

발간등록번호
11-1543000-000193-01

큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 대량재배확립과
알코올성 간손상 개선을 위한 건강기능식품(개별인증형) 개발
(Optimization of cultivation technique of *Agrimonia eupatoria* and
development of a food material improving liver function from the extract)

(주)지유본초

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 대량재배확립과 알코올성 간손상 개선을 위한 건강기능식품(개별인증형) 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 30 일

주관연구기관명 : (주)지유본초
주관연구책임자 : 정 원 진
세부연구책임자 : 정 원 진
연 구 원 : 김 지 현
연 구 원 : 강 현 정
협동연구기관명 : 성균관대학교
협동연구책임자 : 이 선 미
협동연구기관명 : 성균관대학교
협동연구책임자 : 지 옥 표
협동연구기관명 : 바이오코리아(주)
협동연구책임자 : 이 민 경
협동연구기관명 : 세명대학교
협동연구책임자 : 김 형 준

요 약 문

I. 제 목

큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 대량재배확립과 알코올성 간손상 개선을 위한 건강기능식품(개별인증형) 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 목적: 큰등골짚신나물(*A. eupatoria*)을 정제수로 추출하여 알코올성 간손상으로부터 간기능 개선을 위한 건강기능성 식품을 개발하고자 함.

○ 필요성

보건의료적측면 : 우리나라의 40대 50대 주요 사망질환인 간질환(간염, 간경화, 간암)의 수가 많고 해마다 증가하는 추세임. 예방 및 치료 보조제로서 꾸준히 사용할 수 있는 간손상 개선 건강기능식품의 개발이 필요함.

사회문화적측면: 질병예방에 대한 삶의 질 향상에 대한 관심이 고조되고 있음. 특히 간질환의 심각성에 비해 뚜렷한 치료법이 없으므로 예방차원의 효능과 안전성이 검증된 건강기능식품 개발이 필요함.

산업경제적측면 : 간질환이 주로 경제활동 40~50대에 발병하여 잠재적인 경제적 피해 일임. 다년생초본으로 경제성 및 재배용이성이 확보된 신규특용작물로서 농가소득 증가에 공헌함.

과학기술적 측면: 간질환 외에도 항암, 항바이러스 효과가 탁월하여 시장확장 가능성을 지님.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 큰등골짚신나물의 재배법 확립 및 대량재배 기반 조성

큰등골짚신나물의 유전자를 조사하여 정체성을 확인하고, 발아촉진방법, 적정재식거리 등을 연구하여 재배법을 확립하고 실제 생산을 가능하게 대량재배기반을 조성함.

2. 큰등골짚신나물 수추출물의 지표성분의 확립 및 기준시험법 연구

큰등골짚신나물 수추출물로부터 플라보노이드 성분을 분리하고 각 성분의 구조를 규명하여 지표성분을 확립함. 이로부터 TLC 및 HPLC 분석법을 개발하여 기준시험법을 확립함.

3. 큰등골짚신나물의 간손상 개선능을 동물실험으로 유효성 및 작용기작 연구

liquid Lieber DeCarli diet을 이용한 알코올성 간질환모델에서의 큰등골짚신나물 추출물의 보호효과를 확인 하는 것을 내용으로 함. 혈액학 및 조직학적 평가를 통해 큰등골짚신나물 추출물의 효능을 확인하고 간 조직에서의 유전자 및 단백질의 발현 확인을 통해 이의 작용기전을 규명하는 것을 범위로 함.

4. 큰등골짚신나물 수추출물 제조에 있어서 scale-up 공정 확립 연구

대량추출공정에 있어서 공정에서 추출효율을 높이기 위해 추출 및 건조 방법을 연구함. 기준시험법의 적용연구를 위해 완제품 기준시험법에 대한 연구를 수행하여 기준시험법을 확립하고, 대량추출을 시행하면서 확립된 기준시험법을 적용하여 지표성분 함량 및 고형분 수

율의 변화를 추적함.

5. 큰등골짚신나물의 간손상 개선능에 대한 인체적용시험 연구

큰등골짚신나물추출물의 간기능개선능에 대한 인체적용시험의 프로토콜을 작성하고 예비인체적용시험을 수행함. 예비인체적용시험에서 도출된 결과로 본인체적용시험을 수행하여, 간기능개선능에 대한 큰등골짚신나물 추출물의 적정 유효량을 확정함

