

# 최 종 보 고 서

발간등록번호

11-1543000-000867-01

## 미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발 연구

(The development of global star nutraceuticals using  
the mineral Angelica Sinensis Radix medicinal crop)

(주)한국전통의학연구소

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발 연구”의  
보고서로 제출합니다.

2015 년 4 월 27 일

주관연구기관명 : (주)한국전통의학연구소

주관연구책임자 : 황성연

연 구 원 : 이재원

연 구 원 : 이승희

연 구 원 : 오진주

연 구 원 : 김진아

연 구 원 : 배혜민

연 구 원 : 이유정

연 구 원 : 김은지

연 구 원 : 최건섭

연 구 원 : 목지예

연 구 원 : 최정원

연 구 원 : 권은비

연 구 원 : 오현아

연 구 원 : 여희경

연 구 원 : 황윤경

# 요 약 문

## I. 제 목

미네랄 함유 약용작물(당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 최근 생활수준이 급속도로 향상됨에 따라 건강 보존과 인간의 수명, 삶의 질 향상에 대한 LOHAS(Lifestyle of Health and Sustainability)적인 관심이 높아지고 있기 때문에 만성 성인질환을 예방할 수 있는 건강기능식품이 고부가가치산업으로 인식되며 경제발전과 더불어 매년 고도성장을 이루고 있음.
- 우리나라는 자양강장제라는 식품들이 피로회복 등을 목적으로 알려져 있으나, 확실한 혈액 순환성 기전이 밝혀지지 않았을 뿐만 아니라, 정확한 유효성에 대한 평가도 이루어지지 않고 있음. 이에 혈액순환 개선등을 위한 건강 기능성 식품이 체계적이고 과학적으로 개발된다면, 국내 건강기능성 식품산업에 큰 발전이 되리라 사료됨
- 이에, 본 사업을 통해 혈행개선에 효과적인 건강기능성식품 개발에 초점을 맞추어, 건강에 대한 소비자의 욕구를 충족시킴과 동시에, 국내 생약을 이용한 제품을 개발함으로써 중금속으로부터 안전한 먹거리를 제공하고 또한 글로벌 경쟁력 확보를 통한 수출 증대를 기대하는 할수 있는 제품개발을 목적으로 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
인체 효과 시험 자료 수집	이론적 접근방법	논문 및 보고서 조사
건강기능식품으로의 유통 및 마케팅 전략 수립	이론적·실험적 접근방법	특허 출원 및 등록
개별인정형신청	이론적·실험적 접근방법	인체적용시험 진행

## IV. 연구개발결과

- WSY-3063 지표물질 설정 및 규격 설정 완료
- In vitro, In vivo 혈행개선 효능 시험 확인
- 인체적용 시험 프로토콜 작성 및 인체적용시험 진행 완료
- 개별인정형 신청 진행 중

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 개별인정형 원료로서 승인으로 인해 혈행개선 건강기능 식품 제품으로 출시

## SUMMARY

**I. Title :** The development of global star nutraceuticals using the mineral Angelica Sinensis Radix medicinal crop

### **II. Purpose and Necessity of research and development**

○ In recent years, there are remarkable development in living standards. In line with such an improvement, people's interest toward preservation of health, human life, and improvement of quality of life is getting more increased.

○ With increased awareness of health functional foods affecting prevention of chronic adult disease, relevant health industries have been positioned as one of value-added business with higher growth every year.

Despite many products widely used in nutrient tonics, there are still lack of evidences concerning mode of actions and assessment of efficacy in blood circulation diseases.

If the scientific development of healthy functional food improving blood circulation is achieved, the great advances in local health function food industry can be obtained.

○ Thus, this project aims to develop the health functional food improving blood circulation. This product development would meet the needs of the health of the consumer. At the same time, the development of those products using domestic herbal can provide safe food from heavy metals. In addition, this development can be expected to increase exports through a secure global competitiveness.

### **III. Research contents and scope**

Research scope	Research methods	Specific details
Collection of data obtained by human clinical trial	Theoretical Approach	Research papers and reports
Establishment of distribution and marketing strategy of products	Theoretical/Experimental Approach	Patent applications and registration
Health Functional Food Research	Theoretical/Experimental Approach	Human clinical trial

### **IV. Results**

○ Establishment of complete set of indicator and standard materials of WSY-3063

○ Determination of efficacy in improving blood circulation through the *in-vivo*, *in-vitro* tests and human clinical trial

○ Establishment of protocol for human clinical trial and fulfillment of human clinical trial

○ Application process on health functional food qualification is in progress

### **V. Research utilization plan**

○ Will obtain the approval of WSY-3063 as the raw material of qualified health functional food by the Ministry of Food and Drug Safety and sales of that material and the health functional food products containing WSY-3063 for the purpose of improving blood circulation



## CONTENTS

I . Introduction of R&D projects.....	7p
II . Current national and international technology trends.....	9p
III. Results of R&D projects.....	14p
IV. Target achievement rate of R&D projects and Contribution rate of related fields... .....	116p
V. Research utilization plan.....	125p
VI. International Scientific and Technical Information.....	129p
VII. References.....	133p

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	7p
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	9p
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과.....	14p
제 4 장	목표달성도 및 관련분야의 기여도.....	116p
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	125p
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	129p
제 7 장	참고문헌.....	133p

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 당귀를 이용한 건강기능식품 (개별인정형)의 개발

### 1. 연구 개발의 목적

- 최근 생활수준이 급속도로 향상됨에 따라 건강 보존과 인간의 수명, 삶의 질 향상에 대한 LOHAS(Lifestyle of Health and Sustainability)적인 관심이 높아지고 있기 때문에 만성 성인질환을 예방할 수 있는 건강기능식품이 고부가가치산업으로 인식되며 경제발전과 더불어 매년 고도성장을 이루고 있음.
- 생명과학의 발달에 힘입어 인간의 수명이 연장됨에 따라 필연적으로 수반되는 심혈관 질환, 암, 당뇨, 비만, 치매 등 만성 성인질환의 급증과 관련하여 인체의 생리기능을 유지하고 개선시키는 유익한 건강기능식품의 섭취로써 건강을 증진시키고 만성 성인 질환을 예방하여 LOHAS시대의 고부가가치산업의 새로운 패러다임의 변화를 나타나고 있음.
- 국내식품산업도 지속적인 성장을 하고 있지만 매출액, 영업이익, R&D 등에서 글로벌 식품 기업과의 경쟁력에서 큰 격차가 존재하고 있으며, 원재료 수입에 의존하는바 국제 곡물가격 및 환율변화 등의 외부요소에 많은 영향을 받음.
- 최근 건강 기능성 시장 동향을 살펴보면, 치료형에서 예방형으로 변화되고 있으므로 비교적 안전하고 장기간 복용 가능한 한방식품의 수요가 증대되고 있는 실정임. 항암, 면역강화 제제의 경우, 시장 점유율은 2009년 10% 내외(약 380억 달러), 2012년 10% 내외(약 540억 달러)의 세계 시장을 형성할 것으로 전망함.
- 이에, 혈액순환 개선등을 위한 건강기능식품의 안전성 및 유효성 등 과학적 근거를 확보하고, 국내 및 세계시장에 진출할 수 있도록 개발하고자 함.
- 한방 제제를 활용한 혈액순환 개선 등의 기준 규격형 건강기능성 식품을 개발하여 혈액순환 저하를 예방하거나 개선 또는 치료함으로써 건강한 생활에 기여하고자 함.

### 2. 연구 개발의 필요성

- 우리나라는 자양강장제라는 식품들이 피로회복 등을 목적으로 알려져 있으나, 확실한 혈액순환성 기전이 밝혀지지 않았을 뿐만 아니라, 정확한 유효성에 대한 평가도 이루어지지 않고 있음. 이에 혈액순환 개선등을 위한 건강 기능성 식품이 체계적이고 과학적으로 개발된다면, 국내 건강기능성 식품산업에 큰 발전이 되리라 사료됨
- 스트레스, 흡연, 음주, 비만 및 성인병 등을 원인으로 하는 혈액순환 문제로 인하여 많은 환자들이 말 못할 고통에 시달리고 있음. 이에 대한 원천적인 원인을 치료하기 위하여 부작용 걱정이 없는 건강기능성 식품 개발이 요구됨.

- 현재까지 진행되어온 연구는 경험적 방법이나 과거 문헌에 의한 임상치료가 개별적으로 이루어져 왔고, 그 치료에 대한 문헌고찰만 있을 뿐 정확한 작용기전 및 각각의 처방에 대한 기본적인 체계적인 연구는 전무한 상태이므로, 본 연구를 통해 과학화 하여 일반인들의 이해와 확신을 주는 계기가 될 것이다.
- 이에, 본 사업을 통해 혈행개선에 효과적인 건강기능성식품 개발에 초점을 맞추어, 건강에 대한 소비자의 욕구를 충족시킴과 동시에, 국내 생약을 이용한 제품을 개발함으로써 중금속으로부터 안전한 먹거리를 제공하고 또한 글로벌 경쟁력 확보를 통한 수출 증대를 기대하는 할수 있는 제품개발을 목적으로 함.

### 3. 국내외 관련분야 환경변화

: 당귀에서 함량이 증가된 미네랄의 항산화, 항염증 등 생물학적 기능적 역할

#### ○ 마그네슘

- 마그네슘의 간단한 사용으로 과산화물의 촉매적 역할의 제거 뿐만 아니라 이들의 생물학적 기전을 밝힌 연구 논문.
- Kevin Barnesea et al. Biologically relevant mechanism for catalytic superoxide removal by simple manganese compounds. PNAS. 2012;109(18):6892-6897.

#### ○ 아연

- 셀레늄과 아연은 잘 알려진 필수미량원소로서 이들의 강력한 생물학적 기능에 대해서 알려진 바가 있음. 그러나 이들의 원소가 강화된 버섯을 재배하고 이들의 처리를 한 동물실험의 결과 항산화 및 항암 활성을 평가하였음.
- Yan H, Chang H. Antioxidant and Antitumor Activities of Selenium- and Zinc-Enriched Oyster Mushroom in Mice. Biol Trace Elem Res. 2012.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 건강기능성 원료의 국내시장 규모

- 생산 : 2012년 1조 4,091 억원 → 2013년 1조 4,820억원(5.2% 증가)
- 수출 : 2012년 584 억원 → 2013년 754 억원(32.7% 증가)
- 수입 : 2012년 3,532 억원 → 2013년 3,854 억원(12.2% 증가)

### 2. 국내 건강기능식품 인정 현황 (출처 : 2014.02.28 식약처 보도자료)

- ‘13년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 기능성 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입원료의 인정은 감소한 것으로 나타남.
  - 지난해 국내 제조원료의 기능성 인정은 ‘12년(10건)에 비해 1.2배(22건) 증가하였으나 수입 원료는 같은 기간 28건에서 15건으로 감소하였음.
  - 이는 국내 건강기능식품 제조업체들이 국내 천연생물자원을 활용한 다양한 기능성 원료 개발에 집중하는 반면 수입 소재의 신규 발굴은 주춤한데 따른 것으로 분석됨.
- ※ 개별인정 현황 : ‘09년(97건)→’10년(68건)→’11년(42건)→’12년 (38건)→’13년(37건)
- ※ 국내 제조원료 인정 비율 : (‘09)25%→(‘10)27%→(‘11)29% →(‘12)26% →(‘13)59%

### 3. 혈행개선제품 시장 현황

- 혈행 개선이란
  - 혈행이란 혈액이 혈관을 통해서 신체의 각 부분으로 이동하는 것을 의미함. 혈액은 신체의 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포에서 만들어낸 노폐물을 제거해 주며, 우리 몸에 필요한 호르몬을 운반하고, 외부 유해물질로부터 세포를 방어하며, 적당한 체온을 유지시켜주고, 지혈작용을 하는 등 신체내의 항상성을 유지시켜주는 역할을 함. 따라서 원활한 혈액의 흐름은 신체기능을 유지하는데 매우 중요한 역할을 함.
- 혈행 개선에 관련된 건강기능식품 기능성 원료 현황


#### - 2013년 기능성내용별 기능성원료 인정현황

번호	기능성		기능성 원료명	건수
	분류	내용		
1	피로개선	피로 개선에 도움	홍경천 추출물	1
2	혈당조절	식후 혈당상승 억제에 도움	잔나비겉상버섯균사체	1
3	체지방감소	체지방 감소에 도움	마테얼수추출물, 돌외잎주정추출분말(2), 락토페린(우유정제단백질), 키토산(2), 미역등 복합추출물(잔티젠)	7
4	간건강	간 건강에 도움	도라지추출물, 발효울금	2



5	혈행개선	혈행 개선에 도움	나토균배양분말	1
6	관절/뼈건강	관절 건강에 도움	로즈힙분말(2), 가시오갈피등복합추출물, 전칠삼추출물등복합물	4
		뼈 건강에 도움	가시오가피숙지황복합추출물	1
7	눈 건강	눈 건강에 도움	들쭉열매추출물, 루테인지아잔틴복합추출물	2
8	피부 건강	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움	포스파티딜세린(2), 저분자콜라겐펩타이드, 핑거루트추출분말(판두라틴),	4
		피부 보습에 도움	히알루론산, 히알루론산나트륨	2
9	긴장 완화	스트레스로 인한 긴장 완화에 도움	홍경천추출물	1
10	항산화	항산화에 도움	유비퀴놀	1
11	혈압 조절	높은 혈압 감소에 도움	포도씨효소분해추출분말	1
12	인지능력	인지능력 개선에 도움	L. helveticus 발효물, 도라지추출물(DRJ-AD)	2
13	면역 기능	면역력 증진에 도움	효모베타글루칸, 합성PLAG, 동충하초주정추출물	3
14	콜레스테롤 개선	혈중 콜레스테롤 개선에 도움	녹차추출물	1
15	과민피부상 태개선	면역과민반응에 의한 피부상태 개선에 도움을 줄 수 있음	과채유래유산균(L.plantarum CJLP133), L.sakei Probio65	2
16	갱년기 남성건강	갱년기 남성의 건강에 도움을 줄 수 있음	MR-10 민들레등복합추출물	1
총 계				37

(‘13년도 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황 발표 (식품의약품안전처))

- 지난 2013년 한 해 동안 인정받은 건강기능식품의 기능성은 ‘체지방감소’가 7건으로 가장 많았으며, 그 다음으로 ‘관절/뼈건강’과 ‘피부 건강’이 각 4건, ‘면역 기능’ 3건순임.

혈행 개선에 관련된 인정형 원료	
<p>오메가-3지방산함유유지</p> 	<p>○ 오메가-3지방산함유유지는 오메가-3 계열[DHA(Docosahexaenoic acid)와 EPA(Eicosapentaenoic acid)]의 불포화지방산으로 식용 어류, 바닷물범, 조류(藻類)를 원재료로 하여 제조한 것임</p> <p>○ 일일섭취량 : DHA와 EPA의 합으로서 0.5~2.0 g/일</p>

<p>홍삼</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 홍삼은 인삼(<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)을 원재료로 사용하여, 말리지 않은 수삼을 증기 또는 기타 방법으로 찌서 익혀 말린 것으로 이를 분말화 하거나 물이나 주정으로 추출하여 제조하며, 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합이 0.8~34 mg/g임</li> <li>◦ 일일섭취량 : 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합이 2.4~80 mg/일</li> </ul>
<p>프랑스해안송껍질추출물</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 프랑스남서부 해안에 자생하는 프랑스해안송(<i>Pinus pinaster</i>) 껍질을 주정으로 추출하여 제조하며, 총 프로시아니딘 함량이 600~800 mg/g 함유되어 있음</li> <li>◦ 일일섭취량 : 프랑스해안송껍질추출물로서 100~300 mg/일</li> </ul>
<p>나토배양물</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 나토균을 일정한 배양배지조건에서 배양하고 부형제와 혼합하여 제조하며, 피브린용해효소활성이 14,000~22,000 U/g임</li> <li>◦ 일일섭취량 : HK나토배양물로서 133 mg/일</li> </ul>
<p>은행잎추출물</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 은행나무(<i>Ginkgo biloba</i> L.) 잎을 주정으로 추출하여 플라보놀 배당체(flavonol glycosides)가 240~300 mg/g임</li> <li>◦ 일일섭취량 : 은행잎추출물로서 120 mg/일</li> </ul>

<p style="text-align: center;"><b>혈행 개선에 관련된 고시형 원료</b></p>	
<p>영지버섯자실체추출물</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 영지버섯자실체추출물은 영지버섯(<i>Ganoderma lucidum</i> 또는 <i>Ganoderma tsugae</i>)의 자실체를 열수로 추출하여 제조하며, 베타글루칸이 10 mg/g이상 함유되어 있음</li> <li>◦ 일일섭취량 : 베타글루칸으로서 24~42 mg/일</li> </ul>
<p>감마리놀렌산함유유지</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 감마리놀렌산함유유지는 오메가-6 장쇄 불포화 지방산으로 달맞이꽃 종자, 보리지 종자, 까막까치밥 종자를 원재료로 하여 제조한 것으로 감마리놀렌산이 70 mg/g 이상이어야 함</li> <li>◦ 일일섭취량 : 감마리놀렌산으로서 240~300 mg/일</li> </ul>

○ 국내 혈행 개선 관련제품 현황

- 혈행 개선 치료제 시장 규모는 연간 1,500억원대에 이르고 있음. 수십 개의 관련 제품이 경

쟁하고 있으나 주요 제품은 기넥신 (SK케미칼), 타나민 (유유), 사미온 (일동제약)으로, 세계의 제품이 관련시장의 60%를 웃도는 점유율을 나타내고 있음.

- 업계에서는 혈류 개선제 시장은 광범위한 적용 범위 및 높은 안전성으로 인해 부담 없는 처방대상범위가 넓어, 향후에도 지속적으로 시장이 확대될 것으로 보고 있음.
- 현재 기능성 식품 분야에서 가장 역동성이 큰 것으로 평가되는 시장이 혈행 개선 분야로서 뇌혈관질환, 심혈관질환, 고혈압, 콜레스테롤 등에 특화된 기능성식품 시장임. 국내 심혈관계 관련 건강 기능식품은 2005년 약 535억원 팔렸음.
- 지난 2010/2012년 기능성원료별 시장규모를 살펴보면 혈행 개선 효능이 있는 것으로 알려진 오메가-3의 경우 여전히 기능성부분 상위 5개 성분에 포함되어 있음. 금액구성비로 9.9%에 해당하여, 혈행 개선 기능성원료 시장의 규모가 큰 것을 알 수 있음.
- 혈행 개선 시장은 시장규모가 전망이 좋으며 기존에 시장을 지배하던 오메가-3가 여전히 독보적이지만 서서히 내리막길을 걸으면서 시장이 요동치고 있음. 소비자에게 어필할 수 있는 컨셉 개발 시 혈행 시장 장악은 물론 상위권 기능식품 기업으로 도약도 가능함.
- 오메가-3를 제외하고는 시장을 지배하는 품목도 없고, 비타민이나 홍삼처럼 강력한 메일 브랜드가 있는 것도 아니기에 충분히 개발가치가 있음.

**기능성원료별 시장구조(2010년 vs 2012년)**

	2010 섭취율	2012 섭취율	2010 구입률	2012 구입률	금액 구성비
[base]	733명	838명	551명	583명	%
홍삼	44.7	39.1	44.6	41.9	44.6 (46.8%)
비타민 류	36.3	44.6	36.1	41.0	15.8 (13.4%)
오메가 3	23.9	32.1	22.0	27.4	10.1 (9.9%)
칼슘	12.8	12.5	13.1	13.6	4.4 (3.5%)
알로에	5.5	5.6	5.6	6.3	3.4 (4.9%)
글루코사민	10.9	9.8	9.4	10.1	3.1 (5.0%)
키토산	1.4	2.9	1.8	3.3	2.6 (0.9%)
클로렐라	4.1	2.6	4.0	2.6	2.1 (2.9%)
프로폴리스	1.1	1.0	1.1	1.7	1.8 (0.4%)
HCA <sup>1)</sup>	0.3	1.1	0.9	1.2	1.3 (0.5%)
기타					10.8 (7.6%)

상위 5개 성분  
점유율(금액 기준)  
78.3%  
2조 1,899 억원

상위 10개 성분  
점유율(금액 기준)  
89.2%  
2조 5,283 억원

\* ( ) 2010년 데이터  
<sup>1)</sup> HCA(가르시니아감보지아껍질추출물)

○ 국외 혈행 개선 관련제품 현황

- 은행잎 추출물은 독일에서는 1965년에, 프랑스에서는 1974년에 혈관장애, 혈류 개선 및 치매증의 개선을 목적으로 한 의약품으로 이용되기 시작하였고, 이탈리아, 스위스, 한국,



대만, 말레이시아 등도 독일 및 프랑스와 마찬가지로 주로 의약품으로 취급되고 있음. 그러나 미국, 영국, 캐나다 및 일본은 건강식품으로 취급되어 여러 가지 식품형태로 유통되고 있으며 매출 또한 매우 큼.

- 은행잎 엑기스의 의약품이나 식품 등의 상품규모는 세계적으로 연간 약 10억 달러에 이르며, 독일은 1989년에는 약 4억2,000만 마르크(2,500억 원)의 매출을 올렸음. 프랑스도 은행잎 엑기스제 타나칸(Tanakan)이 125%의 성장률로 약 8억 프랑(1,700억 원)의 매출을 기록하였음.
- 은행잎의 기능성분을 추출하기 위하여 유럽의약품원료용에는 처리의용이성 때문에 케톤계 용매나 에스테르계 용매 등을 사용한 추출정제법이 많이 사용되고, 일본에서는 에탄올 및 물만을 용매로 사용하여 추출하며, 신선한 은행잎 500kg 정도로부터 은행잎 엑기스 1kg 정도를 얻음.
- 은행잎 추출물은 항산화 효과, 혈소판 응집 억제 효과, 혈관 확장 효과 등 3가지 주요 작용을 통해 혈액순환을 개선함. 이러한 작용을 하는 은행잎추출물의 주성분은 Flavonoid계 화합물인 Kaempferol, Quercetin, Isorhamnetin과 Terpene계 화합물인 Bilobalide, Ginkgolide A, B, C, D, M, J 등이 알려져 있음.
- 최근 은행잎 추출물을 건강기능식품으로 판매 허가한 미국에서 여러 부작용 사례가 보고되고 있음. 눈의 충혈, 혈액응고 시간이 지연되어 뇌출혈이 발생하는 등의 부작용 사례가 보고되고 있는데 이는 은행잎 성분 중 혈소판 응집을 억제하는 ‘징코라이드B’ 때문이며 중증 뇌졸중 환자나 심장병 환자는 복용의 주의가 필요함.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 1절 연구개발의 목표 및 연구개발 수행 내용

##### 가. 연차별 연구개발 목표 및 연구개발 수행 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	미네랄 함유 약용 작물의 재배 및 작용기전 연구	약용작물 지역 재배농가와의 계약	100%	당귀 지역 재배농가와의 계약 완료
		미네랄 함유 약용작물의 최적 재배 기술 개발 및 추출물 공정 확립	100%	안동시 농업기술센터와 안동시를 통해 재배 실험 진행 중
		약용작물에서의 미네랄 함량 및 약리 성분 조사	100%	종별 당귀의 미네랄 및 약리성분 함량 조사
		미네랄 함유 약용 작물의 항산화, 항염 효과 확인	100%	미네랄이 함유된 당귀의 항산화, 항염 효과를 in vitro 실험을 통해 확인
		약용작물 당귀에서의 테쿠르신 함량 조사	100%	종별 당귀의 테쿠르신 함량 조사
2차 년도 (2012)	미네랄 함유 약용 작물의 시제품 제작 및 효능 확인	동물실험을 통한 유효량 및 독성 실험	100%	GLP 기관인 메드빌과 계약하여 단회독성, 4주 DRF, 13주 반복독성 시험 확인
		건강기능식품의 시제품 제작 및 안정성 시험	45%	시제품 제작 완료 후 한풍제약과 계약하여 3년의 안정성기간 중 1년 진행 완료
		in vivo, in vitro에서 미네랄 당귀 함유 약용작물의 남성 불임 및 혈행 개선 효과 건강기능식품(환) 등의 개발 근거마련	100%	미네랄함유 당귀를 이용한 발기부전, 불임 및 항혈전, 혈행개선 효과를 in vitro, in vivo를 통해 확인
		건강기능식품의 남성 불임 및 혈행 개선 건강기능식품(환) 등의 제품화	100%	미네랄함유 및 발효기술의 접목 시킨 ‘발효 당귀’ 제품화
3차 년도 (2013 ~ 2014)	미네랄 함유 약용 작물의 건강기능식 품 제형 개발 및 제품화	건강기능식품으로의 유통 및 마케팅 전략 수립, 유통 판매	100%	롯데 면세점 외 3곳에서 ‘발효 당귀’ 판매
		미네랄 함유 약용작물의 개별인정형을 위한 인체적용시험 프로토콜 작성 및 IRB 승인	100%	혈행개선 개별인정형을 위한 인체적용시험 프로토콜 작성 및 부산대병원과 성모병원에서 IRB 승인
		인체적용 시험 진행 및 통계	95%	인체적용 시험 완료 후 인체적용시험의 프로토콜의 유효성지표기준 통계 진행
		건강기능식품 기능성 인증 추진	75%	인체적용시험 결과를 포함한 개별 인정형 신청을 위한 자료 작성 및 식약처 상담을 통한 순차적 진행

##### 나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
인체 효과 시험 자료 수집	이론적 접근방법	논문 및 보고서 조사
건강기능식품으로의 유통 및 마케팅 전략 수립	이론적·실험적 접근방법	특허 출원 및 등록
인체 적용시험 프로토콜 작성	이론적·실험적 접근방법	실험결과를 활용하여 전문 임상시험수탁업체에 의뢰

다. 세부연구수행 결과

(1) 1차년도

- 미네랄 함유 양액비료를 이용한 고효율 당귀 재배 기술 개발

① 실험실 내 발아 생장 시험

○ 미네랄 양액 처리에 따른 당귀 성장 촉진효과 평가

- 시험 목적

실험실 상에서 미네랄 양액 처리에 따른 당귀 성장 촉진 효과를 검증하고자 함.

- 시험 방법 및 재료

㉞ 미네랄 양액 제조

양액 : 5.5g 마그네슘 + 0.55g 아연 + 50 ul 게르마늄-셀레늄 + 50 ml 증류수

- 200 ppm : 양액을 1/20로 희석
- 400 ppm : 양액을 1/10로 희석
- 800 ppm : 양액을 1/5로 희석

㉟ 실험실 조건 처리방법

- 유리관 또는 Test-tube에 1% agar를 포함하는 MS 배지 (또는 물)
- 뿌리를 수세한 당귀를 이식 (한천배지가 40도 전후)
- 상온 방냉 (1시간)
- 적당한 농도의 희석 양액을 200 ul - 1000 ul 씩 매일 첨가
- 지상부, 지하부의 생육도 변화를 측정 (길이측정 - mm)

- 시험 결과

- 미네랄 양액 처리 시 식물성장용 배지인 MS 배지보다는 증류수에 단시간 생육시키면서 생육촉진 효과를 평가하는 것이 필요함.
- 실제 한천배지보다는 물만으로 배양하는 것이 효율적임(수경재배 가능). (1개월 이상 시험관 수경재배 가능)
- 뿌리생장, 지상부 생장을 측정한 결과 미네랄 양액 처리 시 4-8일 정도 생육 시 생육 촉진효과가 인정됨(더욱 많은 묘목으로 실험하여 통계적 결과 처리 필요함).









처리	초기 및 시간변화 사진도	8일 경과후 사진
무처리구		
200 ppm 처리구		
400 ppm 처리구		
800 ppm 처리구		

표 1. 미네랄 양액 처리에 따른 당귀의 생육 촉진 활성 사진

양액 처리 (ppm)	시료	0 day		Ave.	SD	Ave.	SD	시료	8 day		Ave.	SD	Ave.	SD
		지하부 (cm)	지상부 (cm)	지하부 (cm)	지상부 (cm)	지하부 (cm)	지상부 (cm)		지하부 (cm)	지상부 (cm)	지하부 (cm)	지상부 (cm)		
무 처 리	1	7.2	10.5	6.2	1.2	11.0	0.8	1	7.2	10.8	6.2	1.2	11.2	0.9
	2	7.5	10.5					2	7.5	10.5				
	3	5.0	11.8					3	5.0	11.8				
	4	6.5	12.0					4	6.5	12.5				
	5	5.0	10.4					5	5.0	10.4				
200	1	9.5	12.5	7.0	1.8	9.9	1.9	1	9.5	12.5	7.0	1.8	10.2	2.2
	2	7.0	10.5					2	7.0	12.0				
	3	8.0	8.5					3	8.0	8.5				
	4	5.5	10.5					4	5.5	10.5				
	5	5.0	7.5					5	5.0	7.5				
400	1	6.5	12.0	5.8	1.0	10.4	1.1	1	6.8	13.5	5.9	1.1	11.4	1.3
	2	7.0	11.0					2	7.0	10.5				
	3	6.0	9.5					3	6.0	11.0				
	4	4.5	10.0					4	4.5	12.0				
	5	5.0	9.5					5	5.0	10.2				
800	1	4.5	7.5	7.0	1.5	11.1	2.4	1	4.5	8.2	7.0	1.5	11.6	2.1
	2	7.0	12.5					2	7.0	13.5				
	3	8.0	12.5					3	8.0	12.5				
	4	7.5	9.8					4	7.5	11.0				
	5	8.0	13.0					5	8.0	13.0				

표 2. 미네랄 양액 처리에 따른 당귀의 생육 촉진 활성 평가도

- 즉 미네랄 양액 처리 결과 200-800 ppm 처리의 경우 무처리군보다 지상부의 성장이 촉진됨을 확인함. 그러나 실제 농가재배시 이식 시기 및 양액 처리에 따른 당귀 생육촉진 효과를 검정할 필요가 있다고 판단됨.

② 실험실 내 발아 촉진 시험

○ 미네랄, 저온 및 GA(gibberellin)가 일당귀 종자의 발아에 미치는 영향

• 시험 목적

본 실험은 미네랄, 저온 및 식물호르몬의 일종인 GA 처리를 통한 일당귀 발아율 향상과 발아소요일수를 단축할 수 있는 적정 발아 환경 조건을 규명하여 종자의 발아력을 유지하고 발아율 향상으로 종자 소요량 절감, 입모율 증대, 재배기간 단축 등 재배의 안정성을 확보하고자 실시되었음.

• 시험 방법 및 재료

㉔ 일당귀 종자

- 본 실험은 강원대학교 생명건강공학과 실험실과 온실에서 2012년 8월부터 11월까지 실시되었으며 봉화고냉지 약초시험장에서 제공받았음.



그림 1. 일당귀 종자

㉕ 미네랄이 일당귀 종자의 발아에 미치는 영향

- Mineral water (미네랄용액)의 농도가 종자 발아에 미치는 영향을 살펴보기 위해 실험실에서 종자를 땅에 담아 2일 동안 흐르는 물에 침적 후 꺼내어 각각 50립씩의 종자를 3번 반복으로 미네랄 용액의 농도를 다르게 하여 처리함.
- 미네랄 용액은 (1) 물 (2) Mg (3) Zn (4) Ge+ Se 등 물과 3가지 무기염류를 혼합함 (표3).

Treatment	Combination
control	물 1L
0.5X	물 1L+ Mg50g+ Zn5g+ (Ge+ Se)0.45cc
1X	물1L+ Mg100g+ Zn10g+ (Ge+ Se)0.90cc
2X	물1L+ Mg20g+ (Ge+ Se)0.18cc

표 3. 미네랄 용액의 혼합

- 농도별 (0.5X, 1X, 2X)의 미네랄 용액과 대조구로 물에 24시간 담가 각각 처리한 후 petri dish에 농도별로 두어 마르지 않게 각각의 미네랄 용액을 뿌려 줌 (그림2).



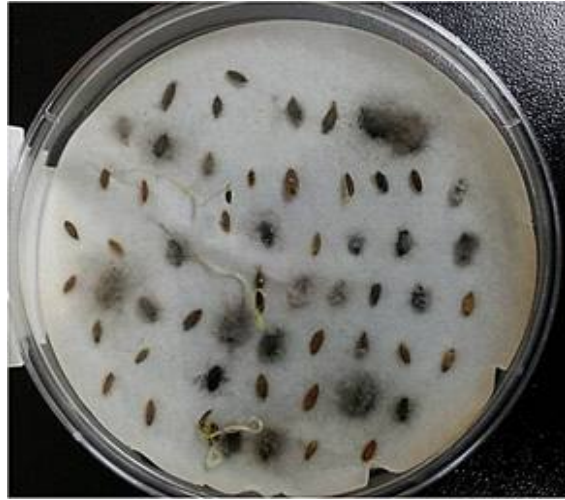


그림 2. petri dish 발아율 조사

- 발아가 된 종자는 과중하여 흙이 마르지 않도록 매일 물을 공급함 (그림3).



그림 3. 육모트레이에 종자 과중

㉔ 저온과 GA의 유무가 일당귀 종자의 발아에 미치는 영향

- 저온이 일당귀 종자 발아율에 미치는 영향을 보기 위해 종자를 모래와 섞어 용기에 넣은 후 모래가 충분히 젖을 정도로 물을 흠뻑 넣은 후, 냉장고 4도와 -20도에 7일과 14일 동안 넣어 둠(그림 4). 각 처리한 일당귀 종자 30립씩 3반복을 실시함. 처리가 끝난 후 넓은 용기에 얇게 펴서 25도 온실에 두고 발아를 시키면서 발아 립 수를 조사함. 이때, -20도에서 처리한 종자는 냉동고에서 꺼내 24시간 해동 후 넓은 용기에 옮김.

- GA처리를 한 종자를 저온에 보관한 후 발아 실험하였을 때 종자 발아율에 미치는 영향을 보기 위해 종자를 모래와 섞어 플라스틱 용기에 넣은 후 모래가 충분히 젖을 정도로 지베렐린 용액 (gibberellin 5ppm)을 흠뻑 넣은 후, 냉장고 4도와 -20도에 7일과 14일 동안 넣어 둠(그림 4). 각 처리한 일당귀 종자 30립씩, 3반복을 실시함. 처리가 끝난 후 넓은 용기에 얇게 펴서 25도 온실에서 두고 발아 립 수를 조사함. 이때, -20도에서 처리한 종자는

냉동고에서 꺼내 24시간 해동 후 넓은 용기에 옮겨 발아시킴.



그림 4. 용기에 종자와 젖은 모래를 혼합하여 저온 처리한 사진

- 결과

- ⑦ 미네랄 용액의 농도가 일당귀 발아에 미치는 영향

- 미네랄 용액 1X와 2X를 처리한 일당귀는 파종 10일 후 종자발아가 시작되었으며 무처리와 0.5X 처리한 일당귀는 파종 후 12일 후에 비로소 종자 발아가 시작되었음. 발아시험 17일 이후에는 발아가 저조하여 17일까지만 조사하였음 (그림 5).



그림 5. 일당귀의 발아

- 미네랄 용액은 식물의 영양흡수에 필수 요소인 칼슘, 마그네슘, 칼륨 등의 무기염류가 비교적 많이 포함된 용액으로써 저농도 처리에 비해 고농도 처리를 했을 때 발아율 향상과 발아시간의 단축의 효과가 나타났음.

- 또한 현재 실험의 결과를 보면 1X < 무처리 < 0.5X < 2X 순으로 발아율이 나왔음. 2X



에서 가장 높은 발아율이 보였지만, 1X에서 발아율이 가장 낮게 나타났음. 실험 진행 중 1X 처리군에서 흙에서 벌레가 발견되었고 발아된 종자도 많이 죽은 것으로 보아 이 같은 실험 결과는 해충의 영향에 기인하는 것을 보였음. 또한 정상적으로 실험이 진행 되었을 경우를 가정해 보았을 때 무처리 <math>0.5X \leq 1X \leq 2X</math> 순으로 발아율이 증가하였을 것으로 추정됨.

Germination rate(%)	control	0.5X	1X	2X
	70.6	74.0	60.0	76.6

표 4. 미네랄 용액 농도에 따른 발아율

㉔ 저온과 GA의 유무가 일당귀 발아에 미치는 영향

㉕ 저온과 물의 영향

- 발저온에서 일당귀 종자의 발아율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 4도와 7도에서 각각 7일과 14일 처리한 후 종자발아 일수와 발아율을 조사하였는데 저온에서의 발아는 4도/14일 처리가 발아카운트를 시작한지 6일 만에 발아하였고, 4도/7일 처리에서 7일 만에 발아하였음. -20도/7일에서는 6일 만에 발아, -20도/14일에서는 15일 만에 발아하였음.

- 발아율은 4도/7일이 23%, 4도/14일이 11%, -20도/7일이 3% 그리고 4도/14일이 1% 임 (그림6).



그림 6. 일당귀의 발아

㉖ 저온과 GA의 영향

- 일반적으로 신장 촉진작용, 종자 발아 촉진작용, 개화촉진작용 등 식물의 생장을 촉진하는 식물 성장조절제인 gibberelin 5ppm을 처리하여 종자발아 일수와 발아율을 조사하였음.

- 저온과 GA처리를 한 당귀는 4도/7일, 4도/14일 처리에서 동일하게 7일 만에 발아하였고 -20도/7일이 13일 만에 발아, -20도/14일 처리에서는 14일 만에 발아하였음. 발아율은 4도/7일 처리가 22%, 4도/14일 처리가 11%, -20도/7일 처리가 5.3%, -20도/14일 처리가 8.6%일.

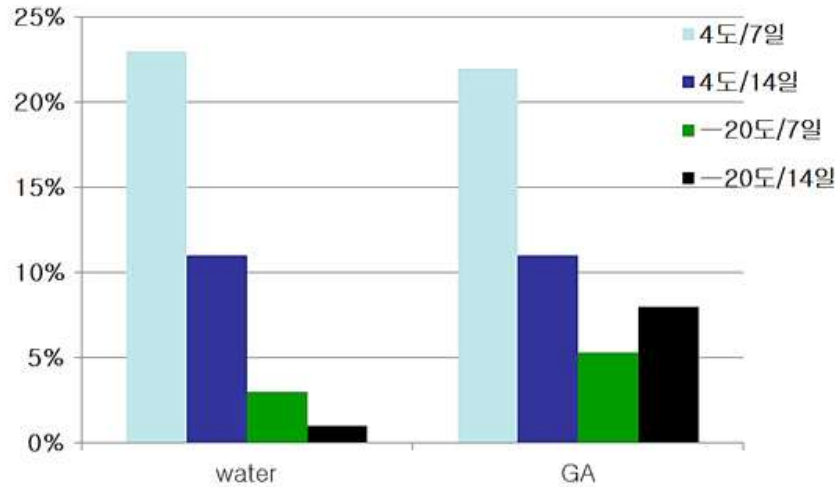


그림 7. 미네랄, 저온 및 GA(gibberellin)가 일당귀 종자의 발아에 미치는 영향(Effects of low temperature and gibberellin on germination of *A. acutiloba*)

- 무처리 (실험1\_에서는 8일째 발아가 전혀 되지 않은 것에 비하면 발아기간 단축에 있어서 저온처리 효과는 인정되고 -20도에서의 물보다는 GA이의 효과가 인정되나 4도에서는 물과 GA간에 유의한 차이가 발견 되지 않았음.

- 4동 처리구에서는 물과 GA처리구의 발아율과 발아시기에 거의 차이가 없으므로 물과 GA간에 유의한 차이가 발견되지 않는 것으로 보이나 -20도/7일 물 처리구는 발아율이 3%에 그치지만 GA처리구는 5.3%이고 -20도/14일 물 처리구는 1%, GA 처리구는 8.6%임. -20도에서는 물 처리구 보다는 GA 처리구가 발아율이 훨씬 더 좋은 것으로 나왔음. 이로써 4도에서는 물과 GA간 차이가 발견 되지 않지만 -20도에서는 GA가 발아율 향상에 영향을 미치는 것으로 보임.

- 또한 저온에서 물과 GA처리구 < 25도 무처리 < 미네랄 처리 순으로 발아율이 높았음. 그래서 일당귀 발아율을 높이는 방법은 25도에서 미네랄 용액이 고농도일수록 발아율이 높아질 것이라고 생각됨.



그림 8 . 일당귀 실험실 재배 사진

③ 미네랄 양액 처리 온실 재배 실험

- 미네랄 양액처리에 따른 당귀의 미네랄 함량 변화 검토 (2012년)

• 시험 목적

3종의 미네랄 (Se, Ge, Zn) 함량이 높은 당귀를 생산할 수 있는 최적 재배기술 탐색하기 위하여 초기 생육단계에서 농도별 비료 처리에 따른 영향을 확인하기 위함. 참당귀와 일당귀 묘목을 각각 이식한 후 미네랄 비료를 살포하였을 경우, 고도가 낮은 지역에서 당귀의 생육이 원활하게 이루어지지 않는 점을 개선할 수 있는지, 또 미네랄 비료의 처리에 따라 약용작물 내의 약리성분의 함량에 변화를 가져올 수 있는지 등에 대한 검증을 하기 위함.

• 시험 방법 및 재료

㉔ 미네랄 양액 처리

1차년도 기간 중, 안동시 농업기술센터 비닐하우스 1동에 황산아연비료 (가루), 황산마그네슘 비료 (가루), 셀레늄+ 게르마늄 비료 (액체)의 3가지 비료를 총 3개월 동안 처리하였으며 처리 농도와 처리 횟수에 따라 채취한 샘플 (총 샘플수 110개)에서 미네랄 함량을 분석하였음.

- 시험 요소 1 농도: 농도1 (저농도), 농도2 (중농도), 농도3 (고농도), 농도4 (초고농도)
- 시험 요소 2 처리 횟수: 1회 처리군 (1번 샘플), 2회 처리군 (2번 샘플), 3회 처리군 (3번 샘플)

		1차 처리		2차 처리			3차 처리				
		실험 개시	1주 차	2주 차	4주 차	5주 차	6주 차	8주 차	9주 차	10주 차	12주 차
1회 처리군	무처리										
	농도1										
	농도2										
	농도3										
	농도4										
2회 처리군	무처리										
	농도1										
	농도2										
	농도3										
	농도4										
3회 처리군	무처리										
	농도1										
	농도2										
	농도3										
	농도4										

그림 9. 온실 재배 시험군 미네랄 비료 처리 일정표

- 시험 방법: 묘목 옮겨심기 -> 미네랄 비료 1차 시비 -> 2차 시비 -> 3차 시비 -> 최종 샘플링 -> 수확 -> 자연건조



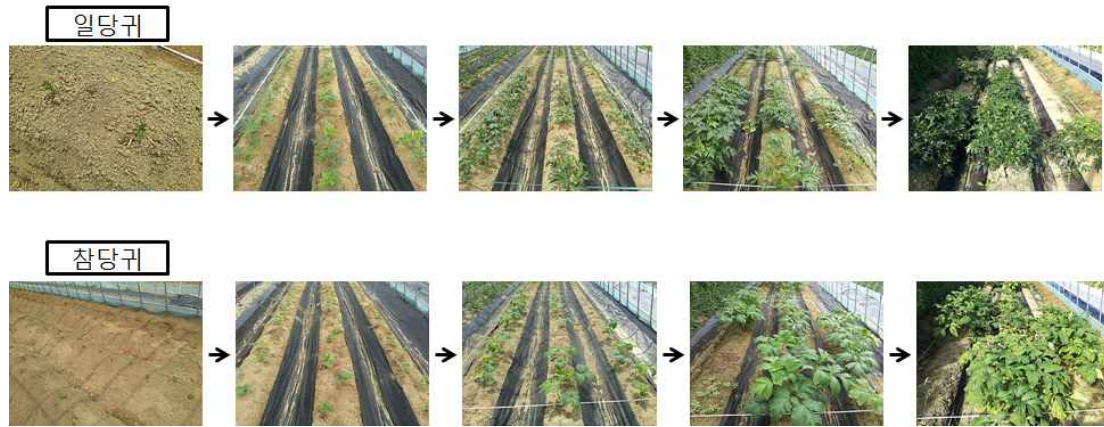


그림 26 일당귀 및 참당귀의 생육 과정



그림 27 일당귀 및 참당귀 샘플링

- 포크레인을 이용하여 수확하였고 지상부 (잎, 줄기)는 잘라내고 지하부 (뿌리)만 세척하여 하우스에 자연 건조함.

㉞ ICP (Inductively Coupled Spectrometer)를 이용한 당귀의 미네랄 정량 시험법

ICP를 이용한 미네랄 비료 처리 횟수 및 처리 후 시간 경과에 따른 미네랄 함량 변화 비교

- a~e, 1~105 까지 당귀 생물시료로 받아 건조 후 질산 분해하여 ICP 분석함 (현재 노란색으로 표시된 시료만 질산 분해 후 ICP분석).

- 시료는 총 4가지로 분류됨 (참당귀 뿌리, 참당귀 줄기, 일당귀 뿌리, 일당귀 줄기)

미네랄 처리 횟수	미네랄 처리 농도	1차처리			2차처리			3차처리			
		0주차	1주차	2주차	4주차	5주차	6주차	8주차	9주차	10주차	12주차
1회 처리군	무처리	a	1	16	31			66			91
	저농도	b	2	17	32			67			92
	중농도	c	3	18	33			68			93
	고농도	d	4	19	34			69			94
	초고농도	e	5	20	35			70			95
2회 처리군	무처리		6	21	36	46	56	71			96
	저농도		7	22	37	47	57	72			97
	중농도		8	23	38	48	58	73			98
	고농도		9	24	39	49	59	74			99
	초고농도		10	25	40	50	60	75			100
3회 처리군	무처리		11	26	41	51	61	76	81	86	101
	저농도		12	27	42	52	62	77	82	87	102
	중농도		13	28	43	53	63	78	83	88	103
	고농도		14	29	44	54	64	79	84	89	104
	초고농도		15	30	45	55	65	80	85	90	105

그림 10. ICP 분석을 위한 시료 분류표

- 당귀 생물시료를 세척 후 지상부 (줄기)와 지하부 (뿌리)로 나눔.
- 80℃에서 항량건조 시료 건조 무게 측정 : 대략 0.2g으로 맞춤.
- 5ml 질산 가하여 60~100℃로 서서히 온도 가하여 분해함.
- 3차 증류수로 10ml 맞춤 후 5배 희석하여 ICP측정함.

• 결과

㉞ 재배 시험 결과

- 미네랄 비료 농도에 의한 생육정도의 차이는 뚜렷이 나타나지 않은 반면 고농도와 초고 농도 처리군에서는 생육상태가 불량해지는 개체들이 출현하였음.
- 6월초부터 응애와 진딧물이 발생하여 농약을 꾸준히 살포하였으나 재발생 확률이 높으며 하고 현상이 나타났음.
- 또 다른 문제점으로는 일당귀 일부에서 꽃대가 발생하였고 하우스 내 당귀 위치와 기타 요소에 의해 개체간의 생육차이가 있었음. 농도별 샘플이 1개였기 때문에 성분 분석 시 샘플이 농도구간 다른 개체를 대표할 수 있을지에 대한 의문점 발생하였음.

