

(옆면)

(앞면)

117052-
3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O) 발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004030-01

벌꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선
건강기능식품 연구개발

벌꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발

2022. 04. 05.

2021

주관연구기관 / 종근당건강(주)
공동연구기관 / 충남대학교 산학협력단

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원



제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "멸꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발"
(개발기간 : 2017.06.15 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 3. 25.

주관연구기관명 : 종근당건강(주) (대표자) 김호준 
공동연구기관명 : 충남대학교 산학협력단 (대표자) 정종윤 (인) 

주관연구책임자 : 조경원

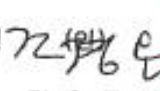
공동연구책임자 : 정주영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.


최종보고서						보안등급 일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]				
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명		고부가가치식품기술개발				
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			사업명	내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호		117052-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	80%	LB1801	15%	LB9999	5%			
	농림식품과학기술분류	PA0201	70%	PA0205	20%	PA0299	10%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문									
	영문									
연구개발과제명	국문		밀꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발							
	영문		Research and development of health functional foods for the improving prostate using domestic medicinal plant							
주관연구개발기관	기관명	중근당건강(주)		사업자등록번호	134-81-29992					
	주소	(31816) 충청남도 당진시 합덕읍 인더스파크로 170		법인등록번호	135011-0049540					
연구책임자	성명	조경원		직위	이사					
	연락처	직장전화	02-6292-9285	휴대전화	010-8935-4908					
		전자우편	ginseng333@ckdhc.com	국가연구자번호	11234587					
연구개발기간	전체		2017. 06. 15 - 2021. 12. 31(4년 6개월)							
	단계 (해당 시 작성)	1단계								
		n단계								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발 비의 지원금		
	현금	현금	현물	지방자치단체 현금	기타() 현물	현금	현물			
총계	720,000	25,000	216,000					745,000	216,000	961,000
1단계	1년차	140,000	5,000	42,000				145,000	42,000	187,000
	2년차	280,000	10,000	87,000				300,000	87,000	387,000
	3년차	280,000	10,000	87,000				300,000	87,000	387,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		역할	기관유형	
공동연구개발기관	충남대학교 산학협력단	정주영	교수	042-821-8899	lyjung@cnu.ac.kr	공동	대학			
위탁연구개발기관	충남대학교 산학협력단	김영호	교수	042-821-5933	yhk@cnu.ac.kr	위탁	대학			
연구개발기관 외 기관										
연구개발담당자 실무담당자	성명	진유정		직위	대리					
	연락처	직장전화	02-6292-9258	휴대전화	010-9241-5792					
		전자우편	jin901109@ckdhc.com	국가연구자번호	11560710					

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

2022 년 3 월 25 일

연구책임자: 조 경 원 

주관연구개발기관의 장: 김 호 곤 (직인) 

공동연구개발기관의 장: 정 중 울 (직인) 

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

사업명	고부가가치식품기술개발			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		117052-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	80%	LB1801	15%	LB9999	5%
	농림식품 과학기술분류	PA0201	70%	PA0205	20%	PA0299	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	벌꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발						
연구개발과제명	벌꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발						
전체 연구개발기간	2017. 06. 15 - 2021. 12. 31						
총 연구개발비	총 961,000 천원 (정부지원연구개발비: 720,000 천원, 기관부담연구개발비 : 241,000 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표(<input checked="" type="checkbox"/>)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	벌꿀복합추출물의 전립선 건강 개선 건강기능식품 신청 및 제품화					
	전체 내용	<ol style="list-style-type: none"> 1. 벌꿀복합추출물 원료 표준화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 항산화 활성 평가 ○ 세포 활성평가 ○ 원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정 ○ 기능성분 2종 분석법 확립 ○ 제제검토 2. 벌꿀복합추출물 기능성 및 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> ○ 전립선질환 유도 동물활성평가 완료 ○ 전립선 비대 메카니즘 규명 완료 ○ 인체적용시험 프로토콜 확립 및 인체적용시험 완료 ○ 안전성 평가(독성실험) 완료 3. 벌꿀복합추출물의 개별인정 신청 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 복합소재의 안정성 평가 완료 ○ 개별인정 허가서류 작성 ○ 제품화 2건 및 매출액 725백만원 					
	목표	벌꿀복합추출물 원료 표준화					
	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항산화 활성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 자생소재 18종의 원료 스크리닝 - DPPH, ABTS 측정 ○ 세포 활성평가 <ul style="list-style-type: none"> - 독성평가: MTT assay - 활성측정: PSA 및 AR 활성, 5α reductase 2 ○ 원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 자생소재 18종 중 복합원료 선정 					

		<ul style="list-style-type: none"> - 수율 확인을 통해 최적 추출기술 확립 - 3 Lot 생산을 통한 공정표준설정 ○ 기능성분 2종 분석법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 분리정제 및 구조동정 - HPLC를 이용하여 지표성분에 대한 분석조건을 확립 ○ 제제검토 <ul style="list-style-type: none"> - 복합소재의 기준 및 시험항목 설정 - 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법 항목설정
	목표	멸꿀복합추출물 기능성 및 안전성 평가
	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전립선질환 유도 동물활성평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 무게, DHT, testosterone 감소 등 확인 ○ 전립선 비대 메카니즘 규명 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 비대증 억제 메커니즘 확인 ○ 인체적용시험 프로토콜 확립 및 인체적용시험 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 건강 인체적용시험 대상자, 바이오마커 선정 완료 - 전립선 건강 인체적용시험 프로토콜 확립 완료 - 시험약 및 대조약 구분 어려운 인체적용시험 시제품 생산 완료 - 인체적용시험 시험약 및 대조약 분석 완료 - 인체적용시험 완료 ○ 안전성 평가(독성실험) 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 단회, 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험, 염색체이상시험, 소핵 시험, 복귀돌연변이시험 수행
	목표	멸꿀복합추출물의 개별인정 신청 및 제품화
	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복합소재의 안정성 평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 복합소재에 대한 원료 안정성 검사 및 유통기한 설정 완료 ○ 개별인정 허가서류 작성 <ul style="list-style-type: none"> - 개별인정신청에 따른 성적서 확보 - 개별인정신청서 작성 ○ 제품화 2건 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 건강 개선 제품화 전략 수립 완료 - 전립선 건강 개선 제품 2건 개발 및 매출액 725백만원 발생
연구개발성과		<ul style="list-style-type: none"> ○ 사업화 지표 <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 2건 - 특허등록 1건 - 기술실시 1건 (기술료 7.2백만원 실시) - 제품화 2건 - 매출액 725백만원 - 고용창출 5명 ○ 연구기반 지표 <ul style="list-style-type: none"> - SCI 논문 5건 (평균 IF 2.75) - 학술발표 4건 - 교육지도 2건 - 인력양성 4명 - 홍보전시 2건
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과		<ul style="list-style-type: none"> ○ 쏘팔메토, 사군자추출분말에 이어 국내 3번째 전립선 건강 개선 개별인정 원료로 등록이 가능하며, 이를 이용한 스타제품의 개발이 가능함, 또한 시장에 다양한 전립선 건강 소재를 제공하여 전립선 건강기능식품 시장의 확장을 가져올 것으로 예상됨 ○ 국내산 멸꿀과 산수유를 사용한 원료의 개발을 통해 추후 농가소득에도 큰 도움이 될 것으로 예상됨

	○ 국내산 천연물을 그 주요 소재 및 기능성 물질로 개발함으로써 국내 농식품산업 시장 활성화 및 국내 농식품 산업의 세계 경쟁력 확보할 수 있음												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	5	2											
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)	전립선 비대		평활근 이완		소염		국내약용식물		기능성식품				
영문핵심어 (5개 이내)	BPH		smooth muscle relaxation		anti-inflammatory		Domestic medicinal plants		Functional food				

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	15
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	94
4. 목표 미달 시 원인분석	101
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	102
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	102

별첨 자료

1. 연구개발과제의 개요

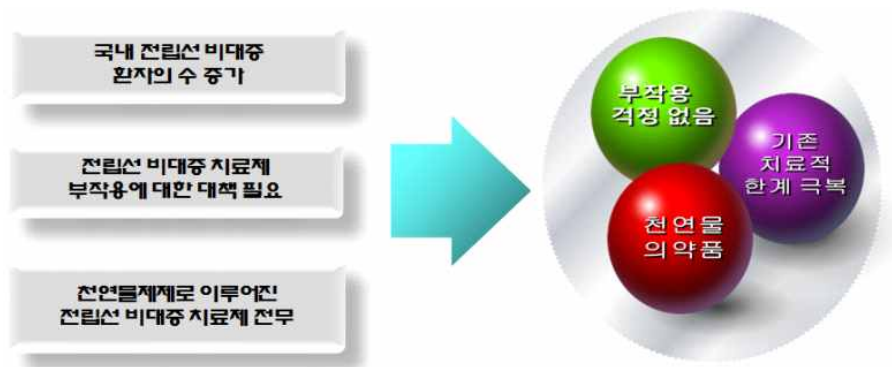
1-1. 연구개발 목적

- 국내 약용작물 2종 이상의 복합물의 지표 성분 확인 및 표준화된 기능성 원료 개발
- 개발 원료를 이용한 전립선 건강개선 효능평가 및 개별인정 획득

1-2. 연구개발의 필요성

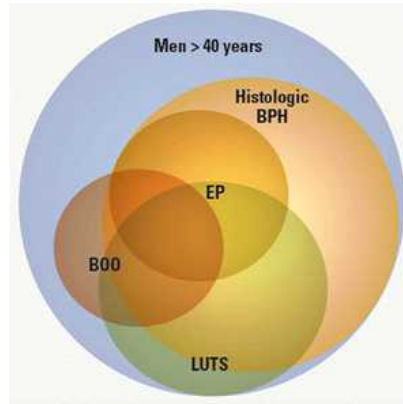
(1) 연구개발의 개요

- 전 세계 질환 분포 중 남성을 대상으로 하는 질환으로써 높은 유병률을 나타내는 질환은 심혈관계질환, 대사성 질환이며 다음으로 큰 분포를 갖는 질환이 비뇨기계 질환임
- 대표적 비뇨기과 질환의 발병 원인은 환경의 변화, 생활패턴의 변화, 직업적 다양성, 유전적 요인 등에 의한 복합적 요인이 작용하여 나타나는 것으로 알려져 있으며 이 질환은 앞으로도 지속적인 증가가 예상됨
- 대표적인 비뇨기 관련 질환으로는 전립선비대증, 전립선암, 전립선염 등이 있으며, 일반적인 성인의 전립선의 크기는 20g 정도이나, 전립선이 비대해져 40~400g의 비정상적인 크기로 커지게 되면, 가까이 있는 요로를 압박으로 빈뇨, 야간빈뇨 등의 요의를 느낌. 전립선비대증을 가진 환자들은 요로폐색이나 기타 합병증이 없으면 외과적 치료를 할 필요는 없으나 80세까지 약 50% 정도는 치료가 필요한 실정임



<기술개발 필요성>

- 전립선비대증 환자 중 일부가 전립선암과 관련되어 있으며, 그 자체가 치명적인 질환은 아니지만, 삶의 질을 저하시킨다는 점에서 초고령화 사회로 진입하고 있는 현 사회의 중요한 문제임
- 전립선비대증의 치료방법은 초기에는 거의 수술을 수행하였으나, 80년대 후반부터는 약물 투여방법으로 급속도로 변화하고 있음. 그러나 종래 전립선비대증의 치료에 사용되는 약물들은 많은 부작용을 나타내고 있고 그 효능에 한계가 있음

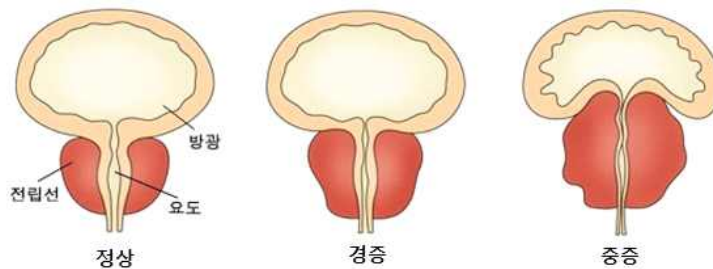


<40세 이상에서 나타나는 전립선 증상>

- *전립선비대증(BPH) : benign prostatic hyperplasia
- *하부요로증상(LUTS) : lower urinary tract symptom
- *방광출구폐색(BOO) : bladder outlet obstruction
- *전립선의 증대(EP) : enlargement of the prostate

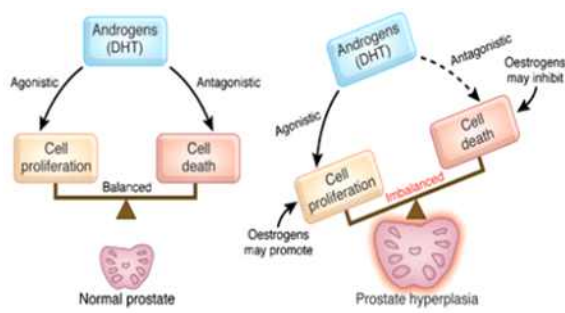
(출처: Roehrborn CG. Med Clin North Am. 2011;95(1):87-100)

- 보건복지부(2004)의 전립선비대증 유병률 조사에 따르면, 42.3%가 전립선비대증으로 인해 중등도 이상의 하부요로 증상이 있는 것으로 나타났으며, 국외도 50세 이상 남성의 하부요로 증상의 유병률이 약 28%~42% 이상으로 나타남(Berger et al., 2006; Naslund et al., 2007; Norby, Nordling, & Mortensen, 2005)
- 전립선비대증은 조직학적 전립선의 비대로 인해 하부요로 증상과 동시에 발기부전 증상이 나타남

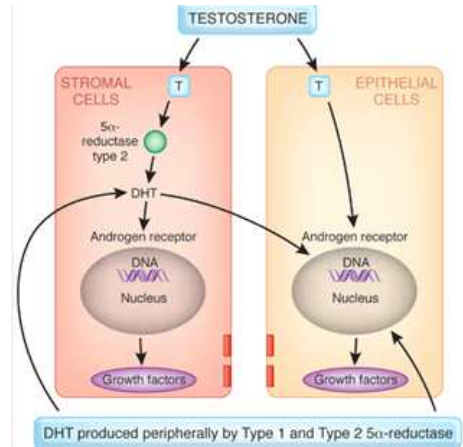


<전립선비대증 진행단계>

- 전립선비대증의 진행은 방광의 하부에서 후부 요도를 둘러싸고 있는 기관이며 중심대, 말초대, 이행대의 명확한 3개 구역으로 이루어져 있고, 전립선비대증은 대부분 이행대에서 호발함
- 전립선비대증에 의한 하부요로 증상은 전립선의 정적기전 및 동적기전과 관련이 있음. 정적기전은 비대해진 전립선에 의한 물리적 방광 출구의 폐쇄이고, 동적기전은 전립선의 평활근 강도의 증가를 일컫음



<전립선비대증 작용기전>



<테스토스테론 전립선 대사>

- 전립선비대증은 노화 과정과 남성 호르몬을 분비하는 고환으로 인하여 발생하며 다양한 요인 및 영향에 의해 발병함

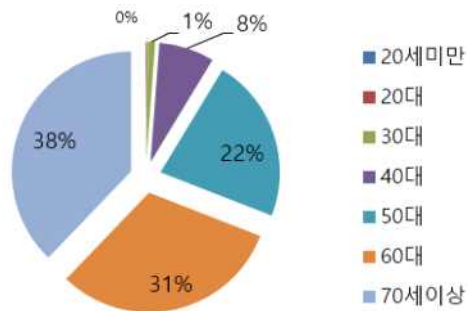
구분	요인 및 영향
DHT, Androgen	· 노화로 인해 혈중 테스토스테론은 감소하지만 DHT과 Androgen 수용체는 증가함 → 남성의 경우 노화로 인해 호르몬 불균형으로 전립선 비대 발생
에스트로겐	· 혈중 에스트로겐은 남성의 경우 나이가 증가함에 따라 증가함. · 전립선비대증 환자는 전립선 내 에스트로겐 수치가 증가하게 되며, 전립선 용적이 큰 환자는 혈중 에스트라디올(성호르몬)이 높은 농도로 존재함.
기질과 상피의 상호관계	· 기질의 구성성분에 장애가 발생하여 세포의 증식에 대한 정상적인 억제반응 상실
세포고사	· 정상 전립선에 비해 전립선비대증의 상피에서 세포고사가 약 4배 감소 · 세포고사를 억제하는 bcl-2가 전립선 상피에서 증가
성장인자	· 세포성장인자와 스테로이드호르몬의 상호작용은 세포의 증식과 상실 균형에 영향 · 전립선의 증식에 관여하는 성장인자로는 EGF, KGF, TGF- α , TGF- β , IGF, FGF 등
교감신경 신호전달체계	· 전립선조직 내에는 레닌-안지오텐신 체계가 존재하는데 전립선비대증에서 활성화
염증과 사이토카인	· 전립선염에서 전립선 내의 염증세포, 특히 T 세포는 성장인자의 주요한 공급원인 T 세포에서 분비된 여러 가지 성장인자들은 전립선의 간질과 세포의 증식인자로 작용하여 발병함.
유전요인과 가족력	· 전립선비대증 환자들의 자손이 같은 질환을 수술 받을 확률이 4.2배 높음

- 전립선비대증에 의해 흔히 배뇨곤란, 잔뇨감, 빈뇨, 긴박뇨, 세뇨, 배뇨지연, 야간뇨, 간헐뇨와 같은 심각한 하부요로 증상을 일으켜 신체적, 정신적, 사회 심리적, 직업적, 성적 등의 다차원적인 측면에서 삶의 질에 대한 부정적 영향을 미치고 있음
- 남성 노인은 연령이 증가하면서 노화와 함께 전립선비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)이 발생하는데 이들의 문제 해결을 위한 관심은 저조한 편임
- 멀꿀은 우리나라의 전남, 경남, 충남 등 남쪽 지방의 계곡이나 숲속에서 볼 수 있으며 줄기와 잎, 뿌리는 약재로 사용하며, 항염증, 해열, 진통 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있음
- 멀꿀은 심장이 약하거나 불완전할 때 기능을 정상으로 돌이키는 데 사용하는 강심제나, 체내의 불필요한 수분의 배출을 촉진하는 이뇨제로도 사용됨. 이외에도 피하지방 축적의 억제, 관절 질환, 자궁근종이나 안면신경통 등에도 효과가 있다고 알려져 있으나 전립선 관련 질환에 대한 효과는 알려져 있지 않음

- 자사는 기술개발 제품을 통해 부작용이나 약물 내성을 유발하지 않고, 치료 효과가 우수한 새로운 전립선 건강의 개선 및 예방에 도움이 되는 새로운 개별인정형 기능성 식품소재를 개발하고 함

(2) 연구개발의 중요성

(가) 경제적·사회적 측면



<연령별 진료인원 점유율>



<연도별 진료 인원 추이>

출처: 건강보험심사평가원

- 전립선비대증은 50세 이상 남성에서 흔히 발생하는데 전립선 비대증 환자에 대한 역학조사에 따르면, 50~59세 14.6%, 60~69세 24.6%, 70~79세 36.2%로 연령이 증가함에 따라 유병률이 증가하며, 전체 대상의 42.3%는 중등도 이상의 하부요로 증상이 있는 것으로 나타남(Ministry for Health, Welfare and Family Affairs)
- 전립선비대증의 발병 원인은 서구화된 음식 문화, 환경오염물질 증가, 인구의 고령화로 인해 발병하며 소비자 관심과 증상 관리의 중요성에 대해 소비자의 니즈가 성장하고 있음
- 전립선비대증은 조직학적으로 전립선 이행대 부분에서 과도한 결절성 증식을 동반한 요도주위의 선조직과 기질조직의 진행성 과증식이 특징적 소견으로 요도주위의 결절들은 요도를 눌러 폐쇄를 야기함에 따라 하부요로 증상을 유발함(Hong, 2005)
- 이러한 하부요로 증상은 교감신경 활성화 기전에 의해 발기부전을 일으켜 중증의 하부요로 증상이 있는 경우 발기부전 위험도가 하부요로 증상이 없는 경우에 비해 14.9배 더 높게 나타나고 발기부전은 결국 성기능 저하나 상실을 가져와 자신감 결여 및 스트레스로 발전되어 삶의 질 저하의 원인이 되고 있음(Ko et al., 2008)
- 더욱이 남성에서 발기부전은 단순히 성기능 저하만을 의미하지 않고 전반적인 건강과 매우 중요하게 연관되어 있으며 연령이나 우울증상 수준과 유의한 관련성을 나타냄(Cheng, Emil, & John, 2007)
- 따라서 전립선 비대로 인한 하부요로 증상은 중·노년 남성에게 발기부전으로 인한 성기능 저하뿐 아니라 우울과 같은 정서적 안녕의 저하를 초래하고 하부요로 증상 정도는 우울과 밀접한 관련성을 나타내 결국 전반적인 QoL(삶의 질) 저하를 초래함

(나) 과학적 측면

- 전립선비대증으로 인한 복합병증 형태로 발병하며 대표적으로 하부요로 증상, 발기부전 등과 같이 발병됨
- 노인 남성의 하부요로 증상은 전립선비대증, 전립선 종대 혹은 방광 경부 폐색 등과 연관된 전립선 관련 질병으로 구분됨
- 전립선비대증과 관련하여 나타나는 증상은 중년 이후 배뇨와 관련하여 나타나는 증상을 일컫는 하부요로 증상(Low urinary tract symptoms, LUTS)의 범주에 포함됨
- 전립선비대증과 관련된 하부요로 증상은 빈뇨, 잔뇨감, 야간뇨, 요단절, 요절박, 약뇨, 요주저와 같은 형태로 발생함

<전립선비대증에 따른 하부요로 증상>

구분	증상
빈뇨 (frequency)	소변을 본 후 2시간 내에 다시 소변을 봄. 하루에 8회 이상 소변을 봄.
잔뇨감 (residual urine sense)	배뇨 후 소변이 남아 있는 것같은 느낌
야간뇨 (nocturia)	수면 중 소변을 보기 위해 한 번 이상 잠에서 깬.
요단절 (interruption)	요류가 잠시 멈추었다가 다시 시작됨.
요절박 (urgency)	요의가 느껴지면 참기 어려움.
약뇨 (weak stream)	요류가 약함.
요주저 (hesitancy)	배뇨시 힘을 주어야 하거나 기다려야함.

- 이 중 빈뇨, 요절박, 야간뇨의 증상은 전립선이 커져서 방광을 자극하거나 방광 감각기능의 이상으로 저장 기능에 장애가 생겨서 발생하며 잔뇨감, 요단절, 요주저 등의 증상은 방광의 수축력이 저하되거나 방광 출구폐쇄에 의해 생김
- 임상적으로는 국제 전립선 증상 점수표(International Prostate Symptom Score, IPSS)를 이용하여 증상을 평가함. 이 표는 전술한 전립선비대증 관련 증상들에 대하여 그 정도에 따라 0~5점까지 점수화하여 해당 점수를 합산하며 이 점수와 별도로 현재 증상의 정도가 자신의 삶에 어느 정도 영향을 주고 있는지를 평가함
- 0점에서 6점까지 나누어 삶의 질 점수를 측정하며 IPSS 증상 점수가 7점 이하인 경우는 가벼운 증상으로, 8 ~ 19점은 중간 정도의 증상이 있는 것으로, 20점 이상인 경우는 심한 증상을 호소하는 것으로 평가함
- 전립선비대증은 진행성 만성질환으로서 연령 증가와 함께 조직학적 전립선 비대 및 다양한 정도의 방광출구 폐색으로 인해 하부요로 증상과 발기부전이 점진적으로 심각해지고 이로 인한 삶의 질 저하가 동반됨

(다) 산업적 측면

- 전립선비대증의 치료방법은 약물적, 수술적, 보완대체요법이 사용됨
- 약물적 치료법으로는 알파 교감신경 차단제, 5- α -환원효소억제제, PDE5효소저해제 등이 있으며 중등도 이상의 증상에서는 적극적인 치료법인 수술적 치료(TURP 등)가 이용됨
- 약물치료의 경우 기립성 저혈압, 두통, 어지러움 등의 부작용이 보고됨

구분	치료약물	장, 단점	
α -차단제	테라조신	장점	혈압강하 효과로 고혈압 환자에게 사용가능 혈압강하제로 개발,최고요속증가등의 효과
		단점	기립성저혈압, 두통, 무기력증, 어지러움
	독사조신	장점	발기기능, 성기능만족 개선
		단점	어지러움
	탐스로신	장점	투여량0.2mg = 테라조신5mg 같은 효과
		단점	어지러움
	알푸조신	장점	고령 환자에게 처방이 가능함.
		단점	간부전 환자에게 사용 어려움, 어지러움
5 α -환원효소 억제제	피나스테리드	장점	전립선의 과성장 억제, 전립선 용적감소
		단점	성욕 감소, 사정지연, 여성형 유방
	두타스테리드	장점	1형, 2형 5 α -환원효소에 작용
		단점	성욕 감소, 사정지연, 여성형 유방
항콜린성 약물	옥시부티닌, 프로피베린, 톨테로딘, 트로스피움	장점	빈뇨, 요저락 등의 증상 완화
		단점	입마름, 변비, 졸음, 시야흐림
항이뇨 호르몬제	데스모프레신	장점	야간뇨로 인한 환자불편도 개선
		단점	저 나트륨혈증

- 약물적, 수술적 치료법의 부작용과 환자 순응도를 고려하여 보완대체 요법이 사용되며 하부요로 증상 개선 및 야뇨증 개선 등의 원료가 주로 사용됨
- 생약제제를 병원에서 처방받아 복용하는 약제로 제조된 것을 복용하는 경우보다는 일반인이 시중에서 자유로이 구입 복용이 가능한 기능성 식품으로 제조된 것을 복용하는 경우가 많음
- 쏘팔메토(Saw palmetto) 는 전립선비대증 치료에 대한 과학적인 근거는 부족하나 치료약물(5-알파환원효소 억제제 등)의 부작용을 피하고자 생약제제의 사용빈도가 높음

원료명	식용가능부위	기능성분 (지표성분)	기전 및 효과
복분자	열매※(복분자)	Ellagic acid	<ul style="list-style-type: none"> 기전: 안드로겐 수용체, 전립선 특이항원(PSA)과 5-알파 환원 효소 발현억제 전립선 무게, 전립선 세포의 상피세포 두께 및 면적이 감소, 전립선비대 유발 호르몬인 DHT level이 감소
울금	뿌리줄기(제한적)	Curcumin	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 5-알파환원효소 억제 효과 : positive control인 finasteride(5 µM)와 동등한 수준의 저해
쏘팔메토	열매	Lauric acid	<ul style="list-style-type: none"> 기전 :5-알파환원효소 억제,알파차단제 효과 : 하부요로증상 개선 효과(임상연구자료 부족)
토마도추출물 (라이코펜)	열매	lycopene	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 5-알파환원효소 억제, 안드로겐 수용체 발현 억제 효과 : 전립선 크기 유의적 감소 확인
아프리카 서양자두	열매(씨앗 제외)	Pygeumafri- ca num	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 피세포성장인자(EGF), 인슐린유사성장인자(IGF-1), 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)를 억제 효과 : 국제전립선증상점수(IPSS) 46%개선(전립선비대증환자대상)
남아프리카 해오라비사초 (하이포시스루페 리)	미 등재	Beta- sitosterol	<ul style="list-style-type: none"> 전립선 크기 증가 억제(전립선세포의 고사를 유도)(in vitro) 요속의 개선 및 잔뇨량의 감소와 같은 효과를 보임
아론	덩이뿌리, 줄기, 잎	chlorogenic acid, caffeic acid	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 5-알파환원효소 억제 효과 : 전립선 무게 감소(in vivo), 정자수 증가효과 및 남성호르몬 증가 효과
사상자	열매(제한적)	α-cadinene, torilin	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 5-알파환원효소 억제 효과 : 전립선 무게 감소(in vivo),혈중 DHT가 감소
석창포	뿌리줄기(제한적)	β-asarone	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 알파차단제 효과 : 전립선 무게 감소(in vivo),혈중 DHT가 감소
호밀(세닐톤)	싹, 씨앗	Ergotoxin	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 항염증반응, 알파차단제 효과 :전립선 크기 감소(in vivo), 배뇨증상 야간빈뇨의 횟수 감소, 최대요속 개선
호박씨	줄기, 잎, 꽃, 열매, 씨앗	Polyphenol derivatives	<ul style="list-style-type: none"> 하부요로증상, 야뇨증 증상의 개선과 잔뇨량의 감소의 효과
애기뽕기름	잎(제한적)	Malic acid	전립선비대증뿐만 아니라 전립선염 환자에서도 하부요로증상의 개선

- 전립선비대증 환자 204명을 대상으로 한 설문 조사 결과, 50대가 30.4%로 가장 높게 집계되었으며 동반 질환별 비교에서는 발기부전을 동반한 환자에서 사용빈도가 높게 집계됨

<기능성소재의 선호도>

구분	선호도(%)	
건강기능식품	쏘팔메토	39.3
	라이코펜	10.7
	호박씨	3.6
생약제제	쏘팔메토	25
	아프리카 자두나무	10.7
	애기뽕기름	7.1
	호밀기름	3.6
합계	100	

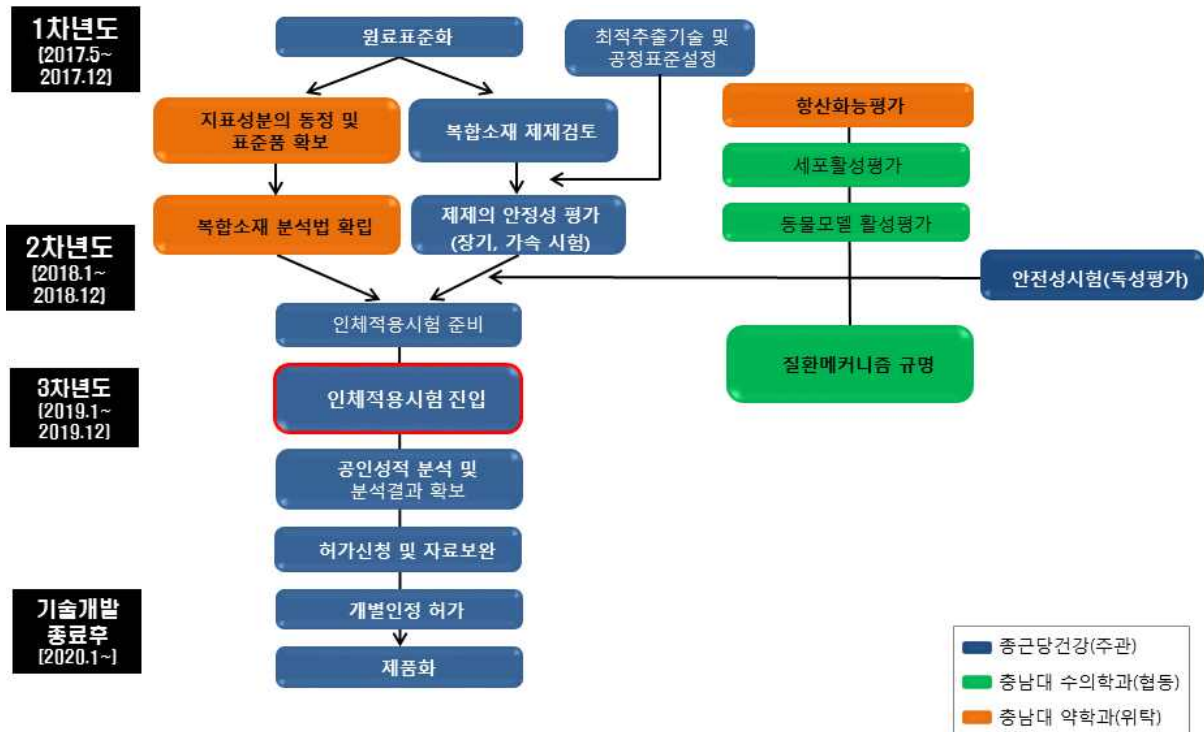
*출처: ① 전립선비대증으로 인한 하부요로증상 환자의 생약제제 이용현황: 단일기관연구, 부산대학교 의과대학, 2016.
② 전립선비대증 진료지침, 대한전립선학회, 2010

- 이러한 생약요법은 소팔메토 등을 이용한 건강기능식품, 건강지향형식품 등이 이용되고 있으나, 과학적인 근거가 부족하며 추가적인 동물효능평가 및 임상시험자료가 필요함
- 보완대체요법은 이제 의료계에서 간과해서는 안 될 분야로 자리 잡아가고 있으며 그 중 생약제제는 가장 널리 연구되고 쉽게 이용이 가능한 분야이며 특히, 환자들의 생약제제에 대한 접근성이 좋아지면서 건강기능식품의 비중이 더욱 중요시되고 있음
- 최근 임상에서는 건강과 관련된 삶의 질의 중요성이 강조되고 있으며 건강 관련 삶의 질이란 삶의 질을 구성하는 요소 중 개인의 건강에 직접적으로 연관된 부분을 의미하는 것으로, 질병 또는 치료에 의해서 영향을 받는 삶의 질의 신체적, 정서적, 사회적 측면 모두 관여함(Salinas Sanchez et al., 2001)

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연구개발 추진 전략

- 종근당건강(주)은 건강기능식품 및 일반식품 제조업 기업으로 자사 제품을 개발 및 생산하는 일련의 프로세스 중 축적된 know-how와 전문가를 통한 지속적인 기술자문을 통하여 기술연구를 추진
- 기술문서 심사에 필요한 각종 시험 항목에 대한 평가를 공인인증기관에서 수행하며 제품화 허가에 필요한 문서 작성은 자사에서 확보
- 전립선건강 관련 기능성 소재의 개발 및 이를 위한 기술자문 위원회 개최를 통해 꾸준한 제품 품질 향상에 노력
- 신규소재에 대한 검증을 위한 테스트 항목과 방법들에 대한 논의를 바탕으로 지속적인 노력 수행



<기술개발 모식도>

2-2. 연구 결과

(1) 국내외 기술 및 제품시장 동향 연구

(가) 국내 기술 및 제품시장 동향 연구

1) 국내 기술현황

- 치료법에는 약물치료와 비약물치료 방법으로 분류되며 약물치료 방법이 가장 많이 사용됨
- 약물치료는 치료 효과가 크며 회복이 빠르고 부작용이 적은 장점이 있으며, 그 외의 치료법으로는 비외과적인 방법과 수술적 치료방법이 있으나 료 후 부작용이 크고 비용이 과다 발생하는 단점이 있음
- 사용되는 약물들로는 α -차단제로서 테라조신, 독사조신, 알푸조신, 탐스로신, 실로도신 등이 있으며, 5α -환원효소 억제제로서 피나스테리드, 두타스테리드가 있음. 이외에 생약으로는 톱야자 추출물, 아프리카 서양자두, 호밀, 쏘팔메토, 호박씨유 등이 있음

<전립선비대증의 치료방법>

치료방법	적용대상	치료효과	비 고
보완대체요법	경상 이상	+++	부작용이 없고 치료효과는 좋으나 과학적인 evidence가 부족함.
약물요법	경상 이상의 중등도 증상	+++++	부작용이 적으며 전립선비대증 환자의 70% 대상으로 일반적인 치료방법
비외과적 침습치료	중등도 이상	+++	수술적 치료의 보완치료법으로 사용되나 비용효과 면으로 비효율적인 방법
수술적 치료	중등도 이상	+++	점차 전립선 비대증 수술의 빈도는 감소하는 추세

* 치료효과: + 치료효과 낮음, +++++ 치료효과 매우 높음

<기존 치료제의 장단점>

구분	치료약물	장, 단점	선호도	
생약제제	톱야자 추출물	장점	부작용 없음	+++
		단점	치료효과 입증이 부족함	
	아프리카 서양자두	장점	부작용 없음	+
		단점	치료효과 입증이 부족함	
	하이포시스 루페리	장점	부작용 없음	+
		단점	치료효과 입증이 부족함	
호밀	장점	부작용 없음	+	
	단점	치료효과 입증이 부족함		
α -차단제	테라조신	장점	혈압강하 효과로 고혈압 환자에게 사용가능	+++
		단점	기립성저혈압, 두통, 무기력증, 어지러움	
	독사조신	장점	발기기능, 성기능만족 개선	+++
		단점	어지러움	
	탐스로신	장점	기립성 저혈압	++++
		단점	어지러움	
5α -환원효소 억제제	피나스테리드	장점	전립선의 과성장 억제, 전립선 용적감소	++
		단점	성욕 감소, 사정지연, 여성형 유방	
	두타스테리드	장점	1형, 2형 5α -환원효소에 작용	+++
		단점	성욕 감소, 사정지연, 여성형 유방	
항콜린성 약물	옥시부티닌, 프로피베린, 톨테로딘	장점	빈뇨, 요저락 등의 증상 완화	+++
		단점	입마름, 변비, 졸음, 시야흐림	
항이노 호르몬제	데스모프레신	장점	야간뇨로 인한 환자불편도 개선	+
		단점	저 나트륨 혈증	

* 치료선호도: + 선호도 낮음, +++++ 선호도 매우 높음

- 전립선비대증 치료를 위해서 기존에 판매되고 있는 약물로는 탐스로신, 피나스테리드, 두타스테리드, 테라조신, 알푸조신, 생약제 등이 있으며, 최근 출시된 나프토포딜 약물이 단일제로써 시판되고 있음
- 약물은 즉효성은 우수하나 생약에 비해 부작용 사례가 크며 내성으로 인한 피해사례 다수 보고됨

< α -차단제 약물 vs. 5α -환원효소 억제제의 비교>

종류	α -차단제	5α -환원효소 억제제
기전	α -receptor를 차단하여 전립선의 평활근을 이완	테스토스테론을 DHT로 변환하는 효소를 억제하여 전립선의 비정상적인 성장을 억제
성분	탐스로신, 알푸조신, 테라조신, 독사조신 등	피나스테리드, 두타스테리드 등
부작용	기립성저혈압, 두통, 무기력증, 어지러움	성욕감퇴, 발기부전, 유방확대, 다모증, 최기형 등

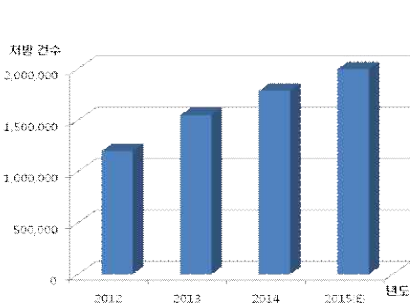
- α -환원효소억제제를 장기간 복용하는 경우, 성욕감퇴, 발기부전, 유방확대, 다모증, 최기형 등의 부작용이 나타나는 경우가 많으며 강력한 최기형성으로 인해 가임기 여성의 경우 약물의 노출을 피해야 하며, 임신을 계획하고 있는 남성의 경우 선택할 수 없는 치료제임. 따라서 보다 효과가 좋고 부작용이 적은 치료제의 선택이 필요함
- 항콜린성 약물에는 옥시부티닌, 프로피베린, 톨테로딘, 트로스피움 등이 간혹 사용되나 약물의 부작용으로 입마름, 변비, 졸음, 시야 흐림 등이 있음
- 항이뇨 호르몬제로는 데스모프레신이 있으며 빈뇨 등에 효과가 입증되었으나 저나트륨혈증과 같은 부작용이 발생함
- α -차단제 약물은 전립선비대증 치료에 가장 많이 사용되는 약물이며 이들 약물 중 테라조신과 독사조신, 알푸조신의 경우는 기립성저혈압, 두통, 무기력증, 어지러움 같은 부작용이 발생하는 문제점이 있음
- 이외에 생약제제로 톱야자 추출물, 아프리카 서양자두, 하이포시스 루페리, 호밀 등이 민간요법으로 사용되고 있지만, 임상적인 치료 효과 입증이 부족함
- 기존 고시형 쏘팔메토 소재의 경우 민간에 널리 이용되고 있으며 단일, 복합형태로 판매 중이나 효과에 대한 과학적인 evidence가 미비함