IV. 연구개발결과

1. 큰등골짚신나물의 ITS 유전자가 짚신나물속의 구분에 가장 적정함을 확인하고, 유전자 조사로부터 본 연구개발에서 쓰이는 품종은 *Agrimonia eupatoria*와 99.5% 동일하고 *A. pilosa*와는 93.6% 유사하였음. 종자처리방법으로는 저온층적처리가 가장 시간이 짧은 발아시간 및 높은 발아율을 보였으며, 재식거리연구에서는 45*45cm로 하는 것이 가장 효율적이었음. 대량재배 기반 조성을 지속적으로 실시하여 2011년 경남 함양군 1,200평으로부터 2013년 경남, 경북, 경기, 강원도 지역에 산재하여 27,400평으로 재배단지를 확장하였음.
2. 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올에 의해 유도된 혈중 ALT, AST 및 염증성 사이토카인의 증가 억제를 통한 간 손상 개선효능을 나타내었으며, 산화성 손상 지표인 MDA 및 CYP2E1의 활성 억제 효능을 나타냈다. 또한, 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올성 간질환 모델에서 중심적인 역할을 하는 염증 매개 신호 전달 인자인 Toll-like receptor 4 및 이의 하위기전들의 억제 효능을 보였다. 종합적으로 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올 간 손상 개선에 탁월한 효과를 나타내며, 이는 아마도 산화적 손상과 Toll-like receptor에 의한 염증성 신호경로를 억제함으로써 나타내는 것으로 여겨진다.
3. *A. eupatoria*의 메탄올추출물로부터 7개의 플라보노이드 성분을 분리하고 그들의분광학적 데이터로 분석하여 taxifolin 3-glucoside (1), aromadendrin 3-glucoside (2), quercetin 3-glucoside (3), apigenin 7-glucuronide (4), luteolin 7-glucuronide (5), quercetin 3-galactoside (6), quercetin 3-rhamnoside (7), apigenin 7-glucuronide methyl ester (8), luteolin 7-glucuronide methyl ester (9), kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside (10) and epiaromadendrin 의 성분을 확인하였다. 품질관리를 위한 지표물질로서 apigenin-7-glucuronide and luteolin-7-glucuronide를 후보로 선정하였고 그들의 함량은 각각1.04 ~ 1.31 and 0.68 ~ 0.98 %로 나타났음.
4. 건강기능식품원료로서 부형제를 포함하는 최종추출물을 위한 전처리법을 추가하고 지표물질로 Luteolin 7-glucuronide를 선정하여 기준시험법을 작성하였다. 지표물질과 추출물의 HPLC-PDA(photo diode array detector)로 확보된 chromatogram은 특이성 면에서 정확히 일치하였으며 지표물질은 0.83~83 ppm에서 상관계수 0.9998의 높은 상관계수를 보였다. 또한 시료 중의 지표물질에 대한 일내반복성의 상대표준편차(RSD)는 1.5%, 일간반복성은 0.4%로 기준시험법은 높은 재현성을 나타냈으며, 회수율은 시험된 조건에서 99.4~101.5를 나타냈다. 따라서 완성된 시험법은 큰등골짚신나물의 최종 수추출분말의 품질관리를 위한 기준시험법으로 적합한 것으로 판단된다.

전처리법이 추가된 최종 추출물 최적추출을 위하여 부형제의 함량 및 건조방법의 변화에 의한 추출수율이 변화를 측정하였다. 추출용매는 물로 추출했을 때 가장 높은 생산수율을 나타냈고, 분무건조와 동결건조는 비슷한 수율을 나타냈으나 분무건조시 maltodextrin을 60%이상 사용하는 것이 적절하였다. 부형제로 maltodextrin을 60%와 80%을 사용했을 때는 16.4%

이상의 수율을 확인하였다. 스케일업을 위하여 원료 200kg을 사용하여 3회 파일럿스케일 추출을 시행하였고 고형분 추출수율 및 지표성분의 함량을 공정단계별로 확인하였다. 최종추출 분말의 지표성분함량은 약 29.0~33.8 mg/ml이었고 고형분 수율은 약 16.3~20.0%임.

5. 큰등골짚신나물의 간손상개선능이 효과적인지 확인하기 위해 인체적용시험이 수행되었다. 80명의 피험자는 시험군과 대조군으로 나뉘어 ALT(Alanine aminotransferase)의 감소효과가 있는지 검정하기 위해 8주 동안 일주일에 2회 시험품을 복용하였다. 본 시험에서는 ALT에 유의할만한 감소의 효과를 보이지 않았다. 이는 높은 복용량 및 짧은 시험기간 때문으로, 향후 심도 깊은 인체적용시험이 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 간기능손상 개선능을 동물시험을 통해 그 유효성을 확인하였으며, 기전연구를 통해 염증반응의 억제를 통해 이루어짐을 증명하였다. 이는 본 기능성식품 인증에 중요한 진전을 이루었을 뿐만 아니라 타 기능성 원료의 간기능 손상 개선능에 대한 한 예를 보여줌으로써 해당 기능성 식품의 개발에도 촉진제 역할을 할 것이다.
2. 간기능손상 개선능을 가진 건강기능성식품 원료를 개발하기 위해서는 본 과제의 원료에 대한 성분 표준화가 필요하였다. 원료의 지표성분의 표준화를 완료하였고 이를 생산공정에 적용할 수 있는 기준시험법을 완료하였다. 큰등골짚신나물을 원료로 한 기능성 식품의 품질관리를 위한 방법을 확립하였을 뿐만 아니라 Luteolin 7-glucuronide를 표준물질로 관리하고자 하는 타 기능성식품의 기준시험법으로도 활용될 수 있다.
3. 큰등골짚신나물의 원료화를 위해 대량 재배를 위한 기반을 완성하였다. 발아방법 및 재식거리 등에 대해 확인하는 등 재배방법을 확립하였으며 현재 17,000평의 재배단지를 위탁재배를 통해 경영중이다. 이는 해당 농가의 농가소득을 증가시켰으며, 이를 거점으로 작목반 등의 구성을 통해 고용창출, 농가소득 확대 등에 기여하게 될 것이다.
4. 큰등골짚신나물의 기준시험법 등은 향후 기능성 원료 인증 후 활용시 산업체 이전 후에 상업화에 이용될 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

