

발간등록번호

11-1543000-000767-01

양파·알로에 복합소재를 이용한 기능성 제품 개발에 관한 연구

(Development of functional food utilizing complex
material with onion and aloe)

아주대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “양파·알로에 복합소재를 이용한 기능성 제품 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2014 년 12 월 9 일

주관연구기관명 : 아주대학교

주관연구책임자 : 정 이 숙

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 박 세 원

협동연구기관명 : (주)김정문알로에

협동연구책임자 : 백 진 흥

요 약 문

I. 제 목

“ 양파·알로에 복합소재를 이용한 기능성 제품 개발에 관한 연구 ”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 양파·알로에 복합소재의 지표성분을 표준화하여 혈액순환기능을 증진시키는 건강기능 제품을 개발하여 개별인정을 획득함으로써 건강기능제품산업의 발전과 양파와 알로에 재배 농가의 소득 증대를 목표로 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증 및 기능성 물질의 기작 연구
 - 단독소재 및 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증
 - 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 기작 연구
 - 양파와 알로에로부터 혈액순환 증진 기능성 물질 발굴
 - 세포모델에서 기능성물질의 작용 기작 연구
 - 기능성물질의 심혈관질환 의약소재화 연구
- 양파·알로에 복합소재의 지표성분 표준화를 통한 품질관리기준 확립
 - 양파·알로에 복합소재의 지표성분 표준화를 통한 품질관리기준 확립
 - Pilot-scale 제조공정의 최적화 연구
 - 양파·알로에의 시너지 효과 유발 물질 발굴
- 양파·알로에 복합소재의 안전성 평가 후 제품화 연구 및 개별인정 획득
 - 양파·알로에 복합소재의 대량생산(임상실험용)
 - 양파·알로에 복합소재의 독성실험
 - 개별인정 신청 및 접수
 - 개별인정형 제품 개발

IV. 연구개발결과

- 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증 및 기능성 물질의 기작 연구
 - 양파 및 알로에 단독소재의 혈액순환기능 증진효능 및 세포 독성, 출혈지연시간을 관찰함.
 - 복합소재의 추출용매별, 시간별, 비율별에 따른 혈액순환기능 증진효능 및 세포 독성, 출혈지연시간을 관찰하였고, 복합소재가 단독소재보다 시너지 효능이 나타남.
 - 각 기능/지표성분인 quercetin과 aloin의 혈액순환기능 증진효능을 관찰함.
 - 시제품의 혈액순환기능 증진효능을 관찰함.
 - 양파와 알로에 및 기능/지표성분의 심장질환 개선효능 및 약리기전을 관찰함.

- 양파·알로에 복합소재의 지표성분 표준화를 통한 품질관리기준 확립
 - 복합소재의 원료 및 제조공정을 표준화함.
 - 지표성분을 표준화하고 품질관리기준을 확립함.
 - 가용량과 활성효과를 고려한 최적의 비율을 확인함.

- 양파·알로에 복합소재의 안전성 평가 후 제품화 연구 및 개별인정 획득
 - 안전성 실험을 완료함.
 - 인체임상시험을 현재 약 80% 이상 진행함.
 - 개별인정신청을 위한 자료수집 및 시장조사를 완료함.
 - 복합소재를 부원료로 한 제품을 개발함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- SCI급 논문 11편, 비SCI 논문 2편 게재 완료
- 국내특허출원 2건 완료
- 중앙TV방송 SBS에 홍보성과 1건 완료
- 본 복합소재를 부원료로 하는 기능성 제품 출시 및 제품홍보 8건 완료
- 전임상 유효성 데이터 및 독성시험과 인체임상시험을 통한 개별인정신청 예정
- 양파·알로에 복합소재의 개별인정 획득 후 혈행개선 건강기능식품 출시 예정
- 양파·알로에 복합소재의 심혈관질환 개선 전임상 결과를 통해 의약소재화 가능

SUMMARY

I. Subject

“ Development of functional food utilizing complex material with onion and aloe ”

II. Purpose & Necessity of Research and Development

- Purpose of this research is to develop of functional health products industry and increase the income of farmers by acquiring individual recognition through standardization of index components of complex materials of onion and aloe extracts and development health function products to promote blood circulation.

III. Details & Scope of Research and Development

- The observation of blood circulation efficacy of complex materials
 - The blood circulation of exclusive or complex materials of onion and aloe extracts
 - The regulatory mechanisms of onion and aloe complex materials in blood circulation efficacy
 - The excavation of functional components from onion or aloe extracts
 - The regulatory mechanisms of function components in vitro model
 - The protective effect of functional components on cardiovascular disease model
- The formulation of quality management of complex materials
 - The standardization of index components and the formulation of quality standard of onion and aloe complex materials
 - The optimization research of pilot-scale manufacturing process
 - The excavation of functional components with synergic efficacy of onion and aloe extracts
- The commercialize research of complex materials
 - The mass production of onion and aloe complex materials (for clinical trials)
 - The safety test of onion and aloe complex materials
 - The application and reception of individual recognition for functional materials

- Development of functional health products

IV. Results of Research and Development

- The observation of blood circulation efficacy of complex materials
 - Completion of observing the improving efficacy of onion or aloe single material against blood circulation, cytotoxicity, and bleeding time.
 - Completion of observing the improving efficacy of onion and aloe complex materials against blood circulation, cytotoxicity and bleeding time, which according to the extract solvent, the time and the ratio manners.
 - Observing the effects of quercetin or aloin on blood circulation.
 - Completion of observing the improving efficacy of prototypes of onion and aloe complex materials on blood circulation.
 - Observing the improving efficacy and pharmacological mechanism of onion, aloe or its major components on cardiovascular diseases model.
- The formulation of quality management of complex materials
 - Standardizing the raw materials and the manufacturing process of the onion and aloe complex composite material.
 - Standardizing the index components of onion or aloe extracts.
 - Establishment of quality control standard.
 - Establishment of optimum ratio considering the available amount and activities.
- The commercialize research of complex materials
 - Completion of safety test.
 - Approximately 80% completed clinical trials in progress
 - Completion of data collection and market research for application of individual recognition.
 - Development of functional health products using onion and aloe complex materials.

V. Research Outcome & Utilization Plan

- Publication SCI: 11, SCIE: 2
- Korean patent application: 2
- Central media broadcasting SBS promotion accomplishment: 1
- Functional health product launch: 1
- Securing of safety test and preclinical and clinical trials results
- Permits for individual recognition as functional food are currently being prepared
- Available in pharmaceutical chemical materials

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research and development	9
Section 1. Background of economic, industrial and social research	
Section 2. Validity of the research and development subject	
Section 3. Trends of domestic and international research	
Chapter 2. The status of domestic and international technological development	15
Section 1. The status of domestic and international technological development	
Chapter 3. Contents and results of research and development	20
Section 1. The observation of blood circulation efficacy of complex materials	
Section 2. The formulation of quality management of complex materials	
Section 3. The commercialize research of complex materials	
Chapter 4. Achievement and devotion	136
Section 1. Target achievement of details projects	
Section 2. Devotion to relative field	
Chapter 5. Application plans of research results	140
Section 1. Publication and patent	
Section 2. Promotion and commercialization strategy	
Chapter 6. Foreign information collected	148
Chapter 7. The current status of research installation and equipment	149
Chapter 8. References	150

목 차

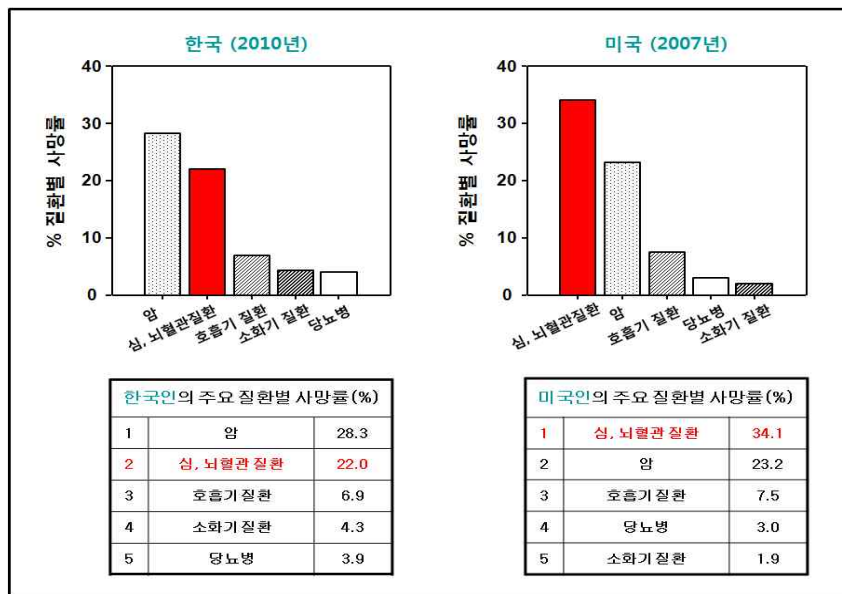
제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 1 절	경제적, 산업적, 사회적 측면에서의 연구배경	9
제 2 절	연구개발 소재의 타당성	11
제 3 절	국내, 외 연구 동향	13
	1. 국내연구동향	
	2. 국외연구동향	
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 1 절	국내외 관련분야 환경변화	15
	1. 2012년 국내외 기술개발현황	
	2. 2013년 국내외 기술개발현황	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절	양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증 및 기능성물질의 기작 연구	20
	1. 단독소재(양파 및 알로에)의 혈액순환기능 증진효능 검증	
	2. 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증	
	3. 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 기작 연구	
	4. Lab scale로 제조된 양파·알로에 복합소재의 항혈소판 효능 검증	
	5. 시제품의 항혈소판 효능 검증	
	6. 기능성 물질의 항혈소판 효능 관찰	
	7. 양파 및 기능성분의 심장보호효능 및 기작 연구	
	8. 분획별 양파·알로에 복합소재의 in vitro에서의 항혈소판 효능 검증	
제 2 절	양파·알로에 복합소재의 지표성분 표준화를 통한 품질관리기준 확립	46
	1. 건강기능식품 개별인증 획득을 위한 원료 표준화 과정	
	2. 양파·알로에의 복합소재 개발	
	3. 기능/지표성분 설정	
	4. 양파·알로에 복합소재의 표준화	

5. Pilot-scale 제조공정의 최적화 연구	
6. 양파·알로에의 시너지 효과 유발 물질 발굴	
제 3 절 양파·알로에 복합소재의 안전성 평가 후 제품화 연구 및 개별인정 획득	93
1. 양파·알로에 복합소재의 대량추출 및 임상실험 시제품 생산	
2. 알로에 추출물 등 복합물의 독성검사 실시	
3. 임상시험 : 알로에 추출 등 복합물의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 미치는 효과	
4. 알로에 추출물 등 복합물의 시작 적용 제품 출시(부원료 사용)	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	136
제 1 절 세부과제별 목표달성도	136
제 2 절 관련분야에의 기여도	139
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	140
제 1 절 연구논문 발표 및 지적재산권 확보	140
1. 논문게재 성과	
2. 지적재산권 성과	
3. 학술회의 발표 성과	
제 2 절 홍보 및 사업화 전략	142
1. 홍보성과	
2. 우수성과 지목	
3. 사업화 전략	
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	148
제 7 장 연구시설·장비 현황	149
제 8 장 참고문헌	150

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 경제적 · 산업적 · 사회적 측면에서의 연구배경

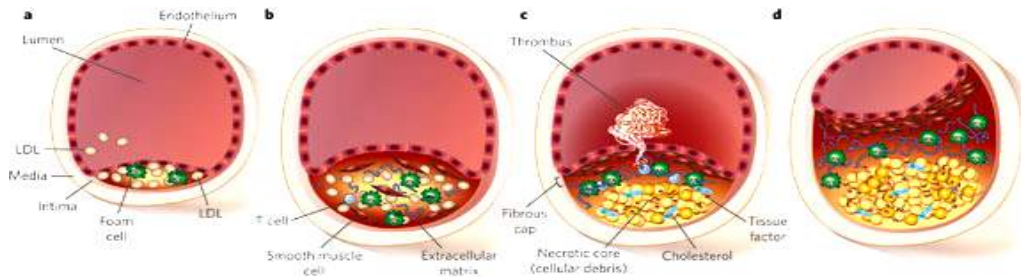
- 전 세계적으로 현대의학기술과 경제발달로 인해 노령인구가 급격히 증가하고 있고, 이에 따라 노년의 건강한 삶을 지속적으로 유지하기 위해 건강에 대한 인식이 확산됨으로써, 질환 예방을 위한 식생활 개선 및 건강기능제품에 대한 개발이 급격히 증가하고 있음.
- 심근경색, 고혈압, 동맥경화, 협심증 등의 심혈관질환은 우리나라에서 암과 더불어 주요한 사망원인을 차지하고 있음. 세계보건기구 (WHO)의 발표에 따르면, 전 세계 사망원인 1위가 **심혈관질환**이며, 아시아·태평양 지역에서 전 세계 심혈관질환의 절반 이상이 발생되고 있고, 서구 지역에 비해 젊은 연령에서의 발병 빈도가 높아 이로 인한 사회적 · 경제적 질병부담이 꾸준히 증가하고 있는 추세임 (그림 1).



[그림 1] 주요 사망원인 질환

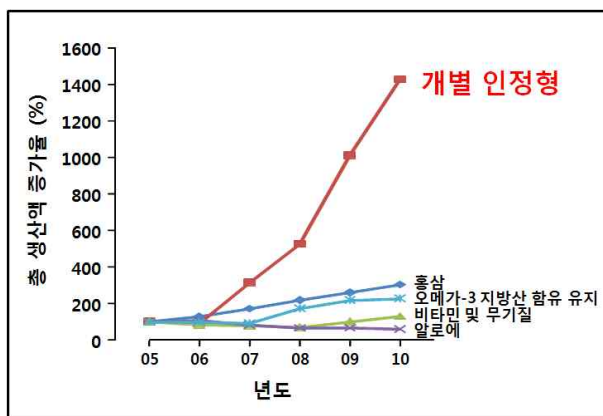
- 보건복지부에 따르면 2008년 국민건강영양조사를 토대로 20세 이상 성인에서 만성질환 위험인자를 한 가지 이상 보유한 인구는 65.9%에 이르는데, 이러한 위험인자를 가진 사람들은 혈액순환장애질환으로 발전할 가능성이 매우 높다고 보고함 (연합뉴스, 2010. 7월).
- 혈액순환장애질환: 전 세계적으로 주요 사망원인을 차지하는 심장, 뇌질환과 당뇨는 궁극적으로 혈액 순환 장애로 발생하는 질환임. 혈액순환장애질환은 혈관 내 과도한 혈소판 응집에 의해 형성된 혈전, 혈관수축이나 죽상경화증과 같은 혈관 내 증상이 있을시 혈관 내 물질들의 작용에 의해 혈관이 좁아져 생김. 혈관이 좁아지면 혈액의 혈소판이 압착되어 손상을 입게 되며 혈액 내에서 혈소판이 응집되어 혈전을 생성함. 이 혈전은 혈관을 막아 동맥으로부터 공급받는 산소와 영양소를 차단하여 급성 심근 경색 발생을 유도함.

따라서 혈전 생성 및 혈소판 과응집을 예방하는 하는 것은 혈액순환장애 질환을 예방하는 중요한 요소임 (그림 2).

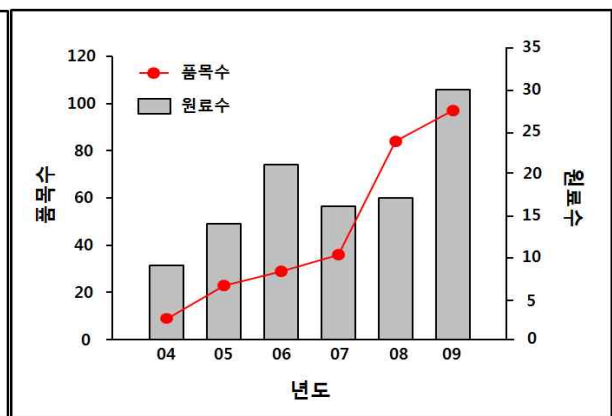


[그림 2] 혈액순환장애 질환의 과정

- 최근 국내외적으로 건강기능제품에 대한 선호도가 증가되었고, 주요 질환에 효능이 있는 농산물의 단일성분을 이용한 개발보다 복합성분을 이용한 건강기능제품의 개발이 증가하고 있음. 한편, 국내 건강기능제품의 생산액이 비약적으로 증가했지만, 그 중 기능성에 많은 제한을 갖는 고시형 제품이 90% 이상을 차지하므로, 여러 기능성을 가지는 개별인정형 제품의 생산이 필요함.
- 개별인정형 품목의 총 생산액은 2009년 800 억 원에 비해 2010년 1,129 억 원으로 약 41% 정도가 증가하였으며, 이것은 2005년 79 억 원에 비해서 1,400% 이상 증가한 수치임 (그림3). 또한, 2004년 법률 시행 이후 2009년까지 6년 동안 받은 개별인정형 원료 품목 수는 매년 20% 이상의 성장세를 보이고 있음 (그림 4).



[그림 3] 품목별 총생산액 증가율추이



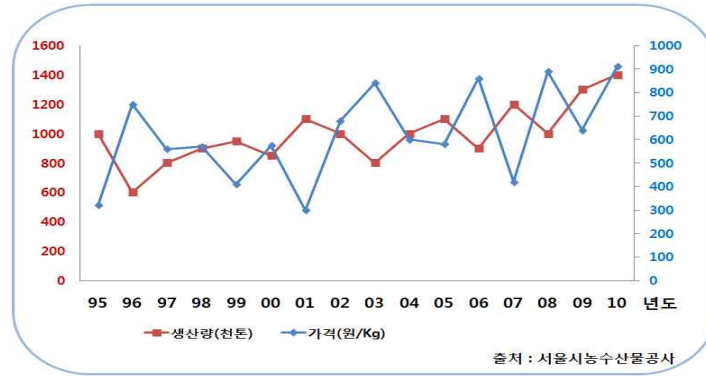
[그림 4] 개별인정형원료수 및 품목수 증가량

- 건강기능제품에는 농생명자원을 활용한 제품이 높은 비중을 차지함. 식약청의 건강기능제품 통계자료에 따르면, 농생명자원을 원료로 한 건강기능제품 매출액이 2005년 6,755억 원에서 2009년 9,598억 원으로 매년 9.5% 꾸준히 증가하고 있고, 품목수도 매년 증가함.

- 따라서, 본 연구에서는 양파·알로에라는 농가의 소득에 기여할 수 있는 농산물을 활용하여 유용성분을 발굴하고 지표성분을 표준화하여 혈액순환장애질환에 대한 개선효능 및 안전성을 검증함으로써 건강기능제품을 개발하여 개별인정을 획득함으로써 고부가 가치 창출 산업에 기여하고자 함.

제 2 절 연구개발 소재의 타당성

- 2010년 식약청의 건강기능제품 생산실적 통계자료에 따르면, 100 억 원 이상 판매된 제품군은 홍삼과 비타민 제품의 뒤를 이어 고시형 품목으로써 알로에 제품이 3위를 차지하고 있음. 하지만, 알로에 제품은 대부분 배변기능 및 피부, 면역질환에 대한 기능성만을 인정 받은 고시형 건강기능제품이 대부분임.
- 또한, 개별인정형 원재료의 70%를 수입에 의존하는 실정에 비추어 볼 때 원료의 국산화를 위해 국가전략차원에서 개별인정형 제품 개발에 대한 지원규모의 확대와 필요성이 강력하게 제기되고 있음.
- 최근에 질환에 대한 효능에 있어서 단일 성분보다도 복합성분들의 혼합물이 보다 효과적이라는 연구결과가 많이 보고됨에 따라, 농생명자원으로부터 생리활성 물질의 최적 복합 성분 조성을 발굴하여 기능성 제품의 식의약소재로 개발하는 데 관심이 모아지고 있음.
- 대표적인 복합소재 건강기능제품으로 한국야쿠르트의 ‘쿠퍼스’가 있는데 이것은 간장 질환에 대한 보호 효능으로 개별인정을 받은 헛개나무 열매추출분말을 주성분으로 하여 그 외에 영지, 더덕, 유산균 등의 성분을 함유하고 있음. 여기에 축적된 프로바이오틱스 기술을 바탕으로 한 유산균의 효능이 더해져 시너지 효과 나타냄. 쿠퍼스의 2010년 연간 매출액은 1,000 억 원대에 달하며, 일평균 30만개, 월 150 억 원 판매고를 올리고 있음.
- 양파는 생산량이 일정하지 않아 매해마다 수급불균형으로 인하여 양파의 가격에 대한 파동이 일어나고 있는 실정임 (그림 5). 이로 인하여 양파 농가 소득의 불안정을 초래하고 국내 소비 용도가 가정용으로 편중되어 가공이용률은 매우 낮은 것으로 나타났으며, 마늘과 양파는 저장성이 낮아 부패에 의한 폐기율이 30%이상이 되고 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정임.



[그림 5] 양파의 연도별 생산량과 가격

- 양파 농가의 소득을 안정화하기 위해서는 생산기술의 개발과 함께 양파의 유통 및 소비 시장의 안정적 확보가 매우 중요한데 이러한 방법은 첫째, 가공용 소비를 확대하는 방법과 둘째, 기능성이 우수한 품종을 선발하거나 육성하는 방법임. 두 가지를 동시에 만족하기 위해서는 소비자들이 필요로 하는 제품을 생산하는 것임.
- 특히, 양파의 주요 생리활성 물질인 퀘세틴(quercetin)의 항암효과 및 항산화 효능은 이미 많이 알려져 있고, 양파의 혈전 억제 및 동맥경화 방지를 통한 혈류개선효과, 심장기능 보호효과 등의 긍정적인 효과를 본 연구팀을 비롯한 여러 연구팀에서 보고하였음. 또한, 양파의 주요 성분인 퀘세틴은 심혈관 기능개선, 고혈압 개선, 혈중 콜레스테롤 감소, 항암효과 등의 다양한 효능을 갖고 있는 것으로 알려져 있음. 하지만, 2009년 연구에 따르면 이렇게 다양한 효능을 갖는 퀘세틴의 장내 흡수율이 2% 미만으로 매우 낮음. 최근에는 Natural polymer 사용을 통해 quercetin이 좀 더 잘 흡수될 수 있는 장 내 부위(colon)로 이동할 수 있다는 연구결과가 발표됨. (Singhal A et al. 2011)
- 현재까지 알로에와 관련된 건강기능 제품으로는 2010년 알로에 제품이 584억 원 (5%)으로 2위를 차지하였음. 알로에의 경우 대부분이 수입에 의존하고 있으나, 수입산 알로에의 경우 알로에의 수입과정과 상태에 따라 알로에 생체 고분자의 보존이 어려워 고품질의 알로에의 원료를 사용할 수 없게 될 가능성이 증가함. 따라서 국내산 알로에를 사용할 경우, 알로에의 생체 고분자가 잘 보존된 고품질 알로에를 원료로 하여 건강기능성 제품을 생산할 수 있으며, 이로 인한 알로에 소비에 대한 기대가 증가할 경우, 농가의 새로운 소득 대체원을 제시할 수 있음.
- 특히, 알로에 역시 emodin, aloesin, acetylmannan등과 같이 고기능성 성분들이 다량 함유된 식물로써, 항암효과, 면역 강화, 염증완화, 대장 운동 촉진등과 더불어, 혈소판 응집 억제 효능을 가진 것으로 알려져 있음. 또한 알로에의 성분 중 생체고분자(natural polymer)와 같은 성분을 다량 함유한 것으로 알려져 있음. 따라서 알로에와 양파의 복합 물질을 개발하였을 때, 알로에가 양파 퀘세틴의 생체 이용률 저하에 대한 문제를 보완하여 체내 퀘세틴의 흡수율 증진에 기여할 것으로 사료되며, 혈액순환기능 증진에 대한 두 복합소재의 시너지 효과를 기대할 수 있음.

- 현재까지 개별 인정을 받은 복합소재의 종류는 총 21개로 관절/뼈건강, 혈당조절, 체지방 감소, 면역기능에 대한 개선 효능을 인정받은 원료가 대부분을 차지하고 있는 가운데 기존의 단독소재로서 양파와 알로에의 효능은 많이 알려져 있으나, 양파·알로에 복합소재를 이용한 건강기능제품, 특히 혈액순환기능 증진에 대한 건강기능제품은 개발되지 않았으므로 양파와 알로에의 복합소재를 원료로 한 건강기능성제품은 제품 경쟁력이 매우 우수할 것이라고 생각됨.
- 본 연구에서는 천연 농생명자원인 양파 및 알로에를 이용하여 복합소재를 개발하고, 복합소재의 기능성자원의 혈액순환 기능 증진 효능을 검증함으로써 고기능성 소재를 발굴하여 개별인정 획득을 도모하고자 함. 궁극적으로는 고기능성 복합소재의 건강기능제품의 실용화 전략을 위해 기업체와 협력하여 고등급의 개별인정을 획득하고 기술이전을 수행함으로써 기능성제품의 과학적 근거를 제시할 수 있고, 더불어 기업친화적인 소재를 이용함으로써 적극적인 기업참여를 기대할 수 있음. 또한 천연물로부터 고기능성 물질을 발굴 및 기작을 규명하여 심혈관질환 개선을 위한 신의약 소재를 제시하여 고부가 가치 산업화를 촉진할 수 있음.

제 3 절 국내·외 연구 동향

1. 국내 연구 동향

[표 1] 양파 및 알로에의 국내 연구 동향

연도	연구 내용	연구자	소속	학회지
1997	고 또는 저콜레스테롤 식이를 먹인 쥐에 있어서 양파, 마늘이 체내 콜레스테롤과 중성지방 수준 및 혈소판 응집에 미치는 영향	강정애, 강정숙	제주대학교	한국영양학회
2000	비상품 양파추출물의 Mouse 피부암 및 위장암 억제효과	이찬중 외 5명	경북대학교	한국식품영양과학회지
2002	케일가공부산물 및 양파의 마른 껍질로부터 체중조절용 bioflavonoids 소재 개발	김혜영 외 5명	한국식품개발연구원	농림부 보고서
2009	알로에 베라와 흰무늬 엉겅퀴 혼합물의 사염화탄소로 유도된 간독성과 간섬유화에 대한 보호효과	Kim SH 외 6명	성균관대학교	J Pharmacol Sci
2009	마우스에서 알로에 베라의 다균성	Yun N 외	성균관대학	Food Chem

	패혈증에 대한 보호효과	2명	교	Toxicol
2011	양파 메탄올 추출물의 허혈/저산소로 유도된 심장세포사멸에 대한 항산화 효과를 통한 보호효과	Park CH 외 8명	경북대학교	Int J Mol Med

- 양파와 관련된 국내 연구현황은 현재까지 혈소판 응집 억제, 피부암 및 위장암 억제 효과, 허혈성 심혈관 질환 등에 관한 연구가 이루어짐. 알로에와 관련된 연구현황은 간독성, 패혈증, 장운동 기능 개선에 관한 연구 효과에 대한 연구가 주로 이루어짐.

2. 국외 연구 동향

[표 2] 양파 및 알로에의 국내 연구 동향

연도	연구 내용	연구자	소속	국가
2006	알로에 베라즙의 린데인으로 유도된 간독성과 유전독성에 대한 보호효과	Etim OE 외 3명	University of Uyo	나이지리아
2007	스트랩토조토신으로 유도된 당뇨쥐에서 활성산소 바이오마커에 대한 양파 섭취의 감소 효과	Azuma K 외 3명	National Institute of Vegetable and Tea Science	일본
2008	추출물의 카드뮴으로 유도된 신장독성에 대한 양파와 마늘 효과	Suru SM	University of Ibadan	나이지리아
2008	허혈/재관류로 유도된 뇌손상에 대한 양파 메탄올 추출물의 보호효과	Shri R & Singh Bora K	Punjabi University	인도
2009	간에서 카드뮴으로 유도된 산화적 손상에 대한 양파와 마늘 추출물의 보호효과	Obioha UE 외 3명	University of Ibadan	나이지리아
2010	알로에 베라의 ECG와 혈압 측정에 대한 효과	Shah SA 외 5명	University of the Pacific	미국
2010	당뇨병과 이상지질혈증 치료를 위한 알로에 베라	Ngo MQ 외 2명	CVS Pharmacy	미국
2011	알로에 베라 겔 추출물의 항산화 효소와 아족시메탄으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 효과	Anilakumar KR 외 5명	Defence Food Research Laboratory	인도
2011	캔디다성질염에 대한 알로에 베라 및 대식세포의 반응에 대한 기능의 면역조절작용 효과	Farahnejad Z 외 2명	AJA University of Medical Sciences	이란

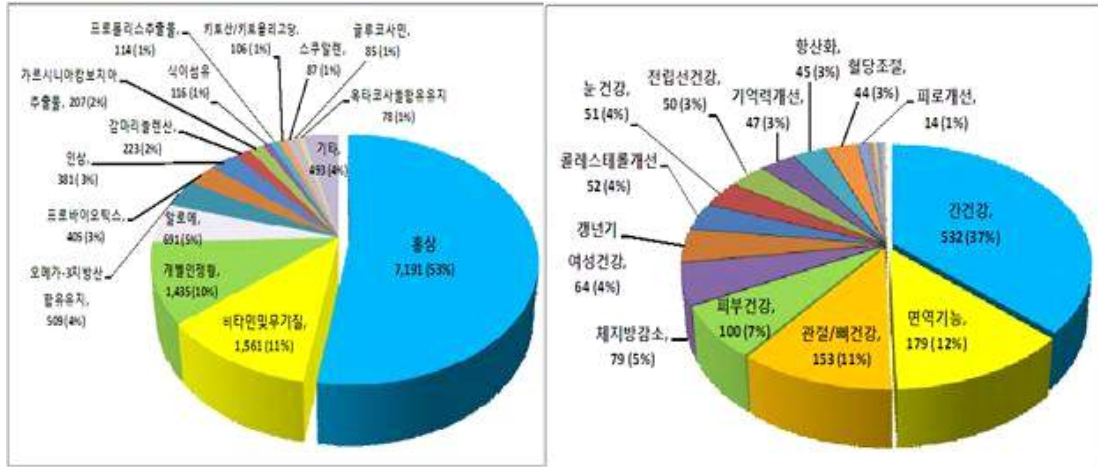
- 양파와 관련된 국외 연구현황은 현재까지 당뇨, 신장, 뇌경색 등에 대한 효과 관찰 및 항산화 효과에 대한 연구가 주로 이루어짐. 또한, 알로에와 관련된 연구현황은 간 독성, 유전 독성, 당뇨 등에 대한 효과 관찰 및 항산화 효과에 대한 연구가 주로 이루어짐.
- 현재까지 양파와 알로에에 관한 연구는 간, 장, 위, 피부, 뇌경색 등 다양한 질환에 관한 연구가 이루어져 왔음. 그러나 아직 양파·알로에 복합 추출물의 효과에 대한 연구가 이루어지지 않았음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련분야 환경변화

1. 2012년 국내외 기술개발현황

- 식품의약품안전청은 '11년 건강기능식품 생산액 총 1조3천682억 원으로 '10년(1조671억원) 대비 28.2% 증가한 것으로 분석하였으며, 건강기능식품 제도가 시행된 '04년 2천 506억원에 대비 4.5배 증가한 것으로 분석했음. 이 중 건강기능식품 수출액은 '10년도 460억 원에서 '11년 556억원으로 21.0% 증가하였음. 이러한 건강기능식품 산업 성장 추세는 우리나라가 고령화 사회로 진입하고 자기 건강관리 (Self-Health Care)에 대한 관심 증가 등이 이유로 풀이됨.
- 건강기능식품 품목별 생산실적 분석 결과,
 - 홍삼제품 생산액이 전체 건강기능식품 시장의 52.6% (7천190억원)을 차지하며 1위를 달성함.
 - 홍삼제품은 '04년 전체 건강기능식품 시장의 30% (1천920억원), '10년 54.5% (5천817억 원)을 기록하며 현재까지 1위를 유지하고 있음.
 - 그 뒤를 이어 ▲비타민 및 무기질 제품 (1천561억원) ▲개별인정형 제품 (1천434억원) ▲알로에 제품 (691억원) ▲오메가-3 지방산 함유 제품 (508억원) 순으로 나타났음.
 - '10년 대비 가장 많이 증가한 품목은 ▲감마리놀렌산 139.8% (93억→223억) ▲비타민 및 무기질 57.5% (991억→1,561억) ▲오메가-3 지방산 함유유지 46.2% (348억→509억) 순으로 나타남.
 - 이러한 증가 추세의 원인은 감마리놀렌산과 오메가-3 지방산 함유유지 제품의 경우 육류 및 고지방식 섭취 증가로 인한 소비 수요가 증가한 것으로 풀이됨.
 - 비타민 및 무기질 제품은 바쁜 일상 속에서 직장인들의 식이보충용 소비가 늘고 있는 것으로 분석됨 [그림 6].



[그림6] 건강기능식품 품목별 및 질환별 생산실적

- 아울러, 소비자 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능식품도 꾸준히 증가하고 있음.
- 최근, 개별인정형 품목의 총 생산액은 ‘10년 1,129억 원에 비해 ’11년 1,435억 원으로 약 27% 정도가 증가하였으며, 이것은 2005년 79 억 원에 비해서 1,800% 이상 증가한 수치임. 또한, 2004년 법률 시행 이후 받은 개별인정형 원료 품목 수는 매년 20% 이상의 성장세를 보이고 있음.
- 이러한 천연 원료를 질환예방 및 건강증진과 관련시켜 이해하고자 하는 국내외 시도가 전 년도에 비해 크게 증가하였고, 특히, 천연 원료와 혈행개선과의 관련성은 기존에 은행잎 위주로만 연구되었던 것과는 달리 최근 1~2년 사이 다양한 소재가 혈행개선과 관련있다는 국내외 수많은 논문발표들로 미루어 보아 다양한 소재를 이용한 혈행개선효능 연구가 계속해서 증가하고 있음을 알 수 있음.
- 따라서 최근 국내외 연구 성장 속도와 발맞추어 혈행개선에 효능있는 물질의 발굴과 그 작용 기작을 밝히는 것은 부작용이 적고 쉽게 접할 수 있는 건강기능식품 개발에 있어 중요한 연구가 될 것으로 사료됨.

2. 2013년 국내외 기술개발현황

- 식품의약품안전처(처장 정승)는 ‘12년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조4,091억원으로 ‘11년(1조3,682억원) 대비 3% 증가하였지만 예년에 비해 둔화세를 나타냈다고 밝혔다.
- ‘12년 건강기능식품 생산실적은 국내·외 전반적 경기침체에 따른 건강기능식품 수요 감소 및 중저가 제품 선호 등의 이유로 둔화세를 보였으나, 개별인정형 건강기능식품은 성장세

를 이어가고 있는 것으로 나타남.

- 제품별 분석 현황으로는 '12년도 전체 건강기능식품 생산액(1조4,091억원) 중 46%(6천484억원)를 차지한 홍삼제품이 가장 높은 점유율을 보였지만 '11년도의 53% 점유율에 비해서는 크게 감소하였음.

※'11년도 건강기능식품 전체 생산액 1조3,682억원, 홍삼제품 생산액 7,191억원, 그 뒤를 이어 ▲비타민·무기질 11.7%(1천646억원) ▲알로에 4.9%(687억원) ▲프로바이오틱스 3.7%(518억원) ▲오메가-3지방산함유유지 3.5%(497억원) 제품 순으로 나타났음 [그림 7].

【품목별 생산실적 현황(상위 10개 품목)】

('12. 12. 31. 기준, 출처:식약처)							
순위	구분	총생산액					증가율 ('12/'11,%)
		2008	2009	2010	2011	2012	
	총생산액(억원)	8,031	9,598	10,671	13,682	14,091	3.0
1	홍삼	4,184	4,995	5,817	7,191	6,484	-9.8
2	개별인정형	416	799	1,129	1,435	1,807	25.9
3	비타민·무기질	531	761	991	1,561	1,646	5.4
4	알로에	639	648	584	692	687	-0.7
5	프로바이오틱스	190	254	317	405	518	27.9
	누계(5품목)	5,960	7,457	8,838	11,284	11,142	-1.3

[그림 7] 품목별 생산실적 현황 (식약처, 2012. 12)

- 개별인정형 건강기능식품 성장세 유지하였는데, 새로운 기능성 원료를 사용한 '개별인정형' 건강기능식품의 지난해 생산실적은 1,807억원으로 '11년 1,435억원에 비해 26% 증가한 것으로 나타났음.

※ 개별인정형 : 고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 기능성 원료로 제조한 건강기능식품 (헛개나무 추출물, 당귀혼합 추출물 등)

※ 개별인정형 생산실적 (%는 전년대비 증감률) : ('08) 416억원 → ('09) 800억원 (92%) → ('10) 1,129억원 (41%) → ('11) 1,435억원 (27%) → 1,807억원 (26%)

- 제품별로는 헛개나무과병추출분말(간 건강)이 전체 27.8%(502억원)을 차지하여 가장 많았으며, 그 뒤를 이어 ▲당귀혼합추출물 (면역기능) 13.6% (245억원) ▲그린마떼추출물 (체지방감소) 8.1% (147억원) ▲밀크씨슬추출물 (간건강) 7.5% (135억원) 등으로 나타남.

- 또한, 상위 5위 제품군 중 지난해 가장 높은 성장세를 보인 제품은 체지방 감소 제품으로 201.2% (78 → 235억원)이었으며, 갱년기 여성 건강 103.1% (64 → 130억원), 간 건강 41.6% (531 → 752억원) 등의 순이었음.

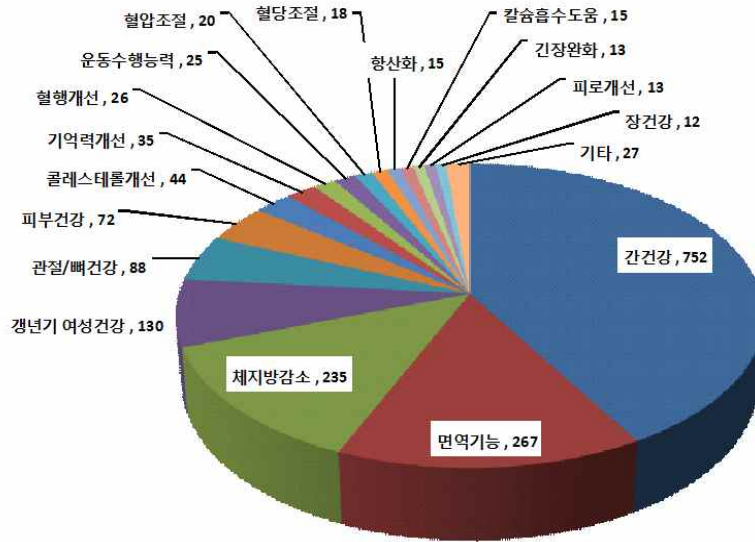
이들 제품의 급성장 요인은 젊음을 유지하고 싶은 욕구 증대와 몸매관리를 중시하는 사회

적 환경 때문인 것으로 풀이됨.

- 기능성별로는 간 건강 관련 제품이 전체 개별인정형 제품의 41.6% (752억원) 가량을 차지하여 가장 많았으며, 그 뒤를 이어 ▲면역기능 14.8% (267억원) ▲체지방감소 13% (235억원) ▲갱년기 여성건강 7.2% (130억원) 제품 순이었음 [그림 8]

【개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적('12년/억원)】

('12. 12. 31. 기준, 출처:식약처)



[그림 8] 개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적 (식약처, 2012. 12)

- 현재 국내 기능성 제품 관련 연구는 항산화, 면역, 항암, 순환기질환에 초점을 두어 다양한 원료 및 제품 개발에 투자하고 있음. 소비자들이 수입산에 비해 국내산을 월등히 선호하고 있는 것이 사실인데 반하여 아직은 대부분의 기능성 원료를 수입에 의존하고 있음. (건강기능식품의 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전청, 2012) 따라서, 우리만의 고유한 신기술이나 외국 신기술을 방어 또는 대체할 수 있는 기술확보를 통하여 국내 기능성 식품산업을 자체적으로 육성하는 것이 절실히 요구됨.
- 우리나라 저자가 참여하여 발표한 논문은 1992년부터 최근까지 총 2,000 여편이며, 우리나라의 건강기능식품 관련 연구 활동은 1990년대 중반부터 본격적으로 시작되어 2006년 이후부터는 급격히 증가하여 논문이 발표되고 있음.
- 건강기능식품에는 농산물을 활용한 제품이 높은 비중을 차지함. 건강기능식품 중 농산물 활용 제품의 비중은 2005년부터 현재까지 꾸준히 증가하고 있으며, 품목수도 매년 증가하고 있음. 이는 소비자의 농산물을 원료로 한 기능성 식품에 대한 선호도를 반영하는 것임.
- 전 세계적으로도 건강기능식품 관련 논문은 1990년대에 천천히 증가하다가 2009년부터는 연간 10,000건이 넘는 논문이 발표되고 있는 것을 통해 현재 건강기능식품 활용 및 응용

기술 개발이 더욱 활발해지고 있다는 것을 알 수 있음.

- 국외의 연구는 양파와 같은 농산물로부터 과육과 과피 등의 특수 성분을 추출하여 기능성을 확인하고 그걸 이용한 기능성 상품 개발에 대한 연구가 유기적으로 진행되고 있으며, 그 연구범위가 매우 다양하며 체계적으로 유지되어 오고 있음.
- 미국과 유럽에서는 식품개발연구소를 설립하여 기능성 식품관련 산업화 연구를 활발히 진행하고 있으며, 국제협력 연구를 진행하여 건강기능식품의 발전이 느린 나라들과의 공동 연구를 통해 발달된 기술을 전달해 주고 있음.
- 이상과 같이 국내 뿐만 아니라 국외에서도 농산물을 활용하여 다양한 생리활성 물질을 탐색하고 발굴하여 고기능성 물질을 실용화하는 방법에 대해 많은 연구와 투자를 하고 있으나 이 분야의 무한한 잠재력에 비해 아직 국내의 연구는 체계적으로 확립되지 않았으며 일부 국한된 기관에서만 연구들이 진행되는 실정임.
- 따라서 본 연구진은 개별인정형 후보소재인 양파와 알로에를 활용하여 유용성분을 발굴하고 지표성분을 표준화하여 혈액순환 장애질환에 대한 개선 효능 및 안전성을 검증함으로써 건강기능제품을 개발하여 개별인정 획득을 도모하고자 하며, 궁극적으로 고부가가치 창출 산업에 기여하고자 함.

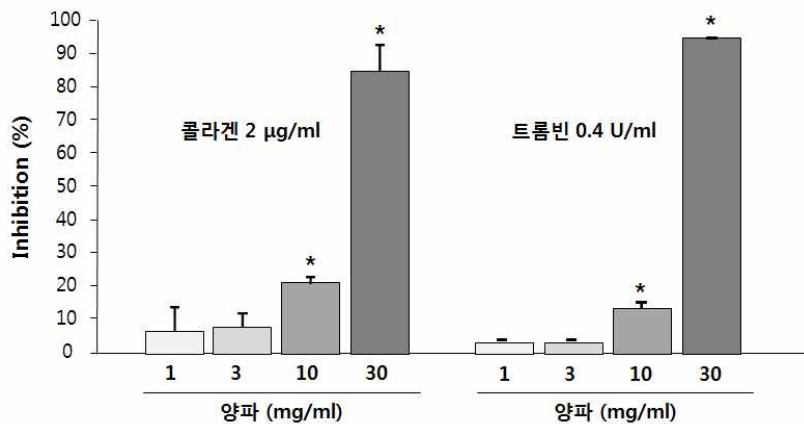
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 효능 검증 및 기능성물질의 기작 연구

1. 단독소재(양파 및 알로에)의 혈액순환기능 증진효능 검증

가. 양파 단독소재의 혈소판 응집 억제효능

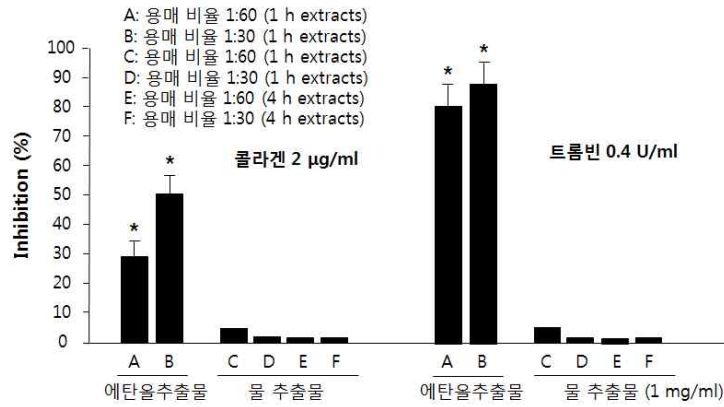
- 콜라겐과 트롬빈으로 유도된 혈소판 응집반응에서 양파 에탄올 추출물에 의해 혈소판 응집이 농도 의존적으로 억제되었음 [그림 1-1].



[그림 1-1] 콜라겐 2 µg/ml과 트롬빈 0.4 U/ml으로 유도된 혈소판 응집반응에서 양파 에탄올 추출물의 혈소판 응집효과 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=6)

나. 알로에 단독소재의 혈소판 응집 억제효능

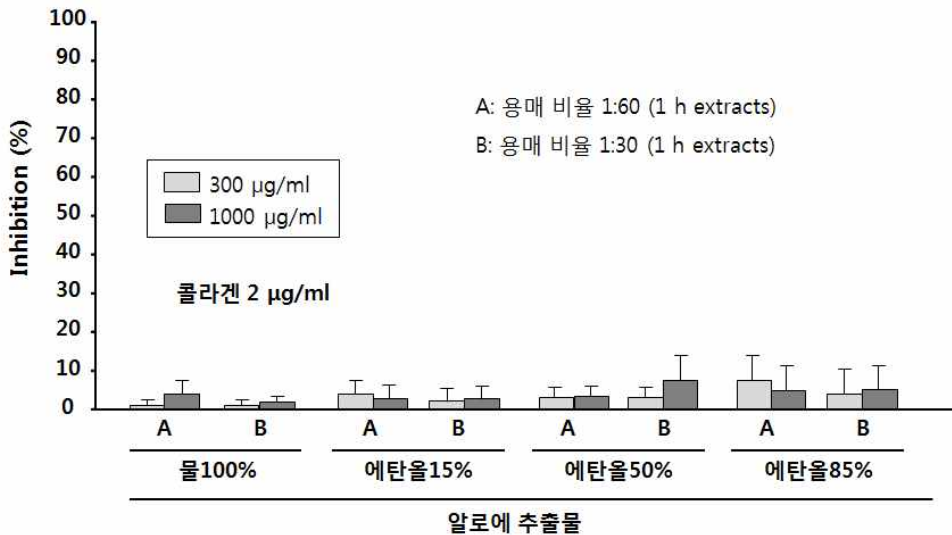
- 알로에를 용매 종류와 비율, 추출 시간에 따라 각각 추출하였고 (제 1 협동과제 결과 참고), 추출한 모든 알로에 샘플의 혈소판 응집억제효능을 관찰한 결과, 시간과 비율에 따른 효능의 변화가 없었던 반면, 용매에 따른 혈소판 응집억제효능의 변화가 나타남. 물과 에탄올 100% 추출물의 효능을 비교하였을 때, 알로에 물 추출물에서는 혈소판 응집억제 효과가 나타나지 않은 반면, 에탄올 100% 추출물에서는 혈소판 응집억제효과가 증가하였음. [그림 1-2].



