

발간등록번호
11-1543000-000817-01

제주산 까마귀쪽나무를 이용한 골관절염 완화 개별인정형 건강기능식품 개발

(Individual authorized health functional food development
which relieve osteoarthritis using *Litsea japonica* from Jeju)

(재)제주테크노파크

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제주산 까마귀쪽나무를 이용한 골관절염 완화 개별인정형 건강기능식품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 01 월 25 일

주관연구기관명 : (재)제주테크노파크

주관연구책임자 : 윤 원 종

연 구 원 : 정 용 환

연 구 원 : 오 대 주

연 구 원 : 함 영 민

연 구 원 : 양 재 영

연 구 원 : 송 상 목

협동연구기관명 : (주)휴림

협동연구책임자 : 조 주 현

협동연구기관명 : (주)아이지에스

협동연구책임자 : 임 해 숙

요 약 문

I. 제 목

제주산 까마귀쪽나무 열매를 이용한 골관절염 완화 개별인정형 건강기능식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발의 목적

(1) 제주산 까마귀쪽나무 열매 활용 골관절염 완화 건강기능식품 개별인정형 원료 개발

가. 제주 자생 까마귀쪽나무 열매 농용자원화를 위한 고품질 생산기술 확립

나. 식품의약품안전처 고시용 지표/유효성분 확보 및 원료표준화에 따른 기준규격설정

다. 제주 자생 까마귀쪽나무 열매 건강기능식품 원료 개별인정 자료 확보 및 등록

라. 생리활성 기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발

마. 글로벌 시장 진출을 위한 대형 유통/마케팅 구조 확립

○ 연구개발의 필요성

(1) 우리나라는 2000년에 인구의 7% 이상이 65세 이상으로 고령화사회로 진입하였으며 2018년에는 14%를 초과하는 고령화사회, 2026년에는 20%를 초과하는 초고령화사회가 될 것으로 전망

(2) 골관절염은 고령화사회로 진입하면서 문제시 되는 대표적인 질환이며 관절의 손상을 수반하여 사람들의 거동을 불편하게 하는 주요 원인으로 고령인구의 건강한 삶 유지 및 경제적 생산 활동에 악 영향을 끼침

(3) 골관절염은 노화로 인해 관절부위로 공급되는 혈류의 흐름이 감소하고 말초신경의 기능이 저하되면서 발생

(4) 관절염에는 여러 종류가 있으며, 종류별로 그 원인이 서로 다르게 나타나는데 가장 흔한 것은 골관절염(퇴행성관절염)으로 관절에 생기는 상처나 감염, 나이 등이 원인이 되며 다른 원인으로는, 류머티즘성 관절염과 건선성 관절염 등이 있음

(5) 이에 따라 정부에서는 2006년 12월 ‘고령친화산업 진흥법’을 제정하고, 범 정부차원의 건담 조직을 신설·운영하여 고령친화산업 육성 계획을 수립하는 등 다양한 노력을 기울이고 있음

- (6) 고령친화산업 활성화 전략보고서에 따르면 향후 골관절 건강식품 등 고령친화 식품산업은 2020년까지 연평균 성장률 9.12%로 전망하고 있어 고령친화령 건강기능식품 산업의 발전 가능성은 매우 높음

III. 연구개발 내용 및 범위

(1) 까마귀쪽나무 열매 유래 건강기능식품 기능성원료 자원화 연구

- 가. 천연추출물의 관절염 관련 유효성 검색
- 나. 유용천연물의 유효 및 지표성분 연구
- 다. Target 유전자 분석을 통한 분자생물학적 기전연구
- 라. 제주산 까마귀쪽나무 열매 자원화를 위한 대량생산기술 확립 및 재배 표준화 연구

(2) 까마귀쪽나무 열매 유래 건강기능식품 기능성원료 원료표준화 연구

- 가. 유효 및 지표성분을 이용한 원료 표준화 연구
- 나. 지표성분을 이용한 표준기준 및 시험방법 설정
- 다. 유효물질의 최적 추출공정 및 표준공정 확립
- 라. 원료안정성 평가

(3) 까마귀쪽나무 열매 유래 건강기능식품 기능성원료 기능성 및 안전성 평가

- 가. 기능성원료 유효성 평가: *in vitro* 및 *in vivo* 효능 평가 및 규명
- 나. 기능성원료 인체적용시험: 골건강 개선 인체적용시험
- 다. 천연물질의 안전성 평가: 급성, 아급성 및 유전독성 평가(GLP 기관 의뢰)

(4) 까마귀쪽나무 열매 유래 건강기능식품 기능성원료 제품화 연구

- 가. 식품원료 scale up 연구
- 나. 기능성식품 제제 및 제형 연구
- 다. 기능성식품 원료 및 제제 안정성 평가(가속, 실온)
- 라. 유용물질의 전임상 및 기능성식품 인체적용 시험(전문기관 의뢰)
- 마. 기능성식품 시제품 제작

IV. 연구개발결과

(1) 까마귀쪽나무 열매 원료표준화 및 기준규격설정 확립

가. 지표/유효성분 분리 및 최적 추출공정과 표준공정법 개발

나. 일반성분 및 무기영양성분 분석 완료

(2) 까마귀쪽나무 열매 유효성 평가 및 비임상효력시험

가. 까마귀쪽나무 열매 항염증 유효성 평가 및 기전연구 완료: *in vitro*

나. 까마귀쪽나무 열매 진통 및 골관절 완화 비임상효력시험 완료: *in vivo*

다. 인체적용시험 제품 골관절 완화 비임상효력시험 재현성 검토 완료: *in vivo*

(3) 까마귀쪽나무 열매 관절건강 관련 인체적용시험 완료

가. 관절건강 임상 protocol 제작 및 IRB 승인 완료

나. 관절건강 인체적용시험 완료에 따른 기능성 입증 자료 확보

(4) 까마귀쪽나무 열매 원료 제형조건 확립 및 사업화 추진

가. 까마귀쪽나무 열매를 이용한 다양한 제형연구

나. 제형별 시작품 제작 및 안정성확보

다. 사업화 추진을 위한 판매전략 수립

(5) 까마귀쪽나무 열매 고품질 생산 및 대량번식기술 개발

가. 까마귀쪽나무 열매 고품질 원료 생산 및 대량번식기술 개발 완료

나. 까마귀쪽나무 열매 대량생산을 위한 대량증식 시험포 조성 완료

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구성과

(1) 특허출원(3건)

가. 까마귀쪽나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성물

나. 까마귀쪽나무 미성숙과 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 항염증용 조성물

다. 까마귀쪽나무 추출물과 이로부터 분리된 Litseakolide D2를 이용한 항염증용 조성물

(2) 논문게재(2건)

- 가. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. International Immunopharmacology. 2014. 22:84-97
- 나. Anti-inflammatory effect of litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS induced RAW264.7 cells. Journal of Functional Foods. 2015. 13:80-88

(3) 학술발표(8건)

- 가. Anti-inflammatory Activity of *Litsea japonica* fruit extract in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2012. 한국분자세포생물학회
- 나. Fruit of *Litsea japonica* in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of inflammation and bone damage. 2013. 한국응용생명화학회
- 다. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* fruit in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2013. 한국식품영양과학회
- 라. Anti-inflammatory Activities of The Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2013. 한국식품영양과학회
- 마. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2014. 한국식품과학회
- 바. Anti-inflammatory Activities of The Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2014. 한국식품과학회
- 사. Anti-inflammatory effect and Action Mechanism of Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2014. Natural Product Biotechnology
- 아. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2014. Natural Product Biotechnology

(4) 세미나발표(1건)

- 가. Individual authorised health functional food development which relieve osteoarthritis using Jeju native resource. 2014. 한국식품영양과학회

○ 성과활용 계획

- (1) 까마귀쪽나무 열매 개별인정형 건강기능식품 원료 신청 및 등록
- (2) 골건강 개선 건강기능식품 기능성 원료 소재 활용 산업화 추진
- (3) 지적재산권 활용 기술이전 실시 및 보완 특허 출원 추진
- (4) 까마귀쪽나무 열매 대량증식 확립에 따른 농용자원화

I . Title

Individual authorized health functional food development which relieve osteoarthritis using *Litsea japonica* from Jeju

II. Research and Development Purpose and Necessity

○ Purpose of Research and Development

- (1) Development of functional raw material for an osteoarthritis alleviation health food using *Litsea japonica* fruit from Jeju
 - A. Establishment of high quality production technology for rendering of wild Jeju *Litsea japonica* fruit as an agricultural resource
 - B. Procurement of index content and functional substance for the Korea Food and Drug Administration, and notice and establishment of a standard test method
 - C. Procurement and registration of functional wild Jeju *Litsea japonica* fruit food raw material individual qualification data
 - D. Development of a global functional food above 2nd class bioactivity function
 - E. Establishment of a large-scale distribution and marketing structure for expansion into the global market

○ Necessity of Research and Development

- (1) Korea is considered an aging society; in 2000 more than 7% of the population was aged 65 or older. This proportion is expected to exceed 14% by 2018. It is expected that Korea will become a super-aging society, in which the elder population exceeds 20%, by 2026.
- (2) Osteoarthritis has increased as a problem in the aging population. It is a major cause of behavioral discomfort, and is associated with damage to the joints, which negatively affects the wellbeing and economic productivity of the elderly.
- (3) Osteoarthritis develops as the blood supply to the joints decreases and the peripheral nerve function deteriorates, due to aging.
- (4) There are various types of arthritis which have different causes. Osteoarthritis is the most common, and is caused by injuries or infections to the joint and aging; other forms of arthritis include rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis.

- (5) In view of the aging population, the government enacted the ‘Promotion of senior-friendly industries’, and is making various efforts such as making senior friendly industry nurture plans by newly founding and operating government-wide task forces
- (6) According to the Senior-friendly industry Vitalization Strategy Report,’ the senior-friendly food product industry, which includes bone and joint health foods, is expected to achieve annual growth rates of 9.12% until 2020. This indicates the huge potential of the senior friendly functional food industry.

III. Research and Development Content and Range

- (1) Research on the resource rendering of *Litsea japonica* fruit as a functional food raw material
 - A. Search for the arthritis-related effectiveness of natural extracts
 - B. Research on the active and index ingredients of useful natural substances
 - C. Molecular biology operandi research through target gene analysis
 - D. Research on the standardization of cultivation of resource rendering of the raw materials of Jeju wildlife resources
- (2) Research on raw material standardization for *Litsea japonica* fruit based functional foods
 - A. Research on raw material standardization using active and index ingredients
 - B. Setting standard benchmark and experimental methods using index ingredients
 - C. Establishment of an optimal and standard process of effective ingredient extraction
 - D. Raw material safety evaluation
- (3) Establishment for functional and safety on functional material of *Litsea japonica* fruit based health functional food
 - A. Evaluation of natural substance effectiveness; investigation of preclinical performance
 - B. Clinical Study for functional material: joint health clinical study
 - C. Natural substance safety evaluation: acute, sub-acute, and genetic toxicity

evaluation (requested to GLP institute)

- (4) Research on Jeju biotic resource-based functional food product commercialization
 - A. Food product raw material scale up research
 - B. Functional food medication and formulation research
 - C. Evaluation of functional food raw material and medication safety (accelerated, room temperature)
 - D. Preclinical testing of useful substances and application of functional food in humans (commissioned to a specialized agency)
 - E. Production of functional food sample product

IV. Research and Development Results

- (1) Establishment of material standardization and standard specification settings on *Litsea japonica* fruit
 - A. Development of index/active ingredient division, optimal extraction process, and standard processing methods
 - B. Completed analysis of general and mineral nutrition components
- (2) Effectiveness evaluation and non-clinical effectiveness experiment on *Litsea japonica* fruit
 - A. Completed anti-inflammatory effectiveness evaluation and operandi research on *Litsea japonica* fruit: *in vitro*
 - B. Completed non-clinical pain and joint alleviation experiment on *Litsea japonica* fruit: *in vivo*
 - C. Completed non-clinical joint alleviation effectiveness experiment reproducibility review for human body experiment product on *Litsea japonica* fruit: *in vivo*
- (3) Completed *Litsea japonica* fruit joint health-related human experiments
 - A. Completed Institutional Review Board approval and production of joint health clinical protocol
 - B. Procurement of functionality-supporting evidence, according to completion of joint health human experiments

- (4) Execution of *Litsea japonica* fruit material formulation condition establishment and commercialization
 - A. Various formulation research studies using *Litsea japonica* fruit
 - B. Procurement of safety and production of trial product per formulation
 - C. Established sales strategy for commercialization
- (5) Development of *Litsea japonica* fruit mass reproduction and high quality fiwa manufacturing technology
 - A. Completed development of high quality *Litsea japonica* fruit material production and mass reproduction technologies
 - B. Completed creation of mass propagation experimental field for *Litsea japonica* fruit mass production

V. Accomplishment and its application plan

○ Accomplishment

- (1) Patent application
 - A. Composition for Pain Relief Using an Extract of *Litsea japonica* or Compounds Isolated Therefrom
 - B. Composition for Anti-inflammation Using an Extract of Immature Fruits of *Litsea japonica* or Compounds Isolated Therefrom
 - C. Anti-inflammation Composition Using *Litsea japonica* Extract and Litseakolide D2 isolated from the same
- (2) Paper publication
 - A. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. *International Immunopharmacology*. 2014. 22:84-97
 - B. Anti-inflammatory effect of litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS induced RAW264.7 cells. *Journal of Functional Foods*. 2015. 13:80-88
- (3) Academic publication

- A. Anti-inflammatory Activity of *Litsea japonica* fruit extract in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2012. *Korea Society for Molecular and Cellular Biology*
- B. Fruit of *Litsea japonica* in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of inflammation and bone damage. 2013. *Korea Society for Applied Biological Chemistry*
- C. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* fruit in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2013. *Korea Society Food Science and Nutrition*
- D. Anti-inflammatory Activities of The Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2013. *Korea Society Food Science and Nutrition*
- E. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2014. *Korea Society Food Science and Technology*
- F. Anti-inflammatory Activities of The Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2014. *Korea Society Food Science and Technology*
- G. Anti-inflammatory effect and Action Mechanism of Compounds Isolated from *Litsea japonica* Fruit in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. 2014. *Natural Product Biotechnology*
- H. Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. 2014. *Natural Product Biotechnology*

(4) Seminar presentation

- A. Individual authorised health functional food development which relieve osteoarthritis using Jeju native resource. 2014. *Korea Society Food Science and Nutrition*

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Present status of related R&D in domestic and foreign countries	25
Chapter 3. Contents and results of the research	31
Chapter 4. Degree of achievement against research goal and impact on other research areas	208
Chapter 5. Plan for utilization of results of the research	212
Chapter 6. Information of science and technology of foreign countries	221
Chapter 7. References	223

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제1절	연구개발의 목적	15
제2절	연구개발의 필요성	17
제 2 장	국내외 기술개발 현황	25
제1절	국내외 기술개발현황	25
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	31
제1절	연구수행 내용	31
제2절	연구수행 결과	74
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	208
제1절	연구개발목표의 달성도	208
제2절	관련분야 기술발전의 기여도	210
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	212
제1절	실용화, 산업화 및 타연구에의 활용 계획	212
제2절	특허, 논문 등 지식재산권 확보 계획	214
제3절	기타	219
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	221
제1절	해외 건강기능식품 기술 동향	221
제2절	국제학술대회 참석	222
제 7 장	참고문헌	223

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구개발의 최종목표

가. 제주산 까마귀쪽나무 열매 개별인정형 건강기능식품 원료 소재 개발 및 농용자원화

- (1) 우량종묘 생산: 제주 자생 까마귀쪽나무 열매 농용자원화를 위한 고품질 생산기술 확립 1식
- (2) 지리적표시 등록: 국립농산물품질관리원의 “까마귀쪽나무 열매” 지리적표시 등록 1건
- (3) 원료표준화: 식품의약품안전청 고시용 지표물질 및 기능성분(유효성분) 추출 1건
- (4) 까마귀쪽나무 열매 건강기능식품 원료 개별인정 자료 확보 및 신청: 생리활성기능 2 등급 이상
- (5) 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발 1건 이상
- (6) 유통/마케팅 구조 확립: 글로벌 시장 진출을 위한 대형 유통/마케팅 구조 확립

2. 연구개발의 주요내용

가. 기능성 원료의 표준화

- (1) 원재료의 표준화: 생물종 기원, 사용 부위, 오염물질 확인 등
- (2) 제조공정의 표준화: 제분, 추출, 혼합, 포장 및 저장 등
- (3) 지표(유효)성분 선정: 분석이 용이하고 안정성이 확보된 성분 선정
- (4) 분석방법의 선정: 재현성, 정량적인 분석방법 확립
- (6) 기준시험법 개발/작성: 기능성원료에 대한 기준 및 시험방법 개발/작성

나. 유효성 평가

- (1) *in vitro* test: NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS, COX-2 등
- (2) *in vitro* test: 조골세포 염증 매개인자(IL-6, COX-2) 억제 효능 분석
- (3) *in vivo* test: MIA model에 의한 골관절염 억제 효능 분석 등

다. 안전성 평가 (GLP 독성시험)

- (1) 단회투여독성시험 자료 확보
- (2) 유전독성시험 (염색체이상시험, 소핵시험 및 복귀돌연변이시험) 자료 확보

라. 원료 생산공정 scale-up

- (1) 표준공정 scale up 및 공정관리 적용
- (2) 원료 시생산 및 표준생산공정서(MF) 작성
- (3) 표준공정서 타당성 평가, 공정관리 적용

마. 제제 및 제형 연구

- (1) 제형 설계, 제제 안정성시험 및 compatibility test
- (2) 제형결정 및 formulation 연구, 시생산 제품 안전성 시험(가속, 가온)

바. 제품 생산 및 마케팅

- (1) 홍보자료 작성, 제품 디자인
- (2) 제품디자인 설계, 특허 및 상표 출원 등

사. 식약청 건강기능식품 원료 개별인정 등록자료 filing

- (1) 소재, 기능/지표성분, 제조방법, 기타 규격항목, 안전성, 기능성 섭취량 설정근거 등 건강기능식품 개별인정등록을 위한 연구수행 및 요건확보

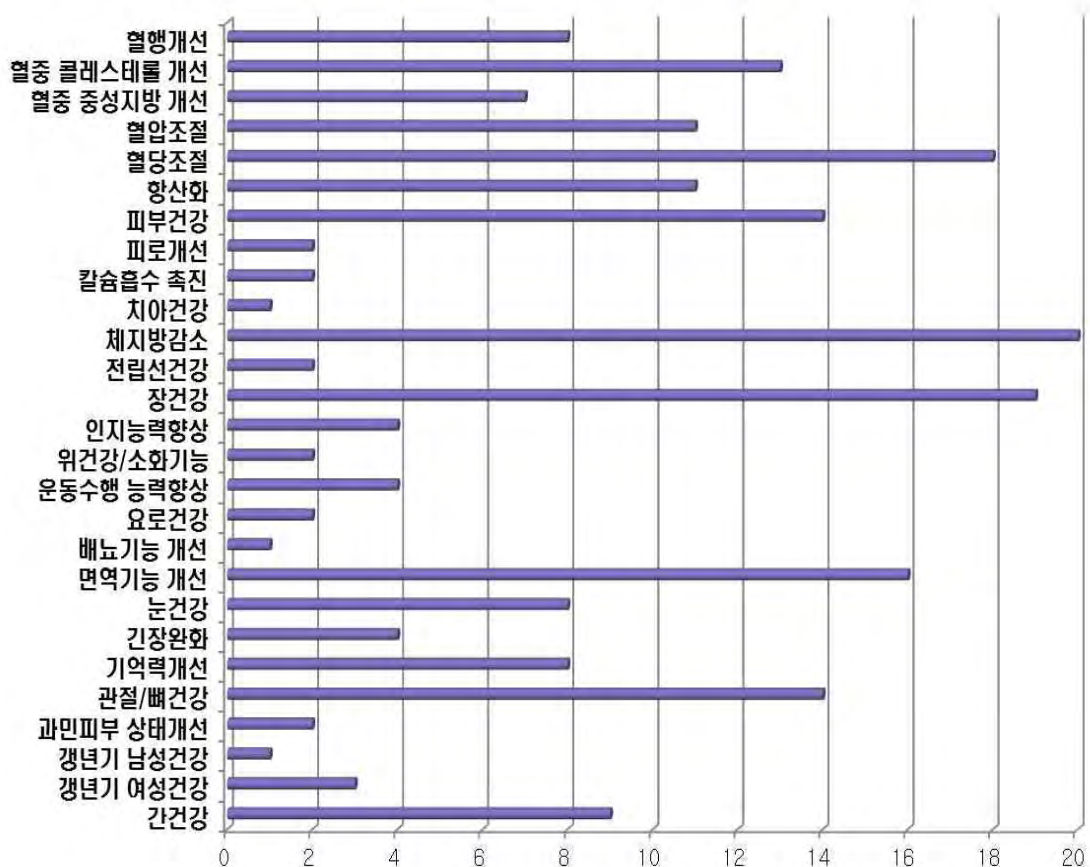
제 2 절 연구개발의 필요성

1. 건강기능식품 산업의 특성

- 가. 식품산업은 식품을 생산하거나 수입된 식품의 최종 소비자에게 전달되기까지에는 식품 원료의 생산, 수집, 가공, 저장, 판매라는 여러 유통단계를 경유하게 되고, 이와 같은 유통단계를 거치면서 소비자가 원하는 형태로 변환되고 동시에 식품산업 자체의 소득을 유발시키게 되면 고용 및 부가가치를 창출하게 됨.
- 나. 국내·외의 식품소비자는 건강지향, 웰빙(well-being) 추구 등을 통해 자신의 삶의 질을 높이려는 욕구로 과거의 단순한 먹거리 의미가 아닌 맛, 건강, 다양성 등의 질적인 면을 중시하는 의미로 확대되고 있음.
- 다. 최근에는 LOHAS(Lifestyle Of Health Aand Sustainability) 개념이 도입되어 자연친화제품 식품산업을 비롯한 전체 산업군의 트렌드가 되면서 세계건강기능 식품산업은 지속적인 성장을 거듭하고 있는 추세임.
- 라. 건강기능식품의 발전은 세계 식품산업 전반에 커다란 지각변동을 예고하고 있으며, 많은 기업에게 새로운 기회로 인식되어 식품산업체 뿐만 아니라 식품관련 분야에 참여하고 있는 대기업, 다국적 유통업체 및 제약업체도 적극적인 시장참여 의사를 밝히고 있음.
- 마. 건강보조식품으로 시작된 국내 건강기능식품시장은 지난 10년간 꾸준한 성장을 해오고 있으나, 세계시장에 비추면 매우 빈약한 시장을 형성하고 있으며, 소재부분은 수입 원료의 의존도가 매우 높아 국내 생산 건강기능식품의 국제경쟁력은 매우 미약한 실정임.
- 바. 그러나, 건강기능식품의 태동과 더불어 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망되고 있음.
- 사. 세계 보건정책의 새로운 패러다임이 질병치료에서 질병예방으로 바뀌어 가고 있음에 따라 건강기능식품산업을 질병예방을 통한 국민의료비 절감과 건강증진으로 삶의 질 향상에 기여하는 미래 핵심 동력산업으로 육성하기 위한 국가적인 기능성소재 연구개발과 제품화 연구개발 지원이 기대되고 있음.
- 아. 국내 건강기능식품 제조업소 중 건강기능식품 GMP 지정업소는 30% 정도이며, 제주지역에 2개 업소가 지정되어 산업기반은 조성되어 있으나, 천연자원을 이용한 연구나 건강기능식품 개발이 미비한 실정임.
- 자. 식약처 건강기능식품 생산실적 통계자료에 따르면, 100억원 이상 판매된 제품군은 대부분 고시형 원료를 사용하는 제품으로 홍삼, 알로에, 영양보충제, 글루코사민, 인삼, 클로렐라, 감마리놀렌산, 효모, 유산균, EPA/DHA를 함유한 제품이 주류를 이루고 있음.
- 차. 또한, 건강기능식품 중 신제품 개발의 척도라고 할 수 있는 개별인정형 건강기능식품 시장은 지속적으로 꾸준히 증가하고 있음. 대표적으로는 알코올성 손상으로부터 간을 보호

하는데 도움을 줄 수 있는 생리활성 2등급의 헛개나무과병추출물, 갱년기 여성건강 분야 백수오/당귀/속단 복합추출물 등으로서 매출분야도 꾸준히 증가되고 있는 추세임.

카. 최근 식약처의 자료에 따르면 2013년 12월 기준으로 기능성 종류는 27종이며, 개별인정 원료는 206점으로서 체지방감소>장건강>혈당조절>면역기능개선>관절/뼈건강 순임.



[건강기능식품의 기능성 종류와 개별인정 원료현황, 2013년 12월 기준]

타. 최근, 우리나라는 2000년에 전인구의 7% 이상이 65세 이상인 고령화사회로 진입하였으며 2018년에 65세 인구가 14%를 초과하는 고령사회, 2026년에는 20%를 초과하는 초고령사회가 될 전망이다.

파. 이에 따라 정부에서는 2006년 12월 ‘고령친화산업 진흥법’을 제정하고, 범 정부차원의 전담 조직을 신설·운영하여 고령친화산업육성 계획을 수립하는 등 다양한 노력을 기울이고 있음.

하. 고령친화산업 활성화 전략보고서에 따르면 향후 골관절 건강 식품 등 고령친화 식품산업은 2020년까지 연평균 성장률 9.12%로 전망하고 있어 고령친화형 건강기능식품 산업의 발전 가능성은 매우 높다고 할 수 있음.

〈 고령친화 실버산업 시장 규모 〉

(단위 : 억원, %)

구분		2002	2010	2020	연평균 성장률
기능성 식품산업		36,000	68,929	149,883	8.2%
고령친화 실버산업	비중 (매출액기준)	28.3	30.7	31.2	-
	매출액	10,188	21,153	46,738	8.8%

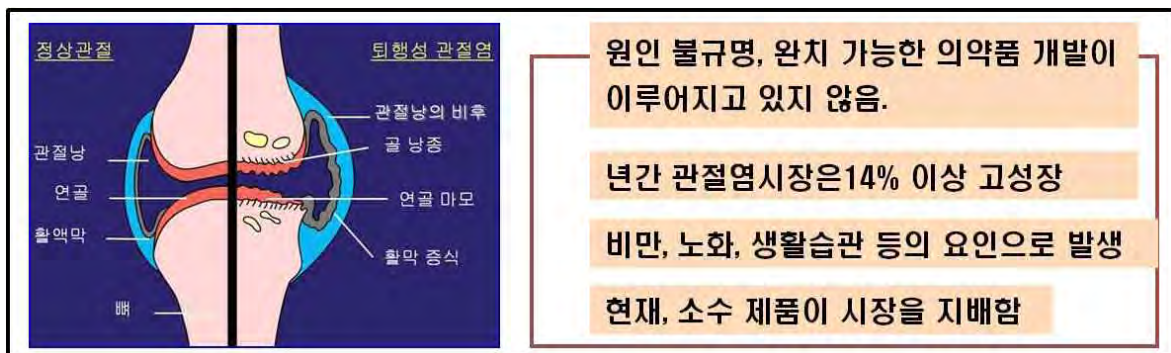
“고령친화산업 활성화 전략” (BT 스페셜 노화 연구동향, 2009)

2. 연구개발 방향: 골관절 완화 건강기능식품 소재 개발

- 가. 건강기능식품 소재 중 고시형 제품에 비해 개별인정형 제품은 소비자들이 원하는 다양한 기능성을 제공할 수 있으며 마케팅 측면에서 다양하게 활용할 수 있어 잠재력이 큰 분야임.
- 나. 특히, 최근에는 지역의 대표적인 농림축산자원(예, 창원 양파추출물)과 연계하여 기능성을 인정받음으로서 지역 농림축산자원의 브랜드 창출과 지역산업발전에 기여하는 등 다각적으로 활용할 수 있는 점이 많아 개별인정형 건강기능식품 소재 개발이 여러 분야에 걸쳐서 다양하게 이루어지고 있음.
- 다. 기존의 골관절과 관련된 건강기능식품소재로는 초록입홍합추출오일(3건), 황금추출물 등 복합물(2건), N-아세틸글루코사민(1건), 로즈힙분말(1건), Dimethylsulfone(MSM)(6건), 글루코사민(2건), 전칠삼추출물 등 복합물(1건), 지방산복합물(1건), 호프추출물(1건), 차조기등 복합추출물(1건), 가시오갈피 등 복합추출물(1건)으로 총 11건의 원료명으로 20건의 개별인정을 획득하였음(건강기능식품 인정현황, 식약처, 2012).
- 라. 단일 천연물로 획득한 것은 20건 중 5건이며, 이중 사업화중인 소재는 1~2건에 불과한 실정임. 이에 본 연구개발사업을 통하여 얻어지는 소재는 좁은잎천선과나무의 천연물 단일 추출물로서 소비자에게 어필할 수 있는 소재의 차별성이 클 것으로 판단됨.
- 마. 인체는 성장기뿐만 아니라 살아가면서도 골의 합성과 분해가 지속적으로 계속되는데 골의 분해 현상은 성장기 때에도 계속 진행된다. 그럼에도 지속적으로 성장을 하는 것은 골의 분해보다 합성이 더욱 활발히 일어나기 때문임.
- 바. 골대사 장애에는 기전적으로 크게 두가지로 구별됨. 골다공증과 같이 여러 원인으로 골밀도(bone mineral density, BMD) 감소, 골조직의 미세구조 변화로 인한 골격대사 장애와 골절임.
- 사. 여러 가지 환경적 영향, 신체의 정신적 또는 육체적인 변화에 의한 호르몬의 불균형이나, 골을 만드는 것보다 분해하는 것이 더욱 활발한 노년기의 경우 작은 충격으로도 골이 쉽게 부러지는 현상이 일어나게 됨.
- 아. 흔히들 갱년기 이후의 여성에게 빈번하게 일어나는 골다공증(osteoporosis)은 신체 내에

서의 호르몬의 불균형으로 인해 골을 만드는 일이 어려워지고, 골을 분해하는 것이 더욱 활발하여, 골 사이에 공간이 생김으로써 발행하는 병임.

- 차. 골다공증은 골조직의 낮은 골량(bone mass)과 미세구조의 파괴로 특징지어지는 골격질환으로 뼈가 부러지기 쉽고 골절 가능성이 높은 질환임.
- 카. 골다공증 외에도 골석화증(osteopetrosis)으로 골의 분해가 잘 일어나지 않을 경우 골 내의 공간이 석회화 되면서, 골의 발달이 일어나지 않거나, 팔, 다리가 짧으며 모든 면역세포의 근간인 골수의 형성이 일어나지 않는 병이 생기기도 함.
- 타. 이러한 골석화증 또한 골이 너무 딱딱하여 골다공증에 걸린 골처럼 쉽게 부러지기도 함. 하지만, 국내에서는 골석화증 보다는 골다공증이 더욱 빈번하게 일어나고, 전 세계적으로도 골다공증이 갱년기 이후의 문제로 대두되고 있는 추세임.
- 파. 특히, 관절염은 관절의 손상을 수반하는 질환으로서 55세 이상의 사람들의 거동을 불편하게 하는 주요 원인이 됨.
- 하. 관절염에는 여러 종류가 있으며, 종류별로 그 원인이 서로 다름. 가장 흔한 것은 골관절염(퇴행성 관절염)으로, 관절에 생기는 상처나 감염, 나이 등이 원인이 되며 다른 원인으로는 류머티즘성 관절염과 건선성 관절염이 있음.



3. 실버산업 대응 차세대 식품산업 육성을 위한 산업 클러스터 구축

- 가. 세계적으로 생물자원에 대한 관심이 증대되고 자국의 생물자원에 대한 가치를 인식하고 이를 자원화하고 있음.
 - (1) 국제적으로 생물다양성 협약(CBD), 세계생물다양성정보기구(GBIF), OECD 세계 생물자원센터네트워크(OECD/GBRCN), 국제식물신품종보호협약(UPOV), 세계생물바코드컨소시엄(CBOL) 등을 통해 생물자원에 대한 관심이 증대되고 있음.
- 나. 이에 따라 자원보유국과 자원가치발굴국 간의 이익 공유에 대한 대립이 첨예화되고 있으므로 자국의 고유 자원에 대한 자원가치 발굴 및 소재 개발에 의한 산업화는 매우 중요한 의미를 가짐.
 - (1) 선진국의 생물자원에 대한 광범위한 채취 및 특허·독점권 행사행위에 대한 자국 생물자원을 보호하고자 하는 개도국의 반발 및 그에 따른 대립이 예상됨.

다. 우리나라에서도 녹색성장시대를 맞이하여 산업의 기본소재로서 생물자원이 갖는 가치가 재해석되고 그 중요성이 증대되고 있음.

(1) 본 사업은 실버산업 대응 건강기능성 식품 개별인정화를 목표로 도내 청정 생물자원을 소재를 확보, 개발하여 글로컬 기능성 식품 시장 마켓을 겨냥하는 사업임.

라. 건강기능식품 산업은 각 기업들의 연구/기술개발 등 개별적인 노력만으로는 산업화가 어렵다는 한계를 가지고 있음.

(1) 생물자원을 활용한 건강기능식품 개발은 소재에 대한 효능/안전성평가 등 과학적 근거 마련 및 제품화를 위한 원료표준화 및 관리가 바탕이 되어야 함.

(2) 개별 기업이 소재개발에서 제품화 단계에 이르기까지 필요한 모든 기술을 다 갖추기 위해서는 비용이 과다하게 발생하므로, 기술개발자와 수요 기업간의 연결 고리가 필요한 실정임.

마. 본 사업에서는 다양한 건강기능식품 시장의 요구를 충족시킬 수 있는 제주 특화 생물자원을 대상으로 식품산업에서 요구하는 기능성, 안전성 등 과학적 근거 확보를 통해 건강기능식품 부재의 연약한 제주 향토 기업들의 자생력을 확보함은 물론 신성장동력 산업으로 발전할 수 있는 기회 제공

4. 실버그린 건강기능식품 산업이란 ?

가. 실버그린 건강기능식품 산업이란 식품산업 중 고령화시대에 건강개선 및 질병예방을 위해 사용되는 기능성 식품소재 및 가공 산업을 칭함.

나. 고령친화 실버산업은 전통의학의 원리와 소재, 방법론을 활용하여 개발된 고령자용 서비스나 제품을 공급하고 생산하는 산업으로서, 고령자의 건강증진, 질병예방, 질병치료, 재활에 기여할 수 있고, 고령인구의 증가, 고령자의 구매력 향상과 더불어 활성화가 될 것으로 예상되며, 높은 부가가치를 가짐으로써 향후 고령사회의 경제성장과 고용창출에 기여할 수 있는 산업으로 정의 될 수 있음.

다. 고령친화 실버산업의 범위는 질병이 있는 고령자와 건강한 고령자를 포함하여 예비노인과 주수발자가 이용하는 보건 의료 서비스업산업을 말하는 것으로, 고령자의 건강증진, 질병예방, 질병치료, 재활 측면에서 큰 기여를 할 고부가 가치 산업으로 의료, 문화, 관광, 연구개발 등이 복합적으로 결합된 산업의 형태를 띠고 있음.

라. 우리나라는 2000년에 전인구의 7% 이상이 65세 이상인 고령화 사회로 진입하였으며 2018년에 65세 인구가 14%를 초과하는 고령사회, 2026년에는 20%를 초과하는 초고령사회가 될 전망이다.

마. 이에 따라 정부에서는 고령친화산업을 미래성장동력산업으로 육성·지원할 수 있는 제도적 기틀을 마련하고자 지경부, 복지부 공동으로 2006년 12월 ‘고령친화산업 진흥법’을 제정하고, 범 정부차원의 전담 조직을 신설·운영하여 고령친화산업육성 계획을 수립하는 등 다양한 노력을 기울이고 있음.

바. 고령친화산업 활성화 전략보고서(저출산 고령사회 위원회, 2006)에 의하면, 고령친화 식품산업은 2020년 까지 연평균 성장률 9.12%로 전망하고 있어 실버산업대응 건강기능식품 산업의 발전 가능성은 매우 높음.

❖ 고령인구의 건강한 삶 유지와 경제적 생산활동 참여를 가능케하는 노화 관련 연구 및 삶의 질 향상 기술개발에 대한 요구 증대

☞ Well-Being: Health + 정신적 건강

☞ LOHAS: 사회적 well-being



사. 제주지역은 오래 전부터 장수하는 노인들이 많아 역사적으로 ‘장수의 섬’으로 널리 알려져 왔음. 그러한 명성의 이면에는 청정한 자연환경과 따뜻한 기후, 웰빙 식품으로 인정받는 토속음식 외에도 풍부한 천연자원을 보유하고 있음.

아. 또한 제주지역은 다른 타 시도 지역에 비해 65세 이상 노인인구 가운데 80세 이상 노인 인구가 차지하는 비율이 전국에서도 가장 높게 나타나고 있어서 고령화 현상은 더욱 가속화 되고 있는 실정임.

차. 따라서 실버그린 건강기능식품 산업의 개발은 향후 제주도가 고령화 사회에서 장수의 이미지를 제고하여 이를 관광, 휴양, 의료 및 관련 실버산업과 연계되어 새롭게 발전되어 큰 시너지 효과를 나타낼 수 있음.

< 고령친화 실버산업 시장 규모 >

(단위 : 억원, %)

구분		2002	2010	2020	연평균 성장률
기능성 식품산업		36,000	68,929	149,883	8.2%
고령친화 실 버산업	비중 (매출액기준)	28.3	30.7	31.2	-
	매출액	10,188	21,153	46,738	8.8%

“고령친화산업 활성화 전략” (BT 스페셜 노화 연구동향, 2009)

카. 고령친화형 건강기능식품은 고령자의 생리적 특성과 제품의 기능을 고려한 것으로 노화 억제, 항암·면역강화식품, 비만방지·뷰티식품, 성인병예방 개선식품, 건강유지 향상식품 등으로 분류할 수 있으며, 제주 지역의 특성을 고려한 건강기능식품 유망품목은 항산화 제품, 면역증진 제품, 골관절 질환개선 제품, 영양보충용 제품, 당뇨조절 제품, 비만조절 제품, 장내균총개량 제품, 혈중지질조절 제품 등의 실용화 기술임.

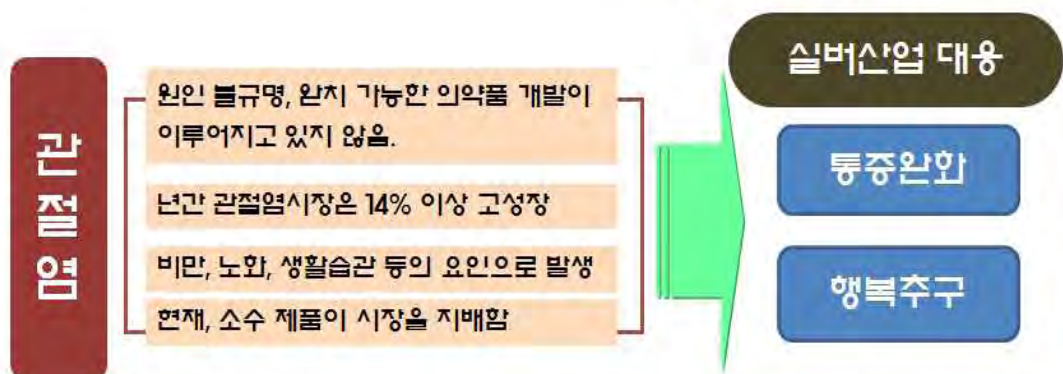
타. 특히, 제주도는 유네스코 지정 세계자연유산으로 청정지역의 브랜드를 소유하고 있어 제주자생 생물자원과 활용한 새로운 소재의 발굴과 더불어 토종 약재나 유기농 원료를 사용한 참신하고 효능이 검증된 제품 개발을 개발한다면 고령친화형 건강기능식품 산업을 제주 미래전략산업으로 발전할 잠재력은 충분히 갖추고 있다고 판단됨.

5. 골관절염 개선효능을 갖는 개별인정형 소재개발 추진 전략

가. 대기업이 주도하는 개별인정형 건강기능식품시장에서 중소기업이 경쟁할 수 있는 방안은 기능성이 우수하면서 차별화된 소재를 개발하여 산업화하는 것이며, 특히 본 사업에서 개발하고자 하는 골관절염개선 소재분야는 고시형소재외에는 경쟁력을 갖는 소재가 아직 없어 빠른 시장진입과 시장을 점유할 수 있을 것으로 판단되어 본 사업이 필요함.

❖ 건강기능식품 시장동향 (2개 분야 중)

- 해외: 소화 > 체중조절 > 심혈관건강 > 면역력증강 > **관절/뼈**
- 국내: 체지방 > 간건강 > 전립선건강 > **관절/뼈**



나. 차별화된 특화된 소재개발을 통한 관련시장에서의 경쟁우위 확보 : 기술적인 차별화를 넘어 마케팅을 위한 차별화 전략(1차적 기능-영양 + 2차적 기능-맛)으로 활용이 가능하여 관련시장의 진입 및 경쟁에서 용이할 것으로 판단됨



다. 선행연구를 통해 기확보된 소재를 대상으로 식약청 건강기능식품 원료개별인증에 요구되는 핵심요소인 ① 소재 표준화, ② 기능성 확보, ③ 안전성 확보 등을 참여기관 및 기업들이 협력하여 체계적으로 수행할 예정이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

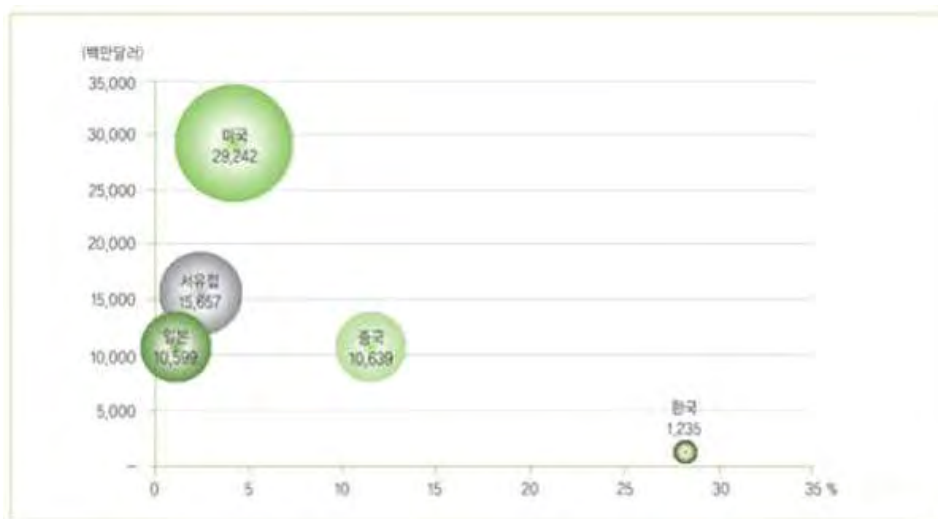
제 1 절 국내·외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

가. 식생활의 서구화에 따른 성인병 증가 및 삶의 질 개선을 추구하는 이른바 웰빙 추세에 따라 건강기능성 식품에 대한 관심이 증가하고 있으며 건강기능식품법의 발효로 기능성 식품에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있음.

나. 세계 보건정책의 새로운 패러다임이 질병치료에서 질병예방으로 바뀌어 가고 있음에 따라 건강기능식품산업은 질병예방을 통한 국민의료비절감과 건강증진으로 삶의 질 향상에 기여하는 미래 핵심 동력산업으로 육성하기 위한 국가적인 기능성소재 연구개발과 제품화 연구개발 지원이 기대되고 있음.

다. 건강보조식품으로 시작된 국내 건강기능식품시장은 지난 10년간 꾸준한 성장을 해오고 있으나, 2011년 기준 국내 건강기능식품 시장은 세계 시장에서 1.4%의 비중을 차지할 정도로 세계시장에 비추면 매우 빈약한 시장을 형성하고 있으며, 소재부분은 수입 원료의 의존도가 매우 높아 국내 생산 건강기능식품의 국제 경쟁력은 매우 미약한 반면, 국내 시장의 전년 대비 성장률은 28.2%로 매우 높게 나타나 있음.



[국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)]

자료 : 'NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report' , Nut. Business J.(2012)

라. 건강기능식품 산업은 완전경쟁형태의 시장으로 무수히 많은 업체들이 시장에 참여하여 경쟁을 하고 있음.

(1) 제품의 브랜드, 가격 및 유통경로에 따라 제품수명의 장단에 많은 영향을 미침

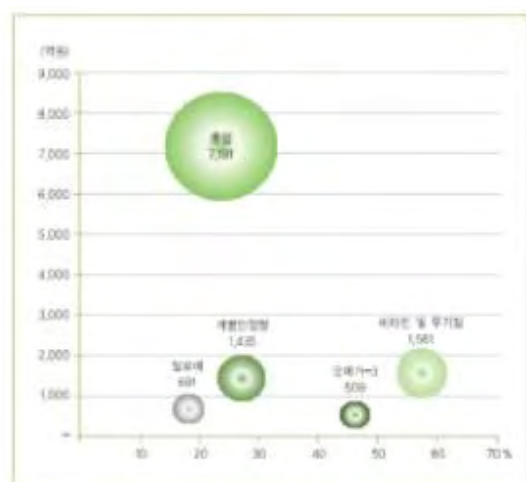
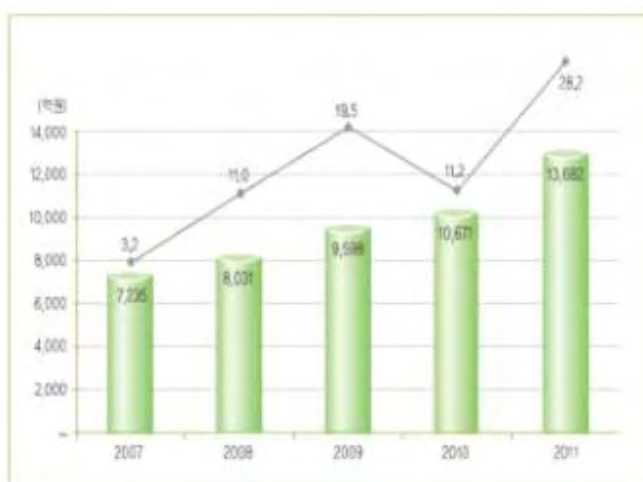
- (2) 약국체인이나 방문판매 채널에 높은 유통마진을 보장하고 고가로 제품을 유통하는 경우 단기 수익에 도움이 될 수 있으나, 제품의 수명은 2~3년을 넘기지 못하는 경우가 많음
- (3) 현재의 기능성식품시장은 자금력과 인지도 높은 브랜드 마케팅 능력을 갖추고 대규모 유통경로를 확보하고 있는 대기업에 매우 유리한 환경임
- (4) 연구개발에 특화된 중소기업체는 제한적인 자금과 인력으로 인해 직접유통망을 확보하기 어려움
- (5) 자체 연구개발을 통해 효능이 우수한 기능성 식품소재가 적용된 제품을 개발하여 시장을 선점한 대기업 유통망을 활용하는 방안이 가장 효율적인 사업화 모델임.

마. 국내 건강기능식품의 시장의 2011년 생산액은 13,682억원으로, 내수시장을 중심으로 빠르게 성장하고 있음.

- (1) 전체 생산액 중 국내 판매금액이 13,126억원(95.9%), 수출액은 556(4.1%)억원으로 내수시장이 큰 비중을 차지하고 있음.

바. 건강기능식품 중 홍삼이 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 2011년 전체 건강기능식품 생산액의 52.6%(7천억원)를 차지함.

- (1) 최근 홍삼제품의 면역효과 이외에도 피부미용 및 주름개선 등의 미용기능이 각광받기 시작하면서, 전년대비 성장률이 23.6%를 기록하는 등 국내 건강기능식품시장의 성장을 주도하고 있음.
- (2) 이러한 홍삼제품에 대한 주요 소비 계층이 기존의 4·50대 중장년 위주에서 미용에 관심이 많은 2·30대 젊은 층으로 확장되면서 연령에 구분 없이 홍삼의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 전망됨



[국내 건강기능식품 생산액 및 성장률 현황] [주요 품목별 생산액 및 성장률 현황]

자료 : '11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 식품의약품안전처(2012. 5)

사. 비타민 및 무기질은 세계시장의 증가와 함께 국내에서 가장 큰 성장률을 나타내고 있음.

- (1) 생산액 상위 5품목 중 2010년에서 2011년 증가율이 가장 높은 것은 비타민 및 무기질로 전년(991억원) 대비 57.5% 상승한 1,561억원으로 나타남.
- (2) 세계 건강기능식품 중 점유율이 가장 큰 품목인 비타민과 무기질은 국내 시장에서도 급속히 증가하고 있음.
- (3) 이는 인지도와 구매경험이 높은 비타민이 친숙도가 높으며, 비타민과 무기질은 일반의약품으로 출시되고 있어 소비자들이 쉽게 구매할 수 있기 때문임.

아. 소비자 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 이용한 개별인정형 제품의 시장이 새롭게 부각되고 있음.

- (1) 2011년도 개별인정형 제품은 전년 대비 27.1% 성장한 1,435억원으로 이중 생산액 1위는 간 건강제품(532억원)이었으며, 그 다음으로 면역기능에 도움을 주는 제품(179억원), 관절/뼈건강 제품(153억원)순으로 나타남.
- (2) 이러한 개별인정형 건강기능식품의 성장 요인은 우리 사회의 음주문화 등으로 간 건강 제품에 대한 소비 수요 증대, 일본 방사능 유출, 환경오염, 자외선 등으로 인한 면역기능이나 피부건강에 대한 소비자 관심 증가 등의 이유로 풀이됨.
- (3) 또한 기존에 존재하는 원료에서 벗어나 치료 효능을 가진 개별인정형 원료가 발견되면 신규 시장을 창출할 수 있는 잠재적 가능성이 내재되어 있어 대기업들이 개별인정형 원료를 찾는데 주력하고 있음



[건강기능식품 분류별 생산현황]



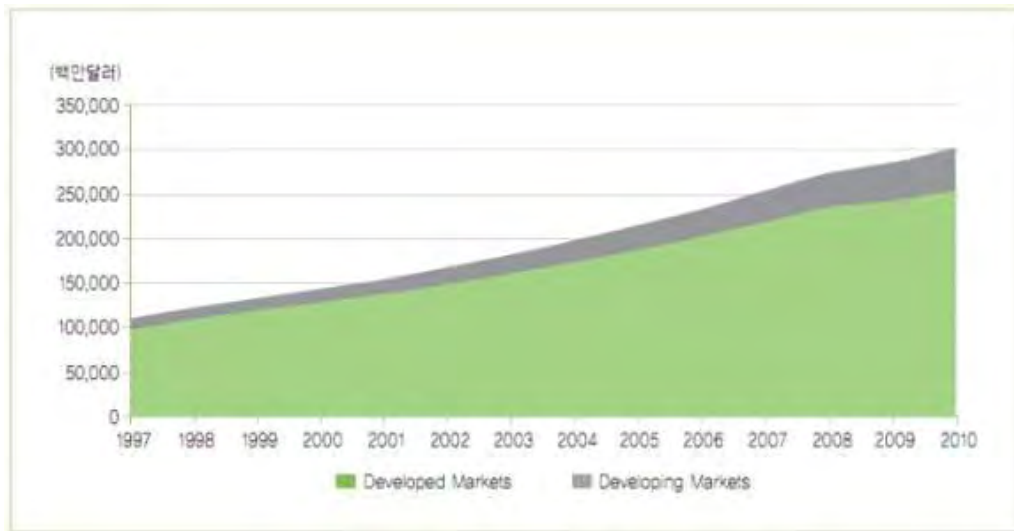
[개별인정형 세부품목별 생산현황]

자료 : '11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 식품의약품안전처(2012. 5)

2. 국외 기술개발 현황

가. 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 건강기능식품이 포함된 Nutrition Industry의 시장규모는 최근 5년간 연평균 6% 수준의 고성장세를 지속하고 있음.

- (1) DataMonitor의 자료(2011)에서 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 것임.
- (2) 또한 최근 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥 개발국의 경제성장과 함께 수요가 크게 증가하는 추세이기 때문에 높은 잠재력을 지닌 시장으로 평가됨



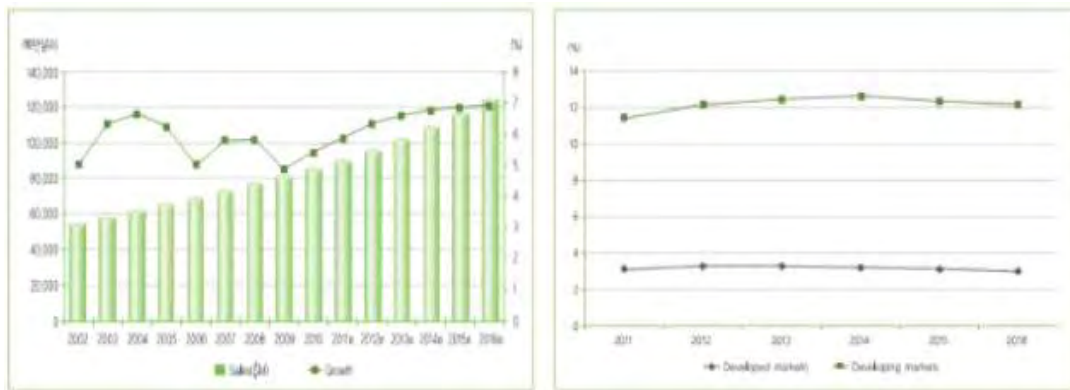
[선진국(Developed Markets)과 개발도상국(Developing Markets)의 시장규모 추이]

자료 : Nutrition Business Journal estimates(\$ mil., consumer sales). Developed markets include USA, Canada, Western Europe, Japan and Australia/New Zealand.

나. 이러한 건강기능식품 시장의 높은 성장세는 ‘건강 지향적 소비자’의 증가에 따라 지속·확대 될 것으로 예상됨 : Datamonitor(2011)의 조사에 의하면, 소비자의 약 60%는 평소 건강에 대한 관심이 매우 높았으며, 미국의 Food Marketing Institute의 조사에서는 소비자의 65%가 음식 섭취를 통해 건강 상태를 조절하는 특성이 있는 것으로 나타남.

다. 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 890억 달러이며, 향후 2016년에는 1,200억 달러를 상회할 것으로 예상됨.

- (1) 특히 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되어, 향후 세계 건강기능식품 시장은 이들 개발도상국에 의해 주도될 것으로 판단됨.
- (2) 이러한 개발도상국과 선진국간의 성장률 차이는 건강기능식품의 수요가 인구 구조나 소득의 요인에 많은 영향을 받는 특성에 기인한 것이며, GDP의 성장률이 상대적으로 높고 고령화가 진행되고 있는 개발도상국의 추세가 반영된 것임



[건강기능식품 세계시장 규모 및 성장률] [건강기능식품 시장규모 성장률 추세]

자료 1 : ‘NBJ’s Global Supplement & Nutrition Industry Report’ , Nut. Business J.(2012)

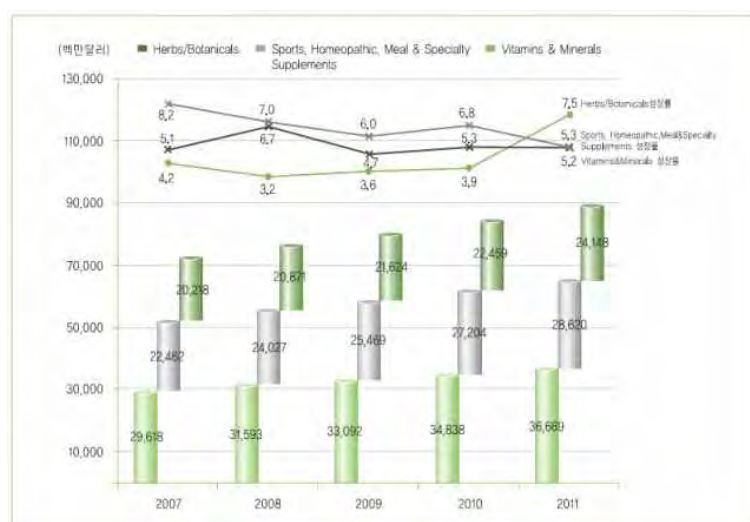
라. 국가/지역별 2011년 매출액을 살펴보면 미국이 29,242백만 달러로 가장 높으며, 2위는 서유럽이 15,657백만 달러로 나타남. (위 자료중, <국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)> 참조)

(1) 미국은 2010년(28,066백만달러)대비 4.2% 성장한 29,242백만 달러로 세계시장에서 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지하고 있음.

(2) 아시아 시장을 살펴보면 중국이 10,639백만달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 전년대비(2010년, 9,540백만달러) 성장률은 11.5%로 급속한 성장세를 나타내고 있음.

마. Vitamins & Minerals의 시장규모가 가장 크며, 최근 Sports nutrition이 시장 성장을 주도함.

(1) 건강기능식품의 대표상품으로 이미 소비자들에게 깊게 인식된 Vitamins & Mineral의 2011년 시장규모는 360억 달러이며 전년대비 5.3%의 성장률을 기록함



[건강기능식품 품목별 세계 시장현황]

자료 2 : ‘NBJ’s Global Supplement & Nutrition Industry Report’ , Nut. Business J.(2012)

(2) 또한 최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 체중 조절과 체력 향상을 돕는 Performance enhancers, Muscle builders, Weight gainers 등 건강 증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 Sports nutrition 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록함



[해외 Sports nutrition제품 예시]

바. 국내 건강기능식품시장

주요 건강기능식품	시장규모(억원)	주요 건강기능식품	시장규모(억원)
면역력 증진	1조 7천억원	비만 개선(체중 조절)	2백억원
피로 회복	4천억원	집중력 및 기억력 개선	5백억원
항산화(노화 방지)	2천5백억원	알레르기	1천5백억원
혈행개선(콜레스테롤개선)	4천5백억원	눈 건강	4백억원
관절 및 골밀도 개선	8백억원	혈당 조절용	4백억원
위 장관 기능 개선	1천2백억원	미용 개선	3백억원
성장 개선	5백억원	성기능 개선	1천억원

[출처 : 식품유통연감, 2010, 주요건강식품현황]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 내용

1. 재료 및 방법

가. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 및 분획물 제작

제주도 전 지역에 자생하고 있는 녹나무과에 속하는 까마귀쪽나무(*Litsea japonica*) 열매를 구입하여 종자를 제거한 후 수분을 제거하기 위해 3일 동안 동결건조를 하였고 수분이 완전히 제거되면 마쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 까마귀쪽나무 주정 추출물 및 순차적 분획물의 제조는 70% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료에 80% 주정 에탄올로 2회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전히 건조시켰다. 건조된 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 2회 반복 실시하였다.

나. 지표/유효성분 분리 및 정제

본 연구에서는 건조된 까마귀쪽나무 열매 및 잎 70% 에탄올 주정 추출물에서 지표성분과 유효성분을 규명하기 위해 단일화합물을 분리정제를 실시하였다. 효능이 뛰어난 CH_2Cl_2 분획물에 대하여 celite column chromatography를 실시하여 *n*-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, MeOH으로 각각 극성별로 용매 소분획물을 얻었으며, 이들 분획 중 활성이 확인된 *n*-hexane 소분획을 VLC(Vacuum liquid chromatography)방법을 이용하여 총 18개의 소소분획으로 나눔. 그 중 HPLC 분석결과 고함량 피크가 검출된 5번, 7번 분획에 대해 다시한번 silicagel column chromatography 정제를 실시하여 단일화합물 1, 2을 분리함. 또한 활성이 확인된 9번, 14번 분획에 대해 Revers phase column chromatography 기법을 이용하여 단일화합물 3, 4, 5을 분리함. 분리된 단일화합물은 NMR 등의 분광학적 분석과 문헌조사를 통해 구조를 결정하였다.(도식1)

다. 세포배양

한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)로부터 생쥐(murine) 대식세포주인 RAW 264.7세포와 인간(Human) 조골세포인 MG-63세포를 구입하여, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), 및 streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO Inc.)을 배양배지로 사용하였고, 배양조건은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 95% air, 5% CO_2 가습 공기 조건 하 포화 상태(subconfluence)에서 배양하였으며, 각각 3과 4일마다 계대배양 하였다. 혈구계를 이용하여 세포의 수를 측정하였으며, trypan blue dye exclusion을 통하여 살아있는 세포의 수를 확인하였다.

라. 질소화합물 (Nitric oxide) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 추출물 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 $100 \mu\text{L}$ 와 Griess 시약 $100 \mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 비교하였다.

마. 세포독성 평가 (LDH assay)

RAW 264.7 세포 (1.5×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지에 추출물 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 $50 \mu\text{L}$ 와 reconstituted substrate mix를 $50 \mu\text{L}$ 를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 $50 \mu\text{L}$ 의 stop solution을 넣은 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

바. 염증 유발 인자 prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 세포 (1.5×10^5 cells/mL)와 MG-63(1.0×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 RAW 264.7 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 조제된 추출물 시료 $50 \mu\text{L}$ 와 450 μL 의 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 MG-63 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 조제된 추출물 시료 $50 \mu\text{L}$ 와 450 μL 의 IL-1 β (10 ng/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24 시간 후 prostaglandin E_2 (PGE_2)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. PGE_2 의 측정은 PGE_2 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

사. 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β and IL-6) 생성 억제 효능 평가

RAW 264.7 세포(1.5×10^5 cells/mL)와 MG-63(1.0×10^5 cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2 항온기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 RAW 264.7 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 조제된 추출물 시료 $50 \mu\text{L}$ 와 450 μL 의 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 MG-63 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 조제된 추출물 시료 $50 \mu\text{L}$ 와 450 μL 의 IL-1 β (10 ng/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24 시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 분)하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines 생성 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 -20°C 이하

에 보관하였다. pro-inflammatory cytokines 정량은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

아. 단백질 발현 억제 효능 평가(western blotting)

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 한 후 세포 용해버퍼 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO_3 , 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 ug/mL aprotinin, 25 ug/mL leupeptin]를 첨가하여 30분간 4°C 에서 용해 시킨 후 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다. 분리된 단백질 20~30 μg 를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2 시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-rabbit iNOS (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA), NF- κ B와 MAPKs 기전연구를 검토하기 위해 anti-rabbit NF- κ B와 MAPKs (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 TTBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse와 rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

자. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차(SD)를 구하여 신뢰수준 95%($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

2. 골관절염 개선 비임상효력시험

가. 급성관절염 비임상효력시험

(1) 시험방법 및 시험항목

- ① 일반증상관찰: 투여 전 기간에 걸쳐 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류 및 정도, 발현일을 개체별로 기록하였다.
- ② 체중측정: 모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여개시시에 절식 후 측정하였다.
- ③ 급성 관절염 유도: 랫드의 발바닥 용적을 plethysmometer로 측정한 후 시험물질을 경구투여하고 30분 후에 우측 뒷 발바닥에 기염제로 1% carrageenan/생리식염수를 0.1 mL씩 피하주사하여 급성 관절염을 유발시켰다.