㉞ 미네랄 분석 시험 결과

- 미네랄 비료 처리 횟수에 따른 Ge-Se 함량변화

미네랄 비료 처리 횟수	미네랄 비료 처리 농도	참당귀 뿌리								참당귀 줄기							
		ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)								ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)							
		Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge		
1	a 무처리	1113	8860	0	0	29	0	0	2755	6690	136	321	36	90	0		
	b 저농도	1632	3665	0	0	21	0	0	2745	6715	102	246	26	91	0		
	c 중농도	2245	5540	40	132	28	0	0	768	3400	41	277	20	92	0		
	d 고농도	2575	7635	40	200	33	0	0	1283	4455	50	641	34	113	0		
	e 초고농도	3395	7320	101	291	44	0	0	1311	5320	49	325	35	80	0		
2	36 무처리	10035	17510	235	1448	75	24	0	7370	19320	57	361	51	0	0		
	37 저농도	7320	9470	138	380	59	0	0	7905	26280	41	113	38	0	0		
	38 중농도	8215	14240	218	874	83	0	0	9040	35470	100	218	80	0	0		
	39 고농도	8975	17520	192	1009	136	0	0	9660	21400	77	240	164	0	0		
	40 초고농도	4535	9205	93	331	45	0	0	11655	30150	242	161	283	0	0		
3	76 무처리	2006	3805	52	504	20	65	0	2985	7615	0	0	43	0	0		
	77 저농도	3265	4815	90	1082	40	107	0	6370	35980	140	342	479	0	0		
	78 중농도	3895	6955	145	663	54	78	0	12425	41180	58	136	940	0	0		
	79 고농도	4855	6985	125	541	101	107	0	6420	23420	61	0	173	0	0		
	80 초고농도	3255	5160	94	855	134	87	0	10895	39230	51	0	590	0	0		

그림 11. 온실 재배 참당귀의 뿌리 및 지상부에서의 미네랄 성분 분석 결과

미네랄 비료 처리 횟수	미네랄 비료 처리 농도	일당귀 뿌리							일당귀 줄기						
		ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)							ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)						
		Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge
1회 처 리군	a 무처리	3715	13360	95	2411	60	0	0	1196	3670	22	195	25	0	0
	b 저농도	6635	16920	198	8060	112	0	0	3665	10580	73	1267	88	0	0
	c 중농도	4455	9615	54	1625	56	0	0	660	2565	0	46	16	0	0
	d 고농도	4390	10960	91	4425	71	0	0	1191	3335	0	397	29	24	0
	e 초고농도	1143	3785	0	337	18	0	0	1191	3915	24	177	29	0	0
2회 처 리군	36 무처리	10130	29640	129	1756	129	0	0	5825	31490	0	201	63	0	0
	37 저농도	5895	14150	37	1091	50	0	0	5595	20210	0	321	45	0	0
	38 중농도	4910	9830	0	1564	92	0	0	5075	30040	0	523	75	0	0
	39 고농도	7920	18050	67	2362	87	0	0	8890	40740	51	24	73	0	0
	40 초고농도	24975	34700	255	2580	205	0	0	3755	18710	0	284	45	0	0
3회 처 리군	76 무처리	6765	9355	76	1083	54	0	0	2710	17240	0	37	40	0	0
	77 저농도	3905	6605	45	1043	45	26	0	1854	5905	0	74	84	0	0
	78 중농도	5435	7430	42	872	47	0	0	2119	9255	30	258	77	33	0
	79 고농도	4365	5625	0	163	82	0	0	3455	21630	25	120	55	0	0
	80 초고농도	10165	9190	67	1536	0	0	0	14900	76900	84	650	1252	0	0

그림 12. 온실 재배 일당귀의 뿌리 및 지상부에서의 미네랄 성분 분석 결과

- 미네랄 비료 처리 후 시간경과에 따른 Ge-Se 함량변화

시간 경과	미네랄 처리 농도	참당귀 뿌리							참당귀 줄기						
		ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)							ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)						
		Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge
0주	a 무처리	1113	8860	0	0	29.35	0	0	2755	6690	136.45	320.5	36.05	89.9	0
	b 저농도	1632	3665	0	0	20.95	0	0	2745	6715	101.55	245.85	26.05	90.6	0
	c 중농도	2245	5540	40.1	132.45	27.85	0	0	768	3400	41.35	276.5	20.15	91.75	0
	d 고농도	2575	7635	39.6	200.1	32.5	0	0	1283	4455	49.6	641	33.8	113.2	0
	e 초고농도	3395	7320	101.25	291	43.7	0	0	1311	5320	49.4	324.5	34.55	79.8	0
4주	31 무처리	6100	10660	97.7	374	50.2	26.55	0	10460	31750	152.75	1627	55.5	56.95	0
	32 저농도	5895	11110	151.4	794	45.45	24.85	0	10370	33290	98.55	613	41	0	0
	33 중농도	7590	12520	177.95	1194	154.95	0	0	10465	33720	80.7	553	41.35	0	0
	34 고농도	6840	8620	114.15	510	53.7	29.85	0	5705	18700	90.15	906.5	49.75	0	0
	35 초고농도	6695	13080	81.6	500.5	71.65	0	0	9770	35660	136.45	483.5	176.25	0	0
8주	66 무처리	3880	6580	103.55	426.5	33.75	33.3	0	4930	35220	98.75	283	40.55	0	0
	67 저농도	4630	8440	136.15	1231.5	56.65	40.35	0	12175	48150	343	1495.5	69.7	0	0
	68 중농도	5270	7545	159.8	585.5	40.15	59.65	0	11225	53200	181.8	336.5	62.6	0	0
	69 고농도	3745	8320	104.95	504	36.85	68.75	0	6605	22720	73.25	0	21.95	0	0
	70 초고농도	2610	4125	72.7	283	31.9	60.05	0	5015	29440	38.35	0	30.45	0	0

그림 13. 온실 재배 참당귀의 뿌리 및 지상부에서의 미네랄 성분 분석 결과



시간 경과		미네랄 처리 농도	일당귀 뿌리							일당귀 줄기						
			ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)							ppm (mg-미네랄/Kg-dry당귀)						
			Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn	Se	Ge
0주	a	무처리	3715	13360	94.65	2411	60.15	0	0	1195.5	3670	22.35	195.25	25.05	0	0
	b	저농도	6635	16920	197.5	8060	111.8	0	0	3665	10580	72.9	1267	87.8	0	0
	c	중농도	4455	9615	53.5	1625	55.95	0	0	659.5	2565	0	45.9	15.5	0	0
	d	고농도	4390	10960	90.95	4425	70.8	0	0	1191	3335	0	396.5	28.55	24.4	0
	e	초고농도	1143	3785	0	337	18	0	0	1191	3915	24	176.8	29.4	0	0
4주	31	무처리	5870	10050	118.7	4545	77.85	0	0	5930	37550	65.35	1602.5	59.55	0	0
	32	저농도	4275	13200	81.5	1271.5	48.75	0	0	4855	24890	44.4	1330.5	60.2	0	0
	33	중농도	6915	14050	35	555.5	48.5	0	0	7375	52200	43.9	606	54.95	0	0
	34	고농도	9990	25560	109.9	3895	86.55	0	0	6575	30580	53.35	818	110.15	0	0
	35	초고농도	8720	20150	68	2228.5	113.05	0	0	6385	32510	39.95	942	80.4	0	0
8주	76	무처리	3530	5780	0	17.25	22.35	0	0	2745	13460	0	0	40.65	0	0
	77	저농도	4165	7210	0	312.5	31.4	0	0	9160	93300	142.3	790	96.3	0	0
	78	중농도	4455	6895	59.55	475	61.25	0	0	1567	6595	0	0	47.25	0	0
	79	고농도	4990	9870	48.9	338.5	43.85	0	0	8230	86700	81.55	106.85	101.85	0	0
	80	초고농도	2550	3695	0	17.95	22.25	0	0	4320	38400	0	0	103	0	0

그림 14. 온실 재배 일당귀의 뿌리 및 지상부에서의 미네랄 성분 분석 결과

- 참당귀 및 일당귀 시료에서 미네랄 분석결과 Ge-Se의 농도 증가가 확인되지 않음.
- 참당귀의 초기 어린 유년체의 경우 지상부에서 Se가 고농도로 검출되나 지하부에서는 나타나지 않았음.
- 일당귀의 초기 어린 유년체의 경우 지상부 및 지하부 모두에서 Se, Ge가 나타나지 않음.
- 참당귀, 일당귀 모두 최종 재배단계에서 Ge-Se가 검출한계 (Se: 0.03 ppm, Ge: 0.1 ppm) 이하로 나타남.
- 미네랄 양액 처리에 의해 식물체내 Ge-Se 증가가 인정되지 않음.
- 위의 결과를 1차년도 결과처럼 Cluster 및 treeview program을 이용하여 분석할 예정임.

○ 당귀로부터 Coumarin계 decursin의 정량 및 일당귀, 참당귀 decursin 함량 분석

• 시험 목적

㉠ HPLC -UV를 이용하여 당귀로부터 decursin 정량

㉡ (1)을 이용한 일당귀, 참당귀 decursin 함량 분석

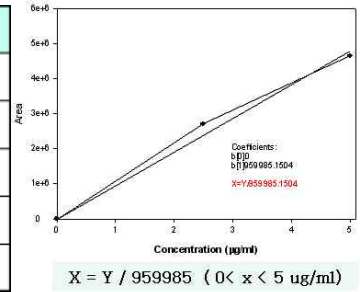
㉢ 다양한 Ge-Se 양액처리시의 당귀별 decursin 함량 변화 검토.

• 시험 방법 및 재료

- HPLC-UV 조건

HPLC-UV condition	
Detector	UV detector (330 nm)
Column temp.	RT (~25C)
Solvent	75% acetonit
Flow	0.5ml/min
Column	C18 (Agilent)
Injection	20ul
Pressure	60-62.

ug/ml	RT	AREA
100	10.96	15293519.60
10	10.96	7702551.06
5	10.96	4645971.91
2.5	10.96	2707870.56
0	0	0



- Decursinol standard

• 결과

- Decursin 함량

- 참당귀의 경우, 에탄올 추출물의 경우 Butanol fraction을 제외하고 모두 1 µg/ml 이상의 함량이 나왔으며 일당귀는 대부분 0.3 µg/ml 이하로서 거의 검출되지 않았음.

sample	미네랄 처리	농도 (µg/mL)	area	Decursin (µg/mL)
참당귀 EtOH ex.	전	100	1000306.2	1.0420
참당귀 H fr.	후	100	1176129.29	1.2252
참당귀 EA fr.	후	100	1247196.99	1.2992
참당귀 BuOH fr.	후	100	428815.79	0.4467
일당귀 EtOH ex.	전	100	57955.51	0.0604
일당귀 H fr.	후	100	272139.7	0.2835
일당귀 EA fr.	후	100	101067.88	0.1053
일당귀 BuOH fr.	후	100	12490.17	0.0130

그림 15. 온실 재배한 참당귀 및 일당귀의 decursin 함량 분석 결과

④ 해발 700m 노지 재배 시험

○ 농지임대 및 당귀 위탁재배 계약

• 시험 목적

해발 700m 고지에서 미네랄 양액 처리한 참당귀 및 일당귀의 대량 재배 후 이들의 미네랄 함유량, 잔류·오염물질 및 지표성분 등을 분석하고자 함.

• 시험 방법 및 재료

㉞ 계약 재배 내용

일당귀 위탁재배 내용



- 소재지: 경북 안동시 임동면 대곡리 516
- 면적: 8,200 m<sup>2</sup> (2,500 평)
- 목표: 미네랄 양액 비료를 이용한 당귀의 재배
- 대상 품목: 미네랄 미량요소 복합 비료 3종 (또는 그 이상)
- 실험 내용: 미네랄 양액비료 실험법에 따른 당귀의 미네랄 함유량, 생산량, 생육효과 검정 (생물, 건물중량 검정)

참당귀 위탁재배 내용

- 소재지: 경북 안동시 도산면 가송리 437-3
- 면적: 8,200 m<sup>2</sup> (2,500 평)
- 목표: 미네랄 양액 비료를 이용한 당귀의 재배
- 대상 품목: 미네랄 미량요소 복합 비료 3종 (또는 그 이상)
- 실험 내용: 미네랄 양액비료 실험법에 따른 당귀의 미네랄 함유량, 생산량, 생육효과 검정 (생물, 건물중량 검정)

㊤ 고지 재배 후 수확한 당귀 사진

- 참당귀



그림 16. 노지 재배한 참당귀의 수확 후 사진

- 일당귀



그림 17. 고지에서 재배한 일당귀의 수확 후 사진

㉔ 잔류·오염물질 및 지표성분 분석

㉕ 참당귀

지표물질 및 설정 근거 대한약전외의약품등기준 (KPC) 일반시험법 중 ‘당귀 (當歸) Angelica Gigas Root’의 함량시험법을 바탕으로 지표물질로 설정함.

구조			
일반명 (구조식, 분자량)	Nodakenin (C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub> , 408.40)	Decursin (C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub> , 328)	Decursinol (C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> , 246.261)

표 5. 참당귀의 지표물질 구조식 및 분자량

성 상

당귀 (當歸, *Angelica Gigas* Root, *Angelica gigas* Nakai)는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai (산형과 Umbelliferae)의 뿌리로써 굵고 짧은 주근으로부터 줄기 및 잎의 잔기가 남아 있음. 주근의 길이는 약 3 ~ 7 cm, 지름 2 ~ 5 cm이고 가지뿌리의 길이는 15 ~ 20cm임. 바깥면은 연한 황갈색 ~ 흑갈색으로 주근 및 가지뿌리에는 세로주름이 많으며 주근에는 가로주름이 있는 것도 있음. 껍질은 평탄하고 형성층에 의하여 목부와 피부의 구별이 뚜렷하며 목부와 형성층 부근의 피부는 어두운 황색이나 나머지 부분은 흰색임. 이 약은 특유한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰면서 단 것이 특징임.

## 정 량 법

이 약의 가루 약 0.5 g을 정밀하게 달아 메탄올 20 mL를 넣고 환류냉각기를 달고 1 시간 가열한 다음 여과한다. 잔류물에 메탄올 20 mL를 넣어 같은 방법으로 조작함. 여액을 모두 합하여 메탄올을 넣어 정확하게 50 mL로 하여 검액으로 함. 따로 노다케닌표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 20 mL로 함. 이 액 5 mL를 정확하게 취하고, 데쿠르신표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 녹인 다음 메탄올을 넣어 정확하게 50 mL로 하여 표준액으로 함. 검액 및 표준액 10  $\mu$ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험할 때 검액의 노다케닌, 데쿠르신 및 데쿠르시놀안겔레이트 (데쿠르신에 대한 상대유지시간 약 1.02)의 피크면적 ATa, ATb 및 ATc 및 표준액의 노다케닌, 데쿠르신의 피크면적 ASa 및 ASb를 측정함.

$$\begin{aligned} & \text{노다케닌 (C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{)의 양 (mg)} \\ & = \text{노다케닌표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_{Ta}}{A_{Sa}} \times \frac{1}{4} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{총데쿠르신 [데쿠르신 (C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{) 및} \\ & \text{데쿠르시놀안겔레이트 (C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{)]의 양 (mg)} \\ & = \text{데쿠르신표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_{Tb} + A_{Tc}}{A_{Sb}} \end{aligned}$$

- 조작조건 -

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)

칼 럼 : 안지름 4 ~ 6 mm, 길이 15 ~ 20 cm인 스테인레스관에 5  $\mu$ m의 옥타데실실릴화한 실리카겔이 충전된 칼럼 혹은 이와 동등한 칼럼

이동상 : 아세트니트릴 · 물 (50 : 48)

유 량 : 0.7 mL/분

## 정 량 기 준

대한약전에 당귀의 정량은 총 노다케닌 (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub> : 408.40) 및 총 데쿠르신 [데쿠르신 (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> : 328.36) 및 데쿠르시놀안겔레이트 (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> : 328.36)]합이 6.0% 이상을 함유한다고 명시

## 순 도 시 험

- 이물

가) 줄기 및 목질근 : 이 약은 줄기 및 목질근이 5.0 % 이상 섞여 있지 않다.

나) 그 밖의 이물 : 이 약은 줄기 및 목질근 이외의 이물이 1.0 % 이상 섞여 있지 않다.

- 중금속

가) 납 5 ppm 이하

나) 비소 3 ppm 이하

- 다) 수은 0.2 ppm 이하
- 라) 카드뮴 0.3 ppm 이하

- 잔류농약

- 가) 총 디디티 (p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합) 0.1 ppm 이하
- 나) 디엘드린 0.01 ppm 이하
- 다) 메톡시클로르 1 ppm 이하
- 라) 총 비에이치씨 ( $\alpha, \beta, \gamma$  및  $\delta$ -BHC의 합) 0.2 ppm 이하
- 마) 아조싸이클로틴 0.2 ppm 이하
- 바) 아족시스트로빈 0.1 ppm 이하
- 사) 알드린 0.01 ppm 이하
- 아) 엔도설판 ( $\alpha, \beta$ -엔도설판 및 엔도설판설페이트의 합) 0.2 ppm 이하
- 자) 엔드린 0.01 ppm 이하
- 차) 터부코나졸 1.0 ppm 이하
- 카) 펜디메탈린 0.2 ppm 이하
- 타) 펜프로파스린 0.2 ppm 이하
- 파) 세톡시딤 0.2 ppm 이하
- 하) 플루아지포프부틸 0.3 ppm 이하

- 이산화황 30 ppm 이하

회 분 6.0 % 이하.

㉠ 일당귀

지표물질 및 설정 근거 대한약전외의약품등기준 (KPC) 일반시험법 중 '일당귀 (日當歸) Angelica Root'의 함량시험법을 바탕으로 지표물질로 설정함.

성 상

이 약은 뿌리로 두껍고 짧은 주근으로부터 여러 개의 곁뿌리가 갈라져 나와 전체적으로 방추형을 이루며 길이 10 ~ 25 cm이다. 바깥면은 어두운 갈색, 적갈색이고 세로주름 및 가로로 길게 튀어나온 잔뿌리 자국이 많다. 자른 면은 어두운 갈색 ~ 황갈색을 띠고 평평하다. 이 약의 횡단면을 현미경으로 볼 때 코르크층은 4 ~ 10 층으로 되고 그 안쪽에 여러 층의 후각조직이 있다. 피부에는 분비세포로 둘러싸인 많은 유도와 때때로 큰 세포간극이 있다. 피부와 목부의 경계는 명료하고, 목부에는 많은 도관과 방사조직이 교대로 방사상으로 배열되고 바깥쪽 도관은 단독 또는 몇 개씩 모여서 조밀하게 배열되고 췌기모양을 이루고 가운데 부근에 있는 도관은 극히 드물게 존재한다. 전분립은 단립 더러는 2 ~ 5 개의 복립이고 단립의 직경은 20  $\mu\text{m}$ 이하, 복립은 25  $\mu\text{m}$ 에 이른다. 전분립은 가끔 호화되어 있다. 이 약은 특유한 냄새가 나고 맛은 약간 달며 후에 약간 맵다.

순도시험

- 엽초 이 약은 엽초가 3.0 % 이상 섞여 있지 않다.
- 이물 이 약은 엽초 이외의 이물이 1.0 % 이상 섞여 있지 않다.
- 중금속



- 가) 납 5 ppm 이하
- 나) 비소 3 ppm 이하
- 다) 수은 0.2 ppm 이하
- 라) 카드뮴 0.3 ppm 이하

**- 잔류농약**

- 가) 총 디디티 (p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합계) 0.1 ppm 이하
- 나) 디엘드린 0.01 ppm 이하
- 다) 총 비에이치씨 (α,β,γ 및 δ-BHC의 합계) 0.2 ppm 이하
- 라) 알드린 0.01 ppm 이하
- 마) 엔드린 0.01 ppm 이하

회 분 7.0 % 이하

산불용성회분 1.0 % 이하

엑스함량 묽은에탄올엑스 35.0 % 이상

**• 결과**

㉠ **참당귀의 잔류·오염물질 및 지표성분 분석**

**검사시험성적서**

검체명	당 귀 (참)	의뢰번호	F13011002	원산지	한국산
의뢰지(업체)	한국전통의학연구소	의뢰일자	2013.01.10	의뢰량(g)	500 g
의뢰자주소	서울특별시 강남구 논현동 80-1 신원빌딩 7층				

▶ 의뢰하신 sample에 대한 시험결과는 다음과 같습니다.

검사항목	허용기준	시험결과
잔류농약	BHC계열 (α,β,γ 및 δ-BHC합계)	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	DDT계열 (DDD, DDE 및 DDT 합계)	0.1 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Aldrin	0.01 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Endrin	0.01 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Dieldrin	0.01 ppm 이하 적 합 (N.D.)
중금속	납(Pb)	5.0 ppm 이하 적 합 (0.414 ppm)
	비소(As)	3.0 ppm 이하 적 합 (0.361 ppm)
	카드뮴 (Cd)	0.3 ppm 이하 적 합 (0.185 ppm)
	수은 (Hg)	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	잔류아산화물	30 ppm 이하 적 합 (5.114 ppm)
곰팡이독소 (Aflatoxin B1)	10 ppb 이하	-
헵타미렌	5 ppb 이하	-
성 상	대한약전	적 합
특 인 시 점	대한약전	적 합
순 도 시 점	대한약전	적 합
건 조 량	-	-
회 분	6.0 % 이하	적 합 (5.3 %)
산불용성회분	-	-
경 유 량	0.1 mL	적 합 (0.15 mL)
침 침 함 량	-	적 합 (19.03 %)
엑스 함 량	물 엑스	-
	묽은에탄올엑스	-
	에틸엑스	-

▶ 본 검사는 식약청고시, 대한약전 및 대한약전의 생약규격에 의거하여 시험하였으며, 상기의 결과는 귀사에서 제시한 Sample에 한하여 실험한 결과입니다.  
▶ 위 성적은 시험의뢰 목적 이외의 상품선진 및 기타 법적 요건이나 상업용으로 사용할 수 없습니다.

2013년 02월 05일  
**(주) 글로벌허브**

GQP803-3(Rev.0)

(주)글로벌허브

A4(210x297)

**검사시험성적서**

검체명	당 귀 (참)	의뢰번호	F13011002	원산지	한국산
의뢰지(업체)	한국전통의학연구소	의뢰일자	2013.01.10	의뢰량(g)	500 g
의뢰자주소	서울특별시 강남구 논현동 80-1 신원빌딩 7층				

▶ 의뢰하신 sample에 대한 시험결과는 다음과 같습니다.

검사항목	허용기준	시험결과
개 별 농 약	Methoxychlor	1.0 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Azoxyclostin	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Azoxystobin	0.1 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Endosulfen(α,β-Endosulfen 및 Endosulfen sulfate)	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Tebuconazole	1.0 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Pendimethalin	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Fenpropathrin	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Setoxydim	0.2 ppm 이하 적 합 (N.D.)
	Fluzifop-butyl	0.3 ppm 이하 적 합 (N.D.)

▶ 본 검사는 식약청고시, 대한약전 및 대한약전의 생약규격에 의거하여 시험하였으며, 상기의 결과는 귀사에서 제시한 Sample에 한하여 실험한 결과입니다.  
▶ 위 성적은 시험의뢰 목적 이외의 상품선진 및 기타 법적 요건이나 상업용으로 사용할 수 없습니다.

㉠ **판정결과 : 적 합**

통 관	책임자	최 현 미
검 시	실무자	이 화 성
인학번호	054-856-1488	

2013년 02월 05일  
**(주) 글로벌허브**

GQP803-3(Rev.0)

(주)글로벌허브

A4(210x297)

㉔ 일당귀의 잔류 · 오염물질 및 지표성분 분석

### 검사시험성적서

경제명	당귀 (일)	의뢰번호	F13011001	원산지	한국산
의뢰자(단체)	한국검정분석연구원	의뢰일자	2013.01.10	의뢰량(g)	500 g
의뢰자주소	서울특별시 강남구 논현동 86-1 신한빌딩 7층				

▶ 의뢰하신 sample에 대한 시험결과는 다음과 같습니다.

검사항목	허용기준	시험결과	
잔류 농약	Et-C계열 (α,β,γ 및 δ-Et-C계열)	0.2 ppm 이하	적합 (N.D.)
	DDT계열 (DDE, DDE 및 DDT 계열)	0.1 ppm 이하	적합 (N.D.)
	Aldrin	0.01 ppm 이하	적합 (N.D.)
	Endrin	0.01 ppm 이하	적합 (N.D.)
	Dieldrin	0.01 ppm 이하	적합 (N.D.)
중금속	납(Pb)	5.0 ppm 이하	적합 (0.196 ppm)
	비소(As)	3.0 ppm 이하	적합 (0.093 ppm)
	카드뮴 (Cd)	0.3 ppm 이하	적합 (0.042 ppm)
	수은 (Hg)	0.2 ppm 이하	적합 (N.D.)
	잔류이산화황	30 ppm 이하	적합 (2.262 ppm)
아플라톡신 B1	10 ppb 이하	-	
벤조피렌	5 ppb 이하	-	
성상	대한약전	적합	
확인시험	대한약전	적합	
순도시험	대한약전	적합	
건조강령	-	-	
회분	6.0 % 이하	적합 (5.0 %)	
산불용성분	-	-	
용유용량	0.1 mL	적합 (0.1 mL)	
정량함량	0.0010 ~ 0.0015 (0.0010 이하) 또는 0.0015 ~ 0.0020 (0.0015 이하) 또는 0.0020 ~ 0.0025 (0.0020 이하) 또는 0.0025 ~ 0.0030 (0.0025 이하)	0.803 %	
엑스첨첨	몰락스	-	
	폴리메탄올락스	-	
	이탈락스	-	

▶ 본 검사는 식약청고시, 대한약전 및 대한약전의 생약규격서에 의거하여 시험하였으며, 상기의 결과는 귀사에서 제시한 Sample에 한하여 실험한 결과입니다.  
▶ 위 성적은 시험의뢰 목적 이외의 상품선전 및 기타 법적 요건이나 실험용으로 사용할 수 없습니다.

㉔판정결과 : **적합**

시험 결과	제명자 성명	시험일자	시험장 소재지
적합	이희성	2013.01.10	서울
전화번호		054-856-1488	

2013년 02월 05일  
**(주) 글로벌허브**

GQF803-3(Rev.0) (주)글로벌허브 A4(210x297)

(2) 2차년도

- 미네랄 함유 당귀의 효능 연구

(가) 당귀 추출물 제조 및 유효성분/생리활성 비교

① 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물 제조 및 유효성분 비교

㉔ 시험 목적

- 미네랄 처리 당귀의 유효성분 및 생리활성 평가를 위해 일당귀, 참당귀로부터 열수 및 유기용매 추출물을 조제하여 유효성분 및 생리활성을 비교하고자 함.

㉔ 시험 방법 및 재료

㉔ 당귀 추출물 제조

○ 1차년도의 결과 열수추출물 외에, 다양한 유기용매를 이용하여 추출물을 조제하였음.

- 무처리 당귀의 경우, 일당귀와 참당귀의 에탄올 추출물 및 열수 추출물을 각각 조제하였으며 이후 에탄올 추출물은 순차적 유기용매 분획을 통해 활성성분을 분획하였음. 사용용매는 hexane (H), ethylacetate (EA), butanol (B), 및 물 잔류물 (W)이며, 총 시료는 20종임.



그림 47. 실험에 사용된 당귀 에탄올 추출물 및 분획물 (20종)

㉔ 결과

㉕ 참당귀 및 일당귀 추출물의 분획 효율

추출물/분획물	추출 및 분획효율(%)			
	일당귀		참당귀	
	비처리*	처리	비처리	처리
EtOH ex.	4.30	2.24	10.21	7.53
H fr.	22.72	13.40	23.99	21.49
EA fr.	3.33	10.00	38.27	34.62
B fr.	10.10	38.22	5.97	5.66
W res.	62.08	35.36	25.77	33.89

표 1. 당귀별 미네랄 양액 처리에 따른 추출효율 및 분획 효율

- 일당귀, 참당귀 모두에서 미네랄 양액 처리 시 추출효율이 감소화하며, 분획효율의 변화도 나타났음. 이는 미네랄 양액 처리에 의해 당귀의 성분으로 변화가 나타남을 의미함. 그러나 이러한 차이가 재개환경의 차이에 기인한 차이가 아님을 배제할 수는 없음.

㉖ 참당귀 및 일당귀 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

● 일당귀 추출물

	무처리				처리			
	총 플라보노이드	총 폴리페놀	총당	환원당	총 플라보노이드	총 폴리페놀	총당	환원당
EtOH ex.	17.17±0.46	39.59±1.41	362.00±40.77	70.38±0.52	10.69±0.79	26.67±0.06	346.08±12.17	34.45±1.66
H fr.	4.14±0.10	15.65±0.43	76.29±1.22	18.89±0.26	7.40±0.10	68.68±9.81	66.83±6.82	32.85±1.83
EA fr.	47.69±1.45	112.74±0.98	194.72±11.44	73.47±1.40	35.43±2.90	96.17±0.37	126.56±0.24	83.04±1.75
B fr.	11.02±0.82	108.14±11.16	464.42±52.95	127.80±6.29	5.71±1.37	40.76±1.23	729.08±3.65	92.98±4.28
W res.	2.65±0.22	25.71±2.76	666.68±31.04	139.40±5.24	1.70±0.09	12.57±1.59	745.43±19.47	61.80±1.22

표 2. 일당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 성분 변화 (단위: mg/g)

- 미네랄 양액 무처리 경우 처리한 경우보다 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 높게 나타났음.
- 미네랄 양액을 처리하지 않은 경우 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 총 폴리페놀 함량이 높게 나타났으나, 미네랄 양액 처리 시에는 에틸아세테이트 분획과 헥센 분획에서 높은 함량을 나타내어 미네랄 양액 처리에 의해 상대적으로 지용성 폴리페놀 함량이 증가되었음을 알 수 있었음. 이러한 현상은 총 플라보노이드 함량 평가에서도 동일하게 나타났음.

● 참당귀 추출물

	무처리				처리			
	총 플라보노이드	총 폴리페놀	총당	환원당	총 플라보노이드	총 폴리페놀	총당	환원당
EtOH ex.	18.25±0.82	26.19±0.25	130.92±4.26	7.05±0.49	10.29±3.37	47.44±3.31	445.06±25.56	43.65±5.59
H fr.	8.07±0.80	11.19±0.49	13.01±6.09	4.96±0.23	7.00±0.77	17.65±2.76	68.09±21.91	7.56±0.40
EA fr.	29.33±1.28	44.23±1.23	35.38±3.65	5.51±0.30	26.74±1.37	29.36±0.06	18.60±10.35	7.33±0.61
B fr.	32.54±2.39	100.42±3.43	245.38±2.43	66.55±7.95	25.95±3.50	88.28±2.70	358.13±7.30	94.21±2.44
W res.	8.50±1.52	31.13±0.37	643.44±14.00	20.37±3.75	2.85±0.19	16.09±0.31	590.94±18.87	32.78±1.75

표 3. 참당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 성분 변화(단위: mg/g)

- 미네랄 양액 무처리 경우 처리한 경우보다 총 플라보노이드 함량이 높게 나타났으나, 상대적으로 총 폴리페놀, 총 당 및 환원당 함량은 미네랄 양액 처리 경우가 훨씬 높게 나타났음.
- 미네랄 양액 무처리 시 총 폴리페놀 함량은 부탄올 분획, 에틸아세테이트 분획, 물 잔류물의 순으로 높은 함량을 나타내었으나, 미네랄 양액 처리 시에는 부탄올 분획, 에틸아세테이



트 분획과 핵셴 분획 순으로 높은 함량을 나타내어 상대적으로 지용성 폴리페놀 함량이 증가되었음을 알 수 있었음. 이러한 현상은 총 플라보노이드 함량 평가에서도 동일하게 나타났음.

(나) 미네랄 양액 시비에 따른 약리성분 함량변화

㉔ 생육 단계별 미네랄 양액 처리에 따른 유효성분 증대 여부

- 재배단계에서 Ge-Se 양액 처리 당귀의 지상부 및 지하부의 유효 성분 (decursin 및 decursin angelate)의 함량 변화를 무처리구와 비교하고자 함.

㉕ 일당귀 사용재료

미네랄처리횟수	미네랄처리 농도	1차 처리			2차 처리			3차 처리			
		0주차	1주차	2주차	4주차	5주차	6주차	8주차	9주차	10주차	12주차
1회 처리군	무처리	a	1	16	31			66			91
	저농도	b	2	17	32			67			92
	중농도	c	3	18	33			68			93
	고농도	d	4	19	34			69			94
	초고농도	e	5	20	35			70			95
2회 처리군	무처리		6	21	36	46	56	71			96
	저농도		7	22	37	47	57	72			97
	중농도		8	23	38	48	58	73			98
	고농도		9	24	39	49	59	74			99
	초고농도		10	25	40	50	60	75			100
3회 처리군	무처리		11	26	41	51	61	76	81	86	101
	저농도		12	27	42	52	62	77	82	87	102
	중농도		13	28	43	53	63	78	83	88	103
	고농도		14	29	44	54	64	79	84	89	104
	초고농도		15	30	45	55	65	80	85	90	105

- 일당귀 시료: 총 105종

재배 단계 중 무처리, 저농도, 중농도, 고농도 및 초고농도 처리된 일당귀 시료로서 각각 1회 처리 (0 주차), 2회 처리 (4 주차) 및 3회 처리 (8 주차)된 시료임.

㉔ 참당귀 사용재료

		1차 처리			2차 처리			3차 처리			
미네랄처리횟수	미네랄 처리 농도	0 주차	1 주차	2 주차	4 주차	5 주차	6 주차	8 주차	9 주차	10 주차	12 주차
1회 처리군	무처리	a	1	16	31			66			91
	저농도	b	2	17	32			67			92
	중농도	c	3	18	33			68			93
	고농도	d	4	19	34			69			94
	초고농도	e	5	20	35			70			95
2회 처리군	무처리		6	21	36	46	56	71			96
	저농도		7	22	37	47	57	72			97
	중농도		8	23	38	48	58	73			98
	고농도		9	24	39	49	59	74			99
	초고농도		10	25	40	50	60	75			100
3회 처리군	무처리		11	26	41	51	61	76	81	86	101
	저농도		12	27	42	52	62	77	82	87	102
	중농도		13	28	43	53	63	78	83	88	103
	고농도		14	29	44	54	64	79	84	89	104
	초고농도		15	30	45	55	65	80	85	90	105

- 참당귀 시료: 총 105종

재배 단계 중 무처리, 저농도, 중농도, 고농도 및 초고농도 처리된 일당귀 시료로서 각각 1회 처리 (0 주차), 2회 처리 (4 주차) 및 3회 처리 (8 주차)된 시료임.

- 총 210종 중 decursin 분석에 사용된 시료는 (전체 134종의 시료)

- 일당귀 시료 지상부 : 52종
- 일당귀 시료 지하부 : 40종
- 참당귀 시료 지상부 : 24종
- 참당귀 시료 지하부 : 18종

- 나머지 시료의 경우, 당귀의 mineral 성분 변화 분석을 위해 질산-염산 분해를 통해 사용되어, HPLC 분석기로 부적당함 (실제 실험에 사용할 만큼의 지하부가 나타나는 경우는 5주 재배 이 후에 가능함. 그 이전에는 지하부 뿌리의 크기가 너무 작아 실험에 사용할 충분한 양이 되지 못함: 이미 지하부를 미네랄 분석에 사용하여 현재의 decursin 분석에는 사용하지 못함).

- 또한 당귀의 경우 저장성이 낮은 약용작물로, 저온 저장 중에도 시료의 손상이 나타났다. 따라서 6개월 ~ 10개월의 저온 저장 중, 비교적 상태적 양호한 시료를 HPLC 분석에 사용하였음.

○ decursin 정량

- 당귀의 decursin 함량 분석을 위해 지상부, 지하부로 구분하여 음건 후, 건조중량의 10배의 methanol을 가하고, 4일간 상온에서 추출한 후, 추출물을 0.2 μm PFTE filter syringe로 여과 하고 HPLC system으로 분석하였음.
- 실험에 이용된 HPLC 분석은 Shimadzu SCL-10A system controller와, Shimadzu LC-10AD Liquid chromatograph pump 및 Shimadzu SPA-10A UV-Vis detector로 구성된 시스템을 사용하였으며, 자세한 분석 조건은 다음과 같음.

- HPLC-UV Analysis
- Detector : UV detector (330 nm)
- Column temp. : RT (~25C)
- Solvent : 75% acetonitrile
- Flow : 0.5ml/min
- Column : C18 (Agilent)
- Injection volume : 20ul

- 실험에 사용한 decursin은 기존의 보고에 따라 정제된 표준품 decursin을 사용하였다. decursin은 상기 조건에서 11.5분의 retention time을 나타내었으며, 표준 검량곡선은 다음과 같음.

- $Y = 50766.7 X + 1304$
- $X = (Y / 50766.7 - 1304) (R^2 = 0.9999755483)$
- where X: decursin 농도 (μg/ml), Y: Area in HPLC analysis

- 실험결과

○ 각각의 당귀시료의 음건 및 추출

- 각각 당귀 시료는 흐르는 물로 잘 씻어 이물질을 제거한 후, 세절하여 음지에서 일주일 간 건조하였음. 이 후 80도의 건조기로 옮겨 2일간 추가 건조하여 수분함량이 최소화 되도록 함량 건조하였음.
- 먼저 일당귀의 각각 시료의 추출효율은 사용부위 (지하부)의 굵기 및 형태에 따라 차이가 있었으며, 지상부의 평균 추출효율은  $17.76 \pm 6.12\%$ , 지하부의 평균 추출효율은  $11.187 \pm 3.94\%$ 로 나타났다. 추출효율의 일부 결과는 다음의 표에 예시로 나타내었음.

일당 당귀	부위	용기 무게	추출시 료무게 (g)	용기+ 당귀	추출물무게- MeOH의양(g)	E-tube 무게	건조후E- tube	고형분량 (g)	총고형분 량(g)	추출효율(%)
20	지상	19.19	0.49	19.68	15.4	1.11143	1.11542	0.00399	0.0798	16.28571
33	지상	19.24	0.55	19.79	15.4	1.1132	1.11757	0.00437	0.0874	15.89091
34	지상	18.84	0.48	19.32	15.4	1.11352	1.1156	0.00208	0.0416	8.666667
35	지상	19.41	0.5	19.91	15.4	1.11611	1.12026	0.00415	0.083	16.6
39	지상	19.25	0.53	19.78	15.4	1.11697	1.12019	0.00322	0.0644	12.15094
40	지상	19.26	0.47	19.73	15.4	1.11196	1.11895	0.00699	0.1398	29.74468
42	지상	19.26	0.48	19.74	15.4	1.10892	1.1156	0.00668	0.1336	27.83333
43	지상	19.4	0.41	19.81	15.4	1.11062	1.11288	0.00226	0.0452	11.02439
44	지상	19.4	0.43	19.83	15.4	1.11949	1.12336	0.00387	0.0774	18
45	지상	19.28	0.44	19.72	15.4	1.111	1.11377	0.00277	0.0554	12.59091
46	지상	19.11	0.52	19.63	15.4	1.11409	1.12191	0.00782	0.1564	30.07692
47	지상	19.37	0.51	19.88	15.4	1.11135	1.11707	0.00572	0.1144	22.43137
48	지상	19.34	0.5	19.84	15.4	1.11164	1.11551	0.00387	0.0774	15.48
49	지상	19.19	0.44	19.63	15.4	1.11154	1.11591	0.00437	0.0874	19.86364
50	지상	19.48	0.52	20	15.4	1.11184	1.11751	0.00567	0.1134	21.80769
52	지상	19.44	0.49	19.93	15.4	1.11211	1.11644	0.00433	0.0866	17.67347
53	지상	19.34	0.45	19.79	15.4	1.11619	1.11847	0.00228	0.0456	10.13333
54	지상	19.26	0.45	19.71	15.4	1.11534	1.1197	0.00436	0.0872	19.37778
55	지상	19.43	0.44	19.87	15.4	1.1107	1.11677	0.00607	0.1214	27.59091
56	지상	19.17	0.54	19.71	15.4	1.11608	1.12173	0.00565	0.113	20.92593
57	지상	19.4	0.43	19.83	15.4	1.11176	1.11775	0.00599	0.1198	27.86047
58	지상	19.06	0.49	19.55	15.4	1.11379	1.11696	0.00317	0.0634	12.93878
59	지상	18.89	0.44	19.33	15.4	1.11663	1.11877	0.00214	0.0428	9.727273
60	지상	19.04	0.45	19.49	15.4	1.11165	1.11448	0.00283	0.0566	12.57778
61	지상	18.98	0.58	19.56	15.4	1.11316	1.11492	0.00176	0.0352	6.068966
62	지상	19.43	0.48	19.91	15.4	1.11549	1.11792	0.00243	0.0486	10.125
63	지상	18.89	0.44	19.33	15.4	1.11655	1.11933	0.00278	0.0556	12.63636
64	지상	19.29	0.53	19.82	15.4	1.11335	1.11794	0.00459	0.0918	17.32075
65	지상	18.83	0.42	19.25	15.4	1.11692	1.119	0.00208	0.0416	9.904762
66	지상	19.26	0.47	19.73	15.4	1.11595	1.11966	0.00371	0.0742	15.78723
67	지상	18.95	0.47	19.42	15.4	1.11532	1.11898	0.00366	0.0732	15.57447
68	지상	19.44	0.5	19.94	15.4	1.11397	1.11982	0.00585	0.117	23.4
69	지상	19.21	0.5	19.71	15.4	1.03214	1.03447	0.00233	0.0466	9.32
70	지상	19.34	0.52	19.86	15.4	1.11371	1.11953	0.00582	0.1164	22.38462

71	지상	19.42	0.52	19.94	15.4	1.10888	1.11366	0.00478	0.0956	18.38462
72	지상	19.49	0.46	19.95	15.4	1.03559	1.04187	0.00628	0.1256	27.30435
73	지상	19.25	0.48	19.73	15.4	1.11553	1.12073	0.0052	0.104	21.66667
74	지상	19.18	0.53	19.71	15.4	1.11595	1.12054	0.00459	0.0918	17.32075
75	지상	19.19	0.48	19.67	15.4	1.11296	1.11712	0.00416	0.0832	17.33333
76	지상	18.9	0.5	19.4	15.4	1.11377	1.11592	0.00215	0.043	8.6
77	지상	19.24	0.56	19.8	15.4	1.11183	1.11774	0.00591	0.1182	21.10714
78	지상	19.32	0.49	19.81	15.4	1.11497	1.11998	0.00501	0.1002	20.44898
79	지상	19.22	0.48	19.7	15.4	1.11171	1.11643	0.00472	0.0944	19.66667
80	지상	19.4	0.47	19.87	15.4	1.11116	1.11609	0.00493	0.0986	20.97872
81	지상	18.89	0.39	19.28	15.4	1.11587	1.11996	0.00409	0.0818	20.97436
82	지상	19.05	0.46	19.51	15.4	1.10917	1.11476	0.00559	0.1118	24.30435
83	지상	19.38	0.48	19.86	15.4	1.11699	1.12306	0.00607	0.1214	25.29167
84	지상	18.96	0.46	19.42	15.4	1.11358	1.1157	0.00212	0.0424	9.217391
85	지상	19.34	0.43	19.77	15.4	1.11327	1.11793	0.00466	0.0932	21.67442
86	지상	19.31	0.44	19.75	15.4	1.11378	1.11801	0.00423	0.0846	19.22727
87	지상	19.27	0.45	19.72	15.4	1.11488	1.12011	0.00523	0.1046	23.24444
88	지상	18.85	0.52	19.37	15.4	1.10872	1.11187	0.00315	0.063	12.11538
90	지상	19.39	0.52	19.91	15.4	1.11551	1.11879	0.00328	0.0656	12.61538

일당귀	부위	용기 무게	추출시료무게(g)	용기+당귀	추출물무게-MeOH의양(g)	E-tube 무게	건조후 E-tube	고형분량(g)	총고형분량(g)	추출효율(%)
35	지하	19.27	0.54	19.81	7.7	1.11369	1.12145	0.00776	0.0776	14.37037
54	지하	19.32	0.49	19.81	7.7	1.11593	1.12161	0.00568	0.0568	11.59184
57	지하	19.23	0.49	19.72	7.7	1.11186	1.12016	0.0083	0.083	16.93878
60	지하	19.36	0.47	19.83	7.7	1.11513	1.12271	0.00758	0.0758	16.12766
61	지하	19.34	0.48	19.82	7.7	1.11309	1.12021	0.00712	0.0712	14.83333
62	지하	19.36	0.46	19.82	7.7	1.10844	1.11241	0.00397	0.0397	8.630435
64	지하	19.27	0.45	19.72	7.7	1.11918	1.1251	0.00592	0.0592	13.15556
66	지하	19.4	0.5	19.9	7.7	1.11141	1.11816	0.00675	0.0675	13.5
67	지하	19.26	0.47	19.73	7.7	1.02824	1.03515	0.00691	0.0691	14.70213
68	지하	19.29	0.46	19.75	7.7	1.11357	1.11757	0.004	0.04	8.695652
69	지하	19.39	0.47	19.86	7.7	1.11416	1.11995	0.00579	0.0579	12.31915
70	지하	19.3	0.49	19.79	7.7	1.10941	1.11187	0.00246	0.0246	5.020408
71	지하	19.3	0.49	19.79	7.7	1.03907	1.04491	0.00584	0.0584	11.91837
72	지하	19.34	0.5	19.84	7.7	1.11363	1.12048	0.00685	0.0685	13.7

73	지하	19.15	0.46	19.61	7.7	1.1126	1.1162	0.0036	0.036	7.826087
74	지하	19.42	0.52	19.94	7.7	1.11707	1.1206	0.00353	0.0353	6.788462
75	지하	19.34	0.55	19.89	7.7	1.11154	1.11468	0.00314	0.0314	5.709091
76	지하	19.22	0.51	19.73	7.7	1.11405	1.1222	0.00815	0.0815	15.98039
77	지하	19.48	0.48	19.96	7.7	1.11204	1.11444	0.0024	0.024	5
78	지하	19.33	0.5	19.83	7.7	1.11441	1.1186	0.00419	0.0419	8.38
79	지하	19.38	0.53	19.91	7.7	1.11209	1.11666	0.00457	0.0457	8.622642
80	지하	19.31	0.48	19.79	7.7	1.11135	1.11318	0.00183	0.0183	3.8125
81	지하	19.31	0.46	19.77	7.7	1.11386	1.12292	0.00906	0.0906	19.69565
82	지하	19.22	0.52	19.74	7.7	1.11149	1.11965	0.00816	0.0816	15.69231
83	지하	19.39	0.45	19.84	7.7	1.1116	1.11697	0.00537	0.0537	11.93333
84	지하	19.43	0.54	19.97	7.7	1.1174	1.12075	0.00335	0.0335	6.203704
85	지하	19.22	0.53	19.75	7.7	1.11302	1.11958	0.00656	0.0656	12.37736
86	지하	19.37	0.51	19.88	7.7	1.11008	1.11607	0.00599	0.0599	11.7451
87	지하	19.37	0.51	19.88	7.7	1.11129	1.11674	0.00545	0.0545	10.68627
88	지하	19.22	0.61	19.83	7.7	1.11262	1.1176	0.00498	0.0498	8.163934
90	지하	19.34	0.49	19.83	7.7	1.11129	1.1172	0.00591	0.0591	12.06122

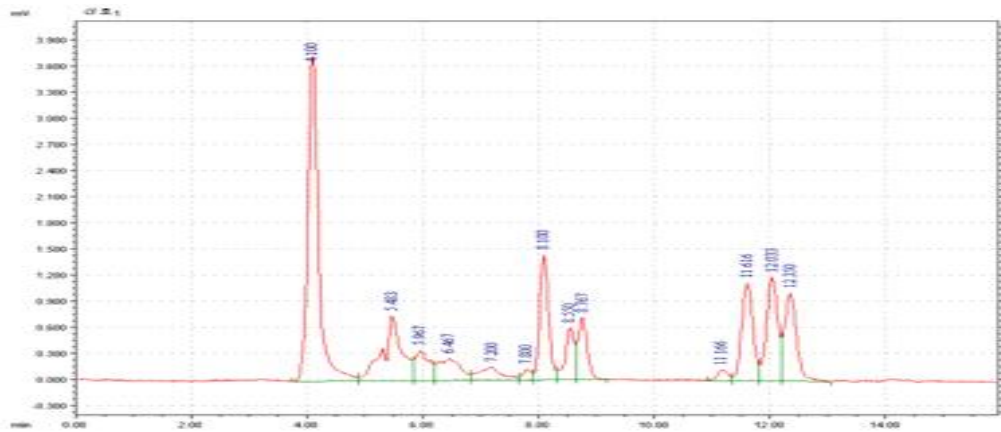
- 한편 참당귀의 각각 시료의 추출효율은 사용부위 (지하부)의 굵기 및 형태에 따라 차이가 있었으며, 지상부의 평균 추출효율은 20.8 ± 3.4%, 지하부의 평균 추출효율은 13.7 ± 3.8%로 나타났음. 추출효율 일부 결과는 다음의 표에 예시로 나타냄.