[그림 1-2] 콜라겐과 트롬빈으로 유도된 혈소판 응집반응에서 추출방법에 따른 알로에 추출물의 혈소판 응집억제반응에서 알로에 물추출물과 에탄올 추출물의 혈소판 응집효과 비교 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=6)

다. 알로에 물과 에탄올 비율별 추출에 대한 혈소판 응집 억제효능

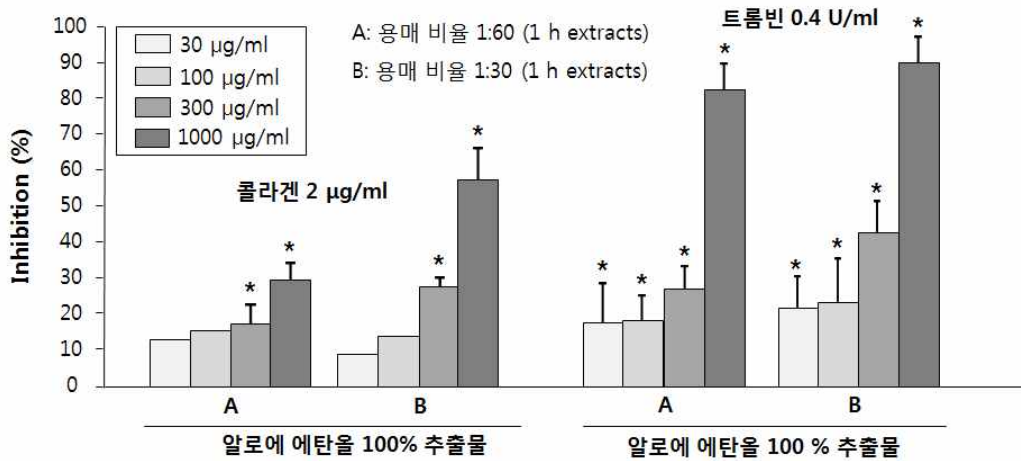
- 알로에 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 혈소판 응집억제효과가 유의적으로 나타났으므로, 알로에 에탄올 %에 따라 추출을 하였고 (제 1협동과제 결과 참고), 알로에 에탄올 %에 따른 추출물의 효능을 관찰한 결과, 에탄올 15 ~ 85% 모두에서 물 추출물과 마찬가지로 혈소판 응집효과가 나타나지 않았음 [그림 1-3].



[그림 1-3] 알로에 에탄올 %에 따른 추출물의 혈소판 응집 억제효과 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=3)

라. 알로에 에탄올 추출물의 혈소판 응집 억제효능

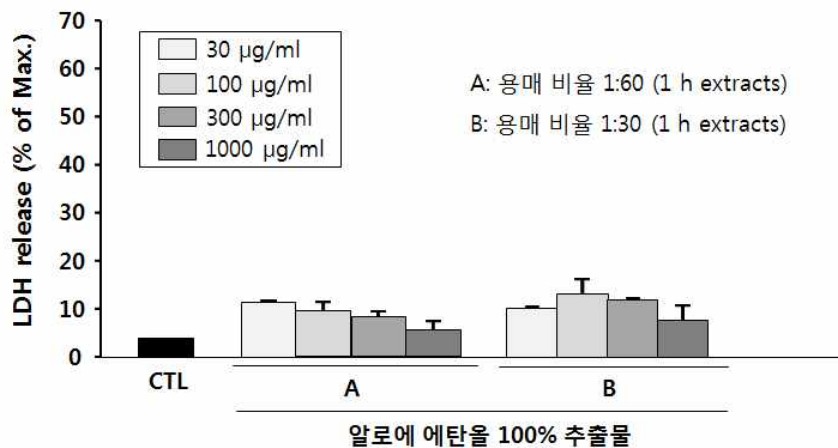
- 알로에 에탄올 100% 추출물의 농도별 혈소판 응집효과를 관찰한 결과, 알로에 에탄올 100% 추출물 30 ~ 1000 ug/ml을 처리했을 때, 콜라겐과 트롬빈 모두에서 농도 의존적으로 혈소판 응집이 억제되었음 [그림 1-4].



[그림 1-4] 추출조건이 다른 알로에 에탄올 100% 추출물의 혈소판 응집억제 효과 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=3)

마. 알로에 에탄올 100% 추출물의 세포독성

- 알로에의 혈소판 응집 억제 효과가 세포 독성과 무관함을 보기 위하여 가장 흔히 이용되는 방법인 LDH 유리 정도를 통하여 알로에 에탄올 100% 추출물의 세포독성을 관찰한 결과, 알로에 추출물에 의해 LDH 유리 정도가 증가하지 않은 것을 통해 알로에 추출물은 세포독성을 일으키지 않고 혈소판 응집 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었음 [그림 1-5].

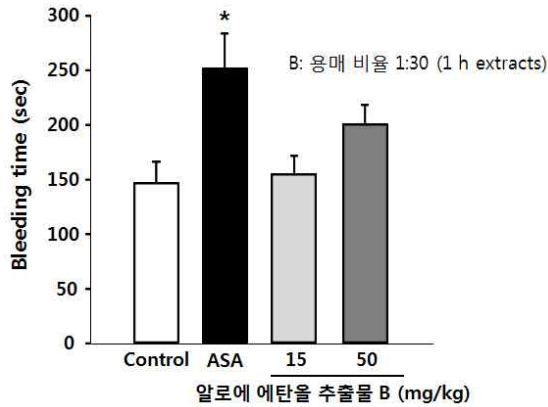


[그림 1-5] 혈소판 응집 억제효과를 가지는 알로에 에탄올 100% 추출물의 혈소판 세포독성 관찰 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=3)

바. 알로에 에탄올 100% 추출물의 출혈지연효능

- 생리적으로 혈소판 응집은 상처가 났을 때 지혈되는 과정 중 하나임. 따라서 혈소판 응집을 억제한다는 것은 상처가 났을 때 출혈이 지연되어 지혈이 잘 되지 않을 수 있다는 가능성이 있음. 잘 알려진 혈소판 응집억제제인 아스피린 (ASA)의 경우, 혈소판 응집을 억제하는 만큼 상처가 났을 때 출혈지연도 같이 일어나므로, 이러한 출혈지연 부작용은 아스피린의 주된 부작용이라 할 수 있음. 본 실험에서는 혈소판 응집 억제효능이 있는

알로에 에탄올 추출물이 출혈지연작용에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보았고, 대조군으로 아스피린을 사용하였음. 그 결과, in vitro에서 혈소판 응집 억제반응을 보였던 농도인 300 µg/ml (15 mg/kg)와 1,000 µg/ml (50 mg/kg) 모두에서 아스피린보다 출혈지연작용이 약하게 나타났음 [그림 1-6]. 따라서 출혈지연 부작용이 적을 것으로 예상되었음.

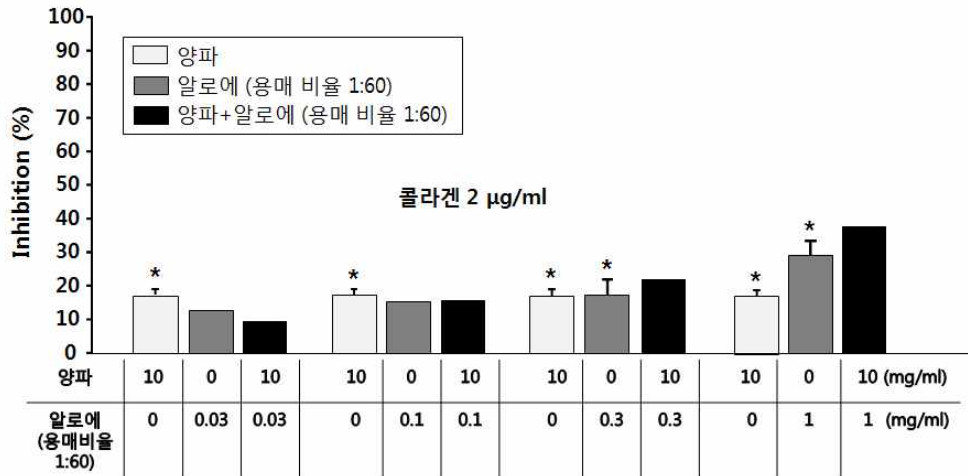


[그림 1-6] 혈소판 응집 억제반응 효과를 나타내는 알로에 에탄올 추출물의 출혈지연효능을 관찰. 알로에 에탄올 추출물 15 mg/kg는 in vitro상 혈소판 억제효능이 있는 농도인 300 µg/ml이고, 50 mg/kg는 1000 µg/ml 임. (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=3)

2. 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진효능 검증

가. 양파·알로에(용매 비율 1:60) 복합소재의 혈소판 응집 억제효능

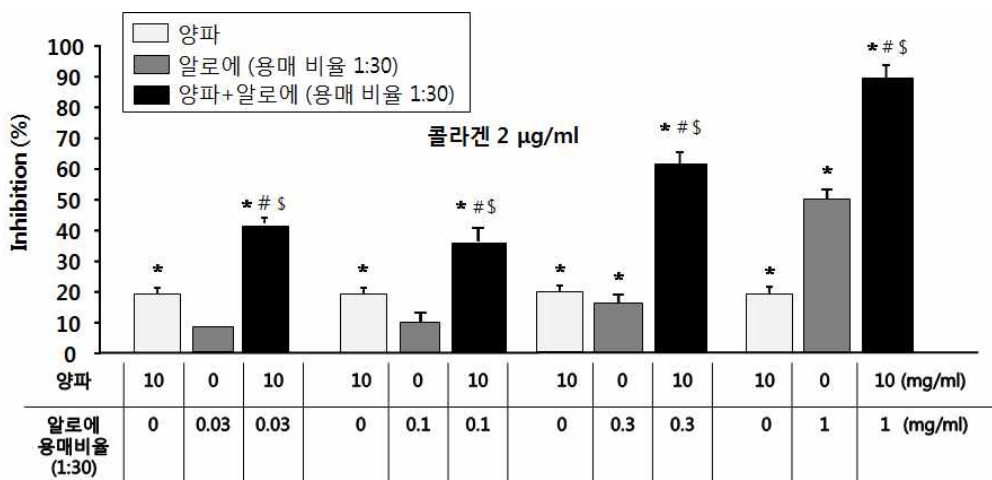
- 앞서 I의 결과에서 각각 양파와 알로에 단독소재의 혈소판 응집 억제효과를 관찰하였고, 그 결과, 알로에는 100% 에탄올 추출물에서 그 효능이 나타났지만, 비율별 추출법에 따라서는 효능 정도가 크게 다르게 나타나지 않았음. 또한, 양파 단독소재는 선행결과와 당해연도 연구결과에 비추었을 때, 양파 알로에 추출물이 효능이 뛰어난 것을 관찰하였음. 하지만, 단독소재의 효능 자체만으로 최대효능을 나타내지 못할 뿐 아니라, 높은 농도를 사용해야하는 단점을 가지고 있으므로, 우리는 적은 농도로 최대의 효능을 이끌기 위해 단독소재 결과를 바탕으로 복합소재를 만들었고, 그 효능을 관찰하였음. 먼저, 양파는 10 mg/ml로 고정하였고, 알로에 100% 에탄올 추출물 중 용매 비율이 1:60으로 추출된 알로에 추출물을 섞어 콜라겐에 대한 혈소판 응집 억제효과를 관찰 한 결과, 양파 단독과 알로에 단독의 효과와 비교하여 양파·알로에 복합소재의 효과는 유의성 있게 증가하지 않았음 [그림 1-7].



[그림 1-7] 약한 혈소판 응집 억제현상을 보였던 농도인 양파 10 mg/ml을 고정하고 알로에 에탄올 추출물 (용매 비율 1:60)을 농도별로 혼합처리 하여 콜라겐에 의한 혈소판 응집 정도를 관찰. (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=6)

나. 콜라겐으로 유도된 혈소판 응집과정에서 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 혈소판 응집 억제효능

- 용매 비율 1:60으로 추출한 알로에 에탄올 추출물과 양파의 복합소재 혈소판 응집억제 효능은 각각의 단독소재의 효과와 크게 다르지 않았으므로, 1/30으로 추출한 알로에 에탄올 추출물과 양파의 복합소재의 효능을 관찰함. 이번에도 마찬가지로 양파는 10 mg/ml로 고정하였고, 알로에 100% 에탄올 추출물 중 용매 비율이 1:30으로 추출된 알로에 추출물을 농도별로 섞어 관찰한 결과, 양파 단독과 알로에 단독소재보다 복합소재에서 유의성 있게 혈소판 응집억제 효과가 증가하였음 [그림 1-8]. 특히, 양파 10 mg/ml과 알로에 (용매 비율 1:30) 0.3 mg/ml을 섞었을 때, 시너지 효과가 가장 크게 나타나는 것을 통해 양파와 알로에 추출물의 최적 비율을 100:3으로 결정함.

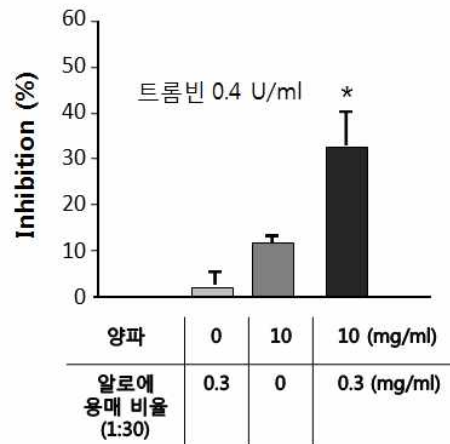


[그림 1-8] 약한 혈소판 응집 억제현상을 보였던 농도인 양파 10 mg/ml을 고정하고 알로에 에탄올 추출물 (용매 비율 1:30)을 농도별로 혼합처리 하여 콜라겐에 의한 혈소판 응집 정도를 관찰. (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, # p<0.05 vs. 양파 단독, \$ p<0.05 vs 알로에 단독,

N=6)

다. 트롬빈으로 유도된 혈소판 응집과정에서 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 혈소판 응집 억제효능

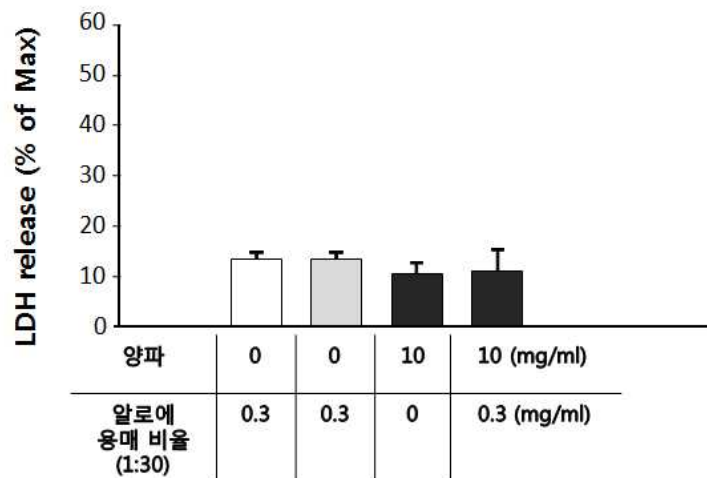
- 콜라겐에 대한 혈소판 응집 억제효과를 보인 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재가 트롬빈에 의한 혈소판 응집현상에서도 억제효과를 보이는지 확인함. 그 결과, 트롬빈에서도 콜라겐과 마찬가지로 복합소재의 혈소판 응집 억제 효과가 관찰됨 [그림 1-9].



[그림 1-9] 가장 큰 시너지 효과를 갖는 양파·알로에 (용매 비율 1:30) 복합소재를 트롬빈으로 유도된 혈소판 응집반응에서 관찰 (Mean±SEM, * p<0.05 vs. vehicle, N=3)

라. 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 세포독성

- 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 세포 독성을 관찰하기 위해 Lactate Dehydrogenase (LDH) 유리 정도로 관찰함. 그 결과, 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 혈소판 응집억제효과가 있는 농도에서 LDH 유리가 증가하지 않았으므로, 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재는 세포독성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인됨 [그림 1-10].

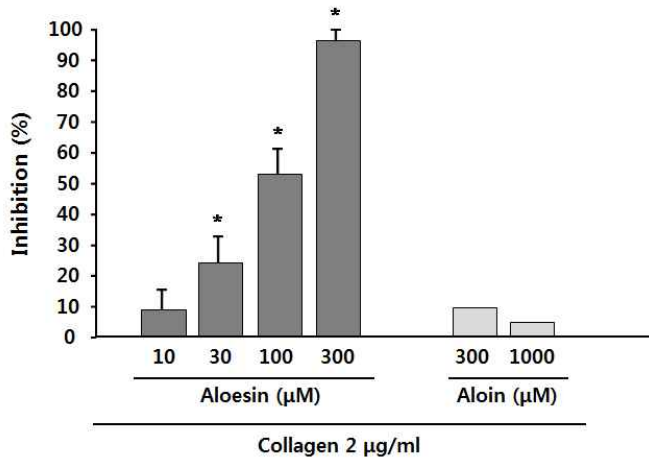


[그림 1-10] 혈소판 응집 억제효과를 가지는 양파·알로에(1/30) 복합소재의 세포독성을 LDH

유리로 관찰. (Mean±SEM, N=3)

마. 알로에 지표성분 및 기능성분 후보물질의 항혈소판 효능

- 선행결과로 양파의 지표성분 및 기능성분은 퀘세틴 (Quercetin)으로 확립하였고, 알로에의 지표성분 및 기능성분을 찾기 위해, 알로에 성분 중 함유량이 비교적 높은 성분인 알로에신 (aloesin)과 알로인 (aloin)의 혈소판 응집 억제효과를 관찰함. 그 결과 알로에신은 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제효과가 관찰된 반면, 알로인은 혈소판 응집억제효과가 나타나지 않았음 [그림 1-11]. 이상의 결과로부터, 알로인은 지표성분으로, 알로에신은 지표성분 및 기능성분으로 가능함을 알 수 있음.

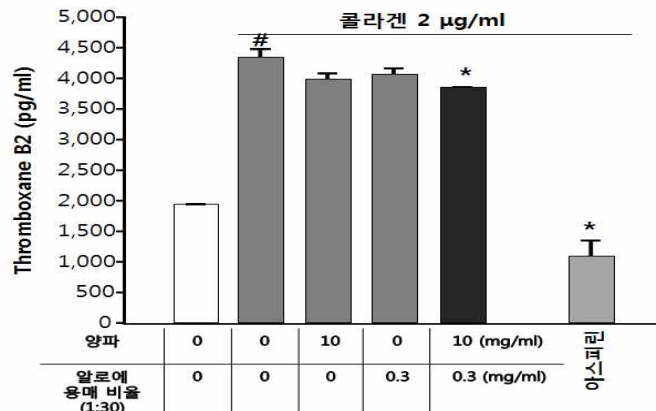


[그림 1-11] 알로에 성분 중 하나인 알로에신 (aloesin)과 알로인 (aloin)의 혈소판 응집억제 효과를 관찰. (Mean±SEM, *p<0.05 vs vehicle, N=3)

3. 양파·알로에 복합소재의 혈액순환기능 증진 기작 연구

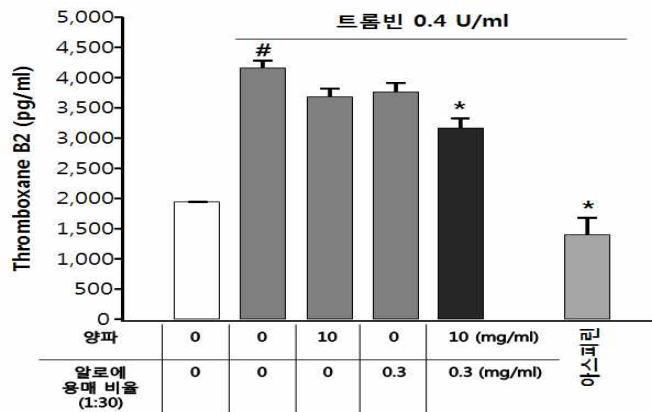
가. 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 Thromboxane A₂ (TXA₂)의 억제효능

- 앞서 양파·알로에 복합소재의 혈소판 응집억제 효능을 관찰하였고, 복합소재의 혈소판 억제 기작을 알아보기 위해 콜라겐에 의한 혈소판 응집과정에서 일어나는 TXA₂의 증가를 양파·알로에 복합소재가 억제하는지 관찰함. 그 결과, 양파·알로에 단독소재에서는 TXA₂ 억제효과가 없었으나, 복합소재에서는 TXA₂ 억제효과가 잘 나타났음 [그림 1-12].



[그림 1-12] 혈소판 응집 억제효과를 가지는 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 TXA₂ 세포레벨 관찰. (Mean±SEM, #p<0.05 vs control, *p<0.05 vs vehicle, N=3)

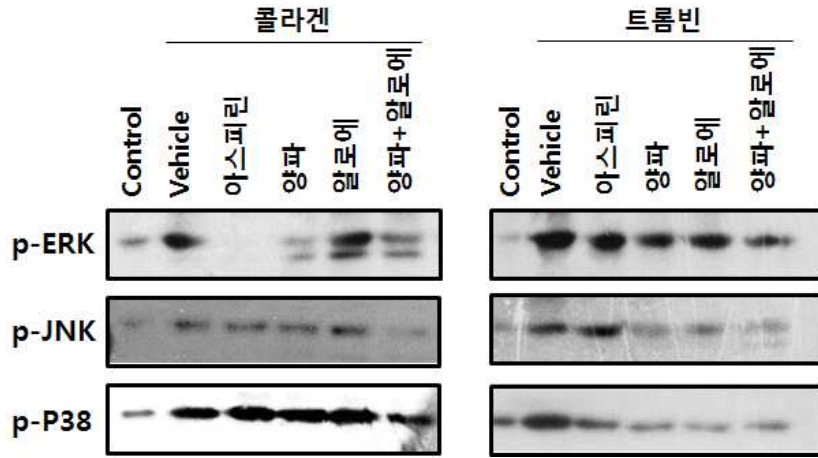
- 마찬가지로, 트롬빈에 의한 혈소판 응집과정에서 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 응집 억제기작이 TXA₂ 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여, 트롬빈 처리 후 TXA₂의 억제효과를 관찰한 결과, 양파·알로에 단독소재에서는 TXA₂ 억제효과가 없었으나, 복합소재에서는 TXA₂ 억제효과가 매우 잘 나타났음 [그림 1-13].



[그림 1-13] 혈소판 응집 억제효과를 가지는 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 TXA₂ 세포레벨 관찰. (Mean±SEM, #p<0.05 vs control, *p<0.05 vs vehicle, N=3)

나. 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소재의 MAPKs의 발현변화 관찰

- 복합소재의 혈소판 응집 억제기작으로 단백질 발현변화를 관찰함. 콜라겐과 트롬빈에 의해 증가된다고 알려져 있는 MAPKs가 양파·알로에 복합소재에 의해 감소하는지 알아보기 위해 MAPKs인 ERK, JNK, p38의 발현변화를 관찰한 결과, 콜라겐이나 트롬빈에 의해 증가된 ERK, JNK, p38의 인산화가 양파·알로에 복합소재에 의해 발현이 감소되는 경향을 보였음 [그림 1-14]. 하지만, 토털 MAPKs의 변화를 보지 않았으므로, 명확한 결과를 얻기 위해 복합소재의 MAPKs에 대한 영향관찰 실험을 현재 계속하여 진행하고 있으며, 10월 말까지 최종 결과를 확보할 수 있음.



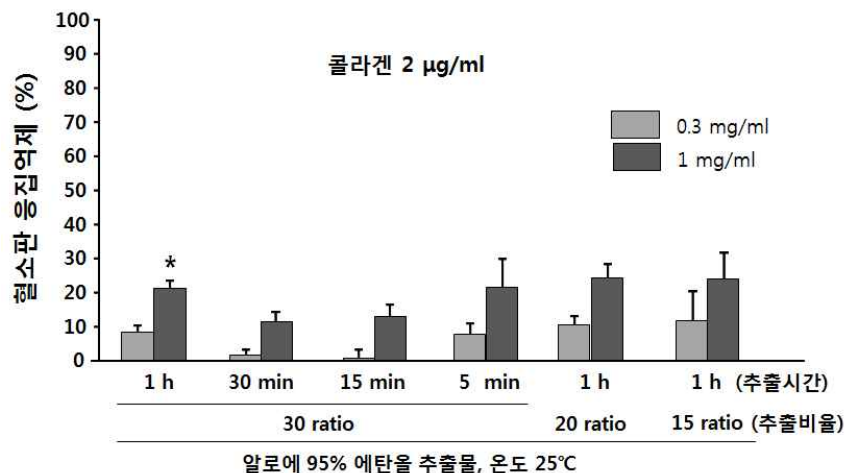
[그림 1-14] 혈소판 응집 억제효과를 가지는 양파·알로에(용매 비율 1:30) 복합소제에 의한 MAPKs의 발현변화 관찰.

- 위의 결과로부터 양파·알로에 복합소제는 in vitro 실험에서 혈소판 응집 억제에 대해 시너지 효과를 갖는다는 것을 알 수 있음.
- 생체 흡수율이 낮다고 알려진 양파의 기능성분인 퀴세틴은 다당류에 의해 흡수율이 높아진다는 보고가 있고, 알로에는 다당류가 다량 함유된 물질이므로 여러 보고와 본 연구결과를 토대로 알로에의 다당류가 양파의 퀴세틴 흡수율을 증가시킬 수 있는 가능성이 기대됨.

4. Lab scale로 제조된 알로에, 양파 복합소제의 항혈소판 효능 검증

가. 알로에 95% 에탄올 추출물의 추출 조건에 따른 항혈소판 효능 비교

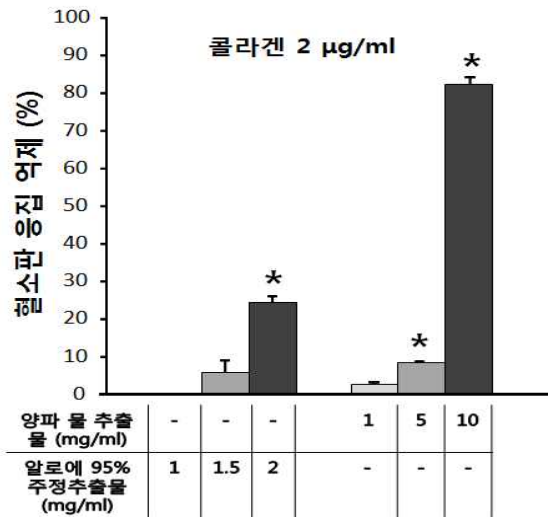
- 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물의 추출조건에 따른 혈소판 응집 억제정도를 관찰한 결과, 추출비율 30 ratio, 추출온도 25°C, 추출시간 1 시간에 의해 가장 높은 억제 효능이 나타남 [그림 1-15].



[그림 1-15] 콜라겐 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물의 혈소판 응집 억제 효과 (N=3, Mean \pm SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독)

나. Lab scale 추출조건 확립 후 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 항혈소판 효능 검증

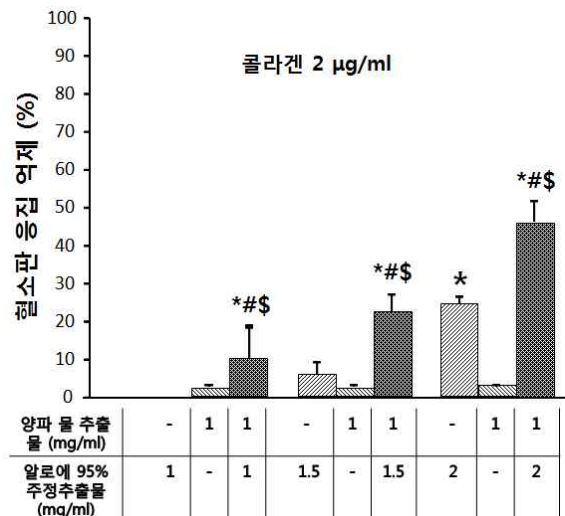
- 콜라겐 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 유도된 혈소판 응집 반응에서 lab scale로 추출조건이 확립된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 혈소판 응집 억제정도를 관찰한 결과, 알로에는 2 mg/ml에서, 양파는 10 mg/ml에서 최고 억제효과를 보였음 [그림 1-16].



[그림 1-16] 콜라겐 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 혈소판 응집 억제 효과 (N \geq 5, Mean \pm SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독)

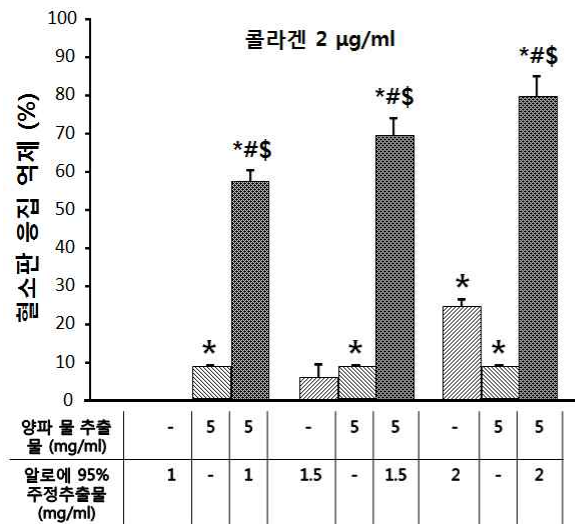
다. Lab scale 추출조건에서 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소재의 항혈소판 효능 검증

- 콜라겐 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 유도된 혈소판 응집 반응에서 lab scale로 추출된 양파 물 추출물을 1 mg/ml로 고정시키고 알로에 95% 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 알로에 1 mg/ml에서부터 혈소판 응집 억제효과가 나타났고, 2 mg/ml에서 최고 억제효과를 보였음 [그림 1-17].



[그림 1-17] 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소재의 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독, #p<0.05 vs. 콜라겐+알로에, \$p<0.05 vs 콜라겐+양파)

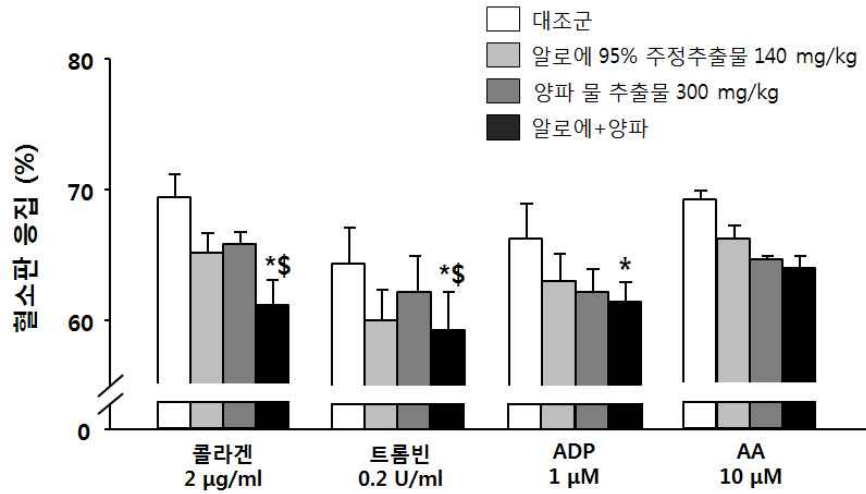
- 또한, 양파 물 추출물을 5 mg/ml로 고정시키고 알로에 95% 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 알로에 1 mg/ml에서부터 혈소판 응집이 55%가 억제되었고, 최고 2 mg/ml에서는 약 80%가 억제되었음 [그림 1-18].



[그림 1-18] 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소재의 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독, #p<0.05 vs. 콜라겐+알로에, \$p<0.05 vs 콜라겐+양파)

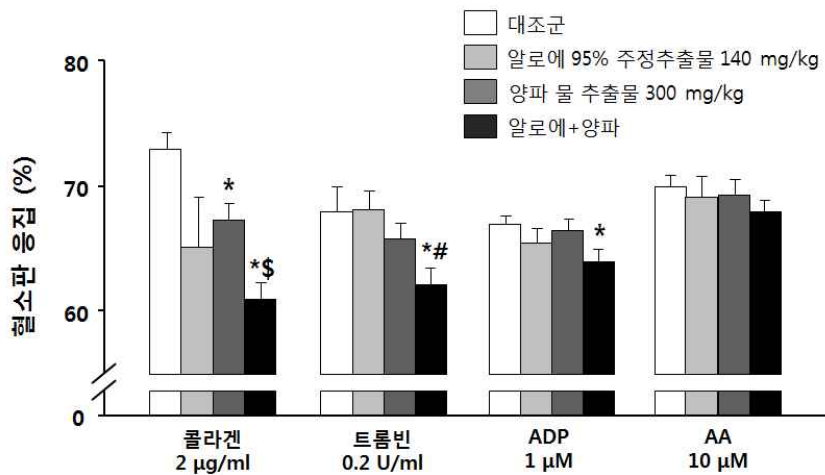
라. Lab scale로 제조된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 경구투여 후 항혈소판 효능 검증

- In vitro 결과에서 양파와 알로에 각각의 효능이 약할 때, 복합소재의 효능이 극대화되었던 농도인 알로에 95% 에탄올 추출물 2 mg/ml과 양파 물 추출물 5 mg/ml을 in vivo로 환산한 결과, 알로에는 120 mg/kg, 양파는 300 mg/kg의 농도가 나왔음. 하지만, 알로에는 120 mg/kg보다 140 mg/kg에서 최고 효능을 보였으므로, 알로에 140 mg/kg와 양파 300 mg/kg의 농도로 랫드에게 경구투여를 실시함. 단회 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA (Arachidonic acid) 10 µM로 각각 혈소판 응집을 유도한 결과, 콜라겐과 트롬빈에 의한 혈소판 응집에서 양파와 알로에 각각의 효능과 비교하여 복합소재의 혈소판 응집 억제 효과가 더 뛰어났음 [그림 1-19].



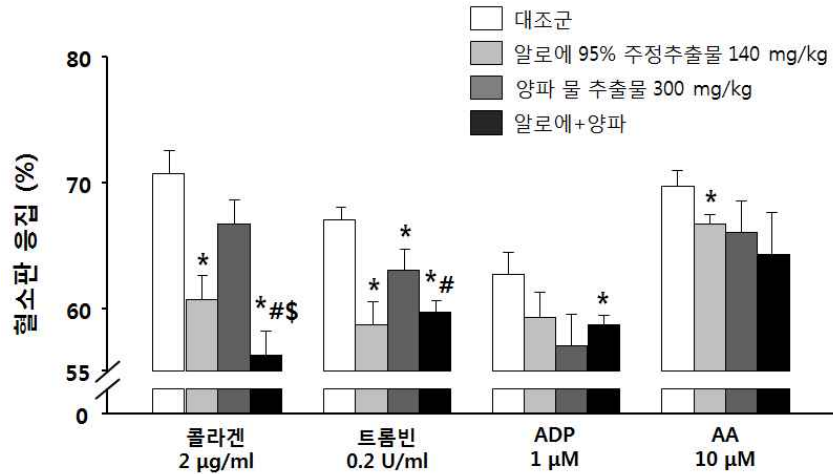
[그림 1-19] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소재의 단회 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

- 알로에 95% 에탄올 추출물 140 mg/kg과 양파 물 추출물 300 mg/kg을 랫드에게 7일동안 경구투여한 후 콜라겐, 트롬빈, ADP, AA로 혈소판 응집을 유도한 결과, 단회와 유사하게 콜라겐과 트롬빈에서 양파와 알로에 각각의 효능보다 복합소재의 혈소판 응집 억제 효과가 더 뛰어났음 [그림 1-20].



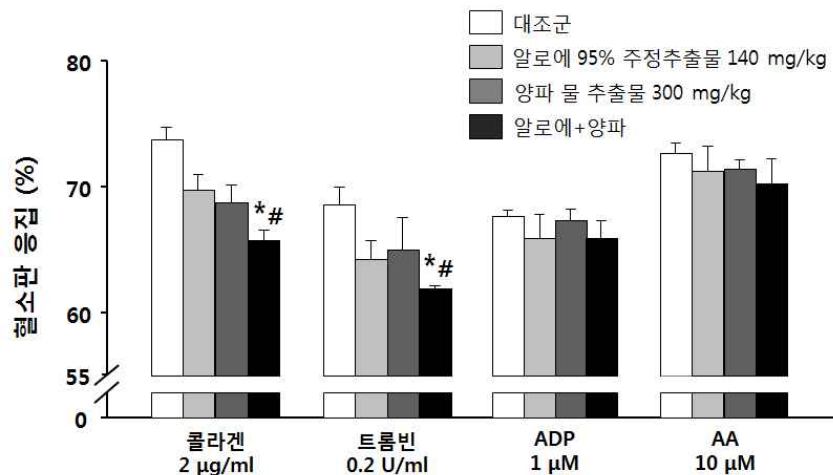
[그림 1-20] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소재의 7일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA (Arachidonic acid) 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

- 랫드에게 14일동안 양파와 알로에를 경구투여한 후 콜라겐, 트롬빈, ADP, AA로 각각 혈소판 응집을 유도한 결과, 콜라겐과 트롬빈에 대한 혈소판 응집 억제효과가 알로에와 양파 단독소재와 비교해서 각각 유의적으로 혈소판 응집을 억제하였음 [그림 1-21].



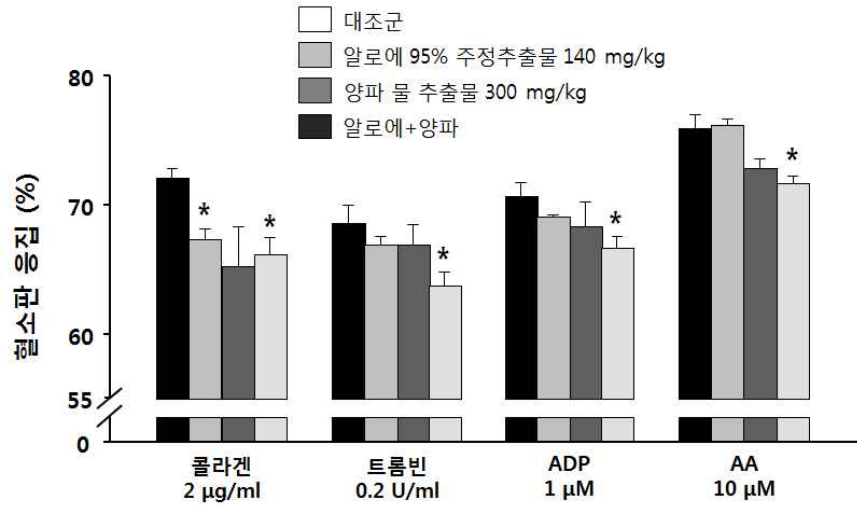
[그림 1-21] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소제의 14일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

- 랫드에게 21일 동안 양파와 알로에를 경구투여한 후 콜라겐, 트롬빈, ADP, AA로 각각 혈소판 응집을 유도한 결과, 혈소판 응집 억제효과가 알로에와 양파 단독소재와 비교해서 각각 유의적으로 혈소판 응집을 억제하였음 [그림 1-22].



[그림 1-22] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소제의 21일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

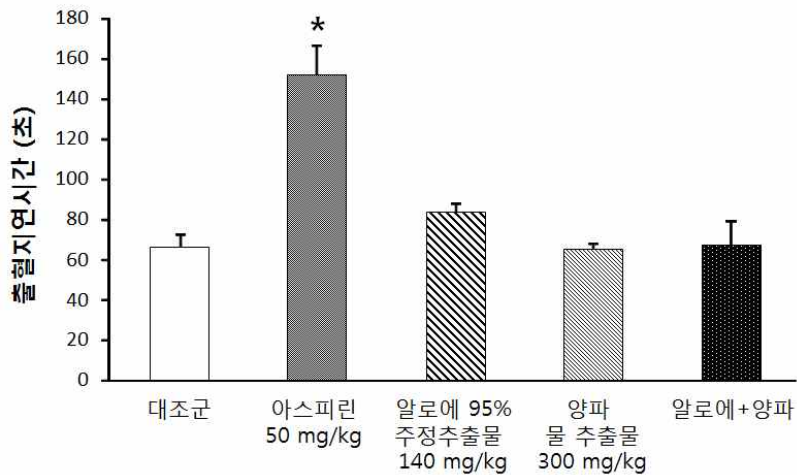
- 28일 경구투여에 의해서도 혈소판 응집 억제효과가 알로에와 양파 단독소재와 비교해서 각각 유의적으로 혈소판 응집을 억제하였음 [그림 1-23].



[그림 1-23] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소제의 28일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

마. Lab scale로 제조된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 경구투여 후 출혈 지연시간 관찰

- Ex vivo에서 혈소판 응집 억제효과를 보였던 농도인 알로에 95% 에탄올 추출물 140 mg/kg와 양파 물 추출물 300 mg/kg가 출혈지연반응을 보이는지 관찰한 결과, 단독소재 및 복합소재 모두 대조군에 비해 출혈지연시간이 연장되지 않았음. 이것은 항혈소판제제로 알려진 아스피린의 출혈지연반응과는 다른 결과라 할 수 있음.



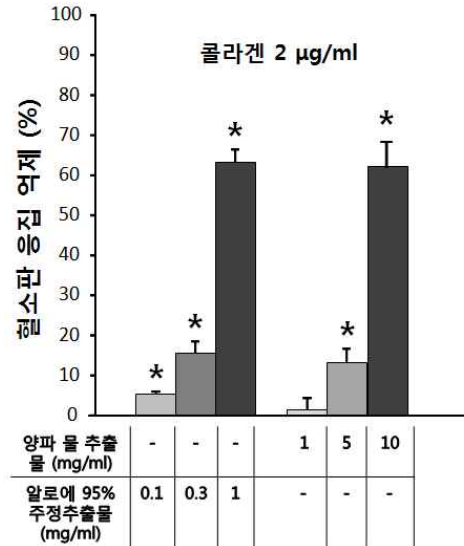
[그림 1-24] 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소제의 경구투여 후 출혈지연시간 측정 (N≥8, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 대조군)

5. 시제품의 항혈소판 효능 검증

가. 제조공정 scale up 후 제조된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물인 시제품

의 항혈소판 효능 검증

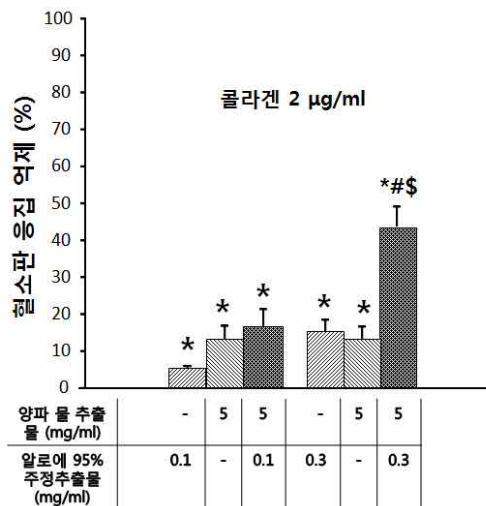
- 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 제조공정 scale up하여 제조된 추출물인 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 혈소판 응집 억제 정도를 관찰한 결과, 알로에는 1 mg/ml에서, 양파는 10 mg/ml에서 최고 억제효과를 보였음 [그림 1-25].



[그림 1-25] 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 scale up 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독)

나. 시제품의 항혈소판 효능 검증

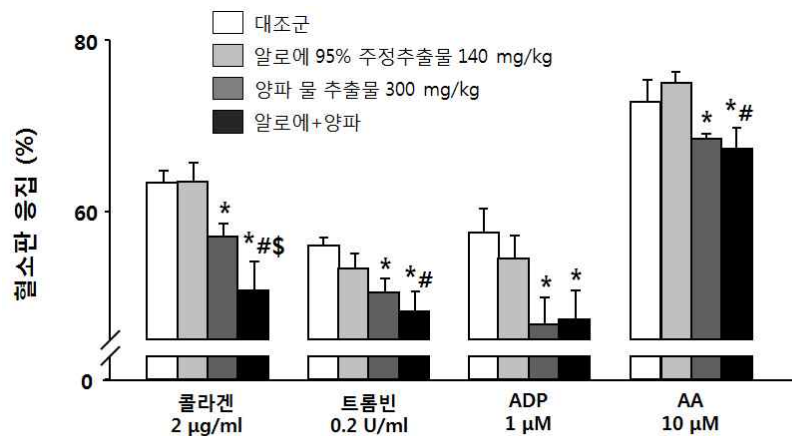
- 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 scale up 양파 물 추출물을 5 mg/ml로 고정시키고 알로에 95% 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 알로에 0.1 mg/ml에서부터 혈소판 응집 억제효과가 나타났고, 0.3 mg/ml에서 최고 억제효과를 보였음 [그림 1-26].



[그림 1-26] 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물의 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독)

다. 시제품 경구투여 후 항혈소판 효능 검증

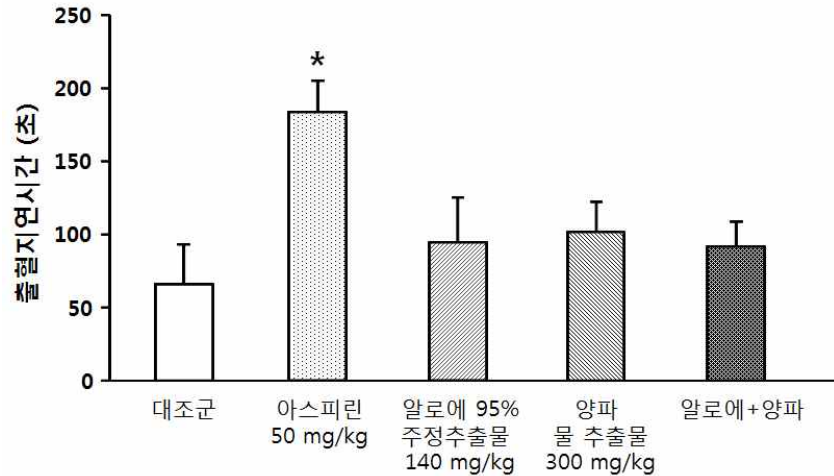
- Lab scale로 추출하여 ex vivo 결과에서 혈소판 응집 억제효과를 보였던 농도인 알로에 95% 에탄올 추출물 140 mg/kg와 양파 물 추출물 300 mg/kg로 랫드에게 경구투여를 실시하였고, 앞서 14일 경구투여부터는 항혈소판의 최고 효능이 나타나므로, scale up 추출물에서는 14일 경구투여를 실시하였음. 14일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA (Arachidonic acid) 10 µM로 각각 혈소판 응집을 유도한 결과, 콜라겐과 트롬빈, AA에 의한 혈소판 응집에서 양파와 알로에 각각의 효능과 비교하여 복합소제의 혈소판 응집 억제 효과가 더 뛰어났음 [그림 1-27].



[그림 1-27] Scale up된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 복합소제의 14일 경구투여 후 콜라겐 2 µg/ml, 트롬빈 0.2 U/ml, ADP 1 µM, AA 10 µM로 각각 유도된 혈소판 응집 반응에서 혈소판 응집 억제 효과 (N≥5, Mean±SEM, *p<0.05 vs. agonist 단독, #p<0.05 vs. agonist+알로에, \$p<0.05 vs agonist+양파)

라. 시제품 경구투여 후 출혈지연시간 관찰

- Ex vivo에서 혈소판 응집 억제효과를 보였던 농도인 알로에 95% 에탄올 추출물 140 mg/kg와 양파 물 추출물 300 mg/kg가 출혈지연반응을 보이는지 관찰한 결과, lab scale 제조 추출물과 유사하게 단독소재 및 복합소재 모두 대조군에 비해 출혈지연시간이 연장되지 않았음. 이는 기존에 알려진 항혈소판제인 아스피린 등이 정상적인 지혈작용을 저해시키는 것과 비교할 때, 양파와 알로에 복합소제는 항혈소판 기능과 더불어 지혈작용에 대한 부작용이 적다는 것을 의미함.



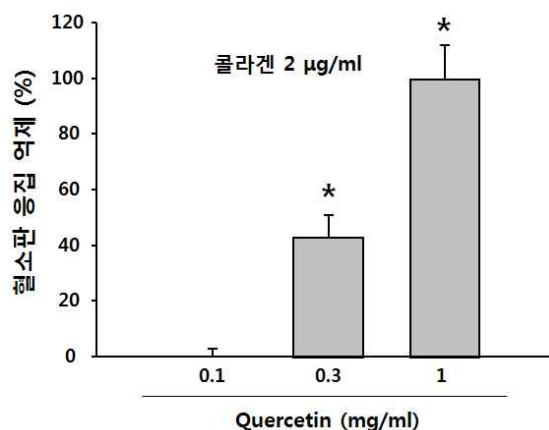
[그림 1-28] 제조공정 Scale up 후 제조된 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물 단독소재 및 복합소재의 경구투여 후 출혈지연시간 측정 (N≥8, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 대조군)

- 지금까지의 실험 결과를 종합하여 볼 때, 알로에 95% 에탄올 추출물과 양파 물 추출물은 lab scale 뿐 아니라 scale up 조건에서도 항혈소판 효능을 나타냈으며, 부작용의 지표인 지혈시간 연장에 있어서도 적은 영향을 주는 것으로 나타났음.

6. 기능성 물질의 항혈소판 효능 관찰

가. 양파의 지표성분이자 기능성 물질인 quercetin의 혈소판 응집 억제효과

- 양파의 지표성분이자 기능성 물질인 quercetin의 혈소판 응집 억제 효과를 관찰한 결과 quercetin은 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제효과가 관찰되었고, 1 mg/ml에서 거의 100%의 혈소판 응집 억제효과를 관찰하였음 [그림 1-29].

