(1.0%), 콩(8.4%)은 거의 전량 수입에 의존하고 있다. 또한 만성적인 식량부족으로 고통을 받고 있는 북한과의 통일을 고려하면 문제는 더욱 심각해진다. 식량이 무기화되면 돈만 가지고는 곡물을 구할 수 없게 된다. 1970년대 두 차례 오일쇼크를 통해 석유무기화의 위력을 경험했지만 식량이라는 특수성에 비취볼 때 식량무기화는 이를 능가하는 엄청난 위기를 초래할 것으로 생각된다
- (8) 우리나라는 우루과이라운드 협상 결과에 따라 2004년까지 10년 동안의 쌀 관세화 유예기간을 가졌으며, 추가로 2014년까지 쌀 관세화 유예 연장이 결정되었다. 그러나 이에 대한 대가로 쌀 의무수입물량을 현행 21만5000톤(1988~90년 연평균 쌀 소비량의 4%)에서 2014년까지 40만8700톤(7.96%)으로 늘려야 함. 이 가운데 10~30%에 해당되는 물량은 소비자에게 밥쌀용으로 판매해야 한다.
- (9) 현재, 우리나라 국민1인당 연간 쌀 소비량은 1979년 136kg에서 75kg 수준으로 떨어지고 있으며, 연속적인 풍작으로 생산량은 늘어나고 있음. 최소시장접근(MMA)으로 어쩔 수 없이 들어오는 외국쌀은 연간 30만톤 수준으로 늘어나고, 2002년부터 2007년까지 연간 30만톤 내외 지원되던 대북지원도 중단되는 등 **쌀 공급량 초과로 재고가 늘어날 수밖에 없는** 수급구조가 되었다.
- (10) 이러한 쌀 공급량초과 사태에 기인한 **농가소득의 감소는 전체 농업의 근간을 흔들**어 놓는 계기가 되고 있다. 농가소득의 감소로 인한 농업 포기 가업이 늘고, 농지면적이 줄어들면서 점차 국내 식량자급율은 떨어질 수밖에 없는 구조로 나아가고 있다. 덧붙여 국민 식량의 73%를 해외에 의존하는 현재 상황에서 당장 내년인 2015년 쌀의 완전개방은 우리농업에 있어 큰 위기가 될 것이다.

- (11) 따라서 우리 농업을 살리고 식량 자급율을 증가시키기 위해서는 농가의 소득을 증대시킬 수 있는 방안을 마련하여야 한다.
- (12) 쌀을 이용한 다양한 고부가가치의 상품의 개발은 이러한 농업을 살리고 식량자급율을 증진시키기 위한 최소한의 노력이 될 수 있을 것이다.

나. 쌀 및 쌀 부산물(미강)의 특성

- (1) 쌀은 우리 조상 대대로 이어온 주식으로서 우리 식생활의 근본을 이루고 있고 우리의 건강과 밀접한 관계에 있을 뿐 아니라 건강과 부의 척도이다. 국민 경제가 발전되고 생활양식이 서구화되어 감에 따라 과거의 기본 식량이었던 쌀과 같은 곡류의 섭취가 감소되고 육류를 비롯한 지방질 식품의 섭취량이 크게 증가하였으며 이와 동시에 성인병의 발병이 점차 증가되어 국민건강을 위협하고 있다.
- (2) 최근의 과학적 연구 결과에 의하면 쌀의 일반적인 영양성분 뿐 아니라 다양한 기능성분이 함유되어 있어 각종 기능성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 쌀의 소비량이 많이 감소하기는 하였지만, 아직도 국민 대다수는 쌀을 기반으로 하는 식생활을 하고 있어 쌀은 아직도 우리의 사회적 문화적 정치적 경제적 산업적 모든 면에서 중요한 식량 자원이라고 할 수 있다.
- (3) 식물학적으로 벼 속에는 약 20개의 종이 있으며, 이 중 사람이 재배하는 것은 아시아 벼 (*Oryza sativa* L.)와 아프리카 벼(*Oryza glaberrima* S.) 2 종이 있다.
- (4) 아시아 벼는 다시 열대벼(indica)와 온대벼(japonica)로 나뉜다. 인디카는 열대지방인 인도나 동남아시아에서 주로 재배되는 벼로서 아밀로스 함량이 높아 우리 입맛에는 찰기가 부족하고 싱겁게 느껴지고, 자포니카는 온대지역인 우리나라, 일본, 중국의 동북지방, 이집트, 미국, 호주 등에서 주로 재배되는 벼로서 밥이 차지고 윤기가 있다. 자포니카는 전 세계 쌀 생산의 12-15% 정도를 차지하고 있다.
- (5) 벼는 출수생태에 따라 조생종, 중생종, 만생종으로 구분함. 생육기간은 조생종 약 140일, 중생종 약 160일, 만생종 180일 정도이며, 용도에 따라 밥쌀용(밥쌀, 김밥용 등), 가공용(국수, 빵, 양조, 발아현미, 즉석밥, 떡, 튀김용 등), 기능성(다이어트, 영양식, 홍국쌀 가공용 등), 사료용 등으로 분류하기도 함. 현미의 길이와 폭의 비율(장폭비=길이÷폭)로 보아 길쭉한지 혹은 짧고 둥근 모양인지에 따라 장립종(3.1이상), 중립종(2.1~3.0), 단립종(2.0 이하)으로 구분하기도 함. 우리나라 품종은 대부분 단립종에 속한다. 밥을 지었을 때 찰기의 차이를 나타내는 아밀로스 함량의 차이에 따라 찰쌀, 중간찰쌀, 멥쌀로 구분한다.
- (7) 특수미로는 유색미, 향미 등이 있으며, 유색미는 벼의 종피(현미층)에 안토시아닌 혹은 탄

닌 계열의 색소가 있는 쌀로, 이 색소는 인체의 노화를 예방하는 항산화 기능이 있다고 알려져 있으며, 적색, 갈색 및 흑색이 대부분이다. 향미는 구수한 누룽지 향을 가진 쌀로서 인도나 동남아시아 사람들이 즐겨먹는 쌀 중에는 향미가 비교적 많으며, 이 외에도 섭취하여도 당화되는 전분량이 적어 상당량이 체내 흡수 되지 않고 몸 밖으로 배출되어 중성지방 저감 및 혈당상승억제 효과가 있는 특수전분의 쌀, 철분이나 아연 등의 인체에 필수적인 미량원소 혹은 비타민, 필수 아미노산 등 영양소의 함량이 보통 쌀보다 높도록 유전적으로 개선된 쌀 등도 개발되고 있다.

(8) 벼를 도정하여 쌀을 생산하는 과정을 살펴보면, 벼 외피(外皮)인 왕겨와 내피(內皮)를 포함하는 현미(玄米)로 구분이 되는데 왕겨가 벗겨진 다음에 수차례에 걸쳐 도정이 이루어지면서 백미(白米), 그리고 쌀눈(胚芽)를 포함하는 쌀겨(米糠)로 나뉘어지게 되며, 이 쌀겨가 미강이다.

(9) 미강은 현미를 도정하는 과정에서 생기는 과피, 종피, 호분층 등의 부산물을 말하며, 주로 쌀눈, 싸라기, 순수미강, 쌀가루 등이 혼재된 상태로 존재한다. 쌀 도정과정에서 발생하는 미강의 양은 현미의 약 10% 정도로, 많은 양에 해당하지만 미강이 식감을 떨어뜨리고 불필요한 것으로 간주되어 일부 미강유로 제조되고 대부분 사료 및 비료재료로 사용되거나 폐기되고 있는 실정이다. 또한 공기에 노출되게 되면 쌀겨 내부의 lipase에 의한 지방가수분해로 지방산과 글리세롤로 변화가 이루어지게 되고 쌀겨가 가지고 있는 고유의 맛이 변질되고 원래부터 쌀겨가 가지고 있는 역한 냄새나 맛이 항상 포함되어 있어 식용으로 활용하기에는 부적합한 상태로 변화가 이루어지게 되는 단점을 가지고 있다.

(10) 그러나 최근 미강의 영양적 가치가 재평가 되면서 건강보조식품 등에 다양하게 이용되고 있다.(대한민국 공고특1992-0003054) 미강의 영양분포는 쌀눈에 약 66%, 쌀겨에 약 29%, 그리고 백미에 나머진 약 5% 정도가 함유되어 있으나, 조섬유, 중성섬유질, 섬유소 등의 식이섬유는 순수미강에 다량 함유되어 있으며, 현미의 섭취 시에는 이들 식이섬유에 의하여 변비의 예방이나 다이어트에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

(11) 미강에는 강한 항산화력을 나타내는 γ -oryzanol, tocopherol, tocotrienol 등 매우 뛰어난 생리활성 phytochemical들이 다량 포함되어 있고, 베타시토스테롤, 스티그마스테롤 등과 같은 식물성 스테롤과 스쿠알렌이 함유되어 있으며 지구력 증진에 도움이 주는 것으로 알려져 있는 옥타코사놀도 함유되어 있다.

(12) 미강의 지용성 생리활성 물질 중 하나인 γ -oryzanol은 campesterol, β -sitosterol 등의 sterol과 trierpenoid alcohol이 모핵인 ferulic acid와 ester 결합을 하고 있는 무색, 무취의 혼합물질로 현재까지 약 10 종류의 γ -oryzanol 성분이 보고되었으며 유지 및 유지식품의 산화방지제로서 이용될 뿐만 아니라 화장품 및 의약품의 원료로서 널리 사용되고 있다(2-5).

(13) 또한 쌀과 미강의 주요 phenolic acid이며 γ -oryzanol의 모핵인 ferulic acid는 LDL (low

density lipoprotein)산화억제, radicals에 의한 세포손상 보호 등 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라 당뇨 유도 쥐의 혈중 지질 개선효과도 보고되고 있다(6-11).

- (14) 미강 내에는 tocopherol과 tocotrienol이 풍부하게 함유되어 있으며 이들은 혈액, 조직, 세포의 지질 산화를 방지하는 기능으로 인체에 가장 중요한 지용성 비타민으로 알려져 있다. 이 중 tocotrienol은 tocopherol이고, 같은 비타민 E 계열의 비타민(vitamer)로서 영양적 가치가 없는 것으로 간주되어 왔으나, 1990년대 중반 이후 항산화, 항암, 고지혈증 개선, 혈당 저하, 동맥경화 완화 등 다양한 생리활성 효과 면에서 tocopherol 보다 4~6 배 이상 월등한 것으로 밝혀졌고, 자외선 노출에 의한 피부 손상을 방지하는 것으로 보고되고 있다(8-10).
- (15) 쌀겨로부터 풍부하게 얻을 수 있는 유지자원의 하나인 미강유는 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 불포화지방산으로 이루어져 있어 영양적인 가치가 뛰어나다. 특히 linoleic acid는 고지방식으로 인한 면역력의 저하를 막아주는 것으로 보고되고 있다.
- (16) 또한 최근 연구보고에 의하면 linoleic acid 등 불포화지방산이 5 α -reductase의 활성을 저해하여 Dihydroxy Testosterone (DHT)의 생산을 감소시켜 탈모에 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며(15-17),Choi(18)의 결과에 의하면 미강유가 C57BL/6 수컷 마우스에서 hair growth 효과가 나타내었다고 보고되었다.

다. 탈모

(1) 연구 배경 및 중요성

- (가) 현재 한국 성인 남성의 23%인 350 여만 명이 탈모 증세를 보이고 있으며, 여성과 청소년 까지 합하면 거의 천만 명에 육박할 것으로 추산되고 있어 이에 따른 사회 경제적 문제가 심각하게 대두되고 있다. 지난 2002년 2천억 원 규모의 탈모시장은 2006년도에 5천억 원으로 증가하면서 이제는 1조원대의 거대 시장으로 해마다 급격하게 성장하고 있다.
- (나) 이처럼 탈모증은 그 환자수의 증가와 사회적인 관심의 증대에도 불구하고 그 치료 방법이 매우제한적인 현실이다. 국소 도포제로 미녹시딜(minoxidil[®]) 및 경구 제로 프로페시아(propecia[®]) 등이 처방되고 있으나 수반되는 부작용인 심혈관계 장애, 피부자극, 성기능 감소, 심각한 기형유발 등의 이유로 한계점을 드러내고 있어 보다 안전하고 환자들에게 거부감 없는 유용한 제품의 개발과 이데 대한 임상적 검증이 시급하다.

(2) 탈모증에 대하여

- 탈모증은 모발이 정상적으로 존재하는 부위에서 소실되는 질환으로 주로 두부에 발생한

다. 안드로겐성 탈모증(Androgenic alopecia)은 모든 남녀에서 사춘기 이후에 발생하는 가장 흔한 유형의 탈모증으로 남성 호르몬과 유전적인 소인이 중요한 인자로 생각되고 있다. 국소적으로 두피 중앙부 (전두부 및 두정부)의 모발이 연모(vellus hair)로 변하여 점진적으로 길이가 짧아지고 가늘어지며 모양이 소형화 되는 것을 특징으로 한다.

(가) 남성형 탈모증(남성형 대머리)

- 남성형 탈모증은 청소년기 이후 발생하는 가장 흔한 형태의 탈모증으로써 흔히 대머리라고 불리우는 탈모형태이다. 양측 측두부의 머리선의 후퇴로 위에서 볼 때 앞머리선이 숫자 3 혹은 영문자 M 처럼 보이고 두정부의 탈모가 우세하게 나타난다. 이는 남성에 약 50% 에서 발생하며 일반적으로 40-50대에 시작하는 경우가 많으나 사춘기 직후나 20대 초반에 시작되는 경우도 적지 않게 관찰되고 있다. 원인으로는 남성호르몬이 모낭에 미치는 영향과 유전적인 소인 등이 중요한 원인들로 알려져 있다.
- Hamilton은 안드로겐성 탈모증을 임상적 단계에 따라 처음 분류하였으며, 이후 Norwood는 Hamilton의 분류 기준을 변형하여 안드로겐성 탈모증을 재분류 하였고 현재 이 기준이 사용되고 있다 (Figure 1).

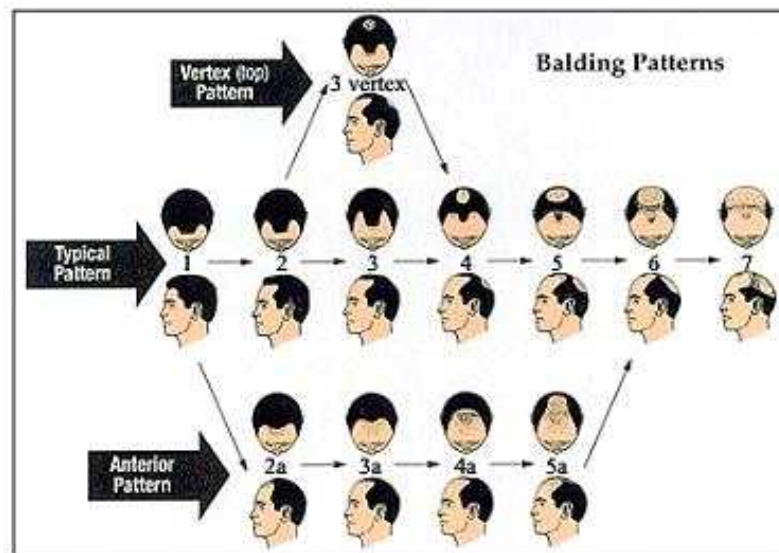


Figure 1. The modified Hamilton-Norwood classification of male androgenic alopecia

(나) 여성형 탈모증(여성형 대머리)

- 여성에서도 남성형 탈모증에서 처럼 남성 호르몬과 유전적 요인에 의한 탈모증이 발생되는데 남성의 탈모 양상과는 달리 남성에서처럼 심한 형태의 탈모가 진행되는 경우는 드물고 앞 머리선도 일반적으로 잘 유지되지만 두정부(머리 맨 위쪽 두피)에서 전체적인 모발의 감소를 보이며 이러한 양상이 뒤 쪽에서 앞쪽으로 점점 더 넓게 진행되기

때문에 크리스마스 나무(Christmas Tree) 형태를 보일 수 있다(Figure 2). 특히 여성의 경우 내분비기관의 이상에 의한 호르몬 분비 이상에 의해서도 이러한 탈모증이 발생할 수 있으므로 주의를 요한다.



Figure 2. 좌측의 남성형 탈모증 환자에서는 M자 모양으로 앞 머리선의 후퇴를 볼 수 있으나 여성 탈모증에서는 앞 머리선이 잘 유지되고 전체적으로 크리스마스 나무(Christmas Tree) 형태를 보인다 (Springer Ket al., American Family Physician, 2003).

- 탈모증의 빈도는 연령이 증가할수록 증가하는데 국내 보고에 의하면 남자의 경우 40-50대가 되면 30% 이상에서 나타나고 여자의 전체 유병율도 5% 이상으로 추정되고 있다. 최근에는 병원에 내원하여 치료받는 젊은 연령층의 환자수가 점차 증가하는 경향을 보이고 특히 여자환자의 비율이 증가하는 추세이다. 이는 아마도 외모에 대한 관심이 증가하는 사회적인 경향과 경제능력의 향상 등에 기인한 영향으로 생각된다. 이처럼 탈모증은 그 환자수의 증가와 사회적인 관심의 증대에도 불구하고 그 치료 방법이 매우제한적인 현실이다. 국소 도포제로 미녹시딜(minoxidil[®]) 및 경구 제로 프로페시아(propecia[®]) 등이 처방되고 있으나 수반되는 부작용인 심혈관계 장애, 피부 자극, 성기능 감소, 심각한 기형유발 등의 이유로 한계점을 드러내고 있어 보다 안전하고 환자들에게 거부감 없는 유용한 제품 개발과 이데 대한 임상적 검증이 시급하다.
- 탈모는 정상적으로 모발이 존재해야 할 부위에 모발이 없는 상태를 말한다. 탈모는 노화가 진행됨에 따라 나타나는 자연스러운 현상이지만 현대인의 삶의 지리 개선되고 미적 욕구가 증대됨에 따라 하나의 질병으로 인식되고 있다.
- 탈모의 원인으로는 비특이적 면역, 자가면역반응, 스트레스, 유전적 요인 등 보고되고 있다. 남성형 탈모는 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나 유전적 요인과 더불어 안드로겐(Androgen)이라 불리는 남성 호르몬의 영향을 받는 것으로 알려져 있다.
- Testosterone은 남성호르몬 중 가장 많은 양을 차지하고 있는 것으로 5 α -reductase에 의해 보다 활성이 강한 Dihydrotestosterone (DHT)으로 환원된다. DHT의 남성호르몬 수용체에 대한 친화도는 testosterone 의 5배 정도이며 남성형 탈모의 가장 큰 원인으로 작용 한다. 그러므로 남성형 탈모를 방지하기 위한 방법으로 5 α -reductase 를 저해하기

위한 연구가 많이 진행되고 있다. 이에 대한 효과가 알려져 있는 물질로는 finasteride, cyproterone acetate 등이 있으며 최근에는 천연 추출물을 이용한 시도가 이루어지고 있다.

- 또 다른 탈모의 큰 원인은 아토피, 지루성 피부염 그리고 탈모성 모낭염 등 염증반응의 결과로 알려져 있다. 염증반응은 조직의 손상을 비롯한 외부로부터의 자극, 감염 등 다양한 감염원에 대한 생체 내 방어 반응의 하나로서 국소혈관과 다양한 면역세포가 사이토카인들이 관여하여 초기 방어를 제공하는 일련의 과정이다.
- 이러한 요인에 의해 염증이 발생이 되면 reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO)와 같은 활성종과 염증관련 지표인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 같은 효소가 중요한 역할을 담당한다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람-음성균의 세포외막에 존재하며, RAW 264.7과 같은 대식세포에서 pro-inflammatory cytokine들을 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- LPS에 의해 세포외 자극이 세포막 안으로 전달되면 세포외 자극을 세포내 핵까지 전달하는 신호전달 경로가 활성화 되고 염증을 유발시키는 iNOS, cyclooxygenase-2 (COX-2) 등의 target gene을 발현시킨다. iNOS는 macrophage와 hepatocytes에 존재하게 되며, 염증이 다른 병원균들과 관여하는 동안 NO생성은 현저하게 증가하고 세포독성을 나타나게 된다. 더욱이 정상적인 NO의 free radical과 과산화 질소를 생성하기 위한 oxygen과의 격렬한 반응으로 산화력의 상실을 야기할 수 있는 강력한 pro-oxidant molecule인 NO를 만든다. 그러므로 염증성 자극의 반응에 의한 NO생성의 저해는 염증성 질병에서 치료적 방법으로 사용될 수 있다.
- 체내의 에너지 대사 과정에서 산소의 대부분은 산화적 인산화를 통해 정상적으로 환원되지만 그 중 일부는 인체에 유해한 활성산소나 유리기를 형성하여 인체에 장해를 일으키는 것으로 알려져 있다. 활성산소종이란 superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$)이 있고, 그 외에 $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH 및 HOCl 등을 포함한다(27). 이들은 노인성 질환과 노화를 비롯한 많은 질환의 중요 원인으로 보고되어 있으며, 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고, 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 염증, 뇌졸중, 암, 동맥경화 등 다양한 질병을 유발하게 된다.

(3) 탈모 시장 현황

(가) 탈모 시장의 현황을 살펴보면, 예전에는 특히 40대~50대 남성들이 탈모시장에서 주 고객이었던 반면 그 흐름이 점차적으로 20~30대의 남성으로 옮겨 가고 있으며, 이제는 젊은 여성 탈모로 점차적으로 확산되어 가고 있다. 또한 청소년기 탈모 역시 크게 확산되는 추세로, 심지어 초등학생, 영유아기의 아동들까지도 탈모로 고생하고 있다. 더 이상 탈

모시장에 중년남성들의 '영역' 이 아닌 다양한 연령층이 탈모 시장의 '영역'이 되었다.

- (나) 탈모시장에서 가장 발 빠르게 움직이는 샴푸업계는 샴푸시장에서 2007년에는 4.6%에 불과하던 탈모방지 샴푸가 2009년 14.3%를 차지, 무려 3배 이상이나 성장한 것으로 나타난다.
- (다) 탈모와 관련한 사람들의 관심이 높아지면서 탈모전문 클리닉이나 두피관리센터, 한방 탈모 클리닉 등 다양한 클리닉이 생겨나고 이에 따라 두피모발관리사에 대한 관심 또한 늘어나며 탈모치료 자체가 한 분야의 전문적인 시스템이 생겨나고 있다.
- (라) 탈모 진행을 막는 가장 효과적인 방법은 조기에 예방 및 개선 관리이다. 두피의 가려움, 비듬 및 과다피지, 모발이 가늘어지거나 모발 빠짐이 두드러지는 현상 등의 증상을 오랫동안 방치하게 되면 탈모가 급속도로 진행된다. 조기에 예방 및 두피 환경 개선을 위해 빠른 시일 안에 두피 전문가의 상담을 통해 개개인의 두피 타입에 맞는 관리를 진행하는 것이 탈모예방의 지름길이며 Daily Care 를 위한 육모 및 민감성 두피 개선 기능성 화장품 개발을 통해 지속적으로 두피와 모발을 관리해야만 탈모를 예방 및 개선 할 수 있다.

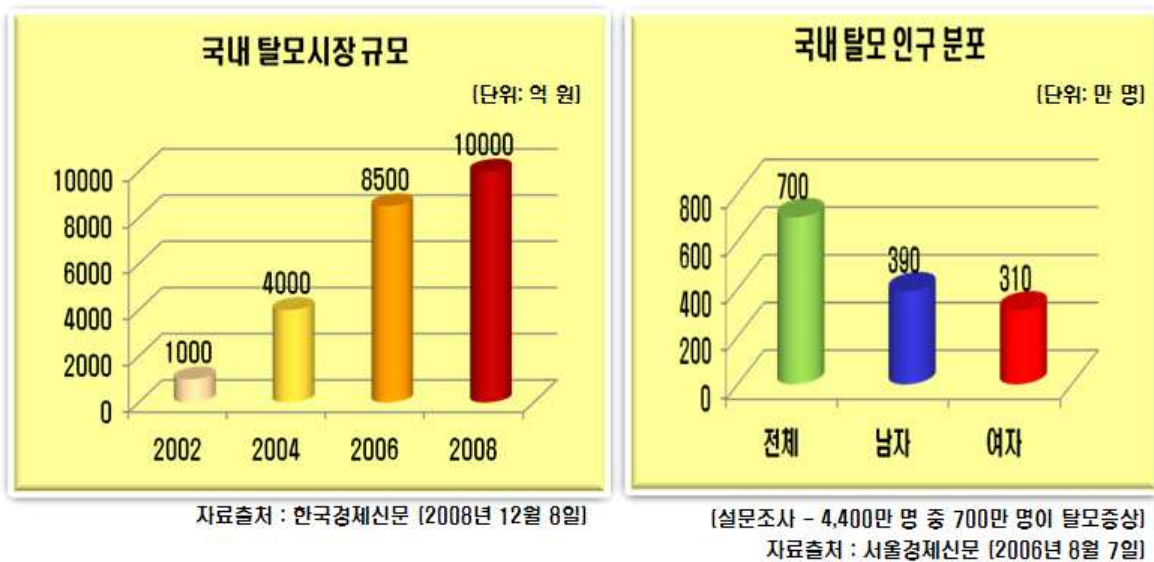


Fig 3. 국내 탈모 시장 규모 및 탈모 인구분포도.

- (마) 탈모 관련 시장은 2002년에 약 1천억원, 2006년에는 약 8천 5백억원, 2008년에는 1조 원 정도로 급성장 하는 시장이다. 2006년 국내 탈모인구가 700만명에서 청소년과 여성의 탈모인구 증가로 인해 현재 탈모인구는 약 1천만명 이상을 바라보고 있으며 2012년 현재 탈모 시장규모는 3조원규모로 급증하였으며, 지속적으로 성장할 것으로 전망된다.
- (바) 2005년 이후 시장규모의 급성장은 홈쇼핑 및 인터넷 쇼핑몰이 큰 역할을 하였고,

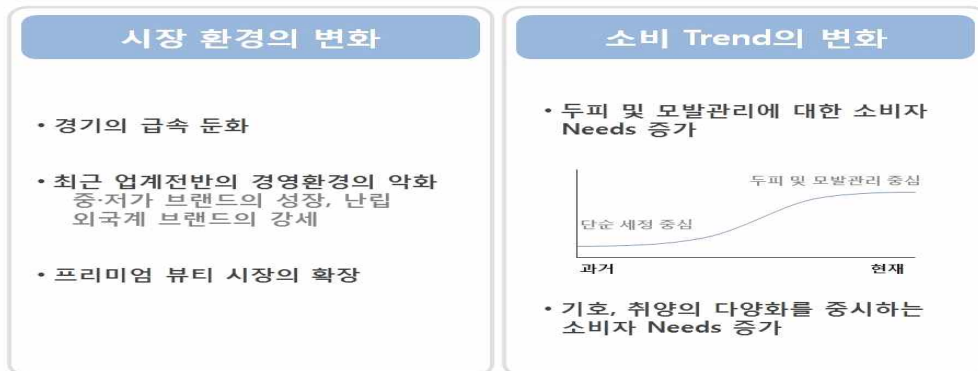
40~50대는 물론 20~30대에 이르기까지 다양한 연령층이 탈모시장에서 큰 비중을 차지하게 됐다. 10대 이하의 청소년 및 여성탈모의 증가는 이미 사회적 이슈가 되고 있다.

뷰티 산업 제품 구매상황에 대한 이해



남성, 여성 탈모 증가 및 연령층 확대 기인 탈모 시장 활성화

시장과 소비자의 취향 급 변화



문제성 두피개선 및 손상 모발을 **윤기 있게** 바꿔주는 **전문 헤어 크리닉**

KEY BENEFIT	TARGET MARKET	IMAGE	현상
<p>모발 손상에 따른 과학적 케어 및 맞춤형 고급 앰플</p>	<p>25세 전 후 여성</p>	<p>LUXURY SPECIALTY SCIENCE</p>	<p>문제성 두피 및 손상 모발</p>

지속적인 소비자 조사에 의한 제품 개발 강조

(사) 최근 탈모관련 의약부외품 및 화장품, 헤어커버용 순간 증모제, 가발, 두피전용 기능성 제품, 모발이식, 건강기능식품, 아로마제품, 두피관리기기 등이 혁신상품으로 등장하고 있다.

SWOT 분석



(아) 결과적으로 탈모관련 파생 상품들이 두각을 나타내며 급성장 추세를 보이는 이유로는 국내 뷰티산업의 성장과 더불어 소비자층의 인식 및 트렌드 변화에 기인한다고 볼 수 있으며, 또한 다양한 탈모 커뮤니티 카페들이 정보공유를 하고 있어 정보 확산성이 뛰어나다.

(자) 또한, 기능성 화장품 연구에서 신소재 개발 부분은 매우 중요한 축이며 제품 차별화 기능을 강조 요소로 작용하고 있다.

(차) 탈모 및 퍼머, 염색 등으로 인한 손상두피 수요가 증가하고 있으며, 기능성 두발 화장품 시장의 성장은 지속화되고 있으며, 특히 천연 기능성 화장료 개발과 육모제(의약외품) 및 민감성 두발 전문 화장품에 대한 수요는 지속적으로 증가 추세에 있다.

(카) 뷰티산업에서는 독창성이 주요 항목으로 제품군을 리드하는 활성원료 및 효능이 우수한 독창적 원료를 필요로 하고 있다.

(타) 국내 기능성 화장품군이 성장기에 접어들며 신규 활성원료에 대한 니즈 확산으로 효능 있는 물질개발 시 막대한 시장 잠재력을 보유하고 있다.

(파) 현재 국내에는 천연물 및 한약재 소재를 활용한 한방 화장품 개발이 활발하며 일부 구

조 및 활성관계 규명 연구가 이루어지고 있으며, 효능/임상 시험 인프라가 확립되어 있고, 기능성 화장품 법 시행이 안정기에 접어들어 국내 임상기관들의 인프라가 구축되어 있다.

(하) 독창적 이미지 확보 및 신규 생물자원의 응용 단계이다.

(4) 국내 헤어 케어 및 양모 효과에 관한 화장품 기술 동향

(가) 국내의 화장품 회사 기술 개발 헤어 케어 제품

- ① 애경산업 : 헤어 케어용 제품으로 샴푸와 린스 겸용샴푸인 “하나로”, “리앙뜨 샴푸/린스” 프리미엄급 헤어 케어 시스템인 “케라시스” (샴푸, 린스, 트리트먼트, 앰플 등 4단계 시스템)
- ② 태평양 : 비듬 전문 샴푸 “덴트롤 쿨민트 후레쉬”
- ③ N&B 헤어 케어 화장품 사업부 : 앤앤비 쿨 시리즈로 샴푸와 트리트먼트, “N&B 쿨 샴푸”

(나) 탈모 방지 및 발모 촉진 제품

제조사	제품명	특징	적용기술
태평양제약	닥터모	의약외품	유화기술
엘지생활건강	모앤모아	의약외품	유화기술
CJ	직공모발력	의약외품	유화기술
두리화장품	땡기머리	국내 특허등록	유화기술
한독화장품	스펠라 707	국내 특허등록	유화기술

(다) 탈모 방지 및 양모 촉진 제품의 경우 천연물 또는 한방 소재로부터 추출하여 조성물 형태의 유화 제형을 제조기술로 사용하였으며, 경피 흡수 향상을 위한 기술은 배제되어 있는 실정이다.

(라) 최근 화장품의 경피 흡수 향상을 위해 다중에멀전 기술인 나노리포좀을 이용한 미립자 제형기술이 보편화되고 있으며, 초임계 유체를 이용한 미립자제형기술은 아직 보편화되고 있지 않다.

(5) 국외 헤어 케어 및 양모 효과에 관한 화장품 기술 동향

(가) 국외의 경우 탈모 치료제 개발이 활성화되어 있으며, 해외 천연자원을 이용한 소재 개발은 대동소이하나 평가관련 기술 개발은 국내 개발 수준을 훨씬 앞서 있다. 현재 상용화되고 있는 제품 및 기술동향을 간략히 요약하면 다음과 같다.

(나) FDA승인 제품 : 비 천연 제제

- ① 상품명 : 마이녹실

[특징] 고혈압치료제 개발 중 발명된 제품 40대 중년 여성일부에서만 효과
부작용: 피부질환 사용을 중단하면 다시 머리카락이 빠짐

② 피나스테라이드 (상품명 : 프로페시아, 프로스카)

[특징] 전립선 치료제 개발과정에서 발명된 제품, 유전성 탈모의 경우 효과

부작용: 여성의 경우 손에 물질이 닿기만 해도 남아의 성기 기형을 초래, 간수치 증가, 고혈압, 성기능 장애등

(다) 천연 제제

① 원료 식물 아르가니아스피노사로부터의 천연 단백질을 포함하는 제제

[특징] 피부 및 모발에 대한 재생 및 재활 효과

② 활성 성분으로서 잔토실룸 분게아눔(Zanthoxylum bungeanum) 추출물

[특징] 모발 보호 화장품 조성물은 가려움증(itching sensation), 얼얼함(stinging), 작열감(burning), 반(redness)등의 자극성을 방지, 감소 효과 (인용: 한국기술거래소: 【기술및 시장동향】 두피 및 모발의 개선 효과 활성을 갖는 조성물)

- 위 내용을 전체적으로 요약하면 아래의 그림과 같다



Fig 4. 탈모치료제의 종류 및 특징

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황

가. 초임계 유체 국내 기술 및 산업 동향

- (1) 고압/고압 유체 무 오염 기술을 이용한 국내 연구는 1980년 중반 일부 연구소 및 대학에서 기초 연구를 시작으로 소재 추출/분리, 화학공정 개선에 대한 논문이 발표되었으며, 1990년 중반부터 식품/의약품/향료 산업분야에 적용되기 시작하였다.
- (2) 최근에는 응용 범위가 점차 확대되고 있는 추세며, 특히 천연물질에 존재하는 기능성 물질에 대한 분리공정개발은 재래식 추출공정에서 발생하는 추출원료의 열에 대한 변성, 목적성분의 유기용매와의 접촉에 의한 구조변형, 저 비점 물질의 높은 휘발성에 의한 포집의 어려움 등을 해결함으로써 식품, 의약품, 환경 산업 분야에 큰 기여를 하고 있다.
- (3) 국내에서는 고압 이산화탄소를 이용한 식품소재생산, 천연원료에서 essential oil 추출, 제약회사의 용매재처리 공정에 대한 국산화에 성공을 거두었으나, 고부가가치성 천연 기능성 바이오 소재를 효율적으로 분리 생산하기 위한 특수 목적의 공정설비는 수입에 의존하고 있다.
- (4) 고압/고압 유체 무오염의 특성을 이용한 연구가 추출, 분리, 세정, 미립자, 반응, 에너지, 환경 분야에서 활발하게 진행되고 있으나, 어류에는 기능성과 안전성이 우수한 유용한 물질들이 다양하게 함유 되어있고 그 특성에 대한 선임 연구자들의 연구논문이 발표되었음에도 불구하고 에너지 저감형 및 친환경 고압/고압 유체 무 오염 분리기술에 대한 연구가 활발히 진행되지 않고 있다.
- (5) 국내 초임계 유체 학회는 2006년 창립되어 화학, 식품, 에너지, 환경, 반도체, 섬유 등의 분야에서 많은 우수 연구자들이 참여하고 있으며, 매년 정기 학술회를 개최하여 최신 연구 결과를 발표하고 또한 국외 전문가를 초빙하여 세미나를 통한 정보교류, 국제협력관계를 도모한다.
- (6) 국내 초임계 유체 관련 논문은 1982년 처음 논문이 발표되었고 1990년 이후부터 이 분야의 연구가 활발히 진행되어 최근 연간 50여 편 이상의 논문이 화학공학, KICHE J. 생물공학, 공업화학, 식품학회지 등에 발표되고 있다.
- (7) 1990년 이후부터 식품, 의약품, 바이오산업체에서는 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정을 혼합물질로부터 특정성분을 분리하기 위해 pilot scale의 장치를 국외 (일본, 독일, 미국, 오스트리아 등)으로부터 수입하여 그 회사의 특정 제품을 생산하기 위한 신기술로 사

용하고 있으며, 대학과 연구기관(KIST, 화학연구소, 서강대, 영남대, 수원대, 경북대, 부경대, 울산대 등)에서는 초임계 유체를 이용한 추출, 분리, 세정, 미립자, 반응, 고분자, 염색 분야에 기초 및 응용 연구를 활발한 연구가 진행되고 있다.

- (8) 최근 (주)오뚜기, (주)유맥스, (주)유한양행, 한국 인삼공사 등에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 천연원료로부터 식품, 의약품, 화장품 관련 소재 및 고품질의 제품을 생산하고 있으며, 적용분야가 점차 확대되고 있는 추세이나 기능성이 뛰어난 소재를 분리 회수하기 위해서는 공정개선이 요구되며 특히 향기성분 분리회수에 대한 연구는 향후 고부가가치 산업으로 전망이 밝아 기초 연구가 진행되고 있다.

나. 초임계 유체 국외 기술 및 산업 동향

- (1) 미국의 고압 유체 기술은 70년대에 초임계 이산화탄소 추출기술에 관한 연구가 시작되었으며, 80~90년대를 거치면서 분리에 관한 연구들이 이루어지면서 1988년 Kraft General Foods의 자회사인 Maxwell House사에서 Huston에 카페인이 없는 커피를 제조하는 공정을 상업화하였고, 1990년에는 와이오밍 주에 Hop 추출기술이 상업화되어 초임계기술의 전성기를 맞이하고 있으며, 최근 미국의 National Center for Agricultural Utilization Research의 연구소장인 Jerry King 박사팀은 고압 유체 무 오염 기술을 이용하여 천연물질로부터 다양한 기능성 물질을 분리 정제하는 연구가 활발히 진행되고있고 캐나다의 NOEAC사는 대형 고압 이산화탄소 추출 공정을 설비하여 천연 기능성 물질을 추출하여 식품/의약품 산업용 고품질 원료를 생산하거나 국내외 관련 산업체의 용역을 처리해 주고 있다.
- (2) 일본의 고압 유체 무 오염 분리기술은 20여 년 전부터 수행되어, 현재 다양한 분야에 적용시켜 많은 성과를 도출하고 있으며, 1980년대에는 고압 이산화탄소 추출기술을 시작으로 EOS Group에서는 유체의 성질과 상평형 위주의 연구가 수행되었고, 1990년대에는 일본 산자부 산하 동북연구소와 동북대학교의 Arai 교수를 중심으로 한 SCF Group은 고압유체 무오염의 chemical recycle에 관한 연구와 초임계 수를 이용한 난분해성 유기물 분해에 관한 연구를 수행하였고, 1991년에는 MESC(Ministry of Education, Science and Culture) 에서 고압 유체 무 오염 기술에 대한 국가적 차원에서 지원되어, 2000년대에는 나노 입자제조에 관한 연구들이 많이 수행되었으며, 고베철강에서는 1990년 후반부터 고압 유체 무 오염 생산용 장비를 보급한다.
- (3) 유럽에서 고압 유체 무 오염 관련기술은 미국이나 일본에 비해서 먼저 고압 유체 추출기술이 도입되어 상업화가 이루어지고 있으며, 고압 이산화탄소를 이용한 추출 분야가 크게 연구 개발되어 왔으며, 프랑스에서는 천연물질에서 향기성분 추출, 독일에서는 커피로부터 카페인 제거 및 담배의 니코틴 제거, 이탈리아, 스페인 등에서는 식물류에서 기능성 물질을 추출하여 식품에 적용하는 연구개발이 활발히 진행되고 있고, 영국에서는 고압 유체 무 오염 친환경공정 개발에 중점을 두고 Green Technology에 주력하고 있으며 Environmental..., Earth Friendly..., Sustainable란 단어를 사용하고 있으며, 유럽에서는

천연물질로부터 기능성 바이오 소재를 생산하여 다양한 제품을 출시하고 있다.

- (4) 초임계 유체 관련 논문 발표 추이는 1990년대 후반부터 매년 40건 이상의 연구 결과가 도출되고 있으며, 바이오산업 (화학 소재, 식품, 의약품) 분야에 많은 연구 논문이 발표되고 있다. (미국의 해외논문 검색 사이트인 SCOPUS(www.scopus.com)에서 검색어 'supercritical extract'를 사용하여 1976년부터 2007년까지 발표된 자료)

다. 미강추출물의 특정 성분이 효능을 미치는지에 대한 연구내용

- (1) 현미의 외피부분인 미강은 대부분 부산물(미강)로서 가축 사료 등에 이용되고 있다. 미강에는 생리활성을 가진 물질, 비타민 B1, 비타민 B2, gamma-oryzanol, 페놀산이 함유되어 있으며, 특히 미강의 페놀산은 폴리페놀의 한 종류로서 항산화 활성과 함께 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되었다.
- (2) 곡류 등 식물의 세포벽에는 hydroxycinnmic acid, hydroxybenzoic acid 계열의 페놀산이 일부는 유리형태로 그리고 대부분은 세포벽 다당체에 ester결합상태로 존재하고 있고, ferulic acid, para-coumaric acid, benzoic acid, sinapic acid 등이 존재하며, 미강에도 이러한 페놀산 종류들이 분포되어 있다고 알려져 있다.
- (3) 최근 보고된 연구에서 ferulic acid가 제 1형 당뇨병모델 쥐에서 간의 과산화물 생성 감소 및 혈당 강하효과를 나타냈고, 미강에서 얻은 페놀산 추출액을 제 2형 당뇨병 모델에 적용한 결과, 인슐린 분비력 향상과 함께 혈당강하 효과를 나타낸 것으로 보고되고 있다.
- (4) 미강 가수분해물을 에틸 아세테이트로 추출하여 얻은 미강 페놀산 농축물과 hydroxycinnmic acid도 인간유래 간세포(HepG2cell), 췌장세포(HIT-T15 cell)에서 활성산소 생성 억제하는 것이 확인되었고, 미강의 페놀산 농축물, ferulic acid와 sinapic acid가 ROS 생성억제 활성을 나타내는 것이 보고되었다.
- (5) 쌀의 도정과정에서 생산되는 부산물(미강)인 미강으로부터 에탄올 추출물을 얻어 DPPH 라디칼 소거, 티로시나제 저해 활성, Human dermal fibroblast(HDF) 세포에서 ROS 제거시험을 통해 피부 항산화 및 미백효과를 확인했다.
- (6) 미강의 생리활성 물질로는 pytosterol, gamma-oryzanol, tocopherol, tocotrienol, 안토시아닌 (cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3,5 diglucoside, malvidin, peonidin-3-glucoside, pelagonodin-3,5- iglucoside), 휘발성 향기 성분등이 보고되고 있으며, 특히 흑미 미강의 생리활성 물질은 안토시아닌 색소로 보고되고 있다.
- (7) 이러한 흑미 미강의 안토시아닌(cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3,5 diglucoside, malvidin, peonidin-3-glucoside, pelagonodin-3,5- iglucoside)은 혈청과 간에서 콜레스테롤 저해효과, 혈액응고, 궤양형성 방지, cancer cell invasion 저해, 면역조절기능등이 보

고되고 있다. 특히 안토시아닌 색소성분(cyanidin-3-glucoside 및 그 대사체, cyanidin, protocatechuic acid)의 항염증 작용이 알려져 있다.

(8) 흑미 미강 70% 에탄올 추출물의 항산화, 항돌연변이, 항종양 활성 연구에서 mast cell 과 basophile에서 히스타민 분비 억제 작용, 마우스 천식 모델에서 ovalbumin 유래 기도 염증저해 작용, 식품에서 항염증, 항알러지 작용이 보고되고 있다.

(9) 미강함유 tocotrienol의 SOD와 GPX 활성 비교에서 그 항산화 능력이 보고되었다.

(10) 이상의 참고문헌은 다음과 같다.

- T. Oka, M. Fujimoto, R. Nagasaka, H. Ushio, M. hori, H.Ozaki, Cyloartenyl ferulate, a component of rice bran oil-derived γ -orizanol, attenuates mast cell degranulation, *Phytomedicine* 17, 152-156, 2010
- 하태열, 쌀의 기능적 우수성, *식품산업과 영양* 13(2), 22-26, 2008
- 강미영, 이연리, 고희중, 남석현, 거대 배아미 에탄올 추출물의 항산화활성 및 항변이원성, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(1), 61-66, 2004
- S.W. Min, S.N. Ryu, D.H. Kim, Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -d-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid, *International Immunopharmacology* 10, 959-966, 2010
- S.P.Choi, S.P. Kim, M.Y. Kang, S.H. Nam, M. Friedman, Protective effects of black rice bran against chemically-induced inflammation of mouse skin, *J. Agric. Food Chem.* 58, 10007-10015, 2010
- 전복선, 전정애, 정병구, 미강에탄올 추출물의 항산화 활성과 티로시나제 저해 활성, *한국미용학회지*, 16(2), 602-606, 2010
- 정은희, 하태열, 황인경, 미강 페놀산 농축물과 Hydroxycinnamic acid의 세포내 항당뇨 및 항산화 활성, *Koren J. Food & Nutr.* 23(2), 233-239, 2010
- 우기민, 이영상, 김용호, 미강함유 Tocotienol의 항산화 효과, *Korean J. Crop. Sci.*, 50(S), 4-7, 2005

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 기술개발 선행연구

1. 벼 도정부산물(미강)을 이용한 예비효능 및 안전성 실험결과

가. 벼 도정부산물(미강) 추출 및 수율

(1) 시료 추출법

- 열수 추출: 미강 200g + 정제수 2L → 80℃에서 4시간 추출 → 농축
- 헥산 추출: 미강 200g + hexane 2L → 80℃에서 4시간 추출 → 농축
- 초임계유체 추출: 53.7g → 추출
 - 추출 조건: 실온(19.4℃), 유량계(33.618 m³)

(2) 벼 도정부산물(미강) 수율

- 추출방법에 따른 벼 도정부산물(미강)의 추출수율 확인 결과 초임계 유체 추출법에서 1시간 추출시간에서 13%의 추출수율을 확보하였다.

Table 1. 추출방법에 따른 도정 부산물(미강)의 추출수율

	initial amount(g)	yield(g)	yield(%)
열수 추출물	200	38	19
헥산 추출물	200	33	16.5
초임계유체 추출물	53.7	7.5g	13

나. 마우스 모발성장효과 확인시험

(1) 시험방법

- 6주령 암컷 C57BL/6 mouse를 구입하여 음성대조군(물), minoxidil 처리군, 미강열수추출물, 헥산추출물, 초임계 추출물 처리군으로 분류하여 각각 6마리씩 배정하고 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 털을 제거하고, 4주간 1일 1회 도포하고 모발 성장에 대한 변화를 관찰하였다.

(2) 마우스 모발성장효과 결과

- 탈모증 개선정도에 대한 평가결과 미강 추출물 도포군에서 3% 미녹시딜과 비슷한 효과를 보였고, 특히 미강 초임계유체 추출물 도포 군에서는 양성대조군 3% 미녹시딜 도포 군에 비해서도 우월한 모발성장 효과를 확인하였다.



(A) 3% 미녹시딜 (B) 미강 열수추출물 (C) 미강 핵산추출물 (D) 미강 초임계유체 추출물

Fig. 1 마우스 모발성장 효과

다. Rat의 피부 자극 test 및 독성 test

(1) 피부 자극 test

- 7주 SD rat를 털을 제거하고 사포로 피부 자극한다. 이러한 피부에 sample을 발라서 피부 자극 test를 실시하였다. 시료로는 미강 열수 추출물, 핵산 추출물, 초임계 추출물을 cream type으로 하여 사용하였고, control로는 미녹시딜을 사용하였다.(피부에 자극을 준다는 부작용이 보고되고 있음)
- 매일 일정한 시간에 cream을 발라서, 17일 후 육안으로 보이는 피부 자극을 확인하였다.

(2) 피부 자극 test결과

- Rat의 털을 제거한 다음 사포를 이용하여 피부 자극을 주었다.
- 피부 자극 test를 17일 정도 수행한 결과, 육안으로 비교하였을 때 모든 군에서 눈에 띄는 피부 자극이 나타나지 않았다.





			
3% 미녹시딜 도포군	미강 열수추출물 도포군	미강 핵산추출물 도포군	미강 초임계유체 추출물 도포군

Fig. 2 동물 실험을 통한 피부자극 평가

제 2절. 초임계 이산화탄소 추출 공정 개발 및 최적화

1. 원료 벼 도정부산물(미강)의 성분 분석

가. 실험진행 flow

- 미강의 열수 추출물, 헥산 추출물, 일반 조건의 초임계 추출물을 이용한 마우스에서 초임계 추출물에서 유의적인 모발성장 효과를 보였으므로, 이들에 대한 효능이 예측되는 유효성분 분석이 필요하였다. 따라서 헥산 추출물과 초임계 추출물을 대상으로 유효성분 조사 및 그의 성분 분석을 시행하였다.

나. 실험 방법

(1) 미강유 및 초임계 이산화탄소 미강추출물 지방산 조성 분석

추출물의 지방산 조성 분석은 GC를 이용하여 수행하였으며, 분석 조건은 Table 1와 같았다.

Table 1. GC system for detection of fatty acids.

Parameter	Condition
ATD-400(Perkin Elmer, USA)	
Tube Type	Tenax-TA
2nd split ratio	7:1
1st desorption	320°C(3min)
2nd desorption	340°C(1min)
25t cryo temp	-30°C
GC/MS(QP-2010, Shimadzu)	
	35°C(10min)
Oven temp.	8°C/min - 120°C(10min)
	12°C/min - 180°C(7min)
	15°C/min - 230°C(10min)
Column	AT-1(60m×0.32m ×1.0 μ m)
Column flow	0.62ml/min
Interface Temp.	250°C
Mass Range	20~350m/z
Column Pressure	15.7psi
MS Det. Temp	250°C
Carrier gas	He(99.9999%)

(2) Tocols 분석

(가) Tocols 분석을 위한 전처리는 AOCS의 방법에 따라 시행한다. 100ml round flask 에 internal standard(5- α -cholestan in chloroform 1mg/ml)을 미리 넣고, chloroform을 날려놓고 준비한다. 1g 기름에 5% pyrogallol ethanol solution 2ml을 가하여 잘 흔들어주고, 에탄올 20ml 을 넣어준다.

(나) Hot plant에서 가열해주고 끓은 상태에서 50% KOH용액 1ml를 넣은 후, 5분 유지한다. (refluxing 함) : KOH를 넣으면 용액이 노랗고 투명하다가 5분정도 지나면

- 투명한 갈색이 됨
- (다) 이 용액에서 D.W 50ml를 가하고 250ml의 separate funnel로 옮긴후 50ml의 diethyl ether를 가해 1분간 흔들여 준다.
 - (라) 하층부를 다시 separate funnel에 50ml diethyl ether를 가하고 층 분리가 되면 하층부를 다시 separate funnel로 옮긴다.
 - (마) 이러한 조작 후 상층부를 모두 합하고 여기에 20ml의 증류수를 가하여 흔든 후 물층을 제거한다. (이를 3회정도 반복하여 물층을 washing함)
 - (바) Diethyl ether층을 40도 이하에서 감압농축 한다.
 - (사) 농축수기 벽면을 hexane으로 잘 씻어낸 후 여과하여 수분 및 불순물을 제거한 후 여과액을 10ml 정용플라스크로 옮기고 *n*-hexane 또는 chloroform으로 표선까지 채운후 tocolds을 분석 시료로 사용한다. chloroform으로 정용하였을 경우, 1ml을 취하여 chloroform을 날린후 hexane 1ml을 넣어 분석에 사용함
 - (아) HPLC chromatogram상에서 분리된 tocolds는 표준 tocolds retention time과 비교하여 동정한다.
 - (자) Tocolds의 정량을 위해서 α -, β -, γ -, δ - tocopherol 표준품을 각각 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 50ppm, 100ppm의 농도로 하여 분석한 HPLC chromatogram의 peak 면적비를 기준으로 tocolds의 함량을 구한다.
 - (차) HPLC에 의한 tocolds의 분석
HPLC를 이용한 분석 조건은 Table 2과 같다.

Table 2. The HPLC condition for the analysis of tocolds

Part	Condition
Injector	Rheodyne(Rohnert Park,CA) injection with a 100 μ l sample loop
Column	LichrospherSi-60column(250*4.6mm i.d Merk co.)
Mobile phase	hexane:2-propanol(99:1,v/v)
Fluorescence Detector	excitation:298nm/emission:325nm
Flow	1ml/min

(3) Squalene, policosanol 및 phytosterol 분석

- (가) Tocolds 분석을 위한 전처리는 AOCS의 방법에 따라 시행한다. 100ml round flask에 internal standard(5- α -cholestan in chloroform 1mg/ml)을 미리넣고, chloroform을 날려놓고 준비한다. 1g 기름에 5% pyrogallol ethanol solution 2ml을 가하여 잘 흔들어주고, 에탄올 20ml을 넣어준다.
- (나) Hot plant에서 가열해주고 끓은 상태에서 50% KOH용액 1ml를 넣은 후, 5분 유지다. (refluxing 함) : KOH를 넣으면 용액이 노랗고 투명하다가 5 분정도 지나면 투명한 갈색이 됨.
- (다) 이 용액에서 D.W 50ml를 가하고 250ml의 separate funnel로 옮긴 후 50ml의 diethyl ether를 가해 1분간 흔들여 준다.

- (라) 하층부를 다시 separate funnel에 50ml diethyl ether를 가하고 층 분리가 되면 하층부를 다시 separate funnel로 옮긴다.
- (마) 이러한 조작 후 상층부를 모두 합하고 여기에 20ml의 증류수를 가하여 흔든 후 물층을 제거한다. (이를 3회정도 반복하여 물층을 washing함)
- (바) Diethyl ether층을 40도 이하에서 감압농축 한다.
- (사) 농축수기 벽면을 chloroform으로 잘 씻어낸 후 여과하여 수분 및 불순물을 제거한 후 여과액을 chloroform으로 잘 씻어낸 후 TMS 시약을 사용하여 유도반응 시키고 분석시료로 사용한다.
- (아) GC chromatogram상에서 분리된 Phytosterol, Squalene, Policosanol는 표준 Phytosterol, Squalene, Policosanol의 retention time과 비교하여 동정한다.
- (자) GC에 의한 phytosterol, squalene, policosanol의 분석GC를 이용한 분석 조건은 Table 3와 같다.

Table 3. The GC condition for the analysis of Phytosterol, Squalene, Policosanol

Part	Condition
Injector	310°C, split (50:1)
Column	SAC™-5 Capillary Colum, 30m × 0.25mm i.d., × 0.25µm
Carrier gas	He (1.0 mL/min)
Oven temp.	280°C (1min) → 2°C/min → 300°C (20min)
Detector temp.	320°C

(4) γ-oryzanol 분석

- (가) 일정량의 시료유지를 test tube에 넣고, chloroform을 가한 후 시료유지를 완전히 녹인다.
- (나) 시료유지 용액이 투명하지 않으면, 0.45 µm membrane filter로 여과한다.
- (다) 이 용액을 315 nm에서 spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정한다.
- (라) 흡광도 값이 1을 넘으면 1이하가 될 때 까지 희석한다.
- (마) 측정된 흡광도 값을 흡광계수 ($1_{cm}^{1\%}E$) 358로부터 γ-oryzanol 함량을 계산한다.

다. 초임계 추출물의 성분분석결과

(1) 미강의 조성

- (가) Saponifiable material (약 96%)
 - ① 중성지질 (88~89%)
 - ② 포화 지방산 (약 18%)
 - ③ 불포화 지방산 (Oleic acid 약 42%, linoleic acid 약 37%)
 - ④ Waxes (3~4%)
 - ⑤ Free fatty acid (2~4%) → FFA의 함량이 높다.

(나) Unsaponifiable material (약 4%)

- ① 비타민 E, γ -oryzanol (sterol과 ferulic acid의 ester 결합) 등
- ② sterol 42%, 고급알코올 24%, oryzanol 20%, α -tocopherol 전체 oil의 0.1%

(다) 미강유의 일반성상

Table 4 미강유의 물리화학적 특성

	원유	정제유
비중	0.913~0.921	0.913~0.919
굴절률	1.470~1.473	1.470~1.473
요오드가	97~103	92~115
검화가	181~189	180~195
불검화가	3~5	3.5이하
색소(IOR+ Y)	-	75이하
산가	4~120	0.2이하

(2). 미강유의 지방산 분포특징

(가) 전체 TG에서 비율

- saturated : monounsaturated : polyunsaturated = 0.73 : 1 : 0.93

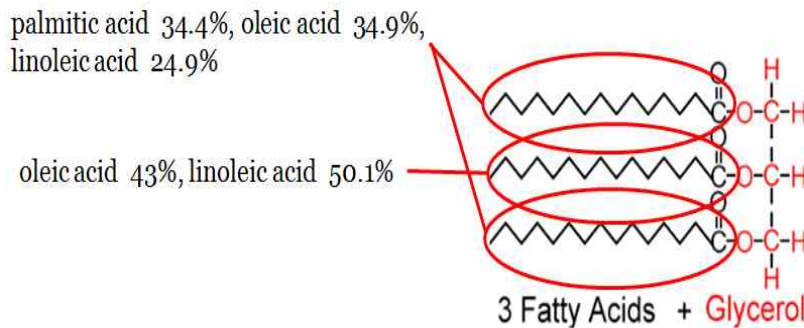


Fig. 1 TG에서의 지방산 조성형태

(나) 초임계 추출물과 헥산 추출물의 지방산 조성

- 초임계 추출물과 헥산 추출물의 지방산 조성을 분석한 결과, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid가 주된 성분을 이루고 있었다. 또한 두 추출물의 지방산 조성을 비교한 결과, palmitic acid는 헥산 추출물에서 함량이 높는데 비하여, 불포화지방산인 oleic acid, linoleic acid는 초임계 추출물에서 그 함량이 높게 나타났다.

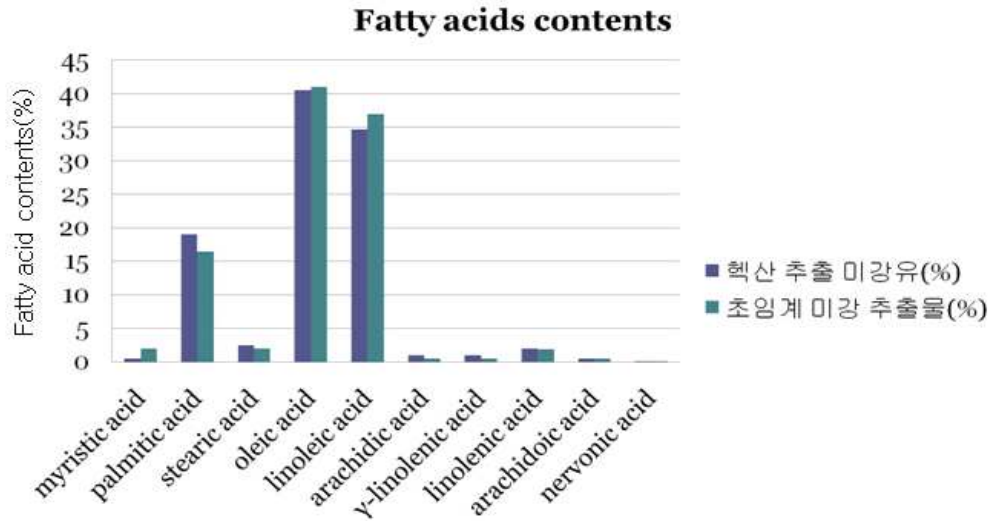


Fig. 2 초임계 추출물과 헥산 추출물의 지방산 조성비교

(3) 초임계 추출물과 헥산 추출물의 유효성분 비교

- 초임계 추출물과 헥산 추출물에 대해 일반적으로 미강의 유효성분으로 알려진 토코페롤류, 폴리코사놀, 감마오리자놀, phytosterol의 성분 분석을 통해 비교하였다.

(가) 토코페롤류

- 초임계 추출물과 헥산 추출물의 유효성분 분석에서 감마토코페롤과 감마토코트리엔올의 구성이 헥산추출물에 비해 초임계 추출물에서 높게 나타났다.

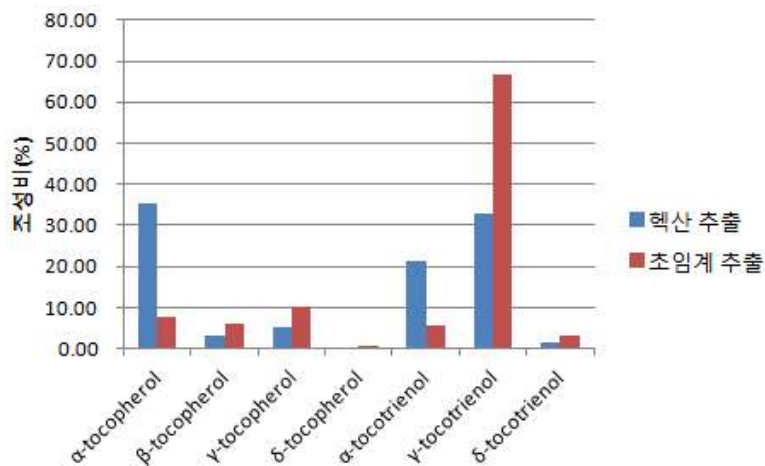


Fig. 3 초임계 추출물과 헥산 추출물의 토코페롤류 조성 비교

(나) Squalene, Policosanol, Phytosterol류

- 각 Squalene, Policosanol, Phytosterol류의 전체 농도는 초임계 추출물에 비해 헥산 추출물에서 각각 높은 농도를 보였다.

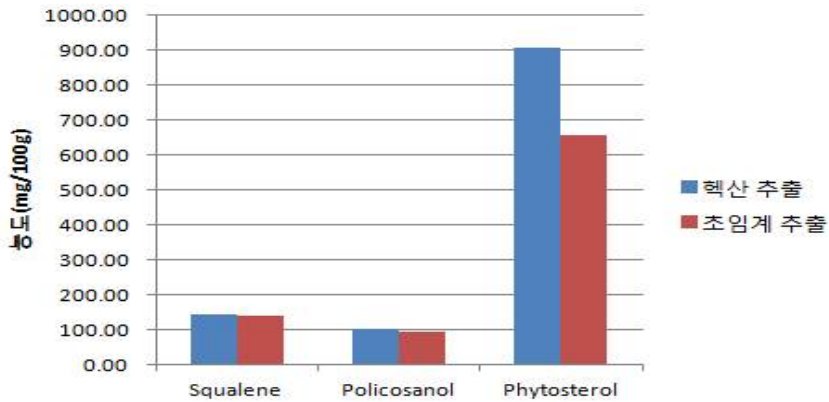


Fig. 4 초임계 추출물과 헥산 추출물의 Squalene, Policosanol, Phytosterol류 함량 비교

(다) Policosanol류

- Policosanol류의 종류를 세분화하여 분석한 결과, 초임계 추출물에서의 tetracosanol, 과 hexacosanol에서의 함량이 헥산추출물에 비해 높게 나타났다.

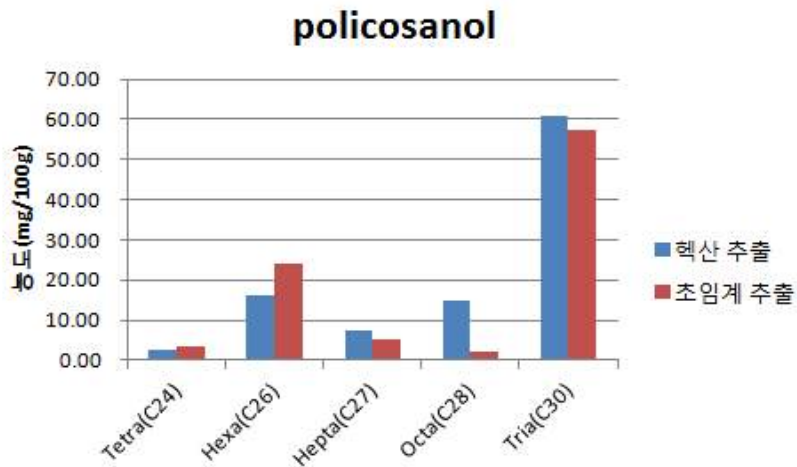


Fig. 5 초임계 추출물과 헥산 추출물의 Policosanol류의 조성 비교

(라) Phytosterol류

- Phytosterol의 분석결과에서는, 대부분 헥산 추출물에서의 농도가 높았으며, cycloatenol 경우 초임계 추출물과 비슷한 농도를 보였다.

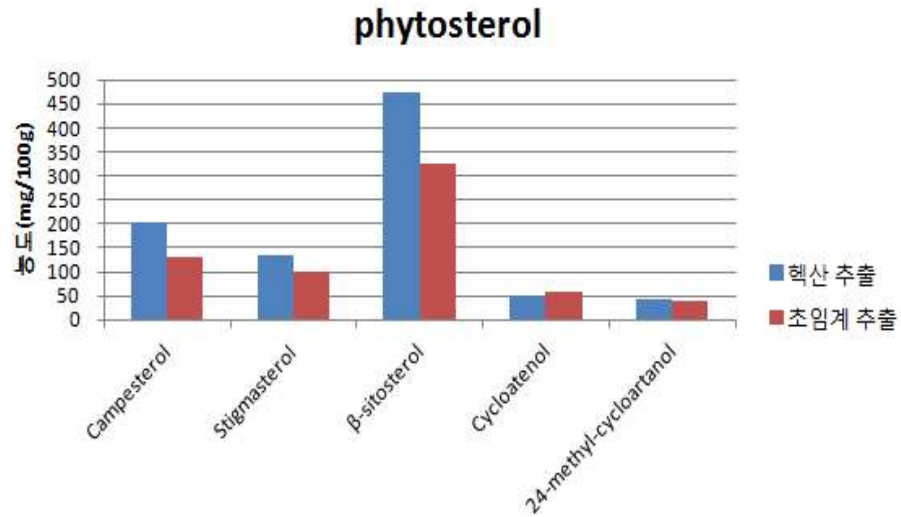


Fig. 6 초임계 추출물과 헥산 추출물의 Phytosterol류 조성 비교

(마) γ -Oryzanol

- γ -Oryzanol의 함량은 헥산 추출물에서 0.85%로 초임계 추출물에서의 0.73%에 비해 높았다.

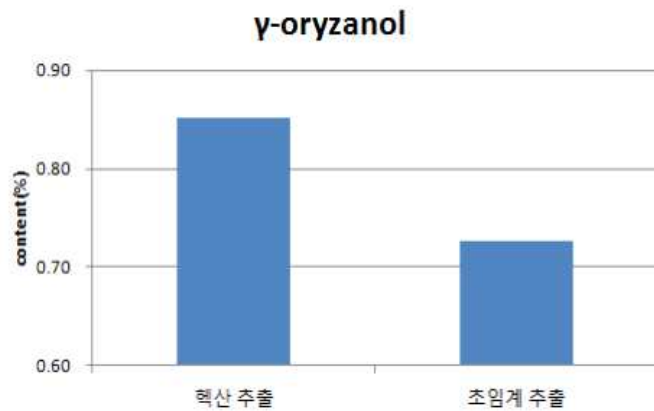


Fig. 7 초임계 추출물과 헥산 추출물의 γ -Oryzanol 농도 비교

(바) 초임계 미강 추출물 성분 분석 결과

- 다음 표 5는 초임계 추출물의 주요성분 분석 결과를 정리한 결과이다.
- 초임계 미강 추출물은 약 84%가 지방으로 구성되어 있다.
- 또한 폴리코사놀 약 0.1%, 토클류 약 0.05%, 오리지놀 약 0.7%, 파이토스테롤류 0.7%, 스쿠알렌 0.1 를 각각 차지하고 있다.

Table 5. Concentrations and compositions of RB-SCE major components

Components	Sub-components	Composition (%)	Total concentration
Fatty acids	myristic acid	1.6	83.9 (g/100 g oil)
	palmitic acid	16.3	
	stearic acid	1.6	
	oleic acid	41.1	
	linoleic acid	36.4	
	arachidic acid	0.6	
	γ -linolenic acid	0.6	
	linolenic acid	1.4	
	arachidoic acid	0.4	
	nervonic acid	0.1	
Policosanols	Tetra(C24)	3.5	92.33 (mg/100 g oil)
	Hexa(C26)	26.2	
	Hepta(C27)	5.8	
	Octa(C28)	2.4	
	Tria(C30)	62.0	
Tocols	α -tocopherol	7.6	46.88 (mg/100g oil)
	β -tocopherol	5.9	
	γ -tocopherol	10.0	
	δ -tocopherol	0.9	
	α -tocotrienol	5.5	
	γ -tocotrienol	66.8	
	δ -tocotrienol	3.3	
γ -Oryzanol			0.74 (g/100 g oil)
Phytosterols	Campesterol	20.1	655.68 (mg/100 g oil)
	Stigmasterol	15.1	
	β -sitosterol	49.9	
	Cycloartenol	8.8	
	24-methyl-cycloartanol	6.2	
Squalene			141.04 (mg/100 g oil)

라. 결론

- 유효성분들의 분석결과에서 초임계 추출물에서 함량이 높게 나타난 linoleic acid와 감마 토코트리엔올을 초임계 추출물의 유효성분으로 선택하였고, 특히 생리활성물질로 많이 알려진 미강유래 유감마오리지놀과 폴리코사놀도 비교 분석하기 위해 유효성분으로 선택하였다.

2. 초임계 이산화탄소 추출 공정 개발

가. 실험진행 flow

- 초임계 이산화탄소 추출공정은 우선 추출오일의 수율과 유효성분들의 분석결과에서 초임계 추출물에서 함량이 높게 나타난 linoleic acid와 감마토코트리에놀, 감마오리자놀, 폴리코사놀 중에서 특히 linoleic acid와 감마오리자놀의 수율에 초점을 두고 개발하였으며, 각 유효성분들의 함량을 비교하였다.

나. 실험방법

(1) 추출장치

- 본 연구에서는 3L 용량의 Semi-Batch-system의 초임계 유체 추출장치를 사용하였으며, 시스템 공정도 및 사진을 Fig. 8. 에 나타내었다. 초임계 유체 추출장치는 최대 압력이 500 bar, 최대 온도 100℃ 까지 사용 가능하였으며, 장치 구성은 추출조 (Extractor), 분리조 (separator), 고압 정량 액화 이산화탄소 펌프, 냉각기, 이산화탄소 저장조 (CO₂ reservoir tank) 와 유량 조절장치, 그리고 온도 조절을 위한 열교환기로 구성되었다.

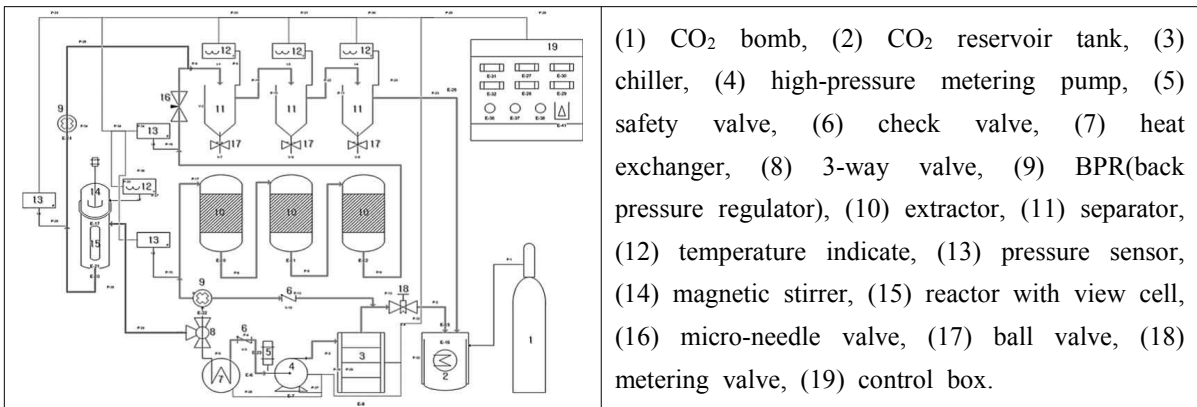


Fig. 8 Schematic diagram of the pilot-scale supercritical fluid extractor used in this study.

(2) 원료 지질 함량 측정

- 유기용매 추출법을 이용하여 미강에 포함된 총 조지방의 함량을 측정하였으며, 총 조지방의 함량을 기준으로 초임계 유체 추출 실험의 추출수율을 계산하였다. 유기용매 추출의 경우 준비된 미강 분말 10g을 Soxhlet 추출장치에 넣고 헥산 100mL를 사용하여 80℃에서 24시간 동안 수행하였다. 회수한 추출물은 회전식 감압 농축기 (HS-2005S, 대한과학, 대한민국) 를 사용하여 감압농축하고 추출된 오일을 회수하여 남아 있는 헥산을 건조 시켜 미강 내 최대 조지방 함량(%)을 구하였다.

$$\text{총 조지방 함량(\%)} = \frac{\text{추출된 오일의 무게}}{\text{미강 분말의 무게}} \times 100$$

(3) 초임계 이산화탄소 추출

- 초임계 이산화탄소 추출은 추출압력(150~330 bar), 추출온도(32~60℃), 추출시간(0~240 min) 그리고 이산화탄소 유량은 135g CO₂/min 로 고정하여 수행하였다. 각 공정 조건마다 시간별로 분획하여 총 4시간 동안 추출 실험을 수행 하였으며, 초임계 이산화탄소 공정의 추출 수율은 유기용매 추출법으로 80℃에서 24시간 동안 추출하여 얻은 총 조지방 함량을 기준으로 아래 식에 의해 계산하였다. 그리고 추출물은 -60℃에서 심온동결고에 저장하여 분석용으로 사용하였다.

$$\text{수율(\%)} = \frac{\text{초임계 유체에 의해 추출된 오일양}}{\text{총 조지방 함량}} \times 100$$

(4) 지방산 분석

- 추출된 미강 오일 중의 지방산 조성은 미강 오일을 헵탄에 용해시킨 후 2N 농도의 KOH를 녹인 methanol 용액과의 전이에스테르화 반응을 통해 fatty acid methyl ester 로 전환시켜 GC/FID 분석을 통해 확인하였다. 본 실험에서는 GC/FID로 미국 Hewlett Packard 社의 6890 Series II 기종을 사용하였으며, 분석 칼럼으로는 DB-WAX (30m × 0.25mm × 0.25μm, J&W Scientific, USA) 를 사용하였다. 이때 오븐의 온도는 100℃에서 2분간 유지시킨 후 200℃까지 25℃/min 의 속도로 승온 시키고 230℃까지는 5℃/min 의 속도로 승온 시킨 후 8분간 온도를 유지하여 분석 하였다. 이동상으로는 수소 기체를 사용하였고, 시료는 1μL를 주입하였으며, split ratio 는 50:1로 하였다. 또한 주입부의 온도와 검출기의 온도는 250℃로 유지하였다.

(5) γ-oryzanol 함량 분석

- γ-oryzanol 함량은 Kim 과 Kim (30)의 방법에 따라 시행하였다. 1 g의 각 추출물을 test tube에 넣고, chloroform을 가한 후 각 조건별 초임계 미강 추출물을 완전히 녹인다. 이 용액을 spectrometer (GeneQuant 1300, GE Gealthcare Life Sciences, USA)를 이용하여 315nm에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도 값을 흡광계수 (1cm1%E) 358로부터 γ-oryzanol 함량을 계산한다.

다. 결과

(1) 추출온도, 압력 시간에 따른 수율

- 미강에 포함된 총 조지방의 함량을 측정하기 위해 Soxhlet법을 이용하여 80℃에서 24시간 동안 수행하였으며, 시간에 따라 추출된 미강유의 수율변화를 Fig. 9에 나타내었다. 5시간내에 약 96%이상의 오일이 추출되었고, 미강에는 13g/100g rice bran powder(dried basis)의 오일이 함유되어 있음을 확인하였으며, 추후 수행된 초임계 이산화탄소 추출 실험에서 이 값을 기준치로 이용하여 미강유의 추출 수율을 계산하였다.

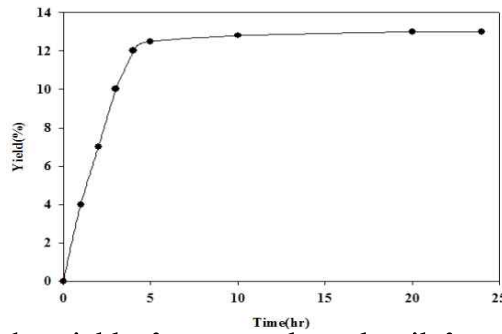


Fig. 9. Variation in the yield of extracted crude oil from rice bran by soxhlet method.

- 본 연구에서 미강으로부터 초임계 이산화탄소를 이용한 미강유 추출실험은 압력 (150~330bar) 및 온도(32~60℃)에서 수행하였다. 미강으로부터 미강유 추출조건 최적화를 위해 추출 온도, 추출 압력 그리고 추출시간에 대한 영향을 알아보았으며, 초임계 이산화탄소 추출 수행 동안 이산화탄소 유입량은 135g/min으로 고정시켜 추출온도 및 압력에 따라 미강유에 대한 용해도를 측정하였다. 추출온도 및 압력에 대한 추출속도 변화는 Fig. 10에 나타내었다.

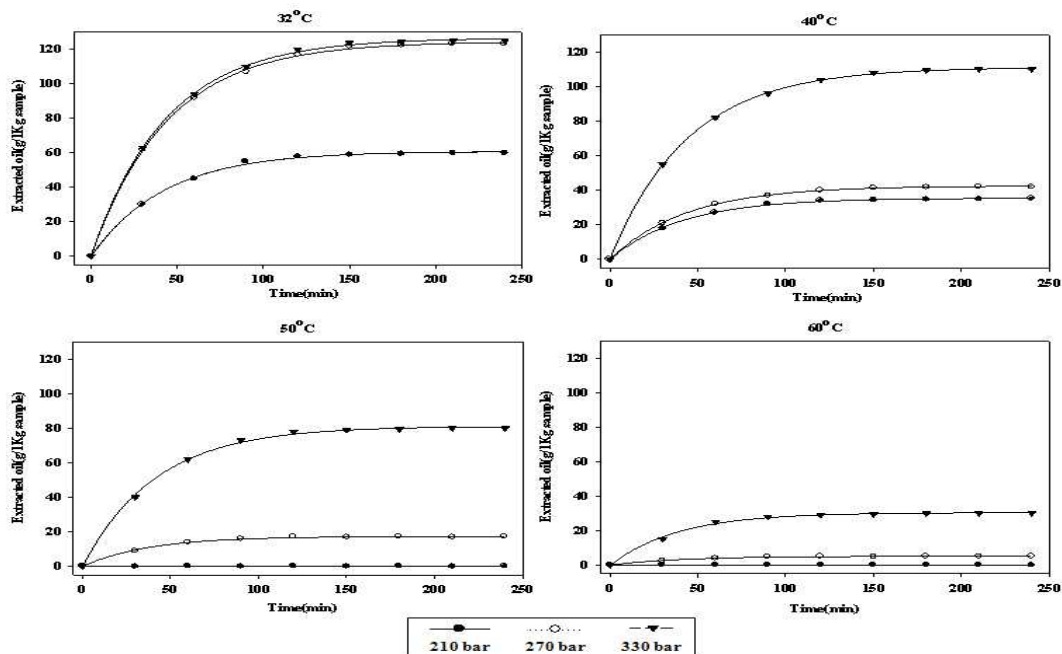


Fig. 10 Extraction rate curve of rice bran oil by SC-CO₂ at CO₂ flow rate of 135g/min.

- 추출 온도와 압력에 대한 미강유의 추출 수율 변화를 나타낸 Fig. 12을 보면 추출온도별 압력이 증가할수록 추출 속도도 증가하는 경향을 나타내었다. 추출온도 32℃, 압력 270~330bar 범위에서 123~125 g/Kg sample 으로 높은 추출속도 및 수율을 나타냈으며, 추출온도 40℃ 이후에서는 모든 실험 내 압력 범위에서 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 온도를 상승시키면 열역학적으로 matrix 내부에서 용질로의 열전달이 보다 강렬해지고, 초임계 이산화탄소의 확산계수가 높아져 시료의 미세 기공으로의 침투력이 상승하지만 일정 압력에서 온도가 증가할 때 초임계 이산화탄소의 밀도는 감소하므로 초임계 이산화탄소의 용해도는 감소하기 때문이다.
- 또한, 초임계 이산화탄소 추출은 거의 모든 추출조건 범위에서 추출시간 50분 내에 추출 수율의 50%이상이 추출되었으며, 추출시간 100분 이상부터는 정점둔화를 이루었다. 이는 미강시료의 표면 흡착에 의한 미강유 추출과 내부 흡착에 의한 미강유 추출로 구분하여 판단할 수 있으며, 시료 내부 흡착에 의한 미강유 추출의 경우 초임계 이산화탄소의 미세기공으로의 침투속도가 추출속도 결정단계를 이룬다고 판단할 수 있다.
- 본 연구에서는 60℃ 이상의 고온 조건하에서 압력이 상승할수록 추출수율이 감소하는 retro grade 현상은 발생하지 않았다. Retro grade 현상은 초임계 유체의 용해도 측정에서 나타나는 일반적인 현상으로 특정 압력을 기준으로 낮은 압력 범위에서는 대상 용질의 초임계 유체에 대한 용해도가 밀도의 영향을 더 크게 받기 때문에 온도가 증가함에 따라 초임계 유체의 밀도가 감소하고 이로 인해 용질의 용해도가 감소하게 된다. 반면에 높은 압력 범위에서는 용해도가 용질의 증기압에 의해 더 큰 영향을 받기 때문에 동일 압력조건에서 온도가 증가할수록 초임계 유체의 밀도는 감소하나 용질의 증기압 증가가 더 크게 작용하여 결과적으로 용해도가 증가하게 된다.
- 이러한 결과를 해석하기 위해 용해도 변화를 확인하였으며, Fig. 11에 추출온도 및 압력 별 이산화탄소 사용량에 따른 미강유의 용해도를 나타내었다.
- 용해도 변환은 Fig. 10의 실험결과를 바탕으로 추출 시간 대신 이산화탄소의 사용량에 따른 오일의 추출 속도로 환산한 후 일직선이 되는 영역을 plot 하여 직선의 기울기를 구하고, 이를 초임계 이산화탄소의 온도 및 압력 변화에 따른 미강유의 용해도로 나타낸 것이다.
- Fig. 11에서 미강유에 대한 초임계 이산화탄소의 용해도는 동일 압력에서 온도가 감소할수록 증가하였으며, 특히 270bar 압력을 기준으로 30℃를 제외한 각각의 온도 조건에서 용해도 증가를 확인하였다. 또한, 270bar~330bar 압력 범위 내에서 온도가 60℃에서 40℃로 감소할수록 용해도 증가율은 감소하는 경향을 나타내었고, 32℃에서 용해도 변화는 정지하였다.

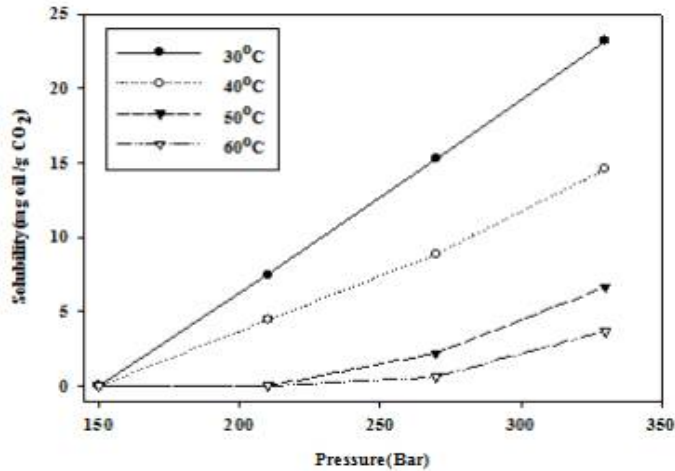


Fig. 11. Solubility of rice bran oil in supercritical carbon dioxide calculated from the experimental results shown in Fig. 12.

- 한편, 본 실험의 초임계 이산화탄소 추출 조건 범위에서 미강유에 대한 초임계 이산화탄소의 용해도 변화 측정 결과 retro grade가 발생하는 용해도 변곡점은 발견되지 않았다. 이로써 본 실험 범위는 용질에 대한 초임계 이산화탄소의 용해도 변곡점이 발생하지 않는 온도 및 압력범위에 해당된다고 판단할 수 있다.

(2) 미강유 추출수율 최적화 실험모델 계획

- Pilot-scale 초임계 이산화탄소 추출 공정을 이용한 미강유의 최적 추출 조건을 확립하기 위해 예비실험 결과를 바탕으로 중심합성계획법 (central composite design) 을 사용하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM) 을 이용한 회귀분석을 수행하였다. 중심합성법에 의한 요인(독립변수)의 실험계획은 추출압력(x₁, 150~330 bar), 추출 온도(x₂, 32~60 °C), 추출시간(x₃, 30~240 min)을 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하였으며, Table 5과 같다.

Table 5. Code and experimental conditions for the central composite design

Factor	Symbol	Coded values				
		-2	-1	0	1	2
Pressure (Bar)	x ₁	150	195	240	285	330
Temp. (°C)	x ₂	32	39	46	53	60
Extraction time (Min)	x ₃	0	60	120	180	240

- 요인변수에 의해 영향을 받는 종속 변수로는 미강유의 추출수율(Y)을 선택하였다. 이때, 세 개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀 모델식은 아래 [식 1] 과 같다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{33}x_3^2 \quad \text{[식 1]}$$

- 회귀분석에 의한 모델식의 예측은 Minitab (minitab statistical software, version16) program을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점을 분석하여 최적점을 구하였다.

- 본 연구의 초임계 이산화탄소 미강유 추출 실험 설정 범위는 용해도 변곡이 발생하는 retro grade를 포함하지 않고 있기 때문에 반응표면 분석을 이용한 미강유 추출 수율 최적 조건을 탐색하였다. 미강으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 미강유 추출 수율 최적화를 분석하기 위해 추출압력(x_1 , 150~330 bar), 추출온도(x_2 , 32~60 °C), 추출시간(x_3 , 30~240 min)을 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 실험계획을 수립하고 미강유 추출 수율을 측정하였다(Table 6).

Table 6. Central composite design (CCD) and experimental results

RUN	Variable levels			Response
	x_1 ¹⁾	x_2 ²⁾	x_3 ³⁾	Y(%)
1	-1	-1	-1	20.76
2	1	-1	-1	24.61
3	-1	1	-1	0.00
4	1	1	-1	10.76
5	-1	-1	1	26.76
6	1	-1	1	32.23
7	-1	1	1	0.00
8	1	1	1	13.07
9	-2	0	0	0.00
10	2	0	0	80.00
11	0	-2	0	90.00
12	0	2	0	3.69
13	0	0	-2	0.00
14	0	0	2	32.30
15	0	0	0	30.76

¹⁾ x_1 : Pressure (Bar).

²⁾ x_2 : Temp. (°C).

³⁾ x_3 : Extraction time (Min).

- 각 추출 조건에 따른 추출 수율의 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 7. 에 나타내었으며, 세 가지 변수(압력, 온도, 시간) 중 시간 변수를 일정하게 유지하고 다른 두 가지 변수의 함수로 반응을 나타냄으로써 등고선과 3차원 그림으로 반응표면을 나타내었다. 반응표면 결과는 Fig. 12과 Fig. 13에 나타내었다.

Table 7. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of rice bran

Response	The second order polynomial ¹⁾	R ²	Signification
Yield	$Y = 5.2800 + 12.0719x_1 - 15.8219x_2 + 5.03312x_3$ $+ 4.24500x_1^2 + 5.95625x_1x_2 - 1.71750x_2^2 +$ $1.81375x_1x_3 + 0.491250x_2x_3 - 1.41375x_3^2$	0.9528	0.043

x₁ : Pressure (Bar).

x₂ : Temp. (°C).

x₃ : Extraction time (Min).

$$^1) Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{33}x_3^2.$$

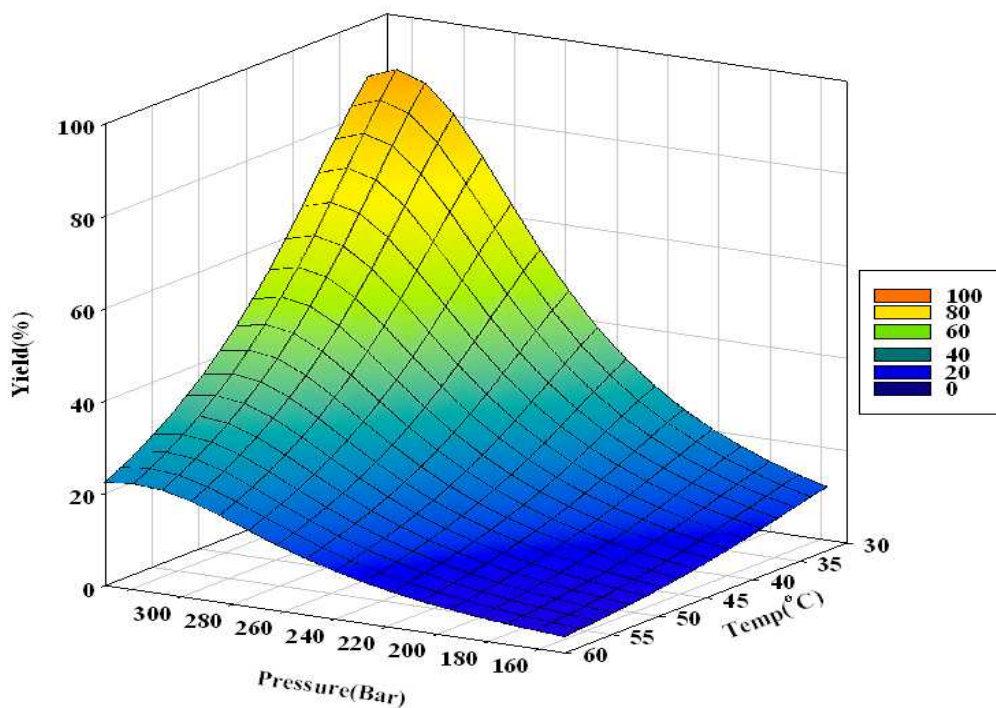


Fig. 12 Effect of temperature and pressure for yield of rice bran oil in supercritical carbon dioxide at CO₂ flow rate of 135g/min and 4hr.

- 반응표면 그래프에 따르면 추출압력 및 추출온도가 추출 수율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 추출압력이 증가할수록 추출온도는 감소할수록 높은 추출 수율을 나타내었다. 반응표면 분석에 의해 예측된 수율은 추출압력 330bar, 추출온도 32°C, 추출시간 120min 에서 최대값 90%로 나타났다. 반응표면 예측 값과 실험 실측 값 비교 시 추출조건에 따른 초임계 이산화탄소 미강유 추출 수율을 측정 한 결과에 대한 회귀식의 R² 값은 0.9528로 높은 상관관계를 보였고 5%이내에서 유의성이 인정되었으며, 실험데이터는 이차방정식에 잘 부합됨을 확인하였다.

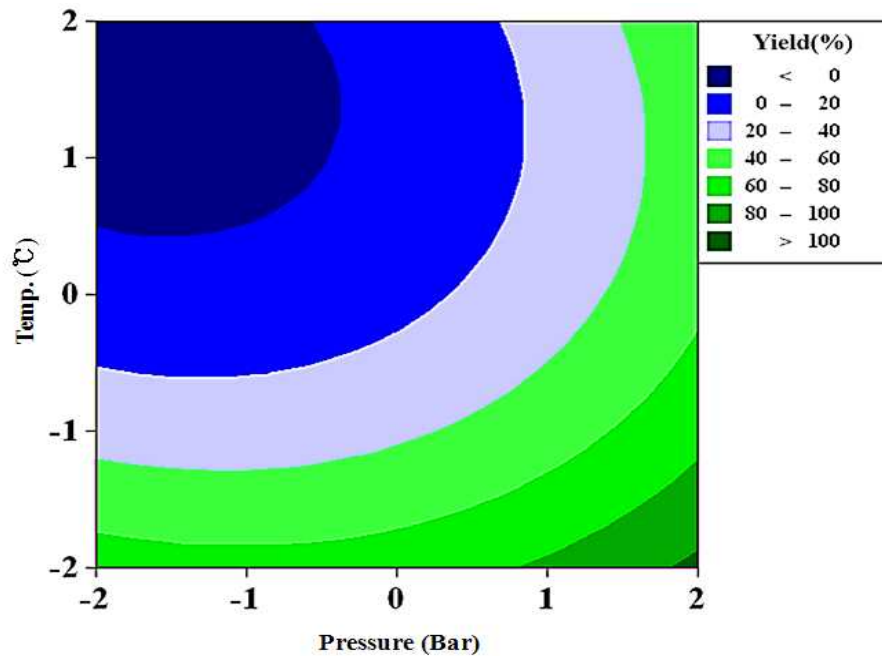


Fig. 13 Contour plots for optimization of rice bran oil extraction yield(%).