참당귀	부위	용기 무게 (g)	추출시료 무게 (g)	용기+당귀 (G)	추출물무게- MeOH의양(g)	E-tube 무게(g)	건조후 (g)	고형분량(g)	총 고형분량 (g)	추출효율(%)
37	지상	19	0.5	19.5	15.4	1.1161	1.12257	0.00647	0.1294	25.9
41	지상	18.83	0.46	19.29	15.4	1.11142	1.11677	0.00535	0.107	23.3
46	지상	18.98	0.45	19.43	15.4	1.10981	1.11559	0.00578	0.1156	25.7
47	지상	18.86	0.44	19.3	15.4	1.11433	1.11857	0.00424	0.0848	19.3
48	지상	19.02	0.48	19.5	15.4	1.11508	1.1202	0.00512	0.1024	21.3
49	지상	18.85	0.45	19.3	15.4	1.1158	1.11982	0.00402	0.0804	17.9
51	지상	19.07	0.53	19.6	15.4	1.11543	1.11925	0.00382	0.0764	14.4
52	지상	18.86	0.44	19.3	15.4	1.10916	1.11367	0.00451	0.0902	20.5
54	지상	18.88	0.42	19.3	15.4	1.11181	1.11502	0.00321	0.0642	15.3
56	지상	19.01	0.39	19.4	15.4	1.11376	1.11821	0.00445	0.089	22.8
57	지상	18.91	0.53	19.44	15.4	1.10932	1.11337	0.00405	0.081	15.3
58	지상	19.05	0.5	19.55	15.4	1.10914	1.11428	0.00514	0.1028	20.6
59	지상	18.92	0.46	19.38	15.4	1.11166	1.11806	0.0064	0.128	27.8
60	지상	18.93	0.51	19.44	15.4	1.11444	1.1209	0.00646	0.1292	25.3
61	지상	19	0.49	19.49	15.4	1.11589	1.1205	0.00461	0.0922	18.8
62	지상	18.98	0.51	19.49	15.4	1.11464	1.12034	0.0057	0.114	22.4

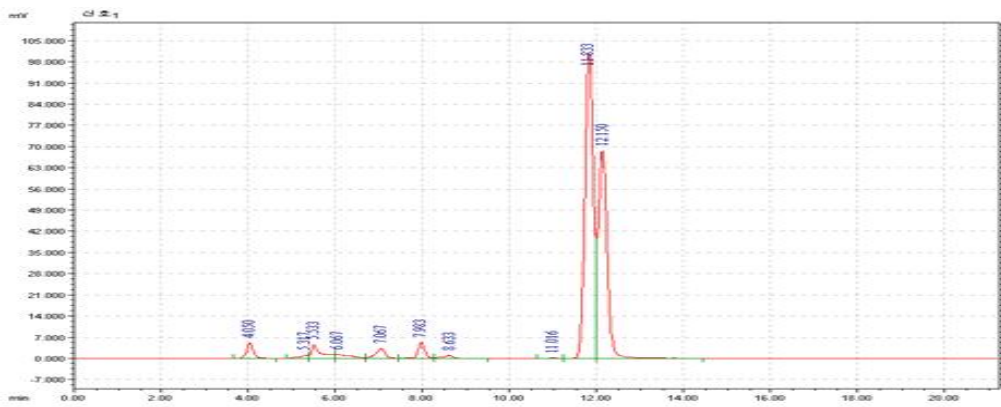


64	지상	18.92	0.49	19.41	15.4	1.11108	1.11632	0.00524	0.1048	21.4
65	지상	19.05	0.42	19.47	15.4	1.1162	1.12037	0.00417	0.0834	19.9
76	지상	18.95	0.46	19.41	15.4	1.11384	1.11775	0.00391	0.0782	17.0
81	지상	19.01	0.49	19.5	15.4	1.11358	1.11887	0.00529	0.1058	21.6
82	지상	18.78	0.52	19.3	15.4	1.1151	1.11984	0.00474	0.0948	18.2
83	지상	18.95	0.46	19.41	15.4	1.11178	1.11635	0.00457	0.0914	19.9
85	지상	18.96	0.41	19.37	15.4	1.10901	1.11326	0.00425	0.085	20.7
86	지상	19.06	0.41	19.47	15.4	1.11397	1.11887	0.0049	0.098	23.9
90	지상	18.88	0.46	19.34	15.4	1.11322	1.11812	0.0049	0.098	21.3
62	지하	19.37	0.44	19.81	7.7	1.10915	1.11484	0.00569	0.0569	12.9
76	지하	19.17	0.42	19.59	7.7	1.114	1.12135	0.00735	0.0735	17.5
81	지하	19.33	0.49	19.82	7.7	1.11428	1.12296	0.00868	0.0868	17.7
82	지하	19.24	0.5	19.74	7.7	1.11395	1.1186	0.00465	0.0465	9.3
83	지하	18.86	0.44	19.3	7.7	1.11374	1.1173	0.00356	0.0356	8.1
85	지하	19.44	0.48	19.92	7.7	1.11122	1.11868	0.00746	0.0746	15.5
90	지하	19.18	0.37	19.55	7.7	1.11352	1.11906	0.00554	0.0554	15.0

- HPLC 분석



일당귀 지하부 methanol 추출물의 HPLC 분석

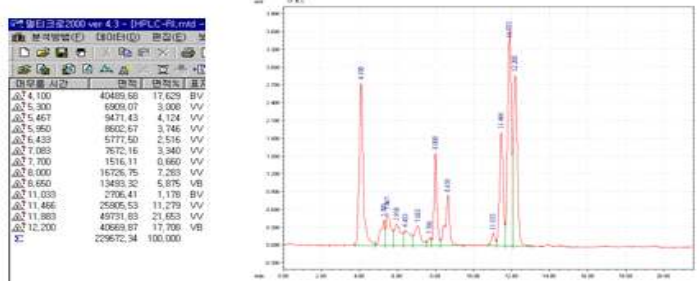
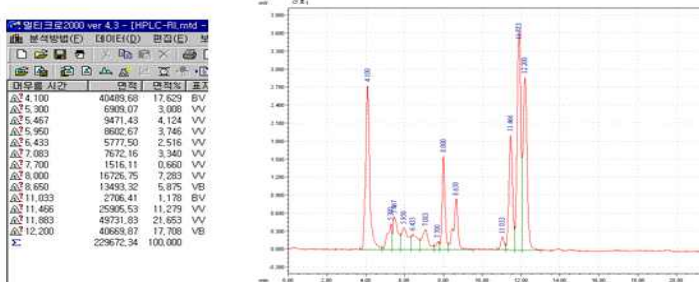
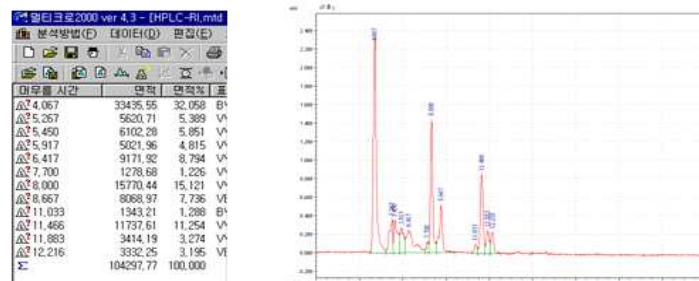
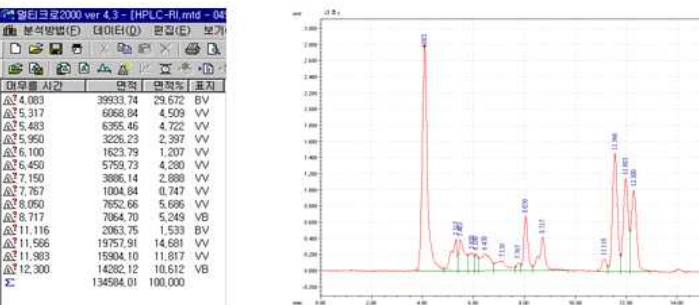
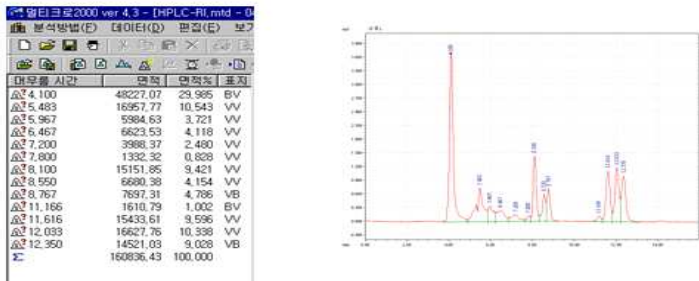


참당귀 지하부 methanol 추출물의 HPLC 분석

- 일당귀의 경우 UV 330 nm에서 검출되는 성분이 참당귀보다 다양하며, 또한 극성 차이도

다양한 성분을 가지고 있음을 알 수 있다. 그러나 decursin의 경우, 전체적으로 참당귀의 경우가 일당귀보다 높은 함량을 나타냄.

○ 일당귀의 지하부 분석 결과

 <table border="1" data-bbox="183 481 406 672"> <thead> <tr> <th>대수</th> <th>시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ</td><td>4.100</td><td>40489.68</td><td>17.629</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.300</td><td>6908.07</td><td>3.008</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.467</td><td>9471.43</td><td>4.124</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.960</td><td>8902.67</td><td>3.746</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.433</td><td>5777.50</td><td>2.516</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.083</td><td>7672.16</td><td>3.340</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.700</td><td>1516.11</td><td>0.660</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.000</td><td>16726.75</td><td>7.283</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.850</td><td>13493.32</td><td>5.876</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.033</td><td>2706.41</td><td>1.178</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.466</td><td>25305.53</td><td>11.279</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.883</td><td>49791.83</td><td>21.653</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.200</td><td>40668.87</td><td>17.708</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td></td><td>229672.34</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대수	시간	면적	면적%	표지	Δ	4.100	40489.68	17.629	BV	Δ	5.300	6908.07	3.008	VV	Δ	5.467	9471.43	4.124	VV	Δ	5.960	8902.67	3.746	VV	Δ	6.433	5777.50	2.516	VV	Δ	7.083	7672.16	3.340	VV	Δ	7.700	1516.11	0.660	VV	Δ	8.000	16726.75	7.283	VV	Δ	8.850	13493.32	5.876	VB	Δ	11.033	2706.41	1.178	BV	Δ	11.466	25305.53	11.279	VV	Δ	11.883	49791.83	21.653	VV	Δ	12.200	40668.87	17.708	VB	Σ		229672.34	100.000		<p>일당귀 : 무처리</p>					
대수	시간	면적	면적%	표지																																																																													
Δ	4.100	40489.68	17.629	BV																																																																													
Δ	5.300	6908.07	3.008	VV																																																																													
Δ	5.467	9471.43	4.124	VV																																																																													
Δ	5.960	8902.67	3.746	VV																																																																													
Δ	6.433	5777.50	2.516	VV																																																																													
Δ	7.083	7672.16	3.340	VV																																																																													
Δ	7.700	1516.11	0.660	VV																																																																													
Δ	8.000	16726.75	7.283	VV																																																																													
Δ	8.850	13493.32	5.876	VB																																																																													
Δ	11.033	2706.41	1.178	BV																																																																													
Δ	11.466	25305.53	11.279	VV																																																																													
Δ	11.883	49791.83	21.653	VV																																																																													
Δ	12.200	40668.87	17.708	VB																																																																													
Σ		229672.34	100.000																																																																														
 <table border="1" data-bbox="183 761 406 996"> <thead> <tr> <th>대수</th> <th>시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ</td><td>4.100</td><td>40489.68</td><td>17.629</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.300</td><td>6908.07</td><td>3.008</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.467</td><td>9471.43</td><td>4.124</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.960</td><td>8902.67</td><td>3.746</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.433</td><td>5777.50</td><td>2.516</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.083</td><td>7672.16</td><td>3.340</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.700</td><td>1516.11</td><td>0.660</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.000</td><td>16726.75</td><td>7.283</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.850</td><td>13493.32</td><td>5.876</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.033</td><td>2706.41</td><td>1.178</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.466</td><td>25305.53</td><td>11.279</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.883</td><td>49791.83</td><td>21.653</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.200</td><td>40668.87</td><td>17.708</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td></td><td>229672.34</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대수	시간	면적	면적%	표지	Δ	4.100	40489.68	17.629	BV	Δ	5.300	6908.07	3.008	VV	Δ	5.467	9471.43	4.124	VV	Δ	5.960	8902.67	3.746	VV	Δ	6.433	5777.50	2.516	VV	Δ	7.083	7672.16	3.340	VV	Δ	7.700	1516.11	0.660	VV	Δ	8.000	16726.75	7.283	VV	Δ	8.850	13493.32	5.876	VB	Δ	11.033	2706.41	1.178	BV	Δ	11.466	25305.53	11.279	VV	Δ	11.883	49791.83	21.653	VV	Δ	12.200	40668.87	17.708	VB	Σ		229672.34	100.000		<p>일당귀 : 저농도 처리</p>					
대수	시간	면적	면적%	표지																																																																													
Δ	4.100	40489.68	17.629	BV																																																																													
Δ	5.300	6908.07	3.008	VV																																																																													
Δ	5.467	9471.43	4.124	VV																																																																													
Δ	5.960	8902.67	3.746	VV																																																																													
Δ	6.433	5777.50	2.516	VV																																																																													
Δ	7.083	7672.16	3.340	VV																																																																													
Δ	7.700	1516.11	0.660	VV																																																																													
Δ	8.000	16726.75	7.283	VV																																																																													
Δ	8.850	13493.32	5.876	VB																																																																													
Δ	11.033	2706.41	1.178	BV																																																																													
Δ	11.466	25305.53	11.279	VV																																																																													
Δ	11.883	49791.83	21.653	VV																																																																													
Δ	12.200	40668.87	17.708	VB																																																																													
Σ		229672.34	100.000																																																																														
 <table border="1" data-bbox="183 1086 406 1332"> <thead> <tr> <th>대수</th> <th>시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ</td><td>4.067</td><td>33435.55</td><td>32.058</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.267</td><td>5620.71</td><td>5.389</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.450</td><td>6102.28</td><td>5.851</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.917</td><td>5021.96</td><td>4.815</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.417</td><td>9171.92</td><td>8.794</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.700</td><td>1278.68</td><td>1.226</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.000</td><td>15720.44</td><td>15.121</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.667</td><td>8068.97</td><td>7.736</td><td>VE</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.033</td><td>1343.21</td><td>1.288</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.466</td><td>11737.61</td><td>11.254</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.883</td><td>3414.19</td><td>3.274</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.216</td><td>3332.25</td><td>3.195</td><td>VE</td></tr> <tr><td>Σ</td><td></td><td>104297.77</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대수	시간	면적	면적%	표지	Δ	4.067	33435.55	32.058	BV	Δ	5.267	5620.71	5.389	VV	Δ	5.450	6102.28	5.851	VV	Δ	5.917	5021.96	4.815	VV	Δ	6.417	9171.92	8.794	VV	Δ	7.700	1278.68	1.226	VV	Δ	8.000	15720.44	15.121	VV	Δ	8.667	8068.97	7.736	VE	Δ	11.033	1343.21	1.288	BV	Δ	11.466	11737.61	11.254	VV	Δ	11.883	3414.19	3.274	VV	Δ	12.216	3332.25	3.195	VE	Σ		104297.77	100.000		<p>일당귀 : 중농도 처리</p>										
대수	시간	면적	면적%	표지																																																																													
Δ	4.067	33435.55	32.058	BV																																																																													
Δ	5.267	5620.71	5.389	VV																																																																													
Δ	5.450	6102.28	5.851	VV																																																																													
Δ	5.917	5021.96	4.815	VV																																																																													
Δ	6.417	9171.92	8.794	VV																																																																													
Δ	7.700	1278.68	1.226	VV																																																																													
Δ	8.000	15720.44	15.121	VV																																																																													
Δ	8.667	8068.97	7.736	VE																																																																													
Δ	11.033	1343.21	1.288	BV																																																																													
Δ	11.466	11737.61	11.254	VV																																																																													
Δ	11.883	3414.19	3.274	VV																																																																													
Δ	12.216	3332.25	3.195	VE																																																																													
Σ		104297.77	100.000																																																																														
 <table border="1" data-bbox="183 1411 406 1680"> <thead> <tr> <th>대수</th> <th>시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ</td><td>4.083</td><td>39933.74</td><td>29.672</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.317</td><td>6068.84</td><td>4.509</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.483</td><td>6395.46</td><td>4.722</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.950</td><td>3226.23</td><td>2.397</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.100</td><td>1823.79</td><td>1.307</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.450</td><td>5753.73</td><td>4.200</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.150</td><td>3886.14</td><td>2.888</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.767</td><td>1004.84</td><td>0.747</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.050</td><td>7852.66</td><td>5.696</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.717</td><td>7064.70</td><td>5.249</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.116</td><td>2063.75</td><td>1.533</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.586</td><td>19757.91</td><td>14.681</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.983</td><td>15904.10</td><td>11.817</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.300</td><td>14282.12</td><td>10.612</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td></td><td>134584.01</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대수	시간	면적	면적%	표지	Δ	4.083	39933.74	29.672	BV	Δ	5.317	6068.84	4.509	VV	Δ	5.483	6395.46	4.722	VV	Δ	5.950	3226.23	2.397	VV	Δ	6.100	1823.79	1.307	VV	Δ	6.450	5753.73	4.200	VV	Δ	7.150	3886.14	2.888	VV	Δ	7.767	1004.84	0.747	VV	Δ	8.050	7852.66	5.696	VV	Δ	8.717	7064.70	5.249	VB	Δ	11.116	2063.75	1.533	BV	Δ	11.586	19757.91	14.681	VV	Δ	11.983	15904.10	11.817	VV	Δ	12.300	14282.12	10.612	VB	Σ		134584.01	100.000		<p>일당귀 : 고농도 처리</p>
대수	시간	면적	면적%	표지																																																																													
Δ	4.083	39933.74	29.672	BV																																																																													
Δ	5.317	6068.84	4.509	VV																																																																													
Δ	5.483	6395.46	4.722	VV																																																																													
Δ	5.950	3226.23	2.397	VV																																																																													
Δ	6.100	1823.79	1.307	VV																																																																													
Δ	6.450	5753.73	4.200	VV																																																																													
Δ	7.150	3886.14	2.888	VV																																																																													
Δ	7.767	1004.84	0.747	VV																																																																													
Δ	8.050	7852.66	5.696	VV																																																																													
Δ	8.717	7064.70	5.249	VB																																																																													
Δ	11.116	2063.75	1.533	BV																																																																													
Δ	11.586	19757.91	14.681	VV																																																																													
Δ	11.983	15904.10	11.817	VV																																																																													
Δ	12.300	14282.12	10.612	VB																																																																													
Σ		134584.01	100.000																																																																														
 <table border="1" data-bbox="183 1758 406 2027"> <thead> <tr> <th>대수</th> <th>시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ</td><td>4.100</td><td>48227.07</td><td>29.985</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.483</td><td>16957.77</td><td>10.543</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>5.967</td><td>5984.63</td><td>3.721</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>6.467</td><td>6623.53</td><td>4.118</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.200</td><td>3988.37</td><td>2.480</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>7.800</td><td>1332.32</td><td>0.828</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.100</td><td>15151.95</td><td>9.421</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.550</td><td>5680.38</td><td>3.454</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>8.767</td><td>7697.31</td><td>4.786</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.166</td><td>1610.79</td><td>1.002</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>11.616</td><td>15433.61</td><td>9.596</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.033</td><td>16627.75</td><td>10.398</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ</td><td>12.950</td><td>14521.03</td><td>9.028</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td></td><td>160836.43</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대수	시간	면적	면적%	표지	Δ	4.100	48227.07	29.985	BV	Δ	5.483	16957.77	10.543	VV	Δ	5.967	5984.63	3.721	VV	Δ	6.467	6623.53	4.118	VV	Δ	7.200	3988.37	2.480	VV	Δ	7.800	1332.32	0.828	VV	Δ	8.100	15151.95	9.421	VV	Δ	8.550	5680.38	3.454	VV	Δ	8.767	7697.31	4.786	VB	Δ	11.166	1610.79	1.002	BV	Δ	11.616	15433.61	9.596	VV	Δ	12.033	16627.75	10.398	VV	Δ	12.950	14521.03	9.028	VB	Σ		160836.43	100.000		<p>일당귀 : 초고농도 처리</p>					
대수	시간	면적	면적%	표지																																																																													
Δ	4.100	48227.07	29.985	BV																																																																													
Δ	5.483	16957.77	10.543	VV																																																																													
Δ	5.967	5984.63	3.721	VV																																																																													
Δ	6.467	6623.53	4.118	VV																																																																													
Δ	7.200	3988.37	2.480	VV																																																																													
Δ	7.800	1332.32	0.828	VV																																																																													
Δ	8.100	15151.95	9.421	VV																																																																													
Δ	8.550	5680.38	3.454	VV																																																																													
Δ	8.767	7697.31	4.786	VB																																																																													
Δ	11.166	1610.79	1.002	BV																																																																													
Δ	11.616	15433.61	9.596	VV																																																																													
Δ	12.033	16627.75	10.398	VV																																																																													
Δ	12.950	14521.03	9.028	VB																																																																													
Σ		160836.43	100.000																																																																														

· 일당귀 지하부의 decursin 함량

No.	사용 부위	Decursin	
		mg/g-MeOH ex.	mg/g-당귀
35	지하	0.09	0.01
54	지하	0.00	0.00
57	지하	0.20	0.03
60	지하	0.33	0.05
61	지하	0.53	0.08
62	지하	0.23	0.02
64	지하	3.82	0.50
66	지하	0.22	0.03
67	지하	0.18	0.03
68	지하	0.29	0.03
69	지하	0.19	0.02
70	지하	0.45	0.02
71	지하	0.20	0.02
72	지하	0.16	0.02
73	지하	0.32	0.03
74	지하	1.24	0.08
75	지하	0.28	0.02
76	지하	0.40	0.06
77	지하	0.51	0.03
78	지하	0.37	0.03
79	지하	0.23	0.02
80	지하	0.81	0.03
81	지하	0.85	0.17
82	지하	0.22	0.03
83	지하	0.44	0.05
84	지하	0.17	0.01
85	지하	0.20	0.02
86	지하	0.07	0.01
87	지하	23.10	2.47
88	지하	0.29	0.02
90	지하	1.57	0.19
91	지하	9.54	0.46
92	지하	1.40	0.06
93	지하	2.61	0.11
94	지하	16.98	0.68
97	지하	0.42	0.02
98	지하	3.01	0.22
99	지하	2.88	0.14
100	지하	3.35	0.08
102	지하	34.61	1.73
104	지하	2.78	0.12

· 일당귀 지하부의 decursin 및 decursin angelate 함량

No.	사용 부위	Decursin+ decursin angelate	
		mg/g-MeOH ex.	mg/g-당귀
35	지하	7.79	1.12
54	지하	0.00	0.00
57	지하	19.30	3.27
60	지하	8.02	1.29
61	지하	27.75	4.12
62	지하	11.56	1.00
64	지하	51.53	6.78
66	지하	6.38	0.86
67	지하	1.66	0.24
68	지하	7.65	0.67
69	지하	36.21	4.46
70	지하	2.58	0.13
71	지하	3.84	0.46
72	지하	2.22	0.30
73	지하	5.85	0.46
74	지하	38.82	2.64
75	지하	3.62	0.21
76	지하	2.31	0.37
77	지하	22.40	1.12
78	지하	50.14	4.20
79	지하	4.90	0.42
80	지하	5.19	0.20
81	지하	11.00	2.17
82	지하	12.63	1.98
83	지하	15.04	1.79
84	지하	3.02	0.19
85	지하	23.27	2.88
86	지하	11.70	1.37
87	지하	68.43	7.31
88	지하	2.36	0.19
90	지하	5.45	0.66
91	지하	17.29	0.83
92	지하	2.61	0.11
93	지하	3.64	0.16
94	지하	18.02	0.72
97	지하	0.82	0.04
98	지하	3.22	0.24
99	지하	5.43	0.27
100	지하	4.24	0.10
102	지하	44.79	2.23
104	지하	5.80	0.26

- 무처리 일당귀의 지하부의 경우, 8주차 재배시 평균 decursin 함량은  $0.04 \pm 0.021$  mg/g-당귀로 나타남. 한편, 양액처리 일당귀의 경우, 1회 처리 8주차 재배의 경우 평균 0.02

$\pm 0.00185$  mg/g-당귀의 decursin이 검출되고 있으며, 2회 처리 8주차의 경우 평균  $0.04 \pm 0.0317$  mg/g-당귀의 decursin이 검출되어 양액 처리에 따라 무처리 군보다 decursin 함량의 증가 변화는 거의 없는 것으로 나타남.

- 각각 1회, 2회 및 3회 처리된 12주차 일당귀의 경우 무처리의 경우 평균  $0.46 \pm 0.18$  mg/g-당귀의 decursin이 검출되고 있으나, 미네랄 양액 처리시에는  $0.12 \sim 0.92$  mg/g-당귀의 decursin 이 검출되려 미네랄 양액 처리에 따른 함량 증가가 나타나는 것으로 이해됨.

· 12주차 시료의 decursin 함량 (mg/g-당귀)

· 무처리:  $0.46 \pm 0.181$

· 1회 처리:  $0.29 \pm 0.344$

· 2회 처리:  $0.12 \pm 0.087$

· 3회 처리:  $0.92 \pm 1.13$

- 그러므로 기존의 total polyphenol, total flavonoid, 항산화 활성 등의 결과와 종합하면, 미네랄 양액 처리에 의해 당귀의 대사가 변화되고, 성분의 변화가 나타나는 것으로 추측 가능함.

- 한편 무처리 일당귀의 지하부의 경우, 8주차 재배시 평균 decursin과 decursin angelate 함량은  $0.56 \pm 0.26$  mg/g-당귀로 나타났다. 한편, 약액처리 일당귀의 경우, 1회 처리 8주차 재배의 경우 평균  $1.37 \pm 2.07$  mg/g-당귀의 decursin과 decursin angelate 함량이 검출되고 있으며, 2회 처리 8주차의 경우 평균  $0.90 \pm 1.16$  mg/g-당귀의 decursin이 검출되어 양액 처리에 따라 무처리군보다 decursin과 decursin angelate 함량의 증가가 나타나는 것으로 판단됨.

- 각각 1회, 2회 및 3회 처리된 12주차 일당귀의 경우 무처리군에서 평균  $0.83 \pm 0.13$  mg/g-당귀의 decursin과 decursin angelate 함량이 검출되고 있으나, 미네랄 양액 처리시에는  $0.16 \sim 1.25$  mg/g-당귀가 검출되어 미네랄 양액 처리에 따른 함량 증가가 나타나는 것으로 이해됨. 그러나 처리농도에 따른 변화는 불명확하여, 미네랄 양액 처리 농도에 따른 함량 증가는 추후 심화된 연구가 필요함.

· 12주차 시료의 decursin과 decursin angelate 함량 (mg/g-당귀)

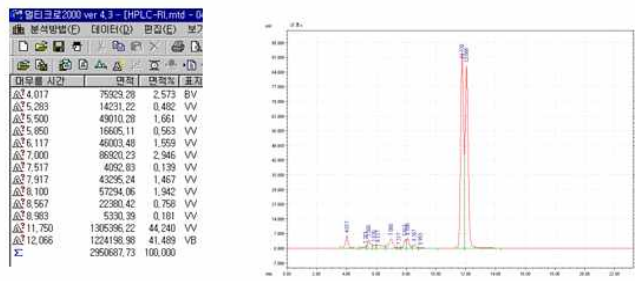
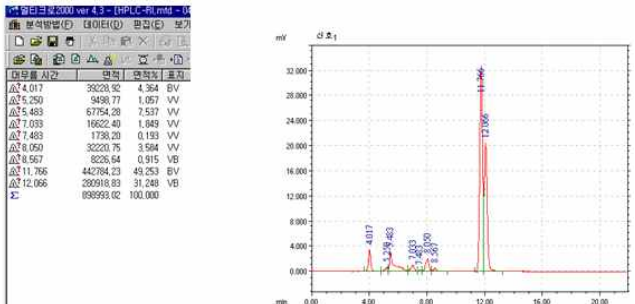
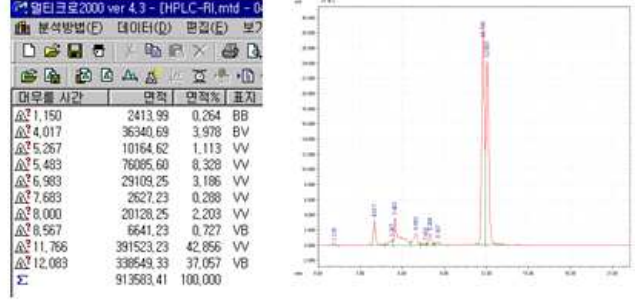
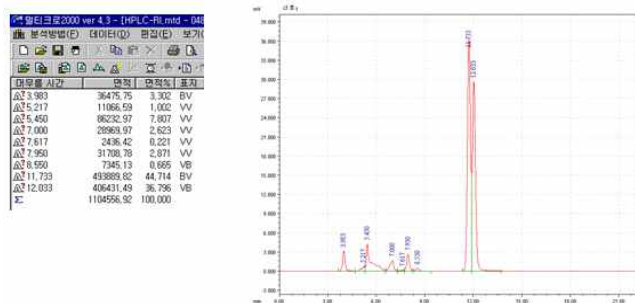
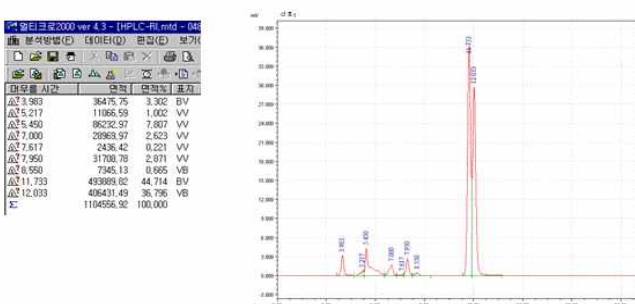
· 무처리:  $0.83 \pm 0.13$

· 1회 처리:  $0.34 \pm 0.340$

· 2회 처리:  $0.16 \pm 0.111$

· 3회 처리:  $1.25 \pm 1.39$

○ 참당귀의 지하부 분석 결과

 <table border="1"> <thead> <tr> <th>대분류 시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 4.017</td><td>75929.29</td><td>2.573</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.283</td><td>14231.22</td><td>0.482</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.500</td><td>49010.28</td><td>1.661</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.850</td><td>18685.11</td><td>0.593</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 6.117</td><td>40003.48</td><td>1.359</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.000</td><td>86920.23</td><td>2.946</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.517</td><td>4092.83</td><td>0.139</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.917</td><td>43295.24</td><td>1.467</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.100</td><td>57294.06</td><td>1.942</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.567</td><td>22380.42</td><td>0.758</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.983</td><td>5330.39</td><td>0.181</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 11.750</td><td>1365396.22</td><td>44.240</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 12.066</td><td>1224198.98</td><td>41.489</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td>295687.73</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대분류 시간	면적	면적%	표지	Δ <sup>2</sup> 4.017	75929.29	2.573	BV	Δ <sup>2</sup> 5.283	14231.22	0.482	VV	Δ <sup>2</sup> 5.500	49010.28	1.661	VV	Δ <sup>2</sup> 5.850	18685.11	0.593	VV	Δ <sup>2</sup> 6.117	40003.48	1.359	VV	Δ <sup>2</sup> 7.000	86920.23	2.946	VV	Δ <sup>2</sup> 7.517	4092.83	0.139	VV	Δ <sup>2</sup> 7.917	43295.24	1.467	VV	Δ <sup>2</sup> 8.100	57294.06	1.942	VV	Δ <sup>2</sup> 8.567	22380.42	0.758	VV	Δ <sup>2</sup> 8.983	5330.39	0.181	VV	Δ <sup>2</sup> 11.750	1365396.22	44.240	VV	Δ <sup>2</sup> 12.066	1224198.98	41.489	VB	Σ	295687.73	100.000		<p>당귀 : 무처리</p>
대분류 시간	면적	면적%	표지																																																										
Δ <sup>2</sup> 4.017	75929.29	2.573	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.283	14231.22	0.482	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.500	49010.28	1.661	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.850	18685.11	0.593	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 6.117	40003.48	1.359	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.000	86920.23	2.946	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.517	4092.83	0.139	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.917	43295.24	1.467	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.100	57294.06	1.942	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.567	22380.42	0.758	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.983	5330.39	0.181	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 11.750	1365396.22	44.240	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 12.066	1224198.98	41.489	VB																																																										
Σ	295687.73	100.000																																																											
 <table border="1"> <thead> <tr> <th>대분류 시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 4.017</td><td>95228.92</td><td>4.364</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.290</td><td>9899.77</td><td>0.057</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.483</td><td>67754.28</td><td>7.537</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.033</td><td>16622.40</td><td>1.649</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.463</td><td>1738.20</td><td>0.193</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.050</td><td>32203.78</td><td>3.984</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.567</td><td>8226.64</td><td>0.915</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 11.766</td><td>442784.23</td><td>49.253</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 12.066</td><td>209916.98</td><td>31.248</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td>898999.02</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대분류 시간	면적	면적%	표지	Δ <sup>2</sup> 4.017	95228.92	4.364	BV	Δ <sup>2</sup> 5.290	9899.77	0.057	VV	Δ <sup>2</sup> 5.483	67754.28	7.537	VV	Δ <sup>2</sup> 7.033	16622.40	1.649	VV	Δ <sup>2</sup> 7.463	1738.20	0.193	VV	Δ <sup>2</sup> 8.050	32203.78	3.984	VV	Δ <sup>2</sup> 8.567	8226.64	0.915	VB	Δ <sup>2</sup> 11.766	442784.23	49.253	BV	Δ <sup>2</sup> 12.066	209916.98	31.248	VB	Σ	898999.02	100.000		<p>참당귀 : 저농도 처리</p>																
대분류 시간	면적	면적%	표지																																																										
Δ <sup>2</sup> 4.017	95228.92	4.364	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.290	9899.77	0.057	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.483	67754.28	7.537	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.033	16622.40	1.649	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.463	1738.20	0.193	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.050	32203.78	3.984	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.567	8226.64	0.915	VB																																																										
Δ <sup>2</sup> 11.766	442784.23	49.253	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 12.066	209916.98	31.248	VB																																																										
Σ	898999.02	100.000																																																											
 <table border="1"> <thead> <tr> <th>대분류 시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 1.150</td><td>2413.99</td><td>0.264</td><td>BB</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 4.017</td><td>36340.69</td><td>3.978</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.267</td><td>10164.62</td><td>1.113</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.483</td><td>76095.60</td><td>8.328</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 6.983</td><td>29103.25</td><td>3.196</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.683</td><td>2627.23</td><td>0.288</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.000</td><td>20128.25</td><td>2.203</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.567</td><td>6641.23</td><td>0.727</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 11.766</td><td>391523.23</td><td>42.856</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 12.063</td><td>338549.33</td><td>37.057</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td>913583.41</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대분류 시간	면적	면적%	표지	Δ <sup>2</sup> 1.150	2413.99	0.264	BB	Δ <sup>2</sup> 4.017	36340.69	3.978	BV	Δ <sup>2</sup> 5.267	10164.62	1.113	VV	Δ <sup>2</sup> 5.483	76095.60	8.328	VV	Δ <sup>2</sup> 6.983	29103.25	3.196	VV	Δ <sup>2</sup> 7.683	2627.23	0.288	VV	Δ <sup>2</sup> 8.000	20128.25	2.203	VV	Δ <sup>2</sup> 8.567	6641.23	0.727	VB	Δ <sup>2</sup> 11.766	391523.23	42.856	VV	Δ <sup>2</sup> 12.063	338549.33	37.057	VB	Σ	913583.41	100.000		<p>참당귀 : 중농도 처리</p>												
대분류 시간	면적	면적%	표지																																																										
Δ <sup>2</sup> 1.150	2413.99	0.264	BB																																																										
Δ <sup>2</sup> 4.017	36340.69	3.978	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.267	10164.62	1.113	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.483	76095.60	8.328	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 6.983	29103.25	3.196	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.683	2627.23	0.288	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.000	20128.25	2.203	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.567	6641.23	0.727	VB																																																										
Δ <sup>2</sup> 11.766	391523.23	42.856	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 12.063	338549.33	37.057	VB																																																										
Σ	913583.41	100.000																																																											
 <table border="1"> <thead> <tr> <th>대분류 시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 3.983</td><td>36475.75</td><td>3.302</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.217</td><td>11066.59</td><td>1.002</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.450</td><td>86232.97</td><td>7.807</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.000</td><td>28969.97</td><td>2.623</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.617</td><td>2436.42</td><td>0.221</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.950</td><td>31788.78</td><td>2.871</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.950</td><td>7345.13</td><td>0.665</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 11.733</td><td>493889.82</td><td>44.714</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 12.033</td><td>406431.49</td><td>36.796</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td>1104956.92</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대분류 시간	면적	면적%	표지	Δ <sup>2</sup> 3.983	36475.75	3.302	BV	Δ <sup>2</sup> 5.217	11066.59	1.002	VV	Δ <sup>2</sup> 5.450	86232.97	7.807	VV	Δ <sup>2</sup> 7.000	28969.97	2.623	VV	Δ <sup>2</sup> 7.617	2436.42	0.221	VV	Δ <sup>2</sup> 7.950	31788.78	2.871	VV	Δ <sup>2</sup> 8.950	7345.13	0.665	VB	Δ <sup>2</sup> 11.733	493889.82	44.714	BV	Δ <sup>2</sup> 12.033	406431.49	36.796	VB	Σ	1104956.92	100.000		<p>참당귀 : 고농도 처리</p>																
대분류 시간	면적	면적%	표지																																																										
Δ <sup>2</sup> 3.983	36475.75	3.302	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.217	11066.59	1.002	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.450	86232.97	7.807	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.000	28969.97	2.623	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.617	2436.42	0.221	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.950	31788.78	2.871	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.950	7345.13	0.665	VB																																																										
Δ <sup>2</sup> 11.733	493889.82	44.714	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 12.033	406431.49	36.796	VB																																																										
Σ	1104956.92	100.000																																																											
 <table border="1"> <thead> <tr> <th>대분류 시간</th> <th>면적</th> <th>면적%</th> <th>표지</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 3.983</td><td>36475.75</td><td>3.302</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.217</td><td>11066.59</td><td>1.002</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 5.450</td><td>86232.97</td><td>7.807</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.000</td><td>28969.97</td><td>2.623</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.617</td><td>2436.42</td><td>0.221</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 7.950</td><td>31788.78</td><td>2.871</td><td>VV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 8.950</td><td>7345.13</td><td>0.665</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 11.733</td><td>493889.82</td><td>44.714</td><td>BV</td></tr> <tr><td>Δ<sup>2</sup> 12.033</td><td>406431.49</td><td>36.796</td><td>VB</td></tr> <tr><td>Σ</td><td>1104956.92</td><td>100.000</td><td></td></tr> </tbody> </table>	대분류 시간	면적	면적%	표지	Δ <sup>2</sup> 3.983	36475.75	3.302	BV	Δ <sup>2</sup> 5.217	11066.59	1.002	VV	Δ <sup>2</sup> 5.450	86232.97	7.807	VV	Δ <sup>2</sup> 7.000	28969.97	2.623	VV	Δ <sup>2</sup> 7.617	2436.42	0.221	VV	Δ <sup>2</sup> 7.950	31788.78	2.871	VV	Δ <sup>2</sup> 8.950	7345.13	0.665	VB	Δ <sup>2</sup> 11.733	493889.82	44.714	BV	Δ <sup>2</sup> 12.033	406431.49	36.796	VB	Σ	1104956.92	100.000		<p>참당귀 : 초고농도 처리</p>																
대분류 시간	면적	면적%	표지																																																										
Δ <sup>2</sup> 3.983	36475.75	3.302	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.217	11066.59	1.002	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 5.450	86232.97	7.807	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.000	28969.97	2.623	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.617	2436.42	0.221	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 7.950	31788.78	2.871	VV																																																										
Δ <sup>2</sup> 8.950	7345.13	0.665	VB																																																										
Δ <sup>2</sup> 11.733	493889.82	44.714	BV																																																										
Δ <sup>2</sup> 12.033	406431.49	36.796	VB																																																										
Σ	1104956.92	100.000																																																											



· 참당귀 지하부의 decursin 함량

No.	사용 부위	Decursin	
		mg/g-MeOH ex.	mg/g-당귀
62	지하	ND	ND
76	지하	187.3	32.77
81	지하	142.1	25.16
82	지하	321.2	29.87
83	지하	138.3	11.19
85	지하	258.7	40.21
90	지하	179.9	26.93
91	지하	256.9	20.8
92	지하	87.0	10.3
93	지하	74.4	6.8
94	지하	48.2	4.4
95	지하	76.9	9.1
97	지하	75.6	6.3
98	지하	97.0	8.7
99	지하	81.7	7.4
100	지하	221.7	18.4
102	지하	66.7	6.5
104	지하	274.3	21.9

· 참당귀 지하부의 decursin 및 decursin angelate 함량

No.	사용 부위	Decursin + decursin angelate	
		mg/g-MeOH ex.	mg/g-당귀
62	지하	ND	ND
76	지하	367.23	64.27
81	지하	305.08	54.04
82	지하	546.01	50.78
83	지하	150.35	12.16
85	지하	452.25	70.29
90	지하	334.02	50.01
91	지하	497.76	40.38
92	지하	142.04	16.82
93	지하	134.50	12.38
94	지하	84.98	7.72
95	지하	143.30	17.04
97	지하	144.41	11.99
98	지하	176.83	15.83
99	지하	143.67	13.01
100	지하	403.35	33.46
102	지하	124.05	12.09
104	지하	460.38	36.79

- 참당귀의 지하부의 decursin 함량 분석 결과는 일당귀의 결과와는 달리, 미네랄 양액 처리에 의해 decursin 함량이 변화가 거의 없거나, 오히려 감소하는 패턴을 나타내고 있음. 이에 대해서는 추가적인 반복 실험이 필요한 상태임.
- 특히 무처리한 12주 재배한 참당귀의 경우 decursin 함량이  $20.83 \pm 2.551$  mg/g-당귀를 나타내고 있으나, 1회 처리한 경우  $7.65 \pm 2.622$  mg/g-당귀, 2회 처리한 경우  $10.19 \pm 5.557$  mg/g-당귀, 3회 처리한 경우  $14.21 \pm 10.902$  mg/g-당귀를 나타내었음. 이러한 결과는 같은 당귀라 하더라도 미네랄 양액 처리가 미치는 영향이 일당귀와 참당귀에서 차이가 있을을 의미하며, 향후 decursin 함량 증가에 관한 측면에서는 미네랄 양액의 조제 및 처리방법 등이 각각의 당귀에 대해 별도로 검토되어야 함을 의미함.
- 또한 참당귀 지하부의 decursin 및 decursin angelate 함량의 변화를 검토한 결과, 무처리군에서는 decursin 및 decursin angelate 함량이  $40.38 \pm 12.33$  mg/g-당귀를 나타내고 있으나, 1회 처리한 경우  $13.49 \pm 4.409$  mg/g-당귀, 2회 처리한 경우  $18.57 \pm 10.05$  mg/g-당귀, 3회 처리한 경우  $24.43 \pm 17.48$  mg/g-당귀를 나타내었음.

(다) 참당귀 및 일당귀 추출물의 항산화 활성 평가

○ 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물 제조 및 유용성분 비교

㉠ 시험 목적

미네랄 처리 당귀의 유용성분 및 생리활성 평가를 위해 일당귀, 참당귀로부터 열수 및 유기용매 추출을 조제하여 유용성분 및 생리활성을 비교하고자 함.

㉡ 실험방법

각각의 당귀 사료에 대한 항산화 기능을 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능과 ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 양이온 소거능, 환원력 평가 및 nitrite 소거능을 측정하였음.

먼저 DPPH 음이온 소거능 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20  $\mu$ l에 99.5% 에탄올에 용해시킨  $2 \times 10^{-4}$ M DPPH용액 380  $\mu$ l를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader (Asys Hitech, Exper96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정 하였음. DPPH 음이온 소거능은 시료첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였음.

ABTS 양이온 소거능 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma Co., USA) 5 ml와 140 mM potassium persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 에탄올로 희석하였음. 조제된 희석용액 190 ml와 참나물 시료 10 ml를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA를 결정하였음.

$$ASA (\%) = [(C-S)/C] \times 100, C: \text{DMSO 첨가시 흡광도}, S: \text{시료 첨가시 흡광도}.$$

환원력 평가는 시료 2.5 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml와 10% potassium ferricyanide 2.5 ml를 첨가하고 50°C에서 20 분간 반응 시킨 후, 10%

trichloroacetic acid 2.5 ml를 첨가하여 반응을 종료하고 4000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였음. 회수한 상등액은 증류수로 2배 희석한 후, 신선하게 조제된 0.1% ferric chloride 용액과 5:1 (v/v) 비율로 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였음.

한편 nitrite 소거능 측정의 경우, 아질산염 용액 (1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정 한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma Co., USA)를 가하고 혼합하였음. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite양을 측정하였다. NSA (%)는 다음의 식에 의해 계산하였음.

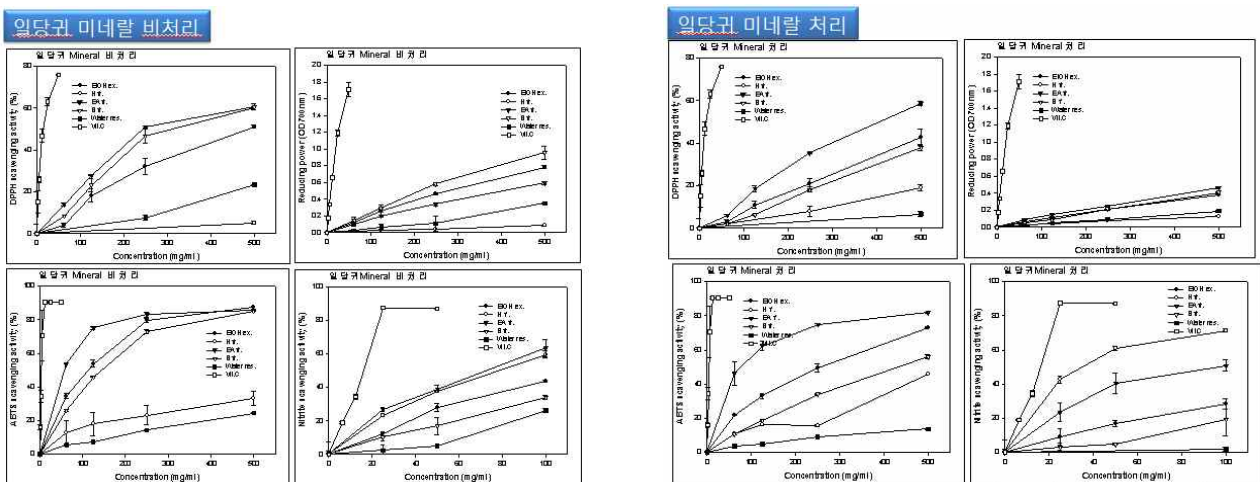
$$NSA (\%) = [1 - (A - C) / B] \times 100, A: 1 \text{ mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도}, B: 1 \text{ mM nitrite 용액의 흡광도}, C: \text{시료의 흡광도}$$

㉠ 결과

● 일당귀 추출물

일당귀	무처리			처리		
	DPPH	ABTS	nitrite	DPPH	ABTS	nitrite
EtOH ex.	484.53	290.46	>100	>500	300.41	>100
H fr.	>500	>500	78.06	>500	>500	35.09
EA fr.	244.70	235.92	72.42	407.56	252.76	95.87
B fr.	310.72	122.11	>100	>500	148.00	>100
W res.	>500	413.12	>100	>500	>500	>100

표 4. 일당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 항산화 활성의 변화(IC<sub>50</sub>) (단위: ug/ml)



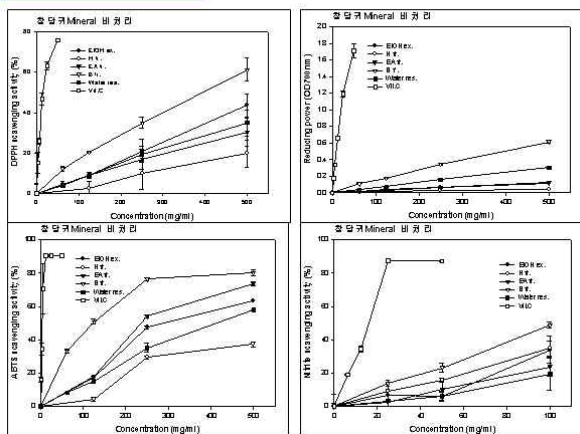
- Vitamin C의 DPPH, ABTS, Nitrite 소거능을 나타내었으며, 전반적인 항산화기능은 ethylacetate 분획에서 가장 우수하였음.

● 참당귀 추출물

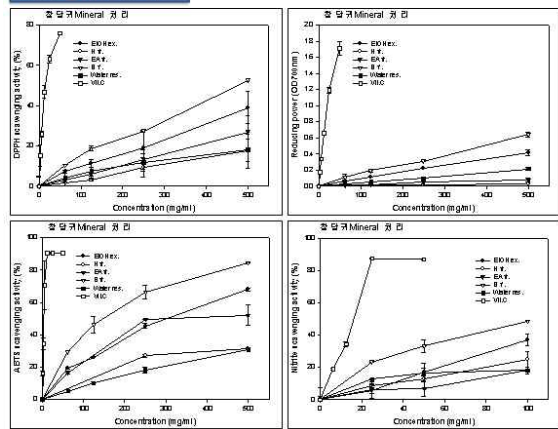
참당귀	무처리			처리		
	DPPH	ABTS	nitrite	DPPH	ABTS	nitrite
EtOH ex.	>500	300.41	>100	>500	255.14	>100
H fr.	>500	>500	>100	>500	>500	>100
EA fr.	>500	252.76	>100	>500	76.87	>100
B fr.	393.68	148.00	>100	473.79	431.98	>100
W res.	>500	>500	>100	>500	>500	>100

표 5. 참당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 항산화 활성의 변화(IC<sub>50</sub>) (단위: ug/ml)

참당귀 미네랄 비처리



참당귀 미네랄 처리



- Vitamin C의 DPPH, ABTS, Nitrite scavenging activity IC<sub>50</sub>는 15.02, 4.47 및 16 µg/ml.
- 참당귀의 경우 nitrite 소거능은 모두 IC<sub>50</sub>가 100 µg/ml 이상이었으며, 전반적인 항산화기능은 butanol 분획에서 가장 우수하였음.

(라) 참당귀 및 일당귀 추출물의 항혈전 활성 평가

○ 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물 제조 및 유용성분 비요

㉠ 시험목적

- 미네랄 처리 당귀의 유용성분 및 생리활성 평가를 위해 일당귀, 참당귀로부터 열수 및 유기용매 추출물을 조제하여 유용성분 및 생리활성을 비교하고자함.

㉡ 실험방법

- 당귀 열수 추출물의 항혈전 활성은 thrombin time, prothrombin time 및 aPTT 를 측정하여 평가하였음. 항혈전 활성 평가를 위한 thrombin time 측정 시, 혈장은 최근 1개월 동안 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4°C에서 5,000 g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며 (신선동결혈장), 필요시 상온에서 해동하여 사용하였음. 항혈전 활성은 이미 보고된 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였으며, 트롬빈 타임(혈액응고의 중심효소 저해시간), 프로트롬빈 타임 (외인성 혈전생성) 및 에이

피티티 타임 (내인성 혈전 생성)을 측정하였음.