<식약처 인정 전립선 관련 기능성 소재>

기능성		기능성 소재
전립선 건강	전립선 건강 유지에 도움	쏘팔메토열매추출물(고시), 쏘팔메토열매추출물 등 복합물
배뇨기능 개선	방광에 의한 배뇨 기능 개선에 도움	호박씨추출물 등 복합물
요로건강	요로 건강에 도움	크랜베리추출물, 파크랜크랜베리추출분말

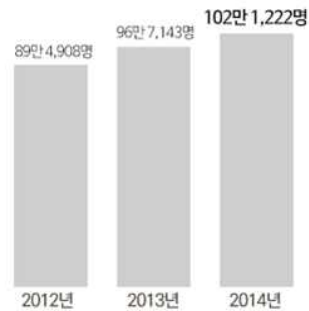
2) 국내 시장 현황

- 전립선비대증(Benign prostatic hyperplasia, BPH)은 성인 남성에게 흔하게 나타나는 질병의 하나로, 50세 이상의 남성의 50%, 80세 이상의 남성의 80% 이상이 이환되는 것으로 보고되고 있어 남성 요로 장애 중 가장 높은 빈도를 나타냄
- 한국의 전립선비대증 환자의 수는 2006년 45만 9천 명 정도에서 2014년 102만 1천 명으로 222% 이상의 증가율을 나타내며 최근 그 발병이 급속히 증가하고 있음



<전립선비대증 치료제 처방 건수>

출처 : Ubist live, 2015년



<건강보험 진료 인원 추이>

출처 : 건강보험심사평가원, 2014년

3) 국내 경쟁제품 현황

- ‘쏘팔메토 열매추출물’을 주원료로 전립선 건강에 도움을 주는 제품의 판매율이 높음

구분	국내	
제품사진		
제품명	쏘팔메토블렌드	CJ 전립소쏘팔메토
업체명	암웨이	CJ
유형	건강기능식품	건강기능식품
주원료	쏘팔메토열매추출물 등 복합물 (쏘팔메토열매추출물, 네틀루트 추출물복합물, 밀납, 레시틴)	쏘팔메토 열매추출물, 아연
섭취량(1day)	500mg, 3회	500 mg, 1회
구성	90캡슐(45.18g)	60캡슐(30g)
30일 단가	42,000원	8,000원
특징	1)째기품, 쏘팔메토복합제 2)부원료: 호박씨유 추출물, 오렌지 추출물, 두나리엘라추출물	1)미국 발렌사 원료이용

4) 국내 지식재산권 현황

지식재산권명	지식재산권 출원인	출원국/출원번호	
검쟁나무 추출물을 함유하는 전립선 질환의 예방 및 치료용 조성물	충남대학교산학협력단	한국	1020150142201
멸꿀 추출물을 함유하는 전립선 질환의 예방 및 치료용 조성물	충남대학교산학협력단	한국	1020150142205
합환피 추출물을 함유하는 전립선 질환의 예방 및 치료용 조성물	충남대학교산학협력단	한국	1020160040269
구슬꽃나무 잎 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 전립선비대증 치료용 조성물	중앙대학교 산학협력단	한국	1020150054058
전립선 비대증 치료 및 예방용 조성물	주식회사 켄백스앤카엘	한국	1020157031587
천연물 추출물을 포함하는 전립선 비대증의 예방 또는 치료용 조성물	충남대학교산학협력단	한국	1020140174078
오미자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 및 배뇨장애의 예방 또는 치료용 조성물	사회복지법인 삼성생명공익재단	한국	1020140009030
달모 또는 전립선 비대증의 예방, 치료 또는 개선용 약학 조성물 및 건강기능식품용 조성물	재단법인 전남생물산업진흥원	한국	1020140107688
산사자 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물	경희대학교 산학협력단	한국	1020120087408
국내자생식물을 이용한 전립선 질환 치료용 조성물	중앙대학교 산학협력단	한국	1020150081169
지실 추출물을 포함하는 전립선 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물	한국 한의학 연구원	한국	1020140153894
섬오갈피나무 추출물 또는 이로부터 분리한 신규화합물을 유효성분으로 함유하는 달모 질환의 예방 및 치료용 조성물	제주대학교 산학협력단	한국	1020090037163

5) 국내 전립선 관련 천연물 소재 현황

원료명	식용 가능 부위	기능성분 (지표성분)	기전 및 효과
멸꿀	열매	Erythrodiol	■기전: 안드로겐 수용체, 전립선 특이항원(PSA)과 5-알파 환원 효소 발현억제 ■전립선비대 유발 호르몬인 DHT level이 감소(동물효능평가)
복분자	열매※(복분자)	Ellagic acid	■기전: 안드로겐 수용체, 전립선 특이항원(PSA)과 5-알파 환원 효소 발현억제 ■전립선 무게, 전립선 소포의 상피세포 두께 및 면적이 감소, 전립선비대 유발 호르몬인 DHT level이 감소
울금	뿌리줄기(제한적)	Curcumin	■기전 : 5-알파환원효소 억제 ■효과 : positive control인 finasteride(5 μM)와 동등한 수준의 저해
쏘팔메토	열매	Lauric acid	■기전 :5-알파환원효소 억제,알파차단제 ■효과 : 하부요로증상 개선 효과(임상연구자료 부족)
토마토추출물 (라이코펜)	열매	lycopene	■기전 : 5-알파환원효소 억제, 안드로겐 수용체 발현 억제 ■효과 : 전립선 크기 유의적 감소 확인
야콘	덩이뿌리, 줄기, 잎	chlorogenic acid, caffeic acid	■기전 :5-알파환원효소 억제 ■효과 : 전립선 무게 감소(in vivo), 정자수 증가효과 및 남성호르몬 증가 효과
사상자	열매(제한적)	α-cadinene, torilin	■기전 :5-알파환원효소 억제 ■효과 : 전립선 무게 감소(in vivo),혈중 DHT가 감소
석창포	뿌리줄기(제한적)	β-asarone	■기전 : 알파차단제 ■효과 : 전립선 무게 감소(in vivo),혈중 DHT가 감소
호밀(세닐톤)	짚, 씨앗	Ergotoxin	■기전 : 항염증반응, 알파차단제 ■효과 :전립선 크기 감소(in vivo), 배뇨증상 야간빈뇨의 횟수 감소, 최대요속 개선
호박씨	줄기, 잎, 꽃, 열매, 씨앗	Polyphenol derivatives	■하부요로증상, 야뇨증 증상의 개선과 잔뇨량의 감소의 효과
애기썩기풀	잎(제한적)	Malic acid	■전립선비대증뿐만 아니라 전립선염 환자에서도 하부요로증상의 개선

(나) 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 국외 기술현황

- GSK에서는 두타스테리드 0.5mg, 탐스로신 0.4mg 복합제의 개발을 완료하여 2010년 4월 유럽 시판 승인을 받았음. 아보다트연질캡슐의 특허 만료 5년 전에 발매함으로써 아보다트 시장의 매출을 지속적으로 유지하는 전략으로 개발되었음
- 미국 FDA는 양성전립선비대 환자 4,844명을 대상으로 2년간 두타스테리드 0.5mg/day과 탐스로신 0.4mg/day, 두타스테리드 0.5mg/day + 탐스로신 0.4mg/day 병용요법의 효과를 비교한 임상시험을 진행함
- 임상시험에서 두타스테리드 0.5mg과 탐스로신 0.4mg의 병용요법은 탐스로신이나 두타스테리드 단일요법보다 전립선 비대 증상을 현저하게 개선함. 그러나 임상시험의 부작용을 비교한 시험에서는 단일 성분에 비해 부작용이 늘어남

2) 국외 시장 현황

- 전립선비대증의 유병률은 전 세계적으로 표준화가 되지 않았으며 하부요로 증상으로 판단함
- 현재, 하부요로 증상의 정도, 직장수지검사, 전립선의 비대, 요속검사, 압력요류 검사 등으로 진단하고 있어, 같은 기준으로 적용하더라도 국가별 큰 차이가 발생함

3) 국외 경쟁제품 현황

- 다양한 소재를 복합하여 사용한 제품이 많으며 탈모방지 및 성기능향상의 기능성을 강조함

구분	해의	
제품사진		
제품명	PROSTATE EXTREME	Prostarex
업체명	TSBrandlab	Prostarex
유형	건강기능식품	건강기능식품
주원료	쏘팔메토 열매추출물 베타-시토스테롤	비타민D, E, B, 아연, 셀레늄
섭취량(1day)	826mg, 2회	900mg, 2회
구성	60캡슐	60캡슐
30일 단가	13,590원	28,300원
특징	1) 부원료: 썬기풀, 표고버섯, Zine, Pumpkin Seed, Pygeum, quercetin 등 2) 남성 활력증가 3) 탈모방지	1) 부원료: 썬팔메토 열매추출물, 아미노산, 베타-시토스테롤, Pygeum, quercetin, lycopene 2) 전립선 크기 유지 3) 방광강화 및 성기능 향상

4) 국외 지식재산권 현황

지식재산권명	지식재산권 출원인	출원국/출원번호	
Method for extracting and separating nucleoside from rape pollen and rape bee pollen and application thereof in resisting benign prostatic hyperplasia	Xu Yida	CN	201310499581
Traditional Chinese medicinal material compound extract for resisting benign prostatic hyperplasia	XINJIANG BILL BROTH	CN	201410516411
COMPOSITION AND METHOD FOR THE TREATMENT OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATITIS	RICHARDSON LABS	US	PCT/US1998/018199
A pharmaceutical composition for the medical treatment of the benign prostatic hyperplasia, its preparation method and its therapeutical application	H.P.B. Sociedad Anonima	EP	06117523.8
Application of antrodia cinnamomea in anti-benign prostatic hyperplasia medicines	SHANGHAI JIAO TONG	CN	201610620474.5
Compound Chinese medicinal preparation for treating benign prostatic hyperplasia and preparation method thereof	Institute of Basic Research in Clinical Medicine,China Academy Of Chinese Medical Sciences	CN	201110364304
METHOD FOR TREATMENT OF PROSTATIC HYPERPLASIA AND/OR AMELIORATING URINARY DISTURBANCE WITH BANANA FLOWER EXTRACT	TCI Co., Ltd.	US	14861338
Composition and lipid formulation of a hyaluronan-degrading enzyme and the use thereof for treatment of benign prostatic hyperplasia	Xiaoming Li Mysore Ramprasad Curtis	US	13815311
Composition for the treatment of benign prostate hyperplasia	Ferring B.V.	EP	10740272.9
COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA	Petri Axel Niclas Erichsen Lars	US	13381762

5) 국외 전립선 관련 천연물 소재 현황

원료명	식용가능부위	기능성분 (지표성분)	기전 및 효과
쏘팔메토	열매	Lauric acid	<ul style="list-style-type: none"> 기전 :5-알파환원효소 억제,알파차단제 효과 : 하부요로증상 개선 효과(임상연구자료 부족)
토마토추출물 (라이코펜)	열매	lycopene	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 5-알파환원효소 억제, 안드로겐 수용체 발현 억제 효과 : 전립선 크기 유의적 감소 확인
아프리카 서양자두	열매(씨앗 제외)	Pygeum africanum	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 피세포성장인자(EGF), 인슐린유사성장인자(IGF-1),염기성섬유아세포 성장인자(bFGF)를 억제 효과 : 국제전립선증상점수(IPSS) 46%개선(전립선비대증환자대상)
남아프리카 해오라비사초 (하이포시스루페리)	미 등재	Beta-sitosterol	<ul style="list-style-type: none"> 전립선 크기 증가 억제(전립선세포의 고사를 유도)(in vitro) 요속의 개선 및 잔뇨량의 감소와 같은 효과를 보임
호밀(세닐톤)	싹, 씨앗	Ergotoxin	<ul style="list-style-type: none"> 기전 : 항염증반응, 알파차단제 효과 : 전립선 크기 감소(in vivo), 배뇨증상 야간빈뇨의 횟수 감소, 최대요속 개선
호박씨	줄기, 잎, 꽃, 열매, 씨앗	Polyphenol derivatives	<ul style="list-style-type: none"> 하부요로증상, 야뇨증 증상의 개선과 잔뇨량의 감소의 효과
애기뽕기름	잎(제한적)	Malic acid	<ul style="list-style-type: none"> 전립선비대증뿐만 아니라 전립선염 환자에서도 하부요로증상의 개선

(2) 원료 스크리닝 (항산화 활성 평가; DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정)

- 13번(맥문동, 물), 31번(맥문동, 주정)을 제외한 대부분의 추출물에서 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 나타내었음
- 최종농도가 낮아질수록 몇몇 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능이 급격히 감소함을 확인함
- 5번(산수유, 물), 7번(야관문, 물), 10번(멸꿀 미숙과, 물), 12번(멸꿀 줄기, 물), 15번(황금, 물), 23번(산수유, 주정), 25번(야관문, 주정), 28번(멸꿀 미숙과, 주정), 30번(멸꿀 줄기, 주정), 33번(황금, 주정) 총 10개의 추출물이 다른 추출물보다 DPPH 라디칼소거능, ABTS 라디칼소거능 모두 우수한 활성을 가지는 것으로 확인함

DPPH radical scavenging activity ^a

Extract	concentration					Extract	concentration				
	3 mg/mL (%)	1.5 mg/mL (%)	0.75 mg/mL (%)	0.375 mg/mL (%)	0.188 mg/mL (%)		3 mg/mL (%)	1.5 mg/mL (%)	0.75 mg/mL (%)	0.375 mg/mL (%)	0.188 mg/mL (%)
1 가시오가피 (물)	69.7 ± 3.8	69.2 ± 2.5	54.7 ± 1.2	45.0 ± 2.3	35.6 ± 1.2	19 가시오가피 (주정)	75.4 ± 2.5	70.8 ± 2.4	61.4 ± 1.1	57.8 ± 2.4	41.9 ± 1.4
2 건포도 (물)	37.1 ± 3.1	26.3 ± 1.4	18.9 ± 2.7	12.1 ± 0.9	9.2 ± 1.3	20 건포도 (주정)	34.4 ± 0.8	23.7 ± 1.2	17.0 ± 2.1	6.7 ± 1.2	3.4 ± 1.2
3 독활 (물)	15.2 ± 3.2	10.3 ± 1.5	9.3 ± 1.4	5.1 ± 1.2	N.A	21 독활 (주정)	64.9 ± 1.2	52.2 ± 1.2	42.4 ± 2.4	25.8 ± 3.3	17.4 ± 0.9
4 사삼자 (물)	22.9 ± 2.9	13.7 ± 2.1	7.8 ± 2.9	2.4 ± 1.8	0.8 ± 1.1	22 사삼자 (주정)	4.9 ± 2.1	4.0 ± 2.6	3.9 ± 1.2	1.2 ± 1.3	0.8 ± 2.9
5 산수유 (물)	84.1 ± 0.4	77.8 ± 2.6	67.6 ± 1.4	50.7 ± 3.3	40.3 ± 1.1	23 산수유 (주정)	82.4 ± 3.1	81.2 ± 1.7	76.1 ± 3.1	68.7 ± 2.1	52.2 ± 1.8
6 석창포 (물)	39.2 ± 1.2	35.2 ± 2.2	34.9 ± 2.1	22.4 ± 3.5	15.2 ± 1.9	24 석창포 (주정)	53.2 ± 2.4	49.1 ± 2.4	41.6 ± 1.1	35.8 ± 1.7	26.8 ± 1.0
7 야관문 (물)	79.7 ± 0.9	75.3 ± 3.1	72.3 ± 2.4	65.8 ± 1.4	48.6 ± 0.9	25 야관문 (주정)	72.3 ± 3.1	69.9 ± 1.5	60.4 ± 0.9	58.2 ± 0.4	41.8 ± 2.4
8 진피 (물)	51.6 ± 4.6	41.4 ± 2.7	30.5 ± 1.4	20.2 ± 0.8	12.2 ± 0.6	26 진피 (주정)	53.2 ± 1.2	49.2 ± 3.1	31.6 ± 1.2	23.6 ± 1.8	14.2 ± 0.4
9 지자 (물)	73.9 ± 3.1	64.7 ± 2.8	52.3 ± 3.3	37.8 ± 1.4	29.0 ± 2.3	27 지자 (주정)	63.2 ± 2.3	59.6 ± 2.1	52.9 ± 1.0	40.2 ± 2.8	31.8 ± 2.8
10 멸꿀 미숙과 (물)	76.5 ± 2.8	74.4 ± 1.2	69.4 ± 1.4	58.4 ± 1.3	41.8 ± 1.2	28 멸꿀 미숙과 (주정)	73.4 ± 2.0	69.6 ± 2.4	63.4 ± 1.1	57.5 ± 3.0	43.9 ± 1.7
11 멸꿀 잎 (물)	44.2 ± 3.8	39.1 ± 2.4	33.2 ± 2.9	23.4 ± 2.0	15.9 ± 0.2	29 멸꿀 잎 (주정)	35.8 ± 2.5	28.5 ± 0.6	25.1 ± 2.8	18.9 ± 2.5	12.3 ± 1.4
12 멸꿀 줄기 (물)	77.6 ± 0.8	71.0 ± 3.3	66.4 ± 2.1	59.9 ± 3.1	51.1 ± 1.7	30 멸꿀 줄기 (주정)	75.4 ± 0.7	71.8 ± 2.1	68.2 ± 0.8	54.0 ± 1.6	41.8 ± 1.0
13 맥문동 (물)	27.1 ± 3.1	12.3 ± 2.0	4.8 ± 1.1	3.3 ± 2.5	2.2 ± 3.4	31 맥문동 (주정)	18.3 ± 3.8	6.2 ± 0.2	5.4 ± 0.7	2.5 ± 1.2	1.4 ± 1.1
14 황금 (물)	34.7 ± 3.3	22.8 ± 2.1	22.2 ± 2.5	10.1 ± 2.3	5.2 ± 2.5	32 황금 (주정)	38.8 ± 2.2	13.2 ± 1.6	6.9 ± 2.3	3.2 ± 2.8	1.3 ± 1.7
15 황기 (물)	69.3 ± 1.5	58.5 ± 2.3	49.8 ± 1.6	43.5 ± 1.3	35.7 ± 0.9	33 황기 (주정)	82.9 ± 0.1	82.0 ± 2.2	80.8 ± 2.3	66.4 ± 1.0	50.2 ± 1.8
16 황기 (물)	29.1 ± 2.9	24.1 ± 2.3	20.2 ± 2.1	12.6 ± 1.5	8.5 ± 1.6	34 황기 (주정)	25.7 ± 0.6	21.5 ± 1.3	15.9 ± 1.0	8.2 ± 1.4	5.2 ± 1.4
17 홍삼근 (물)	30.7 ± 2.2	27.4 ± 3.8	19.3 ± 1.4	10.9 ± 0.4	6.5 ± 1.7	35 홍삼근 (주정)	55.6 ± 1.3	41.2 ± 1.1	36.8 ± 0.6	29.3 ± 2.4	14.8 ± 1.7
18 홍삼미 (물)	20.3 ± 3.1	15.3 ± 1.2	9.4 ± 0.8	7.4 ± 1.4	5.7 ± 0.4	36 홍삼미 (주정)	52.3 ± 2.1	33.8 ± 1.4	23.7 ± 2.1	13.7 ± 1.2	7.0 ± 0.3
						대조 (쏘팔메토 오일)	13.4 ± 2.6	10.5 ± 2.7	11.5 ± 2.3	3.7 ± 1.2	1.8 ± 0.6
						Trolox ^b	91.3 ± 0.9	90.8 ± 2.3	85.6 ± 2.0	79.3 ± 0.9	77.4 ± 2.8

N.A. Not Activity
^a Extracts were tested three times
^b Trolox was positive compound

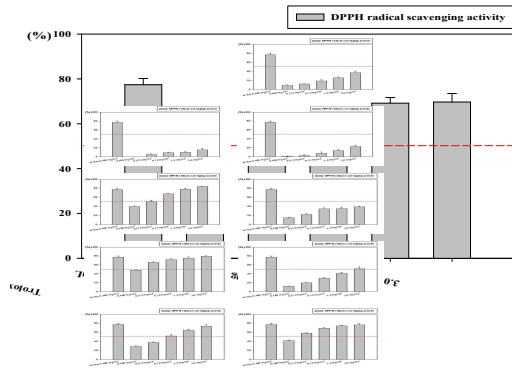
<열수, 주정추출물의 DPPH 라디칼 소거능>

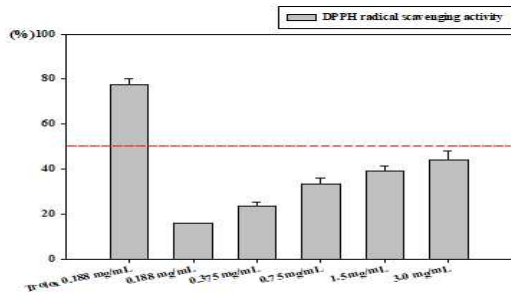
ABTS radical cation decolorization activity ^a

Extract	concentration					Extract	concentration				
	3 mg/mL (%)	1.5 mg/mL (%)	0.75 mg/mL (%)	0.375 mg/mL (%)	0.188 mg/mL (%)		3 mg/mL (%)	1.5 mg/mL (%)	0.75 mg/mL (%)	0.375 mg/mL (%)	0.188 mg/mL (%)
1 가시오가피 (물)	91.4 ± 0.3	92.9 ± 0.1	92.4 ± 0.4	91.4 ± 0.3	89.8 ± 2.1	19 가시오가피 (주정)	93.2 ± 0.7	92.8 ± 0.1	92.8 ± 0.2	92.1 ± 0.3	88.6 ± 0.3
2 건포도 (물)	89.7 ± 1.7	62.9 ± 0.2	36.5 ± 0.1	19.7 ± 0.3	10.6 ± 0.5	20 건포도 (주정)	83.1 ± 1.4	54.1 ± 2.3	30.0 ± 0.4	16.1 ± 0.3	8.3 ± 0.5
3 독활 (물)	91.9 ± 0.1	90.8 ± 0.3	88.3 ± 0.4	60.6 ± 1.9	37.9 ± 1.1	21 독활 (주정)	89.7 ± 0.3	85.7 ± 2.1	82.7 ± 2.0	62.3 ± 3.2	37.5 ± 0.6
4 사삼자 (물)	92.6 ± 0.1	90.5 ± 1.4	68.5 ± 0.2	41.2 ± 0.3	23.8 ± 0.2	22 사삼자 (주정)	92.3 ± 0.4	91.7 ± 0.3	90.7 ± 0.3	89.7 ± 0.5	71.2 ± 1.4
5 산수유 (물)	93.3 ± 0.6	93.3 ± 0.9	93.2 ± 1.4	93.1 ± 2.3	91.8 ± 0.5	23 산수유 (주정)	93.5 ± 2.1	93.2 ± 0.3	93.1 ± 1.9	93.1 ± 2.1	92.8 ± 2.1
6 석창포 (물)	93.2 ± 0.1	92.9 ± 0.1	92.9 ± 0.3	75.7 ± 0.7	49.7 ± 1.7	24 석창포 (주정)	92.9 ± 0.2	92.9 ± 1.5	92.4 ± 0.1	83.3 ± 0.7	62.4 ± 0.8
7 야관문 (물)	93.2 ± 1.1	92.7 ± 0.3	92.6 ± 0.2	91.6 ± 0.9	91.5 ± 0.2	25 야관문 (주정)	93.5 ± 0.2	93.4 ± 0.1	93.3 ± 0.3	93.1 ± 0.8	91.4 ± 0.8
8 진피 (물)	92.9 ± 0.6	92.6 ± 0.3	83.3 ± 0.7	60.6 ± 0.4	39.2 ± 0.2	26 진피 (주정)	92.7 ± 0.6	92.7 ± 0.3	87.6 ± 0.8	70.4 ± 0.3	50.4 ± 0.4
9 지자 (물)	93.3 ± 0.2	93.1 ± 0.6	93.1 ± 2.2	89.9 ± 0.4	65.2 ± 0.5	27 지자 (주정)	93.2 ± 0.3	93.1 ± 0.3	92.6 ± 0.1	92.1 ± 0.7	81.2 ± 2.6
10 멸꿀 미숙과 (물)	94.1 ± 1.2	93.7 ± 1.8	92.3 ± 0.9	92.3 ± 1.3	91.8 ± 0.9	28 멸꿀 미숙과 (주정)	93.5 ± 0.2	93.3 ± 0.3	93.2 ± 0.3	92.9 ± 0.1	91.8 ± 0.3
11 멸꿀 잎 (물)	92.2 ± 0.1	91.9 ± 0.8	91.6 ± 0.2	78.7 ± 1.2	48.4 ± 0.5	29 멸꿀 잎 (주정)	90.8 ± 0.4	88.9 ± 0.7	80.5 ± 0.9	58.6 ± 0.8	35.5 ± 0.2
12 멸꿀 줄기 (물)	92.9 ± 0.4	92.8 ± 2.1	92.5 ± 3.1	92.2 ± 1.1	91.8 ± 0.2	30 멸꿀 줄기 (주정)	93.1 ± 0.3	92.8 ± 0.2	92.8 ± 0.3	92.1 ± 2.1	91.2 ± 0.9
13 맥문동 (물)	66.4 ± 2.1	37.1 ± 0.7	19.8 ± 0.1	10.1 ± 0.5	3.9 ± 0.2	31 맥문동 (주정)	62.3 ± 0.3	34.5 ± 0.3	20.1 ± 1.6	10.4 ± 0.2	5.1 ± 1.8
14 황금 (물)	93.0 ± 0.1	92.9 ± 0.2	73.9 ± 0.4	46.4 ± 0.4	26.1 ± 1.0	32 황금 (주정)	93.0 ± 0.2	92.0 ± 0.4	92.0 ± 0.3	89.1 ± 0.7	68.5 ± 1.7
15 황기 (물)	93.0 ± 0.1	93.0 ± 0.3	93.1 ± 1.6	92.8 ± 0.3	91.2 ± 2.1	33 황기 (주정)	93.3 ± 0.2	93.3 ± 1.1	93.2 ± 0.1	92.6 ± 0.1	90.7 ± 0.3
16 황기 (물)	93.2 ± 0.1	87.6 ± 0.1	63.1 ± 0.8	38.5 ± 0.2	21.3 ± 0.4	34 황기 (주정)	92.9 ± 0.1	92.5 ± 0.6	80.4 ± 2.1	52.1 ± 0.5	30.9 ± 2.0
17 홍삼근 (물)	93.3 ± 0.3	82.5 ± 0.7	52.7 ± 0.2	30.1 ± 0.6	16.7 ± 0.1	35 홍삼근 (주정)	93.3 ± 0.3	82.5 ± 1.4	60.7 ± 2.1	40.5 ± 2.7	22.3 ± 0.8
18 홍삼미 (물)	90.6 ± 2.9	81.1 ± 0.2	51.6 ± 0.9	29.0 ± 0.5	16.7 ± 0.5	36 홍삼미 (주정)	93.4 ± 0.1	89.3 ± 1.0	66.2 ± 2.2	41.7 ± 0.8	24.2 ± 1.0
						대조 (쏘팔메토 오일)	24.5 ± 2.1	9.9 ± 3.2	4.4 ± 0.4	1.7 ± 1.2	1.8 ± 0.3
						Trolox ^b	91.3 ± 2.1	90.2 ± 2.1	86.4 ± 2.1	79.4 ± 2.5	74.9 ± 0.6

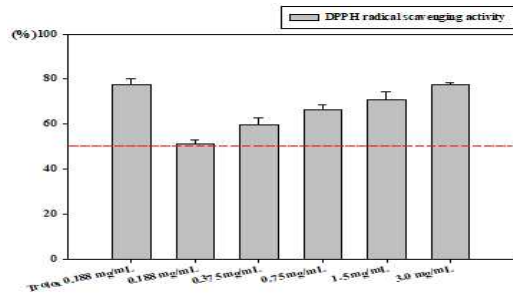
^a Extracts were tested three times
^b Trolox was positive compound

<열수, 주정추출물의 ABTS 라디칼 소거능>

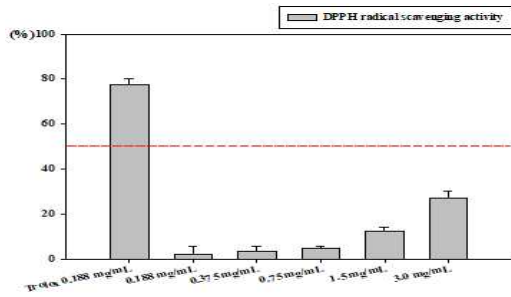




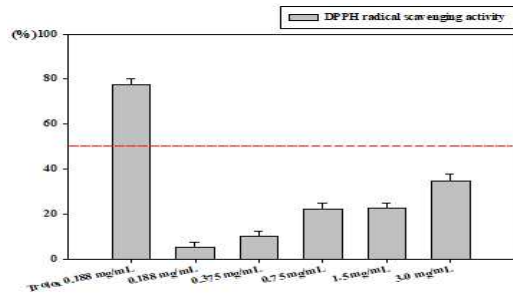
11. 벌꿀 잎(물)



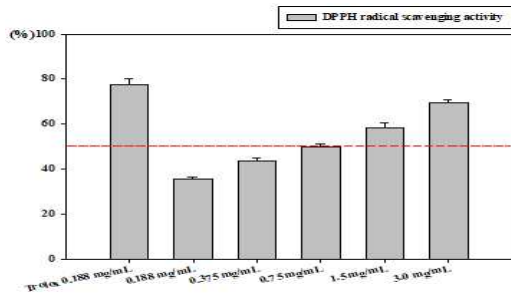
12. 벌꿀 줄기(물)



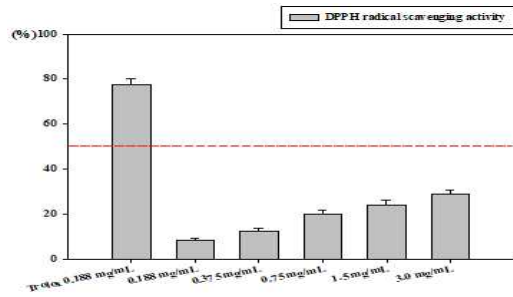
13. 맥문동(물)



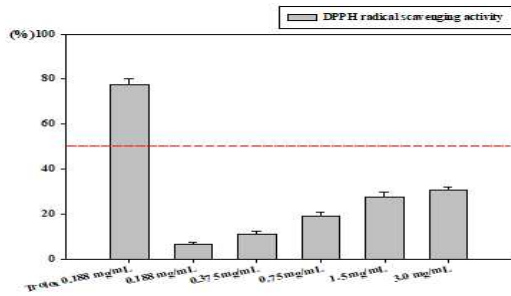
14. 울금(물)



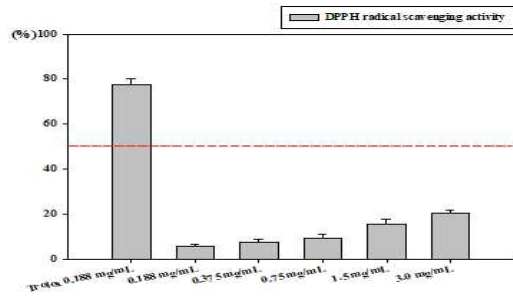
15. 황금(물)



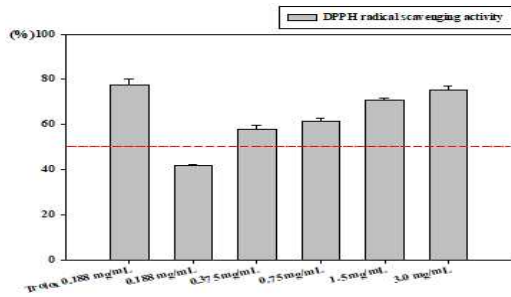
16. 황기(물)



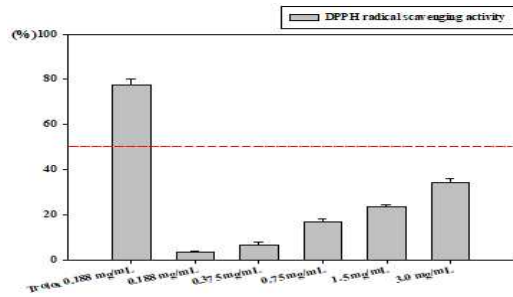
17. 홍삼근(물)



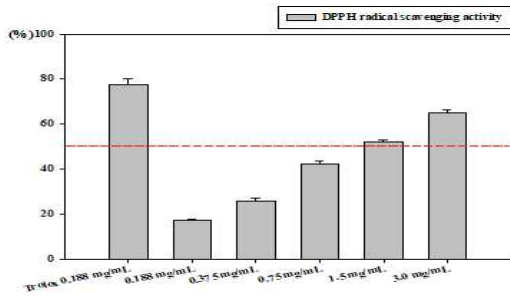
18. 홍삼미(물)



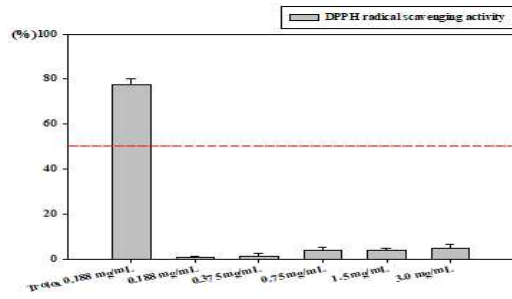
19. 가시오가피(주정)



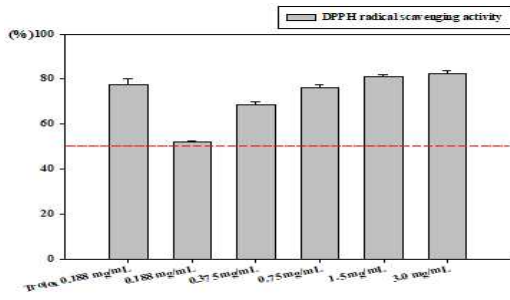
20. 건포도(주정)



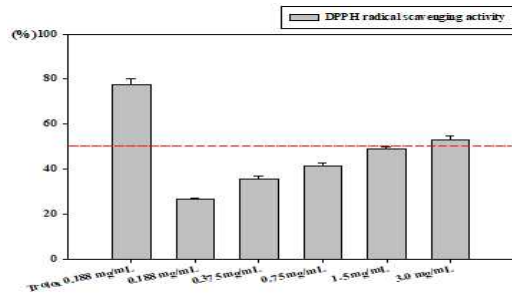
21. 독활(주정)



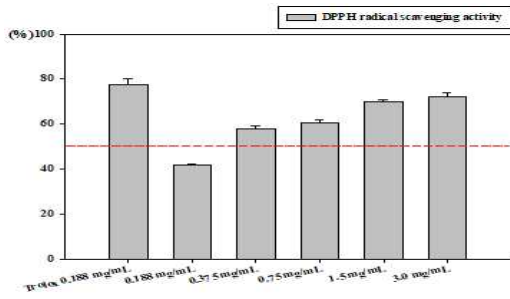
22. 사상자(주정)



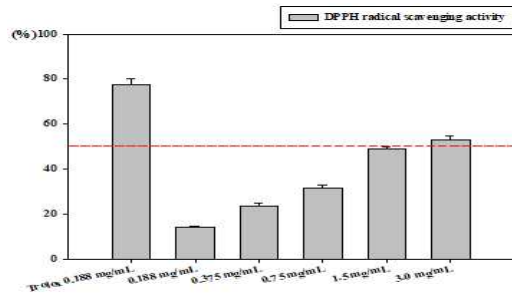
23. 산수유(주정)



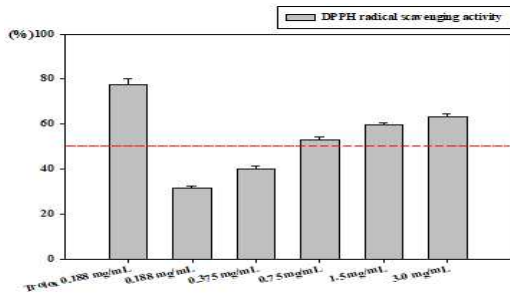
24. 석창포(주정)



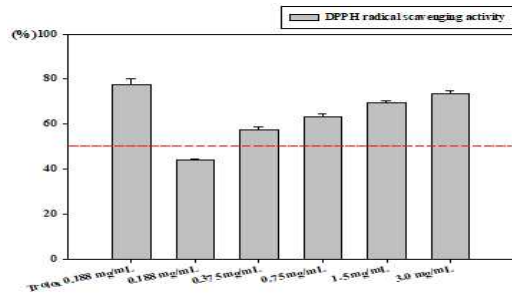
25. 아관문(주정)



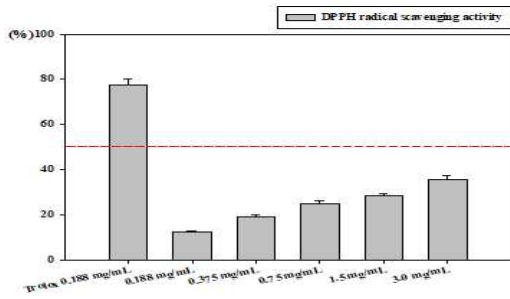
26. 진피(주정)



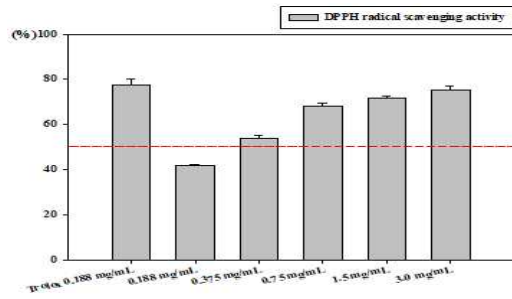
27. 치지(주정)



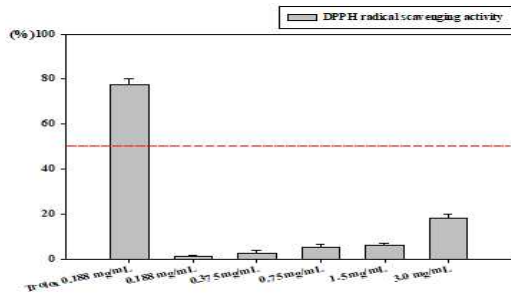
28. 멀꿀 미숙과(주정)



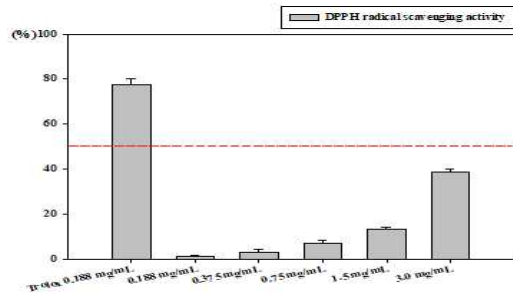
29. 멀꿀 잎(주정)



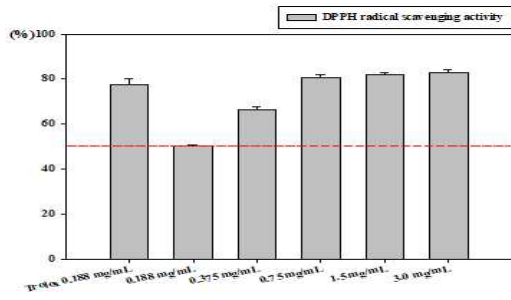
30. 멀꿀 줄기(주정)



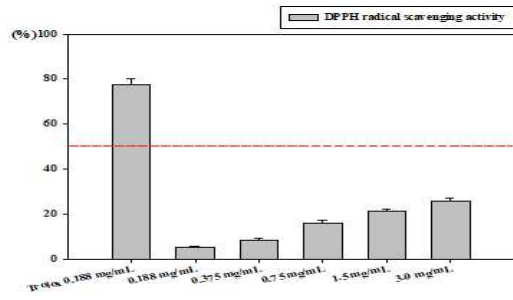
31. 맥문동(주정)



