

(옆면)

(앞면)

317042-3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O)발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003276-01

오미자 인지능력
복합추출물 개선
건강기능식품개발
이용한

오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발

2020.09.29.

2020

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

주관연구기관 / (주)알피바이오
협동연구기관 / 경기도경제과학진흥원
1위탁연구기관 / 아주대학교산학협력단
2위탁연구기관 / 네오뉴트라(주)

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발”(개발기간 : 2017. 06. 15. ~ 2020. 06. 30.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 09. 29.

주관연구기관명 : (주)알피바이오

(대표자) 김남기 (인)

협동연구기관명 : (재)경기도경제과학진흥원

(대표자) 김기준 (인)

1위탁연구기관명 : 아주대학교산학협력단

(대표자) 오영태 (인)

2위탁연구기관명 : 네오뉴트라(주)

(대표자) 강재학 (인)

주관연구책임자 : 배문형

협동연구책임자 : 최춘환

1위탁연구책임자 : 박은국

2위탁연구책임자 : 김우재

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	317042-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.06.15. ~ 2020.06.30.	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	농림축산식품연구개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발			
	세부 과제명	1세부: 오미자 복합추출물을 이용한 제조시스템구축 및 건강기능식품의 사업화 1협동: 오미자 복합추출물을 이용한 원료 표준화 및 유전형질 판별 1위탁: 오미자 복합추출물을 이용한 동물실험 효능 검증 및 기전 연구 2위탁: 오미자 복합추출물을 이용한 인체적용시험 및 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청			
연구책임자	배문형	해당단계 참여연구원 수	총: 31명 내부: 31명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 450,000천원 민간: 150,000천원 계: 600,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 39명 내부: 39명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 1,160,000천원 민간: 388,000천원 계: 1,548,000천원
연구기관명 및 소속부서명	1세부(주관기관): (주)알피바이오 1협동: (재)경기도경제과학진흥원			참여기업명: (주)알피바이오	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 1위탁: 아주대학교산학협력단 2위탁: 네오뉴트라(주)			연구책임자: 1위탁 : 박은국 2위탁 : 김우재	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	5	4									

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 표준화된 오미자복합추출물을 이용한 유효성 평가를 통해 인지능 개선에 대한 효능평가 완료(SCI/비SCI 논문 5편, 지식재산권(출원 3건, 등록 1건 완료)) 2. 경도인지저하자를 대상으로 오미자복합추출물을 12주 간 섭취하였을 시 인지능력이 유의적으로 개선됨을 확인함 3. 전문연구인력 3명 채용완료(유효성분 분리, 인지능개선 기능성평가 업무 수행) 4. 주관기관의 사업화를 위한 분석기술관련 특허의 기술이전 완료(오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법) 5. 자생식물의 가치제고를 통한 오미자와 칠해목의 신규 기능성 확보 완료 6. 원재료 계약 재배를 통한 국내 농가의 매출 증대 및 농업조합의 산업 활성화 가능 7. 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품 개발 및 판매 완료 8. 인지기능개선 기능성의 신규 건강기능식품 개발을 통해 정체된 인지기능개선 건강기능식품 시장의 활성화 및 소비자의 선택폭 확대 	<p>보고서 면수</p> <p style="text-align: center;">205</p>
--	--

<요약문>

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구 목적</p> <p>1) 국내 농림자원인 오미자, 칠해목(이하 까마귀밥나무)을 이용하여 원료표준화, 동물시험 및 인체적용시험을 통해 기능성과 안전성을 입증하고, 오미자복합추출물을 인지능력 개선에 도움이 되는 기능성원료로서 식품의약품안전처로부터 개별인정을 획득하고자 함</p> <p>2) 국산 오미자와 칠해목의 소비촉진 및 인지능력 개선 홍보를 위해 과학적으로 기능성과 안전성을 입증하여 개별인정이 승인될 때까지 오미자복합추출물을 부원료로 사용한 건강기능식품을 개발하고자 함</p> <p>3) 개별인정 승인 시 오미자복합추출물을 주원료로 사용하여 인지능력 개선에 도움이 되는 건강기능식품을 개발하여 산업화하고자 함</p> <p>2. 연구 내용</p> <p>1) 오미자복합추출물의 유효성분 분리 및 기준규격 설정</p> <p>(1) 약용식물 탐색을 통한 오미자, 칠해목의 최적 추출 및 배합 비율 조건 확립</p> <p>(2) 칠해목의 지표(또는 기능)성분 확인을 위한 분리 정제 및 구조결정 분석 방법 확립</p> <p>(3) 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/채취시기) 확립</p> <p>(4) 지표(또는 기능)성분 설정</p> <p>(5) 지표(또는 기능)성분별 분석법 확립</p> <p>(6) 지표(또는 기능)성분 동시 분석법 개발</p> <p>(7) 기능성원료 대량생산 시스템 구축</p> <p>2) 오미자복합추출물의 안전성 평가</p> <p>(1) 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험</p> <p>(2) 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험</p> <p>(3) 오미자복합추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험</p> <p>(4) 오미자복합추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵 시험</p> <p>(5) 오미자복합추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험</p> <p>3) 오미자복합추출물로부터 인지능 개선 효능검증 및 기전 연구</p> <p>(1) 오미자복합추출물의 신경세포 독성 및 보호효능 평가</p> <p>(2) 오미자복합추출물에 따른 세포사 및 세포생존 관여 인자 확인</p> <p>(3) Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 동물모델을 이용한 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능검증</p> <p>(4) 오미자복합추출물의 인지능력 개선 작용기전 연구</p> <p>4) 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발 및 산업화 연구</p> <p>(1) 원재료(오미자, 칠해목) 안전성 검사</p> <p>(2) 오미자복합추출물 제조공정 확립(GMP 시설)</p> <p>(3) 오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 및 유해물질 기준규격 설정</p> <p>(4) 인체적용시험용 식품 개발 및 제조(GMP 시설)</p> <p>(5) 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 기능성원료 개별인정을 위한 인체적용시험 심사위원회(IRB) 승인 및 인체적용시험 실시</p> <p>(6) 인지능력 개선 건강기능식품 개별인정 기능성 원료 신청서 접수 완료</p> <p>(7) 인지능력 개선 건강기능식품 시제품 개발(품목신고) 및 사업화</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>1. 칠해목에 대한 재배지역을 선정한 후 생육 시기별 지표성분의 변화량 확인 완</p>

	<p>료</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 지표성분의 함량이 유지되며 생산 수율이 20% 이상으로 확보되는 수확시기 결정 완료 3. 각 원료별 생산 공정 최적화 완료 4. 각 지표성분별 분석법 최적화 및 복합물의 지표성분 분석을 위한 동시 분석법 개발 완료 5. 표준화된 오미자복합추출물을 이용한 유효성 평가를 통해 인지능 개선에 대한 효능평가 완료(SCI/비SCI 논문 5편, 지식재산권(출원 3건, 등록 1건 완료)) 6. 장기 안전성 평가를 통한 오미자복합추출물의 무독성량(NOAEL) 확보 완료 (5,000 mg/kg) 7. 경도인지저하자를 대상으로 인체적용시험을 수행하여 인지능력(ADAS-cog, ADAS-K 등)의 유의적으로 개선 확인 완료 8. 전문연구인력 3명 채용완료(유효성분 분리, 인지능개선 기능성평가 업무 수행) 9. 오미자복합추출물의 유효성 및 분석기술 확보를 위한 출원 특허 4건 완료 10. 주관기관의 사업화를 위한 분석기술관련 특허의 기술이전 완료(오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법) 11. 자생식물의 가치제고를 통한 오미자와 칠해목의 신규 기능성 확보 완료 12. 원재료 계약 재배를 통한 국내 농가의 매출 증대 및 농업조합의 산업 활성화 가능. 13. 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품 개발 및 판매 완료. 14. 인지기능개선 기능성의 신규 건강기능식품 개발을 통해 정체된 인지기능개선 건강기능식품 시장의 활성화 및 소비자의 선택폭 확대 15. 다양한 제형 및 제재 개발 기술력을 바탕으로 정제, 경질캡슐, 스틱분말, 젤리 스틱 등 다양한 제품을 개발 계획 수립 완료 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 오미자와 칠해목으로 인지능력 개선에 도움을 주는 오미자복합추출물 및 이를 이용한 건강기능식품을 개발하게 되면, 국내 농림자원의 고부가가치화를 통해 재배농가의 소득 증대와 함께 지역 경제를 활성화 가능함 2. 인지능력 개선의 효능을 가진 오미자복합추출물의 전임상 및 임상연구 기반으로 확보된 특허 및 논문 등의 지식재산권을 활용하여 식약처로부터 건강기능식품 개별인정을 승인받은 후 오미자복합추출물을 주원료로 이용한 건강기능식품을 개발/판매 예정임 3. 현재 시판되고 있는 인지능력 개선 치료제의 경우 간독성 등과 같은 부작용으로 장기간 사용하기에 부적합하지만, NOAEL 5,000mg/kg 이상인 오미자복합추출물을 이용한 건강기능식품이 개발되면 장기복용에도 부작용이 적으며, 국민 건강증진과 더불어 고령층의 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 기대됨 4. 오미자복합추출물의 기능성 원료로의 판매뿐만 아니라 자체 기술이전을 통한 다양한 건강기능식품 개발에 활용할 계획임 5. 개별인정 승인 및 다수의 홈쇼핑 성공 경험을 바탕으로 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능 및 제품인지도를 높이고 홈쇼핑 및 온/오프라인 판매채널을 통해 적극적으로 판매할 계획임 6. 기 구축된 대형유통망((주)알피바이오)을 활용한 마케팅 전략을 통해 건강기능식품의 국내 사업화뿐만 아니라 미국, 일본, 러시아 등의 해외 시장 진출이 가능할 것으로 전망됨 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>농림자원</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>오미자</p>	<p>칠해목 (까마귀밥나무)</p>	<p>인지능력</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>agriculture and forestry resources</p>	<p>health functional food</p>	<p>Schizandra Chinensis</p>	<p>Ribes fasciculatum</p>	<p>cognitive ability</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요	7
1절. 연구개발의 목적	7
2절. 연구개발의 필요성	7
3절. 국내외 시장현황	12
4절. 연구개발의 범위	19
2장 연구수행 내용 및 결과	23
1절. 오미자복합추출물의 유효성분 분리 및 기준규격 설정	23
2절. 오미자복합추출물의 안전성 평가	71
3절. 오미자복합추출물로부터 인지능 개선 효능검증 및 기전 연구	127
4절. 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발 및 산업화 연구	143
5절. 연구개발의 성과	191
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	198
1절. 목표 달성도 및 연구개발 수행내용	198
2절. 목표 달성여부	202
3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책	202
4장 연구결과의 활용 계획	203
붙임. 참고 문헌	204

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

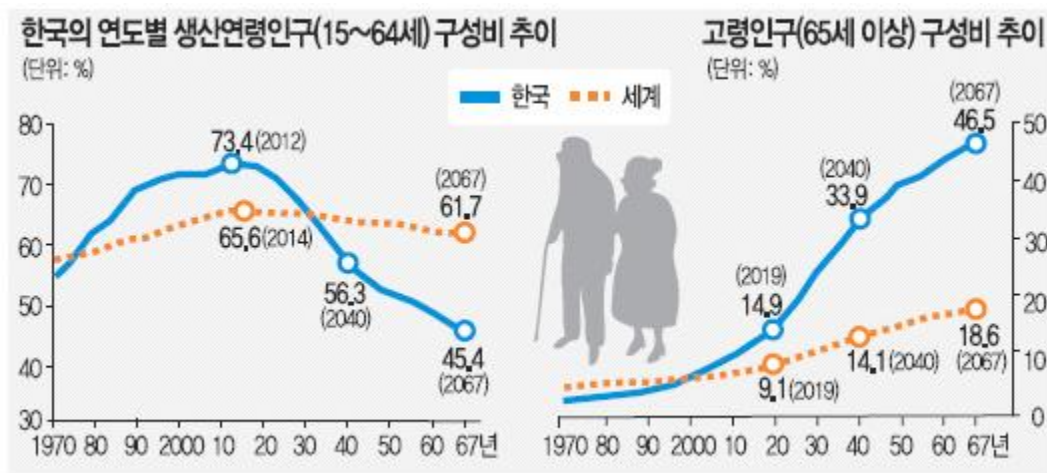
다양한 문헌 조사, 특히 검색, 전문가 자문을 통하여 선별한 총 42종의 약용식물을 대상으로 신경세포(PC12, SH-SY5Y)의 보호활성을 측정하여, 식품으로 사용 가능한 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료의 신규 소재인 오미자와 칠해목(이하 까마귀밥나무)을 선정하였다. 본 연구과제는 오미자와 칠해목을 대상으로 원재료 표준화, 지표(또는 기능)성분 선정, 제조공정 표준화, 안전성 평가, in vitro 및 in vivo를 통한 효능 평가, 인체적용시험 등을 통하여 기능성과 안전성을 입증하고 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품으로 개발하고자 한다.

2절 연구개발의 필요성

1. 고령화사회를 지나 고령사회 및 초고령사회로 진입

- 고령인구 비율이 전체 인구의 14%를 넘으면 고령사회, 20%를 넘으면 초고령사회로 분류되는데, 한국은 이미 2017년 고령사회에 진입했다. 2019년 통계청 장래 인구추계 자료에 따르면, 우리나라 전체 인구는 5,170만 명으로 2028년까지 계속 증가 후 2067년에 3,900만 명으로 크게 감소할 것으로 예상된다. 반면, 65세 이상 인구는 768만 5천명으로 2050년(1,900만 7천명)까지 지속적으로 증가할 것으로 전망한다.

- 또한, 세계 인구 중 65세 이상 비율은 2019년 9.1%에서 2067년 18.6%로 증가하나, 한국의 경우에는 14.9%에서 46.5%로 증가하여 노년부양비의 증가가 매우 클 것으로 예상된다.



한국의 생산연령인구 및 고령인구 구성비 추이 (국민일보)

2. 고령사회에 따른 치매 의료비 증가

- 현대 사회의 인구 분포는 고령화 추세로 급변하고 있고 치매와 같은 퇴행성 뇌신경계질환의 발병도도 높아져, 치매의 적극적인 치료의 필요성에 대한 의식이 증가하고 있다.

- 치매는 후천적으로 뇌의 기능의 여러 영역에 지속적으로 전반적인 감퇴가 오는 퇴행성현상으로 치매를 앓는 환자는 기억 능력 손상을 비롯하여 언어 능력, 시공간 지각능력, 계산 능력 추상적 사고 능력, 문제 해결 능력 등 광범위한 영역에서 기능을 상실하게 되며 신경학적 이상을 동반하여 종국에 가서는 사고나 감염성 질환 등과 같은 합병증으로 사망하게 되는 질병이다.

- 국민 건강 보험 공단에 따르면 국내 치매 진료 인원은 2006년 10만 5천명에서 2011년 31만 2천명으로 늘어 296.3%의 급속한 증가를 보이고 있다.

연도별 치매진료인원

(단위: 명)

연도	전체	65세 미만	65세 이상
2006	105,337	11,606	93,731
2007	135,802	13,064	122,738
2008	175,749	15,637	160,112
2009	215,459	17,880	197,579
2010	261,522	20,929	240,593
2011	312,077	23,090	288,987
2006년 기준 2011년 증가(%)	296.3	198.9	308.3

- 치매 총 진료비는 2051억 원에서 9994억 원으로 487.4% 늘었다고 보고하였다. 특히 65세 이상 노인의 경우 진료인원은 9만 3731명에서 28만 8987명으로 308.3%, 총 진료비는 1869억 원에서 9415억 원으로 503.7% 늘었다. 그럼에도 현재까지는 치매를 치료할 수 있는 뚜렷한 의약품이나 치료 방법이 제시되고 있지 않아, 환자를 보살피기 위한 사회 전반적인 부담이 커지고 있는 상황이다.

[표2] 연도별 치매 진료비 및 공단부담금

(단위: 천만 원)

연도	전체		65세 미만		65세 이상	
	총진료비	공단부담금	총진료비	공단부담금	총진료비	공단부담금
2006	20,505	16,790	1,811	1,523	18,694	15,266
2007	33,013	26,618	2,446	2,044	30,567	24,574
2008	50,345	39,100	3,385	2,812	46,961	36,288
2009	62,106	48,669	4,155	3,514	57,951	45,155
2010	81,023	63,877	5,175	4,411	75,847	59,467
2011	99,939	78,848	5,784	4,937	94,155	73,911
2006년 기준 2011년 증가 %	487.4	469.6	319.3	324.1	503.7	484.1

- 현재 우리나라는 급속한 고령화와 함께 핵가족화로 인한 가족 지지체계의 붕괴가 노인개인이 부담해야 하는 경제적 부담을 가중시키고 있으며, 아울러 가족 전체 나아가서는 사회 전체의 막대한 경제적인 부담을 가중시키고 있다.

3. 농산물에서 유래한 치매 등 퇴행성 질환 치료 소재 연구의 산업적 중요성

- 식습관과 질병 위험의 관계에 대한 연구 자료 축적으로 생체 방어, 신체리듬 조절, 질병의 예방과 회복 등 생체기능을 조절할 수 있는 ‘기능성식품’의 개념이 수립되었다.



농산물 유래 질환 개선 소재 연구의 산업적 중요성

- 건강 기능성식품의 세계 시장은 2000억불을 상회하며, 국내시장의 매출은 일본의 1/30 정도로서 성장의 여지가 충분하다.

	미국	EU	일본	캐나다	한국	아시아 ¹⁾	기타 ²⁾	계
매출액(억불)	708	647	364	60	10	139	95	2,023
%	35.0	32.0	18.0	3.0	0.5	6.9	4.6	100

주 1) 일본, 한국 제외.
2) 라틴아메리카 등.

세계 건강기능식품 시장에서의 한국의 위치 (Nutrition Business Journal, 2006)

4. 농산물 유래 인지능 개선제 연구 개발의 과학적 필요성

- 기능성 식품의 임상적 효능 및 안전성에 대한 과학적 근거 부족으로 인한 소비자의 불신이 시장 성장에 큰 장애가 되고 있다.

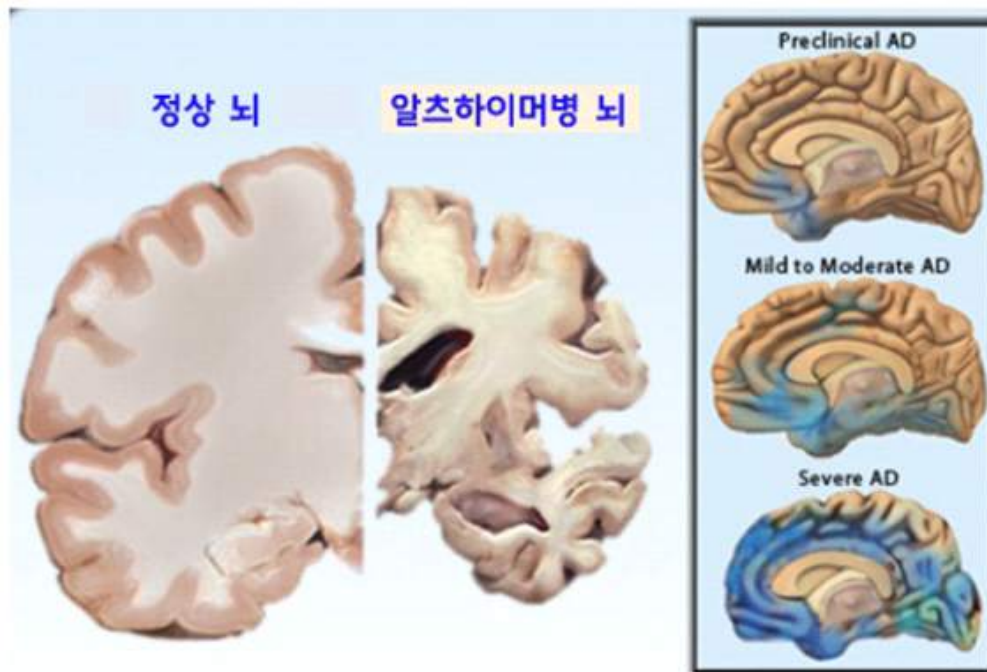
- 일본의 경우 2005년경의 코엔자임Q10 이나 이소플라본 등의 적정 섭취량에 관한 논란으로 소비심리가 위축되고 2006년 이후에는 이렇다 할 히트상품이 없어 건강식품 시장 전체가 영향을 받을 정도이다.

- 뇌의 지능을 이용하여 문제를 인식하고 해결할 수 있는 방법 또는 과정을 생각해내는 능력을 인지능력이라고 할 수 있으며 문제를 해결하는 방법을 생각해내기 위해서는 과거의 체험 등을 응용하게 되는 데 이 때 과거의 체험을 기억해 낼 수 있는 기억력이 필요하게 된다.

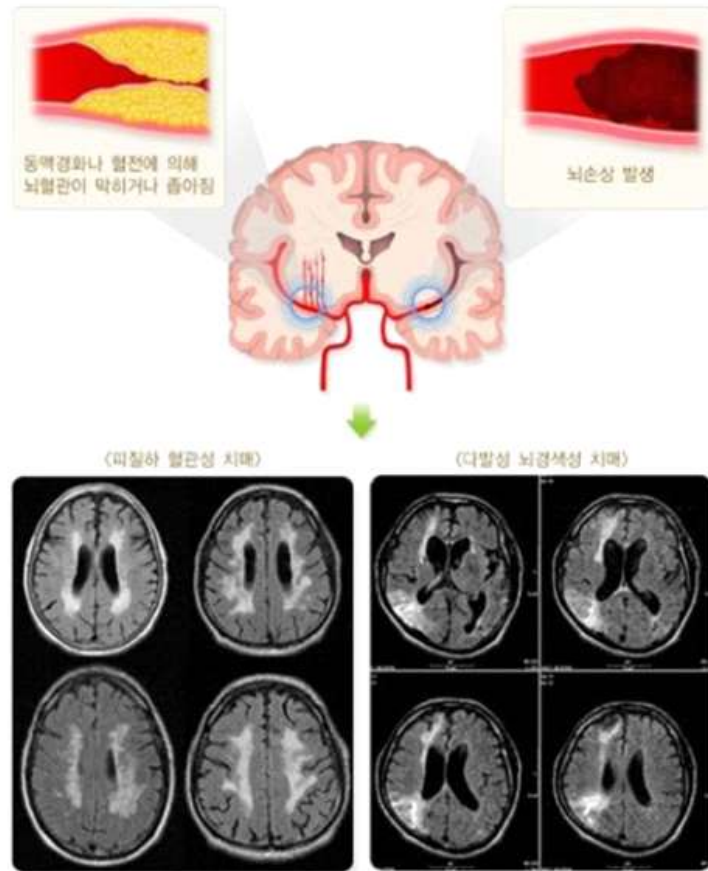
- 치매는 단순히 기억력이 떨어진 상태가 아닌, 주로 내과적 신경과적 원인으로 뇌신경의 일시적 혹은 지속적인 손상이 발생한 것으로, 다발성 인지기능이 지속적으로 저하되어 말을 하거나 이해하는 능력이 떨어지고, 시간과 공간에 대한 감각장애, 성격변화가 생기며, 계산능력이 떨어져 일상생활이나 사회생활을 하는데 지장을 일으키는 상태 등 정신기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 하는 진행성·퇴행성 질환임. 흔히 '노망' 또는 '망녕'으로 일컬어지며 아직까지 발병 원인이 정확하게 밝혀지지 않았지만 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

- 치매는 노인인구가 급격히 증가하고 있는 현대 사회에서 최대의 노화 질환일 뿐만 아니라 21세기에 인류가 당면할 심각한 보건문제가 될 것으로 예상되고 있기 때문에 '21세기 질환'으로 명명되고 있다.

- 노화 과정에서 베타 아밀로이드(β -amyloid)라는 단백질이 뇌에 축적되어 엉키게 되고 이로 인해 알츠하이머병이 발병되는 것으로 알려져 있음. 현재까지 치매의 원인으로 받아들여지고 있는 사실 중의 하나는 앞서 언급한 바와 같은 원인으로 발생한 알츠하이머병이 치매를 야기함. 이것 이외의 치매의 원인에 따른 종류로는 뇌동맥의 경화에서 오는 혈관형 치매, 알코올성 치매, 그리고 파킨슨병 치매 등이 있다.



<알츠하이머병 치매>



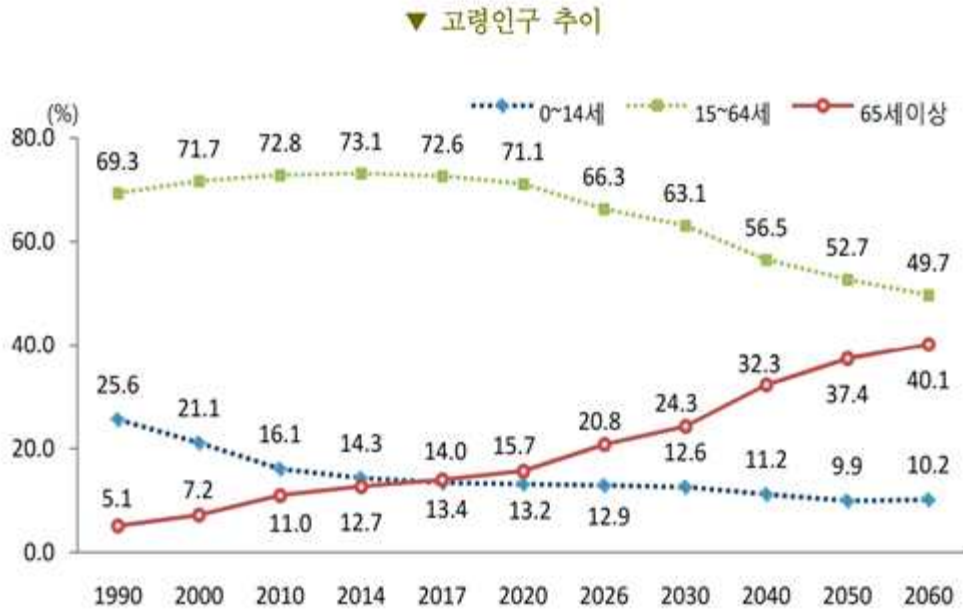
<혈관성 치매>

- 현재까지 FDA등을 통해 공식적으로 치매 치료제로 허가된 약물은 대부분 알츠하이머에 의한 치매를 대상으로 하고 있으며, 그 약물 작용점도 acetylcholinesterase라는 효소로 제한되어 있다. 하지만 이 효소는 치매를 일으키는 근본적인 원인을 제공하는 것은 아니라 이 효소를 저해함으로써, 알츠하이머병으로 인한 치매 환자에게 나타나는 acetylcholine이라는 신경 전달 물질 저하 현상을 억제하여 정상적인 생활이 가능하도록 유도하는 역할만을 할 뿐이다. 아직까지는 어떤 범주에 속하는 치매이건 간에 치매라는 질환의 원인을 근본적으로 되돌려 정상 상태로 만들어주는 약물은 없는 실정이다.
- 알츠하이머성 치매치료제로 Cognex(Tacrine)이 미국식품안전위생국(FDA) 승인을 받은 이후로 ARICEPT(Donepezil), Exelon(Rivastigmine), Razadyne(Galantamine), Namenda(Memantine) 등이 있으며, 이들 약물은 공통적으로 메스꺼움, 식욕감퇴, 구토, 설사 등의 심각한 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 일단 복용이 중단되면 다시 원래의 장애를 보여주는 것으로 보고되어 항 치매 약물로서 논란의 여지가 많음. 이러한 단점을 보완할 치매치료제의 개발이 시급하다.
- 인지능력 개선 관련 국내 시장을 분석한 결과 노인의 인지능력 저하나 기억력 개선 건강기능식품으로 참당귀, 피브로인효소, 비파엽, 구기자 등 다양하게 개발되었으나, 여전히 홍삼이 기억력 개선 식품으로 시장 점유율을 크게 차지하고 있다. 따라서 노인 인구가 지속적으로 급증함에 따라 인지능력 개선에 초점을 맞춘 새로운 소재의 건강기능식품의 시장진입이 필요하다.

3절 국내외 시장현황

1. 국내 치매치료제 시장현황

- OECD에 따르면 2019년 노인인구 비율이 14% 이상인 고령사회에 도달하게 되며, 급속한 고령화로 인한 치매환자 증가할 것으로 예측하고 있다.



(출처 : 통계청, "2014 고령자 통계"(2014.9), p13)

- 2011년 치매관리법을 제정해 2012년부터 시행 중이며, 치매의 예방, 치매환자의 진료, 요양, 그리고 치매 퇴치를 위한 연구 등에 관한 정책을 종합적으로 수립하고 시행 중이다. 2014년 치매 관련 국가연구개발 투자는 총 408억원으로 전체 국가 R&D 투자액의 0.2%를 차지한다.

- 2016년 기준 국내 치매치료제 주요 5품목의 시장규모는 970억원이며 아세틸콜렌 에스테라제 억제제로 대표적인 아리셉트가 약 670억원이며 엑셀론, 에빅사, 레미닐 등이 그 뒤를 따르고 있다. (2016년 IMS 자료 참조)

치매치료제 매출 추이

순위	제약명	회사명	단위: 100억 원							
			2016년		2015년		2014년		2013년	
			매출액	성장률	매출액	성장률	매출액	성장률	매출액	
1	아리셀프렐/구입승용제인등	한국에이지	88,981	9.4%	88,480	12.7%	47,446	20.5%	39,880	
2	리셀프렐/구입승용제인	한국노바티스	15,801	+28.4%	20,890	-14.7%	28,919	12.4%	21,278	
3	에비시알/제	한국셀도탁	9,940	14.1%	8,711	17.8%	7,424	2.6%	7,284	
4	아리셀프에리스렐	한국에이지/다움제약	8,178	6.5%	7,878	7.0%	7,170	18.0%	6,280	
5	메다닐피알서빙렐	한국간편	4,714	-8.8%	4,875	-17.2%	5,898	-17.1%	7,115	
치매치료제 5종목 매출 TOTAL			96,965	1.9%	95,128	9.5%	91,658	18.1%	81,202	

- 다국적 제약사들이 현재 치매치료제 시장을 선점하고 있는 상황이며 국내 제약사들도 SK케미칼을 포함하여 아이큐어의 붙이는 치매치료제인 리바덤 출시 등으로 시장 진출에 노력하고 있다.

가. 국내 건강기능식품 제품생산 및 시장현황

- 국내 건강기능식품으로서 가장 많이 생산되고 있는 홍삼이 기억력 개선으로 사용되고 있으므로 인지 능력 관련 기능성의 일부로 사용되고 있다고 볼 수 있다.

- 홍삼은 2015년 생산액 기준 전체 건강기능식품 시장의 46.2%를 차지하여 약 7000억에 달하는 매출을 보이고 있으나, 이는 모두 기억력 개선만을 위한 클레임이 아니라 면역기능을 필두로 하여 혈행 개선, 피로회복, 갱년기 건강 등 다양한 복합기능을 강조하고 있다. 따라서 홍삼 전체의 매출이 건강기능식품에서 인지력 관련 전체 시장을 대변한다고 볼 수는 없다.

- 이 외에도 은행잎 추출물이 혈행 개선과 기억력 개선의 이중 복합 기능을 강조하고 있으나, 생산액 자체가 미약하며 건강기능식품 중 6번째로 많이 생산되고 있는 EPA 및DHA 함유 유지 또한 기억력 개선을 강조한 개별인정 기능을 추가하여 고시형으로 전환되면서 복합형태로 제품을 많이 출시하고 있는 상황이나 주로 건조한 눈 개선이나 혈행 개선 등에 포커스가 맞추어져 있는 상황이다.

인지(기억력)관련소재	생산액(단위: 억)
홍삼	6,942.9
은행잎추출물	48.2
EPA&DHA함유유지	484.7
포스파티딜세린	15.2
참당귀추출분말	1.2
피브로인효소가수분해물	21.8
비파엽추출물	1.4
구기자추출물	6.0
원지추출분말	11.5
합 계	7,532.9

(Ref : 2015 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원)

- 가속화되고 있는 고령화의 실정에 맞게 노인의 인지능력 저하나 기억력 개선에 초점을 맞춘 제품은 참당귀, 피브로인효소, 비파엽, 구기자 등 개별인정형으로도 다양하게 개발되고 있으나 예방차원의 건강기능식품이라도 그 효과에 대한 객관적인 증거가 어려워졌기에 보다 과학적이고 합리적인 소재의 개발이 시급한 실정이다.



- 실제 소비자들을 대상으로 염려하고 있는 건강문제에 대한 질문을 하였을 때 피로회복이나 면역력 관련이 가장 많았으나 기억력 관련해서도 많은 사람들이 관심을 보이고 있었으며, 특히 50대와 60대의 경우에는 13.1%, 19.1%가 기억력 문제를 염려하고 있다고 응답하여 연령이 높을수록 염려하고 있는 건강관련 문제로 파악된다. 기억력 관련 염려에 대한 대처방법에 대해서도 음식이나 건강관련 식품을 섭취한다는 비중이 36%, 크게 노력하는 점이 없다고 37.5%로 좋은 성분 개발 시 잠재적 시장 크기 확장될 수 있음을 나타낸다.


염려하고 있는 건강문제	(%)
피로회복	31.2
면역력 증진	22.8
스트레스	20.5
눈건강	14.5
관절건강	10.6
갱년기 건강	9.9
기억력	9.0
콜레스테롤	9.0
간건강	8.9
체지방 감소	7.9
혈행 개선	6.9
장건강	5.2

(Ref: 2016 건강기능식품 시장 현황 및 소비자 실태 조사, 한국건강기능식품협회)

나. 대표적인 국내 인지능력개선 건강기능식품

- 홍삼



1		판매원 : 정관장 제품명 : 아이패스 성분 : 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3 = 12.3 mg
2		판매원 : 풀무원 제품명 : 폴비타귀인 홍삼정 성분 : 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3 = 7 mg

3		<p>판매원 : 한삼인</p> <p>제품명 : 아이홍삼</p> <p>성분 : 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3 = 6 mg</p>
---	---	--


- 은행잎추출물

1		<p>판매원 : 대응제약</p> <p>제품명 : 브레인플래쉬</p> <p>성분 : 플라보놀배당체 28 mg, 비타민A 700 µg, 비타민C 100 mg, 비타민E 11 mg α-TE, 망간 3 mg, 코엔자임Q10 98 mg</p>
2		<p>판매원 : 종근당건강</p> <p>제품명 : 징코앤메모리</p> <p>성분 : 플라보놀배당체 28.8 mg</p>
3		<p>판매원 : 일양약품</p> <p>제품명 : 징코비타</p> <p>성분 : 플라보놀배당체 36 mg, 비타민B1 1.2 mg, 비타민B2 1.4 mg, 비타민B6 1.5 mg, 셀렌 55 µg, 아연 8.5 mg</p>

- 포스파티딜세린

1		<p>판매원 : 유한메디카</p> <p>제품명 : 진큐피에스</p> <p>성분 : 포스파티딜세린 300 mg, 진세노사이드 3.3 mg, 비타민A 240 µg, 비타민B6 0.6 mg, 비타민E 3.8 mg</p>
2		<p>판매원 : 천호식품</p> <p>제품명 : 갭빡임이 계속될땐 인지력</p> <p>성분 : 포스파티딜세린 300 mg, 비타민E 10 mg</p>

- 개별인정형

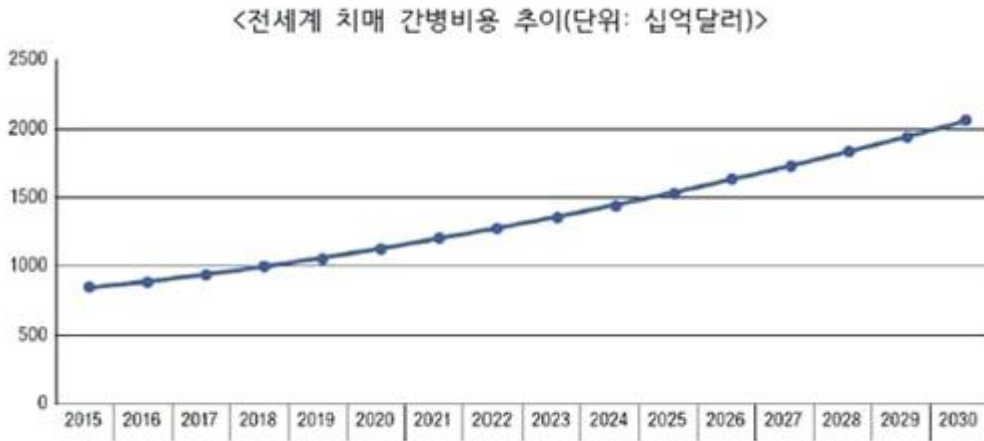
1		<p>판매원 : 중외제약</p> <p>제품명 : 중외 레코넥스</p> <p>성분 : 데쿠르신 40 mg, 데쿠르시놀 0.5 mg</p>
---	---	---

2		<p>판매원 : 뉴트라젠 제품명 : 인지Q 성분 : 데커신 100.8 mg</p>
3		<p>판매원 : 천호식품 제품명 : 감빡감빡 메모리 성분 : 알라닌 2.94 mg, 티로신 2.49 mg, 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3=5.6 mg</p>
4		<p>판매원 : 보타바이오 제품명 : 메모리업 스마트 성분 : 퀘르세틴 1.05 mg</p>

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

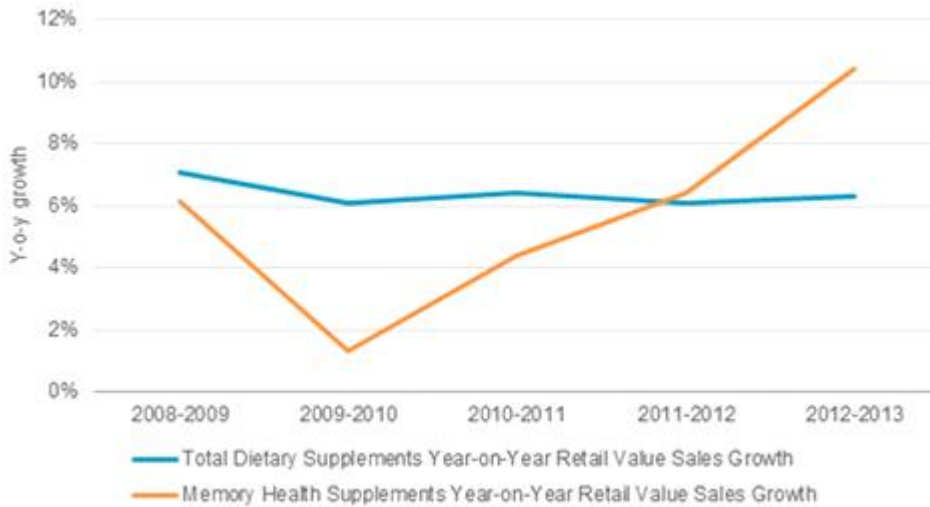
가. 전 세계 치매치료제 시장현황

- 전 세계적으로 고령인구가 증가하여 치매환자의 수가 급증할 것으로 예상되는 가운데 미국, 일본 등 주요국들에서 치매치료제 개발에 박차를 가하고 있다.
- 2020년 글로벌 시장 212억 달러, 국내 2조원 이상의 규모 예상. ‘치매분야 국가연구개발 조사분석보고서’에 따르면 전 세계 치매 인구는 2015년 약 4천680만명에서 2050년에는 약 3배 증가해 1억3천150만명에 이를 것으로 예상되며 전 세계 치매와 관련한 사회경제적 비용은 2010년 6천40억달러로 추산되며 2030년에는 1조달러에 이를 것으로 예측된다.
- 글로벌 각국은 치매 간병서비스 확충과 비용 절감을 실현시키기 위해 다양한 노력을 전개 중이며 국가 정책 차원에서 치매 진단과 치료제 개발에 힘을 쏟고 있는 실정이다.
- 국제알츠하이머협회(Alzheimer’s Disease International, ADI)는 2050년 전세계 치매 환자수가 1억명을 넘어설 것으로 전망되며, 치매 환자 증가로 인한 치매 간병비용은 2015년 8180억달러로 추산되며 2030년 2조달러(약 2200조원)을 넘어설 것으로 예상된다.




출처 : KDB대우증권 리서치센터, 김현태의 헬스케어 인사이트, 2016.2.26.

- 2013년 세계 기억력개선 건강기능식품 시장 규모는 15억 달러로 추산됨. 2013 건강기능식품의 세계적 추이를 보면 매년 6% 증가하는 반면, 기억력개선에 도움을 주는 건강기능식품은 2012년 대비 2013년에 성장률 10%를 기록하여 앞으로 가파른 성장이 예상된다.



출처 : Euromonitor International

나. 대표적인 해외 인지능력개선 건강기능식품

1		제조원 : Now / 미국 제품명 : Brain Elevate 성분 : 은행잎, 로즈마리, 포스파티딜세린, 뱀뿔 섭취량 : 1일 2캡슐 용량 및 가격 : 120 캡슐(2개월 분) / 45,000 원
2		제조원 : Now / 미국

		<p>제품명 : CurcuBrain 성분 : 커큐민 섭취량 : 1일 1캡슐 용량 및 가격 : 50 캡슐(50일 분) / 45,000 원</p>
3		<p>제조원 : Natrol / 미국 제품명 : DHA 500 Super Strength 성분 : DHA, 비타민E 섭취량 : 1일 1캡슐 용량 및 가격 : 30 캡슐(1개월 분) / 19,300 원</p>
4		<p>제조원 : LifeExtension / 미국 제품명 : Blueberry Extract 성분 : 블루베리, 식료, 베리혼합 섭취량 : 1일 2캡슐 용량 및 가격 : 60 캡슐(1개월 분) / 34,000 원</p>

다. 나라별 현황

(1) 미국

미국은 국가 차원의 대규모 프로젝트 진행하면서 가속화 시스템을 구축 중. 2015년 국립보건원(NIH)이 식품의약국(FDA)과 알츠하이머협회와 제약회사 10곳과 제휴하여 알츠하이머 치료제 개발을 가속화하기 위한 지식포털을 구축. 미국 제약회사 일라이릴리도 영국 아스트라제네카와 2014년 치매치료제 공동 개발 및 판매에 합의

(2) 영국

국민건강보험(NHS)이 대학과 연구기관 및 기업과 유기적으로 결합해 치매 진단 및 치료제 개발에 적극적으로 나서고 있는 가운데 2020년까지 국제치매연구소를 설립한다는 계획

(3) 일본

2013년 각료회의가 결정한 일본재흥전략에 입각해 2020년까지 치매의 근본 치료제 임상시험 프로젝트를 진행. 제약회사 에자이가 2020년 시판을 목표로 미국 바이오젠 아이텍과 신규 알츠하이머 치료제를 공동 개발기로 하고 2014년에 판매계약을 체결

4절 연구개발 범위

구분 (연도)	세부과제명	연구개발 목표	연구개발 수행내용
1차 년도 (2017)	(주)알피바이오 : 오미자복합추출물 을 이용한 제조시 스템구축 및 건강 기능식품의 사업화	제조공정 표준화 연구	- 제조공정 표준화 시 설정된 조건을 토대로 scale-up하여 추출, 농축, 건조조건에 따른 수율을 비교하고, 최적의 제조공정 조건을 결정
		기능성원료의 신경세포보호활성 및 신경세포 독성 측정	- 과산화수소로 산화 스트레스가 유도된 신경세포에 오미자추출물과 칠해목추출물을 처리하여 LDH assay를 통한 신경세포보호활성 및 신경세포 독성을 평가 (젯산탈수소효소, 뇌 신경세포 생존율)
		기능성원료의 효능 극대화 를 통한 추출물 조건별 평가	- 신경세포 보호 활성을 측정하여 오미자복합추출물, 칠해목의 인지능력 개선 효능극대화를 위한 에탄올 추출 비율별 평가, 칠해목추출물 분획별 평가 및 최적 배합조건을 검토
		기능성원료의 신경세포의 사멸 및 괴사억제 평가	- FACS를 통한 세포 사멸 및 괴사를 평가 (Annexin V/PI apoptosis)
		동물모델을 통한 안전성 평가	- 오미자복합추출물의 안전성을 확보하기 위하여 GLP 기준의 기능성원료 동물 독성평가 (일반독성(단회투여독성시험, 2주반복 DRF 시험), 유전독성(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)) 수행
	(재)경기도경제과학진흥원 : 오미자 복합추출물을 이용 한 원료 표준화 및 유전형질 판별	분획물로부터 지표·유효성 분 분리정제 및 구조결정	- 오미자 복합추출물의 원료표준화를 위해 뇌신경세포 보호활성을 나타낸 분획물로부터 얻은 8개의 분리 화합물의 구조 동정 - 분리화합물로부터 뇌신경세포 보호활성을 가지는 물질 탐색
		지표(또는 기능)성분 설정	- 천연물화학적인 분석방법을 통해 오미자의 지표성분으로는 함유량이 가장 많은 Schizandrin으로 정하였으며, 칠해목의 지표성분은 분리 정제실시한 결과 4-hydroxy benzoic acid 화합물을 설정
		표적유전자 확보 및 유전 자감별법 확립	- 표적유전자 확보 및 유전자 감별법 확립을 위해 국내외 16종의 칠해목 및 근

			연종의 Blast, Neighbor joining tree 와 ITS 바코딩을 이용하여 칠해목 감별
	아주대학교 산학협력단 : 오미자복합추출물을 이용한 동물실험 효능 검증 및 기전 연구	기능성원료의 동물모델 유효성 평가	- Scopolamin로 일시적인 기억력 손상이 유도된 동물모델 구축 완료 - 일시적인 기억력 손상이 유도된 동물모델을 이용하여 오미자복합추출물복합추출물에 대한 인지능개선 유효성을 평가
	네오뉴트라(주) : 오미자복합추출물을 이용한 인체적용시험 및 개별인정형	인지기능개선에 대한 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발	- 조사된 인체적용시험 자료 검토 및 식품의약품안전처 건강기능식품 가이드라인을 바탕으로 프로토콜 초안 작성
2차 년도 (2018)	(주)알피바이오 : 오미자복합추출물을 이용한 제조시스템구축 및 건강기능식품의 사업화	제조공정 재설정 및 대량생산 시스템 구축	- 당을 다량 함유하고 있는 오미자의 특성으로 심한 흡습이 발생해 제조공정 재확립 및 대량생산 시스템 구축
		인체적용시험자 자료집 작성	- 원료표준화 및 전임상 평가자료를 바탕으로 인체적용시험자 자료집 작성
		기능성원료의 세포 사멸 및 괴사 평가	- 오미자복합추출물이 세포 사멸 및 괴사를 억제하여 인지능력 개선에 효능이 있음을 검증
	(재)경기도경제과학진흥원 : 오미자복합추출물을 이용한 원료 표준화 및 유전형질 판별	동물모델을 통한 안전성 평가	- 오미자복합추출물의 안전성을 확보하기 위하여 GLP 기준의 기능성원료 동물 독성평가 (조제물분석, 단회 DES, 13주반복투여독성) 수행 - 시험물질을 13주동안 반복 경구투여한 결과 시험물질 투여야 기인한 독성 변화는 관찰되지 않아 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단
		지표성분 설정 및 표준함량설정을 위해 정량분석 시험	- 지표성분의 함량설정을 위해 HPLC-UV 분석법 개발 및 분석법을 검증(Selectivity, Linearity, LOD, LOQ, Repeatability)
		제조공정 표준화를 위한 기준규격설정	- 제조공정 표준화를 위해 오미자, 칠해목 추출물 제조 단계별 지표성분 함량 분석
	UHPLC-MS/MS를 이용한 오미자, 남오미자 판별법 연구 및 칠해목 식물	- 대사체분석 기법을 기반한 오미자 및 칠해목의 동속식물간의 판별기술 확립 (까치밥나무 5점, 칠해목 12점, 명자순 3	

		의 판별법 연구	점, 꼬리까치밥나무 4점)
아주대학교 산학협력단 : 오미자복합추출물을 이용한 동물실험 효능 검증 및 기전 연구		기능성재료에 대한 동물 실험 유효성 평가	- scopolamine으로 일시적인 기억력 손상을 일으킨 동물모델에서 오미자복합추출물 투여후 인지능개선 생리학 지표를 개선(BDNF, CREB, ERK, AKT)시켜 기억력 개선동물 실험 (모리스수중미로, 수동회피시험)에 효과를 검증
		동물효능시험 결과에 따라 인체적용시험 시 기능성 원료의 최적의 농도 설정	- 오미자복합추출물의 투여는 인지능력 개선에 효과가 있는 것으로 판단되며, 최적의 유효 용량은 150 mg/kg/day로 결정 - 본 시험에서 최초로 시행되는 점을 감안하여 1일 섭취량은 최종 1,500 mg/day로 설정
네오뉴트라(주) : 오미자복합추출물을 이용한 인체적용시험 및 개별인정형		인체적용시험 계획서(프로토콜)개발	- 인체에 대한 오미자복합추출물의 안전성과 유효성 평가를 위한 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 및 프로토콜 IRB 승인
		인체적용시험 수행	- 인체적용시험 수행(개시모임/모니터링)
3차년도 (2019~2020)	(주)알피바이오 : 오미자복합추출물을 이용한 제조시스템구축 및 건강기능식품의 사업화	오미자복합추출물을 이용한 제품 개발	- 개별인정 획득 전 오미자복합추출물 부원료로 활용한 건강기능식품을 개발하여 알피바이오가 운영하는 사판물에 판매
		원재료(오미자, 칠해목) 안전성 검사	- 원재료(오미자, 칠해목) 중 유해물질(중금속, 잔류농약)의 “식품의 기준 및 규격”의 적합 확인
		오미자복합추출물 제조과정 확립(GMP 시설)	- 제조단계별 지표(또는 기능)성분 함량 및 수율에 따른 제조공정을 확립
		오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 기준규격 설정	- 공인기관인 한국기능식품연구원 분석 결과에 따라 지표(또는 기능)성분 기준규격을 설정
		오미자복합추출물의 유해물질 기준규격 설정	- 오미자복합추출물의 중금속(납, 총비소, 카드뮴 및 총수은), 곰팡이독소 및 잔류농약(자가규격 58종)에 대한 분석결과 불검출 확인. - 공인기관인 한국기능식품연구원에 위탁하여 분석 완료

	인체적용시험용 식품 개발 및 제조(GMP 시설)	- 인체적용시험 시험식품 및 대조식품 제조
(재)경기도경제과학진흥원 : 오미자 복합추출물을 이용한 원료 표준화 및 유전형질 판별	기능성 원료의 재배지별 지표물질 함량 분석	- 개발된 HPLC-UV분석법을 활용하여 국내산 오미자 5개 지역, 칠해목 2개 지역의 지표물질(Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid) 함량 분석
	HPLC를 이용한 기능성원료의 표준화	- 오미자, 칠해목 분석법 밸리데이션을 완료 (특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 범위(Range), 정량한계(Limit of Quantitation), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 시스템 적합성(System suitability testing))
아주대학교 산학협력단 : 오미자복합추출물을 이용한 동물실험 효능 검증 및 기전 연구	치매 유발 동물모델에서 기능성원료(오미자복합추출물)에 대한 전임상 유효성 평가 시험	원료표준화가 완료된 기능성 식품원료에 대한 3가지 혼합 비율로, 치매 유발 동물모델에서 전임상 유효성 평가. 기능성 원료의 전임상 시험 용량은 기존의 개별인정형 원료의 1일 섭취량을 고려하여 3가지 용량으로 시험하며 오미자 복합추출물의 독성시험을 통한 안정성을 확보.
	기능성원료에 대한 동물 실험 검증 및 작용기전 규명	- scopolamine으로 일시적인 기억력 손상을 일으킨 동물모델에서 오미자복합추출물투여후 인지능개선 생리학 지표를 개선(Caspase-3, Bax, Acetylcholine)시켜 기억력 개선동물 실험 (Y-maze)에 효과를 검증
네오뉴트라(주) : 오미자복합추출물을 이용한 인체적용시험 및 개별인정형	인체적용시험 수행 완료	- 프로토콜에 따른 인체적용시험 수행 - 인체적용시험 모니터링 실시 및 보고서 작성(모니터링 보고서, 연구상황 보고서 등) - DM(Data Management) 및 통계분석 - 결과보고서 작성을 통한 IRB 결과 보고 완료
	개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 작성 및 식약처 신청 완료
	개별인정형 건강기능식품 기능성원료 승인	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 검토에 따른 보완자료 작성 중

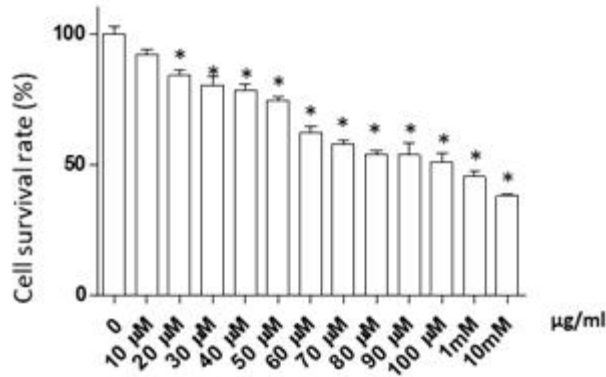
2장 연구수행 내용 및 결과

1절 오미자복합추출물의 유효성분 분리 및 기준규격 설정

1. 약용식물 탐색을 통한 오미자, 칠해목의 최적 추출 및 배합비율 조건 확립

가. 신경세포에 산화적 스트레스를 유도하기 위한 과산화수소(H_2O_2) 최적의 농도 선정

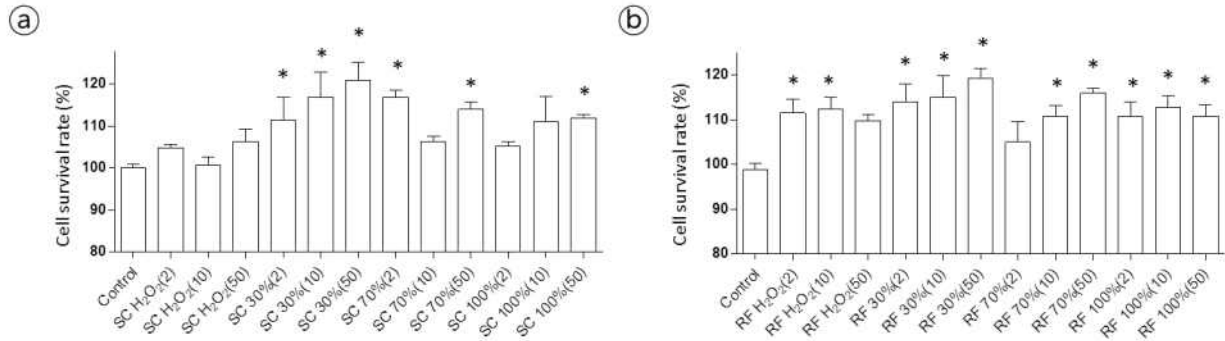
- 신경세포 사멸을 유도하기 위한 과산화수소의 처리 농도를 결정하기 위해 SH-SY5Y 세포를 96 well plate에 37°C에서 24 시간 동안 배양한 후 과산화수소를 농도별(10~100 μM)로 1시간씩 처리하고 MTT assay를 이용하여 신경세포의 생존율을 측정하였다. 생성된 formazan은 DMSO로 용해시키고 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 550 nm에서 O.D값(흡광도)을 측정하였으며, 측정한 formazan 생성 정도는 정상 세포에서의 측정값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.



- 신경세포의 생존율을 확인한 결과, 정상세포와 비교 시 50%의 세포사멸이 유도된 과산화수소 처리 농도는 100 μM 으로, 뇌신경세포에 산화적 스트레스를 유도하기 위한 과산화수소의 농도는 100 μM 으로 선정하였다.

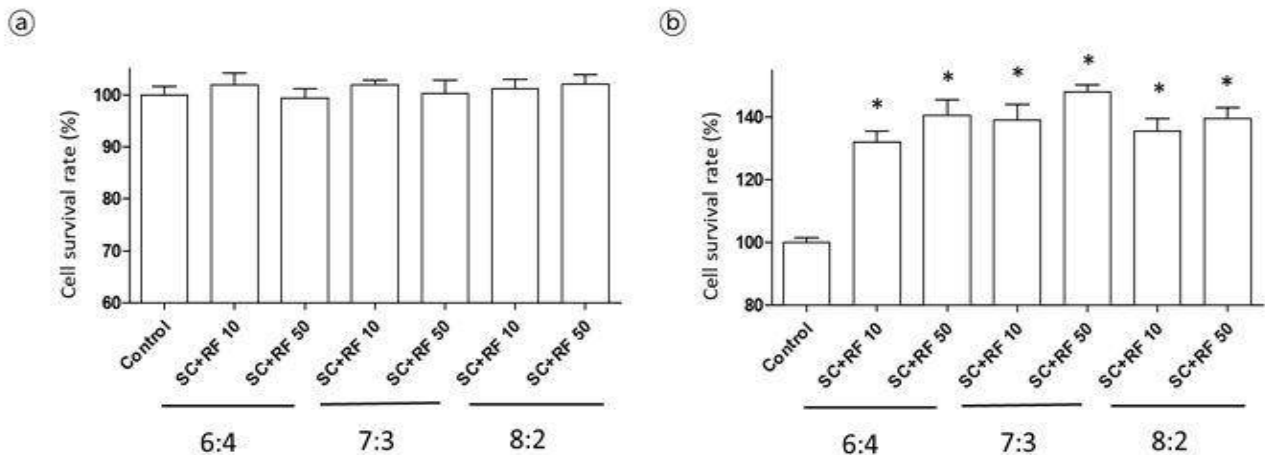
나. 오미자, 칠해목의 최적의 추출 용매 비율 설정

- 오미자와 칠해목을 0, 30, 70 및 100 % 주정을 이용하여 추출하였으며, 추출된 각각의 추출물을 2, 10, 50 $\mu g/ml$ 의 농도로 SH-SY5Y 신경세포를 이용한 세포보호 효능을 확인한 결과, 주정 농도별 오미자추출물과 칠해목추출물을 처리한 신경세포는 산화스트레스 유도제인 과산화수소만 처리한 음성대조군보다 우수한 세포보호 효능을 나타냈으며, 특히 30% 주정에서 우수한 활성을 보였다.



다. 세포보호 효능 극대화를 위한 오미자추출물, 칠해목추출물의 최적 배합비율 결정

- 오미자추출물, 칠해목추출물의 세포보호 효능을 극대화하기 위해 각각의 추출물의 비율을 수율로써 6 : 4, 7 : 3 및 8 : 2로 혼합한 후 10 및 50 ug/ml의 농도로 SH-SY5Y 신경세포를 이용한 세포보호 효능을 확인한 결과, 다른 복합처리물 군보다 오미자와 칠해목추출물의 혼합비율이 7 : 3에서 가장 유의적으로 높은 신경세포 보호활성을 확인할 수 있었다. 또한, 오미자, 칠해목 추출혼합물은 세포 독성이 없는 것을 확인하였다.

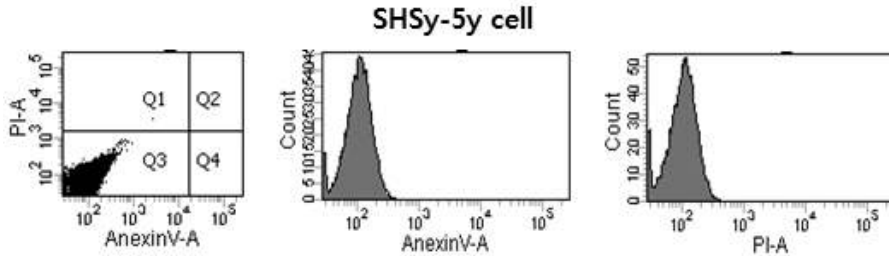


라. 오미자, 칠해목 추출혼합물의 세포사멸 및 세포괴사 억제효능 평가

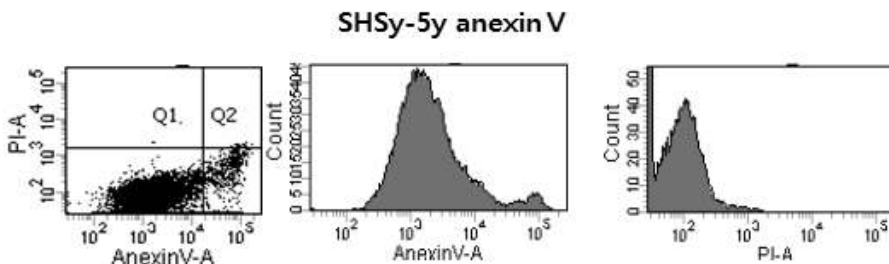
- Annexin V와 PI는 정상세포의 세포질에 존재하는 PS(Phosphatidyl Serine)가 세포사로 인하여, 세포 표면에 노출되게 되면 Annexin V와 결합하게 되며, 이와 반대로 세포막의 손상의 경우 PI 화합물이 세포 안에 유입되어 핵을 염색시킨다. 즉, 본 실험에서는 신경세포 보호활성 효능 극대화된 30% 에탄올로 추출된 오미자·칠해목 추출혼합물(고형물 대비 7:3)을 이용하여 세포사멸 및 세포괴사 억제 실험을 세포자동해석분리장치 (FACS)를 이용하여 Annexin V(세포사멸)와 PI(세포괴사) 실험을 진행하였다.

- 세포를 분주한 후 안정화를 위해 24시간동안 37°C, 이산화탄소 5%의 조건에서 배양하였으며, 양성대조군으로는 현재 인지능개선 건기식으로 시판되고 있는 포스파티딜세린 100µg/ml를 사용하였으며, 오미자칠해목 복합추출물(7:3) 10, 50 µg/ml농도에서 비교 분석하였다. 신경세포 보호활성을 보기위해 사용된 과산화수소의 농도는 100uM이며, 대조군에는 처리되는 물질에 포함된 DMSO의 농도와 동일한 농도의 DMSO를 처리하였다.