- ④ 부종 측정: 부종 유발 후 1 시간 간격으로 5회에 걸쳐 부종의 용적을 측정한 후 시험 물질 투여전 용적을 기준으로 하여 그 증가율과 억제율을 다음 식으로 계산하였다.

나. 만성관절염 비임상효력시험

(1) 시험방법 및 시험항목

- ① 조직의 광학현미경적 소견: 관절의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 10% normal buffered formalin으로 각각 관절염이 유도된 마우스의 족관절을 고정하였다. 고정 후 Calci-clear rapid로 탈회하고, 일반적인 방법에 의하여 수세, 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였으며, 포매 후 3 um의 절편을 제작하여 일반적인 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.
- ② 사이토카인에 대한 면역조직화학염색: 파라핀 포매 조직을 면역염색용 slide에 3 um 두께로 자른 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 조직 slide를 phosphate buffered saline(PBS)으로 함수시킨 후, hydrogen peroxide를 이용하여 endogenous peroxidase를 제거하였다. 일차 항체는 anti-mouse IL-6, anti-goat TNF- α 를 1 : 100으로 희석하여 4℃에서 overnight 하였다. PBS로 세척한 후 anti-mouse 및 anti-goat HRP 이차항체를 반응시킨 후 DAB와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색을 시행하고 permount로 마운팅하여 광학현미경으로 판독하였다.
- ③ 방사선학적 검사: 쥐의 발목 관절에 대하여 시험 종료 후 X-ray 검사를 시행하였다.
- ④ 비장세포의 분리 및 배양: 시험 종료 후 마우스의 비장을 분리하여 histopaque을 처리한 후, 500 xg로 20분간 원심분리하여 lymphocyte층을 얻었다. 다시 RPMI-1640 배지로 세척한 후, 24 well plate에 분주하고, 5% CO₂ 세포배양기에서 3일간 배양한 후 실험에 사용하였다.
- ⑤ 혈청 및 비장 세포 내 IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 측정: 시험 종료 후 마우스 안와정맥총에서 채혈한 후 원심분리를 이용하여 분리한 혈청과 비장세포 상등액에 대하여 IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 의 변화량을 ELISA kit을 이용하여 정량하였다.
- ⑥ 양성대조군으로 조인스정 (에스케이케미칼)

다. 말초성 진통 억제 비임상효력시험 (Acetic acid-induced writhing test) 시험방법

- ① 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 진통효과를 알아보기 위한 방법의 하나로 복부 수축 반응을 지표로 하며, 말초신경계의 진통 효력 시험에 주로 사용되는 시험방법이다.
- ② 실험동물은 5주령 ICR mouse를 1주간 습도 50%, 온도 24~26℃로 유지되는 사육장에서 순화시켰으며, 사료 및 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 자극물 (초산 0.75% 함유 생리 식염수)을 0.1mL/10g body wt의 용량으로 실험 전 12시간 동안 절식시킨 마우스의 복강에 주사로 주입하였으며, 자극물의 주입 60분 전 까마귀쪽나무 열매 추출물, 디클로로메탄 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B를 경구 투여하였다.
- ③ 자극물이 투입되면 복강 내에서 통증을 유발하여 몸을 뒤틀거나, 뒷다리를 쭉 뻗는 동작 등의 writhing syndrome 반응을 보이게 된다.
- ④ 총 10분 동안 writhing (몸을 뒤튼 상태로 2초 이상 지속) 횟수를 측정한 결과를 [그림 68]에 나타내었다. [그림 68]에서 각 색깔·도형별 포인트는 실험동물의 writhing의 숫

자이며, 직선(-)은 그 평균값이다.

라. 중추성 진통 억제 동물시험 (Tail-flick test)

(1) 시험방법

- ① 꼬리 회피 반응 시험법을 이용하여 중추성 진통 억제 효과를 확인하였다.
- ② 급성 통증 모델 중 중추신경계에 작용하는 진통제를 검색할 때 많이 사용하는 방법이다.
- ③ 5주령 ICR 마우스를 1주일간 순화시킨 후 각각 무게를 재고 식별이 가능하도록 꼬리에 매직으로 표시를 하였다.
- ④ 쥐 꼬리의 1/3지점 을 측정해 표시하고, 반응에 영향을 미치지 않도록 빛이 닿지 않는 쪽에 표시를 하였다.
- ⑤ 반응시간이 3~4 sec가 되도록 강도를 맞추며, cut off time은 10초 정도로 정하였다. 약물주입은 복강주사로 하였다.
- ⑥ 동물의 꼬리 끝을 열판에 올려 놓고 꼬리치기가 일어나기까지의 시간을 측정하여 시료 무처리군과 비교하여 꼬리치기가 일어나기까지의 시간 증가율 (TFL change)을 구하였다.

마. 중추성 진통 억제 동물시험 (Hot plate test)

(1) 시험방법

- ① Hot plate test를 이용하여 중추성 진통 억제 효과를 확인하였다.
- ② Hot plate test는 중추신경계에 작용하는 진통제를 검색할 때 사용하는 방법으로 mouse 의 발바닥이 열에 매우 민감하여, 참을 수 없을 정도의 열이 감지되면 뛰거나, 발바닥을 움츠리거나, 핏을 행위를 하는데, hot plate에 접촉할 때부터 뒷발을 털거나 핏을 때까지의 시간(sec)을 측정하는 방법이다.
- ③ 5주령 ICR 마우스를 구입하여 1주간 순화시킨 후 실험동물의 몸무게를 측정하고, 실험동물을 실험환경에 적응시키기 위하여 15~30 분 정도 두었다.
- ④ 전열기를 55℃ 혹은 적당한 온도로 미리 조절하였으며 각각의 시험물질 (즉 까마귀쪽 나무 열매 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B)을 경구투여하고, 시료 경구 투여 60 분 경과 후에, 테스트를 시작하여 뒷발을 털거나 핏을 때까지의 시간을 초(sec) 단위로 측정하였다.

바. MIA (monosodium iodoacetate)에 의한 골관절염 비임상효력시험

(1) 시험방법

약물 유도 모델은 실험동물에 특정 약물을 intra-articular injection 등의 방법으로 주입하여 chondrocyte의 metabolism을 저해하거나, ligament와 tendon의 손상을 유발함으로써 골관절염을 발생시키는 방법으로 MIA (monosodium iodoacetate)를 사용하여 골관절염을 유발 시킨다. 무릎주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA: Monosodium iodoacetate를 1 mL 주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 μ L (60 mg/mL)씩 투여한다. MIA 희석시에는 0.9 % saline을 사용한다. MIA 투여 7 일 후에 관절염 유발유무를 확인하여 관절염이 유발된 동물만을 사용한다.



MIA에 의한 골관절염 유발 과정

(2) 식이량 측정 및 시험물질 투여

1주일에 1회 또는 2회씩 식이량 (g 수) 및 음수량 (mL량)을 측정하며, 식이섭취량은 측정이 이루어지는 날의 일정한 시간에 칭량하여 1일 평균 식이섭취량을 산출하며, 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 체중 증가량을 식이섭취량으로 나누어서 계산한다. 같은 방법으로 음수량을 측정한다. 시험물질은 오전 투여, 측정은 오후에 하는 것을 원칙으로 한다. 측정일은 시험물질을 경구투여한 후 4, 7, 11, 14 제 되는 날에 각각 시행한다. 양성대조군으로 NSAID 약물로는 주로 염증의 중요한 매개자인 cyclooxygenase enzymes 활성을 억제하여 prostaglandin 합성을 저해함으로써 항염증 작용을 나타내는 항염증 약물인 indomethacin을 사용하였다.

(3) 생물학적 지표 검사

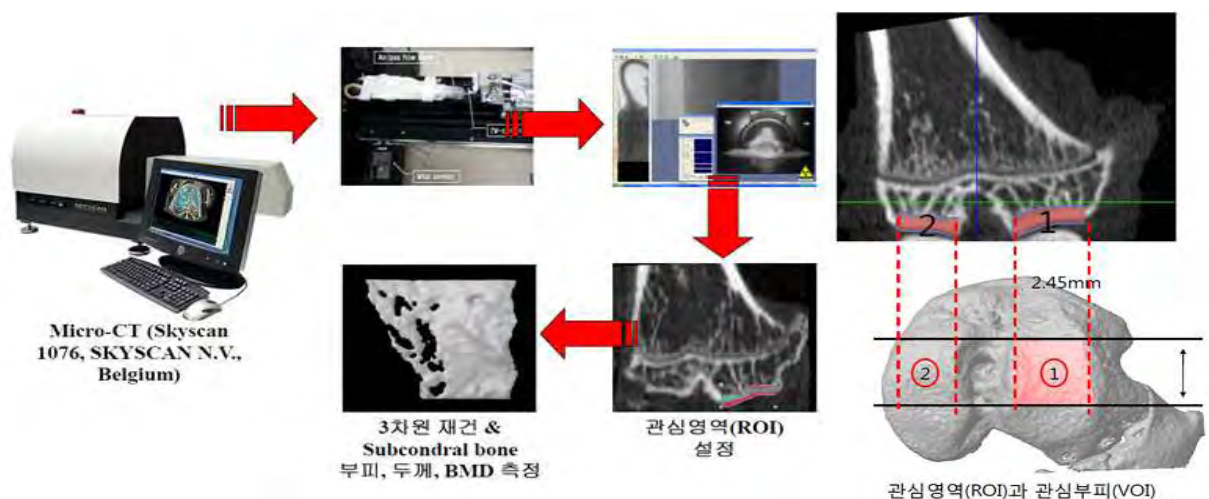
투여전 후 또는 전체 투여기간에 걸쳐일정한 간격을 두고 혈액 및 synovial fluid를, 채취한다. 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 분리한뒤, 염증성 지표로서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 사이토카인은 ELISA로 측정한다. 그리고 연골조직의 파괴정도를 확인하기위해 synovial fluid를 이용하여 MMP-2, 3, 7, 9, 13 및 TIMP-1, 2 등의 발현을 측정한다. 투여가 완료된 후에는 실험동물의 사체로부터 synovial tissue를 채취하여 RNA를 분리하여 PCR 등의 방법을 통해 MMP-2, 3, 7, 9, 13 및 TIMP-1, 2 등의 mRNA 발현정도를 분석한다.

○ 생물학적 지표 검사를 위한 primer sequences

	Forward	reverse
MMP2	TCCCAGATCTGCAAGCAAG	AGAATGTGGCCACCAGCAAG
MMP3	TGATGGGCCTGGAATGGTC	TTCATGAGCAGCAACCAGGAATAG
MMP7	GACATTGCAGGCATCCAGAAGTTA	AGGGCGTTTGCTCATTCCAG
MMP9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG
MMP13	CCCTGGAATTGGCGACAAAG	GCATGACTCTACAATGCGATTAC
TIMP1	CATCTCTGGCCTCTGGCATC	CATAACGCTGGTATAAGGTGGTCTC
TIMP2	GACACGCTTAGCATCACCCAGA	CTGTGACCCAGTCCATCCAGAG

(4) 마이크로 CT

골관절염을 유발 시켜 시험물질 투여가 완료된 후 마이크로 CT를 이용하여 실험부위를 촬영하였다. 촬영 전 실험동물은 전신 마취하여 옆드린 자세로 거치대에 위치시키고 외부 모니터링 하에 촬영하여 결과를 확인하였다.



Parameter	Bone volume	Mean number of objects per slice	Crosssectional thickness
약어	BV	Obj.N	Cs.Th
단위	mm ³		mm
의미	골조직의 부피	골조직의 평균조각 개수 골조직이 하나의 균일한 덩어리일 경우 그 값은 '1' 값이 커질수록 뼈조직이 조각나 있음을 의미함	골조직의 평균 횡단 두께

<마이크로 CT 촬영 과정 및 촬영 조건>

3. 원료표준화 (기능/지표물질 시험법 검토 및 선정)


까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 지금까지 분리 정제된 단일 화합물에서 원료표준화를 위해 지표성분을 선정하여 원료표준화를 실시하였으며 지표성분 선정은 함량이 제일 많은

Hamabiwalacton A와 B를 가지고 지표성분으로서 가능 여부를 확인하기 위해 시험법 검토를 추진하였다.


가. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hammabiwalactone A, B 시험법 검토

(1) 분석물질

① Hamabiwalactone A (HLA)

Chemical structure	
Synonym	3-[(1E)-1-Dodecen-11-yn-1-yl]-5-methyl-2(5H)-furanone
Chemical formula	C17H26O2
Molecular Weight	262.3
CAS number	128396-35-0
Storage	+4℃

② Hamabiwalactone B (HLB)

Chemical structure	
Synonym	2(5H)-Furanone,3-(1E)-1,11-dodecadien-1-yl-5-methyl-, (5S)-2(5H)-Furanone,3-[(1E)-1,11-dodecadienyl]-5-methyl-, (5S)-(9CI); (+)-
Chemical formula	C17H26O2
Molecular Weight	262.3
CAS number	128396-35-0
Storage	+4℃

(2) 분석시료

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 (LJM-F-1Lot)

(3) 분석방법

① 시약 및 시액

㉠ 표준물질: 표준물질은 천연물화학에 의뢰하여 대량 분리 및 정제한 것을 사용하였다.

- Hamabiwalactone A (천연물화학 분리·정제, 99%)
- Hamabiwalactone B (천연물화학 분리·정제, 96%)

㉡ 일반시약

- 에탄올 (덕산, HPLC grade)

- 메탄올 (덕산, HPLC grade)
- 초산 (덕산, HPLC grade)
- 아세토니트릴 (Burdick&Jackson, HPLC grade)
- 디클로로메탄 (덕산, HPLC grade)

② 표준용액의 제조

- ㉠ Hamabiwalactone A, B 표준물질 약 50 mg을 정밀히 취하여 디클로로메탄 5mL에 용해하여 vortexing 후 정용 (stock solution)한다.
- ㉡ Stock solution을 메탄올로 200, 100, 50, 25, 12.5 ppm으로 적절히 희석하여 표준용으로 사용한다.

③ 시험용액의 제조

- ㉠ 시료 약 500 mg을 정밀히 달아 70% 에탄올에 용해한다.
- ㉡ Vortexing하여 초음파추출 후 최종 100 ml로 정용한다.
- ㉢ 0.22 μ m PTFE membrane syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

④ 기기분석조건

Instrument	HPLC		
Detector	PDA detector		
wavelength.	254 nm		
Column	Waters Sunfire C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm		
Mobile Phase	A: 0.5% Acetic acid		
	B: Acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	90	10
	2.0	90	10
	32.0	0	100
	42.0	0	100
	43.0	90	10
	58.0	90	10
Flow rate	1.0 ml/min		
Injection volume	10 μℓ		
Oven Temperature	30°C		


⑤ 계산식

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

나. 시험법 검증

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B (HLB) 함량을 확인하기 위하여 설정된 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성 (Specificity), 직선성 (Linearity), 정확성 (Accuracy), 정밀성 (Precision), 범위 (Range) 등의 항목을 검토하였다.

(1) 분석물질: Hamabiwalactone B(HLB)

Chemical structure	
Synonym	2(5H)-Furanone,3-(1E)-1,11-dodecadien-1-yl-5-methyl-, (5S)-2(5H)-Furanone,3-[(1E)-1,11-dodecadienyl]-5-methyl-, (5S)- (9CI); (+)-
Chemical formula	C17H26O2
Molecular Weight	262.3
CAS number	128396-35-0
Product	
Lot. No. 20120124, Adjusted purity	96.0%
Storage	+4℃

(2) 분석시료: 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물

(3) 분석방법: 고속액체크로마토그래피법

(가) 장비

HPLC System	Shiseido Nanospace SI-2 , Japan 3101 Pump, Autosampler 3023, DAD 3117 , Column Oven 3014, Degasser 3202
Analytical Column	Agilent 1200 series, Agilent, USA Quat Pump G1311A, Autosampler G1329, DAD G1315D, Column Oven G1316A, Degasser G1322A Cadenza CD-C18 (4.6mm × 150mm, 5um)

(나) 시약

① 표준물질: Hamabiwalactone B (천연물화학, Cat. No. NPC-KC119, Lot. No. 20120124, Adjusted purity : 96.0%)

② 일반시약

- 에탄올 (덕산, HPLC grade)
- 메탄올 (덕산, HPLC grade)
- 초산 (덕산, HPLC grade)

- 아세토니트릴 (Burdick&Jackson, HPLC grade)
- 디클로로메탄 (덕산, HPLC grade)

③ 표준용액 조제

- ㉠ Hamabiwalactone B 표준물질 약 50 mg을 정밀히 취하여 디클로로메탄 5mL에 용해하여 vortexing 후 정용한 것을 stock solution으로 한다.
- ㉡ Stock solution을 메탄올로 200, 100, 50, 25, 12.5ppm으로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

④ 시험용액 조제

- ㉠ 시료 약 200 mg을 정밀히 달아 70% 에탄올에 용해한다.
- ㉡ Vortexing하여 초음파추출 후 최종 50 mL로 정용한다.
- ㉢ 0.45 μ m PTFE membrane syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

⑤ 분석조건

Instrument	HPLC		
Detector	PDA detector		
wavelength.	254 nm		
Column	Cadenza C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm		
Mobile Phase	A: 0.5% Acetic acid		
	B: Acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	60	40
	2.0	60	40
	30.0	0	100
	35.0	0	100
	40.0	60	40
	45.0	60	40
Flow rate	1.2 ml/min		
Injection volume	5 μℓ		
Oven Temperature	30℃		

⑥ 계산

Hamabiwalactone B	검량선결과(μ g/ml) × 최종량(ml) × 희석배수 × 표준품순도
(mg/g) =	시료채취량(mg)

※ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 HLB 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토	<ul style="list-style-type: none"> ○ 검출시간 : 약 23~24분 ○ spectrum : λ_{max} 약 254 nm 표준용액과 시험용액 일치 ○ peak purity : 시험용액 중 Hamabiwalactone B peak가 5 points 일치, 단일물질로 확인됨
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 7개 농도에서 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목적농도의 12.5~400%에서 확인 6.4~298.3 mg/L ○ R^2 : 0.999
	시료에 대한 6개 농도에서 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목적농도의 35~200%에서 확인 ○ R^2 : 0.999
정확성 (Accuracy)	시료 중 3개 농도로 표준 물질 첨가하여 회수율 검토	<ul style="list-style-type: none"> ○ 검출된 표준물질농도 - 20.259~107.655 ug/ml 회수율 - 96.52~102.63% RSD(%) - 1.00%
정밀성 (Precision)	3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험실내 정밀성 함량 - 13.686~13.733 mg/g RSD(%) - 0.174% ○ 반복정밀성 함량 - 13.548~13.870 mg/g RSD(%) - 0.285~0.719%
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 6.4~298.3 mg/L

4. 원료소재의 안정성 확보

가. 계획

- (1) 개발목표: 까마귀쪽나무 열매를 원료소재로 활용하기 위하여 안정성을 확보하고자 함.
또한 원료소재 지표물질의 안정성을 확보하기 위하여 pH의 변화에 따른 안정성을 검토하고자 함.
- (2) 개발내용: 까마귀쪽나무 열매를 열수 및 주정으로 추출하여 원료소재로서 안정성을 확보하기 위한 연구로, 천연물추출물이 원료소재로 유통 및 사용되어지는 가장 일반적인 방법을 선택하여 진행하였음. 그 방법으로는 까마귀쪽나무 열매를 추출하여 농축한 형태로 안정성을 확보하고자 하였으며, pH변화에 따른 지표물질을 안정성확보를 진행 중에 있음.

나. 연구수행방법

- (1) 까마귀쪽나무 열매의 원료소재화

- ① 열수추출물 : 까마귀쪽나무 열매 (종자제외)를 100℃ 압력추출기에서 1차 및 2차 각각 5시간 추출하여 여과한 다음 20 brix, 40 brix로 각각 농축하였음 ▶ 가열하여 원료 시료병에 밀봉
- ② 주정추출물 : 까마귀쪽나무 열매 (종자제외)를 85℃ 압력추출기에서 1차 및 2차 각각 5시간 추출하여 여과한 다음, 주정을 증발/농축시키고 추출물을 20 brix와 40 brix로 각각 농축하였음 ▶ 가열하여 원료 시료병에 밀봉
- ③ 소재의 안정성평가 시료 : 50mL 시료샘플용기

소재(시료명)	제조번호	비고
까마귀쪽나무열매 열수추출물시료 : 20 brix	HR-20120828-1	원료(W-20)
까마귀쪽나무열매 열수추출물시료 : 40 brix	HR-20120828-2	원료(W-40)
까마귀쪽나무열매 주정추출물시료 : 20 brix	HR-20120829-1	원료(E-20)
까마귀쪽나무열매 주정추출물시료 : 40 brix	HR-20120829-2	원료(E-40)

(2) 원료소재의 성분분석

- ① 까마귀쪽나무 열매의 열수추출물과 주정 추출물 원료소재를 각각 6 brix로 보정하여 원료소재에 대한 성분분석을 실시하였음.
- ② 성분분석항목 (9대영양성분) : 열량, 탄수화물, 단백질, 지방, 나트륨, 포화지방, 트랜스 지방, 당, 콜레스테롤
- ③ 시험방법 : 식품공전

(3) 안정성 평가항목

- ① 성상 및 pH
- ② 미생물검사(식품공전) : 세균, 대장균군
- ③ 점도 : 측정기기는 brookfield사의 dV-ii viscometer를 사용하였고 스펀들은 no.2, 180 rpm으로 setting하여 측정하였음.
- ④ 색도 : 각각의 시료 5 mL를 petri-dish (55×12mm)에 넣고 색도색차계 (Model CR-300, Osaka, Japan)를 이용하여 L*(lightness), a*(redness) 및 b*(yellowness) 값을 측정하였으며 시료당 15회 (3개*5회 측정) 반복 시험하여 색도의 변화정도를 측정하고, 그 평균값으로 나타내었음.
- ⑤ 1차년도 원료소재의 안정성연구
 - ㉠ 가속시험 ▶ 1차년도 원료소재 연구에 있어서는 3개월 실시
 - 가속시험기간 : 3개월간 실시(제조 후, 1, 2, 3월)
 - 보존조건 : 38℃, 80% RH 이상
 - 시험항목 및 시험방법 : 성상, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목
 - ㉡ 장기안정성시험 ▶ 1차년도 원료소재 연구에 있어서는 3개월 실시

- 장기안정성시험기간 : 24개월 (또는 12개월) 이상(3개월 단위 측정)
- 보존조건 : 실온
- 시험항목 및 시험방법 : 성상, 미생물 (대장균군)등 필요항목
- ㉔ 시험방법

시험항목	시험방법	규격			
		열수추출물 20 brix	열수추출물 40 brix	주정추출물 20 brix	주정추출물 40 brix
성상	-	짙은 갈색 액상	짙은 갈색 액상	짙은 갈색 액상	짙은 갈색 액상
대장균군	식품공전	0	0	0	0
세균	식품공전	0	0	0	0
점도	상기설명	14.5 ± 1.1	28.4 ± 1.1	11.5 ± 1.9	35.8 ± 1.5
색도	상기설명	28.86 ± 0.58	29.18 ± 0.48	28.84 ± 0.56	29.23 ± 0.44
pH	-	5.26 ± 0.13	5.33 ± 0.12	5.48 ± 0.10	5.59 ± 0.11

※ 색도의 경우 명도로만 기준으로 설정하였으며, 적색도 및 황색도도 실제로 시험항목에 포함하여 진행하였음.

5. 원료소재를 이용한 다양한 제형연구 I : 1차

가. 계획

- (1) 개발목표 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 원료로 하여 산업화 등을 목적으로 다양한 제형연구를 추진하고자 함.
- (2) 개발내용 : 까마귀쪽나무 열매 주정추출물을 주원료로 하여 다양한 제형연구를 수행하는 것으로, 소비자가 가장 선호하는 제품인 음료형태의 제품부터, 환 제품, 캡슐 제품 등 다양한 제형에 대한 연구를 수행하였으며, 특히 환제품의 경우, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 원료의 단독소재 보다는 기존에 다양하게 활용되어지고 있는 소재를 사용한 연구도 추진하였음.

나. 연구수행방법

- (1) 까마귀쪽나무 열매의 원료소재화

① 제형연구 및 1차 제형제작

- ㉔ 일반적으로 제형을 포함한 제품제작연구는 (주)휴림의 신제품개발에 따른 자체 메뉴얼에 따라 조성비를 선정하였음. ㉔ 중앙연구소 제품개발부에서 제품의 특성, 제품의 목적, 소비자 타겟, 제품의 제형 등을 고려하여 3~5종의 레시피를 개발하여 1차 레시피에 따른 각각의 제형 제품을 제작하고, ㉔ 마케팅본부에서 소비자 및 전문가의 의견을 수렴하여 다시 논의한 다음 ㉔ 다시 레시피를 조정하여 다시 만들어 평가하는 과정을 3~5회 걸쳐서 1단계로 완성하여 시작품을 제작하는 것으로 매뉴얼이 구성되어 있음. 본 연구에서는 ㉔의 단계로 1차로 선정된 제형별 레시피를 기준으로 제품을 제작하여 원료소재의 안정성 및 품질관리 등에 필요한 기본적인 시험을 수행하였음. 궁극적으로는 2차년도 과정(2차

년도 수행계획에 포함되어 있음)에는 ㉞와 ㉟과정을 거치면서 최종적으로 산업화에 적절한 제품을 완성하게 됨.

- ㉞ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 소재를 이용한 제형연구는, 일반인들이 가장 선호하고 있는 음료제품을 포함하여, 휴대하기가 편한 캡슐 및 환 제형 등에 대하여 다양한 연구를 추진하였음.

㉟ 제형별 특징

- 공통적인 특징 : *in vivo* test 선행연구의 결과에서 효능이 우수한 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말 10mg/kg을 참고로 제형연구를 수행하였음. 성인 60kg을 기준으로 하였을 때 최대 600mg을 섭취하는 것을 기준으로 하여 제형연구를 수행하였음.
- 제형1 (음료) : 음료로서 상품화는 방법으로는 다양하게 있지만, 혼합음료로서 1회 섭취하는 용량이 50~100 ml이며, 포장용기로는 병, 파우치, 치어팩 등 다양하게 포장이 가능함. 본 제형연구를 추진하는데 있어서 100ml 병을 이용한 연구를 진행하였으며, 주원료인 까마귀쪽나무 열매 주정 추출농축액의 고형분으로서 함량이 1일 섭취량인 600mg이 되도록 레시피를 개발하였으며, 1차 제품을 제작하였음.
- 제형 2(캡슐) : 까마귀쪽나무 열매 소재의 관절염완화 기능에 대한 부형제 외 다른 성분을 최소화하는 것으로 제형연구를 추진.
- 제형 3(환) : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출농축액소재를 기본으로 하여 일반적으로 환제품의 주원료로 많이 알려진 매실추출농축액, 산수유추출농축액, 청국장분말 등의 기능성소재를 첨가하여 제형을 개발하는 방향으로 추진하였음. 제형 1과 제형 2와는 달리 기능적인 측면은 기준섭취량에 60%정도의 함량을 함유하도록 레시피를 조절하여 제형연구를 수행하였음.

- ㉟ 제형제작 : 음료 병 제품은 100ml / 1병 (내용물기준), 캡슐은 360mg/1캡슐 (내용물기준), 환제품의 경우 환10개를 기준으로 0.66g~1.55g을 기준으로 제작하였음.

② 1차 제형연구로 개발된 제품의 안정성 확보

- ㉞ 가속시험 ▶ 1차 제형연구에 있어서는 2~3개월 실시 (매월측정)

- 가속시험기간 : 2~3개월간 실시 (제조 후, 1개월, 2개월, 3개월)
- 보존조건 : 38°C, 80% RH 이상
- 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물 (대장균 및 세균) 등 필요항목

- ㉟ 장기안정성시험 ▶ 1차 제형연구에서는 생략

- 장기안정성시험기간 : 24개월 (또는 12개월) 이상(3개월 단위 측정)
- 보존조건 : 실온
- 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물 (대장균군)등 필요항목

㉔ 시험방법

시험항목	시험방법	비 고
성상	갈색분말 / 짙은갈색액상	
지표성분	상기에 기술된 분석방법	
대장균군	식품공전	
세 균	식품공전	

5-1. 원료소재를 이용한 다양한 제형연구 II : 2차

가. 계획

- (1) 개발목표 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 건강기능식품소재로 활용하여 상품화에 적용하기 위한 제형별 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 함.
- (2) 개발내용 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 건강기능식품의 주원료로 하여 시작품을 제작함에 있어, 소비자가 건강기능식품으로 선호하는 제형에 대한 조사를 실시하였으며, 또한 산학연과 컨설팅 전문가가 포함된 전문가그룹의 제형에 대한 의견을 반영하여 시작품을 제작하고 그 안정성을 확보하는데 있음

나. 연구수행방법

(1) 건강기능식품 제형별 선호도조사

㉠ 소비자그룹의 제형별 선호도 조사

㉡ 2013년 01월에 휴림 건강전문대리점에 방문하는 소비자를 대상으로 실시하였음.

㉢ 총 참여한 인원은 122명으로 남자가 33명이었으며 여자가 89명이었음. 또한 29세 이하가 29명이었으며, 30세~49세 까지가 51명이었으며, 50세 이상이 42명이 참여하였음.

㉣ 선호도 조사내용

- » 건강기능식품의 제형 중 가장 선호하는 제형 1순위와 2순위를 선정하는 것으로, 가장 보편적인 제형인 음료 (액상형태), 타블렛 (알약형태), 캡슐 (연질 및 하드), 분말 및 과립, 기타 (환, 젤리 등)로 구분하여 선호도를 조사하였음.
- » 선호도 분석 : 1순위를 2점, 2순위를 1점으로 산정하여 분석하였음.

㉡ 전문가 그룹의 제형별 선호도 조사

㉢ 2013년 02월에 산업체, 학계 및 연구, 컨설팅전문가 등 9명을 대상으로 신규 개발 중인 소재의 대한 건강기능식품 제형에 대한 선호도를 조사하였음.

㉣ 총 참여한 인원은 9명으로 산업체가 5명, 학교 및 연구가 2명, 컨설팅 등 자문전문가 2명으로 구성되었음.

㉣ 선호도 조사내용

- » 건강기능식품의 제형 중 가장 선호하는 제형 1순위와 2순위를 선정하는 것으로, 가장 보편적인 제형인 음료 (액상형태), 타블렛 (알약형태), 캡슐 (연질 및 하드), 분말 및 과립, 기타 (환, 젤리 등)로 구분하여 선호도를 조사하였음.
- » 선호도 분석 : 1순위를 2점, 2순위를 1점으로 산정하여 분석하였음.

(2) 건강기능식품 제형별 선호도조사 결과를 활용한 제형제작

① 제형 : 타블렛 및 캡슐

② 제형별 제작 및 특징

㉞ 특징 : *in vivo* test 선행연구의 결과에서 효능이 우수한 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말 50 mg/kg을 참고로 제형연구를 수행하였음. 성인 60kg을 기준으로 하였을 때 최대 300 mg을 섭취하는 것을 기준으로 하여 제형연구를 수행하였으며, 추후 인체적용시험의 용량설정 및 기능성 검토에 따른 적정량 조절이 가능.

㉟ 타블렛 제형의 특징 : 개당 500 mg의 타블렛으로 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말이 150 mg이 함유되어 있는 용량으로 시작품을 제작하였음. 특히 타블렛은 인체적용시험 제형으로 선정하였음. 기존의 타블렛 제형의 경우 개당 600~900 mg가 주를 이루고 있으며, 비타민 제형의 경우 1500 mg이나, 상품화를 추진하면서 여러 가지측면을 고려하여 개당 500 mg로 시작품을 제작하기로 하였음.

㊱ 캡슐제형의 특징 : 개당 450 mg의 캡슐로 제작하였으며, 타블렛과 같이 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말이 개당 150 mg 이 함유되어 있는 용량으로 시작품을 제작.

(3) 건강기능식품 제형별 선호도조사 결과로 제작한 제형의 안정성 확보

① 타블렛 제형 시작품의 가속시험을 통한 안정성 확보 : 가속시험기간은 6개월간 실시하며, 보존조건은 38°C, 80% RH 이상이며, 시험항목 및 시험방법은 지표성분의 함량과 성상, 대장균군 (음성) 그리고 봉해도 (60분 이내) 등 필요항목임.

② 캡슐 제형 시작품의 가속시험을 통한 안정성 확보 : 가속시험기간은 6개월간 실시하며, 보존조건은 38°C, 80% RH 이상이며, 시험항목 및 시험방법은 지표성분의 함량과 성상 그리고 봉해도 등 필요항목임.

6. 원료소재 대량생산연구

가. 계획

- (1) 개발목표 : 까마귀쪽나무 열매를 건강기능식품의 기능성 원료소재로 상품화에 활용하기 위하여 대량생산조건을 확보하고자 함.
- (2) 개발내용 : 까마귀쪽나무 열매를 건강기능식품소재로 상품화하기 위하여 주정을 이용한 대량 추출 => 농축 => 분말화 과정에 대한 최적조건을 확립하였으며, 즉시 상품화가 가능하도록 지역 영농조합법인을 통하여 까마귀쪽나무 열매를 자체적으로 추가 확보하였음. 또한 까마귀쪽나무 열매를 이용한 장기적인 사업화 관점에서 원료의 안정적인 확보를 위하여 자체적으로 까마귀쪽나무를 발아 재식하였음.

나. 수행내용

(1) 대량생산조건

- ① 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 제조 : 까마귀쪽나무 열매 (종자제외) 건조물을 추출기 넣고 20배수의 주정 (70%)을 첨가한 다음 추출▶여과▶농축 (증발) 과정을 거쳐 10brix, 20 brix와 40 brix로 각각 농축을 추진함.
- ② 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말제조 : 상기 주정추출물제조에 있어서 10 brix로 농축한 추출물을 산업용 동결건조기에 넣고 분말화함.

(2) 안정성연구

- ① 장기적인 저장용은 20 및 40 brix로 농축하여 보관하면서, 시료화하여 사용하기 위한 안정성 검토를 수행하였음. 안정성 평가항목으로는 성상 및 pH, 미생물검사 (식품공전, 세균, 대장균군), 그리고 점도 (측정기기 : brookfield사의 dV-ii viscometer, 스펀들 no.2, 180 rpm으로 setting)를 수행하였음.

시험항목	시험방법	규격	
		주정추출물 (20 brix)	주정추출물(40 brix)
성 상	-	짙은 갈색 액상	짙은 갈색 액상
대장균군	식품공전	0	0
세 균	식품공전	0	0
점 도	상기설명	11.5 ± 1.9	35.8 ± 1.5
색 도	상기설명	28.84 ± 0.56	29.23 ± 0.44
pH	-	5.48 ± 0.10	5.59 ± 0.11

※ 색도의 경우 명도로만 기준으로 설정하였으며, 적색도 및 황색도도 실제로 시험항목에 포함하여 진행하였음.

7. 안전성 시험(GLP 독성시험)

가. 단회투여 시험방법

(1) 시험개요

- ① 시험목적: 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 LJM-F70 (까마귀쭈나무 열매 70% 에탄올 주정 추출물) 을 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시한다.
- ② Good Laboratory Practices: 본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.
 - “비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2009-183 호 (2009 년 12 월 22 일)
- ③ 시험기준: 본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시한다.
 - “의약품등의 독성시험기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2012-86 호 (2012 년 8 월 24 일)
- ④ 동물윤리: 본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 전부개정 2011 년 8 월 4 일 법률 제 10995 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 120727).
- ⑤ 수의학적 관리: 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따라 실험동물의 극심한 통증 및 고통 등을 예방하기 위한 안락사가 포함된 수의학적 관리를 시험책임자, 수의사 및 시험의뢰자와 협의하에 실행한다.

(2) 시험계

- ① 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
- ② 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Korea
- ③ 종 및 계통의 선택이유: Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택한다.
- ④ 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위: 수컷, 12 마리, 5 주령, 90.0 ~ 150.0 g/암컷, 12 마리, 5 주령, 80.0 ~ 140.0 g
- ⑤ 투여시 주령 및 동물수: 6 주령, 암수 각 10 마리
- ⑥ 검역·순화: 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (Sartorius, Germany)로 체중을 측정한다. 6 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰한다. 단, 동물입수시 검역실에서 약 3 일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동한다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태를 평가한다. 이상동물은 CO₂ 가스를 흡입시켜 안락사 시킨다.
- ⑦ 개체 및 사육 상자 식별: 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육 상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착한다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착한다.
- ⑧ 군분리: 군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물 중에서 순화종료일(군분리일)에 실시한다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10 마리를 선발한다. 선발한 동

물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2 군, 군당 5 마리로 군분리한다.

⑨ 잔여동물의 처리: 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시킨다.

(3) 사육환경조건

① 동물실번호 A318

② 사육상자의 종류, 크기 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)

③ 사육상자당 수용동물 수 2~3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)

④ 온도 19.0~25.0° C

⑤ 상대습도 30.0~70.0%

⑥ 환기횟수 10~15 회/시간

⑦ 명암주기 (조명시간) 12시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

⑧ 조도 150~300 Lux

⑨ 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 급이기는 약 1 회/2 주 빈도로 교환한다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

(4) 사료 SOP/GER/011)(

① 종류: 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

② 제조자 Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

③ 급이방법: 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시킨다.

④ 사료의 분석 및 확인: 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

⑦ 음수: 종류 및 급수방법: 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 자유섭취 시킨다. 음수의 분석 및 확인: 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청원군 강외면 오송생명 1 로 184 (연제리 676 번지))에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 439 호, 2011 년 12 월 30 일, 일부개정)의 전 항목에 대하여 실시한다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

(5) 투여

① 투여경로: 경구투여

② 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택한다.

③ 투여방법 및 투여횟수: 투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출한다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여한다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4 시간에 사료를 급여한다.

(6) 군구성 및 투여용량

① 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	10	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)

- ② 투여용량설정: 본시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B12831P)으로 5,000 mg/10 mL/kg 을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일 시험물질 투여군을 설정한다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여한다.

(7) 관찰 및 검사

- ① 일반증상 관찰: 투여당일 (0 일)에 투여 후 30 분까지는 적어도 1 회 이상, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하고 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰한다.
- ② 사망동물의 처리: 관찰기간 중 사망동물은 발견 시 체중을 측정한 후 부검을 실시하는 것을 원칙으로 하고, 즉시 부검이 불가능할 경우 냉장보관 후 24 시간 이내에 부검한다.
- ③ 체중측정: 체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 일 및 14 일 (부검일)에 측정한다.
- ④ 부검: 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검한다.
- ⑤ 조직병리학적 검사: 부검 시 육안소견이 관찰된장기·조직에 대해서 필요하다고 판단된 경우, 조직병리학적 검사를 실시한다.

(8) 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test 를, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test 를 실시하여 유의성을 확인한다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

나. 유전독성 시험방법(소핵시험, 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험)

○ 소핵시험

(1) 시험개요

- ① 시험목적: 마우스 골수세포를 이용하여 시험물질 LJM-F70 (까마귀쪽나무 열매 70%에탄올 주정 추출물)의 소핵유발 유무를 평가한다.
- ② Good Laboratory Practices: 본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices를 준수한다.
 - “1비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호 (2009년12월22일)
- ③ 시험기준: 본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시한다.

- “1의약품등의독성시험기준”, 식품의약품안전청 고시 제2012-86호 (2012년8월24일)

- ④ 동물윤리: 본 시험은 동물보호법(제정1991년5월31일 법률 제4379호, 전부개정2011년8월 4일 법률 제10995호)에 근거한 (주)바이오독스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호 : 120681).
- ⑤ 수의학적 관리: 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따라 실험동물의 극심한 통증 및 고통 등을 예방하기 위한 안락사가 포함된 수의학적 관리를 시험책임자, 의사 및 시험의뢰자와 협의하에 실행한다.
- ⑥ 시험물질조제방법: 시험물질의 조제는 투여일에 실시한다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (Sartorius, Germany), 유발에 넣고 소량의 부형제를 가하여 유봉으로 균일하게 현탁시킨다. 현탁된 시험물질액을 조제용기에 넣고 부형제를 가하여 규정용량으로 조제한다.
- ⑦ 양성물질의 조제: Mitomycin C (MMC) 2 mg에 주사용수 (Choongwae Pharma Corp., Korea) 4 mL를 첨가하여 용해한 후 생리식염주사액 (Choongwae Pharma Corp., Korea)을 더하여 0.2 mg/mL으로 조제하여 초저온냉동고 (-80 ~ -60° C) 내에 보존하고, 사용시 해동하여 시험에 사용한다.
- ⑧ 시험물질액의 분석: 시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않는다.

(2) 시험계

- ① 종 및 계통 마우스, CrljOri:CD1(ICR), SPF
- ② 생산자 ORIENTBIO INC., Korea
- ③ 종 및 계통의 선택이유 ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택한다.
- ④ 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위
 - 용량설정시험: 수컷, 17마리, 7주령, 26.0 ~ 34.0 g
 - 검체제작시간 설정시험: 수컷, 10마리, 7주령, 26.0 ~ 34.0 g
 - 본시험: 수컷, 27마리, 7주령, 26.0 ~ 34.0 g
- ⑤ 검역·순화: 반입시동물의 외관 검사를 실시한 후, 체중을 측정한다 (Sartorius, Germany). 약 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰한다. 단, 동물 입수시 검역실에서 약 3일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동한다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태를 평가한다. 이상 동물은 안락사 시킨다.
- ⑥ 개체 및 사육상자 식별: 순화기간 중에는 입수시에 체중측정한 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화 기간 중 개체식별카드를 부착한다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 한다. 사육상자에는 색깔별로 라벨을 부착하여 식별한다.
- ⑦ 군분리: 군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일 (군분리일)에 실시한다. 군분리일에 평균체중에 가까운 동물에 대해 용량설정시험용 15마리, 검체제작시간 설정시험용 9마리 및 본시험용 25마리를 선별한다. 선별한 동물

은 각군평균체중이 균등하도록 군분리한다.

⑧ 잔여동물의 처리: 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시킨다.

(3) 사육환경조건

① 검역실 번호 A316

② 동물실 번호 A324

③ 사육 상자의 종류, 크기

- 순화기간중: 폴리카보네이트 케이지, 260W×420D×180H (mm)

- 시험기간중: 폴리카보네이트 케이지, 200W×260D×130H (mm)

④ 사육 상자당 수용동물 수

- 검역 및 순화기간중: 용량설정시험 8 ~ 9마리

검체제작시간 설정시험 10마리

본시험 9마리

시험기간중: 용량설정시험 3 마리

검체제작시간 설정시험 3 마리

본시험 5 마리

⑤ 온도: 19.0 ~ 25.0° C

⑥ 상대습도: 30.0 ~ 70.0%

⑦ 환기회수: 10 ~ 15 회/시간

⑧ 명암주기 (조명시간): 12 시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)

⑨ 조도: 150 ~ 300 Lux

⑩ 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 급이기는 1회/2주, 급수병은 2회/주 빈도로 교환한다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

(4) 용량설정시험

① 본시험의 용량을 설정하기 위해 비GLP 시험으로 실시한다.

② 투여용량의 선택이유: 가이드라인에서 정한 최고용량은 2,000 mg/kg 이지만, 시험물질이 식품인 것을 고려하여 5,000 mg/kg 을 최고용량으로 하고, 2,500, 1,250, 625 및 313 mg/kg 의 4 용량을 설정한다.

③ 투여방법: 1 용량당 3 마리로 한다. 테프론제 존데를 장착한 주사기를 사용하여 강제경구 투여한다. 투여액량은 10 mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로하여 산출한다.

④ 일반증상 및 사망동물 관찰 투여직후 (투여 0일), 투여후 2시간, 투여후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 각 용량별 사망동물을 관찰한다.

⑤ 본시험의 용량설정: 최고용량인 5,000 mg/kg에서 사망동물 및 일반증상이 관찰되지 않

을 경우에는 5,000 mg/kg을 최고용량으로 설정하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다. 최고용량인 5,000 mg/kg에서 사망동물이 관찰된 경우에는 사망동물이 확인되지 않은 최고 용량을 본시험의 최고용량으로 설정하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다.

(5) 검체제작시간 설정 시험

- ① 본시험의 검체제작시간 설정하기 위해 비GLP시험으로 실시한다.
- ② 투여방법: 용량설정시험에서 설정한 최고용량을 1회 경구투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한다. 각 시간당 동물은 3마리로 한다. 투여액량은 10 mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출한다.
- ③ 일반증상 및 사망동물 관찰: 시험물질 투여직후 (투여 0일), 투여후 2시간, 투여후 1, 2 및 3일에 일반증상을 관찰한다. 사망동물 발견 시에는 체중을 측정한 후 부검을 실시하는 것을 원칙으로 하고, 즉시 부검이 불가능한 경우에는 24시간 이내에 부검한다.
- ④ 검체제작시간의 설정: 소핵유발빈도가 증가하는 시간대를 골수세포채취시간으로 결정한다. 모든 시간대별에서 소핵유발의 증가가 확인되지 않은 경우에는 일반적으로 사용되는 투여후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 한다.

(6) 군구성: 각군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정한다.

(7) 투여

- ① 투여경로: 경구투여
- ② 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예정경로를 고려하여 경구투여를 선택한다.
- ③ 투여방법 및 투여회수: 시험물질은 테프론제 존데를 장착한 주사기를 사용하여 1회 강제경구 투여한다. 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여한다. 양성대조물질 MMC는 일반적으로 많이 사용되고 있는 복강에 1 mL 주사기를 이용하여 1회 투여한다. 투여액량은 10 mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로하여 산출한다.

군	투여액량 (mL/kg)	투여회수	투여경로	마리수 (개체번호)
G1 음성대조	10	1	경구	5 (1101-1105)
G2 저용량	10	1	경구	5 (1201-1205)
G3 중용량	10	1	경구	5 (1301-1305)
G4 고용량	10	1	경구	5 (1401-1405)
G5 양성대조	10	1	복강내	5 (1501-1505)

(8) 관찰 및 평가

- ① 일반증상 및 사망동물 관찰: 일반증상 관찰은 투여직후 (투여 0일), 투여후 2시간 및 검체 제작일 까지 24시간 간격으로 실시하며, 각 용량의 사망동물을 관찰한다. 사망동물 발견 시에는 체중을 측정한 후 부검을 실시하는 것을 원칙으로 하고, 즉시 부검이 불가능한 경우에는 24시간 이내에 부검한다.

- ② 체중측정: 체중은 투여일 (투여 0일) 및 골수채취직전에 측정한다 (Sartorius, Germany). 또한, 사망동물에 대해서는 사망 발견시에 측정한다.
- ③ 골수세포의 채취 및 도말검체의 제작: 시험물질 투여 후 각군의 검체제작시간에 동물을 경추 탈골한다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μ L의 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취한다. 골수세포 부유액은 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말한다. 개체당 3매의 골수도말검체를 제작한다. 슬라이드글라스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정한다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)으로 조제)으로 약 30분간 염색한다. 0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)을 사용하여 세척하고 0.004% citric acid 수용액에 세정하여 건조시킨다.
- ④ 검체의 관찰: 코드화된 골수도말표본을 1,000배 배율의 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰한다. 검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵 다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구한다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체 당 500개의 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구한다.

(9) 시험의 성립조건

- ① 아래의 조건을 만족하는 경우 성립으로 한다.

-
- 음성대조군 및 양성대조군에 있어 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 **historical control data**의 범위내에 있을 것.
-

(10) 결과의 판정

- ① 아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정한다.

-
- 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 **Kastenbaum and Bowman**의 추정학적 통계방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 것.
-

(11) 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증한다. 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램(version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시한다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정 한다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett' t-test의 다중검정을 실시한다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis를 실시하고 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Steel' test의 다중검정을 실시한다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

○ 염색체이상시험

(1) 시험개요

- ① 시험목적: 시험물질에 대해 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 사용하여 염색체이상 유발성의 유무를 검토한다.
- ② Good Laboratory Practices: 본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices를 준수한다.
 - “비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2009-183 호
- ③ 시험기준: 본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시한다.
 - “의약품등의독성시험기준”, 식품의약품안전청 고시 제 2012-86 호

(2) 시험물질의 조제

세포증식억제시험의 최고용량인 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 10배 stock (수용액) 또는 100배 stock (유기용매)를 조제하기 위해, 시험의뢰자가 제공한 정보에 따라 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수 및 dimethyl sulfoxide에는 균일하게 현탁되었고, acetone 및 tetrahydrofuran에는 용해 또는 현탁되지 않았다. 따라서, 현탁성이 좋은 주사용수를 선택한다.

- ① 조제방법: 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시한다. 최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (Sartorius, Germany), 유발에 넣고 소량의 부형제를 가하여 유봉으로 균일하게 현탁시킨다. 현탁된 시험물질액을 조제용기에 넣고 부형제로 규정용량이 되도록 조제한다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제한다.
- ② 양성물질의 조제: 2 mg/vial의 MMC에 주사용수 (Choongwae Pharma Corp., Korea) 4 mL를 가하여 vortex mixer로 용해시킨 후 생리식염수 (Choongwae Pharma Corp., Korea)로 희석하여 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 stock solution을 조제한다. B[a]P는 필요량을 칭량한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 stock solution을 조제한다. 조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, $-80 \sim -60^\circ\text{C}$)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용한다.

배양계열	S9 mix	명칭	Stock concentration ($\mu\text{g/mL}$)	최종처리용량 ($\mu\text{g/mL}$)
단시간처리법	-	MMC	5	0.05
	+	B[a]P	2,000	20
연속처리법	-	MMC	5	0.05

(3) 세포주

- ① 명칭: Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포
- ② 선택이유: 검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용되고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 Chinese Hamster Lung (CHL/ IU) 세포주를 선택한다.
- ③ 입수 및 보관: CHL/IU 세포주 (Lot No.: 3375917, U.S.A.)는 2011년 11월 24일에 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Eagle' Minimum Essential Medium (EMEM)이 들어있는 75 cm^2 플라스크 (Nunc,

Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이코 플라즈마의 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 가하여 플라스크 바닥으로부터 세포가 분리된 것을 확인하였다. 세포현탁액을 tube에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 1×10⁶ cells/mL이 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO (Merck, Germany)의 최종농도가 10% 가 되도록 하여 동결보존용 튜브에 분주하고, 초저온냉동고 (-80 ~ -60° C)에서 하루동안 방치한 후, 액체질소탱크에 사용시까지 보관하였다.

- ④ 계대배양: 동결된 세포를 37° C로 설정된 항온수조에서 녹인 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 배양한다. 세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80%이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포가 분리한다. 세포현탁액을 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 배양한다.
- ⑤ 전배양: 염색체이상시험에는 세포 계대수가 30 이내인 세포를 사용한다. 대수증식기의 세포에 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 플라스틱 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨 후, 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10⁴ cells/mL 세포현탁액을 만든 후, 세포증식억제시험용은 96 well plate (200 μL/well; Nunc, Denmark), 분시험용은 60 mm dish (5 mL/dish, BD, U.S.A.)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 1일간 배양한다.
- ⑥ 배지: 시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 Penicillin G sodium과 10,000 μg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen, U.S.A.)을 100 : 1의 비율로 첨가한다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8° C) 보관한다.

(1) S9 mix의 조제

- ① 입수 및 보관: S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60° C)에 보관하고, 유효기한 내에 사용한다.

<S9의 특성>

사용동물	Sprague-Dawley rat [Cr1:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

② S9 mix 조성

성분		각 성분의 함유량
S9		0.3 mL
Cofactor C	50 mmol/L MgCl ₂	0.1 mL (5 μmol)
	330 mmol/L KCl	0.1 mL (33 μmol)
	50 mmol/L Glucose-6-phosphate	0.1 mL (5 μmol)
	40 mmol/L NADP	0.1 mL (4 μmol)
	20 mmol/L HEPES완충액(pH 7.2)	0.2 mL (4 μmol)
	정제수	0.1 mL
총 액량		1 mL

③ S9 mix의 조제방법: S9 mix는 필요량을 사용시에 조제한다. 동결보관된 S9과 Cofactor C를 해동하여 2 : 4.7의 비율로 혼합하여 조제한다.

(5) 세포증식억제시험 (SOP/GNT/014)

① 본시험의 용량을 설정하기 위해 비GLP로 실시한다.

② 용량: 가이드라인에서 추천한 5,000 μg/mL을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5 μg/mL의 8용량을 설정한다. 또한, 음성대조군을 설정한다.

③ 처리방법: 계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM으로 희석하여 96 well plate (Nunc, Denmark)에 200 μL씩 분주하고, 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 1일간 배양한다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리한다. 한 용량당 4 well을 사용하고, 시험번호 및 각 계열을 기입해서 well plate를 구별한다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리한다.

<S9 mix 조제 방법>

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (μL/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200
	+	음성대조	0.73	0.17	0.1	200
		시험물질	0.73	0.17	0.1	200
연속처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200

처리후, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하에는 6시간 배양한 후 well내를 Dulbecco' Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)로 세정하고, 신선한 배양액 200 μL를 가해 18시간 더 배양한다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양한다. 시험물질의 침전은 시험물질액 처리시와 처리종료시에 각 용량별로 관찰한다.

④ 흡광도 측정: 배양종료 후 모든 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT, 5 mg/mL D-PBS)를 50 μ L씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후에 배양액을 버리고 건조시킨다. 여기에 DMSO를 150 μ L씩 첨가하여 침전물을 용해시킨다. ELISA reader (ELx808IU, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

- ⑤ 본시험의 용량설정의 이유: 세포증식억제시험의 결과, 세포독성이 없고 시험물질 처리 종료시에 침전이 확인되지 않는 경우에는 5,000 μ g/mL을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2,500 및 1,250 μ g/mL)의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다. 세포증식억제가 확인된 경우, 약 50% 세포증식억제용량 (Inhibition concentration 50%: IC50)을 산출한다. 세포증식을 약 50% 억제하는 용량인 IC50을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다. 세포독성이 없고 시험물질 처리 종료시에 침전이 확인된 경우, 시험물질 처리 종료시에 침전이 형성되는 최저용량을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정한다.

(6) 본시험

- ① 처리방법: 계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM로 희석하여 60 mm dish (BD, U.S.A.)에 5 mL씩 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37° C 배양기에서 1일간 배양한다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리한다. 한 용량당 2개의 plate를 사용하고, 각각의 plate에 유성펜으로 코드화한 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 대사활성화 존재유무를 기입하여 식별한다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리한다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.7		0.13	5
연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

처리후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 6시간 배양한 후 plate내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5 mL로 교환하고 18시간 더 배양한다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양한다. 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시와 처리종료시에 각 용량별로 관찰한다.

- ② 검체제작: 배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 μ g/mL 되게 첨가한다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 plate 바닥으

로부터 세포를 떼어낸다. 떨어진 세포를 1,000 rpm 에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, 한일과학)한 후 상등액을 버리고 37° C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 mL 첨가하여 vortex mixer로 교반한 후 37° C에서 20분간 방치한다. 20분 후, 1 mL의 냉각한 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1)을 넣고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 세포를 반고정한다. 이후, 5 mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 vortex mixer로 교반하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 1회 반복하여 세포를 고정한다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드글라스 2군데에 1~2방울 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하고 코드화한다. 건조 후, 3% Giemsa 염색액으로 약 20분간 염색한다.

(7) 관찰

슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시한다. 단시간처리법에서 양성의 결과를 얻었을 경우에는 연속처리법의 슬라이드 관찰은 실시하지 않는다. 단, 양성의 결과를 명확히 하기위해 연속처리법의 슬라이드 관찰을 실시할 수도 있다. 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기세포가 관찰 가능한 3용량 이상을 설정한다. 각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경 (BX51, Olympus, Japan, 400~1,000배 배율)으로 관찰한다. 구조이상으로서 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse), 갭 (gap: 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위) 및 기타 (other; o)로 분류한다. 기타로서 1개의 분열중기세포에 다수의 gap 및 절단 등이 있는 경우에는 단편화 (fragmentation; frg)로 기록한다. Gap에 대해서는 결과 기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가한다. 또한, 수적 이상으로서 배수체 (polyploid; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication; end)를 기록한다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고, 퍼센트 값을 염색체이상빈도로 한다. 또한, 염색체이상의 종류를 각각 기록한다.

(8) 시험의 성립조건

- 아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 한다.

- 염색체이상출현빈도가 음성대조군에서는 5% 미만, 양성대조군은 10% 이상일 것.
- 시험물질군에서 분열중기상 세포를 200 개 관찰한 용량이 3 용량 이상일 것.
- 세포의 오염이 없을 것.

(9) 결과의 판정

- 염색체이상을 가진 세포 (gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni등의 판정기준에 따라 아래와 같이 판정한다.

이상세포의 평균 출현율	판정
5% 미만	음성 (-)
5% 이상 ~ 10% 미만	의양성 (±)
10% 이상	양성 (+)

의양성으로 판정될 경우 적절한 시험 조건하에서 확인시험을 실시한다. 확인시험의 결과, 다시 의양성으로 판정될 경우, 종합적인 평가는 의양성으로 판정한다. 양성으로 판정된 경우는 D20 및 TR값을 구한다.

- D20: 20%의 세포에 염색체이상이 출현할 수 있는 농도 (mg/mL)
- TR값: 단위용량 (mg/mL)당의 염색분체형교환 (cte) 출현빈도의 비교치

(10) 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시한다. 음성으로 판정될 경우에는 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher' exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 0.05) 검증을 실시하고, 양성으로 판정될 경우에는 용량의존성에 대해 Cochran-Armitage trend test에 의해 유의차 검증을 실시한다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

○ 복귀돌연변이시험

(1) 시험개요

- ① 시험목적: 시험물질 까마귀죽나무 열매 주정추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하여 검토한다.
- ② Good Laboratory Practices: 본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices를 준수한다.
 - “비임상시험관리기준”, 식품의약품안전청 고시 제2009-183호
- ③ 시험기준: 본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시한다.
 - “의약품등의독성시험기준”, 식품의약품안전청 고시 제2012-86호

(2) 시험재료 및 방법

- ① 시험물질: 까마귀죽나무 열매 주정 추출물(LJM-F70: Lot No. JBRI-LJM-F70-02)
- ② 시험물질 및 양성대조군 조제: 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였고 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시킨 후 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였으며 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다. 양성물질의 조제는 각 군주에 대한 양성대조물질의 용량은 본 국방부 직할부대 및 기관의 이타에 기초하여 설정하였다. 양성대조물질은 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60° C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다. 양성대조물질은 아래와 같다.

명칭	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	실온	Wako, Japan

- ③ 균주는 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 가이드라인에서 추천되고 있는 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA1535, *Salmonella typhimurium* TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA (pKM101) 5종을 선택하여 사용하였다. 각 균주에 대한 유전자형 및 양성대조물질의 종류와 용량은 아래와 같다.

종	균주명	유전자형	
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i> Δ uvrB (pKM101)
	TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i> Δ uvrB (pKM101)
	TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i> Δ uvrB
	TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa</i> Δ uvrB
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA(pKM101)	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i> (pKM101)

S9 mix	균주명	명칭	용량 (μ g/plate)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	AF2	0.005
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	2.0

(3) 시험방법시험개요

- ① 전배양은 동결보관된 각 균주를 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37° C, 130 rpm)한다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10^9 cells/mL 이상 되는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.
- ② 배지는 Nutrient broth No.2(Oxoid, UK)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 첨가하여 stirrer로 교반하여 용해시킨다. 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가한다. 조제후 고압증기 멸균하였고 최소 glucose 한천평판배지 Bacto agar(BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 조제하여 고압증기 멸균후 VB (Vogel-Bonner) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 각각 첨가하고 플레이트에 분주하여 실온

방치하였다. 또한 Top agar 염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 각각 0.5 및 0.6%가 되게 조제한 후, 고압증기멸균한다. 멸균후, 살모넬라균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

<최소 glucose 한천평판배지의 조성>

성분	각 성분의 함유량
Bacto agar	15 g
VB salts 10배 농축액	100 mL
20% glucose	100 mL
초순수	800 mL
총 액량	1 L

<VB salts 10배 농축액의 조성>

성분	사용량	제조사
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
구연산	1.829 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
K ₂ HPO ₄	10 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	3.58 g	YAKURI PURE CHEMICALS Co., Ltd., Japan
초순수	100 mL	-

③ S9 특성 및 S9 mix의 조성

사용동물	Sprague-Dawley rat [Cr1:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

성분		각 성분의 함유량
S9		0.1 mL
Cofactor A	0.4 mol/L MgCl ₂	0.02 mL (8 μmol)
	1.65 mol/L KCl	0.02 mL (33 μmol)
	1.0 mol/L Glucose-6-phosphate	0.005 mL (5 μmol)
	0.1 mol/L NADPH	0.04 mL (4 μmol)
	0.1 mol/L NADH	0.04 mL (4 μmol)
	0.2 mol/L Sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5 mL (100 μmol)
	정제수	0.275 mL
총 액량		1 mL

- ④ 본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하기 위해 가이드라인에서 추천하는 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 5용량을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 생육저해가 관찰되는 경우에는 생육저해가 확인된 가장 낮은 용량을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 5용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 시험물질의 석출이 관찰되는 경우는 복귀변이콜로니의 계측에 장애가 되지 않는 가장 높은 용량을 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 4용량의 시험물질군을 설정한다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.
 - ⑤ 유전자돌연변이 확인을 위해 균 배양은 프리인큐베이션법으로 실시한다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열, 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였으며 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군, 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입하였다. 처리방법은 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 μL 씩 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 μL 및 각 균주현탁액 100 μL 를 첨가한 후, 37° C에서 20분간 진탕한다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 각각 2 mL씩 첨가하여 vortexing하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온에서 방치하였다. 대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 μL 대신에 S9 mix 500 μL 를 첨가한다. 그외의 처리는 동일하게 실시하고 배양법 및 배양시간 Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37° C 배양기에서 48시간 배양하였다.
 - ⑥ 무균검사는 잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해, 최고용량의 시험물질액, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 및 S9 mix를 건열멸균한 유리시험관에 각각 넣고, 37° C 배양기에서 20분간 진탕한다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing 한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에 방치한다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37° C 배양기에서 약 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.
- (4) 관찰 및 계측
- ① 시험물질의 석출의 관찰은 시험물질 처리시 및 콜로니 수 계측시에 시험물질의 석출에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다.
 - ② 콜로니수의 계측은 배양 종료후, 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터(Protocol, SYMBIOSIS, UK)로 자동계측하고 자동계측이 정확하지 않을 경우에는 육안계수를 실시하였다.
 - ③ Background lawn의 관찰은 생육저해 유무를 확인하기 위해, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성유무를 확인한다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 한다.
 - ④ 시험의 성립조건은 다음과 같은 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

-
- 음성 및 양성대조군에서의 평균복귀변이콜로니수가 Historical control data 의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것.
 - 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않을 것.
 - 오염이 없을 것.
-

⑤ 결과의 판정은 다음과 같은 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

-
- 적어도 1개 군주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것.
-

(5) 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않는다.

