

발간등록번호

11-1543000-000836-01

식물성 다당 배합체를 이용한 위기능개선 개별인정형
기능성 식품 소재 개발

(Development of specific functional food product for the
improvement of gastric function from plant polysaccharide
conjugate)

(주)에스앤디

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물성 다당 배합체를 이용한 위기능개선 개별인정형 기능성식품 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 01월 31일

주관연구기관명 : (주)에스앤디

주관연구책임자 : 권 상 오

세부연구책임자 : 권 상 오

연 구 원 : 이 응 주

연 구 원 : 조 용 석

연 구 원 : 한 권 섭

협동연구기관명 : 차의과대 산학협력단

협동연구책임자 : 함 기 백

협동연구기관명 : 한림대 산학협력단

협동연구책임자 : 임 순 성

요 약 문

I. 제 목

과제명	식물성 다당 배합체를 이용한 위기능개선 개별인정형 기능성 식품 소재 개발
-----	--

II. 연구개발의 목표

위 질환과 관련한 *H.pylori*균의 위 내벽 부착을 억제하는 기능을 가지고 있는 식물 유래의 다당배합체의 시장확대의 한계를 극복하기 위하여 Urease억제 소재등 최적의 위질환 예방 소재를 선발하여, 전임상 효능평가 및 안전성, 안정성을 확보하고 인체적용시험 등 과학적 자료를 확보하여 위 기능개선 기능성을 지닌 개별인정형 건강기능식품 소재 허가신청을 위한 자료화를 목표로 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. *H. pylori* 억제에 대한 기능성을 보완할 수 있는 소재 선발 및 원료 생산/안전성 평가 및 임상프로토콜 개발
 - (1) *H. pylori*의 생육억제, urease 저해활성, 부착 억제 등 기능성 보완 소재 선발
 - (2) 기존의 MPG-6(인삼, 인진쑥)와 신규 소재의 최적의 혼합비율 선정
 - (3) 추출 최적화 및 대량생산체계 구축
 - (4) Formulation 개선- 원생약 균질성 확보
 - (5) 제형연구 및 제품화 연구
 - (6) 식약청 개별인정 신청자료 filing화
2. 신규 소재의 표준화, 기준규격 및 안정성 평가
 - (1) 원료 소재의 지표 및 기능성분 선정
 - (2) 혼합원료 구성성분 pattern 분석
 - (3) 원료 표준화 및 validation
 - (4) 기시법 작성
 - (5) 안정성 평가 - 가속시험, 가혹시험, 장기보존시험
3. 신규원료의 전임상효능 평가 및 인체적용시험
 - (1) 원료 혼합비율별 효능평가(*in vitro*) - 최적의 혼합비율 선정
 - (2) 전임상 효능평가 (*in vitro* 및 *in vivo*)
 - in vitro* 효능: *H.pylori* 억제능, Urease 저해활성, *H.pylori*부착 억제 활성 평가
 - in vivo* 효능: Mongolian gerbil을 이용한 위 궤양 유도 동물모델에서의 치료 및 개선 효능 평가, 체중 및 식이 섭취량 측정, 위 적출 및 병변확인, 조직 병리학적 검사, 부검을 통한 분자생물학적 기전 규명.
 - (3) 약리기전 규명
 - (4) IRB 신청 및 진행
 - (5) 인체적용시험: *H.pylori*에 의한 위점막 손상 개선에 대한 여누결과물의 효능 평가를 수행 [피험자의 수는 80명으로 하여 이중맹검으로 수행]

IV. 연구개발결과

1. H.pylori에 의한 위점막 손상에 개선을 효능을 가지는 물질을 5종을 추가로 실시한 결과, in vitro시험에서 녹차당배합체가 추가적으로 효과가 있는 것으로 나타났으며, H.pylori에 부착억제효과, 항균효과를 통하여 최적의 배합비를 선정하였다.
2. 1차로 선발된 수삼당배합체, 인진쑥배합체, 녹차당배합체와 복합물에 대하여 in vivo시험을 통하여 인진쑥과 녹차당배합체가 H.pylori에 의한 위점막손상 개선에 효능이 가장 우수한 것으로 나타났다.
3. 인진쑥녹차복합추출물에 대한 건강기능식품 개별인정 획득을 위하여 지표물질을 설정한 결과 protocatechuic acid(인진쑥)와 EGCG(녹차)를 선정하였으며, 지표물질의 밸리데이션에 대한 시험법 검토를 공인기관에서 검토 확립하였다.
4. 제조밸리데이션 관련하여 원료에 대한 식품원료 사용유무, 제조공정중의 수율, 지표물질의 변화에 대한 제조밸리데이션을 수행하였으며, 제조된 소재에 대한 유해물질, 잔류농약, 일반 성분들에 대한 자료를 확보하였다.
5. 인진쑥, 녹차추출물과 인진쑥녹차복합추출물에 대한 in vivo 약리기전 시험에서 COX-2와 pSTAT3의 발현 감소, HSP70발현, TNF- α 의 발현감소, 15-PGDH의 발현 증가, TUNEL assay에 의한 염색이 현저히 감소하는 것으로 나타난 결과에서 H.pylori에 대한 제균 또는 감염에 의한 위점막 손상을 개선하는데 도움을 주는 것으로 나타났다.
6. H.pylori에 의한 위점막손상 개선에 효과가 가장 우수한 인진쑥녹차복합추출물의 인체적용 시험용 임상약은 프로시보와 시험약으로 구분하여 제조하였으며, 임상은 위점막손상 개선 관련한 자료에 의하여 피험자수를 80명으로 하여 이중맹검에 의하여 차병원에서 임상계획서에 따라 IRB를 승인후 인체적용시험을 실시하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내 유업체에서 판매하고 있는 발효유의 원료(MPG-6)보다 더 우수한 소재 (**생육억제효능과 urease 저해활성**을 가지는 추가 천연물 유래 원료의 최적의 혼합비율) 를 개발하여 신규의 지식재산권을 확보하고, 이를 기반으로 신규의 위 기능개선 개별인정 제품을 출시하여, 업체매출 증대 및 신규의 일자리 창출이 가능하고 국민의 건강에 기여.
- 현재, 참여기관(한림대)에서 구축된 천연소재의 개별 인정형 원료인정의 노하우를 금번의 신규 소재의 고급화 및 기능성 강화를 통해 고급기술의 주관기관 전수의 기회를 제공하여 향후 업체에서 개발되는 고부가가치 식품 소재들의 개별 인정형 제품개발에 주력할 수 있는 기술 함양 및 마케팅 경쟁력을 확보.
- 위 질환을 유발하는 작용기전 탐색을 통한 부착억제 및 위 염증을 제어할수 있는 신규 소재를 확보하여 기존 제품에 비해 더 우수한 활성 및 시장 경쟁력 확보.
- 순수 국산의 농산물로부터 개별인정형 혹은 고시형의 건강기능식품 소재의 개발로 다양한 형태의 농가 소득이 기대되며, 이를 가공, 판매, 수출까지 진행함으로써 국가 경제의 경쟁력 향상에 기여할 것으로 기대함.
- 국내 농산물을 이용한 제품 개발 및 기능성 입증을 통하여 국내 농가소득 증대, 국내 농산자원의 고급화 및 표준화에 기여할 것으로 판단되며 향후 표준화된 농산물 재배 방법에 대한 연구등을 통한 농업기술에 선진화에 기여할 것으로 사료됨.

SUMMARY

I. Titles

Projects	Development of specific functional food product for the improvement of gastric function from plant polysaccharide conjugate.
----------	--

II. The object of the study

Helicobacter pylori infection is associated with diverse gastrointestinal diseases. A polysaccharide has to characterize its anti-adhesive effects against helicobacter pylori. In order to overcome the limitations of market for the plant polysaccharide was selected prevention material of gastrointestinal diseases. It was confirmed pre-clinical efficacy, safety, stability and scientific data of in human study. The purpose is documentation for permit of development of health functional food as preventing gastritis and gastric Ulcer.

III. The content and the scope of the study

1. Raw material selection, material production / safety assessment and clinical protocol development
 - (1) Functional materials selection of growth inhibition of H. pylori, urease and adhesive inhibitory activity
 - (2) Optimum mixing ratio selection of MPG-6 (ginseng, injinssuk) and new materials
 - (3) Establishment of the mass production system and optimization of extraction
 - (4) Improved Formulation - homogeneity securement of Herbal sources
 - (5) Formulation and commercialization study
 - (6) Documentation (filing) for the Individual Certification on the Functional Health Food
2. Standardization of the new material and safety assessment
 - (1) Selected functional components of the material
 - (2) Component pattern Analysis of composite
 - (3) Standardization of raw materials and validation
 - (4) Development of the standard analytical methods
 - (5) Safety assessment - accelerated test, stress test and Long-term Storage Test
3. Pre-clinical (*in vivo*) evaluation and in human study of health functional food
 - (1) Efficacy evaluation by Mixing ratio (*in vitro*) - Optimum mix ratio selection
 - (2) Pre-clinical evaluation (*in vitro* and *in vivo*)
 - *in vitro*: growth inhibition of H. pylori, urease and adhesive inhibitory activity
 - *in vivo* : improved efficacy evaluation in animal models of induced gastric ulcer (histopathological examination, molecular mechanism).
 - (3) IRB application and progress
 - (4) Development of the standard analytical methods
 - (5) In human study: 10 weeks, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for the evaluation of efficacy on gastritis by H. pylori (n=80).

IV. The result

1. Substance having an effect to improve the gastric mucosal damage caused by H.pylori was tested five kinds. As a result, the effect of green tea polysaccharide was confirmed in vitro tests (adhesive inhibitory activity of H. pylori and antibacterial activity).and the optimum ratio was selected.
2. The selected ginseng, injinssuk, green tea glycoconjugates and composite were performed in vivo test. As a result, Injinssuk and green tea glycoconjugates were appeared effect in improving gastric mucosal damage caused by H.pylori.
3. Validation of protocatechuic acid (injinssuk) and EGCG (green tea) for the individual certification on the Functional Health Food were established.
4. The yield of the manufacturing process and a change in the indicator material of production were carried out validation. And harmful substance, pesticide residue and general component were analyzed.
5. In pharmacological mechanisms test was decreased expression of COX-2 and pSTAT3, HSP70 expression and reduction of the expression of TNF- α , increased expression of 15-PGDH and Staining was significantly reduced by the TUNEL assay. As a result, it was found to improve the gastric mucosal damage.
6. Placebo and Investigational Drugs were prepared. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for the evaluation of efficacy on gastritis by H. pylori (n=80) is progressing in CHA clinical trial center.

V. The outcome of the study and further plants

1. By developing excellent material than the material (MPG-6) were obtained for the new intellectual property. Based on this, we introduced a new product of the individual certification on the Functional Health Food. Therefore, companies increase sales, new jobs, and can contribute to the health of the people.
2. We ensure the competitiveness of high value-added product development (individual certification on the Functional Health Food) and marketing.
3. Explore mechanism of action was to secure a new material that can be controlled via the adhesion inhibition and stomach inflammation. And it was obtained in excellent activity and market competitiveness compared to conventional products.
4. Development of functional food of stomach improvement is expected income of farms. Also, this sales and exports are expected to contribute to the national economy.
5. Is believed to contribute to the advancement of agricultural techniques, such as through the study of the standardized agricultural cultivation methods.

CONTENTS

Chapter 1 Outline of the study	8
Section 1 Outline of the development of technology	8
Section 2 Needs of the research	8
Chapter 2 Status of technology development at home and aboard	10
Section 1 Status of domestic technology development	10
Section 2 Status of overseas technology development	11
Chapter 3 장 Research content and results	12
Section 1 Objective of the research	12
Section 2 Material production/assessment and clinical protocol development	13
1. Human applicable test material production	13
2. Manufacturing Overview	15
3. Standard compounds	19
4. Composition and content of investigational functional foods	21
Section 3 Standard compounds validation and harmful substance analysis	23
1. Set-up test of standard compounds	23
2. Validation of standard compounds	33
3. Standardization of harmful substance	46
4. Standardization of Other than substance	48
Section 4 Pre-clinical (<i>in vivo</i>) evaluation and Studies on the mechanism	49
1. <i>in vitro</i> test	49
2. <i>in vivo</i> test	54
가. Effect of Inflammation inhibitory activity (24 weeks)	55
나. Effect of Inflammation inhibitory activity (36 weeks)	60
다. Studies on the mechanism of anti-inflammatory action	65
Section 5 In human study of health functional food	78
1. Plans of human applicable test	79
2. Application Status of deliberation of IRB	96
3. letter of acceptance of IRB	99
4. Report of human applicable test	100
Chapter 4 Achievement and contribution to related industries	101
Section 1 Achievement of development	101
Section 2 Contribution of development	105
Chapter 5 Result of the study and application plan	106
Section 1 Objective of the research	106
Section 2 Other application plans	106
Chapter 6 Technology information gathered in the process of the study	108
Chapter 7 Research facilities·status of equipment	110
Chapter 8 References	111

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 1 절 개발대상기술의 개요	8
제 2 절 연구개발의 필요성	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 1 절 국내 관련기술 현황	10
제 2 절 국외 관련기술 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제 1 절 연구개발의 목표	12
제 2 절 원료생산 및 임상 Protocol 개발	13
1. 인체적용시험 원료 생산	13
2. 제조개요	15
3. 지표물질	19
4. 임상시험용 기능식품의 조성 및 함량	21
제 3 절 지표물질의 밸리데이션 및 유해물질 평가	23
1. 지표물질 설정 시험	23
2. 지표물질의 시험법 Validation 확보	33
3. 유해물질의 규격설정	46
4. 규격설정 이외의 물질에 대한 기준규격설정	48
제 4 절 신규소재의 전임상 효능평가 및 약리기전 규명	49
1. in vitro 연구에서 위관련 균 이외의 효능시험	49
2. H.pylori 유도 동물 효력시험	54
가. H.pylori에 의한 염증 억제 효능비교(24주)	55
나. H.pylori에 의한 염증 억제 효능비교(36주)	60
다. H.pylori에 의한 염증억제 in vitro 기전연구	65
제 5 절 인체적용시험에 의한 효능평가	78
1. 인체적용시험계획서	79
2. 인체적용시험 IRB 심의 신청서 현황	96
3. 인체적용시험 IRB 승인서	99
4. 인체적용시험 보고	100
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	101
제 1 절 연차별 연구개발 목표달성도	101
제 2 절 관련분야로의 기여도	105
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	106
제 1 절 연구성과목표	106
제 2 절 연구성과활용 계획	106
제 6 장 연구개발 중 수집한 해외과학기술정보	108
제 7 장 연구시설·장비 현황	110
제 8 장 참고문헌	111

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 개발대상기술의 개요

개발하고자 하는 기술의 범위 : 인삼 및 사철썩을 포함하는 천연물로부터 위기능 개선 관련 개별인정 허가를 취득하기 위한 표준화 및 기준규격 확립, 전임상효능평가, 안전성, 안정성 및 임상시험에 대한 과학적인 자료를 확보하여 위기능개선 관련 개별인정형 원료 개발 범위로 한다.

원료 : 인삼 산성다당체는 인간 위 상피세포에 대한 *Helicobacter pylori*의 부착 방해 및 *H. pylori*에 의해 야기된 hemagglutination을 저해한다. 홍삼에 존재하는 특이한 성분인 panaxytriol은 *H. pylori*를 억제하는 것으로 알려져 있다. 인삼과 마찬가지로 사철썩 (*Artemisia capillaris*)으로부터 추출한 산성다당체에서도 인간 위 상피세포에 대한 *H. pylori*의 부착 방해에 효과가 있는 것으로 나타났다. 그리고 여기에 천연물로부터 생육 억제효능과 urease 저해활성을 가지는 추가 천연물 원료의 적절한 혼합비율로 *H. pylori*에 대한 부착 억제 소재 이외에도 생육억제, urease 저해활성 등 *H. pylori* 억제에 대한 현재 위력(본사의 기능성원료 첨가 제품)의 기능성을 보완/강화한 소재를 개발한다.

용도 : *H. pylori* 균에 대한 부착 억제 및 생육억제, urease 저해활성 소재를 대상으로 *H. pylori*로부터 기인한 위기능개선 소재로 활용하고 자한다.

기능 및 목표 : 소화성 궤양 및 위암 발병과 밀접한 관련이 있는 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 평가하고 생육 억제 측면뿐만 아니라 urease 저해 활성 및 적혈구 응집 반응을 통한 부착억제 등 다각적인 전임상 평가를 통해 원료 소재에 대한 최적화를 통해 표준화, 안전성, 임상평가를 실시하여 위기능 개선 효능을 갖는 원료 소재에 대한 개별인정을 목표로 한다.

성능 및 규격 : *H. pylori* 부착 및 생육 억제 소재 도출 및 대한 기능(지표)물질을 선정하고 효능을 상호 보완하여 시너지 역할을 할 수 있는 있도록 원료 소재를 최적화하여 위 기능 개선 효과를 극대화할 수 있도록 한다.

제2절 기술(또는 제품)개발의 필요성 및 중요성

1. 기술적 측면에서의 중요성

- 개별인정형 건강기능식품의 개발은 개발과정 및 인정 절차 등의 전문성이 꼭 필요한 협력연구 과제이므로 과제 계획부터 최종까지 전략 수립이 중요하며 특히 이 중 기능성 자료확보를 위해 전임상 및 임상실험, GLP 기관의 독성자료는 꼭 필요한 과정이다.
- 위점막 내 *H. pylori*의 감염이 위질환 및 위암 발생에 관여하는 것으로 알려져 주목을

받고 있다. 비침습적인 그람 음성균인 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*, 이하 *H. pylori*)균은 위 점막에 기생하는 나선균으로 크기 0.4~1.25 μ m, 길이 5.0 μ m의 가늘고 긴 나선형 몸통과 편모를 갖고 있다. 우리나라 성인의 70% 정도가 보균자로 이러한 배경으로 위에 좋은 식품 소재의 개발의 필요성이 대두되기 시작했다.

- 따라서, 만성 위질환과 위암의 중요한 발병인자인 *H. pylori* 성장을 저해하고 위점막을 보호할 수 있는 기능성 소재를 도출하여 식약청으로부터 개별인정을 통한 안전성과 기능성을 확보 받아 식생활에서 쉽게 접근할 수 있는 기존 제품에 기능 소재를 추가한 제품 개발이 다양화될 필요가 있다.

2. 경제적 측면에서의 중요성

- 세계 건강기능식품의 시장규모는 통계기관별로 다소 차이는 있지만 1997년 650억 달러, 2002년 2,023억 달러로 높은 성장률을 나타내었으며 2007년에도 3,771억 달러(2002년 대비 86% 증가)에 달하고 있음
- 또한 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 식품산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있음.
- 국내 소화기약물 중 동아제약의 스티렌(위점막보호제)은 국내에서 승인받은 신약으로 년 800억원 이상의 매출을 달성하고 있으며 삼진제약의 바메딘(위궤양 치료제)은 지난 2007년 발매 이후 해마다 50% 이상 씩 꾸준한 성장세를 보이며 2010년 50억원 매출, 2011년 100억원 달성을 기대하고 있다. 또한, 대웅제약의 알비스는 400억원의 매출을 기록하고 있다.
- 소화기 약물은 다른 질환시에도 위점막보호를 위해 처방되는 약물로서 부작용을 최소화 하면서 실생활과 밀접한 관련이 있는 천연물 소재의 도출은 기능성 식품소재 뿐만 아니라 천연물 신약까지 발전할 수 있는 부가가치가 크고 잠재력이 무한한 시장이다.

3. 산업적 측면에서의 중요성

- 웰빙과 함께 건강기능식품시장은 연 15% 성장세를 가진 유망사업이다.
- 건강기능식품의 안전성이나 기능성에 대한 과학적이고 체계적인 근거 자료의 제시가 건강기능식품 선택에 있어 소비자의 가장 needs의 하나이며, 우리나라도 인체적용시험을 통해 그 기능성이 입증 될 경우 높은 등급의 건강기능식품 원료개별인정을 받음으로써 고부가가치 산업화를 위한 필수불가결한 과정으로 자리매김하였다.
- 신약 외에 유산균을 비롯한 유산균 비피더스균의 식품시장 규모는 유산균 음료가 8000억, 발효유가 약 2조 5000억 시장을 형성하는 것으로 파악되고 있다.
- ‘헛개나무 열매추출분말’은 식약청에서 건강기능식품으로 인정받은 소재로서 발효유 형태로 제품 출시를 위해 식약청으로부터 건강기능식품으로 재승인을 받아 고가의 원료에 대한 시장에서의 가격 저항감을 제품 효능으로 전략을 선회하여 2009년 40억원, 2010년 1200억원(잠정)의 매출액을 달성하고 있다. 이와 같이 위기능 개선 소재 원료에 대한 식약청으로 부터의 인정을 통해 기존 제품에 기능성을 가미한 새롭고 다양화된 상품 개발 및 출시를 통해 식품 산업계의 활성화를 기대할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 관련기술 현황

- 건강기능식품의 원료는 모두 농림수산자원에서 유래한다해도 과언이 아니다. 농림수산자원은 과학적이고 체계적인 연구를 통하여 각각의 원료에 기능성을 확인하고, 부여함으로써 비가공의 소재보다 몇 배 이상의 부가가치를 높일 수 있게 된다. 건강기능식품은 크게 고시형제품과 개별인정형제품으로 나뉘게 되는데, 고시형제품에 비해 개별인정형제품은 소비자들이 원하는 다양한 기능성을 제공할 수 있으며, 업체의 입장에서는 일종의 독점권을 부여하는 기능으로 마케팅 측면에서 다양하게 활용할 수 있어 잠재력이 큰 분야임.
- 특히 최근에는 지역의 대표적인 농림수산자원(예, 창원 양과추출물)과 연계하여 기능성을 인정받음 으로서 지역 농림수산자원의 브랜드 창출과 지역산업발전에 기여하는 등 다각적으로 활용할 수 있는 점이 많아 개별인정형 건강기능식품 소재 개발이 여러 분야에 걸쳐서 이루어지고 있음.
- 식품의약품안전청은 2012년도 건강기능식품 총 생산액은 1조 4091억원으로 전년대비 3% 증가 했으나, 두자릿수 성장세를 보였던 예년에 비해 성장세가 추출하며, 생산량은 2011년 3만 9611톤보다 14.8% 감소한 3만 3735톤이라고 했다. 식약처의 분석에 따르면 이는 국내외 전반적 경기침체의 영향으로 건강기능식품의 수요가 감소한 것으로 판단하였다.
- 그러나 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능성 식품은 작년 생산실적인 1807억원으로 전년대비 25.9%의 가파른 성장세를 나타내었다고 한다.
- 개별인정형제품은 새로운 기능성에 대한 니즈와 맞물려 틈새시장을 공략하고자 하는 기업이 늘고 있다는 점을 감안할 때 꾸준히 증가할 것으로 예상 됨. 개별인정형제품의 상위 5개품목중 2009년과 2010년 헛개나무 과병추출 분말이 부동의 1위를 유지하며 2010년에는 44억원의 생산실적으로 다른 개별인정형 제품에 비해 급속한 성장을 함.
2010년 장건강과 관련된 기능성 원료 인정은 1건으로 장질환 관련 소재 개발은 경쟁력이 있을 것으로 판단 됨.
- 과거에는 식품 제조업체의 약속과 마케팅으로 소비자에게 식품정보를 제공했지만 그 시대와는 달리 현재 그리고 미래에는 건강 기능성 표시 규정을 통해 과학적 인증절차를 걸쳐 더욱 신뢰성 있는 업체-소비자간 의사소통이 가능해짐.
- 식품 소비시장의 급격한 변화는 혁신적인 제품 개발의 필요성을 증가시키고 있고 소비자의 삶의 질 향상으로 신체 특정부위의 건강에 대한 관심도가 높아지고, 식품규제 환경은 더욱 엄격해지고 있음. 이런 상황에서 제약과 식품의 결합이 시장의 요구 사항을 충족 할 수 있을 것으로 기대. 이외에도 소비자의 인식 또한 질병 예방 및 건강 향상을 위한 개인별 맞춤형 영양소 수요가 늘고 있음.
- 기능성식품 시장은 건강증진·질병예방의 중요성이 강조됨에 따라 향후 연평균 10% 수준으로 성장이 전망되는 미래 고성장 시장으로 선진국에서는 이미 기능성평가를 위한 기관을 설립하고 기능성식품 R&D를 활발하게 진행하고 있음.

- 동아제약(주) ‘스티렌(애엽성분 유래 eupatilin성분 위점막보호제)’은 애엽에 함유되어 있는 플라보노이드 중 eupatilin을 활성성분으로 한 항궤양성 효과를 갖는 천연물 유래 신약이다.
- *H. pylori* 감염에 세균과 위염 경감을 위해 보조용법으로 생균제(probiotics), *H. pylori* 백신, 장기 복용할 수 있는 식물성 화합물 (phytochemicals)에 대한 연구가 진행되고 있다.
- 위장질환 개선과 관련한 기능성 상품화 : 한국 야쿠르트에서는 장내 유해 세균을 억제하고 헬리코박터균의 증식과 위내부착을 억제하는 4종류의 유산균을 넣은 유산균음료를 출시하였다. 이 음료에는 헬리코박터균 항체를 함유한 면역 난황(IEY)과 요소 분해효소의 활성을 억제하는 차조기 농축액의 기능성 성분에 최근 신규강화 성분으로 위 건강에 도움을 주는 소재로 강화약속 농축액, 전통한방소재로 위 운동성 강화 소재인 탕자 추출물 추가되면서 한층 업그레이드된 신제품을 출시하였다. 최근의 복합기전에 의한 위질환 개선제 개발에 의한 효과로 예상된다

제 2 절. 국외 관련기술 현황

- 천연 생약추출물로부터 *H. pylori*에 대한 항균활성 효과를 검색하여 기능성 소재를 탐색하려는 국외의 연구들은 2000년대에 들어서면서 활발히 시작되었다. 국외 연구들도 각 국가별 자생 천연 추출물을 소재로 한 탐색 연구에 중점을 두고 있다.
- 지중해 연안의 허브 추출물과 그리스 지역 13종의 허브 추출물, 이탈리아 지역 17종의 허브 추출물, 모로토의 전통생약, 중국 지역의 자생 생약 추출물, 파키스탄 자생 식물 등 주로 허브와 생약 제제 등이 있다.
- 마누카 꿀은 UMF(Unique Manuka Factor)라고 불리는 독특한 천연물질을 통하여 높은 항생 및 항균 효능이 있는 것으로 알려졌다. 마누카의 UMF성분이 대부분의 위염이나 위궤양의 주원인으로 밝혀진 헬리코박터 파일로리균과 위염/궤양 등에 효능이 우수함
- 네덜란드 푸드밸리내 위치한 식품개발연구소인 「니조(NIZO)」 연구소는 건강부서(Health Department)를 두고 기능성식품관련 산업화 연구를 활발히 진행하고 있으며, 캐나다의 리차드슨(Richardson) 기능성식품 센터」는 서부 식품자원을 경쟁력 있는 기능성 식품으로 개발·지원하는 역할을 담당하고 있음.
- 이를 반영하듯 현재 세계 기능성식품 시장은 미국, 유럽, 일본 등 선진국이 80% 이상을 차지하고 있으며, 스위스 파마톤사의 경우 인삼 사포닌을 추출한 기능성식품(제품명 : 진사나) 개발로 연 30억\$(약3조원) 매출을 올리고 있음.
- 앞으로, 국민소득수준의 증가와 삶의 질 향상, 고령화 사회로의 진입에 따라 건강의 유지 및 증진이 무엇보다 중요한 사회적 트렌드가 형성됨에 따라 건강기능 식품산업은 더욱더 큰 관심을 받게 됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 목표

1. 과제 목표

본 연구 과제는 위 질환과 관련한 *Helicobacter pylori*균의 위 내벽 부착을 억제하는 기능을 가지고 있는 식물 유래의 다당 배합체의 시장확대의 한계를 극복하기 위하여 urease 억제 소재등의 최적의 위 질환 예방소재를 선별하여, 전임상 효능평가 및 안전성, 안정성을 확보하고 인체 적용시험등 과학적 자료를 확보하여 위 기능 개선 기능성을 지닌 개별 인정형 건강기능식품 소재 허가신청을 위한 자료화를 목표로 한다.

- 위 질환 관련 *Helicobacter pylori*균의 숙주인 위 내벽에 부착을 저해하는 기전, *Helicobacter pylori*균이 분비하는 urease를 저해하는 기전, 위 상피 세포의 과 면역 인자의 발현을 저해함으로써 *Helicobacter pylori*균으로부터 유도되는 과면역등을 저해하는 기전등의 in vitro, in vivo 검증을 통한 과학적인 식품 소재 개발.
- 임상적으로 유효성이 인정되어 사람이 섭취하여도 효능을 확인할 수 있는 선도적 소재 개발.
- 국내 농산물을 이용한 부가가치 증대 및 고 기능성 건강 기능성 식품 소재 개발.
- 과학적 검증을 통한 안전성을 확보하여 안심하고 섭취 가능한 식품 소재 확립.
- 안정성을 입증하여 장기간 복용해도 유효성을 보장할 수 있는 신뢰받는 식품기업으로 발돋움.

2. 연구일정

기관	개발내용	2011 (1차년도)	2012 (2차년도)	2013 (3차년도)
주관기관 (주)에스엔디	신규소재 선별			
	최적의 혼합비율 선정			
	추출최적화 및 대량생산 구축			
	CRO 관련업무 (임상 protocol 개발 및 신청서류점검, 식약청업무협의)			
	IRB 자료지원 및 임상시험결과분석			
	원료 및 시제품 생산			
	상품화 방안			
	식약청 개별인정 신청자료준비 및 보완			
참여기관 한림대학교	신규소재 선별 및 원료 지표/ 기능성분 확인(구조결정)			
	신규소재 및 지표성분 Pattern 분석			
	원료 표준화 및 validation/기준규격 설정			
	제형연구/원료생약 균질성 확보			
	안정성 평가(가혹 및 가속시험)			
	식약청 제출 자료작성 및 보완실험			
참여기관 차의과대	원료 혼합비율별 효능평가(in vitro)			
	전임상 효능평가(in vitro, in vivo)			
	약리기전 규명			
	IRB 승인 및 진행			
	인체적용시험 및 결과분석			

제2절 원료생산 및 임상 protocol 개발

1. 인체적용시험 원료 생산

가. 원재료

○인진쑥 (사철쑥, *Artemisia capillaris*)

인진쑥은 사철쑥의 어린줄기나 잎을 말린것으로 애당쑥이라고도 하며 주로 냇가의 모래땅에서 흔히 자란다. 높이가 30~100cm이다. 밑부분은 목질이 발달하여 나무같이 되고 가지가 많이 갈라진다. 꽃이 피지 않는 가지는 끝에 잎이 뭉쳐나고 잎자루가 길다. 밑부분에 달린 잎은 잎자루가 길고 길이 1.5~9cm, 나비 1~7cm로서 2회 깃꼴로 갈라진다. 갈래조각은 실처럼 가늘고 나비 약 0.3mm이며 전체가 비단 같은 털로 덮인다. 위로 갈수록 잎이 작아진다.

꽃은 8~9월에 노란색으로 피고 두화(頭花)는 둥글며 지름 2mm 정도로 원추꽃차례에 달린다. 길이 1~2mm의 꽃자루가 있다. 총포는 둥글고 털이 없으며 포조각은 3~4줄로 늘어선다. 바깥조각은 달걀 모양, 안조각은 타원 모양이다. 열매는 수과로서 길이 약 0.8mm이다.

어린순을 식용하며, 포기 전체를 염증을 없애는 이뇨제로 쓰거나 황달에 사용하기도 하며, 주산지는 한국·일본·타이완·중국·필리핀 등지에 분포한다.

인진쑥의 주요 약리 작용에 대한 보고는 주로 간기능 개선 및 간 섬유화 억제에 관한 연구가 많이 되어 있다. 특히 고신대학교 최병태 교수팀은 인진쑥 추출물은 간의 염증반응을 억제시키는 효능을 보고하였고, 대구 한의대 김승모 교수팀에서는 인진쑥 추출물 2,000mg/kg의 농도에서도 생식, 발생 및 태자 독성을 나타내지 않는 안전한 소재로 보고하고 있다. 특히 전통적으로 간장 질환 관련 간 기능을 보호하고 간에서 발생하는 염증을 저해하는 소재로서 많이 사용되고 있으며, 최근 국내에서는 간섬유화를 억제시키는 보고가 많이 되고 있다. 특히 대한약전의 생약규격집에 언급되어 있는 인진쑥의 규격에 따라 원료의 규격을 설정할 예정이며, 규격 내용은 다음과 같다.

이 농산물은 사철쑥 *Artemisia capillaris* Thunberg (국화과 Compositae)의 지상부이다. 봄에 채취한 것을 ‘면인진(綿茵蔯)’이라 하고, 가을에 채취한 것을 ‘인진호(茵蔯蒿)’라 한다.

성상 면인진(綿茵蔯) 이 농산물은 지상부로 말린 덩어리 모양이고 회백색 ~ 회록색이며 전체에는 흰색의 털이 덮여있고 섬유처럼 부드럽다. 줄기는 가늘고 길이 15 ~ 25 mm, 지름 1 ~ 2 mm이며 표면의 흰색의 털을 제거하면 세로무늬를 선명하게 볼 수 있고 질은 부드럽다. 잎에는 잎자루가 있고 1 ~ 3 회 우상으로 갈라져 있으며 길이 1 ~ 3 cm, 지름 약 1 cm이다. 소엽편은 난형 또는 도피침형이고 조형이며 선단은 예첨두이다. 이 농산물은 맑은 향기가 있고 맛은 약간 쓰다.

○인삼 (*Panax ginseng* C. A. Mey)

우리나라와 일본에서는 두릅나무과의 인삼의 뿌리로서 가는 뿌리와 코르크층을 제거한 것을 말한다. 특히 우리나라에서는 백삼(白蔘:생 것), 홍삼(紅蔘:찜 것), 미삼(尾蔘:가는 뿌리)으로 구분하여 기록했으나 민간에서는 야생삼도 장뇌와 산삼으로 구별한다. 중국에서는 인삼의 뿌리와 뿌리줄기를 말하며 원삼(재배삼), 홍삼, 산삼(야생삼)으로 구별한다. (그림 21) 특히 이 농산물은 가늘고 긴 원주형-방추형으로 때때로 중간쯤에서 2- 개의 결뿌리가 나있고 길이 12-20cm이며 주근은 지름 1-3cm이다. 바깥면은 엷은 황갈색-엷은 회갈색을 띠며 세로주름과 가는 뿌리의 자국이 있다. 근두부에는 줄기의 잔기가 붙어있던 뇌두가 있다. 껍은 면은 거의 평탄하며 엷은 황갈색이고 형성층 부근에서는 갈색을 띤다. 이 약의 횡절면을 현미경으로 보면 전분립이 가득차 있는 박막성의 유세포로 되어 있고 피층의 여러 곳에는 황색-황적색의 분비물이 들어있는 분비도가 있다.

이 농산물의 효능은 중국의 의학서인 《신농본초경》에서는 365종의 천연물을 상중하의 3 품으로 분류하고 있으며, 상품 약 120종, 중품 약 120종, 하품 약 125종으로 구별하였는데, 인삼은 상품에 들어 있다. 인삼의 효능에 대해서 “오장을 보호하고, 정신을 안정시키며 눈을

밝게 하고, 오래 복용하면 몸이 가벼워지고 오래 살 수 있다”는 등의 표현을 하고 있다. 후한 헌제 때의 고서 《상한론》에 처음으로 인삼의 구체적인 처방이 21방(총 113)이 나오고 있다. 한국에서 오늘날도 흔히 사용되고 있는 한방처방서인 《방약합편》에 올라 있는 467방의 처방이 상증하의 3통분류로 나뉘어 있고, 상통처방은 '보제(補劑)', 중통처방은 '화제(和劑)', 하통처방은 '공제(功劑)'이며, 인삼이 배합되어 있는 132종의 처방의 약 94%가 상통과 중통에 들어 있음으로 보아, 인삼은 보약 또는 강장제로 사용되는 것이지 특정 질병에 대한 치료약으로 사용되는 것이 아님을 알 수 있다. 한방에서 인정되는 인삼의 효능을 요약하면, 강장·강심·건위보정·진정약으로 널리 상용되고, 특히 위장기능 쇠약에 의한 신진대사기능의 저하에 진흥소재로 사용되며, 병약자의 위부정체감·소화불량·구토·흉통·식욕부진 등에도 응용된다고 알려져 있다.

		
인진쑥 (<i>Artemisia capillaris</i>)	인삼 (<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey)	녹차 (<i>Camellia sinensis</i>)

○ 녹차 (차나무, *Camellia sinensis*)

녹차는 차나무의 잎을 이용하여 발효시키지 않은 차잎[茶葉]을 사용해서 만든 차이다. 국내에서는 전남 보성, 경남 하동, 제주 일원에서 기업적으로 재배되고 있으며, 당 연구에는 전남 보성산 녹차를 이용하였다. 녹차는 차를 자주 마실 경우 혈전 형성을 막아주고 콜레스테롤과 혈당을 낮추는 효과가 있다. 또한 중치 예방에도 효과가 있다고 한다. 녹차 추출물은 항산화 작용이 있다.

녹차의 매력인 쌉싸름한 맛은 카테킨(catechin)이라 불리는 탄닌 성분 때문이다. 항산화 작용을 하는 폴리페놀의 한 종류인 카테킨은 녹차 한 잔에 대략 100mg이 들어 있으며, 그중 가장 강력한 성분인 'EGCG'는 비타민 C보다 항산화 효능이 20배나 높은 것으로 알려져 있다.

카테킨 성분은 항암 효과와 혈관 건강을 지키는 기능을 한다고 알려져 있다. 카테킨은 위암, 폐암 등을 예방하는 효과가 있고, 혈압을 낮추어주며 심장으로의 혈류를 늘리는 효과도 있다. 소화기관 내에서의 콜레스테롤의 흡수를 저해하고 지질의 체내 침착을 억제한다. 이에 혈압을 떨어뜨리고, 심장을 강화하며, 지방간이나 동맥경화를 예방한다. 또 감기 바이러스의 활동을 저지시키고 체내 세포가 바이러스에 감염되는 것을 막는다.

차에 함유되어 있는 주요 성분은 카페인(3%), 탄닌, 테아닌, 세키세놀, 비타민 C (150~500 mg), 비타민 B1, B2, 나이아신, 펜토텐산, 이노시톨, 루틴 등이다. 기름기가 많은 음식을 먹고 차를 마시면 개운하고 강한 알칼리성이므로 위산 과다에도 좋다.

최근 미국 예일 대학교 연구팀은 높은 흡연율에도 한국인·일본인의 동맥경화, 폐암 유병률이 서구인보다 상대적으로 낮은 것은 녹차 소비량이 많기 때문으로 추정했다. 이들은 이 같은 '아시안 패러독스'의 비결로 녹차의 카테킨을 지목했다. 녹차의 카테킨 등 폴리페놀 성분이 항산화 작용을 하고, 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춘다. 아미노산의 일종인 '테아닌'은 심신을 이완시키고 혈압을 낮추며, 학습능력을 높여준다. 차나무에서 첫 번째로 따는 잎으로 만든 '우전'에 테아닌이 풍부하다.

한편 『본초강목(本草綱目)』에는 '녹차를 차게 해서 마시면 담이 생긴다'고 나와 있다. 녹차는 찬 성질을 가지고 있어 몸의 열을 내리기 때문에 냉녹차보다는 따뜻한 녹차가 좋다. 그러나 공복에 녹차를 너무 많이 마시면 속이 쓰리고 소화를 방해할 수 있다. 또한 식사 직후 진한 녹차를 마시면 녹차의 탄닌산이 섭취한 음식의 단백질, 철 등의 체내 흡수를 방해해서 소화 불량이나 영양 불량을 일으킬 수 있다.

녹차와 약을 함께 먹으면 서로 결합하여 약효를 떨어뜨리며, 녹차는 이뇨 작용이 강해서 약물의 체내 잔류 시간을 짧게 만들 수 있기 때문에 약을 복용하는 사람들은 주의하여야 한다. 카페인의 각성 작용이 불면증을 악화시킬 수 있으므로 불면증 환자는 녹차를 마시지 않는 것이 좋다. 또한 카페인 때문에 심계항진, 두통, 이명, 눈의 침침함 등의 증상이 나타날 수 있다.

가. 원재료 조성비

인삼	10%	[식품원재료 DB 식용가능, 국내산]
인진쑥	30%	[식품원재료 DB 식용가능, 국내산]
녹차	60%	[식품원재료 DB 식용가능, 국내산]

나. 사용되는 원부재료

사용된 원료	근거	식품원료사용 유무	제조사
주정	(발효)주정소매업 면허증	사용가능	대한주정라이프 주식회사

2. 제조개요

이 식품은 각각의 원료를 개별 추출하여 주정을 투입하여 건조 분말화 한 다음 일정한 비율에 따라 혼합한 소재로, 수삼(*Panax ginseng* C.A. Mey)인진쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg), 녹차(*Camellia sinensis*)을 원료로 하고 있다.

가. 제조공정도

제조공정은 원료로부터 각각의 다당체를 제조하여 분말화 한 다음, 무중력 혼합기를 이용하여 배합기준체 따라 배합한 다음 지표물질의 균질성을 확인 하여 제조하는 것으로 하였다.

나. 원재료부터 단위공정별 제조방법 설명

- 1) 원료검사: 수삼, 인진쑥, 녹차를 엄선 구입하여 규격 및 기준에 따라 시험하여 적합 여부를 확인한다.
- 2) 원료투입 및 세척: 원료를 칭량저울로 계량하여 케이지 넣고 추출탱크에 투입한 후 원료를 정제수로 세척 후 즉시 정제수 제거한다.
- 3) 추출 및 여과: 각각 원료의 세척이 완료되면 추출기내의 원료의 10배수(녹차-15배수)에 해당하는 정제수를 투입하여, 추출기 온도를 95℃ 이상(수삼, 녹차 85℃)으로 가온하면서 추출액을 순환하며 8시간 추출 실시, 추출액을 카트리지 75~100µm 필터로 여과 한다.
- 4) 농축: 농축기 온도 60℃, 700mmHg 설정 후 19±2Brix가 될 때까지 농축을 실시한다.
- 5) 주정처리: 탱크에 주정을 투입하고 교반하면서 농축액을 투입하여 다당체를 분리한다.
- 6) 회수분리 : 형성된 다당체는 상분리를 통하여 형성된 다당체를 분리한다.
- 7) 건조: 분리된 다당체는 동결건조기를 이용하여 건조를 한다. 동결건조조건은 동결온도 -20℃ 이하. 700mHg) 이다.
- 8) 금속등 이물제거: 동결건조가 종료된 분말은 자석함(8,000GAUS 이상)을 통과하여 금속등을 제거한다.
- 9) 포장: 포장규격에 맞게 포장한다.

다. 인삼다당체 (GP)

수삼 100kg을 세척한 다음, 습식분쇄기로 분쇄하여 추출탱크에 넣고 정제수를 원료의 20배수를 투입한 다음 약 85℃에서 8시간 추출하고 커트러지 필터로 여과한 다음, 여액을 약 60℃ 이하에서 감압농축하여 사전에 조제된 70% 주정으로 분리하여 동결건조한 분말을 2.0 kg 얻는다. (수율 약: 2.0%)

표1. 인삼다당체의 제조공정도

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	유효성분 (총당/우론산)	수율(kg)
원재료	수삼 200kg		6.0 (1,200,000mg)	19.7%	200
↓					
세척	정제수	실온			
↓					
추출 및 여과	정제수 1,000 L	추출온도 85 ℃ 추출시간 8시간 여과필터 75um			
↓					
농축	감압농축기	45℃, 700mmHg	4.2 (252,000mg)	44.7% (7.6 %)	60 (60bx)
↓					
주정처리	주정 70 %	1,000 L			
↓					
분리	원심분리				
↓					
건조	동결건조기	-20℃, 700mmHg			4.0
↓					
금속등 이물제거	자석함	8,000 GAUS			
↓					
포장	지대포장	100g 단위	0.8mg/g (3,200mg)	83.5% (우론산26.0%)	4 (수율:2.0%)

인삼(수삼)을 정제수로 첨가하여 추출한 추출물에는 총당이 44.7% 함유되어 있으며, 여기에는 환원당등 단당류들도 함께 함유되어 있으며, 주정처리에 따른 다당체를 분리하여 분석한 결과 총당이 83.5% 이며, 인삼다당체에는 우론산(Uronic acid)이 26.0%를 함유하고 있다.

라. 인진썩다당체 (MP)

인진썩 100kg을 추출탱크에 넣고 정제수를 원료의 10배수를 투입한 다음 약 93±3℃에서 8시간 추출하고 커트리지 필터를 사용하여 여과한 다음, 여액을 약 65℃ 이하에서 감압농축하여 사전에 조제된 70% 주정으로 분리하여 동결건조한 분말을 7.7 kg을 얻는다. (수율: 약 7.7%)

표2. 인진썩 다당체의 제조공정도

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	유효성분 (총당/우론산)	수율(kg)
원재료	인진썩 200kg		0.065mg/g (13,000mg)	18.0%	200
↓					
세척	정제수	실온			
↓					
추출 및 여과	정제수 1,000 L	추출온도 95 ℃ 추출시간 8시간 여과필터 75um			
↓					
농축	감압농축기	45℃, 700mmHg	0.105 (8,400mg)	24.0% (8.9%)	80 (56Bx.)
↓					
주정처리	주정 70 %	1,000 L			
↓					
분리	원심분리				
↓					
건조	동결건조기	-20℃, 700mmHg			15.6
↓					
금속등 이물제거	자석함	8,000 GAUS			
↓					
포장	지대포장	100g 단위	0.198mg/g (3,049mg)	60% (우론산 29%)	15.4 (수율7.7%)

인진썩 열수추출물에는 총당이 24.0% 함유되어 있으며, 우론산(Uronic acid)이 8.9%있으며, 주정처리에 따른 다당체화한 결과 총당이 60.0%, 우론산(Uronic acid)이 29.0%를 함유하고 있다.