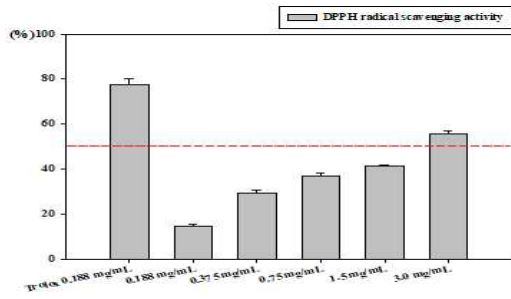
32. 울금(주정)



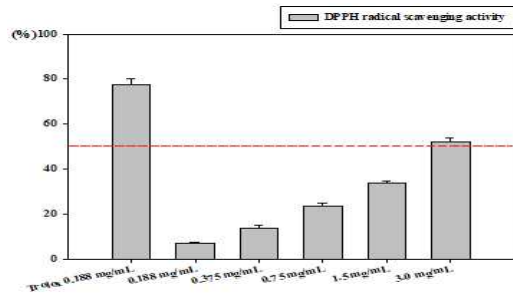
33. 황금(주정)



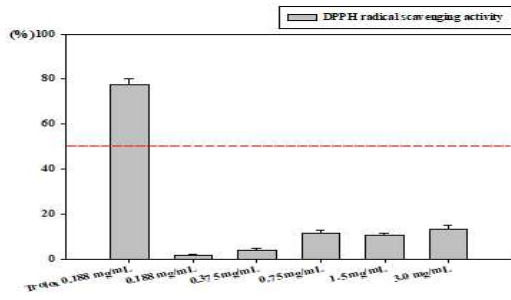
34. 황기(주정)



35. 홍삼근(주정)

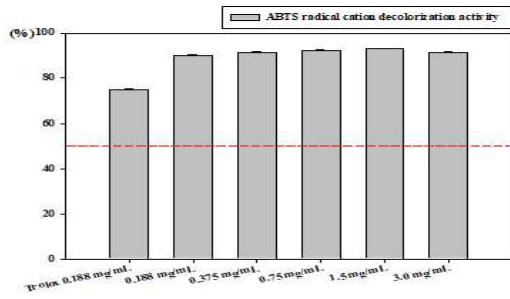


36. 홍삼미(주정)

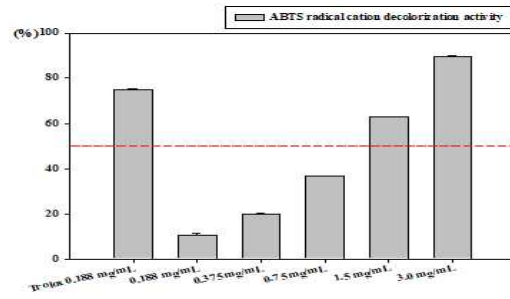


37. 대조(소팔메 토오일)

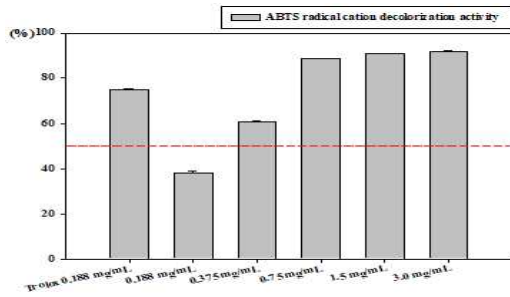
<열수, 주정 추출물의 DPPH 라디컬소거능>



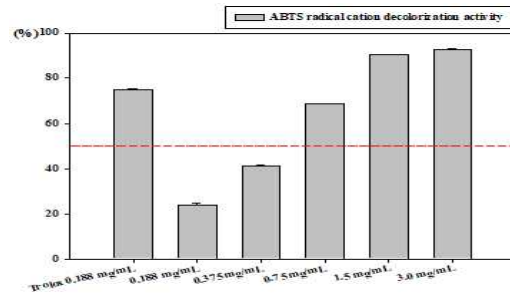
1. 가시오가피(물)



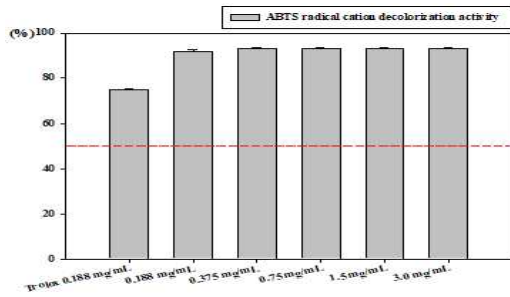
2. 건포도(물)



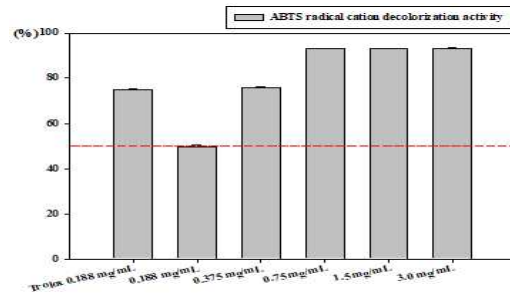
3. 독활(물)



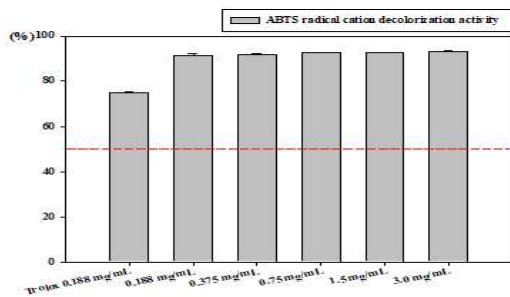
4. 사상자(물)



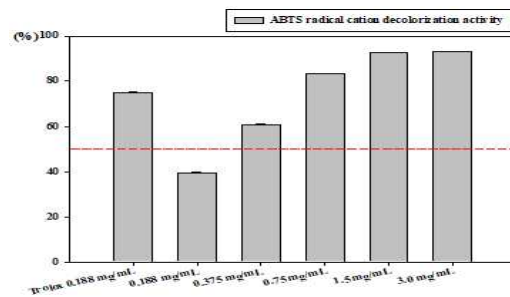
5. 산수유(물)



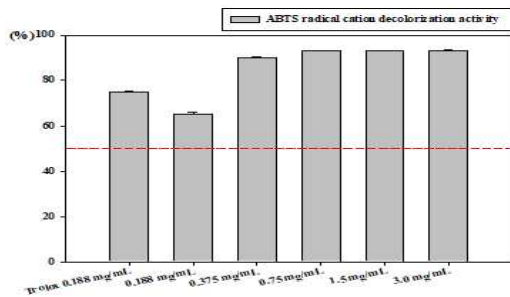
6. 석창포(물)



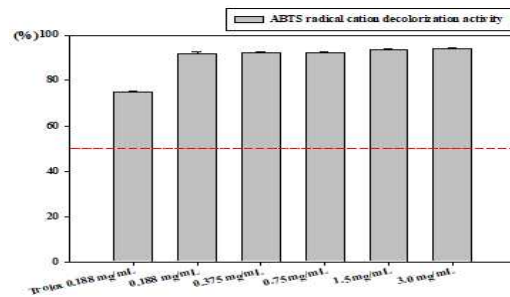
7. 야관문(물)



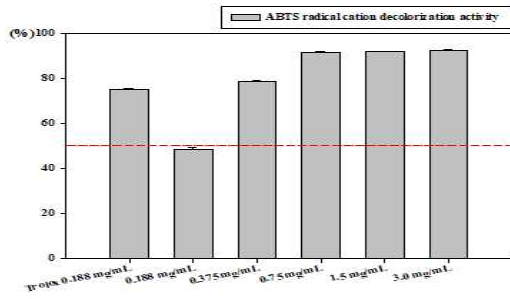
8. 진피(물)



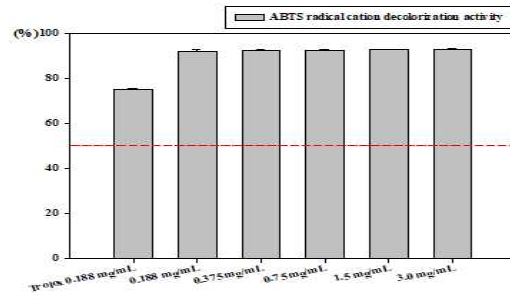
9. 치자(물)



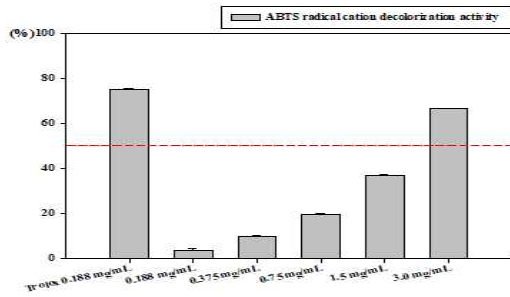
10. 멀꿀 미숙과(물)



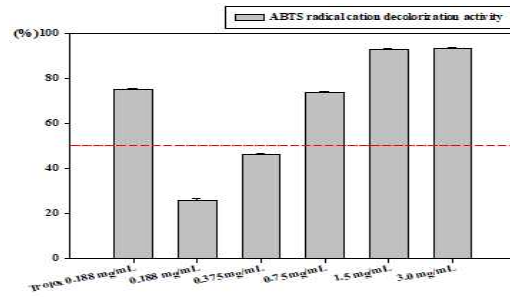
11. 멀꿀 잎(물)



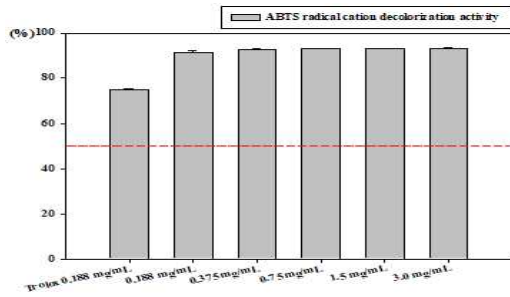
12. 멀꿀 줄기(물)



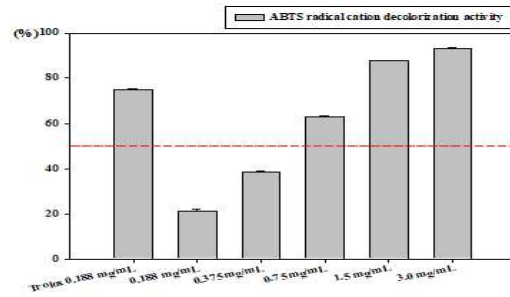
13. 맥문동(물)



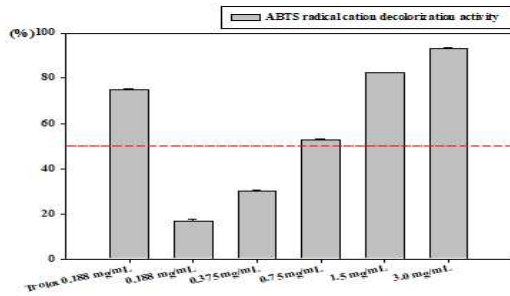
14. 울금(물)



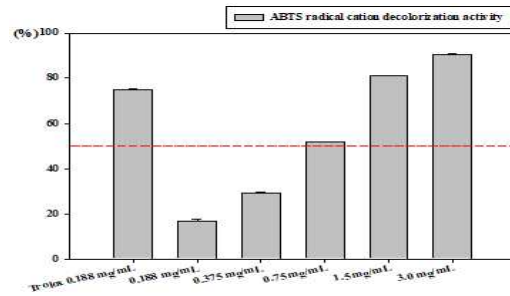
15. 황금(물)



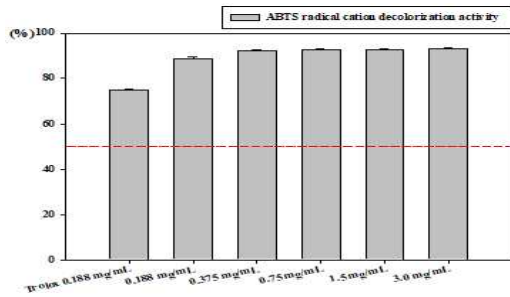
16. 황기(물)



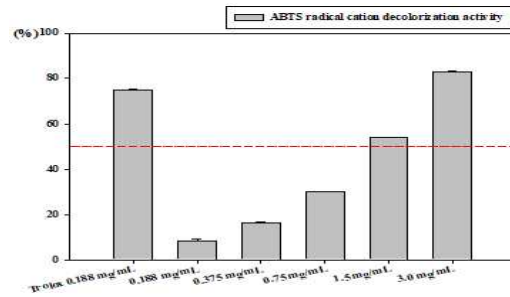
17. 홍삼근(물)



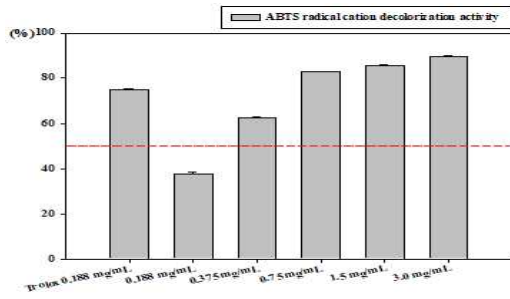
18. 홍삼미(물)



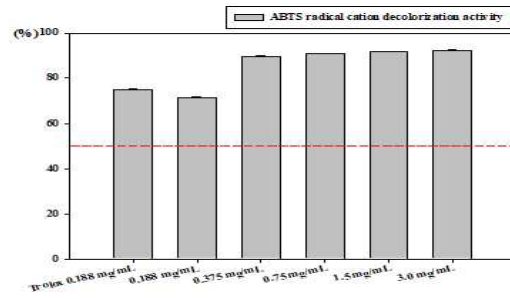
19. 가시오가피(주정)



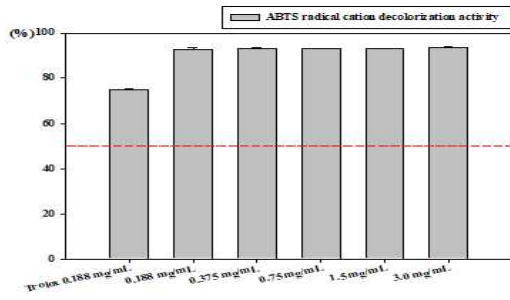
20. 건포도(주정)



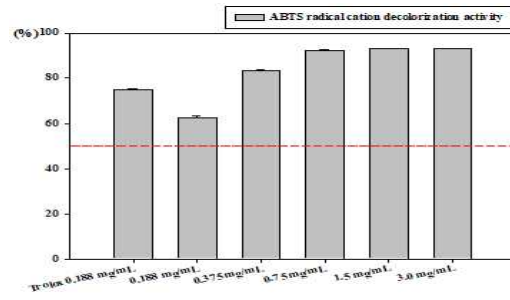
21. 독활(주정)



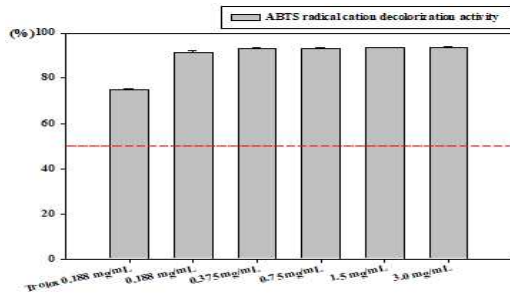
22. 사상자(주정)



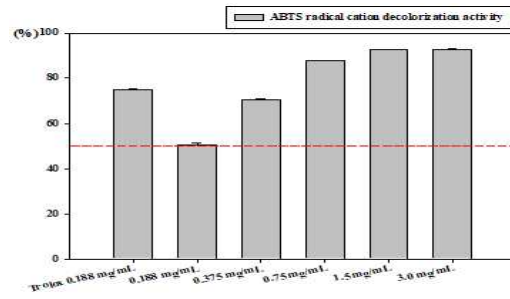
23. 산수유(주정)



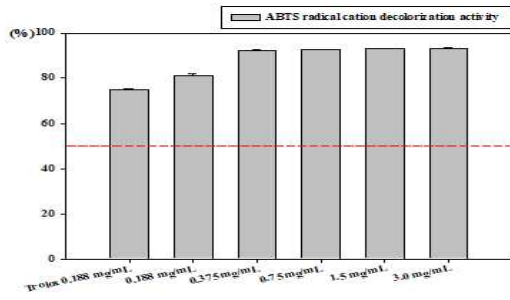
24. 석창포(주정)



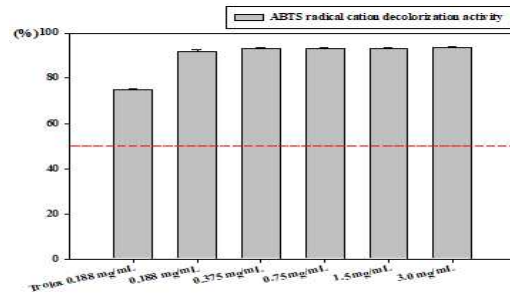
25. 아관문(주정)



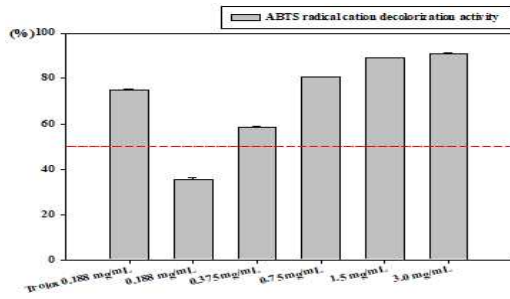
26. 진피(주정)



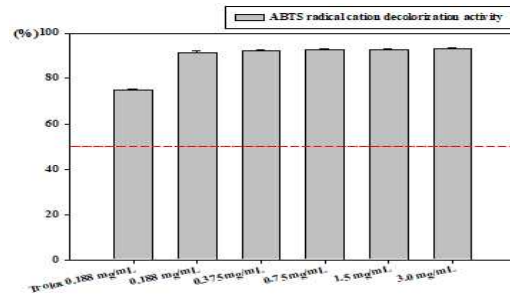
27. 치지(주정)



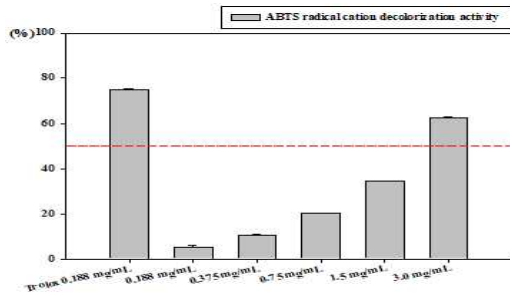
28. 멀꿀 미숙과(주정)



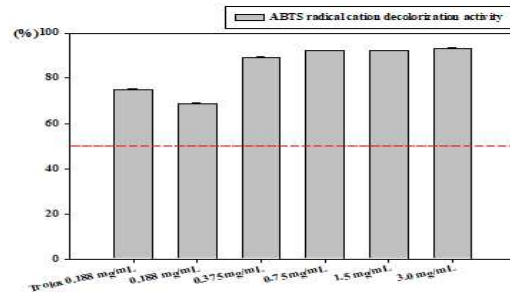
29. 멀꿀 잎(주정)



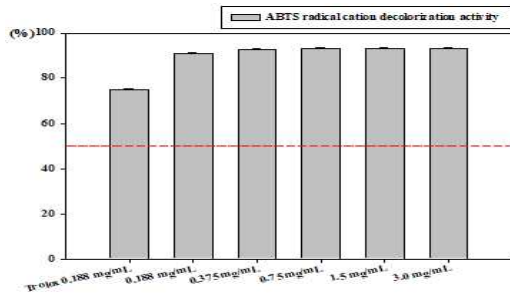
30. 멀꿀 줄기(주정)



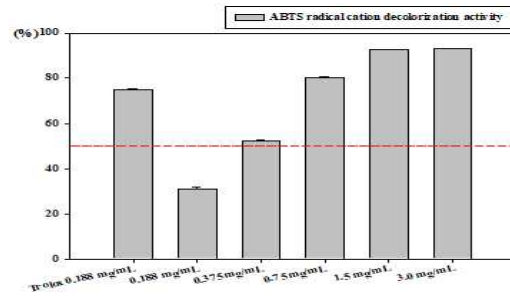
31. 맥동(주정)



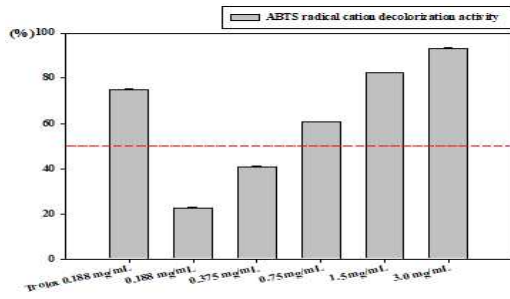
32. 울금(주정)



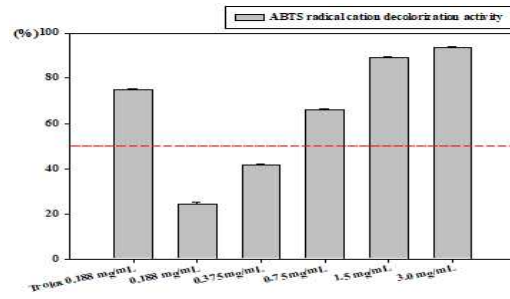
33. 황금(주정)



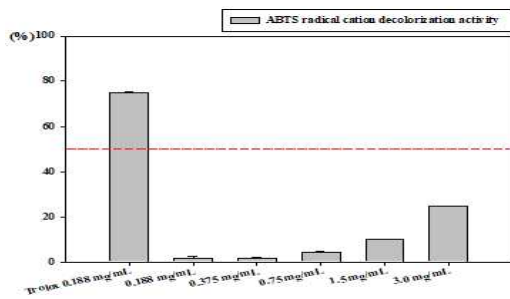
34. 황기(주정)



35. 홍삼군(주정)



36. 홍삼미(주정)



37. 대조(소팔메 토오일)

<열수, 주정 추출물의 ABTS 라디컬소거능>

(3) 원료 스크리닝 (세포 활성 평가)

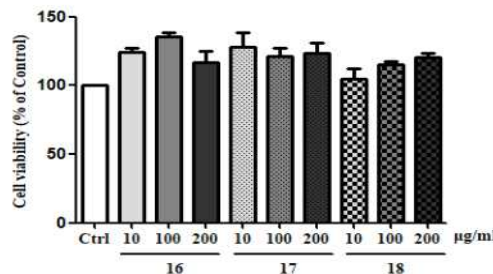
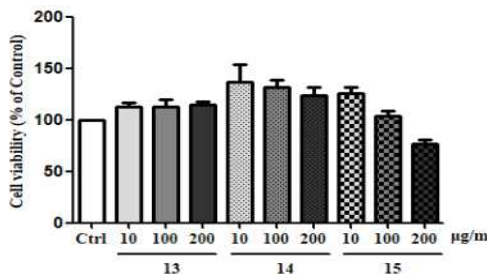
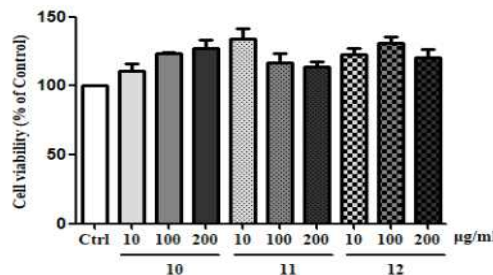
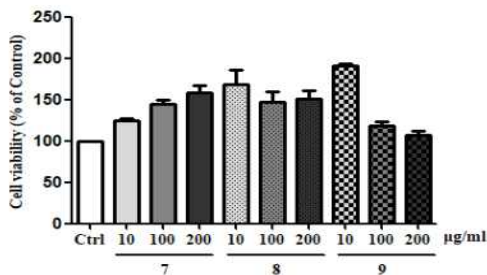
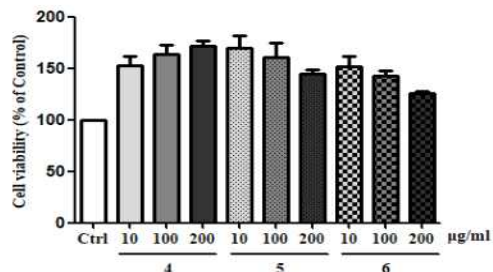
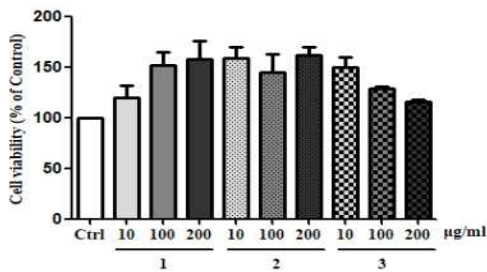
(가) 세포 활성평가

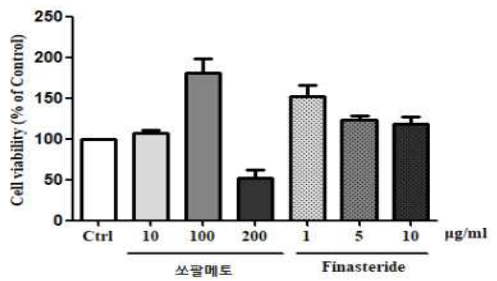
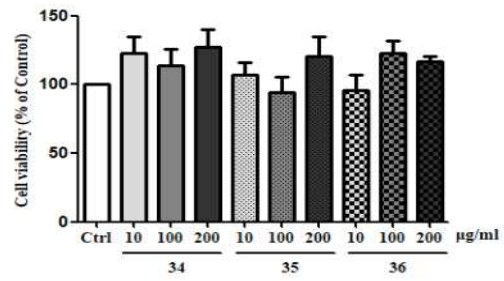
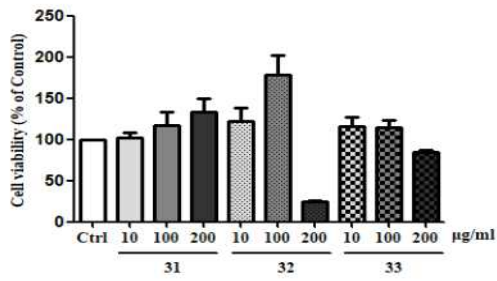
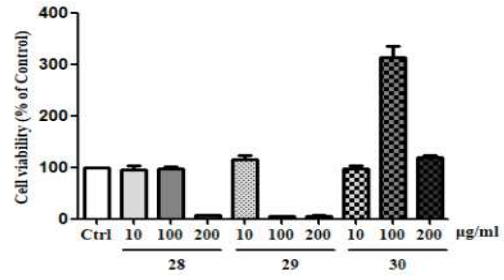
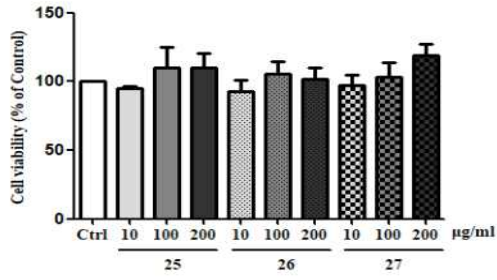
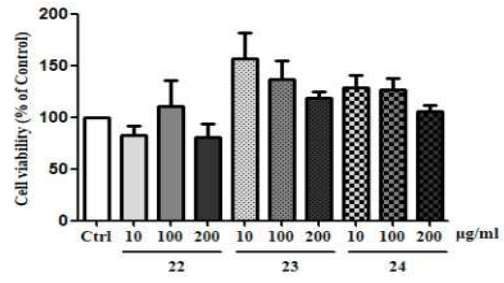
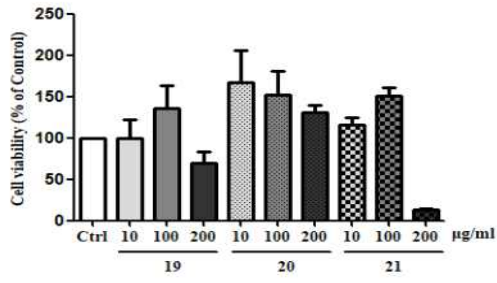
1) 세포 배양

- 전립선 세포주인 LNCaP는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받음. LNCaP는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)가 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco)에서 배양함. LNCaP는 세포 seeding 전, FBS가 포함된 phenol-red free RPMI-1640 배지를 이용하여 일정 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양함

2) 세포 독성평가

- 96 well plate에 1 x 10⁴ cell을 분주하여 18h 동안 배양한 뒤, 각 물질을 농도별로 처리함. 물질처리 72h 후 cell viability assay kit (EZ-cytox; DaeilLab Service, Korea) 용액을 첨가한 후, ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정함
- LNCaP 세포에 1-36번 추출물을 72h 처리한 후, 각각의 대조군과 세포 생존율을 비교한 결과는 아래와 같음
- 15번(황금, 물), 19번(가시오가피, 주정), 28번(말꿀 미숙과, 주정), 29번(말꿀 잎, 주정), 쏘팔메토 원료는 각각 200 µg/ml에서 세포 생존율에 대한 영향이 있음을 확인함

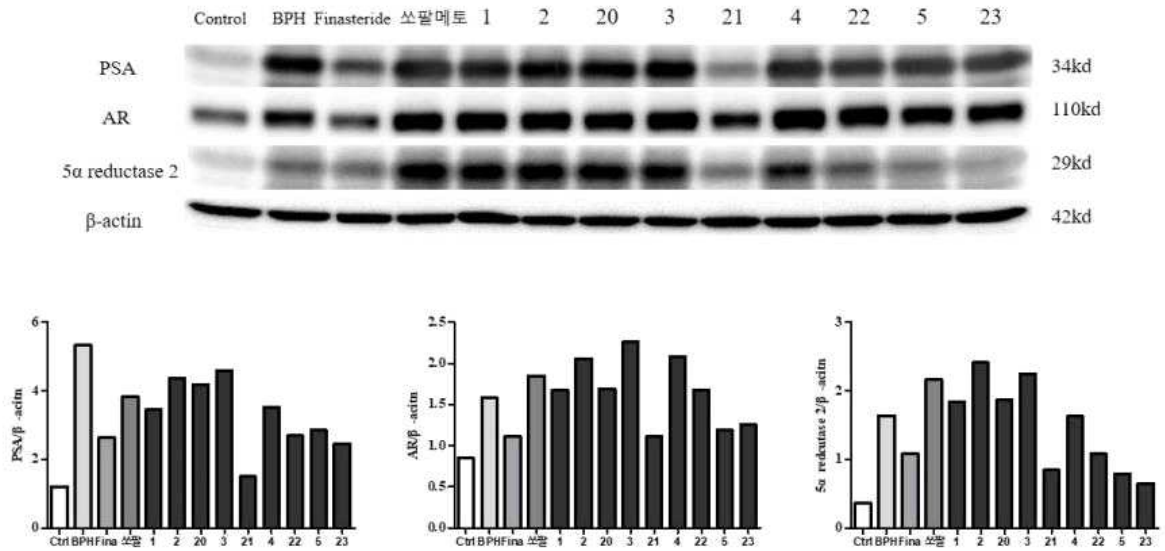




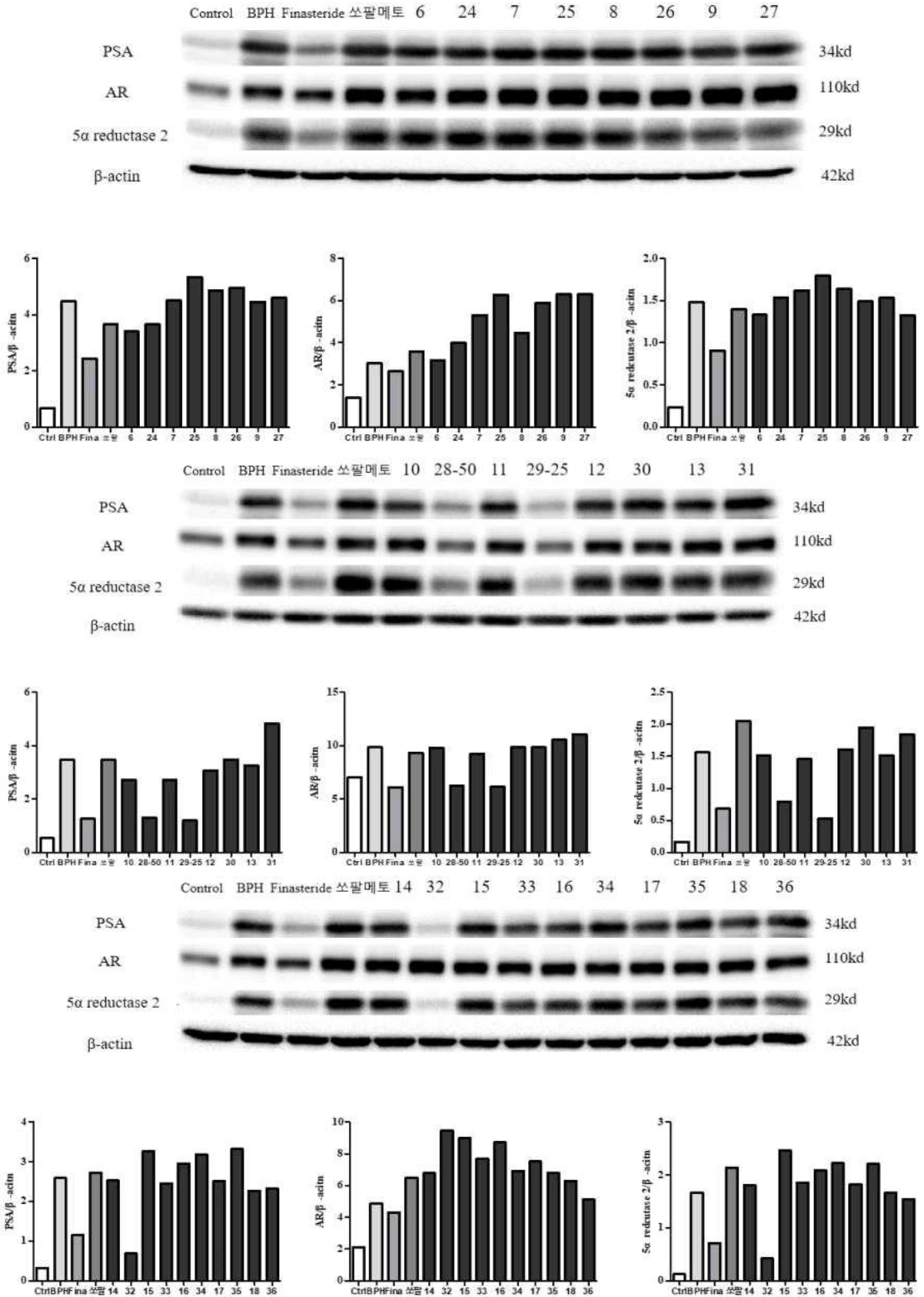
<LNCaP cell 세포독성>

(나) 전립선비대증 관련 Protein 발현량 측정

- 6 well plate에 5×10^4 cell을 분주하고 18h 동안 배양한 뒤, 각 물질을 농도별로 처리함. 물질처리 72h 후 harvest 함. Cell sample은 RIPA buffer (pH 7.2)로 분해하고 centrifuge (12,000 rpm for 20 min at 4°C) 한 후, 상층액만을 사용하여 western blot 함
- LNCaP 세포에 추출물을 각 100µg/ml 처리한 후, 양성대조군(Finasteride)과 비교한 결과는 아래와 같음
- 21번(독활, 주정), 5번(산수유, 물), 23번(산수유, 주정), 28번(멸꿀 미숙과, 주정), 29번(멸꿀 잎, 주정) 추출물에서 PSA, AR, 5α reductase 2 expression이 감소함을 확인함
- 32번(울금, 주정) 추출물에서 PSA, 5α reductase 2 expression이 감소하였고, AR expression의 변화는 없음을 확인함
- 36종의 소재 중 항산화 활성이 우수하며, 전립선비대증 관련 protein 발현량이 우수한 산수유(주정)와 멸꿀 잎(주정)을 최종적으로 선정함



<LNCaP cell line에서 전립선비대증 관련 단백질 발현-1>



<LNCaP cell line에서 전립선비대증 관련 단백질 발현-2>

(4) 원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정

(가) 멀꿀 잎 및 산수유의 부위, 채취 시기, 추출 횟수별 수율

1) 부위별 추출 수율

- 부위별 추출 수율을 분석한 결과, 멀꿀 과피, 멀꿀 열매 전체, 멀꿀 1년생 잎과 멀꿀 3년생 잎에서 수율이 높음을 확인함
- 추출 수율 및 생리활성평가 결과, 멀꿀 3년생 잎의 70% 주정추출물과 산수유 70% 주정추출물을 최종 원료로 선정함

순번	용매	원료명	투입량	농축액				동결건조분말	
				농축액 (g)	brix	예상분말 (g)	예상수율 (%)	건조분말 (g)	FD수율
1	물 95°C, 12h	열매전체	50	32.4	43.6	14.9	29.7%	14.0	28%
2		과피	50	40.6	41.4	17.7	35.4%	16.5	33%
3		종자부위	50	47.2	12.2	6.1	12.1%	6.2	12%
4		1년생 잎	40	20.6	58.2	12.6	31.5%	12.2	31%
5		3년생 잎	40	30.3	35.1	11.2	28.0%	10.7	27%
6		5년생 잎	40	25.6	40.9	11.0	27.5%	9.9	25%
7		1년생 줄기	40	32.1	29.5	10.0	24.9%	9.3	23%
8		3년생 줄기	40	39.9	16.7	7.0	17.5%	6.1	15%
9		5년생 줄기	40	65.0	9.0	6.2	15.4%	5.3	13%
10		산수유	40	56.0	42.2	24.9	62.2%	22.8	57%
11	70% 주정 75°C, 12h	열매전체	50	34.2	39.4	14.2	28.4%	13.5	27%
12		과피	50	35.2	45.1	16.7	33.4%	15.3	31%
13		종자부위	50	40.3	26.1	11.1	22.1%	9.7	19%
14		1년생 잎	40	47.1	27.7	13.7	34.3%	12.9	32%
15		3년생 잎	40	59.6	16.0	10.0	25.1%	9.5	24%
16		5년생 잎	40	46.7	19.2	9.4	23.6%	9.1	23%
17		1년생 줄기	40	59.9	14.4	9.1	22.7%	8.4	21%
18		3년생 줄기	40	54.2	10.5	6.0	15.0%	4.8	12%
19		5년생 줄기	40	37.6	12.4	4.9	12.3%	3.2	8%
20		산수유	40	58.6	33.1	20.4	51.0%	19.1	48%

2) 채취 시기별 추출 수율

- 채취 시기별 추출 수율을 분석한 결과, 가을에 수확한 멀꿀 3년생 잎과 산수유를 이용하여 멀꿀, 산수유 추출 복합물로 실험을 진행할 예정임

순번	용매	채취 시기	원료명	추출 횟수	투입량 (g)	농축액				동결건조분말	
						농축액 (g)	brix	예상분말 (g)	예상수율 (%)	건조분말 (g)	FD 수율
1	70% 주정 75°C, 12h	봄	멀꿀3년생 잎	1차	100	180.0	7.8	14.8	14.8%	15.0	15%
2		가을	멀꿀3년생 잎		100	170.0	15.9	28.5	28.5%	26.8	27%
3		봄	멀꿀3년생 잎	2차	100	180.0	2.0	3.8	3.8%	4.1	4%
4		가을	멀꿀3년생 잎		100	210.0	3.4	7.4	7.4%	6.3	6%
5		봄	멀꿀3년생 잎	1차+	100	320.0	5.9	19.8	19.8%	15.8	16%
6		가을	멀꿀3년생 잎	2차	100	239.0	14.7	37.0	37.0%	31.6	32%
7		가을	산수유	1차	100	110.0	37.5	43.4	43.4%	39.0	39%
8		가을	산수유	2차	100	160.0	11.5	19.4	19.4%	18.0	18%
9		가을	산수유	1차+ 2차	36	50.0	40.7	21.4	59.5%	19.0	53%