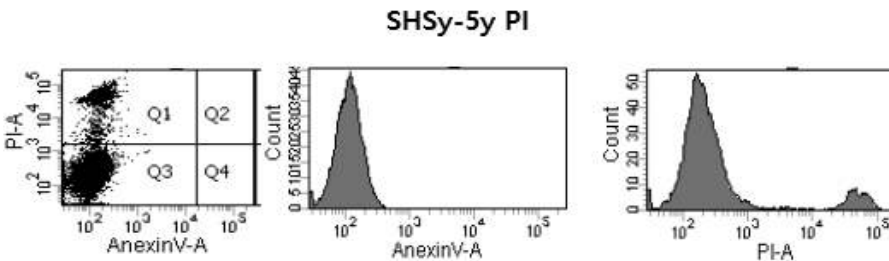
- 과산화수소 처리 후 1시간동안 37°C, 이산화탄소 5%의 조건에서 배양후, Annexin V와 PI를 처리하고 빛이 들지않는 곳, 상온에서 15분간 반응한 후, 세포자동해석분리장치(FACS)를 이용하여 분석하였다.



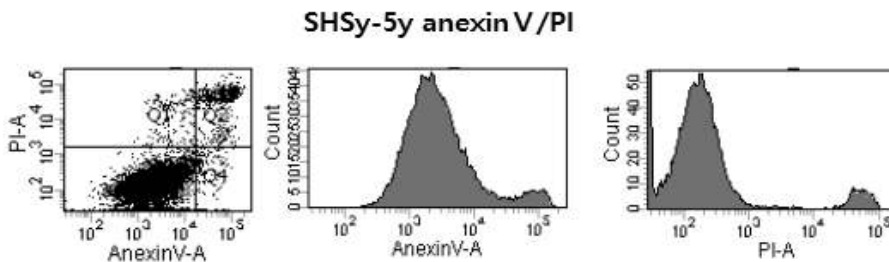
정상세포에서 과산화수소를 처리하지 않은 대조군



정상세포에서 세포사멸을 보기 위한 Annexin V를 처리한 대조군



정상세포에서 세포괴사를 보기 위한 PI를 처리한 대조군

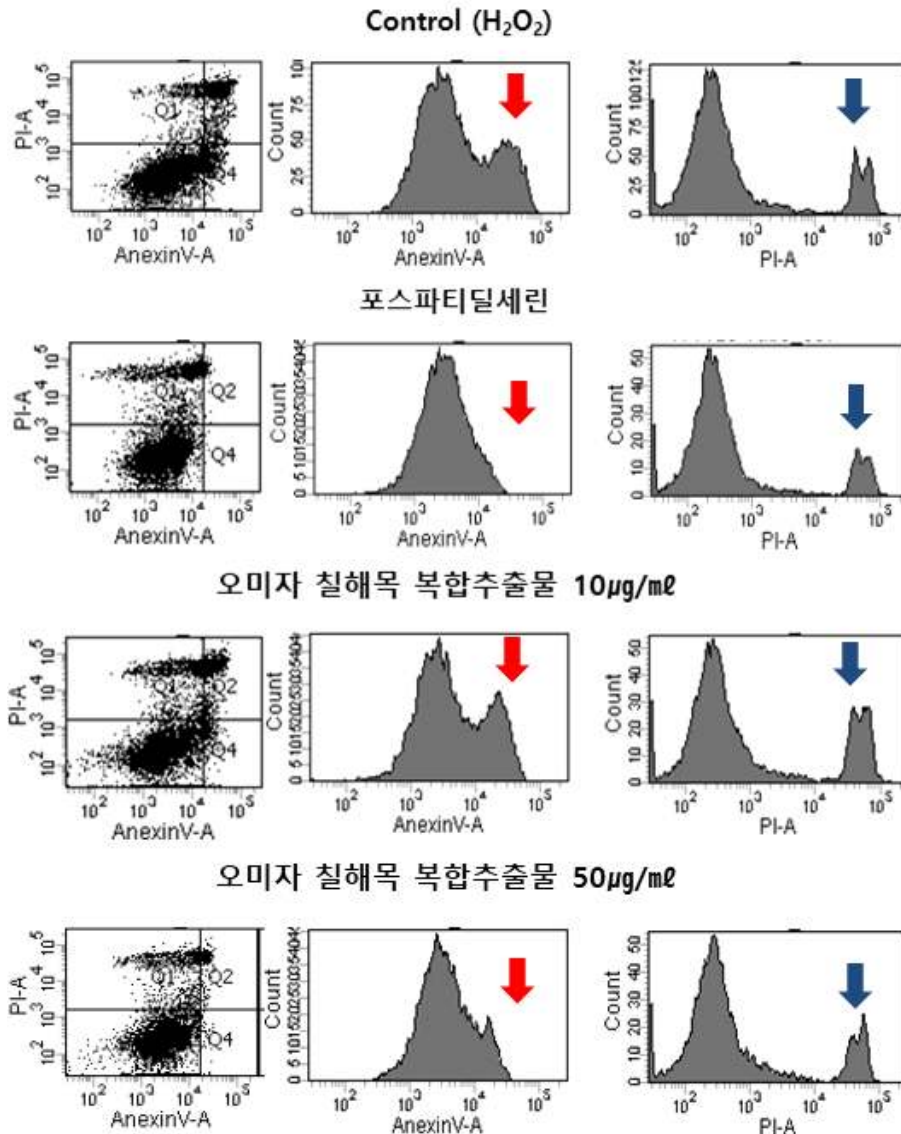


정상세포에서 세포사멸 및 세포괴사를 보기 위한 Annexin V와 PI를 처리한 대조군

Q1 : 세포괴사 반응구역, Q2 : 세포괴사와 세포사멸 반응구역, Q3 : 생존한 세포 반응구역,

Q4 : 세포사멸 반응구역

- 신경세포 사멸 및 괴사를 측정하기 위해 대조군의 반응을 분석한 결과, Annexin V는 세포사멸(Q4)에 반응, PI는 세포괴사(Q1)에 반응하는 것을 알 수 있으며, 위 실험에서 사용된 염색약이 문제가 없었다.



과산화수소를 처리한 신경세포에서 기능성원료의 세포사멸(빨간화살표) 및 괴사(파란화살표)억제 평가

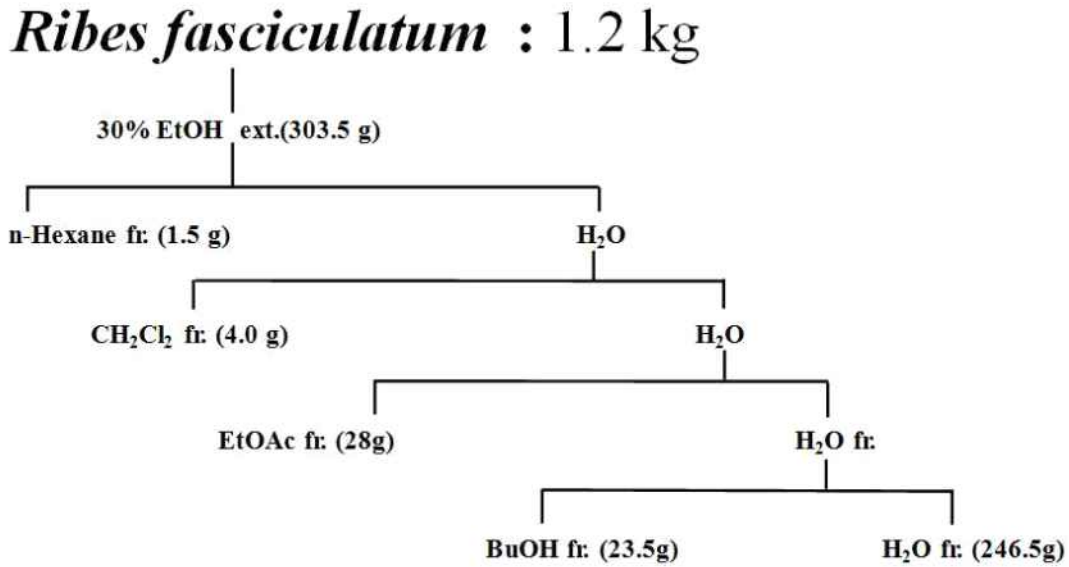
마. 결론

- 과산화수소로 산화 스트레스가 유도된 SH-SY5Y 세포에서 신경세포 보호효능을 확인한 결과, 오미자, 칠해목 각각의 추출물이 30% 주정 추출물 50 ug/ml의 농도에서 가장 높은 보호효능이 있음을 확인하였으며, 세포보호 효능 극대화를 위한 오미자추출물과 칠해목추출물의 최적의 배합비율은 수율로써 7 : 3임을 확인하였다. 또한 세포괴사 및 세포사멸을 확인한 결과, SH-SY5Y 신경세포에 과산화수소를 처리하였을 때, Annexin V와 PI의 증가가 나타나 세포 사멸과 괴사를 확인하였다. 하지만 오미자·칠해목 추출혼합물의 경우, 50 µg/mL 농도에서 PI(세포괴사)에서는 변화가 없었지만, Annexin V(세포사멸)의 수치 감소가 나타나 SH-SY5Y 신경세포의 세포사를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 오미자·칠해목 추출혼합물이 산화적 스트레스에서 신경세포 보호효과를 확인할 수 있었다.

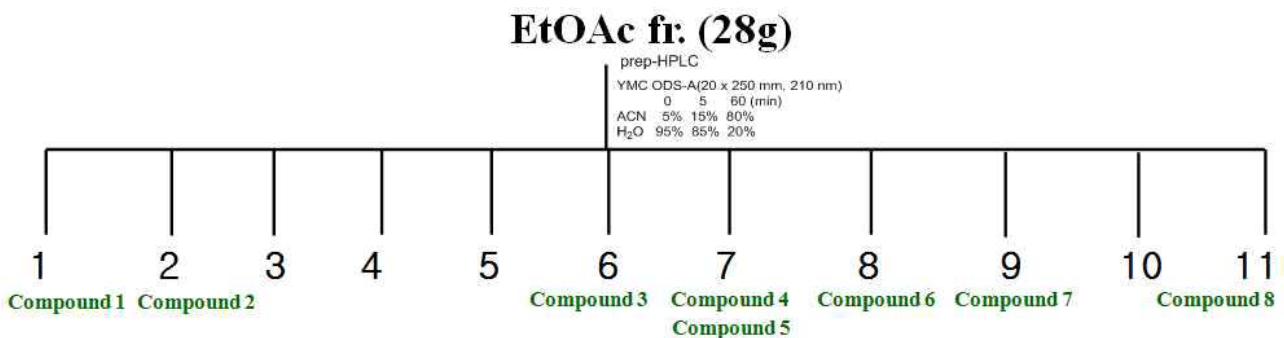
2. 지표 및 유효성분 확인을 위한 분리 정제 및 구조 결정 분석 방법 확립

가. 칠해목 추출 및 분획

- 칠해목 1.2 kg을 가장 우수한 뇌신경세포 보호활성을 나타내었던 30% EtOH로 추출하여, 추출물 303.5 g을 얻었으며, 이를 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 각각 1.5 g, 4.0 g, 28 g, 23.5 g, 246.5 g의 분획물을 얻었다.



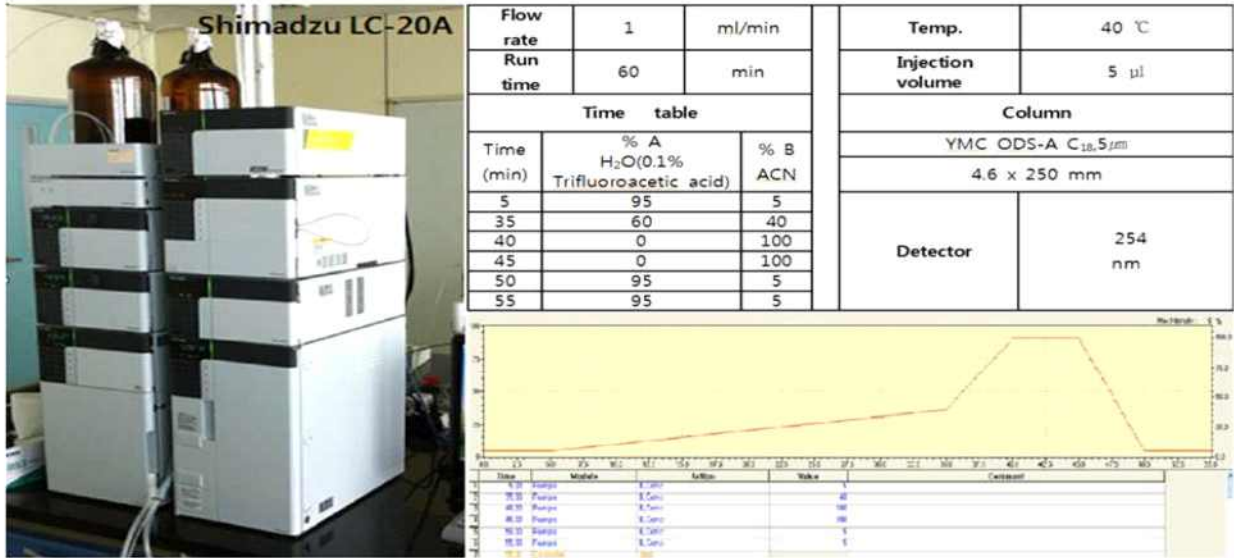
- 이 중 우수한 뇌신경세포 보호활성을 나타낸 에틸아세테이트 분획물을 대상으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 11개의 분획으로 나누었다. RP18 컬럼크로마토그래피를 실시하여 fraction 1은 화합물 1을, fraction 2는 화합물 2를, fraction 6은 화합물 3을, fraction 7은 화합물 4, 5를, fraction 8은 화합물 6을, fraction 9는 화합물 7을, fraction 11은 화합물 8을 얻었으며, 분리한 화합물의 구조결정은 NMR(1D, 2D)등의 분광데이터와 문헌 분석을 통해 결정하였다.



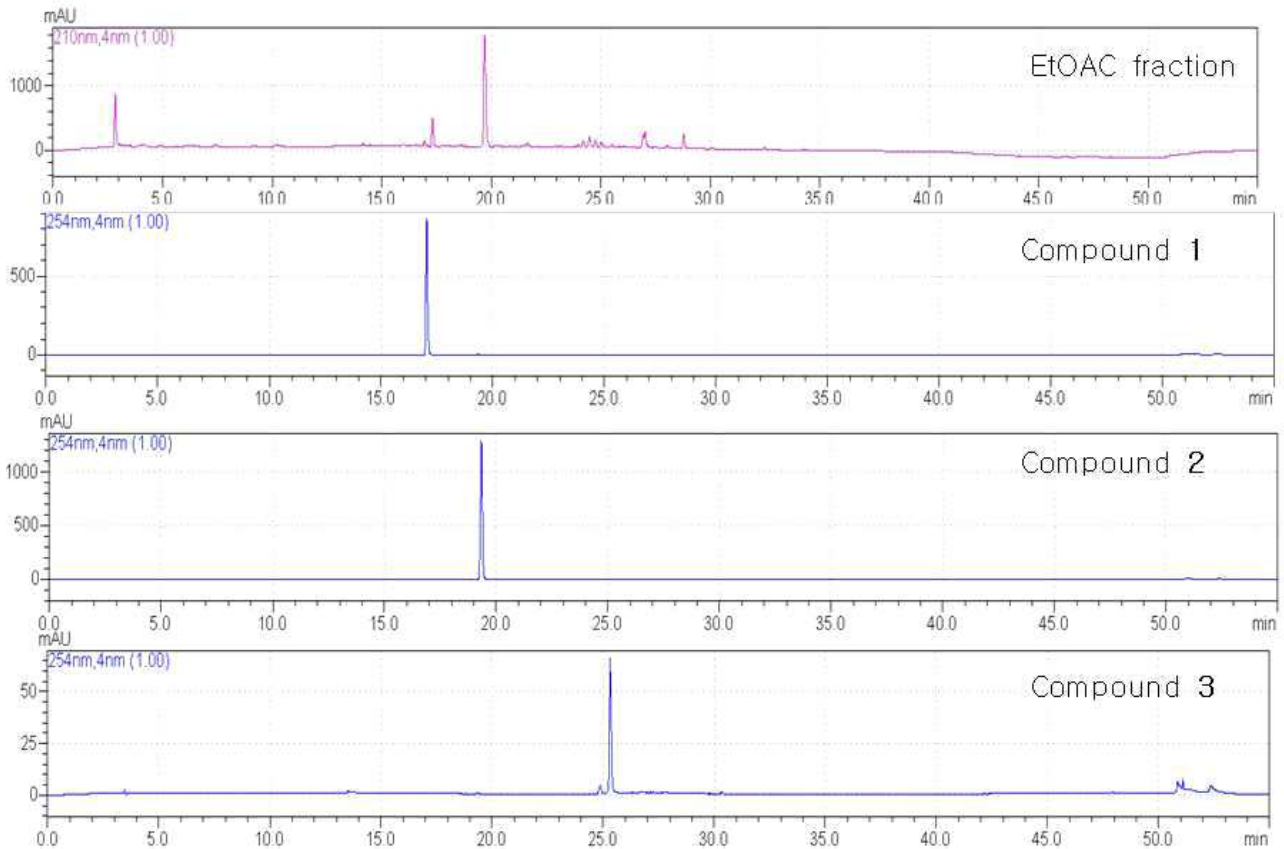
나. 칠해목 HPLC 분석조건 분리 화합물의 HPLC profiles

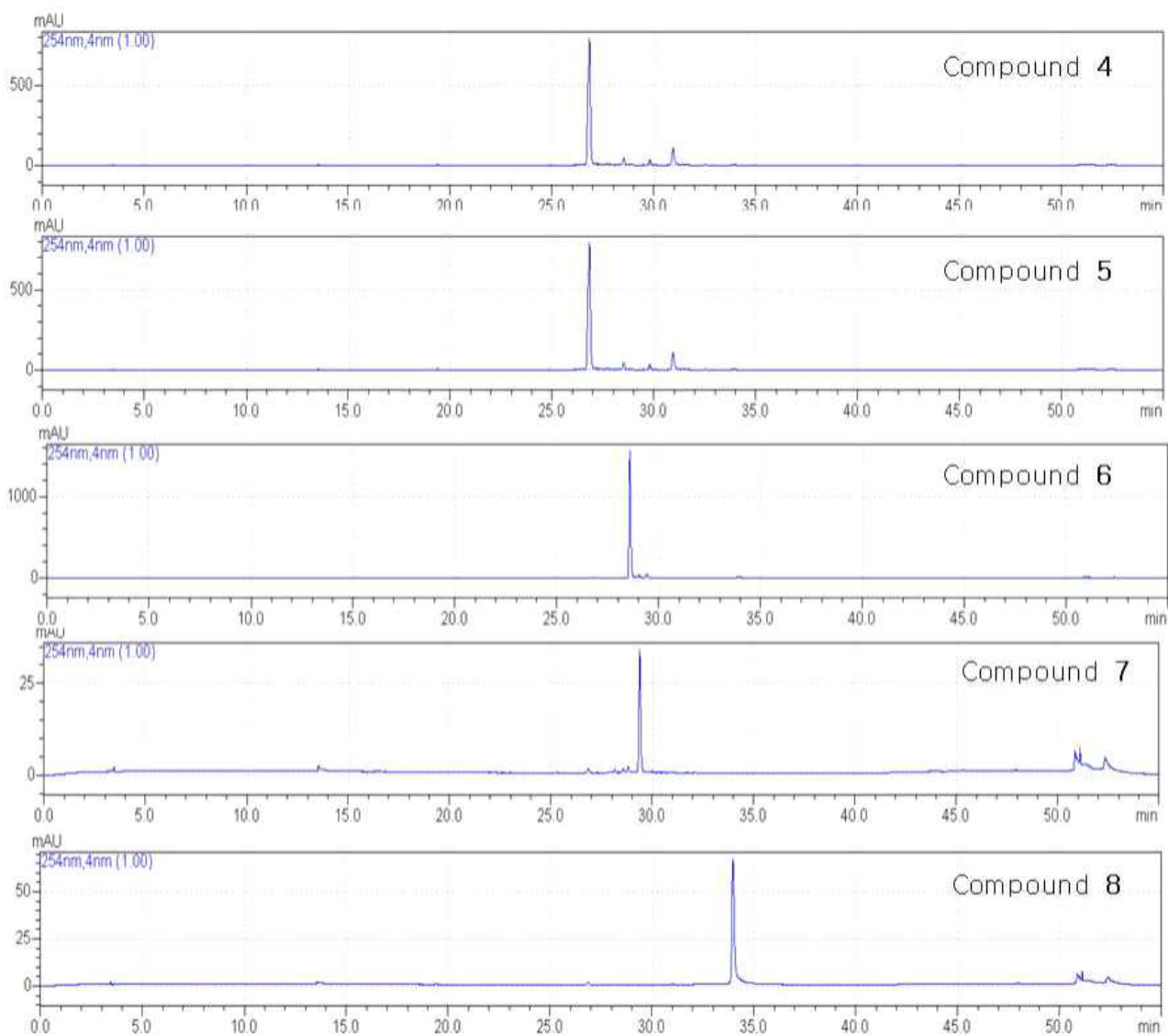
- HPLC 분석조건

HPLC condition



- 분리 화합물의 HPLC profiles

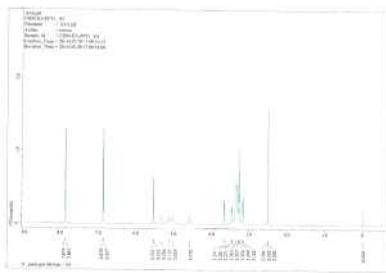




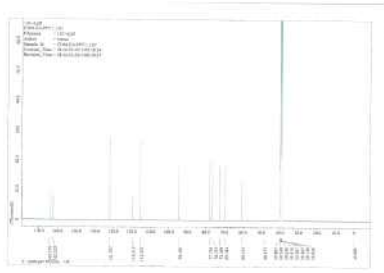
다. 칠해목 분리 화합물의 구조 동정

- 8개의 분리 화합물의 구조를 동정하기 위하여 핵자기공명기(NMR, Bruker Co., Ascend III 700 MHz) 분석, COSY-NMR 분석, 질량분석(MS) 등을 수행하였다. 상기 화합물을 NMR 전용 Merck Co.에 DMSO-d6에 녹여 5mm의 NMR 튜브 내에 넣고, 수소 및 탄소 핵자기공명을 측정하였고, 각 용매의 피크를 내부 표준물질로 하거나 TMS(tetramethylsilane)의 피크를 기준으로 하여 측정하였다. (분리한 화합물들의 분광데이터 측정은 1D, 2D NMR를 측정하였으며, 분석용매는 CD3OD를 이용함?)

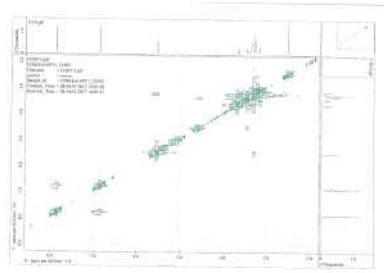
(1) 화합물 1(hydroxy benzoic acid-4-glucoside)



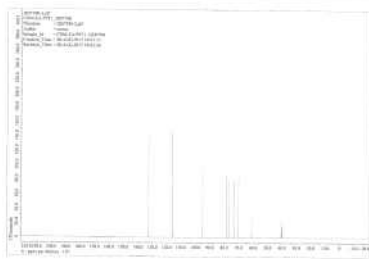
1H_NMR data



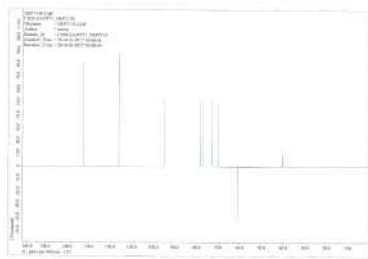
13C_NMR data



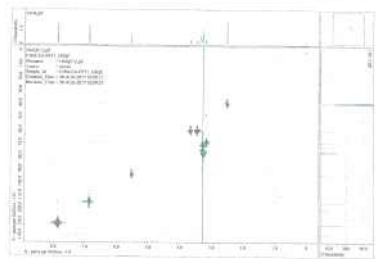
COSY



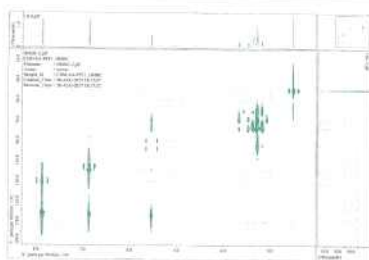
DEPT90



DEPT135



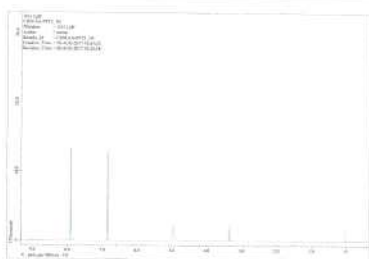
HSQC



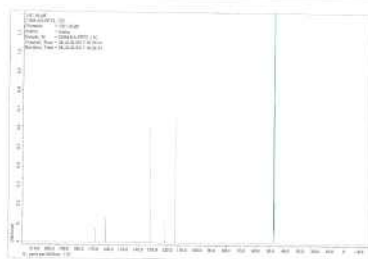
HMBC

Structure

(2) 화합물 2(4-Hydroxybenzoic acid)



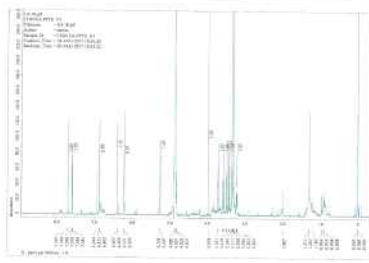
1H_NMR data



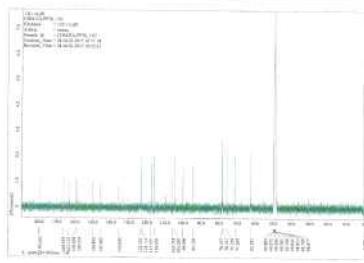
13C_NMR data

Structure

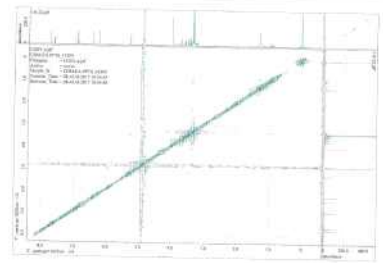
(3) 화합물 3(queretin-3-glucoside)



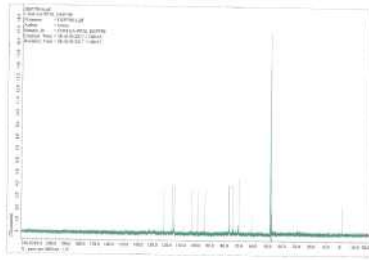
1H_NMR data



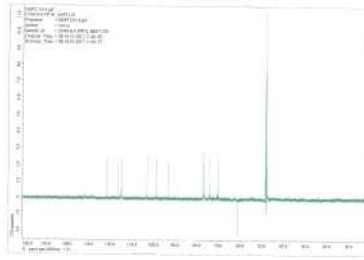
13C_NMR data



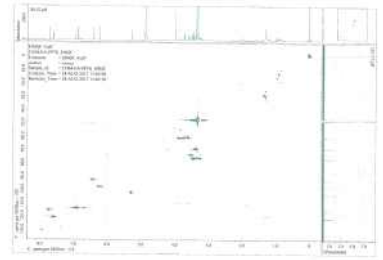
COSY



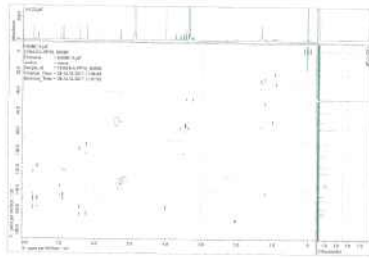
DEPT90



DEPT135



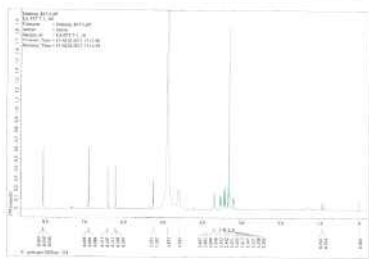
HSQC



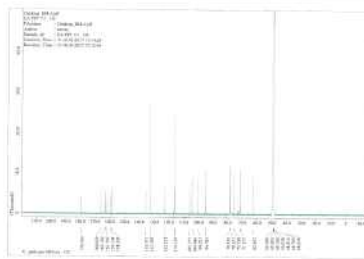
HMBC

Structure

(4) 화합물 4(kaempferol-3-glucoside)



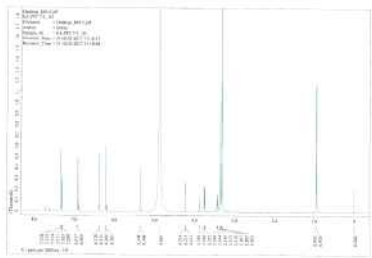
1H_NMR data



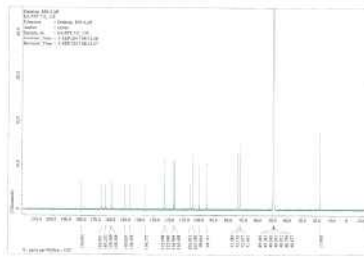
13C_NMR data

Structure

(5) 화합물 5(querctin-3-rhamnoside)



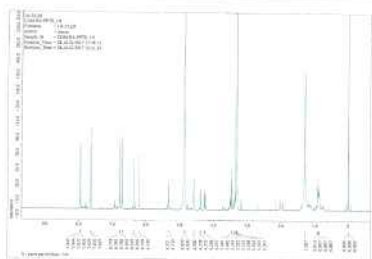
1H_NMR data



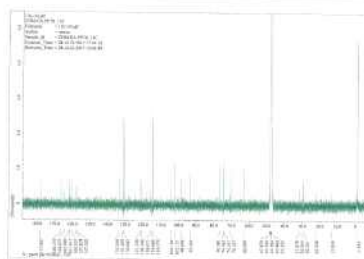
13C_NMR data

Structure

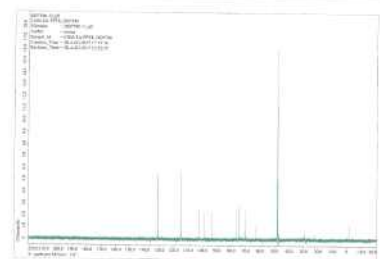
(6) 화합물 6(rugosaflavonoid C)



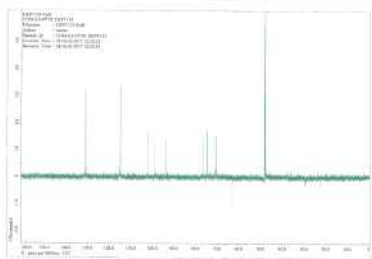
1H_NMR data



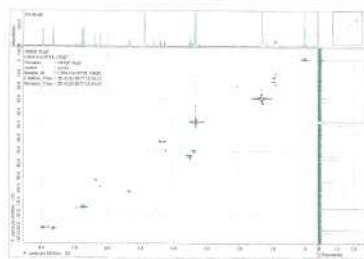
13C_NMR data



DEPT90



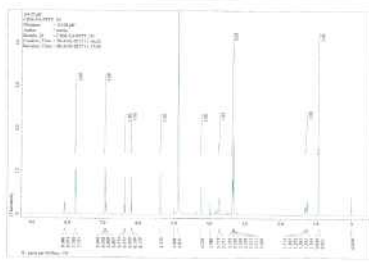
DEPT135



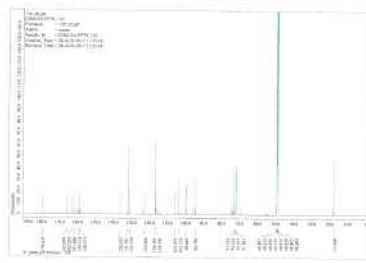
HSQC

Structure

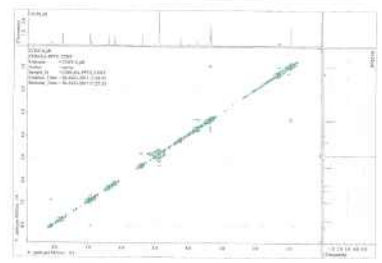
(7) 화합물 7(kaempferol-3-rhamnoside)



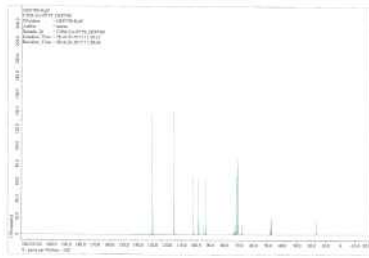
1H_NMR data



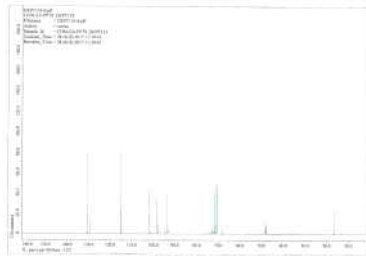
13C_NMR data



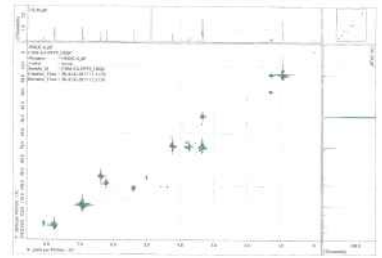
COSY



DEPT90



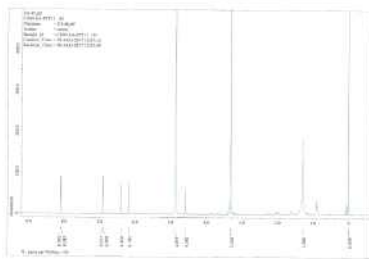
DEPT135



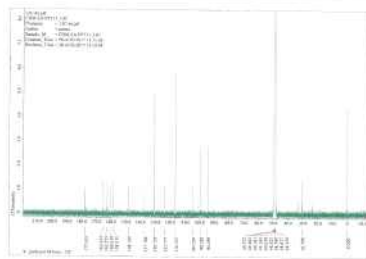
HSQC

Structure

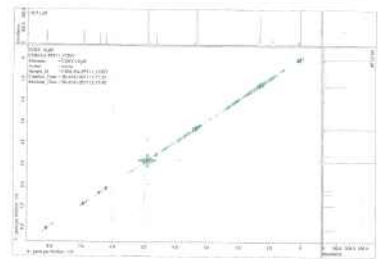
(8) 화합물 8(kaempferol)



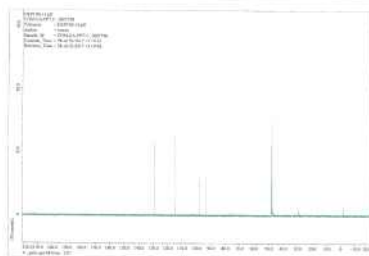
1H_NMR data



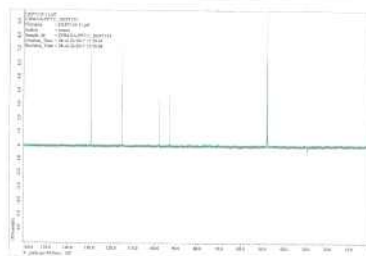
13C_NMR data



COSY



DEPT90

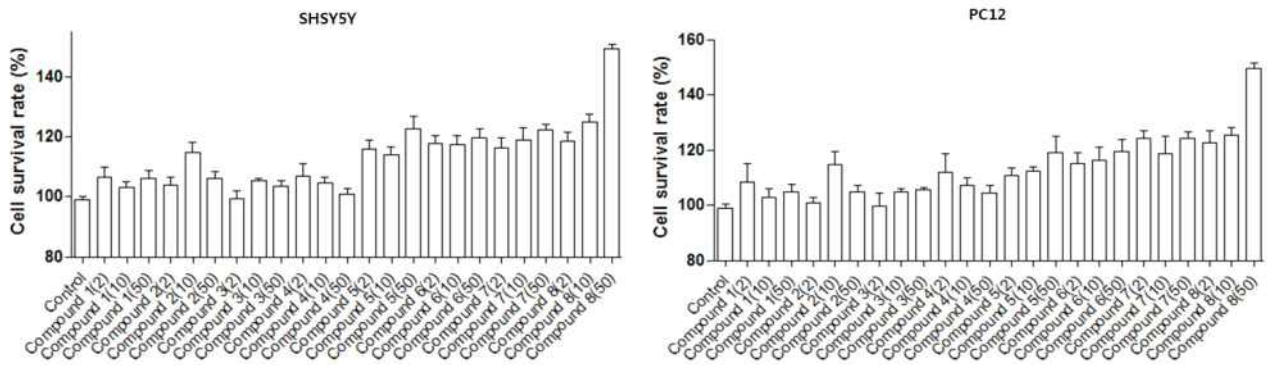


DEPT135

Structure

라. 칠해목 분리 화합물의 뇌신경세포 보호 효능 평가

- 8개의 분리 화합물의 뇌신경세포 보호활성을 확인하기 위하여 과산화수소를 처리한 신경세포(SH-SY5Y, PC12)에 MTT assay를 수행한 결과, 분리된 화합물 모두 뇌신경세포 보호효능을 나타내었다.



마. 결론

- 4-Hydroxybenzoic acid를 포함하여 8개의 성분을 분리하였으며, 분리된 화합물 모두 뇌신경세포 보호효능을 나타내었다.

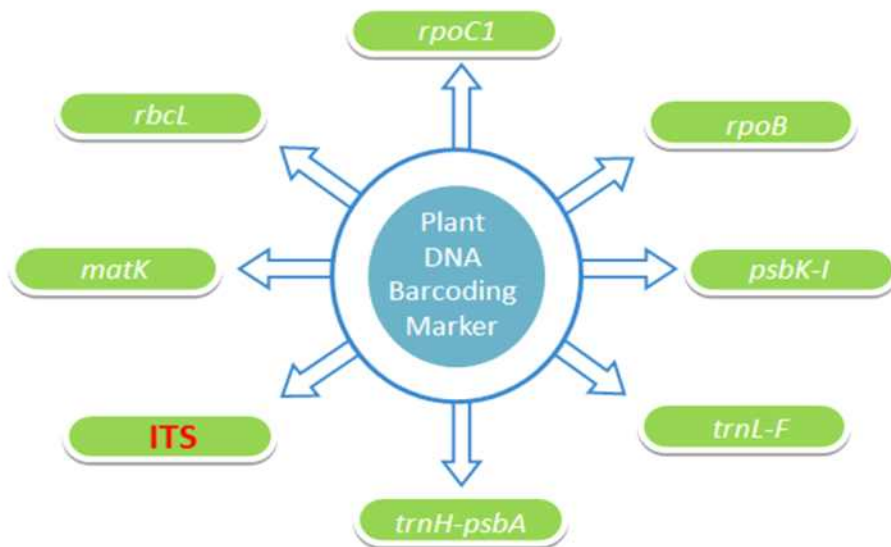
3. 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/채취시기) 확립

가. DNA 바코딩방법을 통한 구분

까마귀밥여름나무(*Ribes fasclculatum* var. *chinense*),의 근연종 *Ribes nigrum*, *Ribes altissimum*, *Ribes pulchellum*, *Ribes rubrum*, *Ribes procumbens*, *Ribes pauciflorum*등을 확보하여 다양한 바코딩을 이용하여 최적 바코딩마커를 확립하였다.

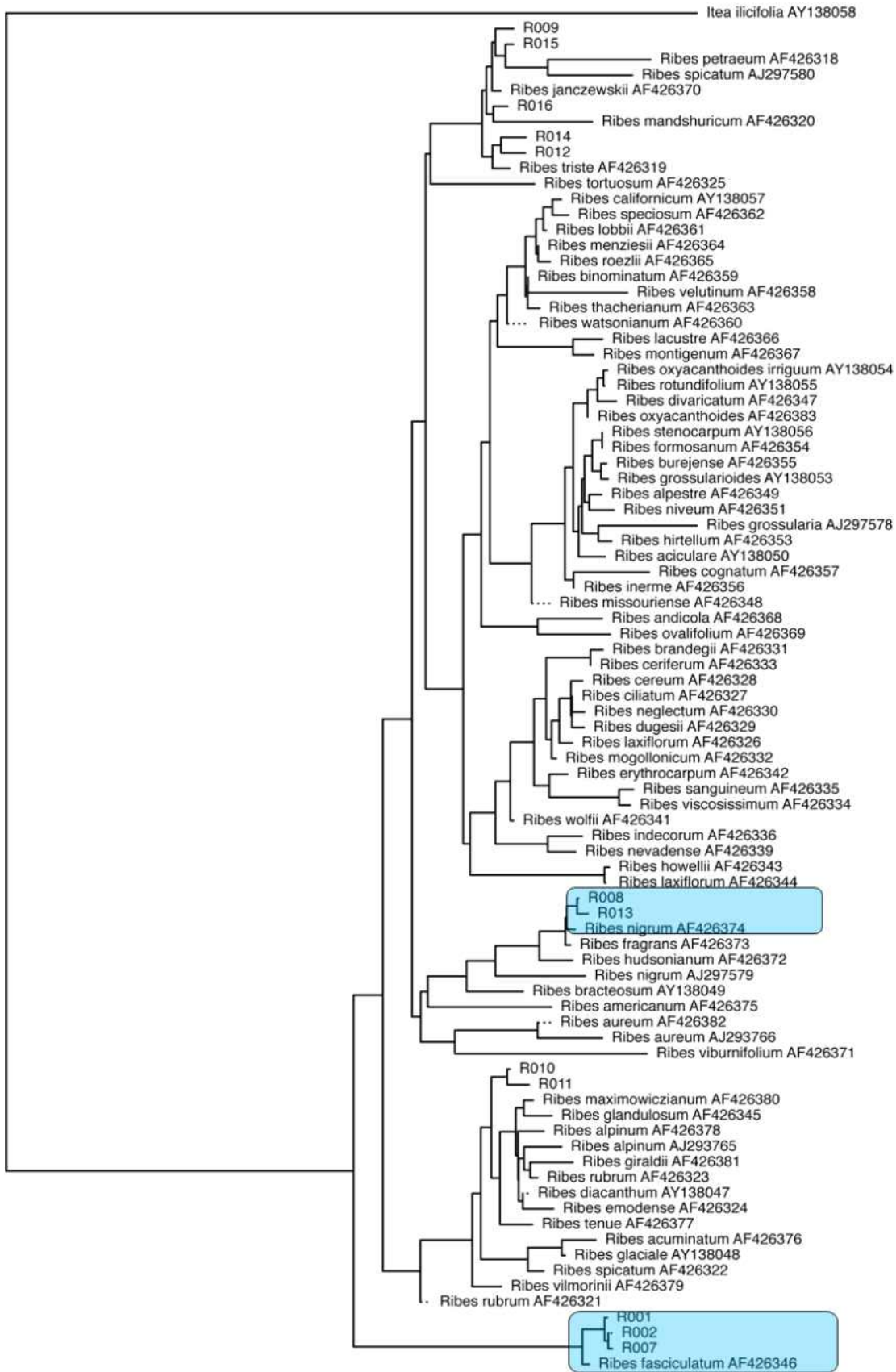
국내산 8종과 몽고산 8종의 칠해목 및 근연종의 Blast와 Neighbor joining tree 분석결과 가 완전히 일치 하지 않았으나, *R. fasclculatum*과 *R. nigrum*의 종구분은 ITS 바코딩을 이용하면 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다.

Representative Plant DNA Barcoding Markers



Code No.	Voucher No.	Species	BLAST Results			
			ITS	matK	rbcL	psbK-I
R001	-	Ribes fasciculatum var.chinense	Ribes fasciculatum	Ribes fasciculatum var. chinense	Ribes fasciculatum var. chinense	Ribes meyeri
R002	-	Ribes fasciculatum var.chinense	Ribes fasciculatum	Ribes fasciculatum var. chinense	Ribes fasciculatum var. chinense	Ribes meyeri
R003	-	Ribes fasciculatum var.chinense	Sequencing failed	Sequencing failed	PCR failed	Sequencing failed
R004	-	Ribes fasciculatum var.chinense	PCR failed	Ribes fasciculatum var. chinense	PCR failed	Ribes meyeri
R005	-	Ribes fasciculatum var.chinense	PCR failed	Sequencing failed	Sequencing failed	Sequencing failed
R006	-	Ribes fasciculatum var.chinense	Sequencing failed	Ribes fasciculatum var. chinense	Sequencing failed	Sequencing failed
R007	-	Ribes fasciculatum var.chinense	Ribes fasciculatum	Ribes lacustre	Ribes fasciculatum var. chinense	Ribes meyeri
R008	MK 143	Ribes nigrum	Ribes nigrum	Ribes nigrum	Ribes aureum	Ribes meyeri
R009	MK 148	Ribes altissimum	Ribes himalense	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes meyeri
R010	MK 296	Ribes pulchellum	Ribes rubrum	Ribes rubrum	Ribes maximowiczianum	Ribes meyeri
R011	MK 443	Ribes pulchellum	Ribes rubrum	Ribes rubrum	Sequencing failed	Ribes meyeri
R012	MK 484	Ribes rubrum	Ribes altissimum	Ribes rubrum	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes meyeri
R013	MK 576	Ribesprocumbens	Ribes nigrum	Ribes nigrum	Ribes aureum	Ribes meyeri
R014	MK 594	Ribesrubrum	Ribes environmental	Ribes rubrum	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes meyeri
R015	MK 598	Ribes pauciflorum	Ribes rubrum	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes rubrum	Sequencing failed
R016	MK 649	Ribes altissimum	Ribes himalense	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes moupinense var. tripartitum	Ribes meyeri

NJ tree



Neighbor joining tree for Ribes species ITS sequences from this study and genebank data

나. UHPLC-HR-MS/MS 기반의 대사체 기법을 통한 구분

(1) 수집시료 및 감별

칠해목을 동속이종에서 유래한 원료와 구분하기 위해 (주)동북아생물다양성연구소 현진오 박사로부터 원산지가 정확한 까마귀밥속 식물 19점(까치밥나무 5점, 칠해목(까마귀밥나무) 7점, 명자순 3점, 꼬리카치밥나무 4점)을 확보한 후 UHPLC-HR-MS/MS 기반의 대사체 기법을 통해 동속 식물을 구분하였다.

번호	Label	산지	시료명	기타 사항
1	HD020-2-1	강원도 인제군	까치밥나무	
2	HD020-2-2	대암산	까치밥나무	
3	HD020-2-3	함백산 (강원도 정선군)	까치밥나무	
4	HD020-2-4	함백산 (강원도 정선군)	까치밥나무	
5	HD020-2-5	강원도 춘천시	까치밥나무	
6	HD020-3-1	전라남도 담양군(자연천사)	칠해목	
7	HD020-3-2	제천약초뜰	칠해목	
8	HD020-3-3	경기도 안성시	칠해목	
9	HD020-3-4	충청남도 보령시	칠해목	
10	HD020-3-5	충청남도 당진시	칠해목	
11	HD020-3-6	전라남도 함평군	칠해목 (까마귀밥여름나무)	
12	HD020-3-7	경상북도 안동시	칠해목	
13	HD020-4-1	D382	명자순	
14	HD020-4-2	함백산 (강원도 정선군)	명자순	
15	HD020-4-3	전라북도 무주군	명자순(잎)	
16	HD020-5-1		꼬리카치밥나무	
17	HD020-5-2	석개재 (강원도 삼척시)	꼬리카치밥나무	
18	HD020-5-3	강원도 정선군	꼬리카치밥나무(수나무)	
19	HD020-5-4	강원도 정선군	꼬리카치밥나무	

(2) UHPLC-HR-MS/MS 분석법 개발

(가) 표준품 및 시약

본 실험에서 시료의 분석에는 1등급 용매를 사용하였고, acetonitrile과 methanol, water 등 HPLC에 직접 사용하는 용매는 J. T. Baker사 (USA) HPLC급 고순도 용매를 사용하였고 증류수는 PURE-UP(Chem-Science, Modesto, CA, USA)에서 18 MΩ/cm로 여과한 것을 사용하였다.

(나) 실험 기구 및 분석기기

- Mass spectrometer : LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, USA)
Mass range : m/z 400 / 1200 (HESI positive ion mode)
- Liquid chromatography system : Accela UHPLC system (Thermo Scientific, USA)
Column : Acquity BEH C18 (2.1 × 150 mm, 1.7 μm, Waters)
- Statistic : Compound Discover 2.1 (Thermo Scientific, USA)

(다) 검출 확인

다음과 같은 UHPLC-HR-MS/MS 조건을 확립하였으며 20분 이내에 모든 성분이 검출됨을 확인하였다.

분석 조건 (LC)	Column	Acquity BEH C18(2.1×150mm, 1.7 μm, water)		
	Column Tem.	25℃		
	Flw rate	0.2 ml/min		
	Injection	10 μl		
	Autosampler tem.	25℃		
	Mobile phase	A : 0.1% formic acid B : 0.1% acetonitrile *Prerun time : 2min		
		Time(min)	A(%)	B(%)
0.0		95.0	5.0	
15.0		5.0	95.0	
20.0	95.0	5.0		
분석 조건 (MS)	Ion source	Electrospray (ESI) mode		
	Ion polarity	positive		
	End plate offset	-500 V		
	Capillary voltage	4500 V		
	Nebulizer pressure	0.3 bar		
	Dry gas (N2)	4.0 ml/min		
	Capillary temp.	180 ℃		
	Mass range	400 - 1200		

(라) 시료 전처리 과정

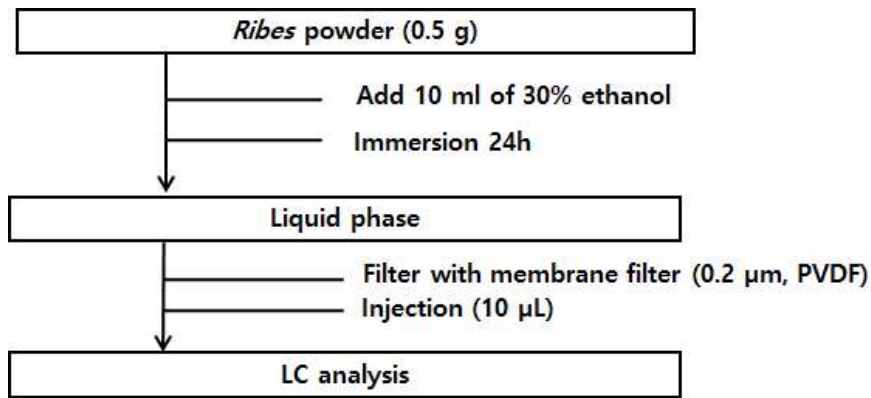
원산지가 정확한 시료 19점 (까치밥나무 5점, 칠해목 7점, 명자순 3점, 꼬리까치밥나무 4점)을 산지에서 채집하여 건조과정을 통한 후에 믹서를 이용하여 분쇄하였다. 분말화한 후 50호 체로 여과하여 균질화하고 이를 500 mg씩 정밀하게 취하여 10 ml의 추출용매를 가하였다.

(마) 추출조건

제조한 시료를 냉침법으로 30% ethanol로 24시간 동안 추출한 후 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 하고 0.2 um PVDF syringe filter로 여과하여 추출용액을 만들었다. 추출용액을 확립된 UHPLC-HR-MS/MS 분석법에 적용하여, 까마귀밥속의 성분들을 분석하였다.

(3) UHPLC-HR-MS/MS 분석 결과

(가) 시료 제조 방법



(나) UHPLC 분석조건

칠해목속에 함유되어 있는 성분들 간의 간섭으로 적은 양의 성분들이 ion suppression 되는 것을 막기 위해 column을 통한 분리를 하였다. 고정상으로 reverse phase column인 C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)을 사용하였고, 이동상에 이온화가 잘 되도록 0.1% formic acid (v/v)를 첨가한 이동상을 사용하였다. 10 ul sample volume를 injection 하여 flow rate가 0.2 ml/min인 gradient elution으로 20분간 분석하는 LC 조건을 확립하였다.

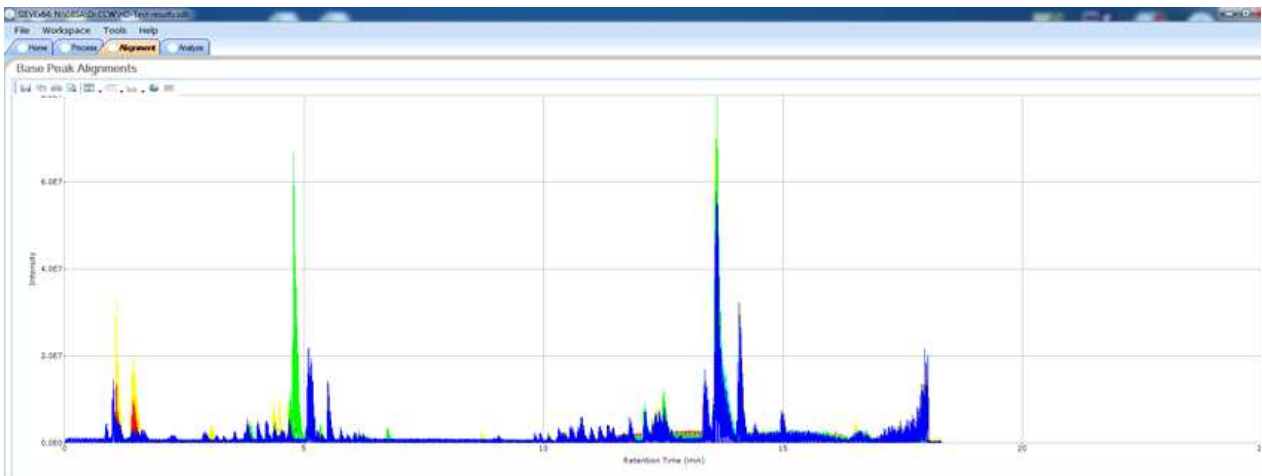


Fig. Chromatogram of Ribes.

(다) 칠해목 동속식물의 대사체 분석

분석을 통해 얻은 19개의 data를 존재하는 많은 변수들 중에서 공통적인 부분만을 뽑아 표현하는 주성분 분석(Principal Component Analysis)으로 그룹간 유의성을 확인한 결과, 까치밥나무, 칠해목(까마귀밥나무), 명자순, 꼬리까치밥나무 그룹이 나뉘는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 까마귀밥속 식물을 빠르고 정확하게 구분할 수 있으며, 관련 제품의 품질관리를 위한 표준화가 가능할 것으로 판단되었다.

- Bucket 설정 : 통계처리를 하기 전 19개의 raw data를 Thermo Scientific's SIEVE 2.2 program으로 옮겨서 bucketing을 하였다.

The image shows a screenshot of a software interface displaying a large table of data. The table has multiple columns and rows, with numerical values ranging from approximately 0 to 1000. The interface includes a menu bar at the top and a status bar at the bottom. The data appears to be organized into groups, possibly corresponding to different samples or treatments.

Fig. Bucket table of Ribes.

- 주성분분석 : 설정된 bucket을 가지고 동일한 프로그램인 Thermo Scientific's SIEVE 2.2을 이용하여 주성분분석을 하였다.

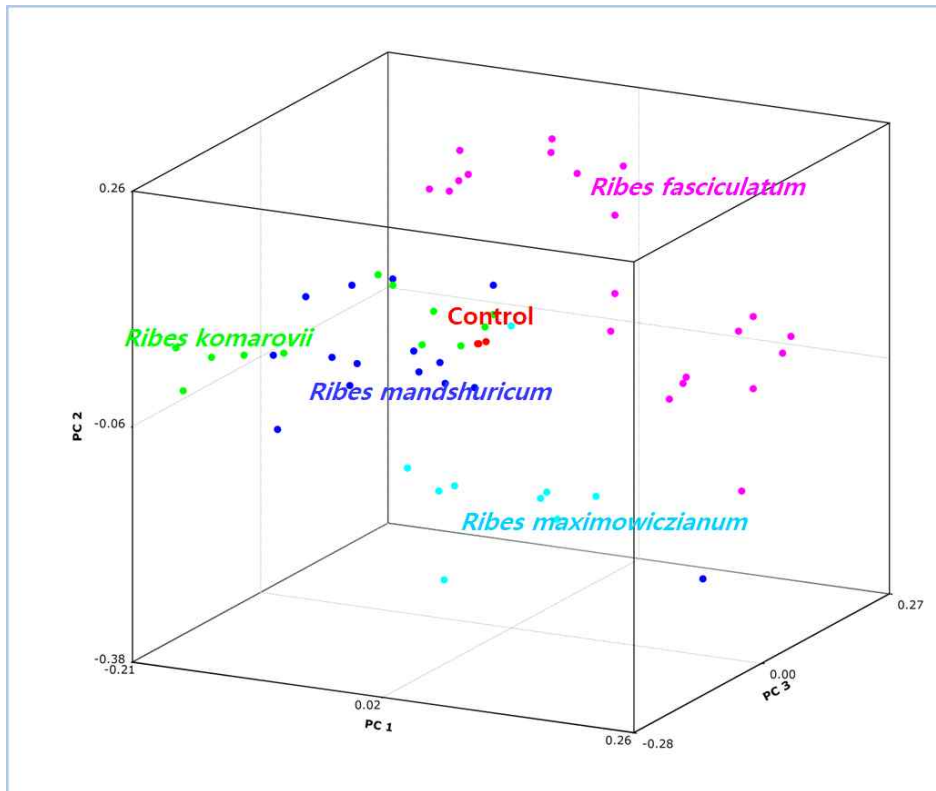


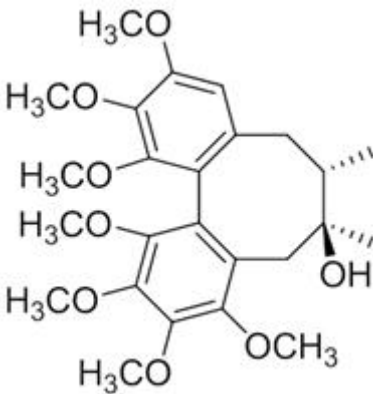
Fig. Principal Component Analysis score plot

다. 재배 지역에 따른 지표(또는 기능)성분 함량 비교

(1) 오미자 재배지별 함량분석

(가) 재료 및 시약

① 표준물질 (Schizandrin)

표준품명	Schizandrin
제조/판매회사명	Sigma Co.
구조식	
분자식	C ₂₄ H ₃₂ O ₇
분자량	432.51
CAS No.	7432-28-2

② 시약

- Ethanol (HPLC grade, Daejung)
- 0.05% Trifluoroacetic acid water (HPLC grade, Daejung)
- Methanol (HPLC grade, Burdick & Jackson)
- Acetonitrile (HPLC grade, Burdick & Jackson)
- Distilled water

(나) 시험방법

① 표준물질 제조

- 표준물질(Schizandrin) 2mg을 정밀히 취하여 2mL 실험용 튜브에 넣는다.
- 1mL의 메탄올을 이용하여 완전히 녹인다(표준원액 농도 : 2mg/mL).
- 표준원액을 10, 30, 50, 75, 100ug/mL의 농도가 되게 메탄올 용액으로 각각 희석하여 제조한다.
- 0.45um 멤브레인 필터로 여과한 용액을 표준용액으로 한다.

② 시료추출물 제조

- 100mg의 분쇄된 산지별 오미자 건조시료를 칭량하여, 70% 에탄올 용액 10ml을 첨가하여 잘 혼합함.

- 위의 시료를 초음파진탕기에서 20분간 초음파진탕 추출을 함.
- 추출된 시료를 0.45um 멤브레인 필터로 여과함.
- 표준용액의 농도 범위에 각 성분의 HPLC 피크면적 값이 초과되지 않도록 에탄올을 이용하여 추출시료를 희석하여 분석함. 본 실험에서는 시험용액 그대로 사용함.