마. 녹차다당체 (GT)

녹차 100kg을 추출탱크에 넣고 정제수를 원료의 15배수를 투입한 다음 약 80℃,에서 4시간 추출하고 카트리지 필터로 여과한 다음, 여액을 약 60℃ 이하에서 감압농축하여 사전에 조제된 70% 주정으로 분리하여 동결건조한 분말 5.36 kg을 얻는다. (수율:약 5.36 %)

표3. 녹차다당체의 제조공정도

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	유효성분 (총당/우론산)	수율(kg)
원재료	녹차 200kg		27.7 (5,540,000)	39.9%	200
↓					
세척	정제수	실온			
↓					
추출 및 여과	정제수 1,500 L	추출온도 80 ℃ 추출시간 4시간 여과필터 75um			
↓					
농축	감압농축기	온도 : 45℃ 압력: 700mmHg	11.3 (1,017,000)	27.2% (18.5%)	90 (50bx.)
↓					
주정처리	주정 70 %	1,000 L			
↓					
분리	원심분리				
↓					
건조	동결건조기	온도 : -20℃			10.8
↓					
금속등 이물제거	자석함	8,000 GAUS			
↓					
포장	지대포장	100g 단위	38.7 (410,220mg)	60.0% (우론산34.7%)	10.6 (수율:5.3%)

녹차 열수추출물에는 총당이 27.2%, 우론산(Uronic acid)이 18.5%였으나, 주정처리로 녹차다당체화한 결과 총당이 60.0%, 우론산(Uronic acid)이 34.7%를 함유하고 있다.

이렇게 얻어진 인삼다당체:인진쑈다당체:녹차다당체를 각각 1kg, 4.5kg, 5.0kg (10:45:50)을 정밀하게 칭량하여 균일하게 혼합한 다음 원료식품을 제조한다.

(A)

제조지시기록서				
제 품 명	제 조 번 호	제 조 단 위	제품생산량	
녹차추출농축액분말 (GT)	SD-GT-CS-002	원료 30 kg/Lot	0.96 kg	
제 정 인	제 조 인	작업	검도	승인
2012. 07. 13	조성	제조장	연구부서 책임자	품질부서 책임자
개정번호: 00	2012. 07. 13	이승주	조용식	이재원
작업 전 점검 항목 (양호: ○, 불량: ×)		DATA	작업자	확인자
1. 원료의 포장 상태 (○) 3. 작업장의 청결상태 (○) 2. 기구 용기의 청결상태 (○) 4. 포장, 모토장구 확인 (○)			권유중	이승주
품질명	작업공정	기록내용	작업자	확인자
정량 확인		✓ 기구상태확인	권유중	이승주
원료투입		1. 저울의 수평 및 영점 확인을 한다. 2. 사용된 원료를 측정하고 정량 내용을 확인한다. 3. 1회차 30 kg		
		1. 추출기 내의 포장상태 및 청소상태를 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 원료를 추출케이지에 투입하고 추출탱크에 투입한다. 3. 정제수량 원료의 15배수 투입한다. 1) 정제수 460 L		
		1. 추출기 온도를 80℃로 설정한다. 2. 설정온도에서 추출액을 순환하면서 2시간 가온추출한다. 3. 가온을 중지하고 2시간 순환추출한다. 4. 추출 진행 과정을 확인하여 기록하도록 한다.		
		1) 추출온도 80 ℃ 2) 가온추출시간 2 hr 3) 순환추출시간 2 hr		
		추출 시작 시간 11:00	추출 종료 시간 13:00	
		시간(hr) 온도(℃) 작업자 확인자	시간(hr) 온도(℃) 작업자 확인자	
		1 80 권유중 이승주	5 80 권유중 이승주	
		2 80 권유중 이승주	6 80 권유중 이승주	
		3 80 권유중 이승주	7 80 권유중 이승주	
		4 80 권유중 이승주	8 80 권유중 이승주	
비 고				

(SD-GT-CS-002) REV.00 (주)에스엔디 1 / 4

(B)

제조지시기록서				
제 품 명	제 조 번 호	제 조 단 위	제품생산량	
인진숙추출농축액분말(MP)	SD-MP-AC-002	원료 35 kg/Lot	1.19 kg	
제 정 인	제 조 인	작업	검도	승인
2012. 02. 03	조성	제조장	연구부서 책임자	품질부서 책임자
개정번호: 00	2012. 02. 03	이승주	조용식	이재원
작업 전 점검 항목 (양호: ○, 불량: ×)		DATA	작업자	확인자
1. 원료의 포장 상태 (○) 3. 작업장의 청결상태 (○) 2. 기구 용기의 청결상태 (○) 4. 포장, 모토장구 확인 (○)			권유중	이승주
품질명	작업공정	기록내용	작업자	확인자
정량 확인		✓ 기구상태확인	권유중	이승주
원료투입		1. 저울의 수평 및 영점 확인을 한다. 2. 사용된 원료를 측정하고 정량 내용을 확인한다. 1) 인진숙 85 kg		
		1. 추출기 내의 포장상태 및 청소상태를 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 원료를 추출케이지에 투입하고 추출탱크에 투입한다. 3. 정제수량 원료의 10배수 투입한다. 1) 정제수 350 L		
		1. 추출기 온도를 95℃로 설정한다. 2. 설정온도에서 추출액을 순환하면서 8시간 동안 추출한다. 3. 추출 진행 과정을 확인하여 기록하도록 한다.		
		1) 추출온도 95 ℃ 2) 추출시간 8 hr		
		추출 시작 시간 09:20	추출 종료 시간 17:30	
		시간(hr) 온도(℃) 작업자 확인자	시간(hr) 온도(℃) 작업자 확인자	
		1 95 권유중 이승주	5 95 권유중 이승주	
		2 95 권유중 이승주	6 95 권유중 이승주	
		3 95 권유중 이승주	7 95 권유중 이승주	
		4 95 권유중 이승주	8 95 권유중 이승주	
비 고				

(SD-MP-AC-002) REV.00 (주)에스엔디 1 / 4

제조지시기록서

제 품 명	제 조 번 호	제 조 단 위		
녹차추출농축액분말(GT)	SD-GT-CS-002	원료 30 kg/Lot		
품질명	작업공정	DATA	작업자	확인자
건 조		1. 분무건조기의 상태 및 청소상태를 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 알균이 종료된 백을 분무건조기를 사용하여 분말화 한다. 분무건조기의 조건은 아래와 같다.		
		1) Type Disc 2) Inlet temp. 185~210℃ 3) Outlet temp. 85~98℃		
선 별		1. 메쉬재, 자석함 상태 및 청소상태 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 메쉬재와 자석함을 이용하여 이물을 제거한다.		
		1) 자석함 10,000 gauss 2) 메쉬재 30~40 mesh		
포 장		1. 포장선, 작업복장, 포장기구의 청결, 청리정돈을 확인한다. ✓ 청결상태확인		
		2. 포장기의 수평 및 영점 확인을 한다. ✓ 제량기 확인		
		3. 제품의 포장단위 및 수량을 확인하고 정량하게 포장한다.		
		1) 분말 총 중량 0.96 kg 2) 내포장 단위 0.1 kg 3) 내포장 갯수 10 ea 4) 포장 Loss 량 kg		
생산수율	이론생산량	기준생산량	기공수율 (기준량/이론량)	생산수율 (실생산량/이론량)
	1.0 kg	1.0 kg	100%	0.96%
비 고				

(SD-GT-CS-002) REV.00 (주)에스엔디 4 / 4

제조지시기록서

제 품 명	제 조 번 호	제 조 단 위		
인진숙추출농축액분말(MP)	SD-MP-AC-002	원료 35 kg/Lot		
품질명	작업공정	DATA	작업자	확인자
건 조		1. 분무건조기의 상태 및 청소상태를 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 알균이 종료된 백을 분무건조기를 사용하여 분말화 한다. 분무건조기의 조건은 아래와 같다.		
		1) Type Disc 2) Inlet temp. 185~210℃ 3) Outlet temp. 85~98℃		
선 별		1. 메쉬재, 자석함 상태 및 청소상태 확인한다. ✓ 기구상태확인		
		2. 메쉬재와 자석함을 이용하여 이물을 제거한다.		
		1) 자석함 10,000 gauss 2) 메쉬재 30~40 mesh		
포 장		1. 포장선, 작업복장, 포장기구의 청결, 청리정돈을 확인한다. ✓ 청결상태확인		
		2. 포장기의 수평 및 영점 확인을 한다. ✓ 제량기 확인		
		3. 제품의 포장단위 및 수량을 확인하고 정량하게 포장한다.		
		1) 분말 총 중량 1.03 kg 2) 내포장 단위 0.1 kg 3) 내포장 갯수 10 ea 4) 포장 Loss 량 0.01 kg		
생산수율	이론생산량	기준생산량	기공수율 (기준량/이론량)	생산수율 (실생산량/이론량)
	1.19	1.19	100%	1.03%
비 고				

(SD-MP-AC-002) REV.00 (주)에스엔디 4 / 4

그림1. 식물원래의 다당체의 대량생산 시스템의 제조표준서에 따른 제조기록서 (A) 녹차추출농축액분 제조기록서(녹차다당체) (B)인진숙추출농축액분말 제조기록서(인진숙다당체)

Uronic acid 분석 방법

산성당의 측정은 다당류의 uronic acid 측정을 위한 비색분석 방법으로 분석하였다(Bitter T 외 1명, A modified uronic acid carbazole reaction. Analytical Biochemistry 4; 330-334, 1962).

시약 I는 Sodium tetraborate decahydrate 1.9 g을 hot water 4 mL에 가하여 용해시킨 후 미리 얼음에 냉각시킨 196 mL의 c-H₂SO₄에 넣고 교반하여 제조한다.

시약 II는 0.25 g의 carbazole 을 250 mL의 Ethanol에 용해시켜 제조한다.

표준용액은 D-Glucuronic acid (G5269-10 g) 0.1 g을 증류수 100 mL에 용해시킨 다음 증류수를 이용하여 농도별로 희석한다. 검사 시료는 0.1 g을 증류수 100 mL에 용해시킨다.

표준용액과 시료용액 1 mL를 test tube에 각각 취한 후 시약 I을 각 test tube에 4.5 mL씩 가하고 잘 혼합한다. 이 혼합액은 비등수욕상에서 가열(100°C, 10min)시킨 후 ice bath에서 급냉하고 시약 II 0.15 mL를 각각의 test tube에 가하고 잘 혼합한 후 비등수욕상에서 가열한다. 가열이 끝나면 ice bath에서 급냉시키고 실온이 될 때까지 방치 한 후 잘 혼합하여 분광광도계(spectrophotometer) 파장 525 nm에서 흡광도를 측정한다.

시료 중 Uronic acid 함량 (mg/100mg 시료, %)

$$\text{도 } mg/100mg) = \frac{\text{Sample Abs}}{\text{standard Abs}} \times \text{Standard의 농도}(\mu g) \times \frac{100mg}{\text{시료취량}(0.2mg)} \times \frac{1}{1000} *$$

* Standard의 농도가 μg 단위이므로 이것을 mg단위로 보정하기 위한 것임

Total carbohydrate 분석 방법

총당의 정량은 phenol-H₂SO₄법에 따라 시료에 페놀을 가한후 농황산을 가하여 가수분해 후 발색되는 노란색을 UV-spectrophotometer로 480nm에 흡광도를 측정하였다(Dubois M외 3명, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28:350-356,1956)

시약 I (5% phenol reagent)는 phenol <Sigma p-5566> 5 g에 증류수 100 mL 첨가하여 제조 한다.

표준용액은 Glucose (G5767-25 g) 2 g을 증류수 20 mL에 용해시키고 증류수를 이용하여 10 배씩 3회 연속 희석한다. 그 다음 이 용액을 이용하여 농도별로 희석한다.

검사 시료는 0.1 g을 증류수 100 mL에 용해시킨 다음 시료용액을 증류수를 이용하여 5배 희석한다.

표준용액 및 시료용액 1 ml를 test tube에 각각 취한 다음 5% phenol 용액을 각 test tube에 1 mL씩 가하고 잘 혼합한다. 그리고 황산원액(H₂SO₄)을 각 test tube에 5 mL씩 가하고 잘 혼합한 후 실온(25°C)에서 20분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 잘 혼합하여 분광광도계 (spectrophotometer) 파장 480 nm에서 흡광도를 측정한다.

시료 중 총 탄수화물량 (mg/100mg 시료, %)

$$\text{농도}(mg/100mg) = \frac{\text{Sample Abs}}{\text{Standard Abs}} \times \text{Standard의 농도}(\mu g) \times \frac{100mg}{\text{시료취량}(0.2mg)} \times \frac{1}{1000} *$$

* Standard의 농도가 μg 단위이므로 이것을 mg단위로 보정하기 위한 것임

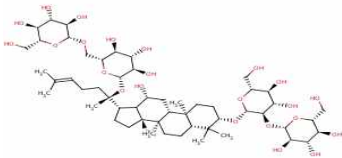
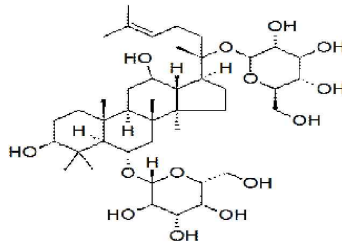
3. 원료 기준 규격 설정

가. 원료를 특징 지을 수 있는 정상, 물성 등

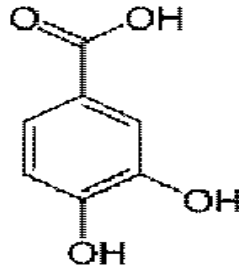
○ 시험원료는 건조된 인삼, 인진쑥, 녹차를 열수 추출한 다음 주정으로 다당체를 제조한 분말이며, 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 갈색임.

나. 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

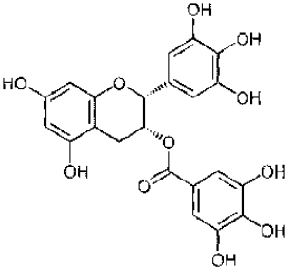
○ 기능성분(또는 지표성분) : Ginsenoside Rg1+Rb1 0.8 mg/g

일반명	진세노사이드 알비원 (Ginsenoside Rb1)	진세노사이드 알지원 (Ginsenoside Rg1)
구조		
분자식	$C_{54}H_{92}O_{23}$	$C_{42}H_{72}O_{14}$
분자량	1109.29 g/mol	80.01 g/mol
CAS No.	41753-43-9	22427-39-0

○ 기능성분(또는 지표성분) : Protocatechuic acid 0.9 mg/g

일반명	Protocatechuic acid
구조	
분자식	$C_7H_6O_4$
분자량	154.12 g/mol
CAS No.	99-50-3

○ 기능성분(또는 지표성분) : EGCG (Epigallocatechin gallate) 6.0 mg/g

일반명	EGCG (Epigallocatechin gallate)
구조	
분자식	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
분자량	458.37 g/mol
CAS No.	989-51-5

○ 인진쑥(SND에서 시료 제공)추출물은 물에 잘 녹지 않아서 Solubility를 측정하였다. 30% 에탄올과 70% 에탄올에 녹인 후 원심분리를 하여 상, 하층으로 분리하였다. 70% 에탄올에서 Solubility가 가장 좋았다. 따라서 70% 에탄올에서 Solubility가 가장 좋았으며, 상층에는 저분자들이, 하층에는 고분자들이 있는 것으로 확인된다. Recycle HPLC(JAI, LC908-C60)를 이용하였다. 이동 용매는 5% Methanol에 0.1% TFA를 첨가하였고, 용매 분획한 인진쑥 EtoAc층 700mg을 이동용매 2ml에 녹인 후 주입하였다. 5% Methanol에서, 서서히 100% Methanol로 분석하였다. 타겟물을 농축하여 HPLC 확인 결과 254nm에서 단일 피크로 확인되었지만, 280nm에서는 3개의 피크가 확인되었다. Chemical profile를 통한 인진쑥의 Target compound 성분이 Protocatechuic acid로 확인되었음

○ 인삼 (건강기능식품의 기준 및 규격 전면 개정, 2008)d; 고시형 제품 규격기준에 따라 진세노사이드의 함량으로 규격기준을 설정함

○ 녹차의 성분 중 EGCG와 UV, RT값이 같음을 확인되었다. 이를 바탕으로 녹차에 일정한 EGCG를 넣어 spike test를 실시하였다. spike test 결과 EGCG가 증가됨이 확인되어 존재함을 알 수 있었다. (Fig 6.) 따라서 녹차의 지표성분으로는 EGCG (Epigallocatechin gallate)로 결정하였음

다. 임상시험용 건강기능식품의 정보

SD-1003F은 인진쑥/녹차 물추출물 복합 배당체로 제형은 그램당 지표성분인 Protocatechuic acid 0.9 mg이상, EGCG (Epigallocatechin gallate)을 0.019mg 을 함유한 경구용 정제로 500mg 용량으로 구성되어 있다

4. 임상시험용 건강기능식품의 조성 및 함량(1정 500mg 당 함량)

시험물질의 임상약 형태와 제형설계는 내추럴F&B의 연구소와 공동으로 위질환 관련한 최적의 제형 조건을 설정하기 위하여 부형제의 첨가량, 부형제의 종류, 제형의 형태를 설정하였다. 제형은 제형별 특성에 따라 현재 많이 이용되고 있는 장방형의 tablet 형태로 하여 피험자들이 쉽게 접근이 가능하도록 설계하였다. (표4, 그림1)

표4. 인체적용형 임상약의 제형배합비

배합목적	성분명	규격	분량(mg)	
			임상본약	임상위약
주성분	인진쑥/녹차 물추출물 배당체	별규	125.0	
결합제	유당분말			125.0
결합제	결정셀룰로오스	식첨	175.0	175.0
결합제	유당혼합분말		175.0	169.0
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	식첨	10.00	10.0
고결방지제	이산화규소	식첨	5.00	10.0
활택제	스테아린산마그네슘	식첨	5.00	5.0
색소	식용색소류	식첨		1.0
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스	식첨	4.50	4.5
코팅제	자당지방산에스테르	식첨	0.50	0.5
합계			500.0	500.0

(제형설계: 내추럴 F&B)

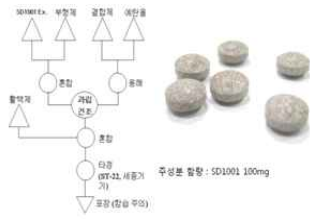
가. 임상시험용 건강기능식품의 제조방법에 관한 자료

이 식품은 적합한 제조소에서 제조된 인진쑥, 녹차 열수추출을 한 다음 주정으로 분말화한 SD1003을 투명필름코팅정제 제법에 따라 제조한다(표5).

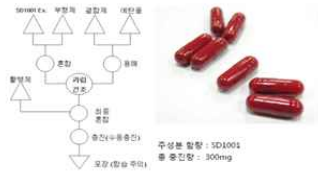
나. 인체적용 제제의 특성

- 1) 성상 : 장방형 황색 투명필름 정제
- 2) 확인시험 : HPLC
- 3) 붕해도 : 이 약은 식품공전 일반시험법 중 붕해시험법에 따라 시험할 때 적합. (물, 60 분 이내)
- 4) 제재균일성: 이 식품은 일반시험법 중 제재 균일성 시험법의 투명필름정제 시험법에 따라 시험할 때 적합. ($\pm 10\%$ 이내)
- 5) 함량분석: 지표물질 배합비에 따라 설정
- 6) 포장재질 : 용기:PTP, 재질:PVC, PVDC, Al-Foil / 용기헨디캡병, 재질:PP, PE, PS
- 7) 보관방법 : 건냉소 보관

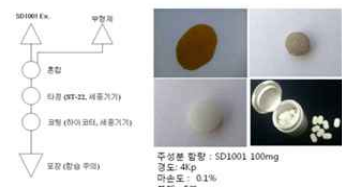




발포정



캡셀제



정제

- 발포정 : 원료의 독특한 향이 강하고 물에 충분히 용해되지 않는 단점 및 기호도 평가 불량.
- 캡셀제 : 상온에서 캡셀제 젤라틴의 물렁해지는 현상 및 흡습성(25°C, 상대습도 60%, 2hr. 노출 시 흡습율 2.45%)등 내용물이 젤라틴 재질을 변색시키는 현상이 발생.
- 정 제 : 원료의 고유한 맛과 향의 마스킹이 용이하고 600mg정제의 경우에도 물과 함께 복용이 용이.

그림 2. 임상약의 제형종류와 제형별 이화학적 특성

표5. 인체적용시험용 임상약의 제조방법

공정번호	공정명칭	원료, 시약, 용매 등	비고
1	원료 청량	주성분 인진쑈/녹차 물추출물 배당체 부형제 결정셀룰로오스 부형제 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 제피제 히드록시프로필메틸셀룰로오스 흡착제 이산화규소 제피제 자당지방산에스테르 용 제 주정 용 제 정제수 활택제 스테아린산마그네슘	
2	체과 (사과)	주성분 인진쑈/녹차추출물 배당체 부형제 결정셀룰로오스 부형제 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 흡착제 이산화규소	
3	혼합	공정 2의 반제품	
4	최종 혼합	공정3의 반제품 활택제 스테아린산마그네슘	
5	타정	공정4의 반제품	
6	코팅액 조제	코팅기제 : 히드록시프로필메틸셀룰로오스 코팅기제 자당지방산에스테르 용 제 주정	
7	필름코팅	공정6의 반제품	
8	선별	공정7의 반제품	
9	포장	공정8의 반제품	용기:알루미늄사면, 재질:알루미늄

제3절 지표물질의 밸리데이션 및 유해물질 평가

1. 지표물질 설정 시험

○ 기존의 성분과 비교하였으며, 후보성분을 뽑아 인진쑥, 수삼, 녹차와 비교분석하였다. 기존에 알려진 성분을 UV, retention time, MS 값을 기본 데이터를 확보하여 분석하였다.

가. 인진쑥추출물

① 인진쑥의 chemical profiling 분석

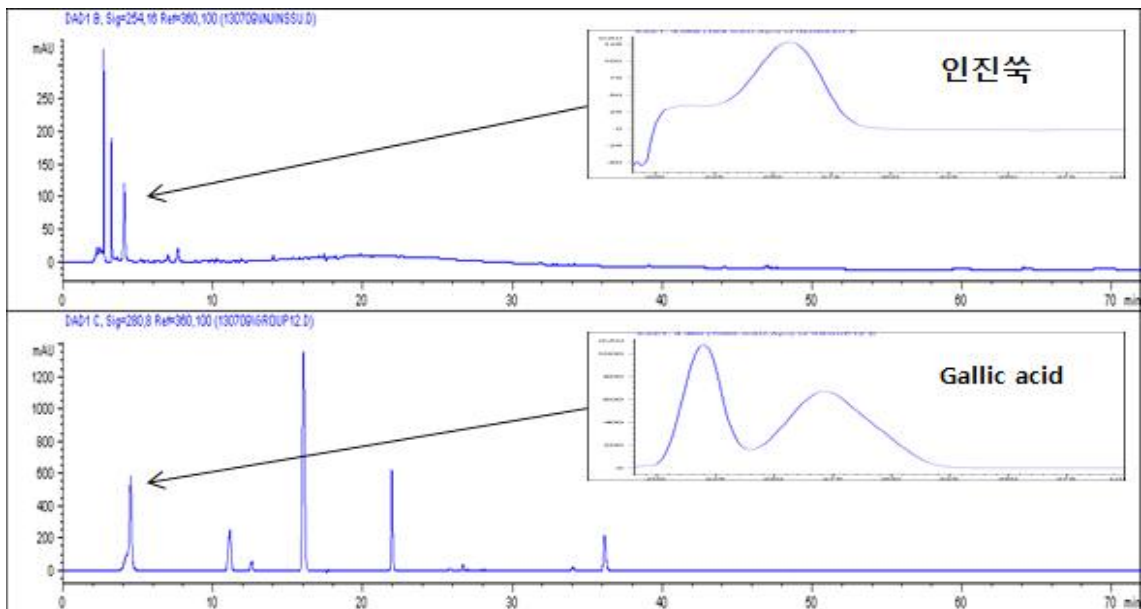


그림 3. 인진쑥의 chemical profiling 분석

- 분석 결과, 인진쑥과 gallic acid와 retention time과 UV 패턴이 비슷한 모습을 보였으며, 인진쑥과 인진쑥 + gallate의 spike test를 실시하였다.

② 인진쑥의 spike test 분석

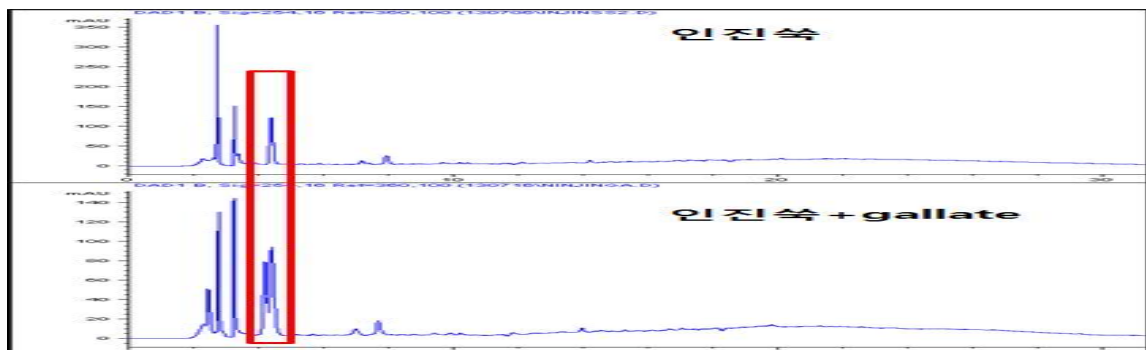


그림 4. 인진쑥, 인진쑥 + gallate의 spike test

○ spike test는 원 시료 안에 이미 알고 있는 특정성분을 넣어 특정성분의 유무를 파악 할 수 있으며, HPLC의 정확성 또한 알 수 있는 분석방법이다.

- RT값은 비슷하나 첨가하였을 때 다른 RT값에 Peak가 생기므로 gallate가 아님을 확인하였다.

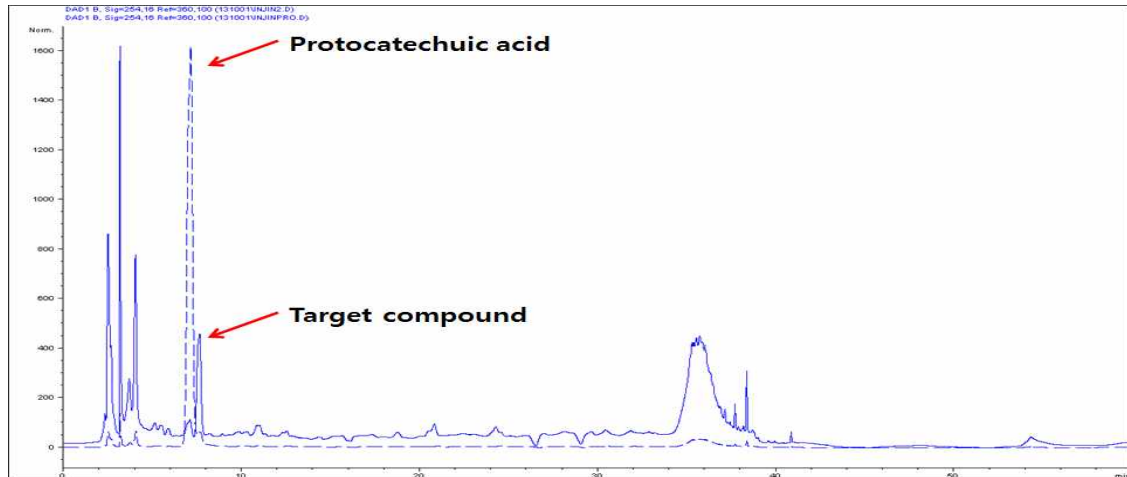


그림 5. 인진쑥과 Protocatechuic acid와의 spike test

- Chemical profile를 통한 인진쑥의 Target compound 성분이 Protocatechuic acid로 확인되었음.

③ 인진쑥의 Solubility

○ 인진쑥(SND에서 시료 제공)추출물은 물에 잘 녹지 않아서 Solubility를 측정하였다. 30% 에탄올과 70% 에탄올에 녹인 후 원심분리를 하여 상, 하층으로 분리하였다. 70% 에탄올에서 Solubility가 가장 좋았다. 이것을 LC로 확인 결과 <그림6>과 같은 결과를 확인 할 수 있었다.

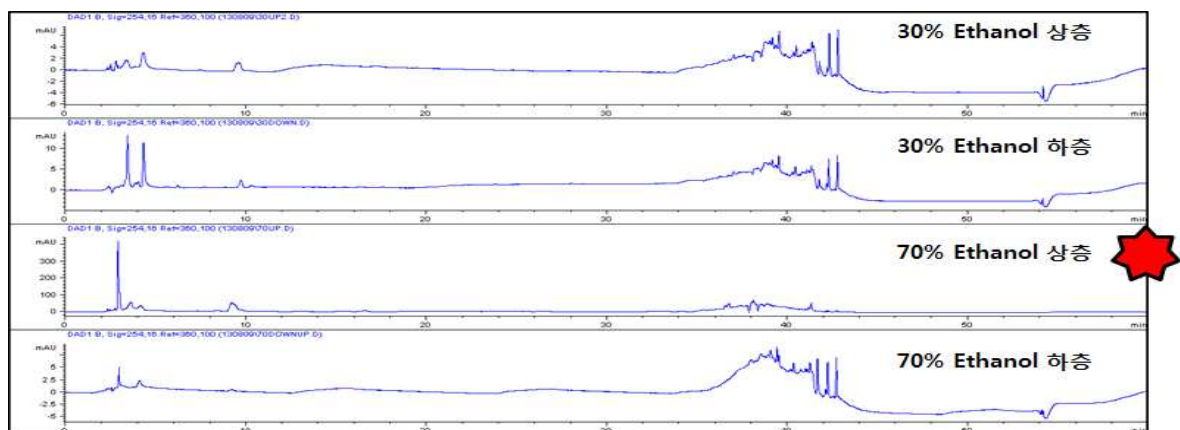


그림 6. 인진쑥의 solubility 확인

- 따라서 70% 에탄올에서 Solubility가 가장 좋았으며, 상층에는 저분자들이, 하층에는 고분자들이 있는 것으로 확인된다.

④ 인진쑥의 용매 분획

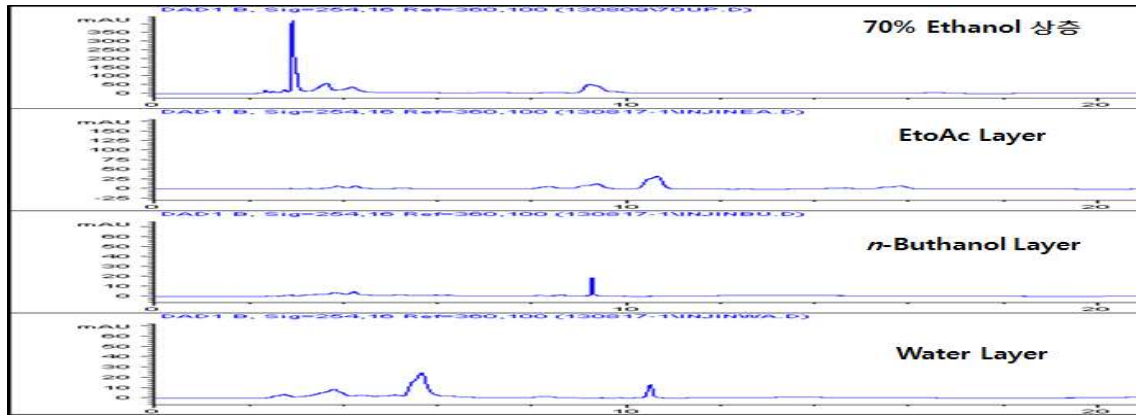


그림 7. 인진쑥의 70% ethanol 상층의 용매분획

○ 70% 에탄올의 상층(저분자)을 가지고 극성에 따른 용매 분획을 EtoAc, Buthanol, Water로 실시하였다. 용매분획을 통하여 극성별로 물질들을 분리하였다. 이것을 LC로 확인 결과 <그림 7.>과 같은 결과를 확인 할 수 있었다.

- 용매 분획 후 농축하여 수율을 확인한 결과 EtoAc 164 mg, Buthanol 10 mg, Water 13 mg 확인되었다. 수율적인 면에서 EtoAc층이 수율이 높았으며, 따라서 지표 성분으로 많은 물질이 있을 것이 예상된다. 용매 분획한 EtoAc층으로 Recycle HPLC를 이용하여 저분자를 분리하였다.

⑤ Recycle HPLC를 이용한 저분자 분리

○ Recycle HPLC(JAI, LC908-C60)를 이용하였다. 이동 용매는 5% Methanol에 0.1% TFA를 첨가하였고, 용매 분획한 인진쑥 EtoAc층 700mg을 이동용매 2ml에 녹인 후 주입하였다. 5% Methanol에서, 서서히 100% Methanol로 분석하였다. 타겟물을 농축하여 HPLC 확인 결과 254nm에서 단일 피크로 확인되었지만, 280nm에서는 3개의 피크가 확인되었다. 이 부분을 농축하여 다시 순환크로마토그래피(Recycle HPLC)를 이용하여 추가 분리 실시하였다.

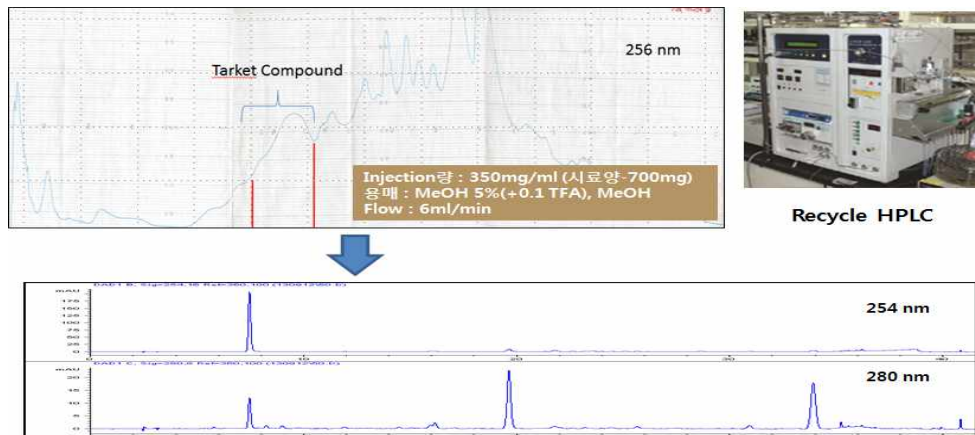


그림 8. 인진쑥 EtoAc layer을 recycle HPLC을 이용한 분리

⑥ 인진쑥의 2차 지표성분 후보 물질 분리를 위한 실험

○ Recycle HPLC(JAI, LC908-C60)를 이용하여 추가 분리를 실시하였다. 이동 용매는 5% Methanol에 0.1% TFA를 첨가하였고, 용매 분획한 인진쑥 EtoAc층으로부터 타겟물 72mg을 이동용매 1ml에 녹인 후 주입하였다. 5% Methanol에서, 서서히 100% Methanol로 분석하였다. 타겟물을 농축하여 HPLC 확인 결과 210, 254, 280nm에서 단일 피크로 확인되었으며, 미지의 성분으로 판단되어 이 성분을 향후 LC/MS, NMR등을 통해 성분을 규명 할 예정이다, 진행 중에 있다.

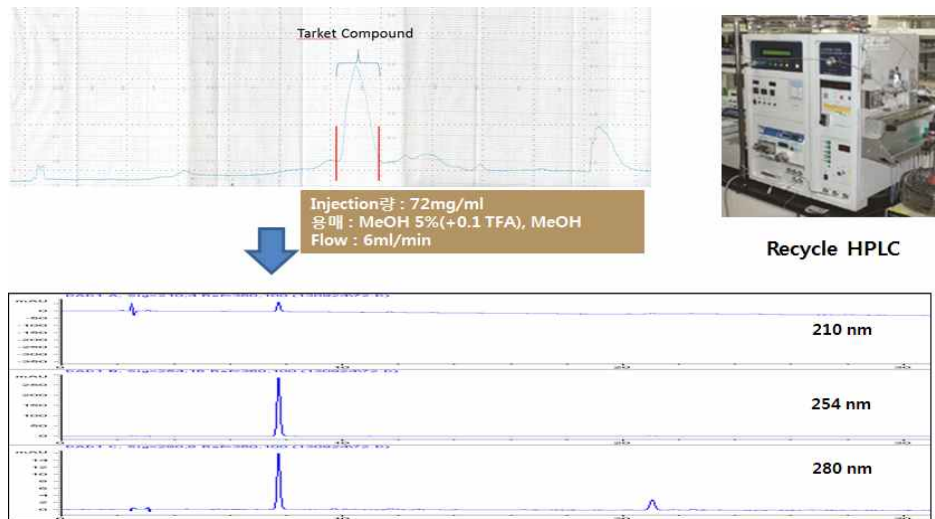


그림 9. 인진쑥 EtoAc layer을 recycle HPLC을 이용한 추가분리

⑦ 인진쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg) 원료 기준 설정

⑦-1. 의약품, 식품 활용 가능성

인진쑥에 대하여 식품의약품안전처 식품원재료 검색한 결과, 식품 소재로 지상부가 가능하다. 인진쑥의 약성에 대해서 <동의학사전>에는 “맛은 쓰고 매우며 성질은 매우 차다. 방광경, 비경, 위경에 작용한다. 열을 대리고 습을 없애며, 소변을 잘 보게 한다” 라고 적혀있다.

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
사철쑥	인진쑥, 애당쑥, 면인진, 인진호, 인진(茵陳), 자화열당, 황화열당, 초조용, Tarragon, 생당쑥, 냉강쑥, 더위지기, 인진초	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg	인진호(茵陳蒿, Artemisiae Capillaris Herba)	지상부		

⑦-2. 성 상

국화과의 여러해살이풀로 높이는 30-100cm이며, 잎은 어긋나고 꽃이 피지 않는 가지 끝에 서는 뭉쳐난다. 초가을에 노란 꽃이 원추(圓錐) 화서로 핀다. 어린잎은 식용하고 약재로도 쓴다. 개울가 모래땅에서 난다.

나. 수삼추출물

① 수삼(인삼)의 chemical profiling 분석

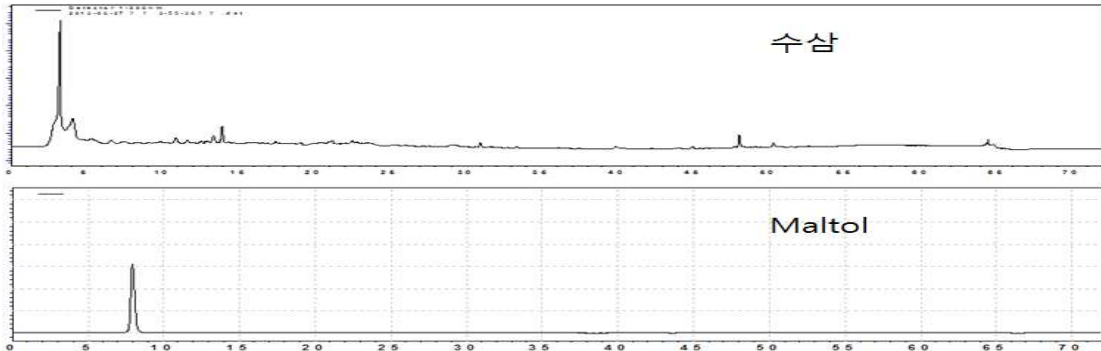


그림 10. 인삼과 Maltol의 비교

- 문헌 검색에서는 수삼에 maltol이 있는 것으로 확인되었지만, 성분 분석 결과 수삼의 main성분인 maltol은 없는 것으로 확인되었다.

② 인삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer.) 원료 기준 설정

②-1. 의약품, 식품 활용 가능성

인삼에 대하여 식품의약품안전처 식품원재료 검색한 결과, 식품 소재로 잎, 뿌리, 조직배양삼, 열매가 가능하다. 인진쑈의 약성에 대해서 <동의보감>에는 “곽란으로 딸꾹질하는 것을 멎게 하며 v{위로 고름을 뱉는 것을 치료하며 담을 삭힌다” 라고 적혀있다.

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
땅두릅나무		<i>Oplopanax elatus</i> Nakai	자인삼(刺人蔘)-뿌리			전체
미국삼	서양인삼, American Ginseng, 화기삼	<i>Panax quinquefolius</i> L.		뿌리 / 잎		
인삼	Ginseng, 백삼(白蔘), 홍삼(紅蔘), 야산삼(野山蔘), 별직삼(別直蔘), 귀개, 토정, 인초, 열삼, 장뇌삼(長腦蔘), 산양삼	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer, <i>Panax schinseng</i> Nees (이명)	인삼(人蔘, Ginseng Radix Alba)	잎 / 뿌리 / 조직배양삼 / 열매		
인삼로 (人蔘廬, Ginseng Nodus)						
자인삼 (刺人蔘)						

②-2. 성장

두릅나뭇과(Araliaceae)의 여러해살이풀로 주로 4-6년 된 뿌리를 약재로 사용한다. 건강 기능을 향상시키는 성질은 사포닌(진세노사이드)과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 재배 삼, 장뇌 삼, 산삼이 있으며, 수삼, 백삼, 홍삼으로 가공한다. 우리나라 인삼은 고려 인삼으로 알려져 있다. 국제식품규격위원회는 2009년 인삼 제품에 대한 아시아 지역의 규격(CODEX STAN 295R-2009)을 제정하였다. 인삼 제품은 인삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer) 또는 아메리카 인삼(*Panax quinquefolius* L.)으로 만든 것으로서 건조 인삼(dried raw ginseng), 증자한 건조 인삼(dried steamed ginseng), 인삼 추출물(raw ginseng extract)과 증자한 인삼 추출물(steamed ginseng extract)로 정하고 있다. 특히 인삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer)으로 만든 제품은 백삼 또는 홍삼으로 표시할 수 있도록 하고 있다.

③ 인삼 (건강기능식품의 기준 및 규격 전면 개정, 2008)

1) 제조기준

(1) 원재료 : 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)

(2) 제조방법

(가) 상기 (1)의 원재료를 그대로 분말화하거나 수분을 제거한 후 분말화 하여 식용에 적합하도록 함

(나) 상기 (1)의 원재료를 물이나 주정(물·주정 혼합물 포함)으로 추출하여 여과하거나, 여과한 후 농축 또는 발효하여 식용에 적합하도록 함

(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 진세노사이드 Rg1과 Rb1을 합하여 0.8 ~ 34mg/g 함유하고 있어야 함

(4) 제조 시 유의사항 : 원재료인 인삼근은 '인삼산업법'에 적합하여야 하며 4년근 이상의 것으로 춘미삼, 묘삼, 삼피, 인삼박은 사용할 수 없으며 병삼인 경우에는 병든 부분을 제거하고 사용할 수 있음

2) 규격

(1) 색상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함

(2) 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합

(가) 원료성 제품 : 표시량 이상

(나) 최종제품 : 표시량의 80 ~ 150%

(3) 세균수 : 1mL 당 3,000 이하(농축액에 한함)

(4) 대장균군 : 음성

3) 최종제품의 요건

(1) 기능성 내용 : 면역력 증진, 피로회복

(2) 일일 섭취량 : 면역력 증진, 피로회복 : 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계로서 3 ~ 80mg

4) 시험법

(1) 시험용액의 조제

(a) 분말의 시험용액

시료 약 1g을 정밀히 달아 250mL의 환류용 플라스크에 취한다. 50% 메탄올 용액 50mL를 가하여 70~80℃의 수욕에서 1시간 환류냉각한 후 식히고 원심 분리한 다음 상등액을 농축플라스크에 취한다. 잔류물에 대하여 위의 조작을 1회 더 반복한다. 농축플라스크에 옮긴 상등액을 수욕 중에서 60℃이하에서 감압 농축한다. 농축물을 물-아세트니트릴 혼합용매(80:20) 2mL에 용해한 다음 여과(0.45μm)하여 시험용액으로 한다.

(b) 농축액 및 농축액 분말의 시험용액

시료 약 2g을 정밀히 달아 물 50mL에 완전히 용해한 다음 여과(0.45μm)하여 시험용액으로 한다.

(c) 인삼성분함유제품의 시험용액

시료 약 3~4g을 정밀히 달아 물 50mL에 완전히 용해한 다음 여과(0.45 μm)하여 시험용액으로 한다. 시료에 지용성물질이 포함된 경우, 시료 약 3~4g을 분액여두에 취

하고 n-hexane 100mL 및 70% 메탄올 100mL를 가하여 3시간 동안 진탕 추출한다. 층이 완전히 분리될 때까지 정치한 다음 하층을 농축플라스크에 취하여 수욕 중에서 감압농축하고 농축물을 물 10mL에 용해한 후 여과(0.45 μ m)하여 시험용액으로 한다.

(2) 표준용액의 조제

진세노사이드 Rb1 및 Rg1 표준품 각각을 메탄올에 녹여 여과(0.45 μ m)하여 각각 표준원액을(1mg/mL)만들고, 표준원액을 메탄올로 적당히 희석하여 표준용액을 만든다.

(3) 시험조작

(a) 고속액체크로마토그래프의 측정 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼(ODS 칼럼, 4.6mm×250mm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정 파장)	자외부흡광광도검출출기(203nm)		
주입량	20 μ L		
이동상	아세토니트릴 : 물 (gradient)		
	시간	물	Acetonitrile
	Int	80%	20%
	10	80%	20%
	40	68%	32%
	48	58%	42%
	50	0%	100%
	60	0%	100%
유량	62	80%	20%
	70	80%	20%
유량	1.6mL/min		

주) 피크의 분리능 등 최적조건을 주기 위해 이동상 비율 및 유속을 변경할 수 있다.

(b) 정량시험

표준용액과 시험용액을 각각 20 μ L씩 주입하여 앞의 조건에서 시험한다. 표준용액의 피크의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 진세노사이드 Rb1 및 Rg1의 농도(μ g/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 시료 중 진세노사이드 Rb1 및 Rg1 함량(mg/g)을 구한다.