3) 추출 횟수별 추출 수율

- 횟수별 추출 수율을 분석한 결과, 제품화를 위한 시생산 가공비를 최소화하기 위해 1차 추출방법 선정함

순번	용매	추출 횟수	원료명	투입량 (g)	농축액				동결건조분말	
					농축액 (g)	brix	예상분말 (g)	예상수율 (%)	건조분말 (g)	FD 수율
1	70% 주정 75°C, 12h	1차	멸꿀3년생 잎	1000	879	29.6	274.1	27.4%	269.21	27%
2			멸꿀3년생 잎	1000	1029	25.94	281.0	28.1%	265.73	27%
3		2차	멸꿀3년생 잎	1000	709.53	10.01	74.8	7.5%	73.56	7%
4			멸꿀3년생 잎	1000	609	10.36	66.4	6.6%	53.2	5%
5		1차+2차	멸꿀3년생 잎	1000	1239	24.6	321	32.1%	314	31%
6		1차	산수유	100	100	33.46	35.2	35.2%	32.67	33%
7			산수유	100	139	29.34	42.9	42.9%	40.8	41%
8		2차	산수유	100	258.3	7.28	19.8	19.8%	18.07	18%
9			산수유	100	69	22.56	16.4	16.4%	14.7	15%
10		1차+2차	산수유	100	119	47.11	59.0	59.0%	52.9	53%
11			산수유	100	369	16	62.1	62.1%	58.4	58%
12		1차	멸꿀 잎 산수유 복합추출	100	90.0	35.6	33.7	33.7%	22.7	23%
13			멸꿀 잎 산수유 복합추출	1000	469	49	242	24.2%	208.3	21%
14		2차	멸꿀 잎 산수유 복합추출	100	60.0	13.3	8.4	8.4%	10.0	10%
15			멸꿀 잎 산수유 복합추출	1000	369.0	21.4	83.3	8.3%	65.2	7%
16		1차+2차	멸꿀 잎 산수유 복합추출	100	189	19.35	38.5	38.5%	34.2	34%

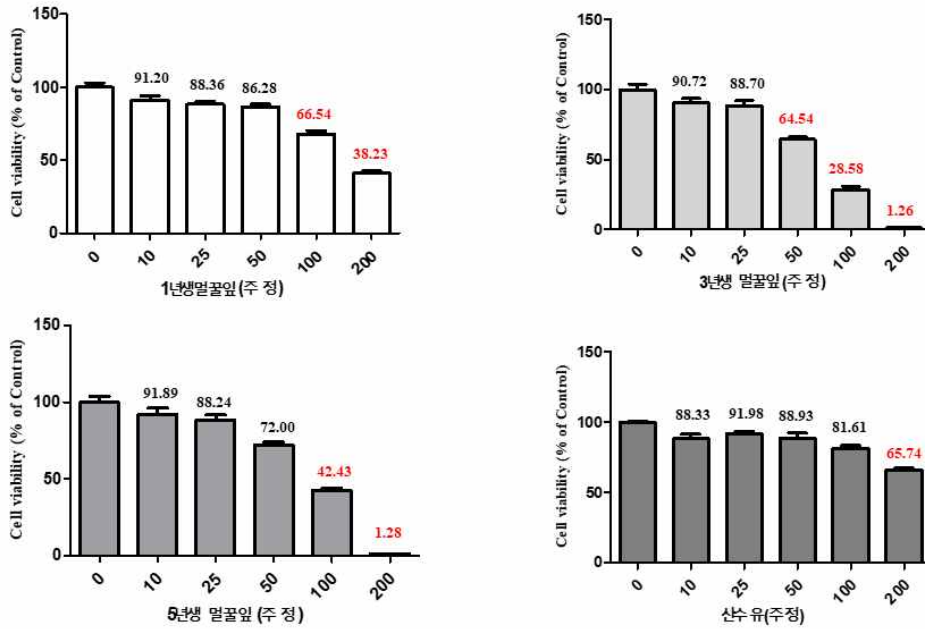
(나) 멸꿀 잎 및 산수유의 채취 시기별 세포활성 및 전립선비대증 관련 Protein 발현량 측정

1) 세포 배양

- 전립선 세포주인 LNCaP는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받음. LNCaP는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 RPMI-1640 배지 (Gibco)에서 배양함. LNCaP는 세포 seeding 전, FBS가 포함된 phenol-red free RPMI-1640 배지를 이용하여 일정 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양함

2) 세포 독성평가

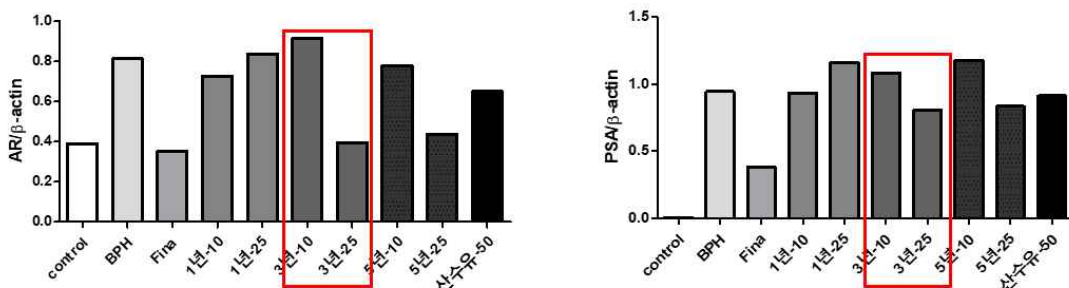
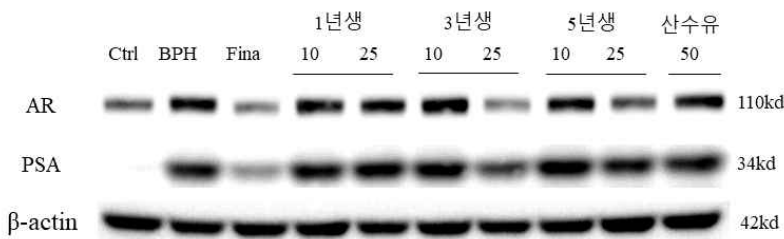
- 96 well plate에 1 x 10⁴ cell을 분주하여 18h 동안 배양한 뒤, 각 물질을 농도별로 처리함. 물질처리 72h 후 cell viability assay kit (EZ-cytox; DaeilLab Service, Korea) 용액을 첨가한 후, ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정함
- LNCaP 세포에 멸꿀 잎(1, 3, 5년생; 주정) 추출물과 산수유(주정) 추출물을 72h 처리한 후, 각각의 대조군과 세포 생존율을 비교한 결과는 아래와 같음
- 멸꿀 잎(1, 3, 5년생; 주정) 100µg/ml과 산수유 200µg/ml 농도에서 세포 생존율에 영향이 있음을 확인함



<멸꽃 잎, 산수유의 채취 시기별 LNCaP cell 세포독성>

3) 전립선비대증 관련 Protein 발현량 측정

- 6 well plate에 5×10^4 cell을 분주하고 18h 동안 배양한 뒤, 각 물질을 농도별로 처리함. 물질처리 72h 후 harvest 함. Cell sample은 RIPA buffer (pH 7.2)로 분해하고 centrifuge (12,000 rpm for 20 min at 4°C) 한 후, 상층액만을 사용하여 western blot 함
- LNCaP 세포에 소팔메토, 멸꽃 잎(1, 3, 5년생; 주정), 산수유 추출물(주정)을 각각 10, 25μg/ml 처리한 후, 양성대조군(Finasteride, 10μM)과 비교한 결과는 아래와 같음
- 3년생 멸꽃 잎에서 AR, PSA expression의 감소를 확인함

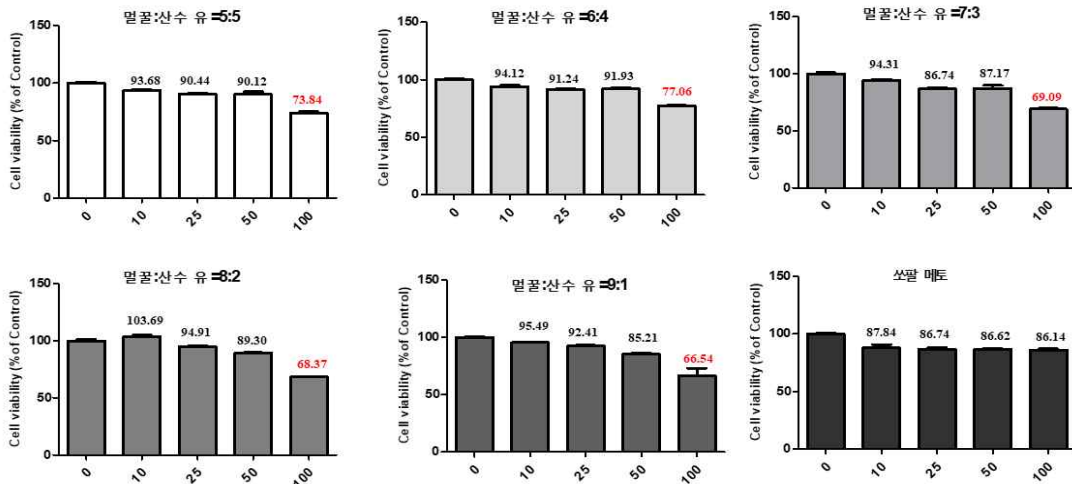


<멸꽃 잎, 산수유의 채취 시기별 전립선비대증 관련 단백질 발현>

(다) 멸꼴 잎 및 산수유의 복합비 선정

1) 복합 비율별 세포활성

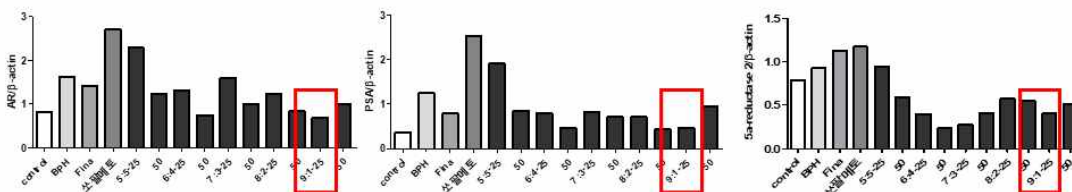
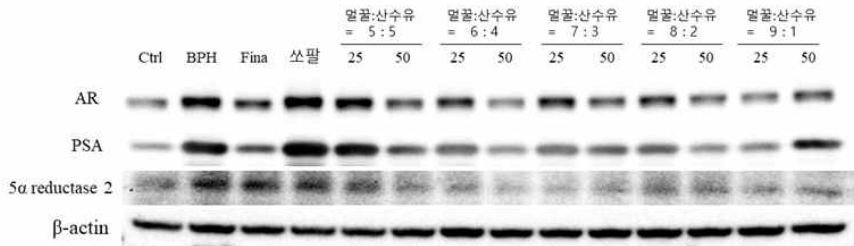
- 멸꼴:산수유 비율을 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1의 비율로 전립선 세포주인 LNCaP에 72 처리한 후, 각각의 대조군과 세포 생존율을 비교한 결과는 아래와 같음
- 복합 비율별 세포활성을 분석한 결과, 100µg/ml 농도에서 각각 세포 생존율에 대한 영향이 있음을 확인함



<멸꼴잎, 산수유의 복합 비율별 LNCaP cell 세포독성>

2) 복합 비율별 전립선비대증 관련 Protein 발현량 측정

- LNCaP 세포에 쓰팔메토, 멸꼴과 산수유의 복합비율별(5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1) 추출물을 각 25, 50µg/ml 처리한 후, 양성대조군(Finasteride, 10µM)과 비교한 결과는 아래와 같음
- 복합 비율별 전립선비대증 관련 Protein 발현량 측정한 결과, 멸꼴:산수유의 9:1 비율 추출물에서 PSA, AR, 5α reductase 2 expression의 감소함을 확인함
- 이러한 자료를 근거로, 멸꼴 주정추출물:산수유 주정추출물의 복합비는 9:1로 설정함



<멸꼴 잎, 산수유의 복합 비율별 전립선비대증 관련 단백질 발현>

(라) 멀꿀 잎 및 산수유의 3lot 생산

1) 멀꿀잎추출분말, 산수유추출분말 batch size 생산

- 위에서 확정된 추출방법으로 대호양행에서 batch size로 멀꿀잎추출분말과 산수유추출분말을 각각 3lot씩 생산하였음
- Batch size로 생산한 결과, lot별 수율, 지표성분 함량의 차이는 확인되지 않았음. 이에 생산 공정이 표준화되었음을 확인함

제품명		멀꿀잎추출분말						
Lot No.	20181116-01	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2018.11.14	제조시작일	2018.11.14	제조완료일	2018.11.16			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			멀꿀잎추출물 (고형분 100%포서)	70	30.3	30.3	김수준	김수준
2			덱스트린 (4#)	30	30.0	30.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.9℃		습도 : 24%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2018.11.14	2018.11.14	2018.11.14	2018.11.14				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	11.0	11.0	11.0	11.0				
수율 (%)	100%	100%	100%	100%				
비고			제조관리책임자					
<안정성> - 김수준			김재민		홍영희		홍영희	

제품명		멀꿀잎추출분말						
Lot No.	20181231-2	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2018.12.27	제조시작일	2018.12.27	제조완료일	2018.12.27			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			멀꿀잎추출물 (고형분 100%포서)	70	30.3	30.3	김수준	김수준
2			덱스트린	30	30.0	30.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.9℃		습도 : 26%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2018.12.27	2018.12.27	2018.12.27	2018.12.27				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	11.0	11.0	11.0	11.0				
수율 (%)	100%	100%	100%	100%				
비고			제조관리책임자					
			김재민		홍영희		홍영희	

제품명		멀꿀잎추출분말						
Lot No.	20190104-3	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2019.01.02	제조시작일	2019.01.02	제조완료일	2019.01.04			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			멀꿀잎추출물 (고형분 100%포서)	70	30.3	30.3	김수준	김수준
2			덱스트린 (4#)	30	30.0	30.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.7℃		습도 : 27%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2019.01.02	2019.01.02	2019.01.02	2019.01.02				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	10.6	11.0	11.0	10.6				
수율 (%)	106%	100%	100%	96.4%				
비고			제조관리책임자					
			김재민		홍영희		홍영희	

<멀꿀잎추출분말 3lot 제조지시기록서>

제품명		산수유추출분말						
Lot No.	20181112-1	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2018.11.12	제조시작일	2018.11.12	제조완료일	2018.11.12			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			산수유추출물 (고형분 100%포서)	50	50.0	50.0	김수준	김수준
2			덱스트린 (4#)	50	50.0	50.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.1℃		습도 : 24%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2018.11.08	2018.11.12	2018.11.12	2018.11.12				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	10.6	11.0	11.0	10.7				
수율 (%)	106%	100%	100%	97.3%				
비고			제조관리책임자					
<안정성> - 김수준			김재민		홍영희		홍영희	

제품명		산수유추출분말						
Lot No.	20181112-2	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2018.11.12	제조시작일	2018.11.12	제조완료일	2018.11.12			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			산수유추출물 (고형분 100%포서)	50	50.0	50.0	김수준	김수준
2			덱스트린	50	50.0	50.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.3℃		습도 : 24%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2018.11.07	2018.11.12	2018.11.12	2018.11.12				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	10.8	11.0	11.0	10.7				
수율 (%)	108%	100%	100%	97.3%				
비고			제조관리책임자					
			김재민		홍영희		홍영희	

제품명		산수유추출분말						
Lot No.	20181112-3	유통기한	제조일부러24개월	제조단위	1kg			
제조시일	2018.11.12	제조시작일	2018.11.12	제조완료일	2018.11.12			
성상 및 유형	흰은 직질색의 분말				제조지시자	김수준		
No	Lot No	시험번호	원료명	배합비율 (%)	기준량 (kg)	사용량 (kg)	정량자	확인자
1			산수유추출물 (고형분 100%포서)	50	50.0	50.0	김수준	김수준
2			덱스트린 (4#)	50	50.0	50.0	김수준	김수준
합계				100.0	100.0	100.0	김수준	김수준
정량시 확인사항		자유 염질 확인		확인				
		정량실 온도도 확인		온도 : 17.1℃		습도 : 24%		
특기사항								
공정명	수출/농축	배합	건조/압도량		기타			
제조일자	2018.11.08	2018.11.12	2018.11.12	2018.11.12				
공정 투입량	10.0	11.0	11.0	11.0				
실제 생산량	10.8	11.0	11.0	10.7				
수율 (%)	108%	100%	100%	97.3%				
비고			제조관리책임자					
<안정성> - 김수준			김재민		홍영희		홍영희	

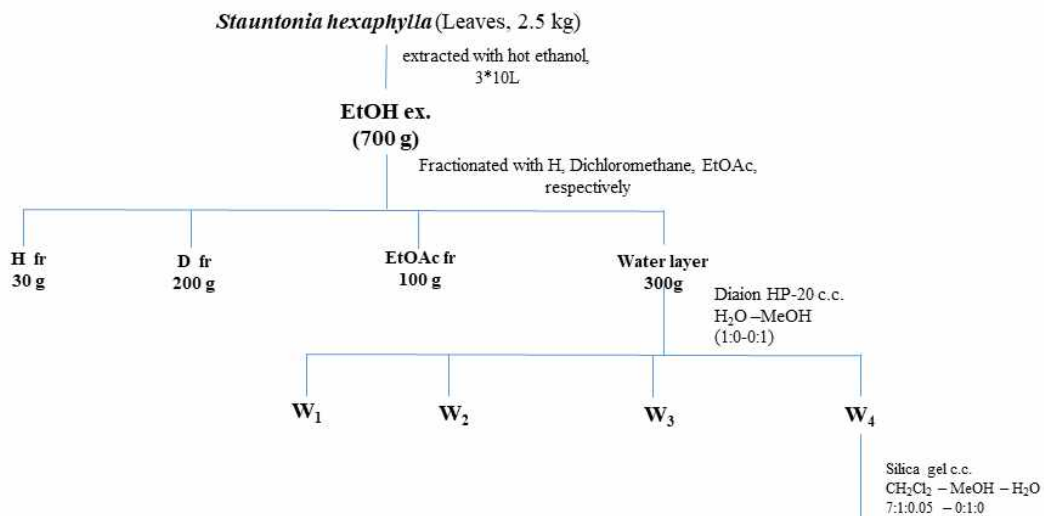
<산수유추출분말 3lot 제조지시기록서>

(5) 복합소재의 기능성분 2종 분석법 확립

(가) 멀꿀로부터 지표성분의 분리정제와 구조동정

1) 멀꿀로부터 hederacoside D의 분리정제

- 건조된 멀꿀 잎 2.5 kg을 에탄올 10 L로 3회 반복 추출하여 멀꿀 에탄올 엑스 700을 얻음
- 이를 물에 현탁한 후에 헥산(H), 디클로로메탄(D), 에틸아세테이트(EtOAc), 물(Water layer)로 용매 분획함. 얻어진 물층 300g을 물-메탄올 (100:0 - 0:100)의 gradient 용매 조건으로 Diaion HP 20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4개의 분획 (W1-W4)를 얻음
- W4 분획을 다시 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (7: 1: 0.05 - 0:1:0)의 용매 조건으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 7개의 소분획 (W4A-W4H)을 얻음
- 소분획 W4H를 CH₂Cl₂-Aceton-MeOH-H₂O (2:1:1;0.2)의 용매 조건으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 hederacoside D 35.0 mg을 얻음



<Hederacoside D 분리 정제 과정>

2) Hederacoside D의 구조동정

- Hederacoside D는 백색의 침상으로 얻어졌으며, 선광도 $\alpha]_D^{+15.9}(c = 1.85, \text{MeOH})$ 를 나타내었고, MS spectrum에서 분자량 C₅₂H₈₆O₂₂ (M, 1074.56)의 화합물임을 알 수 있었음
- 각종 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR, 2D spectrum을 문헌에서 보고된 data와 비교함으로써 hederacoside D임을 동정하였음

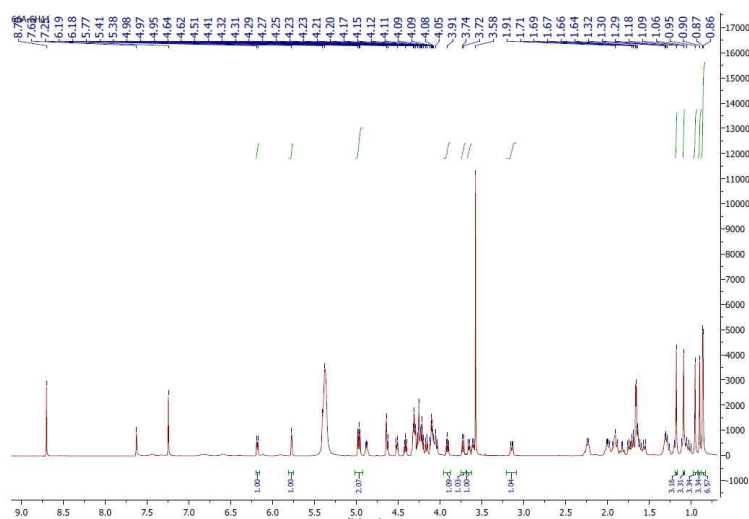
<Hederacoside D 구조>

<¹H- and ¹³C-NMR spectral data of hederacoside D>

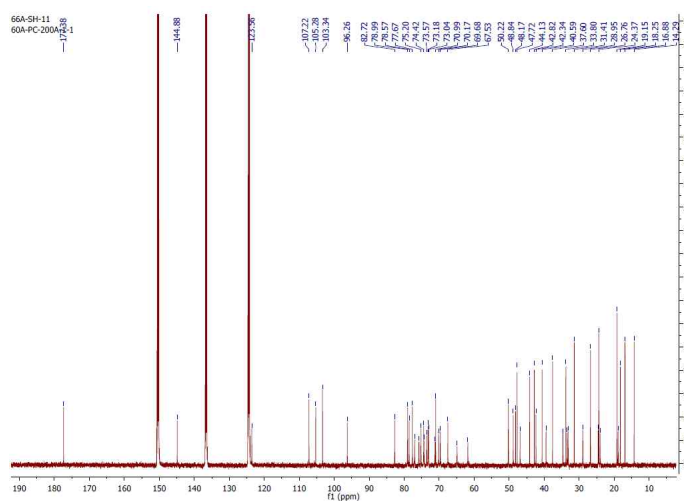
Position	Ref.	$\delta C^{a,b}$	$\delta H^{a,c}$ (Mult., J in Hz)
1	38.8	39.5	0.90 (m)/1.50(m)
2	26.0	26.8	1.29 (m)/1.65 (m)
3	81.9	82.7	4.28 (m)
4	43.4	44.1	-
5	47.6	47.7	1.24 (m)
6	18.1	18.9	1.19 (m)/1.40 (m)
7	32.7	33.1	5.97 (d, 8.5)
8	39.9	40.6	-
9	48.1	48.8	-
10	36.9	37.6	-
11	23.8	24.0	1.29 (m)/2.15 (m)
12	122.9	123.6	5.44 (br s)
13	144.0	144.9	-
14	42.1	44.6	-
15	28.2	28.8	4.40 (s)
16	23.3	24.3	-
17	47.0	48.1	-
18	41.6	42.7	1.21 (s)
19	46.1	47.6	0.50 (d, 4.0)/1.07 (d, 4.0)
20	30.7	31.3	-
21	33.9	34.5	-
22	32.5	33.4	1.75 (m)/1.94 (m)
23	64.5	64.9	3.69 (d, 10.0)
24	13.5	14.3	0.90 (s)
25	16.1	16.9	0.95 (s)
26	17.5	18.2	1.09 (s)
27	26.0	26.8	1.19 (s)
28	176.4	177.4	-
29	33.0	33.8	0.86 (s)
30	23.6	24.4	0.86 (s)
C-3			
1'	106.6	107.2	4.98 (d, 8.5)
2'	73.1	73.6	4.52 (m)
3'	74.7	73.3	4.29 (m)
4'	69.6	70.1	4.31 (m)
5'	66.9	67.5	3.72 (m)/4.26 (m)
C-28			
1''	95.6	96.2	6.18 (d, 8.0)
2''	73.8	74.3	4.10 (m)
3''	78.7	78.5	3.76 (m)
4''	70.8	71.3	4.13 (m)
5''	78.7	78.4	3.76 (m)
6''	69.2	69.7	4.25 (m)/4.37 (m)
1'''	104.8	105.2	4.96 (d, 9.0)
2'''	75.3	75.2	3.99 m

3'''	76.5	78.5	4.20 m
4'''	78.4	72.0	4.31 m
5'''	77.1	78.7	3.85 mm
6'''	61.2	61.8	4.46 (m)/4.34 (m)
1'''	102.7	103.3	5.78 (br s)
2'''	72.5	73.0	4.84 m
3'''	72.7	73.2	4.58 m
4'''	73.9	74.4	4.30 *
5'''	70.2	71.0	4.55 m
6'''	18.5	19.2	1.66 (d, 6.0)

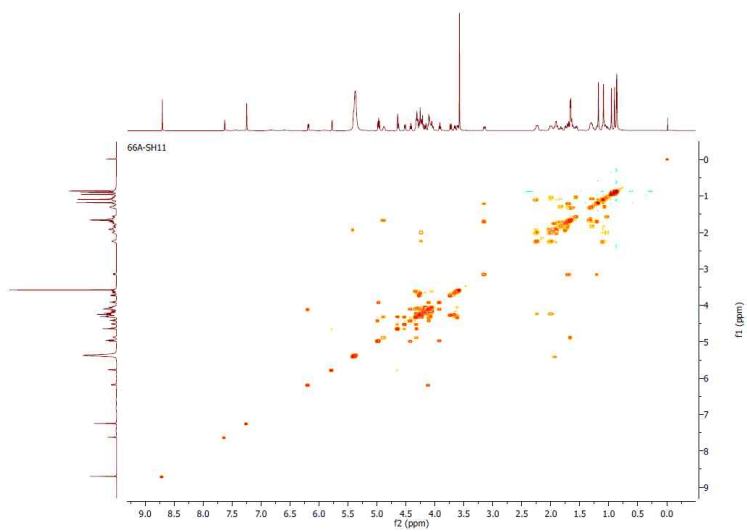
Measured in ^aPyridine-d₅, ^b150MHz, ^c600MHz.*Overlapped signals



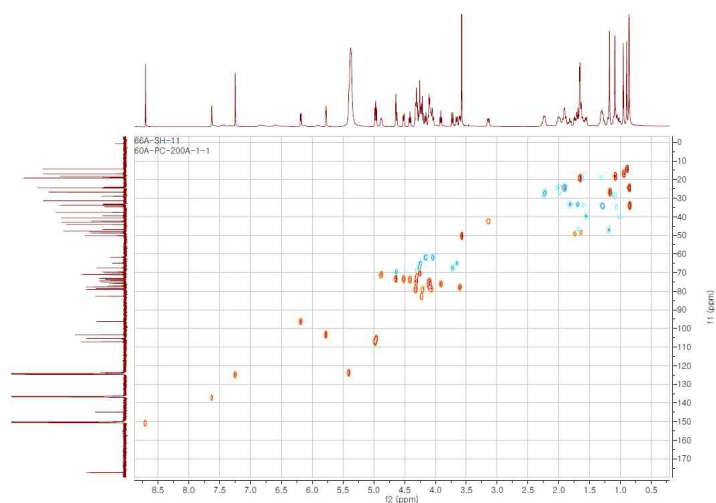
<1H-NMR spectrum of hederacoside D (600 MHz, pyridine-d₅)>



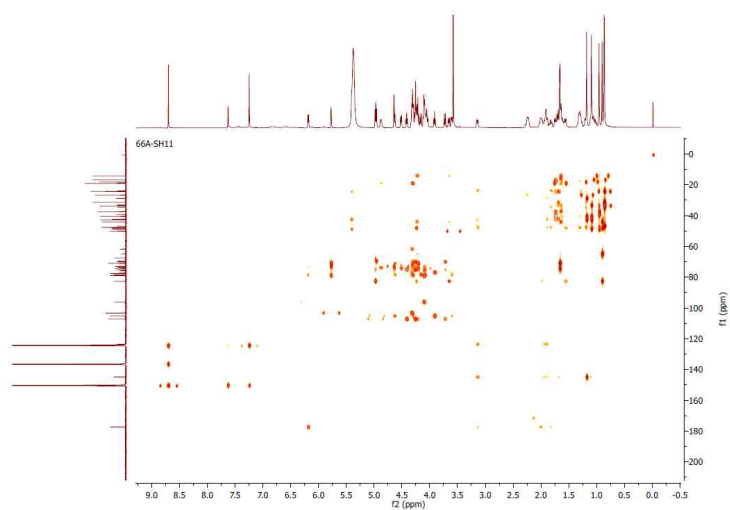
<13C-NMR spectrum of hederacoside D (150 MHz, pyridine-d₅)>



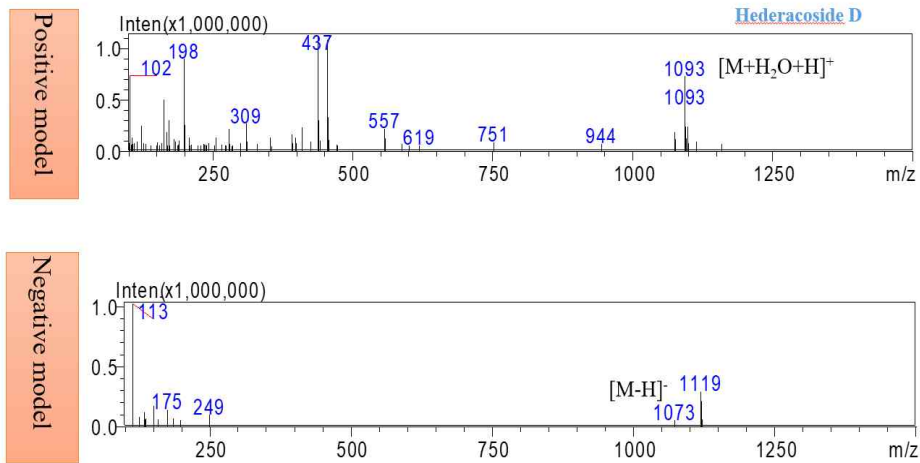
<COSY spectrum of hederacoside D (60 MHz, pyridine-d₅)>



<HSQC spectrum of hederacoside D (60 MHz, pyridine-d₅)>



<HMBC spectrum of hederacoside D (60 MHz, pyridine-d₅)>



<MS spectra of hederacoside D (positive and negative mode)>

(나) 멀꿀 잎과 산수유의 지표성분 분석법 확립 및 분석

1) 멀꿀 잎과 산수유의 지표성분 선정

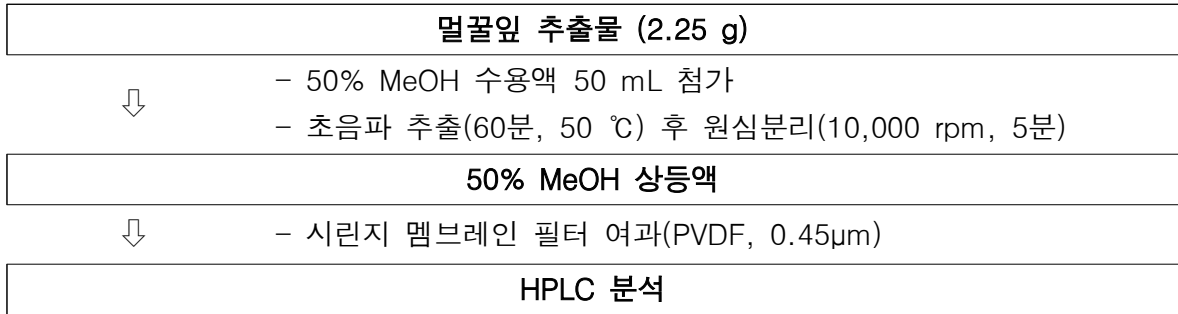
- 멀꿀 잎과 산수유의 예비시험에서 멀꿀 잎 및 산수유로부터 다수의 성분을 분리하였으나 그 중 멀꿀 잎의 hederacoside D 및 산수유의 morroniside가 개별 식물의 특성을 비교적 잘 대변하고 있으므로 지표물질로 선정하였음
- 선정된 지표물질의 분자량 및 구조식은 다음과 같음

<The molecular information about marker compounds>

Compound name	Molecular formula	Molecular weight	Structure
Hederacoside D	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1075.2	
Morroniside	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	406.3	

2) 멀꿀 잎 추출물로부터 hederacoside D의 분석

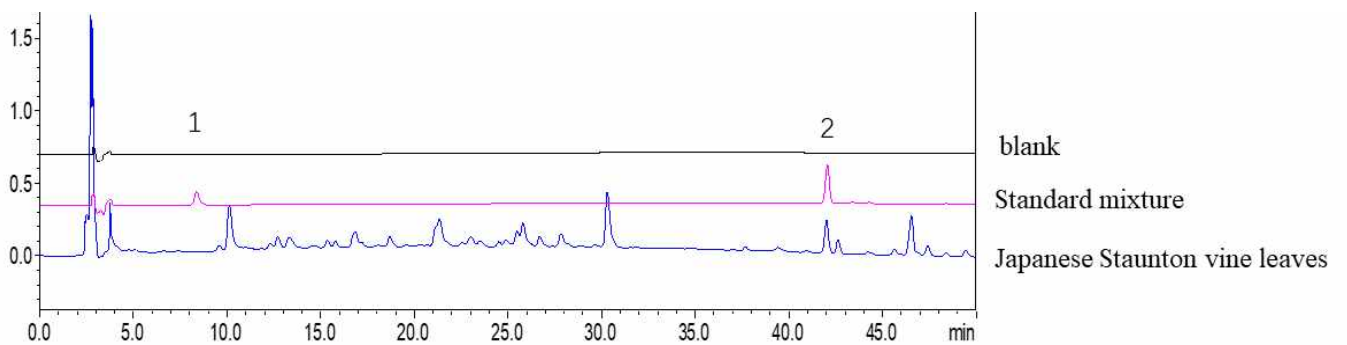
- 멀꿀 잎 추출물을 다음과 같이 처리하여 HPLC로 분석하였을 경우, 머무름시간 약 44분 부근에서 hederacoside D의 성분피크가 확인됨
- 아래의 HPLC 크로마토그램에서 보는 바와 같이 hederacoside D는 멀꿀 잎 추출물에서 유래하는 타 성분의 피크와 완전히 분리됨



<Sample preparation from the extract of Japanese Staunton vine leaves for HPLC injection>

<HPLC condition for the analysis of hederacoside D from the extract of Japanese Staunton vine leaves>

Device	Shimadzu LC-20AD system	
Column	Optimapak C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water	
	B: 0.1% formic acid in acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B %
	0	12
	50	40
detector	UV 240 nm (0 - 35 min), UV 205 nm (35-50 min)	
Flow rate	1 mL/min	
Column temperature	30 °C	
Injection volume	20 μL	



<Chromatogram of extract of Japanese Staunton vine leaves
 peak 1: morroniside (tR = 8.7 min), peak 2: hederacoside D (tR = 43.6 min)>

3) 산수유로부터 morroniside의 분석

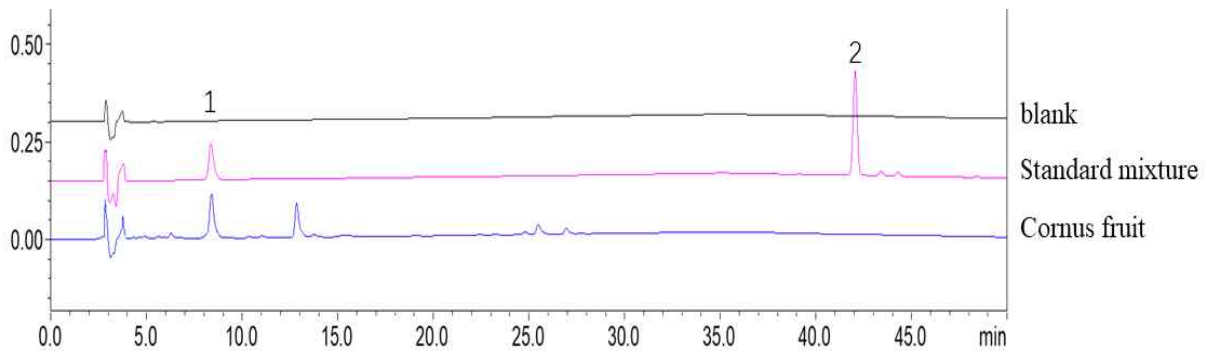
- 산수유 추출물을 다음과 같이 시료를 전처리하여 HPLC로 분석하였을 경우, 머무름시간 약 8.5분 부근에서 morroniside의 성분피크가 확인됨
- 아래 그림의 HPLC 크로마토그램에서 보는 바와 같이 morroniside는 산수유 추출물에서 유래하는 타 성분의 피크와 완전히 분리됨

산수유 추출물 (2.25 g)	
↓	<ul style="list-style-type: none"> - 50% MeOH 수용액 50 mL 첨가 - 초음파 추출(60분, 50 °C) 후 원심분리(10,000 rpm, 5분)
50% MeOH 상등액	
↓	- 시린지 멤브레인 필터 여과(PVDF, 0.45μm)
HPLC 분석	

<Sample preparation from the extract of Cornus fruit for HPLC injection>

<HPLC condition for the analysis of morroniside from the extract of Cornus fruit>

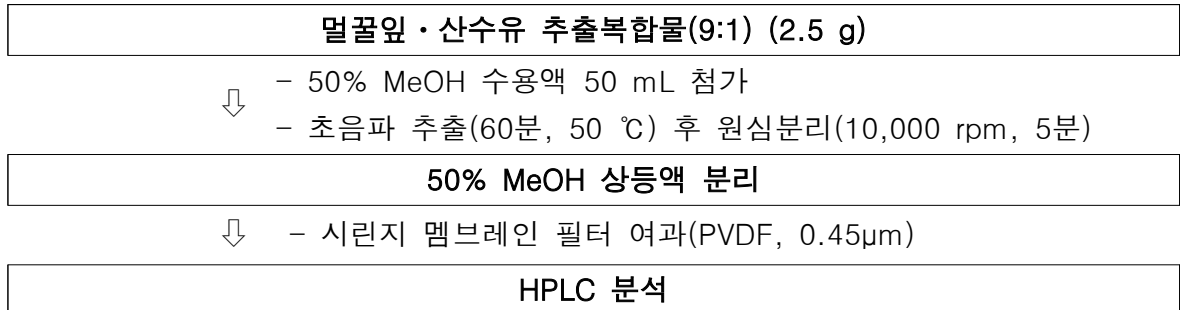
Device	Shimadzu LC-20AD system	
Column	Optimapak C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B %
	0	12
	50	40
detector	UV 240 nm (0 - 35 min), UV 205 nm (35-50 min)	
Flow rate	1 mL/min	
Column temperature	30 °C	
Injection volume	20 μL	



<Chromatogram of extract of Cornus fruit
peak 1: morroniside (tR = 8.7 min), 2. hederacoside D (tR = 43.6 min)>

4) 복합소재의 지표성분 2종에 대한 분석법 확립

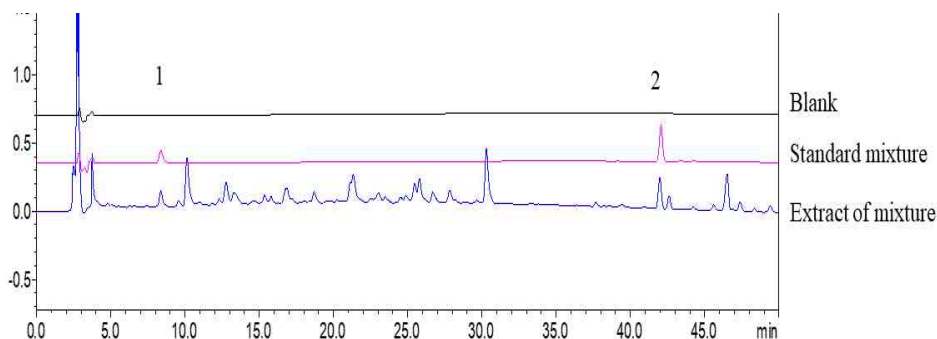
- 멀꿀잎·산수유 추출복합물(9:1) 2.5 g을 취하여 다음과 같이 시료 전처리한 후 HPLC 분석조건에 따라 분석한 결과, 머무름 시간 약 8.5분 부근에서 morroniside가, 약 44분 부근에서 hedercoside D 성분의 피크가 각각 확인됨



<Sample preparation from the extract mixture of the Japanese Staunton vine leaves and Cornus fruit (9:1) for HPLC injection>

<HPLC condition for the analysis of morroniside and hedercoside D from the extract mixture of the Japanese Staunton vine leaves and Cornus fruit (9:1) >

Device	Shimadzu LC-20AD system	
Column	Optimapak C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)	
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B %
	0	12
	50	40
detector	UV 240 nm (0-35 min), UV 205 nm (35-50 min)	
Flow rate	1 mL/min	
Column temperature	30 °C	
Injection volume	20 µL	



<Chromatogram of the extract mixture of the Japanese Staunton vine leaves and Cornus fruit (9:1). Conditions: column; Optimapak C18, mobile phase; A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile, detection; UV 240 nm (0 – 35 min), UV 205 nm (35-50 min), flow rate; 1 mL/min. peak 1: morroniside (tR = 8.7 min), 2. hedercoside D (tR = 43.6 min)>

- HPLC 크로마토그램에서 보는 바와 같이 morroniside 및 hederacoside D는 추출복합물에서 유래하는 타 성분의 피크와 완전히 분리되었다.