- 트롬빈 타임 (Thrombin Time): 37°C에서 0.5 U 트롬빈 (Sigma Co., USA) 50  $\mu$ l와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l, 다양한 농도의 시료 추출액 10  $\mu$ l를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100  $\mu$ l를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였음. 대조로는 아스피린 (Sigma Co., USA)과 헤파린 (heparin; Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였음. DMSO의 경우 32.1 초의 응고시간을 나타내었음. 열 안정성 측정의 경우에는 다양한 농도의 시료용액을 100°C에서 30 분간 열처리하고, 실온에서 1시간 방냉한 후, 잔존활성을 측정하였음. 트롬빈 저해 효과는 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었음.
- 프로트롬빈 타임 (prothrombin time): 표준혈장(MD Pacific Co., China) 70  $\mu$ l와 다양한 농도의 시료액 10  $\mu$ l를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130  $\mu$ l의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었음. 대조로는 아스피린(Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 18.1초의 응고시간을 나타내었음.
- 에이피티티 타임 (aPTT: activated Partial Thromboplastin Time); 혈장 100  $\mu$ l와 다양한 농도의 시료 추출액 10  $\mu$ l를 Amelung coagulometer KC-1A (Japan)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 50  $\mu$ l의 aPTT reagent (Sigma, ALEXINTM)를 첨가하고 다시 37°C에서 3 분간 배양하였음. 이후 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였음. 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였으며, 이 경우 55.1 초의 응고시간을 나타내었음. aPTT의 결과는 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었음. 37°C에서 0.5U 트롬빈 (Sigma Co., USA) 50  $\mu$ l와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l, 다양한 농도의 시료 추출액 10  $\mu$ l를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100  $\mu$ l를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였음. 시료 대조군으로는 항혈전제로 사용되고 있는 aspirin (Sigma Co., USA) 및 heparin (Sigma Co., USA)을, 용매 대조군으로는 시료 대신 DMSO를 사용하였음. DMSO의 경우 평균 33.0초의 응고시간을 나타내었으며, 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었음.

#### ㉔ 결과

#### ㉕ 일당귀 추출물

- 일당귀의 경우 ethylacetate 분획에서 매우 강력한 에이피티 타임 연장 효과를 나타내어 일당귀가 내인성 혈전 생성을 저해함을 확인하였음. 그러나 미네랄 양액 처리에 의해 hexane 분획을 제외한 다른 추출물 및 분획에서 항혈전 활성이 증가되는 현상은 나타나지 않았음.

Samples	Conc. (mg/ml)	무처리			처리		
		트롬빈 타 임	프로트롬 빈 타임	에이피티 타임	트롬빈 타 임	프로트롬빈 타임	에이피티 타임
EtOH ex.	5.0	1.7±0.1	1.0±1.0	1.1±0.0	1.7±0.0	0.8±0.0	1.3±0.1
H fr.	5.0	1.4±0.0	1.1±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	1.2±0.0	>15
	2.5	1.2±0.2	1.1±0.3	1.0±0.5	1.1±0.4	1.1±0.1	1.1±0.0
EA fr.	5.0	1.1±0.0	1.5±0.0	>15	0.8±0.0	1.4±0.1	>15
	2.5	1.0±0.3	1.1±0.2	1.7±0.2	1.0±0.3	1.2±0.3	1.0±0.2
B fr.	5.0	1.5±0.1	1.0±0.0	1.1±0.1	1.1±0.1	0.9±0.0	1.3±0.2
	2.5	1.1±0.6	1.1±0.1	1.0±0.4	1.0±0.2	0.9±0.4	1.1±0.3
W res.	5.0	1.0±0.0	0.9±0.0	0.7±0.0	0.9±0.0	0.9±0.1	0.8±0.0
aspirin	1.5	2.5±0.1	1.8±0.0	1.4±0.0	2.5±0.1	1.8±0.0	1.4±0.0
DMSO	-	1.0±0.1	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.1	1.0±0.0	1.0±0.0

표 6. 일당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 항혈전 활성의 변화

㉠ 참당귀 추출물

- 참당귀의 경우 butanol 분획에서 강력한 내인성 혈전생성 억제활성이 나타났으며, ethanol 추출물, hexen 분획 및 물 분획에서는 오히려 내인성 혈전생성 촉진 활성이 나타났음. 미네랄 양액 처리의 경우 부탄올 분획의 에이피티 타임 연장 효과는 인정되지 않았음.

Samples	Conc. (mg/ml)	무처리			처리		
		트롬빈 타 임	프로트롬 빈 타임	에이피티 타임	트롬빈 타임	프로트롬빈 타임	에이피티 타임
EtOH ex.	5.0	1.3±0.0	0.9±0.0	0.5±0.0	1.7±0.0	1.0±0.0	0.8±0.0
H fr.	5.0	2.2±0.2	0.9±0.1	0.5±0.0	1.3±0.1	1.0±0.0	1.6±0.1
	2.5	1.3±0.1	-	-	-	-	-
EA fr.	5.0	1.1±0.1	1.0±0.0	2.0±0.1	0.8±0.0	1.0±0.0	0.7±0.0
	2.5	-	-	-	-	-	-
B fr.	5.0	1.1±0.0	1.0±0.0	>15	1.1±0.1	1.1±0.0	1.3±0.1
	2.5	-	-	1.7±0.0	-	-	-
W res.	5.0	1.0±0.0	0.8±0.0	0.6±0.0	1.0±0.0	0.8±0.0	0.9±0.2
aspirin	1.5	2.5±0.1	1.8±0.0	1.4±0.0	2.5±0.1	1.8±0.0	1.4±0.0
DMSO	-	1.0±0.1	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.1	1.0±0.0	1.0±0.0

표 7. 참당귀의 미네랄 양액 처리에 따른 항혈전 활성의 변화

- 일당귀와 참당귀의 에이피티 타임 연장 효과를 비교하였을 때, 참당귀에서 연장 효과가 큰 것을 확인함.

(마) 참당귀 및 일당귀 추출물의 대장암세포 성장억제효과 평가

○ 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물 제조 및 유용성분 비교

㉠ 시험목적



- 당귀는 암세포 성장억제효과가 이미 보고되어 있으며, 대장암세포 SW480에서는 caspase-3 활성화를 통한 암세포 사멸효과 보고 (박경옥 외, 2007. 한국식품유통저장학회지, 14: 655-661)되어 있으며, 암세포 생육억제, 돌연변이 유발 억제 및 Angiotensin converting enzyme 저해활성도 알려져 있다 (함문선 외, 1996. 한국응용미생물생명공학회 24: 624-629). 실제 함문선을 포함한 여러 연구자들은, 참당귀 추출물은 위암세포 (SNU 1), 폐암세포 (A549), 유방암세포 (MCF7) 및 간암세포 (Hep3B)에 대해 세포생육 억제 활성을 나타내었으며, 특히 간암세포에 대해 생육억제 효과가 우수함을 보고한 바 있으므로 본 시험을 통해 참당귀 및 일당귀의 열수 및 에탄올 추출물을 이용하여 인간 대장암세포 생육억제 활성을 평가하고자함.

㉔ 시험방법 및 재료

㉕ 대장암 세포 배양

- 본 실험에서는 인간 대장암세포 HCT116을 사용하여 당귀 열수/에탄올 추출물의 세포생육 억제활성을 평가하였으며, 세포주의 배양 및 계대에는 Dulbecco`s Modified Eagle Medium (Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였으며, 10% Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Korea)을 첨가하여 사용하였음. 한편 조제된 다양한 추출물들이 HCT116 세포주의 세포 생육에 미치는 영향은 One solution cell proliferation assay kit (Promega, USA)를 이용하여 평가하였음. 즉, 96 well plate에 well당  $3 \times 10^3$ 개의 세포를 접종하고 24시간 배양한 후 다양한 농도의 당귀 열수 추출물을 처리하였음. 각 추출물을 각각 24시간 동안 반응시킨 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sul fophenyl)-2H-tetrazolium (MTS: Promega, USA) 용액을 각 well 당  $20 \mu\text{l}$ 씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 4시간 동안 반응 시켰으며, 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 성장률을 계산하였음. 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을  $\text{mean} \pm \text{SD}$  값으로 나타내었으며, 50% 성장억제를 나타내는 농도를  $\text{IC}_{50}$  (Inhibitory Concentration  $_{50}$ )로 표시하였음.

㉖ 통계분석

- 실험 결과는 SPSS 17.0 버전을 사용하여  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 나타냈으며, ANOVA Tukey LSD 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였음. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였음.

㉗ 결과

㉘ 참당귀 및 열당귀 열수 추출물의 대장암세포 성장억제효과 평가

시료	용매 대조구 (물)	일당귀 -5mg	일당귀 -10mg	참당귀 -5mg	참당귀 -10mg	일당귀 + mine ral -5mg	일당귀 + mine ral -10mg	참당귀 + mine ral -5mg	참당귀 + mine ral -10mg
OD1	2.1229	2.1216	2.0795	2.1177	2.1584	2.1512	1.9644	2.105	2.0436
OD2	2.0461	2.1788	2.0235	2.1894	2.153	2.1707	1.9816	2.1151	2.0174
OD3	2.0313	2.1337	2.0136	2.1299	2.239	2.1698	2.0162	2.1545	2.0114
OD4	2.0088	2.1006	2.1531	2.1292	2.1682	2.1134	2.0575	2.1169	2.0924
평균	2.0522	2.1336	2.0674	2.1415	2.1796	2.1512	2.0049	2.1228	2.0412
편차	0.0495	0.0330	0.06406	0.03238	0.04006	0.0268	0.04114	0.02172	0.03689

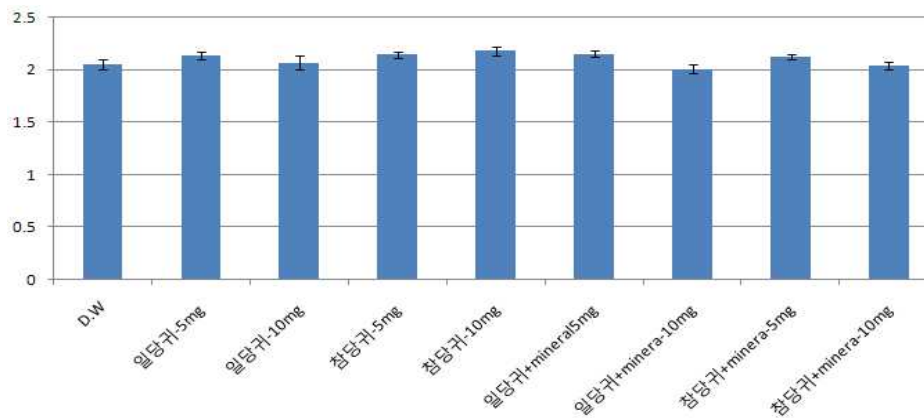


표 8&그림 64. 당귀 열수 추출물이 HCT 116 인간대장암 세포 생육에 미치는 영향

- 일당귀 및 참당귀 열수 추출물이 HCT116 인간대장암 세포 생육에 거의 영향을 미치지 않았고, 미네랄을 처리한 일당귀, 참당귀 열수 추출물 경우에도 용매 대조구인 물 처리군에 비해 97.7-106.2%의 생육도를 나타내어 거의 영향을 미치지 않았음.
- 사용 세포주에 따라 결과가 달라질 수 있으므로 보다 다양한 많은 암세포에 대한 평가가 필요하다고 판단됨.

㉔ 참당귀 및 일당귀 에탄올 추출물의 대장암세포 성장억제효과 평가

참당귀 및 일당귀 추출물을 이용하여 인간 대장암세포 생육억제 활성을 평가하였음. 방법은 참당귀 및 일당귀 열수 추출물의 대장암세포 성장억제효과 평가와 동일함.

시료	용매 대조구 (물)	일당귀 -5mg	일당귀 -10mg	참당귀 -5mg	참당귀 -10mg	일당귀 + mine ral -5mg	일당귀 + mine ral -10mg	참당귀 + mine ral -5mg	참당귀 + mine ral -10mg
OD1	2.489 1	2.197 3	2.2736	2.1739	2.2887	2.3434	2.1315	2.1646	2.03
OD2	2.519 1	2.332 6	2.2873	2.2119	2.1596	2.4802	2.115	2.1999	2.117
OD3	2.441 4	2.246 6	2.2738	2.1728	2.2611	2.4327	2.0999	2.2728	2.0757
OD4	2.401 5	2.234 7	2.2427	2.3158	2.3532	2.3328	2.1003	2.2228	2.0636
평균	2.462 7	2.252 8	2.2693 5	2.2186	2.2656 5	2.3972 7	2.1116 8	2.2150 3	2.0715 8
편차	0.051 8	0.057 1	0.0188 8	0.0673	0.0805	0.0711	0.0149 7	0.0453 5	0.0359 3

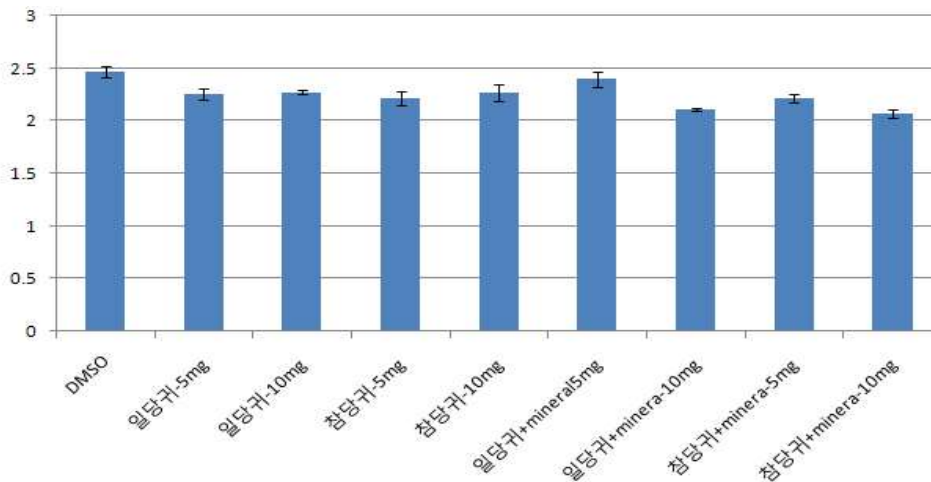


표 9&그림 65. 당귀 에탄올 추출물이 HCT 116 인간대장암 세포 생육에 미치는 영향

- 참당귀 및 일당귀 에탄올 추출물은 HCT116 인간대장암 세포 생육에 약한 생육저해 활성을 나타냈으며, (생육도 84.1~92.1%) 미네랄 처리 참당귀 및 일당귀 에탄올 추출물도 농도 의존적인 생육저해 활성을 나타내었음. 따라서 생육저해활성이 우수한 분획물의 조제 및 다양한 세포주 사용에 따른 추가실험이 필요하다고 판단됨.

㉔ 참당귀 에탄올 추출물의 미네랄 처리 유무에 따른 대장암세포 성장억제효과 평가

시료	대조 구	참당귀 추출물 농도 (ug/ml)									
		무처리					미네랄 양액 처리				
측정	DM SO	10	50	100	150	200	10	50	100	150	200
OD1	2.62	2.29	1.95	0.91	0.79	0.73	2.51	1.98	1.08	0.70	0.73
OD2	2.61	2.16	1.95	0.88	0.84	0.71	2.50	1.99	1.08	0.75	0.79
OD3	2.65	2.26	1.94	0.89	0.83	0.72	2.40	1.97	1.01	0.75	0.81
OD4	2.63	2.35	1.82	0.90	0.84	0.72	2.56	1.93	1.04	0.72	0.72
평균	2.63	2.27	1.91	0.90	0.82	0.72	2.49	1.97	1.05	0.73	0.76
편차	0.02	0.08	0.01	0.02	0.01	0.01	0.07	0.02	0.03	0.03	0.05

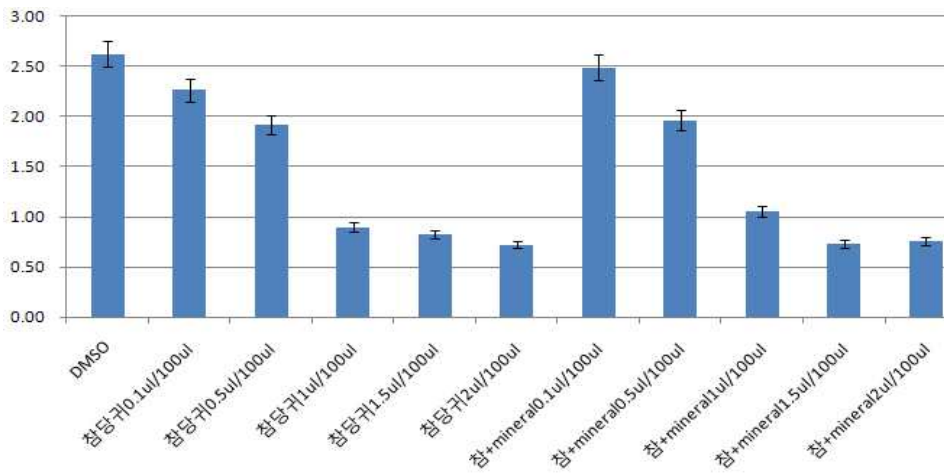


표 10 & 그림 66. 참당귀 에탄올 추출물이 HCT 116 인간대장암 세포 생육에 미치는 영향

- 농도의존적인 대장암세포 생육저해를 확인하기 위해 미네랄 양액 처리 및 무처리한 참당귀 지하부의 에탄올 추출물을 조제하고, 이의 다양한 농도를 HCT116 대장암세포에 처리하였음.
- 참당귀 추출물은 농도 의존적으로 암세포 성장 억제효능을 나타내었음. 그러나 미네랄 양액 처리에 따른 암세포 생육 억제 활성의 증대는 인정되지 않았음.

(바) 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물의 항당뇨 활성 평가

○ 참당귀 및 일당귀의 에탄올 추출물 제조 및 유용성분 비교

㉠ 시험목적

- 전분 및 합성기질을 이용하여  $\alpha$ -amylase 저해,  $\beta$ -amylase 저해 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 각각 측정하는 시험법을 통해 참당귀 및 일당귀 에탄올 추출물을 이용하여 in vitro 항당뇨 활성을 평가하고자 함.

㉡ 시험방법 및 재료

㉢  $\alpha$ -amylase 저해 활성

-  $\alpha$ -amylase 저해활성은 전분이 요오드 염색용액 (I<sub>2</sub>+KI)에 청색으로 발색하는 원리를 이용하여 미분해 전분의 양을 정량하는 실험방법을 이용하여 평가하였음. 먼저

다양한 농도의 시료 2.5  $\mu\text{l}$ 와 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한  $\alpha$ -amylase (0.25 U/ml) 25  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 37°C에서 10분간 pre-incubation 한 후, 0.5% soluble starch (Samchun Chemicals Co., Korea) 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여 37°C에서 10분간 반응하였음. 이후 1N acetic acid 10  $\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지시켰으며, 반응액에 25  $\mu\text{l}$ 의 요오드 염색용액 (I<sub>2</sub>+KI)을 가하여 반응 정지하였음. 발색은 96 well microplate reader (Sunrise-BAS/C, Tecan Co., USA)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3번 반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였음. 각각의 효소활성은 unit로 환산하여 나타냈으며,  $\alpha$ -amylase 활성을 50% 저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산하였음.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가군 효소활성} / \text{대조군 첨가군 효소활성})] \times 100$$

㉠  $\beta$ -amylase 저해 활성

-  $\beta$ -amylase 저해 활성은 Lin 등의 방법을 수정하여 사용하였음. 먼저 다양한 농도의 시료 2.5  $\mu\text{l}$ 와 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)로 희석한  $\beta$ -amylase (0.25 U/ml) 25  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 37°C에서 10분간 pre-incubation 한 후, 0.5% soluble starch (Samchun, Chemicals Co., Korea) 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여 37°C에서 10분간 반응하였음. 이후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지하였음. 반응액에 150  $\mu\text{l}$ 의 DNS (5-dinitrosalicylic acid, Sigma Co., St. Louis, USA) 용액을 가하여 100°C에서 5분간 가열하여 발색한 후 상온에서 방냉하였음. 발색액은 96 well microplate reader (Sunrise-BAS/C, Tecan Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 실험은 3번 반복한 후 평균값을 구하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였음. 각각의 효소활성은 unit로 환산하여 나타냈음.  $\beta$ -amylase 활성을 50% 저해하는 농도를 IC<sub>50</sub>으로 계산함.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가군 효소활성} / \text{대조군 첨가군 효소활성})] \times 100$$

㉡  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성

- 다양한 농도의 시료 2.5  $\mu\text{l}$ 와 50 mM Sodium acetate buffer (pH 5.6)로 희석한  $\alpha$ -glucosidase (0.68 U/ml) 25  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 37°C에서 10분간 pre-incubation 한 후, 1 mM pNPG (p-nitrophenol glucoside; Sigma Co., USA) 용액 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여 60°C에서 10분간 반응하였음. 이후 1M NaOH 25  $\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였음.

$$\text{저해율 (\%)} = [1 - (\text{시료 첨가군 효소활성} / \text{대조군 첨가군 효소활성})] \times 100$$

㉢ 결과

- 참당귀 및 일당귀 추출물 모두 임상에서 당뇨치료제로 사용되는 acarbose보다 약한 항당뇨 활성이 확인됨.

Conc. 500ug/ml	사용 부위	Ge-Se처리 (초고농도)	a-amylase Inhibition (%)	b-amylase Inhibition (%)	a-glucosidase Inhibition (%)
참당귀	지상부	무처리	6.4	21.6	0.8
		처리	6.8	18.8	4.2
	지하부	무처리	8.7	14.8	10.0
		처리	6.5	17.4	12.9
일당귀	지상부	무처리	7.3	13.1	14.2
		처리	8.9	28.6	12.2
	지하부	무처리	4.0	19.3	3.5
		처리	5.1	22.6	5.3

표 8. 미네랄 양액 처리 및 무처리한 참당귀, 일당귀 추출물의 항당뇨 활성변화 검토

- 특히 전분 말단으로부터 maltose를 유리시키는 전분분해 효소를 저해 활성이 상대적으로 우수함.
- 참당귀의 경우 지하부에서, 일당귀에서는 지상부에서 α-glucosidase 저해효과가 확인 됨.
- 미네랄 양액 처리시에 β-amylase (전분 말단으로부터 maltose를 유리시키는 전분분해 효소) 저해활성의 증가가 확인됨.
- 그러나 항당뇨 활성에서 중요한 α-glucosidase 저해효과는 그 증가가 미미함.

(사) 당귀 외 다수 약용작물의 발기부전 효능 평가

① 당귀를 포함한 아홉 가지 약용작물의 발기부전 효능 스크리닝 실험

○ 남성 불임 개선에 대한 당귀의 효능

- 예로부터 당귀는 피가 부족할 때 보혈작용을 하며 피의 순환이 원활하지 못할 때 순환을 원활하도록 하는 것으로 잘 알려져 있으며 혈액정화작용과 장의 운동을 원활히 해주는 것으로 널리 쓰였음. 이와 더불어 남성불임에도 경험적으로 효능이 있다고 알려져 여러 가지 약재들과 혼합하여 많이 이용되고 있음.
- 온신환(溫腎丸)의 경우, 자식을 갖지 못하는 경우 복용하는 처방으로 남성이 신장의 정기가 부족해 자식이 없을 때 치료하는 것임. 주요한 약재로는 산수유, 숙지황, 파극, 토사자, 당귀, 녹용, 익지인 등의 약재가 주로 들어감.
- 고본건양단(固本健陽丹)은 남성불임에 쓰이는 한약 처방전으로, 숙지황, 산수유 각 112.5 g, 파극 75 g, 토사자, 숙단, 원지, 사상자 각 56.25 g, 백복신, 산약, 우슬, 두충, 당귀, 육종용, 오미자, 익지인(초), 녹용 각 37.5 g, 구기자 112.5 g, 인삼 75 g을 가루로 만들어 꿀을 섞어 오자대 크기로 만들어 식전에 소금물이나 따뜻한 술에 50~70알씩 먹음.

㉞ 시험 방법 및 재료

㉞ MTT 실험을 통한 원료의 안전성 확인

- 각각의 시료들은 30% 에탄올에서 50℃로 6 시간 동안 추출 한 뒤 농축하여 실험에 사용하였음. 96 well plate에 TM3 cell 180 μl (2×10<sup>5</sup> cells)에 시료들을 500 ppm 으로 20 μl씩 처리한 후 37℃에서 24 시간 배양한 다음 MTT 용액 (5 mg/ml) 20 μl를 첨가



하여 37°C에서 3 시간 배양하였음. 그 후 상층액을 제거한 뒤 DMSO를 well당 200  $\mu$ l 씩 넣고 20 분간 반응 시킨 다음 ELISA reader 570 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였음. 정상군 (시료 처리 대신에 PBS를 처리한 그룹)의 값을 control로 하고 이때의 O.D. (Optical density) 값을 세포의 생존도가 100%라고 정의하고, 나머지 군의 측정된 O.D. 값을 상댓값으로 환산하였음.

㉞ NO 농도 측정

- 비아드레날린성, 비콜린성 신경 및 내피로부터의 일산화질소 (nitric oxide, NO) 방출은 음경해면체내의 구아닐사이클라제 (guanylate cyclase)활성화 시키고 세포내 cGMP (cyclic GMP) 수준을 증가시켜 발기능을 개선시키므로 발기능 측정을 위해 NO 농도를 측정함. NO는 불안정하고 안정성이 없는 물질로서 반간기가 매우 짧기 때문에 직접적으로 정량 할 수 없으므로, 체내 산화대사 물질인 nitrite의 함량을 측정함으로써 NO의 함량을 예상할 수 있음. HUVEC 세포를 이용하여 eNOS에 관여하여 발기에 밀접히 관여하는 NO 생성 효능을 측정하였음.

㉞ ACE (Angiotensin converting enzyme)저해율 측정

- ACE는 혈압을 조절하는 아주 중요한 역할을 하고 있는 효소로 10 개의 아미노산으로 구성된 angiotensin I을 angiotensin II로 가수분해함으로써 혈압을 증가시킴. 강력한 혈관 수축제인 angiotensin II는 알도스테론의 분비를 촉진시키고 그 결과 알도스테론은 신장 내 Na<sup>+</sup>와 물의 함량을 증가시키며 동맥혈압의 증가를 가져옴. CE를 저해하여 angiotensin II의 생성을 억제한다면 혈압을 낮추고, 혈관을 이완시키면 음경 내 혈류량이 증가하게 되어 음경 발기가 유도될 수 있으므로 ACE 저해율을 측정하여 발기능을 평가하고자함. 본 실험에서는 ACE 조직 powder로부터 추출하여 효소 액으로 사용하였음. 효소반응을 통해 생성된 hippuric acid를 228 nm에서 측정하여 저해율을 확인하였음.

㉞ 결과

㉞ 당귀 외 아홉 가지의 약재의 TM3 cell에서 안전성 확인

- 당귀, 황기, 삼지구엽초 외 여섯 가지의 약재는 500 ppm에서 cell viability (%)가 90%를 넘지 않아 안전성에서 제외 하였음.

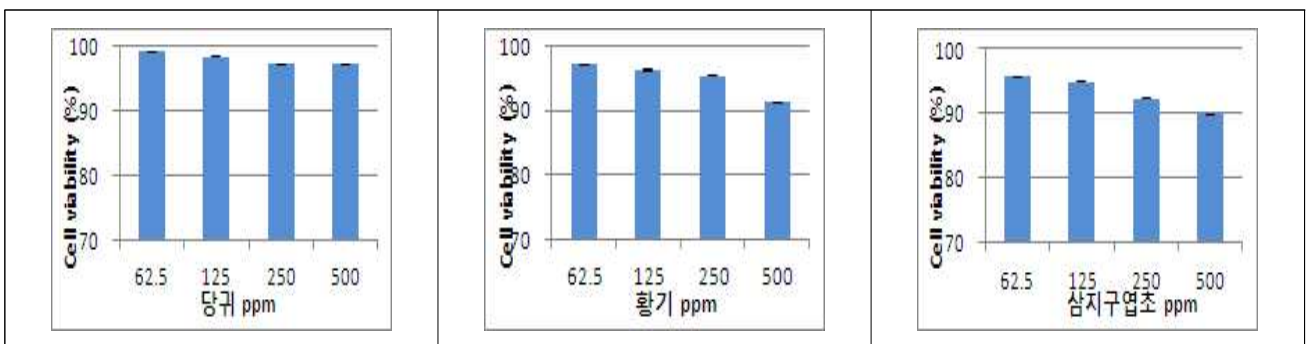


그림 47. MTT assay를 이용한 TM3 cell에서의 cell viability (%)

㉞ NO 생성 측정

- 당귀, 황기, 삼지구엽초의 NO생성 확인 결과 당귀와 삼지구엽초에서 농도의존적으로 NO의 생성이 증가하는 것을 확인 할 수 있음.

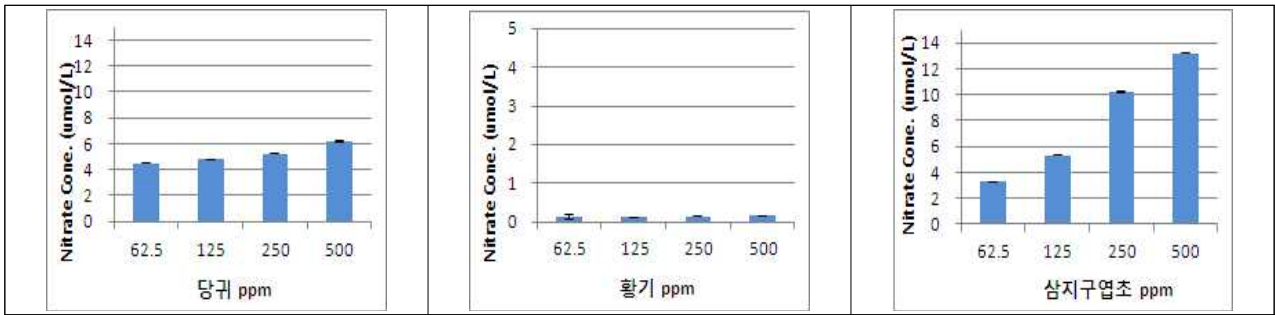


그림 48. HUVEC 세포에서 NO 생성

㉟ ACE 저해율 측정

- ACE 저해 효과 실험에서 가장 높은 저해 효과를 당귀에서 확인 할 수 있었음.

시료 명	농도	ACE 저해율 (%)
당귀	500 ppm	69.4 ± 2.2
황기		15.2 ± 2.6
삼지구엽초		37.7 ± 3.2
Enalapril maleate salt 양성 대조군	25 ppm	99.1 ± 4.4

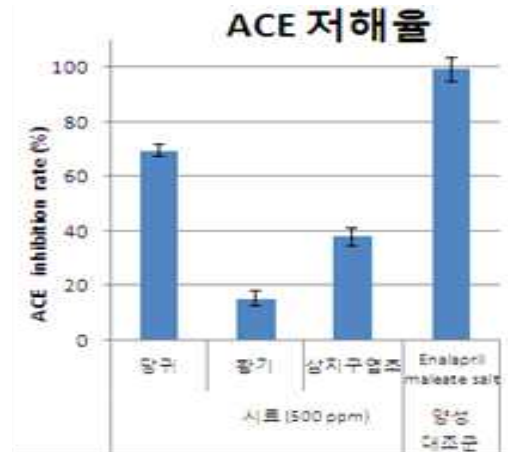


표9 & 그림 49. ACE 저해율 (%) 측정

(아) 인체적용시험 계획의 변경

- 대장암에 대한 항암효과의 경우 “천연물 신약 항암치료제” 부분으로 정확한 기전 및 연구가 진행 되어야 하며, 추후 위의 평가결과를 활용하여 진행 할 예정임.
- 발기부전에 대한 당귀의 효능도 기대가 되며, “발기부전” 또한 치료제로 천연물 신약으로서의 개발에 본 과제의 평가결과를 활용하여 더욱 심화된 기전 및 연구를 진행할 예정임.
- “남성불임에 도움을 주는 건강기능식품의 개발” 관련 식약처 민원 질의 결과, 해당 항목은 인정 사례가 없으며, 직접적인 임신으로 이어지지 않을 수 있는 우려 때문에 기능성 항목으로 인정해주기 어려울 것이라는 답변을 받음.
- 이에 연구의 방향과 목표를 변경하여 본 과제 내에서 관련 선행 연구로 진행된 항산화, 항혈전 등의 실험결과 들로 미루어 보아, 일당귀보다 참당귀가 탁월한 효능을 보인 항산화와 항혈전 결과와 관련되며, 기존 개별인정형 원료로서 승인 항목이 있는 “혈행개선”으로 연구개발을 지속하고자 함.
- 위의 변경사항은 2013년도 8월에 제출된 연차 계획서 작성으로 협의가 이루어진 내용임.

(자) 당귀의 항혈전 및 혈행개선 기능

① 연구의 필요성

- 혈액순환장애의 정의 : 혈액의 순환을 막는 장애로 다음과 같은 단계를 거치며 발병함.



그림 50. 혈액순환 장애 발병단계

- 원인과 관련 인자 : 당뇨, 고혈압, 고지혈증, 고연령, 가족력, 흡연, 비만, 운동부족, 스트레스 등이 있으며, 다음과 같은 유전자와 인자들의 상관성이 입증되었음.

- ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1, 세포간접착단백질, 동맥경화증에서 혈관협착에 관여.
- VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1, 혈관세포접착단백질, 동맥경화증에서 혈관협착에 관여.
- COX-2 : Cyclooxygenase-2, 염증유발 효소
- 5-LO : 5-Lipoxygenase, 염증유발 효소
- HMG-CoA reductase : HMGR, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, 콜레스테롤 생합성과정에서 rate-limiting step을 조절하는 효소
- LDL-cholesterol : Low-Density Lipoprotein-cholesterol, 저밀도 지단백, 지방산과 콜레스테롤을 운반하는 분자, 혈중 농도가 높을 때 혈액순환장애를 유발.
- HDL-cholesterol : High-Density Lipoprotein-cholesterol, 고밀도 지단백, 지방산과 콜레스테롤을 운반하는 분자, 혈중 농도가 낮을 때 혈액순환장애를 유발.
- TG : Triglyceride : 중성지방, 혈중 농도가 높을 때 혈액순환장애를 유발.
- A.I : Atherogenic index : 동맥경화위험도 지수,  

$$AI = [(Total-콜레스테롤) - (HDL-콜레스테롤)] / HDL-콜레스테롤$$
 의 식으로 산출
- C-reactive protein : 급성기 염증 반응 (acute phase)에서 혈중농도 증가, 뇌졸중 및 동맥경화증에서 혈중농도 증가.
- Thromboxane B2 : TXB2, 혈소판 응집 혈관 수축 작용으로 혈전형성에 관여.

② 원료 추출방법 및 추출수율

원료명	추출조건			농축조건		건조 조건		추출 수율
	용매조건 (1회)	온도(°C)	시간(hr)	온도(°C)	시간(hr)	온도(°C)	시간(hr)	
당귀	12배 중량비, 30%주정	60	4	55	3	60	48	30.63
단삼	12배 중량비, 30%주정	60	4	55	3	60	48	31.47
치자	12배 중량비, 30%주정	60	4	55	3	60	48	33.28

표 10. 추출방법 및 수율

- 당귀 추출물 등 복합물의 제조

- 당귀추출물 : 치자추출물 = 6 : 4의 중량비로 혼합 (이하, 당6치4)
- 당귀추출물 : 단삼추출물 : 치자추출물 = 5 : 3 : 2의 중량비로 혼합 (이하, 당5단3치2)

※ 참당귀(*Angelica gigas*. Nakai)는 보혈조경(補血調經), 활혈지통(活血止痛)의 효능이 있어 빈혈이나 어혈 및 혈액순환 개선에 사용되는 중요한 생약으로, 상기에서 언급하였듯이 인체적용시험에 앞서 당귀추출물을 사용하여, aPTT을 측정 한 결과, 참당귀 에탄올 추출물 5mg/ml은 무침가군 보다 각 1.3배 이상 연장된 혈액응고억제 효과를 나타냄을 확인하였다. 이는 아스피린 1.5~2.0 mg/ml에 해당하는 효과임.

※ 단삼 (*Salvia mitiorrhiza*. Bunge)의 뿌리는 심혈관 질환 특히 협심증과 심근 경색 치료에 사용된 전통적인 생약제로써, 어혈성의 심복부동통을 치료하며, 고혈압, 관상동맥질환, 그리고 죽상경화성 혈관질환의 치료심장병에 쓰인다고도 알려짐.

※ 치자(*Gardenia jasminoides*. Eills)의 경우도 본초강목에서 토혈, 비출혈, 하혈, 혈뇨, 타박으로 인한 어혈, 신경성 두통, 화상을 다스린다고 하여 혈행과 관련된 생약으로 알려져 있으며 주로 혈액응고 과정을 억제하는 것으로 보고됨.

- 당귀, 단삼, 치자의 복합물을 가지고 항산화 효능, 세포독성, 항혈전 활성, cell-adhesion 변화, 혈관 내 염증 억제, 지질 과산화 억제 등의 기능을 시험하여 “혈행개선”건강기능식품으로 개발하기 위한 근거를 마련하였음.

③ 항산화능 - DPPH radical scavenging activity

㉔ 시약 및 기기

- DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), EGCG (Epigallocatechin gallate)는 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품을 사용하였고, 기타 시약류는 분석용 특급시약을 사용하였

음. ELISA reader는 Molecular Devices, CA (USA)의 기기를 사용하였음.

㉔ 실험 방법

- 안정한 free radical 인 DPPH가 hydrogen proton-radical scavenger에 의해 노란색의 diphenylpicrylhydrazine으로 변색되는 현상을 이용하여 각 샘플의 전자공여능을 측정하였음.
- 농도별로 용해한 샘플 및 양성 대조군 (EGCG) 75  $\mu$ l와 DPPH (0.2 mM in ethanol) 750  $\mu$ l, 3차 정제수 675  $\mu$ l를 혼합한 후 상온에서 30분간 반응시켰음. 96 well plate에 반응액 200  $\mu$ l를 옮긴 후 ELISA reader로 520 nm의 차장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성 (%)은 (1-시료 첨가구의 흡광도/시료 무 첨가구의 흡광도)  $\times$  100의 계산식을 사용하였으며, 발생한 라디칼 50%를 소거하는데 필요한 시료의 농도 (SC50)는 ppm 단위로 표시하였음. 실험결과는 3회 반복하여 평균  $\pm$  표준오차 (mean  $\pm$  SEM)로 나타냈으며, Student`s t-test로 통계처리하여 비교하였으며 통계처리에서 p 값이 0.05 미만일 경우 ( $p < 0.05$ ) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였음.

㉔ 실험 결과

DPPH radical scavenging activity					
	당귀	치자	단삼	당6치4	당5단3치2
Mean	254.89	200.21	38.78	283.04	95.43
STDEV	3.08	3.79	1.86	17.64	4.45

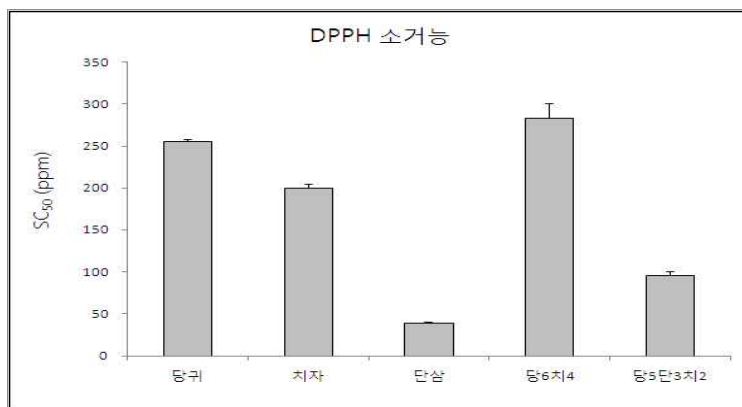


표 11 & 그림 51. DPPH radical scavenging activity

④ 폴리페놀 함량분석

㉔ 실험방법

- 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 페놀의 함량이 증가할수록 항돌연변이, 콜레스테롤 저하작용, 항암 및 항산화작용 등의 다양한 생리활성 기능이 있음.
- 총 페놀성 화합물의 함량은 Gutfinger (Gutfinger, 1981)의 방법을 변형하여 측정하였음.

즉, 시료 1 ml에 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 ml를 가하여 3분간 상온에서 반응시킨 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 ml를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켰음. 이 반응물 1 ml를 취하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 표준농도 곡선은 EGCG를 이용하여 작성하였음. 실험결과는 3회 반복하여 평균 ± 표준오차 (mean ± SEM)로 나타냈으며, Student`s t-test로 통계처리 하여 비교함. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우 (p < 0.05) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였음.

㉞ 실험결과

Total polyphenol					
	당귀	치자	단삼	당6치4	당5단3치2
Average	1.63	2.52	8.76	1.57	4.19
STDEV	0.14	0.17	0.12	0.04	0.03

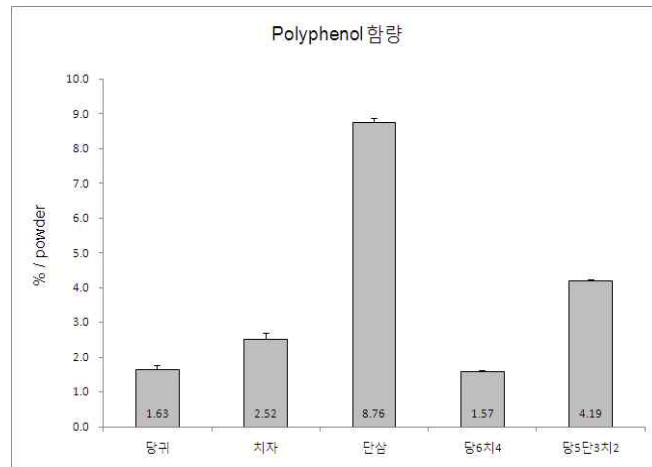


표12 & 그림 52. Total polyphenol

㉟ 세포독성 측정

㊱ 시약 및 기기

- Penicillin G, streptomycin, FBS, α-MEM, MTT는 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품을 사용하였고, 기타 시약류는 분석용 특급시약을 사용하였음. ELISA reader는 Molecular Devices, CA (USA)의 기기를 사용하였음.

㊲ 실험방법

- 마우스 대식세포주인 Raw264.7 세포는 한국세포주 은행으로부터 분양받아 계대 배양하여 사용하였음. 배지는 penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml)이 포함된 α-MEM으로 FBS를 전체양의 10%가 되도록 혼합하고 pH 7.4로 조절한 뒤 CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75 cm<sup>2</sup> plastic flask (T-75)에서 계대 배양하여 세포주를 유지하며 실험에 사용하였음.

- Raw264.7 세포를 96 well plate에 간세포 1×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주하고 CO<sub>2</sub>

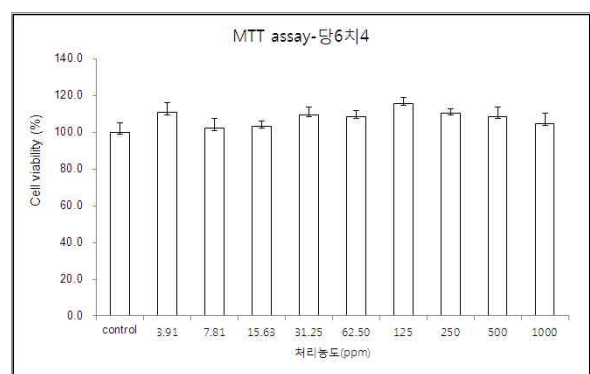
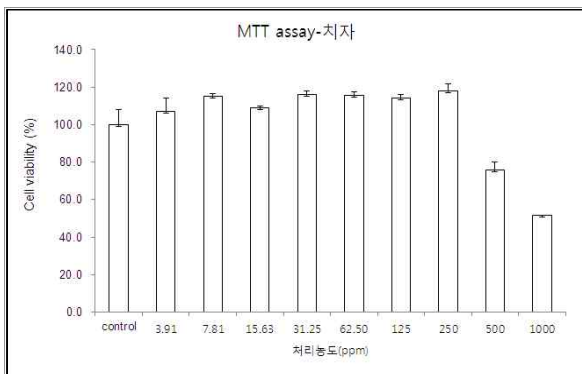
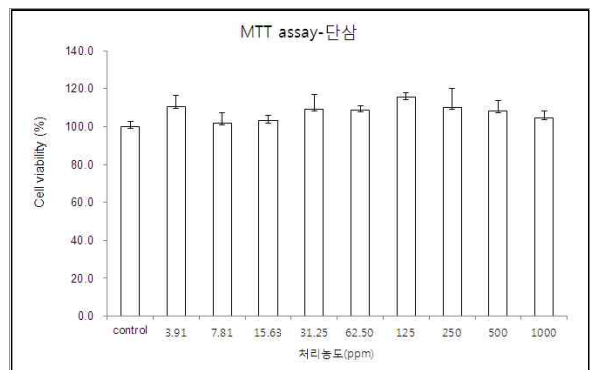
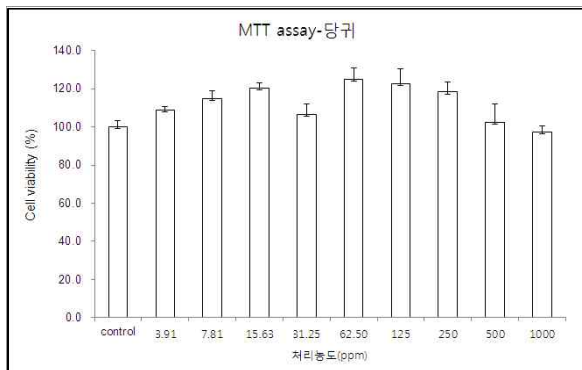


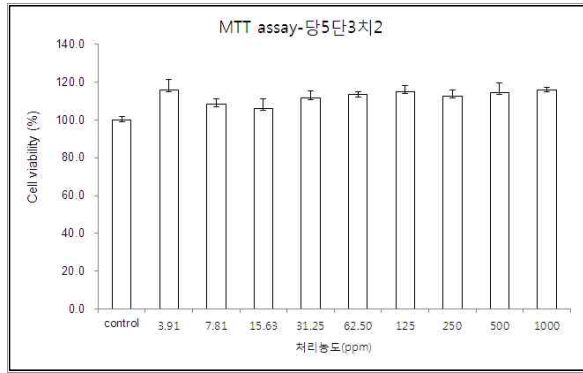
incubator에서 24시간 배양하였음. 24시간 뒤 배양배지를 제거하고 새로운 배양배지와 함께 DMSO (최종농도 1%)를 이용하여 용해한 시료를 농도별로 세포에 처리하고 24시간 동안 배양하였음. 24시간 동안 배양시킨 96 well plate에 PBS에 용해한 MTT 용액 (5 µg/mL)을 가하고, CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 방치하였음. 3시간 동안 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT가 blue formazan을 형성하면 상등액을 제거하고 DMSO를 well당 200 µL씩 넣어 20분간 shaking한 다음 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였음. 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었음.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = (\text{샘플처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

㉔ 실험결과

- 당귀, 단삼, 치자, 당6치4, 당5단3치2를 각각 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm, 31.25 ppm, 15.63 ppm, 7.81 ppm, 3.91 ppm의 농도로 처리하여 세포독성의 확인하였음.
- 치자의 경우 1000 ppm과 500 ppm에서 약간의 세포 독성을 보였고 다른 모든 시료에는 모든 처리 농도에서 세포독성을 보이지 않았음.





⑥ 혈전 (fibrin) 용해 활성

㉠ 시약 및 기기

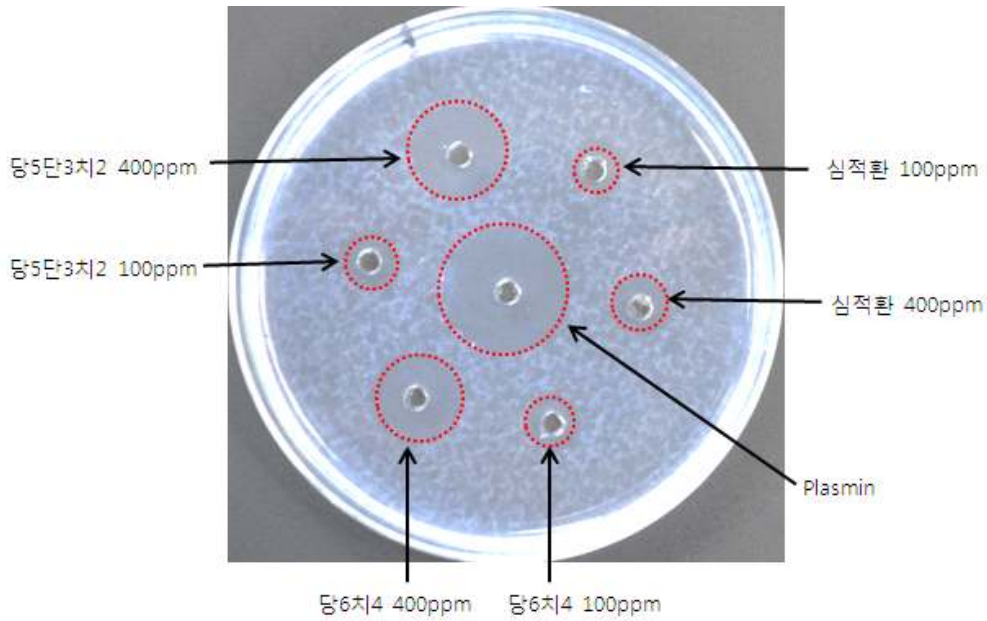
- Fibrinogen (from human plasma), Thrombin (from human plasma), Plasma (from human plasma)는 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품을 사용함.

