

121041-
2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
유용농생명자원사업화기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004375-01

농생명 자원을 활용한 뇌건강 개별 인정형
건강기능식품소재 개발

농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발

2023.05.10

2023

주관연구기관 / 광동제약(주)
협동연구기관 / 국립호남권생물자원관
/ (주)바이나리

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

최종보고서										보안등급		
										일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			유용농생명자원사업화기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		내역사업명			유용농생명자원사업화기술개발사업		
공고번호		제 농축 2021-24호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호			121041-2		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801	40%	2순위 LA0906	30%	3순위 LA0305	30%					
	농림식품과학기술 분류	1순위 PA0201	40%	2순위 CA0105	30%	3순위 PA0204	30%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발									
		영문	Development of Individual Case-Authorized health functional food materials of brain health using agricultural life resource									
연구개발과제명		국문	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발									
		영문	Development of Individual Case-Authorized health functional food materials of brain health using agricultural life resource									
주관연구개발기관		기관명	광동제약			사업자등록번호		113-81-08888				
		주소	서울특별시 서초구 서초중앙로 85			법인등록번호		110111-0152134				
연구책임자		성명	이기원			직위		책임연구원				
		연락처	직장전화			휴대전화		국가연구자번호				
			전자우편									
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)									
		1단계	1차년			2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월)						
			2차년			2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년)						
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		525,000	30,000	196,000					555,000	196,000	751,000	
1단계	1년차	225,000	13,000	84,000					238,000	84,000	322,000	
	2년차	300,000	17,000	112,000					317,000	112,000	429,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고	
											역할	
											기관유형	
공동연구개발기관		국립호남권 생물자원관	정진우		부장						공동	
		바이나리	금상일		연구소장						공동	
연구개발담당자 실무담당자		성명	유지수			직위		선임연구원				
		연락처	직장전화			휴대전화		국가연구자번호				
			전자우편									

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 2월 6일

연구책임자: 이 기 원

주관연구개발기관의 장: 최 성 원

공동연구개발기관의 장: 류 태 철

공동연구개발기관의 장: 박 영 일

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



제출문

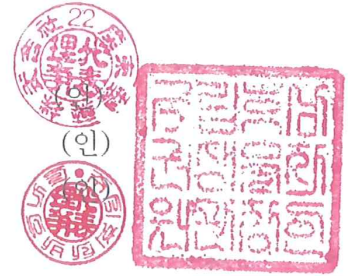
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발”
(개발기간 : 2021.04. ~ 2022.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023.05.10

주관연구기관명 : 광동제약(주) 최 성 원
협동연구기관명 : 국립호남권생물자원관 류 태 철
협동연구기관명 : (주)바이나리 박 영 일



주관연구책임자 : 이 기 원
협동연구책임자 : 정 진 우
협동연구책임자 : 금 상 일

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

사업명		유용농생명자원사업화기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)		유용농생명자원사업화기술개발사업				연구개발과제번호		121041-2
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801	40%	2순위 LA0906	30%	3순위 LA0305	30%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0201	40%	2순위 CA0105	30%	3순위 PA0204	30%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발						
연구개발과제명		농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)						
총 연구개발비		총 751,000 천원 (정부지원연구개발비: 525,000 천원, 기관부담연구개발비 : 226,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표(○)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농생명 자원을 활용한 뇌관련 질환의 예방효과가 기대되는 개별인정형 건강기능식품 개발 - 유용 농생명 자원의 가치부각과 우수성 홍보를 위한 과학적 입증자료 구축 및 산업화 ○ 건강기능식품 개별인정형 허가를 위한 기능성·유효성평가 진행(인지기능 및 기억력 개선) 및 과학적 근거자료 확보 - 유용 농생명자원의 건강기능식품 개별인정을 위한 원료 및 제조공정 표준화 - 유용 농생명자원의 기준규격설정 - 최신 기술을 활용한 인지기능 및 기억력 개선 기능성 및 기전 규명 - 유용 농생명 자원의 안전성 검증 - 과제 종료 후 건강기능식품 개별인정을 위한 인체적용시험 준비 						
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구개발 사업은 국립낙동강생물자원관에서 기술이전 받은 기억력 및 인지기능 개선에 대한 우수한 기술력을 바탕으로 유용 농생명자원 기반 뇌질환 개선에 탁월한 효능을 가지는 융·복합소재 발굴과 기술사업화를 위한 원천기술고도화 연구를 통하여 예방/개선 차원의 건강기능식품 개발 과정의 과학적 근거자료를 마련 ○ 후보소재의 산업적 안전성과 약리효능 및 기능성을 확보하기 위하여 세계적으로 인정받은 생체조직 투명화 기술을 활용한 3차원 바이오이미지 database를 기반으로 인지 및 기억력 개선 효능 평가 시스템을 구축하여 후보물질의 약리효능을 보다 실증적으로 규명하고자 함 ○ 건기식 개발을 위한 원료 표준화 및 공정표준화 확립 - 소재의 최적추출법 확립, 대량생산시스템 확립, 지표성분의 분석 밸리데이션, 소재의 성분 profiling 및 선도물질 발굴 등의 연구 및 개별인정형 허가를 위한 인체적용시험 계획 수립 및 사업화 계획을 수립 및 수행 ○ 전임상시험을 통한 안전성 및 기능성·유효성 평가 확립 						

		<ul style="list-style-type: none"> - 전통의학에 근거한 농생명 소재의 기억력 및 인지기능 효능 검증 후 후보소재 선정, 단일 및 복합물의 기억력 및 인지기능 세포 효능 및 기전 연구 수행 - 최신 기술인 뇌건강 3D 기술을 활용하여, 기억력 및 인지기능의 동물 효능 및 기전 연구 수행
1단계 (해당 시 작성)	목표	
	내용	
n단계 (해당 시 작성)	목표	
	내용	

연구개발성과	1. 정성적 연구개발 성과																																																																																																																																																																							
	○ 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 개별인정형 소재 개발을 위한 최종 소재 선정 및 비임상 시험 완료																																																																																																																																																																							
	① 전통 지식 기반 농생명자원을 활용한 후보소재 12종 중 7종 발굴																																																																																																																																																																							
	<table border="1"> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>[초석잠]</td> <td>[석창포]</td> <td>[삼삼자]</td> <td>[익모초]</td> <td>[자근]</td> <td>[금은화]</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>[사삼]</td> <td>[연자육]</td> <td>[당귀]</td> <td>[원지]</td> <td>[복령]</td> <td>[하수모]</td> </tr> </table>							[초석잠]	[석창포]	[삼삼자]	[익모초]	[자근]	[금은화]							[사삼]	[연자육]	[당귀]	[원지]	[복령]	[하수모]																																																																																																																																															
																																																																																																																																																																								
	[초석잠]	[석창포]	[삼삼자]	[익모초]	[자근]	[금은화]																																																																																																																																																																		
																																																																																																																																																																								
	[사삼]	[연자육]	[당귀]	[원지]	[복령]	[하수모]																																																																																																																																																																		
	② 여러 가지 소재의 물, 주정10%, 20%, 30%, 70% 추출물의 세포 효능 스크리닝을 통하여 4가지 소재(초석잠, 석창포, 금은화, 익모초)를 선정																																																																																																																																																																							
	<table border="1"> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">[초석잠 열수추출물]</td> <td colspan="2">[석창포 열수추출물]</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">[금은화 열수추출물]</td> <td colspan="2">[익모초 20% 주정추출물]</td> </tr> </table>					[초석잠 열수추출물]		[석창포 열수추출물]						[금은화 열수추출물]		[익모초 20% 주정추출물]																																																																																																																																																								
																																																																																																																																																																								
[초석잠 열수추출물]		[석창포 열수추출물]																																																																																																																																																																						
																																																																																																																																																																								
[금은화 열수추출물]		[익모초 20% 주정추출물]																																																																																																																																																																						
③ 4가지 소재의 단독, 복합 효능 스크리닝(세포 및 ex vivo)을 통하여 최종 초석잠 추출물 동물시험 수행																																																																																																																																																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th>번호</th> <th>석창포</th> <th>초석잠</th> <th>금은화</th> <th>익모초</th> <th>효능</th> <th>번호</th> <th>석창포</th> <th>초석잠</th> <th>금은화</th> <th>익모초</th> <th>효능</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td></td><td>★</td><td>14</td><td></td><td>2</td><td></td><td>1</td><td>-</td></tr> <tr><td>2</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td></td><td>★</td><td>15</td><td></td><td></td><td>2</td><td>1</td><td>-</td></tr> <tr><td>3</td><td>1</td><td></td><td></td><td>1</td><td>-</td><td>16</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td></td><td>-</td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>★</td><td>17</td><td></td><td>1</td><td></td><td>2</td><td>-</td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>★</td><td>18</td><td></td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>-</td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>★</td><td>19</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>★★</td></tr> <tr><td>7</td><td>1</td><td>2</td><td></td><td></td><td>★</td><td>20</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>★★</td></tr> <tr><td>8</td><td>1</td><td></td><td>2</td><td></td><td>★★★</td><td>21</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>★★★</td></tr> <tr><td>9</td><td>1</td><td></td><td></td><td>2</td><td>★</td><td>22</td><td>1</td><td>1</td><td></td><td>1</td><td>★★</td></tr> <tr><td>10</td><td>2</td><td>1</td><td></td><td></td><td>-</td><td>단일1</td><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>★★</td></tr> <tr><td>11</td><td>2</td><td></td><td>1</td><td></td><td>★</td><td>단일2</td><td></td><td>1</td><td></td><td></td><td>★★★</td></tr> <tr><td>12</td><td>2</td><td></td><td></td><td>1</td><td>-</td><td>단일3</td><td></td><td></td><td>1</td><td></td><td>★★</td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td>2</td><td>1</td><td></td><td>-</td><td>단일4</td><td></td><td></td><td></td><td>1</td><td>★★</td></tr> </tbody> </table>	번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능	번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능	1	1	1			★	14		2		1	-	2	1		1		★	15			2	1	-	3	1			1	-	16		1	2		-	4		1	1		★	17		1		2	-	5		1		1	★	18			1	2	-	6			1	1	★	19	1	1	1		★★	7	1	2			★	20		1	1	1	★★	8	1		2		★★★	21	1		1	1	★★★	9	1			2	★	22	1	1		1	★★	10	2	1			-	단일1	1				★★	11	2		1		★	단일2		1			★★★	12	2			1	-	단일3			1		★★	13		2	1		-	단일4				1	★★
번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능	번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능																																																																																																																																																													
1	1	1			★	14		2		1	-																																																																																																																																																													
2	1		1		★	15			2	1	-																																																																																																																																																													
3	1			1	-	16		1	2		-																																																																																																																																																													
4		1	1		★	17		1		2	-																																																																																																																																																													
5		1		1	★	18			1	2	-																																																																																																																																																													
6			1	1	★	19	1	1	1		★★																																																																																																																																																													
7	1	2			★	20		1	1	1	★★																																																																																																																																																													
8	1		2		★★★	21	1		1	1	★★★																																																																																																																																																													
9	1			2	★	22	1	1		1	★★																																																																																																																																																													
10	2	1			-	단일1	1				★★																																																																																																																																																													
11	2		1		★	단일2		1			★★★																																																																																																																																																													
12	2			1	-	단일3			1		★★																																																																																																																																																													
13		2	1		-	단일4				1	★★																																																																																																																																																													
④ 동물실험 결과 초석잠 단독 추출물 유의적 결과 확보																																																																																																																																																																								

구분	동물행동 실험		베타-아밀로이드		신경염증 마커		신경전달물질		산화스트레스	
	수중미로	Y미로	Cortex (뇌피질)	Hippocampus (해마)	TNF-α	IL-6	Acetylcholinesterase	Choline acetyltransferase	글루타치온 (cortex)	글루타치온 (해마)
음성대조										
양성대조 (도네페질)	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.01	P<0.001	P<0.001	P<0.01		P<0.001	
초식잠 100mg						P<0.001			P<0.05	P<0.05
초식잠 200mg	개선경향	개선경향	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.001	P<0.05		P<0.05	P<0.001
초식잠 400mg	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.001		P<0.05	P<0.01	P<0.01

⑤ 자사 비용으로 인체적용시험 준비 진행 중 (2023년 진행 예정)

- 인체적용시험 CRO 선정 완료 (네오뉴트라), 실시기관 선정 진행 중
- 인체적용시험을 위한 예산 '23년 예산 확보 (총금액 약 4억 중 '23년 1.8억 집행 예정)

예산부서	예산부서명	예산과목	예산과목명	세부항목코드	세부항목명	당년예산
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C1905		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2395		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2316		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2382		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2622		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2623		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2584	석창포/초식잠(인지)	180,000,000



2. 정량적 목표 대비 성과

- 특허출원 : 4건 출원 목표 대비 7건 출원
- 특허등록 : 1건 등록 목표 대비 3건 등록
- 기술이전, 기술료 : 1건 목표 대비 2건 이전, 50백만원 목표 대비 25백만원
- 고용창출 : 6명 목표 대비 8명 고용(광동4명, 국립낙동강생물자원관2명, 바이나리2명)
- 논문 : 6건 목표 대비 6건 논문발표 (SCI 2건-IF 7.67,4.99, 비SCI 4건)
- 학술발표 : 2건 목표 대비 8건 학술발표 ; 수상 5건(우수발표상)
- 정책활용 : 2건 목표 대비 7건 (국무조정실 신산업규제혁신위원회 건기식분야 규제개선 의견 제안 등)
- 홍보전시 : 언론보도 5건, 부스전시 2건, 결과물 전시 1건

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과

- 개별인정 허가를 위한 인체적용시험 자료로 활용
 - 건강기능식품 개별인정 허가를 위해서는 인체적용시험이 필수적이며, 인체적용시험 자료로 본 연구의 자료를 활용 가능함
- 1차산업 고부가가치 창출 및 고용증대 효과
 - 국내 농가와 계약 재배 시스템을 도입하여 안정적으로 우수한 원료를 공급받고, 서로 상생하여 농가의 소득 증대에 이바지 할 수 있을 것으로 기대되며, 지역 내 우수한 연구인력, 생산인력 등을 지속적으로 총원한다면, 지역의 경제도 활성화시킬 수 있을 것으로 기대됨
 - 지속적인 농생명 소재의 기능성 소재로의 개발은 1차산업의 고부가가치 창출 및 산업 발전에 기여 할 수 있음
- 건강기능식품 산업 발전 효과
 - 국내산 농생명 소재를 이용하여 뇌건강 기능성 식품소재 개발함으로써 국내·외 치매예방 및 기억력개선 효능이 우수한 건강기능식품을 판매할 수 있음. 국내의

	우수한 농산물 유래 기능성소재를 개발하여 국내 뿐 아니라 미국 FDA로부터 NDIN (New Dietary Ingredient Notification) 승인받는다면 안전하고 기능이 입증된 우수한 원료로서 국제적으로 우수한 dietary supplement로 개발이 가능할 수 있을 것으로 기대됨 - 국내 식품산업의 보호와 고부가가치산업인 건강기능식품의 국제경쟁력 확보											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	6	7						생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	농생명자원		건강기능식품		기억력 향상		인지기능		개별인정			
영문핵심어 (5개 이내)	Agricultural life resources		Health functional food		Improve memory		Cognitive function		Individual Case-Authorized			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	8
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	89
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도	99
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	99
6. 별첨자료(자체평가의견서 등)	103

1. 연구개발과제의 개요

■ 최종목표

- 농생명 자원을 활용한 뇌관련 질환의 예방효과가 기대되는 개별인정형 건강기능식품소재의 개발 및 사업화
- 건강기능식품 개별인정형 허가를 위한 비임상시험(세포,동물시험)
- 과제 종료 후 개별인정형 허가를 위한 인체적용시험 추진(자체비용)

구분	내 용
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농생명 자원을 활용한 뇌관련 질환의 예방효과가 기대되는 개별인정형 건강기능식품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유용 농생명 자원의 가치부각과 우수성 홍보를 위한 과학적 입증자료 구축 및 산업화 - 건강기능식품 개별인정형 허가를 위한 연구 진행(인지기능 및 기억력 개선) 및 자료 확보
세부 목표	<ol style="list-style-type: none"> 1) 유용 농생명자원의 건강기능식품 개별인정을 위한 원료 및 제조공정 표준화 2) 유용 농생명자원의 기준규격설정 3) 최신 기술을 활용한 인지기능 및 기억력 개선 기능성 및 기전 규명 4) 유용 농생명 자원의 안전성 검증 5) 과제 종료 후 건강기능식품 개별인정을 위한 인체적용시험 준비
목표 달성 모식도	<p>목표 뇌건강 건강기능식품 사업화 및 농가소득 창출</p> <p>방법 뇌건강 건강기능식품 개별인정 소재 개발 및 식약처 허가</p> <p>연구단계 2021~2022 (2년)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 뇌건강 소재의 발굴 및 효능 연구 • 제조공정 표준화 (대량생산조건 확립) <p>발전단계 2023~2024 (2개년)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 뇌건강 소재의 인체적용시험 연구 확대 • 뇌건강 건강기능식품 개별인정 허가 획득 <p>사업화 단계 2025~2026 (2개년)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 뇌건강 건강기능식품 제품화, 매출 발생 • 사업화 위한 고용창출 • 원료 농가 계약재배

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 기관별 연구개발과제의 내용

담당기관	목표	주요 연구개발내용
광동제약	원료표준화	<ul style="list-style-type: none"> 소재의 유사종, 원산지 등 지표성분함량 분석
	제조공정표준화	<ul style="list-style-type: none"> 추출방법, 용매, 온도, 시간 등에 따른 추출 lab scale 최적공정 확립 최적 공정의 scale-up : pilot scale 공정 확립
	기준규격설정	<ul style="list-style-type: none"> 선정 소재의 지표성분 분석법 확립 및 분석 분석법 validation 농약, 중금속 등 유해물질 분석 및 규격 설정
국립 호남권 생물자원관	뇌질환 효능검증을 위한 <i>in vitro</i> 모델계 정립	<ul style="list-style-type: none"> 기억력 및 인지기능 개선 효능검증을 위한 표준화된 <i>in vitro</i> 모델계 정립 및 표준시험법(SOP) 확립
	농생명자원 기반 기초효능 검증을 통한 최적 기능성소재 도출	<ul style="list-style-type: none"> 기초효능 검증(항산화 등)을 통한 농생명자원 기능성 소재 선별 복합추출물에 따른 기억력 및 인지기능 개선 효능검증 및 최적 후보소재 도출
	뇌질환 모델에서의 복합추출물 기능성 약리효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> (뇌신경염증) 신경염증 억제 효능평가 및 기전연구 (뇌혈관장벽) 뇌혈관 강화 효능평가 및 기전연구 (기억력/인지) β-amyloid 침착억제 효능평가 및 기전연구 (시냅스가소성) 신경전달물질 활성화 효능검증 및 기전연구
	Primary culture된 뇌질환세포 모델에서 인지 및 기억력 개선 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> 복합추출물에 의한 뇌신경염증 억제 효능평가 뇌혈관 강화 및 기억력/인지기능 개선 효능평가 시냅스가소성 조절 및 항상성 효능평가 기억력 및 인지기능 개선 관련 분자적 기전 규명
	개별인정형 건강기능식품개발을 위한 심화연구	<ul style="list-style-type: none"> 논문/특허를 기반으로 건기식 개발을 위한 추가 근거자료 확보 및 심화연구 지원
바이나리	천연후보소재의 β -amyloid 형성 및 축적 억제 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 치매 마우스 모델을 활용한 천연후보소재의 β-amyloid 침착 억제 효능 평가 - Thioflavin staining 및 3D imaging 분석 - 뇌조직에서의 Tau protein immunostaining
	천연후보소재의 뇌인지 능력 효능 평가를 위한 cytokine 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 뇌조직에서의 천연후보소재의 cytokine 발현 조절 효능 평가 - TNF-α, IL-1, PEG₂ immunostaining 및 3D imaging 분석
	천연후보소재의 신경전달 및 시냅스 가소성 조절 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 뇌조직에서의 천연후보소재의 신경전달물질 및 시냅스 가소성 조절 효능 평가 - 아세틸콜린 활성화 평가 - ChAT, mGluR, CaMK, CREB immunostaining 및 3D imaging 분석
	천연후보소재의 뇌혈관장벽(BBB) 강화 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 천연후보소재의 마우스 뇌혈관 강화 효능 평가 - Lectin으로 염색된 마우스 뇌혈관의 3차원 이미징 도출 - 도출된 결과를 활용한 뇌혈관의 길이 직경 비교 및 정량적 분석
	동물행동시험분석	<ul style="list-style-type: none"> 동물행동시험을 통한 뇌인지 효능 평가 연구 - 모리스수중미로, 수동회피, 팔방미로, 반스미로 시험 등
광동제약	인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 개별인정용 인체적용시험 수행 - Protocol 개발, CRO, 실시기관 선정, IRB 승인 후 인체적용시험 수행(사업비 4억예산:자체비용 투자하여 진행)
	건강기능식품 개별인정 허가	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 유의미한 결과 획득 시 건강기능식품 개별인정 신청 및 허가 안정성 실험 수행 제품화 계획 수립(제형, 디자인, 마케팅, 유통채널 확정)
	제품화/판매 및 제품 extension	<ul style="list-style-type: none"> 홈쇼핑, TM, 약국, 마트 등 SKU 수립 및 제품 판매 복합제품 등 제품 extension

2) 연차별 연구개발과제의 내용

구분	목표	주요 연구개발내용
1년차 (2021년)	원료및 제조공정표준화	<ul style="list-style-type: none"> 소재의 유사종, 원산지 등 지표성분함량 분석 추출방법, 용매, 온도, 시간 등에 따른 추출 lab scale 최적공정 확립
	기준규격설정	<ul style="list-style-type: none"> 선정 소재의 지표성분 분석법 확립 및 분석 분석법 validation
	뇌질환 효능검증을 위한 <i>in vitro</i> 모델계 정립	<ul style="list-style-type: none"> 기억력 및 인지기능 개선 효능검증을 위한 표준화된 <i>in vitro</i> 모델계 정립 및 표준시험법(SOP) 확립
	농생명자원 기반 기초효능 검증을 통한 최적 기능성소재 도출	<ul style="list-style-type: none"> 기초효능 검증(항산화 등)을 통한 농생명자원 기능성 소재 선별 복합추출물에 따른 기억력 및 인지기능 개선 효능검증 및 최적 후보 소재 도출
	뇌질환 모델에서의 단일추출물 기능성 약리효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> (뇌신경염증) 신경염증 억제 효능평가 및 기전연구 (뇌혈관장벽) 뇌혈관 강화 효능평가 및 기전연구 (기억력/인지) β-amyloid 침착억제 효능평가 및 기전연구 (시냅스가소성) 신경전달물질 활성 효능검증 및 기전연구
	Primary culture된 뇌질환세포 모델에서 인지 및 기억력 개선 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> 추출물에 의한 뇌신경염증 억제 효능평가 뇌혈관 강화 및 기억력/인지기능 개선 효능평가
	천연후보소재의 β -amyloid 형성 및 축적 억제 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 치매 마우스 모델을 활용한 천연후보소재의 β-amyloid 침착 억제 효능 평가 - Thioflavin staining 및 3D imaging 분석 - 뇌조직에서의 Tau protein immunostaining
	천연후보소재의 뇌인지 능력 효능 평가를 위한 cytokine 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 뇌조직에서의 천연후보소재의 cytokine 발현 조절 효능 평가 - TNF-alpha, IL-1, PEG2 immunostaining 및 3D imaging 분석
천연후보소재의 신경전달 및 시냅스 가소성 조절 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 마우스 뇌조직에서의 천연후보소재의 신경전달물질 및 시냅스 가소성 조절 효능 평가 - 아세틸콜린 활성 평가 - ChAT, mGluR, CaMK, CREB immunostaining 및 3D imaging 분석 	
2년차 (2022년)	제조공정표준화	<ul style="list-style-type: none"> lab scale 추출공정의 scale-up : pilot scale 공정 확립 - lab scale 추출공정의 적용 및 수율확인
	기준규격설정	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분, 농약, 중금속 등 유해물질 분석 및 기준 규격 설정
	Primary culture된 뇌질환세포 모델에서 인지 및 기억력 개선 효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> 시냅스가소성 조절 및 향상성 효능평가 기억력 및 인지기능 개선 관련 분자적 기전 규명
	뇌질환 모델에서의 복합추출물 기능성 약리효능 검증	<ul style="list-style-type: none"> (뇌신경염증) 신경염증 억제 효능평가 및 기전연구 (뇌혈관장벽) 뇌혈관 강화 효능평가 및 기전연구 (기억력/인지) β-amyloid 침착억제 효능평가 및 기전연구 (시냅스가소성) 신경전달물질 활성 효능검증 및 기전연구
천연후보소재의 뇌혈관장벽(BBB) 강화 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> 천연후보소재의 마우스 뇌혈관 강화 효능 평가 - Lectin으로 염색된 마우스 뇌혈관의 3차원 이미징 도출 - 도출된 결과를 활용한 뇌혈관의 길이 직경 비교 및 정량적 분석 	
과제종료 후 1~2년차	인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 개별인정용 인체적용시험 수행 - Protocol 개발, CRO, 실시기관 선정, IRB 승인 후 인체적용시험 수행 (사업비 4억예산:자체비용 투자하여 진행)
과제종료 후 3년차	건강기능식품 개별인정 허가	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 유의미한 결과 획득 시 건강기능식품 개별인정 신청 및 허가 안정성 실험 수행 제품화 계획 수립(제형, 디자인, 마케팅, 유통채널 확정)
과제종료 후 4차년차	제품화 및 판매	<ul style="list-style-type: none"> 홈쇼핑, TM, 약국, 마트 등 SKU 수립 및 제품 판매
과제종료 후 5년차	제품 extension	<ul style="list-style-type: none"> 복합제품 등 제품 extension

(1) 주관기관 : 광동제약(주)

1.1 원료 및 Lab scale 제조공정 표준화

□ 원료의 선정

- 동의보감, 본초강목 등의 전통의서에서 사용해온 원료를 검토 및 분석하고 1차 후보군을 선별
 - 효능이 보고된 원료 중 식품으로 사용가능하며 지재권 확보가능한 원료 선별, 원료의 효능 screening 소재 7가지 선정(석창포, 초석잠, 상삼자, 익모초, 자근, 금은화, 사삼)

	기원	식용부위 /제한여부	형태
상삼자	뽕나무 <i>Morus alba</i> Linné 또는 기타 동속 근연식물 (뽕나무과 Moraceae)의 완전히 익기 전의 열매	열매	
익모초	익모초 <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn (꿀풀과 Labiatae)의 지상부	지상부/제한	
자근	지치(<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)의 뿌리	뿌리	
금은화	인동덩굴 <i>Lonicera japonica</i> Thunberg (인동과 Caprifoliaceae)의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃	꽃봉오리 /제한	
사삼	잔대 <i>Adenophora triphylla</i> var. japonica Hara 또는 사삼(沙蔘) <i>Adenophora stricta</i> Miq. (초롱꽃과 Campanulaceae)의 뿌리	뿌리	
초석잠	꿀풀과(脣形科 : Labiatae/Lamiaceae) <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	뿌리	
석창포	<i>Acori Graminei</i> Rhizoma <i>Acorus gramineus</i> Solander (천남성과, Araceae)의 뿌리줄기	뿌리줄기/ 제한 (물추출물)	

1.1.1 소재별 lab scale 추출공정 정립

- lab scale 추출공정 확립을 위하여 기존의 논문 등 문헌을 검토하여 열수, 주정의 추출 시간 온도별 수율 확인 시험을 진행
- 열수의 경우 온도를 100℃로 고정하고 3,6,9시간 시간별로 수율 확인
- 주정의 경우 20% 주정으로 시간(4,8,12시간), 온도(60,80,100℃)별로 수율 확인

1) 추출시간별 수율확인 시험

① 열수추출 - 시간대별

소재	자초			금은화			사삼			익모초			상심자			석창포			초석잠		
	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12
추출시간 (hr)	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12	3	6	12
Brix(%)	34	35	35	35	35	35	32	33	33	16	16	17	45	46	45	14	15	14	39	39	40
고형분 (%)	39	40	40	31	32	33	51	50	52	16	17	17	50	52	52	47	48	49	46	48	48
수득량 (g)	37	38	38	22	22	23	43	43	43	12	12	13	71	72	72	12	12	13	52	53	53
수율 (%)	37	38	38	22	22	23	43	43	43	12	12	13	71	72	72	12	12	13	52	53	53

② 주정추출 - 시간대별

소재	자초			금은화			사삼			익모초			상심자		
추출시간 (hr)	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12
Brix(%)	32	35	38	23	26	27	23	24	25	15	16	17	50	54	58
고형분 (%)	38	41	43	25	27	28	39	42	43	26	28	29	63	68	72
수득량 (g)	33	39	41	19	21	22	33	37	38	9	12	13	55	60	63
수율 (%)	33	39	41	19	21	22	33	37	38	9	12	13	55	60	63

2) 추출온도별 수율확인 시험 (주정)

주정추출 - 온도별 (8시간 고정)

소재	자초			금은화			사삼			익모초			상심자		
추출온도 (℃)	60	80	100	60	80	100	60	80	100	60	80	100	60	80	100
Brix(%)	35	36	35	26	28	27	24	24	25	16	15	18	54	56	55
고형분 (%)	41	42	41	27	29	28	42	41	43	28	28	30	68	69	68
수득량 (g)	39	40	39	21	22	21	37	38	38	12	12	13	60	61	60
수율 (%)	39	40	39	21	22	21	37	38	38	12	12	13	60	61	60

3) 결론

- 추출물의 제조공정은 제품화를 위한 대량생산시 단가와 직접적인 관계가 있기 때문에, 대량 생산 공정을 고려하여 적절한 온도와 시간을 설정
- 열수추출 및 주정추출의 온도와 시간을 비교하였을 때, 열수추출은 100℃, 3시간, 주정추출은 60℃, 8시간으로 공정을 설정

5) 확립된 공정에 따른 소재의 추출시험

항목	열수추출	주정추출
원료량	100g	100g
용매 및 양	정수, 10배수	주정, 10배수
온도(℃)	100	60
추출시간(hr)	3	8

① 열수추출

소재	가공	Brix(%)	고형분(%)	무게(g)	수율(%)	수득량(g)	비고
자초	추출	4.21	4.04	798.74	32.27	32.27	녹색
	농축	34.81	39.8	93.6	37.25	37.25	
금은화	추출	5.53	5.24	508.01	26.62	26.62	10 배수에서 꼭 안잠김, 약재가 물을 많이 먹음
	농축	35.49	31.43	71.93	22.61	22.61	
사삼	추출	6.22	6.39	603.44	38.56	38.56	
	농축	32.8	51.12	83.76	42.82	42.82	냉각 시 굳는 현상
익모초	추출	2.12	1.87	606.21	11.34	11.34	10 배수에서 꼭 안잠김, 약재가 물을 많이 먹음
	농축	16.37	15.96	77.98	12.45	12.45	
상심자	추출	7.51	7.72	886.15	68.41	68.41	
	농축	45.11	50.3	141.84	71.35	71.35	
석창포	추출	2.02	1.64	735.45	12.06	12.06	
	농축	14.05	47.19	26.15	12.34	12.34	
초석잠	추출	6.68	6.47	716.86	45.47	46.38	
	농축	39	46.38	111.66	50.77	51.79	

② 10% 주정추출

소재	가공	Brix(%)	고형분(%)	무게(g)	수율(%)	수득량(g)	비고
자초	추출	7.63	4.62	776	35.85	35.85	탁하고 검붉은 색
	농축	35.24	41.53	95.07	39.48	39.48	
금은화	추출	7.12	3.64	598.54	21.79	21.79	
	농축	26.72	27.83	81.43	22.66	22.66	
사삼	추출	8.11	5.54	562.67	31.17	31.17	용매 중 에탄올함량 높아질수록 탁해짐, 여과 시 케이킹 우려
	농축	23.89	42	89.51	37.59	37.59	
익모초	추출	5.67	1.77	603	10.67	10.67	탁하고 누런 색
	농축	16.42	28.87	41.24	11.91	11.91	
상심자	추출	10.69	7.87	688.35	67.72	54.17	추출 중 씨앗이 분리돼 여과에서 막힐 수 있음
	농축	54.08	68.31	88.45	75.53	60.42	

③ 20% 주정추출

소재	가공	Brix(%)	고형분(%)	무게(g)	수율(%)	수득량(g)	비고
자초	추출	11.34	5	753	37.65	37.65	탁하고 검붉은 색
	농축	33.22	39.2	105.63	41.41	41.41	
금은화	추출	11.2	4.04	597.36	24.13	24.13	
	농축	41.07	41.9	56.93	23.85	23.85	
사삼	추출	10.72	5.66	530.97	30.05	30.05	용매 중 에탄올함량 높아질수록 탁해짐, 여과 시 케이킹 우려
	농축	18.59	31.69	109.12	34.58	34.58	
익모초	추출	9.24	1.96	609.65	11.95	11.95	탁하고 누런 색
	농축	25.89	27.75	41.65	11.56	11.56	
상심자	추출	13.92	7.76	683.26	66.28	53.02	추출 중 씨앗이 분리돼 여과에서 막힐 수 있음
	농축	58.73	73.42	76.2	69.93	55.95	

④ 30% 주정추출

소재	가공	Brix(%)	고형분(%)	무게(g)	수율(%)	수득량(g)	비고
자초	추출	14.06	4.17	764	31.86	31.86	탁하고 검붉은 색
	농축	36.58	42.43	87.37	37.07	37.07	
금은화	추출	14.55	3.93	591.25	23.24	23.24	
	농축	27.93	27.02	88.53	23.92	23.92	
사삼	추출	13.87	5.67	534.65	30.31	30.31	용매 중 에탄올함량 높아질수록 탁해짐, 여과 시 케이킹 우려
	농축	15.48	22.57	143.14	32.31	32.31	
익모초	추출	12.7	1.55	627	9.72	9.72	탁하고 누런 색
	농축	21.84	16.65	67.3	11.21	11.21	
상심자	추출	17.14	7.84	677.07	66.35	53.08	추출 중 씨앗이 분리돼 여과에서 막힐 수 있음
	농축	38.56	44.71	125.35	70.05	56.04	

⑤ 70% 주정추출

소재	가공	Brix(%)	고형분(%)	무게(g)	수율(%)	수득량(g)	비고
자초	추출	21.3	2.39	782	18.69	18.69	맑고 검붉은 색
	농축	31.86	32.76	68.09	22.31	22.31	
금은화	추출	22.98	4.27	620.83	26.51	26.51	비교적 분말이 더 들어감. 여과 중 loss 발생
	농축	32.34	33.25	76.71	25.51	25.51	
사삼	추출	22.51	3.68	575.45	21.18	21.18	용매 중 에탄올함량 높아질수록 탁해짐, 여과 시 케이킹 우려
	농축	15.33	21.4	99.75	21.35	21.35	
익모초	추출	20.7	1.77	626	11.08	11.08	탁하고 초록 색
	농축	25.46	26.11	43.23	11.29	11.29	
상심자	추출	24.7	8.04	654.37	65.76	52.61	추출 중 씨앗이 분리돼 여과에서 막힐 수 있음
	농축	42.01	44.95	114.79	64.50	51.60	

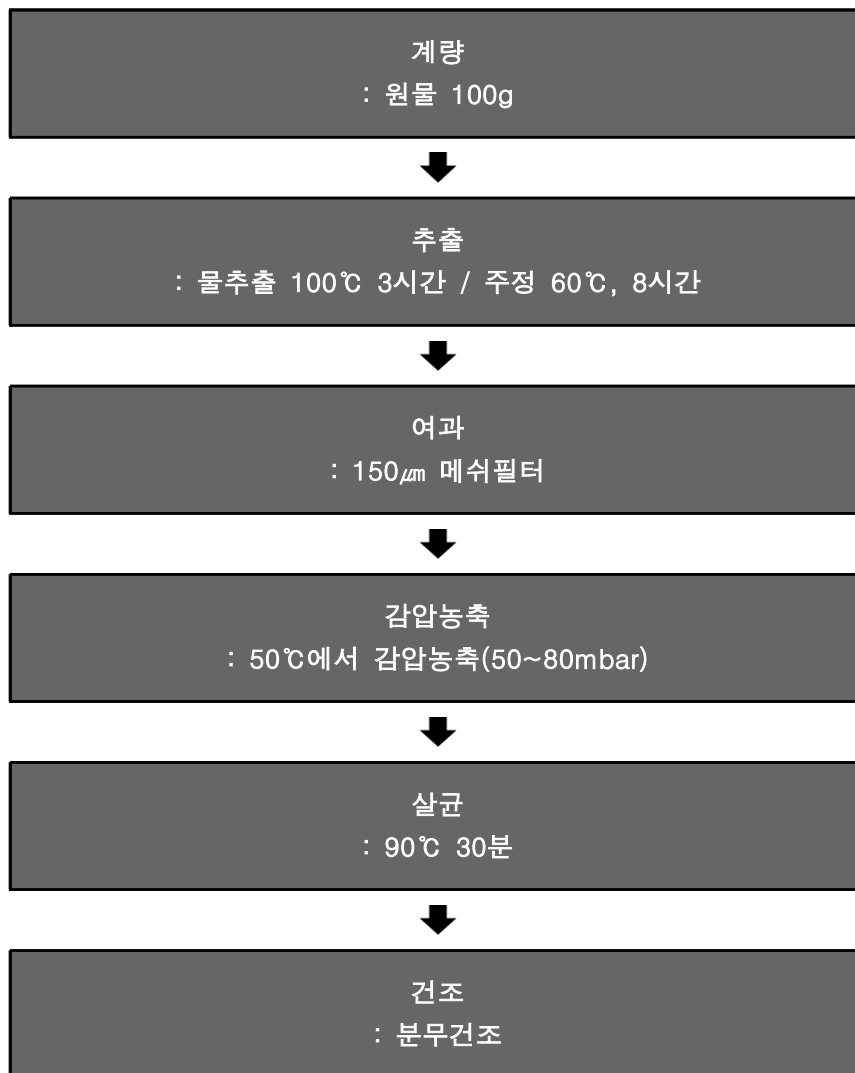
⑥ 용매별 각 소재의 추출 수율 비교

소재	열수추출	10% 주정	20%주정	30%주정	70% 주정
자초	37.25	39.48	41.41	37.07	22.31
금은화	22.61	22.66	23.85	23.92	25.51
사삼	42.82	37.59	34.58	32.31	21.35
익모초	12.45	11.91	11.56	11.21	11.29
상심자	71.35	75.53	69.93	70.05	64.50
석창포	12.34	-	-	-	-
초석잠	50.77	-	-	-	-