(6) 복합소재 제제검토

- 복합소재의 기준 및 시험항목 설정(QC항목 설정)
- 분석법이 확립된 멀꿀잎·산수유 추출복합물에 대하여 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법(안) 항목설정

<기준 및 시험방법 시험(안) 예비항목 리스트>

예비 항목	관련사항	분석방법	
제품명	전립선건강 기능성식품	HPLC	
제품형태	농축액 분말	HPLC	
안정성(QC) 관련 지표	성상	한국표준색이름(산업자원부 기술표준원) 참조, 검사의뢰서 참조	
	중금속	납	식품공전 제10.일반시험법 7.식품중 유해물질시험법 7.1.2.금속별시험에 근거하여 시험 후 ICP-MS로 측정
		총비소 카드뮴	
		총수은	식품공전 제10.일반시험법 7.식품중 유해물질시험법 7.1.중금속시험 7.1.2.4.수은(Hg)에 근거하여 시험
미생물 - 대장균군	식품공전 제10.일반시험법 3.미생물시험법 3.7.대장균군 3.7.1.점성시험 가.유당배지법에 준하여 실험		
기능성관련 지표	Heder cosine D, mornoniside	HPLC, UV detector	
지표물질 선정 안	Heder cosine D, mornoniside	HPLC, UV detector	

(7) 복합소재의 안정성 평가

- 식품의약품안전처 ‘건강기능식품에 관한 법률 시행규칙’ 제8조 제1항 제1호에 따른 건강기능식품의 유통기한 설정기준에 의거 실험을 진행하였으며, 분말제품으로 유통기한 설정 실험을 진행함.

(가) 유통안정성 시험방법

1) 저온보존 시험

- 검체 수 : 제제시험 샘플 (시판할 제품과 동일 처방, 제형, 포장용기)
- 보존조건 : $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5 \%$
- 시험기간 : 6개월 이상
- 측정시기 : 시험개시, 1개월, 3개월, 6개월
- 시험 항목 : 기준 및 시험방법에 설정한 항목
- 시험회수 : 각 시험항목별로 3회 이상 실시하여 평균치 기재

2) 상온보존 시험

- 검체 수 : 제제시험 샘플 (시판할 제품과 동일 처방, 제형, 포장용기)
- 보존조건 : $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5 \%$
- 시험기간 : 6개월 이상
- 측정시기 : 시험개시, 1개월, 3개월, 6개월
- 시험 항목 : 기준 및 시험방법에 설정한 항목
- 시험회수 : 각 시험항목별로 3회 이상 실시하여 평균치 기재

3) 가속시험

- 검체 수 : 장기보존 시험과 동일
- 보존조건 : $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5 \%$
- 시험기간 : 시험개시, 1개월, 3개월, 6개월
- 시험 항목 : 기준 및 시험방법에 설정한 항목
- 시험회수 : 각 시험 항목별로 3회 이상 실시하여 평균치 기재

(나) 유통안정성 시험결과

1) 저온보존 시험결과($4 \pm 2^\circ\text{C}$)

<멀꿀복합추출물 소재 저온보존 시험결과>

시험항목	시험기준	시험결과(개월)			
		0	1	3	6
성 상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 녹갈색의 분말	적합	적합	적합	적합
Morrioniside	(mg)함량(%) 표시량 (1.86mg/g)의 80~120%	97.6	97.1	96.2	94.9
Hederacoside D	(mg)함량(%) 표시량 (28.3mg/g)의 80~120%	99.7	99.5	99.0	98.6
대장균군		음성	-	-	음성
판 정		적합	적합	적합	적합

2) 상온보존 시험결과(20±2℃)

<멀꿀복합추출물 소재 장기보존 시험결과>

시험항목		시험기준	시험결과(개월)			
			0	1	3	6
성 상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 녹갈색의 분말	적합	적합	적합	적합
Morrnositide	(mg)함량(%)	표시량 (1.86mg/g)의 80~120%	97.6	96.3	94.5	93.6
Hederacoside D	(mg)함량(%)	표시량 (28.3mg/g)의 80~120%	99.7	98.9	97.1	96.8
대장균군			음성	-	-	음성
판 정			적합	적합	적합	적합

3) 가속시험결과(40±2℃)

<멀꿀복합추출물 소재 장기보존 시험결과>

시험항목		시험기준	시험결과(개월)			
			0	1	3	6
성 상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 녹갈색의 분말	적합	적합	적합	적합
Morrnositide	(mg)함량(%)	표시량 (1.86mg/g)의 80~120%	97.6	94.2	93.4	91.8
Hederacoside D	(mg)함량(%)	표시량 (28.3mg/g)의 80~120%	99.7	97.3	95.1	93.8
대장균군			음성	-	-	음성
판 정			적합	적합	적합	적합

(다) 안정성 시험결과

1) 성상변화

- 시생산 제품을 반복 실험한 결과에서 적합으로 판정되었다. 즉, 색의 변화, 냄새의 발생, 형태이상 등이 전혀 발생하지 않아 상기 안정성 시험에서 내용물의 성상에는 아무런 변화가 없는 것이 확인되었음

2) Morrniside의 함량 변화

- 기준·규격에서 Morrniside의 함량은 80%~120%로 설정하였고, 3회 반복실험 결과의 평균값을 사용하였음. 각 온도별 보관에 따른 기능성분의 함량은 큰 차이를 나타내지 않았음

3) Hederacoside D 함량 변화

- 기준·규격에서 Hederacoside D의 함량은 80%~120%로 설정하였고, 3회 반복실험 결과의 평균값을 사용하였음. 각 온도별 보관에 따른 기능성분의 함량은 큰 차이를 나타내지 않았음

4) 대장균군

- 대장균군을 검사한 결과, 제조 직후 및 저장기간, 저장온도에서 모두 검출되지 않았으며 미생물 등의 증식은 없었음

(라) 회귀방정식

- 위의 안정성 시험에서 기능성분인 Morroniside, Hederacoside D의 함량에 따라 '멀꿀복합추출물'의 유통기간을 다음과 같이 산출하였다.

1) 각 성분의 저장온도별 회귀방정식

<각 성분 저장온도별 회귀방정식 산출>

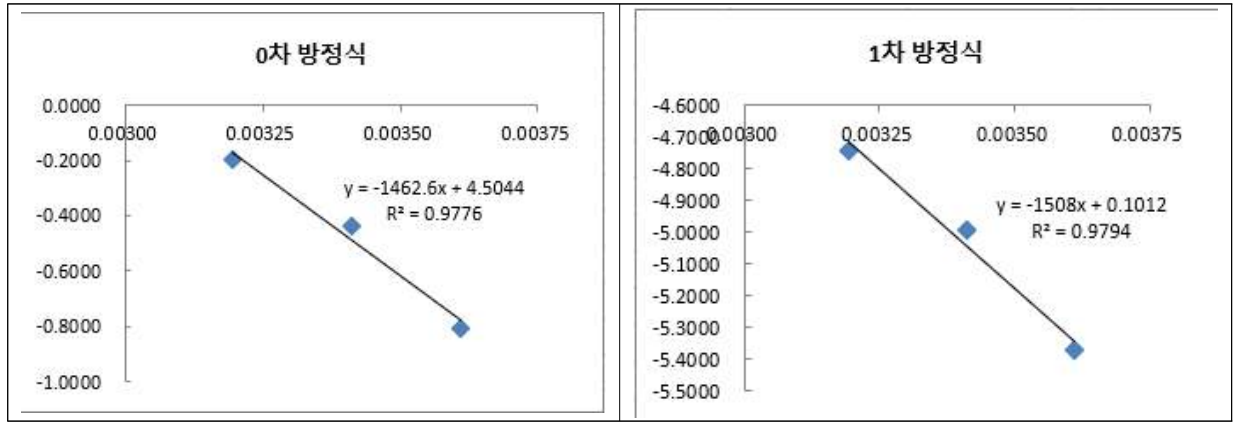
성분	반응차	온도(℃)	회귀방정식	결정계수
Morroniside	0차	4	$y = -0.4476x + 97.5690$	0.99943
		20	$y = -0.6476x + 97.1190$	0.91176
		40	$y = -0.8238x + 96.3095$	0.79398
	1차	4	$y = -0.0047x + 4.5806$	0.99960
		20	$y = -0.0068x + 4.5760$	0.91444
		40	$y = -0.0087x + 4.5675$	0.80113
Hederacoside D	0차	4	$y = -0.1857x + 99.6643$	0.97876
		20	$y = -0.4881x + 99.3452$	0.84976
		40	$y = -0.9214x + 98.7786$	0.88583
	1차	4	$y = -0.0019x + 4.6018$	0.97912
		20	$y = -0.0050x + 4.5986$	0.85082
		40	$y = -0.0096x + 4.5929$	0.89093

- 0차 및 1차 반응식의 결정계수 분석 결과 각 시험 성분은 아래와 같은 반응식을 따르는 것으로 나타났다.
- Morroniside : 1차 반응식
- Hederacoside D : 1차 반응식
- 앞의 반응식에서 소실속도상수(K)를 이용하여 아레니우스 반응식으로 각 시험성분에 대한 활성화 에너지를 산출하면 다음과 같다.

2) 활성화 에너지 산출

<Morroniside 활성화에너지 산출식>

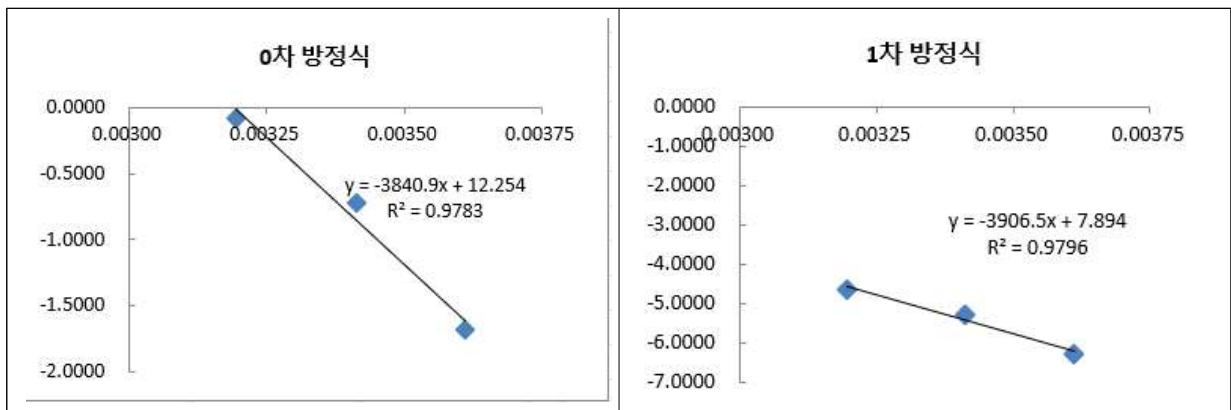
반응차	온도℃	온도(T)		1/T(x축)	K	LnK(y축)
0차	4	277		0.003610	0.4476	-0.8038
	20	293		0.003413	0.6476	-0.4345
	40	313		0.003195	0.8238	-0.1938
LnK = $\frac{-1462.64}{1/T} + 4.5044$ (R2 = 0.9776) (Ea = -2906.27)						
1차	4	277		0.003610	0.0047	-5.3703
	20	293		0.003413	0.0068	-4.9930
	40	313		0.003195	0.0087	-4.7415
LnK = $\frac{-1507.97}{1/T} + 0.1012$ (R2 = 0.9794) (Ea = -2996.34)						



< Morroniside 활성화 에너지 산출 그래프 >

<Hederacoside D 활성화에너지 산출식>

반응차	온도 ℃	온도(T)	1/T(x축)	K	LnK(Y축)
0차	4	277	0.003610	0.1857	-1.6835
	20	293	0.003413	0.4881	-0.7172
	40	313	0.003195	0.9214	-0.0818
LnK=	-3840.86	1/T	+	12.2544	(R2= 0.9783)
(Ea= -7631.78)					
1차	4	277	0.003610	0.0019	-6.2800
	20	293	0.003413	0.0050	-5.3036
	40	313	0.003195	0.0096	-4.6511
LnK=	-3906.54	1/T	+	7.8940	(R2= 0.9796)
(Ea= -7762.30)					



<Hederacoside D 활성화 에너지 산출 그래프 >

3) Morroniside 유통기한 산출

(1) 실험하지 않은 각 온도 구간별 반응속도 산출

<Morroniside 온도별 반응속도 산출식>

반응차	온도(℃)	온도(T)	1/T(x축)	LnK(Y축)	K
0차	10	283	0.003534	-0.663965	0.514806
	15	288	0.003472	-0.574236	0.563135
	20	293	0.003413	-0.487571	0.614116
	25	298	0.003356	-0.403813	0.667769
	30	303	0.003300	-0.322820	0.724104
1차	10	283	0.003534	-5.227323	0.005368
	15	288	0.003472	-5.134814	0.005888
	20	293	0.003413	-5.045462	0.006438
	25	298	0.003356	-4.959108	0.007019
	30	303	0.003300	-4.875605	0.007630

(2) 연간변화 반응속도 산출

<Morroniside 기간별 반응속도 산출식>

반응차	저장온도 (℃)	온도별 유통기간 (A)		반응속도상수 (B)	연간변화 반응속도상수 (A*B)
0차	10	152일	(5개월)	0.514806	2.574031
	15	30일	(1개월)	0.563135	0.563135
	20	61일	(2개월)	0.614116	1.228233
	25	61일	(2개월)	0.667769	1.335538
	30	61일	(2개월)	0.724104	1.448208
	누계	365일	(12개월)		7.149145
1차	10	152일	(5개월)	0.005367877	0.026839
	15	30일	(1개월)	0.005888148	0.005888
	20	61일	(2개월)	0.006438486	0.012877
	25	61일	(2개월)	0.007019183	0.014038
	30	61일	(2개월)	0.007630476	0.015261
	누계	365일	(12개월)		0.074904
반응차	최초함량 (A)	품질규격 (B)	A-B	연간감소량	유통기간(월)
0차	97.6	80.0	17.6	7.149145	29.54
1차	4.58088	4.3820	0.199	0.074904	31.86

4) Hederacoside D 유통기한 산출

(1) 실험하지 않은 각 온도 구간별 반응속도 산출

<Hederacoside D 온도별 반응속도 산출식>

반응차	온도(℃)	온도(T)	1/T(x축)	LnK(Y축)	K
0차	10	283	0.003534	-1.317558	0.267788
	15	288	0.003472	-1.081934	0.338939
	20	293	0.003413	-0.854352	0.425559
	25	298	0.003356	-0.634407	0.530250
	30	303	0.003300	-0.421721	0.655917
1차	10	283	0.003534	-5.909980	0.002712
	15	288	0.003472	-5.670327	0.003447
	20	293	0.003413	-5.438853	0.004344
	25	298	0.003356	-5.215147	0.005434
	30	303	0.003300	-4.998823	0.006746

(2) 연간변화 반응속도 산출

<Hederacoside D 기간별 반응속도 산출식>

반응차	저장온도(℃)	온도별 유통기간 (A)		반응속도상수 (B)	연간변화 반응속도상수 (A*B)
0차	10	152일	(5개월)	0.267788	1.338942
	15	30일	(1개월)	0.338939	0.338939
	20	61일	(2개월)	0.425559	0.851118
	25	61일	(2개월)	0.530250	1.060500
	30	61일	(2개월)	0.655917	1.311834
	누계	365일	(12개월)		4.901333
1차	10	152일	(5개월)	0.002712240	0.013561
	15	30일	(1개월)	0.003446738	0.003447
	20	61일	(2개월)	0.004344463	0.008689
	25	61일	(2개월)	0.005433636	0.010867
	30	61일	(2개월)	0.006745880	0.013492
	누계	365일	(12개월)		0.050056
반응차	최초함량 (A)	품질규격 (B)	A-B	연간감소량	유통기간(월)
0차	99.7	80.0	19.7	4.901333	48.23
1차	4.60217	4.3820	0.220	0.050056	52.77

(마) 최종 유통기한 선정 및 결과 종합

<최종 유통기한 선정>

시험성분	반응차수	국내 유통온도 반영
Morrnocide	1차	31.86 개월
Hederacoside D	1차	52.77 개월

- ‘멀꿀복합추출물분말’은 건강기능식품 신규 기능성원료로 하는 제품으로 이를 PE 차광 밀폐용기에 보관하여 제조 직후부터 4℃, 20℃ 및 40± 2℃/상대습도 75±5%RH에서 6개월 동안 시험한 결과, 일반항목인 성상, 중금속, 대장균군 결과는 모두 기준규격에 적합이었음. ‘멀꿀복합추출물분말’의 기능성분 시험결과로 회귀분석을 하고 2007년도 우리나라 연간 온도별 예상 유통일수를 적용하여 Arrhenius식으로 산출한 유통기한은 Morrnicide 31.86개월, Hederacoside D 52.77개월로 예측된 바, 차광 밀폐 용기를 사용하여 빛의 투과와 습도에 안정한 포장으로 경시 변함 및 함량의 변화에 영향을 받지 않는 것으로 판단하여 제품의 유통기한을 24개월로 설정하였음

(8) 전립선 비대 메카니즘 규명 및 전립선질환 유도 동물활성평가

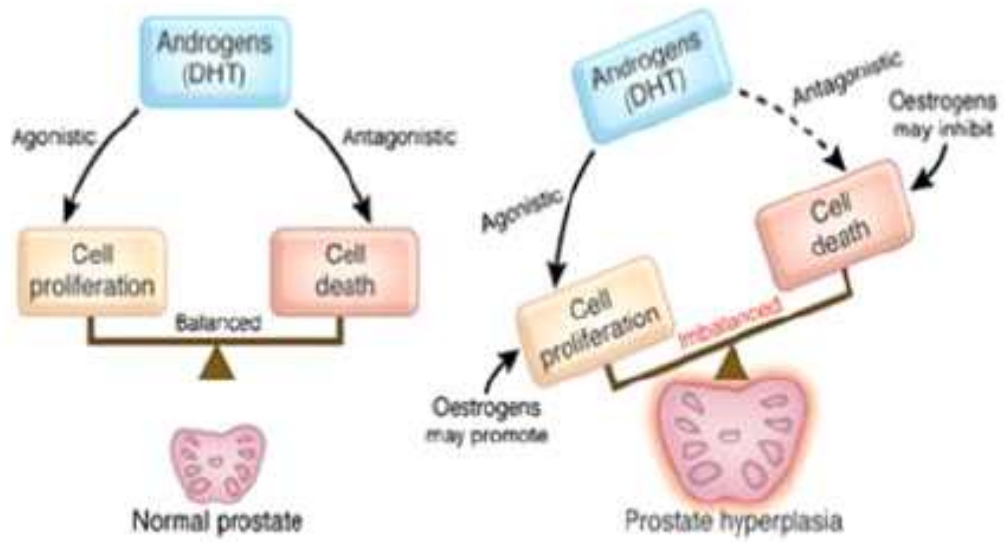
(가) 전립선 비대증 메카니즘

1) 전립선의 노화

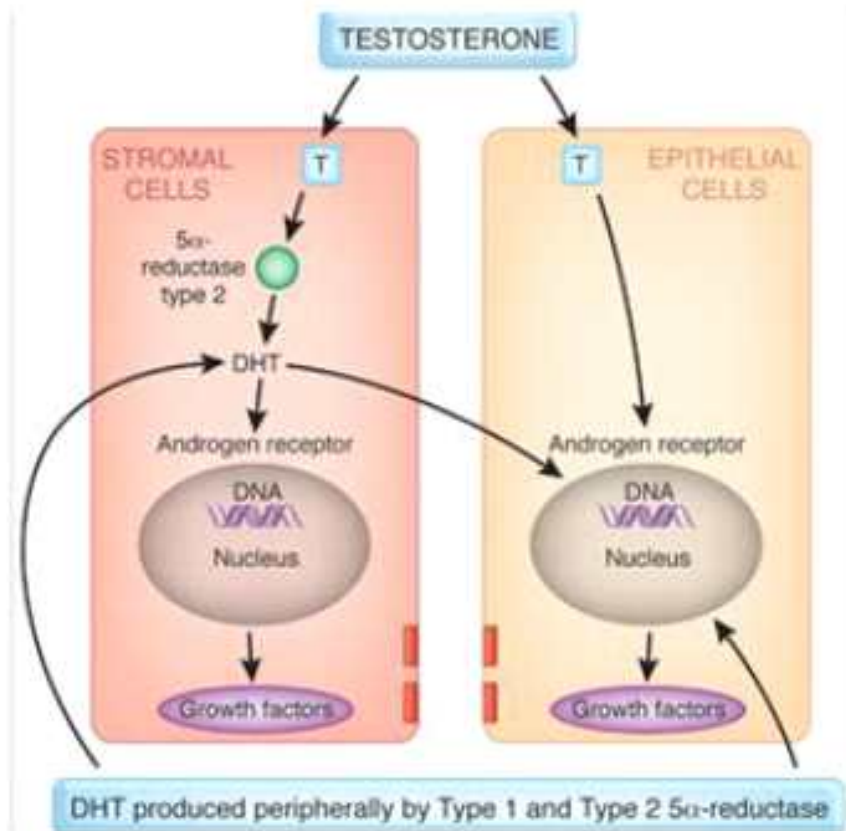
- 전립선이 건강하다는 것은 전립선의 생리적 또는 병리적 변화로 인해 파생되는 여러 증상들이 발생하지 않는 것을 말함. 전립선은 다른 안드로겐에 의존하는 장기들과는 달리 일생동안 안드로겐에 반응을 유지함. 예로 남성의 성기 같은 경우 안드로겐 수용체의 발현이 청소년기 이후로 줄어듦. 따라서 안드로겐이 높은 레벨을 유지하더라도 성기의 성장은 멈춤. 이와 달리 전립선은 노화가 진행되면서 지속적으로 성장하기 때문에 여러 가지 증상들이 생길 수 있음. 전립선이 커지면서 요로의 저항이 점점 커지고 이로 인한 부작용으로 방광의 기능이 변화함. 방광 출구의 저항만큼 방광의 압력이 강하게 유지된다면 정상적으로 방광을 비울 수 있겠지만 노화로 인한 방광, 신경계의 기능이 점점 약화되어 생기는 하부요로 증상이 정상적인 생활과 충분한 수면을 방해하게 됨

2) 전립선 비대증 추측 기전

- 전립선 노화의 원인은 아직까지 분명하지 않으나 확실한 것은 나이에 따른 변화이며 안드로겐, 특히 디하이드로테스토스테론(DHT)의 존재와 관련이 있다는 것임. 그러나 안드로겐은 전립선의 성장에 있어서 기본적으로 형태를 유지하기 위해서는 꼭 필요하지만, 이의 발생 요인으로 직접 관여하지는 않는 것으로 보임. 고환의 라이디히세포(Leydig cell)에서 분비된 테스토스테론은 단순 확산에 의해 전립선 세포로 유입되고 5-알파 환원효소에 의해 DHT로 전환됨. DHT는 전립선에 대한 작용에 있어서 테스토스테론의 약 5배에 해당하는 안드로겐 역가를 가지고 있으며, 전립선 내 DHT의 농도는 테스토스테론의 약 2배 정도임. 따라서 DHT의 전립선에 대한 역할은 테스토스테론의 약 10배에 해당한다고 볼 수 있음. DHT는 전립선 상피와 버팀질세포의 핵에 존재하는 안드로겐수용체(AR)에 결합하여 구조적 변화와 이합체화를 유도하게 되고 이 과정에서 HSP(heat shock protein)이 떨어져 나가게 됨. 그 결과 AR DNA의 몇몇 분절이 전사됨. 이 분절들은 여러 EGF, FGF 등의 성장인자와 관련된 유전자에 암호화되며 이후 분비된 EGF, FGF 등은 버팀질과 상피세포의 세포막에 위치하는 성장인자수용체와 결합하여 전립선의 성장을 유도함. 반면 이러한 증식은 정상 전립선에서 세포고사의 기전을 통한 억제로 평형을 이루게 되는데 이에 bcl-2, bax 세포고사 유전자에 의해 조절받는 TGF- β 가 중요한 역할을 함. 따라서, 전립선 성장의 유발기전으로 버팀질세포에 의해 분비된 EGF, TGF- β 및 FGF 등의 과도한 주변분비 또는 자가분비작용을 통해 상피세포 또는 버팀질세포의 증식이 촉진된다는 버팀질/상피 상호작용이나 세포고사의 결합으로 인한 억제기전의 약화에 따른 상대적 증식 등이 제시되고 있으며 이러한 전립선세포의 증식과 세포고사의 비정상적인 불균형은 전립선 성장을 유도하는 중요한 원인으로 생각되고 있음. 나이가 들게 되면 성호르몬의 변화가 초래됨. 우선 혈중 테스토스테론 농도가 감소를 보임. 그러나 세포내 5-알파 환원효소의 활성이 증가하고 이에 따른 전립선세포 내 DHT 농도의 증가를 보이며 세포 내에서도 이에 반응하는 AR이 증가한다. 따라서 나이에 따른 테스토스테론은 감소하더라도 전립선 내 DHT 농도는 큰 차이가 없음



<전립선 비대증 작용기전>



<테스토스테론 전립선 대사>

(나) 전립선비대증 유도 Rat 동물모델의 효능에 대한 연구

1) 실험방법

- 6주령의 SD rat (오리엔트)를 1주일간 순화시킨 후 군당 10 마리씩 9그룹으로 구분함. 즉, PBS를 투여한 정상 대조군 (정상 대조군), PBS 및 Testosterone 5mg/kg 투여군 (BPH 대조군), Finasteride 10mg/kg 및 Testosterone 투여군 (Fina 투여군), Saw Palmetto 100mg/kg 및 Testosterone 투여군 (So투여군), 멸꿀복합추출물 25mg/kg 및 Testosterone 투여군 (SC25), 멸꿀복합추출물 약재투여군 50mg/kg 및 Testosterone 투여군 (SC50), 멸꿀복합추출물 약재투여군 100mg/kg 및 Testosterone 투여군 (SC100), 멸꿀복합추출물 약재투여군 200mg/kg 및 Testosterone 투여군 (SC200), J 추출물투여군 100mg/kg 및 Testosterone 투여군 (J100) 총 9 군으로 구분하여 실험함. 약재투여군, Fina 투여군, So투여군은 각각 PBS에 용해 시켜 동물 1구당 매일 체중대비 용량으로 매일 1 회씩 28 일간 금속제 Zonde 가 부착된 3ml syringe를 이용하여 강제 경구 투여함

<실험동물의 투여농도 및 방법>

실험군	투여 물질 및 용량
NC	Corn oil (s.c) +PBS (p.o.)
BPH	Testosterone (5mg/kg)+PBS (p.o.)
Fina	Testosterone (5mg/kg)+Finasteride(10mg/kg, p.o.)
So	Testosterone (5mg/kg)+Saw palmetto (100mg/kg)
SC25	Testosterone (5mg/kg)+멸꿀복합추출물 (25mg/kg)
SC50	Testosterone (5mg/kg)+멸꿀복합추출물 (50mg/kg)
SC100	Testosterone (5mg/kg)+멸꿀복합추출물 (100mg/kg)
SC200	Testosterone (5mg/kg)+멸꿀복합추출물 (200mg/kg)
J100	Testosterone (5mg/kg)+J추출물(100mg/kg)

- 체중측정 : 모든 실험동물의 체중을 약재투여 시작일 및 일주일에 한 번씩 체중을 측정하여 체중 별 Testosterone의 투여량 및 약물 투여량을 조정함. 체중측정은 투여 전에 전자저울을 이용하여, rat이 움직이지 않는 안정 상태에서 체중을 측정함
- 전립선 적출 (Prostate gland) 및 측정 : 최종 희생일에 모든 실험동물을 18 시간 이상 절식 후 회복하여 전립선을 적출한 다음, 주변 지방조직을 제거하고 중량을 측정함
- Dihydrotestosterone & Testosterone analysis : 희생시킨 동물모델의 복대정맥에서 채혈을 실시하여 혈중내의 Dihydrotestosterone (DHT) 와 testosterone을 ELISA kit를 이용하여 측정함. 또한, 각 개체의 전립선 조직을 수득하여, lysis 버퍼를 넣고 총 단백질을 정량하고 ELISA kit를 이용하여 전립선 조직 내에 존재하는 DHT와 testosterone의 발현량을 측정함
- 전립선 조직내의 전립선 비대증 protein 발현변화 측정 : 전립선 조직을 RIPA buffer (pH 7.2)로 분해하고 centrifuge (12,000 rpm for 20 min at 4°C) 한 후, 상층액만을 사용하여 AR, PSA를 western blot을 실시함

- 전립선 조직의 조직학적 평가 : 희생된 동물의 전립선 조직을 파라포르말데하이드 용액에 고정시켜 H&E 염색을 측정한 후 상피두께를 측정함
- 전립선 조직의 immunohistochemistry : 희생된 전립선 조직에서 5 α -reductase 2와 PCNA를 IHC로 진행하여 발현 정도를 확인함

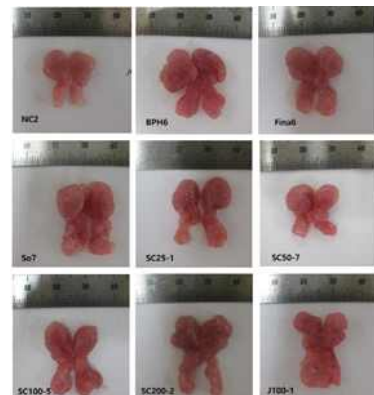
(다) In vivo 전립선 비대증 관련 메카니즘 탐색

1) 전립선비대 유도 Rat 동물모델의 전립선 무게 변화

- Testosterone(5mg/kg, s.c.)을 투여하여 유도한 전립선 비대증군은 대조군에 비해 전립선 무게가 2배 증가하였음. 반면 5-알파 환원효소 억제제로 임상에서 사용 중인 Finasteride 처리군은 대조군에 비해 전립선의 무게가 1.6배 증가하였고, 전립선비대 유도군에 비해 유의성 있게 전립선 무게가 감소하여, testosterone 투여에 의한 전립선 비대 모델 구축 및 양성대조군을 통한 전립선 비대 전해 효과를 확인하였음. 또한, SC50 투여군에서도 1.6배로 증가하였고, 전립선비대 유도군에 비해 유의성 있게 전립선 무게가 감소하였음

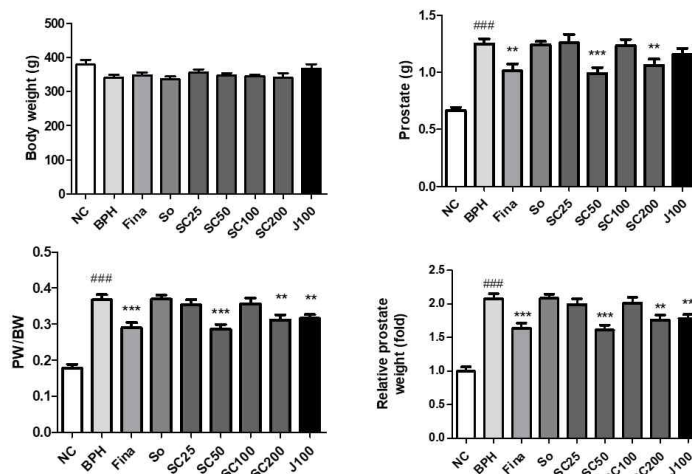
<전립선 무게 변화>

	Body weight		Prostate weights	
	Initial (g)	Final (g)	Absolute (g)	Relative (fold)
N. Control	230.9±9.51	378.9±40.92	0.66±0.08	1.00±0.18
BPH	230.9±8.90	340.6±23.13	1.25±0.12 ^{###}	2.07±0.23 ^{###}
Finasteride	230.7±8.22	348.0±23.15	1.01±0.06 ^{***}	1.64±0.22 ^{***}
So	230.8±8.09	336.2±22.75	1.24±0.08	2.09±0.17
SC-25mg/kg	230.7±7.77	355.5±26.14	1.26±0.19	1.99±0.23
SC-50mg/kg	230.8±7.73	346.8±23.29	0.99±0.14 ^{***}	1.61±0.21 ^{***}
SC-100mg/kg	230.9±7.69	345.7±12.56	1.23±0.14	2.01±0.24
SC-200mg/kg	230.9±7.90	341.0±37.82	1.06±0.15	1.76±0.22
J-100mg/kg	230.9±7.93	367.1±36.88	1.16±0.14	1.78±0.17



p< 0.001 compared with the NC group

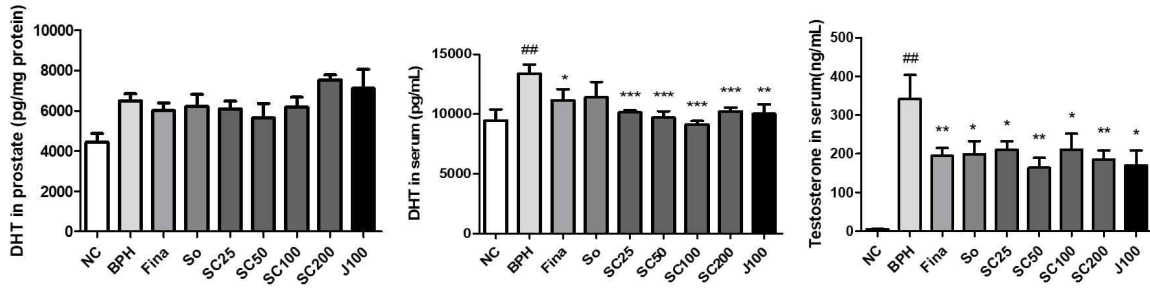
*** p<0.001 and ** p<0.01 compared with the BPH group



<멀꿀복합추출물에 의한 전립선의 무게 변화>

2) DHT와 testosterone level의 변화

- 멀꿀복합추출물 투여에 의한 혈청 내 Dihydrotestosterone(DHT)와 testosterone을 측정한 결과, 양성대조군이 fina군에서 유의성 있게 감소하였고, SC25, SC50, SC100, SC200 투여군에서도 testosterone에 의해 증가된 전립선 유도군에 대해 통계학적으로 유의성 있게 혈청 내 DHT를 감소시켰고, 전립선 조직내에서의 DHT의 감소 효과는 나타내지 못했음. 또한, 혈중 내 testosterone은 모든군에서 유의성 있게 감소함



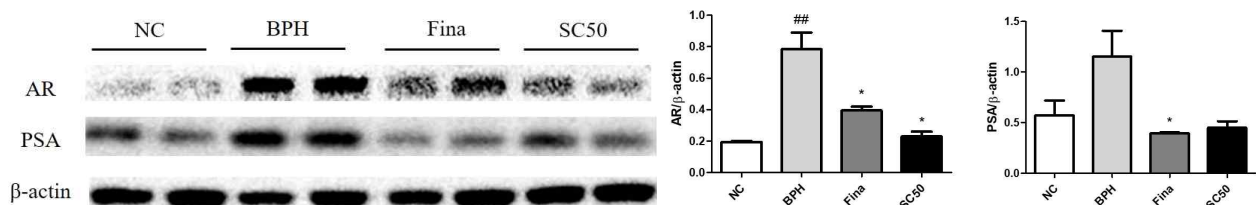
p< 0.001 compared with the NC group

*** p<0.001, ** p<0.01 and * p<0.05 compared with the BPH group

<멀꿀복합추출물에 의한 혈청, 조직내의 DHT와 testosterone의 변화>

3) 전립선 조직내에서 AR, PSA 발현 억제 확인

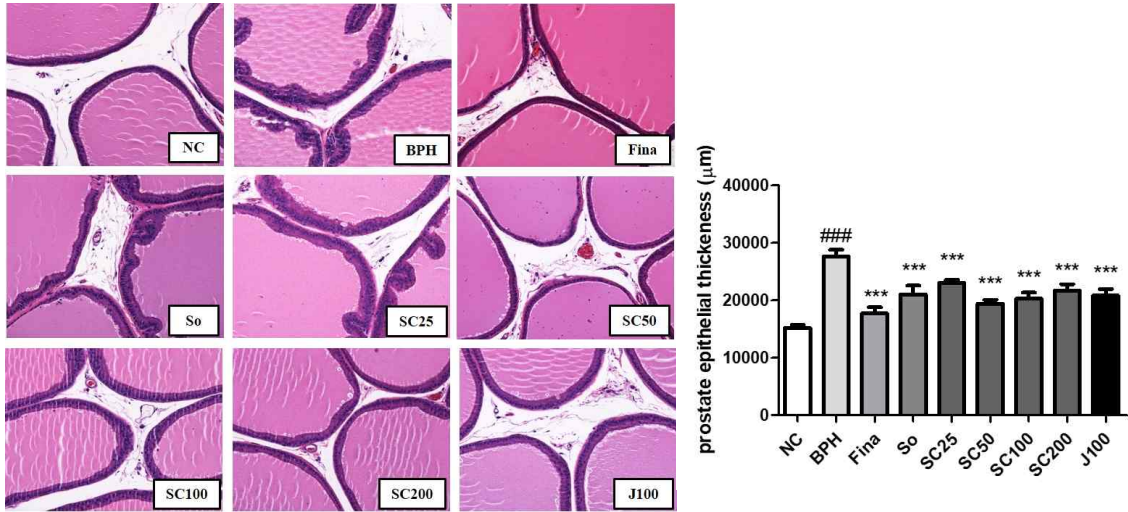
- 희생시킨 동물의 전립선 조직에서 SC50 투여군에서 AR이 유의성 있게 감소하였으나, SC50 투여군에서 PSA는 감소하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았음



<멀꿀복합추출물에 의한 전립선 조직의 AR, PSA의 단백질 레벨의 변화>

4) 전립선 조직의 상피세포 두께 감소 효과

- 전립선 조직의 상피 두께를 측정하기 위하여 H&E염색을 진행한 결과 대조군에 비하여 전립선 비대 유도군에서 상피두께가 유의성 있게 증가하였고, 전립선 비대 유도군과 비교하였을 때 fina투여군을 포함한 모든 투여군에서 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었음