㉡ 실험 방법

- 50 mM sodium phosphate buffer (pH7.4)에 0.5% 농도로 녹인 fibrinogen 5 ml에 동일 완충용액에 용해한 thrombin (100 NIH unit/ml) 0.1 ml을 가하고 여기에 1% 농도로 용해한 agarose 용액 5 ml을 첨가하여 혼합한 후 직경 9 cm의 petri dish에 붓고 상온에서 1시간 응고하였음. 응고된 fibrin-agarose gel에 직경이 3mm의 구멍을 뚫고 여기에 샘플을 각 농도별로 처리하였음. 양성대조군으로는 plasmin을 사용하였음.

㉢ 실험 결과

Sample	처리농도	용해면적
Plasmin	1U/mL, 10 $\mu$ L	13.85cm <sup>2</sup>
당6치4	100ppm, 10 $\mu$ L	2.01cm <sup>2</sup>
당6치4	400ppm, 10 $\mu$ L	6.15cm <sup>2</sup>
당5단3치2	100ppm, 10 $\mu$ L	2.27cm <sup>2</sup>
당5단3치2	400ppm, 10 $\mu$ L	8.04cm <sup>2</sup>
심적환	100ppm, 10 $\mu$ L	1.54cm <sup>2</sup>
심적환	400ppm, 10 $\mu$ L	2.54cm <sup>2</sup>



(자) 미네랄 함유 당귀를 이용한 고부가가치 제품 개발

① 혈행개선에 도움을 주는 소환 형태의 식품의 개발

○ 미네랄함유 및 발효기술을 접목시킨 ‘발효당귀’ 개발 과정

- 2012년 노지에서 계약재배 된 미네랄 당귀를 이용하여, 맛이 순하고 섭취가 용이한 제품으로 개발하여 발매함. 이전 연구와 특허의 내용을 근거로, 당당귀가 고함량으로 들어간 본 제품을 혈액순환에 도움을 줄 것으로 기대하며 관련 효능 연구를 진행할 계획임.

※ 제품명 : 황성연 발효당귀

※ 식품의 유형 : 기타가공식품

※ 재료 : 당귀 90%, 마 8%, 쌀 2%

※ 제조방법 :

1) 원료 구입 및 선별 세척: 각각의 원료를 선별, 세척하여 건조

2) 혼합 및 증자: 각각의 원료를 배합비율에 따라 혼합한 후 혼합한 원료를 증자

3) 발효 및 증자, 건조: 발효균을 접종하여 발효시킨 후 증자한 원료를 60-80℃에서 건조

4) 제분 및 제환, 정환: 건조한 원료를 제분한 분말을 쌀풀에 혼합하여 제환하며 제환한 환을 정환기에 넣어 둥글게 성형

5) 건조 및 선별: 환을 성형한 후 60-80℃에서 4시간 건조한 후 환 크기에 따라 선별

6) 충전, 포장 및 검사, 출하: 환을 충전한 후 식품의 표기 기준에 적합한 표시지침을 표시하여 출하



## ② 제품사진



## ③ 제조방법 설명서

### 제조방법 설명서

- 제품명 : 황성원발효강귀
- 식품의 유형 : 기타가공식품
- 재료 : 당귀 90%, 마8%, 현2%



- 유통기한 : 제조일로부터 24개월
- 유통기한 서정사유 : 제조가공업소 유통기한 설정시제 참조 및 설정에 따른 조사결과에 의함
- 유통기한 기제 기구 및 설비 : 세척실, 저울, 건조기,속성분,배합기,출,배합기,제분기,나말기,환주기,정환기,선별기,정환기
- 제조방법

- ① 원료 구입 및 선별세척: 각각의 원료를 선별, 세척하여 건조한다.
- ② 혼합 및 증자: 각각의 원료를 배합비율에 따라 혼합한 후 혼합한 원료를 증자한다
- ③ 발효 및 증자, 건조: 발효분을 집종하여 발효시킨 후 증자한 원료를 60-80℃에서 건조한다.
- ④ 세분 및 제환, 정환: 건조한 원료를 세분한 분말을 활물에 혼합하여 제환하며 제환한 환을 정환기에 넣어 등급제 성형한다.
- ⑤ 건조 및 선별: 환을 성형한 후 60-80℃에서 4시간 건조한 후 환 크기에 따라 선별한다.
- ⑥ 충전,포장 및 검사,출하: 환을 충전한 후 식품의 표기 기준에 적합한 표시지침을 표시하여 출하한다.

- 제품의 특성(성상) : 이 제품은 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 · 이취가 없어야 한다.
- 기 타
- 포장단위 : 자사포장단위 (180g)
- 포장재질 : PETE(폴리에틸렌테레프탈레이트)

남해보물섬 영농조합법인

대표자 이금선, 손헌도(인)



## ④ 품목제조신고

※ 식품위생법 시행규칙 (별지 제43호서식) (개정2011. 8. 19)

### 식품(식품첨가물)품목제조보고서

보고인	성 명	남해보물섬영농조합법인 (이금선, 손헌도)	주민등록번호	194671-0001921 670217-2830422 651207-1683127
	주 소	경상남도 남해군 남면 평산리 902-6	전화번호	010-2962-7002, 011-507-4339

영업소	명 칭 ( 상 호 )	남해보물섬영농조합법인
	주 소	경상남도 남해군 남면 평산리 902-6

식품의 유형	기타가공식품	①영업 신고 번 호	제 107 호
	제품명	황성원발효강귀	
유통기한 품질유지기한	제조일부터 일(24 월, 년)		
	제조일부터 일( 월, 년)		
원재료명또는성 산명및재활용율	당귀 90%, 마8%, 현2%		
	용도·용법	1일2회 1회3g 물과함께 섭취한다.	
포장방법및포장 단위	PETE(폴리에틸렌테레프탈레이트)		
	자사포장단위180g		
성상	이 제품은 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 · 이취가 없어야 한다.		
고열량·저지방·식 용·해당 여부	[ ] 에 [ ] 아니오 [ ] 해당없음		

기타

\*식품위생법 제27조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고 합니다.

일 수	보관소 - 8200 (2018. 2. 11) (18년)
2018년 2월 19일	
이금선	손헌도
이금선	손헌도

보고인 남해보물섬영농조합 법인  
이금선, 손헌도 (생필 또는 인)

### 남해군수 귀하

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생법시행규칙에 발급한 식품등의 표시 기준 및 규격 참조서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

유의사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 해당식품 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분명 경우만 해당합니다.

원본대조필





관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2012.07.31  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2012-0083903 (접수번호 1-1-2012-0613037-07)  
 출원인명칭 안동대학교 산학협력단(2-2005-020294-7) 외 2명  
 대리인성명 특허법인 태웅(9-2012-100102-8)  
 발명자성명 손호용 황성언  
 발명의명칭 정당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기공코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 \* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원들 기조로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상라이언, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적으로첨가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서 등을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2012.07.31  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2012-0083899 (접수번호 1-1-2012-0613019-85)  
 출원인명칭 안동대학교 산학협력단(2-2005-020294-7) 외 2명  
 대리인성명 특허법인 태웅(9-2012-100102-8)  
 발명자성명 손호용 황성언  
 발명의명칭 정당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기공코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 \* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원들 기조로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상라이언, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적으로첨가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서 등을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

(3) 3차년도

(가) 당귀를 이용한 건강기능식품 (개별인정형)의 개발

○ WSY-3063

- 참당귀, 단삼, 치자를 이용하여 혈행개선 효능 스크리닝 결과 (2차년도 효능시험).

참당귀 : 단삼 : 치자 = 5 : 3 : 2의 비율로 확정하였으며, WSY-3063이라 칭함.

○ WSY-3063의 개별인정형 개발을 위한 추가 효능 시험 진행

※ In vitro

① 세포접착단백질 (ICAM-1)의 발현억제 실험

- TNF-α에 의해 활성화된 HUVEC세포에서 세포접착단백질인 ICAM-1의 발현을 억제하는 효능을 측정하기 위해 면역세포화학염색을 실시함.

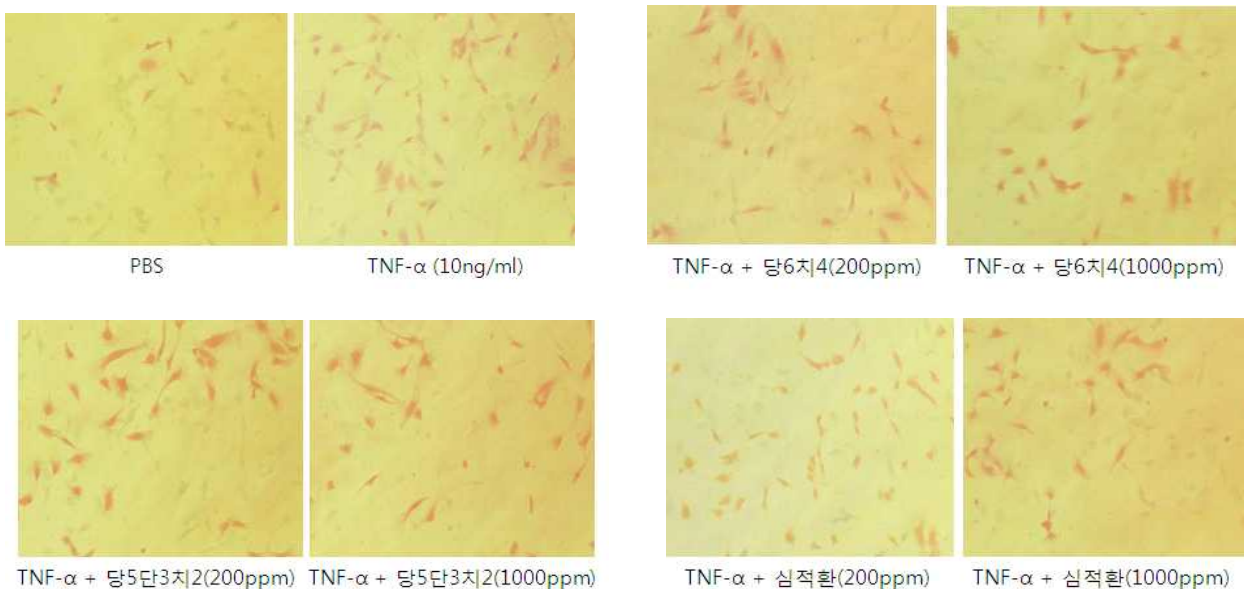
㉞ 실험방법

- 24 well plate에 12 mm 커버글라스를 넣고 HUVEC세포를  $1 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 1 ml/well seeding 후 배양 (at 37°C, for 24 hours)하여 샘플을 처리하고 1시간 후 TNF-α를 1 μg/ml 처리하고 다시 배양 (at 37°C, for 24 hours)한 후 배지를 PBS로 씻어낸 후 4% formalin으로 고정하고 일차항체인 ICAM-1 (Cell Signaling Technology, MA, USA) 과 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 이용하여 항원을 표지하고 DAB로 발색. Mayer's hematoxylin으로 배경 염색 진행함.

㉞ 실험결과

- 정상적인 인간 제대정맥혈관내피세포군 (PBS 처리군)은 ICAM-1의 발현이 된 세포가 극소수이지만 TNF-α에 의해 활성화한 세포군 (TNF-α 처리군)은 약 70% 이상의 세포가 발현 (아래의 그림에서 적갈색으로 표지된 세포)되었고 당6치4 또는 당5단3치2를 처리한 경우 ICAM-1의 발현이 처리한 농도에 의존적으로 감소함을 알 수 있음.

- 또한 대조군으로 사용한 심적환을 처리한 경우 ICAM-1의 발현에 영향을 주지 않았음.



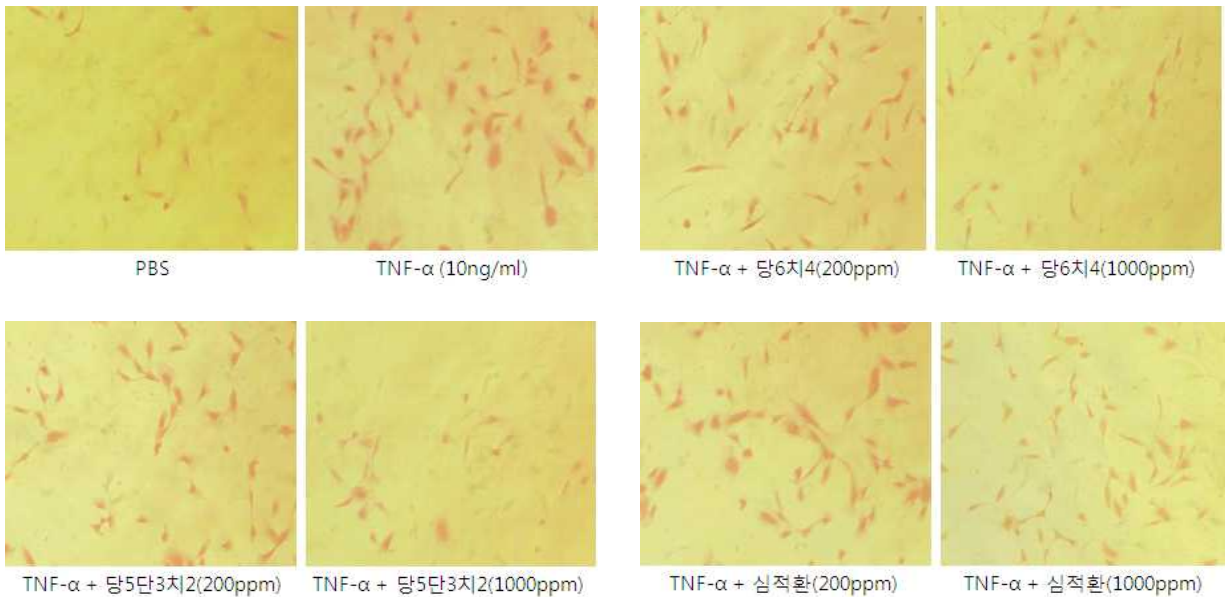


②세포접착단백질 (VCAM-1)의 발현억제 실험

- 실험방법 ICAM-1과 동일

㉞ 실험 결과

- 정상적인 인간 제대정맥혈관내피세포군 (PBS 처리군)은 VCAM-1의 발현이 된 세포가 극소수이지만 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화한 세포군 (TNF- $\alpha$  처리군)은 약 70% 이상의 세포가 발현 (아래의 그림에서 적갈색으로 표지된 세포)되었고 당6치4 또는 당5단3치2를 처리한 경우 VCAM-1의 발현이 처리한 농도에 의존적으로 감소함을 알 수 있었음.
- 또한 대조군으로 사용한 심적환을 처리한 경우 VCAM-1의 발현에 영향을 주지 않았음.



③ 혈관염증유발 효소 (COX-2)의 발현억제 실험

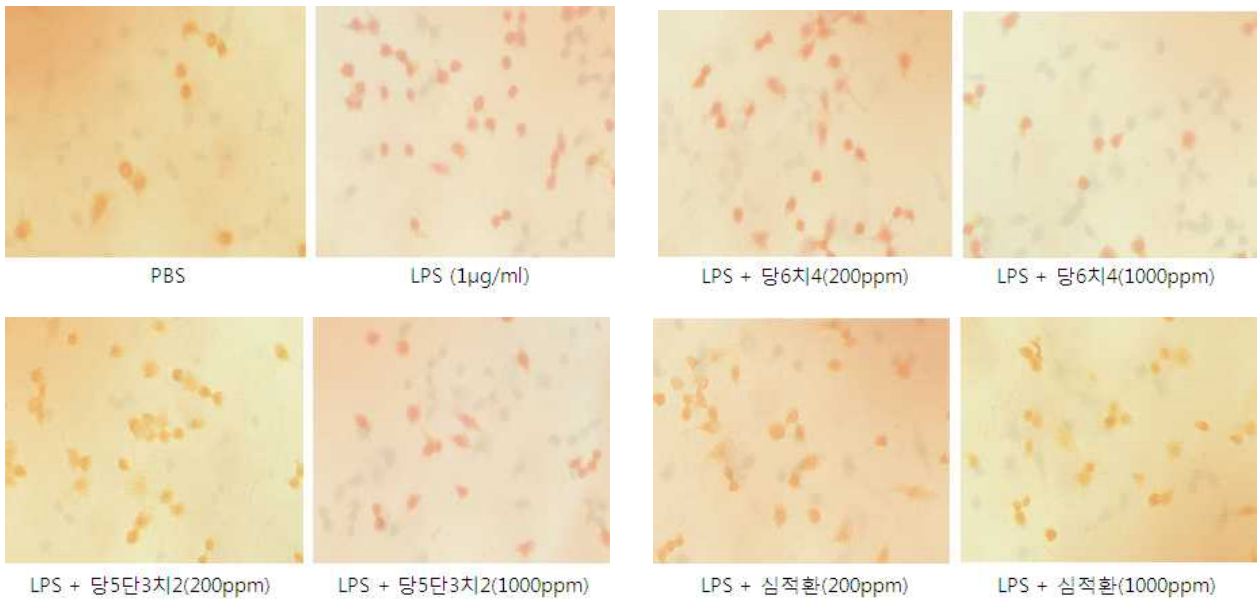
- LPS를 이용한 염증 세포 (Raw264.7 cell)모델에서 염증유발효소인 COX-2의 생체내 발현을 억제하는 효능을 측정하기 위해 면역세포화학염색을 실시함.

㉞ 실험 방법

- 4 well plate에 12 mm 커버글라스를 넣고 RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 1 ml/well seeding 후 배양 (at 37 $^{\circ}$ C, for 24 hours)하여 샘플을 처리하고 1시간 후 LPS (1  $\mu$ g/ml) 처리하고 다시 배양 (at 37 $^{\circ}$ C, for 24 hours)한 후 배지를 PBS로 씻어낸 후 4% formalin으로 고정하고 일차항체인 COX-2 (Cell signaling Technology, MA, USA) 와 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 이용하여 항원을 표지하고 DAB로 발색. Mayer's hematoxylin으로 배경 염색 진행함.

㉞ 실험 결과

- 정상세포군 (PBS 처리)은 COX-2의 발현이 된 세포가 극소수이지만 염증을 유발한 세포군 (LPS 처리)은 약 50% 이상의 세포가 발현(아래의 그림에서 적갈색으로 표지된 세포)되었고 당6치4 또는 당5단3치2를 처리한 세포군은 혈관염증유발 효소인 COX-2의 발현을 200ppm의 처리농도에서는 억제하지 않지만 1000ppm의 처리농도에서는 억제함.
- 또한 대조군으로 사용한 심적환을 처리한 경우 COX-2의 발현에 영향을 주지 않음.



④ 혈관염증유발 효소(5-LO)의 발현억제 실험

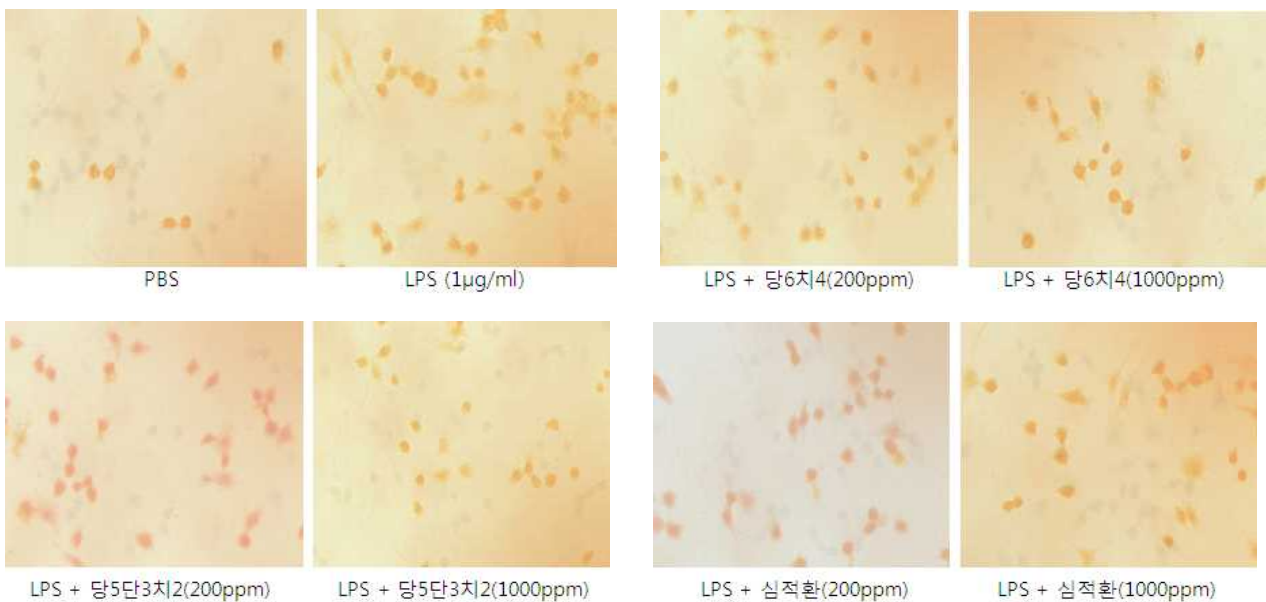
- LPS를 이용한 염증 세포 (Raw264.7 cell)모델에서 염증유발효소인 5-LO의 생체내 발현을 억제하는 효능을 측정하기 위해 면역세포화학염색을 실시함.

- 실험 방법 COX-2와 동일

㉞ 실험 결과

- 정상세포군 (PBS 처리)은 5-LO의 발현이 된 세포가 극소수이지만 염증을 유발한 세포군 (LPS 처리)은 약 50% 이상의 세포가 발현 (아래의 그림에서 적갈색으로 표지된 세포)되었고 당6치4 또는 당5단3치2를 처리한 세포군은 혈관염증유발 효소인 5-LO의 발현을 200ppm의 처리농도에서는 억제하지 않지만 1000ppm의 처리농도에서는 억제함.

- 또한 대조군으로 사용한 심적환을 처리한 경우 5-LO의 발현에 영향을 주지 않음.



⑤ Human LDL 산화억제

- LDL의 산화는 혈전형성, 혈관내피세포의 손상, 죽상판의 확대 및 거품세포(foam)의 형성에 관련된 것으로 알려져 있음.
- 본 연구에서는 Cu<sup>2+</sup>로 유도된 human LDL의 산화를 음성대조군과 대비하여 백분율로 측정 하였음.

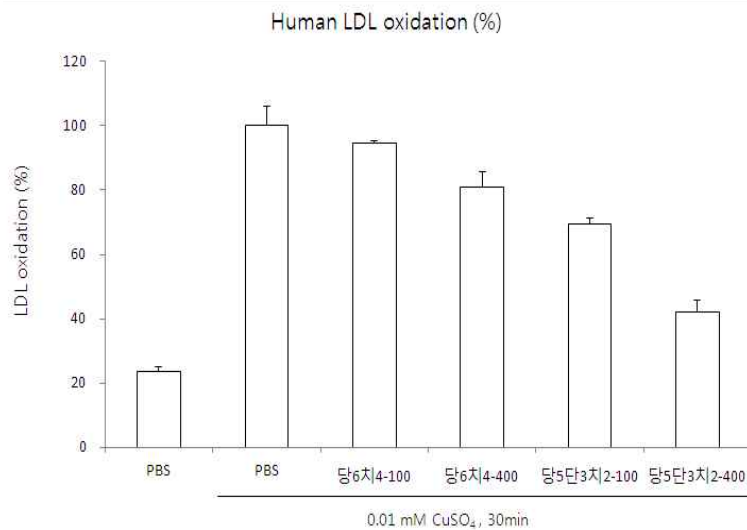
㉠ 실험 방법

- Human LDL (≥ 5 mg/mL, Sigma Chemical Co., Louis, MO, USA)을 10 mM PBS buffer (pH 7.4) 10 mL에 희석한 후 320 μL를 분주하고 여기에 0.1 mM CuSO<sub>4</sub> 40 μL 및 농도별로 희석한 시료 40 μL를 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 20% TCA (Trichloroacetic acid)를 1 mL 및 0.67% TBA (2-thiobarbituric acid, in 0.05 M NaOH)를 1 mL 첨가하였음. 95°C, 45분간 water bath에서 반응시키고 얼음으로 냉각시킨 후 1,000×g에서 10 분간 원심분리 하였음. 생성된 MDA (malondialdehyde)를 ELISA reader (Molecular Devices) 기기를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였음. LDL의 산화율은 다음과 같은 식을 사용하여 나타냄. LDL 산화율 (%) = (시료 처리군의 흡광도/시료 무처리군의 흡광도)×100. 실험결과는 2회 반복하여 평균±표준오차 (mean±SEM)로 나타냈으며, Student's t-test로 통계처리하여 비교함. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우 (p < 0.05) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였음.

㉡ 실험 결과

- 당6치4 및 당5단3치2의 최종반응 농도가 각각 100 ppm, 400 ppm일 경우, human LDL의 산화는 아래의 표에 표현한 바와 같이 human LDL의 산화가 처리농도에 의존적으로 감소함.

Human LDL oxidation (%)						
Sample 처리농도	PBS	0.01 mM CuSO <sub>4</sub> , 30min 처리				
		PBS	당6치4 100ppm	당6치4 400ppm	당5단3치2 100ppm	당5단3치2 400ppm
IC <sub>50</sub> (ppm)	23.42 ± 1.65	100.00 ± 6.04	94.57 ± 0.91	80.85 ± 4.94	69.34 ± 1.83	41.91 ± 4.02



⑥ ACE효소억제

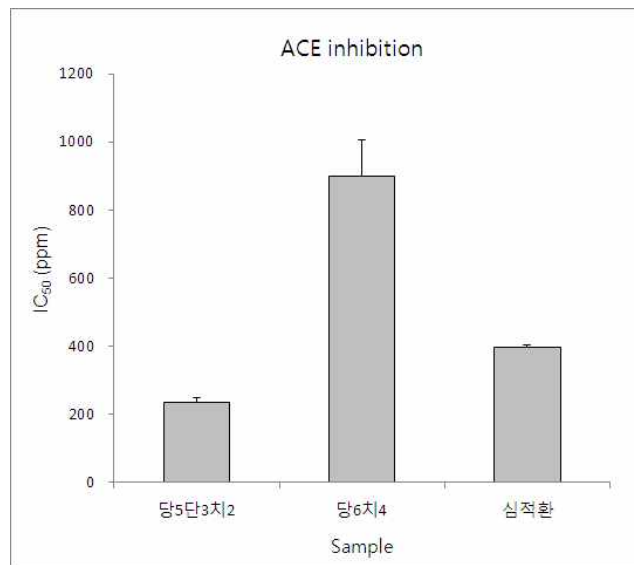
- 당귀, 치자, 단삼이 혈관수축작용을 담당하는 ACE효소를 저해시켜 혈관의 이완을 통해 혈압의 감소와 원활한 혈액순환을 유도하는지 알아보기 위해 ACE효소 억제율을 실험 진행. 실험에 사용한 ACE의 기질인 Angiotensin I을 대신하여 N-Hippuryl-His-Leu을 사용하였고 ACE는 토끼의 폐 조직 powder로부터 추출하여 효소액으로 사용했다. 효소반응을 통해 생성된 hippuric acid를 228 nm에서 측정하여 저해율을 확인함.[1-4]

㉠ 실험 방법

- 시료들을 3000 ppm이 되게 증류수에 녹여 사용 전까지 4℃에 보관했다. 본 실험은 Cho 등[1-4]의 방법을 수정하여 수행. Rabbit lung acetone powder (Sigma, USA)을 0.3 M NaCl 이 함유된 0.1 M Sodium borate buffer (pH 8.3) 0.1 g/ml (w/v)의 농도로 한 후, 4℃ 2 시간 추출하였다. 이후 4℃, 4000 rpm에서 40 min동안 원심분리 하였으며, 상등액을 ACE 조효소액으로 사용함. 기질은 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M Sodium borate buffer (pH 8.3)에 HHL (hippuryl-histidyl-leucine)을 5 mg/ml (w/v)의 농도로 녹인 후 사용함. ACE 저해활성은 시료 50 μl에 ACE 조효소액 50 μl을 가한 다음 37℃에서 5 분간 예비반응을 시킨 뒤 기질 용액 50μl을 가한 후 다시 37℃에서 2시간 반응. 0.1 M HCl 150 μl를 첨가하여 반응을 정지시키고 750 μl의 ethyl acetate를 가한 후 15 초간 교반하고 4℃, 3000 rpm에서 5 분간 원심분리 진행. 상등액을 완전히 건조시키고 증류수 1 ml에 녹여 228 nm에서 흡광도를 측정함. 음성 대조군으로는 조효소액 대신 증류수를 사용하였으며 양성 대조군은 Enalapril maleate salt를 사용함. 모든 대조군 및 실험군은 2반복 하여 ACE 저해율을 다음 계산식을 이용하여 계산함. ACE 저해율 (%) = [1 - (O.D. of ACE test / O.D. of ACE control)] × 100

㉡ 실험 결과

	제조농도 (ppm)	최종농도 (ppm)	저해율	IC <sub>50</sub>
당5단3치2	3000	1000	86.7 ± 0.52	235.0 ppm
	1500	500	66.2 ± 1.05	
	750	250	57.4 ± 2.79	
	375	125	37.2 ± 1.39	
당6치4	3000	1000	51.3 ± 2.61	896.3 ppm
	1500	500	43.4 ± 2.09	
	750	250	34.1 ± 2.35	
	375	125	30.9 ± 2.09	
심적환	3000	1000	81.6 ± 0.26	395.0 ppm
	1500	500	61.2 ± 0.35	
	750	250	48.3 ± 1.66	
	375	125	25.8 ± 0.17	
Enalapril maleate salt (양성 대조군)	75	25	91.9 ± 0.78	



※ In vivo

① 고지혈증 동물 모델

㉠ 실험방법

- 실험에 사용할 동물은 260~300 g의 7주령 수컷 Sprague Dawley계 흰쥐 (샘타코, Korea) 를 구입한 후 1주 동안 새로운 사육 환경에 적응시키고, 실험 전 기간 동안 실험동물들은 고형사료 (샘타코, Korea) 및 물을 자유롭게 섭취. 사육실 온도는 20±2℃, 상대습도는 65±5%를 유지하고, 광주기와 암주기를 12시간이 되도록 빛을 조절. 고지혈증 동물 모델을 제작하기 위하여 하기한 Table 2.에 나타낸 바와 같이 식이조성을 조절한 사료를 2주간 sham군에는 일반식이를 공급하고 음성대조군과 양성대조군 및 실험군에는 고

콜레스테롤 식이를 공급한 후 하기한 Table 1에 나타낸 바와 같이 각 시료를 농도별로 식이에 첨가하여 다시 4주간 사료를 공급. 마지막 사료의 공급 24시간 후 에테르로 마취하고 하대정맥에서 채혈하였고 20분간 상온에서 방치한 후 고속원심분리기 (Centricon T-42K, Italy)를 이용하여 3,000 rpm으로 15분간 원심분리를 시행하여 혈장을 얻음.

Table 1. Oral dose of sample

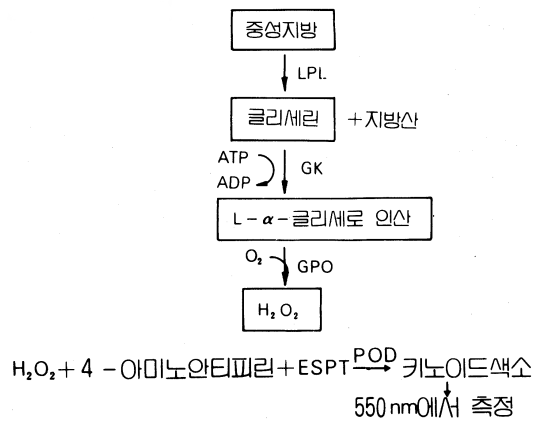
		Oral dose / day(28 days)
Normal diet	sham	DW
High-cholesterol diet	(-)control	DW
	당6치4-100	당6치4 100 mg/kg body weight
	당6치4-400	당6치4 400 mg/kg body weight
	당5단3치2-100	당5단3치2 100 mg/kg body weight
	당5단3치2-400	당5단3치2 400 mg/kg body weight
	심적환-400	심적환 400 mg/kg body weight

Table 2. Ingredient of diet

Ingredient	Normal diet	High-cholesterol diet
	%(w/w)	%(w/w)
Casein(from milk)	20	20
Corn Starch	15	15
Sucrose	49	49
Cellulose	6	4.5
Corn Oil	5	5
Mineral Mixture	3.5	3.5
Vitamin Mixture	1	1
Choline Bitartrate	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3
Cholesterol	0	1
Cholic acid	0	0.5
Total	100	100

Ⓢ 혈중 중성지방 (TG) 측정

㉠ 실험 원리



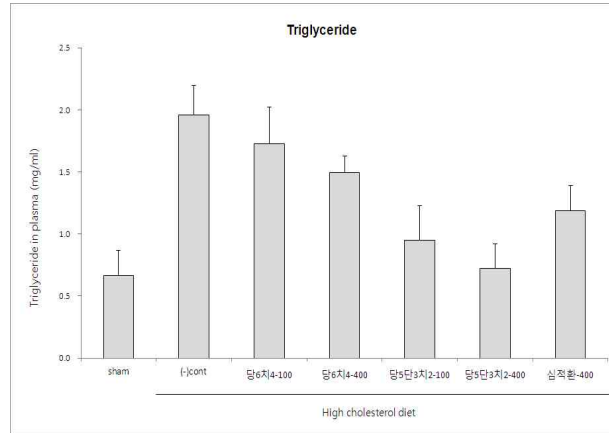
㉡ 실험 방법

- 상기 “고지혈증 동물모델 제작 및 시료투여” 실험에서 채취한 혈장에서 혈중 중성지질 농도는 중성지방 정량 검사용 kit (아산제약)를 이용하여 측정. 즉, 시험관에 혈장 또는 표준 중성지방액 (3 mg/ml)을 20  $\mu$ l를 넣고 효소시액 3 ml 첨가한 후 교반하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 기기를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정. 혈중 중성지방의 농도는 kit에 포함된 표준 중성지방의 표준곡선을 이용하여 측정한다. 실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차 (mean±SEM)로 나타냈으며, Student’s t-test로 통계처리하여 비교. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우 ( $p < 0.05$ ) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정.

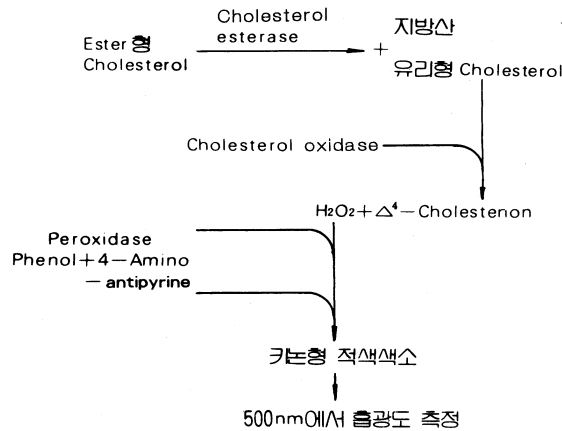
㉢ 실험 결과

Triglyceride in plasma (mg/ml)		
Normal diet	sham	0.66 ± 0.20
High-cholesterol diet	(-)control	1.96 ± 0.24
	당6치4-100	1.73 ± 0.30
	당6치4-400	1.49 ± 0.13
	당5단3치2-100	0.95 ± 0.28
	당5단3치2-400	0.72 ± 0.20
	심적환-400	1.19 ± 0.20





- ㉔ 혈중 총콜레스테롤 측정
- ㉕ 실험 원리

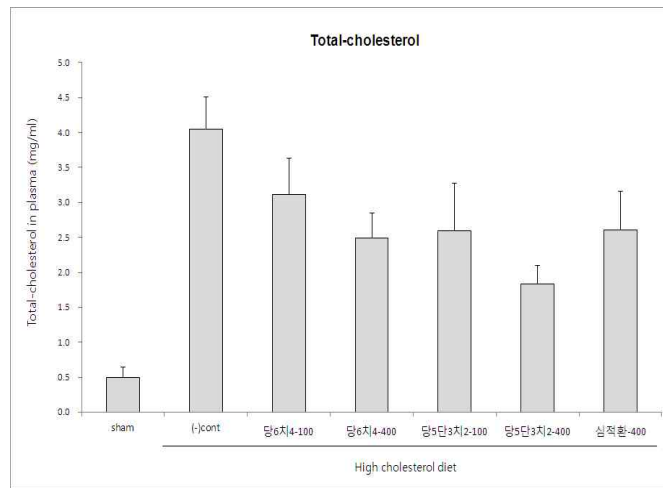


㉖ 실험방법

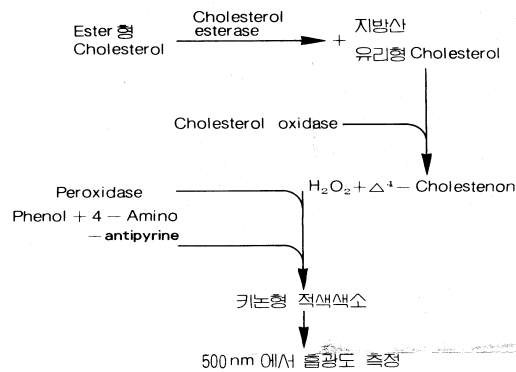
- 상기 “고지혈증 동물모델 제작 및 시료투여” 실험에서 채취한 혈장에서 혈중 총콜레스테롤 농도는 총콜레스테롤 정량 검사용 kit (아산제약)을 이용하여 측정. 즉, 시험관에 혈장 또는 표준 콜레스테롤 용액 (3mg/ml)을 20  $\mu$ l를 넣고 효소시액 3 ml 첨가한 후 교반하고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 기기를 이용하여 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정. 혈중 총콜레스테롤의 농도는 kit에 포함된 표준 콜레스테롤의 표준곡선을 이용하여 측정. 실험결과는 3회 반복하여 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ SEM)로 나타냈으며, Student’s t-test로 통계처리하여 비교. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우 ( $p < 0.05$ ) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정.

㉗ 실험결과

Total-cholesterol in plasma (mg/ml)		
Normal diet	sham	0.50 ± 0.15
High-cholesterol diet	(-)control	4.04 ± 0.47
	당6치4-100	3.11 ± 0.52
	당6치4-400	2.49 ± 0.35
	당5단3치2-100	2.59 ± 0.69
	당5단3치2-400	1.83 ± 0.27
	심적환-400	2.61 ± 0.55



- ㉔ 혈중 HDL-콜레스테롤 측정
- ㉕ 실험원리



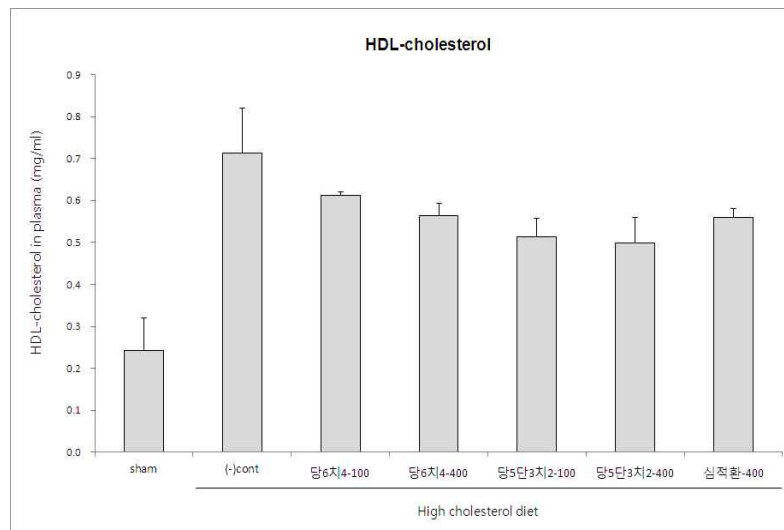
㉖ 실험방법

- 상기 “고지혈증 동물모델 제작 및 시료투여” 실험에서 채취한 혈장에서 HDL-콜레스테롤의 농도는 HDL-콜레스테롤 정량 검사용 kit (아산제약)를 이용하여 측정. 즉, 혈장 200 μl에 분리시액 200 μl를 첨가한 후 교반하고 실온에서 10분간 반응 후 3000 rpm, 10분간 원심분리. 상층액 100 μl에 효소시액 3 ml을 첨가하고 37℃에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 기기를 이용하여 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정. 혈중 HDL-콜레스테롤의 농도는 kit에 포함된 표준 HDL-콜레스

테롤 (0.5 mg/ml)의 표준곡선을 이용하여 측정. 실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차 (mean±SEM)로 나타냈으며, Student's t-test로 통계처리하여 비교. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우 (p < 0.05) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정.

㉔ 실험결과

HDL-cholesterol in plasma (mg/ml)		
Normal diet	sham	0.24 ± 0.08
High-cholesterol diet	(-)control	0.71 ± 0.11
	당6치4-100	0.61 ± 0.01
	당6치4-400	0.56 ± 0.03
	당5단3치2-100	0.51 ± 0.04
	당5단3치2-400	0.50 ± 0.06
	심적환-400	0.56 ± 0.02



㉕ 혈중 LDL-콜레스테롤 측정

㉖ 실험 원리

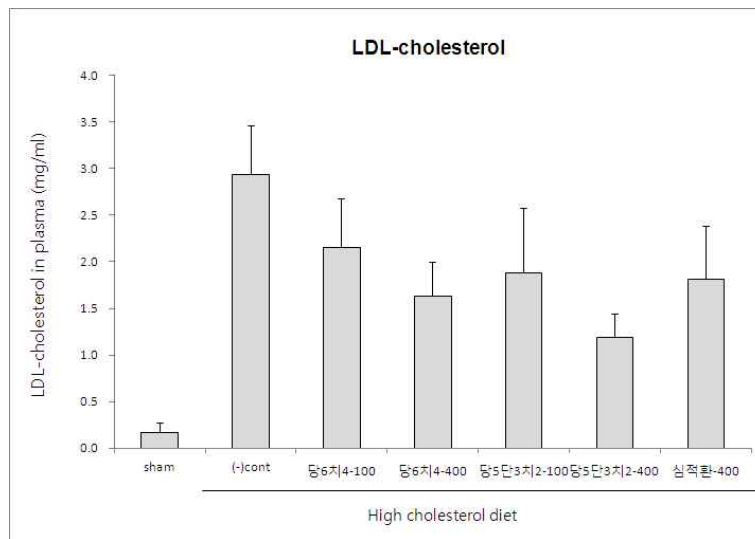
- 혈중 LDL-콜레스테롤의 계산은 상기한 혈중지질농도 측정결과를 Friedewald formula에 대입하여 계산.

㉗ 실험 방법

- LDL cholesterol = Total cholesterol - [HDL cholesterol + (Triglyceride / 5)]의 식을 사용.

㉘ 실험 결과

LDL-cholesterol in plasma (mg/ml)		
Normal diet	sham	0.16 ± 0.10
High-cholesterol diet	(-)control	2.94 ± 0.52
	당6치4-100	2.61 ± 0.51
	당6치4-400	1.63 ± 0.36
	당5단3치2-100	1.89 ± 0.69
	당5단3치2-400	1.19 ± 0.26
	심적환-400	1.81 ± 0.56



㉔ 동맥경화 위험도 지수 (AI) 측정

㉕ 실험 원리

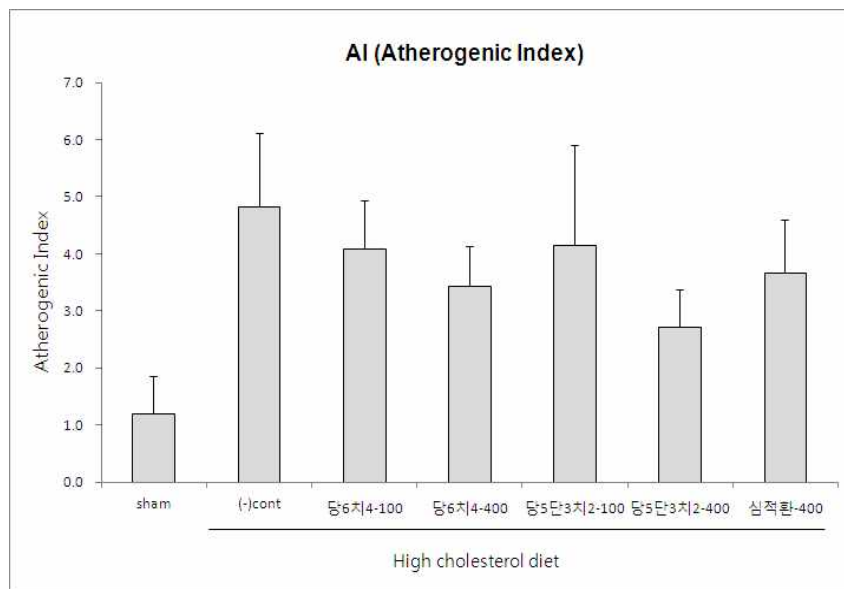
- 동맥경화의 위험도를 나타내는 동맥경화지수의 계산은 상기한 혈중지질농도 측정결과를 다음의 계산식에 대입하여 계산.

㉖ 실험 방법

-  $AI = [(Total\text{-콜레스테롤}) - (HDL\text{-콜레스테롤})] / HDL\text{-콜레스테롤}$ 의 식을 사용.

㉗ 실험 결과

AI (Atherogenic Index)		
Normal diet	sham	1.20 ± 0.66
High-cholesterol diet	(-)control	4.82 ± 1.29
	당6치4-100	4.08 ± 0.84
	당6치4-400	3.43 ± 0.70
	당5단3치2-100	4.15 ± 1.76
	당5단3치2-400	2.70 ± 0.66
	심적환-400	3.66 ± 0.94



㉞ 혈액응고 관련인자 (Thromboxane B<sub>2</sub>) 생성 억제 확인

㉟ 실험 원리

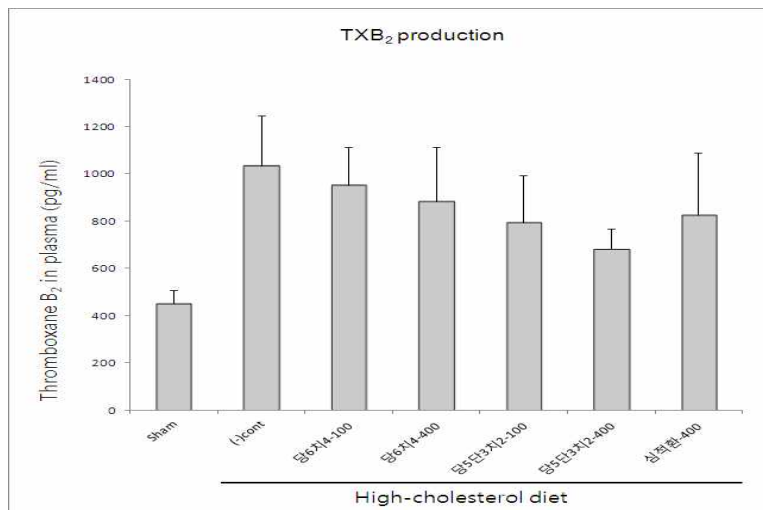
- Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)는 혈소판의 응집, 혈관 수축, 기관지 수축 등의 작용으로 뇌졸중, 혈전증, 협심증, 기관지천식에 관여함.
- 프로스타그란딘(PGG<sub>2</sub> or PGH<sub>2</sub>)이 변환된 TXA<sub>2</sub>는 반감기가 30초 정도로 화학적으로 매우 불안정하여 생성 직후 체내에서 최종대사 산물인 Thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)로 변환됨.

㊱ 실험 방법

- 본 연구에서는 TXA<sub>2</sub>가 변환된 TXB<sub>2</sub>를 ELISA의 방법으로 측정.

㊲ 실험 결과

Thromboxane B <sub>2</sub> in plasma (pg/ml)		
Normal diet	sham	451.6 ± 53.3
High-cholesterol diet	(-)control	1033.4 ± 211.7
	당6치4-100	949.4 ± 160.1
	당6치4-400	881.4 ± 231.1
	당5단3치2-100	794.2 ± 198.3
	당5단3치2-400	681.0 ± 85.0
	심적환-400	824.1 ± 261.9



- 혈행의 기능이 저하 되는 것은 항혈전기능의 저하뿐만 아니라, 고콜레스테롤과 혈관 협착 또한 중요한 지표이며, WSY-3063의 경우 이러한 여러 원인의 혈행의 기능을 개선 할 수 있을 것으로 예상됨.