(3) 유기용매 및 초임계 이산화탄소 미강 추출물의 지방산 함량, γ -orynanol 함량 비교

- 본 연구에서는 유기용매 추출 미강유 및 초임계 이산화탄소 추출 미강유의 지방산 함량을 비교하여 유기용매 및 초임계 이산화탄소에 대한 미강유의 지방산 함량 변화를 측정하였으며, 각 추출 조건에 따른 지방산 함량은 Table 8 와 같다.
- Hexane 추출 미강유와 초임계 미강 추출물의 지방산 함량을 비교한 결과, 미강유 전체 지방산 조성 중 oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0) 가 주로 구성되었으며, 이는 Ryu 와 Cheigh (33)의 연구결과와 동일하게 나타났다.
- Hexane 추출 미강유의 경우 palmitic acid (C16:0)는 11.94 g/100 g oil, oleic acid (C18:1)는 26.51 g/100 g oil, linoleic acid (C18:2)는 25.76 g/100 g oil을 나타내었고, 초임계 미강 추출물의 경우 palmitic acid (C16:0)는 8.08~13.9 g/100 g oil, oleic acid (C18:1)는 20.8~34.7 g/100 g oil, linoleic acid (C18:2)는 17.6~32.3 g/100 g oil 사이의 함량을 나타냈다.
- 이 중 270 bar, 32°C 조건에서 가장 높은 함량인 palmitic acid (C16:0)는 13.9 g/100 g oil, oleic acid (C18:1)는 34.7 g/100 g oil, linoleic acid (C18:2)는 32.3 g/100 g oil로 Hexane 추출에 비해 높은 함량을 나타내었다.

Table 8. Comparison of fatty acid content of rice bran oil obtained by supercritical extraction and hexane extraction.

(g/100 g oil)

Fatty Acids	Supercritical Carbon Dioxide												Hexane
	210 Bar				270 Bar				330 Bar				
	3	4	5	60°C	3	4	5	60°C	3	4	5	60°C	
	2°C	0°C	0°C		2°C	0°C	0°C		2°C	0°C	0°C		
C14:0	0.24	0.24	-	-	0.22	0.19	0.22	0.29	0.13	0.24	0.23	0.27	0.22
C16:0	13.5	12.1	-	-	13.9	13.1	10.4	12.7	8.08	12.0	12.5	14.5	11.94
C16:1	0.13	0.12	-	-	0.14	0.13	0.10	0.12	0.08	0.12	0.11	0.12	0.12
C17:0	0.04	0.03	-	-	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03
C18:0	0.95	0.79	-	-	1.06	1.02	0.70	0.82	0.64	0.78	0.83	0.95	0.87
C18:1	30.1	25.7	-	-	34.7	32.9	20.6	24.0	20.8	24.7	26.2	27.3	26.51
C18:2	28.2	24.3	-	-	32.3	30.5	19.2	22.8	19.3	22.9	24.1	17.6	25.76
C20:0	0.29	0.24	-	-	0.33	0.31	0.21	0.23	0.22	0.24	0.27	0.29	0.25
C20:1	0.36	0.29	-	-	0.39	0.37	0.24	0.27	0.25	0.29	0.31	0.32	0.30
C18:3	1.08	0.94	-	-	1.19	1.11	0.73	0.89	0.71	0.89	0.92	0.57	0.98
C21:0	0.06	0.04	-	-	0	0	0.07	0.08	0	0.05	0.05	0.07	0.05
C22:0	0.25	0.07	-	-	0	0.10	0.06	0.07	0.07	0.07	0.09	0.08	0.07
C20:3	0	0.51	-	-	0	0	0.40	0.84	0	0.42	0.37	0.27	0.17
C20:4	0.04	0.03	-	-	0.03	0	0.05	0.06	0.00	0.04	0.04	0.04	0.04
C24:0	0.12	0.10	-	-	0.24	0.17	0.10	0.11	0.11	0.10	0.14	0.13	0.11

- 유기용매 및 초임계 이산화탄소 추출 미강유의 지방산 함량 비교 시 지방산 함량은 초임계 이산화탄소의 추출조건인 32°C 범위에서는 210bar, 40°C 범위에서는 210bar, 270bar 압력조건에서 유기용매 추출 미강유 보다 높은 지방산 함량을 나타내었으며, 미강유 전체 지방산 조성 중 대다수 oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0) 가 차지하였고, oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0) 순으로 높은 함량을 나타내었다.
- Hexane 추출 미강유 및 각 추출 조건에 따른 초임계 미강 추출물의 γ -oryzanol 함량은 Table 9과 같다. 각 초임계 추출 조건에 따름 γ -oryzanol 함량은 5.05~11.30 g/100g oil의 함량을 나타냈으며 Hexane 추출 미강유는 6.94 g/100g oil를 나타내었다. Lilitchan 등 (34)에 의하면 hexane, ethanol 및 isopropanol 등 다양한 용매를 사용하여 γ -oryzanol을 추출한 결과 ethanol과 isopropanol을 용매로 사용하였을 때 hexane을 비롯한 다른 용매 보다 추출 함량이 높았으며, ethanol의 경우 0.379 g/100 g oil, isopropanol의 경우 0.374 g/100g oil로 나타났다고 한다. 그에 비해 초임계 미강 추출물의 경우 270 bar, 32°C 조건에서 γ -oryzanol 함량은 11.30 g/100g oil로 다른 용매 추출에 비해 월등히 높았다.

Table 9. Comparison of γ -oryzanol content of rice bran oil obtained by supercritical extraction and hexane extraction.

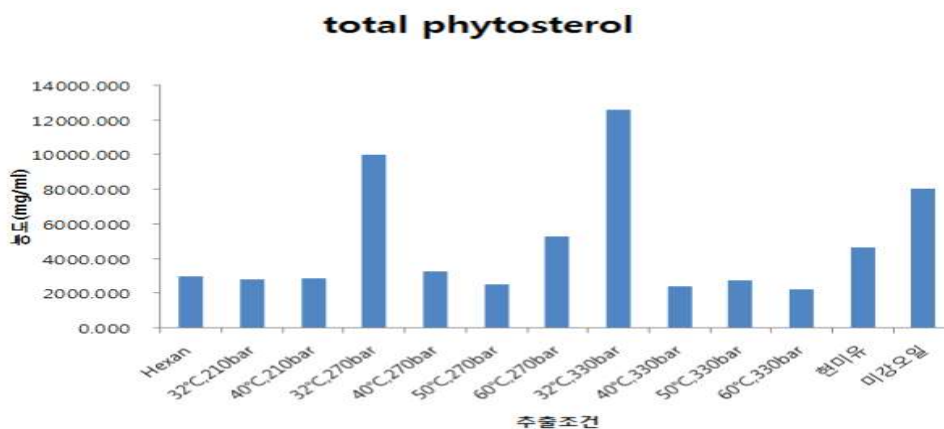
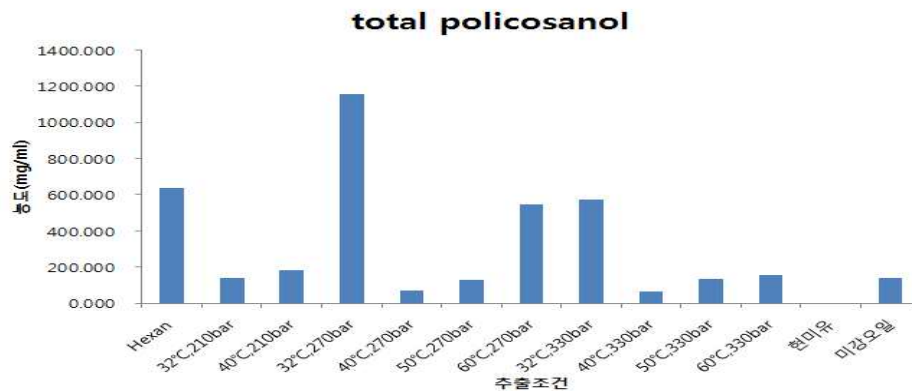
(g/100 g oil)

Components	Supercritical Carbon Dioxide												Hexane
	210 Bar				270 Bar				330 Bar				
	3 2°C	4 0°C	5 0°C	6 0°C	3 2°C	4 0°C	5 0°C	6 0°C	3 2°C	4 0°C	5 0°C	60°C	
γ -oryzanol	7.1	6.9	-	-	11.	6.5	6.8	5.93	8.9	5.2	5.8	5.05	6.94
	9	9			30	8	7		8	2	4		

(4) CO₂ 초임계 추출 조건에 따른 미강유 유효성분의 조성변화 비교

(가) 조건별 초임계 미강 추출물의 유효성분 분석

- CO₂ 초임계 추출조건에 따른 각 지용성 유효성분들의 농도는 추출 조건에 따라 매우 큰 차이를 보이고 있었다. 32°C, 270bar 에서의 CO₂ 초임계 추출조건이 유효성분인 및 policosanol, squalene, tocol류 등에서 hexane 추출에 비해 비슷하거나 높은 농도로 추출됨을 알 수 있었다.



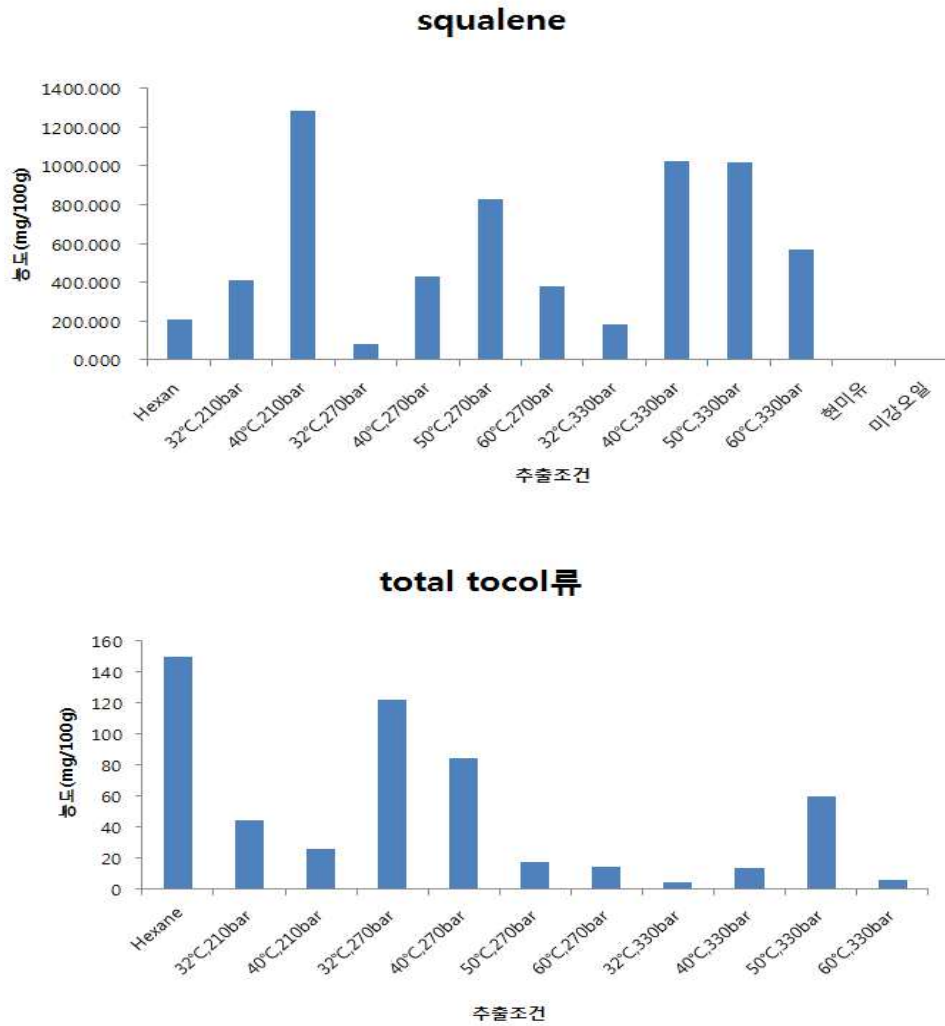


Fig 14. CO₂ 초임계 추출 조건에 따른 미강유 유효성분의 조성변화 비교

(나) Tocol류의 조성변화

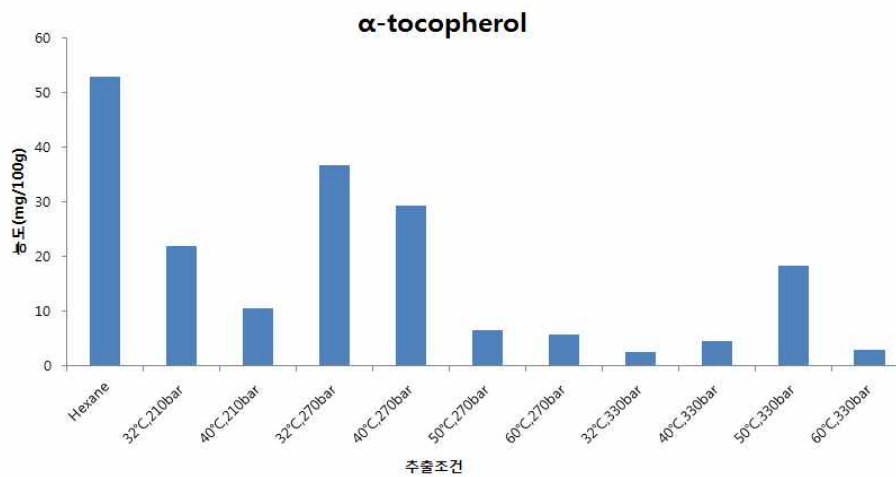
- Hexane 추출 미강유 및 각 추출 조건에 따른 초임계 미강 추출물의 tocols 함량은 Table 10과 같다. 각 조건별 미강유는 대부분 α-tocopherol과 γ-tocotrienol의 함량이 가장 높았으며, α-tocopherol은 2.41~52.91 mg/100g oil, γ-tocotrienol은 0.83~45.40 mg/100g oil로 나타났다. 이 중 270 bar, 32°C 조건에서 가장 높은 tocols 함량을 나타내어, α-tocopherol은 36.79 mg/100g oil, γ-tocotrienol은 40.73 mg/100g oil이 었다. 그러나 이는 Hexane 추출 미강유 (α-tocopherol 52.91 mg/100g oil, γ-tocotrienol 45.40 mg/100g oil)보다 낮은 함량이었다.

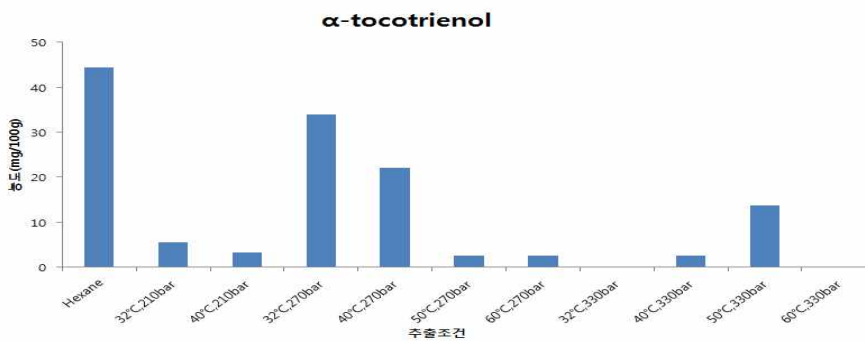
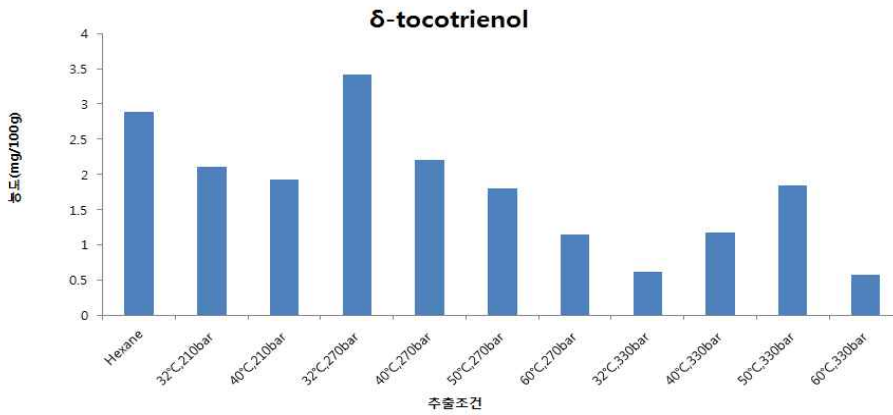
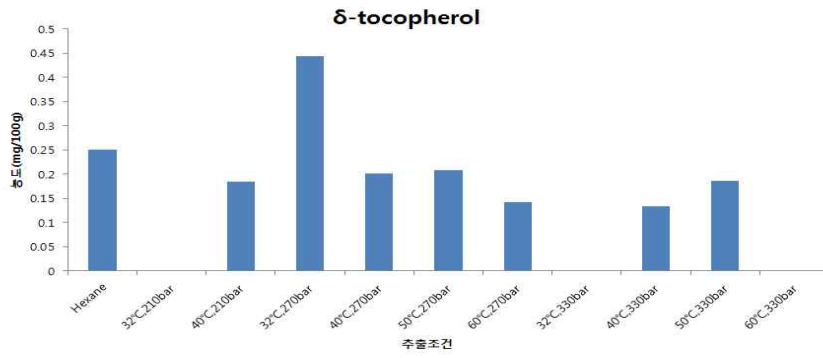
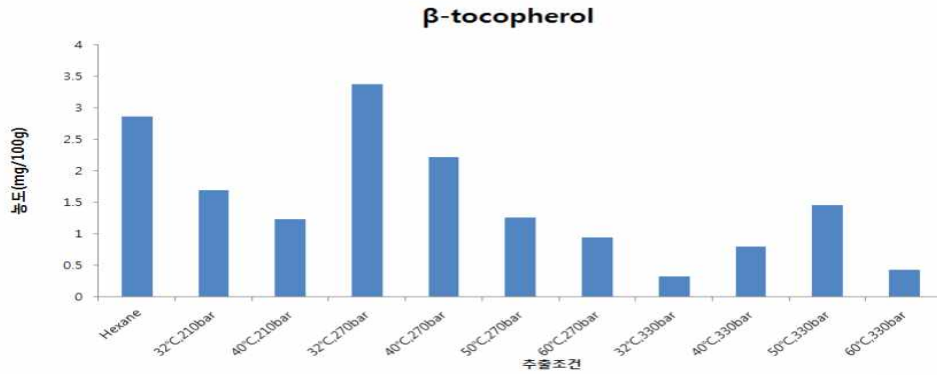
Table 10. Comparison of tocols composition and content of rice bran oil obtained by supercritical extraction and hexane extraction.

(mg/100 g oil)

Components	Supercritical Carbon Dioxide												Hexane
	210 Bar				270 Bar				330 Bar				
	3 2°C	4 0°C	5 0°C	6 0°C	3 2°C	4 0°C	5 0°C	6 0°C	3 2°C	4 0°C	5 0°C	60°C	
α-tocopherol	21.	10.	-	-	36.	29.	6.5	5.66	2.4	4.5	18.	2.81	52.91
	79	43			79	39	4		1	1	19		
β-tocopherol	1.6	1.2	-	-	3.3	2.2	1.2	0.93	0.3	0.7	1.4	0.43	2.87
	9	3			8	2	5		3	9	5		
γ-tocopherol	1.1	0.7	-	-	3.5	2.7	0.5	0.44	0.0	0.4	1.8	0.31	3.87
	9	6			7	7	8		0	2	0		
δ-tocopherol	-	0.1	-	-	0.4	0.2	0.2	0.14	-	0.1	0.1	-	0.25
		8			4	0	1			3	9		
α-tocotrienol	5.4	3.1	-	-	33.	22.	2.5	2.47	-	2.5	13.	-	44.30
	1	7			93	01	6			1	67		
γ-tocotrienol	12.	8.2	-	-	40.	25.	4.6	3.47	0.8	4.1	22.	1.69	45.40
	34	0			73	68	7		3	3	59		
δ-tocotrienol	2.1	1.9	-	-	3.4	2.2	1.7	1.14	0.6	1.1	1.8	0.57	2.898
	1	2			1	1	9		1	8	5		

- 32°C, 270bar 의 초임계 추출조건에서 hexane 추출물에 비해 높은 농도의 α-tocopherol, β-tocopherol, γ-tocotrienol의 함량이 확인되었으며, δ-tocotrienol의 경우도 hexane 추출물과 비슷한 함량으로 추출됨을 확인하였다.





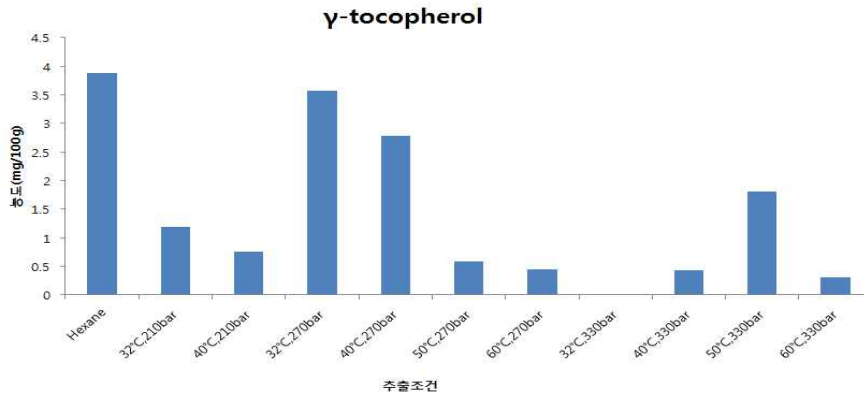
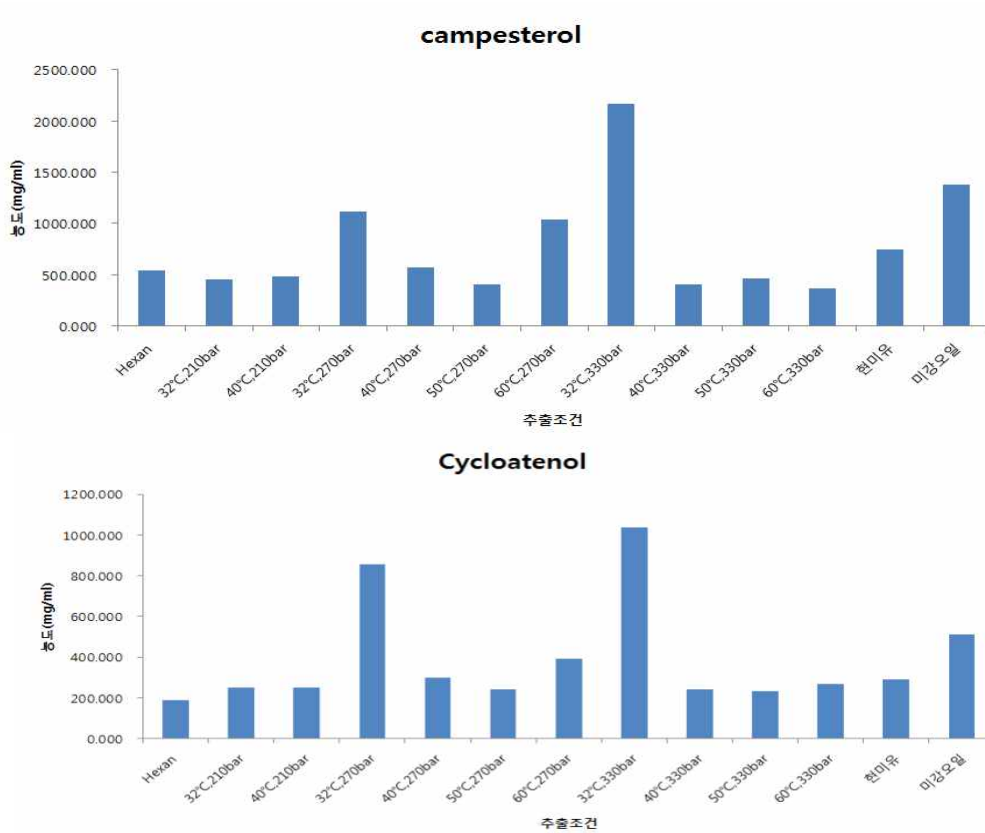


Fig 15. CO₂ 초임계 추출 조건에 따른 미강유 tocol 류의 함량비교

(다) CO₂ 초임계 추출 조건에 따른 미강유 pytosterol 류의 조성변화 비교

- 32°C, 270bar와 32°C, 330bar의 추출조건에서 pytosterol 의 함량이 가장 높았으며, 이들의 각 구성 성분도 가장 높게 나타났다.



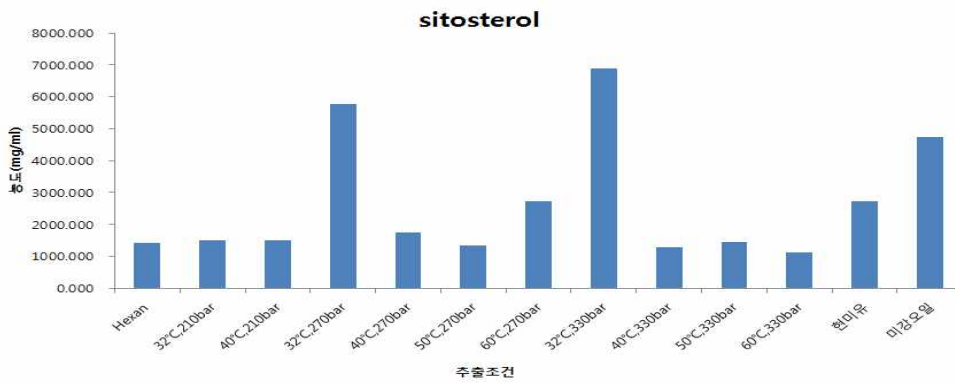
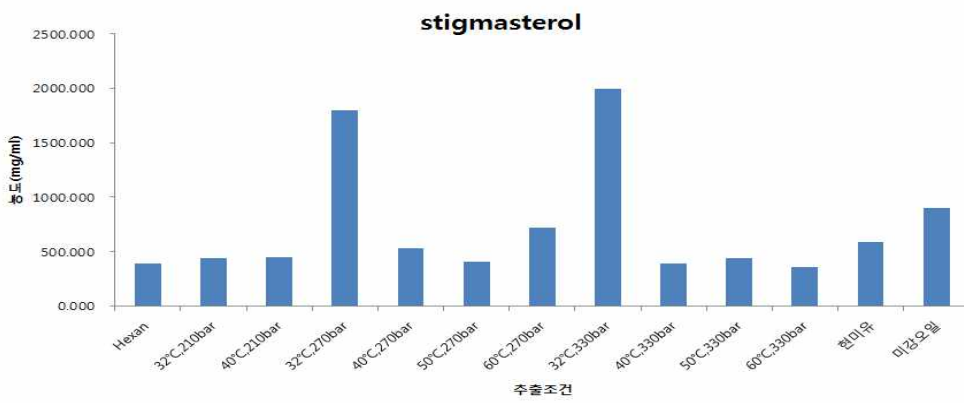
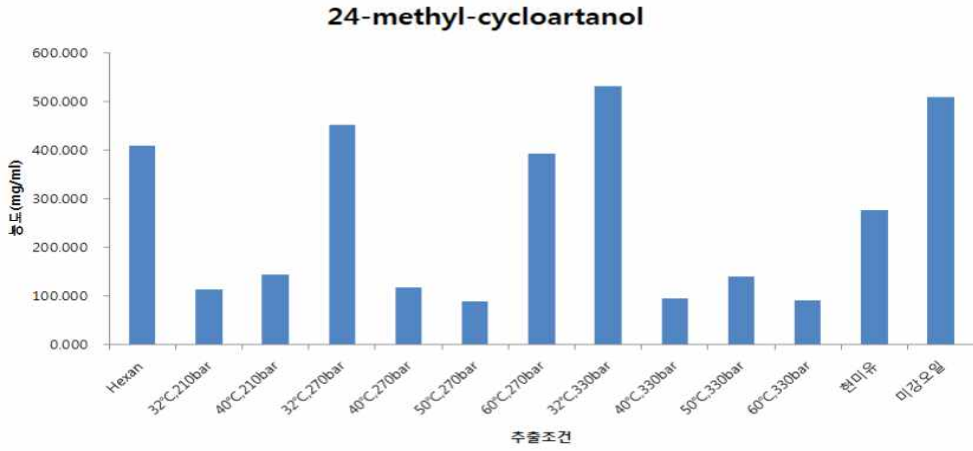


Fig 16. CO₂ 초임계 추출 조건에 따른 미강유 pytosterol 류의 조성변화 비교

제 3 절. 추출물의 in vitro 생리활성 및 안전성 test

1. 초임계 미강 추출물의 안전성 시험(세포독성)

가. 시험방법

(1) HaCat cell을 이용한 세포 독성실험

(가) 헥산 추출물과 초임계 이산화탄소 미강 추출물의 세포독성 검사

- ① 모발각질형성세포 (HaCat)를 penicillin (100 $\mu\text{l}/\text{mL}$), streptomycin (100 $\mu\text{l}/\text{mL}$), 10% FBS가 포함된 DMEM (GIBCO BRL, NY, USA)배지를 사용하여 5% CO_2 조건하에서 37 $^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다.
- ② 최적 조건 확립 : 세포수에 따른 MTS 결과를 통해 세포수를 1.5×10^5 로 확정하였다.(Fig. 1)
- ③ 세포 배양 후, 96 well plate (Flacon, USA)에 모발각질형성세포 (1.5×10^5)를 분주하고, 24시간동안 배양 후 270 bar 32 $^\circ\text{C}$ 초임계 추출 미강유 (2 μl , 5 μl , 10 μl)와 270 bar 40 $^\circ\text{C}$ 초임계 추출 미강유 (2 μl , 5 μl , 10 μl), 헥산 추출 미강유 (2 μl , 5 μl , 10 μl), 현미유 (2 μl , 5 μl , 10 μl), γ -oryzanol (0.4 μg , 4 μg , 40 μg), policosanol (0.4 μg , 4 μg , 40 μg), γ -tocotrienol (0.2 μl , 1 μl , 2 μl), linoleic acid (1 μl , 2 μl , 3 μl)를 첨가하고 다시 24시간 동안 배양하였다.
- ④ MTS (Promega, USA) 20 μl 를 각 well에 처리하여 4 시간 배양한 후 형성된 formazan 을 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

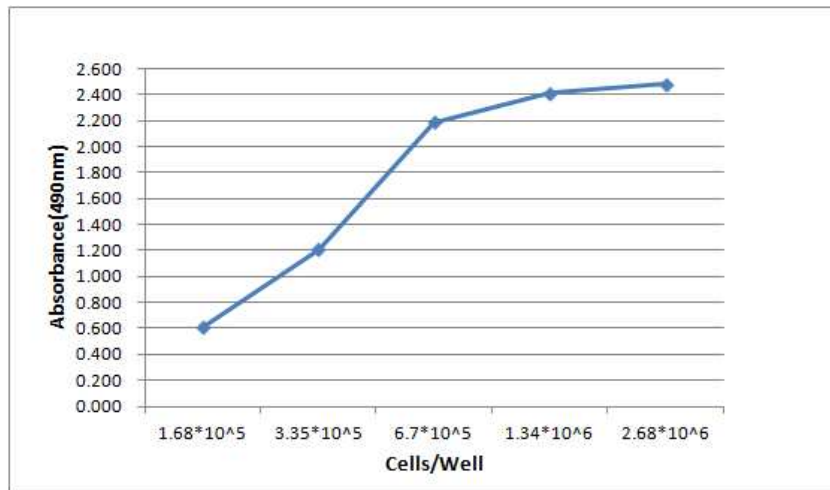


Fig. 1 세포수에 따른 MTS결과

(2) RAW264.7 cell을 이용한 세포 독성실험

(가) 세포배양

- 세포주인 RAW 264.7 macrophage cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell은 10 % Fetal Bovin Serum (FBS, Hyclone, USA), 100 units/ml Penicillin 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Gibco, USA)이 함

유된 Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에서 37°C, 5 % CO₂ 존재 하에 배양하였다.

(나) 시료

- 초임계 미강 추출물 (1.66, 16.6, 83, 166, 332 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- Linoleic acid (0.28, 2.8, 14, 28, 42, 56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 γ -oryzanol (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

(다) MTS Assay

- 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well의 RAW264.7 macrophage 세포를 분주하고 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후, 270 bar 32°C 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 재 배양하였다. 배양 후 Plate에 20 μl 의 MTS Solution을 첨가하여 CO₂배양기 (37°C, 5 % CO₂)에서 1시간 반응시키고, Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하여 비교하였다.

(라) SRB Assay

- SRB assay는 Vanicha 와 Kanyawim의 방법 (31)에 따라 시행하였다. MTS assay와 동일하게 세포 및 시료를 처리하여 총 48 시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 Plate에 50 μl 의 TCA (trichloroacetic acid)를 첨가하여 4°C 에서 1 시간 고정시켰다. 1 시간 뒤 TCA를 제거하고 증류수로 5 회 세척한 뒤 0.4 % SRB 100 μl 를 첨가하여 상온에서 10 분 염색하였다. 염색이 끝난 후 1 % acetic acid로 5 회 세척하여 건조시키고, 100 μl 의 10 mM Tris (pH10.5)로 SRB dye를 녹여 Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하여 비교하였다.

나. 결과

(1) HaCat cell을 이용한 세포 독성실험

(가) 헥산 추출물과 초임계 이산화탄소 미강 추출물의 HACAT cell에서의 viability

- 헥산 추출물 및 linoleic acid 최대 수율을 보인 두 조건에서의 초임계 추출물들은 HACAT cell에서의 세포독성을 관찰할 수 없었으며, 오히려 세포의 proliferation effect를 나타냄을 알 수 있었다.

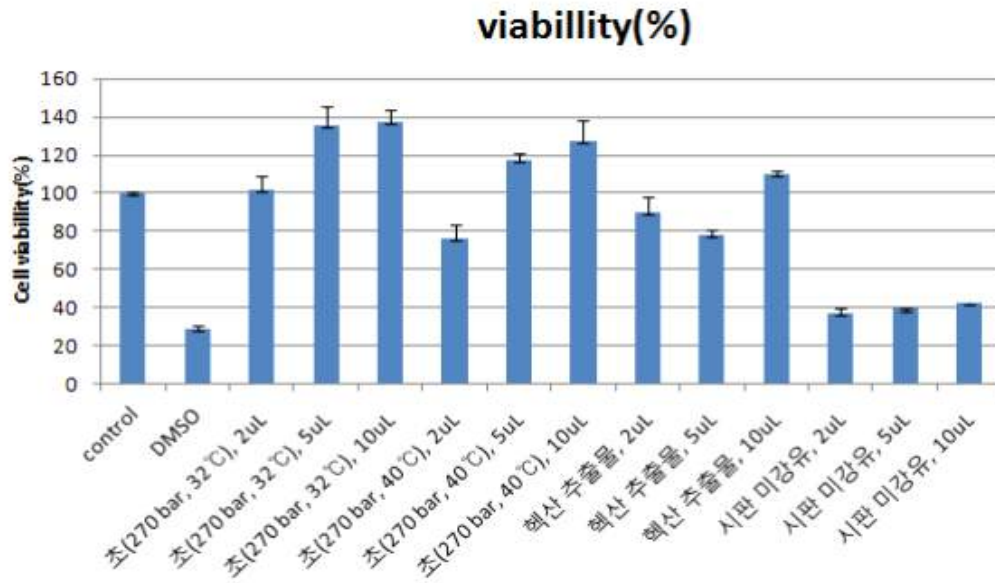


Fig. 2 초임계 추출물, 핵산 추출물, 시판 현미유에 의한 HACAT cell viability

(나) 미강의 유효성분들의 HACAT cell에서의 viability

① Linoleic acid

- linoleic acid의 경우, HACAT cell에서의 세포 독성은 발견할 수 없었으며, 또한 이 성분에 의한 cell의 proliferation effect도 관찰되지 않았다.

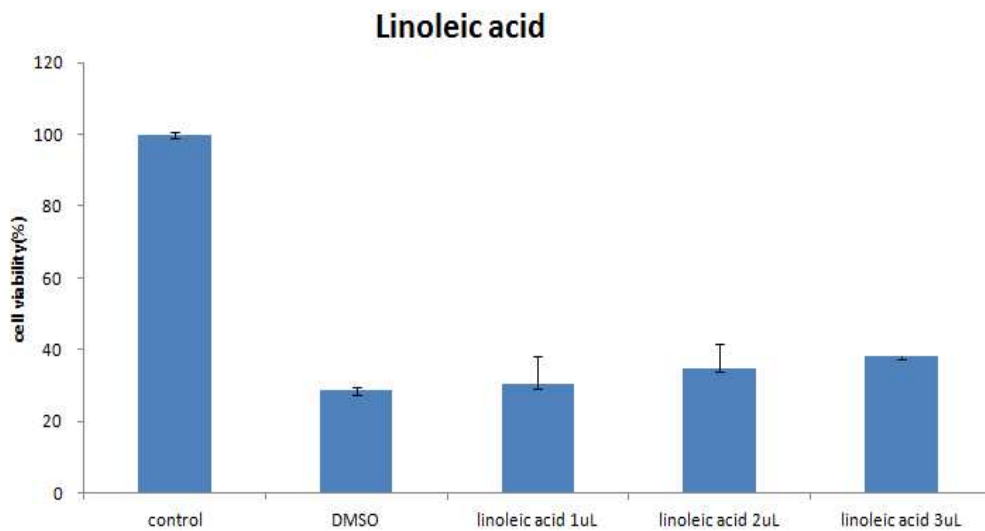


Fig. 3 linoleic acid에 의한 HACAT cell viability

② γ -Tocotrienol

- γ -tocotrienol의 경우, 세포독성은 관찰되지 않았으며, 농도에 따라 세포증식을 활성화시키는 효과를 확인할 수 있었다.

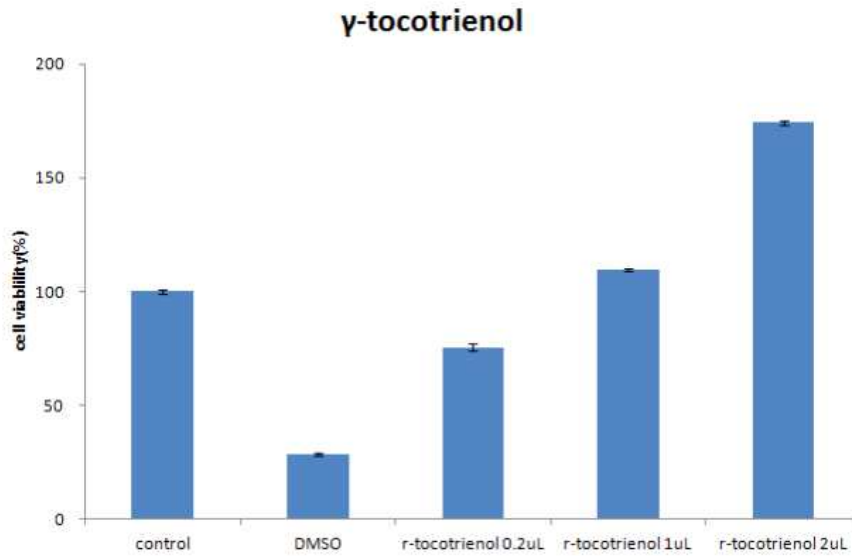


Fig. 4 γ -Tocotrienol에 의한 HACAT cell viability

③ γ -Oryzanol

- γ -Oryzanol의 경우도, 세포독성은 관찰되지 않았으며, 농도에 따라 세포증식을 활성화시키는 효과를 확인할 수 있었다.

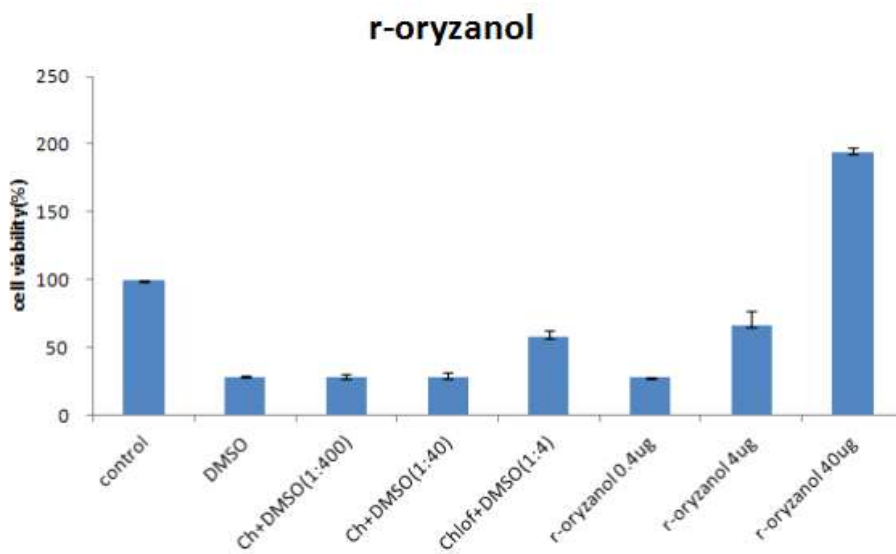


Fig. 5 γ -Oryzanol에 의한 HACAT cell viability

④ Policosanol

- Policosanol의 경우는, 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았으나, 세포 증식효과도 나타나지 않았다.

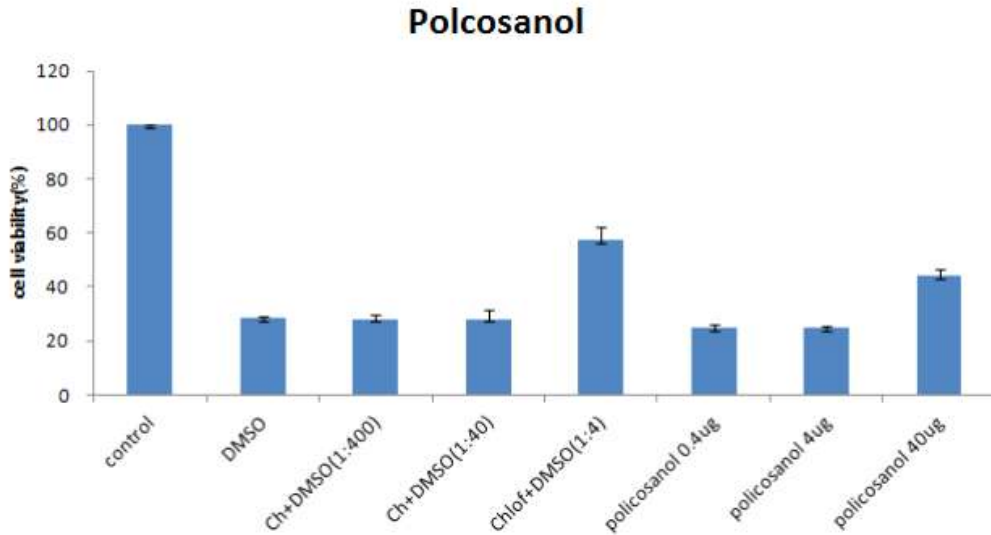


Fig. 6 olicosanol에 의한 HACAT cell viability

(2) RAW 264.7 cell을 이용한 세포 독성실험

(가) 초임계 미강 추출물의 세포 생존율에 의한 세포 독성

① MTS Assay에 의한 cell viability

- RAW 264.7 macrophage cell에 초임계 미강 추출물을 농도별 (1.66, 16.6, 83, 166, 332, 498 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 처리한 후 MTS assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 측정된 결과는 Fig. 7(a)와 같으며 166 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도에서 독성을 나타내었다.

② SRB Assay에 의한 cell viability

- SRB assay는 배지 난용성 물질들을 세포에 처리 시 직접 세포와의 반응에 의한 결과를 알 수 있기 때문에 많이 이용되는 assay 법이다. SRB assay에 의한 cell viability test 결과는 Fig. 7(b)와 같다. 초임계 미강 추출물을 농도별 (1.66, 16.6, 83, 166, 332, 498 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 처리 후 SRB assay에 의한 cell viability는 MTS assay 결과와 동일하였다. MTS 및 SRB assay에 의한 cell viability를 토대로 다음 단계의 cell 처리 농도는 166 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하에서 실시하는 것으로 결정하였다.

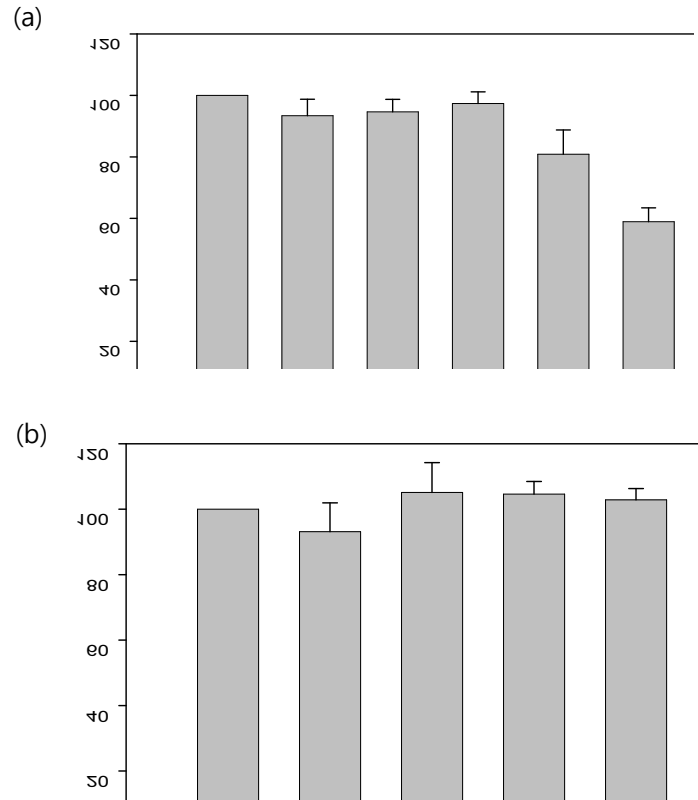


Fig 7. Comparisons of effects of rice bran supercritical extract on the cell viability in RAW 264.7 macrophages using MTS assay (a), SRB assay (b). The cells were treated with Rice Bran Supercritical Extract for 24 hour. Cells viability were determined by MTS and SRB assay. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

(나) 유효성분의 세포 생존율에 의한 세포독성 평가

① MTS assay에 의한 cell viability

- 항염증 활성 실험에서의 각 유효성분의 시료 투여 농도를 결정하기 위하여 RAW 264.7 macrophage cell에 γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -oryzanol (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linoleic acid (0.28, 2.8, 14, 28, 42, 58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 농도별로 처리하고 MTS assay에 의한 cell viability를 측정하였다. γ -tocotrienol의 MTS assay에서의 cell viability는 Fig. 8(a)와 같으며, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 독성을 나타내었다. γ -oryzanol의 MTS assay에 의한 cell viability는 Fig. 8(b)와 같으며, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 80 % 이하의 생존율을 보였다. Linoleic acid의 MTS assay에 의한 cell viability는 Fig. 10(c)와 같으며, 28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 80% 이하의 생존율로 독성을 나타내었다.

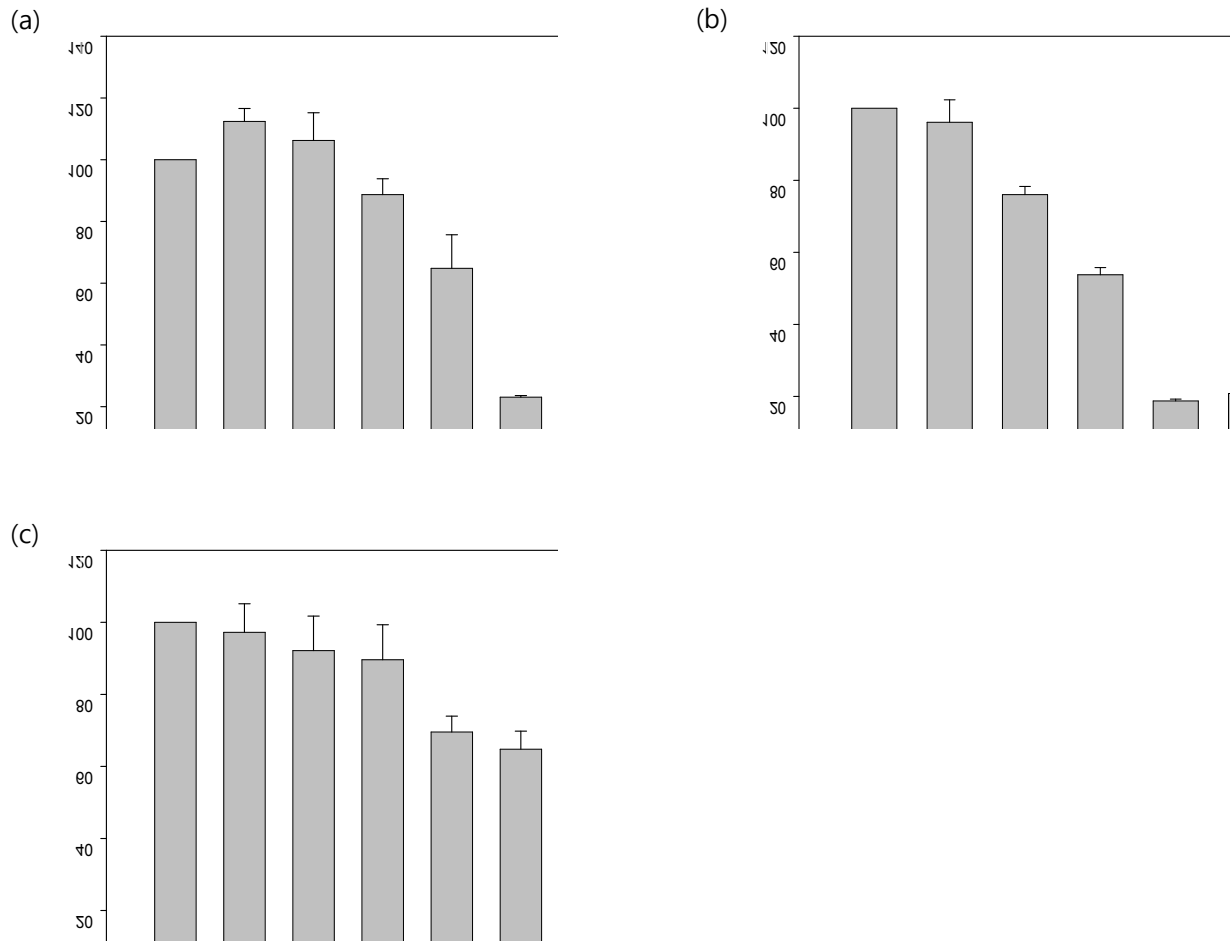


Fig 8. Comparisons of effects of γ -tocotrienol (a), γ -oryzanol (b), and linoleic acid (c) on the cell viability in RAW 264.7 macrophages using MTS assay. The cells were treated with γ -tocotrienol for 24 hours. Cell viability was determined by MTS assay. The values are expressed as the mean \pm S.D. of three individual experiments.

② SRB assay에 의한 cell viability

- 초임계 미강 추출물에서와 마찬가지로 배지 난용성 물질들을 세포에 처리 시 세포와의 반응에 의한 결과를 알아보기 위해 SRB assay에 의한 cell viability를 측정하였다.
- RAW 264.7 macrophage cell에 γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -oryzanol (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linoleic acid (0.28, 2.8, 7, 14, 28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 농도별로 처리한 결과, γ -tocotrienol의 SRB assay에 의한 cell viability는 Fig. 11(a)와 같으며, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 독성을 나타내었다. γ -oryzanol의 SRB assay에 의한 cell viability는 Fig. 9(b)와 같으며, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서부터 80% 이하의 생존율을 나타내었고, Linoleic acid의 SRB assay에 의한 cell viability는 Fig. 9(c)와 같으며, 28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 80% 이하의 생존율로 독성을 나타내었다.
- MTS 및 SRB assay에 의한 cell viability를 토대로 다음 단계의 cell 처리 농도는 γ -tocotrienol은 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, γ -oryzanol은 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, linoleic acid는 28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이하에서 실시하는 것으로 결정하였다.

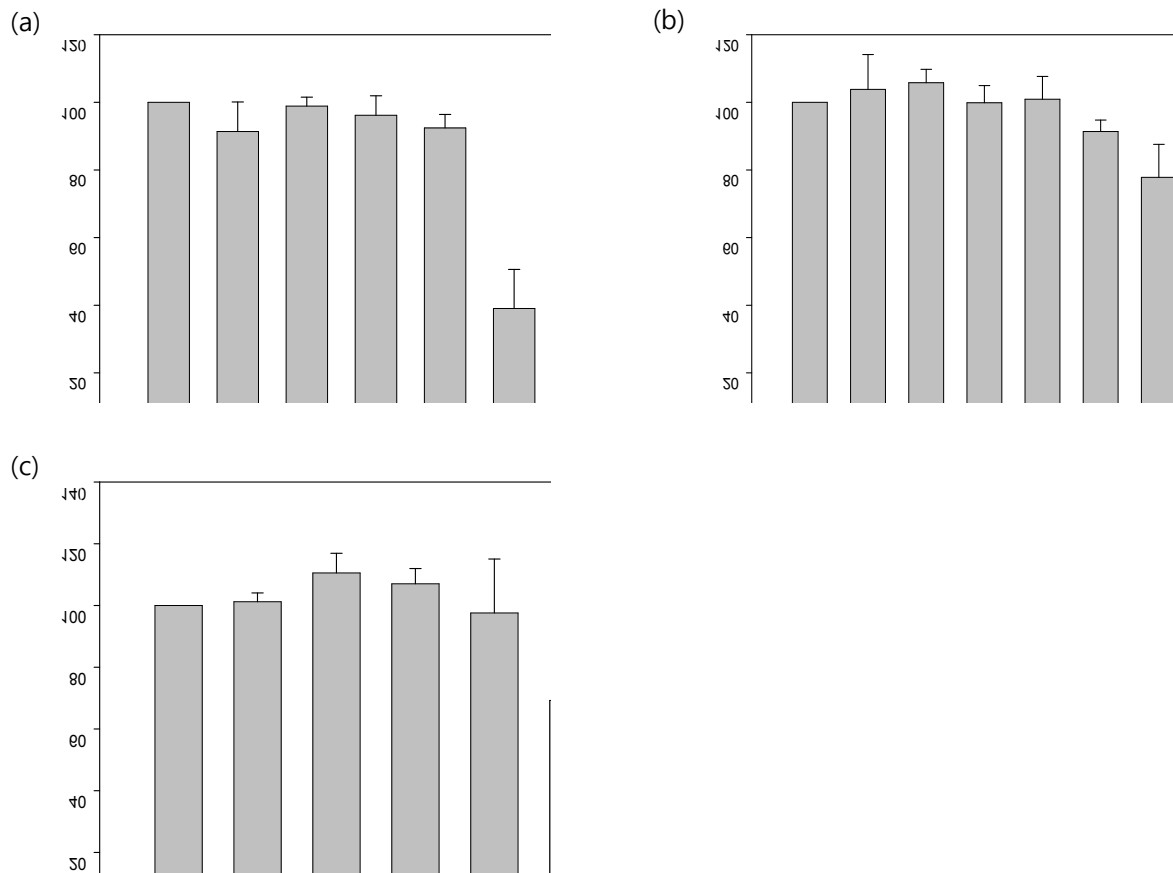


Fig 9. Comparisons of effects of γ -tocotrienol (a), γ -oryzanol (b), and linoleic acid (c) on the cell viability in RAW 264.7 macrophages using SRB assay. The cells were treated with γ -oryzanol for 24 hour. Cells viability were determined by SRB assay. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

2. *in vitro* assay 를 이용한 항균, 항산화의 검증

가. 항산화 활성

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 측정 시료

- 270 bar 32°C 초임계 이산화탄소 추출물(0.2 μ l, 0.5 μ l, 1 μ l/20 μ l)
- 270 bar 40°C 초임계 이산화탄소 추출물 (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l)
- 헥산 추출물 (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l)
- 시판 현미유 (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l)
- γ -oryzanol (0.4 μ g, 4 μ g, 40 μ g)
- policosanol (0.4 μ g, 4 μ g, 40 μ g)
- γ -tocotrienol (0.2 μ l, 1 μ l, 2 μ l)
- linoleic acid (1 μ l, 2 μ l, 3 μ l)

(나) 측정 방법

① DPPH radical scavenging activity assay

- 96 well plate에 각 농도별로 조제한 시료 100 μ l와 ethanol에 용해 된 0.4 mM DPPH (Sigma Aldrich, USA)를 동량 첨가하여 30분간 암실에 방치한 후 Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 다음 식으로 계산한 후 대조군에 대한 항산화활성을 백분율로 표시하여 비교하여 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (\text{공시료군} - \text{반응군} / \text{공시료군}) * 100$$

② ABTS radical 소거 측정

- 7 mM ABTS (Sigma Aldrich, USA)와 2.45 mM Potassium persulfate (1/1, v/v)를 실온에서 12~16 시간 암실에서 방치하여 파랑/녹색의 ABTS \cdot^+ 를 형성시킨 후 Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 흡광도가 739 nm에서 0.70 \pm 0.02가 될 까지 ethanol로 희석하였다. 96 well plate에 희석된 ABTS \cdot^+ reagent 180 μ l에 각 농도별로 조제한 시료 20 μ l를 가하여 5분 동안 방치한 후 739 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 다음 식으로 계산한 후 대조군에 대한 항산화활성을 백분율로 표시하여 비교하여 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (\text{공시료군} - \text{반응군} / \text{공시료군}) * 100$$

(다) 결과

① 벼도정부산물(미강)의 추출조건에 따른 항산화 활성 비교

- 미강 유래 4가지 추출물의 항산화 활성을 비교해 본 결과, 초임계 추출물의 DPPH 라디칼 제거 활성은 추출조건에 따라 약간 차이가 있으나, 약 80%정도였다. 그러나 헥산 추출물의 DPPH 라디칼 제거 활성은 거의 없는 것으로 나타났으며, 시판 미강유의 활성은 50~70% 정도의 DPPH 라디칼 제거 활성을 나타내었다.

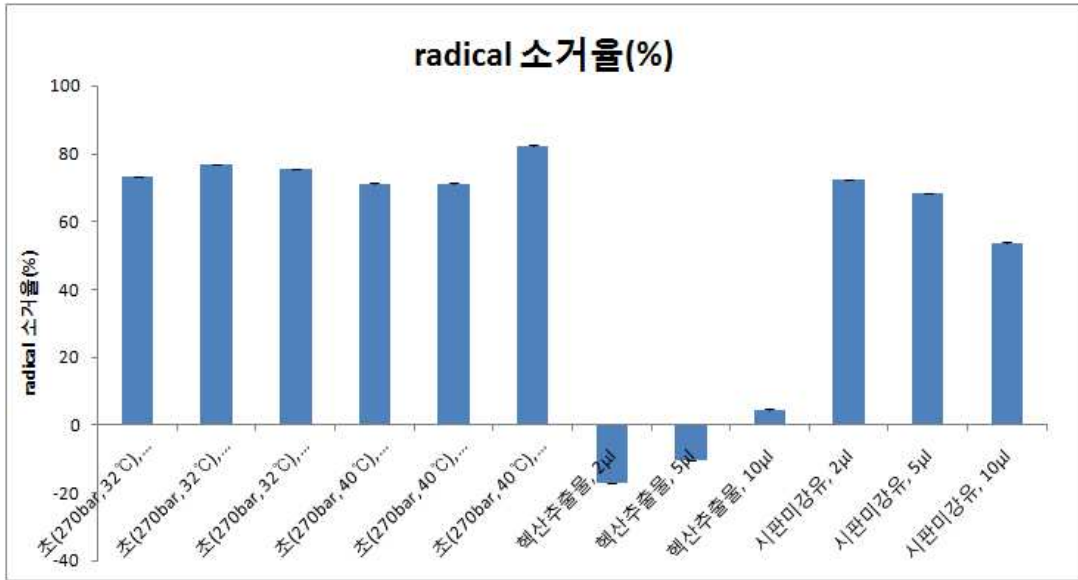


Fig. 10 임계 추출물, 헥산 추출물, 시판 현미유에 의한 DPPH radical 소거율

② 초임계 미강 추출물의 항산화 활성 평가

㉠ DPPH

- 초임계 미강 추출물의 DPPH radical 소거 활성 정도는 Fig. 11와 같다. 초임계 미강 추출물의 DPPH radical 50 % 저해 농도 (RS₅₀)는 0.035 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 α -tocopherol (RS₅₀=1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에 비해 약 36배 높았다. 이는 항산화 성분과 항산화 활성 간의 상관관계에 대하여 보고한 Seo와 Choi 등(35)의 연구에서와 같이 본 실험의 미강에 다량 포함되어있는 polyphenolic 화합물로 인하여 높은 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

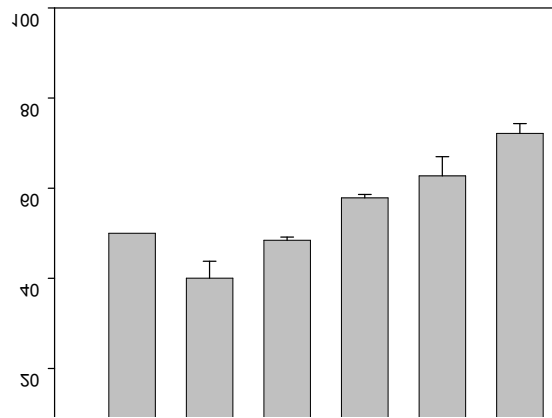


Fig 11. Radical scavenging effects on DPPH radical of Rice Bran Supercritical Extract.

㉞ ABTS

- 초임계 미강 추출물의 ABTS radical 소거 활성 정도는 Fig. 12과 같다.

L-ascorbic acid는 0.042 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 약 50 %의 ABTS radical 소거 활성을 보였으며, 초임계 미강 추출물의 경우 L-ascorbic acid와 비슷한 농도인 0.042 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 약 98 %의 ABTS radical 소거 활성을 보였다.

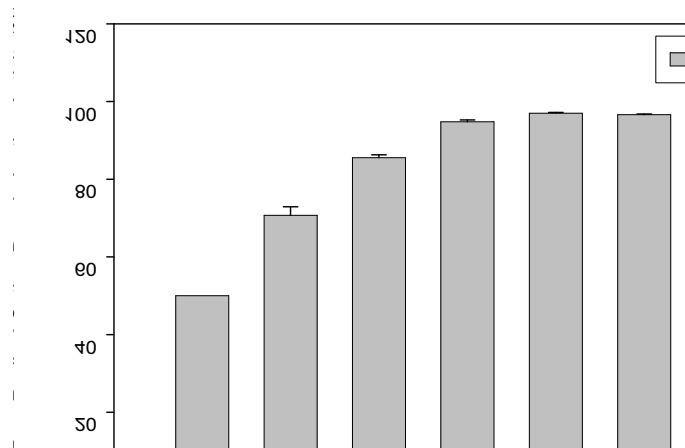


Fig 12. Radical scavenging effects on ABTS radical of Rice Bran Supercritical Extract.

③ 미강 유효성분들의 항산화 활성

- γ -oryzanol의 4 μL 의 경우 최대 80%의 DPPH 라디칼 제거 활성을 나타냈었으며, γ -tocotrienol의 경우에도 24 μL 사용에 의해 약 90%에 이르는 DPPH 라디칼 제거 활성을 나타냈었다. Linoleic acid의 경우에는 약 30% 정도의 DPPH 라디칼 제거 활성을 나타냈어 항산화활성은 크지 않는 것으로 나타났다. 그러나 policosanol의 경우에는 농

도가 증가할수록 DPPH 라디칼 제거 활성은 떨어지는 것으로 나타났다. (Fig. 13)

- 각 유효성분의 DPPH radical 소거 활성 정도는 DPPH radical 50 % 저해 농도인 RS₅₀ 값으로 나타냈으며, 결과는 ABTS radical 50 % 저해 농도와 비교하여 Table 1 에 나타내었다. γ -tocotrienol의 RS₅₀값은 0.033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 α -tocopherol (RS₅₀=1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에 비해 약 37 배 높았다. Oureshi (10)등에 따르면 γ -tocotrienol은 tocopherol 보다 30~60배 정도로 높은 DPPH radical 저해 효과를 가지며, 본 연구 결과에서도 유사한 활성을 나타내었다. γ -oryzanol의 RS₅₀값은 0.915 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 α -tocopherol과 유사한 활성을 나타내었고, Linoleic acid 는 DPPH radical 소거 활성을 나타내지 않았다.
- 각 유효성분의 ABTS radical 소거 활성 정도는 DPPH radical 50 % 저해 농도와 마찬가지로 RS₅₀값으로 나타냈으며, ABTS radical 소거 활성 결과는 Table 1과 같다. γ -tocotrienol의 RS₅₀값은 0.042 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 ascorbic acid와 동일한 저해 활성을 나타냈으며, γ -oryzanol의 RS₅₀값은 0.54 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 ascorbic acid 보다 다소 낮은 저해활성을 나타냈다. Linoleic acid는 ABTS radical 소거 활성을 나타내지 않았다.

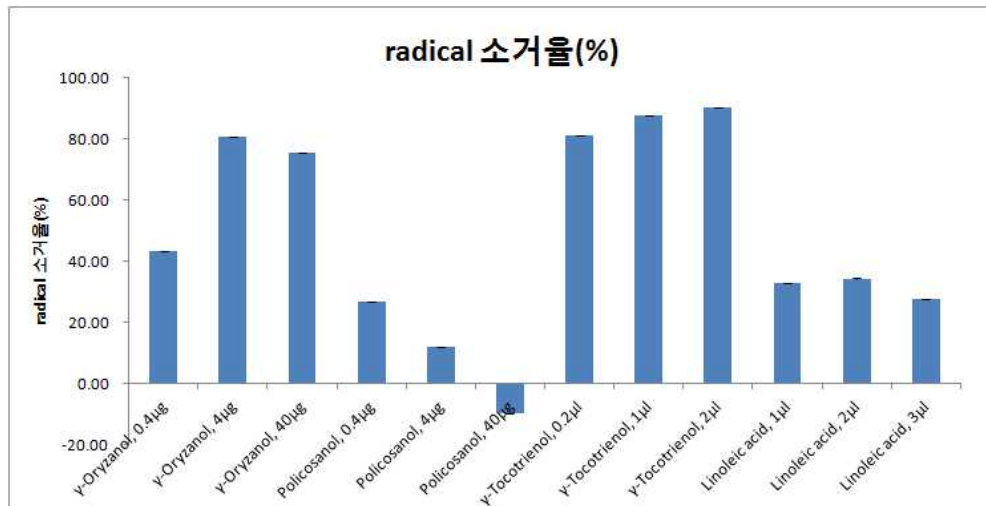


Fig. 13 강 유효성분에 의한 DPPH radical 소거율

Table 1. Comparison of antioxidant activity as determined by the DPPH and ABTS assays from active components.

Antioxidant activity ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			
Components	DPPH(RC ₅₀)	Components	ABTS(RC ₅₀)
α -tocopherol	1.25 \pm 0.002	L-ascorbic acid	0.042 \pm 0.013
γ -tocotrienol	0.033 \pm 0.446	γ -tocotrienol	0.042 \pm 0.138
γ -oryzanol	0.915 \pm 0.271	γ -oryzanol	0.54 \pm 0.325
Linoleic acid	-	Linoleic acid	-

나. 항균활성

(1) 여드름 균 저지 활성 시험방법

(가) 균주 : *Staphylococcus aureus*(NA 배지)

(나) 방법

- ① NA배지에 3차 도말을 한 후 30°C, 48h 배양한 후 NB에 2% 접종하여 2시간에 한번씩 660 nm에서 O.D값을 측정한 뒤, 균이 제일 활성을 띄는 0.8~1.0 사이의 범위 안에 들어왔을 때 NA배지에 100 μl 씩 분주하여 도말한 후 각각의 샘플을 Disk에 70 μl 씩 분주한 후 배지에 올려 30°C, 48h 배양하였다.
- ② 사용한 샘플은 초임계 이산화탄소 추출 미강유 (7 μl , 0.7 μl , 0.014 μl , 0.007 μl /70 μl), 헥산 추출물 (7 μl , 0.7 μl , 0.014 μl , 0.007 μl /70 μl), γ -Tocotrienol (0.7 μl , 0.07 μl , 0.0014, 0.007 μl /70 μl)이며, 각 농도별로 1, 2, 3, 4로 지정하였다.
- ③ 모든 샘플의 Blank(B)는 D.W이고, 초임계 이산화탄소 추출물과 헥산추출물의 Control(C)은 DMSO이며, γ -Tocotrienol의 Control(C)은 99% EtOH이었다.

(다) 결과

- 초임계 추출물에서 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성이 나타났으며, γ -Tocotrienol의 경우 뛰어난 항균활성을 나타내었다.
- 저해되는 정도를 cm로 나타낸 결과, 초임계 추출물의 경우, 농도가 증가할수록 저해 활성이 증가하는 것을 보였다. 그러나 초임계 추출물의 경우, *Staphylococcus aureus*에 대한 저해활성은 나타나지 않았다.

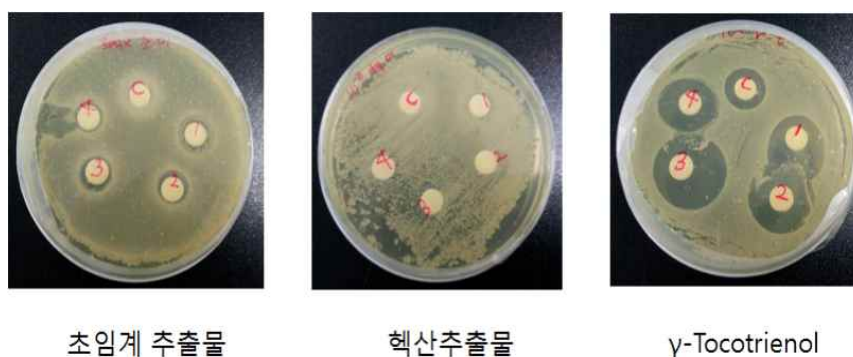


Fig. 14 임계 추출물, 헥산 추출물, 미강유효성분에 의한 여드름 균 저지 활성

Table 2. 초임계 추출물, 헥산 추출물, 미강유효성분에 의한 여드름 균 저지 활성비교

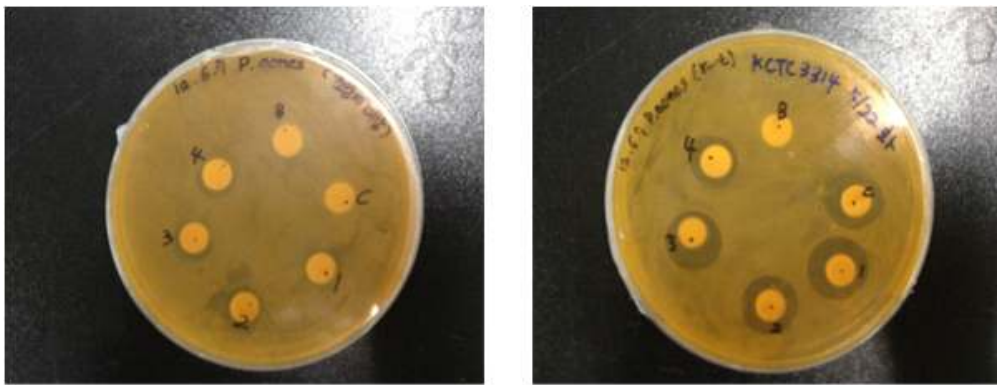
	초임계 추출물	헥산추출물	γ -Tocotrienol
control	-	-	1.6 cm
1	1.3 cm	-	2.1 cm
2	1.2 cm	-	2.3 cm
3	1.1 cm	-	2.6 cm
4	1.0 cm	-	2.3 cm

(2) 비듬균 저지 활성 시험

(가) 사용균주 : *Propionibacterium acnes* (KCTC 3314)(BHI 배지)

(나) 실험방법

- ① BHI배지에 3차 도말을 한 후 37°C, 96h 혐기 배양한 후 BHI broth에 2% 접종하여 2 시간에 한번씩 660 nm에서 O.D값을 측정한 뒤 균이 제일 활성을 띄는 0.8~1.0 사이의 범위 안에 들어왔을 때 BHI배지에 100 μ l씩 분주하여 도말한 후 각각의 샘플을 Disk에 70 μ l씩 분주한 후 배지에 올려 37°C, 96h 배양하였다.
- ② 사용한 샘플은 초임계 이산화탄소 추출 미강유 (7 μ l, 0.7 μ l, 0.014 μ l, 0.007 μ l/70 μ l), 헥산 추출물 (7 μ l, 0.7 μ l, 0.014 μ l, 0.007 μ l/70 μ l), γ -Tocotrienol (0.7 μ l, 0.07 μ l, 0.0014, 0.007 μ l/70 μ l)이며, 각 농도별로 1, 2, 3, 4로 지정하였다.
- ③ 모든 샘플의 Blank(B)는 D.W이고, 초임계 이산화탄소 추출물과 헥산추출물의 Control(C)은 DMSO이며, γ -Tocotrienol의 Control(C)은 99% EtOH이다.



초임계 추출물

γ -Tocotrienol

Fig. 15 임계 추출물, 미강유효성분에 의한 비듬균 저지 활성

(다) 결과

- 비듬균에 대한 저해활성도 또한 초임계 추출물과 γ -Tocotrienol에서 나타났다.

Table 3. 초임계 추출물, 미강유효성분에 의한 비듬균 저지 활성비교

	초임계 추출물	γ -Tocotrienol
control		1.7 cm
1	0.9 cm	1.7 cm
2	1.2 cm	1.5 cm
3	1.1 cm	1.5 cm
4	1.0 cm	1.2 cm

3. 결론

- 미강의 유효성분의 모발각질형성 세포(HaCa T cell)에서의 MTS 검사결과에서는 γ -oryzanol, γ -tocotrienol이 특히 세포의 높은 증식활성을 보였다.
- 초임계 추출물과 그 유효성분인 γ -oryzanol, γ -tocotrienol은 높은 항산화활성도 보이고 있으며, 특히 γ -tocotrienol은 여드름균과 비듬균에 대한 항균활성도 높게 나타내었다.

제 4 절. 효소반응 공정 개발

1. 서론

- 미강의 초임계 추출물의 지방산 및 감마오리자놀 수율을 향상시키기 위한 단계로 효소를 이용한 에스테르교환반응을 유도하는 효소반응 공정을 개발하였다.

가. 효소반응공정 원리

(1) 미강유의 지방산 분포특징

- 전체 TG에서 비율

saturated : monounsaturated : polyunsaturated = 0.73 : 1 : 0.93

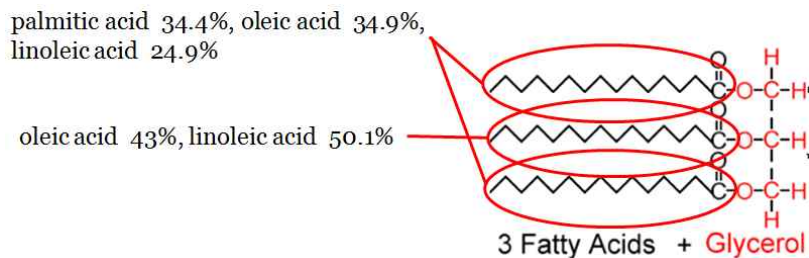


Fig 1. TG에서의 지방산 조성형태

(2) 효소반응공정

- 일반적으로 220℃ 이상의 높은 온도와 금속 촉매 또는 알칼리 촉매를 이용한 조건에서 식용유지를 과량의 글리세롤과 반응시키면, 화학적 에스테르교환 반응이 일어나게 된다. 이 결과 diglyceride(DG)와 monoglyceride(MG) 등이 생산된다. 하지만 화학적 방법에 의한 생성물은 고온의 반응과정과 높은 수율의 혼합물을 얻기 위한 여러 번의 분자증류 과정에 의해서 생성 과정 중 많은 에너지가 소비되며 불포화 지방산들에 의한 중합체 생성 및 색상이 변색되고 이취를 내는 단점을 지니게 된다.
- 위와 같은 화학적 합성의 단점을 보완하기 위하여 효소반응을 통한 합성 방법이 사용되고 있다. 효소적 반응에 의한 합성 방법들은 화학적 방법보다 낮은 온도 상태에서 비교적 높은 수율의 생산물을 얻을 수 있어 정제 비용 및 에너지 소비를 줄일 수 있으며, 더욱이 위치, 기질, 구조 선택성인 효소들을 이용하여 합성하고자 하는 유용 물질을 선택적, 효율적으로 생산 가능하다.
- DG와 MG는 글리세롤 한 분자에 각각 2와 1개의 지방산이 결합되어 있는 형태로 triglyceride(TG)보다 친수성을 가지고 있어 식품의 유화제 및 계면활성제 등으로 사용되고 있으며, 다른 대사 경로를 통하여 간에서 TG보다 빠르게 β-산화 과정을 거쳐 에너지원으로 사용됨에 따라, 혈중지질의 수치를 높이지 않으며 체중 개선 및

비만예방 등과 같은 생리효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

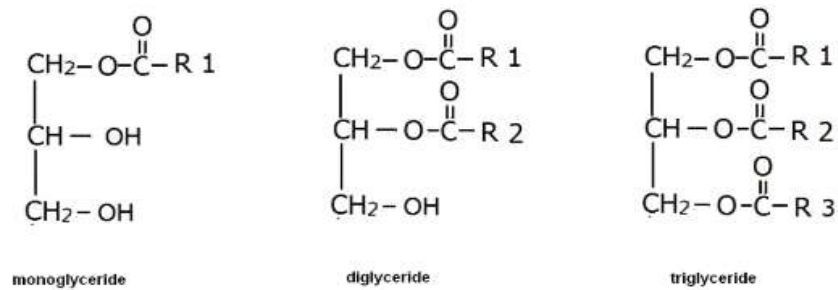


Fig 2. glyceride 형태

- 미강유는 일반적으로 글리세롤 한 분자에 지방산이 3개가 결합되어 있는 트리글리세라이드(triglyceride) 형태를 이루고 있다. 리파아제효소 (TL-IM, RM-IM)는 특정한 사슬에 날카로운 체인구조를 가지고 있어 온도와 압력을 가해주면 트리글리세라이드에 붙어 있는 지방산 가지들을 물리적으로 끊어주어 가수분해 시킨다. 이 가수분해물은 알코올(에탄올)과 에스테르교환반응(transesterification)을 일으키고 글리세롤과 지방산에틸에스터 반응물을 생성한다.

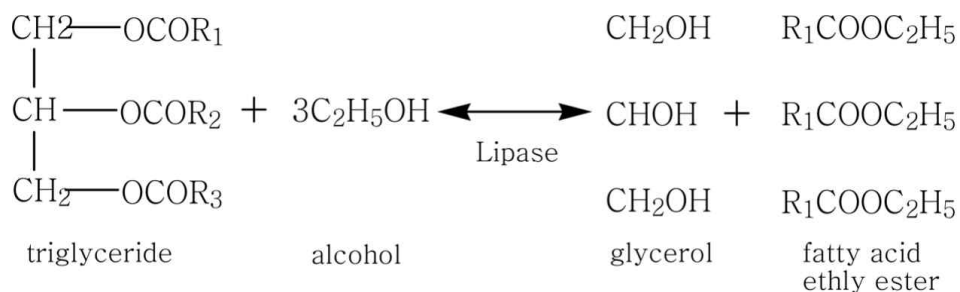


Fig 3. 효소반응공정 반응 메카니즘

(3) 반응생성물의 물리 이화학적 분석 및 향산화 활성

(가) 효소반응생성물 지방산 분석

- 유지를 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란 메탄올 용액을 가하고 가열하여 에스테르화 한다. 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 분석을 행한다. 개별 지방산의 함량 및 대표적인 지방산의 합을 계산하여 포화지방, 단일불포화지방, 다중불포화지방 함량을 분석한다.

2. 실험재료 및 방법

가. 시료

(1) 효소반응공정 확립

(가) 미강 초임계 추출물

- 추출원료: 미강과우더 57kg (피엔라이스, 남평벼·동진1호 외 혼합품종)
- 추출환경: 270bar, 32℃, 2시간
- 추출량: 9.5kg
- 평균분자량: 860 (g/mol)

(나) 효소

- Lipozyme TL-IM (lipase from *Thermomyces lanuginosus*) (Immobilized), 덴마크 Novozymes사 (Cat. No. LA331037)
- Lipozyme RM-IM (lipase from *Rhizomucor miehei*), (Immobilized) 덴마크 Novozymes사 (Cat. No. LUX00214)

(다) 에탄올

- 시료정보: 미강유의 지방산과 글리세롤로 가수분해 후 Tri-glyceride기에 OH기를 제공하고 지방산에 에틸기(R)를 제공하여 미강유 지방산을 에스터물로 치환에 필요(분자량: 46 (g/mol))

(2) 반응생성물의 물리 이화학적 분석 및 항산화 활성

(가) 효소반응생성물 지방산 분석

- 14% 트리플루오로보란메탄올 (Boron trifluoride methanol solution, 14%) (Sigma-Aldrich co.)에서 구입하여 사용하였다.
- 수산화나트륨 (Sodium hydroxid), 염화나트륨 (Sodium chloride), 무수황산나트륨 (Sodium sulfate anhydrous, granular)은 모두 Junsei chemical Co., Ltd에서 구입하여 사용하였다.
- 메탄올 (Methanol, CARLO ERBA Reagenti SpA)에서 구입하여 사용하였다.
- 이소옥탄 (iso-Octane) (Fisher, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.
- Methyl undercanonate approx, 99%, GC (Sigma-Aldrich co.) 에서 구입하여 사용하였다.

(나) DPPH radical 제거 활성

- RM-IM (미1:에3, 미1:에6, 미1:에9, 미1:에12)
- TL-IM (미1:에3, 미1:에6, 미1:에9, 미1:에12)

나. 효소반응 공정

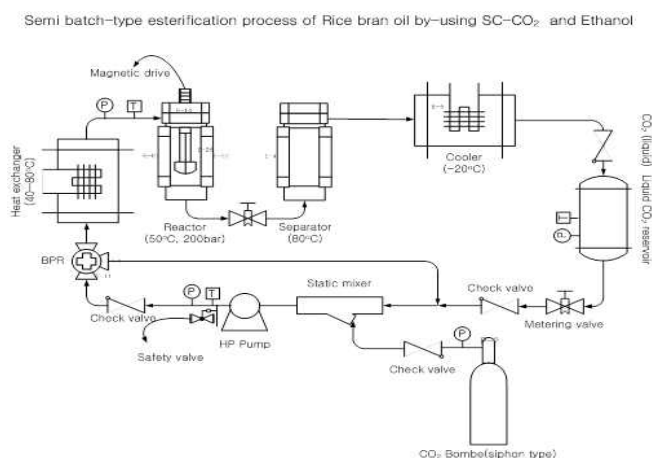


Fig 4. Semi batch-type esterification process of rice bran oil (RBO) by using SC-CO₂ and ethanol.

다. 실험방법

(1) 효소반응공정 확립

- (가) 미강추출물의 효소반응물은 Table 1.과 같은 비율로 제조하였다.
- (나) 반응물을 제조한 후 초임계 장치에서 50°C, 200bar의 환경에서 3시간동안 반응 후 추출하였다.
- (다) 추출물을 농축하여 에탄올을 제거한 후 잔여 글리세린을 감압필터로 제거하였다.

Table 1. 미강추출물에서의 효소반응물 제조

종류	투입량	효소		미강유		에탄올		미강유:에탄올 비율 (mol/mol)
		투입량	mol	투입량 (g)	mol	투입량 (g)		
TL-IM	4.2g(3%)	0.15		129	0.45	20.7	1:3	
				129	0.9	41.4	1:6	
				129	1.35	62.1	1:9	
				129	1.8	82.8	1:12	
RM-IM	4.2(3%)	0.15		129	0.45	20.7	1:3	
				129	0.9	41.4	1:6	
				129	1.35	62.1	1:9	
				129	1.8	82.8	1:12	

* 효소의 투입함량(%)은 미강유 무게에 대한 함량임.

(2) 반응생성물의 물리 이화학적 분석 및 항산화 활성

(가) 효소반응생성물 지방산 분석

- 식품공전 중 (2012) 중식품의 기준 및 규격 제 10.일반시험법 1.1.5.4. 지방산 가. 제 1법에 의하여 실험하였다.

① 시험법 적용범위

- 식용유지류에 적용한다.

② 장치

- 기체크로마토그래프 : 불꽃이온화검출기(FID)
- 교반기(vortex mixer)

③ 시약 및 시액 제조

- 14% 트리플루오로보란메탄올 용액(125 g $\text{BF}_3/\text{L MeOH}$)
- 메탄올성 수산화나트륨용액(0.5 N) : 수산화나트륨 2 g을 메탄올 100 mL로 조제한다. 장시간 방치하는 경우 흰 침전(탄산나트륨)이 생길 수 있으나 이는 무시하여도 된다.
- 이소옥탄 : 기체크로마토그래피용
- 내부표준용액 : undecanoic($\text{C}_{11:0}$) 0.01 g을 이소옥탄용액에 녹여 10 mL가 되게 한다 (1 mg/mL).
- 표준용액 : 각 지방산 메틸 에스테르와 내부표준물질 undecanoic acid 메틸 에스테르를 이소옥탄에 녹여 각각 0.5 mg/mL이 되도록 조제한다.

④ 시험용액의 조제

- 지방 및 유지
 - ㉠ 검체 약 25 mg을 유리 튜브에 정밀히 취하고 내부표준용액 1 mL를 첨가한다. 0.5 N 메탄올성 수산화나트륨용액 1.5 mL를 가하고 질소를 불어넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합한다.
 - ㉡ 100°C heating block에서 약 5분간 가온한다. 이를 냉각한 후 14% 트리플루오로보란 메탄올 용액 2 mL를 가하고 다시 질소를 불어넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합하고 100°C에서 30분간 가온한다.
 - ㉢ 30~40°C로 냉각하여 이소옥탄용액 1 mL를 가하여 질소를 불어넣은 후 뚜껑을 덮고 이 온도에서 30초간 격렬히 진탕한다.
 - ㉣ 다음 즉시 포화 염화나트륨용액 5 mL를 가하고 질소를 불어넣은 후 뚜껑을 덮고 진탕한다.
 - ㉤ 상온으로 냉각한 후 수층으로부터 분리된 이소옥탄층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 시험용액으로 한다.

⑤ 시험조작

- 기체크로마토그래피 조건
 - 지방산 분석시 $\text{C}_{18:3}$ (Linolenic acid, n3 cis)과 $\text{C}_{20:1}$ (Eicosenic acid) 및 $\text{C}_{22:1}$ (Docosaenoic

acid), C_{20:3}(Eicosatrienoic acid)와 C_{20:4} (Arachidonic acid)의 분리도는 1.0 이상이어야 한다.

㉑ 칼럼 : SP-2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 μm) 혹은 이와 동등한 것

㉒ 주입부온도 : 225℃

㉓ 칼럼온도 : 100℃에서 4분간 유지한 후 3℃/min의 비율로 240℃까지 온도를 상승시키고 이후 15분이상 유지한다.

㉔ 검출기온도 : 285℃

㉕ 유량 : 헬륨 0.75 mL/min

㉖ split ratio : 200 : 1

⑥ 장치

- 기체크로마토그래피/불꽃이온화검출기는 Shimadzu Co., Ltd를 이용하였다.
- 기기 : GC-2010 Gas Chromatograph
- Injector : AOC-20i Auto Injector
- Detector : FID

(나) DPPH 라디칼 제거 활성

- 각 시료를 96 well plate (Flacon, USA)에 0.1 mL씩 분주하고 0.4 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 동량 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

$$- \text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = \left(\frac{\text{공시료군} - \text{반응군}}{\text{시료군}} \right) \times 100$$

라. 결과

(1) 효소반응공정 확립

(가). 수율

- 효소반응 공정에서 효소반응 실험결과는 Table 2.와 같다.

Table 2. Reaction yield of ethyl esters of rice bran oil (RBO) by enzymatic hydrolysis reaction using TL-IM and RM-IM, respectively. The mole ratio of ethanol to RBO was 3, 6, 9 and 12, respectively.

<RM-IM>

RBO (g)	Ethanol (g)	Mole ratio	Glycerol (g)	Unreacted and remained ethanol (g)	ethyl esters (g)		Reaction yield (%)
					Theoretical value	Experimental value	
129	20.7	1:3	13.8	-	135.9	67.8	49.8
129	41.4	1:6	13.8	20.7	135.9	101.5	74.6
129	62.1	1:9	13.8	41.4	135.9	103.8	76.3
129	82.8	1:12	13.8	62.1	135.9	56.1	41.2

<TL-IM>

RBO (g)	Ethanol (g)	Mole ratio	Glycerol (g)	Unreacted and remained ethanol (g)	ethyl esters (g)		Reaction yield (%)
					Theoretical value	Experimental value	
129	20.7	1:3	13.8	-	135.9	59.7	43.9
129	41.4	1:6	13.8	20.7	135.9	93.5	68.8
129	62.1	1:9	13.8	41.4	135.9	102.8	75.6
129	82.8	1:12	13.8	62.1	135.9	55.4	40.7

Reaction yield of ethyl esters = (theoretical value / experimental value) × 100

- RM-IM, TL-IM 두 개의 효소 모두 미강:에탄올 비율 1:9 에서 가장 높은 수율을 보였다. 하지만 두 개의 효소 모두 미강:에탄올 비율 1:12 에서 오히려 추출 수율이 감소하였다. 이는 에탄올 과다 투입 시 효소반응 공정에서 생기는 부산물인 H₂O의 양이 많이 생성되어 효소가 유지와 만나 반응을 하는데 방해하기 때문인 것으로 사료된다.
- 또한 효소반응 추출물을 상온으로 방치 후 글리세린을 필터링 하였을 때 필터링 된 글리세린 양이 거의 없었다. 이는 초임계 추출 시 이산화탄소 유체가 반응기 고압에서 대기로 팽창하는 효과로 인해 온도가 낮아져 대부분의 글리세린이 고체가 되어 반응기 안 필터에 효소와 함께 걸러져 나와 효소반응 추출물에는 글리세린이 생성되지 않았던 것으로 사료된다.
- 전체적인 결과로 TL-IM 보다는 RM-IM에서 더 높은 수율을 보였다.
- 본 실험에서는 반응 몰비가 1:6몰인 경우 전환율이 가장 높게 나타났으며, 종래 일반상 효소반응에서보다 비교적 높은 반응 몰비에서 높은 전환율을 나타내는 결과이다. 이는 반응용매 및 기질인 에탄올이 초임계 이산화탄소 기체상에 쉽게 용리되기 때문에 효소가 존재하는 반응 상 (액상)에 비교적 작은양의 에탄올이 존재하게 되어 효소불활성화가 감소하는 것이며, 초임계 유체의 높은 확산성과 낮은 점도 그리고 효소가 존재하는 반응 상으로의 연속적인 기질 공급으로 인해 리파아제의 반응 속도가 증가하였기 때문이다.
- 한편, 효소종류에 대한 영향은 TL-IM 보다 RM-IM 의 효소 영향이 높게 나타났지만 큰 차이는 없었다.

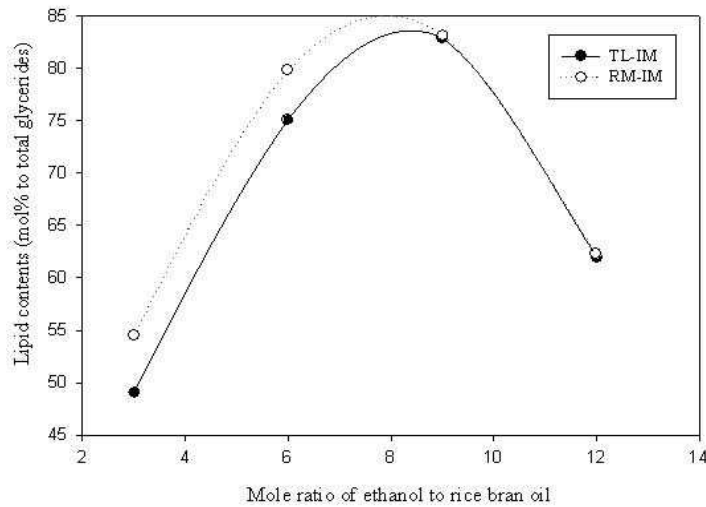


Fig 5. 효소 반응 조건에 따른 지방의 수율

(나) 총 글리세리드 함량 대비 생성된 에틸에스테르의 함량비

- 본 실험은 반응용매비 및 첨가 효소종류에 대한 영향을 알아보기 위해 수행하였으며, 반응 종료후 미강유에 대한 에탄올 함량비를 기준으로 총 글리세리드 함량 대비 생성된 에틸에스테르의 함량비를 나타낸 결과이다.