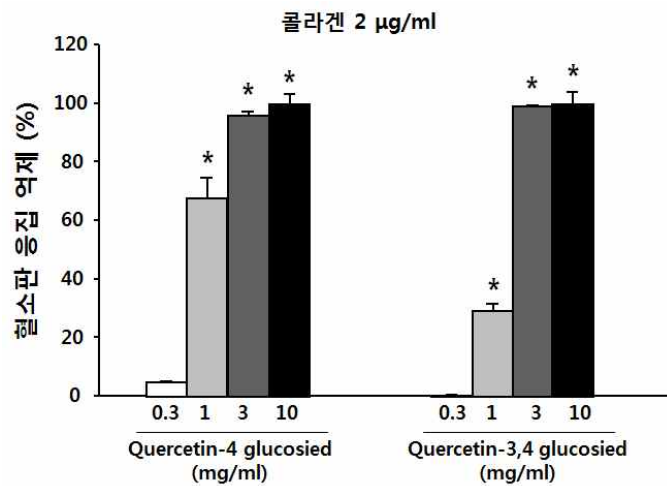


[그림 1-29] 양파의 지표성분인 quercetin의 항혈소판 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐)

나. Quercetin 배당체의 혈소판 응집 억제 효과

- 양파에는 quercetin 뿐 아니라, quercetin 배당체도 많이 함유되어 있으므로 quercetin 배

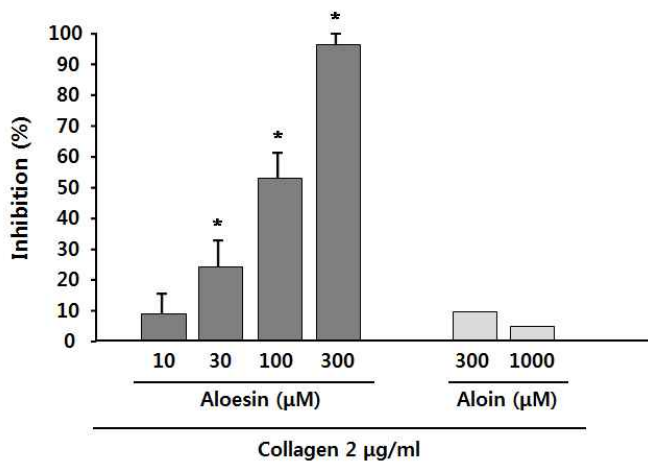
당체의 항혈소판 효능을 관찰함. 그 결과, quercetin-4 glucoside와 quercetin-3,4 glucoside 모두 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제효과가 관찰되었고, 그 중 10 mg/ml에서 거의 100%의 혈소판 응집 억제효과를 관찰하였음 [그림 1-30].



[그림 1-30] Quercetin 배당체의 항혈소판 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐)

다. 알로에의 지표성분이자 기능성 물질인 aloesin의 혈소판 응집 억제효과

알로에의 지표성분이자 기능성 물질인 aloesin의 혈소판 응집 억제 효과를 관찰한 결과 aloesin은 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제효과가 관찰되었고, 300 µM에서 거의 100%의 혈소판 응집 억제효과를 관찰하였음. 반면, 알로에의 또다른 성분인 aloin은 혈소판 응집 억제 효과가 관찰되지 않았음 [1-31].

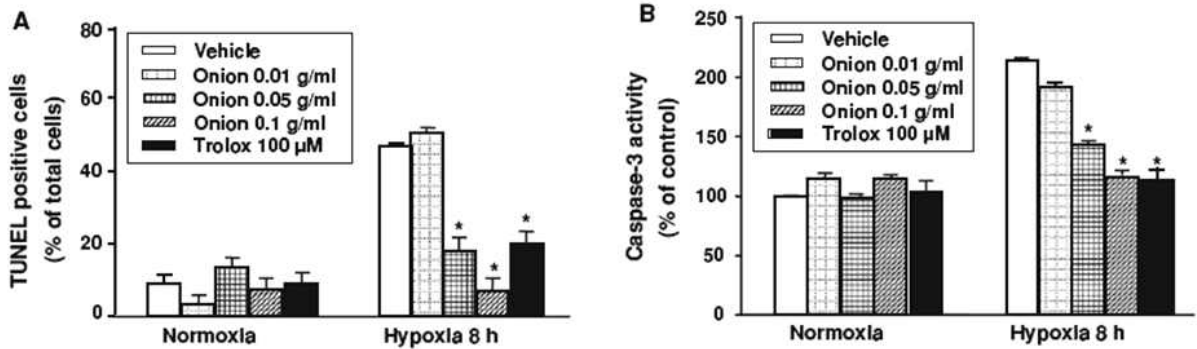


[그림 1-31] 알로에 성분인 알로에신 (aloesin)과 알로인 (aloin)의 혈소판 응집억제 효과를 관찰. (Mean±SEM, *p<0.05 vs 콜라겐, N=3)

7. 양파 추출물 및 기능성분의 심장보호효능 및 기작 연구

가. 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물의 보호 효능

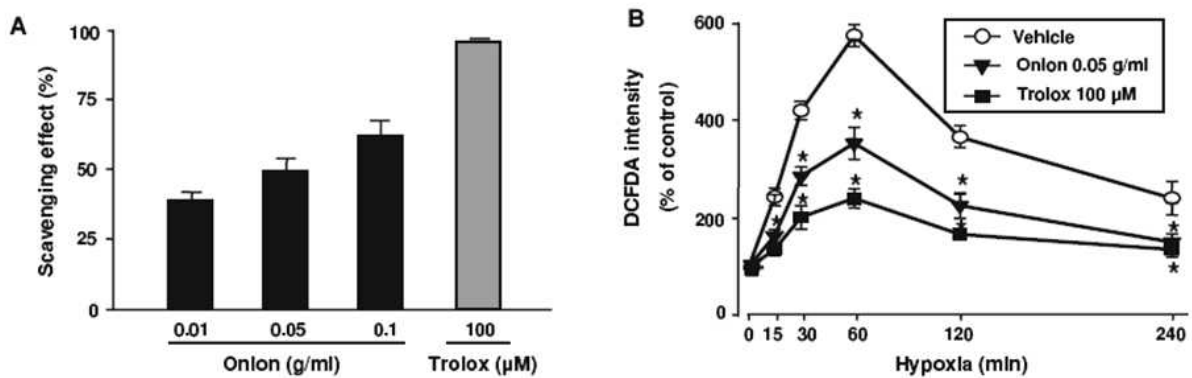
- 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물의 농도별 심근세포 보호효과를 관찰한 결과, 세포고사 정도를 확인할 수 있는 TUNEL assay에서 저산소에 의해 심근세포 사멸이 증가하였고, 양파 추출물 0.05 ~ 0.1 g/ml에서 심근세포 감소가 관찰되었음. 또한, 세포고사의 마커인 caspase-3 활성화를 관찰한 결과, 저산소에 의해 증가된 caspase-3 활성화가 양파 추출물 0.05 ~ 0.1 g/ml에서 감소되었음 (그림 1-32).



[그림 1-32] 저산소성 심근세포에서 양파 추출물의 세포보호 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

나. 양파 추출물의 항산화 효능 관찰

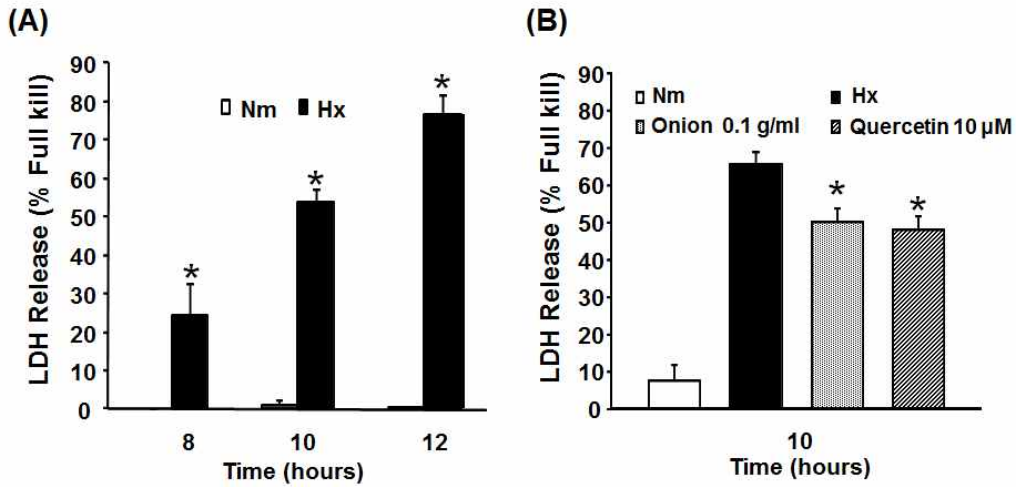
- 양파 추출물의 항산화 효능을 관찰하기 위해 DPPH assay를 통해 자유라디칼의 제거 효능을 관찰한 결과, 양파 0.01 ~ 0.1 g/ml에서 자유라디칼 제거 효능이 나타났으며, 저산소에 의한 산화적 스트레스에 대해 양파의 항산화 효능을 관찰한 결과, 양파 추출물 0.05 g/ml에서 저산소에 대한 항산화 효능을 관찰하였음 (그림 1-33).



[그림 1-33] 양파의 항산화 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs vehicle)

다. 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 보호 효능

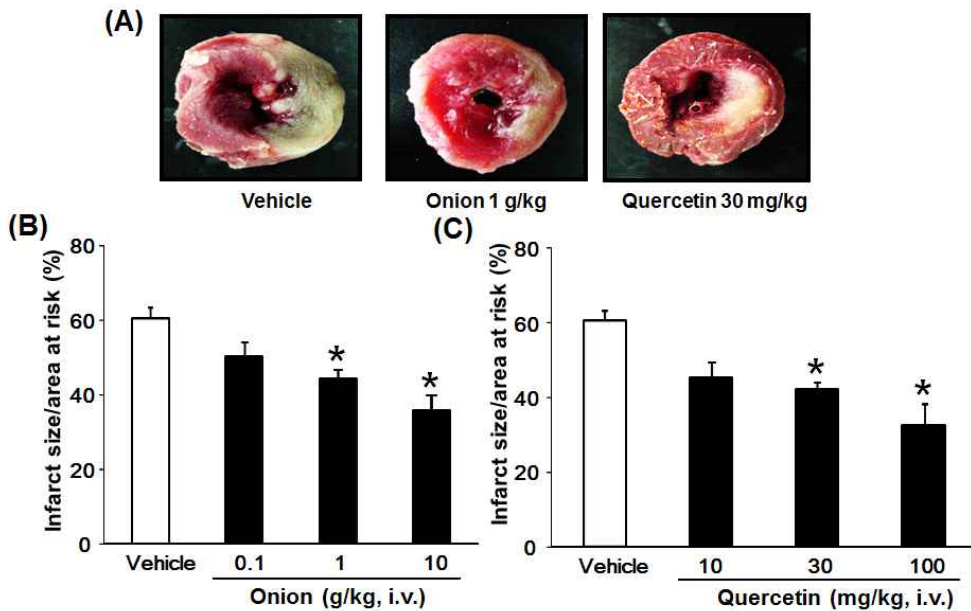
- 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 농도별 심근세포 보호효과를 관찰하기 위하여 저산소 노출 시간에 따른 세포사멸 정도를 관찰한 결과, 세포사멸 정도를 확인할 수 있는 LDH assay에서 저산소 노출 시간에 따라 심근세포 사멸이 증가하였고, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 심근세포 사멸이 억제되었음 (그림 1-34).



[그림 1-34] 저산소성 심근세포 사멸에 대한 양파와 quercetin의 심근세포 보호 효능 (N=6, Mean±SEM, *p<0.05 vs. hypoxia (Hx))

라. 심근경색 동물모델에서 양파 추출물과 quercetin의 심장보호효능 관찰

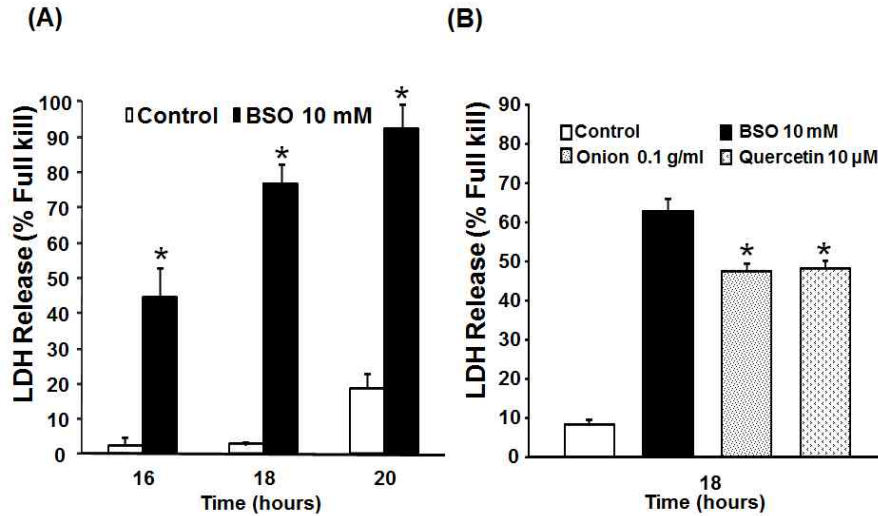
- 양파 추출물의 심장보호효능을 관찰하기 위해 심근경색 유도 동물모델에서 경색부위를 관찰한 결과, 양파 1 g/kg, quercetin 30 mg/kg에서 심근경색 감소가 관찰되었음 (그림 1-35).



[그림 1-35] 양파와 quercetin의 심근경색 보호 효능 (N=6, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

마. 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 보호 효능

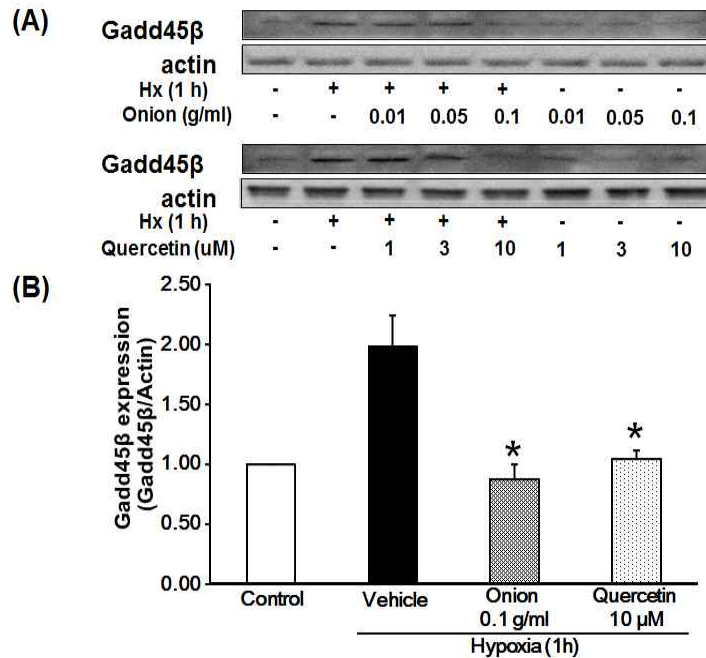
- 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 농도별 심근세포 보호효과를 관찰하기 위하여 산화적 스트레스를 유발하는 물질인 BSO 처리 후 시간에 따른 세포사멸 정도를 관찰한 결과, 세포사멸 정도를 확인할 수 있는 LDH assay에서 산화적 스트레스 노출 시간에 따라 심근세포 사멸이 증가하였고, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 심근세포 사멸이 억제되었음 (그림 1-36).



[그림 1-36] 산화적 스트레스에 대한 양파와 quercetin의 심근세포 보호 효능 (N=6, Mean±SEM, *p<0.05 vs. BSO 단독)

바. 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 Gadd45β 감소 효능

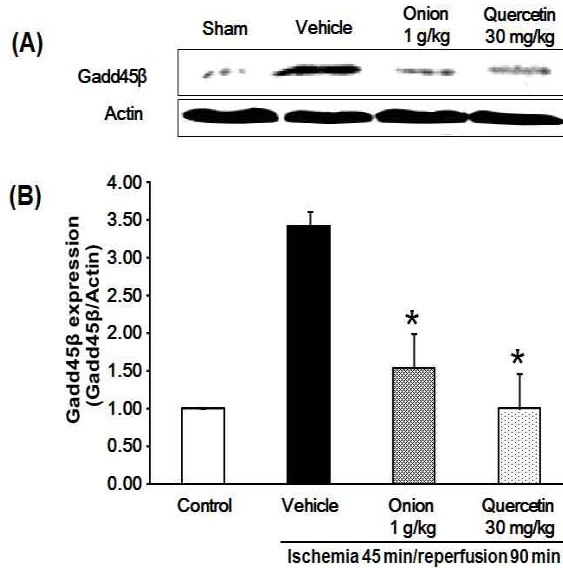
- 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 저산소 1시간 처리 후 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 Gadd45β의 발현 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 Gadd45β의 발현이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-37).



[그림 1-37] 저산소성 심근세포 모델에서 Gadd45β 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

사. 심근경색 동물모델에서 양파 추출물과 quercetin의 Gadd45β 감소 효능

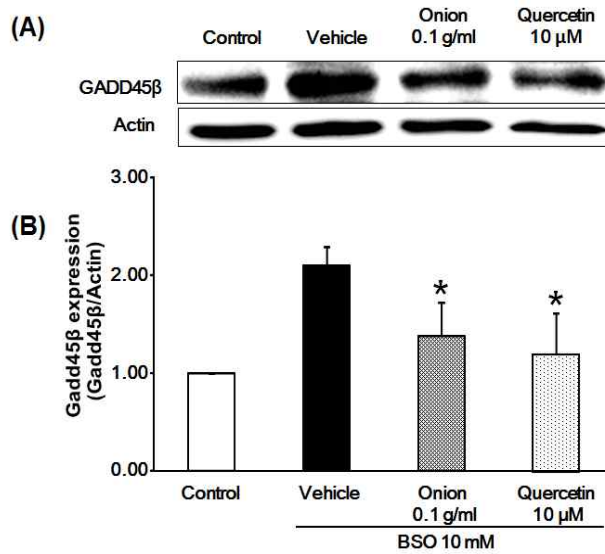
- 심근경색 동물모델에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 허혈/재관류 후 심장조직에서 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 Gadd45 β 의 발현 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μ M에서 Gadd45 β 의 발현이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-38).



[그림 1-38] 허혈/재관류 동물모델에서 Gadd45 β 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=3, Mean \pm SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

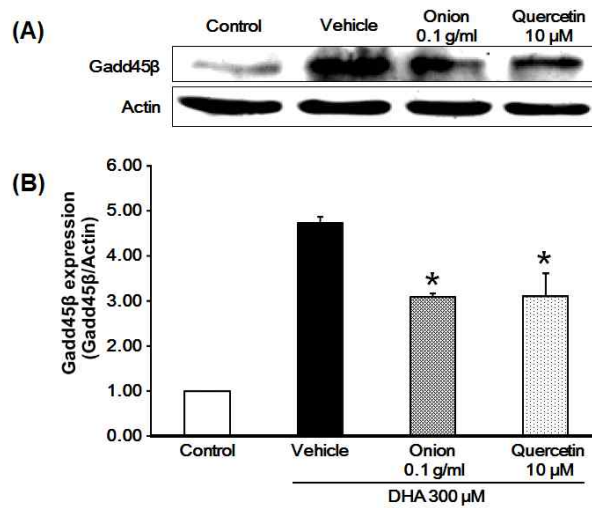
아. 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 Gadd45 β 감소 효능

- 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 산화적 스트레스를 유도한다고 알려진 BSO를 처리한 후, 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 Gadd45 β 의 발현 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μ M에서 Gadd45 β 의 발현이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-39).



[그림 1-39] 산화적 스트레스 심근세포 모델에서 Gadd45β 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

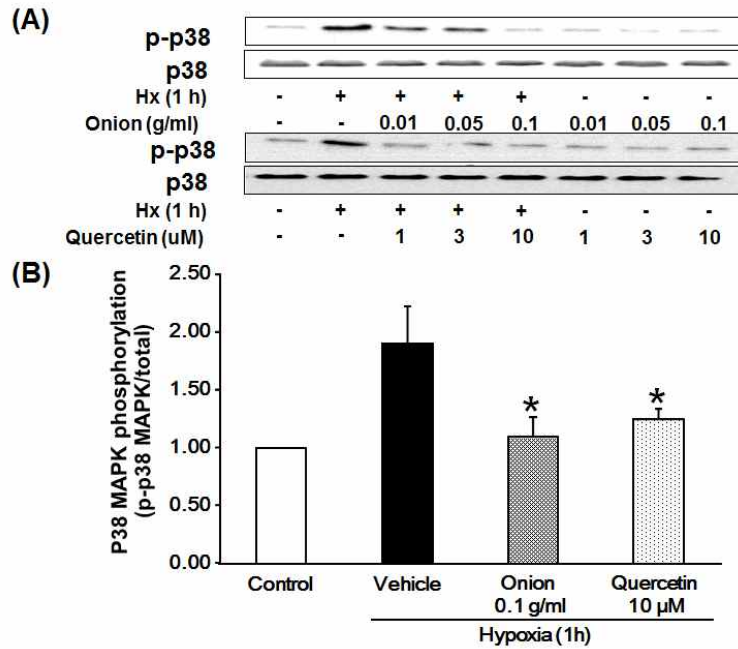
자. 대사적 손상에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 Gadd45β 감소 효능



[그림 1-40] 대사적 손상 심근세포 모델에서 Gadd45β 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=4, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

차. 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 p38 활성화 억제 효능

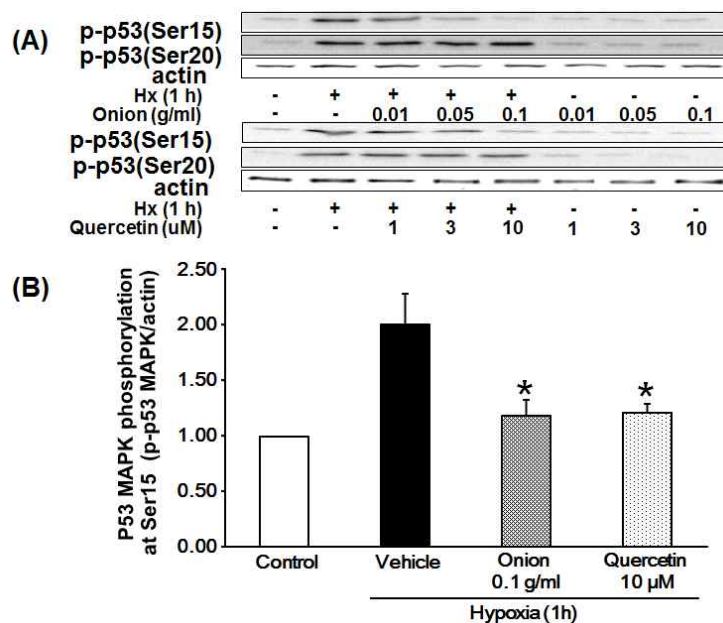
- 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 저산소 1시간 처리 후 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 p38의 활성화 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 p38의 활성이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-41).



[그림 1-41] 저산소성 심근세포 모델에서 p38 활성 증가에 대한 양파와 quercetin의 억제 효능 (N=4, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

카. 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 p53 감소 효능

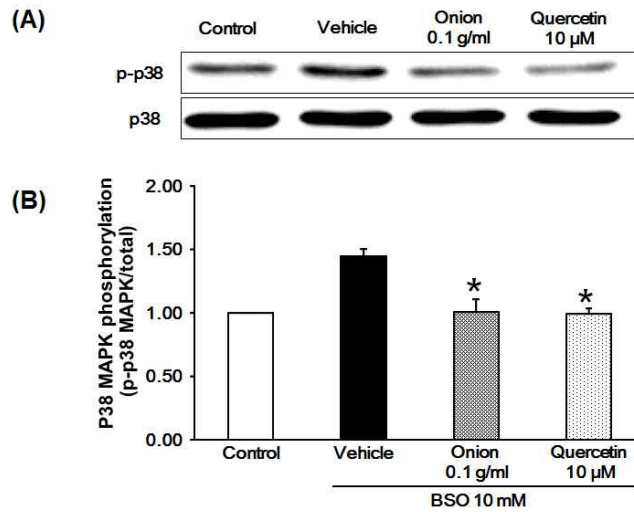
- 저산소성 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 저산소 1시간 처리 후 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 p53의 발현 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 uM에서 p53의 발현이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-42).



[그림 1-42] 저산소성 심근세포 모델에서 p53 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=6, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

타. 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 p38 활성화 억제 효능

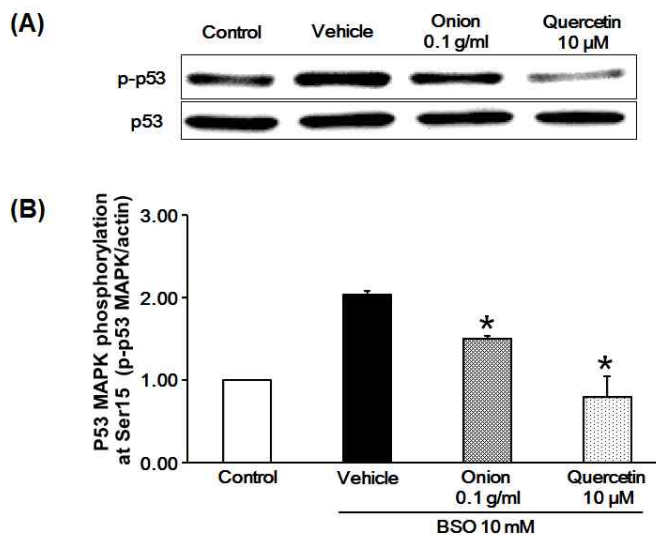
- 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 산화적 스트레스를 유도한다고 알려진 BSO를 처리한 후, 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 p38의 활성화 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 p38의 활성이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-43).



[그림 1-43] 산화적 스트레스 심근세포 모델에서 p38 활성화 증가에 대한 양파와 quercetin의 억제 효능 (N=4, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

파. 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 p53 감소 효능

- 산화적 스트레스에 의한 심근세포사멸에서 양파 추출물과 quercetin의 심근보호 약리기전을 관찰하기 위하여 산화적 스트레스를 유도한다고 알려진 BSO를 처리한 후, 심근세포 사멸을 유도한다고 알려진 p53의 발현 정도를 관찰한 결과, 양파 추출물 0.1 g/ml, quercetin 10 μM에서 p53의 발현이 억제되었음. 따라서 양파 추출물과 quercetin은 이 기전을 억제하여 심근보호 효능을 나타냄 (그림 1-44).

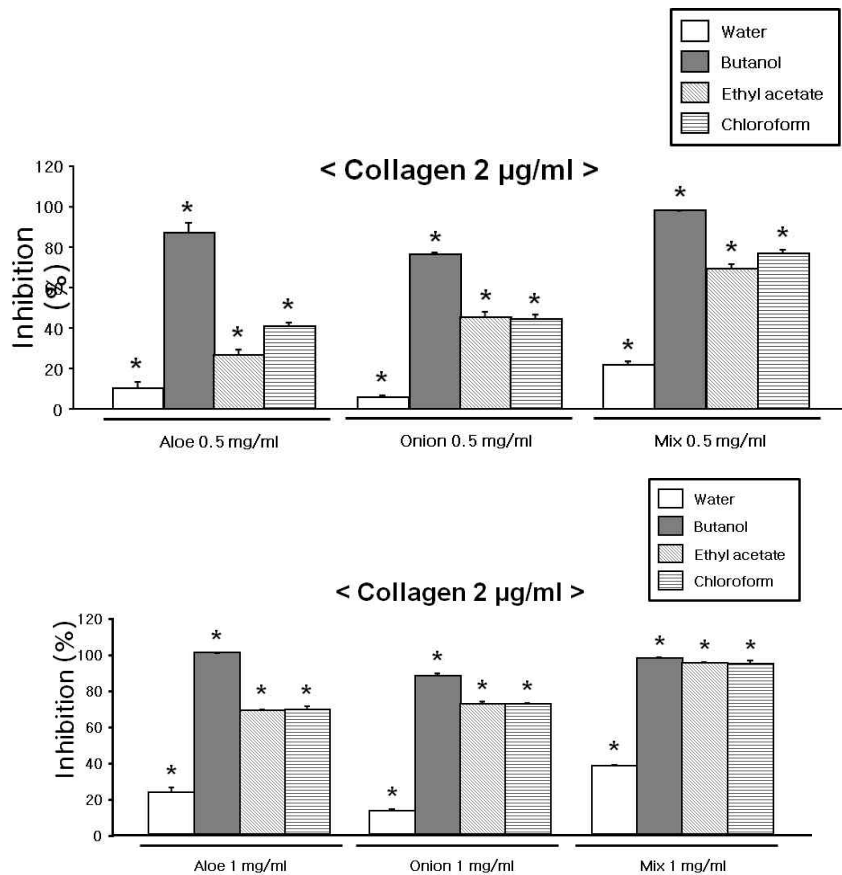


[그림 1-44] 산화적 스트레스 심근세포 모델에서 p53 증가에 대한 양파와 quercetin의 감소 효능 (N=4, Mean±SEM, *p<0.05 vs. vehicle)

8. 분획별 알로에와 양파 복합소재의 in vitro에서의 항혈소판 효능 검증

가. 알로에 추출물과 양파 추출물, 복합소재의 분획별 항혈소판 효능 검증

- 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 추출물과 양파 추출물, 복합소재의 분획별 혈소판 응집 억제정도를 관찰한 결과, 알로에 추출물, 양파 추출물, 복합소재의 물 추출물, 부탄올 추출물, 에틸아세테이트 추출물, 클로로포름 추출물 모두 0.5 ~ 1 mg/ml에서 항혈소판 효능을 보였으며, 그중 물 추출물의 효능이 가장 낮았고, 부탄올 추출물의 효능이 가장 높게 나타났음 (그림 1-45)



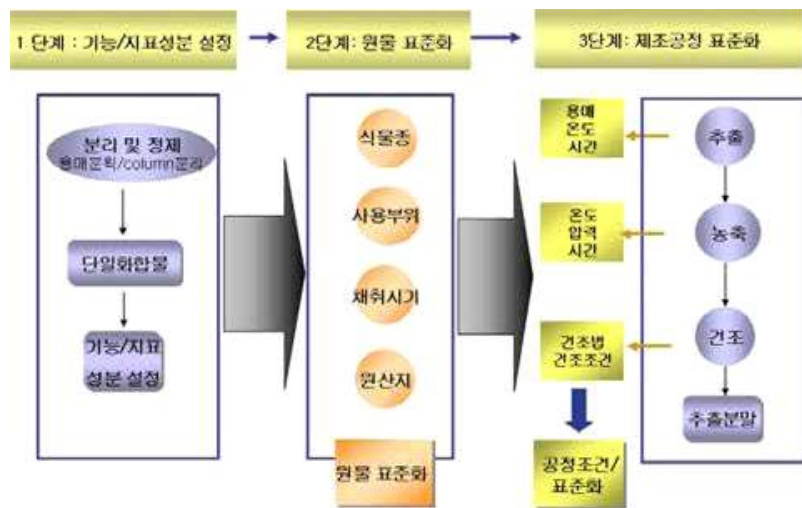
[그림 1-45] 콜라겐 2 µg/ml로 유도된 혈소판 응집 반응에서 알로에 추출물과 양파 추출물, 복합소재의 분획별 혈소판 응집 억제 효과 (N≥3, Mean±SEM, *p<0.05 vs. 콜라겐 단독)

- 위의 결과를 종합하여 볼 때, 양파와 알로에 복합소재는 항혈소판 효능이 뛰어나고, 출혈 지연과 같은 부작용 또한 적어 혈행개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 원료임을 입증하였음. 또한, 양파·알로에 복합소재 및 그 기능성분인 quercetin과 aloesin의 혈소판 응집 억제기작 연구를 통해 양파·알로에가 가지는 시너지 효과 뿐 아니라 약리기전 또한 규명하였음.

제 2 절 양파·알로에 복합소재의 지표성분 표준화를 통한 품질관리기준 확립

1. 건강기능식품 개별 인증 획득을 위한 원료 표준화 과정

- 양파·알로에 기능성 복합소재의 품질관리를 위해서는 기능성 원료의 표준화 작업이 필요함. 기능성 원료의 표준화란 천연물에 함유되어 있는 고유한 성분을 지표로 설정하여 성분의 변화를 최소화함으로써 품질관리 하는 것을 의미. 이러한 표준화 작업을 통해서 원재료의 생산에서부터 제조과정에 이르기까지 기능/지표성분의 관리를 함으로써 제품의 재현성 향상 및 기능성을 보장할 수 있다고 봄. 기능성 원료의 표준화를 위해서 지표/기능성분 설정, 지표성분의 시험법 정립, 원재료 표준화, 제조공정 표준화 작업을 수행함 (그림 2-1).



[그림 2-1] 건강기능식품 기능성 원료 표준화 과정 (식약청)

2. 양파·알로에의 복합소재 개발

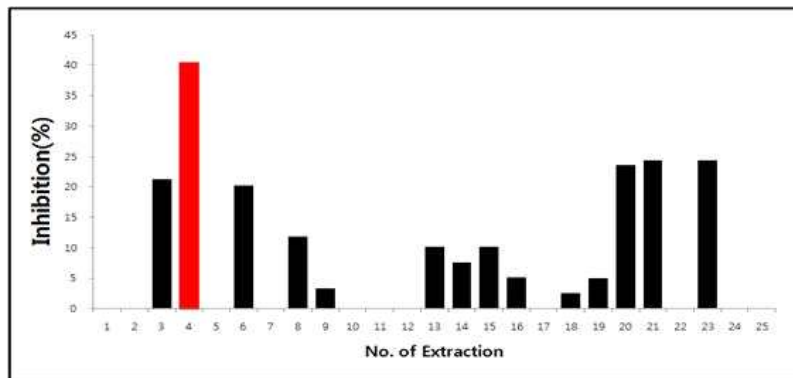
- 양파·알로에 기능성 복합소재 개발을 위해서 본 연구진은 각 품목의 생리활성을 갖는 추출물을 제조한 후 각 추출물의 혼합비율에 따른 생리활성 정도 및 시너지효과를 비교하여 복합소재를 개발함.

가. 알로에 추출물 제조

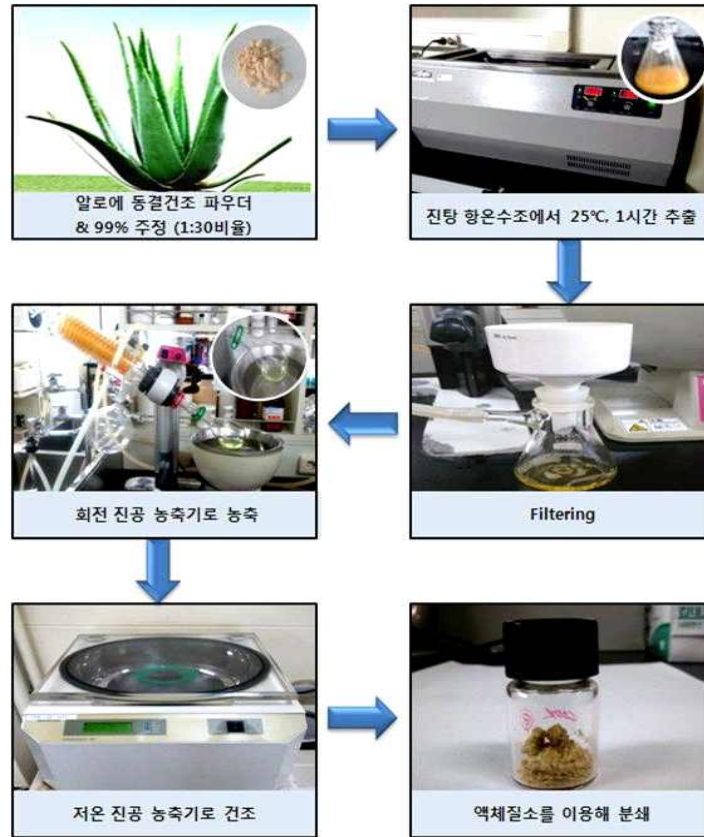
- 본 추출물 제조에 사용된 알로에는 제주도 서귀포시 (주)김정문알로에 농장에서부터 수확되었으며 Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용함. 2012년 2월 수확된 잎의 껍질을 제거한 후 동결 건조하여 분쇄 후 분말상태로 만들어 -70℃에 보관하며 사용함. 혈액순환기능 증진 효과를 갖는 알로에 추출물 제조법은 기존 연구된 바가 미비하여 본 연구진은 에탄올 비율, 온도, 시간, 용매 비율별 추출물을 제조(표 1) 하여 생리활성 실험을 진행함. 결과로, 주정 99%, 25℃, 1시간, 1:30비율의 조건에서 효과가 가장 좋았음을 알 수 있었고 (그림 2-2), 위의 조건에 따른 추출물 제조법을 정립 (그림 2-3).

[표 1] 에탄올 비율, 온도, 시간, 용매 비율에 따른 추출물을 제조조건

NO.	Time [hour]	주정 [%]	Temp [℃]	L/S [-]
1	1.00	0.00	25.00	30.00
2	1.00	0.00	25.00	60.00
3	1.00	99.00	25.00	60.00
4	1.00	99.00	25.00	30.00
5	4.00	0.00	25.00	30.00
6	4.00	99.00	25.00	30.00
7	4.00	0.00	25.00	60.00
8	4.00	99.00	25.00	60.00
9	2.50	50.00	30.13	45.00
10	1.44	50.00	42.50	45.00
11	2.50	14.65	42.50	45.00
12	2.50	50.00	42.50	34.40
13	3.56	50.00	42.50	45.00
14	2.50	85.35	42.50	45.00
15	2.50	50.00	42.50	55.61
16	2.50	50.00	42.50	45.00
17	2.50	50.00	42.50	45.00
18	2.50	50.00	54.87	45.00
19	1.00	0.00	60.00	60.00
20	1.00	99.00	60.00	60.00
21	1.00	99.00	60.00	30.00
22	1.00	0.00	60.00	30.00
23	4.00	99.00	60.00	30.00
24	4.00	0.00	60.00	60.00
25	4.00	0.00	60.00	30.00



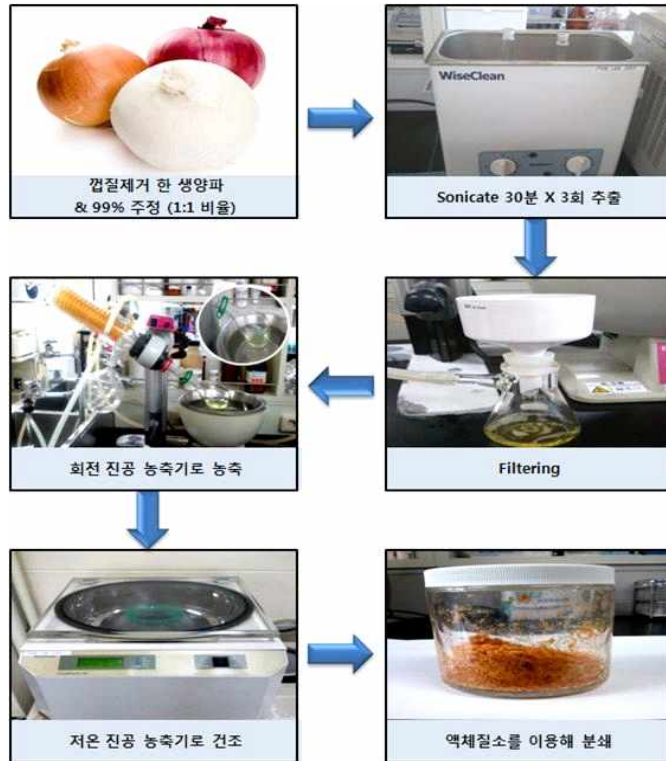
[그림 2-2] 알로에 추출조건에 따른 생리활성(혈소판응집)



[그림 2-3] 알로에 추출물 제조법

나. 양파 추출물 제조

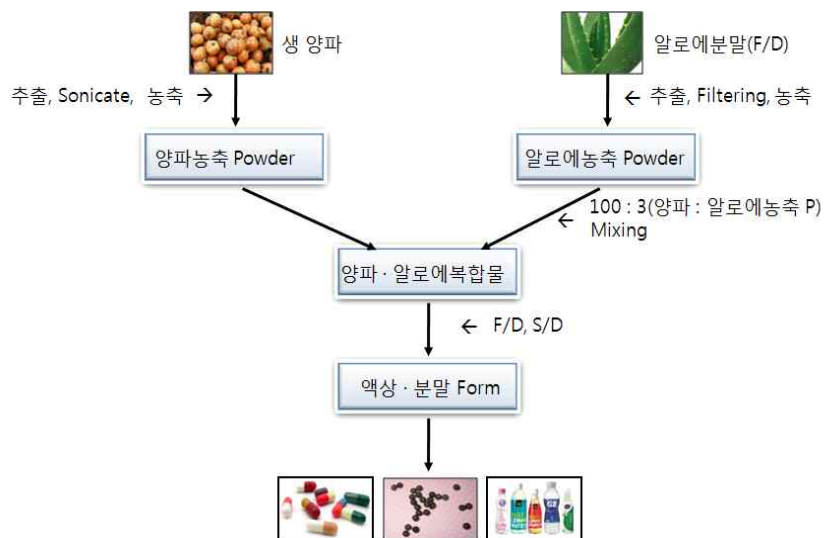
- 본 추출물 제조에 사용된 양파는 전라남도 무안군 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 수확되었으며 썬파워 품종을 사용. 2012년 6월 수확된 양파를 세척 한 후 껍질을 제거하고 사용함. 양파 추출물은 혈액순환기능 증진 효과를 갖는 추출물 제조법이 많이 연구되어 왔기 때문에 기존의 연구를 바탕으로 추출물 제조법을 확립함 (그림 2-4).



[그림 2-4] 알로에 추출물 제조법

다. 양파 · 알로에 복합물 제조

- 양파 · 알로에 복합물 제조는 각 추출물의 비율에 따른 생리활성 정도에 따라 결정됨. 양파 추출물 100 mg/ml을 기준으로 알로에 추출물의 비율에 따른 생리활성(혈소판 응집실험)정도는 앞의 제 1세부과제의 결과를 참조. 양파 추출물과 알로에 추출물을 단독으로 하였을 때 보다 혼합하였을 때 생리활성 효과가 더 좋음을 알 수 있음. 또한 알로에의 함량이 증가할수록 효과가 증가함을 알 수 있음. 그러나 경제적인 측면을 고려하였을 때 100:3의 비율이 복합소재로서의 가장 좋은 비율임을 확인할 수 있었음. 따라서 양파 · 알로에 복합물은 양파 · 알로에 추출물을 100:3의 비율로 섞어서 제조하였음 (그림 2-5).



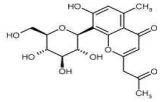
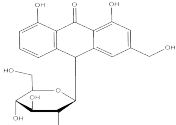
3. 기능/지표성분 설정

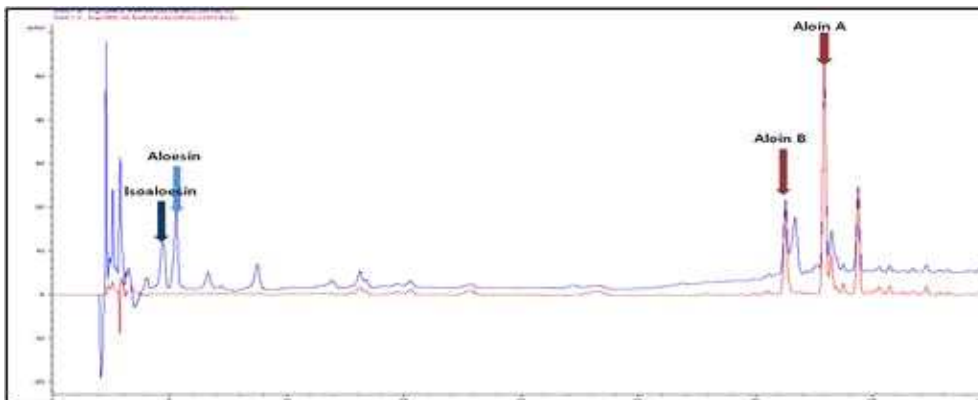
- 원료의 품질관리를 위한 기능/지표성분의 설정에 있어 고려하여야 할 사항은 특이성, 대표성, 안정성, 용이성으로 원재료에 따라 특이적으로 존재하거나 추출물의 성분 중 대표할 만한 성분이어야 함. 이러한 기능/지표성분은 열, 빛, 습도 등의 일반적인 보관조건에서 안정성이 높아야 하며 분리된 단일성분이 HPLC, GC, UV 등과 같은 범용화된 분석기기를 이용하는 일반적인 방법, 상업적 표준물질의 사용가능 여부, 분석 비용 등을 고려하여야 함. 따라서 본 연구팀은 아래와 같이 알로에와 양파 추출물의 기능/지표성분을 설정함.

가. 알로에 추출물의 기능/지표성분 설정

- 알로에 추출물의 대표적인 성분으로 Aloin, Aloesin, isoaloesin 임을 확인할 수 있었고 (표 2와 그림 2-6), 그 중 Aloesin은 오직 알로에만 함유된 성분이며, 계절별 variation이 적고 온도와 pH에 강해서 알로에의 지표성분으로 적합 [Park et al, 1998]. 또한 알로에의 대표적인 성분인 Aloin 또한 HPLC를 이용해 쉽게 분석이 가능하며 크로마토그램 상에서 다른 성분의 방해받지 않아 정확한 분석이 가능함으로서 지표성분으로서 적합. 그러나 Aloin은 하루섭취량의 기준치가 있기 때문에 향 후 복합소재의 섭취량에 따라 지표성분으로서의 사용가능 여부가 판단 될 것으로 보임.

[표 2] 알로에 추출물의 기능성분(지표성분)

구조식	정보
	일반명 : 알로에신(Aloesin) 분자식 : C ₁₉ H ₂₂ O ₉ 분자량 : 394.4 CAS No. : 30861-27-9
	일반명 : 알로인(Aloin) 분자식 : C ₂₁ H ₂₂ O ₉ 분자량 : 418.39 CAS No. : 8015-61-0

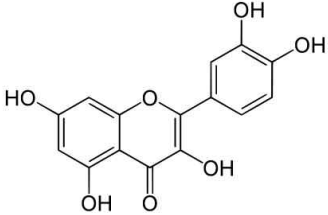


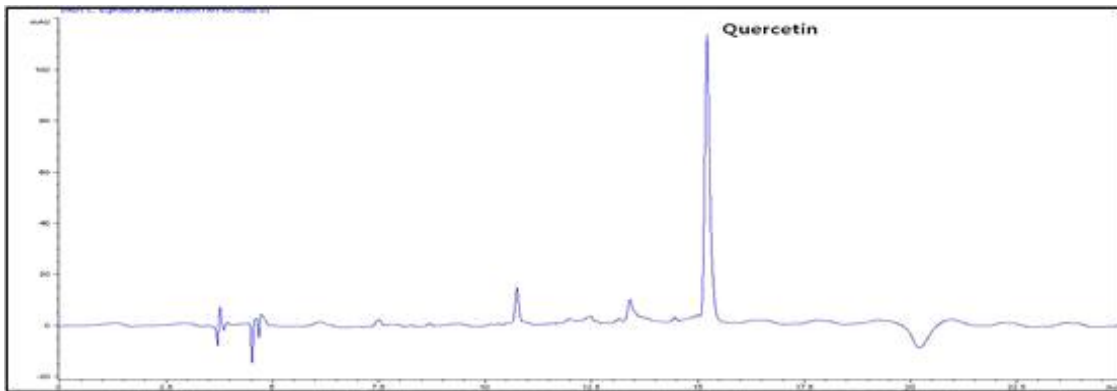
[그림 2-6] 알로에 추출물의 크로마토그램

나. 양파 추출물의 기능/지표성분 설정

- 양파의 주된 flavonoid 성분인 Quercetin은 항산화 효과를 가지며, 혈소판의 활성을 억제시켜 혈행 개선효과를 가지며, 창녕 양파추출액의 지표성분으로서 Quercetin이 실제 사용되었음 (Jeon et al, 2011). 따라서 본 연구진의 양파 추출물의 기능/지표성분으로서 Quercetin 사용이 가능하다고 사료됨 (표 5, 그림 2-7).