*석창포는 식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료로 물추출물만 사용가능

*초석잠은 선행연구에서 물추출물이 효능이 있었음

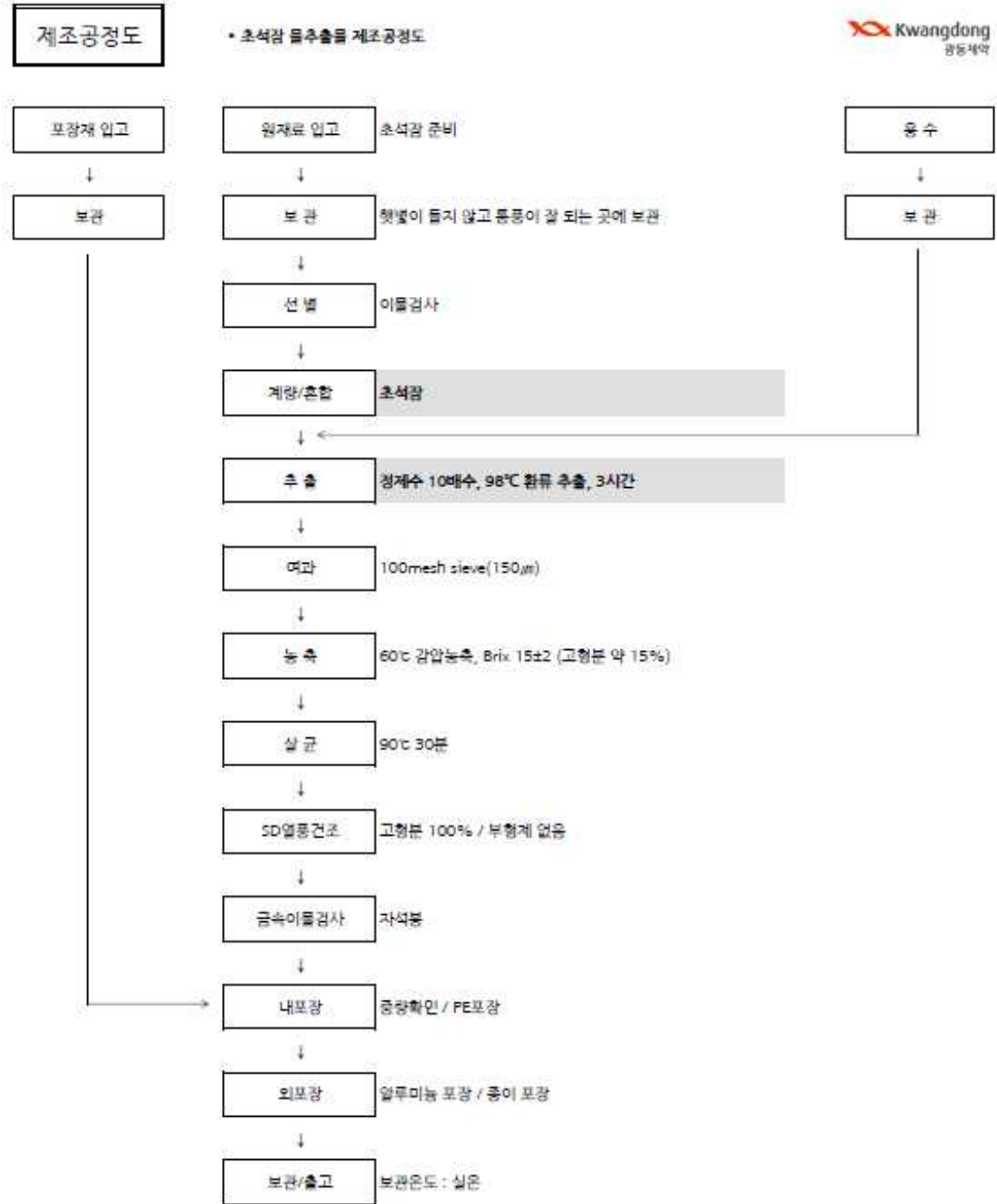
⑦ Lab scale 제조공정



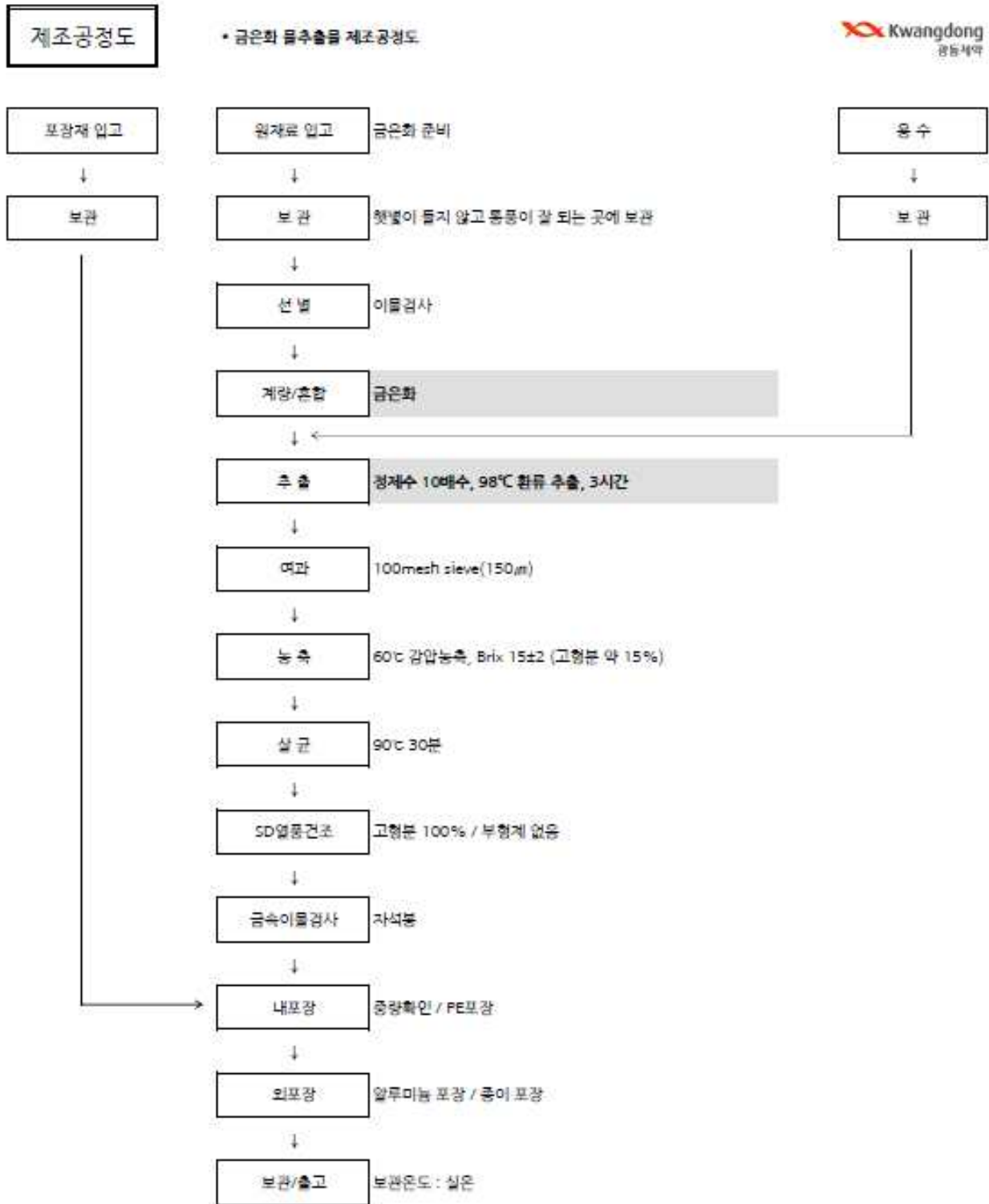
1.2 선정 소재 Pilot scale 추출공정 정립

- 7가지 소재 중 효능 스크리닝을 통하여 선정된 4가지 소재 금은화, 석창포, 익모초, 초석잠의 Pilot scale 추출공정 확립

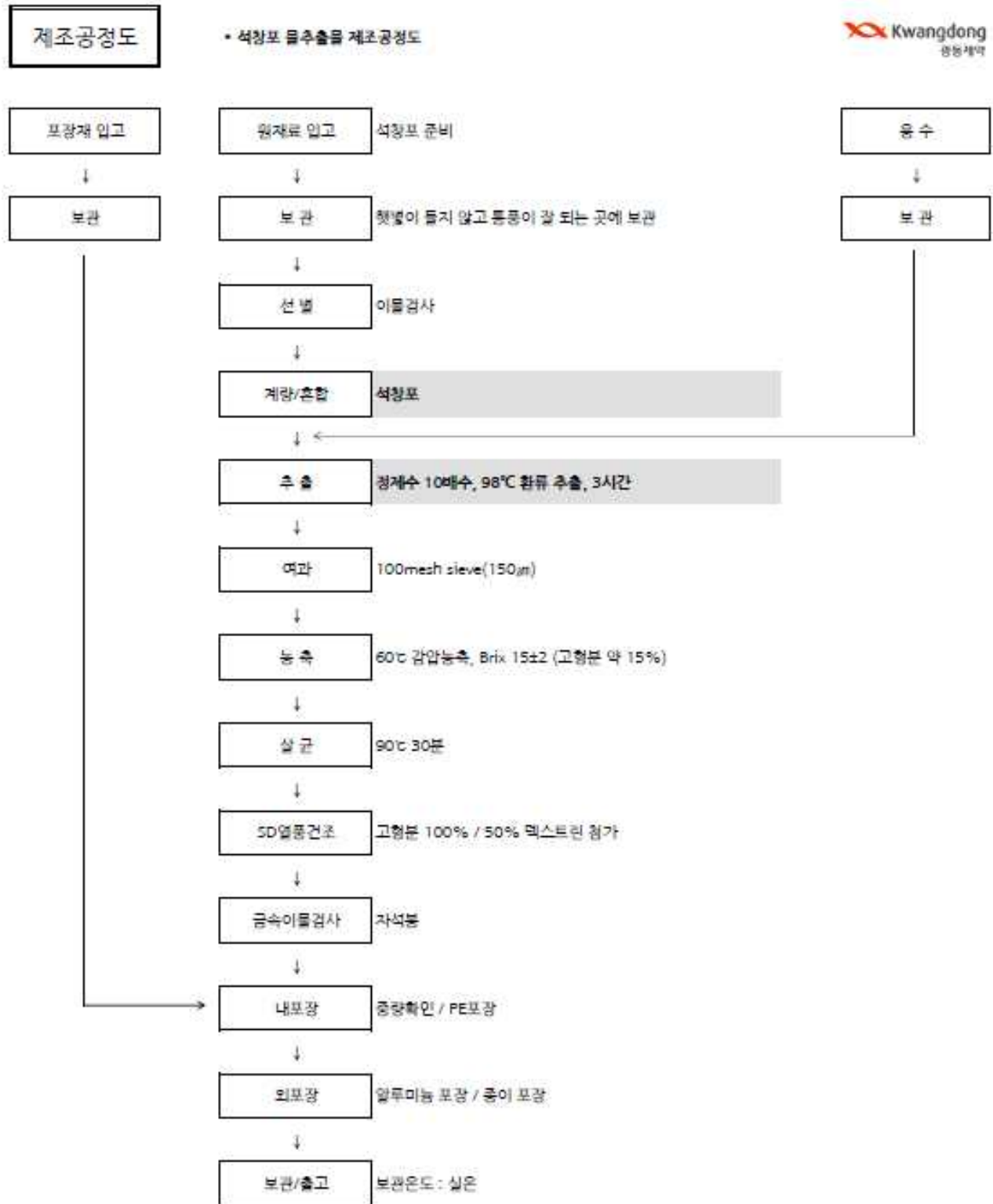
(1) 초석잠



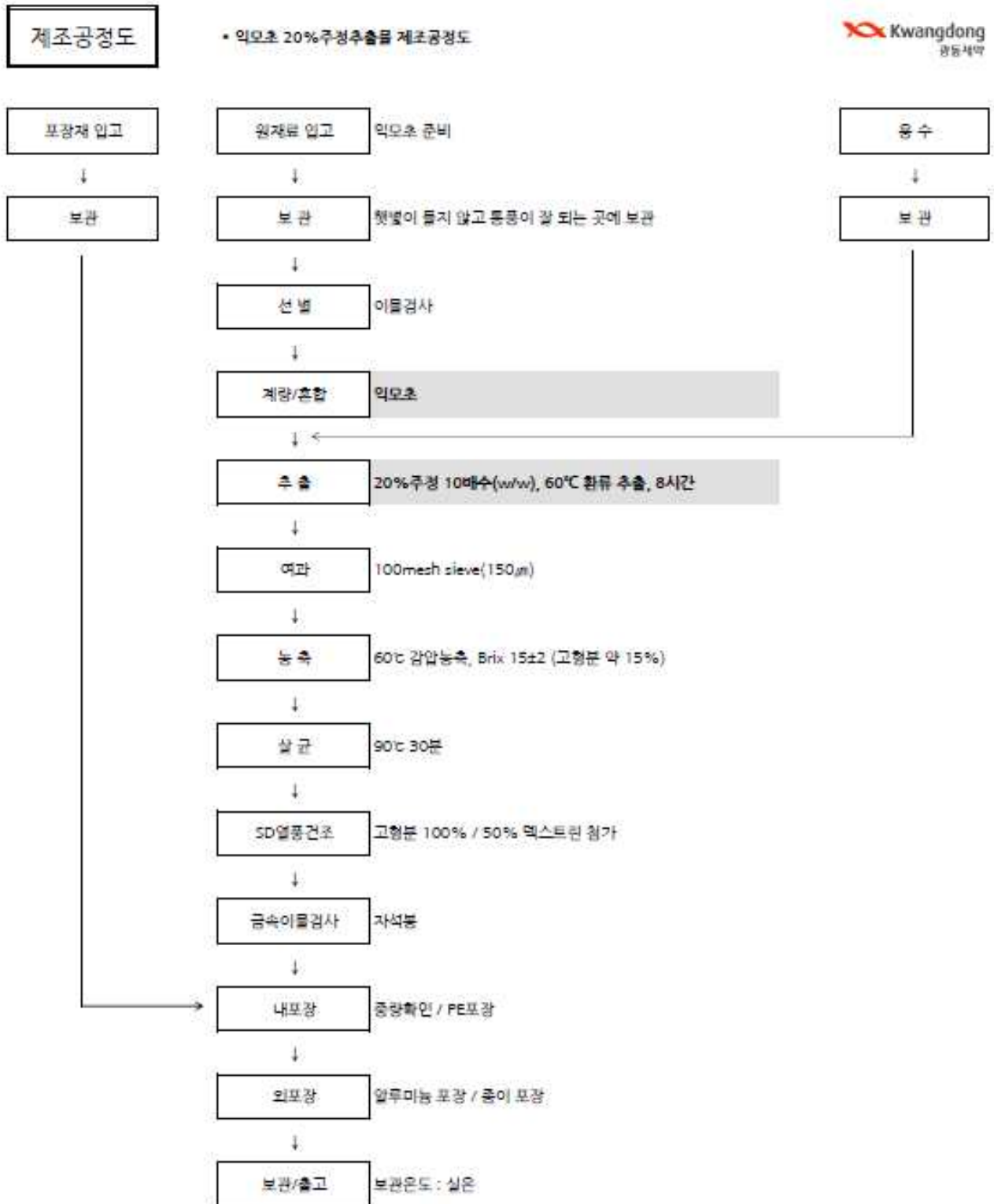
(2) 금은화



(3) 석창포



(4) 익모초



2.1 기준규격설정

2.1.1 소재별 지표성분 후보물질 검토

	기원	식용부위 /제한여부	지표성분 후보물질
상심자	뽕나무 <i>Morus alba</i> Linné 또는 기타 동속 근연식물 (뽕나무과 Moraceae)의 완전히 익기 전의 열매	열매	resveratrol,
익모초	익모초 <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn (꿀풀과 Labiatae)의 지상부	지상부/제한	rutin, leonurine
자근	지치(<i>Lithospermum erythrorhizon</i>)의 뿌리	뿌리	lithospermic acid
금은화	인동덩굴 <i>Lonicera japonica</i> Thunberg (인동과 Caprifoliaceae)의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃	꽃봉오리 /제한	chlorogenic acid, rutin,
사삼	잔대 <i>Adenophora triphylla</i> var. japonica Hara 또는 사삼(沙蔘) <i>Adenophora stricta</i> Miq. (초롱꽃과 Campanulaceae)의 뿌리	뿌리	β -sitosterol, lupenone
초석잠	꿀풀과(脣形科 : Labiatae/Lamiaceae) <i>Stachys sieboldii</i> Miq.	뿌리	choline, stachydrine,
석창포	<i>Acori Graminei</i> Rhizoma <i>Acorus gramineus</i> Solander (천남성과, Araceae)의 뿌리줄기	뿌리줄기/제한 (물추출물)	β -asarone, α -asarone, 내부표준물질 (1,4-dimethoxybenzene)

2.1.2 소재별 지표성분 분석

2.1.2.1 금은화

□ 시험방법

가. 장치 및 기기

- 고속액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 자외선 검출기 (Ultra Violet (UV) detector)
- 저울 (Balance)
- 증류수기 (Water Purification system)
- 환류장치 (Reflux apparatus)
- 0.45 μ m 멤브레인 필터

나. 시약 및 시액

- 클로로겐산 (Chlorogenic acid, CAS No. 327-97-3)
- 아세토니트릴 (Acetonitrile, HPLC grade)
- 메탄올 (Methanol, HPLC grade)
- 인산 (Phosphoric acid)
- 80% 메탄올 (추출용매): 1 L 정용병에 메탄올 800 mL을 넣은 후 증류수로 1 L 정용한다.

다. 표준원액 및 용액의 제조

- (1) 표준물질 4종 (파에오니플로린, 클로로겐산, 노다케닌, 데커신) 각 약 10 mg을 정밀히

측정하여 10 mL 정용병에 넣은 후 메탄올에 정용한 것을 표준원액으로 한다.

- (2) 메탄올을 이용하여 표준원액을 단계적으로 희석하여 검량선 작성용으로 사용한다.
- (3) 표준용액에 대한 농도는 시료에 대해 예비실험을 실시하고, 시료의 시험용액의 농도가 표준용액 농도 가운데 오도록 제조하여 사용한다.

라. 시험용액의 제조

- (1) 250 mL 둥근 플라스크에 시료의 상태에 따라 약 2.0 - 20.0 g을 정밀히 칭량한 후 추출용매 (80% 메탄올) 100 mL을 가한다.
- (2) 위의 플라스크를 85 °C에서 3시간 동안 환류 추출한다.
- (3) 추출용액을 실온까지 식힌 후 여과지 (Whatman N0.2)를 이용하여 여과 후 80% 메탄올을 이용하여 100 mL로 정용한다.
- (4) 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 HPLC 분석을 위한 최종 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

(1) HPLC 분석조건

컬럼	Shiseido Capcell Pak C18 UG120 (4.6 ID x 150 mm, 5 um)		
검출기	PDA (Paeoniflorin - 230 nm, Chlorogenic acid, Nodakenin, Decursin - 325 nm)		
컬럼 온도	35 °C		
유속	1.0 mL/min		
주입량	5 μL		
이동상	A: 증류수 (0.1% 인산), B: 아세토니트릴 (0.1% 인산)		
	시간 (분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
	0	100	0
	30	75	25
	33	75	25
	35	0	100
	40	0	100
50	100	0	

(2) 정량시험

: 크로마토그램상 피크 면적으로 검량선을 작성하여 시험용액에서의 분석물질 (파에오니플로린, 클로로겐산, 노다케닌, 데커신) 함량을 각 각 계산한다.

(3) 계산식

$$\text{분석물질 함량(mg/g)} = \frac{\text{시험액의 농도(ug/ml)} \times \text{시험용액의 전량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

① Chlorogenic acid 분석결과

시료명	Chlorogenic acid (mg/g)	정확도 (%)	정밀도 (RSD %)
금은화 원물	16.96 ± 0.24	91.48 ± 3.05	3.34
금은화 물 추출	6.04 ± 0.02	90.47 ± 4.86	5.37
금은화 10% EtOH 추출	2.86 ± 0.00	92.98 ± 1.51	1.62
금은화 20% EtOH 추출	6.66 ± 0.17	86.87 ± 6.87	7.86
금은화 30% EtOH 추출	4.99 ± 0.02	88.69 ± 4.98	5.62
금은화 70% EtOH 추출	10.97 ± 0.05	89.74 ± 7.05	7.85

② Rutin 분석결과

시료명	Rutin (mg/g)	정확도 (%)	정밀도 (RSD %)
금은화 원물	4.50 ± 0.11	90.48 ± 6.64	7.34
금은화 물 추출	0.21 ± 0.01	100.53 ± 3.58	3.56
금은화 10% EtOH 추출	0.08 ± 0.00	104.78 ± 4.54	4.34
금은화 20% EtOH 추출	0.21 ± 0.01	100.83 ± 6.06	6.01
금은화 30% EtOH 추출	0.21 ± 0.01	99.50 ± 4.42	4.44
금은화 70% EtOH 추출	0.38 ± 0.03	90.70 ± 2.71	2.99

2.1.2.2 자근

- 자근의 Lithospermic acid 분석은 식약처 개별인정 지초추출분말(제2009-97호)의 분석법에 따라 분석

① Lithospermic acid

시료명	Lithospermic acid (mg/g)	정확도 (%)	정밀도 (RSD %)
자근 원물	4.47 ± 0.39	101.97 ± 1.33	1.31
자근 물 추출	0.51 ± 0.02	99.57 ± 3.14	3.15
자근 10% EtOH 추출	0.37 ± 0.01	102.11 ± 0.59	0.58
자근 20% EtOH 추출	0.96 ± 0.02	101.48 ± 2.25	2.22
자근 30% EtOH 추출	1.47 ± 0.04	100.96 ± 2.52	2.50
자근 70% EtOH 추출	2.43 ± 0.29	102.49 ± 4.60	4.49

2.1.2.3 익모초

□ 시험방법

가. 장치 및 기기

- 고속액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 질량분석기 (Mass Spectrometry, MS)
- 교반기 (Shaker)
- 저울 (Balance)
- 정용병 (Volumetric flask)
- 0.45 µm 멤브레인 필터

나. 시약 및 시액

- Leonurine (CAS No. 24697-74-3)
- Rutin (CAS No. 153-18-4)
- 개미산(Formic acid, HPLC grade)
- 메탄올 (Methanol, HPLC grade)

다. 표준원액 및 용액의 제조

- (1) 각 각의 표준물질 일정량을 정확히 달아 메탄올을 이용하여 1000 µg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다.
- (2) 상기 표준원액을 메탄올로 단계적으로 희석하여 표준용액으로 한다.
- (3) 표준용액의 농도는 시료에 대해 예비 실험을 실시하여, 시료의 시험용액의 농도가 표준용액 농도 가운데 오도록 제조하여 사용하며, 실험당일 제조하도록 한다.

라. 시험용액의 제조

- (1) 검체 일정량을 정밀히 취하여 추출용매인 메탄올을 일정량 가한다.
- (2) 위 용액을 균질화 한 후 정용 한 후 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 분석을 위한

최종 시험용액으로 한다.

라. 시험조작

(1) 액체크로마토그래피 (HPLC) 조건

컬럼	Shiseido Capcell Pak C18 UG 120 (4.6 ID x 250 mm, 5 μm)		
컬럼 온도	35℃		
유속	1.0 mL/min		
주입량	2 μL		
이동상	시간 (분)	증류수 (0.1% 개미산)	메탄올 (0.1% 개미산)
	0	80	20
	4	20	80
	6	20	80
	6.2	80	20
10	80	20	

(2) 질량분석기 (MS) 조건

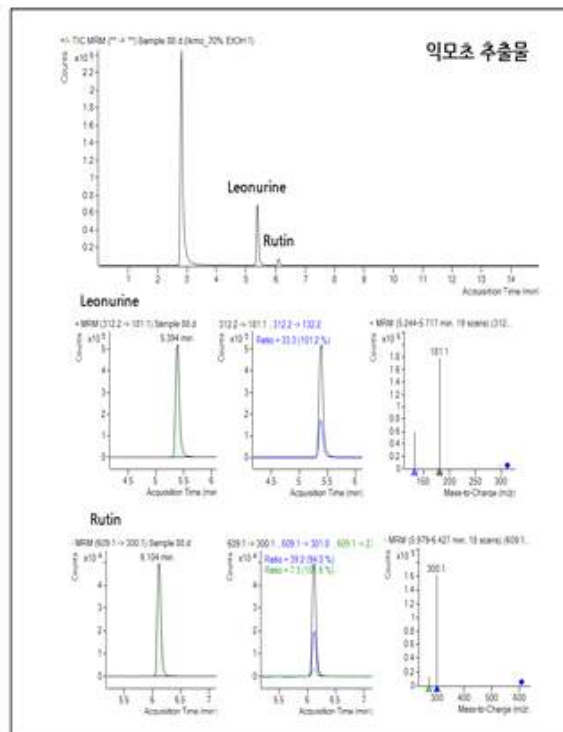
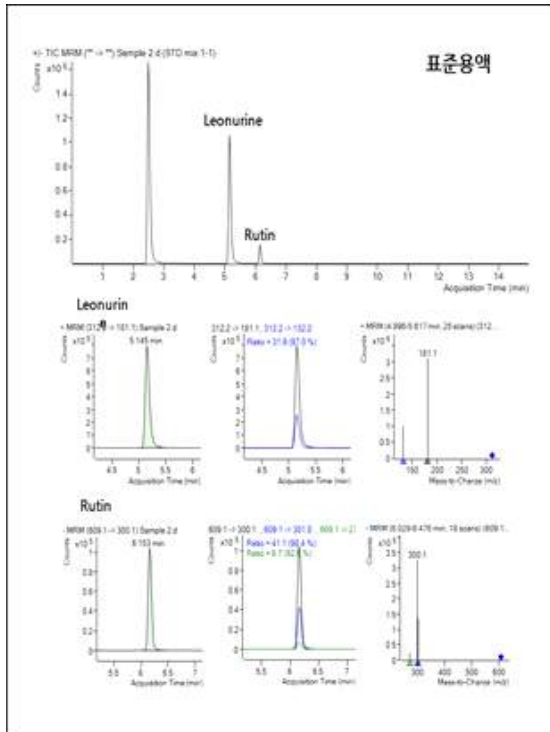
Ion Source Parameters	Ion Mode	ESI- Mode (Positive: Leonurine, Negative: Rutin)		
	Gas Temperature	350 ℃		
	Nebulizer	45 psi		
	Sheath gas Tem	350 ℃		
	Sheath gas flow (N ₂)	11 L/min		
MRM 조건	분석물질	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (CE, v)
	Leonurine	312.2	181.1	40
			132.2	40
	Rutin	609.1	300.1	40
			301.0	40

(3) 정량시험: 크로마토그램상의 피크 면적으로 검량선을 작성하여 시험용액에서의 분석물질 함량을 계산한다.

(4) 계산식

$$\text{분석물질 함량(mg/g)} = \frac{\text{시험액의 농도(ug/ml)} \times \text{시험용액의 전량(mL)} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

* Leonurine, Rutin 크로마토그램



① Rutin 분석결과

시료명	Rutin (mg/g)	정확도 (%)	정밀도 (RSD %)
익모초 원물	1.82 ± 0.12	109.38 ± 3.45	3.15
익모초 물 추출	0.08 ± 0.00	89.76 ± 3.82	4.26
익모초 10% EtOH 추출	0.10 ± 0.00	81.77 ± 0.73	0.90
익모초 20% EtOH 추출	0.13 ± 0.01	103.03 ± 4.98	4.83
익모초 30% EtOH 추출	0.11 ± 0.00	100.70 ± 6.15	6.10
익모초 70% EtOH 추출	0.25 ± 0.02	91.65 ± 4.85	5.29

② Leonurine 분석결과

시료명	Leonurine (mg/g)	정확도 (%)	정밀도 (RSD %)
익모초 원물	2.32 ± 0.26	95.75 ± 3.84	4.01
익모초 물 추출	0.95 ± 0.04	94.43 ± 8.28	8.77
익모초 10% EtOH 추출	1.38 ± 0.04	81.58 ± 0.75	0.92
익모초 20% EtOH 추출	1.63 ± 0.03	82.24 ± 1.84	2.23
익모초 30% EtOH 추출	1.40 ± 0.06	92.65 ± 6.70	7.23
익모초 70% EtOH 추출	2.12 ± 0.06	105.05 ± 4.91	4.67

2.1.2.4 석창포

□ 시험방법

가. 장치 및 기기

- 고속액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 자외부흡광광도검출기 (Diode array detector)
- 증류수기 (Water purification system)
- 초음파추출기 (Sonicator)

나. 시약 및 시액

- α-asarone: PhytoLab GmbH사 99 % 이상 또는 이와 동등한 것
- β-asarone: PhytoLab GmbH사 99 % 이상 또는 이와 동등한 것
- Phosphoric acid: 삼전순약공업사 또는 이와 동등한 것
- 정제수: 18.2 MΩ 이상인 것
- 아세토니트릴(Acetonitrile): J.T.Baker사 HPLC grade 또는 이와 동등한 것
- 메탄올(Methyl alcohol): J.T.Baker사 HPLC grade 또는 이와 동등한 것

다. 표준액의 제조

- 1) 표준원액: α, β-asarone 각각 약 10 mg을 10 mL 부피플라스크에 취한다. 메탄올을 이용하여 용해하고 정용한 것을 표준원액으로 한다.
- 2) 검량표준용액: 각각의 표준원액과 메탄올을 이용하여 적당한 농도로 희석하여 사용한다. 제조 방법의 예는 아래와 같으며 필요에 따라 증가하여 제조할 수 있다.
 - (1) 200 ug/mL: 표준원액 각각 2 mL을 10 mL 부피플라스크에 취하고 메탄올로 정용
 - (2) 100 ug/mL: 메탄올 1 mL과 200 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합
 - (3) 50 ug/mL: 메탄올 1 mL과 100 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합
 - (4) 25 ug/mL: 메탄올 1 mL과 50 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합
 - (5) 12.5 ug/mL: 메탄올 1 mL과 25 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합

- (6) 6.25 ug/mL: 메탄올 1 mL과 12.5 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합
- (7) 1.25 ug/mL: 메탄올 4 mL과 6.25 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합
- (8) 0.625 ug/mL: 메탄올 1 mL과 1.25 ug/mL 표준용액 1 mL 을 혼합

라. 시험용액의 제조

- 1) 석창포 원물 및 추출물 분말 등의 경우 약 1 g을, 추출액 등의 경우 약 10 g을 50 mL 부피 플라스크에 취한다. 50 % 메탄올을 약 20 mL 을 가하여 혼합한 후 50 mL 로 정용한다.
- 2) 30 분간 초음파 추출한 후 실온으로 한다.
- 3) 0.45 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다. 단, 희석이 필요한 경우 50% 메탄올을 이용하여 희석한다.

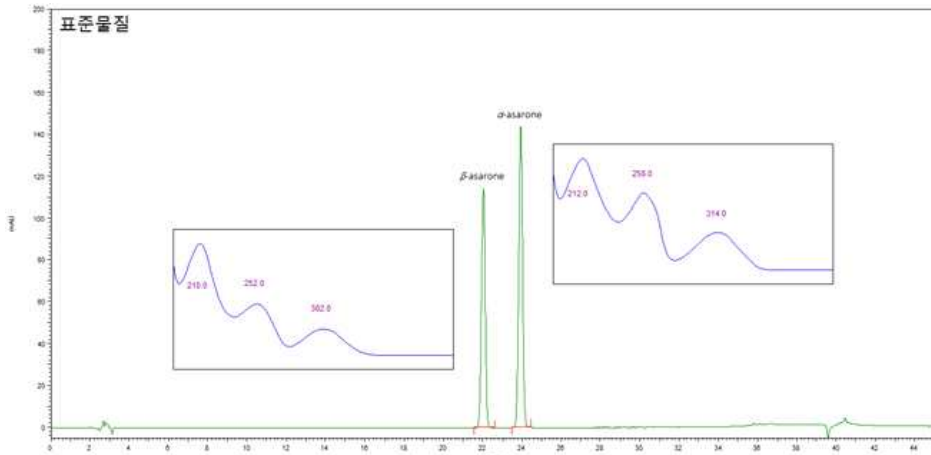
마. 시험조작

1) HPLC-DAD 분석조건

Column	Shiseido Capcellpak UG120 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm), 30 °C																										
Flow rate	1.0 mL/min																										
Detector	PDA, 250 nm																										
Mobile phase	A: 0.1 % phosphoric acid B: Acetonitrile	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>45</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>37</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>		min	A(%)	B(%)	0	65	35	3	65	35	30	45	55	33	10	90	36	10	90	37	65	35	45	65	35
min	A(%)	B(%)																									
0	65	35																									
3	65	35																									
30	45	55																									
33	10	90																									
36	10	90																									
37	65	35																									
45	65	35																									

- 2) 정량시험 : 표준용액의 농도와 크로마토그램상의 피크 면적으로 검량선을 작성하여 시험 용액의 농도를 구하고, 계산식에 의해 시료 중 α, β-asarone 각각의 함량(mg/g)을 계산한다.
- 3) 계산식

$$\alpha, \beta\text{-asarone 함량(mg/g)} = \frac{\text{시험액의 농도(ug/ml)} \times \text{최종분류(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$



[HPLC-DAD chromatogram 및 spectrum]

□ α-asarone, β-asarone 분석결과

	단위	분석결과	
		α-asarone	β-asarone
석창포 원물 2	mg/100g	0.124 ± 0.00	15.59 ± 0.35
석창포 원물 1	mg/100g	0.142 ± 0.00	13.75 ± 0.44
석창포 원물 1_물추출물	mg/g	0.014 ± 0.00	0.31 ± 0.00

2.1.2.5 초석잠

□ 시험방법

가. 장치 및 기기

- 고속액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 질량분석기/질량분석기 (Mass spectrometer/Mass spectrometer)
- 증류수기 (Water purification system)
- 저울 (Balance)
- 초음파추출장치 (Sonicator)

나. 시약 및 시액

- Choline Chloride, Sigma-Aldrich사 순도 98% 이상 또는 이와 동등한 것
- 아세토니트릴(Acetonitrile), J.T Baker사 HPLC grade 또는 이와 동등한 것
- 정제수 (18.2 MΩ 이상인 것)
- Formic acid, Sigma-Aldrich사 또는 이와 동등한 것
- 0.45 um Hydrophilic PTFE Syringe Filter, ADVANTEC사 HP045AN 또는 이와 동등한 것

다. 표준액의 제조

- 1) 표준원액: Choline Chloride 약 10 mg을 정밀히 달아 100 mL 부피플라스크에 취한 후 정제수로 정용한 것을 표준원액으로 한다. (100 µg/mL) Choline의 농도는 아래식을 이용하여 계산한다.

$$\text{Choline의 농도(ug/mL)} = \frac{\text{표준품 취한량(mg)}}{\text{최종부피(mL)}} \times \frac{104.12}{139.62} \times 1000$$

- 104.12: Choline 분자량 (g/mol)

- 139.62: Choline Chloride 분자량 (g/mol)

- 2) 표준용액①_1000 ng/mL: 표준원액 1 mL을 정제수를 이용하여 100 mL로 한다.
- 3) 검량표준용액: 표준용액①과 정제수를 이용하여 적당한 농도로 희석하여 사용한다. 제조방법의 예는 아래와 같으며 필요에 따라 용량을 증가하여 제조할 수 있다.
 - (1) 200 ng/mL: 표준용액① 2 mL을 10 mL 부피플라스크에 취한 후 정용
 - (2) 100 ng/mL: 정제수 1 mL과 200 ng/mL 표준용액 1 mL을 혼합
 - (3) 50 ng/mL: 정제수 1 mL과 100 ng/mL 표준용액 1 mL을 혼합
 - (3) 25 ng/mL: 정제수 1 mL과 50 ng/mL 표준용액 1 mL을 혼합
 - (4) 12.5 ng/mL: 정제수 4 mL과 25 ng/mL 표준용액 1 mL을 혼합
 - (5) 6.25 ng/mL: 정제수 4 mL과 12.5 ng/mL 표준용액 1 mL을 혼합

라. 시험용액의 제조

- 1) 균질화한 시료 약 0.5 ~ 1 g을 50 mL 부피플라스크에 취하고 정제수를 이용하여 정용한다.
- 2) 30분 간 혼합하며 초음파 추출 후 실온으로 한 것을 0.45 um 실린지 필터로 여과한다
- 3) 이 액 1 mL을 취하여 100 mL 한 것을 시험용액으로 한다. 단, 추가희석이 필요한 경우 정제수로 적절하게 희석한 것을 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

1) HPLC 분석조건

Column	Shodex Hilic VC-50 2D (2.0 X150 mm), 40℃
Mobile phase	0.2 % formic acid in DW : 0.2 % formic acid in ACN = 75 : 25(v/v)
Flow rate	0.2 mL/min

2) MS/MS 조건

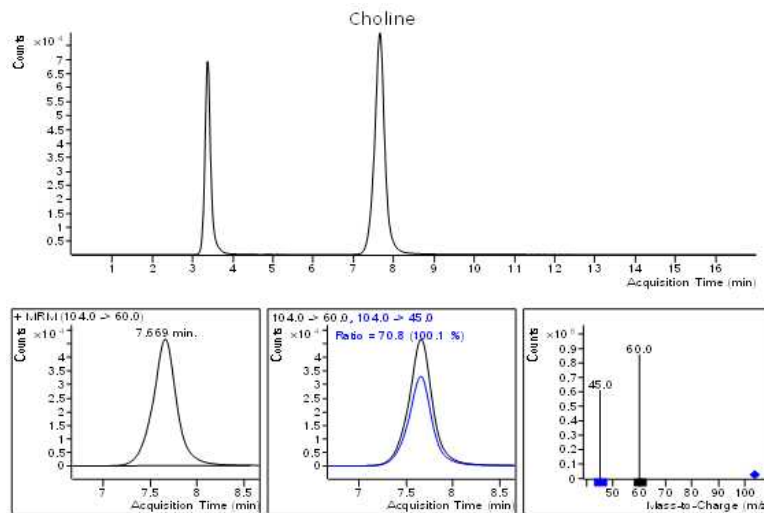
Ion source type	Agilent Jet Stream Electrospray ionization (ESI, positive)				
Drying Gas temp.	Nitrogen, 320 °C				
Gas Flow	10 L/min				
Nebulizer	45 psi				
Sheath Gas temp.	Nitrogen, 350 °C				
Sheath Gas Flow	11 L/min				
MRM ion	Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragment (V)	CE (V)
	Choline	104	60 45	120 120	20 20

3) 정성시험: 표준물질과 시험용액의 머무름 시간과 측정 질량 값(m/z)은 일치하여 한다. 또한 이온간 반응세기의 비율(ion ratio)을 비교하여 그 비율이 허용범위(± 20~30%) 이내에서 일치하여야 한다.

이온간 반응세기의 비율(%)	허용범위
> 50%	± 20%
>20%, ≤ 50%	± 25%
>10%, ≤ 20%	± 30%

4) 정량시험: 표준물질의 면적으로 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구하고, 계산식에 의해 시료 중 Choline의 함량 (mg/g)을 계산한다

$$\text{Choline의 함량(mg/g)} = \frac{\text{시험용액의 농도}(ng/mL) \times \text{최종부피}(mL) \times \text{희석배수}}{\text{검체 채취량}(g)} \times \frac{1}{1,000,000}$$



[표준물질 TIC]

□ Choline, Stachydrine 분석 결과

	단위	분석결과	
		Choline	Stachydrine
초석잠 원물 1	mg/g	0.88 ± 0.02	10.93 ± 0.31
초석잠 원물 1_물추출농축액	mg/g	0.43 ± 0.02	6.60 ± 0.14
초석잠 원물	mg/g	0.74 ± 0.01	3.57 ± 0.13

2.1.2.6 상심자

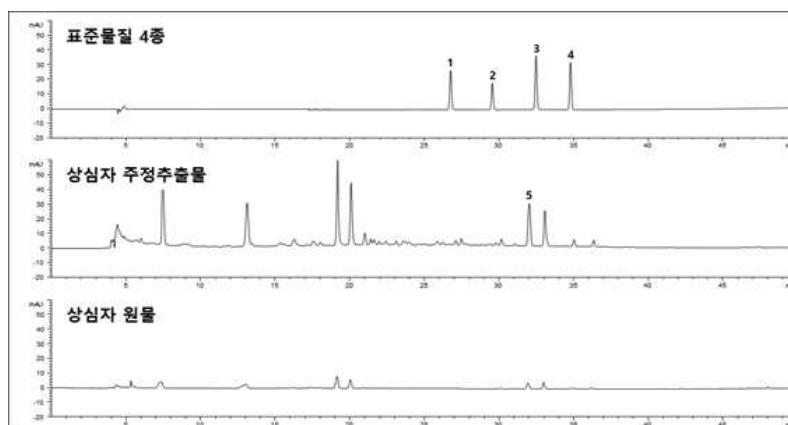
상심자는 대한민국약전외한약(생약)규격집에 수록된 한약재로, 이 약은 뽕나무 *Morus alba* Linné 또는 기타 동속 근연식물 (뽕나무과 Moraceae)의 완전히 익기 전의 열매이다. 열매가 자홍색을 나타낼 때 채취하여 건조한 것을 한약재로 사용하며, 어지러움, 이명, 구갈, 소갈, 강장, 진통약, 불면증, 요동, 변비 등의 치료로 이용하는 것으로 알려져 있다.(등록특허 10-1963494) 뽕나무의 열매(상심자) 이외에도 잎(상엽), 가지(상지), 뿌리껍질(상백피) 등에서의 면역증강, 퇴행성관절염, 항지혈, 항산화, 혈당강하 등 다양한 효능효과에 대한 연구가 이루어 지고 있다. 상심자(미숙과), 오디(성숙과) 등에는 항산화성 anthocyanin (cyanidin 3-glucoside)를 다량 함유하고 있을뿐 아니라 항고혈압성 및 항산화성 γ -aminobutyric acid (GABA), rutin과 항염증, 항고혈압 및 항피부노화 물질인 resveratrol 유도체, 그리고 항당뇨성 물질인 1-deoxynojirimycin (DNJ) 및 moracin유도체가 함유되어 있음이 밝혀졌다. Resveratrol은 식물성 에스트로겐류로 알려진 stilbenoids의 여성호르몬인 에스트로겐과 비슷한 구조를 가진 유효성분으로서 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐의 효능을 낼 수 있다. (식물성 에스트로겐은 화학적 구조와 생체 합성적 측면에서 칼콘(chalcone), 플라보노이드(flavonoid), 리그난(lignan), 스틸베노이드(stilbenoids) 등의 다양한 그룹으로 분류된다.)

상심자 중 지표물질을 stilbenoids류로 선정하고 문헌자료를 참고하여 resveratrol, piceid (polydantin), rhaponticin, rhapontigenin을 선정하여 분석을 진행하였다.

Table 1. HPLC 분석 조건

Column	Supelco Discovery C18(4.6 mm x 250 mm, 5 μ m), 30 $^{\circ}$ C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Detector	PDA, 320 nm		
Mobile phase	A: 0.1 % phosphoric acid B: Methanol		
	min	A(%)	B(%)
	0	85	15
	5	85	15
	4	35	65
	5	10	90
	53	10	90
	54	85	15
	60	85	15

상심자 원물 및 추출물을 분석 한 결과 resveratrol 외 3종은 검출되지 않았으나, rutin 등 기타 물질이 확인되었다. 그러나 rutin 등의 플라보노이드 계열은 천연물 중에 다량 존재하는 물질로 품질 지표성분으로 설정하지 적절하지 않다고 판단되어진다.



[HPLC 크로마토그램. 1. piceid 2. rhaponticin 3. resveratrol 4. rhapontigenin 5. rutin]

2.2 Pilot scale 원료 기준규격설정

2.2.1 Pilot scale 원료 지표성분 분석

① 초석잠 지표성분 분석

단위	단위	분석결과	
		Choline	Stachydrine
초석잠 추출물분말_Lot 1	mg/g	0.92	5.41
		0.92	5.45
		0.92	5.28
초석잠 추출물분말_Lot 2	mg/g	0.94	5.24
		0.93	5.28
		0.93	5.18
초석잠 추출물분말_Lot 3	mg/g	0.93	5.20
		0.90	5.17
		0.94	4.97
평균	mg/g	0.93	5.24
지표성분 규격	mg/g	0.74~1.12	4.19~6.29

② 금은화 지표성분 분석

	단위	Chlorogenic acid	
		μg/g	μg/g
금은화 추출분말_Lot 1	mg/g	2.29	0.70
		2.71	0.76
		2.45	0.68
금은화 추출분말_Lot 2	mg/g	2.30	0.67
		2.24	0.66
		2.33	0.68
금은화 추출분말_Lot 3	mg/g	2.92	0.71
		3.10	0.69
		2.71	0.63
평균	mg/g	2.56	0.69
지표성분 규격	mg/g	2.05~3.07	0.55~0.83

③ 석창포 지표성분 분석

	단위	Asarone	
		p-asarone	α-asarone
석창포추출물분말_Lot 1	mg/g	1.92	0.064
		1.91	0.064
		1.90	0.064
석창포추출물분말_Lot 2	mg/g	1.90	0.065
		1.92	0.065
		1.90	0.063
석창포추출물분말_Lot 3	mg/g	1.91	0.064
		1.91	0.064
		1.92	0.065
평균	mg/g	1.91	0.06
지표성분 규격	mg/g	1.53~2.29	0.05~0.07

④ 익모초 지표성분 분석

	단위	Leonturine	
		μg/g	μg/g
익모초 추출분말_Lot 1	mg/g	5.64	1.71
		5.20	1.99
		5.24	1.91
익모초 추출분말_Lot 2	mg/g	4.32	1.82
		5.05	1.91
		4.95	1.89
익모초 추출분말_Lot 3	mg/g	4.98	1.92
		4.97	1.83
		4.83	1.79
평균	mg/g	5.02	1.86
지표성분 규격	mg/g	4.02~6.02	1.49~2.23

2.2.2 Pilot scale 원료 유해물질 분석

① 중금속

소재	비소		
	비소	카드뮴	납
석창포 추출분말_Lot 1	0.53	0.01	0.08
석창포 추출분말_Lot 2	0.56	0.01	0.08
석창포 추출분말_Lot 3	0.51	0.01	0.07
석창포	0.53	0.01	0.07
초석잠 추출분말_Lot 1	0.28	불검출	0.07
초석잠 추출분말_Lot 2	0.27	불검출	0.07
초석잠 추출분말_Lot 3	0.26	불검출	0.06
초석잠	0.27	불검출	0.07
익모초 추출분말_Lot 1	0.25	0.01	0.06
익모초 추출분말_Lot 2	0.25	0.01	0.06
익모초 추출분말_Lot 3	0.26	0.01	0.07
익모초	0.25	0.01	0.06
금은화 추출분말_Lot 1	0.12	0.04	0.05
금은화 추출분말_Lot 2	0.09	0.04	0.05
금은화 추출분말_Lot 3	0.08	0.03	0.03
금은화	0.10	0.04	0.04

② 곰팡이독소

총 아플라톡신(B1, B2, G1, G2의 합)

시도병	단위	Lot 1	Lot 2	Lot 3
석창포 추출분말	µg/kg	불검출	불검출	불검출
초석잠 추출분말	µg/kg	불검출	불검출	불검출
금은화 추출분말	µg/kg	불검출	불검출	불검출
익모초 추출분말	µg/kg	불검출	불검출	불검출

③ 잔류농약 510종

시도병	단위	Lot 1	Lot 2	Lot 3
석창포 추출분말	mg/kg	불검출	불검출	불검출
초석잠 추출분말	mg/kg	불검출	불검출	불검출
금은화 추출분말	mg/kg	불검출	불검출	불검출
익모초 추출분말	mg/kg	불검출	불검출	불검출

- 식품의 기준 및 규격 제 1. 총칙 2. 기준 및 규격의 적용 7)에 따라 정량한계(0.01 mg/kg) 미만 불검출 처리

④ 유해물질 시험 방법

□ 납

「건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-25호)」, [별표 4] 시험법 적용표에

따라 「식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-48호)」, 제8. 일반시험법, 9. 식품

중 유해물질 시험법, 9.1 중금속 시험법에 따라 시험한다.

□ 비소

「건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-25호)」, [별표 4] 시험법 적용표에 따라 「식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-48호)」, 제8. 일반시험법, 9. 식품 중 유해물질 시험법, 9.1 중금속 시험법에 따라 시험한다.

□ 카드뮴

「건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-25호)」, [별표 4] 시험법 적용표에 따라 「식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-48호)」, 제8. 일반시험법, 9. 식품 중 유해물질 시험법, 9.1 중금속 시험법에 따라 시험한다.

□ 곰팡이독소(총 아플라톡신)



「건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-25호)」, [별표 4] 시험법 적용표에 따라 「식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-48호)」, 제8. 일반시험법, 9. 식품 중 유해물질 시험법 9.2 곰팡이독소 9.2.9 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2), 오크라톡신 A, 제랄레논, 푸모니신(B1, B2) 동시분석법에 따라 시험한다.

□ 잔류농약


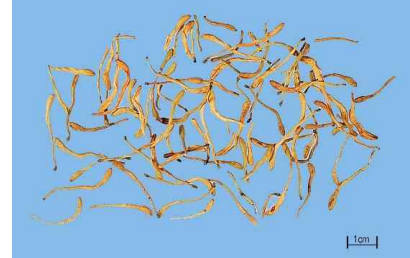
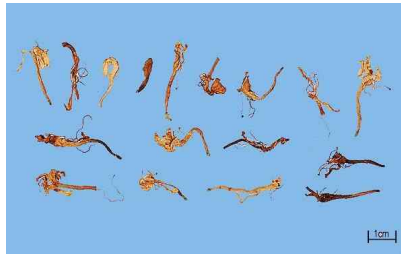
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(제2021-66호)」에 따라 「수입식품 등 검사에 관한 규정(제2022-19호)」, [별표 3] 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목 중 동시다분석 검사대상(69종)을 「식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처고시 제2022-48호)」 제8. 일반시험법, 7. 식품 중 잔류농약 분석법, 7.1 식품일반, 7.1.2 다성분 시험법 7.1.2.2 다성분 시험법-제2법 및 7.1.2.7 아조사이클로틴(Azocyclotin) 및 사이헥사틴(Cyhexatin)에 따라 시험한다.