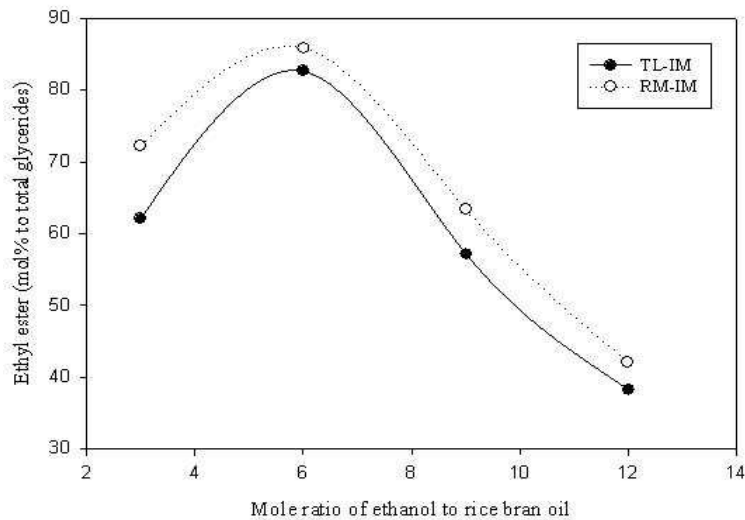


Fig 6. 총 글리세리드 함량 대비 생성된 에틸에스테르의 함량비

- 반응결과 반응몰비에 따라 전환율은 62.1, 82.7, 57.2, 38.3(TL-IM), 72.2, 85.9, 63.4, 42.1(RM-IM)순으로 나타났다.
- 에탄올효소분해반응은 1:3몰 반응이 이론값이지만 에탄올효소반응 자체가 가역반응을 수반하기 때문에 전체적으로 소비되는 에탄올량은 부족하여 전환율이 높지 않다. 반면 에탄올 함량이 과량 투입될 경우 기질과 효소간의 접촉 효율이 떨어져 반응표면적이 감소하므로 더 많은 반응 시간을 요구하게 된다. 이는 에탄올의 과량 첨가 시, 반응 속도가 급격히 감소하는 기질 저해 반응 현상이며 효소는 비가역적으로 불활성화 (dead-end

inhibition) 되기 때문이다.

(다) 총 글리세리드 함량 대비 생성된 유리지방산 함량비

- 본 실험은 반응용매비 및 첨가 효소종류에 대한 영향을 알아보기 위해 수행하였으며, 반응 종료후 미강유에 대한 에탄올 함량비를 기준으로 총 글리세리드 함량 대비 생성된 유리지방산 함량비를 나타낸 결과이다.

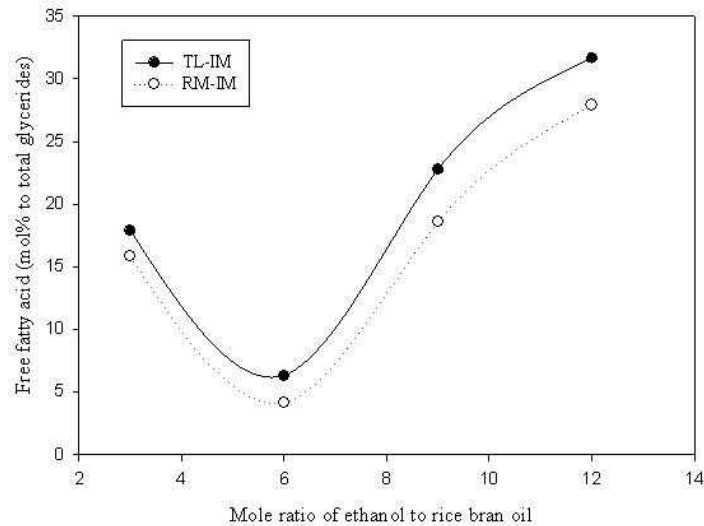


Fig 7. 총 글리세리드 함량 대비 생성된 에틸에스테르의 함량비

- 반응결과 반응몰비에 따라 유리지방산함량은 17.9, 6.3, 22.8 31.7(TL-IM), 15.8, 4.1, 18.6, 27.9(RM-IM)순으로 나타났다. 에탄올효소분해반응에서 기질인 아실트리글리세라이드는 효소에 의해 아실그룹을 공격받아 지방산이 분리되고 분리된 지방산에 에탄올의 에틸기가 치환되어 에틸에스테르가 생성된다. 이중 미반응 지방산은 반응종료후에도 유리지방산으로 존재한다.
- 본 실험의 경우 에탄올 반응몰비가 1:6몰에서 가장 낮은 값을 나타내었으며 그 이상의 몰수에서는 에스테르교환반응보다 가수분해 반응이 주를 이루므로 유리지방산 함량이 증가하는 추세를 나타내었다.

(라) HPLC profile

- RM-IM으로 효소반응을 진행한 결과 미강 초임계 추출물의 HPLC 분포변화를 나타내었다.

(마) 물성

- 추출 전 미강유는 상온에서 고체의 왁스상태였지만 추출 후 에스테르 반응추출물은 상온에서 액체 상태로 유지되었고, 5°C로 냉장하였을 때 왁스형태로 굳는 물성을 지녔다.
- 본 연구에서 제조한 효소반응 생성물의 물성은 Fig 8.와 같다.



Fig 8. 반응생성물의 상온 및 냉장보관시의 물성

(2) 반응생성물의 물리 이화학적 분석 및 항산화 활성

(가) 효소반응생성물 지방산 분석

Table 3 효소반응생성물의 지방산 함량

지방산명	초임계 미강유	RM-IM 미1:에3	RM-IM 미1:에6	RM-IM 미1:에9	RM-IM 미1:에12	TL-IM 미1:에3	TL-IM 미1:에6	TL-IM 미1:에9	TL-IM 미1:에12
CaprylicAcid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LauricAcid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MyristicAcid	0.22	0.11	0.12	0.12	0.13	0.14	0.12	0.12	0.11
Pentadecanoic acid	0.0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
PalmiticAcid	13.86	9.32	9.31	9.05	9.25	8.46	8.99	9.23	8.85
PalmitoleicAcid	0.14	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06
HeptadecanoicAcid	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
StearicAcid	1.06	0.70	0.64	0.64	0.68	0.66	0.65	0.64	0.66
OleicAcid	34.16	23.95	22.55	22.10	22.21	25.07	22.30	22.28	24.20
Linoleic Acid	32.30	23.69	22.52	21.76	21.85	25.19	21.83	21.96	21.63
ArachidicAcid	0.33	0.27	0.24	0.24	0.23	0.23	0.24	0.23	0.25
cis-11-Eicosenoic Acid	0.39	0.30	0.26	0.26	0.26	0.30	0.27	0.26	0.27
Linolenic Acid	1.19	0.75	0.73	0.69	0.70	0.81	0.69	0.71	0.68
Heneicosanoic Acid	0.0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03
cis-11,14-Eicosadien oic Acid	0.11	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
Behenic Acid	0.0	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08
Erucic acid	0.0	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02
cis-11,14,17-Eicosatri enoic Acid	0.0	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01
Arachidonic Acid	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Lignoceric Acid	0.24	0.12	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11
Nervonic Acid	0.0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
cis-4,7,10,13,16,19-Do cosahexaenoic Acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
합계(g/100 oil)	84.07	59.53	56.77	55.24	55.69	61.26	55.47	55.81	57.04

(나) 효소반응물의 산가

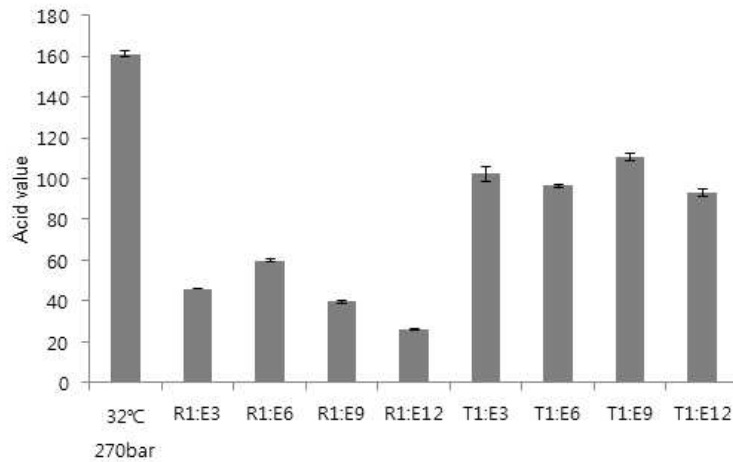


Fig 9. The acid value of ethyl esters prepared with 3, 6, 9 and 12 of mole ratio of ethanol to RBO using 3% RM-IM and TM-IM, respectively.

(다) 효소반응물의 감마오리자놀 함량

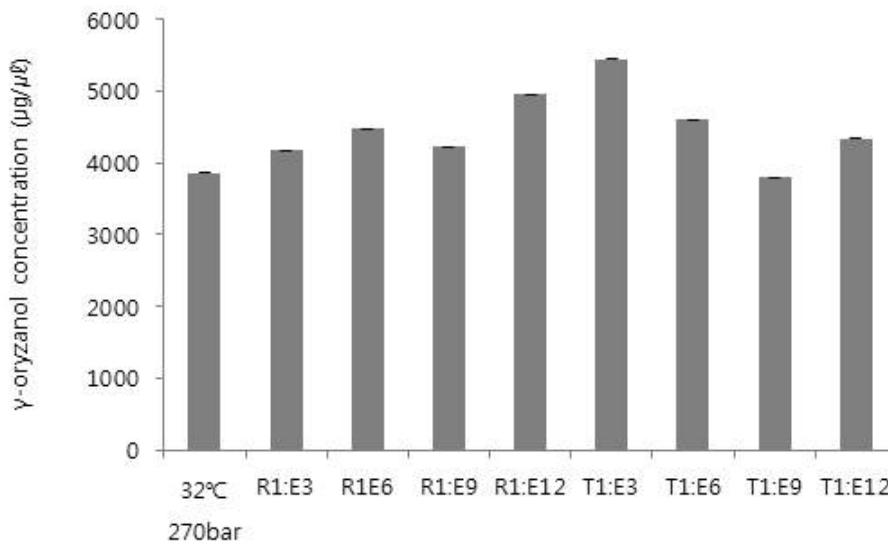


Fig 10. The γ -oryzanol content of ethyl esters prepared with 3, 6, 9 and 12 of mole ratio of ethanol to RBO using 3% RM-IM and TM-IM, respectively.

(라) DPPH 라디칼 제거 활성 결과

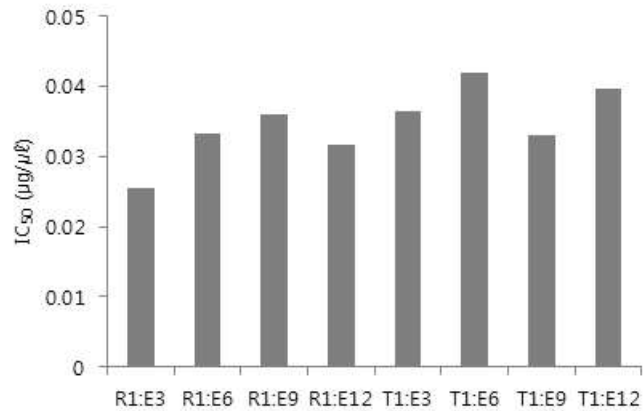


Fig 11. The IC₅₀ of DPPH radical scavenging activity of ERBO prepared by enzymatic esterification by RM-IM and TM-IM at different mole of ethanol to RBO. The mole ratio of ethanol to RBO was 3, 6, 9 and 12. The IC₅₀ of DPPH radical scavenging effect of RBO was 0.035µg/µL.

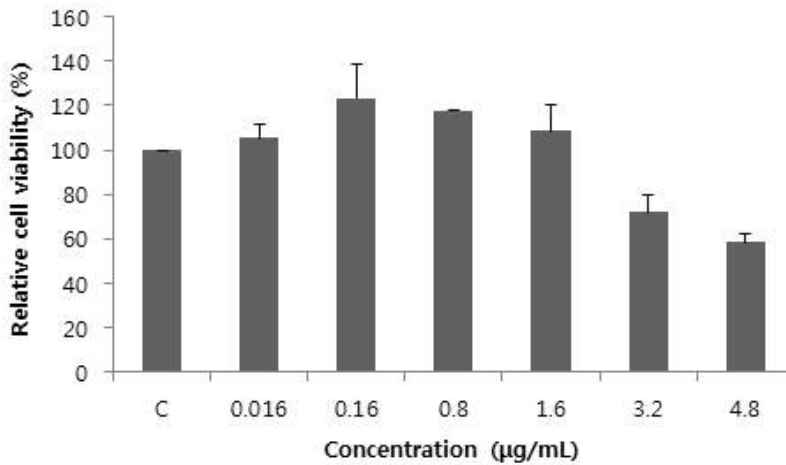


Fig 12. Effect of (RM 1:3) of RBO at concentrations of 0.16, 0.32, 0.8, 1.6, or 3.2 µg/mL on the viability of RAW 264.7 cells after 24 h of treatment as measured by the MTS assay.

* Denotes a significant difference from controls at $P < 0.05$.

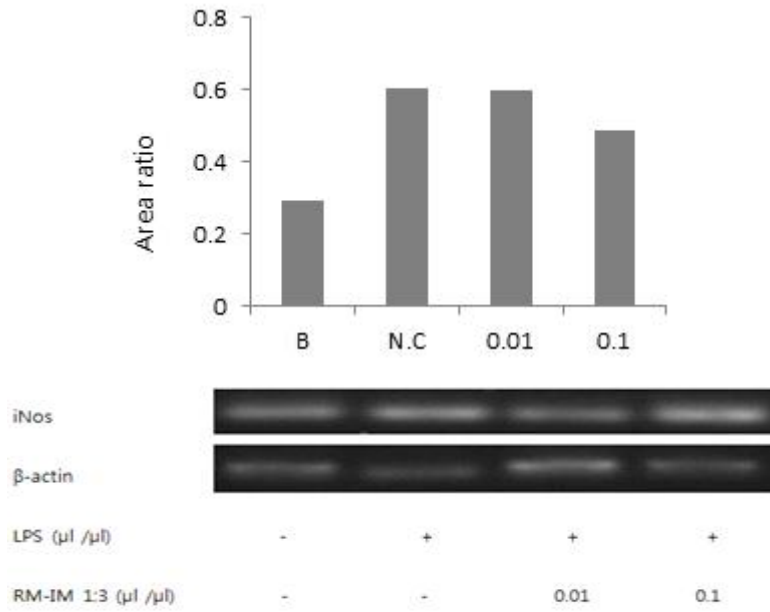


Fig 13. The anti-inflammatory effect of RM-IM 1:3 hydrolysate of RBO was examined evaluating its suppression effect on iNOS mRNA expression.

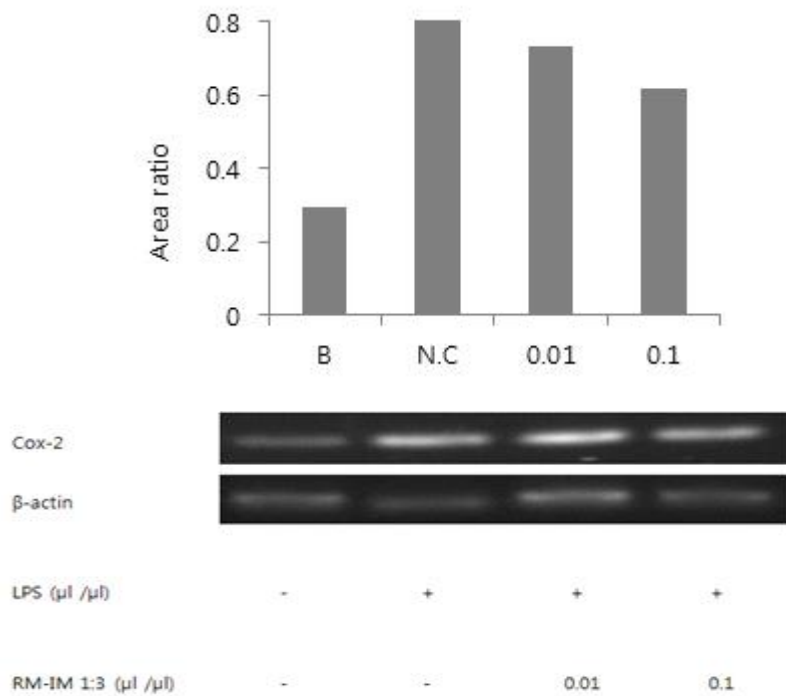


Fig 14. The anti-inflammatory effect of RM-IM 1:3 hydrolysate of RBO was examined evaluating its suppression effect on Cox-2 mRNA expression.

- 효소반응 공정개발 결과 TG 및 지방산 함량의 수율은 매우 낮으며, 항산화 활성 또한 초임계 추출물에 비해 많이 떨어지고 있어 향후 최적화 공정이 필요하나, 본 연구에서는 공정단위의 생성이 생산단가와 연관되므로 차후 초임계 추출물로 최적화 공정 및 제품화 단계를 진행하였다.

제 5 절. 초임계 추출물의 대량생산 공정개발

1. 실험방법

가. 1L Pilot scale에서 추출조건 최적화

- 초임계 추출은 온도와 압력에 의해 이산화탄소의 초임계점을 유도하여 추출하는 방법이다. 그러나 1L pilot scale에서는 조작 조건을 32°C, 270 bar로 setting을 하면, 압력은 일정한 압력은 유지하나 온도 variation이 다소 있는 것이 관찰되었다. 따라서 온도 변화에 따른 추출조건의 안정화를 확인할 필요가 있었다.

(1) 추출조건의 최적화를 위한 디자인

일정 압력 270bar에서 32±1°C의 온도(31, 32, 33, 35°C) variation으로 3회 반복 실험결과, 지표성분의 유의적 편차를 확인하였다.

나. 대량 추출 공정 개발

* 추출조건

- 추출원료: 미강파우더 57kg
- 추출환경: 270bar, 32°C, 2시간 (진남나노바이오센터에 의뢰)
- 추출량: 9.5kg (추출수율: 약 16.6%)

다. 대량 추출 생산물의 무균 Test

(1) Filter

- Filter는 Satorius stedim biotech co.을 사용하였다.

Table 1. 사용한 filter의 종류 및 특징

filter	order no.	feature of product
filter-1	17575 ACK	With 0.2 µm membrane, pack of 50, sterile, individually packed
filter-2	16532 K	0.2 µm, pack of 50, sterile, individually packed

(2) 무균 Test

① 균주 : Staphylococcus aureus

② 방법

- NA 배지에 3차 도말을 한 후 30°C, 48h 배양한 후 NB에 2% 접종하여 2시간에 한번씩 660 nm에서 O.D값을 측정한 뒤, 균이 제일 활성을 띠는 0.8~1.0 사이의 범위 안에 들어왔을 때 MRS배지에 100 µl씩 분주하여 도말한 후 각각의 샘플을 3차 도말 하였다.

- 사용한 샘플은 scale up 한 초임계 미강 추출물과 scale up-filter 초임계 미강 추출물을 사용하였다.

라. 저장 온도 및 시간에 따른 산화 안정성 Test

* 실험재료

- 각 온도별(-20, 4, 18, 60℃)로 저장 된 초임계 미강 추출물
- 각 시간별(0, 1.5, 3, 4.5, 6 month)로 저장 된 초임계 미강 추출물

2. 결과

가. 1L Pilot scale에서 추출조건 최적화

(1) 온도 조건에 따른 지방산 함량의 편차 비교

Table 2. 온도 조건에 따른 지방산 함량

지방산명	270- 31A	270- 31B	270- 31C	270- 32A	270- 32B	270- 32C	270- 33A	270- 33B	270- 33C	270- 35A
MyristicAcid	0.14	0.14	0.17	0.18	0.15	0.17	0.17	0.16	0.17	0.16
Pentadecanoic acid	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
PalmiticAcid	10.58	10.62	11.29	11.59	10.91	11.44	11.46	11.57	11.43	11.42
PalmitoleicAcid	0.08	0.08	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09
HeptadecanoicAcid	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
StearicAcid	0.69	0.70	0.64	0.66	0.68	0.68	0.68	0.71	0.68	0.72
OleicAcid	27.42	27.69	26.48	27.18	27.36	27.58	27.35	28.46	27.52	28.15
Linoleic Acid	25.97	26.17	25.95	26.63	26.25	26.65	26.52	27.37	26.73	26.81
ArachidicAcid	0.24	0.24	0.20	0.21	0.23	0.22	0.22	0.23	0.22	0.24
cis-11-Eicosenoic Acid	0.30	0.30	0.26	0.27	0.29	0.28	0.28	0.30	0.28	0.30
Linolenic Acid	0.86	0.87	0.90	0.92	0.89	0.91	0.91	0.93	0.92	0.90
Heneicosanoic Acid	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
cis-11,14-Eicosadieno ic Acid	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Behenic Acid	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07
Erucic acid	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Arachidonic Acid	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
Lignoceric Acid	0.11	0.11	0.08	0.08	0.10	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10
Nervonic Acid	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
cis-4,7,10,13,16,19-Docosa hexaenoic Acid	0.01	0.01	0.01	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
합계(g/100 oil)	66.61	67.13	66.28	68.05	67.20	68.33	67.98	70.15	68.34	69.13

Table 3. 온도 변화에 따른 지방산 함량의 재현성

(g/ 100g oil)										
지방산명	조건	A	B	C	평균	표준편차	CV(%)	평균	표준편차	CV(%)
Palmitic Acid	270-31	10.58	10.62	11.29	10.83	0.33	3.01	11.2	0.4	3.4
	270-32	11.59	10.91	11.44	11.31	0.29	2.58			
	270-33	11.46	11.57	11.43	11.49	0.06	0.52			
	270-35	11.42	-	-	11.42	0.00	0.00			
Oleic Acid	270-31	27.42	27.69	26.48	27.20	0.52	1.91	27.5	0.5	1.9
	270-32	27.18	27.36	27.58	27.37	0.16	0.60			
	270-33	27.35	28.46	27.52	27.78	0.49	1.76			
	270-35	28.15			28.15	0.00	0.00			
Linoleic Acid	270-31	25.97	26.17	25.95	26.03	0.10	0.38	26.5	0.4	1.6
	270-32	26.63	26.25	26.65	26.51	0.18	0.69			
	270-33	26.52	27.37	26.73	26.87	0.36	1.35			
	270-35	26.81			26.81	0.00	0.00			

Table 4. 온도 변화에 따른 감마오리자놀 함량의 재현성

시료명	농도(µg/ml)	평균	표준편차	CV	전체 평균	전체 표준편차	전체 CV값
31℃ 270bar-A	2751.397	2874.3	212.88	7.4	2747.49	345.78	12.6
31℃ 270bar-B	2751.397						
31℃ 270bar-C	3120.112						
32℃ 270bar-A	2893.855	2916.2	102.40	3.5			
32℃ 270bar-B	2826.816						
32℃ 270bar-C	3027.933						
33℃ 270bar-A	2597.765	2531.6	562.97	22.2			
33℃ 270bar-B	3058.659						
33℃ 270bar-C	1938.547						
35℃ 270bar	2508.38	-	-	-			

나. 대량 추출 공정 개발

(1) 지방산 조성 분석

Table 5. 대량 추출 공정에서 지방산 함량

지방산명	270-32	scale up
MyristicAcid	0.18	0.13
Pentadecanoic acid	0.02	0.02
PalmiticAcid	11.59	9.96
PalmitoleicAcid	0.10	0.08
HeptadecanoicAcid	0.03	0.02
StearicAcid	0.66	0.70
OleicAcid	27.18	27.06
Linoleic Acid	26.63	25.25
ArachidicAcid	0.21	0.27
cis-11-Eicosenoic Acid	0.27	0.31
Linolenic Acid	0.92	0.81
Heneicosanoic Acid	0.03	0.03
cis-11,14-Eicosadienoic Acid	0.02	0.02
Behenic Acid	0.06	0.10
Erucic acid	0.01	0.02
Arachidonic Acid	0.01	0.01
Lignoceric Acid	0.08	0.18
Nervonic Acid	0.02	0.02
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	0.04	0.01
합계(g/100 oil)	68.05	65.01

(2) 리놀렌산 함량 분석 결과

Table 6. 대량 추출 공정에서 리놀렌산 함량

조건	평균 함량 (g/100 oil)
31C270	26.03 ±0.10
32C270	26.51 ±0.18
33C270	26.87 ±0.36
35C270	26.81
scale up 1차	25.25
scale up 2차	28

(3) 감마오리자놀 함량

Table 7. 대량 추출 공정에서 감마오리자놀 함량

시료명	농도(µg/ml)
270-32	2893.855 ±214.15
Scale up 1차	19016.760 ±2401.82
Scale up 2차	28

다. 대량 추출 생산물의 무균 Test

(1) 지방산 조성 분석

Table 8. 무균 조작에 의한 지방산 함량 변화

지방산명	filtering 전	filter-1	filter-2
MyristicAcid	0.13	0.16	0.16
Pentadecanoic acid	0.02	0.03	0.02
PalmiticAcid	9.96	9.98	9.99
PalmitoleicAcid	0.08	0.10	0.10
HeptadecanoicAcid	0.02	0.03	0.03
StearicAcid	0.70	0.82	0.83
OleicAcid	27.06	26.55	26.67
Linoleic Acid	25.25	24.30	24.41
ArachidicAcid	0.27	0.32	0.32
cis-11-Eicosenoic Acid	0.31	0.37	0.37
Linolenic Acid	0.81	0.88	0.88
Heneicosanoic Acid	0.03	0.03	0.03
cis-11,14-Eicosadienoic Acid	0.02	0.02	0.02
Behenic Acid	0.10	0.11	0.12
Erucic acid	0.02	0.02	0.02
cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid	0.00	0.02	0.02
Arachidonic Acid	0.01	0.04	0.04
Lignoceric Acid	0.18	0.22	0.22
Nervonic Acid	0.02	0.02	0.03
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	0.01	0.01	0.01
합계(g/100 oil)	65.01	64.02	64.29

(2) 감마오리자놀 함량 분석

Table 9. 무균 조작에 의한 감마오리자놀 함량 변화

시료명	농도(µg/ml)
Filtering 전	19016.760 ±2401.82
Filter-1	23541.899 ±330.7
Filter-2	24581.006 ±785.63

(3) 무균 test 결과

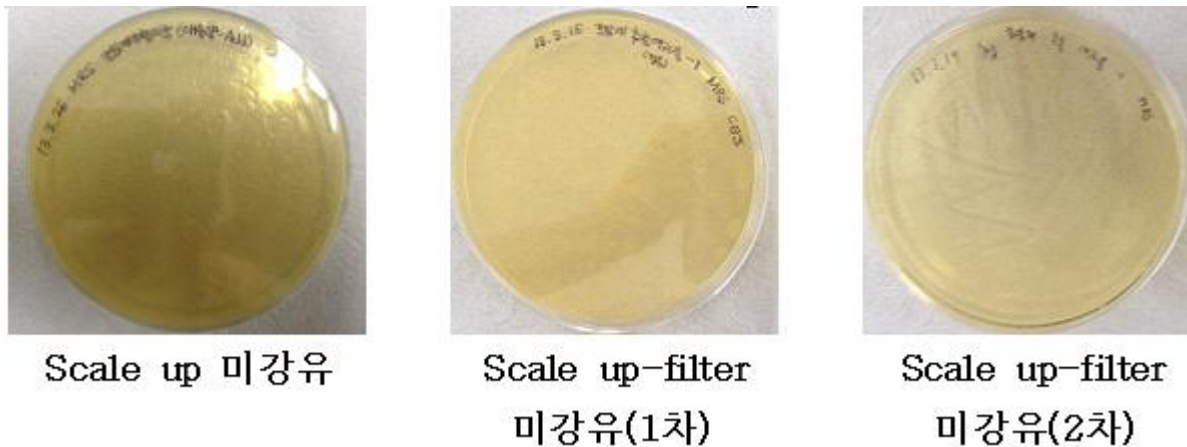


Fig 1. 대량 추출 생산물 및 filtering에서의 무균 Test

라. 저장 온도 및 시간에 따른 산화 안정성 Test

- 저장온도에 따른 산화 안정성을 평가하기 위해 각 저장 온도에서 시간에 따른 지표성의 함량 변화와 산가를 측정하였다.

3. 결론

가. 1L Pilot scale에서 추출조건 최적화

- Pilot scale에서 온도 variation에 의한 변화는 주요지방산의 경우 CV 값이 5 % 이내로 큰 차이가 없다는 것이 확인되었으며, 감마오리자놀의 경우 CV값이 약 13%를 나타내어 온도에 따른 변화양상을 보였다. 그러나 32℃의 경우에는 CV값이 3.5%로 5%이내의 값을 나타내었다. 따라서 온도는 32℃에 가능한 한 맞추어야 할 것이며, 이 온도에 의한 감마오리자놀의 함량은 다소 변화가 야기된다고 판단된다.

나. 대량 추출 공정 개발

- TG 및 리놀렌산의 함량의 변화는 거의 없으나 감마오리자놀 농도가 특별히 증가하여 이에 대한 반복실험의 필요성이 대두되었다.

다. 대량 추출 생산물의 무균 Test

- 무균상태를 위해 가열살균을 할 수 없어 기름상을 여과할 수 있는 소수성 filter를 선택하여 무균화 작업을 실시하였다. 그 결과 filtering에 의해 지방산 조성 및 감마오리자놀의 함량의 변화가 없음을 확인할 수 있었다.
- 무균 test에서는 호기성 균을 대상으로 scale up에서는 아무것도 관찰되지 않았고, 여과한 초임계 미강 추출물에서 균 형태의 결과물(1차)이 보여 1 colony를 획득한 후 다시 3차 도말(2차)을 시행하였다. 그러나 균이 자라지 않았다. 아마도 왁스 성분이 배지 위에서 균은 것으로 사료된다.

제 6절. 초임계 추출물의 지표물질 설정 및 분석 방법 확립

1. 지표물질 설정

- 초임계 추출물의 in vitro, in vivo 생리활성 검정을 통해 확인된 리놀렌산과 감마오리자놀을 지표성분으로 설정하고 이들의 기준 설정 및 분석방법을 확립하기 위한 연구를 진행하였다.
- 초임계 미강 추출물의 기준 및 시험방법은 다음과 같다.

Table 1. 기준 및 시험방법의 요약

시험항목		기준	시험방법	참고
성상		노란색의 왁스형태	육안 관찰	대한약전
확인	리놀레산	검액 및 표준액의 크로마토그램에서 리놀레산의 피크 유지시간은 일치해야 한다.	가스 크로마토그래피	식품공전 일반시험법 지방산분석법
	감마 오리자놀	파장 231±2nm, 291±2nm 및 315±2nm에서 흡수극대를 나타낸다	UV 스펙트럼	의약품 기준 및 시험방법 감마오리자놀 확인시험 1항
굴절률		1.470 ~ 1.473	굴절계	대한약전 일반시험법 굴절률
비누화가		60- 110	검화가	식품공전 일반시험법 비비누화물
비중		0.916 ~ 0.922	비중계	대한약전 일반시험법 비중
산가		120 이하	유리지방산 적정(산염기적정)	식품공전 일반시험법 산가
요오드가		90 ~ 110	요오드 적정(역적정)	식품공전 일반시험법 요오드가
납		2 ppm 이하	유도결합플라즈마 분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 납 시험법
비소		2 ppm 이하	유도결합플라즈마 분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 비소시험법
정량	리놀레산	22 ~ 28 g / 100 g	가스크로마토그래피	식품공전 일반시험법 지방산분석법
	감마 오리자놀	1730 ~ 3730 mg	흡광도 측정	대한약전. 자외가시부흡광도측정법

○ 시험 방법

1.1 성상

- 1.1.1 대한약전 통칙 29에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체는 노란색의 왁스형태 이어야 한다.

1.2 확인시험

- 1.2.1 함량시험법 중 리놀레산 정량법에 따라 시험할 때 검액 및 표준액의 크로마토그램에서 리놀레산의 피크 유지시간은 일치해야 한다.

- 1.2.2 의약품 기준 및 시험방법 감마 오리자놀 확인시험 1)에 따라 다음과 같이 시험할 때 파장 231±2 nm, 291±2 nm 및 315±2 nm에서 흡수극대를 나타낸다.

- 1.2.2.1 검체를 클로로포름(1→100,000)에 녹이고 흡광도를 측정한다

1.3 굴절률

1.3.1 대한약전 일반시험법 6. 굴절률 측정법에 따라 시험할 때 20℃에서 검체의 굴절률 n_D^{20} 는 1.470 ~ 1.473범위 이내이어야 한다.

1.4 비누화가

1.4.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.2 비누화법에 따라 시험할 때 검체의 비누화가는 60 ~ 110 사이 이어야 한다.

1.4.1.1 분석원리 : 지질 1 g중의 유리산의 중화 및 에스테르의 검화에 필요한 수산화칼륨의 mg수이다.

1.4.1.2 시험조작

1.4.1.2.1 검체 1~2 g을 200 mL의 플라스크에 정밀히 달아 넣고 0.5 N 수산화칼륨·에탄올용액 25 mL를 정확히 가한다.

1.4.1.2.2 이에 갈아 맞춘 작은 환류냉각관 또는 공기 냉각기로써 길이 약 75 cm, 직경 7 mm의 유리관을 달고 수욕 중에서 때때로 흔들며 저으면서 30분간 가열한다.

1.4.1.2.3 다음 페놀프탈레인시액을 지시약으로 하여 즉시 0.5 N 염산으로 과잉의 수산화칼륨을 적정한다.

1.4.1.2.4 같은 방법으로 0.5 N 수산화칼륨·에탄올용액 25 mL 를 가지고 공시험을 한다.

1.4.1.3 계산방법

$$\text{비누화가} = 28.05 \times (b - a) \times f / S$$

a: 검체를 사용했을 때의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)

b: 공시험에 있어서의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)

S: 검체의 채취량 (g)

F: 0.5 N 염산의 역가

1.5 비중

1.5.1 대한약전 일반시험법 20. 비중 및 밀도측정법에 따라 시험할 때 25℃에서 검체의 비중은 0.916 ~ 0.922 범위 이내이어야 한다.

1.6 산가

1.6.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.1 산가에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체의 산가는 120 이하 이어야 한다.

1.6.1.1 분석원리 : 산가라 함은 지질 1 g을 중화하는데 필요한 수산화칼륨의 mg 수를 말하며, 산가는 지방산이 글리세라이드로서 결합형태로 있지 않은 유리지방산의 양을 나타낸다.

1.6.1.2 시험조작

1.6.1.2.1 검체 5 ~ 10 g을 정밀히 달아 마개달린 삼각플라스크에 넣고 중성의 에탄올·에테르 혼액(1:2) 100 mL를 넣어 녹인다.

1.6.1.2.2 2% 알칼리블루-6B를 지시약으로 하여 엷은 홍색이 30초간 지속할 때까지 0.1N 에탄올성수산화칼륨용액으로 적정한다.

1.6.1.2.3 같은 방법으로 에탄올·에테르 혼액(1:2) 100 mL을 가지고 공시험을 한다.

1.6.1.3 계산방법

$$\text{산가} = \frac{5.611 \times (a-b) \times f}{S}$$

S : 검체의 채취량(g)

a : 검체에 대한 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 소비량 (mL)

b : 공시험에 대한 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 소비량 (mL)

f : 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 역가

1.7 요오드가

1.7.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.3 요오드가(위스법)에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체의 요오드가는 90 ~ 110사이 이어야 한다.

1.7.1.1 분석원리 : 지질 100 g에 흡수되는 할로겐의 양을 요오드의 g수로 나타낸 것이다.

1.7.1.2 시험조작

1.7.1.2.1 검체 0.2 ~ 0.4 g을 취하여 250 mL의 마개달린 삼각플라스크에 취하고 클로로포름 15 ~ 20 mL를 가한다.

1.7.1.2.2 여기에 일염화요오드시액^(주2) 25 mL를 피펫으로 일정한 속도록 적가한다.

(주2) 일염화요오드시액 : 재승화시킨 요오드 13 g을 초산 1,000 mL에 녹이고 그 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 놓고, 이에 씻은 건조염소를 통하여 다시 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 그 양이 최초의 적정량의 2배가 되도록 한다. 요오드는 약간 과잉의 정도로 한다. 이 시액은 마개달린 갈색유리병에 넣어 파라핀으로 봉하고 사용직전에 연다. 30일 이상 지난 시액은 사용하면 아니된다.

1.7.1.2.3 이 액을 암소에서 1시간 방치한다(예상되는 요오드가가 100이하일 경우 30분 방치할 수도 있다.).

1.7.1.2.4 1N 요오드화칼륨^(주3) 20 mL 및 물 100 mL를 가하여 흔들어서 섞은 다음 유리한 요오드를 0.1N 티오황산나트륨액으로 적정한다(지시약 전분시액^(주4) 1 mL)

(주3) 1N 요오드화칼륨용액 : 요오드화칼륨 16.5g을 물에 녹여 100ml로 한다. 이 액은 차광하여 보존한다.

(주4) 전분시액 : 전분 1g을 찬물과 잘 섞고 이를 열탕 200ml에 저어 섞으면서 천천히 가하고 액이 반투명하게 될 때까지 끓이고 방냉 정지한 다음 상층액을 사용한다.

1.7.1.2.5 같은 방법으로 클로로포름 15~20 mL를 가지고 공시험을 한다.

1.7.1.3 계산방법

$$\text{요오드가} = 1.269 \times (b - a) \times f / S$$

- a: 본 시험에 있어서의 0.1N 티오황산나트륨액의 소비량 (mL)
- b: 공 시험에 있어서의 0.1 N 티오황산나트륨액의 소비량 (mL)
- s: 검체의 채취량(g)
- f: 0.1 N 티오황산나트륨액의 역가

1.8 납

1.8.1 식약청 고시 제 2013-28호 기능성 화장품 기준 및 시험방법 VI. 일반시험법 VI-2. 제제 1. 납시험법 다. 유도결합플라즈마분광기를 이용하는 방법으로 다음과 같이 시험할 때 2.0 ppm이하 이어야 한다.

1.8.2 분석원리 : 시료를 고주파유도코일에 의하여 형성된 알곤 플라즈마에 도입하여 여기된 원자가 바닥상태로 이동할 때 방출되는 발광선 및 발광강도를 측정하여 원소의 정성 및 정량분석에 이용하는 방법이다.

1.8.3 시험조작

1.8.3.1 검액 조제 : 검체 약 0.2 g ~ 0.5 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣는다. 검체를 분해하기 위하여 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL을 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파분해 장치에 장착하고 다음 조작 조건에 따라 무색 ~ 옅은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 조심하여 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량플라스크에 옮기고 물 적당량으로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 물을 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. (다만, 필요에 따라 검체를 분해하기 위하여 사용되는 산의 종류 및 양과 극초단파분해 조건을 바꿀 수 있다.)

<조작조건>

최대파워 : 1000W

최고온도 : 200℃

분해시간 : 약 35분

1.8.3.2 따로 질산 7 mL, 염산 2mL 및 황산 1mL를 가지고 검액과 동일하게 조작하여 공시험액으로 한다.

1.8.3.3 표준액의 조제 : 납 표준원액(1000 µg/mL)에 0.5 % 질산을 넣어 농도가 다른 3가지 이상의 검량선용 표준액을 만든다. 이 표준액의 농도는 액 1 mL당 납 0.01 ~ 0.2 µg 범위내로 한다.

1.8.4 계산방법

1.8.4.1 각각의 표준액을 다음의 조작조건에 따라 유도결합플라즈마분광기(ICP spectrometer)에 주입하여 얻은 납의 검량선을 가지고 검액 중 납의 양을 측정한다.

<조작조건>

파장 : 220.353nm(방해성분이 함유된 경우 납의 다른 특성과장 선택가능)

플라즈마가스 : 아르곤(99.99 v/v% 이상)

1.9 비소

1.9.1 식약청 고시 제 2013-28호 기능성 화장품 기준 및 시험방법 VI. 일반시험법 VI- 제제 4. 비소시험법 다. 유도결합플라즈마분광기를 이용하는 방법으로 다음과 같이 시험할 때 2.0 ppm 이하 이어야 한다.

1.9.2 분석원리 : 시료를 고주파유도코일에 의하여 형성된 알곤 플라즈마에 도입하여 여기된 원자가 바닥상태로 이동할 때 방출되는 발광선 및 발광강도를 측정하여 원소의 정성 및 정량분석에 이용하는 방법이다.

1.9.3 시험조작

1.9.3.1 검액의 조제 : 검체 약 0.2 g ~ 0.5 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣는다. 검체를 분해하기 위하여 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL을 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파 분해 장치에 장착하고 다음 조작조건에 따라 무색 ~ 엷은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 조심하여 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량플라스크에 옮기고 물 적당량으로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 물을 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. (다만, 필요에 따라 검체를 분해하기 위하여 사용되는 산의 종류 및 양과 극초단파의 분해조건을 바꿀 수 있다.)

<조작조건>

최대파워 : 1000W

최고온도 : 200℃

분해시간 : 약 35분

1.9.3.2 따로 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL를 가지고 검액과 동일하게 조작하여 공시험액으로 한다.

1.9.3.3 표준액의 조제 : 비소 표준원액(1000 µg/mL)에 0.5% 질산을 넣어 농도가 다른 3가지 이상의 검량선용 표준액을 만든다. 이 표준액의 농도는 액 1 mL당 비소 0.01 ~ 0.2 µg 범위내로 한다.

1.9.4 계산방법

1.9.4.1 각각의 표준액을 다음의 조작조건에 따라 유도결합플라즈마분광기(ICP spectrometer)에 주입하여 얻은 비소의 검량선을 가지고 검액 중 비소의 양을 측정한다.

<분석조건>

파장 : 193.759nm(방해성분이 함유된 경우 비소의 다른 특성파장 선택가능)
플라즈마가스 : 아르곤(99.99 v/v% 이상)

1.10 리놀레산 정량

1.10.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.4 지방산에 따라 다음과 같이 시험할 때 미강추출물 100g 당 리놀레산 함량은 22 ~ 28g 사이이어야 한다.

1.10.1.1 분석원리 : 유지를 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올 용액을 가하고 가열하여 에스테르화한다. 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 분석하여 리놀레산의 함량을 구한다.

1.10.1.2 시험조작

1.10.1.2.1 검체 약 25mg을 유리 튜브에 정밀히 취하고 내부표준용액^(주5) 1 mL를 첨가한다.

(주5) 내부표준용액 : Triundecanoin(C11:0) 0.01g을 이소옥탄용액에 녹여 10ml가 되게 한다.(1mg/ml)

1.10.1.2.2 이어 0.5N 메탄올성 수산화나트륨용액^(주6) 1.5mL를 가하고 질소를 붙여넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합한다.

(주6) 메탄올성 수산화나트륨용액(0.5N) : 수산화나트륨 2g을 메탄올 100mL로 조제한다. 장시간 방치하는 경우 흰침전(탄산나트륨)이 생길 수 있으나 이는 무시하여도 된다.

1.10.1.2.3 이어 100°C heating block에서 약 5분간 가온한다.

1.10.1.2.4 이를 냉각한 후 14% 트리플루오로보란메탄올 용액^(주7) 2mL를 가하고 다시 질소를 붙여넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합하고 100°C에서 30분간 가온한다.

(주7) 14% 트리플루오로보란메탄올 용액 : 125g BF₃/L MeOH

1.10.1.2.5 이어 30~40°C로 냉각하여 이소옥탄용액 1mL를 가하여 질소를 붙여넣은 후 뚜껑을 덮고 이 온도에서 30초간 격렬히 진탕한다.

1.10.1.2.6 다음 즉시 포화 염화나트륨용액 5mL를 가하고 질소를 붙여넣은 후 뚜껑을 덮고 진탕한다.

1.10.1.2.7 상온으로 냉각한 후 수층으로부터 분리된 이소옥탄층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 시험용액으로 한다.

1.10.1.2.8 다음과 같이 기체크로마토그래피의 조건을 설정할 때 시스템적합성 평가^(주8) 결과는 적합해야 한다.

(주8) 시스템적합성 평가 : 리놀레산 피크와 인접한 피크 사이의

분리도는 1.5이상이어야 한다. 표준액의 6회 반복주입시 리놀레산과 내부표준물질의 면적비에 대한 상대표준편차(%RSD)는 2.0이하이어야 한다.

<조건>

- (1) 칼럼 : SP-2560 (100m*0.25mm*0.2 μ m) 혹은 이와 동등한 것
- (2) 주입부온도 : 225 $^{\circ}$ C
- (3) 칼럼온도 : 100 $^{\circ}$ C에서 4분간 유지한 후 3 $^{\circ}$ C/min의 비율로 240 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시키고 이후 15분 이상 유지한다.
- (4) 검출기온도 : 285 $^{\circ}$ C
- (5) 유량 : 헬륨 0.75mL/min
- (6) split ratio : 200:1

1.10.1.3 계산방법

$$\text{놀레산 (g/100g)} = \frac{Pt/Pti}{Ps/Psi} * \frac{Ws}{Wt} * \frac{Is}{It} * 1.0067 * 0.9524 * 100$$

Pt/Pti : 검액의 크로마토그램에서 얻은 리놀레산 및 내부표준물질의 피크면적 비

Ps/Psi : 표준액의 크로마토그램에서 얻은 리놀레산 및 내부표준물질의 피크면적 비

Ws : 표준액 중 리놀레산의 양(mg)

Wt : 검체량 (mg)

It : 검액 중 내부표준물질의 양(mg)

Is : 표준액 중 내부표준물질의 양(mg)

1.0067 : 내부표준물질의 트리글리세라이드로부터 리놀레산 메틸에스테르의 전환계수

0.9524 : 리놀레산의 지방산 전환계수

100 : 검액 100g 당 리놀레산 함량 보정

1.10.1.4 검액의 대표 크로마토그램

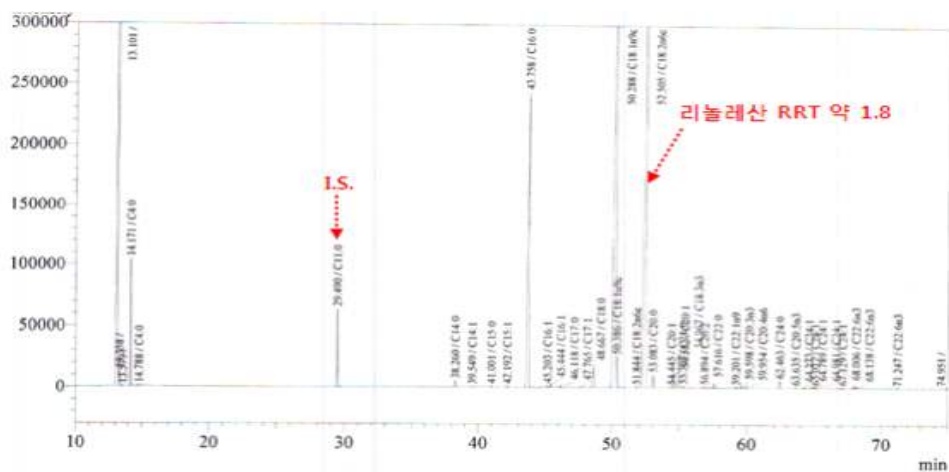


Fig 1. 검액의 대표 크로마토그램

1.11 γ -오리자놀

1.11.1 대한약전 일반시험법 41. 자외가시부흡광도측정법에 따라 다음과 같이 시험할 때 검액의 감마 오리자놀의 함량은 1730 ~ 3730 mg 사이이어야 한다.

1.11.1.1 분석원리 : 측정된 검체의 흡광도 값을 ($\frac{1\%}{1cm}E$) 흡광계수 358 로부터 감마 오리자놀의 함량을 계산한다.

1.11.1.2 분석조작

1.11.1.2.1 검체를 클로로포름에 완전히 녹여 흡광도 값이 1이하가 되도록 한다.

1.11.1.2.2 시료유지 용액이 투명하지 않으면, 0.45 μm 여과지로 여과한다.

1.11.1.2.3 이 용액을 315 nm에서 흡광도를 측정한다.

1.11.1.2.4 클로로포름을 315 nm에서 흡광도를 측정한다.(Blank)

1.11.1.3 계산방법

$$\text{리자놀}(C_{40}H_{58}O_4)\text{의 양}(mg) = \frac{A-B}{358} * 1000mg * \frac{C}{100mL}$$

A: 검액의 흡광도

B: Blank의 흡광도

C: 검체 g 당 클로로포름 부피(mL)

358 : 315nm에서 1%, 1cm에서의 감마오리자놀의 흡광계수

제 7절. 생리활성 메커니즘 규명

1. 항염증활성

가. 마우스 귀 염증 억제 효과

(1) 재료 및 방법

(가) 시약

- 본 실험에서 사용된 미강추출물(RB-SCE)은 전남 바이오에서 공급받았다. Linoleic acid(LA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 Cayman-oryzanol(OZ)은 Oryza Oil&Fat Chemical Co. (Ichinomiya City, Japan)에서 공급받았다. 염증유발제로 사용되는 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 Sigma에서 구입하였다.

(나) 실험 동물

- 본 실험에서 사용한 실험동물은 BALB/c 8~10주령 암컷 마우스로 샘타코(주)에서 구입하여 사육장 내에서 약 일주일 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다.

(2) 실험 방법

(가) 홍반(붉은정도)실험

- 염증을 유발 시키는 시약인 PMA(20 ug/ml)을 마우스의 귀안쪽 부분에 10 μ l 씩 바른 후, 드라이기의 냉풍을 이용하여 말린 다음 LA (0.2 mg/ml), OZ (11.1 mg/ml), RB-SCE (3 %), Positive control인 Indomethacin (30 mg/ml), Ethanol(Negative control)을 10ul씩 발라준 후 드라이기의 냉풍을 이용하여 말려주었다. 각각의 같은쪽 귀에 4마리씩(4반복) 실험하였다.
- 시약을 바른 직후 0h 대에 귀의 붉은 정도를 확인하기 위해 카메라를 사용해 정해 놓은 높이와 위치에서 촬영하였다. 귀부분을 확대시켜 귀가장자리 3군데, 안쪽 3군데의 머젠더 값의 평균을 구하고, 10h후에도 위와 같이 카메라를 사용하여 측정한 후 머젠더 값의 평균을 구하였다.

홍반 정도 = 0h 의 머젠더값 평균 - 10h 머젠더값 평균

(나) 부종 실험

- 위와 같은 염증의 유발 후 각각 0시간과 10시간 후의 마우스의 염증유발 부위의 부종을 마우스의 귀 부위를 버지스 캘리퍼를 이용하여 귀 두께를 3반복하여 측정하였다.

(3) 연구 결과 및 고찰

(가) 홍반(붉은정도)실험

- 0h에 염증유발 시약과 sample을 마우스 귀에 동시에 발라서 10h 후 부종정도를 측정

한결과, Fig 1에서와 같이 PC>RB-SCE>OZ>LA의 순서로 홍반의 붉은 정도가 낮아졌다. 따라서 RB-SCE의 홍반억제가 확인이 되었으며, 이는 주로 감마오리자놀의 효과로 확인되었다.

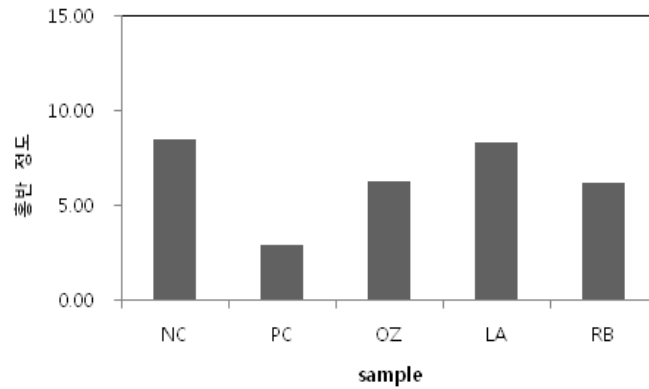


Fig 1. 각각의 sample에 따른 귀 홍반의 붉은정도 차이.

(나) 부종 실험

- 0h에 염증유발 시약과 sample을 마우스귀에 동시에 발라서 10h 후 부종정도를 측정한 결과 Fig 2.에서와 같이 LA>RB-SCE>PC>OZ의 순서로 유의적으로 부종의 정도가 줄어들었다. 본 실험의 결과 RB-SCE의 부종억제 효과는 PC와 비슷한 수준이었으며, 주로 LA에 의한 부족효과임을 확인할 수 있었다. PC보다는 낮으나 OZ의 부종 억제효과도 확인되었다.

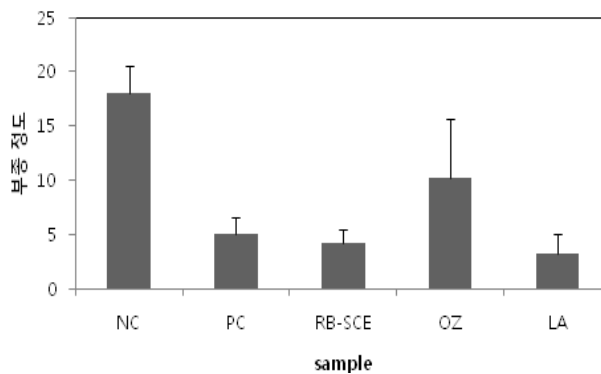


Fig 2. 각각의 sample에 따른 귀 부종의 크기 차이.

(5) 결론

- RB-SCE의 염증억제효과를 마우스귀를 이용하여 확인한 결과, 뛰어난 염증억제 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 주로 LA에 의해 부종억제효과가, OZ에 의한 부종억제와 홍반억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

나. 초임계 미강 추출물의 RAW264.7 세포에서의 항염증 메커니즘 규명

(1) 실험재료 및 방법

(가) 시료 및 추출물제조

- 본실험에 사용된 미강 (*Oryzasativa*Linn.*varjaponica*theKoreancultivars, Dongjin; Gramineae)은 2011 년도에 부산광역시 기장군에서 공급받았다., 초임계 추출은 추출압력 210, 270, 330 bar, 추출온도 32, 40, 50, 60°C, 추출시간 240 min 그리고 이산화탄소 유량은 135g CO₂/min로 고정하여 (주)에코마인에서 수행하였고, 본 연구에서는 초임계 미강 추출물을 공급받아 -80°C에서 저장하여 분석용으로 사용하였다.

(나) 시약

- 세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal bovine serum (FBS), Streptomycin-penicillin는 Hyclone Co.(Thermo Scientific, USA), Lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA), Cell Titer 96@AQueousOneSolution(MTS)은 Promega Co.(Madison, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항산화 활성 측정에 사용된 시약으로 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Rabbit anti-iNOS, COX-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology Co.(CA, USA)에서 anti-β-actin 항체는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(다) 세포 및 처리

- 세포주인 RAW 264.7 macrophage cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell은 10 % Fetal Bovin Serum (FBS, Hyclone, USA), 100 units/ml Penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에서 37°C, 5 % CO₂ 존재 하에 배양하였다.

(라) 초임계 미강 추출물의 항염증 활성 평가

① Nitric Oxide(NO) 측정

- Nitric oxide (NO)의 농도는 n-1-naphthylethylenediamine, sulfanilamide, NO₂⁻가 반응하여 azo coupling 을 이루는데, 이를 griess reaction 을 이용하여 540nm 에서 흡광도 측정하는 방법으로 Wang 등(24)의 방법으로 시행하였다.
- 6 well plate에 2.5×10⁵cells/well이 되도록 RAW264.7 macrophage 세포를 분주하고 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양하였다. RAW264.7 세포에 각각 LPS 3 µg/ml를 처리하고, 270 bar, 32°C 초임계 미강 추출물 (1.66, 4.15, 8.3, 16.6 µg/ml)을 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다.
- 24 시간 배양 후, 배양 상층액 100 µl 씩을 96 well plate에 취하고, 여기에 griess

reagent 100 μ l를 넣어 상온의 어두운 곳에서 10 분간 반응시킨 후 Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO_2)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다. 각 시료에 대한 NO 농도는 3 회 반복하여 측정하였다.

② Western Blot Analysis

- RAW264.7 macrophage 세포에서 발현되는 염증관련 분자지표인 iNOS와 COX-2 단백질 발현에서의 초임계 미강 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot analysis를 수행하였다.
- 6 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 RAW264.7 세포를 분주하고 24 시간 배양하였다. LPS 3 μ g/ml를 처리하고, 270 bar, 32°C 초임계 미강 추출물 (1.66, 4.15, 8.3, 16.6 μ g/ml)을 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다. 시료처리 후 세포를 1 X icecold-phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 washing 하고 다시 PBS 1 ml 분주하여 cell 을 수집한 후 4°C, 13000 rpm으로 원심 분리하여 cell pellet을수거하였다.
- 수거한 cell pellet에 1 X RIPA buffer (Tech&Innovation, Korea) 100 μ l를 넣고 1 시간 단백질을 lysis 시킨 뒤 17000 rpm. 15 min 원심 분리하여 BCA 시약 (Thermo Scientific, USA)을 사용하여 단백질 농도를 정량하였다.
- 정량 후 10 % SDS-polyacrylamine gel에 전기영동 한 후 cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 하였다. 5 % skim milk로 2 시간 동안 blocking 한 후, 1 : 2500의 비율로 β -actin, 1 : 200의 비율로 COX-2, 1 : 100의 비율로 iNOS antibody를 첨가하여 교반기 에서 4°C, Over Night 하였다. 교반 후 1 X PBST로 10 분 간격으로 3 회 washing하고, 1 : 500의 비율로 희석한 secondary antibody를 첨가하여 1 시간동안 4°C에서 교반하였다. 1 시간 뒤 PBST를 사용하여 10 분 간격으로 3 회 washing 한 후, ECL detection (Thermo Scientific, Finland)용액을 사용하여 High performance chemiluminescence film에 현상하였다.

③ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

- 초임계 미강 추출물의 RAW264.7 macrophage 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 유전자발현에 미치는 효능 측정을 위하여 RT-PCR을 수행하였다.
- 6 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 RAW264.7 세포를 분주하고 24 시간 배양하였다. LPS 3 μ g/ml를 처리하고, 270 bar, 32°C 초임계 미강 추출물 (1.66, 4.15, 8.3, 16.6 μ g/ml)을 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다. 배양 후 mRNA 분리를 위하여 세포 내의 total RNA를 Total RNA isolation (MACHEREY-NAGEL, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 mRNA 는 ImProm-IITMReverseTranscriptionSystem (Promega,USA) 을 이용하여 cDNA로 합성하였다.
- 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 μ g에 primer 1 μ l를 넣고 증류수로 10 μ l를 맞춘 후 Dr. Taq-HOT MasterMix 2X with Dye (DOCTOR PROTEIN, Korea) 10 μ l를 혼합하였다. 각 유전자들의 primer 서열은 Table 3. 과 같다.
- PCR 반응은 iNOS (94°C 5 분 initial denaturation, 94°C 45 초denaturation, 50°C 45 초

annealing 그리고 72°C 2 분 extension), COX-2 및 β -action (94°C 2 분 initial denaturation, 94°C 30 초 denaturation, 58°C 30 초 annealing 그리고 72°C 30초 extension)을 40 cycle amplification하였다. Amplification 후에 PCR 반응 시킨 시료를 2 % agarose gel에서 100 Volt에서 25 분간 전기영동하고 UV에서 관찰하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) 초임계 미강 추출물의 항염증 활성 평가

① Nitric Oxide 생성 억제

- 초임계 미강 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophage cell에 염증 유발물질인 LPS로 스트레스를 유도하여 NO 생성 정도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.
- LPS 처리에 의한 NO의 농도는 70 μ M NaNO₂이상으로 증가하였고, 1.66 μ g/ μ l 농도의 초임계 미강 추출물을 처리한 실험군에서 54.9 μ M NaNO₂로 저해되었으며, 추출물의 농도가 높아질수록 NO 농도를 억제하였다.

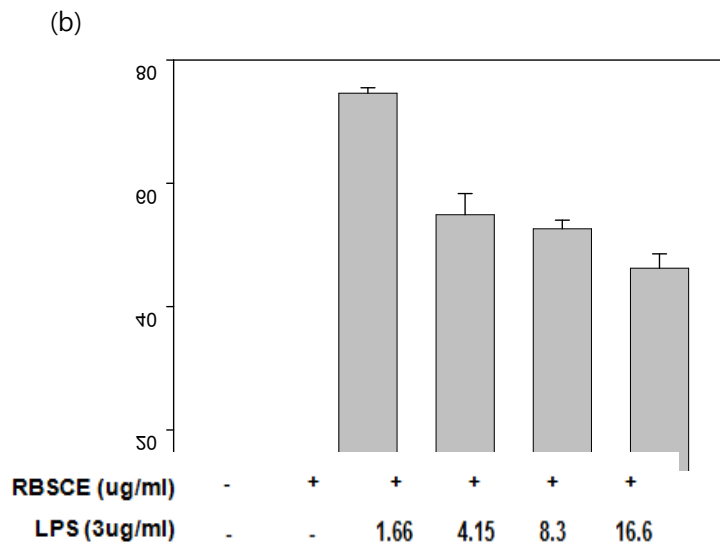


Fig 3. Effects of rice bran supercritical extract on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. The cells were pretreated with LPS (3 μ g/ml)for 24 hour and treated concentrations of rice bran supercritical extract. After 24 hour incubation, the amount of nitric oxide in the culture supernatant was measured by the Griess reaction. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

② 염증관련 분자지표의 mRNA 발현 조절

- RAW 264.7 macrophage cell에서 LPS에 의해 활성화된 NO의 관련효소인 iNOS와 다른 염증유발 관련 효소인 COX-2의 유전자 발현에 대한 RAW 264.7 macrophage cell에서 초임계 미강 추출물의 효과를 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

- 그 결과 LPS 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리했을 때 iNOS와 COX-2의 발현이 대조군에 비해 증가하였다. 또한 유의적인 NO 생성 억제능을 보인 초임계 미강 추출물은 iNOS 발현을 1.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서부터 농도 의존적으로 저해시켰으며, iNOS에 비해 낮지만 COX-2 발현도 농도 의존적으로 저해시켰다(Fig 4).

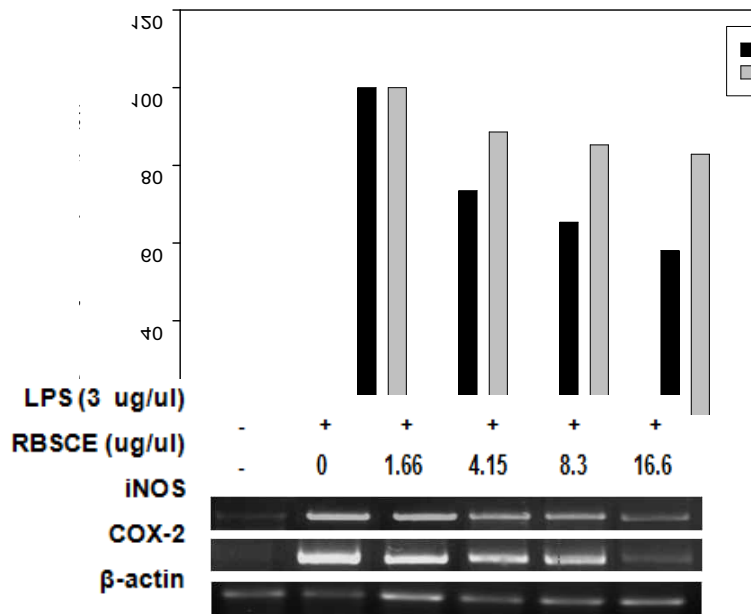


Fig 4. Effects of rice bran supercritical extract on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Quantification of iNOS and COX-2 mRNA expressions were measured by Image analysis. The values were expressed as a percentage of maximal band intensity in culture treated with LPS alone. Each bar represents the means \pm S.D. from three independent experiments.

③ 염증관련 분자지표의 단백질 발현 조절

- 유의적인 NO 생성 억제능과 iNOS 및 COX-2 mRNA 저해를 보인 초임계 미강 추출물이 염증관련 분자지표인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량에 미치는 영향을 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophage cell에 LPS로 이들의 발현을 유도시켰다.
- LPS로 유도된 cell에 초임계 미강 추출물을 처리하여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 농도를 western blot analysis로 비교한 결과 iNOS의 생성 저해 정도는 유의적인 차이를 보이지 않았지만, COX-2의 발현은 농도 의존적으로 단백질 발현 농도가 감소하였으며, 16.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 수준에서 가장 높게 감소하였다(Fig. 5).

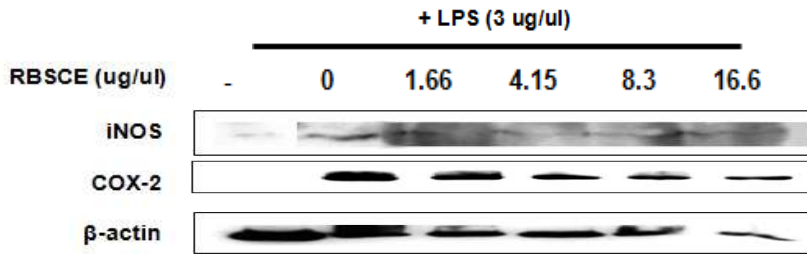


Fig 5. Inhibition of iNOS and COX-2 protein expression by rice bran supercritical extract in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pretreated with LPS (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hour and treated concentrations of rice bran supercritical extract. After 24 hour incubation, the total lysates of the proteins were subjected to western blot analysis, as described in materials and methods.

다. 초임계 미강 추출물의 유효성분들의 항염증 활성에서의 역할 규명

(1) 실험재료 및 방법

(가) 시료

- 실험에 사용된 Linoleic acid (LA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 Gamma-tocotrienol (TT)은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였고, Gamma-oryzanol (OZ)은 Oryza Oil&Fat Chemical Co. (Ichinomiya City, Japan)에서 공급받았다. Rabbit anti-iNOS, COX-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 anti- β -actin 항체는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

(나) 시약

- 세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal bovine serum (FBS), Streptomycin-penicillin는 Hyclone Co.(Thermo Scientific, USA), Lipopoly-saccharide (LPS)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA), Cell Titer 96@ AQueousOneSolution(MTS)은 Promega Co.(Madison, USA)에서 구입하여 사용하였다. Rabbit anti-iNOS, COX-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology Co.(CA, USA)에서 anti- β -actin 항체는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여사용하였다.

(다) γ -tocotricenol, γ -oryzanol 및 linoleic acid의 항염증 활성 평가

① Nitric Oxide(NO) 측정

- Nitric oxide (NO)의 농도는 n-1-naphthylethylenediamine, sulfanilamide, NO_2^- 가 반응하여 azo coupling 을 이루는데, 이를 griess reaction 을 이용하여 540nm 에서 흡광도 측정하는 방법으로 Wang 등(24)의 방법으로 시행하였다.
- 6 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 RAW264.7 macrophage 세포를 분주하고 37 $^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 incubator에서 24 시간 동안 배양하였다. RAW264.7 세포에 각각 LPS 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고, Linoleic acid (0.28, 2.8, 14, 28, 42, 56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 γ -oryzanol (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 각

각 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다.

- 24 시간 배양 후, 배양 상층액 100 μl 씩을 96 well plate에 취하고, 여기에 griess reagent 100 μl 를 넣어 상온의 어두운 곳에서 10 분간 반응시킨 후 Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO_2)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다. 각 시료에 대한 NO 농도는 3 회 반복하여 측정하였다.

② Western Blot Analysis

- RAW264.7 macrophage 세포에서 발현되는 염증관련 분자지표인 iNOS와 COX-2 단백질 발현에서의 초임계 미강 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 6 well plate에 2.5×10^5 cells/well이 되도록 RAW264.7 세포를 분주하고 24 시간 배양하였다.
- LPS 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고, Linoleic acid (0.28, 2.8, 14, 28, 42, 56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 γ -oryzanol (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 각각 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다.
- 시료처리 후 세포를 1 X ice cold-phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 washing 다시 PBS 1 ml 분주하여 cell 을 수집한 후 4°C, 13000 rpm으로 원심 분리하여 cell pellet을 수거하였다. 수거한 cell pellet에 1 X RIPA buffer (Tech&Innovation, Korea) 100 μl 를 넣고 1 시간 단백질을 lysis 시킨 뒤 17000 rpm. 15 min 원심 분리하여 BCA 시약 (Thermo Scientific, USA)을 사용하여 단백질 농도를 정량하였다.
- 정량 후 10 % SDS-polyacrylamine gel에 전기영동 한 후 cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 하였다. 5 % skim milk로 2 시간 동안 blocking 한 후, 1 : 2500의 비율로 β -actin, 1 : 200의 비율로 COX-2, 1 : 100의 비율로 iNOS antibody를 첨가하여 교반기 에서 4°C, Over Night 하였다. 교반 후 1 X PBST로 10 분 간격으로 3 회 washing하고, 1 : 500의 비율로 희석한 secondary antibody를 첨가하여 1 시간동안 4°C에서 교반하였다. 1 시간 뒤 PBST를 사용하여 10 분 간격으로 3 회 washing 한 후, ECL detection (Thermo Scientific, Finland)용액을 사용하여 High performance chemiluminescence film에 현상하였다.

③ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

- 초임계 미강 추출물의 RAW264.7 macrophage 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2의 유전자발현에 미치는 효능 측정을 위하여 RT-PCR을 수행하였다.
- 6 well plate에 5.0×10^5 cells/well이 되도록 RAW264.7 세포를 분주하고 24 시간 배양하였다. LPS 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고, Linoleic acid (0.28, 2.8, 14, 28, 42, 56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -tocotrienol (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 γ -oryzanol (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 각각 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다.
- 배양 후 mRNA 분리를 위하여 세포 내의 total RNA를 Total RNA isolation (MACHEREY-NAGEL, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 mRNA 는 ImProm-II™ RecerseTranscriptionSystem(Promega,USA)을 이용하여 cDNA로 합성하였다.
- 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 μg 에 primer 1 μl 를 넣고 증류수

로 10 μl 를 맞춘 후 Dr. Taq-HOT MasterMix 2X with Dye (DOCTOR PROTEIN, Korea) 10 μl 를 혼합하였다. 각 유전자들의 primer 서열은 Table 1. 과 같다.

- PCR 반응은 iNOS (94°C 5 분 initial denaturation, 94°C 45 초denaturation, 50°C 45 초 annealing 그리고 72°C 2 분 extension), COX-2 및 β -action (94°C 2 분 initial denaturation, 94°C 30 초 denaturation, 58°C 30 초 annealing 그리고 72°C 30초 extension)을 40 cycle amplification하였다. Amplification 후에 PCR 반응 시킨 시료를 2 % agarose gel에서 100 Volt에서 25 분간 전기영동하고 UV에서 관찰하였다.

Table 1. Sequences of the primers used for RT-PCR analysis in this study.

Gene		Primer sequence
iNOS	sense	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCACCACC-3'
	anti-sense	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	sense	5'-CTGACCCACTTCAAGGGAGTCTGG-3'
	anti-sense	5'-CCATCCTGGAAAAGGCGCAGTT-3'
β -actin	sense	5'-TGACCGAGCGTGGCTACAGC-3'
	anti-sense	5'-ACCGCRCATTGCCGATAGTG-3'

(2) 실험결과

(가) 유효성분의 항염증 활성

① Nitric Oxide 생성 억제

- 각 유효성분의 항염증 활성을 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophage cell에 LPS로 유도된 NO에 대한 생성 억제 효과를 γ -tocotrienol (0.01, 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -oryzanol (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linoleic acid (0.28, 0.7, 1.4, 2.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에서 확인하였다. LPS 처리에 의한 NO의 농도는 70 μM NaNO_2 이상으로 증가하였고, γ -tocotrienol을 처리군에서는 γ -tocotrienol 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 부터 52.1, 49.1, 45.9, 42.1 μM NaNO_2 로 농도 의존적으로 NO의 생성이 억제되었다(Fig. 6).
- γ -oryzanol을 처리군 또한 γ -oryzanol 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 부터 52.09, 49, 13.3, 41.09 μM NaNO_2 로 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되었다(Fig. 7). Linoleic acid를 처리군은 linoleic acid 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 부터 67.95, 51.42, 55.9, 54.57 μM NaNO_2 로 NO 생성이 억제되었으나 농도 의존적으로 억제되지 않았다(Fig. 8).

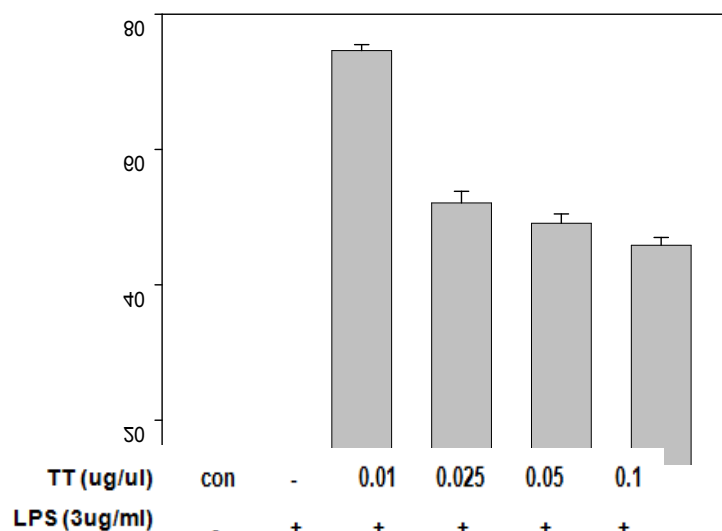


Fig 6. Effects of γ -tocotrienol(TT) on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. The cells were pretreated with LPS($3 \mu\text{g/ml}$) for 24 hour and treated concentrations of γ -tocotrienol(TT). After 24 hour incubation, the amount of nitric oxide in the culture supernatants was measured by the Griess reaction. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

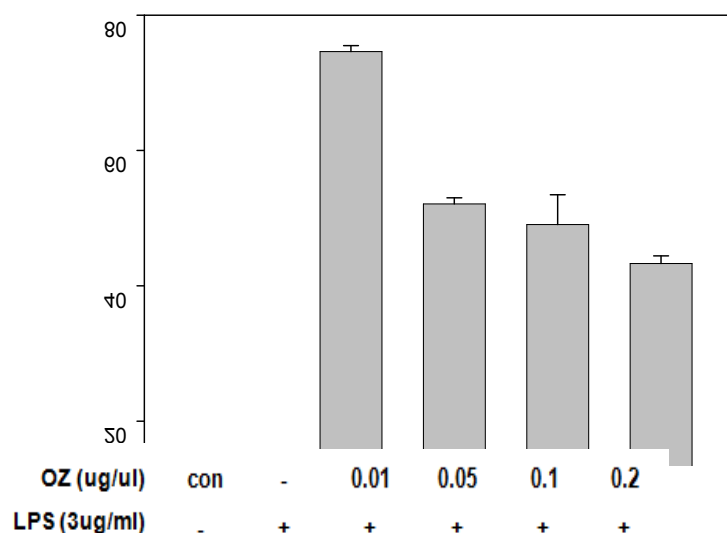


Fig 7. Effects of γ -oryzanol(OZ) on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. The cells were pretreated with LPS($3 \mu\text{g/ml}$) for 24 hour and treated concentrations of γ -oryzanol(OZ). After 24 hour incubation, the amount of nitric oxide in the culture supernatants was measured by the Griess reaction. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

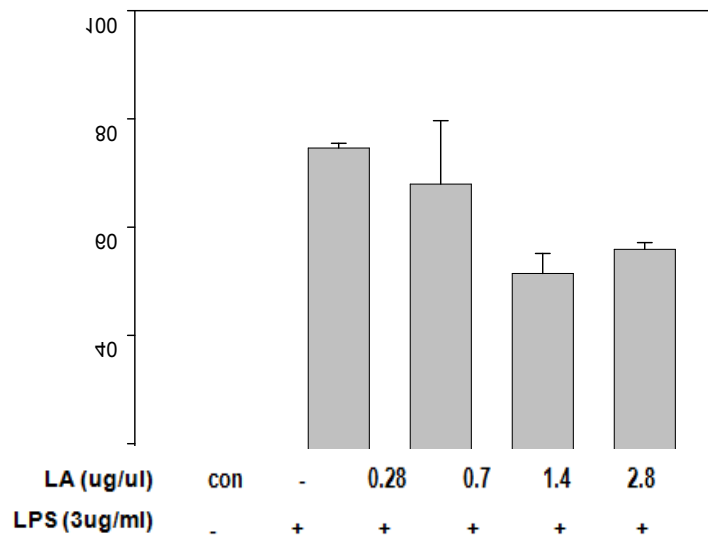


Fig 8. Effects of linoleic acid(LA) on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. The cells were pretreated with LPS(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hour and treated concentrations linoleic acid(LA). After 24 hour incubation, the amount of nitric oxide in the culture supernatants was measured by the Griess reaction. The values are expressed as the means \pm S.D. of three individual experiments.

(2) 염증관련 분자지표의 mRNA 발현 조절

- RAW 264.7 macrophage cell에서 LPS에 의해 유도된 염증관련 효소인 iNOS와 COX-2의 유전자 발현에 대한 유효성분의 효과를 조사하기 위하여 γ -tocotrienol (0.01, 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -oryzanol (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linoleic acid (0.28, 0.7, 1.4, 2.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 를 처리한 후 RT-PCR을 통해 유전자 발현량 변화를 비교하였다.
- LPS를 처리한 군에서 염증관련 mRNA의 발현이 증가하였고, γ -tocotrienol을 처리군에서 iNOS mRNA 발현은 억제 정도는 낮으나 농도 의존적으로 발현을 감소시켰으며, COX-2 mRNA 발현은 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 40 % 이하로 감소시켰다(Fig. 9).
- γ -oryzanol을 처리군에서 iNOS mRNA 발현은 농도 의존적으로 감소하였으며, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서부터 40 % 이하로 매우 높게 감소하였다. COX-2 mRNA 발현은 농도 의존적인 경향은 보이지 않았으나 모든 농도에서 50 % 이하로 감소하였다(Fig. 10). Linoleic acid 를 처리군에서 iNOS와 COX-2 mRNA 발현은 농도 의존적인 경향은 보이지 않았으나, 모든 농도에서 발현이 감소하였고, 특히 모든 농도에서 COX-2 mRNA 발현을 50 % 이하로 감소시켰다(Fig. 11).

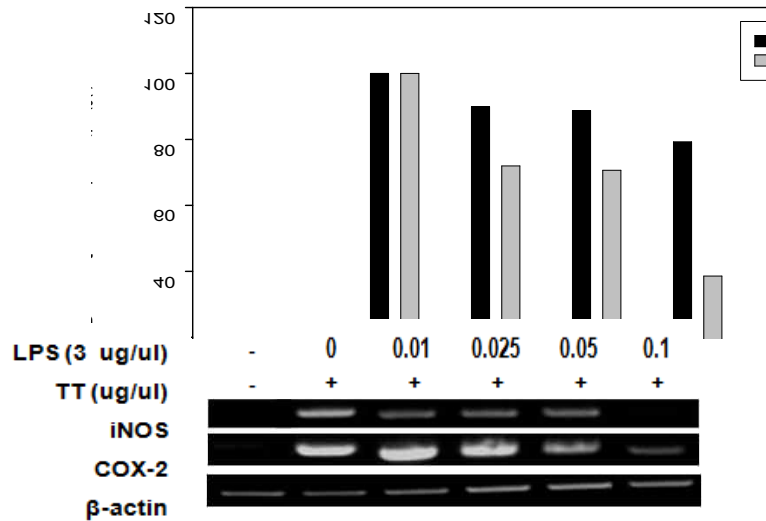


Fig 9. Effects of γ -tocotrienol(TT) on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Quantification of iNOS and COX-2 mRNA expressions were measured by Image analysis. The values were expressed as a percentage of maximal band intensity in culture treated with LPS alone. Each bar represents the means \pm S.D. from three independent experiments.

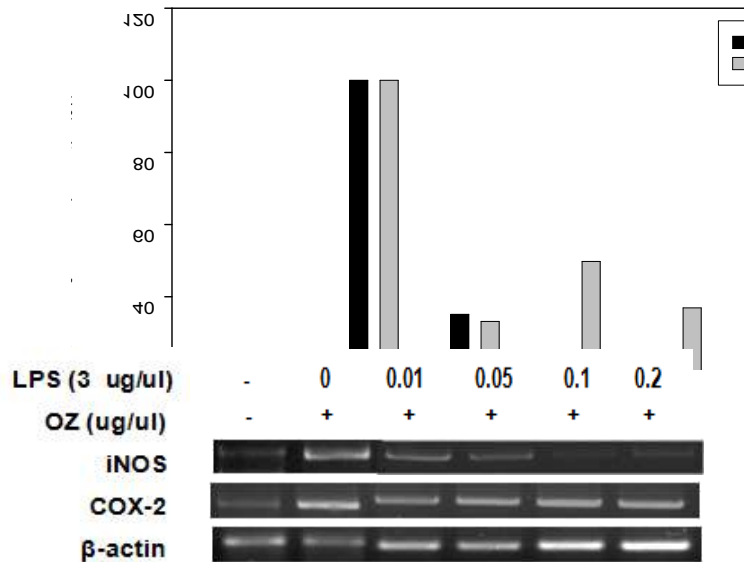


Fig 10. Effects of γ -oryzanol(OZ) on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Quantification of iNOS and COX-2 mRNA expressions were measured by Image analysis. The values were expressed as a percentage of maximal band intensity in culture treated with LPS alone. Each bar represents the means \pm S.D. from three independent experiments.

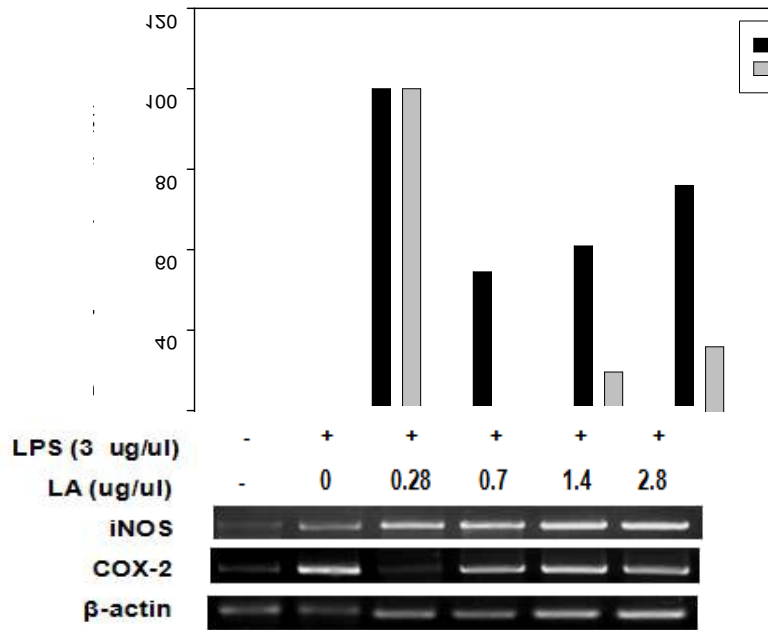


Fig 11. Effects of linoleic acid(LA) on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Quantification of iNOS and COX-2 mRNA expressions were measured by Image analysis. The values were expressed as a percentage of maximal band intensity in culture treated with LPS alone. Each bar represents the means±S.D. from three independent experiments.

(3) 염증관련 분자지표의 단백질 발현 조절

- 염증관련 분자지표인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 LPS로 유도된 RAW 264.7 macrophage cell에 γ -tocotrienol (0.01, 0.025, 0.05, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), γ -oryzanol (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), linoleic acid (0.28, 0.7, 1.4, 2.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 처리하고, 그 iNOS와 COX-2 단백질 발현량을 western blot analysis로 비교하였다.
- LPS를 처리 했을 때 염증관련 단백질의 발현 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. γ -tocotrienol은 COX-2 단백질 발현 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 현저히 감소하였고, iNOS 단백질 발현 농도에 유의적인 차이를 보이지 않았으나(Fig. 12), Wu (36)의 결과에 의하면 γ -tocotrienol은 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 농도를 감소한다고 보고하였다.
- γ -oryzanol을 처리군에서는 iNOS 단백질 발현 농도는 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 대조군과 유사한 수준으로 감소하여 iNOS 저해 활성이 뛰어난 것을 알 수 있었다. COX-2 단백질 발현 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 13).
- Linoleic acid를 처리군에서 iNOS 단백질 발현 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, COX-2 단백질 발현 농도는 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서부터 현저히 감소 시켰다(Fig. 14).

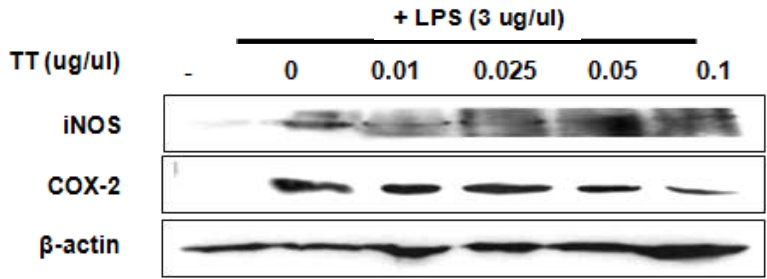


Fig 12. Inhibition of iNOS and COX-2 protein expression by γ -tocotrienol(TT) on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pretreated with LPS(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hour and treated concentrations of γ -tocotrienol(TT). After 24 hour incubation, the total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described in materials and methods.

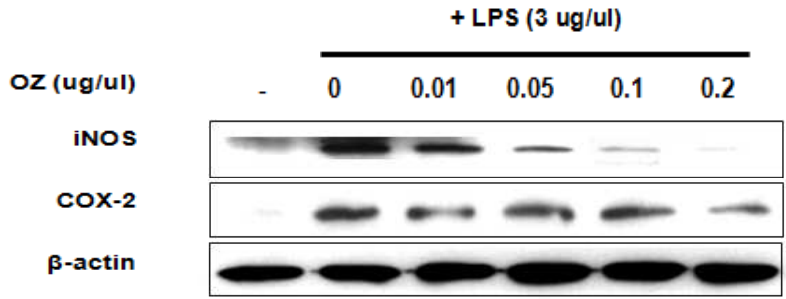


Fig 13. Inhibition of iNOS and COX-2 protein expression by γ -oryzanol(OZ) on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pretreated with LPS(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hour and treated concentrations of γ -oryzanol(OZ). After 24 hour incubation, the total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described in materials and methods.

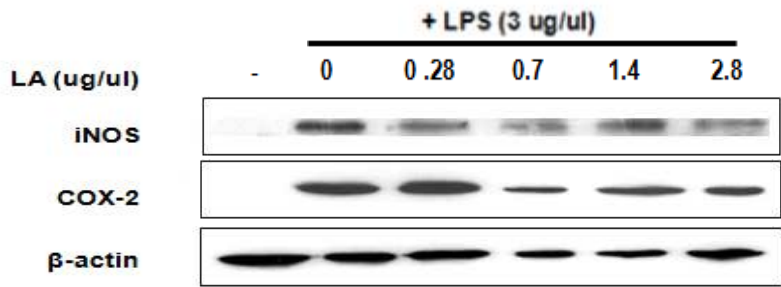


Fig 14. Inhibition of iNOS and COX-2 protein expression by linoleic acid(LA) on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cells were pretreated with LPS(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hour and treated concentrations of linoleic acid(LA). After 24 hour incubation, the total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described in materials and methods.

라. 초임계 미강 추출물의 HaCaT 세포에서의 항염증 메커니즘 규명

(1) 실험 재료 및 방법

(가) 시료 및 추출물 제조

- 본 실험에 사용된 미강은 2011 년도에 부산광역시 기장군에서 공급받았다. 초임계 추출은 추출압력 270, 추출온도 32°C, 추출시간 240min 그리고 이산화탄소 유량은 135g CO₂/min로 고정하여 (주) 에코마인에서 수행하였고, 본 연구에서는 초임계 미강 추출물을 공급받아 -80°C에서 저장하여 분석용으로 사용하였다.

(나) 시약

- 세포 배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal bovine serum (FBS), Streptomycin-penicillin는 Hyclone Co.(Thermo Scientific, USA), Poly(I:C)는 InvivoGen(USA), Cell Titer 96® AQueousOneSolution(MTS)은 Promega Co.(Madison, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(다) 세포배양

- 세포주인 HaCaT cell은 고려대학교 손상욱교수 연구팀에서 분주 받아 사용하였다. Cell은 10 % Fetal Bovin Serum (FBS, Hyclone, USA), 100 units/ml Penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified of Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에서 37°C, 5 % CO₂ 존재 하에 배양하였다.

(라) 초임계 미강 추출물의 항염증 활성 평가

(가) MTS Assay

- 96 well plate에 2×10⁴cells/well의 HaCaT 세포를 분주하고 37°C, 5 % CO₂incubator에서 24 시간 동안 배양한 후, 270 bar 32°C 초임계 미강 추출물 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml)을 농도별로 처리하여 24 시간 동안 재 배양하였다. 배양 후 Plate에 20 µl의 MTS Solution을 첨가하여 CO₂배양기 (37°C, 5 % CO₂)에서 1시간 반응시키고, Microplate Reader (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하여 비교하였다.

(나) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

- 초임계 미강 추출물의 HaCaT 세포에서 발현되는 iNOS와 COX-2, IL-8의 유전자발현에 미치는 효능 측정을 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 6 well plate에 2.5×10⁵cells/well이 되도록 HaCaT 세포를 분주하고 24 시간 배양하였다. Poly(I:C) 10 µg/ml를 처리하고 4시간 후, 270 bar, 32°C 초임계 미강 추출물 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml)을 농도별로 처리하여 20 시간 동안 재 배양하였다. 배양 후 mRNA 분리를 위하여 세포 내의 total RNA를 Total RNA isolation (MACHEREY-NAGEL, USA)를 이용하여 분리하였다. 분

리된 mRNA는 ImProm-Ⅱ™ Reverse Transcription System(Promega,USA)을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 PCR을 수행하기 위해 cDNA 4 μg에 primer 1 μl를 넣고 멸균 증류수로 5 μl를 맞춘 후 Dr. Taq MasterMix 2X with Dye (DOCTOR PROTEIN, Korea) 10 μl를 혼합하였다. 각 유전자들의 primer 서열은 Table 1. 과 같다. PCR 반응 조건은 β-actin, TNF-α, IL-1α는 50℃ 2min, 95℃ 10min에서 반응 후 95℃ 10sec와 60℃ 1min을 40회 반복하여 증폭 시켰다. IL-6, IL-8는 45℃ 30min, 94℃ 5min에서 반응 후 94℃ 30sec, 60℃ 30sec, 72℃ 45sec를 35회 반응하여 Amplification 시켰다. Amplification 후에 PCR 반응 시킨 시료를 2 % agarose gel에서 100 Volt에서 25 분간 전기영동하고 UV에서 관찰하였다.

Table 2. Primers Used for Real-Time PCR

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Size (bp)
β-actin	Forward	GGCCATCTCTTGCTCGAAGT	312
	Reverse	GAGACCTTCAACACCCCAGC	
COX-2	Forward	TGAGCATCTACGGTTTGCTG	158
	Reverse	TGCTTGTCTGGAACAACACTGC	
iNOS	Forward	CATGCTACTGGAGGTGGGTG	197
	Reverse	CATTGATCTCCGTGACAGCC	
IL-8	Forward	ATGACTTCCAAGCTGGGCCGTG	299
	Reverse	TATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAA	

(2). 결과 및 고찰

(가) 초임계 미강 추출물의 항염증 활성 평가

(가) Cell number 결정

- 초임계 미강 추출물의 항염증 활성을 조사하기 위해 HaCaT cell의 Cell number를 결정한 결과는 Fig 15.과 같다.
- Cell number 결정에 의해 MTS assay를 수행하기 위한 96well에서의 HaCaT Cell number는 2×10^4 cells/well로 결정 되었다.

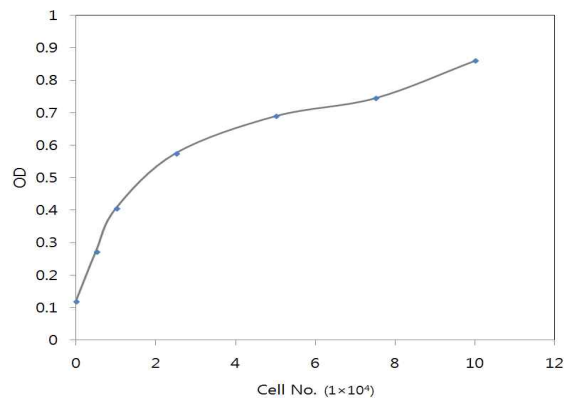


Fig 15. The determination of optimum cell numbers for HaCaT cell at 490nm

(나) MTS Assay에 의한 cell viability

- 항염증 활성 실험에서의 시료 투여 농도를 결정하기 위하여 HaCaT cell에 초임계 미강 추출물을 농도별 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 처리한 후 MTS assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 측정된 결과는 Fig 16.와 같으며 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 독성을 나타내었다.