[표 5] 양파 추출물의 기능성분(지표성분)

구조식	정보
	일반명 : 퀘세틴(Quercetin) 분자식 : C ₁₅ H ₁₀ O ₇ · 2H ₂ O 분자량 : 338.27 CAS No. : 6151-25-3



[그림 2-7] 양파 추출물의 크로마토그램

4. 양파 · 알로에 복합소재의 표준화

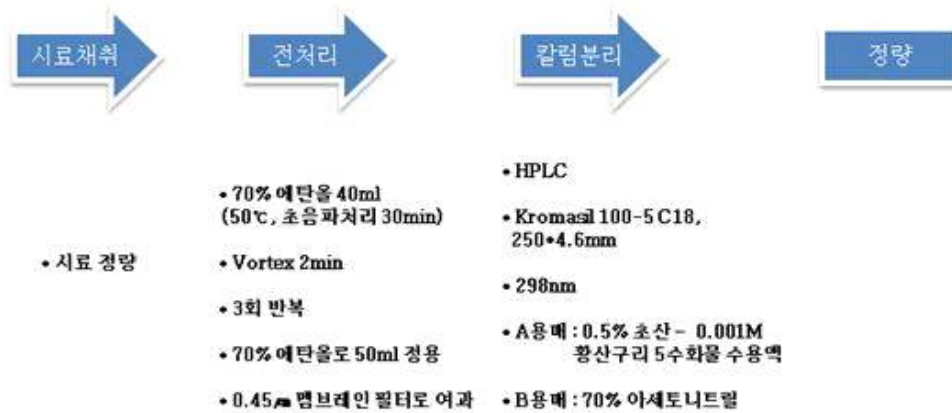
- 양파 · 알로에 복합소재의 표준화를 위해서는 기능/지표성분 분석 할 수 있는 시험법이 정립되어야 함. 정립된 시험법을 통해서 원재료의 원산지, 수확시기, 품종 등에 따른 기능/지표성분 함량을 분석하여 원료의 기능/지표성분 함량범위를 설정. 또한, 제조공정별 기능/지표성분의 함량을 분석하여 제조공정상의 품질관리를 위한 함량범위를 설정.

가. 기능/지표성분 시험법 정립

(1) 알로에 추출물의 지표성분 시험법: 알로에신/알로인 정량법

(가) 시험방법의 요약

- 본 시험법은 알로에 추출물 분말시료 중 존재하는 알로에신을 70% 에탄올로 추출하여 C18칼럼을 통해 알로에신을 분리하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 알로에신, 알로인의 최대흡수 파장인 298nm, 360nm 에서 검출하여 정량함.



[그림 2-8] 알로에 추출물의 지표성분 시험법

(나) 장비와 재료

① 실험실 장비 및 소모품

- ㉠ 용매용 일회용 실린지
- ㉡ 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- ㉢ HPLC용 유리병
- ㉣ Vortex
- ㉤ 정용플라스크 (250ml, 1L)
- ㉥ 초음파 진탕기

② 분석장비

- ㉦ 고속액체크로마토그래프
- ㉧ 자외선흡광광도검출기(UV Detector)
- ㉨ Kromasil 100-5 C18, 250*4.6mm 또는 이와 동등한 것

③ 분석장비의 준비

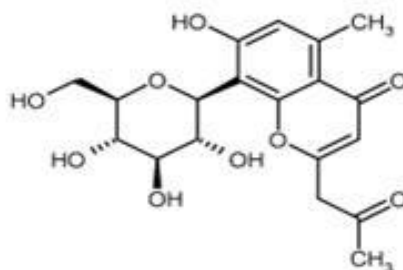
- 이동상은 2개의 용매가 사용 되는데 A용액은 0.5% 초산 - 0.001M 황산구리 5수화물 수용액이고 B용액은 70% 아세트니트릴 용액임. 이 두 개의 용매를 80 : 20 (A : B)의 비율로 분당 1ml씩 충분한 시간 동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화시킴.

(다) 표준물질 및 일반시약

① 표준물질

㉠ Aloesin

- 분자식 : C₁₉H₂₂O₉, 분자량 : 394.4, CAS No. : 30861-27-9



[그림 2-9] Aloesin 구조식

② 일반시약

- 가) 에탄올(ethanol, HPLC grade)
- 나) 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 다) 초산(Acetic acid, HPLC grade)
- 라) 증류수(water, HPLC grade)
- 마) 황산구리 5수화물(CuSO₄·5H₂O)

(라) 시험과정

① 시약 제조

- 가) 0.5% 초산 - 0.001M 황산구리 5수화물 수용액 (이동상 A): 황산구리 5수화물 0.2496g 을 1L 정용플라스크에 취하고, 증류수를 넣어 표선까지 맞추어 0.001M 황산구리 5수화물 수용액을 만든다. 0.001M 황산구리 5수화물 수용액 995ml와 초산 5ml를 섞음.
- 나) 70% 아세토니트릴 용액(이동상 B): 아세토니트릴 700ml과 증류수 300ml을 넣어 섞음.

② 표준용액 제조

- 가) 알로에신, 알로인 표준물질 10mg을 정밀히 측정.
- 나) 정밀히 측정된 표준물질을 100ml 정용플라스크에 넣음.
- 다) 증류수를 넣어 표선까지 맞춤.
- 라) 다)의 용액을 증류수로 희석하여 2, 1, 0.5, 0.025, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 함.

③ 시험용액 제조

- 가) 알로에신, 알로인으로 0.01~2 μg 에 해당하는 양을 정밀히 측정.
- 나) 정밀히 측정된 시료를 정용플라스크에 취함.
- 다) 정용플라스크에 70%이하가 되게끔 70% 에탄올을 넣은 뒤 30℃의 온도에서 초음파처리 30분간 실시.
- 라) 2분간 Vortex 실시.
- 마) 다)에서 라)의 과정을 총 4회 실시.
- 바) 용액의 온도를 상온에 맞게 낮춤.
- 사) 70% 에탄올을 정용플라스크의 표선까지 맞춤.
- 아) 이 용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 얻은 여과액을 시험용액으로 함.

(마) 분석 및 계산

① 기기 분석

- 다음 (표 3, 4)의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있음.

[표 3] 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μl
칼럼온도	25℃
이동상	A용매 : 0.5% 초산 - 0.001M 황산구리 5수화물 수용액 B용매 : 70% 아세토니트릴
검출기 파장	298nm
유량	1ml/분

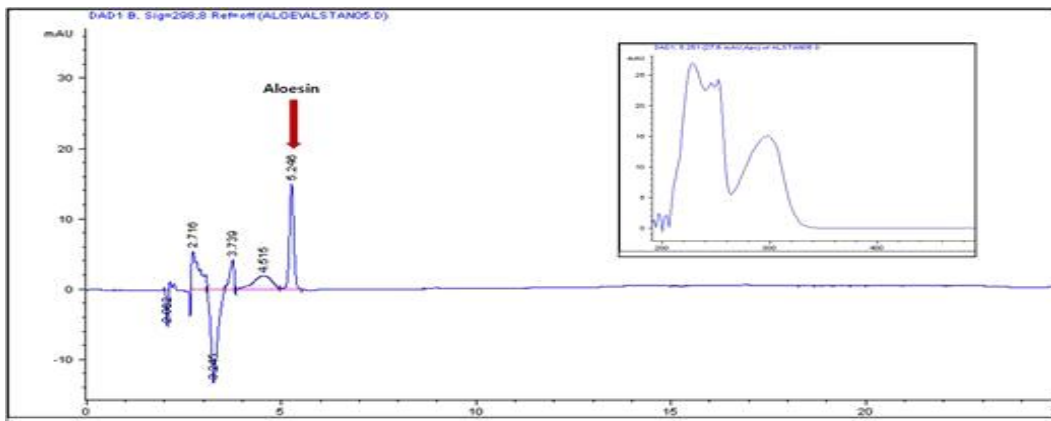
칼럼	Kromasil 100-5 C18, 250*4.6mm
----	-------------------------------

[표 4] 이동상 조건

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
10	75	25
20	75	25
30	60	40
40	50	50

② 결과 분석(예)

㉠ 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼



[그림 2-10] Symmetry = 0.932

③ 표준물질 검량선의 작성

- ㉠ 시험과정에서 제조한 표준용액을 (표 6,7)의 방법으로 분석을 실시.
- ㉡ 얻어진 각 농도의 표준물질의 피크 면적값을 구함.
- ㉢ 표준물질 농도 대 면적값의 표준 검량선을 작성.

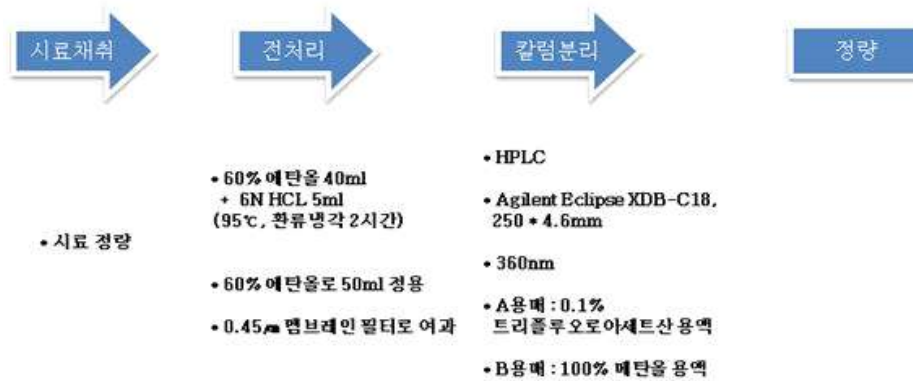
④ 계산

- ㉠ 시험용액의 면적값을 표준검량선 산출 식에 대입.
- ㉡ 나온 값을 다음 식에 대입.
 - 알로에신의 농도($\mu\text{g}/\ell$) = $(A / B) \times C$
 - A : 계산에서 나온 값
 - B : 시험용액의 전량(ml)
 - C : 최종 시험용액 용량(ml)
- ㉢ 함량계산 : 계산에서 나온 값에 제품의 용량(ℓ)를 곱함.

(2) 양과 추출물의 지표성분 시험법: 퀘르세틴 정량법

(가) 시험방법의 요약

- 본 시험법은 양과 추출물 분말시료 중 존재하는 퀘세틴을 60% 에탄올과 6N HCL로 추출하여 C18칼럼을 통해 퀘르세틴을 분리하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 알로에신의 최대흡수 파장인 360nm에서 검출하여 정량.



[그림 2-11] 양파 추출물의 지표성분 시험법

(나) 장비와 재료

① 실험실 장비 및 소모품

- ㉠ 용매용 일회용 실린지
- ㉡ 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- ㉢ HPLC용 유리병
- ㉣ 부피플라스크
- ㉤ 정용플라스크 (50ml)
- ㉥ 회전식감압농축기
- ㉦ 환류냉각기

② 분석장비

- ㉧ 고속액체크로마토그래프
- ㉨ 자외선흡광광도검출기(UV Detector)
- ㉩ Agilent Eclipse XDB-C18, 250 * 4.6mm 또는 이와 동등한 것

③ 분석장비의 준비

이동상은 2개의 용매가 사용 되는데 A용액은 0.1% 트리플루오로아세트산 용액이고 B용액은 100% 메탄올 용액임. 이 두 개의 용매를 80 : 20 (A : B)의 비율로 분당 1ml씩 충분한 시간 동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화시킴.

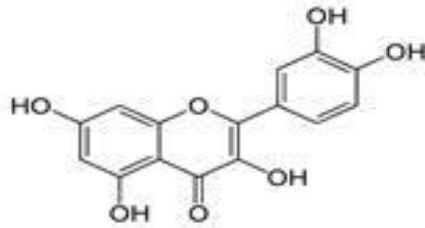
(다) 표준물질 및 일반시약

① 표준물질

㉠ Quercetin

분자식 : C₁₅H₁₀O₇ · 2H₂O, 분자량 : 338.27 CAS No. : 6151-25-3

구조 :



[그림 2-12] Quercetin 구조식

② 일반시약

- 가) 메탄올(methanol. HPLC grade)
- 나) 에탄올(ethanol, HPLC grade)
- 라) 염화수소(HCL)
- 마) 증류수(water. HPLC grade)
- 바) 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic Acid)

(라) 시험과정

① 시약 제조

- 가) 0.1% 트리플루오로아세트산 용액 (이동상 A)
: 1ml 트리플루오로아세트산과 999ml HPLC용 water를 혼합.
- 나) 100% 메탄올 용액 (이동상 B)

② 표준용액 제조

- 가) 퀘세틴 표준물질 10mg을 정밀히 측정.
- 나) 정밀히 측정된 표준물질을 10ml 정용플라스크에 넣음.
- 라) 메탄올을 넣어 표선까지 맞춤.
- 마) 용액을 증류수로 희석하여 25, 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 함.

③ 시험용액 제조

- 가) 퀘세틴으로 10~30 μg 에 해당하는 양을 정밀히 측정.
- 나) 정밀히 측정된 시료를 60% 에탄올 40ml와 6 N HCL 5ml를 첨가하여 용해.
- 라) 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 환류 냉각.
- 마) 이를 회전식감압농축기로 농축한 하여 60% 에탄올을 사용하여 50ml로 정용.
- 바) 이용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 얻은 여과액을 시험용액으로 함.

(마) 분석 및 계산

① 기기 분석

- 다음 (표 5, 6)의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있음.

[표 5] 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μl
칼럼온도	25 $^{\circ}\text{C}$
이동상	A용매 : 0.1% 트리플루오로아세트산 용액

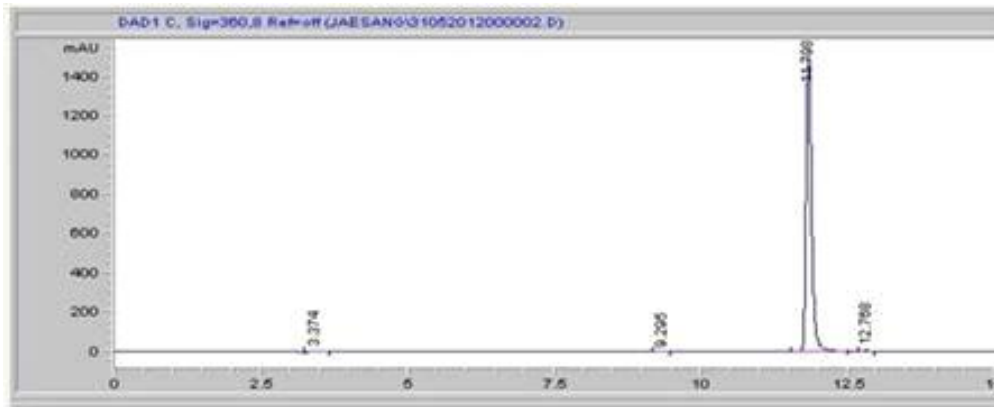
	B용매 : 100% 메탄올 용액
검출기 파장	370nm
유량	0.8ml/분
칼럼	Agilent Eclipse XDB-C18, 250 * 4.6mm

[표 6] 이동상 조건

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
10	20	80
15	20	80
16	80	20
25	80	20

② 결과 분석(예)

㉠ 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼



[그림 2-13] 표준물질의 크로마토그램

③ 표준물질 검량선의 작성

- ㉠ 시험과정에서 제조한 표준용액을 (표 8,9)의 방법으로 분석을 실시.
- ㉡ 얻어진 각 농도의 표준물질의 피크 면적값을 구함.
- ㉢ 표준물질 농도 대 면적값의 표준 검량선을 작성.

④ 계산

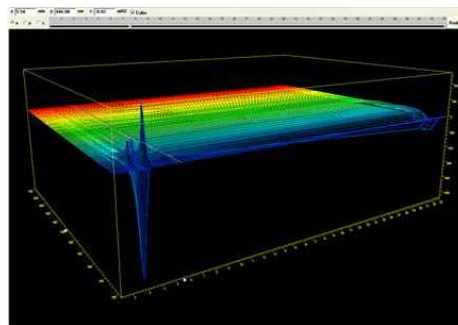
- ㉠ 시험용액의 면적값을 표준검량선 산출 식에 대입.
- ㉡ 나온 값을 다음 식에 대입.
 - 퀘르세틴의 농도($\mu\text{g}/\ell$) = $(A / B) \times C$
 - A : 계산에서 나온 값
 - B : 시험용액의 전량(ml)
 - C : 최종 시험용액 용량(ml), 이 시험에서는 2로 한다.
- ㉢ 함량계산 : 계산에서 나온 값에 제품의 용량(ℓ)를 곱함.

나. 시험법의 타당성

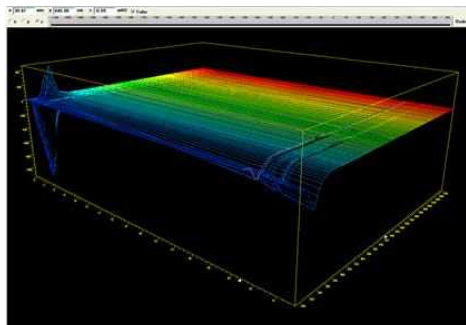
- (1) 알로에신/알로인 정량법의 시험방법 타당성 자료

(가) 특이성(Specification)

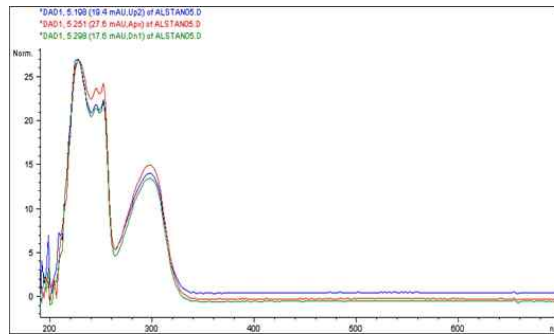
- ① Aloesin 표준물질의 peak은 05.00~05.20min의 시간대에 형성됨.
Aloin 표준물질의 peak은 30.10~30.20min의 시간대에 형성됨.
- ② Aloesin 표준물질 peak의 파장별 흡광도를 확인한 결과는 (그림 2-14)와 같음.
Aloin 표준물질 peak의 파장별 흡광도를 확인한 결과는 (그림 2-15)과 같음.
 - ㉠ Aloesin 표준물질의 05.2분경에 나타난 peak은 298~300nm 권역에서 가장 높은 흡광도를 나타냄
 - ㉡ Aloin 표준물질의 30.1분경에 나타난 peak은 360nm 권역에서 가장 높은 흡광도를 나타냄.
- ③ 분석시료의 peak은 Aloesin은 05.08~05.28min, Aloin은 30.15~30.23min의 시간대에 형성됨.
 - ㉠ 장시간 HPLC 분석을 실시할 경우 peak 검출시간의 변동이 약간 나타났으나 표준물질의 검출시간 변동 폭과 유사하여 동일한 peak으로 판단됨.
- ④ 시료와 표준물질 peak의 파장별 흡광도는 (그림 2-16), (그림 2-17)와 같음.
 - ㉠ 분홍색 표준물질 graph와 비교하여 동일한 최대 흡광파장 및 동일한 패턴으로 나타남.
- ⑤ 시료 Chromatogram 중 Aloesin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도는 (그림 2-18)과 같음. 시료 Chromatogram 중 Aloin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도는 (그림 2-19)와 같음.
 - ㉠ 동일 peak을 시간대별로 3개의 점에서 파장별 흡광도를 확인한 결과 Aloesin과 Aloin 단일 peak으로 추정된다.
- ⑥ 상기의 사실로 미루어 분석시료의 peak과 Quercetin 표준물질 peak은 동일한 물질의 peak로 판단됨.



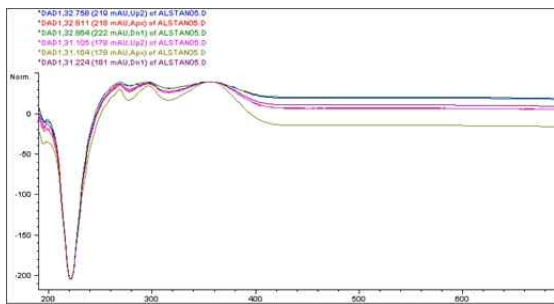
[그림 2-14] Aloesin 표준물질의 파장별 흡광도



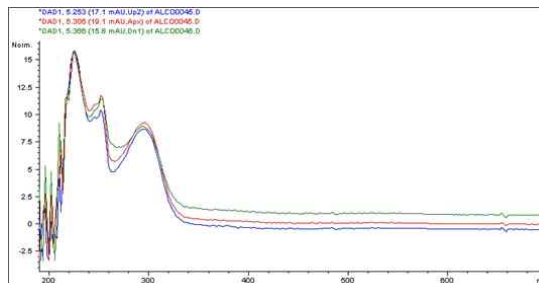
[그림 2-15] Aloin 표준물질의 파장별 흡광도



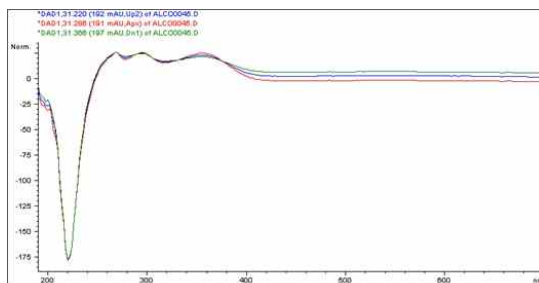
[그림 2-16] Aloesin 표준물질의 파장별 흡광도



[그림 2-17] Aloin 표준물질의 파장별 흡광도



[그림 2-18] Aloesin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도 비교



[그림 2-19] Aloin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도 비교

(나) 정확성(Accuracy)

- 정확성은 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준 값에 근접한 정도를 의미함. 따라서 표준물질을 통해 얻은 참값을 제품의 측정값과 비교하여 시험법의 정확성을 검증해야함.

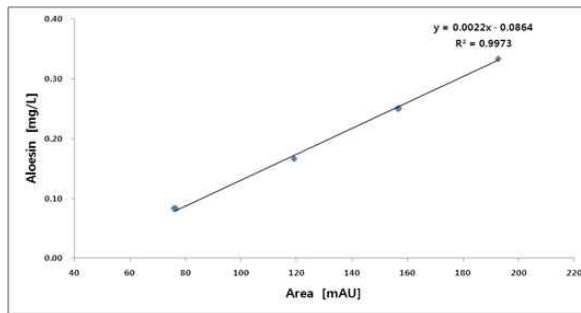
연구과제의 진행 상 최종 제품이 없기 때문에 최종 제품이 완성되는 대로 진행할 예정입니다.

(다) 정밀성(Precision)

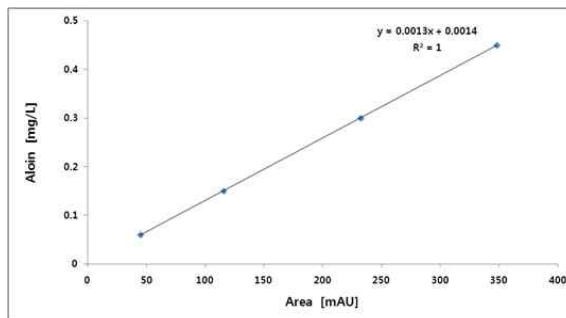
- 정밀성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성을 의미함. 따라서 동일 제품에 대하여 4~9회의 반복실험을 실시하여 시험법의 정밀성을 검증해야함. 연구과제의 진행 상 최종 제품이 없기 때문에 최종 제품이 완성되는 대로 진행할 예정입니다.

(라) 직선성(Linearity)

- ① Aleosin, Aloin 표준물질의 직선성 실험 결과는 (그림 2-20), (그림 2-21)과 같음.
- ② 0.05~0.5mg/l 수준의 표준물질을 4가지 농도로 제조하여 농도별 면적을 바탕으로 표준검량선을 작성한 결과 직선성 값은 Aloesin은 0.9973 , Aloin은 1로 나타남.



[그림 2-20] Aloesin 표준물질의 표준검량선(각 0.08, 0.16, 0.25, 0.33 mg/l 표준물질)

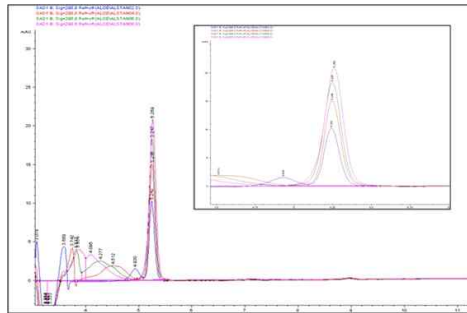


[그림 2-21] Aloin 표준물질의 표준검량선(각 0.06, 0.15, 0.3, 0.45 mg/l 표준물질)

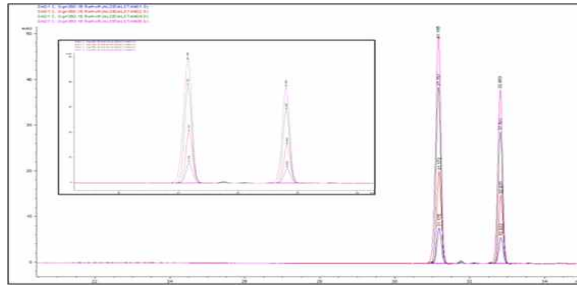
(마) 범위(Range)

- ① Aloesin 표준물질의 chromatogram은 (그림 2-22)과 (그림 2-24) 나타낸 바와 같음.
Aloin 표준물질의 chromatogram은 (그림 2-23)과 (그림 2-25)에 나타낸 바와 같음.
- ② 표준물질로 0.05~0.5mg/l 수준의 농도에서 직선성이 나타났으며, 정량하기에 적절한 면적값을 나타내는 것으로 보임.
- ③ (그림 2-22)과 (그림 2-23)과 같이 0.08mg/l 에서도 정량이 충분히 가능할 만큼의 peak area를 나타냄.

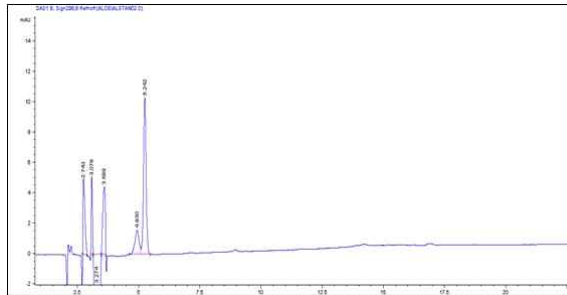
- ④ 모든 정량값이 0.1~0.5mg/l 사이에서 형성되어 표준용액 4개 농도 중 중간농도인 0.2 및 0.4mg/l 범위 안에 위치하여 표준용액 농도 및 시료 농도가 적절한 범위에 위치하고 있다고 판단됨.



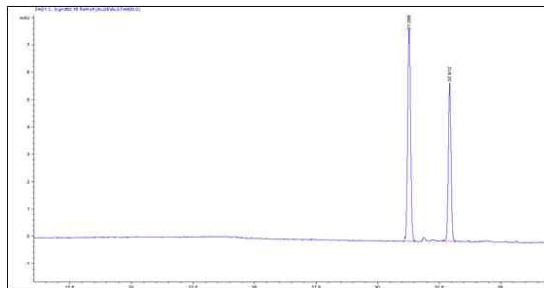
[그림 2-22] 0.05~0.5mg 수준의 Aloesin 표준물질 chromatogram: 청색 0.08mg/l, 적색 0.16mg/l, 녹색 0.25mg/l, 분홍색 0.33mg/l



[그림 2-23] 0.05~0.5mg/l 수준의 Quercetin 표준물질 chromatogram: 청색 0.06mg/l, 적색 0.15mg/l, 녹색 0.3mg/l, 분홍색 0.45mg/l



[그림 2-24] 0.08mg/l Aloesin 표준물질 chromatogram

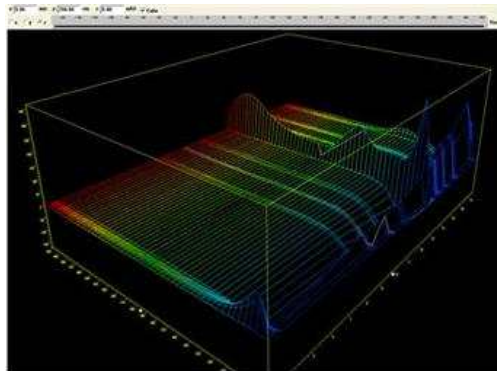


[그림 2-25] 0.06mg/l Aloin 표준물질 chromatogram

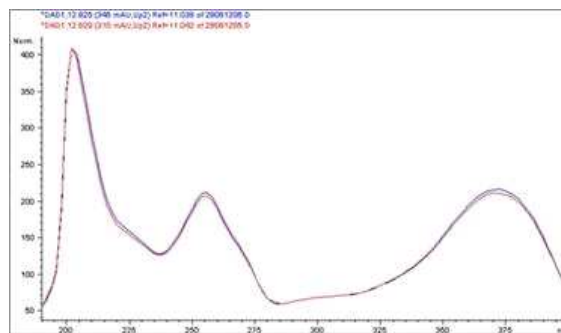
(2) 퀘세틴 정량법의 시험방법 타당성 자료

(가) 특이성(Specification)

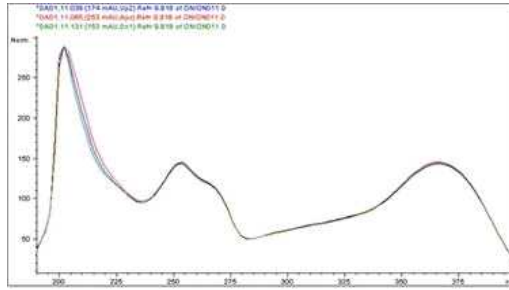
- ① Quercetin 표준물질의 peak은 12.50~13.00min의 시간대에 형성됨.
- ② Quercetin 표준물질 peak의 파장별 흡광도를 확인한 결과는 (그림 2-26)과 같음.
 - Quercetin 표준물질의 12.73분경에 나타난 peak은 340~360nm 권역에서 가장 높은 흡광도를 나타냄.
- ③ 분석시료의 peak은 12.60~13.39min의 시간대에 형성되었음.
 - 장시간 HPLC 분석을 실시할 경우 peak 검출시간의 변동이 약간 나타났으나 표준물질의 검출시간 변동 폭과 유사하여 동일한 peak으로 판단됨.
- ④ 시료와 표준물질 peak의 파장별 흡광도는 (그림 2-27)와 같음.
 - 분홍색 표준물질 graph와 비교하여 동일한 최대 흡광파장 및 동일한 pattern으로 나타났다.
- ⑤ 시료 Chromatogram 중 Quercetin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도는 (그림 2-28)과 같음.
 - 동일 peak을 시간대별로 3개의 점에서 파장별 흡광도를 확인한 결과 Quercetin 단일 peak으로 추정됨.
- ⑥ 상기의 사실로 미루어 분석시료의 peak과 Quercetin 표준물질 peak은 동일한 물질의 peak으로 판단됨.



[그림 2-26] Quercetin 표준물질의 파장별 흡광도



[그림 2-27] Quercetin 표준물질의 파장별 흡광도



[그림 2-28] Quercetin 추정 peak의 시간별 파장별 흡광도 비교

(나) 정확성(Accuracy)

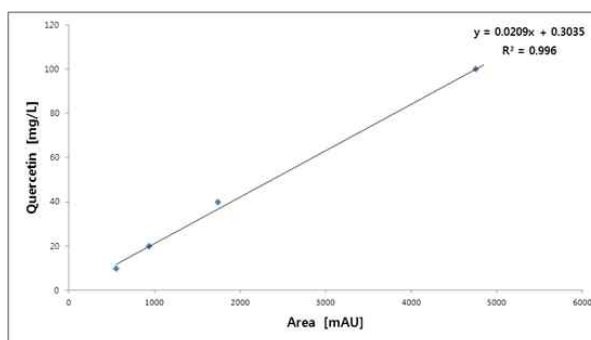
- 정확성은 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준 값에 근접한 정도를 의미함. 따라서 표준물질을 통해 얻은 참값을 제품의 측정값과 비교하여 시험법의 정확성을 검증해야함. 연구과제의 진행 상 최종 제품이 없기 때문에 최종 제품이 완성되는 대로 진행할 예정임.

(다) 정밀성(Precision)

- 정밀성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성을 의미함. 따라서 동일 제품에 대하여 4~9회의 반복실험을 실시하여 시험법의 정밀성을 검증해야함. 연구과제의 진행 상 최종 제품이 없기 때문에 최종 제품이 완성되는 대로 진행할 예정임.

(마) 직선성(Linearity)

- ① Quercetin 표준물질의 직선성 실험 결과는 (그림 2-29)와 같음.
- ② 10~150mg/l 수준의 표준물질을 4가지 농도로 제조하여 농도별 면적을 바탕으로 표준검량선을 작성한 결과 직선성 값은 Quercetin은 0.996로 나타남.

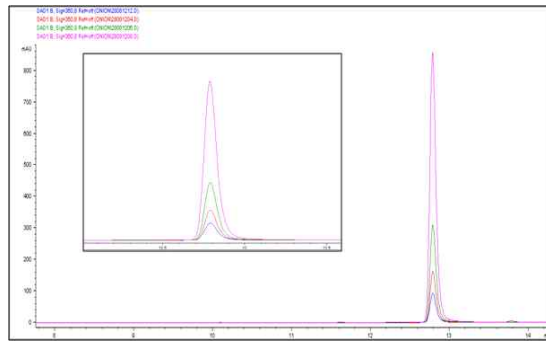


[그림 2-29] Quercetin 표준물질의 표준검량선(각 10, 20, 40, 100 mg/l 표준물질)

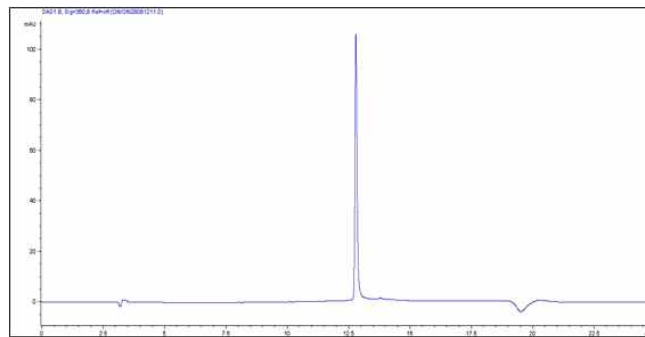
(바) 범위(Range)

- ① Quercetin 표준물질의 chromatogram은 (그림 2-30)에 나타낸 바와 같음.
- ② 표준물질로 10~150mg/l 수준의 농도에서 직선성이 나타났으며, 정량하기에 적절한 면적 값을 나타내는 것으로 보임.
- ③ (그림 2-31)과 같이 10mg/l 에서도 정량이 충분히 가능할 만큼의 peak area를 나타냄.

- ④ 모든 정량값이 10~100mg/ℓ 사이에서 형성되어 표준용액 4개 농도 중 중간농도인 20 및 40mg/ℓ 범위 안에 위치하여 표준용액 농도 및 시료 농도가 적절한 범위에 위치하고 있다고 판단됨.



[그림 2-30] 0.05~0.5mg 수준의 Quercetin 표준물질 chromatogram : 청색 10mg/ℓ, 적색 20mg/ℓ, 녹색 40mg/ℓ, 분홍색 100mg/ℓ



[그림 2-31] 10mg/ℓ Quercetin 표준물질 chromatogram

다. 원재료 표준화

- 원재료 표준화의 목적은 향 후 복합소재의 품질관리에 있어서의 기능/지표성분 범위설정을 하기 위함임. 개별인정에 있어서 기능/지표성분 범위를 설정해 놓으면, 반드시 그 기준에 맞는 복합소재를 생산해내야 함. 그렇기 때문에 향 후 사용하게 될 원료의 기능/지표성분 함량범위를 분석해서 범위설정에 반영해야 함. 고려해야 할 사항은 원재료의 부위, 원산지, 수확시기 등이 있음. 알로에의 경우 국내산 알로에는 90% 이상이 제주도에서 재배되기 때문에 제주도를 원산지로 수확시기별 표준화를 진행하였음. 양파의 경우 주요 원산지인 무안에서 품종과 수확시기에 따른 표준화를 진행하였음. 원재료 표준화에는 본 연구진이 확립한 추출법 및 시험법으로 실험을 진행하였음.

(1) 알로에의 원재료 표준화

- 본 표준화에 사용된 알로에는 제주도 서귀포시 (주)김정문알로에 농장으로부터 수확되었으며 (그림 2-32)과, Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용하였음. 수확 시기는 1월, 2월, 3월, 4월, 6월로 처음 내달간은 한 달 간격으로 수확하였으며 내달 이후에는 두 달 간격으로 수확하여 표준화 하였음. 수확된 잎은 껍질을 제거한 후 동결 건조하여 액체질소를 넣고 분쇄 후 분말상태를 만들어 -70℃에 보관하며 사용하였음. 동결 건조된 알로에 분말은 복합소재의 추출법과 같은 추출법을 사용하였으며, 분석조건 또한 같은 조건으

로 사용하였음 (표 7).



[그림2-32] 알로에 제주도 재배 단지 (김정문 알로에)

- 수확시기에 따른 Aloesin과 Aloin의 함량분석 결과, Aloesin의 함량범위는 1.22~5.29mg/g이며, 평균함량은 2.85mg/g. 그리고 Aloin의 함량범위는 2.64~15.18mg/g이며, 평균함량은 8.52mg/g. 원료의 지표성분 함량범위 설정 시 최저, 최고 함량범위의 80~120%를 사용하는데, Aloesin의 경우 1.52~6.35mg/g이며, Aloin의 경우 2.11~18.21mg/g 임. 이를 지표성분 함량범위 설정 시 반영할 수 있다고 봄.

[표 7] 알로에의 수확시기별 기능성분(지표성분) 함량 분석

수확시기 [월]	Aloesin [mg/Extracted solids g]	Aloin A [mg/Extracted solids g]
1	5.29	14.53
2	1.31	4.09
3	1.73	2.64
4	3.89	15.18
6	1.22	3.52
8	3.68	11.17

(2) 양파의 원재료 표준화

- 본 표준화에 사용된 양파는 전라남도 무안군 국립식량과학원 바이오에너지작물센터로부터 공급받았으며, 적응구분에 따른 품종을 3가지씩 선택하여 표준화하였음. 2012년 수확된 양파를 10일간 건조시킨 후 껍질을 제거하여 사용하였음. 복합소재의 추출법과 같은 추출법을 사용하였으며, 분석조건 또한 같은 조건으로 사용하였음.
- 적응구분에 따른 품종별 Quercetin의 함량분석 결과, 품종 간 함량차이가 큰 것으로 보임. 함량이 가장 낮은 품종(귀공자 6.41mg/g, 로망 6.84mg/g, 체어맨 8.42mg/g)을 제외하고 Quercetin의 함량범위는 10.59~19.02mg/g이며, 평균함량은 13.81mg/g임. 원료의 지표성분의 함량범위 설정 시 최저, 최고 함량범위의 80~120%를 사용하는데, Quercetin의 경우 8.47~22.82mg/g이며 이를 지표성분 함량범위 설정 시 반영할 수 있다고 봄 (표 8).

[표 8] 양파의 품종별 기능/지표성분 함량 분석

적응구분	품종	Quercetin
------	----	-----------

		[mg/Extracted solids g]
극조생	귀공자	6.41
	마루시노 330	19.02
	하야마루	11.37
조생	로망	6.84
	맙시황	12.30
	신선황	14.29
중생	새로미	13.63
	썬파워	18.35
	야무진황	12.30
만생	대풍	12.47
	엘리먼트	10.59
	체어맨	8.42

라. 제조공정 표준화

- 제조공정의 표준화는 각 제조단계(원재료, 추출, 농축, 건조)에서 지표성분의 함량 변화를 측정하는 것이며, 지표성분은 각 제조공정별 함량 변화가 적어야함. 또한, 제조공정 표준화를 통해 설정한 함량 범위는 향후 실제 생산에 있어서 지켜져야 함.

(1) 알로에 추출물 제조공정 표준화

- 알로에 추출물 제조공정 표준화에 있어서 분석법은 앞서 정립된 ‘알로에신/알로인 정량법’을 사용하였으며, Aloesin의 함량은 원재료 8g 당 원재료 1.148mg/g, 추출물 1.106mg/g, 농축물 1.281mg/g, 건조물 1.072mg/g으로 각 제조공정간 약 10%내외의 함량차이를 갖고 있음. Aloin 함량은 원재료 1.98mg/g, 추출물 1.884mg/g, 농축물 1.928mg/g, 건조물 1.916mg/g으로 약 5%내외의 함량차이를 보임 (표 9). 따라서 제조공정별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

[표 9] 알로에 추출물 수율 및 aloesin 함량

제조공정	공정, 식품	수율	Aloesin 함량 (mg)	Aloin 함량 (mg)
원재료	알로에 분말	8 g	1.148	1.980
추출	99% 주정, 25℃, 1시간	250 ml	1.106	1.884
농축	회전 진공 농축기	50 ml	1.281	1.928
건조	저온 진공 농축기	0.3960 g	1.072	1.916

(2) 양파 추출물 제조공정 표준화

- 양파 추출물 제조공정 표준화에 있어서 분석법은 앞서 정립된 ‘퀘세틴 정량법’을 사용하

였으며, Quercetin의 함량은 원재료 50g 당 원재료 917.127mg/g, 추출물 898.103mg/g, 농축물 877.023mg/g, 건조물 879.746mg/g 으로 각 제조공정간 약 5%내외의 함량차이를 보임 (표 10). 따라서 제조공별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

[표 10] 양파 추출물 수율 및 quercetin 함량

제조공정	공정, 식품	수율	Quercetin 함량 (mg)
원재료	양파	50 g	917.127
추출	99% 주정, 50℃, Sonicate 1시간 30분	500 ml	898.103
농축	회전 진공 농축기	250ml	877.023
건조	저온 진공 농축기	3.4382 g	879.746

5. Pilot-scale 제조공정의 최적화 연구

가. Pilot-scale에서 양파·알로에 복합 추출물 제조

- Pilot-scale에서의 양파·알로에 복합 추출물 제조는 실험실내에서 가능한 최대의 양으로 추출물을 제조하는 것으로 실제 제조공정에서 일어날 수 있는 지표성분의 함량변화를 예측하고자 하는 작업임. 그에 따라 기초 연구 시 사용되었던 양파, 알로에 원재료 량의 400배 또는 100배가 되도록 scale-up하여 추출물을 제조한 후 3:1의 비율로 혼합하여 복합 추출물을 제조하였으며 그에 따른 지표성분 함량 및 수율을 측정하였음 [표 11].

(1) Pilot-scale에서의 양파·알로에 추출물 제조

- Pilot-scale의 추출을 위해 전라남도 무안군 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 수확된 썬파워 품종을 사용하였으며 2012년 6월 수확된 양파를 0℃에 저장된 것을 사용하였음. Scale-up을 위해서 기초 연구 시 사용되었던 양파 약 50g의 400배가 되도록 20kg을 사용하였으며 양파를 세척 한 후 껍질을 제거하고 잘게 다진 후 주정 99%를 1:1의 비율로 넣은 후 sonication 30분 3회 추출하였음. 추출 후 고형분은 filter paper로 걸러내고 추출액만을 취하여 회전 진공 농축기로 농축한 후 저온 진공 농축기로 완전히 건조하여 분말화하였음. Pilot-scale에서의 추출물의 지표성분 함량 및 수율을 측정한 결과 지표성분인 Quercetin의 함량은 1.66mg/g에서 1.35mg/g으로 약 10%의 변화로 차이가 크지 않음을 알 수 있었고 추출 수율은 6.8%에서 6%로 낮아짐을 알 수 있었음[표 11].
- 알로에는 제주도 서귀포시 (주)김정문알로에 농장으로부터 수확된 Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용함. 2012년 2월 수확된 잎의 껍질을 제거한 후 동결 건조하여 분쇄 후 분말상태로 만들어 -70℃에 보관하며 사용함. 기초 연구에서 사용되었던 알로에 분말 8g보다 100배 높은 800g을 사용하여 주정 99%를 1:30의 비율이 되도록 넣은 후 상온에서 1시간 동안 회전추출을 하였음. 고형분은 paper filter를 통해 제거되고 추출액만을 취하여 회전 진공 농축기로 농축한 후 저온 진공 농축기로 완전히 건조하여 분말화 하였

음. Pilot-scale에서의 추출물의 지표성분 함량 및 수율을 측정된 결과 지표성분 함량인 Aloesin의 함량이 1.73mg/g에서 1.53mg/g으로 약 12%으로 변화가 거의 없음을 알 수 있었고 추출 수율의 경우 5%에서 4.5%로 낮아짐을 알 수 있었음[표 11].

[표 11] 양파 추출물과 알로에 추출물의 Pilot-scale 추출에 따른 변화

	양파 추출물		알로에 추출물	
	소량 추출	Pilot-scale 추출	소량 추출	Pilot-scale 추출
원재료	50g	20kg	8 g	800g
용매	50ml	20L	240ml	24L
수율	6.8%	6%	5%	4.5%
지표성분 함량	1.66mg	1.51mg	1.73mg	1.53mg

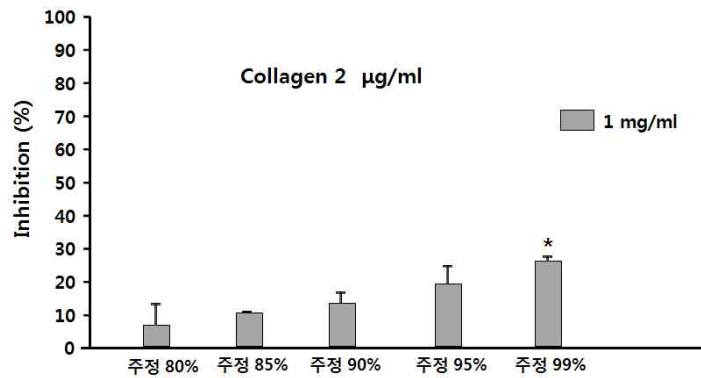
- 이와 같이 Pilot-scale하여 추출해 본 결과 추출과정에서의 여러 가지 수정사항을 발견되었으며 이를 수정하고자 추가 실험을 진행하였음. 양파 추출물의 경우 추출속진을 목적으로 사용되었던 sonication은 대량 추출 시 사용이 어려우며, filter에 사용되었던 filter paper 또한 실제 제조공정상에서의 사용이 어려움이 있을 것으로 판단되었음. 또한 양파·알로에 추출에 사용되었던 주정 99%의 구입이 어려우며 높은 단가에 따른 산업화의 어려움이 있음. 뿐 만 아니라 수율 측정의 결과 Scale-up할 경우에 수율이 낮아짐을 알 수 있었고, 이는 실제 제조공정에서의 수율 또한 낮아짐을 예측 할 수 있었음. 그러나 수율은 산업적인 측면에서 매우 중요한 부분을 차지하기 때문에 수율에 따른 문제점을 수정해야 했음. 그에 따라 본 연구진은 생리활성에는 큰 변화가 없으나 수율을 높이며 실제 제조공정에서 사용될 수 있는 추출 방법을 간구하고자 하였음.

(2) Pilot-scale에서의 문제점 해결방안

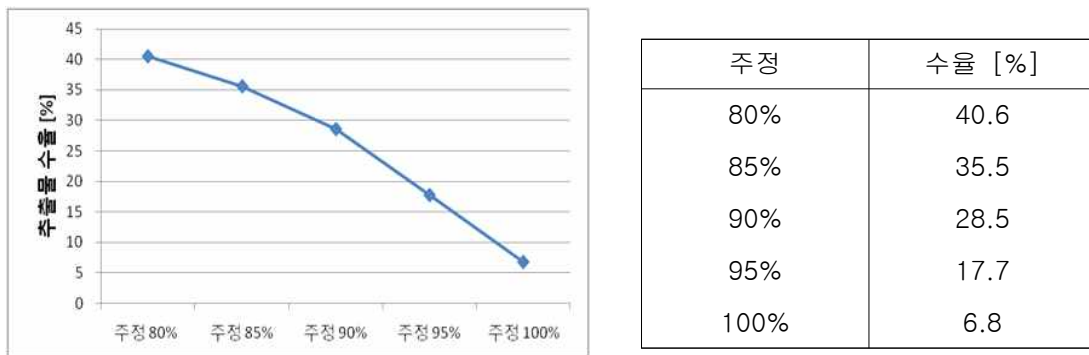
- 기초 연구에서 사용된 소량의 추출법을 Pilot-scale한 결과 제조공정 및 수율에서 문제점이 발견되었음. 양파 추출물의 경우 실제 제조공정에서 sonication 및 filter paper 사용의 어려움을 고려해 sonication과정을 양파를 분쇄하여 착즙하는 과정으로 수정하였으며 100 메쉬의 거름망을 사용하여 filter하였음. 또한 99%의 주정의 사용이 어려움에 따라 주정 99% 추출물과 증류수 추출물의 생리활성을 비교하여 용매를 바꾸고자 하였음. 그 결과 주정 99%의 추출물과 증류수 추출물의 생리활성 정도가 효능을 보이는 범위 내에서 크게 차이나지 않음을 알 수 있었음 (그림 2-33). 따라서 산업적인 측면을 고려하여 효능에는 영향을 미치지 않으나 비용이 절감될 수 있는 증류수 추출물을 선택하였음.