2.3 Pilot scale 원료 관능검사 규격설정




① 석창포

항목	내용																		
라틴 생약명	Acori Graminei Rhizoma																		
기원	이 약은 석창포 <i>Acorus gramineus</i> Solander (천남성과 Araceae)의 뿌리줄기이다.																		
공정서	대한민국약전외한약(생약)규격집																		
감별요점	<table border="1"> <tr> <td>약용부위</td> <td>뿌리줄기</td> </tr> <tr> <td>전체모양</td> <td>약간 납작한 끈 모양이고 약간 구부러졌고 때로 가지가 갈린다.</td> </tr> <tr> <td>질감</td> <td>질기고 꺾기 쉽다.</td> </tr> <tr> <td>크기</td> <td>길이 10 - 20 cm, 지름 3 - 10 mm</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">바깥면</td> <td>연한 황갈색 - 황적색</td> </tr> <tr> <td>마디가 많으며 삼각형의 잎 자국이 좌우로 엇갈려서 배열하고 있다. 마디에는 때로 털 모양을 한 비늘잎 자국이 있고 마디 사이에는 세로무늬가 있다.</td> </tr> <tr> <td>아래쪽에는 뿌리 자국이 있고 때로 짧은 뿌리가 남아 있는 것도 있다.</td> </tr> <tr> <td>잘린면</td> <td>꺾은 면은 섬유성이며 연한 황갈색 - 회백색이다.</td> </tr> <tr> <td>냄새</td> <td>특이한 방향이 있다.</td> </tr> <tr> <td>맛</td> <td>맛은 조금 쓰다.</td> </tr> </table>	약용부위	뿌리줄기	전체모양	약간 납작한 끈 모양이고 약간 구부러졌고 때로 가지가 갈린다.	질감	질기고 꺾기 쉽다.	크기	길이 10 - 20 cm, 지름 3 - 10 mm	바깥면	연한 황갈색 - 황적색	마디가 많으며 삼각형의 잎 자국이 좌우로 엇갈려서 배열하고 있다. 마디에는 때로 털 모양을 한 비늘잎 자국이 있고 마디 사이에는 세로무늬가 있다.	아래쪽에는 뿌리 자국이 있고 때로 짧은 뿌리가 남아 있는 것도 있다.	잘린면	꺾은 면은 섬유성이며 연한 황갈색 - 회백색이다.	냄새	특이한 방향이 있다.	맛	맛은 조금 쓰다.
약용부위	뿌리줄기																		
전체모양	약간 납작한 끈 모양이고 약간 구부러졌고 때로 가지가 갈린다.																		
질감	질기고 꺾기 쉽다.																		
크기	길이 10 - 20 cm, 지름 3 - 10 mm																		
바깥면	연한 황갈색 - 황적색																		
	마디가 많으며 삼각형의 잎 자국이 좌우로 엇갈려서 배열하고 있다. 마디에는 때로 털 모양을 한 비늘잎 자국이 있고 마디 사이에는 세로무늬가 있다.																		
	아래쪽에는 뿌리 자국이 있고 때로 짧은 뿌리가 남아 있는 것도 있다.																		
잘린면	꺾은 면은 섬유성이며 연한 황갈색 - 회백색이다.																		
냄새	특이한 방향이 있다.																		
맛	맛은 조금 쓰다.																		
참고	<ol style="list-style-type: none"> 중국약전에는 석창포의 기원식물이 석창포(石菖蒲) <i>A. tatarinowii</i> Schott.로 되어 있는데, <i>Acorus gramineus</i>와 유사종으로 생각된다. 수창포(水菖蒲) : 창포 <i>A. calamus</i> var. <i>angustatus</i> Bess.의 뿌리줄기. 비교적 거칠고 크며 분지하기도 함. 단면은 거의 편평하고 해면상으로 유백색 - 담갈색을 띤다 감별요점: 석창포(石菖蒲)는 질이 단단하고 향기가 강하다. 뿌리마디가 수창포에 비하여 촘촘하게 나 있다. 석창포의 마디 사이 거리는 0.2 - 0.8 cm이고 수창포의 마디사이 거리는 1 - cm이다. 절단시에는 수창포와 구별이 어려우므로 원형으로 수입해야 한다. 잎의 잔기와 잔뿌리, 토사 등의 이물이 5.0 % 이상 섞여 있지 않아야 한다. 건조감량 13.0 % 이하. 바깥면이 연한 노란색이고 꺾은 면은 흰색에 가깝고 방향이 짙은 것이 좋다. 																		
  																			
<p>석창포</p> <p>마디가 많으며 삼각형의 잎 자국이 좌우로 엇갈려서 배열하고 있다.</p>	<p>석창포 절편</p> <p>섬유성이며 연한 황갈색 - 회백색이다.</p>																		

② 금은화

항목	내용																	
라틴 생약명	Lonicerae Flos																	
기원	기원 이 약은 인동덩굴 <i>Lonicera japonica</i> Thunberg (인동과 Caprifoliaceae)의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃이다.																	
공정서	대한민국약전																	
감별요점	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">약용부위</td> <td>꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃</td> </tr> <tr> <td>전체모양</td> <td>꽃봉오리는 작은 막대 모양 또는 깔때기 모양이고 꽃은 입술모양</td> </tr> <tr> <td>크기</td> <td>길이 15 - 35 mm이고, 윗부분은 지름 약 3 mm, 아랫부분은 지름 약 1.5 mm이다.</td> </tr> <tr> <td>바깥면</td> <td>황백색 또는 녹백색이고 오래 저장한 것일수록 색은 진하다.</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">잘린면</td> <td>확대경으로 볼 때 연한 갈색의 털이 밀생한다.</td> </tr> <tr> <td>꽃받침은 녹색으로 끝이 5 개로 갈라져 있다.</td> </tr> <tr> <td>갈라진 조각은 털이 있고 길이 약 2mm이다.</td> </tr> <tr> <td>수술은 5 개로 노란색이고 암술은 1 개다.</td> </tr> <tr> <td>냄새</td> <td>특유한 냄새가 있다.</td> </tr> <tr> <td>맛</td> <td>담백하며 약간 쓰다.</td> </tr> </table>	약용부위	꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃	전체모양	꽃봉오리는 작은 막대 모양 또는 깔때기 모양이고 꽃은 입술모양	크기	길이 15 - 35 mm이고, 윗부분은 지름 약 3 mm, 아랫부분은 지름 약 1.5 mm이다.	바깥면	황백색 또는 녹백색이고 오래 저장한 것일수록 색은 진하다.	잘린면	확대경으로 볼 때 연한 갈색의 털이 밀생한다.	꽃받침은 녹색으로 끝이 5 개로 갈라져 있다.	갈라진 조각은 털이 있고 길이 약 2mm이다.	수술은 5 개로 노란색이고 암술은 1 개다.	냄새	특유한 냄새가 있다.	맛	담백하며 약간 쓰다.
약용부위	꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃																	
전체모양	꽃봉오리는 작은 막대 모양 또는 깔때기 모양이고 꽃은 입술모양																	
크기	길이 15 - 35 mm이고, 윗부분은 지름 약 3 mm, 아랫부분은 지름 약 1.5 mm이다.																	
바깥면	황백색 또는 녹백색이고 오래 저장한 것일수록 색은 진하다.																	
잘린면	확대경으로 볼 때 연한 갈색의 털이 밀생한다.																	
	꽃받침은 녹색으로 끝이 5 개로 갈라져 있다.																	
	갈라진 조각은 털이 있고 길이 약 2mm이다.																	
	수술은 5 개로 노란색이고 암술은 1 개다.																	
냄새	특유한 냄새가 있다.																	
맛	담백하며 약간 쓰다.																	
참고	<ol style="list-style-type: none"> 1. 줄기와 잎이 5.0 % 이상 혼입되어서는 안 된다. 2. 완전 개화한 꽃은 부적합품이다. 3. 중국에서는 <i>Lonicera macranthoides</i> Hand.-Mazz., <i>Lonicera hypoglauca</i> Miq., <i>Lonicera confusa</i> DC 등을 산은화(山銀花)로 사용하나, 우리는 금은화로 인정하지 않는다 																	
																		
<p style="text-align: center;">금은화</p> <p>작은 막대 - 깔때기 모양의 꽃봉오리이다.</p>		<p>금은화 개화 - 부적합품</p> <p>완전 개화한 꽃은 부적합품이다.</p>																

③ 익모초

항목	내용																				
라틴 생약명	Leonuri Herba																				
기원	이 약은 익모초 <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn (꿀풀과 Labiatae)의 지상부로서 꽃이 피기 전 또는 꽃이 필 때 채취한 것이다.																				
공정서	대한민국약전																				
감별요점	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">약용부위</td> <td>지상부</td> </tr> <tr> <td>전체모양</td> <td>네모난 줄기와 여기에 달린 잎과 꽃으로 되어 있다.</td> </tr> <tr> <td>질감</td> <td>질은 가볍다.</td> </tr> <tr> <td>크기</td> <td>줄기는 길이 30 - 60 cm, 지름 1 - 5 mm</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">바깥면</td> <td>줄기 황록색 - 녹갈색을 띠며, 희고 짧은 털이 촘촘히 나 있다.</td> </tr> <tr> <td>잎 3심열 - 전열로 줄기에 마주나서 붙어 있다. 윗면은 연한 녹색을 띠며 아랫면은 흰색의 짧은 털이 촘촘히 나고 회록색이다.</td> </tr> <tr> <td>꽃 전체</td> <td>잎겨드랑이에 윤생으로 촘촘히 난다. 꽃받침 : 통모양으로 끝이 5갈래로 갈라지며 연한 녹색 - 녹갈색이다.</td> </tr> <tr> <td>잘린면</td> <td>줄기의 껍은 면에는 흰색의 커다란 수가 있다.</td> </tr> <tr> <td>냄새</td> <td>특유한 냄새가 약간 있다.</td> </tr> <tr> <td>맛</td> <td>쓰고 수렴성이 있다.</td> </tr> </table>		약용부위	지상부	전체모양	네모난 줄기와 여기에 달린 잎과 꽃으로 되어 있다.	질감	질은 가볍다.	크기	줄기는 길이 30 - 60 cm, 지름 1 - 5 mm	바깥면	줄기 황록색 - 녹갈색을 띠며, 희고 짧은 털이 촘촘히 나 있다.	잎 3심열 - 전열로 줄기에 마주나서 붙어 있다. 윗면은 연한 녹색을 띠며 아랫면은 흰색의 짧은 털이 촘촘히 나고 회록색이다.	꽃 전체	잎겨드랑이에 윤생으로 촘촘히 난다. 꽃받침 : 통모양으로 끝이 5갈래로 갈라지며 연한 녹색 - 녹갈색이다.	잘린면	줄기의 껍은 면에는 흰색의 커다란 수가 있다.	냄새	특유한 냄새가 약간 있다.	맛	쓰고 수렴성이 있다.
약용부위	지상부																				
전체모양	네모난 줄기와 여기에 달린 잎과 꽃으로 되어 있다.																				
질감	질은 가볍다.																				
크기	줄기는 길이 30 - 60 cm, 지름 1 - 5 mm																				
바깥면	줄기 황록색 - 녹갈색을 띠며, 희고 짧은 털이 촘촘히 나 있다.																				
	잎 3심열 - 전열로 줄기에 마주나서 붙어 있다. 윗면은 연한 녹색을 띠며 아랫면은 흰색의 짧은 털이 촘촘히 나고 회록색이다.																				
꽃 전체	잎겨드랑이에 윤생으로 촘촘히 난다. 꽃받침 : 통모양으로 끝이 5갈래로 갈라지며 연한 녹색 - 녹갈색이다.																				
잘린면	줄기의 껍은 면에는 흰색의 커다란 수가 있다.																				
냄새	특유한 냄새가 약간 있다.																				
맛	쓰고 수렴성이 있다.																				
참고	<ol style="list-style-type: none"> 1. 여름에 줄기와 잎이 무성하고 꽃이 피기 전 또는 꽃이 피기 시작할 때 채취하여別に 말리거나 절단하여別に 말린다. 2. 질이 연하고 잎이 많고 색깔이 회록색인 것이 좋다. 3. 1년생 익모초는 사용할 수 없다 																				
																					
<p style="text-align: center;">익모초 절편</p> <p>네모난 줄기와 여기에 달린 잎, 꽃으로 되어 있다.</p>	<p style="text-align: center;">익모초 줄기 바깥면</p> <p>황록색 - 녹갈색을 띠다</p>	<p style="text-align: center;">익모초 전형(채집품)</p> <p>잎은 줄기에 대생으로 붙어 있고, 꽃은 엽액에서 윤생으로 밀생한다.</p>																			

3.1 분석법 검증 (Validation)

3.1.1 석창포 중 α , β -Asarone

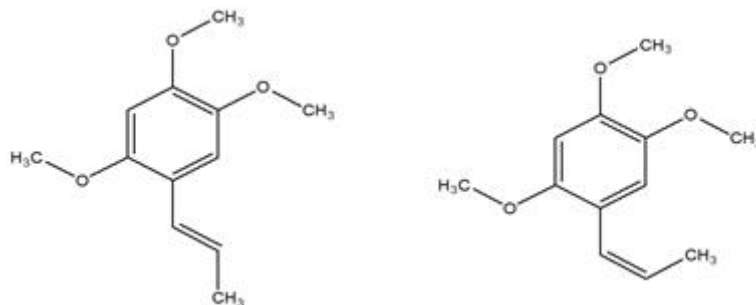
(1) 전체 요약

작성일	2021.09.29	해당분야	화학시험	부서	안전센터
항목	α , β -asarone				
검증목적	석창포 및 추출물 중 α , β -asarone 분석에 적용하는 것에 그 목적이 있다.				
시험방법	안전센터 시험방법지시서 (KDFR-SOP-C-095)				
수행도 인자값	수행도 인자	평가기준 또는 평가방법	결과	판정	
	정확도(Accuracy) (인증값 또는 회수율)	회수율 80 ~ 110 % 이하	α -asarone:95.96 ~ 97.87 % β -asarone:98.70 ~ 99.68 %	적합	
	정밀도(Precision) (Repeatability)	상대표준편차 (RSD) 5 % 이하	α -asarone:2.14% β -asarone:1.09%	적합	
	정량한계(LOQ)	10 σ /s	α -asarone:0.178 μ g/mL β -asarone:0.106 μ g/mL	적합	
	검출한계(LOD)	3.3 σ /s	α -asarone:0.059 μ g/mL β -asarone:0.035 μ g/mL	적합	
	직선성/범위 (Linearity/Range)	$r^2 > 0.99$	0.999 이상 (α -asarone: 0.63 ~ 201.65 μ g/mL) (β -asarone: 0.60~ 191.82 μ g/mL)	적합	
	-	-	-	-	
검토결과	석창포 및 추출물 중 α , β -asarone 분석결과의 신뢰성을 확보하고자 직선성, 정확성 및 정밀성 등을 식약처 시험법 검증 가이드라인에 준하여 분석방법의 유효성을 검증한 결과 분석에 적합함.				

(2) 분석법 검증 상세내용

1. 서론

석창포(*Acorus gramineus* Solander)는 정신신경계 질환에 널리 쓰이는 한약재로 사용부위는 뿌리줄기이며, 물추출물에 한하여 식품에 제한적으로 사용할 수 있다. 석창포의 효능연구는 주로 뿌리의 정유성분을 대상으로 중추신경계 기능, 흥분 발작증상 및 장관수축 억제 작용 등이 보고되어 있으며 그 외 약리작용으로는 진정, 건위, 진통, 이뇨, 소화, 뇌신경 보호작용을 하는 것으로 알려져 있다. 석창포의 정유성분은 약 0.1 ~ 0.4 %로 주성분은 β -asarone이며 그 외 α -asarone, caryophyllene, sekishon, isoasarone, safrole, methylisoeugenol 등이 보고되었다.(Korean J.FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 45, No. 3, pp. 279 ~ 287(2013))



[Figure 1. α -asarone 및 β -asarone의 구조]

석창포 원물 및 물추출물등에 대한 지표성분 함량분석 및 기준설정을 위해 식품의약품안전처 생약연구과 자료 및 문헌 등을 참고하여 지표성분 2종(α , β -asarone)의 시험법 확립 및 검증을 수행하였다. 검증시료는 물추출물분말(50 % 덱스트린 분말함유)을 사용하였다.

1.1 분리분석조건 확립

기존의 이화학분석 연구로는 HPLC, GC-MS, GC-FID 등이 사용되었으며, 이를 참고하여 지표성분 2종의 분리분석이 가능하며 물질의 고유스펙트럼확인이 가능한 HPLC-PDA를 선정하여 분석조건 확립을 수행하였다. 이동상은 물질의 특성 및 문헌들을 참고하여 0.1% 인산과 아세트 니트릴을 선정하였으며, 기울기용리를 사용하여 분리하였다. 검출 파장은 지표물질의 스펙트럼을 확인하여 특이성과 정량범위들을 고려하여 250 nm를 선정하였다.

1.2 추출조건(용매) 확립

기존 연구에 따르면 석창포 원물의 경우 주로 메탄올을 사용하여 추출한다. 그러나 식품원료로 사용하기 위해서는 물을 이용한 추출물만을 사용할 수 있으며 이를 분말화 하기 위해 덱스트린이 첨가된다. 이를 고려하여 물과 메탄올 그리고 혼합용매 3종을 이용하여 추출 용매별 지표성분 2종의 함량 비교분석을 진행하였다. 추출방법은 30분간 초음파 추출한다. 75 % 메탄올과 50% 메탄올에서 유사한 결과를 나타내었으나, 75% 메탄올의 경우 시료 뭉침 현상이 나타나 최종적으로 50 %메탄올을 추출용매로 선정하였다.

Table 1. 추출용매 별 지표성분 2종 함량

	100 % MeOH	75 % MeOH	50 % MeOH	25 % MeOH	DW
β -asarone	3.75 ± 0.08	3.93 ± 0.02	3.93 ± 0.02	3.87 ± 0.00	3.67 ± 0.04
α -asarone	0.12 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00

1.3 시료 량에 따른 함량 변화 확인

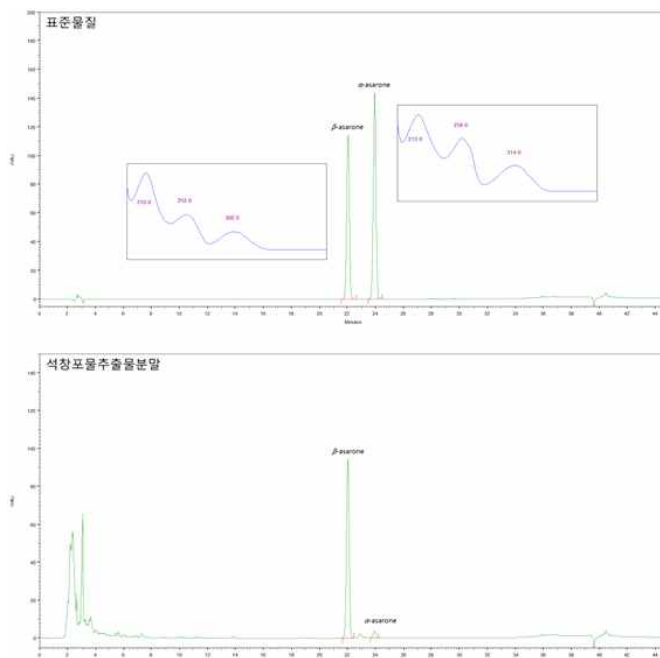
시료량에 따른 추출효율 변화를 확인하기 위하여 기준시료량(1.0 g)을 기준으로 50 %, 150 %의 시료량에 대한 함량 평가를 진행하였다. 분산 분석결과 주성분인 β -asarone의 p-value 는 0.05 이상으로 시료량에 따른 함량의 유의적 차이는 없는 것으로 판단하였다.

선정된 HPLC 분석조건과 추출조건을 이용하여 지표성분 2종에 대한 시험법 검증을 수행하였다.

2. α , β -asarone 시험법 검증

2.1 시료 전처리 및 분석조건

시료의 전처리 및 분석조건은 석창포 중 α , β -asarone 시험방법지시서 (KDFR-SOP-C-095, Ver.00)에 따라 수행하였다. 시험방법지시서에 따라 분석한 표준물질과 시료의 크로마토그램은 그림 2에 나타냈다.



[Figure 2. 표준물질 및 샘플의 크로마토그램]

2.2 시험법 검증 결과

1) 직선성(Linearity), 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantification, LOQ)
표준물질을 이용하여 0.625 ~ 200 µg/mL의 농도 범위에서 직선성을 확인하였다. 7개의 농도범위에서 결정계수(r^2)는 0.999 이상임을 확인하였다. (Table 2)

검출한계와 정량한계는 기울기의 평균과 y-절편의 표준편차를 이용한다, 검출한계는 $3.3\sigma/S$ (σ : standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S: slope of a calibration curve), 정량한계는 $10\sigma/S$ 의 수식에 의해 확인하였다. 검출한계 및 정량한계는 Table 2에 나타냈다.

Table 2. α , β -asarone 직선성 및 검출/정량한계

	직선성 범위($\mu\text{g/mL}$)	결정계수(r^2)	검출한계($\mu\text{g/mL}$)	정량한계($\mu\text{g/mL}$)
α -asarone	0.63 ~ 201.65	0.999	0.059	0.178
β -asarone	0.60~ 191.82	0.999	0.035	0.106

2) 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

정밀성 확인을 위하여 석창포 물추출물분말(50% 덱스트린함유)을 이용하여 3회 반복 시험한 결과의 상대표준편차(Relative Standard Deviation, %)로 평가하였다. 시료 중 α , β -asarone 함량의 상대표준편차는 5 % 이내로 시험법의 정밀성을 확인하였다. (Table 3)

정확성을 확인하기 위하여 석창포 물추출물분말(50% 덱스트린함유)에 표준물질을 첨가하여 회수율(recovery)을 평가하였다. ($n=3$) 회수율은 95 ~ 100 % 수준으로 분석에 적합함을 확인하였다. (Table 3)

Table 3. α , β -asarone 시험법 정확성 및 정밀성

	Accuracy			Precision	
	Sample conc. (mg/g)	Spiked conc. (mg/g)	Detected conc. (mg/g)	Recovery (%)	Intra-day (RSD %)
α -asarone		0.050	0.154 ± 0.00	97.87 ± 0.84	2.14
		0.504	0.594 ± 0.00	97.22 ± 0.78	
	0.11 ± 0.00	0.252	2.569 ± 0.07	97.77 ± 2.49	
		5.041	4.955 ± 0.04	96.25 ± 0.77	
		7.562	7.358 ± 0.06	95.96 ± 0.76	
β -asarone		0.048	3.97 ± 0.01	99.33 ± 0.15	1.09
		0.480	4.40 ± 0.00	99.35 ± 0.07	
	3.95 ± 0.04	2.398	6.33 ± 0.03	99.68 ± 0.44	
		4.796	8.70 ± 0.04	99.46 ± 0.45	
		7.193	11.00 ± 0.07	98.70 ± 0.61	

2.3 관련제품 분석

검증된 시험법을 이용하여 석창포 원물 2종, 물추출물, 물추출물분말을 분석한 결과는 아래와 같다.

	단위	분석결과	
		α -asarone	β -asarone
석창포 원물 2	mg/100g	0.124 ± 0.00	15.59 ± 0.35
석창포 원물 1	mg/100g	0.142 ± 0.00	13.75 ± 0.44
석창포 원물 1_물추출물	mg/g	0.014 ± 0.00	0.31 ± 0.00
석창포 원물 1_물추출물분말	mg/g	0.128 ± 0.00	3.95 ± 0.04

3. 결론

석창포 중 지표물질 2종(α , β -asarone) 함량분석법 검증을 위하여 표준물질을 이용하여 직선성을 확인하였을 때 0.625 ~ 200 μ g/mL 농도범위 내에서 결정계수 0.99 이상임을 확인하였다. 석창포 물추출물분말을 이용하여 지표성분 2종의 정밀성과 정확성을 확인한 결과 반복시험에 대한 상대표준편차는 5 % 이하, 회수율 80 ~ 110 % 이내로 시험법의 유효함을 검증하였다.

3.1.2 초석잠 중 Choline

(1) 전체요약

작성일	2021.10.12	해당분야	화학시험	부서	안전센터
항목	Choline				
검증목적	초석잠 및 추출물 중 Choline 분석에 적용하는 것에 그 목적이 있다.				
시험방법	안전센터 시험방법지시서 (KDFR-SOP-C-096)				
수행도 인자값	수행도 인자	평가기준 또는 평가방법	결과	판정	
	정확도(Accuracy) (인증값 또는 회수율)	회수율 80 ~ 110 % 이하	91.38 ~ 99.82 %	적합	
	정밀도(Precision) (Repeatability)	상대표준편차 (RSD) 5 % 이하	1.95 %	적합	
	정량한계(LOQ)	10 σ /s	0.15 ng /mL	적합	
	검출한계(LOD)	3.3 σ /s	0.45 ng /mL	적합	
	직선성/범위 (Linearity/Range)	$r^2 > 0.99$	0.997 이상 (농도범위: 1.28 ~ 206.13 ng/mL)	적합	
검토결과	초석잠 및 추출물 중 Choline 분석결과의 신뢰성을 확보하고자 직선성, 정확성 및 정밀성 등을 식약처 시험법 검증 가이드라인에 준하여 분석방법의 유효성을 검증한 결과 분석에 적합함.				

(2) 분석법 검증 상세내용

1. 서론

초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)은 꿀풀과(Labiata) 석잠풀속(*Stachys* Linne)의 약용식물로 중국, 일본, 러시아 등에서 주로 재배된다. 산지의 풀밭에서 자라는 1년생 본초로 뿌리는 가을에 3 ~ 6 cm 정도로 자라는데 누에모양을 하고 있어 식물의 동충하초라 불린다. 중국에서는 대표적 장수 채소로서 뇌경색, 기억력 증진, 인지기능저하개선, 노인성 치매등에 유용 소재로 이용되고 있으며, 일본에서도 성인병, 만성병 치료에도 사용된다. 초석잠 주요성분으로는 acetoside, stachyose, stachydrine, choline, Phenylethanoid glycosides 등이 있으며 치매와 기억력 증진, 장내미생물 증식작용을 통한 면역력 강화에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.

이중 Choline은 기억과 학습의 중추적 역할을 하는 뇌신경전달물질인 아세틸콜린 (acetylcholine, ACh)의 앞 단계의 물질로, 체내 부족은 집중력, 기억력 저하, 인지장애 등을 유발할 수 있다고 알려져 있다. 관련문헌등을 참고하여 초석잠 지표물질을 choline으로 선정하고, 지표성분 함량분석 및 기준설정을 목적으로 시험법 확립 및 검증을 수행하였다. 추가적으로 주성분으로 알려진 stachydrine도 함께 검증을 수행하였다. 검증시료는 초석잠 원물을 사용하였다.



[Figure 1. Choline, stachydrine의 구조]

1.1 분리분석조건 선정

Choline은 친수성, 염기성물질로 HPLC를 사용하여 분석 시 보편적으로 사용되는 C18 컬럼에서는 머무름에 어려움이 있음을 고려하여 극성 고정상을 갖는 HILIC(Hydrophilic interaction chromatography, 친수성 상호작용 액체크로마토그래피) 컬럼을 선정하여 분석에 적용하였다. 또한 구조적으로 흡광을 나타내지 않음을 고려하여 검출기는 질량분석기를 선정하여 분석에 적용하였다.

1.2 추출조건(용매) 확립

관련 문헌, 특허 등을 참고하여 70% 에탄올과 물을 이용하여 choline 함량 비교분석을 진행하였다. 추출방법은 30분간 초음파 추출한다. 함량 비교분석결과 물을 추출용매로 선정하였다. 시료량에 따른 추출효율 변화를 확인하기 위하여 기준시료량(0.5 g)을 기준으로 200%의 시료량에 대한 함량 평가를 진행하였다. 분산 분석결과 choline의 p-value 는 0.05 이상으로 시료량에 따른 함량의 유의적 차이는 없는 것으로 판단하였다.

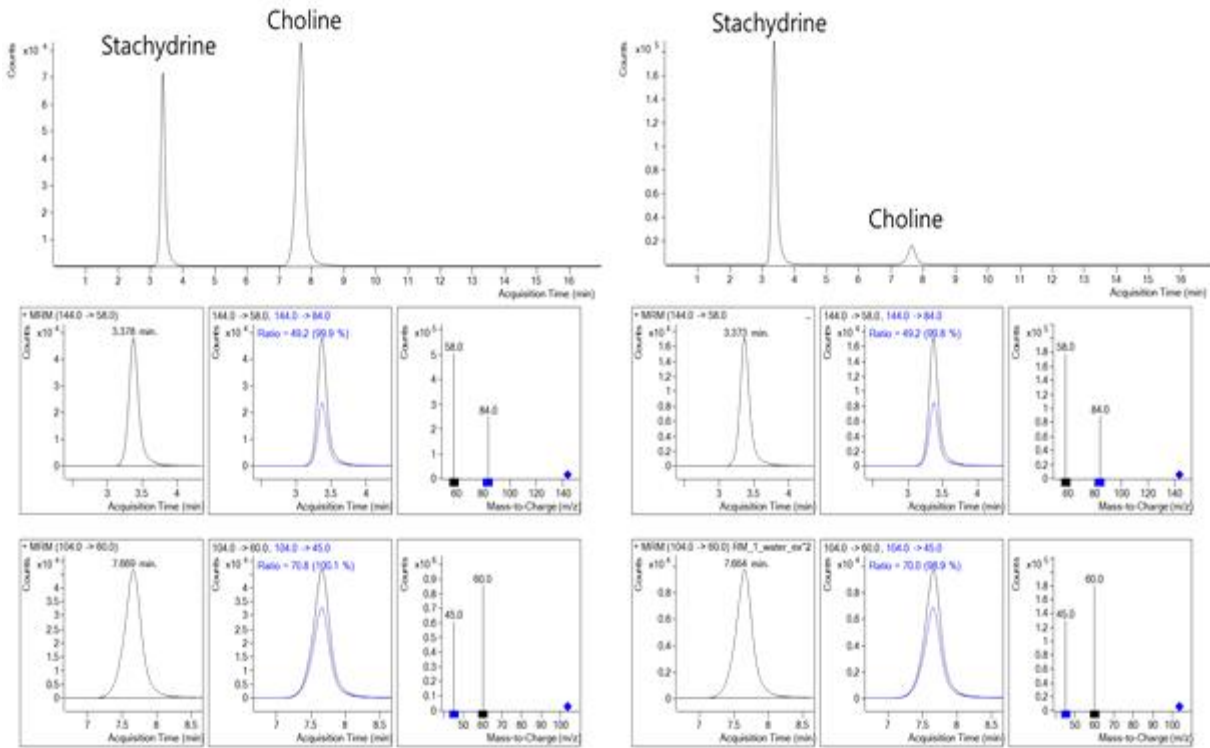
Table 1. 추출용매 별 지표성분 2종 함량

	70 % EtOH	DW
choline	0.78 ± 0.02	0.90 ± 0.01

2. Choline 시험법 검증

2.1 시료 전처리 및 분석조건

시료의 전처리 및 분석조건은 초석잠 중 Choline 시험방법지시서 (KDFR-SOP-C-096, Ver.00)에 따라 수행하였다. 시험방법지시서에 따라 분석한 표준물질의 크로마토그램은 그림 2에 나타냈다.



[Figure 2. 표준물질 및 샘플 크로마토그램]

2.2 시험법 검증 결과

1) 직선성(Linearity), 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantification, LOQ) 표준물질을 이용하여 1 ~ 200 ng/mL의 농도 범위에서 직선성을 확인하였다. 7개의 농도범위에서 결정계수(r^2)는 0.997 이상임을 확인하였다. (Table 2)

검출한계와 정량한계는 기울기의 평균과 y -절편의 표준편차를 이용한다, 검출한계는 $3.3\sigma/S$ (σ : standard deviation of y -intercepts of regression analysis, S : slope of a calibration curve), 정량한계는 $10\sigma/S$ 의 수식에 의해 확인하였다. 검출한계 및 정량한계는 Table 2에 나타났다.

Table 2. Choline 직선성 및 검출/정량한계

	직선성 범위 (ng/mL)	결정계수 (r^2)	검출한계 (ng/mL)	정량한계 (ng/mL)
Choline	1.288 ~ 206.128	0.997	0.144	0.438
Stachydrine	1.294 ~ 207.040	0.999	0.284	0.861

2) 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

정밀성 확인을 위하여 초석잠원물을 이용하여 3회 반복 시험한 결과의 상대표준편차(Relative Standard Deviation, %)로 평가하였다. 시료 중 Choline 함량의 상대표준편차는 5 % 이내로 시험법의 정밀성을 확인하였다. (Table 3)

정확성을 확인하기 위하여 초석잠원물에 표준물질을 첨가하여 회수율(recovery)을 평가하였다. ($n=3$) 회수율은 91 ~ 102 % 수준으로 분석에 적합함을 확인하였다. (Table 3)

Table 3. Choline 시험법 정확성 및 정밀성

Sample conc. (mg/g)	Accuracy			Precision
	Spiked conc. (mg/g)	Detected conc. (mg/g)	Recovery (%)	Intra-day (RSD %)

		0.206	1.053 ± 0.04	96.05 ± 3.44	
Choline	0.88 ± 0.02	1.031	1.833 ± 0.09	95.39 ± 4.81	1.95
		2.061	2.865 ± 0.12	97.06 ± 4.00	
		2.070	13.14 ± 0.12	101.07 ± 0.89	
Stachydrine	10.93 ± 0.31	10.352	20.58 ± 0.35	96.72 ± 1.63	2.81
		20.704	29.22 ± 0.34	92.37 ± 1.06	

2.3 관련제품 분석

검증된 시험법을 이용하여 초석잠 원물 2종, 물추출농축액을 분석한 결과는 아래와 같다.

	단위	분석결과	
		Choline	Stachydrine
석창포 원물 1	mg/g	0.88 ± 0.02	10.93 ± 0.31
석창포 원물 1_물추출농축액	mg/g	0.43 ± 0.02	6.60 ± 0.14
석창포 원물 2	mg/g	0.74 ± 0.01	3.57 ± 0.13

3. 결론

초석잠 중 지표물질 함량분석법 검증을 위하여 표준물질을 이용하여 직선성을 확인하였을 때 1 ~ 200 ng/mL 농도범위 내에서 결정계수 0.99 이상임을 확인하였다. 초석잠 원물을 이용하여 지표성분의 정밀성과 정확성을 확인한 결과 반복시험에 대한 상대표준편차는 5 % 이하, 회수율 80 ~ 110 % 이내로 시험법의 유효함을 검증하였다.

3.1.3 금은화 중 Chlorogenic acid

-금은화의 Chlorogenic acid는 당사 안전센터의 생약지표물질 동시분석에 대한 표준시험법을 활용하였다.

(1) 전체요약

작성일	2021.10.12	해당분야	화학시험	부서	안전센터
항목	Chlorogenic acid				
검증목적	생약 지표물질 4종 동시분석에 대한 표준시험법 신뢰성 확보				
시험방법	안전센터 시험방법지시서 (KDFR-SOP-C-098)				
결과	1. 민감도와 선택성				
	분석물질	직선성범위	상관관계	검출한계 (µg/mL)	정량한계 (µg/mL)
		(µg/mL)	$r \geq 0.99$	LOD = 3.3σ/S	LOQ = 10σ/S
	파에오니플로린 (Paeoniflorin)	0.47 - 93.10	0.999	0.090	0.273
	클로로겐산 (Chlorogenic acid)	0.23 - 45.05	0.999	0.033	0.099
	노다케닌 (Nodakenin)	0.25 - 50.00	0.999	0.020	0.061
데커신 (Decursin)	1.00 - 200.00	0.999	0.005	0.016	

2. 정확도 및 정밀도 평가					
분석물질	매질	정확도			정밀도
		Spiking Con. (µg/mL)	Detected Con. (µg/mL)	회수율 (%)	RSD %
Chlorogenic acid	원물	17.46	15.98 ± 0.53	91.48 ± 3.05	3.34
	물추출물		15.80 ± 0.85	90.47 ± 4.86	5.37
	10% EtOH		16.24 ± 0.26	92.98 ± 1.51	1.62
	20% EtOH		15.17 ± 1.19	86.87 ± 6.83	7.86
	30% EtOH		15.49 ± 0.87	88.69 ± 4.98	5.62
	70% EtOH		15.67 ± 1.23	89.74 ± 7.05	7.85
검토의견	본 시험법 정립보고서는 작약, 천궁, 당귀의 대표적인 지표물질로 알려진 파에오니플로린(Paeoniflorin), 클로로겐산(Chlorogenic acid), 노다케닌(Nodakenin), 데커신(Decursin) 4종 동시분석법의 신뢰성을 확보하고자 직선성, 정확성, 정밀성을 고려하여 분석법에 대한 유효성 검증일 실시했다. 그 결과, 본 동시분석법을 적용하여 위 3종의 생약 원물과 그 것이 함유되어 있는 농축액에 대해 지표물질 4종을 분석하기에 적합했다.				

(2) 분석법 검증 상세내용

1. 서론

식품 개발 시 빈번하게 사용되는 생약의 종류로는 작약, 천궁, 당귀가 있다. 작약(*Paeonia lactiflora*)은 내분비계에 작용하여 혈당을 내리는 효과가 있고, 그 밖에 혈관 확장 작용, 동맥경화 억제효과, 혈압 상승 효과, 고콜레스테롤혈증 억제 효과 등이 있다고 알려져 있다. 천궁(*Ligusticum officinale* (Makino) Kitag)은 혈액순환 개선에 사용되며 혈관을 확장시키고 혈류를 증가시킨다. 그 밖에 혈액응고작용, 중추성 근이완 작용, 항염증 작용 등이 있다. 당귀 (*Angelica gigas*)는 양혈, 보혈작용이 있으며, 혈환 등의 통증을 제거 시킬 수 있다. 생약의 경우 단일로 사용하는 경우 보다는 다수의 약재로 구성된 복합물로서 여러 성분들과 상호작용을 하여 효과를 나타낸다. 따라서, 제품개발 과정 중 생약의 지표성분을 설정하고 동시에 분석하여 성분 스크리닝 및 프로파일링 하는 것이 제품 개발 과정에서 품질을 결정 짓는 중요한 단계라 생각된다.

그러므로 본 표준 시험법에서는 식품 개발 시 빈번하게 사용되는 3종 생약 (작약, 천궁, 당귀)에 대한 지표물질을 설정하고 동시분석법을 구축했다. 3종의 생약 중 작약과 당귀는 생약 공정서 규격이 설정되어 있으며, 천궁은 공정서 규격은 설정되어 있지 않지만 한약재 품질 표준화연구사업단 보고서의 지표물질 후보군이 제시되어 있다 (표 1). 따라서 규격서와 연구보고서, 연구문헌을 참고하여 표준품 수급의 용이성 및 동시분석이 가능여부 등에 대해 검토하고 작약의 파에오니플로린 (Paeoniflorin), 작약의 클로로겐산 (Chlorogenic acid), 당귀의 노다케닌 (Nokakenin), 데커신 (Decursin)을 대표적인 지표물질로 설정하고 4종 동시분석법을 구축했다. 구축한 분석법은 유효성 검증을 실시했으며 분석법을 적용하여 생약뿐 아니라 생약이 함유되어 있는 농축액에서의 지표물질 4종 함량 수준을 모니터링 했다.

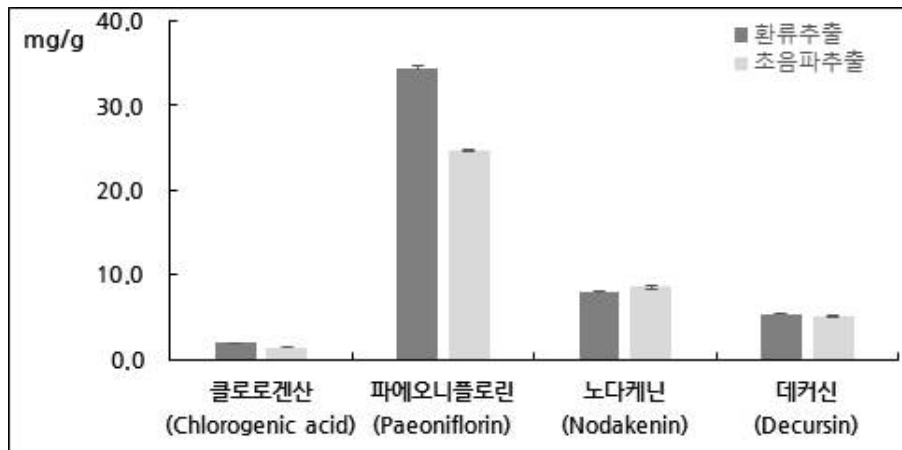
2. 분석조건 및 전처리 방법

먼저, 분석법에 대한 최적화를 위해 한약재 품질 표준화사업단 자료집과 Seo *et al* (Simultaneous quantification of eight marker compounds in Yongdamsagan-Tang), Islam *et al* (A validated LC method for simultaneous determination of phenolic, coumarin and phthalide compounds in the ethanolic extract of *Angelica tenuissima*) 등의 문헌을 참고했다.

분석을 하고자 하는 4종류의 화합물 모두 C18 컬럼에서 분리가 가능하며, 이동상은 물과 아세트니트릴에 0.1% 인산을 첨가한 것으로 하여 시간에 따른 기울임 용리 (Gradient system)를 이용하였다. 검출기 파장은 파에오니플로린의 경우 230 nm가 최적 파장이며, 클로로겐산, 노다케닌, 데커신은 325 nm가 최적 파장 이기 때문에 두 종류의 파장을 설정했다. 표 2에 생약 지표물질 4종에 대한 HPLC 분석조건을 나타냈으며, 그에 따른 크로마토그램을 그림 2에 나타냈다.

두번째, 시료 전처리 방법에 대해 최적화를 실시했다. 80% 메탄올을 추출용매로 하고 환류추출 (85 °C, 3시간) 과 초음파 추출 (sonicator 이용, 60분)을 비교하여 검토한 결과, 클로로겐산, 노다케닌, 데커신은 추출법에 따라 그 함량 차이가 나지 않았으나, 파에오니플로린은 환류추출을 수행했을 때 그 함량이 증가했으므로, 파에오니플로린 추출효율을 고려하여 환류 추출법 (85 °C, 3시간)을 시료 전처리 방법으로 선정했다 (그림 2).

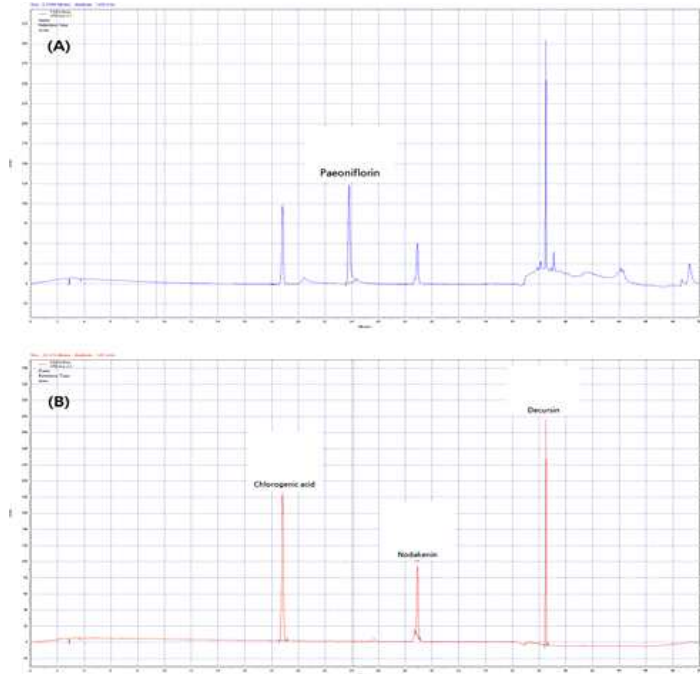
생약 3종에 대한 지표물질 4종 분석을 위한 HPLC 분석조건과 자세한 시료 전처리 방법 및 분석조건은 안전센터 시험방법 지시서 KDFR-C-80에 나타냈다.



[그림 2. 지표물질 4종 분석을 위한 추출방법 비교]

표 1. 생약지표물질 4종 HPLC 분석조건

컬럼	Shiseido Capcell Pak C18 UG120 (4.6 ID x 150 mm, 5 um)		
검출기	PDA (Paeoniflorin - 230 nm, Chlorogenic acid, Nodakenin, Decursin - 325 nm)		
컬럼 온도	35 °C		
유속	1.0 mL/min		
주입량	5 µL		
이동상	A: 증류수 (0.1% 인산), B: 아세트니트릴 (0.1% 인산)		
	시간 (분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
	0	100	0
	30	75	25
	33	75	25
	35	0	100
	40	0	100
50	100	0	



[그림 3. 생약 지표물질 4종 동시분석 크로마토그램 (A) PDA 230 nm, (B) 325 nm]

3. 분석법 검증 결과

3.1 직선성, 검출/정량한계

확립한 분석법은 직선성, 검출한계 (Limit of Detection, LOD), 정량한계 (Limit of Quantification, LOQ)를 산출하여 분석물질의 민감도와 선택성에 대한 평가를 수행하고 그 결과를 표 3에 나타냈다. 원료 및 원료가 함유 농축액에서 각 각 분석물질 함량에 대해 예비실험을 실시하여, 직선성 범위 안에 포함될 수 있게 설정했다. 그 결과, 직선성에 대한 상관계수 (Correlation, r)는 0.99 이상을 나타냈다.

정성한계는 $3.3 s/S$ (s : standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S : slope of a calibration curve)의 수식에 의해 산출 했을 때, 분석물질에 따라 다르지만 0.005 – 0.090 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타냈다. 정량한계는 $10 s/S$ (s : standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S : slope of a calibration curve)에 따라 산출 했으며, 이 때 0.061 – 0.273 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위를 나타냈다.

표 2. 생약 지표물질 4종의 직선성, 정성 및 정량한계

분석물질	직선성 범위	상관계수	정성한계	정량한계
	($\mu\text{g/mL}$)	(R)	($\mu\text{g/mL}$)	
파에오니플로린	0.47 – 93.10	0.99	0.090	0.273
클로로겐산 (금은화)	0.23 – 45.05	0.99	0.033	0.099
노다케닌	0.25 – 50.00	0.99	0.020	0.061
데커신	1.00 – 200.00	0.99	0.005	0.016

3.2 정밀도 및 정확도

구축한 표준시험법의 정확도와 정밀도는 생약 3종과 생약이 함유되어 있는 농축액을 매질로 하여 평가를 수행했다.

먼저, 시험법의 정밀도는 지정된 조건에서 시행된 반복적 시험결과의 근접한 정도로서 상대표준편차 (Relative Standard Deviation, RSD %)로 나타내며 실험의 효과를 의미한다. 정밀도 측정 시 첨가된 표준용액의 농도는 시료에서 검출된 시험용액의 농도를 고려했다. 이 때, 정밀도 RSD

%는 분석물질에 따라 다르지만 0.48 - 6.84%를 나타냈다.

시험법의 정확도는 생약 원료와 농축액을 매질로 했다. 분석물질이 당귀, 감초, 작약의 대표 지표물질이기는 하지만, 서로 다른 생약과의 간섭효과가 있을 수 있기 때문에 분석하고자 하는 생약원료 각 각에 대해 분석물질의 혼합표준용액을 첨가하여 분석방법의 전 조작을 수행하여 표준용액이 회수되는 정도를 산출함으로써, 간섭효과를 함께 평가할 수 있다. 그 결과, 회수율은 매질과 분석물질에 따라 다르지만 83.87 - 107.66%의 범위를 나타냈다.

AOAC 분석법 가이드라인에 허용되는 RSD%는 표준용액 농도가 10 µg/mL 일 때 7.3%, 100 µg/mL 일 때 5.3% 이내 이며, 회수율의 기준 범위는 10 µg/mL로 첨가했을 때 권고 회수율 범위는 80 - 110%이므로 본 시험법의 정밀도와 정확도 결과는 AOAC 시험법 검증 가이드라인 권고 회수율 범위에 적합하다.

표 3. 생약 지표물질 4종 동시분석법중 클로로겐산 정확도 및 정밀도 평가

분석물질	매질	정확도			정밀도 (RSD %)
		Spiking Con. (µg/mL)	Detected Con. (µg/mL)	회수율 (%)	
클로로겐산 (Chlorogenic acid)	원물	17.46	15.98 ± 0.53	91.48 ± 3.05	3.34
	물추출물		15.80 ± 0.85	90.47 ± 4.86	5.37
	10% EtOH		16.24 ± 0.26	92.98 ± 1.51	1.62
	20% EtOH		15.17 ± 1.19	86.87 ± 6.83	7.86
	30% EtOH		15.49 ± 0.87	88.69 ± 4.98	5.62
	70% EtOH		15.67 ± 1.23	89.74 ± 7.05	7.85

4. 분석법 적용

구축한 동시분석법을 적용하여 작약, 천궁, 당귀 생약 원물 및 혼합농축액 2종에 대해 지표물질 함량을 정량 하여 표 4에 나타냈다. 결과, 생약이 복합적으로 함유되어 있는 농축액에는 지표물질 4종이 모두 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다. 생약 단일로 분석 결과에서 작약은 파에오니플로린, 천궁은 클로로겐산, 당귀는 노다케닌과 데커신이 가장 높게 나타나 지표물질임을 확인할 수 있었다. 하지만, 데커신을 제외한 파에오니플로린, 클로로겐산, 노다케닌은 다른 생약에도 그 함량이 미량 검출된 것을 확인 할 수 있었다. 노다케닌의 경우 당귀뿐 아니라 천궁에도 함유되어 있는 것을 확인 할 수 있었는데, 노타케닌은 쿠마린 (Coumarin) 계열의 화합물로 당귀, 방풍, 강활 등 다양한 식물에 함유되어 있다는 연구 결과가 있다. 뿐만 아니라 기능성농식품자원정보 서비스 자료에 의하면 천궁의 활성 성분으로 노다케닌, 클로로겐산, 파에오니플로린을 제시하고 있다. 따라서 본 분석법에서 제시한 지표물질 4종은 생약에 함유되어 있는 성분을 의미하는 것이며, 지표물질이 생약 진위여부를 판별하는 화합물은 아님을 확인 할 수 있다. 따라서 제품 개발 단계에서 생약의 지표물질 함량 및 간섭을 평가하는 방법으로 활용 할 수 있을 것이다.