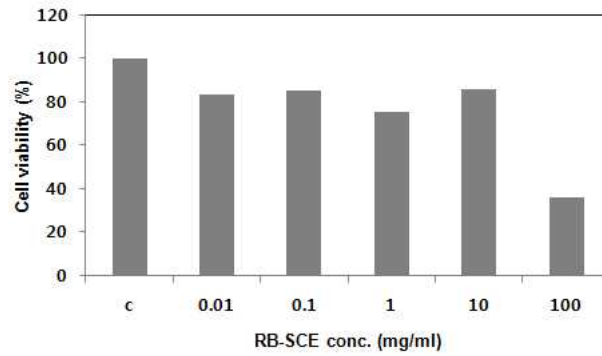


Fig 16. The viability of HaCaT cell at different concentration of RB-SCE by MTS assay

(다) 염증관련 분자지표의 mRNA 발현 조절

- NO 관련 효소인 iNOS와 염증유발 관련효소인 COX-2, 피부자극시 초기에 염증 유발 사이토카인인 IL-8의 유전자 발현에 대한 HaCaT cell에서 초임계 미강 추출물의 효과를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

-결과로 poly(I:C) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리했을 때 iNOS와 COX-2의 발현감소가 없었다(Fig 17,18). 하지만 IL-8에서는 발현이 감소하는 것이 보였다.(Fig 19).

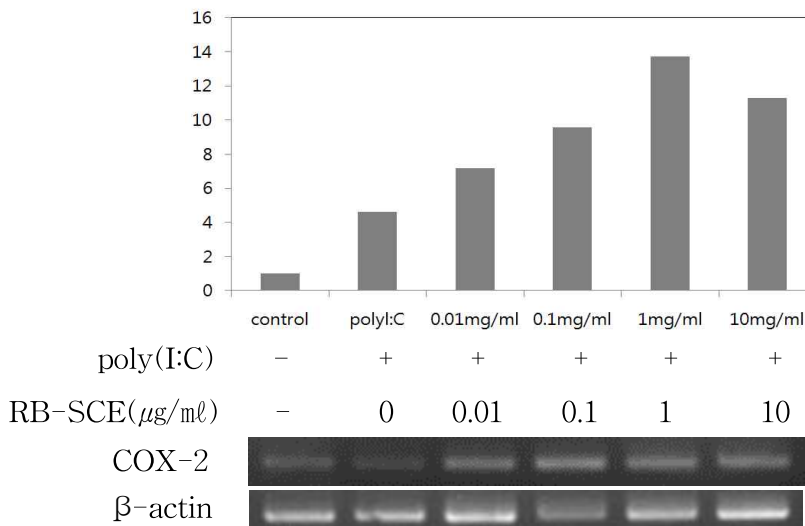


Fig 17. Effects of RB-SCE on COX-2 expression in polyI:C-stimulated HaCaT cell

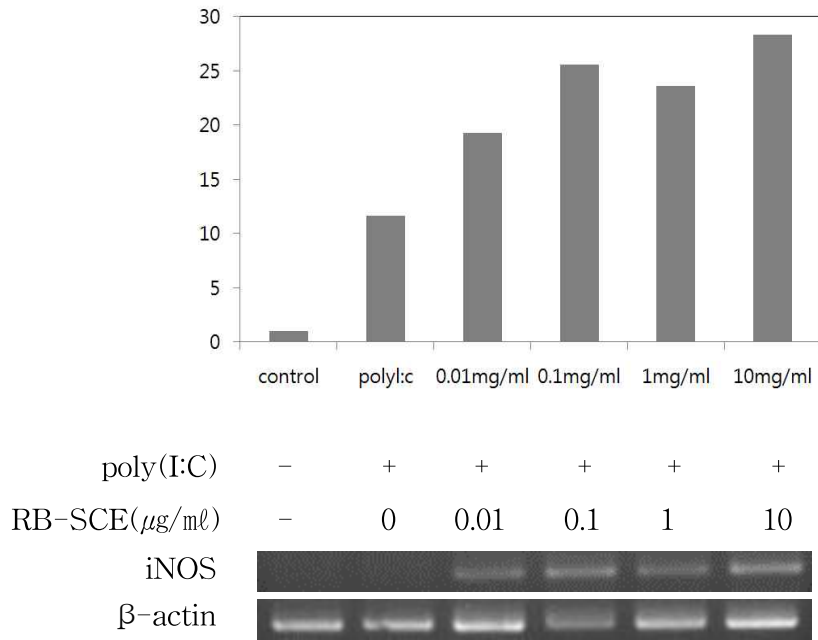


Fig 18. Effects of RB-SCE on iNOS expression in poly:I:C-stimulated HaCaT cell

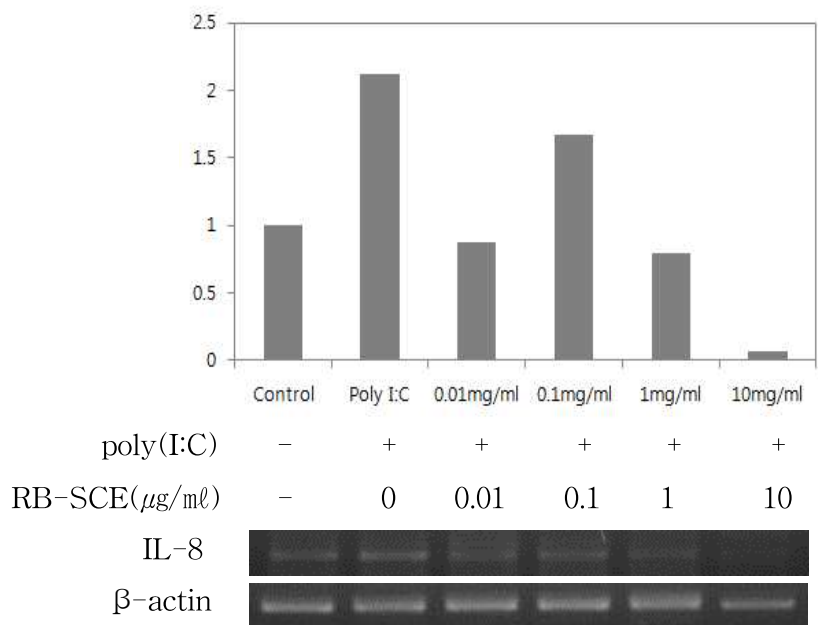


Fig 19. Effects of RB-SCE on IL-8 expression in poly:I:C-stimulated HaCaT cell

2. 초임계 미강 추출물의 5 α -Reductase 활성 억제 효과

가. 실험방법

- 5 α -reductase 억제 활성 평가는 Thapana Kumar 등(32)의 방법에 따라 시행하였다.
- -70°C에 보관되어 있는 간을 꺼내어 0.85 % 생리식염수로 세척한다. 세척한 1 g의 간과 9 ml의 river solution (0.32 M sucrose, 1mM DTT, 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5))을 넣고 4500 g, 30 분 원심분리한다. 초임계 미강 추출물 (0.1 g/ml 50 % ethanol) 0.2 ml, 0.02 mM phosphate buffer 1 ml, 500 ppm testosterone 0.3 ml과 앞서 원심분리 된 간 용액 1 ml을 섞어준다. NADPH (0.77 mg/ml) 0.5 ml을 넣고 37°C에서 30 분간 방치한다. 그 후 dichloromethane 5 ml과 propyl-p-hydroxybenzoate 0.5 ml을 넣어준다. 60 초 동안 흔들고 400 g에서 10 분간 원심분리하여 -70°C에서 방치하여 물층을 냉각시킨다. 냉각 된 물층을 제거한 후 남은 용액을 취하여 진공 농축시켜 methanol 5 ml에 녹인 후 HPLC 분석을 하였다.
- HPLC 분석 조건은 Table 3. 와 같다. Complete reaction (r×n)은 초임계 미강 추출물 대신 50 % ethanol 0.2 ml을 넣는다. Enzyme control (ctrl)은 실험과정 중 NADPH을 넣기 전에 dichloromethane을 먼저 넣어 testosterone이 DHT로 변환하는 것을 막아주었다. HPLC 분석 결과에서 얻어진 각 피크의 retention time을 비교하여 각 피크의 area ratio (Γ)을 구하였으며, 5 α -reductase 억제 활성은 아래 계산식에 따라 구하였다.

$$\% \text{ inhibition} = [(\Gamma_{\text{sample}} - \Gamma_{r \times n}) / (\Gamma_{\text{ctrl}} - \Gamma_{r \times n})] \times 100$$

Table 3. HPLC condition for the analysis of 5 α -reductase in Rice Bran Supercritical Extract.

Part	Condition
Oven temp.	40°C
Injector	CTO-10AVP (Shimadzu) injection with a 10.0 μ l sample loop
Column	Hypersil [®] -ODS (250*4.6mm i.d Thermo co.)
Mobile phase	65% Methanol (>98% pure)
Detector	UV, 242nm
Flow	1ml/min

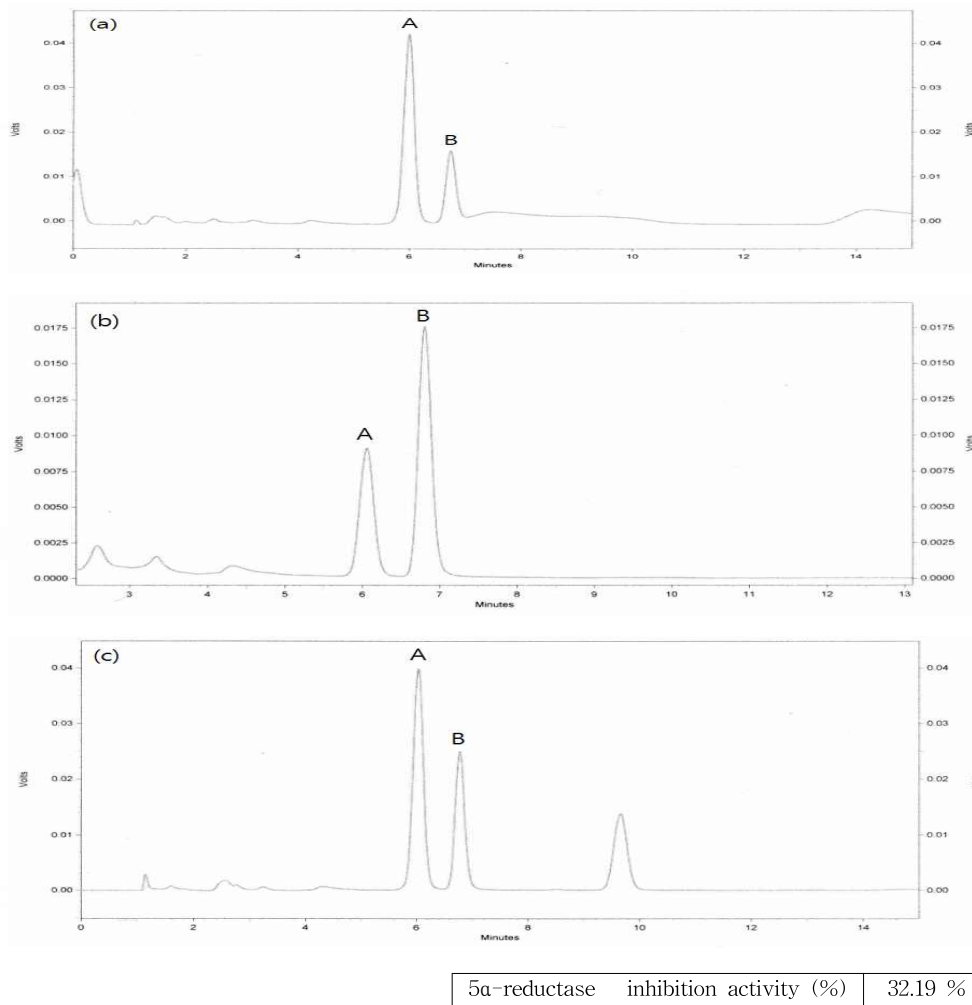


Fig 20. HPLC chromatogram of: complete reaction control (a), enzyme blank (b) and rice bran supercritical extract (c). A and B represent propyl-*p*-hydroxybenzoate, and testosterone, respectively.

나. 결과

- 초임계 미강 추출물 및 그 성분의 5 α -reductase 활성 저해에 대한 HPLC chromatogram은 Fig 20.과 같다.
- A는 propyl-*p*-hydroxybenzoate 피크로 internal standard를 나타내었으며, B는 testosterone의 피크이다.
- (1)은 Enzyme blank로 초임계 미강 추출물 대신 50% ethanol이 들어갔다. 실험과정 중 NADPH를 넣기 전에 dichloromethane을 먼저 넣어 testosterone이 DHT로 변환하는 것을 막아주어 enzyme에 의해 DHT로 변하지 않아 B 피크가 높게 나타났다.
- (2)는 complete reaction control로 초임계 미강 추출물 대신 50% ethanol이 들어가 있는 대조군으로 5 α -reductase enzyme 활성에 의해 testosterone이 DHT로 변하여 B 피크가 줄어들었다.

- (3)은 초임계 미강 추출물을 처리한 실험군으로 testosterone이 DHT로 변환하는 것이 저해되어 (2)에 비해 B의 피크가 높게 나타났다.
- (4)는 초임계 미강 추출물의 구성성분인 Γ -oryzanol을 처리한 실험군으로 testosterone이 DHT로 변환되는 것을 막고 있으나 그렇게 큰 효과가 보이지 않았다.
- (5)는 초임계 미강 추출물의 구성성분인 linoleic acid를 처리한 실험군으로 testosterone이 DHT로 변환하는 것을 막지 못해 효과가 미미한 것으로 보였다.
- 앞서 설명한 실험방법에 따라 HPLC 분석 결과에서 얻어진 각 피크의 retention time을 비교하여 각 피크의 area ratio를 비교해 5 α -reductase 저해 활성정도를 계산한 결과 초임계 미강 추출물에서는 54.7%, Γ -oryzanol에서는 8.7% 그리고 linoleic acid에서는 5.5%의 저해활성을 나타내었다(Fig 21). Thapanaa와 Chalyavat 등에 의하면 *Oryza sativa* L은 0.12 μ g/ml에서 약 50% 5 α -reductase 저해 활성을 가진다고 보고하였다.

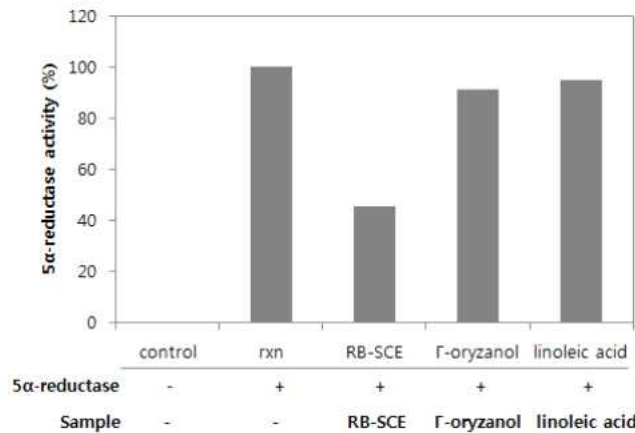


Fig 21. control, rxn, RB-SCE, Γ -oryzanol, linoleic acid에 대한 5 α -reductase 저해활성

3. C57BL/6 마우스를 이용한 초임계 미강 추출물의 양모효능 연구

가. 서론

- 본 연구에서는 RB-SCE의 기전 연구를 위해, RB-SCE와 주요 구성성분인 LA 및 OZ의 양모 촉진 효과를 등쪽 피부를 제모한 C57BL/6N 마우스를 이용하여 다시 한 번 3% minoxidil 과 비교 평가하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 검체

- (가) 실험물질: 초임계 이산화탄소 유체로 제조된 미강 추출물 및 주요 구성성분인 Linoleic acid (LA)와 γ -oryzanol (OZ)
- (나) 대조물질: 3% minoxidil (MoxidilTM, HanmiPharmCo, Seoul, Korea]

(2) 실험동물

- 대략 63마리의 C57BL/6N mice (OrientBio, Seungnam, Korea) [ANNEX I, II]를 6일간 순화시킨 후, 전기 제모기와 80% thioglycolic acid 를 함유한 제모 크림을 이용하여, 등쪽 피부를 완전히 제모하였으며, 제모 24시간 후 제모 상태 및 절식 후 체중 (18.86 ± 0.99 g, $16.3 \sim 20.5$ g)을 기준으로 군당 8마리씩 6군 (총 48마리)으로 구분하여 실험에 사용하였으며 (Table 1, Fig 1), 모든 실험동물은 대구한의대학교 실험동물윤리위원회의 동물윤리 기준에 따라 취급하였으며, 사전 승인 하에 실시하였다 [Approval No. DHU2014-061; ANNEX III].

(3) 실험방법

(가) 군분리

- 무처치 대조군 (제모 후 무처리한 대조군)
- 매체 대조군 (제모 후 10% ethanol 처리 대조군)
- Minoxidil (제모 후 3% minoxidil 도포 대조 약물군)
- RB-SCE (제모 후 3% RB-SCE 도포 실험군)
- LA (제모 후 11.1 mg/ml 농도의 LA 도포 실험군)
- OZ (제모 후 0.22 mg/ml 농도의 OZ 도포 실험군)

(나) 샘플 처리

- 100 μ l의 3% minoxidil, 3% RB-SCE, 11.1 mg/ml 농도의 LA 및 0.22 mg/ml농도의 OZ 각각을 제모한 등쪽 피부에, 제모 24시간 후부터 매일 1회씩 14일 동안 도포하였으며, 별도의 무처치 대조군을 준비하였고, 매체 대조군에서는 실험물질 대신 10% ethanol 만 동일한 방법으로 동일한 기간 동안 도포하였다 (Table 4, Fig 22).

Table 4. Experimental designs used in this study

Groups	Dose (mg/day) of Treatment	Drug	Animal No.
Controls			
Non-treated	No treatment		CM01~CM08
Vehicle	100 μ l of 10% ethanol (Vehicle)		CM09~CM16
Reference			
Minoxidil	100 μ l of 3% minoxidil		CM17~CM24
Test substances			
RB-SCE	100 μ l of 3% RB-SCE (dissolved in 10% ethanol)		CM25~CM32
LA	100 μ l of 11.1 mg/ml of LA		CM33~CM40
OZ	100 μ l of 0.22 mg/ml of OZ		CM41~CM48

RB-SCE = rice bran supercritical CO₂extract, test materials

LA = linoleic acid

OZ = γ -oryzanol

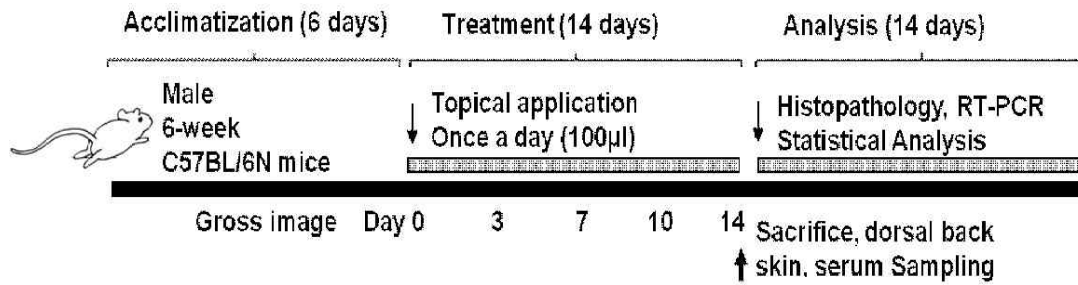


Fig. 22. Experimental designs used in this study

(다) 제모

- 이전의 방법들 [Shin et al., 2011; Hou et al., 2013; Choi et al., 2014; Junlatat and Sripanidkulchai, 2014]에 따라, 무처리 대조군을 포함하여, 모든 실험동물을 6일간의 순화 후, 전기 제모기와 80% thioglycolic acid 를 함유한 제모 크림(NiClean™, IldongPharmaceuticalCo.,Seoul,Korea)을 이용하여, 등쪽 피부를 완전히 제모하였다.

(라) 관찰항목

- 실험물질의 양모 촉진 효과는 모발 성장시기 (anagen phase)를 의미하는 등쪽 피부의 흑색화 (darkening) [Hou et al., 2013; Choi et al., 2014]를 기준으로 평가하였으며, 모발 증식 부위를 제모 24시간 후 실험물질 처리 전, 실험물질 처리 시작 후 3, 7, 10 및 14 일후에 각각digital camera (FinePix S700; Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여, 촬영한 육안 사진을 자동 영상 분석 프로그램 (iSolution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Quebec, Canada)을 이용하여 분석하였으며, 최종 희생일에 모발 평균 길이 역시 각각 측정하였다. 14일간의 실험물질 도포 후, 등쪽 피부를 2 부분으로 채취하여, 조직학적 및 RT-PCR 분석을 실시하였고, 일부 피부 조직을 NMR 분석을 위해 별도 보관하였다.
- 본 실험에서는 체중 및 증체량, 제후 실험물질을 도포한 등쪽 피부에서 모발 증식 부위 (%) 및 모발 평균 길이 (mm)의 변화를 육안적으로 평가하였으며, 후보물질 적용 피부 부위의 조직병리학적 변화 - 단위 면적당 평균 모낭 수(follicles/mm²hypodermis), hairshaft를 함유한 anagen phase의 성숙한 모낭의 비율 (%/total observed follicles), 모낭의 평균 직경 (µm/shaft regions of follicle), 세포 증식 지표인 Ki-67 [Yoon et al., 2011; Holub et al., 2012] 면역반응세포의 수적 변화와 함께 피부 조직내 KGF, IGF, VEGF 및 TGF-β mRNA expressions의 변화 역시 측정하였다.
- 본 실험에서 RT-PCR에 사용한 primer, 면역형광염색에 사용한 1차 항체와 발색 kit 는 각각 Table 5 및 6에 기록하였다.

Table 5. Oligonucleotides for QuantitativeRT-PCRUsed in ThisStudy

Target	5' - 3'	Sequence
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Forwar	ATC TTC AAG CCG TCC TGT GT
	d	GCA TTC ACA TCT GCT GTG CT
Insulin-like growth factor-1 (IGF)	Reverse	
	Forwar	TCA TGT CGT CTT CAC ACC TCT TCT
(IGF)	d	CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCA T
	Reverse	
Keratinocyte growth factor (KGF)	Forwar	ACG AGG CAA AGT GAA AGG GA
	d	TGC CAC AAT TCC AAC TGC CA
Transforming growth factor-β (TGF-β)	Reverse	
	Forwar	GCG GCA GCT GTA CAT TGA CT
(TGF-β)	d	ACT GTG TGT CCA GGC TCC AA
	Reverse	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH)	Forwar	CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C
	d	AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG
	Reverse	

Table 6. Primary antiserum and detection kits used in this study

Antisera or detection kits	Code	Source	Dilution
Primary antiserum* Anti-Ki67 antibody [PP-67]	ab6526	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Detection kits			
Normal horse serum blocking solution	PK-6200	Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA	1:100
Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG		Molecular Probes, Eugene, OR, USA	
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	

MMP = matrix metalloprotease

다. 실험결과

(가) 체중의 변화

- 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 실험 전 기간동안 인정되지 않았으며, 모든 실험물질 도포군에서도 무처리 또는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 실험 전 기간동안 인정되지 않았다 (Table 7, Fig 23).
- 실험물질 도포 기간인 14일동안의 증체량은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 1.64%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체

대조군에 비해 -4.03, -1.61, -0.81 및 0.81%의 변화를 나타내었다.

Table 7. Body Weight Gains after 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice

Groups	Body weights (g):				Body weight gains [B - A]
	Before hair remove	At initial vehicle/test material applies [A]*	At last vehicle/test material applies	At sacrifice [B]*	
Controls					
Non-treated	21.64±0.69	18.65±0.91	23.08±0.61	20.18±0.93	1.53±0.89
Reference	21.75±1.03	18.76±1.25	23.31±1.10	20.31±1.13	1.55±0.28
Test substances					
Minoxidil	21.60±1.15	18.85±1.27	23.90±1.47	20.34±1.15	1.49±0.61
RB-SCE	21.58±0.79	18.63±0.59	23.43±0.64	20.15±0.74	1.53±0.57
LA	21.8±1.12	18.94±1.22	23.81±1.42	20.48±1.14	1.54±0.43
OZ	21.81±0.90	19.00±0.80	23.58±1.07	20.56±1.07	1.56±0.45

Values are expressed mean ± SD of eight mice, g

* All animals were overnight fasted

RB-SCE = rice bran supercritical CO₂ extract, 3% solution dissolved in 10%ethanol

LA = linoleic acid (11.1 mg/ml)

OZ = γ-oryzanol (0.22 mg/ml)

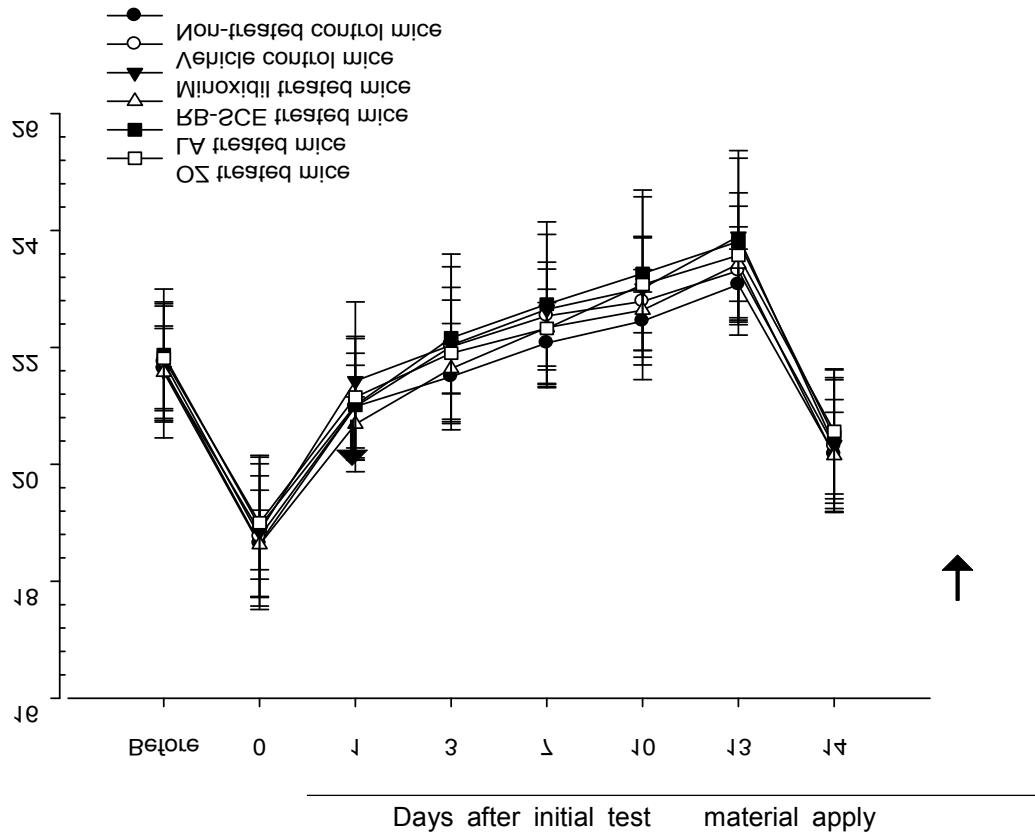


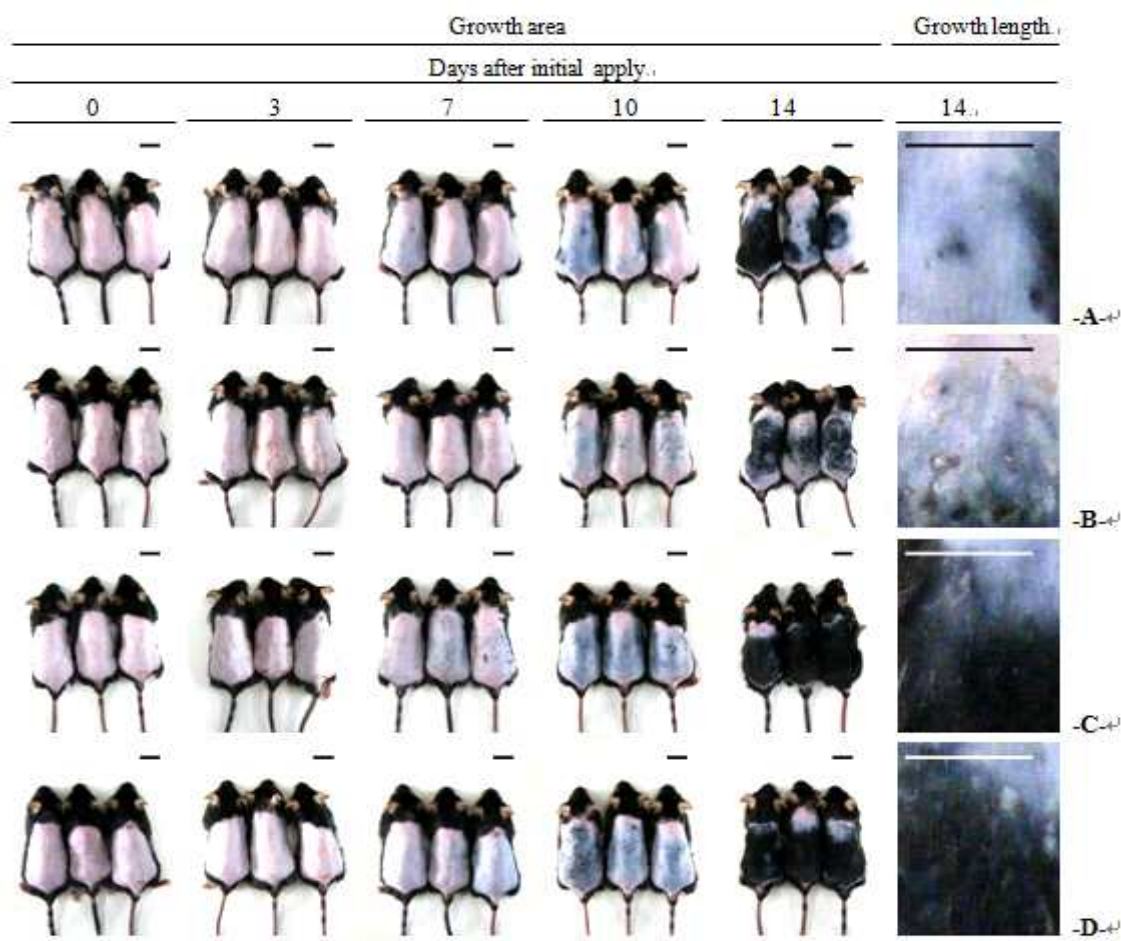
Fig 23. Body Weights Changes during 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice

(나) 모발 증식 부위의 변화

- 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 육안 모발 증식 부위의 변화는 실험 전 기간 동안 인정되지 않았으나, minoxidil 도포군에서는 도포 시작 3일 후부터 무처리 또는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 모발 증식 부위의 증가가 인정되기 시작하였으며, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서도 각각 도포 시작 7일 후부터 무처리 또는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 모발 증식 부위의 증가가 인정되기 시작하였다 (Table 8, Fig 24).
- 도포 시작 3, 7, 10 및 14일 후 육안 모발 증식 부위는 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 4.24, -0.10, 3.24 및 -7.61%의 변화를 나타내었으며, minoxidil 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 222.16, 337.21, 90.80 및 93.53%의 변화를 나타내었고, RB-SCE 도포군에서는 2.99, 283.16, 72.80 및 89.54%의 변화를 나타내었으며, LA 도포군에서는 5.33, 315.41, 82.13 및 96.07%의 변화를 각각 나타내었다. 또한 OZ 도포군에서는 도포 시작 3, 7, 10 및 14일 후 육안 모발 증식 부위가 매체 대조군에 비해 -0.42, 104.70, 60.12 및 82.79%의 변화를 각각 나타내었다.

Table 8. Changes on the Gross Hair Growth Area during 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice

Groups	Days after initial apply				
	0	3	7	10	14
Controls					
Non-treated	0.00±0.00	2.57±1.74	5.03±1.90	16.61±4.79	41.43±11.50
Vehicle	0.00±0.00	2.67±1.82	5.02±2.27	17.15±6.70	38.28±11.24
Reference					
Minoxidil	0.00±0.00	8.61±2.66 ^{ef}	21.96±10.01 ^{ef}	32.73±10.27 ^{ac}	74.10±18.61 ^{ac}
Test substances					
RB-SCE	0.00±0.00	2.75±1.67	19.40±5.81 ^{ef}	29.64±7.89 ^{ac}	72.55±14.43 ^{ac}
LA	0.00±0.00	2.82±0.75	20.86±8.58 ^{ef}	31.24±10.14 ^{ac}	75.05±16.91 ^{ac}
OZ	0.00±0.00	2.66±1.04	10.28±4.10 ^{ef}	27.46±8.19 ^{bd}	69.97±14.69 ^{ac}



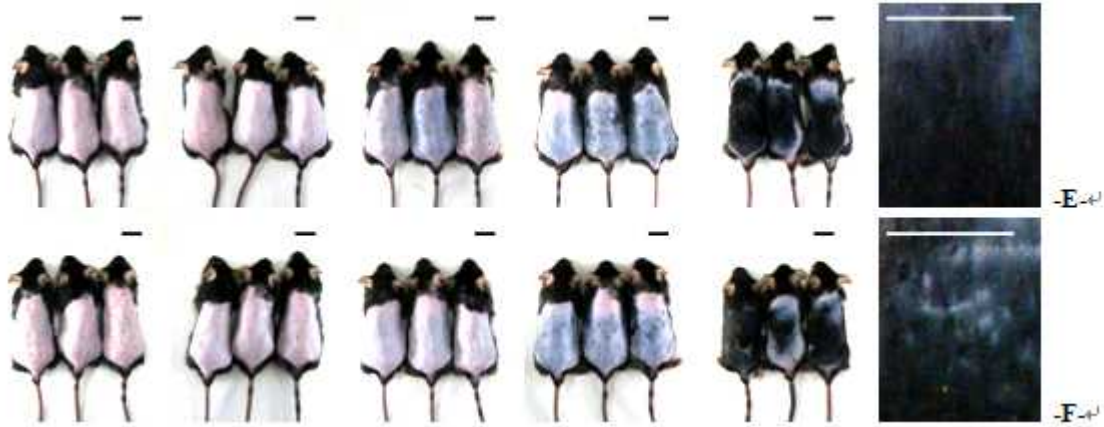


Fig 24. Representative Gross Images of Dorsal Back Skin, Taken from Hair-removed Mice

A = Non-treated dorsal back hair removed mice (non-treated control)

B = 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (vehicle control)

C = 3% minoxidil treated dorsal back hair removed mice (Minoxidil)

D = 3% RB-SCE dissolved in 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (RB-SCE)

E = 11.1 mg/ml of LA treated dorsal back hair removed mice (LA)

F = 0.22 mg/ml of OZ treated dorsal back hair removed mice (OZ)

Scale bars = 14mm

(다) 모발 평균 길이의 변화

- 매체 대조군의 경우, 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 평균 길이의 변화는 인정되지 않았으나, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 도포군에서는 각각 무처리 또는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 모발 평균 길이의 증가가 인정되었다 (Fig 24, 25).
- 실험물질 도포 시작 14일 후 모발 평균 길이는 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -0.70%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 104.86, 100.47, 110.67 및 99.69%의 변화를 나타내었다.

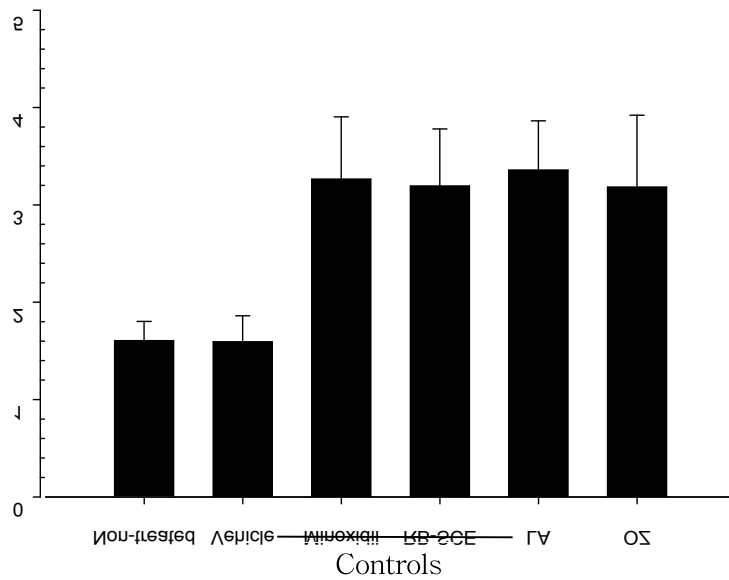


Fig 25. Changes on the Mean Hair Growth Lengths after 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice.

Values are expressed mean \pm SD of eight mice

^a $p < 0.01$ as compared with non-treated control by LSD test

^b $p < 0.01$ as compared with vehicle control by LSD test

(라) 피부 조직내 mRNA 발현의 변화

- 매체 대조군의 경우, 무처리 대조군에 비해 의미 있는 피부 조직내 VEGF, IGF, KGF 및 TGF- β mRNA 발현의 변화는 인정되지 않았으나, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 도포군에서는 각각 무처리 또는 매체 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) VEGF, IGF 및 KGF mRNA 발현의 증가와 함께 TGF- β mRNA 발현의 감소가 인정되었다 (Table 9).

- VEGF mRNA 발현은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -1.19%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 129.17, 121.13, 132.41 및 83.19%의 변화를 나타내었다.

- IGF mRNA 발현은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -4.11%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 283.73, 270.62, 357.25 및 310.72%의 변화를 나타내었다.

- KGF mRNA 발현은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -2.82%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 288.52, 358.51, 264.19 및 414.00%의 변화를 나타내었다. TGF- β mRNA 발현은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 1.92%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및

OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 -67.04, -75.72, -66.42 및 -78.11%의 변화를 나타내었다.

Table 9. Changes on the Skin mRNA Expressions after 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice

mRNA	VEGF	IGF	KGF	TGF-β
Groups				
Controls				
Non-treated	1.05±0.10	1.03±0.12	1.02±0.10	0.98±0.08
Vehicle	1.04±0.08	0.99±0.11	0.99±0.08	0.99±0.12
Reference				
Minoxidil	2.39±0.64 ^{cd}	3.80±1.16 ^{cd}	3.85±0.79 ^{cd}	0.33±0.11 ^{ab}
Test substances				
RB-SCE	2.30±0.52 ^{cd}	3.67±0.74 ^{cd}	4.55±1.31 ^{cd}	0.24±0.10 ^{ab}
LA	2.42±0.56 ^{cd}	4.53±0.99 ^{cd}	3.61±0.83 ^{cd}	0.33±0.12 ^{ab}
OZ	1.91±0.34 ^{cd}	4.07±1.38 ^{cd}	5.10±1.37 ^{cd}	0.22±0.07 ^{ab}

Values are expressed mean ± SD of eight mice

^a p<0.01 as compared with non-treated control by LSD test

^b p<0.01 as compared with vehicle control by LSD test

^c p<0.01 as compared with non-treated control by MW test

^d p<0.01 as compared with vehicle control by MW test

(마) 조직병리학적변화

- 매체 대조군의 경우, 무처리 대조군과 비교하여 의미 있는 조직학적 변화는 인정되지 않았다. 즉 무처리 대조군과 유사한 단위 면적당 평균 모낭 수, hair shaft를 함유한 anagen phase의 성숙한 모낭의 비율, 모낭의 평균 직경, 모낭 내 Ki-67 면역반응 세포의 수적 변화를 각각 나타내었다.
- 한편 모든 4 종류의 실험물질의 도포군에서는 각각 무처리 및 매체 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 모낭 수, 성숙 모낭의 비율, 모낭의 평균 직경 및 모낭 내 Ki-67 면역반응 세포의 수적 증가가 각각 인정되었다 (Table 10, Fig 26 and 27).
- 단위 면적당 평균 모낭 수는 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -1.59%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 174.19, 162.90, 171.77 및 138.71%의 변화를 나타내었다. Hair shaft를 함유한 anagen phase의 성숙한 모낭의 비율은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 3.66%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 75.69, 82.75, 92.94 및 69.80%의 변화를 나타내었다.

- 모낭의 평균 직경은 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 0.38%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 101.93, 128.25, 148.40 및 89.10%의 변화를 나타내었다. 모낭 내 Ki-67 면역반응 세포의 수는 매체 대조군에서 무처리 대조군에 비해 -5.08%의 변화를 나타내었으며, minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 각각 매체 대조군에 비해 475.00, 1044.64, 1246.43 및 686.61%의 변화를 나타내었다.

Table 10. General Histomorphometrical Analysis of Dorsal Back Skins after 14 Days of Continuous Topical Apply of Vehicle, Minoxidil, RB-SCE, LA or OZ in Hair-removed Mice

Groups	Mean numbers of hair follicle (follicles/mm ² of hypodermis)	Percentage of mature anagen phased follicles contains hair shaft (%/total follicle)	Mean hair follicle diameters (μm/shaft regions of follicle)	Mean numbers of Ki-67 immunolabeled follicular cells (cells/follicle)
Controls				
Non-treated	15.75±4.33	30.75±10.78	36.84±11.04	14.75±8.14
Vehicle	15.50±5.53	31.88±11.52	36.98±10.03	14.00±7.33
Reference				
Minoxidil	42.50±10.13 ^{ab}	56.00±14.06 ^{ab}	74.67±18.41 ^{ab}	80.50±22.07 ^{cd}
Test substances				
RB-SCE	40.75±12.24 ^{ab}	58.25±12.80 ^{ab}	84.41±12.33 ^{ab}	160.25±75.22 ^{cd}
LA	42.13±12.03 ^{ab}	61.50±16.04 ^{ab}	91.86±18.03 ^{ab}	188.50±92.03 ^{cd}
OZ	37.00±10.34 ^{ab}	54.13±12.24 ^{ab}	69.93±10.61 ^{ab}	110.13±34.47 ^{cd}

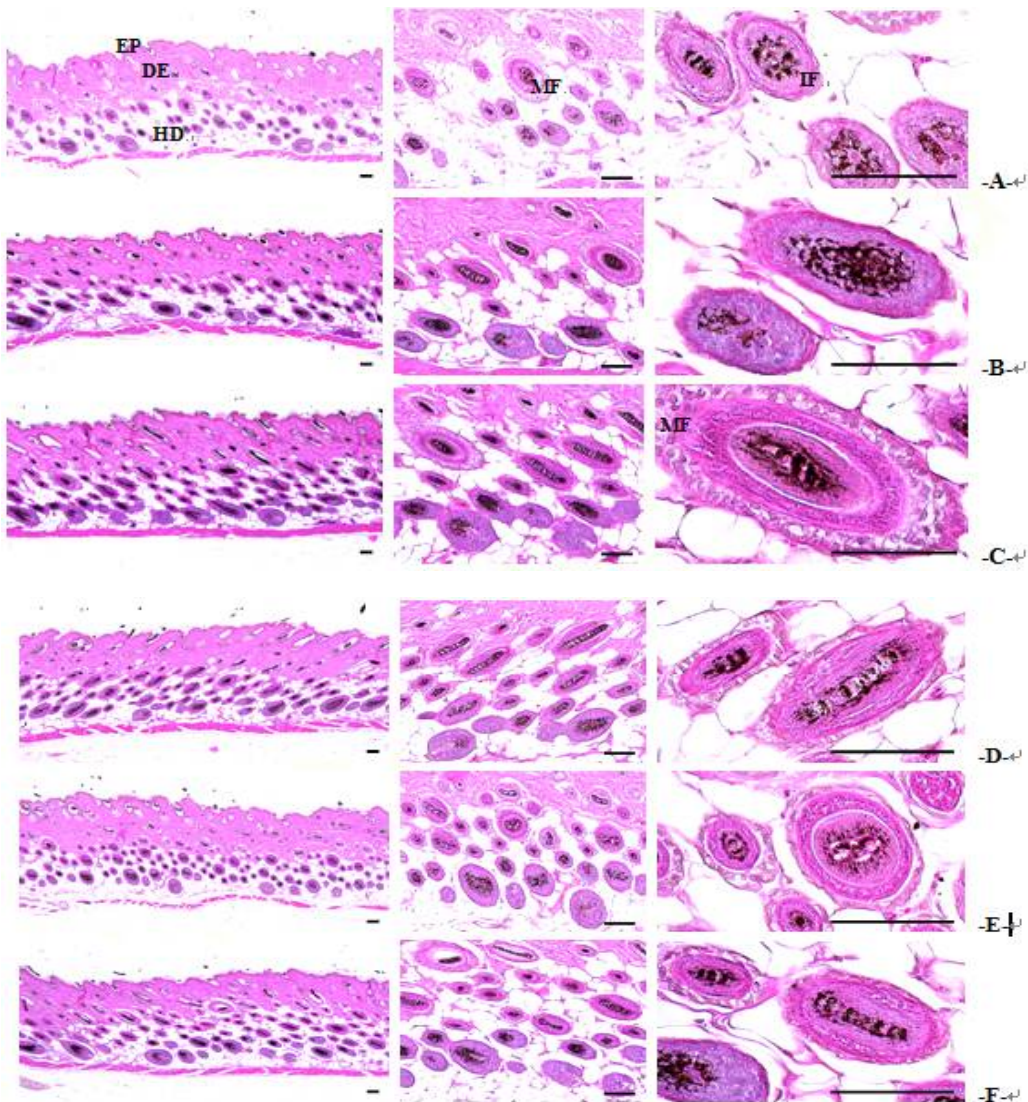


Fig 26. Representative Histological Images of Dorsal Back Skin Tissues, Taken from Hair-removed Mice

A = Non-treated dorsal back hair removed mice (non-treated control)

B = 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (vehicle control)

C = 3% minoxidil treated dorsal back hair removed mice (Minoxidil)

D = 3% RB-SCE dissolved in 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (RB-SCE)

E = 11.1 mg/ml of LA treated dorsal back hair removed mice (LA)

F = 0.22 mg/ml of OZ treated dorsal back hair removed mice (OZ)

EP = epithelium

MF = mature anagen phased follicles contains hair shaft

IF = immature follicle

DE = dermis

HD = hypodermis

Scale bars = 80 μ m.

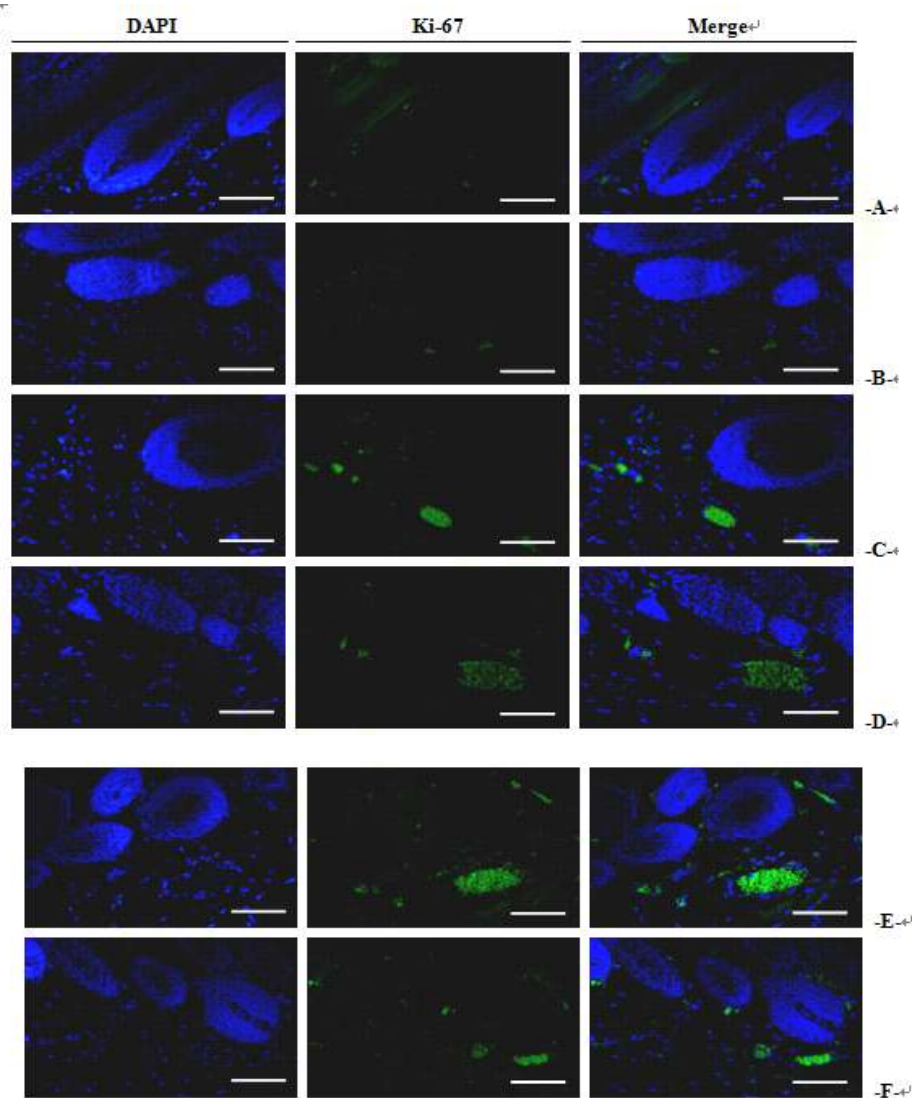


Fig 27. Representative Ki-67 Immunofluorescent Images of Dorsal Back Skin Tissues, Taken from Hair-removed Mice

- A** = Non-treated dorsal back hair removed mice (non-treated control)
- B** = 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (vehicle control)
- C** = 3% minoxidil treated dorsal back hair removed mice (Minoxidil)
- D** = 3% RB-SCE dissolved in 10% ethanol treated dorsal back hair removed mice (RB-SCE)
- E** = 11.1 mg/ml of LA treated dorsal back hair removed mice (LA)
- F** = 0.22 mg/ml of OZ treated dorsal back hair removed mice (OZ)

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

Immunostain against Ki-67 and count stained with DAPI

Scale bars = 80 μ m.

라. 고 찰

- 모발성장주기 (hair growth cycle)는 일반적으로 3단계로 구성되는데, 모유두에서 모발을 성장시키는 시기 (anagen phase), 모발의 퇴화가 시작되는 시기 (catagen phase) 및 모발의 성장이 멈추거나 노화된 모발을 탈모시키는 시기 (telogen phase)로 분류 된다 [Zong et al., 2003].
- 모발은 모발의 각 성장주기에 대하여 다양한 인자들이 작용함으로써 양모 또는 탈모를 유발하게 된다 [Shin et al., 2011; Choi et al., 2014]. 본 연구에서는 RB-SCE의 기전 연구를 위해, RB-SCE와 주요 구성성분인 LA 및 OZ의 양모 촉진 효과를 등쪽 피부를 제모한 C57BL/6N 마우스를 이용하여, 다시 한번 평가하였다.
- 즉, 체중 및 증체량, 제모후 실험물질을 도포한 등쪽 피부에서 모발 증식 부위 및 모발 평균 길이의 변화를 육안적으로 평가하였으며, 후보물질 적용 피부 부위의 조직병리학적 변화단위 면적당 평균 모낭 수, hair shaft를 함유한 anagen phase의 성숙한 모낭의 비율, 모낭의 평균 직경, 세포 증식 지표인 Ki-67 면역반응세포의 수적 변화와 함께 피부 조직내 KGF, IGF, VEGF 및 TGF- β mRNA 발현의 변화 역시 측정하였으며, 실험결과는 3% minoxidil 도포군과 비교 평가하였다.
- 본 실험에서는 이전의 방법들 [Shin et al., 2011; Hou et al., 2013; Choi et al., 2014; Junlatat and Sripanidkulchai, 2014]에 따라, 전기 제모기와 80% thioglycolic acid 를 함유한 제모 크림을 이용하여, 등쪽 피부를 완전히 제모하였으며, 제모 24시간 후부터, 100 μ l의 3% minoxidil, 3% RB-SCE (10% ethanol에 용해), 11.1 mg/ml 농도의 LA 및 0.22 mg/ml농도의 OZ 각각을 제모한 등쪽 피부에 매일 1회씩 14일 동안 도포하였으며, 별도의 무처리 대조군을 준비하였고, 매체 대조군에서는 실험물질 대신 10% ethanol 만 동일한 방법으로 동일한 기간동안 도포하였다.
- 본 실험의 결과, 10% ethanol을 도포한 매체 대조군에서는 무처리 대조군과 비교하여, 의미 있는 모발 증식 부위 및 모발 평균 길이의 변화가 인정되지 않았으며, 유의성 있는 피부의 조직학적 변화 (단위 면적당 평균 모낭 수, hair shaft를 함유한 anagen phase의 성숙한 모낭의 비율, 모낭의 평균 직경 및 Ki-67 면역반응세포의 수)가 인정되지 않았고, 피부 조직내 KGF, IGF, VEGF 및 TGF- β mRNA 발현의 변화 역시 인정되지 않아, 매체에 의한 영향은 없는 것으로 판단되었다.
- 한편 minoxidil 처리군에서는 처리 시작 3일 후부터 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 증식 부위의 증가 인정되었으며, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서도 각각 처리시작 7일 후부터 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 증식 부위의 증가 인정된다.
- 또한 minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 평균 길이, 단위 면적당 평균 모낭 수, anagen phase의 성숙한 모낭의 비율,

모낭의 평균 직경 및 Ki-67 면역반응세포의 수적 증가가 각각 인정되었고, 피부 조직내 KGF, IGF 및 VEGF mRNA 발현의 증가가 TGF- β mRNA 발현의 감소와 함께 인정되었다.

- 특히, RB-SCE 및 LA 처리군에서는 minoxidil 도포군에 비해서도 현저한 모낭 직경 및 Ki-67 면역반응세포의 수적 증가가 인정되었다. 이러한 결과는 이전의 연구 [Choi et al., 2014]에서와 유사하게 RB-SCE 및 주요 구성 성분인 LA와 OZ가 KGF, IGF 및 VEGF mRNA 발현 증가가 TGF- β mRNA 발현 억제를 통한 모낭 세포 증식을 촉진하여, 양모 촉진효과를 나타내는 것으로 판단된다.
- 본 실험에서 무처리 대조군에 비해 의미 있는 체중 및 증체량의 변화가 매체 대조군에서 인정되지 않았으며, minoxidil을 포함한 모든 실험 물질 도포군에서도 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다.
- 매체 및 무처리 대조군을 포함한 본 실험에 사용한 모든 hairless 마우스는 동일한 연령의 정상 C57BL/6 마우스의 체중 증가 범주 [Fox et al., 1984; Tajima, 1989] 내에서 체중 증가를 각각 나타내었다.
- 각 시기별 모낭은 특징적인 형태를 나타내며, 모유두에서 모발을 성장시키는 시기 (anagen phase) 동안 모낭은 확장되어, 피하지방층 (panniculus adipisus)에서 피하 근육층 (panniculus carnosus)으로 증식하며, 모근 세포들이 증식, 분화하여 hair shaft를 형성하면서, 길이 성장을 계속하고, 피부조직의 비후와 함께 모낭의 수적 증가가 지속적으로 일어난다 [Moffat, 1968; Ogawa and Hattori, 1983].
- 이후 모발의 퇴화가 시작되는 시기 (catagen phase)에서는 모낭의 퇴축이 시작되고, 피부의 두께 역시 감소되며, 모발의 성장이 멈추거나 노화된 모발을 탈모시키는 시기 (telogen phase)로 들어서면 hair의 탈락이 일어나고, 이후 모낭의 줄기세포들이 활성화되면 새로운 anagen phase에 접어들게 되고, hair shaft의 생성이 일어난다 [Zong et al., 2003; Choi et al., 2014].
- 현재까지 제모한 C57BL/6 마우스에서 실험물질의 양모 촉진 효과는 모발 성장시기 (anagen phase)를 의미하는 등쪽 피부의 흑색화 (darkening)를 기준으로 평가되어 왔으며 [Hou et al., 2013; Choi et al., 2014], 조직학적으로 피하지방층내 모낭 수, 모낭 직경 및 hair shaft를 포함한 anagen phase의 mature 모낭 수의 증가 역시 양모 촉진 효과를 의미하는 것으로 판단되어 왔다 [Shin et al., 2011; Hou et al., 2013; Choi et al., 2014; Junlatat and Sripanidkulchai, 2014].
- 본 실험의 결과, 10% ethanol을 도포한 매체 대조군에서는 무처리 대조군과 비교하여, 의미 있는 모발 증식 부위 및 모발 평균 길이의 변화가 인정되지 않았으며, 유의성 있는 피부의 조직학적 변화 (단위 면적당 평균 모낭 수, hair shaft를 함유한 anagen phase의 성

숙한 모낭의 비율, 모낭의 평균 직경 및 Ki-67 면역반응세포의 수)가 인정되지 않아, 매체에 의한 영향은 없는 것으로 판단되었다.

- 한편 minoxidil 처리군에서는 처리 시작 3일 후부터 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 증식 부위의 증가 인정되었으며, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서도 각각 처리 시작 7일 후부터 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 증식 부위의 증가 인정된다.
- 또한 minoxidil, RB-SCE, LA 및 OZ 처리군에서는 매체 또는 무처리 대조군에 비해 유의성 있는 모발 평균 길이, 단위 면적당 평균 모낭 수, anagen phase의 성숙한 모낭의 비율 및 모낭의 평균 직경 증가가 각각 인정되었다. 이러한 결과는 이전의 연구 [Choi et al., 2014]에서와 유사하게 RB-SCE 및 주요 구성 성분인 LA와 OZ의 양모 촉진효과를 나타내는 직접적인 증거로 판단된다.
- 다양한 cytokine 및 성장인자들이 모발 증식에 관여하는 것으로 알려져 있으며 [Choi et al., 2014], 모발의 성장을 촉진하고 anagen phase의 시작을 위해서는 IGF-1, 섬유모세포 성장인자 (bFGF), KGF 및 VEGF의 발현 증가가 필수적이며, 반대로 모발의 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려진 TGF- β 와 IL (interleukin)-1의 발현은 감소되어야 한다 [Danilenko et al., 1996; Fujie et al., 2001].
- 이중 VEGF는 혈관신생을 조절하는 대표적인 성장인자로, 동시에 세포의 생존, 증식, nitric oxide 및 prostacyclin의 분비와 같은 다양한 세포 기능에도 관여하는 것으로 알려져 있다 [Messenger and Rundegren, 2004]. VEGF의 발현 증가는 혈관 생을 의미하며, 모발의 성장 주기에 따라 VEGF mRNA의 발현은 다양한 양상을 나타내고, 특히 anagen phase 시 현저히 증가되는 반면 telogen phase에서는 감소되는 것으로 알려져 있다.
- IGF는 피부를 포함한 다양한 조직과 기관에서 세포의 성장, 생존 및 분화를 조절하는 peptide 호르몬의 일종으로, 모낭의 세포 증식 및 이동에 관여하여, 모발의 성장을 촉진하는 인자로 알려져 있다 [Weger and Schlake, 2005].
- KGF 역시 진피조직에서 발현되며, paracrine 기전으로 진피의 증식 및 분화에 관여하며, 특히 창상 치유를 촉진하고, 모발의 성장을 주도하는 것으로 알려져 있다 [Werner and Smola, 2001].
- 이와는 반대로 TGF- β 는 각질세포의 apoptosis 를 유발하여, 모발의 탈락을 촉진하고 telogen phase로 접어들게 한다 [Li et al., 1999].
- Choi et al [2004]의 보고에 따르면 RB-SCE 및 주요 구성성분인 LA와 OZ는 minoxidil과 유사한 정도로 피부 조직내 VEGF, IGF 및 KGF mRNA 발현을 증가시키고, TGF- β mRNA 발현은 억제한다. 본 연구에서도 Choi et al [2004]의 보고와 동일한 결과가 관찰되

어, RB-SCE 및 주요 구성 성분인 LA와 OZ가 KGF, IGF 및 VEGF mRNA 발현 증가가 TGF- β mRNA 발현 억제를 통해 양모 촉진효과를 나타내는 것으로 다시 한번 관찰되었다.

- Ki-67은 MKI67로도 불리우는 단백질로, 사람의 경우 MKI67 유전자에 encoding되어 있으며 [Schonk et al., 1989], 세포 증식에 필수적인 단백질로 알려져 있고 [Rahmanzadeh et al., 2007], 특히 ribosomal RNA transcription에 관여한다 [Bullwinkel et al., 2006]. 즉, Ki-67 항원의 비활성화는 ribosomal RNA 합성을 억제하므로 [Rahmanzadeh et al., 2007], 종양에 있어 중요한 세포 증식 인자로 활용되어져 왔다 [Hu-Lowe et al., 2008; Awasthi et al., 2012]. 모낭내에서의 Ki-67 면역반응성의 증가 역시 모낭세포의 증식에 따른 모발의 성장을 의미하므로 [Yoon et al., 2011; Holub et al., 2012], 곧 양모 촉진 효과를 의미한다.
- 본 실험의 결과에서도, minoxidil, RB-SCE, OZ 및 LA 처리군에서는 무처리 및 매체 대조군과 비교하여 각각 현저한 Ki-67 면역반응세포의 수적 증가가 인정되었으며, 특히 **RB-SCE 및 LA 처리군에서는 minoxidil 도포군에 비해서도 현저한 Ki-67 양성세포의 수적 증가가 인정되었다.** 따라서, 이전의 연구 [Choi et al., 2014]에서와 유사하게 RB-SCE 및 주요 구성 성분인 LA와 OZ가 KGF, IGF 및 VEGF mRNA 발현 증가가 TGF- β mRNA 발현 억제를 통한 모낭 세포 증식을 촉진하여, 양모 촉진효과를 나타내는 것으로 판단된다.

마. 결론

- 이상에서, **RB-SCE 및 주요 구성 성분인 LA와 OZ**는 KGF, IGF 및 VEGF mRNA 발현 증가가 TGF- β mRNA 발현 억제를 통한 모낭 세포 증식을 촉진하여, **양모 촉진효과를 나타내는 것으로 판단된다.**

4. NMR를 이용한 조직의 대사산물(Metabolome) 분석

가. 원리

- 핵자기공명분광기기 (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)를 이용하면 아미노산, 유기산, 당, 핵산관련물질, 지방 등의 다양한 대사산물을 동시에 분석할 수 있다.

나. 측정 방법

- 본 연구에 사용된 NMR은 동물조직을 시료 전처리 없이 직접 NMR에서 대사산물을 분석하는 장비로서, 본 연구에서 사용된 동물 표피에서 lipids, tryglyceride, isoleucine, creatine, taurine, hypotaurine, glycine, lactate, alanine, acetate, arginine, glutamine, glutamate, glycerol, tyrosine, phenylalanine, fumarate, adenosine, formate가 동시에 검출되었으며, 이들 성분의 차이를 이용하여 탈모 치료제의 효능을 대사가작에 기반을 두고 추적하였다. NMR분석 결과는 MATLAB (The MathWorks, Inc.) 프로그램을 이용하여 진행하였다.

- 장비: 700 MHz ^1H HRMASNMRspectrometer((Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)
- 측정온도: 5 °C
- 조직 시료 양: 10 mg
- 1차 시료 : control(10% ethanol처리 mouse 조직; negative control)
skin 1(3% Minoxidil 처리 mouse 조직; positive control)
skin2 (3% 초임계 추출물 처리 mouse 조직: sample)
- 2차 시료 : NC (무처리 ; mouse 조직; negative control)
VC (10% ethanol처리 mouse 조직; vehicle control)
PC (3% Minoxidil 처리 mouse 조직; positive control)
RB-SCE (3% 초임계 추출물 처리 mouse 조직: sample 1)
LA (Linoleic acid 처리 mouse 조직: sample 2)
OZ (감마오리자놀 처리 mouse 조직: sample 3)

다. 측정 결과

(1) 1차 측정 결과

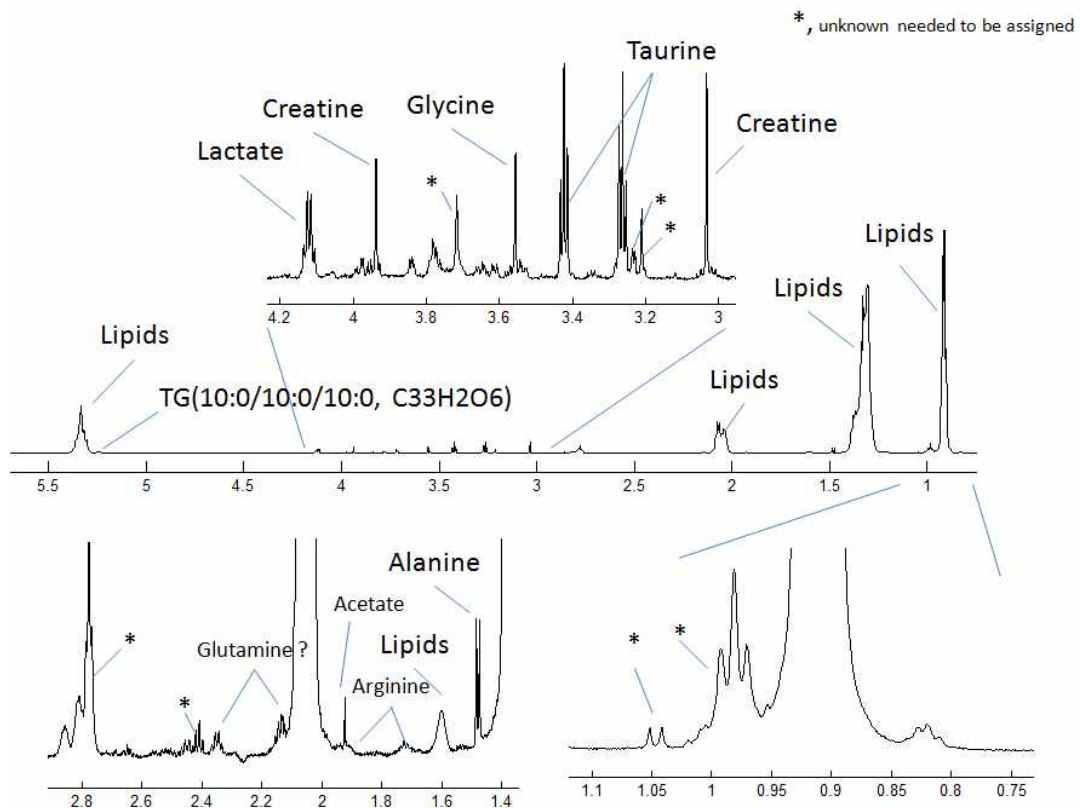


Fig 28. 분석 결과 대표적인 NMR spectrum

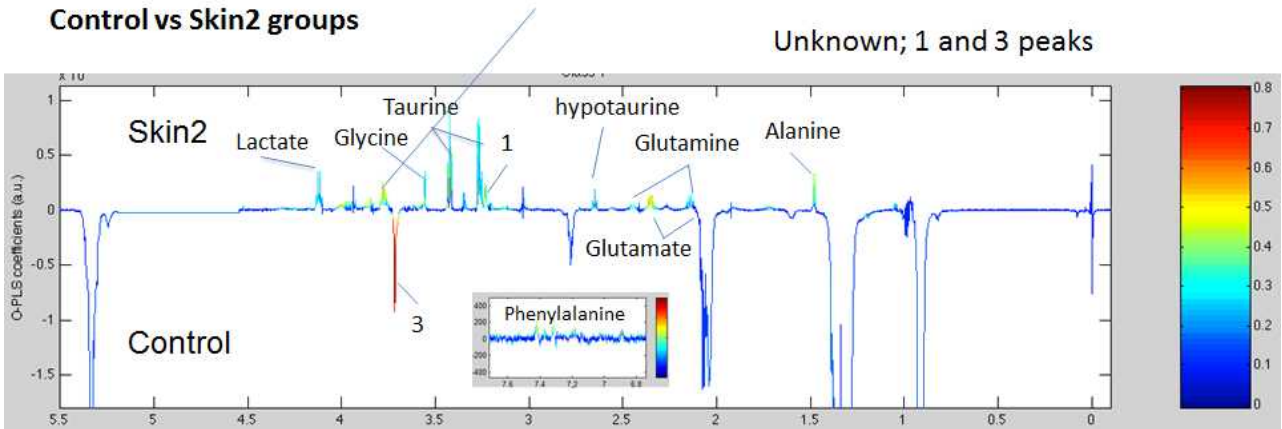


Fig 29. 초임계 미강 추출물 처리에 의한 변화 metabolites의 확인

- Negative control군에 비해 초임계 추출물처리 군의 skin 조직에서 ID된 대부분의 성분은 지방 성분과 함께 유기산, 아미노산 성분이 ID되었다. 그러나 positive control에서 주로 ID된 성분은 glycerol이었다. 이는 minoxidil 제조사의 주된 부형제가 glycerol이므로 이에 기인한 물질로 사료된다.
- 초임계 추출물에 의해 발현된 대사체 성분은 Fig. 29과 같이 lactate, glycine, taurine, hypotaurine, glutamine, glutamate, alanine 들로 확인되었다. 이들의 대사기작을 살펴본 결과, 대부분, taurin 생합성 기작에 관여하는 대사산물임을 알 수 있었다. 이 결과를 근거로 확인해 본 결과 모낭이 형성되는 과정에 taurin이 합성되며, 이 taurin이 모낭 형성에 영향을 미치는 요인으로 작용하는 듯 하다.
- 초임계 추출물은 다양한 지방성분이 추출되어 있는 복합물이므로 그 관여기작은 매우 다양할 것으로 사료된다. 그러나 이들 복합물이 탈모 방지 및 양모를 위한 작용 기작은 항산화 작용이외에도 taurin 생합성에 관여하는 것으로 사료된다. 이에 대한 연구는 각 지표성분을 대상으로 더 연구되어야 할 것이다.

(2) 2차 측정 결과

- 두 번째 동물 실험 결과 뛰어난 양모효과를 나타내면서 성장인자 등의 사이토카인으로 확인된 시료를 이용하여 두 번째 NMR 분석 결과는 다음과 같다.
- 대표적인 대사체의 분포는 거의 비슷하였다. 그러나 그 발현량의 차이를 나타내는 대사물질의 양의 차이가 1차 실험에 비해 많은 차이를 보이지 않았다. 단지 lactate와 3-hydroxybutyrate의 발현량의 차이만을 나타내었다.
- lactate는 모낭세포에서 모낭의 형성을 위한 에너지원으로 glutamate를 대사하여 생긴 대사체로 알려져 있다.

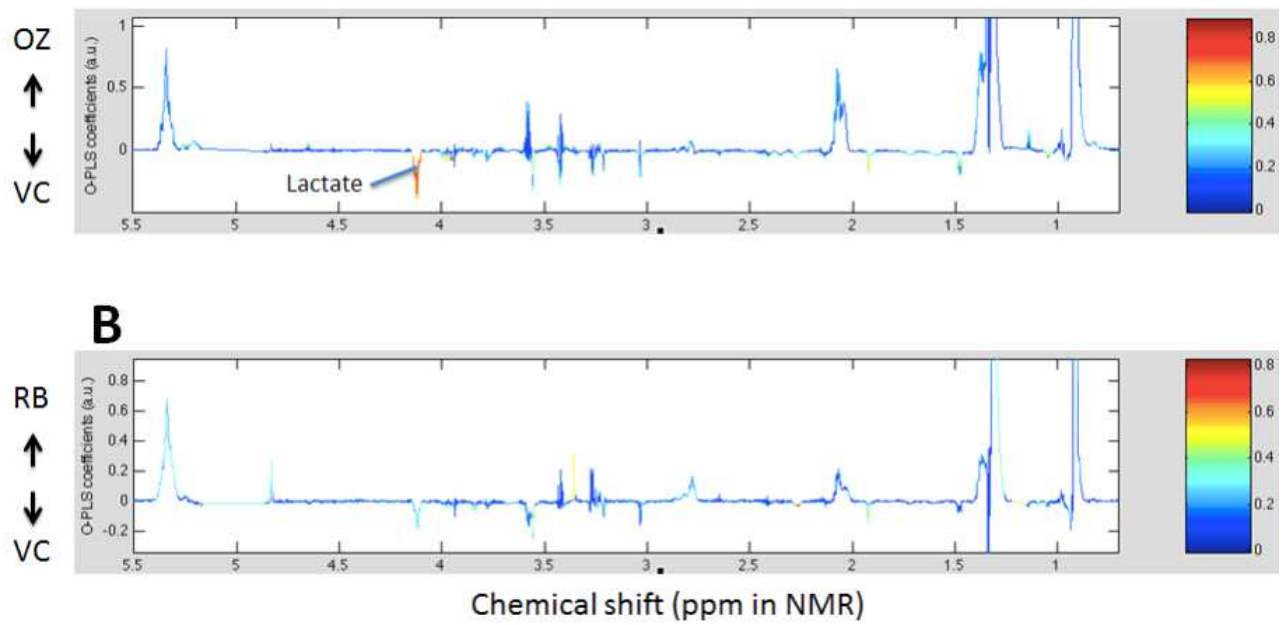


Fig.30. OPLS loading plot derived from NMR spectrum of intact skin tissue treated with OZ (A) and RB (B).

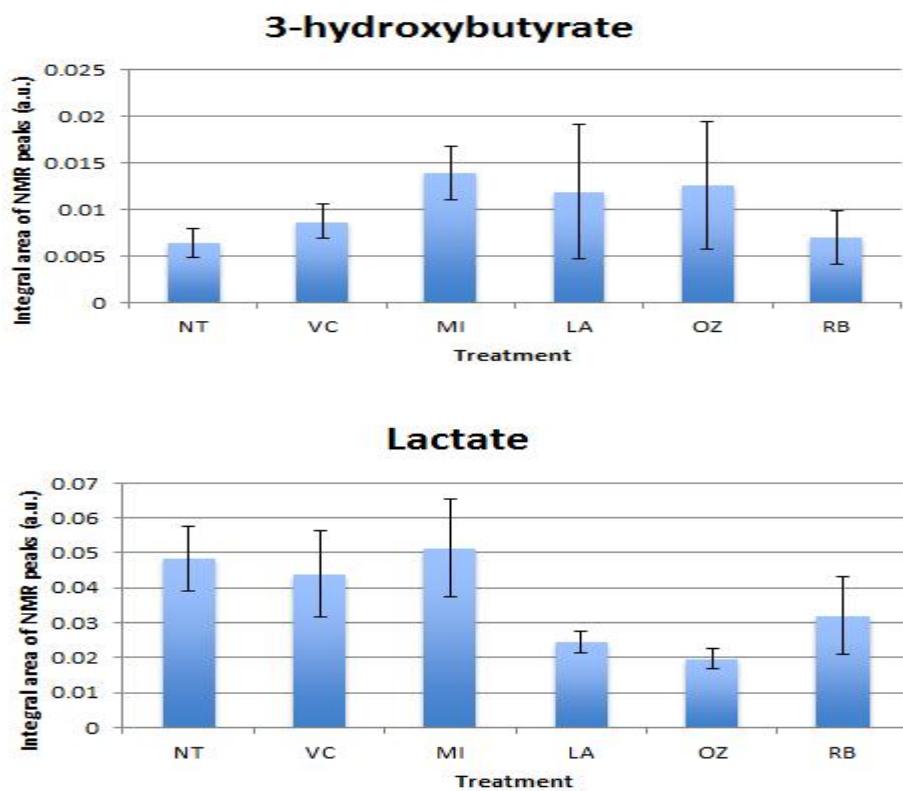


Fig.31. Changes of lactate and 3-hydroxybutyrate in skin tissues with various treatment conditions

라. 결론

- 본 연구는 NMR을 이용한 조직자체의 metabolome 분석법을 이용한 방법으로, 양모효과를 나타내는 물질에 의한 대사체의 변화를 확인하기 위해 진행되었다.
- 그러나 동물실험을 통해 얻어지는 조직을 이용하는 과정을 거치면서 taurine의 생합성 관련 대사체의 확인을 위해 2차 동물실험을 진행하였으나 재현성을 확인하지는 못하였다.
- 그러나 실험진행 검토결과 조직채취시의 진피 및 표피의 포함여부에 따른 결과로 판단되며, 이에 실험 동물 희생시 채취한 혈청을 대상으로 3차 NMR 분석을 진행 중에 있다.

제 8 절 식약청 인증준비

1. 초임계 미강추출물의 안전성 평가

가. 실시된 독성시험의 종류

- 본 연구는 초임계 미강추출물의 안전성 평가를 위한 비임상 독성시험을 실시하였다. GLP독성 기관인 (주) 켄온에서 독성시험이 실시되었다.
- 실시된 독성시험의 종류는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. 시험 종류

시험종류	진행상황
랫드 단회투여 독성시험(경피)	완료
랫드 단회투여 독성시험(경구)	완료
랫드 1주 반복투여 독성시험(경피)	완료
랫드 4주 반복투여 독성시험(경피)	완료
복귀돌연변이 예비시험 및 본시험	완료
염색체이상 예비시험 및 본시험	완료
소핵 예비시험 및 본시험	완료
토끼 피부자극시험	완료
토끼 안점막 자극시험	완료
기니픽 피부감작성시험	완료

나. 독성시험 결과 (별첨 자료 참조)

(1) 미강 추출물

(가) 유전독성시험 RBSCE

시험제목	결과	비고
복귀돌연변이시험 (살모넬라 4 균주, 대장균 1 균주)	음성	대사활성계 적용 및 비적용시 5균주 모두에서 최고농도 5000 µg/plate 까지 음성임.
염색체이상시험 (CHL cells)	음성	대사활성계 적용 6시간 처리군(120 및 140 µg/mL)에서는 염색체의 구조적 이상 및 수적 이상이 통계학적으로 유의한 증가를, 비적용 6시간 처리군(200 및 220 µg/mL)에서는 염색체의 수적이상이 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었음. 그러나 이들 이상은 심한 세포독성으로 인한 것으로 판단하며, 생물학적인 이미는 없는 것으로 판단함.
소핵시험 (ICR 마우스)	음성	시험물질 고용량(600 mg/kg/day로 2 회 복강 투여)에 이르기까지 소핵의 증가는 없음.

(나) 랫드 경구 및 경피독성시험

시험제목	결과	비고
랫드 단회투여 독성시험(경피)	개략의 치사량 2000 mg/kg 이상	Day 2에 전군에서 체중감소가 관찰되었으나, Day 4 에서 모두 회복, 경피적용방법에 따른 일시적 변화로 판단.
랫드 단회투여 독성시험(경구)	개략의 치사량 10000 mg/kg 이상	전군에서 산발적으로 연변, 설사, 항문주의오염이 관찰되었으나, 체중 감소 및 부검소견시 위장관의 변화를 나타내지 않아 우발적 변화로 판단.
랫드 1주 반복투여 독성시험(경피)	4 주 투여에서 고용량은 2000 mg/kg/day 를 추천	암컷에서 투여기간 중 체중 감소 및 증가 억제가 전군에서 산발적으로 관찰, 경피적용방법에 따른 우발적 변화로 판단.
랫드 4주 반복투여 독성시험(경피)	무독성량 2000 mg/kg/day	부형제대조군 암컷 1 례가 사망, 사망 전 특별한 이상소견이 관찰되지 않았으며, 부검 결과, 시험물질과 연관된 변화는 관찰되지 않아, 우발적 변화로 판단.

(다) 토끼 피부 및 안자극성시험

시험제목	결과	비고
뉴질랜드 화이트 토끼 피부자극성시험	중등도 자극성 물질 (moderate irritatnt)로 판정	1차 피부자극지수 2.71
뉴질랜드 화이트 토끼 안자극성시험	비자극성 물질 (non-irritatnt)로 판정	안점막자극지수 0.

(2) 미강 추출물

(가) 토끼 피부자극성시험 및 기니픽 피부감작성시험

시험제목	결과	비고
뉴질랜드 화이트 토끼 피부자극성시험	비자극성 물질 (non-irritatnt)로 판정	1차 피부자극지수 0.
기니픽(하틀리 계) 피부감작성시험	매우 약한(very weak) 감작성으로 판정	감작용 0 %.

2. 유효성 평가

가. 양모효과 유효성 평가

(1) 위탁기관인 고려대학교의 동물 유효성 실험

- 원료의 유효성 확보를 위해 positive control로 미녹시딜을 설정
- 양모제 가이드라인에 따른 시험방법으로 C57BL/6 마우스의 모낭 성장기 유도 및 퇴행기 억제 효능의 평가

(2) 고려대학교 안산병원 피부과와의 임상유효성 실험

- 미강 에센스의 임상 시험을 통해 유효성 확보

3. 제품의 기준 및 시험방법 확립

가. 초임계 미강 추출물의 규격화

(1) 기준 및 시험방법

시험항목	기준	시험방법	참고	
성상	노란색의 왁스형태	육안 관찰	대한약전	
확인	리놀레산 검액 및 표준액의 크로마토그램에서 리놀레산의 피크 유지시간은 일치해야 한다.	기체 크로마토그래프법	대한약전 일반시험법 8. 기체크로마토그래프법 (식품공전 일반시험법 지방산분석법 참조)	
	감마 오리지놀 파장 231±2nm, 291±2nm 및 315±2nm에서 흡수극대를 나타낸다	UV 스펙트럼	의약품 기준 및 시험방법 감마오리지놀 확인시험 1항	
굴절률	1.470 ~ 1.473	굴절계	대한약전 일반시험법 굴절률	
비누화가	60- 110	검화가	식품공전 일반시험법 비비누화물	
비중	0.916 ~ 0.922	비중계	대한약전 일반시험법 비중	
산가	200 이하	유리지방산 적정(산염기적정)	식품공전 일반시험법 산가	
요오드가	90 ~ 110	요오드 적정(역적정)	식품공전 일반시험법 요오드가	
납	2 ppm 이하	유도결합플라즈마분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 납 시험법	
비소	2 ppm 이하	유도결합플라즈마분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 비소시험법	
정량	리놀레산	22 ~ 28 g / 100 g	가스크로마토그래피	식품공전 일반시험법 지방산분석법
	감마 오리지놀	1.73~30mg	흡광도 측정	대한약전 자외가시부흡광도측정법

(2) 시험 결과

(가) 정량시험

- 미강 추출물(RB-SCE)의 감마 오리지놀 함량시험(흡광도 실험)

① Lab scale 추출 결과

Lab scale	희석배수	1반복	2반복	3반복	평균	농도 (ug/ml)	농도 (mg/ml)
1차 (2011. 10)	200	0.477	0.433	0.453	0.454	3907.56	3.91
2차-A (2012. 12)	300		0.378	0.351	0.364	4,963.0	4.96
2차-B (2012. 12)	300	0.344	0.327	0.341	0.337	4,691.3	4.69
2차-C (2012. 12)	300	0.338	0.395	0.351	0.361	4,931.3	4.93
3차 (2014. 2)	300	0.338	0.327	0.34	0.335	4,668.0	4.67

② 대량(전남 바이오생산) 추출결과

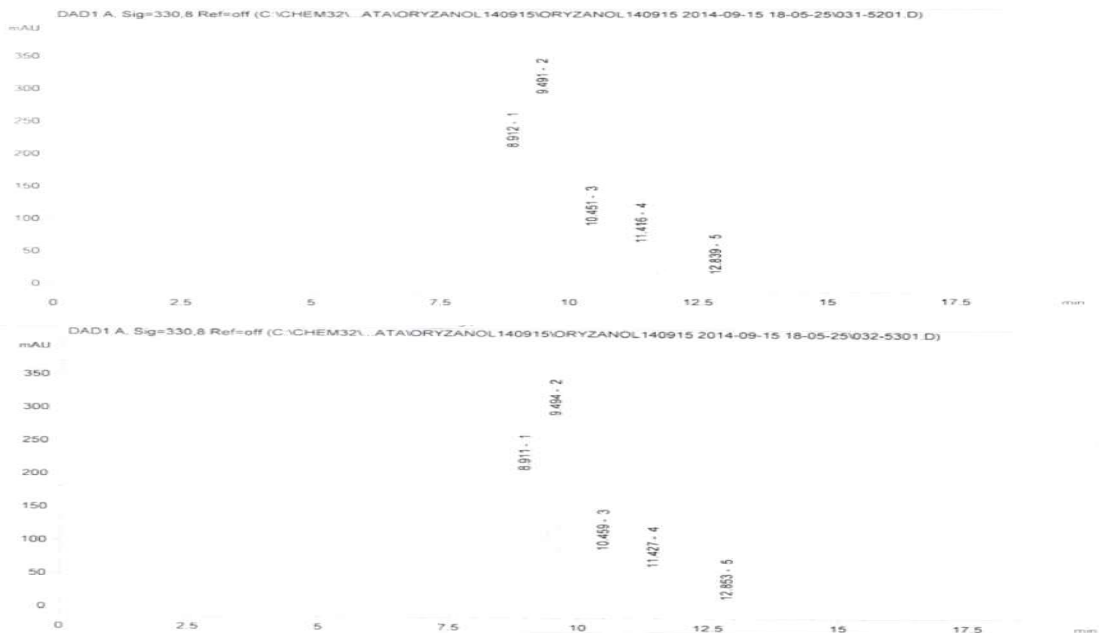
	희석배수	1반복	2반복	3반복	평균	농도 (ug/ml)	농도 (mg/ml)
1차 (2012. 2)	700	0.737	0.744	0.79	0.757000	20738.67	20.73867
2차 (2014. 5)	800	0.829	0.983	1.031	0.947667	28785.78	28.78578

(나) 확인시험

- 미강 추출물(RB-SCE)의 감마 오리자놀의 확인시험법 -HPCL

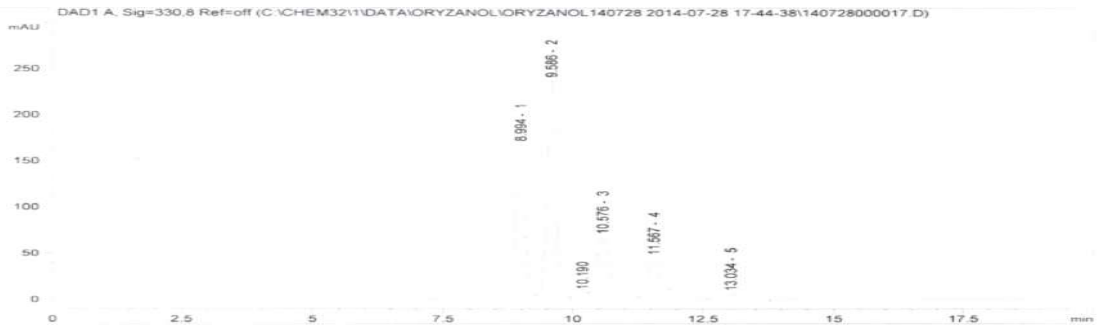
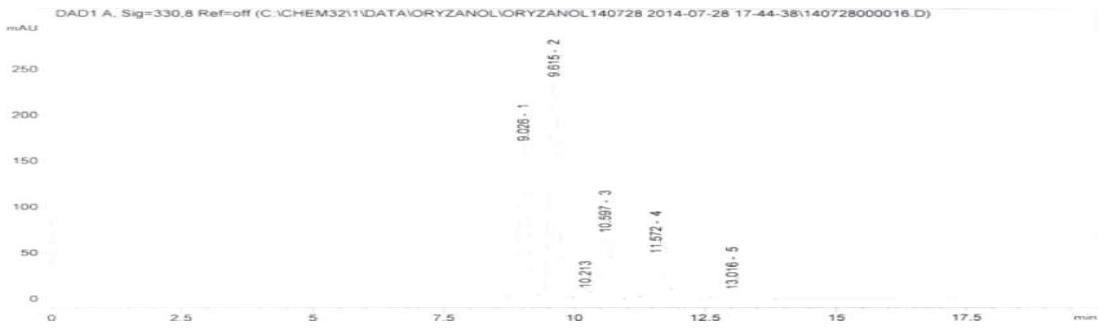
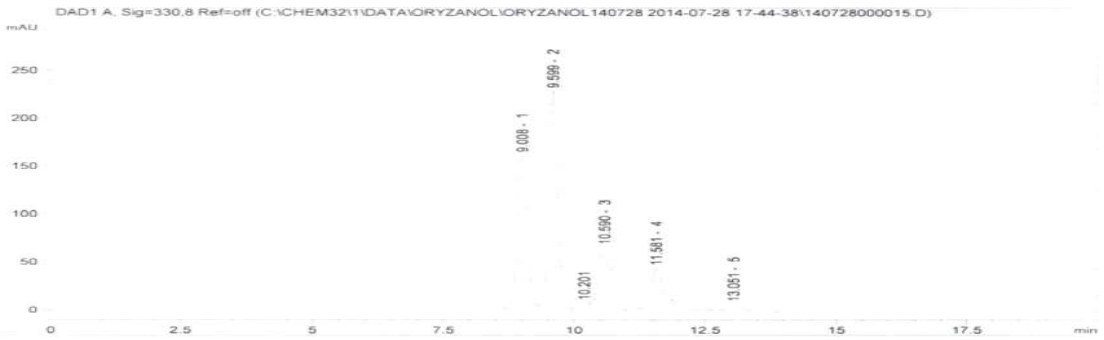
① 대량추출(전남바이오생산) 시료 : 표준품 대비 같은 시간대의 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.

㉞ 1차 생산 HPLC chromatogram

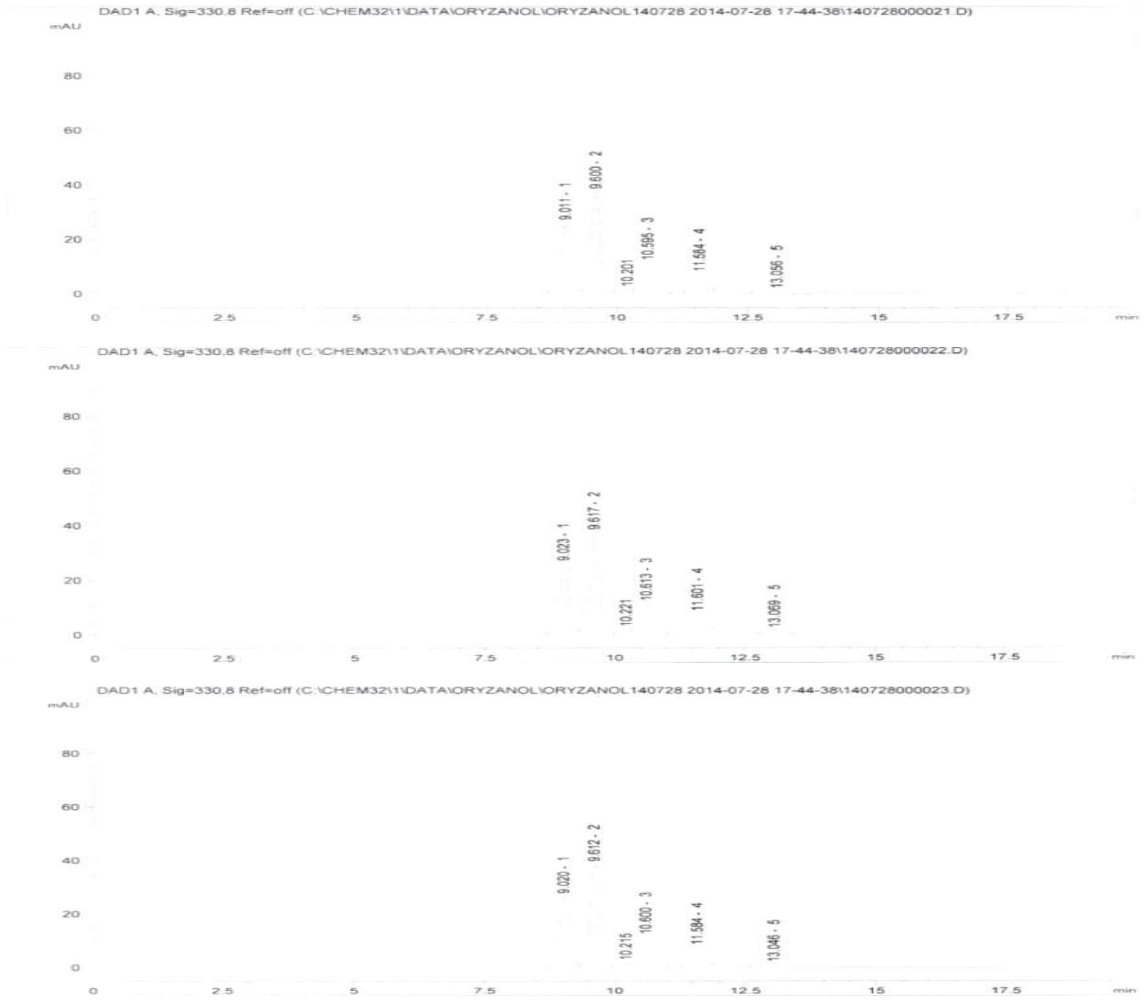




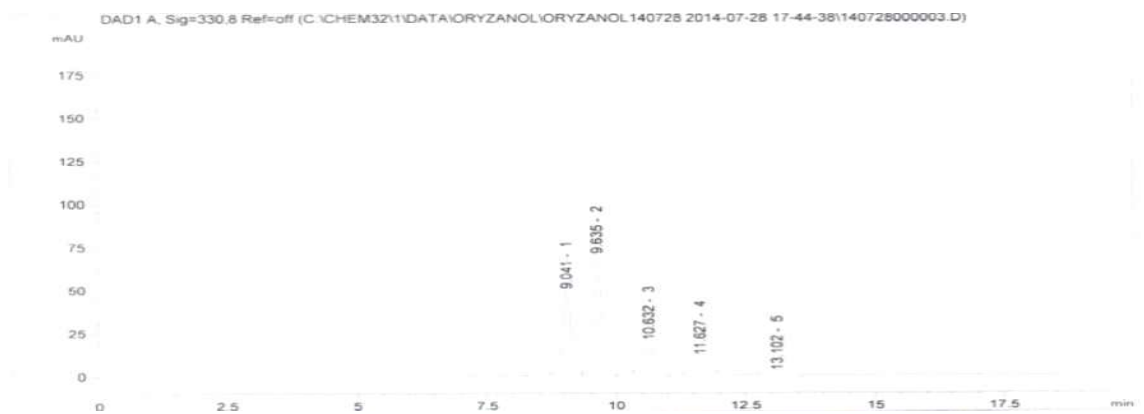
㉠ 2차 생산 HPLC chromatogram



㉔ Lab scale HPLC chromatogram



② 표준품 : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.