8. 까마귀쪽나무 인체적용시험

가. 인체적용시험의 목적

노화로 인해 슬관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 까마귀쪽나무 열매 주정 추출분말 섭취의 골관절 기능 개선, 염증반응 억제, 연골기질분해 작용 억제를 확인하기 위함이다.

나. 인체적용시험의 배경

퇴행성 관절염은 관절 연골의 퇴행성 변화에 의해 발생하며, 주된 증상은 통증이다. 관절의 염증 반응은 염증을 유발시키는 cytokine과 이를 생성하는 대식 세포의 수가 증가하거나 면역세포에서 염증을 유발하는 leukotriene B4가 증가하여 일어난다. 관절에서 염증반응으로 인해 연골에 손상이 일어나서 매끈매끈한 관절 연골 면이 울퉁불퉁해지면서 연골 밑의 뼈에 이상이 생기게 된다. 관절 질환에서처럼 만성 염증은 해로울 수 있다. 만성염증은 관절들에 있는 두 개의 주요 부위, 즉 윤활막과 연골에 영향을 미친다. 연골의 파괴가 점점 진행되면서 관절 불안정성과 기능소실이 초래된다. 관절염 초기에는 염증이 주로 윤활막선을 침범하며 질환이 진행됨에 따라 연골에서 변화가 일어나고 연골세포의 사망이 최고조에 다다르고 세포외 바탕질의 붕괴에 의해 연골의 파괴가 완전히 일어난다. 퇴행성 관절염을 예방하거나 치료하는 약물은 아직 개발되어 있지 않으나, 진통 및 항염 작용을 가진 약물, 즉 Cox-2 억제제 또는 비스테로이드성 항염제(NSAIDs)가 많이 사용되고 있다. 그러나 장기 복용 또는 남용은 소화기계 및 혈액응고기전의 부작용을 초래할 수 있으며, 면역력과 인체 저항력을 저하시켜 결과적으로 관절염을 악화시킬 우려가 있다. 따라서 관절 건강에 도움을 주는 건강기능식품은 연골 소실 또는 관절 변형에 따른 관절/연골 기능 유지에 도움을 줄 수 있으며, 더 나아가 퇴행성 관절염위험을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 까마귀쪽나무 열매 주정추출분말은 *in vitro* 실험에서 항염증 기능을 확인하였으며, carrageenan 및 MIA로 유도된 골관절염 동물모델에 있어서 까마귀쪽나무 열매 주정추출분말의 섭취가 염증성 매개물질의 생산을 억제하고 연골의 기질분해 작용을 유전자 수준에서 억제하여 골관절염의 진행을 유의적으로 저하시키는 것을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 선행 연구 결과를 바탕으로, 노화로 인해 슬관절에 비염증성 기능 이상을 보이는 중년 이상의 성인에서 까마귀쪽나무 열매 주정추출분말 섭취의 골관절 기능 개선, 염증반응 억제, 연골기질분해 작용 억제기능 평가하고자 한다.

다. 인체적용시험계획

관절건강 인체적용시험은 노화로 인해 슬관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 까마귀쪽나무 열매 주정추출분말 섭취의 골관절 기능 개선, 염증반응 억제, 연골기질분해 작용 억제를 확인하기 위함이 목적이다. 까마귀쪽나무 열매 주정추출물에 대한 인체적용시험을 위한 인체적용시험계획서(임상 protocol)는 개별인정형 건강기능식품 인증 전문 CRO기관인 바이오푸드 네트워크 씨알오를 통하여 작성되었다.

○ 인체적용시험계획서(임상 protocol) 요약

인체적용시험 제목	까마귀쪽나무 열매 주정추출분말의 슬관절 건강 개선 기능성을 평가하기 위한 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	제주테크노파크
인체적용시험 책임자	이화여자대학교 식품영양학과 권오란 교수
인체적용시험 공동연구자	분당차병원 정형외과 김재화 교수 분당차병원 정형외과 류근정 수련의 서울과학기술대학교 식품공학과 김지연 교수
인체적용시험 실시기관명 및 주소	분당차병원 (경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지 분당차병원)
시험기간	IRB 승인일로부터 1년
시험대상	노화로 인해 슬관절에 불편을 호소하는 중년 만50세 이상의 성인 남녀
인체적용시험 목적	노화로 인해 슬관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 까마귀쪽나 무 열매 주정추출분말 섭취의 골관절 기능 개선, 염증반응 억제, 연골기질 분해 작용 억제를 확인함
디자인	12주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험
시험식품	까마귀쪽나무 열매 주정추출분말(까마귀쪽나무 열매 주정추출분말 100 mg/d, 200 mg/d)
대조식품	Placebo
시험방법	<p>방문 1(0주)에 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자는 연구대 상자 선정 및 제외 기준에 의해 적합여부를 판정 받는다. 선정된 연구대상 자는 방문 1(0주)에 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군으로 무작위 배 정되어 12주간 대조식품 또는 시험식품을 섭취한다. 방문 1(0주), 방문 2(4 주), 방문 3(8주), 방문 4(12주)에 바이오마커를 측정한다.</p> <pre> graph LR S[Screening & Randomization] --> P[대조군(Placebo)] S --> L[저용량 시험군] S --> H[고용량 시험군] P --> C[Completion] L --> C H --> C </pre> <p>방문1 (D-0, 0주) 방문2 (D+28, 4주) 방문3 (D+56, 8주) 방문4 (D+84, 12주)</p>
연구대상자수	대조군, 저용량 시험군, 고용량 시험군은 각 군당 23명씩, 총 69명이 목표이 고, 탈락률(20%)을 고려하여 선정기준에 적합한 대상자는 군당 29명씩, 총 87명을 등록하기로 한다.
연구대상자 포함기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다. 본 연구에 참여를 동의하고, 서면동의서에 서명한 자 만 50세 이상 남녀 American College of Rheumatology Criteria에 의해 골관절에 불편을 호소 하는 자

연구대상자 제외기준	1) Kellgren-Lawrence grade 3, 4에 해당하는 자 2) 첫 방문전 1주일 이내에 NSAID계 의약품을 투여받은 자 3) 염증성 관절염 소견(ESR or CRP 상승)이 의심되는 경우 4) 고도 비만자(BMI 30 이상) 5) 보행에 장애를 줄 수 있는 다른 신경계 혹은 하지 관절(고관절, 족부관절) 이상자 6) 중등도 이상의 요통 및 하지의 방사통을 호소하는 경우 7) 하지의 심한 신경학적 및 혈관성 질환자, 하지 부정정렬이 있는 자 8) 폐경 후에 호르몬 요법을 받고 있는 여성 9) 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자 10) 첫 번째 방문 전 4주 이내에 임상시험에 참여한 자 11) 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 기타 질환
기능성 평가	[Subjective biomarker] • VAS [0, 4, 8, 12주] • WOMAC [0, 4, 8, 12주] • SF-36 [0, 12주] [Objective biomarker] • 방사선학적 검사 [0, 12주] • Serum: CTX-II, MMPs, COMP, CRP, ESR, IL-6, fructosamine, TIMP1 [0, 12주] • Urine: CTX-II, Glu-Gal-PYD [0, 12주]
안전성 평가	1) 이상반응 2) 활력징후 3) 임상병리검사 (일반혈액검사 및 뇨 검사)

○ 인체적용시험 진행 일정표

Visit		1	2	3	4
Week		0	4	8	12
Window period		0	28d ± 5d	56d ± 5d	84d ± 5d
서면동의서		✓			
인구학적 조사(성별, 생년월일, 연령)		✓			
병력 조사		✓			
의약품/건강기능식품 복용력 조사		✓	✓	✓	✓
신체계측 (신장, 체중, BMI)		✓	✓	✓	✓
안전성 평가	활력징후(맥박, 혈압, 체온)	✓	✓	✓	✓
	임상병리검사(혈액, 뇨 검사)1)	✓			✓
	임신반응검사2)	✓			
기능성 평가	VAS, WOMAC	✓	✓	✓	✓
	SF-36, 방사선학적 검사, 검체분석3)	✓			✓
음주력 및 흡연력 조사		✓			
식습관 조사(24hr-recall)		✓			✓
적합성 평가		✓			
무작위배정		✓			

시험식품 및 대조식품 배부	✓	✓	✓	
반납식품 회수/순응도 확인		✓	✓	✓
이상반응 확인		✓	✓	✓

(1) 채혈하기 전날 12시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목 검사

단, 스크리닝 방문 4주 이내에 건강검진 결과가 있는 연구대상자에 한하여 스크리닝 방문 시 임상병리검사(혈액, 뇨 검사)를 생략할 수 있다.

① 혈액학적 검사: CBC(WBC, RBC, Hb, Hct, PLT), differential count(neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes)

② 혈액화학적 검사: AST, ALT, BUN, creatinine, glucose, total protein, albumin, uric acid

③ 뇨 검사: pH, color, specific gravity, protein, glucose, ketone, blood

(2) 폐경(무월경이 24개월 이상)이 확인된 연구대상자를 제외한 가임기 여성에 한해 소변으로 실시한다.

(3) Serum: CTX-II, MMPs, COMP, CRP, ESR, IL-6, fructosamine, TIMP1

Urine: CTX-II, Glu-Gal-PYD

○ 까마귀쪽나무 열매 안전성 자료 (섭취 근거)

섭취 근거	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 까마귀쪽나무 열매는 2007년부터 식품공전의 ‘식품에 사용할 수 있는 원료의 목록’에 등재되어 있음 ▶ 신청원료가 건강지향형 음료에 부원료로 포함되어 2013년부터 판매되고 있으며, 판매 이후 현재까지 해당 제품 섭취에 대한 부작용이 보고된 바 없음
안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 안전성 관련 데이터베이스 검색 결과 2014년 12월 현재, 까마귀쪽나무와 Hamabiwalactone B에 대하여 안전성을 우려할 만한 보고사항 없었음
섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 제안섭취량: 신청원료로서 200 mg/d (원재료로서 2,307 mg/d) ▶ 일상 섭취량 <ul style="list-style-type: none"> - 원재료의 섭취량 정보 없음 - 건강지향형 음료에 부원료로서 함유되어 있는 신청원료의 섭취량 150-300 mg/d ▶ 섭취량 평가: 일상 섭취량에 대한 정보가 충분하지 않아 섭취량이 증가한 것으로 평가됨.
인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 신청원료를 200 mg/d의 수준으로 12주간 섭취시킨 인체적용시험에서, 활력징후, 혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사 결과 유의미한 부작용 및 이상반응 보고가 없었음.
독성시험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 단회투여독성시험: LD50 >5g/kg BW ▶ 유전독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 복귀돌연변이시험에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA (pKM101) 균주에 대한 돌연변이 유발성 관찰되지 않음 - 염색체이상시험에서 염색체 이상 세포 빈도는 5% 미만으로 염색체 이상을 유발하지 않음 - 소핵시험에서 소핵다염성적혈구 출현빈도가 음성대조군 대비 유의적 차이 없어 소핵 유발에 영향 없음

9. 시작품제작 및 품질검사

가. 계획

- (1) 개발목표 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 소재를 이용하여 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 하였음.
- (2) 개발내용 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 일일섭취량분석 및 인체적용시험에 사용한 레시피를 기준으로 약간의 선호도를 보완하여 제작하고자 하며, 영양성분 및 안정성확보를 통한 상품화를 추진하고자 함. 우선적으로 건강기능식품 제형에서 가장 선호도를 가지고 있는 타블렛과 캡슐 제형으로 시작품을 제작하였음.

나. 연구수행방법

(1) 시작품제작

(가) 레시피 개발

- ① 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 소재를 이용한 시작품제작은 (주)휴림의 신제품 개발에 따른 자체 메뉴얼에 따라 조성비를 선정하였음(선행적으로 연구된 부분 반영).
- ② 타블렛 및 캡슐 제품 : 효능을 나타낼수 있는 일일섭취량분석 및 인체적용시험에 사용한 레시피를 기본으로 하여 레시피를 개발하였음.

(나) 디자인 개발

- ① 방향 : 까마귀쪽나무의 기능성인 관절건강을 잘 반영된 디자인 방향과 소비자에게 친근하면서 접근이 가능한 디자인, 그리고 고급화 및 차별화가 가능한 방향
- ② 개발내용 : 타블렛 디자인(라벨 및 박스), 캡슐 디자인(라벨 및 박스)

(다) 시작품제작

- ① 타블렛 제품 : 60정 / 1병(1일 2정)
- ② 캡슐 제품 : 60캡슐/1병(1일 2캡슐)

(2) 개발한 시작품의 안정성 확보

(가) 가속시험

- 가속시험기간 : 3개월간 실시(제조후, 1, 2, 3월)
- 보존조건 : 38℃, 80% RH 이상
- 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목

(다) 시험방법

시험항목	시험방법	비 고
성상	갈색분말 / 짙은갈색액상	
표준물질	상기에 기술된 분석방법	
대장균군	식품공전	
붕해도	식품공전	

10. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 상품화

가. 계획

- (1) 개발목표 : 까마귀쪽나무 열매를 건강기능식품의 기능성 원료소재로 상품화를 추진하기 위한 브랜드개발, BI개발, 디자인개발을 추진하고자 하며, 마케팅전략을 수립하여 건강기능식품으로 상품화시 활용하고자 함.
- (2) 개발내용 : 까마귀쪽나무 열매를 건강기능식품소재로 상품화에 필요한 브랜드 및 BI를 개발하고 이를 이용한 디자인을 개발하고자 하였음. 또한 까마귀쪽나무 열매를 소재로 한 건강기능식품으로 상품화시 시장진입 및 유통/판매전략을 수립하고자 함.

나. 수행내용

- (1) 본 사업내용은 까마귀쪽나무 소재를 활용한 단계적이면서 체계적인 상품화 추진을 위하여 까마귀쪽나무에 대한 브랜드를 개발을 추진.
- (2) 본 수행내용은 사업개발계획서 외 추가적으로 추진한 내용임.
- (3) 브랜드개발을 통한 BI개발
- (4) 마케팅전략수립 : 건강기능식품으로 상품화를 위한 전략수립

제 2 절 연구수행 결과

1. 까마귀쪽나무 열매 지표/유효성분 규명 결과

가. 분광학적 분석 data를 통한 분리정제 단일화합물의 구조 규명

- NMR data (^1H -, ^{13}C -NMR)를 통한 proton과 carbon의 splitting 및 Chemical shift에 대한 정보를 이용한 molecular formula의 확인
- 결정된 구조에 대한 data를 기존 문헌과 비교 확인

(1) Identification of compound 1 (Hamabiwalactone B)

Colorless, viscous oil; ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) : 7.00 (1H, br s, H-3), 6.79 (1H, td, J =14.5, 7.0 Hz, H-7), 6.07 (1H, d, J =16.0 Hz, H-6), 5.80 (1H, ddt, J =17.0, 10.0, 7.0Hz H-16) 5.01 (1H, br q, J =7.0Hz H-4), 4.88~4.98 (2H, m, H-17), 2.15(2H, q, J =7.5Hz, H-8), 2.03(2H, q, J =7.0Hz, H-15), 1.40 (3H, d, J =6.5Hz, H-5), 1.25 (2H, br s, H-9) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 172.2 (C-1), 147.0 (C-3), 139.4 (C-16)139.0 (C-7), 129.6 (C-2), 118.5 (C-6), 114.3 (C-17), 77.1 (C-4), 33.9 (C-15), 33.6 (C-8)29.5 (C-9, 10), 29.4 (C-11), 29.2 (C-12), 29.1 (C-13), 28.9 (C-14), 19.3 (C-5)

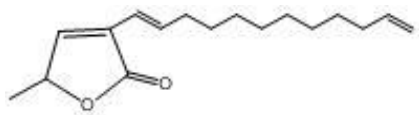
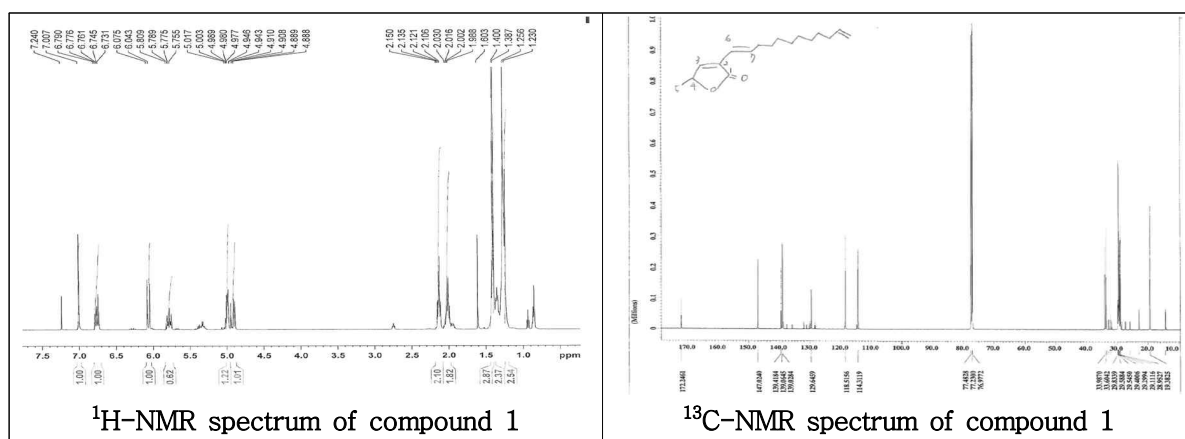


그림 1. Compound 1의 구조



(2) Identification of compound 2 (Hamabiwalactone A)

Colorless, viscous oil; ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) : 7.00 (1H, br s, H-3), 6.79 (1H, td, J =15.0, 7.0 Hz, H-7), 6.07 (1H, d, J =15.5 Hz, H-6), 5.01 (1H, br q, J =6.5Hz H-4), 2.16

(2H, td, J =7.0, 2.5Hz, H-15), 2.13(2H, q, J =7.0Hz, H-8), 1.91 (1H, t, J =2.5Hz, H-17), 1.40 (3H, d, J =6.5Hz, H-5), 1.27 (2H, br s, H-9) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 172.2 (C-1), 147.0 (C-3), 138.9 (C-7), 129.6 (C-2), 118.5 (C-6), 84.9 (C-16), 77.1 (C-4), 68.2 (C-17), 33.5 (C-8), 29.4 (C-9), 29.3 (C-10), 29.1 (C-11), 28.9 (C-12, 13), 28.6 (C-14), 19.3 (C-5), 18.5 (C-15)

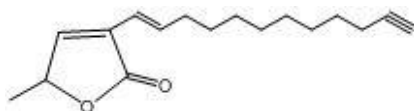
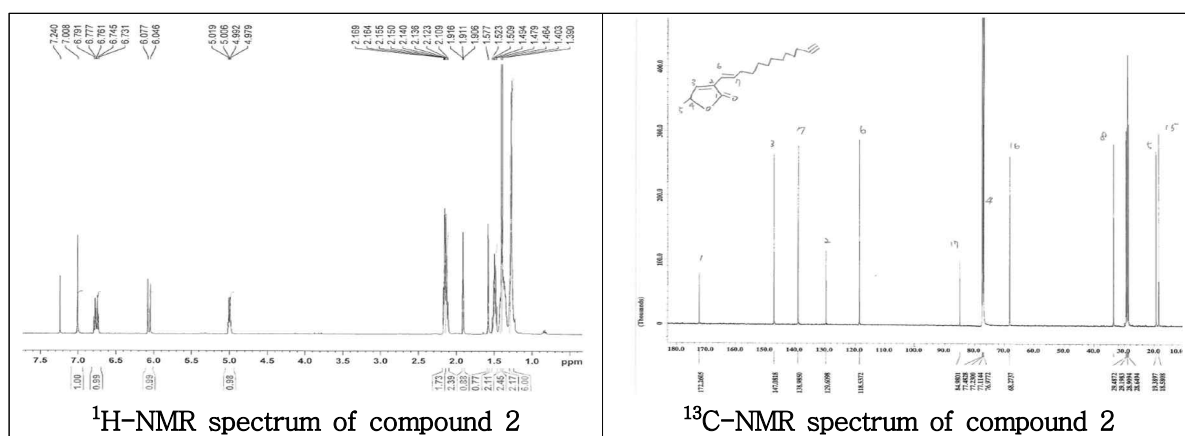


그림 2. Compound 2의 구조



(3) Identification of compound 3 (Litsenolide C2)

Colorless, viscous oil; ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) : 4.49 (1H, br s, H-3), 4.48 (1H, qd, J =2.6, 8.3 Hz, H-4), 1.35 (3H, d, J =8.3 Hz, H-5), 7.00 (1H, td, J =2.0, 10.6Hz H-6), 2.40 (2H, m, H-7), 1.52(2H, m, H-8), 1.25 (20H, br s, H-9-18), 0.87 (3H, t, J =8.6Hz, H-19), 1.97 (1H, m, OH) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 170.1 (C-1), 129.4 (C-2), 72.4 (C-3), 82.9 (C-4), 19.8 (C-5), 149.0 (C-6), 29.9 (C-7), 28.6 (C-8), 29.8 (C-9-16), 29.7 (C-9-16)), 29.65 (C-9-16), 29.61 (C-9-16), 29.5 (C-9-16), 32.1 (C-17), 22.8 (C-18), 14.3 (C-19)

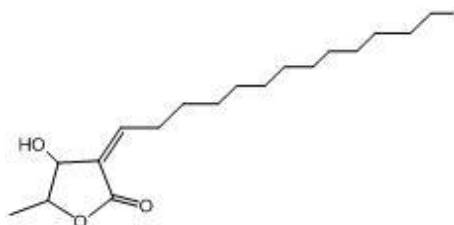
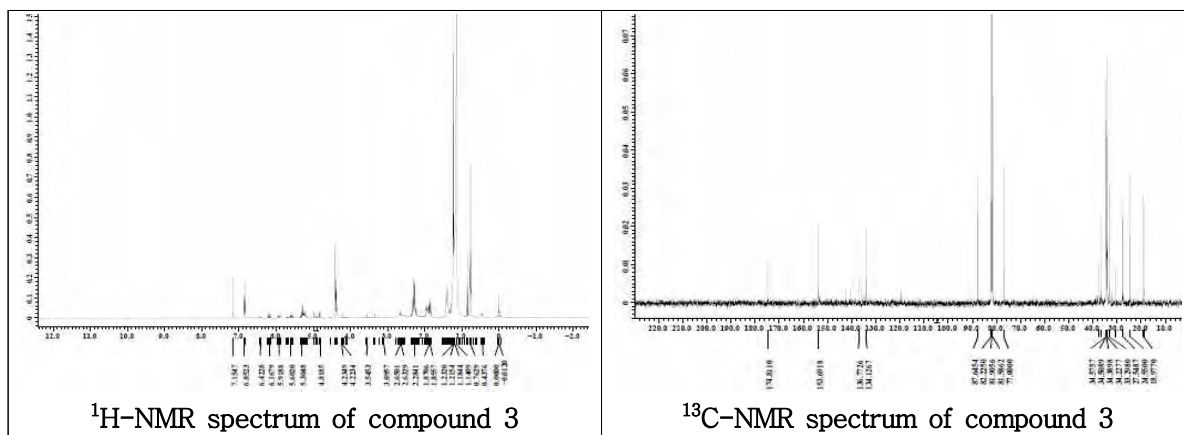


그림 3. Compound 3의 구조



(4) Identification of compound 4 (Litsenolide B2)

Colorless, viscous oil; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : 4.49 (1H, br m, H-3), 4.48 (1H, qd, *J* =2.6, 8.3 Hz, H-4), 1.31 (3H, d, *J* =8.3 Hz, H-5), 6.95 (1H, td, *J* =2.0, 10.3Hz H-6), 2.40 (2H, m, H-7), 1.50(2H, m, H-8), 1.26 (10H, br s, H-9-13), 1.51 (2H, m, H-14), 2.16 (2H, td, *J* =3.1, 8.8 Hz, H-15), 1.91 (1H, t, *J* =3.1 Hz H-17), ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 170.0 (C-1), 129.4 (C-2), 72.3 (C-3), 82.9 (C-4), 19.8 (C-5), 148.9 (C-6), 29.8 (C-7), 28.6 (C-8), 29.5 (C-9-14), 29.4 (C-9-14), 29.2 (C-9-14), 28.8 (C-9-14), 18.5 (C-15), 84.9 (C-16), 68.3 (C-17)

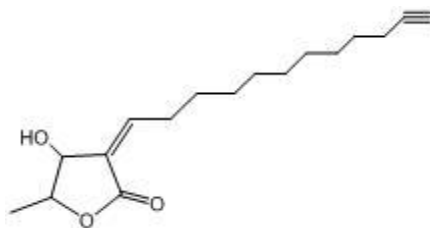
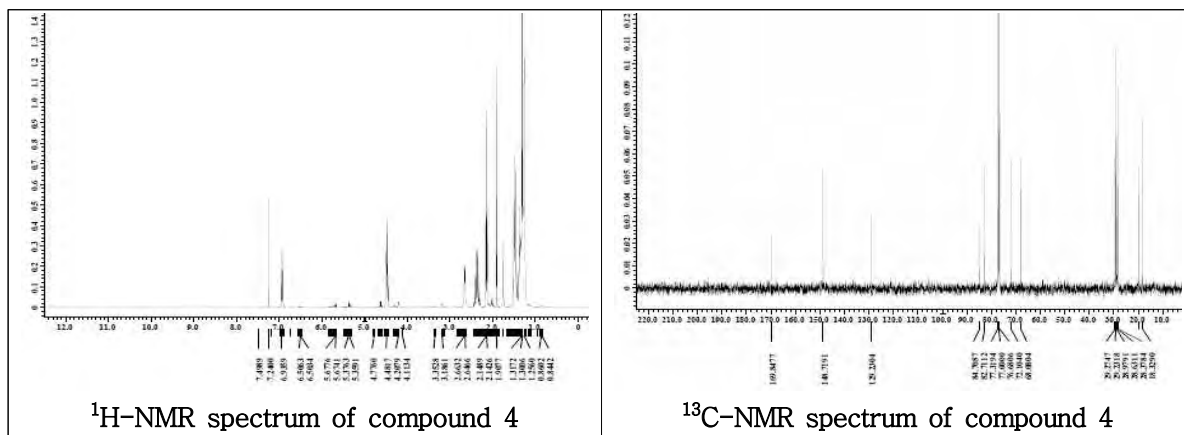


그림 4. Compound 4의 구조



(5) Identification of compound 5 (Litsealactone B)

Colorless, viscous oil; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : 3.40 (1H, dd, J =6.5, 5.5 Hz H-2), 4.30 (1H, dd, J =3.1, 6.3 Hz, H-3), 4.50 (1H, dq, J =3.1, 6.5 Hz, H-4), 1.45 (3H, d, J =6.3Hz H-5), 2.40 (2H, m, H-7), 1.50(2H, m, H-8), 1.26 (10H, br s, H-9-13), 1.51 (2H, m, H-14), 2.16 (2H, td, J =3.1, 8.8 Hz, H-15), 1.91 (1H, t, J =3.1 Hz H-17), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 170.0 (C-1), 129.4 (C-2), 72.3 (C-3), 82.9 (C-4), 19.8 (C-5), 148.9 (C-6), 29.8 (C-7), 28.6 (C-8), 29.5 (C-9-14), 29.4 (C-9-14), 29.2 (C-9-14), 28.8 (C-9-14), 18.5 (C-15), 84.9 (C-16), 68.3 (C-17)

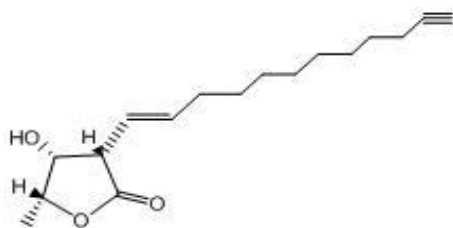
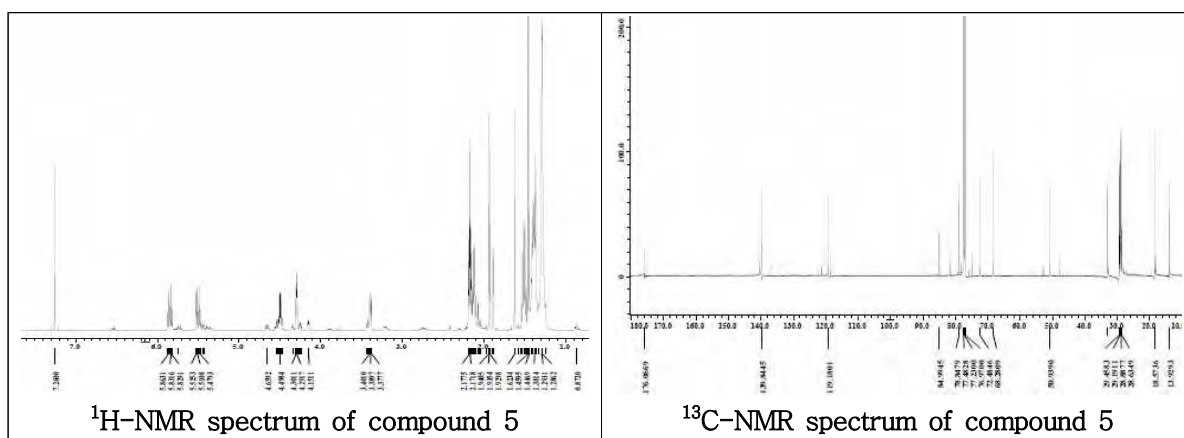


그림 5. Compound 5의 구조



(6) Identification of compound 6 (Tamarixetin-3-O-rhamnoside)

FABMS m/z 485.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, MeOH-d_4) : 7.41 (1H, dd, J =2.0, 8.0 Hz H-6'), 7.34 (1H, d, J =2 Hz, H-2'), 7.09 (1H, d, J =8.5 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, J =2 Hz H-8), 6.20 (1H, 2, H-6), 5.38 (1H, d, J =1.5 Hz H-1"), 4.22-3.59 (4H, m, H-2", 3", 4", 5"), 3.93 (3H, s, O-CH₃), 0.93 (3H, d, J =6.0, Hz, rha-CH₃) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 179.8 (C-4), 166.1 (C-7), 163.4 (C-5), 159.4 (C-2), 158.7 (C-9), 151.1 (C-3'), 149.0 (C-4'), 136.3 (C-3), 124.4 (C-6'), 123.0 (C-1'), 116.7 (C-5'), 113.7 (C-2'), 106.0(C-10), 103.6 (C-1"), 72.3 (C-2"), 72.2 (C-3"), 72.0 (C-5"), 17.8(rah-CH₃)

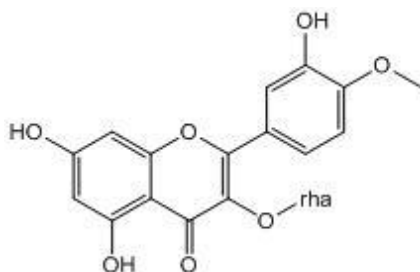
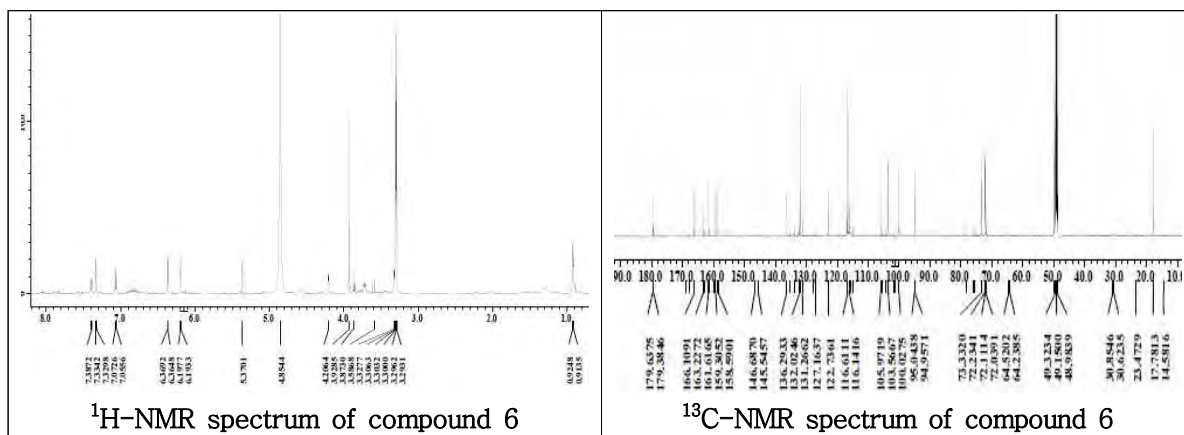


그림 6. Compound 6의 구조



(7) Identification of compound 7 (Afzelin)

- FABMS m/z 455.0 $[M + Na]^+$; 1H -NMR (500MHz, MeOH- d_4) : 6.16 (1H, d, J =2.5 Hz H-6), 6.33 (1H, d, J =2.5 Hz, H-8), 7.74 (2H, d, J =9.0 Hz, H-2', H-5'), 6.92 (2H, d, J =9.0 Hz H-3', 5'), 5.37 (1H, d, J =2 Hz, H-6), 5.37 (1H, d, J =1.5 Hz H-1"), 4.22-3.59 (4H, m, H-2", 3", 4", 5"), 0.93 (3H, d, J =5.5, Hz, rha-CH₃) ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl₃) 179.6 (C-4), 166.1 (C-7), 163.2 (C-5), 161.6(C-4'), 159.3 (C-2), 158.5 (C-9), 136.2 (C-3), 132.0 (C-2', 6'), 122.7 (C-1'), 116.6 (C-3',5'), 105.9(C-10), 103.5 (C-1"), 100.0(C-6), 94.9(C-8), 73.3 (C-4"), 72.2 (C-2"), 72.1 (C-3"), 72.0(C-5"), 17.7(rah-CH₃)

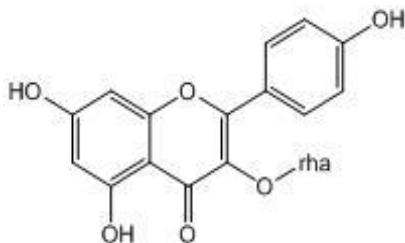
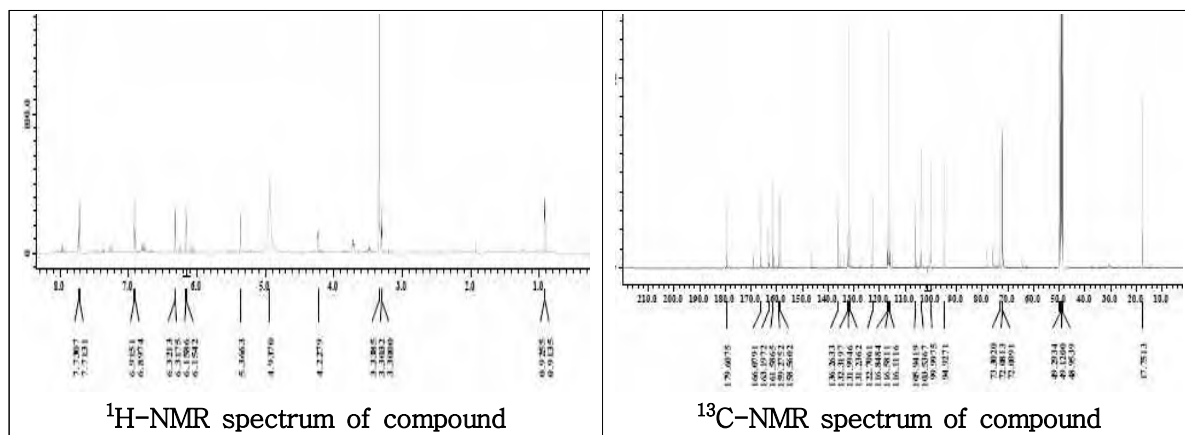


그림 7. Compound 7의 구조



(8) Identification of compound 8 (Quercitrin)

- FABMS m/z 471.0 $[M + Na]^+$; ¹H-NMR (500MHz, MeOH-d₄) : 6.20 (1H, d, J =2.0 Hz H-6), 6.39 (1H, d, J =2.0 Hz, H-8), 7.34(1H, d, J =2.0 Hz, H-2'), 6.92 (1H, d, J =8.5 Hz H-5'), 7.31 (1H, dd, J =2, 8.5 Hz, H-6'), 5.35 (1H, d, J =1.5 Hz H-1"), 4.22-3.59 (4H, m, H-2",3",4",5"), 0.94 (3H, d, J =6.0, Hz, rha-CH₃) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 179.46 (C-4), 166.1 (C-7), 163.2 (C-5), 159.3 (C-2), 158.5 (C-9), 149.8(C-4'), 146.4(C-3'), 136.2 (C-3), 123.0 (C-1'), 122.8 (C-6'), 116.9 (C-5'), 116.3(C-2'), 105.8(C-10), 103.5 (C-1"), 99.9(C-6), 94.7(C-8), 73.4 (C-4"), 72.2 (C-2"), 72.1 (C-3"), 72.0(C-5"), 17.6(rah-CH₃)

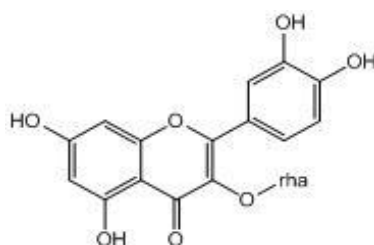
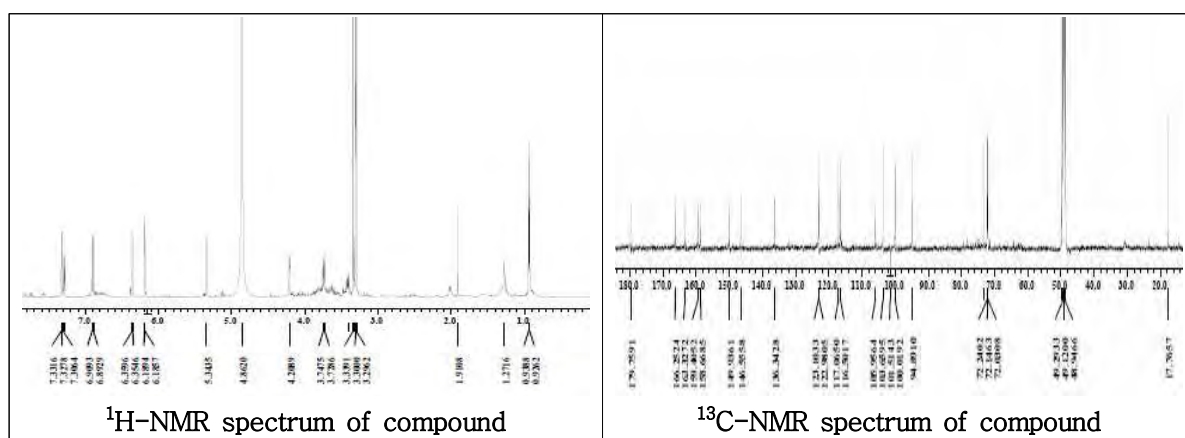


그림 8. Compound 8의 구조



(9) 현재까지 분리 정제된 화합물 구조

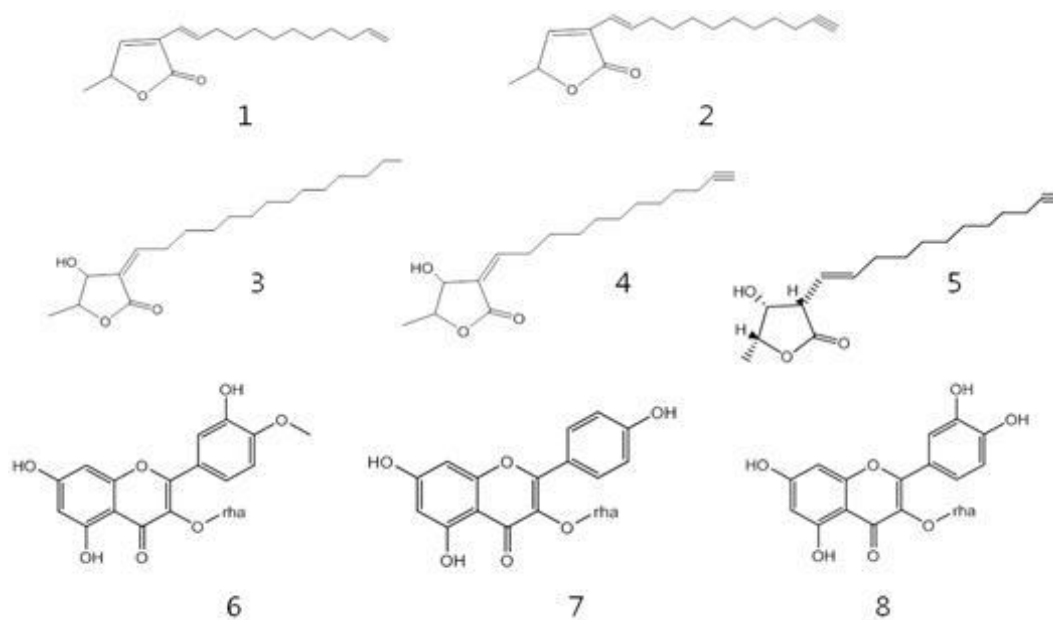


그림. 9 까마귀쪽나무 열매 및 잎으로부터 분리 정제된 단일 화합물 구조

2. *in vitro* 유효성 평가 결과 (까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 및 분획물)

가. 대식세포 (RAW 264.7 cells)에서 관절염 유발 인자 억제 효능 평가

(1) 질소화합물 (Nitric oxide) 생성 억제 효능 및 세포독성 평가 결과

추출물과 분획물을 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 10)에 나타내었고, 분획물 중 CH₂Cl₂ 분획물을 2.5, 5 및 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 10-1)에 나타내었다. (그림 10)을 참조하여 보면, 추출물과 분획물 모두 LPS 만의 처리군에 비해 NO 생성 억제 활성을 보이고 있고, 특히 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획물에서 높은 NO 생성 억제 활성을 보이고 있음을 알 수 있다. (그림 10-1)는 특히 활성이 우수한 CH₂Cl₂ 분획물이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보임을 나타낸 결과이다.

(2) 세포독성 평가 (LDH assay) 결과

추출물과 분획물을 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 10)에 나타내었고, CH₂Cl₂ 분획물을 2.5, 5 및 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 10-1)에 나타내었다. (그림 10)과 (그림 10-1)를 참조하여 보면, 추출물과 분획물 모두 특별한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있으며, 다만 CH₂Cl₂ 분획물의 경우 최고 처리농도인 10 ug/mL에서 약간의 세포독성을 보임을 알 수 있다. 이러한 실험 결과는 전체적으로 상기 NO 생성 억제 활성이 세포독성에 의한 결과가 아님을 말해준다고 할 수 있다.

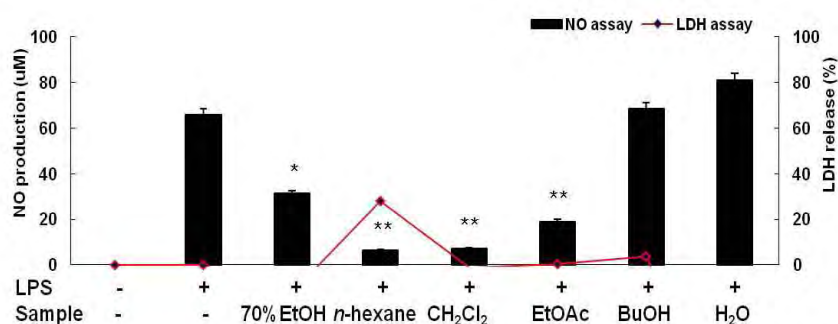


그림 10. Inhibitory effect of 70% EtOH and solvent fractions of *Litsea japonica* fruit on nitric oxide production and cell viability in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

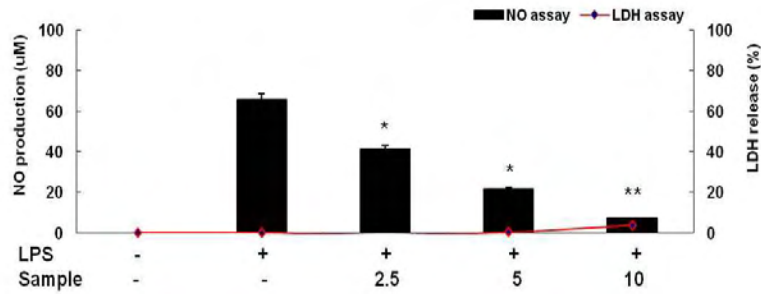


그림 10-1. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fraction of *Litsea japonica* fruit on nitric oxide production and cell viability in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

나. Prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 억제 효능 평가 결과

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 및 분획물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 11)에, CH_2Cl_2 분획물을 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 11-1)에 나타내었다. (그림 11)과 (그림 11-1)를 참조하여 보면, 상기 NO 생성 억제 결과와 유사하게 *n*-hexane, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물의 PGE_2 생성 억제 활성이 높음을 알 수 있고, CH_2Cl_2 분획물의 경우 농도 의존적으로 PGE_2 생성 억제 활성을 보임을 알 수 있다.

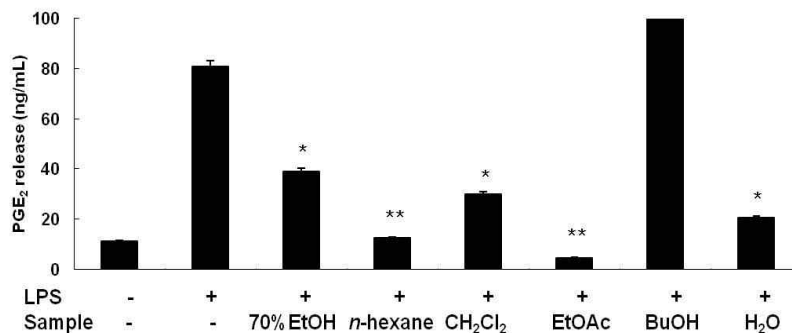


그림 11. Inhibitory effect of 70%EtOH and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on PGE_2 production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

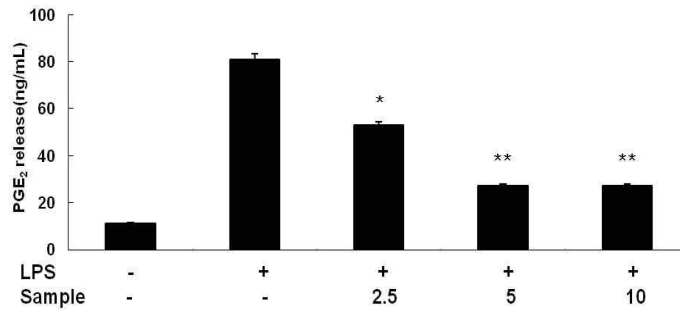


그림 11-1. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on PGE₂ production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

다. 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β and IL-6) 생성 억제 효능 평가 결과

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물과 분획물을 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 12) 내지 (그림 14)에 나타내었고, CH₂Cl₂ 분획물을 2.5, 5 및 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 12-1) 내지 (그림 14-1)에 나타내었다. (그림 12) 내지 (그림 14)를 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획물이 높은 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 (그림 12-1) 내지 (그림 14-1)에서 확인되듯이, CH₂Cl₂ 분획물은 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있다.

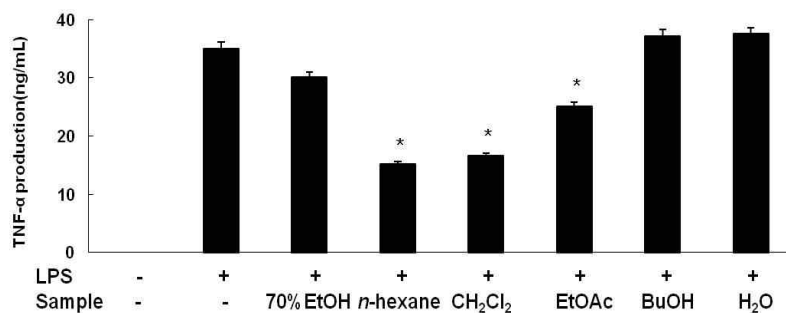


그림 12. Inhibitory effect of 70%EtOH and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on TNF- α production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

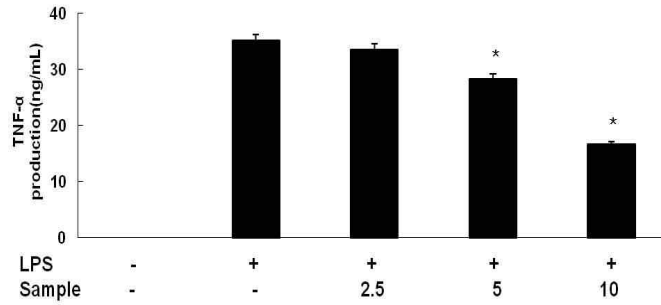


그림 12-1. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fraction of *Litsea japonica* fruit on $\text{TNF-}\alpha$ production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

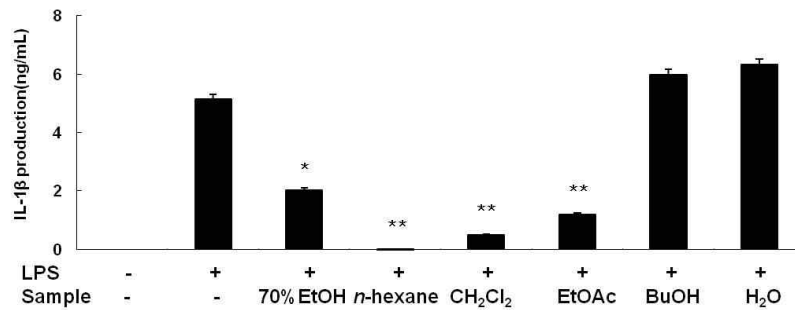


그림 13. Inhibitory effect of 70%EtOH extract and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on $\text{IL-1}\beta$ production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

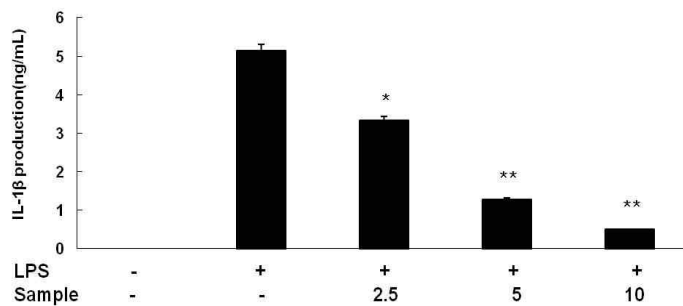


그림 13-1. Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fraction of *Litsea japonica* fruit on $\text{IL-1}\beta$ production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

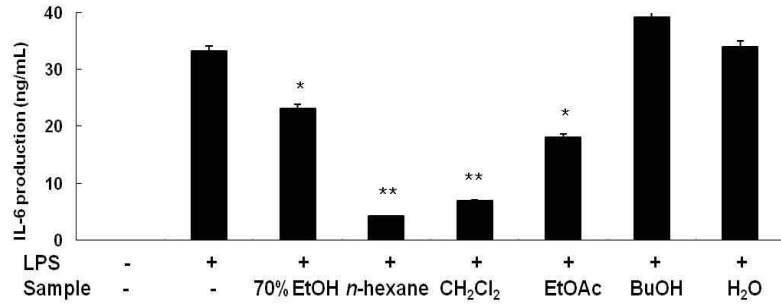


그림 14. Inhibitory effect of 70%EtOH and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

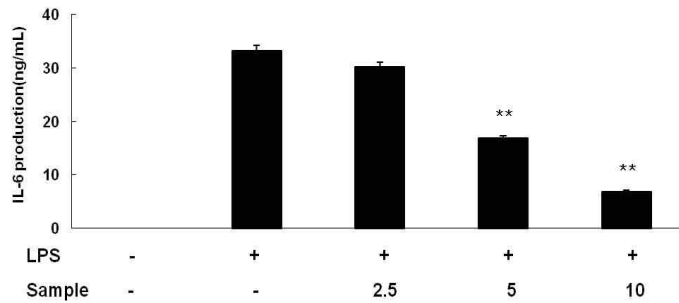


그림 14-1. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

라. 관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 평가 (western blotting) 결과

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물과 분획물을 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 15)에 나타내었고, CH₂Cl₂ 분획물을 2.5, 5 및 10 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 15-1)에 나타내었다. (그림 15)과 (그림 15-1)를 참조하여 보면, 상기의 결과들과 유사한 경향을 보이면서, *n*-hexane, CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획물이 높은 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 (그림 15) 내지 (그림 15-1)에서 확인되듯이, CH₂Cl₂ 분획물의 경우 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있다.

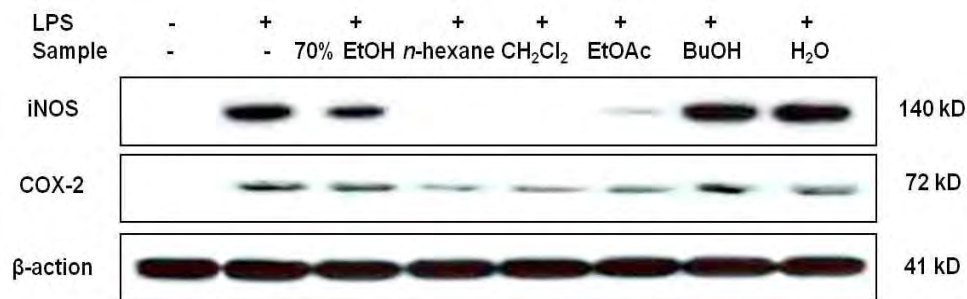


그림 15. Inhibitory effect of 70% EtOH extract and solvent fractions of *Litsea japonica* fruit on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.

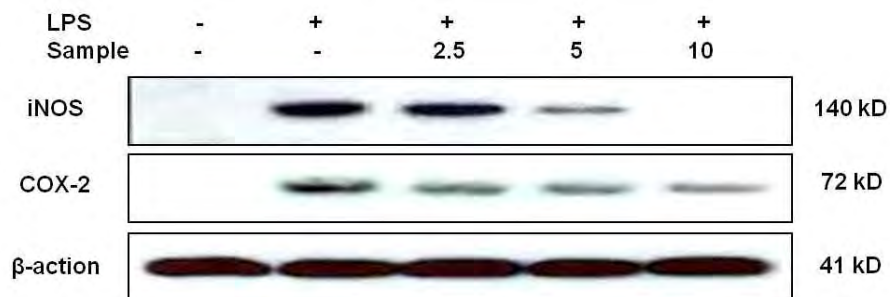


그림 15-1. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.

마. 관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 규명을 위한 기전연구 결과

관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능을 규명하기 위해 NF- κ B와 MAPKs 기전연구를 수행하였고, CH₂Cl₂ 분획물을 2.5, 5 및 10 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 16)과 (그림 17)에 나타내었다. (그림 16)과 (그림 17)에서 확인되듯이, CH₂Cl₂ 분획물의 경우 농도 의존적으로 NF- κ B (I κ B- α , p65, 그리고 p50)와 MAPKs (JNK와 p38)의 인산화를 억제시키는 활성을 보이고 있어 NF- κ B와 MAPKs의 기전이 관절염 유발 인자의 발현을 조절한다는 것을 확인하였다.

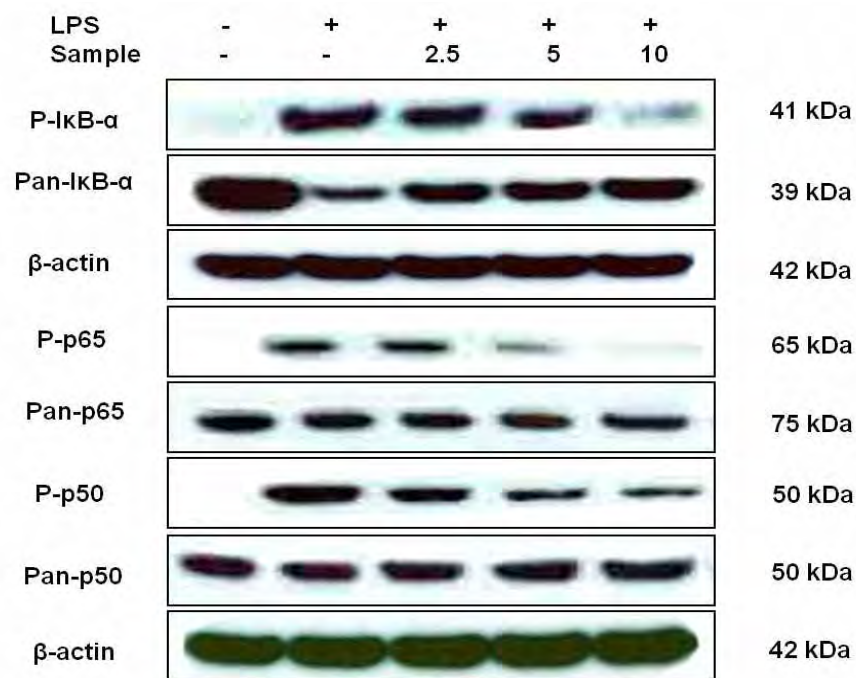


그림 16. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on the I κ B- α and NF- κ B protein levels in RAW 264.7 cells.

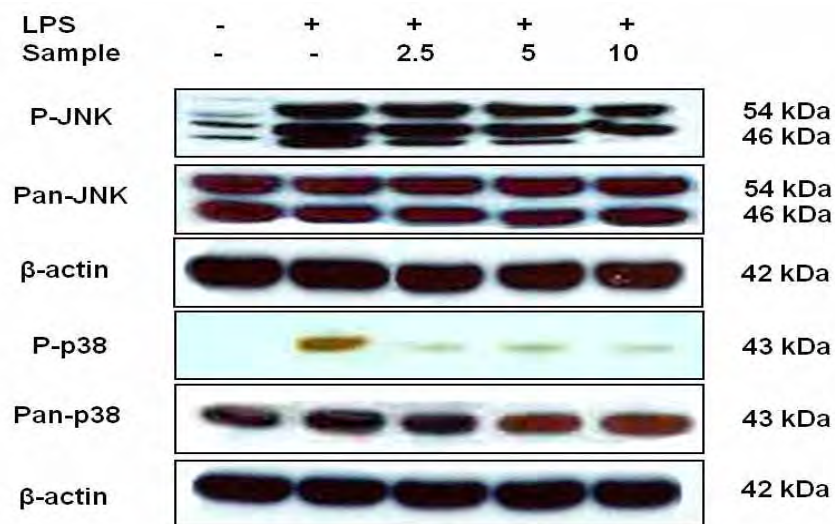


그림 17. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on the protein level of MAPKs in RAW 264.7 cells.

바. 조골세포 (MG-63 cells)에서 골대사성 질환 유발 인자 억제 효능 평가

(1) Interleukin-6 (IL-6) 생성 억제 효능 평가 결과

(그림 18)를 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획물이 높은 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 (그림 18-1)에서 확인되듯이, CH₂Cl₂ 분획물은 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있다.

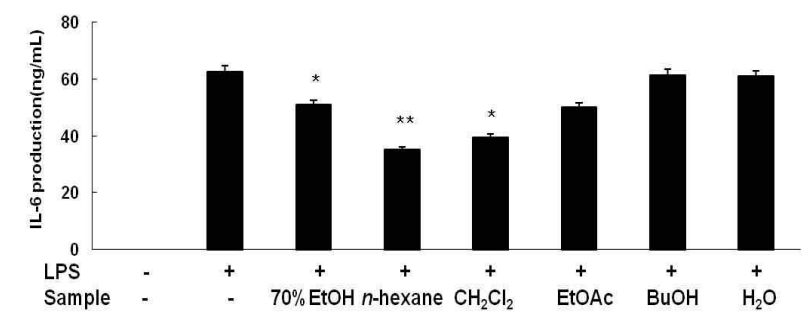


그림 18. Inhibitory effect of 70%EtOH and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on IL-6 production in MG-63 cells. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. *,*P*<0.05; **,*P*<0.01

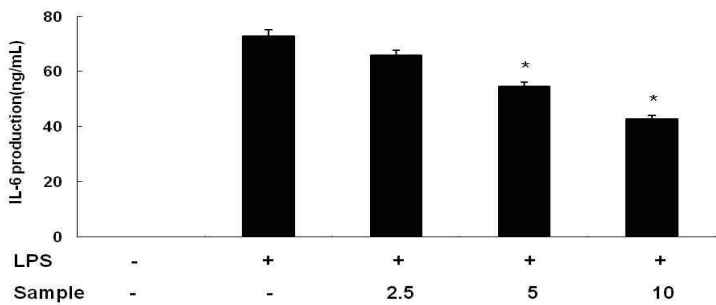


그림 18-1. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on IL-6 production in MG-63 cells. Values are the mean ± SEM of triplicate experiments. *,*P*<0.05; **,*P*<0.01

(2) Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 효능 평가 결과

(그림 19)과 (그림 19-1)를 참조하여 보면, 상기 IL-6 생성 억제 결과와 유사하게 *n*-hexane, CH₂Cl₂ 및 EtOAc 분획물의 PGE₂생성 억제 활성이 높음을 알 수 있고, CH₂Cl₂ 분획물의 경우 농도 의존적으로 PGE₂생성 억제 활성을 보임을 알 수 있다.

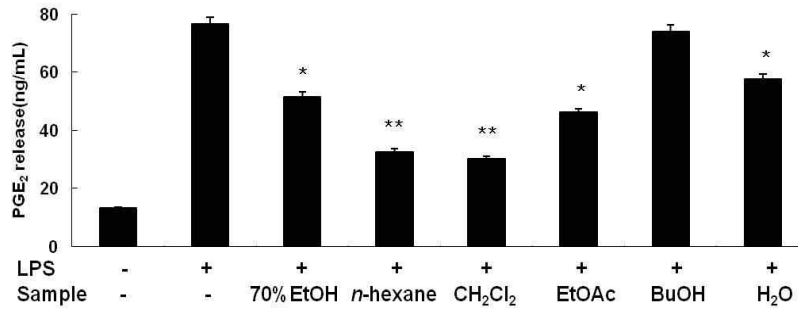


그림 19. Inhibitory effect of 70%EtOH and solvent fraction of *Litsea japonica* fruit on PGE₂ production in MG-63 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

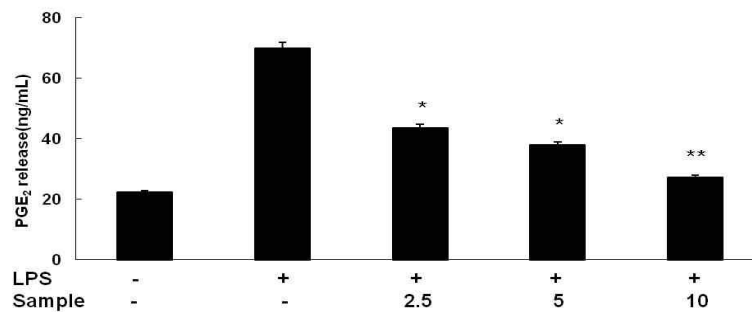


그림 19-1. Inhibitory effect of CH₂Cl₂ fraction of *Litsea japonica* fruit on PGE₂ production in MG-63 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

2-1. *in vitro* 유효성 평가 결과 (까마귀쪽나무 열매 미숙과 주정 추출물 및 유효성분)

가. 대식세포 (RAW 264.7 cells)에서 관절염 유발 인자 억제 효능 평가

(1) 질소화합물 (Nitric oxide) 생성 억제 효능 및 세포독성 평가 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 성숙과와 미성숙과를 5, 10 및 20 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 20)에 나타내었고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일 화합물을 2.5, 5 및 10 uM의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 21)에 나타내었다. (그림 20)을 참조하여 보면, 성숙과와 미성숙과 모두 LPS 만의 처리군에 비해 NO 생성 억제 활성을 보이고 있고, 특히 성숙과 보다는 미성숙과에서 NO 생성 억제 활성이 좋은 것을 알 수 있다. (그림 21)은 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 활성 추적을 통해 분리한 단일화합물인 Litsenolide B2와 Litsenolide C2도 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보임을 나타낸 결과이다.