③ 기기분석 조건

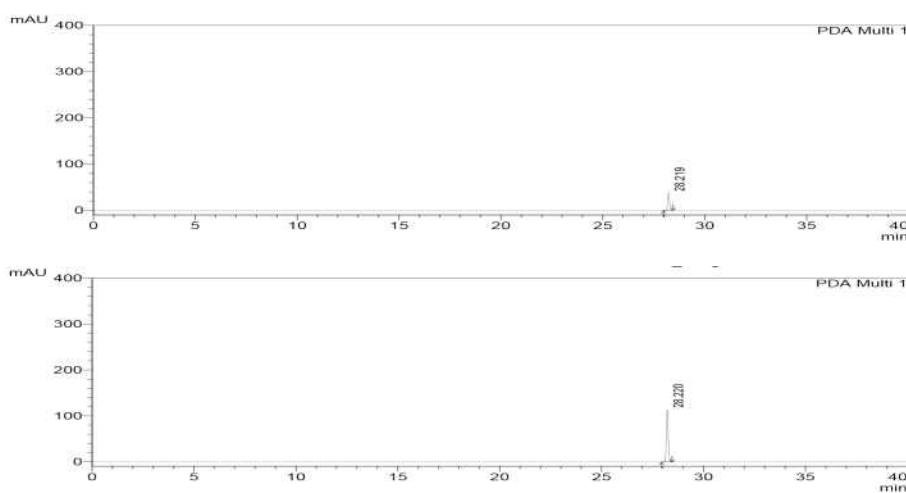
항 목	조 건
주입량	10uL
컬럼 온도	30℃
이동상	A 용액 : 0.05% 트리플루오로초산 B 용액 : 100% 아세토니트릴
검출기 파장	254nm
유속	1.0mL/분

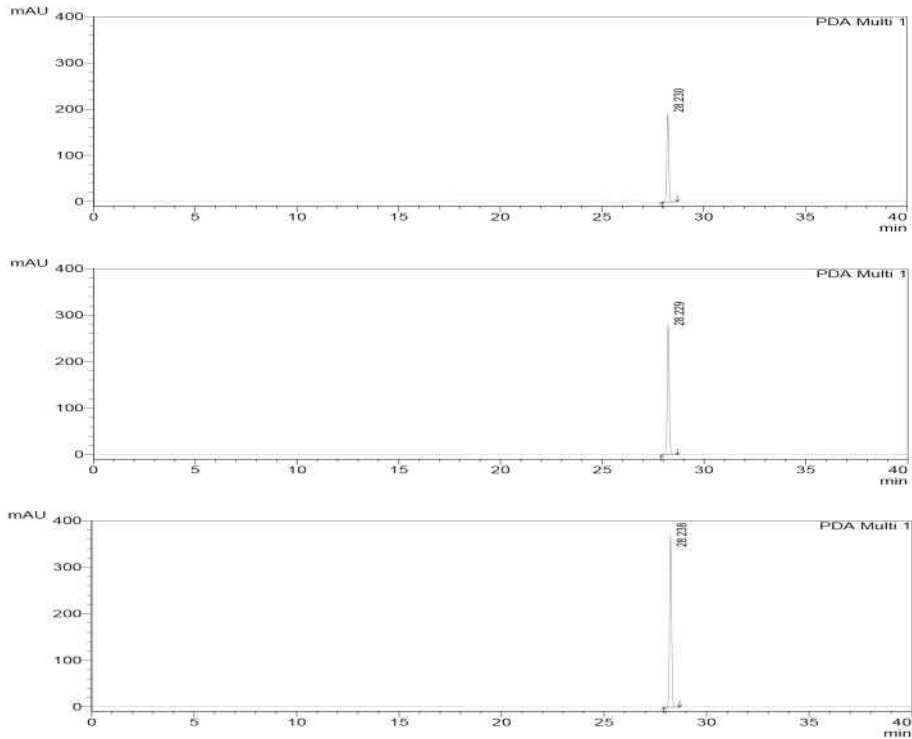
이동상 조건

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	95	5
30	35	65
31	0	100
40	0	100
41	95	5
60	95	5

(다) 시험결과

① 표준물질의 크로마토그램

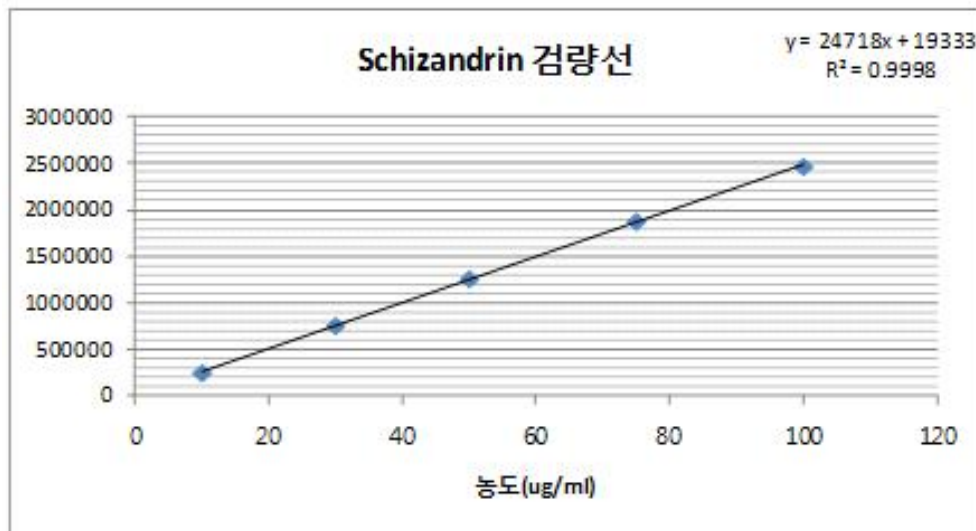




오미자의 표준물질 HPLC 분석 크로마토그램

② 표준물질로 검량선 작성

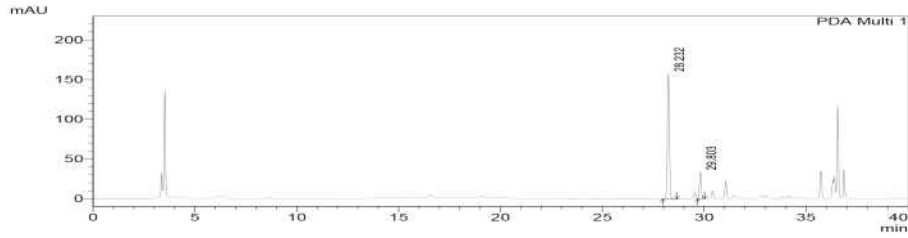
- 농도는 표준물질을 농도별(5점 이상)로 HPLC 측정하여 위와 같이 검량곡선을 그리고 농도와 면적간의 회귀식을 계산함. 이때 시료의 농도는 표준물질의 농도범위 안에 들어가도록 희석하여 측정함.



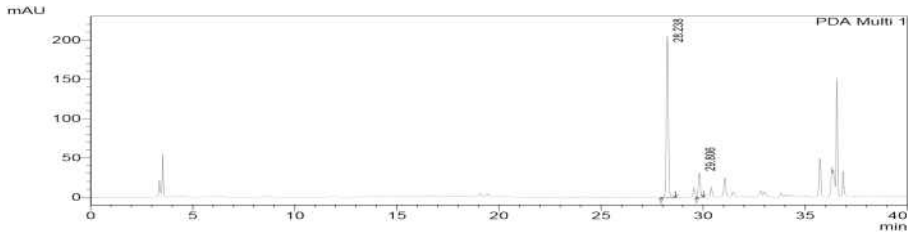
표준물질에 대한 검량곡선 및 검량식

③ 시료의 크로마토그램

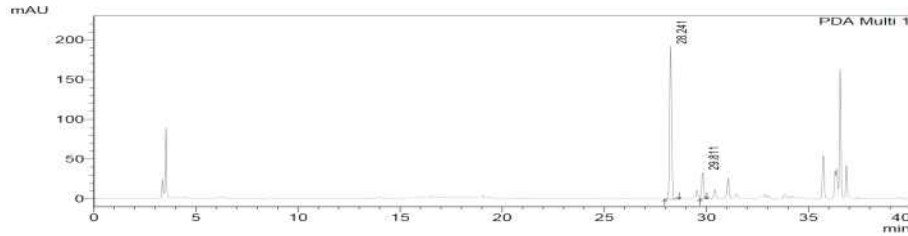
A 지역



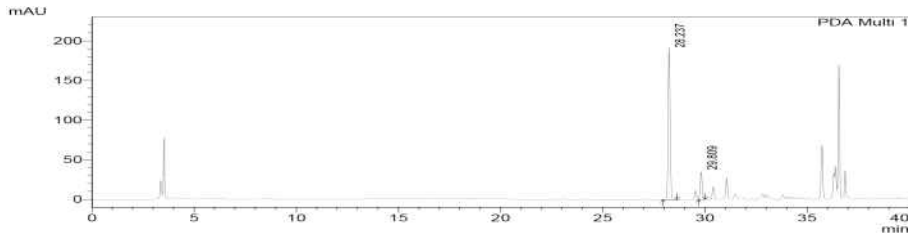
B 지역



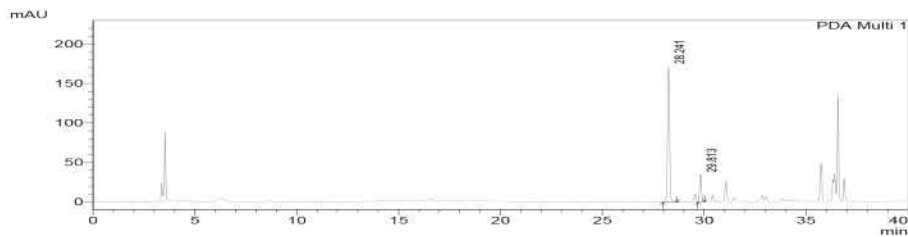
C 지역



D 지역



E 지역



산지별 오미자의 지표성분 HPLC 분석 크로마토그램

④ 검량곡선활용 HPLC 검출 농도 환산

- 분석된 시료 중 오미자의 시험용액으로부터 검출된 지표성분의 피크 면적값을 검정곡선식의 y값에 대입하여 x값을 계산한다.

Schizandrin 1062212 (측정된 면적값) = 24718x + 19333이므로 x=42.19ug/mL임.

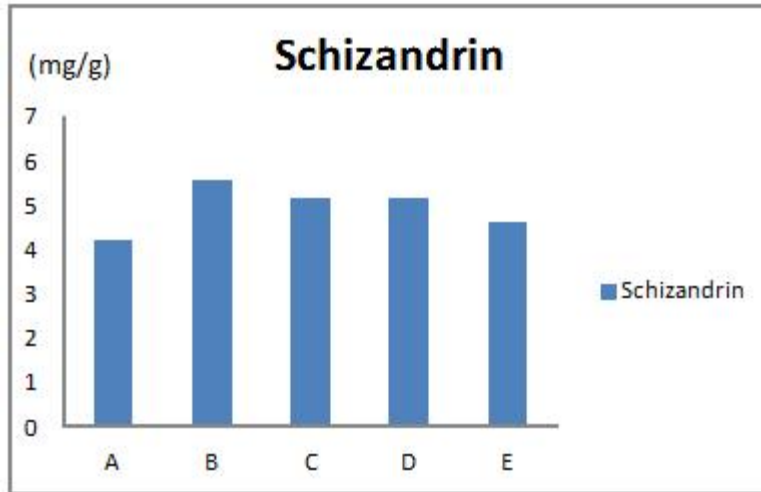
⑤ 시료 중 최종농도계산법

- 시료의 최종농도의 사용된 시료의 무게, 추출부피 및 희석배수를 고려하여 계산한다.

시험용액의 전량 = 10 mL

시료 채취량(건조중량) = 0.1 g

- Schizandrin의 함량 = $42.19 \text{ [ug/mL]} \times 10\text{[mL]} / 0.1\text{[g]} = 4.22\text{mg/g}$



산지별 오미자의 유효/지표성분 함량 비교

- A 지역의 오미자 건조시료 100g 중 Schizandrin의 함량은 422mg이 함유되어 있음을 의미함. 계산식을 통해 산출된 값을 나타냄.

- 산지별 유효/지표성분들은 A 지역 (4.22mg/g), B 지역 (5.55mg/g), C 지역 (5.16mg/g), D 지역 (5.17mg/g), E 지역 (4.63mg/g)으로 검출되었다.

(2) 칠해목 재배지별 함량분석

(가) 재료 및 시약

① 표준물질 (4-Hydroxybenzoic acid)

표준품명	4-Hydroxybenzoic acid
제조/판매회사명	Sigma Co.
구조식	
분자식	C ₇ H ₆ O ₃

분자량	138.12
CAS No.	99-96-7

② 시약

- Ethanol (HPLC grade, Daejung)
- 0.05% Trifluoroacetic acid water (HPLC grade, Daejung)
- Methanol (HPLC grade, Burdick & Jackson)
- Acetonitrile (HPLC grade, Burdick & Jackson)
- Distilled water

(나) 시험방법

① 표준물질 제조

- 표준물질(4-Hydroxybenzoic acid) 2mg을 정밀히 취하여 2mL 실험용 튜브에 넣는다.
- 1mL의 메탄올을 이용하여 완전히 녹인다(표준원액 농도 : 2mg/mL).
- 표준원액을 100, 150, 200ug/mL의 농도가 되게 메탄올 용액으로 각각 희석하여 제조한다.
- 0.45um 멤브레인 필터로 여과한 용액을 표준용액으로 한다.

② 시료추출물 제조

- 100mg의 분쇄된 산지별 칠해목 건조시료를 칭량하여, 30% 에탄올 용액 10mL을 첨가하여 잘 혼합함.
- 위의 시료를 50℃ 온침 추출을 함. 이때 8시간 추출함.
- 추출된 시료를 0.45um 멤브레인 필터로 여과함.
- 표준용액의 농도 범위에 각 성분의 HPLC 피크면적 값이 초과되지 않도록 에탄올을 이용하여 추출시료를 희석하여 분석함. 본 실험에서는 시험용액 그대로 사용함.

③ 기기분석 조건

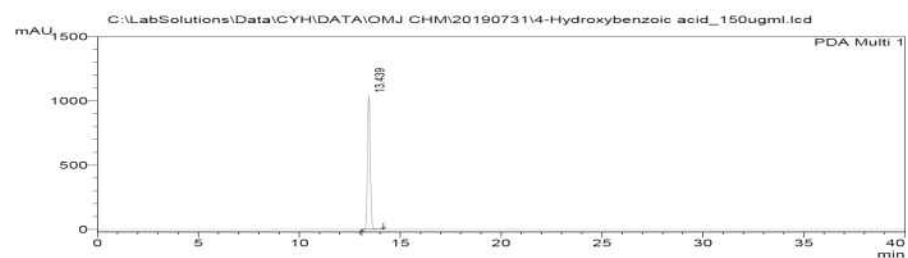
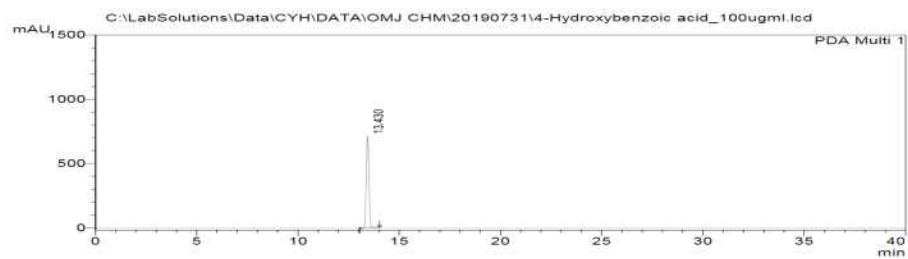
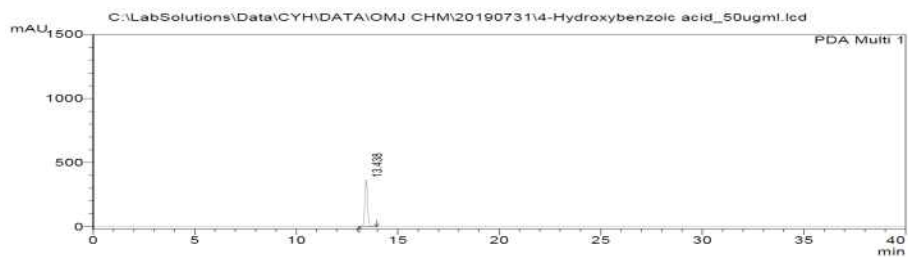
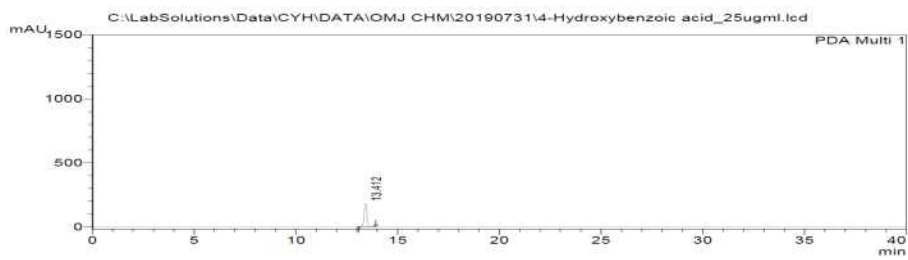
항 목	조 건
주입량	10uL
컬럼 온도	30℃
이동상	A 용액 : 0.05% 트리플루오로초산 B 용액 : 100% 아세토니트릴
검출기 파장	254nm
유속	1.0mL/분

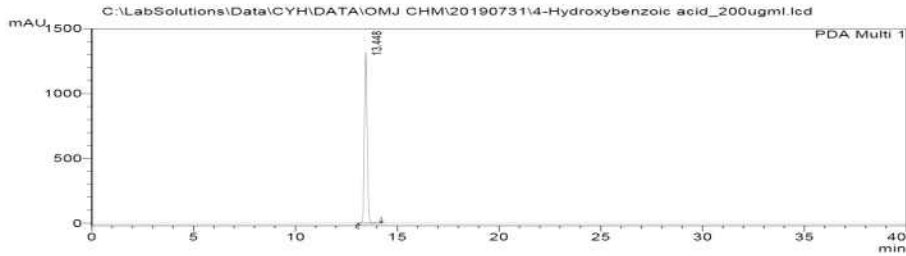
이동상 조건

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	95	5
30	35	65
31	0	100
40	0	100
41	95	5
60	95	5

(다) 시험결과

① 표준물질의 크로마토그램

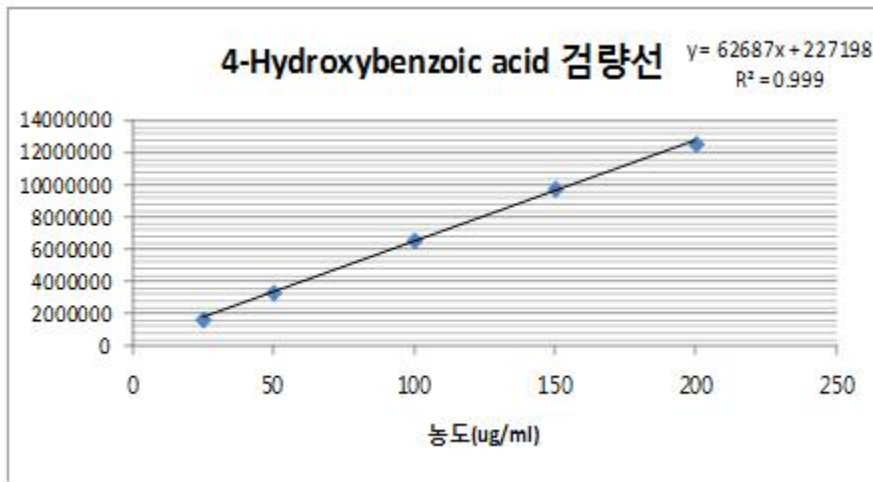




칠해목의 표준물질 HPLC 분석 크로마토그램

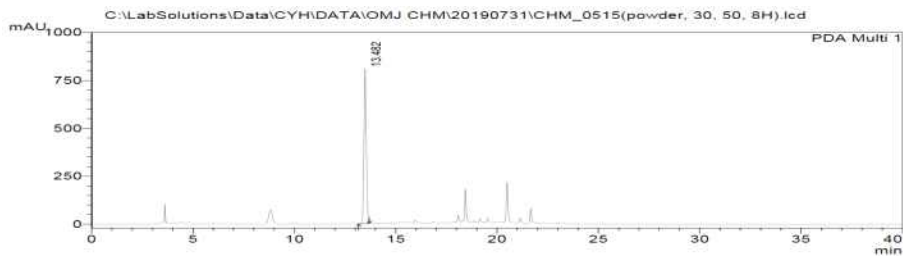
② 표준물질로 검량선 작성

- 농도는 표준물질을 농도별(5점 이상)로 HPLC 측정하여 위와 같이 검량곡선을 그리고 농도와 면적간의 회귀식을 계산함. 이때 시료의 농도는 표준물질의 농도범위 안에 들어가도록 희석하여 측정함.



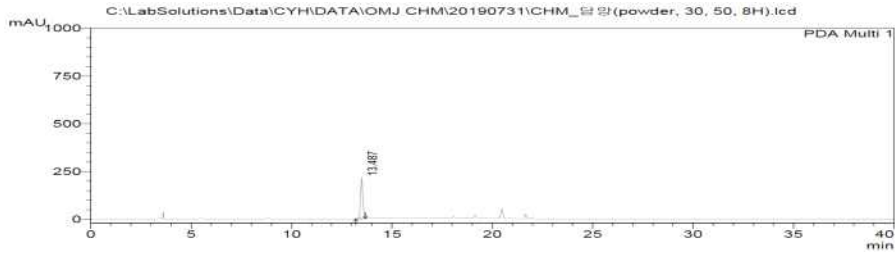
표준물질에 대한 검량곡선 및 검량식

③ 시료의 크로마토그램



A 지역

B 지역



산지별 칠해목의 지표성분 HPLC 분석 크로마토그램

④ 검량곡선활용 HPLC 검출 농도 환산

- 분석된 시료 중 칠해목의 시험용액으로부터 검출된 지표성분의 피크 면적값을 검정곡선식의 y값에 대입하여 x값을 계산한다.

4-Hydroxybenzoic

7233546 (측정된 면적값) = 63538x + 178590이므로 $x=111.04\mu\text{g/mL}$ 임.

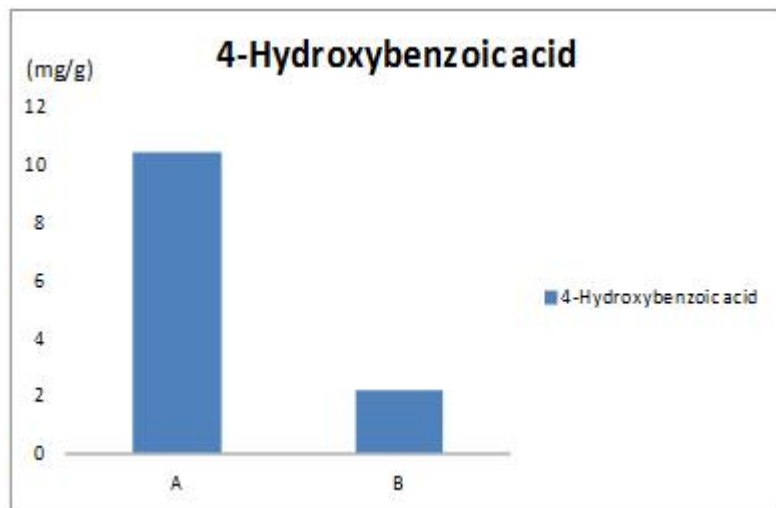
⑤ 시료 중 최종농도계산법

- 시료의 최종농도의 사용된 시료의 무게, 추출부피 및 희석배수를 고려하여 계산한다.

시험용액의 전량 = 10 mL

시료 채취량(건조중량) = 0.1 g

- 4-Hydroxybenzoic acid의 함량 = $103.94 [\mu\text{g/mL}] \times 10[\text{mL}] / 0.1[\text{g}] = 103.9\text{mg/g}$



산지별 칠해목의 유효/지표성분 함량 비교

- A 지역의 칠해목 건조시료 100g 중 4-Hydroxybenzoic acid의 함량은 1039mg이 함유되어 있음을 의미함. 계산식을 통해 산출된 값을 나타냄.

- 산지별 유효/지표성분들은 A 지역 (10.39mg/g), B 지역 (2.18mg/g)으로 검출되었다.

라. 채취시기에 따른 지표(또는 기능)성분 함량 비교

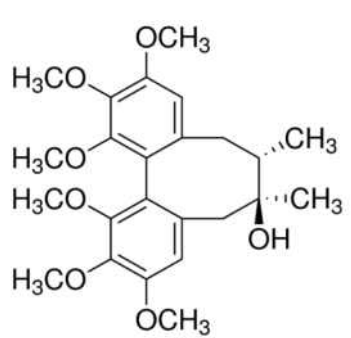
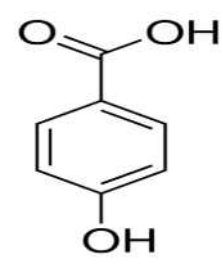
채취 시기	4-Hydroxybenzoic acid 함량	규격 적/부	추출수율
2019년 03월 06일	4.9 mg/g	부적합	
2019년 04월 20일	7.7 mg/g	적합	5%
2019년 05월 05일	8.0 mg/g	적합	10%
2019년 06월 15일	8.3 mg/g	적합	20%

- 칠해목 원료중 4-Hydroxybenzoic acid의 함량 규격은 6~8mg/g으로 설정하였고, 추출수율은 사업성을 위해 20% 이상으로 설정하였다.
- 칠해목의 재배 시기별 지표성분의 함량변화를 확인하기 위하여 위탁재배처인 초봄의 농장에서 기간별로 칠해목 잎을 1kg 씩 수확후 건조하여 사용하였다.
- 4월과 5월의 칠해목 잎 샘플은 4-Hydroxybenzoic acid의 함량 규격은 충족하나 추가 생육이 필요한 상태이며 추출수율이 10% 이하이므로 수확시기로 선정하지 않았다.
- 6월 중순 이후의 잎을 수확한 후 4-Hydroxybenzoic acid 함량 및 추출수율을 확인한 결과 자체 규격에 적합하여 수확시기를 6월 중순 ~ 7월 중순으로 설정하였다.

4. 지표(또는 기능)성분 설정

가. 지표(또는 기능)성분

- (1) 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon) : Schizandrin
 (2) 칠해목(*Ribes fasciculatum* var. *chinense* Maxim) : 4-Hydroxybenzoic acid

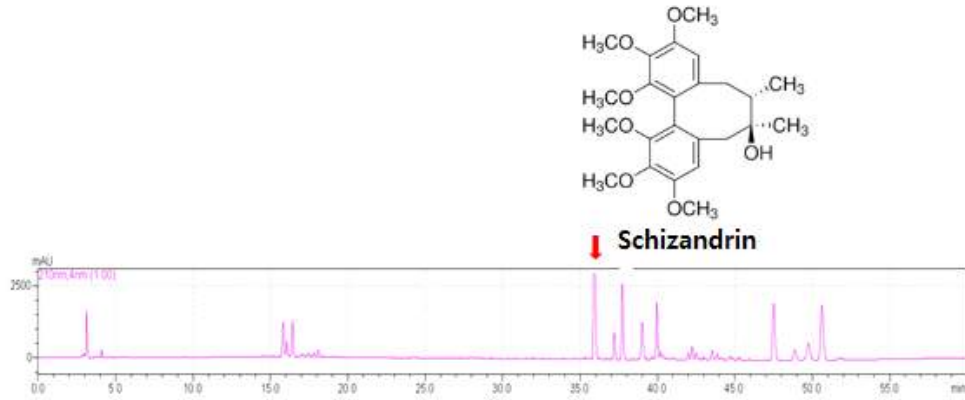
일반명	Schizandrin	4-Hydroxybenzoic acid
구조		
분자식	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	C ₇ H ₆ O ₃
분자량	432.51	138.12
CAS No.	7432-28-2	99-96-7

나. 지표(또는 기능)성분 설정근거

(1) Schizandrin

오미자의 대표적인 생리활성 물질은 lignan으로 그 구조적인 특이성에 따라 활성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. lignan성분들 중 대표적인 Schizandrin은 신장독성을 억제하는 효과가 보고되었고, gomisins A와 gomisins N은 급성 간독성에 대하여 우수한 보호 활성을 가져 간독성을 개선시키며, gomisins N은 흰 쥐에서 항산화작용을 통해 지질과 산화를 억제하고 간암에 효과적이라고 보고되었다. 그 외다른 연구에서 Schizandrin은 항산화작용, 혈당저하작용, 항퀘양작용, 만성간염치료효과, 중추신경 흥분작용, 항균에 효과가 있다고 검증된 바 있다.

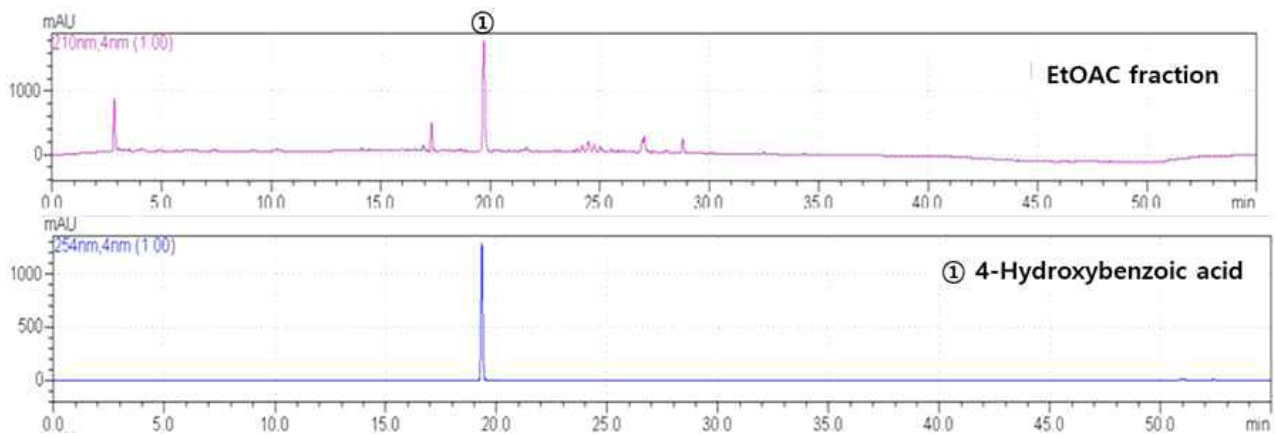
오미자복합추출물의 제조공정 및 규격은 Schizandrin으로 표준화 되어있으며, HPLC 분석법으로 원료 내 Schizandrin함량을 용이하게 분석 할 수 있었다. 분석방법의 타당성(Validation)은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 범위 항목으로 검증 하였다. Schizandrin 표준품은 상용화 되어있어 수급이 용이한 점도 안정적인 신청원료 생산에 도움이 된다.



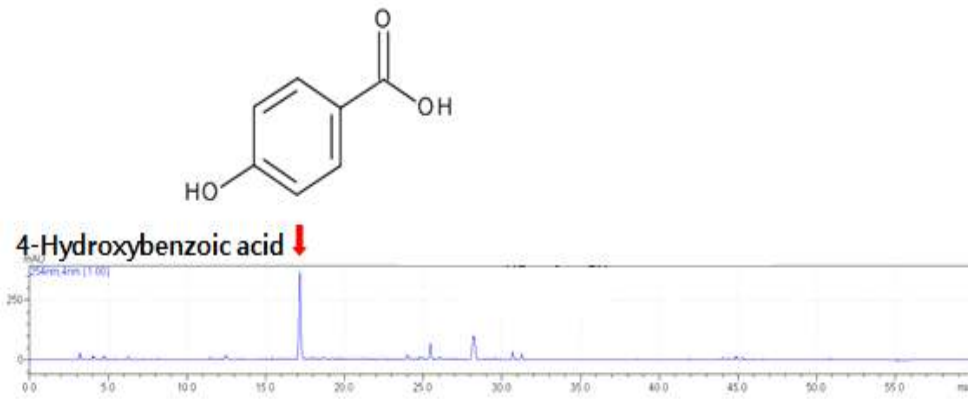
(2) 4-Hydroxybenzoic acid

오미자추출등복합물 중 4-Hydroxybenzoic acid의 분석방법은 HPLC 분석법이며 원료내 4-Hydroxybenzoic acid 함량을 용이하게 분석할 수 있었다. 분석방법의 타당성(Validation)은 특이성 및 직선성 항목으로 검증하였다.

칠해목추출물의 기능(또는 지표)성분을 선정하기 위해 칠해목추출물을 Ethyl acetate로 분획하여 8개의 성분함량을 peak별로 확인하였다. 8개 분획물중 가장 높은 피크 함량은 하기 표의 결과 1번의 peak 함량이 제일 높았다. 해당 화합물의 구조는 LC-MS 및 NMR 분석을 통해 4-Hydroxybenzoic acid임을 확인하였고, 4-Hydroxybenzoic acid는 8개 분획물 중 면적값이 90%임을 확인하였다.



4-Hydroxybenzoic acid의 표준품은 상용화 되어 있어 수급이 용이한 점도 안정적인 신청원료 생산에 도움이 된다. 또한 제조공정 중 함량을 용이하게 분석할 수 있었으며, 표준화가 가능하였다. 따라서 4-Hydroxybenzoic acid는 오미자복합추출물을 균일하고 안정적으로 관리할 수 있는 기능(또는 지표)성분이라고 판단하였다.



상기와 같은 근거를 바탕으로 “Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid”는 균일하고 안정적으로 생산/관리 할 수 있는 기능(또는 지표)성분이라고 판단하여, “오미자복합추출물”의 기능(또는 지표)성분으로 설정하였다.

5. 지표(또는 기능)성분 분석법 확립

가. 표준 및 분석용 샘플 조제 방법

(1) 표준용액

Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid 표준용액은 4.46 ~ 54.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.50 ~ 102.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 40% EtOH에 녹여 사용하였다. 각 샘플을 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과한 후 사용하였다.

(2) 시험용액

오미자복합추출물은 10 mg/ml 농도로 40% EtOH에 녹여 사용하였다. 각 샘플을 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과한 후 사용하였다.

나. HPLC 분석 조건

Method	Condition		
Instrument	HPLC		
	A(0.05% TFA Water)	B(Acetonitrile)	
	init.	95	5
	5	95	5
Mobile Phase	35	35	65
- Gradient elution	36	10	90
	45	10	90
	46	95	5
	65	95	5
Column	YMC ODS-A (250 x 4.6 mm I.D)		
Detector(Wavelength)	UV 254 nm		
Flow rate	1.0 ml/min		
Injection Volume	10 μl		
Column Oven Temperature	30 $^{\circ}\text{C}$		
Run Time	65 min		

다. 정량시험

각 표준용액에서 얻은 Schizandrin과 4-Hydroxybenzoic acid의 피크면적을 이용하여, 다음 계산식에 대입해 시료 중 Schizandrin과 4-Hydroxybenzoic acid의 함량을 계산하였다.

$$\text{Schizandrin 함량}(\text{mg}/\text{g}) = \frac{S1 \times a1 \times b1 \times \text{표준품순도}}{\text{시료 취한량 (mg)}}$$

S1 : 시험용액 중 Schizandrin 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

a1 : 시험용액 전량 (ml)

b1 : 시험용액 희석배수

$$\text{4-Hydroxybenzoic acid 함량}(\text{mg}/\text{g}) = \frac{S2 \times a2 \times b2 \times \text{표준품순도}}{\text{시료 취한량 (mg)}}$$

S2 : 시험용액 중 4-Hydroxybenzoic acid 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

a2 : 시험용액 전량 (ml)

b2 : 시험용액 희석배수

라. 오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 분석법 검증(Method Validation)

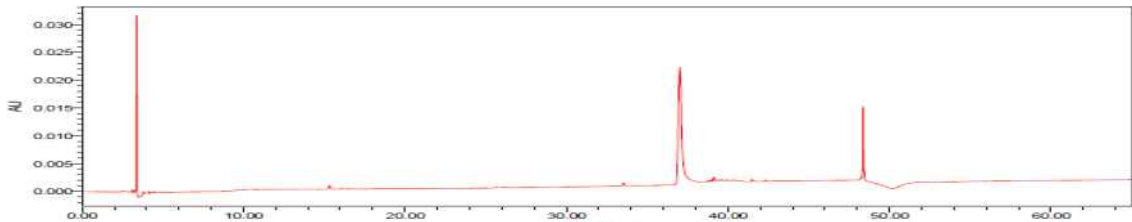
Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid의 HPLC 분석 방법은 자사시험법으로 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(제2018-73호), “[별표 1]에 따른 시험방법 타당성(밸리데이션) 검토 항목의 정의 및 적용”에 근거하여 시험방법의 타당성 검증을 실시하였다.

(1) 특이성(Specificity)

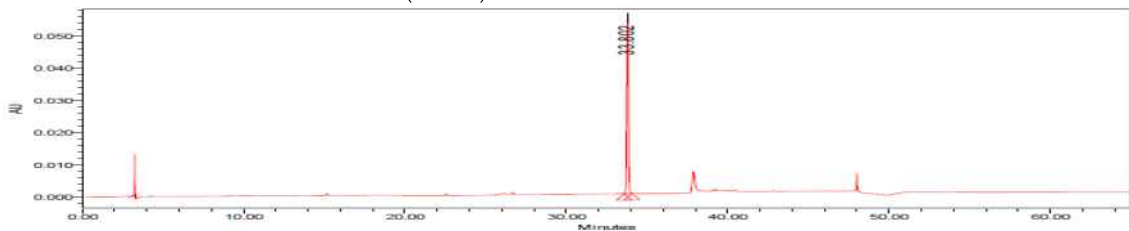
- HPLC 분석 결과 Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid 피크가 기타 성분의 피크와 양호한 분리를 보였으며 Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid 피크의 검출시간(Retention Time)은 약 15.3분이었다. Blank의 크로마토그램에서는 Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid의 피크는 검출되지 않았으며, 표준용액과 시험용액의 크로마토그램에서 Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid의 피크가 일치함을 확인하였다.

또한 PDA spectrum 분석결과, Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid의 시험물질 및 표준물질의 패턴이 동일함을 나타내어, Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid 특이성은 입증되었다.

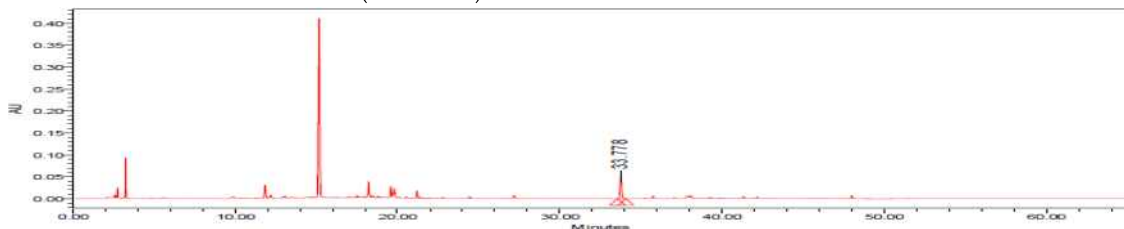
(가) Schizandrin



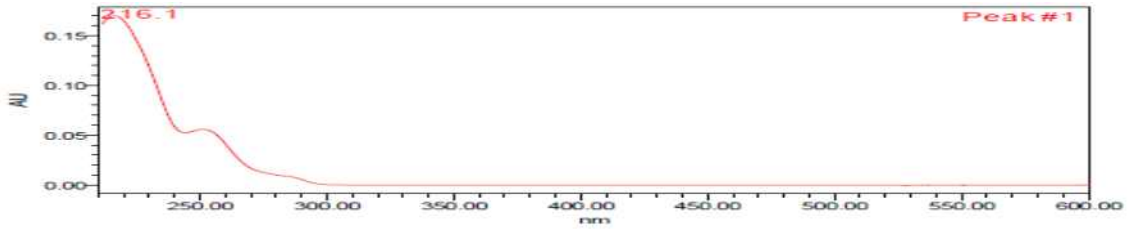
공시험액(Blank) 크로마토그램 - 전처리 용매



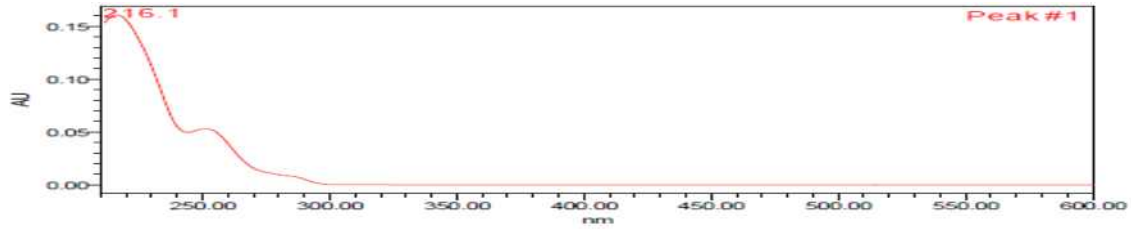
표준액(Standard) 크로마토그램 - Schizandrin



시험용액(Sample) 크로마토그램

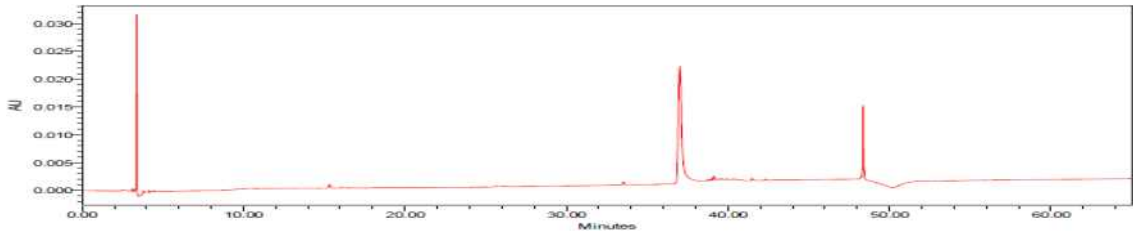


표준액(Standard) PDA spectrum - Schizandrin

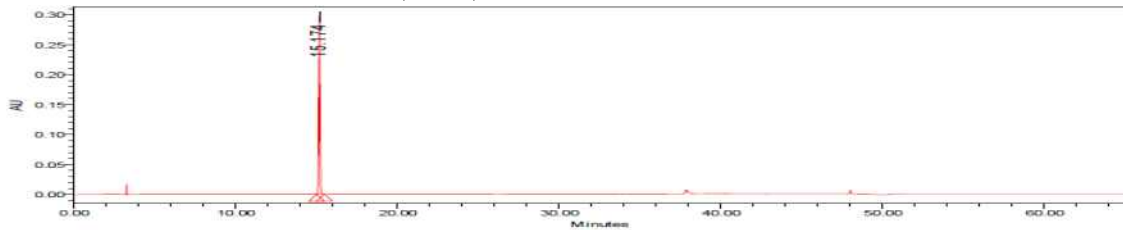


시험용액(Sample) PDA spectrum - Schizandrin

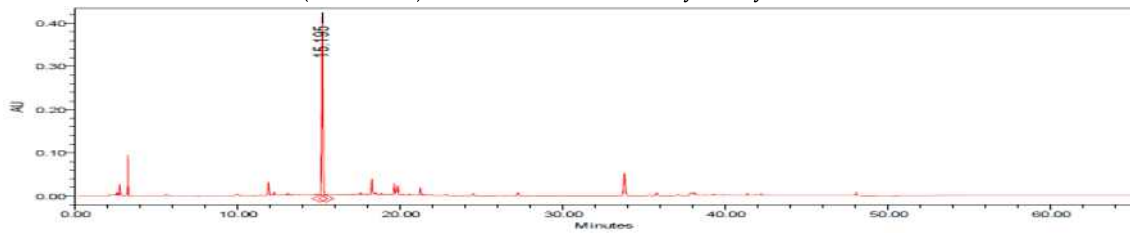
(나) 4-Hydroxybenzoic acid



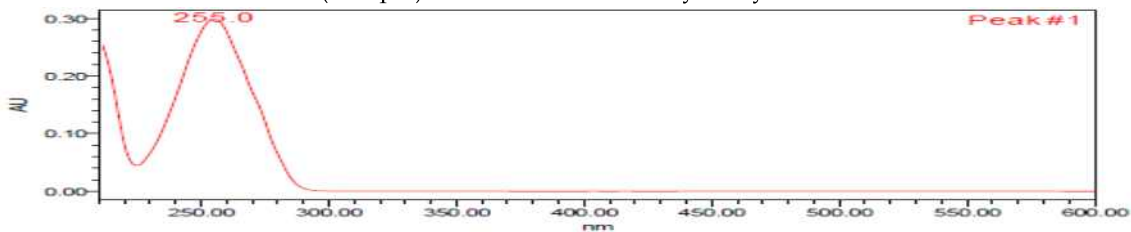
공시험액(Blank) 크로마토그램 - 전처리 용매



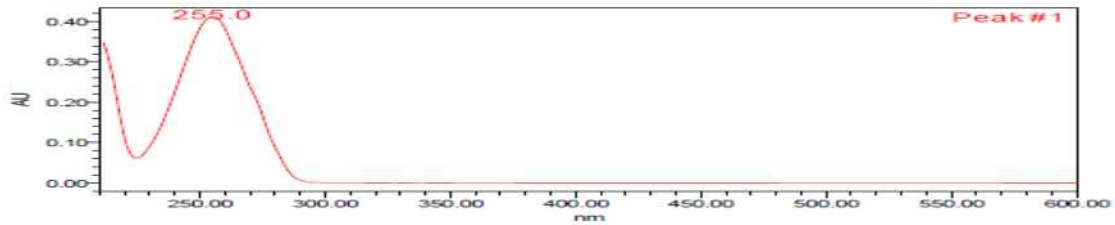
표준액(Standard) 크로마토그램 - 4-Hydroxybenzoic acid



시험용액(Sample) 크로마토그램 - 4-Hydroxybenzoic acid



표준액(Standard) PDA spectrum - 4-Hydroxybenzoic acid



시험용액(Sample) PDA spectrum - 4-Hydroxybenzoic acid

(2) 직선성(Linearity)

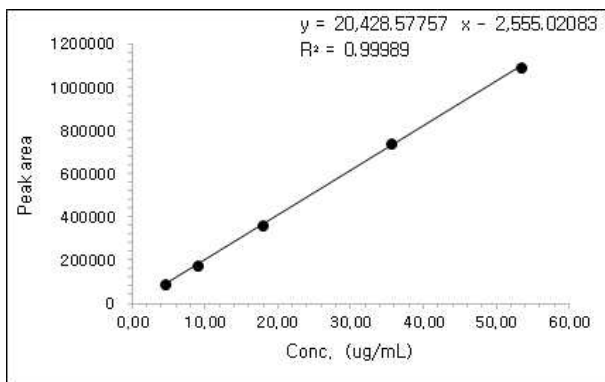
- Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid을 5개의 농도별(25~300% 범위)로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 상관계수를 확인하였다.

(가) Schizandrin 평균 회귀분석

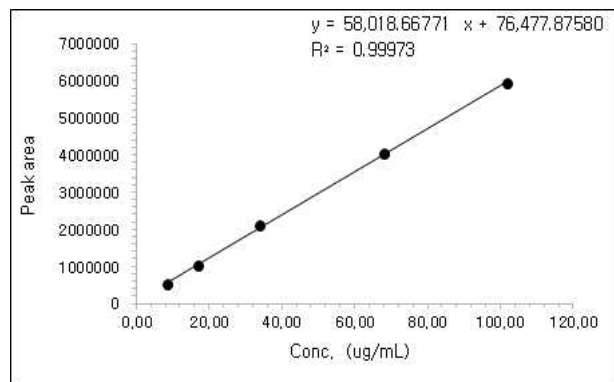
	기울기	y-절편	R2
1회	20394.93750	-3468.78125	0.99995
2회	20552.43676	-2007.97115	0.99981
3회	20338.35844	-2188.31010	0.99990
평균	20428.57757	-2555.02083	0.99989
표준편차	110.93296	796.46036	-
정량한계($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.390		

(나) 4-Hydroxybenzoic acid 평균 회귀분석

	기울기	y-절편	R2
1회	57886.76912	80184.50000	0.99967
2회	57842.13427	78622.79087	0.99968
3회	58327.09972	70626.33654	0.99985
평균	58018.66771	76477.87580	0.99973
표준편차	268.04067	5127.38897	
정량한계($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.884		



Schizandrin



4-Hydroxybenzoic acid

(3) 범위(Range) 및 정량한계(LOQ)

- Schizandrin은 4.46 ~ 54.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4-Hydroxybenzoic acid은 8.50 ~ 102.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 상관계수가 0.999이상인 직선성을 확보할 수 있었다.

(가) Schizandrin

Schizandrin의 정량한계 0.390 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 직선성 시험의 최저농도인 4.455 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이며 검증된 범위(Range)의 모든 시험결과를 신뢰할 수 있었다.

(나) 4-Hydroxybenzoic acid

4-Hydroxybenzoic acid의 정량한계(LOQ)는 0.884 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 직선성 시험의 최저농도인 8.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이며 검증된 범위(Range)의 모든 시험결과를 신뢰할 수 있었다.

(4) 정확성(Accuracy)

(가) Schizandrin

3개의 다른 농도인 50%(9.00, 8.91, 9.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 100%(18.00, 17.82, 18.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 150%(Schizandrin : 27.00, 26.73, 27.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서의 회수율(이론함량에 대한 검출함량의 비)을 계산한 결과, Schizandrin의 평균 회수율은 100.23%로 확인되었다.

메트리스 면적			362681							
지표 성분 함량	표준품 채취량 (mg)	회석 배수	이론 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	전체면적	지표성분 면적	검출 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	회수율 (%)	평균 회수율 (%)	표준 편차	RSD (%)
50%	10.00	1111.11	9.00	545850	183169	9.09	101.02	100.23	1.344	1.341
	9.90		8.91	545438	182757	9.07	101.81			
	10.00		9.00	547117	184436	9.15	101.70			
100%	10.00	555.56	18.00	730146	367465	18.11	100.63			
	9.90		17.82	720534	357853	17.64	99.00			
	10.00		18.00	720560	357879	17.64	98.02			
150%	10.00	370.37	27.00	907811	545130	26.81	99.30			
	9.90		26.73	912790	550109	27.05	101.21			
	10.00		27.00	908088	545407	26.82	99.35			

(나) 4-Hydroxybenzoic acid

3개의 다른 농도인 50%(16.98, 16.98, 16.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 100%(33.97, 33.97, 33.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 150%(50.95, 50.95, 50.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서의 회수율(이론함량에 대한 검출함량의 비)을 계산한 결과, 4-Hydroxybenzoic acid의 평균 회수율은 101.41%로 확인되었다.

메트리스 면적			2057775							
지표 성분 함량	표준품 채취량 (mg)	회석 배수	이론 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	전체면적	지표성분 면적	검출 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	회수율 (%)	평균 회수율 (%)	표준 편차	RSD (%)
50%	10.00	588.24	16.98	3120241	1062466	16.99	100.07	101.41	0.596	0.587
	10.00		16.98	3132283	1074508	17.20	101.29			
	10.00		16.98	3130266	1072491	17.17	101.08			
100%	10.00	294.12	33.97	4143150	2085375	34.63	101.94			
	10.00		33.97	4143692	2085917	34.63	101.97			
	10.00		33.97	4137945	2080170	34.54	101.68			
150%	10.00	196.08	50.95	5130642	3072867	51.65	101.37			
	10.00		50.95	5130583	3072808	51.64	101.36			
	10.00		50.95	5146597	3088822	51.92	101.91			

(5) 정밀성(Precision)

각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)를 확인하기 위해 주입반복성 및 실험실내 정밀성을 확인하였다.

(가) Schizandrin

- 주입반복성에서는 3개의 다른 농도인 50%(5003.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100%(10002.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 그리고 150%(15001.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 5회 반복시험하여 면적에 대한 상대표준편차(RSD)를 확인한 결과, Schizandrin의 면적에 대한 상대표준편차는 50%, 100%, 150%농도에서 각각 0.041%, 0.673%, 0.103%로 확인되었다.

지표 성분 함량	검체 채취량 (mg)	회석 배수	피크면적	이론 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	검출 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	검출 함량 (mg/g)	평균 함량 (mg/g)	표준 편차	RSD (%)
50%	500.3	100	179402	5003.0	8.91	1.78	1.78	0.0007	0.041
			179309						
			179270						
			179453						
			179317						
100%	1000.2	100	357976	10002.0	17.65	1.76	1.75	0.0118	0.673
			356981						
			351965						
			357394						
			355516						
150%	1500.1	100	517169	15001.0	25.44	1.70	1.70	0.0017	0.103
			516961						
			517984						

			518226		25.49	1.70			
			517497		25.46	1.70			

- 분석날짜, 시험자, 시험장비를 다르게 하여 실험실내 정밀성을 진행한 결과, Schizandrin의 면적에 대한 상대표준편차는 1차, 2차에서 각각 0.222%, 0.165%로 확인되었다.

(나) 4-Hydroxybenzoic acid

- 주입반복성에서는 3개의 다른 농도인 50%(5003.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 100%(10002.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 150%(15001.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 5회 반복시험하여 면적에 대한 상대표준편차(RSD)를 확인한 결과, 4-Hydroxybenzoic acid의 면적에 대한 상대표준편차는 50%, 100%, 150%농도에서 각각 0.172%, 0.712%, 0.604%로 확인되었다.

- 분석날짜, 시험자, 시험장비를 다르게 하여 실험실내 정밀성을 진행한 결과, 4-Hydroxybenzoic acid의 면적에 대한 상대표준편차는 1차, 2차에서 각각 0.501%, 0.531%로 확인되었다.

지표 성분 함량	검체 채취량 (mg)	희석 배수	피크면적	이론 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	검출 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	검출 함량 (mg/g)	평균 함량 (mg/g)	표준 편차	RSD (%)
50%	500.30	100	1026407	5003.0	16.37	3.27	3.27	0.0056	0.172
			1026949		16.38	3.27			
			1024609		16.34	3.27			
			1025852		16.36	3.27			
			1022868		16.31	3.26			
100%	1000.20	100	2046167	10002.0	33.95	3.39	3.38	0.0241	0.712
			2049373		34.00	3.40			
			2020173		33.50	3.35			
			2050181		34.02	3.40			
			2027035		33.62	3.36			
150%	1500.10	100	2980479	15001.0	50.05	3.34	3.31	0.0200	0.604
			2979413		50.03	3.34			
			2954465		49.60	3.31			
			2941921		49.39	3.29			
			2951502		49.55	3.30			

마. 결론

“오미자복합추출물”의 Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid의 시험방법은 자사 시험법으로 시험방법에 대한 타당성(밸리데이션) 자료를 아래와 같이 정리 하였다. 밸리데이션 항목 중 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision) 및 범위(Range)에 대한 검토 결과는 아래와 같으며, 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 (제 2020-24호), “[별표 1]에 따른 시험방법 타당성(밸리데이션) 검토 항목의 정의 및 적용”에 적합 하였다.

항목	평가방법	타당성 결과	
		Schizandrin	4-Hydroxybenzoic acid
특이성 (Specificity)	<ul style="list-style-type: none"> - HPLC 분석 시 머무름 시간(Retention time)으로 검토 - 크로마토그램 상에서 peak의 간섭현상 유무로 확인 - Schizandrin 및 4-Hydroxybenzoic acid 표준용액과 시험용액의 PDA 스펙트럼 비교 	<ul style="list-style-type: none"> - 검출시간 : 약 33.8분대에 peak 검출 - peak 간섭현상 발생 안함 - PDA 스펙트럼이 동등함을 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> - 검출시간 : 약 15.2분대에 peak 검출 - peak 간섭현상 발생 안함 - PDA 스펙트럼이 동등함을 확인함
직선성 (Linearity)	<ul style="list-style-type: none"> - 표준용액 5개 농도로 3 반복 - 직선성 확인, $R^2 > 0.99$ 	- R^2 평균값 > 0.99989	- R^2 평균값 > 0.99973
정확성 (Accuracy)	<ul style="list-style-type: none"> - 기준농도 50, 100 및 150% 농도로 회수율 검토 (3반복) - 회수율 범위 ; Schizandrin 98.02~101.81% 이내 ; 4-Hydroxybenzoic acid 100.07~101.94% 이내 	<ul style="list-style-type: none"> - 평균 회수율(%) : 100.23% - 상대표준편차(%) : 1.341 	<ul style="list-style-type: none"> - 평균 회수율(%) : 101.41% - 상대표준편차(%) : 0.587
정밀도 (Precision)	<ul style="list-style-type: none"> - 2명의 실험자가 일간 정밀도 평가(6반복) - 상대표준편차가 5% 이하여야함 	<ul style="list-style-type: none"> - 반복성 ; 평균: 1.70~1.78 ug/ml ; SD: 0.0007~0.1118 ug/ml ; RSD(%): 0.041~0.673 % - 재현성 ; 평균: 1.75~1.80 ug/ml ; SD: 0.0030~0.0039 ug/ml ; RSD(%): 0.165~0.222 % 	<ul style="list-style-type: none"> - 반복성 ; 평균: 3.27~3.38 ug/ml ; SD: 0.0056~0.0241 ug/ml ; RSD(%): 0.172~0.712 % - 재현성 ; 평균: 3.26~3.38 ug/ml ; SD: 0.0169~0.0173 ug/ml ; RSD(%): 0.501~0.531 %
범위 (Range)	- 직선성, 정확성 및 정밀성 검토	- 4.455~54.00 ug/ml	- 48.49~102.00 ug/ml

6. 지표(또는 기능)성분 동시 분석법 개발

오미자, 칠해목의 성분인 Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid을 지표성분으로하여 HPLC-UV 분석법을 개발하였다. 이동상의 유기용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 기울기 용리 조건 및 파장 등을 변화시켜가며 동시에 지표성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 설정하였다.

가. 표준 및 분석용 샘플 조제 방법

(1) 표준용액

분리된 지표성분들은 ethanol, methanol에 대한 용해도가 낮아 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 일정량 가하여 ethanol/DMSO (99/1, v/v)를 용매로 이용하였으며, 각각 2 mg씩을 정밀히 달아 제조한 용매에 녹인 후 0.2 um PVDF membrane filter로 여과하여 1000 ug/ml의 보관용 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액은 ethanol로 희석하여 사용하였다.

(2) 시험용액

오미자복합추출물은 20% ethanol에 녹여서 분석시료를 조제하였으며, 농축액과 추출액은 적당량으로 희석하여 시료를 조제하였다.

나. HPLC 분석 조건

일반적인 ODS 칼럼인 YMC C18 (4.6 × 250 mm, 5 um) column을 사용하여, 이동상의 유기용매의 종류와 조성, 기울기의 용리 유무, 기울기 조건 및 파장 등을 변화시켜가며 동시에 지표성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 설정하였다.

다. HPLC-UV 분석법 개발

(1) 기울기 용리 조건 확립

- 단일 용리를 시도하였으나, 20~70% 함량의 유기용매 조건에서 검출되는 2종의 지표성분에 대하여 다른 peak와의 겹침 현상이 발생하였다.
- 기울기 용리를 사용하여 이동상의 조성을 시간에 따라 변화시켜가며 빠른 시간에 오미자, 칠해목의 지표성분 2종이 가장 잘 분리되는 조건을 확립하였다.

(2) 최적 파장의 선정

- Photodiode array detector (PDA)를 사용하여 오미자, 칠해목의 2가지 성분 (4-Hydroxybenzoic acid, schizandrin)의 최대흡수 파장을 확인한 결과, 4-Hydroxybenzoic acid의 최대흡수 파장은 255 nm, Schizandrin의 최대흡수 파장은 216 nm 이었다(Fig.). 따라서 간섭성분의 영향이 가장 적고 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분의 동시분석이 원활한 254 nm를 최적파장으로 선정하였다.
- 위의 결과들을 종합하여 Table과 같이 HPLC 분석조건을 확정하였다.

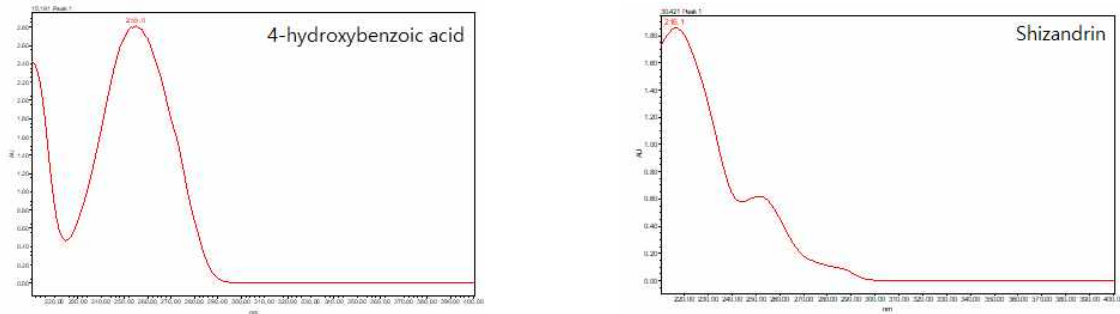


Fig. UV spectrums of 4-Hydroxybenzoic acid and Schizandrin

Table . Optimum analytical condition of HPLC-UV for 4-Hydroxybenzoic acid and Schizandrin

	Time	A (0.05% TFA in water)	B (Acetonitrile)
Mobile phase	0	95	5
	5	95	5
	30	35	65
	31	10	90
	40	10	90
Detector	UV (254nm)		
Column	YMC C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm)		
Temperature	25 °C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Device	Waters e2695, Waters 2998 detector (Waters, Milford, MA, USA)		

라. HPLC-UV 분석법에 대한 검증(Method Validation)

분석법 검증은 선택성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 피크면적의 반복성 시험 등 4가지 항목에 대하여 수행하였다.

(1) 선택성(Selectivity)

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분이 다른 피크의 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지를 확인하였다.

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분의 머무름 시간은 4-Hydroxybenzoic acid가 약 15분, Schizandrin이 약 30분 이었고 오미자, 칠해목의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하고 분리되었다

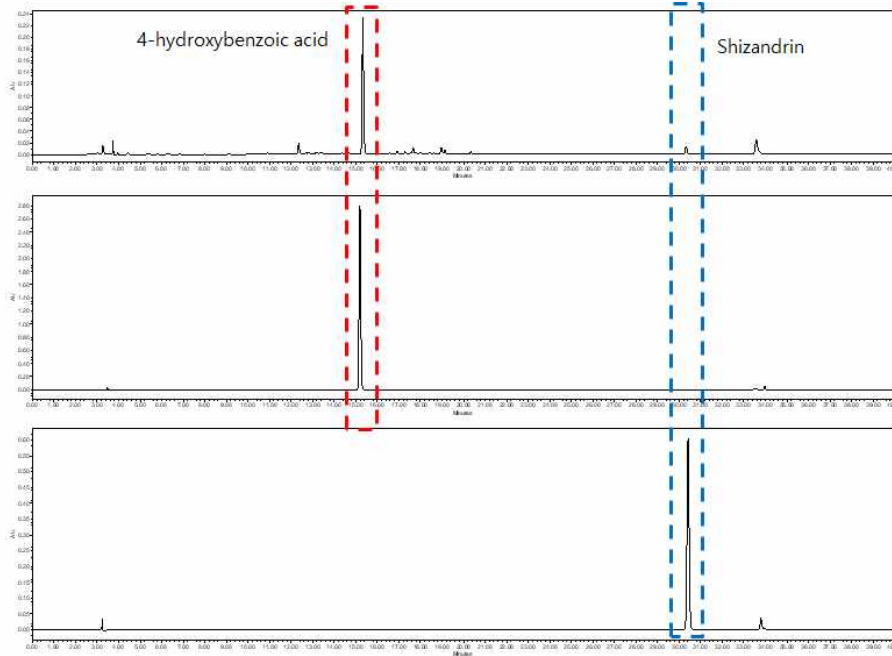


Fig. Typical HPLC chromatogram of sample and standards.