- 알로에 추출물의 경우 실제 제조공정에서 경제적인 측면과 취급 주의에 따른 문제점으로 주정 99%의 사용이 어렵다고 판단하여 주정 99% 추출물과 가장 가까운 효능을 보이면서 수율을 높일 수 있는 추출물을 제조하고자 하였음. 그에 따라 80%, 85%, 90%, 95% 주정 추출물을 제조하여 혈소판 응집 억제효능을 봄. 그 결과 1mg/ml의 낮은 추출물 농도 때문에 inhibition은 작지만 주정 99%와 95%간의 혈소판 응집효능 차이가 크지 않음을 알 수 있었음[그림 2-33]. 또한 수율을 측정 한 결과 주정 99%일 때 6.8%로 가장 낮았으며 주정 95%추출물은 17.7%로 주정의 농도가 낮아질수록 수율이 증가함을 알 수 있

있음[그림 2-34]. 따라서 효능에는 영향을 미치지 않으나 수율을 높일 수 있는 추출법을 위하여 주정 95% 추출물을 선택하였음.



[그림 2-33] 알로에 추출물에 따른 혈소판 응집 억제효과



[그림 2-34] 알로에 추출물에 따른 수율변화

(나) Pilot-scale에서의 제조공정 수율 및 지표성분 함량 측정

- 개별인정형 기능성 원료에 대한 품질관리 기준을 확립하기 위하여 지표성분을 이용한 표준화방법을 이용하는데, 이는 각 제조공정별 지표성분함량의 변화를 확인하는 것으로 제조공정별 지표성분 함량의 변화가 적어야 함. 따라서 실제 제조공정에서의 지표성분 함량 변화를 최소화하기 위하여 Pilot-scale을 통한 제조공정별 지표성분함량의 변화를 통해서 실제 제조공정에서의 지표성분 함량변화를 예측할 수 있음. 이를 위해 Pilot-scale에서의 각각의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정하였음. 다음의 Pilot-scale 추출은 앞서 보고된 수정된 추출법으로 진행하였음.

(1) 양파 추출물의 Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율

- 양파 추출물의 Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정하기 위하여 기초 연구에 사용되었던 원재료 량의 400배가 되도록 양파를 사용하여 추출물을 제조하였음. 본 시료는 전라남도 무안군 서남부채소농협에서 공급받았으며 2012년 6월 수확된 썬 파워 품종을 0℃에 저장된 것을 사용하였음. 20kg의 양파의 껍질을 제거 한 후 세척 하여 증류수와 함께 분쇄한 뒤 100메쉬 거름망을 사용하여 고형분을 제거하고 추출액만을 취하였음. 추출액은 회전 진공 농축기로 농축한 후 저온 진공 농축기로 완전히 건조하여 분말화 하였음. Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정한 결과는 [표 12]

로 Quercetin의 함량이 원재료 20kg 당 812.6mg/g, 추출물 796.4mg/g, 농축물 783.2mg/g, 건조물 800.9mg/g, 으로 각 제조공정간 약 5%내외의 함량차이를 보임. 따라서 제조공정별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

[표 12] Pilot-scale에서의 양파 추출물 수율 및 quercetin 함량

제조공정	공정, 식품	수율	Quercetin 함량 (mg)
원재료	양파	20kg	812.6
추출	증류수, 분쇄, 100메쉬 거름망 필터	28L	796.4
농축	회전 진공 농축기	10L	783.2
건조	저온 진공 농축기	1430.2g	800.9

(2) 알로에 추출물의 Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율

- 알로에 추출물의 Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정하기 위하여 기초 연구에 사용되었던 원재료 량의 100배가 되도록 알로에 베라 분말을 사용하여 추출물을 제조하였음. 본 시료는 제주도 서귀포시 (주)김정문알로에 농장으로부터 수확된 Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용하였으며 2012년 2월 수확된 잎의 껍질을 제거한 후 동결 건조하여 분쇄 후 분말상태로 만들어 -70℃에 보관하며 사용함. 알로에 분말 800g을 사용하여 주정 95%를 1:30의 비율이 되도록 넣은 후 상온에서 1시간 동안 회전추출을 하여 paper filter를 사용하여 고형분을 제거하고 추출액만을 취하였음. 추출액은 회전 진공 농축기로 농축한 후 저온 진공 농축기로 완전히 건조하여 분말화 하였음. Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정한 결과는 [표 13]으로 Aloesin의 함량은 원재료 800g 당 16.3mg/g, 추출물 13.8mg/g, 농축물 14.6mg/g, 건조물 15.6mg/g으로 각 제조공정간 약 5%내외의 함량차이를 갖고 있음. 따라서 제조공정별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

[표 13] Pilot-scale에서의 알로에 추출물 수율 및 Aloesin 함량

제조공정	공정, 식품	수율	Aloesin 함량 (mg)
원재료	알로에 분말	800g	16.3
추출	95% 주정, 25℃, 1시간	24L	13.8
농축	회전 진공 농축기	3L	14.6
건조	저온 진공 농축기	120g	15.6

다. 실제 제조공정을 통해 얻어진 추출물의 제조수율 및 지표성분의 함량 측정

- 실험실내 Pilot scale에서의 수정된 추출법을 실제 제조공정에 실용하여, 최종 양파·알로에 복합 추출물 얻음. 그에 따라 실제 제조공정을 통해 얻어진 추출물의 제조수율 및 지

표성분의 함량을 측정하였으며, 각각의 제조공정별 지표성분함량을 측정하여 제조공정표 준화를 진행하였음. 그 결과 양파·알로에 각각 제조공정별 지표성분함량의 변화가 적음을 알 수 있었음[표 15, 16].

(1) 양파·알로에 복합 추출물의 실제 제조공정도

- 양파·알로에 복합 추출물은 양파·알로에를 각각 추출하여 분말화 한 뒤 3:1의 비율로 혼합하여 제조하였음.

(가) 양파 추출물의 제조공정도

- 양파의 실제 제조공정은 제2협동기관인 김정문알로에(주) 공장에서 진행 되었으며 그에 따른 제조공정도를 [그림 2-35]에 나타내었음. 양파는 전라남도 무안군 서남부채소농협에서 공급받았으며 2012년 6월에 수확된 썬파워 품종을 0℃에 저장된 것으로 1톤을 사용하였고, 추출용매로는 양파의 실험실내 Pilot-scale에서 최종적으로 선정한 정제수를 사용함. 최종추출법의 L/S ratio 7:10을 반영하여 정제수 1,429L을 넣어 습식분쇄 하였음. 100메쉬의 필터프레스를 이용하여 여과한 후 45℃의 농축 단계를 거친 후 건조단계를 진행하였음. 그러나 기초 연구에서 사용된 저온진공건조를 실제 공정에서 적용할 경우, 추출물이 공기 중 습기를 흡수하여 높은 점도현상으로 인한 분말화의 어려움이 있었음. 이에 대한 대책으로 농축액에 텍스트린(45%)을 첨가하여 분무건조를 통해 최종 양파 추출물 분말을 얻었음. 이때 텍스트린 함량을 제외하고 얻어진 최종분말의 양은 30.25kg이며 3%의 수율을 얻었음[표 14].

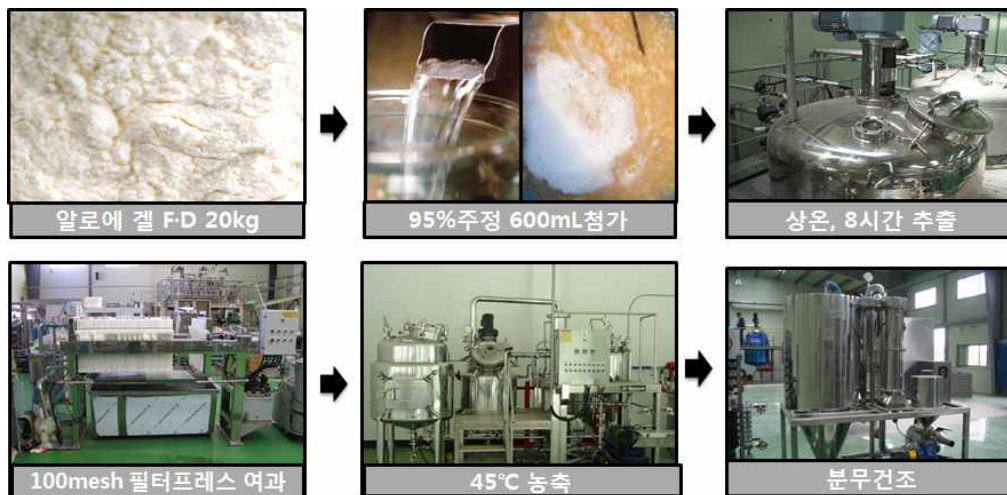


[그림 2-35] 양파 물 추출물의 제조공정도

(나) 알로에 추출물의 제조공정도

- 알로에는 제주도 서귀포시 김정문알로에(주) 농장으로부터 수확 된 Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용하였으며 2012년 2월 수확된 잎의 껍질을 제거한 후 동결 건조하여 분쇄 후 분말상태로 만들어 -70℃에 보관하며 사용함. 실제 공정에서 알로에 겔 동결건조 분말 20kg을 사용하였으며, 추출용매로는 알로에의 실험실내에 Pilot-Scale에서 최종적으로 선정한 95%주정을 사용함. 최종 추출법을 활용하여 L/S 30ratio인 600L의 95%주정을 넣어 상온에서 8시간 추출하였음. 이후 100메쉬의 필터프레스를 이용하여 여과한 후 45℃의 농축 단계를 거친 후 건조단계를 진행하였음. 그러나 기초 연구에서 사

용된 저온진공건조를 실제 공정에서 적용할 경우 알로에의 높은 다당체의 함유로 인한 점도현상으로 인해 분말화의 어려움이 있으므로 이를 방지하기 위해 농축액에 텍스트린(50%)을 첨가하여 분무건조를 통해 최종 알로에추출물 분말을 얻었음[그림 2-36] 이때 텍스트린함량을 제외하고 얻어진 최종분말의 양은 2.5kg이며 12.5%의 수율을 얻었음[표 4].



[그림 2-36] 알로에 겔 F·D 95%주정 추출물의 제조공정도

(2) 실제 제조공정에서 얻어진 추출물의 제조공정 수율 및 지표성분함량 분석과 제조공정 표준화

(가) 실제 제조공정에서의 제조공정 수율 및 지표성분 함량

- 실제 제조공정에서 얻어진 추출물과 실험실의 Pilot-scale 추출물간의 제조공정 수율 및 지표성분 함량을 비교한 결과로 보았을 때, 양파·알로에 각각의 추출물 모두 실제공정에서 낮은 수율을 나타냄. 지표성분의 함량은 Quercetin의 경우 실험실내 Pilot-scale에서의 추출물에는 0.56mg/1g 함유하였으며, 실제공정의 추출물에서는 0.48mg/1g으로 나타났음. 알로에 추출물의 경우 실험실내 Pilot scale에서의 추출물에는 Aloesin이 0.13mg/1g으로 검출이 되었으나 실제공정의 추출물에서는 Aloesin이 극소량 검출이 되어 지표성분으로써 Aloesin을 사용할 수 없었음. 그러나 종전에는 낮은 함량을 보였던 미지의 성분이 높은 함량으로 검출되었으며, 향 후 그 성분을 규명하여 지표성분으로써 사용할 계획임. 이러한 원인은 실험실내의 제조공정과 실제 제조공정 사이의 여러 가지 컨드롤 할 수 없는 요인들로 인한 것으로 판단됨. 그에 따라 본 연구진은 향 후 여러 번의 실제 제조공정에서의 추출을 진행하여 수율 및 지표성분 함량을 측정하여 오차범위를 줄여나갈 예정임.

[표 14] 실제 제조공정 및 실험실 내 Pilot-scale 추출의 수율 및 지표성분함량비교

항목	양파 추출물		알로에 추출물	
	실제제조공정	실험실 내 Pilot-scale추출	실제제조공정	실험실 내 Pilot-scale추출
원재료	1톤	20kg	20kg	800g
용매	1429L	28L	600L	24L
최종분말	30.25kg	1430.2g	2.5kg	120g
수율	3.0%	7.16%	12.5%	15%
지표성분 함량	Quercetin 0.48mg/1g	Quercetin 0.56mg/1g	지표성분 후보물질 62.41mg/1g	Aloesin 0.13mg/1g

(나) 양파·알로에 복합 추출물의 실제 제조공정에서의 제조공정 표준화

- 실제 제조공정에서 얻어진 추출물의 제조공정 단계별(원재료, 추출, 농축, 건조) 수율 및 지표성분함량 비교를 통해 향후 품질관리 기준에 필요한 함량범위 확립되어야하며, 제조 각 단계에서의 추출용매, 추출공정, 추출용매의 비율, 건조과정과 같은 중요한 공정변수들이 적절하게 관리되어야함. 따라서 양파 및 알로에의 실제 공정에서의 제조공정 표준화과정을 통해 제조수율 및 지표성분의 함량을 얻음.

① 양파 추출물의 제조공정 표준화

- 실제 제조공정에서 얻어진 양파 추출물의 제조공정 단계별 수율 및 지표성분함량을 비교하여 [표 15]에 나타냄. 결과적으로 Quercetin의 함량은 원재료 1톤 당 13.7g, 추출물 13.6g, 농축물 12.3g, 건조물 14.5g으로 각 제조공정 간의 차이가 약 5%내외의 함량차이를 보였으며 제조공정 단계별 함량변화가 적음을 알 수 있으므로 제조공정 표준화에 적용 가능함.

[표 15] 양파의 실제 제조공정 Pilot-scale에서의 단계별 수율 및 지표성분함량

Manufacturing Step	Process	Yield	Contents of Quercetin(g)
원재료	생양파	1톤	13.7
추출액	정제수, 분쇄	1,429L	13.6
농축액	농축	16.7L	12.3
추출분말	분무건조	30.25kg	14.5

② 알로에 추출물의 제조공정 표준화

- 실제 제조공정에서 얻어진 알로에 추출물의 제조공정 단계별 수율 및 지표성분함량을 측정하였음. 그러나 알로에의 지표성분인 Aloesin의 경우, 실제 제조공정에서 얻은 양파·알로에 복합물에서 극소량으로 검출되어 Aloesin 대신 함량이 증가한 미지의 성분을 지표성분으로 설정하여 함량분석하였음. 이 성분은 향후 LC/MS, NMR등을 이용하여 물질을 규명한 다음 지표성분으로 채택할 예정임. 다음 [표 16]은 제조공정표준화를 위한 알로에의 각 단계별 원재료의 함량 증 지표성분 후보물질에 대한 함량이며, 원재료 20kg 당 149g, 추출물 158g, 농축물 147g, 건조물 156g으로 결과적으로 각 제조공정

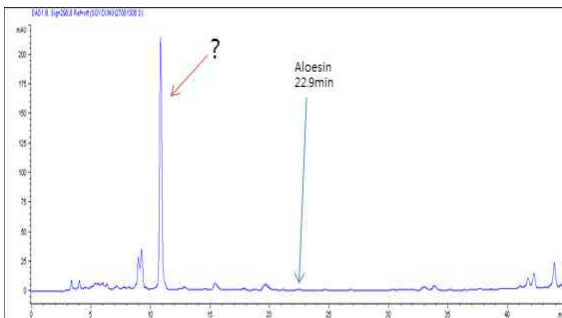
간의 차이가 약 5%내외의 함량차이를 나타냄. 제조공정 단계별 함량변화가 적음을 알 수 있으므로 제조공정 표준화에 적용 가능할 것으로 보임.

[표 16] 알로에의 실제 제조공정 Pilot-scale에서의 단계별 수율 및 지표성분함량

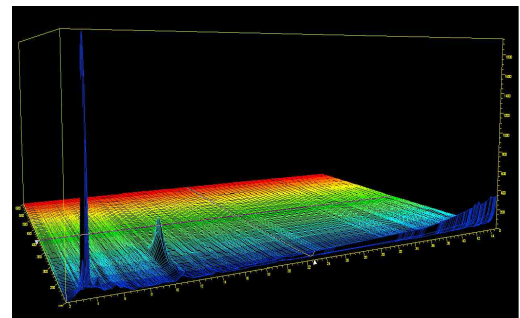
Manufacturing Step	Process	Yield	알로에의 지표성분 후보물질(g)
원재료	알로에겔F·D	20kg	149
추출액	95%주정, 추출	600L	158
농축액	농축	4.3L	147
추출분말	분무건조	2.5kg	156

③ 알로에의 새로운 지표성분 후보물질

- 실제 제조공정으로부터 얻은 양과 ·알로에 복합물 추출물을 Aloesin 시험법으로 분석한 결과 지표성분으로 설정한 Aloesin의 함량이 정량하기 어려울정도의 미량의 함량을 나타내었음. 그러나 기존에 미량으로 존재하던 미지의 성분이 R/T 10.87min에서 높은 함량으로 검출되었음[그림 2-37]. 따라서 기존에 설정하였던 지표성분인 Aloesin을 대신하여 미지의 성분을 사용 할 수 있다고 판단하였으며 이 성분을 향후 LC/MS, NMR을 통해 성분규명을 할 예정이며 진행 중에 있음[그림 2-38]. 미지의 성분 peak의 파장별 흡광도를 확인한 결과는 [그림 2-38]과 같음. peak는 290~300nm 권역에서 가장 높은 흡광도를 나타냄.

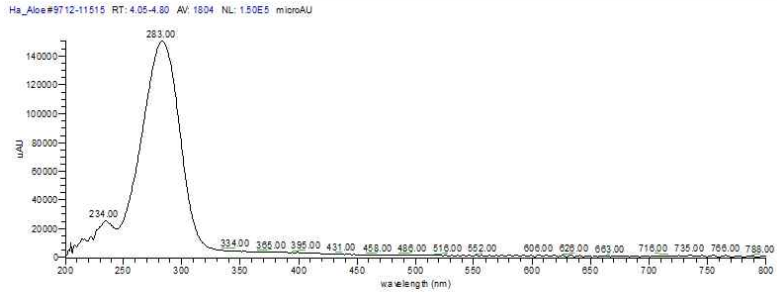


[그림 2-37] 미지의 물질 크로마토그래프

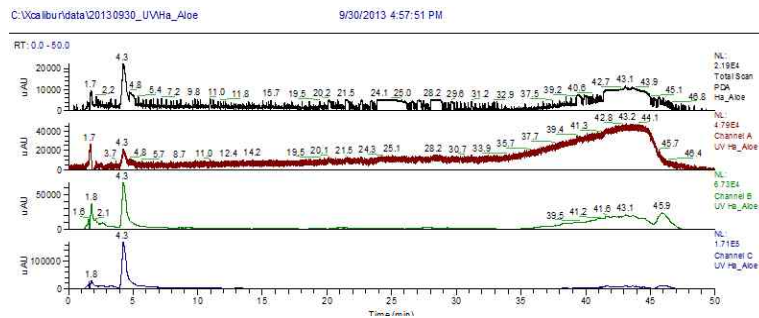


[그림 2-38] 미지의 물질의 Spectrum

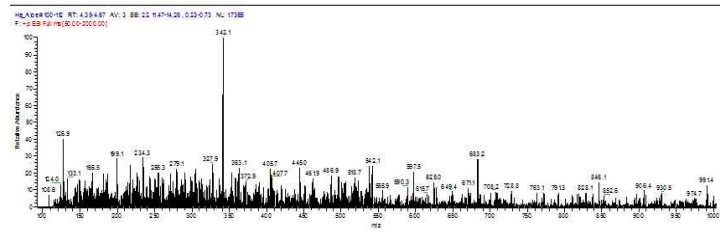
- 따라서 기존에 설정하였던 지표성분인 Aloesin을 대신하여 미지의 성분을 사용 할 수 있다고 판단하였으며 이 성분을 LC/MS를 이용하여 분자량을 추측하였고, 향후NMR을 통해 성분규명을 할 예정임[그림 2-39, 40, 41].



[그림 2-39] 액체크로마토그래피-질량분석법 UV



[그림 2-40] 액체크로마토그래피-질량분석법 Chromatograph



[그림 2-41] 액체크로마토그래피-질량분석법 MS

라. 실제공정에서 얻은 추출물에 따른 지표성분 시험법의 문제점 해결 및 재정립

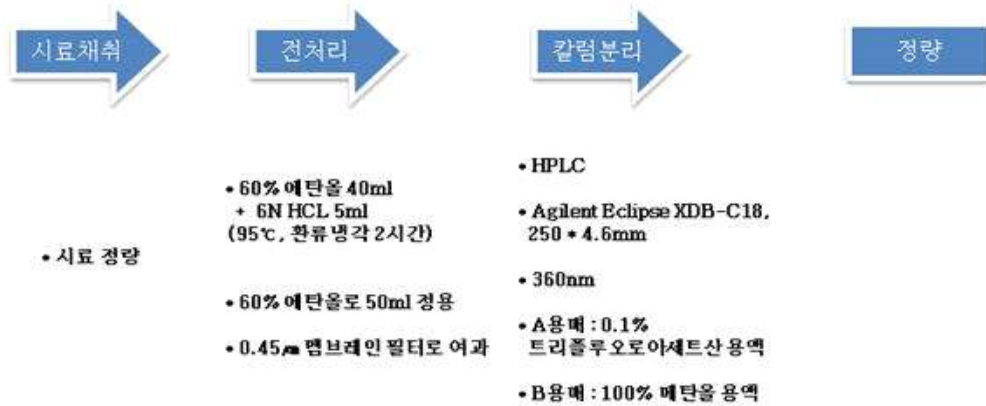
- 양파·알로에 복합물의 표준화를 위해서는 지표성분을 분석 할 수 있는 시험법이 정립되어야 함. 1차년도의 연구를 통해 시험법을 정립하였으나, 실제공정에서 얻어진 양파·알로에 복합물을 기존 시험법에 적용할 경우 분석 오염과 같은 문제점이 발생하여 시험법을 재정립함.

(1) 양파·알로에 복합물 중 Quercetin의 정량법

(가) 양파·알로에 복합물의 기존 Quercetin 정량법

① 시험방법의 요약

- 본 시험법은 양파 추출물 분말시료 중 존재하는 퀘세틴을 60% 에탄올과 6N염화수소로 추출하여 C18칼럼을 통해 퀘세틴을 분리하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 Quercetin의 최대흡수 파장인 360nm에서 검출하여 정량.



[그림 2-42] Quercetin 정량법

② 장비와 재료

㉠ 실험실 장비 및 소모품

- 용매용 일회용 실린지
- 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- HPLC용 유리병
- 부피플라스크
- 정용플라스크 (50ml)
- 회전식감압농축기
- 환류냉각기

㉡ 분석장비

- 고속액체크로마토그래프
- 자외선흡광광도검출기(UV Detector)
- Agilent Eclipse XDB-C18, 250 * 4.6mm 또는 이와 동등한 것

㉢ 분석장비의 준비

- 이동상은 2개의 용매가 사용 되는데 A용액은 0.1% 트리플루오로아세트산 용액이고 B 용액은 100% 메탄올 용액임. 이 두 개의 용매를 80 : 20 (A : B)의 비율로 분당 1ml씩 충분한 시간 동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화시킴.

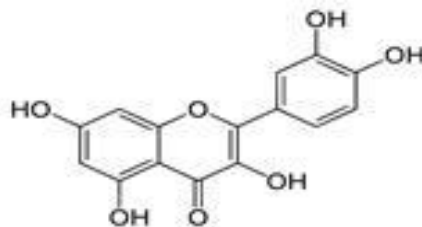
③ 표준물질 및 일반시약

㉠ 표준물질

- Quercetin

분자식 : C₁₅H₁₀O₇ · 2H₂O, 분자량 : 338.27 CAS No. : 6151-25-3

구조 :



[그림 2-43] Quercetin 구조식

㉔ 일반시약

- 메탄올(methanol, HPLC grade)
- 에탄올(ethanol, HPLC grade)
- 염화수소(HCL)
- 증류수(water, HPLC grade)
- 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic Acid)

④ 시험과정

㉑ 시약 제조

- 0.1% 트리플루오로아세트산 용액 (이동상 A)
: 1ml 트리플루오로아세트산과 999ml HPLC용 water를 혼합.
- 100% 메탄올 용액 (이동상 B)

㉒ 표준용액 제조

- 퀘세틴 표준물질 10mg을 정밀히 측정.
- 정밀히 측정된 표준물질을 10ml 정용플라스크에 넣음.
- 메탄올을 넣어 표선까지 맞춤.
- ㉑의 용액을 증류수로 희석하여 25, 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 함.

㉓ 시험용액 제조

- 퀘세틴으로 10~30 μg 에 해당하는 양을 정밀히 측정.
- 정밀히 측정된 시료를 60% 에탄올 40ml와 6 N HCL 5ml를 첨가하여 용해.
- 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 환류 냉각.
- 이를 회전식감압농축기로 농축한 하여 60% 에탄올을 사용하여 50ml로 정용.
- 이 용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 얻은 여과액을 시험용액으로 함.

⑤ 분석 및 계산

㉑ 기기 분석

- 다음 [표 17], [표 18]의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있음.

[표 17] 고속액체크로마토그래프 조건(예)

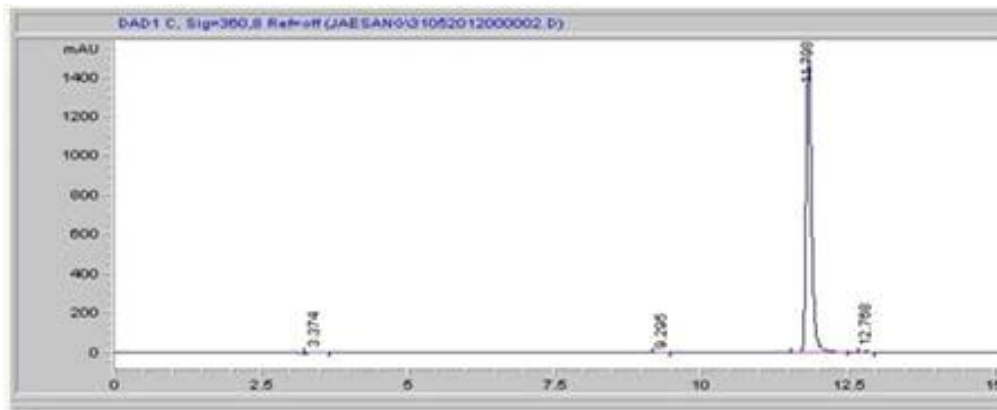
항목	조건
주입량	10 μl
칼럼온도	25 $^{\circ}\text{C}$
이동상	A용매 : 0.1% 트리플루오로아세트산 용액 B용매 : 100% 메탄올 용액
검출기 파장	370nm
유량	0.8ml/분
칼럼	Agilent Eclipse XDB-C18, 250 * 4.6mm

[표 18] 이동상 조건

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
10	20	80
15	20	80
16	80	20
25	80	20

㉔ 결과 분석(예)

- 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼



[그림 2-44] 표준물질 크로마토그램

㉕ 표준물질 검량선의 작성

- 시험과정에서 제조한 표준용액을 [표 7, 8]의 방법으로 분석을 실시.
- 얻어진 각 농도의 표준물질의 피크 면적값을 구함.
- 표준물질 농도 대 면적값의 표준 검량선을 작성.

㉖ 계산

- 시험용액의 면적값을 표준검량선 산출 식에 대입.
- 나온 값을 다음 식에 대입.
 - 퀘르세틴의 농도($\mu\text{g}/\ell$) = $(A / B) \times C$
 - A : 계산에서 나온 값
 - B : 시험용액의 전량(ml)
 - C : 최종 시험용액 용량(ml), 이 시험에서는 2로 한다.

(나) 양파·알로에 복합물에서의 분석오염에 따른 Quercetin 정량법의 수정

① 이동상 용매의 기울기 및 총 분석시간 변경

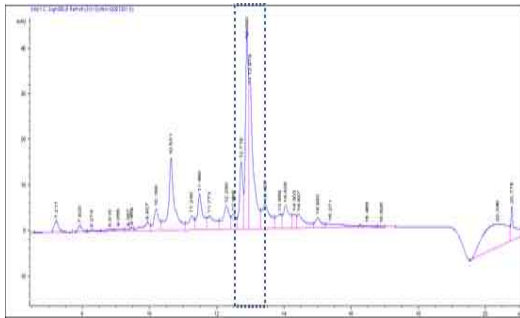
- 실제 공정에서 얻은 양파·알로에 복합물을 [표 19]과 같은 시험법을 적용하여 분석한 결과 Quercetin의 retention time에서 알로에의 성분인 Aloin과 겹쳐서 검출되었음. 이 결과를 봤을 때 얻고자하는 지표성분 Quercetin의 분석법이 오염된 것을 확인함[그림 2-45]. 이에 대해 고속액체크로마토그래피의 분석조건을 [표 20]와 같이 이동상용매의 기울기 및 총 분석시간을 변경하여 분석한 결과 약간의 교정은 되었으나 큰 분리능을 얻지 못하였음 [그림 2-46]. 이에 따라 이동상용매의 변경을 통하여 분리능을 높이고자 함.

[표 19] 기존 1차년도 Quercetin 시험법 변경

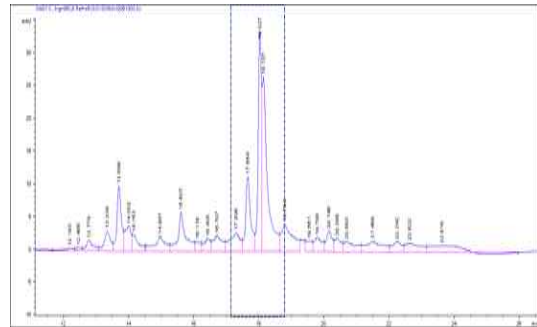
시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
10	20	80
15	20	80
16	80	20
25	80	20

[표 20] 이동상 용매의 기울기 및 총 분석시간

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
15	40	60
25	40	60
30	80	20
35	80	20



[그림 2-45] 기존 1차년도 Quercetin 시험법의 분석오염



[그림 2-46] 유기용매 비율 및 분석시간 변경

② 이동상용매 변경

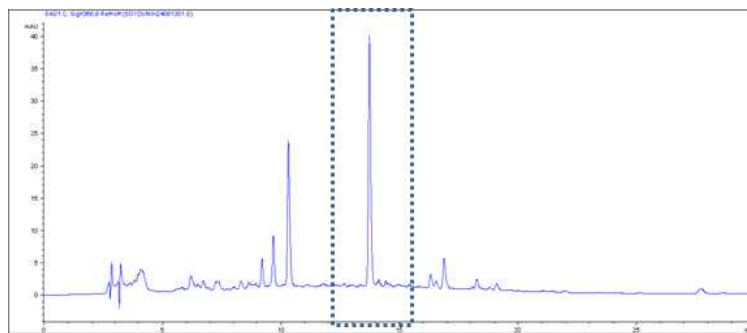
- 오염된 peak간의 분리능을 높이기 위해 이동상 B용매인 메탄올 용액을 아세토나이트릴 용액으로 변경하여 분석하였음[표 21, 22]. 그 결과 검출된 peak의 오염 없이 Quercetin 단일 물질을 얻어 낼 수 있었음[그림 2-47].

[표 21] 기존 1차년도 Quercetin 시험법

항목	조건
이동상	A용매 : 0.1% TFA B용매 : 100% 메탄올 용액

[표 22] 이동상 (B)용매 변경

항목	조건
이동상	A용매 : 0.1% TFA B용매 : 아세토나이트릴



[그림 2-47] 이동상용매 변경 후 Quercetin 단일물질 검출

③ 최종 변경된 양과·알로에 복합물의 Quercetin 정량법

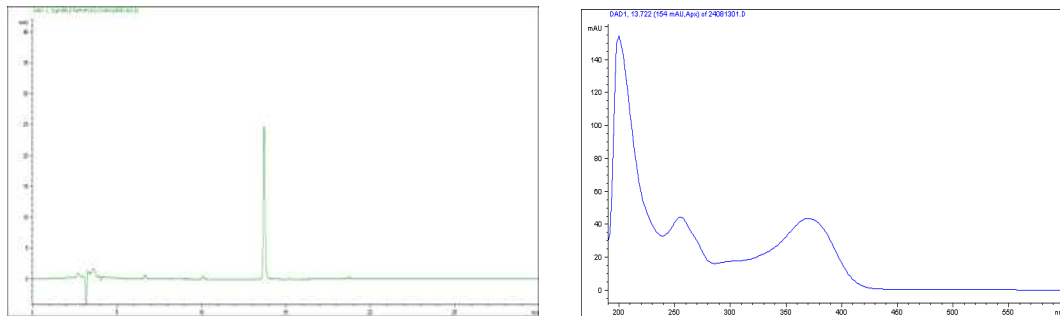
- 양파·알로에 복합 추출물을 0.5g 정량하여 60%에탄올 45ml과 6N염화수소 5ml을 넣어 95℃에서 2시간동안 환류냉각 한 후 0.45 μ m멤브레인 필터로 여과하여 시험용액과 표준용액을 제조하여 분석에 사용함. 고속액체크로마토그래프의 분석 조건은 [표 23]와 같으며 이동상의 조건은 [표 24]와 같음.

[표 23] 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ l
칼럼온도	25℃
이동상	A용매 : 0.1% 트리플루오로아세트산 용액 B용매 : 아세토나이트릴
검출기 파장	360nm
유량	0.8ml/분
칼럼	Agilent Eclipse XDB-C18, 250 * 4.6mm

[표 24] 이동상 조건

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	80	20
15	50	50
25	50	50
30	80	20



[그림 2-48] 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼

(나) 양파·알로에 복합물 중 알로에신 및 미지성분 정량법

① 시험방법의 요약

- 본 시험법은 알로에 추출물 분말시료 중 존재하는 알로에신을 물로 추출하여 C18칼럼을 통해 알로에신, 미지성분을 분리하는 방법으로 자외부흡광광도검출기를 이용하여 알로에신의 최대흡수 파장인 298nm에서 검출하여 정량함.



[그림 2-49] Aloesin 정량법

② 장비와 재료

㉠ 실험실 장비 및 소모품

- 용매용 일회용 실린지
- 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- HPLC용 유리병
- Vortex
- 정용플라스크 (250ml, 1L)
- 초음파 진탕기

㉡ 분석장비

- 고속액체크로마토그래프
- 자외선흡광광도검출기(UV Detector)
- Kromasil 100-5 C18, 250*4.6mm 또는 이와 동등한 것

㉢ 분석장비의 준비

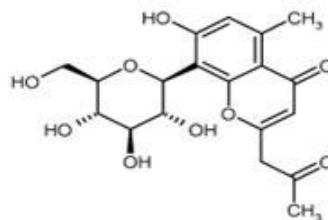
- 이동상은 2개의 용매가 사용 되는데 A용액은 물 수용액이고 B용액은 메탄올 용액임. 이 두 개의 용매를 87 : 13 (A : B)의 비율로 분당 0.7ml씩 충분한 시간 동안 흘려 기기와 칼럼을 안정화시킴.

③ 표준물질 및 일반시약

㉠ 표준물질

- Aloesin

분자식 : C₁₉H₂₂O₉, 분자량 : 394.4, CAS No. : 30861-27-9



[그림 2-50] Aloesin 구조식

㉡ 일반시약

- 메탄올(methanol, HPLC grade)
- 증류수(water, HPLC grade)

④ 시험과정

㉑ 표준용액 제조

- 알로에신 10mg을 정밀히 측정.
- 정밀히 측정된 표준물질을 100ml 정용플라스크에 넣음.
- 증류수를 넣어 표선까지 맞춤.
- ㉒의 용액을 증류수로 희석하여 2, 1, 0.5, 0.025, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 함.

㉒ 시험용액 제조

- 알로에신으로 0.01~2 μg 에 상당하는 양을 정밀히 측정.
- 정밀히 측정된 시료를 정용플라스크에 취함.
- 정용플라스크에 70%이하가 되게끔 물을 넣은 뒤 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 초음파처리를 30분간 실시.
- 2분간 Vortex 실시.
- 용액의 온도를 상온에 맞게 낮춤.
- 물을 정용플라스크의 표선까지 맞춤.
- 이 용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 얻은 여과액을 시험용액으로 함.

⑤ 분석 및 계산

㉑ 기기 분석

다음 [표 25], [표 26]의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있음.

[표 25] 고속액체크로마토그래프 조건(예)

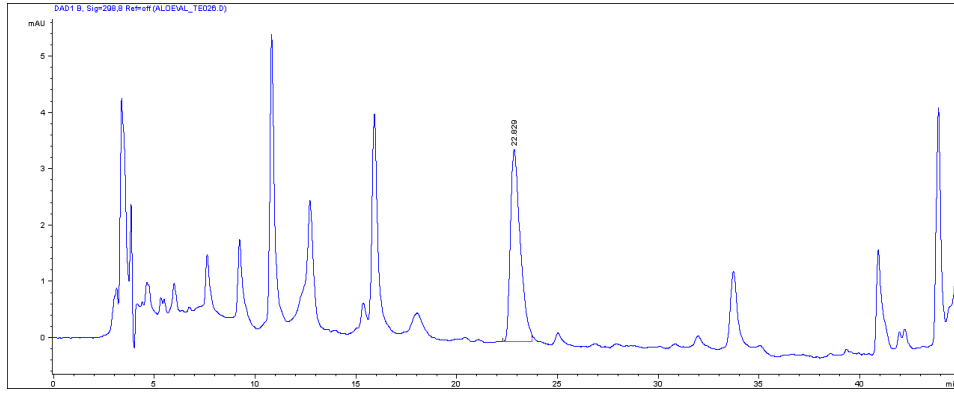
항목	조건
주입량	20 μl
칼럼온도	25 $^{\circ}\text{C}$
이동상	A용매 : 물 B용매 : 메탄올
검출기 파장	298nm
유량	0.7ml/분
칼럼	Kromasil 100-5 C18, 250*4.6mm

[표 26] 이동상 조건

시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
0	87	13
10	82	18
20	77	23
30	72	28
45	40	60

㉒ 결과 분석(예)

- 표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼



[그림 2-51] 시험물질의 크로마토 그래프 (Aloesin 298nm)

㉔ 표준물질 검량선의 작성

- 시험과정에서 제조한 표준용액을 [표 15, 16]의 방법으로 분석을 실시.
- 얻어진 각 농도의 표준물질의 피크 면적값을 구함.
- 표준물질 농도 대 면적값의 표준 검량선을 작성.

㉕ 계산

$$\text{Quercetin (mg/g)} = C \times \frac{V}{SA} \times P \times F$$

- C : 검량선 농도(ug/ml)
- V : 최종 Volume(ml)
- SA : 샘플 무게(mg)
- P : 표준품 순도
- F : 회석배수

마. 수정된 시험법과 추출법에 대한 원재료 표준화

- 실제 제조공정에서 얻은 양파·알로에 추출물에 대한 시험법 및 추출법을 최종적으로 정립하였음. 앞서 진행된 연구를 통해 기존의 추출법과 시험법의 변경됨에 따라 이에 맞는 원재료 표준화를 다시 진행함.

(1) 최종 시험법 및 추출법을 통한 양파의 원재료표준화

- 최종적으로 정립한 시험법 및 추출법을 적용시켜 2013년 6월 진라남도 무안군 국립식량과학원 바이오에너지작물센터로부터 얻은 8가지 품종의 생양파를 사용하여 원재료표준화를 진행함[그림 2-52]. 실제 제조공정에서 얻은 최종추출분말의 Quercetin함량은 0.48 mg/g이었으며, 80~120%를 적용하였을 때 0.38 mg/g~0.58 mg/g범위를 나타내며 이와 같은 함량은 지표성분 함량범위 설정 시 반영됨. 원재료표준화에서 얻은 여러 품종의 Quercetin 함량 분석은 향후 원재료 선택에 사용되며 앞서 고려된 0.38 mg/g~0.58 mg/g범위 내의 품종들을 원재료로써 사용하게 됨. 그에 따라 품종별 Quercetin의 함량 분석 결과, 가장 낮은 품종(영미황 0.17 mg/g, 나비황 0.19 mg/g)을 제외하고 썬파워(0.57 mg/g), 신선황(0.51 mg/g), 맵시황(0.39 mg/g), 대풍(0.45 mg/g) 품종은 지표성분 함량 범위에 포함되므로 함량을 고려하여 원재료 설정 시 참고할 예정임[표 27].



[그림 2-52] 양파의 수확시기에 따른 품종별 원재료표준화

[표 27] 최종 시험법 및 추출법을 이용한 양파의 품종별 원재료표준화

품종	Quercetin [mg/g]
선파워	0.57
신선황	0.51
로망	0.25
맵시황	0.39
제어맨	0.37
대풍	0.45
영미황	0.17
나비황	0.19

(2) 최종 시험법 및 추출법을 통한 알로에의 원재료표준화

- 양파·알로에 복합물의 품질관리에 있어서 지표성분 범위설정을 위한 기존의 알로에 원재료표준화의 경우 1월, 2월, 3월, 4월, 6월, 8월의 수확시기별로 연구하였으며, 당해년도의 경우 기존에 진행한 원재료표준화의 수확시기를 제외한 나머지 수확시기별(5월, 7월, 9월, 10월, 11월, 12월)로 연구 진행함. 추출용매를 95% 주정을 사용하는 등 최종적으로 정립한 추출법 및 시험법을 적용시켜 제주도 서귀포시 (주)김정문알로에 농장으로부터 수확한 Aloe Vera 품종으로 3년 이상 된 잎을 사용하여 수확시기별 지표성분함량의 차이를 비교함. 기존의 알로에 지표성분으로써 Aloesin을 설정하였지만, 실제제조공정 양파·알로에 복합소재에서 Aloesin의 극소량 검출로 인해 Aloesin 대신 다른 미지의 물질을 지표성분 후보물질로 선정하였음. 이에 대해 알로에의 수확시기별 원재료표준화를 지표성분 후보물질의 함량비교를 [표 28]에 나타냄. 지표성분 후보물질의 함량이 5월~9월 사이에 비해 10월~12월의 함량이 비교적 낮은함량을 나타냄. 이 결과를 계절적으로 분류하여 비교해보았을 때 여름에 비해 겨울이 될수록 함량이 약간 줄어드는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 알로에의 실제 제조공정에서 얻은 최종추출분말의 지표성분 후보물질의 함량 62.4 mg/g의 80~120%의 함량을 적용하였을 때 49.92 mg/g~74.88 mg/g범위를 나타내며, 이를 지표성분 함량범위 설정시 반영할 수 있다고 봄. 전체적으로 보았을 때 5월~9월에 수확한 알로에를 지표성분

함량을 반영하여 원재료 결정에 유리하다고 판단함.

[표 28] 최종 시험법 및 추출법을 이용한 알로에의 수확시기별 원재료표준화

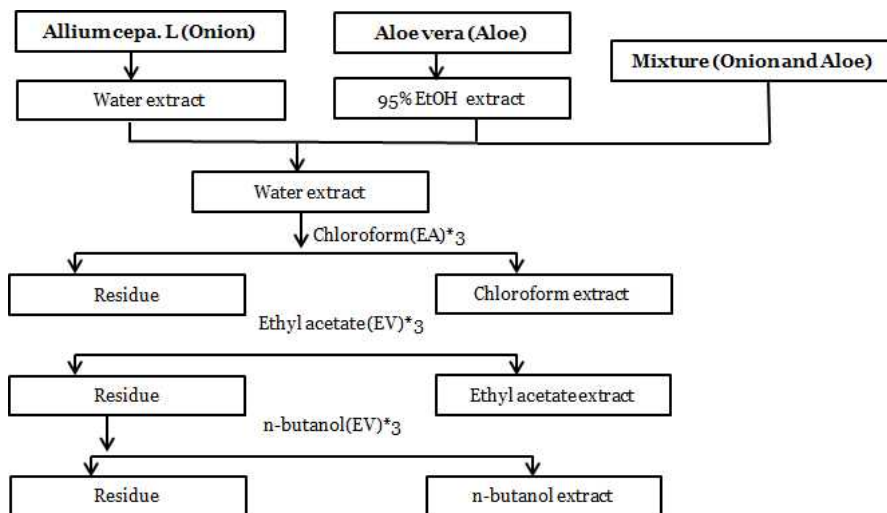
수확시기[월]	알로에 지표성분 후보물질 [mg/g]
5	61.1
7	62.3
9	62.7
10	59.8
11	60.1
12	59.4

6. 양파·알로에의 시너지 효과 유발 물질 발굴

가. 연구내용

(1) 양파·알로에의 유용성분 profiling

- 단일 양파추출물, 단일 알로에추출물 및 양파·알로에 복합소재의 용매별 분획의 활성성분 확인을 위해 양파의 Water 추출물과 알로에의 95% ethanol 추출물하여 극성이 다른 용매인 Chloroform, Ethyl acetate, n-butanol, H₂O 등의 용매로 순차적으로 분획. 각 분획물에서 생리활성이 높은 단일 peak의 검출을 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 분석함.



[그림 2-53] 각 추출물의 용매별 분획

(2) 양파·알로에의 유용성분 및 분획의 시너지 효과 검증

- 양파·알로에 복합소재의 분획물이 단일양파추출물과 단일알로에추출물을 배합함으로써 시너지 효과의 발휘여부를 확인하기 위해 항산화 활성 실험(DPPH assay, FRAP assay, Total phenol contents 등) 및 생리활성 검증(혈소판 응집 억제효능, 세포독성, 출혈지연

관찰 등)을 통해 비교분석함.

(가) DPPH assay

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 의한 소거능은 Brand-Williams, Cuvelier, Berset 등 (1995)의 방법을 변형하여 측정함. 시료 250 μ l에 0.1mM DPPH 용액 2.5mL을 가한 후, 99.9% methanol 250 μ l을 혼합함. 반응액을 혼합하고 실온에 80분 방치 후 분광광도계 (UV spectrophotometer, Shimadzu, Japan)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정함.

(나) FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) assay

- FRAP은 Benzie, Strain (1996) 방법을 참고하여 측정함. FRAP시약은 25mL acetate buffer (300mM, pH3.6)와 2.5mL 40mM HCl에 용해한 10mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)시약 2.5 mL와 20mM ferric sulfate(FeSO₄) 2.5 mL를 가하여 제조함. 제조한 3mL FRAP reagent에 각각의 분획물 100 μ l와 증류수 300 μ l를 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시킨 후, 593 nm에서 UV spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 593nm에서 흡광도를 측정함.

(다) 총 페놀함량 분석

- 총 페놀 함량은 Folin-ciocalteau법에 의해 측정. 시료 50 μ l에 증류수 1150 μ l와 2N Folin-Ciocalteau 용액 200 μ l을 가하고 7분간 방치 후 20% NaCO₃ 용액 600 μ l을 가하여 혼합한 후 1시간 방치하여 765nm에서 흡광도를 측정함.