[계산식]

$$\text{진세노사이드 Rb1 함량(mg/g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

$$\text{진세노사이드 Rg1 함량(mg/g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

S : 시험용액 중 개별 진세노사이드 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

다. 녹차추출물

① 녹차의 chemical profiling 분석

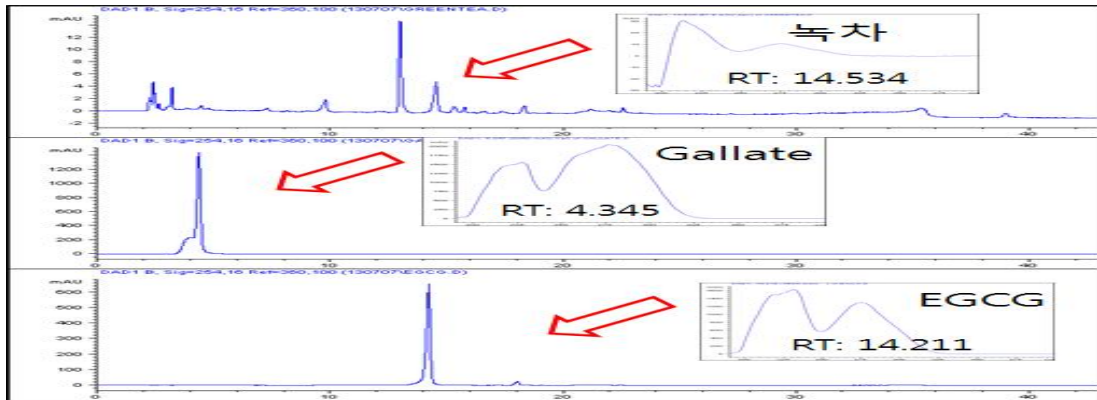


그림 11. 녹차와 Gallate, EGCG의 비교

- 분석 결과, 녹차의 성분 중 EGCG와 UV, RT값이 같음을 확인되었다. 이를 바탕으로 녹차에 일정한 EGCG를 넣어 spike test를 실시하였다. spike test 결과 EGCG가 증가됨이 확인되어 존재함을 알 수 있었다. <그림12.> 따라서 녹차의 지표성분으로는 EGCG (Epigallocatechin gallate)로 결정하였다.

② 녹차의spike test 분석

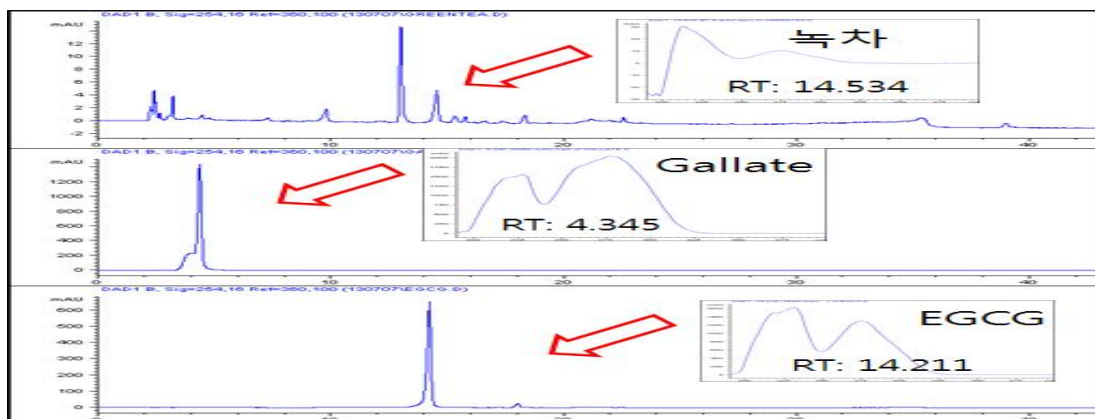
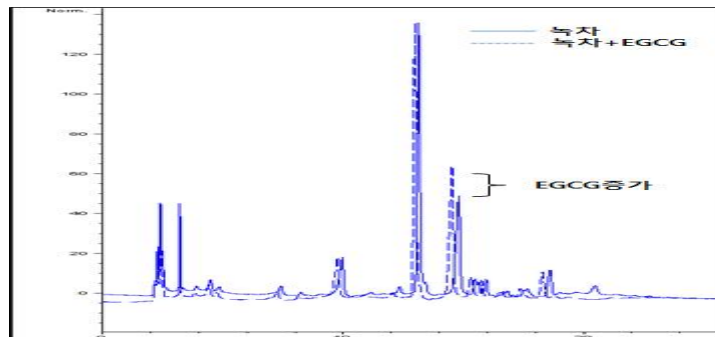


그림 12. 녹차와 EGCG와의 spike test

③ 녹차(*Camellia sinensis* L.) 원료 기준 설정

③-1. 의약품, 식품 활용 가능성

녹차에 대하여 식품의약품안전처 식품원재료 검색한 결과, 식품 소재로 잎, 꽃, 줄기, 씨 가능하다.

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
차나무	녹차나무(Green Tea), 다목, Tea, 다엽	<i>Camellia sinensis</i> L. <i>Thea sinensis</i> L.(이명)	다실(茶實)-열매, 산차아목(山茶亞木), 산차과(山茶科), 차속(茶屬)	잎 / 꽃 / 줄기 / 씨		

③-2. 성상

차나뭇과(Theaceae)의 상록 활엽 관목으로 잎은 긴 타원형이다. 어린잎은 차 원료로, 열매는 기름을搾다. 한국, 일본, 중국, 인도 등지에 분포한다.

③-3. 녹차추출물 (건강기능식품의 기준 및 규격 전면 개정, 2008)

1) 제조기준

- (1) 원재료 : 녹차(*Camellia sinensis*, *Thea sinensis*) 잎
- (2) 제조방법 : 상기 (1)의 원재료를 물 또는 주정(물·주정 혼합물 포함)으로 추출 후 여과하여 식용에 적합하도록 함
- (3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 카테킨을 200mg/g 이상 함유하고 있어야 함.
카테킨은 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC), 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨((-)-epicatechin, EC) 및 에피카테킨갈레이트((-)-epicatechin gallate, ECG) 합계량으로 환산하며 4가지 카테킨이 모두 확인되어야 함. 최종제품의 경우 4가지 카테킨을 모두 확인할 필요는 없음
- (4) 제조 시 유의 사항 : 카페인 함량이 50,000mg/kg 이하이어야 함

2) 규격

- (1) 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함
- (2) 카테킨
 - (가) 원료성 제품 : 표시량 이상
 - (나) 최종제품 : 표시량의 80 ~ 120%
- (3) 카페인(mg/kg) : 50,000 이하
- (4) 대장균군 : 음성

3) 최종제품의 요건

- (1) 기능성 내용 : 항산화 작용
- (2) 일일 섭취량
카테킨으로서 0.3 ~ 1g
- (3) 섭취 시 주의사항
카페인 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음

4) 시험법

(1) 장치

고속액체크로마토그래프

(2) 표준용액 조제

에피갈로카테킨(EGC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨(EC), 에피카테킨갈레이트(EGC) 표준품 각각을 메탄올에 녹여 각각 표준원액(1,000 µg/mL)을 만들고, 표준원액을 메탄올로 적당히 희석하여 표준용액을 만든다.

(3) 시험용액 조제

에피갈로카테킨(EGC), 에피갈로카테킨갈레이트(EGCG), 에피카테킨(EC) 및 에피카테킨갈레이트(EGC)의 합계량으로서 20 ~ 80mg이 함유되도록 적당량의 시료를 용량플라스크에 정밀하게 달아 메탄올을 가하고 초음파를 이용하여 분산 또는 용해시켜 정확하게 100mL로 한다. 이를 0.45µm의 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

(4) 시험조작

(a) 고속액체크로마토그래프의 측정 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼(ODS 칼럼, 4.6mm×250mm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정과장)	자외부흡광광도검출기(280nm)		
주입량	10µL		
이동상	0.1% 초산용액 : 아세토니트릴 (gradient)		
	시간(분)	0.1% 초산용액	아세토니트릴
	0	85	15
	10	85	15
	15	70	30
	20	50	50
	21	85	15
30	85	15	
유 속	1.0mL/min		

(b) 정량시험

표준용액과 시험용액을 각각 10µL씩 주입하여 앞의 조건에서 시험한다. 표준용액 중 카테킨의 피크의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액중 카테킨의 농도(µg/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 시료 중 카테킨의 함량(%)을 구한다.

[계산식 1]

$$\text{개별 카테킨 함량(mg/g)} = S \times \frac{V}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

S : 시험용액 중 개별 카테킨의 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액의 전량(mL)

[계산식 2]

$$\text{카테킨 함량(mg/g)} = \text{EGC(mg/g)} + \text{EGCG(mg/g)} + \text{EC(mg/g)} + \text{ECG(mg/g)}$$

라. 결론

본 실험에서는 위 질환 예방 소재 및 배합물에 대해 지표성분으로 선정 및 시험법을 확립하고 검증(validation)하여 시험방법의 적합성과 타당성을 검증하고자 한다.

○ 건강기능식품의 기준 및 규격 전면 개정을 통하여 규격 설정을 확립하였음.

○ 지표성분으로는 인진쑥은 protocatechuic acid로 선정, 인삼은 ginsenoside로 선정, 녹차는 EGCG로 선정하였으며, 이로부터 생산된 원료의 추출물에 함유된 지표성분의 양을 측정하여 기준규격을 설정하고,

안정성 테스트 실시할 예정임

2. 건강기능식품 개별인정원료의 자료 Filling - 지표물질의 시험법 밸리데이션 확보

가. 녹차추출물의 지표물질 EGCG의 시험법

(1) 개요 : 본 연구는 인진쑥녹차추출 복합물을 표준화하기 위하여 기능/지표성분인 Epigallocatechin gallate (EGCG)을 분석 할 수 있는 시험법을 검토 및 설정 하고자 한다.

(가) 분석시료 : 인진쑥녹차추출복합물 - (제조번호 : SD-MPGT-004)

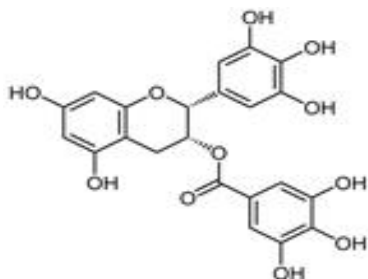
(나) 제조방법

① 원재료 : 인진쑥, 녹차

② 원재료 : 제조과정 : 인진쑥을 물 추출한 후 여과·농축, 주정처리 및 살균 후 건조한다. 녹차를 물 추출한 후 여과·농축, 주정처리 및 살균 후 건조한다. 그리고 인진쑥 분말과 녹차 분말을 비율에 맞게 배합한다.

(다) 기능/지표물질

① 녹차 - 성분명 : Epigallocatechin gallate (EGCG)



CAS No. : 989-51-5

Chemical name : (-)-Epigallocatechin
gallate

Molecular formula : $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$

Molecular weight : 458.37

(2) 기준·규격 설정

(가) 인진속녹차추출 복합물 중 EGCG 시험법 검토

- 인진속녹차추출복합물의 EGCG 함량 분석을 위하여, 우선 한림대학교 산학협력단에서 제공한 시험법의 적용여부를 검토하였으나, EGCG의 Peak 분리도에 문제점이 발견되어 문헌 검토를 통하여 분석법을 추가 검토하여 최종 분석법을 설정하였다.

① 표준용액의 제조

- 표준물질 EGCG를 20% 메탄올에 10mg/ml의 농도로 녹인 후, 멤브레인 필터로 여과한다. 제조한 표준품을 적당량 희석하여 표준용액으로 한다.

② 시험용액 조제

- 시료 200 uL을 10mL 부피 플라스크에 넣는다. (카테킨 20~80mg이 함유되도록)
- 메탄올을 가하여 조심스럽게 흔든 뒤, 표선까지 맞춘다.
- 약 10분 가량 초음파진탕기로 용해시킨다.
- 메탄올을 이용하여 10배 희석 후, 0.45um 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 사용한다.

③ 기기 분석조건

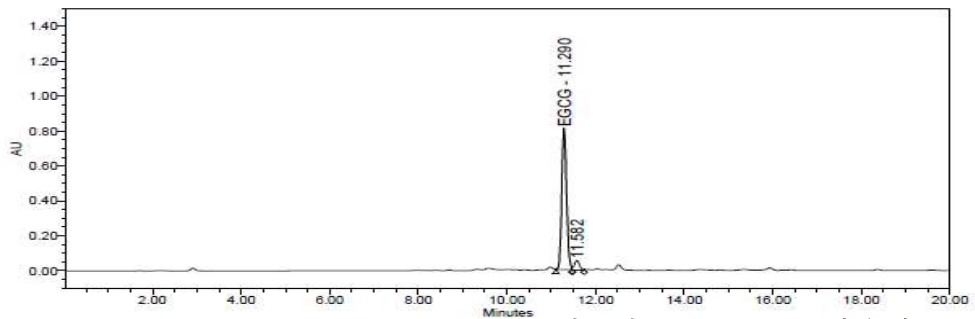
항목	수정안
주입량	20 μ l
칼럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	A: 0.1% 초산용액, B : ACN
유속	1.0 mL/min
칼럼	C18 (4.6 \times 250 mm)
검출기(파장)	280 nm

④ 이동상 조건

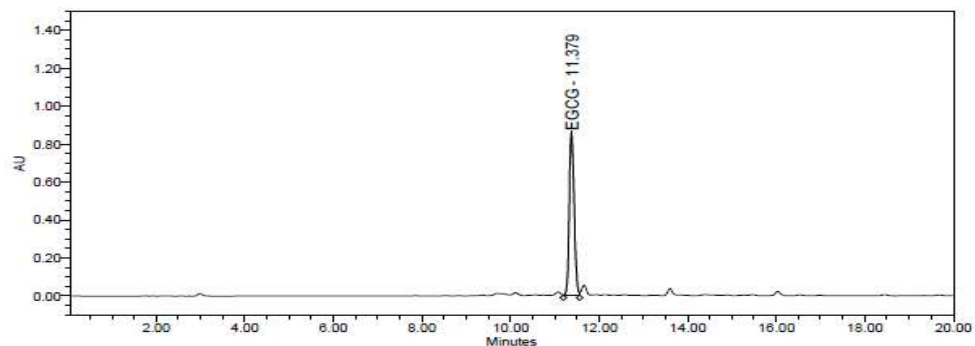
시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	95	5
20	75	25
21	0	100
35	0	100
36	95	5
50	95	5

(나) 분석 결과

① 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 변화



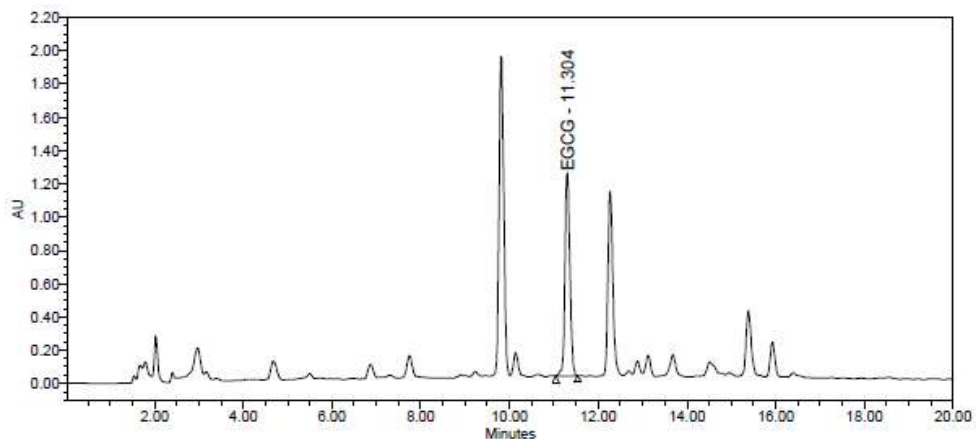
A) EGCG Std 400 at 20% EtOH (이동상 A : 0.1% 초산용액)
- Area : 6128312 / R.T : 11.290 min



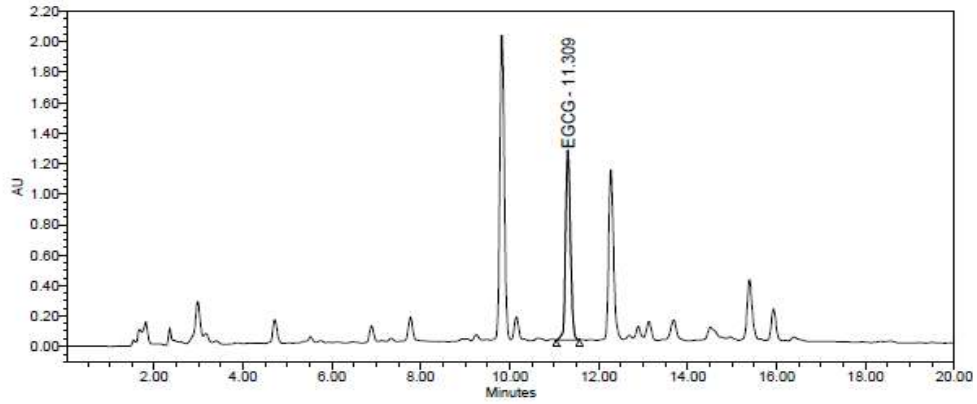
B) EGCG Std 400 at 20% EtOH (이동상 A : 0.1% TFA용액)
- Area : 6518077 / R.T : 11.379 min

그림 13 . 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 표준품 EGCG 의 chromatogram

② 녹차추출 농축액 분말에서 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 변화



A) 녹차추출농축액 분말 at 20% EtOH (이동상 A : 0.1% TFA 용액)
- Area : 9391910

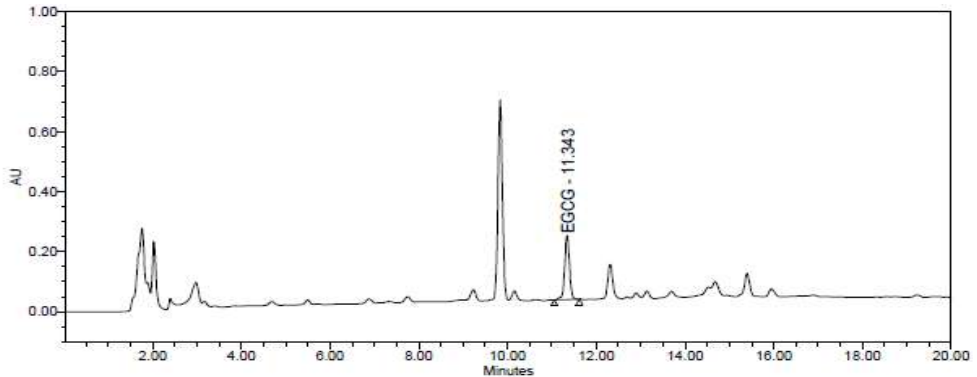


B) 녹차추출농축액분말 at 20% MeOH (이동상 A : 0.1% TFA용액)

- Area : 9405025

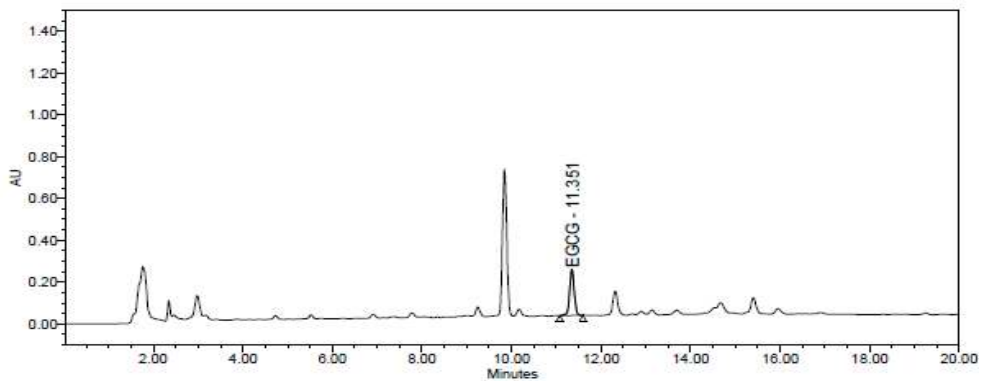
그림 14. 녹차추출 농축액 분말에서 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 EGCG의 chromatogram

③ 인진쑥녹차 복합물에서 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 변화



A) 인진쑥녹차추출 복합물 at 20% EtOH (이동상 0.1% TFA용액)

- Area : 1611751



B) 인진쑥녹차추출 복합물 at 20% MeOH (이동상 0.1% TFA용액)

- Area : 1576778

그림 15. 인진쑥녹차 복합물에서 전처리 용매 및 이동상 조건에 따른 EGCG의 chromatogram

⑤ 결론

- 20% MeOH과 20% EtOH로 전처리한 EGCG Peak는 샤프하고 깔끔하게 나타났으며, Peak 패턴과 Area의 차이가 없는 것으로 확인되었다. (그림 13 ~ 15).
- 수정 분석법에는 MeOH을 사용하게 되어 있으며, HPLC 분석 시 EtOH 보다는 MeOH을 사용하는 것이 바람직하므로 전처리 용매는 20% MeOH을 사용하는 것으로 결정하였다.
- 이동상 조건 중 0.1% 초산용액과 0.1% TFA용액의 분석패턴과 결과 값이 같았으나, 인진 지표물질인 PCA 분석법에서 이동상으로 0.1% TFA용액을 사용하므로 가급적 같은 용매를 동상으로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되어 이동상으로 0.1% TFA 용액으로 설정 하였다. (그림 13 ~ 15).
- 상기 사항을 검토하고 반영하여 EGCG 분석법 확정하였다.

(3) 최종 선정된 분석법을 통해 표준품의 정밀성과 직선성에 대한 실험

(가) 표준품

- 표준용액을 약 1mg/1mL로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석을 진행하였다. 그 결과 EGCG는 200 ~ 1,000 ppm에서 직선성이 확인되었다($R^2=0.9981$). 표준용액의 검량선 결과는 표 6과 같다.

표 6. 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	200	4,804,462	
2	400	9,619,283	
3	600	14,476,210	
4	800	18,936,425	
5	1,000	22,838,656	

(나) 인진쑥녹차추출 복합물

- 인진쑥녹차추출 복합물 시료 약 0.2 g을 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 EGCG 함량을 반복 실험한 결과, 18.22 ± 0.0567 mg/g으로 나타났다(표 7).

표 7. 시료량을 동일하게 취한 인진쑥녹차추출 복합물 중 EGCG함량

시료명	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (g)	용액량 (mL)	희석배수	표준품순도	EGCG (mg/g)	합계±SD (mg/g)
1	381.528	0.2046	10	1	0.98	18.274	18.22 ±0.0567
2	383.063	0.2067	10	1	0.98	18.161	
3	382.034	0.2054	10	1	0.98	18.227	

(다) 인진쑈녹차추출 복합물의 시료량 변화에 따른 영향

- 인진쑈녹차 추출 분말 시료량을 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg으로 달리 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 EGCG 함량을 반복 실험한 결과, 8.16 ± 0.248 mg/g으로 편차 없는 수치를 얻을 수 있었다(표 8).

표 8. 시료량을 달리 취한 인진쑈녹차추출 복합물 중 EGCG 함량

시료명	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (g)	용액량 (mL)	희석 배수	표준품 순도	EGCG (mg/g)	합계±SD (mg/g)
1	280.180	0.1540	10	1	0.98	17.829	
2	401.582	0.2167	10	1	0.98	18.161	18.166
3	462.959	0.2485	10	1	0.98	18.257	±0.248
4	591.628	0.3148	10	1	0.98	18.417	

(4) 시험법 검토 결과

(가) 본 시험법 검토는 인진쑈녹차추출 복합물 중 EGCG 정량분석 가능여부를 위한 것이며, 이를 위해 우선 한림대학교 산학협력단에서 제공한 시험법의 적용여부를 검토하였으나, EGCG의 Peak 분리도에 문제점이 발견되어 문헌 검토를 통하여 분석법을 추가 검토하여 최종 분석법을 설정하였다.

(나) 최종 선정된 분석법을 통해 표준품의 정밀성과 직선성에 대해 실험을 진행하였다. 그 결과 EGCG는 200 ~ 1,000 ppm에서 직선성이 확인되었다($R^2=0.9981$).

(다) 인진쑈녹차추출 복합물 시료 약 0.2 g을 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 EGCG 함량을 반복 실험한 결과, 18.22 ± 0.0567 mg/g으로 나타났다.

(라) 인진쑈녹차추출 복합물의 시료량을 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg으로 달리 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 EGCG 함량을 반복 실험한 결과, 18.16 ± 0.248 mg/g으로 편차 없는 수치를 얻을 수 있었다.

(5) 최종 설정된 시험법

(가) 표준물질

① Epigallocatechin gallate (Sigma, 93894)

분자식 : $C_{22}H_{18}O_{11}$, 분자량 : 458.37, CAS No. : 989-51-5

(나) 표준액 제조

① 표준품 10mg 을 10mL 부피플라스크에 넣고 HPLC 급 20% 메탄올로 표선까지 채운다.

② 제조된 표준품을 20% 메탄올로 희석하여 표준액 1,000 ug/mL, 800 ug/mL, 600 ug/mL, 400 ug/mL, 200 ug/mL 로 제조한다.

(다) 검액 제조

- ① 시료 200mg 을 10mL 부피플라스크에 넣는다.
- ② 20% 메탄올로 표선까지 정용한다.
- ③ 10 분동안 초음파진탕기로 추출한다.
- ④ 15mL 코니칼튜브에 옮겨 담은 후 4,000rpm 에서 10 분동안 원심분리 한다.
- ⑤ 상등액을 0.45 μ m(RC-membrane) 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.
※농도가 높을 시 20% 메탄올로 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

(라) 분석조건

① EGCG (Epigallocatechin gallate) 분석조건

항목	조건
주입량	20 μ l
칼럼온도	40 $^{\circ}$ C
샘플온도	10 $^{\circ}$ C
이동상	A : ACN, B: H ₂ O(add0.1%TFA)
유속	1.0 mL/min
칼럼	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (4.6 \times 150 mm, 3.5 μ m) 또는 이와 동등한 것
검출기(파장)	280 nm

② EGCG (Epigallocatechin gallate) 이동상조건

시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	5	95
20	25	75
21	100	0
35	100	0
36	5	95
50	5	95

(마) 계산

$$\text{EGCG (mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$$

- C: 시험용액 중 지표성분의 농도 (ug/mL)
- a: 시험용액의 전량 (mL)
- b: 희석배수
- S: 시료량 (g)
- 1/1,000: 단위 환산 계수

나. 인진쑥 PCA 분석의 시험법 검토

(1) 개요 : 본 연구는 인진쑥녹차추출 복합물을 표준화하기 위하여 기능/지표성분인 Protocatechuic acid (PCA)을 분석 할 수 있는 시험법을 검토 및 설정 하고자 한다.

(가) 분석시료 : 인진쑥녹차추출 복합물 - (제조번호 : SD-MPGT-004)

(나) 제조방법

① 원재료 : 인진쑥, 녹차

② 원재료 : 제조공정 : 인진쑥을 물 추출한 후 여과·농축, 주정처리 및 살균 후 건조한다. 녹차를 물 추출한 후 여과·농축, 주정처리 및 살균 후 건조한다. 그리고 인진쑥 분말과 녹차분말을 비율에 맞게 배합한다.

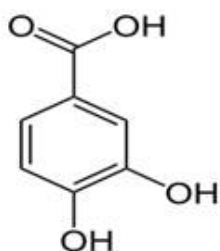
(다) 기능/지표물질

① 인진쑥 - 성분명 : Protocatechuic acid (PCA)

(2) 기준·규격 설정

(가) 인진쑥녹차추출 복합물 중 PCA 시험법 검토

- 인진쑥녹차추출 복합물의 PCA 함량 분석을 위하여, 우선 한림대학교 산학협력단에서 제한 시험법의 적용여부를 검토하였으나, PCA의 Peak 분리도에 문제점이 발견되어 문헌 검토를 통하여 분석법을 추가 검토하여 최종 분석법을 설정하였다.



CAS No. : 99-50-3

Chemical name : Protocatechuic acid

Molecular formula : C₇H₆NO₄

Molecular weight : 154.12

① 표준용액의 제조

- 표준물질 PCA를 20% 메탄에 1mg/10ml의 농도로 녹인 후, 멤브레인 필터로 여과한다. 제조한 표준품을 적당량 희석하여 표준용액으로 한다.

② 시험용액 조제

- 시료 200 uL을 10mL 부피플라스크에 넣는다.
- 메탄올을 가하여 조심스럽게 흔든 뒤, 표선까지 맞춘다.
- 약 10분 가량 초음파진탕기로 용해시킨다.
- 15mL 코니칼튜브에 옮겨 담은 후 4,000rpm에서 10분간 원심분리 한다.
- 상등액을 멤브레인 필터(0.45μm)로 여과하여 시험용액으로 한다.

③ 기기 분석조건

항목	조건
주입량	10 μ l
칼럼온도	30 $^{\circ}$ C
이동상	A : H ₂ O(add0.1%TFA),B:ACN
유속	0.7 mL/min
칼럼	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (4.6 \times 150 mm, 3.5 μ m) 또는 이와 동등한 것
검출기(파장)	254 nm

④ Protocatechuic acid 이동상 조건(기존 방법)

시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	95	5
30	83	17
40	0	100
50	0	100
55	95	5
65	95	5

⑤ Protocatechuic acid 이동상 조건(변경조건)

시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	95	5
30	87	13
40	0	100
50	0	100
55	95	5
65	95	5

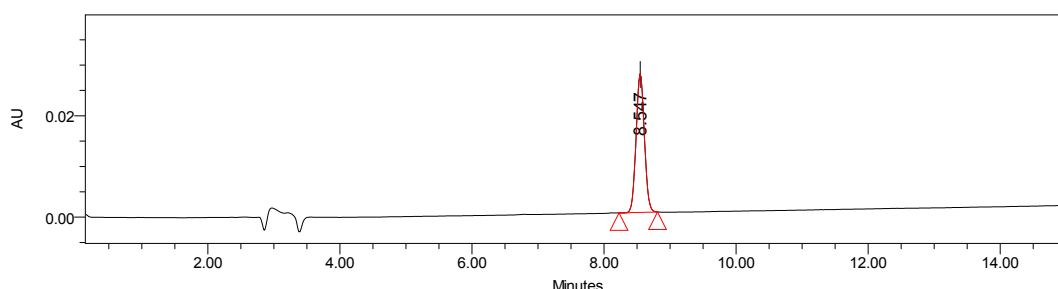
(나) 분석 결과

- 한림대에서 제시 분석법(기존방법)에서 이동상 조건 중 30분의 17% ACN을 13% ACN으로 변경하여 분석한 결과, PCA의 R.T가 8.09 ~ 8.22분 내에서 안정적으로 나타남을 확인하였다.

- 인진쑥추출 분말 시료에서 PCA peak 주변의 다른 peak가 분리되는 것이 확인되어 PCA의 peak 분리도 문제점을 개선할 수 있었다(그림. 16 ~ 17).

① 표준용액 시료 내 Protocatechuic acid의 chromatogram

a. 기존 방법



b. 변경 방법(30분대에서 13% ACN)

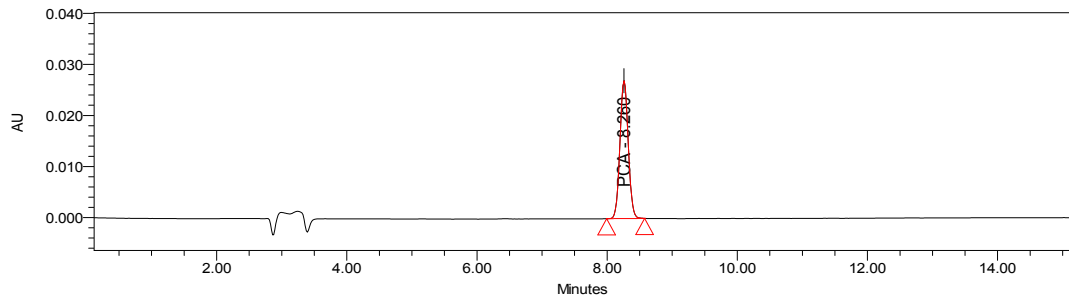
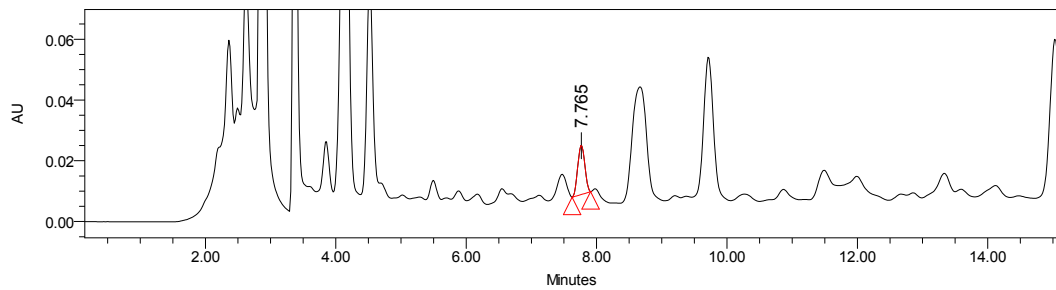


그림 16. 표준용액 시료 내 Protocatechuic acid 의 chromatogram (STD : 5 ppm)

② 인진쭈추출 분말 시료 내 Protocatechuic acid 의 chromatogram

a. 기존 방법



b. 변경 방법(30분대에서 13% ACN)

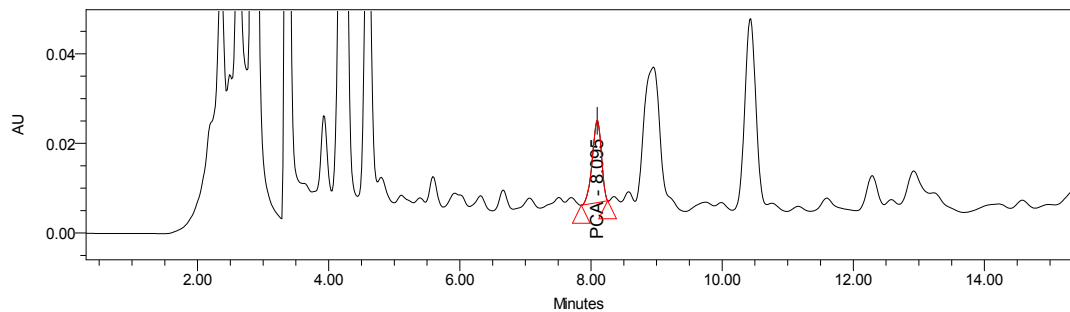
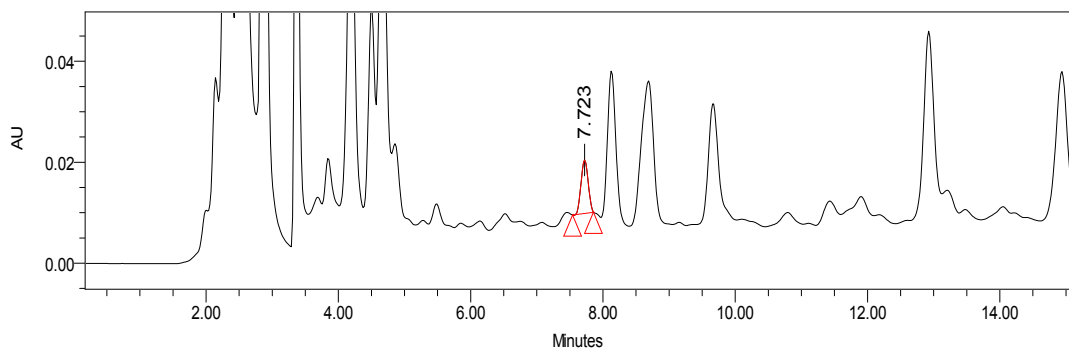


그림 17. 인진쭈추출 분말 시료 내 Protocatechuic acid 의 chromatogram

③ 인진쭈녹차추출 복합물 시료 내 Protocatechuic acid 의 chromatogram

a. 기존 방법



b. 변경 방법(30분대에서 13% ACN)

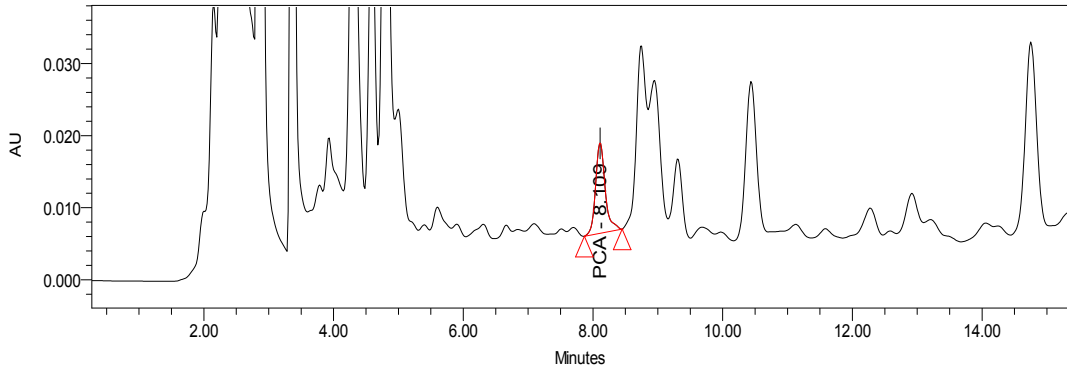


그림 18. 인진쑥녹차추출 복합물 시료 내 Protocatechuic acid 의 chromatogram

④ 결론

- 한림대에서 제공한 분석법 #1에서 이동상 조건의 변경에 따른 시료들에서 PCA peak 주위의 다른 peak의 제거를 위한 확인 시험을 진행하였다.
- 한림대에서 제공한 분석법 #1에서 이동상 조건 중 30분의 17% ACN을 13% ACN으로 변경하여 분석한 결과, PCA가 안정적으로 나타남을 확인하였다.
- 시료에서 PCA peak 주변의 다른 peak가 분리되는 것이 확인되어 PCA의 peak 분리도 문제점을 개선할 수 있었다.
- 상기 사항을 검토하고 반영하여 PCA 분석법 확정하였다.

(3) 최종 선정된 분석법을 통해 표준품의 정밀성과 직선성에 대한 실험

(가) 표준품

- 표준용액을 약 1.1mg/10mL로 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석을 진행하였다. 그 결과 PCA는 0.55~27.5 ppm에서 직선성이 확인되었다($R^2=0.9996$). 표준용액의 검량선 결과는 표 9와 같다.

표 9. 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	0.55	24,082	
2	1.15	51,115	
3	5.50	268,549	
4	11.00	533,875	
5	27.50	1,279,197	

(나) 인진쑈죽차추출 복합물 중 PCA 함량

- 인진쑈죽차추출 복합물 시료 약 0.2 g을 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 PCA 함량을 반복 실험한 결과, 0.091±0.0005 mg/g으로 나타났다(표 10).

표 10. 시료량을 동일하게 취한 인진쑈죽차추출 복합물 중 PCA 함량

시료명	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (g)	용액량 (mL)	회석 배수	표준품 순도	PCA함량 (mg/g)	합계±SD (mg/g)
1	1.854	0.204	10	1	0.9963	0.0903	
2	1.935	0.210	10	1	0.9963	0.0916	0.091 ±0.0005
3	1.930	0.208	10	1	0.9963	0.0910	

(다) 인진쑈죽차추출 복합물의 시료량에 따른 PCA 함량 변화

- 인진쑈죽차추출 복합물 시료량을 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg으로 달리 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 PCA 함량을 반복 실험한 결과, 0.0895±0.0002 mg/g으로 편차 없는 수치를 얻을 수 있었다(표 11).

표 11. 시료량을 달리 취한 인진쑈죽차추출 복합물 중 PCA 함량

시료명	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (g)	용액량 (mL)	회석 배수	표준품 순도	PCA함량 (mg/g)	합계±SD (mg/g)
1	0.972	0.1117	10	1	0.9963	0.0867	
2	1.370	0.1540	10	1	0.9963	0.0887	0.0895 ±0.0002
3	1.962	0.2167	10	1	0.9963	0.0902	
4	2.308	0.2485	10	1	0.9963	0.0925	

(4) 시험법 검토 결과

(가) 본 시험법 검토는 인진쑈죽차추출 복합물 중 PCA 정량분석 가능여부를 위한 것이며, 이를 위해 우선 한림대학교 산학협력단에서 제공한 시험법의 적용여부를 검토하였으나, PCA의 Peak 분리도에 문제점이 발견되어 문헌 검토를 통하여 분석법을 추가 검토하여 최종 분석을 설정하였다.

(나) 최종 선정된 분석법을 통해 표준품의 정밀성과 직선성에 대해 실험을 진행하였다. 그 결과 PCA는 0.55 ~ 27.5 ppm에서 직선성이 확인되었다($R^2=0.9996$).

(다) 인진쑈죽차추출 복합물 시료 약 0.2 g을 취해 20% 메탄올로 일정량 용해한 다음 10분간 초음파 추출하여 샘플 중의 PCA 함량을 반복 실험한 결과, 0.091±0.0005 mg/g으로 나타났다.

(라) 인진쑈죽차추출 복합물의 시료량을 100 mg ~ 250 mg까지 4개의 포인트로 시료량을 달리 취하여 분석한 결과 0.0895±0.0002 mg/g으로 편차 없이 나타났다.

(마) 기기분석 조건과 전처리 방법을 변경하여 실험을 진행한 결과, 인진쑥녹차추출 복합물의 PCA 함량은 0.09 mg/g으로 확인할 수 있었다.

(5) 최종 설정된 시험법

(가) 표준물질

① Protocatechuic acid(Sigma, 03930590)

분자식 : $C_7H_6NO_4$, 분자량 : 154.12, CAS No. : 99-50-3

(나) 표준액 제조

① 표준품 1mg을 10mL 부피플라스크에 넣고 HPLC급 20% 메탄올로 표선까지 채운다.

② 제조한 표준용액을 20% 메탄올에 희석하여 표준액 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 ug/mL로 제조한다.

(다) 검액 제조

① 시료 200mg을 10mL 부피플라스크에 넣는다.

② 20% 메탄올로 표선까지 정용한다.

③ 10분동안 초음파진탕기로 추출한다.

④ 15mL 코니칼튜브에 옮겨 담은 후 4,000rpm에서 10분동안 원심분리한다.

⑤ 상등액을 0.45 μ m(RC-membrane) 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

(라) 분석 조건

① Protocatechuic acid 분석조건

항목	조건
주입량	10 μ l
칼럼온도	30 $^{\circ}$ C
샘플온도	15 $^{\circ}$ C
이동상	A : ACN, B: H ₂ O(add0.1%TFA)
유속	0.7 mL/min
칼럼	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (4.6 \times 150 mm, 3.5 μ m) 또는 이와 동등한 것
검출기(파장)	254 nm

② Protocatechuic acid 이동상 조건

시간(분)	A 용액(%)	B 용액(%)
0	5	95
30	13	87
40	100	0
50	100	0
55	5	95
65	5	95

(마) 계산

$$\text{Protocatechuic acid (mg/g)} = C \times (a \times b) / S \times 1/1,000$$

- C: 시험용액 중 지표성분의 농도 (ug/mL)
- a: 시험용액의 전량 (mL)
- b: 회석배수
- S: 시료량 (g)
- 1/1,000: 단위 환산 계수

3. 유해물질에 대한 규격 설정

가. 유해물질(납, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군) 설정 근거

- (1) 식품의약품안전처 '건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정'의 '[별표2]유해물질 규격설정 항목(제14조 제6호가목 관련)'에 따라 중금속(납, 총비소, 카드뮴, 총수은) 및 제조시 오염될 수 있는 대장균군을 유해물질 규격으로 설정하였다.
- (2) 국내 식품위생검사기관인 한국건강기능식품연구원에 신청원료의 유해물질에 대한 분석을 의뢰한 결과 값을 참고하여 기준을 설정하였다.

나. 납

- (1) 규격: "4.0 ppm 이하이어야 한다."로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 건강기능식품 기능성원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2013-10호)의 유해물질 규격설정항목 중금속 규격을 참고하였다.
 - (나) 원료 3Lot (SD-MPGT-002 ~ 004) 실측치의 평균값은 0.7504 ppm 이었으며, 안전량을 고려하여 4.0 ppm 이하로 설정하였다.
- (3) 시험법
 - (가) 건강기능식품공전(식품의약품안전청고시 제2008-12호) [별표 4] 시험법 적용표를 따라 식품공전 제10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(pb) 1)시험용액의 조제 가)습식분해법 (2)마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제후 ICP-MS로 시험하였다.

다. 총비소

- (1) 규격: "10.0 ppm 이하이어야 한다."로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 건강기능식품 기능성원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제 2013-10호)의 유해물질 규격설정항목 중금속 규격을 참고하였다.
 - (나) 원료 3Lot (SD-MPGT-002 ~ 004) 실측치의 평균값은 0.2626 ppm 이었으며, 안전량을 고려하여 10.0 ppm 이하로 설정하였다.
- (3) 시험법
 - (가) 건강기능식품공전(식품의약품안전청고시 제2008-12호) [별표 4] 시험법 적용표를 따라 식품공전 제10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(pb) 1)시험용액의 조제 가)습식분해법 (2)마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 시험하였다.

라. 카드뮴

- (1) 규 격: “1.0 ppm 이하이어야 한다.”로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 건강기능식품 기능성원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2013-10호)의 유해물질 규격설정항목 중금속 규격을 참고하였다.
 - (나) 원료 3Lot (SD-MPGT-002 ~ 004) 실측치의 평균값은 0.3605 ppm 이었으며, 안전량을 고려하여 1.0 ppm 이하로 설정하였다.
- (3) 시험법
 - (가) 건강기능식품공전(식품의약품안전처 고시 제2008-12호) [별표 4] 시험법 적용표를 따라 식품공전 제10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(pb) 1)시험용액의 조제 가)습식분해법 (2)마이크로웨이브법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 시험하였다.

마. 총수은

- (1) 규 격: “1.0 ppm 이하이어야 한다.”로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 건강기능식품 기능성원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제 2013-10호)의 유해물질 규격설정항목 중금속 규격을 참고하였다.
 - (나) 원료 3Lot (SD-MPGT-002 ~ 004) 실측치의 평균값은 0.0033 ppm 이었으며, 안전량을 고려하여 1.0 ppm 이하로 설정하였다.
- (3) 시험법
 - (가) 건강기능식품공전(식품의약품안전처 고시 제2008-12호) [별표 4] 시험법 적용표를 따라 식품공전 제10. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.4 수은(Hg)에 따라 분석하였다.