(2) 직선성

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분에 대하여 4-Hydroxybenzoic acid는 5 ~ 250 ug/ml, Schizandrin은 6.25 ~ 200 ug/ml의 농도범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수 (R²)가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분에 대하여 4-Hydroxybenzoic acid는 5 ~ 250 ug/ml, Schizandrin은 6.25 ~ 200 ug/ml의 농도범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수 R²이 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내었다

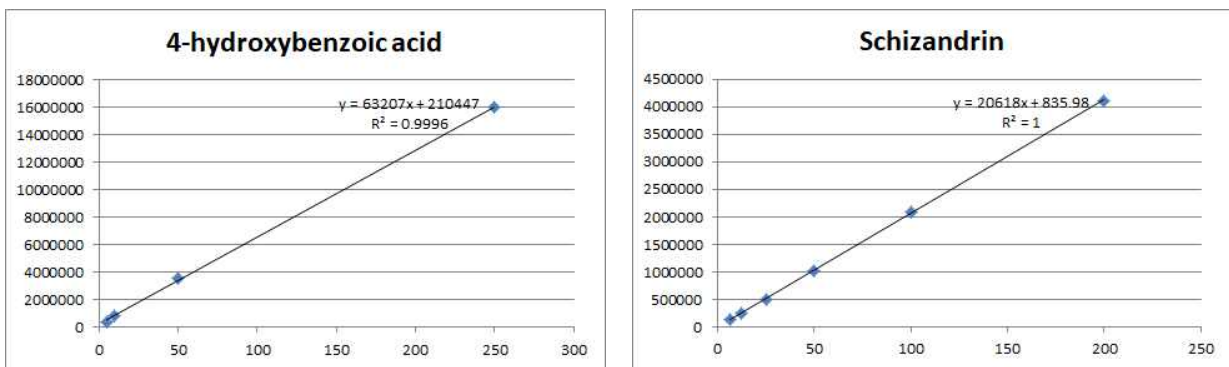


Fig. Standard calibration curves of 4-Hydroxybenzoic acid and Schizandrin

(3) 검출한계 및 정량한계(LOD, LOQ)

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분 표준용액을 적정 농도로 희석하면서 분석하였을 때, 크로마토그램상에서 신호대 잡음비 (S/N ratio)가 10 이상인 LOQ와 신호대잡음비 (S/N ratio)가 3 이상인 LOD을, 정밀성이 20% 이하이며 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 정량한계

를 설정하였다.

- 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분 표준용액을 적정 농도로 희석하면서 분석하였을 때, LOD와 LOQ는 4-Hydroxybenzoic acid (0.5 ug/ml, 1.5 ug/ml), Schizandrin (0.3 ug/ml, 0.9 ug/ml)로 각각 설정하였다

Table . Limit of quantification of 4-hydroxybenzoic acid and Schizandrin

Compounds	LOD (ug/mL)	LOQ (ug/mL)
4-Hydroxybenzoic acid	0.5	1.5
Schizandrin	0.3	0.9

(4) 피크면적의 반복성(Repeatability)

- 분석기기의 시간에 따른 변화 정도를 보기 위하여 오미자, 칠해목의 2가지 지표성분의 표준용액을 연속 5회 분석하여 머무름 시간과 피크면적의 변화 정도를 평가하였다.

- 반복성 시험 결과 머무름 시간 및 피크면적의 변화되는 정도는 RSD (%) 0.10 ~ 2.44 으로 분석 기기의 오차가 신뢰할 수 있는 수준임을 확인하였다

Table . Repeatability of analytical system

Compounds	Retention time (n=5)		Peak area (n=5)	
	Mean (min)	RSD (%)	Mean (min)	RSD (%)
4-Hydroxybenzoic acid	15.40	0.10	22937353	2.04
Schizandrin	30.33	0.02	433048.7	2.44

마. 지표(또는 기능)성분 함량 분석 결과

오미자, 칠해목 복합추출물을 개발한 전처리법으로 전처리 후, 확립한 HPLC-UV 분석법에 적용하여 오미자, 칠해목 지표성분 2종의 피크 면적을 구하였다. 미리 작성한 검량선에 면적비를 대입하여 추출용액 중 각 주성분의 농도를 구하였다.

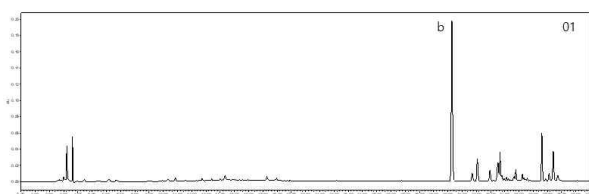
Table. Sample list

번호	산지	시료명	기타사항	수집일자
1	한국	오미자 원료	원생약	2018.02.
2	한국	오미자 추출액		2018.02.
3	한국	오미자 농축액		2018.02
4	한국	칠해목 원료	원생약	2018.02.
5	한국	칠해목 추출액		2018.02.
6	한국	칠해목 농축액		2018.02
7	한국	오미자/칠해목복합추출물 분말	spray dry	2018.06.

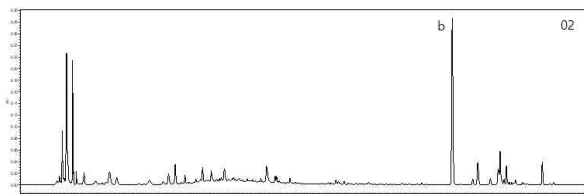
Table. Assay analysis result of 4-Hydroxybenzoic acid and Schizandrin

Sample number	Contents (w/w, %)					
	4-Hydroxybenzoic acid (n=3)			Schizandrin (n=3)		
	mean	SD	RSD	mean	SD	RSD
1	N/D	N/D	N/D	0.485	0.004	0.810
2	N/D	N/D	N/D	87.389	0.241	0.276
3	N/D	N/D	N/D	152.967	0.142	0.093
4	0.967	0.005	0.497	N/D	N/D	N/D
5	60.682	0.489	0.494	N/D	N/D	N/D
6	143.262	1.152	1.144	N/D	N/D	N/D
7	0.457	0.002	0.509	0.199	0.001	0.477
평균						

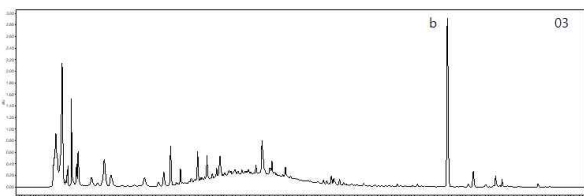
* N/D : not detected



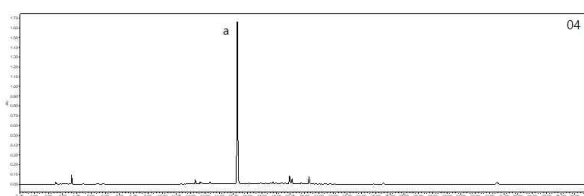
오미자 원료



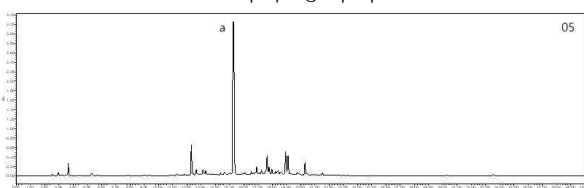
오미자 추출액



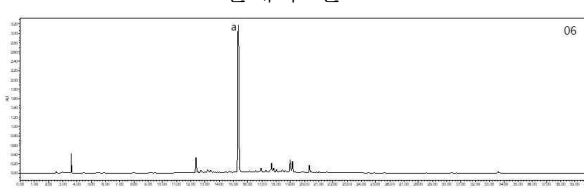
오미자 농축액



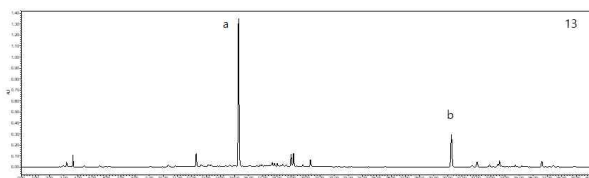
칠해목 원료



칠해목 추출액



칠해목 농축액



오미자/칠해목복합추출물 분말



7. 기능성원료 대량생산 시스템 구축

가. 수율에 따른 추출과정 확립

- In vitro 실험에서 최적의 효능을 보인 오미자추출물 : 칠해목추출물의 혼합 비율이 7:3이 되도록 하기 위해 우선 각각의 추출 수율을 확인하였다.

- 30% 에탄올로 추출하면 추출물에 에탄올이 다량 함유되어 있어 가장 흔히 사용하는 빛의 굴절률을 통한 농도측정기(brix)인 당도측정기로는 에탄올의 간섭으로 인해 정확한 측정이 불가능하다. 이에 따라 추출물 상태에서는 할로젠수분측정기를 사용하여 건조감량(Loss of drying, LOD)을 통해 추출 농도를 확인하였다. 단, 농축이 완료된 상태에서는 에탄올은 모두 제거되고 수분만 남은 상태 이므로 당도측정기를 사용하여 농축 농도를 확인하였다. (향후 실질적인 공정관리 및 3lot 생산 시에도 에탄올이 모두 제거된 농축물의 농도를 측정할 것으로 할로젠수분측정기와 당도측정기를 병행하여 측정할 예정)

(1) 할로젠수분측정기를 사용한 추출 후 추출물의 농도 측정

	오미자	칠해목
농도	 <p>18-02-13 오미자 추출물 5g 3.6%</p>	 <p>18-02-13 칠해목 추출물 5g 1.75%</p>
	2.5%	1.55%

할로젠수분측정기로 측정한 오미자, 칠해목추출물의 농도

(2) 디지털 당도측정기를 사용한 농축 후 농축물의 농도 측정

	오미자	칠해목
농도	 <p>ATAGO 20.2 Brix % Pocket 65th Anniversary</p>	 <p>ATAGO 20.5 Brix % Pocket 65th Anniversary</p>
	20.2 %	20.5 %

디지털 당도측정기로 측정한 오미자, 칠해목농축물의 농도

(3) 오미자추출물의 수율(30%에탄올 10배수, 50℃ 8시간 추출)

	오미자 원재료	20brix 농축 후 중량	고형분량	수율
1차	10 kg	12.5kg	2.50kg	25.0%
2차		12.3kg	2.46kg	24.6%
3차		12.7kg	2.54kg	25.4%
평균 추출수율				25.0%

오미자추출물의 수율

(4) 칠해목추출물의 수율(30%에탄올 10배수, 50℃ 8시간 추출)

	칠해목 원재료	20brix 농축 후 중량	고형분량	수율
1차	10 kg	7.6kg	1.52kg	15.2%
2차		7.5kg	1.50kg	15.0%
3차		7.5kg	1.50kg	15.0%
평균 추출수율				15.0%

칠해목추출물의 수율

(5) 각각의 추출수율에 따른 원재료 비율

각각의 추출수율을 확인한 결과 오미자의 추출수율은 평균 25%이고 칠해목의 평균 추출수율은 15%로 확인 되었다. 이 결과에 따라 아래 표3과 같이 원재료 비율을 추출 하였을 시 In vitro 실험에서 최적의 효능을 보인 7:3의 혼합 추출물을 제조 할 수 있음을 확인 하였다.

	오미자 10kg	칠해목 7kg
수율	25%	15%
고형분	2.5kg	1.05kg
고형분 합	3.55kg	
고형분 비율%	70%(2.5kg)	30%(1.05kg)

각각의 추출수율에 따른 오미자, 칠해목 원재료 비율

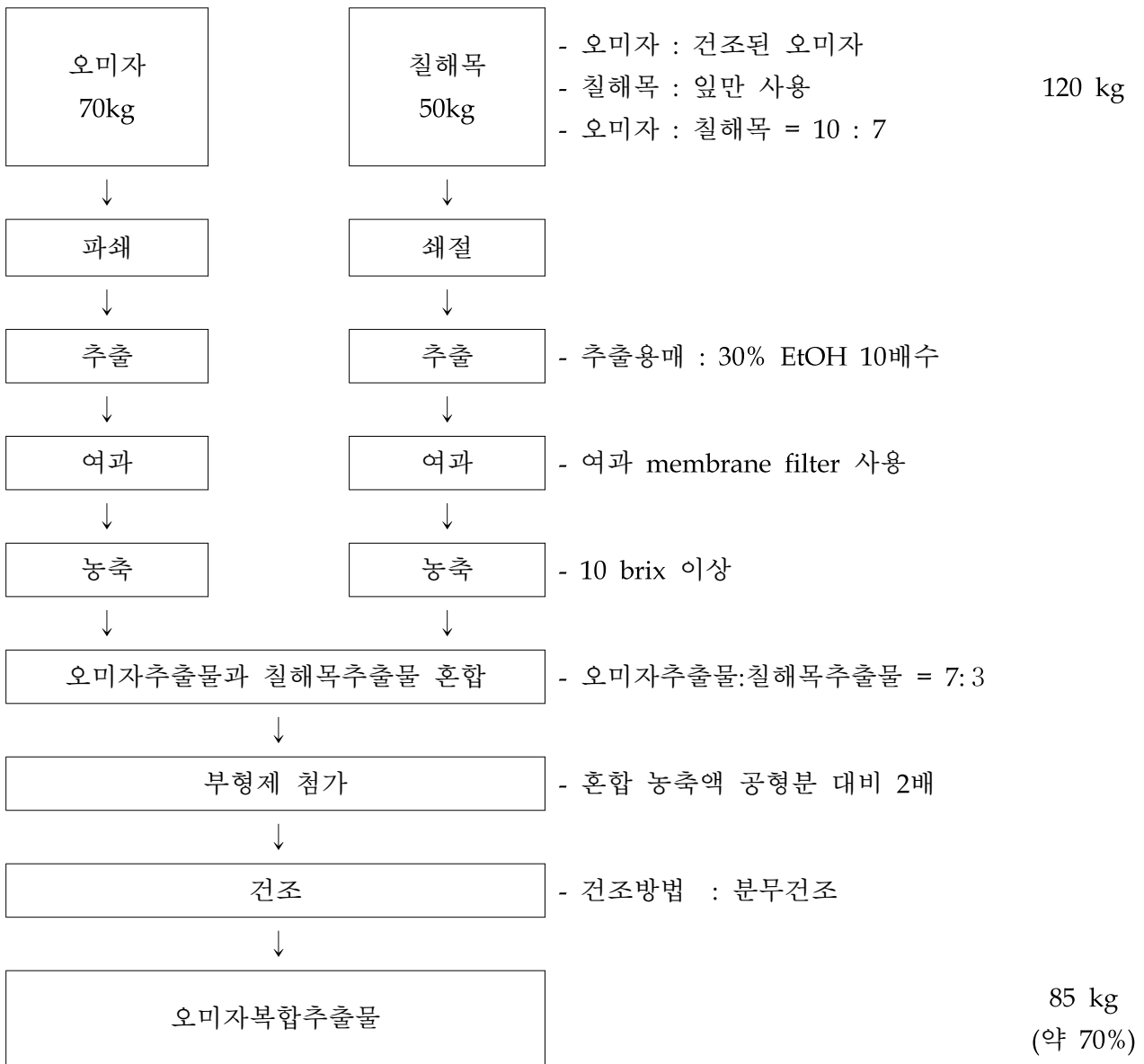
나. 분말화를 위한 건조 공정 확립

- 오미자복합추출물을 기능성 원료로 유통하기 위해서는 상업적으로 다양한 제형(정제, 연질캡슐, 하드캡슐, 분말스틱)에 사용할 수 있도록 해야한다. 추출을 통한 농축물에서 하기 원료를 인정받을 경우 기능성 원료의 최종 형태가 extract로 적용 할 수 있는 제형이 액상의 음료형태이다. 이에 따라 유통 가능한 원료의 형태로는 정제, 캡슐제, 분말제 등 다양한 제품, 제형에 사용 가능하도록 최종 기능성 원료의 형태가 분말이 되도록 제조 공정을 확립하는 과정이 필수이다.

- 오미자의 주성분인 Schizandrin을 비롯한 오미자의 여러 유효성분은 대부분 고분자 다당체로 구성되어 있으며, 오미자는 당을 포함하는 탄수화물의 함량이 높아 오미자 추출물을 분말로 제

형화하는 경우, 농축된 당류에 의한 심한 흡습이 발생하여 유동성이 낮아지고 제형 형태 및 품질의 안전성 유지에 문제가 발생할 수 있음을 염두에 두고 다양한 건조방법 및 부형제 비율을 통해 기능성원료의 최종 제조공정을 확립하였다.

다. 최종 제조공정도



오미자복합추출물의 최종 제조공정도

2절 오미자복합추출물의 안전성 평가

1. 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

가. 연구목적

암수 SD 랫드를 이용하여 시험물질인 오미자복합추출물을 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

나. GLP 준수

본 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호 (2017 년 5 월 1 일) “비임상시험관리기준” 및 “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

다. 시험기준

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일) “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 실시하였다.

라. 동물실험윤리규정의 준수

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015 년 1 월 20 일 법률 제 13023 호)에 근거한 (주)바이오독스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 170791).

마. 재료 및 방법

(1) 시험물질

물질명	RP-1701
Lot No.	RP20171027
성상	연한 황갈색의 분말
성분	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid
친화성	Hydrophilic
제조일	2017년 10월 27일
유효기간	제조일로부터 2년
보관조건	실온
제공자	(주)알피바이오

(2) 부형제

명칭	주사용수
Lot No.	DBA7004
보관조건	실온
제공자	JW Pharmaceutical Co., Ltd. Republic of Korea

(3) 시험물질의 조제

- 시험물질의 조제 : 시험물질은 전자저울 (ENTRIS423i-1S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 교반기로 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도 (500 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다.
- 조제물의 분석 : 조제물의 안전성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

(4) 시험계

- 종 및 계통 : 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
- 생산자 및 구입처 : ORIENTBIO INC., Republic of Korea
- 종 및 계통의 선택이유 : Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.
- 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 : 수컷, 12 마리, 5 주령, 126.4 ~ 140.4 g / 암컷, 12 마리, 5 주령, 105.3 ~ 119.5 g
- 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 : 수컷, 10 마리, 6 주령, 160.0 ~ 178.5 g / 암컷, 10 마리, 6 주령, 123.9 ~ 147.3 g
- 검역.순화 : 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.
- 개체 및 사육상자 식별 : 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역.순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.
- 군분리 : 순화기간 종료일에 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10 마리를 선발하여 암수 각 2 군, 군당 5 마리로 군분리하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 배치하였다.
- 잔여동물의 처리 : 잔여동물은 군분리 종료 후 본시험에서 제외시켰다.

(5) 사육환경

(가) 환경조건

- 사육상자의 종류, 크기 : 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)
- 사육상자당 수용동물 수 : 3 마리 (검역.순화기간) / 1 마리 (관찰기간)
- 온도 : 실측치: 20.9 ~ 22.5°C / 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
- 상대습도 : 실측치: 38.6 ~ 52.6% / 허용범위: 30.0 ~ 70.0%
- 환기횟수 : 10 ~ 15 회/시간
- 명암주기 (조명시간) : 12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)
- 조도 : 150 ~ 300 Lux
- 사육기재의 교환 및 세척 : 사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

(나) 사료

- 종류 : 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)
- Lot No. : 2918C-081517MA
- 제조자 : Envigo RMS, Inc., U.S.A.
- 급이방법 : 급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.
- 사료의 분석 및 확인 : 사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(다) 음수

- 종류 및 급수방법 : 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.
- 음수의 분석 및 확인 : 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(6) 투여

- 투여경로 : 경구투여
- 투여경로의 선택이유 : 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.
- 투여방법 및 투여횟수 : 투여액량은 10 mL/kg 으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4 시간에 사료를 급여하였다.

(7) 군구성 및 투여용량

(가) 군구성

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

(나) 투여용량설정

본 시험의 예비시험으로 5,000 mg/10 mL/kg 을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과, 사망례는 관찰되지 않았다. 시험의뢰자와의 협의에 따라, 본 시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

(8) 관찰 및 검사

(가) 일반증상 관찰

투여당일 (0 일)에 투여 후 30 분, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다.

(나) 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 및 14 일 (부검일)에 측정하였다.

(다) 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO2 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

(라) 조직병리학적 검사

부검 시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

(9) 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과에 대해서 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 아래의 방법으로 통계분석을 실시하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어 Student t-test 를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

바. 결과

(1) 사망유무

암수 대조군 및 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

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

(2) 일반증상

- 암수 대조군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.
- 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 시험물질색변 (compound-colored stool) 이 암수 각 4 마리에서 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터는 일반증상의 이상이 관찰되지 않았

다. 이는 시험물질에 의한 일시적인 변화로 판단된다.

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

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

NOA: No Observable Abnormality

(3) 체중변화

관찰기간 동안, 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

Sex	Group / Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain 0~14
			0	1	3	7	14	
Male	G1 0	Mean	169.2	194.0	217.2	259.0	326.3	157.1
		S.D.	6.7	7.3	8.7	13.3	22.7	17.5
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	171.0	195.9	218.5	261.0	330.4	159.4
		S.D.	6.3	8.0	6.9	10.6	15.6	11.6
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	132.9	152.9	165.3	182.7	211.3	78.4
		S.D.	9.5	12.7	10.8	9.6	5.3	11.1
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	131.9	150.2	165.5	183.3	210.5	78.6
		S.D.	5.1	5.4	7.3	7.5	14.0	16.7
		N	5	5	5	5	5	5

(4) 부검

부검시, 암수 대조군 및 시험물질 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

Summary of Necropsy Findings

Male	Group	
	1	2
No. of Animal	5	5
No. of Examined	5	5
No Finding Noted	5	5

Female	Group	
	1	2
No. of Animal	5	5
No. of Examined	5	5
No Finding Noted	5	5

사. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질인 오미자복합추출물을 SD계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 5,000 mg/kg 용량을 설정하였고, 대조군(주사용수)을 설정하여, 암수 각 5마리에 단회 경구투여하였다. 투여 후 14일 동안 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기관 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1일에 시험물질색변이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 오미자복합추출물을 암수 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

2. 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험

가. 연구목적

암수 SD 랫드를 이용하여 시험물질인 오미자복합추출물을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하기 위하여 실시하였다.

나. GLP 준수

본 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호 (2017 년 5 월 1 일) “비임상시험관리기준” 및 “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

다. 시험기준

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일) “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 실시하였다.

라. 동물실험윤리규정의 준수

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015 년 1 월 20 일 법률 제 13023 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 180239).

마. 재료 및 방법

(1) 시험물질

물질명	RP-1701
Lot No.	① RP-20180320, ② RP-20180227
성상	연한 황갈색의 분말
성분	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid
친화성	Hydrophilic
제조일	① 2018 년 3 월 20 일, ② 2018 년 2 월 27 일
유효기간	제조일로부터 2년
보관조건	실온
제공자	(주)알피바이오

(2) 부형제

명칭	주사용수
Lot No.	DBA7013, DBA8004
보관조건	실온
제공자	JW Pharmaceutical Co., Ltd. Republic of Korea

(3) 시험물질의 조제

(가) 시험물질의 조제

시험물질은 전자저울 (CP3202S, BP3100S, ENTRIS423i-1S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 교반기로 현탁시켰다. 조제병에 조제물을 옮긴 후, 부형제를 가하여 규정농도 (125, 250 및 500 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 조제병에 넣어 냉장 하에서 보관한 후, 안정성이 확보된 8 일 이내에 사용하였다.

(나) 안정성 및 균질성

본시험의 투여농도를 포함하는 50 및 500 mg/mL 의 조제물은 균질하였으며, 실온 4 시간 및 냉장 8 일간 안정하였다.

(다) 농도분석

조제물의 분석은 HPLC (Prominence, Shimadzu Corp., Japan)로 수행하였으며, 투여 전 및 투여 13 주에 각 용량별 조제물의 증충에서 3 회 채취하여 각각 1 회 측정하였다.

분석결과는 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 Schizandrin 이 투여 전에 각각 93.53, 97.39 및 93.57%, 투여 13 주에 각각 93.16, 90.46 및 91.33%였으며, 4-Hydroxybenzoic acid 가 투여 전에 각각 107.62, 111.51 및 108.78%, 투여 13 주에 각각 110.75, 107.08 및 111.17%로서 판정기준 (설정농도의 $\pm 15\%$ 이내)에 부합되었다.

(4) 시험계

- 종 및 계통 : 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF
- 생산자 및 구입처 : ORIENTBIO INC., Republic of Korea
- 종 및 계통의 선택이유 : Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.
- 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 수컷, 45 마리, 5 주령, 125.4 ~ 142.0 g / 암컷, 45 마리, 5 주령, 104.3 ~ 125.7 g
- 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 : 수컷, 40 마리, 6 주령, 193.4 ~ 216.9 g / 암컷, 40 마리, 6 주령, 148.2 ~ 175.5 g
- 검역.순화 : 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7~8 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.
- 개체 및 사육상자 식별 : 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역.순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체 식별카드를 부착하였다.
- 군분리 : 순화기간 종료일에 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 40 마리를 선발하여 암수 각 4 군, 군당 10 마리로 군분리하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 배치하였다.
- 잔여동물의 처리 : 잔여동물은 군분리 종료 후 본시험에서 제외시켰다.

(5) 사육환경

(가) 환경조건

- 사육상자의 종류, 크기 : 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)
- 사육상자당 수용동물 수 : 3 마리 (검역.순화기간) / 1 마리 (관찰기간)
- 온도 : 실측치: 21.4 ~ 24.9°C / 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
- 상대습도 : 실측치: 35.8 ~ 68.7% / 허용범위: 30.0 ~ 70.0%
- 환기횟수 : 10 ~ 15 회/시간
- 명암주기 (조명시간) : 12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)
- 조도 : 150 ~ 300 Lux
- 사육기재의 교환 및 세척 : 사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

(나) 사료

- 종류 : 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)
- Lot No. : 2918C-012918MA, 2918C-030518MA, 2918C-031918MA, 2918C-050718MA
- 제조자 : Envigo RMS, Inc., U.S.A.
- 급이방법 : 급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.
- 사료의 분석 및 확인 : 사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(다) 음수

- 종류 및 급수방법 : 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.
- 음수의 분석 및 확인 : 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(6) 투여

- 투여경로 : 경구투여
- 투여경로의 선택이유 : 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.
- 투여방법 및 투여횟수 : 투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3, 5 및 10 mL)를 이용하여 13 주간 1 일 1 회 위내에 강제투여하였다.

(7) 균구성 및 투여용량

(가) 균구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1	대조군	0	10 (1101~1110)	10 (2101~2110)
G2	저용량군	1,250	10 (1201~1210)	10 (2201~2210)
G3	중용량군	2,500	10 (1301~1310)	10 (2301~2310)
G4	고용량군	5,000	10 (1401~1410)	10 (2401~2410)

(나) 투여용량설정

2 주 반복투여 용량결정시험의 결과, 5,000 mg/kg/day 용량에서 시험물질 투여에 의한 독성 영향은 관찰되지 않았다. 따라서, 용량결정시험 결과와 시험의뢰자와의 협의에 따라 본시험의 투여용량은 5,000mg/kg/day 를 고용량으로 설정하고, 공비 2 를 적용한 2,500 및 1,250 mg/kg/day를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

(8) 관찰 및 검사

(가) 일반증상 관찰

투여기간 (13 주) 동안, 1 일 1 회 일반증상을 관찰하고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다.

(나) 체중측정

투여개시일 (투여전), 투여 개시 후 주 1 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하므로, 체중평가에서 제외하였다.

(다) 사료섭취량 측정

투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1 일간의 섭취량을 측정하였다. 관찰기간에는 7 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다. 투여 13 주에는 6 일간의 섭취량을 측정하여 1 일의 평균섭취량을 산출하였다.

(라) 안과학적 검사

군당 암수 각 5 마리에 대하여 투여 13 주에 안과학적 검사를 실시하였다. 안과학적 검사는 산동제 (Lot No.: 16K08JF, 이습토 아트로핀 1% 점안제, 한국알콘)를 점안하기 전에 육안으로 동공대광반사 및 전안부 관찰을 실시하고, 산동제 점안 후에 검안경 (ALL PUPIL II, Keeler, U.K.)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대해서 실시하였다.

(마) 뇨검사

군당 암수 각 5 마리에 대하여 투여 13 주에 뇨검사를 실시하였다. 신선뇨 (약 3 시간 채집뇨) 및 축뇨 (약 24 시간 채집뇨)를 수거하여, 아래 항목들을 검사하였다. 신선뇨 채취 중에는 투여 및 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취시켰다.

종류	항목	단위	측정방법 / 측정기기
신선뇨	pH	-	Combur ¹⁰ Test [®] M stick (Roche, Germany), Reflectance photometry,뇨화학 분석기 (cobas u 411, Roche, Germany)
	단백 (protein)	mg/dL	
	당 (glucose)	mg/dL	
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	잠혈 (occult blood)	Ery/ μ L	
	색상 및 투명도	-	육안관찰
	침사	-	현미경 검사
축뇨	뇨량	mL	피펫, 피펫에이드
	뇨비중	-	비중계 (Vet360, Reichert, U.S.A.)

(바) 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검 전 약 18 시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane 으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1mL 을 EDTA 함유 tube 에 넣은 후, 혈구 분석기 (XN-V, SYSMEX, JAPAN)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
적혈구수 (total erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ μ L	Hydrodynamic focusing DC detection
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Cyanide-free SLS-hemoglobin method
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Pulse height detection
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Calculated
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	Calculated
혈소판수 (platelet count, PLT)	$\times 10^3$ cells/ μ L	Hydrodynamic focusing DC detection
백혈구수 (total leukocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ μ L	Flow cytometry method
백혈구백분율 (WBC differential counting) - 중성호성백혈구 (neutrophils, NEU) - 림프구 (lymphocytes, LYM) - 단핵구 (monocytes, MONO) - 산호성 백혈구 (eosinophils, EOS) - 염기호성 백혈구 (basophils, BASO)	%	Flow cytometry, Fluorescence staining
망상적혈구 (reticulocytes, Reti)	%	Flow cytometry, Fluorescence staining

응고검사는 채취한 혈액 약 2 mL 을 3.2% sodium citrate 함유 tube 에 넣고, 3,000 rpm 으로

10 분간 원심분리한 후 혈장을 채취하였다. 응고시간 분석기 (Coapresta 2000, SEKISUI, Japan) 로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	sec	Coagulation time method
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)	sec	

(사) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm 으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기 (7180, HITACHI, Japan) 및 전해질 분석기 (EasyLyte, MEDICA, U.S.A.)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	JSCC
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	U/L	JSCC
감마 글루타미트 트랜스펩티다제 (gamma glutamyl transpeptidase, GGT)	U/L	G5CMP
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총빌리루빈 (total bilirubin, T-Bili)	mg/dL	Vanadate oxidation
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민 (albumin, Alb)	g/dL	BCG
Albumin/Globulin ratio (A/G ratio)	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS
인 (phosphorus, P)	mg/dL	Fiske Subbarow
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH
칼슘 (calcium, Ca)	mg/dL	OCPC
염소* (chloride, Cl)	mmol/L	Ion-selective electrode
나트륨* (sodium, Na)	mmol/L	
칼륨* (potassium, K)	mmol/L	

* 전해질분석기로 측정

(아) 부검

모든 동물에 대해서 투여 92 일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

(자) 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기 (#)는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

뇌(brain)	뇌하수체 (pituitary gland)	심장(heart)
폐(lung)	간(liver)	비장(spleen)
신장#(kidney)	부신#(adrenal gland)	고환#(testis)
전립선(prostate)	난소#(ovary)	자궁(uterus)

(카) 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환, 안구 및 시신경은 Davidson 고정액에 고정 후, 10% 중성완충 포르말린 용액에 고정하였다.

뇌(brain)	뇌하수체 (pituitary gland)	갑상선(thyroid gland)
부갑상선(parathyroid gland)*	흉선(thymus)	폐(lung including bronchi)
기관(trachea)	심장(hear)	간(liver)
비장(spleen)	신장(kidney)	부신(adrenal gland)
타액선(salivary gland)	식도(esophagus)	위(stomach)
십이지장(duodenum)	공장(jejenum)	회장(ileum)
맹장(cecum)	결장(colon)	직장(rectum)
췌장(pancreas)	고환(tetis)	부고환(epididymis)
전립선(prostate)	정낭(seminal vesicle)	난소(ovary)
자궁(uterus)	질(vagina)	방광(urinary bladder)
악하 림프절 (submandibular lymph node)	장간막 림프절(mesenteric lymph node)	안구(eye)
시신경(optic nerve)*	하더리안선(Harderian gland)	혀(tongue)
유선(mammary gland)	피부(skin)	흉골(stemum including bone marrow)
대퇴골(femur including bone marrow)	척수(spinal cord)	

* 해당 장기·조직이 슬라이드에 존재할 때만 조직병리학적 검사를 실시하였다.

조직병리학적 검사를 실시하는 장기/조직은 조직병리 검체제작 SOP 에 준하여 검체를 제작하고, 잔여 장기/조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

조직병리학적 검사는 아래의 장기·조직에 대하여 검경하였다.

- 대조군 및 고용량군의 모든 개체
- 중용량군과 저용량군의 육안소견이 관찰된 장기·조직

(9) 자료의 통계처리

체중, 사료섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량 결과에 대해서 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 아래의 방법으로 통계분석을 실시하였다. Bartlett test 를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, Oneway analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test 를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

바. 결과

(1) 일반증상

투여기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았으며, 암수 1,250 및 2,500 mg/kg/day 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

암수 5,000 mg/kg/day 투여군의 전개체에서 투여 11 ~ 12 일부터 시험물질색변 (compound-colored stool) 또는 투여 전후 유연 (salivation)이 투여기간 동안 관찰되었다. 이는 다른 항목에서 시험물질 투여에 의한 영향이 인정되지 않아, 시험물질 과량 투여에 의한 변화 또는 시험물질의 물리화화학적 특성으로 인한 변화로 시험물질 투여에 의한 독성변화는 아닌 것으로 판단된다.

(2) 체중변화

관찰기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

Sex: Male		(g)													
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							Week						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	204.9	269.2	326.1	376.5	416.6	450.7	477.6	497.2	518.3	536.1	551.3	565.2	577.3	584.8
	S.D.	5.6	7.6	13.0	16.4	17.7	23.4	21.2	25.4	27.9	28.2	32.3	36.3	34.9	40.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	205.0	271.8	335.6	389.7	432.4	467.6	494.3	514.8	534.0	551.0	566.8	579.8	593.0	599.3
	S.D.	5.1	10.8	17.6	23.9	26.5	28.1	33.8	34.9	39.7	43.4	45.5	47.9	52.4	54.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	204.8	267.2	327.9	380.2	424.7	459.7	487.2	503.1	525.5	542.4	559.3	571.0	582.1	586.6
	S.D.	7.5	12.6	20.6	22.7	27.1	28.9	32.5	34.8	36.3	40.6	41.6	41.5	41.3	45.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	205.0	266.5	324.2	374.8	416.5	449.2	475.3	495.0	514.9	532.6	546.9	558.0	571.3	577.5
	S.D.	5.7	10.2	18.9	25.6	31.1	37.1	37.4	40.8	46.6	47.7	51.8	51.8	52.8	51.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Sex: Female		(g)													
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							Week						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	162.9	190.3	217.5	239.1	252.5	263.2	275.5	283.7	286.0	287.7	296.6	303.3	305.0	304.0
	S.D.	6.7	11.7	13.1	10.2	12.8	13.7	11.4	10.1	14.1	17.6	16.7	17.5	19.3	19.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	162.6	188.5	211.1	227.4	244.4	252.7	263.5	269.0	275.3	282.5	288.9	291.2	295.1	294.3
	S.D.	7.7	8.2	9.9	11.9	15.8	16.3	18.4	20.4	19.9	21.9	21.7	23.8	21.7	24.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	163.0	186.3	209.5	231.8	250.5	262.7	274.3	283.3	290.7	297.0	302.0	309.0	316.2	316.2
	S.D.	6.3	9.1	15.1	16.2	16.0	20.0	21.0	19.4	21.1	25.6	25.9	26.3	28.1	28.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	162.6	185.8	212.6	235.1	253.0	264.1	277.1	283.3	289.0	295.6	299.1	304.5	307.9	306.6
	S.D.	8.1	9.5	12.5	14.4	14.0	17.8	18.4	17.5	21.2	19.4	19.6	21.0	22.8	22.0
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

(3) 사료섭취량

관찰기간 동안, 암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향은 없는 것으로 판단된다.

그 외, 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로, 용량의존성이 없거나, 시험물질 투여에 의한 체중변화가 동반되지 않아, 독성학적 의미는 없었다.

Sex: Male		(g/day)													
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							Week						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	29.5	30.9	34.0	35.6	36.0	35.8	35.1	34.2	34.5	34.5	34.2	33.9	32.4	31.0
	S.D.	2.4	2.2	2.2	2.4	2.1	2.7	2.7	2.7	2.2	2.0	2.1	2.3	1.8	2.4
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	30.1	31.0	34.8	36.5	36.8	35.7	34.6	33.9	33.6	33.3	33.2	32.6	31.8	29.3
	S.D.	1.8	1.6	1.8	2.1	2.1	1.7	2.3	2.5	2.5	2.9	2.3	2.7	2.7	2.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	29.7	29.7	32.6	34.4	35.0	34.5	32.9	31.9	33.2	32.7	32.5	31.8	30.6	28.2
	S.D.	1.9	1.4	1.5	2.4	2.2	2.0	2.4	2.5	2.9	3.3	2.9	2.2	2.4	3.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	30.1	29.1	31.7 *	32.9 *	33.0 *	32.5 *	31.9 *	30.7 *	31.8	31.7	31.5	30.3 **	30.3	28.0
	S.D.	3.0	2.1	2.1	2.5	2.6	3.3	2.8	3.2	3.4	3.2	3.2	2.9	3.0	2.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05, ** p<0.01.

Sex: Female		(g/day)													
Group / Dose (mg/kg/day)		Week							Week						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	20.6	22.2	23.9	24.2	24.3	23.9	23.7	22.9	21.5	21.5	22.1	21.4	20.4	18.3
	S.D.	1.7	1.3	1.2	1.2	1.5	1.2	1.6	1.4	1.3	1.7	1.8	1.7	1.5	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	21.3	21.3	22.1 #	22.4	23.3	22.1	22.0	21.6	21.2	21.1	20.9	20.5	19.8	17.3
	S.D.	1.7	1.0	1.1	1.6	1.9	2.0	1.8	1.7	1.7	2.1	2.1	2.1	1.6	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	22.0	21.4	23.3	23.9	24.3	24.2	24.1	22.9	22.6	22.5	22.0	21.9	21.4	18.9
	S.D.	1.9	1.2	1.5	1.9	2.2	2.4	2.1	1.9	2.0	2.0	1.8	2.4	2.1	2.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	21.7	20.5	22.9	23.1	23.9	23.0	22.8	21.8	21.4	21.5	20.7	20.3	20.5	17.9
	S.D.	2.3	2.3	3.1	3.0	2.4	2.6	1.8	1.6	1.5	1.6	1.2	1.6	2.1	1.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Steel test: ## p<0.01.

(4) 안과학적 검사

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

(5) 뇨검사

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 독성변화로 판단되는 결과는 없었다.

검출 및 빈도의 감소/증가경향이 관찰된 항목 모두 경미한 변동으로서 우발적 분포이거나, 연관된 항목의 변화가 관찰되지 않았으므로 모두 독성학적 의미는 없었다.

Sex		Male				Female			
Group / Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals		0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
		5	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	5.0	9.1	8.0	8.9	7.9	7.6	13.2	8.3
	S.D.	2.8	3.3	3.9	4.4	7.6	5.9	6.7	3.8
Color	Pale yellow							1	
	Yellow	5	5	5	5	5	5	4	5
	Amber								
Transparency	Clear	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mild turbidity Turbidity								
pH	5								
	6								1
	6.5					1	1		
	7			1	1	4	3	3	3
	8	5	4	4	1	1	3	2	1
9						1			
Protein (mg/dL)	-	1		2		2	3	2	1
	25	4	5	2	2	2	2	3	2
	75			1	3	1			2
	150								
	500								
Glucose (mg/dL)	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
	50								
	100								
	300								
	1,000								
Ketone body (mg/dL)	-	2				2	1	1	
	5	3	4	3	1	3	2	3	2
	15		1	1	2		2	1	3
	50			1	2				
	150								
Bilirubin (mg/dL)	-	5	5	5	5	5	4	5	5
	1						1		
	3								
	6								
Occult blood (Ery/ μ L)	-	5	3	4	5	5	5	5	4
	10		2	1					
	25								
	50								
	150								
	250								1

Sex		Male				Female			
Group / Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals		0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
		5	5	5	5	5	5	5	5
Cast [△]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1~5								
	6~10								
	>10								
Epithelial cell [△]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1~5								
	6~10								
	>10								
Leukocyte [△]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1~10								
	11~50								
	51~100								
	>100								
Erythrocyte [△]	0	5	5	5	5	5	5	5	5
	1~10								
	11~50								
	51~100								
	>100								
Specific gravity	1.000 ~ 1.010								
	1.011 ~ 1.020					1			
	1.021 ~ 1.030	1					1	2	1
	1.031 ~ 1.040	1		2			2	1	1
	1.041 ~ 1.050		2		1	1	1	2	3
	1.051 ~ 1.060	2	1	2		2			
	>1.060	1	2	1	4	1	1		

△: Sediment

(6) 혈액학적 검사

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 그 외, 유의성이 관찰된 항목은 배경데이터 내의 경미한 변동으로 관련항목의 변화들이 동반되지 않거나, 독성학적 의미를 가지지 않는 범위내의 경미한 변화로 독성학적인 의미는 없었다.

Sex: Male																	
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ($\times 10^6$ cells/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times 10^3$ cells/ μ L)	Reti (%)	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)				NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	8.68	15.0	43.6	50.4	17.4	34.5	1073	2.88	9.33	24.1	66.3	8.3	1.1	0.2	17.9	16.2
	SD	0.55	0.6	1.7	1.6	0.7	0.4	127	0.46	2.86	9.6	11.3	2.6	0.5	0.1	0.6	1.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	8.63	14.9	43.3	50.2	17.3	34.4	1002	2.72	7.87	21.3	67.9	9.7	0.8	0.3	18.4	15.7
	SD	0.31	0.6	1.4	1.3	0.6	0.5	119	0.59	1.59	9.5	10.0	2.6	0.3	0.1	0.6	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	8.74	15.2	44.1	50.5	17.4	34.5	1022	2.37	7.33	21.6	68.2	9.1	0.9	0.3	18.5	16.8
	SD	0.30	0.5	1.2	1.1	0.6	0.5	78	0.28	3.69	9.8	10.5	2.3	0.4	0.1	0.6	1.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	8.48	14.4 *	42.4	50.1	17.0	33.9 *	1026	2.16 #	7.64	16.3	74.2	8.4	0.9	0.2	18.2	16.2
	SD	0.34	0.6	1.5	1.2	0.6	0.5	75	0.24	1.04	6.6	7.5	1.5	0.3	0.1	0.7	0.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.
Significantly different from control by Steel test: ## p<0.01.

Sex: Male

(g)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary gland	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis	Prostate
G1 0	Mean	557.4	2.21	0.0120	1.63	1.74	14.28	0.93	3.33	0.0661	3.68	0.71
	S.D.	38.4	0.10	0.0011	0.09	0.12	1.25	0.15	0.33	0.0109	0.28	0.17
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	572.0	2.18	0.0124	1.58	1.74	14.10	0.95	3.22	0.0592	3.52	0.64
	S.D.	54.8	0.10	0.0011	0.10	0.15	1.27	0.11	0.23	0.0062	0.45	0.19
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	559.1	2.17	0.0126	1.55	1.72	14.79	0.87	3.26	0.0669	3.74	0.68
	S.D.	44.1	0.11	0.0016	0.12	0.14	2.31	0.18	0.28	0.0138	0.21	0.11
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	549.0	2.05 **	0.0118	1.61	1.67	15.55	0.79	3.35	0.0627	3.62	0.60
	S.D.	47.0	0.10	0.0019	0.15	0.17	1.66	0.13	0.40	0.0062	0.23	0.15
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

Sex: Female

(g)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary gland	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	285.3	1.89	0.0171	0.92	1.14	6.72	0.50	1.78	0.0654	0.0699	1.23
	S.D.	19.4	0.08	0.0016	0.07	0.05	0.59	0.06	0.16	0.0074	0.0065	0.54
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	278.5	1.92	0.0155	0.88	1.15	6.86	0.49	1.76	0.0589	0.0757	0.95
	S.D.	19.9	0.12	0.0028	0.09	0.10	0.75	0.08	0.20	0.0098	0.0096	0.45
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	300.0	1.91	0.0177	0.99	1.15	7.95 **	0.46	1.80	0.0677	0.0727	0.98
	S.D.	26.7	0.09	0.0023	0.07	0.08	0.79	0.06	0.11	0.0104	0.0088	0.34
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	289.9	1.88	0.0184	0.93	1.16	8.33 **	0.46	1.88	0.0663	0.0769	1.22
	S.D.	22.2	0.10	0.0022	0.09	0.08	0.70	0.06	0.18	0.0086	0.0150	0.68
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

(٤) Relative

Sex: Male

(g/100 g body weight)

Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary gland	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Testis	Prostate
G1 0	Mean	557.4	0.40	0.0022	0.29	0.31	2.57	0.17	0.60	0.0119	0.66	0.13
	S.D.	38.4	0.04	0.0002	0.02	0.03	0.18	0.02	0.02	0.0020	0.07	0.03
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	572.0	0.39	0.0022	0.28	0.31	2.47	0.17	0.57	0.0104	0.62	0.11
	S.D.	54.8	0.04	0.0002	0.02	0.03	0.16	0.03	0.06	0.0013	0.11	0.03
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	559.1	0.39	0.0023	0.28	0.31	2.64	0.16	0.59	0.0120	0.67	0.12
	S.D.	44.1	0.02	0.0003	0.03	0.02	0.26	0.03	0.05	0.0026	0.07	0.02
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	549.0	0.38	0.0021	0.29	0.31	2.83 *	0.14	0.61	0.0115	0.66	0.11
	S.D.	47.0	0.03	0.0003	0.02	0.02	0.17	0.02	0.07	0.0018	0.06	0.03
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.

Sex: Female		(g/100 g body weight)										
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary gland	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Adrenal gland	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	285.3	0.66	0.0060	0.32	0.40	2.36	0.17	0.62	0.0230	0.0247	0.44
	S.D.	19.4	0.03	0.0007	0.01	0.03	0.15	0.01	0.06	0.0030	0.0033	0.22
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	278.5	0.69	0.0056	0.32	0.41	2.46	0.18	0.63	0.0212	0.0271	0.34
	S.D.	19.9	0.07	0.0009	0.02	0.02	0.17	0.03	0.06	0.0033	0.0024	0.15
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	300.0	0.64	0.0059	0.33	0.38	2.65 **	0.15	0.60	0.0227	0.0243	0.33
	S.D.	26.7	0.06	0.0006	0.03	0.02	0.19	0.02	0.04	0.0039	0.0031	0.13
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	289.9	0.65	0.0064	0.32	0.40	2.88 **	0.16	0.65	0.0229	0.0264	0.41
	S.D.	22.2	0.06	0.0009	0.02	0.03	0.15	0.02	0.04	0.0031	0.0043	0.21
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

(9) 부검

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 인정되지 않았다. 그 외, 부검에서 관찰된 소견은 우발적인 것으로 시험물질 투여와의 연관성은 없었다.

Summary of Necropsy Findings

Male	Group			
	1	2	3	4
No. of Animals	10	10	10	10
No. of Examined	10	10	10	10
No Finding Noted	10	9	9	10
Jejunum -Diverticulum	0	0	1	0
Testis -Small	0	1	0	0

Female	Group			
	1	2	3	4
No. of Animals	10	10	10	10
No. of Examined	10	10	10	10
No Finding Noted	10	10	10	10

(10) 조직병리학적 검사

암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 모두 인정되지 않았다. 그 외, 조직병리학적 검사 결과 관찰된 변화는 우발적인 변화로 독성학적 의미는 없었다.

The following abbreviations have been used throughout the table

Table Code
Grade 1 : minimal
Grade 2 : slight
Grade 3 : moderate
Grade 4 : severe

(7) male

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
Adrenal gland	No. of Examined	10	0	0	10
-Vacuolation, cortical, diffuse	Grade 1	2	0	0	2
	Grade 2	3	0	0	1
	Total Number of affected	5	0	0	3
Brain	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Cecum	No. of Examined	10	0	0	10
-Infiltrate, inflammatory cell, mucosa	Grade 1	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
Colon	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Duodenum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Epididymis	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Esophagus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Eye	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Femur including bone marrow	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Harderian gland	No. of Examined	10	0	0	10
-Infiltrate, lymphocyte, focal	Grade 1	1	0	0	1
	Total Number of affected	1	0	0	1
Heart	No. of Examined	10	0	0	10
-Infiltrate, inflammatory cell, myocardium, focal	Grade 1	4	0	0	1
	Total Number of affected	4	0	0	1
Ileum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Jejunum	No. of Examined	10	0	1	10
-Diverticulum	Presence	0	0	1	0
	Total Number of affected	0	0	1	0
Kidney	No. of Examined	10	0	0	10
-Basophilia, tubule, cortex	Grade 1	2	0	0	3
	Total Number of affected	2	0	0	3
-Cast, hyaline, medulla	Grade 1	1	0	0	2
	Total Number of affected	1	0	0	2

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
-Infiltrate, inflammatory cell, interstitium	Grade 1	6	0	0	6
	Total Number of affected	6	0	0	6
Liver	No. of Examined	10	0	0	10
-Extramedullary hematopoiesis	Grade 1	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Fatty change, sporadic/periportal	Grade 1	1	0	0	1
	Total Number of affected	1	0	0	1
-Infiltrate, mononuclear cell, focal	Grade 1	8	0	0	7
	Total Number of affected	8	0	0	7
Lung including bronchi	No. of Examined	10	0	0	10
-Alveolar macrophage aggregation	Grade 1	0	0	0	2
	Total Number of affected	0	0	0	2
-Infiltrate, mononuclear cell, alveolar, focal	Grade 1	4	0	0	4
	Total Number of affected	4	0	0	4
-Mineralization, arterial wall	Grade 1	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
Mammary gland (inguinal)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Mesenteric lymph node	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Optic nerve	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Pancreas	No. of Examined	10	0	0	10
-Infiltrate, inflammatory cell, focal	Grade 2	0	0	0	1
	Total Number of affected	0	0	0	1
Parathyroid gland	No. of Examined	10	0	0	8
	No Finding Noted	10	0	0	8
Pituitary gland	No. of Examined	10	0	0	10
-Cyst, Pars distalis	Presence	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
Prostate	No. of Examined	10	0	0	10
-Concretions	Grade 1	2	0	0	0
	Grade 2	1	0	0	2
	Total Number of affected	3	0	0	2
-Infiltrate, inflammatory cell, interstitium	Grade 1	4	0	0	6
	Grade 2	1	0	0	2
	Total Number of affected	5	0	0	8

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
Rectum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (parotid)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (sublingual)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (submandibular)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Seminal vesicle	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Skin (inguinal)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spinal cord (thoracic)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spleen	No. of Examined	10	0	0	10
	-Congestion	Grade 1	1	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Pigmentation	Grade 1	7	0	0	9
	Grade 2	2	0	0	1
	Total Number of affected	9	0	0	10
Sternum including bone marrow	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Stomach	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Submandibular lymph node	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Testis	No. of Examined	10	1	0	10
	-Atrophy, tubule, focal	Grade 2	0	1	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
-Atypical residual bodies	Grade 1	0	1	0	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
-Vacuolation, Sertoli cell	Grade 1	0	1	0	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
Thymus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Thyroid gland	No. of Examined	10	0	0	10
	-Ultimobranchial cyst	Presence	0	0	0
	Total Number of affected	0	0	0	2
Tongue	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Trachea	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
Rectum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (parotid)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (sublingual)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (submandibular)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Seminal vesicle	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Skin (inguinal)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spinal cord (thoracic)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spleen	No. of Examined	10	0	0	10
	-Congestion	Grade 1	1	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Pigmentation	Grade 1	7	0	0	9
	Grade 2	2	0	0	1
	Total Number of affected	9	0	0	10
Sternum including bone marrow	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Stomach	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Submandibular lymph node	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Testis	No. of Examined	10	1	0	10
	-Atrophy, tubule, focal	Grade 2	0	1	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
-Atypical residual bodies	Grade 1	0	1	0	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
-Vacuolation, Sertoli cell	Grade 1	0	1	0	0
	Total Number of affected	0	1	0	0
Thymus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Thyroid gland	No. of Examined	10	0	0	10
	-Ultimobranchial cyst	Presence	0	0	0
	Total Number of affected	0	0	0	2
Tongue	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Trachea	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Urinary bladder	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10

(۲) female

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
Adrenal gland	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Brain	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Cecum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Colon	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Duodenum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Esophagus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Eye	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Femur including bone marrow	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Harderian gland	No. of Examined	10	0	0	10
	-Infiltrate, lymphocyte, focal	Grade 1	1	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
Heart	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Ileum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Jejunum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Kidney	No. of Examined	10	0	0	10
	-Basophilia, tubule, cortex	Grade 1	1	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Cast, hyaline, medulla	Grade 1	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Infiltrate, inflammatory cell, interstitium	Grade 1	2	0	0	4
	Total Number of affected	2	0	0	4
Liver	No. of Examined	10	0	0	10
	-Infiltrate, mononuclear cell, focal	Grade 1	5	0	0
	Total Number of affected	5	0	0	5
Lung including bronchi	No. of Examined	10	0	0	10
	-Alveolar macrophage aggregation	Grade 1	1	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
-Infiltrate, mononuclear cell, alveolar, focal	Grade 1	1	0	0	1
	Total Number of affected	1	0	0	1

Summary of Histopathological Findings

Organ	Group	1	2	3	4
	No. of Animals	10	10	10	10
Mammary gland (inguinal)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Mesenteric lymph node	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Optic nerve	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Ovary	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Pancreas	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Parathyroid gland	No. of Examined	9	0	0	9
	No Finding Noted	9	0	0	9
Pituitary gland	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Rectum	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (parotid)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (sublingual)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Salivary gland (submandibular)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Skin (inguinal)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spinal cord (thoracic)	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Spleen	No. of Examined	10	0	0	10
	-Extramedullary hematopoiesis	Grade 1	0	0	0
	Total Number of affected	0	0	0	1
-Pigmentation	Grade 1	4	0	0	5
	Grade 2	6	0	0	5
	Total Number of affected	10	0	0	10
Sternum including bone marrow	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Stomach	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Submandibular lymph node	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Thymus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Thyroid gland	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
-Ultimobranchial cyst	Presence	1	0	0	0
	Total Number of affected	1	0	0	0
Tongue	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Trachea	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Urinary bladder	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Uterus	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10
Vagina	No. of Examined	10	0	0	10
	No Finding Noted	10	0	0	10

사. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질인 RP-1701 을 Sprague-Dawley (CrI:CD(SD))계 암수 랫드에 13 주간 반복 경구투여시에 대한 안전성을 평가하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 의 3 개 용량과 대조군 (주사용수)을 설정하였고, 암수 각 군당 10 마리에 13 주간 경구 투여하였다.

관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중과 사료섭취량 측정, 안과학적 검사, 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질색변 또는 투여 전후 유연이 관찰되었다.

암수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검에 있어서 시험물질 투여에 기인한 독성 변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사 결과, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성 변화는 관찰되지 않았다.

본시험 조건하에 시험물질 RP-1701 을 랫드에 13 주 반복 경구투여한 결과, 무독성량(NOAEL) 은 암수 모두 5,000 mg/kg/day 로 판단된다.

3. 오미자복합추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험

가. 연구목적

시험물질인 오미자복합추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 검토하였다.

나. GLP 준수

본 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호 (2017 년 5 월 1 일) “비임상시험관리기준” 및 “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

다. 시험기준

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일) “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 실시하였다.

라. 재료 및 방법

(1) 시험물질

물질명	RP-1701
Lot No.	RP20171027
성상	연한 황갈색의 분말
성분	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid
친화성	Hydrophilic
제조일	2017년 10월 27일
유효기간	제조일로부터 2년
보관조건	실온
제공자	(주)알피바이오

(2) 음성대조물질

명칭	주사용수
Lot No.	16021
보관조건	실온
제공자	JW Pharmaceutical Co., Ltd. Republic of Korea

(3) 양성대조물질

명칭	Lot No. (#: Batch No.)	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	# MKBX7529V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	# S43858V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	# STBD3302V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	BCBR5712V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	# WXBC1554V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

(4) 조제 및 분석

(가) 시험물질의 조제

- 조제방법 : 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 균일하게 현탁 시킨 후, 부형제로 규정용량 (50.0 mg/mL)이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다.

- 조제물의 분석 : 조제물의 안전성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

(나) 양성물질의 조제

- 조제방법 : 각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 본 기관의 historical control data에 기초하여 설정하였다. SA는 주사용수 (Lot No.: 16021, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea)에, 2-NF, 9-AA, 4-NQO 및 2-AA는 DMSO (Lot No.: K47795931, Merck, Germany)에 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

- 각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량

S9 mix	균주명	명칭	용량(ug/plate)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA(pKM101)	4-NQO	0.1
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2uvrA(pKM101)	2-AA	2.0

(5) 시험균주 및 배지

(가) 시험균주

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

- 선택이유 : 변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용하고 있으며, 가이드라인에서 추천하는 균주를 사용하였다.

- 입수 및 보관 : 균주는 2015년 10월 22일 (TA98, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101)), 2015년 11월 25일 (TA100 및 TA1537)에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM, Inc., U.S.A.)에서 구입하였다. 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm)한 후, 각 균주의 유전자형 (genotype), 자발복귀변이 콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다.

각 균주의 특성을 확인한 후, 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결 보관용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다.

(나) 전배양

동결 보관된 각 균주를 실온에서 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130 rpm, BS-31, JEIO TECH. CO., LTD., Republic of Korea)하였다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10⁹ cells/mL 이상인 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.

(다) 배지

- Nutrient broth 배지 : Nutrient broth (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 넣고 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 최종농도가 0.8%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제 후, 고압증기 멸균하였다.

- 최소 glucose 한천평판배지 : Bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 넣어 조제하고 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, Vogel-Bonner (VB) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 넣고 플레이트에 분주하여 실온에서 굳혔다.

- Top agar : 염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 넣어 각각 0.5 및 0.6%가 되도록 조제한 후, 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, 살모넬라균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제하였다.

(6) S9 mix의 조제

- 입수 및 보관 : S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

- S9의 특성

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

- S9 mix 조성

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

- S9 mix의 조제방법 : S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 17092907)과 Cofactor A (Lot No.: A17092607)를 해동하여 1:9의 비율로 혼합하여 조제하였다.

(7) 시험방법

(가) 용량설정시험

- 용량 : 가이드라인에서 추천하는 5,000 μg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 μg/plate의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

- 시험방법 : 용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

- 본시험의 용량설정 : 용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전이 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 군주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 μg/plate를 본시험의 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625 및 313 μg/plate의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

(나) 본시험

- 시험방법 : 본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다. 본시험은 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하여 2회 실시하였다. 각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재 유무를 식별한 번호를 기입하였다.

- 처리방법 : 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질 100 μL를 각 튜브에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 μL 및 각 균주현탁액 100 μL를 넣은 후,

20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 2 mL씩 첨가하여 vortexing하고, 최소 glucose 한천평판 배지에 중층하여 실온에서 굳혔다. 대사활성화존제 하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다.

- 배양법 및 배양시간 : Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientific Co., LTD., Republic of Korea)에서 48시간 배양하였다.

- 무균검사 : 잡균에 의한 오염 유무를 확인하기 위하여, 시험물질 최고용량 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 S9 mix 500 µL를 튜브에 각각 넣고, 20분간 진탕배양 (37°C, 90 rpm)하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가하여 vortexing한 후, nutrient broth 한천평판배지에 중층하여 실온에서 굳혔다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

- 확인시험 : 아래의 경우에 해당되지 않았기 때문에 확인시험을 실시하지 않았다.

* 유전자돌연변이 유발성에 있어, 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우

* 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4단계 이상 확보되지 않은 경우

(8) 관찰 및 판정

(가) 관찰 및 계측

- 시험물질의 침전의 관찰 : 시험물질의 처리시 및 복귀변이콜로니수 계측시에 시험물질의 침전을 육안으로 관찰하고 기록하였다.

- 복귀변이콜로니수의 계측 : 배양 종료 후, 복귀변이콜로니수는 자동콜로니 계측기 (ProtoCOL3, SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하거나 육안계수를 실시하였다. 자동계측이 정확하지 않다고 판단되는 경우, 육안계수를 실시하였다.

- Background lawn의 관찰 : 생육저해 유무를 확인하기 위하여, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성 유무를 실체현미경 (45배 배율, SZ61, Olympus, Japan)으로 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 음성대조군과 비교하여 복귀변이콜로니수가 현저히 감소하거나, background lawn이 엷어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

(나) 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

* 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀변이콜로니수가 historical control data의 범위 내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것.

* 오염이 없을 것.

(다) 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

* 1개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것.