(라) 혈소판 응집 억제 효능

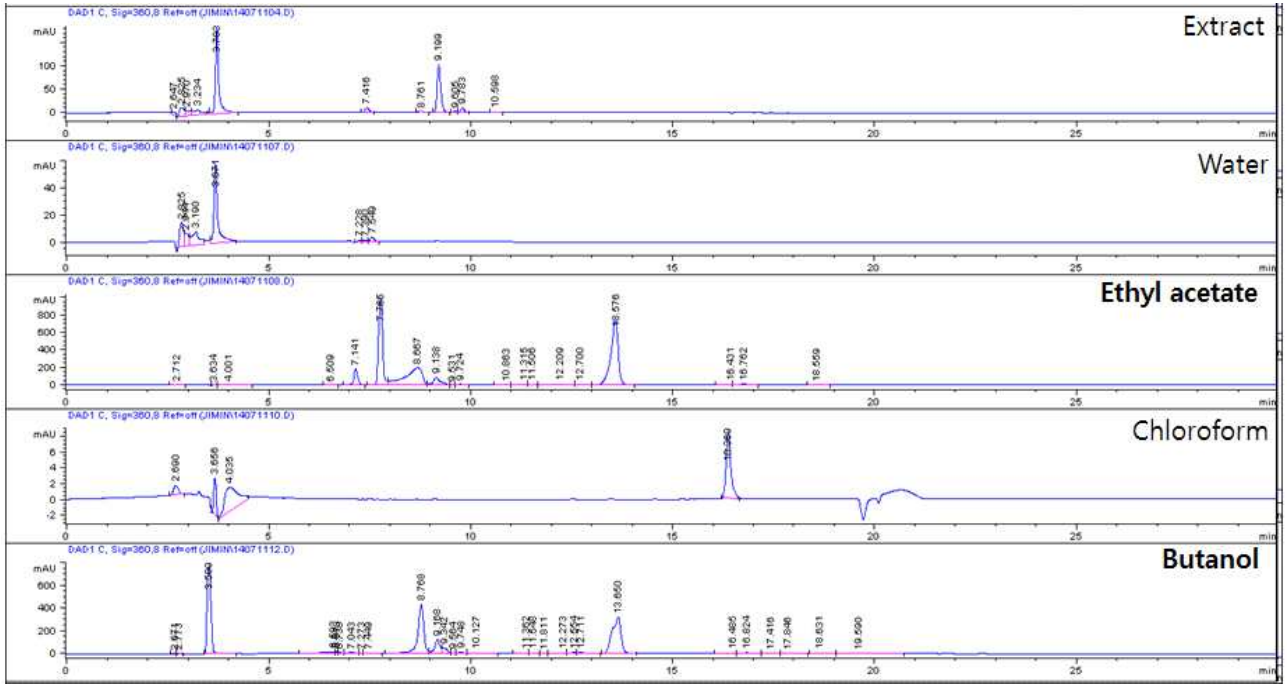
- 랫드의 혈액에서 혈소판을 분리한 후 콜라겐으로 유도된 혈소판 응집 모델에서 분획을 5분 선처리에 의한 혈소판 응집 억제 효능을 aggregometer를 사용하여 측정함.

나. 연구결과

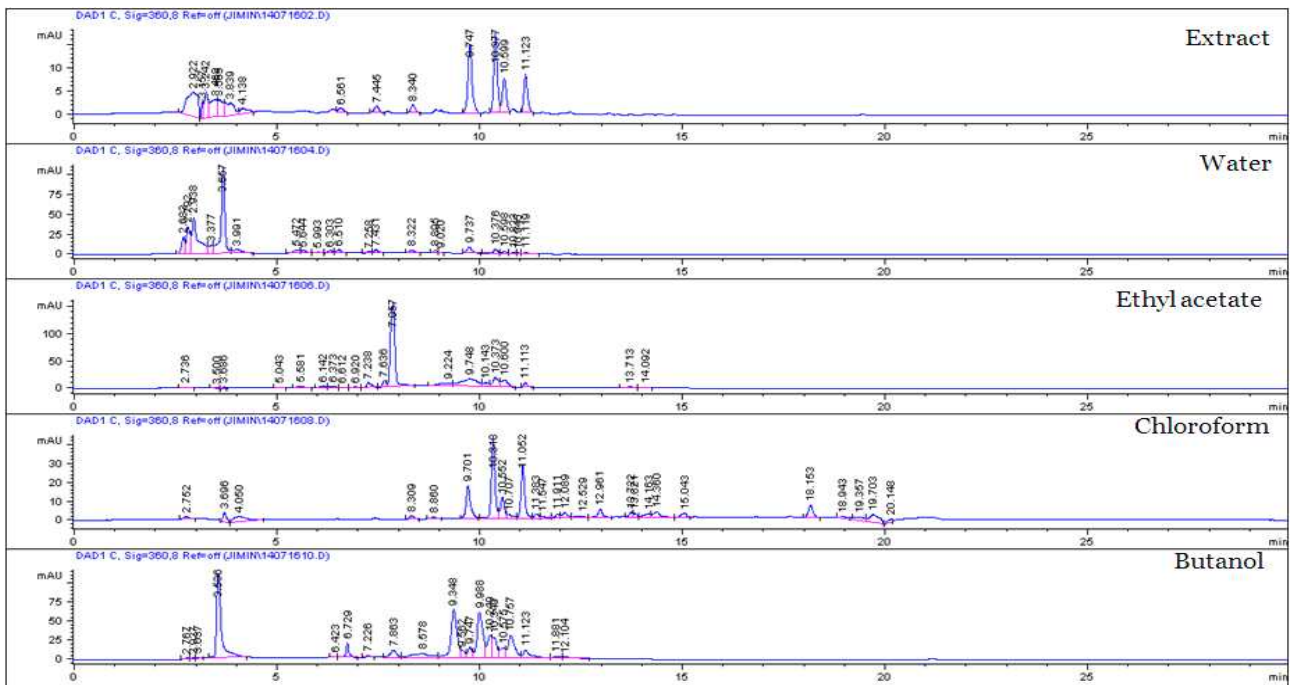
(1) 양파·알로에의 유용성분 profiling

(가) 양파의 유용성분 분석법을 이용한 단일 양파, 단일알로에와 양파·알로에 복합소재 분획물의 chromatograph

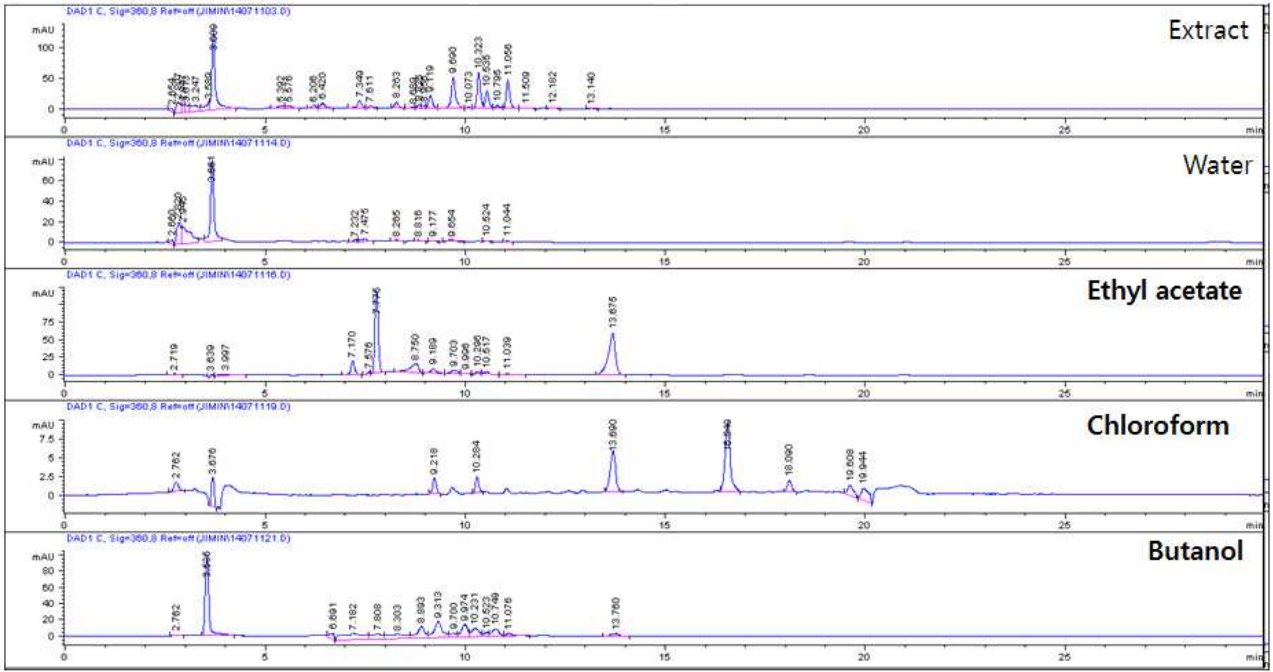
- ① 단일 양파, 단일 알로에 추출물과 양파·알로에 복합소재의 분획물을 각각 양파의 유용성분 분석법(Jeon, jeong 등, 2011)을 이용하여 HPLC Chromatograph 360nm에서 분석함(그림 2-54, 55, 56).



[그림 2-54] 단일양과 추출물의 용매분획별 Chromatograph (360nm)



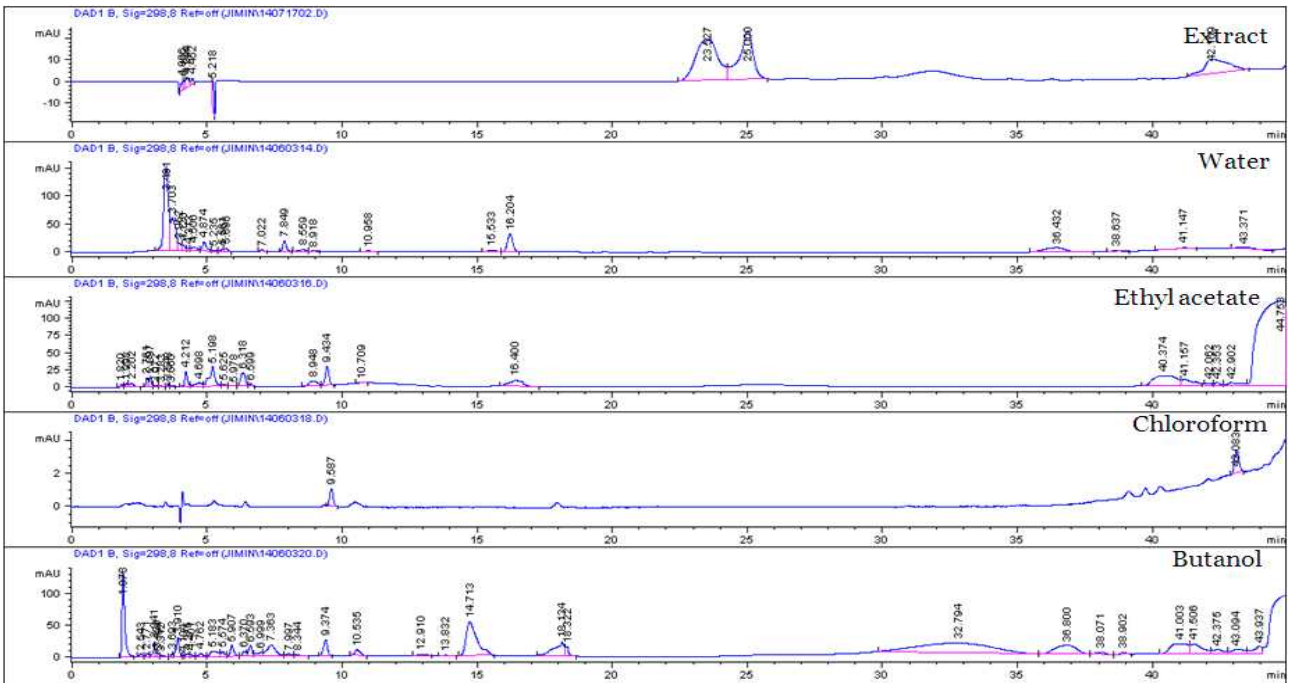
[그림 2-55] 단일알로에 추출물의 용매분획별 Chromatograph (360nm)



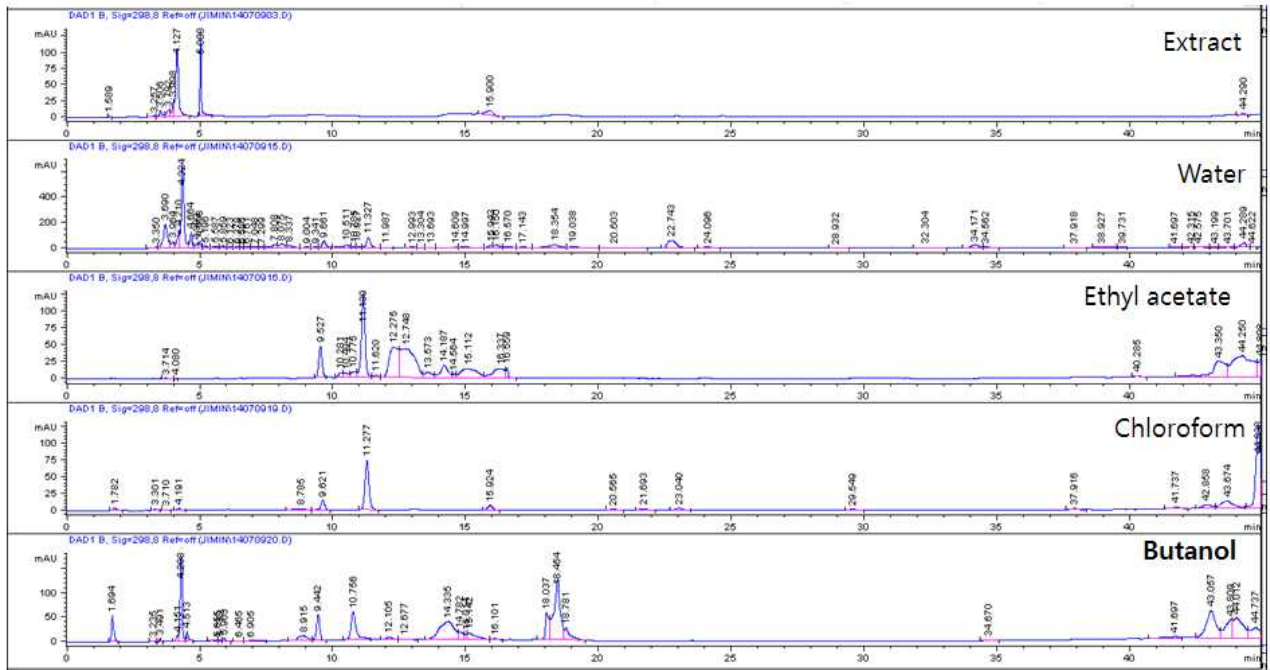
[그림 2-56] 양파·알로에 복합소재의 용매분획별 Chromatograph (360nm)

(나) 알로에 유용성분 분석법을 이용한 단일 양파, 단일 알로에와 양파·알로에 복합소재 분획물의 chromatograph

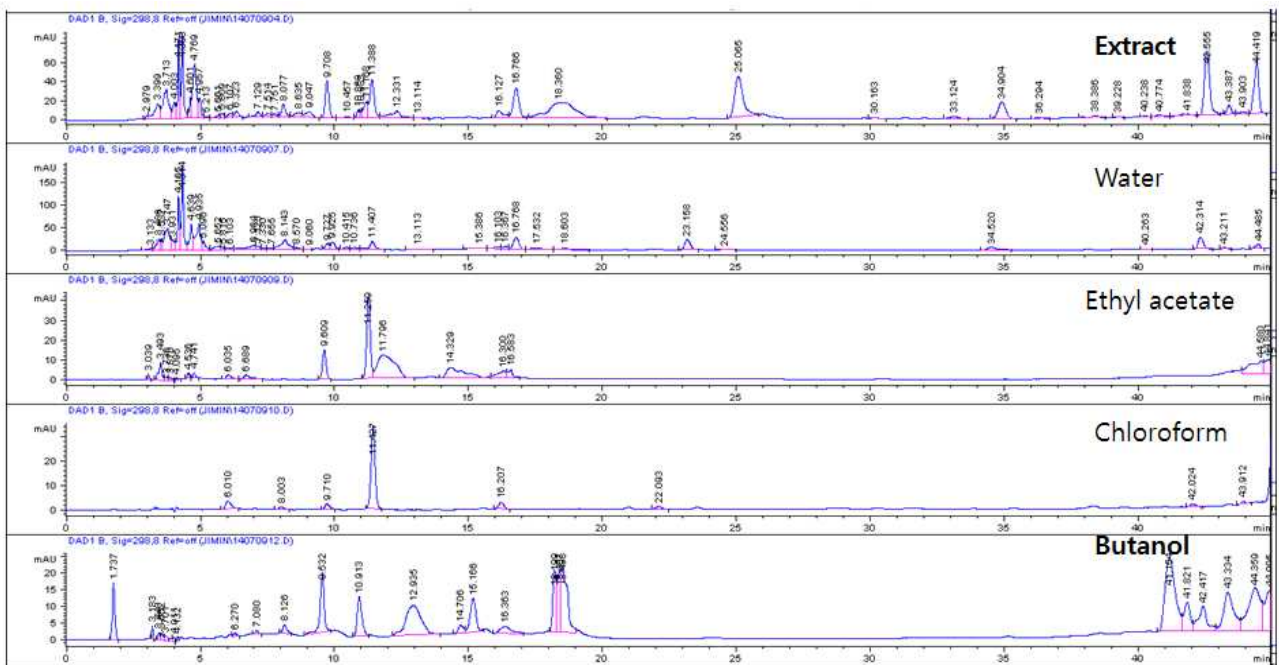
- ① 단일 양파, 단일 알로에와 양파·알로에 복합소재의 분획물을 각각 알로에 유용성분 분석법(Park 등, 1998)을 이용하여 생리활성 성분을 HPLC chromatograph 298nm에서 분석함(그림 2-57, 58, 59).



[그림 2-57] 단일양파 추출물의 용매분획별 Chromatograph (298nm)



[그림 2-58] 단일알로에 추출물의 용매분획별 Chromatograph (298nm)



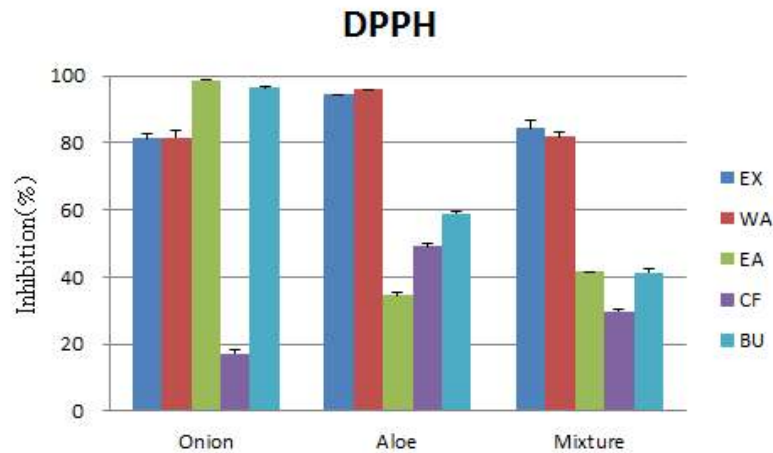
[그림 2-59] 양파·알로에 복합소재의 용매분획별 Chromatograph (298nm)

(2) 양파·알로에의 유용성분 및 분획의 시너지 효과 검증

(가) DPPH assay

- 단일양파와 단일 알로에의 조추출물 및 양파·알로에 복합물의 조추출물을 Chloroform, Ethyl acetate, n-Butanol 및 Water를 이용하여 용매 분획함. 각 용매 분획의 DPPH를 이용하여 항산화 작용 활성을 측정된 결과 Chloroform은 단일양파에서 17.23%, 단일 알

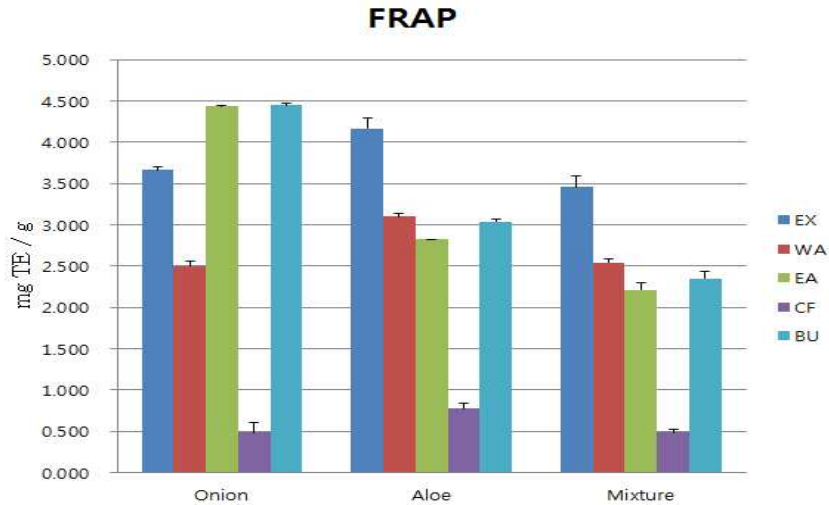
로에에서 49.03%, 양파·알로에 복합물에서 28.63%로 가장 낮은 활성 산소 억제율을 보였으며, Ethyl acetate는 단일양파에서 98.69%, 단일 알로에에서 34.50%, 양파·알로에 복합물에서 41.54%의 활성 산소 억제율을 보였음. butanol에서는 단일양파에서 96.53%, 단일 알로에에서 58.82%, 양파·알로에 복합물에서 41.32%의 활성 산소 억제율을 보였으며, Water에서는 단일양파에서 81.51%, 단일 알로에에서 95.85%, 양파·알로에 복합물에서 81.73%의 활성 산소 억제율을 보였음.



[그림 2-60] 단일양파, 단일알로에와 양파·알로에 복합소재의 용매별 분획물의 DPPH radical 소거능 비교

(나) FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) assay

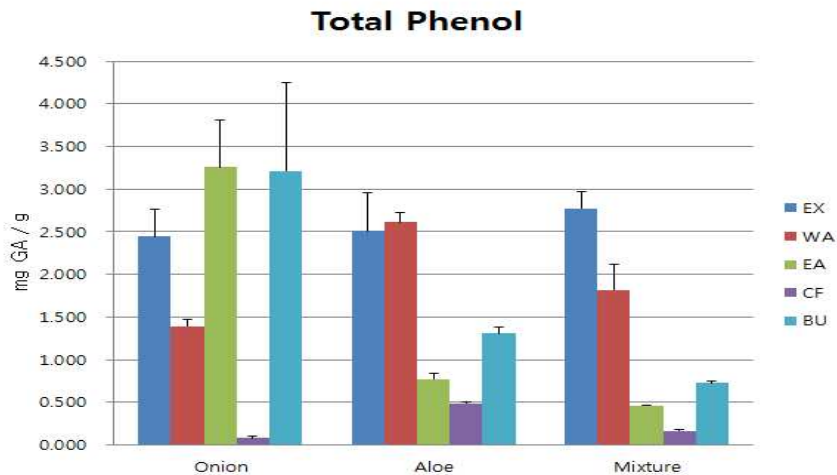
- 환원력은 항산화 능력과 관련이 있는 중요한 인자로서 FRAP에 의한 환원력 측정은 산성 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 것으로, 항산화제와 같이 환원력을 가진 물질은 Fe^{3+} -ferricyanide 복합체를 Fe^{2+} 형태로 환원시켜 청색을 띠게 함. 가공공정에 따른 더덕 추출물의 FRAP에 의한 환원력은 (그림 2-61)과 같이 농도 의존적으로 활성이 증가하는 경향을 나타냄. Water 분획물에서 단일 알로에(3.08 ± 0.04 mg TE/g) > 양파·알로에 복합물(2.59 ± 0.05 mg TE/g) > 단일 양파(2.45 ± 0.06 mg TE/g) 순으로 나타나 유의적인 차이를 보였음($p < 0.05$).



[그림 2-61] 단일양파, 단일알로에와 양파·알로에 복합소재의 용매별 분획물의 FRAP 측정

(다) 총 페놀함량 분석

- 폴리페놀은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 식물계에 널리 분포되어 있으며, phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질, 효소 단백질 또는 기타 거대분자와 결합하는 성질을 가지고 있어 항산화 작용, 항균, 항 알레르기 및 항암효과에 관여하는 것으로 알려져 있음. 총 폴리페놀 함량은 폴리페놀의 산화 환원반응을 응용한 것으로 페놀성 물질인 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용함. 단일 양파, 단일 알로에, 양파·알로에 복합소재의 총 플라보노이드 함량 변화는 (그림 2-62)과 같이 처음 조추출물에서 양파·알로에 복합소재 (2.56±0.20 mg GA/g) > 단일 알로에(2.18±0.44 mg GA/g) > 단일 양파(2.62±0.32mg GA/g) 순으로 유의적인 차이를 나타냄(p<0.05). 양파·알로에 복합소재의 분획물 물 층에서 가장 많은 총 폴리페놀을 함유하는 것으로 나타났다.



[그림 2-62] 단일양파, 단일알로에와 양파·알로에 복합소재의 용매별 분획물의 총 페놀 함량 비교

(라) 혈소판 응집 억제 효능

- 단일양파, 단일알로에, 양파·알로에 복합소재의 혈소판 응집 억제율은 (그림 1-49)과 같

음. Water, Butanol, Ethyl acetate, Chloroform 분획물 중에서 단일양파, 단일알로에, 양파·알로에 복합소재 모두 Butanol 분획물에서 가장 좋은 억제율을 보였음. 첨가한 Butanol 분획물의 농도에 따라 단일양파에서 76.3%, 87.3%의 억제율을 보였고, 단일알로에에서 86.5%, 100%, 양파·알로에 복합소재에서는 각각 97.9%, 97.3%의 혈소판 응집 억제 효능을 보였음.

제 3 절 양과·알로에 복합소재의 안전성 평가 후 제품화 연구 및 개별인정 획득

1. 양과·알로에 복합소재의 대량추출 및 임상실험 시제품 생산

가. 알로에추출물 등 복합물의 대량추출 및 임상실험 시제품 생산

(1) 양과 대량추출 공정

- (가) 양과를 세척기를 이용하여 세척
- (나) 세척된 양과를 절단기를 이용하여 절단
- (다) 절단된 양과 7에 정제수 10을 넣음
- (라) 습식분쇄기를 이용하여 분쇄
- (마) 분쇄된 양과를 압착기 또는 필터프레스를 이용하여 여과
(압착기의 경우, 시중에 유통되고 있는 압착포를 이용. 필터프레스의 경우, 약 100 메쉬의 망을 사용함.)
- (바) 필요에 따라서는 압착 또는 필터후 원심분리를 하여 2차 여과를 실시함.
- (사) 여과된 양과액을 농축 (농축온도는 45℃에서 실시)
- (아) 농축액을 SD하여 분말화

(2) 알로에 대량추출 공정

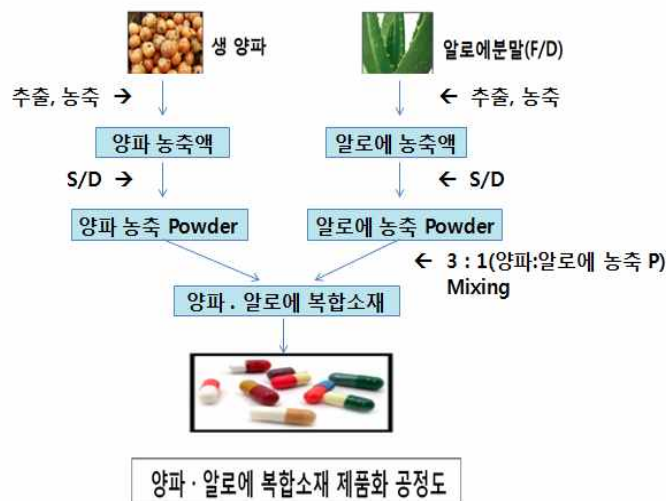
- (가) 알로에 베라 동결건조 분말 1 kg에 주정 30 L를 넣고 추출
- (나) 추출온도는 상온에서 실시 (8 hr)
- (다) 필터프레스를 이용하여 여과
- (라) 여과된 알로에 액을 농축 (농축온도는 45℃에서 실시)
- (마) 농축 알로에에 일부의 정제수 20%를 넣고 재 농축 (주정이 완전히 제거될 때 까지)
- (바) 농축액을 SD하여 분말화

(3) 알로에추출물 등 복합물의 임상시험 시제품 생산

샘플완료보고		결	생산이사	공장장	대표이사
		재			
날짜 : 2013. 9. 11.					
1. 제품명	알로에 양파 캡셀	2. 섭취방법	아침, 점심 3캡셀, 저녁 4캡셀 / 일		
3. 제품유형	건강기능식품(알로에?)	4. 포장방법	0호 캡셀		
5. 규격	380mg, 0호 캡셀	6. 거래처	김정문 알로에		
7. 과립여부		8. 코팅여부			
9. 기타사항	1일 10캡셀 (3800mg)				
[1] 배합비					
	<항 목>	배합비	비 고		
1	양파추출분말(양파55%, 말토덱스트린45%)	71.800	1일 양파로서 1,500.62mg		
2	알로에추출분말(알로에50%, 말토덱스트린50%)	26.400	1일 알로에로서 501.6mg		
3	이산화규소	0.900			
4	스테아린산마그네슘	0.900			
-	미하어백				
-					
	합 계	100.000			
1. 제품명	알로에 양파 캡셀(위약군)	2. 섭취방법	아침, 점심 3캡셀, 저녁 4캡셀 / 일		
3. 제품유형	건강기능식품(알로에?)	4. 포장방법	0호 캡셀		
5. 규격	380mg, 0호 캡셀	6. 거래처	김정문 알로에		
7. 과립여부		8. 코팅여부			
9. 기타사항	1일 10캡셀 (3800mg)				
[1] 배합비					
	<항 목>	배합비	비 고		
1	결정셀룰로오즈	98.100			
2	양피향 분말	0.100			
3	이산화규소	0.900			
4	스테아린산마그네슘	0.900			
#REF!	미하어백				
	합 계	100.000			
[3] 의견					
	<항 목>				
			참 조	생 산	품질관리
					생산관리

[그림 3-1] 임상시험용 시제품 및 위약군 생산

[그림 3-1]과 같은 처방으로 임상 실험용 제품 생산 (위약군, 실험군)을 하였고, 제품화 공정 도는 그림 [3-2]와 같음.



[그림 3-2] 알로에추출물 등 복합물의 제품화 공정도

2. 알로에추출물 등 복합물의 독성검사 실시

- 알로에추출물 등 복합물의 안전성 시험인 독성시험은 각각의 소재를 식품으로 사용하는

주정으로 추출한 농축액을, 또한 각 소재는 현재 일반식품 및 건강기능식품 소재로 널리 사용하므로 각각의 안전성 시험을 할 필요성은 없지만 복합물질에 안전성 확보를 위하여 일반적인 독성시험 중에서 단회투여(설치류 및 비설치류) 및 유전독성(복귀돌연변이, 염색체 이상, 소핵시험)을 우선으로 하고 추후 반복투여 독성을 할 예정이며, 단회투여 및 유전독성은 GLP기관인 (주)켄온에서 실시하였음.

가. 알로에추출물 등 복합물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

(1) 재료 및 방법

(가) 시험물질 및 부형제

① 시험물질

- 명칭 : 알로에추출물 등 복합물(C-1630)
- 외관 : 미백의 분말형태
- 함량 : Quercetin 0.48mg/g, Aloesin 0.06mg/g

② 부형제

- 명칭 : 멸균주사용수

(나) 투여시험물질의 조제

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였고, 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제를 가하여 균질화 함. 투여를 위한 시험물질조제는 투여 당일에 조제하였음.

(다) 시험계 및 사육환경

① 시험계

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫트, Hsd : Sprague Dawley [®] ™ SD [®] ™	
생산자 및 공급원	코아텍	
선정사유	본 시험에 사용한 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 시험결과 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어서 선택하였음.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	22
	투여 시	20
주령	입수 시	7
	투여 시	8
입수 시 체중범위	191.89-208.47g	156.45-180.82g
투여 시 체중범위	210.55-230.56g	157.99-173.52g
간여동물의 처리	다른시험(주/켄온 시험번호:14-RA-089)의 예비투여에 사용	

㉠ 동물정보

㉡ 검역 및 순화

입수 시 외관을 관찰하고, 체중을 측정한 후 7 일간 본 시험을 실시하는 동물실내에서 사육하면서 매일 1회 이상 일반증상을 관찰하였음. 동물 공급처에서 제공한 ‘시험계의 병원체 검사 성적서’를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었음.

㉢ 식별

순화기간에는 적색 유성매직, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성매직을 이용한 미부표 식법을 사용하여 식별하였음. 사육상자에는 용량을 색으로 구별하는 개체식별카드를

부착하였고, 사육상자대는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 동물실 사용기록지를 부착하였음.

㉠ 실험동물윤리규정

본 시험은 (주)캠온 비임상연구소의 실험동물운영위원회에 의해 승인되었음.
(심의번호: 14-R155).

② 사육환경

㉠ 환경조건 및 측정

- 동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)캠온 비임상연구소 제2동물사육구역 8 호실에서 사육하였음.
- 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하였고, 환기횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였음. 실험기간 동안 동물실의 일평균 온도 및 상대습도는 21.7-22.5°C, 55.4-59.6 %였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 이상은 없었음.

㉠ 사료, 물 및 오염물질 검사

- 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Laboratories Inc.,USA)를 (주)두열바이오텍(서울특별시 서초구 바우피로 91, 정보프라자 107 호)으로부터 공급받아 자유섭취 하도록 하였음. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었음.
- 물은 지하수를 자외선 살균기와 미세여과장치를 거친 후, 물병을 이용하여 자유섭취 하도록 하였음. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 과장천로 95)에서 수행하였고, 먹는물수질기준에 적합하였음.

㉠ 사육상자 및 사육밀도

- 스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 사육기간 동안 암수 모두 3 마리 이하/사육상자로 사육하였음.

㉠ 사육관리

- 물은 매일 점검하였고, 물병은 주 1 회 이상 교환하였음.

(라) 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

① 시험군 구성

군	성 별	동물수	동물번호	투여액량(ml/kg)	투여량(mg/kg)
G1	M/F	5/5	1-5 / 21-25	10	0
G2	M/F	5/5	6-10 / 26-30	10	1250
G3	M/F	5/5	11-15 / 31-35	10	2500
G4	M/F	5/5	16-20 / 36-40	10	5000

G1 : 부형제대조군(멸균주사용수)

② 투여량의 설정

- 시험물질이 천연물 추출물이라는 점과 임상예정용량이 2000 mg/60 kg (33.33 mg/kg/day)에 해당인 것을 감안하여, 임상예정용량의 약 150 배에 해당하는 5000 mg/kg을 고용량으로 설정하고, 아래에 공비 2 로 2 개의 군을 설정하였음. 또한 부형제만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였음.

③ 군분리

- 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균에 가까운 동물들을 선택하여 ‘시험군 구성’표와 같이 무작위 분배하였음.

투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용
투여횟수 및 기간	1 회/일, 단회투여, 투여는 10:54-11:12에 실시
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 10 mL/kg으로 산출
투여방법	투여 전에 하룻밤 절식(약 16-20 시간)시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존대를 장착한 주사기를 이용하여 위 내에 직접 투여. 시험물질 투여 후 약 3-4 시간 후에 사료를 재급여.

④ 투여

(마) 관찰 및 검사

① 일반증상

- 일반증상관찰은 모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 실시하였음. 단, 투여 당일에는 시험물질 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 6 시간까지는 매시간 마다 관찰하였으며, 투여일을 Day 1로 설정하여 Day 15까지 실시하였음.

② 체중

- 모든 동물에 대하여 Day 1(투여 전), 2, 4, 8 및 15에 측정하였음.

③ 부검

- Day 15에 모든 생존동물을 CO₂를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였음.

(바) 통계 분석

- 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS (ver. 10.1K)를 이용하였으며 유의수준은 P<0.05로 설정하였음.
- 체중에 대한 통계 분석은 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였음.
- 사망동물이 발생하지 않아 반수치사량(Median Lethal Dose, LD50)은 산출하지 않았음.

(2) 결과

(가) 사망

- 사망동물은 관찰되지 않았음 (그림 3-3).

Table 1. Mortalities

GROUPS (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	MORTALITIES										ALD Value
		DAYS AFTER DOSE										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-15		
MALE												
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2 (1250)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3 (2500)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G4 (5000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 5000 mg/kg
FEMALE												
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2 (1250)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3 (2500)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G4 (5000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 5000 mg/kg

ALD: Approximate Lethal Dose

[그림 3-3] 독성시험 - mortalities 결과

(나) 일반 증상

- 5,000 mg/kg 투여군 수컷 1 레에서 투여 후 2 시간째에 연변(soft stool)과 하복부 오염(soiled perineal region)이 관찰되었음 (그림 3-4).

Table 2. Clinical signs

		CLINICAL SIGNS			
DAYS	SIGNS	GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE					
1	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5
	Soft stool	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
	Soiled perineal region	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
2-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
FEMALE					
1-14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
15	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

The day of administration was designated as day 1.
Number of animals with the sign/Number of animals examined.

[그림 3-4] 독성시험 - 일반증상 결과

(다) 체중

- 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았음 (그림 3-5).

Table 3. Body weights

		BODY WEIGHTS (g)			
DAYS		GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE					
1		220.79±7.21	221.20±4.72	222.39±5.06	222.99±5.18
2		248.35±7.35	248.61±7.31	249.86±4.78	250.31±8.77
4		261.45±10.55	263.63±8.74	264.33±7.19	264.55±9.91
8		292.90±11.24	287.94±9.64	292.43±10.36	290.19±11.91
15		324.61±16.73	315.26±9.95	321.96±14.54	323.64±17.57
GAINS		103.81±9.62	94.06±7.14	99.57±10.63	100.65±12.62
N		5	5	5	5
FEMALE					
1		163.46±4.58	165.44±4.71	168.65±2.87	167.72±4.07
2		179.87±4.75	186.05±5.68	185.80±5.32	184.03±4.74
4		186.80±5.45	191.90±5.65	192.55±4.02	190.51±5.91
8		196.21±8.84	198.92±4.07	202.02±5.87	198.27±9.89
15		206.48±9.65	211.27±7.60	212.71±5.73	205.83±14.24
GAINS		43.02±5.56	45.82±6.32	44.06±4.42	38.11±11.64
N		5	5	5	5

The day of administration was designated as day 1.
Data are expressed as mean ± S.D.
Gain is body weight on day 15 - body weight on day 1.

[그림 3-5] 독성시험 - 체중변화 결과

(라) 부검소견

- 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았음 (그림 3-6).

Table 4. Necropsy findings

NECROPSY FINDINGS					
ORGANS	FINDINGS	GROUPS (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (1250)	G3 (2500)	G4 (5000)
MALE					
	No gross findings	5	5	5	5
	N	5	5	5	5
FEMALE					
	No gross findings	5	5	5	5
	N	5	5	5	5

[그림 3-6] 독성시험 - 부검소견

(3) 고찰 및 결론

- 본 시험은 시험물질 알로에추출물 등 복합물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였음. 시험물질의 투여량은 1250, 2500, 5000 mg/kg으로 설정하여 단회 경구 투여하였음. 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중, 부검소견에서 시험물질과 관련된 변화는 나타나지 않았음.
- 5,000 mg/kg 투여군에서 2 시간째에 일시적으로 나타난 1 레의 연변과 하복부 오염은 절식 후 시험물질 투여 시 관찰될 수 있는 증상이므로 시험물질에 의한 영향이 아니라고 판단하였음.
- 이상의 결과로 보아, 시험물질 알로에추출물 등 복합물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 본 시험조건 하에서 개략의 치사량 (Approximate Lethal Dose; ALD)은 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였음.

나. 알로에추출물 등 복합물의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험

(1) 재료 및 방법

(가) 시험물질, 부형제 및 양성대조물질

① 시험물질

명칭 : 알로에추출물 등 복합물(C-1630)

외관 : 미백의 분말형태

함량 : Quercetin 0.48mg/g, Aloesin 0.06mg/g

② 부형제(음성대조물질)

명칭 : Dimethylsulfoxide [67-68-5] (약칭 DMSO)

순도 : ≥ 99.9 %

공급원 : Sigma-Aldrich Co.(제조번호 472301-500ML)

③ 양성대조물질

- 다음과 같이 양성대조물질을 사용하였고, 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 471에 제시된 것 중에서 선택하였음 (그림 3-7).

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도 (µg/plate)
+	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
			WP2 <i>uvrA</i>	6
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1
-	Sodium azide (SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2
	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 <i>uvrA</i>	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

[그림 3-7] 독성시험 - 복귀돌연변이 시험 결과

물질명	공급원	제품번호	로트번호	입수일	보관
2-AA	Sigma-Aldrich Co.	A38800	STBB1901V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013 년 05 월 31 일	11~30 °C
SA	Sigma-Aldrich Co.	S8032	BCBJ1210V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
2-NF	Sigma-Aldrich Co.	N16754	S43858V	2013 년 01 월 02 일	11~30 °C
4NQO	Sigma-Aldrich Co.	N8141	SLBB5231V	2013 년 01 월 02 일	-15 °C 이하
ICR-191	Sigma-Aldrich Co.	I3636	110M1173V	2013 년 01 월 02 일	-1~10 °C

[그림 3-8] 독성시험 - 조제시험물질 분석

(나) 조제시험물질 및 분석

① 시험물질 조제

- 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였음. 적량의 시험 물질을 칭량하여 부형제를 넣은 것을 최고농도로 하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제하였고, 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제하였음 (그림 3-8).

② 양성대조물질 조제

- SA는 멸균주사용수(대한약품공업㈜, 제조번호 A6M7F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용하였음. 2-AA, B[a]P, 2-NF, 4NQO 및 ICR-191은 DMSO (Sigma-Aldrich Co., # 472301-500ML, 제조번호 SZBD0030V, ≥99.9 %)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용하였음.

③ 조제시험물질의 분석

조제시험물질에 대한 분석은 실시하지 않았음.

(다) 시험계

① 시험계 및 선택이유

- 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (Green and Muriel, 1976)를 사용하였음. 이 균주들은 전술한 MFDS 및 OECD guideline에 복귀돌연변이 시험용 균주로 예시되어 있음. 이들 균주는 다양한 화학 물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이 입증되었으며, 각 균주의 유전적 특

징과 검출 가능한 돌연변이 유형은 다음 표와 같음.

균주명	<i>his/trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미드	검출 돌연변이
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

[그림 3-9] 독성시험 - 검출 가능한 돌연변이 유형

- 살모넬라 TA균주의 *rfa* 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관련된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여줌. DNA 손상의 절제회복에 관련된 유전자에 일어난 *uvrA* 혹은 *uvrB* 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여줌. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여줌.

② 균주 공급원 및 배지

㉠ 균주 공급원

- Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)캠온 비임상연구소에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였음.

㉡ 액체배지

- 복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2 를 사용하였음.

㉢ 최소배지(Minimal glucose agar plate)

- 1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬(90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였다. 대장균(*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L 로 첨가한 것을 사용하였음.

㉣ Top agar

- Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가하였음.

③ 균주의 보존 및 형질확인

㉠ 균주의 냉동보존

- 균주의 장기 보존을 위하여, 균배양액 1 mL 당 90 μ L의 DMSO를 가하여 냉동 vial에 채워 -70°C 이하에서 냉동보관 하였음.

㉡ 마스터 플레이트(Master plate)

- 마스터 플레이트는 냉동 균주를 해동하여 10 시간 배양한 균배양액을 적절한 최소 배지에 도말하여 제작하고 냉장보관하였다. 균배양액의 일부는 형질확인용에 사용하고, 각 균주의 형질확인을 완료한 마스터 플레이트의 균주를 복귀돌연변이시험에

사용하였음.

㉔ 형질확인

- 각 균주에 대하여 Maron and Ames (1983)의 방법에 준하여 다음 표와 같이 유전형질을 확인하였음.

형질	확인 대상 균주
histidine 요구성	살모넬라 TA 균주
uvrB mutation 유지	살모넬라 TA 균주
R-factor 유지	살모넬라 TA 균주
rfa 돌연변이의 유지	살모넬라 TA 균주
spontaneous revertant의 수	살모넬라 TA 균주 및 <i>E. coli</i> WP2 uvrA
tryptophan 요구성	<i>E. coli</i> WP2 uvrA
uvrA mutation 유지	<i>E. coli</i> WP2 uvrA

[그림 3-10] 독성시험 - 유전형질 확인

(라) 대사활성계(S9 mix)

① S9 및 Cofactor

㉑ S9

- 기원 : Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간
- 공급원 : Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)
- 제품번호 : 11-01L
- 로트번호 : 3219
- 단백질 함량 : 35.0 mg/mL
- 보관조건 : 냉동보관(-15°C 이하)

㉒ Cofactor

- 명칭 : Cofactor-I
- 공급원 : Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)
- 제품번호 : 309-50611
- 로트번호 : 999303
- 보관조건 : 냉장보관(-1~10°C)

② S9 mix 1 mL 중의 조성(5 % S9, v/v)

- S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제하였음. S9 mix의 조성은 8 μmol MgCl₂ · 6H₂O, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-P, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 50 μL S9으로 하였으며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였음.

(마) 시험 방법

① 농도군 설정

- 본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-150P)에서 본 시험과 같은 방법으로 전술한 5 종의 균주에 대하여 농도군당 1 개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였음.
- 예비시험에서는 5-5000 μg/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리 시

top agar와 혼합할 때 및 집락 계수 시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였음.

- 그 결과 모든 농도군에서 처리 시 침전은 관찰되지 않았으며, 계수 시 플레이트에서도 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 또한, 모든 균주에서 집락수의 실질적인 증가는 관찰되지 않았음.
- 따라서, 본 시험에서는 다음과 같이 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조균을 포함하며, 농도군당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험하였음.

균 주 명	S9 mix	농도군(μg/plate)					
		15	50	150	500	1500	5000
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

② 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작

- 시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시하였음.
- 시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37 ± 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전배양 하였으며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였음.
- 온도 45 ± 2°C를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용 시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 균게 하였음.
- 음성대조균은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조균은 양성 대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였음.
- 시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였음.
- 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 37 ± 2°C에서 50 ± 2 시간 배양한 후 복귀돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수하였음.

③ 평판의 구별

- 평판에 유성펜으로 시험번호, 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기입하였음.

④ 관찰 항목

- 시험물질 처리 시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였다. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였음.
- 집락은 육안으로 계수하였고, 집락 계수 시 각 평판의 기본성장균층 (background lawn)의 형성여부를 음성대조균과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였음.
- 다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였음.

㉠ 기본성장균층이 옅어지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.

- ㉔ 미세집락(microcolony)이 나타날 때.
 - 집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락수가 음성대조군에서 나타난 집락수 평균치의 50 % 미만으로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단하였음.
- ⑤ 결과의 표기
 - 시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내었으며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시하였음.
- ⑥ 시험 타당성 기준
 - 다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였음.
 - ㉔ 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5 x 10⁸ CFU 이상일 것.
 - ㉕ 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것.

균주명	집락수
TA100	75-200
TA1535	3-37
TA98	15-60
TA1537	4-31
WP2 uvrA	5-40

- ㉕ 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것.
 - ㉖ 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.
 - ㉗ 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것.
- (바) 통계학적 방법 및 결과 평가
- ① 통계학적 분석 : 통계분석은 실시하지 않았음.
 - ② 결과의 평가
 - 대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1 개 균주에서 시험물질 처리군의 평균 집락 수가 농도 의존적으로 증가하거나 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였음.
 - 양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하였으며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단하였다. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고하였음.

(2) 결과

(가) 조제 시험물질

- 시험물질은 부형제에 현탁되었음.

(나) 복귀돌연변이시험(Table 1, Appendix 1 and Appendix 2)

- 조제물을 top agar와 혼합할 때 모든 농도군에서 혼탁이나 침전이 관찰되지 않았음. 집락계수 시 예도 모든 플레이트에서 침전이나 기타 이상은 관찰되지 않았으며, 시험물질 최고농도 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았음.
- Salmonella typhimurium의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537 의 4 개의 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용시 시험물질 농도의 증가에

따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았음.

- E. coli WP2 uvrA에서도 대사활성계 적용 및 비적용시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았음.
- 한편 모든 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었음.
- 시험에 사용한 5 개 균주는 파장 600 nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 1.84-2.95 x 10⁹ (TA균주) 및 3.20 x 10⁹ (E. coli) CFU/mL 이었으며, 모든 플레이트 당 처리된 생균수 0.5 x 10⁸ CFU 이상이었음.