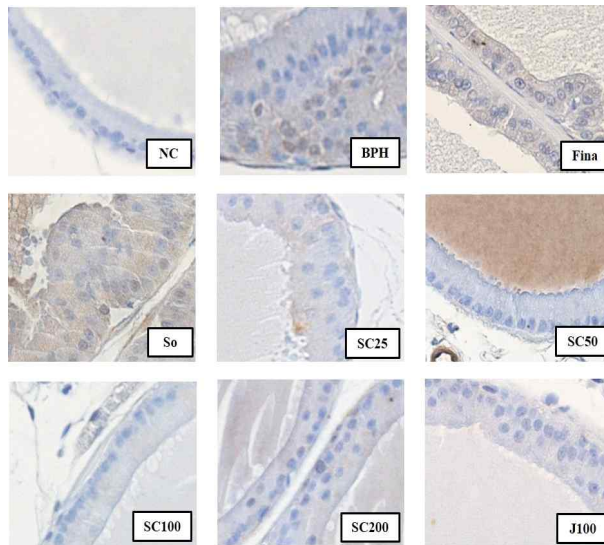
p< 0.001 compared with the NC group

*** p<0.001, ** p<0.01 and * p<0.05 compared with the BPH group

<뭇꿀복합추출물에 의한 전립선 상피세포 두께의 변화>

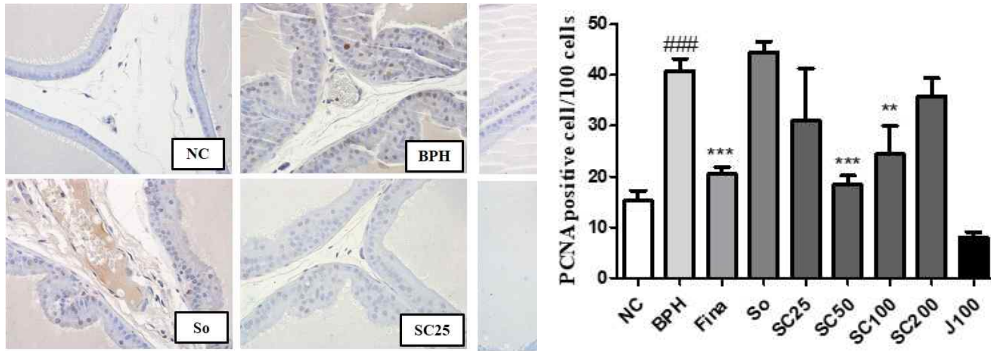
5) 전립선 조직의 면역염색

- 5α-reductase 2 : 대조군과 비교하였을 때 전립선 비대 유도군에서 cytoplasm 부위에서 발색이 되어 전립선 비대 유도군에서 5α-reductase 2가 발현되는 것을 알 수 있었음. 또한, SC50, SC100에서는 cytoplasm에서 거의 발색이 되지 않아, 5α-reductase 2의 발현이 감소되는 것을 알 수 있었음



<뭇꿀복합추출물에 의한 전립선 조직의 5α-reductase 2의 변화>

- PCNA : 대조군의 핵에서는 PCNA가 발색 되지 않았고, 전립선 비대 유도군에서 PCNA가 핵에서 발색되는 것을 알 수 있었음. 또한, 대조군과 비교할 때 전립선 유도군에서 PCNA의 발현이 유의성 있게 증가하는 것을 알 수 있었음. SC50 투여군에서는 전립선 비대 유도군과 비교하였을 때 유의성 있게 PCNA가 감소하는 것을 알 수 있었음



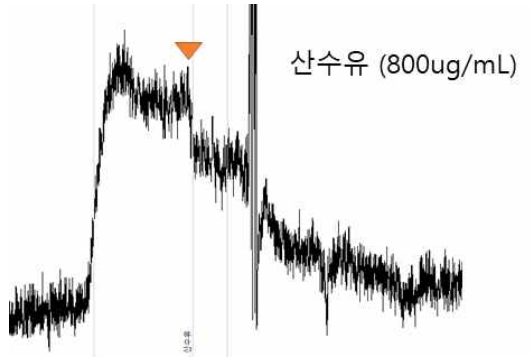
<멀꿀복합추출물에 의한 전립선 조직의 PCNA의 변화>

(라) 전립선 평활근의 알파차단 및 이완효능 평가

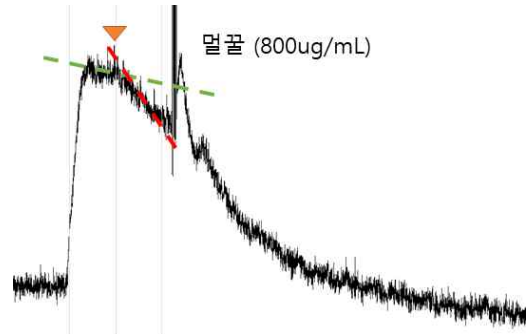
1) 조직 준비 및 등축성 기록

- 250~300g의 Sprague-Dawley (SD) 랫드에서 전립선과 인접한 생식기를 적출하여 120 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11 mM glucose, 25 mM NaHCO₃, 5.9 mM KCl and 1.2 mM NaH₂PO₄.H₂O로 구성된 생리 식염수(continuously bubbled with 5% CO₂, 95% O₂ 혼합가스를 지속적으로 공급하여 pH7.4가 되도록 유지, 37°C 항온)에서 가는 insect pin으로 silicon coated petri-dish에 고정
- 전립선 조직은 실체현미경 (Nikon SMZ-2T)을 이용하여 지방조직 및 결합조직을 제거하고 ventral lobe 부분을 2~3mm길이로 자름. 한쪽 부분을 organ bath chamber 바닥과 연결하고 다른 한쪽은 스테인리스 고리에 걸어 tension transducer (52-9503)과 연결
- 0.8g을 기저장력으로 설정하고 실험에 적용. 0.8g의 장력을 가하여 기본 장력을 만들고, 안정화를 시킨다. 기저 장력이 더 이상 변하지 않고 평형이 이루어졌다고 판단되었을 때 60mM KCl을 투여하여 ventral lobe에서 수축을 유하여, 조직의 정상적인 근수축능력을 확인하고 60mM KCl 에 의한 근수축 정도를 이후에 처치하는 phenylephrine 수축과 비교하여 각 조직간의 차이를 통계적으로 최소화 함
- 60mM KCl 처치 후, 2회 세척한 후 다시 기저장력에 도달하게 되면 1μM phenylephrine을 투여하여 수축반응을 유도. 1μM phenylephrine에 의한 수축반응이 최고점에 도달하고 지속적인 상태가 되면 산수유 추출물, 멀꿀 추출물, 산수유+멀꿀 혼합 추출물을 각각 800μg/ml 용량으로 organ bath 에 첨가하여 각 시료에 대한 ventral lobe의 수축력의 변화를 관찰하여 기록

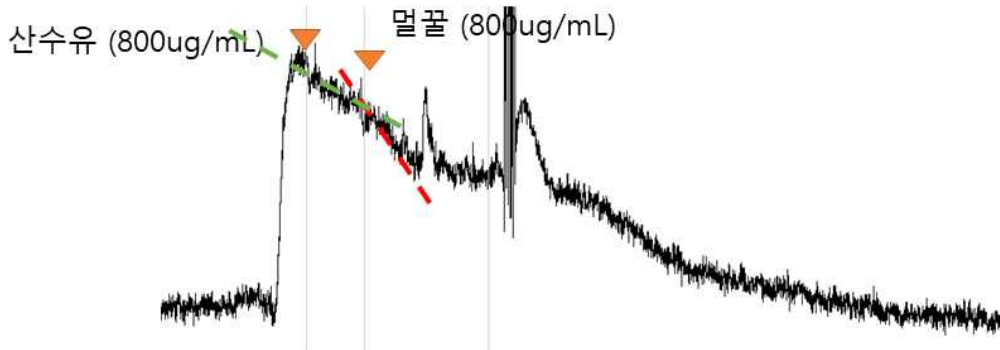
- 산수유+멀꿀 혼합 추출물 800 μ g/ml 처리시 전립선의 ventral lobe의 smooth muscle 수축 능력이 66.77% \pm 1.618% 로 감소



산수유 추출물 처리 (800 μ g/ml)



멀꿀 추출물 처리 800 μ g/ml)



산수유+ 멀꿀 추출물 (800 μ g/ml) 처리 시 전립선 smooth muscle 수축력이 66.77% \pm 1.618% 로 감소

< 전립선 평활근의 알파차단 및 이완효능 평가 >

(9) 안전성 평가

- 식약처 논의결과 멸꿀 잎은 ‘건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료’가 아니므로, 멸꿀 잎을 사용하는 것에 문제는 없다는 답변을 받음. 또한, 독성시험은 멸꿀 잎 단독으로 수행한 자료가 아닌, 멸꿀복합추출물로 수행한 자료를 요청하였음. 따라서 식약처 요청에 적합한 독성시험을 수행하였으며, 그 결과는 아래와 같음
- 멸꿀복합추출물의 안전성 평가 결과, 전체 독성시험(단회 경구투여, 4주 반복 경구투여, 13주 반복 경구투여, 소핵시험, 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험) 모두에서 무독성으로 확인되었으며, 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단되었음

(가) 단회 경구투여 독성시험

1) 실험방법

■ 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Sprague-Dawley [CrI:CD(SD)]	
생산자 및 공급원	㈜오리엔트 바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)	
선정사유	본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과와 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	22
	투여 시	20
주령	입수 시	7
	투여 시	8
입수 시 체중범위	193.92-215.59 g	151.84-168.58 g
투여 시 체중범위	229.01-257.78 g	165.11-186.04 g
잔여동물의 처리	다른 시험 [㈜캠은 시험번호: 18-RR-0989P]의 예비투여에 사용하였다.	

<단회 경구투여 독성시험 동물정보>

■ 시험군 구성

시험군 구성

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

G1: 부형제대조군

<단회 경구투여 독성시험 시험군 구성>

- 투여량 설정: 시험물질을 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 Sprague-Dawley 랫드 암수 각각 1마리에 예비 투여한 결과, 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았음. 상기 결과를 바탕으로 고용량군을 5,000 mg/kg으로 설정하고, 그 아래 공비 2로 두 개의 군을 설정하였음. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였음
- 관찰 및 검사항목: 일반증상, 체중, 부검을 수행함

2) 시험결과

- 멀골복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상, 체중변화 및 육안적 부검소견에서도 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 따라서, 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5,000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단됨

<p style="text-align: center;">최종보고서</p> <p style="text-align: center;">멀골복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p style="text-align: center;">시험번호: 18-RA-1380</p> <p style="text-align: center;">시험의뢰자: 종근당건강㈜</p> <p style="text-align: center;">㈜렘온 비임상연구소</p> <p style="text-align: center;">  <small>Nonclinical Research Institute, Chemon Inc. 240, Namyangsoong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 17162, Republic of Korea</small> </p> <p style="text-align: center;">Chemon Study No. 18-RA-1380</p> <p style="text-align: center;">서 명</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;"> 허혜선, M.S. 시험책임자 ㈜렘온 비임상연구소</p> </div> <div style="width: 45%; text-align: right;"> <p style="text-align: center;">2019.03.06 날 짜</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;"> 이현길, Ph.D., DKBT 운영책임자 ㈜렘온 비임상연구소</p> </div> <div style="width: 45%; text-align: right;"> <p style="text-align: center;">2019.03.06 날 짜</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;"> 조경원 의뢰책임자 종근당건강㈜</p> </div> <div style="width: 45%; text-align: right;"> <p style="text-align: center;">2019.3.4 날 짜</p> </div> </div>	<p style="text-align: center;">Chemon Study No. 18-RA-1380</p> <p style="text-align: center;">진 술 서</p> <p style="text-align: center;">멀골복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p>본 시험은 비임상시험관리기준(제2018-93호, MFDS, 2018.년 11.월 21.일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.</p> <p>상기 시험은 승인된 시험계획서와 ㈜렘온 비임상연구소 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p style="text-align: center;"> 허혜선 M.S. 시험책임자 주 소 : ㈜렘온 비임상연구소 경기도 용인시 처인구 양지연로 240, 17162 연 락 처 : 031-329-9363 (TEL), 031-329-9901 (FAX) E-mail : hhs4340@chemon.co.kr</p> </div> <div style="width: 45%; text-align: right;"> <p style="text-align: center;">2019.03.06 날 짜</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">Chemon Study No. 18-RA-1380</p> <p style="text-align: center;">요 약</p> <p>본 시험은 시험물질 멀골복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다. 멀골복합추출물 1250, 2500 및 5000 mg/kg로 투여하는 시험물질 투여군과 발관주사용수만을 투여하는 투항제대조군으로 설정하여 군당 암수 10 마리(합수 각 5 마리)에 단회 경구투여 하였다.</p> <p>2 주간 시험을, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며, 그 결과는 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 사망동물은 관찰되지 않았다. 2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 4. 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. <p>이상의 결과로 보아, 멀골복합추출물 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않았다. 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단된다.</p>
---	--

<단회 경구투여 독성시험 최종보고서>

(나) 4주 반복 경구투여 독성시험

1) 실험방법

■ 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Sprague-Dawley [Cri:CD(SD)]	
생산자 및 공급원	㈜오리엔트 바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)	
선정사유	본 시험에 사용한 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	28
	투여개시 시	25
주령	입수 시	5
	투여개시 시	6
입수 시 체중범위	120.99~139.65 g	117.51~132.01 g
투여개시 시 체중범위	190.11~213.98 g	154.50~180.21 g
잔여동물의 처리	안락사 처리 하였다.	

<4주 반복 경구투여 독성시험 동물정보>

■ 시험군 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 26-30	10	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 31-35	10	625
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 36-40	10	1250
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 41-45	10	2500
G5	M / F	5 / 5	21-25 / 46-50	10	5000

G1: 부형제대조군(평균주사용수)

<4주 반복 경구투여 독성시험 시험군 구성>

- 투여량 설정: 멀꿀복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg의 용량으로 단회 경구투여한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상, 체중, 부검소견에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 상기 결과를 바탕으로 최고용량군을 5,000 mg/kg/day으로 설정하고, 그 아래 공비 2로 3 개의 군을 설정하였음. 또한, 평균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였음
- 관찰 및 검사항목: 일반증상, 체중, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사를 수행함
- 임상병리 검사항목: 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사를 수행함
- 조직병리 검사항목: 부검, 장기중량 측정, 조직 및 장기의 보존, 조직병리학적 검사

2) 시험결과

- 일반증상 관찰 결과, 유연이 1,250 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서, 시험물질색변이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰됨
- 체중측정 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음

- 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음
- 요검사 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 URO가 증가하였음
- 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 혈액생화학적 검사 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 BUN 농도가 증가하였음
- 장기중량 측정 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 간의 절대 및 상대 중량이 증가하였음
- 부검소견 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음
- 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 멸균복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 625, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day로 4주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 영향으로 1,250 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 유연, 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 시험물질색변, 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 요 중 URO 증가, BUN 증가, 양측 신장 및 간의 절대 및 상대중량 증가가 관찰되었음
- 상기 시험결과를 토대로 추후에 실시할 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 장기간의 투여 기간을 고려하여, 독성이 관찰될 것으로 예측되는 5,000 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 아래로 공비 2.5로 두 개 군을 두는 것을 추천함

최종보고서

Chemon Study No. 18-RR-1381

멸균복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
4 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

시험번호: 18-RR-1381

시험의뢰자: 종근당건강㈜

취검은 비임상연구소

Chemon Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
246, Namsong-ro, Yangsi-gu, Cheongju, Chungcheong-do, 38171, Republic of Korea

Chemon Study No. 18-RR-1381

서 명

정 역, M.S. 시험책임자, 취검은 비임상연구소
이 현진, Ph.D., DKBT, 한용복합제 시험책임자, 취검은 비임상연구소
조 경민, 의용박사, 종근당건강(주)

2019.04.03
2019.04.03
2019.3.29

진 출 서

멸균복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

본 시험은 대한민국과학기술원(2018-03호, MFDS, 2018 년 11 월 21 일), OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) EN/NC/CHEM(98)17에 따라 수행되었다.

상기 시험은 승인된 시험계획서와 취검은 비임상연구소 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서와 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 지향할 만한 영향은 발생하지 않았다.

정 역, M.S. 시험책임자, 취검은 비임상연구소
주 소 : 경기도 용인시 처인구 영지면 남정로 246, 17162
연 락 처 : 031-329-5083 (TEL), 031-329-9991 (FAX)
E-mail : 18464340@chemon.co.kr

Chemon Study No. 18-RR-1381

요 약

본 시험은 시험물질 멸균복합추출물 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 시험을 실시하는 독성시험을 실시하여 투여 13 주 후에 경구투여 독성시험에서의 투여량 설정에 참고 자료로 수행되었다.
멸균복합추출물 625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군과 배양주사 복수군을 투여하는 부정제대조군을 설정하여, 양성 음수 및 5 미터의 4 주간 반복 경구투여 하였다.
일반적 관찰, 적응 측정, 사료 및 물섭취량 산출, 양과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 부검소견관찰을 실시하였고, 그 결과는 다음과 같다.

1. 일반적 관찰 결과, 투여 1250 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서, 시험물질변색이 5000 mg/kg/day 투여군 암수에서 관찰되었다.
2. 적응측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
3. 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
4. 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
5. 양과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
6. 요검사 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 URO가 증가하였다.
7. 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 발생하지 않았다.
8. 혈액생화학적 검사 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 BUN 농도가 증가하였다.
9. 장기중량 측정 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 간의 절대 및 상대 중량이 증가하였다.
10. 부검소견 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 멸균복합추출물 Sprague-Dawley 랫드에 625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 4 주간 반복 경구투여 시험을 실시하는 독성시험에 의한 영향으로 1250 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 유전, 5000 mg/kg/day 투여군 암수에서 시험물질변색, 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 요중 URO 증가, 양측 신장 및 간의 절대 및 상대중량 증가가 관찰되었다.

상기 시험결과를 토대로 추후에 실시할 13 주 반복 경구투여 독성시험에서는 장기간의 투여기간을 고려하여, 독성이 관찰될 것으로 예측되는 5000 mg/kg/day를 고용량군으로 설정하고, 아래로 공비 2.5로 두 개 군을 두는 것을 추천 한다.

(다) 13주 반복 경구투여 독성시험

1) 실험방법

■ 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 랫드, Sprague-Dawley [CrI:CD(SD)]	
생산자 및 공급원	㈜오리엔트 바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)	
선정사유	본 시험에 사용한 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물로서 일반독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	암컷
동물 수	임수 시	44
	투여개시 시	40
주령	임수 시	5
	투여개시 시	6
임수 시 체중범위	126.00-143.90 g	111.42-130.57 g
투여개시 시 체중범위	180.28-206.36 g	147.33-171.98 g
잔여동물의 처리	다른 시험[㈜렘은 시험번호: 19-RR-0249]의 예비투여에 사용하였다.	

<13주 반복 경구투여 독성시험 동물정보>

■ 시험군 구성

군	성 별	동물수	동물번호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1	M / F	10 / 10	1-10 / 41-50	10	0
G2	M / F	10 / 10	11-20 / 51-60	10	800
G3	M / F	10 / 10	21-30 / 61-70	10	2000
G4	M / F	10 / 10	31-40 / 71-80	10	5000

G1: 부형제대조군 (멸균주사용수)

<13주 반복 경구투여 독성시험 시험군 구성>

- 투여량 설정: Sprague-Dawley 랫드에 625, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day의 용량으로 4주 반복 투여한 결과, 시험물질에 의한 영향으로 1,250 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 유연, 5,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 시험물질색변, 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 요 중 URO 증가, BUN 증가, 양측 신장 및 간의 절대 및 상대중량 증가가 관찰되었음. 상기 결과를 바탕으로 최고용량군을 5,000 mg/kg/day로 설정하고, 그 아래 공비 2.5로 2개의 군을 설정하였음. 또한, 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정함
- 관찰 및 검사항목: 일반증상, 체중, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사를 수행함
- 임상병리 검사항목: 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사를 수행함
- 조직병리 검사항목: 부검, 장기중량 측정, 조직 및 장기의 보존, 조직병리학적 검사

2) 시험결과

- 일반증상 관찰 결과 유연이 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 및 시험물질색변이 5,000 mg/kg/day 투여군 암수 모두 동물에서 관찰되었음
- 체중측정 관찰 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 일일 평균 체중 감소 및 증체량이 감소하였음
- 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음
- 요검사 결과, 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷 또는 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 SG, PRO 및 KET이 증가하였음
- 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 혈액생화학적 검사 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 ALT가 증가하였음. 800 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 Na⁺, 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 TCHO, Cl⁻, 및 5,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 GLU가 감소하였음
- 장기중량 측정 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군 수컷 및 2,000 mg/kg/day 이상 투여군 암컷에서 간의 절대 및 상대 중량이 증가하였음
- 부검소견 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음
- 조직병리학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음
- 이상의 결과로 보아, 멀꿀복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여하였을 때 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았음
- 따라서, 본 시험조건에서 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단하였고, 독성학적 표적장기는 관찰되지 않았음

최종보고서

Chemon Study No. 18-RR-1382

멀꿀복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13 주간 반복 경구투여 독성시험

시험번호: 18-RR-1382

시험의뢰자: 종근당건강㈜

뢰quen은 비임상연구소

Chemon Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
246, Namgyong-ro, Yangju-si, Chongju, Kangwon-do, Republic of Korea

Chemon Study No. 18-RR-1382

서명

시험책임자: 이현철 (2019.09.18)

시험책임자: 이현철 (2019.09.18)

Chemon Study No. 18-RR-1382

진술서

멀꿀복합추출물(Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주간 반복 경구투여 독성시험)

본 시험은 비임상시험관리기준(제2018-93호, MFDS, 2018.년 11.월 21.일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practices (1997) EN/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

본 시험은 종근당 시험계획서와 관련된 비임상연구소의 SOP에 따라 수행되었고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 제해할 만한 영향이 발생하지 않았다.

김희선 (2019.09.18)

시험책임자

주소: 종근당 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 영지면 남평로 240, 17162

연락처: 031-529-9363 (TEL), 031-529-9901 (FAX)
E-mail: hns4340@chemon.co.kr

Chemon Study No. 18-RR-1382

요약

본 시험은 멀꿀복합추출물(Sprague-Dawley 랫드)에 13 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행하였다.

멀꿀복합추출물 800, 2000 및 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군과 말라우시복합추출물 투여하는 부정제(대조군)를 설정하여 암수 각 10 마리에 투여하였다.

일반증상, 체중측정, 사료 및 물섭취량, 안과, 안구학적 검사, 도파사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 방광염/신장염, 부검소견(중량 및 조직병리학적 검사)을 실시하였고, 시험물질 투여군과 부정제(대조군)를 비교하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

- 일반증상: 경증 결과, 투여량 2000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷 및 시험물질색변이 5000 mg/kg/day 투여군 암수 모두 관찰되어 관찰되었다.
- 체중측정: 경증 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 일일 평균 체중 감소 및 증체량이 감소하였다.
- 사료섭취량: 경증 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- 물섭취량: 경증 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- 안과학적 검사: 경증 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 요검사: 경증 결과, 2000 mg/kg/day 이상 투여군 수컷 또는 5000 mg/kg/day 투여군 암수에서 SG, PRO 및 KET이 증가하였다.
- 혈액학적 검사: 경증 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- 혈액생화학적 검사: 경증 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 ALT가 증가하였다. 800 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 Na⁺, 5000 mg/kg/day 투여군 수컷에서 TCHO, Cl⁻, 및 5000 mg/kg/day 투여군 암수에서 GLU가 감소하였다.
- 장기중량 측정: 경증 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 수컷 및 2000 mg/kg/day 이상 투여군 암수에서 간의 절대 및 상대 중량이 증가하였다.
- 부검소견: 경증 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 조직병리학적 검사: 경증 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

인상의 결과로 보아, 멀꿀복합추출물(Sprague-Dawley 랫드)에 13 주간 반복 경구투여하였을 때 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험조건에서 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5000 mg/kg/day로 판단하였고, 독성학적 표적장기는 관찰되지 않았다.

(라) 체내 소핵시험

1) 실험방법

■ 동물정보

종 및 계통	특정병원체 부재(SPF) 마우스, Hsd:ICR(CD-1 [®])	
생산자 및 공급원	코아텍(경기도 평택시 진위면 진위로 181-21)	
선정사유	본 시험에 사용한 마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 유전독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다.	
성별	수컷	
동물 수	임수 시	33
	투여개시 시	30
주령	임수 시	7
	투여개시 시	8
임수 시 체중범위	28.89 - 32.79 g	
투여개시 시 체중범위	33.62 - 36.83 g	
잔여동물의 처리	안락사 처리하였다.	

<소핵시험 동물정보>

■ 시험군 구성

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

G1: 음성대조군(멸균주사용수)

G2-G4: 시험물질 투여군

G5: 양성대조군(Cyclophosphamide monohydrate)

<소핵시험 시험군 구성>

- 투여량 설정: 투여량을 결정하기 위하여 동일 종 동일 주령의 동물을 사용하여 예비시험을 실시하였음. 예비시험에서는 투여액량을 10 mL/kg/day로, 시험물질 용량을 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day로 설정하여 용량당 암수 각 3마리에 2일간 경구투여하였고, 투여일을 포함하여 총 4일간 관찰하였음. 그 결과 모든 동물에서 특별한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았으며 성별에 따른 현저한 독성의 차이도 없었음. 따라서 본 시험에서는 수컷 동물을 사용하며, 예비시험 결과에 따라 체중을 기준으로 5,000 mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 시험군을 구성하였음
- 골수검체 제작: 골수검체는 Schmid (1975)의 방법에 따라 다음과 같이 제작함. 검체 제작시기는 일반적으로 적용하는 기간인 최종 투여로부터 약 24시간 후로 하였음. 각 동물을 CO₂로 흡입 마취시켜 사망을 확인한 후 한 쪽 대퇴골을 적출해 23G 주사침을 사용, 2 mL의 Fetal Bovine Serum(FBS)으로 골수를 씻어내려 세포현탁액을 수거하였음.

세포현탁액을 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였음. 상등액을 제거한 후 침전된 골수세포를 slide glass에 도말하여 실온에서 충분히 건조한 후 메탄올에 5분간 고정하였음. 검체는 각 동물당 2매씩 제작하였음. 고정과 건조가 끝난 검체는 염색/계수 전까지 보관장에 보관하였음

- 타당성 기준: 부검 시 모든 군에서 5마리 이상의 동물이 생존할 것. 시험물질 투여군 및 양성대조군에서 PCE/RBC 비율이 음성대조군의 20% 이상일 것. 음성대조군 및 양성대조군에서 4,000개의 PCE 중 MNPCE의 빈도가 각각의 Historical control data (이하 HCD) 범위와 유사하고, 본 시험에서 양성대조군의 결과는 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타낼 것.
- 세포독성 평가: PCE:RBC 비율의 평균값이 음성대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타낼 때 세포독성이 있는 것으로 판정함
- 소핵 유발성: 시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도가 어느 한 용량에서라도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내며, 그 증가에 용량상관성이 있고, 음성대조군의 HCD 범위를 벗어날 경우를 양성으로 판정함. 모든 시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않고, 용량상관성이 없으며, 음성대조군의 HCD 범위 내에 있을 때 음성으로 판정하였음

2) 시험결과

- 소핵시험 결과, 모든 시험이 타당성 기준은 만족하였음
- 본 시험에 적용한 용량범위 내에서, 개체 당 4,000개의 PCE를 대상으로 MNPCE를 계수한 결과, 시험물질을 투여한 모든 군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량상관성이 없었으며, 음성대조군의 HCD 범위 내에 있었음
- 따라서 멀꿀복합추출물은 본 시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스 체내 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨

<p style="text-align: center; font-size: small;">최종보고서</p> <hr/> <p style="text-align: center;">멀꿀복합추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경우부터 체내 소핵시험</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">시험번호: 19-M3-1388</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">시험의뢰자: 종근당건강㈜</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">위임은 비임상연구소</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> Nonclinical Research Institute, Chemon Inc. 205, Yungpyeong-ro, Yangju-si, Gyeongju, Gyeongsang-do, 71702, Republic of Korea </div> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">Chemon Study No. 19-M3-1388</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: small;">서 명</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">김민섭</p> <p style="font-size: x-small;">김민섭 시험책임자 비임상 연구소</p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">2019.04.15</p> <p style="font-size: x-small;">날짜</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">이현경</p> <p style="font-size: x-small;">이현경 시험책임자 비임상 연구소</p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">2019.04.15</p> <p style="font-size: x-small;">날짜</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">김경민</p> <p style="font-size: x-small;">김경민 시험책임자 비임상 연구소</p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p style="font-size: small;">2019.04.15</p> <p style="font-size: x-small;">날짜</p> </div> </div>	<p style="text-align: center; font-size: small;">Chemon Study No. 19-M3-1388</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: small;">진 술 서</p> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">멀꿀복합추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경우부터 체내 소핵시험</p> <p style="font-size: x-small;">본 시험은 비임상시험관리기준(GMP)에 의해, OECD, 2018년 11월 11일 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) (OECD/GLP)에 의해 수행되었습니다.</p> <p style="font-size: x-small;">본기 시험은 종말의 시험 목적에 따라 비임상시험 가이드라인에 따라 수행되었고, 시험 목적에 따라 필요에 따라 변경되었습니다. 시험 목적의 변경은 최종 시험 보고서에 반영되었습니다.</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p style="font-size: small;">김민섭</p> <p style="font-size: x-small;">김민섭 시험책임자 비임상 연구소 주소: 비임상연구소 경기도 불암서로 245-1, 17102 영 우: 100-100 (영등포구) 영등포구 영등포동 1-1로 11, 영우 2 빌딩 402호 E-mail: res.MR@chemon.co.kr</p> </div> <hr/> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">Chemon Study No. 19-M3-1388</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: small;">요 약</p> <p style="font-size: x-small;">본 시험의 시험물질 멀꿀복합추출물의 체내 독성 영향을 평가 하기 위하여, 시험 목적에 따라 비임상시험관리기준(GMP)에 의해, OECD, 2018년 11월 11일 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) (OECD/GLP)에 의해 수행되었습니다.</p> <p style="font-size: x-small;">시험물질인 멀꿀복합추출물 100, 3000, 10000 mg/kg/day의 용량을 1일 1회, 총 14일간 경구 투여 하였다.</p> <p style="font-size: x-small;">시험물질투여량에 상관없이 모든 시험군에서, 시험물질투여량 100 mg/kg의 Cytochrome P450 (CYP) 효소 활성을 1.5배 이상 증가시켰다. 그러나, 시험물질투여량 3000, 10000 mg/kg/day의 용량에서, CYP 효소 활성은 유의하게 증가하지 않았다.</p> <p style="font-size: x-small;">소핵의 평가는 시험물질 투여량 100, 3000, 10000 mg/kg/day의 용량에서, 소핵 유발률의 증가를 관찰하였다. 그러나, 시험물질 투여량 100, 3000, 10000 mg/kg/day의 용량에서, 소핵 유발률은 음성대조군의 HCD 범위 내에 있었으며, 용량상관성이 관찰되지 않았다.</p> <p style="font-size: x-small;">세포독성 평가는 PCE (Polychrome E) (New blood cell)의 빈도를 측정하였다. 그러나, 시험물질 투여량 100, 3000, 10000 mg/kg/day의 용량에서, PCE 빈도는 음성대조군의 HCD 범위 내에 있었으며, 용량상관성이 관찰되지 않았다.</p> <p style="font-size: x-small;">따라서, 멀꿀복합추출물은 본 시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스 체내 골수세포를 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.</p>
--	--

(마) 체외 염색체이상시험

1) 실험방법

- 시험계: 본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IO 세포주를 사용하였음. 본 시험에서 사용한 세포주의 세포 증식을 및 핵형 검사는 (주)켄온 비임상연구소에서 실시하였으며 그 결과, 염색체 modal number는 25이며, 분열주기는 약 13.5시간이었음
- 시험물질 처리: 세포를 처리계열(Treatment series) 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군(계열-1)에는 4.0mL, 비적용군(계열-2 및 3)에는 4.5mL의 배양액을 분주, 1시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리하였음. 음성대조군에는 같은 양의 부형제만을 처리하였음. 계열-1 및 계열-2는 처리개시로부터 약 6시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5 mL의 Ca^{2+} & Mg^{2+} free Dulbecco's phosphate buffered saline(CMF D-PBS)로 세포층을 1회 세척한 후 신선한 배양액 5 mL를 가하여 증기세포 수거 시까지 계속 배양하였음. 계열-3은 세척 없이 증기세포 수거 시까지 계속 처리하였음. 모든 계열의 처리개시 및 종료 시에 침전의 생성 혹은 pH에 따른 배양액의 색변화 등을 관찰하였음
- 검체 제작: 시험물질 처리 개시로부터 약 22시간 후 모든 플라스크에 50 μ L의 콜히친액을 처리하여(최종농도 1 μ M) 2시간 경과 후 진탕법으로 증기세포를 수거하였음. 증기세포를 포함한 배양액을 원심분리, 75 mM KCl 액에 의한 저장액처리 및 고정(메틸알콜:빙초산=3:1 v/v)을 거쳐 공기건조법으로 염색체 검체를 제작하였고 5% Giemsa액으로 염색하였음
- 염색체이상의 계수의 기준: 염색체이상의 형태판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의하였음. 각 플라스크로부터 제작한 2매의 검체 중 1매씩을 선택하여 코드화한 후, 150개의 분열중기상(이하 '중기상'이라 함)을 대상으로 1,000배의 배율로 염색체이상을 계수하였음
- 구조적 이상 판별: 동원체 수가 23~27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수를 기록함. 이상은 크게 염색체형 절단 및 교환(chromosome break, chromosome exchange)과 염색분체형 절단 및 교환(chromatid break, chromatid exchange)으로 대별해 계수하였으며, gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였음. 염색체이상이 10개 이상(gap 포함, multiple aberration) 혹은 단편화(fragmentation)는 '기타'로 분류하여 1개의 이상으로 계수하였음
- 수적 이상 판별: 이상의 유무에 관계없이 150개의 중기상을 계수하면서 동원체의 수에 따라 diploid(23-36 동원체), polyploid($37 \leq$ 동원체) 및 핵내배화(endoreduplication)로 분류, 그 수를 기록하였음

2) 시험결과

- 본 시험은 모든 시험타당성 기준을 만족하였음. 염색체이상을 계수한 결과, 처리 방법에 상관없이 모든 시험물질 처리군에서 염색체의 구조적 및 수적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량 의존적으로 증가하지 않았으며, 음성대조군의 HCD 범위 내에 있었음
- 이상의 결과로 보아, 멀꿀복합추출물은 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료되며, 명백한 음성으로 판단됨

진술서

말꽂복합추출물의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 체외 염색체이상시험

시험번호: 18-VG-1386

시험의뢰자: 종근당건강㈜

㈜켄은 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc. 240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17162, Republic of Korea

말꽂복합추출물의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL) 세포를 이용한 체외 염색체이상시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2018-93호, MFDS, 2018. 11. 21. 일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MG/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

상기 시험은 승인된 시험계획서와 9켄은 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

Handwritten signature: 김성숙, Date: 2019. 04. 25. Printed name: 김성숙, M.S., 시험책임자, 주소: 9켄은 비임상연구소, 경기도 용인시 처인구 용지면 남평로 240, 17162, 연락처: 031-526-9369 (TEL), 031-329-9901 (FAX), E-mail: kss1526@chemon.co.kr

서명

요약

Handwritten signature: 김성숙, Date: 2019. 04. 25. Printed name: 김성숙, M.S., 시험책임자, 9켄은 비임상연구소

시험물질 말꽂복합추출물의 유전독성 평가를 위하여 배양 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 자극 및 비적용하에 염색체이상시험을 수행하였다. 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도된 헷드의 간균질액에 cofactor를 첨가한 것을 사용하였다.

시험물질은 말근주사용수에 현탁하여 처리하였다. 고농도는 Relative Increase in Cell Count (RICC)를 세포독성의 지표로 하여 결정하였다.

음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 다음 표와 같이 농도군을 설정하였으며, 농도군당 2개의 플라스크를 사용하였다.

Table with 5 columns: Treatment series, Metabolic activation, Treatment time - recovery time (hrs), Dose of test article (µg/mL), Positive control and dose (µg/mL). Rows 1-3.

활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리 후, 배양면적 25 cm² 플라스크에 5 x 10⁴ 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 처리개시로부터 24 시간 후에 염색체 결체를 제작하여, 플라스크당 150 개 (농도군당 300 개)의 증기상으로부터 염색체 이상을 계수하였다. 결과는 구조적(혹은 수적) 이상을 가진 증기상의 빈도(%)로 나타내었다.

염색체 이상을 계수한 결과, 시험물질 처리군에서 구조적 및 수적 염색체 이상을 가진 증기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 중량 의존적으로 증가하지 않았으며, Historical Control Data 범위 내에 있었다.

한편, Benzo[a]pyrene 혹은 4-Nitroquinoline-1-oxide를 처리한 모든 양성대조군에서는 확실한 양성 결과를 얻었다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 말꽂복합추출물은 본 시험에 사용한 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 사료되며, 명백한 음성으로 판단된다.

Handwritten signature: 이현걸, Date: 2019. 04. 25. Printed name: 이현걸, Ph.D., DKBT, 운영책임자, 9켄은 비임상연구소

Handwritten signature: 조경원, Date: 2019. 4. 22. Printed name: 조경원, 의뢰책임자, 종근당건강㈜

(바) 복귀돌연변이시험

1) 실험방법

- 시험계: 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 (Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 uvrA (Green and Muriel, 1976)를 사용함
- 농도군 설정: 본 시험의 처리 농도는 예비시험에서 본시험과 같은 방법으로 전술한 5종의 균주에 대하여 농도군 당 2개의 플레이트(평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정함. 예비시험에서는 5~5,000 µg/plate의 8단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리 시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수 시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰함. 그 결과 시험물질 처리 시 5,000 µg/plate 농도군에서 시험물질 혼탁이 관찰됨. 집락 계수 시에는 모든 농도군에서 시험물질 혼탁 및 침전이 관찰되지 않았음. 모든 균주에서 세포독성은 나타나지 않았고, 집락 수의 실질적인 증가도 관찰되지 않았음. 따라서, 본시험에서는 다음과 같이 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조군을 포함하며, 농도군당 3개의 플레이트를 사용하여 시험하였음
- 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작: 시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시함.
- 관찰 항목: 시험물질 처리 시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰하였음. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였음. 집락은 육안으로 계수하였음. 집락 계수 시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였음
- 독성여부 관찰: 다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였음. ① 기본성장균층이 얇어지거나 없어지면서 집락 수의 감소가 나타날 때. ② 미세집락(microcolony)이 나타날 때

2) 시험결과

- 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 평균 집락 수의 실질적인 증가나 세포독성은 관찰되지 않았음. 한편 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락 수의 확실한 증가가 관찰되었음
- 이상의 결과로 시험물질 멸균복합추출물은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료됨

최종보고서

진술서

말골복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

말골복합추출물의 박테리아를 이용한
복귀돌연변이시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2018-93호, MFDS, 2018년 11월 21일), OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였다.

시험번호: 18-VG-1384

상기 시험은 승인된 시험계획서와 ㈜켄은 비임상연구소의 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였다. 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았다.

시험의뢰자: 종근당건강㈜

박범수, M.S. 2019.07.09
시험책임자
주 소 : ㈜켄은 비임상연구소
경기도 용인시 처인구 양지면 남평로 240, 17162
연락처 : 031-526-9373 (TEL), 031-329-9901 (FAX)
E-mail : pskpbs@chevon.co.kr

㈜켄은 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chevon Inc.
240, Nampreong-ro, Yanggi-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
17162, Republic of Korea

서명

요약

박범수, M.S. 2019.07.09
시험책임자
㈜켄은 비임상연구소

본 시험은 시험물질 말골복합추출물이 대사활성계 작용 및 비작용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스딘인 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

대사활성계로는 Aroclor1254로 유도한 헛드의 간균질액에 보조인자(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

처리용 시험물질은 말관주사용수에 현탁하여 조제하였다. 아래 표와 같이 설정한 농도군과 복형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험군을 구성하였으며, 농도군당 3개의 평판을 사용하였다.

균주명	SS mix	농도군(μg/plate)				
TA strains	+/-	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1500	5000

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 평균 집락 수의 실질적인 증가나 세포독성은 관찰되지 않았다.