마. 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하였으며 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

바. 결과

(1) 용량설정시험

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 2.8의 시험방법에 따라 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

(2) 본시험

- 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배를 초과하지 않았다. 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

Table 3. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation (1st and 2nd Main Studies)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	23 , 22 , 23	23	1	24 , 22 , 25	24	2
		313	22 , 23 , 21	22	1	25 , 24 , 22	24	2
	RP-1701	625	20 , 18 , 22	20	2	25 , 27 , 27	26	1
		1,250	21 , 20 , 18	20	2	23 , 21 , 24	23	2
		2,500	20 , 19 , 22	20	2	21 , 22 , 24	22	2
		5,000	20 , 21 , 23	21	2	23 , 23 , 25	24	1
2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	687 , 707 , 711	702	13	712 , 725 , 717	718	7	
TA100	Water for injection	0	77 , 76 , 83	79	4	87 , 85 , 82	85	3
		313	76 , 79 , 81	79	3	83 , 82 , 80	82	2
	RP-1701	625	74 , 80 , 83	79	5	85 , 90 , 88	88	3
		1,250	79 , 72 , 78	76	4	84 , 86 , 83	84	2
		2,500	80 , 85 , 83	83	3	84 , 88 , 80	84	4
		5,000	79 , 82 , 84	82	3	85 , 87 , 90	87	3
Sodium azide (SA)	1.5	721 , 712 , 709	714	6	701 , 711 , 707	706	5	
TA1535	Water for injection	0	13 , 14 , 14	14	1	14 , 13 , 16	14	2
		313	13 , 14 , 15	14	1	14 , 17 , 15	15	2
	RP-1701	625	13 , 15 , 12	13	2	13 , 15 , 15	14	1
		1,250	13 , 11 , 14	13	2	14 , 17 , 16	16	2
		2,500	11 , 12 , 10	11	1	13 , 14 , 14	14	1
		5,000	13 , 13 , 16	14	2	17 , 19 , 16	17	2
Sodium azide (SA)	1.5	545 , 587 , 573	568	21	562 , 547 , 550	553	8	
TA1537	Water for injection	0	10 , 8 , 10	9	1	10 , 10 , 9	10	1
		313	9 , 9 , 10	9	1	9 , 9 , 10	9	1
	RP-1701	625	10 , 11 , 8	10	2	7 , 9 , 8	8	1
		1,250	9 , 8 , 10	9	1	10 , 11 , 9	10	1
		2,500	10 , 9 , 8	9	1	10 , 11 , 8	10	2
		5,000	9 , 10 , 10	10	1	10 , 7 , 9	9	2
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	557 , 563 , 550	557	7	542 , 560 , 545	549	10	
WP2 _{uvrA} (pKM101)	Water for injection	0	100 , 109 , 102	104	5	133 , 134 , 137	135	2
		313	105 , 101 , 108	105	4	130 , 134 , 137	134	4
	RP-1701	625	101 , 99 , 104	101	3	136 , 128 , 132	132	4
		1,250	104 , 106 , 99	103	4	140 , 138 , 131	136	5
		2,500	107 , 109 , 100	105	5	139 , 131 , 128	133	6
		5,000	117 , 108 , 114	113	5	161 , 164 , 158	161	3
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	0.1	820 , 829 , 826	825	5	801 , 811 , 785	799	13	

S.D.: Standard Deviation

Table 4. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation (1st and 2nd Main Studies)

Strain	Test substance	Dose (µg/plate)	1 st Main study			2 nd Main study		
			Individual revertant colony counts	Mean	S.D.	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	33 , 36 , 37	35	2	35 , 35 , 32	34	2
		313	32 , 34 , 32	33	1	36 , 36 , 32	35	2
		625	34 , 35 , 31	33	2	33 , 36 , 35	35	2
		1,250	35 , 34 , 35	35	1	34 , 39 , 37	37	3
		2,500	33 , 34 , 32	33	1	34 , 37 , 34	35	2
		5,000	32 , 35 , 34	34	2	38 , 40 , 39	39	1
	2-Ammoanthracene (2-AA)	1.0	368 , 371 , 379	373	6	421 , 437 , 431	430	8
TA100	Water for injection	0	97 , 104 , 103	101	4	98 , 96 , 102	99	3
		313	100 , 102 , 97	100	3	103 , 105 , 110	106	4
		625	106 , 107 , 99	104	4	113 , 105 , 107	108	4
		1,250	91 , 100 , 91	94	5	108 , 108 , 115	110	4
		2,500	109 , 101 , 102	104	4	108 , 107 , 116	110	5
		5,000	97 , 105 , 99	100	4	120 , 113 , 115	116	4
	2-Ammoanthracene (2-AA)	2.0	923 , 930 , 921	925	5	927 , 892 , 874	898	27
TA1535	Water for injection	0	14 , 13 , 12	13	1	13 , 14 , 12	13	1
		313	13 , 14 , 12	13	1	13 , 13 , 12	13	1
		625	12 , 13 , 12	12	1	12 , 11 , 12	12	1
		1,250	13 , 14 , 14	14	1	11 , 10 , 10	10	1
		2,500	11 , 12 , 10	11	1	11 , 12 , 9	11	2
		5,000	12 , 13 , 14	13	1	10 , 13 , 12	12	2
	2-Ammoanthracene (2-AA)	3.0	170 , 172 , 171	171	1	169 , 172 , 174	172	3
TA1537	Water for injection	0	18 , 17 , 17	17	1	19 , 21 , 20	20	1
		313	18 , 17 , 19	18	1	23 , 22 , 20	22	2
		625	19 , 18 , 20	19	1	22 , 23 , 25	23	2
		1,250	19 , 21 , 20	20	1	21 , 21 , 20	21	1
		2,500	18 , 20 , 19	19	1	23 , 20 , 21	21	2
		5,000	17 , 18 , 20	18	2	22 , 23 , 22	22	1
	2-Ammoanthracene (2-AA)	3.0	198 , 189 , 210	199	11	201 , 193 , 194	196	4
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	156 , 158 , 158	157	1	150 , 160 , 154	155	5
		313	152 , 156 , 150	153	3	162 , 160 , 168	163	4
		625	154 , 165 , 158	159	6	166 , 171 , 167	168	3
		1,250	154 , 165 , 156	158	6	164 , 172 , 165	167	4
		2,500	174 , 169 , 169	171	3	167 , 164 , 157	163	5
		5,000	167 , 174 , 169	170	4	179 , 171 , 179	176	5
	2-Ammoanthracene (2-AA)	2.0	530 , 521 , 521	524	5	499 , 454 , 501	485	27

S.D.: Standard Deviation

- 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질에 의한 생육저해 및 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

(3) 시험의 성립

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위 내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었다. 또한, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다

Table 5. Historical Control Data

Historical negative control values of revertant colonies						
Strain	S9 mix	N	Mean ± S.D.	Range		
				Lower	Upper	
TA100	-	101	86.2 ± 10.5	59.0	113.5	
	+	101	96.8 ± 11.6	69.2	124.5	
TA1535	-	100	10.9 ± 1.8	5.6	16.2	
	+	100	10.2 ± 1.6	5.8	14.6	
WP2uvrA (pKM101)	-	100	123.5 ± 16.0	81.5	165.5	
	+	100	156.3 ± 17.3	113.6	199.0	
TA98	-	101	18.5 ± 2.9	10.3	26.6	
	+	101	27.4 ± 3.6	16.9	37.9	
TA1537	-	100	7.8 ± 1.1	4.7	10.9	
	+	100	14.7 ± 2.4	7.2	22.1	

Historical positive control values of revertant colonies							
Strain	S9 mix	Positive control	Dose (µg/plate)	N	Mean ± S.D.	Range	
						Lower	Upper
TA100	-	SA	1.5	101	621.1 ± 49.5	487.2	755.0
	+	2-AA	2.0	93	744.7 ± 155.2	462.0	1,027.5
TA1535	-	SA	1.5	101	496.1 ± 39.1	387.2	605.1
	+	2-AA	3.0	100	137.6 ± 21.0	88.7	186.6
WP2uvrA (pKM101)	-	4-NQO	0.1	86	679.2 ± 124.9	327.2	1,031.2
	+	2-AA	2.0	100	499.4 ± 52.7	348.1	650.6
TA98	-	2-NF	5.0	101	554.6 ± 78.6	359.1	750.1
	+	2-AA	1.0	93	392.3 ± 52.3	275.3	509.4
TA1537	-	9-AA	80.0	101	408.1 ± 127.6	201.0	615.1
	+	2-AA	3.0	92	186.7 ± 28.1	121.4	252.0

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, Tetrahydrofuran, Normal saline injection, etc .

S.D.: Standard Deviation

SA: Sodium azide

2-AA: 2-Aminoanthracene

4-NQO: 4-Nitroquinoline N-oxide

2-NF: 2-Nitrofluorene

9-AA: 9-Aminoacridine

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 10, 2015 to May 18, 2017 (4-NQO).

The above historical control values were obtained from the data pooled from Nov. 19, 2015 to May 18, 2017.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-\bar{R}-\bar{R}_s$ value.

사. 고찰 및 결론

시험물질 오미자복합추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균 (WP2uvrA(pKM101)균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 각각 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해 및 침전이 대사활성화비존재하 및 존재하의 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 최고용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

본시험의 결과, 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았다. 각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 RP-1701의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

4. 오미자복합추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험

가. 연구목적

마우스 골수세포를 이용하여 시험물질인 오미자복합추출물의 소핵 유발성을 검토하였다.

나. GLP 준수

본 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호 (2017 년 5 월 1 일) “비임상시험관리기준” 및 “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

다. 시험기준

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일) “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 실시하였다.

(4) 동물실험윤리규정의 준수

본 시험은 동물보호법 (제정 1991 년 5 월 31 일 법률 제 4379 호, 일부개정 2015 년 1 월 20 일 법률 제 13023 호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 170884).

라. 재료 및 방법

(1) 시험물질

물질명	RP-1701
Lot No.	RP20171027
성상	연한 황갈색의 분말
성분	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid
친화성	Hydrophilic
제조일	2017년 10월 27일
유효기간	제조일로부터 2년
보관조건	실온
제공자	(주)알피바이오

(2) 음성대조물질

명칭	주사용수
Lot No.	DBA7009
보관조건	실온
제공자	JW Pharmaceutical Co., Ltd. Republic of Korea

(3) 양성대조물질

명칭	Mitomycin C (MMC)
Lot No.	SLBN5647V
보관조건	냉장
제공자	SIGMA ALDRICH, Co., U.S.A.

(4) 조제 및 분석

(가) 시험물질의 조제

시험물질의 조제는 시험물질 투여일에 실시하였다. 필요량의 시험물질을 칭량한 후 ENTRIS423i 1S CP 3 23S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 교반기로 교반하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량 용량설정시험 : 500, 250, 125 및 62.5 mg/mL, 본시험 : 500, 250 및 125 mg/mL) 이 되도록 조제 하였다.

(나) 조제물의 분석

조제물의 안전성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

(다) 양성대조물질의 조제

MMC 2 mg에 주사용수 (Lot No.: 16021, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea) 4 mL를 가하여 용해시킨 후, 생리식염주사액 (Lot No.: 16149, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea) 6 mL를 가하여 최종농도가 0.2 mg/mL가 되도록 조제하였다.

(5) 시험계

- 종 및 계통 : 마우스, CrljOri:CD1(ICR), SPF

- 생산자 및 구입처 : ORIENTBIO INC., Republic of Korea

- 종 및 계통의 선택이유 : ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있고, 가이드라인에서 추천 하는 동물 종으로서 선택 하였다.

- 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 :

* 용량설정시험 : 수컷, 17 마리, 7 주령, 29.2 ~ 32.3 g / 암컷, 17 마리, 7 주령, 24.2 ~ 26.6 g

* 본시험 : 수컷, 27 마리, 7주령, 28.3 ~ 32.6 g (용량설정시험의 결과, 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에, 본시험의 암컷 을 입수하지 않았다.)

- 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위 :

* 용량설정시험 : 수컷, 15 마리, 8 주령, 35.0 ~ 37.7 g / 암컷, 15 마리, 8 주령, 27.0 ~ 30.6 g

* 본시험 : 수컷, 25 마리, 8 주령, 32.8 ~ 37.5 g

- 검역.순화 : 반입시 동물의 일반상태 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였다 (ENTRIS4202I 1S, Sartorius, Germany). 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물 입수시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동하였다.

검역, 순화 기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다.

- 개체 및 사육상자 식별 : 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역.순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체 식별카드를 부착하였다.
- 군분리 : 군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일 군분리 일에 실시하였다. 군분리일의 체중이 평균체중에 가까운 필요 동물 수 (용량설정시험 : 암수 각각 15 마리 , 본시험 : 수컷 25 마리) 를 선별하였다. 선별한 동물은 각 군의 평균체중이 균등하도록 분리하였다.
- 잔여동물의 처리 : 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

(6) 사육환경

(가) 환경조건

- 사육상자의 종류, 크기 : 폴리카보네이트 케이지, 260W×420D×180H (mm), 폴리카보네이트 케이지, 260W×260D×130H (mm)
- 사육상자당 수용동물 수 : 8~9 마리 (검역.순화기간) / 3~5 마리 (시험기간)
- 온도 : 실측치: 18.2 ~ 24.0°C(검역실), 19.4 ~ 24.0°C(동물실) / 허용범위: 19.0 ~ 25.0°C
- 상대습도 : 실측치: 42.9 ~ 64.4%(검역실), 46.1 ~ 60.8%(동물실) / 허용범위: 40.0 ~ 70.0%
- 환기횟수 : 10 ~ 15 회/시간
- 명암주기 (조명시간) : 12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)
- 조도 : 150 ~ 300 Lux
- 사육기재의 교환 및 세척 : 사육상자 및 급이기는 1 회/2 주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

(나) 사료

- 종류 : 실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)
- Lot No. : 2918C-100317MA
- 제조자 : Envigo RMS, Inc., U.S.A.
- 급이방법 : 급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.
- 사료의 분석 및 확인 : 사료의 분석은 Envigo RMS, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 입수하여 확인한 결과, 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(다) 음수

- 종류 및 급수방법 : 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취시켰다.
- 음수의 분석 및 확인 : 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 (환경부령 제 684 호, 2016 년 12 월 30 일, 타법개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하였다.

(7) 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 비 GLP 로 실시하였다.

(가) 투여용량 : 시험물질이 식품인 것을 고려하여 5,000 mg/kg 을 최고용량으로 하고, 공비 2 를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg 의 총 4 단계의 시험물질군을 설정 하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

(나) 투여방법 및 투여횟수

폴리에틸렌제 존데를 장착한 주사기 (1 mL)를 사용하여 24시간 간격으로 2회 강제경구 투여하고, 각 용량당 암수 각 3 마리로 하였다. 투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

(다) 일반증상 관찰

1차 투여직후 및 1 차 투여 후 2 시간 , 2 차 투여 전, 2 차 투여직후 및 2 차 투여 후 2 시간, 2차 투여 후 1 일에 각 용량의 일반증상을 관찰하였다.

(라) 체중측정

체중은 2 차 투여 후 1 일 에 측정 하였다 (ENTRIS4202I 1S, Sartorius, Germany)

(마) 본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 또한, 관찰기간동안 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중변화는 확인되지 않았다.

따라서, 본시험의 최고용량은 5,000 mg/kg 으로 하고, 이하 용량은 2,500 및 1,250 mg/kg 의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 사망동물에서 암수 성차가 관찰되지 않았기 때문에 본시험은 소핵 유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다.

(8) 본시험

(가) 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여횟수	투여경로	마리수(수컷, 개체번호)
G1 음성대조군	0	10	2	경구	5 (1101~1105)
G2 저용량군	1,250	10	2	경구	5 (1201~1205)
G3 중용량군	2,500	10	2	경구	5 (1301~1305)
G4 고용량군	5,000	10	2	경구	5 (1401~1405)
G5 양성대조군	2	10	1	복강내	5 (1501~1505)

(나) 투여방법 및 투여횟수

① 시험물질(경구투여)

폴리에틸렌제 존데를 장착한 주사기 (1 mL)를 사용하여 24시간 간격으로 2회 강제경구 투여하였다. 음성대조군은 시험물질과 동일한 방법으로 부형제를 24 시간 간격으로 2 회 강제경구 투여하였다. 투여액량은 10 mL/kg 으로 하였고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다

② 양성대조물질(복강투여)

양성대조물질은 일회용 주사침 (26 G)과 주사기 (1 mL)를 사용하여 검체제작 24시간 전에 1회 복강내 투여하였다. 투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

(다) 일반증상 관찰

1차 투여직후 및 1 차 투여 후 2 시간 , 2 차 투여 전 , 2 차 투여직후 및 2 차 투여 후 2 시간 , 2 차 투여 후 1 일에 각 용량의 일반증상을 관찰 하였다.

(라) 체중측정

체중은 골수채취직전에 측정 하였다 (ENTRIS4202I 1 S, Sartorius, Germany)

(마) 검체제작

시험물질 2 차 투여 후 24 시간에 동물을 경추탈골 하였다.
대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 µL 의 우태아 혈청 Fetal bovine serum, FBS, Lot No.: 1907422 Gibco, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취 하였다. 골수세포부유액은 1,000 rpm 4°C 에서 5 분간 원심분리 Micro17TR , H anil Science Industrial Co., Ltd. Ltd., Republic of Korea) 하고 상층액을 제거한 후, 침전된 골수세포를 부유시켜 슬라이드글라스에 소량을 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2 매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 코드 번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sorenson 인산완충액 (pH 6.8)으로 조제) 으로 30 분간 염색하였다. 염색된 슬라이드는 0.01 mol/L Sorenson 인산완충액 (pH 6.8) 및 0.004% citric acid 수용액에 세정하여 건조시킨 후 , 봉입제 (Entellan new, Merck, Germany) 로 봉입하였다.

(9) 관찰 및 판정

(가) 관찰

코드화된 골수도말 검체 를 현미경 600 배 배율 , BX51, Olympus, Japan) 으로 관찰하였다. 검체 1 장당 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE)를 2 000 개씩 관찰하고, 1 개체당 4 000 개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현율을 구하였다.

골수세포 증식억제의 지표로서, 검체 1 장당 총적혈구 250 개를 관찰하여, 1 개체당 500 개의 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

(나) 시험의 성립조건

아래의 조건을 만족하는 경우 성립으로 하였다.

- * 음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것.
- * 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것.

(다) 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정 하였다.

- * 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가할 것
- * 증가에 따른 용량의존성이 있을 것
- * 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data 의 관리범위 이상으로 증가할 것

(10) 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.) 을 사용하여 통계해석을 실시하였다.

소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대하여 Mann Whitney test 를 실시하여 음성대조군과 시험물 질군간의 유의차와 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검정하였다. (유의수준 : 양측 0.05 및 0.01).

총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중에 대하여 Bartlett test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간의 등분산성을 검정하였다 (유의수준 : 0.05). 등분산이 인정되어, One way analysis of variance (ANOVA) 를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준 : 양측 0.05 및 0.01). 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도는 유의성이 확인되어 음성대조군과의 유의차가 있는 시험물질군을 확인하기 위하여 Dunnett's t-test 의 다중검정을 실시하였다 (유의수준 : 양측 0.05 및 0.01). 음성대조군과 양성대조군과의 비교에 대해서는 Folded-F test 를 실시하여 등분산성을 검정 하였다 (유의수준 : 0.05). 등분산이 인정되어 Student t-test 를 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준 : 양측 0.05 및 0.01).

바. 결과

(1) 일반증상 관찰

관찰기간 동안, 수컷의 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.

(2) 체중변화

관찰기간 동안, 시험물질군의 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중 변화는 확인되지 않았다.

(3) 소핵 유발 출현빈도

시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과

비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다.

양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 확인되었다 ($p < 0.01$). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다.

Table 7. Results of Main Study in Male ICR Mice

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after 2 nd dosing	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	159 / 500	2 / 4,000
					1102	179 / 500	2 / 4,000
					1103	170 / 500	1 / 4,000
					1104	157 / 500	0 / 4,000
					1105	162 / 500	2 / 4,000
					Total	827 / 2,500	7 / 20,000
					% (Mean±S.D.)	33.1 ± 1.81	0.035 ± 0.022
	1,250	P.O.	24	1201	155 / 500	1 / 4,000	
				1202	145 / 500	1 / 4,000	
				1203	140 / 500	3 / 4,000	
				1204	167 / 500	1 / 4,000	
				1205	138 / 500	3 / 4,000	
				Total	745 / 2,500	9 / 20,000	
					% (Mean±S.D.)	29.8 ± 2.40	0.045 ± 0.027
Test substance	RP-1701	2,500	P.O.	24	1301	176 / 500	2 / 4,000
					1302	170 / 500	1 / 4,000
					1303	171 / 500	3 / 4,000
					1304	158 / 500	2 / 4,000
					1305	163 / 500	3 / 4,000
					Total	838 / 2,500	11 / 20,000
					% (Mean±S.D.)	33.5 ± 1.42	0.055 ± 0.021
	5,000	P.O.	24	1401	140 / 500	1 / 4,000	
				1402	165 / 500	0 / 4,000	
				1403	150 / 500	1 / 4,000	
				1404	152 / 500	0 / 4,000	
				1405	145 / 500	3 / 4,000	
				Total	752 / 2,500	5 / 20,000	
					% (Mean±S.D.)	30.1 ± 1.88	0.025 ± 0.031
A Positive control	MMC	2	IP.	24	1501	159 / 500	268 / 4,000
					1502	167 / 500	276 / 4,000
					1503	141 / 500	253 / 4,000
					1504	131 / 500	238 / 4,000
					1505	157 / 500	255 / 4,000
					Total	755 / 2,500	1,290† / 20,000
					% (Mean±S.D.)	30.2 ± 2.93	6.450 ± 0.366

P.O.: Per Os.

IP.: Intraperitoneal

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

S.D.: Standard Deviation

MMC: Mitomycin C

Significant difference from negative control by Mann-Whitney test: † $p < 0.01$

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

(4) 시험의 성립

음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data 의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있었다. 또한, 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로

로 유의하게 증가하였기 때문에 본시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것으로 판단하였다.

Table 8. Historical Control Data

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE)							
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	MNPCE/PCE (%) (Mean±S.D.)	Range [MNPCE/PCE] (%)		95% control limit ^{a)} [MNPCE/PCE]
					MIN	MAX	
Negative control	24	0	32	0.042 ± 0.019	0.007	0.077	<13
Positive control	24	2	32	6.119 ± 1.275	4.988	7.250	-

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes						
Group	Hours after dosing (hr)	Dose (mg/kg)	N	PCE/(NCE+PCE) (%) (Mean±S.D.)	Range [PCE/(NCE+PCE)] (%)	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	32	30.66 ± 3.006	25.96	35.36
Positive control	24	2	32	29.39 ± 3.864	24.72	34.07

Negative control: Water for injection, Normal saline injection, Corn oil, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, etc.

Positive control: Mitomycin C (2 mg/kg, IP., single dosing)

N: The total number of micronucleus test.

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 6, 2013 to Mar. 17, 2017.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-R$ value.

a) Poisson-based 95% control limits of the historical negative control data.

-: No data

사. 고찰 및 결론

시험물질 오미자복합추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발 유무를 평가하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 24 시간 간격으로 2 회 경구투여 하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2 를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg 으로 용량설정시험을 실시한 결과, 암수 모두 모든 용량에서 시험물질에 의한 일반증상의 이상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 최고용량은 5,000 mg/kg 으로 하고, 이하 용량은 2,500 및 1,250 mg/kg 의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정 하였다. 용량설정시험에서, 암수 모두 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에 본시험은 소핵 유발에 감수성이 좋다고 알려져 있는 수컷을 사용하였다.

본시험의 결과 시험물질군의 다염성적혈구 Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE) 의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 확인되지 않았다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 확인되었다 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교 하여 유의한 차이는 확인 되지 않았다.

이상의 결과로부터 본 시험조건 하에서 시험물질 오미자복합추출물은 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성이 없는 것으로 판단된다.

5. 오미자복합추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

가. 연구목적

포유류 배양세포주 (CHL/IU cell line)를 이용하여 시험물질인 오미자복합추출물의 염색체이상 유발성을 검토하였다.

나. GLP 준수

본 시험은 식품의약품안전처 고시 제 2017-32 호 (2017 년 5 월 1 일) “비임상시험관리기준” 및 “OECD Principles of Good Laboratory Practice” Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

다. 시험기준

식품의약품안전처 고시 제 2017-71 호 (2017 년 8 월 30 일) “의약품등의 독성시험기준”에 근거하여 실시하였다.

라. 재료 및 방법

(1) 시험물질

물질명	RP-1701
Lot No.	RP20171027
성상	연한 황갈색의 분말
성분	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid
친화성	Hydrophilic
제조일	2017년 10월 27일
유효기간	제조일로부터 2년
보관조건	실온
제공자	(주)알피바이오

(2) 음성대조물질

명칭	주사용수
Lot No.	16021
보관조건	실온
제공자	JW Pharmaceutical Co., Ltd. Republic of Korea

(3) 양성대조물질

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Mitomycin C (MMC)	MKBZ9075V	냉장	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	SLBP3558V	실온	SIGMA-ALDRICH, Co., U.S.A.

(4) 조제 및 분석

(가) 시험물질의 조제

- 조제방법 : 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 균일하게 현탁시켰다. 그 후, 부형제로 규정 용량 (50.0 mg/mL)이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계 희석하여 조제하였다.
- 조제물의 분석 : 조제물의 안전성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

(나) 양성물질의 조제

MMC는 DMSO (Lot No.: K47795931, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시켜 10 µg/mL의 stock solution을 조제하였다. B[a]P는 필요량을 칭량한 후, DMSO (Lot No.: K47795931)를 가하여 vortex mixer로 교반하여 용해시켜 2,000 µg/mL의 stock solution을 조제하였다. 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C, OPR-DFU-657CEV, Operon, Republic of Korea)에 동결 보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

계열	S9 mix	명칭	Stock concentration (µg/mL)	최종처리용량 (ug/mL)
단시간처리법	-	MMC	10	0.1
	+	B[a]P	2,000	20
연속처리법	-	MMC	10	0.1

(5) 시험계

(가) 세포주

- 명칭 : CHL/IU 세포
- 선택이유 : 검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용하고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 CHL/IU 세포주를 선택하였다.
- 입수 및 보관 : CHL/IU 세포는 2011년 11월 24일에 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)이 들어있는 75 cm² 플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기 (MCO-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다.
- CHL/IU 세포의 특성

ATCC® Catalog No.	CRL-1935
Lot No.	3375917
Modal chromosome number	25
동물	Cricetulus griseus (hamster, Chinese)
장기	폐
형태	섬유아세포
생육특징	부착형
Doubling time	약 15시간

CHL/IU 세포는 Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이코플라즈마 오염유무를 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액 (SIGMA-ALDRICH, Co.,

U.S.A.)을 배양플라스크에 가하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. 1×10^6 cells/mL가 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO를 최종농도가 10%가 되도록 가하여 동결 보관용 튜브에 분주하였다. 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 하루 동안 보관한 후, 액체질소탱크로 옮겨 사용시까지 지 보관하였다.

(나) 계대배양

동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 해동하여 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어 있는 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포가 배양플라스크 바닥면적에 70 ~ 80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm² 플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

(다) 전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 13 이내인 세포를 사용하였다. 대수증식기의 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 혈구계수관을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10^4 cells/mL 세포현탁액을 만든 후, 용량설정시험용은 6 well 플레이트 (2 mL/well, Nunc, Denmark), 본시험용은 60 mm 플레이트 (5 mL/plate, BD, U.S.A.) 및 6 well 플레이트 (2 mL/well)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

(라) 배지

시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Gibco, U.S.A.)을 100:1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8°C) 보관하였다.

(6) S9 mix의 조제

- 입수 및 보관 : S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.
- S9의 특성

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

- S9 mix 조성

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

- S9 mix의 조제방법 : S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결 보관된 S9 (Lot No.: 17102708)과 Cofactor C (Lot No.: C17102508)를 해동하여 2:4.7의 비율로 혼합하여 조제하였다.

(7) 시험방법

(가) 용량설정시험

① 용량

용량설정시험의 최고용량은 시험물질이 식품인 점을 고려하여 5,000 µg/mL로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

② 처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 1 well을 사용하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질	
단시간처리법	-	음성대조	2.7	-	0.3	2
		시험물질	2.7		0.3	2
	+	음성대조	2.2	0.5	0.3	2
		시험물질	2.2		0.3	2
연속처리법	-	음성대조	2.7	-	0.3	2
		시험물질	2.7		0.3	2

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)으로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다. 시험물질 처리 후, 각 계열의 1,250 µg/mL 이상에서 pH 변화가 관찰되어 해당 용량의 pH를 측정하였다. 그 결과, 음성대조군과 비교하여 1.0 이상 변화하지 않았다. 또한, 각 계열의 음성대조군 및 시험물질 최고용량군에 대하여 삼투압을 측정하였다. 그 결과, 음성대조군과 비교하여 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았다.

③ Relative Population Doubling (RPD)의 산출

용량설정시험의 전배양시, Satellite대조군으로 세포독성 확인용 well 플레이트 (1 well)를 제작하였다. Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구하였다.

$$\text{RPD (\%)} = \frac{(\text{No. of population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

$$\text{Population doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number}/\text{Initial cell number})]/\log 2$$

④ 본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과 (Table 1), 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우, 용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/mL에서 42.0 및 47.4%의 세포독성이 관찰되었다. 연속처리법의 경우, 5,000 및 2,500 µg/mL에서 55% 이상의 세포독성이 확인되어, 세포증식을 약 55% 억제하는 용량을 산출한 결과, 2,338.5 µg/mL였다.

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 1,250 µg/mL 이상에서 관찰되었다.

⑤ 본시험의 용량

본시험의 용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/mL에서 약 40% 이상의 세포독성이 확인되었기 때문에, 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하여, 판독가능한 용량을 3단계 이상 확보하기 위하여, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 5단계의 시험물질군을 설정하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 세포증식을 약 55% 억제하는 용량인 2,300 µg/mL를 최고용량으로 하여, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 5단계의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
연속처리법	-	2,300, 1,150, 575, 288, 144

(나) 본시험

- 처리방법

배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질	
단시간처리법 연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.70		0.13	5
연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, 플레이트 내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속 처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시 (Colcemid 처리전)에 각 용량 별로 관찰하였다. 용량설정시험에서 삼투압이 음성대조군과 비교하여 50 mOsm/kg 이상 변화 하지 않았기 때문에 본시험에서 삼투압을 측정하지 않았다. pH의 경우, 시험물질 처리 후, 단 시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하의 1,250 µg/mL 이상, 연속처리법의 대사활성화비 존재하의 1,150 µg/mL 이상에서 pH 변화가 관찰되어 해당 용량의 pH를 측정하였다. 그 결과, 음성대조군과 비교하여 1.0 이상 변화하지 않았다.

- RPD의 산출

RPD 측정은 용량설정시험과 동일한 방법으로 실시하였으며, 각 용량당 1 well을 사용하였다. Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료 후에 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 RPD를 구하였다.

- 검체제작

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Gibco, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL가 되도록 첨가 하여 세포분열을 중지시켜 정지시켰다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플 레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea)하였다. 상등액을 버리고 37°C에서 보존한 0.075 mol/L KCl 수용액 5 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 냉각고정액 (methanol:acetic acid = 3:1) 1 mL를 첨가한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 5 mL의 냉각고정액을 첨가한 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 고정 하였다. 이러한 고정작업을 1회 반복하였다. 소량의 냉각고정액에 세포를 부유시킨 후, 슬라이

드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 검체 슬라이드를 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하였다. 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하고, 초순수로 세척 및 건조한 후, 봉입제 (Entellan new, Merck, Germany)로 봉입하였다.

(8) 관찰 및 판정

(가) 관찰 및 계측

검체 슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 염색체 관찰의 대상 용량은 각 처리법 모두 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정하였다. 각 용량당 최소 300개의 분열중기상을 현미경 (600배 배율, BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분하였다. 구조이상에 대해서는 염색분체절단 (chromatid break, ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange, cte), 염색체절단 (chromosome break, csb), 염색체교환 (chromosome exchange, cse), 염색분체갭 (chromatid gap, ctg), 염색체갭 (chromosome gap, csg) 및 단편화 (fragmentation, frg)를 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록하였다. Gap은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의하였다. 또한, 수적이상에 대해서는 배수체 (polyploidy, pol) 및 핵내배화 (endoreduplication, end)를 관찰하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. Gap에 대해서는 gap이 관찰되는 세포를 포함 또는 미포함하는 이상세포를 구분하여 기록하였다. 기타 (other)는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 종류와 수를 기록하였다.

(나) 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

- * 음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것.
- * 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 있을 것.
- * 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상이 300개 이상 관찰될 것.
- * 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3단계 이상일 것.

(다) 결과의 판정

염색체이상을 가진 세포 (gap 미포함)의 출현빈도에 대하여 아래의 조건을 모두 만족하는 경우 양성으로 하였다.

- * 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 하나 이상의 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것.
- * 증가에 따른 용량의존성이 있을 것.
- * 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것.

(9) 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용

하여 통계해석을 실시하였다. 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도 (gap 미포함)에 대해서 Fisher's exact test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01)를 검증하였다.

바. 결과

(1) RPD 측정

단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 µg/mL에서 각각 100, 94.6, 95.6, 88.9, 73.1 및 45.2%, 존재하의 0, 313, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 µg/mL에서 100, 94.0, 92.9, 82.4, 75.7 및 67.2%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 144, 288, 575, 1,150 및 2,300 µg/mL에서 각각 100, 88.4, 82.0, 82.0, 70.2 및 24.7%였다.

(2) 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하의 1,250 µg/mL 이상, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 1,150 µg/mL 이상에서 관찰되었다.

(3) 염색체이상 관찰대상 용량

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량에서 300개의 분열중기상이 관찰 가능하여, 최고용량을 포함한 3용량을 염색체이상 관찰대상 용량으로 설정하였다.

계열	S9 mix	염색체이상 관찰대상 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-/+	5,000, 2,500, 1,250
연속처리법	-	2,300, 1,150, 575

(4) 염색체이상 출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (p<0.01).

Table 2. Summary Results of the Main Study

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	SP mix	Trt-Rec time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}			
						ctb	csb	cte	cse	fig	gap		total (%)		end	pol		total (%)		
											ctg	csg	gap-	gap+						
Water for injection	0	100	-	6-18	150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)	0
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
RP-1701	313	94.6	-	6-18	not observed															
	625	95.6	-	6-18	not observed															
RP-1701	1,250†	88.9	-	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.3)	0
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RP-1701	2,500†	73.1	-	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	3 (1.0)	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
RP-1701	5,000†	45.2	-	6-18	150	0	0	2	0	0	0	0	0	2 (0.7)	3 (1.0)	2	3	7 (2.3)	0	
					150	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	
MMC	0.1	60.9	-	6-18	150	4	0	24	0	0	0	0	0	48* (16.0)	48 (16.0)	0	1	1 (0.3)	0	
					150	4	1	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Water for injection	0	100	+	6-18	150	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	1	1 (0.3)	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RP-1701	313	94.0	+	6-18	not observed															
	625	92.9	+	6-18	not observed															
RP-1701	1,250†	82.4	+	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	0	3 (1.0)	0	
					150	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
RP-1701	2,500†	75.7	+	6-18	150	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1	2	4 (1.3)	0		
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
RP-1701	5,000†	67.2	+	6-18	150	0	0	1	0	0	0	0	2 (0.7)	2 (0.7)	1	2	4 (1.3)	0		
					150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
B[a]P	20	52.3	+	6-18	150	9	0	38	2	0	0	0	83* (27.7)	83 (27.7)	0	0	0 (0.0)	0		
					150	13	0	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Water for injection	0	100	-	24-0	150	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	1	1 (0.3)	0	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
RP-1701	144	88.4	-	24-0	not observed															
	288	82.0	-	24-0	not observed															
RP-1701	575	82.0	-	24-0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (0.7)	2 (0.7)	0	0	2 (0.7)	0	
					150	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
RP-1701	1,150†	70.2	-	24-0	150	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	1 (0.3)	0		
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
RP-1701	2,300†	24.7	-	24-0	150	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.3)	1 (0.3)	0	1	5 (1.7)	0		
					150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	
MMC	0.1	53.7	-	24-0	150	8	0	47	0	0	0	0	89* (29.7)	89 (29.7)	0	1	1 (0.3)	0		
					150	9	1	35	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

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

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

RPD: Relative Population Doubling, Trt-Rec time: Treatment-Recovery times

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by Fisher's exact test: * p<0.01

†: Precipitation

(5) 시험의 성립

음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data (Table 3)의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있으며, 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다. 또한, 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상이 300개 이상 관찰되어 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3용량 이상인 것으로부터, 해당시험은 적절한 시험조건 하에서 실시된 것이 확인되었다.

Table 3. Historical Control Data

Historical control values of structural aberrations										
Group	SQ mix	Ttt-Rec time (hr)	N	Structural aberration cells excluding gap (%) (Mean±S.D.)		Range (%)		95% control limit ^{c)} [structural aberration cells/300 cells]		
						MIN	MAX	MIN	MAX	
Negative	-	6-18	44	0.288	±	0.364	0	1.01*	0	<3
	+	6-18	44	0.311	±	0.390	0	1.09*	0	<3
	-	24-0	42	0.246	±	0.361	0	0.87*	0	<2
Positive	-	6-18 ^{a)}	39	23.44	±	5.667	11.09*	35.78*		
	+	6-18 ^{b)}	39	24.64	±	4.922	12.13*	37.15*		
	-	24-0 ^{a)}	37	35.37	±	6.862	19.09*	51.65*		

Historical control values of numerical aberrations										
Group	SQ mix	Ttt-Rec time (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)		Range (%)		95% control limit ^{c)} [numerical aberration cells/300 cells]		
						MIN	MAX	MIN	MAX	
Negative	-	6-18	44	0.174	±	0.292	0	0.83*	0	<2
	+	6-18	44	0.167	±	0.264	0	0.97*	0	<2
	-	24-0	42	0.262	±	0.290	0	1.13*	0	<2

Negative control: Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone

Ttt-Rec time: Treatment-Recovery times

S.D.: Standard Deviation

a) Mitomycin C (0.1 µg/mL)

b) Benzo[a]pyrene (20 µg/mL)

c) Poisson-based 95% control limits of the historical negative control data.

N: The total number of chromosome aberration test

The above historical control values were obtained from the data pooled from Jul 15, 2013 to May 22, 2017.

*: The range was calculated by the control limit of X derived from X-R-Rs value.

사. 고찰 및 결론

시험물질 RP-1701의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL로 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 계열에서 세포독성이 관찰되었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하의

경우, 용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/mL에서 42.0 및 47.4%의 세포독성이 관찰되었다. 연속처리법의 경우, 5,000 및 2,500 µg/mL에서 55% 이상의 세포독성이 확인되어, 세포증식을 약 55% 억제하는 용량을 산출한 결과, 2,338.5 µg/mL였다.

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 1,250 µg/mL 이상에서 관찰되었다. 따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
연속처리법	-	2,300, 1,150, 575, 288, 144

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 RP-1701은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

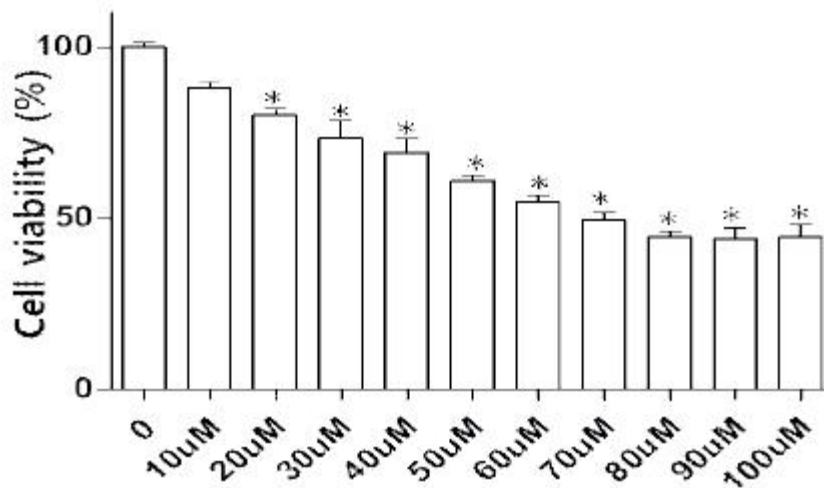
3절 오미자복합추출물로부터 인지능 개선 효능검증 및 기전 연구

1. 오미자복합추출물의 신경세포 독성 및 보호효능 평가

가. 과산화수소 처리에 따른 신경세포 독성평가

- PC12 세포에 산화 스트레스를 유도하기 위해 과산화수소(H_2O_2)를 이용하였으며, 본 실험에 사용할 과산화수소의 적정농도를 알아보기 위해 PC12 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/0.1 mL/well로 분주 후 24시간 동안 배양시켰으며, 각각의 well에 과산화수소가 10~100 μ M의 첨가된 성장배양액을 1시간씩 처리한 후 MTT assay를 이용하여 각각의 농도에 따른 신경세포의 생존율을 확인하였다.

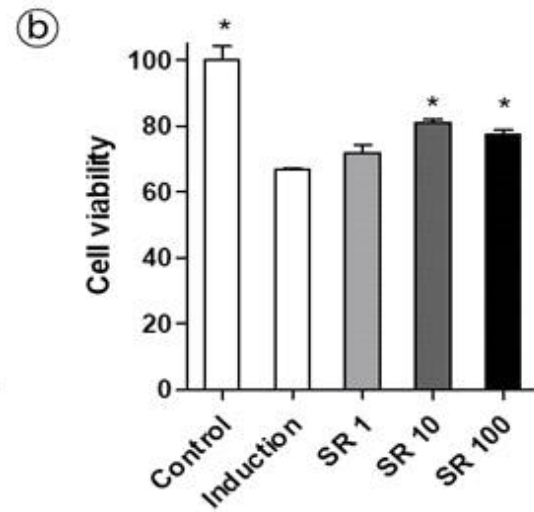
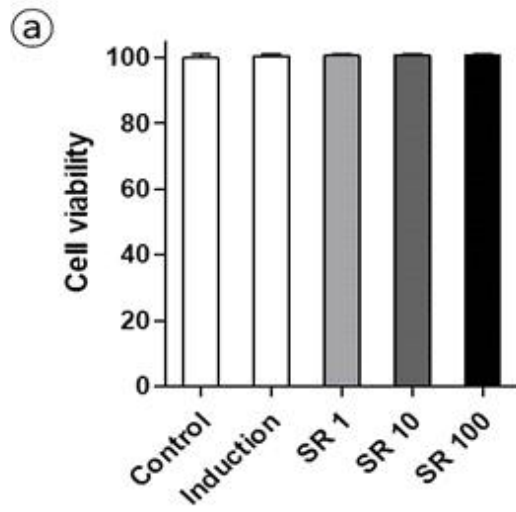
- 과산화수소를 PC12 세포에 50 μ M의 농도에서 세포 생존율에서 60%의 유의적인 감소를 확인할 수 있었으며($p < 0.05$), 이에 본 연구에서는 PC12 세포에 처리되는 과산화수소의 농도는 50 μ M을 사용하였다.



나. 오미자복합추출물의 독성 및 보호효능 평가

- 오미자복합추출물(SR)의 세포 독성을 확인하기 위해 1, 10, 그리고 100 μ g/mL의 세가지 농도를 PC12 세포에 24시간 처리한 후, 과산화수소의 독성평가와 동일한 방법으로 세포생존율을 확인한 결과, 과산화수소를 처리하지 않은 상태에서 오미자복합추출물(SR)을 농도별로 신경세포에 처리하였을 때, 오미자복합추출물은 세포독성에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

- 또한, 신경세포에 50 μ M 농도의 과산화수소로 1시간 처리 후 오미자추출물복합물 처리 시, 1 μ g/mL의 농도에서의 세포생존율은 유의적인 차이가 확인되지 않았으나, 10 μ g/mL와 100 μ g/mL에서 각각 15%와 11.5%로 유의적으로 세포생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이는 오미자복합추출물 10 μ g/mL 이상의 농도에서 과산화수소로 유발된 세포 독성에서 신경세포를 보호해주는 것으로 판단된다.



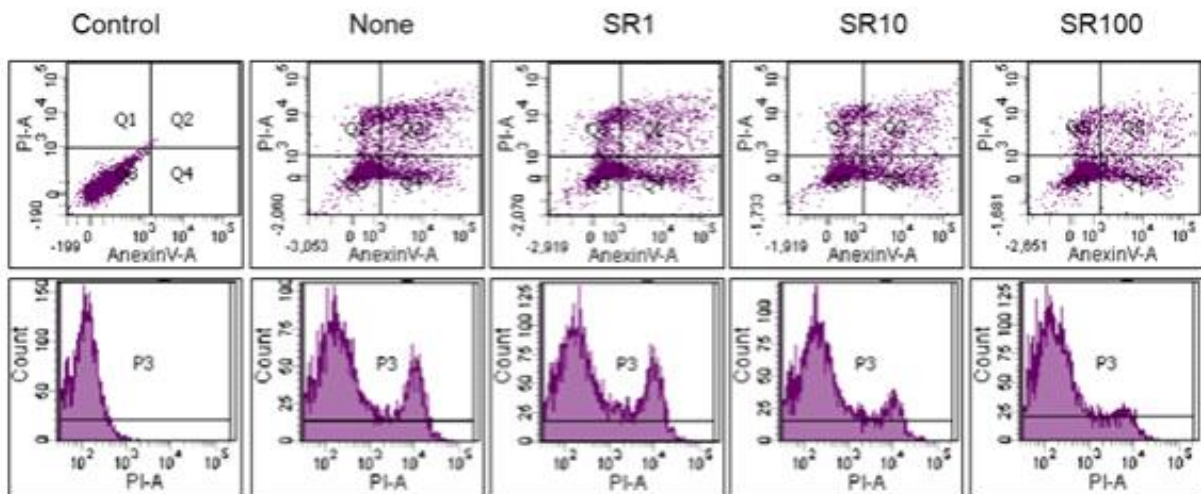
2. 오미자복합추출물에 따른 세포사 및 세포생존 관여 인자 확인

오미자복합추출물의 처리에 따른 PC12세포의 사멸을 분석하기 위하여 본 실험에서는 FACS(세포자동해석분리장치)를 통한 Annexin V와 PI의 분석과 Western blotting을 통한 세포사멸 및 세포생존에 관여하는 단백질 발현을 확인하였다.

가. FACS를 이용한 세포사 확인

- Annexin V와 PI는 세포사와 관련된 단백질로써 세포사가 일어날 경우, 세포질에 존재하는 PS(phosphatidyl serine)는 세포 표면에 노출되게 되어 Annexin V와 결합하게 되어 세포사를 일으키게 되며, 이와 반대로 세포막의 손상으로 인한 세포괴사의 경우 PI 화합물이 세포 안에 유입되어 핵을 염색시키는 것으로 알려져 있다.

- FACS를 이용하여 Annexin V와 PI 발현을 확인한 결과, PC12세포에 과산화수소 처리 시 사멸 및 괴사가 나타났다. 하지만 오미자복합추출물의 처리 시 Annexin V의 발현은 10 µg/mL에서 79%와 100 µg/mL에서 65% 감소되었으며, 세포괴사와 관련된 PI의 발현 또한 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

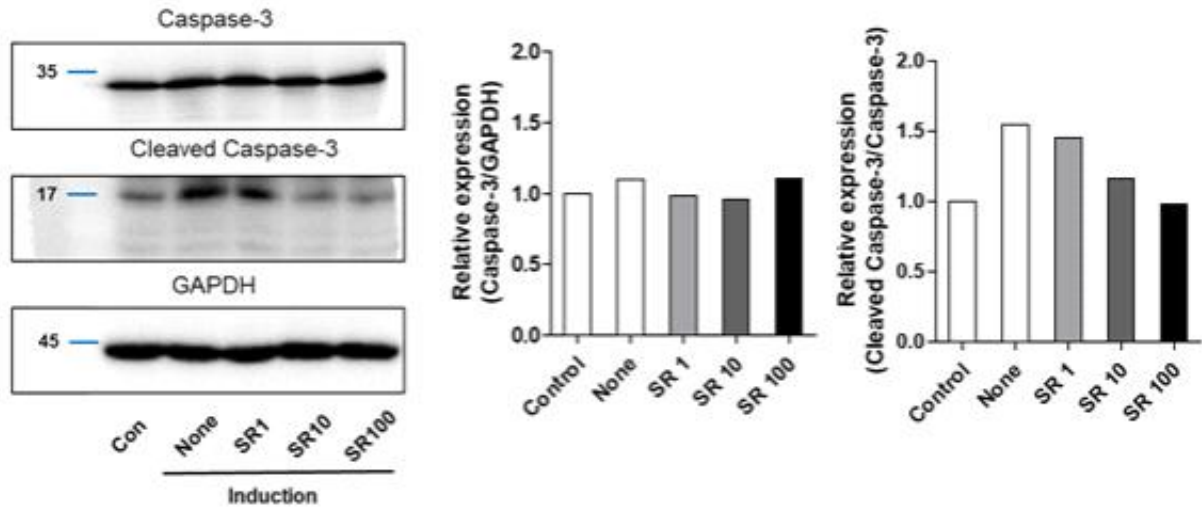


나. 세포사멸 관여하는 단백질 발현 확인

(1) 세포사멸 관련 효소

- Caspase-3 단백질은 세포 내에서 비활성화 효소원으로 존재하지만 단백질분해성 절단(Proteolytic cleavage)에 의해 inhibitor domain이 떨어지면 Cleaved Caspase-3 단백질로 활성화되고 세포사멸을 촉진시킨다. 세포사 과정 중 마지막 단계에서 중요한 역할을 하며, 높은 활성도를 나타내는 것으로 알려져 있다.

- 신경세포에 과산화수소로 1시간 처리 후 1, 10 그리고 100 µg/mL의 농도로 오미자추출물 복합물을 처리한 결과, 오미자복합추출물 처리군에서 농도의존적으로 Cleaved Caspase-3의 발현이 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다.



(2) 미토콘드리아에 의한 내인성 세포사멸 경로(intrinsic apoptosis pathway)

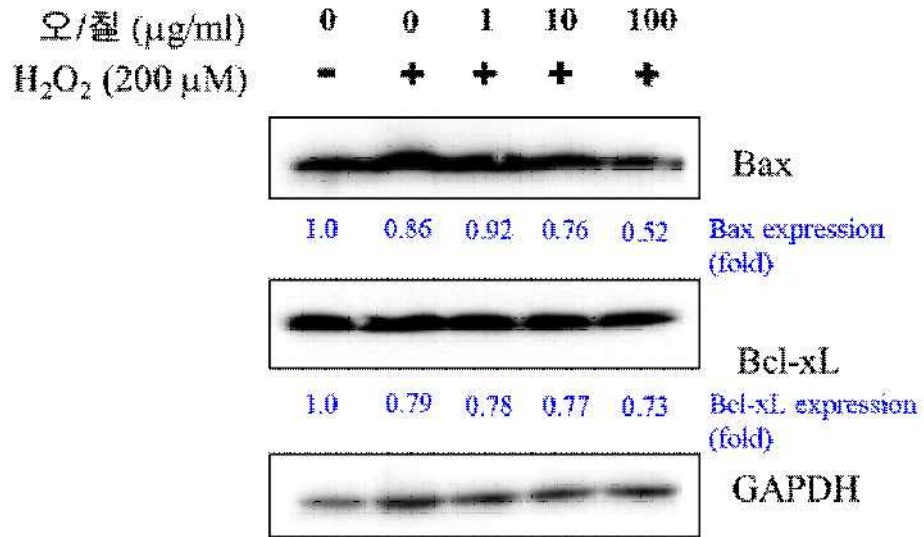
- 미토콘드리아 외막의 투과성 증가와 미토콘드리아의 내막 공간에서 세포질 내로의 사멸유도자인 Cytochrome C의 방출로 caspase가 활성화되어 세포사멸을 일으킨다.

- 미토콘드리아에 의한 intrinsic apoptosis pathway에 작용하는 단백질인 Bcl-2 family는 다양한 종류가 존재한다. Bcl-2 family는 크게 pro-survival regulator와 pro-apoptosis regulator로 나눌 수 있는데, pro-survival regulator는 cytochrome C의 유출을 막아 세포사멸을 막고, pro-apoptosis regulator는 반대로 cytochrome C의 유출에 관여함으로써 세포사멸을 일으킨다.

Pro-survival	Bcl-2 sub-family	Bcl-2
		Bcl-xL
		Bcl-w
Pro-apoptosis	Bax sub-family	Bax
		Bak
		Bok/Mtd
	BH3 sub-family	Bik/Nbk/Blk
		Bad
		Bid

본 실험에서는 pro-survival regulator인 Bcl-XL과 pro-apoptosis regulator인 Bax의 발현량을 확인하였다.

- 신경세포에 과산화수소로 1시간 처리 후 1, 10 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 오미차추출등복합물을 처리한 결과, Bcl-xL의 발현량은 변화가 없었지만, Bax의 발현량은 오미자복합추출물 처리군에서 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.



- 이는 오미자복합추출물은 과산화수소로 유도된 세포 독성으로 인한 세포괴사와 세포사를 억제할 수 있었으며, 이는 선행 연구되었던 천연 추출물들과 같은 세포사 억제 효과가 있는 것을 본 실험 결과를 통해서 재확인할 수 있었다.

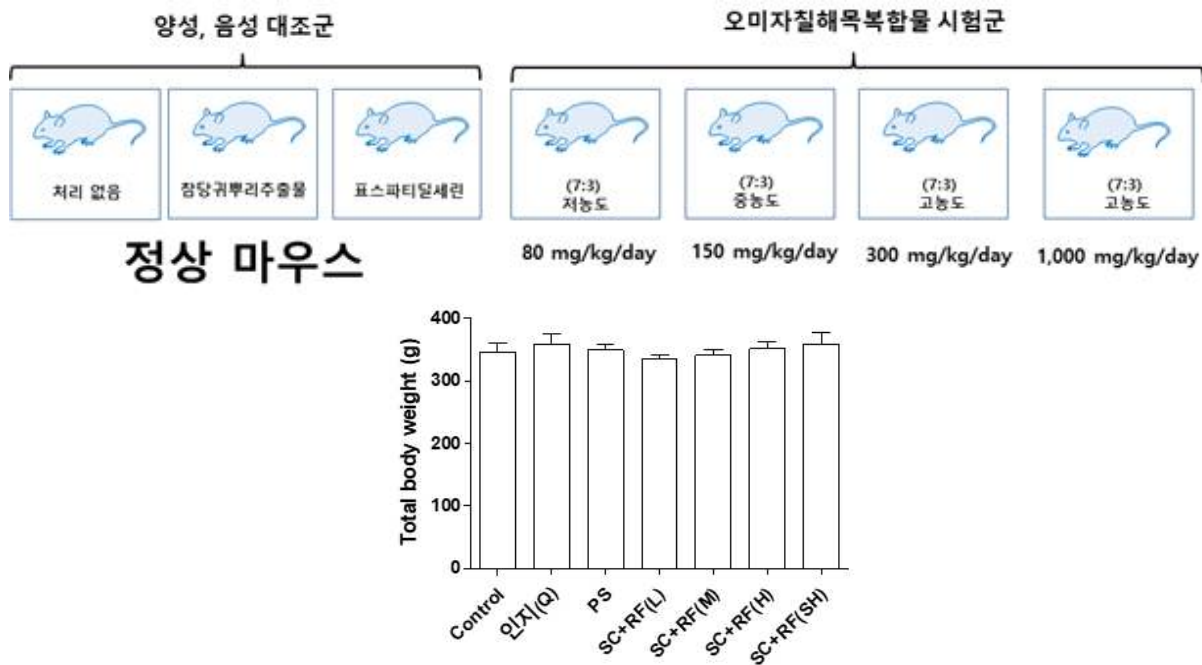
3. Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 동물모델을 이용한 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능검증

가. Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 동물모델 및 시험용량 선정

본 시험은 Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 동물모델인 수컷 SD 랫드에 시험물질인 오미자복합추출물을 반복 경구 투여한 후, 인지능력 개선에 효과가 있는지 Morris water maze test (수중미로) 및 Passive avoidance test (수동회피)를 통해 평가하고자 실시하였다.

(1) 정상군 동물모델을 이용한 동물 독성 평가

- 정상군 동물모델에서 오미자복합추출물의 인지능 개선에 대한 non-GLP수준의 독성시험을 진행하기 위해서 4가지 용량(저농도(SC+RF(L)): 75mg/kg/day, 중농도(SC+RF(M)): 150mg/kg/day, 고농도(SC+RF(H)): 300 mg/kg/day, 및 최대무독성용량 NOAEL(SC+RF(SH)) 1,000mg/kg 의 4가지 용량으로 각 군당 8 마리씩)에서 7:3 비율(오미자7: 칠해목3)로 하며, 양성 대조군은 현재 시판되고 있는 개별인정형 건기식인 참당귀뿌리추출물(인지Q)과 포스파티딜세린을 사용하여, 총 4주간 사료첨가 방법으로 구강 투여하였다. 그 결과, 몸무게 변화, 외형 변화, 행동변화, 사료, 음수 섭취량, 장기 및 조직 등의 특이한 점이 발견되지 않았다.

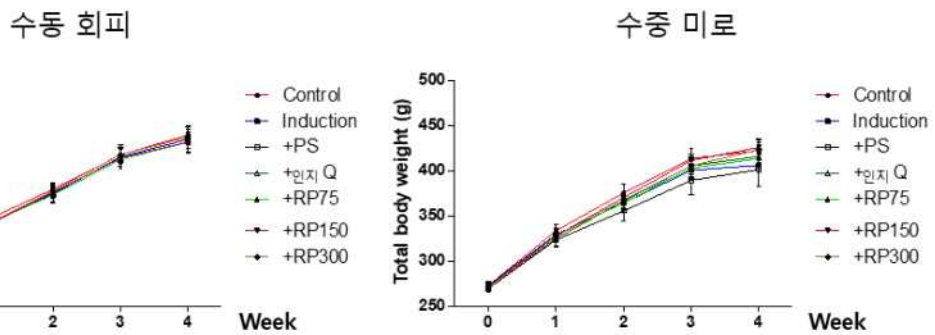
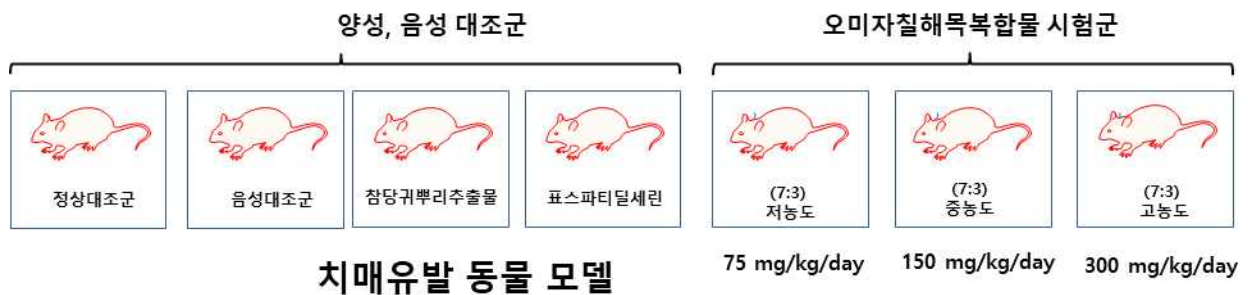


정상군 동물모델의 추출물 투여 시험에서 체중

(2) 인지능력 저하용 시험물질의 용량 결정

- Scopolamine은 학습능력 및 기억력을 저하시키는 물질로 기억력 및 인지능력개선 효능시험에 폭넓게 사용되고 있다. 총 6군으로 분리하여 실험을 하였으며, 스코폴린을 투여하지 않은 정상 대조군을 제외한 모든 군에 0.9% 생리식염수에 0.25 mg/mL로 용해한 스코폴린(scopolamine: Lot No.: SLBP0022V, Sigma Aldrich, MO, U.S.A.)을 투여하여 기억력 감소를 유발하였다.

- 인지력이 저하된 동물에 생리식염수만 투여한 음성대조군과 포스파티딜세린(PS)을 50 mg/kg/day 용량으로 투여한 양성 대조군을 설정하였다.
- 시험군은 오미자복합추출물을 저농도<75 mg/kg/day: RP75>, 중농도<150 mg/kg/day: RP150>, 고농도<300 mg/kg/day: RP300>로 1일 1회, 위내에 28일 동안 총 28회 투여하였다.
- Morris water maze test (수중미로) 및 Passive avoidance test (수동회피) 실험에서 사용된 3가지 용량(저농도; 75 mg/kg/day, 중농도; 150 mg/kg/day, 고농도; 300 mg/kg/day) 및 음성 양성 대조군에서 4주간 구강으로 투여하였고 몸무게 변화, 외형 변화, 행동변화 등의 특이점이 발생하지 않았다.



치매유발 동물모델의 추출물 투여 시험에서 체중

나. 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능검증 시험방법

(1) 인지능 개선능력 확인을 위한 미로시험

- Morris water maze test는 water maze를 사분원으로 나누어 그 중 한 곳에 도피대를 숨겨 놓고, 도피대가 있는 방향에 공간 단서를 부착하여 동물이 출발 위치와 상관 없이 공간 단서를 인지하여 도피대를 찾아가는 능력을 평가하였다.

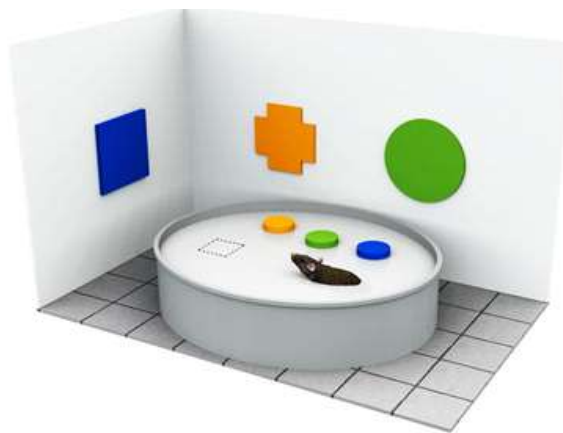
- 시험물질인 오미자복합추출물을 저농도 처리군<75 mg/kg/day: RP75>, 중농도 처리군<150 mg/kg/day: RP150>, 고농도 처리군<300 mg/kg/day: RP300>를 반복 투여 한 후, scopolamine을 투여하여 학습능력 및 기억력 저하를 스코폴라민에 의해 유발한 후에 Morris water maze test를 시행하여 인지능력 개선에 대한 시험물질의 효능을 평가하였다. 오미자 복합추출물 투여 후 23일부터 27일까지 Morris water maze test를 SMART video tracking system(Smart 3.0, Panlab Harvard Apparatus, Spain)을 통해 실시하였다.