(3) 시험 방법
- 첨부자료

나. 미장 에센스의 규격화

(1) 기준 및 시험방법

완제품 시험기록서					결	담	확	승
					재	당	인	인
제품명		제조번호		제조일자	포장년월일		제조처	
에코마인 라이스브랜 에센스		DA001		2014년 1월 20일	2014년 1월 23일		한국콜마주식회사	
유형	채취방법	샘플채취량	채취자	채취년월일	포장수량(EA)			
의약외품	자가 기준	3 EA	이승훈	2014년 1월 24일	50 EA			
시험 항목	시험 기준		시험 방법		시험 결과	비 고		
성상/향취	점성의 투명한 액상 / 특이취		육안 / 후각 확인		적합			
안정성	5℃, 40℃, 50℃에서 3일간 안정		Incubator		적합			
pH	6.5 ~ 8.5		「대한약전」 일반시험법 pH측정법		7.5			
비중	0.950 ~ 1.000		「대한약전」 일반시험법 비중 및 밀도측정법 중 제 1법 비중병에 의한 측정법		0.992			
점도	800 ~ 3,000		LV形, 2*12RPM		2,000			
확인시험	합량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.		대한민국 약전 일반 시험법 중 액체크로마토그래피법		같음			
정량시험	0.005 ~ 0.02%		대한민국 약전 일반 시험법 중 액체크로마토그래피법		0.0074%			
알코올수 측정	10 ~ 25%		「대한약전」 일반시험법 알코올수측정법 제 2 법 기체크로마토그래프법		23.5%			
용량편차 시험	포장용량 : 100ml		「대한약전의 의약품 등 기준」 의약품등의 질량(용량)편차 기준 및 시험방법		평균용량 = 100.9ml			
시험일자	2014년 1월 24일		시험자	이승훈	판정 결과			
판정일자	2014년 1월 24일		판정자	이승훈				

(2) 시험 결과

(가) 정량시험

- 미강 에센스의 감마오리자놀 함량시험 결과 (HPLC 법)

① Lot 1

Peak No./area	1	2	3
1	43.18606	43.67204	43.11544
2	77.93501	78.44701	77.46465
3	37.04612	37.53845	36.99477
4	24.95756	24.52768	24.99477
5	4.45684	3.99458	5.26977
합계	187.5816	188.1798	187.8394
감마오리자놀함량 (mg/kg)	7.391161	7.41434	7.401151
평균(mg/kg)	7.402217		
회석배수 X 10 (mg/kg)	74.02217		
농도 (%)	0.0074		

② Lot 2

Peak No./area	1	2	3
1	132.0347	132.2096	129.5999
2	179.931	180.7076	175.8298
3	90.06818	90.62856	86.4968
4	60.95619	58.25416	58.94369
5	7.70836	7.73201	7.86828
합계	470.6984	469.532	458.7385
감마오리자놀함량 (mg/kg)	18.36192	18.31672	17.89847
평균(mg/kg)	18.19237		
회석배수 X 10 (mg/kg)	181.9237		
농도 (%)	0.0182		

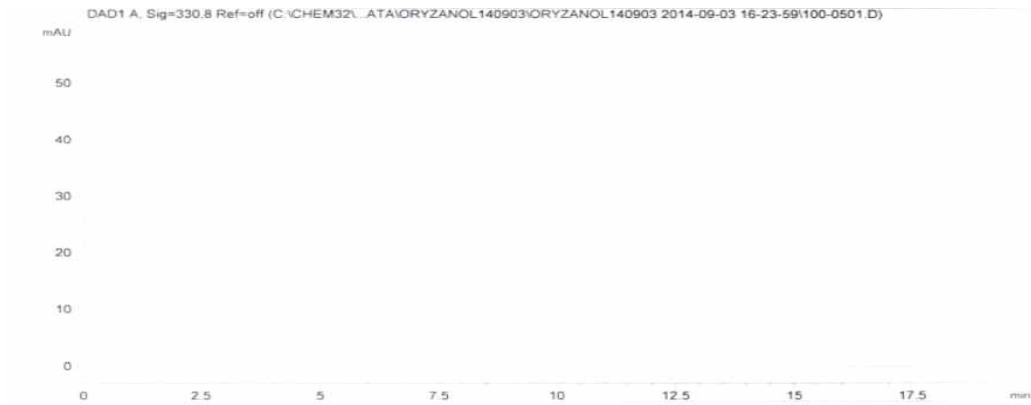
③ Lot 3

Peak No./area	1	2	3
1	94.75665	94.52479	93.31156
2	134.081	134.3845	132.1954
3	68.28893	68.44862	66.18808
4	44.11966	44.18079	43.43777
5	6.28463	5.78423	5.66161
합계	347.5309	347.3229	340.7945
감마오리자놀함량 (mg/kg)	13.58919	13.58113	13.32815
평균(mg/kg)	13.49949		
회석배수 X 10 (mg/kg)	134.9949		
농도 (%)	0.0135		

(나) 확인시험

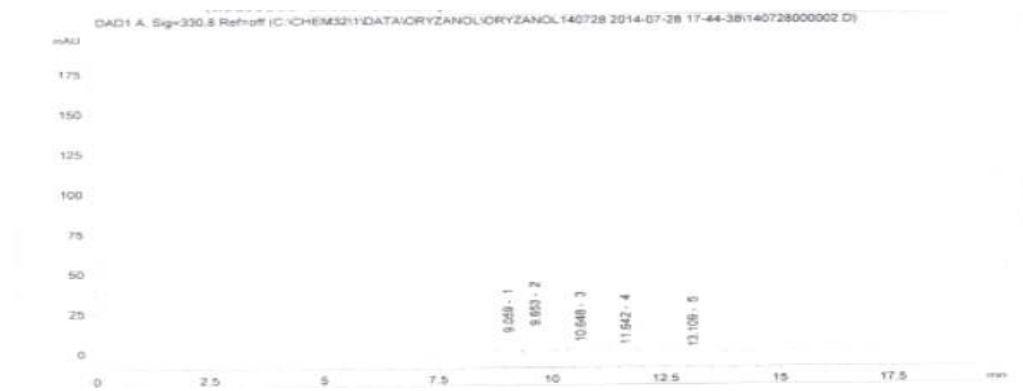
- 미강 에센스의 감마오리자놀 확인시험 결과 (HPLC 법)

① Blank 1: HPLC 이동상 용매 :

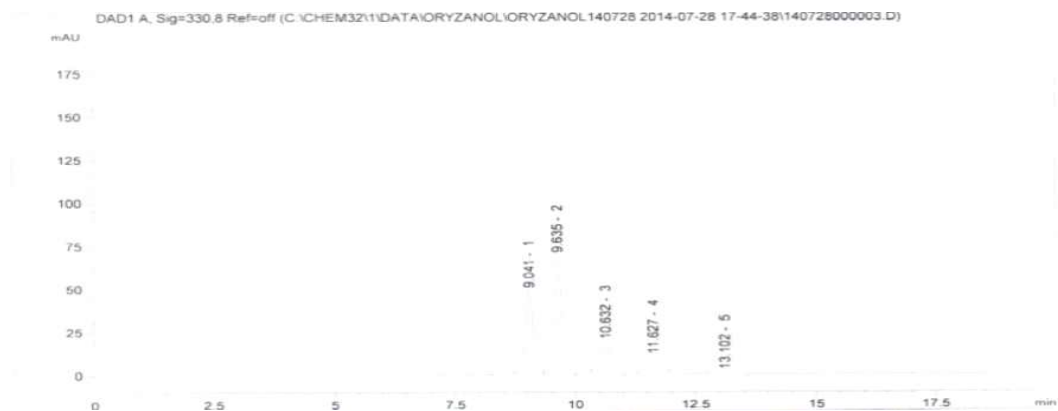


② 표준품

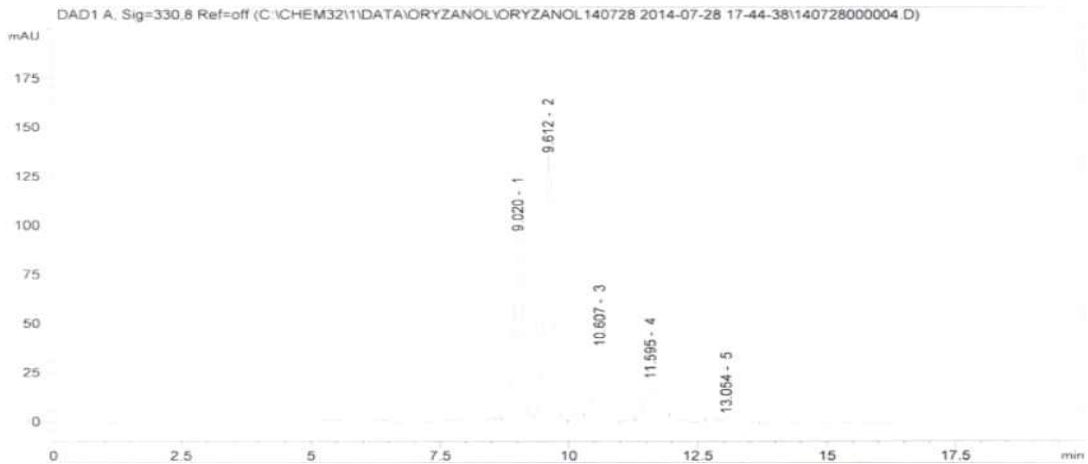
㉑ Standard 1 (감마오리자놀 표준품 15mg/kg) : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.



㉒ Standard 2 (감마오리자놀 표준품 75mg/kg) : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.

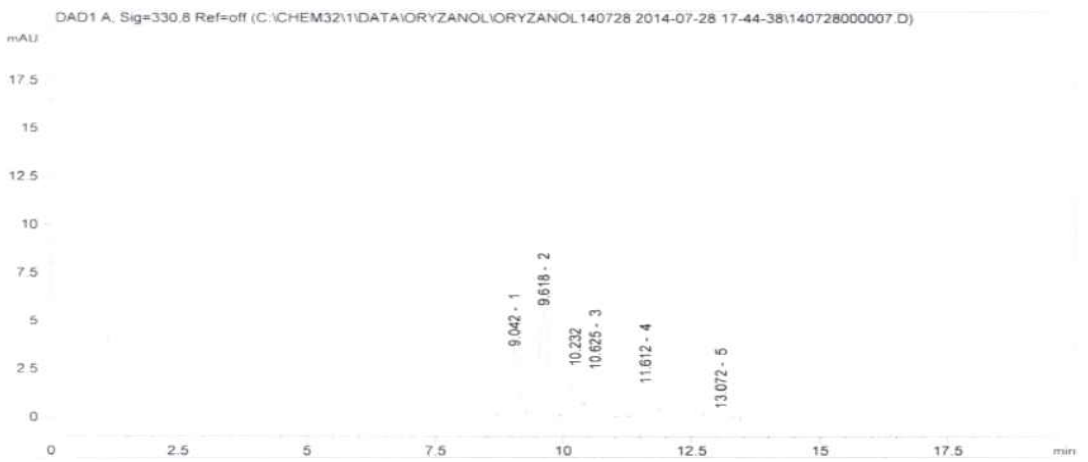
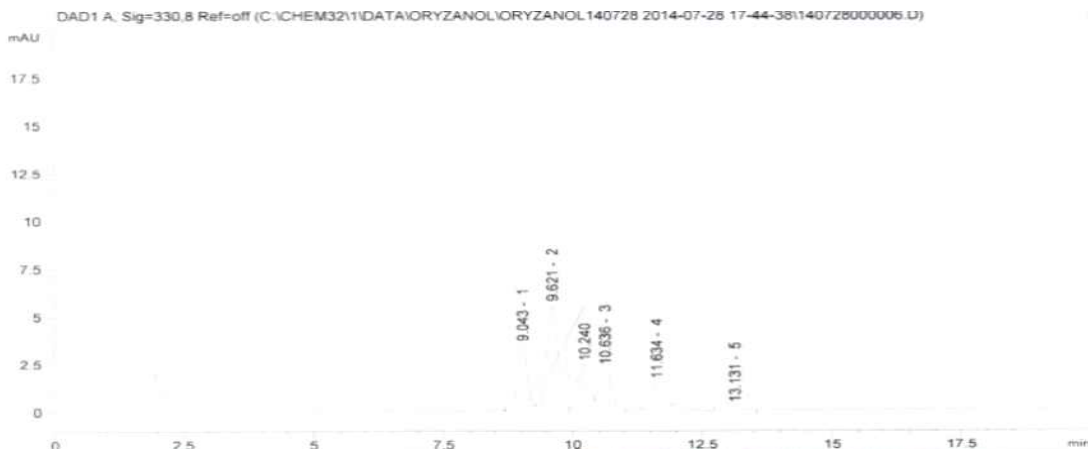


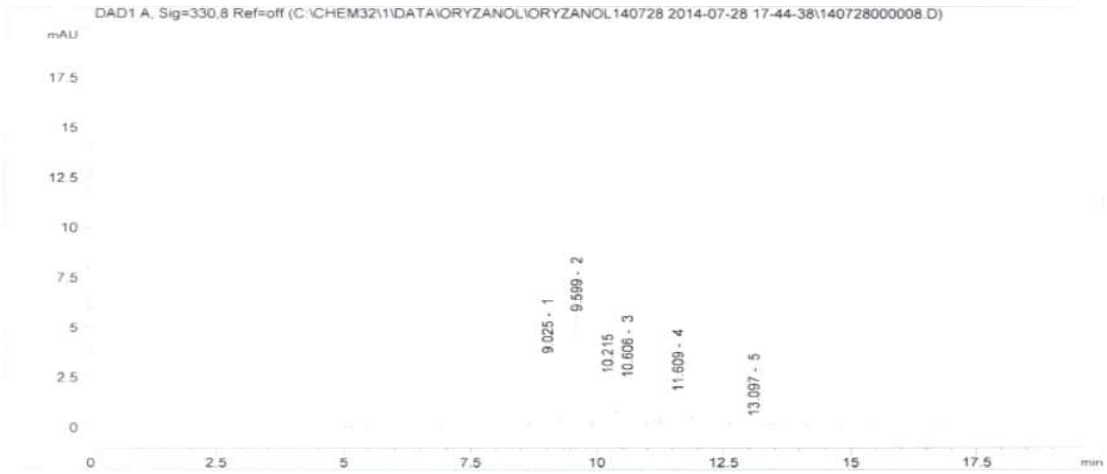
㉔ Standard 3(감마오리자놀 표준품 150mg/kg) : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.



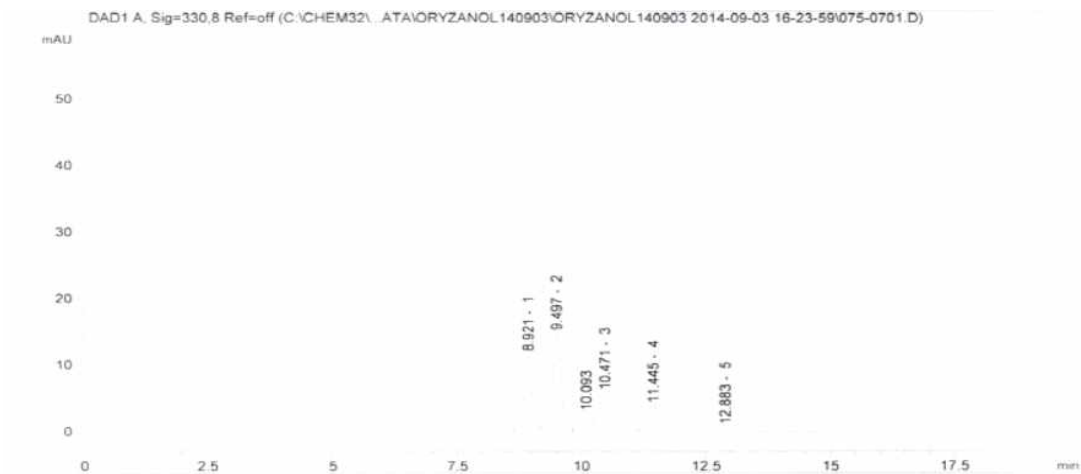
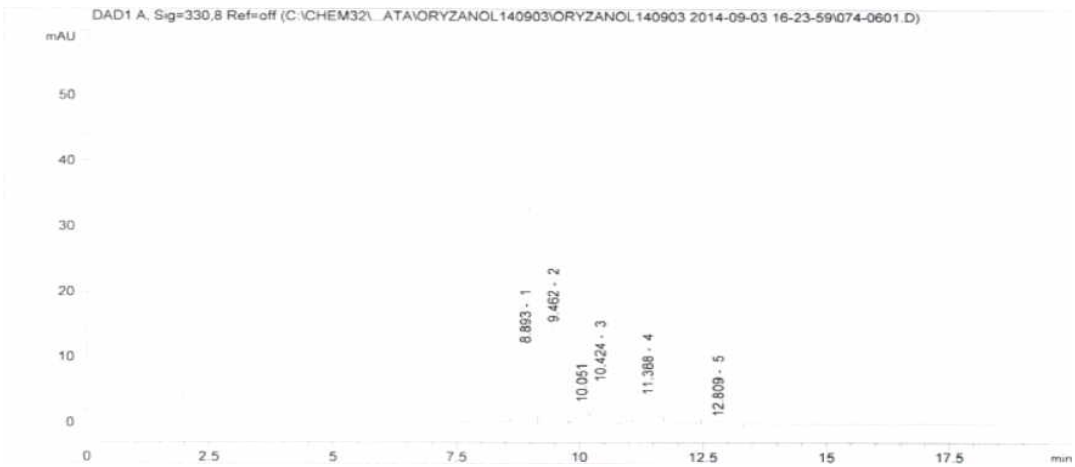
③시료

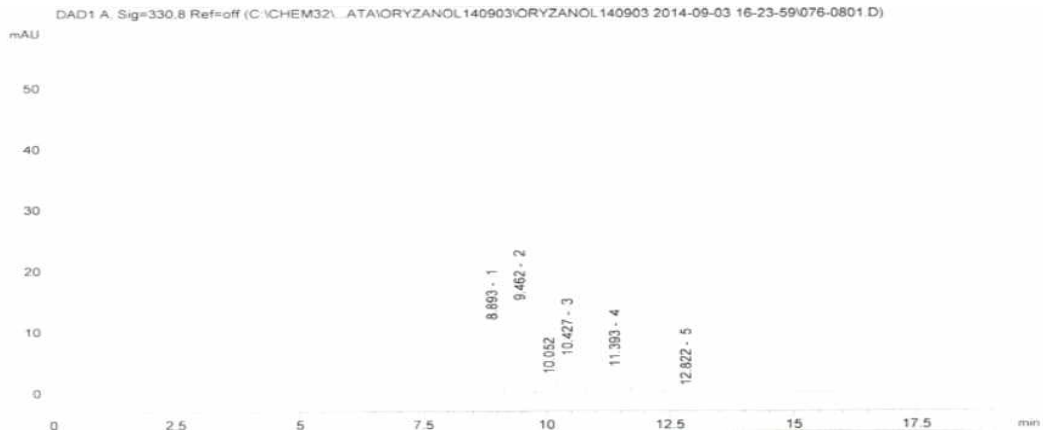
㉕ 미강 에센스 Lot 1 : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.



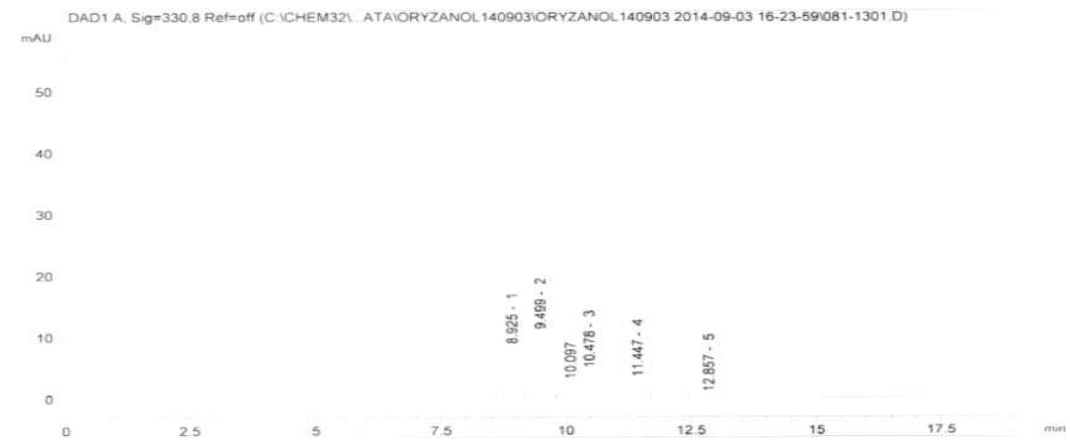
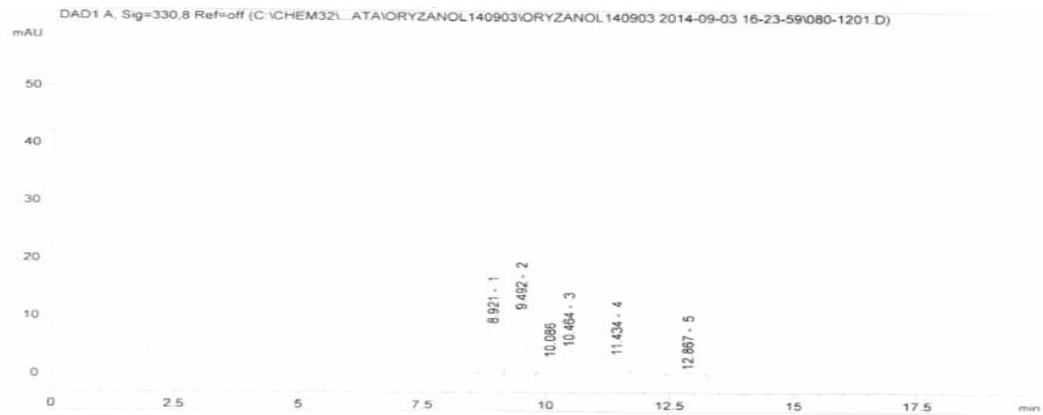


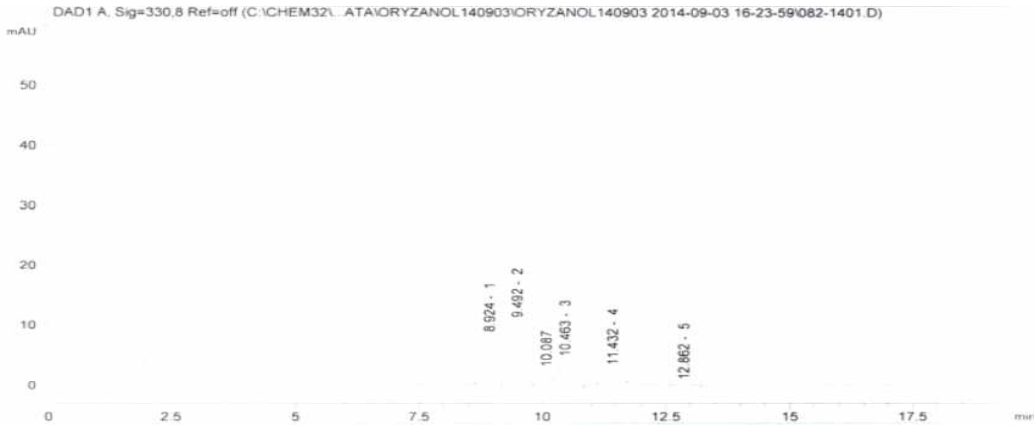
㉔ 미강 에센스 Lot 2 : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6 분, 12.4~13.1분에서 확인됨.





㉔ 미강 에센스 Lot 3 : 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인됨.





(3) 시험방법 밸리데이션 보고서

(가) 목적

- 감마오리자놀의 함량시험 밸리데이션이 프로토콜에 따라 적절하게 진행되었는지 확인하고 문서화하기 위함.

① 적용범위(Scope)

- 미강 에센스의 감마오리자놀의 함량시험 밸리데이션 프로토콜에 적용함.

항목	내용
시험법	HPLC를 이용한 감마오리자놀의 함량시험
검체명	미강에센스
분석물질명	감마오리자놀
용매	MetOH : ACN : dichloromethane : acetic acid = 50 : 44 : 3 : 3 (v)
표준액 농도	100mg/kg
시험장비	HPLC (제조사 : Agilent 1200 series)
시험자	박영주, 박준호

② 장비/절차/시험법 설명

- 밸리데이션 계획

시험	항목	시험액	시험액농도	횟수	시험일	시험자	
1	완건성	미강에센스	100%	12	14. 9. 15	박영주	
2	시스템 적합성	표준액	100%	6	14. 9. 15	박영주	
3	정밀성	반복성	미강에센스	50%	6	14. 9. 15	박영주
			미강에센스	100%			
			미강에센스	150%			
	실험실내 정밀성	미강에센스	100%	6	14. 9. 16	박준호	
4	특이성	표준액	100%	1	14. 9. 15	박영주	
		미강에센스	100%	1	14. 9. 15	박영주	

		blank	용매	1	14. 9. 15	박영주
5	직선성	표준액	15	3	14. 9. 15	박영주
		표준액	50	3	14. 9. 15	박영주
		표준액	75	3	14. 9. 15	박영주
		표준액	100	3	14. 9. 15	박영주
		표준액	150	3	14. 9. 15	박영주

③ 표준품

- 감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD) 100mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid(50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 100%로 한다.

항목	내용
표준품명	감마오리자놀
표준품 제조사/제조번호	Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD
표준액 농도	감마오리자놀으로서 100mg/kg

④ 시료

- 미강 에센스 10g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 100%로 한다.

품명	제조사	제조번호
미강 에센스	(주) 에코마인	Lot 2
감마오리자놀 표준품	Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD	

⑤ 시험액

㉠ 완전성

품명	미강에센스
미강 에센스 100%	미강 에센스 10g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 100%로 하였음.

㉡ 시스템적합성

시험액	조제방법
감마오리자놀 표준액 100%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD) 100mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid(50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 100%로 하였음.

㉔ 특이성

시험액	조제방법
Blank	MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid(50:44:3:3) 혼합용액
감마오리자놀 표준액100%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD)100mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid(50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 100%로 하였음.
미강 에센스 100%	미강 에센스 10g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 100%로 하였음.

㉕ 정밀성

시험액	조제방법
미강 에센스 50%	미강 에센스 5g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 50%로 하였음.
미강 에센스 100%	미강 에센스 10g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 100%로 하였음.
미강 에센스 150%	미강 에센스 15g을 정확하게 취하여 혼합용액을 가하여 정확하게 100mL로 한 다음 초음파 분산장치로 완전히 녹인 후 0.45 μ m필터로 여과하여 미강에센스 150%로 하였음.

㉖ 직선성

시험액	조제방법
감마오리자놀 표준액15%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD)15mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid(50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 15%로 하였음.
감마오리자놀 표준액50%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD)50mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid (50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 50%로 하였음.
감마오리자놀 표준액75%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD) 75mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid (50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 75%로 하였음.
감마오리자놀 표준액100%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD)100mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN: dichloromethaneacetic acid (50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45 μ m필터로 여과하여 표준액 100%로 하였음.

감마오리자놀 표준액150%	감마오리자놀 표준품 (제조사: Oryza Oil and Fat Chemical Co. LTD)150mg을 정밀하게 달아 MetOH:ACN:dichloromethane:acetic acid (50:44:3:3) 혼합용액을 가하여 정확하게 100ml로 한다. 이 액 10ml를 정확하게 취해 혼합용액을 가하여 100mL 한 다음 0.45μm필터로 여과하여 표준액 150%로 하였음.
-------------------	---

(나) 시험방법

① 조작

- 검액 및 표준액을 가지고 다음 조건으로 대한민국 약전 일반 시험법 중 액체크로마토그래피법에 따라 시험하여 검액 및 표준액에서의 각 성분의 머무름 시간에서의 피크 면적을 비교한다

② HPLC분석조건

- 컬럼 : C 18 (4.6mm X 250mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것
- 검출기 : 자외부 흡광광도계 (측정파장 330nm)
- 유량 : 1.4 mL/min
- 이동상 : MetOH : ACN : dichloromethane : acetic acid = 50 : 44 : 3 : 3 (v)
- 주입량 : 20μL

③ 확인

- 330 nm 파장에서 메인 피크가 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인이 되며, 각각 Cycloartnyl, 24 methylene-cycloartnyl, Campesterol, β-sitosterol, cyclobranol ferulate로 확인할 수 있으며, 이들 메인 피크의 면적의 합으로 계산한다.

* 계산방법

- 완전성, 정밀성 : 감마오리자놀 함량(mg/kg)
- 감마오리자놀 함량(mg/kg) = (표준품 농도* 미강에센스 피크면적 합)*10/
표준품 피크면적 합

(다) 시험결과

① 완전성

반복수	미강에센스 피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	421.96515	156.9879492
2	432.82034	161.255933
3	430.38658	160.2990407
4	432.29513	161.0494338
5	430.47845	160.3351616
6	431.07524	160.5698042
7	432.24126	161.0282535
8	432.20943	161.0157388

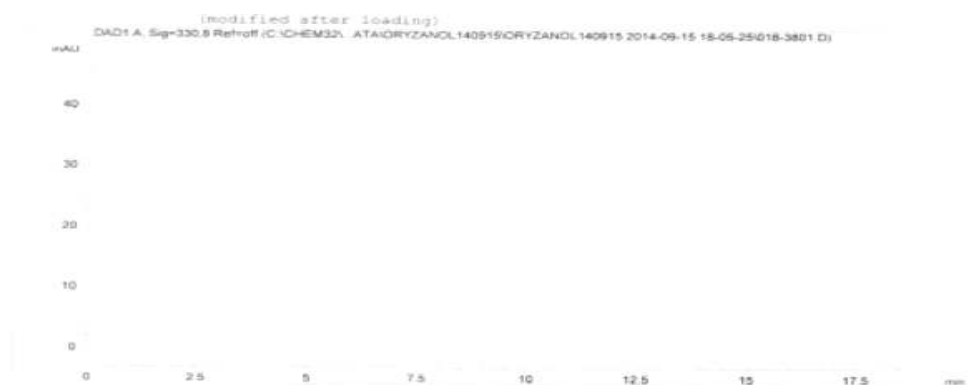
9	433.96064	161.7042699
10	430.60547	160.3851026
11	430.22871	160.2369702
12	430.48723	160.3386137
평균		160.4338559
표준편차		1.18058065
상대표준편차		0.735867529
95% 신뢰구간		99.5~100.5%

② 시스템적합성평가

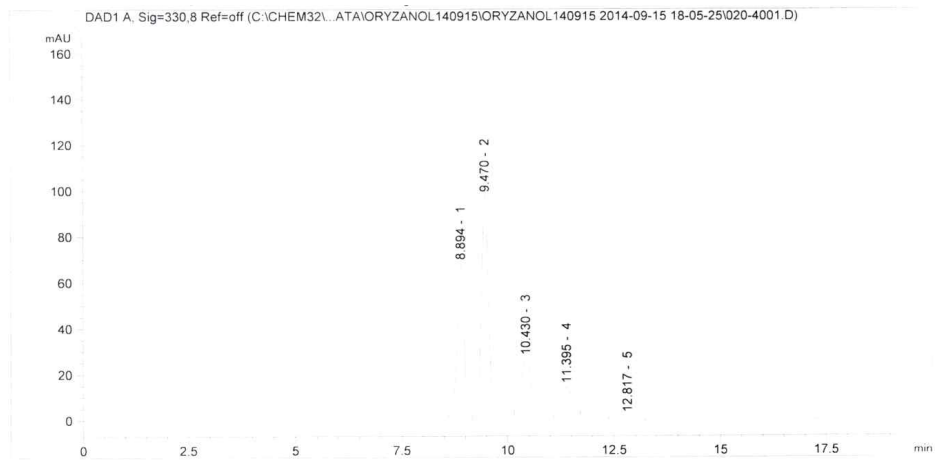
반복수	표준품 피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	2613.598	102.3785463
2	2619.132	102.3363859
3	2623.26	102.2480931
4	2585.54454	100.7652174
5	2591.05636	100.9819281
6	2594.02647	101.0987053
평균		101.5033273
표준편차		0.725828549
상대표준편차		0.715078578
95% 신뢰구간		100.3~102.4%

③ 특이성

㉞ Blank의 chromatogra



㉠ 감마오리자놀 표준품(100%)의 chromatogram



㉠ 시료의 chromatogram



㉠ 정밀성 1(반복성 1: 미강에센스 50%)

횟수	검체명	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	미강에센스 50%	211.48987	74.23443815
2	미강에센스 50%	216.40276	76.16606118
3	미강에센스 50%	213.32473	74.9558583
평균			75.11878588
표준편차			0.87301818
%RSD			1.162183557
95% 신뢰구간			96.8~103.2%

⑤ 정밀성 1(반복성 2: 미강에센스 100%)

횟수	검체명	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	미강에센스 100%	421.96515	156.9879492
2	미강에센스 100%	432.82034	161.255933
3	미강에센스 100%	430.38658	160.2990407
4	미강에센스 100%	432.29513	161.0494338
5	미강에센스 100%	430.47845	160.3351616
6	미강에센스 100%	431.07524	160.5698042
평균			160.0828871
표준편차			1.56437482
%RSD			0.977228016
95% 신뢰구간			99.0~101.0%

⑥ 정밀성 1(반복성 3: 미강에센스 150%)

횟수	검체명	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	미강에센스 150%	634.02378	240.3639931
2	미강에센스 150%	647.83638	245.7947551
3	미강에센스 150%	650.70132	246.9211764
평균			244.3599748
표준편차			3.13599858
%RSD			1.283351984
95% 신뢰구간			96.4~103.6%

⑦ 정밀성 2(시험실내 정밀성: 미강에센스 100%)

㉠ 시험자 1(박영주)

번호	시험일	시험자	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	2014. 09. 15	박영주	421.96515	156.9879492
2	2014. 09. 15	박영주	432.82034	161.255933
3	2014. 09. 15	박영주	430.38658	160.2990407
4	2014. 09. 15	박영주	432.29513	161.0494338
5	2014. 09. 15	박영주	430.47845	160.3351616
6	2014. 09. 15	박영주	431.07524	160.5698042
평균				160.0828871
표준편차				1.56437482
%RSD				0.977228016
95% 신뢰구간				99.0~101.0%

㉔ 시험자 2(박준호)

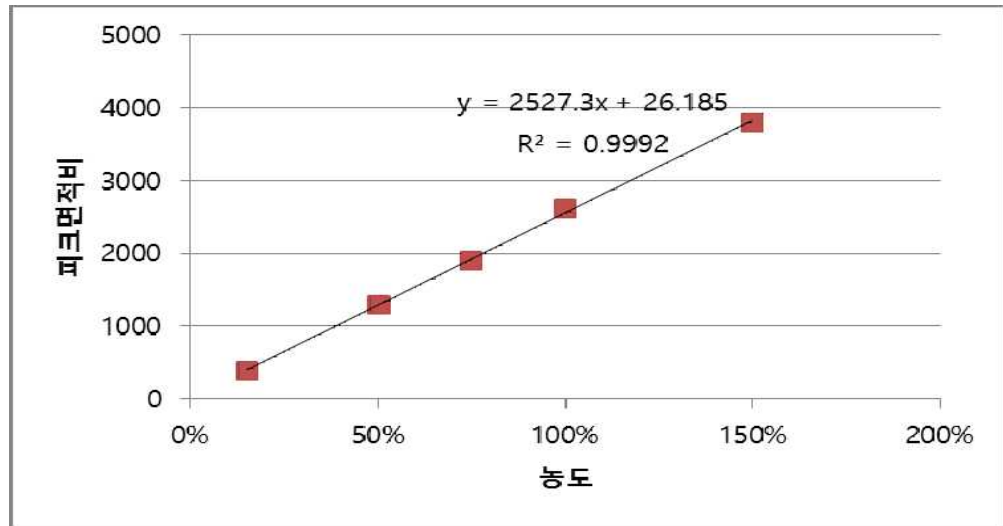
번호	시험일	시험자	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	2014. 09. 16	박준호	432.24126	161.0282535
2	2014. 09. 16	박준호	432.20943	161.0157388
3	2014. 09. 16	박준호	433.96064	161.7042699
4	2014. 09. 16	박준호	430.60547	160.3851026
5	2014. 09. 16	박준호	430.22871	160.2369702
6	2014. 09. 16	박준호	430.48723	160.3386137
평균				160.7848248
표준편차				0.56868004
%RSD				0.353690117
95% 신뢰구간				99.6~100.4%

㉕ 실험실내 정밀성(시험자 1, 시험자 2)

번호	시험일	시험자	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
1	2014. 09. 15	박영주	421.96515	156.9879492
2	2014. 09. 15	박영주	432.82034	161.255933
3	2014. 09. 15	박영주	430.38658	160.2990407
4	2014. 09. 15	박영주	432.29513	161.0494338
5	2014. 09. 15	박영주	430.47845	160.3351616
6	2014. 09. 15	박영주	431.07524	160.5698042
7	2014. 09. 16	박준호	432.24126	161.0282535
8	2014. 09. 16	박준호	432.20943	161.0157388
9	2014. 09. 16	박준호	433.96064	161.7042699
10	2014. 09. 16	박준호	430.60547	160.3851026
11	2014. 09. 16	박준호	430.22871	160.2369702
12	2014. 09. 16	박준호	430.48723	160.3386137
평균				160.4338559
표준편차				1.18058065
%RSD				0.735867529
95% 신뢰구간				99.5~100.5%

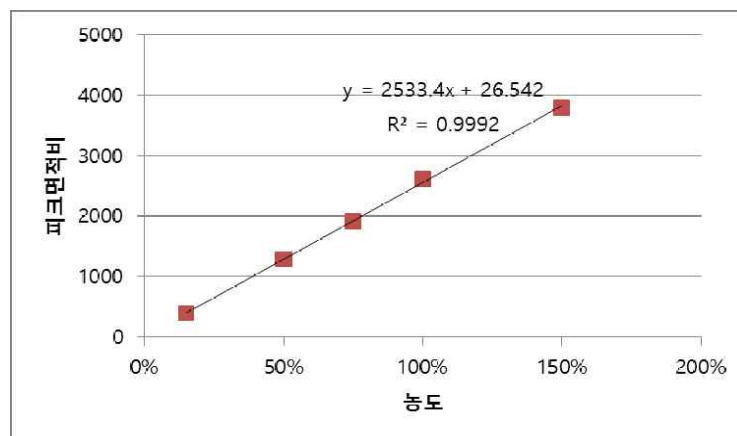
⑧ 직선성 1

시험액 농도	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
15%	388.334	15
50%	1295.895	50
75%	1904.014	75
100%	2613.598	100
150%	3785.566	150
회귀방정식		$y=a+bx$
결정계수(r^2)		0.999
Y 절편(a)		26.185
기울기(b)		25.273



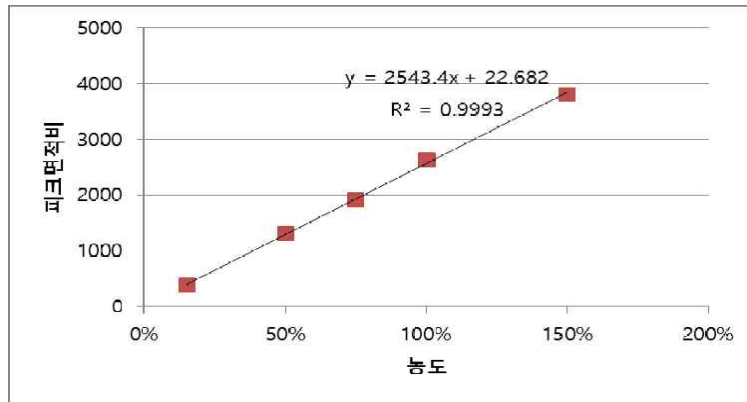
⑨ 직선성 2

시험액 농도	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
15%	388.188	14.27512434
50%	1299.391	50.2427173
75%	1911.999	74.42397568
100%	2619.132	102.3363859
150%	3794.276	148.7224284
회귀방정식		y=a+bx
결정계수(r ²)		0.999
Y 절편(a)		26.542
기울기(b)		25.334



⑩ 직선성 3

시험액 농도	피크면적	감마오리자놀 함량(mg/kg)
15%	388.9472	14.40061335
50%	1303.807	50.37056696
75%	1906.92	74.08343163
100%	2623.26	102.2480931
150%	3809.625	148.8929386
회귀방정식		$y=a+bx$
결정계수(r^2)		0.999
Y 절편(a)		22.682
기울기(b)		25.434



(라) 프로토콜 실시 결과 요약

시험	항목	기준	결과	판정	
I	완건성	%RSD : 5.0%이하	0.7%	적합	
II	시스템적합성평가	%RSD : 1.0%이하	0.7%	적합	
III	특이성	5개의 피크	표준액 100%	5개	적합
			미강에센스 100%	5개	
			blank	피크없음	
IV	정밀성, 반복성	%RSD : 5.0%이하	미강에센스 50%	1.2%	적합
			미강에센스 100%	1.0%	
			미강에센스 150%	1.3%	
V	실험실내 정밀성	%RSD : 5.0%이하	시험자 1(박영주)	1.0%	적합
			시험자 2(박준호)	0.4%	
			시험자 1&2	0.7%	
VI	직선성	r^2 : 0.99이상	0.999, 0.999, 0.999	적합	
VII	정확성	N/A	정밀성, 직선성, 특이성이 입증되었으므로 정확성 추론	적합	
VIII	범위	N/A	15~150% (감마오리자놀로서 15~150mg/kg)	적합	

(마) 결론(Conclusion)

- 미강 에센스의 감마오리자놀 함량시험법을 벨리데이션하고자 미강 에센스의 감마오리자놀 함량시험 벨리데이션 계획서에 따라 벨리데이션을 실시하였음. 벨리데이션은 완건성(용액의 안정성), 시스템 적합성, 정밀성, 특이성, 직선성, 정확성 및 범위 항목으로 평가하였음.
- 벨리데이션 결과 완건성, 시스템 적합성, 정밀성, 특이성, 직선성 항목에서 모두 기준을 만족하였음.
- 완건성은 시험액의 안정성을 24 시간동안 평가하였고 평가결과 시험액은 24 시간동안 안정성을 유지함을 확인하였음. 총6회의 주입반복성을 통한 시스템적합성 평가결과 %RSD가 0.7%로 기준을 만족하였음.
- 특이성 시험에서는 이미 피크의 Identity를 알고 있는 5개의 피크를 가진 감마오리자놀 표준품과 100% 미강 에센스 그리고 시험액 조제에 사용된 MetOH:ACN:dichloromethaneacetic acid (50:44:3:3) 혼합용액을 분석하였음. 9분, 9.2~9.6분, 1~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인이 되는 5개의 피크를 가진 감마오리자놀 표준품을 통해 미강에센스의 같은 시간대의 메인피크가 확인이 되므로써 감마오리자놀 성분임을 확인하였고, 시험액 조제에 사용된 MetOH:ACN:dichloromethaneacetic acid (50:44:3:3) 혼합용액에서는 어떠한 피크도 나타나지 않음을 확인하였음. 이로써 5개의 피크를 가진 크로마토그램이 감마오리자놀임을 확인하였고 주변피크에 영향을 받지 않고 정량할 수 있음을 알 수 있었음.
- 정밀성 시험에서는 반복성과 실험실내 정밀성 모두 기준을 만족하였음. 반복성 시험에서 50%, 100%, 150% 미강추출물 농도별로 1.2%, 1.0%, 1.3%의 %RSD를 나타내었음.
- 실험실내 정밀성의 평가는 시험의 대표 변동요인으로 시험일과 시험자를 달리하여 평가하였음. 시험결과 각 시험자의 %RSD는 1.0%, 0.4%였고 두 시험자의 결과를 합한 %RSD는 0.7%로 모두 기준을 만족하였음. 이로써 시험일과 시험자에 따른 변동에 의한 분산은 시험오차 수준으로 유의할 만한 수준은 아니라고 판단됨.
- 3회의 직선성시험 결과 50~150%의 범위에서 결정계수(r^2)가 0.999, 0.999, 0.999로 기준을 만족하였음.
- 정확성은 이미 입증된 정밀성, 직선성 및 특이성 시험을 통해 해당 시험법이 정확성을 나타낼 수 있음을 추론할 수 있음.
- 결론적으로 본 벨리데이션을 통해 미강추출물의 리놀레산 함량시험은 50~150%의 범위에서 미강추출물의 리놀레산 함량 시험법으로 타당함을 검증하였음.

다. 미강에센스 시험방법

(1) 성상 :

육안으로 확인한다.

(2) pH :

pH는 수용액 중의 수소이온농도값에 활동도계수를 곱한 값, 즉 수소이온활동량의 역수의 상용대수로 정의하며 실용적으로는 검액 중의 수소이온농도의 척도로 쓰인다.

검액의 pH는 표준액의 pH (pH_S)와 관련하여 다음 식으로 나타내고 유리전극을 써서 pH 측정기로 측정한다.

$$\text{pH} = \text{pH}_S + \frac{E - E_S}{2.3026 \text{ RT/F}}$$

- pH_S : pH 표준액의 pH
- E : 검액 중에서 유리전극과 참조전극을 조합한 전지의 기전력 (V)이며 전지의 구성은 다음과 같다.

유리전극 | 검액 | 참조전극

- E_S : pH 표준액 중에서 유리전극과 참조전극을 조합한 전지의 기전력 (V)이며 전지의 구성은 다음과 같다.

유리전극 | pH 표준액 | 참조전극

- * R : 기체정수
- * T : 열역학적온도
- * F : 패러데이정수

식에서 2.3026 RT/F는 단위 pH 당 기전력 (V)의 크기를 나타내고 다음 표 1의 온도 의존성이 있다.

(가) pH 용액

① pH 표준액

- pH 표준액은 pH의 기준으로 쓴다. pH 표준액의 조제에는 증류한 물 또는 전도율 $2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (25 °C) 이하 및 유기체탄소 0.50 mg/L 이하의 물을 15 분 이상 끓여서 이산화탄소를 날려 보내고 이산화탄소흡수관 (소오다석회)을 달고 식힌 물을 사용한다. 표 2의 pH 표준액은 각각 규정하는 방법으로 만든다. 이들 pH 표준액은 경질유리병 또는 폴리에틸렌병에 밀폐하여 보관한다. 또 염기성 표준액은 이산화탄소흡수관을 달아 보존하는 것이 좋다. 또 장기간 보존하면 pH가 변화할 수 있으므로 만든지 오래된 것은 새로 만든 것과 비교하여 pH가 같은지를 확인한 다음 쓴다.

표 1 기전력의 온도의존성

액체의 온도(°C)	2.3026 RT/F(V)
5	0.05519
10	0.05618
15	0.05717
20	0.05817
25	0.05916
30	0.06015
35	0.06114
40	0.06213
45	0.06313
50	0.06412
55	0.06511
60	0.06610

② 옥살산염 pH 표준액

- pH측정용디옥살산수소칼륨이수화물을 가루로 만들어 데시케이터 (실리카겔)에서 건조한 다음 12.71 g (0.05 mol)을 정확하게 달아 물에 녹여 정확하게 1000 mL로 한다.

③ 프탈산염 pH 표준액

- pH측정용프탈산수소칼륨을 가루로 만들어 110 °C에서 항량이 될 때까지 건조한 다음 10.21 g (0.05 mol)을 정확하게 달아 물에 녹여 정확하게 1000 mL로 한다.

④ 인산염 pH 표준액

- pH측정용인산이수소칼륨 및 pH측정용인산수소이나트륨을 가루로 만들어 110 °C에서 항량이 될 때까지 건조하고 인산이수소칼륨 3.40 g (0.025 mol) 및 인산일수소나트륨 3.55 g (0.025 mol)을 정확하게 달아 물에 녹여 정확하게 1000 mL로 한다.

⑤ 붕산염 pH 표준액

- pH측정용붕산나트륨을 데시케이터 (브롬화나트륨 포화용액) 중에 방치하여 항량으로 한 다음 3.81 g (0.01 mol)을 정확하게 달아 물에 녹여 정확하게 1000 mL로 한다.

⑥ 탄산염 pH 표준액

- pH측정용탄산수소나트륨을 데시케이터 (실리카겔)에서 항량이 될 때까지 건조한 것 2.10 g (0.025 mol) 및 pH측정용탄산나트륨을 300 ~ 500 °C에서 항량이 될 때까지 건조한 것 2.65 g (0.025 mol)을 정확하게 달아 물에 녹여 정확하게 1000 mL로 한다.

⑦ 수산화칼슘 pH 표준액

- pH측정용수산화칼슘을 가루로 만들어 그 5 g을 플라스크에 넣고 물 1000 mL를 넣어 잘 흔들어 섞고 23 ~ 27 °C로 하여 충분히 포화시킨 다음 그 온도에서 상정액을 여과하여 맑은 여액 (약 0.02 mol/L)을 쓴다.

이들 pH 표준액의 각 온도에서의 pH 값은 표 2와 같다. 이 표에 없는 온도의 pH는 표의 값에서 내삽하여 구한다.

표 2 pH 표준액의 pH 온도 의존성

온도 (°C)	옥살산염 pH 표준액	프탈산염 pH 표준액	인산염 pH 표준액	붕산염 pH 표준액	탄산염 pH 표준액	수산화칼슘 pH 표준액
0	1.67	4.01	6.98	9.46	10.32	13.43
5	1.67	4.01	6.95	9.39	10.25	13.21
10	1.67	4.00	6.92	9.33	10.18	13.00
15	1.67	4.00	6.90	9.27	10.12	12.81
20	1.68	4.00	6.88	9.22	10.07	12.63
25	1.68	4.01	6.86	9.18	10.02	12.45
30	1.69	4.01	6.85	9.14	9.97	12.30
35	1.69	4.02	6.84	9.10	9.93	12.14
40	1.70	4.03	6.84	9.07		11.99
50	1.71	4.06	6.83	9.01		11.70
60	1.73	4.10	6.84	8.96		11.45

(나) 장치

- pH 측정기는 보통 유리전극 및 참조전극으로 된 검출부와 검출된 기전력을 증폭하는 증폭부 및 측정결과를 표시하는 지시부로 되어 있다. 지시부에는 영점교정용 및 감도조정용 다이얼이 있다. 그 밖에 장치에 따라서는 온도보상용다이얼이 있는 것도 있다. pH 측정기는 다음 조작법에 따라 임의의 한 종류의 pH 표준액의 pH를 매회 검출부를 물로 잘 씻은 다음 5 회 반복하여 측정할 때 지시한 값의 재현성이 ± 0.05 pH 단위인 것을 쓴다.

(다) 조작법

- 유리전극은 미리 물에 수 시간 이상 담가 둔다. pH 측정기는 전원을 넣어 장치가 안정된 것을 확인한 다음에 쓴다. 검출부를 물로 잘 씻고 부착된 물은 여과지 등으로 가볍게 닦아 낸다. pH 측정기의 교정은 2 종류의 pH 표준액을 써서 보통 다음과 같이 한다. 전극을 인산염 pH 표준액에 담그고 영점교정용다이얼로 표의 pH에 일치시킨다. 다음에 예상되는 검액의 pH에 가까운 pH를 갖는 pH 표준액을 두 번째 표준액으로 하여 같은 조건으로 pH를 측정한다. 얻어진 pH가 표에 나타난 pH와 일치하지 않을 때에는 감도교정용다이얼로 규정하는 pH에 일치시킨다. 2 종류의 pH 표준액의 pH가 조정하지 않고도 규정하는 pH의 ± 0.05 pH 단위에 일치할 때까지 같은 조작을 반복한다. 또 온도보상용다이얼이 있는 장치를 쓰는 경우 눈금 값을 pH 표준액의 온도에 일치시킨 다음 교정한다. 또한 위의 조작을 자동적으로 하는 기능을 가지고 있는 경우 2 개의 pH 표준액의 pH가 규정하는 pH의 ± 0.05 pH 단위에 일치하는지를 정기적으로 확인한다. 장치의 교정이 끝난 다음 검출부를 물로 잘 씻고 여과지 등으로 가볍게 닦아낸다. 검출부를 검액에 담그고 안정된 지시값이 얻어지는지를 확인한 다음 그 값을 읽는다. 측정할 때 필요하면 검액을 가만히 교반할 수 있다. 또한 검액의 온도는 교정에 쓴 pH 표준액의 온도와 같게 한다 (± 2 °C). 또 검액이 알칼리성일 때 필요하면 측정용 용기는 뚜껑이

있는 것을 써서 질소 등의 불활성 기체 기류 중에서 측정한다. 또 pH 11 이상에서 알칼리금속이온을 함유하는 액은 오차가 크기 때문에 알칼리오차가 적은 전극을 쓰고 다시 필요한 보정을 한다.

(3) 비중

- 밀도 ρ (g/mL 또는 g/cm³)는 물질의 단위부피당의 질량이고, 비중 d 는 어떤 부피를 가지고 있는 물질의 질량과 그것과 같은 부피의 표준물질의 질량과의 비이며, 이것을 상대 밀도라고도 한다. 비중 d_t' 는 검체와 물 (H₂O)과의 각각 온도 t' °C 및 t °C에서의 같은 부피의 질량비를 말한다. 따로 규정이 없는 한 측정에는 제 1 법, 제 2 법 또는 제 4 법을 쓰고 수치에 “약” 이라고 기재되어 있을 때는 제 3 법을 쓸 수 있다.

(가) 제 1 법 비중병에 의한 측정법

- 비중병은 보통 10 ~ 100 mL 유리용기로 온도계가 달려 있는 갈아 맞춘 마개와 표선 및 갈아 맞춘 뚜껑이 있는 측관 (側管)이 있다. 미리 깨끗이 씻고 건조한 비중병의 질량 M 을 달고 다음에 마개 및 뚜껑을 열어 검체를 채우고 규정온도 t' °C보다 1 ~ 3 °C 낮은 온도에서 기포가 남지 않도록 조심하여 마개를 닫는다. 천천히 온도를 올려 온도계가 규정온도를 나타낼 때 표선 위쪽의 검체를 측관으로부터 빼내고 측관에 뚜껑을 닫고 외부를 잘 닦은 다음 질량 M_1 을 단다. 같은 비중병에 물을 넣어 같은 방법으로 조작하고 규정온도 t °C에서의 질량 M_2 를 달아 다음 식에 따라 비중 d_t' 를 구한다.

$$d_t' = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

검체 및 물을 가지고 같은 온도에서 측정할 때 ($t' = t$), 온도 t' °C에 있어서의 검체의 밀도 ρ_t' 를 표에 나타낸 온도 t' °C에서의 물의 밀도 ρ_{st} 및 측정한 비중 d_t' 를 써서 다음 식에 따라 계산한다.

(4) 점도

- 점도측정법은 검체의 점도를 점도계로 측정하는 방법이다. 액체가 일정한 방향으로 운동하고 그 흐름에 수직인 방향에 속도의 차이가 있을 때 그 흐름에 평행한 평면의 양측에 내부마찰력이 생긴다. 이 성질을 점성이라 한다. 흐름에 평행한 평면의 단위면적당 내부마찰력을 전단응력 (剪斷應力)이라 하며 흐름에 수직인 방향의 속도기울기를 전단속도라고 한다. 전단응력이 전단속도에 비례하는 액체를 뉴턴액체라고 한다. 그 비례정수 η 는 일정온도에서 그 액체의 고유한 정수로 점도라 한다. 그 단위는 파스칼초 (Pa·s)를 쓰지만 보통 밀리파스칼초 (mPa·s)로 표시한다.

또한 전단응력이 전단속도에 비례하지 않는 액체는 비뉴턴액체라 하고 이 액체의 점도는 전단속도에 따라 여러 가지로 변화한다는 점에서 겔보기점도라 한다. 이 경우 전단응력을 이것에 대응하는 전단속도로 나눈 값이 겔보기점도이고, 전단속도와 겔보기점도의 관계가 얻어지면 이 비뉴턴액체의 유동 특성을 알 수 있다. 점도 η 를 같은 온도

의 그 액체의 밀도로 나눈 값을 운동점도 ν 라고 하며 그 단위로서는 초당 제곱미터 (m^2/s)를 쓰고 있지만 보통 초당 제곱밀리미터 (mm^2/s)로 표시한다. 액체의 점도는 다음 어느 한 방법을 써서 측정한다.

(가) 제 2 법 회전점도계법

- 이 측정법은 뉴턴액체 또는 비뉴턴액체에 적용하는 방법이며 보통 액체 속을 일정한 각속도로 회전하는 로터에 작용하는 힘(토크)을 용수철의 비틀림 정도로 검출하여 점도로 환산하는 원리를 응용한 측정법이다. 다음 장치 및 조작법으로 점도를 측정한다.

① 장 치 : 다음 장치들중 단일원통형회전점도계 사용

- * 단일원통형회전점도계는 액체 속의 원통을 일정한 각속도로 회전시킬 때의 토크를 측정하는 점도계이다. 장치는 그림 2b와 같다. 미리 점도계교정용표준액을 써서 시험적으로 장치정수 K_B 를 정해 액체의 점도 η 를 다음 식에 따라 계산한다.

$$\eta = K_B \cdot \frac{T}{\omega}$$

η : 액체의 점도 ($mPa \cdot s$)

K_B : 장치정수 (rad/cm^3)

ω : 각속도 (rad/s)

T : 원통면에 작용하는 토크 ($10^{-7} N \cdot m$)

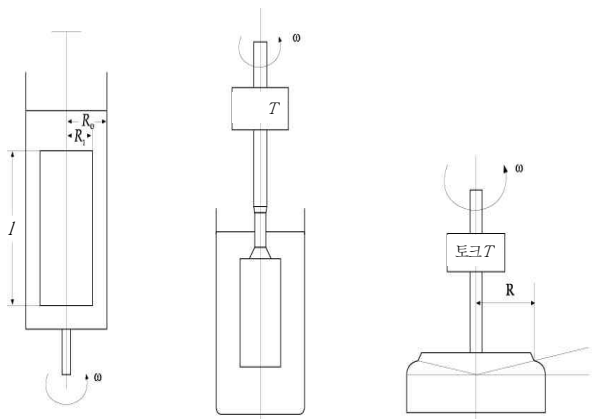


그림 2a
공축이중원통
형회전점도계

그림 2b
단일원통형회
전점도계

그림 2c
원추평판형회
전점도계

② 조작법

- 점도계는 그 회전축이 수평면에 대하여 수직이 되도록 설치한다. 측정에 필요한 양의 검액을 장치에 채운 다음 의약품각조에서 규정하는 온도가 될 때까지 방치한다. 검체의 점도를 측정 정밀도 1 % 이내로 측정할 필요가 있는 경우 측정계의 온도제어는 $\pm 0.1 \text{ } ^\circ C$ 이내로 유지할 필요가 있다.

검액이 규정온도가 된 것을 확인한 다음 장치를 작동시킨다. 회전이 정상 상태에 이르러 회전수 또는 토크에 해당하는 점도계의 지시눈금이 안정된 다음 지시값을 읽어 각각의 장치에 해당하는 계산식을 써서 점도 η 를 계산한다. 또한 미리 점도계교정용표준액을 써서 측정하여 장치정수를 결정하고 확인 및 조작법의 타당성을 확인한다. 비뉴턴액체인 경우에는 일정한 회전속도 또는 일정한 토크를 가하여 겔보기점도를 얻는 조작을 회전속도 또는 토크를 바꾸면서 반복하고 이러한 일련의 측정에서 검체의 전단속도와 전단응력의 관계(유동곡선)를 얻는다. 점도계의 교정은 물 및 점도계교정용표준액을 써서 한다. 이것들은 회전점도계의 장치정수를 결정하거나 확인하기 위하여 쓴다. 또한 점도계를 정기적으로 교정하여 규정하는 측정정밀도가 확보되어 있음을 확인한다.

(5) 확인시험, 함량시험

- 액체크로마토그래프법은 적당한 고정상을 써서 만든 칼럼에 검체혼합물을 주입하고 이동상으로 액체를 써서 고정상에 대한 유지력의 차를 이용하여 각각의 성분으로 분리하여 분석하는 방법이다. 액상검체 또는 용액으로 만들 수 있는 검체에 적용할 수 있으며, 물질의 확인, 순도시험, 정량 등에 쓴다. 칼럼에 주입된 혼합물은 각 성분이 고유한 비율 k 로 이동상 및 고정상에 분포한다.

$$k = \frac{t_{R(X)} - t_{R(0)}}{t_{R(0)}}$$

이 비율 k 는 액체크로마토그래프법에서는 질량분포비 k 로 부른다. 이 비율 k , 이동상의 칼럼통과시간 t_0 ($k = 0$ 인 물질을 주입한 때부터 그 물질의 피크정점까지의 시간) 및 유지시간 t_R (피검검체를 주입한 때부터 피검물질의 피크정점까지의 시간)과의 사이에는 다음과 같은 관계가 있으므로 같은 조건인 경우 유지시간은 물질의 고유한 값이 된다.

$$t_R = (1+k)t_0$$

(가) 장 치

- 보통 이동상송액용펌프, 검체도입장치, 칼럼, 검출기 및 기록장치로 되어 있다. 필요하다면 이동상조성제어장치, 칼럼항온조, 반응시약송액용펌프, 화학반응조 등을 쓴다. 펌프는 칼럼 및 연결튜브로 이동상 및 반응시약을 일정한 유량으로 보낼 수 있는 것도 있다. 검체도입장치는 일정한 양의 검체를 정확하고 재현성이 좋게 장치에 도입하는 것이다. 칼럼은 일정한 크기의 액체크로마토그래프용충전제를 안쪽 면이 평활하고 불활성인 금속 등의 관에 고르게 충전한 것이다. 또한 충전제 대신 고정상을 관벽에 보유시킨 것을 쓸 수 있다. 검출기는 피검물질의 이동상과는 다른 성질을 검출하는 것으로 자외가시부흡광광도계, 형광광도계, 시차굴절계, 전기화학검출기, 화학발광검출기, 전기전도도검출기, 질량분석계 등이 있고

보통 수 μg 이하의 검체에 대하여 농도에 비례하는 신호를 낸다. 기록장치는 검출기에 의하여 얻어진 신호의 강도를 기록하는 것이다. 필요하다면 기록장치로서 데이터처리장치를 써서 크로마토그램, 유지시간, 피검물질의 정량값 등을 기록 또는 출력할 수 있다. 이동상조성제어장치는 단계적 제어 (stepwise 방식)와 농도 기울기제어 (gradient 방식)가 있고 이동상의 조성을 제어할 수 있다.

(나) 조 작 법

- 장치를 미리 조정한 다음 의약품각조에서 규정하는 조작조건에 검출기, 칼럼, 이동상을 써서 이동상을 규정하는 유량으로 흐르게 하고 칼럼을 규정온도로 평형이 되게 한 다음 의약품각조에서 규정하는 양의 검액 또는 표준액을 검체도입장치를 써서 검체도입부를 통하여 주입한다. 분리된 피검물질을 검출기로 검출하여 기록장치에서 크로마토그램을 얻는다. 분석되는 피검물질이 검출기에서 검출되는 데에 적합한 흡수, 형광 등의 물성을 갖지 않은 경우에는 적당하게 유도체화하여 검출한다. 유도체화는 보통 전라벨(prelabeling)법 또는 후라벨(postlabeling)법에 따른다.

① 확인 및 순도시험

- 이 방법을 확인시험에 사용하는 경우는 검액 및 표준액의 피검물질의 유지시간이 일치할 것 또는 검액에 표준피검물질을 첨가하여도 검체의 피검물질의 피크모양이 변하지 않을 때에 시험한다. 또한 피검물질의 화학구조에 관하여 동시에 알 수 있는 검출기를 이용할 경우, 유지시간의 일치와 화학구조에 관한 정보가 일치하는 것을 확인하는 것으로 보다 특이적인 확인시험을 수행할 수 있게 된다. 이 방법을 순도시험에 사용하는 경우는 보통 검액 중 혼재물의 한도에 해당하는 농도의 표준액을 쓰는 방법 또는 면적백분율법으로 시험한다. 따로 규정이 없는 한 검액의 이성질체비는 면적백분율법으로 구한다. 면적백분율법은 크로마토그램에서 얻은 각 성분의 피크면적의 합계를 100으로 하고 이에 대한 각 성분의 피크면적비로부터 조성비를 구한다. 다만 정확한 조성비를 얻기 위해서는 혼재물의 주성분에 대한 감도계수에 의해 피크면적을 보정한다.

② 정 량

㉞ 내부표준법

- 내부표준법에서 일반적으로 피검물질에 되도록 가까운 유지시간을 가지며 검체의 모든 피크와 완전하게 분리되는 안정한 물질을 내부표준물질로 선택한다. 의약품각조에서 규정하는 내부표준물질 일정량에 피검물질표준품을 단계적 농도가 되도록 넣어 여러 개의 표준액을 만든다. 이들 표준액 일정량씩을 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적 또는 피크높이에 대한 피검물질표준품의 피크면적 또는 피크높이의 비를 구한다. 이 비를 세로축으로 하고 피검물질표준품의 양 또는 내부표준물질의 양에 대한 피검물질표준품의 양의 비를 가로축으로 하여 검량선을 작성한다. 이 검량선은 보통 원점을 지나는 직선이 된다. 다음에 의약품각조에서 규정하는 방법으로 같은 양의 내부표준물질을 넣은 검액을 만들어 검량선을 작성하였을 때와 같은 조건으로 크로마토그램을 얻어 그 내부표준물질의 피크면적 또는 피크높이에 대한 피검물질의 피크면적 또는 피크높이의 비를 구하여 검량선을 써서 검체의 양을 구한다. 의약품각조에서는 보통 검량선이 직선이 되는 농도범위에 들

어가는 한 개의 표준액 및 표준액의 농도에 가까운 농도의 검액을 만들어 의약품각조에서 규정하는 각각의 양을 주입한 다음 같은 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 피검물질의 양을 구한다.

㉔ **절대검량선법**

- 피검물질표준품을 단계적 농도가 되도록 취하여 여러 개의 표준액을 만들고 표준액 일정량씩을 정확하고 재현성 있게 주입하여 크로마토그램을 얻는다. 얻어진 크로마토그램으로부터 피검물질의 피크면적 또는 피크높이를 세로축으로 하고 피검물질표준품의 양을 가로축으로 하여 검량선을 작성한다. 이 검량선은 보통 원점을 지나는 직선이 된다. 다음에 의약품각조에서 규정하는 방법으로 검액을 만들어 검량선을 작성할 때와 같은 조건으로 크로마토그램을 얻어 피검물질의 피크면적 또는 피크높이를 측정하고 검량선을 써서 검체의 양을 구한다. 의약품각조에서는 보통 검량선이 직선이 되는 농도범위에 들어가는 한 개의 표준액 및 표준액의 농도에 가까운 농도의 검액을 만들어 의약품각조에서 규정하는 각각의 양을 주입한 다음 같은 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 피검물질의 양을 구한다. 이 방법은 주입조작 등의 모든 측정조작을 엄밀하게 일정한 조건을 유지하여 시험한다.

③ **피크측정법**

- 기체크로마토그래프법의 피크측정법에 따른다.

④ **시스템적합성**

- 기체크로마토그래프법의 시스템적합성에 따른다.

⑤ **조작조건변경에 관한 주의사항**

- 의약품각조의 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 충전제의 입자경, 칼럼온도, 이동상의 조성비, 이동상의 완충액 조성, 이동상의 pH, 이동상의 이온쌍시약 농도, 이동상의 염 농도, 이동상 교체 횟수 및 시간, 농도기울기 프로그램 및 그 유량, 유도체화 시약의 조성 및 유량, 이동상의 유량과 반응시간 및 화학반응온도는 시스템적합성의 규정에 적합한 범위 내에서 일부 변경할 수 있다.

⑥ **용어**

- 기체크로마토그래프법의 용어에 따른다.

⑦ **주 의**

- 표준피검물질, 내부표준물질 및 시험에 쓰는 시약·시액은 측정을 방해하는 물질을 함유하지 않은 것을 쓴다.

(6) **알코올수측정법**

- 알코올수라 함은 탄크제 등 에탄올을 함유한 체체에 대하여 다음 방법으로 측정할 때 15℃에서 검체 10 mL로부터 얻은 에탄올층의 양 (mL)을 말한다.

(가) **제 2 법 기체크로마토그래프법**

- 15℃에서 검체를 취하여 다음 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 조작하여 에탄올의 함량 (vol%)을 측정하고 이 값으로부터 알코올수를 구하는 방법이다.

표 3 증류액량

검체 에탄올 함량 (vol%)	증류액 (mL)
80 이상	13
80 ~ 70	12
70 ~ 60	11
60 ~ 50	10
50 ~ 40	9
40 ~ 30	8
30 이하	7

① 알코올수축정용무수에탄올

- 에탄올의 함량을 측정한 무수에탄올이다. 다만 무수에탄올의 비중 d_{4}^{20} 와 에탄올 함량과의 관계는 0.797 : 99.46 vol %, 0.796 : 99.66 vol%, 0.795 : 99.86 vol%이다.

② 검액 및 표준액의 조제

㉞ 검액

- 에탄올 (C₂H₅OH) 약 5 mL에 해당하는 양의 검체를 15 ± 2 °C에서 정확하게 취하여 물을 넣어 정확하게 50 mL로 한다. 이 액 25 mL를 정확하게 취하여 여기에 내부표준액 10 mL를 정확하게 넣고 물을 넣어 정확하게 100 mL로 한다.
표준액 검액과 같은 온도의 알코올수축정용무수에탄올 5 mL를 정확하게 취하여 물을 넣어 정확하게 50 mL로 한다. 이 액 25 mL를 정확하게 취하여 여기에 내부 표준액 10 mL를 정확하게 넣고 물을 넣어 100 mL로 한다.

㉞-1 조작법

- 검액 및 표준액 25 mL씩을 취하여 각각 고무마개가 달린 100 mL 세구 (細口) 원통형 유리병에 넣고 고무마개로 막고 알루미늄캡으로 밀전한 다음 온도 변화가 적은 실내에서 미리 1 시간 이상 방치한 물에 유리병을 목까지 잠기도록 넣고 액이 마개에 묻지 않도록 하면서 가만히 흔들어 섞은 다음 30 분간 방치한다. 각각의 용기 안의 기체 1 mL를 가지고 다음 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크높이에 대한 에탄올의 피크높이비 Q_T 및 Q_S를 구한다.

$$\text{코올수} = \frac{Q_T}{Q_S} \times \frac{5 \text{ (mL)}}{\text{검체의 양(mL)}} \times \frac{V}{9.406}$$

V : 알코올수축정용무수에탄올 중 에탄올 (C₂H₅OH)의 함량 (vol %)

㉞ 내부표준액

- 아세토니트릴용액(3 → 50)

㉞-1 조작조건

- 검출기 : 불꽃이온화검출기
- 칼 럼 : 안지름 약 3 mm, 길이 약 1.5 m인 유리관에 150 ~ 180 μm의 기체크로마토그래프용다공성에틸비닐벤젠-디비닐벤젠공중합체

(평균공경 0.0075 μm , 비표면적 500 ~ 600 m^2/g)를 충전한다.

- 칼럼온도 : 105 ~ 115 $^{\circ}\text{C}$ 의 일정온도
- 운반기체 : 질소
- 유 량 : 에탄올의 유지시간이 5 ~ 10 분이 되도록 조정한다.
- 칼럼의 선정 : 표준액에서 얻은 용기 안의 기체 1 mL를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 에탄올, 내부표준물질의 순서로 유출하고 그 분리도가 2.0 이상인 것을 쓴다.

(7) 용량편차실험

(가) 기준

- 제제 10 개 내용물의 평균용량은 표시량 이상이고, 개개의 내용물의 용량은 표시량이 60 mL 이하인 경우에는 표시량의 90 % 이상, 60 mL를 넘고 150 mL 이하인 경우에는 표시량의 95 % 이상일 때 적합하다. 다만, 이 범위를 벗어났을 때에는 20 개를 더 취하여 시험할 때 총 30 개의 내용물의 평균용량은 표시량 이상이고 개개의 내용물의 용량은 표시량이 60 mL 이하인 경우에는 표시량의 90 % 이하인 것이 1개 이하, 60 mL를 넘고 150 mL 이하인 경우에는 표시량의 95 % 이하인 것이 1 개 이하일 때 적합하다.

(나) 시험방법

- 제제 10 개를 가지고 내용물을 메스실린더로 직접 용량을 측정한다. 또는 내용물이 들어 있는 용기에 뷰렛으로 물을 떨어뜨려 용기를 가득 채웠을 때의 소비량을 정확하게 측정한다. 이때 개개의 번호를 기록하는 등으로 식별하여 각 제제와 그 용량이 대응하도록 조심한다. 용기의 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 기타 적당한 유기 용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 건조하고 다시 뷰렛으로 물을 떨어뜨려 용기를 가득 채워 소비량을 정확하게 측정한다. 이 값(빈 용기에서 측정한 물의 소비량)에서 먼저 측정한 물의 소비량을 빼서 내용물의 용량으로 한다.

4. 미강 추출물 안정성

가. 시험조건

(1) 시험대상: 37 $^{\circ}\text{C}$ 270 bar에서 추출한 미강 (lap scale)

(2) 안정성 확인 항목

(가) 지방산 함량 (리놀레산)

(나) 감마오리자놀

(다) 산가

(3) 안정성 확인 조건

- 영하 20, 4 °C 조건에서 0, 1.5, 3, 4.5, 1, 6개월 간 각 항목 확인

나. 결과

지방산 함량 (리놀레산)

	0	1.5	3	4.5	6
영하20℃	25.5	24.3	26.42	20.35	22.54
4 °C	25.5	24.4	25.03	19.49	22.23

감마오리자놀

	0	1.5	3	4.5	6
영하20℃	2893.9	3488.5	4923.1	5209.78	5509.77
4 °C	2893.9	3166.7	4838.7	4889.78	4898.98

산가

	0	1.5	3	4.5	6
영하20℃	177	169.9	144.7	144.7	163.7
4 °C	177	168.5	147.2	147.2	174.6

5. 미강 에센스 안정성

가. 기록서

(1) 시험대상: 3 lot 미강 에센스 (0.5% 초임계 미강 함유)

- Lot No. 1: 2014.1.20 생산
- Lot No. 2, 3: 2014.8 생산

(2) 안정성 확인 항목

- (가) 색상
- (나) 색상/냄새
- (다) 점도/경도
- (라) pH
- (마) 감마오리자놀 함량

(3) 안정성 확인 조건

- 5 °C, 25 °C, 40 °C, 50 °C cycle 조건에서 1, 3, 6개월 간 각 항목 확인

(4) 안정성 확인 결과

(가) Lot No. 1:

- 모든 조건에서 6개월 현재 정상변화 없음
- 50 °C에서 1개월째 미세황변 관찰
- 40 °C에서 3개월째 미세황변 관찰
- 5 °C, 25 °C 6개월 현재까지 변화없음, 안전
- Cycle 실험결과에서는 3개월째 미세황변 관찰
- 감마오리자놀 함량: 0.00725 %

(나) Lot No. 2:

- 현재 모든 조건에서 이상없음
- 감마오리자놀 함량: 0.0181 ± 0.0001%

(다) Lot No. 3:

- 현재 모든 조건에서 이상없음
- 감마오리자놀 함량: 0.0134 ± 0.00006%

나. 결과

제품명: ECM-MESS(0.5)Q

제조번호(Lab No): MH0109-DAB

제조일자: 2014-01-20

보관조건 (시험주기)	시험항목	1일 (3/26)	1 주 (4/1)	2주 (4/8)	1개월 (4/25)	3개월 (6/25)	6개월 (9/25)
5°C (3개월)	정상	OK	OK	OK	OK	OK	
	변색/변취	OK	OK	OK	OK	OK	
	점도/경도	2000	2000	1900	2000	1700	
	pH	7.72	7.78	7.75	7.75	8.19	
25°C (6개월)	정상	OK	OK	OK	OK	OK	
	변색/변취	OK	OK	OK	OK	OK	
	점도/경도	2000	2000	1800	1800	1600	
	pH	7.72	7.78	7.75	7.76	7.98	
40°C (3개월)	정상	OK	OK	OK	OK	OK	
	변색/변취	OK	OK	OK	OK	OK	
	점도/경도	2000	2000	1900	1900	1200	
	pH	7.72	7.78	7.75	7.75	7.82	
50°C (1개월)	정상	OK	OK	OK	OK		
	변색/변취	OK	OK	OK	미세 황변		
	점도/경도	2000	2000	1900	1900		
	pH	7.72	7.78	7.74	7.75		
CYCLE (3 개월)	정상	OK	OK	OK	OK	OK	
	변색/변취	OK	OK	OK	OK	미세 황변	
	점도/경도	2000	2000	1900	1900	1400	
	pH	7.72	7.78	7.75	7.75	7.88	

* 당일 시험 기록서

- 점도/ 경도: 2000(LV2*12rpm). pH: 6.76, 비중: 0.992

(위탁기관- 고려대학교 안산병원 피부과)

제 1 절 미강 초임계 추출물의 *in vivo* 생리활성 검증

1. 미강 초임계 추출물

가. 실험 방법

(1) 마우스에서 초임계 미강 추출물 도포 및 관찰 방법

- 6주령 암컷 C57BL/6 mouse를 구입하여 대조군, minoxidil 처리군, 미강 초임계 추출물 처리군으로 분류하여 각 각 6마리씩 배정하고 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 털을 제거하고, 4주간 base(대조군: negative control 군), minoxidil[®] (대조군: positive control 군), 및 시제품을 1일 1회 도포하고 모발 성장에 대한 변화를 관찰한다.

- * Group 1. 음성대조군
- * Group 2. 양성대조군
- * Group 3. 미강 초임계 추출물 3%
- * Group 4. 미강 초임계 추출물 5%
- * Group 5. 미강 압착유 5%

(2) 마우스에서의 모발 성장에 대한 임상사진 평가

- 획득된 디지털 임상 사진을 이용한 탈모증 개선 정도에 대한 임상사진 평가를 대조군과 비교 분석시행 한다.

(3) 모발의 비 측정

- 전체 삭모 부위 중 생장기 모발이 자란 부위의 비와 털이 자란 부위의 비를 매주 측정한다.

(4) 생장기 모낭의 형성 여부 평가

- 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정한 후 수세, 탈수 과정을 거쳐 paraffin으로 포매하여, 3 μ m의 절편을 제작하여 H&E염색과 toluidin blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰한다.

(5) Real time RT-PCR을 이용한 VEGF(vascular endothelial growth factor),

IGF(isulin like growth factor)-1, 및 KGF(keratinocyte growth factor), TGF-beta (Transforming growth factor)의 변화에 대한 정량적 분석

- 4주째에 마우스의 피부에서 조직 생검하여 조직에서 RNA를 Trizol용액을 사용하여 분리한 후 DEPC-treated water에 녹이고, BioPhotometer(ependorf)로 RNA를 정량한다. 정량한 RNA는 My Cycler(Bio-Rad)를 이용한 RT-PCR를 통해 cDNA를 합성하고 합성된 cDNA와 iQTM SYBR Green Supermix, 그리고 primer를 water에

함께 희석하여 iCycler(Bio-Rad, multicolor Real-Time PCR Detection System)으로 합성되는 정도의 값을 측정한다.

(6) 통계 처리

- 모든 분석은 SPSS(version 12.00, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 통계적 유의성을 검증하고 *p* value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

나.결과

(1) 마우스에서의 모발 성장에 대한 임상사진 평가

- 탈모증 개선 정도에 대한 평가 결과 모든 미강추출물 도포군에서 치료전이나 음성 대조군에 비하여 높은 모발 성장을 관찰할 수 있었다. Group4의 경우는 양성 대조군인 3% 미녹시딜 도포군 만큼의 모발 성장속도를 보였으며, Group3는 양성대조군보다 월등한 모발 형성의 결과를 보였다.

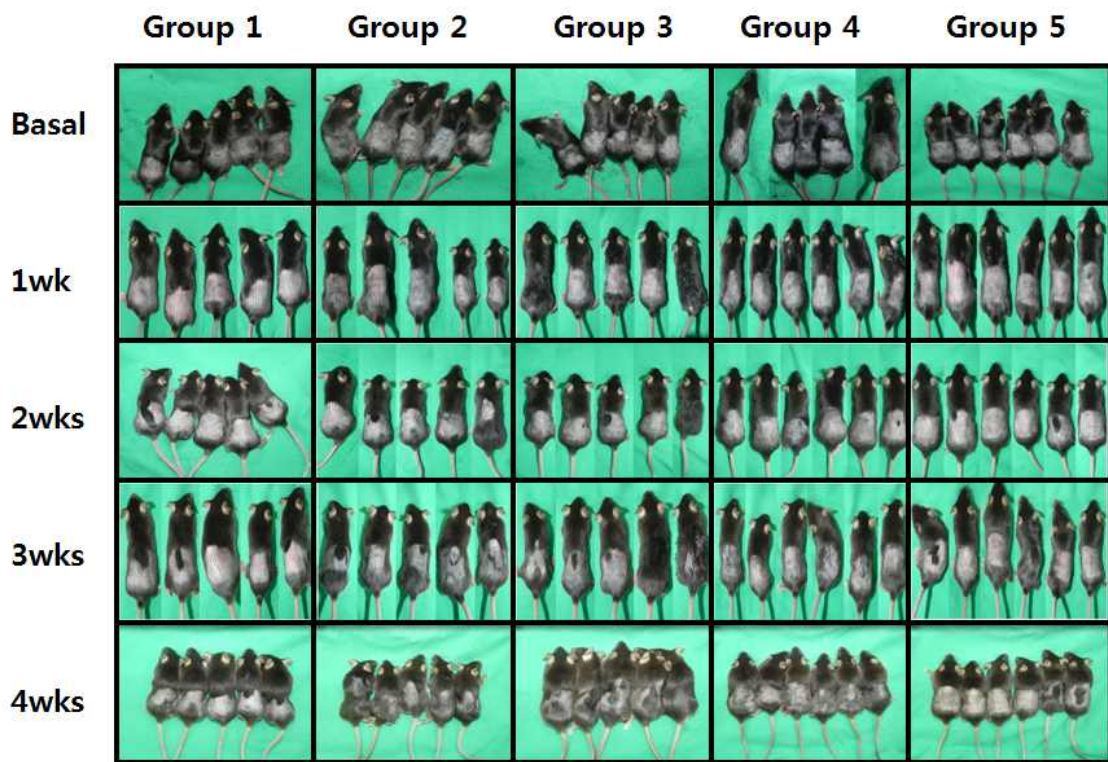


Fig1.초임계미강추출물에 의한마우스의모발성장사진

(2) 생장기 모낭의 형성 여부 평가

- 실험 시작 4주 후 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정한 후 수세, 탈수 과정을 거쳐 paraffin으로 포매하여, 4 μ m의 절편을 제작하여 H&E염색과 toluidin blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군 인 Group 1의 경우 피부 두께도 얇아져 있고, 모낭을 형성하는 모습을 찾기 힘들었다. 양성 대조군인 Group2에서는 성장 초기의 모습을 보였으며, 모낭으로서 분화하고 있는 표피와 성장 중에 있는 모낭에 미약하게 toluidin blue 염색 반응을 나타냈다. Group 3, Group4은 양성 대조군과 비슷하게 성장기의 모낭들이 많이 관찰되며, 대부분의 모낭들이 피하층까지 성장하였으며 성장중인 모구의 내외모 근초에 강한 toluidin blue 염색 반응이 나타났다. 특히, Group3은 다른 그룹에 비해 피부층의 두께가 월들이 두꺼워져 있으며, 분화되고 있는 모낭의 수도 많음을 관찰 할 수 있다. 반면 Group5은 음성대조군보다는 피부의 두께나 모낭의 수는 증가되어 보이나 양성 대조군이나 다른 시험군에 비해서는 그 증가가 미약해 보임을 알 수 있다.

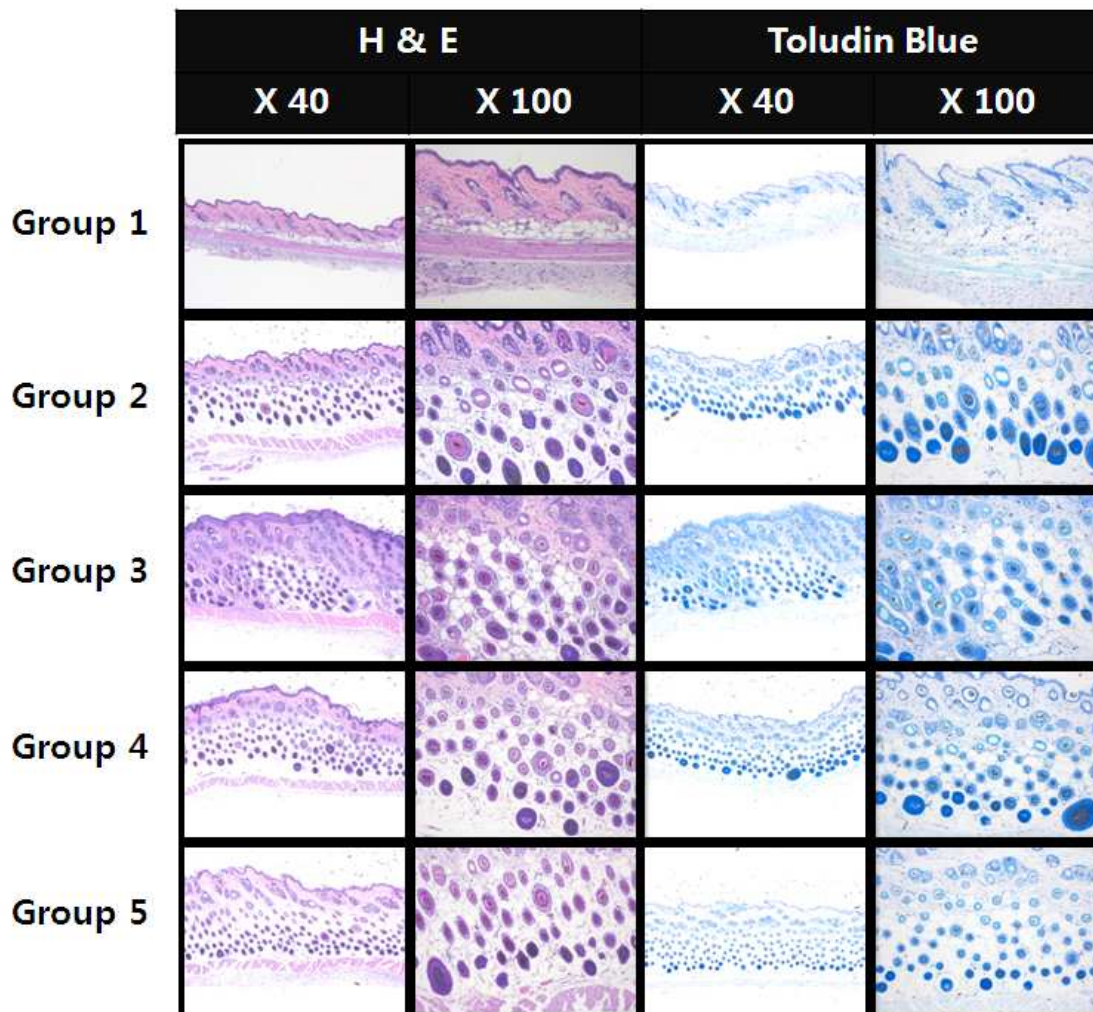


Fig2. 초임계 미강추출물에 의한 생장기 모낭 형성 평가

(3) real time RT-PCR을 이용한 IGF-1, KGF, VEGF 및 TGF-β 변화에 대한 결과

- base, 미강을 정제한 제품들, 미녹시딜 도포 후에 IGF, KGF, VEGF 및 TGF-β 등의 성장 인자에 대한 mRNA 정량 분석 결과에서 KGF의 발현은 Group 3, Group 4, Group 5에서 base를 도포한 음성대조군에 비해서 증가하는 발현을 보이고 있으며, Group 5 의미있는 발현을 보였다 ($p < 0.05$). Group 3, Group 4에서도 의미있는 증가는 아니지만, 발현량이 증가되는 것처럼 관찰 되었다. IGF의 발현은 양성 대조군인 Group 2와 실험군 Group 3에서의 발현이 증가되어 보이지만 의미 있는 증가는 아니었다.
- VEGF의 유전자 발현량은 Group 2, Group 3, Group 4에서 증가되는 양상을 보였으며, Group 4에서는 통계적으로 유의한 수치를 보였다. 또한, TGF-β의 유전자 발현량 역시 Group 2, Group 3, Group 4에서 증가되는 양상을 보였으며, 세군 모두 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다. 위의 결과들로 비추어볼 때 미강 추출물 3%나 미강 추출물 5%가 모발형성에 관여하는 여러 성장인자들을 증가시키는데 효과적임을 알 수 있다.

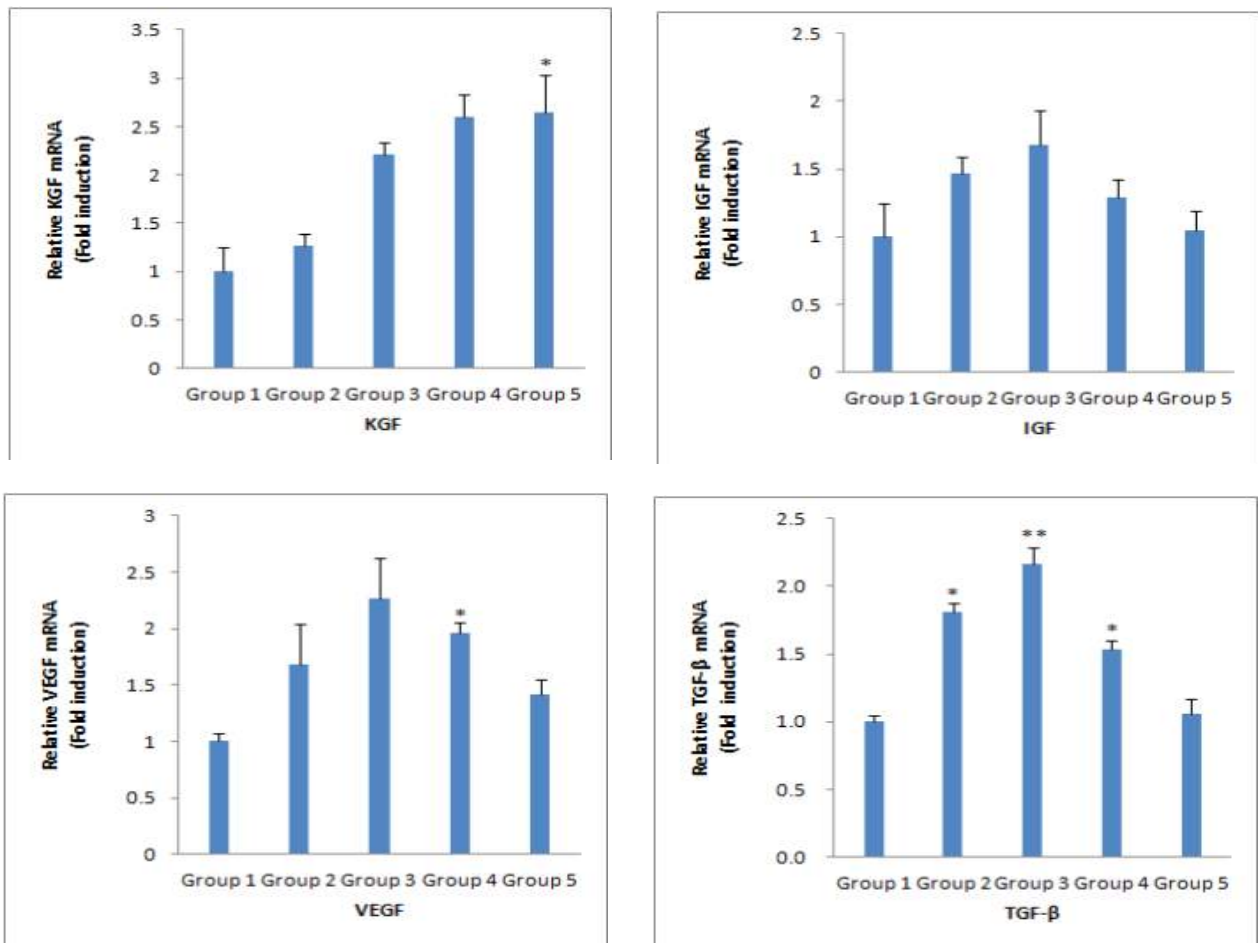


Fig3. 초임계 미강 추출물에 의한 growth factor 발현 양 비교

2. 초임계 미강의 유효성분의 마우스에서의 모발 성장에 대한 유효성 평가

가. 실험 방법

(1) 6주령 암컷 C57BL/6 mouse를 구입하여 대조군, minoxidil 처리군, 지표물질 처리군으로 분류하여 각 각 6마리씩 배정하고 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 털을 제거하고, 4주간 base(대조군: negative control 군), minoxidil[®] (대조군 : positive control 군), 및 시제품- linoleic acid, gamma-oryzanol, policosanol, gamma-tocotrienol을 1일 1회 도포하고 모발 성장에 대한 변화를 관찰하였다.