바. 대장균군

- (1) 규 격: “음성”로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 원료 3Lot (SD-MPGT-002 ~ 004)의 한국기능식품연구원 검사결과에서 모두 불검출되어 규격을 음성으로 설정하였다.
- (3) 시험법
 - (가) 건강기능식품공전(식품의약품안전처 고시 제2008-12호) [별표 4] 시험법 적용표를 따라 식품공전 제10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7. 대장균군 3.7.1. 정성시험 가) 유당배지법으로 시험하였다.

4. 규격설정 이외의 물질에 대한 기준규격 설정

가. 잔류농약

- (1) 규 격: “불검출”로 설정하였다.
- (2) 설정근거
 - (가) 원료(SD-MPGT-004)의 59종의 잔류농약에 대해 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과 잔류농약 59종이 모두 불검출 되었다.

(3) 시험법

(가) ‘식품공전 제10. 일반시험법 4 식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분 분석법 4.1.2.2. 다중농약성분 제2법’과 ‘식품공전 제10.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분 분석법 4.1.2.2 다중농약다성분 분석법’에 따라 실시하였다.

4. 시험성적서 요약

가. 시험성적서

[시험기관명 : 한국기능식품연구원]

제안 기준 및 규격	시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
규격항목	정상		이미, 이취가 없는 진한 갈색 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진한 갈색 분말		
	중금속 (mg/kg)	납	4.0 이하	0.7938	0.7269	0.7305
		총비소	10.0 이하	0.2550	0.2580	0.2748
		카드뮴	1.0 이하	0.3683	0.3547	0.3587
		총수은	1.0 이하	0.003	0.003	0.004
	미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
세균수(cfu/g)		-	780	590	730	
규격 미설정 항목	잔류농약	59종	불검출	-	-	불검출

나. 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치 ^{a)} (mg/kg)	최대 섭취량 ^{b)} (mg)	제안규격 ^{c)} (µg/g)	제안규격에 의한 일일 노출량 ^{d)} (µg)	1일 최대 노출허용량(µg)
납	0.7504	300	4	1.2	10.8
총비소	0.2626		10	3	150
카드뮴	0.3605		1	0.3	3.0
총수은	0.0033		1	0.3	2.1

^{a)}실측치 : 한국기능식품연구원 3LOT 실측치의 평균값

^{b)}최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 300 mg/일로 설정 (최대섭취량 300 mg으로 신청함)

^{c)}제안규격 : 신청인이 제안한 규격

^{d)}제안규격에 의한 일일노출량 : b × c

제4절. 신규소재의 전임상 효능평가 및 약리기전 규명

1 in vitro 연구에서 위관련 균 이외의 효능시험

가. 위관련 균주이외의 응집반응에 억제효과

시험물질이 섭취부터 장까지 이르기까지 존재하는 유해균주에 대한 응집반응에 의한 제거 효과를 알아보기 위하여 각 기관별로 존재하는 대표적인 유해균 9종과 장에서 유익균 1종에 대하여 조사하였다. 시험방법은 1차년도와 같이 김등 *J.Microbiol. Biotechnol.* (2003), 13(6), 853-858, 이등 *Biosci. Biotechnol, Biochem.*, (2009), 73(1), 209-212, 이등 *Phyther Res.* (2007) 23, 460-466에서 제시되었던 시험 방법을 적용하여 실시하였다. *H. pylori* 등 균주는 한국생명공학연구원 생명자원센터로부터 분양을 받아 사용하였으며, 배양 조건은 *Brucella*

broth에 10% FBS를 첨가한 배지에 선발한 균주들 이외의 균에 대한 생장을 억제하기 위하여 항생제 vancomycin(10mg/mL), Trimethoprim (5mg/mL), Polymyxin B(2,500Unit/L)의 농도로 첨가하여 약 48시간동안 10% CO₂ 배양기를 활용하여 혐기적인 조건에서 배양하여 사용되었다.

채혈된 사람 적혈구 세포는 채혈 즉시 Alserver's solution에 녹여 3회 정도 세척한 후 원심분리를 통해 적혈구와 혈장등을 분리하여 응집반응이 나타나지 않게 전 처리하여 사용하였다. 1차적으로 적혈구 응집 저해 활성을 평가하기 위한 조건 시험을 수행 하였으며 적혈구에 PBS만 처리한 Negative Control군, 적혈구에 각 균주들을 처리한 Positive Control군을 설정하였고, 각각 투입된 적혈구 세포 숫자는 hemacytometer를 이용하여 세포숫자를 조정한 후에 사용되었다.

위와 같은 조건에 따라 반복적인 재현성을 확인하였고 적혈구세포와 균주들과의 응집반응은 E.coli, L.plantarum, S. muyans 균에서는 나타나지 않거나 미비한 것으로 보이며, 식도균인 H.pylori, C.troclis균 등 유해한 균들에 대하여서는 강한 응집반응을 나타내었다. 시험물질들인 GP, MP, GT 가 나타내는 적혈구 응집효과도 각각 균주들에 대하여 특이적인 효과를 나타내었다.(그림 2)

시험물질들이 각각 균주들이 적혈구 응집반응에 대한 최소저해효과를 분석한 결과 GP는 H.P, P.G, A.A, P.A, C.T균들에 대하여 강한 응집저해효과를 MP는 H.P, A.A, C.T균 들에 대하여 강한 적혈구 응집저해효과를 가지며, GT는 H.P, P.A, S.A, C.T 균들에 대하여 강한 적혈구 응집저해효과를 나타내었다. 위장에 존재하는 H.P균에 대한 적혈구응집반응 최소저해농도(MIC) 에 있어 GT가 0.01mg/ug 로 가장 강한 응집저해효과를 나타내었으며, HP 0.25mg/ug, MP 0.6mg/ug으로 나타났다. 식도에 존재하는 C.T 균에 대하여서는 GP, GT가 0.05mg/ug으로 나타났고, MP는 0.1mg/ug 로 나타나 시험물질들이 H.P 균 이외에 식도와 관련한 유해균에 있어서도 강한 응집제거효과가 있는 것으로 확인되었다(표 12).

적혈구 응집반응 최소 저해농도 (MIC in mg/mL)											
당배합체 및 특이당	MW(Da)	H.P	P.G	A.A	P.A	S.A	S.E	E.C	L.A	L.P	C.T
GP	80,000	0.25	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	-	0.05
MP	10,000	0.6	-	0.8	-	-	-	-	-	-	0.1
GT	80,000	0.01	-	-	0.05	0.1	-	-	-	-	0.05
Pectin	20,000	-	0.0001	-	0.01	0.01	-	-	-	-	-
Heparin	3,000	-	0.02	-	0.1	1.0	-	-	0.1	-	-
SOS	1,159	-	0.01	-	1.0	1.0	-	-	-	-	-
GlcA	194	-	-	-	0.5	0.5	0.5	-	0.1	-	-
GalA	212	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-
GlcNAc	212	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	152	-	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-
Palatinose	342	-	0.1	-	-	-	-	0.01	-	-	-
Trehalulose	342	-	0.01	-	-	-	-	0.1	0.01	-	-

H. P.: *Helicobacter pylori*, P. G.: *Porphyromonas gingivalis*, A. A.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, P. A.: *Propionibacterium acnes*, S. A.: *Staphylococcus aureus*, S. E.: *Staphylococcus epidermidis*, E. C.: *Escherichia coli*, L. A.: *Lactobacillus acidophilus*, L.P.: *Lactobacillus platarum*, C.T: *Candida tropicalis*

표12. 시험물질의 적혈구 응집반응 최소 저해농도(MIC)에 대한 조사



그림 19. 균주들에 대한 응집반응 시험결과
나. 식물성 다당체가 원료와의 혼합시기에 따른 응집반응 효과 연구

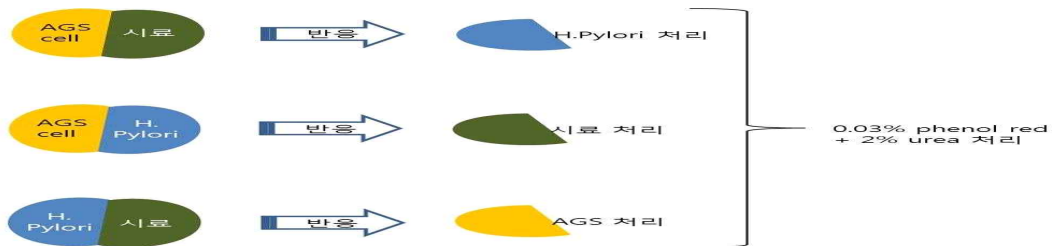
가. 식물유래 다당체가 균주와의 응집반응에 있어서의 투입시기에 따른 응집효과 분석

식물유래 다당체가 인체내에서의 형성되는 환경에 따른 H. pylori 균주에 대한 응집효과를 나타내는 알아보기 위하여 다음과 같이 3가지의 시험구성을 하여 연구개발 소재가 H.pylori에 대한 응집효과를 조사하였다. 사용원료인 GP, GT, MP, GTMP, MPG-6에 대한 성장과 시험을 위한 100ml의 정제수에 용해할 때의 특성은 아래와 같다.



시료명	성장
GP	-엷은 갈색빛을 지님.
GT	-약간 가라앉는 물질이 생기며, 그 색은 아주 엷은 고동색을 지님
MP	-물에 용해시 가라앉는 물질이 생기며, 그 색도 같은 색을 지님.
GT/MP	-물에 용해시 침전물이 생기며, 그 색은 아주 밝은 갈색빛을 가짐.
MPG-6	-짙은 갈색빛을 지님. 침전물이 발생함, 그 색도 같은 색을 지님.

(1) 분석 시험 구성

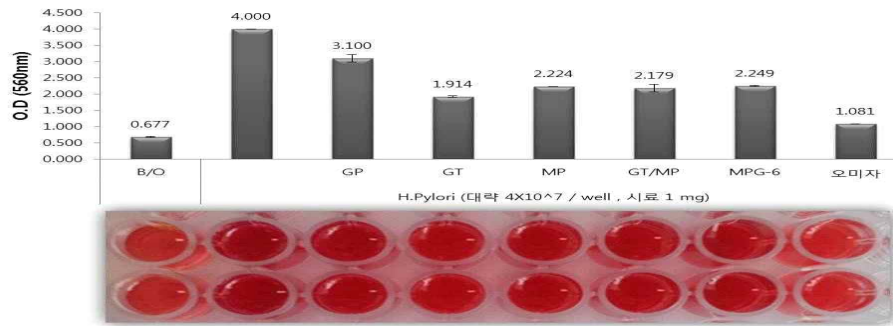


(2) 시험 재료 및 시약

- (가) 세포주: AGS cells (ATCC CRL 1739, a human gastric adenocarcinoma epithelial cell line)
- (나) 세포배지: RPMI 1640 contained 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) antibiotics-antimycotic
- (다) 균주 : H.pylori균 (ATCC 43504)을 20 ml의 적정 배지에 넣고, 10 % CO2의 조건하의 인큐베이터(37 °c ,유지)에서 shaking 하며 이틀간 배양한다.
- (라) 균주배지 : Brucella media, 10% FBS , antibiotic (vancomycin 100 ug/ml, trimethoprim 5 ug/ml, polymycin B 2500U)
- (마) 시료제조 : 시료 5종 모두 멸균수에 100 mg/ml 농도로 따뜻한 온도를 유지하며 녹여서 사용했다.

(3) 시험결과

(가)시료/균주 흡광도 측정



(나)농도별 희석된 H.pylori균

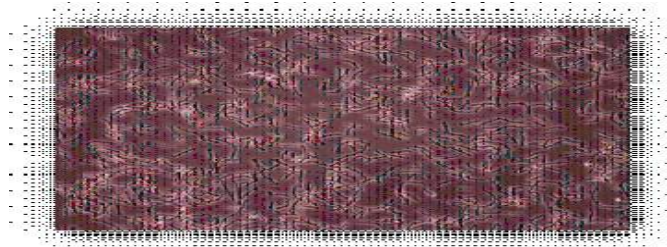
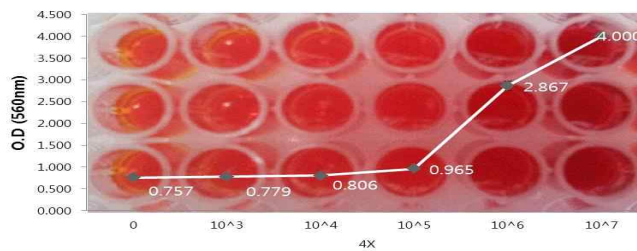


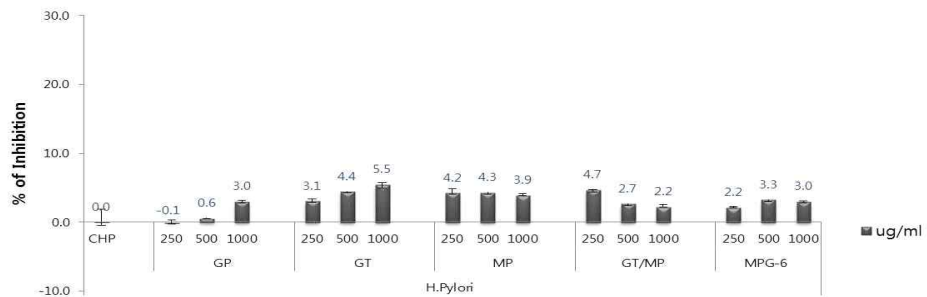
그림 이 시험은 H. pylori의 생균력이 있어야 하기 때문에, 건강한 균주를 키웠는지 확인하기 위해, urea를 넣은 phenol red 염색으로 발색과 현미경으로 나선균 모양을 지니는지 확인한다.

(1) Urea Phenol red assay

①



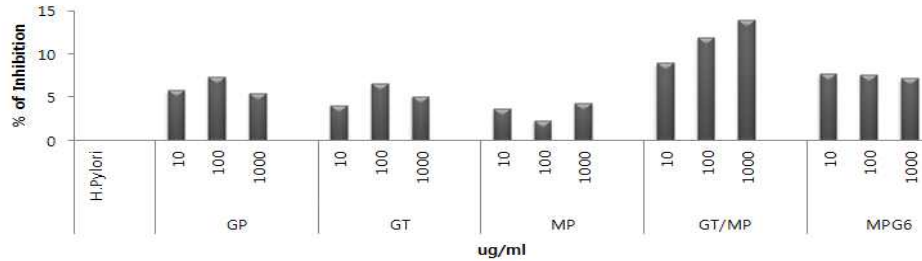
Urea Phenol Red assay



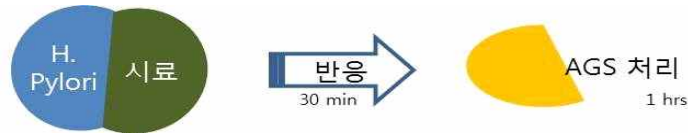
②



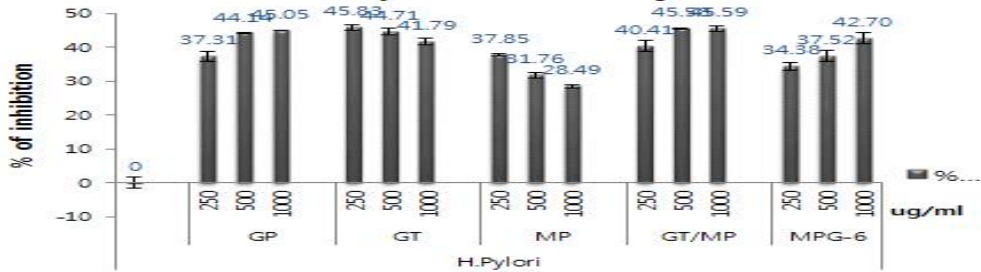
urea phenol red assay



③



Urea phenol red assay



시험물질과 AGS cell을 먼저 반응시킨 후에 H.pylori균을 첨가하여 응집반응을 시험한 결과 대부분 10% 미만의 미비한 효과를 보였으며, 크게 눈에 띄는 효과를 보인 것은 없었다.

AGS cell과 H.pylori 균을 먼저 반응시킨 다음 시험물질을 첨가한 결과 GP, MP, GT의 단독으로 처리한 시험구보다 GTMP, MPG-6의 혼합물에서 H.pylori에 대한 응집제거 효과가 높은 것으로 나타났으며, GTMP의 혼합물의 경우 1000ug/ml에서 15%로 다른 시험구보다 저해율이 높은 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

H.pylori와 시험물질을 먼저 반응시킨 다음 AGS cell을 첨가하여 응집 저해효과를 시험한 결과 GT와 GTMP의 시료에서는 250 ug/ml에서도 40% 이상의 응집저해 효과를 나타내었다.

상기의 시험과 같이 식물성 산성배당체를 Urea phenol red를 이용해 정량화 분석을 해본 결과, 위암세포주에 균주(H.Pylori) 또는 시료를 선처리 한 그룹에서는 10%~13%의 부착 저해능이 보이는 것으로 나타났으나, 균주와 시료를 반응시킨 후 위암세포주에 반응을 시켰을 때, GTMP시료에서는 40~55% 까지 높은 응집저해 효과를 나타내었으며, 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. GT의 시료구도 기존의 MPG-6보다 높은 것으로 나타나, 본 연

구과제를 통하여 H.pylori 균에 대하여 보다 강한 응집성을 나타내는 것은 인삼유래의 다당체보다는 녹차와 인진쑤 다당체의 혼합물이 단독으로 사용하는 시료구보다 응집성이 높은 것을 알 수가 있었다.

2. H.pylori 유도 동물 효력시험

본 기관은 주관기관이 개발하고자 하는 여러 신규 원료들의 헬리코박터 필로리 균의 성장 및 그 균으로 인한 위염 및 위암에 대한 효능평가 및 약리기전을 확립하고자 이를 위해 공동연구 참여기관인 한림대학교의 실험실과 주관기관에서 제공되는 다양한 시험 물질들을 이용하였다. 전체적인 계획 및 진행사항은 1차년도 세포주 모델에서의 효능시험 (In vitro study)이고 2차년도 동물모델에서의 시험 물질들의 전임상 효능시험 (In vivo study) 검증이다. 2차년도 동물 모델에서의 결과를 요약하면 아래와 같다. 시험에 사용된 시료는 MP, MPG6, GT, GTMP, GP이다.

구분	배합비(%)				
	MP	MPG-6	GT	GTMP	GP
인삼다당체		10%			100%
인진쑤다당체	100%	90%		50%	
녹차다당체			100%	50%	

헬리코박터 필로리는 만성 위염과 소화성 궤양 재발의 중요한 원인이 되며 위암 및 위림프종과 관련이 있는 전염력이 있는 세균으로 위점막에 염증 반응을 일으킨다. 그 기전으로 직접적 기전 및 간접적 기전으로 구분할 수 있는데, 직접적 기전은 헬리코박터에서 분비되는 여러 세포독성인자가 위상피세포에 손상을 주는 것, 헬리코박터에 의해 생성된 암모니아가 위점막 손상을 일으키는 것, 그리고 헬리코박터 파이로리로부터 호중구를 끌어드릴 수 있는 화학주성인자가 점막내로 흡수되어 혈액내 호중구의 점막 침윤을 유도하는 것 등이며, 간접적 기전은 위상피세포에서 화학주성인자의 분비가 증가하게 되어 염증세포가 침윤하는 것이다. 또한, 산소 라디칼의 증가로 인한 산화적 스트레스의 증가, 산화성 DNA 손상 증가, 상피세포 증식 및 세포사멸이 증가된다. 이러한 작용으로 만성위염에서 위축성 위염 및 장상피화생으로 변환되며, 여기에 여러 환경적 인자 및 유전적 인자가 더해지면 장형의 위암이 발생할 수 있다. 따라서 본 연구에서 고염식이와 헬리코박터 필로리 균에 의한 위의 염증 반응을 5종류의 시험 물질들이 억제 및 예방할 수 있는지를 살펴보았다.

헬리코박터 필로리 균이 더 잘 감염되게 하기 위하여 proton pump inhibitor (20mg/kg)를 i.p injection으로 1회/일, 3일 동안 투여하였다. 두 번째 PPI 투여 후 절식 시작하여 하루 절식 시킨 후, 세 번째 PPI를 i.p로 준 다음에, 약 1시간 후, 헬리코박터 균을 gavage로 감염시켰다. 감염시키고 30분 후에 다시 diet를 공급하였다. 그 다음날 다시 18~24시간 절식후, 헬리코박터 균을 접종하였다. 총 4번의 감염을 이틀에 한번씩, 하루 절식 후에 유발하였다. 24주 후 부검하

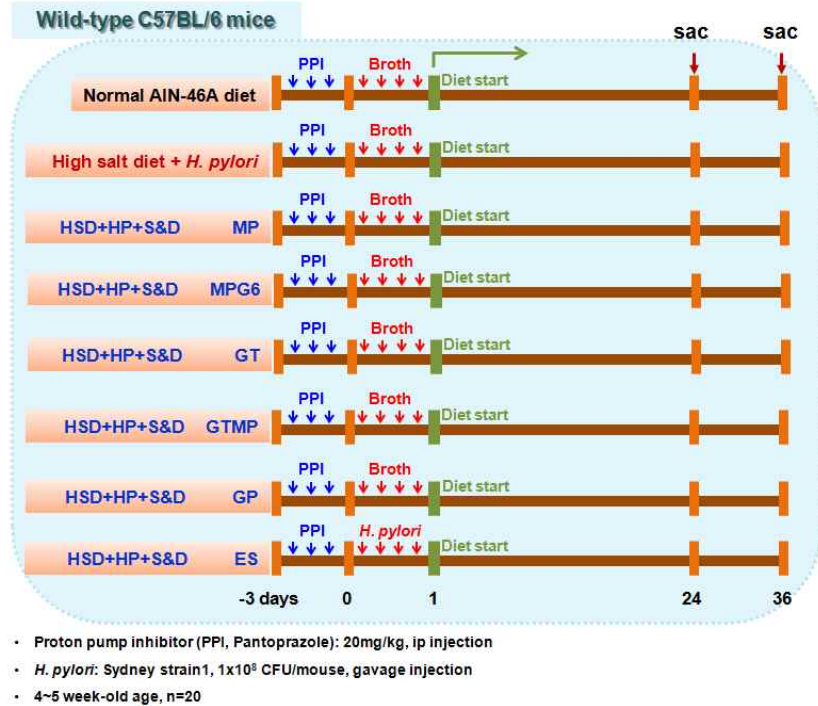


그림 20. 시험 물질들의 *H. pylori*에 의한 위염 및 위암 발생 억제 및 예방 효능을 살피기 위한 동물 실험 프로토콜

여 *H. pylori*에 의하여 염증이 생겼는지 관찰하고, 그에 대한 시험 물질의 효능을 관찰하였다. 7월 8일에 36주 부검을 통하여 *H. pylori*에 의한 adenoma 형성을 관찰하고, 시험 물질의 억제 효능이 있는지를 관찰하였다.

가. *H. pylori*에 의한 염증 억제 효능 비교 (24주)

(1) 헬리코박터 파일로리 처리에 따른 체중, 음수량, 사료량

시험물질의 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 C57BL6를 이용하여 헬리코박터 파일로리 감염 모델에 관한 동물실험을 실시하였다. 헬리코박터 파일로리 균이 더 잘 감염되게 하기 위하여 4주령의 어린 C57BL/6 mouse를 사용하여 proton pump inhibitor (20mg/kg)를 i.p injection으로 1회/일, 3일 동안 투여하였다.

두 번째 PPI 투여 후 절식 시작하여 하루 절식시킨 후, 세 번째 PPI를 i.p로 준 다음에, 약 1시간 후, 헬리코박터 파일로리를 마우스당 1×10^9 CFU/ml의 농도로 100 μ L씩 gavage로 감염시켰다. 감염시키고 30분 후에 다시 diet를 공급하였다. 그 다음날 다시 18~24시간 절식 후, 헬리코박터 균을 접종하였다. 총 4번의 감염을 이틀에 한번씩, 하루 절식 후에 유발하였다. 감염이 끝나면, 헬리코박터 균에 의한 염증을 더 심화시키기 위하여 7.5 % NaCl이 함유된 high salt diet를 투여하였다. 시험물질들은 이미 보고된 선행 연구 결과들을 참고하여 체중 60 kg의 성인 하루 4.5 g을 섭취하는 양으로 계산하여 음수로 투여하였다. 음수와 high salt diet는 1주일에 두 번 교체하였으며, 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였다.

그림 21.에서 볼 수 있듯이, 실험 시작과 헬리코박터 파일로리 감염이 끝난 이후에도 Normal 그룹과 헬리코박터 그룹이 체중차이가 나는 것을 관찰할 수 있었고, GT, MPG6, GP

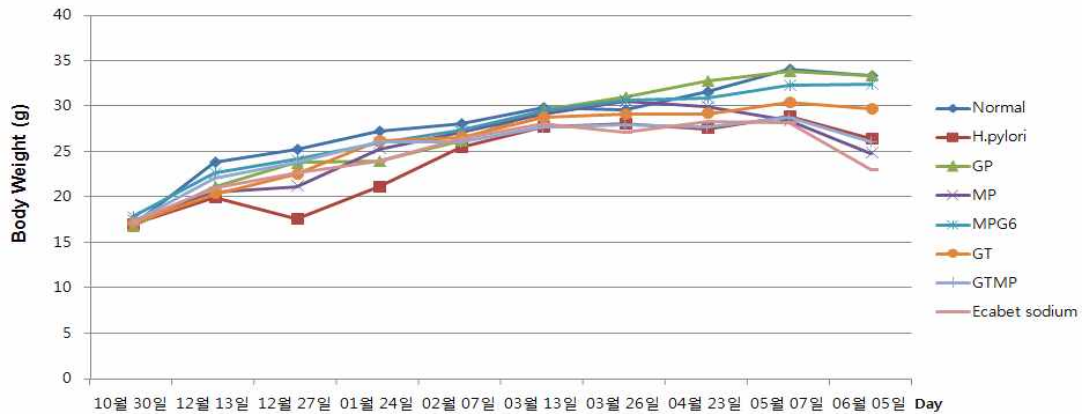


그림 21. 그룹별 mouse body weight

투여군에서 헬리코박터 그룹보다 약간 체중이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Normal group을 제외하고는 헬리코박터 균에 의한 위염을 심화시키기 위해서 high salt diet를 투여하므로 마우스가 섭취한 음수량과 사료량이 증가되어 있는 양상을 확인할 수 있었다. 이와 같은 동물 실험은 PPI injection과 *H. pylori* 감염이 2012년 11월 8일까지 끝났고, 24주차에서 sacrifice해서 분석을 수행하였다. 비교 약물으로는 임상에서 사용되는 ecabet sodium을 투여하였다. 헬리코박터균 감염 24주 후 부검하여 *H. pylori*에 의하여 염증이 생겼는지 관찰하였고 그에 대한 시험 물질들의 효능을 관찰하였다.

(2) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 감염과 시험물질 처리에 따른 육안 소견과 병리 소견

헬리코박터 감염 24주후에 일부 부검을 하여 위를 적출하였다. 육안 소견을 살펴보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration과 장형화생, 그리고 염증반응을 나타내는 적변현상을 확인할 수 있었으나, 모든 시험 물질 처리군 특히 MP와 GTMP 처리군에서 정상 그룹과 같이 위 상태가 좋은 것을 관찰할 수 있었다 (그림22).

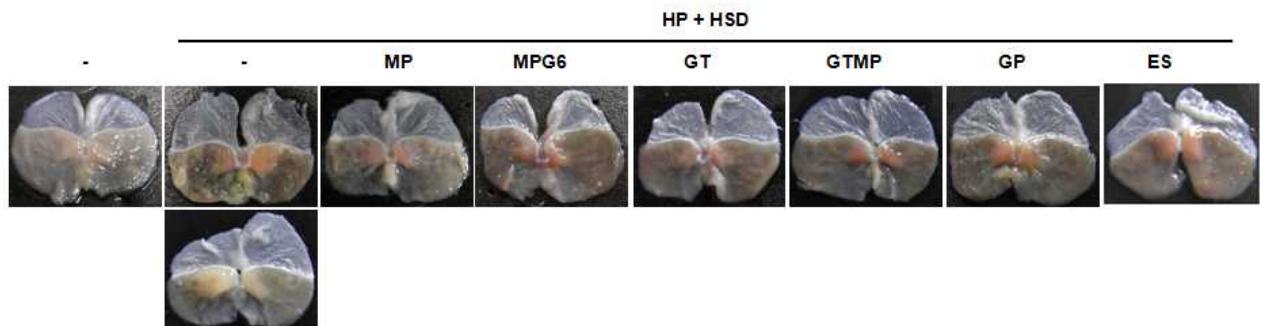


그림 22. 그룹별 육안소견

좀 더 자세히 관찰하기 위하여 적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E staining을 하여 pathology를 관찰하였다. 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등의 병변을 관찰하였고, 임상에서 쓰이는 ecabet sodium 처리 그룹도 비슷한 정도로 헬리코박터에 의해서 위손상이 일어난 것을 확인하였다. 그러나 시험 물질 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 MP와 GTMP 처리 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다 (그림 23).

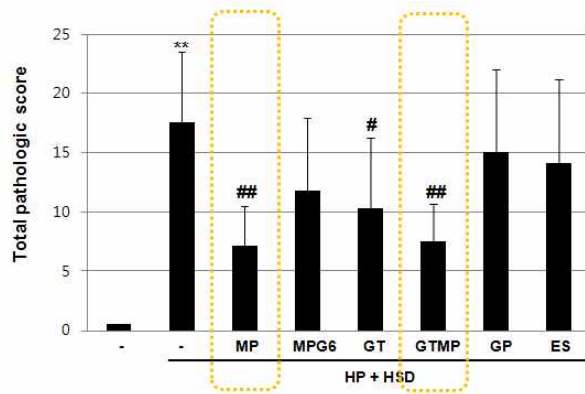
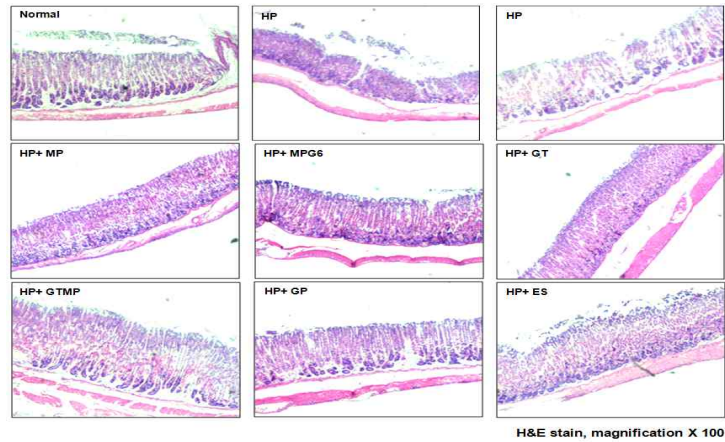


그림 23. 그룹별 병리소견

(3) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 시험 물질 처리에 따른 염증 및 세포독성인자 규명

시험 물질들의 헬리코박터 감염에 의한 위손상에 대한 보호 효능을 검증하기 위하여 mouse serum을 이용하여 염증유도인자인 PGE₂와 lipid peroxidation marker로서 산화적 스트레스의 척도인 malondialdehyde (MDA)의 level을 측정하였다. 예상대로 헬리코박터 그룹에서 정상그룹보다 높은 PGE₂와 MDA level을 나타내었다. 이때 ecabet sodium은 거의 영향을 주지 않았으며, 시험 물질들 특히 MP와 GTMP는 이들 PGE₂와 MDA level을 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 24).

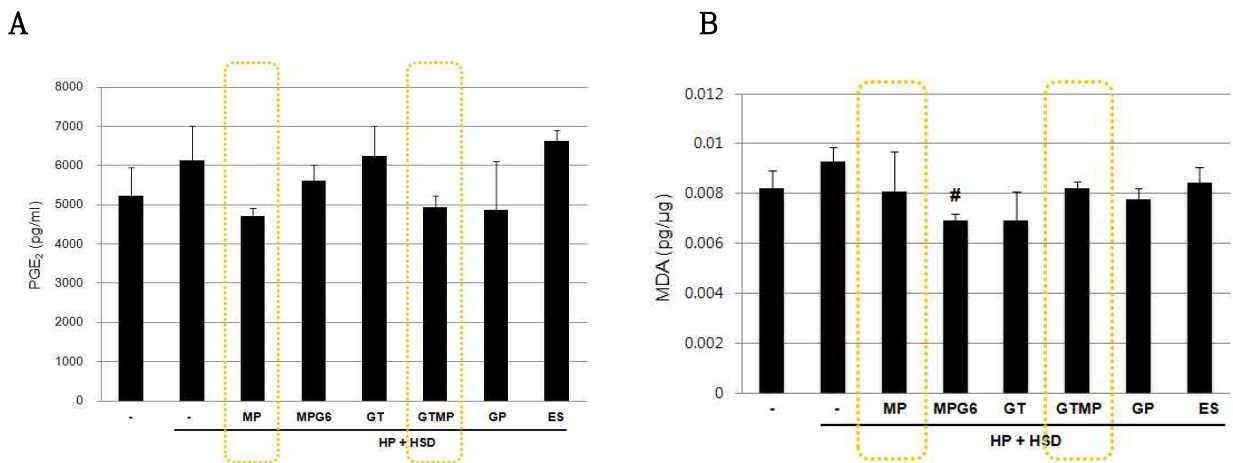


그림 24. 그룹별 PGE₂ level (A)과 MDA level (B)

위장염 모델에서 염증 반응을 유도하는 대표적인 cytokine인 TNF- α 와 IL-6 level을 측정해 본 결과, H. pylori에 의해 유도된 그룹에서 TNF- α 와 IL-6 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 시험물질들 특히 MP와 GTMP의 처리에 의해서 그 발현 정도가 유의성있게 감소한 것을 관찰하였다 (그림 25).

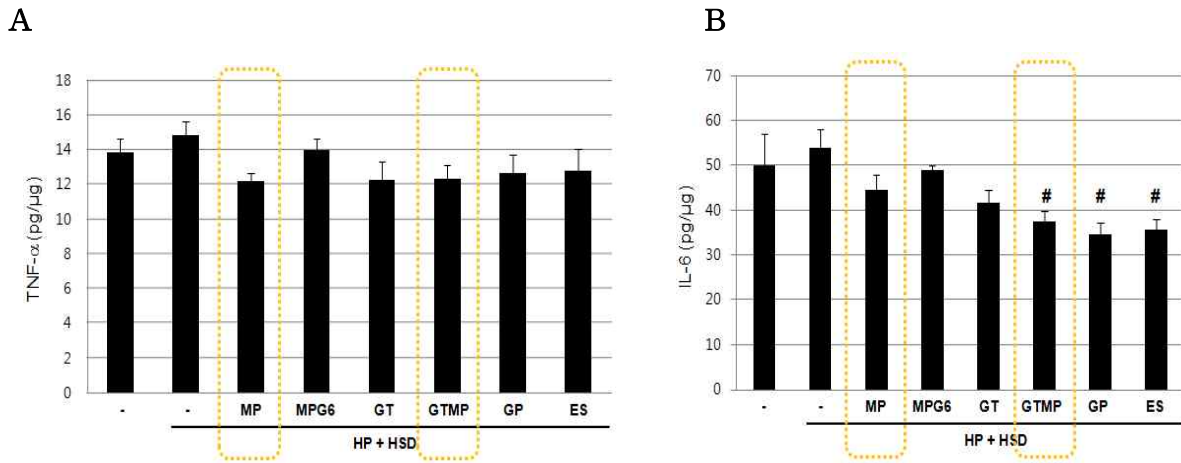


그림 25. 그룹별 TNF- α level (A)과 IL-6 level (B)

또한, 대표적인 항산화 효소로서 세포보호효능을 보이는 효소인 HO-1의 경우 MP와 MPG6에서 더 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 26).

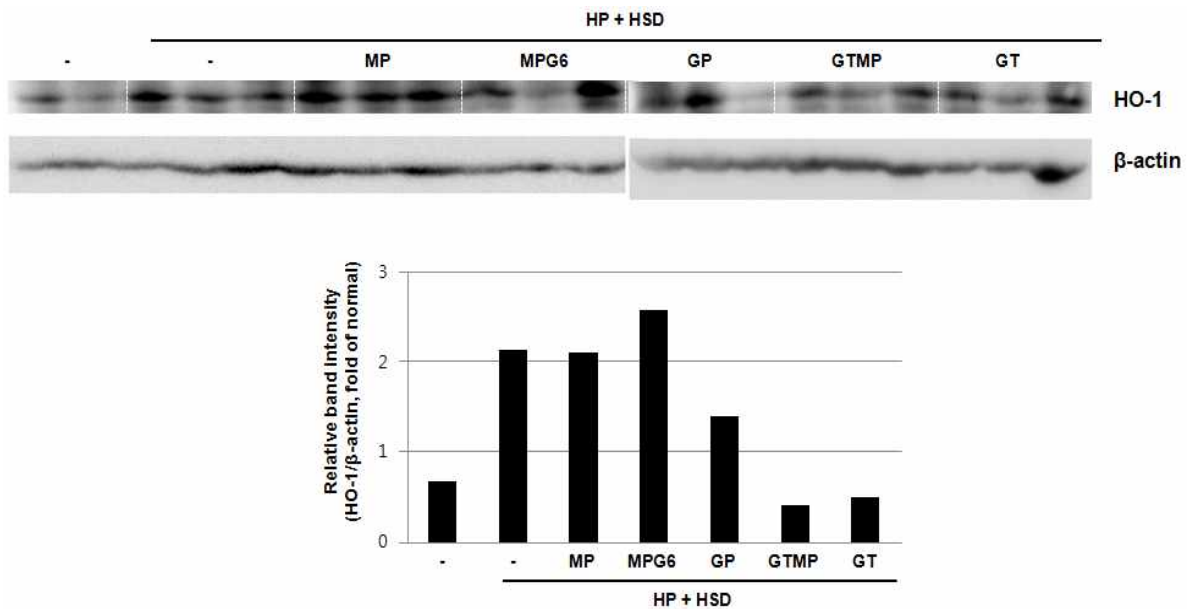


그림 26. 그룹별 HO-1 발현 결과

이때 시험물질들이 단순히 염증 반응만을 억제하는지 아니면 host 자체의 보호 효능도 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 위점막층의 mucin을 염색할 수 있는 PAS staining을 수행하였다. 그 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서는 보호 효능을 나타낼 수 있는 점막층이 손상되어 PAS 염색이 현저하게 감소되어 있었고, 시험물질 처리그룹 특히 MP와 GTMP에서 그러한 점막 손상이 통계적으로 유의하게 보호되어 있는 것을 관찰하였다 (그림 27).

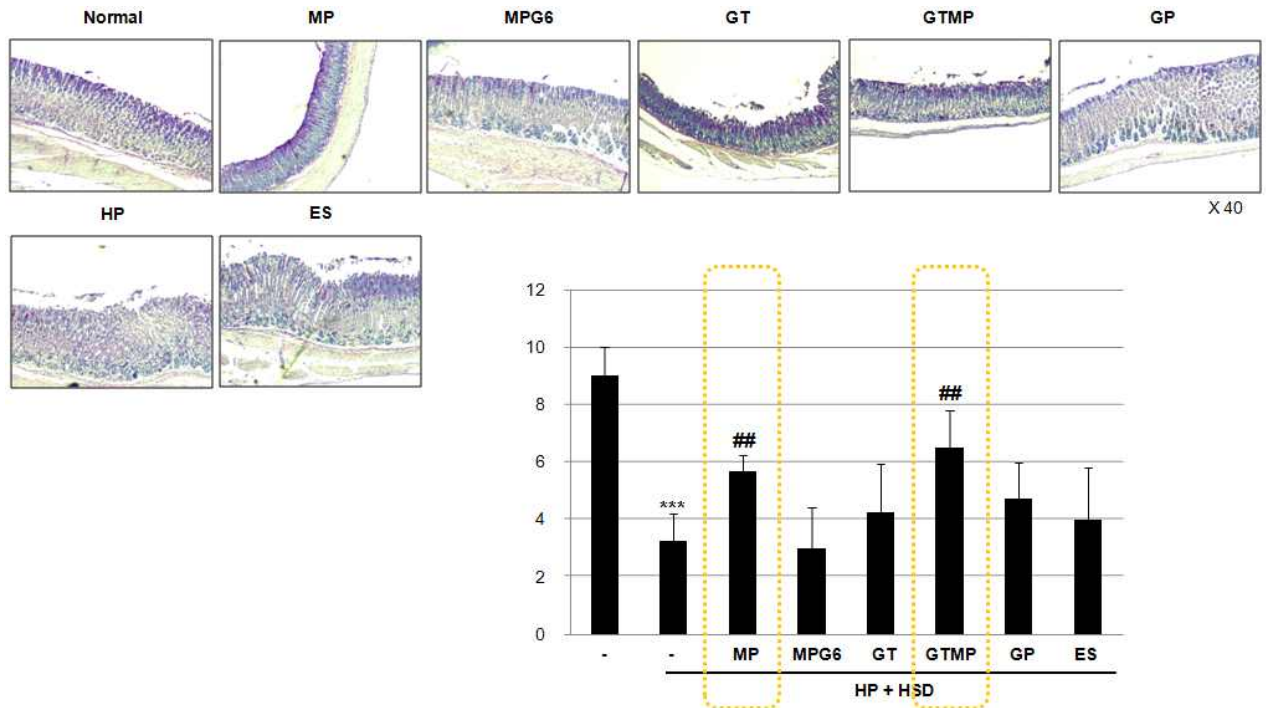


그림 27. 그룹별 PAS 염색 결과

apoptosis 즉, 세포 사멸과 세포 손상의 정도를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 수행하였다. 예상한 바와 같이, 헬리코박터 감염의 ulcer가 일어난 부위에서 현저하게 염색이 되었으며, 시험 물질이 처리된 그룹 특히 MP와 GTMP에서는 그 염색이 감소하는 것으로 보아 헬리코박터 감염으로 인한 위 점막의 염증과 조직 손상이 MP와 GTMP 투여에 의해 감소한다는 것을 알 수 있었다. (그림 28).

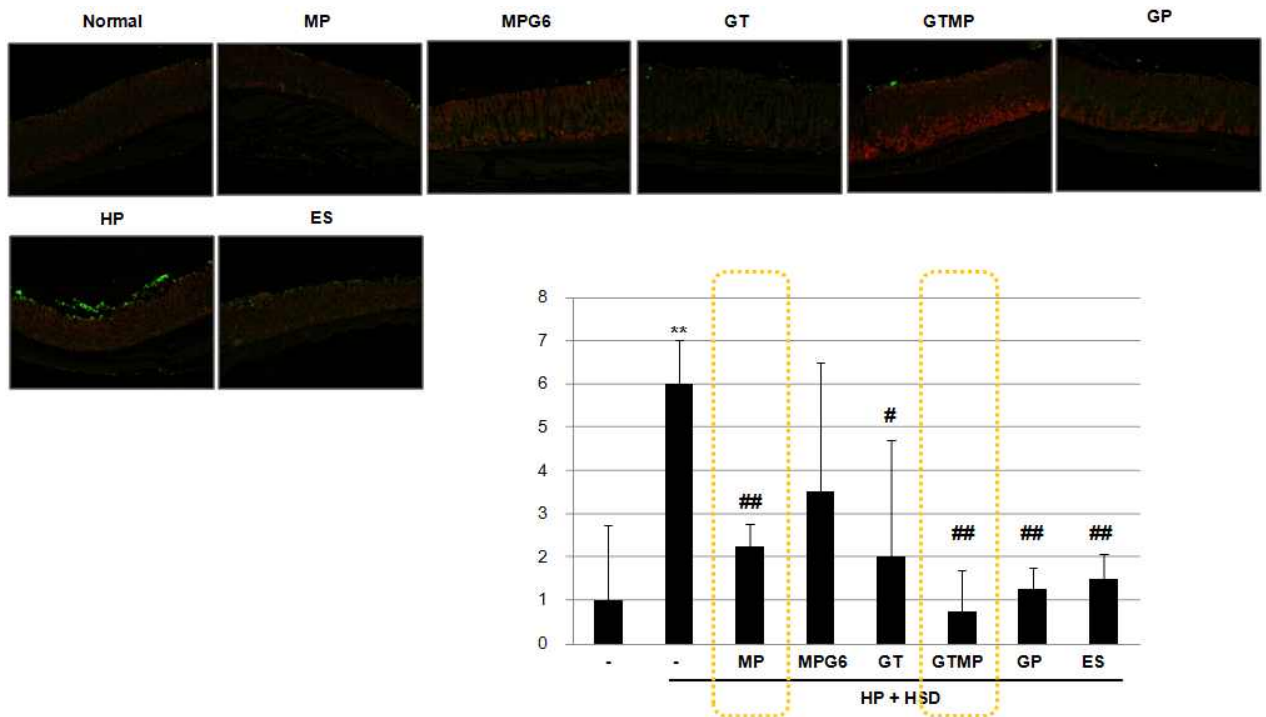


그림 28. 그룹별 TUNEL assay 결과

나. *H. pylori*에 의한 염증 억제 효능 비교 (36주)

(1) 헬리코박터 파일로리 처리에 따른 체중, 음수량, 사료량

시험물질의 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 C57BL6를 이용하여 헬리코박터 파일로리 감염 모델에 관한 동물실험을 실시하였다. 헬리코박터 파일로리 균이 더 잘 감염되게 하기 위하여 4주령의 어린 C57BL/6 mouse를 사용하여 proton pump inhibitor (20mg/kg)를 i.p injection으로 1회/일, 3일 동안 투여하였다.

두 번째 PPI 투여 후 절식 시작하여 하루 절식시킨 후, 세 번째 PPI를 i.p로 준 다음에, 약 1시간 후, 헬리코박터 파일로리를 마우스당 1×10^9 CFU/ml의 농도로 100 μ L씩 gavage로 감염시켰다. 감염시키고 30분 후에 다시 diet를 공급하였다. 그 다음날 다시 18~24시간 절식 후, 헬리코박터 균을 접종하였다. 총 4번의 감염을 이틀에 한번씩, 하루 절식 후에 유발하였다. 감염이 끝나면, 헬리코박터 균에 의한 염증을 더 심화시키기 위하여 7.5 % NaCl이 함유된 high salt diet를 투여하였다. 시험물질들은 이미 보고된 선행 연구 결과들을 참고하여 체중 60 kg의 성인 하루 4.5 g을 섭취하는 양으로 계산하여 음수로 투여하였다. 음수와 high salt diet는 1주일에 두 번 교체하였으며, 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였다.