- 구체적으로, Water maze를 4부분으로 나누고 4분원의 남서쪽 중앙에 도피대를 세운후 수면

1cm 아래 잠기도록 물을 채우고, 색소(Kids paint(black), Kidsmomart, Korea)를 풀어 도피대가 보이지 않도록 하였다. 도피대를 두는 위치에 공간을 인지할 수 있는 도형모양의 공간단서를 water maze 안쪽 벽에 부착하였다.

- Scopolamine (Lot. NO: SLBP0022V, Sigma-aldrich, MO, U.S.A.)을 1mg/kg 용량으로 복강투여(3 mL, 23 G, Doowon meditec Co., Korea)하고 30분동안 home cage에 방치후 수중미로를 실시하였다. 동물을 도피대 위에서 10초간 머무르게 하고 도피대를 찾아 갈수 있도록 학습시행을 4회 실시하였으며, 학습 때 마다 다른 방향에서 출발시키고, 학습 시행마다 시험동물이 도피대를 찾아가는 시간 (escape latency time)을 기록하였으며, 이와 같은 과정을 5일간 수행하였다.

- 시험물질 투여 23 일부터 27일까지 5일동안 water maze 내 도피대에 찾아가는 훈련을 진행하였다. 훈련은 하루에 5번 연속적으로 수행하였고 도피대에 도달하는 시간(escape latency time)을 측정하여 평균값을 산출하였다.



모리스 수중미로 시험(Morris water maze test)

(2) 인지능 개선 수동회피 실험

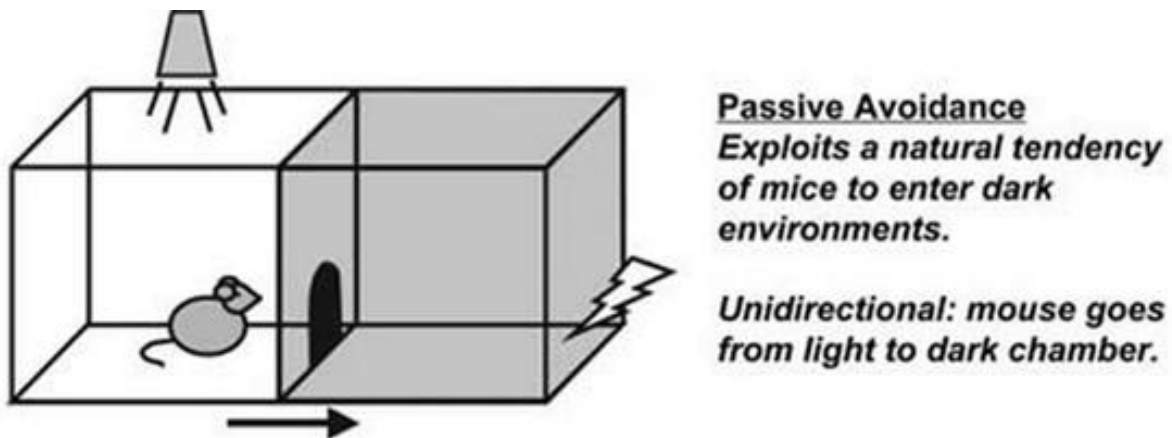
- 수동회피 시험은 white room과 dark room으로 구성된 조건화 상자에서 이루어지며, White room에 시험동물을 위치시키고 등을 켜면 어두운 곳을 좋아하는 시험동물은 dark room으로 이동하게 되며, dark room은 전기자극을 줄 수 있도록 설계되어 있다.

- 시험동물에 scopolamine을 투여하고 white room에 위치시킨 후, 등을 켜서 dark room으로 이동하도록 한후, 전기자극을 주어 dark room의 전기자극을 학습통해 기억을 하게하였다. 다음날 시험동물을 white room에 위치시키고 등을 켜 후 dark room으로 이동하는 시간 (latency time)을 측정하여 전 날의 전기자극이 학습 및 기억이 되었는지 평가하였다.

- 구체적으로, 시험물질투여 후 25 일째에 조건화상자 (수동회피 시험상자)의 불꺼진 white room에 동물을 넣고, 60초간 적응시킨 후 white room의 LED 등을 켜고 동시에 guillotine door를 열어 주었다. 180초 동안 dark room에 탐색과 적응을 시켰다.

- 시험물질투여 후 26일째에 위 과정을 시행하였으며, 한번 더 반복하여 불이 켜지고 dark room에 들어가는 시간이 30초 내외가 되도록 적응시켰다. 시험물질 투여 27일째 학습 1시간 전에 시험물질을 투여하고, 시험물질 투여 30분 후 0.9% 생리식염수에 0.25 mg/mL로 용해한 scopolamine (Lot No.: SLBP0022V, Sigma Aldrich, MO, U.S.A.)을 4 mL/kg 액량으로 복강투여 하였다. Scopolamine 투여 30분 후 동물을 불이 꺼진 white room에 넣고 10초 후 LED등을 켜고 동시에 guillotine door를 열어주었으며, 동물이 dark room으로 들어가면 guillotine door를 닫고 0.5 mA로 3초간 전기자극을 주었다.

- 검사시행은 학습시행 24시간 후에 실시하였으며, 동물이 dark room에 들어가는데 걸리는 시간(latency time)을 timer로 측정하였다. 300초 동안 dark room에 들어가지 않으면 시험을 종료하였다.



수동회피시험(Passive avoidance test)

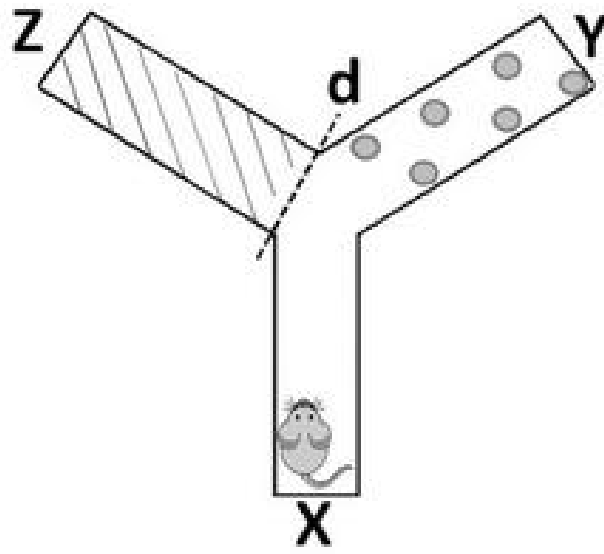
(3) 인지능 개선 Y-미로 실험

- 스코폴라민으로 유발된 기억력 손상에 대한 오미자칠해목 추출혼합물의 효과를 확인하기 공간인지를 평가하는 Y-미로를 이용한 랫드 동물실험을 실시하였다.

- 실험에 이용되는 기구는 Y자 모양의 120° 각도를 이루는 3개의 통로로 구성되어있다. 각 통로를 A, B, C 로 정하고 한쪽 통로에 랫드를 놓고 8분간 자유롭게 움직이게 하는 동안 미로에 들어간 팔의 횟수를 기록하였다. 세 개의 미로에 팔이 들어간 경우 1점씩 부여하였고, spontaneous alternation(변경 행동력)은 3개의 미로에 차례로 팔이 들어가는 것으로 정의하였으며, spontaneous alternation을 계산할 수 없는 경우(4회 이하로 들어간 경우), 데이터 산출 및 통계분석에서 제외하였다.

$$\text{Spontaneous alternation \%} = \frac{\# \text{ spontaneous alternations}}{\text{total number of arm entries} - 2} \times 100$$

spontaneous alternation(변경 행동력) 공식



Y-미로 실험(Y-maze test)

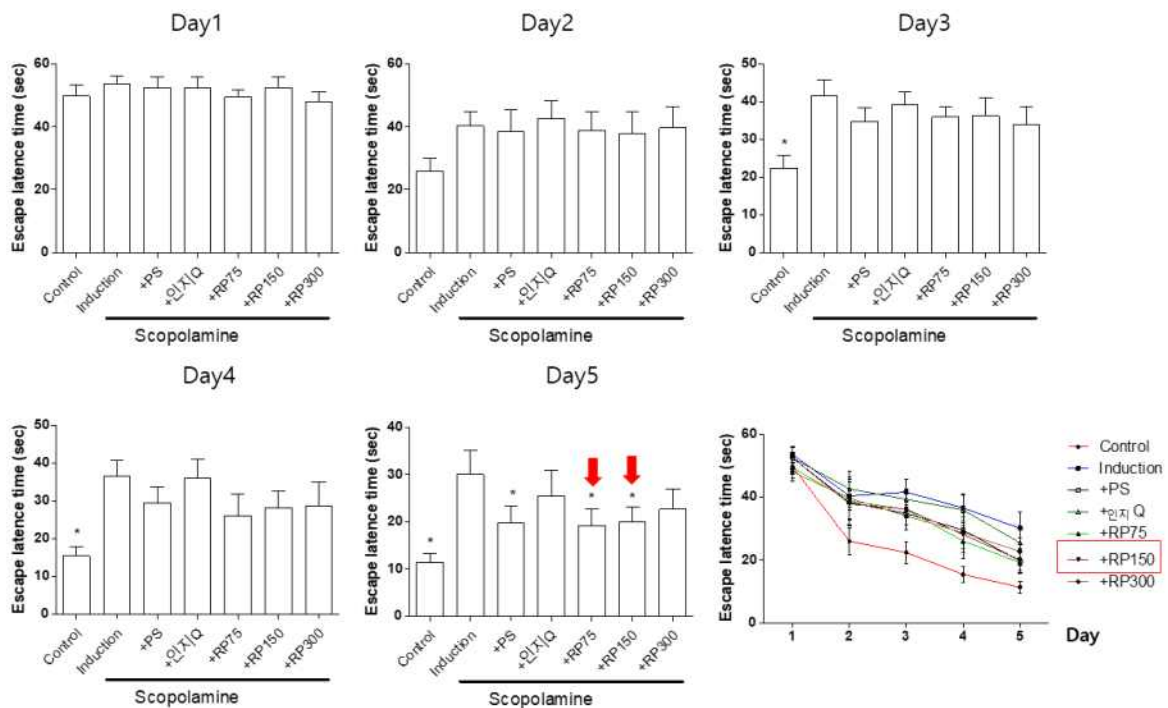
4. 오미자복합추출물의 인지능력 개선 작용기전 연구

- 뇌의 활성인자인 뉴로트로핀(Neurotrophin)은 신경세포의 생존과 분화를 결정짓는 인자로 뇌 유도 신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF), 신경성장인자(Nerve growth factor; NGF)등이 있다. 특히, BDNF는 해마에서 직접적인 신경세포 생성을 대표하는 인자로 이는 기억이나 시냅스가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자인 Cyclic adenosine monophosphate(cAMP) response element-binding protein(CREB)의 활성화로 인해 유도된다.

- 오미자복합추출물을 농도별로 Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD Rat에 4주간 투여하였을 때, 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자인 CREB 및 신경영양인자인 BDNF의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

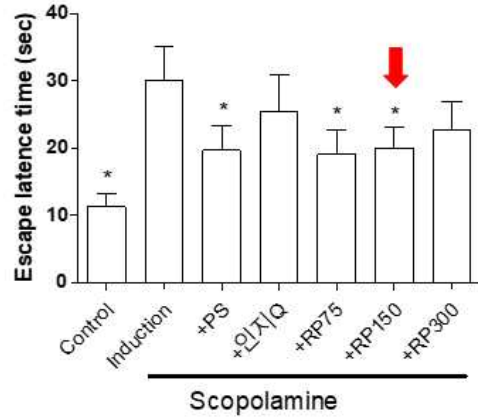
가. 수중미로 실험 결과

- Training 5일(시험물질 투여 23일 ~ 27일) 동안 도피대에 도달하는 시간은 정상대조군, 음성대조군 및 모든 시험물질 투여군에서 훈련이 진행될수록 점차 감소하는 경향을 나타냈으며, 5일째 수중미로에서 오미자복합추출물 75 및 150 mg/kg 투여군에서 음성대조군과 비교하여 도피대에 도달하는 시간이 짧아 졌으며 특히 오미자복합추출물 150 mg/kg에서 가장 좋은 효능을 나타내었다.



날자별 도피대를 찾아가는 시간 (escape latency time)

- 동물 실험 6일째 도피대를 제거한후 60초 동안 도피대가 있던 사분원에 머무는 시간 (swimming time in the target quadrant)을 측정하였다.



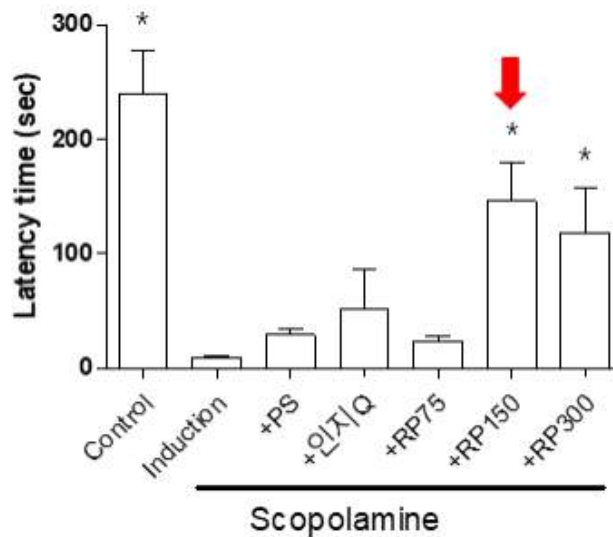
도피대가 있던 사분원에 머무는 시간 (swimming time in the target quadrant)

- 60초동안 도피대가 있던 사분원 안에서 머문 시간 (Swimming time in the target quadrant) 을 측정한 결과, 시험물질 투여 28일째 (training 6일째)에 음성대조군에서 정상대조군과 비교하여 감소하였다. 시험물질투여군 75 및 150 mg/kg 및 양성대조군 PS는 음성대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다.

나. 수동회피 실험결과

(1) 전기자극을 받았던 어두운 방으로 들어갈때 걸리는 시간(Latency time)

- 추출물 투여 4주후 Latency time을 측정한 결과, 오미자복합추출물 150 및 300 mg/kg 투여군에서 음성대조군과 비교하여 증가하였으며, 특히 오미자복합추출물 150 mg/kg에서 가장 좋은 효능을 나타내었다.



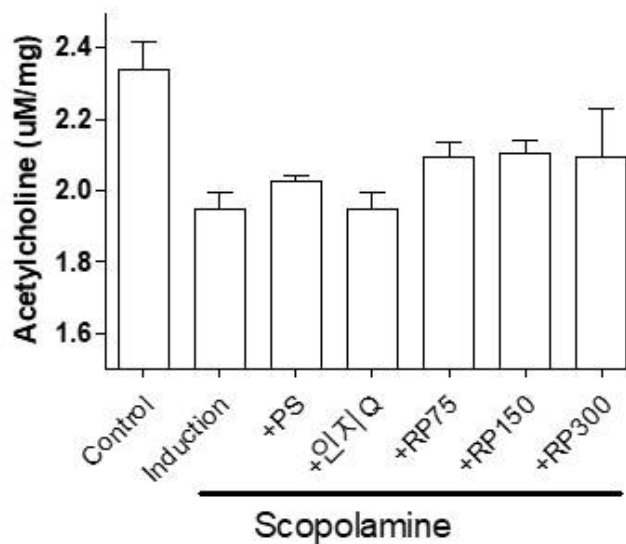
동물이 dark room에 들어갈때 걸리는 시간(latency time)

(2) Acetylcholine(Ach) 농도 측정 결과

- 검사시행이 종료되면 동물의 해마를 적출하여 Acetylcholine(Ach) 농도를 측정 하였다.

- 해마의 Acetylcholine(Ach) 농도 측정은 Amplex Red Acetylcholine / Acetylcholinesterase Assay Kit (Lot No.: 1841438, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, U.S.A.)를 사용하여 Multilabel Plate Reader(VICTOR X, Perkin Elmer, MA, U.S.A.)에서 excitation wavelength 540 nm, emission wavelength 595 nm로 농도를 측정하였다.

- 음성대조군에서 scopolamine 투여에 의해 acetylcholine의 농도가 감소된 것이 유의($p < 0.01$)적으로 확인되었으며, 양성대조군 (PS) 및 오미자복합추출물 3가지 농도 투여시 acetylcholine의 농도가 상승하는 것을 확인하였다. 하지만 유의성 확보는 미흡하여 후속 연구를 통해 추가 확인이 필요할 것으로 판단하였다.



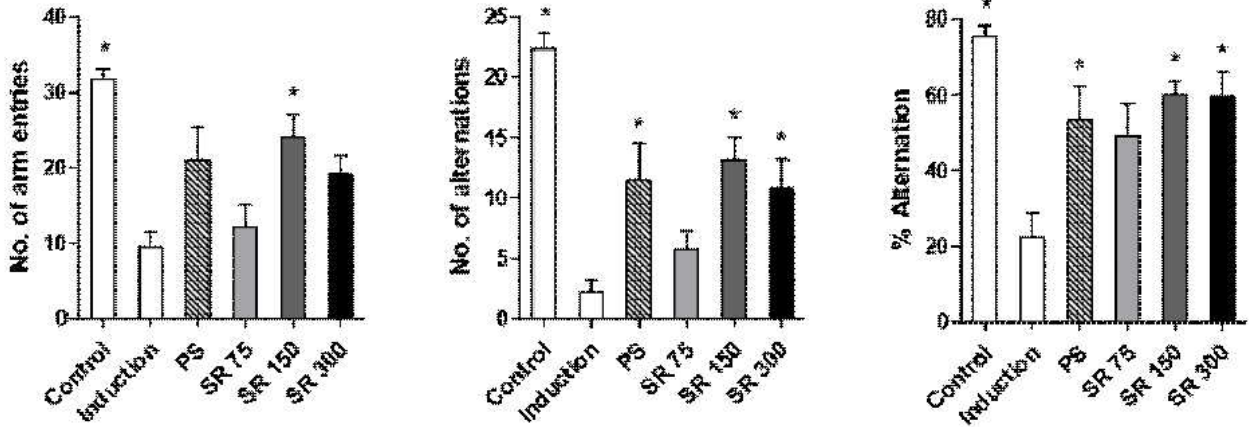
해마의 Acetylcholine(Ach) 농도 측정

다. Y maze 실험결과

(1) Spontaneous alternation(변경 행동력)

- 스코폴라민을 투여한 음성대조군의 경우 팔을 넣은 횟수와 spontaneous alternation에서 정상대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소 되었다.

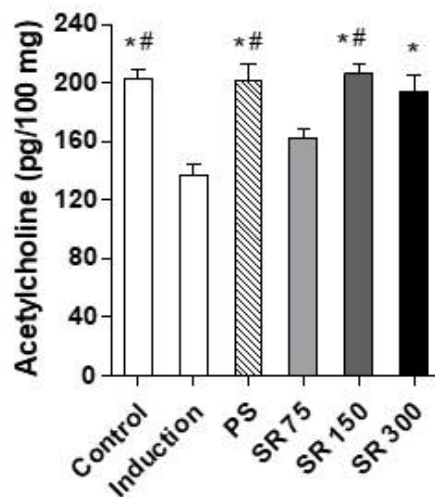
- 스코폴라민으로 인지력이 저하된 동물이 각 미로에 팔을 넣는 횟수가 10회 미만으로 감소한 반면 오미자복합추출물을 150과 300 mg/kg용량으로 투여한 군에서 각각 20회 이상으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).



Y-미로 실험 결과

(2) Acetylcholine(Ach) 농도

- 검사가 종료된 동물을 희생시킨 후 뇌 조직 중 해마를 적출하여 해마의 Acetylcholine 농도를 측정하였다.
- 해마의 Acetylcholine(Ach) 농도는 Universal Acetylcholine ELISA Kit (Lot No.: 1BPB6CIFHC, Novus Biologicals, LLC, CO, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.
- 스크폴라민을 투여한 음성대조군의 acetylcholine양이 137.2 pg/100 mg으로 명확히 감소하였으며 정상대조군에서는 202.9 g/100mg으로 유의적으로 유지되는 것을 확인하였다($p < 0.001$). 특히 오미자복합추출물을 150과 300 mg/kg으로 투여한 군에서 음성대조군 대비 150.03%(206.2 pg/100 mg)과 141.14%(193.6 pg/100 mg) 으로 유의적인 증가가 확인되었다($p < 0.05$).



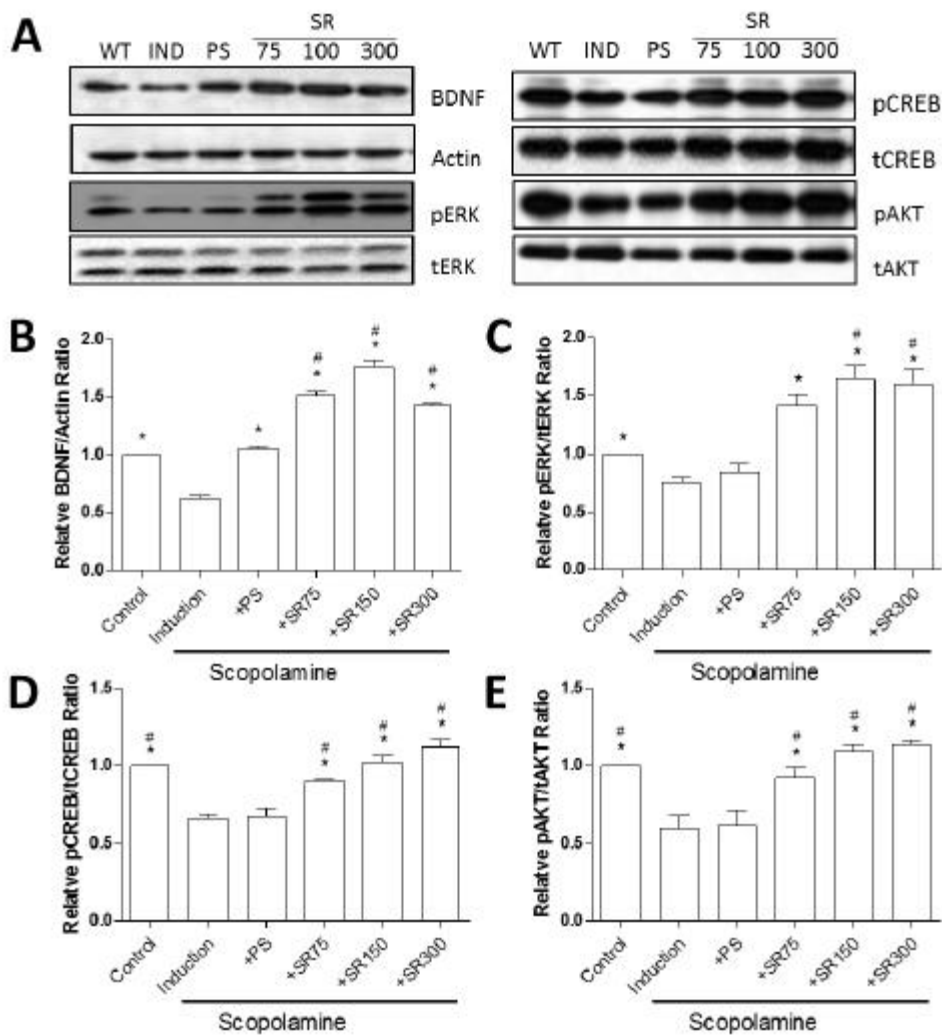
해마의 Acetylcholine(Ach) 농도 측정

라. 시냅스 가소성 조절 단백질의 발현양 확인 결과

(1) BDNF-CREB signaling

- 뇌의 활성인자인 뉴로트로핀(Neurotrophin) 중 신경세포의 생존과 분화를 결정짓는 신경영양 인자인 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)의 발현 확인을 통해 시냅스 가소성이 유지되거나, 회복되는 것을 확인하고자 시냅스가소성과 관련된 다양한 전사인자인 CREB, ERK, AKT 단백질의 활성화를 확인하였다.

- 시험동물에 scopolamine을 투여한 후 각 전사인자의 발현이 감소한 것을 확인하였고, 오미자 복합추출물을 150 및 300 mg/kg 용량으로 투여한 시험군에서 BDNF, pCREB, pERK, pAKT의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.



해마의 인지기능개선 인자인 BDNF, CREB, ERK, AKT의 발현량

- 결론적으로 모리스 수중미로, 수동회피, Y-maze 실험 등을 통해 스코폴라민에 의해 일시적인 기억력 손상이 유발된 동물모델에 오미자복합추출물의 투여한 후 다양한 인지기능 향상 지표가 확인 됨으로써 실험동물의 기억력 및 인지기능이 개선되었음을 확인하였다. 특히 과산화수

소등의 산화스트레스에 대한 보호능력이 우수하며, 해마 조직세포내의 시냅스 가소성에 영향을 주는 단백질의 발현을 정상 수치만큼 회복시켜 아세틸콜린의 양을 유지시키는 것으로 확인되었다. 이의 결과를 종합하면 오미자복합추출물은 신경세포의 보호능이 있으며 신경염증 및 시냅스 가소성을 조절하는 인자를 정상 수치로 유지시킴으로써 기억력 및 인지능력의 개선 효능이 있는 것으로 확인되었다.

바이오마커			연구 유형	
			In vitro	In vivo
신경세포 보호	신경세포 사멸억제	세포생존율	○	
		세포사멸 관련 단백질 및 유전자 발현(caspase)	○	
신경염증 억제		MAPKs(ERK)		○
신경전달 물질 및 시냅스 가소성 조절	신경전달 물질생성, 분비 및 대사조절	Acetylcholine		○
		CREB		○
	시냅스 가소성	BDNF		○
동물 행동시험 (인지행동적 지표)		모리스 수중미로 시험		○
		수동회피 시험		○
		Y-미로 시험		○

4절 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발 및 산업화 연구

1. 원재료(오미자, 칠해목) 안전성 검사

가. 원재료(오미자, 칠해목) 중 유해물질(중금속)의 [식품의 기준 및 규격] 적합성 검토

- 관련규정 : [식품의 기준 및 규격] 제2. 3. 식품일반의 기준 및 규격 5) 중금속 기준.

대상식품	납(mg/kg)	카드뮴(mg/kg)	무기비소(mg/kg)
곡류(현미 제외)	0.2 이하	0.1 이하	0.2 이하
서류	0.1 이하	0.1 이하	
콩류	0.2 이하	0.1 이하	
견과종실류	땅콩 또는 견과류	0.1 이하	0.3 이하
	유지 종실류	0.3 이하	0.2 이하
과일류	0.1 이하	0.05 이하	
엽채류(결구 엽채류 포함)	0.3 이하	0.2 이하	
엽경채류	0.1 이하	0.05 이하	
근채류	0.1 이하	0.1 이하	
과채류	0.1 이하	0.05 이하	
버섯류	0.3 이하	0.3 이하	

* 총비소 0.2 mg/kg 초과 검출 시에만, 무기비소로 시험하여 기준 적용

- 시험항목 : 납, 카드뮴

- 시험기관 : 수원여자대학교 식품분석연구센터

- 시험결과

중금속	오미자		적용기준 (생물)
	건조(시험)	생물(산출)*	
납(mg/kg)	0.04	0.0088	0.1 이하
카드뮴(mg/kg)	0.005	0.0011	0.05 이하

중금속	칠해목		적용기준 (생물)
	건조(시험)	생물(산출)*	
납(mg/kg)	1.019	0.123	0.3 이하
카드뮴(mg/kg)	0.151	0.0183	0.2 이하

* 산출방법(근거 : 2017년 자주하는 질문(FAQ)집 (식품·축산물·건강기능식품))

$$\begin{aligned}
 \text{생물 중 중금속 농도(mg/kg)} &= \frac{100 - \text{생물 중 수분함량}}{100 - \text{건조물 중 수분함량}} \times \text{건조물 중 중금속(mg/kg)} \\
 &= \frac{100 - 80.5}{100 - 11} \times 0.04 \text{ mg/kg} \\
 &= 0.0088 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

- 결과검토 : 오미자 및 칠해목에 함유된 중금속(납, 카드뮴)은 [식품의 기준 및 규격] 농산물의 중금속 기준 이하로 유해물질(중금속) 함량은 [식품의 기준 및 규격]에 적합하였다.

나. 원재료(오미자, 칠해목) 중 유해물질(잔류농약)의 [식품의 기준 및 규격] 적합성 검토

- 관련규정 : [식품의 기준 및 규격] 제2. 3. 식품일반의 기준 및 규격 10) 농약의 잔류허용기준. [식품의 기준 및 규격]에는 오미자의 농약 잔류허용기준만 있고, 칠해목의 농약 잔류허용기준은 없다. 따라서 칠해목은 [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준의 그 농약 기준 중 당해농산물과 제1. 3. 1) 식물성 원료의 분류에서 정한 대분류군(단, 견과종실류, 과실류 및 채소류에 한해서는 소분류를 우선 적용)에 속한 농산물의 최저기준을 우선 적용하고 [별표 4] 농산물의 농약 잔류허용기준의 그 농약 기준 중 최저기준을 적용하였다.

- 시험항목 : 잔류농약 320종

- 시험기관 : 수원여자대학교 식품분석연구센터

- 시험결과

* 오미자 : Fenitrothion 외 3종 검출

검출성분명	검출치(mg/kg)	허용기준(mg/kg)	적용기준
Fenitrothion	0.011	5.0	오미자(건조)
Chlorfenapyr	0.084	2.0	
Buprofezin	0.065	3.0	
Methoxyfenozide	0.049	1.0	

* 칠해목 : 320종 모두 불검출

- 결과검토 : 오미자(건조)에서 검출된 Fenitrothion, Chlorfenapyr, Buprofezin, Methoxyfenozide의 잔류량은 각각 0.011, 0.084, 0.065, 0.049 mg/kg으로 [식품의 기준 및 규격]의 잔류허용기준 최소량보다 적어 [식품의 기준 및 규격]에 적합하였다.

2. 오미자복합추출물 제조공정 확립(GMP 시설)



오미자추출물등복합물 제조공정도

* A : Schizandrin, B : 4-Hydroxybenzoic acid

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
[오미자 추출농축액]				
원재료	오미자 Schisandra chinensis (Turcz.) Baillon	국내, 열매	A: 9.57	70
↓				
파쇄		2~4시간, 5mesh 통과분		
↓				
추출	30% 주정, 10배수	50 °C, 8시간, 0.5kgf/cm ²		
↓				
여과	필터프레스 여과 (퍼라이트, 주정 사용)	50 °C 이하, 2시간, 여과포 10~20um, 0.5~1kgf/cm ²	A: 0.52	680
↓				
농축		50~55 °C, 4시간, 700±50 mmHg, 10 brix 이상	A: 1.52	137.5 (고형분 22.26)
[까마귀밥나무 추출농축액]				
원재료	까마귀밥나무 Ribes fasciculatum var. chinense Maxim	국내, 잎	B: 7.24	50
↓				
세절		4시간, 5~10cm 크기		
↓				
추출	30% 주정, 20배수	50 °C, 8시간, 0.5kgf/cm ²		
↓				
여과	필터프레스 여과 (퍼라이트, 주정 사용)	50 °C 이하, 2시간, 여과포 10~20um, 0.5~1kgf/cm ²	B: 0.39	900
↓				
농축		50~55 °C, 4시간, 700±50 mmHg, 10 brix 이상	B: 2.06	97 (고형분 9.53)
[오미자추출물등복합물]				
혼합		고형분 대비 오미자 : 까마귀밥나무 = 7 : 3		234.5 (고형분 31.79)
↓				
부형제 첨가	말토덱스트린	혼합 농축액 고형분 대비 2배		298
↓				
살균		90~95 °C, 1시간		
↓				
분무건조		Inlet 170~180 °C, outlet 80~90 °C 3~4시간, 13,000±1,000rpm		
↓				
원료			A: 1.88 B: 3.37	85 (수율 70.8%)

Approved by

본 사 : 우 06188/서울특별시 강남구 영동대로 315, 4층/Tel 02-2002-9811/Fax 02-2002-9719
공 장 : 우 18543/경기도 화성시 마도면 청원산단 5길 60/Tel 031-5183-3600/Fax 031-5183-3657

3. 오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 및 유해물질 기준규격 설정

가. 지표(또는 기능)성분의 기준규격 설정

(1) 지표(또는 기능)성분의 규격

(가) Schizandrin (mg/g) : 1.5 ~ 2.3

(나) 4-Hydroxybenzoic acid (mg/g) : 2.7 ~ 4.1

(2) 지표(또는 기능)성분 규격 설정 근거

(가) Schizandrin

오미자복합추출물의 Schizandrin 함량은 한국기능식품연구원의 3 lot, 3 반복 시험성적서(lot1. 2019-11-01, lot2. 2019-12-01, lot3. 2019-12-02)상에서 각각 1.86, 1.90 및 1.91 mg/g의 함량으로 검출되었으며, 평균함량은 1.89mg/g 이었다. 따라서 “오미자복합추출물”의 Schizandrin 규격을 80~120% 범위로 설정하여 1.5~2.3mg/g으로 설정하였다.

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

반복수 \ Lot No.	Schizandrin 함량 (mg/g)			평균
	1 (Lot. 2019-11-01)	2 (Lot. 2019-12-01)	3 (Lot. 2019-12-02)	
1반복	1.78	1.88	1.88	
2반복	1.90	1.89	1.90	
3반복	1.90	1.94	1.94	
평균	1.86	1.90	1.91	

(나) 4-Hydroxybenzoic acid

오미자복합추출물의 4-Hydroxybenzoic acid 함량은 한국기능식품연구원의 3 lot, 3 반복 시험 성적서(lot1. 2019-11-01, lot2. 2019-12-01, lot3. 2019-12-02)상에서 각각 3.39, 3.38 및 3.38mg/g의 함량으로 검출되었으며, 평균함량은 3.38mg/g 이었다. 따라서 “오미자복합추출물”의 4-Hydroxybenzoic acid 규격을 80~120% 범위로 설정하여 2.7~4.1mg/g으로 설정하였다.

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

반복수 \ Lot No.	4-Hydroxybenzoic acid 함량 (mg/g)			평균
	1 (2019-11-01)	2 (2019-12-01)	3 (2019-12-02)	
1반복	3.39	3.38	3.40	
2반복	3.39	3.37	3.37	
3반복	3.39	3.40	3.37	
평균	3.39	3.38	3.38	

나. 유해물질의 기준규격 설정

(1) 유해물질 규격

(가) 납 : 1.0 ppm 이하

(나) 총비소 : 1.0 ppm 이하

(다) 카드뮴 : 0.3 ppm 이하

(라) 총수은 : 0.5 ppm 이하

(마) 대장균군 : 음성

(바) 곰팡이독소(총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합) : 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하(단, B1은 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하

(2) 유해물질 규격에 대한 근거

“오미자복합추출물”은 오미자 및 칠해목을 원재료로 사용하므로 재배 시 중금속(납, 총비소, 카드뮴 및 총수은), 곰팡이독소 및 잔류농약(자가규격 58종)에 오염 되었을 수 있으므로 중금속 및 잔류농약을 유해물질 규격으로 설정하였다. 또한 제조 시 오염될 수 있는 대장균군도 유해물질 규격으로 설정하였다.

(가) 납

건강기능식품 기능성 원료 및 기준.규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 중금속 규격을 참고로 “오미자복합추출물”은 60kg 성인 1인 1일 섭취량(1.5g)에 따른 규격 상한선을 환산하였다. 환산 값은 7.2mg/kg 이었으며, “오미자복합추출물”의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호:2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 평균 0.0203 mg/kg으로 검출 되었다. 이에 안전성을 고려하여 납의 규격은 환산 값 보다 낮은 1.0 mg/kg 이하로 규격을 설정하였다.

*신청원료의 인체적용시험 일일섭취량은 오미자복합추출물로서 “1.5g/일” 이다.

(나) 총비소

건강기능식품 기능성 원료 및 기준.규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 중금속 규격을 참고로 “오미자복합추출물”은 60kg 성인 1인 1일 섭취량(1.5g)에 따른 규격 상한선을 환산하였다. 환산 값은 100 mg/kg 이었으며, “오미자복합추출물”의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호:2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 평균 0.0367 mg/kg이었다. 이에 안전성을 고려하여 총비소의 규격은 환산 값 보다 낮은 1.0 mg/kg 이하로 규격을 설정하였다.

(다) 카드뮴

건강기능식품 기능성 원료 및 기준.규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 중금속 규격을 참고로 “오미자복합추출물”은 60kg 성인 1인 1일 섭취량(1.5g)에 따른 규격 상한선을 환산하였다. 환산 값은 2.0 mg/kg 이었으며, “오미자복합추출물”의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호:2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 평균 0.0012 mg/kg이었다. 이에 안전성을 고려하여 카드뮴의 규격은 환산 값 보다 낮은 0.3 mg/kg 이하로 규격을 설정하였다.

(라) 총수은

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 중금속 규격을 참고로 "오미자복합추출물"은 60kg 성인 1인 1일 섭취량(1.5g)에 따른 규격 상한선을 환산하였다. 환산 값은 1.4 mg/kg 이었으며, "오미자복합추출물"의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호:2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 평균 0.0046 mg/kg이었다. 이에 안전성을 고려하여 총수은의 규격은 환산 값 보다 낮은 0.5 mg/kg 이하로 규격을 설정하였다.

(마) 대장균군

신청원료 "오미자복합추출물"의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호:2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 음성 이었고, 대장균군의 규격을 음성으로 설정 하였다.

(바) 곰팡이독소(총 아플라톡신;B1, B2, G1 및 G2의 합)

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 중금속 규격을 참고로 "오미자복합추출물"의 한국기능식품연구원 시험성적서(제조번호: 2019-11-01, 2019-12-01, 2019-12-02)상 불검출이었고, 총 아플라톡신의 규격을 불검출로 설정 하였다.

(사) 잔류농약(58종)

오미자복합추출물의 잔류농약 58종은 한국기능식품연구원 시험성적서 상 잔류농약 58종은 불검출 되었다. 따라서 오미자복합추출물은 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(제2020-12호)의 잔류농약 기준에 적합하였다.

잔류농약 항목	결과	잔류농약 항목	결과	잔류농약 항목	결과
다이아지논(Diazinon)	불검출	이소프로치오란 (Isoprothiolane)	불검출	퍼메쓰린(Permethrin)	불검출
디디티(DDT)	불검출	이프로디온(Iprodione)	불검출	루페뉴론 (Lufenuron)	불검출
디코폴(Dicofol)	불검출	디메토에이트 (Dimethoate)	불검출	페니트로치온 (Fenitrothion)	불검출
디클로보스 (Dichlorvos)	불검출	카바릴(Carbaryl)	불검출	펜발러레이트 (Fenvalerate)	불검출
말라치온 (Malathion)	불검출	카보후란(Carbofuran)	불검출	펜토에이트 (Phenthoate)	불검출
메소밀 (Methomyl)	불검출	캡탄(Captan)	불검출	펜프로파스린 (Fenpropathrin)	불검출
메톡시페노자이드 (Methoxyfenozide)	불검출	퀸토젠(Quintozene)	불검출	펜헥사미드 (Fenhexamid)	불검출
메티다치온 (Methidathion)	불검출	클로로타로닐 (Chlorothalonil)	불검출	포스메트 (Phosmet)	불검출
보스칼리드	불검출	클로르피리포스	불검출	프로시미돈	불검출

(Boscalid)		(Chlorpyrifos)		(Procymidone)	
비에치씨 (BHC)	불검출	클로란트라닐리프롤 (Chlorantraniliprole)	불검출	프로클로라즈 (Prochloraz)	불검출
비펜스린 (Bifenthrin)	불검출	클로르헨나피르 (Chlorfenapyr)	불검출	프로페노포스 (Profenofos)	불검출
싸이퍼메쓰린 (Cypermethrin)	불검출	클로로벤주론 (Chorobenzuron)	불검출	플루벤디아마이드 (Flubendiamide)	불검출
싸이프로디닐 (Cyprodinil)	불검출	트리아디메폰 (Triadimefon)	불검출	테부코나졸 (Tebuconazole)	불검출
싸이할로쓰린 (Cyhalothrin)	불검출	트리아조포스 (Triazophos)	불검출	피라크로스트로빈 (Pyraclostrobin)	불검출
아세타미프리드 (Acetamiprid)	불검출	트리플루미졸 (Triflumizole)	불검출	피리메타닐 (Pyrimethanil)	불검출
아зок시스트로빈 (Azoxystrobin)	불검출	트리플루무론 (Triflumuron)	불검출	이육-디아이피엔 (2,6-Diisopropyl-naphthalene)	불검출
아트라진(Atrazine)	불검출	티아메톡삼 (Thiamethoxam)	불검출	피리미포스-메틸 (Pirimiphos-methyl)	불검출
에치온(Ethion)	불검출	피프로닐 (Fipronil)	불검출	후루디옥소닐 (Fludioxonil)	불검출
엔도설판(Endosulfan)	불검출	파라티온-메틸 (Parathion-Methyl)	불검출	이마자릴(Imazalil)	불검출
파클로부트라졸 (Paclobutrazol)	불검출				

다. 영양성분

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	382.77	수분(%)	4.77
탄수화물(%)	87.38	회분(%)	3.00
조지방(%)	2.77	나트륨(mg/100g)	27.93
조단백질(%)	2.08		

라. 시험성적서 요약표

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)				
규격항목	성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 황갈색의 분말					
	Schizandrin (mg/g)	1.5~2.3	1.86	1.90	1.91		
	4-Hydroxybenzoic acid (mg/g)	2.7~4.1	3.39	3.38	3.38		
	중금속 (mg/kg)	납	1.0 이하	0.0200	0.0238	0.0171	
		총비소	1.0 이하	0.0287	0.0458	0.0357	
		카드뮴	0.3 이하	0.0012	0.0008	0.0015	
미생물	총수은	0.5 이하	0.0045	0.0056	0.0038		
	대장균군	음성	음성	음성	음성		
곰팡이 독소	총 아플라톡신 (B1, B2, G1 및 G2의 합)	“오미자복합추출물”의 총 아플라톡신은 한국기능식품연구원 시험성적서 상 모두 “불검출” 되었다.					
규격 미설정 항목	잔류농약	58종	“오미자복합추출물”의 잔류농약 58종은 한국기능식품연구원 시험성적서 상 모두 “불검출” 되었다.				

제 10202000004호
 한국기능식품연구원
시험·검사성적서

제출인	오미자복합추출물	제출일자	2020년 09월 11일
시험인	한국기능식품연구원	검정	정남수
주소	충청남도 홍성군 홍성읍 홍성로14길 44	발주처	한국기능식품연구원
전화번호	041-870-1100	발주처주소	041-870-1100
전자우편주소	hks@kfri.ac.kr	발주처전화	041-870-1100

본 시험은 한국기능식품연구원에 의뢰하여 실시된 것으로서, 본 시험은 한국기능식품연구원의 시험규격에 따라 실시되었습니다.

2020년 09월 11일
 한국기능식품연구원

제 10202000004호
 한국기능식품연구원
시험·검사성적서

제출인	오미자복합추출물	제출일자	2020년 09월 11일
시험인	한국기능식품연구원	검정	정남수
주소	충청남도 홍성군 홍성읍 홍성로14길 44	발주처	한국기능식품연구원
전화번호	041-870-1100	발주처주소	041-870-1100
전자우편주소	hks@kfri.ac.kr	발주처전화	041-870-1100

본 시험은 한국기능식품연구원에 의뢰하여 실시된 것으로서, 본 시험은 한국기능식품연구원의 시험규격에 따라 실시되었습니다.

2020년 09월 11일
 한국기능식품연구원

제 10202000004호
 한국기능식품연구원
시험·검사성적서

제출인	오미자복합추출물	제출일자	2020년 09월 11일
시험인	한국기능식품연구원	검정	정남수
주소	충청남도 홍성군 홍성읍 홍성로14길 44	발주처	한국기능식품연구원
전화번호	041-870-1100	발주처주소	041-870-1100
전자우편주소	hks@kfri.ac.kr	발주처전화	041-870-1100

본 시험은 한국기능식품연구원에 의뢰하여 실시된 것으로서, 본 시험은 한국기능식품연구원의 시험규격에 따라 실시되었습니다.

2020년 09월 11일
 한국기능식품연구원

Schizandrin 성적서(한국기능식품연구원)

--	--	--

성상 및 대장균 성적서(한국기능식품연구원)

--	--	--

총 아플라톡신 성적서(한국기능식품연구원)

시험·검사항목	시험·검사결과	시험·검사방법
중량(250g기준)	263.77 g	중량
수분(100g기준)	85.18%	중량
단백질(100g기준)	0.37%	중량
지방(100g기준)	0.22%	중량
총당(100g기준)	11.85%	중량
총산(100g기준)	0.11%	중량
총아플라톡신(B ₁ +B ₂)	0.000000 mg/kg	중량

영양성분 성적서(한국기능식품연구원)

4. 인체적용시험용 식품 개발 및 제조(GMP 시설)

가. 인체적용시험 섭취량, 섭취방법 및 설정 근거

(1) 섭취량 : 1일 3,000 mg (오지마추출물등복합물로써 1,500 mg/day)

(2) 섭취방법 : 1일 2회, 1회 2정(750 mg/정) 식후 섭취

(3) 설정근거

(가) 동물시험에서의 유효용량 :

Scopolamine을 투여하여 학습능력 및 인지능력 저하를 유발한 동물모델에 오지마추출물등복합물 75mg/kg/day (L), 150mg/kg/day (M), 300mg/kg/day (H)를 28일간 반복 투여한 후, 수동회피 및 수중미로 실험을 수행하였다. 수동회피 실험 결과, 오지마추출물등복합물 150 및 300 mg/kg 투여군에서 전기자극을 주는 dark room에 들어가는 데 걸리는 시간이 음성 및 양성대조군과 비교하여 증가하였으며, 해마의 Acetylcholine(Ach) 농도 또한 증가하는 경향이 있었다. 또한, 수중미로 실험 결과, 오지마추출물등복합물 75 및 150 mg/kg 투여군에서 도피대를 찾아가는 시간이 음성 및 양성대조군과 비교하여 짧아졌음을 확인하였다. 결론적으로 오지마추출물등복합물의 투여는 인지능력 개선에 효과가 있는 것으로 판단되며, 최적의 유효 용량은 150mg/kg/day로 결정되었다.

(나) 인체대상 적용 예측량 산출 :

In vivo 시험 결과에 따르면 시험동물 Rat의 인지능력 개선 증상은 오지마추출물등복합물 150mg/kg 섭취군에서 가장 유효한 개선효과를 나타내었다.

이를 근거로 하여 인간등가용량(Human equivalent dose, HED)을 산출하였을 때 약 24.3mg/kg이었으며, 이를 60kg 성인을 기준으로 투여량을 산정하였을 때 약 1,459mg/60kg인 것으로 확인되었다.

$$\text{HED(mg/kg)} = \text{Animal Dose(mg/kg)} \times \text{Animal Km(Rat=6)} / \text{Human Km(adult=37)}$$

따라서 동물시험을 기반으로 인체적용시험에서의 오지마추출물등복합물 투여량을 산정하였을 때, 적용가능 용량은 약 1,459mg/일임을 확인할 수 있었다.

또한 오지마추출물등복합물 13주 반복투여 독성시험에서 최대무독성량(NOEL)은 5,000 mg/kg/일 이었으며, 이를 근거로 하여 60kg성인의 일일섭취허용량(ADI)를 산출한 결과 3,000 mg/일 임을 확인할 수 있었다.

$$\text{ADI(mg/60kg/일)} = \text{최대무독성량(NOEL)} / \text{불확정계수 } 100^* \times 60\text{kg}$$

* 동물종간 감수성 차이 10 × 사람간 감수성 차이 10

상기와 같이 오지마추출물등복합물의 동물시험 및 13주 반복투여 독성시험을 통하여 인체적용시험에서 유효하고 안전한 용량을 확인할 수 있었으며, 본 시험에서 최초로 시행되는 점을 감안하여 인체에서의 1일 섭취량을 최종 1,500mg/일로 설정 하였다.

나. 인체적용시험용 식품의 조성 및 함량

(1) 시험식품

- 주성분명 : 오지마추출물등복합물(RP-1701)
- 성상 및 제형 : 정제(Tablet)
- 함량 : 750 mg/Tab
- 보관방법 : 실온보관
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정 식후 섭취
- 원재료 및 배합비율 : 1정(750 mg) 당

원료명	배합비 (%)	함량 (mg)
오지마추출물등복합물(RP-1701)	50.0	375.00
결정셀룰로스	43.5	326.25
히드록시프로필메틸셀룰로스	2.5	18.75
스테아린산마그네슘	1.5	11.25
이산화규소	1.5	11.25
이산화티타늄	0.5	3.75
글리세린	0.25	1.875
색소	0.25	1.875
합계	100	750

(2) 대조식품

- 주성분명 : 결정셀룰로스
- 성상 및 제형 : 정제(Tablet)
- 함량 : 750 mg/Tab
- 보관방법 : 실온보관
- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정 식후 섭취
- 원재료 및 배합비율 : 1정(750 mg) 당

원료명	배합비 (%)	함량 (mg)
결정셀룰로스	60.0	450.00
말토덱스트린	33.5	251.25
히드록시프로필메틸셀룰로스	2.5	18.75
스테아린산마그네슘	1.5	11.25
이산화규소	1.5	11.25
이산화티타늄	0.5	3.75
글리세린	0.25	1.875
색소	0.25	1.875
합계	100	750



경희대 IP 샘플



건국대 IP 샘플

5. 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정을 위한 기능성식품 인체적용시험 심사위원회(IRB) 승인 및 인체적용시험 실시

가. 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발

(1) 프로토콜 요약

인체적용시험 제목	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 RP-1701의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	(주)알피바이오 서울특별시 강남구 영동대로 315, 4층
인체적용시험 실시기관	경희대학교병원 (서울특별시 동대문구 경희대로 23) 건국대학교병원 (서울특별시 광진구 능동로 120-1)
인체적용시험 책임자	백종우 (경희대학교병원 정신건강의학과 교수) 유승호 (건국대학교병원 정신건강의학과 교수)
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자
인체적용시험 목적	본 인체적용시험은 만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 RP-1701(오미자복합추출물)을 섭취시켰을 때 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.
시험 단계 및 디자인	단 계: 기타 (건강기능식품) 디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품: RP-1701 (오미자복합추출물) 대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험군 (RP-1701): 1일 2회, 1회 2정을 식후 섭취(오미자복합추출물로서 1.5g/day) 대조군 (Placebo) : 시험군과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험 방법	인체적용시험대상자는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 한다. 배정된 인체적용시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품, 대조식품)을 섭취한다.

	<p>The diagram illustrates the clinical trial timeline. It starts with Visit 1 (Screening) at D-0. Randomization occurs at Visit 2 (D-0), where participants are assigned to either the RP-1701 group or the Placebo group. The RP-1701 group is shown in a yellow box. Both groups follow the same timeline through Visit 3 (D+42, 6 weeks) and Visit 4 (D+84, 12 weeks), where the clinical trial concludes.</p>												
<p>인체적용시험 대상자 수</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>합계</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP Set)</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(20%) 고려 레수</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>		시험군	대조군	합계	최종 평가 레수(PP Set)	40	40	80	Drop-out(20%) 고려 레수	50	50	100
	시험군	대조군	합계										
최종 평가 레수(PP Set)	40	40	80										
Drop-out(20%) 고려 레수	50	50	100										
<p>선정기준</p>	<ul style="list-style-type: none"> 만 55세 이상, 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남녀 국문해독이 가능한 자 CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상, 2.0SD 미만 감소한 자(CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition) 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자 												
<p>제외기준</p>	<ul style="list-style-type: none"> 악성종양, 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 중이거나 퇴원 후 3개월이 경과하지 않은 자 조현병을 앓고 있거나 병력이 있는 자 DSM-V 주요 우울장애에 해당하는 자 치매, 파킨슨, 뇌경색 등 인지기능 저하가 동반되는 질환이 있는 자 (치매 진단의 기준은 DSM-V에 근거한다.) 인체적용시험 시작 4주 이내에 치매나 다른 인지기능의 이상으로 약물 (항정신용제, 퇴행성 질환용제, 뇌기능 개선제, 삼환계 항우울제)을 투여한 경험이 있는 자 비타민E 제제 1일 투여량이 400 IU 이상이거나 투여량 감소가 불가피할 것으로 예상되는 자 인체적용시험 시작 2개월 이내에 Estrogen replacement therapy (국소도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자 인체적용시험 시작 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자 												

	<ul style="list-style-type: none"> • TSH 0.1 μU/ml 이하이거나, 10 μU/mL 이상인 갑상선 질환자 • Creatinine이 수행기관 정상 상한치의 2배 이상인 자 • AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 수행기관 정상 상한치의 3배 이상인 자 • 조절되지 않는 고혈압 환자 (160/100mmHg 이상, 10분 안정 후 측정 기준) • 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dL 이상) • 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자 • 본 인체적용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 인체적용시험에 참여할 계획이 있는 자 • 시험자에 의해 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자
유효성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> • ADAS-cog 총점 • ADAS-cog 기억력 • ADAS-K • Visual C.P.T • ADCS-ADL
안전성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> • 이상반응 • 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) • 활력징후(맥박, 혈압), 체중 • 심전도검사

(2) 프로토콜 확립

인체적용시험계획서

경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 **RP-1701**의
유효성 및 안전성을 평가하기 위한 **12주,**
다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

Protocol No. : RPS_RP-1701
Version No. : 3.0
Version Date : 2019년 03월 14일

㈜알피바이오 소유

Confidential

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자, 인체적용시험담당자, 및 임상시험조사위원회(IRB), 식물의약품안전처를 위해 제공된 것으로 인체적용시험에 사용되는 식물성 성분에는 시험에게 시험평가에 대한 어떤 동의할 것이나, 권위를 부여하고는 ㈜알피바이오의 사전 서면동의 없이 제3자에게 공개될 수 없습니다.

㈜알피바이오
Clinical Study Protocol
Protocol No.: RPS_RP-1701
Version No.: 3.0(2019.03.14) 1/61

㈜알피바이오

© 인체적용시험계획서

인체적용시험 번호	RPS_RP-1701
인체적용시험용 식품	RP-1701 (오미과당복합추출물)
인체적용시험 목적	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 RP-1701의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
시험 단계	기타 (건강기능식품)
인체적용시험 책임자	박종우 (경희대학교병원 정신건강의학과 교수) 유승호 (연세대학교병원 정신건강의학과 교수)
인체적용시험 실시기관	경희대학교병원 (서울특별시 동대문구 경희대로 23) 연세대학교병원 (서울특별시 용인구 남부로 120-1)
인체적용시험 의뢰자	㈜알피바이오 서울특별시 강남구 테헤란로 315, 4층
Confidential	© RP Bio Co.,Ltd. This protocol is the property of RP Bio Co.,Ltd, and may not in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise use without the express permission of RP Bio Co.,Ltd.

NeoNutra co., Ltd. www.Neotrux.com
Confidential

목 차

○ 인체적용시험계획서 1

○ 인체적용시험 진행 일정표 7

○ 약어 9

1. 인체적용시험의 목적 및 단계 14

1.1. 목적 14

1.2. 단계 14

2. 시험자 및 실시기관 지원조직 14

2.1. 인체적용시험실시기관 14

2.2. 인체적용시험책임자 14

2.3. 인체적용시험의뢰자 14

2.4. 인체적용시험수탁기관 (CONTRACT RESEARCH ORGANIZATION, CRO) 15

3. 인체적용시험의 목적 및 배경 15

3.1. 인체적용시험의 목적 15

3.2. 인체적용시험의 배경 15

4. 인체적용시험용 식품 17

4.1. 인체적용시험용 식품의 개요 17

4.1.1. 시험식품 (RP-1701) 17

4.1.2. 대조식품 (Placebo) 17

4.2. 인체적용시험용 식품의 포장 및 라벨링 18

4.3. 인체적용시험용 식품의 교부 19

4.4. 인체적용시험용 식품의 관리 및 기록 19

4.5. 인체적용시험용 식품의 회수 및 폐기 20

4.6. 인형누가람의 유지 20

5. 인체적용시험 기간 20

6. 인체적용시험대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 인체적용시험대상자의 수 21

6.1. 인체적용시험대상자 21

6.1.1. 선정기준 21

6.1.2. 제외기준 21

6.2. 목표한 인체적용시험대상자의 수 및 선정군 22

6.2.1. 인체적용시험대상자 수 22

6.2.2. 선정군 23

7. 인체적용시험방법 24

7.1. 인체적용시험의 설계 24

7.2. 실험법, 실험방법 및 실험 기간 25

7.2.1. 1일 실험법 및 실험방법 25

7.2.2. 실험기간 25

7.2.3. 실험법 설명사유 25

7.3. 병용요법 26

7.3.1. 병용가능 약물 및 식품 26

7.3.2. 병용금지 약물 및 식품 27

7.4. 목적위대량 28

7.5. 인체적용시험대상자 모집 방법 28

8. 관할 항목, 임상검사 항목 및 관찰검사 방법 29

8.1. 인체적용시험 진행일정표 29

8.2. 관찰항목 및 임상검사 항목 31

8.2.1. 인체적용시험대상자 동의 및 연구목적 조사 31

8.2.2. 병력 및 약물투여력 조사, 병력약물 및 병용요법 확인 31

8.2.3. 이학적검사 31

8.2.4. 활력징후(맥박, 혈압) 31

8.2.5. 신체계측(신장, 체중) 32

8.2.6. 식사지도 및 식이조사 32

8.2.7. 임상병리검사 32

8.2.8. 심전도검사 33

8.2.9. CERAD-K 34

8.2.10. 알츠하이머병 평가척도 (ADAS-K) 34

8.2.11. 시각지각검사 (Visual C.P.T) 35

8.2.12. 임상생활활동 평가 (ADCS-ADL) 35

8.2.13. 선정기준/제외기준 확인(인체적용시험대상자 적합성 평가) 36

8.2.14. 무작위배정 및 실험 36

8.2.15. 이상반응 점검 36

8.2.16. 순응도 확인 37

8.3. 관할 검사 방법(일문법) 37

8.3.1. 1차 방문(Screening visit, week -2) 37

나. 인체적용시험 수행

(1) 인체적용시험의 설계

(가) 본 인체적용시험은 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험으로 디자인되었으며, 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 사람이 본 인체적용시험에 참가하면 인구학적 조사, 병력 조사, 약물투여력 조사, 이학적검사, 활력징후, 신체계측, 임상병리검사, 임신반응검사(가임기여성만 해당), 심전도검사, CERAD-K 검사를 실시하여 선정/제외기준에 적합하면 무작위배정을 통한 인체적용시험대상자 등록이 이루어졌다.

(나) 시험군 또는 대조군으로 배정된 인체적용시험대상자는 총 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취하였으며, 각 군의 배정비율은 시험군 : 대조군 = 1 : 1로 하였다.