(2) 세포독성 평가 (LDH assay) 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 성숙과와 미성숙과를 5, 10 및 20 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 20)에 나타내었고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일 화합물을 2.5, 5 및 10 uM의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 21)에 나타내었다. (그림 20)과 (그림 21)를 참조하여 보면, 성숙과와 미성숙과 모두 특별한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있으며, 다만 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 활성 추적을 통해 분리한 단일 화합물 중 Litsenolide C2의 경우 최고 처리농도인 10 uM에서 약간의 세포독성을 보임을 알 수 있다. 이러한 실험 결과는 전체적으로 상기 NO 생성 억제 활성이 세포독성에 의한 결과가 아님을 말해준다고 할 수 있다.

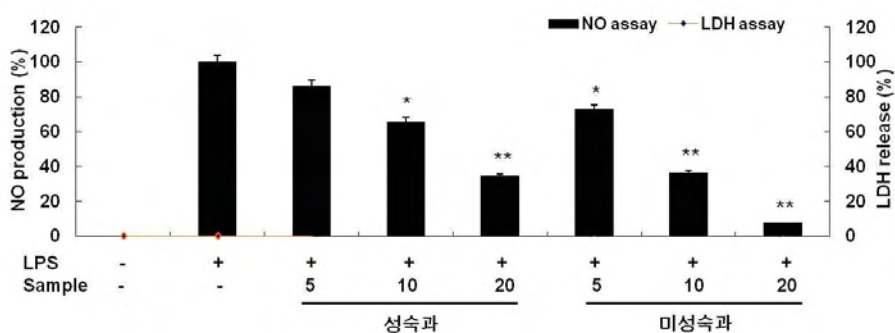


그림 20. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on nitric oxide production and cell viability in RAW 264.7 cells.

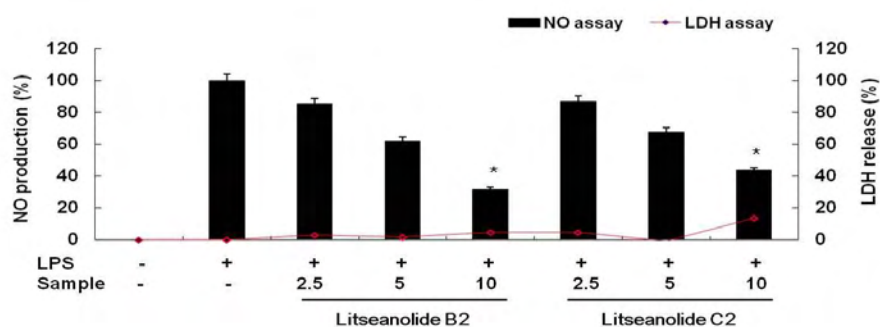


그림 21. Inhibitory effect of compounds isolated from *L. japonica* fruit on nitric oxide production and cell viability in RAW 264.7 cells.

나. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 효능 평가 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 성숙과와 미성숙과를 5, 10 및 20 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 22)에, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물을 2.5, 5 및 10 uM의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 23)에 나타내었다. (그림 22)과 (그림 23)를 참조하여 보면, 상기 NO 생성 억제 결과와 유사하게 나타났으며 미성숙과가 PGE₂ 생성 억제 활성이 높음을 알 수 있고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 활성 추적을 통해 분리한 단일화합물인 Litsenolide B2와 Litsenolide C2도 농도 의존적으로 PGE₂생성 억제 활성을 보임을 알 수 있다.

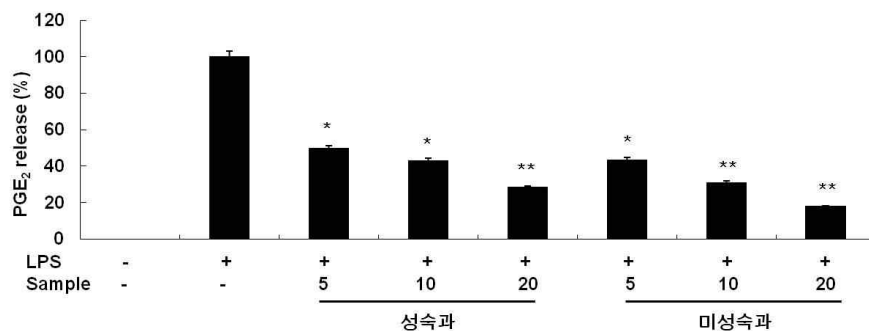


그림 22. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on PGE₂ production in RAW 264.7 cells.

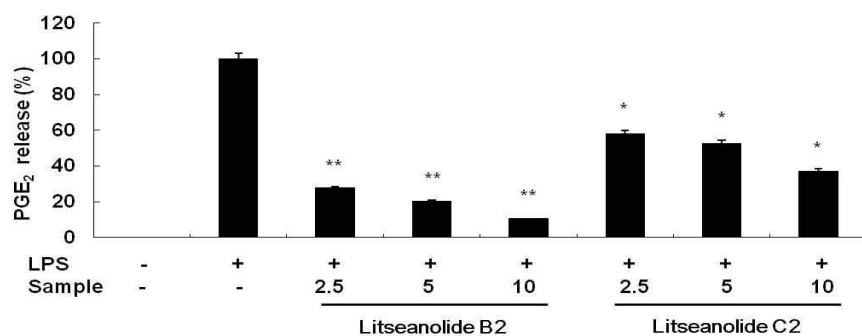


그림 23. Inhibitory effect of compounds isolated from *L. japonica* fruit on PGE₂ production in RAW 264.7 cells.

다. 염증성 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β and IL-6) 생성 억제 효능 평가 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 성숙과와 미성숙과를 5, 10 및 20 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 24) 내지 (그림 26)에 나타내었고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물을 2.5, 5 및 10 uM의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 27) 내지 (그림 29)에 나타내었다. (그림 24) 내지 (그림 26)를 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 성숙과와 미성숙과 모두 높은 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있으

며, 또한 (그림 27) 내지 (그림 29)에서 확인되듯이, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 활성 추적을 통해 분리한 단일화합물인 Litsenolide B2와 Litsenolide C2도 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있다.

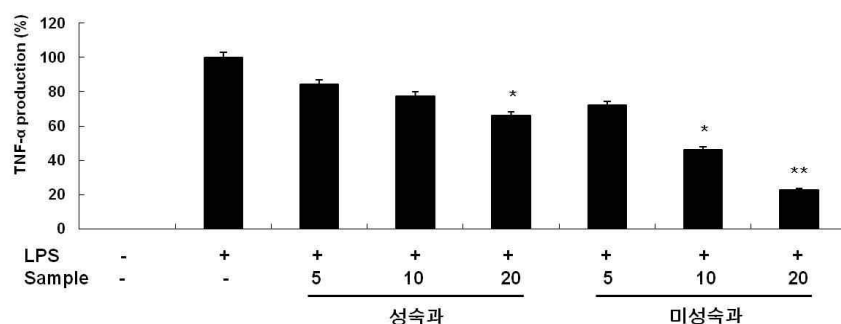


그림 24. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on TNF- α production in RAW 264.7 cells.

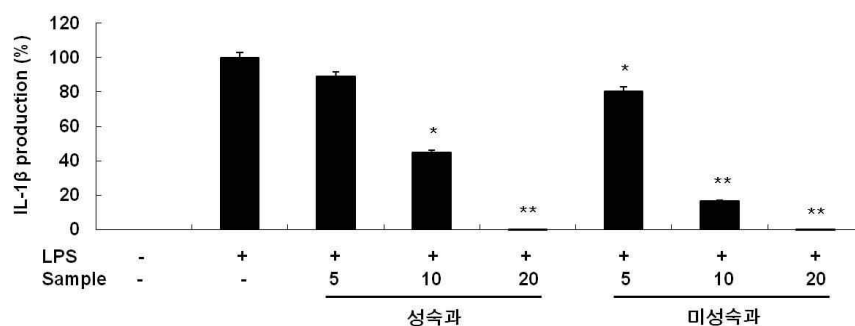


그림 25. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on IL-1 β production in RAW 264.7 cells.

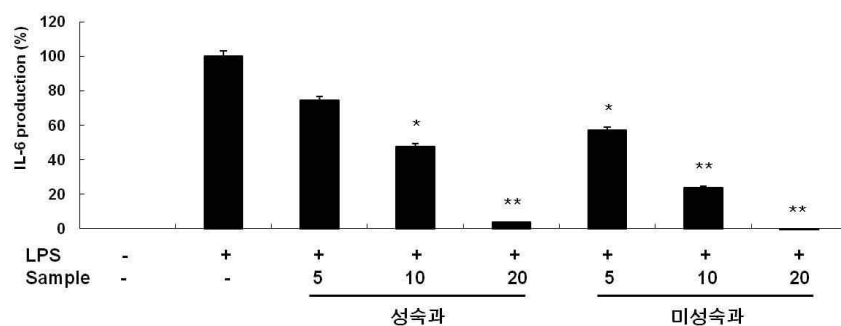


그림 26. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on IL-6 production in RAW 264.7 cells.

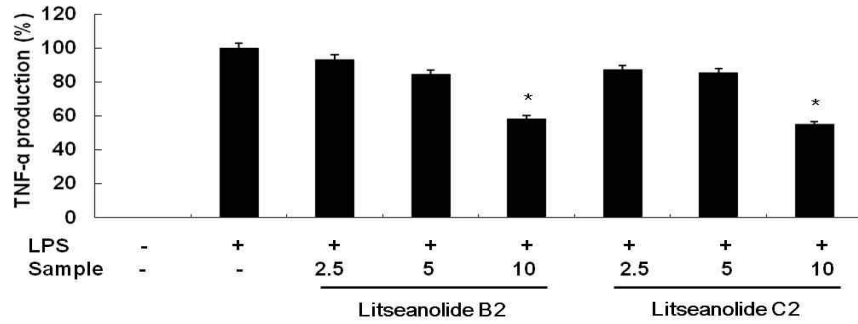


그림 27. Inhibitory effect of compounds isolated from *L. japonica* fruit on TNF- α production in RAW 264.7 cells.

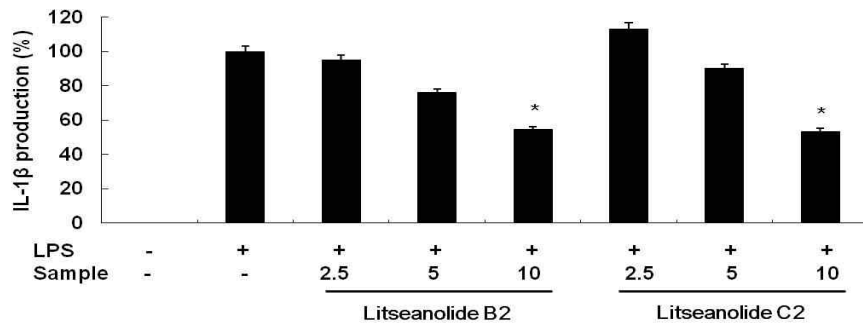


그림 28. Inhibitory effect of compounds isolated from *L. japonica* fruit on IL-1 β production in RAW 264.7 cells.

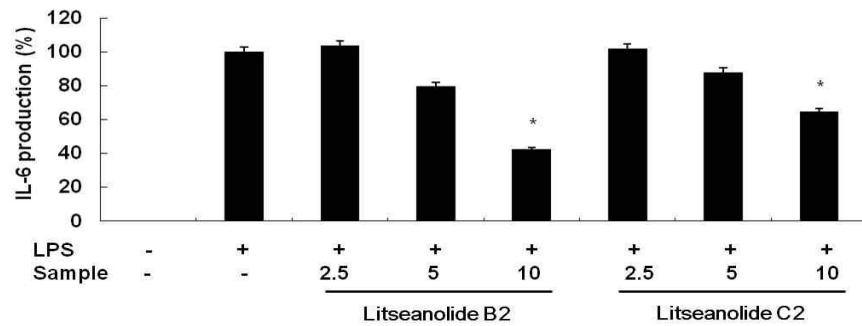


그림 29. Inhibitory effect of compounds isolated from *L. japonica* fruit on IL-6 production in RAW 264.7 cells.

라. 관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 평가 (western blotting) 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 성숙과와 미성숙과를 5, 10 및 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 30)에 나타내었고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일 화합물을 2.5, 5 및 10 μM 의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 31)에 나타내었다. (그림

30)과 (그림 30-1)를 참조하여 보면, 상기의 결과들과 유사한 경향을 보이면서, 성숙과와 미성숙과 모두 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 (그림 21) 내지 (그림 23)에서 확인되듯이, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 활성 추적을 통해 분리한 단일화합물인 Litsenolide B2도 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있다.

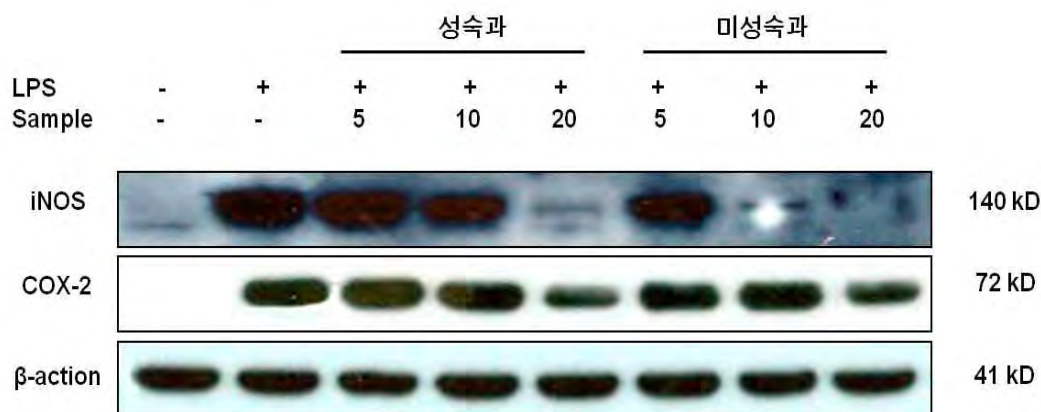


그림 30. Inhibitory effect of 70% EtOH extract of *L. japonica* fruit on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.

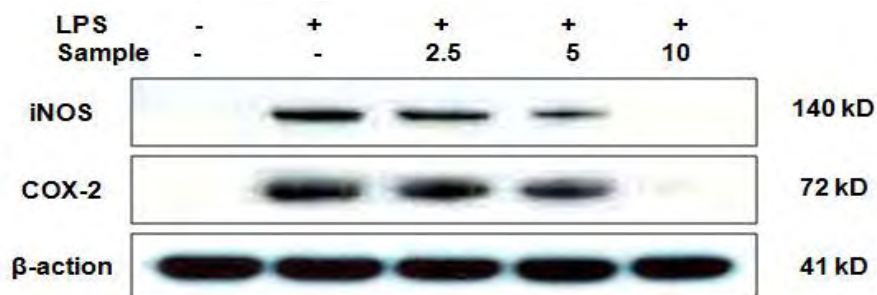


그림 30-1. Inhibitory effect of Litsenolide B2 isolated from *L. japonica* fruit on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7

마. 관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 규명을 위한 기전연구 결과

염증 유발 인자 단백질 발현 억제 효능을 규명하기 위해 NF- κ B와 MAPKs 기전연구를 수행하였고, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물을 2.5, 5 및 10 μ M의 농도로 처리하였을 때의 결과를 (그림 31)과 (그림 32)에 나타내었다. (그림 31)과 (그림 32)에서 확인되듯이, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물이 농도 의존적으로 NF- κ B (I κ B- α , p65, 그리고 p50)와 MAPKs(JNK와 p38)의 인산화를 억제 시키는 활성을 보이고 있어 NF- κ B와 MAPKs의 기전이 염증 유발 인자의 발현을 조절한다는 것을 확인하였다.

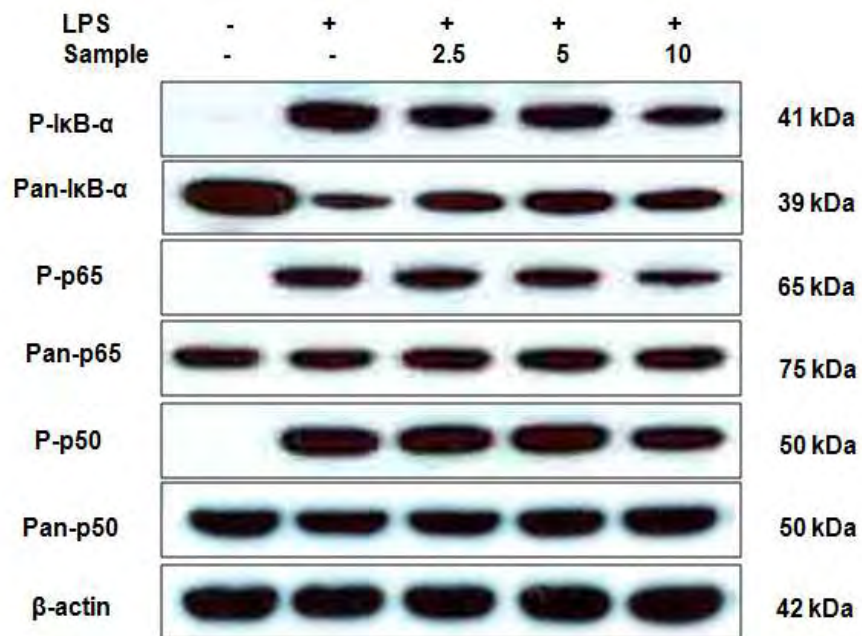


그림 31. Inhibitory effect of Litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit on the I κ B- α and NF- κ B protein levels in RAW 264.7 cells.

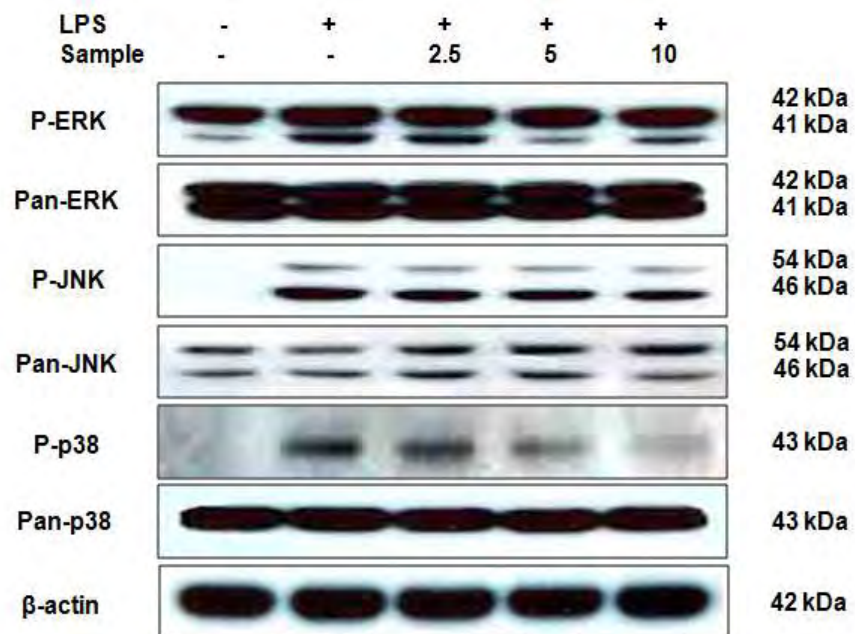


그림 32. Inhibitory effect of Litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit on the protein level of MAPKs in RAW 264.7 cells.

바. 조골세포 (MG-63 cells)에서 골대사성 질환 유발 인자 억제 효능 평가

(1) Interleukin-6 (IL-6) 및 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성 억제 효능 평가 결과

(그림 33)를 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물이 골대사성 질환 유발 인자인 IL-6 생성 억제 활성은 없는 것을 확인하였다. (그림 34)를 참조하여 보면, 상기 IL-6 생성 억제 결과와는 반대로 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에서 분리된 단일화합물이 농도 의존적으로 PGE₂생성 억제 활성을 보임을 확인하였다.

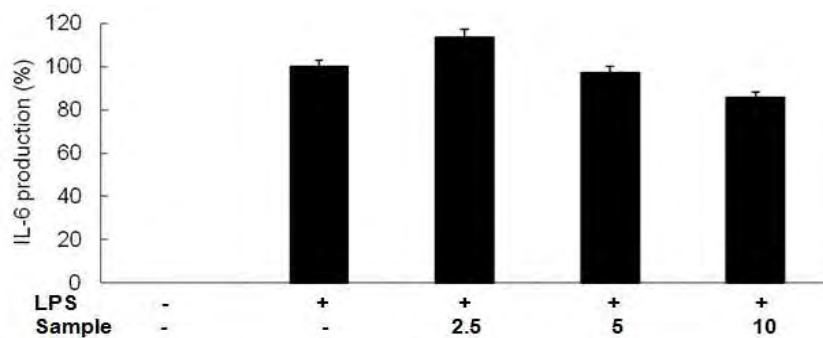


그림 33. Inhibitory effect of Litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit on IL-6 production in MG-63 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

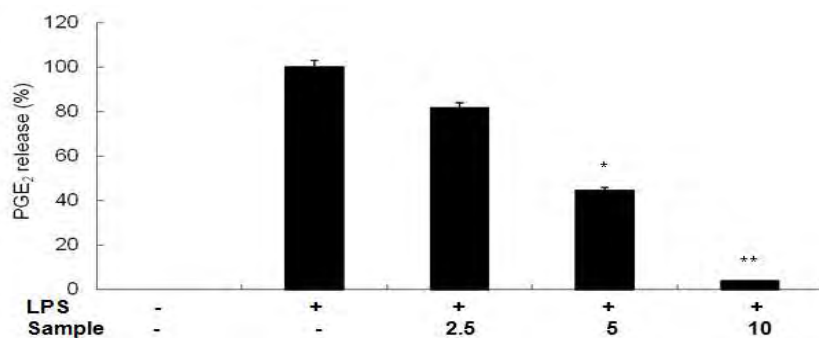


그림 34. Inhibitory effect of Litsenolide B2 isolated from of *Litsea japonica* fruit on PGE₂ production in MG-63 cells. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$

3. 까마귀쪽나무 비임상효력시험

가. 급성관절염 모델에서의 비임상효력시험

(1) 부종 증가율 (Table 1, 그림 35)

대조군의 경우 부종 유발 후 3시간 경과시에 96.6%의 최대 부종증가율을 나타냈으며, 4시간 경과시부터 부종증가율이 떨어졌다. 까마귀쪽나무 추출물 투여군의 경우에는 10 mg/kg 투여시 부종 유발 후 3시간 경과시에 대조군에 비하여 유의성 있는 수준으로 부종 증가율이 감소하였고, 100 mg/kg 투여시 부종 유발 후 2시간 경과 후부터 대조군에 비하여 유의성 있는 수준으로 부종 증가율이 감소하였다. 양성대조군인 조인스 투여군에서는 10 mg/kg의 경우 4시간에서, 100 mg/kg의 경우에는 2시간 경과 후부터 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 수준으로 부종 증가율이 감소하였다.

Table 1. Effects of 70% EtOH extract from *Litsea japonica* on rat' s hind-paw inflammation.

Group	Swelling (%)				
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
G1	39.6 ± 7.37	88.2 ± 12.87	96.6 ± 14.84	84.8 ± 9.29	84.0 ± 15.69
G2	37.2 ± 8.55	61.4 ± 10.15	45.6 ± 11.31*	62.4 ± 12.21	70.4 ± 13.14
G3	32.6 ± 3.50	42.6 ± 3.94*	37.3 ± 8.70*	42.7 ± 5.12**	34.3 ± 10.95*
G4	31.4 ± 4.54	62.0 ± 6.91	77.8 ± 4.65	46.9 ± 2.99**	48.3 ± 2.41
G5	26.7 ± 6.96	31.7 ± 10.37*	40.7 ± 9.23*	23.6 ± 5.17**	27.8 ± 7.31*

G1: Vehicle control, G2: 까마귀쪽나무 (10 mg/kg), G3: 까마귀쪽나무 (100 mg/kg), G4: positive control (Joins, 10 mg/kg), G5: positive control (Joins, 100 mg/kg). Data represented Mean ± SE, *: significantly different from control (p < 0.05), **: significantly different from control (p < 0.01).

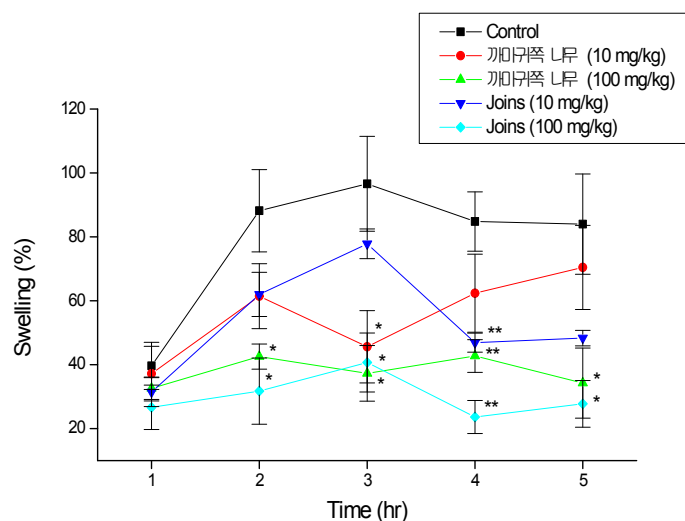


그림 35. Effects of 70% EtOH extract from *Litsea japonica* on rat' s hind-paw inflammation.

Data represented Mean ± SE, *: significantly different from control (p < 0.05), **: significantly different from control (p < 0.01).

(2) 부종 억제율(Table 2, 그림 36)

100 mg/kg 투여시 5시간 경과시에 양성대조군인 조인스 투여군의 경우 50.7%, 시험물질 투여 후 부종 유발 후 2시간과 3시간 경과시에는 전 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 수준으로 증가되었고, 5시간 경과시에는 까마귀쪽나무(100 mg/kg)와 양성대조군 (100 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 수준으로 부종 억제율이 증가되었다.

Table 2. Effects of 70% EtOH extract from *Litsea japonica* on rat' s hind-paw inflammation.

Group	Inhibition (%)				
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
G1	6.1 ± 21.57	30.3 ± 11.51**	52.8 ± 11.71*	26.5 ± 14.40	16.1 ± 15.65
G2	17.7 ± 8.84	51.7 ± 4.46**	61.4 ± 9.01**	49.6 ± 6.04*	59.2 ± 13.04*
G3	20.7 ± 11.45	29.7 ± 7.84**	19.4 ± 4.82*	44.7 ± 3.52*	42.5 ± 2.87
G4	32.7 ± 17.56	64.0 ± 11.76	57.9 ± 9.55*	72.1 ± 6.10**	67.0 ± 8.70*

G1: 까마귀쪽나무 (10 mg/kg), G2: 까마귀쪽나무 (100 mg/kg), G3: positive control (Joins, 10 mg/kg), G4: positive control (Joins, 100 mg/kg). Data represented Mean ± SE, *, significantly different from control (p < 0.05), **, significantly different from control (p < 0.01).

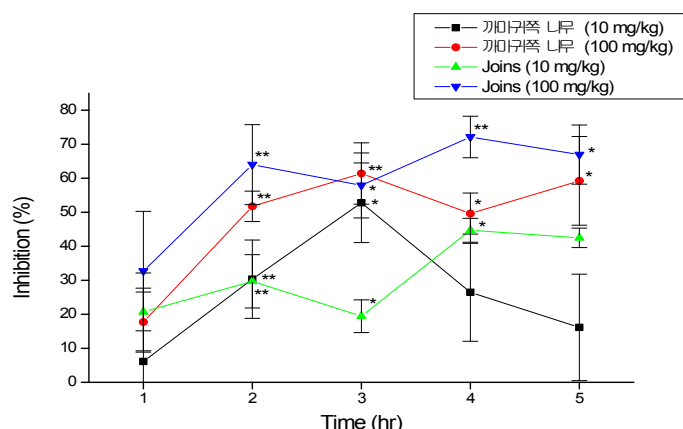


그림 36. Effects of 70% EtOH extract from *Litsea japonica* on rat' s hind-paw inflammation.

Data represented Mean ± SE, *, significantly different from control (p < 0.05), **, significantly different from control (p < 0.01).

나. 만성관절염 모델에서의 비임상효력시험

(1) 조직소견

용매대조군의 경우, 관절면 침식과 주변에 fibroblast의 침착이 관찰되었다. 조인스 투여군의 경우에는 관절면은 smooth하였으나 주변에 collagen의 증식이 관찰된 반면 까마귀쪽나무 투여군의 경우 관절의 파괴나 변형이 거의 관찰되지 않았다 (그림 37).

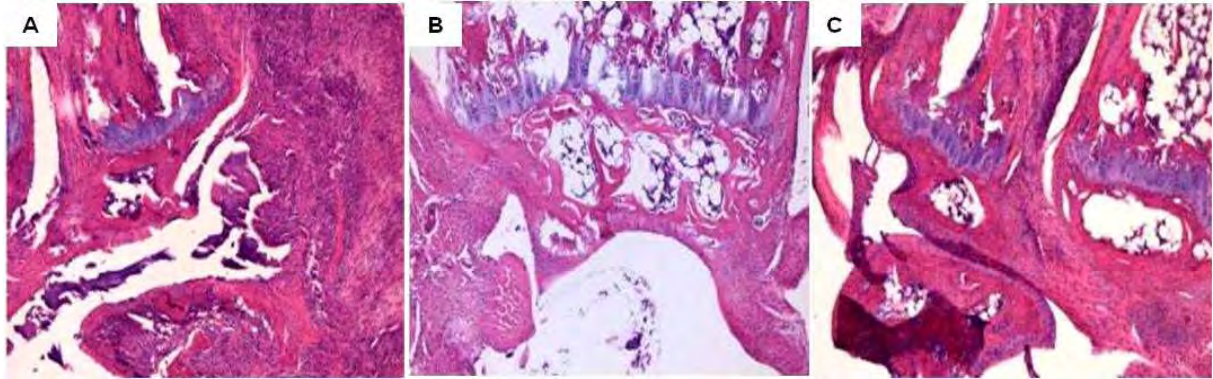


그림 37. Histologic analysis of knee joint. A: vehicle control(CIA only), B: *Litsea japonica*, C: Joins. x 100.

(2) 혈청 및 비장세포내 cytokine 변화

혈청에서의 cytokine 생성 변화는 다음과 같다. IL-6 수치는 까마귀쪽나무 (25 mg/kg) 투여군을 제외한 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 38A). TNF- α 수치는 까마귀쪽나무를 투여한 전 군과 조인스 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 억제되었다 (그림 38B). IFN- γ 수치 또한 까마귀쪽나무 (25 mg/kg) 투여군을 제외한 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다 (그림 38C). 비장세포의 경우, TNF- α 수치는 까마귀쪽나무 (25 mg/kg) 투여군을 제외한 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다 (그림 39B). IFN- γ 수치는 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였으며 특히, 까마귀쪽나무 (50 mg/kg and 100 mg/kg)의 경우 정상대조군의 수준으로 억제되었다 (그림 39C).

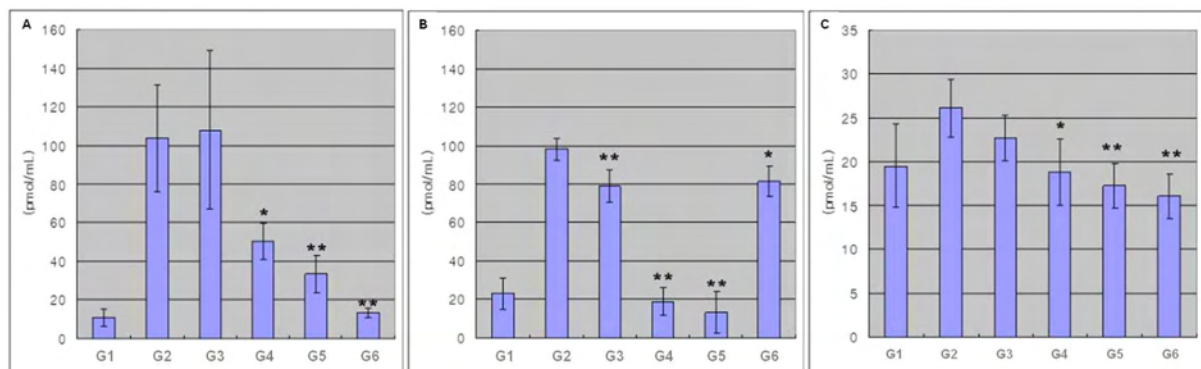


그림 38. Effects of the extract from *Litsea japonica* on cytokines production of serum. A: IL-6, B: TNF- α , C: IFN- γ . G1: normal control, G2: vehicle control (CIA only), G3: 25 mg/kg G4: 50 mg/kg G5: 100 mg/kg G6: positive control(Joins, 10 mg/kg). Data represented Mean \pm SE, *, significantly different from control ($p < 0.05$), **, significantly different from control ($p < 0.01$).

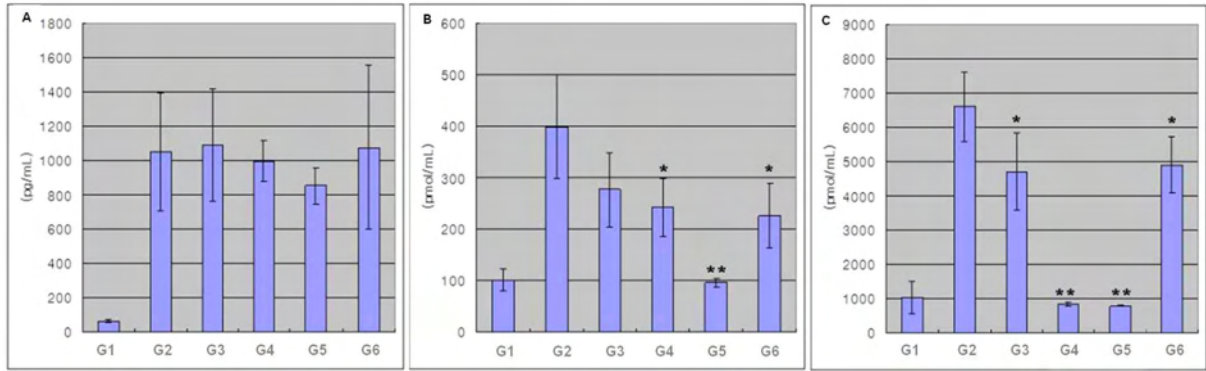


그림 39. Effects of the extract from *Litsea japonica* on cytokines production of lymphocytes. A: IL-6, B: TNF- α , C: IFN- γ . G1: normal control, G2: vehicle control (CIA only), G3: 25 mg/kg G4: 50 mg/kg G5: 100 mg/kg G6: positive control(Joins, 10 mg/kg). Data represented Mean \pm SE, *, significantly different from control ($p < 0.05$), **, significantly different from control ($p < 0.01$).

(3) 방사선학적 검사

시험 종료 후 마우스를 경추탈골로 희생시킨 후 발목관절을 X-ray로 촬영한 결과 용매대조군에서는 심한 관절의 파괴와 변형을 관찰할 수 있었으나 시험물질 투여군에서는 관절의 병변이 거의 관찰되지 않았다(그림 40).



그림 40. Radiographs of the hind paws of collagen-induced arthritis model mice. A: vehicle control(CIA only), B: *Litsea japonica*, C: Joins.

(4) 사이토카인에 대한 면역조직화학 염색

시험 종료 후 마우스의 족관절을 파라민 포매한 후 IL-6와 TNF- α 에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 관절염을 유발한 후 용매만을 투여한 용매대조군에서는 IL-6와 TNF- α 가 족관절 조직 전체에서 많이 발현되었으나, 시험물질 투여군에서는 발현량이 감소되었다 (그림 41, 42).

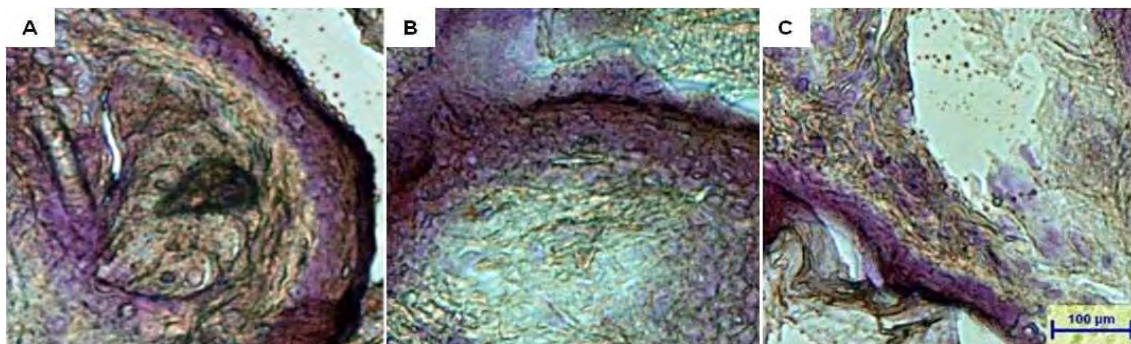


그림 41. Immunohistochemical analysis of IL-6 from the CIA model. A: vehicle control (CIA only), B: *Litsea japonica*, D: Joints.

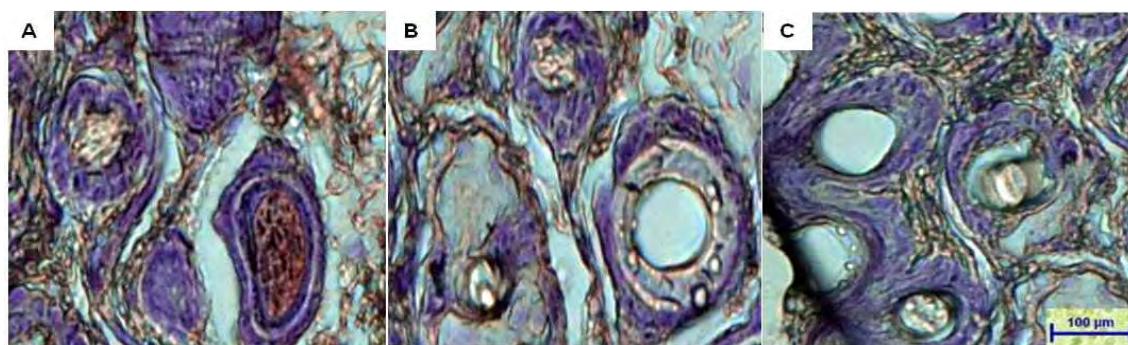


그림 42. Immunohistochemical analysis of TNF- α from the CIA model. A: vehicle control (CIA only), B: *Litsea japonica*, D: Joints.

다. 까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 진통 억제 비임상효력시험

(1) 말초성 진통 억제 비임상효력시험 (Acetic acid-induced writhing test) 결과

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구투여하였다. 까마귀쭈나무 열매 주정 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구 투여하였다. (그림 43)를 참조하여 보면, 시료 비투여군인 대조군의 writhing number에 까마귀쭈나무 열매 주정 추출물과 그 디클로로메탄 분획물, 그로부터 분리된 유효성분인 Hamabiwalactone A와 Hamabiwalactone B의 writhing number가 작은 것을 알 수 있다.

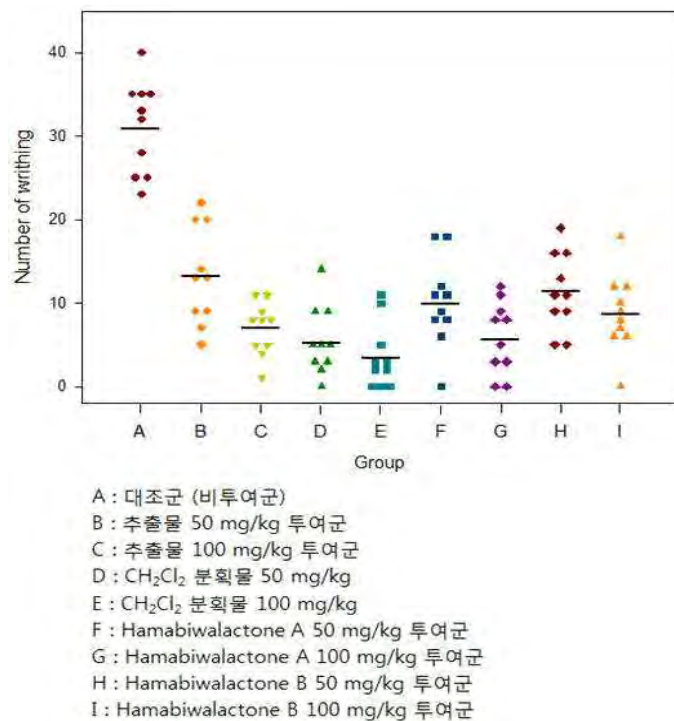


그림 43. 까마귀쪽나무 열매 추출물과 그 CH₂Cl₂ 분획물, 그로부터 분리된 유효성분인 Hamabiwalactone A와 Hamabiwalactone B의 말초성 진통 억제 효과

(2) 중추성 진통 억제 동물시험 (Tail-flick test) 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구투여하였다. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구 투여하였다. (그림 44)을 참조하여 보면 대체로 모든 시료가 농도 의존적으로 진통 억제 효과가 있음을 보여준다.

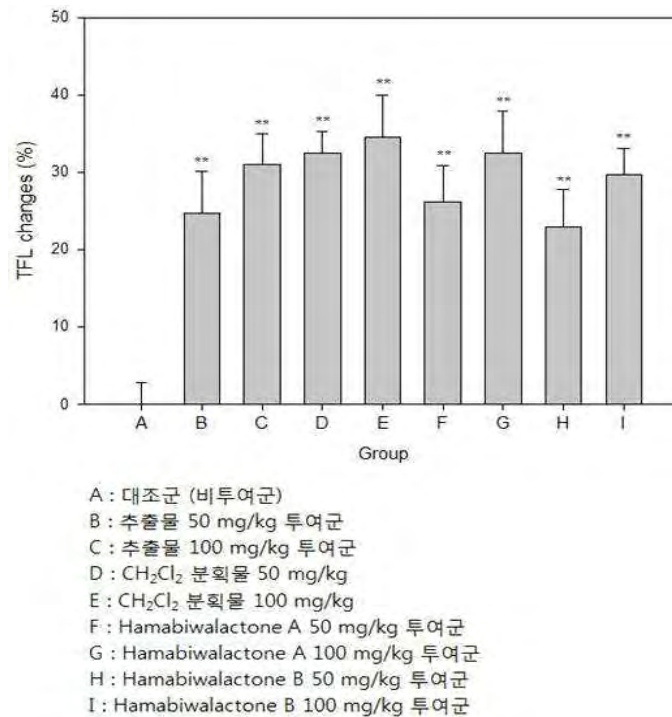
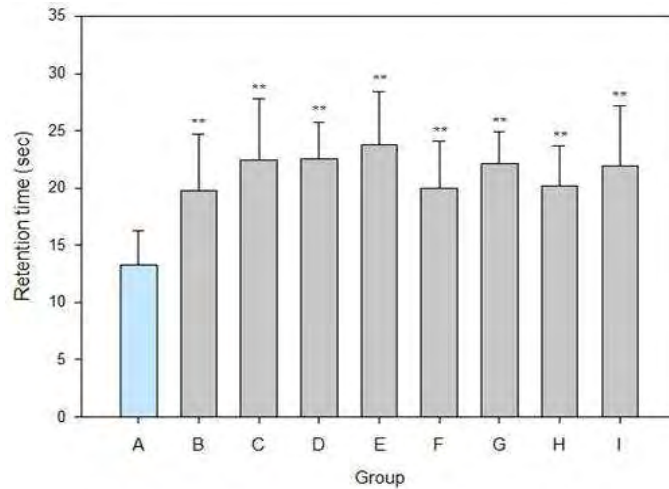


그림 44. 까마귀쪽나무 열매 추출물과 그 CH₂Cl₂ 분획물, 그로부터 분리된 유효성분인 Hamabiwalactone A와 Hamabiwalactone B의 중추성 진통 억제 효과. Data represented Mean \pm SE, *: significantly different from control ($p < 0.05$), **: significantly different from control ($p < 0.01$).

(3) 중추성 진통 억제 동물시험 (Hot plate test) 결과

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물, CH₂Cl₂ 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구투여하였다. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물, 디클로로메탄 분획물 및 Hamabiwalactone A와 B는 실험 시작 60분 전에 경구 투여하였다. (그림 45)을 참조하여 보면, 모든 시료 농도 의존적으로 진통 억제 효과를 보임을 알 수 있다.



A : 대조군 (비투여군)
 B : 추출물 50 mg/kg 투여군
 C : 추출물 100 mg/kg 투여군
 D : CH₂Cl₂ 분획물 50 mg/kg
 E : CH₂Cl₂ 분획물 100 mg/kg
 F : Hamabiwalactone A 50 mg/kg 투여군
 G : Hamabiwalactone A 100 mg/kg 투여군
 H : Hamabiwalactone B 50 mg/kg 투여군
 I : Hamabiwalactone B 100 mg/kg 투여군

그림 45. 까마귀쪽나무 열매 추출물과 그 CH₂Cl₂ 분획물, 그로부터 분리된 유효성분인 Hamabiwalactone A와 Hamabiwalactone B의 중추성 진통 억제 효과. Data represented Mean \pm SE, *: significantly different from control ($p < 0.05$), **: significantly different from control ($p < 0.01$).

라. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 골관절염 개선 비임상효력시험

(1) MIA에 의한 골관절염 모델에서 주차별 행동 결과 및 체중 변화

MIA에 의해 골관절염이 유발된 모델에서 매주 아래와 같은 평가 기준을 통하여 주차별 행동 변화 및 체중 변화를 측정한 결과 주차별 행동 score가 MIA만 처리한 관절염 유발 모델 처리군에 비해 떨어졌고 체중변화는 크게 나타나지 않았다 (그림 46, 그림 47).

<MIA에 의해 유발된 골관절염 모델에서 주차별 행동 score>

- | | |
|---|-----------------------|
| 0 | 정상 |
| 1 | 증상은 경미하나 착지 시 한쪽발로 착지 |
| 2 | 한쪽 발을 경미하게 절뚝거림 |
| 3 | 한쪽 발을 심하게 절뚝거림 |
| 4 | 한쪽 발을 1초 이상 내딛지 못함 |
| 5 | 한쪽 발을 내딛지 못함 |

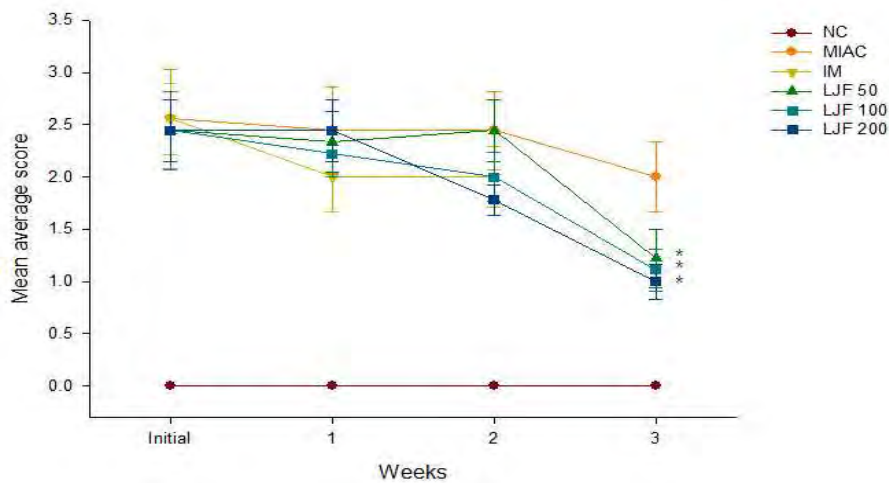


그림 46. MIA 유도 골관절염 모델에서의 주차별 행동 score.
Values represent the mean \pm S.D. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC.

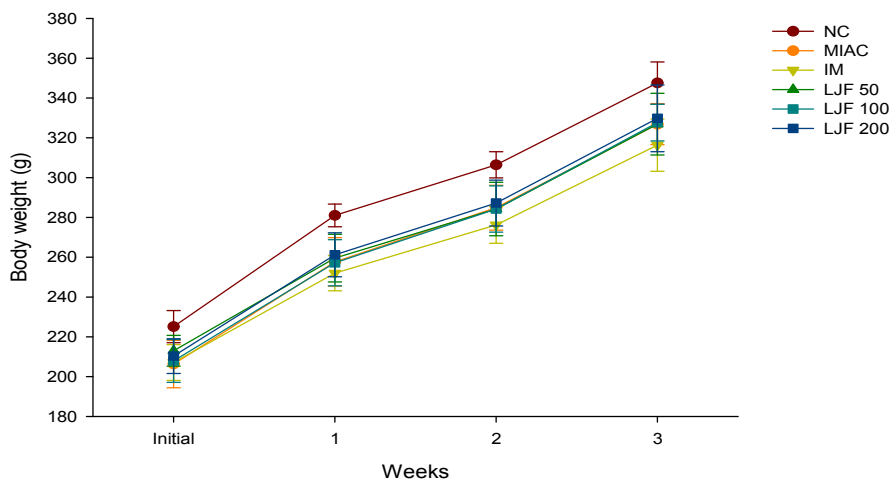


그림 47. MIA 유도 골관절염 모델에서의 주차별 체중변화.

(2) MIA에 의한 골관절염 모델에서 생화학적 지표 변화

MIA에 의해 유발된 골관절염 모델에서 생화학적 지표 변화를 확인하기 위해 투여 전 후에 걸쳐 혈액 및 synovial fluid를, 채취한다. 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 분리한 뒤, 염증성 지표로서 $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$ 등의 사이토카인을 ELISA assay kit를 사용하여 측정하였고 양성대조군으로는 Indomethacin을 사용하였다(그림 48 ~ 50). 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 50, 100 및 200 mg/kg를 처리한 결과 MIA만 처리한 골관절염 유발 모델에 비해 농도 의존적으로 염증성 지표를 억제하는 것을 확인하였다.

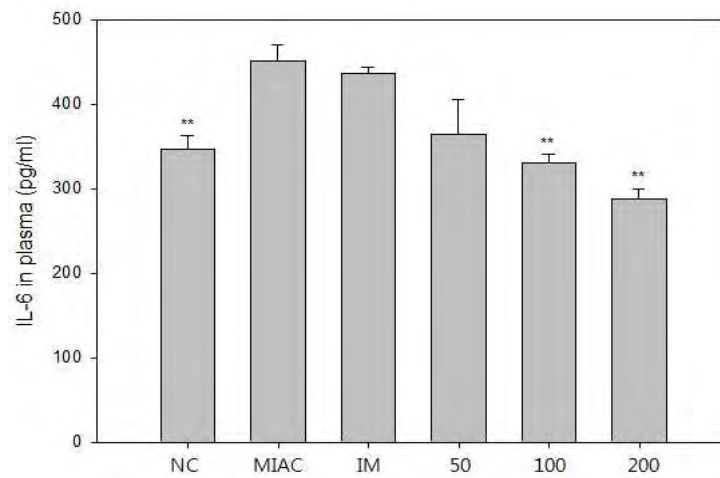


그림 48. MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 IL-6 level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

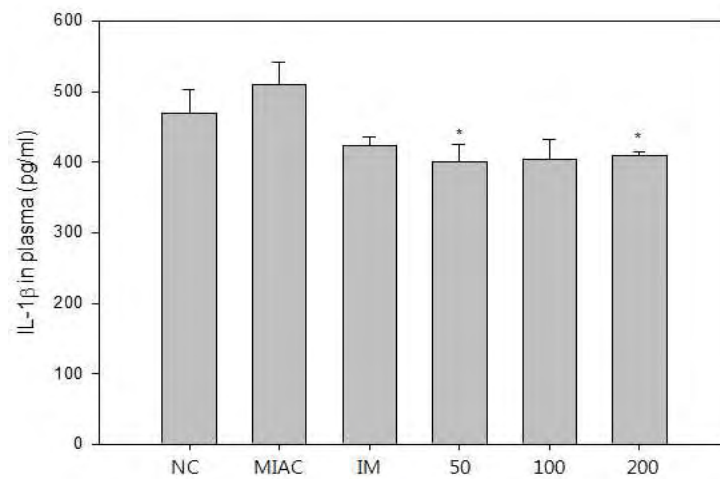


그림 49. MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 IL-1 β level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

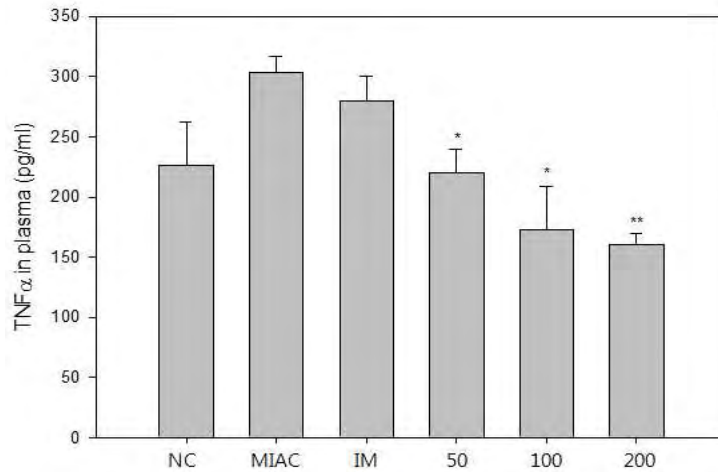


그림 50. MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 TNF- α level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

(3) MIA에 의한 골관절염 모델에서 연골조직에서 생화학적 지표 변화

MIA에 의해 유발된 골관절염 모델에서 생화학적 지표 변화를 확인하기 위해 투여 완료 후 연골조직을 분리하여 골 및 연골의 기지 구성요소를 파괴하는 생화학적 지표인 MMP-2, 3, 4, 9, 13과 TIMP-1, 2에 대한 mRNA 발현 정도를 Real-Time PCR를 통하여 확인하였고 양성대조군으로는 Indomethacin을 사용하였다). 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 50, 100 및 200 mg/kg를 처리한 결과 MIA만 처리한 골관절염 유발 모델에 비해 생화학적 지표에 대한 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(그림 51-1 ~ 52-2).

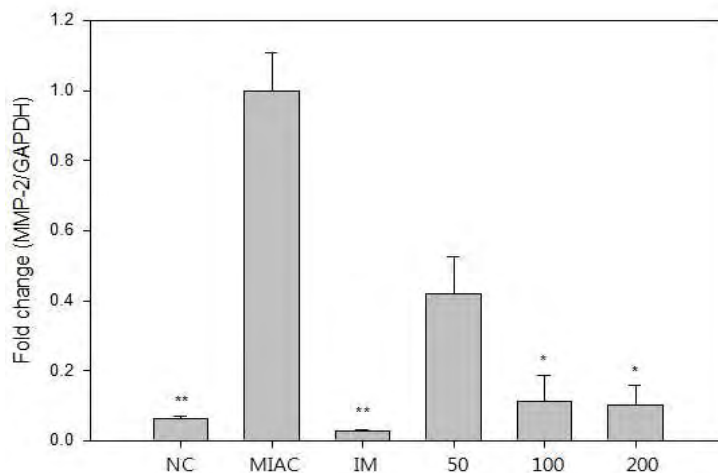


그림 51-1. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-2 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

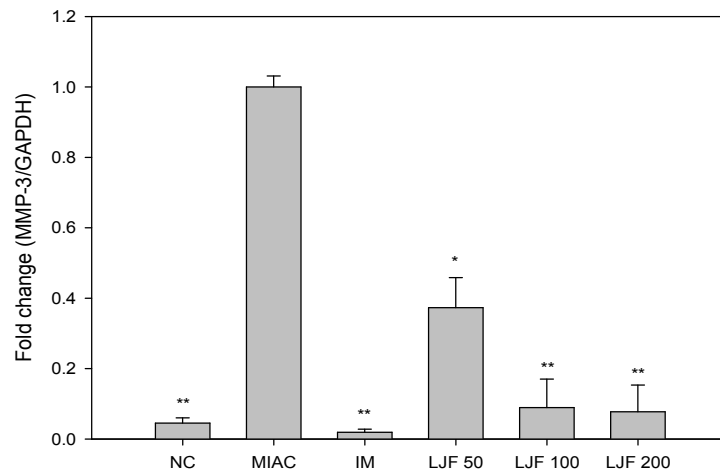


그림 51-2. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-3 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

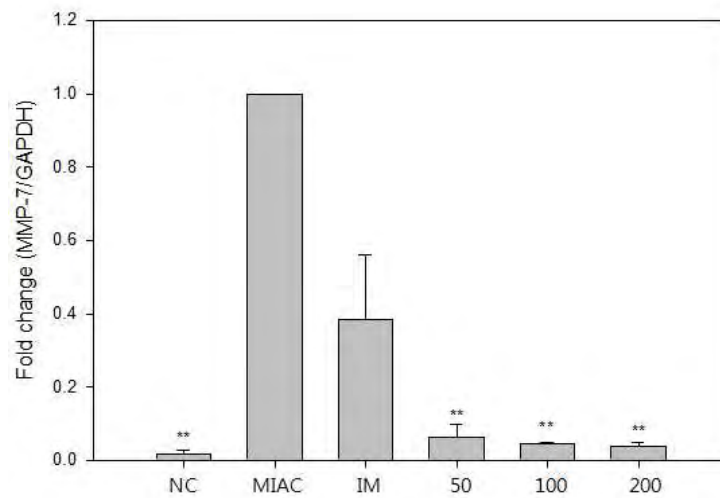


그림 51-3. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-7 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

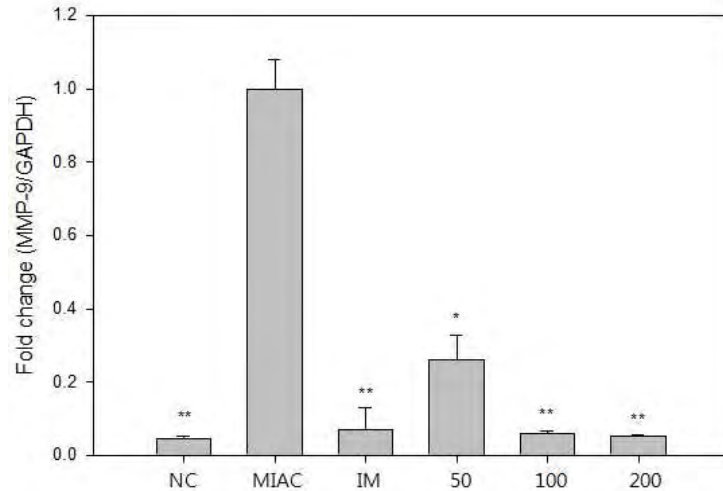


그림 51-4. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-7 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

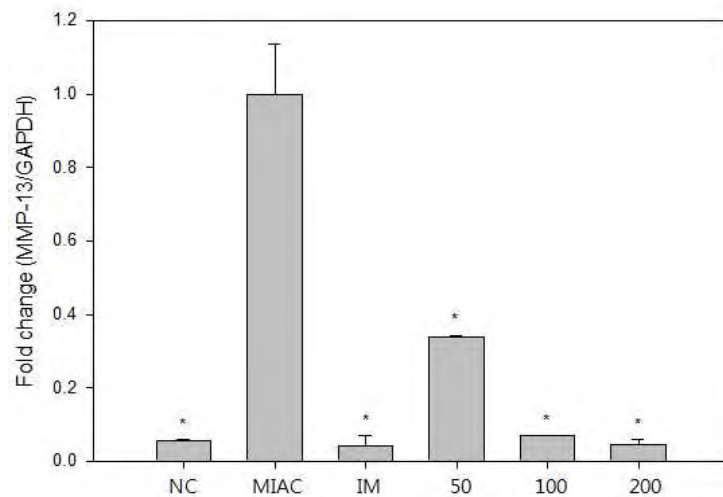


그림 51-5. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-13 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

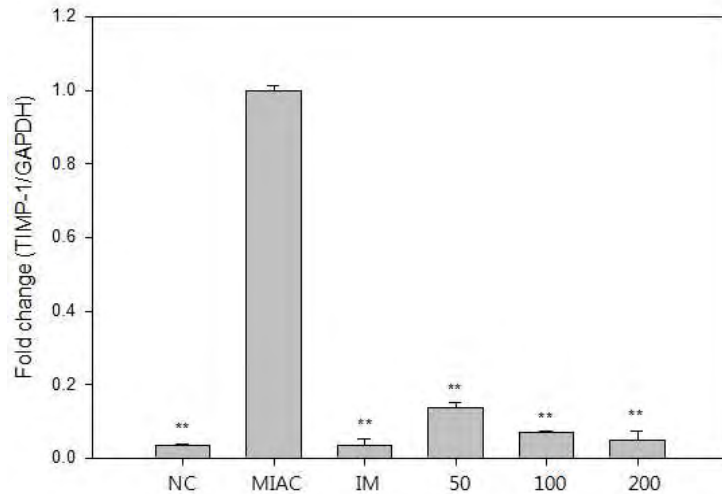


그림 52-1. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIMP-1 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

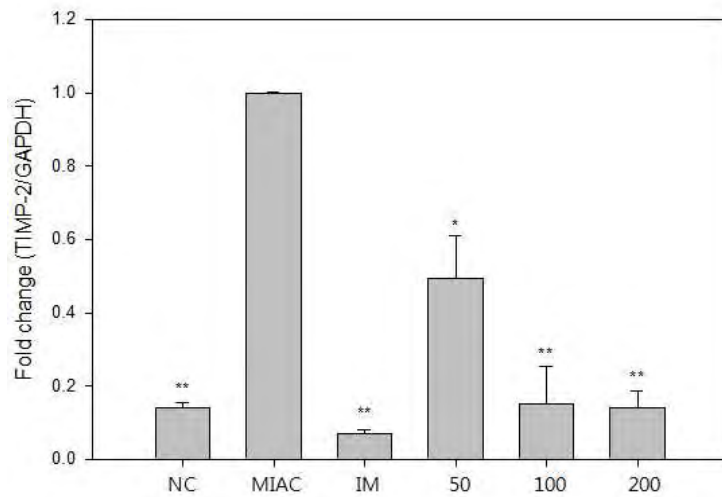


그림 52-2. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIMP-2 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

(4) MIA에 의한 골관절염 모델에서 마이크로 CT 변화

MIA에 의해 유발된 골관절염 모델에서 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에 대한 마이크로 CT를 촬영하였고 마이크로 CT 촬영은 측면 연골하골과 중앙 연골하골을 촬영하여 결과를 확인하였으며 뼈량, 뼈조각 개수 및 뼈두께를 측정하였다. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 50,

100 및 200 mg/kg를 처리한 결과 MIA만 처리한 골관절염 유발 모델에 비해 농도 의존적으로 염증성 지표를 억제하는 것을 확인하였다(그림 53 ~ 56).