그림 29에서 볼 수 있듯이, 실험 시작과 헬리코박터 파일로리 감염이 끝난 이후에도 Normal 그룹과 헬리코박터 그룹이 체중차이가 나는 것을 관찰할 수 있었고, GT, MPG6, GP 투여군에서 헬리코박터 그룹보다 약간 체중이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Normal group을 제외하고는 헬리코박터 균에 의한 위염을 심화시키기 위해서 high salt diet를 투여하므로 마우스가 섭취한 음수량과 사료량이 증가되어 있는 양상을 확인할 수 있었다. 이와 같은 동물 실험은 PPI injection과 *H. pylori* 감염이 2012년 11월 8일까지 끝났고, 36주차에서 sacrifice해서 분석을 수행하였다. 비교 약물으로는 임상에서 사용되는 ecabet sodium을 투여하였다. 헬리코박터균 감염 36주 후 부검하여 *H. pylori*에 의하여 염증이 생겼는지 관찰하였고 그에 대한 시험 물질들의 효능을 관찰하였다.

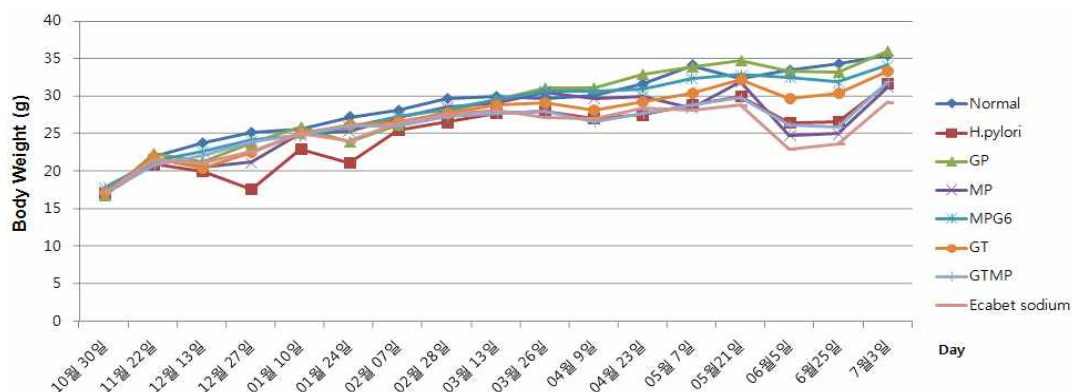


그림 29. 그룹별 mouse body weight

(2) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 감염과 시험물질 처리에 따른 육안 소견과 병리 소견

헬리코박터 감염 36주후에 부검을 하여 위를 적출하였다. 육안 소견을 살펴보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration과 장형화생, 그리고 염증반응을 나타내는 적변현상을 확인할 수 있었으나, 모든 시험 물질 처리군 특히 GT와 GTMP 처리군에서 정상 그룹과 같이 위 상태가 좋은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 30).

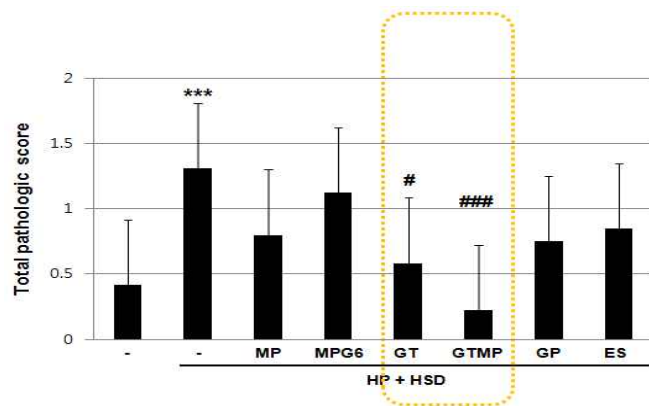
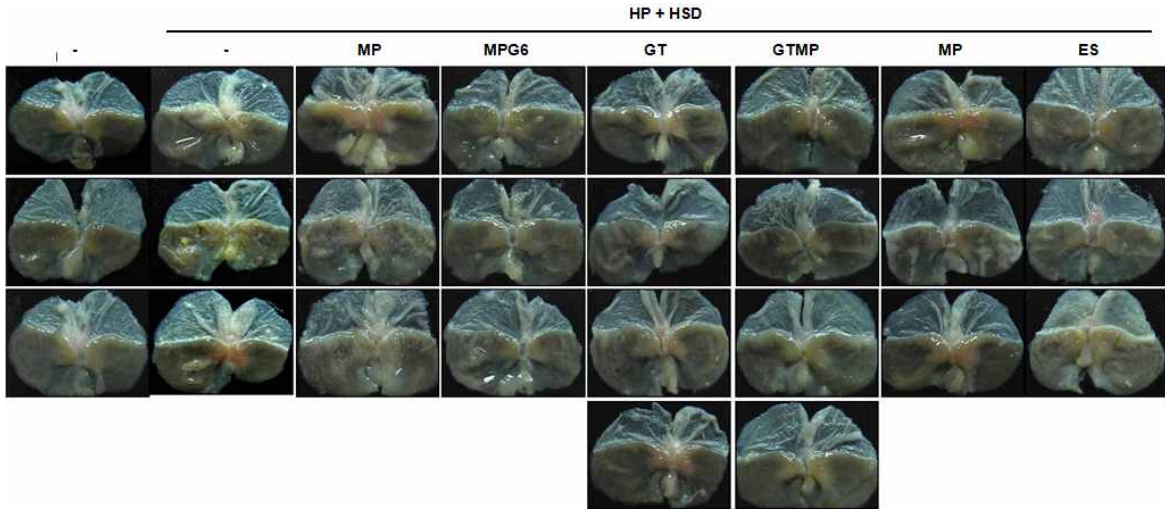
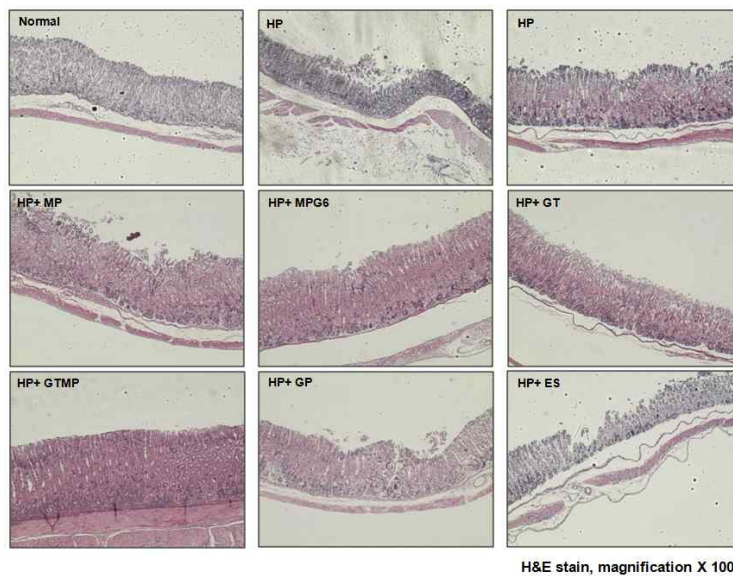


그림 30. 그룹별 육안소견

좀 더 자세히 관찰하기 위하여 적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E staining을 하여 pathology를 관찰하였다. 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등의 병변을 관찰하였고, 임상에서 쓰이는 ecabet soduim 처리 그룹도 비슷한 정도로 헬리코박터에 의해서 위손상이 일어난 것을 확인하였다. 그러나 시험 물질 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 GT와 GTMP 처리 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다 (그림 31).



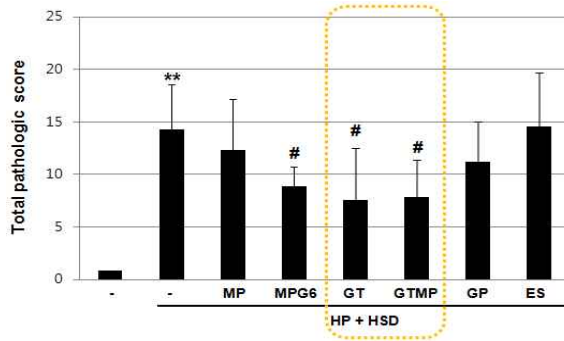


그림 31. 그룹별 병리소견

(3) *H. pylori* 감염 마우스모델에서 시험 물질 처리에 따른 염증 및 세포독성인자 규명

위장염 모델에서 염증 반응을 유도하는 대표적인 cytokine인 TNF- α level을 측정해 본 결과, *H. pylori*에 의해 유도된 그룹에서 TNF- α 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 시험물질들 특히 GT와 GTMP의 처리에 의해서 그 발현 정도가 유의성 있게 감소한 것을 관찰하였다 (그림32).

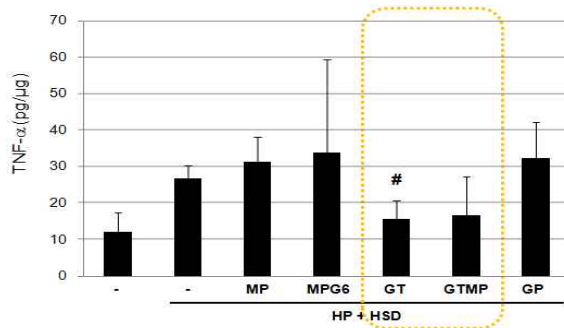


그림 32. 그룹별 TNF- α level

다음으로 염증세포인 macrophage를 염색할 수 있는 F/80 염색을 통하여 염증반응의 정도를 측정하였다. 그림 14에서 볼 수 있듯이, 헬리코박터 그룹에서 macrophage infiltration이 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였고, 이러한 염증세포의 침윤이 시험물질 처리 그룹 특히 GT와 GTMP에서 통계적으로 유의하게 정상 수준 가까이 떨어져 있을 것을 관찰하였다 (그림 33).

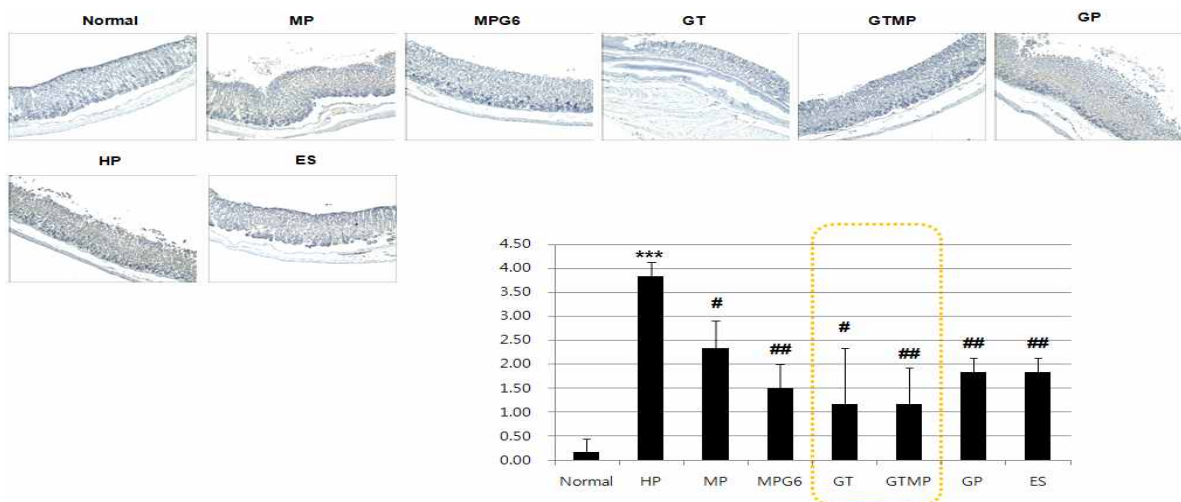


그림 33. 그룹별 F4/80 염색 결과

염증반응의 가장 대표적 단백질인 COX-2와 pSTAT3를 확인하기 위하여 동물 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 수행하였다. MPG6와 GTMP 처리군에서 COX-2와 pSTAT3의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다 (그림 34-35).

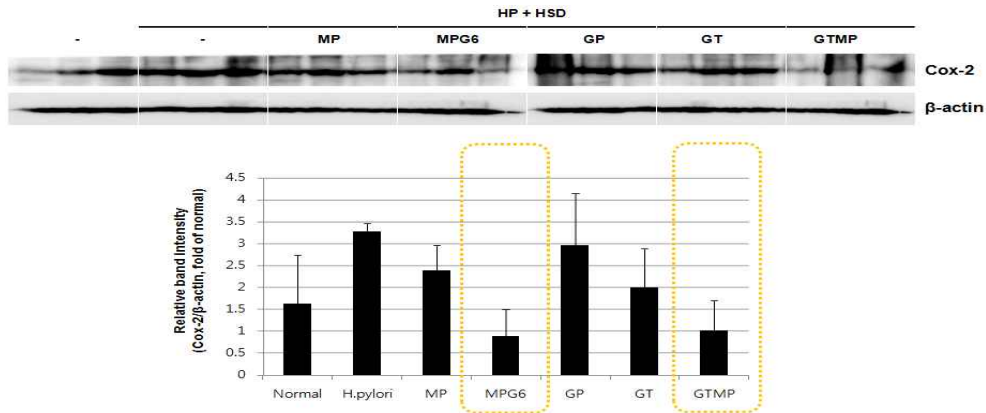


그림 34. 그룹별 Cox-2 발현 결과

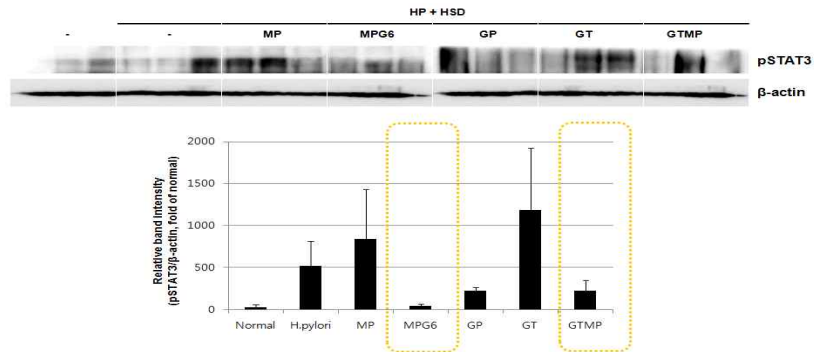


그림 35. 그룹별 pSTAT3 발현 결과

*H. pylori*가 감염되면 산화적 스트레스를 유도한다는 사실을 이미 잘 알려져 있다. 세포 내에서 산화적 스트레스가 발생하게 되면, 그러한 산화적 스트레스를 감소시키기 위해서 항산화 관련 반응들이 일어나게 된다. 다양한 스트레스에 대해서 세포들의 항상성 유지와 보호 작용에 관여한다고 알려져 있는 HSP (70의 경우, GT 처리군에서 더 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 36).

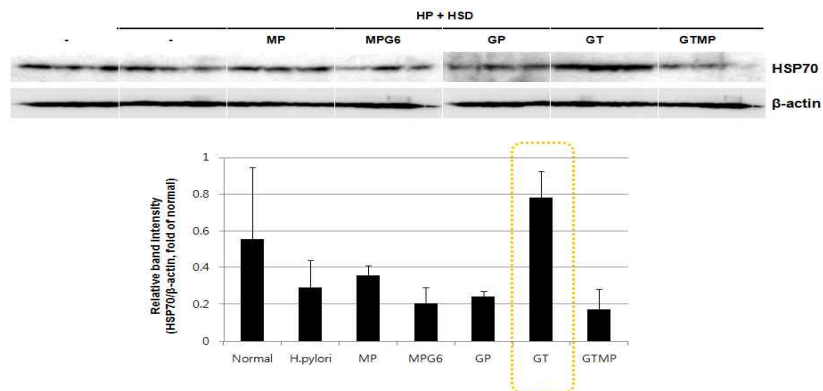


그림 36. 그룹별 HSP70 발현 결과

또한, 대표적인 항산화 효소로서 세포보호효능을 보이는 효소인 HO-1의 경우 역시, GT 처리군에서 더 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 37).

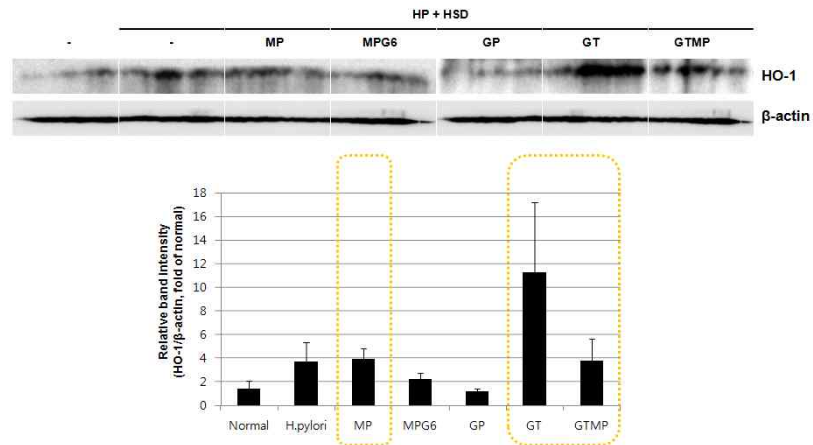


그림 37. 그룹별 HO-1 발현 결과

이때 시험물질들이 단순히 염증 반응만을 억제하는지 아니면 host 자체의 보호 효능도 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 위점막층의 mucin을 염색할 수 있는 PAS staining을 수행하였다. 그 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서는 보호 효능을 나타낼 수 있는 점막층이 손상되어 PAS 염색이 현저하게 감소되어 있었고, 시험물질 처리그룹 특히 GT와 GTMP에서 그러한 점막 손상이 통계적으로 유의하게 보호되어 있는 것을 관찰하였다 (그림 38).

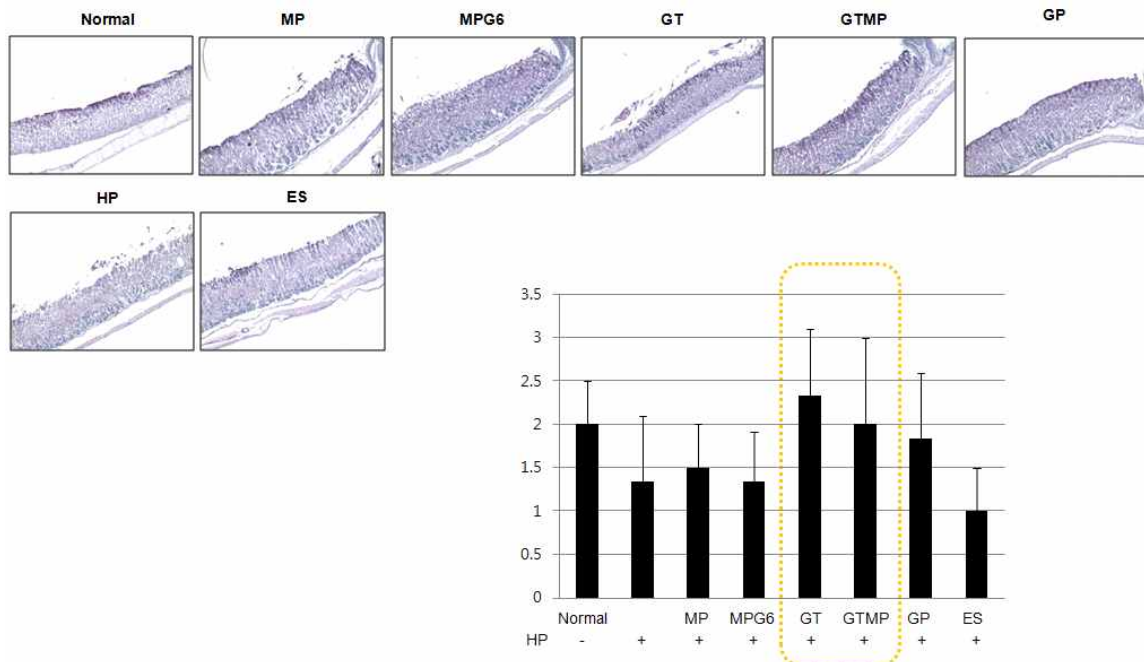


그림 38. 그룹별 PAS 염색 결과

또한 세포사멸의 대표적인 현상인 DNA fragmentation을 응용하여, DNA의 말단 부위를 염색하여 apoptosis 즉, 세포 사멸과 세포 손상의 정도를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 수행하였다. 예상한 바와 같이, 헬리코박터 감염의 ulcer가 일어난 부위에서 현저하게 염색이 되었으나, 시험 물질을 처리한 그룹에서 그 염색이 감소하는 것을 관찰할 수 없었다(그림 39).

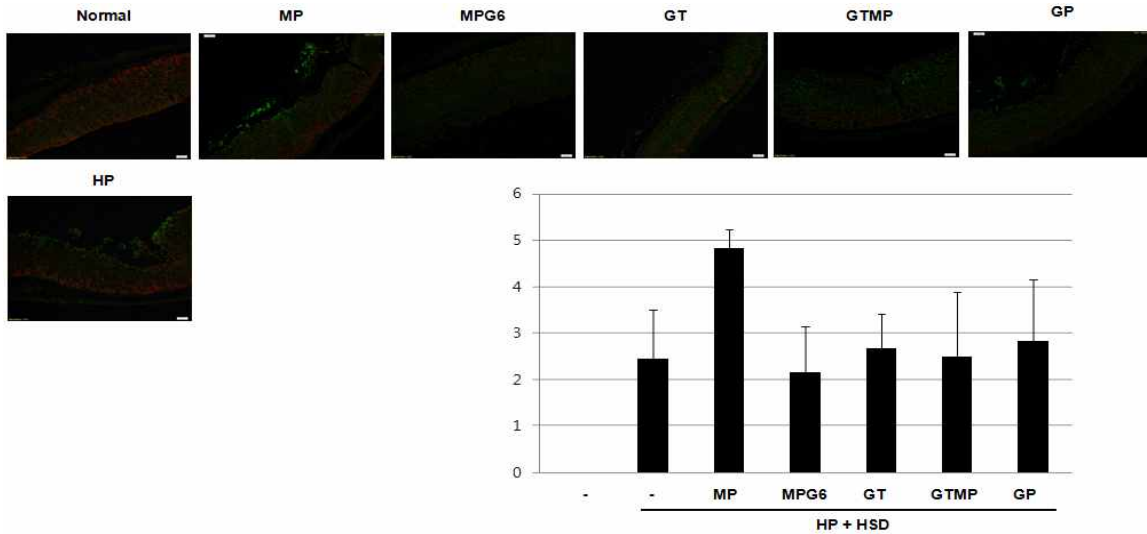


그림 39. 그룹별 TUNEL assay 결과

다. *H. pylori*에 의한 염증 억제 효능 비교 (in vitro 기전 연구)

1차년도에 세포주 모델을 이용한 in vitro 기전연구를 계속 수행하여, 헬리코박터 필로리 균에 의한 염증 반응을 시험 물질들이 억제 및 예방하는 기전을 살펴보았다. *H. pylori*가 감염되면 산화적 스트레스를 유도한다는 사실을 이미 잘 알려져 있다. 세포 내에서 산화적 스트레스가 발생하게 되면, 그러한 산화적 스트레스를 감소시키기 위해서 항산화 관련 반응들이 일어나게 된다. 이 중 heat shock protein (HSP)들은 분자량에 따라 HSP24, HSP32, HSP60, HSP70, HSP90 등으로 구분되고, 평소에 다양한 스트레스에 대해서 세포들의 항상성 유지와 보호 작용에 관여한다고 알려져 있다. 따라서 헬리코박터 필로리에 따른 이들의 변화와 그에 대한 신규 원료들의 활성을 살펴보았다. 흥미롭게도 HSP70의 경우, MP, MPG6, 그리고 GT에 의해 HSP70의 단백질 발현을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. HSP70은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하며 여러 외부 자극으로부터 apoptosis를 억제한다고 알려져 있다. 헬리코박터 필로리가 HSP70의 발현을 억제함으로써 세포 보호 작용을 억제하여 세포사멸을 유도하는데 실험에 사용된 MP와 MPG6가 헬리코박터 필로리에 의해 억제된 HSP70의 발현을 현저하게 증가시키고 세포사멸을 막는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 40-41).

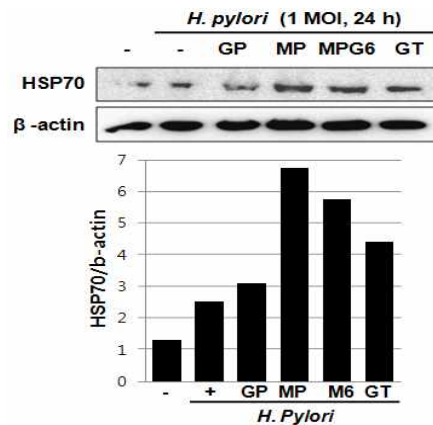


그림 40. 시험 물질들의 *H. pylori*에 의한 산화적스트레스 관련 인자에 대한 효과

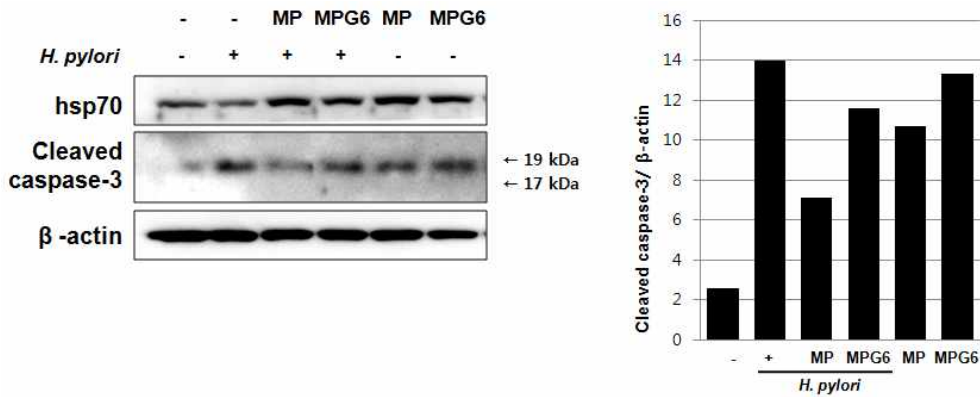


그림 41. 시험 물질들의 *H. pylori*에 의한 apoptosis에 대한 효과 I

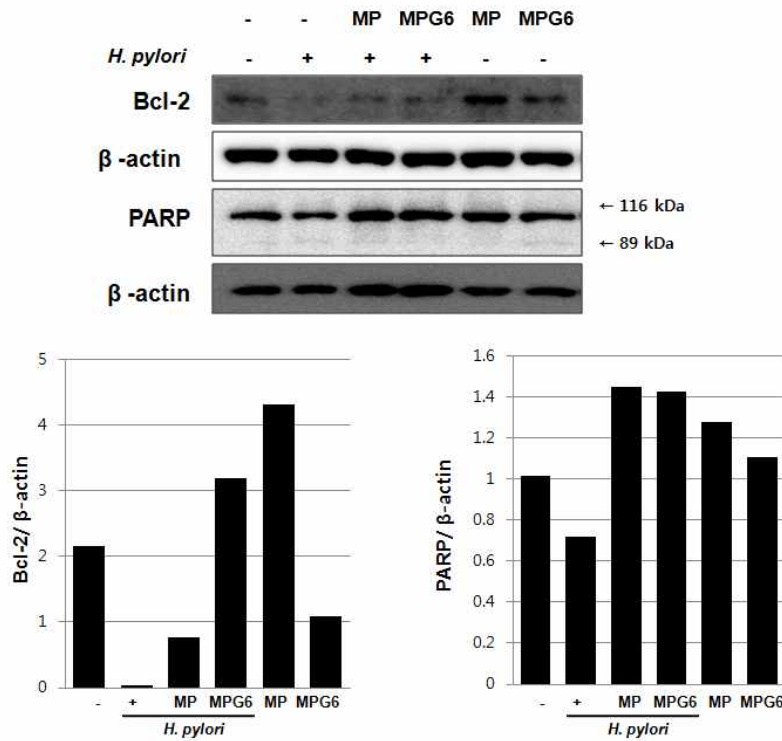


그림42. 시험 물질들의 *H. pylori*에 의한 apoptosis에 대한 효과 II

또한 HDAC은 염색체를 이루는 염색사의 구조변경에 관여하는 효소로써, HDAC이 정상적으로 기능하지 못하도록 저해하면 세포주기 정지, 혈관 형성 억제, 면역조절, 세포사멸 등을 유발한다고 알려져 있는데, 헬리코박터 필로리에 의해 증가한 HDAC3 발현과 감소한 Acetylated H3의 발현이 MP에 의해서 보호 되는 것을 확인할 수 있었다.(그림 43)

본 연구는 다양한 시험물질들의 *H. pylori* 유도 위염에 대한 유효성을 평가하여 소화기 질환 타깃의 제품화에 '근거 중심'의 유효성 평가를 시행하는 것으로 C57BL/6에 *H. pylori*를 감염시켜 염증 상태를 유발시킨 후 시험 물질에 대한 염증 억제 효과를 평가하기 위하여 실시하였다.

24주 부검 후 얻어진 각 그룹의 stomach을 관찰한 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서 육안으로도 관찰될 정의 염증 소견과 현저한 discoloration 현상이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 시험물질들 특히 MP와 GTMP에서 헬리코박터 감염에 의한 위염에 대한 보호 효

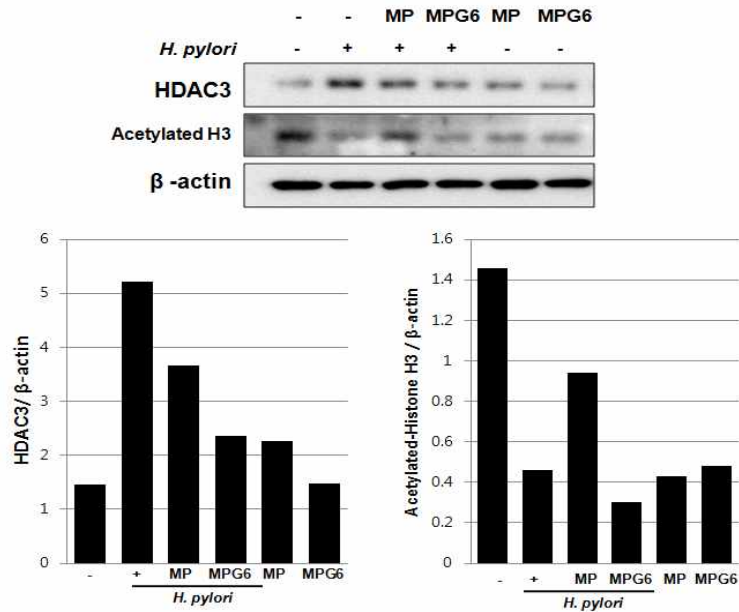


그림 43. 시험 물질들의 *H. pylori*에 의한 HDAC 관련 인자에 대한 효과

과를 보이는 것을 관찰하였다. 또한 36주 간의 시험을 종료하고, 부검 후 얻어진 각 그룹의 stomach을 관찰한 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서 육안으로도 관찰될 정도의 염증 소견과 현저한 discoloration 현상이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 시험물질 처리 그룹 특히 GT와 GTMP에서는 헬리코박터 그룹에 비해 현저히 보호된 소견을 보여주었다. 뿐만 아니라, 시험 물질 처리시 유의하게 *H. pylori* 유도 염증성 증상들을 회복시킴을 관찰하였다. 24주와 36주 이상의 결과를 바탕으로, 시험물질들 중 GTMP 그룹에서 특히 염증성 증상을 억제하는 데 있어서 가장 좋은 효과를 보임을 관찰할 수 있었다.

이상과 같은 연구 결과는 *H. pylori* 감염에 대한 단순한 균주의 제거라든지 감염에 의해 발생된 염증조절만으로는 *H. pylori* 감염에 따른 각종 질환, 위암, 위축성 위염 등의 예방이 힘든 상황에서 *H. pylori* 감염에 따른 위손상을 예방하기 위하여서는 안정성이 입증된 식품 유래 성분인 GTMP의 지속적인 섭취가 중요하다 하겠다. 또한 이미 생활에 보편화되어 있는 물질이 *H. pylori*에 대한 제균 또는 감염에 의한 항염증작용을 갖는 것은 큰 의의를 갖는다고 할 수 있다.

MPGT 위점막 손상 개선에 관련한 동물효능시험결과
[위점막손상 개선 관련 in vivo 효능 검증 결과]

3차년도 전임상 약리기전 규명 실험에서는, 1차년도 및 2차년도에 진행된 in vitro 세포주 실험, 24주 및 36주 동물모델 실험의 각 결과들을 통합적으로 분석하여, 5가지 대상물질 중 가장 효과가 좋았던 단일 물질(MPGT)을 중심으로 향후 실험을 진행하였다. 동물 실험의 특성상 개개의 실험결과가 모두 동일하진 않았지만, 24주 동물 실험 결과에서 MP와 MPGT, 36주 동물 실험 결과 GT와 MPGT가 가장 효과가 좋았으므로, 이후 실험은 MPGT를 중심으로 MP와 GT 세가지 물질을 가지고 약리기전 규명 실험을 진행하였고, 그 결과를 Helicobacter 저널에 논문을 투고하였다.

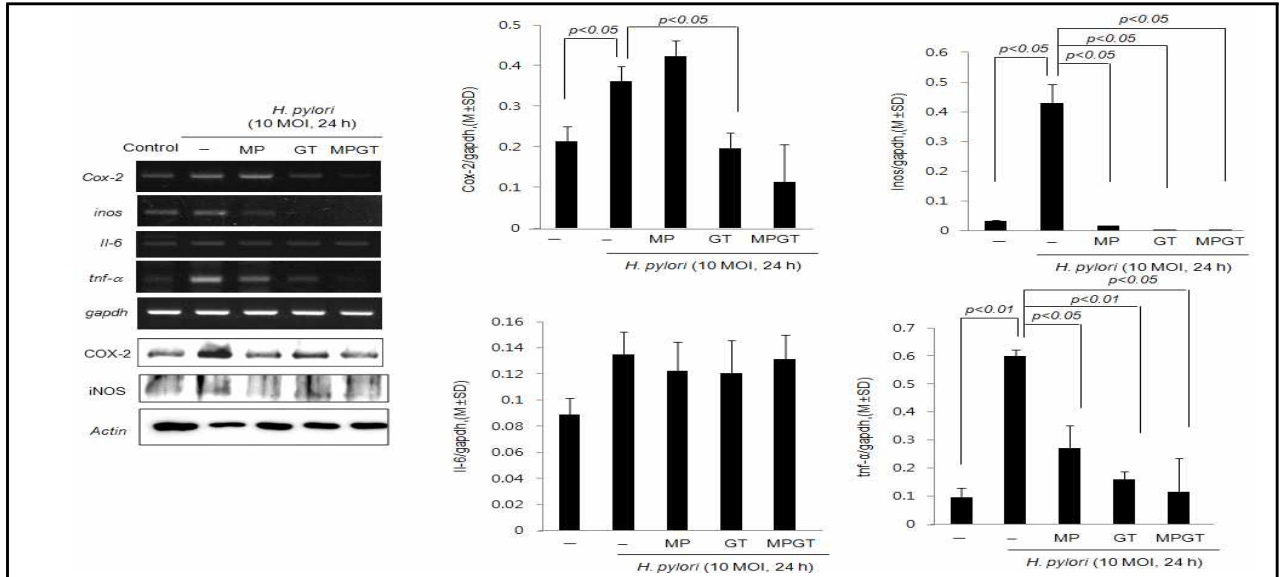


그림 44. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*에 의한 염증 억제 결과

정상 위점막세포인 rat gastric mucosal cell (RGM-1) 세포에서 진행되었고, 0.1 mg/ml의 시험 물질들을 전 처리한 후에 *H. pylori*를 10 MOI로 처리한 후, RNA와 Protein을 분리하여 염증관련 인자들의 발현을 살펴보았다. 그 결과, 염증 반응에 있어서 대표적인 효소로 알려져 있는 COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α 의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 COX-2는 항상 일정하게 발현되는 COX-1과는 다르게 외부 자극이나 염증을 일으킬 수 있는 인자들에 의해 유도되어 점막이나 상처 부위에서 pain이나 fever 등을 유도할 수 있는 prostaglandin E2를 생성함으로써 염증을 매개하는 인자로 잘 알려져 있다. iNOS 또한 염증 반응시 유도되는 효소로 산화적 스트레스를 초래한다. IL-6와 TNF- α 는 대표적인 염증성 사이토카인으로 특히 헬리코박터 필로리 균에 의해 유도되어 염증 반응을 초래한다고 잘 알려져 있다.

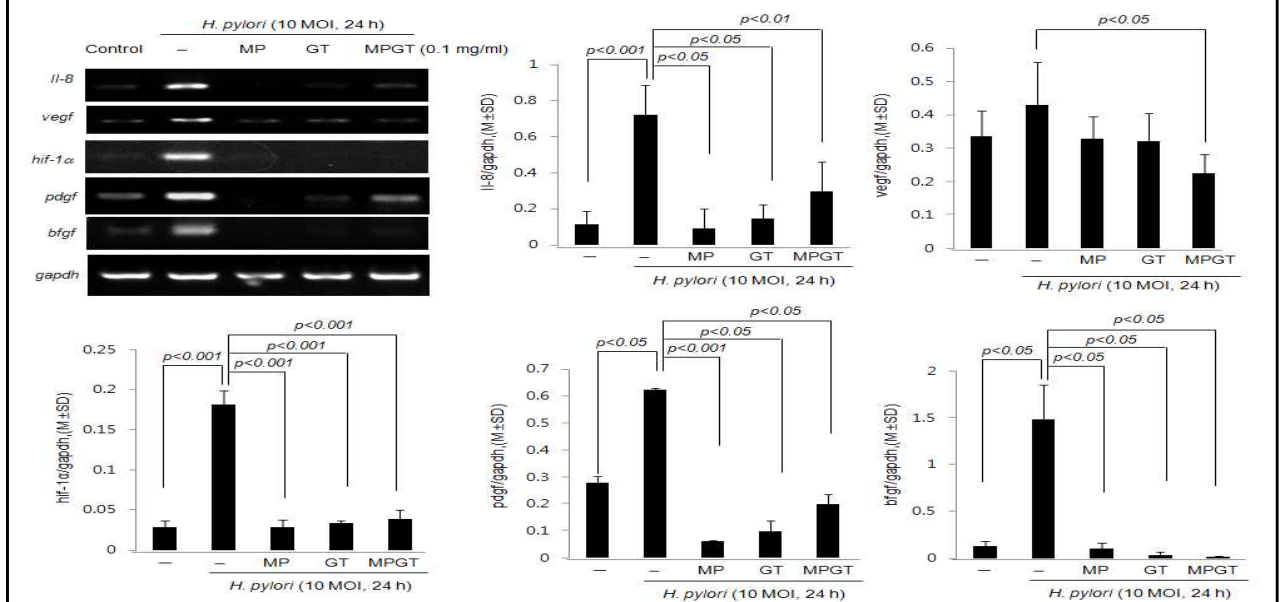


그림 45. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*에 의한 proliferation 억제 결과

다음으로 비정상적 세포 증식 인자들의 발현을 살펴보았다. 그 결과, angiogenesis에 있어서 대표적인 인자로 알려져 있는 VEGF와 그 전사인자인 HIF-1 α 의 발현이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 헬리코박터 필로리균은 host의 angiogenesis를 증가시키고 cell migration에 관여하는 인자들을 유도함으로써 host의 발암과정을 유도한다고 알려져 있다. 뿐만 아니라, growth factor들인 PDGF와 bFGF의 발현 역시 헬리코박터 처리에 의해서 증가된 이들의 발현이 시험물질들의 전처리에 의해서 현저하게 감소됨을 관찰할 수 있었다.

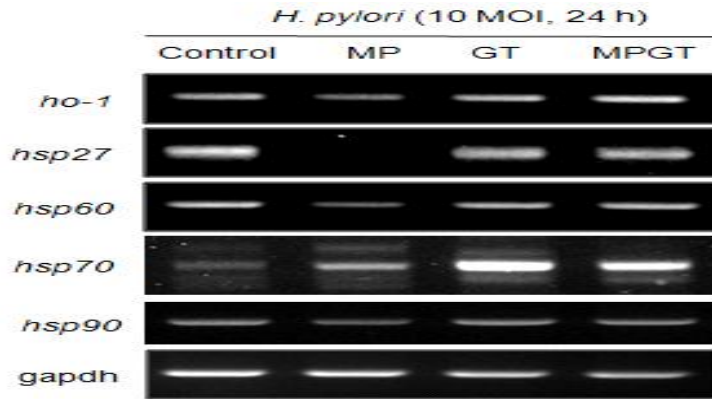


그림 46. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*에 의한 산화적스트레스 관련 인자역제 결과

*H. pylori*가 감염되면 산화적 스트레스를 유도한다는 사실을 이미 잘 알려져 있다. 세포 내에서 산화적 스트레스가 발생하게 되면, 그러한 산화적 스트레스를 감소시키기 위해서 항산화 관련 반응들이 일어나게 된다. 이 중 Hemeoxygenase-1(HO-1)과 heat shock protein (HSP)들은 평소에 다양한 스트레스에 대해서 세포들의 항상성 유지와 보호 작용에 관여한다고 알려져 있다. 흥미롭게도 HO-1과 HSP70의 경우, MP, GT, 그리고 MPGT가 그 발현을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 HSP70은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하며 여러 외부 자극으로부터 apoptosis를 억제한다고 알려져 있다. 헬리코박터 필로리가 HSP70의 발현을 억제함으로써 세포 보호 작용을 억제하여 세포사멸을 유도하는데 실험에 사용된 MP, GT, 그리고 MPGT 모두 헬리코박터 필로리에 의해 억제된 HSP70의 발현을 현저하게 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다.

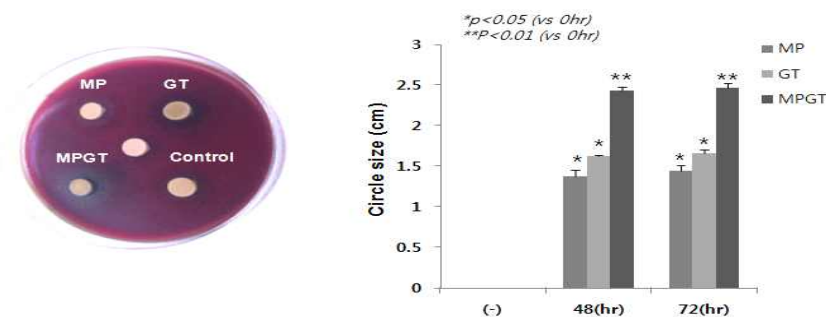


그림 47. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*의 생육 억제 결과

시험 물질 MP, GT, MPGT의 헬리코박터 필로리 균 성장 억제 효능을 비교해 본 결과,

48 시간 처리 후에 MPGT의 헬리코박터 필로리 균의 생육 억제 효능이 가장 뛰어남을 확인하였고, 72 시간 처리 후에도 마찬가지로 MPGT의 억제 효능이 가장 뛰어났다. 그 다음으로 GT, MP의 억제 효능이 좋음을 관찰할 수 있었다.

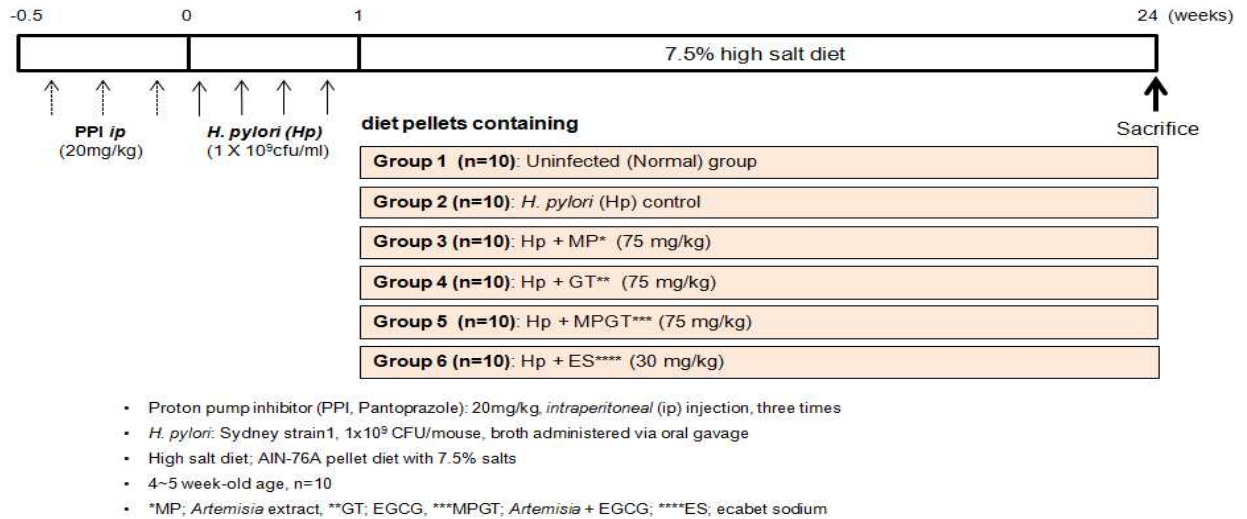


그림 48. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*에 의한 위염 및 위암 발생 억제 및 예방 효능 탐색을 위한 24주 모델

시험물질의 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 C57BL6를 이용하여 헬리코박터 파일로리 감염 모델에 관한 동물실험 (24주 모델)을 실시하였다.