(2) 인체적용시험용 문서 개발

(가) 증례기록서(Case Report Form)

(다) 검사지

<p>ADAS-K, ADCS-ADL</p>	<p>ADAS-K 구성행동 도형그리기</p>	<p>CERAD-K</p>

(라) 기타문서

<p>식이조사지</p>	<p>IP라벨링 가이드</p>	<p>대상자모집공고</p>

(3) 프로토콜 IRB 신청 및 승인

- (가) 개발 완료된 프로토콜 및 인체적용시험 문서를 인체적용시험 실시기관별(건국대학교병원, 경희대학교병원) IRB에 제출하여 승인 획득
- (나) IRB 심의 신청서 및 승인 통지서



심의 신청서

승인 통지서

(4) 개시모임(Initiation Meeting) 실시



(가) 연구 시작 전 인체적용시험 계획서 및 연구진행에 대한 발표 및 질의응답의 시간을 가지기 위한 연구 모임 실시

(나) 개시모임 수행 업무

- ① 인체적용시험 계획서의 전반적 검토(선정/제외기준, 시험진행 절차, 시식품 섭취, 무작위 배정 및 맹검법, 1차 유효성 평가변수 및 기타 자세한 사항들) 및 설명, 논의, 준수사항 (GCP설명)
- ② 시험 관련 문서 및 물품 등 필요한 자료 제공
- ③ 영상진단의학실 검사(임상병리실) 및 특수 컴퓨터 프로그램과 같은 전문적인 절차에 대한 지침 검토
- ④ Protocol, ICF, CRF, 복용일지 등에 대한 모든 질문사항 및 의문점들에 대한 논의
- ⑤ IRB승인 및 변경 사항 문서화
- ⑥ 시험 담당자의 역할과 책임
- ⑦ 향후 모니터링 SDV업무계획 소개 및 근거문서(Source Document)정의(모니터링 방문 간격, 모니터링 방문 시 CRC준비사항 등)
- ⑧ 이상반응 및 중대한 이상반응 등에 대한 보고 및 보고 절차
- ⑨ 의뢰자에게 관련 연구에 관한 최신 정보를 제공
- ⑩ 시험기관 내에서의 절차 및 이슈사항
- ⑪ 연구문서의 종류, 보관 및 사용방법 등에 대한 소개(동의서, 시험대상자 로그, 워크시트, 증례기록서, 수불대장, 처방전, 온도기록지 등의 작성법)
- ⑫ 시험에 사용되는 식품의 수불 일지 확인
- ⑬ 모든 연구 관련 교육 후의 교육기록 문서화
- ⑭ 시험 실시 전 확보되어야 할 기본 문서들 확인, Investigator Site File(ISF) 검토(기록의 보관) 및 ISF보관 기본문서 설명
- ⑮ 연구자파일 및 약국파일 업데이트(추후 발송되는 뉴스레터 와 IRB 관련 변경 및 승인사항, Material 인수증 등)

(다) 실시일자 및 장소

- ① 경희대학교병원 : 2019.03.13 / 경희대학교병원 본관 7층 정신건강의학과 의국
- ② 건국대학교병원 : 2019.02.20 / 스타시티 영준 10층 회의실
- (라) 참석자 : 참여연구진 및 실시기관 담당자, 관리약사, 연구간호사 등
- (마) 개시모임 PPT 및 개시모임 보고서

	
개시모임 PPT	개시모임 보고서

(5) 인체적용시험 연구흐름도

Period	Screening	Active Treatment		
		2	3	4
Visit	1	2	3	4
Week ¹⁾	-2	0	6	12
Window period ²⁾			±7	±5
서면동의서	○			
인구학적 조사 ³⁾	○			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾	○	○		
이학적검사	○		○	○
활력징후(맥박, 혈압)	○		○	○
신체계측(신장, 체중) ⁵⁾		○	○	○
식사지도 및 식이조사 ⁶⁾		○	○	○
임상병리검사 ⁷⁾	○			○
임신반응검사 ⁷⁾	○			
심전도검사 ⁸⁾	○			○

CERAD-K		○			
유효성 검사	ADAS-K		○		○
	Visual C.P.T		○		○
	ADCS-ADL		○		○
인체적용시험대상자 적합성 평가		○	○		
무작위배정			○		
인체적용시험용 식품의 처방			○	○	
이상반응 확인				○	○
순응도 확인 ⁹⁾				○	○
병용약물 및 병용요법 변화 확인				○	○
<p>1) 스크리닝 방문 후 2주일 이내 방문2가 시행되도록 한다. 방문1의 검사결과가 모두 확인되는 경우 방문2를 동시에 실시할 수 있다. 방문1의 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위 배정 전까지 실시할 수 있다.</p> <p>2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.</p> <p>3) 방문1에 인체적용시험대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 흡연력, 음주력, 운동여부, 스트레스 자각 정도를 조사하여 기록한다.</p> <p>4) 방문1에 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 3개월 이내의 약물투여력을 조사하여 기록한다.</p> <p>5) 방문2에서 신장, 체중을 측정하고, 방문3, 4에서 체중을 측정한다. 신장은 0.1cm, 체중은 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정한다.</p> <p>6) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 시험담당자가 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험대상자에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.</p> <p>7) 인체적용시험대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사, 임신반응검사(가임기 여성만 해당)를 재실시 할 수 있도록 한다. 방문1 기준 3주(21일) 내 검사결과가 있을 시, 적용 가능(단, 임신반응 검사는 제외)</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil ■ 혈액화학적 검사 : Glucose, Uric acid, Total Protein, Albumin, Total bilirubin, AST(GOT), ALT(GPT), ALP, BUN, Creatinine, Total Cholesterol, TSH(TSH는 방문1에서만 실시) ■ 뇨검사 : SG, pH, Protein, Glucose, Nitrite, Urobilinogen, Ketone, Bilirubin, Occult Blood, Leukocyte ■ 임신반응검사 : Urine HCG (※ 가임기 여성만 방문1에 시행) <p>8) 방문1의 심전도검사는 스크리닝 방문 기준 3주(21일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능</p>					

9) 방문3, 4에 시험대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 시험담당자 또는 관리약사가 점검 및 기록한다(‘인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날’ 섭취).

(6) 인체적용시험 모니터링

(가) 시험대상자의 권리와 복지를 보호하기 위한 인체적용시험 모니터링 실시

(나) 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거문서(Source Documents)와 대조하여 정확하고(accurate) 완전하며(complete) 검증이 가능한지(verifiable) 확인

(다) 모니터링 주요 내용

- ① 시험책임자가 시험기간 동안 안전하고 적절하게 인체적용시험을 수행할 자격이 있고 자원을 확보하고 있는지 여부 확인
- ② 인체적용시험에 사용되는 시험물질에 대한 다음 사항의 확인
 - 저장조건의 적절성, 섭취기간의 준수 여부 및 이들 시험 물질이 인체적용시험을 실시하기에 충분한지의 여부
 - 선정기준을 만족하는 대상자에게만 시험계획서에 명시된 섭취기간, 섭취방법대로 사용되고 있는지의 여부
 - 대상자가 인체적용시험에 사용되는 시험물질의 적절한 섭취·보관·반납에 관한 정보를 제공받는지의 여부
 - 시험기관에서 인체적용시험에 사용되는 시험물질의 인수 또는 섭취, 의뢰자로의 회수 등이 적절히 관리되고 문서화되는지의 여부
- ③ 시험자가 승인된 시험계획서 또는 시험변경계획서를 준수하고 있는지 여부 확인
- ④ 대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 동의서가 얻어 졌는지의 여부 확인
- ⑤ 시험자가 인체적용시험을 적절히 실시하고 이 기준에서 정한 사항을 준수하기 위하여 필요한 최신의 인체적용시험자 자료집 및 문서, 인체적용시험에 사용되는 시험물질을 포함한 그 밖의 공급품을 수령하였는지의 여부 확인
- ⑥ 시험자가 인체적용시험의 제반 사항을 충분히 숙지하고 있는지의 여부 확인
- ⑦ 시험자가 특정한 인체적용시험관련 기능을 시험계획서 및 의뢰자와 시험기관의 장 또는 시험책임자와 합의한 문서에 따라 수행하고 있으며, 권한이 없는 자에게 이러한 기능이 위임되지 않았다는 사실의 확인
- ⑧ 시험책임자가 선정기준에 적합한 대상자만을 인체적용시험에 참여시키고 있는지의 여부 확인
- ⑨ 대상자 모집 현황에 대한 보고
- ⑩ 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험관련 기록이 정확하고 완전하며 최신 사항이 반영되도록 유지되고 있는지의 여부 확인
- ⑪ 시험책임자가 인체적용시험에 필요한 모든 보고서, 통지서, 신청서 등을 적절히 제공하고 있으며, 이러한 문서들을 통해 해당 인체적용시험을 확인할 수 있고 또한 그 기록이 정확하고 적절하며, 읽기 쉽고, 날짜가 기재되어 있는지 여부 확인
- ⑫ 증례기록서상의 기재 내용, 근거문서 및 그 밖의 인체적용시험 관련 문서의 정확성과 완전성에 대한 검토와 이들의 상호대조로부터 서로 일치하는지의 여부 및 다음 각 사항에

대한 확인

- 인체적용시험계획서에서 요구한 자료가 증례기록서에 정확히 기재되었거나 보고되고 있으며, 근거문서와 일치하는지 여부
- 섭취기간이나 섭취방법 등의 변동사항이 각 대상자별로 적절히 문서화되고 있는지의 여부
- 대상자가 지키지 못한 방문검사, 실시하지 않은 실험실 검사 등에 대하여 증례기록서상에 사실대로 명확하게 기재되었거나 보고되고 있는지의 여부
- 인체적용시험으로부터 대상자가 탈락하거나 탈퇴한 모든 사실이 증례기록서 상에 기재되었거나 보고되고 그 이유가 설명되었는지의 여부
- 증례기록서의 기재오류, 누락사항과 판독하기 어려운 부분에 대하여 시험책임자에게 알리고, 이러한 사항에 대한 정정·첨가·삭제 등이 적절하게 이루어졌는지, 날짜와 그 사유(필요한 경우)가 기재되어 있는지, 시험책임자 또는 시험책임자를 대신하여 증례기록서상의 기재사항에 대한 변경권한을 가진 시험담당자가 서명을 하였는지 등의 확인
- 모든 이상반응이 동 제안서, 인체적용시험계획서, 심사위원회, 의뢰자 및 관련규정에 명시된 기간 내에 적절하게 보고되었는지의 여부 확인
- 시험책임자가 기본문서를 보존하고 있는지의 여부 확인
- 인체적용시험계획서, 표준작업지침서 및 동 제안서에서 정한 사항을 준수하지 않은 것에 대해 시험책임자에게 알리고, 이러한 미 준수 사항이 재발되지 않도록 하는 적절한 조치

(라) KGCP 규정에 의거한 모니터링 보고서 작성

- ① 모니터링을 실시한 날짜 및 장소
- ② 모니터요원의 이름 및 시험자 또는 접촉한 사람의 이름
- ③ 모니터요원이 확인한 사항의 요약
- ④ 임상적으로 의미있는 발견 또는 사건
- ⑤ 인체적용시험 계획서, 의뢰자 표준작업지침서, 실시기관 표준작업지침서 및 이 기준을 위반한 사항 또는 임상시험의 문제점
- ⑥ 결론
- ⑦ 인체적용시험 계획서, 의뢰자 표준작업지침서, 실시기관 표준작업지침서 및 이 기준을 위반한 사항이 재발되지 않도록 조치한 사항 및 조치가 필요한 사항

(마) 모니터링 실시 내역

모니터링 기관(병원)	차수	일 자	실시결과
건국대학교병원	1	2019.04.10	· 모니터링 보고서 작성
	2	2019.05.17	· 모니터링 보고서 작성
	3	2019.05.28	· 모니터링 보고서 작성
	4	2019.05.29	· 모니터링 보고서 작성
	5	2019.06.03	· 모니터링 보고서 작성
	6	2019.06.27	· 모니터링 보고서 작성

	7	2019.06.28	• 모니터링 보고서 작성	
	8	2019.08.09	• 모니터링 보고서 작성	
	9	2019.08.12	• 모니터링 보고서 작성	
	10	2019.09.06	• 모니터링 보고서 작성	
	11	2019.09.26	• 모니터링 보고서 작성	
	12	2019.09.27	• 모니터링 보고서 작성	
	13	2019.09.30	• 모니터링 보고서 작성	
	14	2020.06.11	• 모니터링 보고서 작성	
	경희대학교병원	1	2019.03.29	• 모니터링 보고서 작성
		2	2019.05.08	• 모니터링 보고서 작성
		3	2019.06.21	• 모니터링 보고서 작성
		4	2019.07.05	• 모니터링 보고서 작성
		5	2019.07.19	• 모니터링 보고서 작성
		6	2019.08.21	• 모니터링 보고서 작성
7		2019.09.18	• 모니터링 보고서 작성	
8		2019.09.19	• 모니터링 보고서 작성	
9		2019.09.20	• 모니터링 보고서 작성	

(바) 모니터링 보고서

CR-E04_001/V1.3
Effective Date: 2019.08.26

Site Monitoring Visit Report

Protocol No.	RPS_28-1701
Site Name / Site No.	한국대학교병원 / 02
Principal Investigator	형산관장의학과 용순호 교수

Visit Summary

Monitoring visit date	2019-09-26 27, 30 (목, 금, 월) 11, 12, 13차
모니터링 장소	한국대학교 지하 4층 모니터링실
방문 시 참여 연구자	김보라 CRC
방문 모니터링 시에 하는 것	본 코너다양 시에 하는 것
방문 모니터링	김지영 CRA

Routine Monitoring Visit Checklist

A. IRB	Yes	No	N/A
A-1. 임상연구자 및 인체적용시험 관련講習자가 변경되었는지? (Study Specific Training 기록)		✓	
A-2. 지난 방문 이래 연구계획서 변경 및 (procedure) 변경 사항이 있었는지?		✓	
A-3. IRB 및 Regulatory Authority 문서는 적절히 update 되었는지? - IRB 승인 유효기간: 2019.01.03-2020.12.12	✓		
B. Investigator			
B-1. 책임연구자는 responsibilities의 delegation을 적절히 설정하고, 연구를 수행하고 있는가? (Site Signature & Responsibilities Form)	✓		
B-2. 예정된 모집기간에 따라 대상자가 모집되었는지? - 목표: Screened 54명, Randomized 59명/개입 (의약품 시험대상자 2019년 09월 15일 종료됨)	✓		
B-3. 대상자 동의서에는 대상자의 서명과 날짜를 기입한 후, 연구자의 서명/날짜를 기록하여 문서화하였는지? (승인받은 동의서에 인체적용시험의 어떠한 절차를 실시하기 전에 서명) - 2차 모니터링시 확인 완료됨			✓
B-4. 연구자는 abnormal laboratory result 및 comment를 적절하게 검토하였는지? - 비정상 결과에 대한 임상적 의미를 판단하여 기록하여 포함/제외함	✓		

Page 1 / 8

CR-E04_001/V1.3
Effective Date: 2019.08.26

Site Monitoring Visit Report

B-5. 이상반응 혹은 중대한 이상반응이 발생하였는지?	✓		
B-6. 지난 방문이후 Unblinding이 발생하였는지?	✓		
B-7. Investigator Study File 적절히 보관 및 관리되고 있는가? - 보관 장소: 한국대학교병원 본관 지하 3층 CRC 실 - 보관 파일: ISF Binder 1ea, SCF Binder 3ea, Source Documents Binder 17ea, CRF Binder 17ea	✓		
C. Investigational Product			
C-1. 인체적용시험을 적용할 시 필요한 절차를 완료하였는지? - 모든 대상자 IP 등록 및 반납완료 (2019.08.16)		✓	
C-2. 인체적용시험을 적용할 시 필요한 온도제, 보관기록, Temperature log를 관리하였는지? (e.g. Temperature excursion) - 모든 대상자 IP 등록 및 반납완료 (2019.08.16)			✓
C-3. 의뢰사로부터 인체적용시험용 식물의 입고/의뢰사로부터 식물의 반납이 진행되었는지?		✓	
C-4. 인체적용시험을 적용할 시 필요한 재고가 충분한가? - 모든 대상자 IP 등록 및 반납완료 (2019.08.16)			✓
C-5. 대상자로부터 시험용 식물의 공급과 반환이 정확하게 되었는지? - 모든 대상자 IP 등록 및 반납완료 (2019.08.16)			✓
C-6. 인체적용시험을 적용할 시 필요한 목적기간이 6개월 이상 남아있는가? - 유효기간: 2021년 02월 19일	✓		
D. Data Verification			
D-1. 스크리닝 대상자, 인체적용시험 진행중인 대상자, 초기종료 및 중도탈락 대상자, 인체적용시험을 완료한 대상자는 Subject log에 기록되었는지? (Subject Screening & Enrollment Log, Subject Identification Code List)		✓	
D-2. 모니터링 source document를 CRF와 검토/대조하였는지? - p. 4-5 Data Verification 참고		✓	
D-3. Data Recording 및 Corrective이 적절하게 기록되고 유지되었는지?		✓	
D-4. 연구자에 의해서 이상반응이 적절하게 기록되었는지?			✓

Page 2 / 8

(7) 연구 상황 보고서 작성

(가) 의뢰기관, 실시기관 시험책임자 등 인체적용시험 관련자 간의 원활한 의사교환은 인체적용시험 관련자들이 상호 정보를 공유하여 임상연구 활동에 대해 충분히 인지할 수 있게 하고

나아가 시험대상자의 안전과 복지를 보호하며, 인체적용시험이 적절하게 수행되도록 한다.

(나) 이러한 인체적용시험 관련자들의 상호 정보 공유를 위하여 연구 상황 보고서(Monthly Report)를 작성한다.

(다) 주요내용

- ① 전반적인 연구 Set-up 현황(계약, 미팅, IB, IP, 시험기관 선정, IRB 초기심의, vendor, e-CRF 완료 등)
- ② 시험대상자 등록 예정기간
- ③ 시험대상자 등록 현황(표)
- ④ 모니터링 진행 현황
- ⑤ IRB 진행 현황
- ⑥ 시험대상자 모집광고 진행 현황 등

(라) 연구 상황 보고서(Monthly Report)

(8) 인체적용시험 종료 및 대상자 등록 결과

(가) 본 인체적용시험은 2019년 3월 15일 첫 인체적용시험대상자가 스크리닝 되었고, 2019년 09월 18일 마지막 인체적용시험대상자의 시험이 완료되었다.

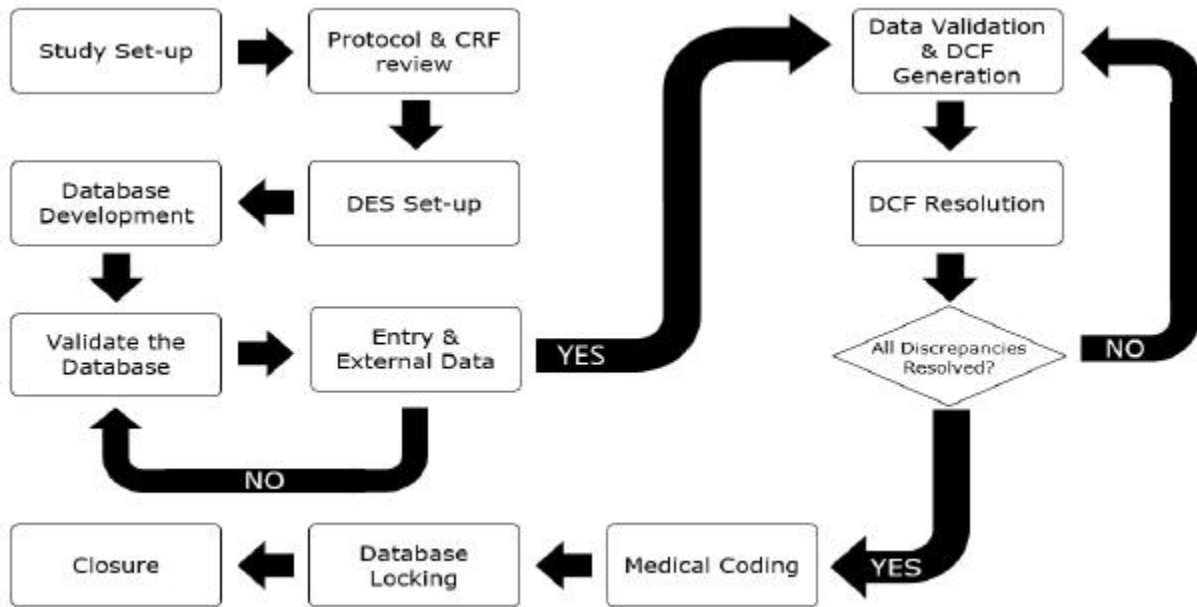
(나) 적합한 인체적용시험대상자를 선정하기 위해 총 112명의 인체적용시험대상자에 대해서 Screening 평가를 실시하였으며, 스크리닝 탈락 12명으로 총 100명(시험군 50명, 대조군 50명)이 무작위배정되었다. 이 중 동의철회로 총 6명이 중도탈락하여 총 94명의 인체적용시험대상자가 인체적용시험을 완료하였다(시험군 46명, 대조군 48명).

(다) 실시기관별 인체적용시험대상자 참여상태(무작위배정된 모든 인체적용시험대상자)

시험기관명	시험자	인체적용시험대상자 수		
		시험군 (RP-1701)	대조군 (Placebo)	Total
경희대학교병원	백종우	25	25	50
건국대학교병원	유승호	25	25	50
Total		50	50	100

다. DM(Data Management) 및 통계분석

(1) Data Management 업무 흐름도



(2) Database Development

(가) Annotated CRF : Final version CRF를 바탕으로 Data Dictionary에서 명시하는 변수에 대한 정의를 기술한 Blank CRF

(나) Data Dictionary : Annotated CRF의 자료를 DB에 입력하기 위한 Database Structure로 변수명, 레이블, 속성 등이 정의된 문서

(3) Data Validation Specification(DVS)

(가) 쿼리(Query, 질의) : CRF로 수집해야 하는 자료 중 계획서·CRF 작성 지침에 위반되거나 수집되어야 할 자료의 누락 또는 수집된 자료 간의 일치하지 않는 항목

(나) DVS는 쿼리항목을 사전정의 및 목록화하는 과정으로서, Data의 무결성을 최대화하고, 높은 수준의 Data Quality를 이끌어내기 위하여 실시함.

(다) Missing Values, Range Checks, Logical Inconsistencies, Protocol Violations 및 적절하지 못한 데이터의 확인 작업 실시

(라) DVS Test : 작성된 DVS의 정확성을 확인하기 위해 DVS Test를 수행하며, Dummy Data (질의가 각 항목별에 해당하는 자료가 입력되었을 때는 검출되고, 그렇지 않은 자료가 입력되

있을 때는 검출되지 않음을 확인하기 위하여 임의로 만드는 자료)를 작성 및 DVS에 적용하여 제대로 실행되는지 검증함. Dummy Data와 출력된 결과와의 불일치를 발견할 경우 이를 해결하여 Retest를 시행하고, Discrepancy가 없을 때까지 반복

(4) DMP(Data Management Plan) 작성

(가) 질 높은 데이터를 제공하고, Project의 분석 목적을 달성하기 위해 시행되는 일련의 Data Management 과정을 계획하여 문서화

(나) DMP의 구성

- ① Signature Page
- ② Modification List
- ③ Abbreviation
- ④ Protocol Summary
- ⑤ Project Team Members and Their Roles
- ⑥ Data Flow
- ⑦ Data Management System
- ⑧ Data Validation
- ⑨ Medical Coding
- ⑩ Database Quality Check(DBQC)
- ⑪ Database Locking/Unlocking
- ⑫ Management of Clinical Study data (Transfer, backup 등)
- ⑬ Archiving

(다) DMP

The image shows two pages from a Data Management Plan (DMP) document. The left page is the title page, and the right page is the table of contents.

Title Page:

- Data Management Plan**
- 경도민지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 RP-1701의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체역용시험
- Protocol No. : RPS_RP-1701
- DMP Ver. No. : 1.0
- Version Date : 2019년 04월 19일

Table of Contents:

Table of Contents	
SIGNATURE PAGE	2
MODIFICATION LIST	3
ABBREVIATION	6
1. PURPOSE	7
2. PROTOCOL SUMMARY	7
3. PROJECT TEAM MEMBERS AND THEIR ROLES	11
4. DATA FLOW	13
4.1. VISIT SCHEDULE	13
4.2. MANAGEMENT OF LABORATORY REFERENCE RANGE	15
4.3. DATA MANAGEMENT PROCEDURES	15
4.4. RECEIPT AND TRACKING OF CRFs	16
4.5. RECEIPT AND MANAGEMENT OF Non-CRF DATA	17
5. DATABASE DESIGN	17
5.1. OVERVIEW OF CRFs AND DATA SET DESCRIPTION	17
5.2. DEVELOPMENT OF DATA ENTRY SCREEN (DES)	18
5.3. EXTERNAL DATA	18
6. DATA ENTRY	18
6.1. SCHEDULE OF DATA ENTRY	19
6.2. METHOD OF DATA ENTRY	19
7. DATA VALIDATION	20
7.1. DATA VALIDATION SPECIFICATION (DVS)	20
7.2. SELF EVIDENT CORRELATION (SEC)	20
7.3. DCF GENERATION/RESOLUTION	21
7.4. EXTERNAL DATA RECONCILIATION	21
8. MEDICAL CODING	21
9. SAE RECONCILIATION	22
10. DATABASE QUALITY CHECK (DBQC)	23
10.1. VARIABLE FOR DBQC	23

(5) Medical Coding

(가) 시험과정에서 수집된 이상반응, 병력, 약물에 대한 자료를 표준용어체계를 이용하여 일괄된 용어로 선택함으로써 자료저장, 검색, 분석, 표현을 용이하게 할 뿐만 아니라 자료의 활용도를 높이고, 신속하고 정확한 정보교환을 가능케 함

(나) Coding dictionary

- ① 이상반응, 동반질환 및 병력, 수술력 : MedDRA ver.22.0 이상
- ② 투여력(선행약물) : WHO drug reference 2019(ATC code)

(6) DB(Database) Locking

(가) Data Cleaning을 확인하고 사전에 정해진 절차에 따라 DB를 잠그는 과정

(나) 실시목적 : 관련자들의 접근 권한을 제한하여 분석이 가능한 자료로 생성하고, 완료된 자료를 저장, 보관하며, 시험 자료의 결과도출, 분석, 제출과정의 데이터 무결성(Data Integrity)을 확보하기 위함

(다) DB Locking 시 점검내용

- 모든 Data가 입력되었는가?
- Medical Coding이 종료되었는가?
- CRF에 기록된 자료들에 대한 임상적 검토가 종료되었는가?
- 모든 Query가 해결되었는가? (Query Resolution)

(7) 통계분석 실시

(가) 통계분석 방법

- ① 통계분석은 SAS?(Version 9.4, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 분석
- ② 인구학적 평가 분석, 유효성 평가 분석, 안전성 평가 분석은 유의수준 0.05로 설정하여 양측검정을 실시하였음. 모든 분석의 p-value에 대해서는 소수점 4자리까지 제시하였으며, 모든 분석의 p-value가 <0.05이면 유의한 것으로 간주
- ③ 평균, 표준편차, 백분율 등 소수점 이하의 값을 가지는 수치에 대해서는 소수점 2자리까지 제시

(나) 분석의 일반적 원칙

- ① 본 인체적용시험의 인체적용시험 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety Set 분석, FA Set(Full Analysis Set) 분석과 PP Set(Per Protocol Set) 분석의 세 가지 형태로 이루어짐.
- ② Safety Set 분석은 안전성 평가 변수 분석 시 적용되는 분석법으로, 무작위배정 후 인체적용시험용 식품을 한번이라도 섭취한 인체적용시험 대상자 집단을 대상으로 분석
- ③ 본 인체적용시험에 무작위배정을 받은 모든 인체적용시험 대상자를 분석 대상으로 하는 원칙(ITT)에 따라, FA Set 분석은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행한 인체적용시험 대상자이며 주요 선정기준 위반에 해당되지 않는 집단을 대상으로 분석
- ④ PP Set 분석은 FA Set 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험 결과에 영향을 미치지

는 중대한 위반사항(선정/제외기준 위반 등)이 없는 인체적용시험 대상자 집단을 대상으로 분석

- ⑤ 유효성에 대한 자료는 PP Set 분석을 주 분석법으로 하였고, FA Set 분석을 추가적으로 실시하였음. 인구학적 및 영양분석에 대한 자료는 PP Set 분석을 주 분석법으로 하였고, 안전성에 대한 자료는 Safety Set 분석을 주 분석법으로 실시
- ⑥ 결측치가 발생한 경우, 결측치가 발생한 시점을 기준으로 가장 최근에 얻어진 자료를 이용하여 보정(LOCF)하여 분석함. 단, 인체적용시험용 식품을 섭취하기 이전의 자료(Baseline)로 대체하지 않으며, 유효성 평가변수 이외의 모든 분석 항목에 대해서는 결측치를 대체하지 않고 있는 그대로의 자료로 분석을 시행
- ⑦ 본 인체적용시험에서 얻은 자료는 적당한 기술 통계량으로 평균(Mean)과 표준편차(Standard deviation)를 산출하여 제시하였으며, 차이(Difference)에 대한 유의성은 양측검정으로 $p < 0.05$ 수준에서 검증
- ⑧ 유효성 평가 변수에 대한 분석방법으로 평가 변수와 연관이 있는 인체적용시험 대상자의 기저특성(공변량, 인체적용시험 대상자가 인체적용시험용 식품을 복용하기 전에 관찰되거나 측정된 일차 유효성 평가 변수에 영향을 미칠 것으로 예상되는 변수)을 고려하여 분석하는 ANCOVA를 실시

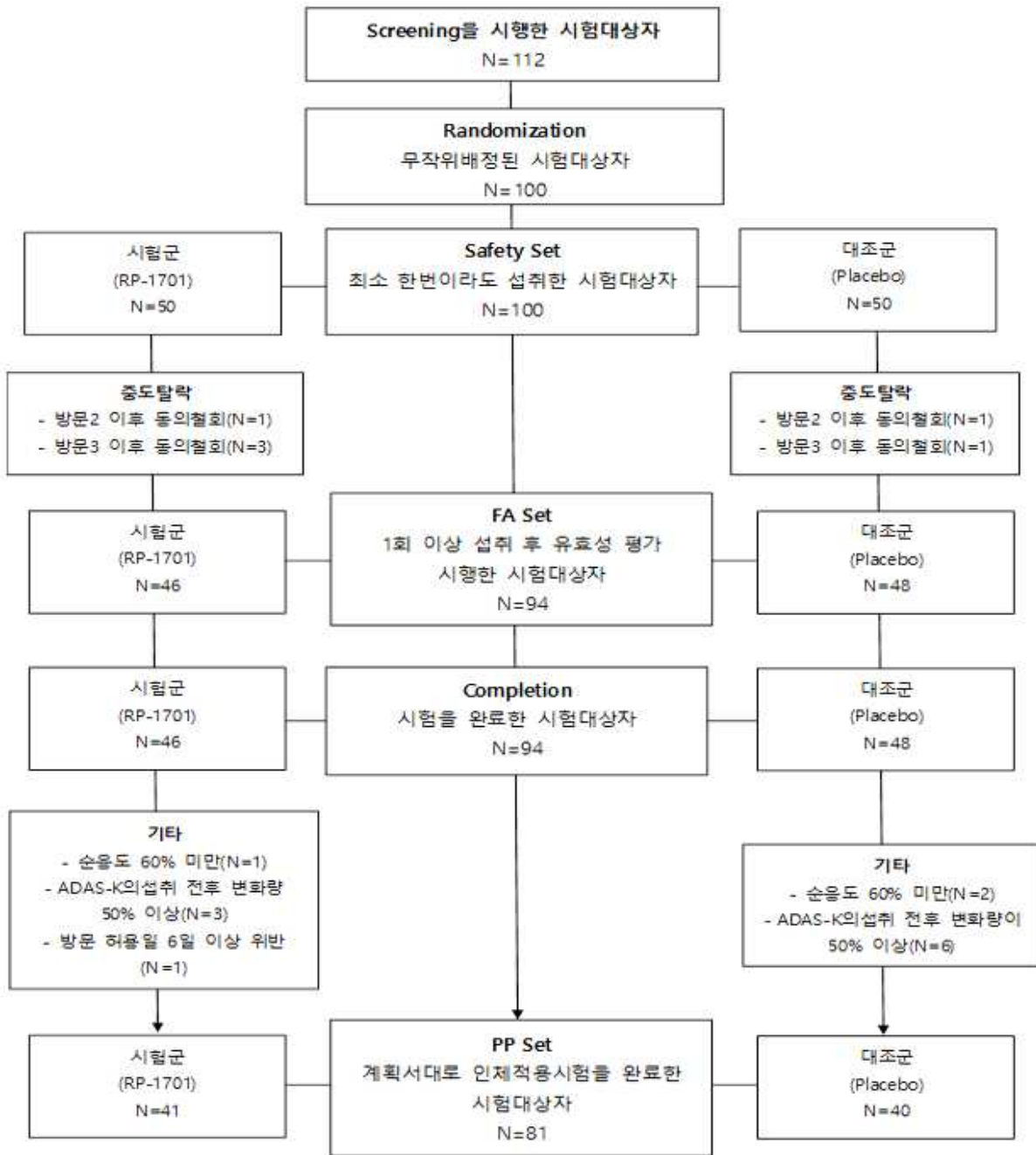
(다) 분석에 포함될 시험대상자군의 선정

- ① Safety Set은 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 인체적용시험대상자로 총 100명(시험군 50명, 대조군 50명)이 분석에 포함
- ② FA Set은 인체적용시험용 식품을 1회 이상 섭취한 후 유효성 평가를 1회 이상 시행하고, 선정/제외기준 위반에 해당되지 않는 인체적용시험대상자 집단을 대상으로 이루어짐. 따라서 중도탈락되어 유효성 평가를 실시하지 않은 6명(시험군 4명, 대조군 2명)을 제외하여 총 94명(시험군 46명 대조군 48명)이 FA Set에 포함
- ③ PP Set은 FA Set 분석에 포함된 인체적용시험대상자 중에서 인체적용시험을 종료하고, 인체적용시험결과에 영향을 미치는 중대한 위반사항이 없는 인체적용시험대상자로서 분석군 판정을 통해 평균 순응도 60% 미만 3명(시험군 1명, 대조군 2명), ADAS-K의 섭취 전후 변화량이 50%이상 9명(시험군 3명, 대조군 6명) 그리고 방문 허용일 6일 이상 위반 1명(시험군 1명)이 제외됨에 따라 총 81명(시험군 41명, 대조군 40명)이 PP Set에 포함

(라) 유효성 평가 변수에 대한 분석

- ① ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력, ADAS-K, Visual C.P.T, ADCS-ADL의 섭취 전후 변화 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였다.
- ② 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화 정도는 ANCOVA와 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

(마) 인체적용시험대상자의 인체적용시험 참여상태 및 분석군 정리



(바) 안전성 평가 변수에 대한 분석

이상반응	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험기간 동안 보고된 모든 이상반응은 MedDRA preferred term에 따라 Coding 하였으며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가 ○ 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석
------	--

<p>임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석 ○ 시험군과 대조군 간의 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가 ○ 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였음.
<p>활력징후(맥박, 혈압), 체중</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활력징후(맥박, 혈압), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내비교는 정규성 만족 여부에 따라 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였음. ○ 시험군과 대조군 간의 비교는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가
<p>심전도검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교

(사) 통계분석 보고서(Statistical Analysis Report)

SA_A03_001V 1.0
Effective Date: 2019.04.15

Statistical Analysis Report

경도인지저하에서 인지가는 향상에 미치는 **RP-1701**의
유효성 및 안전성을 평가하기 위한 **12주**,
다가관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

Protocol No. : RPS_RP-1701
SAR Ver No. : 2.0
Version Date : 2020년 03월 02일

Confidential Page 1 / 112

명령도버미오
Protocol: RPS_RP-1701 Ver.3.0
SAR Ver. 2.0

SA_A03_001V 1.0
Effective Date: 2019.04.15

목 차

SIGNATURE PAGE	2
MODIFICATION LIST	3
ABBREVIATION	10
PROJECT TEAM MEMBERS AND THEIR ROLES	12
1. 목적/목적/시험계획서 요약	13
2. 인체적용시험 진행 일정표	17
3. 인체적용시험의 목적	18
4. 부가적요청	18
5. 목표한 시험대상자와 수 및 선정근거	20
5.1. 시험대상자 수	20
5.2. 선정근거	20
6. 평가 변수	22
6.1. 연구용역학적 평가 변수	22
6.2. 의료성 평가 변수	22
6.2.1. 효능성 평가 변수	22
6.2.2. 안전성 평가 변수	23
6.3. 안전성 평가 변수	24
6.4. 기타 평가 변수	24
7. 통계분석 방법	25
7.1. ANALYSIS SETS	25
7.1.1. 주요 분석/결과 기준 위한 시험	26
7.2. 결과분석의 일반적 원칙	27
7.3. 연구용역학적 변수에 대한 분석	28
7.3.1. 연구용역학적 정보 및 기타 섭취 관련 특성	28
7.3.2. 이차적 분석	29
7.3.3. 평가, 수렴성	29
7.3.4. 각분위치의(신용성)	29
7.4. 의료성 변수를 대한 분석	29

Confidential Page 4 / 112

라. 결과보고서 작성

- (1) 인체적용시험 종료 결과 및 통계분석에 따른 결과를 바탕으로 결과보고서 작성
- (2) 유효성 및 안전성 평가자료에 근거하여 해당 약물의 유용성을 유익성-위험성 차원에서 최종적으로 평가하며, 기준 자료에 비추어 임상적으로 어떤 의미를 갖는지 고찰
- (3) 수록문서

- ① 최종 승인된 인체적용시험 계획서
- ② 최종 승인된 시험자 자료집(Investigator's Brochure)
- ③ 시험 대상자 동의서 및 설명문
- ④ 증례기록서 사본
- ⑤ 인체적용시험 심의에 대한 IRB status
- ⑥ 인체적용시험계획 변경 및 종료 심의의뢰서, 승인통지서
- ⑦ 무작위배정표
- ⑧ 인체적용시험 책임자 서명
- ⑨ 시험대상자 일람표(인구학적 정보, 복용전 특성, 복용 순응도, 병용약물, 유효성 평가결과, 안전성 평가결과)

(4) 결과보고서

Phase 1/2/3/4/5
Clinical Study Report (Version 1.0)
Protocol No.: RPS_RP-1701 (Version 3.0) 12/48

인체적용시험 결과보고서

경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 RP-1701의
유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주,
다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

인체적용시험용 식별	RP-1701 (오인자 및복합수출물)
인체적용시험의뢰자	Phase 1/2/3/4/5 서울특별시 강남구 영동대로 315, 4층
인체적용시험 시작일	2019.03.15 [최 인체적용시험대상자 스크리닝일]
인체적용시험 종료일	2019.09.18 [마지막 인체적용시험대상자 시험완료일]
인체적용시험의뢰자	박종우 (경희대학교병원 정신건강의학과 교수) 이우호 (연세대학교병원 정신건강의학과 교수)
인체적용시험실시기관	경희대학교병원 (서울특별시 용인군 구리동 23) 연세대학교병원 (서울특별시 용인군 능동로 120-1)
인체적용시험 결과보고서 작성일	2020.03.02

본 인체적용시험은 국외 임상시험관리기준(GCP)에 준하여 시행되었습니다.
본 보고서에 포함된 모든 정보는 Phase 1/2/3/4/5 시험 용역없이 공개될 수 없습니다.

NCS/StatSoft, Ltd. | www.StatSoft.com Confidential

Phase 1/2/3/4/5
Clinical Study Report (Version 1.0)
Protocol No.: RPS_RP-1701 (Version 3.0) 13/48

2. 목 차

- 1. 인체적용시험 결과보고서 요약 2
- 2. 목 차 13
- 3. 윤리적 고려에 대한 기술 20
 - 3.1. 인체적용시험 윤리기준 20
 - 3.2. 인체적용시험계획서의 승인 20
 - 3.3. 인체적용시험대상자 동의 21
 - 3.4. 비밀보장 22
- 4. 시험지, 일시기관 및 지원조직 22
 - 4.1. 인체적용시험실시기관 22
 - 4.2. 인체적용시험 시험지 및 위약표 23
 - 4.2.1. 인체적용시험계획서 23
 - 4.2.2. 인체적용시험 공통연구지 23
 - 4.2.3. 인체적용시험일람표 23
 - 4.3. 인체적용시험의뢰자 23
 - 4.4. 인체적용시험수탁기관 (Contract Research Organization, CRO) 23
- 5. 인체적용시험의 목적 및 배경 24
 - 5.1. 인체적용시험의 목적 24
 - 5.2. 인체적용시험의 배경 24
- 6. 인체적용시험용 시용 26
 - 6.1. 인체적용시험용 식별의 개요 26
 - 6.1.1. 시험약품 (RP-1701) 26
 - 6.1.2. 대조약품 (Placebo) 26
- 7. 무작위배정 27
- 7.1. 이중눈가림 28
- 8. 인체적용시험 계획 28
 - 8.1. 인체적용시험의 설계 28
 - 8.1.1. 인체적용시험 기간 29
 - 8.1.2. 인체적용시험 중지 및 탈락기준, 재차시 위험률 대한 기준 29
 - 8.1.2.1. 인체적용시험 중지 및 탈락기준 29
 - 8.1.2.2. 인체적용시험계획서 위반에 대한 조치 30
 - 8.2. 관용량, 임상조사 용액 및 관입 31
 - 8.2.1. 관용량, 임상시험 검사 용액 31
 - 8.2.1.1. 인체적용시험대상자 동의 및 연구학적 조사 31
 - 8.2.1.2. 병역 및 약물부여의 조사, 병용약물 및 병용요법 확인 31

NCS/StatSoft, Ltd. | www.StatSoft.com Confidential

- (5) 최종 완료된 결과보고서를 실시기관별 IRB에 제출하여 결과보고 IRB 승인 획득



(6) 인체적용시험 결과 및 결론

① 유효성 평가 결과

<p>ADAS-cog 총점 변화량</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ ADAS-cog 총점(기억력 4항목, 언어능력 5항목, 수행능력 2항목) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.02 ± 2.36점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.93 ± 2.17점 감소하여($p = 0.0095$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p = 0.0252^*$, 0.0314^*). ○ ADAS-cog 총점 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.75 ± 2.94점 감소하였고($p = 0.0002$), 대조군은 1.42 ± 2.59점 감소하였으나($p = 0.0004$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>ADAS-K 총점 변화량</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ ADAS-K(ADAS-cog 11개 항목, ADAS-non cog 1개 항목) 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.87 ± 2.53점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.78 ± 2.34점 감소하여($p = 0.0427$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p = 0.0468^*$, 0.0391^*). ○ ADAS-K 총점 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.58 ± 3.12점 감소하였고($p = 0.0013$), 대조군은 1.30 ± 2.73점 감소하였으나($p = 0.0019$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>ADAS-cog 기억력 총점 변화량</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ ADAS-cog 기억력 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.50 ± 2.01점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.88 ± 1.33점 감소하였으나($p = 0.0002$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ ADAS-cog 기억력 세부항목의 변화량 분석 결과에서도 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

	<ul style="list-style-type: none"> ○ ADAS-cog 기억력 총점 및 ADAS-cog 기억력 세부항목의 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>Visual C.P.T(시각지속검사) 변화량</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Visual C.P.T(시각지속검사) 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 정반응수는 섭취 12주 후 시험군은 3.10 ± 12.11회 증가하였고($p=0.2759$), 대조군은 1.58 ± 6.81회 증가하였으나($p=0.3205$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ 누락오류수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 3.10 ± 12.11회 감소하였고($p=0.2759$), 대조군은 1.58 ± 6.81회 감소하였으나($p=0.3205$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ 과잉반응수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.78 ± 3.31회 감소하였고($p=0.1393$), 대조군은 0.50 ± 7.56회 증가하여($p=0.1131$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0324^{\&}$). ○ 정반응시간 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.06초 감소하였고($p=0.6882$), 대조군은 0.01 ± 0.05초 증가하였으나($p=0.7992$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ 표준편차 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.03초 감소하였고($p=0.1892$), 대조군은 0.00 ± 0.03초 감소하였으나($p=0.6653$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ Visual C.P.T(시각지속검사) 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>ADCS-ADL 총점 변화량</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ ADCS-ADL 총점 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.07 ± 1.94점 증가하였고($p=0.8105$), 대조군은 0.18 ± 1.58점 감소하였으나($p=0.7403$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ ADCS-ADL 총점 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서도 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

② 안전성 평가 결과

<p>이상반응</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시험군에서는 총 4명의 인체적용시험대상자에게서 6건의 이상반응이 있었고, 대조군에서는 총 9명의 인체적용시험대상자에게서 16건의 이상반응이 있었으나 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음($p=0.1371$). 주된 이상반응은 시험군은 소화기계장애, 대조군은 신경계 장애였으며, 이 중 중대한 이상반응 및 이상반응으로 인한 중도탈락자는 없었다. ○ 인체적용시험 기간 동안에 발생한 이상반응의 증상정도 조사에서 시험군은 경도(mild) 6건이었으며, 대조군은 경도(mild) 14건, 중등도
-------------	--

	<p>(Moderate) 2건이었다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군은 ‘관련이 있다고 생각됨’ 이 1건, ‘관련 있을 가능성 있음’ 이 3건, ‘관련이 없다고 생각됨’ 이 1건 ‘명확히 관련이 없다고 생각됨’ 이 1건이었고 대조군은 ‘관련 있다고 생각됨’ 이 2건, ‘관련 있을 가능성 있음’ 이 10건, ‘관련이 없다고 생각됨’ 이 2건, ‘명확히 관련이 없다고 생각됨’ 이 2건으로 시험자에 의해 판단되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p=1.0000$). ○ 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 시험군 4건으로 주로 소화기장애였으며, 대조군에서 12건이 발생하였고 주로 신경계장애였다. 대조군의 위장관 장애 1건을 제외한 모든 이상반응은 완전치유 되었음을 확인하였다.
<p>임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈액화학적검사 중 ALT(GPT) 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 3.26 ± 6.41 감소하였고($P=0.0004$), 대조군은 2.52 ± 8.35 증가하여($P=0.0102$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($P<0.0001$). 그 외 혈액학적/혈액화학적검사 항목에서는 섭취 12주 후 섭취 군간 유의한 차이는 나타나지 않았다. ○ 뇨검사 분석 결과 시험군의 Occult Blood 항목에서 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나($p=0.0253$), 이는 시험자에 의해 임상적 의미가 없는 것으로 판단되었다. ○ 그 외 뇨검사항목에서는 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>활력징후(맥박, 혈압), 체중</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활력징후(맥박, 혈압) 및 체중 변화량 분석에서 섭취 6주, 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.
<p>심전도검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타났다.

③ 결론

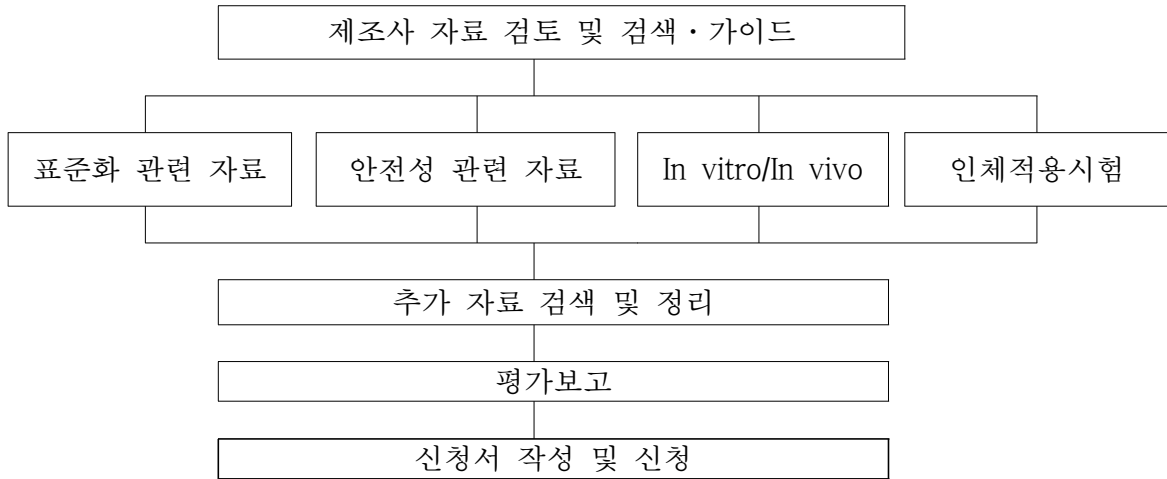
<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구 결과를 살펴보면 ADAS-cog 총점은 섭취 12주 후 시험군이 2.02 ± 2.36점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.93 ± 2.17점 감소하여($p=0.0095$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p=0.0252, 0.0314$). 또한 ADAS-cog에 ADAS-non cog의 한 항목을 추가한 ADAS-K에서도 시험군은 1.87 ± 2.53점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.78 ± 2.34점 감소하여($p=0.0427$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0468, 0.0391$). ○ 이외 시각지속검사(Visual CPT)에서 과잉반응수(commission error)의 변화량은 시험군은 감소하였고($p=0.1393$), 대조군은 증가하여($p=0.1131$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p=0.0324$). ○ 전반적인 인지기능을 나타내는 ADAS-cog 점수(Suh and Mohs 2003)가 시험군에서 더욱 감소한 결과는 RP-1701을 섭취한 시험군이 대조군에 비해 인지기능을 향상시켰다는 결

과를 보여주고 있다.

- 또한 시각지속검사에서 12주 후의 과잉반응수는 군내에서 통계적으로 유의하지는 않았지만 시험군에서는 감소하였고, 대조군에서는 오히려 증가하여 군간의 변화량에서 통계적으로 유의한 차이를 보였음. 시각지속검사에서 과잉반응수는 표적자극이 아닌 자극에 반응하는 ‘오류’로 지속적 주의력과 충동성을 평가함(Dykman 등 1979). 즉 시험군에서는 오류가 감소하였고 대조군에서는 증가하여 RP-1701의 섭취로 인해 시험군에서 지속적 주의력이 대조군에 비해서 호전된 것으로 볼 수 있다.
- 노화와 뇌의 형성력에 대한 연구들을 살펴보면, 노화는 인지기능의 저하와 밀접한 관련이 있으며, 이는 신경 형성력(neural plasticity)의 변화나 형성력의 기전에 직접적으로 영향을 미치는 세포내 변화에 의해 발생한다고 하였음(Burke and Barnes 2006). in vitro 실험을 통해 오미자와 칠해목의 복합추출물인 RP-1701은 신경세포 보호 활성의 효과적인 물질로 개발되었고, 본 연구에서 55세 이상 85세 대상군에서 전반적인 인지기능의 향상과 지속적 주의력을 상대적으로 호전시켰음. 이는 RP-1701이 신경세포의 변화를 통해 관련된 인지기능의 저하를 향상시킬 가능성을 제시하고 있다.
- 12주 기간 동안의 안전성 평가에서도 시험군과 대조군 간의 이상반응 발생율에 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 임상적으로 의미 있는 이상반응은 발생하지 않았으며, 이외 활력징후(맥박, 혈압), 체중, 임상병리검사, 심전도검사에서는 임상적으로 의미가 있는 변화는 관찰되지 않았다.
- **결론적으로 본 시험을 통해 오미자복합추출물(RP-1701)의 인지기능 개선 효과와 인체에 안전하다는 것이 입증됐다.**

6. 인지능력 개선 건강기능식품 개별인정 기능성 원료 신청서 접수

가. 인허가 신청 업무 흐름도



나. ‘건강기능식품 기능성원료 신청’이란, 건강기능식품에 관한 법률 제14조 및 제15조의 규정에 의하여 인정 신청서를 작성하는 것을 의미하며, 안전성/기능성 컨설팅 및 자료 정리, 기준/규격 컨설팅 및 자료 정리 등을 통해 식약처에 제출할 신청서를 작성 및 제출하였다.

다. 제출문서

- ① 제출자료 전체의 총괄 요약본
- ② 기원, 개발경위, 국내/외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- ③ 제조방법 및 그에 관한 자료
- ④ 원료의 특성에 관한 자료
- ⑤ 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- ⑥ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- ⑦ 안전성에 관한 자료
- ⑧ 기능성내용 및 그에 관한 자료
- ⑨ 섭취량, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- ⑩ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

(1) 형태학적 감별법





(가) 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)

원재료 ‘오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)’의 유사종으로는 남오미자(*Kadsura japonica* (L.) Dunal)가 존재한다. 이 둘은 유사종이지만, 생육환경 및 외형상의 특징까지 달라 구별이 가능하였으며, 해당 결과들을 아래와 같이 정리 하였다.

명칭	오미자	남오미자
사진		
학명	Schisandra chinensis (Turcz.) Baill	Kadsura japonica (L.) Dunal
분포	중국, 일본; 함경북도 백두대간 ~ 경상북도, 전라남도까지 분포	중국, 대만, 일본; 전라남도 및 제주도
생육 환경	경사도가 낮은 각지의 산골짜, 특히 전석지에서 군충을 이루어 자람	부식질이 많고 배수가 잘 되는 약간 그늘지고 따뜻한 곳
형태	낙엽 활엽 덩굴성	상록 활엽 덩굴성
크기	길이 6 ~ 9m	길이 3m, 지름 1.5cm
꽃	암수딴그루로 꽃은 4 ~ 6월에 피고 3~5송이의 꽃이 새로 나온 짧은가지의 잎겨드랑이에 각기 한송이씩 피. 꽃 지름 15mm	암수딴꽃 또는 암수한꽃으로 양성꽃이며, 4~8월에 잎겨드랑이에 달리고 연한 황백색이며 지름 2cm임
잎	어긋나기로 또는 짧은가지에서는 속생 길이 7~10cm, 폭 3~5cm로서 넓은 타원형 긴 타원형 또는 달걀모양. 점첨두 예저이며 뒷면 맥 위를 제외하고는 털이 없고 가장자리에 작은 치아모양 톱니가 있으며 잎자루는 길이 1.5~3.0 mm	어긋나기로 잎은 두텁고 표면 윤채가 있음. 넓은 또는 긴 달걀꼴, 긴 타원상 피침형. 양면에 털이 없으며 표면의 뒷면은 유점(油點), 자주색을 띠
열매	장과로서 8 ~ 10월에 붉은색으로 익으며 구형 또는 거꿀달걀상 구형이고 길이 6~12mm이며 여러개가 송이모양으로 달려 밑으로 처지고 1~2개의 종자가 들어 있음. 건조하면 검은색을 띠 진홍색으로 변하고 쭈그러진 주름이 생김	꽃턱은 적색 장과가 밀착하여 둥글게 되고 지름 2~3cm로서 붉은색이며 열매는 9~10월에 익음. 종자는 길이 3mm 정도의 심장모양이며 담황색임.

(나) 칠해목(Ribes fasciculatum var. chinense Maxim, 이하 까마귀밥나무)

원재료 '칠해목(Ribes fasciculatum var. chinense Maxim)'의 유사종 으로는 까치밥 나무(Ribes mandshuricum (Maxim.) Kom), 명자순(Ribes maximowiczianum Kom), 꼬리까치밥나무(Ribes komarovii Pojark)가 존재한다. 유사종이지만, 생육환경 및 외형상의 특징까지 달라 구별이 가능하였으며, 해당 결과들을 아래와 같이 정리 하였다.

명칭	칠해목	까치밥나무	명자순	꼬리까치밥나무
사진				
학명	Ribes fasciculatum var.	Ribes mandshuricum	Ribes maximowiczianum	Ribes komarovii Pojark

	chinense Maxim	(Maxim.) Kom	Kom	
분포	중국, 일본; 평남 및 강원도 이남에서 자라며 경기도, 강원도, 전라남도, 경상남도 등지에서도 비교적 흔하게 분포	중국 분포; 지리산과 북부지방의 고산지대에서 자람	중국, 일본, 극동러시아; 평안남북도, 함경남북도 ~ 강원도 백두대간	북부지방
생육 환경	산지 계곡의 나무 밑	높은 산의 수림속에서 잘 자라는 내음성이 강한 수종	심산지역의 수림 밑에서 자람	-
형태	낙엽 활엽 관목	낙엽 활엽 소관목	작엽 활엽 관목	작엽 활엽 관목
크기	높이 1~1.5m	높이 2m	-	높이 2.5m
꽃	4~5월에 노란색으로 피. 암수딴그루로 잎겨드랑이에 여러 개 달림. 수꽃은 작은꽃대가 길고 꽃받침통이 술잔 모양, 꽃받침조각은 노란색, 난상 타원형 암꽃 씨방은 거꿀달걀형, 1실, 꽃받침통은 술잔 모양, 꽃받침조각 노란색으로 길이는1.5mm, 꽃잎은 거꿀삼각형, 노란색.	양성, 길이 20cm, 총상꽃차례 이룸. 꽃차례에 털이 밀생, 많은 양성꽃이 달리며 포는 숙존성, 꽃받침통은 난상 원형. 꽃받침조각은 둥글고 뒤로 젖혀지고, 꽃잎은 작으며 거꿀달걀모양으로 뒤로 젖혀지고 수술은 길게 밖으로 나오며 암술대는 2개로 갈라지며 5-6월에 녹색으로 개화.	암수딴그루, 4월 하순에 피고 총상꽃차례에 달리며 수꽃차례에 7~10송이, 암꽃차례에 2~6송이씩 달리고 (까치밥나무는 양성꽃으로 많은 꽃이 달림) 선상(腺狀)의 털이 있으며 꽃차례의 포는 일찍 떨어진다. (까치밥나무는 꽃차례의 포가 일찍 떨어지지 않음) 수꽃은 수술이 5개이고 꽃받침조각은 술잔모양이며 타원형이고 꽃잎은 거꿀달걀모양	이가화로 4월 하순에 피고 총상꽃차례에 샘털이 있으며, 포는 떨어지고 암꽃차례는 길이 5cm정도 수꽃의 꽃받침통은 술잔모양이며 꽃받침조각은 둥글고 꽃잎은 노란색 도란상 타원형이며 수술이 꽃잎보다 김. 암꽃에 있어서 씨방은 거꿀달걀모양이고 털이 없으며 꽃받침조각은 타원형
잎	잎은 어긋나기로서 둥글고 3 ~ 5개로 갈라짐. 둔두, 삼장저 또는 절저이며 길이와 폭 5~10cm×4~7cm 뾰족한 톱니가 있음. 잎 앞면에는 털이 없으나 뒷면과 잎자루에는 털이 남. 뒷면은 연한 녹색, 잎자루 길이 2 ~ 3cm.	잎은 원형, 3-5개로 갈라짐. 예두 심장저(까마귀밥여름나무의 기부는 심장저 또는 절저임)이고 겹톱니가 있고 면은 녹색. 길이와 폭이 각각 4-10cm로서 잔털이 산생하며 뒷면에 융털이 있고 엽병은 길이 1-6cm로서 털이 거의 없음. (까마귀밥여름나무의 엽병에는 털이 많음)	잎은 삼각상 원형이고 3개로 얇게 갈라지며 겹톱니가 있고 침두이며 예저 또는 아심장저이고 길이와 폭이 각각 2~4cm로서 양면에 털이 산생하지만 뒷면에 털이 없는 것도 있다. 잎자루 길이는 7~10mm이고 잔털이 산생한다. (까치밥나무의 엽병에는 털이 없음)	어긋나기, 난상 원형, 3-5개로 갈라짐. 톱니가 드물게 있음. 침두 예저 겹톱니가 있음. 길이 3-4cm 표면에 털이 없고 뒷면 맥위에 샘털 있음.
열매	장과로 타원형 9~10월에 붉게 익으며 쓴맛이남. 10여 개의 종자가 들어 있는데,	둥글며 털이 없음 7-8월에 붉은색으로 성숙하고 먹을 수 있음	장과. 둥글며 지름 7mm정도이고 9월에 적색으로 익음	구형. 7월에 붉은 색으로 성숙하고 먹을 수 있음

	세모진 방추형 또는 달걀꼴이며 겉이 끈적끈적하고 연노란색임.			
--	--	--	--	--

(2) 국내 인정 현황

(가) 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)

- 원재료 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)는 식품공전(제2020-18호)에 등재되어 있다. 또한 식품의약품안전처(이하 식약처) 식품원재료 DB에도 등재되어 있으며, 식용가능 부위는 “열매”로 등재되어 있다.

- 대한민국약전의한약(생약)규격집(제2019-72호) [별표5]에 ‘오미자엑스 산’으로 기재 되어 있다.
- 동의보감(한의학교전DB)에 오미자고(五味子膏)는 정기(精氣)를 잘 새어 나가지 않게 하여 몽유·정활탈을 치료에 쓰인다고 기록되어 있다.

- 오미자추출물((주)바이오믹스, 제2016-21호)는 “갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)”으로 개별인정형 기능성 원료로 인정되었으며, 일일 섭취량은 오미자추출물로서 783mg/일이다.

- 오미자추출물((주)바이오포트코리아, 제2018-9호)는 “근력 개선에 도움을 줄 수 있음”으로 개별인정형 기능성 원료로 인정되었으며, 일일 섭취량은 오미자추출물(농축액)로서 1,582mg/일이다.

(나) 칠해목(*Ribes fasciculatum* var. *chinense* Maxim)

- 원재료 칠해목(*Ribes fasciculatum* var. *chinense* Maxim)는 식품공전(제2020-18호) [별표1] “식품에 사용할 수 있는 원료”의 목록에 등재되어 있으며, 식품의약품안전처(이하 식약처) 식품원재료 DB에도 등재되어 있고, 식용 가능 부위는 “잎”으로 등재되어 있다.

- 동의보감(한의학교전DB)의 단독(丹毒) 치료에 칠해목에 열매가 없으면 잎과 줄기를 사용한다고 기록되어 있다.

(3) 국외 인정 현황

(가) 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon)

- 캐나다-Natural Health Products Ingredients Database (이하NHPID)
Natural Health Products Ingredients Database(이하NHPID)상에 원재료 “오미자(*Schisandra chinensis*)”의 과일, 씨앗으로 중국에서는 정통적 약재로 사용된다고 기재되어 있다.

- 국제식품규격(Codex Alimentarius)

Codex Alimentarius(2017.7.22.)상에 “오미자(FB 1235 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill)”가 등재되어 있다.

- 홍콩.Center for Food Safety(이하 CFS)

Center for Food Safety(이하 CFS) “Draft Guidelines on Food Classification for the Pesticide Residues in Food Regulation (Cap. 132CM)(2013.06)”상에 “오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill)”가 등재되어 있다.

- 일본 약리학

일본 약리학(2016.04.01. 제 17판)상에 “오미자(*Schisandra chinensis*)”가 등재되어 있다.

- 스위스-의료제품청 Swissmedic(이하 SMC)

Swissmedic(이하 SMC)상에 “오미자(*Schisandra chinensis*)”가 의약품 또는 식품으로서의 식물 기원 물질 및 제제로 인정되어 있다.

- 이탈리아-Ministero della Salute

이탈리아 보건부(Ministero della Salut)상에 “오미자(*Schisandra chinensis*)” 가 식품으로서 인정 되어 있다.

- 중국-China National Center For Food Safety Risk Assessnemt(이하 CFSA)

China National Center For Food Safety Risk Assessnemt(이하 CFSA)상에 “오미자(五味子)”는 건강식품에 사용할 수 있는 물품 리스트에 기재되어 있다.

- 프랑스-The National Agency of Medicine and Health Products Safety (이하 ANSM)

국립의약품건강제품안전청 ANSM에 “오미자(*Schisandra chinensis*)”가 등재되어있다.

(4) 국내외 사용현황

원재료 오미자(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon) 및 칠해목(*Ribes fasciculatum* var. *chinense* Maxim)와 관련된 식품 또는 건강기능식품(dietary supplement)이 판매되고 있으며, 이를 이용한 식품 및 건강기능식품(dietary supplement)의 제품 정보(일일 섭취량 및 함량 등)를 아래와 같이 정리하였다.