Table 1. Reverse mutagenicity assay results - summary

Test Strain	Chemical Treated	Dose (AF/plate)	Colonies/plate [factor] ^{a)}	
			With S9 mix	Without S9 mix
TA100	Test article	0	131 ± 9	113 ± 5
		15	127 ± 15 [1.0]	117 ± 9 [1.0]
		50	128 ± 12 [1.0]	118 ± 15 [1.0]
		150	132 ± 11 [1.0]	119 ± 3 [1.1]
		500	125 ± 11 [1.0]	120 ± 9 [1.1]
		1500	119 ± 6 [0.9]	117 ± 3 [1.0]
		5000	126 ± 8 [1.0]	101 ± 11 [0.9]
TA1535	Test article	0	10 ± 2	9 ± 1
		15	8 ± 3 [0.8]	7 ± 2 [0.8]
		50	9 ± 1 [0.9]	7 ± 2 [0.8]
		150	11 ± 1 [1.1]	9 ± 1 [1.0]
		500	11 ± 3 [1.1]	9 ± 2 [1.0]
		1500	8 ± 2 [0.8]	9 ± 2 [1.0]
		5000	6 ± 3 [0.6]	8 ± 2 [0.9]
TA98	Test article	0	37 ± 3	34 ± 3
		15	33 ± 4 [0.9]	28 ± 4 [0.8]
		50	31 ± 9 [0.8]	34 ± 3 [1.0]
		150	38 ± 2 [1.0]	35 ± 4 [1.0]
		500	32 ± 2 [0.9]	30 ± 3 [0.9]
		1500	36 ± 4 [1.0]	32 ± 5 [1.0]
		5000	36 ± 1 [1.0]	38 ± 4 [1.1]
TA1537	Test article	0	11 ± 1	10 ± 2
		15	7 ± 3 [0.7]	9 ± 2 [0.9]
		50	11 ± 4 [1.0]	13 ± 3 [1.3]
		150	10 ± 3 [0.9]	11 ± 1 [1.1]
		500	7 ± 1 [0.7]	14 ± 2 [1.4]
		1500	11 ± 3 [1.0]	9 ± 2 [0.9]
		5000	8 ± 2 [0.8]	10 ± 4 [1.0]
E. coli	Test article	0	20 ± 5	17 ± 4
		15	24 ± 4 [1.2]	17 ± 2 [1.0]
		50	20 ± 3 [1.0]	15 ± 4 [0.9]
		150	15 ± 4 [0.8]	19 ± 3 [1.2]
		500	20 ± 2 [1.0]	20 ± 3 [1.2]
		1500	20 ± 3 [1.0]	20 ± 5 [1.2]
		5000	24 ± 4 [1.2]	17 ± 2 [1.0]
Positive controls				
TA100	2-AA	1.0	911 ± 15 [7.0]	
TA1535	2-AA	2.0	187 ± 3 [18.7]	
TA98	B[a]P	1.0	227 ± 19 [6.2]	
TA1537	2-AA	1.0	167 ± 9 [15.7]	
WP2 uvrA	2-AA	6.0	93 ± 3 [4.7]	
TA100	SA	0.5		552 ± 9 [4.9]
TA1535	SA	0.5		352 ± 19 [39.1]
TA98	2-NF	2.0		249 ± 27 [7.4]
TA1537	ICR-191	0.5		112 ± 16 [11.2]
WP2 uvrA	4NQO	0.5		154 ± 27 [9.2]

Test article: 알로에추출물 등 복합물

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

Appendix 1. Reverse mutagenicity assay results – individual plate counts

Test Strain	Chemical Treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate (Status of background lawn ^{a)})					
			With S9 mix			Without S9 mix		
TA100	Test article	0	122 (N)	139 (N)	132 (N)	118 (N)	112 (N)	109 (N)
		15	133 (N)	139 (N)	110 (N)	122 (N)	122 (N)	107 (N)
		50	130 (N)	116 (N)	139 (N)	130 (N)	122 (N)	101 (N)
		150	130 (N)	122 (N)	144 (N)	121 (N)	119 (N)	116 (N)
		500	132 (N)	131 (N)	113 (N)	110 (N)	122 (N)	128 (N)
		5000	113 (N)	121 (N)	124 (N)	121 (N)	115 (N)	115 (N)
TA1535	Test article	0	9 (N)	9 (N)	12 (N)	8 (N)	9 (N)	10 (N)
		15	10 (N)	5 (N)	10 (N)	6 (N)	9 (N)	7 (N)
		50	9 (N)	8 (N)	9 (N)	6 (N)	6 (N)	9 (N)
		150	12 (N)	10 (N)	10 (N)	9 (N)	8 (N)	10 (N)
		500	10 (N)	14 (N)	9 (N)	10 (N)	7 (N)	9 (N)
		5000	9 (N)	9 (N)	5 (N)	8 (N)	11 (N)	9 (N)
TA98	Test article	0	38 (N)	39 (N)	33 (N)	31 (N)	33 (N)	37 (N)
		15	32 (N)	30 (N)	38 (N)	25 (N)	32 (N)	26 (N)
		50	21 (N)	39 (N)	33 (N)	32 (N)	38 (N)	33 (N)
		150	40 (N)	38 (N)	36 (N)	37 (N)	31 (N)	38 (N)
		500	31 (N)	34 (N)	30 (N)	27 (N)	33 (N)	31 (N)
		5000	36 (N)	33 (N)	40 (N)	37 (N)	28 (N)	32 (N)
TA1537	Test article	0	10 (N)	12 (N)	10 (N)	8 (N)	10 (N)	12 (N)
		15	4 (N)	10 (N)	8 (N)	8 (N)	12 (N)	8 (N)
		50	12 (N)	6 (N)	14 (N)	10 (N)	15 (N)	13 (N)
		150	6 (N)	12 (N)	11 (N)	12 (N)	12 (N)	10 (N)
		500	8 (N)	6 (N)	8 (N)	14 (N)	16 (N)	12 (N)
		5000	10 (N)	8 (N)	6 (N)	10 (N)	14 (N)	6 (N)
E. coli WP2 uvrA	Test article	0	14 (N)	22 (N)	24 (N)	21 (N)	15 (N)	14 (N)
		15	28 (N)	25 (N)	20 (N)	18 (N)	18 (N)	14 (N)
		50	20 (N)	18 (N)	23 (N)	13 (N)	13 (N)	20 (N)
		150	16 (N)	11 (N)	19 (N)	18 (N)	23 (N)	17 (N)
		500	22 (N)	18 (N)	21 (N)	17 (N)	21 (N)	23 (N)
		5000	18 (N)	18 (N)	23 (N)	16 (N)	20 (N)	25 (N)
Positive controls								
TA100	2-AA	1.0	928 (N)	900 (N)	904 (N)			
TA1535	2-AA	2.0	190 (N)	188 (N)	184 (N)			
TA98	B[a]P	1.0	210 (N)	222 (N)	248 (N)			
TA1537	2-AA	1.0	166 (N)	177 (N)	159 (N)			
WP2 uvrA	2-AA	6.0	96 (N)	94 (N)	90 (N)			
TA100	SA	0.5				560 (N)	542 (N)	
TA1535	SA	0.5				355 (N)	332 (N)	
TA98	2-NF	2.0				280 (N)	230 (N)	
TA1537	ICR-191	0.5				130 (N)	101 (N)	
WP2 uvrA	4NQO	0.5				127 (N)	154 (N)	

Test article: 알로에추출물 등 복합물

a) Status of background lawn (BL) and plate

N, normal BL; R, reduced BL; A, absent or almost absent BL; E, enhanced BL; O, obscured BL by precipitation; P, precipitation of test article in plate; M, presence of microcolonies; C, contaminated plate.

Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

Appendix 2. Viable cell count of tester strains and results of sterility tests

Test strain	Viable cell counts (10^9 CFU/mL)	Sterility of test article Solution (highest dose)	Sterility of S9 mix
TA100	1.84		
TA1535	2.68		
TA98	2.95	No colony due to contamination	No colony due to contamination
TA1537	1.87		
WP2 uvrA	3.20		

[그림 3-11] 독성시험결과

(3) 고찰 및 결론

- 시험타당성 기준은 모두 만족하였음. 모든 시험균주에서 대사활성계 적용 여부에 상

관 없이 시험물질 처리군의 평균 집락 수는 증가를 나타내지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였음.

- 따라서, 시험물질 알로에추출물 등 복합물은 본 시험조건 하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료됨.

다. 알로에추출물 등 복합물의 배양 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용한 염색체 이상시험

(1) 재료 및 방법

(가) 시험물질, 부형제 및 대조물질

① 시험물질

명칭 : 알로에추출물 등 복합물(C-1630)

외관 : 미백의 분말형태

함량 : Quercetin 0.48mg/g, Aloesin 0.06mg/g

② 부형제(음성대조물질)

명칭 : 멸균주사용주

③ 양성대조물질

- 다음과 같이 대사활성계 적용 시는 Benzo[a]pyrene (CAS No. 50-32-8, 약칭 B[a]P) 를, 대사활성계 비적용 시는 Ethylmethanesulfonate (CAS No. 62-50-0, 약칭 EMS) 를 사용하였음. 이들 양성대조물질은 OECD 가이드라인 TG 473에 제시된 것 중에서 선택하였음 (그림 3-12).

물질명	공급원	제품번호	로트번호	인수일	보관
B[a]P	Sigma-Aldrich Co. (Supelco)	48564	LB98566V	2013년 05월 31일	11-30°C
EMS	Sigma-Aldrich Co.	M0880	BCBG1395V	2012년 06월 12일	11-30°C

[그림 3-12] 염색체 이상시험의 양성대조물질

(나) 조제시험물질 및 분석

① 시험물질 조제

- 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였음. 최고 농도군은 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제에 현탁한 후, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제하였고, 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제하였음.

② 조제시험물질의 분석

- 조제시험물질에 대한 함량분석은 실시하지 않았음.

③ 양성대조물질 조제

- B[a]P는 Dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하여 조제한 원액을 -50 °C 이하에 냉동 보관하고, 처리 직전에 해동하여 시험에 사용하였음. EMS는 처리 직전 배양액에 용해하여 조제하였음.

(다) 시험계

① 시험계 및 선택이유

- 본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주를

사용

- 이 세포주는 다양한 화학물질을 대상으로 한 유전독성시험에 널리 사용되고 있으며, 염색체이상의 검출에 적합함이 입증됨. 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 입수함(Cat. No. CRL-1935). ATCC에서 제공한 정보에 의하면 이 세포주의 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 15 시간임.
- 본 시험에서 사용한 세포주의 세포 증식률 및 핵형 검사 결과, 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 13.5 시간임.

② 배양 조건

- 배양액은 1 리터용 Minimum Essential Medium (Gibco-BRL #41500-034) 분말배지에 sodium bicarbonate (2200 mg), L-glutamine (292 mg), penicillin-streptomycin 액 (Gibco-BRL #15140-122)을 첨가하여 멸균주사용 수로 총 액량을 1000 mL로 조정할 것을 공경 0.2 μm 의 membrane filter로 여과한 것에 Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL #16000-044) 100 mL를 첨가한 것을 사용하였음.
- 세포는 5 %의 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온배양기 (Forma 311 및 3111)에서 세포 배양용 플라스크(배양면적 75 cm², Falcon)를 사용하여 배양하며 매 2-3 일 마다 0.1 % 트립신액으로 세포를 분리, 계대 배양하였음.

③ 세포의 장기 보존

- 장기 보존을 위한 세포는 15 % fetal bovine serum (FBS)을 함유한 배양액에 현탁한 것에 10 % (v/v) dimethylsulfoxide를 첨가하여 액체질소 내에 냉동보관하였다. 해동하여 배양한 세포에 대하여는 증식률 측정, 핵형검사 및 mycoplasma에 의한 오염 여부를 검색하였음.

④ 시험물질 처리를 위한 세포 배양

- 냉동세포를 해동하여 최소한 7 일간 배양 후 시험에 사용하였다. 활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리한 다음 Coulter counter model Z2 (Beckman Coulter)로 mL 당 세포 수를 산출하고, 이를 근거로 배양면적 25 cm² 플라스크당 6×10^4 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종, 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였음.

(라) 대사활성계(S9 mix)

① S9 및 Cofactor

㉠ S9

- 기원 : Aroclor-1254로 유도한 수컷 Sprague-Dawley 랫드의 간
- 공급원 : Molecular Toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)
- 제품번호 : 11-01L
- 로트번호 : 3219
- 단백질 함량 : 35.0 mg/mL
- 보관조건 : 냉동보관(-15°C 이하)

㉡ Cofactor

- 명칭 : Cofactor-I
- 공급원 : Wako Pure Chem. Ind., Ltd. (Japan)
- 제품번호 : 309-50611
- 로트번호 : 999303

- 보관조건 : 냉장보관(-1~10°C)

② S9 mix 1 mL 중의 조성(30 % S9, v/v)

- S9 mix는 S9과 보호소 용액으로 조제하였다. S9 mix의 조성은 8 µmol MgCl₂ · 6H₂O, 33 µmol KCl, 5 µmol G-6-P, 4 µmol NADPH, 4 µmol NADH, 100 µmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 0.3mL S9으로 하였으며, 조제한 S9 mix는 얼음에 채워 사용하였음.

(마) 시험 방법

① 처리농도 결정

- 본 시험의 처리 농도는 예비시험(시험번호 14-VG-152P)에서 본시험과 같은 방법으로 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였고, 처리 방법에 따라 다음과 같이 구분하였음.

- 처리계열-1: 대사활성계 적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6+S)

- 처리계열-2: 대사활성계 미적용 6 시간 처리 - 18 시간 회복(약칭 6-S)

- 처리계열-3: 대사활성계 미적용 24 시간 처리 - 0 시간 회복(약칭 24-S)

- 예비시험에서는 5 - 5000 µg/mL 범위의 8 단계 시험물질을 처리함.

- 시험물질 처리 개시 및 종료시각에 침전생성 여부, 배양액의 색변화 등을 관찰하였음. 관찰은 육안으로 하였으며, 처리종료 시까지 처리액 중에 시험물질 입자가 관찰될 때를 침전으로 판단하였음.

- 시험물질 처리개시로부터 약 24 시간 후 플라스크로부터 세포를 분리, 계수하여 얻은 세포 수로 다음 수식에 의해 상대세포수(Relative Cell Count, RCC)를 산출하여 세포독성의 지표로 하였음.

$$RCC = (\text{처리군의 세포수} / \text{음성대조군의 세포수}) \times 100 (\%)$$

- 예비시험 결과, 모든 처리계열의 모든 농도군에서 침전은 생성되지 않았으며 최고 농도에서도 RCC 값은 92 % 이상이였으므로, 본시험에서는 5000 µg/mL을 고농도로 설정하고 처리계획표와 같이 시험군을 구성하였음 (그림 3-13).

[처리계획]

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article (µg/mL)	Positive control and dose (µg/mL)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	EMS 800
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	EMS 600

[그림 3-13] 염색체 이상시험의 처리계획

② 시험의 실시

㉠ 세포배양

- 배양 면적 25 cm²인 플라스크(Falcon)당 6 × 10⁴ 세포를 5 mL의 배양액으로 파종하여 약 3 일간 배양하였고, 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였음.

㉡ 시험계의 구별

- 플라스크의 측면에 유성펜으로 시험번호, 농도군(코드), S9 mix 처리여부 및 처리시간 등을 기입하였음.

㉢ 시험물질 처리

- 세포를 처리계열(Series) 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리

각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군 (계열-1)은 2.2 mL, 비적용군(계열-2 및 3)은 4.5 mL의 배양액을 분주, 1시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리하였고, 음성대조군에는 부형제만을 같은 양 처리하였음. 처리액 조성은 시험물질 처리액 조성표와 같음 (그림 3-14).

[시험물질 처리액 조성]

Series	Medium + Test article	S9 mix	Final volume
1	2.2 mL + 0.3 mL	0.5 mL	3.0 mL
2	4.5 mL + 0.5 mL	-	5.0 mL
3	4.5 mL + 0.5 mL	-	5.0 mL

양성대조군에는 30 μ L B[a]P (series-1), 400 μ L EMS (series-2) 및 300 μ L EMS (series-3)를 처리하여 함계역량을 동일하게 조정함.

[그림 3-14] 염색체 이상시험의 시험물질 처리액 조성

- 계열-1 및 계열-2는 처리개시로부터 약 6 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 mL의 Ca²⁺ & Mg²⁺ free Dulbecco's phosphate buffered saline (CMF D-PBS)로 세포층을 1 회 세척한 후 신선한 배양액 5 mL를 가하여 중기세포 수거 시까지 계속 배양하였음. 계열-3은 세척 없이 중기세포 수거 시까지 계속 처리하였음. 모든 계열의 처리개시 및 종료 시에 침전의 생성 혹은 pH에 따른 배양액의 색변화 등을 관찰하였음.
- ㉠ 검체 제작
 - 시험물질 처리 개시로부터 약 22 시간 후 모든 플라스크에 50 μ L의 콜히친 액을 처리하여(최종농도 1 μ M) 2 시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거하였음. 중기세포를 포함한 배양액을 원심분리, 75 mM KCl 액에 의한 저장액처리 및 고정(메틸알콜:빙초산=3:1 v/v)을 거쳐 공기건조법으로 염색체검체를 제작하고 5 % Giemsa액으로 염색하였음. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작하였음.
- ㉡ 검체 제작 방법의 선택이유
 - 일반적으로 실시되는 방법이며, 이 방법은 중기세포를 고밀도로 얻을 수 있는 장점이 있음.
- ㉢ 세포독성의 측정
 - 중기세포 수거 후 플라스크에 남아있는 세포를 트립신 액으로 분리 및 계수하여 RCC 값을 산출하였음.
- ③ 염색체이상의 개수
 - ㉠ 계수의 기준
 - 염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물 시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의하였음. 각 플라스크로부터 제작한 2 매의 검체 중 1 매씩을 선택하여 코드화 한 후, 100 개의 분열 중기상(이하 '중기상'이라 함)을 대상으로 1000 배의 배율로 염색체이상을 계수하였음.
 - ㉡ 구조적 이상
 - 동원체 수가 23 - 27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드 상의 위치를 기록

하였음. 이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 대별해 계수하였으며, gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였음. 염색체이상이 10 개 이상(gap 포함, multiple aberration) 혹은 단편화 (fragmentation)는 ‘기타’로 분류하여 1 개의 이상으로 계수하였음.

㉔ 수적 이상

- 이상의 유무에 관계 없이 100 개의 중기상을 계수하면서 동원체의 수에 따라 diploid (23 - 36 동원체), polyploid (37 ≤ 동원체) 및 핵내배화 (endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록하였음.

④ 결과의 표시

- 농도군당 이상중기상 및 염색체이상의 수는 2 반복의 검체로부터 구한 평균으로 나타내었음.

⑤ 시험 타당성 기준

- 다음의 조건을 모두 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였음.

㉕ 시험물질 처리군의 최소한 3 농도군의 모든 플라스크에서 100 개의 중기 상으로부터 염색체 이상의 계수가 가능할 것.

㉖ 음성대조군에서 염색체의 구조적 이상(gap 제외)을 가진 중기세포의 빈도가 5 % 미만이며, 양성대조군에서는 이 빈도가 10 % 이상일 것. 이 때 B[a]P 처리군에서 나타난 이상중기상의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨.

(바) 통계학적 방법 및 결과의 평가

① 통계 분석 프로그램

- 시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용하였음.

② 구조적 이상

- 적어도 1 개 이상의 구조적 이상을 가진 중기상을 이상중기상으로 분류하여 통계처리를 적용하였으며, gap 만을 가진 중기상은 통계처리 대상에서 제외하였음. 음성대조군과 처리군의 자료를 Fisher's exact test로 비교하였으며, $P < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. 시험물질 처리군에서 이상 중기상의 빈도가 유의한 증가를 나타낼 경우는 Chi-square test의 linear-by-linear association으로 용량 상관성을 검사하였음.

③ 수적 이상

- 동원체수 37 이상인 중기상 및 핵내배화를 가진 중기상의 합계에 대하여 구조적 이상의 경우와같은 방법으로 평가하였음.

④ 결과의 평가

- 시험물질 처리군에서 염색체이상을 가진 중기상의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량 단계에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였음. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성, 이상중기상의 빈도 및 세포증식 억제(세포독성)의 정도 또한 판정에 참조하였음.

(2) 결과

(가) 조제 시험물질

- 시험물질은 부형제에 현탁되었으며, 모든 농도군의 조제시험물질에서 침전은 관찰되지 않음.

(나) 대사활성계 적용 6 시간 처리(Table 1 and Appendix 1)

- 시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 이상중기상의 빈도는 음성대조군(0), 1250, 2500 및 5000 µg/mL 순으로 0.0, 0.0, 0.0 및 0.5 이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았음. 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리군에서 모두 0.0으로, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았음. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(17.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었음 (P<0.01).

(다) 대사활성계 비적용(Table 2, 3 and Appendix 2)

① 6 시간 처리

- 시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았음. 이상 중기상의 빈도는 음성대조군(0), 1250, 2500 및 5000 µg/mL 순으로 1.0, 0.0, 0.5 및 0.0 이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았음. 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리군에서 모두 0.0으로, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았음. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(23.5)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었음 (P<0.01).

② 24 시간 처리

- 시험물질을 처리한 모든 군에서 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았음. 이상 중기상의 빈도는 음성대조군 및 모든 시험물질 처리군에서 모두 0.0 이었으며, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았음. 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리군에서 모두 0.0으로, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았음. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도(26.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었음(P<0.01).

Table 1. Chromosome aberration test in the presence of B[a]P - summary (6-hour treatment)^{a)}

Dose (µg/mL)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps		Decision	
		osb (mean)	ose (mean)	otb (mean)	ote (mean)					No. (mean)	-Gaps (mean)		
0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	101
	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	102
	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91
	100	0	0	0	1	0	1	0	Negative	2	1	Negative	
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(1.0)	(0.5)		
20 B[a]P	100	0	0	4	16	0	2	0	0	16	14	0	71
	100	0	0	10	20	0	1	0	Negative	20	20	Positive	
	(100)	(0.0)	(0.0)	(7.0)	(18.0)	(0.0)	(1.5)	(0.0)		(18.0)	(17.0)**		

** Significantly different from the negative control at P<0.01 (Fisher's exact test).

Table 2. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (6-hour treatment)^{a)}

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps No. (mean)	-Gaps No. (mean)	Decision	
		csb (mean)	cse (mean)	ctb (mean)	cte (mean)								
0	100	0	0	0	1	0	1	0	Negative	2	1	Negative	100
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.5)	(0.0)	(1.5)	(0.0)		(2.5)	(1.0)		
1250	100	0	0	0	0	0	3	0	Negative	3	0	Negative	103
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.5)	(0.0)		(1.5)	(0.0)		
2500	100	0	0	1	0	0	0	0	Negative	1	1	Negative	107
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.5)	(0.5)		
5000	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	104
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
800 EMS	100	0	0	6	30	1	1	0	Negative	24	24	Positive	78
	(100)	(0.0)	(0.0)	(5.0)	(26.0)	(0.5)	(3.0)	(0.0)		(25.0)	(23.5)**		

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Table 3. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix – summary (24-hour treatment)^{a)}

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. cells examined (mean)	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}			RCC
		Chromosome type		Chromatid type		Others (mean)	Gaps (mean)	No. (mean)	Decision	+Gaps No. (mean)	-Gaps No. (mean)	Decision	
		csb (mean)	cse (mean)	ctb (mean)	cte (mean)								
0	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	100
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
1250	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	102
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
2500	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	97
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)		(0.0)	(0.0)		
5000	100	0	0	0	0	0	0	0	Negative	0	0	Negative	102
	(100)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.5)	(0.0)		(0.5)	(0.0)		
600 EMS	100	0	0	7	17	1	6	0	Negative	26	23	Positive	77
	(100)	(0.0)	(0.0)	(9.0)	(23.5)	(0.5)	(5.0)	(0.0)		(28.5)	(26.0)**		

** Significantly different from the negative control at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Appendix 1. Cell counts – individual data

Treatment Schedule ^{a)}	S9 mix	Dose (µg/mL)	Cell Counts		Mean	RCC ^{b)} (%)		
			Flask A	Flask B				
06 – 18	+	0	9116	9010	9773	9635	9384	100
		1250	9276	9198	9752	9631	9464	101
		2500	9855	9517	9581	9230	9546	102
		5000	8578	8241	8749	8689	8564	91
		B[a]P 20	6354	6271	6929	6925	6620	71
06 – 18	-	0	9000	8714	9239	9049	9001	100
		1250	9275	9181	9341	9134	9233	103
		2500	9770	9681	9640	9297	9597	107
		5000	9624	9085	9536	9285	9383	104
		EMS 800	7194	7032	7046	6667	6985	78
24 – 0	-	0	9338	9318	8880	8868	9101	100
		1250	9233	9040	9641	9384	9325	102
		2500	9079	9080	8767	8410	8834	97
		5000	9515	9199	9263	9234	9303	102
		EMS 600	7267	7207	6833	6825	7033	77
Initial cell count			4722	4484	4912	4688	4702	

Test article: 알로에추출물 등 복합물

a) Treatment time – recovery time, hours.

b) RCC: Relative Cell Counts = (Cell count of treated flask / Cell count of negative control flask) × 100 (%)

Initial cell count: cell count of untreated flasks at the start of chemical treatment

Two flasks/dose were used. After harvesting mitotic cells, each culture was trypsinized and suspended with 0.5 mL of 0.1% trypsin and 5 mL of culture medium. The cell suspensions of 0.4 mL/culture was diluted 50 times with 19.6 mL of Isoton[®] sol. The cells in 0.5 mL of Isoton[®] sol. were counted twice/culture using Coulter Counter model Z2.

Actual number of cells per flask = Mean Cell Count × 550.

B[a]P: Benzo[a]pyrene (positive control article)

EMS: Ethylmethanesulfonate (positive control article)

Appendix 2. Historical control data

Chinese Hamster Lung cells, Jan 2006 – Mar 2014.

Negative controls

Treatment schedule ^{a)}	S9 mix	Vehicle	% Aberrant metaphase with structural aberration (range)	N
6 – 18	+	All solvents	0.19 ± 0.47 (0 – 2)	230
		DMSO	0.30 ± 0.58 (0 – 2)	66
	-	All solvents	0.16 ± 0.42 (0 – 2)	226
		DMSO	0.20 ± 0.47 (0 – 2)	66
24 – 0	-	All solvents	0.13 ± 0.39 (0 – 2)	222
		DMSO	0.19 ± 0.54 (0 – 2)	62

a) Treatment time–recovery time, hours.

DMSO: dimethylsulfoxide [67-68-5]

Positive controls

Treatment schedule ^{a)} (article and concentration)	S9 mix	% Aberrant metaphase with structural aberration (range)	N
6 – 18 (B[a]P, 20 µg/mL)	+	22.68 ± 8.07 (10 – 46)	148
6 – 18 (EMS, 800 µg/mL)	-	20.77 ± 6.81 (9 – 51)	224
24 – 0 (EMS, 600 µg/mL)	-	25.28 ± 10.22 (9 – 67)	220

a) Treatment time–recovery time, hours.

B[a]P: Benzo[a]pyrene [50-32-8]

EMS: Ethylmethanesulfonate [62-50-0]

[그림 3-15] 염색체 이상시험 결과

(3) 고찰 및 결론

- 시험타당성 기준은 모두 만족하였다. 염색체이상을 계수한 결과, 처리 방법에 상관없

이 모든 시험물질 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 증기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하지 않았으며, 이 결과는 양성판정 기준을 만족시키지 못하였음. 따라서, 시험물질 알로에추출물 등 복합물은 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료됨.

라. 알로에추출물 등 복합물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

(1) 재료 및 방법

(가) 시험물질, 부형제 및 대조물질

① 시험물질

- 명칭 : 알로에추출물 등 복합물(C-1630)
- 외관 : 미백의 분말형태
- 함량 : Quercetin 0.48mg/g, Aloesin 0.06mg/g

② 부형제(음성대조물질)

- 명칭 : 멸균주사용주

③ 양성대조물질

- ㉠ 다음과 같이 Cyclophosphamide monohydrate [CAS No. 6055-19-2, 약칭 CPA]를 사용하였음 (그림 3-16).

물질명	공급원	제품번호	로트번호	인수일	보관
CPA	Sigma-Aldrich Co.	C0768	SLBG4216V	2014년 03월 12일	-1~10°C

[그림 3-16] 소핵시험 양성대조물질

- ㉡ 선택이유: OECD 가이드라인 TG 474에 제시된 것 중에서 선택하였음.

(나) 투여시험물질 조제 및 분석

① 투여시험물질 조제

- 시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용하였음. 용량별로 정량의 시험물질을 칭량한 후 부형제를 가하여 균질화 하였다. 투여를 위한 시험물질 조제는 투여 당일에 조제

② 양성대조물질 조제

- 적량의 CPA를 투여 직전 생리식염 주사액(대한약품공업(주), 78N2K08)에 용해하여 조제

③ 투여시험물질의 분석 : 투여시험물질의 분석은 실시하지 않음

(다) 시험계 및 사육환경

① 시험계

- ㉠ 동물정보 (그림 3-17)

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 진위로 181-21)	
선정사유	본 시험에 사용한 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 시험결과 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 또한 예비시험 결과 성별에 따른 독성차이가 현저하지 않았으므로 수컷을 선택하였다.	
성별	수컷	
동물 수	입수 시	33
	투여개시 시	30
주령	입수 시	7
	투여개시 시	8
입수 시 체중범위	29.14 - 32.32 g	
투여개시 시 체중범위	32.72 - 36.35 g	
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.	

[그림 3-17] 소핵시험 동물정보

㉠ 검역 및 순화

- 입수 시 체중을 측정하고 7 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰고, 순화 기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공함. 동물 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 검토한 결과, 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었음.

㉡ 식별

- 동물은 순화기간에는 개체식별카드로, 투여 및 관찰기간에는 Ear punch를 사용하는 표식법을 사용하여 식별하였음. 사육상자에는 용량별로 개체식별카드를 부착하여 식별하고, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였고, 사육실 입구에는 동물실 사용 기록지를 부착하였음.

㉢ 실험동물윤리규정

- (주)캠온 비임상연구소는 AAALAC(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 2010) 인증을 획득하였으며, 본 시험은 실험동물운영위원회에 의해 승인되었음 (심의번호: 14-M220).

② 사육환경

㉠ 환경조건 및 측정

- 동물은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10 - 20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등 - 오후 8 시 소등) 및 조도 150 - 300 Lux로 유지되는 (주)캠온 비임상연구소 제2동물사육구역 13 호실에서 사육하였음. 온도와 상대습도는 매시간 컴퓨터 시스템을 이용하여 측정하고, 환기 횟수 및 조도는 정기적으로 측정하였음. 사육기간 동안 동물실의 온도 및 상대습도는 일평균 21.0 - 22.0 °C 및 53.9 - 58.6 % 였고, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었음.

㉡ 사료, 물, 깔개 및 오염물질 검사

- 사료는 TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN

RODENT DIET (2918C, Harlan Laboratories Inc., USA)를 (주)두얼바이오텍(서울특별시 서초구 바우피로 91)으로부터 공급받아 급이기에 넣고 자유섭취 하도록 함. 사료의 ‘성분분석 성적서’를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었음. 물은 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 지하수를 폴리카보네이트 제 음수병에 넣고 자유섭취 하도록 하였음. 수질검사는 경기도보건환경 연구원(경기도 수원시 장안구 파장천로 95)에서 수행하였고, 먹는물 수질 기준에 적합하였음. 종이 깔개를 부조(경기도 광주시 오폭읍 문형산길 165)로부터 공급받아 고압증기멸균 후 사용하였음. 깔개의 ‘오염물질 분석성적서’를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었음.

㉔ 사육상자 및 사육밀도

- 폴리카보네이트 사육상자(W 170 x L 235 x H 125 mm)에서 검역 및 순화기간, 투여 및 관찰기간동안 1 마리/사육상자로 수용하였음.

㉕ 사육관리

- 사육상자 및 깔개와 물병은 주 1 회 교환하였음.

(라) 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

① 시험군 구성

시험군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)	투여일수	투여경로
G1	M	6	1-6	10	0	2	경구
G2	M	6	7-12	10	1250	2	경구
G3	M	6	13-18	10	2500	2	경구
G4	M	6	19-24	10	5000	2	경구
G5	M	6	25-30	10 (mL/kg)	70 (mg/kg)	1	복강

G1: 음성대조군(멸균주사용수)
 G2-G4: 시험물질 투여군
 G5: 양성대조군(Cyclophosphamide monohydrate)

[그림 3-18] 소핵시험 시험군 구성

② 투여량의 설정

- 투여량을 결정하기 위하여 동일종 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험 ((주)켄온 시험번호: 14-MG-154P)을 실시하였음. 예비시험에서 시험물질 용량을 1250, 2500 및 5000mg/kg/day로 설정하여 용량당 암수 각 3 마리에 2 일간 투여하고, 투여일 포함 4 일간 관찰하였음. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며 성별에 따른 현저한 독성의 차이도 없었음. 따라서 본 시험에서는 수컷 동물을 사용하며, 예비시험 결과에 따라 체중을 기준으로 5000mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로하여 ‘시험군 구성’표와 같이 시험군을 구성하였음.

③ 군분리

- 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하였고, 평균에

가까운 동물들을 선택하여 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 무작위 분배하였음.

④ 투여

시험동물질	
투여경로 및 선택이유	경구투여, 임상예정경로를 적용하였다.
투여횟수 및 기간	1 회/일, 약 24 시간 간격으로 2 일간, 14:52 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다(10 mL/kg/day).
투여방법	경구 투여용 증대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여 하였다.
양성대조동물질	
투여경로 및 선택이유	일반적으로 채택되는 복강투여로 하였다.
투여횟수 및 기간	시험동물질의 2 회차 투여일에 1 회 투여하였다. 14:55 이전에 투여하였다.
투여액량 산출	투여일에 측정된 체중을 기준으로 산출하였다(10 mL/kg).
투여방법	소독용 알코올을 이용하여 투여할 부위를 소독한 후 26 G 주사침을 이용하여 복강에 투여하였다.

[그림 3-19] 소핵시험 투여방법

(마) 관찰 및 검사

① 일반증상

- 다음 표와 같이 일반증상을 관찰하여 개체별로 기록하였음.

기간	증상관찰
순환기간	매일 1 회 증상 관찰
Day 1: 투여 1 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 2: 투여 2 회차	투여 전, 투여 직후 및 투여 1 시간 후에 증상관찰
Day 3: 부검일	부검 전 1 회 증상관찰

[그림 3-20] 소핵시험 증상 관찰

② 체중

- 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여일 및 검체 제작일에 측정하였음.

③ 골수검체 제작

- 골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작하였음. 검체 제작시기는 일반적으로 적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24 시간 후로 하였음.

㉠ 각 마우스를 CO2로 흡입 마취시켜 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을

- 적출해 23 G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum 으로 골수를 씻어내려 현탁하였음.

㉡ 세포현탁액을 1000 rpm으로 5 분간 원심분리하였음.

㉢ 상등액을 제거한 후 침전된 골수 세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5 분간 고정하였음. 검체는 각 동물당 2 매씩 제작하였음.

㉣ 고정과 건조가 끝난 검체는 염색/계수 전까지 보관장에 보관하였음.

④ 형광관찰법

㉠ 각 동물당 도말상태가 양호한 1 매의 검체를 선정하여, 계수자가 내용을 알 수 없도록 미리 코드화하였음.

㉔ 형광염색액(Acridine orange 액, 이하 AO액)의 조제는 Hayashi (1983)의 방법을 응용하여, acridine orange base (CAS No. 494-38-2) 0.05 % 수용액을 Sorensen buffer (pH 6.8)로 1:4 (v/v) 희석하여 조제하였음.

㉕ 각 검체는 코드순으로 염색하되, 해당 검체의 계수 직전에 실시하였음.

㉖ 검체에 AO액 적량을 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 다음 2 분 후에 염색상태를 확인하고, 적절한 염색상태가 되었을 때 계수를 시작하였음. 계수는 400 배의 배율로 실시함.

㉗ 형광계수에는 형광현미경(Nikon model Ni-U, B-2A fluorescence filter set)을 이용하였고, 소핵의 형태적인 판별은 Hayashi (1983)에 따랐음.

㉘ 다염성적혈구(PCE)는 적색형광으로, 정염성적혈구(NCE)는 형광이 거의 없으며 어두운 회색으로 보였음. 소핵이 있을 경우 적색 바탕에 녹색점으로 나타났음.

⑤ 소핵의 계수 및 결과의 표시

- 동물당 2000 개의 PCE를 계수하면서 그 중 소핵을 가진 PCE (MNPCE)의 수를 계수하였음. 소핵 출현 빈도는 개체당 2000 개의 PCE에서 관찰되는 MNPCE 수의 평균 \pm 표준편차로 나타내었음. 소핵 유무에 상관없이 합계 500 개 이상의 적혈구 (PCE+NCE)를 계수하여 E:RBC 비율을 산출해 세포독성의 지표로 하였다. 이 비율은 $PCE/(PCE+NCE)$ 로 산출하였음.

⑥ 타당성 기준

- 다음의 조건을 만족하였을 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정함.

㉑ 부검시 모든 군에서 5 마리 이상의 동물이 생존할 것.

㉒ 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성 대조군의 20 % 이상일 것.

㉓ 2000 개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 음성대조군은 평균 10.0 (0.5 %) 이하, 양성대조군은 평균 50 (2.5 %) 이상일 것.

(바) 통계 분석 및 판정

① 통계 분석 프로그램

- 시험 결과의 통계분석에는 SPSS (ver. 10.1K) 프로그램을 사용하였음.

② 결과의 평가 및 해석

㉑ 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하며 유의수준은 $P<0.05$ 로 설정하였음. 소핵 유발 빈도에 대하여는 순위화한 데이터를 이용하여 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test를 실시하였음. 그 결과 음성대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았음. 음성대조군과 양성대조군의 자료는 Mann-Whitney U-test로 유의성을 검정하였음. PCE:RBC 비율 및 체중에 대하여는 자료의 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였음. 분산의 동질성은 Levene test로 검정하였음. 그 결과 시험물질 투여군의 PCE:RBC 비율에서 음성대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았음. 음성대조군과 양성대조군의 평균의 차이는 독립표본 T-test로 분석하였음.

㉒ 판정기준

- 투여군의 PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판정하였음. 시험물질 투여군에서

MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며 용량의존적으로 증가하거나, 한 용량 이상에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 때 양성으로 판정하였음. 그러나 통계학적인 유의성을 양성판정의 유일한 근거로 삼지는 않으며, 생물학적 연관성 또한 고려하였음.

(2) 결과

(가) 소핵 유발빈도 및 세포독성 (그림 3-21)

- 개체당 2000 개의 PCE에서 관찰된 소핵을 가진 PCE (MNPCE) 빈도는 음성 대조군 (0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 0.33, 0.67, 1.17 및 1.50 이었음. 시험물질 투여군의 소핵 빈도에 대하여 음성 대조군과의 차이를 조사한 결과, 모든 군에서 통계학적으로 유의한 증가는 나타나지 않았음. 한편, 양성대조군에서는 소핵 빈도가 57.83 으로, 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났음(P<0.01). 세포독성의 지표인 PCE:RBC 비율은 음성대조군 (0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day 투여군 순으로 평균 0.56, 0.54, 0.54 및 0.56 로, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 변화는 없었음. 한편 양성대조군에서는 PCE:RBC 비율이 0.42 로, 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소가 나타났음 (P<0.01).

Table 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio - summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	MNPCE/2000 PCE (Mean±SD)	PCE:RBC Ratio (Mean±SD)	(% Control)
0	6	0.33 ± 0.52	0.56 ± 0.01	100
1250	6	0.67 ± 0.82	0.54 ± 0.02	96
2500	6	1.17 ± 0.75	0.54 ± 0.03	96
5000	6	1.50 ± 0.55	0.56 ± 0.03	100
CPA 70 (mg/kg)	6	57.83 ± 5.91**	0.42 ± 0.02**	75

Test article: 알로에추출물 등 복합물

Appendix 1. Observations of micronucleus and PCE:RBC ratio – individual animal data

Dose (mg/kg/day)	Animal ID	MNPCEs/ 2000 PCEs	Number of PCE / NCE	PCE:RBC Ratio
0	1	1	273 / 227	0.55
	2	0	278 / 222	0.56
	3	0	289 / 211	0.58
	4	0	278 / 222	0.56
	5	1	289 / 211	0.58
	6	0	281 / 219	0.56
1250	7	0	273 / 227	0.55
	8	1	256 / 244	0.51
	9	0	271 / 229	0.54
	10	2	275 / 225	0.55
	11	0	266 / 234	0.53
	12	1	281 / 219	0.56
2500	13	0	276 / 224	0.55
	14	2	247 / 253	0.49
	15	1	278 / 222	0.56
	16	2	277 / 223	0.55
	17	1	281 / 219	0.56
	18	1	262 / 238	0.52
5000	19	2	275 / 225	0.55
	20	1	280 / 220	0.56
	21	2	289 / 211	0.58
	22	1	291 / 209	0.58
	23	2	246 / 254	0.49
	24	1	287 / 213	0.57
CPA 70 (mg/kg)	25	52	205 / 295	0.41
	26	53	221 / 279	0.44
	27	57	211 / 289	0.42
	28	56	216 / 284	0.43
	29	61	198 / 302	0.40
	30	68	210 / 290	0.42

[그림 3-21] 소핵 유발빈도 및 세포독성

(나) 체중(그림 3-22)

- 각 군간의 체중을 비교한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

Table 2. Body weights of mice – summary

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	Body weights (g) at the time of		
		1 st Admin.	2 nd Admin.	Sacrifice
0	6	34.77 ± 1.22	35.24 ± 1.26	34.80 ± 1.36
1250	6	34.68 ± 1.29	35.22 ± 1.47	34.80 ± 1.41
2500	6	34.15 ± 0.65	34.36 ± 0.91	34.32 ± 0.75
5000	6	34.68 ± 1.23	35.48 ± 1.38	35.22 ± 1.48
CPA 70 (mg/kg)	6	34.64 ± 0.87	35.44 ± 1.30	35.11 ± 1.18

Test article: 알로에추출물 중 복합물

Appendix 2. Body weights of mice – individual animal data

BODY WEIGHTS (g)				
Dose (mg/kg/day)	Animal ID	1 st dosing	2 nd dosing	Sacrifice
0	1	32.94	33.03	32.55
	2	34.27	34.98	33.89
	3	34.07	35.29	35.02
	4	35.32	35.56	35.45
	5	35.95	35.72	35.52
	6	36.05	36.87	36.34
1250	7	32.72	33.63	33.05
	8	34.08	33.91	34.09
	9	34.13	34.38	33.89
	10	35.47	35.67	35.33
	11	35.34	36.59	35.45
	12	36.35	37.15	37.01
2500	13	33.79	33.53	34.01
	14	33.26	33.42	33.17
	15	34.71	34.57	34.77
	16	33.70	33.81	33.94
	17	34.82	35.19	34.88
	18	34.62	35.61	35.17
5000	19	33.20	33.75	33.36
	20	33.23	33.79	33.53
	21	34.80	36.14	35.65
	22	35.15	35.79	36.47
	23	35.48	36.56	35.44
	24	36.23	36.87	36.89
CPA 70 (mg/kg)	25	33.59	33.80	34.26
	26	33.66	34.02	33.39
	27	34.58	35.42	35.71
	28	35.39	36.65	35.79
	29	35.68	36.91	36.65
	30	34.91	35.83	34.83

[그림 3-22] 소핵시험 체중변화

(다) 일반증상(그림 3-23)

- 모든 생존동물에서 시험물질 투여로 인한 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 3. Observations of mice

Dose (mg/kg/day)	Animal No.	1 st Admin.			2 nd Admin.			Before Sacrifice
		BD	IPD	1-hr PD	BD	IPD	1-hr PD	
0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0
1250	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0
2500	12	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0
5000	17	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0
CPA 70 (mg/kg)	22	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	-	-	0	0	0	0
	26	0	-	-	0	0	0	0
CPA 70 (mg/kg)	27	0	-	-	0	0	0	0
	28	0	-	-	0	0	0	0
	29	0	-	-	0	0	0	0
	30	0	-	-	0	0	0	0

Appendix 3. Historical control data

(Dec 2012 – Mar 2014, SPF male ICR Mice, 8 weeks old at administration, AD staining)

All vehicle controls

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	0	0.34
Maximum	8	0.69
Mean	1.23	0.52
S.D.	1.28	0.07
No. of Values	125	

Methylcellulose (0.5 and 1 %)

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	0	0.47
Maximum	4	0.69
Mean	1.22	0.57
S.D.	1.04	0.05
No. of Values	23	

Positive controls (intraperitoneal administration)

	MNPCE/2000 PCE	PCE/RBC Ratio
Minimum	51	0.25
Maximum	109	0.50
Mean	66.23	0.38
S.D.	13.45	0.05
No. of Values	124	

Positive control article: Cyclophosphamide monohydrate [CAS No. 6055-19-2]

[그림 3-23] 소핵시험 일반증상

(3) 고찰 및 결론

- 본 시험에 적용한 용량범위 내에서, 개체 당 2000 개의 PCE를 대상으로 소핵을 가진 PCE를 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가는 없었으며, 양성판정 기준을 만족시키지 못하였음. 따라서 시험물질 알로에추출물 등 복합물은 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 사료됨.