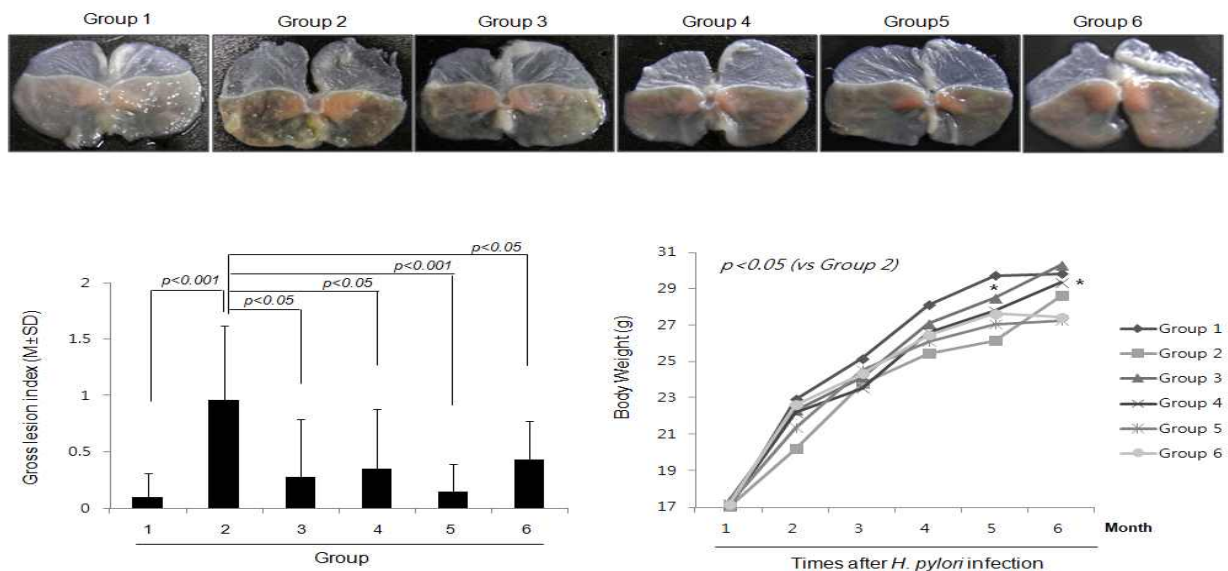


그림 48. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 육안 소견 및 body weight

헬리코박터 감염 24주후 위를 적출하여, 육안 소견을 살펴보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration과 장형화생, 그리고 염증반응을 나타내는 적변현상을 확인할 수 있었으나,

MPGT 처리군에서 정상 그룹과 같이 위 상태가 좋은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 헬리코박터 처리 그룹에서 체중 감소가 나는 것을 관찰할 수 있었고, MP, GT 투여군에서 헬리코박터 그룹보다 약간 체중이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

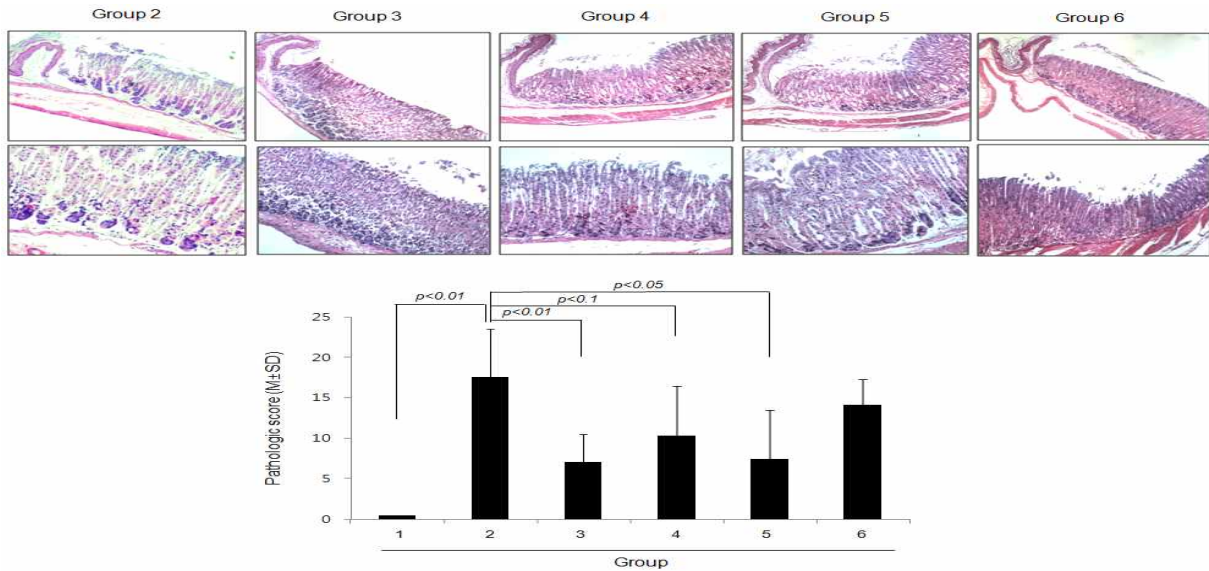


그림 50. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 병리 소견

적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E staining을 하여 pathology를 관찰한 결과, 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등의 병변을 관찰하였고, 임상에서 쓰이는 ecabet sodium 처리 그룹도 비슷한 정도로 헬리코박터에 의해서 위손상이 일어난 것을 확인하였다. 그러나 시험 물질 MP, GT, MPGT 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 MP와 MPGT 처리 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다.

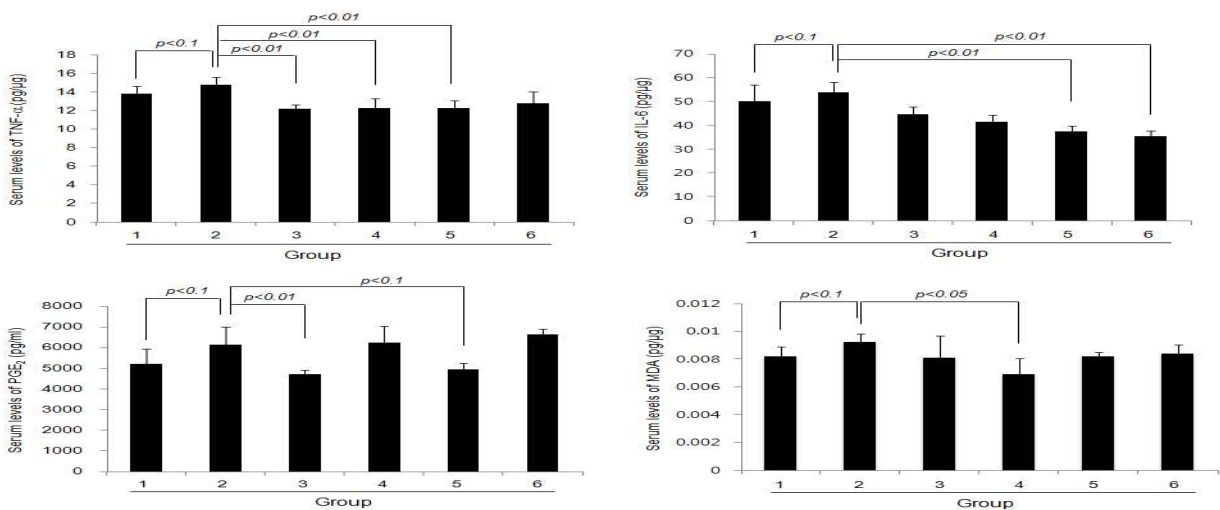


그림 51. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 TNF-α level, IL-6 level, PGE2 level, MDA level 측정

위장염 모델에서 염증 반응을 유도하는 대표적인 cytokine인 TNF- α 와 IL-6 level을 측정해 본 결과, H. pylori에 의해 유도된 그룹에서 TNF- α 와 IL-6 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 시험물질들 특히 MP와 MPGT의 처리에 의해서 그 발현 정도가 유의성있게 감소한 것을 관찰하였다. 시험 물질들의 헬리코박터 감염에 의한 위손상에 대한 보호 효능을 검증하기 위하여 mouse serum을 이용하여 염증유도인자인 PGE2와 lipid peroxidation marker로서 산화적 스트레스의 척도인 malondialdehyde (MDA)의 level을 측정하였다. 예상대로 헬리코박터 그룹에서 정상그룹보다 높은 PGE2와 MDA level을 나타내었다. 이때 ecabet sodium은 거의 영향을 주지 않았으며, 시험 물질들 특히 MP와 MPGT는 이들 PGE2와 MDA level을 감소시키는 것을 확인하였다.

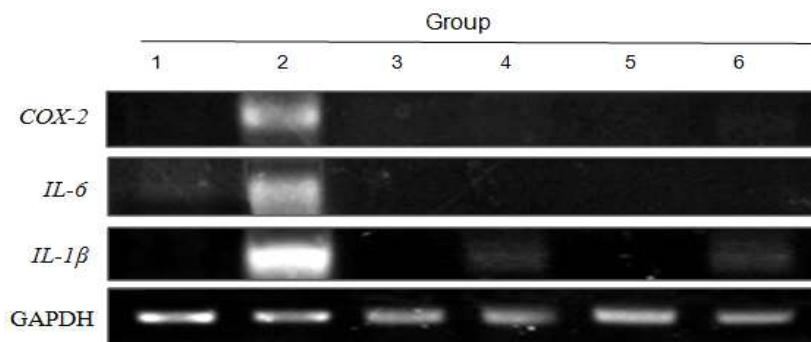


그림 52. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 염증 억제 효과

또한 위 조직에서 RNA를 분리하여 염증관련 인자들의 발현을 살펴보았다. 그 결과, 염증 반응에 있어서 대표적인 효소로 알려져 있는 COX-2, IL-6, IL-1 β 의 발현이 시험 물질 MP, GT, MPGT 처리군에서 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

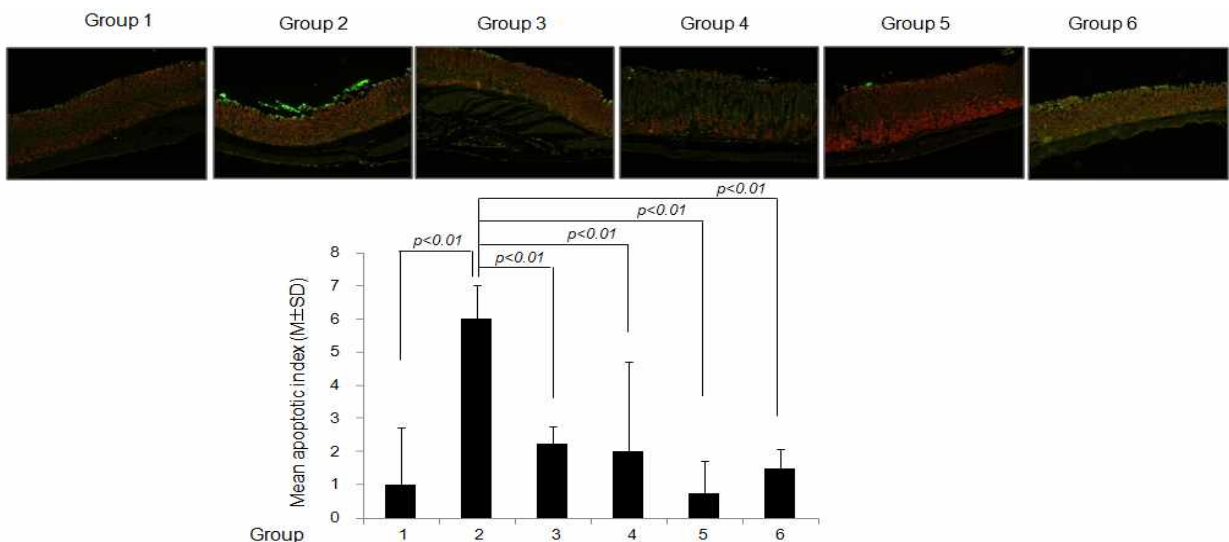


그림 53. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 TUNEL assay 결과

Apoptosis 즉, 세포 사멸과 세포 손상의 정도를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 수행하였다. 헬리코박터 감염의 ulcer가 일어난 부위에서 TUNEL이 현저하게 염색이 되었으며,

시험 물질 MP, GT, MPGT이 처리된 그룹 특히 MPGT에서는 그 염색이 감소하는 것으로 보아 헬리코박터 감염으로 인한 위 점막의 염증과 조직 손상이 MPGT 투여에 의해 감소한다는 것을 알 수 있었다.

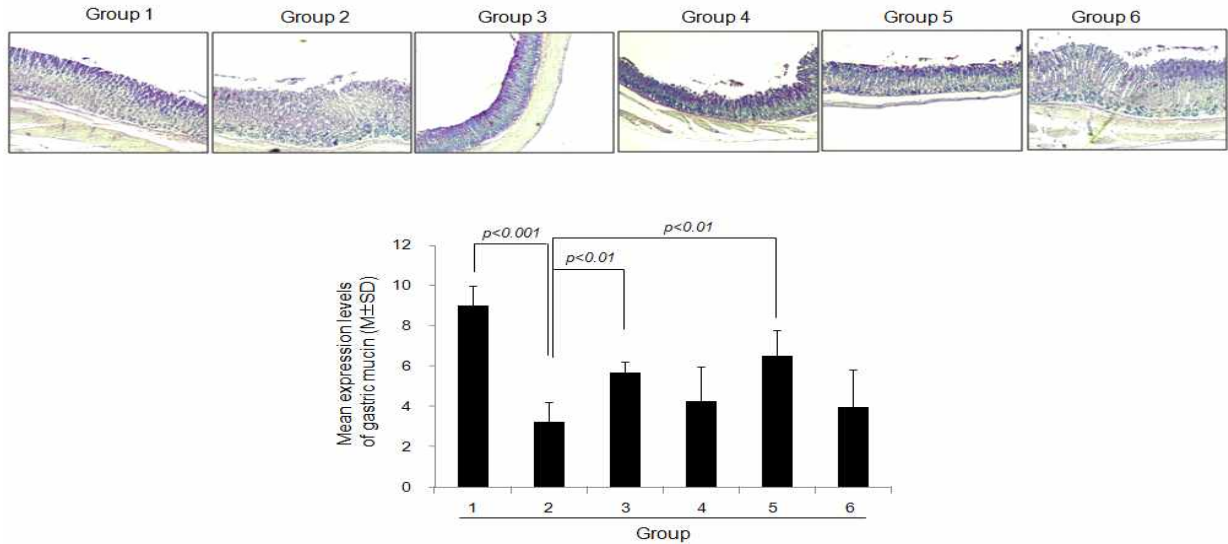


그림 54. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 PAS 염색 결과

다음으로 시험물질들이 단순히 염증 반응을 억제하는지 아니면 host 자체의 보호 효능도 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 위점막층의 mucin을 염색할 수 있는 PAS staining을 수행하였다. 그 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서는 보호 효능을 나타낼 수 있는 점막층이 손상되어 PAS 염색이 현저하게 감소되어 있었고, 시험물질 처리그룹 특히 MP와 MPGT에서 그러한 점막 손상이 통계적으로 유의하게 보호되어 있는 것을 관찰하였다.

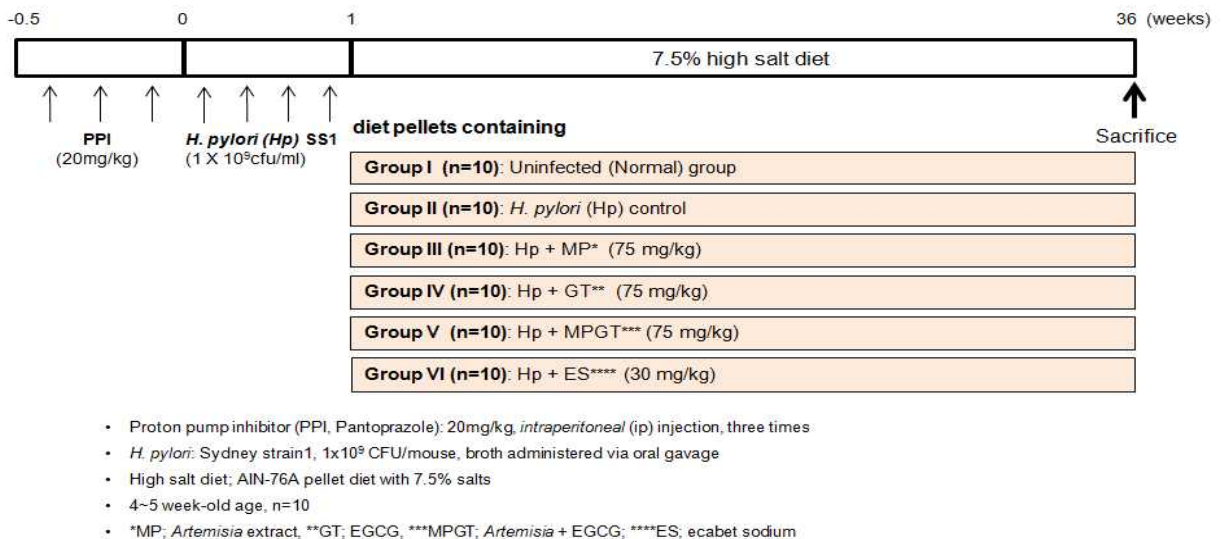


그림 55. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 *H. pylori*에 의한 위염 및 위암 발생 억제 및 예방 효능 탐색을 위한 36주 모델

시험물질의 헬리코박터 파일로리에 의한 위염 및 위암에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 C57BL6를 이용하여 헬리코박터 파일로리 감염 모델에 관한 동물실험 (36주 모델)을 실시하였다.

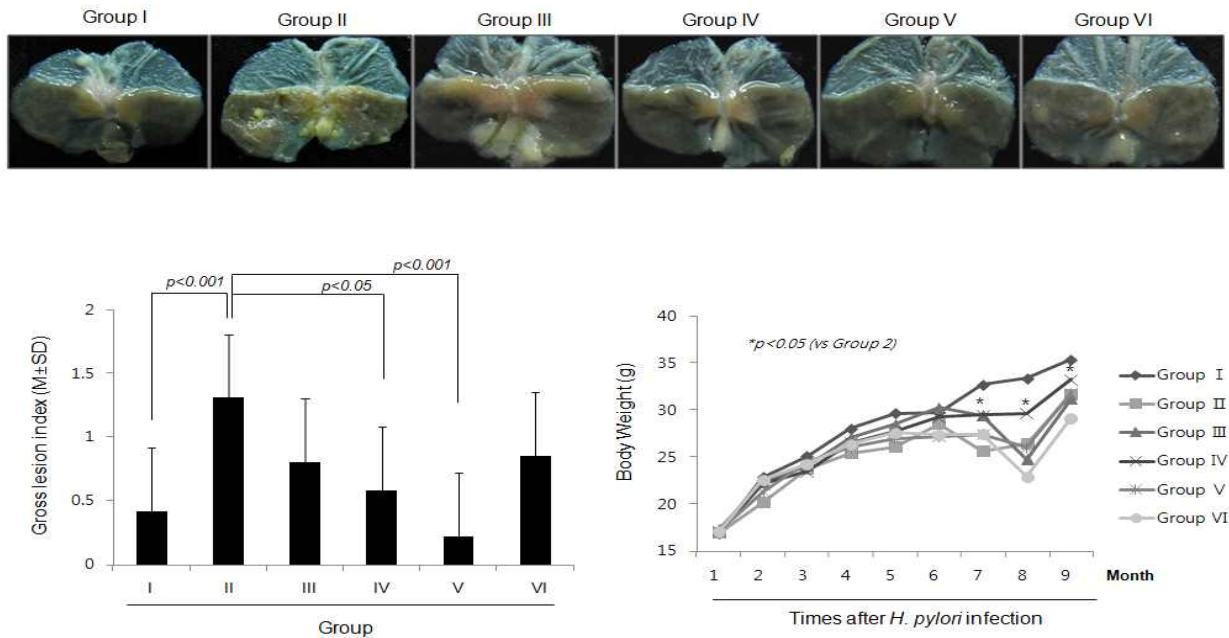


그림 56. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 육안 소견 및 body weight

헬리코박터 감염 36주후에 부검을 하여 위를 적출하였다. 육안 소견을 살펴보면 헬리코박터 감염 그룹에서는 ulceration과 장형화생, 그리고 염증반응을 나타내는 적변현상을 확인할 수 있었으나, MPGT 처리군에서 정상 그룹과 같이 위 상태가 좋은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 헬리코박터 처리 그룹에서 체중 감소가 나는 것을 관찰할 수 있었고, GT 투여군에서 헬리코박터 그룹보다 약간 체중이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

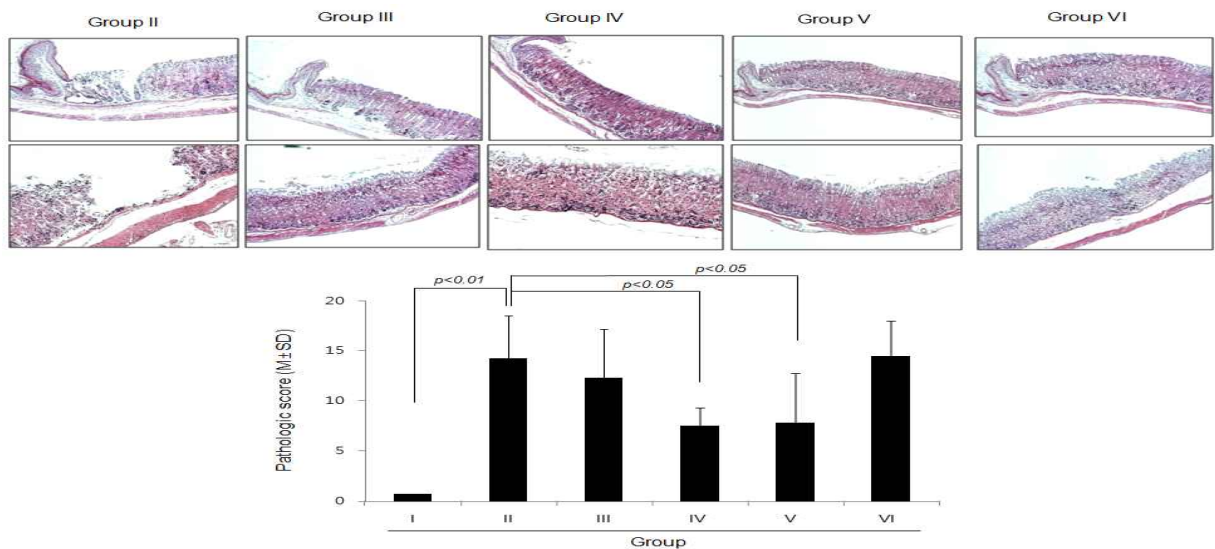


그림 57. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 병리 소견

좀 더 자세히 관찰하기 위하여 적출한 stomach을 formaldehyde에 고정시킨 후 H&E

stining을 하여 pathology를 관찰하였다. 헬리코박터 그룹에서는 염증세포들의 침윤, erosion, ulceration 등의 병변을 관찰하였고, 임상에서 쓰이는 ecabet soduim 처리 그룹도 비슷한 정도로 헬리코박터에 의해서 위손상이 일어난 것을 확인하였다. 그러나 시험 물질 처리군에서 그러한 병변이 호전되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 GT와 MPGT 처리 그룹에서 확연한 호전을 관찰하였다.

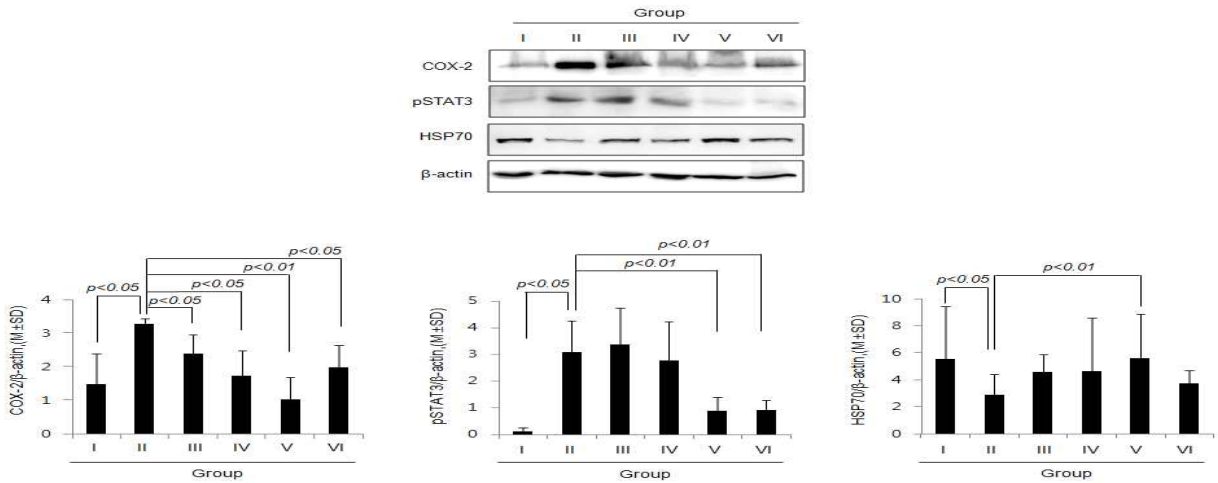


그림 58. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 Cox-2, pSTAT3, HSP70 발현 결과

염증반응의 가장 대표적 단백질인 COX-2와 pSTAT3를 확인하기 위하여 동물 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 수행하였다. MPGT 처리군에서 COX-2와 pSTAT3의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한 다양한 스트레스에 대해서 세포들의 항상성 유지와 보호 작용에 관여한다고 알려져 있는 HSP70의 발현이 MPGT 처리군에서 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

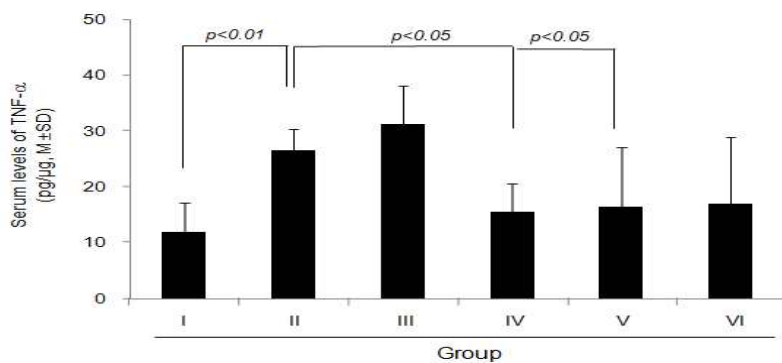


그림 59. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 TNF-α level

위장염 모델에서 염증 반응을 유도하는 대표적인 cytokine인 TNF-α level을 측정해 본 결과, H. pylori에 의해 유도된 그룹에서 TNF-α 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 시험물질들 특히 GT와 MPGT의 처리에 의해서 그 발현 정도가 유의성있게 감소한 것을 관찰하였다.

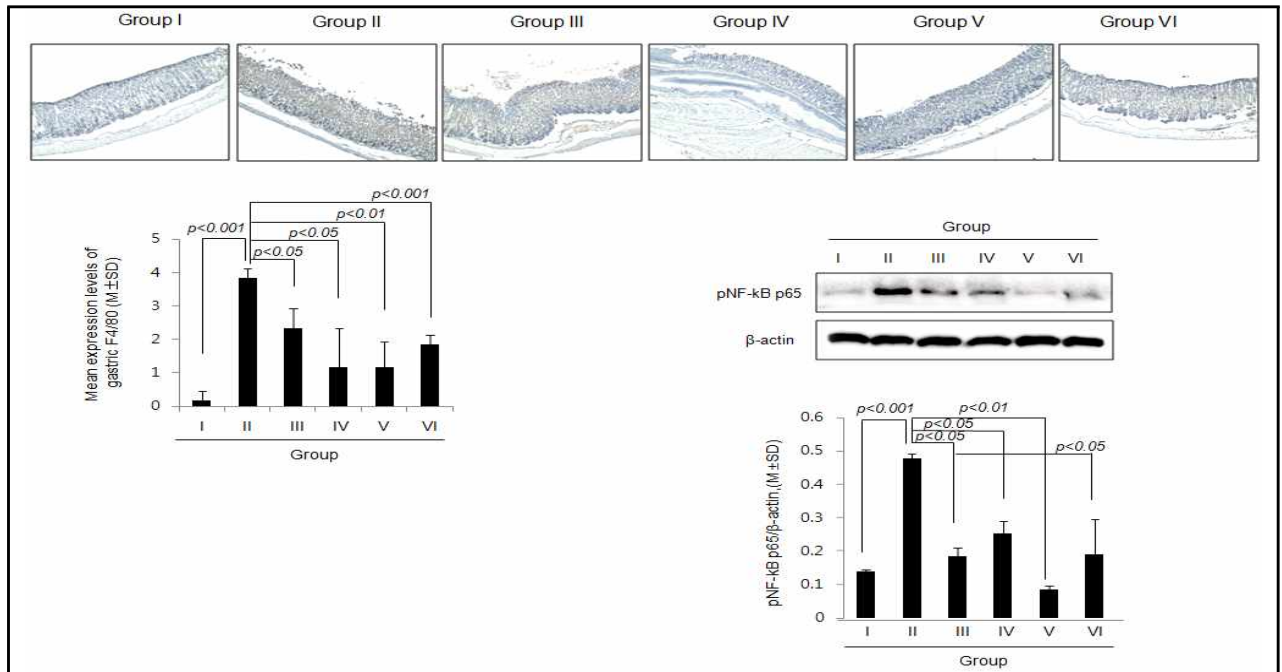


그림 60. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 F4/80 염색 및 pNF-κB 발현 결과
 다음으로 염증세포인 macrophage를 염색할 수 있는 F/80 염색을 통하여 염증반응의 정도를 측정하였다. 헬리코박터 그룹에서 macrophage infiltration이 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였고, 이러한 염증세포의 침윤이 시험물질 처리 그룹 특히 GT와 MPGT에서 통계적으로 유의하게 정상 수준 가까이 떨어져 있을 것을 관찰하였다. 또한 이러한 염증 반응에 관련된 대표적 염증관련 전사인자인 NF-κB의 인산화를 살펴본 결과, 헬리코박터 그룹에서 NF-κB의 인산화가 통계적으로 유의하게 증가되어 있는 것을 확인하였고, 이러한 NF-κB의 인산화가 시험물질 처리 그룹 특히 MP와 MPGT에서 통계적으로 유의하게 정상 수준 가까이 떨어져 있을 것을 관찰하였다.

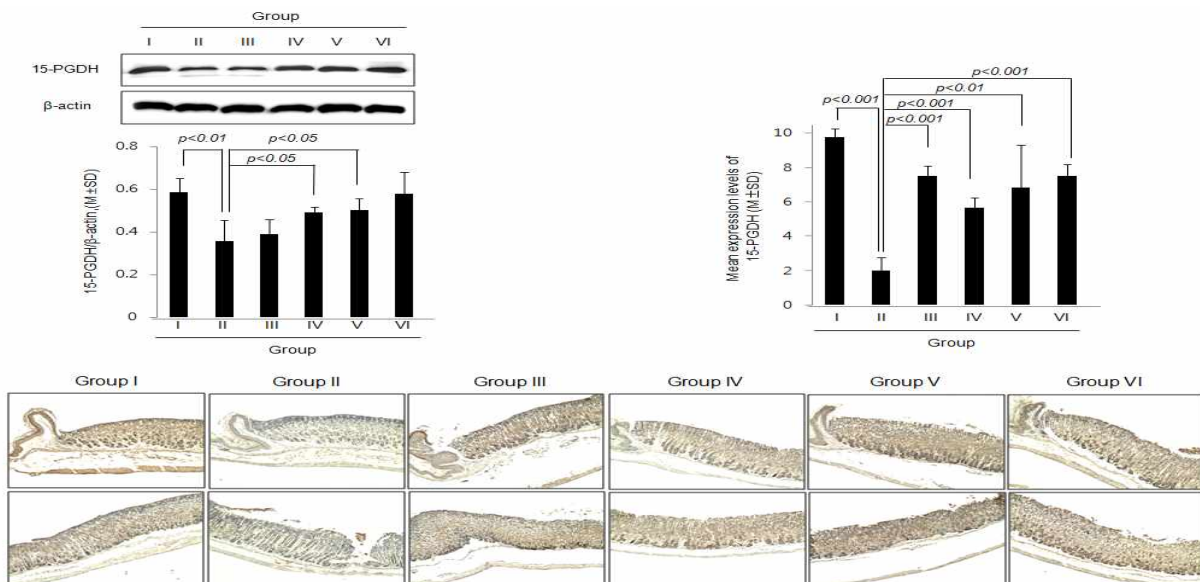


그림 61. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 15-PGDH 발현 및 염색 결과

COX-2의 발현으로 생성된 PGE₂의 세포내 축적은 합성과정 뿐만 아니라 분해과정을 통해 조절되는데, 특히, NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)는 프로스타글란딘의 분해과정의 첫단계를 촉매하는 효소로서, PGE₂를 15-ketoPGE₂로 전환시킴으로써 PGE₂ 불활성에 관여한다. 최근 연구에 의하면 최근 15-PGDH가 정상 조직에 비해 cancer에서 발현이 현저히 저하되며, 15-PGDH의 knock mouse를 이용한 실험을 통해 15-PGDH가 종양억제제로서 작용할 것이라는 연구 내용을 비롯하여, 다양한 암종에서 15-PGDH의 종양억제제로서의 작용 가능성에 대해 보고되고 있다.

이러한 15-PGDH의 발현을 확인하기 위하여 동물 위 조직으로부터 단백질을 추출하여 Western blot을 수행하였고 이를 IHC staining을 통하여 재확인하였다. 헬리코박터 감염 그룹에서는 15-PGDH의 발현이 현저하게 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 반면 시험 물질 MP, GT, MPGT 처리군에서 15-PGDH의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 특히MPGT 처리군에서 그 발현이 현저히 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

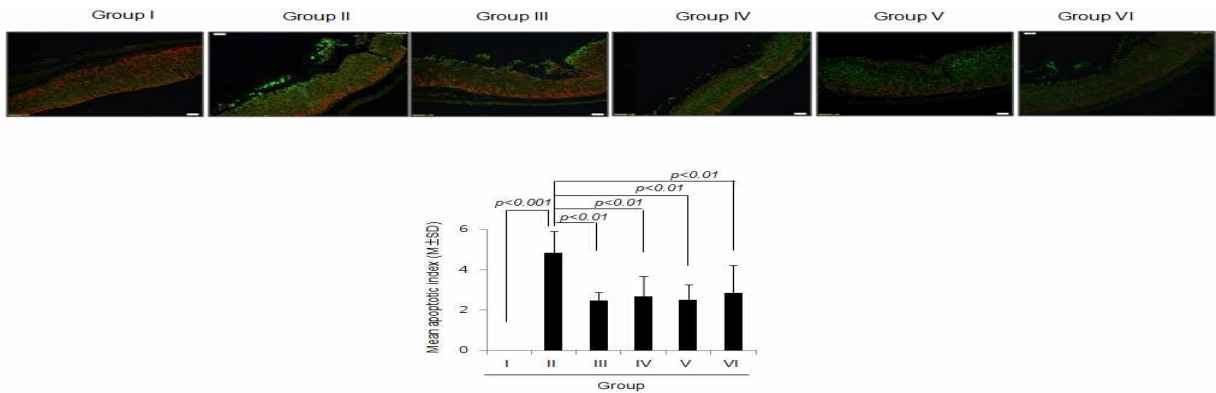


그림 62. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 TUNEL assay 결과

또한 세포사멸의 대표적인 현상인 DNA fragmentation을 응용하여, DNA의 말단 부위를 염색하여 apoptosis 즉, 세포 사멸과 세포 손상의 정도를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 수행하였다. 예상한 바와 같이, 헬리코박터 감염의 ulcer가 일어난 부위에서 TUNEL이 현저하게 염색이 되었으나, 시험 물질 MP, GT, MPGT을 처리한 그룹에서 그 염색이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

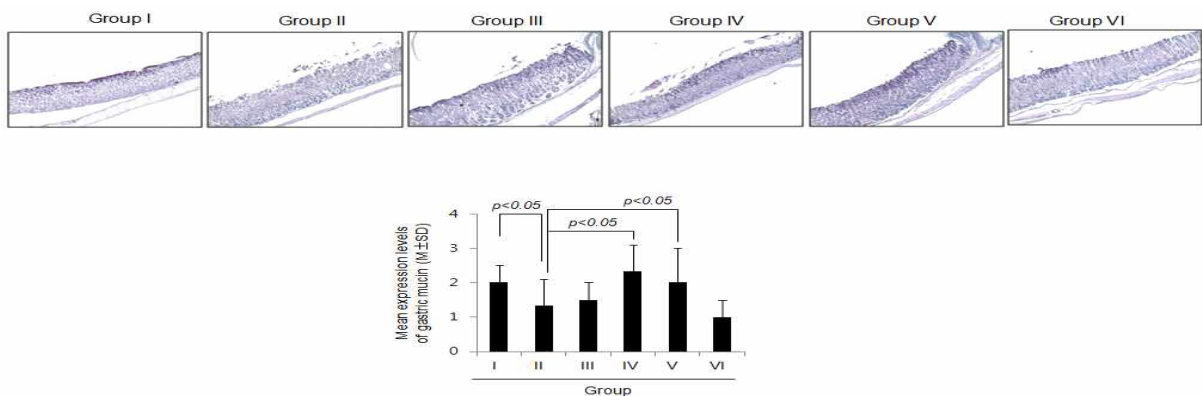


그림 63. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 그룹별 PAS 염색 결과

이때 시험물질들이 단순히 염증 반응만을 억제하는지 아니면 host 자체의 보호 효능도 증가시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 위점막층의 mucin을 염색할 수 있는 PAS staining을 수행하였다. 그 결과, 헬리코박터 감염 그룹에서는 보호 효능을 나타낼 수 있는 점막층이 현저히 손상되어 PAS 염색이 현저하게 감소되어 있었고, 시험물질 처리그룹 특히 GT와 MPGT에서 그러한 점막 손상이 통계적으로 유의하게 보호되어 있는 것을 관찰하였다.

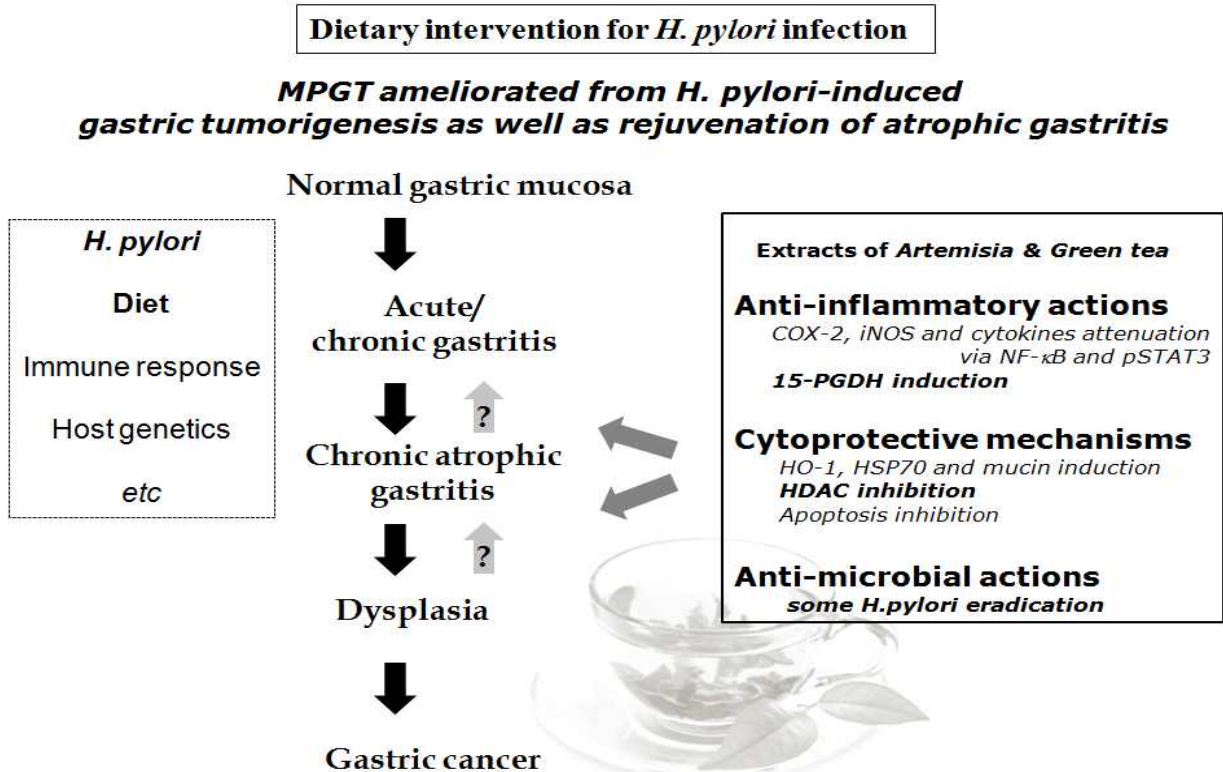


그림 64. 시험 물질 MP, GT, MPGT의 위염 및 위암 발생 억제 및 예방 효능

이상과 같은 연구 결과는 *H. pylori* 감염에 대한 단순한 균주의 제거라든지 감염에 의해 발생된 염증조절만으로는 *H. pylori* 감염에 따른 각종 질환, 위암, 위축성 위염 등의 예방이 힘든 상황에서 *H. pylori* 감염에 따른 위손상을 예방하기 위하여서는 안정성이 입증된 식품 유래 성분인 GTMP의 지속적인 섭취가 중요하다 하겠다. 또한 이미 생활에 보편화되어 있는 물질이 *H. pylori*에 대한 제균 또는 감염에 의한 항염증작용을 갖는 것은 큰 의의를 갖는다고 할 수 있다.

제5절 인체적용시험에 의한 효능 평가

인진쑥녹차추출물의 위기능 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정을 획득하기 위하여 식약처와 방문상담 3회, 모듬토의 1회를 통하여 임상시험계획서를 설정 확립하였다.

1. 인체적용시험계획서

1. 인체적용시험의 명칭 및 단계

1.1. 명칭

H .pylori 연관한 위 손상 개선에 대한 SD1003F(인진썩, 녹차추출물의 복합물)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주 이상, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

10 weeks, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for the evaluation of the efficacy and safety of SD1003F on Helicobacter pylori-associated functional dyspepsia.

1.2. 단계

기타(건강기능식품)

2. 연구자 및 연구지원조직

2.1. 인체적용시험 실시기관

차의과대학교 분당차병원 (경기도 성남시 분당구 야탑로 59)

2.2. 인체적용시험 연구자

2.2.1. 인체적용시험 책임자

함기백 (차의과대학교 분당차병원 소화기내과 교수)

2.2.2. 인체적용시험 공동연구자

홍성표 (차의과대학교 분당차병원 소화기내과 교수)

김원희 (차의과대학교 분당차병원 소화기내과 교수)

2.2.3. 인체적용시험 담당자

분당차병원 소화기내과 CRC 최윤미

2.3. 인체적용시험 의뢰자

(주)에스앤디 대표이사 여경목

충청북도 청원군 오송읍 오송생명4로 163

2.4. 인체적용시험 수탁기관 (Contract Research Organization, CRO)

(주)에스앤디 대표이사 여경목

충청북도 청원군 오송읍 오송생명4로 163

인체적용시험 모니터 (주)에스앤디 이응주 선임, 조용석 박사

TEL : 043-710-8000

FAX : 043-710-8099

3. 인체적용시험의 목적 및 배경

3.1. 인체적용시험의 목적

본 인체적용시험은 인진썩녹차추출물을 섭취했을 때 대조군과 비교하여 *Helicobacter pylori* (이하 *H. pylori*) 연관한 위 손상 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.

3.2. 인체적용시험의 배경

기능성 식품 시장은 건강증진·질병예방의 중요성이 강조됨에 따라 향후 연평균 10% 수준으로 성장이 전망되는 미래 고성장 시장으로 선진국에서는 이미 기능성평가를 위한 기관을 설립하고 기능성식품 R&D를 활발하게 진행하고 있다.

그 예로 네덜란드 푸드밸리 내에 위치한 식품개발연구소인 「니조(NIZO)」 연구소는 건강부서(Health Department)를 두고 기능성식품관련 산업화 연구를 활발히 진행하고 있으며, 캐나다의 리차드슨(Richardson) 기능성식품 센터」는 서부 식품자원을 경쟁력 있는 기능성식품으로 개발·지원하는 역할을 담당하고 있다.

이를 반영하듯 현재 세계 기능성식품 시장은 미국, 유럽, 일본 등 선진국이 80% 이상을 차지하고 있으며, 전세계 인삼 시장 규모는 30억 달러(약3조3천억원)에 이른다. 스위스 파마톤사의 경우 인삼 사포닌을 추출한 기능성식품(제품명: 진사나) 개발로 연 4,000만달러(4,400백만원) 매출을 올리고 있다(한겨레 뉴스, 2012년 12월 10일).

소득 수준이 높아지면서 생활의 여유가 생기고, 건강이 인생에서 중요한 부분으로 자리잡으면서 건강에 대한 관심이 날로 커지고 있다. 건강의 위협을 피부로 느끼는 중장년층 뿐만 아니라 20~30대 젊은 계층 또한 건강에 대한 문제라면 많은 관심을 나타내고 있다.

식품의약품 안전처는 2012년도 건강기능식품 총 생산액이 1조 4091억원으로 전년대비 3% 증가 했으나, 두 자릿수 성장세를 보였던 예년에 비해 성장세가 다소 둔화하였으며, 생산량은 2011년 3만 9611톤보다 14.8% 감소한 3만 3735톤이라고 했다. 식약처의 분석에 따르면 이는 국내외 전반적 경기침체의 영향으로 건강기능식품의 수요가 감소한 것으로 판단하였다.

그러나 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능성 식품은 작년 생산실적인 1807억원으로 전년대비 25.9%의 가파른 성장세를 나타내었다고 한다.

개별인정형제품은 새로운 기능성에 대한 니즈와 맞물려 틈새시장을 공략하고자 하는 기업이 늘고 있다는 점을 감안할 때 꾸준히 증가할 것으로 예상된다. 개별인정형제품의 상위 5개품목중 2009년과 2010년 헛개나무 과병추출 분말이 부동의 1위를 유지하며 2010년에는 44억원의 생산실적으로 다른 개별인정형 제품에 비해 급속한 성장을 했다.

그러므로 2010년 위 건강과 관련된 기능성 원료 인정은 1건으로 위 질환 관련 소재 개발은 매우 경쟁력이 있음은 물론 위암의 사망률이 전세계 3위를 차지하고 하고 여전히 난제로 남아 있는 우리나라 실정으로 볼 때 이를 개선시킬 수 있는 위건강과 관련된 기능성 원료인정은 매우 의의가 높다 하겠다. 현재 식약청의 개별 인정형 신청허가 건수가 매년 증가하고 있고 인정을 위한 기능성 측면에서도 다양해지는 경향을 보이거나 아직까지 위기능 개선에 대한 개별인정 건은 현재 없다.