- * Group 1. negative control (base)
- * Group 2. linoleic acid (11.1 mg/ml)
- * Group 3. policosanol (0.03 mg/ml)
- * Group 4. gamma-oryzanol (0.22 mg/ml)
- * Group 5. gamma-tocotrienol (0.0093 mg/ml)
- * Group 6. positive control (3% minoxidil)

- (2) 획득된 디지털 임상 사진을 이용한 탈모증 개선 정도에 대한 임상사진 평가를 대조군과 비교 분석시행 하였다.
- (3) 전체 삭모 부위 중 생장기 모발이 자란 부위의 비와 털이 자란 부위의 비를 매주 측정 하였다.

나. 결과

- 탈모증 개선 정도에 대한 평가 결과 3% 미녹시딜 도포군에 비해 다소 모발 성장 속도가 떨어지지만 모든 미강추출물 도포군에서 치료 전이나 음성 대조군에 비하여 높은 모발 성장을 관찰할 수 있었다.
- Group 2와 Group 4의 경우는 양성 대조군인 3% 미녹시딜 도포군 만큼의 모발 성장속도를 보였다.

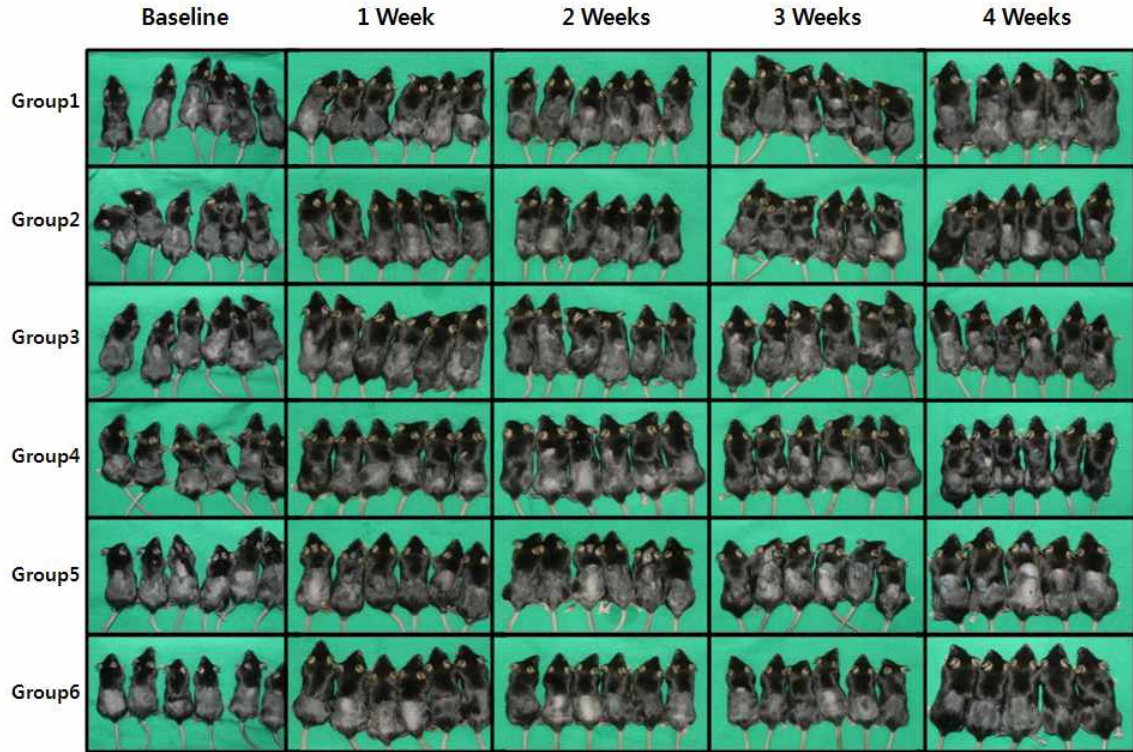


Fig4. 초임계미강추출물의 유효성분에 의한 마우스모발성장효과

(1) 생장기모낭의 형성여부평가

- 실험 시작 4주 후 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정한 후 수세, 탈수 과정을 거쳐 paraffin으로 포매하여, 4 μ m의 절편을 제작하여 H&E염색과 toluidin blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.
- 음성 대조군인 Group 1의 경우 피부 두께도 얇아져 있고, 모낭을 형성하는 모습을 찾기 힘들었다. 양성 대조군인 Group6에서는 성장 초기의 모습을 보였으며, 모낭으로서 분화하고 있는 표피와 성장 중에 있는 모낭에 미약하게 toluidin blue 염색 반응을 나타냈다.
- Group 2, Group4은 양성 대조군과 비슷한게 성장기의 모낭들이 많이 관찰되며, 대부분의 모낭들이 피하층까지 성장하였으며 성장중인 모구의 내외모근초에 강한 toluidin blue 염색 반응이 나타났다.
- 반면, Group3과 Group5의 경우는 다른 군 비해 세포의 염색된 세포의 수도 적음을 한 눈에 볼 수 있으며 Group3은 음성 대조군과 유사하게 피부의 두께도 얇음을 관찰할 수 있었다.

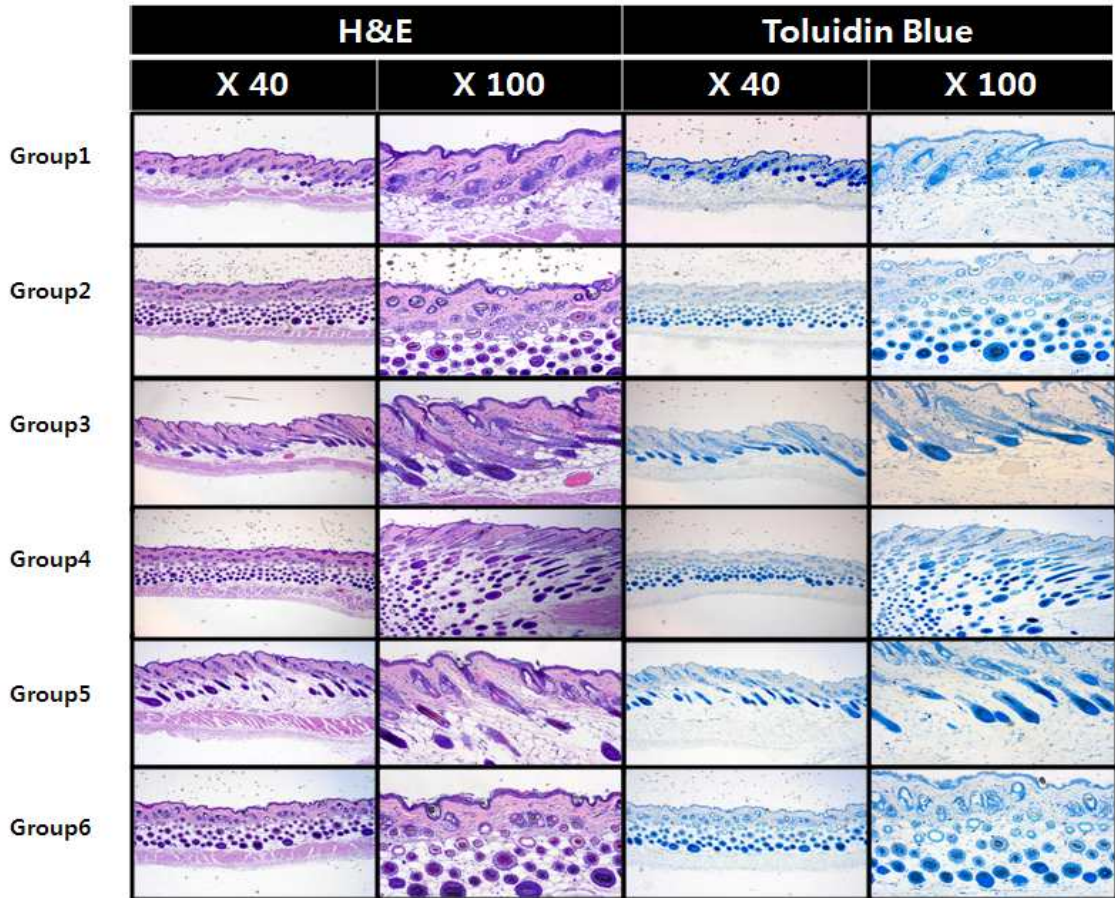


Fig5. 초임계 미강 추출물의 유효성분에 의한 생장기 모낭 형성 평가

(2) realtime RT-PCR을 이용한 IGF-1, KGF, VEGF 및 TGF- β 변화에 대한 결과

- 4주째에 마우스의 피부에서 조직 생검하여 조직에서 RNA를 Trizol 용액을 사용하여 분리한 후 DEPC-treated water에 녹이고, BioPhotometer(ependorf)로 RNA를 정량하였다.
- 정량한 RNA는 My Cyclor(Bio-Rad)를 이용한 RT-PCR를 통해 cDNA를 합성하고 합성된 cDNA와 iQTM SYBR Green Supermix, primer를 water에 함께 희석하여 iCycler(Bio-Rad, multicolor Real-Time PCR Detection System)으로 합성되는 정도의 값을 측정하였다.
- 모든 분석은 SPSS(version 12.00, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 통계적 유의성을 검증하고 p value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.
- base, 미강을 정제한 제품들, 미녹시딜 도포 후에 IGF, KGF, VEGF 및 TGF- β 등의 성장 인자에 대한 mRNA 정량 분석 결과에서 IGF의 발현은 Group 3, Group 4, Group 5, Group 6에서 base를 도포한 음성대조군에 비해서 의미있는 발현을 보였다 ($p < 0.05$). Group 2에서도 의미있는 증가는 아니지만, 발현량이 증가되는 것처럼 관찰 되었다. KGF와 VEGF의 유전자 발현량에서도 모든 시험군에서 음성대조군에

비해 발현량이 증가됨을 보였다. 특히, Group 2와 Group 4는 두 유전자 모두에서 의미 있는 증가량을 보였다.

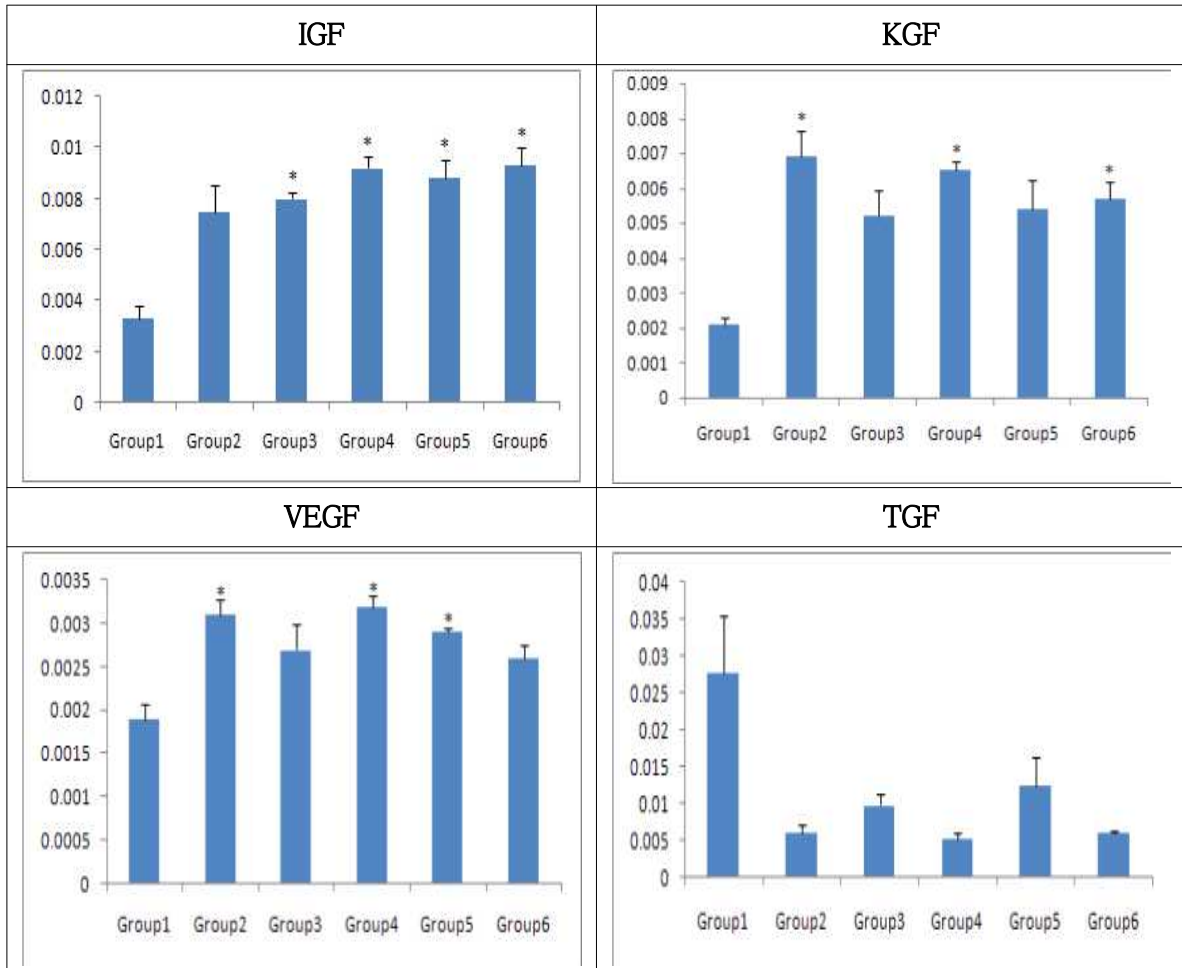


Fig6. 초임계 미강추출물 유효성분의 growthfactor의 발현양비교

- 또한, TGF-β의 유전자 발현량은 모든 대조군에서 음성 대조군 대비 현저히 감소해 보이지만, 통계적으로 유의한 결과는 아니었다.
- 이상의 결과로 볼 때 시험군들의 육모 촉진 효과는 성장 인자인 IGF, KGF와 VEGF 유전자의 증가와 TGF-β의 감소등의 의한 결과로 추정된다.

3. 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품)의 유효성 검증

가. 미강 에센스의 마우스에서의 모발 성장에 대한 유효성 평가

(1) 실험 방법

- 6주령 암컷 C57BL/6 mouse를 구입하여 기본제형군, 기존효능원료(L-menthol, D-panthenol, Salicylic acid), 농도별 초임계 미강추출물로 분류하여 각 각 6마리씩 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 털을 제거하고, 4주간 1일 1회 도포하고 모발 성장에 대한 변화를 관찰하였다.

- * Group 1. 기본제형
- * Group 2. 기본제형 + 기존효능원료
- * Group 3. 기본제형 + 기존효능원료 + 0.05% 미강추출물
- * Group 4. 기본제형 + 기존효능원료 + 0.5% 미강추출물
- * Group 5. 기본제형 + 기존효능원료 + 1% 미강추출물
- * Group 6. 기본제형 + 기존효능원료 + 3% 미강추출물

- 획득된 디지털 임상 사진을 이용한 탈모증 개선 정도에 대한 임상사진 평가를 기본 제형군과 비교 분석시행 하였다.
- 전체 삭모 부위 중 생장기 모발이 자란 부위의 비와 털이 자란 부위의 비를 매주 측정하였다.

(2) 실험 결과

- 탈모증 개선 정도에 대한 평가 결과 0.5% 미강추출물군과 1%의 미강추출물군에 서 대조군에 비해 높은 모발 성장을 관찰할 수 있었다.



Fig 7. 미강 에센스에 의한 마우스의 모발성장

나. 생장기모낭의 형성여부평가

(1) 실험 방법

- 실험 시작 4주 후 등쪽 피부의 발모된 부위를 척추선에 평행하게 절개하여 normal buffered formalin 용액으로 고정한 후 수세, 탈수 과정을 거쳐 paraffin으로 포매하여, 4 μ m의 절편을 제작하여 H&E염색과 toluidin blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 실험결과

- 대조군인 Group 1의 경우 모낭을 형성하는 모습이 가장 미약하였다. Group 2, 3, 6에서는 성장 초기의 모습을 보였으며, 모낭으로서 분화하고 있는 표피와 성장 중에 있는 모낭에 미약하게 toluidin blue 염색 반응을 나타냈다.
- Group 4, 5는 대부분의 모낭들이 피하층까지 성장하였으며 성장중인 모구의 내외모근초에 강한 toluidin blue 염색 반응이 나타났다.

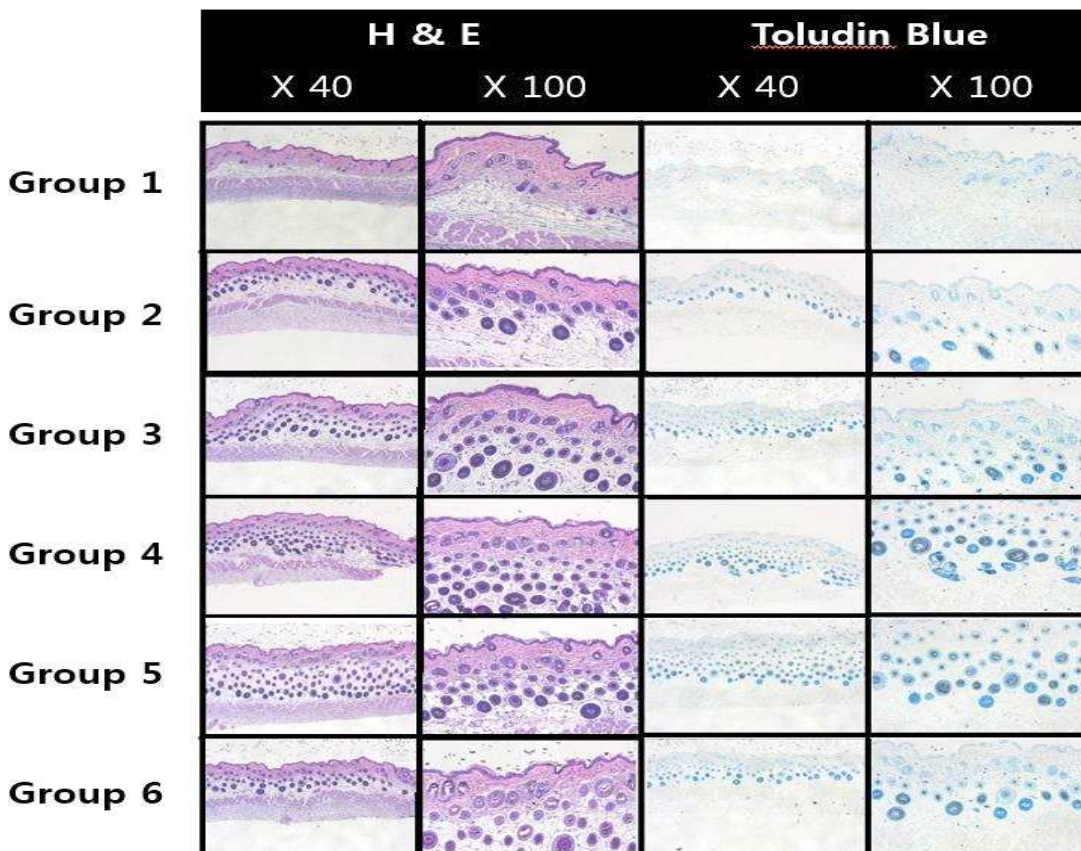


Fig 8. 미강 에센스에 의한 마우스 생장기 모낭 형성평가

다. RealtimeRT-PCR을 이용한 growth factors의 변화

(1) 실험 방법

- 4주째에 마우스의 피부에서 조직을 생검 하여 RNA를 Trizol용액을 사용하여 분리한 후 DEPC-treated water에 녹이고, BioPhotometer(ependorf)로 RNA를 정량하였다.
- 정량한 RNA는 My Cycler(Bio-Rad)를 이용한 RT-PCR를 통해 cDNA를 합성하고 합성된 cDNA와 iQTL SYBR Green Supermix, primer를 water에 함께 희석하여 iCycler(Bio-Rad, multicolor Real-Time PCR Detection System)으로 합성되는 정도의 값을 측정하였다.
- 모든 분석은 SPSS(version 12.00, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 통계적 유의성을 검증하고 p value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

(2) 실험결과

- KGF, IGF, VEGF 및 TGF- β 등의 성장 인자에 대한 mRNA 정량 분석 결과에서 KGF의 발현은 Group D, Group E에서 대조군(Group A)에 비해서 통계적으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$).
- IGF의 발현은 대조군인 Group A와 비교하여 전체적으로 발현이 증가되는 경향을 보였지만 통계적인 의미는 없었다.
- VEGF의 유전자 발현량은 Group E에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다.
- 반면에, TGF- β 의 유전자 발현량은 통계적으로 유의하지 않았다.

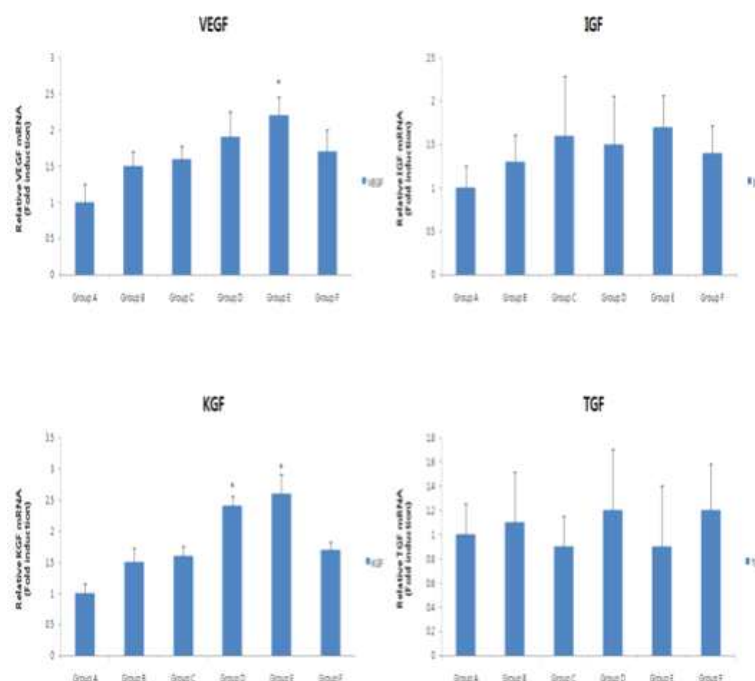


Fig9. 미강에 센스에 의한마우스의 growthfactor의 발현양비교

- 따라서 제형의 유효성 시험결과, 기존 효능물질에 비해 초임계 추출물, 0.5, 1% 첨가한 제형에서 모낭형성 및 형성기 유도효과와 퇴행기 억제 효과를 보여 보다 높은 양모 활성을 나타내었다.

제 2절. 임상시험

1.. 연구 내용 및 방법

가. 임상시험대상자선정

(1) 선정방법

- 책임 연구자 소속 병원의 임상시험심사위원회(IRB) 심사 통과 후에 남성형 및 여성형 탈모증 (Male and Female Pattern Alopecia) 환자 50 여명을 대상으로 임상시험을 시행 한다.
- 한국인 안드로겐성 탈모증(대머리) 환자들을 대상으로 하며 이들을 의학적으로 남성형 및 여성형 탈모증 (Male and Female Pattern Alopecia)으로 진단 및 분류하고 원형 탈모증, 휴지기 탈모증 등의 기타의 탈모 환자는 정확한 비교 분석을 위하여 시험 대상에 포함시키지 않는다.

(2) 선정 기준

- ① 임상 시험의 목적, 방법, 효과 등에 대한 설명을 듣고 서면 동의서에 서명한 탈모증 환자
- ② 최근 3개월 이상 탈모증으로 진단 받고 치료를 필요로 하는 18세 이상의 한국인남녀 탈모증 환자

(3) 제외 기준

- ① 다른 질환으로 약물 치료를 받고 있는 환자
- ② 임신하였거나 수유 중인 여성 환자
- ③ 본 시험 성분에 과민증이 있는 환자
- ④ 본 임상 시험의 목적 및 방법을 이해하지 못하는 환자
- ⑤ 한글을 읽고 쓰고 이해하는데 어려움이 있는 환자
- ⑥ 임상 시험 시작 시점 2주 이내에 다른 탈모 치료 약제나 제품을 투여 받은 환자
- ⑦ 임상시험 담당자가 판단하였을 때 본 임상시험 수행이 어렵다고 판단되는 환자

나.추적관찰방법

- 임상 시험 시작 시점과 제품 사용 후 8주 째, 사용 후 16주째에 피부과 외래에 방문하여 실시한다. Folliscope® 2.5 영상 획득 및 디지털 임상 사진은 일정한 부위의 평가를 위하여 연구 시작 시점에 환자의 두정부 탈모 부위(the leading edge of the vertex bald spot)에 반영구 문신(tattoo)을 시행하고 머리 고정대 (stereotatic device)에 머리를 대고 항상 일정한 조건에서 측정하도록 한다.

(1) 두피모발 분석 장비를 이용한 검사

- 두정부 탈모 부위(the leading edge of the vertex bald spot)에 문신(tattoo)을 하고 이를 중심으로 Folliscope 2.5 영상 모발 검사 장비를 이용하여 영상을 획득

(처음 내원시, 8주, 16주 쯤)하여 모발의 개수, 두께 및 밀도(hair counts, hair thickness and hair density)의 변화를 비교 분석한다 (Figure 1-3).



Fig1. 환자의 두피에서Follicoscope를 이용하여모발상태를측정하는장면



Fig2. 두피의문신부위에서모발의밀도(hairdensity)를측정하는컴퓨터화면사진.

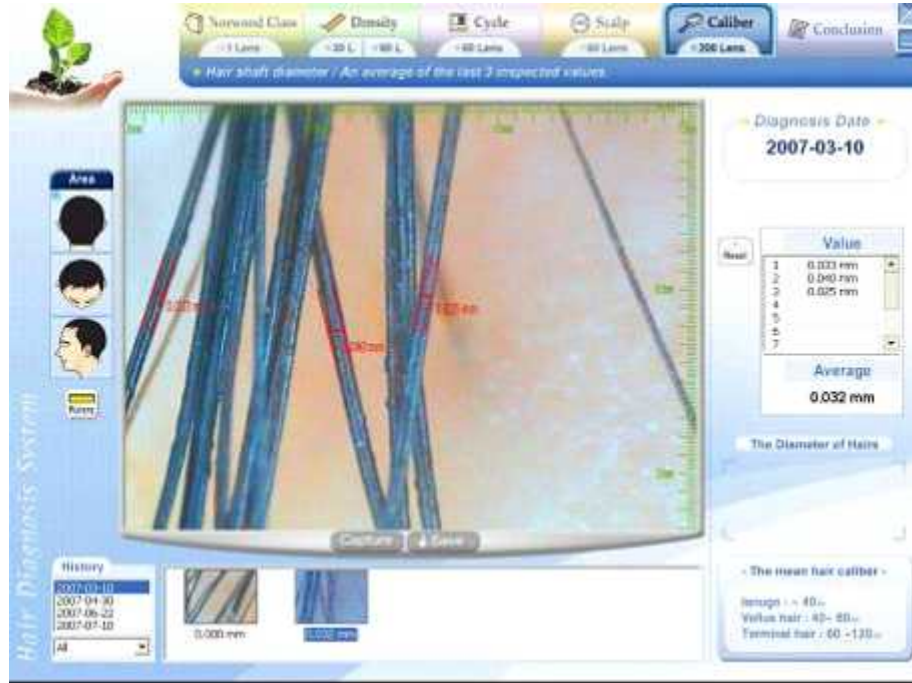


Fig3. 두피의 문신 부위에서 모발의 두께(hair caliber)를 측정하는 컴퓨터 화면 사진.

(2) 환자 만족도(설문지) 검사

- 탈모 관련 국제 논문에서 가장 널리 사용되고 있는 3-point rating scale (호전, 변화 없음, 악화 : improved, no change, or worse)을 이용한 다음과 같은 항목에 대하여 설문지를 통한 환자 만족도 검사를 시행한다.

- * 두정부 탈모 부위의 크기 변화 (Size of vertex spot)
- * 정수리에서의 탈모 (hair loss on top of scalp)
- * 전두부 탈모 변화 (bitemporal recession)
- * 모발 탈락 (hair shedding)
- * 모발의 질 (hair quality)
- * 전체적인 만족도 (overall satisfaction)

(가) 환자 만족도 설문지의 견본

① 두정부 탈모 부위의 면적 변화 (Size of vertex spot)

2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)

4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)

② 정수리에서의 탈모 (hair loss on top of scalp)

2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)

4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)

- ③ 전두부 탈모 변화 (bitemporal recession)
2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
- ④ 모발 탈락 (hair shedding)
2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
- ⑤ 모발의 질 (hair quality)
2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
- ⑥ 전체적인 만족도 (overall satisfaction)
2개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)
4개월 후 (호전 되었다, 변화 없다, 악화 되었다)

(3) 피부과 의사 패널에 의한 탈모증 개선 효과에 대한 임상사진 평가
(expert panel assessment of global photographs)

- (가) 환자는 임상 시험 기간 동안 같은 헤어 스타일과 모발 색깔을 유지하도록 권유한다.
- (나) 머리 고정대(stereotatic device)를 이용하여 일정한 방법과 거리에서 디지털 카메라를 이용하여 처음 내원 시, 8주, 16주 째에 두정부와 전두부 임상 사진 촬영
- (다) 3인 이상의 피부과 전문의 패널을 구성하여 획득된 디지털 임상 사진을 이용한 탈모증 개선 정도에 대한 임상사진 평가를 다음과 같은 점수화 방법으로 시행한다.
- (라) 7-point rating scale: -3에서 +3 점까지 다음과 같이 점수화한다.
매우 악화, 중등도 악화, 경미한 악화, 변화 없음, 경미한 호전, 중등도 호전, 매우 호전 (greatly, moderately, or slightly decreased; no change; slightly, moderately or greatly increased; -3 to +3)

다.통계처리

- 모든 분석은 SPSS(version 20.00, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 통계적 유의성을 검증하고 *p* value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주한다.

2. 결과

가. 임상시험 대상 환자의 분석

(1) 환자 분포와 나이 및 성별

- 총 50명의 환자를 대상으로 시행하였으며 이 중 남자 28명, 여자 22명 이었다. 이들 중 남자 6명과 여자 1명이 개인 사정으로 중도 탈락하여 최종 남자 22명, 여자 21명이 연구에 참여하였다 (Table 1-(a)). 이들의 평균 연령은 남자는 41.2세이고, 여자는 45.5세 이었다 (Table 1-(b)).

Table 1. (a) 조사 군간의 환자 분포와 남녀 성비, (b) 조사 군간의 나이

(a)		(b)	
남자	22 명	남자	41.2 세
여자	21 명	여자	45.5 세
합계	43 명	합계	43.3 세

(2) 대상 환자의 내원시 탈모 형태

- 최초 내원 시 탈모 정도를 평가하기 위해 남자의 경우 헤밀턴-노우드 (Hamilton-Norwood classification), 여자의 경우 루드윅 (Ludwig classification) 분류법을 이용하였다 (Table 2 & 3).

Table 2. 내원시 남성 환자의 탈모 형태 분류

헤밀턴-노우드 분류 (남자)	인원(명)
I	2
II	1
IIa	1
III	4
IIIa	1
IIIvertex	3
IV	4
IVa	0
V	4
Va	2
VI	0
VII	0
총계	22

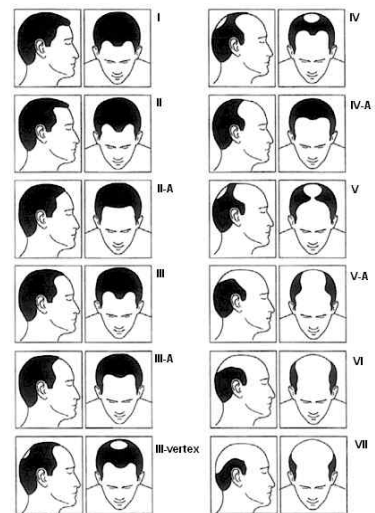
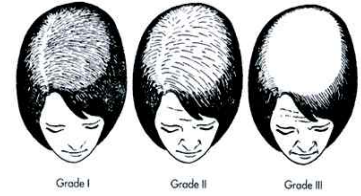


Table 3. 내원시 여성 환자의 탈모 형태 분류

루드윅 분류 (여자)	인원(명)
Grade I	15
Grade II	6
Grade III	0
총계	21



나. 유효성 평가

(1) 두피모발 분석 장비를 이용한 분석 결과

(가) 모발 밀도

- 최초 내원시 미강 포함군은 평균 86.90개/cm²이었고, 치료 후 8주째에는 평균 92.45개/cm² 로 증가하였고 치료 16주째에는 98.38개/cm² 로 증가하였다. 미강 비포함군은 평균 80.98개/cm²이었고 치료 후 8주째 에는 평균 83.36개/cm² 치료 24주째에는 86.82개/cm² 로 증가하였다. 두 치료군 간에 모발 밀도의 호전은 8주, 16주차에 미강 포함군에서 미강 비포함군에 비하여 보다 많은 증가를 보였으나 이는 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p > 0.05$) (Table 4 & Figure 4).

Table 4. 두피모발분석장비를이용한모발밀도측정결과

	미강 포함군	미강 비포함군
치료 전	86.90±13.8	80.98±20.9
치료 후 8주	92.45±10.1	83.36±13.3
치료 후 16주	98.38±10.1	86.82±15.5

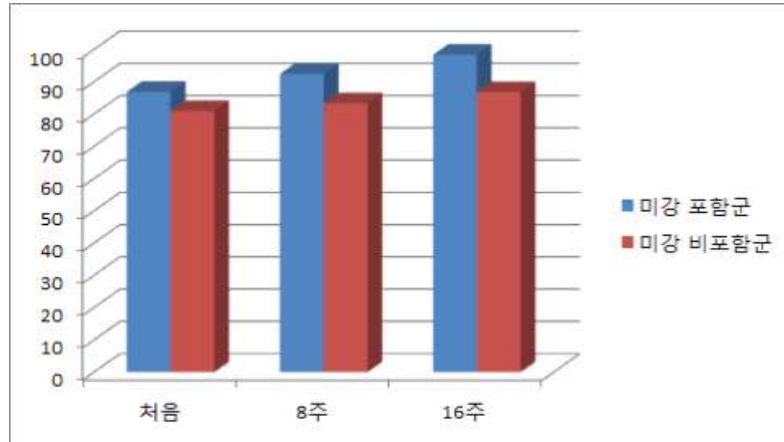


Figure5. 두피모발분석장비를 이용한모발밀도측정결과(Table5의 figure)

(나) 모발 굵기

- 최초 내원시 미강 포함군은 평균 0.066 mm 이었고, 치료 후 8주째에는 평균 0.074 mm 치료후 16주째는 0.083 mm 로 증가하였다. 최초 내원시 미강 비포함군은 평균 0.061 mm 이었고 치료 후 8주째 에는 평균 0.069 mm 로 치료후 16주째는 0.071 mm로 증가하였다. 두 치료군 간에 모발 밀도의 호전은 8주, 16주 모두 미강 포함군에서 미강 비포함군에 비해 굵기가 증가하는 경향을 보였으며 16주의 모발 굵기에 대한 평가는 두 그룹간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (p value 0.025) (Table 5 & Figure 5).

Table 5. 두피모발분석장비를 이용한모발굵기측정결과

	미강 포함군	미강 비포함군
치료 전	0.066±0.018	0.061±0.015
치료 후 8주	0.074±0.014	0.069±0.014
치료 후 16주	0.083±0.016	0.071±0.014

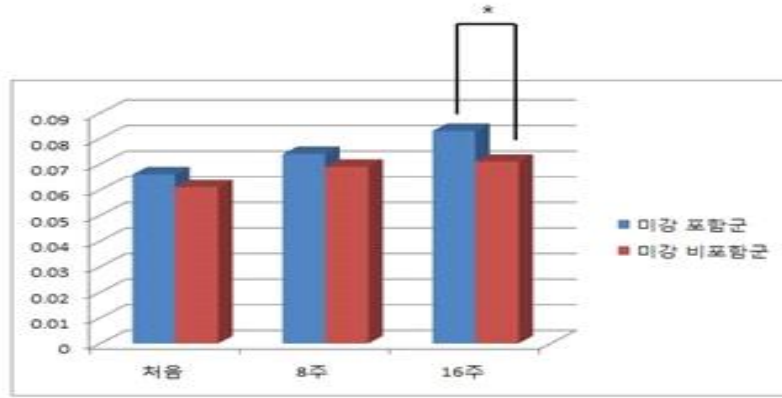


Figure5. 두피모발분석장비를 이용한 모발 굵기 측정 결과 (* $p < 0.025$) (Table 6의 figure)

(2) 피부과 의사 패널에 의한 임상사진 평가

- 2인 이상의 피부과 의사 패널을 구성하여 획득된 디지털 임상 사진을 이용한 탈모증 개선 정도에 대한 임상사진 평가를 “7-point rating scale” 법으로 점수화 하고 비교 분석한다. 미강 포함군에서의 임상적 호전 정도에 대한 점수는 8주차에 평균 0.67이었고 미강 비포함군에서는 평균 0.23이었으며 통계적으로는 유의하지 않았다. 16주차에 임상적 호전 정도에 대한 평균 점수는 미강 포함군에서 1.10 미강 비포함군에서는 0.50이었고, 이는 통계적으로는 유의하였다 (p value 0.013) (Table 6 & Figure 6).

Table 6. 탈모증 개선 효과에 대한 임상사진 평가 점수

	미강 포함군	미강 비포함군
임상 사진 평가 점수(8주 차)	0.67±0.730	0.23±0.752
임상 사진 평가 점수(16주 차)	1.10±0.539	0.50±0.913

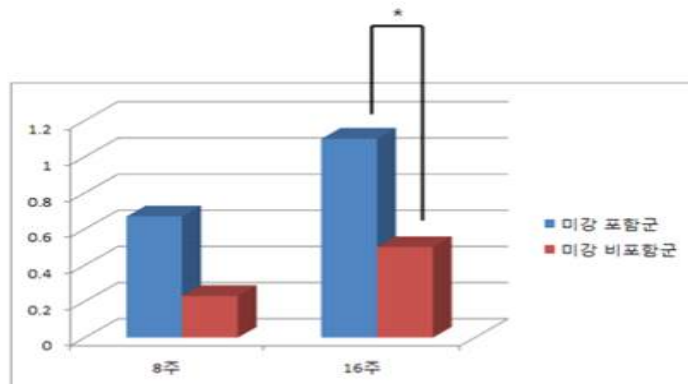


Figure6. 임상사진 평가 결과 (* $p < 0.013$) (Table 7의 figure)

(3) 환자 만족도 설문지 결과

(가) 두정부 탈모 부위의 크기 변화 (Size of vertex spot)

미강포함	8주(명)	16주(명)	미강비포함	8주(명)	16주(명)
호전	8	8	호전	7	7
변화없음	13	13	변화없음	15	15
악화	0	0	악화	0	0

(나) 정수리에서의 탈모 (hair loss on top of scalp)

미강포함	8주(명)	16주(명)	미강비포함	8주(명)	16주(명)
호전	9	10	호전	7	12
변화없음	12	11	변화없음	15	10
악화	0	0	악화	0	0

(다) 전두부 탈모 변화 (bitemporal recession)

미강포함	8주(명)	16주(명)	미강비포함	8주(명)	16주(명)
호전	7	9	호전	7	6
변화없음	14	12	변화없음	15	16
악화	0	0	악화	0	0

(라) 모발 탈락 (hair shedding)

미강포함	8주(명)	16주(명)	미강비포함	8주(명)	16주(명)
호전	11	14	호전	9	9
변화없음	9	6	변화없음	12	12
악화	1	1	악화	1	1

(마) 모발의 질 (hair quality)

미강포함	8주(명)		16주(명)		미강비포함	8주(명)		16주(명)	
	호전	변화없음	악화	호전		변화없음	악화		
호전	6	12	호전	8	9	호전	8	9	
변화없음	15	9	변화없음	13	13	변화없음	13	13	
악화	0	0	악화	1	0	악화	1	0	

(바) 전체적인 만족도 (overall satisfaction)

미강포함	8주(명)		16주(명)		미강비포함	8주(명)		16주(명)	
	호전	변화없음	악화	호전		변화없음	악화		
호전	11	17	호전	10	11	호전	10	11	
변화없음	10	4	변화없음	12	11	변화없음	12	11	
악화	0	0	악화	0	0	악화	0	0	

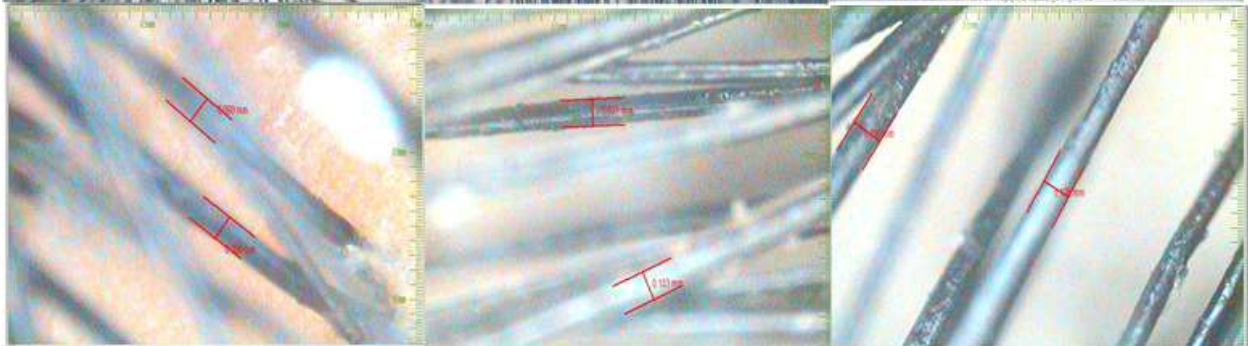
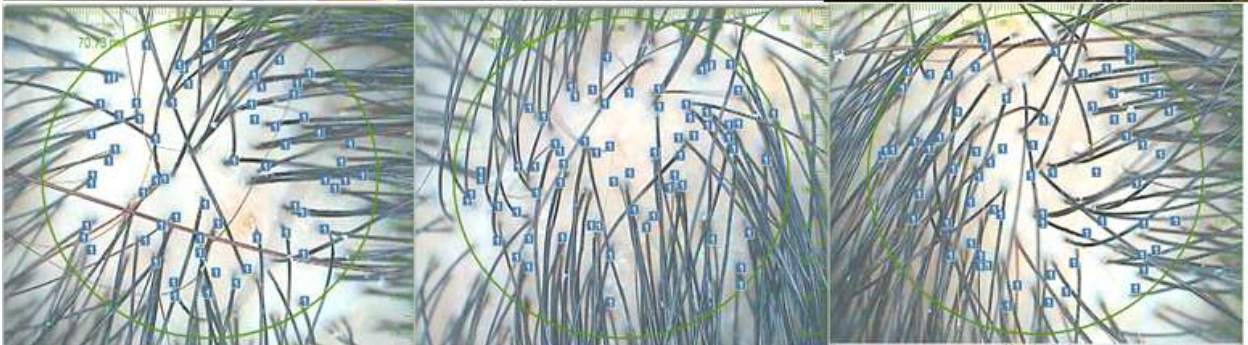
(사) 전체 만족도 변화

	(가) 8주 / 16 주		(나) 8주 / 16주		(다) 8주 / 16주		(라) 8주 / 16주		(마) 8주 / 16주		(바) 8주 / 16주	
	미강 포함군	2.38	2.38	2.43	2.48	2.33	2.43	2.48	2.62	2.29	2.57	2.52
미강 비포함 군	2.32	2.32	2.32	2.55	2.32	2.27	2.36	2.36	2.32	2.41	2.45	2.50

- 전체적으로 미강 포함군의 경우 치료 후 8주차에 2.40점 치료 후 16주차에 2.55점을 보였고, 미강 비포함군의 경우 치료후 8주차에 2.35점 치료 후 16주차에 2.40점을 보였다.

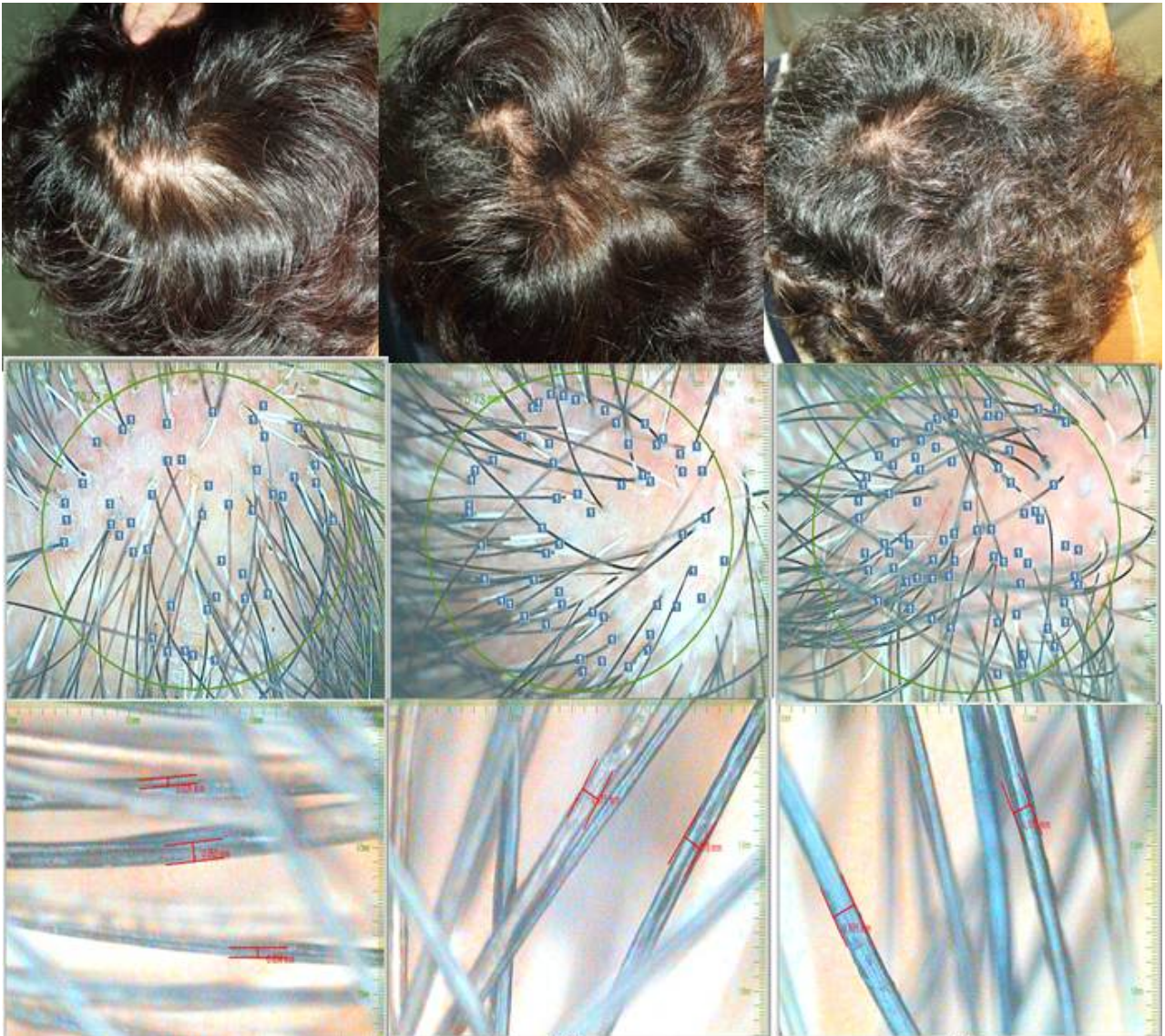
다. 환자증례

(1) 미강포함군-1



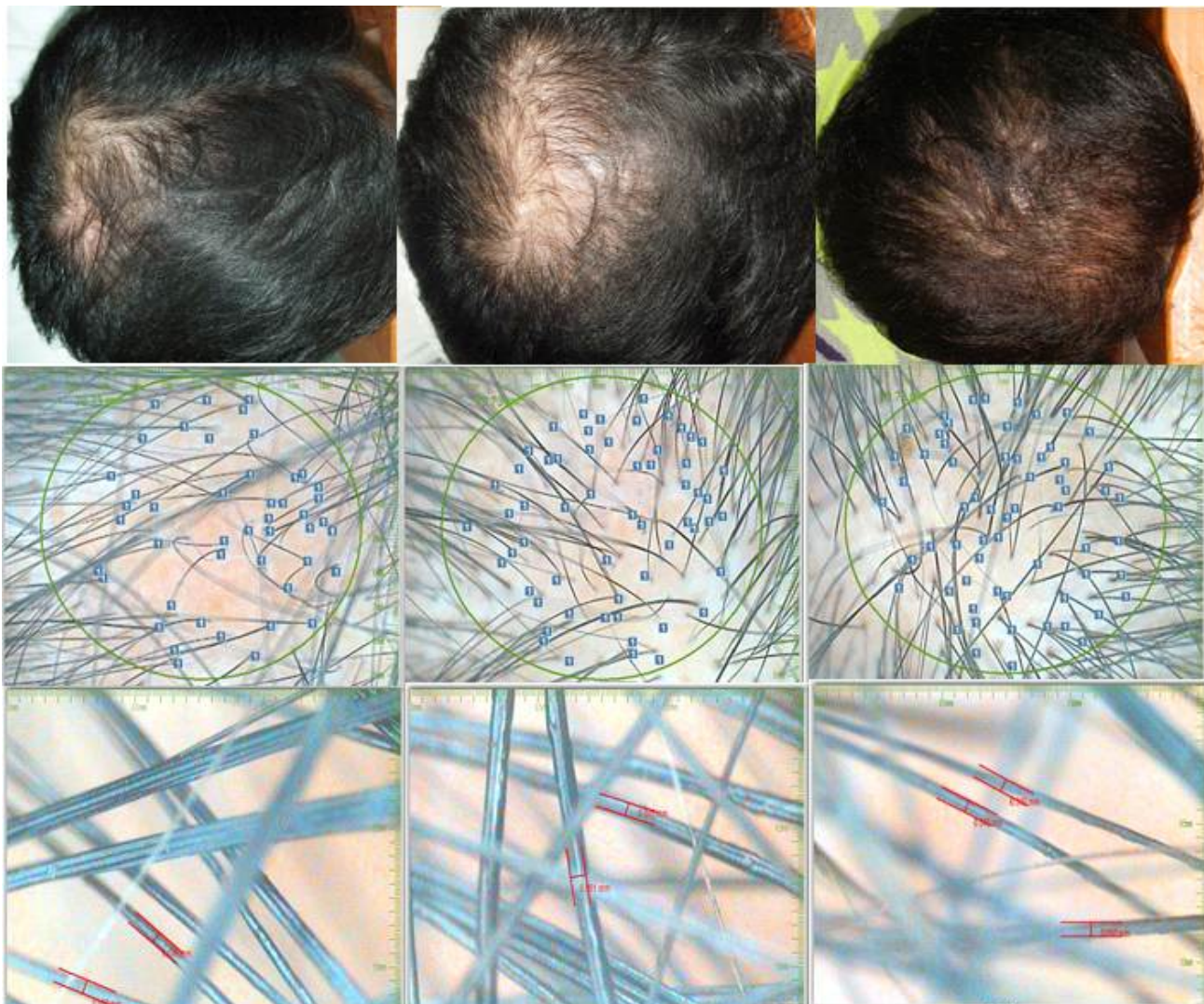
치료전		치료 8 주째		치료 16 주째	
밀도	굵기	밀도	굵기	밀도	굵기
92.5개/cm ²	0.094mm	95개/cm ²	0.097 mm	96개/cm ²	0.11mm

(2) 미강포함군-2



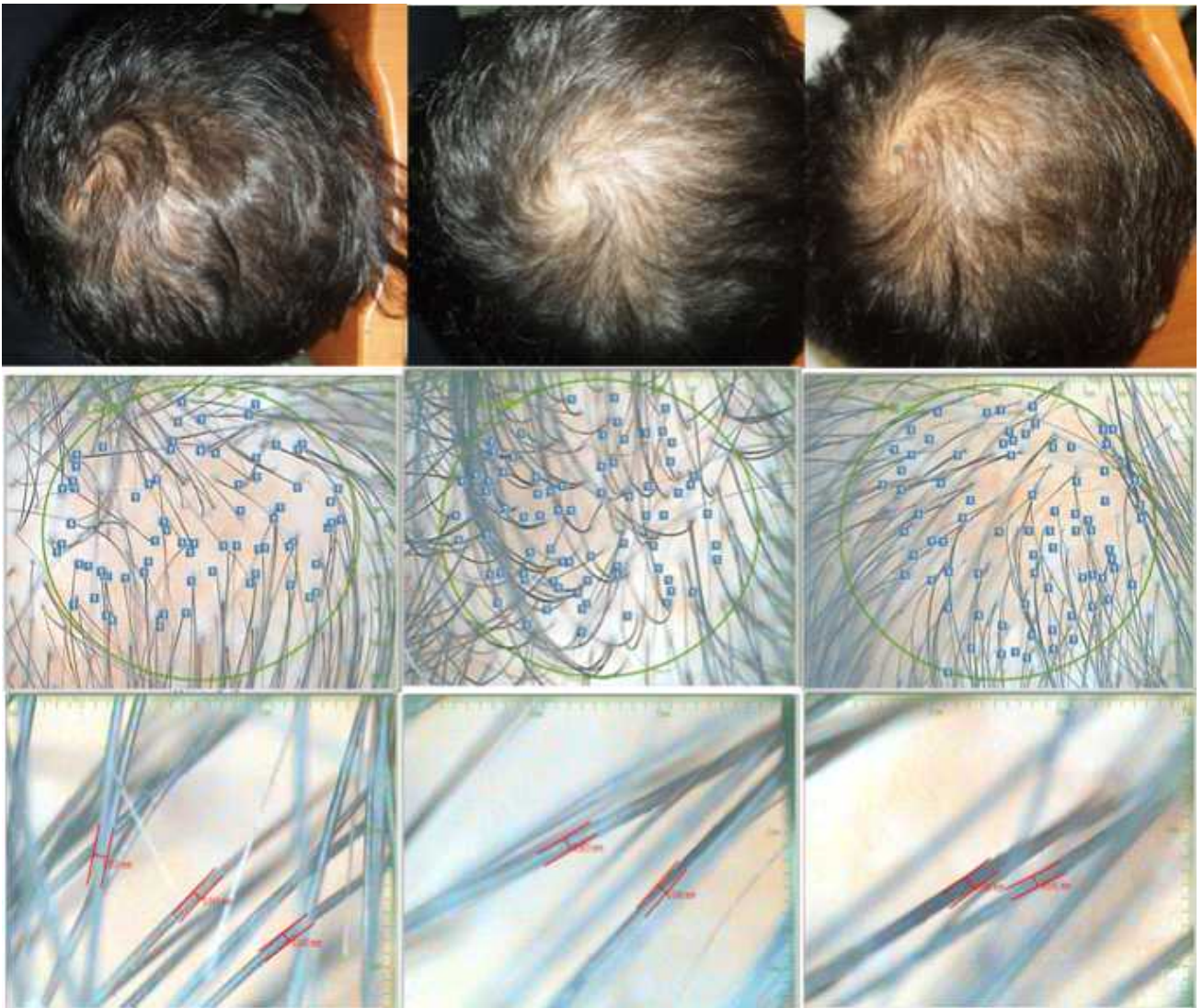
치료전		치료 8 주째		치료 16 주째	
밀도	굵기	밀도	굵기	밀도	굵기
66개/cm ²	0.043mm	82개/cm ²	0.077 mm	99개/cm ²	0.087mm

(3) 미강비포함군-1



치료전		치료 8 주째		치료 16 주째	
밀도	굵기	밀도	굵기	밀도	굵기
71.5개/cm ²	0.048mm	85.5개/cm ²	0.053 mm	87개/cm ²	0.050mm

(4) 미강비포함군-2



치료전		치료 8 주째		치료 16 주째	
밀도	굵기	밀도	굵기	밀도	굵기
99개/cm ²	0.047mm	104개/cm ²	0.048 mm	108개/cm ²	0.052mm

라. 결론

- 본 임상연구는 남성형 및 여성형 탈모환자 50 여명을 대상으로 최신 영상학적 기법과 객관적이고 검증된 임상연구 방법을 통하여 초임계 미강 추출물을 포함한 도포제로 치료 받은 환자군과 미강 추출물이 포함되지 않은 도포제로 치료한 환자군 간의 탈모증의 개선 효과에 대하여 비교 분석을 시행하였다. Folliscope[®] 2.5 영상 획득, 디지털 임상 사진 등의 검사를 실시한 결과 모발 밀도 및 굵기는 미강 포함군에서 비포함군보다 증가하는 경향을 보였으며 특히 미강 포함군의 치료 16주째에 굵기에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.05$).

- 설문조사에서는 치료 8주차에는 비슷하였으나, 16주차에서는 미강 포함군에서 비포함군보다 더 만족하는 경향을 보였다. 그리고 임상사진에 의한 평가에서는 미강 포함군에서 비포함군보다 8주차, 16주차 모두 임상적 호전을 보였으며 특히 16주차의 임상사진평가 결과는 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$).
- 이상의 임상 시험 결과로 초임계 미강추출물이 남성형 및 여성형 탈모증 환자들에게서 유용한 치료 보조제가 될 수 있을 것으로 기대되는 바이다.

제 1 절 미강 추출물의 초임계 유체 미립자 제형 공정 개발

1. 미강 추출물의 초임계 유체 미립자 제형 공정 개발

가. 미립자제형 공정 설계

- 본 연구에서는 미강으로부터 추출된 초임계 미강추출물을 초임계 유체를 이용한 미립자 제형 생산을 위한 공정을 설계하기 위해 기존 초임계 유체 미립자 제조 공정을 검토하고 본 연구에 적합한 신규 공정을 개발하였으며, 기존의 초임계 유체를 이용한 미립자 제조에 응용 가능한 대표적인 공정들은 다음과 같다.
 - RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions)
 - PGSS (Particles from Gas-saturated Solutions)
 - GAS (Gas Anti-solvent Process)
 - SAS (Supercritical Anti-solvent Process)
 - ASES (Aerosol Solvent Extraction System)

- 본 연구의 미립자제형 공정은 ASES (Aerosol Solvent Extraction System)을 기본으로 하여 설계하였으며 PGSS (Particles from Gas-saturated Solutions)공정의 추가 사용도 용이하도록 고안 하였다.

- 또한, 입자 생성 효율을 높이기 위해 보조 용매를 추가공정을 선택하여 반응매의 효율성을 높였다.

- 본 연구에서 개발된 미립자제형 제조 공정도는 하기 그림 1. 에 나타내었으며, 단위공정흐름은 다음과 같다.
 - 이산화탄소를 냉각기를 거쳐 액화 시킨 후 고압정량펌프로 수송하여 승압시킨다.
 - 원료(추출물)를 고압정량펌프를 이용하여 혼합밸브로 수송하여 액화이산화탄소와 함께 열교환기(히터)를 거쳐 승온된 상태로 반응기내부로 수송한다.
 - 반응기내에서 마그네틱 드라이븐 교반기를 이용하여 초임계 이산화탄소와 원료(추출물)을 혼합용액으로 만든다.
 - 상기 초임계 이산화탄소 혼합용액은 혼합밸브에서 반응매와 함께 침출조 내부로 급속 확산되며 비교적 일정한 크기의 미세 입자를 형성 시킨다.
 - 상기 형성된 미세입자는 침출조 내부의 필터에 의해 침전되며, 필터를 통과한 이산화탄소 및 반응매는 분리기 내부로 이동하여 이산화탄소와 반응매로 분리되어 각각 재순환되어 사용되어 질 수 있다.
 - 시스템 압력제어는 BPR(Back Pressure Regulator, 후방압력조절기)에 의해 수행되어지며, 후방압력조절기는 침출기와 분리기 사이에 위치한다.

을 이용한 ASES 및 PGSS 공정의 혼합 공정이며, 미립자제형 포접제로는 식품용 카제인나트륨을 사용하였다.

- 상기 반응에서 포접제로 사용된 카제인나트륨은 분자 구조적으로 양쪽성 계면활성제의 특성을 가지므로 미립자제형을 이루고자하는 추출물을 환상 구조로 둘러쌀 수 있는 포접제로 용이하다고 판단된다.
- 또한, 초임계 미강추출물은 초임계 이산화탄소 추출물로서 카제인나트륨 수용액과 함께 초임계 이산화탄소에 의해 혼합용액으로 변환 후 혼합밸브에서 반응매와 함께 침출조 내부로 급속 확산되며 비교적 일정한 크기의 미세 입자를 형성 시킨다. 본 연구에서 제조한 초임계 미강추출물의 미립자 제형은 아래 그림 2. 와 같다.



	
초임계 미강유 미립자(반응매 : 에탄올)	초임계 미강유 미립자(반응매 : 메탄올)
* 초임계 미강유 충전율 : 33%	
- 충전율 산출 방법 :	
$\frac{\text{초임계 미강 추출물 함량(g)}}{\text{초임계 미강유 미립자 분말(g)}} \times 100 \%$	

그림 2. 초임계 미강 추출물의 미립자 제형물

2. 미립자 제형물의 물성 측정 및 제어 조건 확립

가. 추출물 미립자 제형 주사현미경 분석

- 상기 초임계 미강 추출물을 이용한 미립자 분말의 크기 및 형상은 전계방출 전자현미경(field emission scanning electron microscopy, FE-SEM, JSM6700F, JEOL, Japan)을 통하여 관찰하였으며 분석 결과, 미립자 제형은 2,500배 배율에서 약 1~300 μ m 범위를 형성하고 있었으며, 카제인나트륨(지지체)을 이용한 미립자 제형 제조에서 단일 미립자 제형 제조 사이즈는 미세 입자 크기 결정도가 비교적 높게 나타났다. 이는 카제인나트륨(지지체)에 의한 입자 사이즈 결정단계가 이루어진 것으로 사료된다.
- 전계방출 전자현미경 분석결과는 하기 그림 3.에 나타내었다.

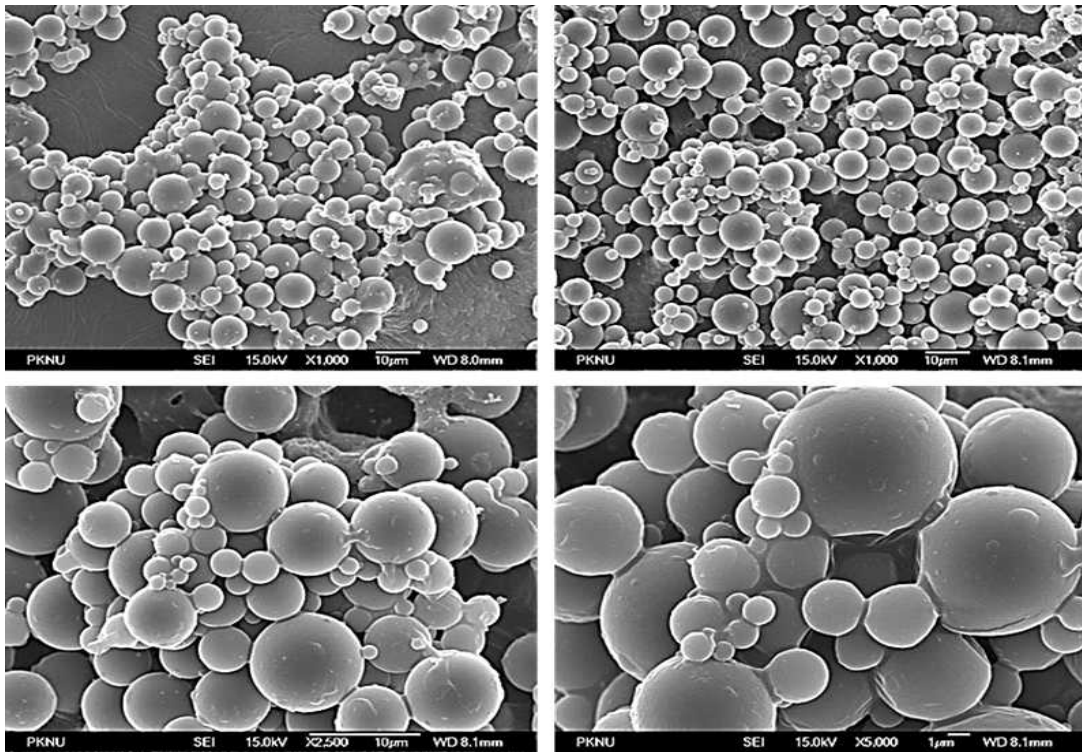


그림 3. 초임계 미강 추출물을 이용한 미립자 분말의 전계방출 전자현미경 측정 사진

나. 추출물 미립자 제형 입도분포분석(입자사이즈 결정도 분석)

- 상기 초임계 미강 추출물을 이용한 미립자 분말의 입도분포분석은 Laser Diffraction Particle Size Analyzer(BECKMAN COULTER (USA), LS 13320)을 이용하여 수행하였으며, 입도분포 측정 결과는 아래 그림 4. 에 나타내었다.
- 측정 결과, 미립자 분포는 1.25 ~ 346.15 μ m 크기의 입도분포범위를 나타내었으며 중앙값 및 평균 입자크기는 각 각 266.42 μ m, 250.12 μ m 를 나타내었다.

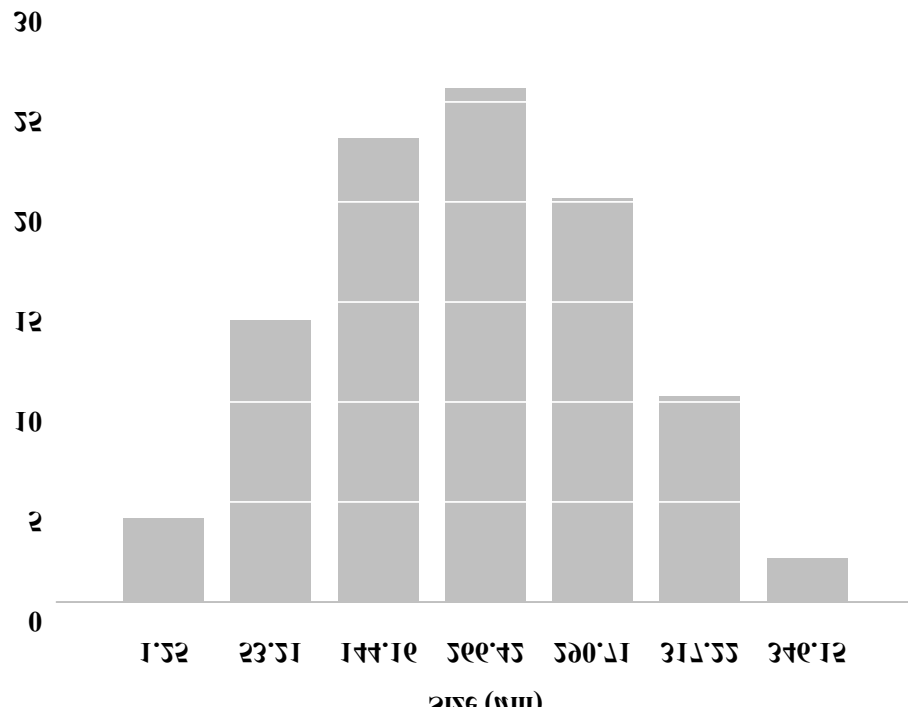


그림 4. 초임계 미강 추출물을 이용한 미립자 분말의 입도분포도

3. 시제품(의약외품) 생산 공정 개발

- 본 연구에서는 벼도정부산물인 미강분말로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 탈모방지 및 양모 촉진 효능을 가지는 지표물질(linoleic acid, policosanol, gamma-oryzanol, gamma-tocotrienol 등) 군들을 대상으로 추출을 수행하였으며, 추출된 초임계 이산화탄소 미강유를 두발화장품 중 토닉제형으로 제조하기 위해서는 초임계 이산화탄소 미강유를 가용화를 시켜야하는 문제점이 있어 이를 해결하기 위해 카제인 나트륨을 담체로 이용하여 초임계 유체 미립자공정상에서 초임계 미강유 미립자 분말을 제조하였다.
- 상기 제조된 초임계 이산화탄소 미강추출물의 미립자분말을 가용화하여 토닉제형을 제조하기 위한 시제품 제조 공정을 개발하였으며, 제조 처방전은 하기 도표에 나타내

었다.

표 1. 초임계 이산화탄소 미강추출물 미립자분말의 토닉제형 처방

Part	Phase	No.	
A	수상	1	
		2	
		3	초임
		4	하
		5	
		6	
		7	면
		8	토코
		9	기



그림 5. 초임계 이산화탄소 미강추출물 미립자분말의 토닉제형

제 2 절 식약청 인증 절차 준비

1. 식약청 인증 절차 준비

가. 식약청 의약외품 승인을 위한 과정 및 방법

- 식약청으로부터 초임계 미강추출물이 함유된 제품군으로 의약외품 승인을 받기 위해 위의 시험들을 진행하였고, 그 결과물에 대한 승인절차를 아래 그림으로 나타내었다.
- 품목허가의 핵심요소는 안전성, 유효성 입증과 기준 및 시험방법 적격성 확립이다. 이를 만족시키기 위해 현재 원료 및 시작품에 대한 시험 진행중이다. 시험의 완료 및 자료확보가 충분히 준비가 되면 의약외품 신고절차에 따라 진행할 것이다.
- 의약외품 승인 신고 시 필요서류는 다음과 같다.
 - 의약외품 품목허가 · 신고 · 심사규정 제 23조 및 별표 3-2를 참조하였다.

표 1. 제출 자료

	자료번호												
	1	2	3	4							5	6	7
				가	나	다	라	마	바	사			
원료	×	○	×	○	○	△	○	○	△	○	×	×	×
제제	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○

▶ 자료번호

1. 기원 또는 발견 및 개발 경위에 관한 자료
2. 기준 및 시험방법에 관한 자료
3. 안정성에 관한 자료(장기보존시험자료 또는 가속시험자료)
 - 가. 신물질 함유 의약외품: 장기보존시험으로 사용기간을 설정하되, 함량 등 유의성 있는 변화가 없는 경우 6개월간의 가속시험자료로서 36개월 이내에 사용기간을 설정할 수 있다. (의약외품 품목허가·신고·심사규정, 제 25조 3항 참조)
4. 독성에 관한 자료
 - 가. 단회투여독성시험자료
 - 나. 반복투여독성시험자료
 - 다. 생식·발생독성시험자료
 - 라. 유전독성시험자료
 - 마. 면역독성시험자료(피부감작성시험자료 포함)
 - 바. 발암성 시험자료
 - 사. 국소독성시험자료
 - 원료: 단회투여독성, 1개월반복투여독성, 유전독성, 면역독성, 국소독성시험
 - 제제: 단회투여독성, 1개월반복투여독성, 점막자극시험

5. 효능·효과를 입증할 수 있는 자료
 - 가. 동물시험법(2개 中 1개 시험방법으로 진행)
 - C57BL/6 마우스를 이용한 평가: 성장기유도평가 + 퇴행기억제효과평가
 - SKH-1 무모마우스 또는 누드마우스를 이용한 평가
 - 나. 임상시험법
6. 외국의 사용현황에 관한 자료
7. 국내 유사제품과의 비교검토 등 그 밖의 특성에 관한 자료

○ 원료 및 의약외품 시험 내용은 그림 6과 같다.

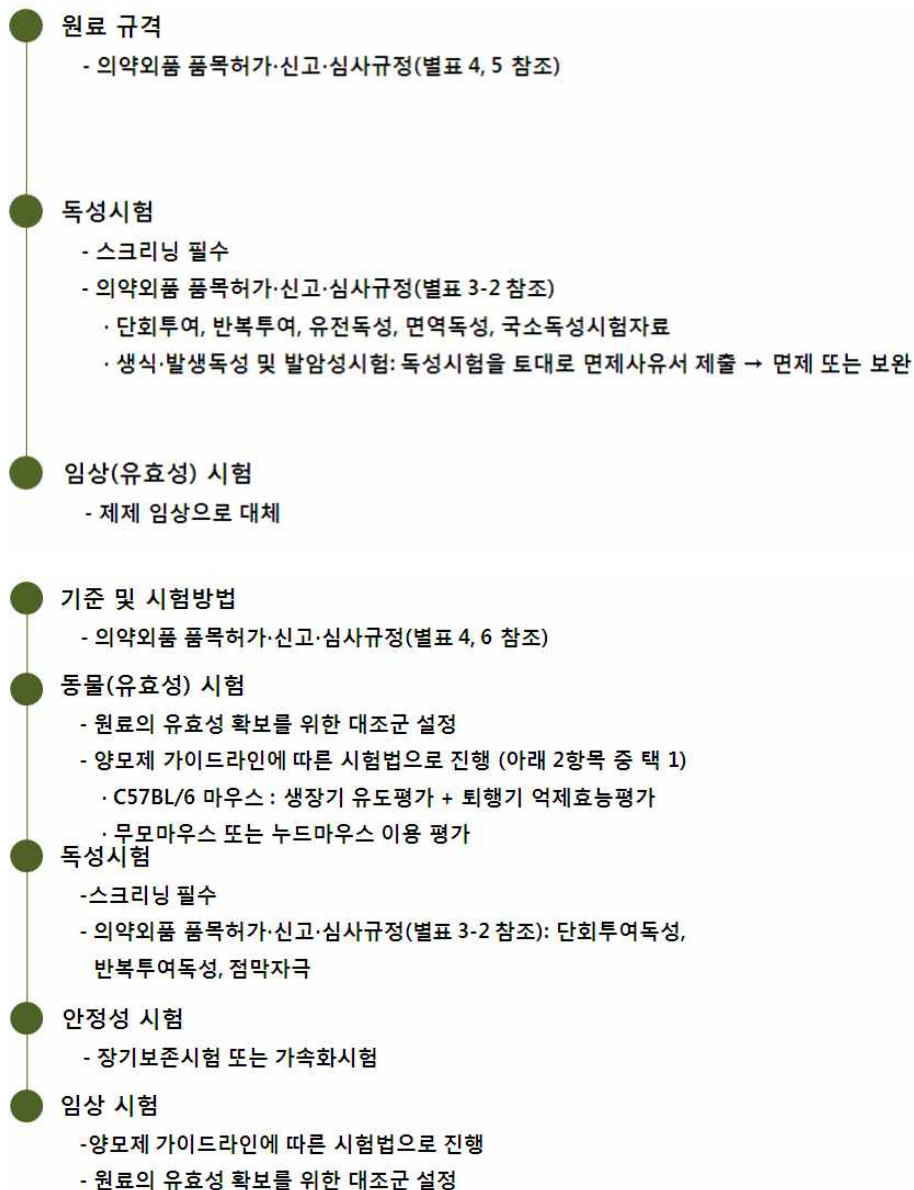


그림 6. 원료 및 의약외품 시험 내용

○ 원료 및 제제의 시험내용에 대한 진행사항은 하기 그림으로 나타내었다.

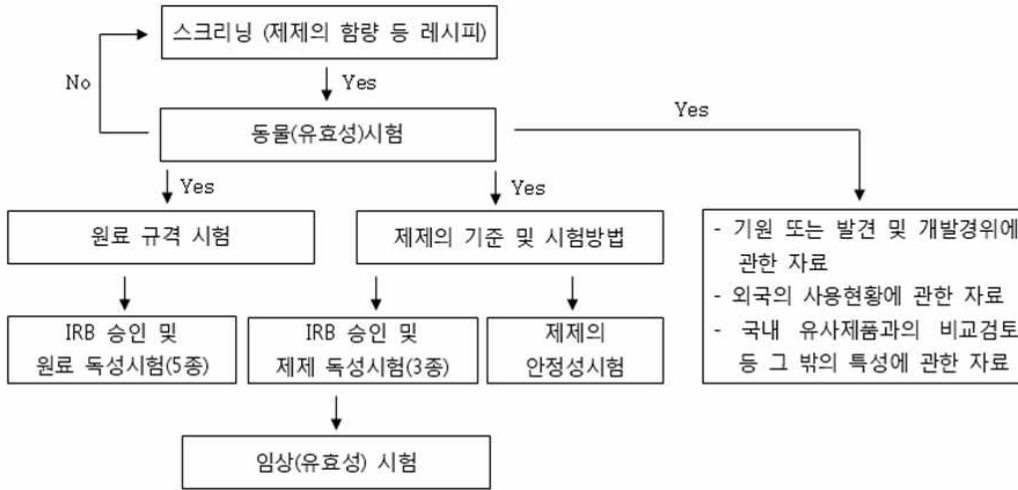


그림 7. 원료 및 제제의 시험내용

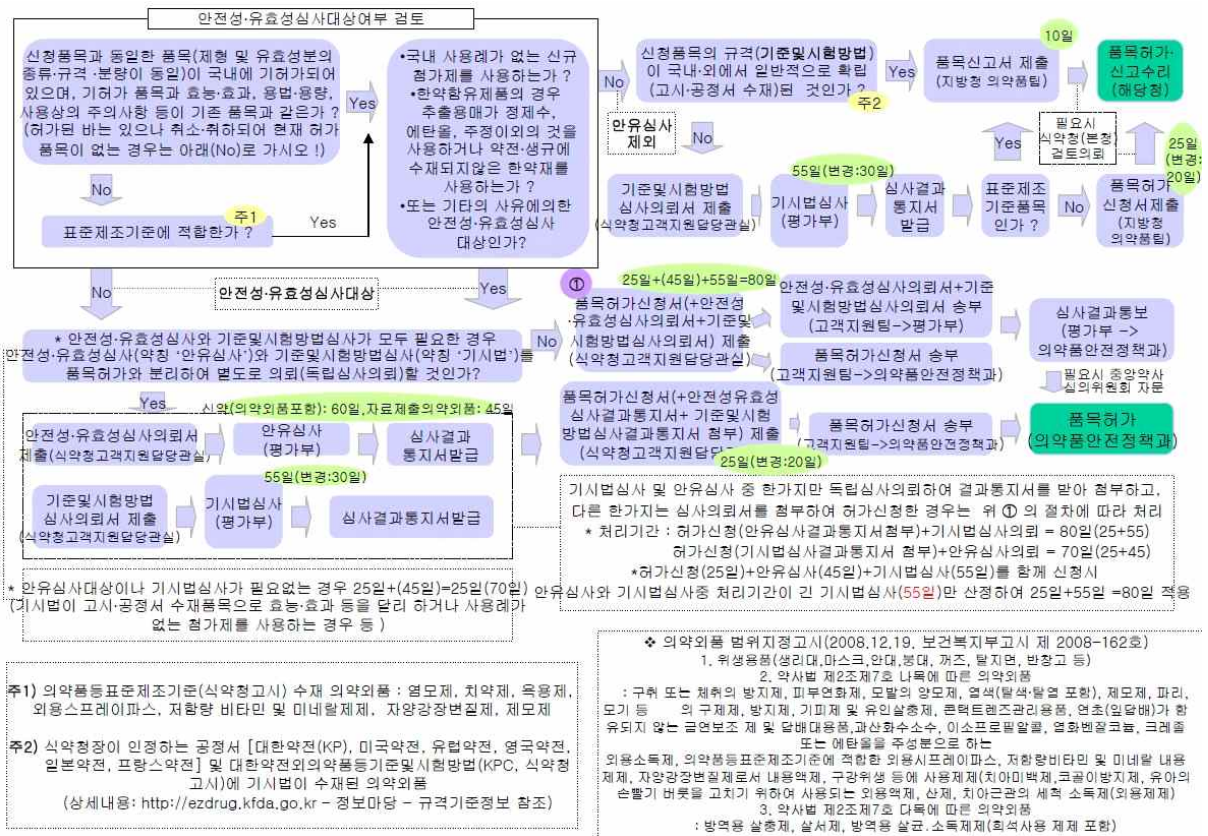


그림 8. 의약품 품목허가 및 신고절차

나. 초임계 미강 추출물의 기준 및 시험방법 확립

○ 식약청 승인을 위한 기준 및 시험방법 설정을 위하여 지표성분을 감마오리자놀과 감마리놀렌산으로 설정하고, 앞의 데이터를 근거로 하여 기준 및 시험방법을 설정하였다.

○ 초임계 미강 추출물의 기준 및 시험방법은 다음과 같다.

표 2. 기준 및 시험방법의 요약

시험항목		기준	시험방법	참고
성상		노란색의 왁스형태	육안 관찰	대한약전
확인	리놀레산	검액 및 표준액의 크로마토그램에서 리놀레산의 피크 유지시간은 일치해야 한다.	가스 크로마토그래피	식품공전 일반시험법 지방산분석법
	감마 오리자놀	파장 231±2nm, 291±2nm 및 315±2nm에서 흡수극대를 나타낸다	UV 스펙트럼	의약품 기준 및 시험방법 감마오리자놀 확인시험 1항
굴절률		1.470 ~ 1.473	굴절계	대한약전 일반시험법 굴절률
비누화가		60- 110	검화가	식품공전 일반시험법 비비누화물
비중		0.916 ~ 0.922	비중계	대한약전 일반시험법 비중
산가		120 이하	유리지방산 적정(산염기적정)	식품공전 일반시험법 산가
요오드가		90 ~ 110	요오드 적정(역적정)	식품공전 일반시험법 요오드가
납		2 ppm 이하	유도결합플라즈마 분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 납 시험법
비소		2 ppm 이하	유도결합플라즈마 분광기	기능성화장품 기준 및 시험방법 비소시험법
정량	리놀레산	22 ~ 28 g / 100 g	가스크로마토그래피	식품공전 일반시험법 지방산분석법
	감마 오리자놀	1730 ~ 3730 mg	흡광도 측정	대한약전. 자외가시부흡광도측정법

○ 시험 방법

1.1 성상

1.1.1 대한약전 통칙 29에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체는 노란색의 왁스형태 이어야 한다.

1.2 확인시험

1.2.1 함량시험법 중 리놀레산 정량법에 따라 시험할 때 검액 및 표준액의 크로마토그램에서 리놀레산의 피크 유지시간은 일치해야 한다.

1.2.2 의약품 기준 및 시험방법 감마 오리자놀 확인시험 1)에 따라 다음과 같이 시험할 때 파장 231±2 nm, 291±2 nm 및 315±2 nm에서 흡수극대를 나타낸다.

1.2.2.1 검체를 클로로포름(1→100,000)에 녹이고 흡광도를 측정한다

1.3 굴절률

1.3.1 대한약전 일반시험법 6. 굴절률 측정법에 따라 시험할 때 20℃에서 검체의 굴절률 n_D^{20} 는 1.470 ~ 1.473범위 이내이어야 한다.

1.4 비누화가

1.4.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.2 비누화법에 따라 시험할 때 검체의 비누화가는 60 ~ 110 사이 이어야 한다.

1.4.1.1 분석원리 : 지질 1 g중의 유리산의 중화 및 에스테르의 검화에 필요한 수산화칼륨의 mg수이다.

1.4.1.2 시험조작

1.4.1.2.1 검체 1~2 g을 200 mL의 플라스크에 정밀히 달아 넣고 0.5 N 수산화칼륨·에탄올용액 25 mL를 정확히 가한다.

1.4.1.2.2 이에 갈아 맞춘 작은 환류냉각관 또는 공기 냉각기로써 길이 약 75 cm, 직경 7 mm의 유리관을 달고 수욕 중에서 때때로 흔들어 저으면서 30분간 가열한다.

1.4.1.2.3 다음 페놀프탈레인시액을 지시약으로 하여 즉시 0.5 N 염산으로 과잉의 수산화칼륨을 적정한다.

1.4.1.2.4 같은 방법으로 0.5 N 수산화칼륨·에탄올용액 25 mL 를 가지고 공시험을 한다.

1.4.1.3 계산방법

$$\text{비누화가} = 28.05 \times (b - a) \times f / S$$

a: 검체를 사용했을 때의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)

b: 공시험에 있어서의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)

S: 검체의 채취량 (g)

F: 0.5 N 염산의 역가

1.5 비중

1.5.1 대한약전 일반시험법 20. 비중 및 밀도측정법에 따라 시험할 때 25℃에서 검체의 비중은 0.916 ~ 0.922 범위 이내이어야 한다.

1.6 산가

1.6.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.1 산가에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체의 산가

는 120 이하 이어야 한다.

1.6.1.1 분석원리 : 산가라 함은 지질 1 g을 중화하는데 필요한 수산화칼륨의 mg 수를 말하며, 산가는 지방산이 글리세라이드로서 결합형태로 있지 않은 유리지방산의 양을 나타낸다.

1.6.1.2 시험조작

1.6.1.2.1 검체 5 ~ 10 g을 정밀히 달아 마개달린 삼각플라스크에 넣고 중성의 에탄올·에테르 혼액(1:2) 100 mL를 넣어 녹인다.

1.6.1.2.2 2% 알칼리블루-6B를 지시약으로 하여 엷은 홍색이 30초간 지속할 때까지 0.1N 에탄올성수산화칼륨용액으로 적정한다.

1.6.1.2.3 같은 방법으로 에탄올·에테르 혼액(1:2) 100 mL을 가지고 공시험을 한다.

1.6.1.3 계산방법

$$\text{산가} = \frac{5.611 \times (a-b) \times f}{S}$$

S : 검체의 채취량(g)

a : 검체에 대한 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 소비량 (mL)

b : 공시험에 대한 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 소비량 (mL)

f : 0.1 N 에탄올성수산화칼륨용액의 역가

1.7 요오드가

1.7.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.3 화학적 시험 1.1.5.3.3 요오드가(위스법)에 따라 다음과 같이 시험할 때 검체의 요오드가는 90 ~ 110사이 이어야 한다.

1.7.1.1 분석원리 : 지질 100 g에 흡수되는 할로겐의 양을 요오드의 g수로 나타낸 것이다.

1.7.1.2 시험조작

1.7.1.2.1 검체 0.2 ~ 0.4 g을 취하여 250 mL의 마개달린 삼각플라스크에 취하고 클로로포름 15 ~ 20 mL를 가한다.

1.7.1.2.2 여기에 일염화요오드시액^(주2) 25 mL를 피펫으로 일정한 속도룩 적가한다.

(주2) 일염화요오드시액 : 재승화시킨 요오드 13 g을 초산 1,000 mL에 녹이고 그 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 놓고, 이에 씻은 건조염소를 통하여 다시 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 그 양이 최초의 적정량의 2배가 되도록 한다. 요오드는 약간 과잉의 정도로 한다. 이 시액은 마개달린 갈색유리병에 넣어 파라핀으로 봉하고 사용직전에 연다. 30일 이상 지난 시액은 사용하면 아니된다.

1.7.1.2.3 이 액을 암소에서 1시간 방치한다(예상되는 요오드가가 100이하일 경우 30분 방치할 수도 있다.).

1.7.1.2.4 1N 요오드화칼륨액^(주3) 20 mL 및 물 100 mL를 가하여 흔들어 섞은 다

음 유리한 요오드를 0.1N 티오황산나트륨액으로 적정한다(지시약 전분시액^(주4) 1 mL)

(주3) 1N 요오드화칼륨용액 : 요오드화칼륨 16.5g을 물에 녹여 100ml로 한다. 이 액은 차광하여 보존한다.

(주4) 전분시액 : 전분 1g을 찬물과 잘 섞고 이를 열탕 200ml에 저어 섞으면서 천천히 가하고 액이 반투명하게 될 때까지 끓이고 방냉 정지한 다음 상층액을 사용한다.

1.7.1.2.5 같은 방법으로 클로로포름 15~20 mL를 가지고 공시험을 한다.

1.7.1.3 계산방법

$$\text{요오드가} = 1.269 \times (b - a) \times f / S$$

- a: 본 시험에 있어서의 0.1N 티오황산나트륨액의 소비량 (mL)
- b: 공 시험에 있어서의 0.1 N 티오황산나트륨액의 소비량 (mL)
- s: 검체의 채취량(g)
- f: 0.1 N 티오황산나트륨액의 역가

1.8 납

1.8.1 식약청 고시 제 2013-28호 기능성 화장품 기준 및 시험방법 VI. 일반시험법 VI-2. 제제 1. 납시험법 다. 유도결합플라즈마분광기를 이용하는 방법으로 다음과 같이 시험할 때 2.0 ppm이하 이어야 한다.

1.8.2 분석원리 : 시료를 고주파유도코일에 의하여 형성된 알곤 플라즈마에 도입하여 여기된 원자가 바닥상태로 이동할 때 방출되는 발광선 및 발광강도를 측정하여 원소의 정성 및 정량분석에 이용하는 방법이다.

1.8.3 시험조작

1.8.3.1 검액 조제 : 검체 약 0.2 g ~ 0.5 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣는다. 검체를 분해하기 위하여 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL을 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파분해 장치에 장착하고 다음 조작조건에 따라 무색 ~ 옅은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 조심하여 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량플라스크에 옮기고 물 적당량으로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 물을 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. (다만, 필요에 따라 검체를 분해하기 위하여 사용되는 산의 종류 및 양과 극초단파분해 조건을 바꿀 수 있다.)

<조작조건>

최대과워 : 1000W

최고온도 : 200℃

분해시간 : 약 35분

1.8.3.2 따로 질산 7 mL, 염산 2mL 및 황산 1mL를 가지고 검액과 동일하게 조작

하여 공시험액으로 한다.

1.8.3.3 표준액의 조제 : 납 표준원액(1000 µg/mL)에 0.5 % 질산을 넣어 농도가 다른 3가지 이상의 검량선용 표준액을 만든다. 이 표준액의 농도는 액 1 mL당 납 0.01 ~ 0.2 µg 범위내로 한다.

1.8.4 계산방법

1.8.4.1 각각의 표준액을 다음의 조작조건에 따라 유도결합플라즈마분광기(ICP spectrometer)에 주입하여 얻은 납의 검량선을 가지고 검액 중 납의 양을 측정한다.

<조작조건>

과장 : 220.353nm(방해성분이 함유된 경우 납의 다른 특성과장 선택가능)

플라즈마가스 : 아르곤(99.99 v/v% 이상)

1.9 비소

1.9.1 식약청 고시 제 2013-28호 기능성 화장품 기준 및 시험방법 VI. 일반시험법 VI- 제제 4. 비소시험법 다. 유도결합플라즈마분광기를 이용하는 방법으로 다음과 같이 시험할 때 2.0 ppm 이하 이어야 한다.

1.9.2 분석원리 : 시료를 고주파유도코일에 의하여 형성된 알곤 플라즈마에 도입하여 여기된 원자가 바닥상태로 이동할 때 방출되는 발광선 및 발광강도를 측정하여 원소의 정성 및 정량분석에 이용하는 방법이다.

1.9.3 시험조작

1.9.3.1 검액의 조제 : 검체 약 0.2 g ~ 0.5 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣는다. 검체를 분해하기 위하여 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL을 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파 분해 장치에 장착하고 다음 조작조건에 따라 무색 ~ 옅은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 조심하여 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량플라스크에 옮기고 물 적당량으로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 물을 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. (다만, 필요에 따라 검체를 분해하기 위하여 사용되는 산의 종류 및 양과 극초단파의 분해조건을 바꿀 수 있다.)