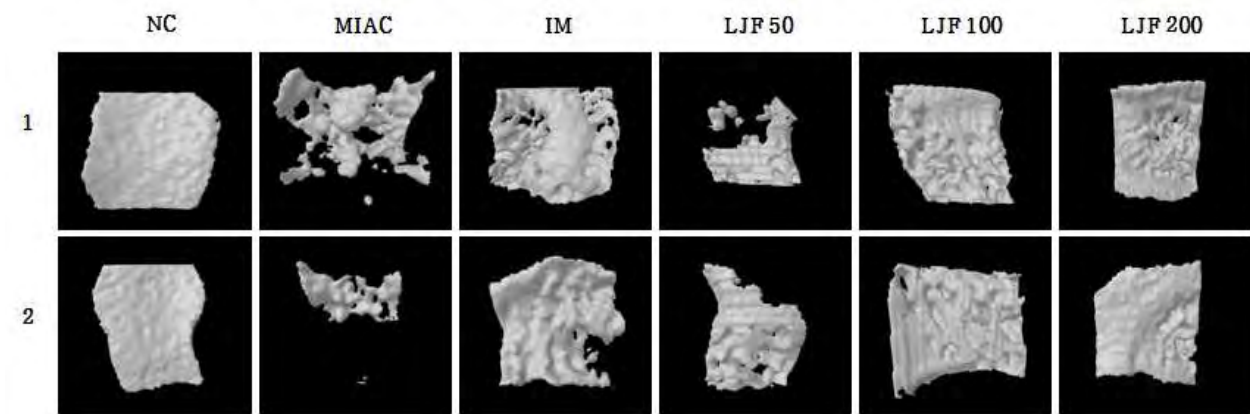


그림 53. MIA 유도 골관절염 모델에서 micro CT를 이용한 subcondral bone 3D 측정. 1, lateral subchondral bone; 2, medial subchondral bone.

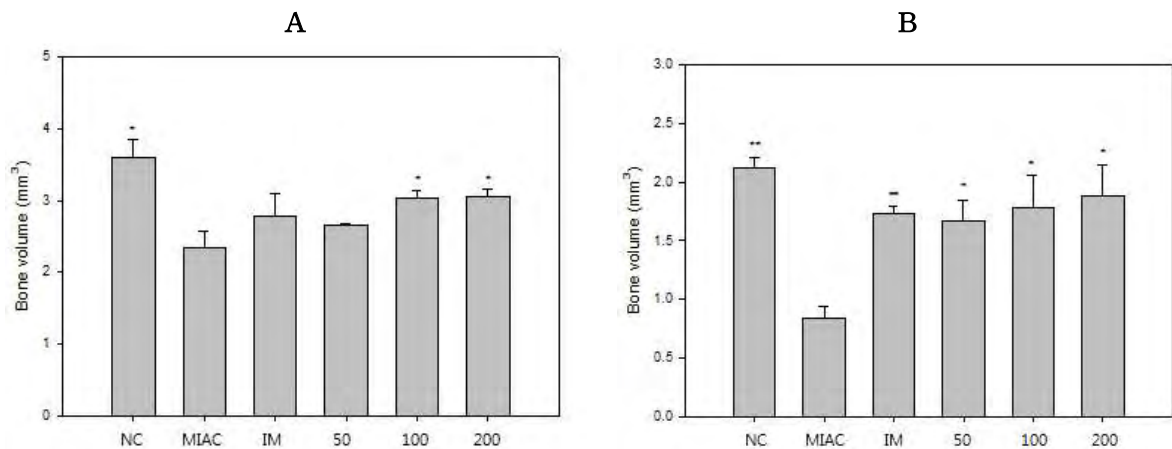


그림 54. MIA 유도 골관절염 모델에서 micro CT를 이용한 bone volume 측정. A, lateral subchondral bone; B, medial subchondral bone. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

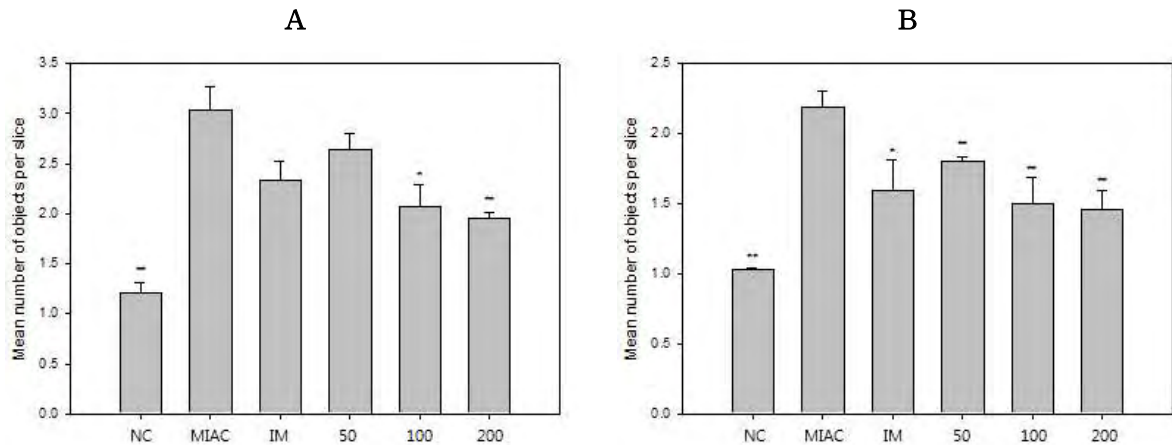


그림 55. MIA 유도 골관절염 모델에서 micro CT를 이용한 뼈 조각 개수 측정. A, lateral subchondral bone; B, medial subchondral bone. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

*Mean number of objects per slice
슬라이드당 object의 개수의 평균
>>시편의 연결성을 의미함.
예) 조각 혹은 끊어진 부분 없이 하나로 연결된 시편의 경우 1로 표시됨.

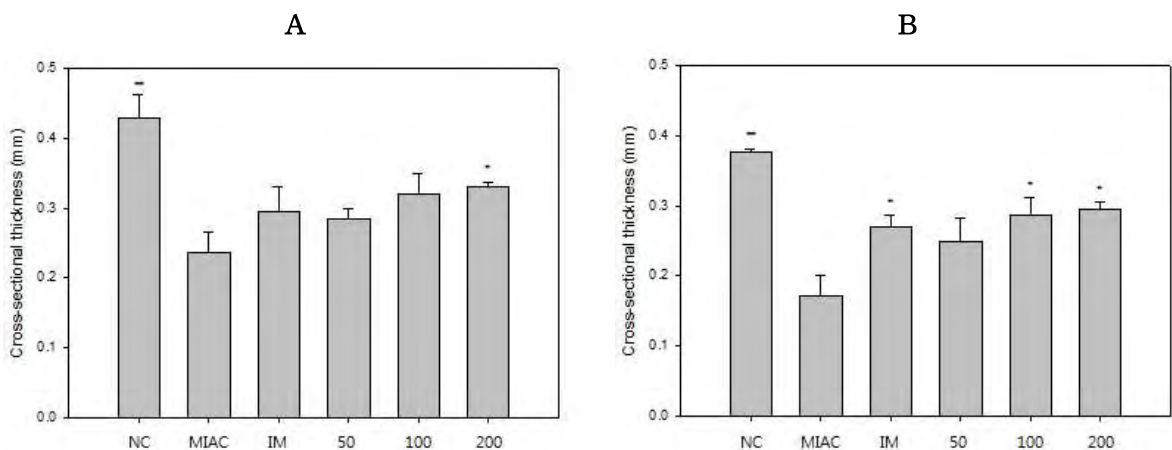


그림 56. MIA 유도 골관절염 모델에서 micro CT를 이용한 cross sectional thickness 측정. A, lateral subchondral bone; B, medial subchondral bone. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

(5) 인체적용시험 시험제품 골관절염 개선 비임상효력시험 재현성 평가

인체적용시험 시험제품에 대한 골관절염 개선 비임상효력시험 재현성 평가를 수행하였다. 우선 MIA로 인해 유발된 골관절염 모델에서 생화학적 지표 변화 확인하기 위해 투여 완료 후 연골조직을 분리하여 골 및 연골의 기지 구성요소를 파괴하는 생화학적 지표인 MMP-2, 3, 4, 9, 13과 TIMP-1, 2에 대한 mRNA 발현 정도를 Real-Time PCR를 통하여 확인하였고 양

성대조군으로는 Indomethacin을 사용하였다. 까마귀쪽나무 열매 인체적용시험 시험제품을 50, 100 및 200 mg/kg를 처리한 결과 MIA만 처리한 골관절염 유발 모델에 비해 생화학적 지표에 대한 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 인체적용시험 시험제품 역시 골관절염 개선 효능을 확인할 수 있었다(그림 57-1 ~ 58-2).

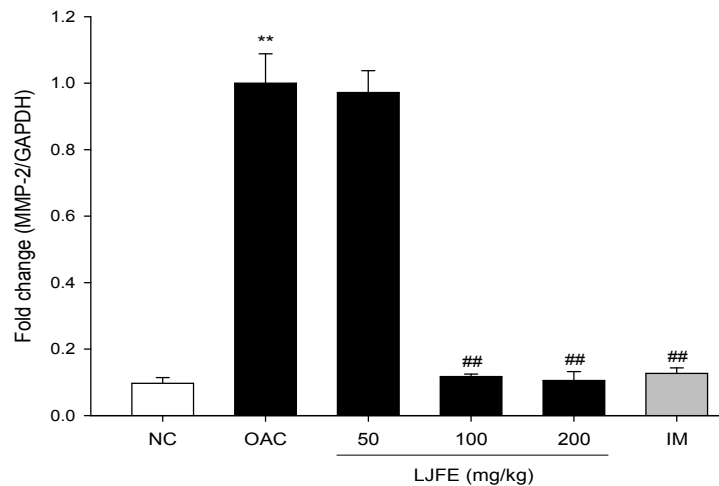


그림 57-1. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-2 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIA, ** $p < 0.01$: significantly different from MIA.

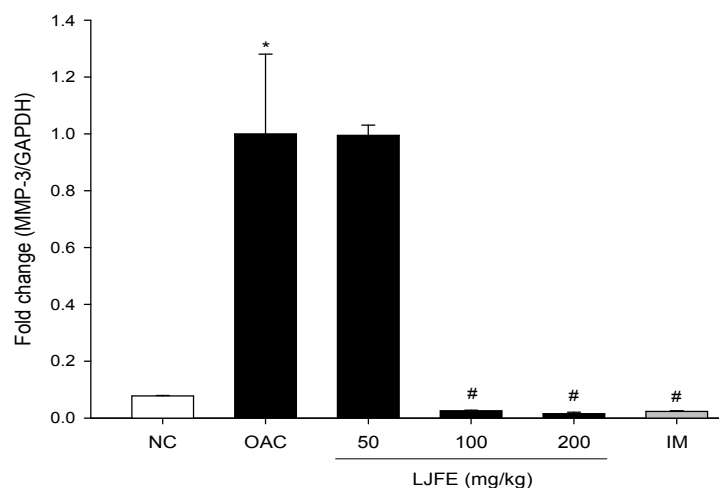


그림 57-2. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-3 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIA, ** $p < 0.01$: significantly different from MIA.

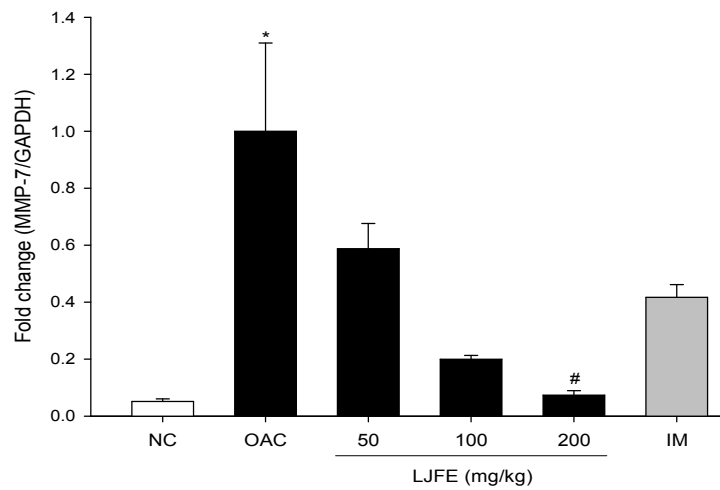


그림 57-3. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-7 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

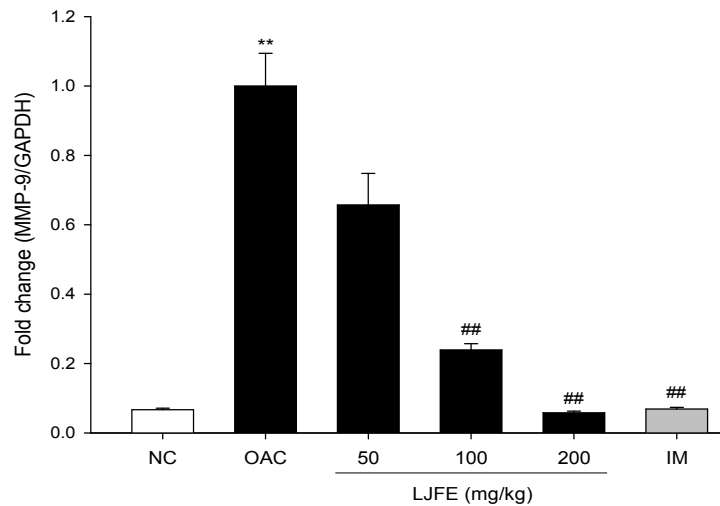


그림 57-4. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-9 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

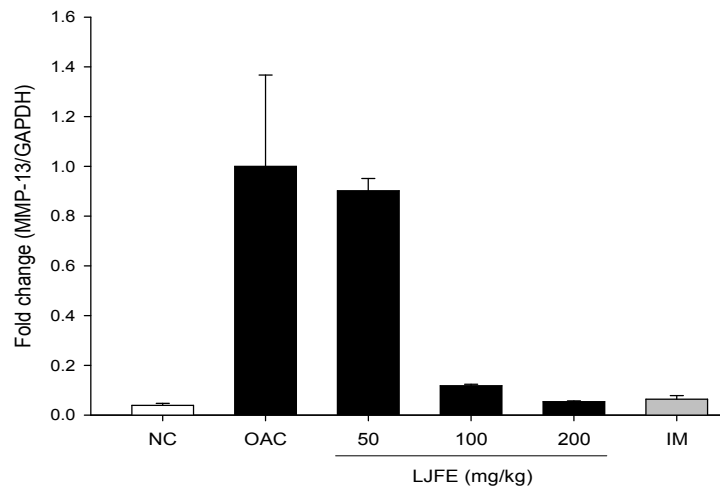


그림 57-5. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-13 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

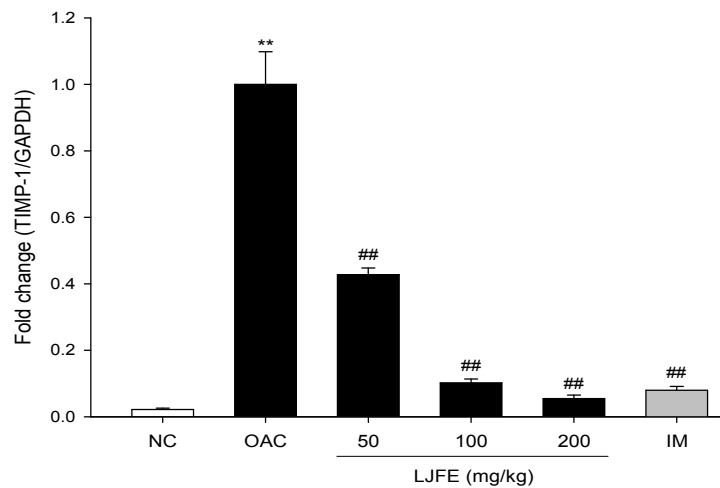


그림 58-1. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIMP-1 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

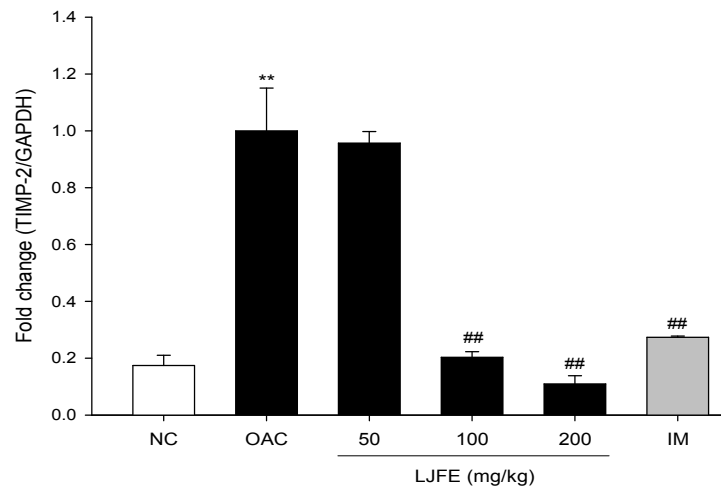


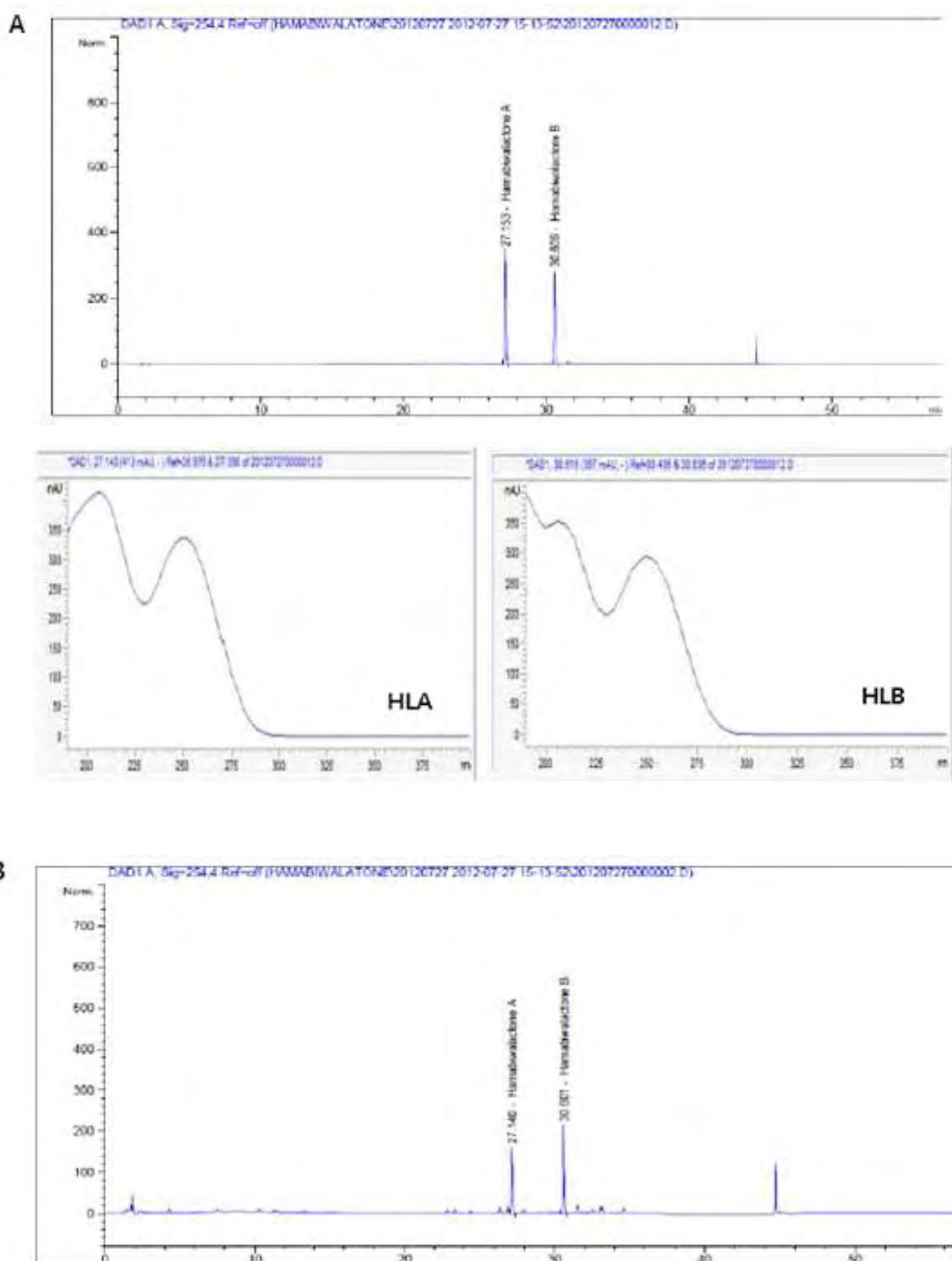
그림 58-2. MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIMP-2 mRNA level 측정. Values represent the mean \pm S.E. * $p < 0.05$: significantly different from MIAC, ** $p < 0.01$: significantly different from MIAC.

3. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 원료표준화 결과

가. 분석 결과

(1) 1차 실험 결과

1차 실험은 Cadenza C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm 컬럼을 사용하여 실험을 하였다. 분석 결과 Hamabiwalactone A의 peak는 약 27분대에 나타났으며, Hamabiwalactone B의 peak는 약 30분대에 나타났다. 두 물질 모두 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대에 peak가 나타났으며, spectrum 확인 결과 Hamabiwalactone A, B의 최대흡광파장이 254 nm임을 확인할 수 있었다. 시험용액과 표준용액의 크로마토그램 및 스펙트럼은 아래와 같다(그림 59).



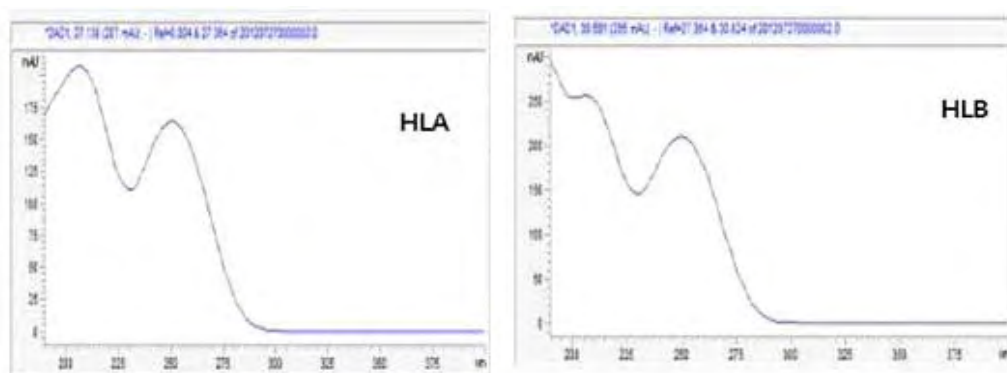


그림 59. 1차 실험의 chromatogram 및 Spectrome(A: STD, B: Sample)

표준용액을 희석하여 검량선을 확인해 본 결과 Hamabiwalactone A는 14.55 ~ 232.80 ppm에서 직선성이 나타났으며($R^2=0.9999$), Hamabiwalactone B는 12.85 ~ 205.60 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다($R^2=0.9999$). 표준용액의 검량선 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. 1차 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

A. Hamabiwalactone A

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	14.55	134.40533	
2	29.10	286.17096	
3	58.20	553.32623	
4	116.40	1099.59326	
5	232.80	2170.36963	

B. Hamabiwalactone B

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	12.85	107.76319	
2	25.70	229.65985	
3	51.40	444.50876	
4	102.80	882.11304	
5	205.60	1743.65601	

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone A, B의 함량을 확인하기 위하여 3반복 분석 결과, Hamabiwalactone A는 20.196 ± 0.57 mg/g, Hamabiwalactone B는 28.372 ± 0.82 mg/g으로 나타났으며, 반복 간에 큰 편차 없이 함량을 확인 할 수 있었다. 또한 필터의 종류

에 따라 함량에 차이가 나는지 알아보기 위하여 0.45 μ m Nylon membrane syringe filter를 사용하여 분석한 결과, Hamabiwalactone A의 함량은 약 20.492 \pm 0.45 mg/g, Hamabiwalactone B의 함량은 약 28.692 \pm 0.66 mg/g 으로 나타나 필터간의 함량차이는 나타나지 않았다(Table 4). 그러므로 업체에서 사용한 동일 사양의 필터인 0.45 μ m PTFE membrane syringe filter로 진행하기로 결정하였다.

Table 4. 1차 실험 결과(필터간의 함량 비교분석)

A. 0.45um PTFE membrane syringe filter

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean \pm S.D (mg/g)
HLA	#1	106.89252	530.9	100	0.99	19.933
	#2	113.07880	537.0	100	0.99	20.847
	#3	90.12277	450.4	100	0.99	19.809
HLB	#1	154.56336	530.9	100	0.96	27.949
	#2	163.98057	537.0	100	0.96	29.315
	#3	130.66742	450.4	100	0.96	27.851

B. 0.45um Nylon membrane syringe filter

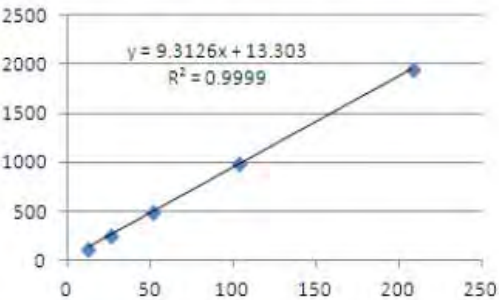
	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean \pm S.D (mg/g)
HLA	#1	111.85573	530.9	100	0.99	20.858
	#2	111.91064	537.0	100	0.99	20.632
	#3	90.921770	450.4	100	0.99	19.985
HLB	#1	161.64567	530.9	100	0.96	29.230
	#2	161.57612	537.0	100	0.96	28.885
	#3	131.18984	450.4	100	0.96	27.962

(2) 2차 실험 결과

2차 실험은 실험의 재현성을 확인하기 위하여 일자를 달리하여 분석하였으며, 시료채취량에 따른 함량 편차 여부를 확인하기 위해 시료채취량을 50 ~ 200%로 하여 실험을 진행하였다. 표준용액은 1차 실험과 동일한 방법으로 다시 제조하여 사용하였다. 분석 결과, 표준용액에 대한 직선성은 Hamabiwalactone A는 13.013 ~ 208.20 ppm에서 직선성이 나타났으며 ($R^2=0.9999$), Hamabiwalactone B는 12.735 ~ 203.76 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다 ($R^2=0.9999$). 표준용액의 검량선 결과는 Table 5과 같다.

Table 5. 2차 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

A. Hamabiwalactone A

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	13.013	130.12338	
2	26.025	259.52887	
3	52.050	492.90768	
4	104.100	991.82843	
5	208.200	1948.70093	

B. Hamabiwalactone B

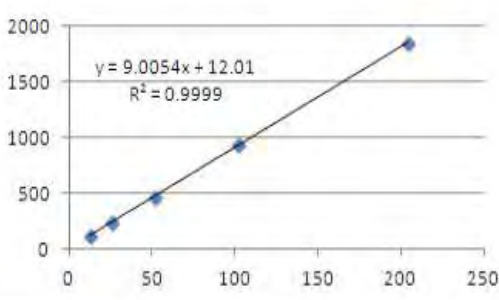
STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	12.735	122.60487	
2	25.470	245.12219	
3	50.470	466.01547	
4	101.880	937.67731	
5	203.760	1843.80884	

Table 6. 2차 재현성 실험 결과

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
HLA	#1	86.460	222.5	50	0.99	19.235
	#2	110.04969	265.6	50	0.99	20.510
	#3	97.40325	251.0	50	0.99	19.209
HLB	#1	117.41038	222.5	50	0.96	25.329
	#2	149.13454	265.6	50	0.96	26.952
	#3	132.07456	251.0	50	0.96	25.257

분석결과 Hamabiwalactone A, B의 peak가 표준용액의 peak와 동일한 시간대인 약 27, 30분 대에 나타났으며, 제시한 시료채취량의 100%를 채취하여 3반복 분석한 결과, Hamabiwalactone A의 평균은 19.651 ± 0.74 mg/g, Hamabiwalactone B의 평균은 25.846 ± 0.96 mg/g으로 나타났으며(Table 6), 1차 실험 결과인 Hamabiwalactone A $20.196 \pm$

0.57 mg/g, Hamabiwalactone B 28.372 ± 0.82 mg/g 와 비교해 볼 때 Hamabiwalactone A는 편차 없이 나타났으나 Hamabiwalactone B는 약간의 편차가 있었다. 이는 표준용액을 만들 때 나타나는 오차로 판단되어 3차 실험을 통해 확인하고자 하였으며 Hamabiwalactone A, B 모두 반복 간의 함량편차는 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다. 또한 시료채취량을 50 ~ 200%로 하여 실험을 진행한 결과, Hamabiwalactone A는 평균 19.726 ± 0.37 mg/g으로 나타났으며, Hamabiwalactone B는 평균 25.919 ± 0.45 mg/g으로 나타나(Table 7), 시료채취량에 따라 함량차이는 나타나지 않았다.

Table 7. 2차 실험 결과(시료의 직선성)

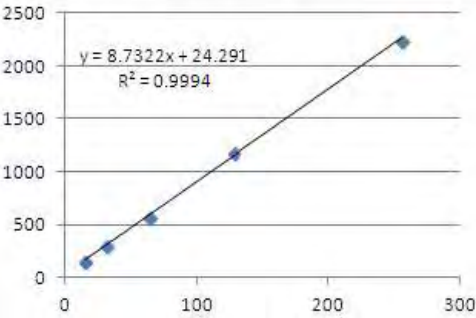
	비율 (%)	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
HLA	50%	47.01063	120.5	50	0.99	19.311	19.726±0.37
	100%	103.44026	255.7	50	0.99	20.025	
	200%	203.11382	506.7	50	0.99	19.842	
HLB	50%	63.86276	120.5	50	0.96	25.439	25.919±0.45
	100%	140.20031	255.7	50	0.96	26.318	
	200%	274.45549	506.7	50	0.96	25.999	

(3) 3차 재현성 실험 결과

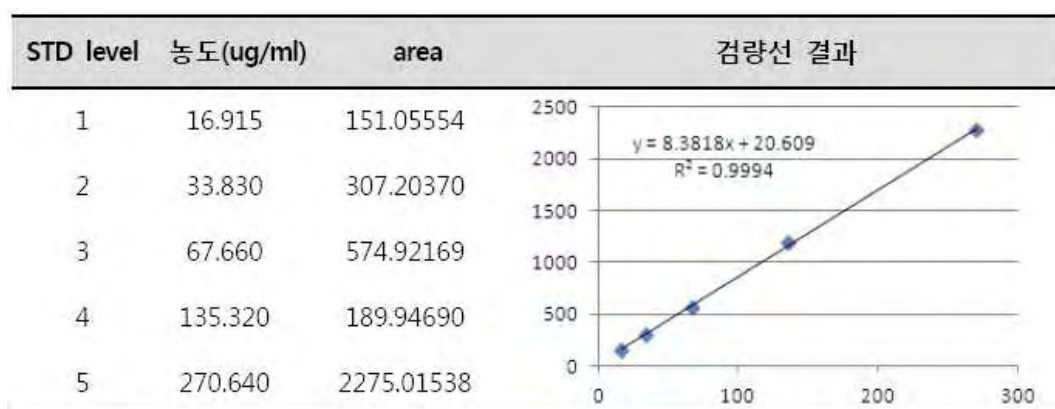
3차 분석은 2차 실험에서 함량 편차를 보인 Hamabiwalactone B의 함량을 확인하고, 시료 간 편차를 알아보기 위하여 제조일자가 다른 3Lot에 대한 함량 실험을 진행하였다. 3차 실험 표준용액의 검량선을 확인해 본 결과 Hamabiwalactone A는 16.035 ~ 256.56 ppm에서 직선성이 나타났으며($R^2=0.9994$), Hamabiwalactone B는 16.915 ~ 270.640 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다($R^2=0.9994$). 표준용액의 검량선 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. 3차 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

A. Hamabiwalactone A

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	16.035	153.88971	 <p>$y = 8.7322x + 24.291$ $R^2 = 0.9994$</p>
2	32.070	306.51746	
3	64.140	571.61462	
4	128.280	1179.30750	
5	256.560	2250.75854	

B. Hamabiwalactone B



Lot별 함량 실험 결과, LJM-F-1Lot는 시험법검토용 시료로 Hamabiwalactone A 평균 함량은 20.859 ± 0.51 mg/g으로 나타나 1차, 2차 분석 결과와 유사하게 나타났으며, Hamabiwalactone B 평균 함량은 28.129 ± 0.67 mg/g 으로 1차 결과와 유사하게 나와 2차 분석 결과에서 편차가 나타났음을 확인 할 수 있었으며 이는 표준용액을 제조하는 과정에서 오차가 나타났을 거라 사료되었다(Table 9). LJM-F-2Lot에서 Hamabiwalactone A의 평균 함량은 26.860 ± 0.83 mg/g 으로 나타났으며, Hamabiwalactone B의 평균 함량은 35.422 ± 1.07 mg/g 으로 나타났다 (Table 9). LJM-F-3Lot에서 Hamabiwalactone A의 평균 함량은 12.075 ± 0.08 mg/g 으로 나타났으며, Hamabiwalactone B의 평균 함량은 15.930 ± 0.09 mg/g으로 나타났다 (Table 9). 위의 결과를 종합하였을 때, Lot내 반복 분석 시 편차는 나타나지 않았지만, Lot간 편차는 나타났다. 그 중 마지막 LJM-F-3Lot에서 큰 차이를 보였으며, 제조공정 변경으로 인해 마지막 LJM-F-3Lot에서 함량이 많이 낮아졌음을 알 수 있었으며 의뢰기관과의 협의를 통해 LJM-F-3 Lot와 동일한 제조공정으로 시료를 재생산하여 함량을 확인하기로 하였다. 1차 ~ 3차 실험결과를 통해 후보 지표물질인 Hamabiwalactone A, B 모두 분리도나 정량에 문제가 없으나 Hamabiwalactone A는 Hamabiwalactone A 앞의 작은 Peak가 추후 부원료의 영향을 받을 수 있다고 사료되어, 의뢰기관과 협의를 통하여 함량이 더 높고 분리도가 좋은 Hamabiwalactone B를 지표물질로 결정하였다.

Table 9. 3차 실험 결과(Lot간 함량편차)

A. LJM-F-1Lot

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
HLA	#1	102.38867	250.0	50	0.99	20.273
	#2	111.63672	261.2	50	0.99	21.156
	#3	109.28586	255.8	50	0.99	21.148
HLB	#1	142.49489	250.0	50	0.96	27.359
	#2	155.07127	261.2	50	0.96	28.497
	#3	152.04468	255.8	50	0.96	28.531

B. LJM-F-2Lot

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
HLA	#1	136.27558	259.8	50	0.99	25.965
	#2	139.55217	255.7	50	0.99	27.015
	#3	159.30353	285.7	50	0.99	27.601
HLB	#1	185.42065	259.8	50	0.96	34.258
	#2	189.95186	255.7	50	0.96	35.658
	#3	216.36082	285.7	50	0.96	36.350

C. LJM-F-3Lot

	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
HLA	#1	66.46631	273.7	50	0.99	12.021
	#2	60.35444	248.1	50	0.99	12.042
	#3	62.25644	253.4	50	0.99	12.161
HLB	#1	90.95128	273.7	50	0.96	15.951
	#2	81.81238	248.1	50	0.96	15.828
	#3	84.53566	253.4	50	0.96	16.012

(4) 4차 재현성 실험

4차 실험에서는 지표물질이 단일물질 Hamabiwalactone B로 결정됨에 따라 분석시간이 길다는 단점을 보완하기 위해 총 분석 시간을 58분에서 45분으로 변경하였고, 이를 위하여 다른 전처리조건 및 기기분석조건은 변경하지 않고 flow rate 및 이동상 gradient 조건을 변경하여 분석을 하였다.

A. 기존의 분석방법

A: 0.5% Acetic acid

B: Acetonitrile

Mobile Phase	Time(min)	A(%)	B(%)	mL/min
	0.0	90	10	1.0
	2.0	90	10	
	32.0	0	100	
	42.0	0	100	
	43.0	90	10	
	58.0	90	10	

B. 변경된 분석방법

Mobile Phase	A: 0.5% Acetic acid			
	B: Acetonitrile			
	Time(min)	A(%)	B(%)	mL/min
	0.0	60	40	1.2
	2.0	60	40	
	30.0	0	100	
	35.0	0	100	
	40.0	60	40	
	45.0	60	40	

변경된 분석방법으로 표준용액을 분석한 결과 Hamabiwalactone B의 peak가 약 25분대에 나타났으며, 시험용액에서도 동일한 시간대에 peak가 나타났다. 시험용액과 표준용액의 spectrum을 확인한 결과 254 nm에서 최대흡광과장이 검출되어 시료 중 Hamabiwalactone B가 확인되었다. 시험용액과 표준용액의 크로마토그램 및 spectrum은 아래와 같다 (그림 60).

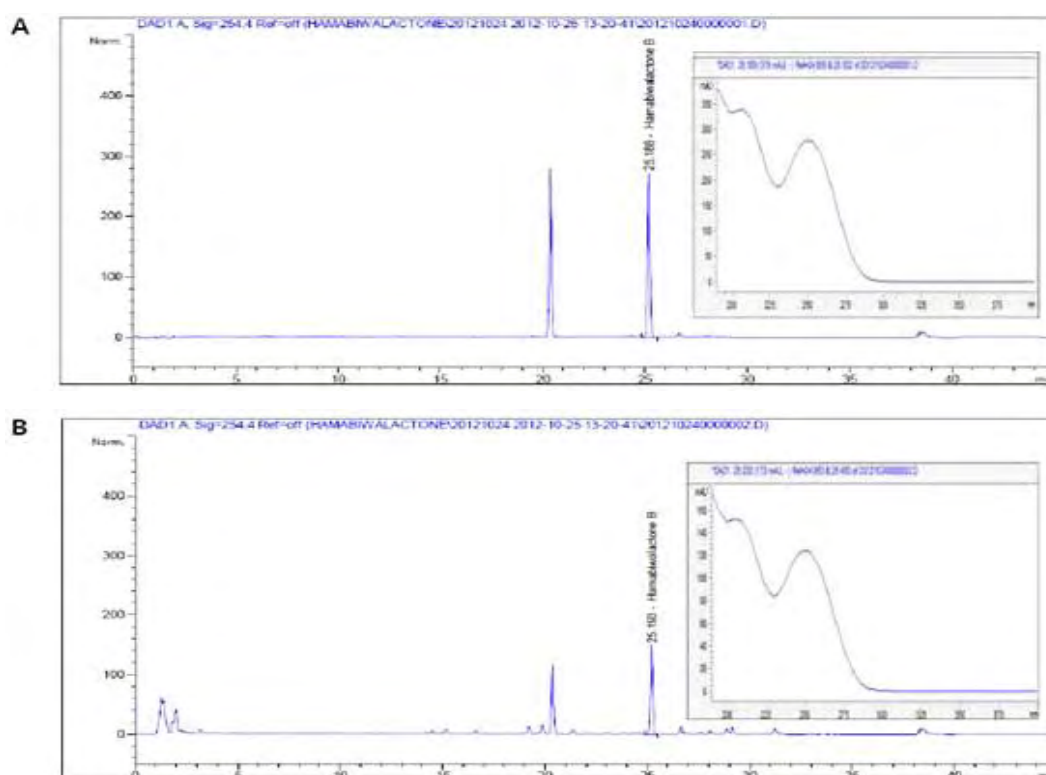


그림 60. 4차 실험의 chromatogram 및 spectrum(A: STD, B: Sample)

표준용액은 3차 실험에서 사용한 Hamabiwalactone B Stock solution 270.64 ppm 을 사용하였고, 시료 역시 3차 실험에서 분석한 LJM-F-1Lot의 시료를 사용하였다. 분석결과, Hamabiwalactone B의 함량이 28.087 mg/g으로 3차 실험의 Hamabiwalactone B 평균인 28.129 ± 0.67 mg/g과 편차가 없는 것으로 확인되었으나 시험법 검증(Method Validation)을 통하여 분석방법에 대한 타당성을 확인해 볼 필요가 있다고 사료되었다(Table 10).

Table 10. 실험방법 변경 전(3차), 후(4차) LJM-F-1Lot 시료 함량

	반복수	시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
3차 HLB	#1	142.49489	250.0	50	0.96	27.359	28.129± 0.67
	#2	155.07127	261.2	50	0.96	28.497	
	#3	152.04468	255.8	50	0.96	28.531	
4차	#1	146.28500	250.0	50	0.96	28.087	-

(5) 5차 재현성 실험

5차 실험은 4차 실험에서 설정된 실험법으로 추가 생산된 4Lot의 Hamabiwalactone B 함량을 측정하기 위하여 진행하였다. 표준용액에서 Hamabiwalactone B의 peak는 23.746분대에 나타났고 시료에서는 23.991분에 검출되었다. 시험용액과 표준용액의 spectrum을 확인한 결과 Hamabiwalactone B의 최대 흡광 파장이 254 nm임을 확인할 수 있었다. 시험용액과 표준용액의 크로마토그램 및 spectrum은 아래와 같다(그림 61).

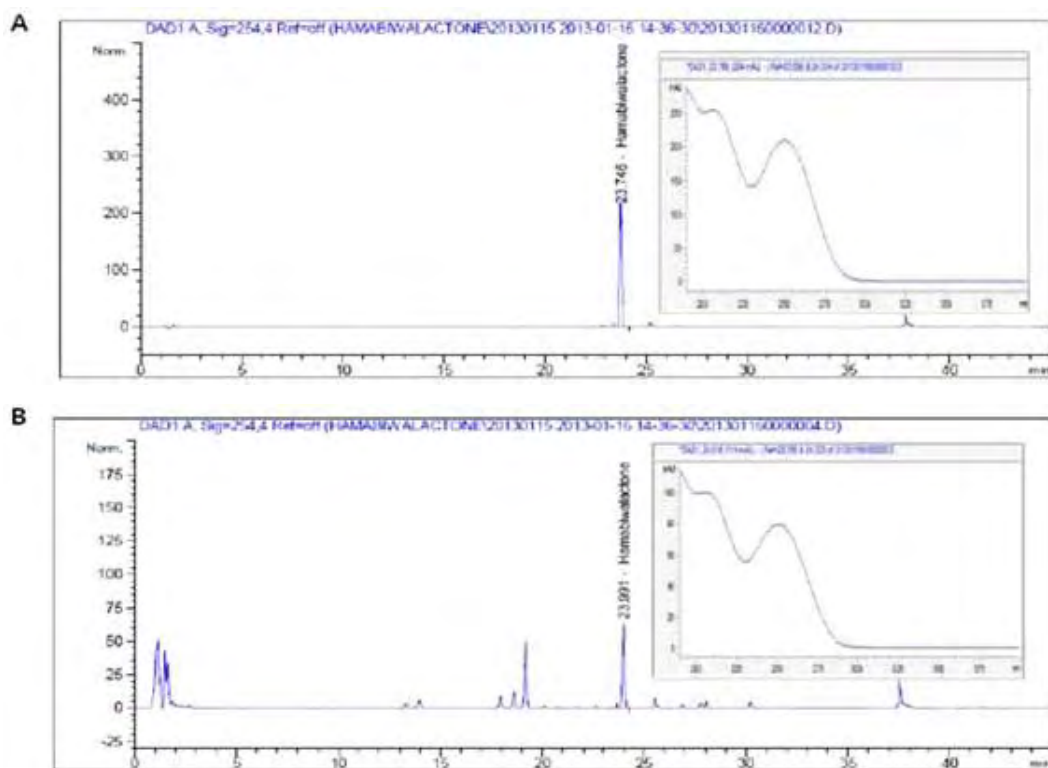
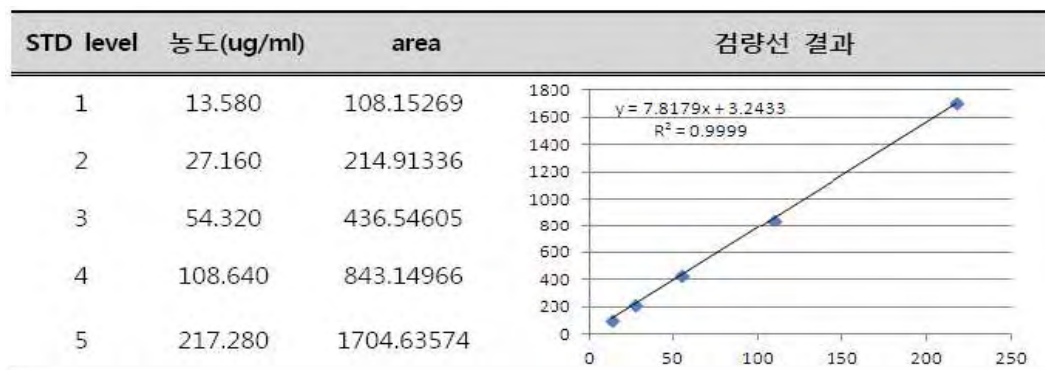


그림 61. 5차 실험의 chromatogram과 spectrum(A: STD, B: Sample)

표준용액의 검량선을 확인해 본 결과 Hamabiwalactone B는 13.58 ~ 217.28 ppm에서 직선성이 나타났다($R^2=0.9999$). 표준용액의 검량선 결과는 Table 11와 같다.

Table 11. 표준물질의 검량선 결과



제조공정에 대한 문제점을 파악하고 재생산한 4Lot를 각각 2반복 전처리하여 함량을 확인하였다. 그 결과, 총 4Lot간 함량은 13.159 ~ 16.089 mg/g 으로 Lot내 반복간에 편차는 없었으며, 3차에 사용된 3Lot 간의 결과값 15.931 ~ 35.422 mg/g와 비교해 볼 때 Lot간의 편차도 많이 줄어들었음을 확인할 수 있었다(Table 12).

Table 12. Lot간 Hamabiwalactone B 함량

Lot		시험용액 농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	용액량 (ml)	표준품 순도	Hamabiwalactone B 함량 (mg/g)	mean±S.D (mg/g)
F-3	#1	79.51628	267.0	50	0.96	14.295	14.498
	#2	71.26383	232.7	50	0.96	14.700	±0.29
F-3-2	#1	64.37114	234.0	50	0.96	13.204	13.182
	#2	60.25731	255.7	50	0.96	13.159	±0.03
F-5	#1	71.76124	214.1	50	0.96	16.089	15.553
	#2	65.76012	210.2	50	0.96	15.017	±0.76
F-7	#1	74.08401	223.5	50	0.96	15.911	15.851
	#2	83.16264	252.8	50	0.96	15.790	±0.09

본 시험법검토는 기능성원료 표준화를 위하여 까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 중 지표물질의 정량 분석 가능여부를 확인하기 위해 진행되었다. 후보 지표 물질은 Hamabiwalactone A와 B였으며, 시험법 검토를 통해 분석에 용이한 물질을 지표물질로 결정하기로 하였다. Hamabiwalactone A는 약 27분대, Hamabiwalactone B는 약 30분대에 peak가 검출되었다. Hamabiwalactone A, B 모두 peak 분리도에 큰 문제가 없었으며, 스펙트럼 확인 결과 표준용액과 시료에서 254 nm에서 발색되어 동일 물질임을 확인할 수 있었다. 또한 0.45 μm Nylon, PTFE membrane syringe filter 두 종류를 사용하여 필터 종류에 따른 차이를 확인해 본 결

과, 두 필터 간 함량 차이는 나타나지 않았다. 그러므로 위의 결과를 바탕으로 의뢰기관과 동일한 재질인 0.45 μm PTFE membrane syringe filter를 사용하기로 결정하였다. 2차 실험은 재현성을 확인하기 위하여 일자를 달리하여 분석하였으며, 시료채취량에 따른 함량 편차 여부를 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과, 시료량에 대한 반복 실험에서는 Hamabiwalactone A는 평균 19.651 mg/g, Hamabiwalactone B는 평균 25.846 mg/g 으로 1차 실험 결과와 비교해 볼 때 Hamabiwalactone A는 큰 편차없이 나타났으나 Hamabiwalactone B는 1차 결과 평균 28.372 mg/g으로 약간의 편차가 있음을 확인 할 수 있었다. 반복간의 큰 편차는 없어 표준품의 제조과정에서 문제가 있을 거라 사료되어 3차 실험을 통해 확인하기로 하였다. 시료 채취량을 50 ~ 200%로 달리 취하여 실험한 결과, 시료 채취량에 따른 편차가 크지 않음을 확인할 수 있었다. 3차 실험에서 세 Lot간(LJM-F-1Lot, LJM-F-2Lot, LJM-F-3Lot) 함량을 확인한 결과, Hamabiwalactone A는 LJM-F-1Lot 평균 20.859 mg/g, LJM-F-2Lot 평균 26.860 mg/g, LJM-F-3Lot 평균 12.075 mg/g으로, Hamabiwalactone B는 LJM-F-1Lot 평균 28.129 mg/g, LJM-F-2Lot 평균 35.422 mg/g, LJM-F-3Lot 평균 15.931 mg/g 으로 분석되었다. 2차 실험에서 사용된 검체 LJM-F-1Lot로 Hamabiwalactone B의 함량이 1차 결과와 유사하였으며 2차 실험 시 Hamabiwalactone B 표준용액 제조방법에서 편차가 나타났을 거라 사료되었다. 3차 실험 결과를 통해 다른 두 Lot와 큰 차이가 나타난 LJM-F-3Lot이 제조공정상의 차이가 있다는 것이 확인되어 의뢰기관과 논의하여 LJM-F-3Lot와 동일한 제조 공정으로 시료를 재생산하여 함량을 확인하기로 하였다. 또한 Hamabiwalactone A보다는 Hamabiwalactone B가 함량이 더 높고 Peak 분리도에서도 Hamabiwalactone B가 간섭 Peak 없이 단일물질로 정량이 가능하므로 두 후보물질 중 Hamabiwalactone B를 지표물질로 결정하였다. 4차 실험에서는 지표물질이 단일물질 Hamabiwalactone B로 결정됨에 따라 분석시간이 길다는 단점을 보완하기 위해 총 분석 시간을 58분에서 45분으로 변경하여 실험을 진행하였다. 분석시간을 단축하기 위해 flow rate와 이동상 gradient 조건을 변경하여 실험을 진행하였을 때, Hamabiwalactone B peak가 약 25분대에 나타났으며, 시험용액에서도 동일한 시간대에 peak가 나타났다. 시험용액과 표준용액의 spectrum 확인 결과 254nm에서 시료 중 Hamabiwalactone B가 확인되었고, 함량도 약 28 mg/g 으로 분석조건을 변경하기 전과 유사하게 검출되었다. 5차 실험에서는 4차 실험시 변경된 조건으로 추가 생산된 4Lot를 분석하여 진행하였으며 Hamabiwalactone B만을 확인하였다. 분석결과는 F-3Lot는 평균 14.498mg/g, F-3-2Lot는 평균 13.182mg/g, F-5Lot는 평균 15.553 mg/g, F-7Lot는 평균 15.851 mg/g 으로 Lot내 반복간에 편차는 없었으며, 3차에 사용된 3Lot 와 비교해 볼 때 Lot간의 편차도 많이 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 위 1~5차 실험 결과를 통해 최종 시험법을 다음과 같이 설정하였으며, 시험법 검증 (Method Validation)을 수행함으로써 설정된 분석방법의 타당성을 확인해 보았다.

※ 최종 설정된 시험법

(1) 시약 및 시액

- ① 표준물질 : Hamabiwalactone B (천연물화학 분리 · 정제, 96%)
- ② 일반시약

- 에탄올 (덕산, HPLC grade)
- 메탄올 (덕산, HPLC grade)
- 초산 (덕산, HPLC grade)
- 아세토니트릴 (Burdick&Jackson, HPLC grade)
- 디클로로메탄 (덕산, HPLC grade)

(2) 표준용액의 제조

- ① Hamabiwalactone B 표준물질 약 50 mg을 정밀히 취하여 디클로로메탄 5mL에 용해하여 vortexing 후 정용(stock solution)한다.
- ② Stock solution을 메탄올로 200, 100, 50, 25, 12.5 ppm으로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

(3) 시험용액의 제조

- ① 시료 약 200 mg을 정밀히 달아 70% 에탄올에 용해한다.
- ② Vortexing하여 초음파추출 후 최종 50 mL로 정용한다.
- ③ 0.45 μ m PTFE membrane syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

(4) 기기분석조건

Instrument	HPLC		
Detector	PDA detector		
wavelength.	254 nm		
Column	Cadenza C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm		
Mobile Phase	A: 0.5% Acetic acid		
	B: Acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	60	40
	2.0	60	40
	30.0	0	100
	35.0	0	100
	40.0	60	40
45.0	60	40	
Flow rate	1.2 ml/min		
Injection volume	5 μℓ		
Oven Temperature	30°C		

(5) 계산식

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

나. 최종 설정된 시험법 검증 (Method Validation) 결과

(1) 특이성 (Specificity)

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B의 retention time과 peak 분리도 확인 Hamabiwalactone B 표준물질과 시료를 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 약 23 ~ 24분대에서 표준용액과 시료에서 동일한 시간대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다(그림 63). 또한 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다.

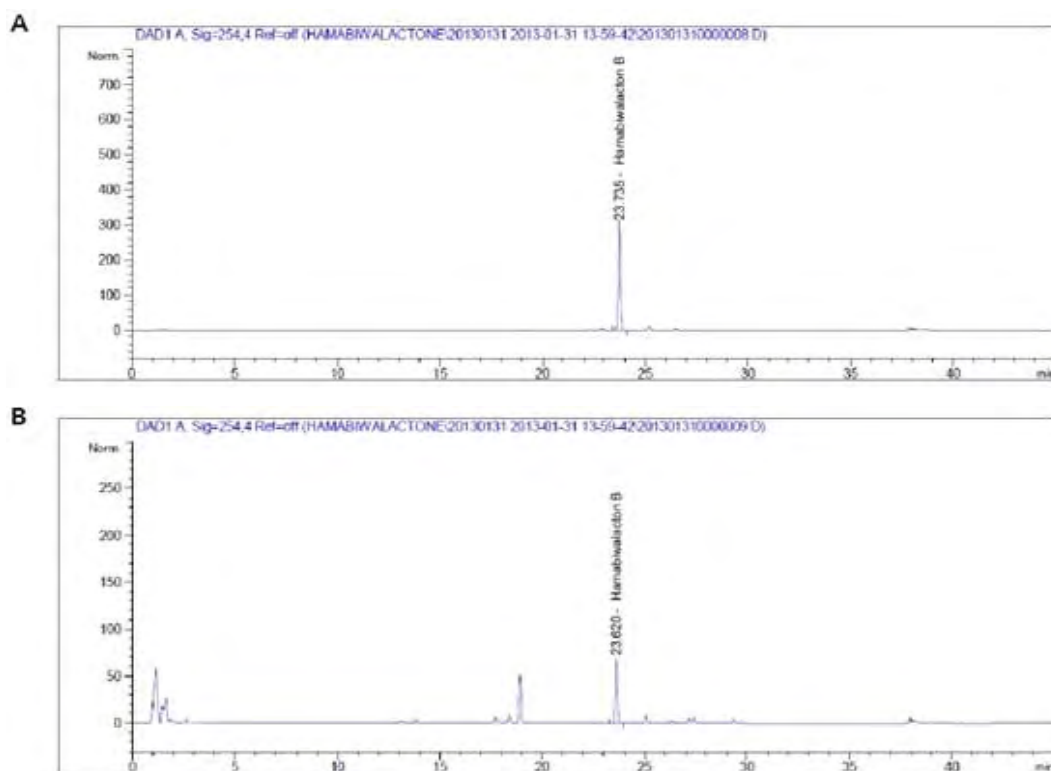


그림 63. 표준용액과 시험용액 중 Hamabiwalactone B의 크로마토그램
(A: 표준용액, B: 시험용액)

(2) 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B의 spectrum과 peak purity 확인

시험용액 중 검출된 크로마토그램이 표준용액인 Hamabiwalactone B와 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 23 ~ 24분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 254 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타남을 확인할 수 있었다 (그림 64). 또한 시험용액의 Hamabiwalactone B peak의 purity를 확인하기 위해서 peak의 5 points spectrum을 확인하였다. 5 points의 spectrum이 모두 일치하여 Hamabiwalactone B가 단일물질임을 확인하였다 (그림 65).

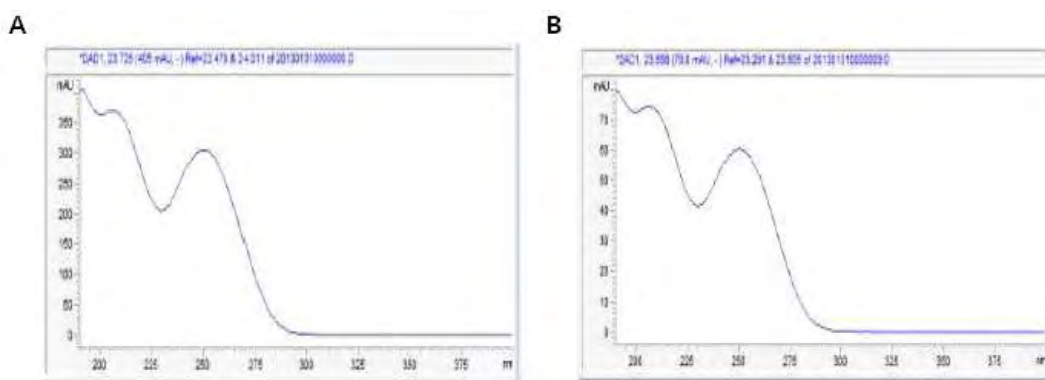


그림 64. Hamabiwalactone B Spectrum(A : 표준용액 B : 시험용액)

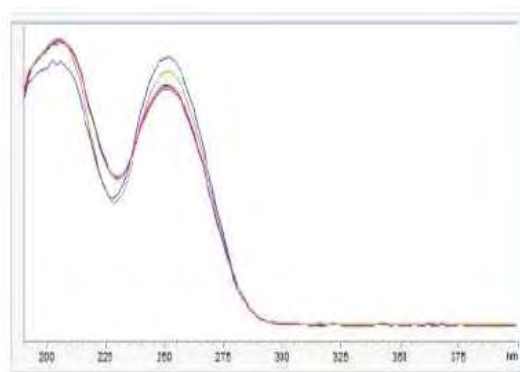


그림 65. Peak purity test : 시험용액 중 Hamabiwalactone B Peak 각 5점의 spectrum 분석

(3) 까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 중 HPLC/MS/MS를 이용한 Hamabiwalactone B 확인

① 실험 결과

까마귀쭈나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B를 확인하기 위하여 HPLC/MS/MS의 MRM(multiple reaction monitoring)을 이용하여 분석하였다. 분석결과, 표준용액과 시료용액에서 동일한 시간 (약 24.16 min)대의 Total ion chromatogram(TIC)을 확인할 수 있었고, 질량 스펙트럼을 확인해 본 결과 precursor ion은 263 m/z이고, product ion 133, 147, 217 m/z로 확인할 수 있었으며, 263 → 133 m/z, 263 → 147 m/z, 263 → 217 m/z의 m/z ratio 값이 유사하게 ($\pm 20\%$) 나타남을 확인 할 수 있었다 (Table 32). 그러므로 위 제시한 분석방법으로 분석한 결과 표준품과 시료 중 Hamabiwalactone B는 동일 성분임을 확인할 수 있었으며, 시료 중 Hamabiwalactone B가 있음을 확인 할 수 있었다.

Table 13. Hamabiwalactone B 분석을 위한 retention time, precursor ion 및 product ion

Compound	RT (min)	MW	Precursor Ion (MS m/z)	Product Ion (MS ² , m/z)			Frag (V)	Collision Energy(V)
				confirm ion				
HLB	24.16~24.17	262	263[M-H] ⁻	133	147	217	100	15/5/5

② 검토 결과

위의 제시된 분석조건으로 HPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과 표준용액과 시험용액에서 TIC에서 동일한 시간대에 peak를 확인하였고, product ion인 133, 147, 217 m/z의 질량 스펙트럼이 유사한 m/z ratio 값을 가지므로 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에 Hamabiwalactone B가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

Table 14. 표준 용액과 시료용액 중 TIC 및 질량 스펙트럼

m/z	표준용액 중 Hamabiwalactone B	까마귀쪽나무열매추출물 중 Hamabiwalactone B
TIC		
263→133		
263→147		
263→217		
m/z ratio		

(4) 직선성 (Linearity)

① 표준물질에 대한 직선성 (Linearity)

표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. Hamabiwalactone B의 검출농도 약 70 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 12.5 ~ 400% 범위에서 3반복 평가하였다. 분석결과 농도별로 직선성이 확인되었으며, 기울기 값은 7.240 ~ 7.952, R2는 0.9996 ~ 0.9998로 나타났다 (Table 15-1 ~ 15-3).