3. 임상시험 : 알로에 추출물 등 복합물의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 미치는 효과

가. 임상시험 총괄표

- 연구범위 : “알로에추출물 등 복합물의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험”

품목		알로에추출물 등 복합물		
기능성		혈소판 응집 및 혈행 개선		
수행기관		세브란스병원 가정의학과 강희철 교수		
연구제목		알로에추출물 등 복합물의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주, 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험		
연구목적		본 인체적용시험의 목적은 하루 평균 흡연량이 10개비 이상인 남성 흡연자를 대상으로 알로에추출물 등 복합물을 섭취했을 때 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 있어 시험군과 대조군을 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위함이다.		
연구유형		인체적용시험	IRB 구성 및 승인	Y
연구설계		Double-blind (이중눈가림)	Randomized (무작위배정)	Placebo-controlled (위약대조)
대상자 선정기준		1) 만 20세 이상의 남성 흡연자로 하루 평균 흡연량이 10개비 이상인 사람 2) 스크리닝시에 혈소판 응집능이 70% 이상인 경우 3) 시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서 (Informed consent)에 작성한 사람		
시험디자인	대조군	Placebo, 1일 3회 식후 섭취/아침, 점심 3캡슐, 저녁 4캡슐		
	시험군	알로에추출물 등 복합물, 1일 3회 식후 섭취/아침, 점심 3캡슐, 저녁 4캡슐 (알로에추출물 등 복합물로서 1일 2000mg)		
	섭취기간	8주		
	식이조절	평소 식이습관 유지, 알로에 및 양과 관련 제품 섭취제한		

<p>바이오마커</p>	<p>1) 혈소판 응집능 평가 2) Serotonin 3) CRP 4) 혈액 응고 검사(blood coagulation test) : Prothrombin Time(PT), activated Partial Thromboplastin Time(aPTT) 5) 지질 검사(lipid test) : Total cholesterol, Triglyceride(TG), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol</p>																										
<p>시험결과</p>	<p>1) 임상시험 진행 현황</p> <table border="1" data-bbox="557 656 1327 987"> <thead> <tr> <th>Center</th> <th>세브란스병원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>IRB 승인일</td> <td>2013.07.26</td> </tr> <tr> <td>개시모임일</td> <td>2013.10.10</td> </tr> <tr> <td>첫 피험자 스크리닝일</td> <td>2014.01.07</td> </tr> <tr> <td>첫 피험자 등록일</td> <td>2014.01.14</td> </tr> </tbody> </table> <p>2) 피험자 등록 현황 (2014년 11월 24일 기준)</p> <table border="1" data-bbox="550 1108 1331 1503"> <thead> <tr> <th></th> <th>세브란스병원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>목표피험자 수</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>스크리닝</td> <td>72</td> </tr> <tr> <td>S/F</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>등록</td> <td>56</td> </tr> <tr> <td>중도탈락</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>진행 중</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>완료</td> <td>46</td> </tr> </tbody> </table> <p>3) 피험자 모집 광고 진행 현황</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원내 포스터 광고: 2013.12~진행중 - 웹사이트(알바몬) 광고: 2014.01.22~2014.02.21 - 벼룩시장 광고: 2014.03.06~2014.04.05 - 일산지역 5개 아파트 게시판 광고: 2014.03.07~2014.03.25 - 일간지(동아일보) 광고: 2014.04.10 - 대상자 모집광고 전단지 배포: 2014.04.18~2014.05.15 - 대상자 모집광고 포스터 부착(연세대): 2014.05.09~2014.05.15 - 무가지(메트로) 광고: 2014.07.24 	Center	세브란스병원	IRB 승인일	2013.07.26	개시모임일	2013.10.10	첫 피험자 스크리닝일	2014.01.07	첫 피험자 등록일	2014.01.14		세브란스병원	목표피험자 수	90	스크리닝	72	S/F	16	등록	56	중도탈락	7	진행 중	2	완료	46
Center	세브란스병원																										
IRB 승인일	2013.07.26																										
개시모임일	2013.10.10																										
첫 피험자 스크리닝일	2014.01.07																										
첫 피험자 등록일	2014.01.14																										
	세브란스병원																										
목표피험자 수	90																										
스크리닝	72																										
S/F	16																										
등록	56																										
중도탈락	7																										
진행 중	2																										
완료	46																										

	<ul style="list-style-type: none"> - 일간지(동아일보) 삽지 광고: 2014.08.21 - 대상자 모집광고 포스터 부착(연세대): 2014.09.11~ 								
향후 계획	<p>1) 향후 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험 진행 일정 <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">일정</th> <th style="text-align: center;">업무</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">현재 ~ 2014년 12월</td> <td>피험자 모집 완료</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">~ 2015년 02월</td> <td>임상시험 완료</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">~ 2015년 04월</td> <td>결과보고서 작성 및 제출</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> - 식품의약품안전처 기능성원료인정 신청 일정 : 2014년 12월 완료 <p>2) 피험자 모집 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원내 포스터, 온라인 광고(카페) : 수시 - 노인 복지회관 등 피험자 모집 협조 요청 	일정	업무	현재 ~ 2014년 12월	피험자 모집 완료	~ 2015년 02월	임상시험 완료	~ 2015년 04월	결과보고서 작성 및 제출
일정	업무								
현재 ~ 2014년 12월	피험자 모집 완료								
~ 2015년 02월	임상시험 완료								
~ 2015년 04월	결과보고서 작성 및 제출								

나. 알로에추출물 등 복합물의 임상시험

(1) 재료 및 방법

(가) 시험재료

① 시험식품 (알로에추출물 등 복합물)

- 주성분명 : 알로에추출물 등 복합물(Alonion)
- 성상 및 제형 : 경질 캡슐
- 함량 : 380mg/1캡슐(알로에추출물 등 복합물로서 373.2mg(텍스트린 제외 200mg))
- 보관방법 : 실온 밀봉
- 용법 및 용량 : 1일 3회 식후 섭취/아침, 점심 3캡슐, 저녁 4캡슐(알로에추출물 등 복합물로서 3732mg(텍스트린 제외 2000mg))
- 원재료 및 배합비율 : 1캡슐(380mg) 중

성분명	배합비(%)	함량(mg)
알로에추출물 등 복합물	98.2	373.16
이산화규소	0.9	3.42
스테아린산마그네슘	0.9	3.42
총합량	100	380

- 지표성분 규격 : 1) Quercetin : 0.3 mg/g 이상
2) Aloesin : 0.05 mg/g 이상

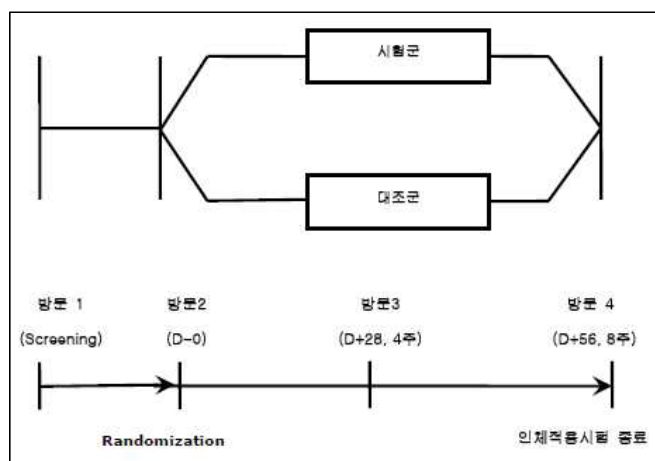
② 대조식품 (Placebo)

- 주성분명 : 결정셀룰로오스
- 성상 및 제형 : 경질 캡슐
- 함량 : 380mg/1캡슐
- 보관방법 : 실온 밀봉
- 용법 및 용량 : 1일 3회 식후 섭취/아침, 점심 3캡슐, 저녁 4캡슐
- 원재료 및 배합비율 : 1캡슐(380mg) 중

성분명	배합비(%)	함량(mg)
결정셀룰로오스	98.1	372.78
양과향분말	0.1	0.38
이산화규소	0.9	3.42
스테아린산마그네슘	0.9	3.42
총합량	100	380

(나) 시험방법

- ① 시험기관 : 세브란스병원 가정의학과 강희철 교수
- ② 섭취기간 : 8주
- ③ 시험방법 : 본 인체적용시험은 단일기관, 이중맹검, 무작위배정, 위약대조 평행 시험으로 디자인 하였다. 자의에 의해 본 시험의 동의서에 서명한 피험자가 등록되면 방문 평가를 통해 피험자 적합성 평가결과, 선정기준에 적합한 피험자에 한하여 2개군 중 한 군으로 무작위 배정된다. 배정된 피험자는 8주간 식품(알로에추출물 등 복합물 또는 placebo)을 섭취하게 된다.



[그림 3-24] 임상시험 시험방법

[인체적용시험 진행 일정표]

Period		Screening	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	4	8
Window period				+/- 7	+/- 5
서면동의서		✓			
인구학적조사		✓			
병력/약물투여력 조사		✓	✓		
이학적 검사		✓	✓	✓	✓
신체계측	신장		✓		
	체중		✓	✓	✓
활력징후(혈압, 맥박)		✓		✓	✓
식사지도 및 식이조사			✓	✓	✓
임상병리검사		✓			✓
심전도 검사		✓			✓
하루 평균 흡연량 평가		✓		✓	✓
유효성 평가	혈소판 응집능 평가	✓		✓	✓
	Serotonin		✓	✓	✓
	CRP		✓	✓	✓
	혈액 응고 검사		✓	✓	✓
	지질 검사		✓	✓	✓
피험자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
시험/대조식품 처방			✓	✓	
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인				✓	✓
병용약물 및 병용요법 확인				✓	✓

④ 피험자 수

	시험군	대조군	총 피험자수
최종 평가 예수(PP)	36	36	72
Drop-out(20%) 고려예수	45	45	90

⑤ 선정기준

- 만 20세 이상의 남성 흡연자로 하루 평균 흡연량이 10개비 이상인 사람

- 스크리닝시에 혈소판 응집능이 70% 이상인 경우
- 시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서 (Informed consent)에 작성한 사람

⑥ 제외기준

- 심근경색, 협심증, 출혈장애 등 심혈관 질환으로 약을 투여 중이거나 치료중인 사람
- 본 인체적용시험 전 2주 이내에 아스피린, 항응고제, 항혈소판제제 등을 투여했거나 투여하고 있는 사람
- 본 인체적용시험 전 2주 이내에 홍삼, 인삼, 청국장, 낫토 등과 같은 혈액 흐름에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취했거나 섭취중인 사람
- 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100mmHg 이상, 피험자 10분 안정 후 측정기준)
- 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dl 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우)
- 조절되지 않는 갑상선질환 등으로 치료중인 사람(주치의에 의해 본 인체적용시험에 참여가 가능하다고 판단되는 자는 참여 가능)
- 연구 시작 3개월 이내에 수술병력이 있는 사람
- Creatinine 연구기관 정상 상한치의 2배 이상인 사람
- AST(GOT), ALT(GPT) 연구기관 정상 상한치의 3배 이상인 사람
- 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 사람
- 본 인체적용시험 전 3개월 이내 다른 시험에 참여했거나 본 시험 기간 중에 다른 시험에 참가할 계획이 있는 사람
- 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 사람

⑦ 유효성 평가 항목 및 방법

㉠ 유효성 평가항목

- 혈소판 응집능 평가
- Serotonin
- CRP
- 혈액 응고 검사(blood coagulation test) : Prothrombin Time(PT), activated Partial Thromboplastin Time(aPTT)
- 지질 검사(lipid test) : Total cholesterol, Triglyceride(TG), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

㉡ 유효성 평가방법

- 혈소판 응집능 평가(Platelet Aggregation Test)
 - : 연세대 심혈관제품 유효성평가센터에서 ADP(10 μ M), Collagen(2 μ g/ml)을 inducer로 하여 채혈 후 2시간 이내에 aggregometer(Chronolog Co.)로 측정하며 혈액의 냉장, 냉동보관은 허용하지 않DMA. 피험자의 PRP(Platelet Rich Plasma)에 응집촉진물질을 넣어 응집 정도를 분석. 본 연구는 스크리닝 검사를 통해서 혈소판 응집능이 70% 미만인 자는 제외.
- Serotonin

: 혈액이 응고할 때 혈소판으로부터 혈청으로 방출되는 혈관수축작용을 하는 물질.

- CRP(C-Reactive Protein, C 반응성 단백)

: 폐렴알균(*Streptococcus pneumoniae*)의 표면 항원인 C 다당체(C-polysaccharide)와 반응하는 단백질로서 급성기 반응 물질(acute phase reactant)의 하나. 급성기 반응 물질이란 염증(감염, 자가면역질환 등)이나 조직 손상(외상, 수술, 심근경색, 종양)에 비특이적으로 반응하여 농도가 변하는 물질들을 가리키는 용어로 그 중 가장 대표적인 물질이 C 반응성 단백임.

- 혈액 응고 검사(Blood Coagulation Test)

- 출혈 질환에 대한 선별 검사로, 특히 혈소판과 응고인자 중 어느 것에 양적으로 또는 기능적으로 문제가 있는지 선별하는 검사

- PT(Prothrombin Time)는 외인성 및 공통성의 응고과정 이상을 검출하는 방법. 유전자 이상, 비타민 K 섭취 및 흡수 불량, 간세포장애, 파종성혈관내응고증후군(DIC) 등에서 연장됨.

- aPTT(activated Partial Thromboplastin Time)은 지혈기구의 이상이 어디에 있는지 조사하는 검사로 내인계 응고장애를 알 수 있음. 연장이 되면 응고인자량의 감소가 의심되고 단축된 경우 양의 증가가 의심됨. PT와 aPTT 모두 연장되는 경우는 fibrinogen 이상증, prothrombin 이상증, 파종성혈관내응고증후군(DIC) 등을 의심할 수 있음. PT는 정상이고 aPTT 연장일 경우 혈우병 등을 의심할 수 있음.

- 지질 검사(Lipid Test)

: 혈중 지질 성분들을 측정하여 이상지질혈증의 감별 진단 및 관상동맥질환의 위험도를 계산하는 검사를 말하며, Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride(TG)를 검사하게 됨.

⑧ 안전성 평가항목 및 평가방법

㉠ 안전성 평가항목

- 이상반응
- 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨 검사)
- 활력징후(맥박, 혈압), 신체계측(체중)
- 심전도 검사

㉡ 안전성 평가방법

- 이상반응

- 이상반응에 대한 정보는 무작위 배정방문 이후부터 피험자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색해야 함. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 피험자가 자발적으로 보고하거나 이학적 검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인될 수 있음. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용 시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 식품과의 인과관계, 인체적용시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함됨.

- 임상병리검사

- 방문 1, 4 에서 임상병리검사를 실시하여 피험자의 전신적인 건강상태를 평가. 시험자는 피험자로 하여금 검사 전 12시간 금식상태로 내원하도록 지시함. 검사 항목에는 다음이

포함됨. 단, 방문1의 임상병리검사는 스크리닝 방문 기준으로 7일 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능.

- 혈액학적 검사: RBC, WBC, Hb, Hct, Platelet, Seg. Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils
- 혈액화학적 검사: AST(GOT), ALT(GPT), Total Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, Na, K, Cl, Creatinine, BUN, Uric acid, γ -GTP
- 소변검사: SG, pH, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, WBC, RBC
- 주목할만한 임상병리학적 비정상치 기준을 벗어나는 임상병리검사 결과는 피험자의 증례기록서(CRF) 연구자 의견(Comments)란에 평가를 기재하고, 연구자가 필요하다고 판단하는 경우 재검사를 실시하여야 함. 임상병리학적 비정상치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 피험자의 증례기록서(CRF)의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력하여야 함.
 - 활력징후
- 방문 1, 3, 4에서 피험자가 안정된 상태에서 동일한 장비를 이용하여 최대한 동일한 시간대에 동일한 시험기관 담당자가 동일한 팔을 측정할 수 있도록 최선을 다하여 혈압과 맥박을 측정하여 기록함.
 - 심전도 검사
- 방문 1, 4 에서 심전도검사를 실시하여 모든 심전도 검사결과는 자격을 갖춘 의사가 실시해야 하며 증례기록서(CRF)에 기록해야 함. 피험자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과는 (주)네오뉴트라 모니터요원과 상의해야 함. 단, 방문1의 심전도 검사는 스크리닝 기준으로 3개월 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능함.

⑨ 통계분석방법

㉠ 일반적 원칙

- 본 인체적용시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety Set 분석, FAS(Full Analysis Set)분석과 PPS(Per Protocol Set)분석의 세 가지 형태로 이루어짐.
- Safety Set 분석은 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 피험자 집단을 대상으로 이루어짐.
- 본 인체적용시험에 무작위 배정을 받은 모든 피험자를 분석 대상으로 하는 원칙(ITT)에 따라 FAS 분석은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행한 피험자이며 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 이루어짐.
- PPS 분석은 FAS 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정제외기준 위반 등)이 없는 피험자 집단을 대상으로 이루어짐.
- 유효성에 대한 자료는 FAS 분석을 주 분석법으로 하고, PPS 분석을 추가적으로 실시. 영양분석에 대한 자료는 FAS 분석을 주 분석법으로 하고 안전성 및 인구학성에 대한 자료는 Safety Set 분석을 주 분석법으로 실시함.
- 결측치가 발생한 경우, 결측치가 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻어진 자료를 이용하여 보정(LOCF)하여 분석함.
- 본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(Mean)과 표준편차

(Standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 양측검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증함.

- 유효성 평가변수에 대한 분석방법으로 평가변수와 연관이 있는 피험자의 기저특성(공변량, 피험자가 시험식품을 섭취하기 전에 관찰되거나 측정된 일차 유효성 평가변수에 영향을 미칠 것으로 예상되는 변수)을 고려하여 분석하는 ANCOVA 를 포함하여 분석할 수 있음. Sub-set(group) analysis(소집단 분석)은 무작위배정이전 또는 치료시작 전의 피험자의 초기 특성으로 범주화하여 추가분석을 실시할 수 있음.

㉞ 유효성 변수에 대한 분석

- 시험식품의 섭취 전과 섭취 후의 평균 변화량에 대한 군간의 차이를 Two sample t-test 와 Wilcoxon rank sum test 를 이용하여 분석함. 군내 비교를 위해서는 Paired T-test를 실시함.

㉟ 안전성 변수에 대한 분석

• 이상반응

- 시험기간 동안 보고된 모든 이상반응에 대한 평가는 피험자의 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출함. 각 군간 이상반응이 발생한 피험자의 비율을 계산하고 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 비교 분석함.

• 임상병리검사

- 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내비교는 paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석함. 뇨 검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교함.

• 임상병리검사

- 활력징후, 신체계측 검사치에 대하여 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석함.

• 심전도 검사

- 심전도 검사 결과는 임상적 유의성에 따라 비정상과 정상으로 분류하여 섭취 전과 후의 변화에 차이가 있는지 McNemar test 를 이용하여 확인함.

(다) 결과

① 임상시험 진행 현황

Center	세브란스병원
IRB 승인일	2013.07.26
개시모임일	2013.10.10
첫 피험자 스크리닝일	2014.01.07
첫 피험자 등록일	2014.01.14

② 피험자 등록 현황 (2014년 11월 24일 기준)

	세브란스병원
목표피험자 수	90
스크리닝	72
S/F	16
등록	56
중도탈락	7
진행 중	2
완료	46

③ 피험자 모집 광고 진행 현황

- 원내 포스터 광고: 2013. 12 ~ 진행 중
- 웹사이트(알바몬) 광고: 2014. 01. 22. ~ 2014. 02. 21
- 벼룩시장 광고: 2014. 03. 06. ~ 2014. 04. 05
- 일산지역 5개 아파트 게시판 광고: 2014. 03. 07. ~ 2014. 03. 25
- 일간지(동아일보) 광고: 2014. 04. 10
- 대상자 모집광고 전단지 배포: 2014. 04. 18. ~ 2014. 05. 15
- 대상자 모집광고 포스터 부착(연세대): 2014. 05. 09. ~ 2014. 05. 15
- 무가지(메트로) 광고: 2014. 07. 24
- 일간지(동아일보) 삽지 광고: 2014. 08. 21
- 대상자 모집광고 포스터 부착(연세대): 2014. 09. 11. ~

④ 향후 계획

㉠ 임상시험 진행 일정

일정	업무
현재 ~ 2014년 12월	피험자 모집 완료
~ 2015년 02월	임상시험 완료
~ 2015년 04월	결과보고서 작성 및 제출

㉡ 식품의약품안전처 기능성원료인정 신청

: 2014년 12월 31일

㉢ 피험자 모집 방안

- 원내 포스터, 온라인 광고(카페) : 수시
- 노인 복지회관 등 피험자 모집 협조 요청

(다) 식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청 시 첨부될 자료 리스트

- ① 제출자료 전체의 총괄 요약본
- ② 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- ③ 제조방법에 관한 자료
- ④ 원료의 특성에 관한 자료

- ⑤ 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한자료 및 시험성적서
 - ⑥ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
 - ⑦ 안전성에 관한 자료
 - ⑧ 기능성 내용에 관한 자료
 - ⑨ 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
 - ⑩ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료
- 위 서류를 정리하여 2014년 12월까지 식품의약품안전처 개별인정 서류 접수 예정임

4. 알로에추출물 등 복합물의 시장 적용 제품 출시(부원료 사용)

- 현재 제2협동 기관인 주/김정문알로에는 개별인정 획득 전에 그간의 시험 data를 활용하여 "김정문 은행잎추출물 맥(현재로는 은행잎 추출분말 주성분의 건강기능성 식품)"제품에 알로에·양파 복합소재를 부원료로 사용하여 그동안 시험의 결과 data를 이용(알로에·양파 복합소재의 혈전용해에 대한 시너지 효과)한 제품을 출시함 (2013. 10)



[그림 3-25] 알로에 추출물 복합물 적용 제품 “맥”

- 본 "김정문 은행잎추출물 맥" 부원료로 사용된 본 연구의 알로에추출물 등 복합물(즉, 양파·알로에 복합소재)의 식품품목보고서는 다음과 같음 (그림 3-26).

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

성명	최 연 태	영년월일 600600-2390019
보고인	주소 서울시 서초구 서초동 1580-10번지	전화번호 02-405-0154
		휴대전화 010-5369-8385
명칭(영문) (주)김정문알로에		
명주소	소재지 전북 김제시 금구면 낙성리 427-3 (Tel: 063-547-9083)	
식품의 유형	기타가공품	영양신고 번호 제 2004 - 00003 호
제품명	말려, 양파 혼합 분말	
유통기한	제조일부터 2년	일(월, 년)
품질유지기한	제조일후	
원재료명 또는 성 분명 및 배합비율	말려	
제품정보	종도 용법	식품의 원료로 사용
보관방법 및 포장 재질	보관방법 : 실온보관 포장재질 : 알루미늄	
포장방법 및 포장 단위	포장방법 : 백포장 포장단위 : 1kg, 5kg, 10kg	
성상	미미, 이취가 있는 미황색 분말	
고열량·저열량 식 품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오	<input type="checkbox"/> 해당 없음
기타		
『식품의약품안전처령 제278호(2013. 10. 22)』 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.		
2013년 08월 22일		(인) 최연태 (인)
보고인 특별자치도지사 · 시장 · 군수 · 구청장 귀하		
취부서류	1. 제조당일당량서 1부 2. 식품위생법시행규칙이 정한 식품등의 표시기준 및 규격 요령서 1부 3. 식품의약품안전처장이 정하여 고시한 방법에 따라 영양성분표시방법을 설명하는 설명서 1부	
유의사항		
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.		

210mmx297mm(일반용지 80g/㎡ (제철종용))

[그림 3-26] 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

- 따라서 본 연구의 최종 결과인 알로에·양파 복합 소재의 개별인정획득(혈행개선 및 혈전용해에 도움)하면, 본 제품은 리뉴얼 계획을 갖고 있음 즉, 기존 "김정문 은행잎추출물 맥" ⇨ "알로에·양파 복합 소재"를 주성분으로 한 기능성 제품

5. 식품의약품안전처 개별인정신청을 완료함.

- 임상시험 결과가 아직 나오지 않은 상황이므로, 임상시험 결과를 제외한 나머지 서류를 첨부하여 개별인정신청을 우선 완료하였고 (2014년 12월 31일), 추후 임상시험 결과가 나오는 대로 추가서류를 제출 할 예정임.

[별지 제 1호 서식]

집 수 증		2015. 05. 26	
		접수일시 : 2014.12.31 17:34	
접수번호	2014-0458962	회사명	(주)김정문알로에
건 명	알로에추출물 등 복합물		
담 당 과	식품안전정책국 건강기능식품기준과	접수자	서경은
위 건명의 민원사안을 접수하였습니다.			

정렴하고 공정한 클린 식약처가 되겠습니다.

※ 식품의약품안전처는 귀하의 민원을 항상 신속하고 공정하게 처리하겠습니다.
 ※ 민원처리 공작사가 금품을 요구 또는 불공정하게 업무를 처리하거나 불친절한 경우
 우리 청 홈페이지(www.mfds.go.kr)나 감사담당관 직통전화 또는 야간콜(03-79-135, kfoig@korea.kr)로 알려주시기 바랍니다.
 ※ 모든 신고내용은 철저히 관리하여 귀하의 개인정보가 외부로 유출되지 않도록 하겠으며,
 창립하고 공정한 식품의약품안전처를 만들기 위한 소중한 자료로 사용하겠습니다.

[그림 3-27] 식품의약품안전처 개별인정신청 접수증

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 세부과제별 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2011)	[제1세부과제] 양파·알로에 복합 소재의 혈액순환 효능검증 및 기능 성물질의 기작연구	단독소재(양파 및 알로에)의 혈액순환 기능증진 효능 검증	100	- 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효능을 검증하였음. - 혈소판 세포독성을 검정하였음. - 혈전 동물모델을 이용한 항혈전 효능을 검증하였음.	
		양파·알로에 복합소재의 혈액순환 기능증진 효능 검증	100	- 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효능을 검증하였음. - 혈소판 세포독성을 검정하였음. - 혈전 동물모델을 이용한 항혈전 효능을 검증하였음.	
		양파·알로에 복합소재의 혈액순환 기능증진 기작 연구	100	- TXA2 생성 억제 효능 검증을 하였음. - 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 기작을 관찰하였음.	
	[제1협동과제] 양파·알로에 복합 소재의 표준화 및 품질관리 기준확 립	기능/지표 성분을 설정	100	- 알로에의 기능/지표성분 확립하였음. : Aloesin, Aloin - 양파의 기능/지표성분 확립하였음. : Quercetin	
		원료와 제조공정을 표준화	100	- 표준화를 위한 시험법 정립하였음. - 시험법의 타당성 증명하였음. - 원재료의 표준화 완료하였음. - 제조공정 표준화 진행하였음.	
		복합 추출물을 제조	100	- 알로에·양파 추출법 확립하였음. - 알로에·양파 추출물 제조하였음. - 시너지 효과를 보이는 추출물 비율 확립하였음.	
		품질 관리기준을 확립	100	- 기준규격 설정을 진행하였음. : 성상, 기능/지표성분 함량, 유해물질	
	[제2협동과제] 양파·알로에 복합 소재의 기능성 원 료 인정을 위한 안전성 실험			100	- 복합소재에 대한 시장조사를 완료하였음.
		기능성 원료 인정 위한 안전성 실험		100	- 복합소재의 제형연구를 통한 시제품을 개발하였음.
				100	- 복합소재의 시제품의 규격기준 실험을 진행하였음. - 봉해도, 안정성 테스트 완료함.
				100	- 복합소재에 대한 독성시험에 대한 실험 디자인을 완료하였음.

2차년도 (2012)	[제1세부과제] 양파·알로에 복합 소재의 혈액순환 효능검증 및 기능 성물질의 기작연 구	Pilot-scale에서 양 파·알로에 복합소재 의 혈액순환기능 증 진 효능 검증	100	- 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효능을 검증하였음. - 혈전 동물모델을 이용한 항혈전 효능을 검 증하였음. - 출혈지연반응에 대한 부작용을 검증하였음.
		실제 제조공정을 통 해 얻어진 양파·알로 에 복합소재의 혈액 순환기능 증진 효능 검증	100	- 콜라겐 및 트롬빈 유도 혈소판 응집 억제 효능을 검증하였음. - 혈전 동물모델을 이용한 항혈전 효능을 검 증하였음. - 출혈지연반응에 대한 부작용을 검증하였음.
		양파·알로에로부터 혈 액순환기능 증진 기능 성 물질 의 제조공정	100	- 혈소판 응집에 대한 기능성 물질의 응집억 제 효능을 검증하였음. - 동물모델에서 항혈전 효능을 검증하였음.
		세포모델에서 기능성 물질의 작용기작 연 구	100	- 콜라겐 유도 혈소판 응집 기작을 연구하였 음 (TXA2, ATP 등).
	[제1협동과제] 양파·알로에 복 합소재의 표준화 및 품질관리 기준 확립	Pilot-scale에서 양 파·알로에 복합 추 출물 제조	100	- 실제 제조공정에 들어가기 전, 실험실에서 가능한 최대한의 양으로 추출물 제조함으 로써 Pilot scale-up하였음.
		Pilot-scale에서의 제 조공정 수율 및 지표 성분의 함량측정	100	- 실제 제조공정에서 일어날 수 있는 지표성 분 함량변화를 예측하기 위하여 Pilot-scale 에서의 제조공정별 수율 및 지표성분 함량 을 측정함.
		실제 제조공정을 통 해 얻어진 추출물의 제조수율 및 지표성 분의 함량 측정	100	- 실제 제조공정에서 얻어진 추출물의 제조 공정 수율 및 지표성분함량 분석하고 제 조공정 표준화를 진행하였음.
		실제공정에서 얻은 추출물에 따른 지표 성분 시험법의 문제 점 해결 및 재정립	100	- 실제 공정에서 얻어진 복합소재의 시험결 과와 기존 시험결과간의 차이가 발생하여 시험법을 재정립함.
		수정된 시험법과 추 출법에 대한 원재료 표준화	100	- 최종적으로 수정한 시험법과 추출법을 토 대로 양파·알로에 원재료 표준화
	[제2협동과제] 양파·알로에 복합 소재의 기능성 원 료 인정을 위한 안전성 실험	양파·알로에 복합소재 의 대량추출 및 임상 시험 시제품 제작	100	- 양파·알로에 복합소재의 추출조건 Lab scale에서 대량 scale 조건 확립하였음.
		독성검사 실시	100	- (주)캠온에서 독성검사 완료하였음.
		임상시험 실시	90	- IRB 승인 완료하였음. - 현재 80% 피험자 모집이 완료되었음.
		시장 적용제품출시	100	- 2013년 10월에 “김정문 맥”을 출시

3차년도 (2013)	[제1세부과제] 양파·알로에 복합 소재의 혈액순환 효능검증 및 기능 성물질의 기작연 구	양파의 심혈관질환 의약소재화 연구	100	- 양파의 심혈관질환 보호효능을 확인하였음. - 양파의 심근세포 사멸 억제효능을 관찰하였음. - 알로에의 심근세포 사멸 억제효능을 관찰하였음.
		양파의 기능성물질 의 심혈관질환 의약 소재화 연구	100	- 퀴르세틴의 심혈관질환 보호효능을 관찰하였음. - 퀴르세틴의 심근세포 사멸 억제효능을 관찰하였음.
		세포모델에서 심혈 관질환 보호기전 규 명	100	- 심근세포 사멸 기작을 관찰하였음. - 양파의 심근세포 보호 기작을 규명하였음. - 퀴르세틴의 심근세포 보호 기작을 규명하였음.
		동물모델에서 심혈 관질환 보호기전 규 명	100	- 심혈관질환 유도 기작을 관찰하였음. - 양파의 심혈관질환 개선 기작을 규명하였음. - 퀴르세틴의 심혈관질환 개선 기작을 규명하였음.
	[제1협동과제] 양파·알로에 복 합소재의 지표성 분 표준화를 통한 품질관리기준 확 립	양파·알로에의 유 용성분 profiling	100	- 추출물을 용매 분획법 (Hexane, ethyl acetate, butanol, H ₂ O)으로 분획물을 제조함.
		양파·알로에의 유 용성분 및 분획의 시너지 효과 검증	100	- DPPH, FRAP, Total Phenol, 혈소판 응집 억제율을 통해 생리활성 정도를 확인함.
		양파·알로에의 시 너지 효과 유발 물 질 기작 규명	100	- HPLC, NMR을 통하여 복합소재의 활성을 확인함.
	[제2협동과제] 양파·알로에 복합 소재의 기능성 원 료 인정을 위한 안전성 실험	개별인정신청을 위 한 시장조사	100	- 개별인정신청을 위한 기타 자료수집 및 시장조사를 완료하였음.
		개별인정신청	80	- 임상시험이 완료된 후 개별인정신청을 진행 할 예정임.
		개별인정형 제품 개 발 착수	80	- 현재 “김정문 맥” 제품에서 개별인정 승인을 받으면 추가하여 제품 개발을 진행할 예정임.

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 양파·알로에의 기능/지표성분을 확립
- 양파·알로에 복합소재의 원료와 제조공정의 표준화 및 기준규격 설정을 통한 품질관리기준 확립
- 추출물을 용매 분획법으로 분획물(Water, Butanol, Hexane, Ethyl acetate)을 제조하고 각각의 활성(DPPH, FRAP, Total Phenol, 혈소판 응집 억제) 측정 DB 구축
- 양파·알로에 복합소재의 생리활성 연구를 통해 혈액순환기능 증진 건강기능 제품 개발
- 개별인정 획득을 통한 건강기능제품산업의 발전과 양파와 알로에 재배 농가의 소득 증대
- 양파와 알로에의 용매별, 추출 분획별, 조건별 혈소판 응집 억제 효능 관찰을 통한 기능 소재의 DB 구축
- 기존 혈행개선관련 제품과 비교할 때, 혈행개선은 뛰어난 반면 출혈지연과 같은 부작용이 적어 타 원료와의 경쟁력 상승
- 복합소재의 독성시험과 인체임상시험을 통해 효능과 안전성에 대한 과학적 근거가 확보된 우수한 건강기능제품의 소재 개발
- 과잉생산 및 폐기 양파 및 알로에 가공을 통한 가격 안정화
- 복합소재의 기능성 성분 추출, 가공, 추적 기술, 성분 안정화 기술 확보
- 알로에 재배 확대에 의한 작목 다양화 및 알로에 농가 소득 증대
- 새로운 고기능성 건강 기능성 제품 수출 증대를 통한 수입대체 효과
- 기능성 제품 개발업체에 산업정보 및 기반 기술 제공
- 양파 생산 가공 유통 시장의 질적 양적 확대 가능

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구논문 발표 및 지적재산권 확보

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분	과제 연관성
		주저자	교신저자	공동저자					
2012	Chrysophanol-8-O-glucoside, an anthraquinone derivatitive in Rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities	서은지	정이숙	이선미	Journal of Pharmacological Science	118(2):245-54	국외	SCI	항혈소판 실험조건 확립
2013	Onion (Allium cepa) extract attenuates brain edema	현수왕	정이숙	장미박세원 김은주	Nutrition	29(1):244 - 249	국외	SCI	특허출원을 위한 양파의 기능성 확대
	Zizyphus jujuba and its active component jujuboside B inhibit platelet aggregation	서은지	정이숙	-	Phytotherapy Research	27(6):829-34	국외	SCI	항혈소판 실험기법 확립
	Glutathione depletion by L-Buthionine-S,R-Sulfoximine induces apoptosis of cardiomyocytes through activation of PKC-delta	김영애	정이숙	김미영	Biomolecules & Therapeutics	21(5):358-63	국내	SCIE	의약소재화를 위하여 심장질환 개선기능 실험기법 확립
	Gadd45beta is transcriptionally activated by p53 via p38alpha-mediated phosphorylation during myocardial ischemic injury	김영애	정이숙	김미영 유혜연 미슈라	Journal of Molecular Medicine JMM	91(11):1303-1313	국외	SCI	의약소재화를 위한 기전규명 조건 확립
	Ultrasound-assisted extraction of quercetin from onion solid wastes	장미	박세원	시부라 레오니드 금영수 김황연	Int J Food Sci & Technol	48(2):246-252	국외	SCI	양파 기능성분 분리조건 확립
	Quantitative analysis of flavonoids, sugars, phenylalanine and	카비타	박세원	아세과 고은영 이을태	Journal of Food Science and	DOI 10.1007/s13197-013	국외	SCI	양파의 분석조건 확립

	tryptophan in onion scales during storage at ambient temperature.				Technology	-1225-2			
	Evaluation of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of eighteen Korean onion cultivars: A comparative study	카비타	박세원	아세과 김설 고은영 이을태	Journal of the Science of Food and Agriculture (Revision)	Volume 94, Issue 8, pages 1521 - 1529, June 2014	국외	SCI	양파의 기능성분에 대한 활성도 규명
	Change in chemical composition of onion (Allium cepa L. cv. Sunpower) during post cold-storage under ambient conditions	카비타	박세원	아세과 김설 고은영	New Zealand Journal of Crop & Horticultural Science	Volume 42, Issue 2, 2014	국외	SCI	양파의 저장별 성분변화 추정 규명
2014	Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood-brain barrier	현수왕	정이숙	-	Biochemical and biophysical research communications	450(4):1638-1642	국외	SCI	양파의 의약소재를 위한 기능성 확대 및 기작 규명
	Inhibition effect of allyl isothiocyanate on platelet aggregation	이도섭	정이숙	김태호	Journal of agricultural and food chemistry	62:7131-7139	국외	SCI	항혈소판 실험기법 확립
	양파와 알로에 복합물이 혈소판 응집에 미치는 영향	이보경	정이숙	이도섭 하소영 박세원	약학회지	58(5):322-327	국내	-	개별인정신청을 위한 양파와 알로에 복합소재의 항혈소판 효능 규명
	Extraction of Antioxidants from Aloe vera Leaf Gel: A Response Surface Methodology Study	김설	박세원	레오니드 아세과 고은영 카비타	Food Analytical Methods	(2014) 7:1804 - 1815	국외	SCIE	알로에의 항산화 기능성분 추출법 확립

2. 지적재산권 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	양파 고체 부산물로부터 고함량의 퀴르세틴을 추출하는 방법	박세원 장미 금영수 고은영 문소현 김황연 레오니드 아스닌	대한민국	10-2012-001658 1
2013	항산화능이 강화된 알로에 베라 추출물의 제조 방법	박세원 김설 고은영	대한민국	10-2013-016697 5

3. 학술회의 발표 성과

발표일시	발표제목	발표자	국내외 구분	학술대회명	장소
2012년 10월 23일	The effect of onion extract on platelet aggregation, cell death and inflammation according to storage periods and condition	이도섭	국내	대한약학회	서울
2012년 8월 5일	Allium cepa attenuates brain edema and BBB dysfunction	정이숙	국외	World congress of food science and technology	브라질

제 2 절 홍보 및 사업화 전략

1. 홍보성과

일시	홍보유형	홍보내용	매체명	성과자
2014년 2월 20일	중앙TV방송	양파의 혈행개선효능	SBS (SBS 생활경제)	정이숙

2. 우수성과 지목

- 2014년 6월 고부가가치식품기술개발사업의 대표 “과학적 우수성과”로 지목됨.

일시	성과구분	내용	사업명	성과자
2014년 6월	우수성과	과학적 성과	농기평 고부가가치식품기술개발사업	정이숙

3. 사업화 전략

가. 실용화 및 산업화 계획

(1) 제품화

- "알로에추출물 등 복합물"의 개별인정형 획득 전에 본 소재를 부형료를 이용하여 '김정문은행잎추출물 맥'이라는 제품명으로 제품 출시(2013. 10) (그림 1)



[그림 1] (주)김정문알로에 “은행잎추출물 맥”

- 제품의 사양 및 표기사항 (표 1)

[표 1] 제품 표기사항

제품명	김정문은행잎추출물 맥(脈)
원재료명	은행잎추출물(기능성원료), 알로에양파복합물(KJM 개발원료) 등
용량	475mg *180 (85.5g)/하드캡셀
섭취방법	1일 3회 1회 1캡셀
가격	250,000원/2개월
셀링포인트	1. 알로에양파혼합분말(KJM 생명과학연구소 개발 원료) 2. 의약품으로 먼저인정받은 은행잎추출물 함유 건강기능식품

(2) 향후 기술이전 및 상품화 계획

- 양파·알로에 복합소재에 대한 임상시험 결과가 긍정적이고, 본 연구의 최종 목표인 "알로에추출물 등 복합물" 개별인정획득(혈행개선 및 혈전용해에 도움)을 할 경우, 주관연구기관은 (주)김정문알로에와의 유상기술이전을 통해 개별인정형 건강기능식품으로 제품을 생산할 계획을 갖고 있음.

나. 교육 및 홍보 계획

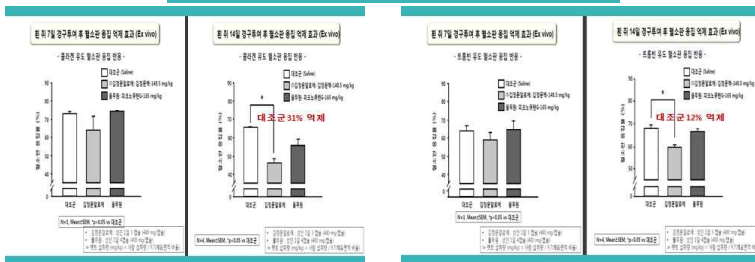
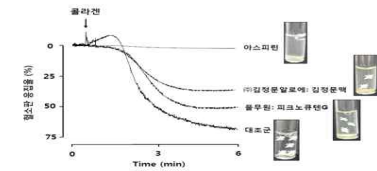
(1) 교육 및 홍보 (김정문은행잎추출물 맥(脈))

(가) 교육 교안

- 제2협동기관인 (주)김정문알로에는 전국 400여개 대리점을 운영하는 방판업체로서 1차 고객인 사업자 및 카운슬러를 대상으로 제품 교육을 통하여 수익을 창출하고 있음 (그림 2).



(가) 김정문알로에 제품의 펠소판 증집 억제 효능



[그림 2] 방문판매 사원들을 위한 교육 내용

(나) 홍보

① 언론 홍보

- 주/김정문알로에는 굿윌 커뮤니케이션즈 광고 대행업체와 광고, 홍보를 하고 있음 (그림 2).



[그림 2] 언론홍보

- 따라서 김정문은행잎추출물 맥의 출시에도 다음과 같이 언론 홍보를 실시하였음 (표 2, 그림 3).

[표 2] 제품 언론홍보 (총: 온라인 7건/ 지면 1건)

No.	계재일	매 체	지면	제목
1	2013.11.5	스포츠서울	인터넷	'루비반지' 제작지원 기념 김정문알로에 '행운의 맥을 잡아라'
2	2013.11.5	포커스	인터넷	[what's up] 건강식품 사고 이온수기 받자
3	2013.11.6	포커스	문화	[what's up] 건강식품 사고 이온수기 받자
4	2013.11.5	EBN	인터넷	김정문 알로에, '행운의 맥을 잡아라'
5	2013.11.5	코스메틱매니아	인터넷	김정문 알로에, '행운의 맥을 잡아라'
6	2013.11.5	푸드투데이	인터넷	김정문 알로에 '루비반지'제작 기념 이벤트
7	2013.11.5	bnt 뉴스	인터넷	[뷰티이벤트]'론칭기념'다채로운 이벤트에 주목
8	2013.11.5	아크렌	인터넷	김정문 알로에 '루비반지'제작 기념 이벤트



[그림 3] 제품 언론홍보

- 따라서 본 알로에 · 양파 복합 소재에 대한 개별인정 획득 및 제품 리뉴얼 따라 각종 매체에 홍보를 할 예정임.(개별인정획득 홍보 및 제품 출시에 대한 홍보 각각)

② 제품설명회

- 주/김정문알로에의 판매형태는 방문판매 형태의 판매업체로서 전국에 대리점 400여점 및 카운슬러 약 5,000여명이 활동하는 업체임.
- 따라서 알로에 · 양파 복합 소재를 주성분으로 한 "혈행개선 및 혈전용해에 도움"을 다는 기능성 표현의 신제품을 출시하여 각 권역별 및 지점에 본사의 교육부, 마케팅 및 연구소의 직원이 제품 설명을 할 예정임.

다. 추가연구(타 제품개발)를 통한 제품 확산화 계획

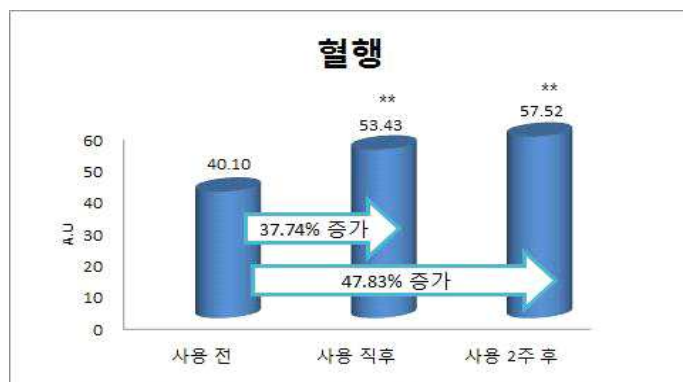
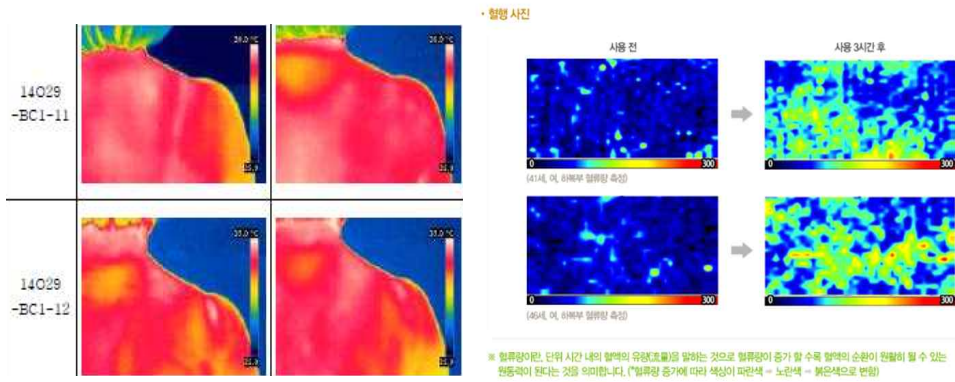
- 건강기능성식품의 제품을 생산 판매하는데 있어서 제품의 활성화를 위해서는 제품을 구매할 경우 이에 상응하는 다른 제품이든 서비스등 1+1를 고객이 원하는 실정임. 따라서 제2합동기관인 주/김정문알로에는 본 연구의 주 기능인 "혈행개선에 도움"에 주는 서비스 차원으로 '큐어히팅크림' 개발 이에 따른 일시적인 피부 온도 상승과 혈행개선에 대한 인체 적용시험을 추가 연구를 통해 본 제품의 영업활성화를 도모하고 함.

(1) 추가연구 진행

㉞ 연구내용

시험제목	큐어 히팅 크림의 일시적인 피부 온도 상승과 즉각적 및 2주 사용시 피부 열행 개선에 대한 인체적용시험
시험기관	중앙대학교 산학협력단
시험기간	2014년 10월 29일 ~ 2014년 11월 12일
시험제품	큐어 히팅 크림
시험목적	큐어 히팅 크림의 일시적인 피부 온도 상승과 즉각적 및 2주 사용시 피부 열행 개선 평가를 확인하고자 실시하였다.
시험 대상자	시험대상자 선정 및 제외기준을 만족하는 만 20~55세의 여성
시험 인원	최종 시험대상자 수: 21명
시험대상자 선정기준	다음의 선정기준에 적합 한 자 1. 만 20~55세의 여성 2. 시험의 목적, 내용 등에 관하여 충분한 설명을 듣고 자발적으로 동의 서명한 자 3. 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 자 4. 시험대상자 제외기준에 포함되지 않는 자
시험대상자 제외기준	다음의 제외기준 중 하나라도 해당되는 자는 본 시험에 참여할 수 없다. 1. 본인이 원하지 않거나 동의서를 작성하지 않은 경우 2. 정신과적 질환이 있는 경우 3. 감염성 피부 질환이 있는 경우 4. 시험참가 시점 8개월 이내의 면역억제제 치료를 받은 경우 5. 시험참가 시점 1개월 이내의 전신 스테로이드 또는 국소치료를 받은 경우 6. 시험 부위에 병변이 있어 측정이 곤란한 경우 7. 아토피성 피부를 가진 경우 8. 화상증, 외상증, 또는 일상적인 광 노출에 대한 반응이 심하거나 알러지가 있는 경우 9. 시험참가 시점 8개월 이내의 피부 스테로이드 또는 피부 진피를 받은 경우 10. 임신 중이거나 수유중인 경우 11. 기타 위의 사항을 외에 책임연구자 또는 시험담당자의 판단으로 인체적용시험 수행이 곤란하다고 판단되는 경우

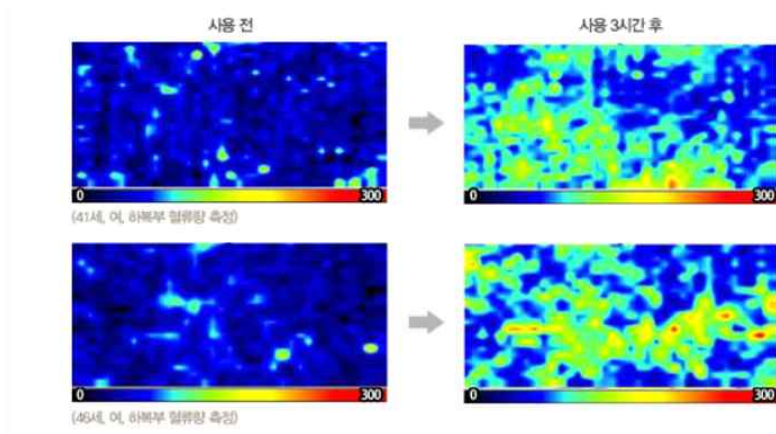
㉞ 연구 예상결과 (현재 진행중에 있음)



*** : $p < 0.05$ by repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni correction

⇒ : 변화율(%) = (after-before) / before * 100

• 혈행 사진



※ 혈류량이란, 단위 시간 내의 혈액의 유량(流量)을 말하는 것으로 혈류량이 증가 할 수록 혈액의 순환이 원활히 될 수 있는 원동력이 된다는 것을 의미합니다. (*혈류량 증가에 따라 색상이 파란색 → 노란색 → 붉은색으로 변함)

[감화 특화 헬스케어소재 글로벌재용화 육성사업으로 '가천대 바이오 헬스 솔루션 R&D사업단'과 공동 진행, P&K피부임상연구센터, 2013.02]

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

번호	기자재명	규격	수량	보유현황	활용도	비고
1	Deep freezer	Thermo	1	기 보유	재료 신선도 유지	
2	3차 증류수기	Direct-Q	1	기 보유	증류수 제조	
3	High speed centrifuge	Avanti-J-E	1	기 보유	단백질 분리	
4	Imaging analyzer	LAS4000 mini	1	기 보유	단백질 발현관찰	
5	Environment control rearing system	DJ-201D	2	기 보유	동물사육	
6	PCR machine	DNA engine	1	기 보유	mRNA 발현관찰	
7	Incubator	304601-7326	1	기 보유	세포배양	
8	HPLC	Agilent 1100 series	1	기 보유	추출물 분리	
9	Rotary evaporator	EYELA N-1000	1	기 보유	추출물 농축	
10	Water bath	EYELA SB-1000	1	기 보유	추출물 온도유지	
11	UV-spectrophotometer	Shimadzu UV-1201	1	기 보유	추출물 스펙트럼 분석	
12	Aggregometer	Chrono-log 700	1	기 보유	혈소판 응집시험	
13	Hypoxic chamber	Technomart	1	기 보유	저산소성 심근세포 모델	
14	ELISA reader	BioTek H4 multi-mode	1	기 보유	세포사멸 측정 및 단백질 정량	
15	Clean bench		2	기 보유	세포실험장치	
16	Rodent ventilator	UB-7025	2	기 보유	동물호흡기구	
17	항온항습기	JSR-JSMI-04 CP	1	기 보유	시제품 및 제품의 안정성 시험	
18	열화상카메라	FLIR -E 30	1	구입	혈행개선 효능 확인	

제 8 장 참고문헌

- 해당사항 없음.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.