현역 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락 수의 확실한 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로 시험물질 말골복합추출물은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

이현걸, Ph.D., DKBT 2019.07.09
운영책임자
㈜켄은 비임상연구소

조경원 2019. 7. 5
의뢰책임자
종근당건강㈜

(10) 인체적용시험 프로토콜

(가) 인체적용시험 대상자 선정기준

- 1) 연령: 만 40세 이상 80세 미만의 성인 남성
 - 전립선 비대증이 많이 발생하는 40대부터 대상자로 선정
 - 상당수의 식품중재연구에서 연령 상한을 정하지 않거나 80세 미만으로 정한 것을 고려하여, 80세 미만을 대상자로 선정
- 2) IPSS: 국제전립선증상점수 (International Prostate Symptom Score: IPSS)가 3~19점인 경증등증의 하부요로증상을 가진 남성
 - 전립선증상이 mild에 해당하는 19점 이하의 대상자를 선정하였으며, 증상이 없는 0~2점은 대상에서 제외

(나) 인체적용시험 전립선건강 바이오마커 설정

- 1) 식약처 고시된 바이오마커 및 서울대병원 및 보라매병원 PI의 의견을 통해 전립선건강 바이오마커 설정 및 인체적용시험을 위한 평가지표를 설정함
- 2) 전립선건강 바이오마커 및 인체적용시험을 위한 평가지표는 다음과 같음
 - 국제 전립선 증상점수(IPSS)
 - 과민성 방광 증상점수(Overactive bladder symptom score; OABSS)
 - 전립선용적
 - 혈청 전립선특이항원(PSA) 및 테스토스테론 수준
 - 요속검사(uroflowmetry)

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		시험관	동물	인체
효소 억제 관련	5-알파 환원효소	○	○	
	테스토스테론(DHT)		○	○
항안드로겐 효과	안드로겐 수용체(AR) 억제	○	○	○
성장 인자 등	Bcl-2, DHT, Bax protein	○	○	
	성장인자(EGF, b-FGF)	○	○	
	전립선 크기		○	○
배뇨 관련 인자	국제 전립선 증상점수(IPSS)			○
	요속검사			○
	잔뇨량			○

<건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서), '전립선 건강에 도움을 줄 수 있음'>

Subject Information	S no.	S _____	Visit Information	Visit no.	<input type="checkbox"/> V1 <input type="checkbox"/> V3 <input type="checkbox"/> V4
	Initial			Visit Date	/ / (YY/MM/DD)
연구책임자	박주현 교수		연구 실시기관	서울대학교병원운영 서울특별시 보라매병원	
시험식품	CKDHC-P29				

국제 전립선 증상점수

(International prostate symptom score)

* 평소(지난 한 달간) 소변을 볼 때의 경우를 생각해서 대략 5번쯤 소변을 본다고 하면 몇 번이나 다음의 불편한 증상이 나타나는가를 생각해서 해당 칸에 V 표시를 하여 주십시오.

문항	국제 전립선 증상점수					거의 항상
	전혀 없음	5번 중 한 번	5번 중 1-2번	5번 중 2-3번	5번 중 3-4번	
1. 평소 소변을 볼 때 다 보았는다고 소변이 남아있는 것 같이 느끼는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
2. 평소 소변을 본 후 2시간 이내에 다시 소변을 보는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
3. 평소 소변을 볼 때 소변줄기가 끊어져서 다시 힘주어 소변을 보는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
4. 평소 소변을 볼 때 어려운 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
5. 평소 소변줄기가 약하다거나 가늘다고 생각한 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
6. 평소 소변을 볼 때 소변이 금방 나오지 않아서 오랫동안 힘을 주어야 하는 경우가 있습니까?	0	1	2	3	4	5
7. 평소 갑자기 일어나서 소변을 보는 경우가 하룻밤에 몇 번이나 있습니까?	0	1	2	3	4	5

문항	생활만족도					
	아무 문제 없다	편찮다	대체로 만족	만족, 불만족 반반	대체로 불만	괴롭다, 견딜 수 없다
지금 소변을 보는 상태로 평생을 보낸다면 당신은 어떻게 느끼겠습니까?	0	1	2	3	4	5

총 증상점수 _____ 점 생활불편점수 _____ 점

<인체적용시험 IPSS 설문지>

Subject Information	S no.	S _____	Visit Information	Visit no.	<input type="checkbox"/> V2 <input type="checkbox"/> V3 <input type="checkbox"/> V4
	Initial			Visit Date	/ / (YY/MM/DD)
연구책임자	박주현 교수		연구 실시기관	서울대학교병원운영 서울특별시 보라매병원	
시험식품	CKDHC-P29				

과민성 방광 증상점수

(Overactive bladder symptom score)

* 아래의 증상이 어느 정도 횟수로 있었습니까?
최근 1주일간 당신의 상태에서 가장 가까운 것을 하나만 골라서 점수의 숫자에 O표 해주세요.

질문	증상	횟수	점수
1	아침에 일어나서 밤에 자기 전까지 몇 회 정도 소변을 보셨습니까?	7회 이하	0
		8~14회	1
		15회 이상	2
2	밤에 잠든 후부터 아침에 일어날 때까지 소변을 보기 위해 몇 회나 일어나셨습니까?	0회	0
		1회	1
		2회	2
		3회 이상	3
3	갑자기 소변이 마려워 참기 힘들었던 적이 있었습니까?	없음	0
		일주일 1회 보다는 적음	1
		일주일 1회 또는 그 이상	2
		1일 1회 정도	3
		1일 2~4회	4
4	갑자기 소변이 마려워서 참지 못하고 소변을 지린 적이 있었습니까?	없음	0
		일주일 1회 보다는 적음	1
		일주일 1회 또는 그 이상	2
		1일 1회 정도	3
		1일 2~4회	4
합계점수		_____ 점	

<인체적용시험 OABSS 설문지>

(다) 인체적용시험 프로토콜 요약

제목	CKDHC-P29의 전립선건강 개선효과 및 안전성 평가를 위한 인체적용연구
연구의뢰자 및 지원기관	종근당건강(주) 농림축산식품부
연구책임자	<ul style="list-style-type: none"> 서울대학교병원운영 서울특별시 보라매병원 비뇨기과 조민철 교수 (연구 총괄 책임자) 서울대학교병원 비뇨기과 구자현 교수
연구대상자	하부요로증상을 호소하는 만 40세 이상 80세 미만의 건강한 성인 남성
연구디자인	12주간 섭취, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 연구
시험식품	CKDHC-P29(멸꿀추출물 및 산수유추출물의 복합물) 함유 캡슐 (CKDHC-P29 400 mg/캡슐)
대조식품	Placebo(CKDHC-P29이 함유되어 있지 않고, 결정셀룰로스와 유당혼합물을 주원료로 하는 시험식품과 성상이 동일한 캡슐)
섭취방법	1일 1회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취 (CKDHC-P29 800 mg/일)
연구방법	<p>방문 1 / -2주 (Screening) 방문 2 / 0주 (Randomization) 방문 3 / 6주 방문 4 / 12주 (Completion)</p> <p>스크리닝검사 기능성평가 임상병리검사 기능성평가 기능성평가 임상병리검사</p> <p>방문 1(-2주)에 자의에 의해 인체적용연구 동의서에 서명한 지원자는 선정·제외기준에 따라 적합성 여부를 판정받는다. 선정된 대상자는 2주간의 run-in period 후 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군에 무작위 배정되어 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 기능성 및 안전성 평가지표를 분석한다.</p>
연구대상자 수	목표 대상자 수는 60명(시험군, 대조군 각각 30명)으로 중도탈락률 25%를 고려하여 선정기준에 적합한 대상자를 총 80명 등록시키기로 한다. (서울대학교병원운영 서울특별시 보라매병원 및 서울대학교병원에서 각각 40명씩 등록)
연구대상자 선정기준	<p>다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 만 40세 이상 80세 미만의 성인 남성 3) 국제 전립선 증상점수(International prostate symptom score; IPSS)가 3-19점인 경증등증의 하부요로증상을 가진 남성
연구대상자 제외기준	<p>다음에 기술된 조건에 해당되는 자를 제외시킨다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 경직장초음파 상 전립선 용적이 40 mL 이상으로 전립선비대증 진행 가능성이 높은 경우 2) 혈중 전립선특이항원(Prostate specific antigen; PSA)이 4 ng/mL 이상인 경우 3) 최대 요속이 5 mL/s 미만 또는 15 mL/s 초과인 경우 4) 잔뇨량이 100 mL 이상인 경우 5) 다음의 의약품을 복용 중인 경우

	<ul style="list-style-type: none"> - 첫 방문 3개월 이내에 5-알파환원효소 억제제를 복용 중인 경우 - 첫 방문 1개월 이내에 알파차단제, 항콜린제, 베타-3 작용제를 복용 중인 경우 <p>6) 첫 방문 1개월 이내에 소팔메토 함유 건강기능식품을 섭취한 경우</p> <p>7) 다음에 해당하는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전립선염, 요로감염증, 급성요폐, 신경인성 방광 현증 - 전립선암 혹은 방광암의 현증 * 방광암은 소변검사를 통해 high power field에서 적혈구가 5개 이상으로 확인된 경우, 방광내시경 또는 urine cytology로 유무를 확인 함. - 전립선, 방광 혹은 요도에 외과적 수술을 받은 경우 - 당뇨병환자로서 당화혈색소(HbA1c) 검사결과 10%를 초과하는 경우 - 고혈압 환자로서 수축기 혈압이 180 mmHg 이상 또는 이완기 혈압이 110 mmHg 이상인 경우 - 담관폐쇄, 담낭농증을 포함한 담낭질환, 장폐색증, 담석이 있는 경우 - 중대한 감염성 질환의 현증 - 교정되지 않는 혈액질환 <p>8) 첫 방문 3개월 이내에 다음에 해당되는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> - 심근경색, 불안정협심증, 심부전(≥ NYHA class 2), 뇌졸중, 조절되지 않는 심실성 부정맥 - 알코올 및 약물 남용 <p>9) 임상적으로 유의미한 인지장애 혹은 정신과적 병력의 현증 및 과거력을 가진 경우</p> <p>10) 시험·대조식품이나 함유 성분에 과민증이 있거나 중증의 식품 알러지 반응 경험이 있는 자</p> <p>11) 첫 방문 1개월 이내에 다른 임상연구에 참여한 자</p> <p>12) 연구자가 본 연구에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 자</p>
<p>식이, 생활습관 지침</p>	<p>Run-in period부터 연구종료 시까지 아래 사항을 준수하되, 이외의 사항은 평소 식이 및 생활습관을 유지한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 산수유 또는 산수유가 함유된 식품, 건강기능식품 섭취 금지 2) 과일 및 채소 과량 섭취 제한(과일·과일주스 ≤ 2회 분량/일, 채소류 ≤ 6회 분량/일) 3) 환류(해조류 환, 채소 환 등), 엑기스류(양파즙, 마늘즙, 흑마늘즙, 호박즙 등), 보양식품(흑염소, 개소주 등) 섭취 금지 4) 제외기준에 명시된 의약품 및 건강기능식품 섭취 금지 5) 한약 복용 금지 6) 방문 24시간 이내에 카페인, 알코올 섭취 금지
<p>기능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국제 전립선 증상점수(IPSS) ▪ 과민성 방광 증상점수(Overactive bladder symptom score; OABSS) ▪ 전립선용적 ▪ 혈청 전립선특이항원(PSA), 테스토스테론 수준 ▪ 요속검사(uroflowmetry): 평균요속, 최대요속, 최대요속까지의 소요시간, 배뇨량, 잔뇨량
<p>안전성 평가</p>	<p>이상반응, 활력징후, 임상병리검사(혈액학적·혈액화학적 검사, 소변 검사)</p>

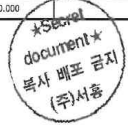
(11) 인체적용시험 시제품 생산

(가) 인체적용시험 시제품 생산

- 인체적용시험 시제품 생산은 건강기능식품 GMP를 보유하고 있는 서흥에서 진행함
- 인체적용시험 시험약과 대조약의 구분이 안 되게 하도록, 대조약에 천연색소(치자그린색소 및 카카오색소)를 추가하였음
- 또한, 인체적용시험 시험약과 대조약의 구분이 안 되게 하도록, 시험약과 대조약을 경질캡슐로 제조함

제품배합표				
중근단건강 / CKDHC-P29 임상용 캡슐 <고객용>				
1 제형: 경질캡슐				
2 제품유형: 임상시험용 제품				
3 내용량: 500mg/cap				
4 규격: #0, 8BR/8BR (녹색불투명) Lot No.: JDDC190901				
5 섭취방법: 1일 1회, 1회 2cap 물과 함께 섭취 Date: 2019. 10. 07				
6 성분: 천연녹갈-녹갈색의 분말을 내용물로한 녹색불투명색의 경질캡슐				
원료명	비율(%)	함량(mg)	1일 섭취량(mg)	비고
1 CKDHC-P29				고객사제공
2 유당혼합(유당 95%, 락토티린 5%)				
3 경질셀룰로스				
4 카로카베시의델셀룰로스나프톨				
5 스테아린산마그네슘				
6 이산화규소				
합계	100.000	500.000	1,000.000	

COMMENTS
1 섭취방법 1일 2cap, CKDHC-P29 800mg/day 섭취 요령함



제품배합표				
중근단건강 / CKDHC-P29 대조군 캡슐 <고객용>				
1 제형: 경질캡슐				
2 제품유형: 임상시험용 제품				
3 내용량: 400mg/cap				
4 규격: #0, 8BR/8BR (녹색불투명) Lot No.: JDFP190901				
5 섭취방법: 1일 1회, 1회 2cap 물과 함께 섭취 Date: 2019. 10. 07				
6 성분: 천연녹갈색의 분말을 내용물로한 녹색불투명색의 경질캡슐				
원료명	비율(%)	함량(mg)	1일 섭취량(mg)	비고
1 유당혼합(유당 95%, 락토티린 5%)				
2 경질셀룰로스				
3 카로카베시의델셀룰로스나프톨				
4 지황색천연색소				
5 스테아린산마그네슘				
6 이산화규소				
7 치자그린색소(치자그린-비지)				
8 카카오색소				
합계	100.000	500.000	1,000.000	

COMMENTS
1 임상용 제품의 내용물과 유사 색상 요령에 따라 천연색소 사용하여 함도



<인체적용시험 시험약 및 대조약 제품배합표>

(나) 인체적용시험 시제품 분석결과

1) 기능성분

- 인체적용시험 시험약과 대조약의 기능성분을 분석한 결과, 시험약에서는 기능성분(Morrnonside, Hederacoside D)이 확인되었으나, 대조약에서는 불검출로 확인되었음

시험 · 검사성적서

발행번호	TEBRC20191202-0002	접수번호	201911015-02
검사완료일	2019.12.02	검사연월일	2019.11.25
제품명	CKDHC-P29 인체적용시험약(시험군)		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형·제형·용량명	해당없음		
제조(수입)일	2018-11-02	유통(제조일자)기준	중근단건강(주)
의뢰자	(31723)충청남도 당진시 송악읍 복은1길 30		
소재지	전화번호: 010-6717-1460	팩번호: 02-312-4375	전자우편: kej763@ckdhc.com
제조원	업체명	소재지	제조국
시험·검사목적	기타(참고용)		

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
Morrnonside(mg/g)	기준없음	1.61	상기성분확인함	
Hederacoside D(mg/g)	기준없음	23.40	상기성분확인함	

중 알 판 정 : 상기성분확인함
시험관사명: 이효정 시험관사책임자: 최학주

비 고 :
* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
* 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과만을 별지로 작성 가능합니다.
* 검사결과를 광고하거나 용기 표지 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

시험 · 검사성적서

발행번호	TEBRC20191202-0001	접수번호	201911015-01
검사완료일	2019.12.02	검사연월일	2019.11.25
제품명	CKDHC-P29 인체적용시험약(대조군)		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형·제형·용량명	해당없음		
제조(수입)일	2018-11-02	유통(제조일자)기준	중근단건강(주)
의뢰자	(31723)충청남도 당진시 송악읍 복은1길 30		
소재지	전화번호: 010-6717-1460	팩번호: 02-312-4375	전자우편: kej763@ckdhc.com
제조원	업체명	소재지	제조국
시험·검사목적	기타(참고용)		

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
Morrnonside(mg/g)	기준없음	불검출	상기성분확인함	
Hederacoside D(mg/g)	기준없음	불검출	상기성분확인함	

중 알 판 정 : 상기성분확인함
시험관사명: 이효정 시험관사책임자: 최학주

비 고 :
* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
* 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과만을 별지로 작성 가능합니다.
* 검사결과를 광고하거나 용기 표지 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2) 잔류농약

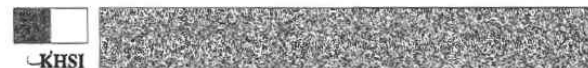
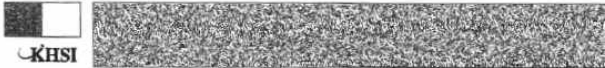
- 인체적용시험 시험약과 대조약의 잔류농약 58종을 분석한 결과는 아래와 같음
- 인체적용시험 대조약에서 잔류농약 58종은 모두 불검출로 확인되었음
- 인체적용시험 시험약에서 잔류농약 58종 중 Chlorothalonil이 0.0133mg/kg 검출되었으나 미량이었으며, 그 이외의 잔류농약은 불검출로 확인되었음

제 D2019111998 호 문서번호 D68B-SM4-4J26			
시험·검사성적서			
제출명	CKDHC-P29 인체적용시험약(시험군)	제조일자 (유통기한)	2019-11-16
시험인	업체명 중근달전장(주)	성 명	김효곤
	주소 충남 양산시 상곡읍 곡준1길 30	접수연월일	2019-11-20
제출번호		검사번호	D2019111998
검사의뢰목적	참고용		

귀하가 주위 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2019-12-03
 시험·검사 책임자: 이정규
 검사관련 총 책임자: 정원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	김효수
DDT(mg/kg)	불검출	김효수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김효수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김효수
Malathion(mg/kg)	불검출	김효수
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김효수
BHC(mg/kg)	불검출	김효수
Difenthrin(mg/kg)	불검출	김효수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김효수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김효수
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김효수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김효수
Ethion(mg/kg)	불검출	김효수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김효수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김효수

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김효수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김효수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captaf(mg/kg)	불검출	김효수
Quintozene(mg/kg)	불검출	김효수
Chlorothalonil(mg/kg)	0.0133 mg/kg	김효수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김효수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김효수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김효수
Trifosphos(mg/kg)	불검출	김효수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김효수
Trifluralin(mg/kg)	불검출	김효수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김효수
Faclobutrazol(mg/kg)	불검출	김효수
Parmethrin(mg/kg)	불검출	김효수
Fenprothion(mg/kg)	불검출	김효수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김효수
Phenothiaz(mg/kg)	불검출	김효수
Fenproprathrin(mg/kg)	불검출	김효수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	김효수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김효수
Frochloraz(mg/kg)	불검출	김효수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김효수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pinimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김효수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김효수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김효수
Chlorantraniliprole(mg/kg)	불검출	이선미



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Chlorobenzuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pipronil(mg/kg)	불검출	김효수
Lufenuron(mg/kg)	불검출	이선미
Tebuconazole(mg/kg)	불검출	김효수
2,6-Diisopropylsophthalene(mg/kg)	불검출	김효수

※ 위 판정은 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 시험이 수행된 경우 시험·검사 및 결과받은 것으로 최종 확정 가능합니다.
 ※ 판정여부는 판교를 통해 알립니다. 시험·검사를 하는 시험·검사를 위한 의뢰서 및 판교서 등에 사용될 수 없습니다.
 ※ 기타문의사항 또는 영수증의 재발급을 받으실 수 있습니다.

2019년 12월 03일

한국기능식품연구원



(사)한국기능식품연구원 부설 한국기능식품연구원 http://www.khssi.or.kr 전화번호 02-3316888-0400-1



<인체적용시험 시험약 잔류농약 분석결과>

제 D2019111997 호
본서확인 AMGC-P4Y8-DBWS

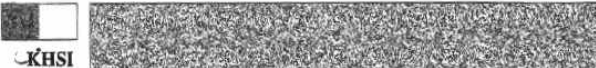
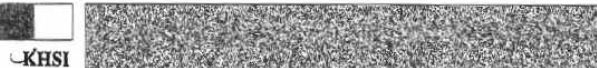
시험·검사성적서

제품명	CKDHC-P39인체적용시험약(대조군)	계조일자 (후봉기판)	2019-11-15
시험인	업적명 공인당인장(부) 주소 충남 양산시 승학동 복촌1길 30	성명	김조연
계조번호		검수년월일	2019-11-22
검사의뢰목적	참고용	검수번호	D2019111997

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2019-12-03
 시험·검사 확인자: 이정구
 검사관련 총 책임자: 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Difenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수
Beesallid(mg/kg)	불검출	이선미
Methoxyfenoside(mg/kg)	불검출	이선미
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Rndosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazali(mg/kg)	불검출	김용수

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Isoprotihlone(mg/kg)	불검출	김용수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captaf(mg/kg)	불검출	김용수
Quintazone(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefop(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Paclofuranol(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Penitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Penvalerate(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Penproprathrin(mg/kg)	불검출	김용수
Penhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorantraniliprole(mg/kg)	불검출	이선미



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Chlorobenzuron(mg/kg)	불검출	이선미
Fipronil(mg/kg)	불검출	김용수
Lufenuron(mg/kg)	불검출	이선미
Tebuconazole(mg/kg)	불검출	김용수
2,6-Diisopropylnaphthalene(mg/kg)	불검출	김용수

※ 위 관청은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 시험이 무작위인 경우 시험·검사 및 결과원은 별도로 작성 가능합니다.
 ※ 관청에서는 불검출 일지외에 시험·검사뢰하신 시험·검사항목 이외의 항목 및 항목도 상세히 사용하지 않습니다.
 ※ 자가용시험사 또는 정부기관 외의 적용 용도로 활용될 수 없습니다.

2019년 12월 03일

한국농수산식품연구원

(사)한국농수산식품연구원 부설 한국농수산식품연구원 <http://www.khsti.or.kr> 전화번호 (02) 6200-1111 팩스번호 (02) 6200-1112 E-mail: khsti@khsti.or.kr S1628-0400-1



<인체적용시험 대조약 잔류농약 분석결과>

3) 중금속 및 대장균

- 인체적용시험 시험약과 대조약의 중금속 및 대장균을 분석한 결과는 아래와 같음
- 인체적용시험 시험약과 대조약의 중금속 분석결과, 총 비소, 총 수은, 납은 모두 불검출로 확인되었으며, 카드뮴은 0.0 mg/kg으로 확인됨
- 인체적용시험 시험약과 대조약의 대장균군 분석결과, 모두 음성으로 확인되었음

대전대학교
신분서 확인번호 : 3LGB-ZMRB-SAWI-RT4D

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191129-0004	원수번호	190100430-002
검사완료일	2019-11-29	접수완료일	2019-11-29
제품명	CCKHC-P29 인체적용시험약 (시험용)		
(등록)제조번호	음북제조신고번호		
유형 · 제형 · 용역명			
제조(수입)일	2018-11-02	유통(출발)지(기타)	입체명 (중근당산(간주))
의뢰자	성명 김주은	소재지	[31723충청남도 당진시 송악읍 복촌1길 30] 전화번호: 010-6717-1460 팩스번호: 02-312-4375 전자우편: kg763@kshc.com
재주위	업체명	소재지	제조국
시험 · 검사목적	식품 (기타(참고용))		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
대장균군	기준없음	음성	상기사항확인함	정상
총 비소(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
총 수은(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
납(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.0	상기사항확인함	

종합판정: 상기사항확인함
 시험검사사용: 김진실, 김진미
 시험검사책임자: 이희정, 최학주

비고:

* 위 판정은 의뢰한 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 * 시간이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.
 * 검사결과를 검토하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

대전대학교
신분서 확인번호 : PHIL-SCON-KV13-71NS

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191129-0003	원수번호	190100431-001
검사완료일	2019-11-29	접수완료일	2019-11-29
제품명	CCKHC-P29 인체적용시험약 (대조용)		
(등록)제조번호	음북제조신고번호		
유형 · 제형 · 용역명			
제조(수입)일	2018-11-02	유통(출발)지(기타)	입체명 (중근당산(간주))
의뢰자	성명 김주은	소재지	[31723충청남도 당진시 송악읍 복촌1길 30] 전화번호: 010-6717-1460 팩스번호: 02-312-4375 전자우편: kg763@kshc.com
재주위	업체명	소재지	제조국
시험 · 검사목적	식품 (기타(참고용))		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
대장균군	기준없음	음성	상기사항확인함	정상
총 비소(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
총 수은(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
납(mg/kg)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.0	상기사항확인함	

종합판정: 상기사항확인함
 시험검사사용: 김진실, 김진미
 시험검사책임자: 이희정, 최학주

비고:

* 위 판정은 의뢰한 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 * 시간이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.
 * 검사결과를 검토하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소센터
 34520 대전광역시 동구 대학로62 산학협력관 325호 직 1:042-280-2645

대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소센터
 34520 대전광역시 동구 대학로62 산학협력관 325호 직 1:042-280-2645

<인체적용시험 시험약 및 대조약의 중금속, 대장균 분석결과>

4) 영양성분

- 인체적용시험 시험약과 대조약의 영양성분을 분석한 결과는 아래와 같음
- 인체적용시험 시험약의 영양성분 분석결과, 열량 379.6 Kcal/100g, 탄수화물 86.4 g/100g, 단백질 1.3 g/100g, 지방 3.2 g/100g, 나트륨 286.1 mg/100g으로 확인됨
- 인체적용시험 대조약의 영양성분 분석결과, 열량 379.9 Kcal/100g, 탄수화물 94.0 g/100g, 단백질 0.3 g/100g, 지방 0.3 g/100g, 나트륨 291.5 mg/100g으로 확인됨

대전대학교
신분서 확인번호 : BIOC-M3B-EDF G-PLUP

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191129-0002	원수번호	190100430-002
검사완료일	2019-11-29	접수완료일	2019-11-29
제품명	CCKHC-P29 인체적용시험약 (시험용)		
(등록)제조번호	음북제조신고번호		
유형 · 제형 · 용역명			
제조(수입)일	2018-11-02	유통(출발)지(기타)	입체명 (중근당산(간주))
의뢰자	성명 김주은	소재지	[31723충청남도 당진시 송악읍 복촌1길 30] 전화번호: 010-6717-1460 팩스번호: 02-312-4375 전자우편: kg763@kshc.com
재주위	업체명	소재지	제조국
시험 · 검사목적	식품 (기타(참고용))		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
열량(kcal/100g)	기준없음	379.6	상기사항확인함	
탄수화물(g/100g)	기준없음	86.4	상기사항확인함	
단백질(g/100g)	기준없음	1.3	상기사항확인함	
지방(g/100g)	기준없음	3.2	상기사항확인함	
나트륨(mg/100g)	기준없음	286.1	상기사항확인함	

종합판정: 상기사항확인함
 시험검사사용: 김예원, 김진실
 시험검사책임자: 이희정, 최학주

비고:

* 위 판정은 의뢰한 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 * 시간이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.
 * 검사결과를 검토하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

대전대학교
신분서 확인번호 : SBVT-FGV65-E2DUJ-V64M

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191129-0001	원수번호	190100430-001
검사완료일	2019-11-29	접수완료일	2019-11-29
제품명	CCKHC-P29 인체적용시험약 (대조용)		
(등록)제조번호	음북제조신고번호		
유형 · 제형 · 용역명			
제조(수입)일	2018-11-02	유통(출발)지(기타)	입체명 (중근당산(간주))
의뢰자	성명 김주은	소재지	[31723충청남도 당진시 송악읍 복촌1길 30] 전화번호: 010-6717-1460 팩스번호: 02-312-4375 전자우편: kg763@kshc.com
재주위	업체명	소재지	제조국
시험 · 검사목적	식품 (기타(참고용))		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
열량(kcal/100g)	기준없음	379.9	상기사항확인함	
탄수화물(g/100g)	기준없음	94.0	상기사항확인함	
단백질(g/100g)	기준없음	0.3	상기사항확인함	
지방(g/100g)	기준없음	0.3	상기사항확인함	
나트륨(mg/100g)	기준없음	291.5	상기사항확인함	

종합판정: 상기사항확인함
 시험검사사용: 김예원, 김진실
 시험검사책임자: 이희정, 최학주

비고:

* 위 판정은 의뢰한 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 * 시간이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.
 * 검사결과를 검토하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소센터
 34520 대전광역시 동구 대학로62 산학협력관 325호 직 1:042-280-2645

대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소센터
 34520 대전광역시 동구 대학로62 산학협력관 325호 직 1:042-280-2645

<인체적용시험 시험약 및 대조약 영양성분 분석결과>

(12) 공인분석 기관 분석의뢰

- 식품의약품안전처의 개별인정형 원료 신청을 위한 제출자료를 사용하기 위해, 멸균복합추출물의 공인분석 검사를 수행함
- 공인분석 검사를 통하여, 원료 자체의 안전성을 확보하고 개별인정 원료 신청을 위한 기초자료로 활용할 수 있음

(가) 영양성분정보자료

- 멸균복합추출물의 영양성분을 한국기능식품연구원에서 분석한 결과 아래와 같이 분석됨

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

성분	합량	성분	합량
열량(Kcal/100 g)	388	수분(%)	5.1
탄수화물(%)	85	회분(%)	3.7
조지방(%)	5	나트륨(mg/100 g)	59.7
조단백질(%)	2		

(나) 성상

- 멸균복합추출물의 성상을 검사한 결과, 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 녹갈색 분말로 확인됨

(다) 곰팡이독소

- 멸균복합추출물의 곰팡이독소(총아플라톡신)를 검사한 결과, 불검출로 확인되어 곰팡이 독소에 대한 안전성이 확인됨

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

시험항목		실측치 (시험성적서)		
곰팡이 독소 (µg/kg)	총아플라톡신	불검출	불검출	불검출

(라) 중금속 및 대장균군

- 멸균복합추출물의 중금속과 대장균군을 한국기능식품연구원에서 분석한 결과 아래와 같이 분석됨
- 납, 카드뮴, 총비소, 총수은에 대한 중금속 검사 결과, 1ppm 미만으로 검출됨을 확인함
- 미생물(대장균군) 검사 결과, 음성으로 나타남

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

시험항목		실측치 (시험성적서)		
중금속 (mg/kg)	납	0.0202	0.0191	0.0186
	총비소	0.0114	0.0137	0.0137
	카드뮴	0.0006	0.0003	0.0003
	총수은	0.0039	0.0043	0.0037
미생물	대장균군	음성	음성	음성

제 D2021022591 호
문서확인 A819-S4U7-SD10

시험·검사성적서

제품명	멸곡복합추출물2	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업제명	종근당건강(주)	성명
	주소	충남 당진시 송악읍 복문1길 30	김포곤
제조번호	18C18005002	접수년월일	2021-02-25
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D0021022591

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2021-03-04
 시험·검사 책임자: 이정구, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0191 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0137 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0003 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0043 mg/kg	노성직
대장균군	음성	강문현
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	안주혜

끝.

■ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ■ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사항목 이외의 참고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.
 ■ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
 ■ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과안은 별지로 작성 가능합니다.

2021년 03월 04일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 무선 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 02-831-8628-8400-1



제 D2021022592 호
문서확인 SH74-42PW-276R

시험·검사성적서

제품명	멸곡복합추출물3	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업제명	종근당건강(주)	성명
	주소	충남 당진시 송악읍 복문1길 30	김포곤
제조번호	18C18005003	접수년월일	2021-02-25
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D0021022592

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2021-03-04
 시험·검사 책임자: 이정구, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0186 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0137 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0003 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0037 mg/kg	노성직
대장균군	음성	강문현
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	안주혜

끝.

■ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ■ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사항목 이외의 참고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.
 ■ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
 ■ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과안은 별지로 작성 가능합니다.

2021년 03월 04일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 무선 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 02-831-8628-8400-1



<중금속, 대장균군, 곰팡이독소 한국기능식품연구원 성적서>

(마) 잔류농약 검사 결과 (65종)

- 65종의 잔류농약 검사 결과, cyhalothrin, chlorothalonil, chlorpyrifos를 제외하고 모두 불검출로 확인됨. 그러나 Cyhalothrin, chlorothalonil, chlorpyrifos의 검출량은 모두 1 ppm 미만의 미량이므로, 농약에 대한 안전성을 입증함

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

제 D2021022590 호
분석확인 6979-LE2M-69K3

시험·검사성적서

제품명	멸종박합수출물	제조일자 (유통기한)	
시험인	염서명 송근영(주)	실험명	김호관
주소	충남 당진시 송악읍 복촌4길 30		
제품번호	LHC180001	합수년월일	2021-02-25
검사기관명	제출용	접수번호	D2021022590

귀하가 우리 연구원에 시험·검사를 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 일자: 2021-03-12
 시험·검사 책임자: 이운영, 이정규, 강경순
 검사관련 유 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0202 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0114 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0006 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0039 mg/kg	노영식
대장균군	유일	강문선
열량(Kcal/100g)	387.77 Kcal/100g	허준
탄수화물(%)	86.89%	허준
포도당(%)	1.86%	이재연
조지방(%)	4.53%	장재인
수분(%)	3.06%	조재인
회분(%)	3.66%	윤재인
나트륨(mg/100g)	59.88 mg/100g	윤재인
지방	표유의 함기가 있고 이비, 이위가 있는 농산물 부류	박윤진
중아플라톡신(μg/kg)	불검출	민주혜
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dieldrin(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	박연희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출	박연희
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	박연희
Cyhalothrin(mg/kg)	0.0195 mg/kg	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	박연희
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	박연희
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수
Iprocten(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	박연희
Carbofuran(mg/kg)	불검출	박연희
Captan(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorothalonil(mg/kg)	0.0147 mg/kg	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	0.0184 mg/kg	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Trioxophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	박연희
Paclotrazin(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Fenproprathrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	박연희
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	박연희
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	박연희
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	박연희
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorantraniliprole(mg/kg)	불검출	박연희
Chlorobenzuron(mg/kg)	불검출	박연희
Fipronil(mg/kg)	불검출	김용수
Lufenuron(mg/kg)	불검출	박연희
Tebuconazole(mg/kg)	불검출	김용수
Z,6-Diisopropynaphthalene(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Carbendazim(mg/kg)	불검출	박연희
Thiabendazole(mg/kg)	불검출	박연희
Clothianidin(mg/kg)	불검출	박연희
Difenoconazole(mg/kg)	불검출	김용수
Pyridaben(mg/kg)	불검출	김용수
Imidacloprid(mg/kg)	불검출	박연희
Piperonyl butoxide(mg/kg)	불검출	김용수
Toltenporad(mg/kg)	불검출	김용수
Diflubenzuron(mg/kg)	불검출	박연희

분.

※ 위 표장은 신뢰된 시험·검사 항목임을 내장으로 한 것입니다.
 ※ 본성적서는 결과를 알리지 않습니다. 시험·검사는 의뢰한 시험·검사항목에 의거하여 알리고 필요 시에 수정할 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증과 관련이 있습니다.
 ※ 시험이 무효한 경우 시험·검사 및 결과서는 변조될 수 없습니다.

2021년 03월 12일
한국기능식품연구원

(사)한국기능식품협회 후원 한국기능식품연구원 http://www.khsr.or.kr 전화번호 02-950-11628-0400-1



<잔류농약 65종 한국기능식품연구원 성적서>

(13) 지적재산권 확보

(가) 지적재산권 2건 출원 및 1건 등록 완료

- **멸꿀복합추출물의 전립선 건강에 대한 지적재산권을 획득하기 위해 지적재산권 1건(출원번호: 10-2018-0101933)을 출원하였음.** 해당 특허는 특허청에서 진보성과 신규성을 인정받아 2020년 특허등록원부(등록번호: 10-2167290)에 등록되었음
- **산수유 주정추출물의 전립선 건강에 대한 지적재산권을 획득하기 위해 지적재산권 1건(출원번호: 10-2021-0163382)을 출원하였음**

순번	특허명	상태
1.	멸꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물	등록
2.	산수유 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물	출원

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2018.08.29
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2018-0101933 (접수번호 1-1-2018-0857439-10)
출원인명칭 종근당건강 주식회사(1-1998-100525-0)
대리인성명 출현경(9-2008-000792-1)
발명자성명 박성선 조경원 정주영 김영호
발명의명칭 멸꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기안코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허료(patent.go.kr) 검색 > 민원서비스(민원포드) > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받으려는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마포-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원권 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자특허출원서(PTO/SB39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 출원서류를 제출하여야 합니다.
- 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
- 기타 심사 절차에 관한 사항은 등록된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

<특허출원 통지서>

**관인생략
출원번호통지서**

출원일자 2021.11.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P82021042)
출원번호 10-2021-0163382 (접수번호 T-1-2021-1357640-14) (DAS접근코드28C2)
출원인명칭 종근당건강 주식회사(1-1998-100525-0)의 1명
대리인성명 김보영(9-2011-000566-1)
발명자성명 박성선 조경원 정주영 김영호
발명의명칭 산수유 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
- 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기안코드) + 접수번호
- 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
- 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

특허증

CERTIFICATE OF PATENT

특허
Patent Number

제 10-2167290 호

출원번호
Application Number

제 10-2018-0101933 호

출원일
Filing Date

2018년 08월 29일

등록일
Registration Date

2020년 10월 13일



발명의 명칭 Title of the Invention

얼굴 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청

Korean Intellectual
Property Office

2020년 10월 13일

특허청장

COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김용래

<특허증>



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요



(14) 개별인정형 신청서류 작성 및 신청

- 신청원료 멸균복합추출물의 개별인정 신청서 초안은 작성 완료하였으며, 인체적용시험에 대한 IRB 종료심의회가 완료된 후, 2022년 2Q 이내로 식약처에 개별인정 신청서를 제출할 예정임

1. 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(☑최초, □변경)*

업 체 명(기관명)		종근당건강(주) (대표자 : 김호곤)				
영업의 종류		건강기능식품 제조업	허가/신고/등록번호	134-81-29992		
주소 및 연락처		* 충청남도 당진시 송악읍 0000 돌				
		* (연락처) 02-000-0000		(팩스) 02-000-0000		
		담당자	(이름) 진○정	(연락처) 010-0000-0000		
신청 원료명		멸균복합추출물				
심사 대상 분류	개별인정 원료	새로운 원료	<input checked="" type="checkbox"/>	신청 가능성	전립선 건강에 도움	
				신청 섭취량	멸균복합추출물로서 800mg/일	
		가능성 추가	<input type="checkbox"/>	(변경 전)		
		섭취량 변경	<input type="checkbox"/>	(변경 후)		
		제조방법 변경	<input type="checkbox"/>			
			가능규격 변경	<input type="checkbox"/>		
			시험방법 변경	<input type="checkbox"/>		
			기타 변경	<input type="checkbox"/>		
		고시된 원료	가능성 추가	<input type="checkbox"/>	(변경 전)	
				<input type="checkbox"/>	(변경 후)	
			<input type="checkbox"/>			
			<input type="checkbox"/>			
			<input type="checkbox"/>			
		<input type="checkbox"/>				
		<input type="checkbox"/>				
국내제조 수입	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국	
			제조회사			
			소재지			
모듬토의	<input type="checkbox"/>	실시 날짜 :				
국가지원과제	<input checked="" type="checkbox"/>	지원 기관 : 농림식품기술기획평가원				

- (최초) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료
- (변경) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

<제출자료의 총괄 요약본>

(15) 제품화 및 매출액

- 본 연구를 통해 생산된 멸균복합추출물을 이용하여 시제품 1건을 생산하였으며, 본 연구를 통해 생산된 산수유추출분말이 함유된 제품 1건을 출시하였음
- 산수유추출분말을 함유한 ‘시원하다 전립센’ 제품은 2021년(4~10월)에 725,351,128원 매출을 일으키고 있음
- 본 과제를 통해 생산된 멸균복합추출물을 사용하기 위하여 출원특허의 기술실시를 하였으며 2020년도에 농촌진흥청에 7,168,000의 금액에 해당하는 기술료를 납부하였음



<시원하다 전립센 제품 사진>

제 200400200071677 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영입허가(번호) : 20040020007

○ 입 소 영 : (주)한국씨엔에스엘

○ 소 재 지 : 충청북도 음성군 원남면 삼경로 16


○ 영 입 의 종 류 : 건강기능식품전문제조업

○ 재 품 명 : 시원하다 전립선 (품목유·소말메토·골매·수술후, 이면, 말간)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (유족 작성)
 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품 품목제조신고를 수리합니다.