Table 15-1. Hamabiwalactone B 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

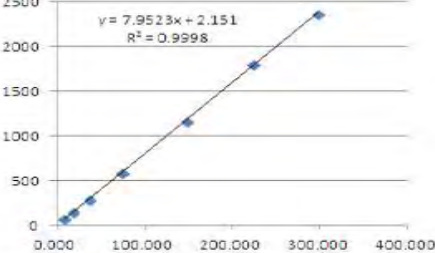
농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	<div>검량선</div> 
12.5%	9.320	77.75581	
25.0%	18.641	153.22086	
50.0%	37.281	298.39825	
100.0%	74.563	593.08429	
200.0%	149.130	1170.49170	
300.0%	223.690	1806.63452	
400.0%	298.250	2363.81714	
기울기	7.9523		
y 절편	2.151		
R²	0.9998		

Table 15-2. Hamabiwalactone B 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

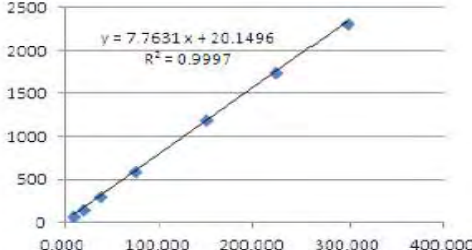
농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	<div>검량선</div> 
12.5%	9.297	80.56013	
25.0%	18.594	158.01340	
50.0%	37.188	313.57806	
100.0%	74.375	596.18903	
200.0%	148.750	1201.13599	
300.0%	223.130	1757.23511	
400.0%	297.500	2313.40112	
기울기	7.7631		
y 절편	20.1496		
R²	0.9997		

Table 15-3. Hamabiwalactone B 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	<div>검량선</div> <p>$y = 7.2407x + 12.212$ $R^2 = 0.9996$</p>
12.5%	6.423	50.28119	
25.0%	12.845	99.96890	
50.0%	25.690	193.59483	
100.0%	51.380	392.28418	
200.0%	102.760	777.47540	
300.0%	154.140	1130.30835	
400.0%	205.520	1487.34875	
기울기	7.2407		
y 절편	12.212		
R ²	0.9996		

② 시료에 대한 직선성 (Linearity)

시료를 중량별로 측정하여 전처리 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시료 200 mg을 취해 50 mL에 녹여 검출된 농도 60 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 35 ~ 200% 범위에서 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인할 수 있었다. 기울기 값은 2.094 ~ 2.211, R^2 는 0.9995 ~ 0.9996 으로 나타났다 (Table 16-1 ~ 16-3).

Table 16-1. 시료를 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

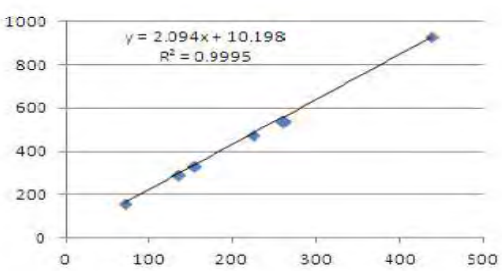
농도(%)	시료채취량 (mg)	면적(area)	<div>검량선</div> 
35%	71.2	158.56342	
50%	134.5	290.83286	
75%	151.9	336.37115	
100%	224.3	480.14417	
125%	258.4	541.21344	
200%	437.2	929.10120	
기울기	2.094		
y 절편	10.198		
R ²	0.9995		

Table 16-2. 시료를 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

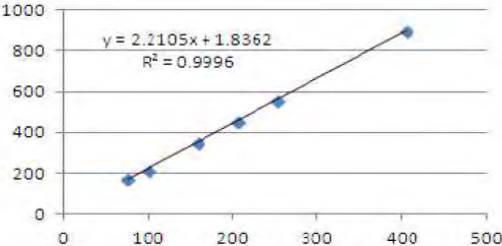
농도(%)	시료채취량(mg)	면적(area)	<div>검량선</div> 
35%	76.2	177.63333	
50%	100.5	215.08379	
75%	158.4	355.21826	
100%	206.2	457.39996	
125%	252.6	557.19952	
200%	405.1	898.86218	
기울기	2.2105		
y 절편	1.8362		
R²	0.9996		

Table 16-3. 시료를 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도(%)	시료채취량(mg)	면적(area)	<div>검량선</div> <p>$y = 2.191x - 3.4278$ $R^2 = 0.9995$</p>
35%	79.2	170.78952	
50%	102.2	220.44272	
75%	162.5	358.31415	
100%	222.1	484.15674	
125%	250.4	534.05109	
200%	408.3	895.15631	
기울기	2.191		
y 절편	-3.4279		
R ²	0.9995		

(5) 정확성 (Accuracy), 회수율 (Recovery)

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B의 정확성을 측정하기 위해 시료에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하였다. 검출농도를 고려하여 시료 약 100 mg을 취한 후 표준용액 검출 농도로 20.98 ~ 104.9 mg/L 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 분석하였다. 농도별로 3반복씩 진행한 결과 회수율 96.52 ~ 102.63%, 표준편차 (SD) 0.98 ~ 1.03%, 상대표준편차(RSD)는 1.00%로 나타났다. 전체적으로 90% 이상의 회수율을 보이므로 분석방법에 문제는 없다고 사료된다 (Table 17).

Table 17. 시료 중 표준용액 농도별 회수율 확인

sample (mg/L)	원료(mg) + 추가 표준용액 농도 (ug/mL)	검출된 Area	시료에 해당하는 Area/(원료량mg)		검출된 표준물질 Area	검출된 표준물질 농도 (mg/mL)	회수율 (%)	평균 (%)	RSD (%)
HLB 원료	-	265.9860	207.88862 (100mg)	209.05995 (100mg)	-	-	-	-	-
	-	238.78354	206.73900 (100mg)				-		
	-	308.62585	212.55224 (100mg)				-		
20.98	sa(mg) + 20.98	383.93576	221.39449(105.9mg)		162.54127	21.399	102.00	99.93	1.00
	sa(mg) + 20.98	373.19809	218.88577(104.7mg)		154.31232	20.259	96.56		
	sa(mg) + 20.98	395.96091	234.56526(112.2mg)		161.39565	21.240	101.24		
41.96	sa(mg) + 41.96	533.57709	233.10184(111.5mg)		300.47525	40.500	96.52	98.48	1.00
	sa(mg) + 41.96	515.08020	205.08781(98.1mg)		309.99239	41.818	99.66		
	sa(mg) + 41.96	564.26337	255.47126(122.2mg)		308.79211	41.652	99.27		
104.90	sa(mg) + 104.90	1121.17188	306.48189 (146.6mg)		814.68999	107.655	102.63	102.15	1.00
	sa(mg) + 104.90	1115.16699	309.40873(148.0mg)		805.75826	106.450	101.48		
	sa(mg) + 104.90	1123.05249	310.45403(148.5mg)		812.59846	107.373	102.36		

(6) 정밀도 (Precision)

① 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B 함량의 분석 재현성 시험을 위해 분석 장비, 분석자와 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였다. 결과는 시료를 3회 반복 전처리 한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 사용한 실험 장비는 Agilent HPLC 1260 infinity와 Shiseido Nanospace SI-2 두 장비, 3일간, 두 명의 시험자가 분석하였다. 실험 일자간의 분석 결과 Hamabiwalactone B의 평균 함량 13.712 mg/g, 표준편차 (SD) 0.024 mg/g, 상대표준편차 (RSD)는 0.174%로 나타났다(Table 18).

Table 18. 분석일자, 분석자, 분석기기간 Hamabiwalactone B 함량

	일자	분석자	기기	Hamabiwalactone B 함량(mg/g)	평균(mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	2013-02-02	A	Agilent 1260	13.733	13.712	0.024	0.174
2	2013-02-03	B	Agilent 1260	13.717			
3	2013-02-04	A	Shiseido SI-2	13.686			

② 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한번 진행시 각각 6번의 전처리를 진행하여 Hamabiwalactone B의 함량을 측정하였다. 일자를 달리하여 측정한 결과 13.548 ~ 13.870 mg/g으로 검출되었고, 평균 13.686 ~ 13.733 mg/g, 표준편차 (SD) 0.039 ~ 0.098 mg/g, 상대표준편차 (RSD) 0.285 ~ 0.719%로 분석되었다 (Table 19-1 ~ 19-3).

Table 19-1. 분석일 02월 02일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	HLB 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	515.96747	70.43072	245.50	13.7706	13.733	0.073	0.530
2	500.40952	68.30702	240.80	13.6160			
3	467.05292	63.75377	223.30	13.7043			
4	473.77774	64.67173	225.20	13.7844			
5	491.13882	67.04155	235.70	13.6529			
6	465.92340	63.59959	220.10	13.8700			

Table 19-2. 분석일 02월 03일, 분석자 B, Agilent HPLC 1260 Infinity

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	HLB 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	442.55304	60.40948	210.80	13.7555	13.717	0.039	0.285
2	581.87579	79.42735	279.00	13.6649			
3	562.82269	76.82656	268.60	13.7292			
4	459.17297	62.67814	220.00	13.6752			
5	473.02075	64.56840	225.30	13.7563			
6	446.15475	60.76462	212.60	13.7192			

Table 19-3. 분석일 02월 04일, 분석자 A, Shiseido Nanospace SI-2

	Area	시험용액 농도(ug/ml)	시료채취량 (mg)	HLB 함량(mg/g)	Average (mg/g)	SD(mg/g)	RSD(%)
1	2154766	63.015	219.60	13.7738	13.686	0.098	0.719
2	2161986	63.226	224.00	13.5484			
3	2245233	65.661	228.00	13.8234			
4	2528535	73.946	259.60	13.6726			
5	2436236	71.246	250.50	13.6519			
6	2413673	70.587	248.30	13.6455			

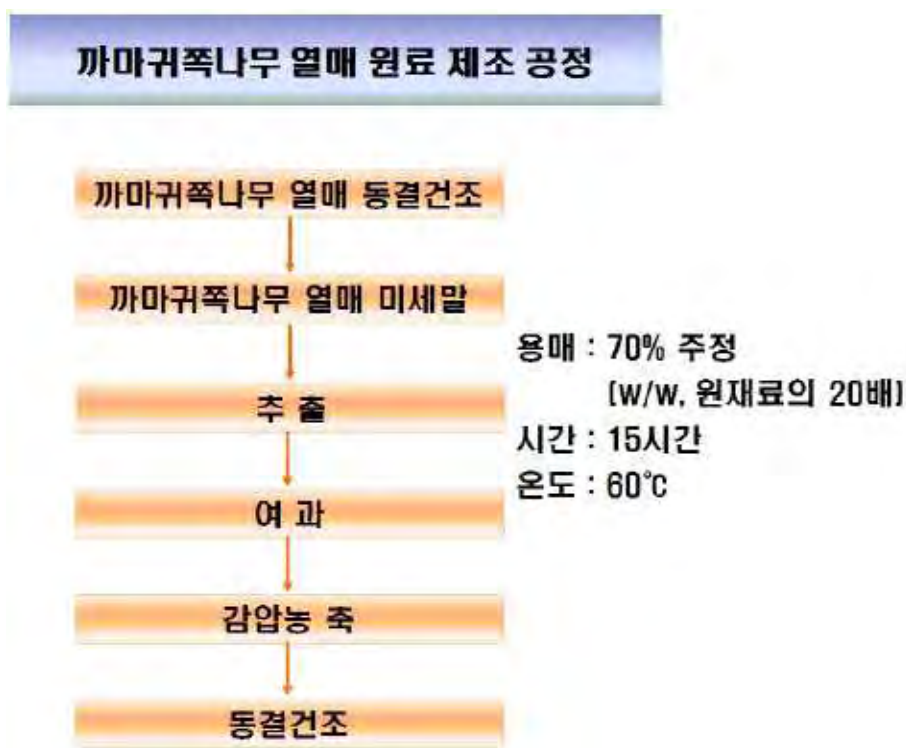
(7) 범위 (Range)

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직선성과 정확도, 정밀도를 고려할 때, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중 Hamabiwalactone B의 분석 농도를 6.4 ~ 298.3 mg/L의 범위로 설정하였다.

3. 까마귀쪽나무 열매 주정추출물 기준규격설정

가. 제조기준

- (1) 원재료 : 까마귀쪽나무 열매
- (2) 제조공정



나. 기준·규격

- (1) 성상 : 이미·이취가 없고 특유의 향미를 가진 흐린 갈흑색 분말
- (2) Hamabiwalactone B 함량 (mg/g) : 14.6 mg/g 의 80 ~ 120 %
- (3) 납 (mg/kg) : 1.0 이하
- (4) 카드뮴 (mg/kg) : 1.0 이하
- (5) 총비소 (mg/kg) : 1.0 이하
- (6) 총수은 (mg/kg) : 1.0 이하
- (7) 대장균군 : 음성

다. 시험법

- (1) 성상: 건강기능식품공전, 한국표준색이름 (산업자원부 기술표준원) 참조
- (2) Hamabiwalactone B 함량 (고속액체크로마토그래피법)

① 장비

HPLC System	Agilent 1200 series, Agilent, USA Quat Pump G1311A, Autosampler G1329, DAD G1315D, Column Oven G1316A, Degasser G1322A
Analytical Column	Cadenza C18 (4.6mm×150mm, 5μm) 또는 이와 동등한 컬럼

② 시약

- Hamabiwalactone B 표준품 : 주)천연물화학, Cat. No. NPC-KC119,
Lot. No. 20120124, Adjusted purity 96.0%
- 에탄올 (덕산, HPLC grade)
- 메탄올 (덕산, HPLC grade)
- 초산 (덕산, HPLC grade)
- 아세토니트릴 (Burdick&Jackson, HPLC grade)
- 디클로로메탄 (덕산, HPLC grade)

③ 표준용액 조제

표준품인 Hamabiwalactone B 약 50 mg을 디클로로메탄 5 mL로 정용 (stock solution) 이
를 메탄올로 적절히 희석하여 사용하였다.

④ 시험용액 조제

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 약 100 ~ 200 mg을 취해 50mL 정용플라스크에 담고 70%
ethanol에 녹인 후 30분간 초음파 추출하여 방냉 한 후 정용한다. 추출액을 0.45 μm PTFE
syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

⑤ 분석조건

Instrument	HPLC system																					
Detector	UV detector (254nm)																					
Column	Cadenza C18 (4.6mm×150mm, 5μm) 또는 이와 동등한 컬럼 A: 0.5% Acetic acid B: Acetonitrile																					
Mobile Phase	<table><tr><th>Time(min)</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr><tr><td>0.0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>2.0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>30.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>35.0</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>40.0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>45.0</td><td>60</td><td>40</td></tr></table>	Time(min)	A(%)	B(%)	0.0	60	40	2.0	60	40	30.0	0	100	35.0	0	100	40.0	60	40	45.0	60	40
Time(min)	A(%)	B(%)																				
0.0	60	40																				
2.0	60	40																				
30.0	0	100																				
35.0	0	100																				
40.0	60	40																				
45.0	60	40																				
Injection Vol.	5μℓ																					
Temperature.	30°C																					
Flow rate	1.2ml/min																					

⑥ 계산

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

- (3) 납: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
(4) 카드뮴: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
(5) 총비소: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
(6) 총수은: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별 시험 (5) 수은 ㉠ 금아말감법
(7) 대장균군: 식품공전 제10. 일반시험법 8. 미생물시험법 5) 대장균군

다. 기준·규격 설정근거

(1) 기능/지표물질 규격 설정에 관한 자료

기능/지표물질의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 추출물의 경우는 표시량의 80 ~ 120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표물질의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. 까마귀쪽나무 열매 주정추출물 중 Hamabiwalactone B 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science 15.0) One-way ANOVA을 이용하여 각 Lot 간의 평균 값 (mean), 표준편차 (SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한치 (Upper Bound)와 하한치 (Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다. 까마귀쪽나무 열매 주정추출물 함량에 대한 기준 규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과 Hamabiwalactone B의 함량 범위 (Table 20 ~ 22)를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80 ~ 120%, 각 Lot별 하한치 ~ 상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치 ~ 상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할

수 있는 기준규격으로 14.6 mg/g의 80% ~ 120%인 11.7 ~ 17.5 mg/g으로 설정하였다. 까마귀 쪽나무 열매 주정 추출물 3Lot의 원료 간 Hamabiwalactone B 함량은 편차가 거의 나타나지 않았으나, 이는 3Lot에 대하여 제한적으로 검토된 것으로 천연물의 경우 원재료 채취 시기, 재배지 등에 따라 편차가 나타날 수 있다. 따라서 추후 생산되는 여러 Lot에 대하여 Hamabiwalactone B 함량을 측정하여 확인할 필요가 있다고 사료된다.

Table 20. Lot 별 Hamabiwalactone B의 함량 분석결과

	Lot No. 반복수	Lot 1	Lot 2	Lot 3	평균
Hamabiwalactone B 함량(mg/g)	1	16.355	14.466	13.902	14.643
	2	15.463	13.901	13.359	
	3	16.410	13.977	13.947	
	평균	16.08	14.11	13.74	

Table 21. Lot 별 Hamabiwalactone B의 함량 범위 결과

Lot No.	표준편차(SD)	표준오차(SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Lot 1	0.53172	0.30699	15.46	16.41	14.7551	17.3968
Lot 2	0.30666	0.17705	13.90	14.47	13.3528	14.8764
Lot 3	0.32714	0.18887	13.36	13.95	12.9235	14.5488
전체	1.14195	0.38065	13.36	16.41	13.7645	15.5200

Table 22. Hamabiwalactone B 함량 범위 (요약)

Hamabiwalactone B(mg/g) 함량 범위	
전체 평균±SD	14.64±1.14(13.74~16.08)
평균의 80~120%	11.68~17.52
각 Lot별 하한치~상한치	13.36~16.41

(2) 유해물질 규격 설정에 관한 자료

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (제14조제6호 가목 관련) [별표 2]에 준하여 설정하였다 (Table 23). 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 경우 까마귀쪽나무 열매를 주정으로 추출하여 분말화 하였으므로 중금속 4종 (납, 총비소, 카드뮴, 총수은)과 미생물 중 대장균군만 유해물질규격으로 설정하였다.

Table 23. 유해물질규격설정항목 (식품의약품안전청고시 제 2012-107호 제14조 제6호 가목 관련)

원료	항목		규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8 μ g/일	
		총비소	< 150 μ g/일	
		카드뮴	< 3.0 μ g/일	
		총수은	< 2.1 μ g/일	
	미생물	대장균군	음성	액상제품 에 한함
		세균수	≤ 100/g	
용매를 사용한 원료	잔류용매	헥산	< 0.005g/kg	
		이소프로필알콜	≤ 0.05g/kg	
		초산에틸		
		메틸알콜		
		아세톤	≤ 0.03g/kg	
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	동물용 의약품		「식품의 기준 및 규격」에 따름	
	곰팡이 독소	아플라톡신		
		파툴린		
		오크라톡신		
		기타곰팡이독소		
	방사능 오염	^{131}I		
$^{134}\text{Cs}+^{137}\text{Cs}$				

① 중금속

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0702 mg/kg, 카드뮴 최대 0.0476 mg/kg, 총비소 최대 0.0253 mg/kg로 검출되었고 총수은은 한 Lot에서 0.003 mg/kg으로 검출되었고, 다른 두 Lot에서는 불검출로 확인되었다. 원료에서 발생할 수 있는 오차, 원료의 1일 최대섭취량, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에서 제안하고 있는 중금속 기준 (상한값)을 고려하여 안전성에 문제가 없도록 설정하고자 하였으며, 그 결과 납, 카드뮴, 총비소, 총수은 1.0 mg/kg 이하로 설정하였다 (Table 24 ~ 26).

Table 24. 중금속 분석결과

시 험 항 목		Lot 1	Lot 2	Lot 3
중금속	납(mg/kg)	0.0298	0.0702	0.0560
	카드뮴(mg/kg)	0.0251	0.0476	0.0422
	총비소(mg/kg)	0.0228	0.0253	0.0253
	총수은(mg/kg)	불검출	0.003	불검출

Table 25. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 중금속 규격 상한값

시 험 항 목	규격	상한값(이하)*
중금속	납(mg/kg)	< 10.8 μ g/일
	카드뮴(mg/kg)	< 3.0 μ g/일
	총비소(mg/kg)	< 150 μ g/일
	총수은(mg/kg)	< 2.1 μ g/일

* 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 섭취량 미정으로 최대섭취량을 1g/일로 계산

Table 26. 중금속 제안규격

시 험 항 목	제안규격(mg/kg)
중금속	납(mg/kg)
	카드뮴(mg/kg)
	총비소(mg/kg)
	총수은(mg/kg)

- ㉑ 납: 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격 (1.0 mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 납을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 10.8 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- ㉒ 카드뮴: 최대섭취량은 1 g/일로 제안된 규격 (1.0 mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 카드뮴을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 3.0 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- ㉓ 총비소: 최대섭취량은 1 g/일로 제안된 규격 (1.0 mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 총비소를 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 150 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.
- ㉔ 총수은: 최대섭취량은 1 g/일로 제안된 규격 (1.0 mg/kg) 범위에서 1.0 μ g/일의 총수은을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 2.1 μ g/일 보다 낮은 섭취 기준임.

나. 대장균군

대장균군은 실험결과 모든 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였다 (Table 27).

Table 27. 대장균군 분석결과

시 험 항 목		제안규격		
미생물	대장균군	음성		
시 험 항 목	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
미생물 대장균군	음성	음성	음성	

(3) 유해물질 규격 미설정에 관한 자료

잔류농약 잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로 「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등검사지침」(제 2012-132호) 별표 3.1. 동시 다분석 검사대상: 59종에 대하여 분석하여야 한다. 또한 식품으로 섭취 이력이 있거나 잔류농약이 오염될 수 있다고 판단되면 원재료에 대한 잔류허용기준이 없다 하여도 정밀검사항목 59종을 분석하여야 한다. 까마귀쪽나무의 경우 원재료에 대한 기준은 없지만 열매부위가 식용으로 가능하여 정밀검사 항목 59종에 대하여 분석하였다. 분석결과 정밀검사항목(59종)이 모두 불검출로 확인되었다 (Table 28, 28-1).

Table 28. 잔류농약 시험항목 및 시험방법

시 험 항 목	시 험 방 법
Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazilil, Iprodione, Iprovalicarb, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분 분석법 4.1.2.2 다중농약다성분-제2법
Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Hexaflmuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분 분석법 4.1.2.2 다중농약다성분 분석법

Table 28-1. 잔류농약(59종) 분석 결과

시 험 항 목	Lot 1 분석결과
BHC	불검출
Bifenthrin	불검출
Cabofuran	불검출
Chlorfenapyr	불검출
Chlorothalonil	불검출
Chlorpyrifos	불검출
Chlorpyrifos-methyl	불검출
Cyhalothrin	불검출
Cypermethrin	불검출
Cyprodinil	불검출
DDT	불검출
Diazinon	불검출
Dichlorvos	불검출
Dicofol	불검출
Endosulfan	불검출
Fenarimol	불검출
Fenitrothion	불검출
Fenpropathrin	불검출
Fenvalerate	불검출
Fludioxonil	불검출
Imazalil	불검출
Iprodione	불검출
Isoprothiolane	불검출
Malathion	불검출
Methomyl	불검출
Methidathion	불검출
Paclobutrazol	불검출
Parathion	불검출
Parathion-methyl	불검출
Permethrin	불검출
Phenthoate	불검출
Phosmet	불검출
Pirimicarb	불검출

시 험 항 목	Lot 1 분석결과
Procymidone	불검출
Quintozene	불검출
Triadimefon	불검출
Triflumizole	불검출
Triazophos	불검출
Prochloraz	불검출
Methoxyfenozide	불검출
Boscalid	불검출
Acetamiprid	불검출
Azoxystrobin	불검출
Atrazine	불검출
Ethion	불검출
Iprovalicarb	불검출
Carbaryl	불검출
Captan	불검출
Tolclofos-methyl	불검출
Triflumuron	불검출
Thiamethoxam	불검출
Fenhexamid	불검출
Profenofos	불검출
Flubendiamide	불검출
Flufenoxuron	불검출
Pyraclostrobin	불검출
Pyrimethanil	불검출
Pirimiphos-methyl	불검출
Hexaflmuron	불검출

라. 영양성분분석

까마귀쪽나무 열매 주정 추출물에 대한 영양성분분석 결과는 Table 29과 같다.

Table 29. 영양성분 시험방법 및 결과

시험항목	시 험 방 법				결 과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 계산	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	6)열량의	442.56
탄수화물(%)	식품공전	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	5)탄수화물	53.54
조단백질(%)	AOAC	OFFICIAL METHOD	991.20		4.54
조지방(%)	식품공전 조지방	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	4)지질 (1)	23.50
수분(%)	식품공전	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	1)수분	12.32
회분(%)	식품공전	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	2)회분	6.10
나트륨 (mg/100g)	식품공전 기성분	제10.일반시험법	11.미량영양성분시험법	1)무	196.55
식이섬유(%)	식품공전	제10.일반시험법	1.일반성분시험법	4)탄수화물 (3)식이섬유	0.63

○ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 영양성분 분석 결과

항목	결과
	까마귀쪽나무열매추출물
열량(kcal/100g)	442.56
탄수화물(%)	53.54
조단백질(%)	4.54
조지방(%)	23.50
수분(%)	12.32
회분(%)	6.10
나트륨(mg/100g)	196.55
총식이섬유(%)	0.63

○ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 유해성분 분석 결과

시험항목		LJM-F-5	LJM-F-8	LJM-F-9
중금속	납(mg/kg)	0.0298	0.0702	0.0560
	카드뮴(mg/kg)	0.0251	0.0476	0.0422
	총비소(mg/kg)	0.0228	0.0253	0.0253
	총수은(mg/kg)	불검출	0.003	불검출
미생물	대장균군	음성	음성	음성

○ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 기준규격 설정

시험항목	제안규격
성상	이미 이취가 없고 특유의 향미 지닌 흐린 갈흑색 분말
Hamabiwalactone B 함량(mg/g)	11.7 ~ 17.5
납(mg/kg)	1.0 이하
카드뮴(mg/kg)	1.0 이하
총비소(mg/kg)	1.0 이하
총수은(mg/kg)	1.0 이하
대장균군	음성

4. 원료소재의 안정성 확보

가. 원료소재의 9대 영양성분 분석

(1) 까마귀쪽나무 열매의 열수 추출물 성분분석 결과

분석항목	분석결과 분석	비 고(%영양소기준치)
열량	16.33 kcal / 100g	
탄수화물	3.67 g / 100g	1.1 %
단백질	0.33 g / 100g	0.6 %
지방	0.07 g / 100g	0.1 %
나트륨	40.02 mg / 100g	2.0 %
포화지방	0.00 g / 100g	0.0 %
트랜스지방	0.00 g / 100g	-
당	2.55 g / 100g	-
콜레스테롤	0.00 mg / 100g	0.0 %

① 까마귀쪽나무 열매 열수 추출물을 6birx로 보정하여 각각의 성분을 분석하였음.

② 6birx 100g을 기준으로 하였을 때, 열량이 16.33kcal, 탄수화물이 3.67g, 단백질이 0.33g, 지방이 0.07g, 나트륨이 40.02mg 및 당이 2.55g으로 분석되었음.

(2) 까마귀쪽나무 열매의 주정 추출물 성분분석 결과

분석항목	분석결과 분석	비 고(%영양소기준치)
열량	21.88 kcal / 100g	
탄수화물	4.98 g / 100g	1.5 %
단백질	0.31 g / 100g	0.5 %
지방	0.08 g / 100g	0.2 %
나트륨	44.26 mg / 100g	2.2 %
포화지방	0.00 g / 100g	0.0 %
트랜스지방	0.00 g / 100g	-
당	3.34 g / 100g	-
콜레스테롤	0.00 mg / 100g	0.0 %

① 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 6 birx로 보정하여 각각의 성분을 분석하였음.

② 6 birx 100 g을 기준으로 하였을 때, 열량이 21.88 kcal, 탄수화물이 4.98 g, 단백질이 0.31 g, 지방이 0.08 g, 나트륨이 44.26 mg 및 당이 3.34 g으로 분석되었음.

나. 열수 및 주정 추출물 소재의 가속시험을 통한 원료소재의 안정성확보

(1) 열수 추출물 원료소재의 가속시험을 통한 원료소재의 안정성확보

① 1차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 28.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2012. 08. 29.

제조번호	HR-20120828-1		HR-20120828-2	
	sample 1	sample 2	sample A	sample B
시험항목				
성 상	적합	적합	적합	적합
대장균균	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합
점 도	적합	적합	적합	적합
색 도	적합	적합	적합	적합
pH	적합	적합	적합	적합

② 2차 가속시험 (2012.09.28)

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 28.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 2차 시험일 : 2012. 09. 28.

제조번호	HR-20120828-1		HR-20120828-2	
	sample 1	sample 2	sample A	sample B
시험항목				
성 상	적합	적합	적합	적합
대장균균	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합
점 도	적합	적합	적합	적합
색 도	적합	적합	적합	적합
pH	적합	적합	적합	적합

③ 3차 가속시험 (2012.10.29)

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 28.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 3차 시험일 : 2012. 10. 29.

시험항목	제조번호	HR-20120828-1		HR-20120828-2	
		sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상		적합	적합	적합	적합
대장균균		적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합
점 도		적합	적합	적합	적합
색 도		적합	적합	적합	적합
pH		적합	적합	적합	적합

(2) 주정 추출물 원료소재의 가속시험을 통한 원료소재의 안정성확보

① 1차 가속시험 (2012.08.30)

- 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 29.
- 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- 가속시험 1차 시험일 : 2012. 08. 30.

시험항목	제조번호	HR-20120829-1		HR-20120829-2	
		sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상		적합	적합	적합	적합
대장균균		적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합
점 도		적합	적합	적합	적합
색 도		적합	적합	적합	적합
pH		적합	적합	적합	적합

② 2차 가속시험 (2012.10.02)

- 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 29.
- 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- 가속시험 2차 시험일 : 2012. 10. 02.

시험항목	제조번호	HR-20120829-1		HR-20120829-2	
		sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상		적합	적합	적합	적합
대장균균		적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합
점 도		적합	적합	적합	적합
색 도		적합	적합	적합	적합
pH		적합	적합	적합	적합

③ 3차 가속시험 (2012.10.30)

- 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 29.
- 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 3차 시험일 : 2012. 10. 30.

시험항목	제조번호	HR-20120829-1		HR-20120829-2	
		sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상		적합	적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합
점 도		적합	적합	적합	적합
색 도		적합	적합	적합	적합
pH		적합	적합	적합	적합

5. 원료소재를 이용한 다양한 제형연구

가. 제형연구 1 : 캡슐

(1) 캡슐제형연구

㉠ 캡슐제품의 제형 및 레시피

㉡ 궁극적으로 인체적용시험을 위한 제품으로 까마귀쪽나무 열매(추출물/추출 농축액/추출 분말)이 가지는 효능을 정확하게 측정하기 위하여, 최소한의 부형제 외 다른 첨가물을 사용하지 않고서 제형연구를 추진하였음.

㉢ 캡슐제형의 1차 레시피

원료명	함량(mg)	함량비율(%)	사용목적
까마귀쪽나무 열매 주정 추출물	200.0	55.556	기능성확인목적
결정셀룰로오스 M101	110.5	30.694	부형제
부형제 1	*	*	부형제
부형제 2	*	*	부형제
합 계	360	100.000	

㉤ 제형 1차 제작



그림 67. 다양한 제형연구에 따른 캡슐 제품 사진

㉡ 캡슐제품의 경우, 1병에 50 캡슐로, 일 3캡슐을 복용하는 것으로 산정하였을 때, 2병 100캡슐의 경우 인체적용시험 30일 (+ 3일)분으로 구성하였음. 밀봉형태는 상기의 사진과 같음

(2) 캡슐 안정성연구

㉠ 1차 캡슐제품의 안정성 검사

㉡ 가속시험 및 1차 가속시험일 (2012. 08. 30.)

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 08. 29.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2012. 08. 30.

제조번호	HR-20120829		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

㉞ 2차 가속시험 (시험일 : 2012. 09. 28.)

제조번호	HR-20120829		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

㉞ 3차 가속시험 (시험일 : 2012 10. 29.)

제조번호	HR-20120829		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

나. 제형연구 2 : 병

(1) 병 제형연구

① 병제품의 제형 및 레시피

- ㉞ 소비자들이 가장 선호하는 타입 인 혼합음료 제형으로 병, 파우치 등 다양한 형태로 제작할 수 있으며, 본 제형연구 및 제품제작에 있어서는 100ml병 제품을 기준으로 하여 추진하였음. 혼합음료 제품의 경우 주원료인 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물을 1일 복용기준인 600mg을 기준으로 하여 아래와 같이 레시피를 1차로 완성하였음.

㉞ (혼합)음료제형의 1차 레시피

성 분 명	배합비(%)	비고
까마귀쪽나무 열매 주정 추출농축액(고형분 40%)	1.50	1일복용=600mg
대추농축액(40brix)	3.67	
홍삼농축액(65brix)	*	
복합추출물	*	
비타민-C	*	
올리고당	*	
기타(감추출물 등)	*	
정제수	*	
계	100.0	

② 병 제품 제형 1차 제작

㉔ (혼합) 음료 제형 1차 제작사진



그림 68. 다양한 제형연구에 따른 병 제품의 안정성 평가 사진

㉔ 음료제품의 특징

- 음료제형으로 상품화를 추진하는 보편적인 용기인 100 mL 병을 이용한 연구진행 및 제품을 1차 제작하였음.
- 주원료인 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액의 고형분으로서 함량이 1일 섭취량인 600 mg이 되도록 제형연구 및 레시피를 개발하여 1차 제품을 제작하였음.
- 제작음료는 16.5 brix 임.

㉔ 음료제품의 가속시험을 통한 안정성평가

- 식품의 유형 : 혼합음료
- 제품의 특징 : 100 mL 이중캡병제품
- 제조 년·월·일 : 2012. 08. 30.
- 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- 가속시험 : 2~3개월 (1개월단위)
- 평가항목 및 내용

시험항목	평가방법	제조번호			평가기준
		sample 1	sample 2	sample 3	
성상	육안	*	*	*	겉은갈색
대장균군	식품공전	*	*	*	불검출
세 균	식품공전	*	*	*	불검출

(2) 병 제형의 안정성 연구

① 1차 음료제품의 안정성 검사 (가속시험을 통한 안정성 평가)

㉔ 1차 가속시험

○ 가속시험 1차 시험일 : 2012. 08. 31.

제조번호	HR-20120830		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

㉕ 2차 가속시험

○ 가속시험 2차 시험일 : 2012. 10. 02.

제조번호	HR-20120830		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

㉖ 3차 가속시험

○ 가속시험 3차 시험일 : 2012. 10. 31.

제조번호	HR-20120830		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

다. 제형연구 3 : 환

(1) 환 제형연구

① 환 제품의 제형 및 레시피

㉔ 환제품의 경우, 까마귀쪽나무열매 주정 추출물외에도 기존에 환제품 원료소재로 많이 이용되고 있는 매실, 산수유, 청국장 등의 소재를 이용하여 복합소재로 다양한 제형연구를 추진하였음. 또한 1차 제작한 제품의 경우 코팅을 한 제품과 코팅을 하지 않은 제품 등으로 제작하였음.

㉕ 환제품의 1차 제형

○ 환제형 1 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 + 매실 추출 농축액

원 재 료 명	배합비(%)	비 고
까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 (고형분40%)	25.0	
매실농축액(고형분 20%)	*	
참쌀	*	
텍스트린	*	
기타 1	*	
기타 2	*	
계	100.0	

○ 환제형 2 : 까마귀쪽나무열매추출농축액+산수유추출농축액

원 재 료 명	배합비(%)	비 고
까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 (고형분40%)	25.0	
산수유농축액(고형분 20%)	*	
참쌀	*	
텍스트린	*	
기타 1	*	
기타 2	*	
계	100.0	

○ 환제형 3 : 청국장분말+까마귀쪽나무열매추출농축액

원 재 료 명	배합비(%)	비 고
청국장분말	35.0	
까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 (고형분40%)	15.0	
참쌀	*	
텍스트린	*	
기타 1	*	
기타 2	*	
계	100.0	

㉔ 환 제조방법

- 기준 및 규격에 적합한 원료 구입 및 선별
- 상기의 배합비율에 따라 칭량
- 원료를 스쿠류반죽기에 넣고 반죽한 다음, 장 환기에 넣어서 환주를 형성한 후 제환기에 넣어 규격에 맞는 환을 제작
- 당의팬에 넣어 둥근 환 모양으로 성형 및 코팅
- 성형이 완료된 제품을 건조기에 넣고 건조
- 건조된 환은 반제품으로 용도에 따라 포장

㉔ 환 제형 제품의 안정성검사

- 검사항목 : 성상, 이물, 수분함량 (참고사항)
- 검사방법 : 식품공전
- 검사기간 : 1차 제형연구로 가속조건하에서 3개월
- 규격

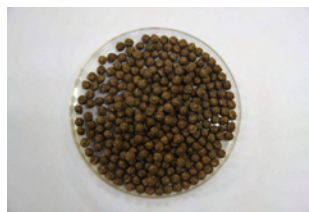
시험항목	시험방법	규 격		
		환제형1	환제형2	환제형
성 상	-	밝은갈색/윤택	짙은갈색	밝은갈색
이 물	-	불검출	불검출	불검출
수분함량(참고)	식품공전	3.2 ± 0.8	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.7

② 1차 제형 제작 및 제작제품의 특징

㉕ 1차 제작한 환제품 사진



(a) 환제형 1



(b) 환제형 2



(c) 환제형 3

그림 69. 다양한 제형연구에 따른 환제품 사진

㉔ 환제형 1 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 + 매실 추출 농축액

- 1통에 150g을 용량으로 제작하였으며, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 (40 brix)이 150 g에 20%인 37.5 g이 함유되어 있는 것으로, 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 고형분으로 환산하였을 경우 15 g이 함유되어 있는 것임.
- 1통의 함유되어 있는 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물은 15 g (고형분기준)으로 일일 섭취량인 600 mg으로 환산하였을 경우, 1통이 25일 분의 용량으로 1일 6.0 g을 섭취하는 것이 적절하다고 판단됨.
- 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물과 매실을 이용한 환 제형의 경우, 환1개의 지름이 5 mm이며, 20개가 3.2 g으로 1일 2회 1회 20개씩 복용하는 것으로 제형연구를 진행하였음.
- (a)환 제형의 제조번호는 HR-20120911-1이며, 수분함량은 3.2± 0.8%로 분석되었음.

㉔ 환제형 2 : 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액 + 산수유 추출 농축액

- 환제형 1과 같이 1통에 150 g으로 제작되었으며, 1통에 까마귀쪽나무 열매 주정 추

출물이 15 g (고형분으로 환산)이 함유되어 있는 것으로 1일 섭취량을 환산하였을 경우 환제형 1과 같이 1일 6.0 g을 섭취하는 것이 적절하다고 판단됨.

○ 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액과 산수유추출농축액을 이용한 환 제형의 경우, 환1개의 지름이 3~4 mm로이며, 20개가 1.5 g으로 1일 3~4회 1회 20~30개씩 복용하는 것으로 제형연구를 진행하였음.

○ (b)환 제형의 제조번호는 HR-20120911-2이며, 수분함량은 $3.8 \pm 0.6\%$ 로 분석되었음.

㉔ 환제형 3 : 청국장분말 + 까마귀쪽나무 열매 주정 추출 농축액

○ 기능성을 목적으로 하는 환제형1과 환제형2와는 달리 기존의 환제품으로 널리 알려진 청국장을 이용한 환 제형연구로 추진하였으며, 1통에 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물이 9 g (고형분으로 환산)이 함유되어 있는 것으로 환제형 1과 환제형 2의 60% 정도로 사용하였음.

○ 청국장분말+까마귀쪽나무 열매 추출농축액을 이용한 환제형의 경우, 환 1개의 지름이 5mm내외로 제작하였음.

○ (c)환 제형의 제조번호는 HR-20120911-3이며, 수분함량은 $3.9 \pm 0.7\%$ 로 분석되었음.

(2) 환 제형 제품의 안정성 연구

① 1차 환제품의 안정성 검사

㉕ 1차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 09. 12.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2012. 09. 13.

시험항목	HR-20120911-1		HR-20120911-2	
	sample 1	sample 2	sample 1	sample 2
성 상	적합	적합	적합	적합
이 물	적합	적합	적합	적합
참고(수분함량)	적합	적합	적합	적합

㉕ 2차 가속시험 (2012.10.15.)

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 09. 12.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 2차 시험일 : 2012. 10. 15.

시험항목	제조번호	HR-20120911-1		HR-20120911-2	
		sample 1	sample 2	sample 1	sample 2
성 상		적합	적합	적합	적합
이 물		적합	적합	적합	적합
참고(수분함량)		적합	적합	적합	적합

㉔ 3차 가속시험 (예정) (2012.11.13.)

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2012. 09. 12.

○ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 3차 시험일 : 2012. 11. 13.

시험항목	제조번호	HR-20120911-1		HR-20120911-2	
		sample 1	sample 2	sample 1	sample 2
성 상		적합	적합	적합	적합
이 물		적합	적합	적합	적합
참고(수분함량)		적합	적합	적합	적합

5-1. 원료소재를 이용한 다양한 제형연구 II : 2차

가. 건강기능식품 제형별 선호도조사

(1) 소비자그룹의 제형별 선호도 조사



그림 70. 소비자 제형별 선호도 점수

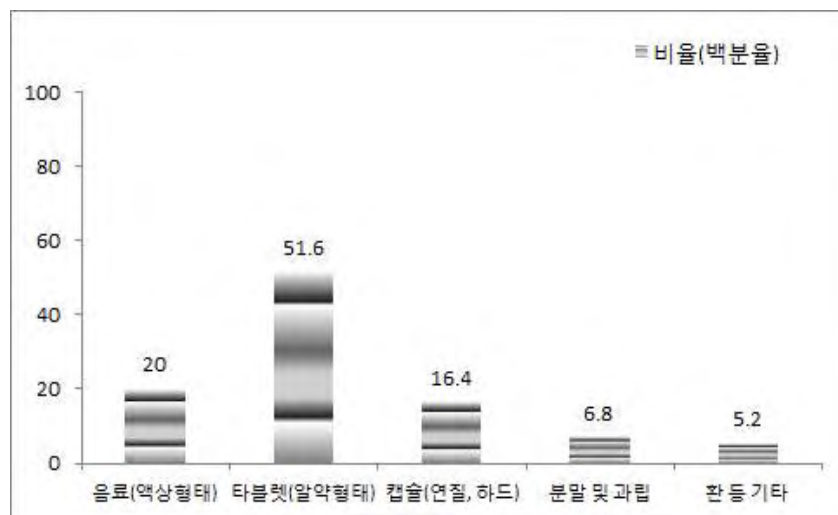


그림 70-1. 소비자 제형별 선호도 백분율

- ① 소비자 122명을 대상으로 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 위의 그림과 같은 결과를 얻었음.
- ② 총 366점 중 타블렛 (알약포함) 형태의 제형이 189점으로 51.6%로 나타났으며, 그 다음으로는 음료 (액상)형태의 제형이 73점으로 20%로 나타났음. 그리고 캡슐 (연질 및

하드) 제형이 60점으로 16.4%를 차지하였으며, 분말 및 과립 제형과 기타 (환 등)제형이 각각 6.8%와 5.2%로 나타났다.

(2) 전문가 그룹의 제형별 선호도 조사

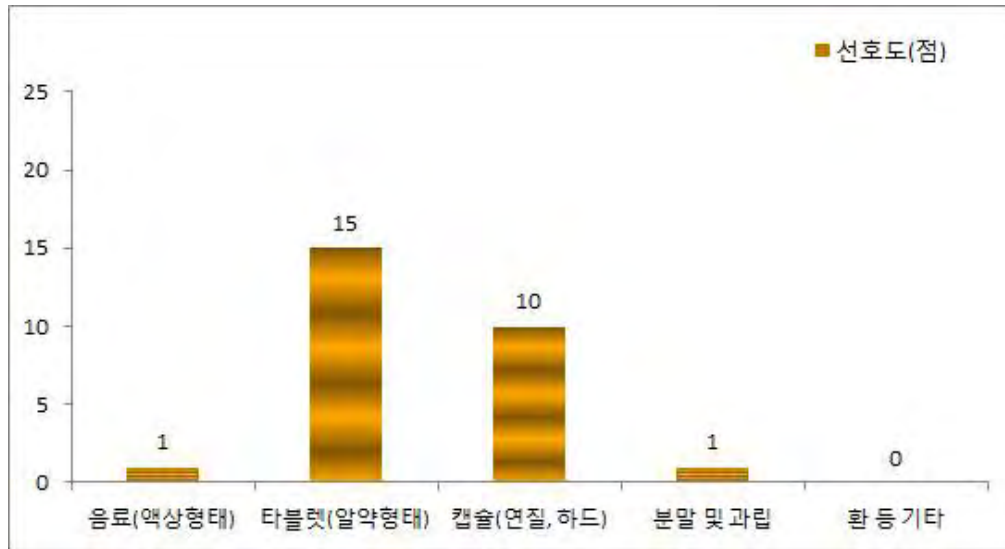


그림 71. 전문가 제형별 선호도 점수

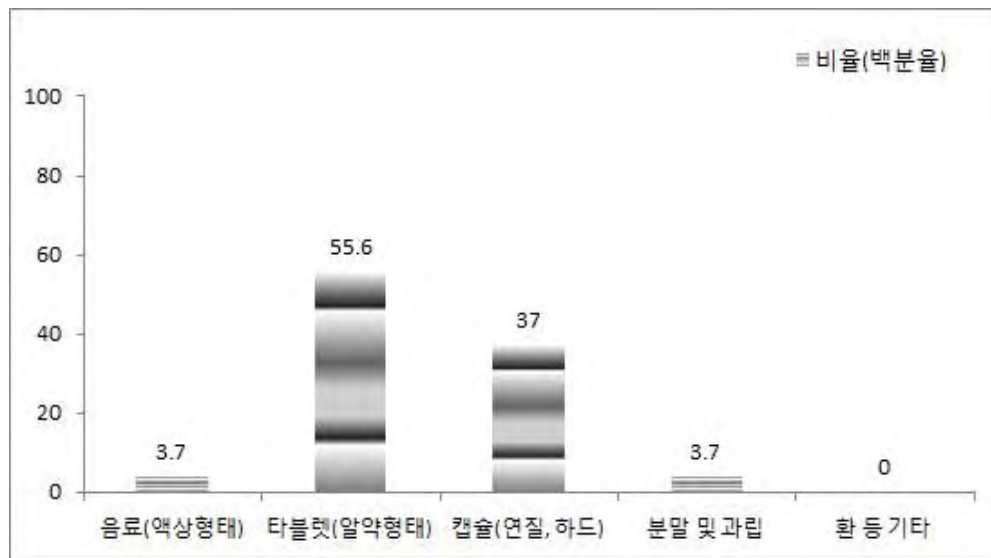


그림 71-1. 전문가 제형별 선호도 백분율

- ① 전문가 9명을 대상으로 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 위의 그림과 같은 결과를 얻었음.
- ② 총 27점 중 타블렛 (알약)제형이 15점 (55.6%)을 얻었으며, 캡슐 (연질 및 하드)제형

이 10점 (37%)을 얻었음. 그리고 음료 (액상)제형과 분말 및 과립 제형이 각 1점 (3.7%)을 얻었으며, 기타제형은 없었음.

(3) 소비자 및 전문가 그룹의 제형별 선호도 분석을 통한 제형 선택

- ① 소비자 및 전문가 그룹의 건강기능식품의 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 타블렛 형태의 제형이 두 그룹 모두 50% 이상으로 조사되었음.
- ② 그러나 두 번째 제형의 경우, 소비자 그룹의 경우 음료제형과 캡슐제형이 비슷하게 선호하는 것으로 조사되었으나, 전문가 그룹의 경우 캡슐제형이 37%으로 3.7%의 음료 제형보다 선호도가 우수한 것으로 조사되었음. 이는 현재 휴림이 건강즙 및 홍삼음료를 주력으로 하는 회사이며, 이를 판매하는 휴림 건강전문대리점에서 선호도 조사를 실시한 것이 일부 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.
- ③ 시작품제형선택 : 가장 우선적으로 타블렛 제형을 이용한 시작품제작을 추진하고자 하며, 2차적으로는 전문가 및 소비자의 의견을 반영하여 캡슐형태의 제형을 이용한 시작품을 제작하고자 함.

나. 건강기능식품 제형별 선호도조사 결과를 활용한 제형제작 및 안정성 시험

(1) 타블렛 제형 제작

- ① 원료 및 성분함량 : 기능성 원료 [까마귀쪽나무 열매 주정추출분말, 배합비 30%], 부원료 [해조칼슘 25%, 말토덱스트린 15% 등]
- ② 제조방법 : 원료구입 ► 칭량 ► 혼합 ► 타정 ► 코팅 ► 선별 ► 포장 ► 최종검사
- ③ 포장방법 및 단위 : 병포장 / 180정/병

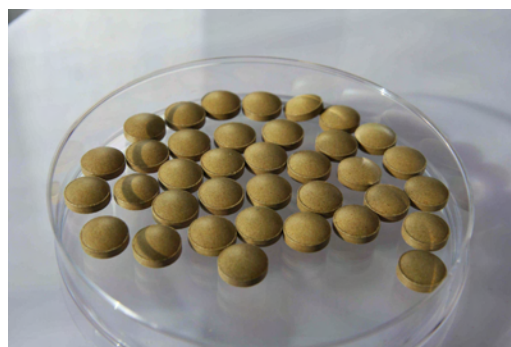


그림 72. 소비자 선호도를 반영한 타블렛 제형 제작

(2) 캡슐제작

- ① 원료 및 성분함량 : 기능성 원료 [까마귀쪽나무 열매 주정추출분말, 배합비 33%], 부원료 [결정셀룰로우스 M101 26% 등]
- ② 제조방법 : 원료구입 ▶ 칭량 ▶ 내용물 혼합 ▶ 캡슐충전 ▶ 선별 및 반제품검사 ▶ 포장 ▶ 최종검사
- ③ 포장방법 및 단위 : 병포장 / 180정/병

(3) 건강기능식품 제형별 선호도조사 결과로 제작한 제형의 안정성 확보

- ① 타블렛 제형 시작품의 가속시험을 통한 안정성 확보

㉠ 가속시험 및 1차 가속시험일 (2013. 02. 25.) : 시험결과 적합

시험항목	제조번호	HR-20130225		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
지표성분함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

㉡ 2차 가속시험 (시험일 : 2013. 03. 25.) : 시험결과 적합

시험항목	제조번호	HR-20130225		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
지표성분함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

㉢ 3차 가속시험 (시험일: 2013 04. 24.) : 시험결과 적합

㉣ 4차 가속시험 (시험일: 2013 05. 27.) : 시험결과 적합

㉤ 5차 가속시험 (시험일: 2013 06. 25.) : 시험결과 적합

㉥ 6차 가속시험 (시험일: 2013 07. 24.) : 시험결과 적합

㉦ 7차 가속시험 (시험일: 2013 08. 26.) : 시험결과 적합

시험항목	제조번호	HR-20130225		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
지표성분함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

- ② 캡슐 제형 시작품의 가속시험을 통한 안정성 확보

㉧ 가속시험 및 1차 가속시험일 (2013. 03. 13.) : 시험결과 적합

제조번호	HR-20130313		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

㉞ 2차 가속시험 (시험일 : 2013. 04. 15.) : 시험결과 적합

제조번호	HR-20130313		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

㉞ 3차 가속시험 (시험일: 2013 05. 14.) : 시험결과 적합

㉞ 4차 가속시험 (시험일: 2013 06. 17.) : 시험결과 적합

㉞ 5차 가속시험 (시험일: 2013 07. 15.) : 시험결과 적합

㉞ 6차 가속시험 (시험일: 2013 08. 19.) : 시험결과 적합

㉞ 7차 가속시험 (시험일: 2013 09. 16.) : 시험결과 적합

제조번호	HR-20130313		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

6. 원료소재 대량생산연구

가. 까마귀쪽나무 열매 대량생산연구

(1) 대량생산 및 주요성분분석

① 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 농축액 제조

소재(시료명)	제조번호	비고
까마귀쪽나무열매 주정추출농축액 : 20 brix	HR-20120829-1	원료(E-20)
까마귀쪽나무열매 주정추출농축액 : 40 brix	HR-20120829-2	원료(E-40)

② 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 농축액의 성분분석 :

㉞ 원료소재의 영양성분분석 : 까마귀쪽나무 열매의 주정 추출물 농축액 소재를 6

brix로 보정하여 성분분석을 실시하였으며, 시험방법은 식품공정법으로 실시하였으며, 성분분석항목 (9대영양성분)으로 열량, 탄수화물, 단백질, 지방, 나트륨, 포화지방, 트랜스지방, 당, 콜레스테롤을 측정하였음.

- ④ 결과 : 20 brix의 농축액을 6 birx 희석하여 100 g을 기준으로 하였을 때, 열량이 약 22 kcal 였으며, 탄수화물이 5 g, 단백질이 0.3 g, 지방이 0.08 g 등으로 분석되었음.

(2) 대량생산 소재의 안정성 연구

- ① 가속조건에서의 원료소재의 안정성연구 : 가속시험기간은 제조 후 6개월간 실시하며, 보존조건은 38℃, 80% RH 이상이며, 시험 항목은 내용에서 언급한 내용과 같음
- ② 1차 가속시험 및 시험일 (2013.01.08.) : 시험결과 적합

제조번호	HR-20130107-1		HR-20130107-2	
시험항목	sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합
점 도	적합	적합	적합	적합
색 도	적합	적합	적합	적합
pH	적합	적합	적합	적합

- ③ 2차 가속시험 및 시험일 (2013.02.04.) : 시험결과 적합

제조번호	HR-20130107-1		HR-20130107-2	
시험항목	sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합
점 도	적합	적합	적합	적합
색 도	적합	적합	적합	적합
pH	적합	적합	적합	적합

- ④ 3차 가속시험 및 시험일 (2013.03.05.) : 시험결과 적합
- ⑤ 4차 가속시험 및 시험일 (2013.04.08.) : 시험결과 적합
- ⑥ 5차 가속시험 및 시험일 (2013.05.06.) : 시험결과 적합
- ⑦ 6차 가속시험 및 시험일 (2013.06.10.) : 시험결과 적합
- ⑧ 7차 가속시험 및 시험일 (2013.07.08.) : 시험결과 적합

시험항목	제조번호	HR-20130107-1		HR-20130107-2	
		sample 1	sample 2	sample A	sample B
성 상		적합	적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합
점 도		적합	적합	적합	적합
색 도		적합	적합	적합	적합
pH		적합	적합	적합	적합

7. 안전성 평가 결과

○ 단회투여 독성시험

(1) 사망유무

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다 (Table 29).

Table 29. Summary of Mortality

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

(2) 일반증상

5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 및 6시간에 시험물질색 변 (compound-colored stool) 및 점액변 (mucous stool)이 수컷 1례에서 관찰되었고, 투여 후 1일에 시험물질색 변이 암수 전례, 점액변이 수컷 1례, 암컷 2례에서 관찰되었으나, 투여 후 2일 이후부터는 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단된다 (Table 30, Table 31).

Table 30. Summary of Clinical Signs

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA Compound-colored stool Mucous stool	5	4 1 1	5	5	4 1 1
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5

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

NOA: No Observable Abnormality

Table 31. Individual Clinical Signs

Sex: Male							
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	1101		-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-
G2 5,000	1201		-	-	-	-	-
	1202		-	-	-	-	-
	1203		-	-	-	-	-
	1204		-	-	-	-	-
	1205	Compound-colored stool Mucous stool	- -	+ +	- -	- -	+ +

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 5,000	1201	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1202	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1203	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1204	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1205	Compound-colored stool Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

-: No observable abnormality

+: Observable abnormality

-: No observable abnormality

+: Observable abnormality

Sex: Female							
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	2101		-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-
G2 5,000	2201		-	-	-	-	-
	2202		-	-	-	-	-
	2203		-	-	-	-	-
	2204		-	-	-	-	-
	2205		-	-	-	-	-

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 5,000	2201	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2203	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2204	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2205	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No observable abnormality

+: Observable abnormality

(3)체중변화

관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다 (그림 72, Table 32, Table 33).

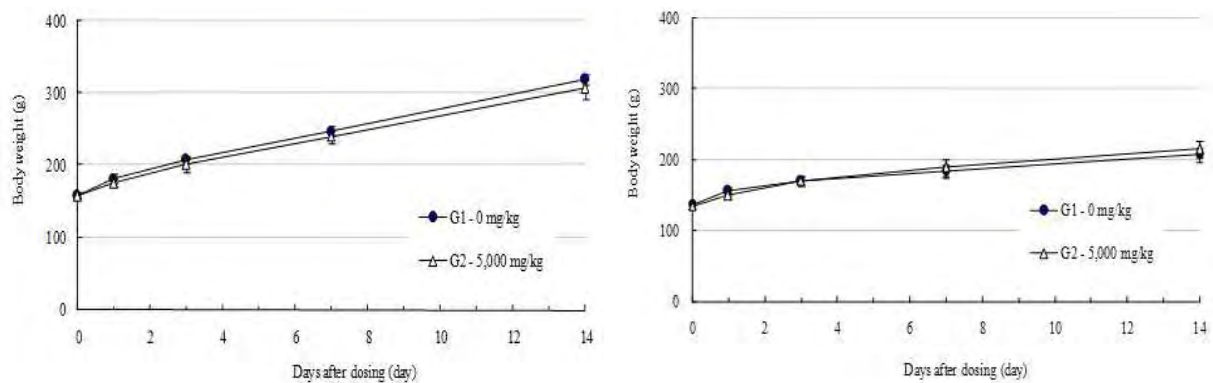


그림 72. Body Weights in Male and Female SD Rats

Table 32. Mean Body Weights

Sex	Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain
			0	1	3	7	14	0 ~ 14
Male	G1 0	Mean	158.1	182.5	207.9	248.3	319.6	161.5
		S.D.	5.0	6.5	5.2	5.7	7.7	6.0
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	158.3	175.6	201.1	240.3	307.0	148.7
		S.D.	3.8	4.9	10.0	9.2	13.7	11.8
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	136.5	155.7	170.2	183.7	207.4	70.9
		S.D.	4.9	4.7	6.9	8.3	9.6	10.6
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	135.3	150.0	170.9	189.2	215.8	80.5
		S.D.	4.5	3.7	6.5	12.1	11.9	13.4
		N	5	5	5	5	5	5

Table 33. Individual Body Weights

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after dosing					Gain	0 ~ 14
		0	1	3	7	14		
G1 0	1101	166.7	193.9	217.0	257.8	330.2		163.5
	1102	156.2	181.7	206.4	245.7	320.2		164.0
	1103	157.9	178.8	205.9	249.3	311.5		153.6
	1104	154.3	179.1	203.8	243.5	323.2		168.9
	1105	155.6	178.9	206.5	245.1	312.9		157.3
	Mean	158.1	182.5	207.9	248.3	319.6		161.5
	S.D.	5.0	6.5	5.2	5.7	7.7		6.0
	N	5	5	5	5	5		5
G2 5,000	1201	159.4	174.4	188.8	231.8	300.6		141.2
	1202	153.1	168.6	193.5	230.3	289.4		136.3
	1203	163.7	181.2	212.6	251.7	317.8		154.1
	1204	158.1	179.3	201.9	241.9	303.8		145.7
	1205	157.3	174.4	208.9	245.8	323.6		166.3
	Mean	158.3	175.6	201.1	240.3	307.0		148.7
	S.D.	3.8	4.9	10.0	9.2	13.7		11.8
	N	5	5	5	5	5		5
Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Days after dosing					Gain	0 ~ 14
		0	1	3	7	14		
G1 0	2101	134.6	156.3	172.3	190.5	216.0		81.4
	2102	139.6	159.3	173.2	174.1	198.4		58.8
	2103	137.1	155.8	166.9	180.3	197.3		60.2
	2104	129.3	147.8	160.2	179.4	207.3		78.0
	2105	141.9	159.2	178.5	194.2	218.1		76.2
	Mean	136.5	155.7	170.2	183.7	207.4		70.9
	S.D.	4.9	4.7	6.9	8.3	9.6		10.6
	N	5	5	5	5	5		5
G2 5,000	2201	132.8	148.5	171.2	205.3	236.3		103.5
	2202	139.0	146.0	171.8	190.4	212.1		73.1
	2203	137.6	156.0	177.8	194.3	215.2		77.6
	2204	128.5	148.9	160.1	173.1	207.5		79.0
	2205	138.4	150.5	173.4	182.8	207.9		69.5
	Mean	135.3	150.0	170.9	189.2	215.8		80.5
	S.D.	4.5	3.7	6.5	12.1	11.9		13.4
	N	5	5	5	5	5		5

(4) 육안적 부검소견

부검시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다 (Table 34, Table 35).

Table 34. Summary of Necropsy Findings

Sex	Male		Female	
Group	G1	G2	G1	G2
Dose (mg/kg)	0	5,000	0	5,000
No. of animals	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5
No. of examined	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

Table 35. Individual Necropsy Findings

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organs*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	1101	All	Unremarkable findings	S	14
	1102	All	Unremarkable findings	S	14
	1103	All	Unremarkable findings	S	14
	1104	All	Unremarkable findings	S	14
	1105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 5,000	1201	All	Unremarkable findings	S	14
	1202	All	Unremarkable findings	S	14
	1203	All	Unremarkable findings	S	14
	1204	All	Unremarkable findings	S	14
	1205	All	Unremarkable findings	S	14
Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organs*	Gross findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	2101	All	Unremarkable findings	S	14
	2102	All	Unremarkable findings	S	14
	2103	All	Unremarkable findings	S	14
	2104	All	Unremarkable findings	S	14
	2105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 5,000	2201	All	Unremarkable findings	S	14
	2202	All	Unremarkable findings	S	14
	2203	All	Unremarkable findings	S	14
	2204	All	Unremarkable findings	S	14
	2205	All	Unremarkable findings	S	14

* External surface and organs in body cavity

S: Scheduled

(5)결론

본 시험의 조건 하에서 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 (LJM-F70)을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

2) 유전독성시험(소핵시험, 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험)

○ 소핵시험

일반증상 및 사망동물의 관찰 시험물질군의 모든 용량에서 일반증상 및 사망동물 관찰되지 않았고 체중변화 시험기간 동안 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 없었으며 ($p \geq 0.05$, ANOVA) 소핵유발빈도 시험물질군의 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 결론적으로 본 시험 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물의 소핵 유발성은 음성으로 판정하였다.

(1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

각군 모든 동물에서 시험기간 동안 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다 (Table 36).

Table 36. Clinical Signs (Main Study)

Group		Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment		
						0	2	24
Negative control	Water for injection	0	P.O.	5	NAD	5	5	5
		1,250	P.O.	5	NAD	5	5	5
	LJM-F70	2,500	P.O.	5	NAD	5	5	5
		5,000	P.O.	5	NAD	5	5	5
Positive control	MMC	2	I.P.	5	NAD	5	5	5

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

MMC: Mitomycin C

NAD: No Abnormalities Detected

(2) 체중변화

시험물질군 모든 동물에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Dunnett's t-test). 양성대조군에서는 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$, Dunnett's t-test) (Table 37).