표 4. 생약 및 농축액의 생약지표물질 4종 중 클로로겐산 함량 모니터링

시료명	지표물질(클로로겐산) 함량 (mg/g)
금은화 원물	16.96 ± 0.24
금은화 물추출물	6.04 ± 0.02
금은화 10% EtOH 추출	2.86 ± 0.00
금은화 20% EtOH 추출	6.66 ± 0.17
금은화 30% EtOH 추출	4.99 ± 0.02
금은화 70% EtOH 추출	10.97 ± 0.05

5. 결과

본 시험법 보고서는 작약, 당귀, 천궁의 대표적인 지표물질 파에오니플로린, 클로로겐산, 노다 케닌, 데커신 동시분석법에 대한 것이다. 분석법에 대한 신뢰성을 확보하고자 직선성, 정확성 및 정밀성을 고려하여 유효성 검증을 실시한 결과, 시험법을 적용하여 작약, 당귀, 천궁 생약 및 이들이 함유되어 있는 농축액/제품에 대해 분석물질 4종을 분석하기 적합했다.

3.1.4. 익모초 중 Rutin, Leonurine

(1) 전체요약

제목	익모초 지표물질 2종 (Leonurine, Rutin) 동시분석법			
부서	안전센터	담당	김선영	
목적	익모초 지표물질 2종 동시분석법의 신뢰성 확보			
평가기준	AOAC 분석법 유효성 검증 가이드라인			
유효성 검증 결과	1. Leonurine			
	수행도 인자	평가기준	검증 결과	판정
	직선성 범위	-	0.66 - 11.47 µg/mL	-
	상관계수	$r \geq 0.99$	0.998	적합
	정성한계	$3.3 \sigma/S^1$	0.053 µg/mL	-
	정성한계	$10 \sigma/S$	0.160 µg/mL	-
	정확도 (회수율)	80 - 110%	81.58 - 105.05%	적합
	정밀도	RSD % < 11%	0.92 - 8.77%	적합
	1) σ : 검량선 회귀 직선식의 기울기 평균. S: y 절편의 표준편차			
	2. Rutin			
	수행도 인자	평가기준	검증 결과	판정
	직선성 범위	-	0.21 - 20.58 µg/mL	-
	상관계수	$r \geq 0.99$	0.998	적합
	정성한계	$3.3 \sigma/S^1$	0.071 µg/mL	-
	정성한계	$10 \sigma/S$	0.215 µg/mL	-
정확도 (회수율)	80 - 110%	81.77 - 109.38%	적합	
정밀도	RSD % < 11%	0.90 - 5.29%	적합	
1) σ : 검량선 회귀 직선식의 기울기 평균. S: y 절편의 표준편차				
의견	본 시험법 정립보고서는 익모초 지표물질 2종 (Leonurine, Rutin)에 대한 동시분석법의 신뢰성을 확보하고자 하였다. 따라서, 직선성, 정확성, 정밀성을 고려하여 분석법에 대한 유효성 검증을 실시한 결과, 본 분석법은 익모초 원물과 익모초 단일 추출물을 분석하기 적합했다.			

(2) 분석법 검증 상세내용

1. 직선성 및 정성/정량한계

분석법의 직선성, 검출한계 검출한계 (Limit of Detection, LOD), 정량한계 (Limit of Quantification, LOQ)를 산출하여 분석물질의 민감도와 선택성에 대한 평가를 수행했다. 직선성은 원료 및 추출액에서 각 각 분석물질 함량에 대해 예비 실험을 실시하여 그 범위를 설정했다.

그 결과, 직선성에 대한 상관계수 (Correlation, r)는 0.99 이상을 나타냈다. 정성한계는 정성한계는 $3.3 \sigma/S$ (σ : slope of a calibration curve, S: standard deviation of y-intercepts of regression analysis)의 수식에 의해 산출 했으며, 정량한계는 $10 \sigma/S$ (σ : slope of a calibration curve, S: standard deviation of y-intercepts of regression analysis)에 따라 산출 하여 표 1에 나타냈다.

표 1. 익모초 지표물질 2종 직선성 및 정성/정량 한계

분석물질	직선성 범위 ($\mu\text{g/mL}$)	상관계수 (R)	정성한계	정량한계
			($\mu\text{g/mL}$)	
Leonurine	0.06 - 11.47	0.99	0.053	0.160
Rutin	0.21 - 20.58	0.99	0.071	0.215

2. 정확도 및 정밀도

정확도와 정밀도는 원물 및 추출액을 매질로 평가를 수행했다. 먼저, 시험법의 정확도는 분석물질의 표준용액을 첨가하여 분석방법의 전 조작을 수행하여 표준용액이 회수되는 정도를 산출하여 시험법의 정확도와 간섭효과를 평가 할 수 있다. 첨가된 표준용액의 농도는 시료에서 검출된 시험용액의 농도를 고려했다. 또한, 시험법의 정밀도는 지정된 조건에서 시행된 반복적 시험결과 의 근접한 정도로서 상대표준편차 (Relative Standard Deviation, RSD %)로 나타내며 실험의 효과를 의미한다. AOAC 분석법 가이드라인에서 허용되는 회수율의 기준 범위는 $1 \mu\text{g/mL}$ 로 첨가했을 때 권고 회수율 범위는 80 - 110%이며, 정밀도는 표준용액을 $1 \mu\text{g/mL}$ 로 첨가했을 때, 상대표준편차 (RSD %)는 11% 이하 이므로 본 시험법의 정밀도와 정확도 결과는 AOAC 시험법 검증 가이드라인 권고 회수율 범위에 적합하다고 할 수 있다 (표 2).

표 2. 익모초 지표물질 정확도 및 정밀도 평가

분석물질	매질	정확도			정밀도
		Spiking Con. ($\mu\text{g/mL}$)	Detected Con. ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)	RSD %
Leonurine	원물	0.57	0.55 ± 0.02	95.75 ± 3.84	4.01
	물추출물		0.54 ± 0.05	94.43 ± 8.28	8.77
	10% EtOH		0.47 ± 0.00	81.58 ± 0.75	0.92
	20% EtOH		0.47 ± 0.01	82.24 ± 1.84	2.23
	30% EtOH		0.53 ± 0.04	92.65 ± 6.70	7.23
	70% EtOH		0.60 ± 0.03	105.05 ± 4.91	4.67
Rutin	원물	0.51	0.56 ± 0.02	109.38 ± 3.45	3.15
	물추출물		0.46 ± 0.02	89.76 ± 3.82	4.26
	10% EtOH		0.42 ± 0.00	81.77 ± 0.73	0.90
	20% EtOH		0.53 ± 0.03	103.03 ± 4.98	4.83
	30% EtOH		0.52 ± 0.03	100.70 ± 6.15	6.10
	70% EtOH		0.47 ± 0.02	91.69 ± 4.85	5.29

4.1 인체적용시험 준비

4.1.1 CRO 선정

1. 인체적용시험 대행 CRO 기관 선정 및 계약 진행 중

1.1 기본 정보

1.1.1 기능성 내용 및 연구 목적

- 기능성 내용 : 인지기능 개선에 도움 등
- 목적 및 CRO 범위 : 안전성, 유효성 검사 인체적용시험으로써 프로토콜 개발, 모니터링, 통계, 보고서 등 CRO 업무 수행

1.1.2 개략적인 과제 정보

인체적용시험 명칭	안전성, 기능성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험	
시험 대상자	인원 수	100명 (2개군-시험군, 대조군)
	선정 기준	
	제외 기준	질환자 등
시험기관 및 수	대학부속병원 2개 사이트	
기간	과제기간	18 개월
	시험기간	10 개월
	선취기간	12 주
인체적용시험 디자인	다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조시험	
위약 및 시험식품의 공급	동일포장, 인체적용시험용 제품이라는 라벨, 무작위 배정에 의한 라벨 등	

- 상기 인체적용시험 규모는 귀사에서 제공한 자료를 바탕으로 디자인한 것으로 확정된 사항은 아닙니다.

1.1.3 CRO 업무의 범위

당사의 CRO 업무의 범위를 별첨2. 인체적용시험 CRO 견적서에 설정하였습니다.

귀사에서 제공해주신 정보 및 당사와 인체적용시험기관의 일정을 기준으로 인체적용시험 진행에 대한 각 업무단계별 예상 소요일정입니다.

번 호	항목	예상 기간(m)	예상 일정	내용
1	Contract for CRO			인체적용시험 CRO 계약 체결
2	Project Setup	1	-	제공된 자료 검토 전략 수립 시험 디자인 연구자/연구기관 선정 프로토콜/CRF 등 개발
3	IRB Submission /Approval (Protocol)	2		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요
4	Initiation Activities	1	-	대상자 모집 방안 등 제반 준비 인체적용시험식품 제조 인체적용시험기관 계약 인체적용시험 study material 제작 등 인체적용시험 개시 모임
5	Study Stage	10		등록기간 : 7 개월 섭취기간 : 12주 모니터링
6	Data Management	1	-	Data validation, Medical coding 등
7	Statistical Analysis	1	-	통계분석 및 표/그림 제작
8	Clinical Study Report	1	-	결과보고서 작성 및 연구자 고할 삼 인
9	IRB Submission (CSR)	1		다기관인경우 다기관 신청 수정/변경은 별도 기간 소요

- 상기 예상 소요기간은 평균적으로 소요되는 예상 기간을 나타낸 것이며, 상황에 따라 변동될 수 있습니다.
- 행정관련 소요기간은 보완여부나 보완내용에 따라 소요일정이 상당히 가변적임을 알려드립니다.

1.3 견적서 내용

1.3.1 규정

- ▶ 견적서 내용은 국사에서 제시한 자료를 근거로 작성한 것이며, 충분히 가변적임을 알려드립니다. 즉, 인체적용시험 연구비 및 CRO 견적은 인체적용시험기간 및 대상자 수, 프로토콜(연구계획서), 검사 항목 변경 등에 따라 가변적일 수 있습니다.
- ▶ 당사는 관련 분야 전문가 협력 체계를 구축하여 양질의 자료 및 결과를 제공하고 있습니다.

1.3.2 CRO 견적 및 결제조건

CRO 비용	110,800 원 (부가세 별도) (별첨 2. 인체적용시험 CRO 견적서 참고)
견적 변동 사항	인체적용시험 기간(대상자 모집/등록, 섭취 등), 대상자 수, 인체적용시험기관 수 등에 의해 견적은 변동될 수 있습니다.
결제조건	계약 후 30%, FPI 30%, LPO 30%, CSR draft 10%

1.3.3 견적서 포함/제외 항목

포함 항목	e-CRF (EDC)
	TMF (sponsor) management
제외 항목	대상자 모집 관련 비용(전단지 제작/광고 등)
	IRB 심의료(초심의, 지속심의, 연차심의 등)
	인체적용시험 배상 보험료
	Central lab. 검사비, 기타 재료 비용 등

1.3.4 인체적용시험기관 및 예상 연구비

인체적용시험기관	국내 대학부속병원 2 곳
예상 연구비	2.0 ~ 2.5 억원 (기관별 검사비, 간접비 등에 따른 변동 가능)
견적 포함 항목	인체적용시험 연구비(대상자교행비 등)

4.1.2 인체적용시험 Protocol 개발 진행 중

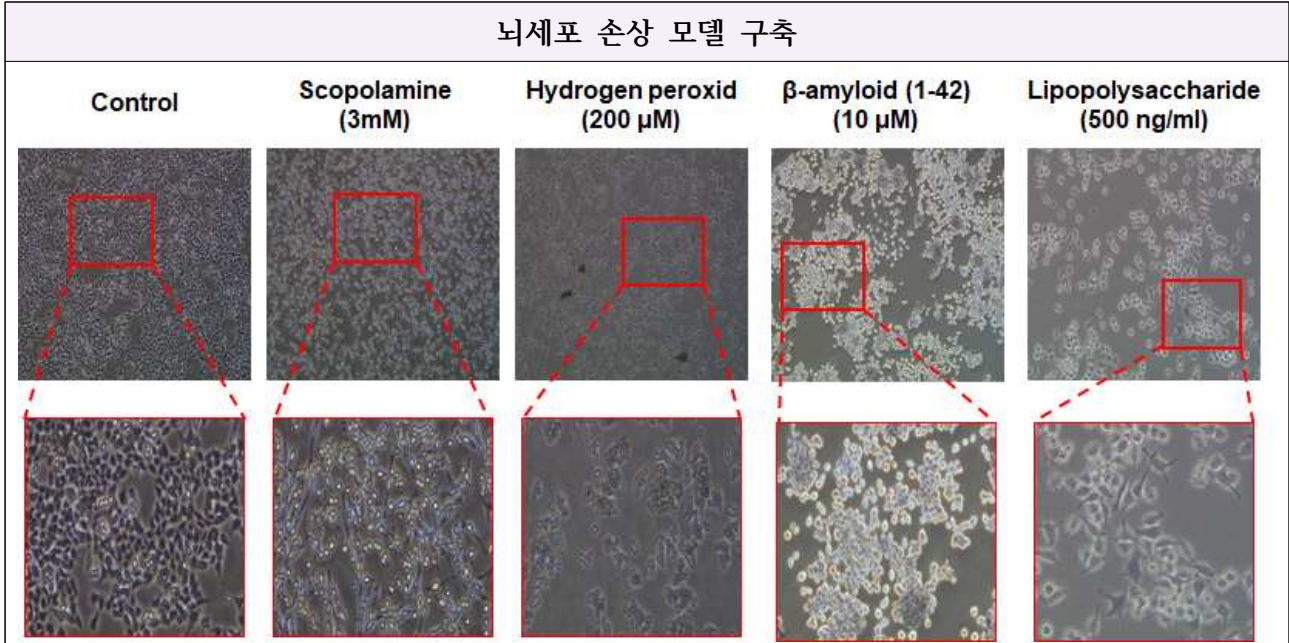
연구제목	초석잠 추출물의 인지기능 및 기억력 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험
선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 만 55세 이상, 만 85세 이하의 남녀 2. 국문해독이 가능한 자 3. CERAD-K의 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.5 SD 이상 감소한 자(CERAD Word List Memory or Word List Recall or Word List Recognition) 4. 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험 참여에 동의하고, 서면 동의서 (Informed Consent Form)를 작성한 자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 중증의 심혈관계, 호흡기계, 면역계, 위장관/간 및 담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자 2. 현재 우울증(DSM-5 기준), 조현병, 알코올 중독, 약물 의존 등 정신적 질환이 있는 자 3. 치매(DSM-5 기준), 파킨슨 등 인지기능 저하가 동반되는 질환이 있는 자 4. 방문1 기준 6개월 이내에 의식 소실을 동반한 두부 외상, 심뇌혈관 질환(협심증, 심근경색, 일과성 허혈발작, 급성 뇌졸중 등) 병력이 있는 자 5. 방문1 기준 2개월 이내에 Estrogen Replacement Therapy(국소도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자 6. 방문1 기준 4주 이내에 인지기능에 영향을 미치는 약물(항정신병제, 중추신경흥분제, 뇌대사개선제, 항콜린제)을 투여한 자 7. 방문1 기준 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자 등
종재군	시험군 / 위약군 각 50명씩 예정
유효성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> ● 1차 유효성 평가 변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) ADAS-cog 11 총점 ● 2차 유효성 평가 변수 <ol style="list-style-type: none"> 1. ADAS-cog 11 기억력 영역 점수 2. ADAS-cog 11 언어/수행능력 점수 3. Verbal Learning Test 등
안전성 평가 변수	<ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적 검사, 뇨검사) 3) 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중) 4) 심전도검사

(2) 공동연구개발기관 : 국립호남권생물자원관

2.1 뇌질환 효능검증을 위한 *in vitro* 모델계 정립

2.1.1 기억력 및 인지기능 개선 효능평가 모델 구축

- ① 1차 소교 세포(Primary microglia), 성상교세포(astrocyte) 및 신경아세포종(neuroblastoma cells) 등 뇌세포 모델을 이용한 항산화, 신경세포 보호, 항염증 등의 기초효능 탐색시스템 구축
- Scopolamine, Hydrogen peroxide (H₂O₂), β-amyloid (Aβ₁₋₄₂), lipopolysaccharide (LPS) 등 각각의 유도물질들을 활용하여 뇌세포 손상(산화적스트레스, 염증, 세포사멸 등)모델 구축



⇒ 뇌세포주(SH-SY5Y neuroblastoma cells, BV2 microglia cells, astrocyte, C6 glioblastoma cells) 대상으로 각각의 유도물질 처리 시 뇌세포 손상 유발 확인 → 이후 뇌질환 모델로 사용함

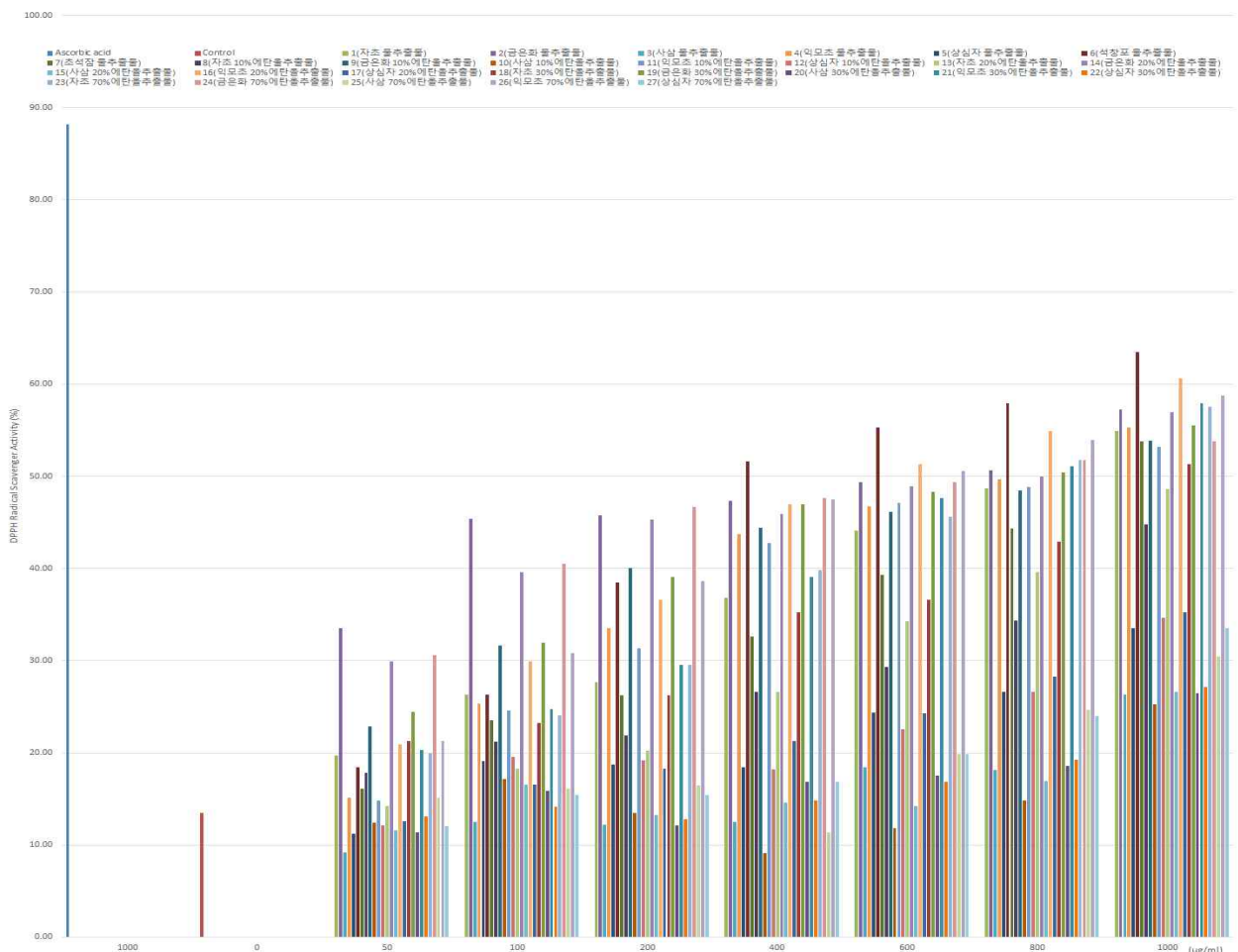
2.2 농생명자원 기반 기초효능 검증을 통한 최적 기능성소재 도출

2.2.1 (기능성소재발굴) 유용농생명자원 기반 기초효능 검증을 통한 최적 기능성소재 도출

- ① 유용농생명자원을 기반으로 문헌조사(논문, 특허 등)를 통한 1차 소재 선정
- ② 구축된 뇌세포 손상 모델들을 활용하여 1차 선정된 소재 기반 항산화 효소 활성 등의 기초효능 검증 및 후보소재 선별
- DPPH radical 소거활성: 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여능을 Blois의 방법에 준하여 측정 → 즉 96-well plate에 시료와 양성대조군으로 흔히 사용되는 Ascorbic acid 및 단계별 희석한 후보소재 추출물을 각각 10 μL와 0.2 mM DPPH 용액 10 μL를 가하고, 실온 암실에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 micro plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정

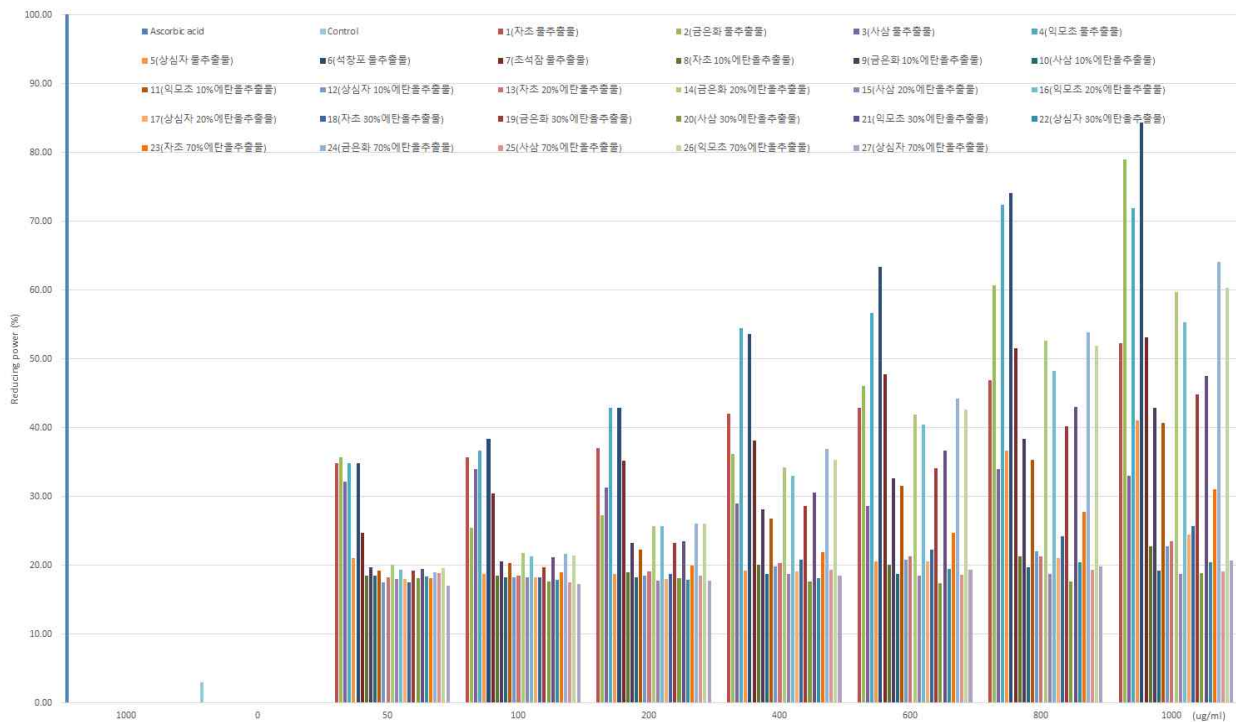
DPPH Radical Scavenger Activity (%)										
Sample	ug/ml	1000	0	50	100	200	400	600	800	1000
Ascorbic acid	88.17									
Control			13.46							
1(자초 물추출물)				19.74	26.32	27.63	36.84	44.08	48.68	54.93
2(금은화 물추출물)				33.55	45.39	45.72	47.37	49.34	50.66	57.24
3(사삼 물추출물)				9.21	12.50	12.17	12.50	18.42	18.09	26.32
4(익모초 물추출물)				15.13	25.33	33.55	43.75	46.71	49.67	55.26
5(상심자 물추출물)				11.18	19.08	18.75	18.42	24.34	26.64	33.55
6(석창포 물추출물)				18.42	26.32	38.49	51.64	55.26	57.89	63.49
7(초석잠 물추출물)				16.13	23.52	26.20	32.60	39.32	44.34	53.79

8(자초 10%에탄올추출물)			17.85	21.21	21.89	26.60	29.29	34.34	44.78
9(금은화 10%에탄올추출물)			22.90	31.65	40.07	44.44	46.13	48.48	53.87
10(사삼 10%에탄올추출물)			12.46	17.17	13.47	9.09	11.78	14.81	25.25
11(익모초 10%에탄올추출물)			14.81	24.58	31.31	42.76	47.14	48.82	53.20
12(상삼자 10%에탄올추출물)			12.12	19.53	19.19	18.18	22.56	26.60	34.68
13(자초 20%에탄올추출물)			14.24	18.24	20.24	26.59	34.26	39.60	48.61
14(금은화 20%에탄올추출물)			29.92	39.60	45.27	45.94	48.94	49.94	56.95
15(사삼 20%에탄올추출물)			11.57	16.57	13.24	14.57	14.24	16.91	26.59
16(익모초 20%에탄올추출물)			20.91	29.92	36.60	46.94	51.28	54.95	60.62
17(상삼자 20%에탄올추출물)			12.57	16.57	18.24	21.25	24.25	28.25	35.26
18(자초 30%에탄올추출물)			21.25	23.25	26.25	35.26	36.60	42.94	51.28
19(금은화 30%에탄올추출물)			24.40	31.93	39.11	46.98	48.35	50.40	55.53
20(사삼 30%에탄올추출물)			11.40	15.85	12.09	16.88	17.56	18.59	26.45
21(익모초 30%에탄올추출물)			20.30	24.74	29.53	39.11	47.66	51.08	57.92
22(상삼자 30%에탄올추출물)			13.11	14.14	12.77	14.82	16.88	19.27	27.14
23(자초 70%에탄올추출물)			19.95	24.06	29.53	39.79	45.61	51.77	57.58
24(금은화 70%에탄올추출물)			30.56	40.48	46.64	47.66	49.37	51.77	53.82
25(사삼 70%에탄올추출물)			15.11	16.14	16.48	11.36	19.89	24.66	30.45
26(익모초 70%에탄올추출물)			21.25	30.80	38.64	47.50	50.57	53.98	58.75
27(상삼자 70%에탄올추출물)			12.05	15.45	15.45	16.82	19.89	23.98	33.52



- Reducing power 환원력활성: 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 1 mL, 후보소재 25 mg을 증류수 1 mL에 용해시킨 용액 1 mL 및 1% potassium ferricyanide 1 mL를 가하고, 이 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가 → 반응이 끝난 혼합물을 1,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액 2 mL과 메탄올 2 mL를 넣고 0.1% iron chloride 용액 0.1 mL를 넣은 후 700 nm에서 흡광도(Biotek) 측정

Reducing power (%)										
Sample	ug/ml	1000	0	50	100	200	400	600	800	1000
Ascorbic acid	100.00									
Control			3.02							
1(자초 물추출물)				34.82	35.71	37.05	41.96	42.86	46.88	52.23
2(금은화 물추출물)				35.71	25.45	27.23	36.16	45.98	60.71	79.02
3(사삼 물추출물)				32.14	33.93	31.25	29.02	28.57	33.93	33.04
4(익모초 물추출물)				34.82	36.61	42.86	54.46	56.70	72.32	71.88
5(상심자 물추출물)				20.98	18.75	18.75	19.20	20.54	36.61	41.07
6(석창포 물추출물)				34.82	38.39	42.86	53.57	63.39	74.11	84.38
7(초석잡 물추출물)				24.70	30.46	35.24	38.12	47.69	51.54	53.10
8(자초 10%에탄올추출물)				18.46	18.46	18.93	20.12	20.12	21.30	22.72
9(금은화 10%에탄올추출물)				19.64	20.59	23.19	28.16	32.66	38.34	42.83
10(사삼 10%에탄올추출물)				18.46	18.22	18.22	18.70	18.70	19.64	19.17
11(익모초 10%에탄올추출물)				19.17	20.35	22.25	26.74	31.48	35.26	40.70
12(상심자 10%에탄올추출물)				17.51	18.22	18.46	19.88	20.83	22.01	22.72
13(자초 20%에탄올추출물)				18.18	18.42	19.15	20.36	21.33	21.33	23.52
14(금은화 20%에탄올추출물)				20.12	21.82	25.70	34.18	41.94	52.61	59.64
15(사삼 20%에탄올추출물)				17.94	18.18	17.70	18.67	18.42	18.67	18.67
16(익모초 20%에탄올추출물)				19.39	21.33	25.70	32.97	40.48	48.24	55.27
17(상심자 20%에탄올추출물)				17.94	18.18	17.94	19.15	20.61	21.09	24.48
18(자초 30%에탄올추출물)				17.45	18.18	18.67	20.85	22.30	24.24	25.70
19(금은화 30%에탄올추출물)				19.26	19.73	23.25	28.65	34.06	40.16	44.86
20(사삼 30%에탄올추출물)				18.08	17.61	18.08	17.61	17.38	17.61	18.79
21(익모초 30%에탄올추출물)				19.49	21.14	23.49	30.53	36.64	42.98	47.44
22(상심자 30%에탄올추출물)				18.32	17.85	17.85	18.08	19.49	20.43	20.43
23(자초 70%에탄올추출물)				18.08	19.02	19.96	21.84	24.66	27.71	31.00
24(금은화 70%에탄올추출물)				19.02	21.61	26.07	36.87	44.15	53.78	64.12
25(사삼 70%에탄올추출물)				18.89	17.51	18.43	19.35	18.66	19.35	19.12
26(익모초 70%에탄올추출물)				19.58	21.43	26.03	35.25	42.62	51.84	60.36
27(상심자 70%에탄올추출물)				17.05	17.28	17.74	18.43	19.35	19.81	20.73

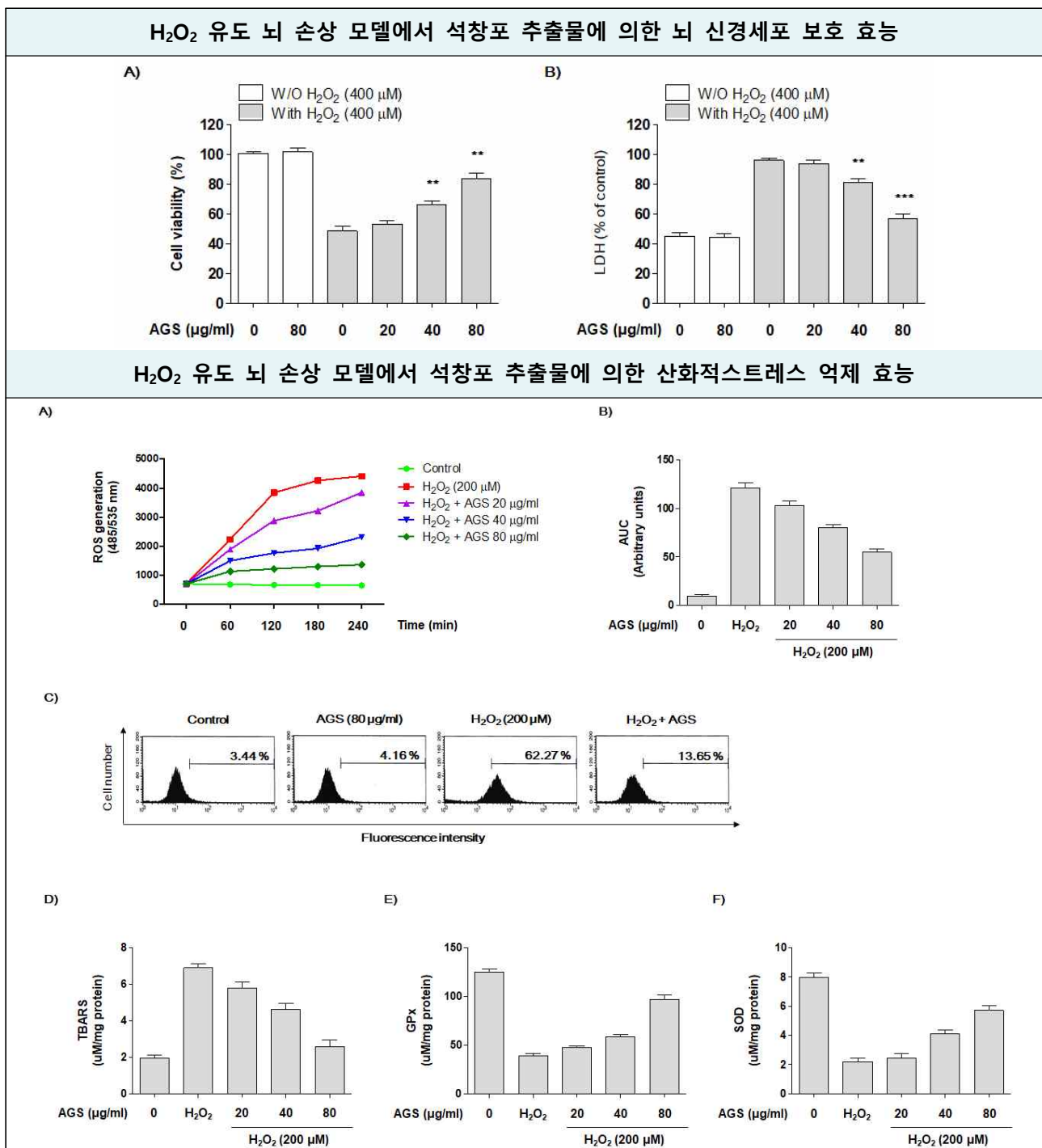


2.3 뇌질환 모델에서의 단일/복합추출물 기능성 약리효능 검증

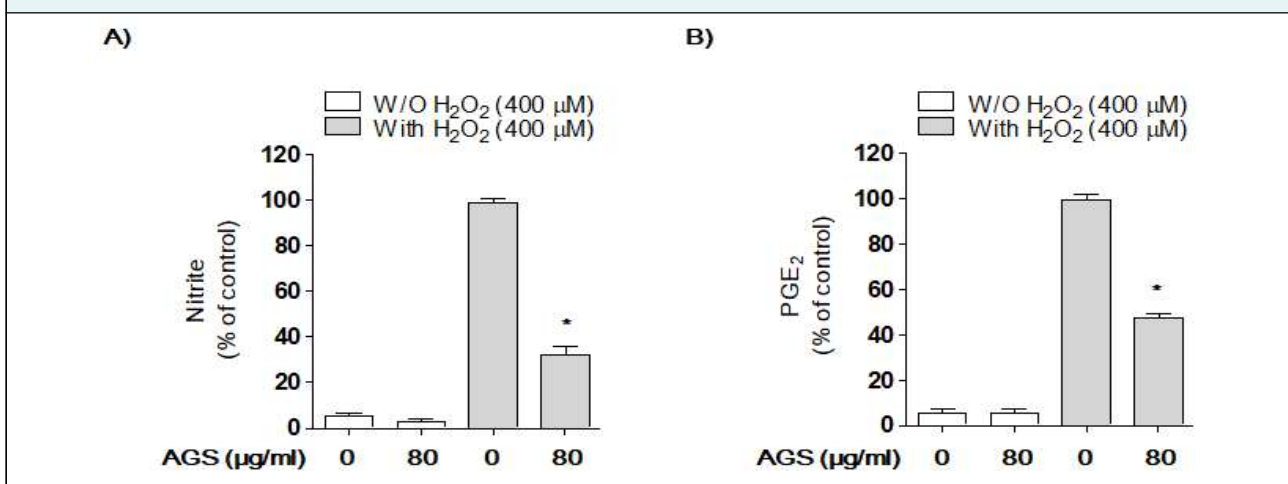
2.3.1 선별된 선도소재(4종) 기반 뇌질환 개선 기능성 약리효능 검증

① 석창포 추출물에 대한 뇌질환 개선 약리효능 검증

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: SH-SY5Y neuroblastoma cells 기반 H₂O₂로 유도된 뇌질환 모델
- 뇌질환 *in vitro* 모델에서의 세포독성 평가: 단일추출물에 대한 기본적인 독성평가는 MTT assay 및 LDH cytotoxicity assay로 단일/복합추출물들의 toxic 또는 non-toxic 조건 설정
- 활성산소종(ROS) 생성영향 조사: 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 fluorescent probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)로 적정시간 동안 염색 후 DNA flow cytometry에 적용
- 항산화 효소 활성: 항산화 효소의 활성은 상용화된 kit를 활용하여(SOD, GPx, Catalase 등) 생성과 염증성 Cytokine 생성 유무 분석
- 뇌신경염증 모델에서의 항염증 억제 바이오마커 생성변화 확인: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit를 활용하여 염증성 매개체 NO 및 PGE2 생성 유무 분석



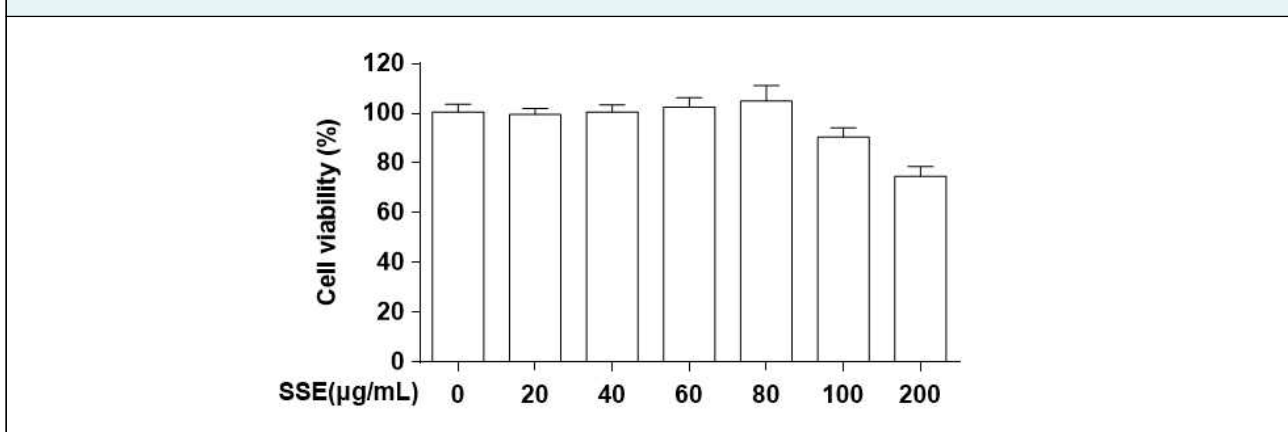
H₂O₂ 유도 뇌 손상 모델에서 석창포 추출물에 의한 항염증 효능



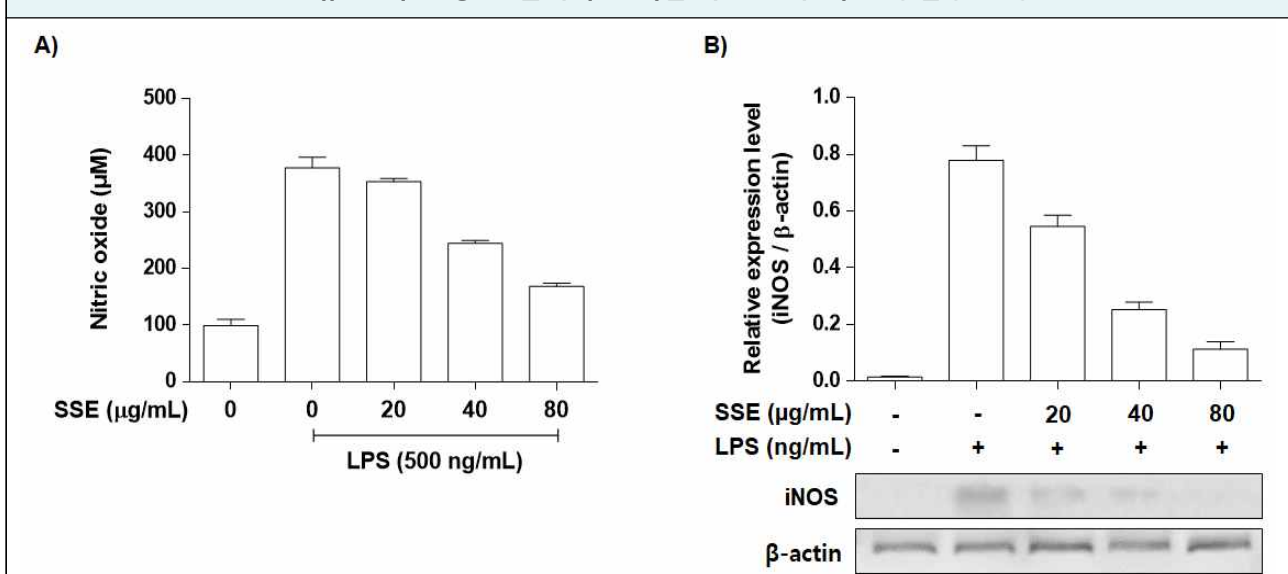
② 초석잠 추출물에 대한 뇌질환 개선 약리효능 검증

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: BV2 microglia cells 기반 LPS로 유도된 뇌질환 모델
- 뇌질환 *in vitro* 모델에서의 세포독성 평가: 단일추출물에 대한 기본적인 독성평가는 MTT assay로 단일/복합추출물들의 toxic 또는 non-toxic 조건 설정
- 뇌신경염증 모델에서의 항염증 억제 바이오마커 생성변화 확인: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit를 활용하여 염증성 매개체 NO 및 PGE₂ 생성 유무 분석

LPS 유도 뇌 손상 모델에서 초석잠 추출물에 대한 약리효능



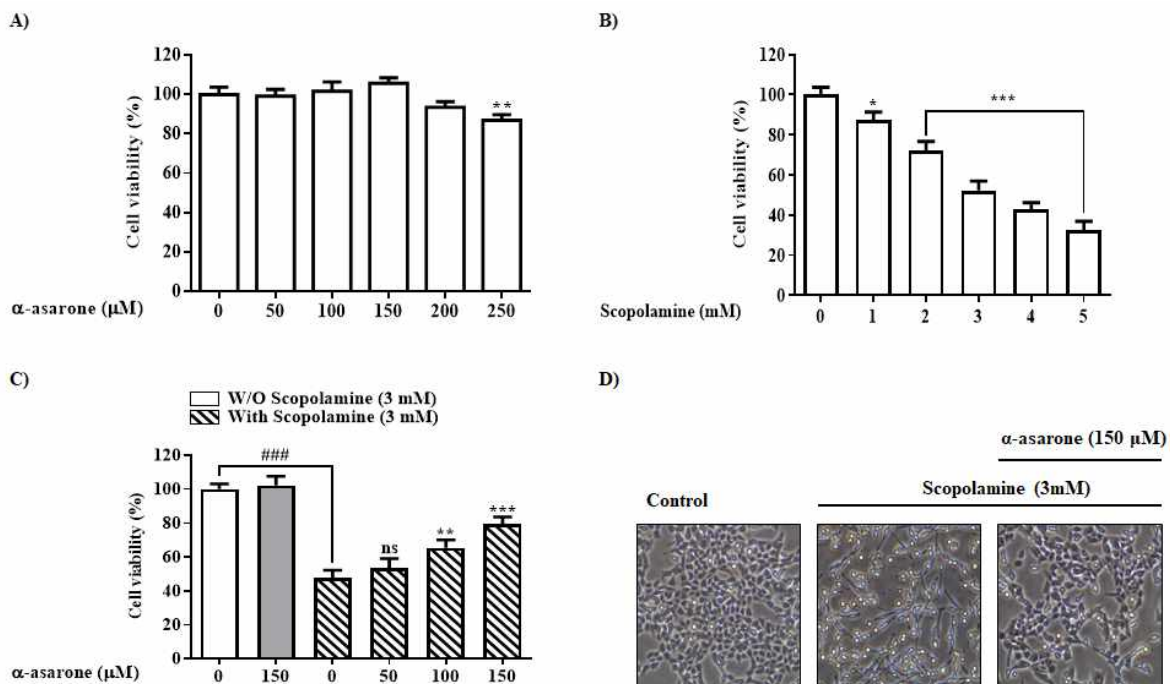
LPS 유도 뇌 손상 모델에서 초석잠 추출물에 의한 항염증 효능



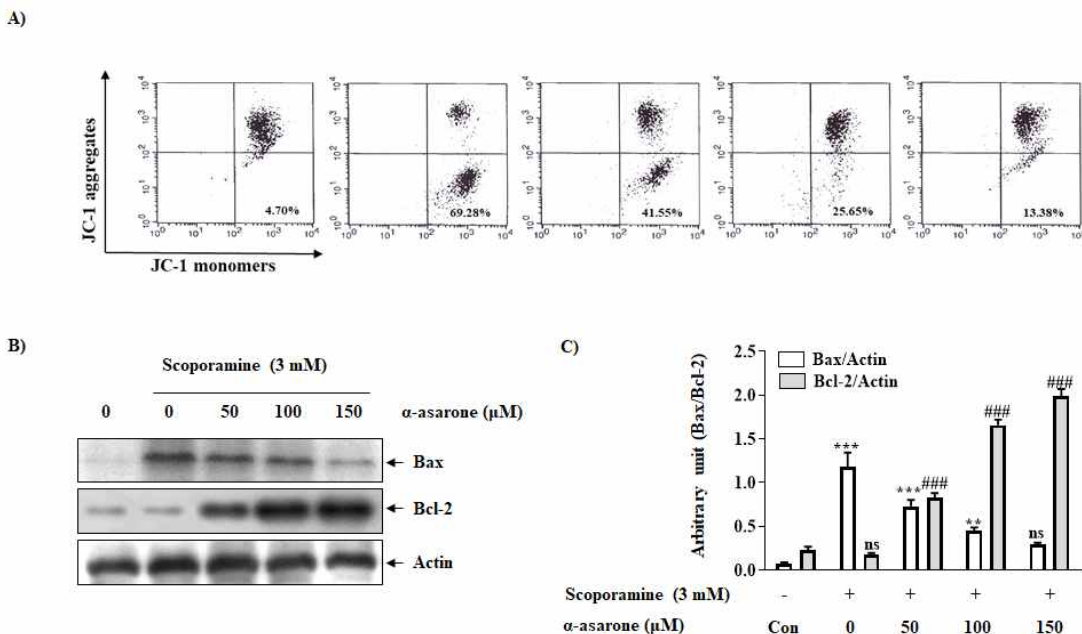
③ 석창포 단일물질(α -asarone)에 대한 뇌질환 개선 약리효능 검증