○ 한풍제약과 계약하여 WSY-3063의 원료 시험제품 생산

① 원료 시험 성적서

HPQC-007

원료 시험 성적서

검 체 명	WSY3063 추출물	Code 번호	WSY3063	
제 조 번 호	13001	의 회 부 서	개발부	
시 험 번 호	2013E0387	시 험 일 자	2013.11.29	
시 험 의 료 번 호	R131128-1	포 장 단 위		
시 험 항 목	시 험 방 법	기 준, 규 격	시 험 결 과	시 험 자
1. 성 상	육안으로 외관을 관찰한다.	갈색의 분말로 약간 특이한 냄새가 있음	7.9g	유진주
2. 수 분	식품공전 II 1. 식품분석시험법 1.1.1 수분	6.6 % 이하	5.01 %	박노라
3. 이 물	식품공전 제10. 일반시험법 9.3 이 물	불결출	불결출	윤차영
4. 대장균시험	식품공전 제10. 일반시험법 3.7 대 장균	음성	음성	김정우
5. Decurcin	대한민국약전 의약품 각조 2부 생 약 및 생약제제	44.64 mg/g의 80-120%	111.08 %	윤차영
6. Geniposide	대한민국약전 의약품 각조 2부 생 약 및 생약제제	30.56 mg/g의 80-120%	111.13 %	윤차영
7. Salvianolic acid B	대한민국약전 의약품 각조 2부 생 약 및 생약제제	13.80 mg/g의 80-120%	111.06 %	김정우
8. 납(mg/kg)	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중 금속시험	3.0 mg/kg이하	1.18 mg/kg	이유진
9. 카드뮴(mg/kg)	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중 금속시험	1.0 mg/kg이하	0.21 mg/kg	이유진
10. 총비소(mg/kg)	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중 금속시험	1.0 mg/kg이하	0.21 mg/kg	이유진
11. 총수은(mg/kg)	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중 금속시험	1.0 mg/kg이하	0.00 mg/kg	이유진
12. 잔류농약	대한민국약전 일반시험법 중 생약 시험법의 잔류농약시험법	총 DDT 0.1 ppm 이하 총 BHC 0.2 ppm 이하 Aldrin 0.01 ppm 이하 Dieldrin 0.01 ppm 이하 Endrin 0.01 ppm 이하	불검출	박노라
판정결과	적합			
판정일자	2013년 12월 10일			
시 험 자	확 인 자	승 인 자		
유진주	박노라	이유진		

(유) 한 풍 제 약 품 질 관 리 부

시 험 일 지					
제품명	WSY3063 추출물	시험일자	2013.11.29	시험자	유진주
1. 성 상	갈색의 분말로 약간 특이한 냄새가 있음 -> 7.9g				
2. 수 분	식품공전 II 1. 식품분석시험법 1.1.1 수분에 따라 시험한다. 시료무게 : 1.998 g 용기무게 : 60.194 g 건조후 무게 : 62.092 g 수 분(%) : $\frac{62.192 - 62.092}{1.998} \times 100 = 5.01 \%$				
3. 이 물	식품공전 제10. 일반시험법 9.3 이물에 따라 시험한다. 기 준 : 불결출 결 과 : 불결출				
4. 대장균군	식품공전 제10. 일반시험법 3.7 대장균군에 따라 시험한다.				
시험명	시험일자	판정일자	배지	시험기준	시험결과
대장균군	2013.12.04	2013.12.09	유당배지	음성	음성
5. Decurcin	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제 당기 함량시험법에 따라 시험한다. 기 준 : 44.64 mg/g의 80-120%				
$\text{총 데쿠르신(C19H20O)의 양(mg/g)} = \frac{\text{데쿠르신 표준품의 양(mg)}}{\text{검체의 양(g)}} \times \frac{\text{AT}}{\text{AS}}$ $\text{Decurcin} = \frac{9.2 \text{ (mg)}}{0.477 \text{ (g)}} \times \frac{510110}{1839945} = 49.59 \text{ mg/g}$ $49.59 / 44.64 \times 100 = 111.08 \%$					
6. Geniposide	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제 치자 함량시험법에 따라 시험한다. 기 준 : 30.56 mg/g의 80-120%				
$\text{Geniposide 양 (mg/g)} = \frac{\text{Geniposide 표준품의 양(mg)}}{\text{검체의 양(g)}} \times \frac{\text{AT}}{\text{AS}}$ $\text{Geniposide} = \frac{10 \text{ (mg)}}{0.9256 \text{ (g)}} \times \frac{7441413}{2359806} = 33.96 \text{ mg/g}$ $33.96 / 30.56 \times 100 = 111.13 \%$					

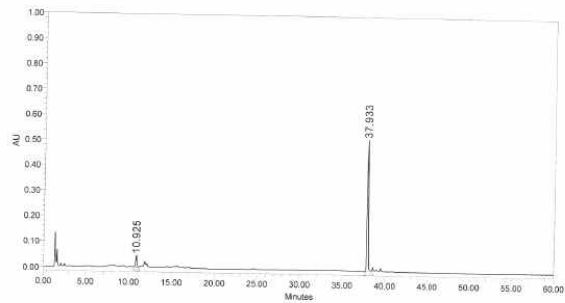
(유) 한 풍 제 약 품 질 관 리 부

시 험 일 지					
제품명	WSY3063 추출물	시험일자	2013.11.29	시험자	유진주
7. Salvianolic acid B	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제 단상 함량시험법에 따라 시험한다. 기 준 : 13.80 mg/g의 80-120%				
$\text{Salvianolic acid B 양 (mg/g)} = \frac{\text{Salvianolic acid B 표준품의 양(mg)}}{\text{검체의 양(g)}} \times \frac{\text{AT}}{\text{AS}}$ $\text{Salvianolic acid B} = \frac{2.9 \text{ (mg)}}{0.6174 \text{ (g)}} \times \frac{1823937}{851724} = 15.73 \text{ mg/g}$ $15.73 / 13.8 \times 100 = 111.06 \%$					
8. 납	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험에 따라 시험한다. 허용기준(mg/kg)보정근거: 식품의약품안전청고시 생약제제 중금속 허용기준				
	중금속	허용기준(mg/kg)	결과(mg/kg)		
	납	3	1.18		
9. 카드뮴	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험에 따라 시험한다. 허용기준(mg/kg)보정근거: 식품의약품안전청고시 생약제제 중금속 허용기준 및 자사기준				
	중금속	허용기준(mg/kg)	결과(mg/kg)		
	카드뮴	1	0.21		
10. 총비소	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험에 따라 시험한다. 허용기준(mg/kg)보정근거: 식품의약품안전청고시 생약제제 중금속 허용기준 및 자사기준				
	중금속	허용기준(mg/kg)	결과(mg/kg)		
	총비소	1	0.21		
11. 총수은	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험에 따라 시험한다. 허용기준(mg/kg)보정근거: 식품의약품안전청고시 생약제제 중금속 허용기준 및 자사기준				
	중금속	허용기준(mg/kg)	결과(mg/kg)		
	총수은	1	0.00		
12. 잔류농약	대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 잔류농약시험법에 따라 시험한다. 총 DDT 0.1 ppm 이하 총 BHC 0.2 ppm 이하 기 준 : Aldrin 0.01 ppm 이하 Dieldrin 0.01 ppm 이하 Endrin 0.01 ppm 이하 판정 : 불검출				

(유) 한 풍 제 약 품 질 관 리 부



Sample Name: WSY3063 8 Nod,Deu



	RT	Area	% Area	Height
1	10.925	398518	7.21	40608
2	37.933	5127140	92.79	513484

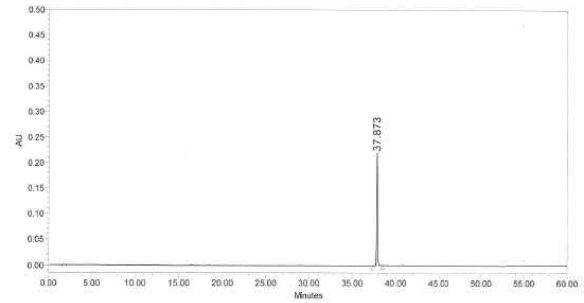
① Nidalein

$$4.2 \text{ mg} \times \frac{398518}{5127140} \times \frac{1.000}{0.511 \text{ g}} = 4.96 \text{ mg/g}$$

② Decursin

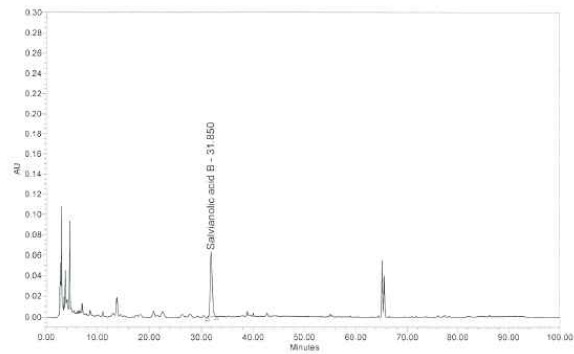
$$9.2 \text{ mg} \times \frac{5127140}{1839945} \times \frac{1.000}{0.511 \text{ g}} = 49.6 \text{ mg/g}$$

Sample Name: Decursin STD



	RT	Area	% Area	Height
1	37.873	1839945	100.00	221970

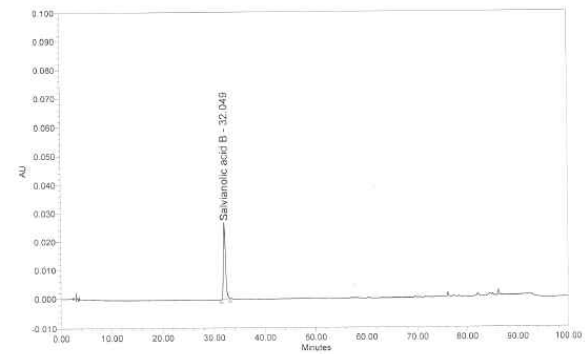
Sample Name: WSY3063 13001  
Date Acquired: 2013-12-10 AM 9:09:51 KST



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Salviannic acid B	31.850	1823937	100.00	62747

$$3.9 \text{ mg} \times \frac{1823937}{151924} \times \frac{1}{0.6114 \text{ g}} = 15.33 \text{ mg/g}$$

Sample Name: Salviannic acid B  
Date Acquired: 2013-12-10 AM 7:28:55 KST



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Salviannic acid B	32.049	751724	100.00	26849



③ 복합물의 제조

당귀 추출물 : 단삼 추출물 : 치자 추출물 = 5 : 3 : 2의 중량비로 혼합  
(당5단3치2; WSY-3063)

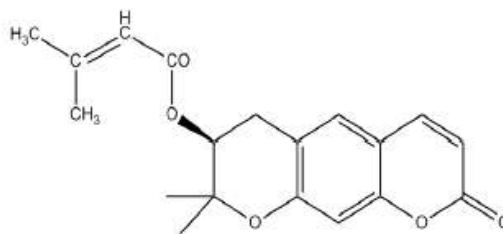
※ 구조 결정, 물리화학적 및 생물학적 성질에 관한 자료

원재료명	학명	사용부위
참당귀	<i>Angelica gigas.</i>	잎, 뿌리
단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	뿌리
치자	<i>Gardenia jasminoides for. grandiflora</i>	열매

※ 지표 성분

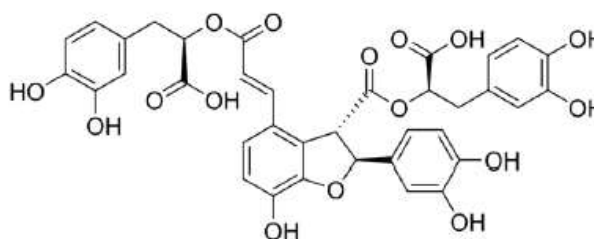
원재료명	기능 (지표)성분
참당귀	Decurcin
단삼	Salvianolic acid B
치자	Geniposide

- Decurcin



Synonyms	(7S)-7,8-Dihydro-8,8-dimethyl-7-[(3-methyl-2-butenoyl)oxy]-2H,6H-benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-2-one
Molecular Formula	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>
Molecular Weight	328.36

- Salvianolic acid B



Synonyms	(2S,3S)-4-[(1E)-3-[(1R)-1-Carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-3-oxo-1-propen-1-yl]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-7-hydroxy-3-benzofurancarboxylic acid 3-[(1R)-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl] ester, Dan Shen Suan B, Danfensuan B, Lithospermic acid B
Molecular Formula	C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>
Molecular Weight	718.61

- Geniposide



Synonyms	Methyl(1R,2S,6S)-9-(hydroxymethyl)-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate
Molecular Formula	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>
Molecular Weight	388.367

○ 시험제품 생산

1회 2정, 1일 3회 복용

WSY3063 정 원료 분량

원료명	규격	mg/ 정 620 mg
WSY3063 혼합 분말	별규	350.0
결정셀룰로오스	식첨	135.0
옥수수전분	KP	92.0
이산화규소	식첨	12.0
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	식첨	14.0
스테아린산마그네슘	식첨	2.0
HPMC	KP	10.00
이산화티타늄	식첨	2.80
글리세린지방산에스테르	식첨	0.90
식용색소 녹색 3호	식첨	0.65
식용색소 적색 40호	식첨	0.65
합 계		620.0

WSY3063 위약 원료 분량

원료명	규격	mg/ 정 620 mg
옥수수전분	KP	302.0
결정셀룰로오스	식첨	275.0
무수구연산	식첨	12.3
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	식첨	12.0
카라멜색소	식첨	2.0
스테아린산마그네슘	식첨	1.5
황색5호알루미늄레이크	식첨	0.2
HPMC	KP	10.00
이산화티타늄	식첨	2.80
글리세린지방산에스테르	식첨	0.90
식용색소 녹색 3호	식첨	0.65
식용색소 적색 40호	식첨	0.65
합 계		620.0

HPQC-008

반 제 품 시 험 성 적 서

검 체 명	WSY3063위약검	Code 번호	F-WSY3063위약	
제 조 번 호	14001	의 외 부 서	개발부	
시 험 번 호	2014R10135	시 험 일 자	2014.03.18	
시험의뢰번호	R140317-2	포 장 단 위		
시 험 항 목	시 험 방 법	기준,규격	시험결과	시 험 자
1. 성 상	육안으로 외관을 관찰한다.	주황색의 장방형 필름 코팅된 정제	주황색의 장방형 필름 코팅된 정제	유진자
2. 중량편차	저울을 이용하여 무게를 측정한다.	± 5%	적합	유진자
3. 분해시험	식품공전 제10. 일반시험법 9. 일반 시험법 9.6 분해시험법	60분 이내	14분	김진화
4. 대장균군	식품공전 제10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군	음성	음성	김진화
5. Decurcin	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
6. Geniposide	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
7. Salvianolic acid B	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
8. 납	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	3.0 mg/kg이하	0.06mg/kg	이유진
9. 카드뮴	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.05 mg/kg	이유진
10. 총비소	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.53 mg/kg	이유진
11. 총수은	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.00 mg/kg	이유진
12. 잔류농약	대한민국약전 생약시험법	총 COT 0.1 ppm 이하 총 BHC 0.2 ppm 이하 Aldrin 0.01 ppm 이하 Dieldrin 0.01 ppm 이하 Endrin 0.01 ppm 이하	불검출	박정아
판정결과	적합	판정일자: 2014. 3. 22. 일	시 험 자	확인 자
			이유진	2014. 3. 22

(유) 한 품 제 약 품 질 관 리 부

HPQC-008

반 제 품 시 험 성 적 서

검 체 명	WSY3063위약검	Code 번호	F-WSY3063위약	
제 조 번 호	14001	의 외 부 서	개발부	
시 험 번 호	2014R10135	시 험 일 자	2014.03.18	
시험의뢰번호	R140317-2	포 장 단 위		
시 험 항 목	시 험 방 법	기준,규격	시험결과	시 험 자
1. 성 상	육안으로 외관을 관찰한다.	주황색의 장방형 필름 코팅된 정제	주황색의 장방형 필름 코팅된 정제	유진자
2. 중량편차	저울을 이용하여 무게를 측정한다.	± 5%	적합	유진자
3. 분해시험	식품공전 제10. 일반시험법 9. 일반 시험법 9.6 분해시험법	60분 이내	14분	김진화
4. 대장균군	식품공전 제10. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군	음성	음성	김진화
5. Decurcin	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
6. Geniposide	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
7. Salvianolic acid B	대한민국약전 의약품 각조 2부 생약 및 생약제제	불검출	불검출	김영옥
8. 납	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	3.0 mg/kg이하	0.06mg/kg	이유진
9. 카드뮴	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.05 mg/kg	이유진
10. 총비소	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.53 mg/kg	이유진
11. 총수은	식품공전 제10. 일반시험법 7.1 중금속시험	1.0 mg/kg이하	0.00 mg/kg	이유진
12. 잔류농약	대한민국약전 생약시험법	총 COT 0.1 ppm 이하 총 BHC 0.2 ppm 이하 Aldrin 0.01 ppm 이하 Dieldrin 0.01 ppm 이하 Endrin 0.01 ppm 이하	불검출	박정아
판정결과	적합	판정일자: 2014. 3. 22. 일	시 험 자	확인 자
			이유진	2014. 3. 22

(유) 한 품 제 약 품 질 관 리 부

- 시험제품



198정/1box (4주±5day 복용분량)  
Visit2, 3 1box씩 총 2박스

- 박스 겔 라벨

<b>인체적용시험용</b>	<b>Subject Initial:</b> <input type="text"/>
<b>【코드명】</b> WSY3063	<b>Random No.</b> R W <input type="text"/>
<b>【제조번호】</b> 14001	<b>Visit No.</b>
<b>【고유코드】</b> Drug code	<b>Date:</b> /        /
<b>Study No. KBMSI WSY3063</b>	

- 복용 설명서

<b>인체적용시험용</b>	<b>【복용 방법】</b>
<b>【코드명】</b> WSY3063	1. 1회 3정을 하루에 2번 식후 30분 이내에 물과 함께 복용하시기 바랍니다.
<b>【제조번호】</b> 14001	2. 시험대상자 일지에 복용유무를 체크해주시기 바랍니다.
<b>【고유코드】</b> Drug code	3. 복용하지 않고 남은 제품은 반납해주시기 바랍니다.
<b>【제조일자】</b> 2014년 03월 14일	4. 복용하고 남은 빈 포장물을 포함하여 모든 포장물을 반납해주시기 바랍니다.
<b>【유효기간】</b> 제조일로부터 24개월	
<b>【용법용량】</b> 1회 3정, 1일 2회 물과 함께 섭취	
<b>【보관방법】</b> 차광포장, 실온(1~30℃)보관	
<b>【제조의뢰자】</b> (주) 한국전통의학연구소	
<b>【제조사】</b> 한풍제약	
임상시험 외의 목적으로 사용할 수 없음	

○ 비임상 독성 시험

① GLP기관인 메드빌과 계약

- WSY-3063 혈행개선 건강기능식품용 조성물의 혈행개선 효능에 대해 인체적용시험을 진행하고 개별인정형 신청을 위해 필요한 안전성 데이터를 확보하기 위해, 식약처의 가이드라인에 따라 공인 GLP 기관에 일반 독성 시험을 의뢰함.
- 시험항목 : 랫드 단회투여독성시험, 랫드 4주 DRF, 랫드 13주 반복독성 (4주 회복군 포함)
- 시험기관 : (주) 메드빌
- 계약서



## 연구 계약서

㈜한국전통의학연구소 (서울시 중구 신문로 2가 1-160 프라임타워 1층 이하 "갑"이라 한다) 와 GLP 안전성평가기관 ㈜메드빌 (서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래타워 15층 이하 "을"이라 한다) 은 위탁 연구 계약을 다음과 같이 체결 한다.

### 제 1조 (시험목적 및 범위)

■ 위탁과제명: 당귀 추출물 등 복합물 물질에 대한 복귀돌연변이시험, 염색체이상 시험 및 소핵시험

■ 위탁연구비: 이천만 원 (₩20,000,000원, VAT별도)

시험항목	단가(원)	시험 물질 수	소요기간(주)
복귀돌연변이시험	20,000	1	8
염색체이상시험			8
소핵시험			8
총 합계	₩20,000,000원 (VAT 별도)		

- 1) 부가세 별도입니다.
- 2) 상기 견적은 국문 보고서 2부 기준입니다.
- 3) 시험소요기간은 시험물질 입수완료 및 분석 조건 제공일로부터 최종보고서(초안) 제출일까지입니다.
- 4) 상세일정은 시험협의 내용에 따라 단축 또는 연장이 될 수 있습니다. 또한, 시험 내용협의 결과에 따라 연구비 및 기간이 조절될 수 있습니다.

■ 위탁 연구 기간: 2013년 06월 03일 ~ 2013년 10월 31일

### 제 2조 (연구기간)

본 연구의 연구기간은 상기 위탁연구기간으로 하되, 연구의 시작일은 시험물질 입수일 및 분석조건 제공 완료일로 하며, 연구개발 종료일은 최종보고서(초안)제출일로 한다. 기간은 "갑"과 "을" 쌍방의 합의에 의하여 변경할 수 있다.

### 제 3 조 (연구수행)

- 1) "갑"은 "을"에게 시험의 수행에 필요한 정보 및 시험물질을 제공한다.
- 2) "을"은 "갑"에게 시험계획서(초안)를 제출하고, "갑"은 이에 대하여 검토의견을

## 연구 계약서

㈜한국전통의학연구소 (서울시 중구 신문로 2가 1-160 프라임타워 1층 이하 "갑"이라 한다) 와 GLP 안전성평가기관 ㈜메드빌 (서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래타워 15층 이하 "을"이라 한다) 은 위탁 연구 계약을 다음과 같이 체결 한다.

### 제 1조 (시험목적 및 범위)

■ 위탁과제명: 당귀 추출물 등 복합물 물질에 대한 단회투여독성시험, 4주DRF 및 13주 반복시험

■ 위탁연구비: 일억 원 (₩100,000,000원, VAT별도)

시험항목	단가(원)	시험 물질 수	소요기간(주)
맷드 단회투여독성시험	100,000	1	6
맷드 4주 DRF			8
맷드 13주 반복 (회복군포함)			32
총 합계	₩100,000,000원 (VAT 별도)		

- 1) 부가세 별도입니다.
- 2) 상기 견적은 국문 보고서 2부 기준입니다.
- 3) 시험소요기간은 시험물질 입수완료 및 분석 조건 제공일로부터 최종보고서(초안) 제출일까지입니다.
- 4) 상세일정은 시험협의 내용에 따라 단축 또는 연장이 될 수 있습니다. 또한, 시험 내용협의 결과에 따라 연구비 및 기간이 조절될 수 있습니다.

■ 위탁 연구 기간: 2013년 06월 03일 ~ 2014년 06월 30일

### 제 2조 (연구기간)

본 연구의 연구기간은 상기 위탁연구기간으로 하되, 연구의 시작일은 시험물질 입수일 및 분석조건 제공 완료일로 하며, 연구개발 종료일은 최종보고서(초안)제출일로 한다. 기간은 "갑"과 "을" 쌍방의 합의에 의하여 변경할 수 있다.

### 제 3 조 (연구수행)

- 1) "갑"은 "을"에게 시험의 수행에 필요한 정보 및 시험물질을 제공한다.
- 2) "을"은 "갑"에게 시험계획서(초안)를 제출하고, "갑"은 이에 대하여 검토의견을

## - 결과 보고서

## ※ 복귀돌연변이 시험

### 최종보고서

#### WSY-3063의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이시험

(시험번호: G01-13028)

### ㈜메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21, IT미래타워 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · http://www.medvill.co.kr



Study No.: G01-13028

### 신뢰성보증확인서

시험 제 목: WSY-3063의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험  
시 항 번 호: G01-13028

점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험계획서	2013. 12. 20.	2013. 12. 20.
시험계획서 변경	2013. 12. 27. 2014. 01. 10.	2013. 12. 27. 2014. 01. 10.
예비시험		
시험물질의 보관	2013. 12. 31.	2013. 12. 31.
시험물질의 조제	2013. 12. 31.	2013. 12. 31.
시험물질의 처리	2013. 12. 31.	2013. 12. 31.
분시험		
시험물질의 조제	2014. 01. 27.	2014. 01. 27.
시험물질의 처리	2014. 01. 27.	2014. 01. 27.
표모니계수	2014. 01. 29.	2014. 01. 29.
시험기초자료	2014. 02. 14. 2014. 02. 18.	2014. 02. 14. 2014. 02. 18.
최종보고서(안)	2014. 02. 14. 2014. 02. 18.	2014. 02. 14. 2014. 02. 18.
최종보고서	2014. 02. 19.	2014. 02. 19.

표 점검내용은 (주)메드빌 신뢰성보증담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다

본 최종보고서는 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서(SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다

㈜메드빌

신뢰성보증책임자: 박정진

2014년 2월 19일



**요약**

본 시험은 시험물질 WSY-3063을 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 균주와 트립토판 요구성 *Escherichia coli* (WP2uvrA (pKM101)) 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험을 실시하였다.

본시험의 용량을 결정 하기 위해 예비시험의 시험물질 최고용량을 5,000 µg/plate로 하며, 최고용량을 포함한 공비 4의 7단계 (5,000, 1,250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 µg/plate) 용량으로 처리하였다. 그 결과 대사활성계 및 비대사활성계의 모든 용량에서 생육저해 및 식균은 관찰되지 않았다. 따라서 대사활성계 및 비대사활성계에서 모든 균주의 본시험 최고 용량은 5,000 µg/plate로 하며, 최고용량을 포함한 공비 2의 5단계 (5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5 µg/plate) 용량의 시험물질균과 음성대조군, 양성대조군으로 설정하였다.

본시험 결과, 대사활성계 및 비대사활성계에서 음성대조군에 비교하여 모든 용량에서 유전독성을 나타내는 복귀돌연변이 콜로니수의 용량의존적인 증가는 관찰되지 않았다. 한편, 양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저하게 증가하며 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다.

이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

: 이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단됨.

※ 염색체이상 시험

신뢰성보증확인서

시험 제목: WSY-3063의 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험  
시험 번호: G02-13026

최종보고서

WSY-3063의 포유류 배양세포를 이용한  
염색체이상시험

(시험번호: G02-13026)


점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험계획서	2013. 12. 20.	2013. 12. 20.
시험계획서 변경	2013. 12. 27.	2013. 12. 27.
예비시험		
시험물질의 보관	2013. 12. 23.	2013. 12. 27.
시험물질의 조제	2013. 12. 23.	2013. 12. 27.
시험물질의 처리	2013. 12. 23.	2013. 12. 27.
본시험		
전배양	2014. 01. 03.	2014. 01. 03.
시험물질의 조제	2014. 01. 06.	2014. 01. 06.
시험물질의 처리	2014. 01. 06.	2014. 01. 06.
검체제작(고정)	2014. 01. 07.	2014. 01. 07.
검체제작(도말)	2014. 01. 07.	2014. 01. 07.
검체제작(염색)	2014. 01. 08.	2014. 01. 08.
검체관독	2014. 01. 28.	2014. 01. 28.
시험기초자료	2014. 02. 07.	2014. 02. 07.
	2014. 02. 12.	2014. 02. 12.
최종보고서(안)	2014. 02. 07.	2014. 02. 07.
	2014. 02. 12.	2014. 02. 12.
최종보고서	2014. 02. 13.	2014. 02. 13.

표 점검내용은 (주)메드빌 신뢰성보증담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

본 최종보고서는 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서(SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다.

메드빌

신뢰성보증책임자 : 박성진

  
2013년 2월 13일

메드빌  
153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21, IT미래타워 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · http://www.medvill.co.kr

**요 약**

본 시험은 시험물질 WSY-3063의 유전독성을 평가할 목적으로 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상시험을 실시하였다.

예비시험 결과, 모든 처리군의 권용량에서 시험물질의 침전을 확인하였다. 또한, 시험물질에 의한 세포독성이 관찰되어, IC<sub>50</sub> 값을 확인한 결과 단시간처리군의 대사활성제의 최고용량은 2,500 µg/mL, 비대사활성제의 최고용량은 700 µg/mL로 결정하였다. 그리고 연속처리군의 비대사활성제의 최고용량은 500 µg/mL으로 결정 하였다. 따라서, 본시험은 음성대조군, 양성대조군 및 최고용량 포함하여 공비 2로 3단계로 결정 하였다.

본시험 결과, 단시간처리군의 대사활성제 및 비대사활성제와 연속처리군의 비대사활성제에서의 염색체이상세포는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가는 나타나지 않았다. 그러나, 양성대조군의 염색체이상세포는 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가되었다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 시험물질인 WSY-3063은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

: 이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 CHL 세포를 이용한 염색체이상시험에서 시험물질인 WSY-3063은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

※ 소핵 시험

**최종보고서**

WSY-3063의  
마우스를 이용한 소핵시험

(시험번호: G03-13008)

㈜메드빌

153-801 서울특별시 급천구 가산동 60-21, II미래타워 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · http://www.medvill.co.kr

신뢰성보증확인서

시험 제 목: WSY-3063의 마우스를 이용한 소핵시험  
시험 번 호: G03-13008

점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험계획서	2014. 01. 07.	2014. 01. 07.
시험제 입수	2014. 01. 29.	2014. 01. 29.
시험물질의 보관	2014. 02. 04.	2014. 02. 04.
시험물질의 조제	2014. 02. 04.	2014. 02. 04.
투여	2014. 02. 04.	2014. 02. 04.
관찰	2014. 02. 04.	2014. 02. 04.
검체제작(골수채취)	2014. 02. 05.	2014. 02. 05.
검체제작(도말)	2014. 02. 05.	2014. 02. 05.
검체제작(염색)	2014. 02. 06.	2014. 02. 06.
검체반독	2014. 03. 05.	2014. 03. 05.
시험기초자료	2014. 03. 12.	2014. 03. 12.
최종보고서(안)	2014. 03. 12.	2014. 03. 12.
최종보고서	2014. 03. 20.	2014. 03. 20.

표 점검내용은 (주)메드빌 신뢰성보증담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

본 최종보고서는 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서(SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 심사과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다.

㈜ 메드빌

신뢰성보증책임자: 박 성 진

  
2014년 3월 20일

요약

본 시험은 시험물질 WSY-3063의 유전독성을 평가하기 위하여 ICR 마우스 골수세포를 이용한 소핵 유발을 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위해 0, 500, 1,000 및 2000 mg/kg의 용량으로 용량결정시험을 실시한 결과, 사망동물 및 일반증상은 관찰되지 않았다. 따라서 본시험은 2,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 최고용량을 포함하여 공비 2로 3단계 (500, 1000 및 2000 mg/kg) 용량으로 설정하였다. 또한, 음성대조군은 용매물, 양성대조군은 Mitomycin C를 설정하였다.

소핵유발시험에서는 용량결정시험에서 결정된 최고용량을 투여한 후, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵의 유발빈도는 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였다.

본시험 결과, 시험물질군에서는 다염색적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염색적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가는 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ ). 또한, 양성대조군에서는 다염색적혈구 중 소핵다염색적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 현저하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 그리고 다염색적혈구의 출현 빈도는 모든용량군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 WSY-3063은 본 시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

: 이상의 결과로부터 WSY-3063은 본 시험의 조건 하에서 마우스 골수세포의 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

※ 단회 독성시험

최종보고서

WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

(시험번호: A01-13028)

신뢰성보증확인서

시험 제목: WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험  
시험 번호: A01-13028

점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험개최서	2013. 12. 04.	2013. 12. 04.
시험계획서	2013. 12. 04.	2013. 12. 04.
시험물질의 보관	2013. 12. 10.	2013. 12. 10.
시험물질의 조제	2013. 12. 10.	2013. 12. 10.
투여	2013. 12. 10.	2013. 12. 10.
관찰	2013. 12. 10.	2013. 12. 10.
부검	2013. 12. 24.	2013. 12. 24.
시험기초자료	2014. 01. 06.	2014. 01. 07.
	2014. 01. 20.	2014. 01. 20.
최종보고서(안)	2014. 01. 06.	2014. 01. 07.
	2014. 01. 20.	2014. 01. 20.
최종보고서	2014. 02. 13.	2014. 02. 13.

표: 점검내용은 (주)메드빌 신뢰성보증담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다


본 최종보고서는 GLP, 시험계획서 및 표준작업절차서(SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다

메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21, IT 미래타워 15층  
Tel) 02-2027-6775 · Fax) 02-2027-6776 · http://www.medvill.co.kr

메드빌

신뢰성보증책임자: 박성권

  
2014년 2월 13일

**요약**

시험물질 WSY-3063의 독성을 조사하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 Sprague-Dawley 랫드 암수 각 5마리에 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 용량으로 부여하여 14일간 일반증상, 체중 및 사망률을 관찰하였고, 관찰 종료일에 부검을 실시하여 육안적 소견을 관찰하였다.

그 결과, 모든 시험물질 부여군에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 체중변화 및 부검결과 특이적인 소견은 없었다.

이상의 결과로 부터, WSY-3063는 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 하였을 경우 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

: 단회 경구투여 하였을 경우 개략의 치사량은 암, 수 모두 2,000 mg/kg 이상인 것으로 판단됨.

※ 4주 반복

**최종보고서**

**WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
용량설정 4주 반복 경구투여 독성시험**

(시험번호 A01-13029)

**㈜메드빌**

153-760 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · http://www.medvill.co.kr



Study No. A01-13029

**신뢰성보증확인서**

시험제목 WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 용량설정 4주 반복 경구투여 독성시험  
시험번호 A01-13029

점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험계획서	2014. 02. 18.	2014. 02. 18.
시험개입수	2014. 02. 18.	2014. 02. 18.
시험동물의 보관	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.
시험물질의 조제	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.
투여	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.
관찰	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.	2014. 02. 25. 2014. 03. 21.
체중	2014. 03. 11. 2014. 03. 25.	2014. 03. 11. 2014. 03. 25.
사료추정	2014. 03. 11.	2014. 03. 11.
체형	2014. 03. 25.	2014. 03. 25.
부검	2014. 03. 25.	2014. 03. 25.
혈액검사	2014. 03. 25.	2014. 03. 25.
삭정	2014. 03. 29.	2014. 03. 29.
박질	2014. 03. 31.	2014. 03. 31.
포매	2014. 04. 01.	2014. 04. 01.
열색	2014. 04. 09.	2014. 04. 09.
시험기초자료	2014. 04. 30.	2014. 04. 30.
최종보고서(안)	2014. 04. 30.	2014. 04. 30.
최종보고서	2014. 05. 28.	2014. 05. 28.

표의 점검내용은 ㈜메드빌 신뢰성보증담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

본 시험은 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서 (SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다.

㈜메드빌  
신뢰성보증책임자 박성권

2014년 5월 28일

### 요 약

본 시험은 시험물질 WSY-3063의 26주 반복 경구투여 독성시험의 용량을 설정하기 위하여 Sprague-Dawley 계통 암·수 랫드에 시험물질을 4주간 반복 경구투여 하였다.

각 군당 암·수 5마리에 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 용량으로 4주 반복 경구투여를 실시하여 사망률, 일반증상, 사료 섭취량, 혈액검사, 부검소견, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

시험기간 중 사망동물은 발생하지 않았고, 일반증상 관찰결과 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.

체중변화, 사료 섭취량, 혈액검사, 장기중량 측정 및 부검 결과 암·수 모두 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

주요 장기에 대한 조직병리학적 검사결과, 2,000 mg/kg 투여군의 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063의 무독성량 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)은 암·수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단하였다.

: 이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063의 무독성량은 암, 수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단하였다.

### ※ 13주 반복 및 4주 회복 독성시험

#### 최종보고서

WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
13주 반복 및 4주 회복 경구투여 독성시험

(시험번호 A01-13030)

㈜메드빌

153-760 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워)  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · <http://www.medvill.co.kr>

#### 실험정보등록인서

시험제목 WSY-3063의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 및 4주 회복 경구투여 독성시험  
시험번호 A01-13030

일련내용	일 시	시험책임자 및 운영책임자 보조인
시험계획서	2014. 05. 02	2014. 05. 02
시험계획서 변경	2014. 05. 26	2014. 05. 26
시험제일수	2014. 05. 02	2014. 05. 02
안구파지검사	2014. 05. 07	2014. 05. 07
시험동물의 보관	2014. 05. 08	2014. 05. 08
시험동물의 조제	2014. 05. 08	2014. 05. 08
투여	2014. 05. 08	2014. 05. 08
일반증상 관찰	2014. 05. 08	2014. 05. 08
체중	2014. 05. 08	2014. 05. 08
사료중량량	2014. 05. 08	2014. 05. 08
사료섭취량	2014. 05. 09	2014. 05. 09
시험동물의 보관	2014. 06. 03	2014. 06. 03
시험동물의 조제	2014. 06. 03	2014. 06. 03
시험동물의 보관	2014. 07. 31	2014. 07. 31
시험동물의 조제	2014. 07. 31	2014. 07. 31
투여	2014. 07. 31	2014. 07. 31
일반증상 관찰	2014. 07. 31	2014. 07. 31
체중	2014. 07. 31	2014. 07. 31
노진사	2014. 07. 31	2014. 07. 31
백중	2014. 07. 31	2014. 07. 31
안구파지검사	2014. 08. 04	2014. 08. 04
사료중량량	2014. 08. 04	2014. 08. 04
사료섭취량	2014. 08. 05	2014. 08. 05
체질	2014. 08. 07	2014. 08. 07
부검	2014. 08. 07	2014. 08. 07
혈액생화학적 검사	2014. 08. 07	2014. 08. 07
신장조직 (H&E)	2014. 08. 14	2014. 08. 14
신장조직 (H&E)	2014. 09. 23	2014. 09. 23



요약

본 시험은 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 대한 WSY-3063을 13주간 반복 경구투여 시 안전성 및 4주간 회복성을 평가하기 위하여 실시하였다.

주요군의 경우, 각 군당 암수 10마리에 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 용량으로 13주간 반복 경구투여를 실시하여 사망률, 일반증상, 사료 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 혈액응고 검사, 부검, 장기중량 측정 및 조직병리학적 검사를 실시하였다. 회복군의 경우에는 0 및 2,000 mg/kg 용량으로 암수 5마리에 13주간 반복 경구투여를 실시한 후 4주간의 회복기간을 두었으며, 주요군과 동일한 검사를 실시하였다.

투여 41일에 수컷 1,000 mg/kg 투여군에서 사망동물 1례 (개체번호: 13008)가 발생하였으며, 부검 결과 비장의 종대, 간의 종대 및 상처, 복강 내 혈액으로 의심되는 적색의 액체가 관찰되었고, 조직병리학적 검사 결과 백혈병 (Leukemia)으로 확인되었다. 사망 동물의 사인은 간의 상처에 의한 과다출혈로 추정하였으며, 이러한 백혈병은 자발발생적으로 시험물질의 독성과는 무관한 것으로 판단하였다.

장기중량 측정 결과, 주요군의 암컷 시험물질 투여군에서 간의 절대 및 상대중량의 증가가 관찰되었으며, 조직병리학적 검사에서는 중심소엽성 간세포 비대 (hypertrophy)가 관찰되었다. 이러한 변화는 시험물질 노출에 의한 대사용 증가에 기인한 결과일 것으로서, 4주간의 회복군에서는 모두 회복되어 관찰되지 않음 독성학적 의미가 없는 가역적인 변화로 판단하였다.

그 외, 일반증상, 체중변화, 사료 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 혈액응고검사, 부검 및 조직병리학적 검사에서 시험물질 투여에 의한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063의 무독성량 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)은 암수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단하였다.



Study No. A01-13030

점검내용	실시일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
전체계획 (박필)	2014. 09. 30	2014. 09. 30
전체계획 (영색)	2014. 10. 17	2014. 10. 17
시험기초자료	2014. 12. 03	2014. 12. 03
최종보고서(안)	2014. 12. 03	2014. 12. 03

표의 점검내용은 ㈜메디빌 인위성보충담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

본 시험은 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서 (SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다.

㈜메디빌

인위성보충책임자 박필인

년 월 일

: 이상의 결과로부터, 시험물질 WSY-3063의 무독성량은 암, 수 모두 2,000 mg/kg 이상으로 판단 됨.

○ 인체적용시험 프로토콜 개발 (CRO, 글로벌 헬스케어)

- WSY-3063 건강기능식품용 조성물의 혈행개선 효능에 대해 확인하고 개별인정형을 신청하기 위해 필요한 인체적용시험의 적절한 계획을 수립하고자 전문 임상시험수탁업체에 해당 프로토콜 개발을 의뢰함.

- 내용 : 혈행개선 건강기능식품 인체적용시험 계획 수립

- 수행기관 : 글로벌 헬스케어

- 계약서

비밀유지합의서

(주)글로벌헬스케어는 업무추진 시 한국전통의학연구소 소유의 기밀정보와 관련하여 정보소유권자 (이하 '소유권자'라 함)에게 다음과 같은 내용으로 비밀유지합의서를 체결하고 이를 준수하기로 한다.

※ "갑"이 "을"에게 제공할 임상 및 인체적용시험 연구계획서 컨설팅 자료는 다음과 같다.

- 1) 임상연구(시험) 계획서
- 2) 중재기록서
- 3) 임상시험자 자료집
- 4) 기타 임상 및 인체적용시험 연구계획서 평가에 필요한 자료 등

1. 소유권자의 정보가 (주)글로벌헬스케어에 제시된 날로부터 (주)글로벌헬스케어는 기밀을 유지할 것이며, 소유권자가 서면으로 허락하지 않는 한 (주)글로벌헬스케어에 활용하도록 한, 소유권자 소유의 어떤 기밀정보도 제 3 자에게 알려주지 않을 것이다. 여기서 '기밀정보'라 함은 (주)글로벌헬스케어에 제공된 모든 논문, 서유, 구두, 도면, 원료, 샘플, 특허서류, 노하우 및 기술 데이터의 모든 정보와 사본을 포함한다.

2. (주)글로벌헬스케어는 소유권자의 고용인, 대리인 등이 위에 언급한 기간과 내용에 대해서 위 각자에게 효력을 미치지 위해서 따로 어떤 제한과 서면상의 행태를 취하지 않더라도 모든 기밀을 유지할 것이며, 소유권자와 (주)글로벌헬스케어는 이를 보장하기 위한 제반 수단을 강구하여 추진한다.

3. 상기 제시된 의무와 할지라도 다음 경우는 예외로 한다.

- (1) 소유권자가 공개하기 이전 (주)글로벌헬스케어의 서면상 기록이나 그러한 명백한 입증에 뒷받침하여 (주)글로벌헬스케어에 알려진 정보

- (2) 공공영역의 부문인 정보
- (3) ㈜글로벌헬스케어가 보유하고 있는 정보

4. 본 협정과 관련된 정보의 공개나 발표는 단지 정보의 평가 목적에 국한하기로 하며, 양 당사자에게 계약 상대방의 정보를 이용하여 임의로 제품이나 서비스를 사용하거나 매도할 권리는 없다.

5. 만일 당사자들의 계약이 만료되어 자료의 반환을 요청할 경우, 각 당사자는 복사된 자료가 있다면 그 복사물을 포함하여 제공된 모든 정보를 되돌려 줘야하며 이 협정은 기밀의무를 지지는 것으로 끝난다.

6. 각 당사자는 해당사항의 본 계약이 이루어진 후 상대방의 사전동의 없이 본 협정기간내에 어떠한 언론에도 정보를 제공해서는 아니된다.

7. 본 협정은 협정일로부터 5년간 유효하다.

8. 본 협약에 기하여 발생하는 분쟁의 관할법원은 소유인의 관할법원으로 한다.

위 내용에 동의한다면 본 협정서 2부에 날인하고 각 1부를 협정 당사자가 보관한다.

2013년 07월 01일

정보 제공자 측  
서울시 종로구 신문로2가 1-160  
한국전통의학연구소  
대표이사 최 건 섭



정보 이용자 측  
서울시 금천구 독산동 977-2번지  
㈜글로벌헬스케어  
대표이사 이 건 영





: 임상연구 (시험)계획서, 증례기록서, 임상시험대상자 자료집, 기타 임상 및 인체적용시험 연구계획서 평가에 필요한 자료.

- 인체적용시험 프로토콜

[주]한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

Study No. KBMSI-WSY3063  
version 1.2

## 인체적용시험계획서 Clinical Study Protocol

**천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험**

**Evaluation of efficacy and safety of herbal mixture WSY-3063 on inhibition of platelet aggregating and blood circulation : Multi-center, Double-blind, Randomized, placebo-controlled study**

시험제품 : WSY3063  
 임상시험번호 : KBMSI-WSY3063  
 2014.03.04. (ver. 0.1)  
 작성일 : 2014.03.25. (ver. 1.0)  
 2014.06.19. (ver. 1.1)  
 2014.07.08. (ver. 1.2)

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험계획서와 관련된 모든 정보는 기밀사항이며, (주) 한국전통의학연구소의 동의 없이 본 문서의 내용도 사용, 공개, 출판 및 배포할 수 없습니다.

CONFIDENTIAL

1

[주]한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

Study No. KBMSI-WSY3063  
version 1.2

### 임상시험계획서 개요

시험명칭	천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
시험단계	□ 1상, □ 2상, □ 3상, □ 4상, ■ 기타(건강기능식품)
시험기관	다기관(2개 기관: 부산대학교병원, 서울성모병원)
시험대상자	만 19세 이상 75세 이하의 순박자립, 두통이나 목당김과 같은 혈액순환장애 증상을 느끼거나 빈번으로 인하여 혈행개선을 필요로 하는 중견장인
시험제품 및 투여방법	WSY-3063 경구투여용 정제 (11정 중 640mg) WSY-3063에 상응하는 위약 상응하는 경구 투여용 캡슐 ■ 투여량: WSY-3063, 1일 2회, 1회 3정, 아침/저녁 식후 30분 이내 복용 ■ 투여방법: 경구 투여 ■ 투여기간: 8주
시험대상자 수	총 100명 (본문 50명)
포함 기준	다음 기술된 조건에 부합되는 자를 시험대상자로 선정한다. 1) 만 19세 이상 75세 미만인 성인 2) 다음 두가지 항목 중 하나 이상에 해당하는 자 - 순박자립, 두통이나 목당김 등과 같은 혈액순환장애 증상을 느끼는 자 - 허리둘레가 남자 ≥90cm, 여자 ≥ 80cm 또는 체질량지수 (BMI)가 25~29.9kg/m <sup>2</sup> 인 자 3) 시험 참가에 앞서 시험의 목적, 내용, 시험제품의 특성 등에 대하여 충분히 설명을 받고 서면 동의한 시험대상자
제외 기준	다음 기술된 조건에 부합되는 자는 시험대상자에서 제외한다. 1) 순박자립, 두통이나 목당김 등과 같은 증상이 혈액순환 장애 이외의 다른 질병(당뇨, 간장성 질환, 근색소증등)으로 진단된 자 2) 심근경색, 협심증, 총혈관 등 심혈관 질환으로 약물을 투여중이거나 치료중인 자 3) 이전 결실증으로 시술을 받았거나 심부전으로 진단받은 자 4) 천식, 만성폐쇄성 폐질환의 병력이 있는 자 5) 혈액응고장애 또는 경련을 받은 자 6) 근육병을 진단받은 자 7) 간염이나 신부전의 기왕력을 가진 자 8) 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100mmHg 이상) 9) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dl 이상 또는 3개월 이내 당노로 인해 새로운 약제를 복용하고 있는 자) 10) 스크리닝시 중증의 간기능 장애(AST, ALT 수치가 정상 상한치 3배 이상), 신기능 장애(Serum creatinine 수치가 정상 상한치 2배 이상)가 있는 자

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

7

[주]한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

Study No. KBMSI-WSY3063  
version 1.2

중단 기준	1) 시험대상자의 계속적인 시험 참여를 어렵게 만든다고 판단되는 이상반응이 발생한 경우 2) 시험대상자가 급지환 병용 약물 또는 요법을 사용한 경우 3) 인체적용시험용 제품 최초 투여 후 선정 및 제외 기준에 따라 시험대상자가 등록에 적합하지 않은 것으로 확인된 경우 4) 인체적용시험 계획서상의 중대한 위반이 발생한 경우 5) 시험대상자가 자의적으로 동의 철회한 경우 6) 시험자가 인체적용시험용 제품 사용을 중단하는 것이 임상적으로 적합하다고 생각하는 경우
시험디자인	본 인체적용시험은 parallel group, randomized, full double blind, placebo controlled로 설계된 시험이다. 본 시험은 8주간의 반복투여 시험으로 이루어지며, 인체적용시험용 건강기능식품과 대조제품(placebo)에 대한 안전성과 유효성을 평가한다. 본 인체적용시험은 자발적으로 서면 동의한 시험대상자는 스크리닝 방문, 1~2주간의 run-in 기간, 8주간의 투여기(Treatment period), 총 9~10주 동안 시험을 수행하게 되며, 2주 간격 및 2번의 4주 간격으로 총 4번 방문하여 계획된 안전성 및 유효성 평가를 실시하게 된다.  방문 시 검사해야 되는 항목: 인구학적 정보(성별, 연령, 신장, 체중, 흡연/음주력), 병력, 신체검사, 활력징후, 임상검사, 혈액 성분 채취(혈액학적, 혈액이화학적, 뇨검사, 혈행개선관련 지표검사, 지질분석검사, hs-CRP, HbA1c), 비만관련지표, 식이섭취 설문

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

8

[주]한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

Study No. KBMSI-WSY3063  
version 1.2

유효성 평가	1) 1차 유효성 평가 변수 : Baseline 기준 대비 8주간의 혈중 Thromboxane B <sub>2</sub> 변화량 2) 2차 유효성 평가 변수 : 1) Baseline 기준 대비 4주 간의 혈중 Thromboxane B <sub>2</sub> 변화량 2) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 Serotonin 농도의 변화량 3) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 Prothrombin time(PT)의 변화량 4) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 Activated partial thromboplastin time(aPTT)의 변화량 5) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 총 콜레스테롤 변화량 6) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 총 중성지방 변화량 7) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 HDL-cholesterol의 변화량 8) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 LDL-cholesterol의 변화량 9) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 수축기 혈압의 변화량 10) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 이완기 혈압의 변화량 11) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 허리둘레의 변화량 12) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 체질량지수(BMI)의 변화량 13) Baseline 기준 대비 8주 간의 hs-CRP의 변화량 14) Baseline 기준 대비 8주 간의 HbA1c의 변화량 15) Baseline 기준 대비 4, 8주 간의 심혈관 설문(QoL)의 점수 변화량
안전성 평가	1) 선정 시점부터 시험 종료까지 자-타과 증상 등 이상반응 2) 각 방문시의 실험실적 검사(혈액학적 검사, 혈액이화학적 검사, 뇨검사) 3) 신체검사, 활력징후 4) 심전도 검사
통계분석 방법	본 인체적용시험은 WSY-3063과 placebo와의 대조를 통하여 안전성 및 유효성을 평가하고자 하는 시험으로 PP 분석법을 주 분석법으로 한다. 모든 통계적 검정은 유의수준 0.05이하에서 실시한다. <b>유효성 분석</b> 유효성 평가변수의 각 변화량은 평균, 표준편차, 최솟값, 최댓값, 중앙값 등으로 표현하며, 이들 변화량의 통계적 유의성을 확인하기 위해 자료가 정규분포를 따를 경우 paired t-test를 시험하며, 정규분포를 따르지 않을 경우 비모수방법인 Wilcoxon signed-rank test를 실시한다. <b>안전성 분석</b> 안전성평가는 이상반응 발생 비율을 계산하여 군내에서 95% 신뢰구간을 구하고 군간 비교, 각 실험실적 검사 결과, 활력징후와 같은 연속형 자료는 Baseline과 비교하여 어떤 변화가 있는지 paired t-test 혹은 ANOVA를 이용하여 분석한다. 범주형 자료는 각 범주별 빈도 및 비율을 제시하며, 군간 차이가 있는지를 chi-square test, Fisher's exact test 등을 이용하여 분석한다.