위점막 내 *H. pylori*의 감염이 위질환 및 위암 발생에 관여하는 것으로 알려져 주목을 받고 있다. 처음으로 헬리코박터 파이로리 균을 배양하고, 이 균이 각종 소화성 질환의 원인을 밝힌 Warren과 Marshall이 2005년에 노벨의학상을 수상하면서 헬리코박터 파이로리 균에 대한 관심과 중요성이 더욱 부각되었다. 우리나라 성인의 70% 정도가 보균자로 이러한 배경으로 위에 좋은 식품 소재의 개발의 필요성이 대두 되고 있다. 따라서, 만성 위질환과 위암의 중요한 발병인자인 *H. pylori* 성장을 저해하고 위점막을 보호할 수 있는 기능성 소재를 도출하여 식약처로부터 개별인정을 통한 안전성과 기능성을 확보 받아 식생활에서 쉽게 접근할 수 있는 기존 제품에 기능 소재를 추가한 제품 개발이 다양화될 필요가 있다.

1. 소화기 약물은 다른 질환 시에도 위점막보호를 위해 처방되는 약물로서 부작용을 최소화하면서 실생활과 밀접한 관련이 있는 천연물 소재의 도출은 기능성 식품 소재뿐만 아니라 천연물 신약까지 발전할 수 있는 부가가치가 크고 잠재력이 무한한 시장이다. 2012년에 일본의 경우에는 위염에서 위암으로 전이되는 환자가 인구 100,000명당 50명으로 증가하고 있어 국가에서는 5조원을 투자하여 위염의 발병 원인이 되는 요소에 대한 연구와 관련 예방·치료제 개발에 전력을 하고 있는 실정이나, 뚜렷하게 효과를 보이는 물질을 찾지 못하고 있는 실정이다.

2. 따라서 기존의 인진쑥과 녹차의 추출물을 혼합하여 부착억제 이외에 생육억제 및 urease 억제 활성이 있는 기능성 강화 원료에 대한 *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험을 통한 효능평가에 대한 과학적 자료가 확보될 경우에는 일본, 중국 등으로의 수출 등이 기대되어 *H. pylori* 관련 위 손상 개선에 효능을 갖는 개별인정형 원료를 개발하고자 한다.

인진쑥(사철쑥, *Artemisia capillaris*)은 사철쑥의 어린줄기나 잎을 말린 것으로 애당쑥이라고도 하며 주로 냇가의 모래땅에서 흔히 자란다. 높이는 30~100cm이다. 밑부분은 목질이 발달하여 나무같이 되고 가지가 많이 갈라진다. 꽃이 피지 않는 가지는 끝에 잎이 뭉쳐나고 잎자루가 길다. 밑부분에 달린 잎은 잎자루가 길고 길이 1.5~9cm, 나비 1~7cm로서 2회 깃꼴로 갈라진다. 갈래조각은 실처럼 가늘고 나비 약 0.3mm이며 전체가 비단 같은 털로 덮인다. 위로 갈수록 잎이 작아진다. 꽃은 8~9월에 노란색으로 피고 두화(頭花)는 둥글며 지름 2mm 정도로 원추꽃차례에 달린다. 길이 1~2mm의 꽃자루가 있다. 총포는 둥글고 털이 없으며 포조각은 3~4줄로 늘어선다. 바깥조각은 달걀 모양, 안조각은 타원 모양이다. 열매는 수과로서 길이 약 0.8mm이다. 어린순을 식용하며, 포기 전체를 염증을 없애는 이노제로 쓰거나 황달에 사용하기도 하며, 주산지는 한국·일본·타이완·중국·필리핀 등지에 분포한다. 인진쑥의 주요 약리 작용에 대한 보고는 주로 간기능 개선 및 간 섬유화 억제에 관한 연구가 많이 되어 있다. 특히 고신대학교 최병태 교수팀은 인진쑥 추출물은 간의 염증반응을 억제시키는 효능을 보고하였고, 대구 한의대 김승모 교수팀에서는 인진쑥 추출물 2,000mg/kg의 농도에서도 생식, 발생 및 태자 독성을 나타내지 않는 안전한 소재로 보고하고 있다. 특히 전통적으로 간장 질환 관련 간 기능을 보호하고 간에서 발생하는 염증을 저해하는 소재로서 많이 사용되고 있으며, 최근 국내에서는 간섬유화를 억제시키는 보고가 많이 되고 있다. 또한 대한약전의 생약규격집에서 원료의 규격 내용이 다음과 같다. 이 농산물은 사철쑥 *Artemisia capillaris* Thunberg (국화과 Compositae)의 지상부이다. 봄에 채취한 것을 '면인진(綿茵蔯)'이라 하고, 가을에 채취한 것을 '인진호(茵蔯蒿)'라 한다. 정상 면인진(綿茵蔯) 이 농산물은 지상부로 말린 덩어리 모양이고 회백색 ~ 회록색이며 전체에는 흰색의 털이 덮여있고 섬유처럼 부드럽다. 줄기는 가늘고 길이 15 ~ 25 mm, 지름 1 ~ 2 mm이며 표면의 흰색의 털을 제거하면 세로무늬를 선명하게 볼 수 있고 질은 부드럽다. 잎에는 잎자루가 있고 1 ~ 3 회 우상으로 갈라져 있으며 길이 1 ~ 3 cm, 지름 약 1 cm이다. 소엽편은 난형 또는 도피침형이고 조형이며 선단은 예첨두이다. 이 농산물은 맑은 향기가 있고 맛은 약간 쓰다. 국내에서는 본 연구의 임상책임연구자인 함기백교수가 인진쑥 추출물을 이용하여 국내 최초의 위염피로제로 개발한 경험이 있고, 이를 통하여 장기간 약물로서의 투여에서도 별 이상반응이 없는 안전한 추출물로 인정되고 있다.

녹차(차나무, *Camellia sinensis*)는 차나무의 잎을 이용하여 발효시키지 않은 차잎[茶葉]을 사용해서 만든 차이다. 국내에서는 전남 보성, 경남 하동, 제주 일원에서 기업적으로 재배되고 있으며, 녹차는 차를 자주 마실 경우 혈전 형성을 막아주고 콜레스테롤과 혈당을 낮추는 효과가 있다. 또한 충치 예방에도 효과가 있다고 한다. 녹차 추출물은 항산화 작용이 있다. 녹차의 매력인 쌉싸름한 맛은 카테킨(catechin)이라 불리는 탄닌 성분 때문이다. 항산화 작용을 하는 폴리페놀의 한 종류인 카테킨은 녹차 한 잔에 대략 100mg이 들어 있으며, 그중 가장 강력한 성분인 'EGCG'는 비타민 C보다 항산화 효능이 20배나 높은 것으로 알려

져 있다. 카테킨 성분은 항암 효과와 혈관 건강을 지키는 기능을 한다고 알려져 있다. 카테킨은 위암, 폐암 등을 예방하는 효과가 있고, 혈압을 낮추어주며 심장으로의 혈류를 늘리는 효과도 있다. 소화기관 내에서의 콜레스테롤의 흡수를 저해하고 지질의 체내 침착을 억제한다. 이에 혈압을 떨어뜨리고, 심장을 강화하며, 지방간이나 동맥경화를 예방한다. 또 감기 바이러스의 활동을 저지시키고 체내 세포가 바이러스에 감염되는 것을 막는다. 녹차에 함유되어 있는 주요 성분은 카페인(3%), 탄닌, 테아닌, 세키세놀, 비타민 C (150~500mg), 비타민 B1, B2, 나이아신, 펜토텐산, 이노시톨, 루틴 등이다. 기름기가 많은 음식을 먹고 차를 마시면 개운하고 강한 알칼리성이므로 위산 과다에도 좋다. 최근 미국 예일 대학교 연구팀은 높은 흡연율에도 한국인·일본인의 동맥경화, 폐암 유병률이 서구인보다 상대적으로 낮은 것은 녹차 소비량이 많기 때문으로 추정했다. 이들은 이 같은 '아시안 패러독스'의 비결로 녹차의 카테킨을 지목했다. 녹차의 카테킨 등 폴리페놀 성분이 항산화 작용을 하고, 혈중 콜레스테롤 수치를 낮춘다. 아미노산의 일종인 '테아닌'은 심신을 이완시키고 혈압을 낮추며, 학습능력을 높여준다. 차나무에서 첫 번째로 따는 잎으로 만든 '우전'에 테아닌이 풍부하다. 한편 『본초강목(本草綱目)』에는 '녹차를 차게 해서 마시면 담이 생긴다'고 나와 있다. 녹차는 찬 성질을 가지고 있어 몸의 열을 내리기 때문에 냉녹차 보다는 따뜻한 녹차가 좋다. 그러나 공복에 녹차를 너무 많이 마시면 속이 쓰리고 소화를 방해할 수 있다. 또한 식사 직후 진한 녹차를 마시면 녹차의 탄닌산이 섭취한 음식의 단백질, 철 등의 체내 흡수를 방해해서 소화 불량이나 영양 불량을 일으킬 수 있다. 녹차는 이뇨 작용이 강해서 약물의 체내 잔류 시간을 짧게 만들 수 있기 때문에 약을 복용하는 사람들은 주의하여야 한다. 카페인의 각성 작용이 불면증을 악화시킬 수 있으므로 불면증 환자는 녹차를 마시지 않는 것이 좋다. 또한 카페인 때문에 심계항진, 두통, 이명, 눈의 침침함 등의 증상이 나타날 수 있다.

이 식품은 각각의 원료를 개별 추출하여 주정을 투입하여 건조 분말화 한 다음 일정한 비율에 따라 혼합한 소재로 이미 전임상연구를 통하여 *H. pylori* 감염시 발생하는 급만성 위염은 물론 헬리코박터 필로리 감염 연관 위암까지도 예방하는 효능을 입증한 바가 있다. 인진쑥(*Artemisia capillaris*), 녹차(*Camellia sinensis*)를 원료로 제조된 *H. pylori* 연관한 위 개선에 효능을 갖는 개별 인정형 원료를 개발하고자 한다.

4. 인체적용시험용 식품

4.1. 인체적용시험용 식품의 개요

4.1.1. 시험식품

- 주성분명 : 인진쑥, 녹차추출물
- 성상 및 제형: 특이한 향을 가진 밝은 황색~갈색 분말이 든 장방형 브라운색 코팅 필름 정제
- 함량 : 600mg/1정 (시험원료로서 150mg/1정)
- 보관방법 : 건냉소 보관
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 1정, 식후 섭취 (시험성분으로서 1일 300mg)
- 원재료 및 배합비율 : 1정(600mg) 중

배합목적	성분명	규격	분량
주성분	인진쑥녹차 분말	별규	150
부형제	결정셀룰로오스	실험	414
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	식침	12.00

흡착제	이산화규소	식첨	12.00
활택제	스테아린산마그네슘	식첨	6.00
코팅기제	히드록시프로필메틸셀룰로오스	식첨	5.40
코팅기제	자당지방산에스테르	식첨	0.60

- 지표성분 : Protocatechuic acid, EGCG (Epigallocatechin gallate)

4.1.2. 대조식품 (Placebo)

- 주성분명 : 유당분말
- 성상 및 제형 : 외관상 시험식품과 동일
- 함량 : 600mg/1정
- 보관방법 : 건냉소 보관
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 1정, 식후 섭취
- 원재료 및 배합비율 : 1정(600mg) 중

배합목적	성분명	규격	분량
결합제	유당분말	식첨	263.00
결합제	결정셀룰로오스	식첨	300.00
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	식첨	12.00
고결방지제	이산화규소	식첨	12.00
활택제	스테아린산마그네슘	식첨	6.00
색소	식용색소류	식첨	1.00
코팅기제	히드록시프로필메틸셀룰로오스	식첨	5.40
코팅기제	자당지방산에스테르	식첨	0.60

4.2. 인체적용시험용 식품의 생산/포장 및 라벨링

인체적용시험용 식품(시험식품 및 대조식품)은 시험의뢰자가 제조 후, 포장하여 인체적용시험 연구자에게 공급한다.

시험식품 및 대조식품으로 생산되는 제품은 각 약물의 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 시험식품과 대조식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 피험자 및 연구자에 대하여 맹검(Blind)이 유지되도록 한다.

인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 약사법 시행규칙 제75조 제6항에 따르며 군별 차이가 노출되지 않도록 제조번호(Lot No.)는 시험식품, 대조식품 제조번호를 함께 기한다. 맹검을 위한 샘플의 생산과 유지방법은 다음과 같다.

- ① 분리보관 : 시험식품과 대조식품들은 라벨링 작업 전까지 제조번호별로 섞이지 않게 별도 보관한다.
- ② 라벨링 : 아래의 내용이 포함된 라벨을 제작한다.

- 1. “인체적용시험용”이라는 표시
- 2. 제품의 코드명 또는 주성분의 일반명 : SD1003F 또는 SD1003F 위약(배정번호)
- 3. 제조번호 및 사용(유효)기한 또는 재검사일자
- 4. 저장방법
- 5. 인체적용시험계획 승인을 받은 자의 상호와 주소
- 6. “인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음”이라는 표시

- ③ 포장 및 고유 코드의 기록 : 시험식품과 대조식품을 각각 6주분씩 소분 포장한 후, 무작위배정표에 따라 고유코드를 포장 라벨지에 기록한다.

4.3. 이중맹검의 유지

이중맹검 유지를 위하여 4.2.항 인체적용시험에 사용되는 제품의 생산/포장 및 라벨링에서 언급된 내용 이외에, 각 군별로 고유코드의 할당 내역은 인체적용시험 연구자가 봉인된 상태로 관리하며, 중대한 약물반응 발생으로 부득이하게 해당 코드 열람이 필요한 경우를 제외하고는 인체적용시험 종료 시까지 공개하지 않는다. 인체적용시험 연구자는 선정된 피험자의 섭취 배정번호와 일치하는 고유코드 식품을 피험자에게 공급하며, 인체적용시험용 식품의 결손 및 파손 시에는 여분(고유코드별)을 사용함으로써 맹검을 유지한다.

5. 인체적용시험 기간

인체적용시험계획서 승인일로부터 12개월

6. 피험자의 선정기준, 제외기준 및 목표 피험자의 수

6.1. 대상자

건강성인으로서 ¹³C-요소호기 검사에서 스크리닝 당시 양성이면서 기능성 소화불량에 해당하는 자

6.1.1. 선정기준

다음 기술된 조건에 부합되는 사람을 피험자로 선정한다.

- 1) 만 19세 이상 ~ 65세 이하의 성인 남녀
- 2) 위장 검사에서 H. pylori 보균자이며 ¹³C-요소호기 검사에서 스크리닝 당시 양성이면서 기능성 소화불량자
- 3) 시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고 서면동의서(Informed consent)에 작성한 자

6.1.2. 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 사람은 피험자에서 제외한다.

- 1) 위궤양 또는 위염환자, 소화기 관련 치료제를 복용하는 자
- 2) 최근 1개월 내에 bismuth 제제나 항생제를 복용하였거나 2주 이내에 H2 길항제나 proton pump억제제를 복용한 사람.
- 3) 위장관절제술을 받은 사람, 상부위장관 출혈이 있는 사람
- 4) 병력 조사 등을 통해 알코올 사용·유발 장애, 심장질환, 중추신경장애 등으로 입원 및 약물치료, 재활치료 중인 사람
- 5) Creatinine 정상 상한치의 2배 이상인 사람

- 6) 조절되지 않는 고혈압 환자(170/100mmHg 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준)
- 7) 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 시 혈당 180mg/dl 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준)
- 8) 임신 중이거나 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 사람
- 9) 본 인체적용시험 기간 중에 다른 인체적용시험에 참가할 계획이 있는 사람
- 10) 본 인체적용시험 시작 1개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했던 사람
- 11) 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 사람

6.2. 목표한 피험자의 수 및 산정근거

6.2.1. 피험자수

	시험군(SD1001F)	대조군(Placebo)	총 피험자수
최종 평가 레수(PP)	34	34	68
Drop-out(15%) 고려예수	40	40	80

피험자 선정, 제외기준에 적합한 80명 이상(군당 40명)을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 최종 유효성 평가 레수로 68명 이상(군당 34명 이상)을 분석하기로 계획한다.

6.2.2. 설정근거

본 인체적용시험의 목적은 투여기간 10주 후 H.pylori 연관한 위 손상 개선효과가 시험군(SD1003F)이 대조군(placebo)과 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 한다.

- 투여 전(Randomization visit, week 0), 투여 후(Closing visit, week 10) 시험군과 대조군의 H. pylori 균 평균값의 변화량 비교

본 연구의 유효한 피험자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정한다.

- 1) 우위성시험(Superiority test)
- 2) 유의수준(Level of significance), 5%, 양측검정
- 3) 제 2종 오류(β)는 0.2로 하여 검정력(power of the test)은 80%를 유지
- 4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율은 같다.

이를 검정하기 위한 인체적용시험의 가설은 다음과 같다.

$H_0 : \mu_t = \mu_c$ (시험종료 시 시험군과 대조군의 위 ^{13}C -요소호기 수치의 평균은 같다).

$H_1 : \mu_t < \mu_c$ (시험종료 시 시험군의 위 ^{13}C -요소호기 수치의 평균이 대조군 보다 작다).

위의 가설을 가정하였을 때 인체적용시험에 필요한 시험예수는 다음과 같이 계산 할 수 있다.

- ① 차이검정 (Inequality test) - 1차 기능성 평가변수가 연속형 변수인 경우
 μ_t 를 시험군에서의 1차 기능성 평가변수의 평균값, μ_c 를 대조군에서의 1차 기능성

평가변수의 평균값이라 할 때 차이검정은 시험군과 대조군에서 건강기능식품의 효과가 차이가 있는지를 보기 위한 검정으로 이 때의 대조군의 피험자수인 n_c 와 시험군의 피험자수인 n_t 의 산출 공식은 다음과 같다.

$$n_c = kn_t \cdot n_t = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 (1 + 1/k)}{(\mu_c - \mu_t)^2}$$

여기서 k 는 시험군/대조군의 할당비로 대부분 1을 설정하게 된다. σ 는 유의수준으로 제 1종 오류를 σ 이하로 유지시키는 피험자수를 산출하게 된다. 대부분의 경우 $\sigma=0.05$ 로 설정을 한다. β 는 검정력을 나타내는 것으로 제 2종 오류를 $1-\beta$ 이하로 유지하게 된다. 제 2종 오류는 제 1종 오류에 비하여 심각한 오류가 아니므로 대부분의 경우 $\beta=0.8$ 로 설정한다.

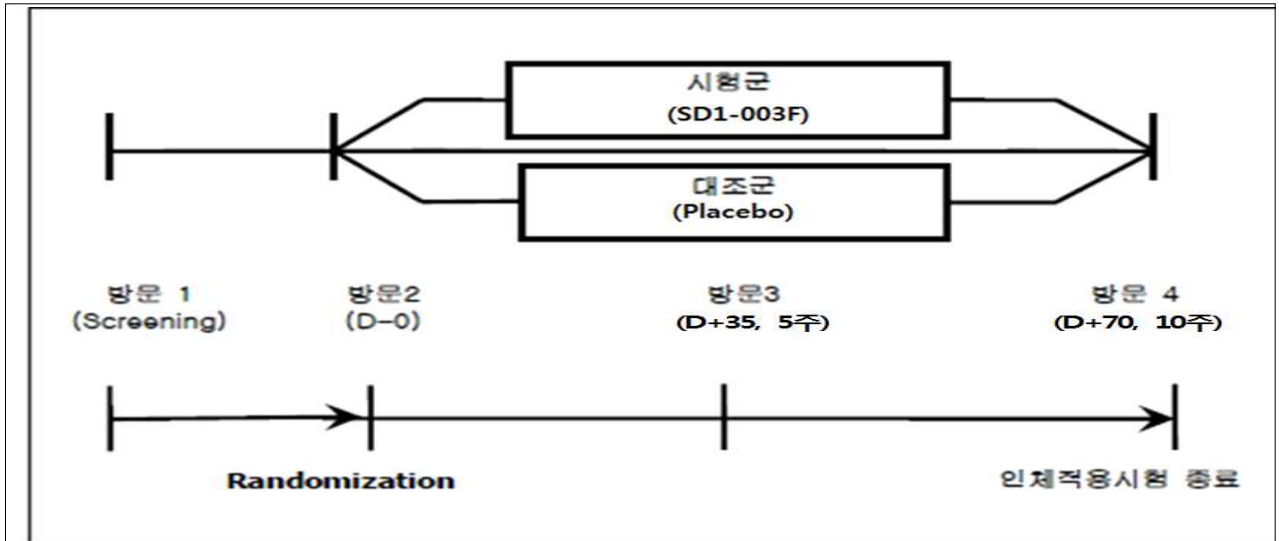
이 공식을 이용할 때의 가정은 두 군, 시험군과 대조군에서 1차 기능성 평가변수의 분산이 같다는 것이다. 이를 σ^2 으로 나타내며 이 값을 알고 있어야 피험자수를 산출할 수 있게 된다. 또한 시험군에서의 1차 기능성 평가변수의 평균값인 u_t 와 대조군에서의 1차 기능성 평가변수의 평균값인 u_c 값도 알고 있어야 한다. u_t 과 u_c 는 대부분의 경우 선행연구논문의 결과로부터 얻어진다. 그러나 σ^2 값은 알 수 없으며 선행연구결과 발표논문으로부터 얻은 σ^2 으로 대체하게 된다. 이 경우 정확한 분포는 정규분포가 아닌 t 분포이므로 구해진 피험자수가 큰 경우(30 이상)에는 위의 공식을 이용하는 것이 무리가 없으나 피험자수가 작은 경우에는 오차가 발생한다. 이 경우는 다음의 공식을 만족하는 대조군의 피험자수인 n_c 와 시험군의 피험자수인 n_t 를 구하면 된다. (출처: 식약처, Biofood. 건강기능식품 인체적용시험 설계안내서)

따라서 본 인체적용시험의 유효성 평가 변수인 ^{13}C -요소호기 검사에 관련하여 피험자수 중 30명 이상인 34명을 군당 피험자수로 정하고 탈락률(15%)을 고려하면 군당 등록할 피험자 수는 40명이며, 총 인원은 80명으로 한다.

7. 인체적용시험방법

7.1. 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 평행 인체적용시험으로 디자인되었다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적 조사, 병력조사, 약물 투여력 조사, 이학적 검사, 신체계측, 활력징후, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성), ^{13}C -요소호기 검사를 실시하여 선정, 대상기준에 적합하면 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정한다. 배정된 피험자는 총 10주간 시험식품(SD1003F) 또는 대조식품(placebo)을 섭취하게 된다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 한다.



7.2. 섭취량, 섭취방법 및 섭취 기간

7.2.1. 1일 섭취량 및 섭취방법

- 시험군 : SD1003F 1일 2회, 1회 1정, 식후 섭취
- 대조군 : Placebo 시험군과 동일

7.2.2. 섭취기간

시험군(SD1001F) 또는 대조군(Placebo)을 10주간 섭취

7.2.3. 섭취량 설정사유

1) 섭취량 : 1일 2회, 1회 1정(시험원료로서 300mg)

2) 설정근거 :

전 임상 연구를 통한 인체적용시험 대상자에게 투여할 최적의 dosage 설정
H.pylori 관련 위 점막 보호 및 산화적 스트레스로부터 세포보호 유도 시험물질 농도 : 45 mg/kg 사람에서 효력유효용량 (HED) : 300 mg 최초 안전 투여 용량 (MRSD) : Safety Factor 1/50 로 고려하여도 4g SD1002F는 인진쑥, 녹차의 물, 주정추출물로서 기존에 분말, 음료수, 젤, 차로서 건강을 생각하는 사람들이 애용되어 온 식품원료로 기능성 평가변수를 확인하고자 하는 용량 범위에서 아주 안전함.

7.2.4. 병용약물 투약 기준

7.2.4.1. 병용가능약물

다음의 경우 인체적용시험기간 동안 병용투여가 가능하다.

- (1) 피험자가 인체적용시험에 참가하기 3개월 이전부터 복용하고 있던 약물 중 본 연구의 결과해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 병용약물(제품)은 시험책임자의 판단 하에 허용한다.
- (2) 기타 질환 또는 이상반응의 치료를 목적으로 일과성으로 사용되는 약제는 담당의사와

상의를 통하여 병용 투여하기로 한다.

- (3) 시험책임자의 판단 없이 임의로 투약한 약물이 시험의 유효성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상 되는 경우 이 피험자는 탈락하게 된다. 투여한 모든 제품 및 투여사유는 반드시 증례기록서에 기재하고 시험책임자가 서명한다.

7.2.4.2. 병용금지약물

다음 약물의 사용은 안전성, 내약성 및/또는 유효성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서 다음에 열거하는 약물은 인체적용시험기간 동안 병용투여 금지한다. (단, wash out 기간이 2주 이상 경과한 피험자의 경우 연구 참여 가능)

- 1) bismuth 제제, 항생제, H2 길항제, proton pump억제제 등 위장질환 개선에 영향을 줄수 있는 약물
- 2) 감초추출물 등 Helicobacter pylori균에 의한 위장질환에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품
- 3) 인진쑥, 녹차 함유 식품

인체적용시험 동안 피험자가 이들 약물 중 어느 것이라도 투여한 경우에는, 시험 중단 여부는 연구자의 판단 하에 평가된다.

인체적용시험용 식품 섭취를 시작한 후에 새로운 약물을 투여한 경우 연구자에게 보고하도록 피험자를 교육한다. 피험자의 인체적용시험용 식품 투여 개시 이후의 모든 약물투여 및 유의한 비약물치료(물리치료 및 수술 포함)를 증례기록서 ‘약물 투여력 및 병용요법 변화 (Concomitant drug and therapy)’에 기재한다.

7.3. 무작위배정

본 인체적용시험은 시험군 또는 대조군을 무작위배정하여 평행시험으로 진행하며, 필요한 피험자 수는 탈락율(15%)를 고려하여 각 군당 40명씩 총 80명이다.

자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 피험자가 본 인체적용시험에 등록되면 방문 평가를 통해 선정기준/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 등록된 순서대로 Computer generated randomization schedule을 이용하여 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정한다.

방문2(Randomization visit, week 0)에서 선정, 제외기준에 적합한 모든 피험자에 대하여 투여군 간의 균형 있는 무작위배정을 위하여 한 블록당 크기는 4 또는 6으로 적용하며, 각 군의 피험자 수의 비는 1:1로 동일하게 하였다.

블록의 크기를 4로 하는 경우 매정 가능한 경우의 수는 6가지가 되며, 예는 다음과 같다.

AABB, ABAB, ABBA, BBAA, BABA, BAAB

A) 시험군 : SD1003F(인진쑥, 녹차 추출물의 복합물)

B) 대조군 : Placebo

인체적용시험기관에서는 동의서에 서명하고, 스크리닝 검사를 시행하는 피험자에게 다음의 스크리닝 번호를 부여한다.

CH-S ZZZ {CH : 차의과대학하교 분당병원, S : Screening의 첫글자, ZZZ : 일련번호(001, 002~)}

이후 방문2에서 해당 피험자가 본 인체적용시험의 대상자로 적합한 경우에 다음의 피험자 번호를 순서대로 부여하고, 이때 일련번호와 같은 번호의 인체적용시험용 식품을 투여한다.

CH-R ZZZ {CH :차의과대학교 분당병원, R : Randomization의 첫글자, ZZZ : 일련번호 (001, 002~)}

7.4. 피험자 모집 방법

본 인체적용시험은 소화불량, 위팽만감, 상복부동통과 상부위장관 증상이 있으며, ¹³C-요소 호기 검사에서 스크리닝 당시 양성에 해당하는 사람으로 원내에 방문한 사람 중 연구계획서와 연구자의 임상적 판단에 따라 피험자를 모집할 계획이다. 또한 병원 내, 외 포스터 부착, 무가지 광고를 통해 총 80명의 피험자를 모집하도록 계획한다.

피험자 모집 공고안은 연구 수행기관의 IRB 심의에서 승인 받은 문구만을 사용한다.

부록 5. 피험자 모집 공고안 참조

8. 관찰 항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법

8.1. 인체적용시험 진행일정표

Period		Screening ¹⁾		Active Treatment	
Visit		1	2	3 ²⁾	4 ²⁾
Week ²⁾		-1	0	5	10
Window period				±7	±5
서면동의서		✓			
인구학적 조사		✓			
동반질환/기타 병력 및 수술력 조사		✓			
이학적 검사		✓	✓	✓	✓
신체계측(신장, 체중) ⁸⁾			✓	✓	✓
활력징후(혈압, 맥박)		✓	✓	✓	✓
식사지도 및 식이조사 ³⁾			✓	✓	✓
임상병리검사 ⁴⁾			✓	✓	✓
임신반응검사(가임기 여성만 해당) ⁴⁾			✓		
심전도 검사 ⁵⁾			✓		✓
1차 유효성평가 ⁶⁾	¹³ C-요소호기 검사	✓		✓	✓
	FD-QOL questions		✓	✓	✓
2차 유효성평가 ⁶⁾	혈청검사		✓		✓
피험자 적합성 평가		✓	✓		
무작위배정			✓		
시험식품 및 대조식품 처방			✓	✓	
채혈 및 소변 채취			✓		✓
이상반응 확인				✓	✓
순응도 확인				✓	✓
약물투여력 및 병용요법 확인		✓	✓	✓	✓

1) 스크리닝 방문 후 1주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 스크리닝 방문 시 임상병리 검사 및 TC, LDL 검사 결과를 당일 확인할 수 있는 경우, 방문2(0주) 검사를 실시할 수

있다.

- 2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전 · 후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전 · 후 5일을 허용한다.
- 3) 시험기간 중 시험식품의 원재료와 관련식품 및 건강기능식품을 가급적 섭취하지 않도록 하고, 시험기간 동안 피험자가 작성할 식이조사지 작성방법에 대해 설명한다.
- 4) 피험자는 채혈하기 전 12시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당) 등을 실시할 수 있다. 임상병리 검사는 7일 이내에 시행된 검사결과로 대체가 가능하다.
 - 혈액학적 검사(10종) : RBC, WBC, Hb, Hct, Platelet, Seg, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
 - 혈액화학적 검사(12종) : AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP, Total protein, Glucose, BUN, Creatinine, Uric acid, Ca, Na, K, Cl
 - 소변검사(10종) : SG, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, Nitrite, Erythrocyte, Leukocyte
 - 임신반응검사(소변) : HCG (※ 가임기 여성만 해당)
- 5) 무작위배정일 기준으로 1개월 이내 검사결과가 있을 시 대체 가능하다.
- 6) 피험자는 채혈하기 전 12시간 금식상태로 내원하여 유효성을 검사한다.
 - ¹³C-요소호기 검사, 혈청검사 및 FD-QOL Questions를 구한다.
- 7) 혈액은 원심 분리하여 serum 3 cc, urine 7.5 cc를 채취하여 시험 종료 시까지 동결된 상태로 보관한다.
- 8) 방문 2(신장, 체중), 방문 3~4(체중)에서 각 신체계측을 시행한다.

8.2. 관찰항목

8.2.1. 피험자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 피험자에게 상세히 설명하고, 서면 동의를 받는다. 서면 동의는 피험자가 자의로 서명하여야 한다. 인구학적 정보 조사의 기록사항은

서면 동의 여부 및 동의 일자와 피험자 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 질환의 가족력, 개인의 일반사항 등을 조사한다.

8.2.2. 병력 및 약물 투여력 조사

문진과 과거 진료 기록 점검 등을 통하여 조사한다. 외과적 수술력을 포함한 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 3개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록한다. 과거력 및 현병력에 대하여 발생 시기(발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 연구자의 의견 등을 기재한다. 약물 투여력은 스크리닝 시점을 기준으로 4주 이내에 선행약물을 모두 확인한다. 단, 혈중 콜레스테롤 치료제는 3개월 이내의 복용 유무를 확인한다.

8.2.3. 이학적 검사

매 방문시 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 피험자의 임상적 상태를 근거로 이학적 검사를 시행한다.

8.2.4. 신체계측(신장, 체중)

방문 2에서 신장과 체중, 방문 3~4에서 체중을 측정하여 기록한다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다한다. 가벼운 옷차림 상태에서 공복상태를 기준으로 신장은 0.1 cm, 체중은 0.1 kg 단위까지 반올림하여 측정한다.

8.2.5. 활력징후(혈압, 맥박) 측정

방문 1 ~ 방문 4에서 혈압과 맥박을 측정하여 기록한다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 최선을 다한다.

8.2.6. 식사지도 및 식이조사

인체적용시험 대상자로 적합하다고 판정될 경우, 시험기간 동안 피험자에게 평소 섭취하던 일반적인 식사형태, 신체활동량, 식이섭취량(음주 포함)을 유지하고, 인진쑥, 녹차 관련 제품들을 정기적으로 먹거나 마시지 않도록 권고한다. 인진쑥, 녹차 관련 제품들로는 건강음료, 다류, 사탕, 젤리 등이 있으며 이에 대한 섭취여부를 방문 2에 조사한다. 피험자에게 시험기간 동안 배부된 식이조사지에 자신이 섭취한 인진쑥, 녹차 관련 제품의 빈도수를 기록하도록 교육한다.

방문2에서는 피험자의 평상시 식이조사를 위해 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 연구당사자가 기록한다.

인체적용시험기간 동안의 피험자의 식이를 조사하기 위해 방문 2~3에 피험자에게 식이조사지를 배부한다. 피험자는 식이조사지에 다음 방문일 전 최근 일주일 중 3일 동안(가능하면 주말 1일 포함) 평소의 식사와 유사한 날의 식사를 기록한다. 방문 3~4에 인체적용시험 담당자는 작성된 피험자의 식이조사지를 확인한다.

인체적용시험기간 동안 작성된 식이조사지는 한국영양학회의 Can pro 3.0 program을 이용하여 식품 및 영양소 섭취량을 분석한다.

8.2.7. 임상병리검사

임상병리검사를 실시하여 피험자의 전신적인 건강상태를 평가한다. 시험자는 피험자로 하여금 12시간 공복상태로 내원하도록 지시한다. 검사 항목에는 다음이 포함된다. 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당) 등을 실시할 수 있다. 임상병리 검사는 7일 이내에 시행된 검사결과로 대체가 가능하다.

- 혈액학적 검사(10종) : RBC, WBC, Hb, Hct, Platelet, Seg, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil
- 혈액화학적 검사(12종) : AST(GOT), ALT(GPT), r-GTP, Total protein, Glucose, BUN, Creatinine, Uric acid, Ca, Na, K, Cl
- 소변검사(10종) : SG, pH, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, Nitrite, Erythrocyte, Leukocyte
- 임신반응검사(소변) : HCG (※ 가임기 여성만 해당)

주목할 만한 임상병리학적 비정상치 기준을 벗어나는 임상병리 검사는 피험자의 증례기록서(CRF) 연구자 의견(comments)란에 평가를 기재하고, 시험자가 적절하다고 판단하는 경우 추가 평가를 실시하여야 한다. 임상병리학적 비정상치로 인하여 임상적 징후/증상이 야기되거나 치료 중재술이 필요한 경우 피험자의 증례기록서(CRF)의 '이상반응'페이지에 진단 또는 의학적 상태를 기록하여야 한다. 임상병리학적 비정상치가 예기치 않은 입원의 주요 원인이거나 이상반응의 중대성 범주에 해당되는 경우 중대한 이상반응의 신속보고 절차를 따라야 한다. 또한 피험자가 임상병리학적 비정상치로 인하여 중도탈락 되는 경우 비정상치가 해소되거나 영구적인 것으로 판단될 때까지 피험자를 추적관찰 하여야 한다.

8.2.8. 심전도 검사

방문 2,4에서 심전도 검사를 실시하여 모든 심전도 검사결과는 연구자에 의해 판독 및 해석하며 증례기록서(CRF)에 기록해야 한다. 피험자를 등록하기 전에 임상적으로 유의한 결과

를 (주)에스앤디 모니터요원과 상의해야 한다. 단, 무작위배정 기준으로 1개월 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능하다.

8.2.9. ¹³C-요소호기 검사

이 방법은 내시경을 이용하지 않으므로 피험자의 불편을 많이 감소하고 비용 효과 면에서도 이점이 있어 점차 그 사용빈도가 늘고 있고 중요성이 강조되는 시험으로 H.pylori 감염을 증명하는 직접검사이다. H.pylori는 많은 양의 요소분해효소를 생성할 수 있으며, 이는 요소를 암모니아와 Co₂로 분해할 수 있다. 이러한 원리를 토대로 해서 구강을 통해 섭취된 탄소동위원소가 포함된 요소가 위장 안에 존재하는 H.pylori 요소분해효소에 의해 분해되어 생긴 CO₂가 혈액 내로 흡수되고 이것이 다시 폐를 통해 배출되는 양을 spectrophotometer, spectrometer 또는 레이저를 이용한 ratio분석기에 의해 측정되는 것이다, 탄소 동위원소는 ¹³C 또는 ¹⁴C가 사용되는데 전자는 비방사성 동위원소이고 후자는 방사성 동위원소이다, ¹³C-요소는 비방사성 동위원소이기 때문에 여러 차례 반복해서 검사를 실시할 수 있고, 어린이와 임산부에서도 안전하게 사용할 수 있으며 매우 안정한 동위원소이어서 호기검사를 채취한 후 사흘 이내에 검사하게 되면 정확한 결과의 판독이 가능하다. 그러나 재료 및 측정계가 매우 고가라는 단점이 있다. 요소호기검사는 20년 전에 처음 소개되어, ¹³C-요소의 용량과 제형, 검체 채취시간과 횟수, 시험식 투여, 양성 기준값(ut-off value)등에 많은 변화가 있었다, 이러한 시도는 검사시간을 단축하고 정확도를 높이며 고가인 ¹³C-요소의 양을 줄여 검사비용을 낮추기 위한 것이었다. 현재 국내에는 75mg, 100mg의 분말형, 근래에 100mg 정제형 ¹³C-요소제제를 사용하고 있다 정제형 또는 캡슐형은 이전의 검사에 비해 빠른 시간에 호기를 채취할 수 있고 구강 또는 인두 내에 있는 요소분해효소 분비 세균에 의한 위양성을 줄일 수 있다는 장점이 있으며, 높은 진단 정확도를 보였다.

8.2.10. 혈청검사 (효소면역측정검사)

혈청 검사는 비침습적이고 가격이 비교적 저렴하며 빠르고 쉽게 검사할 수 있다는 장점이 있다. 혈청검사로는 응집반응, 보체결합, 간접면역형광, Elisa법 등이 있으며, 그 중에서도 ELISA를 이용한 방법이 가장 많이 사용된다. 최근에는 혈청을 분리하거나 복잡한 기구가 필요 없으며, 몇분안에 결과를 알 수 있는 전혈을 이용한 여러 가지 진단용 kit들이 개발되었다. 그러나 혈청검사는 몇가지 제한점을 가지고 있다, 먼저 지역에 따라 민감도 및 특이도가 다양하게 나오는 단점이 있어 H.pylori 감염의 표준적인 진단법으로서의 유용성에 대해서 논란이 있다. 국내의 연구들에서는 검사방법이나 연구자에 따라 민감도가 72~100%, 특이도가 18.8~92.4%로 보고되어, 외국의 보고에 비해 특이도가 낮고 범위가 넓다는 문제점이 있다, 그 외 가장 중요한 제한점은 현재의 활동성 감염과 과거의 감염을 구분할 수 없기에 과거에 치료받아 균이 없어진 경우에도 수 개월 또는 수 년 동안 위양성으로 나타날 수 있다. 따라서 우리나라에서는 H.pylori 감염의 진단 및 제균치료 후 추적 관찰 방법으로는 추천되지 않으며 주로 역학 조사 또는 감염의 선별검사로 이용되고 있다. 그러나 서구에서는 다른 검사에서 위음성의 가능성이 생길 수 있는 경우, 최근 프로톤 펌프 억제제나 항생제를 복용한 환자, 출혈성 궤양 환자, H.pylori균주의 수가 적은 위축성 위염, MALT림프종 환자에서 혈청검사를 추가적으로 시행해 볼 것을 권고하고 있다.

8.2.14. FD-QOL Questions

부록7. 설문지 조사표 (FD-QOL QUESTION)

8.2.15. 선정기준/제외기준 확인(피험자 적합성 평가)

병력 및 기초 조사자료에 근거하여 선정기준에 적합한 피험자를 선별하여 동의서를 받은 후 스크리닝 검사를 실시한다. 스크리닝 검사 평가들을 종합하여 방문 1, 2(인체적용시험용 식품 섭취 전)에 6.1.1항 및 6.1.2항의 선정기준/제외기준에 적합한 피험자선정이 이루어졌는지 최종 평가한다.

8.2.16. 이상반응 점검

이상반응에 대한 정보는 방문 3~4에 피험자에게 우회적으로 질문(Non-directive questioning)하여 탐색해야 한다. 또한 방문 시 또는 방문 기간 사이에 피험자가 자발적으로 보고하거나 이학적 검사, 임상병리검사 또는 기타 평가를 통하여 확인될 수 있다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용 식품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계, 인체적용시험용 식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료법 및 내용 등이 포함된다.

이상반응으로 분류되는 대표적인 증상조사에 대하여 아래에 기술하였다.

(1) 발열에 대한 점검

발열은 체온을 기록하고 발현 정도를 이상반응 평가기준에 따라 기록하며, 약제투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 평가한다.

(2) 자·타각적 증상에 대한 점검

자·타각적 증상은 담당의사의 진료를 통하여 이상반응 발현 여부를 조사하고, 평가 기준에 따라 발현 정도를 기록하며, 약제 투여 및 인체적용시험용 식품과의 인과관계도 평가한다.

(3) 임상병리검사에 대한 점검

임상병리검사에서 어떤 비정상적인 변화는 증상호전 때까지 추적 검사를 실시하도록 하며, 발현 증상에 대한 예상 원인을 기록한다. 또한 임상병리검사 시 검사내용에 지장을 줄 수 있는 요인(심각한 피로 등)이 있었는지 면담을 통하여 기록한다.

8.2.17. 무작위배정 및 섭취

방문2에서 선정기준 및 제외기준에 적합하다고 평가가 이루어진 피험자를 대상으로 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정하고, 무작위배정번호에 따라 인체적용시험용 식품을 배부한다.

섭취방법은 인체적용시험용 식품을 받은 날부터 섭취하도록 하며, 다음 방문일 전날까지 섭취하도록 지도한다.

8.2.18. 순응도 확인

시험식품 및 대조식품의 섭취상황에 대하여 방문2, 3에 시험식품/대조식품 처방 후 관리약사 또는 인체적용시험 담당자가 기록하고, 방문3, 4에 피험자가 지참하고 온 시험식품/대조식품의 잔량을 확인하여 관리약사 또는 인체적용시험 담당자가 점검한다. '시험/대조식품 처방 당일~이번 방문일 하루 전날' 섭취함을 원칙으로 하며, 남은 식품은 연구자에게 반납하도록 한다. 순응도 확인 시 섭취율(%)은 반올림하여 소수점 1자리까지 표기한다.

- 섭취 순응도(%) = 실제 섭취한 식품 수 / 섭취해야 하는 식품 수 × 100

8.2.19. 채혈 및 소변채취

방문2, 방문4에서는 향후의 대사적 생체지표의 측정을 위해 별도의 혈액 및 소변을 채취한다. 혈액은 혈장을 분리하여 혈청 3 cc, 소변 7.5 cc를 -20~-70°C에서 동결 보관한다. 시험 종료 후 일괄적으로 분석되며 연구목적 이외에 다른 곳에 이용되지 않도록 한다.

8.3. 관찰 검사 방법 (방문별)

8.3.1. 1차 방문 (Screening visit, week -1 이내)

본 인체적용시험에 참가하도록 선택된 피험자는 인체적용시험에 대한 설명을 듣고 다음 순

서에 따라 평가를 받는다.

- ① 피험자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 피험자에게 서면 동의서를 받는다.
- ② 피험자는 순서대로 연구 스크리닝 번호를 지정 받는다.
- ③ 피험자의 인구학적 정보, 동반질환/기타 병력 및 수술력, 약물 투여력/병용요법을 조사한다.
- ④ 이학적 검사를 시행하고, 결과를 기록한다.
- ⑤ 활력징후(혈압, 맥박)을 측정한다.
- ⑥ 선정기준 확인을 위한 ^{13}C -요소호기 검사를 측정한다.
- ⑦ 선정/제외 기준에 대해 적합성을 판단한다.
- ⑧ 피험자에게 다음 방문 일을 지정하여 공복상태로 방문하도록 교육한다.

8.3.2. 2차 방문 (Randomization visit, week 0)

이 방문은 최초 방문일 이후 7일 이내에 이루어지고, 다음 순서에 따라 평가를 받는다.

- ① 지난 방문과 비교하여 약물 투여력 및 병용요법의 변화여부를 확인한다.
- ② 이학적 검사를 시행하고, 결과를 기록한다.
- ③ 신체계측(신장, 체중)을 시행한다.
- ④ 활력징후(혈압, 맥박)을 측정한다.
- ⑤ 심전도검사를 실시한다.
- ⑥ 임상병리검사를 실시한다.
- ⑦ 유효성 평가를 위한 혈청검사 - 효소면역측정법(Enzyme immunoassay, EIA) 및 FD-QOL questions를 구한다.
- ⑧ 이제까지의 모든 검사 및 평가결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 적합한지 최종 평가한다.
- ⑨ 무작위배정번호를 부여한다.
- ⑩ 채혈 및 소변 채취하여 혈청 3 cc, 소변 7.5 cc를 동결한다.
- ⑪ 24시간 회상법으로 전날의 식이조사를 실시한다.
- ⑫ 다음 방문 시 제출할 식이조사지를 배부하고 작성방법을 교육한다.
- ⑬ 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취 방법에 대하여 교육한다.
- ⑭ 다음 방문 일을 지정하여 공복상태로 방문하도록 교육한다.