<조작조건>

최대파워 : 1000W

최고온도 : 200℃

분해시간 : 약 35분

1.9.3.2 따로 질산 7 mL, 염산 2 mL 및 황산 1 mL를 가지고 검액과 동일하게 조작하여 공시험액으로 한다.

1.9.3.3 표준액의 조제 : 비소 표준원액(1000 µg/mL)에 0.5% 질산을 넣어 농도가 다른 3가지 이상의 검량선용 표준액을 만든다. 이 표준액의 농도는 액 1 mL당 비소 0.01 ~ 0.2 µg 범위내로 한다.

1.9.4 계산방법

1.9.4.1 각각의 표준액을 다음의 조작조건에 따라 유도결합플라즈마분광기(ICP spectrometer)에 주입하여 얻은 비소의 검량선을 가지고 검액 중 비소의 양을 측정한다.

<분석조건>

파장 : 193.759nm(방해성분이 함유된 경우 비소의 다른 특성파장 선택가능)

플라즈마가스 : 아르곤(99.99 v/v% 이상)

1.10 리놀레산 정량

1.10.1 식품공전 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.4 지방산에 따라 다음과 같이 시험할 때 미강추출물 100g 당 리놀레산 함량은 22 ~ 28g 사이이어야 한다.

1.10.1.1 분석원리 : 유지를 메탄올성 수산화나트륨용액으로 처리하여 알칼리염을 만든 후 트리플루오로보란메탄올 용액을 가하고 가열하여 에스테르화한다. 생성된 지방산에스테르를 이소옥탄에 녹여 분석하여 리놀레산의 함량을 구한다.

1.10.1.2 시험조작

1.10.1.2.1 검체 약 25mg을 유리 튜브에 정밀히 취하고 내부표준용액^(주5) 1 mL를 첨가한다.

(주5) 내부표준용액 : Triundecanoin(C11:0) 0.01g을 이소옥탄용액에 녹여 10ml가 되게 한다.(1mg/ml)

1.10.1.2.2 이어 0.5N 메탄올성 수산화나트륨용액^(주6) 1.5mL를 가하고 질소를 붙여넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합한다.

(주6) 메탄올성 수산화나트륨용액(0.5N) : 수산화나트륨 2g을 메탄올 100mL로 조제한다. 장시간 방치하는 경우 흰침전(탄산나트륨)이 생길 수 있으나 이는 무시하여도 된다.

1.10.1.2.3 이어 100°C heating block에서 약 5분간 가온한다.

1.10.1.2.4 이를 냉각한 후 14% 트리플루오로보란메탄올 용액^(주7) 2mL를 가하고 다시 질소를 붙여넣은 후 즉시 뚜껑을 덮고 혼합하고 100°C에서 30분간 가온한다.

(주7) 14% 트리플루오로보란메탄올 용액 : 125g BF₃/L MeOH

1.10.1.2.5 이어 30~40°C로 냉각하여 이소옥탄용액 1mL를 가하여 질소를 붙여넣은 후 뚜껑을 덮고 이 온도에서 30초간 격렬히 진탕한다.

1.10.1.2.6 다음 즉시 포화 염화나트륨용액 5mL를 가하고 질소를 붙여넣은 후 뚜껑을 덮고 진탕한다.

1.10.1.2.7 상온으로 냉각한 후 수층으로부터 분리된 이소옥탄층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 시험용액으로 한다.

1.10.1.2.8 다음과 같이 기체크로마토그래피의 조건을 설정할 때 시스템적합성 평가^(주8) 결과는 적합해야 한다.

(주8) 시스템적합성 평가 : 리놀레산 피크와 인접한 피크 사이의 분리도는 1.5이상이어야 한다. 표준액의 6회 반복주입시 리놀레산

과 내부표준물질의 면적비에 대한 상대표준편차(%RSD)는 2.0이하이어야 한다.

<조건>

- (1) 칼럼 : SP-2560 (100m*0.25mm*0.2 μ m) 혹은 이와 동등한 것
- (2) 주입부온도 : 225 $^{\circ}$ C
- (3) 칼럼온도 : 100 $^{\circ}$ C에서 4분간 유지한 후 3 $^{\circ}$ C/min의 비율로 240 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시키고 이후 15분 이상 유지한다.
- (4) 검출기온도 : 285 $^{\circ}$ C
- (5) 유량 : 헬륨 0.75mL/min
- (6) split ratio : 200:1

1.10.1.3 계산방법

$$\text{놀레산 (g/100g)} = \frac{Pt/Pti}{Ps/Psi} * \frac{Ws}{Wt} * \frac{1}{Is} * 1.0067 * 0.9524 * 100$$

Pt/Pti : 검액의 크로마토그램에서 얻은 리놀레산 및 내부표준물질의 피크면적비

Ps/Psi : 표준액의 크로마토그램에서 얻은 리놀레산 및 내부표준물질의 피크면적비

Ws : 표준액 중 리놀레산의 양(mg)

Wt : 검체량 (mg)

It : 검액 중 내부표준물질의 양(mg)

Is : 표준액 중 내부표준물질의 양(mg)

1.0067 : 내부표준물질의 트리글리세라이드로부터 리놀레산 메틸에스테르의 전환계수

0.9524 : 리놀레산의 지방산 전환계수

100 : 검액 100g 당 리놀레산 함량 보정

1.10.1.4 검액의 대표 크로마토그램

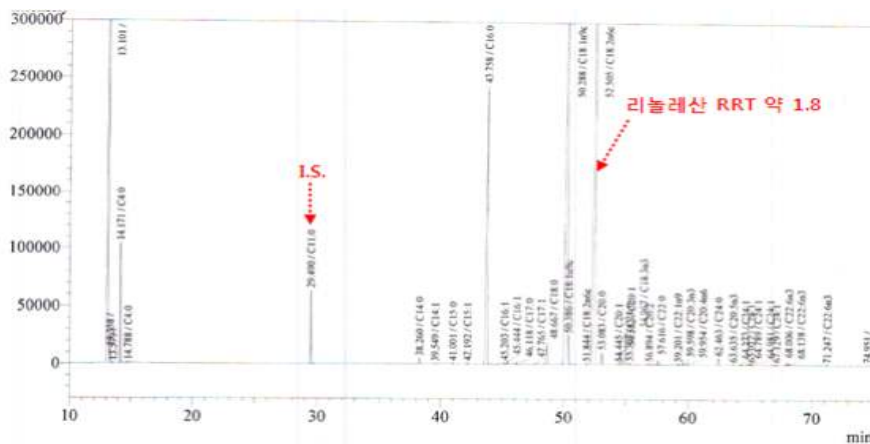


그림 9. 검액의 대표 크로마토그램

1.11 γ -오리자놀

1.11.1 대한약전 일반시험법 41. 자외가시부흡광도측정법에 따라 다음과 같이 시험할 때 검액의 감마 오리자놀의 함량은 1730 ~ 3730 mg 사이이어야 한다.

1.11.1.1 분석원리 : 측정된 검체의 흡광도 값을 ($\frac{1\%}{1cm}E$) 흡광계수 358 로부터 감마 오리자놀의 함량을 계산한다.

1.11.1.2 분석조작

1.11.1.2.1 검체를 클로로포름에 완전히 녹여 흡광도 값이 1이하가 되도록 한다.

1.11.1.2.2 시료유지 용액이 투명하지 않으면, 0.45 μm 여과지로 여과한다.

1.11.1.2.3 이 용액을 315 nm에서 흡광도를 측정한다.

1.11.1.2.4 클로로포름을 315 nm에서 흡광도를 측정한다.(Blank)

1.11.1.3 계산방법

$$\text{리자놀}(C_{40}H_{58}O_4)\text{의 양}(mg) = \frac{A-B}{358} * 1000mg * \frac{C}{100mL}$$

A: 검액의 흡광도

B: Blank의 흡광도

C: 검체 g 당 클로로포름 부피(mL)

358 : 315nm에서 1%, 1cm에서의 감마오리자놀의 흡광계수

2. 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품) 개발 및 평가

가. 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품) 생산 공정

- 본 연구에서는 벼 도정부산물인 미강분말로부터 초임계 이산화탄소를 이용하여 탈모 방지 및 양모 촉진 효능을 가지는 지표물질(L-menthol, D-panthenol, Salicylic acid) 및 미강추출물 주요성분(linoleic acid, gamma-oryzanol 등)을 이용하여 에센스 타입의 제품을 제조하였다.
- 초임계 미강추출물을 가용화하여 에센스 제형을 제조하기 위한 시작품 제조 공정을 개발하였으며, 제조 처방전은 하기 도표에 나타내었다.

표 3. 초임계 미강추출물 에센스 제형 처방

PHASE	NO.	RAWMATERIAL NAME	INCI NAME	합량
A	1	D.I-Water	Purified Water	55.949
	2	EDTA-4NA	Tetrasodium Ethylene diaminetetraacetate	0.030
	3	Aminocoat	Betaine	2.000
	4	Salicylic Acid	Salicylic Acid	0.250
B-1	1	L-Menthol	L-Menthol	0.300
	2	D-Panthenol	D-Panthenol	0.200
	3	Methyl Paraben	Methyl ParahydroxyBenzoate	0.150
	4	Peppermint Oil	Peppermint Oil	0.010
	5	Pure Alcohol 95%	Ethanol	15.000
B-2	6	Cremophor RH40	Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil	2.100
	7	미강	Ext.	0.500
	8	1,3-B.G	1,3-Butylene glycol	8.000
C	1	D.I-Water	Purified Water	10.000
	2	Carbopol 940	Carboxyvinylpolymer	0.100
D	1	D.I-Water	Purified Water	1.000
	2	T.E.A	Triethanolmaine	0.300
E	1	D.I-Water	Purified Water	1.000
	2	Na-Hyaluronate	Sodium Hyaluronate	0.010
F	1	D.I-Water	Purified Water	2.000
	2	Lactic Acid Pharma 90%	-	0.001
G	1	Biopeptide CL	-	0.300
	2	Procaryl	-	0.300
	3	Septonic M-3	-	0.500
합계				100.000

- 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품)은 다음과 같은 절차로 제조 하였다.
 - A 수상에 L-Menthol 0.3g, Salicylic acid 0.25g, D-panthenol 0.2g을 첨가하여 90℃에서 30분간 완전 용해하였다.
 - 40℃이하로 냉각 후 가용화 하였다.
 - B-1상은 가용화 상으로 L-Menthol, D-panthenol, Methyl Paraben, Peppermint Oil을 알콜 95%에 용해 하였다.
 - B-2상의 RH40, 초임계 미강추출물을 섞은 후 1,3-B.G와 함께 섞었다.
 - B-1상과 B-2상을 섞고, C상을 첨가하였다.
 - 완전 용해 되도록 교반 한 후 D상을 첨가하여 교반과 동시에 pH를 측정하였다.
 - E상과 F상을 첨가 교반하고 온도를 40℃로 맞춘 후 G상을 첨가하여 완전 용해하였다.
- 위의 처방전을 활용한 제조공정으로 완성된 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품)은 다음과 같은 성상으로 나타났다.

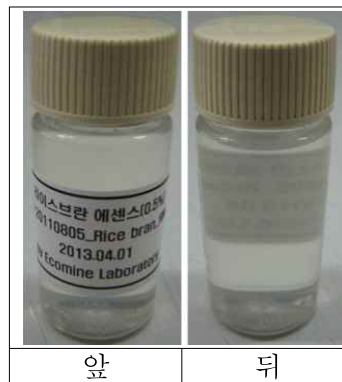


그림 10. 초임계 미강추출물 함유 에센스

- 초임계 미강추출물 함유 에센스의 안정성 평가를 위해 아래와 같이 3개월 간 (2개월 시험, 1개월 시험예정) 시험을 실시하였다. 시험법은 다음과 같다.
 - pH 시험법 : 사용 전 표준완충용액을 이용하여 pH미터를 보정한 후 유리전극을 정제수로 씻고, 항상 수직으로 세워 사용, pH를 알고자 하는 용액에 담구어 안정적인 값을 읽는다.
 - 비중 측정법 : Anton Paar DMA 38 기계를 사용, 실린지에 제품군을 주입하여 값을 읽는다.
- 초임계 미강추출물 에센스의 pH, 비중을 확인한 결과, 한달동안은 제품군에 별다른 차이가 보이지 않았으나, 앞으로 두달간의 시험을 통해 확실한 안정성의 확보를 기대해야 할 것으로 사료되어 진다.

표 4. 초임계 미강추출물 함유 에센스 안정성 시험

COMPATIBILITY TEST REPORT												
제품명	Rice bran Essence						제조일자			2013. 4. 1		
온도	시험 기간	시험 항목	날짜	1day	3day	5day	7day	15day	30day	60day	90day	
				4/1	4/3	4/5	4/7	4/15	4/30	5/30	6/29	
cycle	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		접도	-									
		pH	METROHM 691	5.13	5.04	5.08	5.06	5.12	5.06	5.08		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9968	0.99	0.991	0.9901	0.9905	0.9912	0.991		
0℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		접도	-									
		pH	METROHM 691	5.13	5.05	4.99	4.85	5.06	5.08	5.08		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9968	0.989	0.9899	0.9879	0.9877	0.9886	0.987		
25℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		접도	-									
		pH	METROHM 691	5.13	5.05	5.01	5.03	5.08	5.12	5.11		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9868	0.9868	0.9872	0.989	0.9894	0.987			
40℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		접도	-									
		pH	METROHM 691	5.13	5.05	4.97	4.96	5.04	5.07	5.06		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9868	0.9876	0.9874	0.99	0.9884	0.9882	0.9885		

나. 초임계 미강추출물 함유 에센스(의약외품)의 탈모 방지 및 양모제 시작품 시험성적서

○ 의약외품 (탈모의 방지 또는 양모제) 시험 종류 및 방법은 다음과 같다.

탈모의 방지 또는 양모제
미강유 함유 에센스

1. 상상
육안관찰

2. 확인시험
다음 시험방법에 따라 시험할 때 살리실산, L-멘톨, 텍스판테놀, 리놀레익에씨드, γ -오리지놀이 확인되어야 한다.

(1) 살리실산
1) 살리실산의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.
2) 이 약은 대한약전 살리실산염의 정성법을 3)에 따라 시험한다.

(2) L-멘톨
1) L-멘톨의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.
2) 이 약 7g에 황산 20 mL를 넣고 흔들어 섞을 때 액은 끈적하고 황색을 나타내나 3 시간 방치할 때 액의 점도가 없는 맑은 기름 층을 분리한다.

(3) 텍스판테놀
1) 텍스판테놀 함량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.
2) 이 약 100g에 수산화나트륨시액 5ml를 넣어 녹이고 황산동시액 1량을 넣을 때 액은 진한 청색-자색을 나타낸다.

(4) 리놀레익에씨드
1) 리놀레익에씨드 함량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.

(5) γ -오리지놀
1) γ -오리지놀 함량시험법에 따라 시험할 때 검액에서 얻은 주피크 유지시간은 표준품에서 얻은 주피크 유지시간과 같다.
2) 이 약 8g에 수산화나트륨·에탄올시액 10ml를 넣고 가운하여 녹일 때 액은 황색을 나타낸다.

3. pH
대한약전 일반시험법 중 pH측정법 참조(첨부자료)

4. 함량시험.
살리실산, L-멘톨, 텍스판테놀, 리놀레익에씨드, γ -오리지놀을 대한약전 액체 크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준액에서의 각 성분의 피크면적(또는 높이)A_i 및 A₀로부터 비례 계산한다.

5. 알코올수축경.
대한약전 일반시험법 중 알코올수축경법 참조(첨부자료)

그림 11. 양모제 시작품의 성적서

3. 초임계 미강추출물 함유 헤어샴푸(화장품) 개발

- 본 연구에서는 초임계 미강추출물을 함유한 헤어샴푸 타입의 제품을 제조하였다.
- 초임계 미강추출물을 가용화하여 헤어샴푸 제조를 위한 공정을 개발하였으며, 제조 처방전은 하기 도표로 나타내었다.

표 5. 초임계 미강추출물 함유 헤어샴푸 처방전

PHASE	NO.	RAW MATERIAL NAME	INCI NAME	함량
A	1	D.I-Water	Purified Water	14.359
	2	Kalcol 6870P	Ceranol	0.100
	3	Propylene Glycol	Propylene Glycol	1.000
	4	Micolin T-430 (30%)	TEA-LaurylSulfate	26.000
	5	Hiampho - PB	Cocamidopropyl Betain	10.000
	6	Sunfom-LDE	Lauramied DEA	2.000
	7	Phenonip	PhenoxyEthanol, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Propylparaben, Isobutylparaben	0.500
	8	1-3 Butylene Glycol	1-3 Butylene Glycol	2.000
B	1	D.I-Water	Purified Water	30.000
	2	Polyquaternium-10	Polyquaternium-10	0.500
C	1	D.I-Water	Purified Water	3.000
	2	Nacl	Nacl	1.000
D	1	Peppermint Oil	Peppermint Oil	0.030
	2	Fragrance	Fragrance	0.600
E	1	Biopeptide CL	Glyceryl Polymethacrylate, Propylene Glycol, Palmitoyl Oligopeptide	0.100
	2	PROCAPYL	ButyleneGlycol/Water-PPG26-PEG4 0-Hydrogenated Caster Oil-Apigenin-Oleanolic Acid-Biotinyl Tripeptide-1	0.500
	3	SEPITONIC M-3	Magnesium aspartate, Zinc gluconate, Copper gluconate	0.300
F	1	미강	-	0.500
합계				100.00

- 초임계 미강추출물 함유 헤어샴푸(화장품)는 다음과 같은 절차로 제조 하였다.
 - A상을 85℃에서 완전 용해 하였다.
 - B상은 90℃이상의 온도에서 교반기를 이용하여 물과 Polyquaternium-10을 30분 이상 교반시켜 A상에 첨가하였다.

- A상과 B상 혼합 용해시 점도가 생기는 현상이 진행되면 70℃로 서냉하며 계속 교반시켰다.
 - A, B상에 점도가 형성되면 C상을 첨가했다. 이때 라멜라 구조가 형성되어 부푸는 현상이 보이면 거품이 일더라도 계속 교반했다.
 - 40℃ 이하로 서냉 하면서 D상을 첨가하였다.
 - 40℃ 온도를 유지하면서 E상을 첨가하였다.
 - 랩핑 후 하루정도 실온에서 자연 탈포 하였다.
 - 기포가 완전히 빠진 후 초임계 미강추출물을 첨가하여 교반하였다.
- 위의 처방전을 활용한 제조공정으로 완성된 초임계 미강추출물 함유 헤어샴푸(화장품)는 다음과 같은 성상으로 나타났다.



그림 12. 초임계 미강추출물 함유 샴푸

- 초임계 미강추출물 함유 샴푸의 안정성 평가를 위해 아래와 같이 3개월 간 (2개월 시험, 1개월 시험예정) 시험을 실시하였다. 시험법은 다음과 같다.
- pH 시험 : 사용 전 표준완충용액을 이용하여 pH미터를 보정한 후 유리전극을 정제수로 씻고, 항상 수직으로 세워 사용, pH를 알고자 하는 용액에 담구어 안정적인 값을 읽는다.
 - 점도 측정 : Spindle #5 6RPM을 사용하여 점도측정 하였다.
- 초임계 미강추출물 샴푸의 pH, 점도를 확인한 결과, 한달동안은 제품군에 별다른 차이가 보이지 않았으나, 앞으로 두달간의 시험을 통해 확실한 안정성의 확보를 기대해야 할 것으로 사료되어 진다.

표6. 초임계 미강추출물 함유 샴푸 안정성 시험

COMPATIBILITY TEST REPORT												
제품명	Rice bran shampoo						제조일자			2013. 4. 1		
온도	시험 기간	시험 항목	날짜	1day	3day	5day	7day	15day	30day	60day	90day	
				4/1	4/3	4/5	4/7	4/15	4/30	5/30	6/29	
cycle	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	METROHM 691	4199	4195	4185	4190	4188	4196	4199		
		pH	Anton Paar DMA 38	6.5	6.52	6.63	6.54	6.67	6.61			
		비중	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
0℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-									
		점도	METROHM 691	4199	4196	4187	4182	4193	4196	4194		
		pH	Anton Paar DMA 38	6.5	6.45	6.59	6.7	6.57	6.45			
		비중	-									
25℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	METROHM 691	4199	4213	4116	4188	4201	4209	4210		
		pH	Anton Paar DMA 38	6.5	6.21	6.35	6.45	6.8	6.54	6.55		
		비중	-									
40℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	METROHM 691	4199	4185	4123	4157	4206	4195	4199		
		pH	Anton Paar DMA 38	6.5	6.3	6.2	6.52	6.34	6.54	6.55		
		비중	-									

4. 초임계 미강추출물 함유 헤어토닉(화장품) 개발

- 본 연구에서는 초임계 미강추출물을 함유한 헤어토닉 타입의 제품을 제조하였다.
- 초임계 미강추출물을 가용화하여 헤어토닉 제조를 위한 공정을 개발하였으며, 제조 처방전은 하기 도표로 나타내었다.

표 7 . 초임계 미강추출물 함유 헤어토닉 처방전

PHASE	N O	RAW MATERIAL NAME	INCI NAME	합량
A	1	D.I-Water	Purified Water	66.548
	2	EDTA-4NA	Tetrasodium Ethylenediaminetetraacetate	0.030
	3	Aminocoat	Betaine	2.000
	4	Salicylic Acid	Salicylic Acid	0.250
B-1	1	L-Menthol	L-Menthol	0.300
	2	D-Panthenol	D-Panthenol	0.200
	3	Methyl Paraben	Methyl Parahydroxybenzoate	0.150
	4	Peppermint Oil	Peppermint Oil	0.010
	5	Pure Alcohol 95%	Ethanol	15.00
B-2	6	Cremophor RH40	Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil	2.100
	7	미강	Ext.	0.001
	8	1,3-B.G	1,3-Butylene glycol	8.000
C	1	D.I-Water	Purified Water	1.000
	2	T.E.A(pH5.1 맞추기)	Triethanolmaine	0.300
D	1	D.I-Water	Purified Water	1.000
	2	Na-Hyaluronate	Sodium Hyaluronate	0.010
E	1	D.I-Water	Purified Water	2.000
	2	Lactic Acid Pharma 90%	-	0.001
F	1	Biopeptide CL	-	0.300
	2	Procapyl	-	0.300
	3	Sepitonic M-3	-	0.500
합계				100.000

- 초임계 미강추출물 함유 헤어토닉(화장품)은 다음과 같은 절차로 제조 하였다.
 - 50℃에서 A 수상을 완전 용해하였다.
 - B-1 유상은 알콜 95%에 용해하였다.
 - B-2상의 RH40, 초임계 미강추출물을 섞은 후 1,3-B.G와 함께 섞었다.
 - A상이 완전히 용해가 된 후 40℃ 이하로 냉각하여 B상을 넣고 가용화 하였다.
 - A, B 혼합용액에 C상을 넣고 pH를 맞추었다. (pH 5.8)
 - D상을 첨가하였다.
 - 교반하며 전체 pH 5.1이 되도록 E상을 첨가하였다.
 - 모두 합한 상이 40℃이하가 되었는지 확인 후 F상을 첨가하여 완전 용해 시켰다.
 - 완성된 제조물의 전체 pH를 측정하였다.

- 위의 처방전을 활용한 제조공정으로 완성된 초임계 미강추출물 함유 헤어토닉(화장품)은 다음과 같은 성상을 나타내었다.



그림 13. 초임계 미강추출물 함유 헤어토닉

- 초임계 미강추출물 함유 토닉의 안정성 평가를 위해 아래와 같이 3개월 간 (2개월 시험, 1개월 시험예정) 시험을 실시하였다. 시험법은 다음과 같다.
 - pH 시험 : 사용 전 표준완충용액을 이용하여 pH미터를 보정한 후 유리전극을 정제수로 씻고, 항상 수직으로 세워 사용, pH를 알고자 하는 용액에 담구어 안정적인 값을 읽는다.
 - 비중 측정법 : Anton Paar DMA 38 기계를 사용, 실린지에 제품군을 주입하여 값을 읽는다.
- 초임계 미강추출물 토닉의 pH, 비중을 확인한 결과, 한달동안은 제품군에 별다른 차이가 보이지 않았으나, 앞으로 두달간의 시험을 통해 확실한 안정성의 확보를 기대해야 할 것으로 사료되어 진다.

표 8. 초임계 미강추출물 함유 토닉 안정성 시험

COMPATIBILITY TEST REPORT												
제품명	Rice bran tonic						제조일자			2013. 4. 1		
온도	시험 기간	시험 항목	날짜	1day	3day	5day	7day	15day	30day	60day	90day	
				4/1	4/3	4/5	4/7	4/15	4/30	5/30	6/29	
cycle	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	-									
		pH	METROHM 691	5.18	5.15	5.17	5.11	5.2	5.22	5.21		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9862	0.9841	0.9885	0.99	0.9795	0.9866	0.9899		
0℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	-									
		pH	METROHM 691	5.18	5.16	5.17	5.16	5.18	5.22	5.22		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9862	0.986	0.9865	0.9875	0.98	0.9875	0.9677		
25℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	-									
		pH	METROHM 691	5.18	5.15	5.18	5.16	5.14	5.2	5.21		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9882	0.9857	0.9887	0.9912	0.9884	0.9854	0.9868		
40℃	3개월	외관	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		냄새	-	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음
		점도	-									
		pH	METROHM 691	5.18	5.13	5.14	5.18	5.2	5.14	5.13		
		비중	Anton Paar DMA 38	0.9882	0.9888	0.9854	0.9874	0.9812	0.9871	0.9882		

5. 초임계 미강추출물 함유 3종 시작품의 (샴푸, 토닉, 에센스) 간이임상 테스트 수행

- 본 연구는 문제성 두피에서의 초임계 미강추출물 함유 에센스의 효과를 확인하기 위해 시험을 수행하였다.
- 초임계 미강추출물 함유 3종 시작품의(샴푸, 토닉, 에센스) 간이임상은 자사 클리닉센터인 H 두피관리센터 각 지점에서 실시하였다. 각 지점별에서 3-5명의 간이임상피험자를 선정하여 8주간 임상시험을 진행하였다.
- 시작품은 다음과 같은 용기에 담아 간이임상피험자에게 제공되었다.



그림 14. 간이임상피험자에게 제공된 시작품

- 실험방법은 각자 나누어준 시작품 중 아침에 샴푸하고 모발을 반 건조 후에 토닉을 사용하였으며 저녁에 자기 전 샴푸하고 모발을 완전 건조 후 에센스를 적량 덜어 탈모가 심한 부위에 도포하도록 권고하였다.
- 임상시험 호전효과는 1배 사진을 찍어 탈모의 유형과 진행상황을 판단하고 100배 사진을 찍어 탈모의 원인과 두피건강을 분석, 판단하는 근거로 삼았다. 100배 사진은 아람휴비스사의 ARAMO-SG를 사용하여 촬영 하였다.

표 9. 간이입상피험자 명단

지점명	구분	이름	성별	나이	두피 타입	탈모 타입	일 시
H 두피 관리센터	1	추○○	여	31	지루성	여성형	2013.04.10~6.10
	2	최○○	여	35	지성	여성형	2013.04.10~6.10
	3	최○○	여	28	지성	다발성 원형	2013.04.10~6.10
	4	권○○	여	30	민감+지성	여성형	2013.04.10~6.10
	5	박○○	남	35	민감+지성	M+O형	2013.04.10~6.10
	6	임○○	남	29	민감+지성	O형	2013.04.10~6.10
	7	오○○	여	47	건성	여성형	2013.04.10~6.10
	8	안○○	남	44	지성	M+O형	2013.04.10~6.10
	9	김○○	여	39	지성	여성형	2013.04.10~6.10
	10	김○○	남	40	민감+지성	다발성 원형	2013.04.10~6.10
	11	허○○	여	38	민감+지성	여성형	2013.04.10~6.10
	12	변○○	남	30	민감+지성	O형	2013.04.10~6.10
	13	김○○	남	37	민감+지성	O형	2013.04.10~6.10
	14	류○○	여	32	민감	M형	2013.04.10~6.10
	15	한○○	남	35	지성	O형	2013.04.10~6.10
	16	김○○	여	28	지루성	여성형	2013.04.10~6.10
	17	정○○	남	43	지성	O형	2013.04.10~6.10
	18	이○○	여	35	지루성	M형	2013.04.10~6.10
	19	김○○	여	33	건성	여성형	2013.04.10~6.10
	20	한○○	남	45	민감성	U형	2013.04.10~6.10
	21	공○○	남	49	민감성	M+O형	2013.04.10~6.10
	22	신○○	여	37	건선	M+O형	2013.04.10~6.10
	23	문○○	남	34	민감성	U형	2013.04.10~6.10
	24	서○○	여	48	지성	여성형	2013.04.10~6.10
	25	최○○	남	31	지루성	M+O형	2013.04.10~6.10
	26	최○○	남	35	민감+지성	O형	2013.04.10~6.10
	27	신○○	여	38	건선	원형	2013.04.10~6.10
	28	최○○	남	50	건선	M형	2013.04.10~6.10
	29	구○○	남	39	민감+지성	M+O형	2013.04.10~6.10
	30	장○○	여	33	지성	여성형	2013.04.10~6.10

표 10. 초임계 미강추출물 함유 토닉, 샴푸, 에센스 간이임상시험 결과

성명		두피사진	탈모사진	탈모유형	총평
김 ○○	사용 전			원형 탈모	붉음증 증상이 약간있고 탈모가 진행되어 모밀도가 낮음.
	사용 후			처음보다 모밀도가 높아짐	붉음증 증상의 완화와 함께 모밀도가 증가됨
추 ○○	사용 전			여성형 탈모로 모근에 힘이 없음	모근에 힘이 없어 탈모가 유발됨
	사용 후			모근에 힘이 생김	모밀도의 증가와 함께, 모근에 힘이 생김
박 ○○	사용 전			남성형 탈모 모근에 힘이 없음.	붉음증이 약간 있고 모밀도가 낮음.
	사용 후			탈모 자리에 솜털처럼 신생모가 올라옴	붉음증이 약간 있으나, 탈모 자리에 솜털이 올라와 메밀도가 상당히 증가하였음.
김 ○○	사용 전			O자 탈모.	모발이 비어있는 모낭이 상당량 관찰됨.
	사용 후			O자 탈모 부분의 머리숱이 많아짐.	비어있는 모낭이 상당량 채워지며 탈모가 상당히 완화됨.
박 ○○	사용 전			M+O 탈모 증상	두피가 붉고, 남성형 탈모가 진행
	사용 후			O형 탈모부위에 모발이 굵어짐	두피는 여전히 붉으나, O형탈모부위에 모발이 굵어짐
임 ○○	사용 전			지성두피, O형 탈모	모발이 전체적으로 가늘고 숱이 적어져 가운데가 비어 보임.
	사용 후			탈모증상 완화	모발이 굵어지고 탈모에 완화에 상당한 효과를 보임.

한 ○○	사용 전			O형 탈모	전체적인 모발의 밀도가 낮아 머리가 많이 비어보임.
	사용 후			모밀도가 높아짐.	모발의 밀도가 상당히 증가하고 힘이 생김.
김 ○○	사용 전			여성형 탈모	모발이 가늘고 비어있는 모낭이 상당량 보임.
	사용 후			탈모증상 완화	모발에 힘이 생기고 모발의 밀도 또한 높아짐.
김 ○○	사용 전			여성형 탈모	두피가 전체적으로 붉고 정수리쪽 탈모 진행.
	사용 후			탈모증상 완화	두피 붉음증은 완화되지 않았으나, 탈모증상은 완화됨.
정 ○○	사용 전			여성형 탈모	붉음증 증상이 있고, 여성형 탈모 있음
	사용 후			탈모 부위에 신생모가 올라옴	붉음증과 탈모증상 이 호전
허 ○○	사용 전			여성형 탈모	피지가 많고 두피 전체적으로 붉으며 탈모증상 있음
	사용 후			모밀도 증가	피지 조절이 되고 모밀도가 증가하였으나, 여전히 붉음
여 ○○	사용 전			여성형 탈모	두피가 붉고 탈모 증상 보임
	사용 후			모밀도가 증가되고 있음	붉음증은 개선이 안되었으나, 피지가 조절되고 모밀도가 증가됨
송 ○○	사용 전			유전으로 인한 O형 탈모 진행	비교적 건강한 두피이나 O형 탈모 진행.
	사용 후			탈모완화에 진전이 없음.	두피완화와 탈모완화에 진전이 없음.

김 ○○	사용 전			여성형 탈모.	두피는 상당히 건강한 편이나 모발의 밀도가 낮음.
	사용 후			탈모증상 완화.	모발의 밀도가 높아지고 정상두피로 되돌아옴.
한 ○○	사용 전			남성형 탈모	피지가 많고 각질이 있으며, 탈모증상 있음
	사용 후			탈모증상 완화.	피지와 각질의 양이 많이 줄어들고 모발의 밀도가 상당히 증가.
신 ○○	사용 전			M자, O형 탈모.	각질이 많고 모발이 가늘며 비어있는 모낭이 상당히 보임.
	사용 후			모밀도 증가	각질이 완화되고 모발에 힘이 생겼으며 탈모증상이 상당히 완화됨.
문 ○○	사용 전			O형, M자 탈모가 진행	모발이 상당히 가늘고 밀도가 낮음.
	사용 후			탈모증상 완화	모발이 굵어지고 밀도가 높아짐.
이 ○○	사용 전			여성형 탈모진행	붉음증 현상이 보이며 여성형 탈모가 진행.
	사용 후			탈모진행 완화	붉음증 현상이 완화되고 모발의 밀도가 높아진 것은 아니나 탈모진행 현상이 멈추었음.
김 ○○	사용 전			가르마 부위의 모발의 밀도가 떨어짐	마른비듬이 두피 전체적으로 보이면서 여성형 탈모진행
	사용 후			모발을 굵어졌으나, 모밀도는 큰 차이 없음	마른 비듬은 완화되었으나, 모밀도는 큰 차이 없음
한 ○○	사용 전			U자형태의 남성형 탈모진행,모발이 전체적으로 가늘어짐	예민하고 정수리부위에 염증과 탈모증상이 함께 나타남
	사용 후			모발이 굵어짐	두피 톤은 아직도 붉으며, 가는 모발이 굵어짐

공 ○ ○	사용 전			M+O 탈모 증상	두피가 붉고, 남성형 탈모가 진행
	사용 후			큰 차이 없음	두피톤은 안정화되었으나, 탈모는 큰 차이없음
신 ○ ○	사용 전			모발이 가늘고 정수리 부위 모밀도가 떨어짐	두피가 건조하고 비듬으로 인한 가려움증을 호소. M+O자 탈모진행
	사용 후			모밀도가 증가됨	마른 비듬은 호전되었으나, 아직 가려움증이 있고 모밀도가 증가되었음
분 ○ ○	사용 전			U자 형태의 탈모진행 모발이 가늘고 탄력이 없음.	민감성두피, U자탈모진행
	사용 후			모발에 탄력이 생김	염증이 완화되고 모발에 탄력이 생김
서 ○ ○	사용 전			가르마부위의 모발이 가늘어지고 부위가 넓고 빈모공 다수	지루성두피, 여성형 탈모진행
	사용 후			빈 모공에 신생모가 올라옴	피지분비가 조절되고 빈 모공에 신생모가 올라옴
최 ○ ○	사용 전			모발이 전체적으로 가늘어져있음	지루성두피, 남성형 탈모진행. 모밀도가 떨어짐.
	사용 후			큰 변화없음	피지분비량이 조절되고 비듬이 호전되었음
최 ○ ○	사용 전			신생모가 가늘고 모밀도가 낮음	남성형 탈모, 피지분비과다, 민감성두피
	사용 후			신생모가 올라오는 중	피지가 조절되고 신생모가 올라옴
신 ○ ○	사용 전			원형부위에 솜털이 거의 안보이고 표면이 맨들 맨들함.	건성두피에 원형탈모가 후두부에 보임
	사용 후			탈모부위가 비슷함.	탈모완화에 진전이 안보이고, 변화없음.

최 ○ ○	사용 전			M형 탈모 진행으로 모발이 가늘고 얇음	두피 건조로 인한 마른 비듬, 각질이 있고 가려움증으로 진물이 있으며 탈모가 진행됨
	사용 후			큰 변화없음	피지분비가 정상화로 비듬 및 진물 증상은 완화되나, 탈모는 변화없음
구 ○ ○	사용 전			남성형 탈모 진행으로 모근에 힘이 없음	피지 분비가 많고 남성형 탈모가 진행됨
	사용 후			모근에 힘이 생김	피지분비가 조절되고 모근에 힘이 있으나, 아직 큰 변화는 없음
장 ○ ○	사용 전			탈모증상. 모발에 탄력이 없음	비듬 및 각질이 많고 모발에 탄력이 없고 탈모 증상 있음
	사용 후			모발에 탄력이 생김	피지가 많고 비듬과 염증이 호전되었으며, 모발 탄력이 생김

○ 초임계 미강추출물 함유 토닉, 샴푸, 에센스 간이임상시험 결과 모밀도의 증가 및 모발의 탄력으로 문제성 두피 및 탈모 예방 효과를 나타내었다. 이는 자체적으로 시험한 간이임상이므로 객관적인 데이터로는 사용될 수 없다. 따라서 향후 전문가의 소견 및 객관적인 데이터 제시를 위해 인증기관에 임상시험을 의뢰하여 데이터를 구축할 필요가 있다.

6. 지식재산권 확보

- 본 연구를 함과 동시에 지식재산권 확보를 위한 특허 및 기술가치평가를 받을 수 있었다.
- 아래 특허출원서과 기술가치평가 계약서를 첨부한다.



  <p>특허출원서</p> <p>【출원구분】 특허출원</p> <p>【출원인】</p> <p>【발명】 (주)메코이엔</p> <p>【출원인코드】 1-2008-035026-0</p> <p>【발명명】</p> <p>【발명인코드】 9-2004-000209-1</p> <p>【특성】 (주)메코이엔</p> <p>【발명의 목적】 초임계 유체를 이용한 미강유의 침적 추출 방법, 이에 의한 미강유 및 미강유 저장안, 및 그 용도</p> <p>【발명의 명세서】 Method for optimization of rice bran oil extraction using supercritical fluid, rice bran oil and fatty acid therein, and use thereof</p> <p>【발명자】</p> <p>【상장】 본원숙</p> <p>【출원인코드】 4-1998-046923-2</p> <p>【발명자】</p> <p>【발명의 구분표기】 김민영</p> <p>【상장명】 김민영</p> <p>【우편등록번호】 680730-2094718</p> <p>【우편번호】 611-758</p> <p>【주소】 부산광역시 연제구 가채3동 현대아파트 102동 602호</p> <p>【국적】 KR</p> <p>【발명지】</p> <p style="text-align: center;">3-1</p>	<p style="text-align: center;">기술가치평가 계약서</p> <p>부산광역시 남구 신현로 365 부영테크노 산학협력관 508호 주순봉 두고 있는 주석회사 메코이엔(이하 "메코") 본사와 사용자 메코(2013-043145) (이하 "메코") 발명 : 초임계 유체를 이용한 미강유의 침적 추출 방법, 이에 의한 미강유 및 미강유 저장안, 및 그 용도) 기술에 대해 기술성 및 사업성 분석을 통한 기술가치평가를 수행함에 있어 계약사항을 규정함을 목적으로 한다.</p> <p>제1조 (목적) 본 계약은 "메코"가 출원 중인 특허출원 제10-2013-043145(이하 "특허") 발명 : 초임계 유체를 이용한 미강유의 침적 추출 방법, 이에 의한 미강유 및 미강유 저장안, 및 그 용도) 기술에 대해 기술성 및 사업성 분석을 통한 기술가치평가를 수행함에 있어 계약사항을 규정함을 목적으로 한다.</p> <p>제2조 (평가의 용도) 본 평가의 용도는 기술 이전, 거래용으로 한정한다.</p> <p>제3조 (평가의 범위) "특허"의 소제항 기술평가를 위한 범위는 다음과 같다. ① 기술성 및 사업성 분석 ② 기술이전 계약협상 ③ 평가보고서 작성 및 제출</p> <p>제4조 (평가료) ① 평가료는 발명 이해이탈액(₩2,000,000, VAT 포함)으로 한다. ② 평가료는 현금으로 지급한다. ③ 평가 완료일은 2013년 7월 20일로 한다.</p> <p>제5조 (납부시기) ① 평가료는 발서봉을 본 계약서에 지급한다. ② 위 1항에 따라 본 계약 체결일로부터 10 영업일 이내에 지급하여야 한다.</p> <p>제6조 (비밀유지) 본 평가와 관련하여 상대방에게 구두 또는 문서로 제공된 일체의 자료, 데이터 및 본 평가와 관련한 정보, 형식 등 계약내용에서 비롯된 정보와 본 계약 약관의 비밀유지내용으로 한다.</p> <p>제7조 (자료의 반환) ① 본 평가가 종료(종료) 후 30일은 계약 종료 후 반환하여야 한다.</p>	<p>"메코" 또는 "특허"는 상대방의 요청에 따라 상대방으로부터 제공받은 일체의 자료로 반환하여야 한다.</p> <p>② 제공받은 정보의 변경, 수정, 삭제, 모호성 등 관련 서류는 본 계약의 목적 및 취지에 따라 사용하거나 기타의 방법으로 이를 보관·제기하여서는 안 된다.</p> <p>제8조 (평가의 배제) ① "특허"는 평가료를 납부한 후에 평가 인정이 승인되고 인정이 배제되는 경우 본 평가의 중도 철회(중도철회)를 배제한다. 중도철회는 중도철회금으로 인한 금액 및 평가금(비)을 제외한 나머지 평가료를 환급하고 평가계약은 해제할 수 있다. ② "메코"는 평가 완료 전까지 "특허"에 서면으로 평가계약의 체결을 요청할 수 있다.</p> <p>제9조 (평가) ① 본 계약의 목적을 달성하기 위하여 "특허"에 평가 대상 기술에 국한된 정보, 회계, 영업 자료를 요청할 수 있으며, 제공한 자료는 진실한 상태임을 보장한다. ② "특허"는 평가를 위하여 "메코"를 방문 조사하거나 자료 제출을 요구할 수 있으며, 이에 관련된 이해관계인의 조사를 자료제공에 적극 협력하여야 한다. ③ "메코"는 평가보고서를 평가 목적 이외의 용도로 사용하지 않는다.</p> <p>제10조 (중도철회) "특허"는 본 평가보고서를 근거로 한 평가결과에 대하여 어떠한 책임도 부담하지 아니한다.</p> <p>제11조 (기타) 본 계약이 체결되었음을 증명하기 위하여 계약서 2부를 작성하여 기밀 봉투에 1통씩 보관하기로 한다.</p> <p style="text-align: right;">2013년 06월 18일</p> <p>주석회사 메코이엔 대표이사 조 석 봉 동진기술지평평가사무소 김민영</p>
<p>특허출원서 (10-2013-0043165)</p>	<p>기술가치평가 계약서</p>	

그림 15. 특허 출원서와 기술가치평가 계약서

제 3 절 대량생산 체계 설계 및 구축

1. 대량생산 체계 설계 및 구축

가. 원료 수급 및 가공공정 표준화

- 매년 같은 조건으로 경작된 쌀의 미강을 획득할 수 있도록 도정업체 쌀눈조아 에프엔비와 공급계약을 체결하였다.

- 시제품생산에 사용된 쌀은 안성시 원곡면 성주리에서 경작된 쌀로 추청 품종으로 가공공정을 거쳐 획일화된 미강 파우더로 생산된다.

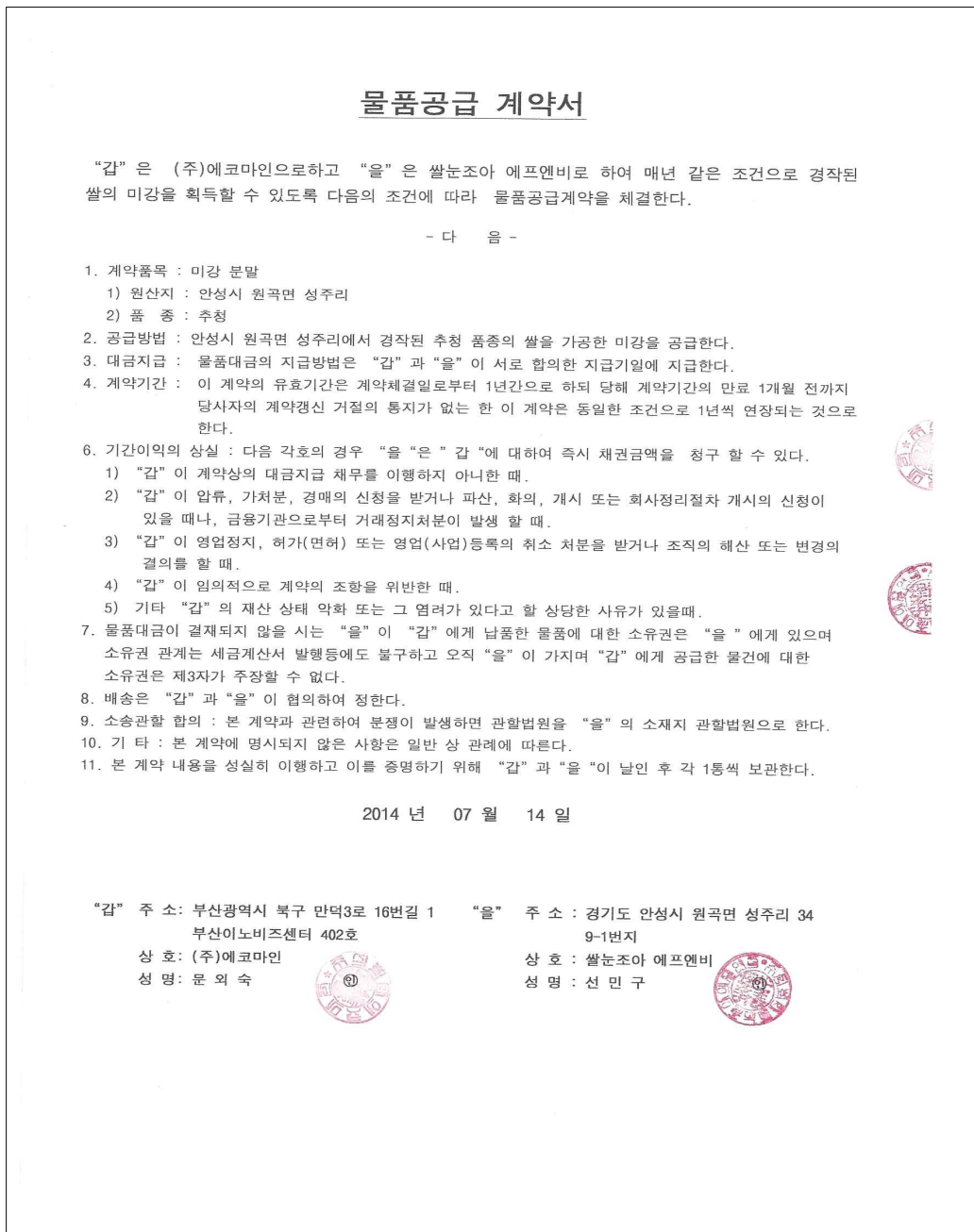


그림 16. 쌀눈조아 에프엔비 물품공급 계약서

나. 대량추출을 위한 공정 표준화

- 도정업체를 통해 생산된 미강 분말을 (재)전남생물산업진흥원 나노바이오연구원 에서 초임계 추출장치를 이용하여 생산하였으며 공정도는 그림 와 같다

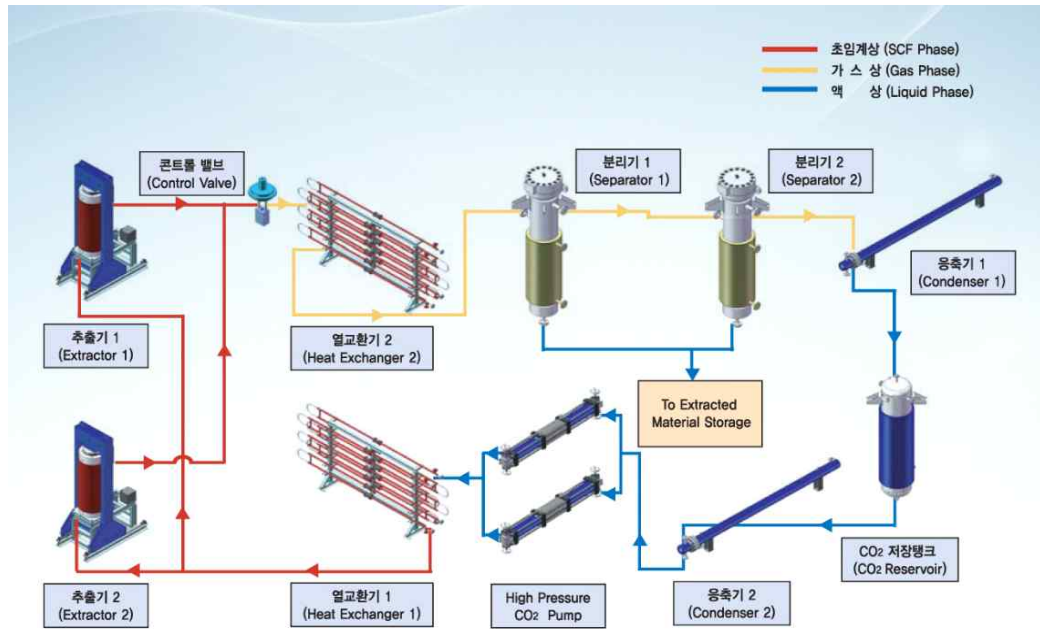


그림 17. 초임계 추출장치 공정도

- 초임계 유체 추출공정은 이산화탄소가 펌프에서 가압된 후 프리히터에서 승온되면 초임계 상태가 된다. 초임계 이산화탄소가 추출조에서 목표조에서 목표물질을 추출한 후 분리조에 도달하여 압력이 감소되면 추출물과 이산화탄소 가스로 분리되어 추출물은 분리조에서 포집되고 이산화탄소 가스는 열교환기를 통해 저장조로 유입된다. 액상 이산화탄소는 다시 펌프로 가압되어 연속순환공정으로 추출에 이용된다
- 미강추출물은 추출조의 압력 270bar, 온도 32℃에서, 분리조의 압력50bar, 온도 40℃에서, CO₂ 를 용매로 6L/min의 유량으로 추출하였다.
- 추출공정은 등압, 펌핑, 가압, 추출유지, 감압 순으로 진행이 되며 1회당 240min의 운영시간으로 20kg의 미강유를 생산하였다.

표 11. 초임계추출공정별 소요시간

추출공정	등압	펌핑	가압	추출유지	감압
운영시간(min)	10	10	20	180	30

○ 전남바이오센터에서 추출한 미강추출물은 식품의약품안전처의 원료시험기준에 따라 분석하였다.

표 12. 미강추출물 시험 기준방법 및 결과

시험항목	시험기준	시험방법	시험결과
성상	불투명한 옅은 노란색의 액상 / 특유풀	육안확인	적합
굴절률	1.400 ~ 1.500	「대한약전」 일반시험법 굴절률측정법(25℃)	1.4710
비중	0.900 ~ 1.000	「대한약전」 일반시험법 비중 및 밀도측정법 중 제 1법 비중병에 의한 측정법	0.938
산가	120 이하	식품공전 일반시험법 산가	104
요오드가	90 ~ 110 이하	식품공전 일반시험법 요오드가	100.4
비누화가	60 ~ 110 이하	식품공전 일반시험법 비누화물	84.0
납	2ppm 이하	기능성화장품 기준 및 시험방법 납시험법	불검출
비소	2ppm 이하	기능성화장품 기준 및 시험방법 비소시험법	불검출
확인시험	330 nm 파장에서 메인피크가 9분, 9.2~9.분, 10~10.4분, 11.0~11.6분, 12.4~13.1분에서 확인	감마오리자놀 확인시험	확인

2. 시제품(의약외품)의 생산

가. 주성분 의약외품 생산

- 2차년도에서 개발한 탈모방지 및 양모촉진 효능을 확인된 미강추출물을 함유하는 에센스를 생산하기 위해, 미강추출물을 주성분으로하여 의약외품 “에코마인 라이스 브랜 에센스”를 (주)한국콜마에서 전공정위탁생산하였으며 물품공급계약을 체결하였다.

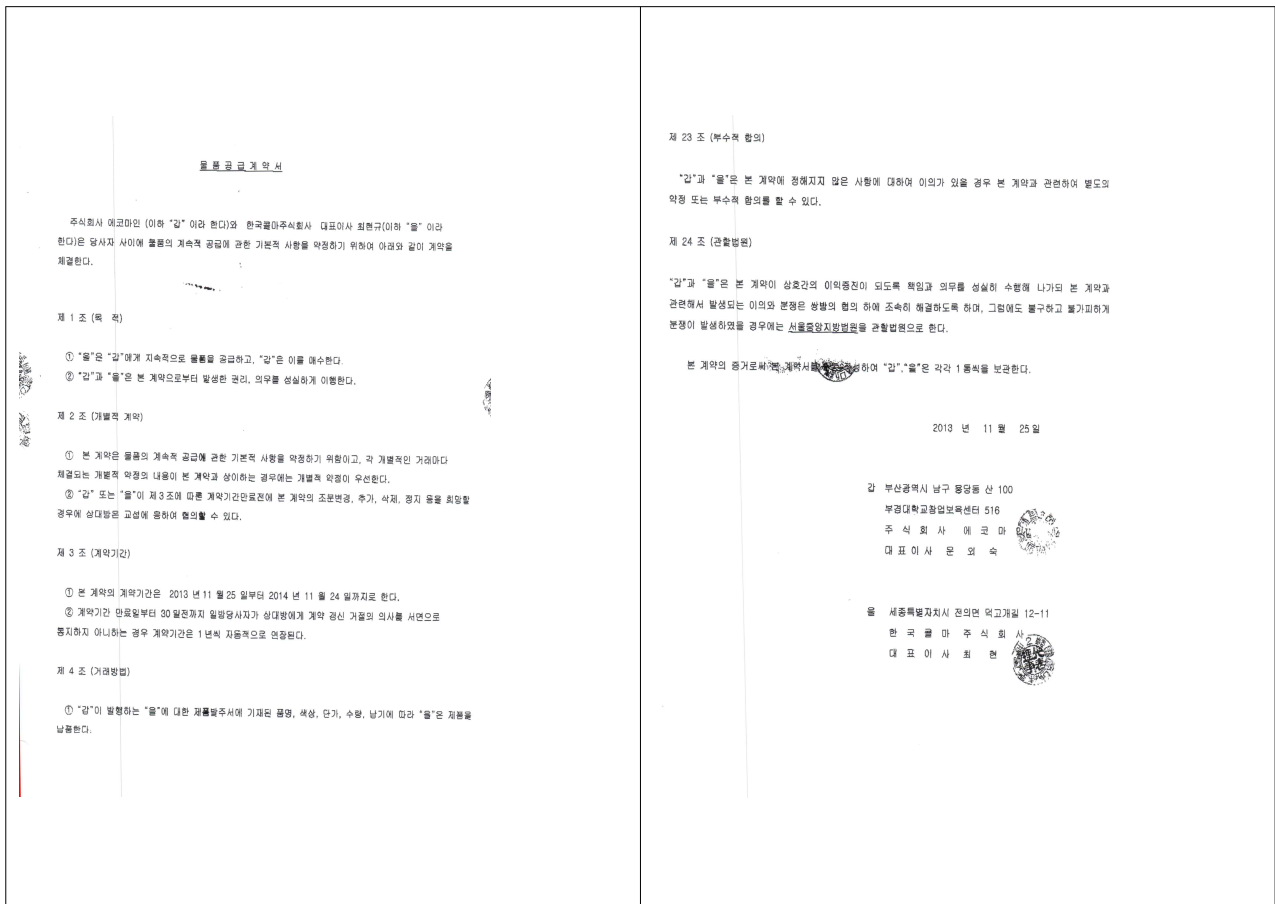


그림 18. 한국콜마주식회사와 의약외품 생산 공급계약서

○ 에코마인 라이스브랜 에센스 처방전은 표 13. 에 나타내었다.

표 13. 의약품 에코마인 라이스브랜 에센스 처방전

Phase	No.	Raw Material Name	INCI Name	함량	Purpose
수상	1	정제수	Water	적량	용제
	2	글리세린	Glycerin	1.0	보습제
	3	하이드록시에칠셀룰로오스	Hydroxyethylcellulose	0.5	점증제
	4	테트라소듐 이디티에이	Tetrasodium EDTA	0.03	킬레이트 화제
	5	C12-14파레스-12	C12-14 Pareth-12	2.0	계면활성제
	6	하이알루로닉에씨드추출물	Hyaluronic Acid	0.5	컨셉
알콜상	7	에탄올	Alcohol	15.0	용제
	8	미강추출물	Oryza Sativa (Rice) Bran Oil	1.0	주성분
	9	피이지-40하이드로 제네이티드캐스터오일	PEG-40 Castor Oil	2.0	계면활성제
	10	트리에탄올아민	Triethanolamine	0.3	pH조절제

○ 의약품 에코마인 라이스브랜 에센스의 제조공정은 다음과 같다.

표 14. 의약품 에코마인 라이스브랜 에센스 제조공정

공정번호	공정명칭	원료	제조방법
1	수상 원료칭량	정제수 글리세린 하이드록시에칠셀룰로오스 테트라소듐 이디티에이 C12-14파레스-12 하이알루로닉에씨드추출물	원료를 칭량하여 60℃에서 완전용해한다.
2	알콜상 원료칭량	에탄올 미강추출물 피이지-40하이드로 제네이티드캐스터오일 트리에탄올아민	가용화하여 60℃에서 알콜에 완전용해한다.
3	혼합/교반	수상파트 알콜상 파트	수상파트와 알콜상파트를 60℃에서 30분간 완전혼합한다.
4	충전	공정 3의 반제품 충전	
5	포장	공정 4의 반제품 포장	



그림 19. 에코마인 라이스브랜 에센스 시제품

○ 의약외품 생산 안정화 test

- 2014년 1월20일 생산된 에코마인 라이스브랜 에센스의 안정성을 검증하기위해 6개월을 목표로 각 온도별 환경에 노출 시켜 색상 변색/변취, 점도/경도, pH를 점검하였다.
- 또한 의약외품 허가 신청을 하기 위해 추가로 2Lot의 제품을 생산하여 현재 안정성 시험을 같은 조건으로 진행 중이다.

안정성시험기록서

제품명	ECM-MESS(1.0)Q			제조번호(Lab No)			MH0109-DAA		제조일자		2014-01-20	
보관조건	시험주기	시험항목	1일 (3/26)	2일 (/)	3일 (/)	1주 (/)	2주 (4/8)	1개월 (4/25)	2개월 (/)	3개월 (6/25)	6개월 (/)	
50℃	1개월	성상	-	-	-	-	OK	OK				
		변색/변취	-	-	-	-	OK	미세 황변				
		점도/경도	-	-	-	-	1700	1600				
		pH	-	-	-	-	7.44	7.44				
40℃	3개월	성상	-	-	-	-	OK	OK		OK		
		변색/변취	-	-	-	-	OK	OK		미세 황변		
		점도/경도	-	-	-	-	1800	1800			1000	
		pH	-	-	-	-	7.45	7.45			7.51	
5℃	3개월	성상	-	-	-	-	OK	OK		OK		
		변색/변취	-	-	-	-	OK	OK		OK		
		점도/경도	-	-	-	-	1900	2000			1500	
		pH	-	-	-	-	7.46	7.48			7.53	
CYCLE	3개월	성상	-	-	-	-	OK	OK		OK		
		변색/변취	-	-	-	-	OK	OK		미세 황변		
		점도/경도	-	-	-	-	1800	1600			1100	
		pH	-	-	-	-	7.44	7.45			7.52	
25℃	6개월	성상	OK	-	-	OK	OK	OK		OK		
		변색/변취	OK	-	-	OK	OK	OK		OK		
		점도/경도	2000	-	-	1900	1900	1800			1000	
		pH	7.50	-	-	7.47	7.45	7.45			7.52	
* 당일 점도/경도	2000 (LV 2 x 12 rpm)											
* 당일 pH	7.49											
* 비중	0.992											

그림 20. 의약외품 라이스브랜 에센스 1LOT 안정성 시험기록서

○ 의약품 완제품 기준 및 시험방법

- 식품의약품안전처의 의약품 및 화장품 완제품 기준 및 시험방법에 의거하여 다음과 같은 방법으로 실험을 하였다.

(1) 정상

- 육안으로 확인한다.

(2) pH

- pH는 수용액 중의 수소이온농도값에 활동도계수를 곱한 값, 즉 수소이온활동량의 역수의 상용대수로 정의하며 실용적으로는 검액 중의 수소이온농도의 척도로 쓰인다.

검액의 pH는 표준액의 pH (pH_S)와 관련하여 다음 식으로 나타내고 유리전극을 써서 pH 측정기로 측정한다.

$$pH = pH_S + \frac{E - E_S}{2.3026 \frac{RT}{F}}$$

pH_S : pH 표준액의 pH

E : 검액 중에서 유리전극과 참조전극을 조합한 전지의 기전력 (V)

E_S : pH 표준액 중에서 유리전극과 참조전극을 조합한 전지의 기전력 (V)

R : 기체정수

T : 열역학적온도

F : 패러데이정수

(3) 비중

- 밀도 ρ (g/mL 또는 g/cm³)는 물질의 단위부피당의 질량이고, 비중 d_4^t 는 어떤 부피를 가지고 있는 물질의 질량과 그것과 같은 부피의 표준물질의 질량과의 비이며, 이것을 상대밀도라고도 한다. 비중 d_4^t 는 검체와 물 (H₂O)과의 각각 온도 t' °C 및 t °C에서의 같은 부피의 질량비를 말한다. 따로 규정이 없는 한 측정에는 제 1 법, 제 2 법 또는 제 4 법을 쓰고 수치에 “약” 이라고 기재되어 있을 때는 제 3 법을 쓸 수 있다.

제 1 법 비중병에 의한 측정법 비중병은 보통 10 ~ 100 mL 유리용기로 온도계가 달려 있는 갈아 맞춘 마개와 표선 및 갈아 맞춘 뚜껑이 있는 측관(側管)이 있다. 미리 깨끗이 씻고 건조한 비중병의 질량 M 을 달고 다음에 마개 및 뚜껑을 열어 검체를 채우고 규정온도 t' °C보다 1 ~ 3 °C 낮은 온도에서 기포가 남지 않도록 조심하여 마개를 닫는다. 천천히 온도를 올려 온도계가 규정온도를 나타낼 때 표선 위쪽의 검체를 측관으로부터 빼내고 측관에 뚜껑을 닫고 외부를 잘 닦은 다음 질량 M_1 을 단다. 같은 비중병에 물을 넣어 같은 방법으로 조작하고 규정온도 t °C에서의 질량 M_2 를 달아 다음 식에 따라 비중 d_4^t 를 구한다.

$$d_t' = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

검체 및 물을 가지고 같은 온도에서 측정할 때 ($t = t'$), 온도 t' °C에 있어서의 검체의 밀도 ρ_t' 를 표에 나타낸 온도 t' °C에서의 물의 밀도 ρ_{st}' 및 측정된 비중 d_t' 를 써서 다음 식에 따라 계산한다.

(4) 점도

- 점도측정법은 검체의 점도를 점도계로 측정하는 방법이다.

액체가 일정한 방향으로 운동하고 그 흐름에 수직인 방향에 속도의 차이가 있을 때 그 흐름에 평행한 평면의 양측에 내부마찰력이 생긴다. 이 성질을 점성이라 한다. 흐름에 평행한 평면의 단위면적당 내부마찰력을 전단응력(剪斷應力)이라 하며 흐름에 수직인 방향의 속도기울기를 전단속도라고 한다. 전단응력이 전단속도에 비례하는 액체를 뉴턴액체라고 한다. 그 비례정수 η 는 일정온도에서 그 액체의 고유한 정수로 점도라 한다. 그 단위는 파스칼초 (Pa·s)를 쓰지만 보통 밀리파스칼초 (mPa·s)로 표시한다.

또한 전단응력이 전단속도에 비례하지 않는 액체는 비뉴턴액체라 하고 이 액체의 점도는 전단속도에 따라 여러 가지로 변화한다는 점에서 겔보기점도라 한다. 이 경우 전단응력을 이것에 대응하는 전단속도로 나눈 값이 겔보기점도이고, 전단속도와 겔보기점도의 관계가 얻어지면 이 비뉴턴액체의 유동 특성을 알 수 있다.

점도 η 를 같은 온도의 그 액체의 밀도로 나눈 값을 운동점도 ν 라고 하며 그 단위로서는 초당 제곱미터 (m^2/s)를 쓰고 있지만 보통 초당 제곱밀리미터 (mm^2/s)로 표시한다. 액체의 점도는 다음 어느 한 방법을 써서 측정한다.

제 2 법 회전점도계법 이 측정법은 뉴턴액체 또는 비뉴턴액체에 적용하는 방법이며 보통 액체 속을 일정한 각속도로 회전하는 로터에 작용하는 힘(토크)을 용수철의 비틀림 정도로 검출하여 점도로 환산하는 원리를 응용한 측정법이다.

(5) 확인시험, 함량시험

- 액체크로마토그래프법은 적당한 고정상을 써서 만든 칼럼에 검체혼합물을 주입하고 이동상으로 액체를 써서 고정상에 대한 유지력의 차를 이용하여 각각의 성분으로 분리하여 분석하는 방법이다. 액상검체 또는 용액으로 만들 수 있는 검체에 적용할 수 있으며, 물질의 확인, 순도시험, 정량 등에 쓴다.

(6) 알코올수측정법

- 알코올수라 함은 탄크제 등 에탄올을 함유한 제제에 대하여 다음 방법으로 측정할 때 15 °C에서 검체 10 mL로부터 얻은 에탄올층의 양 (mL)을 말한다.

제 2 법 기체크로마토그래프법 15 °C에서 검체를 취하여 다음 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 조작하여 에탄올의 함량 (vol%)을 측정하고 이 값으로부터 알코올수를 구하는 방법이다.

(7) 용량편차시험

- 제제 10 개 내용물의 평균용량은 표시량 이상이고, 개개의 내용물의 용량은 표시량이 60 mL 이하인 경우에는 표시량의 90 % 이상, 60 mL를 넘고 150 mL 이하인 경우에는 표시량의 95 % 이상일 때 적합하다. 다만, 이 범위를 벗어났을 때에는 20 개를 더 취하여 시험할 때 총 30 개의 내용물의 평균용량은 표시량 이상이고 개개의 내용물의 용량은 표시량이 60 mL 이하인 경우에는 표시량의 90 % 이하인 것이 1개 이하, 60 mL를 넘고 150 mL 이하인 경우에는 표시량의 95 % 이하인 것이 1 개 이하일 때 적합하다.
- 제제 10 개를 가지고 내용물을 메스실린더로 직접 용량을 측정한다. 또는 내용물이 들어 있는 용기에 뷰렛으로 물을 떨어뜨려 용기를 가득 채웠을 때의 소비량을 정확하게 측정한다. 이때 개개의 번호를 기록하는 등으로 식별하여 각 제제와 그 용량이 대응하도록 조심한다. 용기의 내용물을 완전히 제거하고 물 또는 기타 적당한 유기용매로 용기의 내부를 깨끗이 씻어 건조하고 다시 뷰렛으로 물을 떨어뜨려 용기를 가득 채워 소비량을 정확하게 측정한다. 이 값(빈 용기에서 측정한 물의 소비량)에서 먼저 측정한 물의 소비량을 빼서 내용물의 용량으로 한다.

표 15. 의약외품 에코마인 라이스브랜 시험 성적결과

제 조 번 호 구분	DA001	DH002	DH003
성상	점성의 투명한 액상	점성의 투명한 액상	점성의 투명한 액상
pH	7.5	7.9	8.0
비중	0.992	0.991	0.993
점도	2,000	1.425	2,075
확인시험 (감마오리자놀)	함량시험의 주피크유지시간이 같다.	함량시험의 주피크유지시간이 같다.	함량시험의 주피크유지시간이 같다.
함량시험 (감마오리자놀)	0.0074%	0.0182%	0.0135%
알코올수시험	23.5%	13.7%	12.9%
용량편차	100.9ml	100.7ml	100.3ml

나. 보조성분 의약외품 생산

- 콜마에서 허가된 제품에 미강추출물을 보조성분으로 한 헤슬 바이탈 헤어 샴푸, 토닉, 트리트먼트를 의약외품 별규신청을 하여 의약외품으로 생산하였다.
- 별규신청자료는 다음과 같다.

미강추출물(별규)

1. 제 법 : 이 원료는 쌀 *Oryza sativa*의 미강을 초임계 CO₂ 추출하여 얻은 액이다.
2. 성 상 : 이 추출물은 불투명한 옅은 노란색의 액상으로 특유취가 있다.
3. 굴 절 률 : 1.400 ~ 1.500 (25℃) (대한약전 일반시험법 굴절률측정법)
4. 비 중 : d_{25/25} 0.900 ~ 1.000 (대한약전 일반시험법 비중 및 밀도측정법 제4법)
5. 산 가 : 120이하 (식품공전 일반시험법 산가)
6. 요 오 드 가 : 90 ~ 110이하 (식품공전 일반시험법 요오드가)
7. 비 누 화 가 : 60 ~ 110이하 (식품공전 일반시험법 비비누화물)
8. 순 도 시 험
 - 1) 납 : 이 약 1.0mL를 달아 기능성화장품 기준 및 시험방법 납시험법에 따라 검액을 만들고 조작하여 시험한다. (10ppm이하)
 - 2) 비소 : 이 약 1.0mL를 취하여 기능성화장품 기준 및 시험방법 비소시험법에 따라 검액을 만들고 시험한다. (2ppm이하)
9. 확 인 시 험
감마오리자놀 : 이 약 헵탄용액(1→100,000)을 가지고 의약외품 기준 및 시험방법 감마오리자놀 확인시험 1항에 따라 흡광도를 측정하면 파장 231±2nm, 291±2nm 및 315±2nm에서 흡수극대를 나타낸다.(화장품원료기준 오리자놀 확인시험)

본 규격의 시험방법 및 시약은 별도 규정한 것 이외에는 대한약전 일반 시험법에 따라 시험한다.

(1) 헤슬바이탈헤어 샴푸

- 실리실산, D-판테놀, 아연피리치온을 주성으로 하는 콜마의 의약외품 샴푸에 미강추출물을 보조성분으로 첨가하여 식약처에 의약외품 별규신청을 하였으며 표 16. 은 의약외품 샴푸에 사용된 원료약품 및 분량을 나타내고 있다.

표16. 헤솔바이탈헤어 원료약품 및 그 분량

세부 구성	배합목적	원료명	활성물질 용량	규격	분량	단위	제조원	DMF
-	주성분	살리실산	-	KP	0.2	그램	JUNSEICHEM ICALCO.LTD.	-
-	주성분	D-판테놀	-	USP	0.5	그램	DSM	-
-	주성분	아연피리치온액	-	KPX	0.6	그램	ARCH	-
-	컨셉	미강추출물	-	별규	0.5	그램	에코마인	-
-	계면활성제	소듐라우레스설페이트	-	KQC	40.0	그램	-	-
-	계면활성제	라우릴황산나트륨액	-	KQC	35.0	그램	-	-
-	컨디셔닝제	폴리쿼터늄-7	-	KQC	4.0	그램	-	-
-	보존제	메칠클로로이소치아졸리논/메칠이소치아졸리논 혼합액	-	KQC	적량	그램	-	-
-	용제	정제수	-	KQC	적량	그램	-	-
-	킬레이트화제	테트라소듐이디티에이	-	KQC	적량	그램	-	-

○ 헤솔 바이탈헤어 샴푸의 제조방법은 다음과 같다.

표 17. 헤솔바이탈헤어 샴푸 제조방법

공정번호	공정명칭	원료	비고
1	원료칭량	살리실산 D-판테놀 아연피리치온액 미강추출물 소듐라우레스설페이트 라우릴황산나트륨액 폴리쿼터늄-7 메칠클로로이소치아졸리논 /메칠이소치아졸리논 혼합액 정제수 테트라소듐이디티에이	
2	혼합/교반	살리실산 D-판테놀 아연피리치온액 미강추출물 소듐라우레스설페이트 라우릴황산나트륨액 폴리쿼터늄-7 메칠클로로이소치아졸리논 /메칠이소치아졸리논 혼합액 정제수 테트라소듐이디티에이	수상과 알콜상을 60℃까지 가운. 완전용해된 상태에서 두상을 혼합한다.
3	충전	공정2의 반제품	
4	포장	공정3의 반제품	

(2) 헤솔바이탈헤어 트리트먼트

○ 실리실산, D-판테놀, 아연피리치온을 주성분으로 하는 콜마의 의약외품 트리트먼트에 미강추출물을 보조성분으로 첨가하여 식약처에 의약외품 별규신청을 하였으며 표 18. 은 의약외품 트리트먼트에 사용된 원료약품 및 분량을 나타내고 있다.

표18. 헤솔바이탈헤어 트리트먼트 원료약품 및 그 분량

세부구성	배합목적	원료명	활성물질 용량	규격	분량	단위	제조사	DMF
-	주성분	살리실산	-	-	0.2	그램	삼전순약	-
-	주성분	D-판테놀	-	-	0.5	그램	DSM	-
-	주성분	아연피리치온액	-	-	0.6	그램	ARCH	-
-	컨셉	미강추출물	-	별규	0.5	그램	에코마인	-
-	유화제	알킬트리메틸 암모늄염화물	-	-	8.0	그램	-	-
-	유화보조 제	세테아릴알코올	-	-	10.0	그램	-	-
-	유화보조 제	세틸알코올	-	-	10.0	그램	-	-
-	점도조절 제	히드록시에틸 셀룰로오스	-	-	5.0	그램	-	-
-	컨디셔닝 제	디메칠콘	-	-	2.0	그램	-	-
-	컨디셔닝 제	프로필렌글라 이콜	-	-	5.0	그램	-	-
-	pH조절 제	트리에탄올아 민	-	-	0.1	그램	-	-
-	착향제	조합향료	-	-	0.3	그램	-	-
-	보존제	메칠클로로이 소치아졸리논/ 메칠이소치아 졸리논 혼합액	-	-	0.05	그램	-	-
-	용제	정제수	-	-	적량	그램	-	-
-	킬레이트 화제	테트라소듐 이디티에이	-	-	0.1	그램	-	-

○ 헤솔 바이탈 헤어 트리트먼트의 제조방법은 다음과 같다.

표 19. 헤솔바이탈헤어 트리트먼트 제조방법

공정번호	공정명칭	원료	비고
1	원료칭량	살리실산 D-판테놀 아연피리치온액 미강추출물 알킬트리메틸암모늄염화물 세테아릴알코올 세틸알코올 히드록시에틸셀룰로오스 디메칠콘 프로필렌글라이콜 트리에탄올아민 조합향료(TOP 264) 메칠클로로이소치아졸리논/메칠이소치아졸리논 혼합액 정제수 테트라소듐 이디티에이	
2	혼합/교반	살리실산 D-판테놀 아연피리치온액 미강추출물 알킬트리메틸암모늄염화물 세테아릴알코올 세틸알코올 히드록시에틸셀룰로오스 디메칠콘 프로필렌글라이콜 트리에탄올아민 조합향료(TOP 264) 메칠클로로이소치아졸리논/메칠이소치아졸리논 혼합액 정제수 테트라소듐 이디티에이	수상과 알콜상을 60℃까지 가온. 완전용해된 상태에서 두상을 혼합한다.
3	충전	공정2의 반제품	
4	포장	공정3의 반제품	

(3) 헤솔바이탈헤어 토닉

- 실리실산, 텍스판테놀, L-멘톨을 주성분으로 하는 콜마의 의약품 토닉에 미강추출물을 보조성분으로 첨가하여 식약처에 의약품 별규신청을 하였으며 표 20. 은 의약품 트리트먼트에 사용된 원료약품 및 분량을 나타내고 있다.

표 20. 헤솔바이탈헤어 토닉 원료약품 및 그 분량

세부구성	배합목적	원료명	활성물질 용량	규격	분량	단위	제조원	DMF
-	주성분	살리실산	-	KP	0.25	그램	JUNSEICHEM ICALCO.LTD.	-
-	주성분	텍스판테놀	-	USP	0.2	그램	DSM	-
-	주성분	L-멘톨	-	KP	0.3	그램	ARCH	-
-	컨셉	미강추출물	-	별규	0.001	그램	에코마인	-
-	계면활성제	피이지-40하이 드로제네이티드 캐스터오일	-	KQC	0.1	그램	-	-
-	pH조절제	시트르산나트륨	-	KQC	적량	그램	-	-
-	컨셉	단오수	-	별규	1.0	그램	-	-
-	용제	에탄올	-	KQC	40.0	그램	-	-
-	용제	정제수	-	KQC	적량	그램	-	-

표 21. 헤솔바이탈헤어 토닉 제조방법




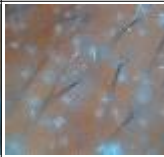












공정번호	공정명칭	원료	비고
1	원료칭량	살리실산 텍스판테놀 L-멘톨 미강추출물 피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일 시트르산나트륨 단오수 에탄올 정제수	
2	혼합/교반	살리실산 텍스판테놀 L-멘톨 미강추출물 피이지-40하이드로제네이티드캐스터오일 시트르산나트륨 단오수 에탄올 정제수	오일상을 가용화시킨후 에탄올에 완전용해 시킨다. 수상과 오일상을 완전 혼합한다.
3	충전	공정2의 반제품	
4	포장	공정3의 반제품	

















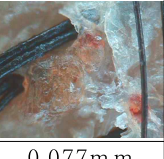
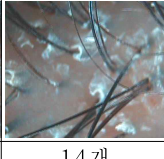


다. 간이임상실험


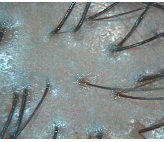






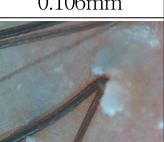
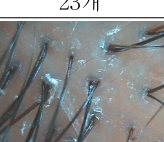
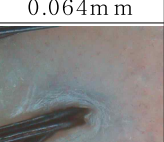


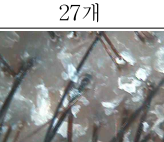
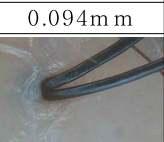



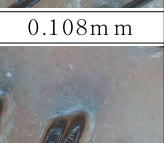
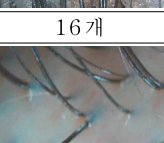
- 본 연구는 문제성 두피에서의 시제품으로 생산한 초임계 미강추출물을 함유한 에센스의 효능을 확인하기 위해 시험을 수행하였다.
- 간이임상은 자사 클리닉센터인 H 두피관리센터 각 지점에서 실시하였다. 총 50명의 간이임상피험자를 선정하여 4개월간 임상시험을 진행하였으며 두피 및 모발 상태를 월 1회 측정하였다.
- 실험방법은 각자 나누어준 시작품을 저녁에 자기 전 샴푸하고 모발을 완전 건조 후 에센스를 적량 덜어 두피 및 모발에 도포하도록 권고하였다.
- 임상시험 호전효과는 1배 사진을 찍어 탈모의 유형과 진행상황을 판단하고 100배 사진을 찍어 탈모의 원인과 두피건강을 분석, 판단하는 근거로 삼았다. 100배 사진은 아람휴비스사의 ARAMO-SG를 사용하여 촬영 하였다.


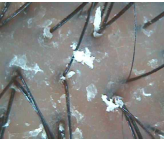



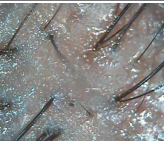



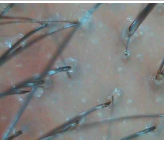





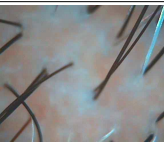




표 22. 에코마인 라이스브렌 에센스 간이임상 결과


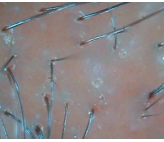

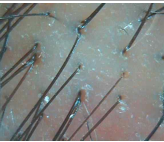



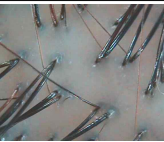

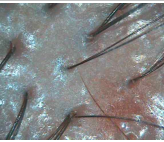





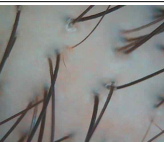




성명		모발굵기 (x200)	메밀도 (x60)	피지	수분	비듬, 각질	홍반, 염증	총평
권 ○ ○	사용 전			3	3	1	3	남성탈모 지성타입 모발가늘고 빈모공많음 가려움없음
		0.042mm	10개					
김 ○ ○	사용 후			2	2	2	3	앞쪽 신생모 많이 올라옴 모발힘생김 제품도포후항상 가려움있음
		0.055mm	17개					
김 ○ ○	사용 전			4	3	3	4	여성탈모 지성 두피붉고, 예민 가려움없음 모발가늘고, 힘없음
		0.038mm	14개					
김 ○ ○	사용 후			3	3	2	3	마지막달에 스트레스많이받음 신생모자라나있음 홍반은 변화없음
		0.073mm	21개					

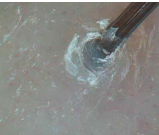
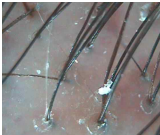


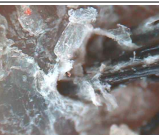
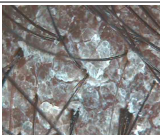

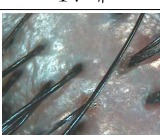





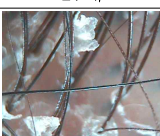

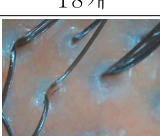
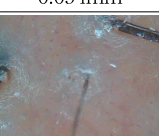
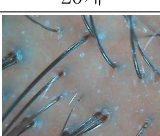
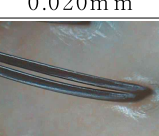
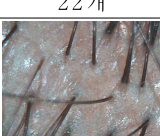
김 ○○○	사용전			4	3	2	5	남성탈모 전체적으로 모발가늘고약함
		0.025mm	8개					
김 ○○○	사용후			3	3	1	3	더워서 땀이많은상태에서 촬영 두피붉으니 신생모는조금씩올라옴
		0.038mm	16개					
김 ○○○	사용전			2	2	2	4	여성-2 염증 비듬두피 모발가늘고 힘없음, 가려움
		0.044mm	13개					
김 ○○○	사용후			2	2	1	3	건조증상완화됨 모발힘생김 모발곱어짐
		0.071mm	20개					
문 ○○○	사용전			4	3	5	5	남성탈모0-2 비듬각질 많음, 모발가늘고 두피붉음
		0.050mm	14개					
문 ○○○	사용후			3	2	2	3	신생모보이심 붉음증은 크게 변화없음
		0.070mm	21개					
박 ○○○	사용전			4	3	4	4	남성탈모0-1 비듬, 모발가늘고힘없음
		0.057mm	11개					
박 ○○○	사용후			3	3	1	2	비듬각질거의완화 잔모도 많이 올라와 힘이 생김
		0.070mm	21개					





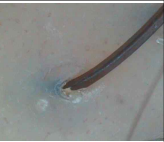
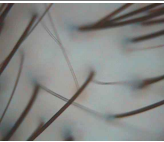

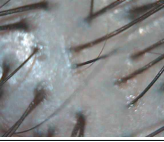

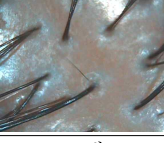



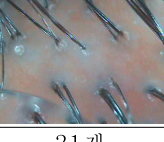
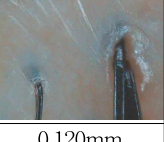
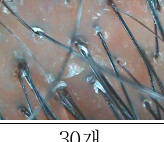
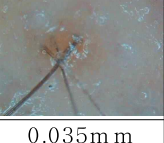
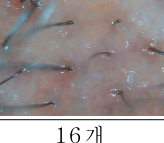
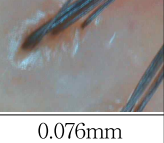

서 ○ ○	사용 전			3	3	3	4	남성탈모 0-3 정수리모발가늘고 빈모공 많음 가려움없음, 비듬 각질보임
		0.038m m	12개					
사용 후			3	2	3	3	마지막달사용잘못했다하심 정수리신생모는조금보이나약함 각질완화	
		0.055m m	17개					
이 ○ ○	사용 전			4	2	2	4	남성탈모 모발가늘고 약함 가려움없음
		0.031m m	9개					
사용 후			2	2	1	3	작은 연모가 굵어짐 본인은 잘모르겠다하심 비듬각질은 거의 완화	
		0.062m m	12개					
이 ○ ○	사용 전			3	2	5	5	여성탈모 비듬각질많음 두피붉음
		0.065m m	10개					
사용 후			2	2	1	3	비듬각질 거의 완화됨 모발도 조금 굵어진 느낌	
		0.081m m	16개					
표 ○ ○	사용 전			2	2	4	3	남성탈모 두피붉고 예민 비듬각질
		0.045m m	16개					
사용 후			2	3	1	2	비듬각질거의감소 가려움없음 모발힘생김	
		0.066m m	25개					
이 ○ ○	사용 전			4	2	5	3	부분적으로 모발이 가늘고 얇음. 비듬, 염증, 가려움증 심함
		0.077m m	14개					
사용 후			2	4	2	1	신생모 굵고 힘있음 수분감이 높아짐	
		0.105m m	19개					


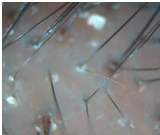



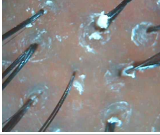



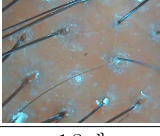


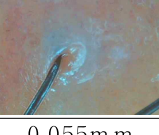
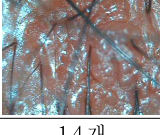


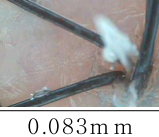
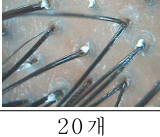


김 ○○	사용 전			3	3	2	3	모발이 가늘고 얇음. 피지분비량과 두피열이 많으편이심.
		0.072m m	19개					
김 ○○	사용 후			2	4	1	2	모발의 밀도가 좋아졌고 신생모가 굵게 올라옴
		0.102mm	22개					
김 ○○	사용 전			4	2	3	5	정수리 부위 염증 심함. 가르마위주로 여성형 탈모진행
		0.083m m	16개					
김 ○○	사용 후			2	4	1	3	홍반이 조금 완화되었고 모발이 전체적으로 힘이 있음.
		0.106mm	23개					
정 ○○	사용 전			4	3	3	4	피지, 각질이 많고 o자형 남성탈모진행
		0.064m m	22개					
정 ○○	사용 후			2	4	1	2	홍반완화
		0.87mm	27개					
배 ○○	사용 전			5	2	5	2	비듬, 각질 심하고 가려움증 심함
		0.094m m	18개					
배 ○○	사용 후			2	4	2	1	두피 수분감이 높아짐.
		0.116mm	22개					
문 ○○	사용 전			5	3	4	4	피지, 비듬, 염증보임 두피 따가움 호소
		0.108m m	16개					
문 ○○	사용 후			3	4	2	2	염증이 거의 가라앉음
		0.116mm	22개					




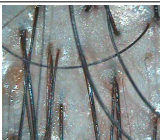

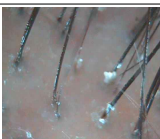

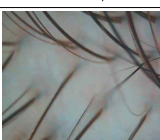




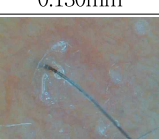
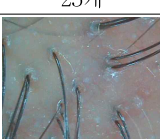
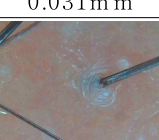
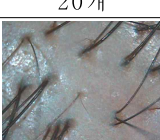




조 ○○○	사용 전			4	2	4	3	비듬, 각질 많고 가르마주변으로 모발이 가늘고 약함
		0.073m m	19개					
사용 후			2	4	1	2	수분감 증가함 비듬이 거의 사라짐	
		0.101mm	23개					
윤 ○○○	사용 전			4	3	3	5	열 많고 두피 전체적으로 붉고 민감한편. 피지분비량 많음
		0.042m m	17개					
사용 후			1	4	1	2	비듬, 각질이 거의 제거된 상태이며 신생모가 힘있게 올라옴	
		0.125mm	16개					
이 ○○○	사용 전			3	3	3	4	두피 중간중간 염증보이고 피지분비량 높은편
		0.070m m	20개					
사용 후			1	4	2	2	수분감이 높아졌고 홍반이 진정됨	
		0.119mm	24개					
김 ○○○	사용 전			3	3	2	3	피지분비량 약간 있고 모발이 가늘고 약함
		0.061m m	18개					
사용 후			2	5	1	2	모발이 굵고 힘이 생김.	
		0.101mm	30개					
정 ○○○	사용 전			5	2	5	2	비듬, 각질 많음
		0.079m m	18개					
사용 후			3	3	3	1	비듬이 거의 제거됨	
		0.087m m	26개					



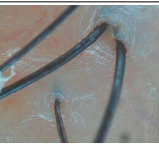







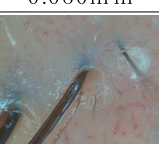
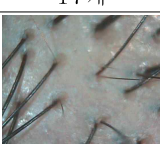

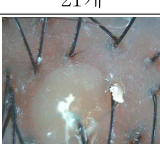
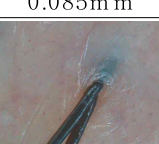
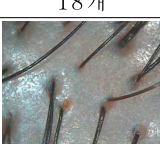
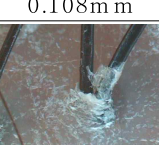
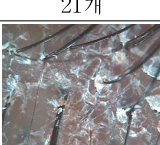
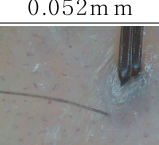

정 ○○	사용 전			3	2	2	3	건조하고 열감이 많음 모발 전체적으로 가늘고 약함
		0.054mm	22개					
사용 후			2	4	1	2	수분감이 높아짐	
		0.103mm	30개					
송 ○○	사용 전			3	2	5	3	각질 많음, 두피가 약간 건조함
		0.066mm	21개					
사용 후			1	5	1	2	수분감이 높음	
		0.113mm	31개					
박 ○○	사용 전			5	2	4	5	피지분비량 많고 모세혈관이 확장되어져있음
		0.104mm	17개					
사용 후			2	3	2	3	홍반완화, 피지분비량 줄어듦	
		0.098mm	20개					
백 ○○	사용 전			3	2	3	3	각질 약간있음
		0.074mm	26개					
사용 후			1	4	1	1	홍반완화	
		0.075mm	28개					
정 ○○	사용 전			3	2	4	3	각질 많이 보임
		0.090mm	18개					
사용 후			1	4	2	2	홍반완화	
		0.105mm	19개					

김 ○○	사용 전			3	2	2	3	모발이 가늘고 약함, 홍반보임
		0.076m m	12개					
김 ○○	사용 후			2	3	1	2	신생모 굵고 힘이 생김, 홍반완화
		0.097m m	15개					
남 ○○	사용 전			1	1	5	5	건선두피, 가려움증 심함, 비듬, 각질 많이 보임
		0.082m m	17개					
남 ○○	사용 후			2	3	2	3	수분감 증가함, 홍반완화
		0.136mm	19개					
김 ○○	사용 전			5	2	5	3	비듬, 피지분비량 많음
		0.073m m	18개					
김 ○○	사용 후			2	4	2	2	홍반완화, 수분감 증가
		0.089mm	17개					
신 ○○	사용 전			4	2	5	5	피지, 비듬, 각질, 홍반 많이 보이심 모발 부분적으로 가늘어져있음
		0.052m m	18개					
신 ○○	사용 후			2	4	2	3	피지량 약간 있고 비듬, 홍반이 사라짐. 모발이 굵고 힘이 생김
		0.094mm	20개					
박 ○○	사용 전			4	3	3	4	가르마위주로 탈모진행 모발 가늘고 얇음. 홍반, 피지가 많은 편임
		0.020m m	22개					
박 ○○	사용 후			2	5	1	2	전체적으로 모발에 힘이 생김. 홍반, 각질, 피지량 많이 줄어듬
		0.082mm	29개					

권 ○○	사용 전			5	2	5	5	비듬, 각질 많은 편 두피 전체적으로 붉고 민감함. 부분적으로 모발이 가늘고 약함
		0.067m m	15개					
사용 후			3	4	3	3	신생모가 굵고 힘이 생김. 피지, 수분감, 각질상태 좋아짐	
		0.101mm	20개					
김 ○○	사용 전			3	2	3	3	모발이 가늘고 약함
		0.062m m	16개					
사용 후			2	3	2	1	모발이 굵고 힘이 생김 수분감이 높아짐	
		0.139mm	24개					
송 ○○	사용 전			5	3	3	4	열, 피지분비량 많으신편 가르마 부위 모발 약함
		0.057m m	21개					
사용 후			4	4	2	3	가르마 부위 모발 약간 힘이 생김. 피지, 홍반 완화됨	
		0.072m m	25개					
김 ○○	사용 전			3	2	3	3	두피전체 홍반이 보이고 모발이 가늘고 약함
		0.031m m	21개					
사용 후			1	3	2	2	피지가 많이 줄고 홍반이 약간 진정됨 수분감이 높아짐	
		0.120mm	30개					
김 ○○	사용 전			4	2	3	4	피지분비량이 아주 많은편. 홍반보임. 모발이 전체적으로 가늘고 약함
		0.035m m	16개					
사용 후			2	4	1	3	수분감이 높고 새롭게 자라나온 모발이 굵고 힘이 있음. 잔각질 없음	
		0.076mm	28개					

최 ○ ○	사용 전			4	3	4	3	피지분비량이 많고 모공주변이 많이 막혀있음. O자형 탈모 모발이 가늘고 약함
		0.035m m	15개					
사용 후			1	5	1	1	수분감이 증가하였고 피지, 각질이 거의 없음	
		0.786m m	27개					
김 ○ ○	사용 전			5	3	4	5	여성형탈모 가르마주변 모발이 가늘고 약함. 피지분비량과 홍반 심함
		0.077m m	16개					
사용 후			2	4	1	3	신생모가 굵고 힘이생김. 수분감이 높아짐	
		0.124mm	26개					
강 ○ ○	사용 전			5	3	4	4	가르마주위로 모발이 가늘고 약함. 모공 주변 산화된 노폐물 많음
		0.067m m	18개					
사용 후			3	3	3	3	홍반이 약간 줄어들음	
		0.094m m	17개					
이 ○ ○	사용 전			5	2	3	5	아주 붉고 민감한 두피 피지분비량이 많고 모발이 가늘고 약함
		0.055m m	14개					
사용 후			3	4	2	3	수분감이 높고 민감한 두피가 진정됨. 신생모 힘있고 굵게 올라옴	
		0.102mm	20개					
조 ○ ○	사용 전			4	3	3	4	산화된 피지, 노폐물들이 모공주변으로 보임 붉음증 전체적으로 보임
		0.083m m	20개					
사용 후			2	5	2	2	붉음증이 가라 앉고 수분감이 증가하였음	
		0.127mm	24개					

김 ○ ○	사용 전			4	2	3	4	두피 전체 붉고 민감함 모발이 가늘고 힘이 약함
		0.088m m	17개					
	사용 후			2	4	2	3	피지분비량이 줄었고 수분감이 늘었음. 새로운 신생모가 굵고 힘있게 올라옴
		0.118mm	24개					
오 ○ ○	사용 전			4	3	3	4	가르마 주변으로 모발이 가늘고 약함. 피지분비량, 두피 열감이 높은편
		0.061 m m	15개					
	사용 후			2	4	2	2	신생모가 굵고 힘이 생김
		0.103mm	20개					
김 ○ ○	사용 전			2	2	3	3	건조하고 마른비듬이 두피 전체적으로 보임 각질층이 두꺼움
		0.088m m	19개					
	사용 후			2	4	2	2	모발이 굵고 힘이 생김
		0.130mm	25개					
김 ○ ○	사용 전			4	3	3	4	모발이 전체적으로 가늘고 얇음. 피지분비량과 두피열이 많은편
		0.031 m m	20개					
	사용 후			3	4	2	3	신생모가 굵고 힘있게 올라옴.
		0.084mm	25개					
이 ○ ○	사용 전			3	2	2	3	모발이 전체적으로 가늘고 얇음. 피지분비량이 많은편
		0.088m m	19개					
	사용 후			2	3	2	2	피지분비량이 줄어들고 수분감이 증가함 새로운 모발이 굵고 힘이 생김
		0.126 m m	24개					

김 ○○	사용전			3	2	4	3	각질많이 보임 모발이 전체적으로 가늘고 얇음
		0.061m m	19개					
사용후			2	4	1	1	수분감이 증가함	
		0.094mm	28개					
문 ○○	사용전			4	2	4	3	가르마위주로 모발이 가늘로 약해져있는 상태. 피지분비량 많음
		0.077m m	16개					
사용후			2	4	2	2	수분감이 높아지고 피지분비량이 줄어듬. 모발에 힘이 생김	
		0.103m m	18개					
이 ○○	사용전			4	2	3	4	두피붉고 민감함 모발이 가늘고 약함 O자형탈모
		0.060m m	17개					
사용후			2	3	1	2	신생모가 힘있게 올라옴. 홍반완화	
		0.099mm	21개					
김 ○○	사용전			4	2	3	4	피지분비량이 많고 두피 중간 중간 화농성 염증보임. 모발 가늘고 약함
		0.085m m	18개					
사용후			2	3	2	3	신생모 굵고 힘있게 올라옴. 피지, 염증, 홍반완화	
		0.108m m	21개					
이 ○○	사용전			1	1	5	5	건조함. 두피전체적으로 비듬으로 덮혀져 있음. 가려움증 심함
		0.052m m	18개					
사용후			2	3	2	2	수분감 높음, 홍반완화	
		0.098m m	19개					





황 ○ ○	사용 전			4	2	5	4	지루성두피, 염증, 비듬, 가려움증 심함
		0.052mm	18개					
	사용 후			2	4	3	3	피지, 비듬, 홍반 완화
		0.098mm	19개					

표 23. 피지, 수분, 비듬·각질, 홍반·염증 상태

기준	1	2	3	4	5
상태	없음	조금 있음	보통	많이 있음	아주 많음

- 간이임상실험결과 모발굵기는 사용 전 평균 0.063mm에서 사용 후 0.112mm로 약 0.049mm로 사용전과 비교하여 70% 굵어졌으며, 메밀도는 사용 전 평균 16.7개에서 사용 후 22.3개로 약 5.66개로 33% 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 두피상태지수 중 피지는 3.72에서 2.12, 수분은 2.38에서 3.58, 비듬은 3.42에서 1.64, 홍반은 3.76에서 2.28로 개선된 것을 확인할 수 있었다.