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

9

: 글로벌헬스케어와의 계약으로 WSY-3063 혈행개선 인체적용시험 프로토콜 완성.

- 실험대상자 명수 산출근거 = 기반연구를 바탕으로 인체적용시험 실험대상자 명수 산출.
- 기능성 인정 유효 지표 = 기반연구 및 식약처 상담을 바탕으로 지표 선정.
- 시험대상자 제외 기준 = 인체적용시험 담당 PI 및 식약처 상담을 바탕으로 선정.

- 피해자 보상에 대한 규약

피해자 보상에 대한 규약

1. 원칙
  - 1) (주)한국전통의학연구소는 인체적용시험 대상자의 신체적 손상(사망)에 대해 보상한다.
  - 2) 손상의 원인이 인체적용시험용 건강기능식품의 섭취로 인해 발생하였을 때 (주)한국전통의학연구소는 임상연구 대상자에게 보상한다.
  - 3) 지속적이고 불구가 될 수 있을 정도의 손상뿐만 아니라 일시적 통증 또는 쉽게 치료될 수 있는 손상에 대해서도 보상한다.
  - 4) 인체적용시험 건강기능식품에 의해 생긴 이상반응 또는 발현된 이상반응의 교정치료 과정에서 발생한 손상의 경우, 인체적용시험용 건강기능식품이 직접적인 원인이 된 손상에 대하여 보상한다.
2. 다음의 경우 보상하지 아니한다.
  - 1) (주)한국전통의학연구소 후원 하에 집행되지 않았거나 (주)한국전통의학연구소가 제공하지 아니한 인체적용시험용 건강기능식품으로 발생한 이상반응에 의한 손상
  - 2) 인체적용시험용 건강기능식품 적용중에 대한 효과 또는 해택을 제공하지 못한 데 대한 보상
  - 3) 서로 합의한 프로토콜에서 시험대상자가 이탈함으로써 야기된 손상
  - 4) 대상자 또는 보호자의 부주의에 의하여 초래된 손상(예: 시험대상자 부주의로 일어난 교통사고)
3. 보상평가 기준
  - 1) 보상수준은 손상의 본질, 그 정도, 지속성 여부 등에 적절한 액수여야 하며, 한국의 법정에 의해 유사한 손상들에 대해 일반적으로 지급되는 것과 동일해야 한다.
  - 2) 보상수준에 대해서 시험대상자의 법정대리인과 (주)한국전통의학연구소 사이에서 이견이 있을 경우, 양자가 수용할 수 있는 전문가의 자문을 구하여야 한다.

시험자명 : (주)한국전통의학연구소 대표이사 최건선 (인) *최건선*  
 서약일 : 2014년 1월 3일

: 글로벌헬스케어와 자회사 변호사의 도움을 받아 피해자 보상에 대한 규약 작성

- 시험대상자 동의를 위한 설명서

- 시험대상자 동의서

시험대상자 동의를 위한 설명서

연구제목	천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험		
연구책임자	(성명) 장기욱 교수	(소속) 서울성모병원	(연락처) 010-9175-2076
시험담당자	(성명) 박준영 연구간호사	(소속) 서울성모병원	(연락처) 010-4699-3645
시험담당자	(성명) 한지숙 교수	(소속) 부산대학교 식용영양학과	(연락처) 051-510-2836
관리약사	(성명) 이경선 관리약사	(소속) 서울성모병원	(연락처) 02-2258-2541

귀하에게 본 인체적용시험에 참여해 주실 것을 요청 드립니다. 본 연구의 참여결정은 전적으로 귀하의 자발적 판단에 의한 것이며, 귀하의 자유의사에 따라 참여를 결정하거나 포기를 결정할 수 있습니다. 또한 연구 진행 도중 언제라도 중단을 결정할 수 있으며, 이로 인한 어떠한 불이익도 받지 않을 것입니다.

아래의 내용은 본 인체적용시험에 귀하가 보다 안심하고 참여하실 수 있도록 제공하여 드리는 건강기능식품과 연구에 관한 정보입니다. 이번 인체적용시험 내용과 이 연구에 참여하실 경우 귀하의 역할과 연구 진행과정 등에 대하여 설명하고자 마련된 것입니다.

이 동의를 위한 설명서를 신중하게 읽어보신 후, 귀하가 본 인체적용시험에 참여할 것인지 여부를 결정하시기 바랍니다. 이 연구를 왜 수행하며, 무엇이 어떻게 진행되는지 귀하가 이해하는 것이 중요하기 때문입니다.

이 시험에 대하여 설명한 이 문서를 읽으면서 어떤 질문이라도 할 수 있습니다. 귀하가 본 시험 참가 여부를 결정하기 위해 필요하다면 얼마든지 많은 질문을 해주셔도 괜찮습니다. 또한 충분한 시간을 갖고 심사숙고하여 읽으신 후, 가족이나 다른 사람과 상의하실 수 있으며, 궁금하신 사항이 있으면 인체적용시험 책임자나 다른 담당자에게 질문하실 수 있습니다.

시험대상자 동의서

연구 제목 : 천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

1. 본인은 연구자로부터 본 인체적용시험의 목적과 구체적인 방법, 예상되는 효과 및 부작용에 대해 충분한 설명을 들었습니다. □
2. 본인은 본 인체적용시험에 대한 시험대상자 설명서를 충분한 시간을 두고 자세히 읽었습니다. □
3. 본인은 궁금한 사항에 대하여 질문을 하였고 연구자로부터 적절한 답변을 듣고 이해했습니다. □
4. 본인은 본 연구에 참여하는 것에 대하여 자발적으로 동의합니다. □
5. 본인은 인체적용시험 기관 중 언제든 연구의 참여를 거부하거나 중도에 철회할 수 있으며, 이로 인해 이후의 치료 및 기타사항에 대해 어떠한 불이익도 받지 않을 것을 알고 있습니다. □
6. 본인은 이 설명서 및 동의서에 서명함으로써 의학 연구 목적으로 나의 개인정보가 법령 법률과 규정이 허용하는 범위 내에서 연구자가 수집하고 처리하는데 동의합니다. □
7. 본인은 본 인체적용연구 참가 기관 동안 다른 기관에 인형할 경우, 다른 기관으로부터의 관련된 기록을 공개하는 것에 동의합니다. □
8. 본인은 이 설명서 및 동의서 사본 1부를 받을 것을 알고 있습니다. □

시험대상자  
 성명 \_\_\_\_\_ 서명일 \_\_\_\_\_년 \_\_\_\_\_월 \_\_\_\_\_일 서명 \_\_\_\_\_

책임 연구자  
 성명 \_\_\_\_\_ 서명일 \_\_\_\_\_년 \_\_\_\_\_월 \_\_\_\_\_일 서명 \_\_\_\_\_

법정 대리인 (필요시), (시험대상자와의 관계: \_\_\_\_\_)  
 성명 \_\_\_\_\_ 서명일 \_\_\_\_\_년 \_\_\_\_\_월 \_\_\_\_\_일 서명 \_\_\_\_\_

참관인 (필요시)  
 성명 \_\_\_\_\_ 서명일 \_\_\_\_\_년 \_\_\_\_\_월 \_\_\_\_\_일 서명 \_\_\_\_\_

- : 인체적용시험의 시작을 위한 시험대상자의 동의서 Form과 동의를 돕기 위한 설명서 작성
  - 본 과제의 인체적용시험에 참여하게된 시험대상자의 동의와, 피해시험대상자에 대한 보상 규약으로 시험대상자의 인권을 지키는 가장 중요한 절차임.

- 증례기록서

(주)한국전통의학연구소      Study No. KBMSI-WSY3063  
Korea Bio Medical Science Institute      CRF version 1.0

## 증례기록서

### CASE REPORT FORM

**천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행 개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험**

Evaluation of efficacy and safety of herbal mixture WSY-3063 on inhibition of platelet aggregating and blood circulation :  
Multi-center, Double-blind, Randomized, placebo-controlled study

Screening Number    S W           

Random Number      R W           

Initial                           

**CONFIDENTIAL**

CONFIDENTIAL

(주)한국전통의학연구소      Study No. KBMSI-WSY3063  
Korea Bio Medical Science Institute      CRF version 1.0

**인체적용시험 Flow Chart**

Period	Screening	Treatment				PT
		1	2	3	4	
Visit No.	-2W~-1W (-14d~-7d)	0W (0d)	4W (28±5d)	8W (56±5d)		
서면동의서 취득	●					
인구학적 정보	●					
병력 및 수술력	●					
약물 투여력	●					
선정/재의기준 확인	●					
무작위 배정		●				
신체검사	●	●	●	●	●	●
활력징후	●	●	●	●	●	●
실험실적 검사	혈액	●	●	●	●	●
	생화학	●	●	●	●	●
	노검사	●	●	●	●	●
심전도 검사		●		●	●	
임신검사	●					
혈행개선관련 지표검사		●	●	●	●	●
혈중 지질성분 검사	●(only TC)	●	●	●	●	●
비만관련 지표검사	●	●	●	●	●	●
hs-CRP 측정		●		●	●	●
HbA1c 측정		●		●	●	●
QoL 설문		●	●	●	●	●
식이섭취 설문 배부	●	●	●			
식이섭취 설문 수거		●	●	●	●	●
인체적용시험용 제품처방		●	●			
시험대상자 알지 배부		●	●			
병용약물 확인		●	●	●	●	●
이상반응 확인			●	●	●	●
순응도 평가			●	●	●	●
시험제출 잔량 반납			●	●	●	●
시험대상자 알지 회수			●	●	●	●

CONFIDENTIAL

(주)한국전통의학연구소      Study No. KBMSI-WSY3063  
Korea Bio Medical Science Institute      CRF version 1.0

Visit 1 Screening	시험대상자 Initial	Screening No.	PAGE
	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span>	S W <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span>	2

**Visit 1 (Screening Visit)**

방문일         (YY.MM.DD)

**시험대상자 동의서 (Informed Consent)**

시험대상자로부터 동의서를 수령하셧습니까?     예     아니오

취득일         (YY.MM.DD)

**인구학적 정보 (Demographic Data)**

• 생년월일         (YY.MM.DD)

• 연령 만   세

▶ (특의년도)-(출생년도)=세 (특의일 기준 생일이 지나지 않은 경우 -1세)  
만 19-75세에 해당되지 않는 경우 시험에서 제외

• 성별     남자     여자    \* "여"인 경우 임신가능성 여부를 확인 하여 "임신검사"(Eppap)를 작성하여 주십시오

• 수유여부     아니오     예    \* "예"인 경우 본 시험에 참여할 수 없습니다.

• 임신여부     아니오     예    \* "예"인 경우 본 시험에 참여할 수 없습니다.

• 신장     cm

• 체중     kg

• 흡연력     아니오     예      개피/일

기간:   년   개월

현재 담배를 피우고 있습니까?     예     아니오

• 음주력     아니오     예      년   잔/주

CONFIDENTIAL

(주)한국전통의학연구소      Study No. KBMSI-WSY3063  
Korea Bio Medical Science Institute      CRF version 1.0

Visit 1 Screening	시험대상자 Initial	Screening No.	PAGE
	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span>	S W <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 5px;"> </span>	5

**임상실험실적 검사 결과 (Laboratory Test Results)**

Not Done (사유:         )

\* 검사일:         (YY.MM.DD)


항목	검사치	정상	비정상		Comment
			N.C.S.*	C.S.**	
혈액 검사	WBC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	RBC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Hemoglobin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Hematocrit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Platelet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
혈액 이화학 검사	AST	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	ALT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Total bilirubin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	BUN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Creatinine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	CK(CPK)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Glucose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
노 검 사	pH	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Protein	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Glucose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Occult blood	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

\* N.C.S.: Non Clinical significance, \*\*C.S.: Clinical significance

CONFIDENTIAL

- : 인체적용시험프로토콜에 존재하는 인체정보 및 유효성지표의 증례기록서 Form 작성
  - 증례 기록서는 인체적용시험의 모든 기능성 인정 유효 지표에 대한 시험대상자의 정보로 시험대상자의 개인 정보를 지키며 인체적용시험에 필요한 지표만을 확인 할 수 있는 중요한 form 임.

- 설문지



(주)한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

Study No. KBMSI-WSY3063  
version 1.1

---

**혈액순환장애 증상 삶의 질 설문지**

시험대상자 성명 : \_\_\_\_\_ 작성일 : \_\_\_\_\_ 년 \_\_\_\_\_ 월 \_\_\_\_\_ 일

최근 4주 동안, 당신의 활동에 있어 얼마만큼 제한을 받았습니까? 어느 정도 불편한 증상이 나타나는가를 생각하셔서 해당 칸에 √표시를 하여주십시오.

증상	매우 그렇다	조금 그렇다	그렇다	그렇지 않다	매우 그렇지 않다
<b>신체적 기능</b>					
1. 잠을 자는데 편안한 자세를 취할 수 있었습니까?	1	2	3	4	5
2. 장시간 서 있을 수 있었습니까?	1	2	3	4	5
<b>사회적 기능</b>					
3. 장시간 서서 하는 사회활동 또는 여가활동을 하는데 지장이 있었습니까? (예, 사교모임, 결혼식, 쇼핑 등)	1	2	3	4	5
4. 장시간 앉아서 하는 사회활동 또는 여가활동을 하는데 지장이 있었습니까? (예, 영화 혹은 공연 등)	1	2	3	4	5
<b>일반적 정신 건강</b>					
5. 초조함을 느끼십니까?	1	2	3	4	5
6. 다른 사람들에게 부담을 준다고 느끼십니까?	1	2	3	4	5
<b>혈액순환장애 증상의 영향</b>					
7. 본인의 혈액순환장애에 의해 좌절감을 느끼십니까?	1	2	3	4	5
8. 혈액순환장애 때문에 미래에 대한 근심을 가지고 계십니까?	1	2	3	4	5

CONFIDENTIAL

: 혈액순환장애 증상 삶의 질 설문지 Form 작성 시험대상자 선정에 중요한 역할을 함.

- 시험대상자 일지

## 시험대상자 일지

---

시험대상자 번호	R W		
시험대상자 이니셜			

방 문 차 수	<input type="checkbox"/> visit 2	<input type="checkbox"/> visit 3
방 문 일	년 월 일	년 월 일
다음 방문 예정일	년 월 일	년 월 일

다음 방문일에 복약 후 남은 시험약과 함께 제출하여 주시기 바랍니다.  
연구간호사 연락처 ☎ 010-4699-3645

본 연구에 참여하여 주셔서 감사드립니다.  
본 시험대상자 일지는 환자분에게 제공된 임상시험용제품 투여에 대한 확인하기 위함입니다.

- ▶ 반드시 담당 의사의 처방에 따라 약을 복용하셔야 합니다.
- ▶ 하루에 2회, 1회 3정씩 복용하십시오.
- ▶ 복용하신 후에는 다음페이지의 '복용일지'에 복용일과 복용시간을 기재하시기 바랍니다.
- ▶ 남은 약과 약포장(약상자, 빈포장)은 버리지 마시고 반드시 다음 방문시 반납하여주시기 바랍니다.
- ▶ 임상시험 참여기간 동안 발생하는 모든 부작용은 담당의사 또는 담당간호사에게 알려주시기 바랍니다.
- ▶ 다음 방문 예정일을 지켜주시고, 방문일은 5일 이상 지연되지 않도록 합니다.

작성 완료하신 본 일지는 다음 방문시 남은 약, 빈 포장과 함께 제출하여 주시기 바랍니다.



: 인체적용시험 제품의 복용일지 Form 작성 순응도 평가에 중요한 역할을 함.

- 인체적용시험은 환자가 아닌 준 건강인을 상대로 진행되기 때문에 시험대상자의 느낌과 생각이 중요하며, 또한 시험대상자 일지를 통하여 매일 복용일지대로 제품을 섭취하였는가에 따라 결과가 좌우됨.

- 식이섭취 조사지

[주원기초병원]연구부  
Korea Hlo Medical Science Institute

Study No. KBMS W093963  
Effective Date. 2024.03.01

### 3일간 식사기록법에 의한 섭취 조사

성별:    / 나:    / 나이:    / 성명:   

보통날 이틀과 주말 하루를 정해서서 하루 중일(24시간) 섭취하신 모든 음식(음료, 간식, 회의 포함)의 이름, 종류명, 섭취량을 적어 주시기 바랍니다.

※ 다음 사항을 읽어보신 후 시작하여 주십시오.

1. 식사기록은 식사 직후에 하는 것이 가장 좋습니다.  
특별한 날 (예: 생일, 직사)의 경우는 다음 날의 섭취내용을 기록하여 주십시오.
2. 본인이 실제로 드신 음식의 양을 정확히 기록하십시오.  
섭취량은 가능한 기온단위(봉지, 컵)로 표기하여 주시기 바랍니다.  
예) 밥 - 공기  
국, 음료 - 대접, 찜  
생선, 고기, 김 - 토막, 조각  
빵 - 찰, 찰기 과일 - 조각, 개  
고추장, 간장, 소금, 설탕 - 작은 술, 큰 술
3. 간식의 경우 구체적으로 기록하여 주십시오.  
예) 스타벅 - 커피 1봉지  
과일 - 사과 중간크기 1개
4. 만약 비하인, 부기질 보충제를 섭취하였다면 하루에 먹는 양, 상표, 라벨에 나타나 있는 정보를 기록합니다.
5. 식품을 조리할 때 사용한 방법을 기입해 주십시오.  
예) 찜을 편을 경우 퐁프링인거, 구운 것인거, 생것인거, 조림인거 구분하여 기입
6. 뒷장의 보기를 참조하여 작성하여 주십시오.

CONFIDENTIAL

1

[주원기초병원]연구부  
Korea Hlo Medical Science Institute

Study No. KBMS W093963  
Effective Date. 2024.03.01

[보기]

대상자	Code No.	일시			
조사	조사	식사	식사		섭취량
끼니	시간	장소	종류명	재료명, 조리상태	
아침	7:30	집	밥	밥	2/3봉지
			된장찌개	된장 두부 고추 묵고추	1큰술 1/5도 1/4개 1/2개
			알차구이	알차 봉지봉	1도안 2작은술
			애추갈치	애추갈치	1/3집
간식	10:30	회사	커피	현식 리스커피	1봉
점심	12:30	회사 식당	의정부밥	의정부 밥	1/2큰술 1봉지
			삼고개미역국	삼고개 미역(물탕)	1/5집 1/2봉
			물치볶음	물치 봉지봉	1큰술 1/2큰술
			노란전복음	노란전복 봉지봉	1/2집시 1작은술
			만두기	만두기	1/3집
간식	16:00	회사	유자차	유자차	1집
저녁	19:30	집	밥	밥	1.5봉지
			부거지국	부거 편장 삼고개 대파	2/5집 1큰술 2조각 1/4개
			삼고개불고기	삼고개 대파	1집시 1/3개
			갈우이	갈우이	1봉
간식	21:00	집	고구마살은것	고구마, 살기	편장크기1개
건강식품 (종류, 재량명, 섭취량)					
영양보충제 (종류, 재량명, 섭취량)					

CONFIDENTIAL

2

: 3일간의 식사기록법에 의한 섭취 조사서 Form 작성 예시 확립. 식이는 콜레스테롤과 연관되어 있음.

- 다기관 IRB 승인

: 인체적용시험을 위하여 선정된 부산대학교 병원과 서울성모 병원의 IRB 기관에 인체적용시험 프로토콜 승인을 받음.

- 시험대상자의 빠른 참여와 좀더 다양한 시험대상자의 모집을 위해 다기관에 인체적용시험을 시작하기로 함.

# (부산대학교 병원)

## 통지서

수신	의뢰기관 (주)한국전통의학연구소
연구책임자	(소속) 순환기내과 (직위) 조교수 (성명) 최정현
IRB 과제번호	H-1403-002-015 심사내용 정규심의
연구과제명	천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈형개선에 대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
연구대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의용기기 <input checked="" type="checkbox"/> 식품 <input type="checkbox"/> 화장품 <input type="checkbox"/> 시술법 <input type="checkbox"/> 기타( wsy-3063 ) 일반명 (분류코드) 건강기능식품 상품명 미정
연구예정기간	2014년 03월 25일 ~ 2015년 03월 31일
최초승인일자	2014년 03월 25일 (참고보고주기 : 12개월)
승인기간	2014년 03월 25일 ~ 2015년 03월 24일
심의종류	정규심의 심의대상 연구계획서의의뢰서
접수일자	2014년 03월 04일 심의일자 2014년 03월 25일
심의자료	1. 임상시험 심의의뢰서 2. 임상시험계획서의 개요 3. Protocol 요약지침 4. 연구계획서 (Ver.1.0) 5. 품목기탁서 (Ver.1.0) 6. 피험자 설명서 및 동의서(Ver.1.0) 7. 연구책임자/공동연구자의 이력서&교육이수증 8. 임상시험지 서약서 9. 경제적 이해갈등관계내역서 10. 연구비 내역서 11. 임상시험자 자료집
심의결과	승인
심의의견	
중간보고여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 ( 보고시기 : 2015-03-24 ) <input type="checkbox"/> 아니오

\* 본 심사위원회는 IRB-002 및 KQIP를 준수하며, 생명윤리및안전에관한법률 등 관련법규를 준수합니다.  
\* 이해갈등 관련 IRB 위원에 있는 경우 토론 및 결정과정에 참여하지 못하도록 위원장이 조치하였습니다.  
\* 만약 본 위원회의 심의결과에 불복할 경우, 심의결과 통보 후 그 사유를 기록하여 이의를 신청할 수 있습니다.  
\* 본 심사위원회에서 통지한 대로 연구기간 1년마다 지속심의의뢰서를 중간보고 기간에 중간보고서를 연구 종료 시에는 종료보고서를 제출하시고 종료보고서 제출 후 1년 이내에 중간보고서를 제출할 주시기를 바랍니다.  
\* 연구 중에 중대한 이상반응 발생 시 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.  
\* 본 임상연구 결과를 임상시험시기기록의 사전 서면동의에 있는 연구원외 학술목적 이외에 실시가능함을 사 용할 수 없습니다.  
\* 본 통지서는 KQIP 제 13조 1항에 따른 심사 통보서로 사용할 수 있습니다.  
\* 심사위원회의 결정사항에 대해 이의가 있는 경우 의의신청 절차에 따라 2회까지 이의신청이 가능합니다.

부산대학교병원  
임상시험심사위원회



# (서울성모병원)

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

## 가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

무연번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8199 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00475-006	시행일	2014-06-26
연구제목	천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈형개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험		
과제번호	KC14HDMED0206		
시험책임자	소속 순환기내과	이름	장기욱
지원기관	주식회사 한국전통의학연구소 서울지점		
심의대상	보통담양제		
연구대상	건강식품		
심의일	2014-06-26		
심의결과	승인		
연구승인유효기간	2015-06-25	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심의의 승인을 득하십시오. 임상연구통보서 종료보고서를 제출하여 주십시오.	
심의내용	<p><b>보통담양제</b></p> <p><b>보통담양제</b></p> <p>1. 성분상 안전성 : 「소박지침, 두릅이나 옥잠강 등 같은 혈액순환장애 증상을 느끼는 자」를 도입 하겠다고 하였는데, 혈액순환장애 이외의 본인으로 인한 원인 증상을 느낄 수 있는 징후, 예를 들면 디스키, 관절염 등을 경험하였던 등의 다른 질병들은 선연한 증상을 모두 배제하여 임의로 개입이 없는지 진단할 수 있는 초기 증상을 필요로 하는 「혈액순환 장애 이외의 다른 질병으로 진단된 경우」도 기술하여 주시기 바랍니다.</p> <p>2. 연구목적 유효성을 입증하고자 하는 것이므로 적절한 통계분석계획이 사전에 이루어져야 합니다. 1차 평가목표치 및 2차 평가목표치, Thromboxane 및 혈형항원대 일차 outcome가 2번이므로 다 중검정법에 대한 대책에 대해 추가 기술하여 주시기 바랍니다.</p> <p>3. 통상적으로 유효성을 입증하는 시험에서는 IT분석군을 주 분석군으로 선정하는데 PP분석을 주 분석군으로 선정할 이유에 대해 추가 기술하여 주시기 바랍니다.</p> <p>4. 계획서 p.21 시험대상자수 선정에서 효과 크기를 Effect size를 0.6으로 매우 큰 효과 크기를 가정 했는데 이에 대한 근거를 추가 기술하여 주십시오.</p> <p>5. 동의서 전반에 시행기관이 「부산대학교병원」으로 기입되어 있어 「서울성모병원」으로 수정하 여 주십시오.</p> <p>6. 동의서 p.8 서명란 중 「법적 대리인」을 「법적 대리인」으로 수정하여 주시기 바랍니다.</p>		

ver 4.0

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

답변내용	<p>1. 제과기준에 다음과 같이 추가 기술하였습니다. 1. 순발지침, 두릅이나 옥잠강 등과 같은 증상이 혈액순환 장애 이외의 다른 질병(디스키, 관절염 등, 근경련증후군 등)으로 진단된 자.</p> <p>2. 본 시험의 1차 유효성 평가 통계 분석 방법인 baseline 대비 종료시점의 9주간의 thromboxane B2 변화량을 보는 단일 통계 분석 계획으로 수정하였습니다. 따라서 본 다중검정법에 대한 추가 적인 기술을 필요하지 않을 것으로 사료됩니다.</p> <p>3. 본 시험은 건강기능식품 개별인증절 허가용 목적으로 진행예정인 인체적용시험이며, 일반적으로 임상시험은 유효성 입증에 있어 IT분석군을 주 분석군으로 규정 하고 있지만, 인체적용시험은 분석군에 대한 계획을 두고 있지 않으나 시험과정의 유효성을 증명하기 위한 주 분석군을 주 분석군으로 선정할 하여 분석하는 것이 시험과정의 안전성 개선에 대한 강요를 확인할 수 있다고 사료 합니다. 또한 인체적용시험 임상 전 식약처와의 사전상담 용자시 PP분석군을 주 분석군으로 하는 부 분에 대해 동의 하였습니다.</p> <p>4. 시험대상자수 선정에 있어서 본 천연물복합제제 WSY-3063의 투여는 최초로 시도되기 때문에 각 격의 생약제제의 유사연구결과 및 비임상연구결과를 근거로 effect size를 설정하였습니다. 관련 근거는 뒤 주요 내용란 별도 첨부하였습니다.</p> <p>5. 다음 오기에 대하여 수정하였습니다. 6. 다음 오기에 대하여 수정하였습니다.</p>
심의의견	<p>-기분사양 : &gt; &lt;심사결과&gt; 승인 과외 규정을 근거로 판단한 결과 IRB에서는 해당 연구의 진행을 "승인"하기로 결정하였습니다. 1. 승인유효기간: 2014. 06. 26 ~ 2015. 06. 25 2. 시험대상자 추가: 연구 기간 중 연구 진행에 대하여 1년 마다 보고하여 주시기 바랍니다. 승인유효기간 이후에도 연구용 지속할 경우, 지속심사주기승인유효기간 내에 지속심사할 제출하여 승인을 득 하거나 연구가 종료된 경우 종료보고 하여 주시기 바랍니다.</p> <p>&gt; 안내사항 1. 심사결과 통보서: 연구자가 반드시 보관해야 하는 서류이므로 해당 연구의 문서와 함께 보관하시 기 바랍니다. 2. 통보보고: 연구 종료 시 중요 보고서를 제출하여 주시기 바랍니다. 종료보고 기간은 승인완료일 이 속 1개월까지입니다. 3. 연구 기간 연장 시 변경계획서를 통하여 연구기간을 변경하여 주시기 바랍니다. 4. 연구대상자 동의서: 최종 승인을 받은 연구대상자 동의서에 승인 유효기간이 명시된 IRB의 확인 도장을 받아 동의확도 시 사용하시기 바랍니다. 5. 연구 진행 시 연구결과를 포함한 이상반응 등 연구 관련 문건에 발생할 경우 가톨릭대학교 의과대학 임상연구관리규정(Ver. 4.0)에 따라 즉시 보고하여 주시기 바랍니다. 6. 연구 종료 후 임상연구 관련 문서는 관련 부처 및 기관규정에 따라 보관절차를 진행하시기 바라며, 상세 절차는 문서본 담당자에게 문의하시기 바랍니다.</p> <p>- 기타 : 1. 임상연구 심의 보충 담양제 2. 2014.06. clinical study protocol ver 1.1, study no. KMGSI-WSY3063 2-2. Change log(v2KOR2_0_B2004v2_0_13May2014_ENG) 3. 설명서 및 문서서 KMGSI-WSY3063_ver No. 1.1 4. 별첨 1. 변경내역서 5. 별첨 2. 시험대상자수 산출근거</p>

ver 4.0

- \* 귀하가 신청하신 심의연건에 대하여 본 임상연구심사위원회의 심의결과를 위와 같이 알려드립니다.
- \* 시험 책임자는 IRB 심의 결과에 의거하는 경우 IRB 통보일로부터 2주 이내에 서면으로 이의 사유를 기록하여 이의 제기할 수 있습니다. 단, 동일 사항에 대하여 2회 연속으로 이의신청을 할 수 없습니다.
- \* 본 임상연구심사위원회의 KGPCP 및 ICH-GCP 규정을 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률을 준수합니다.

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 (직인)

가톨릭대학교 서울성모병원장 (직인생략)

**연구자의 임상시험/연구 수행시 지켜야 할 사항**

1. 위원회의 승인을 받은 계획서에 따라 연구를 수행하십시오.
2. 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전승인을 받고 수행하십시오. 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고 해야합니다.
3. 위원회의 승인을 받은 연구대상자 동의서를 사용하십시오.
4. 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인종된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회 승인을 받아야 합니다.
5. 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거한 동의 과정을 수행할 것이며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에의 참여여부를 고려할 수 있도록 충분한 기회를 제공해야 합니다.
6. 연구대상자 모집광고는 사용 전에 위원회로부터 승인을 득한 후 사용해야 합니다.
7. 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 부작용에 대하여는 위원회에 서면으로 보고해야 합니다.
8. 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출해 주시기 바랍니다.
9. 임상시험 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고해야 합니다.
10. 초기심사에서 승인된 연구의 지속을 위해서는 연구승인유효기간 이내에 계속심의를 신청하여 승인을 득해야 합니다.
11. 임상시험이 종료(조기종료를 포함한다)된 경우, 연구종료 요약자료와 함께 임상시험 종료 사설을 서식 IR-10-02 임상연구종료보고서에 따라 위원회에 보고하여야 합니다.

ver 4.0

**- 개시모임**

- : 부산대학교 병원과 서울성모병원의 인체적용시험 시작을 위한 개시모임을 진행하여 WSY-3063의 인체적용시험에 연관된 책임 교수님 (MD), CRC 간호사, 약사, 등의 진행요원들과 진행.
- 개시 모임을 통하여 CRC 간호사와 책임교수에게 의뢰사의 정확한 의뢰취지와 프로토콜의 설명 및 인지를 위해 개시함.

**(부산대학교병원)**

**(서울성모병원)**

**(주) 한국전통의학연구소**

(☎110-062) 서울특별시 강남구 논현로 652 한일빌딩 5층 (주)한국전통의학연구소  
T.051)240-7471 F.051)254-7720 이메일 chcas7@wellcan.co.kr 담당 요건주

수 신: 부산대학교병원 최정현 교수  
경 유:  
참 조: 김윤진, 이정규, 한지숙, 이효은, 황성연, 김삼숙, 이우정, 김진아  
제 목: 인체적용시험 개시모임 개최 안내

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. (주)한국전통의학연구소에서 의뢰하는 임상연구에 대한 개시모임을 개최하고자 합니다.  
연구기관 부산대학교병원  
연구책임자 부산대학교병원 순환기내과 최정현  
연구과제명 천연물복합체 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험  
실시일자 2014년 04월 22일 화요일 12:00~14:00  
장소 부산대학교병원 임상시험센터 1층 세미나실
3. 이와 관련하여 개시모임 일정표를 첨부하여 보내드리오니 확인 부탁드립니다.
4. 문의사항은 아래를 통하여 연락주시기 바랍니다.  
Email chcas7@wellcan.co.kr  
Tel. 051-240-7471  
Mobile 010-9770-1189

2014. 04. 10.  
(주) 한국전통의학연구소  
대표이사 최건섭 (인)



**(주) 한국전통의학연구소**

(☎110-062) 서울특별시 강남구 논현로 652 한일빌딩 5층 (주)한국전통의학연구소  
T.051)240-7471 F.051)254-7720 이메일 chcas7@wellcan.co.kr 담당 요건주

수 신: 가톨릭대학교 서울성모병원 정 기 속 교수  
경 유:  
참 조: 한지숙, 박준영, 이경연, 황우경, 유소현, 김유정, 최관주, 황성연, 김삼숙, 이우정, 김진아  
제 목: 인체적용시험 개시모임 개최 안내

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. (주)한국전통의학연구소에서 의뢰하는 임상연구에 대한 개시모임을 개최하고자 합니다.  
연구기관 가톨릭대학교 서울성모병원  
연구책임자 서울성모병원 순환기내과 장기속  
연구과제명 천연물복합체 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험  
실시일자 2014년 07월 08일 화요일 14:00~16:00  
장소 서울성모병원 본관 6층 601호
3. 이와 관련하여 개시모임 일정표를 첨부하여 보내드리오니 확인 부탁드립니다.
4. 문의사항은 아래를 통하여 연락주시기 바랍니다.  
Email chcas7@wellcan.co.kr  
Tel. 051-240-7471  
Mobile 010-9770-1189

2014. 07. 02.  
(주) 한국전통의학연구소  
대표이사 최건섭 (인)





○ 인체적용시험 진행

- 임상시험용계약서

: 개시모임진행 후 부산대학교병원과 서울성모병원과 임상시험용계약을 체결.

- 각 다기관 IRB를 통화한 후 인체적용시험을 위해 계약을 체결 함.

(부산대학교병원)

임상시험용계약서

임상시험 의뢰기관인 (주)한국전통의학연구소(이하 "의뢰기관"이라고 한다)와 임상시험 실시기관인 부산대학교병원(이하 "실시기관"이라고 한다), 연구책임자는 상호 합의하에 임상시험 실시에 대한 계약을 아래와 같이 체결한다.

- 제 1조 【연구과제명】**  
본 연구의 과제명은 「천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 다기관, 무작위대장, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험」이다 한다.
- 제 2조 【연구과제와 진행】**  
1) 실시기관: 부산대학교병원  
연구책임자: 최정현  
2) 의뢰기관: (주) 한국전통의학연구소  
대표자: 최연섭
- 제 3조 【연구기관】**  
연구기관은 임상시험실사위원회(IRB)의 임상연구계획 심의 결과에 따라 2014년 03월 25일부터 2015년 03월 31일까지로 한다.
- 제 4조 【연구계획서의 심사와 승인 및 준수】**  
1) 연구계획서는 "실시기관"의 임상시험실사위원회(IRB)의 승인을 득하여야 하며, 그 실시 방법은 승인된 연구계획서를 준수하여 실시하여야 한다.  
2) 연구계획서의 변경 시에는 현행의 절차를 동일하게 준수하여 사전승인을 반드시 받아야 한다.
- 제 5조 【임상시험 연구비의 지급】**  
"의뢰기관"은 임상시험 수행에 필요한 임상시험 연구비로 일금 68,440,000원(간접비 18% 포함)을 "실시기관"에게 납부한다.  
1) 직접비 : 일금 58,000,000원  
2) 간접비 : 일금 10,440,000원  
간접비는 임상시험연구비의 5%로 정한다.  
임상시험용 의약품 관리료는 임상연구비의 3%로 정한다.  
임상연구부서 관리료는 임상연구비의 10%로 정한다.

(서울성모병원)

임상시험용 계약서

임상시험 의뢰기관인 (주)한국전통의학연구소(이하 "의뢰기관"이라고 한다)와 임상시험 실시기관인 가톨릭대학교 서울성모병원(이하 "실시기관"이라고 한다), 연구책임자는 상호 합의하에 임상시험 실시에 대한 계약을 아래와 같이 체결한다.

- 제 1조 【연구과제명】**  
본 연구의 과제명은 「천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위대장, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험」이다 한다.
- 제 2조 【연구과제의 진행】**  
1) 실시기관: 가톨릭대학교 서울성모병원  
연구책임자: 장기택  
2) 의뢰기관: (주) 한국전통의학연구소  
대표자: 최연섭
- 제 3조 【연구기관】**  
연구기관은 임상시험실사위원회(IRB)의 임상연구계획 심의 결과에 따라 2014년 3월 1일부터 2015년 03월 31일까지로 한다.
- 제 4조 【연구계획서의 심사와 승인 및 준수】**  
1) 연구계획서는 "실시기관"의 임상시험실사위원회(IRB)의 승인을 득하여야 하며, 그 실시 방법은 승인된 연구계획서를 준수하여 실시하여야 한다.  
2) 연구계획서의 변경 시에는 현행의 절차를 동일하게 준수하여 사전승인을 반드시 받아야 한다.
- 제 5조 【임상시험 연구비의 지급】**  
"의뢰기관"은 임상시험 수행에 필요한 임상시험 연구비로 일금 99,660,000원(간접비, 약물관리비, 부가세 포함)을 "실시기관"에게 납부한다.  
1) 직접비 : 일금 76,966,510원  
2) 간접비 : 일금 11,543,490원  
ORCC간접비는 직접비의 5%로 정한다.  
병원간접비는 직접비의 10%로 정한다.  
3) 약물관리비 : 2,100,000원  
4) 부가세 : 9,060,000원  
부가세는 총 연구비의 10%로 정한다.  
5) 지불 방법: 현금  
6) 지불 시기: 1차분은 계약일로부터 15일 이내 ₩ 60,985,000  
2차분은 계약일로부터 5개월 이내 ₩ 24,337,500  
3차분은 계약일로부터 시험 종료 후 1개월 이내 ₩ 24,337,500  
7) 입금계좌: 우의은행 1005-402-407285 (계좌주: (학) 가톨릭대학교 서울성모병원)

- WSY-3063 인체적용시험 모집 공고문

(부산대학교병원)

IRB 승인 2014.03.25 H-1403-002-015

**손발저림** 이 있으십니까?

혈액순환장애 인체적용시험 참가자를 모집합니다.

- ◆ 대상 (선정기준)
  1. 손발저림, 두통이나 목당김과 같은 혈액순환장애 증상을 느끼는 자
  2. 비만으로 인하여 혈행개선을 필요로 하는 자

※ 선정대상과 제외대상의 자세한 기준에 대해서는 연구자 및 연구간호사에게 자세하게 상담 받으실 수 있습니다.
- ◆ 인체적용시험용의약품에 대한 정보  
비임상시험을 통하여 안전성이 확보된 천연물복합제제
- ◆ 참가자 혜택  
진료비 (검진비, 검사비) 무료, 소정의 교통비 지급
- ◆ 참여기간  
총 8주간 복용, 총 4회 (4주 간격) 방문
- ◆ 신청방법  
연락처: 051-240-7944/  
010-2911-4089

한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

PNU 부산대학교병원  
Pusan National University Hospital

부산광역시 서구 구덕로 179 부산대학교병원, 시험책임자: 순환기내과 최 정 현

(서울성모병원)

IRB 승인, 과제번호: KC14HDM0206

**손발저림** 이 있으십니까?

혈액순환장애 인체적용시험 참가자를 모집합니다.

- ◆ 대상 (선정기준)
  1. 손발저림, 두통이나 목당김과 같은 혈액순환장애 증상을 느끼는 자
  2. 비만으로 인하여 혈행개선을 필요로 하는 자

※ 선정대상과 제외대상의 자세한 기준에 대해서는 연구자 및 연구간호사에게 자세하게 상담 받으실 수 있습니다.
- ◆ 인체적용시험용의약품에 대한 정보  
비임상시험을 통하여 안전성이 확보된 천연물복합제제
- ◆ 참가자 혜택  
진료비 (검진비, 검사비) 의뢰자 제공, 소정의 교통비 지급
- ◆ 참여기간  
총 8주간 복용, 총 4회 (4주 간격) 방문
- ◆ 신청방법  
연락처: 02-2258-1148  
(담당자: 도민희 연구간호사)



한국전통의학연구소  
Korea Bio Medical Science Institute

가톨릭대학교 서울성모병원  
THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA'S AMY'S HOSPITAL

서울시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 본관 2층 심혈관센터, 시험책임자: 순환기내과 장 기 옥

○ 인체적용 시험 진행 중 인체적용시험 프로토콜 변경 및 위반 사례 보고

- 변경계획서 (Version 1.1 -> 1.2)

시행일 : 2014.08.22.

심의 내용 : 임상시험 방법 : 시험대상자 모집 방법 :

본과제는 원내 모집공고문 부착을 통하여 외래방문을 통하여 알게된 외부 지원자 뿐만 아니라, 시험 참여를 원하는 원내 직원을 시험대상자로 등록하고자 함. 단, 연구와 관련이 있는 직원은 참여시키지 아니한다.

기타 : 1. 병용약물 금지에 대한 내용 보완

: 일관성 치료에 대한 약물 병용 가능에 대한 내용 첨가

2. 스크리닝 방문에 대한 visit window 포함

: 스크리닝 방문에 대한 visit window를 5일로 추가 함.

3. 연구간호사 추가

: 도민희 연구간호사 추가

4. 관리약사 변경에 따른 내용 수정

: 민미나 -> 이정선

5. 단순오기 수정

: 만 19세이상 75세이하 성인 -> 만 19세 이상 75세 미만 성인

식약처 상담 : 병용약물 허용에 대한 가이드라인 상담 진행

- 변동위반 보고서

시행일 : 2014.11.27

변동위반 사유 :

본 인체적용시험은 헬헝개선 지표인 PT, aPTT를 2차 유효성 평가 변수로 잡고 있으며 검사는 Baseline대비 변화량을 확인해야 하므로 visit2부터 시행되어야 하는 검사이지만 연구간호사 CRC의 검사처방 누락으로 인한 몇몇 시험대상자들은 검사가 누락되어 진행되지 않음을 보고한다.

※ 연구간호사인 CRC가 본 검사에 대해 인지하지 못함.

- 변경계획서 (Version 1.2 -> 1.3)

시행일 : 2014.11.27

피험자 관련 : 2차 유효성평가변수인 PT, aPTT검사 누락에 따른 시험대상자수 10명 증가  
변경 사유 :

PT, aPTT는 2차 유효성 평가 변수이며, 본 검사 항목이 누락된 사실을 인지한 시점은 이미 IP복용이 시작된 시점이며, 본 사항은 의뢰자 측에서 제공한 계획서의 중대한 위반사실에 해당하지 않으며, 이상반응을 보이지 않으므로 명확한 탈락 사유가 없다고 사료됨. 하여 본 시험대상자들을 의뢰사 및 시험대상자의 권한에 의해 탈락시키는 것은 오히려 피험자 권익에 문제가 될 가능성이 있다고 판단. 따라서 현재 탈락률이 높지 않은 것을 반영하여 최소한의 인원인 시험대상자 10명을 추가함.

식약처 상담: PT, aPTT검사 누락된 피험자의 탈락에 대한 판단 상담.

- 변경계획서 (Version 1.3 -> 1.4)

시행일 : 2014.12.18

기타 : 1차 유효성 평가 변수 Tromboxane B2 -> aPTT로 변경

의뢰사 측 모니터링 CRA요원 추가 (구혜정, 오현아, 배혜민)

변경사유 :

(재) 서울의과학연구소 (SCL)에서 분석 진행 한 Thromboxanxse B2/Serotonin이 분석결과가 동일 패턴을 보여야 함에도 불구하고 서로 상이한 패턴의 결과를 보임에 따라 과학적 증빙으로서의 역할을 상실한 것으로 사료되어 변경을 하고자함.

※ 본 내용은 맹검해제가된 결과가 아님.

식약처 상담 : 혈행개선의 개별인정형의 지표로서 PT, aPTT가 적합한지 확인.

- 변경계획서 (Version 1.4 -> 1.5)

시행일 : 2014.01.05

기타 : WSY-3063 인체 적용시험의 원활할 진행을 위해 연구간호사 CRC를 추가로 등록

- 인체적용시험 진행 중 발생하는 돌발 상황과 원활한 진행을 위해 인체적용시험 프로토콜의 변경을 진행하였음.
- 각 모든 변경 진행은 식약처의 상담을 통해 진행됨.
- 식약처 상담 및 IRB 변경 심의 신청 및 승인에 각 건에 따라 한달 정도의 기간이 소요됨.
- 교육을 통하여 모니터링 요원인 CRA요원 인력양성 및 외부인원의 CRC 인력양성.

○ 인체적용시험 진행

	스크리닝 수	무작위 배정 수	등록 실패 수	중도 탈락 수	진행 사항
부산대병원	61	51	10	13	- 종료 38명 - Data entry (RWB01~RWB51)
서울성모병원	70	58	12	7	- 종료 51명 - Data entry (RWS01~RWS58)

- 스크리닝 시험대상자 수 Total 131명

- 무작위 배정 수 Total 109명

- 등록 실패 수 Total 22명

- 중도 탈락 수 Total 20명

※ 등록 실패 사유 : 시험대상자 선정 제외 기준 (질환 유무, 임신 등)

※ 중도 탈락 사유 : 중도 동의철회, 중도 미방문, 인체적용시험 중 약물 복용 (감기약 등).

○ 통계의뢰 기관과 계약 체결

- 부산대학교병원 Academe CRO (A-CRO) 통계업무 위탁 계약서

"Vision 2020, 대한민국을 넘어 세계로"



부산대학교병원



수신자 한국전통의학연구소 대표자  
(경유)

제목 임상시험 업무 위탁/대행 계약 체결 통지

1. 귀 원의 발전을 기원합니다.
2. 임상시험 업무 위탁/대행 계약을 다음과 같이 체결하오니, 업무에 참조하시기 바랍니다.

가. 임상시험 업무 위탁/대행 계약 체결 사항

- 1) 계약자(위탁 의뢰기관) : 한국전통의학연구소 대표자 최건섭  
계약자(대행 실시기관) : 부산대학교병원장 정대수 / 임상시험센터장

김형희

- 2) 연구과제명 : 천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험

- 3) 시험책임자 : 가톨릭대학교 서울성모병원 장기욱 / 부산대학교병원 순환기내과 최정현

- 4) 계약금액 : 6,313,500원(간접비 포함, VAT 별도)

- 5) 상세한 사항은 "용역계약서"에 의한다.

- 6) 기타 문의사항은 A-CRO 담당자(정현희 7053)에게 연락하여 주시기 바랍니다.

붙임 : 임상시험 업무 위탁/대행 용역 계약서 1부, 끝.

"위탁기관"

(주 소) 서울시 강남구 논현로 652

(기관명) 한국전통의학연구소

(대표자) 최건섭 (인)

(일 자) 2014 년 12 월 31 일

본인은 본 계약의 내용을 확인하고, 수락하였습니다.

"수탁기관"

(주 소) 부산시 서구 구덕로 179

(병원명) 부산대학교병원

(대표자) 병원장 정대수 (인)

(일 자) 2015 년 1 월 5 일

(임상시험센터장) 김형희 (인)

(일 자) 2015 년 1 월 5 일

임상시험 업무 위탁/대행 용역 계약서

서울시 강남구 논현로 652 에 위치한 한국전통의학연구소 (이하 "위탁기관"이라 칭함)와 부산시 서구 구덕로 179 에 위치한 부산대학교병원 임상시험센터 A-CRO (이하 "수탁기관"이라 칭함) 간에 임상시험 업무수행 위탁의뢰 및 수탁대행에 대한 계약(이하 "본 계약")을 체결하기로 한다.

- 다 음 -

제 1 조 (목적)

이 계약은 "위탁기관"이 의뢰하는 계약내용에 대하여 용역 범위, 비용 및 책임 관계를 명명하기 위함이다.

제 2 조 (업무내용)

1. 과제번호 : KBMSI-WSY3063
2. 과 제 명 : 천연물복합제제 WSY-3063의 혈소판 응집 억제 및 혈행개선에 대한 유효성과 안전성 평가를 위한 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험
3. 연구 책임자(소속/직급/성명): 부산대학교병원 / 교수 / 최 정 현  
가톨릭대학교 서울성모병원 / 교수 / 장 기 욱
4. "수탁기관"은 "위탁기관"에게 본 계약의 첨부된 업무내용 [첨부]에 따른 용역을 제공한다. 단, 계약기간 중에 담당사자의 별도 협의를 통해 업무 범위를 조정할 수 있다.
5. 본 계약기간 동안 "수탁기관"은 본 계약상의 "업무"를 "수탁기관"의 책임하에 실시한다.
6. "위탁기관"은 "수탁기관"에게 "업무"에 필요한 기술자료 등의 제공에 적극 협력하여야 한다.