8.3.3. 3차 방문(Interim visit, week 5)

이 방문은 최초 2차 방문일 이후 35일(± 7 일) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- ① 이상반응 유무를 확인한다.
- ② 지난 방문과 비교하여 약물 투여력 및 병용요법의 변화여부를 확인한다.
- ③ 이학적 검사를 시행하고, 결과를 기록한다.
- ④ 신체계측(체중)을 시행한다.
- ⑤ 활력징후(혈압, 맥박)을 측정한다.
- ⑥ 식사지도 및 식이조사를 시행한다.
- ⑦ 임상병리검사를 시행한다.
- ⑧ 유효성 평가를 위한 ^{13}C -요소호기 검사, FD-QOL questions를 구한다.
- ⑨ 섭취 및 순응도 확인 : 피험자가 무작위로 배정된 제품을 진술한 “7.2 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간” 따라 섭취토록 하고 순응도를 기록한다.
- ⑩ 시험식품/대조식품을 처방하고, 섭취방법을 다시 한 번 설명한다.

⑩ 피험자에게 다음 방문 일을 지정하여 공복상태로 방문하도록 교육한다.

8.3.4. 4차 방문 (Closing visit, week 10)

이 방문은 2차 방문일 이후 70일(±5일) 이후에 이루어지고, 이 방문에서 이루어져야 하는 평가는 다음과 같다.

- ① 이상반응 유무를 확인한다.
- ② 지난 방문과 비교하여 약물 투여력 및 병용요법의 변화여부를 확인한다.
- ③ 이학적 검사를 시행하고, 결과를 기록한다.
- ④ 신체계측(체중)을 시행한다.
- ⑤ 활력징후(혈압, 맥박)을 측정한다.
- ⑥ 임상병리검사를 시행한다.
- ⑦ 채혈 및 소변 채취하여 혈청 3 cc, 소변 7.5 cc를 동결한다.
- ⑧ 심전도 검사를 시행한다.
- ⑨ 식사지도 및 식이조사를 실시한다.
- ⑩ 유효성 평가를 위한 ^{13}C -요소호기 검사, 혈청검사 - 효소면역측정법(Enzyme immunoassay, EIA) 및 FD-QOL questions를 구한다.
- ⑪ 섭취 및 순응도를 확인한다.

8.3.5. 추가방문 (필요 시)

추가 방문은 예정된 방문 외에 피험자 요청 또는 연구자의 판단에 의해 필요하다고 판단될 때 수시로 이루어질 수 있다.

9. 인체적용시험용 식품의 사용상 주의사항

본 인체적용시험에 사용되는 SD1003F 원재료는 인진쑥, 녹차 추출물의 복합물로서 식용 가능한 원료이다.

- 1) 섭취시 주의 : 알레르기 체질은 성분을 확인 후 섭취
- 2) 보관 및 취급상의 주의 : 건냉소 보관

10. 시험중지 및 탈락기준, 분석 제외 기준

10.1. 시험중지 및 탈락기준

인체적용시험에 참여하는 모든 피험자의 시험 완료 여부를 기록하고, 인체적용시험용 식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에는 그 이유를 기록한다. 인체적용시험이 진행 중인 피험자에 대하여 시험을 중단할 수 있는 경우는 다음과 같다.

- ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우
- ② 피험자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 피험자가 시험 중단을 요구하는 경우
- ③ 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 피험자
- ④ 인체적용시험 기간 중 만족스럽지 못한 효과로 인하여 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구하는 경우
- ⑤ 피험자가 인체적용시험 참가 동의를 철회한 경우
- ⑥ 피험자의 추적이 안 되는 경우
- ⑦ 피험자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우
- ⑧ 피험자가 방문기간 동안의 인체시험용 식품섭취가 30% 미만인 경우
- ⑨ 인체적용시험 기간 동안 담당의사의 지시 없이 연구 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- ⑩ 시험자의 판단에 의해 연구의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

- ⑪ 피험자가 임신한 경우
 - ⑫ 간독성 발생 : AST, ALT가 연구기관 정상 상한치의 3배 이상 증가하는 경우
 - ⑬ 소화불량, 위 팽만감, 상복부동통과 상부 위장관 증상으로 약물치료가 필요한 경우
- 시험자가 어떤 사유로든 피험자에게 최선이라고 결론을 내린 경우에는 언제든지 피험자를 탈락시켜야 한다. 계획서 위반이 피험자의 안전성에 유의한 위험이 되지 않으면, 계획서 위반 때문에 피험자를 탈락시키지 말아야 한다.
- 인체적용시험용 식품을 조기 중단한 피험자는 시험에서 탈락된 것으로 고려해서는 안 된다. 피험자는 언제든지 어떤 사유로든 시험을 자발적으로 중단할 수 있다. 피험자가 중단할 의사를 표현한 경우, 방문을 하지 않은 경우, 또는 어떤 사유로든 추적조사에 실패한 경우 탈락으로 간주된다.

조기 탈락이 발생하게 되면, 종료방문(방문4)에 해당하는 평가 및 처치를 시행하여야 하며, 시험자는 피험자가 시험에서 조기 탈락하게 된 일차 사유를 결정하여 이 정보를 증례기록서 ‘시험 종결’에 기재하여야 한다.

추적조사에 실패한 피험자(즉, 중단 의사를 표시하지 않고 시험 방문에 나타나지 않아서 피험자의 상태가 불분명한 피험자)에 대해서는 피험자에게 연락하기 위해 취한 조치(예 : 전화한 날짜, 등기우편 등)를 근거 문서에 기록함으로써 ‘책임을 다했음’을 보여야 한다. 무작위 배정된 후 시험에서 조기 탈락한 피험자를 대체하지는 않을 것이다.

2. 인체적용시험 IRB 심의 신청서 현황

인체적용시험을 위한 임상시험은 분당차병원에서 실시하는 것으로 하였으면, IRB심의를 거쳐 승인을 받아 현재 이체적용시험을 진행중에 있다.


연구제목	H.pylori 연관한 위 손상 개선에 대한 SD1003F(인진썩, 녹차추출물의 복합물)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주 이상, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
연구책임자	함기백 교수 (차병원 소화기내과)
연구의 목적	H.pylori 연관한 위 손상 개선에 대한 SD1003F(인진썩, 녹차추출물의 복합물)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주 이상, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
연구의 배경	현재 식약청의 개별인정형 신청허가 건수가 매년 증가하고 있으나 위기능 개선에 대한 개별 인정 건은 현재 없다. 위점막 내 H. pylori의 감염이 위질환 및 위암 발생에 관여하는 것으로 알려져 주목을 받고 있다. 따라서 인진썩과 녹차의 추출물을 혼합하여 H. pylori 부착억제 이외에 생육억제 및 urease 억제 활성이 있는 기능성 강화 원료에 대한 in viro, in vivo에서 효능평가에 대한 과학적 자료가 확보 하였으며, 이어서 인체적용시험을 통한 효능평가에 대한 과학적 자료가 확보될 경우에는 일본, 중국 등으로의 수출 등이 기대되어 H. pylori 관련 위 손상 개선에 효능을 갖는 개별인정형 원료를 개발하기위해 인체적용시험이 필요하다.
연구 기간	IRB 승인일로부터 12 개월 (종료예정일자: 2015 년 8 월 19 일)
연구 제품 (성분명, 상품명)	- 성분명 : 인진썩, 녹차추출물 - 상품명: 인진썩, 녹차 추출물의 복합물
환자군	건강성인 중에서 ¹³ C-요소호기 검사에서 스크리닝 당시 양성이면서 기능성 소화불량인자
대조군 (또는 정상군)	건강성인 중에서 ¹³ C-요소호기 검사에서 스크리닝 당시 양성이면서 기능성 소화불량인자
대상질환 명	- 최종평가 레수(pp, n=68): 시험군(n=34), 대조군(n=34) - Drop-out(15%) 고려 레수(n=80): 시험군(n=40), 대조군(n=40)
대상자 선정기준	- 만 19세 이상 만 65세 이하의 남·여 - 위장 검사에서 H. pylori 보균자이며 ¹³ C-요소호기 검사에서 스크리닝 당시 양성이면서 기능성 소화불량에 해당하는 자 - 시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면동의서(Information)에 작성하여야 한다.
대상자 제외기준	- 위궤양 또는 위염환자, 소화기 관련 치료제를 복용하는 자 - 최근 1개월 내에 bismuth 제제나 항생제를 복용하였거나 2주 이내에 H2 길항제나 proton pump억제제를 복용한 사람.

	<ul style="list-style-type: none"> - 위장관절제술을 받은 사람, 상부 위장관 출혈이 있는 사람 - 병력 조사 등을 통해 알코올 사용·유발 장애, 심장질환, 중추신경장애 등으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 사람 - Creatinine 정상 상한치의 2배 이상인 사람 - 조절되지 않는 고혈압 환자(170/100mmHg 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준) - 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 시 혈당 180mg/dl 이상, 피험자 스크리닝 당시 기준) - 임신 중이거나 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 사람 - 본 인체적용시험 기간 중에 다른 인체적용시험에 참가할 계획이 있는 사람 - 본 인체적용시험 시작 1개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했던 사람 - 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 사람
대상자 수	본원 80 명 (전체 : 80 명, 국내 : 80명, 해외 :) 명) 산출 근거 - (출처: 식약처, Biofood. 건강기능식품 인체적용시험 설계안내서)
선정-제외를 판단할 수 있는 검사 항목(기준)	피험자의 동의 및 인구학적 조사, 이화학적 검사, 신체계측(신장, 체중), 활력징후(혈압, 맥박) 측정, 임상병리검사, 13C-요소호기검사, 혈청검사(효소면역측정검사)
연구의 방법 (투여방법, 투여량, 투여기간, 병용요법 등) 대조군 및 선정 여부 서의 대조군에서 처치방법	본 인체적용시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 병행 인체적용시험으로 디자인되었다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적조사, 병력조사, 약물 투여력 조사, 이화적 검사, 신체계측, 활력징후, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성), ¹³ C-요소호기 검사를 실시하여 선정, 대상기준에 적합하면 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정한다. 배정된 피험자는 총 10주간 시험식품(SD1003F) 또는 대조식품(placebo)을 섭취하게 된다. 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 한다. - 섭취량 및 섭취방법 시험군 : SD1003F 1일 2회, 1회 2정, 식후 섭취(대조군 : Placebo 시험군과 동일) - 섭취기간 시험군(SD1001F) 또는 대조군(Placebo)을 10주간 섭취 - 병용요법: 없음
자료수집 항목 및 관찰항목	피험자의 동의 및 인구학적 조사, 이화학적 검사, 신체계측(신장, 체중), 활력징후(혈압, 맥박) 측정, 식사지도 및 식이조사, 임상병리검사, 심전도 검사, 13C-요소호기검사, 혈청검사(효소면역측정검사), FD-QOL QUESTIONS, 피험자 적합성 평가, 이상반응 점검, 무작위배정 및 섭취, 순응도 확인, 채혈 및 소변 채취
중지 및 탈락 기준	<ol style="list-style-type: none"> ① 선정기준/제외기준에 위배된 경우 ② 피험자에게 중대한 이상 반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 이상반응(Adverse Events)으로 인하여 피험자가 시험 중단을 요구하는 경우 ③ 섭취 전 검사에서 발견치 못한 전신질환이 발견된 피험자 ④ 인체적용시험 기간 중 만족스럽지 못한 효과로 인하여 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구하는 경우 ⑤ 피험자가 인체적용시험 참가 동의를 철회한 경우 ⑥ 피험자의 추적이 안 되는 경우 ⑦ 피험자에게 인체적용시험용 식품을 섭취하는데 문제가 있는 경우 ⑧ 피험자가 방문기간 동안의 인체시험용 식품섭취가 30% 미만인 경우 ⑨ 인체적용시험 기간 동안 담당의사의 지시 없이 연구 결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우 ⑩ 시험자의 판단에 의해 연구의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우 ⑪ 피험자가 임신한 경우 ⑫ 간독성 발생 : AST, ALT가 연구기관 정상 상한치의 3배 이상 증가하는 경우 ⑬ 소화불량, 위 팽만감, 상복부동통과 상부 위장관 증상으로 약물치료가 필요한 경우
효과 평가 기준, 평가방법, 해석방법 (통계분석방법)	평가 방법 - 1차 유효성 평가 1) ¹³ C-요소호기 검사(UBT) 스크리닝, 방문 3(투여 5주째), 방문 4(투여 10주째)에 식품 투여에 의한 ¹³ C-요소호기 검사치의 평균을 비교한다. 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 2) FD-QOL questions 방문 2(투여 0주째), 방문 3(투여 5주째), 방문 4(투여 10주째)에 식품 투여에 의한 FD-QOL questions 검사치의 평균을 비교한다. -2차 유효성평가 1) 혈청검사 - 효소면역측정법(Enzyme immunoassay, EIA) 방문 2(투여 0주째), 방문 4(투여 10주째)에 식품 투여에 의한 혈청검사치의 평균을 비교한다. 시험군과 대조군의 개선 정도를 분석, 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 통계분석 방법 - 본 인체적용시험의 피험자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety 분석, ITT(Intent-to-treat)분석과 PP(Per protocol)분석의 세 가지 형태로 이루어진다. Safety 분석은 안전성 평가변수 분석 시 적용되는 분석법으로, 무작위 배정 후 인체적용시험용 식품을 한 번이라도 복용한 피험자집단을 대상으로 이루어진다. - ITT분석은 본 인체적용시험에 무작위 배정을 받아 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취하고 유효성 평가를 1회 이상 시행한 피험자 집단을 대상으로 이루어진다. ITT 분석에서 유효성 평가

	<p>변수가 결측(Missing)된 경우에는 LOCF(Last Observation Carried Forward)에 의하여 분석한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - PP분석은 ITT에 포함되는 피험자 중 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항(선정제외기준 위반, 병용금지 약물 섭취 등)이 없는 피험자 집단을 대상으로 이루어진다. - 유효성에 대한 자료는 ITT 분석을 주 분석법으로 하고, PP분석을 추가적으로 실시한다. - 안전성에 대한 자료는 Safety 분석을 주 분석법으로 실시한다. - 본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술통계량으로 평균(mean)과 표준편차(standard deviation)를 산출하여 제시하며, 차이(difference)에 대한 유의성은 양측검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증한다.
<p>부작용을 포함한 안전성, 및 평가방법, 보고방법</p>	<p>1. 안전성 평가 기준</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 : 시험기간 동안 보고된 모든 이상반응에 대한 평가는 피험자의 모든 이상반응을 대표화한 후 발생률을 산출한다. 각 군간 이상반응이 발생한 피험자의 비율을 계산하고 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 비교 분석한다. 2) 임상병리검사 : 섭취 전(방문1)과 섭취 후(방문 3, 4)의 임상병리검사 결과를 비교하여 어떤 변화가 있는지 관찰된 결과치를 제시한다. 혈액학적 및 혈액 화학적 검사치와 같이 연속형(continuous type)자료는 군내비교는 paired t-test를 이용하여 분석하고, 군간 비교는 t-test를 이용하여 분석한다. 뇨 검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다. 3) 신체계측(체중) : 신체계측(체중) 검사치에 대하여 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 t-test를 이용하여 분석한다. 4) 활력징후(혈압, 맥박) : 활력징후(혈압, 맥박) 검사치에 대하여 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 t-test를 이용하여 분석한다. 5) 심전도 검사 : 심전도 검사 결과는 임상적 유의성에 따라 비정상과 정상으로 분류하여 섭취 전과 후의 변화에 차이가 있는지 McNemar test를 이용하여 확인한다. <p>2. 평가 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 본 검사에서 이상반응 평가는 인체적용시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 섭취기간 중에 새로이 나타난 증상으로 인체적용시험용 식품과의 인과관계에 상관없이 의도하지 않았던 증후(임상병리검사상 비정상치 포함) 및 증상과 인체적용시험용 식품 사용과 관련된 일시적인 현상 등을 총칭한다. 2) 인체적용시험용 식품의 이상반응으로 예상되는 현상(중세 및 증상, 시작일, 지속기간 등)은 이상반응 조사서에 빠짐없이 기록되어야 하며, 기록되지 않은 것은 주관적인 증상으로 분류된다. 3) 이상반응 정도에 대한 평가는 연구자가 평가기준을 참고하여 증상의 경중에 따라 단계별로 평가하는 것을 원칙으로 한다. 4) 인체적용시험용 식품과의 인과관계는 담당의사가 평가기준에 따라 6단계로 분류하여 평가를 시행한다. <p>3. 보고방법</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 시험책임자는 연구자는 피험자에게 시험/대조식품 섭취 후 나타날 수 있는 모든 이상반응에 대하여 교육을 실시하고 섭취 후 나타나는 모든 현상에 대하여 보고하도록 교육을 시행한다. 2) 시험/대조식품 사용 후 전신적 또는 임상병리학적으로 나타나는 제반 증상에 대하여 종류, 발생시간, 정도, 처치, 치료약제, 경과, 시험/대조식품과의 인과관계 등에 대한 기록 및 보관은 임상시험관리기준에 준하도록 피험자 증례기록서에 기입한다. 3) 시험책임자는 인체적용시험결과보고 시 인체적용시험 기간 중 발생한 모든 증상에 대하여 서술하고 평가를 실시하며, 시험기간 중 "중대한 이상반응(serious adverse event)" 발생 시에는 임상시험심사위원회(IRB)에 보고하여 시험의 지속 또는 중단 여부를 결정하고, 신속 보고가 필요한 경우 의뢰자를 통해서 다음 각 항에서 정한 기간 내에 신속히 시험기관 IRB에 보고하도록 한다. 4) "중대한 이상 약물반응"이란 인체적용시험용 식품과의 인과관계를 배제할 수 없는 것으로서 다음 항목에 해당하는 것을 말한다. <ol style="list-style-type: none"> ① 피험자가 시험기간 중 사망한 경우 ② 심각한 생명의 위험을 가져온 경우 ③ 영속적이고 중요한 불구 등을 초래한 경우 ④ 입원을 요하거나 이미 입원한 피험자의 입원기일을 늘려야 하는 경우
<p>대상자의 안전보호에 대한 대책</p>	<p>피해발생 시 보상 및 치료대책</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구기간 중 연구자는 귀하의 안전을 지키려고 최선을 다해 노력할 것이고 중대한 이상반응 발생 시는 빠르고 적절한 조치를 취하여 가능한 이상반응을 최소화 하도록 노력할 것입니다. - 연구 참여 중에, 본 인체적용시험과 관련된 손상이 발생할 경우에는 인체적용시험 의뢰자(주)에스앤디에서 피해보상에 관한 규약에 의거하여 피해를 보상할 것이며, 이상반응 및 질환 악화의 경우에는 가능한 한 최선의 치료방법으로 치료할 것입니다.
<p>기타 연구를 안전하고 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항</p>	<p>인체적용시험 실시와 관련된 각종 자료 및 기록을 잘 보존하도록 보관하는 장소가 따로 준비되어 있고 보안을 유지하도록 한다. 임상시험실시기관의 장은 심사위원회 및 시험책임자로부터 인계 받은 기록 및 자료를 보관책임자를 정하여 보관하여야 한다. 문서는 결과 보고서가 작성 완료되어 제출된 후 3년 동안 보관하도록 한다.</p>
<p>연구 근거의 임상문헌(참고문헌)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 권오현, 이귀녕. 임상병리파일. 의학문화사 2003 2) 최병진. 임상 비만학. 고려의학. 2001 3) 배성환. H.pylori 감염에 대한 13C-요소호기검사의 임상적 유용성. 대한소화기학회지. 1998: 31: 615~623 4) 송상훈. 13C-요소호기검사와 H. pylori의 균량 및 조직학적 소견과의 관계.

	대한소화기학회지. 2001:37: 76~81 5) 심상균. 기능성 소화불량증에서 13C-요소호기검사의 DOB30와 위근위부운동기능과의 상관관계. 대한소화기학회지 2001:38:405~410 6) 최봉기. 소화성궤양 환자의 H.pylori 제균치료에서 Rabeprazole 삼제요법의 전향적 연구. 대한소화기학회지. 2003:42:102~107 7) 장재영. H.pylori 제균 전후의 위액 내 암모니아와 표피성장인자 농도의 변화. 대한소화기학회지. 2001:43:283~290 8) 노임환. H.pylori 성 위염에 대한 Mastic Gum의 효과. 대한소화기학회지. 2003:41:277~283
--	---

3. 임상시험 IRB 승인서


차의과학대학교 분당차병원

우)463-712 경기도 성남시 분당구 아합로 59 / ☎ 031)780-5314 / FAX 031)780-5305 / 담당 : 강다은

문서번호 : 의학연구윤리심의위원회(IRB)
2014-0084

시행일자 : 2014. 9. 15

수 신 : (주)에스앤디 대표이사
참 조 :

신	결			지			
접 수	일자			결 재 - 공 람			
	시간						
	번호						
	처리부						
	담당자						

제 목 : 2014년 9월 8패널 신속심의 승인 통지서 발송 건.

1. 귀사의 무공한 발진을 기원합니다.
 2. 귀사에서 제출한 연구과제에 대한 심의결과를 다음과 같이 알려드립니다.

- 다 음 -

1. 심의일자 (승인일자) : 2014년 9월 1일 (월)
 2. 심의종류 : 신속심의
 3. 승인된 연구과제

구분	연구번호	연구제목	책임 연구자	의뢰자
번경	BD2014-124	H .pylori 연관된 위 손상 개선에 대한 SD1003F(연진욱, 녹차추출물의 복합물)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주 이상, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험	형기백	(주)에스앤디

*첨 부 : 승인 통지서 1부 끝. 14-4 ㄹ

차의과학대학교 분당차병원장



4. 인체적용시험 진행 보고

연구제목	H .pylori 연관한 위 손상 개선에 대한 SD1003F(인진쑈, 녹차추출물의 복합물)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 10주 이상, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험
-------------	--

번호	대상자 식별코드	성별 (Sex)	나이 (Age)	진행상황 요약	SAE 발생 유무(건)	동의서 취득여부	비고
CH-S001	CH-R001	F	54	연구완료	없음	있음	
CH-S002		M	42	S/F	없음	있음	
CH-S003	CH-R002	F	46	연구완료	없음	있음	
CH-S004	CH-R003	F	56	연구완료	없음	있음	
CH-S005	CH-R004	F	44	연구완료	없음	있음	
CH-S006	CH-R005	F	60	연구완료	없음	있음	
CH-S007	CH-R006	F	54	연구완료	없음	있음	
CH-S008	CH-R007	M	53	연구완료	없음	있음	
CH-S009	CH-R008	F	45	연구완료	없음	있음	
CH-S010	CH-R009	F	40	연구완료	없음	있음	
CH-S011	CH-R010	M	64	연구완료	없음	있음	
CH-S012	CH-R011	M	40	연구완료	없음	있음	
CH-S013	CH-R012	F	44	연구완료	없음	있음	
CH-S014	CH-R013	M	75	연구완료	없음	있음	
CH-S015	CH-R014	M	55	연구완료	없음	있음	
CH-S016	CH-R015	F	45	연구완료	없음	있음	
CH-S017	CH-R016	M	59	연구완료	없음	있음	
CH-S018		F	48	S/F	없음	있음	
CH-S019	CH-R017	M	48	연구완료	없음	있음	
CH-S020	CH-R018	M	40	연구완료	없음	있음	
CH-S021	CH-R019	F	40	연구완료	없음	있음	
CH-S022	CH-R020	F	50	연구완료	없음	있음	
CH-S023	CH-R021	F	45	연구완료	없음	있음	
CH-S024	CH-R022	F	50	연구완료	없음	있음	
CH-S025	CH-R023	M	62	연구완료	없음	있음	
CH-S026	CH-R024	F	64	연구완료	없음	있음	
CH-S027	CH-R025	F	60	연구진행 중	없음	있음	
CH-S028	CH-R026	F	64	연구진행 중	없음	있음	
CH-S029	CH-R027	F	60	연구진행 중	없음	있음	
CH-S030	CH-R028	M	40	연구진행 중	없음	있음	
CH-S031	CH-R029	M	46	연구진행 중	없음	있음	

CH-S032	CH-R030	M	50	연구진행 중	없음	있음	
CH-S033	CH-R031	M	40	연구진행 중	없음	있음	
CH-S034	CH-R032	F	39	연구진행 중	없음	있음	
CH-S035	CH-R033	F	41	연구진행 중	없음	있음	
CH-S036	CH-R034	F	40	연구진행 중	없음	있음	
CH-S037	CH-R035	M	48	연구진행 중	없음	있음	
CH-S038	CH-R036	F	54	D/O(해외여행)	없음	있음	
CH-S039	CH-R037	F	50	연구진행 중	없음	있음	
CH-S040	CH-R038	F	52	연구진행 중	없음	있음	
CH-S041	CH-R039	M	62	연구진행 중	없음	있음	
CH-S042	CH-R040	M	40	연구진행 중	없음	있음	
CH-S043	CH-R041	F	40	연구진행 중	없음	있음	
CH-S044	CH-R042	F	51	D/O(AE발생)	없음	있음	

* 대상자의 개인정보가 포함되지 않도록 작성하여 주시기 바랍니다.(대상자 식별코드에 성명, 병원 등록번호 등은 기재 불가, 이니셜 또는 일련번호, 스크리닝 번호 등으로 기재)

* 본 연구에 참여한 모든 대상자에 대해 작성하여 주시기 바랍니다.(스크리닝 탈락, 중도 탈락 모두 포함)

* 대상자 동의서 사본(서명페이지)을 첨부해주시기 바랍니다.(동의서 사본에 대상자 진행 리스트의 번호 기재 및 번호 순서대로 정리하여 첨부)

위와 같이 임상시험 대상자 진행 리스트를 보고합니다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여

제 1절. 연차별 연구개발 목표달성도 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2012)	신규 소재 발굴	후보물질 제조 및 탐색	100	국내 농산물을 이용한 위 질환 개선 후보 물질 문헌조사 및 수집, 물질 제조 (각 10g 이상)	
		후보물질 선별	100	Paper Disc법, 적혈구 응집 저해 활성 평가법등을 이용한 물질의 선별	
		후보물질 배합비율 선정	100	선별 물질에 대한 배합 최적 배합비율 조사	
	원료의 표준화 및 제조 공정 개발	산지별 원료 조사	100	인진쑥(3곳), 수삼(2곳), 녹차(3곳) 국내 산지별 수집 완료	
		제조 방법 개발	100	추출 온도, 시간, 전처리법, 분말화 방법에 따른 적혈구 응집 저해 활성 및 uronic acid 함량 분석에 따라 조사	
		기기 분석을 이용한 시험법 개발 (HPLC/GC-MS)	100	HPLC-ELSD를 이용한 기기 분석법 개발 및 조건 탐색, GC-MS를 이용한 시료의 전처리법 및 분석방법 조사	
		후보 물질 구성당 TLC 분석	100	후보 물질의 Nano-TLC 법을 이용한 구성당의 패턴 분석 및 특이성 조사	
		GC-MS를 이용 활성성분 분석	100	선별 물질의 Alditol acetate 유도체 합성을 통한 GC-MS 분석법 확립 및 지표 성분 탐색	
		Uronic acid 함량 분석	100	제조 방법 및 제조 롯데별 Uronic acid 함량 분석	
		Total Carbohydrate 분석	100	제조 방법 및 제조 롯데별 Total Carbohydrate 함량 분석	
		활성 성분 HPLC-ELSD 및 GC-MS 패턴 분석	100	선별 소재의 활성성분 분석법 확립 및 패턴분석을 통한 원료의 선별 및 품질관리 기준 설정.	
		신규 후보 물질의 효력 및 전임상 평가	<i>H.pylori</i> 항균 활성 평가	100	후보 물질 선별을 위하여 paper-disc 법을 이용한 후보 물질 선별
			적혈구 응집 저해 활성 평가	100	<i>H.pylori</i> 에 의한 적혈구 (Human RBC, Red Blood Cell)의 응집 반응을 억제하는 물질 도출
	과면역 Cytokine 저해 활성 평가		100	COX-2, iNOS, IL-8 인자 억제 발현량 조사	
	<i>H.pylori</i> 유도 동물 모델에서의 in vivo 효능 평가		100	<i>H.pylori</i> 유도 동물 모델 효력 시험 진입	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013)	원료 생산 및 임상 protocol 개발	인체적용시험용 원료 생산	100	인체적용시험용 물질 본 생산 (3 lot분), Processing Validation 수행. 지표물질(3개)의 공정중 흐름도 분석 및 매뉴얼화
		제품화 산업화 계획 수립	100	마케팅 계획 및 산업화 방안 확보
		인체시험 protocol 개발	100	인체시험을 위한 CRO선정 계약 인체적용시험은 차의과대 소화기계질 환 팀과 추진 완료:김원희 교수)
		인체 적용시험 및 KFDA와 업무 토의 및 계획 확립	100	식약청과 모듬토의등을 통해 향후 개발인정형 식품소재 등재를 원활하게 추진하기 위한 작업 수행
	원료 기준 규격 및 안정성 평가	원료의 기준규격 설정	100	개발소재의 원료의 기원, 함량규격, 순도시험, 잔류농약등의 위해성분 검사 및 기준을 설정하여 표준화된 원료를 선정 원료 개개당 지표물질 1개 설정
		원료 제형 및 제제 연구	100	최적화된 인체시험용 제형 및 제제를 개발하여 위에서 바로 작용할 수 있는 속방형 제제 연구 위주의 검토
		원료의 장기보존, 가속시험	100	25℃, 상대습도 60% 조건에서의 장기 보존 안정성 진입 40℃, 상대습도 75% 조건에서의 가속 안정성 시험 진입
	신규 소재의 전임상 효능 평가 및 약리기전 규명	<i>H.pylori</i> 유도 동물 효력 시험 평가 계속 진행	100	<i>H. pylori</i> 로 유도한 동물에서 인체시험용 시험물질의 위 질환 개선, 발암억제, 위 염증등의 과면역 개선등의 효능 검증(24주, 36주 식이)
		in vitro 기전 연구 (발암억제 및 위 염증성 cytokine 제어 기전연구)	100	위 궤양 유발 동물 모델을 이용한 효능 확인 체중 및 식이 섭취량 측정 위 적출 및 병변 확인 염증 유전자 발현 유무 검정 염증 관련 단백질 발현 유무 검정 염증이나 암화 과정 관련 cytokine 분석
		in vitro 연구에서 위관련 균 이외의 효능시험	100	구강에서 위까지 타균주들에 대한 부착억제 효능성 시험
		동물 조직 병리학적 연구 (H&E staining, TUNEL assay등)	100	동물 효력 평가후 위장 조직을 이용한 병리학적 검사확인
		분자생물학적 효능평가	100	분자생물학적 기법을 이용한 염증, 과면역, 암화 cytokine

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
3차 년도 (2013)	건식원료 개별인 증 filing	시험법 검증	100	○ 확보된 지표물질에 대하여 공인 기관에 의뢰 시험법을 검토
		공인기관 성적서 확보	95	○ 제조공정중 지표물질의 공인기관 성적서 확보 ○ 제조 3lot에 대한 공인성적서 및 제품의 기준규격 설정
		유해물질에 대한 규격설정	100	○ 건강기능식품법에 따라 납, 비소, 수은, 카드뮴등 유해물질에 대한 관리기준 설정 (공인기관성적서)
		규격설정이외의 물질에 대 한 기준규격 설정	100	○ 잔류농약, 유해미생물등에 대한 규 격기준 설정함
		식약청 양식에 따른 제조 관리기준 설정	100	○ 개별인정형 인허가 기준에 따른 제조공정도안 및 수율 등 분석
		저장안정성 시험	100	○ 원료소재의 개별인정후 품목제조 고보고를 위한 저장안정성 시험 (3개월-유통기한 1년)
		In vivo 효능 논문 투고	100	○ In vivo 효능결과를 해외저널(SCI, 임팩트4.1) 논문투고('14년12월 투고)
		식약청과의 개별인정 관련 업무협의	100	○ 식약처 업무협의 모듬토의 1회, ○ 방문협의 (3회 실시)
	인체적용시험 추진	인체적용시험약 제조 포장	100	○ 인체적용시험약 제조 (96명분) ○ 이중맹검법에 따른 라벨 부착등 임상약 포장
		IB자료 확보	100	○ 인체적용시험을 위한 임상계획서 수립 및 IRB승인을 위한 임상약에 대한 정확한 자료 확보
		임상계획서 확보	100	○ 기 작성된 임상계획서에 대하여 임상의에 의한 자료 수정 보완 ○ 식약처와 방문상담을 통하여 인체 적용 대상자 변경 및 기능성 내용에 대하여 변경 추진
		IRB 신청/승인	100	○ 임상병원에서 IRB 승인
		인체적용시험	100	○ 인체적용시험에 따른 임상관리기 준등에 대한 평가 분석
	신규 원료의 전임상 및 임상 효능평가	약리기전 규명	100	○ 효능 결과를 해외 저널에 투고 ○ 개별인정용 원료에 대한 시험실시
		인체적용시험 및 인체적용 시험 결과 보고서 작성	100	○ IRB filing ○ 위기능 개선 임상 시험 임상시식약처와 협의를 통하여 위 점막 개선에 도움을 주는 식품과 관 련한 인체적용시험 계획서에 따라 임 상시험 진행중

제2절 관련분야로의 기여도

1 제품화 전략측면 부문

- 독자적인 물질분리 및 정제기법과 같은 관리에 의한 지표성분 분석, 시제품의 유효성 평가, 품질관리시스템 구축, 제품인·허가 관련 자료 준비 및 작성, H.pylori 관련 위손상 개선 건강기능성식품의 대량생산 표준 시스템을 구축함.
- 위질환 개선소재의 지표물질에 있어서의 검증된 자료로 국내 특허를 추진하며, 아울러 global 경쟁력과 기술확보를 위하여 미국, 유럽, 중국에 대한 국제특허(PCT)출원을 추진하여 기술 확보 및 경쟁력 강화
- 특허출원 기술과 관련한 과학적 자료를 medical 학술지 또는 Biotechnology 관련한 학술저명지에 논문을 게재하여 H.pylori 관련 위 손상 개선소재의 학술적 인정을 획득을 추진함.
(학술지 게재: Journal of Cancer Prevention. Vol 18. No. 2. June. 2013)
- 자체 생산설비를 국제적으로 인정을 받을 수 있도록 식품GMP 인정을 KFDA에 신청획득(제2013-대전청-0007호, 2013년11월06일)과 자체 기술이전 및 실용화를 통하여 학술적분야 이외의 생산기술관리적 측면에서의 위질환 관련 식품 또는 치료제 시장에서 국제 경쟁력 확보 및 수출 산업화를 추진하고자 하며, 해외시장에서의 심포지엄 전시회를 통하여 소재의 경제적 활성화를 추진한다.
- 국내 시장 뿐만 아니라 글로벌 건식 또는 치료제 시장 진출을 위하여 기구축된 해외 마케팅사업부를 통하여 제품 출시 후 3년내에 동북아시아에 진입하고, 미국 FDA 승인절차를 추진하여 미국 및 유럽지역으로의 판매를 위한 국제적 기업에 기술이전에 의한 기술력 인정 및 로열티에 의한 기술이전비 확보 가능 (2005년 일본 오즈카 등 기업들과 제품수출 추진-실패 사유: in vivo 시험 data와 인체적용시험 결과 부족)

2. 마케팅 전략 부문

- KFDA 인·허가를 통한 제품 상품화의 공인자료 확보 및 신뢰도 상승
- 국내시장 제품출시 후 일본, 중국 삼풍화 무역과 연계하여 동북아시아에 진출하며, 또한 자체 수출사업부 해외마케팅 지원과 연계하여 위질환에 의한 점진적으로 증가하는 위관련 제품의 글로벌 시장 진입을 시도하고자 함

3. 기술 및 지적재산권 확보 전략부문

- 위질환 기능소재의 기술적 및 지적재산권을 확보하기 위하여 위질환 관련 특허중 인진쑥다당체(등록특허 제10-0379189호), 녹차다당체(등록특허 제 10-0602841호)의 특허기술을 고려대로부터 양도체결 특허기술을 확보하였으며, 인진쑥과 녹차다당체의 복합물에 대한 소화기질환에서의 효능의 시너지효과를 중점으로 특허출원을 진행중에 있음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1							1		
	달성	1							-		
2차 년도	목표	1						2	1		
	달성	1							2		
3차 년도	목표	1	1					1	1		
	달성							1	1		
계	목표	3	3					4	3		
	달성	2						1			

제2 절 연구성과 활용계획

가. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1	-	-		(식품저널 2012년 5월, 매일경제 2012년 7월)
	달성	-	1	-	-	2	

. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	The korean perspective of H. pylori infection :lessons from Japan Policy to prevent Gastric Cancer	Sooyeon Lee	Ki Baik Hahm	Eun-Hee Kim	Journal of Cancer Prevention	18	국내	SCI
2013	The Anti-inflammatory effects of Acidic Polysaccharide from Artemisia capillaris on H. pylori Infection	Jong-Min Park	Eun-Hee Kim	Ki-Baik Hahm Sang-Oh Kwon	Journal of Cancer Prevention	18	국내	SCI
2014								

. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	식물성 다당 배합체를 이용한 위기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법	권상오외	KR	10-2013-0162377	2014	천연물 유래 당 배합체를 이용한 위염 및 암 예방 조성물과 그 제조방법	여경목외	KR	10-1434471
2014	식물성 다당 배합체를 이용한 위기능 개선용 조성물 및 이의 제조방법	권상오외	KR	10-2014-0055110					

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4		1	3		2	2	2		2

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 2 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
					2	2

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 시험관 시험자료 요약

실험물질	실험계	실험방법	결과	비고
인진쑥 추출물	FFITC-labeled AGS cell	<i>H. pylori</i> 부착 억제 활성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ASG cell에 대해 생육을 억제하지 않으면서, 농도에 따라 AGS cells에서 <i>H. pylori</i> 부착을 11-44%까지 억제 	▶Planta Med, 70, 615-619 (2004) ▶시놉시스 번호 1
인진쑥 추출물, 녹차 추출물	rat gastric mucosa RGM-1 cell	<i>H. pylori</i> 에 의해 생성된 염증 관련 인자들의 억제 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> RGM-1 cell에 대해 생육을 억제하지 않으며, 염증 반응 효소인 COX-2, iNOS 발현과 염증성 사이토카인 IL-8 발현이 현저하게 감소시켜 항염증효과를 확인 angiogenesis에 있어서 대표인자인 VEGF, HIF-1α, PDGF의 발현을 억제함으로써 <i>H. pylori</i>에 의해 유도되는 항염증을 확인 	▶Journal of Cancer Prevention, 18, 161-168 (2013) ▶시놉시스 번호 2
인진쑥 추출물	erythrocyte	hemagglutination assay와 효소표식당배합체법(ELGA)	<ul style="list-style-type: none"> 최소농도 0.63 mg/mL 처리로 <i>H. pylori</i>에 의한 적혈구 응집반응 억제활성 확인 ELGA 분석결과 <i>H. pylori</i> 부착 억제활성 높게 나타났으며, 농도 의존적으로 부착 억제활성 확인 	▶J. Microbiol. Biotechnol., 13, 853-858 (2003) ▶시놉시스 번호 3
녹차 추출물	AGS cell	hemagglutination assay	<ul style="list-style-type: none"> 병원성 박테리아인 <i>H. pylori</i>, <i>P. acnes</i>와 <i>S. aureus</i>는 각각 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL의 MIC 확인. AGS cell에서 <i>H. pylori</i> 부착 반응 억제활성 높게 나타났으며, 농도 의존적으로 억제활성이 높게 확인($p < 0.05$). 	▶J. Agric. Food Chem., 54, 8717-8723 (2006) ▶시놉시스 번호 7
녹차 열수 추출물	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i> 증식과 생육 평가 및 공포화 독소의 중화 평가	<ul style="list-style-type: none"> <i>H. pylori</i>의 증식과 생육에 미치는 영향을 확인한 결과, 균이 모두 사멸 확인 녹차 열수 추출물의 처리에 따라서 공포화 독소가 모두 소실되어 <i>H. pylori</i>에 의해 생성된 공포화 독소를 중화시킬 수 있음을 확인 	▶Korean K. Biotechnol. Bioeng., 16, 163-169 (2001) ▶시놉시스 번호 8

제 2 절 동물시험 자료 요약

시험 물질	실험동물	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
녹차 열수 추출물	• Mouse	0, 50, 100, 250, 500 mg/kg 농도별 섭취	염증 반응관련 COX-2, iNOS 발현, 신호전달 분자 p38, MAPK 발현	• 녹차 추출액은 용량 의존적으로 알코올에 의한 위점막 손상의 보호효과가 있으며 이는 세포 손상 및 염증과급에 관여하는 COX-2, iNOS과 신호전달 분자인 p38, MAPK를 효과적으로 조절함	▶ 대한 헬리코박터 연구학회지, 3, 146 - 152 (2003) ▶ 시놉시스 번호 4
녹차 50% 메탄올 추출물	• Mongolian gerbils • male (6 주령)	0, 500, 1000, 2000 ppm 농도/6 주 동안 섭취	<i>H. pylori</i> 군체 형성 확인, 위 무게 측정, 부종, 출혈 관찰 및 microscopic score 평가	• 용량 의존적으로 <i>H. pylori</i> 의 감염을 억제하였으며, 위의 부종 출혈 및 microscopic score가 감소됨을 확인($p < 0.05$) • 적출한 위의 무게도 용량 의존적 감소 및 <i>H. pylori</i> 가 감염되지 않은 대조군과 유의함을 확인($p < 0.01$)	▶ Biochemical and Biophysical Research Communications, 310, 715 - 719 (2003) ▶ 시놉시스 번호 5
녹차 열수 추출물	• C57BL/6J (Mouse) • male (6 주령)	녹차 열수 추출물 (3g/300 mL) 음수로 자유섭취/8주 동안 섭취	Gastrointestinal lesion scoring criteria 평가, <i>Helicobacter</i> 군체의 정량(DNA analysis) 평가	• 살균과 발육 억제 효과는 용량 의존적으로 <i>Helicobacter</i> 를 억제함($p < 0.05$) • 시험군인 녹차 추출물 처리 그룹에서 대조군(<i>Helicobacter</i> 만 처리)과 대비하여 유의적으로 조직학적 병변 감소, 염증 감소와 감염 억제를 확인($p < 0.05$)	▶ Int J Antimicrob Agents., 33, 473 - 478 (2009) ▶ 시놉시스 번호 6

제 7 장 연구시설·장비 현황

해 당 사 항 없 음

제 8 장 참고문헌

1. Dongfeng W, Chenghong W, Jun L, Guiwen Z, 2001, Components and activity of polysaccharides from coarse tea, J. Agric. Food Chem., 49: 507-510.
2. Guruge JL, FALK PG, LORENZ RG, DANS M, WIRTH H, BLASER MJ, BERGi DE, GORDON JI, 1998, Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3925-3930.
3. Han, S. H., J. K. Hwang, S. N. Park, K. H. Lee, K. I. Ko, K. S. Kim, K. H. Kim, 2005, Potential effect of solvent fractions of *Taraxacum mongolicum* H. on protection of gastric mucosa, Korean J. Food Sci. Technol., 37: 84-89.
4. Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori k, Okuda T, Sakata I, 1992, Suppression of genotoxicity of carcinogens by epigallocatechin gallate, Pre. Med., 21: 370-376.
5. Hamilton-Miller, J. M. T., 1995, Antimicrobial properties of tea(*Camellia sinensis* L), Antimicrob. Agents Chemother., 39: 2375-2377.
6. Ikada I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M, 1992, Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal adsorption of cholesterol in rats, biochem. Biophys. Acta., 1127: 141-146.
7. Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag HJ, Pras N, 1997, Structure cytotoxicity relationships of a series of natural and semisynthetic simple coumarins as assessed in two human tumor cell line, Z Naturforsch, 52: 3-4.
8. Kohlmeier L, Weteringe KG, Steck S, Kok FJ, 1997, Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature, Nutr. Cancer., 27: 1-13.
9. Kubo I, Muroi H, Himejima M, 1992, Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects, J. Agric. Food Chem., 40: 245-248.
10. Kim TJ, 1996, Functional components of green tea, in Science and culture of green tea, Kim T.J., Eds., p181-186, Bolim, Seoul.
11. Lee JH, Shim JS, Lee JS, Kim MK, Chung MS, Kim KH, 2006, Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria, Carbohydrate Research, 341: 1154-1163.

12. Lee J, Shim JS, Chung M, Lim S, Kim KH, 2009, Inhibition of Pathogen Adhesion to Host Cells by Polysaccharides from *Panax ginseng*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73: 209–212.
13. Lee J, Shim JS, Chung M, Lim S, Kim KH, 2009, In vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion, *Phytother Res.*, 23: 460–466.
14. Lee JH, Park EK, Kim TG, Lim Y, Kim KH, 2004, Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharide from *Artemisia capillaris*, *Planta Med.*, 70: 615–619.
15. Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ., 2007, Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation, *Int J Cancer*. 120: 2306 - 2316.
16. Marshall DG, Dundon WG, Beesley SM, Smyth CJ, 1998, *Helicobacter pylori* - a conundrum of genetic diversity, *Microbiol.* 144: 2925–2939.
17. Moran A, Montero MJ, Martin ML, San Roman L., Pharmacological screening and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens subsp. Gallica.*, 1989, *J Ethnopharmacology*, 26: 197–203.
18. Matsusaki M, Hara Y, 1987, Anti-oxidant activity of green tea catechins, *Jap. J Agr. Chem.*, 59: 129–134.
19. Okuno J, Uchida K, Kaolowaki M, Akahori A, 1981, Choloretic effect of *Artemisia capillaris* extract in rats. *JPN. J Pharmacol*, 31: 835–838.
20. Roberts EAH, Wood DJ, 1951, A study of the polyphenols in tea leaf paper chromaotography, *Biochem. J.*, 49: 414–419.
21. Roedig-Penman A, Gordon MH, 1997, Antioxidant ptoperties of catechins and green tea extracts in model food emulsion, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4267–4270.
22. Stagg G.V., 1980, Tea- the elements of a cuppa, *Nutr. Bull.*, 29: 233–245.
23. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Shimamura T, 1990, Antibacterial and anti-hemolysin activites of tea catechins and their structural relatives, *Jap. J. Bacteriol*, 45: 561–566.

24. Woo, J.S., Ha, B.H., Kim, T.G., Lim, Y., Kim, K.H., 2003, Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion by acidic polysaccharide isolated from *Artemisia capillaries*., J. Microbiol. Biotechnol. 13: 853 - 858.
25. Woo JS, HA BH, Kim TG, Lim Y, Kim KH, 2003, Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion by acidic polysaccharide isolated from *Artemisia capillaris*, J. Microbiol. Biotechnol., 13: 853-858.