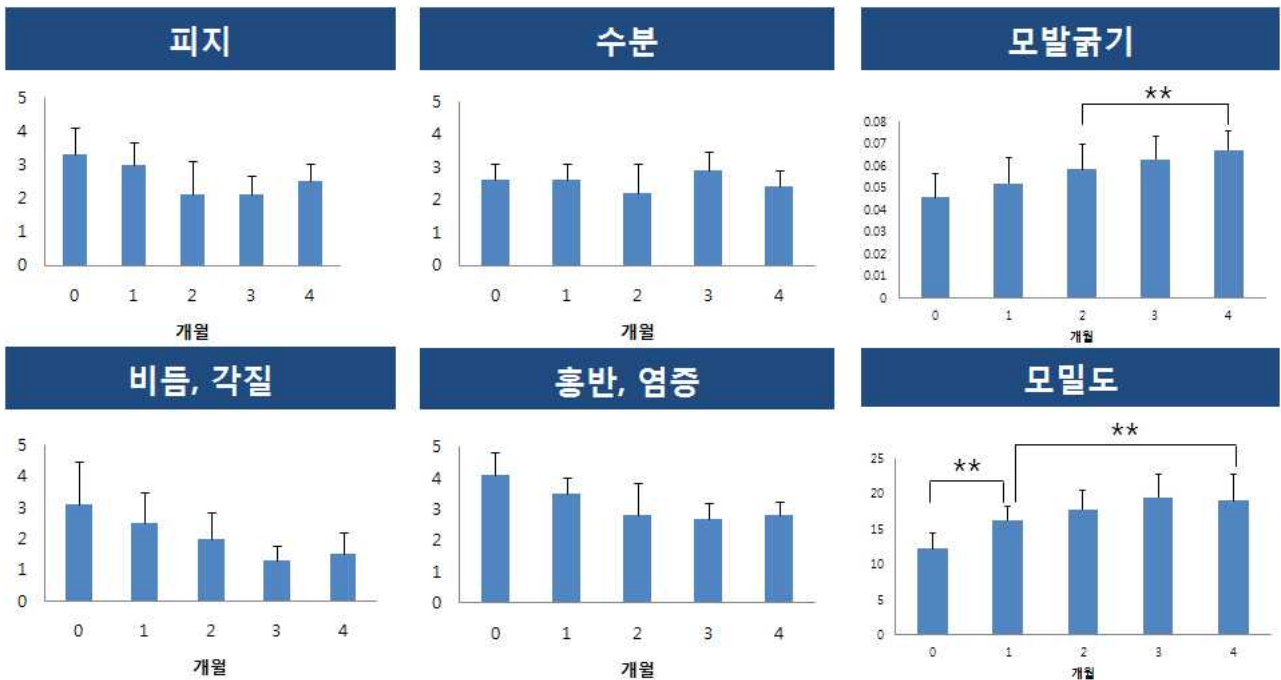


그림 21. 간이임상결과

3. 마케팅 인프라 구축 및 확보

가. 시작품의 브랜드 스토리 구축

(1) 브랜드 스토리 구축 방향

- 브랜드 리뉴얼 개발을 통한 제품의 이미지 제고 및 차별화된 인지도 확립을 목적으로 하고 향토 유망 신기술 보유기업의 브랜드 강화와 지역경제 활성화를 도모하며 국내 기업의 상품이 해외 시장 진입이 용이하도록 전략의 기반 지원을 한다.
 - 전체적 방향: 친환경, 에코, 자연친화적 (성별에 초점을 두지 말자)
 - 소재의 방향: 천연허브, 친환경, 자연소재물질
 - 시장성: 국내 외 동질성 (국내, 해외에서 공통적으로 느낄 수 있도록)
 - 국내시장
 - 국내시장의 포화 상태 속에서의 차별성을 나타낼 수 있도록
 - 현재 시장은 20-30대의 여성을 타겟으로 대형 모델, 효능, 성분, 우아함 등의 컨셉으로 마케팅 하고 있음
- 본 사업의 제품은 현재 시장에서 치열하게 마케팅하고 있는 주제와 차이점이 있으므로 소재, 과학적 근거 등 생각하지 못한 창의력으로 다가가야 할 필요성이 있을 것으로 판단된다. 또한 대기업에서 지금 판매하는 상품과는 차별성을 부각시켜 한층 업그레이드되고 제품의 가치를 높일 수 있도록 천연소재 이용 마케팅과 과학적인 기술력을 발휘한 기업 등의 이미지로 나가는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

(2) 브랜드 제작 계획

- 가독성과 소비자의 인지도를 형성시킬 수 있는 브랜드를 설정
- 국내 뿐 아니라 해외 시장에서 공히 적용 가능한 방안을 수립
- 감각적이고 간결한 디자인으로 제품의 친환경, 고품질, 고효능 이미지를 형성
- 제품 이미지를 각인시킬 브랜드 로고의 개발
- 제품 용기와 다양한 프로모션에 적용 시 활용 가능 여부를 고려한 디자인의 개발

(3) 시제품의 용기 디자인

- 본 사업과 관련한 디자인은 에코, 친환경의 이미지를 연상시킬 수 있는 디자인을 목표로 하며, 본 사업과 적합한 디자인을 제작하기 위해 해외 브랜드를 대상으로 브랜드 디자인을 분석하여 용기 디자인을 개발하였다.
- 국가별, 용도별, 일반적 용기형태의 분포에 따라 기존의 사용자들에게 인식된 편안한 패키지의 분포현황을 파악하고 이를 바탕으로 사용자에게 익숙한 또는 혁신적 디자인의 제시에 대한 방향 설정이 가능한 자료로 구축한다.
- 제품과 타이포-그래픽 외 기타의 요소가 결합된 컬러 전반의 제품 컬러를 분석하고 이를 지침하여 본 사업으로 개발된 제품과 그래픽의 전체적인 컬러방향을 제시한다.
- 독일과 스웨덴의 용기를 분석한 결과 Cap형이 가장 많았으며 그림 25., 그림 26. 과 같은 컬러가 용기 디자인에 가장 많이 사용하는 색상이므로, 이 분석결과를 바탕으로 용기 형태와 컬러를 사용한다면 소비자에게 거부감 없이 쉽게 접근할 수 있도록 할 것으로 생각되므로 분석결과를 바탕으로 하는 용기 디자인을 하는 것이 바람직하다.



그림 22. 독일과 스웨덴의 용기 형태 분석

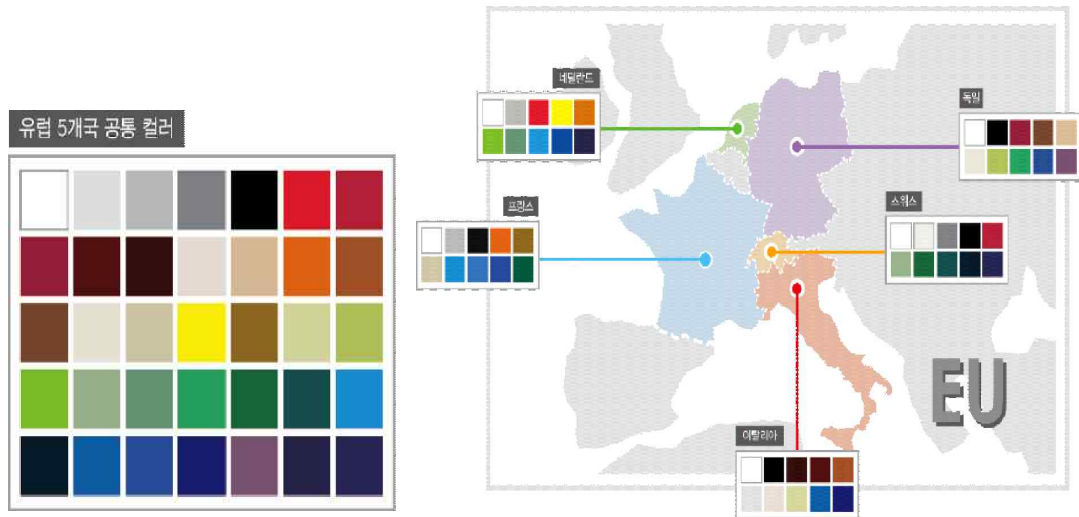


그림 23. 유럽 5개국의 제품 용기 컬러 분석



그림 24. 미강추출물 함유 라이스브랜 라인 디자인

나. 마케팅 인프라 구축 및 확보

(1) 해외화장품 미용 박람회 참가를 통해 해외 바이어 확보

○ 중국 상해 미용 박람회 참가

- 2014년 5월 7일부터 9일까지 중국상해 뉴엑스포센터에서 개최되었으며, 1997년 시작

해 올해로 19회째를 맞는 매년 20만명 이상의 관람객과 1000개 이상의 기업이 참가하는 아시아 최대 뷰티박람회다.

- 이번 박람회에서 브랜드 이미지를 각인시키고 중국 시장에서 인기를 얻고 있는 주요 제품과 본 연구과제를 통해 생산된 미강추출물의 효능 효과와, 시제품 에코마인 라이스브랜 에센스, 헤솔 바이탈 헤어 그로스 라인을 최초로 소개했다.



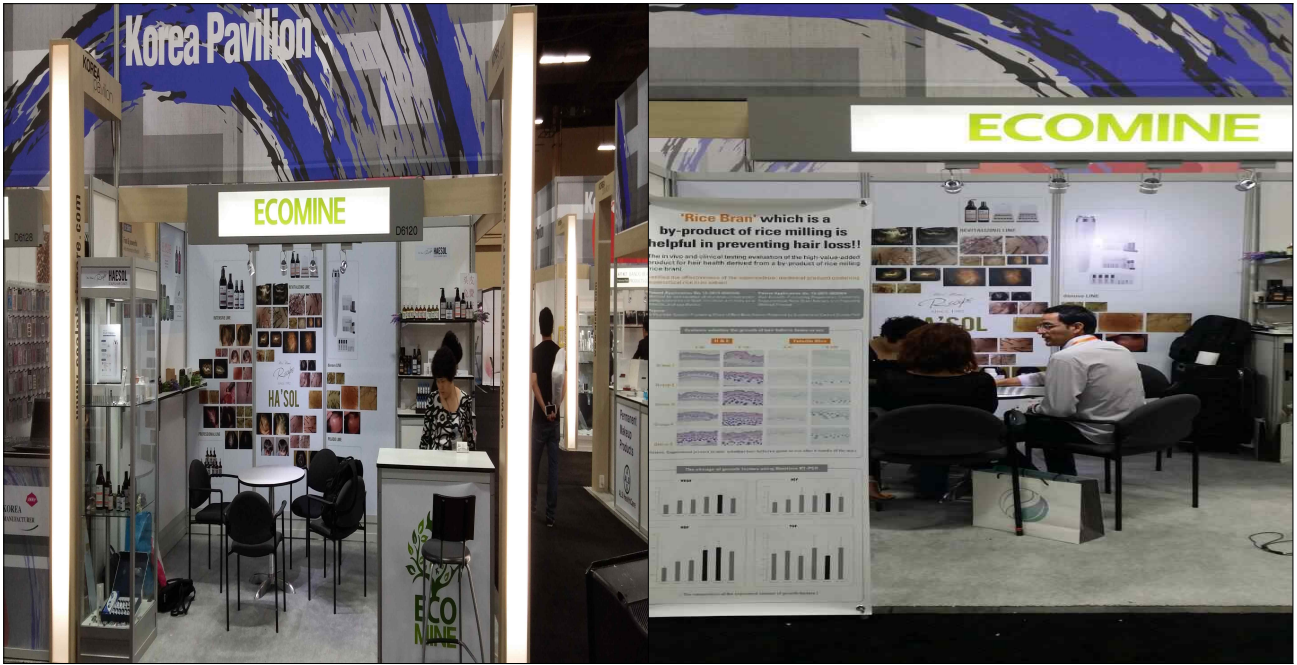
a) 에코마인 부스

b) Ricebran 효능 및 시제품 홍보

그림 25. 상해박람회 참가

○ 미국 라스베이거스 박람회

- Cosmoprof는 해마다 3회에 걸쳐 이탈리아 볼로냐, 아시아 홍콩, 북미 라스베이거스에서 개최되는 세계 최고 뷰티박람회이며, 전 세계 미용, 화장품, 헤어관련 주요 업체들이 다수 참가하는 행사이며, 올해로 10년째를 맞이하여 2014년 7월 13일부터 15일까지 미국 라스베이거스 만달레이 베이 컨벤션 센터에서 개최되었다, 38개 국가에서 미용관련업체 885개가 참가했으며 25만명 이상의 관람객이 참석한 아메리카 최대 뷰티박람회이다.



a) 에코마인 부스

b) Ricebran 효능 및 시제품 홍보

그림 26. 상해박람회 참가

- 미주 해외 바이어 확보

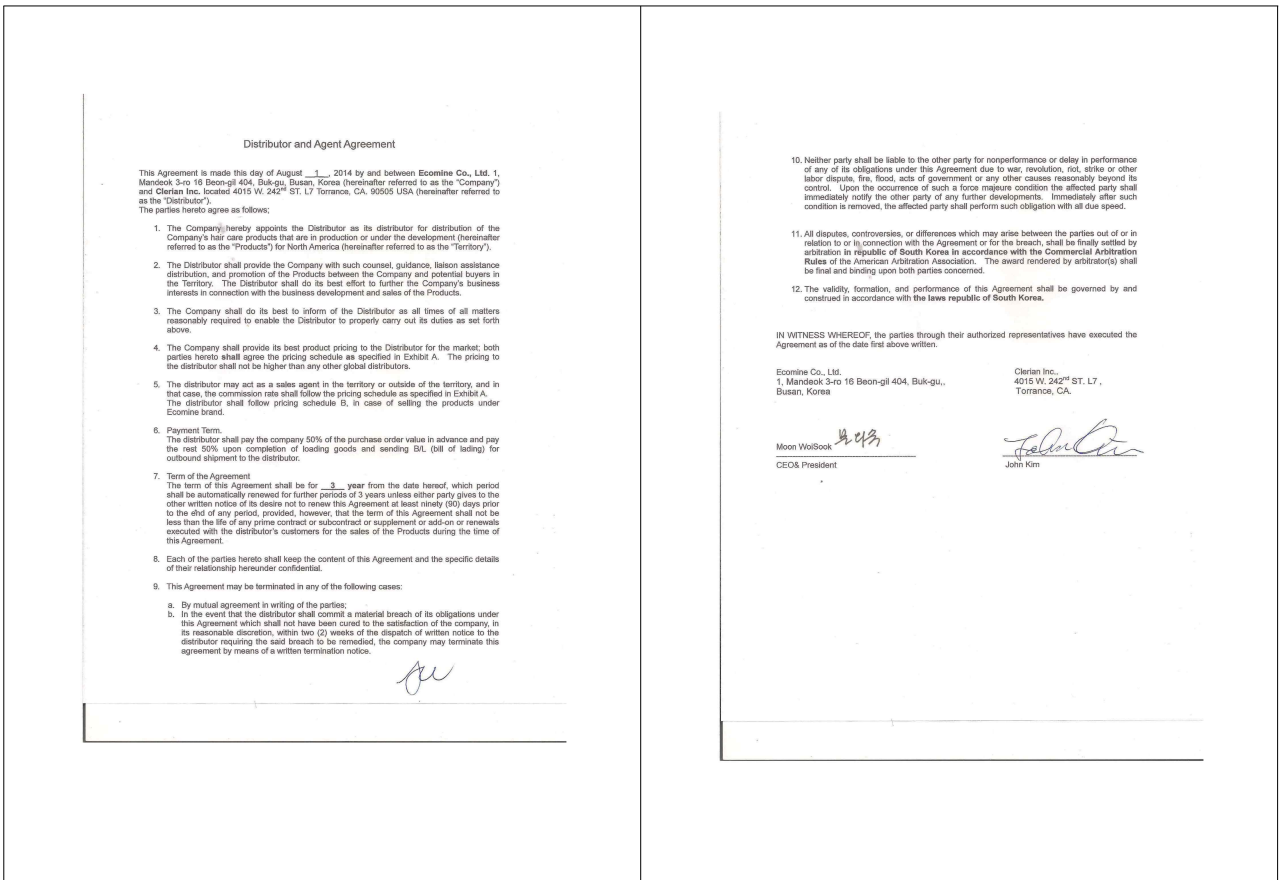


그림 27. Clerian Inc. 와 물품공급계약서

(2) 언론 홍보

- 본 연구를 통해 개발된 미강추출물의 효능효과 언론 보도

(가) 인터넷 신문사 한경닷컴BNT뉴스를 통해 2014년 4월 17일 게재

- 에코마인, 쌀 도정 부산물 '미강 추출물'로 탈모 방지

http://bntnews.hankyung.com/apps/news?popup=0&nkey=201404171123243&c1=03&c2=03&nid=03&mode=sub_view&mode=sub_view

(나) 인터넷 신문사 한경닷컴BNT뉴스를 통해 2014년 9월 12일 게재

- 에코마인, 탈모 관련 향장 소재 개발로 해외 바이어들 높은 호응

http://bntnews.hankyung.com/apps/news?popup=0&nkey=201409111818073&c1=03&c2=03&nid=03&mode=sub_view&mode=sub_view

에코마인, 쌀 도정 부산물 '미강 추출물'로 탈모 방지

[김진현 기자] 헤어케어 전문기업 에코마인이 쌀 도정 부산물인 '미강 추출물'이 탈모 방지에 도움이 된다는 사실을 논문을 통해 증명했다.

신라대학교 산학협력단의 생명산업기술개발사업인 '초임계 유체미립자 제형기술을 이용한 내 도정 부산물의 두발 건강용 고부가 가치 소재 개발'이라는 3차년도 과제를 수행하는 중에 밝혀낸 사실이다.

논문을 살펴보면 '쌀'의 도정 과정에서 발생하는 주요 부산물 '미강 추출물'이 탈모 방지에 효과적인 것으로 설명되고 있다. 미강은 쌀에 포함된 대부분의 영양성분을 함유, 항산화와 항암, 항고지혈증 등의 효과를 지니고 있는 것으로 보고되고 있다.

특히 미강 추출물의 주요 성분 중에서도 리놀레인산과 γ -오리자놀은 모낭의 형성을 유도하는데 탁월한 반응을 보였으며 이에 발모를 촉진하고 탈모를 치료하는데 사용 가능할 것으로 보인다.

이에 에코마인 대표는 "탈모는 조기 예방이 우선이며 이에 두피의 문제점을 보완하기 위해 미강 추출물이 함유된 제품을 개발할 예정이다"며 "앞으로 친환경 글로벌 제품을 개발하는데 더욱 중진할 것이며 국내는 물론 해외 시장도 장악하겠다"고 포부를 밝혔다. (사진제공: 에코마인)

bnt뉴스 기사제보 beauty@bntnews.co.kr

에코마인, 탈모 관련 향장 소재 개발로 해외 바이어들 높은 호응

[김보람 기자] 두피모발 전문 화장품 기업 에코마인의 탈모 예방 개선 향장 소재의 제품화로 '2014 5월 중국 상해 화장품 미용 박람회', '2014 7월 미국 라스베이거스 코스모프 오브 박람회'에서 미국과 중국 바이어들의 높은 호응을 얻었다.

미는 중립수산화물부 지원, 생명산업 기술 개발사업의 일환인 '초임계 유체 미립자 제형 기술을 이용한 내 도정 부산물의 두발 건강용 고부가가치 소재 개발'로 연구되었는데 이는 초임계 미강유를 함유하고 있어 더욱 주목받고 있다.

특히 중국 업체인 BINGO HAIR COSMETIC과 미국 업체 David Cook에서는 초임계 미강 오일 '갈마오리자놀' 성분이 탈모방지 및 양모에 효과적인 것에 큰 관심을 보이며 수출 계약을 체결하였다.

초임계 미강유의 탈모 예방 개선 효과는 주관기관 신라대학교 산학협력단과 참여기업인 에코마인이 3년에 걸쳐 밝힌 연구결과를 연구책임자인 신라대 바이오식품소재학과 김미영 교수의 연구진이 일본 약학회지에 발표했다.

발의 도정 과정에서 발생하는 주요 부산물인 미강은 쌀에 포함된 대부분의 영양성분을 함유하고 있으며 항산화와 항암, 항고지혈증 등의 효과를 지닌 것으로 알려졌다. 이 논문에 의하면 초임계 조건에서 추출된 미강 오일은 탈모 방지에 효과적이며 모낭의 형성을 유도하고 각종 성장 관련 사이토카인들의 발현에 탁월한 효과를 나타낸다고 한다.

참여기업인 에코마인 대표는 "탈모는 조기 예방이 우선이다. 이에 두피의 문제점을 보완하기 위한 초임계 미강 오일이 함유된 다양한 제품으로 빠른 시일 내에 출시할 것이다. 국내는 물론 해외 시장도 장악하겠다"라는 포부를 밝혔다. (사진제공: 에코마인)

bnt뉴스 기사제보 beauty@bntnews.co.kr

그림 28. 미강추출물 효능 언론사 보도 자료

(다) 기술이전 홍보 2014년 9월 16일 게재

- 본 연구과제를 통해 개발된 특허 출원한 “초임계 미강 추출물을 포함하는 발모 촉진제 및 그 제조방법” 기술을 신라대학교 산학협력단과 기술이전 협약을 2014년 9월 15일에 진행하였으며, 연구결과를 바탕으로 두발건강용 고부가 의약외품 및 두발화장품의 국내외 생산 및 판매를 예정하고 있으며, 이를 통한 발모 촉진제 산업 활성화에 큰 기여가 예상된다.

- CNB저널 <http://www.cnbnews.com/news/article.html?no=264874>
- 위클리오늘 <http://www.weeklytoday.com/news/articleView.html?idxno=26285>
- 아주경제 <http://www.weeklytoday.com/news/articleView.html?idxno=26285>
- 부산일보포토뉴스
<http://news20.busan.com/controller/newsController.jsp?newsId=20140917000200>



그림 29. 신라대학교 산학협력단과의 기술이전 언론사 보도 자료

(3) 온라인 마케팅 인프라 구축 및 확보

- 블로그, 카페, 페이스북, 트위터, 인스타그램, 카카오토리등을 활용한 SNS홍보.

표. 24 SNS 홍보 SITE

SNS	사이트
블로그	http://haesolscalp.com/
카페	http://cafe.naver.com/hesol365
페이스북	https://www.facebook.com/HaesolScalp
인스타그램	http://instagram.com/haesol365
트위터	https://twitter.com/haesolscalp
카카오토리	https://story.kakao.com/haesol365



a) 블로그



b) 카페



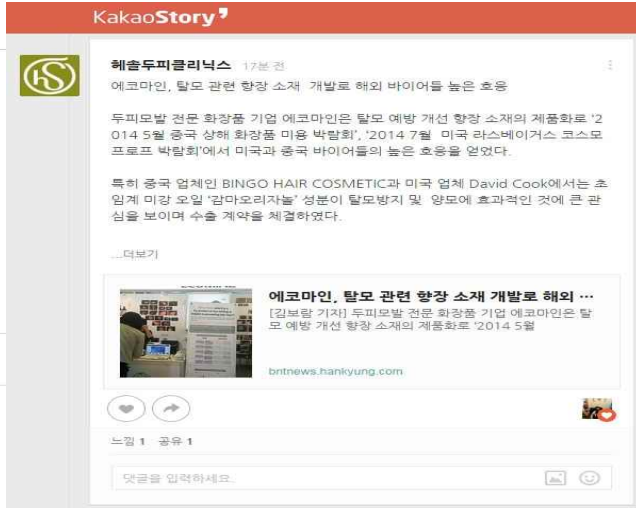
c) 페이스북



d) 트위터



e) 인스타그램



f) 카카오토리

그림 30. 미강추출물 효능 SNS 홍보 활동

(4) 오프라인 마케팅 인프라 구축 및 확보

- LG생활건강 “보떼”, 코리아나 전국 대리점에 샵인샵 입점
- 현재 부산, 경남, 대구, 경북 지역 50개 판매점에 입점
- 2014년 12월 말 서울, 경기, 강원, 제주, 전북 지역 20개 대리점에 500여개 판매점 입점 예상



a) LG생활건강 “보떼”

b) 코리아나

그림 31. 오프라인 마케팅 인프라 구축

라. 국내외 시장 분석

- 두피 탈모 시장은 1조억원이 넘는 시장을 형성하고 있으며 최근에 들어서는 세계적으로 안티에이징에 대한 관심이 높아지면서 두피모발 산업 또한 안티에이징 산업으로 급부상하여 시장이 확대되면서 잠재적 성장 아이템으로 주목받고 있다.
- 두피모발의 노화를 반영하는 건조함과 탄력저하, 퇴색, 가늘어짐 등의 증세를 호소하는 이들은 늘어나고 있으며 현대 사회 속에서 환경적인 문제, 스트레스 등으로 노화 속도는 더욱 빨라지고 있다. 안티에이징 두피 모발 시장은 두피, 모발업계의 신성장 동력, 블루오션으로 평가받고 있다
- 본연구를 통해 개발된 미강추출물을 함유한 두피제품이 두피탈모시장에 진입하기 위해 현재 국내외 판매되고 있는 제품들을 분석하였다.
- 두피탈모에 효능이 있는 감마오리자놀을 함유한 화장품은 이미 많은 제품들이 시판되어 있지만, 의약외품으로 현재 제품화가 되어있지 않다. 감마오리자놀을 함유한 미강추출물인 에코마인 라이스브랜 에센스는 의약외품으로 두피탈모시장에서 큰 각광을 받을 것으로 기대된다.

표 25. 국내 시판중인 감마오리자놀 함유 화장품

국내/해외	제품군	브랜드	제품명	특징
국내		디어스	슈보 시즌 모이스춰 클렌저 샴푸, 컨디셔너	감마오리자놀과 판테놀(프로비타민 B5) 성분 천연 식물(상백피, 구절초) 추출물
국내		디어스 슈보	L.P.P 트리트먼트	감마오리자놀, 판테놀 성분
국내		CJ LION	라이스데이 비누	감마오리자놀
국내		로하스홈	미&고운 모자 샴푸	감마오리자놀, 비타민B, 아민산 성분 '탈모 및 발모촉진을 위한 조성물 특허 출원'
국내		CJ LION	라이스데이 쌀 샴푸, 쌀 린스	감마 오리자놀, 마치현 추출물 손상모발용

표 26. 국내 시판중인 리놀릭산 함유 화장품

국내/해외	제품군	브랜드	제품명	특징
국내		소망	엠세라드 인텐시브 헤어팩	리놀산과 리놀릭산, 토코페놀
국내		소망	엠세라드 헤어 매니큐어	리놀산, 리놀릭산, 토코페롤
해외		DR-WOLFF	리놀라 샴푸	건성두피용 샴푸 젯산 나트륨, 소듐미레스실페이트, 서뮴코코암포아세테이트 , 글리세린, 데실글루코사이드, 판테놀

표 27. 국내 시판중인 쌀겨추출물 함유 화장품


국내/해외	제품군	브랜드	제품명	특징
국내		한국화장품	이지모 샴푸	쌀겨추출물, 검정콩추출물, EGF

표 28. 국내 시판중인 의약외품 트리트먼트

국내/해외	제품군	브랜드	제품명	특징
국내		네이처리퍼블릭	자연의 올리브 하이드로 헤어팩	살리실산, D-판테놀, 피리티온아연액, 플라워 콤플렉스
국내		더페이스샵	명한미인도 천삼진액 보양 트리트먼트 액	텍스판테놀, 니코틴산아미드, 살리실산
국내		아모레퍼시픽	려 약령원 두피 모발팩 크림	백자인, 홍삼, 송엽, 녹차, 동백오일, 창포
국내		두리화장품	땡기머리 해운모 트리트먼트	아연피리치온액, 실리실산, 텍스판테놀, 쌀겨발효추출물

표 29. 국내 시판중인 의약외품 샴푸

국내/해외	제품군	브랜드	제품명	주성분
국내		테라피션	테라피션 녹모수 샴푸	판테놀, 비오틴, 아연피리치온, 니코틴산아미드
국내		두리화장품	댕기머리 진윤 샴푸	구절초, 인삼, 지황추출물, 측백나무잎, 쑥추출물, 주엽나무열매추출물, 상백피추출물, 한련초, 천궁추출물, 창포수
국내		더페이스샵	명한미인도 친삼진액 보양 샴푸액	아연피리치온액, 텍스판테놀, 니코틴산아미드, 비오틴
국내		프로막실	버전엑스 헤어로스 샴푸	살리실산, 아연피리치온액, D-판테놀, 박하추출물, 검정콩추출물
국내		노타모	노타모 5.5 엠코매드 스피드 부스터 샴푸	아연피리치온액, 니코틴산아미드, 비오틴, 판테놀
국내		나실패밀리	진생화 헤어 샴푸	니코틴아미드, 비오틴, 텍스판테놀, 아연피리치온액, 상백피추출물, 의이인추출물
국내		유씨엘	엠 헤어로스 샴푸	니코틴산아미드, 텍스판테놀, 비오틴, 징크피리치온, 아르간트리케넬오일, 강황추출물, 카렌둘라추출물
국내		금성티케이	에르온 힐링액 샴푸	살리실산, 텍스판테놀, 아연피리치온액, 갈근추출물, 소나무잎추출물, 애엽추출물, 천궁추출물

표 30. 국내 시판중인 의약외품 토닉

국내/해외	제품군	브랜드	제품명	특징
국내		테라피션	테라피션 헤어 토닉	판테놀, 비오틴, 니코틴산아미드, 녹용추출물, 해초추출물, 약쑥추출물
국내		아모레퍼시픽	이니스프리 그린 진생 스칼프 토닉	L-멘톨, 살리실산, D-판테놀, 제주돌외추출물
국내		한독화장품	스펠라 707액	초산토코페롤, 살리실산, 니코틴산아미드, 도인추출물, 당귀추출물, 홍화추출물
국내		한독화장품	모생모 토닉	비오틴, 니코틴산아미드, D-판테놀, 아연피리치온액, 초산토코페롤, 인삼추출물, 도인유추출물
국내		에버미라클	이엠 미생모 토닉	EM 허브추출물, L-멘톨, 비오틴, 텍스판테놀, 한련초·석류·홍삼·당귀 등 혼합추출물
국내		나실패밀리	진생화 헤어 토닉	살리실산, 토코페롤아세테이트, 니코틴산아미드
해외		리바이보젠	리바이보젠 스칼프 테라피	토코페롤아세테이트, 포도씨추출물, 사발팜열매추출물, 리놀레익애씨드

마. 타사 제품에 대한 경제적 가치 및 경쟁력 분석

- 현재, 300,000가지의 양모관련 제품이 쏟아지고 있으나 실제 FDA나 식약처 허가를 통한 인증 제품은 거의 없는 실정이다. 현재까지 다른 천연물 추출물을 이용한 양모용 의약외품으로 인증받은 제품은 다음과 같이 2개의 회사에서 3개의 추출물에 국한되어 있다. (표 31)
- 또한 의약외품으로 인증받고 있는 많은 제품 (표 28, 29, 30)은 실제 의약외품의 고시성분을 사용한 경우에 불과하여 양모 효과를 나타내는 천연물 추출물은 거의 드문 상황이다. (표 32)
- 두피 건강 및 양모효과를 가지는 미강 추출물과 그 유효성분인 리놀레산과 감마

오리자놀에 대한 연구는 이미 일본 약학회지에 발표되었으며, 그 효과를 강조하기 위해 식약처 허가를 득할 수 있을 것으로 예상된다.

- 따라서 본 연구결과 미강 초임계 추출물은 다른 천연물 추출물 유래 발모제에 비해 뛰어나 경쟁력을 가지고 있으며, 그 경제적 가치는 매우 뛰어나다고 할 수 있다.

표 31. 식약처 인증 의약외품 및 주성분

업체	제품	신물질 주성분
(주)제이더블유바이오	JW12	곤포, 헤대, 니코틴아미드, 살리실산
(주)아모레퍼시픽	1.려자양울모삼푸액(오) 2.려초의방삼푸액 등	황금연조엑스, 텍스판테놀, 감초엑스, 피리티온아연 액
	1.려화윤생두피모발렉크림 2.려자양울모두피모발렉(디) 3.려초의방두피모발렉 등	백자연추출물, 니코틴아마이드, 텍스판테놀, 피리티온아연 액

표 32. 식약처 인증 고시 성분을 이용하요 개발된 의약외품

주성분	제품명	업체	
L-멘톨, 살리실산, 텍스판테놀	골드심명수	(주)심명제약	
	1.디케이고투폴라진액 2.짙은머리토닉액	(주)디케이코스메틱	
	1.땀기머리스칼토닉액 2.땀기머리한울림두피케어토닉	두리화장품(주)	
	1.모생모에스헤어토닉 2.모생모에스샴푸	한독화장품(주)	
	1. 세라메디스칼프비토닉 2. 헤어올릭헤어케어엔루트볼륨토닉	메디치코리아코스메틱	
	1.헤어폴진액 2.시크릿키뉴소페스트헤어부스터액	(주)우신화장품	
	살리실산, 니코틴산아미드, 초산토코페롤	1. 동의모액 2. 노아에프액	(주)서울화장품
		까뽀리데볼리헤어액	(주)엠코스메틱
		모생모헤어토닉	한독화장품(주)
		모리가릭에센스액	(주)충근당
아연피리치온액, 니코틴산아미드, 비오틴, 텍스판테놀	1.디케이고투폴라진샴푸액 2.짙은머리샴푸액	(주)디케이코스메틱	
	까뽀리데볼리헤어액	(주)엠코스메틱	
	1.모생모샴푸 2.해피모샴푸	한독화장품(주)	
	1.세카모린샴푸 2.유허미인샴푸	(주)피코바이오	
	모리가릭샴푸액	(주)충근당	
	1. 세라메디스칼프비액 2. 페루아나포스파스칼프샴푸액	메디치코리아코스메틱	

4. 국내외 공인 인증 신청

가. 미강추출물 국제화장품 원료규격집 ICID 등록

- ICID등록은 화장품 수출입 및 인증 대행업체인 코스메틱컨설팅을 통해 진행 하였으며, ICID등록을 위해 제출한 제안서 내용과 ICID등재 등록확정 통보서는 아래에 나타내었다.

Description for registering the ingredients on ICID (CTFA)

- 1. Definition:** RB-SCE is extracted from rice bran plant. It consists of Fatty acids, including γ -Orizanol, Linoleic acid and etc.
- 2. Chemical Class:** Vegetable
- 3. Chemical Structure :** N/A
- 4. Suggested INCI Name :** Oryza Sativa (Rice) Bran Oil
- 5. Composition Statement :** Oryza Sativa (Rice) Bran Oil 100%
- 6. Function:** Skin Conditioning Agent
- 7. Ingredient Source:** Vegetable based
- 8. Genus and species :** Rice
- 9. Type of Preparation :** Oil
- 10. Plant Part Used :** Rice bran
- 11. Solvent or Diluent :** Carbon dioxide (removed)
- 12. Empirical Formula :** N/A
- 13. Ingredient Category :** Botanicals
- 14. Manufacturing method:**

: SCE (Supercritical Extract) of rice bran was performed in a semi-continuous flow-type apparatus with a 3-L extractor. Carbon dioxide was pumped into the extractor using a positive displacement, controlled-volume metering pump. A flow rate of 135 g CO₂/min was used for extraction. Pressure in the extractor was controlled using a backpressure regulator. The extraction vessel was loosely packed with glass wool and 1 kg of rice bran was added and distributed throughout the packing.

A small plug of glass wool was then placed in the outlet end of the tube before closure to reduce entrainment. The extract was collected in a separator and chilled by evaporating the loaded solvent at ambient pressure. Extraction was performed at 32°C and 270bar for 240 min.
- 15. Trade Name:**
RB-SCE

August 12, 2014

Ki-Jung Kim
United States

RE: Application No. 2-06-2014-2287

Dear Ki-Jung Kim:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary *wINCI*, and the Council's *On-Line INFOBASE*. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.


It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis
Director, Cosmetic Chemistry
nikitakisj@personalcarecouncil.org
Enclosure

Page 2

August 12, 2014

Application No. 2-06-2014-2287

Submitted By:
Ki-Jung Kim
United States

Manufactured By:
ECOMINE Co., Ltd.
1, Mandok 3-ro 16 Beon-gil 404,
Buk-gu,
Busan., 616-829
Korea (South);

Trade Name:
RB-SCE

Assigned INCI Name:
Oryza Sativa (Rice) Bran Oil


그림 31. PCPC의 등록결정 Letter(B)

나. 식약처 의약외품 품목허가 신청

○ 식약처 의약외품 신청 제품

- 에코마인 라이스브랜 에센스(Ecomine Rice Bran ESSENCE)
- 3년간의 연구 자료를 토대로 미강추출물에 대한 원료성적서와 시제품 에코마인 라이스브랜 에센스의 자료를 취합하여 식약처에 의약외품 신청을 진행하였다.
- 한국콜마주식회사에서 전공정위탁생산으로 진행하였다.
- 제출서류는 다음과 같다.

의약외품 제조판매품목 허가신청서



○ 신청인

【제조소의 명칭】	(주)에코마인	【업허가번호】	의약외품-967(제1공강)
【제조소의 소재지】	(B16-B29)부산광역시 북구 만덕3로16번길 1 부산이노비즈센터 404호		
【대표자】	문외숙		

○ 신청의 구분

【심사의 종류】	안전성·유효성 심사, 기준 및 시험방법 심사
-----------------	--------------------------

○ 상세내용

【제품명】	에코마인라이스브랜에센스
【의약외품분류】	2호 인체 경미 작용제류(가정용 살충제 포함)
【성상】	검정의 투명한 질상
【제조방법】	별첨
【효능·효과】	별첨
【용법·용량】	별첨
【사용상의 주의사항】	별첨 【용도구분】 내수용
【포장단위】	자사포장단위
【저장방법】	기밀용기, 상온보관
【사용기간】	제조일로부터 36개월
【기준 및 시험방법】	별첨
【분류번호】	모발용제(발모, 탈모, 염모, 양모제)(267)
【비고】	비고
【제조원】	전공정위탁제조(제조사), 한국콜마주식회사, 대한민국, 세종특별자치시 권익면 덕고개길 12-11
【제조원】	전공정위탁제조(제조외탁자), (주)에코마인, 대한민국, 부산광역시 북구 만덕3로16번길 1 부산이노비즈센터 404호
	※ 제조원을 추가하시려면 메뉴의 [일련]-[종 추가] 기능을 사용하십시오.

○ 담당자

성명: 박지혜	이메일: pr@ecomine.co.kr
전화번호: (051) 808-2778	팩스: (051) 808-2752
휴대폰: 010-4442-9414	

- 1 -




그림 32. 에코마인 라이스브랜 에센스 의약외품 허가신청서

표 31. 의약품 허가신청 필요서류

안전성·유효성 심사자료	기원 또는 발견 및 개발 경위에 관한 자료
	기준 및 시험방법에 관한 자료
	안정성에 관한 자료 (장기보존시험 또는 가속시험자료)
	단회투여독성시험자료
	반복투여독성시험자료
	유전독성시험자료
	면역독성시험자료(피부감작성시험자료)
	국소독성시험자료
	효능·효과를 입증할 수 있는 자료
	외국의 사용현황에 관한 자료
	국내 유사제품과의 비교 검토 및 기타 특성에 관한 자료
기준 및 시험방법	기원 또는 발견 및 개발 경위에 관한 자료
	국내외에서의 사용현황에 관한 자료
	원료의 물리화학적 성질에 관한 자료
	원료의 제조 방법에 관한 자료
	원료의 기준 및 시험방법에 관한 근거자료 각 항목 기준설정근거(실측치 포함, 3롯트 포함)
	시험성적에 관한 자료-주성분 시험성적서
	표준품 및 시약·시액에 관한 자료
	원료 약품 및 그 분량에 관한 자료 - 원료 중 별첨규격 근거자료
	제조방법에 관한 자료 - 1차 포장용기 재질에 관한 자료
	완제의 기준 및 시험방법에 관한 근거자료 각 항목 기준설정근거(실측치 포함, 3롯트 포함)
	시험성적에 관한 자료-완제품 시험성적서

다. 중국 위생허가 신청

○ 중국위생허가 신청 제품(의약외품 별규제품)

- 헤솔 바이탈 헤어 샴푸(Haesol Vital Hair SHAMPOO)
- 헤솔 바이탈 헤어 토닉 (Haesol Vital Hair TONIC)
- 헤솔 바이탈 헤어 트리트먼트 (Haesol Vital Hair TREATMENT)

○ 중국위생허가 신청은 상해지2스킨 무역유한공사 대행업체를 통해 신청 하였고 대행 계약서는 그림 33. 에 첨부하였다.

표 32. 중국 위생허가 절차

절차	내용
서류 준비	중국 위생허가 계약 체결 및 대행 비용 입금
	전성분표와 외포장진개도 및 샘플 제출
	외포장진개도 중문 번역 및 북경위생국 제출
접수 및 심사	생산공정도, 전성분표 접수
	검사자료준비(2주 소요)
	샘플검사(2~3개월 소요)
	약품거사국 서류 접수
	약품검사국 서류 심사(2~3개월 소요)
완료	위생허가증

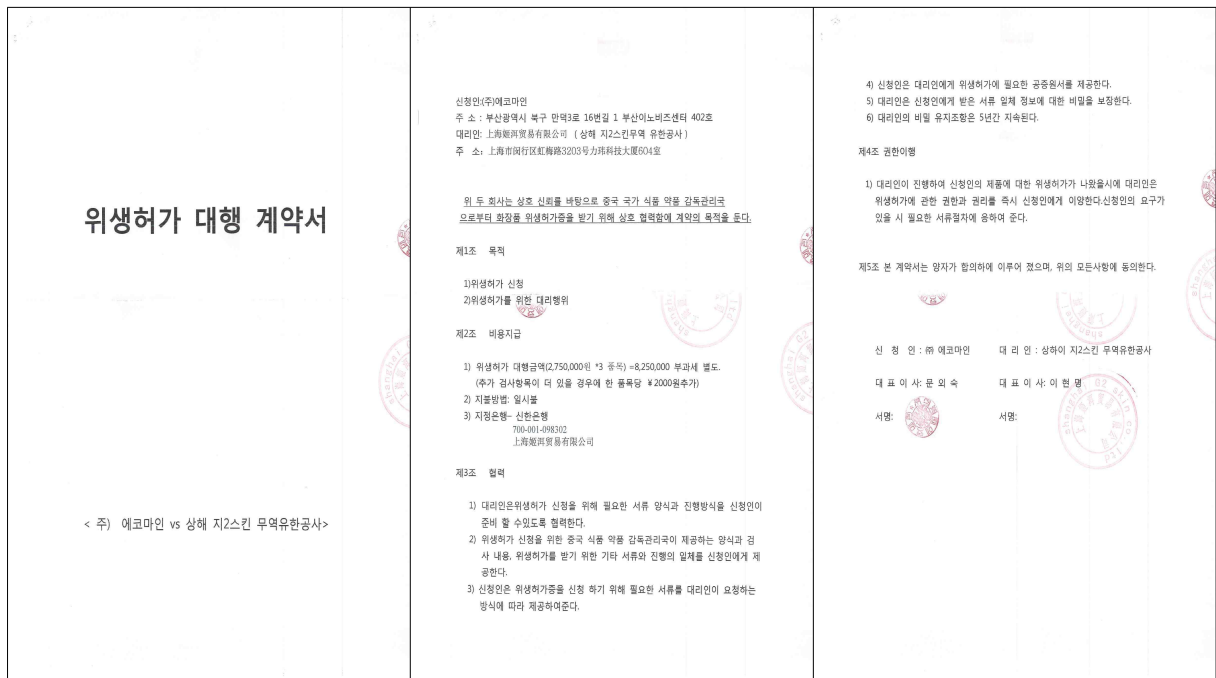



그림 33. 중국위생허가 등록지원 계약서

라. 미국 FDA OTC 신청

○ FDA-OTC 신청 제품(의약외품 별규제품)

- 헤솔 바이탈 헤어 샴푸(Haesol Vital Hair SHAMPOO)
- 헤솔 바이탈 헤어 토닉 (Haesol Vital Hair TONIC)
- 헤솔 바이탈 헤어 트리트먼트 (Haesol Vital Hair TREATMENT)

○ FDA-OTC 신청은 (주)플러스 경영정보 대행업체를 통해 신청 하였고 대행 계약서는 그림 34.에 첨부하였다.


www.fduplus.co.kr

PLUS+ Management Information Tech

계약서 (契 約 書)

계약사항 : 미국 FDA OTC 등록 지원

위탁자 "갑"	시행자 "을"
주 소 : 부산시 북구 만덕3로16번길 1 부신이노비즈니스센터 402, 404호	주 소 : 경기도 평택시 세교동 426-1 2층
회 사 명 : 주식회사 예코마인	회 사 명 : 주식회사 플러스경영정보
대표이사 : 윤 외 속	대표이사 : 김 세 훈

제 1 조 계약의 목적
본 계약은 "갑"에 대한 지원 업무를 "을"이 수행함에 있어 계약 당사자 간의 제반 계약사항을 규정하여 신의, 성실의 원칙에 따라 이를 상호 준수하도록 하는데 그 목적이 있다.

제 2 조 대상 및 비용
1. 비용내역 (부가세별도)

품 명	구 분	등록 비용	총비용
샴푸	미국 FDA OTC 등록	250만원	750만원
토닉	미국 FDA OTC 등록	250만원	
트리트먼트	미국 FDA OTC 등록	250만원	

제 3 조 견적조건, 지불 및 기타조건
1. 견적조건 (부가세별도)
1) "을"의 등록 완료기간은 약 2~3개월로서 FDA의 진행상황에 따라 증감 될 수 있습니다.
2) "갑"의 추진 팀은 1인 이상으로 구성하며, 성분의 정보 필요시 제시하여야 합니다.
2. 비용 지불 및 기타조건
1) 상기 비용은 현금 지불조건으로 FDA 업무상 "갑"은 "을"에게 100% 지불조건입니다.
2) "갑"에 의한 문서 및 준비 지연으로 인하여 등록 완료기간은 연장 될 수 있습니다.
3) 미국으로 제품 및 자료 발송과 송금비용은 견적에 포함되어 있습니다.

제 4 조 기밀유지
1. "을"은 업무 진행 중 "갑"에 관한 정보 및 시스템에 관한 비밀사항은 법령에 의하지 않고는 제3자에게 누설하지 아니한다.

제 5 조 계약의 효력 및 해약
본 계약은 쌍방이 계약서에 서명한 날로부터 효력이 발생되며, 상호 합의에 의거 해약 할 수 있다.

제 6 조 손해배상
"갑"과 "을"은 계약사항 불이행으로 상대방에게 손해를 발생하였을 경우, 이를 배상해야 한다.
본 계약의 증명을 위하여 계약서 2부를 작성하고 "갑"과 "을"이 각각 기명날인 후 1부씩 보관한다.

계약일 : 2014년 07월 01일

"갑" : 주식회사 예코마인
대표이사 : 윤 외 속 (인)

"을" : 주식회사 플러스경영정보
대표이사 : 김 세 훈 (인)

그림 34. 미국 FDA-OTC 등록지원 계약서

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 목표달성도

1. 연구 개발의 목표와 연구내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
1 차 년 도	2011	친환경 공정을 이용한 벼 도정 부산물(미강) 의 두발 건강 소재 개 발	주관	초임계 이산화탄소 추출 공정 개발
				추출조건의 최적화
				소재개발 및 소재의 물리·이화학적 특성 규명
				세포독성 시험
			참여	<i>In vitro</i> 생리활성 검증
				원료 수급 및 전처리 기술 확보
				미립자 제형 공정 개발 및 최적화
				반응 조성물(미강추출물 및 초임계 용매) 물성 검토 및 전처리 기술 확보
				미립자 제형물의 물성 측정 및 제어 조건 확립
			위탁	미강추출물의 대량생산 공정 개발
				자료 조사 및 문헌 수집
				미강 추출물의 <i>in vivo</i> 생리활성 검증
2 차 년 도	초임계 유체 추출물을 이용한 벼 도정 부산 물(미강)의 두발 건강 의약외품 생산 및 건 강기능식품 개발	주관	추출물의 피부자극성 검사	
			효소반응공정 개발 및 최적화	
			생리활성 물질 농축	
			농축물의 물성 제어 조건 확립	
			반응생성물의 산화안정성 평가	
		참여	<i>In vitro</i> 생리활성 검증	
			초임계 유체 추출물의 소재화	
			초임계 유체 추출물(농축미강추출물) 의약외품 제형 개발	
		위탁	시제품(의약외품) 생산 공정 개발	
			시제품(의약외품)의 유효성 검증	
			대량생산 공정의 표준화	
			제품의 표준화	
3 차 년 도	건강기능식품 생산과 대량생산체계 및 인증 체계 구축	주관	개별인정형 신청	
			시제품(의약외품)의 생산	
			대량생산 체계 설계 및 구축	
		참여	마케팅 인프라 구축 및 확보	
			시제품(의약외품) 국내·외 공인 인증 신청	
			시제품(의약외품)의 임상시험	
		위탁		

2. 연차별 연구개발 목표의 달성도

가. 1차년도 연구개발의 목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	<p><주관기관> 초임계 유체 추출 기술을 이용한 베타-도정부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가 소재 개발 및 in vitro 생리활성 검증</p>	초임계 유체추출 공정 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 베타-도정부산물(미강)의 일반성분 분석 및 물리·이화학적 특성 검토 - 초임계 유체 추출물 제조 단위 공정 설계 (Lab-scale)
		추출조건 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 추출온도 및 추출 압력조건 한계범위 설정 - 초임계 용매 조성비 설정(주용매 : 이산화탄소, 보조용매 : 발효 주정) - 유효성분의 최대 수율 범위 확인
		두발 건강용 소재개발 및 소재의 물리·이화학적 특성 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> - 추출 조건(온도, 압력) 변경에 따른 추출물의 물리·이화학적 특성 규명 - 추출물의 기능성 물질 함량 비교 분석 - 추출물의 조성비 분석(지방산 조성, 감마오리자놀, 토클루 등 분석) - 생리활성성분의 성분 규명
		추출물의 생리활성 및 안전성 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> assay를 이용한 생리활성(항균, 항산화, 항염 등)의 검증 - 세포독성 시험
	<p><참여기관> 베타-도정부산물(미강) 유래 두발건강용 고부가가치의 약외품·건강기능식품 개발 및 산업화</p>	원료 수급 및 전처리 기술 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 수급처 확보 - 동결건조 및 파쇄 공정 단일화
		미강 추출물의 초임계 유체 미립자 제형 공정 개발 및 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 초임계 유체 미립자 제조 단위 공정 설계 (Lab-scale, batch-system) · 적용공정 : RESS(rapid expansion of supercritical solution) process
		미강추출물 및 초임계 용매물성 검토 및 전처리 기술 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> - 유체미립자 제형물의 일반성분 분석 - 조성물의 물리·이화학적 검토
		미립자 제형물의 물성 측정 및 제어 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 미립자 입자 크기(particle size<100nm) - 미립자 입도 분포(100nm particle>80%) - 제어 조건 확립(용해도, 가압 조건, 감압조건, 온도 설정, 보조용매 첨가량 등 고려)
		시제품 생산 공정 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품(의약외품 및 화장품) 생산공정 개발
	<p><위탁기관> 베타-도정부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가가치 소재의 <i>in vivo</i> 및 임상시험 평가</p>	<p>베타-도정부산물(미강) 유래 두발건강용 소재의 안전성 및 유효성 평가</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> 평가 가이드라인 구축 및 확보 - 유효성 <ul style="list-style-type: none"> · 동물실험을 통한 양모 효능 평가 · 피부감작 시험

나. 2차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	<주관기관> 초임계 유체 추출을 이용한 벼 도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가 소재 개발 및 <i>in vitro</i> 생리활성 검증	효소반응 공정 개발	100	- 효소반응 공정개발 및 최적화
		추출물의 생리활성 물질 농축	100	- 효소반응 공정을 통한 초임계추출물 활성물질 최대 수율 조건 확립
		반응생성물의 물리 이화학적 분석	100	- 반응생성물의 기능성 물질 함량 분석 - 반응생성물의 지방산 조성 분석
		반응생성물의 생리활성	100	- 반응생성물의 생리활성 검증
		초임계 추출물의 대량생산 공정	100	- pilot 및 large scale 공정 최적화
		초임계 추출물의 안전성 검증	100	- 소재의 독성시험(GLP)
		초임계 추출물의 산화안정성 평가	100	- 가속시험을 통한 저장 안정성 평가
	지표물질 설정 및 분석방법 확립	100	- 지표물질 (linoleic acid 및 gamma-oryzanol 선정) - 분석방법, 추출방법 method validation	
	<참여기관> 벼 도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 의약외품·건강기능 식품 개발 및 산업화	초임계 유체 (농축미강추출물)의 제형 개발	100	- 추출조건 : 270bar, 32℃, 2시간 - 미강 57kg을 전남나노바이오센터에 의뢰하여 9.5kg (수율 : 16.6%) 미강추출물 획득 - 미강 추출물의 무균시험 - 미강 추출물의 시험성적서 준비 - 미강 추출물의 안전성 시험 시료준비 - 초임계 유체(미강추출물)의 제형 test - 성적서
		시작품(의약외품 및 화장품) 생산	100	- 의약외품 및 화장품 시작품 제조공정 - 안정성 test - 간이 임상 test - 식약청 인증 절차 준비
<위탁기관> 벼 도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가가치 소재·제품의 <i>in vivo</i> 및 임상시험 평가	시작품(의약외품)의 유효성검증	100	- 동물실험을 통한 양모효능 평가	

다. 3차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2013)	<주관기관> 초임계 유체 추출을 이용한 비 도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가 소재 개발 및 <i>in vitro</i> 생리활성 검증	생리활성 메커니즘 규명	100	- 양모효과 메커니즘 규명- 항염증 기 작 규명 - 5α-reductase inhibition 활성 규명 중
		대량추출공정 표준화	100	- 초임계 추출 대량 생산의 최적화를 위한 체계구축
		원료 생산물의 표준화 및 재현성 확립	100	- 원료 안정성 확립을 위한 시료인 미 강과우더 추가 구입 - 미강 과우더 구입 후 초임계 추출물 (Lab scale)로 추출원료 및 분석 진행
		제품(의약외품) 표준화/규격화	100	- 초임계 미강추출물이 주성분으로 함 유되는 의약외품 시제품인 라이스 브란에센스의 시험항목 및 기시법 확보
		식약청 허가 신청 준비	100	- 안전성, 유효성, 기준 및 시험방법, 안정성 자료 확보 - 원료 및 제품 안전(Safety) 시험 완 료(캠온) - 라이스브란에센스의 시험항목 및 기 시법 확보 - 원료 및 제품 안정성(Stability) 시험
	<참여기관> 비 도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 의약외품·건강기능 식품 개발 및 산업화	대량생산 체계 설계 및 구축	100	- 원료수급: 서한도정 - 대량추출: 전남나노바이오센터 - 초임계 미강 추출물의 대량추출공정 의 표준화
		시작품(의약외품, 화장품) 생산	100	- 초임계 미강추출물이 보조성분으로 함유되는 의약외품 샴푸, 토닉, 트리 트먼트의 제형 처방 완료 - 국내 OEM생산 1위 기업인 한국콜 마와 물품공급계약 (OEM)을 맺어 의약외품 및 화장품의 제조공정 확 보 - 임상시험용 의약외품 시제품 생산완 료 - 초임계 미강추출물이 보조성분으로 함유되는 의약외품, 샴푸, 토닉, 트 리트먼트의 제형 처방 완료
		마케팅 인프라 구축 및 확보	100	- 해외박람회, 전시회 참가로 앞으로 생산될 제품들의 연구실적을 홍보하 여 기존 거래업체 및 신규 업체들과 수출협의 진행 중. (일본 에오리오사, 중국 Chair man of the Board, 미국 LA 뉴바디 성형외과, 말레이시아의 Beauty Trend Sdn Bhd, 싱가포르 Revamp International Pte Ltd.)
		시제품(의약외품) 국내·외 공인 인증 신청	100	- 국내 인증기관 : 식약처 - 국외 인증기관 : 미국 FDA, 중국위 생허가

	<위탁기관> 비도정 부산물(미강) 유래 두발 건강용 고부가가치 소재·제품의 <i>in vivo</i> 및 임상시험 평가	시작품(의약외품)의 임상시험	100	- IRB승인 획득 및 임상 시험완료
--	---	--------------------	-----	----------------------

3. 평가의 착안점 및 기준에 대한 달성도

주요 성능지표	단위	최종 개발목표	달성도
육모 간이임상시험	%	대조군 대비 100% 효과	C57BL/6 mouse에서 양성대조군 Minoxidil 대비 100%의 모발성장효과 확인
피부 감작 시험	%	0.0<피부반응도<0.1	기니픽(하틀리계) 피부감작성 시험결과 감작율 0%
모발 성장 실험 (<i>In vitro</i>)	%	대조군 대비 IGF-1 발현율>200%, TGF-β1억제율>100%	양성대조군 대비 IGF-1 발현율 350%, TGF-β1억제율114%
항염증 시험	%	>80%	COX-2, iNOS 저해효과 확인
경피 독성 실험	-	경피독성 시험 적격 판정	Rat 단회투여, 1주 반복투여, 4주 반복 투여 경피 독성시험결과, 무독성량 2000mg/kg/day로 무독성으로 평가 (GLP 독성기관 캄온에서 실시)
항산화 시험	%	>80%	알파-토코페롤 대비 360%의 항산화 효과 확인

제 2 절. 관련분야에의 기여도

1. 기술발전예의 성과

가. 초임계 추출 미강의 양모효과

- 쌀은 우리 조상대대로 이어온 주식으로서 우리식생활의 근본을 이루고 있고, 우리의 건강과 밀접한 관계가 있을 뿐 아니라 건강의 부의 척도이기도 하였다. 최근 벼의 도정 부산물인 미강 미강의 기능성 성분과 혈중 콜레스테롤 조절 작용, 혈당, 혈압, 기억력개선, 위장관 개선 등의생리기능성에 대한 과학적인 연구결과들이 많이 보고되고 있다. 본 연구에서는 미강의 양모효과를 과학적으로 증명하였고, 양모효과를 나타내는 미강의 유효성분을 규명하여 일본 약학회지 Biological Pharmaceutic Bulletine에 발표하였다.

나. 미강 중 양모효과와 주효성분 규명

- 본 연구 결과 미강의 양모효과는 리놀레산과 감마오리자놀임을 확인할 수 있었고, 이로써 불포화지방산의 5 α -reductase 저해 활성과 함께 감마오리자놀의 양모효과가 처음으로 밝혀졌다.

다. 초임계 추출 미강의 안전성 확보

- 조상대대로 쌀을 주식으로 하여온 우리나라에서 미강은 일반적으로 안전한 것으로 인식되어 왔다. 그러나 초임계 추출에 의한 미강유에 대한 안전성은 아직 밝혀진 바 없으며, 추출 조건에 따라 농축되는 성분의 농도 차이를 보이기도 하여 이에 대한 안전성 확보가 필요하였다. 본 연구에서는 32 $^{\circ}$ C, 270 bar의 이산화탄소에서 추출된 미강유의 전반적인 독성연구가 진행되었으며, 안전성을 확보할 수 있었다.

라. 마우스 피부조직를 이용한 NMR 분석 시도

- 최근 NMR 장비의 급속한 발달과 DB의 확립으로 조직의 metabolites 분석이 가능해졌다. 본 연구에서는 초임계 미강 추출물이 도포된 마우스의 피부조직을 이용하여 NMR 분석을 최초로 시도하였다. 양모제 개발에 있어 양모효과를 나타내는 기작을 규명하기 위해서는 실제 피부조직 하의 혈액이 공급되는 모델 시스템이 절대적으로 필요한 상황이다. 따라서 동물 모델의 실험이 진행되고, 이 조직에서의 대사체의 분포의 변화가 양모효과와 기작을 규명할 수 있는 좋은 tool임을 확신할 수 있었다.

마. 미강의 초임계 추출물의 의약외품 신청

- 사실상 우리나라 신소재 개발에 있어 양모제로서의 신소재 개발은 거의 보기 드문 상황이라고 할 수 있다. 화장품이나 비누 등의 원료로 간혹 사용이 되기도 하는 미강 오일 대신 초임계 추출 미강유를 포함한 미강에센스의 과학적인 유효성, 안전성, 기준 및 시험방법 등의 연구결과로 식약처 의약외품 허가를 득한다면, 국내 두발건강 화장품 시장의 새로운 판도를 마련할 수 있는 계기가 될 것이다.

2. 기여도

가. 미강유래 기능성 물질을 이용하여 첫째, 현대인이 추구하는 지속 가능한 건강한 삶에 기여할 수 있는 기능 식품·화장품을 제공하여 기존의 합성 제품을 대체할 수 있는 제품으로서의 효과를 기대하며, 둘째, 아름답고 건강한 신체조건을 유지하기 위한 노화 방지용 기능성 소재 제공에 의한 삶의 활력소 증진 효과를 볼 수 있으며, 셋째, 천연물유래 기능성 물질의 고유 특성을 유지시켜 새로운 차원의 건강 기능 제품 개발에 대한 원천기술을 확보하였다.

나. 미강으로부터 기능성 물질을 친환경적 분리기술인 고압 유체 무 오염 추출 방법을 이용하여 분리된 기능성 물질을 식품, 화장품 소재로 쓰일 수 있는 다양한 용도를 개발함으로써 인위적인 화학적 합성으로 제조된 첨가물류를 천연 기능성 소재로 대체하여 기능성에 맞는 맞춤형 신제품을 소비자에게 제공하여 생활의 선진화 및 국민건강 증진 효과에 기여할 수 있다.

다. 신개념의 에너지절감형 친환경 바이오 소재 대량 생산 기술개발은 노동집약형에서 기술 집약형 바이오 소재 제조 산업으로 전환 및 우수한 제조 시설 기반 구축에 의한 국내 바이오 소재 원료의 국제적 수준의 제품 규격화로 세계시장 진출을 기대할 수 있을 것이다

라. 친환경 공정기술 개발을 통한 신성장 바이오 녹색산업에 기여하였다.

마. 농업의 발전 및 수익증대

- (1) 농가 소득의 근본이 될 수 있는 벼에서 유래하는 벼도정부산물의 미강을 이용하여 친환경적인 추출방법으로 추출한 바이오 소재의 양모효과를 확인하고, 이를 사업화까지 한 경우는 매우 드문 경우이다. 본 연구결과가 의약외품으로 식약처 등의 인증을 받게 된다면, 미강 추출 소재는 다양한 형태로 화장품 소재로 널리 사용될 가능성 높다. 이는 국내외 일본 화장품 업계는 새로운 소재 출시 시, 다양한 제품에 적용시키고자 하는 band-wagon effect가 매우 크기 때문이다.
- (2) 또한 본 소재는 양모 효과 뿐만 아니라 항염, 항산화, 면역증강 기능도 가지고 있어 타 제품군으로의 적용 확산될 것으로 기대된다.
- (3) 이러한 저이용 벼 도정 부산물 미강을 고부가 상품화하고, 그의 적용을 확대시킨다면, 농가 소득 증대에 크게 기여할 것이며, 농업경쟁력 및 침체 위기에 놓여있는 쌀 산업의 활성화에 크게 기여하게 될 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

- 총 9편의 논문이 준비 중이며, 이중 2편은 일본 약학회지인 Biological Pharmaceutical Bulletin (SCI)에 게재 및 게재 예정이며, 1편은 Toxicology and Environmental Health Sciences (SCOPUS)에 게재 완료되었다. 또한 총 2 편의 논문이 Food Science and Biotechnology (SCIE)에, 총 2편은 Journal of Environmental Biology (SCIE)에 제출된 상태이며, 2편은 Food Engineering, LWT-Food Science and Technology에 제출예정이다. 총 7번의 학술대회 발표에 참가하였으며, 1건의 출원등록을 완료하였다.
- 총 3 종의 두발건강용 화장품이 상품화가 되었으며, 1건의 두발건강용 에센스가 식약처 의약품 품목인증 신청 중에 있다.
- 석사 1명, 학사 8명의 인력이 본 과제와 관련하여 배출되었으며, 현재 2명의 석사과정 학생이 연구에 참여중이다.
- 본 과제 참여업체인 (주)에코마인에 기술이전 1건이 완료되었다.
- 언론사를 통하여 총 6건의 홍보를 실시하였다.

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종			(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호 출원		등록	SCI	
1차 년도	목표								1	1
	달성							1		2
2차 년도	목표	1						1	1	1
	달성	1						1		2
3차 년도	목표	1	1					1	1	1
	달성	1						1	7	4
계	목표	2	1					2	3	3
	달성	2	1					2	7	7

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	4	1	2	3	
	달성	3	4		9	7	

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저 자	공동저 자				
2012	Extraction Characteristics and Fatty Acid Composition for Rice Bran Oil extracted	노명균	김미령	문외숙, 문진남, 전민희,	J. Food Engineering	투고중	국외	SCI

	by Supercritical Carbon Dioxide			최재석, 천은진				
2013	<i>In vivo</i> hair growth promoting effect of ricebranextract prepared by supercritical carbon dioxide fluid	최재석	김미령, 손상욱	전민희, 문외숙, 문진남, 천은진, 김주완, 이지화,	Biological and Pharmaceuti cal Bulletin	게재 완료	국외	SCI
2013	Cytotoxicity test and a single-dose oral toxicity study of Rice Bran Supercritical CO ₂ Extract	최재석	김미령	문외숙, 문진남, 천은진, 손상욱, 김주완	Toxicology and Environmen tal Health Sciences	게재 완료	국외	SCOP US
2014	Rice bran supercritical CO ₂ extract(RB-SCE)microparti clepreparationbyaerosol solvent extraction system (ASES) and particles from gas-saturated solution (PGSS) processes	최재석	김미령	노명균, 김태욱, 천은진, 문외숙, 김진엽	Journal of Environmen tal Biology	투고중	국외	SCIE
2014	Characteristics of the esterified rice bran oil (ERBO) converted by enzymatic esterification	최재석	김미령	노명균, 김태욱, 천은진, 문외숙, 김진엽	Journal of Environmen tal Biology	투고중	국외	SCIE
2014	Genotoxicity of rice bran oil extracted by supercritical CO ₂ extraction	최재석	김미령	천은진, 김태욱, 문외숙, 김주완	Biological and Pharmaceuti cal Bulletin	accepted	국외	SCI
2014	Acute dermal and ocular irritation test of rice bran supercritical CO ₂ extract(RB-SCE)andskinse nsitivitytestoftestessenceprodu ctwith 0.5% RB-SCE	최재석	김미령	문외숙, 천은진, 김주완	Food Science and Biotechnolo gy	투고중	국내	SCIE
2014	Single-dose and 4-week repeated-dose dermal toxicity study of rice bran supercritical CO ₂ extract in Sprague - Dawley rats	최재석	김미령	천은진, 김태욱, 문외숙, 김진엽, 김주완	Food Science and Biotechnolo gy	accepted	국내	SCIE
2014	Anti-oxidation and anti-inflammatory activity of rice bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid	천은진	김미령	최재석	LWT-Food Science and Technology	투고 준비중	국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	초임계 유체를 이용한 미강유의 최적 추출 방법, 이에 의한 미강유 및 미강유 지방산, 및 그 용도 {Meth5od for optimazation of rice bran oil extraction using supercritical fluid, rice bran oil and fatty acid thereby, and use thereof}	주식회사 에코마인	대한민국	특허-2013-0043165					
2014	초임계미강추출을 포함하는 발모 촉진제 및 그 제조방법 (Hair Growth-Promoting Preparation Containing Supercritical Rice Bran Extract and Preparing Method Thereof)	신라대 김미령	대한민국	10-2014-0020404	2014	초임계추출을 포함하는 발모 촉진제 그 제조방법	신라대 김미령	대한민국	10-1557549

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
	3,000만원		

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
9		1	8		1	8			

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	3		3			

2. 성과활용 계획

가. 실용화, 사업화 계획

(1) 기술 이전

- 본 연구 결과 확보한 특허“초임계미강추출을 포함하는 발모 촉진제 및 그 제조방법”의 참여기업으로의 기술 이전을 통한 사업화가 구체적으로 진행되고 있다. 이미 한구콜마와 함께 화장품 별규성분으로 등록하고 두발건강용 화장품 개발 완료하였으며, 의약외품의 식약처 신청을 완료하였다.

(2) 구체적인 판매계획

(가) 국내 판매계획

- 당사 운영 프렌차이즈 망 이용: (주)헤슬두피클리닉스 (총 8개점)
- 자체 쇼핑몰 운영, 쇼핑몰: 헤슬몰, 롯데몰, G마켓, 11번가, 옥션
- 샵인샵: 하양선코스메틱, 아미통상, 마르지아, 지안코스메틱
- 매스마켓: 롯데백화점부산점 정기 이벤트, 이마트 정기 이벤트
- 바이웰마케팅: 블로그, 카페, SNS-페이스북, 트위터
- 시판: 전국 20개 대리점의 화장품 전문매장 500개소를 통한 매출
- ODM 및 방판: 코스모R&D, 웅진, 유지아 헤어

(나) 국외 판매계획

- 싱가포르 Revamp International Pte Ltd.사와 OEM 계약
- 말레이시아의 Beauty Trend Sdn Bhd,사와 3년간 45만불 계약체결, 프렌차이즈 오픈 (년 내 5개의 프렌차이즈 오픈 예정)
- 중국 광주경쟁력과 3년간 공급계약체결
- 중국 쇼파르과 3년간 공급계약 체결,
- 인도네시아 Megantara Indo Trading Com.사에서 수출 계약 진행중,
- 일본 에오리아사 외: 추가 주문 및 동경박람회 참석시 신규 바이어 발굴 및 이를 통한 매출
- 미국 Desse Divant 외: 5만불 계약체결, 라스베가스 박람회 참석시 신규 바이어 발굴 및 이를 통한 매출
- 기타: 두바이 박람회, 상해 박람회를 통한 OEM 바이어, 소규모 구매 바이어 발굴 및 이를 통한 매출

표 1. 판매처 확보 현황

국내 판매처		연판매액 (백만원)	국외 판매처	국가 명	연판매액 (백만원)
온라인	헤솔물	22	Revamp International Pte Ltd.	싱가폴	300
	쇼핑몰	9	Beauty Trend Sdn Bhd	말레이시아	150
	서원	100	광주경쟁력	중국	150
오프라인	화장품전문점 시판	628	쇼파르	중국	150
	특판(농협, 우체국등)	61	P.T.Megantara Indo Trading Com.	인도네시아	90
	헤솔 체인점	120	에오리아 외	일본	50
	샵인샵	30	Desse Divant 외	미국	50
	ODM 및 방판	282	기타		10
소계		1,252	소계		950
총 계					2,202

표 2. 사업화 목표

항 목	세부 항목	성 과			
		1년	3년후	5년후	
사업화 계획	예상 매출규모 (억원)	1년	3년후	5년후	
		6	30	50	
	시장점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	10%	20%
		국외	-	2%	5%
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	미강 추출물을 함유한 두피팩 제품 개발			
무역수지 개선효과	(단위 : 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체효과	1	10	30	
	수 출	1	10	30	
고용창출	-	1년후	3년후	5년후	
	-	1	2	3	

나. 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 계획

(1) 교육

본 연구 결과를 현대엔텍, 강스코스메띠프로의 교육지도 및 기술 이전 예약

(2) 개발된 미강추출물의 효능효과 언론 보도

(가) 인터넷 신문사 한경닷컴BNT뉴스를 통해 2014년 4월 17일 게재

- 에코마인, 쌀 도정 부산물 ‘미강 추출물’로 탈모 방지

http://bntnews.hankyung.com/apps/news?popup=0&nkey=201404171123243&c1=03&c2=03&nid=03&mode=sub_view&mode=sub_view

(나) 인터넷 신문사 한경닷컴BNT뉴스를 통해 2014년 9월 12일 게재

- 에코마인, 탈모 관련 향장 소재 개발로 해외 바이어들 높은 호응

http://bntnews.hankyung.com/apps/news?popup=0&nkey=201409111818073&c1=03&c2=03&nid=03&mode=sub_view&mode=sub_view

(다) 기술이전 홍보 2014년 9월 16일 게재

- 본 연구과제를 통해 개발된 특허 출원한 “초임계 미강 추출물을 포함하는 발모 촉진제 및 그 제조방법” 기술을 신라대학교 산학협력단과 기술이전 협약을 2014년 9월 15일에 진행하였으며, 연구결과를 바탕으로 두발건강용 고부가 의약품 및 두발화장품의 국내외 생산 및 판매를 예정하고 있으며, 이를 통한 발모 촉진제 산업 활성화에 큰 기여가 예상된다.

- CNB저널 <http://www.cnbnews.com/news/article.html?no=264874>

- 위클리오늘 <http://www.weeklytoday.com/news/articleView.html?idxno=26285>

- 아주경제 <http://www.weeklytoday.com/news/articleView.html?idxno=26285>

- 부산일보포토뉴스 <http://news20.busan.com/controller/newsController.jsp?newsId=20140917000200>

다. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

(1) 추가연구

- 기 추진 중인 마우스 조직의 NMR 분석을 통한 양모효능의 규명은 추가 혈액 시료 분석을 통해 구체적으로 규명이 될 예정이다.

(2) 타연구에 활용

- 생체조직의 실험 후 직접적인 NMR 분석을 통해 조직의 대사체 변화 분석을 통한 구체적인 변화 양상 및 기작을 규명할 수 있을 것이다.
- 또한 본 연구 결과로 확보된 양모효능의 규명 기술은 다른 양모작용을 나타내는 다양한 물질에 대해 적용이 가능할 수 있는 기술이 될 것이다.

제 6 장 참고문헌

- (1) C. Blachandran, P.N. Mayamol, S. Tomas, D. Sukumar, A. Sundaresan, C. Arumughan, An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications, *Bioresource Technology* 99 (2008) 2905-2912.
- (2) D. Sparks, R. Hernandez, M. Zappi, D. Blackwell, T. Fleming, Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane, *J. American Oil Chemists Society* 83 (2006) 885-890.
- (3) Z. Xu, J.S. Godber, Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran, *J. American Oil Chemists Society* 77 (2000) 547 - 551.
- (4) N. Yeddes, J.K. Ch´erif, A. Jrad, D. Barth, M. Trabelsi-Ayadi, Supercritical SC-CO₂ and Soxhletn-hexane extract of Tunisian *Opuntia ficus indica* seeds and fatty acids analysis, *J.Lipids* 2012, ID914693. Available from :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382944>
- (5) F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - a review, *J. Food Engineering* 95 (2009) 240 - 253.
- (7) K.Y. Kwon, M.S.U. Uddin, G.W. Jung, J.E. Sim, B.S. Chun, Supercritical carbon dioxide extraction of phenolics and tocopherols enriched oil from wheat bran, *World academy of sciences, Engineering and Technology* 64 (2010) 255-260.
- (8) M.M. Most, R. Tulley, S. Morales, M. Lefevre, Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans, *American J. Clinical Nutrition* 81 (2005) 64 - 68.
- (9) A.B. Caragay, Cancer-preventive foods and ingredients, *Food Technology* 56 (1992) 65 - 68.
- (10) R. Tahira, R. Ata-ur, A.B. Muhammad, Characterization of rice bran oil, *J. Agricultural Research* 45 (2007) 225 - 230.
- (11) M.E. Ramsay, J.T. Hsu, R.A. Novak, W.J. Reighter, Processing rice bran by supercritical fluid extraction, 45 (1991) 98-104.
- (12) H.B. MacDonald, Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge, *J. American College of Nutrition* 19 (2000) 111s - 118s.
- (13) M. Aranya, R. Warintorn, A. Masahiko, S. Hideki, M. Worapaka, M. Jiradej, Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in noisome by supercritical carbon dioxide fluid, *J. Supercritical Fluids* 54 (2010) 137-144.
- (14) T. Liang, S. Liao, Inhibition of steroid 5 alpha-reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids, *Biochemical J.* 285 (1992) 557 - 562.
- (15) S.P. Jesus, R. Grimaldi, H. Hense, Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil byproduct using supercritical fluid extraction, *J. Supercritical Fluids* 55 (2010) 149-155.

- (16) G. Perretti, E. Miniati, L. Montanari, P. Fantozzi, Improving the value of rice by-products by SFE, *J. Supercritical Fluids* 26 (2003) 63 - 71.
- (17) C.M.P. Sarmiento, S.R.S. Ferreira, H. Hense, Supercritical fluid extraction (SFE) of rice bran oil to obtain fractions enriched with tocopherols and tocotrienols, *Brazilian J. Chemical Engineering* 23 (2006) 243-249.
- (18) S.N. Ko, T.Y. Ha, S.I. Hong, S.W. Yoon, J. Lee, Y. Kim, I.H. Kim, Enrichment of tocopherols from rice germ oil using supercritical carbon dioxide Source, *International J. Food Science and Technology* 47 (2012) 761-767.
- (19) C.R. Chen, C.H. Wang, L.Y. Wang, Z.H. Hong, S.H. Chen, W.J. Ho, C.M.J. Chang, Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil, *J. Supercritical Fluids* 45 (2008)322-331.
- (20) A. García, A. deLucas, J. Rincon, A. Alvarez, I. Gracia, M.A. García, Supercritical carbon dioxide extraction of fatty and waxy material from rice bran, *J. American Oil Chemists Society* 73 (1996) 1127-1131.
- (21) M.S. Kuk, M.K. Dowd, Supercritical CO₂ extraction of rice bran, *J. American Oil Chemists Society* 75 (1998) 623-628.
- (22) W. Zhao, A. Shishikura, K. Fujimoto, K. Arai, S. Saito, Fractional extraction of rice bran oil with supercritical carbon dioxide, *Agricultural and Biological Chemistry* 51 (1987) 1773-1777.
- (23) Z. Shen, M.V. Palmer, S.S.T. Ting, R.J. Fairclough, Pilot scale extraction and fractionation of rice bran oil using supercritical carbon dioxide, *J. Agricultural Food Chemistry* 45 (1997) 4540 - 4544.
- (24) Z. Shen, M.V. Palmer, S.S.T. Ting, R.J. Fairclough, Pilot scale extraction of rice bran oil with dense carbon dioxide, *J. Agricultural Food Chemistry* 44 (1996) 3033 - 3039.
- (25) N.Saito, Y.Ikushima, K.Hatakeda, S.Ito, T.Asano, T.Goto, Fractional extraction of rice-bran oil and its esters with supercritical carbon dioxide, *International Chemical Engineering* 33 (1993) 307-314.
- (26) N.T. Dunford, J.W. King, Phytosterol enrichment of rice bran oil by a supercritical carbon dioxide fractionation technique, *J. Food Sciences* 65 (2000) 1395-1399.
- (27) N.T. Dunford, J.W. King, Thermal gradient deacidification of crude rice bran oil utilizing supercritical carbon dioxide, *J. American Oil Chemists Society* 78 (2001) 121-125.
- (28) H.J. Kim, S.B. Lee, K.A. Park, I.K. Hong, Characterization of extraction and separation of rice bran oil rich in EFA using SFE process, *Separation and Purification Technology* 15 (1999) 1 - 8.
- (29) ISO, International Organization for Standardization ISO 659:1998: . ISO, Geneva; 1999.
- (30) AOAC, American oil Chemists, Society Champaign, Illinois, USA, 1998
- (31) L. Danielski, C. Zetzl, H. Hense, G. Brunner, A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran, *J. Supercritical Fluids* 34 (2005) 133 - 141.

- (32) Olsen EA. Androgenetic alopecia. In: Olsen, EA., editor. Disorders of hair growth: diagnosis and treatment. *New York: McGraw-Hill*. 257-283 (1994).
- (33) Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5 α -reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J. Invest. Dermatol.* **109**, 296 -300 (1997).
- (34) Sawaya ME, Shapiro J. Alopecia: Unapproved treatments or indications. *Clin. Dermatol.* **18**, 177-186 (2000).
- (35) Trüeb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Exp. Gerontol.* **37**, 981-990 (2002).
- (36) De Villez LR. The therapeutic use of topical minoxidil. *Dermatologic Clinics* **8**, 367-375 (1990).
- (37) Shapiro J, Price VH. Hair regrowth: therapeutic agents. *Dermatol. Ther.* **16**, 341-56 (1998).
- (38) Wilson C, Walkden V, Powell S, Shaw S, Wilkinson J, Dawber RPR. Contact dermatitis in reaction to 2% topical minoxidil solution. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 643-646 (1991).
- (39) Friedman ES, Friedman PM, Cohen DE, Washenik K. Allergic contact dermatitis to topical minoxidil solution: etiology and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* **46**, 309-312 (2002).
- (40) McClellan KJ, Markham A. Finasteride. A review of its use in male pattern hair loss. *Drugs* **57**, 111-126 (1999).
- (41) Tosti A, Piraccini BM, Soli M. Evaluation of sexual function in subjects taking finasteride for the treatment of androgenetic alopecia. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **15**, 418-421 (2001).
- (42) Sawaya ME. Novel agents for the treatment of alopecia. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **17**, 276-283 (1998).
- (43) Roh S-S, Kim CD, Lee M-H, Hwang S-L, Rang M-J, Yoon Y-K. The hair growth promoting effect of *Sophora flavescens* extract and its molecular regulation. *J. Dermatol. Sci.* **30**, 43 - 49 (2002).
- (44) Rho S-S, Park S-J, Hwang S-L, Lee M-H, Kim CD, Lee I-H, Chang S-Y, Rang M-J. The hair growth promoting effect of *Asiasari radix* extract and its molecular regulation. *J Dermatol. Sci.* **38**, 89 - 97 (2005).
- (45) Datta K, Singh AT, Mukherjee A, Bhat B, Ramesh B, Burman AC. *Eclipta alba* extract with potential for hair growth promoting activity. *J. Ethnopharmacol.* **124**, 450 - 456 (2009).
- (46) Lee G-S, Hong E-J, Gwak K-S, Park M-J, Choi K-C, Choi I-G, Jang J-W, Jeung E-B. The essential oils of *Chamaecyparis obtusa* promote hair growth through the induction of vascular endothelial growth factor gene, *Fitoterapia* **81**, 17 - 24 (2010).
- (47) Yoon JI, Al-Reza SM, Kang SC. Hair growth promoting effect of *Zizyphus jujube* essential oil, *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1350 - 1354 (2010).
- (48) Bhattacharjee P, Singhal RS, Kulkarni PR. Basmati rice: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**, 1 - 12 (2002).

- (49) Watchararuji K, Goto M, Sasaki M, Shotipruk A, Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresour. Technol.* **99**, 6207-6213 (2008).
- (50) Manosroi A, Ruksiriwanich W, Abe M, Sakai H, Manosroi W, Manosroi J. Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid. *J. Supercritic. Fluids.* **54**, 137-144 (2010).
- (51) Li SC, Chou TC, Shih CK. Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats. *Food Res. Inter.* **44**, 209 - 216 (2011).
- (52) Jariwalla RJ. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **27**, 17-26 (2001).
- (53) Ruksiriwanich W, Manosroi J, Abe M, Manosroi W, Manosroi A. 2011. 5 α -Reductase type 1 inhibition of *Oryza sativa* bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid. *J. Supercritic. Fluids.* **59**, 61-71.
- (54) Xu Z, Godber JS. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**, 547 - 551 (2000).
- (55) Yeddes N, Chérif JK, Jrad A, Barth D, Trabelsi-Ayadi M. Supercritical SC-CO₂ and soxhletn-hexane extract of Tunisian *Opuntia ficus indica* seeds and fatty acids analysis. *J. Lipids* **2012**, 914693 (2012).
- (56) Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, Omar AKM. 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - a review. *J. Food Eng.* **95**, 240 - 253 (2009).
- (57) Roh M-K, Jeon M-H, Moon W-S, Moon J-N, Cheon E-J, Choi J-S and Kim M-R. Characteristics of Extraction and Fatty Acid Composition for Rice Bran Oil by Supercritical Carbon Dioxide. *J. Supercritic. Fluids. Accepted.*
- (58) IUPAC, Method 2.411 Identification and determination of tocopherols. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England (1987).
- (59) AOAC, American oil Chemists, Society Champaign, IL, USA (1998).
- (60) Kim IH, Kim CJ, Separation of oryzanol from the refining byproduct of rice bran oil. *Kor. J. Food Sci Technol.* **23**, 76-89 (1991).
- (61) Moffa GH. The growth of hair follicles and its relation to the adjacent dermal structures. *J. Anat.* **102**, 527-540. (1968).
- (62) Ogawa H., Hattori M. Regulation mechanisms of hair growth. *Curr. Probl. Dermatol.* **11**, 159-170 (1983).
- (63) Fujie T, Katoh S, Oura H, Urano Y, Arase S. The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells. *J. Dermatol. Sci.* **25**, 206-212 (2001).
- (64) Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol. Med. Today.* **2**, 460-467 (1996).

- (65) Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Bri. J. Dermatol.* **150**, 186 - 194 (2004).
- (66) Weger N, Schlake T. IGF-I Signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 873 - 882 (2005).
- (67) Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* **11**, 143-146 (2001).
- (68) Li J, Foitzik K, Calautti E, Baden H, Doetschman T, Dotto GP. TGF- β 3, but not TGF- β 1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 4213-4219 (1999).
- (69) Otomo S. Hair growth effect of minoxidil. *Folia. Pharmacol. Jpn.* **119**, 167-174 (2002).
- (70) Yoshida H, Tanigawa V, Yoshida N, Kuriyama I, Tomiyama Y, Mizushima Y. Lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in rice brans. *Food Chem.* **129**, 479-484 (2011).
- (71) Chen MH, Bergman CJ. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -oryzanol contents. *J.Food Compos.Anal.* **18**, 319 - 331 (2005).
- (72) Xu Z, Godber JS. Purification and identification of components of gamma-oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2724 - 2728 (1999).
- (73) Liang T, Liao S. Inhibition of steroid 5 alpha-reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids, *Biochem. J.* **285**, 557 - 562 (1992).
- (74) De Simone Carlos Iglesias Pascual C, Louro Massaretto I, Kawassaki F, Cerdeira Barros RM, Alberto Noldin J, Lanfer Marquez UM. Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Res. Int.* **50**, 676-681 (2013).
- (75) Haim D, Valenzuela A, Brañes MC, Fuenzalida M, Videla LA. The oleic acid esterification of policosanol increases its bioavailability and hypocholesterolemic action in rats. *Grasas y Aceites.* **63**, 345-354 (2012).
- (76) Lim AB, Wong JW, Yuen KH. Effects of tocotrienol supplementation on hair growth in human volunteers. *Tropical Life Sciences Research*, **21**, 91 - 99 (2010).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업 기술개발사업의의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.