제 3 조 (계약기간)

본 계약의 기간은 계약당사자의 마지막 서명일로부터 수탁기관이 위탁 받은 업무를 완료하는 하는 날까지로 한다. 단, 계약기간은 업무진행상황에 따라 "위탁기관"과 "수탁기관" 상호간에 협의하여 조정하는 것으로 한다.

제 4 조 (용역비용)

1. "위탁기관"은 제 2 조에서 명시한 의뢰과제의 센터 이용에 따른 비용을 "수탁기관"에게 다음과 같이 지급한다.  
(1) 총 비용 : ₩ 6,313,500 원 (간접비 포함, VAT 10% 별도)-(첨부) 세부 견적서 참고  
(2) 지불방법 : "위탁기관"은 다음과 같이 청구서를 발행하고 "수탁기관"은 청구서 발행일로부터 30 일 이내에 "센터이용료"에 해당하는 금액을 전산치리로 지불한다.  
(3) 지급방법 : 1회 납부

○ Data entry

- 통계기관에게 본 시험의 프로토콜에 해당하는 data entry form을 의뢰함
- Data entry form에 증례기록서를 바탕으로 data을 입력
- 입력 후 통계기관에게 통계 의뢰

WSY-3063%20data%20entry\_seou1\_0131[1] - Excel

2페이지	yyymmdd	예1, 아니오0	yyymmdd	yyymmdd	연령	남1, 여2	예1, 아니오0	예1, 아니오0	신장	kg	예1, 아니오0	개피/일	기간(년)	기간(개월)	예1, 아니오0	예1, 아니오0	예1, 아니오0
ID	Initial	방문일	동의서	취득일	생년월일	성별	수유여부	임신여부	cm	kg	예1, 아니오0	개피/일	기간(년)	기간(개월)	예1, 아니오0	예1, 아니오0	예1, 아니오0
RWS01	HMJ	140912	1	140912	809909	34	2	0	158	48.7	0			0	0	0	
RWS02	YSJ	140912	1	140912	881003	25	2	0	167	61	0			0	0	0	
RWS03	SKK	140919	1	140919	896002	25	2	0	165	55.8	0			0	0	0	
RWS04	KYW	140919	1	140919	839906	31	1	0	175	78	1	10	10	0	0	0	
RWS05	BBS	140929	1	140929	670501	47	1	0	175	80	0			0	0	1	30
RWS06	JYH	140924	1	140924	710902	43	1	0	170	60	0			0	0	1	20
RWS07	HTH	140924	1	140924	730410	41	2	0	155	54	0			0	0	0	20
RWS08	SVJ	141007	1	141007	740222	40	1	0	175	78	0			0	0	1	10
RWS09	ASJ	141010	1	141010	451214	69	2	0	144	49	0	0		0	0	0	
RWS10	JWH	141010	1	141010	720301	42	1	0	172	78	1	20	20	0	1	1	20
RWS11	JSJ	141010	1	141010	650907	49	1	0	172.9	69.5	0			0	0	1	30
RWS12	KVK	141010	1	141010	600314	52	1	0	170	73	0			0	0	1	30
RWS13	BHY	141016	1	141016	721222	42	1	0	172	74.5	0			0	0	1	22
RWS14	KHJ	141016	1	141016	660617	48	1	0	167	64	0			0	0	1	20
RWS15	JJH	141016	1	141016	650513	49	1	0	177	91	1	20	25	0	1	1	25
RWS16	LKH	141017	1	141017	740327	40	2	0	165	41	0			0	0	1	10
RWS17	KMJ	141015	1	141015	670920	47	2	0	164	70	0			0	0	1	10
RWS18	LJS	141017	1	141017	790205	35	2	0	161	46.5	0			0	0	1	10
RWS19	CMS	141017	1	141017	781101	36	1	0	176	80	1	20	10	0	0	1	10
RWS20	LIT	141017	1	141017	730326	41	1	0	174.1	72.2	0			0	0	1	20
RWS21	LBH	141014	1	141014	620430	52	1	0	173	79	0			0	0	1	30
RWS22	LEH	141014	1	141014	670623	47	2	0	162	56	0			0	0	0	
RWS23	KMO	141021	1	141021	650520	49	2	0	151	54	0			0	0	0	
RWS24	BJY	141021	1	141021	730805	41	2	0	155	52.7	0			0	0	0	
RWS25	HHW	141017	1	141017	710721	43	1	0	172	74	1	10	20	0	1	0	
RWS26	PHS	141021	1	141021	610115	53	2	0	161	54	0			0	0	0	
RWS27	PGD	141021	1	141021	501209	63	2	0	156	60	0			0	0	0	
RWS28	BHJ	141021	1	141021	910522	23	2	0	163	42	0			0	0	0	
RWS29	BHS	141021	1	141021	851226	28	2	0	165	58	0			0	0	0	

- 통계 분석 결과

: 층화 분석을 통하여 통계 결과 도출

- ※ [PT\_age44↑] 전후비교에서 개선 경향
- ※ [PT\_BMI23↑] 군간비교에서 개선 경향
- ※ [PT\_BMI23↑] 전후비교에서 유의적 개선
- ※ [PT\_LDL130↓] 전후 비교에서 개선 경향
- ※ [PT\_음주有] 전후 비교에서 개선 경향
- ※ [QOL\_BMI23↑] 전후 비교에서 개선 경향

3063\_통계층화분석결과\_장리\_0216 - Excel

Table 9.2 2차 유효성 평가 (PP)_BMI 23 이상	Treatment group	Baseline Mean ± SD	4 weeks Mean ± SD	Difference* Mean ± SD	p-value <sup>1)</sup>	8 weeks Mean ± SD	Difference** Mean ± SD	p-value <sup>2)</sup>
Activated partial thromboplastin time(aPTT)	WSY-3063(N=15)	30.91±4.21	30.25±3.98	-0.66±1.56	0.1230	30.97±4.17	<b>0.07±1.41</b>	0.8571
	Placebo(N=16)	30.67±4.1	31.15±3.28	0.48±2.47	0.4480	30.56±3.26	<b>-0.11±2.28</b>	0.8463
Prothrombin time(PT)	WSY-3063(N=15)	11.08±0.79	11.05±0.86	-0.03±0.43	0.7677	11.4±1.01	<b>0.32±0.47</b>	<b>0.0187</b>
	Placebo(N=16)	11.05±0.54	10.95±0.51	-0.1±0.37	0.3184	11.05±0.51	<b>0.01±0.4</b>	0.9025
삶의질 설문(QoL)의 점수	WSY-3063(N=15)	27.2±5.9	28.43±3.84	1.25±3.39	0.2275	28.2±2.91	<b>1.58±2.87</b>	<b>0.0828</b>
	Placebo(N=16)	27.06±3.17	26.94±5.53	-0.13±4.3	0.9090	27.38±4.06	0.31±5.28	0.8159
Table 10.1 2차 유효성 평가 (PP)_음주안함								
삶의질 설문(QoL)의 점수	WSY-3063(N=12)	25.27±3.77	27.33±3.75	0.82±2.27	0.2690	27.5±4.34	<b>1.82±2.48</b>	<b>0.0355</b>
	Placebo(N=19)	25.78±4.1	27.63±5.35	2±6.4	0.2023	26.32±3.71	0.61±5.63	0.6508
Table 10.2 2차 유효성 평가 (PP)_음주함								
Prothrombin time(PT)	WSY-3063(N=12)	11.08±0.76	11.07±0.95	-0.01±0.38	0.9404	11.45±1.05	<b>0.39±0.49</b>	<b>0.0226</b>
	Placebo(N=12)	10.83±0.32	10.9±0.5	0.06±0.39	0.5773	10.97±0.42	0.13±0.47	0.3427

[PT\_BMI23↑] 전후비교에서 유의적 개선  
 [PT\_BMI23↑] 군간비교에서 개선경향 [QOL\_BMI23↑] 전후 비교에서 개선경향  
 [QOL\_음주無] 전후 비교에서 개선경향  
 [PT\_음주有] 전후 비교에서 개선경향



- 개별인정형 신청을 위한 식약처 사전 상담 진행
- 개별인정형 신청을 위해 준비 자료

식품의약품안전처    자주하는질문    상담신청    상담자료실    민원서식    방문/회신 상담예약

국민의 삶의 질 향상을 위한  
**든든한 식약처**

홈 > 상담예약

민원인 이름	목적예	확정상담장소	식약처-민원실
예약등록일	2014-12-22 10:03	희망상담일시	2014-12-26 11:00
확정상담일시	2014-12-30 09:30	확정상담부서	건강기능식품기준과
확정담당자	김준형	상담구분	방문상담

안녕하세요. 한국전통의학연구소의 목지에라고 합니다. 이번 저희 회사 "일행개선 관련 기능성 원료 개발을 위한 인체적용시험 계획"의 상담 요청 드립니다.

목록보기

식품의약품안전처  
 (우)369-700 충청북도 청원군 감곡면 오송생명2로 187 (연계리 643) 오송보건의료정보타운  
 종합상담센터 : 1577-1255

- 개별인정 신청시 필요한 자료 리스트의 95% 작성 완료.

# 기능성원료 인정 신청을 위한 제출자료

## 1. 제출자료의 총괄 요약본

■ 신청원료 개요  
(■최소, □변경)

회 사 명	주식회사 한국전통의학연구소 (대표이사 : 황성연)		
영업허가(신고번호)	제조업 ■	214911-0029051	수입업 □
주소 및 연락처	* 서울특별시 강남구 논현로 652 *(연락처) 02-3443-9252 (팩스) 02-3444-9252		
	담당자	(이름)	(연락처)
신청 원료명	WSY-3063 (당귀복합추출물)		
실사 대상 분류	개별 인정 원료	새로운 원료 ■	신청 가능성 <input type="checkbox"/> 신청 심취량 <input type="checkbox"/>
		가능성 추가 <input type="checkbox"/> 심취량 변경 <input type="checkbox"/> 제조방법 변경 <input type="checkbox"/> 기준규격 변경 <input type="checkbox"/> 시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	실행개선에 도움을 줄 수 있음. 당귀복합추출물로서 21g/d
	고시된 원료	가능성 추가 <input type="checkbox"/> 심취량 변경 <input type="checkbox"/> 제조방법 변경 <input type="checkbox"/> 기준규격 변경 <input type="checkbox"/> 시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	
국내제조 ■ 수입 □	수입인 경우	수리번호 제조회사 소재지	수출국
모동토의 □	실시 날짜 :		
품목설명회 □	희망 날짜 :		

## ■ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분류	비고
1	제출자료 전체의 총괄 요약본	■예 □ 아니오		
2	기원 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료			
21	기원	■국내 □국외		
22	개발경위	■국내 □국외		
23	국내외 인정허가 현황	■국내 □국외		
24	국내외 사용 현황	□국내 □국외		
3	제조방법 및 그에 관한 자료			
31	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □ 아니오		
32	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □ 아니오		
33	사용된 원료첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 □ 아니오	모두, 일부	
34	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니오		
35	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니오		
4	원료의 특성에 관한 자료			
41	원료를 특징지을 수 있는 특성 물질 등	■예 □ 아니오		
42	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니오 □기능성분 ■지표성분		
43	영양성분정보자료	■예 □ 아니오		
5	기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료			
	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
51	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번S LOT의 시험성적서	□예 □ 아니오		
52	표준품 정보 자사표준품의 경우 순도,구조,동정,유효기간 등 정보 추가	■예 □ 아니오 □사용제품 □자사 표준품		
	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니오 □공인 시험방법 □자사 시험방법		
53	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가			

6. 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료				
61	유효물질 규격 항목인 카복실, 카복실염, 황산화물, 수산화물의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
62	※ 유효물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오		
63	유효물질 규격 미실정 항목인 황산화물, 수산화물의 규격 및 근거 (예: 글루타민산, 미생물 등)	□예 □ 아니오		
64	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	□예 □ 아니오		
64	유효물질중금속, 잔류농약, 미생물 등의 시험방법	■예 □ 아니오		
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)				
7.1	설위근거 정보	■예 □ 아니오		
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	■예 □ 아니오		
7.3	설위량 평가 정보	■예 □ 아니오		
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	■예 □ 아니오		
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	반취투여독성시험	■예 □ 아니오	
		3개월 반복투여독성시험	■예 □ 아니오	
		유전독성시험	■예 □ 아니오	
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발달성)	■예 □ 아니오	
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료				
8.1	시험관시험	■ 신청원료 (논문 편) * 시험기관 : □ 유사원료 (논문 편)		
8.2	동물시험	■ 신청원료 (논문 편) * 시험기관 : □ 유사원료 (논문 편)		
8.3	인체적용시험	□ 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 : □ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)		
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료				
9.1	섭취량 및 근거	■예 □ 아니오		
9.2	섭취방법 및 근거	■예 □ 아니오		
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■예 □ 아니오		
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	■예 □ 아니오		
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	■예 □ 아니오		



- 지표성분의 규격을 공인할 식약처 공인기관 선정.
- 농약 및 곰팡이 등의 유해물질 검사를 위한 식약처 공인기관 선정.
- PT, aPTT로 동물실험 추가 data 필요.

○ WSY-3063의 PT, aPTT를 확인할 In vivo 실험 의뢰.

- 안동대학교 손호용 교수님에 의뢰.
- 계약서

### 연구용역계약서

주식회사 한국전통의학연구소(이하 "갑"이라 한다)는 식품영양학과 교수 손호용(이하 "을"이라 한다)과 안동대학교 산학협력단(이하 "병"이라 한다)에게 "갑"이 개발하는 제품에 관한 연구를 의뢰하고 "을"과 "병"은 이를 수락함에 있어 "갑"과 "을", "병"은 다음과 같이 계약을 한다.

#### 제 1 조 (목적)

본 계약의 목적은 "갑"이 본건 항혈전 효능 연구를 위한 업무를 "을"에게 위탁하고, "병"이 "을"의 연구책임자로서 이를 수행함에 있어 필요한 세부사항을 규정하는 데 있다.

#### 제 2 조 (업무의 내용 및 범위)

"갑"이 "을"에게 의뢰하는 업무의 세부내용은 아래 각 호와 같다.

1. WSY-3063 관련 항혈전 연구
  - in vitro, ex-vivo, in-vivo 연구(TT, PT, aPTT 등)

#### 제 3 조 (연구기간)

본 계약에 따른 총 계약기간은 제2조에 의한 업무가 종료되는 날까지로 하여야 하며, "을"과 "병"은 2015. \_\_\_\_ . \_\_\_\_ 까지 본 계약에 따른 업무를 종료하여야 하고, 업무의 종료는 제 4조 제 4항에 따른 "갑"의 최종보고서 승인일로 한다.

#### 제 4 조 (업무의 수행 및 협조)

① "갑"과 "을", "병"은 신의와 성실으로써 본 계약의 제반 사항들을 이행하여야 하며, "갑"은 본건 업무의 수행을 위하여 필요한 일체의 자료, 정보, 데이터를 "병"에게 제공하고, "병"이 요청하는 경우 업무 수행에 필요한 지도, 자문, 교육, 지원을 제공하여야 한다.

② "을"과 "병"은 연구의 진행상황 등에 대하여 "갑"이 알 수 있도록 수시로 통보하여야 하고, "갑" 또는 "갑"이 지정하는 자의 연구개발 현장 확인, 관련 서류의 열람, 관련 자료의 제출 요청에 성실히 응하여야 한다.

③ "을", "병"은, "갑"의 요청에 따라 연구내용과 진행방향에 대하여 적극 협조하여야 하고, 본 계약의 연구 및 그 결과물에 대한 이해를 위하여 "을"과 "병"의 기술, 정보

: 위의 계약에 따라 WSY-3063의 항혈전 in vivo 실험을 진행 중에 있으며, 약 한 달간의 기간이 소요되는 것으로 확인 함.

- 서울성모병원의 인체적용시험 마무리 후 개별인정형 신청을 위한 안건의 정리 완료.
- 식약처의 공인기관에서의 지표 규격 설정 확인 및 유해물질 확인 진행.
- PT, aPTT 등의 동물 실험을 통한 기반연구 추가
- 위의 사항들을 보완 진행하여 개별인정형 신청 예정이며, 탄탄한 기반연구, 공인기관에서의 지표 설정, 유해물질 확인 결과 및 인체적용시험 결과로 보아 개별인정형 원료로서 승인을 받을 것으로 예상 됨.
  - 2016년 2월 까지 개별인정형 원료로서 승인 예정.
  - 2016년 6월부터 WSY-3063을 건강기능 식품으로서 생산 예정.

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

### 1절 연구개발경과의 성과 및 목표 대비 실적


#### 1. 연구 성과 목표

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표													
1차 년도	목표	2		1									
	실적	-		-									2
2차 년도	목표	-		2				3		1		3	
	실적	2		-				2		1		4	
3차 년도	목표	2	2	2	2	2		-				-	
	실적	4	2	-	-	1				3		8	2
소 계	목표	4	2	2	5	2		3		1		3	
	실적	6	2	-	-	1		2		4		12	
종료1차년도													
종료2차년도													
종료3차년도													
종료4차년도													
종료5차년도													
소 계													
합 계													

#### 가. 특히 성과

특허 출원 및 등록			등록 번호
1	특허명	참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	10-1404 168
	출원인	안동대학교 산학협력단/한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2013	
	출원번호	10-2012-0083903	
2	특허명	일당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	10-1404 165
	출원인	안동대학교 산학협력단/한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2013	
	출원번호	10-2012-0083899	
3	특허명	생약 추출물을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2014	
	출원번호	10-2014-0044796	
4	특허명	생약추출물을 포함하는 혈전 질환의 예방 또는 치료용 조성물	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2014	
	출원번호	10-2014-0044795	
5	특허명	모가득 상표 출원 (제29류)	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2015	
	출원번호	40-2015-0009040	
6	특허명	모가득 상표 출원 (제21류)	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2015	
	출원번호	40-2015-0009041	
7	특허명	레드 폴리페놀 상표 출원 (제29류)	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2015	
	출원번호	40-2015-0001508	
8	특허명	레드 폴리페놀 상표 출원 (제32류)	
	출원인	한국전통의학연구소/황성연	
	출원년도	2015	
	출원번호	40-2015-0001509	

1.



**특 허 증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1404165 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2012-0083899 호	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2012년 07월 31일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2014년 05월 29일	

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
일당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품

특허권자 (PATENTEE)  
등록사항란에 기재


발명자 (INVENTOR)  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)  
2014년 05월 29일



전자등록표는 2017년부터 매년 05월 29일까지 납부하여야 하며, 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

2.



**특 허 증**  
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1404168 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2012-0083903 호	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2012년 07월 31일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2014년 05월 29일	

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품

특허권자 (PATENTEE)  
등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)  
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)  
2014년 05월 29일



전자등록표는 2017년부터 매년 05월 29일까지 납부하여야 하며, 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

3.

관 인 생 략

**출원번호통지서**

출원일자	2014.04.15
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(11p1113)
출원번호	10-2014-0044795 (출원번호 1-1-2014-0358004-10)
출원인명칭	주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명
대리인성명	특허법인 다래(9-2003-100021-7)
발명자성명	홍성연
발명의명칭	상약 추출물을 포함하는 혈전증 예방 또는 치료용 조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부자번호: 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호 정보변경(경정), 변경신고서]를 제출하여야 하며 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허포(patent.go.kr) 검색 - 인원서비스단말번호 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내 출원일을 외국에서 인정하고자 하는 경우에는 국내 출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
\* 제도 안내: <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드  
\* 우선권 인정기간: 특허-실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
\* 미국특허상표청의 출원번호 기호로 우리나라에 우선권 주장할 시, 출원인이 미공개상태이면, 우선권으로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자국외원거서(PTO/SB-39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동행본 안내서를 참조하시기 바랍니다.

4.

관 인 생 략

**출원번호통지서**

출원일자	2014.04.15
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(11p1114)
출원번호	10-2014-0044796 (출원번호 1-1-2014-0358005-55)
출원인명칭	주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명
대리인성명	특허법인 다래(9-2003-100021-7)
발명자성명	홍성연
발명의명칭	상약 추출물을 포함하는 그지혈증, 특약결핵증 및 지방간의 예방 또는 치료용 조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부자번호: 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호 정보변경(경정), 변경신고서]를 제출하여야 하며 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허포(patent.go.kr) 검색 - 인원서비스단말번호 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내 출원일을 외국에서 인정하고자 하는 경우에는 국내 출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
\* 제도 안내: <http://www.kipo.go.kr>-특허담당-PCT/마드리드  
\* 우선권 인정기간: 특허-실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
\* 미국특허상표청의 출원번호 기호로 우리나라에 우선권 주장할 시, 출원인이 미공개상태이면, 우선권으로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자국외원거서(PTO/SB-39)를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동행본 안내서를 참조하시기 바랍니다.



5.

### 관인생략 출원번호통지서

출원 일자 2015.02.05  
 특 기 사 항  
 출원 번호 40-2015-0009040 (접수번호 1-1-2015-0124916-92)  
 출원인 명칭 주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명  
 대리인 성명 박진호(9-2004-000334-9)

### 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기과코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다우로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상사이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고항허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

6.

### 관인생략 출원번호통지서

출원 일자 2015.02.05  
 특 기 사 항  
 출원 번호 40-2015-0009041 (접수번호 1-1-2015-0124917-37)  
 출원인 명칭 주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명  
 대리인 성명 박진호(9-2004-000334-9)

### 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기과코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다우로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상사이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고항허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

7.

### 관인생략 출원번호통지서

출원 일자 2015.01.09  
 특 기 사 항  
 출원 번호 40-2015-0001508 (접수번호 1-1-2015-0022397-25)  
 출원인 명칭 주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명  
 대리인 성명 박진호(9-2004-000334-9)

### 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기과코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다우로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상사이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고항허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

8.

### 관인생략 출원번호통지서

출원 일자 2015.01.09  
 특 기 사 항  
 출원 번호 40-2015-0001509 (접수번호 1-1-2015-0022398-71)  
 출원인 명칭 주식회사한국전통의학연구소(1-2008-043654-7) 외 1명  
 대리인 성명 박진호(9-2004-000334-9)

### 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기과코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경 (경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다우로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표 디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국개상사이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적고항허가서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				

다. 기술 실시

거래년도	기술 실시 명	
2015	WSY-3063 및 레드폴리페놀의 제조 배합 기술)	자체 실시

- 기술이전 감면신청서 제출

기술료 감면 신청서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	교부가가치식품개발사업		연구과제번호	111016-03	
	연구과제명	미네랄 함유 약용작물(당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발에 관한 연구				
	연구기관명	㈜한국전통의학연구소	연구책임자	황성연	참여기업명	㈜한국전통의학연구소
	연구협약일	2011.08.19	연구기간	2011년08월 ~2015년01월(3년5개월)		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 (기관지원금)	계	
	450,000,000	400,200,000	600,000,000	1,450,200,000		
성과활용현황	성과활용명	미네랄 당귀, WSY-3063 및 레드폴리페놀의 제조 배합 기술				
	지재권 종류	노하우	실시권 유형	적정 실시		
	* 지적권이 출원(등록)인 경우	명칭			일자	
		번호				
	실시기관	기관명	㈜한국전통의학연구소	기관유형	중소기업	
		주소	서울특별시 강남구 논현로 652, 한일빌딩5층		대표자	최건섭
사업자번호		211-85-56571	전화번호	02-3443-9252		
부사(담당자)		오현아	e-mail	dhgusdk1255@wellcan.co.kr		
기술료 감면	김면 근거	농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제30조 및 관리기준 제3장 3절				
	감면사유 및 내용	실시기업인 (주)한국전통의학연구소는 중소기업에 해당하여, 본 연구과제의 참여기업에 해당하여 해당 기술료를 정부출연금의 80% 감면 요청함				
감면금액 산출내역	실시기업인 (주)한국전통의학연구소는 연구를 기반으로 한 천연물추출물 관련한 연구를 기반으로한 제품을 제조, 판매하는 업체로, 제반 시설 및 공정관리 능력, 필요 연구장비 등을 보유하고 있음. 이러한 인프라를 바탕으로 해당기술을 활용하여 산업화할 능력이 충분하다고 판단함.					
	정부출연금 : 450,000,000원 ( 징수 금액 : 6,300,000원 ) -실시기업 유형에 따른 감면 : 중소기업 80%감면 -일시납부 : 납부금액의 30% 추가감면 -기술수유기반 유형에 따른 징수비율 : 중소기업 10% 징수					
농림축산식품연구개발사업 처리규정 제35조에 따라 위와 같이 기술료 감면신청서를 제출합니다.						
불일 1. 연구개발과제 개요 1부. 2. 연구계획서 또는 연구결과보고서 등 1부.						
㈜한국전통의학연구소 최 건 섭						
2015년 03 월 16 일 농림수산식품기술기획평가원장 귀하						



라. 사업화 현황

사업화명	사업화 내용	사업화 업체 개요				2013년 매출액	2014년 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발	황성연 발효당귀	(주)한국전통의학연구소	최건섭	18	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	43,071,453	74,181	43,145,634
미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발	절당력	(주)한국전통의학연구소	최건섭	18	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	36,584,090	3,763,237	40,347,327
미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발	모가득	(주)한국전통의학연구소	최건섭	18	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화			
미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발	레드 폴리페놀	(주)한국전통의학연구소	최건섭	18	기술이전-기존업체-상품화			

마. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

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

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
-	-	-	-
-	-	-	-

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
한국천연물의약품 연구회 제5회 정기 세미나	나고야 의정서가 천연물의약품 에 미치는 영향	신약개발연구 조합 산하 천연물의약품 연구회	1	4	2
임상연구자를 위한 심화교육 프로그램	중간분석의 적용 및 통계분석 계획	부산대학교 임상시험센터	1	3	1
CTMS 과제관리 manual	CRA	가톨릭중앙의 료원	1	3	3



바. 홍보 실적

홍보유형	매체명	제목	일시
기타	천보샵	발효당귀 홈페이지 판매	2014-05-14
기타	천보샵	절당력 홈페이지 판매	2014-05-14
기타	신세계 인터넷면세점	발효당귀 신세계 인터넷면세점 판매	2014-01-28
기타	롯데 인터넷면세점	발효당귀 ‘롯데인터넷면세점’ 판매	2013-07-10
기타	롯데백화점	모가득 ‘롯데백화점’ 입점 예정	2015-03-23
기타	위커힐면세점	모가득 ‘위커힐면세점’ 입점 예정	2015-03-23
기타	부산신세계인터넷 면세점	모가득 ‘부산신세계인터넷 면세점’ 입점 예정	2015-03-23
인터넷	파워블로거	모가득 ‘파워블로거를 활용한 해당제품 홍보’	2015-03-23
기타	NS 홈쇼핑	모가득 ‘NS 홈쇼핑’ 첫 론칭	2015-03-27
PPL	SBS 모닝와이드	모가득 ‘SBS 모닝와이드’ 제품 노출 (08:05~08:10)	2015-03-27
PPL	mbn 건강의 자격	레드폴리페놀 ‘mbn 건강의 자격’ 제품 노출 (07:30)	2015-04-12
기타	cj 오쇼핑	레드폴리페놀 ‘cj 오쇼핑 첫 론칭	2015-04-12



**한방과 과학의 재발견, 한국전통의학연구소**

국내 한의학의 선두주자 원광대학교 한의학대학원 교수진을 주축으로 한  
선진물 신약 개발 전문기관  
한방의 과학화를 통해 인류의 삶에 질 향상을 선도하는 생명공학 기업입니다.

**한국전통의학연구소**  
Korea Her Medical Science Institute



안고 싶어요! 뿌리고

**“모가득”은 모두에게  
가득가득 드립니다.**

- ▶ **모가득 여성초환 3개월분!**  
최근 이슈화된 여성초 900mg 이상 함유, 자소엽, 녹차잎, 검은콩 분말, 치자, 단삼, 당귀, 다시마, 한련초, 천궁, 감초 등 100% 국내산 원료
- ▶ **모가득 여성초 삼푸 3개월분!**  
여성초, 자소엽, 녹차의 환상적인 배합과 더불어 멘톨과 페퍼민트 오일을 함유하여 향기로운 향은 물론 상쾌한 두발상태를 만드는데 탁월한 여성초 삼푸
- ▶ **모가득 여성초 미스트 3개월분!**  
언제 어디서나 내가 원할때 컴팩트 하고 가볍게 가방에 쏙쏙 잇아이템! 머리 이곳 저곳에 간단히 뿌릴 수 있는 여성초 미스트

**모가득 여성초 토털 케어 솔루션**은 최근 이슈가 되고 있는 여성초를 주원료한 제품으로 자소엽, 녹차잎, 검정콩, 다시마 등의 12가지의 원료를 오직 국산 원료만을 사용하여 제조한 안전한 제품입니다.

**특히,** (주)한국전통의학연구소의 모가득 여성초환에는 한국전통의학연구소가 연구개발한 특허물질인 WSY-3063 이 함유되어 있어 시중에 판매되는 여성초 제품과 차별성을 두었습니다.

사. 기타 성과

거래년도	성과 명	내용
2011	농지임대 및 당귀 위탁재배 계약서 [미네랄 함유 약용작물(참당귀)의 재배]	재배 기술 전수
2011	농지임대 및 당귀 위탁재배 계약서 [미네랄 함유 약용작물(일당귀)의 재배]	재배 기술 전수

농지임대 및 당귀 위탁재배 계약서

임대인과 임차인 쌍방은 2011년 농림부 시행 “미네랄 함유 약용작물(당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발” 과제에서 미네랄 함유 당귀재배 연구개발을 위하여 아래 표시 농지의 임대 및 재배에 관하여 다음 계약내용과 같이 약정하고 계약을 체결한다.

1. 농지의표시

소재지	경북 안동시 도산면 가송리 437-3		
지 목	전	면 적	100㎡ (30평)

2. 계약내용

제1조(임대차기간 및 임차료) ① 임대인과 임차인은 위 표시 농지의 임대차기간, 연간 임차료 및 임차료 지급 약정일에 관하여 아래와 같이 합의한다.

임 대 차 기 간	2011년 9월 20일 ~ 2011년 12월 31일(수확,선별,건조)
임 차 료	총 계약금 : 이백오십사만원 ( 2,540,000원 ) 1항 계약금: 일백삼오만사천원 ( 1,154,000 원 ) 2항 잔여금: 일백삼십팔만육천원 ( 1,386,000 원 )
임차료지급약정일	1항 2011년 10월 10일까지 2항 잔여금 : 당귀 건조물 전량 인도 후, 3일 이내 지급

② 자연재해, 병충해 등으로 피해가 발생할 경우 임대인과 임차인은 합의하에 당해계약 기간 동안 임차료를 변경할 수 있다.

③ 2차 임차료 지급은 당귀 재배량에 따라 2011년 수확 당시 시세조사를 통하여 관련 자료를 첨부하고 임대인과 협의하여 지급액을 산정 및 1항 계약금을 제외한 차액을 지급한다.

제2조(임차료의 지급) 임차인은 1차 임차료 계약금을 약정일까지 임대인에게 지급한다. 2차 임차료는 임대인에게 당귀 수확물을 전량 지급받은 후 3일 이내 지급한다.

농지임대 및 당귀 위탁재배 계약서

임대인과 임차인 쌍방은 2011년 농림부 시행 “미네랄 함유 약용작물(당귀)의 재배 기술 및 건강기능식품 개발” 과제에서 미네랄 함유 당귀재배 연구개발을 위하여 아래 표시 농지의 임대 및 재배에 관하여 다음 계약내용과 같이 약정하고 계약을 체결한다.

1. 농지의표시

소재지	경북 안동시 임동면 대곡리 516		
지 목	전	면 적	100㎡ (30평)

2. 계약내용

제1조(임대차기간 및 임차료) ① 임대인과 임차인은 위 표시 농지의 임대차기간, 연간 임차료 및 임차료 지급 약정일에 관하여 아래와 같이 합의한다.

임 대 차 기 간	2011년 9월 20일 ~ 2011년 12월31일 (수확,선별,건조)
임 차 료	총 계약금 : 이백오십사만원 ( 2,540,000원 ) 1항 계약금: 일백삼오만사천원 ( 1,154,000 원 ) 2항 잔여금: 일백삼십팔만육천원 ( 1,386,000 원 )
임차료지급약정일	1항 2011년 10월 10일까지 2항 잔여금 : 당귀 건조물 전량 인도 후, 3일 이내 지급

② 자연재해, 병충해 등으로 피해가 발생할 경우 임대인과 임차인은 합의하에 당해계약 기간 동안 임차료를 변경할 수 있다.

③ 2차 임차료 지급은 당귀 재배량에 따라 2011년 수확 당시 시세조사를 통하여 관련 자료를 첨부하고 임대인과 협의하여 지급액을 산정 및 1항 계약금을 제외한 차액을 지급한다.

제2조(임차료의 지급) 임차인은 1차 임차료 계약금을 약정일까지 임대인에게 지급한다. 2차 임차료는 임대인에게 당귀 수확물을 전량 지급받은 후 3일 이내 지급한다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 실용화·산업화 계획

#### 1. 연구수행 결과로 이루어진 상품화된 발효당귀 제품

##### 가. 당귀함유 제품 및 출시

- 본 연구를 통하여 개발된 발효당귀 제품은 (주)남해보물섬영농조합법인에서 제조하여 2013년도 7월부터 판매하기 시작한 상태임. 천보샵, 신세계 인터넷면세점, 롯데 인터넷면세점에 출품되어 판매되고 있으며 2013년도 기준 연 약 4천 3백만원 정도의 매출실적을 이루었음. 현재는 인터넷쇼핑몰을 통한 주문택배 형식으로도 판매되고 있으며, 180g 한병 기준으로 48,000원에 판매되고 있는 상태임. 이와 함께 당귀를 함유한 제품으로 ‘절당력’의 상품명으로 천보샵에서 판매하고 있음. 180g 기준으로 98,000원에 판매되고 있으며, 2013년도 기준 연 3천 8백만원 정도의 매출실적을 이루고 있음.
- 당귀복합물 (WSY-3063)을 함유한 ‘모가득’ 제품의 경우 NS mall, NS 홈쇼핑 카달로그에서 판매 중이며, 2015년 3월 31일 첫 론칭방송을 통해 2,114세트 주문으로 시간외 매진을 달성하였으며, 2015년 4월 9일 앵콜방송에서 1,248세트로 시간내 매진을 기록하여, 2015년 4월 18일, 22일 4차 방송이 확정되었음.
- 당귀복합물 (WSY-3063)을 함유한 ‘레드폴리페놀’ CJ 오쇼핑 2015년 4월 19일 론칭방송 확정으로, 많은 매출이 예상됨.

##### 나. 세부 생산 및 판매 계획

- 2016년 2월 까지 개별인정형 원료로서 승인
- 2016년 6월부터 WSY-3063을 건강기능 식품으로서 생산
- 홈쇼핑 런칭을 통해 월 6억~9억 정도의 연매출액을 계획하고 있으며, 지속적인 유통채널 확보를 통해 매출 증대가 기대됨.
- 부원료가 아닌 주원료로 당귀복합물 (WSY-3063) 건강기능식품으로 론칭시 ‘미네랄 당귀’를 강조하여 판매 성과를 올릴 것이며, 그를 위해 미네랄이 당귀가 부가적으로 가져올 수 있는 효능에 대해 연구할 예정임.
- 2016년도 중반부터 미네랄 당귀의 여러 효능들의 기초 data (납성불임, 간기능, 면역증강 등)를 활용하여 여러 기능의 개별인정형을 획득하기 위한 기반연구를 시작할 예정이며, 제품의 다양화를 추진할 계획임.
- 미네랄 당귀의 단가를 낮추기 위해 안동농업기술센터 및 평창 한약재 유통사업과 함께 국내에서 미네랄 당귀를 키울 수 있는 조건의 농가를 확인하여, 센터와 농가에게 앞서 발생한 매출이익과 기반연구 및 개별인정형 원료로서 승인 등의 여러 가지 가치의 교육으로 미네랄 당귀의 우수성을 전파하고, 재배방법의 기술이전을 통해 미네랄 당귀 생산 농가를 확보할 것이며, 우수한약재 유통지원센터 위탁운영권을 수주하여 생산된 미네랄 당귀를 일괄 구입하여 단가를 낮춘다면, 우수한 국내산 미네랄 당귀의 생산으로 국내 농가의 브랜드화 뿐만 아니라 이익 창출에도 기여할 것으로 예상됨.

번호	제품명	제품사진	제품출시일	상표출원서
1	황성연 발효당귀		2013.02.19	
2	절당력		2013.02.19	
3	레드폴리페놀		출시예정	40-2015-0001508 40-2015-0001509
4	모가득		2015.03.31	40-2015-0009040 40-2015-0009041

나. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

※ 특허

생약 추출물을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 지방간의 예방 또는 치료용 조성물 및 생약 추출물을 포함하는 혈전 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관하여 2014년에 한국전통의학연구원 지정 변리사 사무소를 통한 특허출원을 신청하였으며 추후 2건 등록 예정임.



번호	출원/등록명	출원/등록자명	구분	출원/등록일
1	참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품	안동대학교산학협력단, 한국전통의학연구소, 황성연	특허출원	2012-07-31
2	일당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	안동대학교산학협력단, 한국전통의학연구소, 황성연	특허출원	2012-07-31
3	생약 추출물을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 지방간의 예방 또는 치료용 조성물	(주)한국전통의학연구소	특허출원	2014-04-15
4	생약 추출물을 포함하는 혈전 질환의 예방 또는 치료용 조성물	(주)한국전통의학연구소	특허출원	2014-04-15
5	참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	(주)한국전통의학연구소	특허등록	2014-05-29
6	일당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	(주)한국전통의학연구소	특허등록	2014-05-29

※ 논문

1. Effect of WSY-3063 on oxidant in vitro.
  2. Alleviation of thrombosis with WSY-3063.
  3. Beneficial effects of WSY-3063 on a model of hyperlipidemia.
  4. Inhibitory effects of WSY-3063 on thrombosis animal model.
  5. Effect of WSY-3063 on blood circulation in healthy volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.
- 5편의 논문을 작성 중이며, 최종 확정되는 저널지에 따라 논문명이 변경 될 수 있음.
- 5번째 논문은 인체적용시험 관련 논문이며, CRIS에서 번호를 부여 받은 후 저널지에 제출 가능함. 현재 번호를 부여 받는 중임.

검색할 단어 또는 문장을 입력하세요. 기본검색 | 상세검색

**통합검색**  Q 검색

BROWSE | 임상실태 | 최근등록

**공지사항** ▶ 더보기

- CRIS 등록현황 (Registration ...)
- 시스템 점검에 따른 서비스 일시중지 안내 (...)
- 연구내 돌 확인방식 개선 안내
- 시스템 점검에 따른 서비스 일시중지 안내
- CRIS 등록현황 (Registration ...)

**CRIS 문의**

T 043-249-3027  
cris.cdc@nhri.nhri.net

**International Clinical Trials Registry Platform Search Portal**  
바로가기 ▶

**임상연구 온라인 교육과정**  
바로가기 ▶

**최근 1개월 이내에 신규 등록된 임상연구** ▶ 더보기

- 폐시 내블라이저의 폐내 약물전달 성능과 호흡역학 호전 ... [ 2015-02-23 / KCT0001389]
- 기능성 소화불량증에 대한 침 치료 효과 연구 [ 2015-02-23 / KCT0001388]
- 기간 내 류브의 삽관 성공 판정을 위한 기관 내 삽관 ... [ 2015-02-23 / KCT0001387]
- 건강보험 성인 남성에서 DW1029M01 메트포르민(Met... [ 2015-02-23 / KCT0001386]
- 기억성 경도인지장애에서 12주 인지훈련 전후의 인지기능... [ 2015-02-23 / KCT0001385]

CRIS에는 2015년 2월 24일 현재 1978건의 임상연구정보가 등록되어 있습니다.

**CRIS 통계**

연구종류  
Study Type

중재종류  
Intervention Type

모집현황  
Recruitment Status

질환분류  
Disease Category

시험단계  
Phase

연구책임기관  
Sponsor

**Quick Link**

- FAQ
- 자주하시는일문
- Q&A
- 등록절차
- 입력목적설명집

등록 완료 심사 후 번호 부여 받을 예정.

다. 경제사회 파급효과

- CRA 전문인력 양성 하였음.

고용창출 성과 (단위 : 명)		
창업	사업체 확장	합계
	3명	3명

- 국내 농가에 대한 고급화된 미네랄 당귀 재배방법, 필요성 및 우수성에 대한 교육으로 국내 약재재배 농가의 경제적인 파급효과가 기대됨.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절 개별인정형 신청을 위한 자료 모음

1. 안전성 자료

### 7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

○ 당귀

검색데이터베이스	검색어	결과	안전성여부	첨부번호
Agency for Healthcare Research and Quality	decursin, Angelica gigas	0	—	
American Herbal Pharmacopoeia	decursin, Angelica gigas	0	—	
American Herbal Products Association(AHPA)'s Botanical Safety Handbook	decursin, Angelica gigas	0	—	
Australian Naturopath Network Monographs	decursin, Angelica gigas	0	—	
EBMR(Evidence-Based Medicine Reviews)	decursin, Angelica gigas	0	—	
EFSA(European Food Safety Authority)	decursin, Angelica gigas	0	—	
European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCOP) Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs	decursin, Angelica gigas	0	—	
Expanded German Commission	decursin, Angelica gigas	9	—	
FDA poisonous plant DB	decursin, Angelica gigas	3	—	
GRAS(Generally recognized as safe)	decursin, Angelica gigas	0	—	
Health Canada	decursin, Angelica gigas	21	—	
IOM Dietary Reference Intakes(Institute of Medicine)	decursin, Angelica gigas	0	—	
NAPRALERT	decursin, Angelica gigas	0	—	
Natural Medicine Comprehensive Database	decursin, Angelica gigas	0	—	
Naturalstandard.com	decursin, Angelica gigas	0	—	
NDSL	Angelica gigas and decursin, Angelica gigas and side effect, decursin and toxic, decursin and safety, 당귀 and 부작용	166	4	

PDR for Nutritional Supplements/Herbal Medicines	decursin, Angelica gigas	0	—	
Practical Guide to Natural Medicines	decursin, Angelica gigas	0	—	
PubMed	"Angelica gigas" AND decursin, decursin AND toxic, decursin AND safety	66	—	
RISS	당귀 and decursin, decursin and toxic, 당귀 and 부작용	189	—	
TGA(Therapeutic Goods Administration)	decursin, Angelica gigas	0	—	
Toxcenter	decursin, Angelica gigas	0	—	
Toxline	Angelica gigas, decursin, decursin and toxic, decursin and side effect	101	—	
Translation of the German Commission	decursin, Angelica gigas	0	—	
US FDA poisonous plant database	decursin, Angelica gigas	0	—	
WHO monographs on selected medicinal plants	decursin, Angelica gigas	0	—	
한국학술문헌정보센터(KISS)	Angelica gigas, Angelica gigas and decursin, decursin, decursin and toxic	253	—	

○단삼

검색데이터베이스	검색어	결과	안전성여부	첨부번호
Agency for Healthcare Research and Quality	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
American Herbal Pharmacopoeia	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
American Herbal Products Association(AHPA)'s Botanical Safety Handbook	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
Australian Naturopath Network Monographs	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
EBMR(Evidence-Based Medicine Reviews)	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
EFSA(European Food Safety Authority)	danshen, Salvia miltiorrhiza	5	—	
European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCOP) Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
Expanded German Commission	danshen (38) / Salvia miltiorrhiza (95)	133	—	
FDA poisonous plant DB	danshen (8) / Salvia miltiorrhiza (5)	13	—	
GRAS(Generally recognized as safe)	-		—	
Health Canada	danshen (87) / Salvia miltiorrhiza (204)	291	—	
IOM Dietary Reference Intakes(Institute of Medicine)	danshen / Salvia miltiorrhiza	0	—	
NAPRALERT	danshen / Salvia miltiorrhiza	0	—	
Natural Medicine Comprehensive	danshen / Salvia miltiorrhiza	1	1	

Database				
Naturalstandard.com	-	0	—	
NDSL	danshen AND side effect," Salvia miltiorrhiza" AND side effect, "Salvia miltiorrhiza" AND toxic, 단삼 AND 부작용, 단삼 AND 안전성	92	1	
PDR for Nutritional Supplements/Herbal Medicines	danshen / Salvia miltiorrhiza	26	—	
Practical Guide to Natural Medicines	danshen / Salvia miltiorrhiza	0	—	
PubMed	(Salvia miltiorrhiza OR danshen) AND toxic, (Salvia miltiorrhiza OR danshen AND safety	53	—	
RISS	단삼 OR danshen OR " Salvia miltiorrhiza" AND 독성/단삼 OR danshen OR " Salvia miltiorrhiza" AND 안전성	96	3	
TGA(Therapeutic Goods Administration)	danshen, Salvia miltiorrhiza	11	—	
Toxcenter	danshen / Salvia miltiorrhiza	0	—	
Toxline	danshen, Salvia miltiorrhiza	530	2	
Translation of the German Commission	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
US FDA poisonous plant database	danshen, Salvia miltiorrhiza	14	—	
WHO monographs on selected medicinal plants	danshen, Salvia miltiorrhiza	0	—	
한국학술문헌정보센터(KISS)	danshen, Salvia miltiorrhiza, 단삼	227	—	

○치자

검색데이터베이스	검색어	결과	안전성여부	첨부번호
Agency for Healthcare Research and Quality	geniposide ,gardenia	0	—	
American Herbal Pharmacopoeia	geniposide ,gardenia	0	—	
American Herbal Products Association(AHPA)'s Botanical Safety Handbook	geniposide, Gardenia jasminoides,Gardenia fruit	24	—	
Australian Naturopath Network Monographs	geniposide ,gardenia	0	—	
EBMR(Evidence-Based Medicine Reviews)	Gardenia jasminoides	416	—	
EFSA(European Food Safety Authority)	geniposide ,gardenia	1	—	
European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCOP) Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs	geniposide ,gardenia	0	—	
Expanded German Commission	geniposide ,gardenia	15	—	
FDA poisonous plant DB	geniposide ,gardenia	5	—	



GRAS(Generally recognized as safe)	geniposide ,gardenia	0	—	
Health Canada	geniposide ,gardenia	17	—	
IOM Dietary Reference Intakes(Institute of Medicine)	geniposide ,gardenia	2	—	
NAPRALERT	geniposide ,gardenia	0	—	
Natural Medicine Comprehensive Database	geniposide ,gardenia	0	—	
Naturalstandard.com	geniposide ,gardenia	0	—	
NDSL	geniposide AND (toxic OR geniposide safety),치자 AND (부작용 OR 독성)	83	2	
PDR for Nutritional Supplements/Herbal Medicines	geniposide ,gardenia	0	—	
Practical Guide to Natural Medicines	geniposide ,gardenia	0	—	
PubMed	geniposide AND (toxic OR safety), Gardenia fruit (156)	167	1	
RISS	geniposide ,gardenia 치자 AND (부작용 OR 독성)	209	—	
TGA(Therapeutic Goods Administration)	geniposide ,gardenia	0	—	
Toxcenter	geniposide ,gardenia	0	—	
Toxline	geniposide (123) / geniposide toxic (11) / geniposide safety (2) / Gardenia jasminoides for. Grandiflora (2) / Gardenia fruit (52)		1	
Translation of the German Commission	geniposide ,gardenia	15	—	
US FDA poisonous plant database	geniposide ,gardenia	25	—	
WHO monographs on selected medicinal plants	geniposide ,gardenia	0	—	
한국학술문헌정보센터(KISS)	geniposide ,gardenia, 치자 AND 독성	39	—	



## 제 7장 참고문헌

1. Stefan Offermanns. Activation of Platelet Function through G Protein-Coupled Receptors. *Circulation Research*. 2006.
2. Dominick J. Angiolillo, MD, PhD; Masafumi Ueno, MD; Shinya Goto, MD, PhD. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society* 2010;74:597-607.
3. 손호용, 황성연. 참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품 (10-2012-0083903)
4. 양선아, 임남경, 이인선. 단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과 *Korean J. food sci. Techol.* Vol.39, No.1, pp.83~87(2007).
5. Zengyong Qiao , Jiangwei Ma , Huajin Liu, Sanjun Xiong1, Shuansuo Yang , Guanghao Ge, Yawei Xu. Effect of bioactivity of salvianolic acid B in rats. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.11(1):64-67.2013.
6. 윤혜숙. 한약재 생리활성 성분의 혈소판 응집, 혈액응고 억제능 및 혈관수축 억제능 검색. 한약재 평가기술 과학화 연구 세미나 초록집
7. Kim HB , Kim SL. 2003. Identification of C3G (cyanidin-3 glucoside) from mulberry fruits and quantification with different varieties. *Korean J. Breed* 45:1-5.
8. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1467-1475.
9. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. 2003. The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Sci Industry* 36: 49-60.
10. Kim MH, Ko KC, Lim SH, Yu YS. 1980. Study on the usability of mulberry fruit. Fruit characteristics of mulberry. *Coll of Agric Bull SNU* 5: 221-223.
11. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107.

12. Lee SH, Kim GH. 2008. Inhibitory Effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine artery endothelial cells. *J. Life Sci* 18:653-659.
13. Lutgens, E. et al. 2003. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 2123-2130.
14. Kim HY, Park JY. 2000. Oxidative stress and atherosclerosis. *J. Korean Soc. Endocrinol* 15: 1-14.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업 (미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배기술 및 건강기능식품 개발)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업 (미네랄 함유 약용작물 (당귀)의 재배기술 및 건강기능식품 개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.