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: SH-SY5Y neuroblastoma cells 기반 scopolamine으로 유도된 뇌질환 모델
- 뇌질환 *in vitro* 모델에서의 세포독성 평가: 단일추출물에 대한 기본적인 독성평가는 MTT assay 및 LDH cytotoxicity assay로 단일/복합추출물들의 toxic 또는 non-toxic 조건 설정
- 활성산소종(ROS) 생성영향 조사: 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 fluorescent probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)로 적정시간 동안 염색 후 DNA flow cytometry에 적용
- 항산화 효소 활성: 항산화 효소의 활성은 상용화된 kit를 활용하여(SOD, GPx, Catalase 등) 생성과 염증성 Cytokine 생성 유무 분석
- 뇌신경염증 모델에서의 항염증 억제 바이오마커 생성변화 확인: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit를 활용하여 염증성 매개체 NO 및 PGE₂ 생성 유무 분석

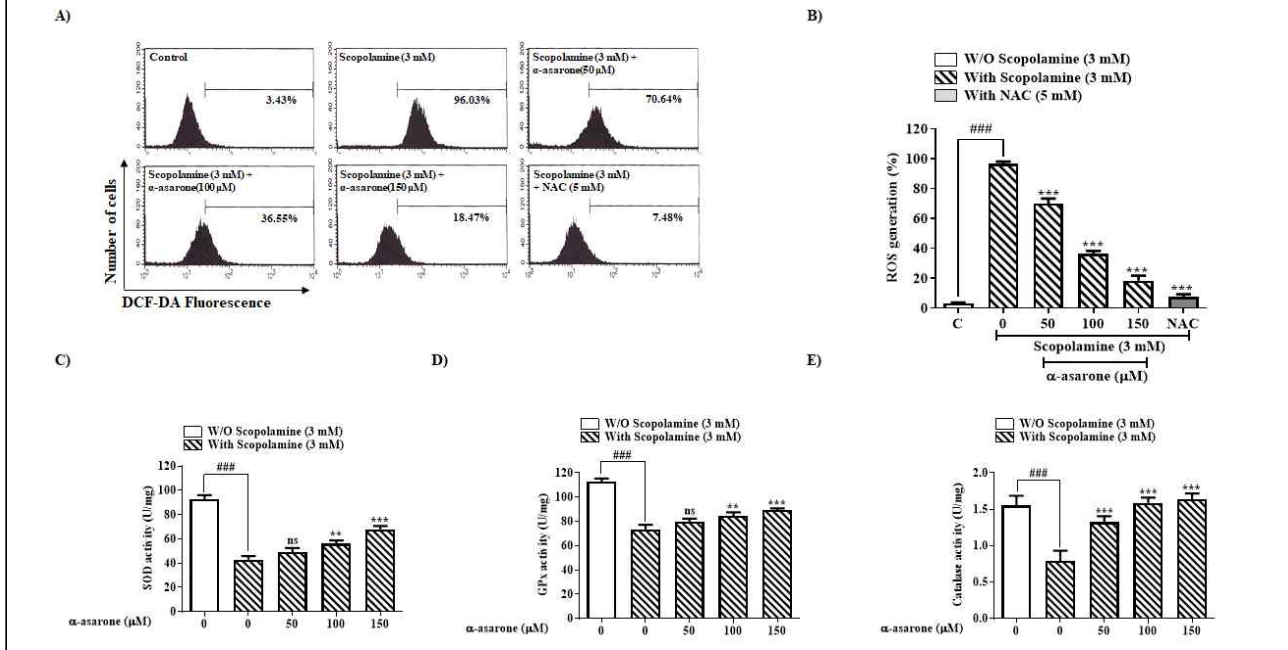
Scopolamine 유도 뇌 손상 모델에서 α -asarone에 의한 뇌 신경세포 보호 효능



Scopolamine 유도 뇌 손상 모델에서 α -asarone에 의한 세포사멸 억제 효능



Scopolamine 유도 뇌 손상 모델에서 α -asarone에 의한 산화적스트레스 억제 효과



2.4 Primary culture된 뇌질환세포 모델에서 인지 및 기억력 개선 효과 검증

② 초석잠 추출물에 대한 뇌질환 개선 약리효과 검증

- 치매유도제(Aluminium chloride, $AlCl_3$) 처리: 치매 유도제인 Aluminium chloride ($AlCl_3$)의 IC_{50} 값에 대한 농도설정을 위하여 배양중인 C6 glioblastoma cells에 $AlCl_3$ 를 각각 100~180 μ M 농도로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사
- Superoxide anion-radical (SAR) 제거능 측정: SAR 제거능 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 따라, 시료용액 0.1 mL와 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.4 mM xanthine과 NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 SAR 양을 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 560 nm에서 흡광도를 측정
- 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 측정: LP 측정은 Kikuzaki와 Nakatani의 방법에 따라, 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH7.0) 용액 12 mL에 에탄올과 시료 4 mL 혼합액을 첨가한 후 24시간 동안 40°C에서 배양하였다. 배양 완료 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate, 0.02 M ferrous chloride를 0.1 mL를 넣은 후 실온에서 3분 동안 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 500 nm에서 흡광도를 측정

치매 유도제($AlCl_3$) 처리에 따른 세포생존율 분석(농도설정)

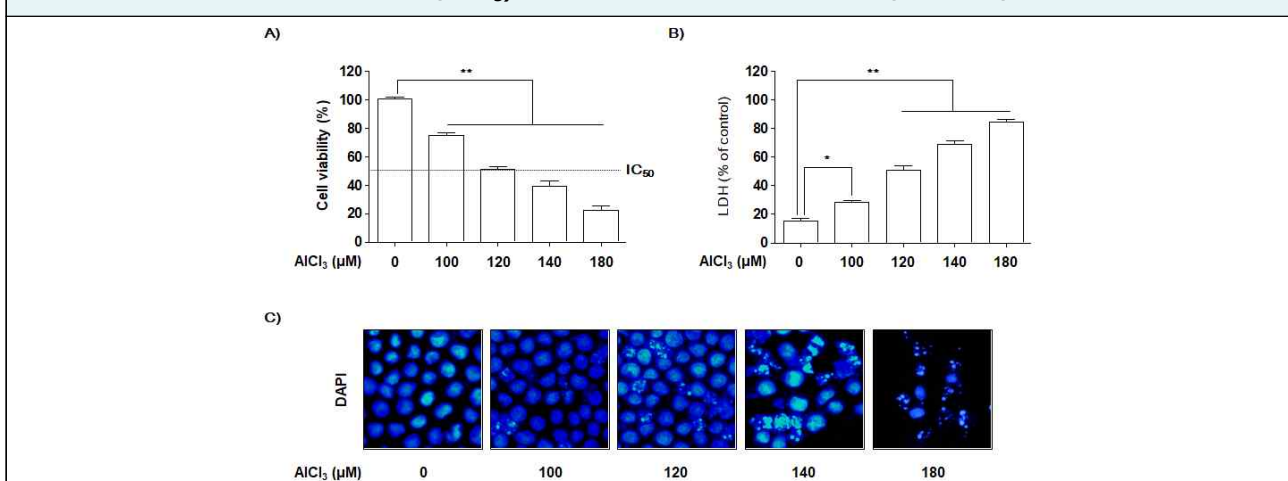


Table 1. The cytotoxicity of Aluminum chloride (AlCl₃) on cultured C6 glioblastoma cells by MTT assay.

Incubation	MTT assay (540 nm)	
Concentration of AlCl ₃ (μM)	Mean ±S.D.	% of control
Control	1.346±0.059	100
100	0.937±0.053	71.2
120	0.719±0.056	54.6
140	0.542±0.054	39.8
180	0.385±0.051	22.4

AlCl₃ 유도 치매 모델에서 초석잠 추출물에 의한 세포사멸 억제 효능

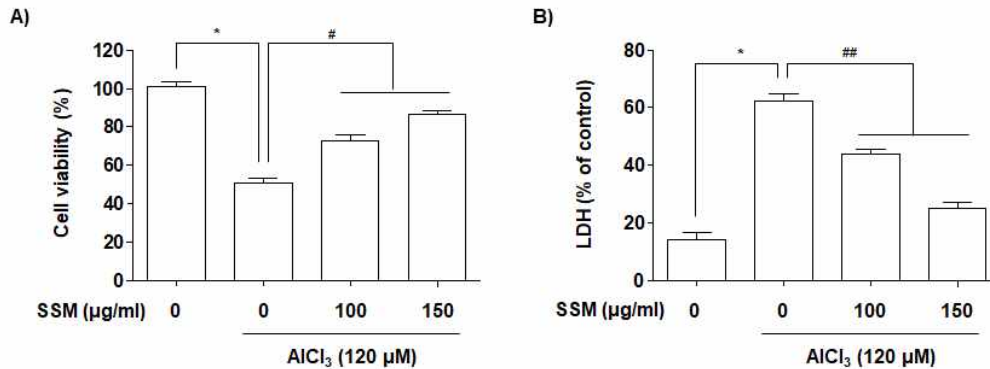


Table 2. The effect of SSM on the cytotoxicity induced by AlCl₃ in cultured C6 glioblastoma cells

Incubation	MTT assay (540 nm)	
Concentration of SSM (μM)	Mean ±S.D.	% of control
Control	0.298±0.015	100
AlCl ₃ (120 μM)	0.092±0.054	52.6
100	0.175±0.019	75.5
150	0.241±0.014	86.9

초석잠 추출물에 의한 항산화 활성 효능(DPPH, SAR, LP assay)

Table 3. The DPPH-radical scavenging activity of SSM extract determined at a wavelength of 517 nm

Concentration of SSM (μg/mL)	DPPH radical scavenging activity (517 nm)	
	% of control	
BHT (50 μM)	77.2	
100	44.2	
150	68.5	

Table 4. The superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of SSM extract determined at a wavelength of 560 nm

Concentration of SSM (μg/mL)	SAR scavenging activity (517 nm)	
	% of control	
BHT (50 μM)	75.3	
100	36.4	
150	49.2	

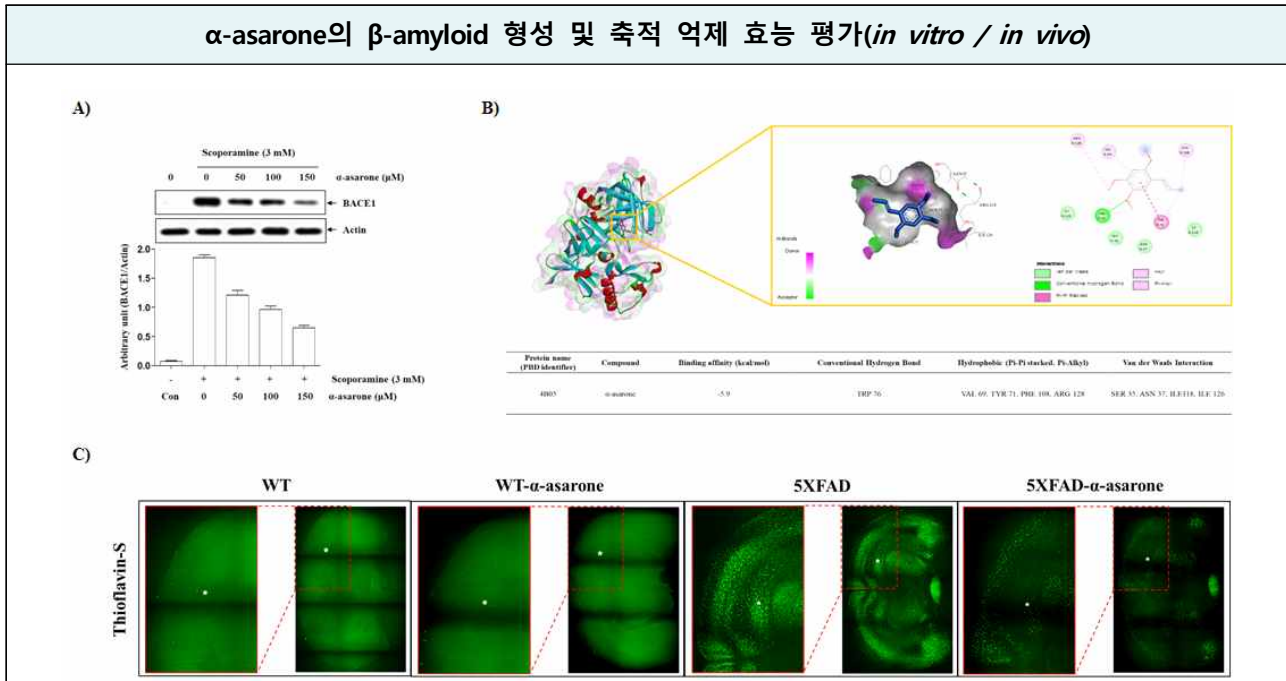
Table 5. The lipid peroxidation (LP) of SSM extract determined at wavelength 500 nm

Concentration of SSM (μg/mL)	Lipid peroxidation (500 nm)	
	% of control	
BHT (50 μM)	70.5	
100	29.8	
150	34.3	

2.5 천연후보소재의 β-amyloid 형성 및 축적 억제 효능 평가

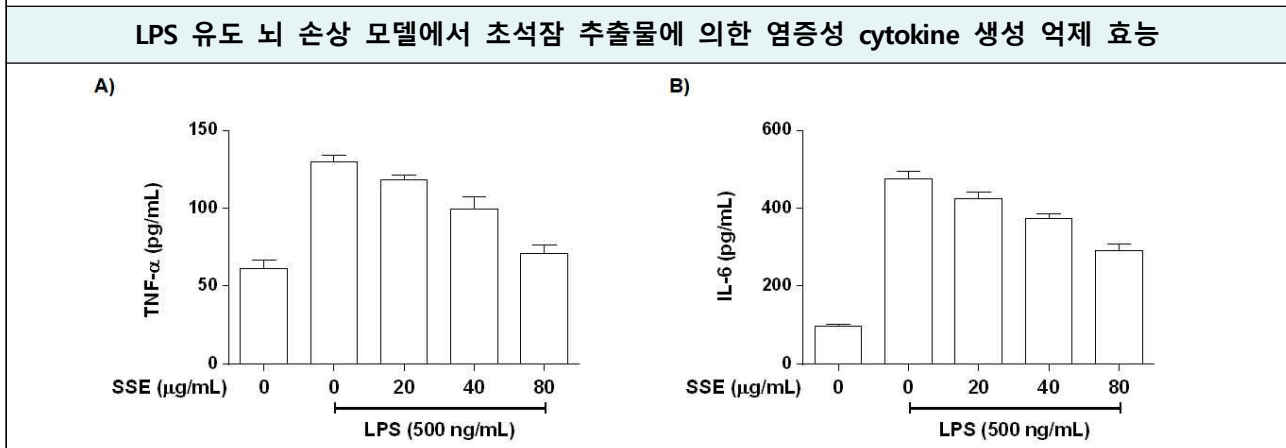
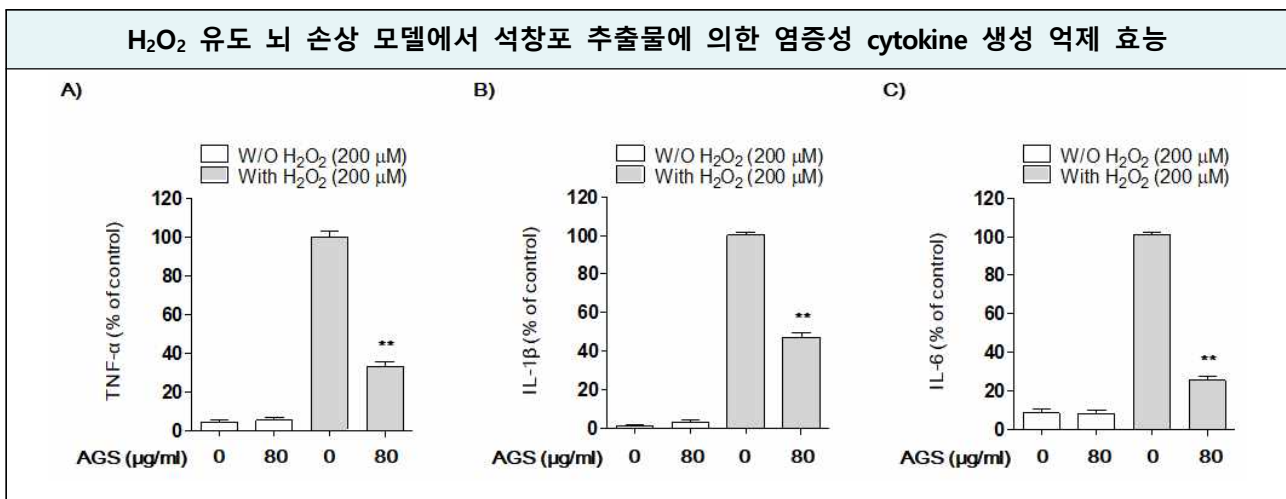
- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: SH-SY5Y neuroblastoma cells 기반 scopolamine으로 유도된 뇌질환 모델

- BACE1 (beta-secretase) 억제효능: PanVera's BACE1 fluorescence resonance energy transfer assay법을 사용하여 β -secretase 억제작용을 효소학적으로 측정함(530-545nm excitation와 570-590nm emission wavelengths에서 형광 측정)

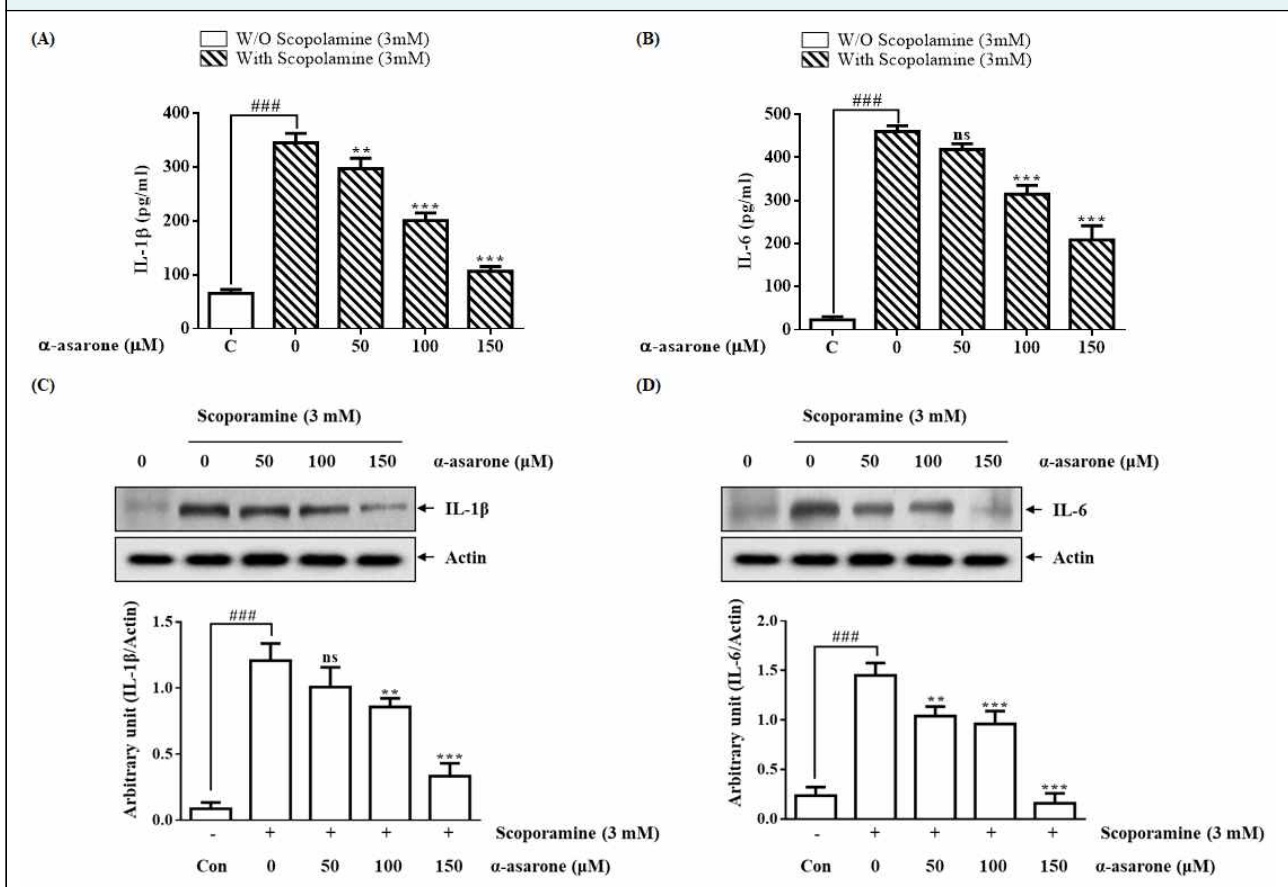


2.6 천연후보소재의 뇌인지 능력 효능 평가를 위한 cytokine 발현 분석

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: SH-SY5Y neuroblastoma cells, BV2 microglia cells 기반 scopolamine, LPS, H_2O_2 로 유도된 뇌질환 모델
- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit를 활용하여 염증성 Cytokine 생성 유무 분석



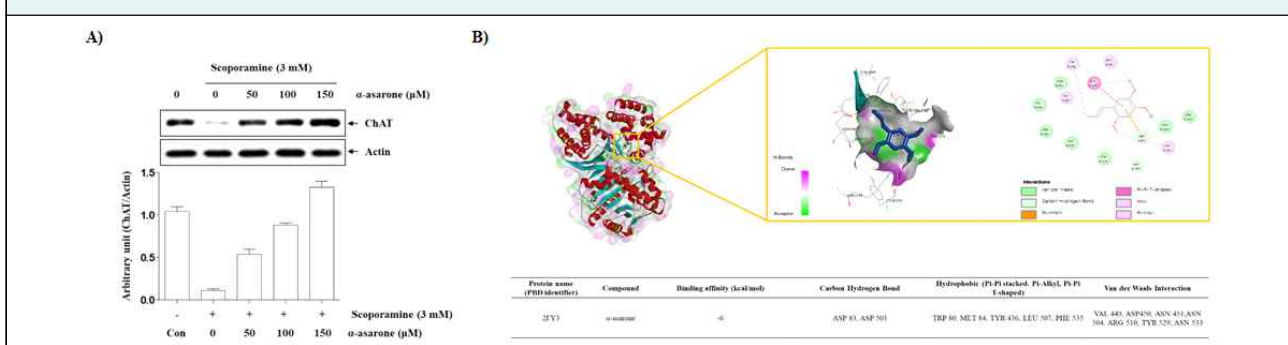
Scopolamine 유도 뇌 손상 모델에서 α -asarone에 의한 염증성 cytokine 생성 억제 효과



2.7 천연후보소재의 신경전달 및 시냅스 가소성 조절 효과 평가

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: SH-SY5Y neuroblastoma cells 기반 scopolamine으로 유도된 뇌질환 모델
- Acetylcholinesterase (AChE) 활성저해도 측정: Ellman법을 사용하여 측정함 \rightarrow 완충액 30 μ l, 화합물 10 μ l와 효소 10 μ l를 넣은 후 기질액 50 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간 배양함 \rightarrow 배양 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 효소활성저해도(%)를 산출함

α -asarone의 신경전달 및 시냅스 가소성 조절 효과 평가

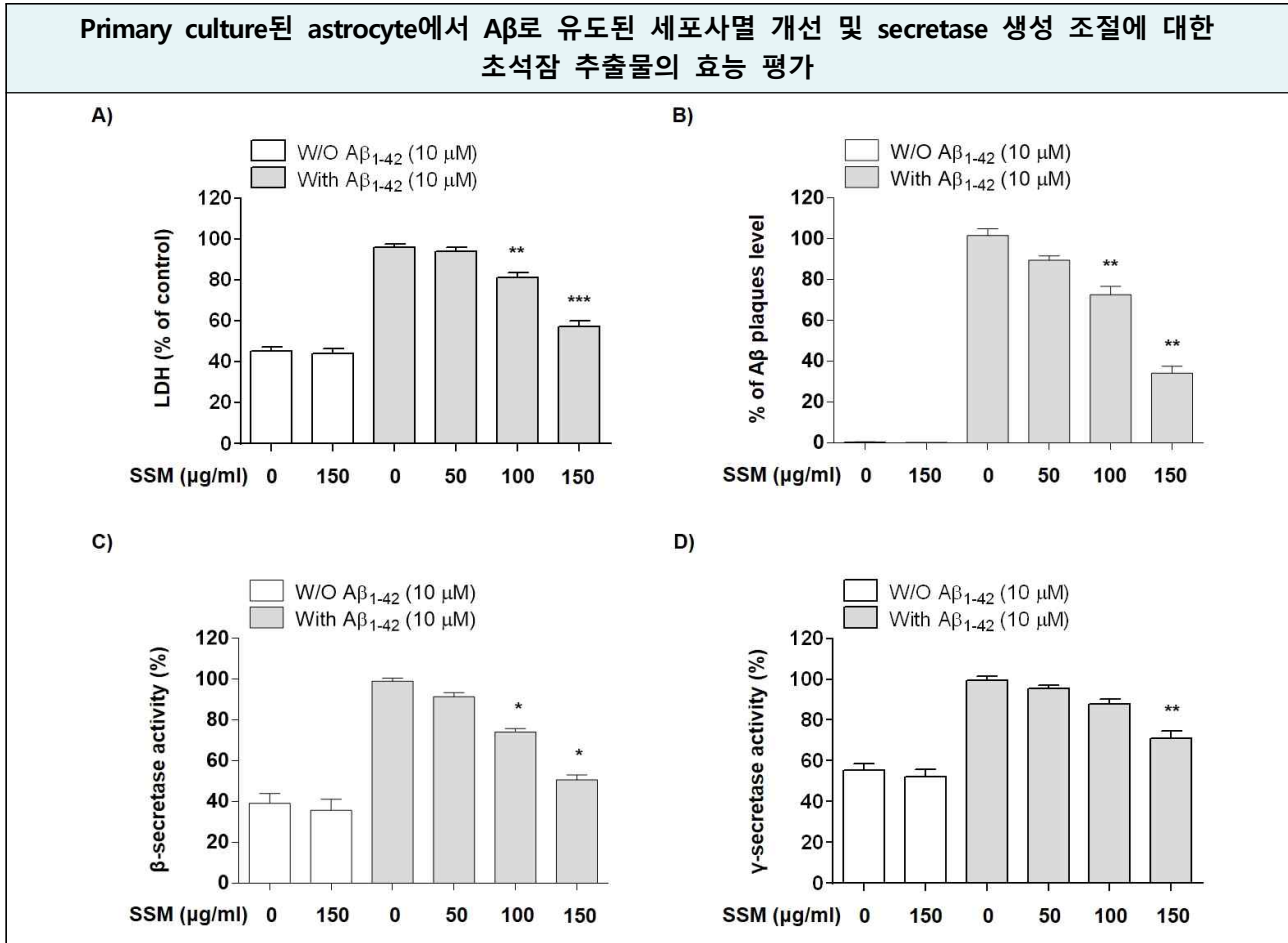


2.8 Primary culture 기반 뇌 질환 세포모델에서 인지 및 기억력 개선 효과 검증

- Primary culture 기반 뇌질환 *in vitro* 모델: Mouse 모델의 태아에서 적출된 뇌로부터 대뇌피질 (cerebral cortex)에서 초대배양(Primary culture)된 astrocyte 사용
- 치매유도제(amyloid beta peptide 1-42) 처리: 치매 유도제인 $A\beta_{1-42}$ 의 IC₅₀ 값에 대한 농도설정을 위하여 배양중인 astrocyte에 $A\beta_{1-42}$ 를 10 μ M 농도로 처리하여 48시간 동안 배양한 후

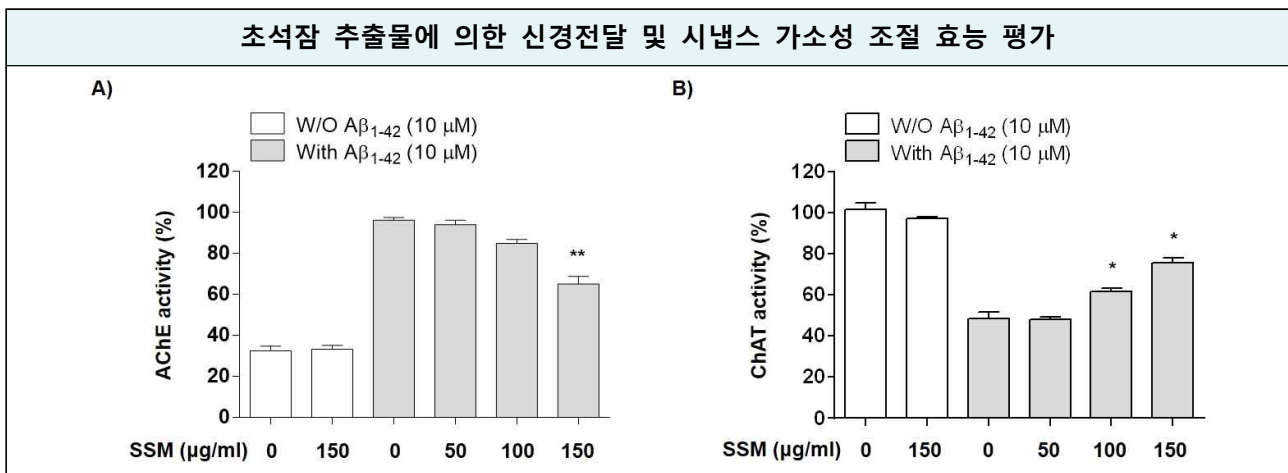
세포생존율을 조사

- β/γ -secretase 저해능 측정: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit를 활용하여 β/γ -secretase 생성 유무 분석



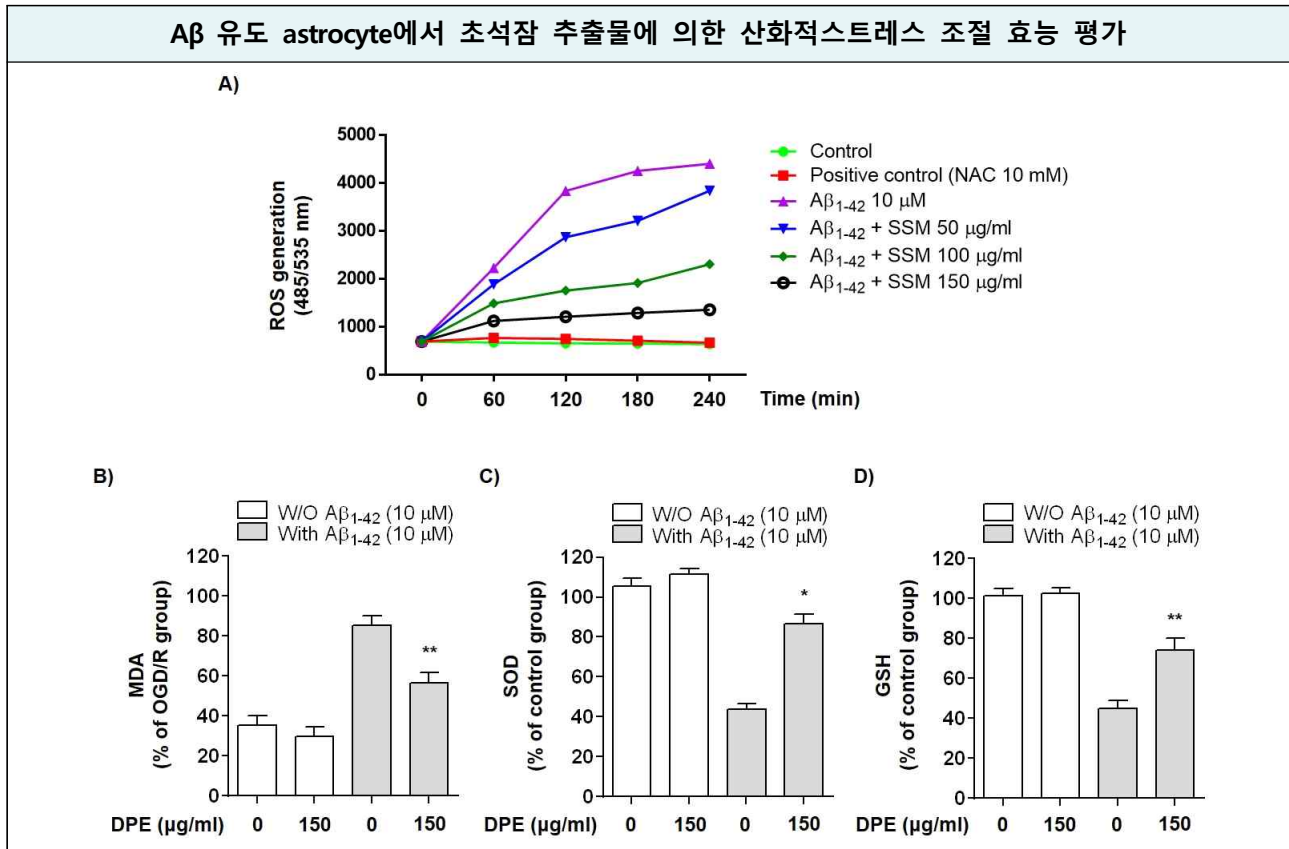
2.9 Primary culture 기반 초석잠 추출물에 대한 신경전달 및 시냅스 가소성 조절 효능 평가

- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: Astrocyte 기반 A β_{1-42} 로 유도된 뇌 질환 모델
- Acetylcholinesterase (AChE) /Choline AcetylTransferase (ChAT) 생성도 측정: Ellman법을 사용하여 측정함 → 완충액 30 μ l, 화합물 10 μ l와 효소 10 μ l를 넣은 후 기질액 50 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간 배양함 → 배양 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 효소활성저해도(%)를 산출함



2.10 Primary culture 기반 초석잠 추출물에 대한 산화적스트레스 조절 평가

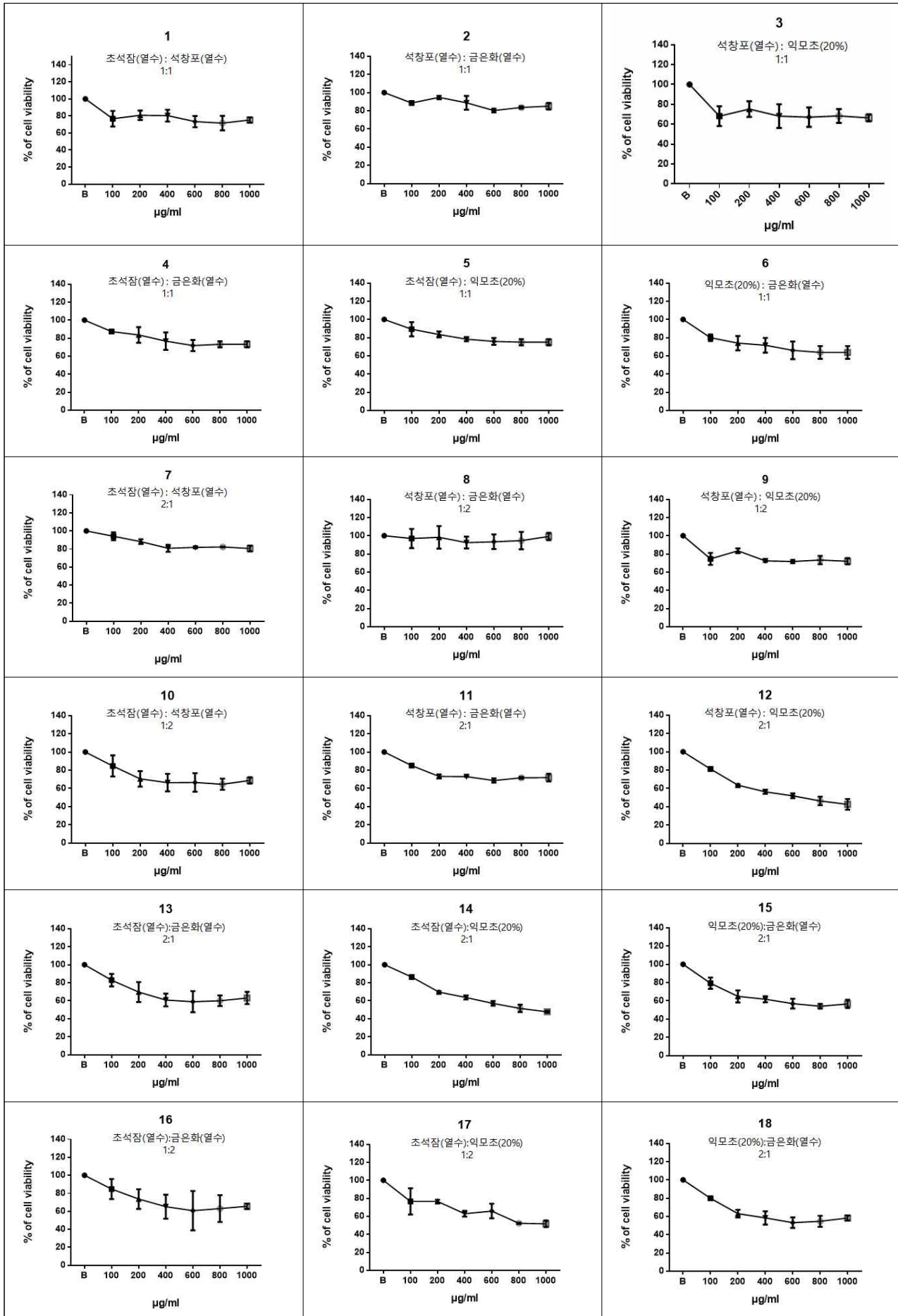
- 표준화된 뇌질환 *in vitro* 모델: Astrocyte 기반 Aβ₁₋₄₂로 유도된 뇌 질환 모델
- 활성산소종(ROS) 생성영향 조사: 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 fluorescent probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)로 적정시간 동안 염색 후 DNA flow cytometry에 적용
- 항산화 효소 활성: 항산화 효소의 활성은 상용화된 kit를 활용하여(SOD, GPx, Catalase 등) 생성 유무 분석

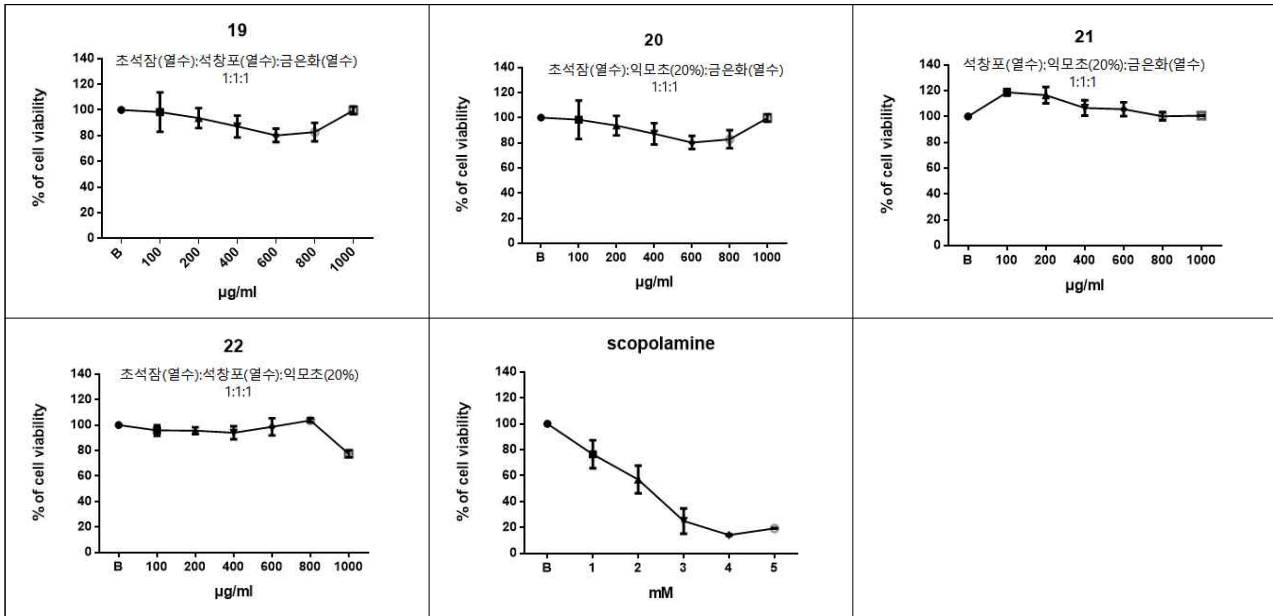


2.11 4가지 소재의 단독, 복합 효능 스크리닝

- 석창포, 초석잠, 금은화, 익모초 4종 복합물 스크리닝

번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능	번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능
1	1	1			★	14		2		1	-
2	1		1		★	15			2	1	-
3	1			1	-	16		1	2		-
4		1	1		★	17		1		2	-
5		1		1	★	18			1	2	-
6			1	1	★	19	1	1	1		★★
7	1	2			★	20		1	1	1	★★
8	1		2		★★★	21	1		1	1	★★★★
9	1			2	★	22	1	1		1	★★
10	2	1			-	단일1	1				★★
11	2		1		★	단일2		1			★★★★
12	2			1	-	단일3			1		★★
13		2	1		-	단일4				1	★★





NO. \ µg/ml	B	100	200	400	600	800	1000
1	0.394	0.277	0.303	0.336	0.271	0.259	0.268
	0.31	0.258	0.263	0.234	0.242	0.241	0.24
2	0.297	0.262	0.278	0.248	0.234	0.246	0.245
	0.291	0.259	0.279	0.274	0.238	0.246	0.255
3	0.355	0.267	0.287	0.272	0.263	0.26	0.245
	0.452	0.276	0.315	0.27	0.272	0.267	0.269
4	0.389	0.308	0.278	0.251	0.242	0.254	0.254
	0.311	0.276	0.279	0.26	0.237	0.235	0.235
5	0.293	0.278	0.238	0.225	0.23	0.227	0.227
	0.303	0.254	0.26	0.242	0.222	0.22	0.22
6	0.332	0.274	0.264	0.257	0.242	0.228	0.228
	0.434	0.336	0.297	0.266	0.257	0.255	0.255
7	0.432	0.393	0.373	0.361	0.357	0.354	0.338
	0.391	0.38	0.352	0.305	0.317	0.323	0.324
8	0.381	0.341	0.341	0.335	0.334	0.335	0.367
	0.34	0.355	0.364	0.33	0.337	0.345	0.347
9	0.477	0.378	0.407	0.35	0.348	0.365	0.355
	0.568	0.39	0.455	0.399	0.393	0.391	0.388
10	0.715	0.547	0.461	0.426	0.424	0.431	0.475
	0.563	0.523	0.431	0.412	0.415	0.368	0.401
11	0.523	0.452	0.391	0.362	0.368	0.371	0.392
	0.534	0.448	0.383	0.369	0.358	0.367	0.368
12	0.626	0.508	0.404	0.363	0.338	0.312	0.294
	0.726	0.593	0.457	0.398	0.364	0.313	0.28
13	0.84	0.499	0.396	0.357	0.325	0.358	0.373
	0.486	0.427	0.377	0.32	0.327	0.312	0.33
14	0.465	0.408	0.328	0.303	0.274	0.226	0.219
	0.468	0.415	0.336	0.303	0.27	0.266	0.237
15	0.551	0.481	0.383	0.353	0.335	0.308	0.33
	0.699	0.524	0.421	0.415	0.372	0.366	0.374
16	0.686	0.527	0.452	0.382	0.311	0.36	0.435
	0.568	0.517	0.454	0.416	0.425	0.411	0.378
17	0.525	0.456	0.409	0.342	0.316	0.277	0.266
	0.56	0.371	0.421	0.34	0.401	0.29	0.275
18	0.592	0.471	0.391	0.378	0.339	0.349	0.356
	0.709	0.589	0.426	0.377	0.348	0.357	0.4
19	0.431	0.377	0.38	0.35	0.33	0.335	0.439
	0.379	0.414	0.376	0.353	0.318	0.333	0.37
20	0.382	0.447	0.428	0.391	0.389	0.374	0.384
	0.362	0.436	0.438	0.401	0.396	0.371	0.365
21	0.39	0.44	0.415	0.412	0.358	0.375	0.428
	0.385	0.422	0.443	0.401	0.384	0.428	0.505
22	0.436	0.405	0.425	0.394	0.409	0.457	0.348
	0.384	0.379	0.36	0.375	0.397	0.394	0.29

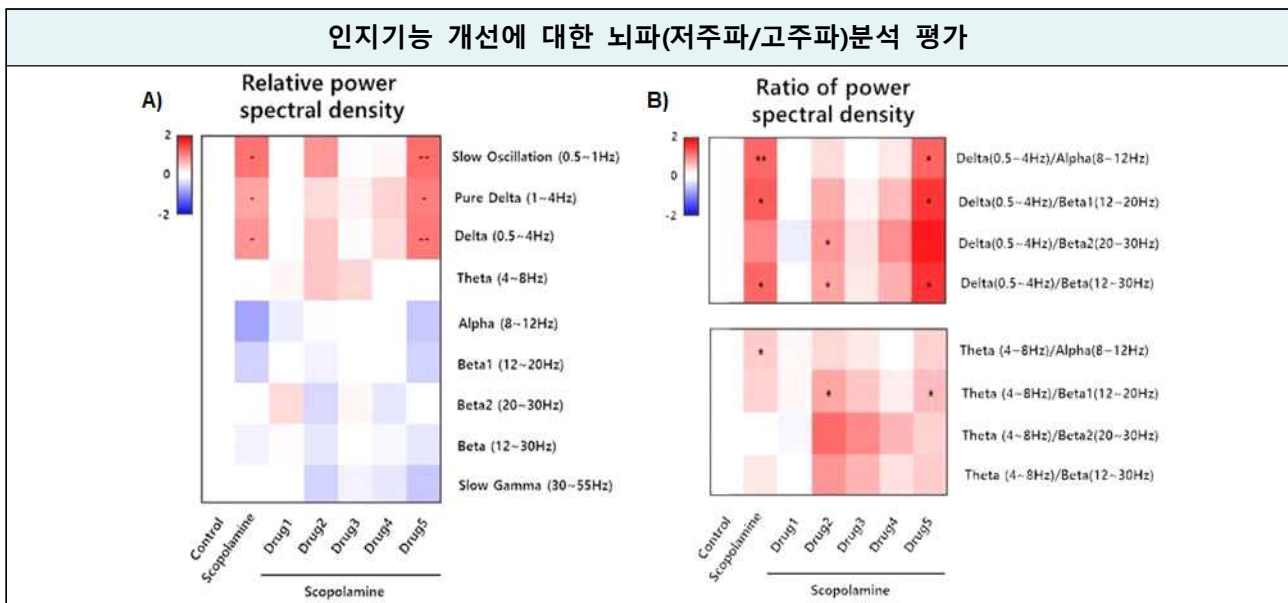
2.12 4가지 소재의 단독, 복합 효능 스크리닝(Ex-vivo)