2016년 07월 25일

대전지방식품의약품안전청장




제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격

제품명	시원하다 전립선
상위방법	1일 1회, 1회 1캡슐을 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	1) 복이제임, 알레르기 제질의 경우 성분을 확인하시고 섭취장에 주시가 바랍니다. 2) 어린이의 경우 섭취 시 꼭에 곁필 우려가 있으니 보호자의 지도하에 섭취하시기 바랍니다. 3) 성인남성만 섭취할 것 4) 수술 전후, 출혈성 질환이 있거나 항응고제 등 복용 시 전문가와 상담할 것 5) 알레르기 제질 등은 개인에 따라 과민반응을 나타낼 수 있음 6) 예스캐복 등 소화제들의 병행용과 성상을 유발할 수 있으니 식사 후 섭취할 것 7) 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 전문가와 상담할 것
포장방법	PTP포장, PE방포장, PET방포장
포장단위	600 mg x 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 90, 100, 112, 120, 150, 160, 180, 200, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 400, 420, 450, 480, 540, 600, 720 캡슐
포장재질	PE, PET, PVC, AL-foil
성상	고유의 향미가 있고 이면, 이취가 없는 주황색 내용물을 함유한 투명한 갈색의 정방형 연질캡슐
기능성내용	[소말메토·말메추출물] 전립선 건강의 유지에 도움을 줄 수 있음. [이면] ①정신적인 연약기능에 필요②정력강화제 성분보충에 필요 [말간] ①정력 향상에 필요②에너지 이용에 필요③유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요
제조방법	① 원료의 구입 및 선별 : 원료는 건강기능식품의 제조기준 및 규격에 적합한 원료를 선별하여 극대화에서 구입한다. ② 포장 : 각 용량을 전자동용 사용하며 권장한다. ③ 캡슐기재 제조 : 캡슐기재 원료를 용액탱크에 넣고 일정시간 혼합



제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격

제조방법	한 뒤 진공 혼합하여 캡슐기재를 만든다. ④ 내용물 제조 : 캡슐기재 원료를 제외한 원료를 혼합기에 투입한 후 교반 및 혼합한다. ⑤ 충전 및 성형 : 제조된 캡슐기재와 내용물을 사용하여 성형기에서 제품 기준규격에 맞게 일괄하게 충전 및 성형한다. ⑥ 건조 및 선별 : 충전, 성형된 제품에 대해 건조를 이행하여 건조 후 건조실에서 건조한다. 건조 완료한 캡슐기재를 선별기를 이용하여 이면 및 성형 중 불량인 나 캡슐을 선별한다. ⑦ 포장 등 : 검사결과 적합한 제품에 대해 포장단위에 따라 포장된 후 유통기한 등을 표시한다. ⑧ 자기품질검사 : 포장완료된 제품을 제품규격에 따라 자기품질검사를 실시한다. ⑨ 보관 및 출하 : 자기품질검사 결과 적합한 제품에 한하여 보관 및 출하한다.
제품의 형태	캡슐
기준과 규격	1) 성 상 : 고유의 향미가 있고 이면, 이취가 없는 주황색 내용물을 함유한 투명한 갈색의 정방형 연질캡슐 2) 로트산 : 표시량의 80-120% (표시량 : 115 mg / 600 mg) 3) 이 면 : 표시량의 80-150% (표시량 : 8.5 mg / 600 mg) 4) 말 간 : 표시량의 80-150% (표시량 : 3 mg / 600 mg) 5) 남(ng/kg) : 1.0 이하 6) 비소(mg/kg) : 1.0 이하 7) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하 8) 수은(mg/kg) : 1.0 이하 9) 대장균군 : 음성 10) 폐해 : 적함 (20분 이내)
보존 및 유통기준	직사광선을 받지 아니하는 서늘한 곳에서 보관 및 유통하시고, 어린이의 손에 닿지 않도록 주의하시기 바랍니다.
유통기간	제조일로부터 24개월
기타	



기능성원료(기능성을 표시하고자 하는 원료)

No.	원재료명 또는 성분명	혼합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	소말메토·말메추출물(고시황)	69.452%	(28%)	
2	출산이면	7.155%	(22%)	
3	말산말간	1.71%	(32.5%)	

기타원료

No.	원재료명 또는 성분명	혼합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	포도씨유	15.172%		
2	말남	5%		
3	대두레시던	1%		
4	출박씨유	1%		
5	β-a-도코놀롤	0.5%	(6%)	
6	산수유추출분말	0.01%		

캡슐원료

No.	원재료명 또는 성분명	혼합비율(%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	황라당	41.2%		
2	황제수	37.25%		
3	글리세린	19.5%		
4	카라멜색소	1.25%		
5	모질에릭물색소	0.5%		
6	해탈미닐란	0.3%		



<시원하다 전립선 제품 품목제조신고증>

- 개별인정 허가 획득 후, 멸꿀복합추출물을 이용하여 제품화를 준비 중임
- 의약품 및 타사제품과 비교하였을 때, 부작용이 없고 효능이 우수함. 또한, 국내산 원료를 이용한 전립선 건강 개별인정원료가 거의 없어, 멸꿀복합추출물을 이용한 제품은 충분히 시장성이 있을 것으로 판단됨

신규소재(전립선 건강 소재) 제품화

- 1) 기존 원료 대비 훌륭한 효과 (쓰팔메토 대비 우수한 효능)
- 2) 쓰팔메토 대비 높은 원가
(쓰팔메토 - 지표성분 환산기준 410mg/Day, 13만원/kg, 연구소재 - 722mg/Day, 75.3만원/kg)
- 3) 신규 국내산 원료로, 시장성 충분할 것으로 판단함

유형	건강기능식품		의약품	
원료명	쓰팔메토	멸꿀 등 복합물	피나스테리드	테라조신
작용기전 (메인 효과)	1. 5α-환원효소 억제 (전립선 비대 억제)	1. 5α-환원효소 억제 2. α-자단제 억제 3. PDE5 억제 (전립선 비대억제, 혈관 확장을 통한 평활근 이완)	1. 5α-환원효소 억제 (전립선 비대억제)	1. α-자단제 (혈관 확장을 통한 평활근 이완)
제형	연질캡슐	정제 또는 연질 (안정성 검토 필요)		
원료 인지도	쓰팔메토 > 멸꿀, 산수유		-	
원료가	13만원/kg (중국산)	75.3만원/kg (국산)		
섭취량	410mg / day (지표성분 28% 기준 토르산 115mg 섭취)	722mg / day	5mg / day	
완제품 원가	3,420원 (자사 전립선프라임 기준)	18,500원 (개별인정 단독처방기준)	-	
소비자가 (1개월)	14,900원 (홍쇼핑)	85,000원 (홍쇼핑)(E)	10,000 ~ 20,000원 사이 (보험가 적용에 따라 상이)	

전립선 제품 비교표

제품명	CJ 전립소 쓰팔메토	시원하다 전립선	시원하다 전립선 프리미엄	베스처 맨파워 쓰팔메토	(신규소재)
제품사진					
제형	연질캡슐(PTP)	연질캡슐(PTP)	연질캡슐(PTP)	연질캡슐(병)	정제 or 연질 (검토 필요)
규격	500mg x 60C (2개월분)	600mg x 60C (2개월)	800mg x 30C (1개월)	1,300mg x 180C (6개월)	1,000mg x 30T (1개월)
1일 섭취량	1일 1회, 1회 1C				1일 1회, 1회 1T
기능성분	쓰팔메토	쓰팔메토, 망간, 아연	쓰팔메토, 망간, 아연 은행잎, 비타민E	쓰팔메토, 옥타, 아연, 비타민B군 복합	멸꿀 등 복합추출물 망간, 아연, 비타민B군
소비자가격	6,150원 (1개월)	6,000원 (1개월)	15,300 (1개월)	5,000원 (1개월)	85,000원 (1개월, 홍쇼핑) 36,000원 (1개월, 온라인)
특장점	국내 최초 개별인정 국내 No.1 전립선 브랜드 2.4분에 1개씩 판매	3중 복합기능성 전립선 건강을 위한 항산화 포플레이션	5중 복합기능성 혈관 확장을 위한 은행잎 처방	8중 복합기능성 캐나다 직수입제품	신규 개별인정소재 전립선 건강
판매원	CJ헬스케어	㈜중근당건강		헬스벨런스㈜	㈜중근당건강
유통채널	홍쇼핑(data), 온라인	온라인	홍쇼핑(data)	온라인	미정
매출액 (M/S)	200억원 ('18년)	4억원 ('18년)	20억원 ('18년)	7억원 ('18년)	-

<멸꿀복합추출물 제품화 검토>

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

세부구분	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
주관연구기관 겸 제1세부 종근당건강(주)	원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정	<ul style="list-style-type: none"> ■ 수율 확인을 통해 최적 추출기술 확인 ■ 3 Lot 생산을 통한 공정표준설정 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국내 자생소재 18종 중 복합원료 선정 ■ 수율 확인을 통해 최적 추출기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 부위별, 채취 시기별, 용매별, 추출 횟수별 ■ 3 Lot 생산을 통한 공정표준설정 완료
	복합소재 제제검토	<ul style="list-style-type: none"> ■ 품질관리 지표 설정을 위한 함량측정기준 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성분 함량, 미생물, 중금속 등 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 복합소재의 기준 및 시험항목 설정 ■ 분석법이 확립된 복합소재 원료에 대하여 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법(안) 항목설정
	안정성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 복합소재에 대한 원료 안정성 검사 <ul style="list-style-type: none"> - 장기, 가속실험으로 안정성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 복합소재에 대한 원료 안정성 검사 및 유통기한 설정 완료
	안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 복합소재의 단회, 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험 수행 ■ 복합소재의 소핵시험, 염색체이상시험, 복귀돌연변이시험 수행 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 복합소재로 단회, 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험과 염색체이상시험, 소핵시험, 복귀돌연변이시험을 수행한 결과, 모든 시험에서 독성이 발견되지 않음
	인체적용시험 시제품 생산 및 수행	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 건강 인체적용시험 대상자, 바이오마커 선정 및 프로토콜 확립 ■ 인체적용시험 시험약 및 대조약 생산 및 분석 ■ 전립선건강 인체적용시험 진행 및 인체적용시험 완료 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 건강 인체적용시험 대상자, 바이오마커 선정 완료 ■ 전립선 건강 인체적용시험 프로토콜 확립 완료 ■ 시험약 및 대조약 구분 어려운 인체적용시험 시제품 생산 완료 ■ 인체적용시험 시험약 및 대조약 분석 완료 ■ 인체적용시험 완료
	지식재산권 확보	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 건강 개선 제품 개발을 위한 지식재산권 확보 방안 모색, 지식재산권 출원 및 등록 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 지식재산권 2건 출원 완료 ■ 지식재산권 1건 등록 완료
	개별인정 신청	<ul style="list-style-type: none"> ■ 개별인정 신청서 작성 ■ 개별인정 신청에 필요한 성적서 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 개별인정신청서 작성 ■ 개별인정신청에 따른 성적서 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 대장균균, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약(65종), 곰팡이독소, 영양성분 및 기능성분 분석

	제품화	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 건강 개선 제품화 전략 수립 ■ 전립선 건강 개선 제품화 및 매출 발생 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 건강 개선 제품화 전략 수립 완료 ■ 전립선 건강 개선 제품 2건 개발 ■ 매출액 725백만원 발생
제1협동기관 충남대학교 수의학과	세포 활성평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 세포주를 이용하여 원료의 생리활성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 독성평가: MTT assay ■ 활성측정: PSA 및 AR 활성, 5α reductase 2
	전립선질환 모델 동물활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선질환을 유도한 동물평가모델에서 효능평가 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 동물활성평가 결과, 전립선건강 개선 효능 확인 - 전립선 무게, DHT, testosterone 감소 등
	메카니즘 규명	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전립선 비대증 억제 메카니즘 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 세포활성, 동물활성 평가 결과를 바탕으로 전립선 비대증 억제 메커니즘 확인
위탁연구기관 충남대학교 약학과	항산화활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 항산화 활성 평가를 통한 원료 스크리닝 - 용매별, 원료별 항산화 활성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 국내 자생소재 18종의 원료 스크리닝 ■ DPPH, ABTS 측정 - 용매별, 원료별 항산화 활성 조사 완료
	지표성분 동정 및 분석법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ■ 지표성분 분리 정제 및 구조동정 ■ 지표성분 2종에 대한 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 각종 컬럼크로마토그래피를 통한 멀꿀의 지표성분 분리정제 및 구조동정 ■ HPLC를 이용하여 지표성분에 대한 분석조건을 확립

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계	계	가중치 (%)
			(2017~2021년)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCI)	목표	2	2	
		실적	5	5	
	논문 (비SCI)	목표	2	2	0
		실적			
	평균 IF	목표			
		실적	2.75	2.75	
	학술발표	목표	2	2	5
		실적	4	4	
	특허출원	목표	2	2	5
		실적	2	2	
특허등록	목표	1	1	10	
	실적	1	1		
품종등록	목표	1	1	10	
	실적	0	0		
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표	1	1	
		실적	1	1	
	기술료	목표			
		실적	7,168	7,168	
	제품화	목표	1	1	20
		실적	2	2	
	매출액	목표	200,000	200,000	20
		실적	725,351.128	725,351.128	
	고용창출	목표	4	4	20
		실적	5	5	
	교육지도	목표	2	2	
		실적	2	2	
	인력양성	목표	2	2	5
		실적	4	4	
홍보전시	목표	2	2	5	
	실적	2	2		
계	목표	200,022	200,022		
	실적	732,550	732,550		

(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	Isolation, structural elucidation, and insights into the anti-inflammatory effects of triterpene saponins from the leaves of <i>Stauntonia hexaphylla</i>	Bioorganic & medicinal chemistry letters	Le Ba Vinh	29(8)	England	Elsevier	SCIE	2019.02.21	0960-894X	100
2	Bioactive triterpene glycosides from the fruit of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and insights into the molecular mechanism of its inflammatory effects	Bioorganic & medicinal chemistry letters	Le Ba Vinh	29 (16)	England	Elsevier	SCIE	2019.07.05	0960-894X	100
3	The chemical constituents of ethanolic extract from <i>Stauntonia hexaphylla</i> leaves and their antiinflammatory effects	Natural Product Research	Le Ba Vinh	-	United Kingdom	Medline	SCIE	2019.07.15	1478-6427	100
4	The therapeutic effects of <i>Stauntonia hexaphylla</i> in benign prostate hyperplasia are mediated by the regulation of androgen receptors and 5 α -reductase type 2	Journal of Ethnopharmacology	Geum-Lan Hong	250	England	Elsevier	SCIE	2019.12.05	0378-8741	100
5	Protective effects of combination of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and <i>Cornus officinalis</i> on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia through inhibition of 5 α -reductase type 2 and induced cell apoptosis	Plos one	Shanika Karunasagara	15(8)	United Kingdom	Medline	SCIE	2020.08.13	1932-6203	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	Interantional conference on Tranditional Medicine Phytochemistry and Medicinal Plants	Da-Young Jung, Ju-Young Jung	2018.10.16	HILTON NARITA	Japan
2	제62회 한국분석과학회 춘계학술대회	GAO Dan	2019.05.16	강릉 세인트존스 호텔	한국
3	FACULTY OF VETERINARY MEDICINE KASETSART UNIVERSITY CERTIFIVATE OF ATTENDANCE	Geum-Lan Hong	2019.06.13	Princess Chulabhorn international conference centre	Thailand
4	The 50 th Annual Meeting and Symposium of the Korean Society of Pharmacognosy	Geum-Lan Hong	2019.11.28	서울 드래곤시티호텔	한국

[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	벌꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물	한국	종근당 건강(주)	2018.08 .29	10-2018- 010193 3	10-2167 290	종근당 건강(주)	2020.10 .13	10-2167 290	100	X
2	산수유 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물	한국	종근당 건강(주), 충남대학 교 산학협력 단	2021.11 .24	10-2021- 016338 2	-	-	-	-	100	X

○ 지식재산권 활용 유형

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√(예정)									
2	√									

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	전립선 건강개선 식품 (시제품)	2020-12-02	종근당건강(주)	-	식품	6개월	-	-
2	시원하다 전립센	2021-03-18	종근당건강(주)	-	건강기능식품	6개월	-	-

□ 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	특허출원	벌꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물	종근당건강(주)	2018.08.29	7,168천원	7,168천원

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계(천원)	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
시원하다 전립센	2021	725,351.128	-	725,351.128	매출집계표
합계		725,351.128		725,351.128	매출집계표

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)				합계
			2017년	2018년	2019년	2020년	
1	벌꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 기능성·전통식품 연구개발	종근당건강(주)	1	1	2	1	5
합계			1	1	2	1	5

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	12
		생산인력	13
	개발 후	연구인력	17
		생산인력	13

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	석사	2018		2				2		2				
2	박사	2019	1					1		1				
3	석사	2019		1			1			1				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
1	건강기능식품의 최신 연구 및 개발동향	건강기능식품과 프로바이오틱스의 최신 연구 및 개발동향을 주제로 세미나 진행	충남테크노파크	1	3	15
2	The nutritional role and importance of omega-3 to prevent cardiovascular disease of Korean	건강기능식품 시장 동향 및 오메가3 효능 검증 및 천연물 소재 연구 동향	한국영양학회	1	0.5	10

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	Internet/PC통신	CEOSCORE DAILY	고속 성장 '종근당건강', 전립선건강 건강기능식품 개발	2019-11-05
2	Internet/PC통신	매일경제	종근당건강(주), '전립선 비대증 건강 개선 소재' 비임상 결과 발표...2021년 상용화 목표	2020-02-27

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
[주관기관 : 종근당건강(주)] ○ 원료 표준화 ○ 최적추출기술 및 공정표준설정 ○ 복합소재 제제검토 ○ 안정성 평가 ○ 안전성 평가 ○ 인체적용시험 시제품 생산 및 수행 ○ 지식재산권 확보 ○ 개별인정 신청 ○ 제품화	○ 국내 자생소재 18종 중 복합원료 선정 ○ 수율 확인을 통한 최적 추출기술 확립 ○ 3 Lot 생산을 통한 공정표준설정 완료 ○ 복합소재의 기준 및 시험항목 설정 ○ 복합소재에 대한 유통기한 설정 완료 ○ 단회, 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험, 염색체 이상시험, 소핵시험, 복귀돌연변이시험 수행 ○ 임상 진입을 위한 시험약/위약 생산 ○ 전립선 건강 임상 수행 및 완료 ○ 지식재산권 2건 출원 및 1건 등록 완료 ○ 개별인정 신청서 작성 ○ 제품개발 및 판매	○ 90

<p>[협동기관 : 충남대학교 수의학과]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 세포 활성평가 ○ 전립선질환 모델 동물활성 평가 ○ 메커니즘 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포 활성평가 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 독성평가: MTT assay - 활성측정: PSA 및 AR 활성, 5α reductase 2 ○ 동물활성평가 결과, 전립선 건강 개선 효능 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 전립선 무게, DHT, testosterone 감소 등 ○ 세포활성, 동물활성 평가 결과를 바탕으로 전립선 비대증 억제 메커니즘 확인 	<p>○ 100</p>
<p>[협동기관 : 충남대학교 약학과]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 항산화활성 평가 ○ 지표성분 동정 및 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 자생소재 18종의 원료 스크리닝 ○ DPPH, ABTS 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 용매별, 원료별 항산화 활성 조사 완료 - 각종 컬럼크로마토그래피를 통한 멀꿀의 지표성분 분리정제 및 구조동정 ○ HPLC를 이용하여 지표성분에 대한 분석조건을 확립 	<p>○ 100</p>

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

(1) 품종등록 미달성 원인

- 본 연구개발 과제는 당초 신규 품종을 발굴하여 품종등록을 진행할 계획이었으나, 국내 농가의 소득증대 및 안정적인 소재 확보를 위해, 기존의 품종을 활용하여 소재 개발을 진행함

(2) 비SCI 논문 성과 부족 원인

- 본 연구개발 과제를 위하여 세포실험 및 동물실험의 학술연구가 수행되었으나, 연구결과가 우수하여 학술적 가치가 더 많이 인정받는 SCI 논문으로 게재함.

(3) 개별인정 신청 미달성 원인

- 본 연구개발 과제를 위한 개별인정 신청을 위해서는 세포논문, 동물논문, 인체적용시험 보고서가 필수적으로 필수적임.
- 본 과제에서 수행한 인체적용시험은 코로나 19 발생과 확산으로 인하여, 대상자 모집이 매우 어려운 상황으로 예정된 기간보다 시험종료가 지연되었음.
- 현재 인체적용시험이 종료되어 개별인정 신청서를 식약처에 제출할 예정임

2) 자체 보완활동

(1) 품종등록 미달성 해결을 위한 자체 보완활동

- 국내 농가의 소득증대 및 안정적인 소재 확보를 위해, 국내의 기존 품종을 활용하여 소재 개발을 진행하였기에, 새로운 품종등록이 불필요함

(2) 비SCI 논문 성과 미달성 해결을 위한 자체 보완활동

- 원래는 비SCI 논문으로 게재할 예정이었으나, 실험 수준 및 결과가 SCI로 게재 가능할 정도로 우수하여 SCI 논문으로 게재함
- 원래 목표인 비SCI 논문보다 학술가치가 높은 SCI 논문으로 게재하여 추가 보완은 불필요함

(3) 개별인정신청 미달성 해결을 위한 자체 보완활동

- 현재 인체적용시험 제외한 부분은 작성이 완료되어 있음
 - 인체적용시험 결과를 추가하여, 2022년 상반기에 개별인정 신청을 완료할 예정임
-

3) 연구개발 과정의 성실성

■ 다수의 연구성과 초과내용

- **학술논문:** SCI 논문은 기존 목표인 2건보다 많은 5건의 논문을 SCI급 학술지에 게재함.
- **학술발표:** 기존 목표 2건보다 많은 4건을 발표하였음.
- **고용창출 및 인력양성:** 본 과제로 신규로 고용된 인원은 5명으로 기존 목표인 4명보다도 더 많은 인원이 신규 고용되었음. 또한, 본 과제를 통해 총 4명의 석·박사를 양성되었고 이는 기존의 목표인 2명보다 많은 수임.
- **제품화 및 사업화 실적:** 본 과제를 통해 총 2건의 제품을 개발하였고, 약 7억2천5백만원의 매출액이 발생하였음. 이는 기존의 목표(제품화 1건 및 매출액 2억원) 보다 월등히 우수한 성과로 본 과제는 매우 성실히 수행되었다고 판단됨

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 코로나19의 상황에서도 건강기능식품 시장은 꾸준한 성장세를 보이고 있으며, 특히 전립선, 눈, 간, 관절 등 특정 신체부위 건강을 강화하는 기능성 건강식품이 최근 4개년 평균 30% 성장하며 건강기능식품 시장 성장을 주도하고 있음.
- 전립선 관련 원료로는 쏘팔메토 열매 추출물만이 존재하였으나, 최근 사군자추출분말이 개별인정원료로 허가받아 전립선 관련 개별인정 원료에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 따라서 현재 시점에 전립선 건강의 임상적 유효성을 입증하고 개별인정 원료 등록을 추진하여 건강기능식품이 출시된다면, 다양한 농식품소재를 통한 시장확대와 농가소득에 본 연구가 기여할 것으로 예상됨.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
특허등록	국내	1
	국외	-
	계	1
인력양성	학사	-
	석사	1
	박사	-
	계	1
사업화	매출액	700,000,000

< 별첨 자료 >

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

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 멸꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발				
	(영문) Research and development of health functional foods for the improving prostate using domestic medicinal plant				
주 관 연구 기관	종근당건강(주)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 종근당건강(주)	
참 여 기 업	충남대학교 산학협력단			(성명) 조경원	
총 연구개발비 (천원)	계	961,000	총 연 구 기 간	2017.06.15. ~ 2021.12.31(4년 6개월)	
	정부출연 연구개발비	720,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	27명
	기업부담금	241,000		내부인원	14명
	연구기관부담금			외부인원	13명

○ 연구개발 목표 및 성과

<연구목적>

- 멸꿀복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 개발
- 개발 원료를 이용한 전립선 건강 개선 효능 평가 및 개별인정 획득

<연구개발 성과>

- 국내외 기술, 제품시장 동향 연구
- 항산화 활성 평가 완료
- 세포 활성평가 완료
- 원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정
- 복합소재의 기능성분 2종 분석법 확립
- 복합소재 제제검토 완료
- 복합소재의 안정성 평가 완료
- 전립선질환 유도 동물활성평가 완료
- 전립선 비대 메카니즘 규명 완료
- 안전성 평가(독성실험) 완료
- 인체적용시험 프로토콜 확립 및 인체적용시험 완료
- 지식재산권 2건 확보 완료
- 개별인정신청 자료 확보
- 제품화 2건 완료

○ 연구내용 및 결과

- 국내외 기술, 제품시장 동향 연구
 - 국내외 제품개발방향 조사 완료
- 항산화 활성 평가 완료
 - 국내 자생소재 18종의 원료 스크리닝
 - DPPH, ABTS 측정
- 세포 활성평가 완료
 - 독성평가: MTT assay

- 활성측정: PSA 및 AR 활성, 5 α reductase 2
- 원료 표준화, 최적추출기술 및 공정표준설정
 - 국내 자생소재 18종 중 복합원료 선정
 - 수율 확인을 통해 최적 추출기술 확립
 - 3 Lot 생산을 통한 공정표준설정 완료
- 복합소재의 기능성분 2종 분석법 확립
 - 각종 컬럼크로마토그래피를 통한 멸균의 지표성분 분리정제 및 구조동정
 - HPLC를 이용하여 지표성분에 대한 분석조건을 확립
- 복합소재 제제검토 완료
 - 복합소재의 기준 및 시험항목 설정
 - 분석법이 확립된 복합소재 원료에 대하여 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법 항목설정
- 복합소재의 안정성 평가 완료
 - 복합소재에 대한 원료 안정성 검사 및 유통기한 설정 완료
- 전립선질환 유도 동물활성평가 완료
 - 전립선 무게, DHT, testosterone 감소 등 확인
- 전립선 비대 메커니즘 규명 완료
 - 세포활성, 동물활성 평가 결과를 바탕으로 전립선 비대증 억제 메커니즘 확인
- 안전성 평가(독성시험) 완료
 - 단회, 4주 및 13주 반복 경구투여 독성시험, 염색체이상시험, 소핵시험, 복귀돌연변이시험 수행
- 인체적용시험 프로토콜 확립 및 인체적용시험 완료
 - 전립선 건강 인체적용시험 대상자, 바이오마커 선정 완료
 - 전립선 건강 인체적용시험 프로토콜 확립 완료
 - 시험약 및 대조약 구분 어려운 인체적용시험 시제품 생산 완료
 - 인체적용시험 시험약 및 대조약 분석 완료
 - 인체적용시험 완료
- 지식재산권 2건 확보 완료
 - 지식재산권 2건 출원 및 1건 등록 완료
- 개별인정 허가서류 작성
 - 개별인정신청에 따른 성적자료 확보
 - 개별인정신청서 자료 확보.
- 제품화 2건 완료
 - 전립선 건강 개선 제품화 전략 수립 완료
 - 전립선 건강 개선 제품 2건 개발 및 매출액 7억2천5백만원 발생

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 멸균복합추출물을 이용한 전립선 건강에 도움이 되는 건강기능식품 개발
- 멸균복합추출물을 주원료로 사용하는 제품 개발, 건강기능식품 소재 판로 확보
- 전립선 건강 개선에 도움이 되는 새로운 고기능성 식품 소재를 개발 및 국내와 해외 시장 진출

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	117052-3		
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	기능성 식품소재		과제구분	단위	
사업명	농생명기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	얼굴 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발		과제유형	개발	
연구개발기관	종근당건강(주)		연구책임자	조경원	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017.06.15- 2017.12.31	140,000	47,000	187,000
	2차년도	2018.01.01- 2018.12.31	290,000	97,000	387,000
	3차년도	2019.01.01- 2021.12.31	290,000	97,000	387,000
	계	2017.06.15- 2021.12.31	720,000	241,000	961,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

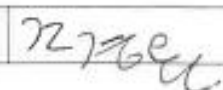
2. 평가일 : 2022.03.20

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
종근당건강(주)	이사	조경원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

전립선 비대증은 50세 이상의 남성의 50%, 80세 이상의 남성의 80%에서 발병되는 것으로 알려져 있으며, 최근 급속히 증가하고 있음. 그러나 전립선 건강 개선 식품 원료로는 소팔메토와 사군자 추출물 등으로 한정되어 있는 실정임. 본 연구를 통해 국내산 산수유와 멀꿀 잎 복합추출물이 전립선 건강에 미치는 과학적 근거를 확보하였음. 세포실험과 동물실험을 통해 국내산 멀꿀과 산수유 복합추출물의 효과가 기존 소팔메토보다 동등이상의 효능이 있음을 확인하였으며, 이러한 효과를 바탕으로 학술논문 5편을 게재하였음. 또한, 본 연구의 독창적인 우수성과를 기반으로 멀꿀과 산수유 복합추출물에 대한 국내 총 2건의 특허출원과 1건의 특허등록을 완료하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구를 통해 발굴한 멀꿀과 산수유 복합추출물의 전립선 건강 개선 연구결과를 이용한 산업적 활용 범위는 건강기능식품에 국한되지 않고, 일반식품 및 메디컬 푸드 등으로 그 활용성을 확대할 수 있음. 또한, 국내산 멀꿀과 산수유를 사용한 원료의 개발을 통해 농식품 소재를 생산하는 농가 소득에도 큰 도움이 될 것으로 기대함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

최근 전립선 건강 개선 제품의 매출이 꾸준히 증가하고 있어, 본 연구를 통해 개발된 전립선 개선 건강기능식품 소재 활용 가능성은 매우 높음. 또한, 국내뿐만 아니라 전 세계적으로도 전립선 비대증 환자는 계속 증가하고 있으며 시장이 성장하고 있어, 전 세계적인 시장 트렌드에도 적합한 연구 성과임. 본 연구에서 제시된 국내산 멀꿀과 산수유 복합추출물에 대한 기능성, 기능 성분 명확화, 원료의 안전성, 원료의 산업화 등을 종합적으로 고려해 볼 때, 추후 고기능성 개별인정 원료로서 효능을 인정받을 것으로 기대함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 연구진은 총 4년 6개월의 연구기간 동안 당초 계획한 모든 연구수행을 완료하여 연구목표를 달성하였음. 국내산 멀꿀과 산수유 복합추출물에 대한 세포실험과 동물실험 및 인체적용시험을 통하여 체계적이고 구체적인 연구결과를 도출하였으며, 독성시험을 통해 원료의 안전성 검증을 완료하였음. 또한, 지표성분 함량 범위 설정, 원료 표준화 및 최적 추출공정 확립, 지표성분 분석방법 확립 등 산업화에 필요한 기반 기술을 구축하였음.

이러한 연구결과는 멀꿀과 산수유 복합추출물의 산업화 및 제품화하는데 효율적으로 사용되었으며, 개별인정 허가 획득에 유효한 결과로 활용될 계획임.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 학술발표 및 논문게재: 연구기간 동안 도출된 연구결과를 바탕으로, SCI 논문 5편, 학술발표 4건을 달성함.
- 지적재산권 확보: 국내 특허출원 2건 및 특허등록 1건의 지식재산권을 확보하였음.
- 기술사업화: 제품화 2건 및 매출액 7억2천5백만원을 달성
- 전문인력양성 및 고용창출: 전문인력 4명(석사 3명, 박사 1명)을 배출하였고, 5명을 고용하는 등의 일자리 창출에 기여.
- 기타: 교육지도 2건, 기술실시 1건, 홍보전시 2건 달성.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 2건	5	100	국내 특허출원 2건 달성
특허등록 1건	10	100	국내 특허등록 1건 달성
품종등록 1건	10	0	개발 소재가 신규 품종등록이 아닌 문제로 미달성
기술실시 1건	-	100	기술실시 1건 달성
사업화 (제품화) 1건	20	100	제품화 2건 달성
매출액 200백만원	20	100	매출액 725백만원으로, 525백만원 초과달성
고용창출 4명	20	100	신규 고용창출 5명으로, 1명 초과달성
SCI 2건	-	100	SCI 논문 5건으로, 3건 초과달성
비SCI 2건	-	0	비SCI가 아닌, SCI 논문으로 게재하여 미달성 (논문 수준 향상)
학술발표 2건	5	100	학술발표 4건으로, 2건 초과달성
교육지도 2건	-	100	교육지도 2건 달성
인력양성 2명	5	100	인력양성 4명으로, 2명 초과달성
홍보전시 2건	5	100	홍보전시 2건 달성
합계	100점	85%	-

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구를 통하여 국내에서 자생하는 농식품 자원 소재인 멀꿀과 산수유 복합추출물을 활용하여, 전립선 건강 개선 식품원료 개발에 대한 구체적이고 과학적 근거를 마련하였음.
또한 산학연 연구개발을 통해 국내 농식품 소재의 우수성과 산업적 가치를 확보하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구의 목적은 멀꿀과 산수유 복합추출물을 활용한 전립선질환 개선 건강기능식품 개발 및 산업화임. 건강기능식품 소재로서의 과학적 근거를 마련하기 위하여 인허가 가이드라인에 맞춘 세포 실험과 동물실험을 수행하였고, 인체적용시험을 완료하였음. 본 과제의 연구성과로 SCI 논문 5편, 학술발표 4건, 특허출원 2건 및 특허등록 1건을 획득하였음. 또한, 제품화 2건으로 매출액 7억2천 5백만원을 달성하여 우수한 사업화 성과를 달성하였음. 다만, 코로나19 감염증의 대유행으로 인체 적용시험이 당초 연구기간보다 매우 지연되어 식약처 개별인정신청이 과제 종료후로 연기될 예정임. 본 과제 평가시 이러한 성과와 불가피한 환경을 고려해주시기를 간절히 요망함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 1) 본 연구의 연구결과를 이용하여 개별인정 신청 및 허가를 획득하여, 전립선 건강 개선 건강기능식품 시장에 우수한 효능의 제품을 출시하여, 국민건강 증진에 이바지하고자 함.
- 2) 본 연구의 연구결과를 이용하여 국내 농식품 소재의 우수성을 알리고, 국내 농가의 소득증진을 통한 농식품산업 발전에 기여하고자 함.

IV. 보안성 검토

- 해당사항 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기능성 식품소재	
연구과제명	멸꿀 복합추출물을 이용한 전립선건강 개선 건강기능식품 연구개발			
주관연구개발기관	종근당건강(주)		주관연구책임자	조경원
연구개발비 (천원)	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	720,000	241,000	0	961,000
연구개발기간	2017. 06. 15 - 2021. 12. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(산업화, 제품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허출원 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 10-2018-0101933 : 멸꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물 • 10-2021-0163382 : 산수유 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물
② 특허등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> • 10-2167290 : 멸꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물
③ 품종등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> • 국내 기존 품종을 활용하여 소재 개발에 따른 품종등록 불필요
④ 기술실시 1건	<ul style="list-style-type: none"> • 특허출원(멸꿀 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물)에 대한 기술실시 및 기술료 7,168천원 납부
⑤ 사업화 (제품화) 1건	<ul style="list-style-type: none"> • 제품화 2건 ✓ 전립선 건강개선 식품(시제품) ✓ 시원하다 전립선
⑥ 매출액 200백만원	<ul style="list-style-type: none"> • 매출액 725백만원
⑦ 고용창출 4명	<ul style="list-style-type: none"> • 신규인력 5명 고용창출 ✓ 황진하, 고은정, 손성호, 심현수, 진유정
⑧ SCI 2건	<ul style="list-style-type: none"> • Bioactive triterpene glycosides from the fruit of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and insights into the molecular mechanism of its inflammatory effects, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>, 29, 2085~2089 (2019) • Isolation, structural elucidation, and insights into the anti-inflammatory effects of triterpene saponins from the leaves of <i>Stauntonia hexaphylla</i>, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>, 29, 965~969 (2019) • Protective effects of combination of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and <i>Cornus officinalis</i> on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia through inhibition of 5α-reductase

	<p>type 2 and induced cell apoptosis, PLOS ONE, 15(8), 1~16 (2020)</p> <ul style="list-style-type: none"> • The therapeutic effects of <i>Stauntonia hexaphylla</i> in benign prostate hyperplasia are mediated by the regulation of androgen receptors and 5α-reductase type 2, Journal of Ethnopharmacology, 250, 112446 (2020) • The chemical constituents of ethanolic extract from <i>Stauntonia hexaphylla</i> leaves and their antiinflammatory effects, Nat Prod Res, 35(11), 1852~1855 (2021)
⑨ 비SCI 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 비SCI가 아닌, SCI 논문으로 게재 (논문 수준 향상)
⑩ 학술발표 2건	<ul style="list-style-type: none"> • FACULTY OF VETERINARY MEDICINE KASETSART UNIVERSITY CERTIFICATE OF ATTENDANCE 초록 등록 “Combination Effects of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and <i>Cornus officinalis</i> on Testosterone-induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats” • Interantional conference on Traditional Medicine Phytochemistry and Medicinal Plants 초록 등록 “Combination Effects of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and <i>Cornus officinalis</i> on Benign Prostatic Hyperplasia in LNCaP cell line” • 2019 한국분석과학회 춘계학술대회 초록 등록 “Standarization of extract mixture of japanese staunton vine and cornus fruit to improve prostate health by HPLC-UV” • (사)한국생약학회 제50회 정기총회 및 학술대회 초록 등록 “Assortment of <i>Stauntonia hexaphylla</i> and <i>Cornus officinalis</i> Protect against Testosterone-induced Benign Prostatic Hyperplasia through Anti-proliferative activity”
⑪ 교육지도 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 2019 한국영양학회 국제학술대회 및 제 54차 정기총회 교육발표 “The nutritional role and importance of omega-3 to prevent cardiovascular disease of Korean, 박성선 전무 (중근당건강)” • 프로바이오틱스 R&D사업 기획을 위한 세미나 및 기획회의 “건강기능식품의 최신 연구 및 개발동향, 조경원 (중근당건강)”
⑫ 인력양성 2명	<ul style="list-style-type: none"> • 석사 3명 배출 ✓ 박세라, 왕재이, GAODAN • 박사 1명 배출 ✓ 소향동
⑬ 홍보전시 2건	<ul style="list-style-type: none"> • CEOSCORE DAILY, “고속성장 '중근당건강', 전립선건강건강기능식품개발” 2019.11.05. • 매일경제, “중근당건강(주), '전립선 비대증 건강 개선 소재' 비임상 결과 발표...2021년 상용화 목표”, 2020.02.27

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

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 (타연구활용액)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
													SCI	비 SCI						논 문 평 균 I F	
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			
가중치	5	10	10				20	20		20				5		5		5			
최종 목표	2	2	1		1		1	900		4				2	2		2	2	3		2
당해 년도	목표	2	1	1		1		1	200		4			2	2		2	2	2		2
	실적	2	1	0		1	7.168	2	725		5			5	0	2.746	4	2	4		2
달성률 (%)	100	100	0		100		100	100		100				100	0		100	100	100		100

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	표준화된 멸균복합추출물의 대량 생산공정 확립
②	멸균 추출물 및 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 질환의 예방 또는 치료용 조성물
③	산수유 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 또는 치료용 약학 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√								
②의 기술		√				√				
③의 기술		√				√				

* 각 해당란에 √ 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	전립선 기능 개선 건강 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상품화
②의 기술	멸꿀 추출물 및 산수유 추출물 특허 등록을 기반으로 건강기능식품 제품개발 및 국내외 판매
③의 기술	산수유 추출물 특허 등록을 기반으로 건강기능식품 제품개발 및 국내외 판매

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(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 (타연구활용등)
	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		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
													SCI	비 SCI						논 문 평 관 I F	
단위	건	건	건	평 가 단 위	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	10	10				20	20		20				5		5		5			
최종목표	2	2	1		1		1	900		4			2	2		2	2	3		2	
연구기간내 달성실적	2	1	0		1	7.168	2	725		5			5	0	2.746	4	2	4		2	
연구종료후 성과창출 계획		1						700									1				

주 의

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