Table 37. Body Weights (Main Study)

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Body weight (g) at the time of	
					Administration	Sacrifice
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	34.4
					1102	33.1
					1103	32.7
					1104	31.4
					1105	31.2
					Mean±S.D.	32.6 ± 1.3
Test substance	LJM-F70	1,250	P.O.	24	1201	34.0
					1202	33.2
					1203	32.5
					1204	31.5
					1205	31.2
					Mean±S.D.	32.5 ± 1.2
	LJM-F70	2,500	P.O.	24	1301	34.0
					1302	33.3
					1303	32.2
					1304	31.7
					1305	30.9
					Mean±S.D.	32.4 ± 1.2
	LJM-F70	5,000	P.O.	24	1401	33.8
					1402	33.3
					1403	32.2
					1404	31.9
					1405	30.8
					Mean±S.D.	32.4 ± 1.2
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	33.6
					1502	33.6
					1503	31.9
					1504	31.9
					1505	30.8
					Mean±S.D.	32.4 ± 1.2

P.O.: Per Os

I.P.: Intraperitoneal

MMC: Mitomycin C

S.D.: Standard Deviation

Significant difference from negative control by Dunnett's t-test : * p<0.05

(3) 소핵다염성적혈구의 출현빈도

시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA test). 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 현저한 증가가 확인되었다 ($p < 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA test) (Table 38).

Table 38. Results (Main study)

Groups		Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Counted PCE : NCE	PCE/ (PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	195 : 305	0.390	1 / 2000
					1102	215 : 285	0.430	1 / 2000
					1103	198 : 302	0.396	2 / 2000
					1104	175 : 325	0.350	1 / 2000
					1105	117 : 383	0.234	0 / 2000
					Total	- : -	-	5 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.360 ± 0.076	1.0 ± 0.7
		1,250	P.O.	24	1201	156 : 344	0.312	1 / 2000
					1202	125 : 375	0.250	0 / 2000
					1203	202 : 298	0.404	0 / 2000
					1204	216 : 284	0.432	0 / 2000
					1205	210 : 290	0.420	0 / 2000
					Total	- : -	-	1 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.364 ± 0.079	0.2 ± 0.4
Test Substance	LJM-F70	2,500	P.O.	24	1301	172 : 328	0.344	0 / 2000
					1302	156 : 344	0.312	0 / 2000
					1303	215 : 285	0.430	1 / 2000
					1304	153 : 347	0.306	1 / 2000
					1305	152 : 348	0.304	1 / 2000
					Total	- : -	-	3 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.339 ± 0.053	0.6 ± 0.5
		5,000	P.O.	24	1401	169 : 331	0.338	1 / 2000
					1402	220 : 280	0.440	1 / 2000
					1403	166 : 334	0.332	0 / 2000
					1404	189 : 311	0.378	0 / 2000
					1405	175 : 325	0.350	0 / 2000
					Total	- : -	-	2 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.368 ± 0.044	0.4 ± 0.5
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	140 : 360	0.280	102 / 2000
					1502	147 : 353	0.294	115 / 2000
					1503	189 : 311	0.378	145 / 2000
					1504	156 : 344	0.312	124 / 2000
					1505	125 : 375	0.250	114 / 2000
					Total	- : -	-	600† / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.303 ± 0.048	120.0 ± 16.0

P.O.: Per Os

I.P. : Intraperitoneal

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MMC : Mitomycin C

S.D. : Standard Deviation

Significant difference from negative control by Kastendaum & Bowman : † p<0.05

(4) 시험의 성립

음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 정상범위에 있었기 때문에 본시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다 (Table 39).

Table 39. Historical Control Data

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)							
Group	Dose (mg/kg)	n	MNPCE/2000PCE			Range(MNPCE/2000PCE)	
			Mean±S.D.			MIN	MAX
Negative control	0	103	0.6	±	0.50	0	1.8
Positive control	2	103	126.2	±	31.44	47.6	204.8

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes							
Group	Dose (mg/kg)	n	PCE/NCE+PCE			Range(PCE/NCE+PCE)	
			Mean±S.D.			MIN	MAX
Negative control	0	103	0.372	±	0.041	0.270	0.473
Positive control	2	103	0.343	±	0.045	0.231	0.455

Negative control : Including water for injection, normal saline injection, olive oil, corn oil, 0.5% methyl cellulose 1,500cP solution, 0.5% CMC-Na solution, DMSO, PBS etc.

Positive control : Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single administration)

The above historical control values were obtained from the data pooled from Jan. 15, 2009 to May 30, 2012.

The range was calculated by the control limit from Mean \pm 2.5S.D.

(5) 결론

이상의 결과로부터 시험물질 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 (LJM-F70)은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

○ 염색체이상시험

(1) 염색체이상 관찰 대상용량

검체제작과정에서, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량에서 분열중기상 세포 200개를 확보할 수 없었기 때문에 최고용량을 제외한 3용량을 염색체 관찰의 대상용량으로 하였다.

(2) 염색체이상출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test, $p \geq 0.05$). 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상이며, 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (Fisher's exact test, $p < 0.05$) (Table 40).

Table 40. Summary of Main Study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations						gap (%)	Number of cells with numerical aberrations		
					ctb	csb	cte	cse	fig	total (%)		end	pol	total (%)
Water for injection	0	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	1	
LJM-F70	35.6	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	71.3	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	143	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	285	-	6-18	toxic										
MMC	0.05	-	6-18	100	6	0	22	0	0	44* (22.0)	0 (0.0)	0	1	2 (1.0)
				100	5	0	17	0	0			0	1	
Water for injection	0	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
LJM-F70	97.5	+	6-18	100	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	2 (1.0)
				100	0	0	0	0	0			0	2	
	195	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	390	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1	1	2 (1.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	780	+	6-18	toxic										
B[a]P	20	+	6-18	100	4	0	13	1	0	33* (16.5)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)
				100	4	0	14	0	0			0	0	
Water for injection	0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
LJM-F70	18.8	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	37.5	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	75.0	-	24-0	100	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	150	-	24-0	toxic										
MMC	0.05	-	24-0	100	8	0	25	0	0	51* (25.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	3	0	21	0	0			0	0	

Aberration; gap: chromatid and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

Significant difference from negative control by fisher's exact test : * p<0.05

(3) 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

(4) Historical Control Data

음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의

범위내에 있었다 (Table 41).

Table 41. Historical Control Data

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	+	6-18	113	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	102	0.2	±	0.3	0	<5
Positive	-	6-18 ^{a)}	113	19.3	±	5.0	<10	34*
	+	6-18 ^{b)}	113	20.8	±	5.8	<10	38*
	-	24-0 ^{b)}	102	19.4	±	5.8	<10	37*

Historical control values of numerical aberration								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range(%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	+	6-18	113	0.1	±	0.3	0	<5
	-	24-0	103	0.1	±	0.3	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% methyl cellulose 1500cP solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Tetrahydrofuran etc.

a : Mitomycin C (0.05 µg/mL)

b : Benzo[a]pyrene (20 µg/mL)

N : The total number of chromosome aberration test

The above historical control values are obtained from the data pooled from Jan. 1, 2011 to May 31, 2012

*: The range was calculated by the control limit from Mean ± 3S.D.

(5) 시험의 성립

음성대조군에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군에서 구조 이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상으로 음성대조군과 비교해서 유의한 증가가 확인되었다. 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열중기상세포가 관찰 가능하였으며, 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다.

(6) 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 (LJM-F70)의 염색체 이상 유발성은 음성으로 판정되었다.

○ 복귀돌연변이시험

(1) 용량설정시험

용량설정시험의 시험방법에 따라, 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다 (Figures 73 ~ 76, Tables 42 ~ 43).

균주명	S9 mix	본시험의 용량 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA98	-/+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
TA100, TA1535, TA1537	-	78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44
TA100, TA1535, TA1537	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

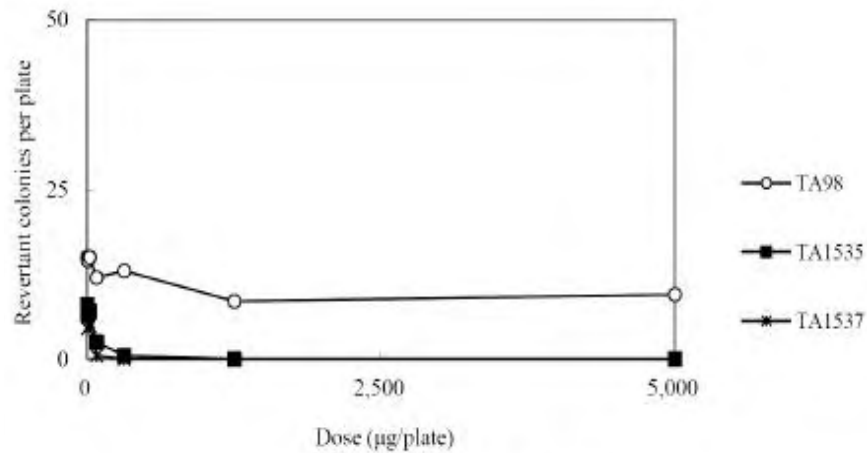


그림 73. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Dose range finding study: TA98, TA1535 and TA1537)

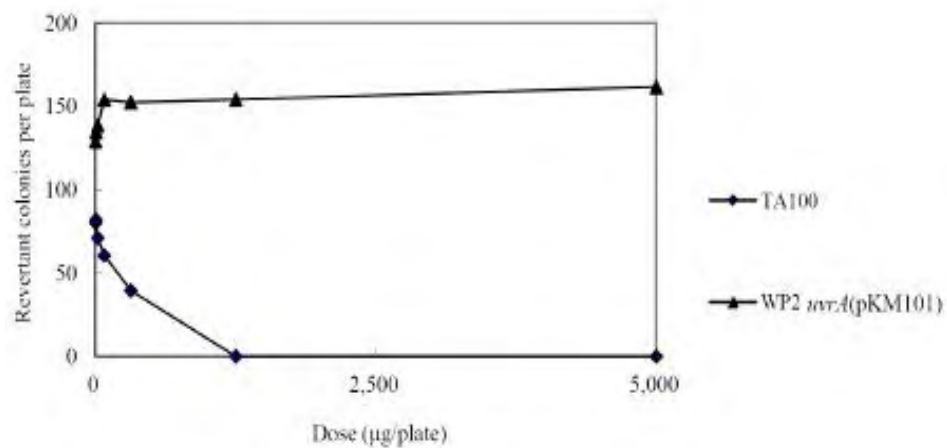


그림 74. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Dose range finding study: TA100 and WP2*uvrA*(pKM101))

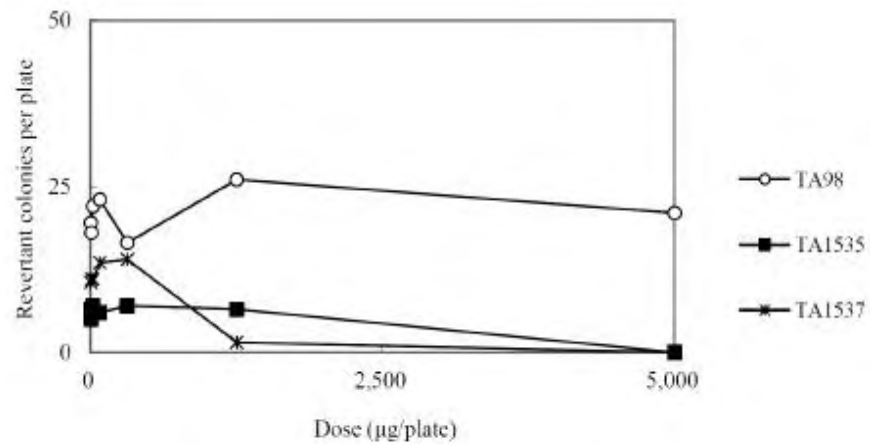


그림 75. Dose-response curve in the presence of metabolic activation (Dose range finding study: TA98, TA1535 and TA1537)

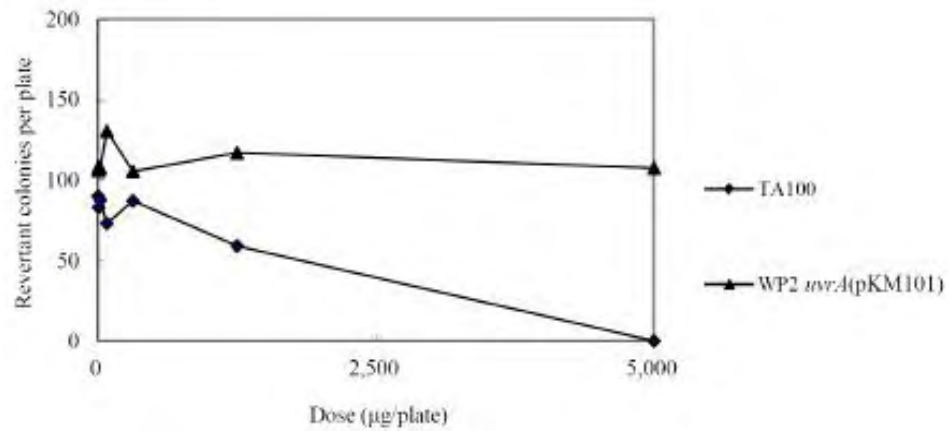


그림 76. Dose-response curve in the presence of metabolic activation (Dose range finding study: TA100 and WP2 *uvrA* (pKM101))

Table 42. The number of revertant colonies per plate in absence of metabolic activation (Dose range finding study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts		Mean
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	17	13	15
		4.88	18	11	15
		19.5	17	13	15
		78.1	11	13	12
		313	15	11	13
		1,250	10*	7*	9
		5,000	11*	8*	10
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	629	610	620
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	80	80	80
		4.88	90	74	82
		19.5	70	72	71
		78.1	64*	57*	61
		313	37*	42*	40
		1,250	0*	0*	0
		5,000	0*	0*	0
	Sodium azide (SA)	1.5	489	413	451
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	7	9	8
		4.88	5	8	7
		19.5	8	6	7
		78.1	2*	3*	3
		313	0*	1*	1
		1,250	0*	0*	0
		5,000	0*	0*	0
	Sodium azide (SA)	1.5	368	384	376
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	5	4	5
		4.88	6	8	7
		19.5	7	3	5
		78.1	0*	1*	1
		313	0*	0*	0
		1,250	0*	0*	0
		5,000	0*	0*	0
	9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	573	575	574
WP2uvr4 (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	127	131	129
		4.88	114	155	135
		19.5	136	141	139
		78.1	132	176	154
		313	150	155	153
		1,250	162	146	154
		5,000	171	152	162
	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	818	724	771

*: Indicated growth inhibition

Table 43. The number of revertant colonies per plate in presence of metabolic activation (Dose range finding study)

Strain	Test item	Dose level (μg/plate)	Individual revertant colony counts		Mean
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	19	20	20
		4.88	16	20	18
		19.5	16	28	22
	LJM-F70	78.1	21	25	23
		313	17	16	17
		1,250	26*	26*	26
		5,000	18*	24*	21
	2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	263	264	264
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	92	88	90
		4.88	83	83	83
		19.5	92	83	88
	LJM-F70	78.1	73	73	73
		313	88	86	87
		1,250	46*	72*	59
		5,000	0*	0*	0
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	489	469	479
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	6	7	7
		4.88	5	5	5
		19.5	6	8	7
	LJM-F70	78.1	7	5	6
		313	6	8	7
		1,250	8*	5*	7
		5,000	0*	0*	0
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	54	65	60
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	13	8	11
		4.88	12	10	11
		19.5	10	12	11
	LJM-F70	78.1	11	16	14
		313	12	16	14
		1,250	3*	0*	2
		5,000	0*	0*	0
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	121	128	125
WP2uvrA (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	102	110	106
		4.88	88	129	109
		19.5	125	90	108
	LJM-F70	78.1	128	133	131
		313	113	98	106
		1,250	110	124	117
		5,000	112	103	108
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	439	433	436

*: Indicated growth inhibition

(2) 본시험 (그림 77 ~ 83, Tables 44 ~ 45)

① 복귀변이콜로니수의 계측을 위해 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 군주의 모든 용량에 대해서 복귀변이 콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 각 군주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

② 시험물질에 의한 생육저해 및 침전: 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 군주는 156 μg/plate 이상, TA100, TA1535 및 TA1537 군주는 78.1 μg/plate, 대사활성화존재하의 TA98 군주는 1,250 μg/plate, TA100, TA1535 및 TA1537 군주는 625 μg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화 비존재하 및 존재하의 WP2uvrA (pKM101) 군주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 석출은 대사활성화 유무에 관계없이 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

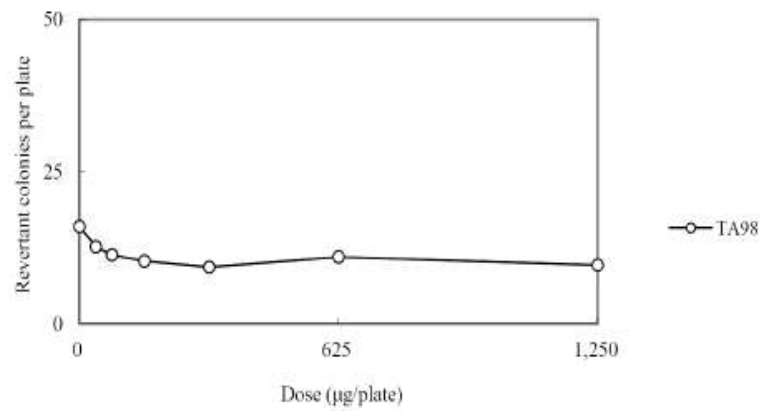


그림 77. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Main study: TA98)

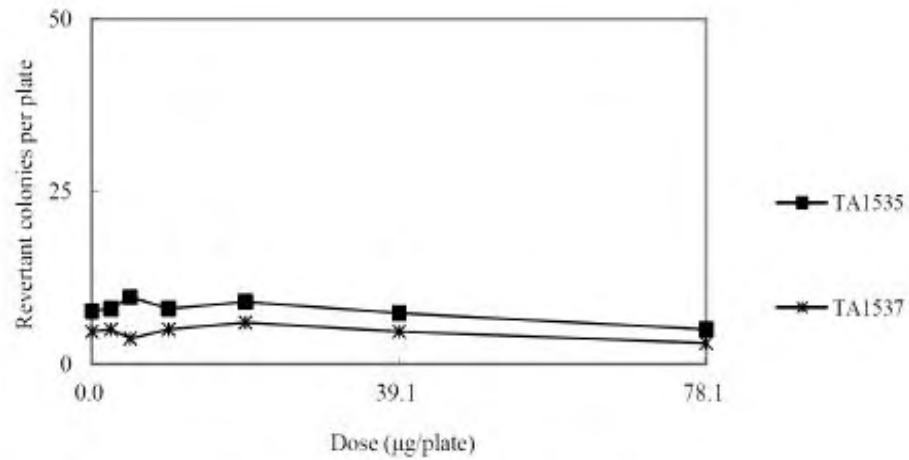


그림 78. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Main study: TA1535 and TA1537)

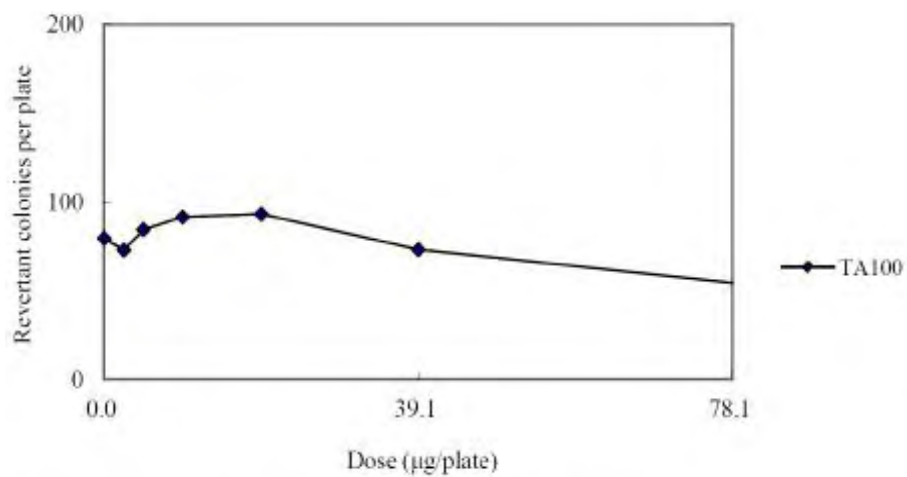


그림 79. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Main study: TA100)

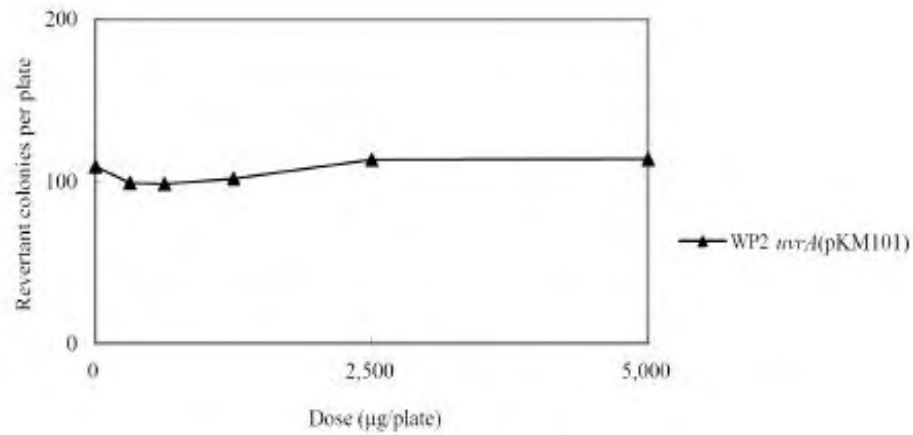


그림 80. Dose-response curve in the absence of metabolic activation (Main study: WP2 *uvrA* (pKM101))

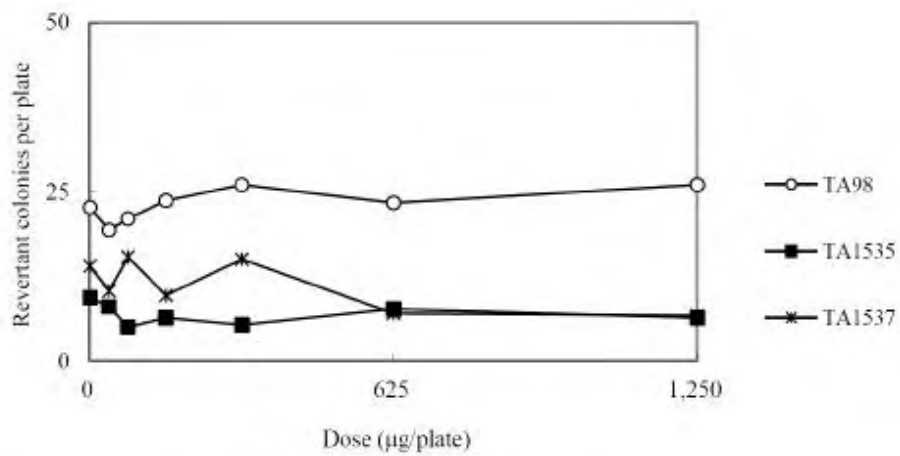


그림 81. Dose-response curve in the presence of metabolic activation (Main study: TA98, TA1535 and TA1537)

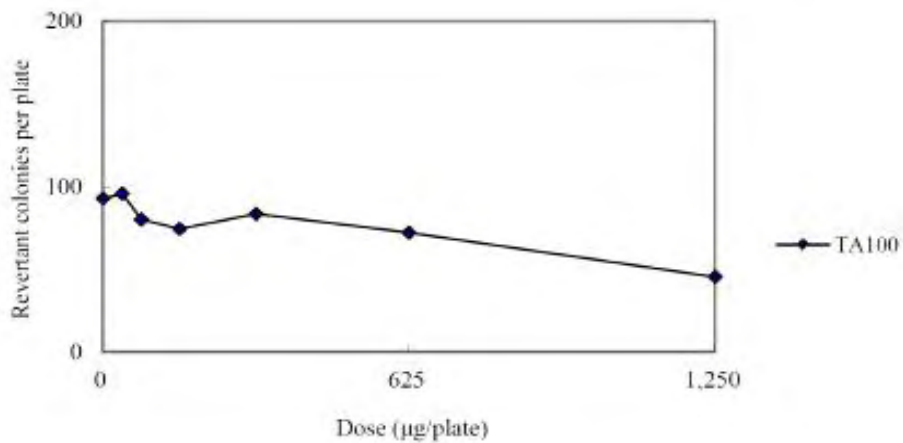


그림 82. Dose-response curve in the presence of metabolic activation (Main study: TA100)

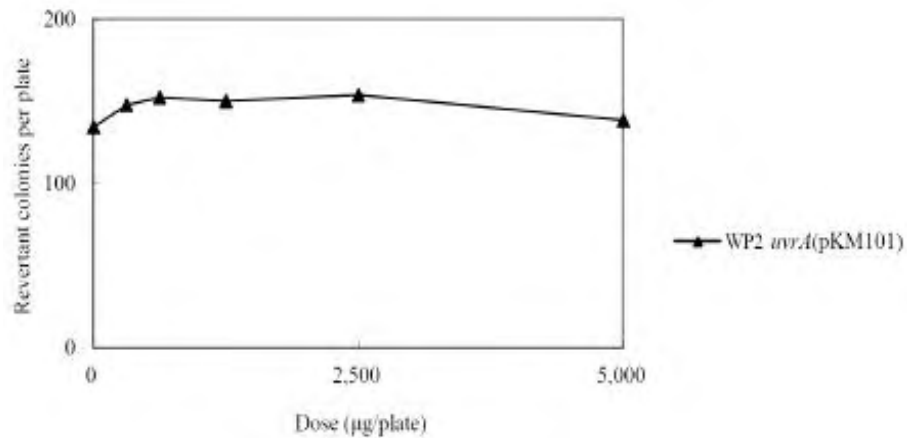


그림 83. Dose-response curve in the presence of metabolic activation (Main study: WP2 *uvrA* (pKM101))

Table 44. The number of revertant colonies per plate in absence of metabolic activation (Main study)

Strain	Test item	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	21 , 12 , 15	16	5
		39.1	12 , 10 , 16	13	3
		78.1	13 , 14 , 7	11	4
		156	10* , 8* , 13*	10	3
		313	10* , 8* , 10*	9	1
		625	11* , 9* , 13*	11	2
		1,250	11* , 9* , 9*	10	1
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	640 , 559 , 625	608	43
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	80 , 73 , 85	79	6
		2.44	63 , 69 , 86	73	12
		4.88	78 , 95 , 80	84	9
		9.77	86 , 96 , 92	91	5
		19.5	76 , 101 , 102	93	15
		39.1	76 , 75 , 68	73	4
		78.1	49* , 58* , 56*	54	5
	Sodium azide (SA)	1.5	479 , 546 , 479	501	39
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	8 , 7 , 8	8	1
		2.44	9 , 7 , 8	8	1
		4.88	8 , 10 , 11	10	2
		9.77	8 , 10 , 6	8	2
		19.5	12 , 7 , 8	9	3
		39.1	10 , 6 , 6	7	2
		78.1	4* , 4* , 7*	5	2
	Sodium azide (SA)	1.5	398 , 418 , 400	405	11
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	4 , 6 , 4	5	1
		2.44	3 , 7 , 5	5	2
		4.88	4 , 4 , 3	4	1
		9.77	6 , 4 , 5	5	1
		19.5	9 , 4 , 5	6	3
		39.1	4 , 3 , 7	5	2
		78.1	2* , 6* , 1*	3	3
	9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	487 , 445 , 327	420	83
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	118 , 124 , 85	109	21
		313	100 , 109 , 88	99	11
		625	100 , 95 , 100	98	3
		1,250	86 , 125 , 94	102	21
		2,500	102 , 113 , 125	113	12
		5,000	120 , 105 , 116	114	8
		0.005	614 , 622 , 634	623	10

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

Table 45. The number of revertant colonies per plate in absence of metabolic activation (Main study)

Strain	Test item	Dose level (μg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	25 , 18 , 25	23	4
		39.1	19 , 27 , 12	19	8
		78.1	19 , 23 , 21	21	2
		156	27 , 16 , 28	24	7
		313	30 , 25 , 23	26	4
		625	22 , 21 , 27	23	3
		1,250	34* , 22* , 22*	26	7
	2-Aminanthracene (2-AA)	1.0	228 , 251 , 223	234	15
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	85 , 105 , 88	93	11
		39.1	90 , 112 , 85	96	14
		78.1	83 , 80 , 77	80	3
		156	82 , 63 , 78	74	10
		313	82 , 89 , 79	83	5
		625	72* , 70* , 74*	72	2
		1,250	51* , 45* , 40*	45	6
	2-Aminanthracene (2-AA)	2.0	726 , 689 , 557	657	89
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	9 , 9 , 10	9	1
		39.1	9 , 10 , 5	8	3
		78.1	6 , 4 , 5	5	1
		156	8 , 7 , 4	6	2
		313	4 , 5 , 7	5	2
		625	8* , 9* , 6*	8	2
		1,250	5* , 7* , 7*	6	1
	2-Aminanthracene (2-AA)	3.0	75 , 92 , 93	87	10
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	16 , 15 , 11	14	3
		39.1	10 , 9 , 12	10	2
		78.1	11 , 17 , 18	15	4
		156	8 , 6 , 15	10	5
		313	16 , 16 , 13	15	2
		625	9* , 6* , 6*	7	2
		1,250	0* , 10* , 10*	7	6
	2-Aminanthracene (2-AA)	3.0	118 , 120 , 89	109	17
WP2uvr4 (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	118 , 130 , 155	134	19
		313	153 , 130 , 160	148	16
		625	153 , 151 , 153	152	1
		1,250	151 , 156 , 143	150	7
		2,500	143 , 168 , 150	154	13
		5,000	138 , 152 , 125	138	14
		2.0	405 , 410 , 411	409	3

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

(3) 확인시험 (그림 84, Table 46)

본시험의 결과, 대사활성화비존재하의 TA98 균주의 156 μg/plate 이상에서 생육저해가 확인되어, 생육저해가 확인되지 않은 4용량 이상이 확보되지 않았다. 따라서 본시험과 동일한 조건 및 방법으로 아래와 같이 확인시험을 실시하였다.

또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	확인시험의 용량 (μg/plate)
TA98	-	156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88

① 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군의 대사활성화비존재하의 TA98 균주의 모든 용량에서 복귀변이 콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

② 시험물질에 의한 생육저해 및 침전: 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 균주의 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 관찰되었다.

이상의 결과로, 용량설정시험, 본시험 및 확인시험에서 재현성이 확보되었기 때문에, 본시험은 음성으로 판정하였다.

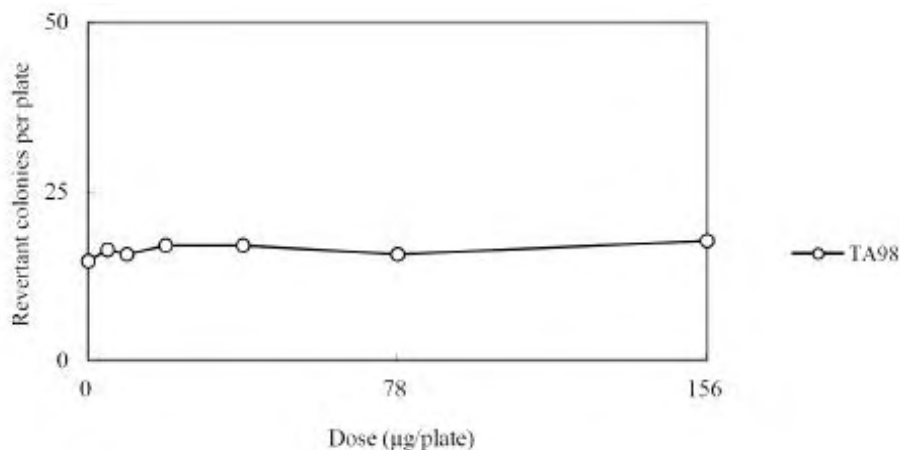


그림 84. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation(Confirmatory: TA98)

Table 46. The number of revertant colonies per plate in absence of metabolic activation (Confirmatory study)

Strain	Test item	Dose level ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	13 , 13 , 18	15	3
		4.88	21 , 11 , 17	16	5
		9.77	16 , 12 , 19	16	4
	LJM-F70	19.5	15 , 18 , 18	17	2
		39.1	19 , 14 , 18	17	3
		78.1	19 , 14 , 14	16	3
		156	16* , 21* , 16*	18	3
	2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	564 , 581 , 687	611	67

S.D.: Standard Deviation

*: Indicated growth inhibition

(4) Historical Control Data

대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치는 historical control data의 범위내에 속하였다 (Table 46).

(5) 시험의 성립

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었다. 또한, 생육저해가 인정되지 않는 용량이 4 용량 이상이었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

(6) 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 (LJM-F70)의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

8. 고품질 생산 및 대량증식 기술 개발

가. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 대량제작

(1) 분말시료 제작 전처리

- 까마귀쪽나무 열매 1000 kg을 구입하여 추출물 제작을 위해 열매에서 종자 분리
- 종자를 분리한 열매의 과육 및 과피를 동결건조기를 이용하여 수분 제거 및 분말시료 제작



1. 원재료 구입



2. 종자분리



3. 동결건조 전처리



4. 동결건조



5. 시료수거



6. 분말시료 포장

그림 85. 분말시료 제작 전처리 과정

(2) 추출물 제작 과정

- 분말시료 40 kg을 기 구축된 최적추출 공정법에 준하여 60 ℃에서 6시간 동안 추출하여 농축
- 동결건조기를 이용하여 수분을 완전히 제거하여 추출물 제작하여 사용



대용량추출공장 전경

대용량추출기

대용량농축기

동결건조기

그림 86. 추출물 제작 활용 장비

나. 우수 개체선발 및 특성조사

(1) 지역별 까마귀쪽나무 잎의 건조 및 추출수율

- 지역별로 채집된 까마귀쪽나무 잎의 건조 및 추출수율은 동결건조기를 사용하여 확인

- 까마귀쪽나무 잎 분말시료 10 g 당 20배에 해당하는 70% EtOH 200 mL에 침출하여 추출
- 건조 (75% 내외) 및 추출수율 (13% 내외)은 조금씩 차이를 보이긴 하였으나 유의적이지는 않음

지역	건조수율(%)	추출량(g)	추출수율(%)
성산	74.9	1.415	14.1
김녕	75.3	1.380	13.8
제주	76.4	1.399	13.9
애월	75.9	1.378	13.7
대정	75.4	1.384	13.8
중문	76.5	1.363	13.6
위미	76.7	1.353	13.5
표선	75.7	1.298	12.9

(2) 지역별 까마귀쪽나무 열매의 건조 및 추출 수율

- 지역별로 채종된 까마귀쪽나무 열매의 건조 및 추출 수율은 동결건조기를 사용하여 확인
- 까마귀쪽나무 열매 분말시료 10 g 당 20배에 해당하는 70% EtOH 200 mL에 침출하여 추출
- 건조 (20% 내외) 및 추출수율 (50% 내외)은 조금씩 차이를 보이긴 하였으나 유의적이지는 않음

지역	건조수율(%)	추출량(g)	추출수율(%)
성산	19.1	4.822	48.2
김녕	19.6	5.191	51.9
제주	20.4	4.879	48.7
애월	20.2	5.295	52.9
대정	20.0	5.282	52.8
중문	20.2	5.040	50.4
위미	20.6	4.981	49.8
표선	19.3	4.898	48.9

(3) 지역별 까마귀쪽나무 잎과 열매 추출물에 대한 효능평가

- 지역별 채집된 까마귀쪽나무 잎과 열매 각각의 70% EtOH 추출물에 대한 관절염 유발인자 NO와 PGE₂ 생성 억제 효능을 평가
- NO와 PGE₂ 생성 억제 효능이 조금씩 차이를 보이긴 하였으나 유의적이지는 않음

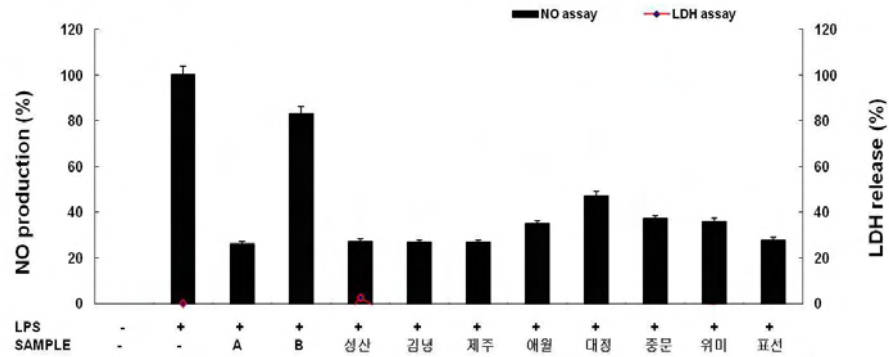


그림 87. 지역별 까마귀쪽나무 잎 70% EtOH 추출물 (50 ug/mL)의 NO 생성 억제 효과
A: 2-amino-4-methylpyridine (10 uM), B: Dexamethason (10 uM)

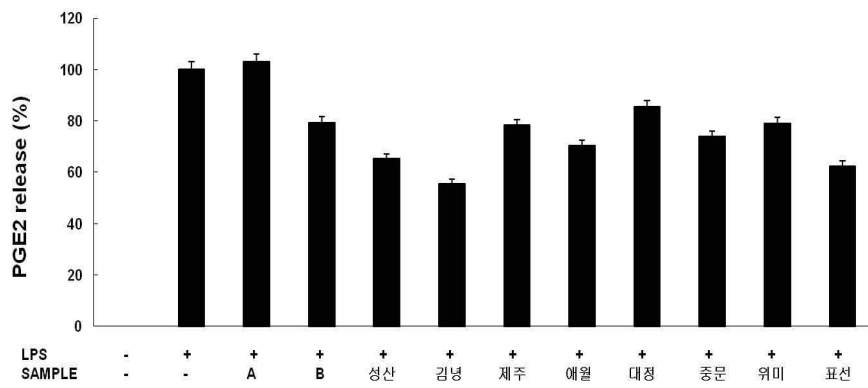


그림 88. 지역별 까마귀쪽나무 잎 70% EtOH 추출물 (50 ug/mL)의 PGE₂ 생성 억제 효과
A: 2-amino-4-methylpyridine (10 uM), B: Dexamethason (10 uM)

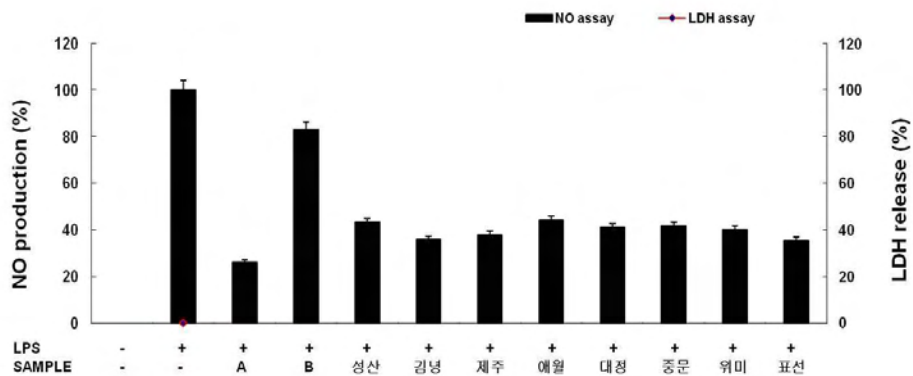


그림 89. 지역별 까마귀쪽나무 열매 70% EtOH 추출물 (10 ug/mL)의 NO 생성 억제 효과
A: 2-amino-4-methylpyridine (10 uM), B: Dexamethason (10 uM)

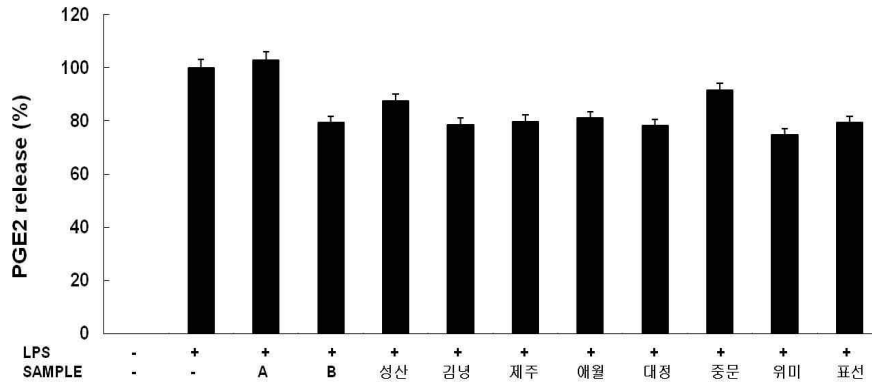


그림 90. 지역별 까마귀쪽나무 열매 70% EtOH 추출물 (10 ug/mL)의 PGE₂ 생성 억제 효과
A: 2-amino-4-methylpyridine (10 uM), B: Dexamethason (10 uM)

(4) 지역별 까마귀쪽나무에 대한 유전자 분석 (유전적 집단 연구)

- 지역별 채집된 까마귀쪽나무에 대한 유전적 차이 확인을 위한 유전자 분석
- 지역별로 미세한 차이는 있으나 유전적으로 동종임을 확인

(가) 실험방법

- 제주지역 8개소 (성산읍, 표선면, 제주시, 김녕/함덕, 애월읍, 대정읍, 중문동, 위미리)에서 까마귀쪽나무 잎을 채취 한 후, Genomic DNA Extraction Kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였음
- 식물 분자계통 및 집단연구에 주로 사용되는 Internal transcribed spacer (ITS) region에 대한 Polymerase chain reaction (PCR)을 위해 Universal Primer인 ITS1과 ITS4를 이용하였음.
- 증폭된 PCR product는 Sequencing하여 염기서열을 결정하였음
- 지역별 각 개체의 염기서열은 MEGA5 software를 이용하여 정렬하였고, Neighbor-joining (NJ)과 Maximum likelihood (ML) 방법을 이용하여 계통수를 작성하였음
- 이 밖에, DNAsp5 software를 이용하여 Haplotype을 결정하였고, 까마귀쪽나무 집단의 유전적 특성 등을 분석하였음.구

(나) 실험결과

Table 47. 까마귀쪽나무 집단의 유전적 특성

Species	SL	S	N	v	k	h (SD)	π (SD)
<i>Litsea japonica</i>	727	34	27	54	3.394	0.950 (0.032)	0.005 (0.001)

SL, sequence length; S, sample size; N, number of haplotypes; v, variable sites; k, average nucleotide difference; h, haplotype diversity; π , nucleotide diversity; SD, standard deviation.



그림 91. 지역별 까마귀쪽나무 ITS PCR product 전기영동 사진

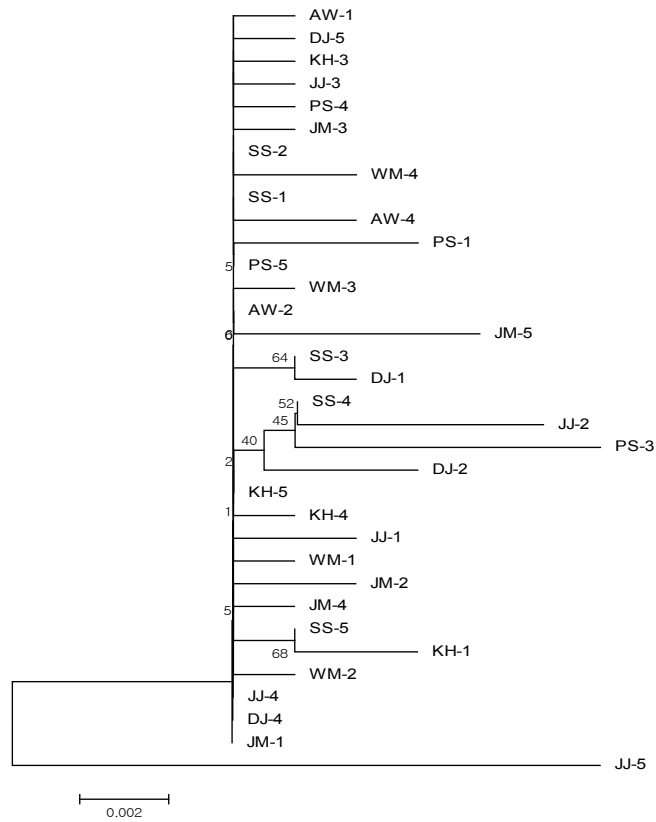


그림 92. 지역별 까마귀쪽나무 ITS 염기서열을 이용한 NJ tree.

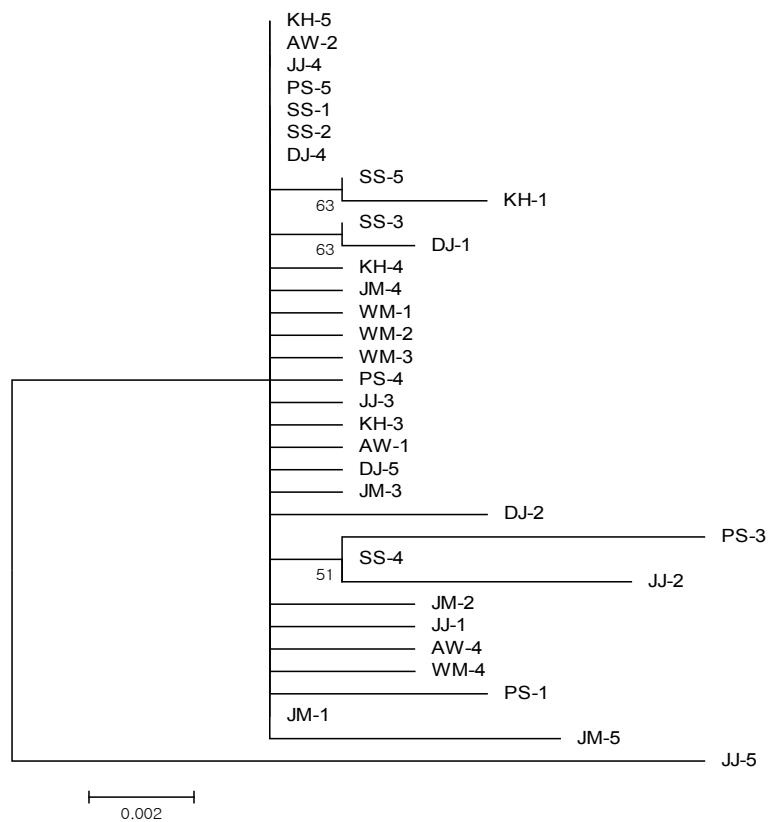


그림 93. 지역별 까마귀쪽나무 ITS 염기서열을 이용한 ML tree

(5) 까마귀쪽나무 대량증식 기술 개발

- 안전한 원료 확보를 위한 대량증식 기술 개발은 제주특별자치도 농업기술원 농산물원종장과 연계하여 4월에 채종한 종자를 선별하여 5월 초에 농산물원종장 내 하우스 (165.3 mm²)에 종자 50 kg을 파종
- 파종 후 30일 이후 종자 발아가 이루어 졌으며, 발아율이 **90% 이상** 약 12,000본으로 파종에 의한 대량 증식 가능성 확인



1. 종자채종



2. 종자선별 및 파종(5월 초)



3. 종자발아(6월)



3-1. 하우스 전경



4. 발아 후 생장(9월)



4-1. 하우스 전경

그림 94. 까마귀쪽나무 대량증식 과정

(6) 까마귀쪽나무 열매 대량 확보 계획

(가) 1차 대량 확보 계획

- ① 본격적인 상품화는 2015년도부터 진행할 계획을 가지고 있음
- ② 2018년도까지는 전량 제주지역의 영농조합법인 등을 통하여 확보하고자 함

(나) 2차 대량 확보 계획

- ① 2019년도부터는 2013년도부터 진행한 재식 등을 통하여 일부 자체적으로 조달하고자 함



그림 95. 까마귀쪽나무 열매 확보를 위한 자체 재식 현황 (2013년 기준)

9. 인체적용시험

기반 연구에서 확인된 기질 분해 억제에 의한 관절 건강 개선 효과가 인체적용시험을 통해 확인됨.

(1) 연구결과

- VAS scale로 측정된 pain score의 개선폭이 시험군에서 농도의존적으로 유의하게 증가함 ($p < 0.001$)

	(Unit: mm)			
	Placebo (n=28)	LJF-L (n=26)	LJF-H (n=25)	P-value ²⁾
Week 0	35.3 ± 4.3 ^{a,3)}	34.3 ± 2.7 ^a	46.1 ± 4.2 ^b	0.045
Week 4	35.8 ± 4.0	29.8 ± 4.1	36.8 ± 4.0	0.345
Week 8	34.3 ± 4.4	28.5 ± 3.3	29.1 ± 3.4	0.579
Week 12	44.9 ± 5.4 ^a	25.0 ± 3.8 ^b	22.8 ± 2.7 ^b	0.006
Changes	9.6 ± 6.3 ^a	-9.3 ± 2.8 ^b	-23.3 ± 3.7 ^c	<0.001
P-value ⁴⁾	0.171	0.002	<0.001	

1) Mean ± SE, a decrease indicates an improvement in symptom

2) Kruskal-Wallis test

3) Different letters in same row are significantly different

4) Wilcoxon signed rank test

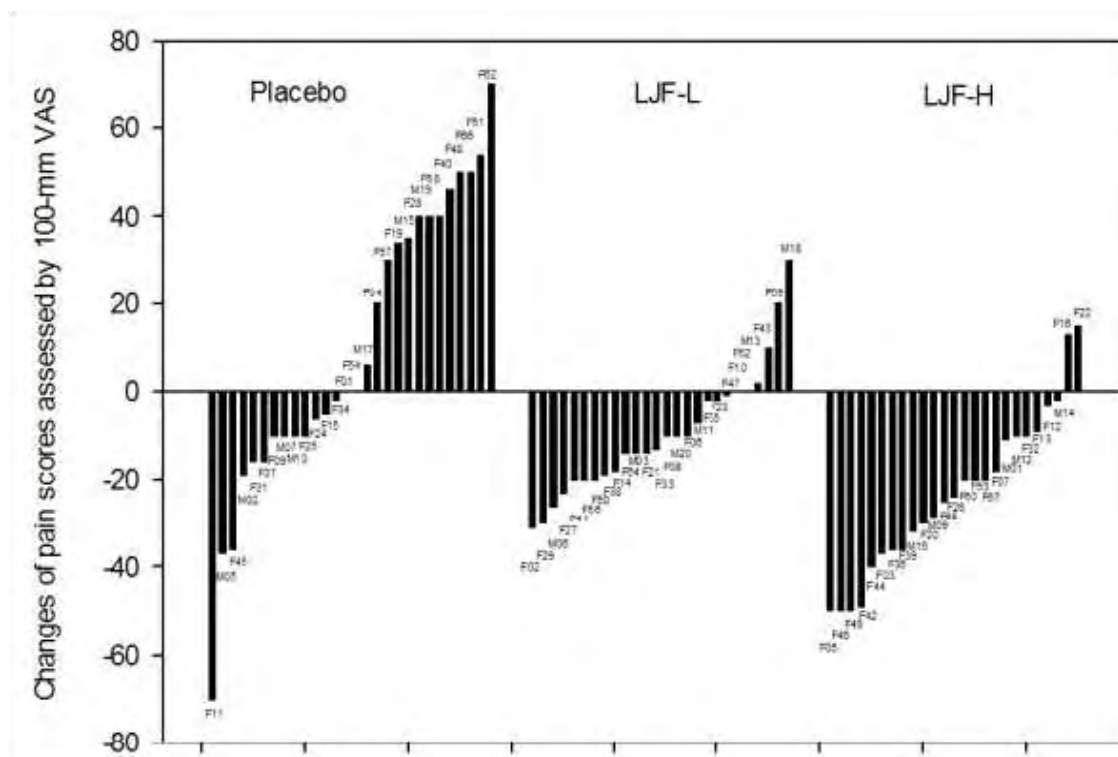


그림 96. Numbers on each bar indicate the subject numbers. A decrease indicates an improvement in symptom.

(가) WOMAC score가 시험군에서 유의하게 개선됨

- 총 점수, 뻣뻣함, 기능저하의 점수가 농도의존적으로 개선되며, 고용량군에서 대조군 대비 유의한 효과를 나타냄 (각 지표에서 각각 $p=0.019$, 0.004 , 0.032)
- 통증 점수가 농도의존적으로 개선되며, 고용량군에서 섭취전 대비 유의한 개선 효과가 나타남 ($p=0.003$)

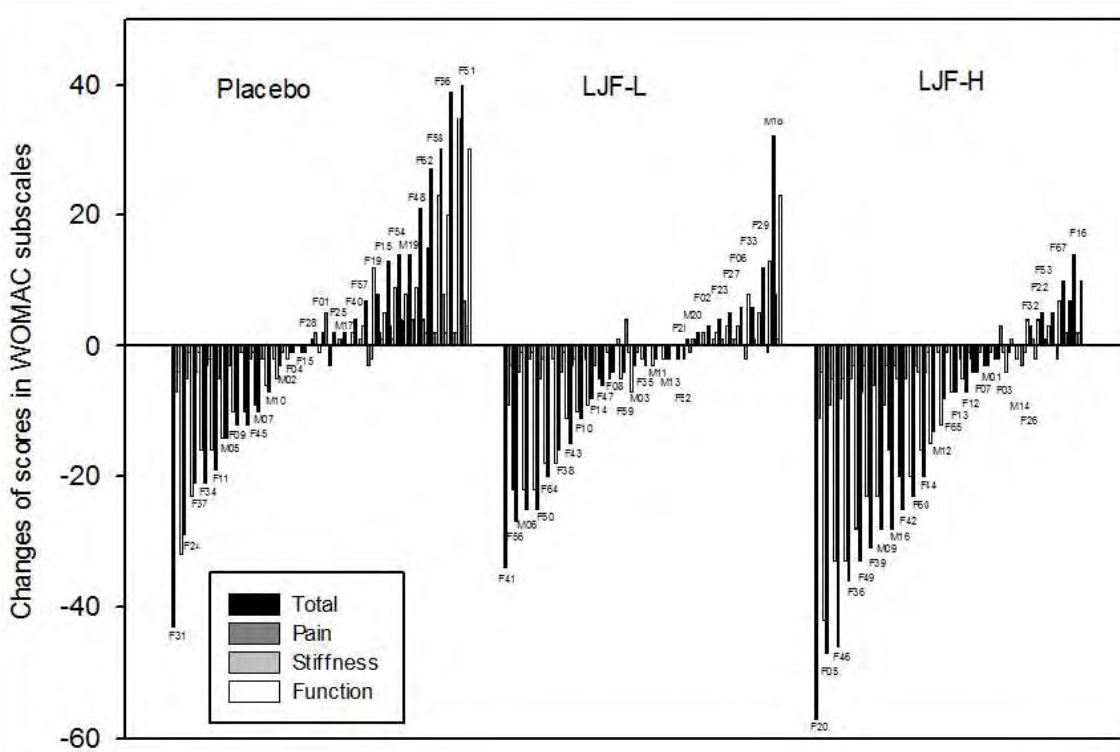


그림 97. Numbers on each bar indicate the subject numbers. A decrease indicates an improvement in symptom.

WOMAC scores ¹⁾				(Unit: score)
	Placebo (n=28)	LJF-L (n=26)	LJF-H (n=25)	P-value ²⁾
Total				
Week 0	20.50 ± 2.99	22.27 ± 3.01	28.60 ± 3.89	0.305
Week 4	19.46 ± 3.22	16.69 ± 2.78	19.48 ± 2.95	0.745
Week 8	17.32 ± 3.26	16.58 ± 2.34	16.80 ± 2.52	0.818
Week 12	21.61 ± 3.32	17.04 ± 2.30	13.32 ± 2.25	0.215
Changes	1.11 ± 3.72 ^{a3)}	-5.23 ± 2.74 ^a	-15.28 ± 3.86 ^b	0.019
P-value ⁴⁾	0.765	0.070	<0.001	
Pain				
Week 0	3.64 ± 0.51	3.88 ± 0.55	5.24 ± 0.76	0.299
Week 4	4.04 ± 0.71	2.73 ± 0.47	3.12 ± 0.53	0.534
Week 8	3.46 ± 0.71	2.96 ± 0.52	2.84 ± 0.51	0.977
Week 12	3.82 ± 0.65	3.15 ± 0.52	2.56 ± 0.35	0.729
Changes	0.18 ± 0.69 ^a	-0.73 ± 0.60 ^{ab}	-2.68 ± 0.78 ^b	0.076
P-value ⁴⁾	0.813	0.144	0.003	
Stiffness				
Week 0	1.86 ± 0.28	2.23 ± 0.30	3.00 ± 0.38	0.100
Week 4	1.96 ± 0.31	1.73 ± 0.25	1.96 ± 0.29	0.832
Week 8	1.50 ± 0.32	1.92 ± 0.23	1.56 ± 0.28	0.306
Week 12	1.89 ± 0.24	1.77 ± 0.14	1.32 ± 0.24	0.114
Changes	0.04 ± 0.31 ^a	-0.46 ± 0.24 ^a	-1.68 ± 0.39 ^b	0.004
P-value ⁴⁾	0.810	0.076	<0.001	
Function				
Week 0	15.00 ± 2.30	16.15 ± 2.32	20.36 ± 2.90	0.438
Week 4	13.46 ± 2.30	12.23 ± 2.18	14.40 ± 2.27	0.776
Week 8	12.36 ± 2.33	11.69 ± 1.74	12.40 ± 1.90	0.886
Week 12	15.89 ± 2.56	12.12 ± 1.79	9.44 ± 1.78	0.169
Changes	0.89 ± 2.88 ^a	-4.04 ± 2.12 ^{ab}	-10.92 ± 2.84 ^b	0.032
P-value ⁴⁾	0.921	0.061	0.001	

1) Mean ± SE, a decrease indicates an improvement in symptom

2) Kruskal-Wallis test

3) Different letters in same row are significantly different

4) Wilcoxon signed rank test

- X-ray로 관찰한 슬관절 협착 정도가 실험 원료군에서 대조군보다 많음
- 혈청 MMP-3 수준이 대조군 대비 유의하게, MMP-9 수준은 농도의존적으로 섭취전 대비 유의한 감소 효과를 보임 (p<0.05)
- 혈액 COMP, IL-6, CRP fructosamine, TIMP-1, ESR와 소변 CTX-II는 군간 변화 없었음.

Biomarkers in blood and urine ¹⁾

	Placebo (n=28)	LJF-L (n=26)	LJF-H (n=25)	P-value ²⁾
<u>Blood</u>				
MMP-3 (ng/ml)				
Week 0	16.33 ± 1.82	13.96 ± 1.79	12.95 ± 1.20	0.357
Week 12	15.89 ± 1.76	16.24 ± 2.17	11.53 ± 1.41	0.097
Changes	-0.44 ± 1.64	2.28 ± 1.15	-1.41 ± 1.22	0.066
% change	7.09 ± 10.09 ^{ab 3)}	24.08 ± 11.04 ^a	-6.09 ± 10.80 ^b	0.034
P-value ⁴⁾	0.929	0.114	0.073	
MMP-9 (ng/ml)				
Week 0	220.44 ± 16.88	258.01 ± 22.25	268.62 ± 28.24	0.491
Week 12	223.70 ± 18.78	226.87 ± 19.88	194.77 ± 17.39	0.381
Changes	3.26 ± 15.25	-31.14 ± 21.60	-73.85 ± 24.44	0.111
% change	9.82 ± 10.92	-7.15 ± 6.09	-15.81 ± 6.92	0.111
P-value ⁴⁾	0.563	0.017	0.005	
COMP (ng/ml)				
Week 0	317.46 ± 44.38	248.54 ± 18.26	282.35 ± 20.95	0.359
Week 12	262.23 ± 17.58	243.51 ± 11.93	257.76 ± 18.77	0.856
Changes	-55.23 ± 35.85	-5.03 ± 16.27	-24.59 ± 19.10	0.815
% change	-4.95 ± 5.94	13.71 ± 15.41	-3.36 ± 6.63	0.806
P-value ⁴⁾	0.248	0.630	0.166	
TIMP-1 (ng/ml)				
Week 0	73.18 ± 3.08	69.90 ± 3.65	68.17 ± 3.13	0.284
Week 12	71.06 ± 3.13	75.49 ± 4.40	65.82 ± 2.84	0.370
Changes	-2.12 ± 4.27	5.59 ± 5.34	-2.35 ± 4.09	0.469
% change	1.14 ± 6.08	14.48 ± 9.79	0.70 ± 6.11	0.500
P-value ⁴⁾	0.496	0.351	0.574	
IL-6 (pg/ml)				
Week 0	1.63 ± 0.16	1.37 ± 0.22	9.15 ± 7.23	0.152
Week 12	1.93 ± 0.26	1.52 ± 0.19	11.17 ± 9.60	0.446
Changes	0.30 ± 0.24	0.14 ± 0.26	2.02 ± 2.40	0.719
% change	40.29 ± 21.32	54.22 ± 24.56	7.97 ± 17.12	0.233
P-value ⁴⁾	0.331	0.225	0.907	
CRP (mg/dL)				
Week 0	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.924
Week 12	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.716
Changes	0.06 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.783
% change	227.4 ± 108.0	50.8 ± 21.8	67.2 ± 41.5	0.707
P-value ⁴⁾	0.085	0.077	0.261	

Biomarkers in blood and urine ¹⁾

	Placebo (n=28)	LJF-L (n=26)	LJF-H (n=25)	P-value ²⁾
ESR (mm/h)				
Week 0	12.54 ± 1.35	12.77 ± 1.58	10.80 ± 0.95	0.674
Week 12	14.93 ± 1.61	14.08 ± 1.73	13.56 ± 1.61	0.793
Changes	2.39 ± 1.66	1.31 ± 1.43	2.76 ± 1.18	0.513
% change	59.26 ± 22.79	28.11 ± 14.65	36.86 ± 19.29	0.363
P-value ⁴⁾	0.143	0.739	0.048	
Fructosamine (mmol/L)				
Week 0	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.855
Week 12	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.409
Changes	-0.02 ± 0.02	-0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.325
% change	-2.41 ± 6.64	-4.14 ± 4.75	6.02 ± 4.80	0.396
P-value ⁴⁾	0.602	0.245	0.250	
MDA (umol/L)				
Week 0	28.35 ± 1.51	29.01 ± 2.04	29.90 ± 2.13	1.000
Week 12	26.15 ± 1.82	24.69 ± 1.72	25.45 ± 1.79	0.950
Changes	-2.21 ± 1.32	-4.32 ± 1.39	-4.45 ± 1.60	0.416
% change	-6.70 ± 4.95	-13.21 ± 4.22	-9.19 ± 7.15	0.536
P-value ⁴⁾	0.142	0.003	0.007	
<u>Urine</u>				
CTX-II (ng/mmol creatinine)				
Week 0	59.99 ± 17.66	42.36 ± 10.58	66.02 ± 12.51	0.341
Week 12	83.82 ± 19.42	50.81 ± 9.43	66.68 ± 25.58	0.474
Changes	23.83 ± 27.07	8.45 ± 8.34	0.66 ± 27.25	0.385
% change	1105.53 ± 463.34	89.80 ± 36.94	83.76 ± 48.06	0.451
P-value ⁴⁾	0.436	0.148	0.556	

1) Mean ± SE

2) Kruskal-Wallis test

3) Different letters in same row are significantly different.