- 석창포, 초석잠, 금은화, 익모초 4종 복합물 스크리닝

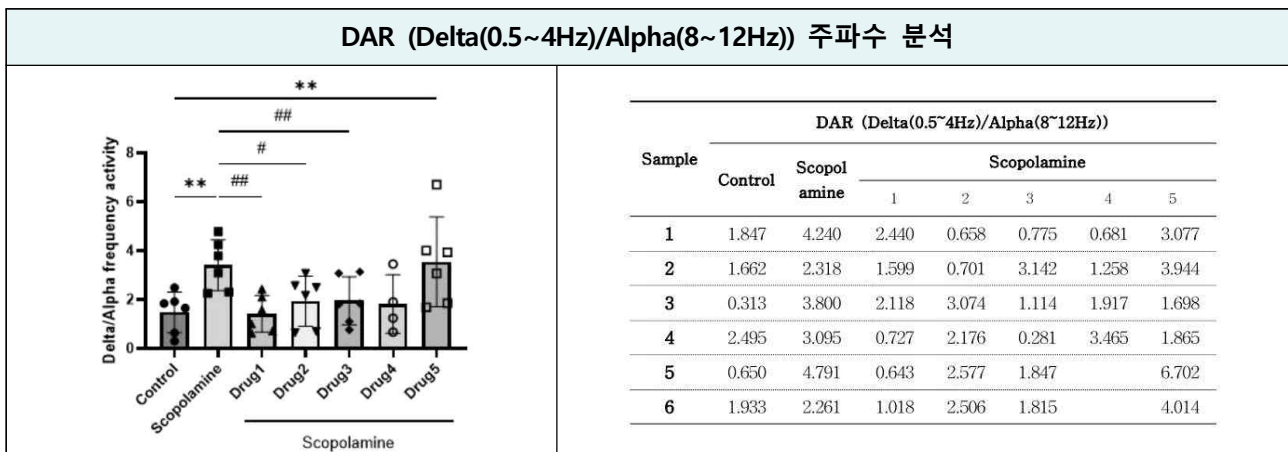
가) 뇌파측정을 통한 Scopolamine에 의한 뇌파변화 확인 및 Drug 1~5 처리 시 뇌파변화 확인

(1) Power spectrum analysis (Relative power spectrum and ratio of power spectrum):

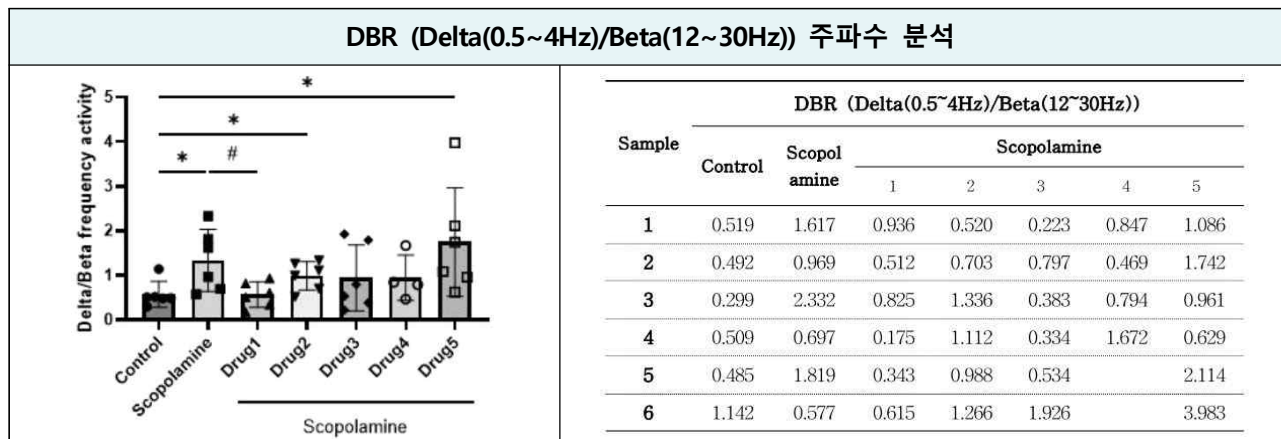
- ① Control과 비교하였을 때, Scopolamine 처리 시 Slow Oscillation, Pure Delta, Delta의 저주파의 band가 통계적으로 유의하게 증가함. Alpha, Beta1, Beta의 고주파의 band는 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았음. 또한 Scopolamine과 Drug1, Drug2, Drug3, Drug4를 각각 동시에 처리 시 Control과 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 Scopolamine과 Drug5를 동시에 처리 시 Scopolamine과 유사하게 Slow Oscillation, Pure Delta, Delta의 저주파의 band가 통계적으로 유의하게 증가함
- ② 인지 장애 발생 시 저주파의 증가와 고주파의 증가가 관찰됨. 이를 평가하기 위해 저주파와 고주파의 Ratio인 DAR (Delta/Alpha), DBR (Delta/Beta), TAR (Theta/Alpha), TBR (Theta/Beta)을 분석하였음. Control과 비교하였을 때, Scopolamine 처리 시 DAR과 DBR, TAR이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, Scopolamine과 Drug1, Drug3, Drug4를 각각 동시에 처리 시 Control과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음. 하지만, Scopolamine과 Drug2를 동시에 처리 시 DBR이 통계적으로 유의하게 증가했고 Drug5를 동시에 처리시 DAR, DBR이 통계적으로 유의하게 증가함



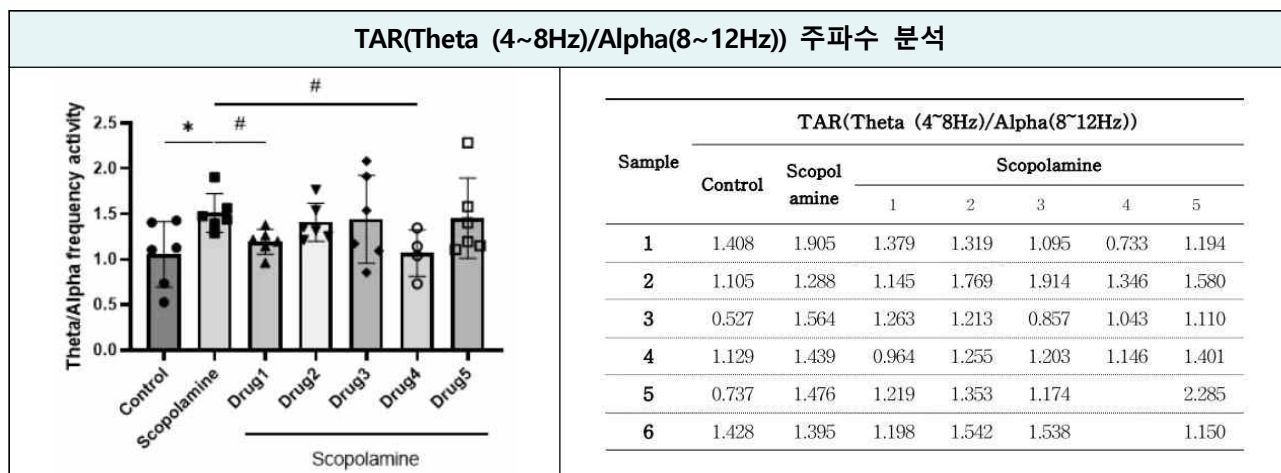
(2) DAR (Delta(0.5~4Hz)/Alpha(8~12Hz)): Scopolamine 처리 시 통계적으로 유의한 차이를 보이는 DAR (Delta(0.5~4Hz)/Alpha(8~12Hz))를 분석한 결과 Control과 비교하였을 때 Scopolamine 처리 시 DAR은 통계적으로 유의하게 증가하였으며, Scopolamine과 Drug5를 동시에 처리 시에도 통계적으로 유의하게 증가함. 또한 Scopolamine과 비교하였을 때 Scopolamine과 Drug1, Drug2, Drug3를 각각 동시에 처리 시 통계적으로 유의하게 감소하여 Control 수준까지 회복됨



(3) Delta(0.5~4Hz)/Beta(12~30Hz): Scopolamine 처리 시 통계적으로 유의한 차이를 보이는 DBR (Delta(0.5~4Hz)/Beta(12~30Hz))를 분석한 결과, Control과 비교하였을 때 Scopolamine 처리 시 DBR은 통계적으로 유의하게 증가하였으며, Scopolamine과 Drug2, Drug5를 각각 동시 처리에도 통계적으로 유의하게 증가함. 또한 Scopolamine과 비교하였을 때, Scopolamine과 Drug1을 동시 처리 시 통계적으로 유의하게 감소하여 Control의 수준까지 회복됨



(4) Theta (4~8Hz)/Alpha(8~12Hz): Scopolamine 처리 시 통계적으로 유의한 차이를 보이는 TAR (Theta(4~8Hz)/Alpha(8~12Hz))를 분석한 결과, Control과 비교하였을 때 Scopolamine 처리 시 TAR은 통계적으로 유의하게 증가하였으며, Scopolamine과 Drug1, Drug4를 각각 동시 처리 시 통계적으로 유의하게 감소하여 Control의 수준까지 회복됨



(5) 종합결론: 제브라피쉬 성어에 Scopolamine 처리 시 인지장애의 특징인 저주파와 고주파의 비율(DAR, DBR, TAR)이 유의하게 증가하여 인지장애가 발생했고, Drug1과 동시에 처리 시 DAR, DBR, TAR을 유의하게 감소시켜 Drug1은 인지장애 개선 효과가 있는 것으로 판단된다. Drug2 와 Drug3, Drug4는 유의한 차이를 보이는 마커도 있어 인지장애를 개선할 가능성은 있으나 추가적인 확인이 필요함. Drug5는 Scopolamine과 비슷한 경향을 보여 인지장애를 개선하지 못하는 것으로 판단됨.

* Drug1 : 초석잠 추출물, Drug2 : 석창포+금은화 추출물, Drug3 : 석창포+금은화+익모초 추출물, Drug4 : 초석잠+석창포+익모초 추출물, Drug5: 금은화+익모초 추출물

(3) 공동연구개발기관 : ㈜바이나리

3.1 연구방법

3.1.1 후보소재의 신경세포 사멸 억제 분석

1) MTT assay

▶ 실험방법

- ① 양성대조물질인 Vitamin C와 후보 소재인 NNIBR-1을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 b-amyloid (1-42)는 1 mg/mL의 농도로 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS (Phosphate Buffer Solution, PBS)로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화 하였고, 이를 최종 10 uM이 되도록 하여 사용하였음.
- ② PC-12 세포는 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cell/mL의 농도로 200 μl를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였음.
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리 후 올리고머화한 b-amyloid(1-42)를 처리하여 24시간 배양한 후 MTT 시약을 5 mg/mL 의 농도로 각 well에 처리하고 2시간 후에 상층액을 제거하고 100% DMSO를 첨가하여 흡광도 595 nm에서 세포 활성도를 측정하였음.

2) 세포사멸 관련 단백질 발현 분석

▶ 실험방법

- ① 시료 처리가 끝난 BV-2 세포에 protease 저해제를 함유하는 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 25 mM NaF, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, Thermo, USA)를 첨가한 후 ICE에서 10분간 반응시킨 다음 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였음.
- ② 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량하여 30~40 μg의 단백질을 10~12% SDS-PAGE에서 전기 영동한 다음 PVDF membrane으로 transfer하였음.
- ③ Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 block 시킨 후 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 하고 PBST 용액으로 3회 washing 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 1시간 동안 반응하였음. 반응이 끝난 membrane은 PBST 용액으로 10분간 3회 washing 한 다음 ECL reagent를 사용하여 반응시킨 후 LAS4,000 image 장비를 이용하여 촬영하였음.

3) LDH assay

▶ 실험방법

- ① 양성대조물질은 Vitamin C와 NNIBR-1을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 b-amyloid(1-42)는 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS (Phosphate Buffer Solution, PBS)로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화 한 것을 최종 10 uM이 되도록 하여 사용하였음.
- ② PC-12 세포는 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cell/mL의 농도로 200 μl를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였음.
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 b-amyloid(1-42)를 처리하여 24시간 배양한 후 96 well plate에 키트에 포함되어 있는 용액 완충액을 첨가하여 교반한 뒤 37°C에서 45분간 세포를 용해하였음.
- ④ 상층액을 96 well plate에 옮긴 후 반응 혼합물을 첨가한 후 차광하여 30분간 반응한 것을 490 nm 및 680 nm의 흡광도를 측정하여 결과값을 계산하였음. LDH의 활성도가 낮을수록 세포의 독성이 적음을 나타냄.

3.1.2 후보소재의 β-amyloid 형성 및 축적 억제

1) Secretase 활성 분석

▶ 실험방법

- ① 마우스의 뇌의 대뇌피질 (cortex)과 해마 (hippocampus)에서 alpha(또는 beta, gamma) -secretase 활성도를 측정하기 위해 secretase activity kit (R&D systems, Wiesbaden, Germany)를 이용하였음.
- ② Black 96-well plate에 50 μ l의 조직 sample lysate를 넣고 50 μ l의 reaction buffer와 섞은 후, reporter로써 EDANS/DABCYL가 접합된 기질 5 μ l를 첨가하여 섞어준 후 37°C에서 1시간 반응 시켰음.
- ③ Reporter인 EDANS/DABCYL은 secretase에 의해 잘려져 형광을 나타내게 되고, 형광분광계를 이용하여 Ex/EM 355/510 nm 파장으로 형광강도를 측정하였으며 fluorometric reaction으로 fluorescence unit단위를 사용하여 결과 처리 하였음.

2) ThT assay

▶ 실험방법

- ① 시험물질인 NNIBR-1 추출물을 농도별로 제작하고 b-amyloid(1-42) 올리고머는 기존의 방법으로 제작하여 사용하였음.
- ② β -amyloid(1-42) 올리고머를 50 μ g의 농도로 DMSO로 녹여 최종 125 μ M이 되도록 하였으며 ThT는 5 mM의 농도로 처치하였음.
- ③ β -amyloid(1-42) 및 NNIBR-1 추출물은 ThT로 섞어 black plate에 넣고 1시간 동안 반응 후 형광 흡광도로 결과값을 관찰하였음 (excitation : 170 nm, emission : 520 nm)

3.1.3 후보소재의 신경염증 억제

1) NO 생성 억제 분석

▶ 실험방법

- ① 마우스 microglial 세포인 BV2 세포에 lipopolysaccharides (LPS)를 처리하여 염증을 유발하였으며 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 등과 같은 염증성 매개인자에 대해 NNIBR-1의 억제 효능을 western blot 기법으로 관찰하였음.
- ② NO의 생성량은 griss reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine, 2.5% phosphoric acid)를 이용하여 측정하였음. NO 조절 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현은 western blot으로 분석하였음.
- ③ 시료 처리가 끝난 BV2 세포에 protease 저해제를 함유하는 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 25 mM NaF, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, Thermo, USA)를 첨가한 후 ICE에서 10분간 반응시킨 다음 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였음.
- ④ 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량하여 30~40 μ g의 단백질을 10~12% SDS-PAGE에서 전기영동한 다음 PVDF membrane으로 transfer하였음.
- ⑤ Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 block 시킨 후 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 하고 PBST 용액으로 3회 washing 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 1시간 동안 반응하였음. 반응이 끝난 membrane은 PBST 용액으로 10분간 3회 washing 한 다음 ECL reagent를 사용하여 반응시킨 후 LAS4,000 image 장비를 이용하여 촬영하였음.

3.1.4 후보소재의 신경전달물질 및 시냅스 가소성 조절

1) AChE 조절 분석

▶ 실험방법

- ① 실험동물에 경구투여로 약물 및 양성대조군인 타크린을 투여한 후 1시간 후 동물을 희생시켰음.
- ② 희생시킨 동물에서 뇌 전체를 적출하고 후각 신경구 (olfactory bulb)와 소뇌를 제거 한 후 pH 8.0, 0.1M Phosphate buffer를 넣은 후 Homogenization을 수행하고 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 획득하였음.
- ③ AChE 저해 활성은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하여 Ellman법으로 측정하였음.
- ④ 상등액의 효소 단백질 함량을 측정하기 위해 BCA kit를 이용하였으며, bovine serum albumin으로 작성한 검량 곡선에 준하여 함량을 환산하였음.
- ⑤ 효소 10 μ l에 조제 추출물 10 μ l를 넣어 37°C에서 15분간 반응시켰으며, 반응 혼합물에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 용해시킨 Ellman's reaction mixture [0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitro benzoic acid)] 70 μ l를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였음.

2) ChAT 조절 분석

▶ 실험방법

- ① 행동실험이 끝난 실험동물의 뇌에서 해마부분을 분리하여 cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail)로 균질화한 후 4°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 획득하였음.
- ② 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량하여 30~40 μ g의 단백질을 10~12% SDS-PAGE에서 전기 영동한 다음 PVDF membrane으로 transfer하였음.
- ③ Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 block 시킨 후 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 하고 PBST 용액으로 3회 washing 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 1시간 동안 반응하였음. 반응이 끝난 membrane은 PBST 용액으로 10분간 3회 washing 한 다음 ECL reagent를 사용하여 반응시킨 후 LAS4,000 image 장비를 이용하여 촬영하였음.

3) mGluR 조절 분석

▶ 실험방법

- ① 적출된 뇌 조직을 30 μ m 두께로 잘른 후 PBS로 조직을 washing 한 후 protease 저해제를 함유하는 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 25 mM NaF, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, Thermo, USA)를 첨가한 후 초음파 파세기로 조직을 균질화 하여 ICE에서 1시간 동안 반응시킨 다음 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였음.
- ② 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량하여 30~40 μ g의 단백질을 10~12% SDS-PAGE에서 전기영동한 다음 PVDF membrane으로 transfer하였음.
- ③ Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 block 시킨 후 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 하고 PBST 용액으로 3회 washing 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 1시간 동안 반응하였음. 반응이 끝난 membrane은 PBST 용액으로 10분간 3회 washing 한 다음 ECL reagent를 사용하여 반응시킨 후 LAS4,000 image 장비를 이용하여 촬영하였음.

4) MAPK 조절 분석

▶ 실험방법

- ① NNIBR-1 추출물을 투여한 후 ERK 및 CREB의 인산화를 관찰하기 위해 마우스의 뇌에서 해마를 분리하여 western blot sample을 획득하였음.
- ② 이를 0.31 M sucrose, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM PMSF, 50 mM NaF 및 1 mM

sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris-HCl buffer (20 mM, pH7.4)에 넣고 균질화 함. 균질액은 10분간 ice에서 반응 후 14,000 rpm으로 20분간 원심분리 하여 상등액을 사용하였음.

- ③ 단백질 함량은 BCA 시약으로 정량하여 30~40 μ g의 단백질을 10~12% SDS-PAGE에서 전기영동한 다음 PVDF membrane으로 transfer하였음.
- ④ Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)를 사용하여 block 시킨 후 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 하고 PBST 용액으로 3회 washing 후 horseradish peroxidase가 중합된 2차 항체를 1시간 동안 반응하였음. 반응이 끝난 membrane은 PBST 용액으로 10분간 3회 washing 한 다음 ECL reagent를 사용하여 반응시킨 후 LAS4,000 image 장비를 이용하여 촬영하였음

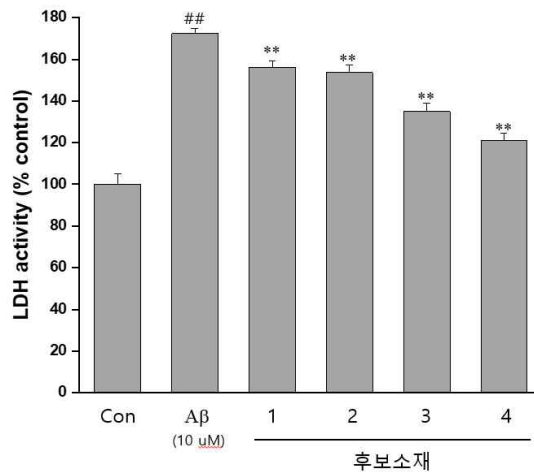
3.2 연구결과

3.2.1 후보소재의 신경세포 사멸 억제 분석

(1) MTT assay

PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 시험에서 세포 활성도가 음성 대조군에 비해 유의적으로 낮아진 것을 확인하였으며 (##, p,0.01 vs. 대조군), 4종의 후보소재의 처리시 음성대조군에 비해 세포 활성도를 증가 (**, p,0.01 vs. b-amyloid) 시켰으며 b-amyloid(1-42) 처리로 유도한 독성에 대한 신경세포의 보호 효능이 있음을 확인하였음.

(2) 세포사멸 관련 단백질 발현 분석

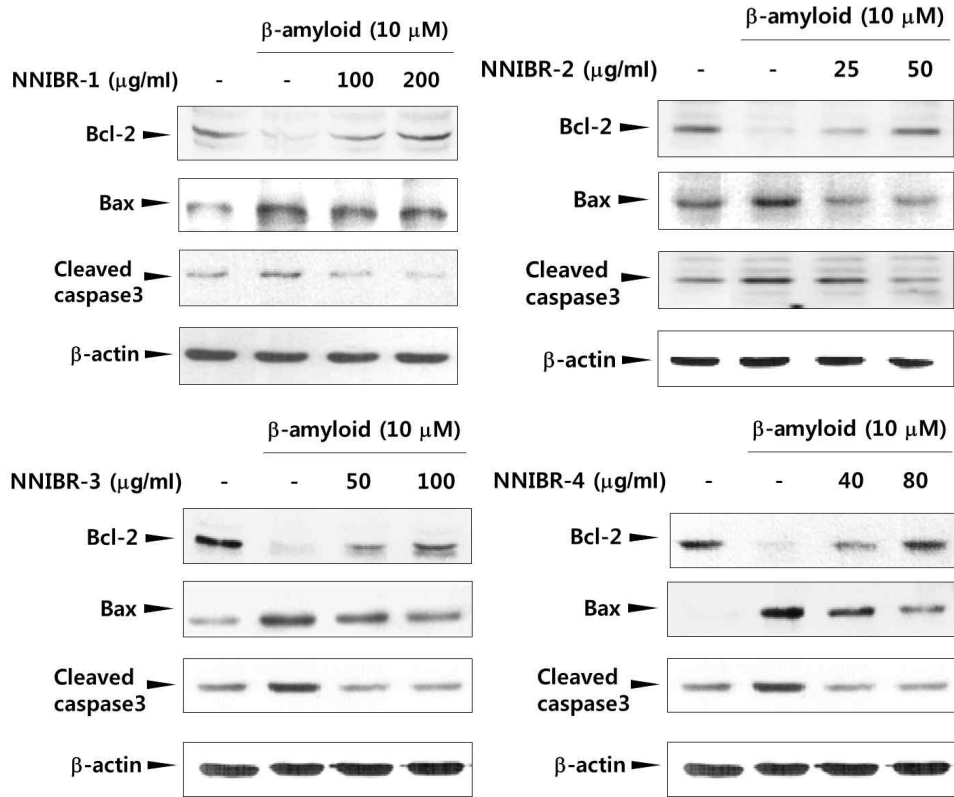


<MTT assay를 이용한 4종의 후보소재의 신경세포 보호 효과>

* 1:초석잠, 2:석창포, 3:금은화, 4:익모초

(2) 세포사멸 관련 단백질 발현 분석

4종의 후보소재에 의해 억제되는 세포사멸을 규명하기 위해 apoptosis 조절 단백질인 Bcl2/Bax의 발현 변화와 caspase의 활성 변화를 관찰하였음. 베타아밀로이드를 처리하면, apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-2 단백질의 발현이 감소되고 촉진시키는 Bax 단백질의 발현은 증가되는 반면에 4종의 후보소재를 농도별로 전처리한 경우 베타아밀로이드에 의해 변동된 Bcl-2/Bax의 발현 양상이 정상으로 회복되었음. 또한, 베타아밀로이드에 의해 증가된 caspase-3의 상대적 활성 역시 후보소재의 전처리에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었음.

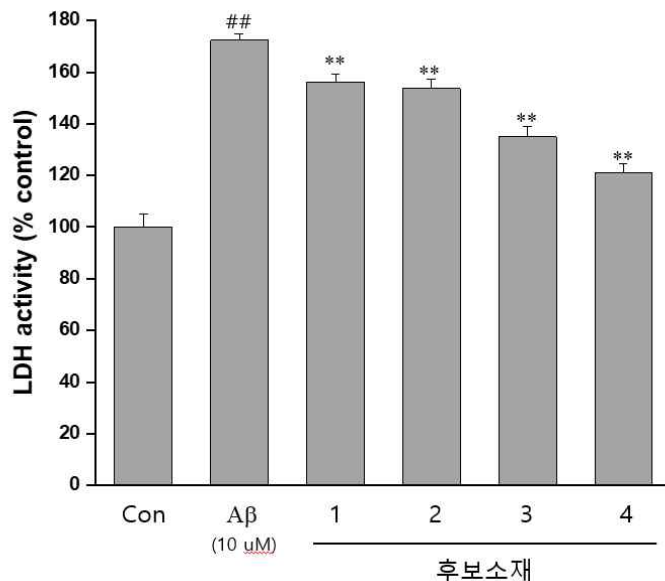


<4종의 후보소재의 신경세포 apoptosis 억제 효과>

* NNIBR 1:초석잠, 2:석창포, 3:금은화, 4:익모초

(3) LDH assay

PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 시험에서 LDH 활성도가 대조군에서 유의적으로 높아진 것을 확인하였으며 (##, $p, 0.01$ vs. 대조군), 4종의 후보소재를 각 농도별로 처리시 음성대조군에 비해 LDH 활성도를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났음. 따라서 MTT 및 western blot으로 관찰한 실험결과로 유추하여 볼 때 4종의 후보소재 모두 β -amyloid(1-42) 처리로 유도한 세포 독성을 낮추는 효능이 있음을 확인하였음.

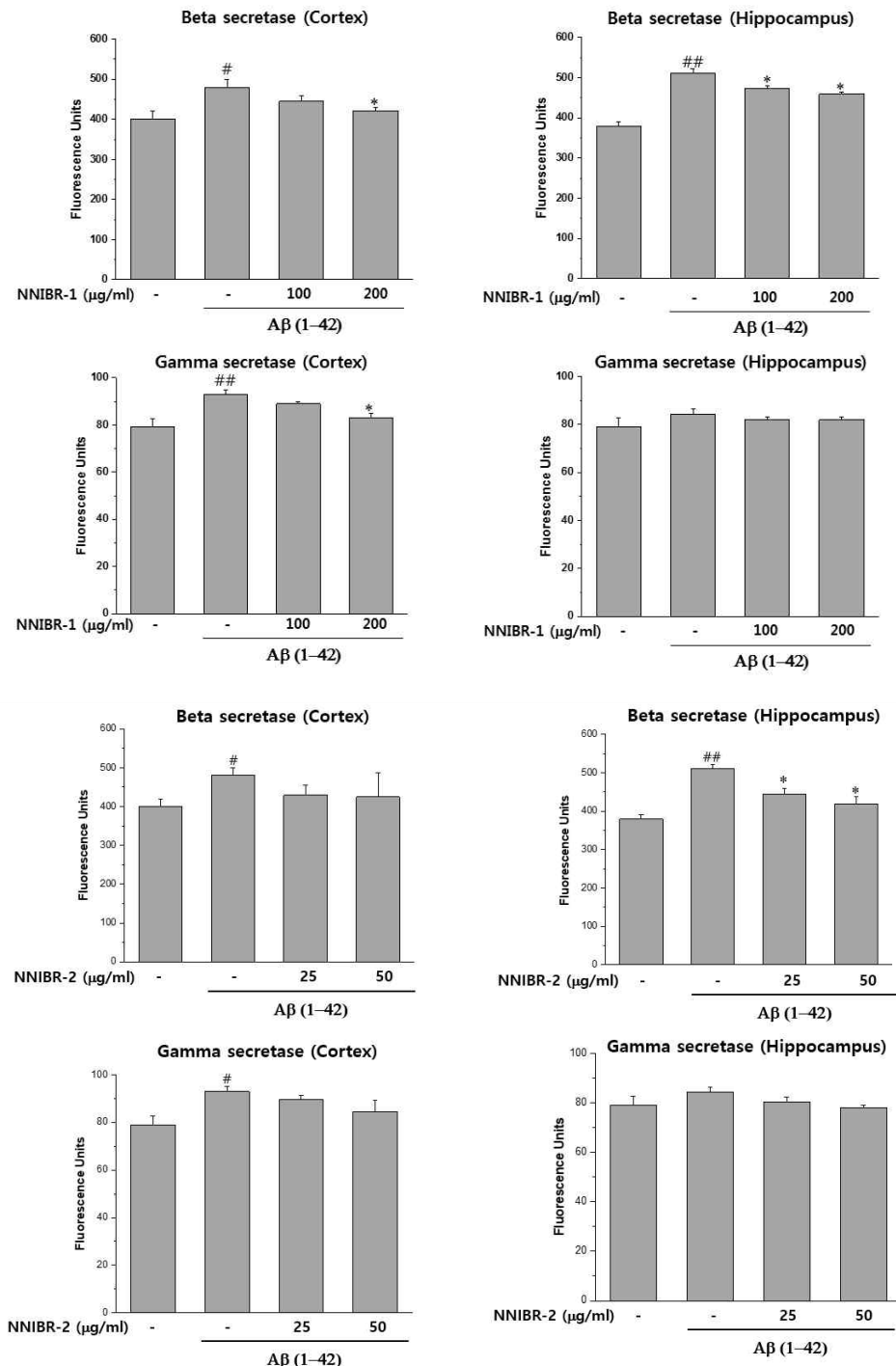


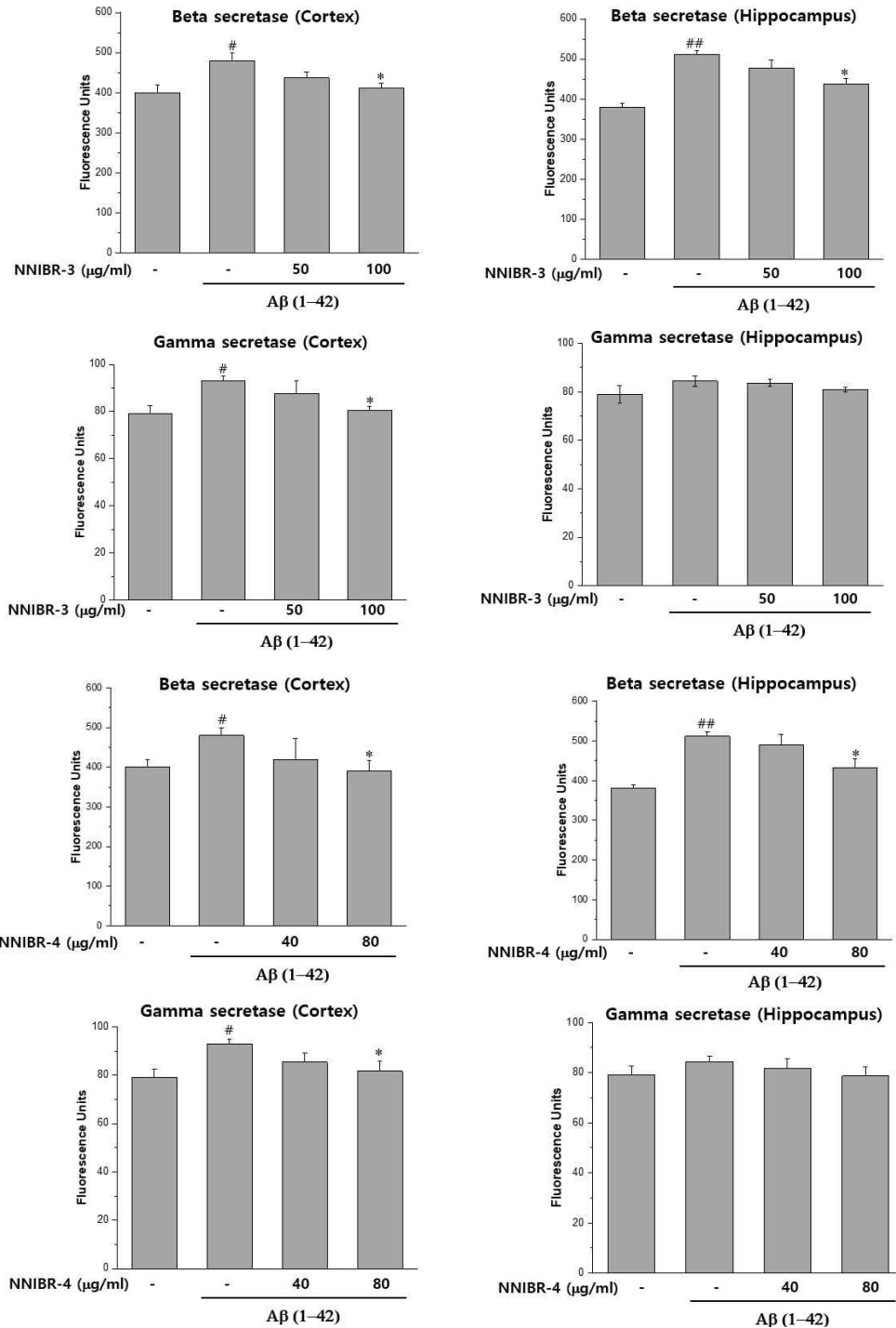
<LDH assay를 이용한 NNIBR-1 추출물의 신경세포 보호 효과>

3.2.2. 후보소재의 b-amyloid(1-42) 단백질 형성 및 축적 억제 분석

(1) Secretase 활성 분석

아밀로이드 단백질의 발현량의 감소가 베타 아밀로이드 생성에 관여하는 효소의 변화에 의한 것인지 규명하기 위해 secretase 활성을 측정하였음. 아밀로이드 베타는 beta-형의 secretase를 해마 및 피질 부위에서 과도하게 증가시키는 것으로 나타났으며 이로 인해 아밀로이드 베타의 생성이 현저히 증가 (##; $p < 0.01$ #; $0.01 < p < 0.05$ va. 대조군) 할 수 있는 것으로 평가되었음. 그러나, NNIBR-1 투여군에서는 증가된 secretase의 활성이 억제 (*, $0.01 < p < 0.05$ va. b-amyloid) 하여 대조군 수준으로 회복되는 것으로 관찰되었음.

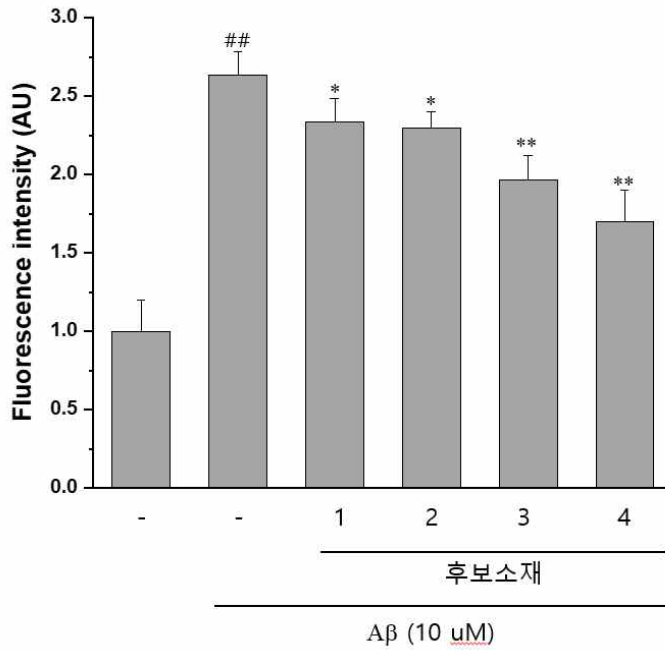




<후보소재 4종에 대한 secretase 억제 효과>

(2) ThT assay

실험결과, 음성 대조군에 비해 b-amyloid(1-42) 단백질 처리군에서 유의적으로 증가한 (##; $p < 0.01$ vs. 대조군) 단백질의 응집도가 4종의 후보소재 처리에 의해 농도 의존적으로 b-amyloid(1-42) 단백질의 응집이 억제 (*, $0.01 < p < 0.05$ vs. b-amyloid)되었음. 치매 환자에 있어 b-amyloid(1-42)의 응집은 산화적 손상을 일으켜 신경세포가 사멸하는 주요한 원인으로 보고되고 있으며 이는 기억력을 감퇴시킬 수 있음. b-amyloid(1-42) 투여로 인해 제작된 치매 모델 마우스에서 4종의 후보소재의 기억력 개선 효과의 일부는 b-amyloid(1-42) 단백질의 응집 억제에 의한 것으로 평가되었음.

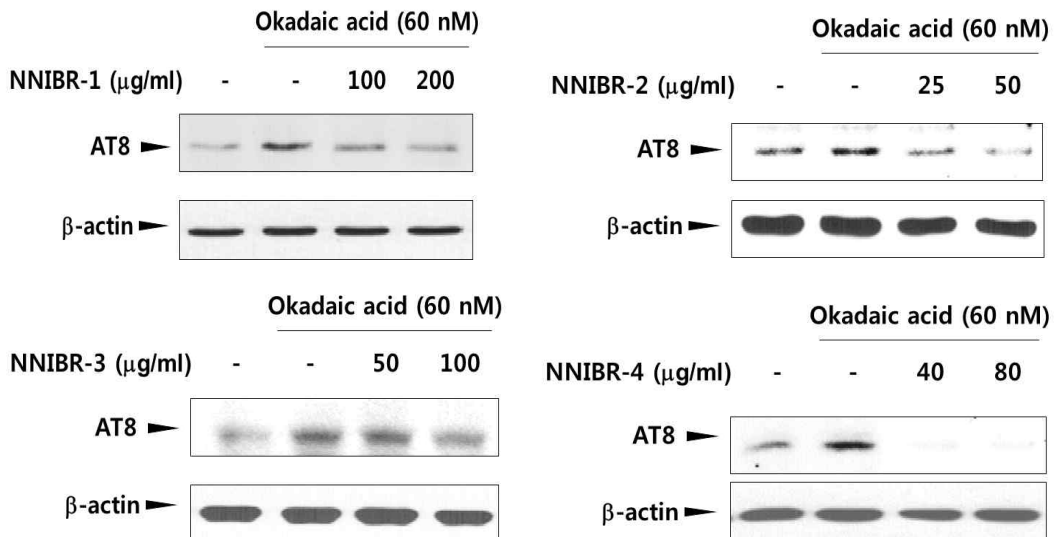


<4종의 후보소재에 의한 b-amyloid 응집 억제 능력>

3.2.3 후보소재의 Tau protein 과인산화 억제 관련 바이오마커 분석

(1) Tau protein 형성 및 과인산화 억제

실험결과 okadaic acid를 처리하는 경우 control 대조군에 비해 단백 발현이 현저히 증가 (##; $p < 0.01$ vs. 대조군) 하였으며 4종의 후보소재를 농도별로 처치한 결과 okadaic acid에 의해 유도된 과인산화가 농도 의존적으로 감소 (*, $0.01 < p < 0.05$ vs. Okadaic acid)하는 것으로 관찰되었음.

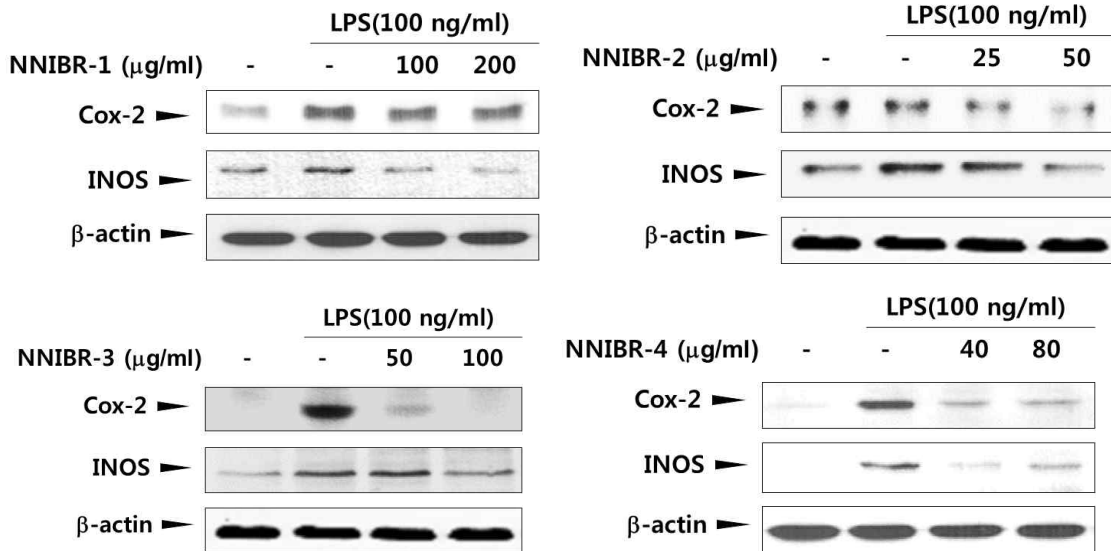


<후보소재 4종에 대한 Tau 인산화 억제 효과>

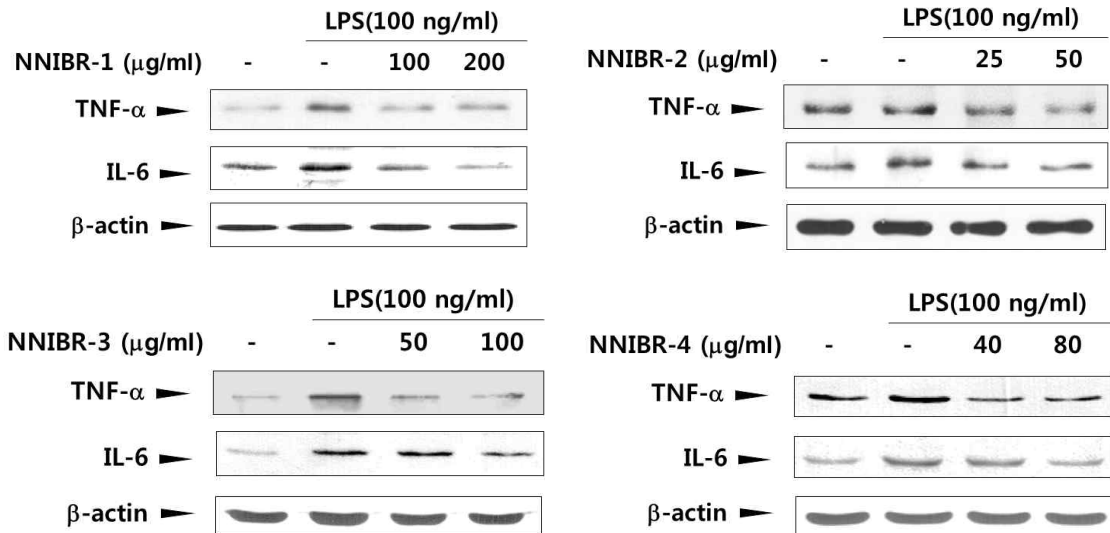
(2) 신경염증 억제 관련 바이오마커 및 산화 질소 생성 억제 분석

4종의 후보소재 추출물의 뇌 신경염증에 미치는 효능을 관찰하기 위해 LPS로 활성화를 유도한 후 염증반응의 표지 인자로 사용되는 NO의 생성량과 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현 변화를

분석하였음. LPS 처리군은 대조군에 비해 NO의 생성량이 현저히 증가 (##; $p < 0.01$ vs. 대조군) 하였으나 후보소재 처리에 의해 NO의 생성량이 감소 (*, $0.01 < p < 0.05$ vs. LPS)하는 것으로 나타났으며 NO의 분비 조절에 관여하는 iNOS와 COX-2의 단백질의 발현도 동일하게 감소하는 것으로 관찰되었음. 이는 4종의 후보소재 추출물이 항신경염증 활성을 가지는 것으로 확인할 수 있음.