표 1. “오미자추출물등복합물” 또는 “오미자” 또는 “까마귀밥나무”를 이용한 국내 제품 정보^{A23)}

유동국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취 시 주의사항	섭취용도
국내		아이에버루테인	(주)알피바이오	400mg/일 (신청원료 오미자추출물등 복합물로서 0.8mg/일)	-	<ul style="list-style-type: none"> 과다 섭취 시 일시적으로 피부가 황색으로 변할 수 있습니다. 알레르기 체질이신 경우 성분을 확인하신 후 섭취하십시오. 임신, 수유부나 질병으로 치료 중인 자는 섭취 전 전문가와 상의하십시오. 	건강기능식품
국내		문경오미자가루	바른약초	오미자 (국내산) 100% 3 ~ 5g/일	-	-	기타가공식품
국내		문경오미자분말	문경팜플러스	오미자 (국내산) 100% 30g/일	-	-	기타가공식품
국내		문경오미자분말	자연맘	오미자 (국내산) 100% 4~6g/일	-	-	기타가공식품
국내		국내자연산 칠해목	천지가약초	칠해목(국내산) 20-30g/일	-	-	일반식품
국내		칠해목, 까마귀밥나무	산마루약초	칠해목(국내산) 20g/일	-	임산부 및 수유부는 섭취 시 주의할 것	일반식품
국외		Schizandra Extract	SWANSON	오미자열매추출물로서 1,000mg/일	간 기능, 피로, 스트레스에 도움	임산부 및 수유부는 섭취 시 주의할 것	Dietary supplement
국외		Schizandra Berry Extract	Natures elements	오미자열매추출물로서 2,000mg/일	간 기능, 부신 기능, 피로 및 뇌 활동에 도움	임산부 및 수유부는 섭취 시 주의할 것	Dietary supplement

“오미자복합추출물” 또는 “오미자” 또는 “칠해목”를 이용한 국내 제품 정보

(5) 안전성 DB

(가) 오미자(Schizandra chinensis)

원재료 “오미자복합추출물”과 이의 기능(또는 지표)성분 “Schizandrin”은 국내외 보고서, 국제기구 보고서 및 관련 데이터베이스의 검색결과 중대한 이상반응 및 독성자료는 검색되지 않았다.

데이터베이스	검색어	검색결과
--------	-----	------

PDR of Herbal Medicine		<ul style="list-style-type: none"> - 장 염증, 불면증, 야뇨증, 빈뇨증, 기침, 만성 설사, 호흡 곤란, 발한, 간염, 신경쇠약 및 불안 등에 사용됨. - 적절한 용량 투여 시 건강상의 위험은 없음. - 파우더, 티크제, 추출물의 형태로 1.5~6g 섭취한다.
Global Information Herb on Integrated Med	Schisandra chinensis, wuweizi, Schizandrin	<ul style="list-style-type: none"> - 신장 강화제, 진정제, 기침, 천명, 자연 발한, 만성설사, 불면증 및 건만증 등에 사용됨. - P450 pathway에 관여하는 약과 병용 섭취 시 주의 필요. - 적절한 용량으로 사용 시 안전. - 간 질환, 간 손상 등의 증상을 나타내는 경우, 오미자 섭취 전 의사와 상담 권고. - 임신부는 사용을 피하고, 수유기 여성의 경우 의사와의 상담없이 섭취하지 않도록 권고 - 의사와의 상담없이 2세이하의 아이에게 오미자 섭취 권고하지 않음 - 표준화된 오미자 추출물로 100~200mg을 1일 2회 섭취하며, 가장 일반적으로 표준화된 오미자 추출물 100mg을 1일 2회 섭취
Web MD		<ul style="list-style-type: none"> - 적절한 용량으로 사용 시 안전. - 가슴앓이, 위장 장애, 식욕 감퇴, 피부 발진 및 가려움증 유발 가능함. - 임신 중 경구 섭취 시 자궁 수축으로 유산 가능성 있음. - 중추 신경계를 자극할 수 있어 뇌압을 높일 수 있으며, 간질 환자에게 권고하지 않음. - 위산을 증가시켜 위식도 반사질환(GERD) 또는 소화성 궤양을 악화시킬 수 있음.
Health Canada		
WHO monograph		해당사항 없음.
The Longwood herbal Task Force		

DrugDigest		
Herbs & Supplements(MedilinePlus)		

(나) 칠해목(까마귀밥나무, *Ribes fasciculatum* var. *chinense* Maxim)

원재료 “오미자복합추출물”과 이의 기능(또는 지표)성분 “4-Hydroxybenzoic acid”는 국내·외 보고서, 국제기구 보고서 및 관련 데이터베이스의 검색결과 중대한 이상반응 및 독성자료는 검색되지 않았다.

데이터베이스	검색어	검색결과
Tox-Info (MFDS 독성정보제공시스템)	Ribes fasciculatum var. chinense Maxim, 4-Hydroxybenzoic acid	- 고용량으로 섭취 시 랫드에서 골격 및 중추신경계에 선척적 결손을 유발할 수 있으며, 마우스에서 질의 각질화, 자궁비대화 및 스트렙토조토신-당뇨병 랫드에서 저혈당 효과를 보임.
PDR of Herbal Medicine		해당사항 없음.
WHO monograph		
The Longwood herbal Task Force		
DrugDigest		
Herbs & Supplements(MedilinePlus)		

라. 개별인정 신청서

기능성 원료 인정 신청을 위한
제 출 자 료

1. 제출자료의 총괄 요약본

신청자료 개요 (■최초, □변경)*

업종명(가중명)	식품첨가제업 (야요리 : 달걀)				
영업주명	건강기능식품건강정보팀	통과/심고/등록번호	제20040017006호		
주소 및 연락처	* 경기도 수원시 영통구 영통신안로 60				
	담당자	[이름] 최영철 식품첨가제업			
	CFO 담당자	[이름] 김경나 내오부외관팀			
신청 품목명	오미자추출물첨가제				
입사 대상 분류	새로운 원료	<input checked="" type="checkbox"/> 신청 기능성	기능성 원료로 인정된 원료의 기능성 개선의 효용을 증진 시킬 수 있음		
		<input type="checkbox"/> 신청 성분	오미자추출물첨가제로서 1.5 g/일		
	기능성 추가	<input type="checkbox"/> 섭취량 변경	[변경 후]		
		<input type="checkbox"/> 제조방법 변경			
		<input type="checkbox"/> 기준규격 변경			
		<input type="checkbox"/> 시험방법 변경			
		<input type="checkbox"/> 시험 원료			
		<input type="checkbox"/> 기능성 추가			[변경 후]
		<input type="checkbox"/> 섭취량 변경			[변경 후]
		<input type="checkbox"/> 제조방법 변경			[변경 후]
기타 부속	<input type="checkbox"/> 수입신고서	수출국			
	<input type="checkbox"/> 수입신고서	제조회사			
	<input type="checkbox"/> 수입신고서	소재지			
입원요청	<input type="checkbox"/> 실시 예정				
외국인용고지	<input checked="" type="checkbox"/> 진행 예정 : 농림축산식품부(고부가가치식품개발사업)				

* [최초] 심사되지 않고 새롭게 제출신청 신청하는 원료
[변경] 심사된 원료 또는 개별인증원료로 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 시험방법 또는 시험방법)

- 1 -
- 2 -

마. 접수증

접수증	
접수번호: 20200263359 접수일자: 2020.05.25	
민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	6579589
민원인 (대표 또는 대리인)	김남기(20040105232)
처리예정일	2020.11.12
처리주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀(1)
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하셔야 민원서류를 수령하실 수 있습니다.
수수료	1,900,000

위 민원의 민원을 접수하였습니다.

7. 인지능력 개선 건강기능식품 시제품 개발(품목신고) 및 사업화

가. 건강기능식품 시제품 개발 및 사업화

(1) 품목제조보고서

- 식약처에 오미자복합추출물이 기능성원료로 개별인정이 승인될 때 까지 오미자복합추출물을 부원료로 사용하여 기존에 판매되고 있는 건강기능식품에 우선 적용하고자하였으며, 기준규격에 부합하는 품질의 원료를 부원료로 사용하여 개발한 건강기능식품의 품목제조신고를 하였다.

- 주관기관 알피바이오에서 판매되고 있는 건강기능식품 중 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품은 없지만 노인을 타겟으로 한다는 점이 동일한 원료인 '루테인(노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음)'을 주원료로 한 건강기능식품에 오미자복합추출물을 부원료로 사용하여 건강기능식품을 개발하였다.

발급번호 : 019N-CF04-K152-B110-4538

제 20040017006600 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영업허가(번호) : 제 20040017006 호

○ 업 소 명 : (주)알피바이오

○ 소 재 지 : 경기도 화성시 향남읍 지곡공단4길 35-8

○ 영업의 종류 : 건강기능식품제조업

○ 제 품 명 : 아이에버루테인 (유형: 루테인 C, 비타민E, 아연, 비타민A, 비타민 B2, 비타민 B6, 마린골드꽃추출물)

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

2017년 07월 18일

경인지방식품의약품안전청장

발급번호 : 019N-CF04-K152-B110-5308

변경 및 재분사용

변경일자	변경항목	변경전	변경후	변경사유	작성지 작성·승인 (서명 또는 인)
2018-06-15	원료나 성분의 함량	대두유 44.5%	대두유 41.5% 겐티아나추출물 3.0%	원료 성분 배합 변경	경인청 식·의약품관리과 권현숙
2019-02-28	원료나 성분의 함량	루테인 : 25%, 콩기름(대두유) : 41.5%	마린골드꽃추출물 : 25%, 콩기름(대두유) : 41.5%, 오미자추출물분말 : 0.1%		경인청 식·의약품관리과 권현숙
2019-03-08	원료나 성분의 함량	콩기름(대두유) 41.4%, 오미자추출물분말 0.1%	콩기름(대두유) 41.21%, 오미자추출물분말 0.2%, 마린골드꽃추출물분말 0.09%		경인청 식·의약품관리과 권현숙

'아이에버루테인' 품목제조 신고증

나. 제품 패키지(시안)

아이에버 루테인

루테인, 아연, 비타민 A, B₂, B₆, C, E 건강기능식품 24g (400mg x 60캡슐)

【원료명 및 함량】 마린골드꽃추출물(루테인 20%), 비타민C, D-α-토코페롤(비타민 E 67%), 산화아연, 비타민A를 합제제타이타늄산화물, 망간, 구리, 비타민D, 비타민E, 비타민E, 겐티아나추출물, 대두유, 말린(향남), 오미자 등 복합추출물(향남, 겐티아나추출물, 대두유, 말린(향남), 과립제 조분(향남)(2종), 결빙저수술을 분말, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필 베타-글루칸, 폴리글리시릴시름, 글리세린, 인디노 색소, 치자정색소, 대두, 망고, 돼지고기, 박송이 함유)

【설취량 및 섭취방법】 1일 1회, 1회 1캡슐을 충분한 물과 함께 섭취하십시오.

【제조원 (주)알피바이오】 경기도 화성시 향남읍 지곡공단 4길 35-8

【소재지 상담실】 02-2002-9813

【소비자 상담실】 02-2002-9813

제조번호 유통기한 까지

'아이에버루테인' 케이스

아이에버 루테인

루테인, 아연, 비타민 A, B₂, B₆, C, E 건강기능식품 24g (400mg x 60캡슐)

【원료명 및 함량】 마린골드꽃추출물(루테인 20%), 비타민C, D-α-토코페롤(비타민 E 67%), 산화아연, 비타민A를 합제제타이타늄산화물, 망간, 구리, 비타민D, 비타민E, 비타민E, 겐티아나추출물, 대두유, 말린(향남), 과립제 조분(향남)(2종), 결빙저수술을 분말, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필 베타-글루칸, 폴리글리시릴시름, 글리세린, 인디노 색소, 치자정색소, 대두, 망고, 돼지고기, 박송이 함유)

【설취량 및 섭취방법】 1일 1회, 1회 1캡슐을 충분한 물과 함께 섭취하십시오.

【제조원 (주)알피바이오】 경기도 화성시 향남읍 지곡공단 4길 35-8

【소재지 상담실】 02-2002-9813

【소비자 상담실】 02-2002-9813

제조번호 유통기한 까지

'아이에버루테인' 설명서

5절 연구개발의 성과

1. 특허

	특허번호	특허명
1	특허출원 (10-2017-0162179호)	칠해목으로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 세포 보호용 조성물
2	특허출원 (10-2018-0145492호)	대사체 분석에 의한 오미자와 칠해목의 동속 식물 구분 방법
3	특허출원 (10-2018-0145491호)	오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법
4	특허등록 (10-1953143호)	오미자 추출물과 칠해목 추출물을 이용한 뇌신경세포 보호용 조성물

2. 논문

	게재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol. (No.)	구분
			주저자	교신저자	공동저자			
1	2018	과산화수소로 유도된 SH-SY5Y 신경 세포 사멸에 대한 오미자칠해목 추출 혼합물의 보호효과	박은국	한경훈, 이승희, 김남기, 배문형, 서영하, 용윤중, 정선용	최춘환	Korean J. Food Nutr.	31(6), 865~872	-
2	2018	Antiadipogenic Effects of Loganic Acid in 3T3-L1 Preadipocytes and Ovariectomized Mice	Eunkuk Park, Jeonghyun Kim	Subin Yeo, Gijeong Kim, Eun-Hee Ko, Sang Woo Lee, Wan Yi Li	Chun Whan Choi, Seon-Yong Jeong	Molecules.	23(7), 1663.	SCI
3	2019	Synergistic Neuroprotective Effect of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum on Neuronal Cell Death and Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in	Eunkuk Park, Min Jeong Ryu	Nam Ki Kim, Mun Hyoung Bae, Youngha Seo, Jeonghyun Kim, Subin Yeo, Memoona Kanwal, Chun Whan	Jun Young Heo, Seon-Yong Jeong	Int J Mol Sci.	20(18), 4517.	SCI

		Rats		Choi				
4	2020	오미자칠해목 추출물의 과산화수소로 유발된 PC12신경 세포 사멸과 스코폴라민으로 유발된 렛드 동물모델에 대한 개선 효과	박은국	한경훈, 허재혁, 김남기, 배문형, 서영하, 용윤중, 정선용	최춘환	Korean J. Food Nutr.	33(3), 347~ 355	-
5	2020	Schisandra Extract and Ascorbic Acid Synergistically Enhance Cognition in Mice through Modulation of Mitochondrial Respiration	Yunseo n Jang, Jae Hyeon Lee, Min Joung Lee	Soo Jeong Kim, Xianshu Ju, Jianchen Cui, Jiebo Zhu, Yu Lim Lee, Eunji Namgung, Han Wool John Sung, Hong Won Lee, Min Jeong Ryu, Eungseok Oh, Woosuk Chung, Gi Ryang Kweon	Chun Whan Choi, Jun Young Heo	Nutrie nts	12(4), 897.	SCI

3. 학술발표

	발표일	제목	학술대회명	구분
1	2017-09-13	DNA barcoding method test for Ribes L. (Grossulariaceae) species-level identifications	2017 식물병리학회	대한민국 (제주)
2	2017-11-08	Neuroprotective effect of Ribes fasciculatum extract on hydrogen peroxide induced neuroblastic cell line	2017 한국식품영양과학회	대한민국 (경주)
3	2017-11-23	Neuroprotective effect of Ribes fasciculatum extract on hydrogen peroxide-induced neuroblastic cell line	2017 한국생약학회	대한민국 (경기)
4	2018-06-18	Neuroprotective effects of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum extract on hydrogen peroxide-mediated	2018 (사)한국응용생명화학회 국제학술대회	대한민국 (제주)

		oxidative stress in neuroblastic cell line		
5	2018-07-18	Neuroprotective effects of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum extracts on scopolamine-induced memory impairment in SD rat	2018 한국실험동물학회 국제 심포지엄	대한민국 (부산)
6	2018-10-17	Ribes속 식물 감별을 위한 UHPLC-HR-MS/MS 기반 대사체학 접근	2018 한국약용작물학회	대한민국 (제주)
7	2018-11-01	The Neuroprotective effects of combined extract of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum extracts on scopolamine-induced memory impairment in SD Rats	2018 한국식품영양과학회	대한민국 (부산)
8	2019-10-23	Synergistic Neuroprotective Effect of Schisandra chinensis and Ribes fasciculatum on Neuronal Cell Death and Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Rats	2019 한국식품영양과학회	대한민국 (제주)
9	2019-04-17	The Neuroprotective Effect of Kaempferol-3-rhamnoside from Ribes fasciculatum extracts on Cognition and Memory Function in a Neurodegenerative Mouse Model	2019 한국미생물학회	대한민국 (제주)

4 제품화

	제품화	주요 내용
1	시제품	“아이에버루테인”제품은 노인성 황반변성에 도움을 줄 수 있는 기능을 지닌 건강기능식품으로 루테인을 주원료로 사용한 기존 제품에 오미자복합추출물을 부원료로 사용하여 건강기능식품을 개발함.
2	매출액	약 2억 3000만원, 개별인정 획득 전 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품을 개발하여 자사가 운영하는 사판몰에 판매

5. 고용창출

	고용인력	고용기관명	고용창출일
1	김지아	경기도경제과학진흥원	2017-12-01
2	노광태	(주)알피바이오	2017-12-04
3	정태호	(주)알피바이오	2018-01-29

6. 기술실시(이전)

	유형	기술료	주요 내용
1	전용실시권	총 2억 6천만원	경기도경제과학진흥원이 개발, 출원한 특허기술 "오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법"에 대한 전용실시권의 기술이전을 체결함.

7. 인력양성

	인력양성명	주요 내용
1	석사인력양성 (여수빈, (주)나인)비	본 연구과제 참여를 통해 오미자복합추출물을 이용한 동물실험 효능 검증 및 기전 연구에 대한 전문인력 1명 배출함

8. 정책활용홍보

(1) 박람회

	유형	행사명	개최기간	활동사항	개최장소
1	박람회	바이오코리아 2018	2018.05.04.~09	-오미자복합추출물 등의 개별인정형 -연구개발 현황 소개 건강기능식품(연질, 정제 등의 제형개발 및 제조기술 소개)	삼성동 코엑스
2	박람회	싱가포르 비타푸드 아시아 박람회	2019.09.11.~12	-오미자복합추출물 연구결과 홍보 -오미자복합추출물을 부원료로 활용한 아 이에버루테인 시제품 홍보	Sands Expo & Convention Centre at Marina Bay Sands, Singapor

(2) 홍보

	유형	매체명	홍보일	내용
1	지방일간지	경기신문	2020.01.30	- '바이오 기술이전 및 연구협력 업 무 협약'을 체결하고 바이오산업 분 야 기술 확산과 미래 먹거리 창출에 공동 협력
2		중부일보		- 경기도경제과학진흥원이 개발한 기술인 '오미자 및 칠해목 복합 추 출물의 지표성분 동시 분석 방법'에 대한 전용실시권의 기술이전 체결

9. 연구성과 추후계획

가. 건강기능식품 개발 일정 :

분류	개발항목	2020년								2021년								
		5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	
오미자추출물등복합물 제품개발	개별인정 신청	■																
	개별인정 보완 완료					■	■	■										
	개별인정 심의 진행							■										
	개별인정 허가 취득								■									
	인지능력 개선 제품 마케팅										■	■	■					
	제품 시생산 및 공정 확립												■	■				
	제품 생산 및 출시																■	■

나. 인지능력 개선 오미자복합추출물의 사업성 검토

(1) 연간 제품 생산량

(가) 원재료 : 오미자(1.4ton/년) 생산, 칠해목(1ton/년)

- 원산지 : 오미자-거창, 칠해목-괴산

- 원료구입비(건중량) : 오미자-48,000원/kg, 칠해목-31,000원/kg

(나) 기능성원료 : 오미자복합추출물로서 연간 약 1.7ton 생산 (200,000원/kg)

(다) 1일섭취량 : 오미자복합추출물로서 1,500mg/일

- 용법 및 용량 : 1일 2회, 1회 2정 (750mg/정)

(라) 중량 및 구성 : 180g (750mg X 240정), 2개월분

- 소비자가격 : 180,000원/2개월분

(마) 생산량 : 건강기능식품 연간 약 9,000개 생산 가능

(2) 제조공정 및 기능성원료 단가

(가) 수득율(부형제 포함) : 70%

(나) 기능성원료 : 오미자복합추출물로서 연간 약 1.7ton 생산 (200,000원/kg)

제조공정	투입 자원	투입 경비	연간 생산량	비고
원재료	오미자 70kg	336 만원	1.4 ton	48,000원/kg
	칠해목 50kg	155 만원	1 ton	31,000원/kg
↓ 추출	30% 추정 1,700kg			
↓ 농축				
↓				외주가공
분무건조	부형제	1,000 만원		1,000 만원/회
↓				
기능성 원료	오미자복합추출물 85kg		1.7 ton	

(3) 인지능력 개선 기능성원료 비교

기능성 원료	고시형	개별인정형			
	포스파티딜세린	참당귀추출분말(Nutrigen)	L.Helveticus 발효물	도라지추출물(RJ-AD)	참당귀주정추출분말(INM176)
기능성 등급	-	생리활성기능 2등급	생리활성기능 3등급	생리활성기능 3등급	생리활성기능 2등급
일일 섭취량	300 mg/일	800 mg/일	1 g/일	3 g/일	800 mg/일
매출액 (2015~2017년)	29.3 억	6.0 억	-	0.4 억	-
2017년	8.4 억	2.8 억	-	-	-
2016년	5.7 억	2.2 억	-	-	-
2015년	15.2 억	1.2 억	-	0.4 억	-

(4) 인지능력 개선 건강기능식품 비교

제품명	[미정]	엘트웰 인지스타 큐
제조원	(주)알피바이오	(주)팜크로스
판매원	(주)알피바이오	(주)엘트웰
중량	180g (750mg X 240정)	108g (600mg X 180정)
용법 및 용량	1일 2회, 1회 2정	1일 3회, 1회 1정
일일 섭취량	오미자복합추출물로서 1.5 g/일	참당귀추출분말로서 800 mg/일
사용기간	2개월	2개월
소비자가격	180,000원	220,000원
기능성 원료	Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid	데커신

(5) 사업화 계획

		(2021 년) 개발 종료 후 1년	(2022 년) 개발 종료 후 2년	(2023 년) 개발 종료 후 3년
내	시장점유율(%)	0.4	2	8
	판매량(단위: BOX)	2,000	10,000	40,000
	판매단가(원)	180,000	180,000	180,000
	국내매출액(백만원)	360	1,800	7,200
해	시장점유율(%)	-	0.01	-
	판매량(단위: BOX)	-	5,000	20,000
	판매단가(\$)	-	200	200
	해외매출액(백만\$)	-	1	4
당사 생산능력		원료 1.7톤	원료 3.4톤	원료 8.5톤

(6) 세부 판매 계획

- 제품에 사용되는 원재료인 칠해목의 채취시기가 한정되어 있기 때문에 원활한 원료 수급을 위해 계약 재배할 예정
- 기존 보유 영업망(약 200처 이상의 대형제약사 및 건강기능식품유통사)을 통해 기존의 인지도 개선 기능성원료보다 효능이 뛰어나고 장기복용에도 부작용이 적으며, 국내 농림자원인 오미자와 칠해목(까마귀밥나무)을 사용했음을 인터넷, SNS 등의 대중매체를 활용한 홍보 예정

3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표 달성도 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	수행 기관	연구개발 목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2017)	(주)알피바이오 (주관)	제조공정 표준화 연구	100	- 제조공정 표준화 시 설정된 조건을 토대로 scale-up하여 추출, 농축, 건조조건에 따른 수율을 비교하고, 최적의 제조공정 조건을 결정
		기능성원료의 신경세포보호활성 및 신경세포 독성 측정	100	- 과산화수소로 산화 스트레스가 유도된 신경세포에 오미자추출물과 칠해목추출물을 처리하여 LDH assay를 통한 신경세포보호활성 및 신경세포 독성을 평가 (젓산탈수소효소, 뇌 신경세포 생존율)
		기능성원료의 효능 극대화를 통한 추출물 조건별 평가	100	- 신경세포 보호 활성을 측정하여 오미자, 칠해목의 인지능력 개선 효능극대화를 위한 에탄올 추출 비율별 평가, 칠해목추출물 분획별 평가 및 최적 배합조건을 검토
		기능성원료의 신경세포의 사멸 및 괴사억제 평가	100	- FACS를 통한 세포 사멸 및 괴사를 평가 (Annexin V/PI apoptosis)
		동물모델을 통한 안전성 평가	100	- 오미자복합추출물의 안전성을 확보하기 위하여 GLP 기준의 기능성원료 동물 독성 평가 (일반독성(단회투여독성시험, 2주반복 DRF 시험), 유전독성(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)) 수행
	(재)경기도경제과학진흥원(협동)	분획물로부터 지표·유효성분 분리정제 및 구조결정	100	- 오미자 복합추출물의 원료표준화를 위해 뇌신경세포 보호활성을 나타낸 분획물로부터 얻은 8개의 분리 화합물의 구조 동정 - 분리화합물로부터 뇌신경세포 보호활성을 가지는 물질 탐색
		지표(또는 기능)성분 설정	100	- 천연물화학적인 분석방법을 통해 오미자의 지표성분으로는 함유량이 가장 많은 Schizandrin으로 정하였으며, 칠해목의 지표성분은 분리정제 후 확인된 결과에 따라 4-hydroxy benzoic acid 화합물로 설정

		표적유전자 확보 및 유전자감별법 확립	100	- 표적유전자 확보 및 유전자 감별법 확립을 위해 국내외 16종의 칠해목 및 근연종의 Blast, Neighbor joining tree 와 ITS 바코딩을 이용하여 칠해목 감별
	아주대학교 산학협력단(위탁)	기능성원료의 동물모델 유효성 평가	100	- Scopolamin로 일시적인 기억력 손상이 유도된 동물모델 구축 완료 - 일시적인 기억력 손상이 유도된 동물모델을 이용하여 오미자복합추출물에 대한 인지능력개선 유효성을 평가
	네오뉴트라(주)(위탁)	인지기능개선에 대한 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발	100	- 조사된 인체적용시험 자료 검토 및 식품의약품안전처 건강기능식품 가이드라인을 바탕으로 프로토콜 초안 작성
2차 년도 (2018)	(주)알피바이오 (주관)	제조공정 재설정 및 대량생산 시스템 구축	100	- 당을 다량 함유하고 있는 오미자의 특성으로 심한 흡습이 발생해 제조공정 재확립 및 대량생산 시스템 구축
		인체적용시험자 자료집 작성	100	- 원료표준화 및 전임상 평가자료를 바탕으로 인체적용시험자 자료집 작성
		기능성원료의 세포 사멸 및 괴사 평가	100	- 오미자복합추출물이 세포 사멸 및 괴사를 억제하여 인지능력 개선에 효능이 있음을 검증
		동물모델을 통한 안전성 평가	100	- 오미자복합추출물의 안전성을 확보하기 위하여 GLP 기준의 기능성원료 동물 독성평가 (조제물분석, 단회 DES, 13주반복투여 독성) 수행 - 시험물질을 13주동안 반복 경구투여한 결과 시험물질 투여야 기인한 독성 변화는 관찰되지 않아 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단
	(재)경기도경제과학진흥원(협동)	지표성분 설정 및 표준함량설정을 위해 정량분석 시험	100	- 지표성분의 함량설정을 위해 HPLC-UV 분석법 개발 및 분석법을 검증(Selectivity, Linearity, LOD, LOQ, Repeatability)
		제조공정 표준화를 위한 지표성분 함량 분석	100	- 제조공정 표준화를 위해 오미자, 칠해목 추출물 제조 단계별 지표성분 함량 분석
		UHPLC-MS/MS를 이	100	- 대사체분석 기법을 기반한 오미자 및 칠

		용한 오미자, 남오미자 판별법 연구 및 칠해목 식물의 판별법 연구		해목의 동속식물간의 판별기술 확립(까치밥나무 5점, 칠해목 12점, 명자순 3점, 꼬리까치밥나무 4점)
아주대학교 산학협력단(위탁)		기능성재료에 대한 동물실험 유효성 평가	100	- scopolamine으로 일시적인 기억력 손상을 일으킨 동물모델에서 오미자복합추출물 투여후 인지능개선 생리학 지표를 개선(BDNF, CREB, ERK, AKT)시켜 기억력 개선동물 실험 (모리스수중미로, 수동회피시험)에 효과를 검증
		동물효능시험 결과에 따라 인체적용시험 시 기능성 원료의 최적의 농도 설정	100	- 오미자복합추출물의 투여는 인지능력 개선에 효과가 있는 것으로 판단되며, 최적의 유효 용량은 150 mg/kg/day로 결정 - 본 시험에서 최초로 시행되는 점을 감안하여 1일 섭취량은 최종 1,500 mg/day로 설정
	네오뉴트라(주) (위탁)	인체적용시험 계획서(프로토콜)개발	100	- 인체에 대한 오미자복합추출물의 안전성과 유효성 평가를 위한 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 및 프로토콜 IRB승인
		인체적용시험 수행	100	- 인체적용시험 수행(개시모임/모니터링)
3차년도 (2019~2020)	(주)알피바이오 (주관)	오미자복합추출물을 이용한 제품 개발	100	- 개별인정 획득 전 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품을 개발하여 알피바이오가 운영하는 사판물(폐쇄물)에 판매
		원재료(오미자, 칠해목) 안전성 검사	100	- 원재료(오미자, 칠해목) 중 유해물질(중금속, 잔류농약)의 “식품의 기준 및 규격” 적합성을 검토
		오미자복합추출물 제조공정 확립(GMP 시설)	100	- 제조단계별 지표(또는 기능)성분 함량 및 수율에 따른 제조공정을 확립
		오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 기준규격 설정	100	- 공인기관인 한국기능식품연구원 분석 결과에 따라 지표(또는 기능)성분 기준규격을 설정
		오미자복합추출물의 유해물질 기준규격 설정	100	- 오미자복합추출물은 오미자 및 칠해목을 원재료로 사용하므로 재배 시 중금속(납, 총비소, 카드뮴 및 총수은), 곰팡이독소 및 잔류농약(자가규격 58종)에 오염 되었을 수 있으므로 중금속 및 잔류농약을 유해물질로

				<p>설정하였으며, 또한 제조 시 오염될 수 있는 대장균군도 유해물질로 설정</p> <p>- 공인기관인 한국기능식품연구원 분석 결과에 따라 유해물질 기준규격을 설정</p>
	인체적용시험용 식품 개발 및 제조(GMP 시설)	100	- 인체적용시험 시험식품 및 대조식품 제조	
(재)경기도경제과학진흥원(협동)	기능성 원료의 재배지별 지표물질 함량 분석	100	- 개발된 HPLC-UV분석법을 활용하여 국내 산 오미자 5개 지역, 칠해목 2개 지역의 지표물질(Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid) 함량 분석	
	HPLC를 이용한 기능성원료의 표준화	100	- 오미자, 칠해목 분석법 벨리데이션을 완료(특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 범위(Range), 정량한계(Limit of Quantitation), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 시스템 적합성(System suitability testing))	
아주대학교 산학협력단(위탁)	치매 유발 동물모델에서 기능성원료(오미자복합추출물)에 대한 전임상 유효성 평가 시험	100	원료표준화가 완료된 기능성 식품원료에 대한 3가지 혼합 비율로, 치매 유발 동물모델에서 전임상 유효성을 평가함. 기능성 원료의 전임상 시험 용량은 기존의 개별인정형 원료의 1일 섭취량을 고려하여 3가지 용량으로 시험하며 오미자복합추출물의 독성시험을 통한 안정성을 확보(최대무독성용량 NOAEL 1,000mg/kg).	
	기능성원료에 대한 동물실험 검증 및 작용기전 규명	100	- scopolamine으로 일시적인 기억력 손상을 일으킨 동물모델에서 오미자복합추출물투여 후 인지능개선 생리학 지표를 개선(Caspase-3, Bax, Acetylcholine)시켜 기억력개선동물 실험 (Y-maze)에 효과를 검증	
네오뉴트라(주)(위탁)	인체적용시험 수행 완료	100	- 프로토콜에 따른 인체적용시험 수행	
			- 인체적용시험 모니터링 실시 및 보고서 작성(모니터링 보고서, 연구상황 보고서 등)	
			- DM(Data Management) 및 통계분석	
			- 결과보고서 작성 및 결과보고 IRB 승인	

			획득
	개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청	100	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 작성 및 식약처 신청 완료
	개별인정형 건강기능식품 기능성원료 승인	85	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 검토에 따른 보완자료 작성 중

2절 목표 달성여부

(주)알피바이오 (주관)	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성원료의 제조공정 표준화 - 기능성원료의 지표(또는 기능)성분 및 유해물질 기준규격 설정 - 기능성원료의 동물 독성 평가(GLP 기준) - 기능성원료의 인지능력 개선 기전 연구(in vitro) - 인체적용시험 수행 총괄 - 기능성원료를 이용한 건강기능식품 개발 및 사업화
경기도경제과학진흥원 (협동)	<ul style="list-style-type: none"> - 뇌신경세포 보호활성을 나타낸 분획물로부터 지표/유효성분 분리 정제 및 구조결정 - 표적유전자 확보 및 유전자감별법 확립 - 기능성 식품 소재(오미자, 칠해목) 원료표준화 - 기능성원료의 지표(또는 기능)성분 분석법 밸리데이션
아주대산단 (위탁)	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성원료의 동물실험 유효성 평가 - 동물 실험에 대한 인지능 생리적/행동학적 분석 실험 및 인체 최적섭취량 설정 - 기능성원료의 인지능력 개선 기전 연구(in vivo)
네오뉴트라(주) (위탁)	<ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 및 프로토콜 IRB 승인 완료 - 인체적용시험 수행 및 결과보고서 IRB 승인 완료 - 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청 완료

3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

- 인체적용시험에서 통계적으로 유의미한 결과를 확보하기 만55세 이상~만85세 이하의 정도인 지지하자를 피험자(100 명)을 모집하기 위해 노력하였음.
- 피험자 모집이 지연될 것으로 예상되어 경희대학교와 건국대학교 병원에서 다기관 임상으로 진행하였고, 피험자 모집을 적극홍보하였음에도 피험자 모집이 지연되어 당초 종료 예정일이었던 2019년도 12월보다 약 5개월 지연된 2020년 5월에 인체적용시험 결과보고서가 IRB 위원회에 제출 되었음.
- 이후 피험자 탈락율을 고려한 통계처리를 실시하고 유효성 결과를 확보한 뒤 '오미자복합추출물'의 개별인정형 인정심의를 신청하였음.
- 현재 경미한 보완요청서를 수령한 상태이며 추가 연구없이 기존의 결과를 활용하여 보완이 가능할 것으로 판단됨.
- 2020년도 9월까지 보완자료 대응 후, 12월 내에 개별인정 원료로 인정받을 수 있을 것으로 판단함.

4장 연구결과의 활용 계획

1. 오미자와 칠해목(이하 까마귀밥나무)으로 인지능력 개선에 도움을 주는 오미자복합추출물 및 이를 이용한 건강기능식품을 개발하게 되면, 국내 농림자원의 고부가가치화를 통해 재배농가의 소득 증대와 함께 지역 경제를 활성화 가능함.
2. 인지능력 개선의 효능을 가진 오미자복합추출물의 전임상 및 임상연구 기반으로 확보된 특허 및 논문 등의 지식재산권을 활용하여 식약처로부터 건강기능식품 개별인정을 승인받은 후 오미자복합추출물을 주원료로 이용한 건강기능식품을 개발/판매 예정임.
3. 현재 시판되고 있는 인지능력 개선 치료제의 경우 간독성 등과 같은 부작용으로 장기간 사용하기에 부적합하지만, NOAEL 5,000mg/kg 이상인 오미자복합추출물을 이용한 건강기능식품이 개발되면 장기복용에도 부작용이 적으며, 국민 건강증진과 더불어 고령층의 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 기대됨.
4. 오미자복합추출물의 기능성 원료로의 판매뿐만 아니라 자체 기술이전을 통한 다양한 건강기능식품 개발에 활용할 계획임.
5. 개별인정 승인 및 다수의 홈쇼핑 성공 경험을 바탕으로 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능 및 제품인지도를 높이고 홈쇼핑 및 온/오프라인 판매채널을 통해 적극적으로 판매할 계획임.
6. 기 구축된 대형유통망((주)알피바이오)을 활용한 마케팅 전략을 통해 건강기능식품의 국내 사업화뿐만 아니라 미국, 일본, 러시아 등의 해외 시장 진출이 가능 할 것으로 전망됨.

붙임. 참고문헌

- 2014 ~ 2019 고령자 통계 - 통계청
- 2045년 노인 비중 37% ‘세계 최고’ 2067년엔 인구 절반 차지 - 국민일보
- 국민건강보험공단 보도자료(2013)
- 울산중앙병원 치매클리닉
- 김현태의 헬스케어 인사이트, KDB대우증권 리서치센터(2016)
- Euromonitor International(2013)
- 식품원재료 DB(오미자, 까마귀밥나무) - 식품의약품안전처
- 한반도의 생물다양성(오미자, 까마귀밥나무) - 국립생물자원관
- WIKIPEDIA 백과 오미자(*Schisandra Chinensis*)
- New Inhibitor against Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription from *Ribes fasciculatum* var. *chinense*.53(1).114(2005).
- 알츠하이머진단·치료기술 - 한국과학기술기획평가원
- 알츠하이머 치매 약물치료의 현황과 미래.57(1).30(2018).
- 치매극복 연구개발사업 - 한국과학기술기획평가원
- 오미자추출물((주)바이오믹스, 제2016-21호) - 식품안전나라 원료별 정보
- 한의학고전DB(동의보감) 오미자(五味子), 까마귀밥나무
- 캐나다 “National Health Products Ingredients Database(NHPID)”-오미자(*Schisandra chinensis*)
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 홍콩 Center for Food Safety(CFS)-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 일본약리학-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 스위스 Swissmedic(SMC)-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 이탈리아 Ministero Della Salute(MDS)-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 중국 China National Center For Food Safety Risk Assessment(CFSA)-오미자(五味子)
- 프랑스 The National Center For Food Safety Risk Assessment(CSFA)-오미자(*Schisandra chinensis*)
- 오미자추출물((주)바이오포트코리아, 제2018-9호) - 식품안전나라 원료별 정보
- 식품의약품안전평가원 생약연구과 오미자
- 국가생물종지식정보시스템(식물도감 상세정보) 오미자, 남오미자
- 국가생물종지식정보시스템(식물도감 상세정보) 까마귀밥나무, 까치밥나무, 명자순, 꼬리까치밥나무
- 오미자 기능(또는 지표)성분 Schizandrin 표준품정보 . Sigmaaldrich
- 까마귀밥나무 기능(또는 지표)성분 4-Hydroxybenzoic acid 표준품정보 . Sigmaaldrich
- 오미자의 물 추출조건에 따른 shizandrin, gomisin A, gomisin N의 함량 비교.30(1).59(2015)
- 오미자의 Schizandrin과 기름성분 및 추출수율 변화. 45(3).158(2000).
- PDR of Herbal Medicine 오미자(*Schisandra chinensis*)
- Global Information Herb on Integrated Med 오미자(*Schisandra chinensis*)

- WEB MD 오미자(*Schisandra chinensis*)
- TOX . INFO 까마귀밥나무(4-Hydroxybenzoic acid)
- 칠해목으로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경세포 보호용 조성물 (10-2017-0162179호)
- 대사체 분석에 의한 오미자와 칠해목의 동속 식물 구분 방법(10-2018-0145492호)
- 오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법(10-2018-0145491호)
- 오미자 추출물과 칠해목 추출물을 이용한 뇌신경세포 보호용 조성물(10-1953143호)
- 과산화수소로 유도된 SH-SY5Y 신경세포 사멸에 대한 오미자칠해목 추출혼합물의 보호효과, Korean J. Food Nutr. 31(6), 865~872
- Synergistic Neuroprotective Effect of *Schisandra chinensis* and *Ribes fasciculatum* on Neuronal Cell Death and Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Rats, Int J Mol Sci. 20(18), 4517.
- 오미자칠해목 추출물의 과산화수소로 유발된 PC12신경세포 사멸과 스크폴라민으로 유발된 렫트 동물모델에 대한 개선 효과, Korean J. Food Nutr. 33(3), 347~355.
- *Schisandra* Extract and Ascorbic Acid Synergistically Enhance Cognition in Mice through Modulation of Mitochondrial Respiration, Nutrients. 12(4), 897.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발				
	(영문) Development of health functional foods for the improvement of cognitive ability using the extract mixture of <i>Schizandra Chinesis(Trucz.) Baillon</i> and <i>Ribes fasciculatum var. chinense Maxim</i>				
주관연구기관	(주)알피바이오		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)알피바이오	
참 여 기 업	(주)알피바이오			(성명) 배문형	
총연구개발비 (1,548,000천원)	계	1,548,000	총 연구 기간	2017.06.15. ~ 2020.06.30. (3년)	
	정부출연 연구개발비	1,160,000	총 참 여 수	총 인원	27
	기업부담금	388,000		내부인원	27
	연구기관부담금	-		외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>1. 연구개발 목표</p> <p>1) 국내 농림자원인 오미자, 칠해목을 이용하여 원료표준화, 동물시험 및 인체적용시험을 통해 기능성과 안전성을 입증하고, 오미자복합추출물을 인지능력 개선에 도움이 되는 기능성원료로서 식품의약품안전처로부터 개별인정을 획득하고자 함.</p> <p>2) 국산 오미자와 칠해목의 소비촉진 및 인지능력 개선 홍보를 위해 과학적으로 기능성과 안전성을 입증하여 개별인정이 승인될 때까지 오미자복합추출물을 부원료로 사용한 건강기능식품을 개발하고자 함.</p> <p>3) 개별인정 승인 시 오미자복합추출물을 주원료로 사용하여 인지능력 개선에 도움이 되는 건강기능식품을 개발하여 산업화하고자 함.</p> <p>2. 연구개발 성과</p> <p>1) 칠해목에 대한 재배지역을 선정한 후 생육 시기별 지표성분의 변화량 확인 완료</p> <p>2) 지표성분의 함량이 유지되며 생산 수율이 20% 이상으로 확보되는 수확시기 결정 완료</p> <p>3) 각 원료별 생산 공정 최적화 완료</p> <p>4) 각 지표성분별 분석법 최적화 및 복합물의 지표성분 분석을 위한 동시 분석법 개발 완료</p> <p>5) 표준화된 오미자복합추출물을 이용한 유효성 평가를 통해 인지능 개선에 대한 효능평가 완료 (SCI/비SCI 논문 5편, 지식재산권(출원 3건, 등록 1건 완료))</p> <p>6) 장기 안전성 평가를 통한 오미자복합추출물의 무독성량(NOEL) 확보 완료(5,000 mg/kg)</p> <p>7) 경도인지저하자를 대상으로 인체적용시험을 수행하여 인지능력(ADAS-cog, ADAS-K 등)의 유의적으로 개선 확인 완료</p>					

- 8) 전문연구인력 3명 채용완료(유효성분 분리, 인지능개선 기능성평가 업무 수행)
- 9) 오미자복합추출물의 유효성 및 분석기술 확보를 위한 출원 특허 4건 완료
- 10) 주관기관의 사업화를 위한 분석기술관련 특허의 기술이전 완료(오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법)
- 11) 자생식물의 가치제고를 통한 오미자와 칠해목의 신규 기능성 확보 완료
- 12) 원재료 계약 재배를 통한 국내 농가의 매출 증대 및 농업조합의 산업 활성화 가능.
- 13) 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품 개발 및 판매 완료.
- 14) 인지능개선 기능성의 신규 건강기능식품 개발을 통해 정체된 인지능개선 건강기능식품 시장의 활성화 및 소비자의 선택폭 확대
- 15) 다양한 제형 및 제재 개발 기술력을 바탕으로 정제, 경질캡슐, 스틱분말, 젤리스트틱 등 다양한 제품을 개발 계획 수립 완료

○ 연구내용 및 결과

1. 연구내용

- 1) 오미자복합추출물의 유효성분 분리 및 기준규격 설정
 - (1) 약용식물 탐색을 통한 오미자, 칠해목의 최적 추출 및 배합비율 조건 확립
 - (2) 까마귀밥나무의 지표(또는 기능)성분 확인을 위한 분리 정제 및 구조결정 분석 방법 확립
 - (3) 원재료 표준화(식물종 확정/재배 지역/채취시기) 확립
 - (4) 지표(또는 기능)성분 설정
 - (5) 지표(또는 기능)성분 분석법 확립
 - (6) 지표(또는 기능)성분 동시 분석법 개발
 - (7) 기능성원료 대량생산 시스템 구축
- 2) 오미자복합추출물의 안전성 평가
 - (1) 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
 - (2) 오미자복합추출물의 SD 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험
 - (3) 오미자복합추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험
 - (4) 오미자복합추출물의 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험
 - (5) 오미자복합추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험
- 3) 오미자복합추출물로부터 인지능 개선 효능검증 및 기전 연구
 - (1) 오미자복합추출물의 신경세포 독성 및 보호효능 평가
 - (2) 오미자복합추출물에 따른 세포사 및 세포생존 관여 인자 확인
 - (3) Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 동물모델을 이용한 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능검증
 - (4) 오미자복합추출물의 인지능력 개선 작용기전 연구
- 4) 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발 및 산업화 연구
 - (1) 원재료(오미자, 칠해목) 안전성 검사
 - (2) 오미자복합추출물 제조공정 확립(GMP 시설)
 - (3) 오미자복합추출물의 지표(또는 기능)성분 및 유해물질 기준규격 설정
 - (4) 인체적용시험용 식품 개발 및 제조(GMP 시설)
 - (5) 인지능력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 기능성원료 개별인정을 위한 인체적용시험 심사위원회(IRB) 승인 및 인체적용시험 실시
 - (6) 인지능력 개선 건강기능식품 개별인정 기능성 원료 신청서 접수 완료

(7) 인지능력 개선 건강기능식품 시제품 개발(품목신고) 및 사업화

2. 연구결과

- 1) 최적추출조건 : 30% 주정, 최적배합비율 : 오미자 : 칠해목 = 7 : 3(고형분 대비)
- 2) 지표(또는 기능)성분 : 4-Hydroxybenzoic acid 포함 8개 성분 분리, 동정 확인(신경세포 보호효능 확인)
- 3) 식물종 : 오미자/칠해목, 지역 : 거창/충북, 사용부위 : 열매/잎, 채취시기 : 봄/봄~여름 확립
- 4) 지표(또는 기능)성분 설정 및 분석법 확립
- 5) 제조공정 표준화
- 6) 오미자복합추출물의 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회
- 7) 오미자복합추출물의 무독성량(NOEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day로 판단
- 8) 오미자복합추출물은 복귀돌연변이를 유발하지 않음
- 9) 오미자복합추출물은 마우스 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않음
- 10) 오미자복합추출물은 CHL세포에서 염색체 이상을 유발하지 않음
- 11) 뇌신경세포주에 오미자복합추출물을 처리한 후 FACS를 이용하여 세포사멸 및 세포괴사 억제효능 확인
- 12) Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 효능 검증(수동회피, 수중미로, Y maze 시험)
- 13) Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 기전연구(CREB, BDNF 등 관련 주요 바이오마커 확보)
- 14) 대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화 확립
- 15) 인체적용시험용 시제품 개발 및 제조
- 16) 경희대학교/건국대학교 병원 IRB 신청/승인 및 인체적용시험 실시
- 17) 인지능력 개선 건강기능식품 기능성 원료 신청서 작성
- 18) 시제품 개발(품목신고) 및 마케팅 전략 수립(싱가폴 비타푸드 홍보 등)

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 연구성과 활용실적

- 1) 인지능 개선에 대한 효능을 바탕으로 SCI/비SCI 논문 5편, 지식재산권(특허) 출원 3건, 등록 1건 완료함.
- 2) 본 연구과제 참여를 통해 오미자복합추출물 유효 성분 분리, 인지능 개선에 대한 기능성 평가 등에 대한 전문 인력 3명 배출함.
- 3) 국내 자원인 오미자와 칠해목을 원재료로 사용함으로써 많은 농가를 포함한 농업조합의 산업 활성화를 기대해볼 수 있음.
- 4) 출원 특허 “오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법”에 관하여 전용실시권의 기술이전을 체결함.
- 5) 만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 오미자복합추출물을 12주 간 섭취하였을 시 인지능력이 개선됨을 확인함.
- 6) 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품을 개발하였으며, 향후 건강기능식품 기능성 원료로 승인 시, 정제, 경질캡슐, 스틱분말, 젤리스티크 등 다양한 제품을 개발하여 시판할 계획임.

2. 연구성과 활용계획

- 1) 오미자와 칠해목(이하 까마귀밥나무)으로 인지능력 개선에 도움을 주는 오미자복합추출물 및 이를 이용한 건강기능식품을 개발하게 되면, 국내 농림자원의 고부가가치화를 통해 재배농가의 소득 증대와 함께 지역 경제를 활성화 가능함.

- 2) 인지능력 개선의 효능을 가진 오미자복합추출물의 전임상 및 임상연구 기반으로 확보된 특허 및 논문 등의 지식재산권을 활용하여 식약처로부터 건강기능식품 개별인정을 승인받은 후 오미자복합추출물을 주원료로 이용한 건강기능식품을 개발/판매 예정임.
- 3) 현재 시판되고 있는 인지능력 개선 치료제의 경우 간독성 등과 같은 부작용으로 장기간 사용하기에 부적합하지만, NOAEL 5,000mg/kg 이상인 오미자복합추출물을 이용한 건강기능식품이 개발되면 장기복용에도 부작용이 적으며, 국민 건강증진과 더불어 고령층의 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 기대됨.
- 4) 오미자복합추출물의 기능성 원료로의 판매뿐만 아니라 자체 기술이전을 통한 다양한 건강기능식품 개발에 활용할 계획임.
- 5) 개별인정 승인 및 다수의 홈쇼핑 성공 경험을 바탕으로 오미자복합추출물의 인지능력 개선 효능 및 제품인지도를 높이고 홈쇼핑 및 온/오프라인 판매채널을 통해 적극적으로 판매할 계획임.
- 6) 기 구축된 대형유통망((주)알피바이오)을 활용한 마케팅 전략을 통해 건강기능식품의 국내 사업화뿐만 아니라 미국, 일본, 러시아 등의 해외 시장 진출이 가능 할 것으로 전망됨.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호	317042-3			
사업구분	농림축산식품연구개발사업				
연구분야	기능성 소재 개발	과제구분	단위		
사업명	고부가가치식품기술개발사업		주관		
총괄과제	기재하지 않음	총괄책임자	기재하지 않음		
과제명	오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발	과제유형	개발		
연구기관	(주)알피바이오		연구책임자	배문형	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도		260,000	88,000	348,000
	2차연도		450,000	150,000	600,000
	3차연도		450,000	150,000	600,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		1,160,000	388,000	1,548,000
참여기업	(주)알피바이오				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 8월 10일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)알피바이오	수석연구원	배문형

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 고부가가치식품기술개발사업을 통해 천연물 복합원료 제품의 개발을 위한 원재료의 표준화 및 제조 공정의 공정 최적화를 완료하였음. 이후 오미자복합추출물이 산화스트레스에 대한 신경세포 보호효과를 확인한 후 인지기능 개선용 제품으로의 개발 가능성을 확인하였음. 또한 세포, 동물, 인체적용시험 등 다양한 유효성 평가를 통해 인지능력 개선에 대한 효능을 입증하였고 국내 연구그룹 중 처음으로 오미자와 칠해목의 복합제품을 개발하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 인지능력개선용 제품시장에 오미자복합추출물 제품을 새롭게 선보임으로써 소비자 선택의 폭을 넓혀줄 수 있으며 정체되어 있던 해당 기능성 시장에 새로운 활력소 제품이 될 것으로 기대하고 있음. 급격한 노령화에 의해 인지능력과 기억력 감퇴에 대한 불안감이 증가되고 있으나 인지기능개선 제품의 출시를 통해 사회적 불안감 해소에 기여할 것으로 판단하고 있음. 또한 국산 농산물의 원활한 공급방법을 제시하고 소비를 촉진시킴으로써 농가의 수익창출을 증대시키고 향후 농업관련 사업의 발전의 본보기가 될 것으로 판단함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구의 주관기관인 (주)알피바이오는 다양한 제품을 생산할 수 있는 생산설비를 보유하고 있으며 오미자복합추출물을 개별인정형 원료로 인정받은 후 소비자의 요구를 충족시킬 수 있는 제제 개발을 실시하여 소프트캡슐, 하드캡슐, 정제, 분말, 젤리제품 등 다양한 제품을 시장에 출시할 예정임. 폐사에서 기존에 확보된 생산 기술력과 폭넓은 영업망을 활용하여 오미자복합추출물 원료를 활용한 인지기능 개선용 제품이 기존 건강기능식품을 선도할 수 있을 것으로 기대하고 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 본 연구의 주요 연구목표인 원재료의 표준화 및 안전성 평가 그리고 유효성 평가를 수행기간 내에 원활히 완료하였으며 그중 가장 우선시 되는 안전성의 평가를 통해 NOAEL을 5,000mg/kg 으로 평가 받은바 있음. 확인된 최대무독성용량을 바탕으로 동물 및 인체의 유효성 평가를 성공적으로 완료하였고 인지기능과 관련한 다양한 지표에서 유의적인 결과를 확보하였음. 이후 해당 자료들을 활용하여 오미자복합추출물의 개별인정형 인정 취득을 위해 식약처에 심의를 신청하였고, 현재 일부 보완요청에 대한 보완을 진행하고 있음. 추가적으로 유효성 평가 결과 및 분석기술 최적화 결과를 활용하여 지식재산권 취득에 힘썼으며 다양한 연구홍보 활동을 수행하였기에 본 연구의 목표 대비 수행결과가 매우 우수하다고 판단함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- 본 연구를 통해 확보된 개발성과는 특허 4건(출원 3건, 등록 1건), 논문 5편(SCI 3편, 비SCI 2편), 학술대회 9건 등으로 효능 및 분석과 관련한 다양한 지적 소유권을 확보하였음. 또한 다양한 학술발표와 박람회 참석을 통해 본 연구의 성과를 다양한 연구그룹에 소개하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
기능성 식품소재(오미자, 칠해목) 원료표준화	10	100	- 식물종 : 오미자/칠해목, 지역 : 거창/충북, 사용부위 : 열매/잎, 채취시기 : 봄/봄~여름 확립
기능성원료의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정	10	100	- 최적추출조건 : 30% 주정, 최적배합비율 : 오미자 : 칠해목 = 7 : 3(고형분 대비)인 오미자복합추출물 제조 완료 - 지표성분(Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid) 분석법 밸리데이션 완수
동물실험 유효성 평가	10	100	- Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 효능 검증(수동회피, 수중미로, Y maze 시험)
인체 최적 섭취량 결정	10	100	- 오미자복합추출물의 투여는 인지능력 개선에 효과가 있는 것으로 판단되며, 최적의 유효 용량은 150 mg/kg/day로 결정 - 본 시험에서 최초로 시행되는 점을 감안하여 1일 섭취량은 최종 1,500 mg/day로 설정
기능성원료의 동물 독성평가(GLP 기준)	10	100	- 단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상 시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험) 시험, 13주 반복독성시험 완수 - 오미자복합추출물의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day임을 확인
인체적용시험(무작위배정, 위약대조, 12주) 완료	10	100	- 인체적용시험용 시제품 개발 및 제조 - 경희대학교/건국대학교 병원 IRB 신청/승인 및 인체적용시험 수행 완료
기능성원료의 작용기전 규명	10	100	- Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 기전 연구(CREB, BDNF 등 관련 주요 바이오마커 확보)
식품의약품안전처에 기능성 원료 개별인정 신청	10	100	- 인지능력 개선 건강기능식품 기능성 원료 신청서 작성 후 개별인정 신청
기능성원료를 이용한 건강기능식품 개발 및 사업화	10	100	- 개별인정 획득 전 오미자복합추출물을 부원료로 활용한 건강기능식품을 개발하여 알피바이오가 운영하는 사판물에 판매
기능성 원료 개별인정 승인	10	85	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 검토에 따른 보완자료 작성 중
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구를 통해 개발된 오미자복합추출물은 인지기능 개선과 관련한 유효성 결과를 국내외의 권위있는 학술지에 게재 하였으며 국내외의 박람회 참가를 통해 다양한 홍보를 실시하였음. 그 결과 오미자복합추출물이 부원료로 포함된 신규 건강기능식품의 매출이 2.3억원 이상 발생하였으며 오미자복합추출물의 사업성을 확인하는 계기가 되었음. 과제의 종료 후에도 폐사에서는 본 원료의 개별인정형 허가 취득을 위해 노력할 것이며 다양한 제형의 건강기능식품으로 개발하기 위해 후속 연구를 진행할 예정임.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 연구의 최종목표인 오미자복합추출물의 개별인정은 현재 허가 신청 후 내용 보완을 진행 중에 있음. 비록 과제 기간 내에 개별인정형 건강기능식품 허가 취득은 완료하지는 못하였으나 9월중 자료보완을 완료한 후 올해 11월 심의를 거쳐 개별인정 허가 취득을 완료할 예정임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 오미자와 칠해목을 이용한 제품의 개발은 처음 시도되는 연구며 기존의 건강기능식품 시장에 새로운 파급 효과를 가져올 것으로 기대하고 있음. 또한 노령화에 따른 인지기능의 개선 건강기능식품의 개발이 요구될 것으로 예상되는 바 다양한 제형의 제품을 개발할 수 있는 추가 지원사업이 절실히 필요 함.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보완성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

본 연구는 일반과제로 수행되었고 특허 출원 및 등록 등 일부 유효성 및 분석방법에 대한 권리는 확보되어 있으나, 원재료의 품질관리 방법 및 제품의 제조방법 등 향후 개별인정형 건강기능식품으로 개발 시 기술이 외부로 노출되었을 경우 심각한 사업적 피해가 발생할 수 있음. 이와같은 사항을 고려하여 향후 1년간의 보안 유지가 필요할 것으로 판단되어 본 연구수행 보고서의 비공개를 신청하는 바임.

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기능성 소재 개발	
연구과제명	오미자 복합추출물을 이용한 인지능력 개선 건강기능식품개발			
주관연구기관	(주)알피바이오	주관연구책임자	배문형	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,160,000,000	388,000,000		1,548,000,000
연구개발기간	2017. 06. 15. ~ 2020. 06. 30.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 기능성 식품소재(오미자, 칠해목) 원료표준화	- 식물종 : 오미자/칠해목, 지역 : 거창/충북, 사용부위 : 열매/잎, 채취시기 : 봄/봄~여름 확립
② 기능성원료의 제조공정 표준화 및 기준규격 설정	- 최적추출조건 : 30% 주정, 최적배합비율 : 오미자 : 칠해목 = 7 : 3(고형분 대비)인 오미자복합추출물 제조 완료 - 지표성분(Schizandrin, 4-Hydroxybenzoic acid) 분석법 밸리데이션 완수
③ 기능성원료의 동물 독성평가(GLP 기준)	- 단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험) 시험, 13주 반복독성 시험 완수 - 오미자복합추출물의 무독성량(NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day임을 확인
④ 동물실험 유효성 평가	- Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 효능 검증(수동회피, 수중미로, Y maze 시험) - 오미자복합추출물의 투여를 통해 확인된 최적의 유효용량은 150 mg/kg/day 임.
⑤ 기능성원료의 작용기전 규명	- Scopolamine으로 유발된 기억력 감소 SD 랫드를 이용하여 인지능력 개선 기전연구(CREB, BDNF 등 관련 주요 바이오마커 확보)

⑥ 인체 최적 섭취량 결정	- 동물 유효용량을 인체유효용량으로 변환하는 Human Equivalent Dose 변환 공식을 활용 함. - HED 변환을 통해 인체 유효용량이 1,500 mg/day로 확인됨. - 유효성과 안전성을 고려하여 해당 용량으로 인체 적용시험을 진행 결정
⑦ 인체적용시험(무작위배정, 위약대조, 12주) 완료	- 인체적용시험용 시제품 개발 및 제조 - 경희대학교/건국대학교 병원 IRB 신청/승인 및 인체적용시험 수행 완료
⑨ 개발중인 원료를 이용한 신규 건강기능식품의 부원료 사용 및 사업화 진행	- 오미자복합추출물을 부원료로 활용하여 건강기능식품을 개발하였고 온라인 쇼핑몰을 통해 판매
⑧ 식품의약품안전처에 기능성 원료 개별인정 신청	- 인지능력 개선 건강기능식품 기능성 원료 신청서 작성 후 개별인정 신청
⑩ 기능성 원료 개별인정 승인	- 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청서 검토에 따른 보완자료 준비 중

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	5		10		35	15		5	5				10		5		5		
최종목표	3	1		1		1	20		1			4	2		5		2		2	
연구기간내 달성실적	3	1		1		1	230		3			3	2		9		0		2	
달성율(%)	100	100		100		100	100		100			75	100		100		0		100	

4. 핵심기술

구분		핵심기술명
①	등록	오미자 추출물과 칠해목 추출물을 이용한 뇌신경세포 보호용 조성물(10-1953143호)
②	출원	칠해목으로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌신경세포 보호용 조성물(10-2017-0162179호)
③	출원	대사체 분석에 의한 오미자와 칠해목의 동속 식물 구분 방법(10-2018-0145492호)
④	출원	오미자 및 칠해목 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법(10-2018-0145491호)

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	○					○				
②의 기술	○					○				
③의 기술	○					○				
④의 기술	○					○	○			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	제품의 기능성 자료로 활용, 마케팅 홍보자료로 활용
②의 기술	제품의 기능성 자료로 활용, 마케팅 홍보자료로 활용
③의 기술	원재료 표준화 및 원산지 증명에 활용, 제품 품질 관리 방법으로 활용
④의 기술	원재료 및 완제품의 품질관리 표준화에 활용, 분석법 최적화에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건		건	백	백	명	백	건	건	건	건	명				

				원		만 원	만 원		만 원								
가중치	5	5	10		35	15		5		5				10		5	5
최종목표	3	3	1		3	19,200	1,700	5		1	4	2		7		5	5
연구기간내 달성실적	3	1	1		1	230		3			3	2		9		0	2
연구종료후 성과창출 계획		2			2	19,000	1,700	4		1	1			2		3	3

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	오미자 및 칠해묵 복합 추출물의 지표성분 동시 분석 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	260,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	2021년 9월 01일
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.