4) Wilcoxon signed rank test

(2) 결론

신청원료로 수행한 세포 및 동물시험에서 신청 원료의 관절 건강 개선 효과가 염증성 사이토카인 및 기질분해 효소 억제 기전에 의한 것임을 확인함

- 대식세포에서 PGE_2 , NO 생성 및 iNOS 단백질 발현, IL-1 β , IL-6 생성이 유의하게 감소함 ($p<0.05$)
- 골관절염 동물 모델에서 혈청 IL-6, IL-1 β , TNF- α 수준과 연골의 MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 mRNA 발현이 유의하게 감소함 ($p<0.05$)
- 통증 유발 연구에서 통증 관련 행동이 감소하고 통증 유발 시간이 유의하게 증가함 ($p<0.05$). 인체연구에서는 노화로 인한 골관절염으로 고통을 호소하는 중년 이상 대상자에게 신청원료 200 mg/d를 12주간 섭취시켰을 때 MMP-3, MMP-9가 유의하게 감소하였고, 이러한 결과 pain score, WOMAC 총 점수, 뻣뻣함, 기능저하가 대조군 대비 유의하게 개선되는 것이 관찰됨 ($p<0.05$). 따라서 신청원료의 기능성은 “연골의 손상을 억제함으로써 관절건강 개선에 도움을 줄 수있음” 으로 제안하며, 이때의 일일섭취량은 200 mg 임

10. 시작품제작 및 품질관리

가. 디자인 개발

(1) 1차 디자인 개발

- ① 디자인개발 내용 : 브랜드를 활용하여 1차적으로 상품화를 추진하고 있는 타블렛 제품에 대한 디자인 개발.
- ② 최종적으로 상품화를 추진하는 제품 : 건강기능식품 중 선호도가 높은 제형으로, 홈쇼핑 및 마케팅적으로 활용하기 위하여 병 포장이 아닌, 날개 포장형태의 제품을 개발하고자 함.



그림 98-1. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 제품의 디자인 시안 [1]



그림 98-2. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 제품의 디자인 시안 [2]

(2) 시제품 제작용 최종디자인



그림 99-1. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 타블렛 제형의 시제품 디자인 시안



그림 99-2. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 캡슐 제형의 시제품의 디자인 시안

나. 시작품제작

(1) 제형별 최종 레시피

① 관절엔 활작 타블렛

원료명	함량(%)
까마귀쪽나무열매주정추출물(제주산)	20.00
덱스트린	X.XX
결정셀룰로오스	X.XX
유당(우유)	X.XX
히드록시프로필메틸셀룰로오스	X.XX
기타 (이산화규소 외)	X.XX

② 관절엔 활작 캡슐

원료명	함량(%)
까마귀쪽나무열매주정추출물(제주산)	20.00
말토덱스트린	X.XX
기타 (이산화규소 외)	X.XX

(2) 타블렛제품의 영양성분 분석 : 공인기관의뢰 분석

분석항목	분석결과 분석	비 고(%영양소기준치)
열량	392.1 kcal / 100g	
탄수화물	87.2 g / 100g	26.4 %
단백질	1.4 g / 100g	2.5 %
지방	4.2 g / 100g	8.2 %
나트륨	66.0 mg / 100g	3.3 %
포화지방	3.2 g / 100g	21.3 %
트랜스지방	0.00 g / 100g	-
당	15.4 g / 100g	-
콜레스테롤	1.8 mg / 100g	0.6 %

다. 타블렛 제품의 자체 품질관리

(1) 제조 년 · 월 · 일 : 2014. 10. 20.

(2) 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

(3) 가속시험 1차 시험일 및 시험결과 : 2014. 10.20. ~ 10.23

제조번호	관절엔 활작 타블렛		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

(4) 가속시험 2차 시험일 및 시험결과 : 2014. 11.19.~11.21

제조번호	관절엔 활작 타블렛		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

(5) 가속시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2014. 12.17.~11.19

제조번호	관절엔 활작 타블렛		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

(5) 가속시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2015. 01.14.~01.16

제조번호	관절엔 활작 타블렛		
시험항목	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분함량	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

11. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 상품화 전략 (마케팅전략수립 포함)

가. 브랜드개발 (휴림자체 수행)

(1) 브랜드개발방향

- ① 휴림의 골관절염개선효능관련 건강기능식품 소재 개발은 기존의 글루코사민 소재의 대체 원료소재로의 접근
- ② 브랜드개발의 접근방법 : 기존의 제품의 분석과 제품의 소비자의 연령층 등을 고려하여 한 번에 알아들을 수 있는 것과 효능을 직관적으로 이해할 수 있는 방향으로 접근



Approach



한번에 알아 들을 수 있게... , 효능을 직관적으로 이해할 수 있게...

그림 100. 까마귀쪽나무 열매 소재를 상품화에 따른 브랜드 개발 방향

나. 마케팅전략수립

(1) 개별인정소재로서의 마케팅전략 수립 방향

- ① 『까마귀쪽나무 열매 원료소재를 이용한 골관절염 제품화』에 따른 마케팅 전략 수립은 환경을 분석하고 타겟팅과 포지셔닝을 설정하고 마케팅 전략을 수립하는 과정으로 수행 었음.
- ② 마케팅전략수립 보고서는 총 72페이지의 PPT 자료로 작성되어 있으며, 이중 회사의 전략과 관련 있는 부분을 제외하고 일반적인 일부를 요약하여 첨부함.

(2) 마케팅전략 보고서 (1) : 표지 및 목차

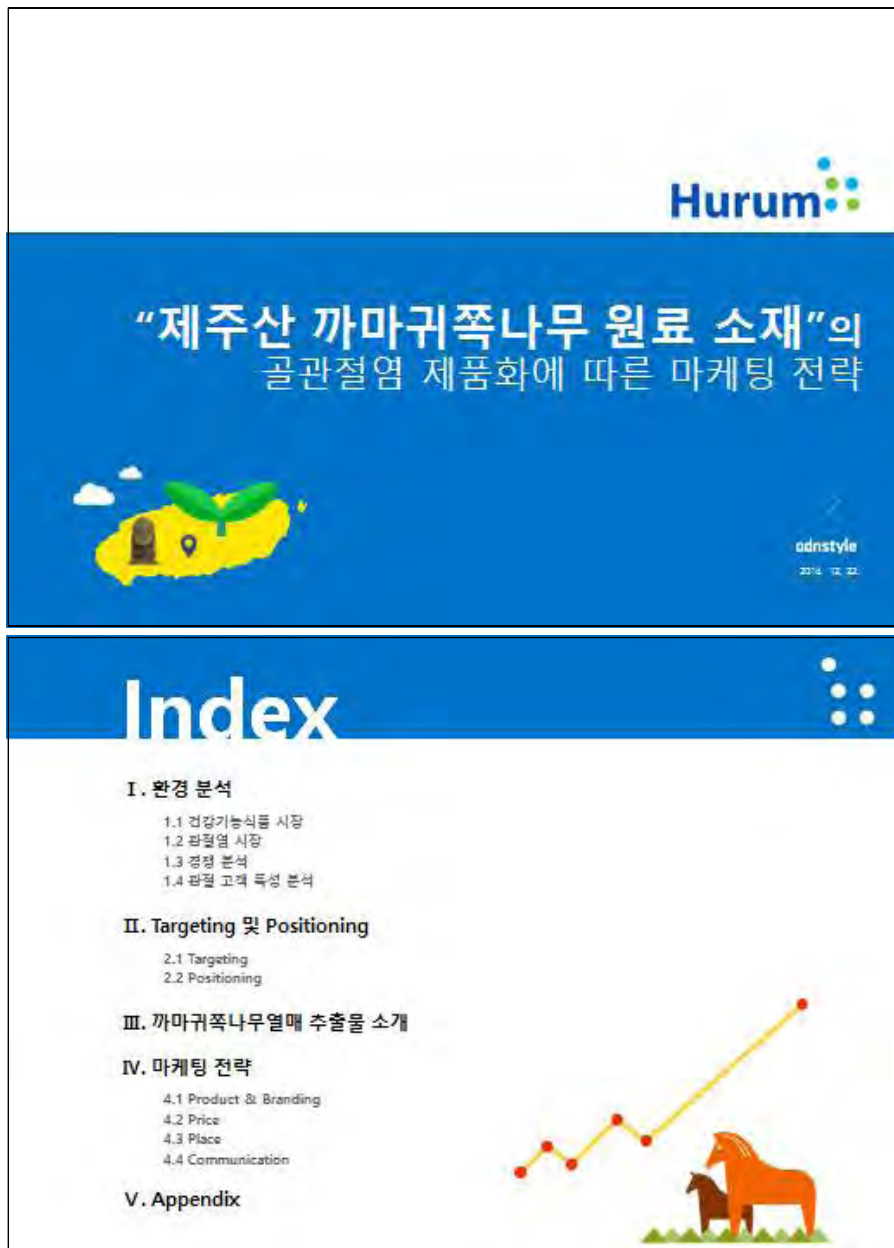


그림 101. 마케팅전략보고서 (1) : 표지 및 목차

(3) 마케팅전략 보고서 (2) : 환경분석 (일부 생략)

The image is a presentation slide. In the top right corner, the 'Hurum' logo is displayed in white text with a small graphic of four colored dots (blue, green, yellow, and red) to its right. The main content area is a dark grey rectangle on the left side of the slide. Inside this rectangle, the text 'I. 환경 분석' is written in a large, bold, white font. Below it, the text '01. 건강기능식품 시장' is written in a smaller, bold, white font. Underneath that, there are three lines of text: '02. 관절염 시장', '03. 경질 분석', and '04. 관절 고객 특성 분석', all in a smaller, regular white font. In the bottom right corner of the slide, there is a stylized graphic of the number '01' in white, with a yellow cloud-like shape behind it and a small white cloud above the '1'. A small white location pin icon is also visible near the bottom of the '01' graphic.

[illegible][illegible][illegible]

국내 건강기능식품 시장은 꾸준히 성장하고 있으나 최근 성장세가 감소하고 있으며, 주요 채널은 방문판매 등 직접판매 채널임

국내 건강기능식품 생산액 순위 (2009~2015)

연도	생산액 (억 원)	증감률 (%)
2009	9,598	18.5%
2010	10,671	11.2%
2011	13,688	28.2%
2012	14,099	3.0%
2013	14,820	5.2%

국내 건강기능식품 유통 채널 구성 (2012)

유통 채널	비율 (%)
방문	29.6%
다인제	29.6%
방문판매	33.9%
대리점	7.7%
홈쇼핑	5.9%
인터넷	3.1%
기타	7.5%

시장 규모 국내 건강기능식품 시장이 2009년 9,598억원에서 2015년 14,820억 7,000원으로 54.9% 증가한 것으로 조사되며 가계 4.4%에 해당함

시장 전망 꾸준히 성장하고 있으나 성장률률 감소하여 3% 이하로 전망됨

주 채널 방문 판매율 33.9%로 직접판매/가정직접 판매가 12.1%로 가장 높은 비중을 차지함

주요 브랜드 > 10억 원의 매출을 올린 브랜드는 28.6%로 11.2%, 대외점 7.7%, 홈쇼핑 5.9%, 인터넷 3.1%, 기타 7.5%로 구성됨
> 1억 원 이상 매출을 올린 브랜드는 2,000개, 10억 이상 매출을 올린 브랜드는 145개, 100억 이상 매출을 올린 브랜드는 17개, 1,000억 이상 매출을 올린 브랜드는 1개임

출처: KITA, KITA, KITA, KITA

**개별 인정형 463건 중 상위 4품목이 시장의 77% 점유하고 있으며
기종 방판, 알배, 매장 재질의 유통력을 활용하여 시장을 견인**

개별 인정형 전로보 생산실적 (2013)

순위	구분	승점(상위4품목)				점점의 점진율	주요 소재	주요 기계
		11년	12년	13년	증감률			
	개별 인정형 총계	1,438	1,807	2,324	100	28.6		
1	역수조출력발생유닛	48	100	704	30.3	694.2	경판/인	전로, KSC
2	전자노출발생유닛	349	332	541	23.3	7	간판/인	전로/인
3	전자노출발생유닛	140	245	314	13.5	23.2	판재	재판/인
4	마사지유닛	4	147	228	3	23.8	판재	전로/인
5	상표 4품목 총계	233	294	1,785	77	79.5		
3	물리노출발생유닛	-	-	83	2.7	-	판재/인	전로
6	전자노출발생유닛	71	41	48	2.1	17.3	판재	전로/인
7	초음파노출발생유닛	29	28	98	3.5	28.6	판재	전로
8	자외선노출발생유닛	-	81	27	1.2	13.7	판재/인	전로/인
9	사출성형노출발생유닛	23	19	23	1.0	21.1	판재	전로
10	전자노출발생유닛	20	21	22	0.9	4.5	판재	전로
	상위 10품목 총계	888	1,164	2,007	38.4	72.4		

[illegible][illegible]

그림 102. 마케팅전략보고서 (2) : 환경분석 (1)

**관절 연골의 손상으로 통증 등이 발생하는 관절염 중
퇴행성 관절염(골관절염)이 가장 대표적이며 향후 주요 타겟 고객임**

관절염 발생 원인과 위치

• 퇴행성 관절염

• 류마티스 관절염

● 퇴행성 관절염
● 류마티스 관절염

관절염 정의

관절염이란 관절의 6가지 구성 요소(관절 연골, 활막, 인대, 관절낭, 관절강 내의 윤활액 등)가 손상되어 통증을 유발하는 질환

관절염의 종류

관절염은 분류상 200여 가지로 분류되나 가장 흔하게 발생하는 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등이 있다

퇴행성 vs 류마티스

- 퇴행성 관절염
 - 관절의 움직임에 따라 관절 연골이 손상되는 퇴행성 질환
 - 관절염의 80% 정도를 차지하며, 노년층에 많이 발생하며, 만성적으로 진행되는 질환임
- 류마티스 관절염
 - 관절염의 20% 정도를 차지하며, 주로 젊은 층에서 발생함
 - 관절염의 20% 정도를 차지하며, 주로 젊은 층에서 발생함
 - 관절염의 20% 정도를 차지하며, 주로 젊은 층에서 발생함

관절염의 위험인자

노년, 여성, 과체중, 관절의 과사용, 관절의 외상, 유전적 요인 등




I. 환경 분석

- 01. 건강기능식품 시장
- 02. 관절염 시장
- 03. 경쟁 분석**
- 04. 관절 고객 특성 분석



의료 / 비의료적 접근 모두 근원적인 치료보다는 증상의 완화 및 약학의 방지가 목적이며 약물요법 및 통증 관리 제품이 시장을 리드			
구분	치료/관리수단	시장 규모	관련 이미지
관절염 치료의 목표	약물/수술 요법 <ul style="list-style-type: none"> • 제2차원 관절/수술 • 진통제/소염제 • 활액 주사 (하이알루론산) • 관절 수술 (인공관절) 	<ul style="list-style-type: none"> • 400억 추정 • 4,100억 (2016년) 	
중증의 최소화	한방 치료 <ul style="list-style-type: none"> • 침 / 봉침 • 약침요법 (봉침) • 약방 • 침치료 	<ul style="list-style-type: none"> • 2000억~3000억 원의 시장 	
관절 약화 방지	운동/물리 치료 <ul style="list-style-type: none"> • 운동치료/물리치료 • 전기치료 • 운동요법 • 재활요법 	<ul style="list-style-type: none"> • 재활치료 및 물리치료를 동시에 진행 	
관절염 치료는 장기적인 치료로 병행과 관리가 중요하다	건강기능 식품 <ul style="list-style-type: none"> • 콜лаг겐 보충제 • 콘드로이틴 보충제 • 히알루론산 보충제 • 오메가3 지방산 보충제 	<ul style="list-style-type: none"> • 700억 추정 • 2000억 추정 • 2000억 추정 • 2000억 추정 	



I. 환경 분석

01. 건강기능식품 시장
02. 관절염 시장
03. 경쟁 분석
04. 관절 고객 특성 분석



관절 건강 식품의 시장 점유율 및 글루코사민 시장 규모는 축소되고 있으며 이는 대로 제품인 글루코사민 호스에 대한 몰입에 기인

관절 건강 식품 및 글루코사민 동향

한국 보건복지 연구원 발표 및 관원모드(09,10년)

연도	관절 건강 식품 시장 점유율 (%)	글루코사민 시장 규모 (억 원)
2007	8.9%	1,305억
2008	8.9%	1,044억
2009	8.4%	992억
2010	8.3%	922억
2011	8.4%	849억
2012	7.9%	798억

출처: 한국보건복지연구원 발표, 관원모드(09,10년)

관절염 자가 증상으로는 통증이 가장 많으며 상태가 심각한 고객은 통증, 상태가 보통 이상인 고객은 관절 영양공급으로 제품 구매

관절염 병원 자가 증상 (평균 2개 보유)

관절염 병원 자가 증상	비율 (%)
통증이 있다	61.3
재려다	37.5
멎었다	36.3
구부러져 배가 불편하다	35.0
움직여야만 소리가 난다	35.0
쏘는다	17.5

(base: 진료 출원자, N=807%)

관절 건강기능식품 구매 시 중요도 요인

관절 건강기능식품 구매 시 중요도 요인	상당 심각 (N=20)	상당 보통 (N=29)	상당 필요 (N=42)
관절 영양공급	13.3	46.4	45.5
영양 재생	36.7	21.4	31.8
관절 통증 해소	43.3	17.9	13.6
관절염 진행 속도 완화	6.7	14.3	4.5
보충제	0.0	0.0	4.5

출처: 관절염 예방 건강기능식품 (관절염 예방) (관절염 예방) (관절염 예방)

[illegible]

그림 103. 마케팅전략보고서 (2) : 환경분석 (2)

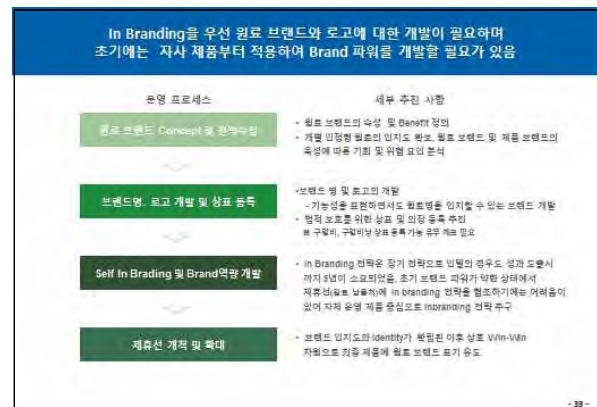


그림 106. 마케팅전략보고서 (4) : 마케팅전략 (2)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	생산 판매 신고 수입 품수	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	1							1	1	학술발표 2
2차년도	1							1	1	학술발표 2
3차년도	2	1	1					2	1	학술발표 2
계	4	1	1					4	3	6

2. 연구성과 목표의 달성도

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				세미나 발표	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록명	생산 판매 신고 수입 품종	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	1									학술발표 2
2차년도	1									학술발표 2
3차년도	1						1	2		학술발표 4
계	3						1	2		8

가. 특허출원: 성과활용 1차년도 협동기관에서 특허 출원 예정(제품생산 전 상표출원)

나. 특허등록: 1차년도 출원한 특허가 현재 특허청 온라인상에 공개되어 있으며 향후 등록 예정

다. 품종명칭 등록: 품종명칭 등록은 까마귀쪽나무 제품화 사례가 없어서 개별인정형 건강기능식품 원료 소재 등록 후 산업화가 이루어지면 지리적표시 등록 시 추가적으로 품종명칭 등록 추진 예정

라. 논문: 논문은 SCI급 2편이 게재되었고 현재 5편 투고 예정

(1) Anti-osteoarthritis effects of *Litsea japonica* fruit in a rat osteoarthritis model induced by monosodium iodoacetate

(2) Efficacy and safety of *Litsea japonica* fruit extract in subjects with painful knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial

(3) Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in

Murine Macrophage RAW 264.7 Cells

- (4) Anti-inflammatory effect of litseakolide D2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells
- (5) *Litsea japonica* extract in a rat acute and chronic arthritis model reduces the symptoms of inflammation.

제 2 절 관련분야 기술발전 기여도

1. 상품화 및 사업화 방법

- 가. 일반적으로 식품의 선택은 식품의 안전성, 기호성, 영양성, 기능성, 경제성 및 편리성 등을 들 수 있으며, 그 평가 방법에서는 우선 모든 식품이 안전하고 위생적이라는 전제하에서 제조·상품화
- 나. 식품의약품안전청이 제시하는 건강기능식품 기준 및 규격에 적합하도록 선정하여 제조.
- 다. 제품의 특성, 장점을 고려한 제품명을 설정하고, 식품의 유형 등을 기능성원료에 맞게 설정.
- 라. 청정제주 브랜드를 부각시키며, 지리적표시 등록 인증 자원의 우수성을 알리는 제품을 제조, 상품화.
- 마. 제품에 함유된 개발물질의 신체조직 기능에 대한 식품영양학적, 생리학적 기능 및 작용을 감안하여 첨가물 설정.
- 바. 원재료 배합기준, 식품첨가물 기준, 제도가공공정관리, 품목제조보고서와 동일한 방법 생산여부, 제조설비, 자가품질관리 등에 대한 점검.
- 사. 제조, 성분배합기준, 제조공정, 표시사항, 위생 등의 점검을 통한 안전성 확보.
- 아. 참여기업은 제주도 재배 약용자원을 이용한 제품개발을 추진해 왔으며, 엑기스, 분말, 과립, 파우치 등 다양한 제품개발 사업화 노하우를 가지고 있으며 초록마을 등 대단위 유통망을 보유하고 있어 본 연구개발은 사업화 실현 가능성이 매우 높은 것으로 사료됨.
- 자. 연구개발 대상 약용식물은 제주지역의 자생 생물자원이기 때문에, 본 과제는 지역자원을 활용하여 글로벌 경쟁력이 있는 제품 개발을 목적으로 하고 있음.
- 차. 기능성이 확인된 제주자생 약용작물에서 추출한 기능성원료를 활용하여 개발한 제품은 청정제주의 의미와 부합되어 홍보효과도 클 것으로 사료되어 그 사업화 가능성은 매우 높다고 사료됨.
- 타. 연구개발이 종료되는 3차년도 이후 건강기능식품 기능성원료의 개별인증 등록 후 당해 연도 제품 시장진입이 가능하며 기업의 소득창출뿐만 아니라 원료공급원의 농가소득이 발생할 것으로 판단됨.

2. 기술발전 기여도

가. 기술적 측면

- (1) 국내 천연물 연구는 아직 생리활성 물질의 일차적 탐색에 머물러 있어 선진국 대비 기술적인 격차가 현저한 바, 본 연구가 성공적으로 종료될 경우 국내의 기술수준을 혁신시킬 것으로 생각됨.
- (2) 핵심기술인 천연물의 효과적인 분리정제, 유효소재 탐색, 신물질의 구조결정, 천연물의 대량생산 등의 단위기술 수준이 혁신될 것임.
- (3) 천연물 유래 기능성 생물소재의 개발기술은 건강기능식품의 개발뿐 아니라, 천연물 신약 개발 등 응용되는 기초적인 개발도구임. 따라서, 과제의 성공적 수행은 향후 신약개

발에 필요한 기초적이 자료로 활용, 제주뿐 아니라 국가산업 경쟁력에 크게 기여할 것으로 예상됨.

나. 경제적·산업적 측면

- (1) 제주도에 풍부한 생물자원의 소재개발은 제주 특화 생물산업의 기반 구축과 지역자원 관리의 효율성을 확보할 수 있는 방안으로 활용될 수 있고, 제품화에 따른 지역경제를 활성화에 기여
- (2) 특산식물의 재배기술 개발과 보급을 촉진하고 소득 작물의 다양화를 유도하여 1차산업 발전에 기여할 뿐 아니라 3차 산업과 연계되어 지역소재 중소기업의 기술 혁신 및 개발에 기여
- (3) 제주의 청정환경 이미지와 어울리는 다양한 웰빙 상품의 개발을 촉진하며, 제주산 생물자원의 가치창출 시너지 효과를 유발
- (4) 지역 자원의 활용으로 소재의 국산화 및 외화 절약 등의 효과에 기여하고 제주 특화 건강·뷰티 생물산업 발전에 기여

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화, 산업화 및 타연구에의 활용 계획

1. ㈜ 휴림의 유통 및 마케팅



가. 현재 휴림의 유통 및 판매

- (1) 할인마트 유통 및 판매 : 이마트 120여 점 등 할인마트를 통한 유통
- (2) 휴림건강전문대리점을 통한 유통 및 판매 : 60여점의 휴림 전문대리점을 통한 유통
- (3) 기타 : 벤더, 취급점, 온라인 등

나. 신규유통발굴

- (1) 홈쇼핑(1차 상품화 추진, 2015년도) 등 신규유통 및 판매망 확충
- (2) 국내외 박람회 참가 등을 통한 국외 바이어 확보를 통한 해외 수출

2. 까마귀쪽나무 열매 소재를 이용한 제품의 산업화

가. 연구개발을 통한 까마귀쪽나무 열매 소재의 주력 상품군으로 개발

- (1) 전략적인 계획을 수립하여 까마귀쪽나무 열매 소재의 다양한 연구를 단계적으로 추진하고 있어, 관련 특허 및 다수의 논문을 투고하는 등 소기의 성과를 얻고 있음.
- (2) 현재 까마귀쪽나무 열매에 대하여 관절건강을 포함하여 다양한 연구를 추진 중에 있음.
- (3) 궁극적으로는 까마귀쪽나무 열매 소재는 차별성을 가지고 있어, 휴림의 주력 상품군으로 개발하고자 함.

나. 유통 및 산업화 추진

- (1) 단계적인 제품화 : 까마귀쪽나무 열매의 개별인정 획득 후 건강기능식품으로 상품화

추진.

(2) 1단계 상품화 : 홈쇼핑을 통한 상품화

(3) 2단계 상품화 : 다양한 유통 채널을 통한 상품화

(가) 휴림이 보유하고 있는 휴림 건강전문대리점과 이마트 등 할인마트 등을 이용한 다양한 상품화 추진.

(나) 다양한 제형을 통한 상품화.

(다) 원료소재 판매를 통한 제품화



3. 타연구에의 활용 계획

가. 확보된 원천기술을 통한 기능성 향장품 및 의약품 소재개발 등 전후방사업 발굴/육성

나. 1차산업 부흥을 위한 자원식물의 계약재배 및 신소득 작물 추가 발굴

다. 지역 기업의 가공기술을 바탕으로 한 전략식품산업 클러스터 조성

라. 향토산업육성사업과의 연계를 통한 지역행복생활권역 사업 추진

제 2 절 특허, 논문 등 지식재산권 확보 계획

1. 특허 확보 계획: 기 출원된 특허 등록 확보 및 기술이전 추진

가. 까마귀쪽나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성물

관 인 생 략	
출 원 번 호 통 지 서	
출 원 일 자	2012.10.09
특 기 사 항	심사청구(무) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2012-0111622 (접수번호 1-1-2012-0816452-92)
출 원 인 명 칭	재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대 리 인 성 명	특허법인 태웅(9-2012-100102-8)
발 명 자 성 명	윤원종 정용환 박수영 함영민 강세찬 오대주 김지현 양수경 송상묵 고영 중 현우철
발 명 의 명 칭	까마귀쪽나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성 물
특 허 청 장	

나. 까마귀쪽나무 미성숙과 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 항염증용 조성물

관 인 생 략	
출 원 번 호 통 지 서	
출 원 일 자	2013.12.23
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2013-0161707 (접수번호 1-1-2013-1179028-95)
출 원 인 명 칭	재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대 리 인 성 명	특허법인 태웅(9-2012-100102-8)
발 명 자 성 명	윤원종 정용환 박수영 함영민 오대주 윤선아 송상묵
발 명 의 명 칭	까마귀쪽나무 미성숙과 추출물 또는 이로부터 분리된 화합 물을 이용한 항염증용 조성물
특 허 청 장	

다. 까마귀쪽나무 추출물과 이로부터 분리된 Litseakolide D2를 이용한 항염증용 조성물

관 인 생 략	
출 원 번 호 통 지 서	
출 원 일 자	2014.12.22
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2014-0185866 (접수번호 1-1-2014-1242464-80)
출 원 인 명 칭	재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대 리 인 성 명	특허법인 태웅(9-2012-100102-8)
발 명 자 성 명	윤원종 함영민 고영종 송상목 현우철 양수경 오대주 박수영 김창숙
발 명 의 명 칭	까마귀쪽나무 추출물과 이로부터 분리된 Litseakolide D2를 이용한 항염증용 조성물
특 허 청 장	

라. 까마귀쪽나무 열매 주정 추출물 개별인정 등록 후 협동기관에서 제품 생산 전 상표 출원 추진 예정

2. 논문 확보 계획: 투고 논문 결과 확보 및 작성 완료

가. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. *International Immunopharmacology*. 2014. 22:84-97.

International Immunopharmacology 22 (2014) 84–97



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation

 CrossMark

Hyun Jung Koo ^{a,1}, Weon-Jong Yoon ^{b,1}, Eun-Hwa Sohn ^c, Young-Min Ham ^b, Seon-A Jang ^a, Jung-Eun Kwon ^a, Yong Joon Jeong ^a, Jong Hwan Kwak ^d, Eunsoo Sohn ^e, Soo-Young Park ^b, Ki-Hyo Jang ^f, Seung Namkoong ^g, Hyo-Sang Han ^h, Yong-Hwan Jung ^b, Se Chan Kang ^{a,*}

^a Department of Life Science, Gachon University, 1342 Seongnamdaero, Seongnam 461-701, Republic of Korea
^b Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark, Seogwipo 697-943, Republic of Korea
^c Department of Herbal Medicine Resources, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Republic of Korea
^d School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea
^e Division of Information Analysis Research, Korea Institute of Science and Technology Information, KISTI, Seoul 130-741, Republic of Korea
^f Department of Food and Nutrition, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Republic of Korea
^g Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Republic of Korea
^h Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, Geumsan 312-702, Republic of Korea

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received 10 February 2014
Received in revised form 22 May 2014
Accepted 3 June 2014
Available online 23 June 2014

Keywords:

Cyclooxygenase-2
Litsea japonica
Analgesic
Anti-inflammatory
Hamabivalactone

Fruits of the *Litsea* family of trees and shrubs contain biologically active compounds, some of which have been used as natural nutrients and flavoring agents in food. In this study, we identified novel anti-nociceptive effects of the 30% ethanol extract, the CH₂Cl₂ fraction and the associated active components (Hamabivalactone A and B) from *Litsea japonica* fruit by using in vivo peripheral and central nervous pain models. In addition, we compared the anti-inflammatory effects of several fractions from *L. japonica* fruit extracts using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw264.7 cells. The CH₂Cl₂ fraction of *L. japonica* fruit (LJM) had an optimal combination of anti-inflammatory effects and low cytotoxicity. Dose response studies were performed to determine the inhibitory effects of LJM on the pro-inflammatory enzymes, COX-2/PGE₂ and NO/iNOS, and pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6, and TNF- α . Molecular profiling revealed that LJM exerts anti-inflammatory effects through inhibition of NF- κ B and JNK/p38 MAPK signaling in LPS-induced macrophages. This study suggests that CH₂Cl₂ fraction of *L. japonica* fruit and its bioactive components are potential candidates as anti-inflammatory and analgesic agents (painkillers) for the treatment of inflammatory diseases.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation and pain are associated with various pathophysiological conditions such as arthritis, cancer, and cardiovascular disease. Inflammatory responses are typically characterized by leukocyte recruitment and activation in response to many inflammatory mediators. Among them, activated macrophages play a crucial role in the development of inflammation, marked by secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), as well as macrophage-derived nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) near the sites of injury [1–4]. Pain is one of the signs of inflammation. Although pain signals are processed in the nervous system, inflammatory mediators and cytokines produced from activated immune cells can also stimulate the nociceptor terminals in the peripheral tissue to enhance pain sensitivity [5–7]. This increased sensitivity to pain during inflammation can lead to consistent chronic pain in the absence of any peripheral noxious stimulus. Therefore, the inhibition of inflammatory mediators may be a useful strategy not only for the treatment of inflammatory diseases, but also for pain management [8–11].

Cyclooxygenase (COX) enzymes contribute to the formation of prostaglandins (PGE₂), which are key mediators of inflammation and pain. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and in particular, COX inhibitors, are the most common medications used for the treatment of pain and inflammation [12]. Traditional non-selective COX inhibitors are associated with gastrointestinal injury and should thus be used in conjunction with agents that protect the gastrointestinal tract [13]. COX-2 inhibitors have been developed to overcome the gastrointestinal toxicity associated with traditional NSAIDs, but, unfortunately, they are also associated with an increased risk of myocardial infarction [14]. In this regard, natural products and dietary supplements derived from plants may offer alternative and effective anti-inflammatory and analgesic properties with low toxicity [15–17].

* Corresponding author at: Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Republic of Korea. Tel.: +82 31 750 8826; fax: +82 31 750 8984.
E-mail address: seckang73@gachon.ac.kr (S.C. Kang).


¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.007>
1567-5769/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

– 216 –

4. Anti-inflammatory effect of litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS induced RAW264.7 cells. Journal of Functional Foods. 2015. 13:80–88.

JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS 13 (2015) 80–88





ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff



 CrossMark

Anti-inflammatory effect of litsenolide B2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells

Young-Min Ham ^{a,1}, Yeong-Jong Ko ^{a,1}, Sang-Mock Song ^a, Jihyun Kim ^a, Kil-Nam Kim ^{b,*}, Ji-Hyun Yun ^c, Ju-Hyun Cho ^c, Ginnae Ahn ^d, Weon-Jong Yoon ^{a,**}

^a Jeju Biodiversity Research Institute (JBRI), Jeju Technopark (JTP), Jeju 699-943, Republic of Korea
^b Marine Bio Research Team, Korea Basic Science Institute (KBSI), Jeju 690-140, Republic of Korea
^c Hurum Jeju Research Institute, Hurum Co., Ltd., Jeju 699-943, Republic of Korea
^d Department of Marine Bio-Food Sciences, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 28 July 2014
 Received in revised form 16 December 2014
 Accepted 17 December 2014
 Available online

Keywords:
Litsea japonica fruit
 Litsenolide
 Anti-inflammatory
 NF- κ B
 MAPKs

ABSTRACT

The anti-inflammatory effects of compounds isolated from the *Litsea japonica* fruit were investigated in LPS-stimulated murine macrophage (RAW 264.7) cells. The results indicated that litsenolide (LNB2) significantly inhibited the LPS-induced release of pro-inflammatory mediators, such as NO and PGE₂. LNC2, and, on the other hand, exhibited cytotoxicity at the same concentrations at which it exhibited an inhibitory property. Therefore, only LNB2 was used for further experimentation. LNB2 reduced the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines. We further investigated the mechanism by which LNB2 inhibits pro-inflammatory mediators and cytokines by examining the level of NF- κ B and MAPKs phosphorylation, which all serve as key components in inflammation-induced signaling pathways in RAW 264.7 cells. LNB2 inhibited the LPS-induced phosphorylation of NF- κ B and MAPKs. These results suggest that LNB2 has an anti-inflammatory effect, inhibiting the production of pro-inflammatory mediators and cytokines via inhibition of NF- κ B and MAPK signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Marine Bio Research Team, Korea Basic Science Institute (KBSI), Jeju 690-140, Republic of Korea. Tel.: +82 64 800 4933; fax: +82 64 805 7800.
 E-mail address: k.kim@kbsi.re.kr (K.-N. Kim).
 ** Corresponding author. Jeju Biodiversity Research Institute (JBRI), Jeju Technopark (JTP), Jeju 699-943, Republic of Korea. Tel.: +82 64 720 2840; fax: +82 64 720 2801.
 E-mail address: yyjkd@jejutp.or.kr (W.-J. Yoon).
¹ These authors contributed equally to this study.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.031>
 1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

다. 투고논문 결과 확보 및 작성 완료: 논문 5편 SCI 논문 투고 진행 및 예정

- (1) Anti-osteoarthritis effects of *Litsea japonica* fruit in a rat osteoarthritis model induced by monosodium iodoacetate
- (2) Efficacy and safety of *Litsea japonica* fruit extract in subjects with painful knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial
- (3) Anti-inflammatory Activities on Supercritical Extraction of *Litsea japonica* seed in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells
- (4) Anti-inflammatory effect of litseakolide D2 isolated from *Litsea japonica* fruit via suppressing NF- κ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells
- (5) *Litsea japonica* extract in a rat acute and chronic arthritis model reduces the symptoms of inflammation.

제 3 절 기타(개별인정형 기능성원료 신청, 세미나 발표, 기술이전)

1. 골건강 분야 개별인정형 건강기능식품 원료 소재 신청 및 등록

- 가. 제주산 까마귀쪽나무 열매 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 인정 신청 및 등록
- 나. 기능성원료 등록 후 제품화를 통해 산업화 추진 예정

2. 까마귀쪽나무 골건강 개선 개별인정형 건강기능식품 세미나 발표

- 가. 한국식품영양과학회 특별 강연

SESSION 13

Sponsored by 휴림, 강원대학교 산학협력단

S13-1 Development prospect of functional food using with bioresources from Jeju (Ho-Chul Kang)

S13-2 Individual authorized health functional food development which relieve osteoarthritis using Jeju native resource (Weon-Jong Yoon)

S13-3 Cranberry products prevent development of experimental colitis in mice (Yoonhwa Park)

S13-4 Anti-oxidant and anti-wrinkling effects of citrus based mixture drinks with bioresources from Jeju (Ok Heon Lee)

S13-2

Individual Authorized Health Functional Food Development Which Relieve Osteoarthritis Using Jeju Native Resource

Weon-Jong Yoon¹ and Ju-Hyun Cho²

¹Jeju Biodiversity Research Institute (JBRI), Jeju Technopark (JTP), Seogwipo 630-041, Korea
²Hurum Jeju Research Institute, Hurum Co., Ltd., Jeju 630-042, Korea

INTRODUCTION

Inflammation is a condition involving localized increases in the number of leukocytes and a variety of complex mediator molecules. Nitric oxide (NO) and prostaglandins are produced at inflammatory sites by stimulation of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), respectively. The inhibition of iNOS activation may prevent the pathological overproduction of NO and thus may be of therapeutic benefit in some types of inflammation. COX-2, which catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandin E₂ (PGE₂), is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of prostaglandins at inflammatory sites. Both iNOS and COX-2 are expressed in response to pro-inflammatory agents such as lipopolysaccharide (LPS) in many cell types, including macrophages, endothelial cells, and smooth muscle cells. In an effort to identify naturally occurring anti-inflammatory substances from natural product, we investigated *Litsea japonica*, an evergreen tree that grows in Jeju area, by evaluating the effects of the crude extract of *L. japonica* and its fractions on the inflammatory response. Inflammatory conditions such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis or osteoporosis are associated with local loss of bone and joint tissue, mainly due to activation of bone and joint receptors. Osteoarthritis is a degenerative disease characterized by the progressive degradation of joint cartilage and is accompanied by secondary inflammation of synovial membranes. The purpose of this study was to evaluate the effects of *L. japonica* on the joint cartilage of rat with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. The aim of this study was to evaluate the effects on mRNA expression of MMP-2, -3, -7, -9, -13, TIMP-1 and -2 in cartilage of osteoarthritis. Experimental osteoarthritis induced by MIA in rats was studied using micro-computed tomography. Also, the goal of this study were to quantify subchondral bone change in osteoarthritis model by use of micro-CT.

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE CRUDE ETHO EXTRACT AND SOLVENT FRACTIONS OF *LITSEA JAPONICA*

In this study, we compared the anti-inflammatory effects of several fractions from *L. japonica* extracts using LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *L. japonica* had an optimal combination of anti-inflammatory effects and low cytotoxicity. Dose response studies were performed to determine the inhibitory effects of *L. japonica* on the pro-inflammatory factors, PGE₂, COX-2 and NO/iNOS, and pro-inflammatory cytokines, IL-1β, IL-6, and TNF-α. Molecular profiling revealed that *L. japonica* exerts anti-inflammatory effects through inhibition of NF-κB and JNK/p38 MAPK signaling in LPS-induced macrophages. This study suggests that *L. japonica* are potential candidates as anti-inflammatory agents for the treatment of inflammatory diseases.

LITSEA JAPONICA IN A OSTEOARTHRITIS MODEL REDUCES THE SYMPTOMS OF INFLAMMATION AND BONE DAMAGE

The purpose of this study was to evaluate the effects of *L. japonica* on the joint cartilage of rat with osteoarthritis

- 184 -

3. 기술이전: 기술이전 2건 완료

가. 항염활성 및 골대사 관련인자 억제 활성을 나타내는 까마귀쥬나무 추출물(등록번호: 10-0812095)

특허기술 통상실시권 허여 계약서	
<p>(제)제주테크노파크(이하 "갑"이라 한다)와 (주)휴임(이하 "을"이라 한다)은 "갑"이 보유한 "항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는 까마귀쥬나무 추출물(이하 "본권 특허"라 한다)의 통상실시권 허여에 관하여 다음과 같이 계약을 체결한다.</p> <p>제1조(목적) 본 계약은 제2조에 기재된 "갑" 소유 기술특허권을 "을"에게 통상실시권을 허여하고 "을"은 통상실시권에 대한 실시료를 지급함에 있어 당사자간 상호 권리와 의무를 규정함을 목적으로 한다.</p> <p>제2조(통상실시권 허여 대상) 본 계약의 대상이 되는 본권 특허의 내용은 다음과 같다. · 발명의 명칭: 항염활성 및 골대사 관련인자 억제활성을 나타내는 까마귀쥬나무 추출물 · 권리번호: 특허 제10-0812095.8(2008. 3. 4)</p> <p>제3조(범위 및 기술지원) ① "갑"은 "을"이 본 계약 제7조에서 정한 본권 특허 실시에 따른 대가지급을 조건으로 "을"에게 본권 특허에 대한 통상실시권을 허여한다. ②본 계약을 통해 "갑"이 "을"에게 허여한 통상실시권은 비독점적이며, "을"은 본권 특허에 대한 통상실시권을 "갑"의 사전 서면승인없이 제3자에게 양도하거나 재실시 또는 알로 제공 등 "갑"의 권리를 침해하는 일체의 행위를 할 수 없다. ③ "을"이 본권 특허의 통상실시권을 행사하는 기간 내에 "갑"이 제3자에게 통상실시권의 허여 등 기타 본권 특허와 관련한 변동이 있을 경우 "을"과 사전 협의하여 진행한다. ④ "을"이 본권 특허를 활용한 제품을 생산함에 있어 "갑"에게 본권 특허의 실시와 직접적으로 관련된 기술지원을 요청할 경우, "갑"은 이에 적극 협력한다. 단, 기술지원 등 협력에 따른 소요비용은 "을"의 부담으로 한다.</p> <p>제4조(기간 및 표시) ① "갑"이 "을"에게 허여한 본권 특허의 통상실시권 허여기간은 본 계약체결일로부터 3년으로 한다. 다만, "을"이 계약 후 매연도별도 매출이 발생치 않는 등 본권 특허의 사업화가 불가능하다고 판단되는 경우, "갑"은 "을"과 협의 하에 계약조건을 변경하거나 계약을 해지할 수 있으며, 이 경우 계약해지 3개월 전에 "을"에게 관련</p>	
<p>"을" 간의 모든 문서에 우선한다. ③ "갑"과 "을"은 본 계약 체결 후, 주소, 대표자 등 중요사항을 변경하였을 시에는 상대방에게 서면으로 통지하여야 하며, 통지 불이행으로 인한 상대방의 손해는 중요사항이 변경된 지의 항변으로부터 면책된다.</p> <p>제15조 (해석) 본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 차이가 있는 경우에는 "갑"과 "을" 상호협력에 의해 조정하여 조정이 되지 않는 경우에는 "갑"의 해석에 따른다.</p> <p>본 계약의 체결을 증명하기 위하여 2통을 작성하여 기명날인을 한 후 각각 1통씩 보관한다.</p> <p>첨부 1. "갑"과 "을"의 법인인감증명서 1부 2. "갑"과 "을"의 사업자등록증 사본 1부</p> <p>2013. 6. 27</p> <p>(갑) (제)제주테크노파크 (을) (주)휴임</p> <p>제주특별자치도 제주시 중앙로 217 제주벤처마루 9층 대표자 한 영 실(인)</p> <p>서울특별시 강남구 역삼동 607-12 한진빌딩 4층 대표자 백 순 실(인)</p>	

나. 까마귀쥬나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성물(출원번호: 10-2012-0111622)

특허기술 통상실시권 허여 계약서	
<p>(제)제주테크노파크(이하 "갑"이라 한다)와 (주)휴임(이하 "을"이라 한다)은 "갑"이 보유한 "까마귀쥬나무추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성물(이하 "본권 특허"라 한다)의 통상실시권 허여에 관하여 다음과 같이 계약을 체결한다.</p> <p>제1조(목적) 본 계약은 제2조에 기재된 "갑" 소유 기술특허권을 "을"에게 통상실시권을 허여하고 "을"은 통상실시권에 대한 실시료를 지급함에 있어 당사자간 상호 권리와 의무를 규정함을 목적으로 한다.</p> <p>제2조(용어의 정의) 본 계약서에서 사용되는 용어는 다음 각 호와 같이 정의한다. 1. "계약기술"이란 본 계약의 대상이 되는 "갑"이 보유한 등록특허기술을 의미하며 계약기술이 발휘되는 계약기술을 구성하는 각각의 등록특허기술 실시에 필요한 도하후, 기술문서, 기술자료를 포함한다. 2. "제품"이란 "을"이 "계약기술"의 일부 또는 전부를 사용하여 생산하는 제품을 말하며, 계약기술의 일부 또는 전부를 사용하여 원료 또는 중간체를 생산 판매하는 경우 그 중간체나 원료를 포함한다. 3. "생산"이란 "을"이 "계약기술"을 이용하여 "제품"을 제조하는 것을 말하며, 제품을 제조로 제조생산하는 당해 해당 일을 "생산제시"이라 한다. 4. "중재율액"이란 기업회계기준에서 정한 계약재물에 대한 매출액을 말한다. 5. "계약발행"이란 "계약기술"의 개발, 확장, 대체 또는 추가 발행 등 계약기술을 기초로 한 일체의 발행, 개발 등을 의미한다. 6. "재실시"란 "갑"과 "을"이 사전 서면합의에 의해 "을"이 제3자에게 "계약기술"의 일부 또는 전부의 실시권을 제공하는 것을 말하며, "갑" 또는 "을"의 "계약발행" 기술 일부 또는 전부를 사용하는 경우를 포함한다.</p> <p>제3조(계약기술) 본 계약의 대상이 되는 "계약기술"은 다음과 같다. · 발명의 명칭: 까마귀쥬나무추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 진통용 조성물 · 권리번호: 특허 출원 제10-2012-0111622.8(2012.10.09)</p> <p>제4조(실시권 범위 및 기술지원) ① "갑"이 "을"에게 허여한 본 계약의 대상이 되는</p>	
<p>본 계약의 체결을 증명하기 위하여 2통을 작성하여 기명날인을 한 후 각각 1통씩 보관한다.</p> <p>첨부 1. "갑"과 "을"의 법인인감증명서 1부 2. "갑"과 "을"의 사업자등록증 사본 1부</p> <p>2014. 4. 29</p> <p>(갑) (제)제주테크노파크 (을) (주)휴임</p> <p>제주특별자치도 제주시 중앙로 217 제주벤처마루 9층 대표자 김 일 실(인)</p> <p>서울특별시 강남구 역삼동 607-12 한진빌딩 4층 대표자 백 순 실(인)</p>	

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 해외 건강기능식품 기술 동향

1. 국외 기술 동향 및 수준

- 가. 삶의 질 향상과 의료서비스의 개선으로 평균 수명이 연장됨에 따라 심장질환, 암, 당뇨, 정신질환, 관절염, 비만 등 만성 또는 난치성 질환이 증가하고 있으며, 이런 만성질환에 대한 예방적 개념이 도입됨에 따라 치료형에서 예방형으로 의약품 및 건강기능식품의 역할 변화가 두드러짐.
- 나. 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 천연물에 대한 경제적 효용가치를 평가하여 보다 다양한 식물 종의 확보에 주력하고 있으며, 이들로부터 신기능성 의약품 소재를 분리 생산하는 체계적인 개발 정책을 펼치고 있음.
- 다. 미국은 기능성 식용식물 및 phytochemical의 소재화를 통하여 천연재료를 사용한 부작용 및 위험을 완화시킬 수 있는 친숙한 식품형태의 의약품 대체 기능성식품 형태의 선호도 증가 추세 임.
- 라. 일본은 최초로 기능성식품이라는 용어를 사용하였으며, 1996년과 2001년 법개정에 따른 기능성식품 관련제도를 완성하면서 기능성식품에 대한 기초연구와 산업연구가 활발히 진행되고 있음.
- 마. 유럽은 기능성식품의 연구발전을 위한 국제기구와 기능성식품의 실천전개를 위한 활동 체계가 조직되었으며, “유럽의 기능성식품 과학 현상” 회의의 연구보고서에 따르면 크게 6가지 항목으로 기능성식품을 분리하여 정리하고 있음.

2. 국내·외 시장 규모 현황

(단위 : 백만원)

년도	(2011년)	(2013년)	(년)
세계 시장 규모	5,018 억불 6,523,400 억원	6,679 억불 8,682,700 억원	
한국 시장 규모	10,513 억원	13,994 억원	
	220 억원 (골건강 관련)	293 억원 (골건강 관련)	

*국내 : 식품의약품안전성, 식품세계(한국식품정보원), 식품저널 외

제 2 절 국제학술대회 참석

1. Natural Product Biotechnology 2014

가. 학술대회: Natural Product Biotechnology 2014

나. 주최: NP Biotechnology

다. 참석자: 전세계 천연물 공학 관련 종사자 및 연구자 등 1,000여명

다. 주요내용

천연물 공학 관련 학술발표 내용은 생물공학 관련 추출 및 분리기법, 생합성 기법, 생산 및 대량생산 기법 등을 공학적인 관점에서 접근한 연구 내용에 대한 학술발표가 이루어졌고 천연물 관련은 천연물 분리 및 신규 물질에 대한 학술발표가 이루어 졌으며 생리활성 관련은 다양한 해조류 및 육상생물에서 향균, 향산화, 항염증, 대사질환 및 뇌질환 등의 분야에 대해 학술발표가 이루어졌다.

라. 향후계획

- (1) 전 세계적으로 다양한 신기술 및 신기술을 접목한 다양한 제품들이 개발되고 있으나 그 나라만의 특산 생물자원을 이용한 소재 및 제품화 역시 꾸준히 증가하고 있어 제주 지역의 특산 생물에 대한 우수성 발굴 및 국제적인 동향을 접목하여 지금보다 더 제주만의 특색이 잘 드러날 수 있는 소재 발굴 및 제품화가 필요함
- (2) 기후 변화에 의한 제주 생태계 변화에 민감하게 대응하여 새로운 생물자원의 출현과 도입 가능한 고부가가치 농산물에 대해 조사
- (3) 지역 기반 생물자원 응용 제품 개발 시 지역 인지도, 소재의 참신성 및 가격 경쟁력, 소비자 니즈, 해당 기능성의 향후 시장 전망 등의 빅데이터를 활용하여 복합적인 분석 후 시장 진출

제 7 장 참고문헌

- Ahmad, R., El Mabrouk, M., Sylvester, J. and Zafarullah, M., 2009. Human osteoarthritic chondrocytes are impaired in matrix metalloproteinase-13 inhibition by IFN-gamma due to reduced IFN-gamma receptor levels. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 1049-1055.
- Ajizian, S. J., English, B. K., & Meals, E. A. 1999. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis*, 179, 939-944.
- Ameys, L. and Chee, W., 2006. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Research & Therapy* 8, R127.
- Baker JR, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW. 1993. Mechanism of fructosamine assay: evidence against role of superoxide as intermediate in nitroblue tetrazolium reduction. *Clin Chem* 39: 2460-2465.
- Becher, N., Hein, M., Uldbjerg, N. and Danielsen, C., 2008. Balance between matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP. *Reproductive Biology and Endocrinology* 6, 45.
- Benedetti, S., Canino, C., Tonti, G., Medda, V., Calcaterra, P., Nappi, G., Salaffi, F. and Canestrari, F., 2010. Biomarkers of oxidation, inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clin Biochem* 43, 973-978.
- Bhat, N. R., Zhang, P., Lee, J. C., & Hogan, E. L. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J. Neurosci.*, 18, 1633-1641.
- Bio. I. 2009. Anti-inflammatory effect of *Litsea Japonica* in acute osteoarthritis rat model. 1-14.
- Braza-Boils, A., Ferrandiz, M.L., Terencio, M.C. and Alcaraz, M.J., 2012. Analysis of early biochemical markers and regulation by tin protoporphyrin IX in a model of spontaneous osteoarthritis. *Experimental Gerontology* 47, 406-409.
- Brew, K., Dinakarpanian, D. and Nagase, H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283.
- Burrage, P.S., Mix, K.S. and Brinckerhoff, C.E., 2006. Matrix metalloproteinases: role in

arthritis. *Front Biosci* 11, 529–543.

- Chen, I. S., Lai-Yaun, I.-L., Duh, C. Y., & Tsai, I. L. 1998. Cytotoxic butanolides from *Litsea akoensis*. *Phytochemistry*, 49, 745–750.
- Choi, H. J., Eun, J. S., Park, Y. R., Kim, D. K., Li, R., Moon, W. S., Park, J. M., Kim, H. S., Cho, N. P., Cho, S. D., & Soh, Y. 2008. Ikarisoside A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, 601, 171–178.
- Coskun, M., Olsen, J., Seidelin, J. B., & Nielsen, O. H. 2011. MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clin. Chim. Acta*, 412, 513–520.
- Cournil, C., Liagre, B., Grossin, L., Vol, C., Abid, A., Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Netter, P. and Gillet, P., 2001. Overexpression and induction of heat shock protein (Hsp) 70 protects in vitro and in vivo from mono-iodoacetate (MIA)-induced chondrocytes death. *Arthritis Research* 3, P41–P41.
- Dunham, J., Hoedt-Schmidt, S. and Kalbhen, D.A., 1993. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Pathol* 74, 283–289.
- Edelman J, Hanrahan P, Ghosh P. 2000. Deer antler cartilage in the treatment of arthritis: results of a 6 month placebo-controlled double-blind study with Cervusen in 54 patients with osteoarthritis. *APLAR Journal of Rheumatology* 4(2): 95–100.
- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000; 133: 635–646.
- Felson DT, Lawrence RC, Hochberg MC, McAlindon T, Dieppe PA, Minor MA, et al. 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. *Ann Intern Med* 133: 726–737.
- Felson DT. 2004. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 42: 1–9, v.
- Ghosh, P., 1999. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulfate for its treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 28, 211–267.
- Ghosh, S., & Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81–96.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.*, 72, 1493–1505.
- Guha, M., & Mackman, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.*, 13, 85–94.
- Guzman, R.E., Evans, M.G., Bove, S., Morenko, B. and Kilgore, K., 2003. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage

- of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 31, 619-624.
- Guzmán-Gutiérrez SL, Gómez-Cansino R, García-Zebadúa JC, Jiménez-Pérez NC, Reyes-Chilpa R. 2012. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *J Ethnopharmacol* 143: 673-679.
- Ham, Y. M., Yoon, W. J., Park, S. Y., Song, G. P., Jung, Y. H., Jeon, Y. J., Kang, S. M., & Kim, K. N. 2012. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-xL. *J. Funct. Food.*, 4, 253-262.
- J O, B I, FJ S, CP S. 1954. The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. 58(3): 426-437.
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 621-663.
- Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H. and Brew, K., 2001. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 276, 12501-12504.
- Kim, E. Y., & Moudgil, K. D. 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol. Lett.*, 120, 1-5.
- Kim, E., Boo, H. J., Hyun, J. H., Kim, S. C., Kang, J. I., Kim, M. K., Yoo, E. S., & Kang, H. K. 2009. The effects of *Litsea japonica* on the induction of apoptosis in HL-60/ADR. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 40, 65-69.
- Kim, K. N., Heo, S. J., Yoon, W. J., Kang, S. M., Ahn, G., Yi, T. H., & Jeon, Y. J. 2010. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 649, 369-375.
- Kim, K. N., Ko, Y. J., Kang, M. C., Yang, H. M., Roh, S. W., Oda, T., Jeon, Y. J., Jung, W. K., Heo, S. J., Yoon, W. J., & Kim, D. 2013. Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, 53, 371-375.
- Kim, N. Y., & Ryu, J. H. 2003. Butanolides from *Machilus thunbergii* and their inhibitory activity on nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Phytother. Res.*, 17, 372-375.
- Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigematsu, T., Hirokawa, M., Akiba, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Fujimori, H., Tsuzuki, Y., Serizawa, H., & Ishii, H. 1998. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic

mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut*, 42, 180-187.

- Koo, H.J., Yoon, W.-J., Sohn, E.-H., Ham, Y.-M., Jang, S.-A., Kwon, J.-E., Jeong, Y.J., Kwak, J.H., Sohn, E., Park, S.-Y., Jang, K.-H., Namkoong, S., Han, H.-S., Jung, Y.-H. and Kang, S.C., 2014. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation. *International Immunopharmacology* 22, 84-97.
- Li, X., & Xu, W. 2011. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus*(pers.) Fries. *J. Ethnopharmacol.*, 135, 1-6.
- Li, X., Lian, L. H., Bai, T., Wu, Y. L., Wan, Y., Xie, W. X., Jin, X., & Nan, J. X. 2011. Cryptotanshinone inhibits LPS-induced proinflammatory mediators via TLR4 and TAK1 signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1871-1876.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorenz, H. and Richter, W., 2006. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 40, 135-163.
- Martel-Pelletier, J., 2004. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, Supplement, 31-33.
- Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N. and Pelletier, J.P., 1999. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4, D694-703.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 4-9.
- Min BS, Lee SY, Kim JH, Kwon OK, Park BY, An RB, et al. 2003. Lactones from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J Nat Prod* 66: 1388-1390.
- Mohan, G., Perilli, E., Kuliwaba, J.S., Humphries, J.M., Parkinson, I.H. and Fazzalari, N.L., 2011. Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 13, R210.
- Murray, J. S., Pfeiffer, C., Madri, J., & Bottomly, K. (1992). Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype. *Eur. J. Immunol.*, 22, 559-565.
- Naito, K., Takahashi, M., Kushida, K., Suzuki, M., Ohishi, T., Miura, M., Inoue, T. and Nagano, A., 1999. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with

- generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 510-515.
- Nii, H., Iwakiri, M. and Kubota, T., 1978. The Constituents of the Essential Oil from *Litsea japonica* (Thunb.) Juss., FRUIT. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1601-1603.
- Nii, H., Iwakiri, M., & Kubota, T. 1978. The constituents of the essential oil from *Litsea japonica* (Thunb.) Juss., Fruit. *Agr. Biol. Chem.*, 42, 1601-1603.
- Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J. and Abramson, S.B., 2001. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism* 44, 1237-1247.
- Reddy, D. B., & Reddanna, P. 2009. Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 112-117.
- Sakata, K., Shigemasa, K., Nagai, N. and Ohama, K., 2000. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 17, 673-681.
- Sarzi-Puttini, P., Cimmino, M.A., Scarpa, R., Caporali, R., Parazzini, F., Zaninelli, A., Atzeni, F. and Canesi, B., 2005. Osteoarthritis: An Overview of the Disease and Its Treatment Strategies. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 35, 1-10.
- Serhan, C. N., & Savill, J. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.*, 6, 1191-1197.
- Sharif, M., Shepstone, L., Elson, C.J., Dieppe, P.A. and Kirwan, J.R., 2000. Increased serum C reactive protein may reflect events that precede radiographic progression in osteoarthritis of the knee. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59, 71-74.
- Sohn, E., Kim, J., Kim, C.-S., Lee, Y.M., Jo, K., Shin, S.D., Kim, J.H. and Kim, J.S., 2013. The Extract of *Litsea japonica* Reduced the Development of Diabetic Nephropathy via the Inhibition of Advanced Glycation End Products Accumulation in db/db Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 9.
- Takeda, K. i., Sakurawi, K., & Ishii, H. 1972. Components of the Lauraceae family—I : New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron*, 28, 3757-3766.
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 335-376.
- Takeda, K.i., Sakurawi, K. and Ishii, H., 1972. Components of the Lauraceae family-I : New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron* 28, 3757-3766.
- Tanaka, H., Nakamura, T., Ichino, K., Ito, K. and Tanaka, T., 1990. Butanolides from *Litsea japonica*. *Phytochemistry* 29, 857-859.

- Technopark J. Efficacy evaluation of *Litsea Japonica* fruit extract in osteoarthritis.
- Uto, T., Fujii, M., & Hou, D. X. 2005. 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate suppresses inducible nitric oxide synthase expression through the inhibition of Janus kinase 2-mediated JNK pathway in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 70, 1211-1221.
- Van, Q., Nayak, B. N., Reimer, M., Jones, P. J., Fulcher, R. G., & Rempel, C. B. 2009. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay. *J. Ethnopharmacol.*, 125, 487-493.
- Yan, Z. Q., & Hansson, G. K. 2007. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol. Rev.*, 219, 187-203.
- Yang, C. P., Huang, G. J., Huang, H. C., Chen, Y. C., Chang, C. I., Wang, S. Y., Chen, I. S., Tseng, Y. H., Chien, S. C., & Kuo, Y. H. 2012. A new butanolide compound from the aerial part of *Lindera akoensis* with anti-inflammatory activity. *Molecules*, 17, 6585-6592.
- Yoon, W.J., Kang, S., Ham, Y.-M., Kim, K.-N., Hyuk Yang, W., Kim, H.-J., Park, S.-Y. and Jung, Y.-H., 2009. Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Litsea japonica* leaves. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53, 27-32.
- Yoshihara, Y., Nakamura, H., Obata, K.i., Yamada, H., Hayakawa, T., Fujikawa, K. and Okada, Y., 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59, 455-461.
- Yun, K. J., Kim, J. Y., Kim, J. B., Lee, K. W., Jeong, S. Y., Park, H. J., Jung, H. J., Cho, Y. W., Yun, K., & Lee, K. T. 2008. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.*, 8, 431-441.
- Zhong, L. M., Zong, Y., Sun, L., Guo, J. Z., Zhang, W., He, Y., Song, R., Wang, W. M., Xiao, C. J., & Lu, D. 2012. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells. *PLoS One*, 7, e32195.
- Zhou, H. Y., Shin, E. M., Guo, L. Y., Youn, U. J., Bae, K., Kang, S. S., Zou, L. B., & Kim, Y. S. 2008. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation. *Eur. J. Pharmacol.*, 586, 340-349.

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.