<후보소재 4종에 대한 NO 생성 단백질 발현 억제 효과>

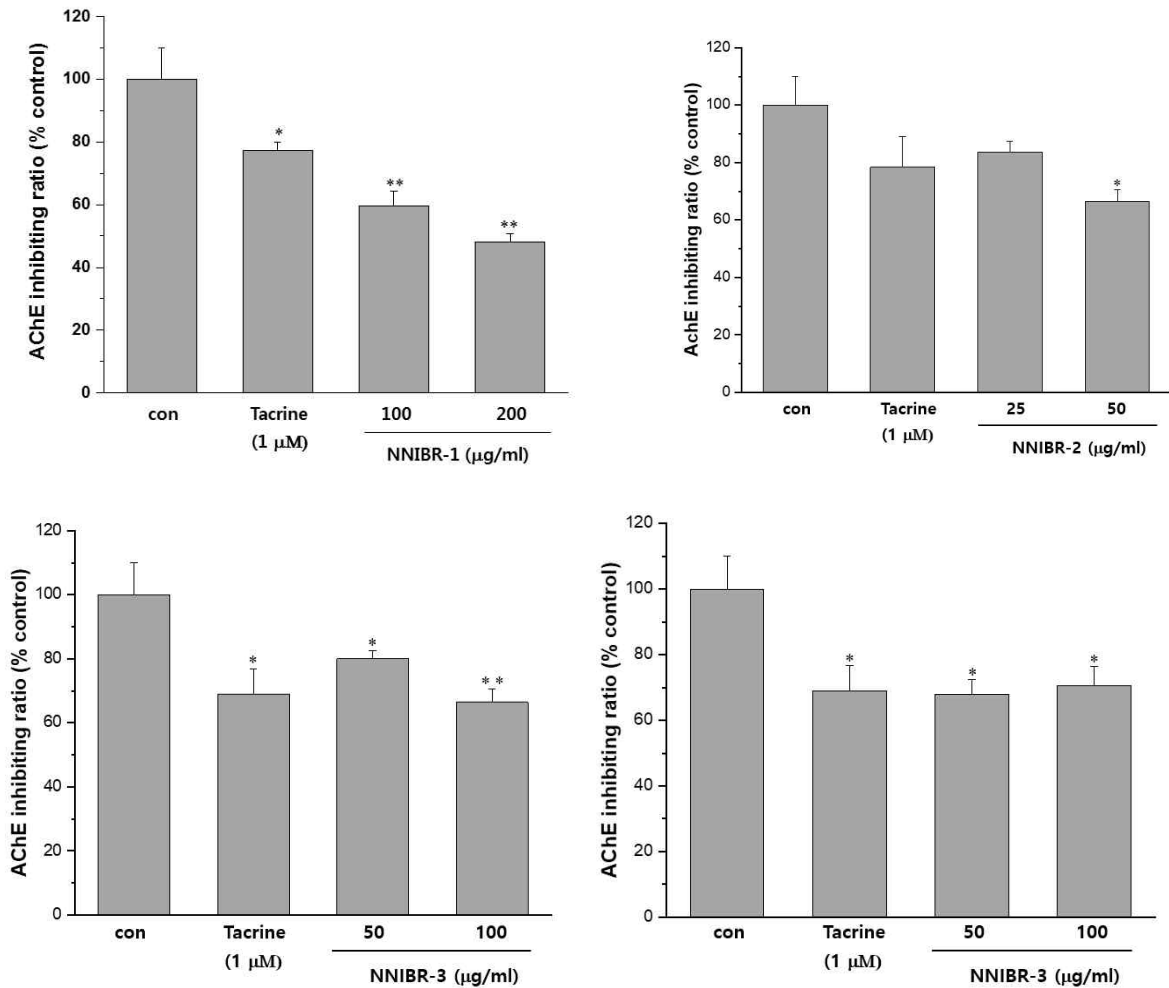


<후보소재 4종에 대한 염증성 사이토카인 발현 억제 효과>

3.2.4 신경전달 물질 생성 및 분비 조절

(1) AChE 조절 분석

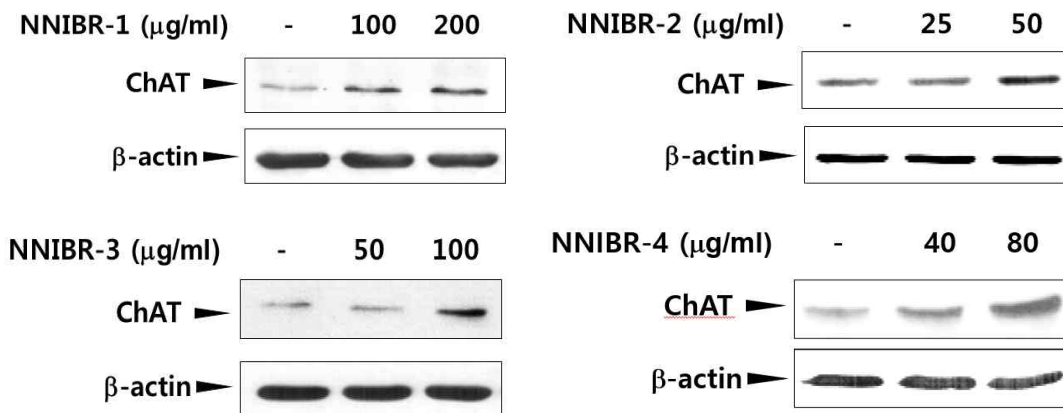
NNIBR-1 추출물의 AChE 저해 활성을 측정한결과 농도 의존적으로 효소 활성 저해 효능 (**, $p < 0.01$, *, $0.01 < p < 0.05$ vs. control)을 나타내었으며 이는 acetylcholine성 신경세포의 기능을 강화시켜 줄 수 있는 AChE 저해 목적의 기능성 후보 소재로서의 활용가치가 높을 것으로 사료됨.



<후보소재 4종 추물물의 AChE 활성 저해 효과>

(2) ChAT 조절 분석

아세틸콜린 합성 효소인 ChAT의 활성은 기본적인 뇌기능의 수행에 있어 콜린성신경계 퇴행에서 ChAT의 활성 감소가 보고된바 있음. 따라서, ChAT의 증가에 의한 아세틸콜린 합성능의 향상은 인지기억력 장애 해소에 효과가 있을 것으로 사료됨. 본 연구에서 관찰된 결과 4종의 후보소재는 뇌조직에서의 ChAT 단백 발현을 증가 (**, p<0.01 vs. control)시키는 것으로 나타났으며 이는 인지기억력의 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

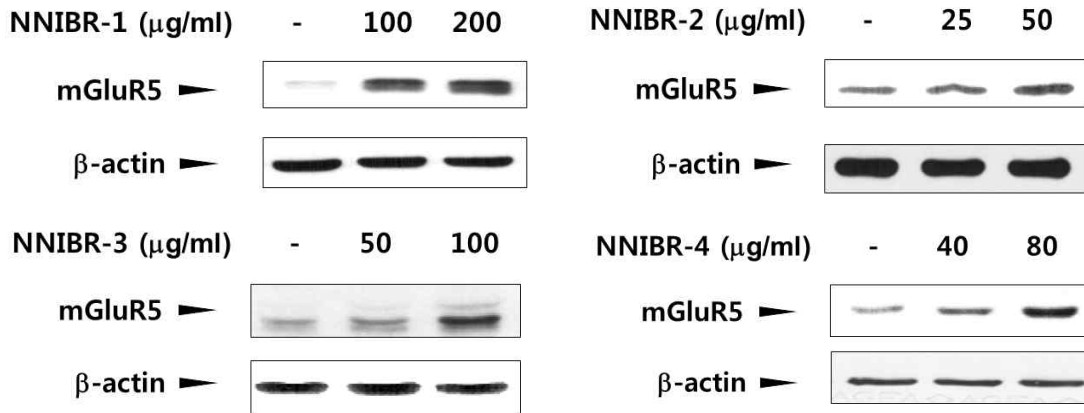


<후보소재 4종에 대한 ChAT 활성 증가 효과>

3.2.5 시냅스 가소성 조절

(1) mGluR 조절 분석

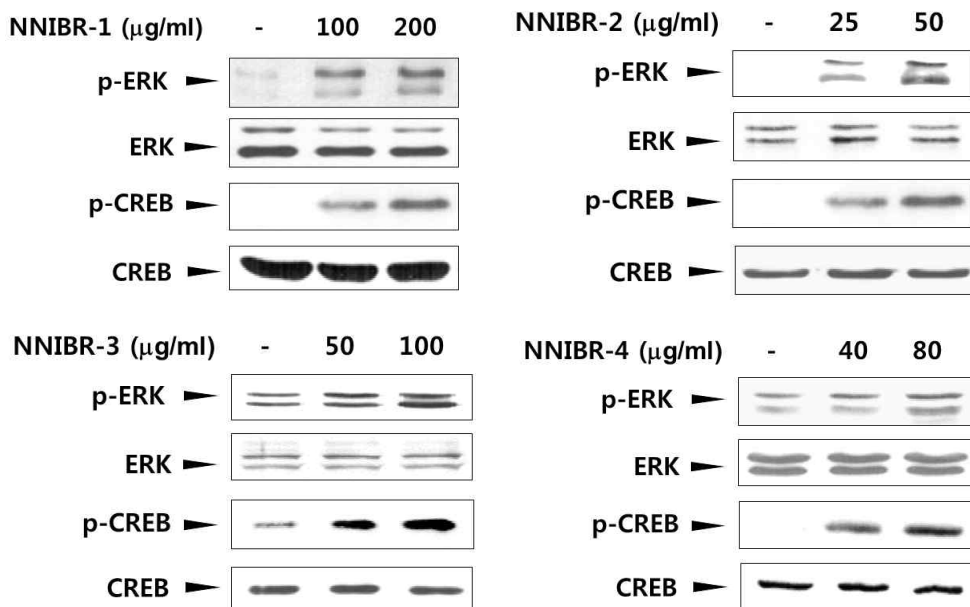
4종의 후보소재가 mGluR의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 4종의 후보소재 모두 mGluR5의 단백 발현을 증가 (**, $p < 0.01$ vs. control)시키는 경향으로 나타났으며 이는 신경보호 및 신경 조직 형성 효과를 나타내는 것으로 확인되며 뇌 인지장애를 개선하는데 유효할 것으로 사료됨.



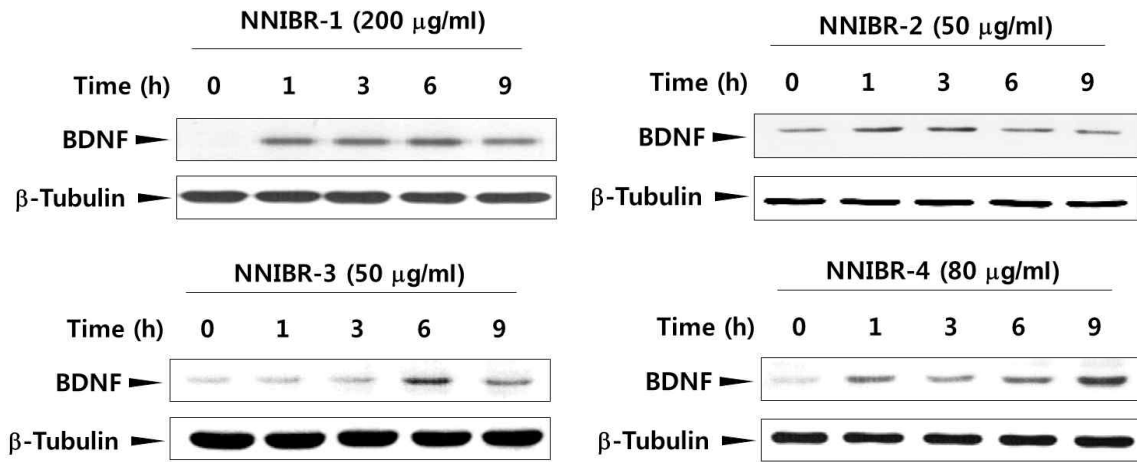
<후보소재 4종에 대한 mGluR5 활성화 증가 효과>

(2) MAPK 조절 분석

실험결과 후보소재 4종의 추출물 투여는 대조군에 비하여 유의적으로 ERK와 CREB의 인산화를 증가시켰음. 또한, 기억력 형성과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 BDNF 또한 후보소재 투여 후 3시간, 9시간 뒤 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음. ERK-CREB-BDNF 신호는 해마의 시냅스에서 기억력의 장기기억강화 (Long-term potentiation, LTP)와 깊은 관련성이 있으며, 본 실험 결과를 통해 선별된 4종의 후보소재의 기억력 개선 효능이 장기 기억 강화에 영향을 주는 것으로 사료됨.



<후보소재 추출물에 대한 mGluR5 활성화 증가 효과>

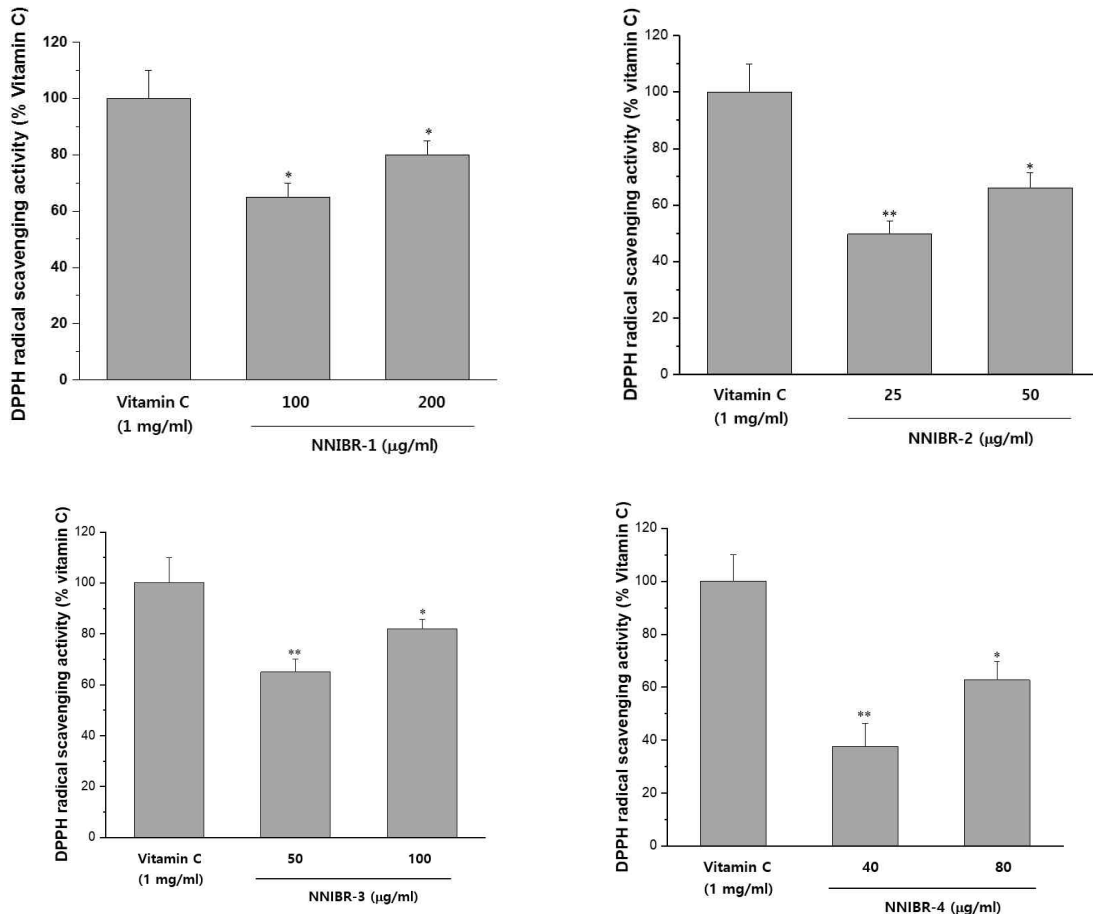


<후보소재 추출물의 BDNF 활성 증가 효과>

3.2.6 산화스트레스 억제

(1) 활성산소종 (ROS 분석)

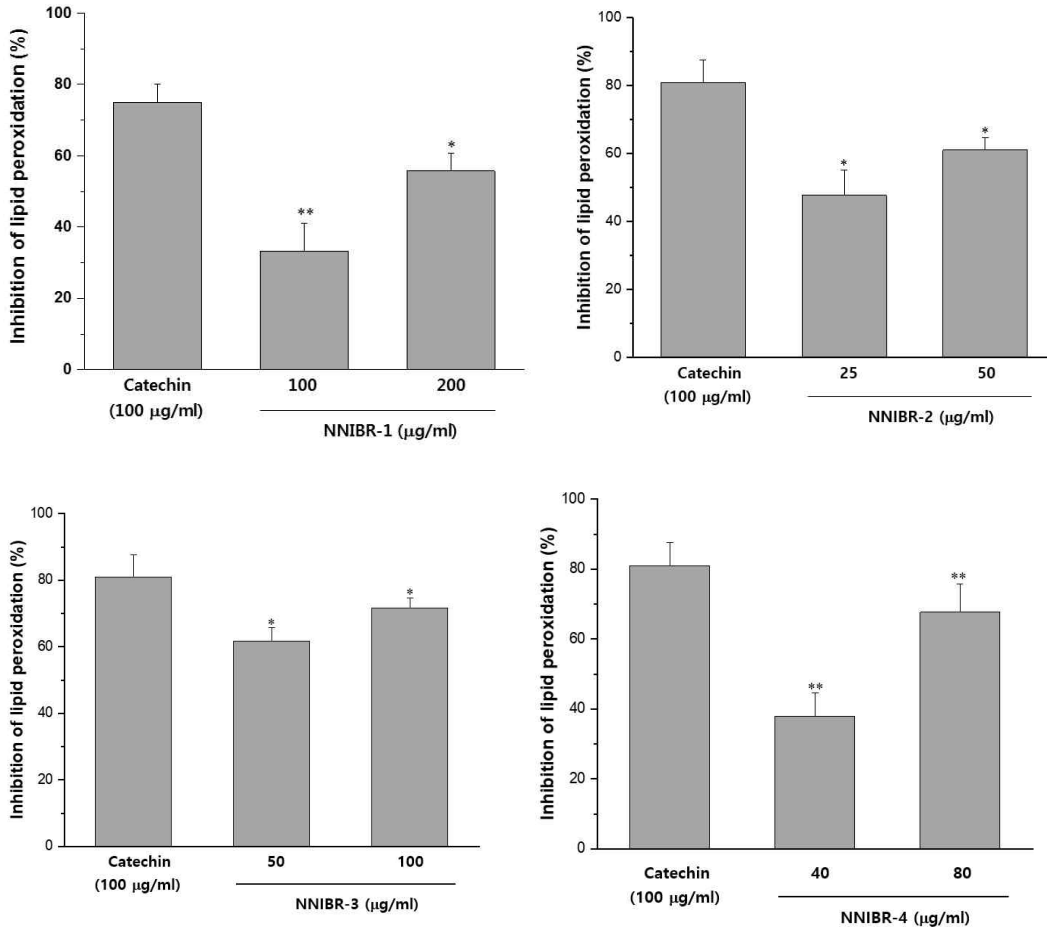
4종의 후보소재 추출물의 DPPH 소거활성 결과 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, positive control로 사용된 vitamin C (1 mg/ml)에 가까운 항산화 활성을 나타내었음. 본 결과는 후보소재 추출물에 폴리페놀성 화합물과 같은 비교적 극성이 큰 화합물들이 다량 함유되어 있기 때문이라 사료됨.



<후보소재 4종 추출물의 활성산소 소거 효과>

(2) 지질 과산화 억제 활성

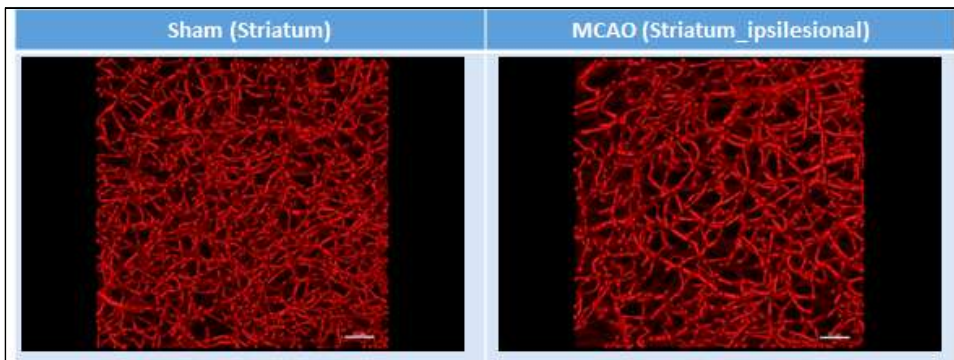
4종의 후보소재 추출물을 이용한 지질 과산화 억제 활성은 농도 의존적으로 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났으며 positive control로 사용된 산화 방지제인 catechin 100 $\mu\text{g/ml}$ 에 가까운 저해 활성을 가지는 것 (**, $p < 0.01$ vs. control,)으로 확인되었음. 이는 항산화 및 산화적 스트레스로부터 나타나는 지질의 과산화로 인한 신경세포 보호 효과를 나타내어 퇴행성 신경질환 등을 예방할 수 있는 기능성 식품 소재로서의 활용 가치가 높다고 판단됨.



<후보소재 4종 추출물의 지질과산화 억제 효과>

3.2.7 뇌혈관 강화 효능 평가

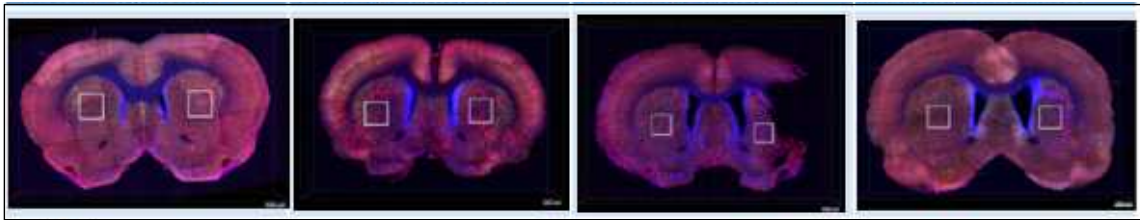
- 천연후보물질의 뇌 혈관 강화 효능 평가를 위해 MCAO stroke 유발 모델에서 혈관의 보호 및 강화 효능을 관찰하였음.



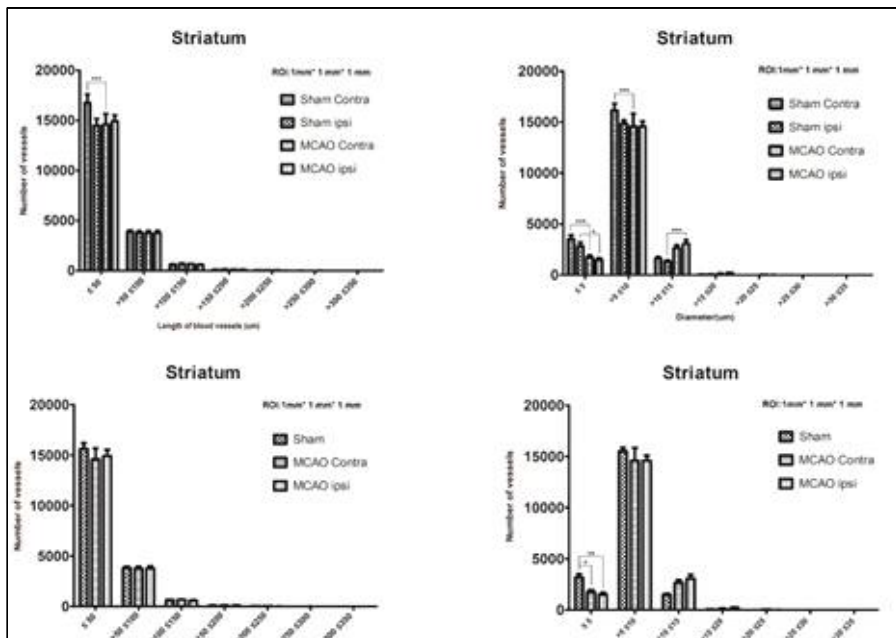
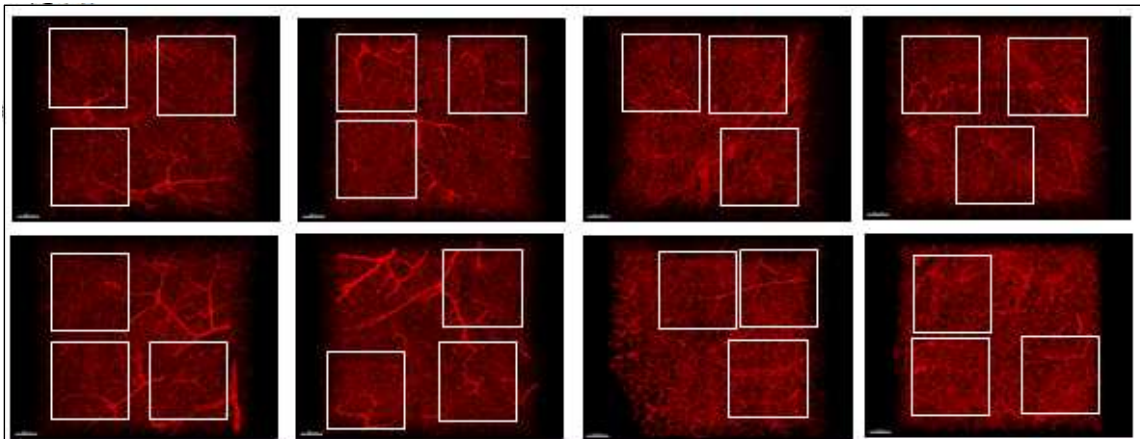
: 혈관의 정량적 분석을 위해 Imaris 프로그램을 활용하여 MCAO가 유발된 마우스의 brain에서 혈관의 정량적 분석, 가우스 필터링 채널에서 Imaris program의 필라멘트 트레이서의 모듈을

활용하여 미세혈관의 길이와 직경을 측정하였음.

- 천연후보물질을 전처리한 후 MCAO strock을 유발한 후 혈관의 보호 효능을 관찰한 결과 후보 소재가 뇌혈관의 보호에 미치는 영향은 유의성있게 관찰되지 않았으며, 이는 MCAO 유발 모델의 중증도 및 약물의 처리 기간에 따라 약물의 보호 효과의 차이가 있을 것으로 예상됨.



<MCAO 유발후 뇌조직의 혈관 및 세포핵 관찰 : MCAO, MACO+약물 처리군>



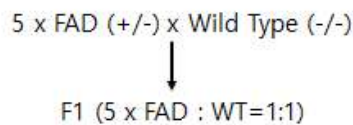
<MCAO 유발후 부위별 혈관의 길이와 직경 관찰 : MCAO, MACO+약물 처리군>

3.2.8 기억력 및 인지기능 개선 기능성 평가

- 인지능력 및 기억력 개선평가를 위한 바이오마커 (식약처 건강기능식품 평가 가이드)
: 인지기능 개선 효능 평가를 위해 5XFAD 치매 형질전환 마우스를 제작하였으며 8주동안 경구투여한 후 각 항목에 해당하는 결과를 관찰하였음.

항 목	바이오 마커	시험방법
베타아밀로이드 형성 및 축적 억제	베타아밀로이드 단백질	조직 염색
타우 단백질 과인산화 억제	과 인산화 타우 단백질	조직 염색
신경염증억제	염증성 사이토카인 (IL-6, TNF- α , IL-1 β)	ELISA
신경전달 물질 조절	Acetylcholinesterase activity (AChE)	activity assay
	Choline acetyltransferase (ChAT)	조직 염색
산화스트레스 억제	글루타치온	조직 염색
동물행동시험	공간 기억력 시험	수중미로 시험법
	단기기억 및 인지능력 시험	Y 미로 시험법

1. 치매 쥐: 5 x FAD (hAPP + hPSEN1: 5 mutations), Jackson Laboratory



2. 실험 군: WT 5군 (vehicle, Donepezil, 조석잠 3), 5 x FAD 5군 (vehicle, Donepezil, 조석잠 3)
3. 행동 시험: 15 ~ 20 마우스/군
4. Assay 시험: 5 ~ 6 마우스/군

<치매쥐 형질전환 마우스 제작 및 실험군>

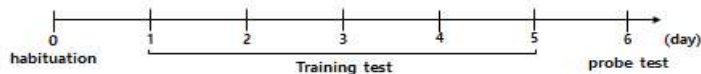
- 동물행동시험 종류 및 방법 (수중미로 시험)

1.1 수중미로 시험

- 수중미로 방법



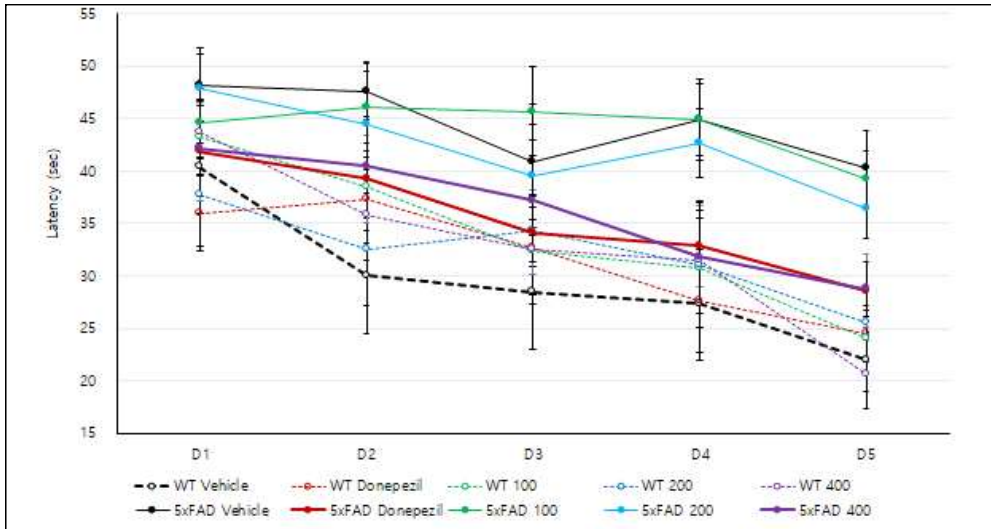
- 수중미로 스케줄



- Test 종류: training test, probe test

- Training test : 날짜 별 도피대 도착시간 변화 추이

: 5XFAD 치매 마우스에서 대조약물로 사용된 도네페질과 후보소재를 농도별로 8주동안 전처치한 후 5일동안 수중 미로 훈련을 실시하였음. 실험결과 5XFAD 치매 모델에서 후보소재를 전처치한 군에서 농도 의존적이지는 않으나 공간기억력을 개선하는 것으로 관찰되었음.



<수중미로 훈련 (학습)을 통해 형성되는 공간기억에 미치는 후보소재의 효과 관찰 : 도피대 도착 시간을 측정>

- Training test : 수중 미로 훈련 5일째 도피대 도착 시간
- : 수중 미로 훈련 기간 동안 치매 유발 군의 도피대에 도착하는 시간이 감소되는 것을 관찰하였으며 치매군의 경우 훈련 초기부터 도피대에 도착하는 시간이 긴 것으로 나타남. 후보소재를 전투여 한 경우 도네페질을 섭취한 군과 400 mg/kg 투여군에서 유의적으로 평균 도착 시간이 감소한 것을 확인하였음.

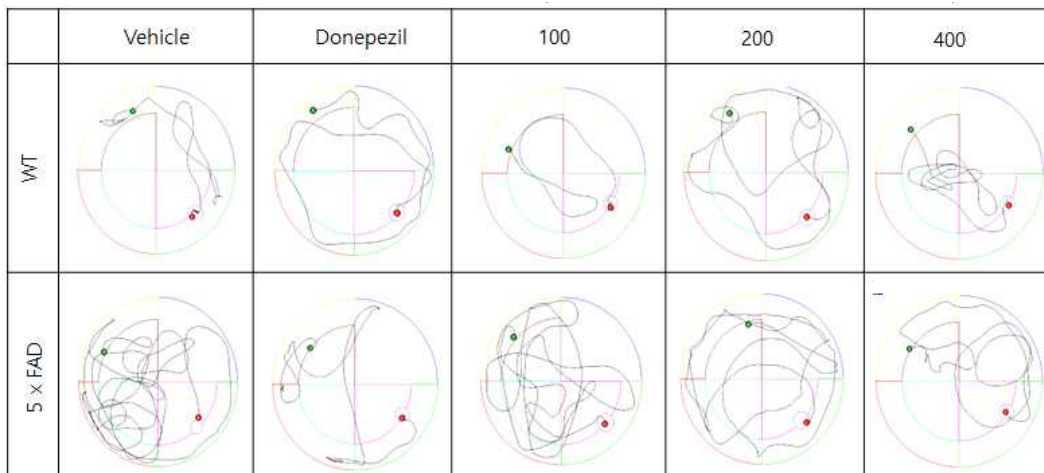
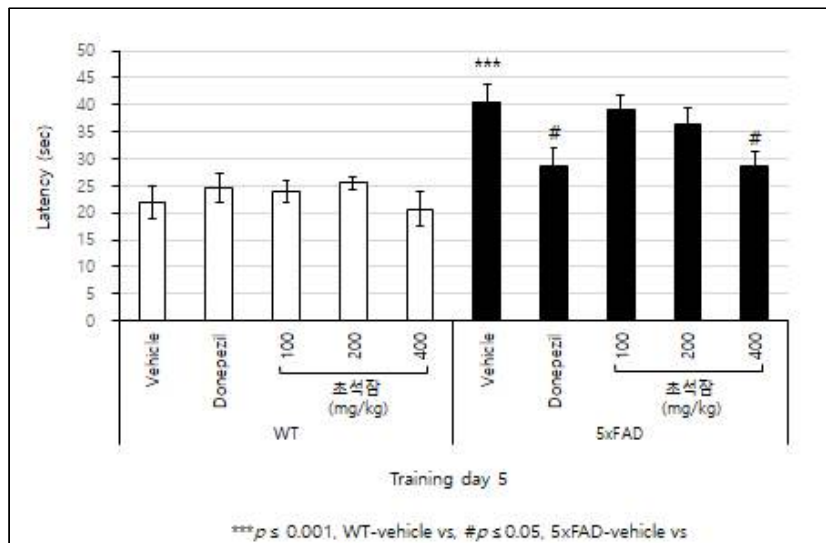
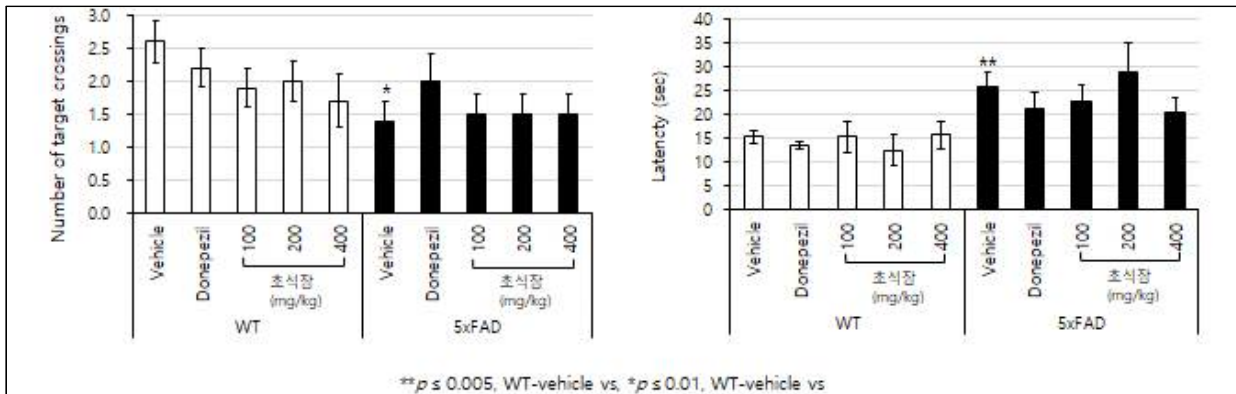


그림. 수중미로 훈련(학습)을 통해 형성되는 공간기억에 미치는 조석잠의 효과 관찰: 도피대 도착 거리

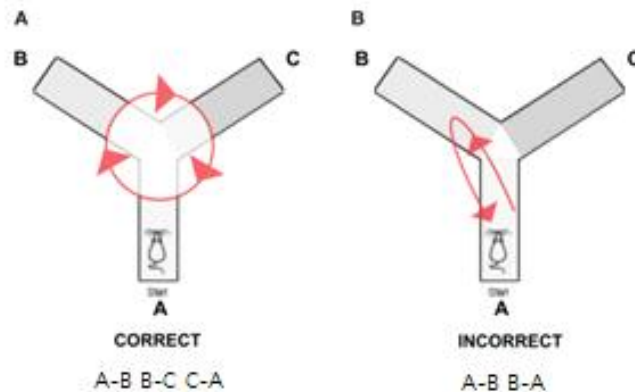
<수중미로 훈련 (학습)을 통해 형성되는 공간 기억에 미치는 후보소재의 효과 : 도피대 도착 시간>

- Probe test : 후보소재의 도피대의 정확한 위치 기억에 미치는 효과 관찰
 : 5XFAD치매 유발모델을 활용하여 도피대 위를 지나는 횟수를 관찰하였으며 치매군의 경우 정상군에 비해 도피대의 위치를 기억하지 못하는 것으로 관찰되었음. 그러나, 도네페질과 후보소재의 전투어 군의 경우 감소하는 경향은 보였으나 유의성은 나타나지 않았음.

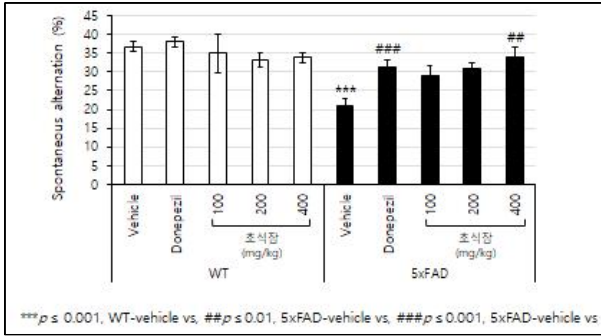


<Probe test : 정확한 위치기억에 미치는 효과 관찰>

- 동물행동시험 종류 및 방법 (Y자 미로 시험)



- Y자 미로 테스트를 통한 단기 기억력에 미치는 효능 관찰
 : 정상군과 치매군의 spontaneous alteration비율을 관찰한 결과 치매 유발 마우스의 경우 현저히 감소하는 것으로 관찰되어 단기 기억이 저하됨을 확인하였음. 그러나, 대조약물인 도네페질과 후보소재의 경우 SA비율이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되어 후보소재의 단기 기억력 증진에 효과가 있음을 확인하였음.

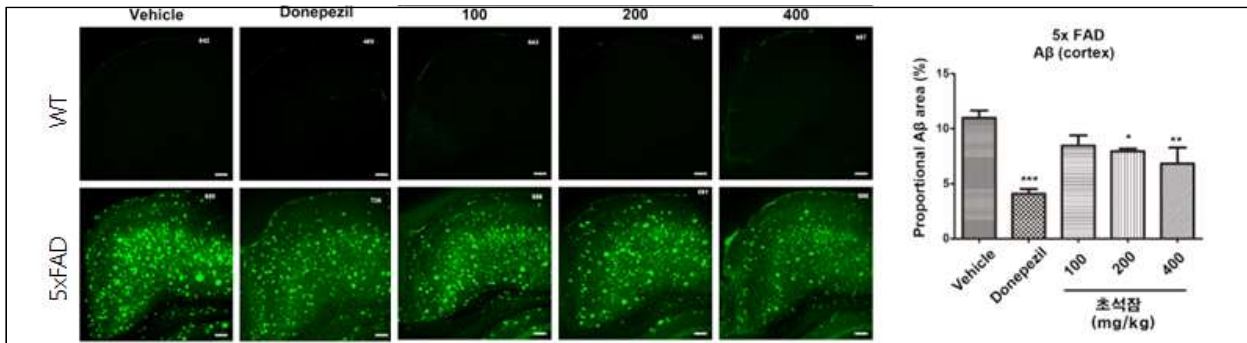


Subject Genotype	Subject Treatment (mg/kg)	Total arm Entries	Total Distance (cm)
WT	Vehicle	37.7 ± 2.0	1797.6 ± 115.2
	Donepezil	41.2 ± 4.1	1952.9 ± 307.7
	Chosikgam 100	35.7 ± 2.0	1577.7 ± 145.2
	Chosikgam 200	39.7 ± 3.8	1567.1 ± 160.0
	Chosikgam 400	38.1 ± 2.4	1424.3 ± 131.4
5xFAD	Vehicle	38.1 ± 2.1	1812.4 ± 125.4
	Donepezil	41.1 ± 3.9	1517.0 ± 75.9
	Chosikgam 100	35.2 ± 3.9	1809.2 ± 223.2
	Chosikgam 200	35.9 ± 2.6	1612.5 ± 93.1
	Chosikgam 400	35.6 ± 3.2	1873.7 ± 161.0

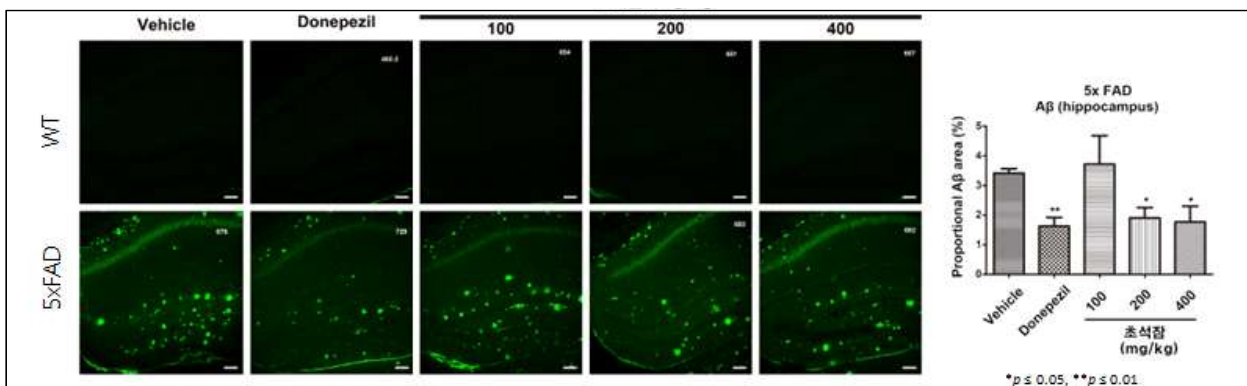
3.2.9 Beta amyloid 억제 효능 평가

- Beta amyloid 축적에 미치는 후보소재의 효능을 평가하기 위해 8주간 양성대조군과 후보소재를 전투여 한 후 마우스 brain을 적출하고 thioflavin s로 염색한후 lightsheet 현미경으로 이미지를 관찰하였음.

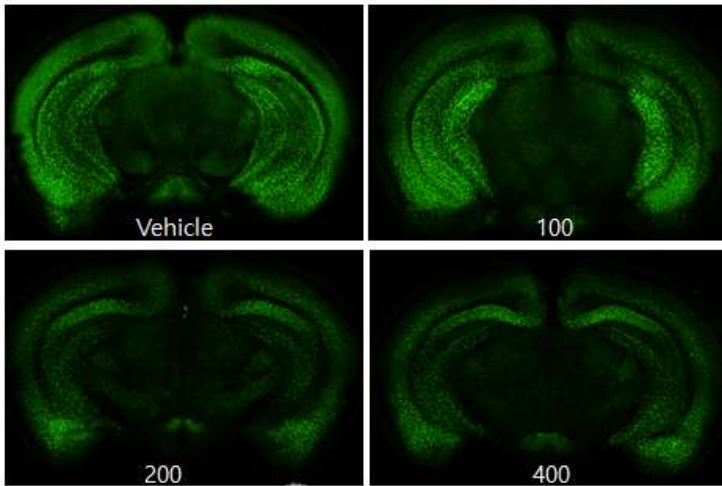
: 5xFAD 치매 모델의 경우 amyloid의 축적이 현저히 증가하였으며, 양성대조군인 도네페질과 후보소재를 투여한 군에서는 amyloid의 축적이 유의적으로 감소하는 것으로 확인하였음.



<대뇌 피질에서의 beta amyloid 억제 효과>



<Hippocampus에서 beta amyloid 억제 효과>

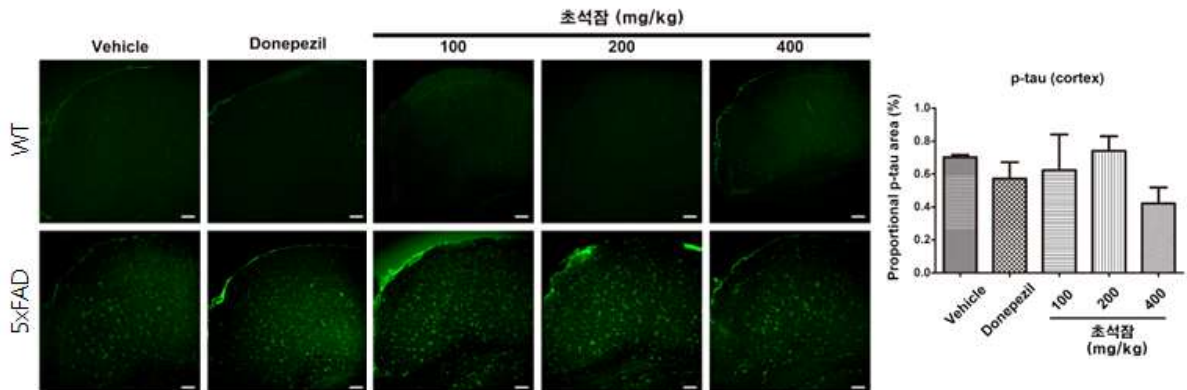


	spot	volume (μm^3)	spot / $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$
5x FAD vehicle	5.96×10^4	2.64×10^{10}	2.26
5x FAD 100	5.65×10^4	3.18×10^{10}	1.78
5x FAD 200	3.47×10^4	2.51×10^{10}	1.38
5x FAD 400	4.04×10^4	3.64×10^{10}	1.11

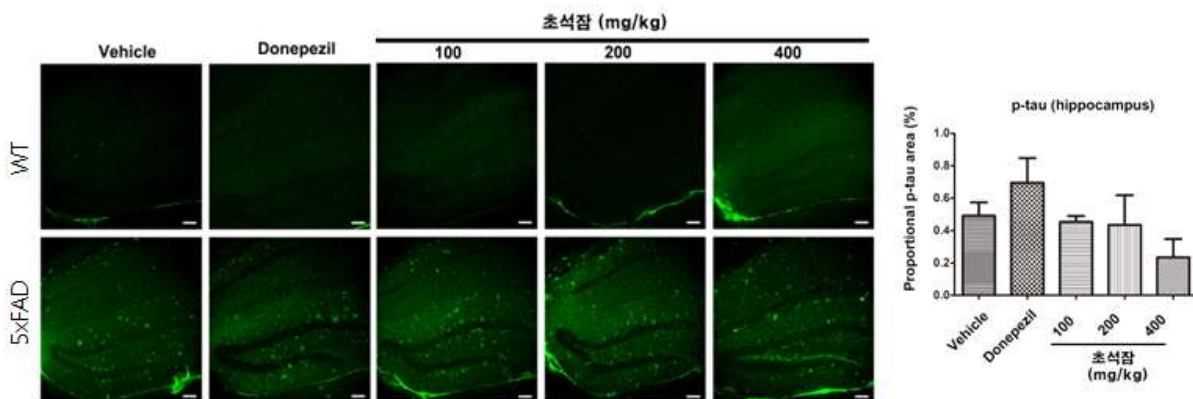
<1 mm 두께의 조직에서 조직투명화를 통한 beta-amyloid 억제 효과 관찰>

3. Beta amyloid 억제 효능 평가 (Tau phosphorylation 억제 효과)

- Beta amyloid 축적에 미치는 후보소재의 효능을 평가하기 위해 8주간 양성대조군과 후보소재를 투여한 후 마우스 brain을 적출하고 phospho-tau 항체를 활용하여 면역염색하였음.
- : 실험 결과 대뇌 피질과 기억을 담당하는 뇌 부위인 hippocampus에서 tau의 과인산화 억제 효과를 관찰한 결과 후보소재 투여에 따른 유의적인 결과가 관찰되지 않았음



<대뇌 피질에서 p-Tau 면역염색 결과>



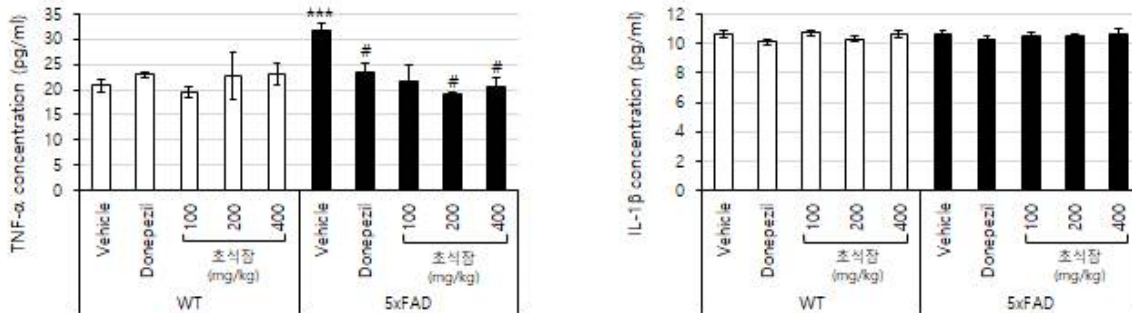
<Hippocampus에서 p-Tau 면역염색 결과>

3.2.10 염증성 사이토카인 억제 효능 평가

- 치매 유발 마우스 모델에서 후보소재와 양성대조군 약물을 8주간 투여하고 염증성 사이토카인

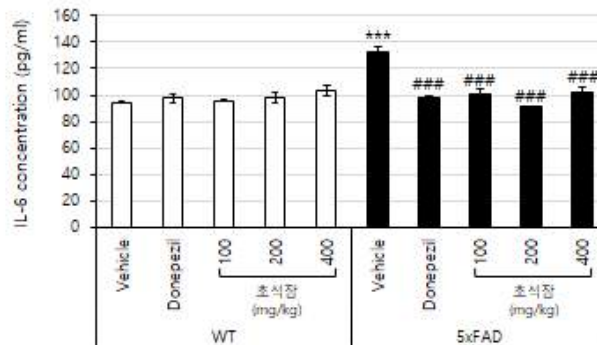
의 발현 억제 효능을 평가하였음.

: 뇌조직에서의 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 억제 효과를 ELISA법으로 관찰한 결과 후보소재 투여에 따른 감소효과는 TNF- α 는 유의적으로 나타났으나 IL-1 β 의 경우 특이적인 감소효과는 관찰되지 않았음.



<약물 투여에 따른 염증성 사이토카인 억제 효과 : TNF- α , IL-1 β >

: IL-6의 경우 치매 유발 마우스에서 현저히 증가하는 것으로 나타났으며 후보소재의 농도 의존적으로 IL-6의 발현을 감소시키는 것으로 관찰되었음.



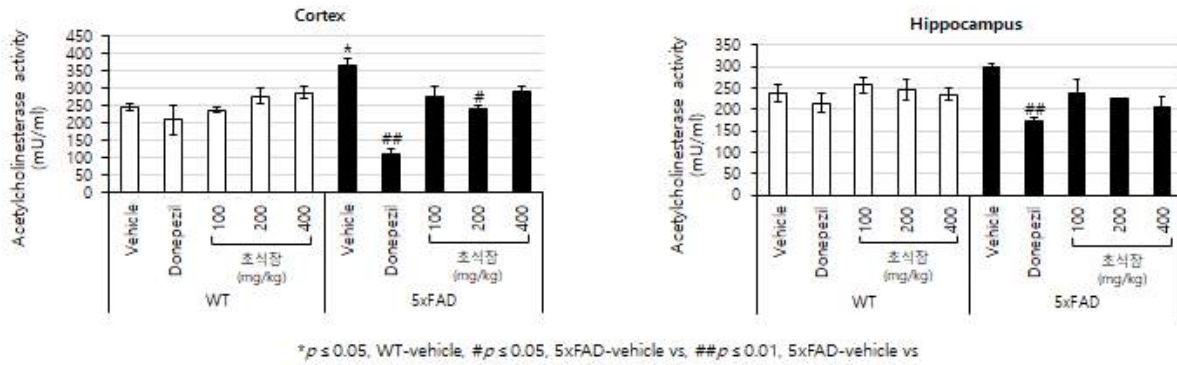
*** $p \leq 0.001$, WT-vehicle vs. ### $p \leq 0.001$, 5xFAD-vehicle vs

<약물 투여에 따른 염증성 사이토카인 억제 효과 : IL-6>

3.2.11 신경전달물질 전달효소 활성 평가

- 치매 유발 마우스 모델에서 후보소재와 양성대조군 약물을 8주간 투여하고 신경전달물질 전달효소의 활성을 평가하였음.

: 후보소재의 신경전달 물질 조절 효능을 평가하기 위해서 8주간 약물을 투여한 치매 마우스의 뇌조직을 분리하고 단백질을 추출한 후 신경전달 물질인 acetylcholinesterase (AChE) activity를 ELISA로 관찰하였음. 실험결과 5XFAD 치매 마우스의 경우 AChE의 활성이 현저히 감소하는 것으로 나타났으며, 양성 대조군과 후보소재를 전투여한 군의 대뇌 피질에서 AChE의 유의적인 활성 억제 효과가 관찰되었음. 그러나, hippocampus에서는 감소하는 경향은 있으나 유의적인 효과는 없는 것으로 확인하였음.

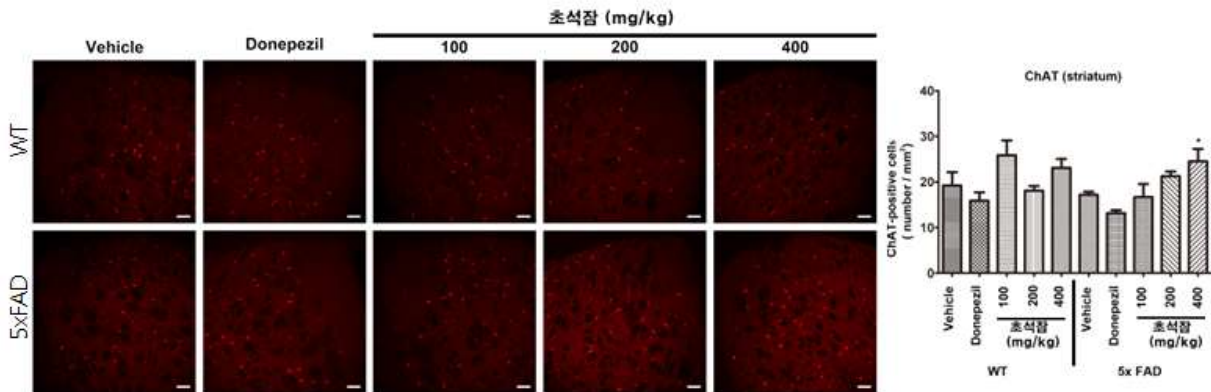


<약물 투여에 따른 신경전달물질 전달효소 활성 억제 효능 평가>

3.2.12 신경전달물질 활성효능 평가

- 치매 유발 마우스 모델에서 후보소재와 양성대조군 약물을 8주간 투여하고 신경전달물질의 활성을 평가하였음.

: 후보소재의 신경전달물질 활성화에 미치는 효능을 평가하기 위해서 8주간 약물을 투여한 치매 마우스의 뇌조직을 분리하고 슬라이드를 제작한 후 항체를 활용한 면역염색법으로 신경전달물질의 발현을 관찰하였음. 실험결과 5XFAD 치매 마우스의 경우 choline acetyltransferase의 활성이 억제되어 있는 것으로 확인했으며 양성대조군과 후보소재를 전투여한 군의 대뇌 조직에서는 신경전달물질인 아세틸콜린의 발현을 증가시키는 ChAT의 발현이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었음.

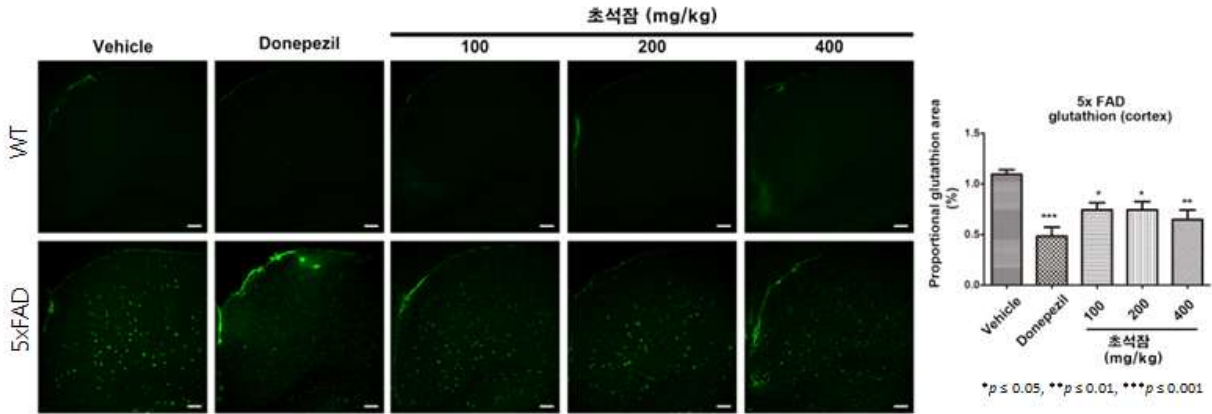


<약물 투여에 따른 신경전달물질 활성 효능 평가>

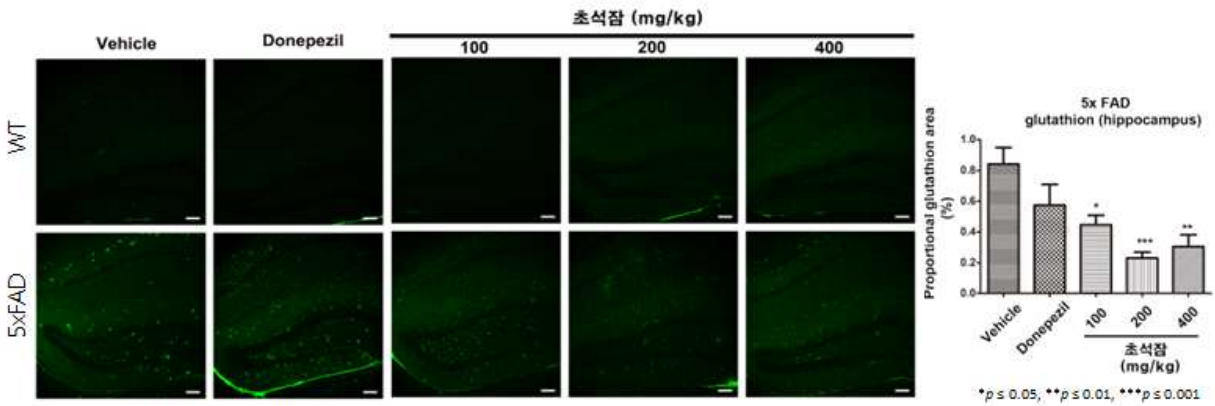
3.2.13 항산화 활성 평가 (산화 스트레스 억제 효과 : Glutathione)

- 산화적 스트레스에 미치는 효과를 관찰하기 위해 치매 유발 마우스 모델을 활용하여 후보소재와 양성대조군 약물을 8주간 투여하고 glutathione의 발현 변화를 관찰하였음.

: 산화적 스트레스의 억제 효과의 경우 5XFAD 치매 마우스에서 발현이 증가하는 것으로 나타났으며 양성대조군과 후보소재 투여군의 경우 증가된 glutathione의 발현을 대뇌 피질과 hippocampus 모두 유의적으로 억제하는 것으로 확인되었음.



<약물 투여에 따른 산화적 스트레스 억제 효능 평가 : cortex>

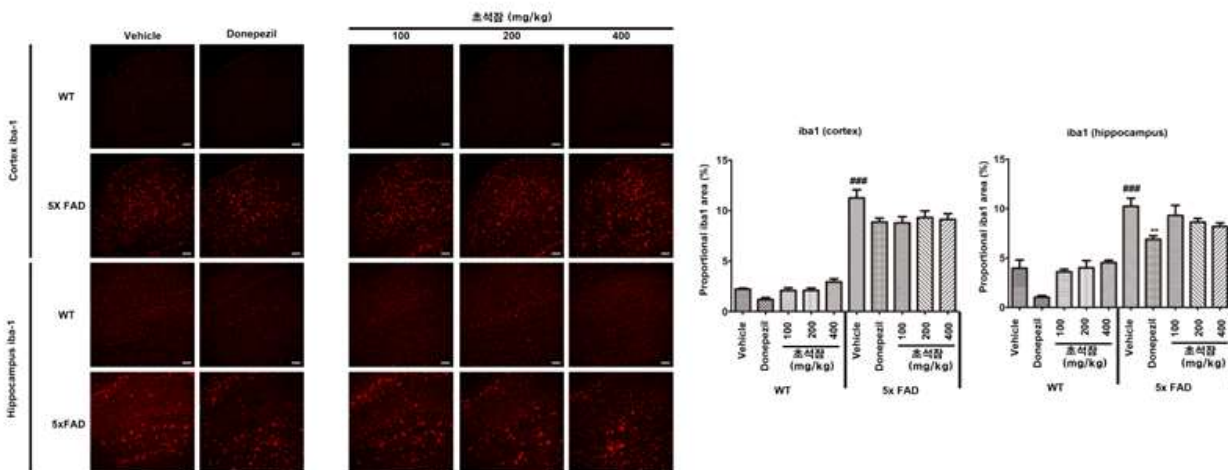


<약물 투여에 따른 산화적 스트레스 억제 효능 평가 : Hippocampus>

3.2.14 면역세포 활성화 억제 효능 평가

- 미세아교세포의 경우 염증으로 인한 치매가 유발될 경우 활성화 되므로 후보소재의 면역세포 활성화 억제 효과를 항체를 활용한 면역염색으로 관찰하였음.

: 5XFAD 치매 마우스의 경우 면역세포의 활성이 증가되어 있음이 관찰되었으며, 양성대조군 및 후보소재 투여군의 경우 면역세포의 활성을 억제하는 것으로 나타났으나 유의성은 없는 것으로 확인되었음.



<약물 투여에 따른 면역세포 활성화 억제 효능 평가>

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

□ 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 개별인정형 소재 개발을 위한 최종 소재 선정 및 비임상 시험 완료

① 전통 지식 기반 농생명자원을 활용한 후보소재 12종 중 7종 발굴

					
[초석잠]	[석창포]	[상심자]	[익모초]	[자근]	[금은화]
					
[사삼]	[연자육]	[당귀]	[원지]	[복령]	[하수오]

② 여러 가지 소재의 물, 주정10%, 20%, 30%, 70% 추출물의 세포 효능 스크리닝을 통하여 4가지 소재(초석잠, 석창포, 금은화, 익모초)를 선정

			
[초석잠 열수추출물]		[석창포 열수추출물]	
			
[금은화 열수추출물]		[익모초 20% 주정추출물]	

③ 4가지 소재의 단독, 복합 효능 스크리닝(세포 및 ex vivo)을 통하여 최종 초석잠 추출물 동물시험 수행

번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능	번호	석창포	초석잠	금은화	익모초	효능
1	1	1			★	14		2		1	-
2	1		1		★	15			2	1	-
3	1			1	-	16		1	2		-
4		1	1		★	17		1		2	-
5		1		1	★	18			1	2	-
6			1	1	★	19	1	1	1		★★
7	1	2			★	20		1	1	1	★★
8	1		2		★★★	21	1		1	1	★★★★
9	1			2	★	22	1	1		1	★★
10	2	1			-	단일1	1				★★
11	2		1		★	단일2		1			★★★★
12	2			1	-	단일3			1		★★
13		2	1		-	단일4				1	★★

④ 동물실험 결과 초석잠 단독 추출물 유의적 결과 확보

구분	동물행동 실험		베타-아밀로이드		신경염증 마커		신경전달물질		산화스트레스	
	수중미로	Y미로	Cortex (뇌피질)	Hippocampus (헤마)	TNF- α	IL-6	Acetylcholin esterase	Choline acetyltransferase	글루타치온 (cortex)	글루타치온 (헤마)
음성대조										
양성대조 (도네페질)	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.01	P<0.001	P<0.001	P<0.01		P<0.001	
초석잠 100mg						P<0.001			P<0.05	P<0.05
초석잠 200mg	개선경향	개선경향	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.001	P<0.05		P<0.05	P<0.001
초석잠 400mg	P<0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.001		P<0.05	P<0.01	P<0.01

⑤ 자사 비용으로 인체적용시험 준비 진행 중 (2023년 진행 예정)

- 인체적용시험 CRO 선정 완료 (네오뉴트라), 실시기관 선정 진행 중
- 인체적용시험을 위한 예산 '23년 예산 확보 (총금액 약 4억 중 '23년 1.8억 집행 예정)

예산부서	예산부서명	예산과목	예산과목명	세부항목코드	세부항목명	당년예산
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C1905		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2395		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2316		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2382		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2622		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2623		
A24216	천연물R&D기획팀	B31380	판)경상연구개발비	C2584	석창포/초석잠(인지)	180,000,000

Gate 1	Gate 2	Gate 3
비임상(세포/동물)	인체적용시험	심의/허가
국비 5.25억	3.9억 + α	0.3억
'21년 4월 ~ '22년 12월	'23. 1Q ~ '24년. 3Q	'25년
비임상 <ul style="list-style-type: none"> > <i>in vitro</i> (세포) <ul style="list-style-type: none"> - 뇌 손상 세포 모델에서 신경세포 보호 - 산화적 손상, 뇌신경 염증 억제 > <i>in vivo</i> (동물) <ul style="list-style-type: none"> - 치매유발동물(5X FAD)모델에서 행동 및 생리학적 바이오마커 개선 	시험 계획 <ul style="list-style-type: none"> > 인체적용시험 준비 <ul style="list-style-type: none"> - 시험용 샘플 생산 - 인체적용 시험자 자료집 작성 > 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> - CRO 확정 / 실시기관 검토 - 실시기관 2곳 이상 선정 - 대상자 모집 : 100명 	개별 인정 <ul style="list-style-type: none"> > 개별인정 신청 / 심의 / 허가 <ul style="list-style-type: none"> - 심의 부대비용(CRO) : 0.3억
원료 공급 표준화 <ul style="list-style-type: none"> > 지표성분 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 설정 및 분석 완료 - 분석법 validation > 원재료/원료단가 절감 등 조사/점검 <ul style="list-style-type: none"> - 계약재배, 생산공정, 수출 관리 조사 	비용 <ul style="list-style-type: none"> > 인체적용시험 비용 약 3.9억 - CRO 약 1.1억 - 실시기관 약 2.0~2.5억 - 기관/실험 부대 비용 약 0.3억 + α 	상업화 <ul style="list-style-type: none"> > 마케팅 전략 수립 > 제품개발 / 안정성 평가(사전 대응)

[주관기관 광동제약 2023년 인체적용시험 계획 및 예산]

□ 연구결과물은 식약처 허가 가이드라인 충족

구분	바이오마커	연구유형		
		세포	동물	인체
신경세포 보호	세포생존율	●		
	미토콘드리아 막전위차	●		
	세포사멸 관련 단백질 및 유전자 발현 (bax, Bcl-2 family, PARP, caspase 등)	●	●	
β -amyloid 형성 및 축적 억제	β -amyloid protein		●	○
	Secretase(- α , - β , - γ)	●	●	○
	Presenilin 1/2	○	○	
Tau protein 과인산화 억제	Tau protein/phospho-tau protein	●	●	○

신경염증 억제		Cytokine(TNF- α , IL-1 β , PGE2 등)	●	●	○
		Cyclooxygenase-2	●	●	
		NF-kB 발현	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)	●	○	
		NO, iNOS	●	○	
신경전달 물질 및 시냅스 가소성 조절	신경전달 물질생성, 분비 및 대사 조절	Acetylcholine, acetylcholinesterase	●	●	
		Choline acetyltransferase	●	●	
		Butylcholinesterase	○	○	
	시냅스 가소성	N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR)		○	○
		Metabotropic glutamate receptor(mGluR)	○	●	
		Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)	○	○	
		MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)		○	
		Postsynaptic density-95(PSD-95)	○	○	
		CREB	○	●	
		BDNF	○	●	○
산화스트레스 억제		Reactive oxygen species	●	●	○
		항산화효소 활성화(SOD, GPx, catalase)	●	○	○
		글루타티온(glutathione)	●	●	○
		8-oxo-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)	○	○	○
		지질과산화(MDA 등)	●	●	○
동물행동시험		모리스수중미로시험(morris water maze test)		●	
		수동회피시험(passive avoidance test)		●	
		팔방미로시험(radial arm maze test)		○	
		반스미로시험(barnes maze test)		○	
		신물질탐색시험(novel object recognition test)		○	

□ 성과지표 및 목표치 결과

성과지표명	년도	2021	2022	계	가중치(%)	연구결과
		논문	2	4	6	15
전담기관 등록·기탁지표	특허	2	2	4	15	7
	보고서원문	1	1	2	15	1
	기술요약정보	1	1	2	15	1
연구개발과제 특성 반영 지표	기술이전		1	1	20	2
	일자리 창출	3	3	6	20	8
계		9	12	21	100	

□ 성능지표 목표치 결과

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치	목표 설정 근거	연구결과
			성능수준	성능수준	2021~2022		
지표성분 확립	건	20	없음	없음	지표성분 시험성적서 1건	식약처 가이드라인	4건
분석법 검증	건	10	없음	없음	분석법 validation 1건 이상	식약처 가이드라인	4건
유해물질 기준 확립	건	10	없음	없음	유해물질 시험성적서 1건	식약처 가이드라인	4건
뇌건강 복합소재 도출	건	10	없음	없음	기초효능 평가 보고서	식약처 가이드라인	1건

In Vitro	뇌 신경염증 개선 기능성 평가	건	25	없음	없음	- SCI/KCI 급 논문 6편 게재 - 특허출원/등록 4건	식약처 가이드라인	- 논문 6건 - 특허 출원 등록 7건
	뇌 혈관 강화 효능평가	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	기억력 및 인지기능 개선 기능성평가	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	신경전달물질 활성화 효능평가	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	뇌 세포사멸 억제 효능평가	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	항산화 활성화평가	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
In vivo	Beta-amyloid 억제	건	25	없음	없음		식약처 가이드라인	
	염증성 사이토카인 억제	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	신경전달물질 전달 효소활성	건		없음	없음		식약처 가이드라인	
	동물행동시험 (인지/기억력 향상)	건		없음	없음		식약처 가이드라인	

(2) 정량적 연구개발성과

성과목표	사업화지표					연구기반지표					
	지식 재산권		기술 실시 (이전)		사업화	학술성과			정책 활용 홍보		
	특허 출원	특허 등록	건수	기술료	고용 창출	논문		논문 평균 IF	학술 발표	정책 활용	홍보 전시
단위	건	건	건	백만원	명	SCI	비 SCI		건	건	건
가중치	20	20		20	20				10	10	
2021년도	2				3	1	1	1-3		1	1
2022년도	2	1	1	50	3	2	2	1-3	2	1	
소 계	4	1	2	50	6	3	3	1-3	2	2	1
전체 성과	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	6.33	⑧	⑨	⑩

- ① 특허출원 : 4건 출원 목표 대비 4건 출원
- ② 특허등록 : 1건 등록 목표 대비 3건 등록
- ③,④ 기술이전, 기술료 : 1건 목표 대비 2건 이전, 50백만원 목표 대비 25백만원
- ⑤ 고용창출 : 6명 목표 대비 8명 고용(광동4명, 국립낙동강생물자원관2명, 바이나리 2명)
- ⑥,⑦ 논문 : 6건 목표 대비 6건 논문발표 (SCI 2건-IF 7.67,4.99, 비SCI 4건)
- ⑧ 학술발표 : 2건 목표 대비 8건 학술발표 ; 수상 5건(우수발표상)
- ⑨ 정책활용 : 2건 목표 대비 7건 (국무조정실 신산업규제혁신위원회 건기식분야 규제개선 의견 제안 등)
- ⑩ 홍보전시 : 언론보도 5건, 부스전시 2건, 결과물 전시 1건

(3) 세부 정량적 연구개발성과
[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	The Effects of Three Types of Blue Honeysuckle (BH) Preparations on the Uterus in Ovariectomized DDY Mice	Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	Ki Won Lee	Volume 38-Issue 3	미국	BJSTR	비SCIE	2021.08.30	2574-1241	100
2	Ethyl Acetate Fraction of Amomum villosum var. xanthioides Attenuates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis via Improvement of Antioxidant Capacities	Antioxidants	Jin-Woo Jeong	Volume 10-Issue 7	스위스	MDPI	SCIE	2021.06.23.	2076-3921	100
3	Single Oral Dose Toxicity Test of Acorus Gramineus and Stachys Sieboldii Water Extracts and their Mixture in ICR Mice	Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	Jin-Woo Jeong	41(5):33067-33074	미국	BJSTR	비SCIE	2022.02.11.	2574-1241	100
4	Anti-inflammatory and Antioxidative Effects of Lotus Root Extract in LPS-PG-Stimulated Human Gingival Fibroblast-1 Cells	Korean J. Plant Res.	Jin-Woo Jeong	35(5):565-573	대한민국	Korean J. Plant Res.	비SCIE	2022.08.03.	1226-3591	100
5	Three-dimensional visualization of cerebral blood vessels and neural changes in thick ischemic rat brain slices using tissue clearing	Sci Rep	Eun-Joo Lee # 1, Sung-Kuk Hong	23;12(1):15897	미국		SCI	2022.09.23.	2045-2322	100
6	Inhibition of Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by the Extract from Sophora japonica Fruit	Journal of Obesity and Weight Loss Therapy	Jin-Woo Jeong	12(12):1000531	미국		비SCIE	2022.12.23.	2165-7904	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 한국환경생물학회 40주년기념 정기학술대회	이기원	2021.10.28..	제주도 휘닉스 섭지코지	대한민국
2	2021년 한국환경생물학회 40주년기념 정기학술대회	정진우	2021.10.28..	제주도 휘닉스 섭지코지	대한민국
3	2021년 한국환경생물학회 40주년기념 정기학술대회	금상일	2021.10.28..	제주도 휘닉스 섭지코지	대한민국
4	2021년 한국자원식물학회	황진	2021.10.07.	국립호남권생물자원관	대한민국

	추계 학술대회 2021년				
5	한국자원식물학회 추계 학술대회	박시완	2021.10.07.	국립호남권생물자원관	대한민국
6	한국자원식물학회 추계 학술대회	김태진	2021.10.07.	국립호남권생물자원관	대한민국
7	한국자원식물학회 추계 학술대회	정진우	2021.04.29.	온라인 비대면	대한민국
8	한국자원식물학회 추계 학술대회	안은정	2021.04.29.	온라인 비대면	대한민국

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	물오리나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물	대한민국	국립낙동 강생물자 원관	2019.11 .12.	1020190 144270	1023189 28	국립낙동 강생물자 원관	2021.10 .22.	1023189 28	1/3	
2	석창포 추출물을 포함하는 기억력 및 인지기능 개선, 허혈 재관류 손상 예방 및 개선용 조성물	대한민국	국립낙동 강생물자 원관	2020.09 .21.	1020200 121691	1022962 72	국립낙동 강생물자 원관	2021.08 .25	1022962 72	1/2	
3	석창포 추출물을 포함하는 기억력 및 인지기능개선, 허혈 재관류 손상 예방 및 개선용 조성물	대한민국	국립낙동 강생물자 원관	2020.06 .01	1020200 065703	1022176 07	국립낙동 강생물자 원관	2021.02 .15	1022176 07	1/2	
4	생체조직 투명화를 이용한 미세플라스틱의 체내 축적 모니터링 방법	대한민국	바이나리	2021.12 .02	10-2021 -017123 2					1/1	
5	생체조직 투명화 가속용액 및 결정을 생성하지 않는 마운팅 용액을 포함하는 생체조직 투명화용 키트 및 생체조직의 투명화 방법	대한민국	바이나리	2022.10 .24	10-2022 -013774 2					50/100	
6	초석잠 추출물을 유효 성분으로 포함하는 단기 기억력 개선 및 인지기능 개선용 조성물	대한민국	국립호남 권생물자 원관	2023.02 .01.	10-2023 -001378 4					1/2	
7	초석잠 추출물을 포함하는 뇌 신경 손상의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	국립호남 권생물자 원관	2023.01 .31.	10-2023 -001378 2					1/2	

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시권	석창포 추출물을 포함하는 기억력 및 인지기능개선, 허혈 재관류 손상 예방 및 개선용 조성물	광동제약	2021.04.23.	12,500,000원	12,500,000원
2	통상실시권	초석잠 추출물을 포함하는 기억력 및 인지기능개선, 허혈 재관류 손상 예방 및 개선용 조성물	광동제약	2021.04.23.	12,500,000원	12,500,000원

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)

(22쪽 중 9쪽)

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	국내			
	국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	연구원 고용	광동제약	2	2	4
2	연구원 고용	국립낙동강생물자원관	2	0	2
3	연구원 고용	바이나리	0	2	2
합계			4	4	8

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 10쪽)

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	채택	건기식분야 규제개선 의견수렴 제안	국무조정실	2021년	건기식+일반식 일체형 제품 규제완화
2	제안	건기식 거래에 관한 공정경쟁규약 제정 초안 의견 제안	건강기능식품협회	2021년	건기식 거래에 관한 공정경쟁규약 초안 제안
3	제안	부정, 불량 건강기능식품 판별법 마련 등을 위한 의견수렴 제안	식약처	2021년	건강기능식품 원료 진위판별법 가이드 마련 제안 등
4	제안	건강기능식품 기준 및 규격 관련 개선이 필요한 안건 제안	식약처/건강기능 식품협회	2022년	식약처 식품기준과, 영양기능 연구 과에서 중금속 규격 개선 추진 진행
5	채택	건강기능식품 거래에 관한 공정경쟁규약	건강기능식품협회	2022년	'22년 7월 건기식협회 건강기능식

		세부운용기준(안) 제정 관련 의견수렴 제안			품' 공정경쟁규약' 신고센터 운영 시작
6	제안	2022년 건강기능식품 관련 규제개선 안건 제안	건강기능식품협회 / 식약처	2022년	건강기능식품 표시광고 규제개선 제안
7	제안	식품 및 건강기능식품 수출 관련 건의사항 (기준·규격 분야) 의견수렴 제안	건강기능식품협회 / 중국 정부	2022년	중국 수출 식품 및 건강기능식품 기준규격 애로사항 제안

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황														
			학위별				성별		지역별								
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	신문보도	조선비즈 등	광동제약, '생물자원 활용 특허기술' 이전협약	2021.04.26
2	신문보도	아주경제	광동제약, 치매 늦추는 건강기능식품 3년내 상용화 한다	2021.04.24
3	신문보도	헤럴드 경제 등	국립낙동강생물자원관-광동제약, 노인성 뇌질환 개선 건강기능식품 개발 추진	2021.04.26
4	신문보도	데일리한국 등	국립낙동강생물자원관, 뇌건강기능식품 개발 본격 추진	2021.05.10.
5	부스전시	미국뇌신경학회	치매연구를 위한 조직투명화 솔루션	2022.11.08.
6	부스전시	유럽뇌신경학회	치매연구를 위한 조직투명화 솔루션	2022.07.09.
7	결과물 전시	경남메세나협회, 한국문화예술포럼협회	연구 결과물 전시	2022.11.08.~16
8	신문보도	광주매일신문 등	국립호남권생물자원관 '자원식물학회' 우수발표상 수상	2022.10.19

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수발표상	우수발표(구두)	안은정	2021.04.29.	한국자원식물학회
2	수상	우수발표상	우수발표(구두)	박시완	2021.10.07.	한국자원식물학회
3	수상	우수발표상	우수발표(구두)	황진	2021.10.07.	한국자원식물학회
4	수상	우수발표상	우수발표	임수아	2022.09.27.	한국자원식물학회
5	수상	우수발표상	우수발표	정진우	2022.12.21.	국립호남권 생물자원관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)

(22쪽 중 11쪽)

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용 농생명자원의 건강기능식품 개별인정을 위한 원료 및 제조공정 표준화 ○ 유용 농생명자원의 기준규격설정 ○ 최신 기술을 활용한 인지기능 및 기억력 개선 기능성 및 기전 규명 ○ 유용 농생명 자원의 안전성 검증 ○ 과제 종료 후 건강기능식품 개별인정을 위한 인체적용시험 준비 	<ul style="list-style-type: none"> ○ lab scale, pilot scale 원료 및 제조공정 표준화 완료 ○ 지표성분, 유해물질 기준규격 설정 완료 ○ 3D 뇌 투명화 기술을 활용한 인지 및 기억력 개선 기능성, 기전 규명 완료 ○ 세포 및 동물에서의 안전성 검증 완료 ○ 인체적용시험 진입을 위한 CRO 선정 완료, 실시기관 선정 진행 중 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 100 ○ 100 ○ 100 ○ 100 ○ 100

4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품소재 개발	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품소재 개발	광동제약	중견기업 (영리)	217	130	0.599	신규 기술개발	☐1-①	59.9
	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품소재 개발	국립호남권생물자원관	국립연 (비영리)	180	180	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품소재 개발	바이나리	중소기업 (영리)	354	215	0.607	신규 기술개발	☐1-①	60.7
계				751	525	-	-	-	-

5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내					
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발	1				
	상품출시				1	
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)					3,000,000
	기술료(단위 : 천원)		25,000			
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	1(건기식 임상)			
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용				식약처 허가		

5.1 시장현황

1) 초고령화 시대

- 2018년 통계청이 보도한 자료에 의하면 2018년 65세 이상 인구는 738만1천명으로 전체 인구 중 14.3%를 차지하고 생산가능인구(15~64세 인구) 100명당 65세 이상 인구를 뜻하는 노년부양비는 19.6명에서 저출산·고령화의 영향으로 2060년에는 82.6명으로 증가할 전망
- 2017년 치매 환자수는 70만명으로 2050년에는 303만명으로 4.3배 증가할 것으로 예상 ⇒ 이에 따라 치매 관리 비용 역시 2015년 약 13조 2,000억원에서 2050년 106조 5,000억원으로 8.1배 늘어날 것으로 추정되며 이는 커다란 사회 문제로 대두되고 있음

[인구노령화 추이 및 전망]



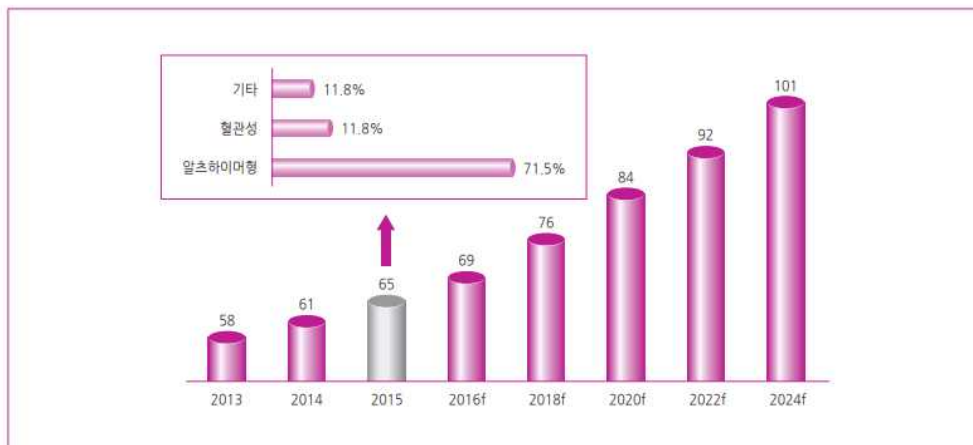
[노인인구 및 치매인구(천명)]



*출처: 통계청(2021)

- 고령 친화형 산업은 통상적으로 노인(또는 중장년층)을 대상으로 민간이 시장 경쟁 원리에 의해 건강, 편의, 안전을 도모하기 위한 제품과 서비스를 제공하는 산업으로 우리나라의 급속한 고령화의 진척은 고령 친화형 건강기능식품에 대한 관심의 증가로 이어짐(기능성 실버식품에 대한 요구 증대)
- 노인성 질환 관련 치료 기술 개발은 단순 치료뿐만 아니라 질환을 관리하면서 발병의 근원을 치료하는 것을 목표로 하며 향후 노령화 사회의 가장 중요한 전략 중 하나로써, 이를 위해 부작용이 동반되는 합성 의약품의 한계점을 천연물을 이용하여 해소할 필요성이 있음
- 우리나라는 65세 이상 인구가 약 10%가 치매환자로 추정되며, 고령사회에 접어들며 개인적·사회적 부담이 가중되고 있음
 - 65세가 지나면 치매 유병률은 5년마다 두 배씩 증가하는 추세를 보임. 선직국의 경우 약 85세 이상 연령층의 약 30%가 치매를 앓고 있다고 보고됨
 - 우리나라는 세계에서 치매환자가 가장 빨리 늘어나는 국가가 될 것으로 전망됨

(단위: 만명)



○ 자료: 중앙치매센터(2016)

[그림 1] 우리나라 65세 이상 치매환자 수 추이(2013-2024) 및 알츠하이머형 치매 현황

2) 인지 및 기억력개선 개별인정 소재 현황

- 기능성 소재 개발 파이프라인 구축 전략의 핵심 요소로 “면역“ 기능성 소재 대두 ; 최근 2년간 3건 개별인정소재로 허가됨.

- 고시형 원료 “홍삼”과의 활성(기능성) 동등성 확보를 전제로 개별인정 소재 연구개발 다수 진행 중('22년 기준 임상 등록 소재 4건 파악됨)

- 인지허가 소재 2건, 2014년 이후 없음, 기억력 허가 소재 9건 최근 인지개선 임상연구 증가 추세

허가일	원료명	기능성내용	1일섭취량 (mg)	회사
2004.09.03	참당귀주정추출분말	노인의 인지능력 저하의 개선에 도움을 줄 수 있음	800	(주)싸이제닉
2014.09.15	참당귀추출분말	노화로 저하된 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있음 / 관절건강에 도움을 줄 수 있음	800	(주)뉴트라젠
2021.11.04	참깨박추출물	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	1,500	극동에치팜
2019.12.31	포도블루베리추출혼합분말	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	600	(주)콜마비앤에이치
2015.04.30	천마 등 복합추출물	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	1,100	(주)헬릭스미스
2014.10.10	구기자추출물	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	1,425	(주)바이오믹스
2014.10.02	비파엽추출물	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	1,500	한국인스팜(주)
2011.09.09	유산균 발효 다시마추출물	기억력개선에 도움을 줄 수 있음/알콜성 손상으로부터 간 보호	1,500	(주)마린바이오프로세스
2011.01.12	당귀등추출복합물	노인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	800	대웅바이오(주)
2009.02.27	BT-11 원지추출분말	성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	300	(주)알바이오
2009.04.29	피브로인추출물BF-7	기억력개선에 도움을 줄 수 있음	200~400	(주)바이오그랜드

3) 인지 및 기억력개선 인체적용시험 연구 현황

- 인지기능 소재 연구 증가 ('22년 기준 5건 진행 중)

원료명	회사	시험기관	모집인원	섭취량/방법	섭취기간
알로에발효추출물 (인지기능)	(주)김정문알로에	우석대학교전주한방병원	20명 (pilot)	2.7 g/day	12주
천마감초추출혼합물 (인지기능/기억력)	무주군약초영농조합법인	원광대학교광주한방병원	100명	1g/day	12주
천마추출물 (인지기능)	(주)일원바이오	원광대학교익산한방병원	100명	500mg/day	12주
MT104-1 (인지기능)	국책과제	경희대학교병원	86명	480 mg/day	12주
황칠잎추출물(인지기능)	(주)휴온스네이처	이화여자대학교	80명	600 mg/day	12주
새싹인삼추출물 (기억력)	주식회사 비티씨	우석대학교전주한방병원	80명	450 mg/day	12주
KD501 현삼추출물 (기억력)	전남대학교	원광대학교한방병원	80명	300 mg/day	12주

5.2 사업화 계획

WBS		22년		23년		24년				25년				
		4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q	1Q	2Q	3Q	4Q
국책과제	비임상 시험 완료													
사업성 평가	인체적용시험 진입 사업성 평가													
대량생산 원료 표준화	1) 공정표준화 검증 자료 확보 - 원료 3반복 시험생산 - 공정별 지표물질 함량 확인을 통한 공정 표준화 2) 기준규격 근거 자료 확보 - 지표성분, 유해물질 분석을 통한 기준규격													

	격 설정 -식약처 제출용 공인기관 분석자료 확보																	
인체적용 시험	1) 인체적용시험 준비 - CRO 및 실시기관 계약 - IRB 심의 및 신청 - 시험식품 생산 2) 분시험 및 분석 - 모집현황 및 분시험 모니터링 - 결과분석 및 보고서 수령																	
식약처 허가	1) 제출자료 확보 2) 개별인정 신청 3) 식약처 대응																	
제품화	1) 원료 안정성 시험 2) 제품 제형 연구 및 제품 안정성 시험 3) 제품 출시																	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		121041-2	
사업구분	유용농생명자원산업화 기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	유용농생명자원산업화 기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관				연구책임자	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01.~ 2021.12.31	225,000	97,000	322,000
	2차년도	2022.01.01.~ 2022.12.31	300,000	129,000	429,000
	계		525,000	226,000	751,000
참여기업	(주)바이나리				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023.01.12

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
광동제약(주)	책임연구원	이기원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

초고령화 시대에 대비하여 인지 및 기억력 개선에 효능이 구전으로만 알려진 소재들의 효능을 과학적으로 증명하고, 이를 식약처 건강기능식품 개별인정형 원료로 개발하기 위하여 허가 요건에 맞추어 연구를 진행하고 유의적인 결과를 도출 해냄

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

초고령화 시대에 인지 및 기억력 장애로 인한 사회적 비용이 2015년 약13조에서 2050년 약106조원으로 천문학적으로 증가할 것으로 추정되며, 정부에서도 고령친화 식품 관련 법률을 제/개정하여 산업발전을 추진하는 가운데 천연물 기반은 안전한 소재 개발로 인한 산업발전에 이바지 할 수 있을 것으로 판단

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

연구설계 단계에서부터 식약처의 허가 요건에 맞추어 설계를 하여 세포, 동물까지 유의적 결과를 도출하였고, 인체적용시험 단계를 완료 하면, 식약처의 건강기능식품 개별인정 허가를 통하여 건강기능식품으로 제품 개발 가능

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

연구개발 성과의 달성을 위하여 주관기관 및 세부기관이 긴밀히 협조하여 노력하였고, 세포,동물시험, 표준화 등 소기의 성과를 충실히 달성 하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

목표 대비 100% 이상의 성과를 달성하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
유용 농생명자원의 건강기능식품 개별 인정을 위한 원료 및 제조공정 표준화	25	100	lab scale 및 pilot scale에서 원료 및 제조공정 표준화 완료
유용 농생명자원의 기준규격설정	20	100	건강기능식품 개별인정 조건에 맞추어 지표성분, 유해성분 규격설정 완료
최신 기술을 활용한 인지기능 및 기억력 개선 기능성 및 기전 규명	30	100	인지기능 및 기억력 개선 기능성 및 기전규명에 최신 뇌조직 투명화 기술을 적용하여 3D로 규명 완료
유용 농생명 자원의 안전성 검증	15	100	세포 및 동물실험을 통하여 안전성 검증 완료
과제 종료 후 건강기능식품 개별인정을 위한 인체적용시험 준비	10	100	주관기관인 광동제약에서 인체적용시험 준비 - 임상CRO 선정완료, 임상기관 선정 진행 중
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구 설계부터 주관기관과 세부기관이 긴밀히 협조하여 건강기능식품 개별인정을 위한 자료를 충실히 마련 하였음.
주관기관인 광동제약은 사업화를 위하여 자비로 2023년 인체적용시험을 진행하고 유의적 결과 확보 시 2024~25년 식약처 허가를 목표로 진행하고 있음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 비임상 시험결과의 도출이 2022년 12월경 완료 되어, 관련 특허 출원 준비 중으로 2023년 1월31일 2건 출원 예정으로 이 결과물에 대한 성과를 인정해주시기 바랍니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 세포 및 동물시험, 표준화 결과물을 바탕으로 인지기능 개선 인체적용시험을 진행할 것이며, 유의적 결과 도출 시 식약처 개별인정 허가를 신청하고, 제품화를 진행할 계획임

IV. 보안성 검토

o 관련 내용의 특허를 출원하므로, 따로 보안조치는 필요치 않음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

○ 관련 내용의 특허를 출원하므로, 따로 보안조치는 필요치 않음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

○ 관련 내용의 특허를 출원하므로, 따로 보안조치는 필요치 않음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	유용농생명자원사업화기술개발사업
연구과제명	농생명자원을 활용한 뇌건강 개별인정형 건강기능식품 소재 개발			
주관연구개발기관	광동제약(주)		주관연구책임자	이기원
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	525,000,000 원	226,000,000 원		751,000,000 원
연구개발기간	2021.04.01. ~ 2022.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(사업화준비) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①유용 농생명자원의 건강기능식품 개별인정을 위한 원료 및 제조공정 표준화	lab scale 및 pilot scale에서 원료 및 제조공정 표준화 완료
②유용 농생명자원의 기준규격설정	건강기능식품 개별인정 조건에 맞추어 지표성분, 유해성분 규격설정 완료
③최신 기술을 활용한 인지기능 및 기억력 개선 가능성 및 기전 규명	인지기능 및 기억력 개선 가능성 및 기전규명에 최신 뇌조직 투명화 기술을 적용하여 3D로 규명 완료
④유용 농생명 자원의 안전성 검증	세포 및 동물실험을 통하여 안전성 검증 완료
⑤과제 종료 후 건강기능식품 개별인정을 위한 인체 적용시험 준비	주관기관인 광동제약에서 인체적용시험 준비 - 임상CRO 선정완료, 임상기관 선정 진행 중

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용외)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문 S C I	비 S C I			논 문 평 균 I F	학 술 발 표	
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건	건
가중치	20	20				20				20				10			10		
최종 목표	4	2			1	50		3,000		8		1	3	3	1-3	2		2	1
당해 년도 목표	4	1			1	50				6			3	3	1-3	2		2	

실적	5	2			2	25			8			3	3		8			7	7
달성률 (%)	125	200			200	50			133			100	100		400			350	700

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	뇌조직 투명화 기술을 적용하여 인지 및 기억력 개선 기능성 기전규명을 3D로 규명
②	초석잠의 인지기능 및 기억력 개선 기전 및 효능 증명

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√				
②의 기술		√				√				

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	뇌조직 투명화 기술을 적용한 data를 활용하여 사업화 시 시작 홍보자료로 활용
②의 기술	기전 및 효능 data 바탕으로 임상시험 실시 및 식약처 개별인정 자료로 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	비SCI			논문평균IF	학술발표	
단위	건	건	건	평년건수	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	20	20				20				20				10			10		
최종 목표	4	2			1	50		3,000		8		1	3	3	1-3	2		2	1
연구기간내 달성실적	5	3			2	25				8			3	3		8		7	7
연구종료후 성과창출 계획								3,000				1							

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원 사업화기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원 사업화 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.