(1) *Agrimonia eupatoria* is a perennial plant belonging to Rosaceae Korea. Because it was introduced to Korea several years ago, the plant cultivating methods has not been established so far. We tried to establish the cultivation method.

Stratification was the best treatment among the experimented ones, showing the reduced days for sprouting and increased germination rate, as compared to non-treated seeds. The seedlings after nursery are recommended to be planted in 45 x 45 cm for both a acceptable crop yield and a convenient management.

The ITS sequence of *A. eupatoria* was compared with sequences of related *Agrimonia* species to identify the cultivated strain. From ITS region sequence similarities, strain was most closely related *A. eupatoria* (similarity value of 99.5 %).

We expanded the cultivating region from 1,700 pyung (1 pyung = 3.3 m²) to 12,000 pyung through 3 years of this project.

(2) We examined the hepatoprotective effects of agrimony water extract (AE) against chronic ethanol-induced liver injury, using Lieber-DeCarli liquid ethanol diet model. After chronic consumption of ethanol, serum aminotransferase activities and pro-inflammatory cytokines markedly increased, and those increases were attenuated by AE. Moreover, AE attenuated chronic ethanol-induced increased cytochrome P450 2E1 activity and lipid peroxidation. Our results suggest that AE ameliorates chronic ethanol-induced liver injury, and that protection is likely due to the suppression of oxidative stress and TLR-mediated inflammatory signaling

(3) Eleven flavonoids were isolated from the MeOH or 70 % MeOH extracts of *A. eupatoria*, and their structures were determined from their spectral data. Isolated compounds were identified as taxifolin 3-glucoside (1), aromadendrin 3-glucoside (2), quercetin 3-glucoside (3), apigenin 7-glucuronide (4), luteolin 7-glucuronide (5), quercetin 3-galactoside (6), quercetin 3-rhamnoside (7), apigenin 7-glucuronide methyl ester (8), luteolin 7-glucuronide methyl ester (9), kaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside (10) and epiaromadendrin (11) by comparison of their spectral data with literature values. Standard markers for quality control have been focused major and/or specific compounds in the standard extract of *A. eupatoria*. Herein, simple, rapid and reliable HPLC method was developed to determine luteolin-7-glucuronide and apigenin-7-glucuronide or luteolin-7-glucuronide alone. The contents were in the range at 1.04 ~ 1.31 and 0.68 ~ 0.98 % for apigenin-7-glucuronide and luteolin-7-glucuronide, respectively.

(4) Validation of Luteolin 7-glucuronide as a marker compound in the standardization of agrimony extract developed for functional health food was attempted by analytical method. The specificity was satisfied with retention time and photo diode array (PDA)

spectrum by analysis of quercetin using HPLC and comparison with standard compound. It showed a high linearity in the calibration curve as coefficient of correlation (R²) of 0.9986, Recovery rate test with quercetin concentration of 0.05, 0.075 and 0.1 mg/mL was revealed in the high range of 82.36~95.26%, 82.70~98.24% and 87.91~95.11%, respectively. The intra-day and inter-day precision in quercetin for agrimony extracts was 0.10~3.28% and 0.96~5.79%, respectively. Therefore, application of Luteolin 7-glucuronide was validated in analytical method as a marker compound in agrimony extracts.

Extractions in bench-scale were experimented in the view of the and and hygroscopicity of the final extraction powder. When aqueous extraction and spray-drying with 60 % of maltodextrin as excipient is applied, the yield of solid contents were higher than 16.4%. The extraction process was then scaled-up and repeated three times using pilot-scale extractor. The contents of the marker compound, Luteolin 7-glucuronid was in the range of 29.0~33.8 mg/ml.

- (5) The aim of the study was to examine whether agrimony extract is an effective, and safe treatment for liver function, especially ALT(Alanine Aminotransferase). Eighty people who have high ALT in liver function test randomised into two groups, forty from the control group and forty from the verum group, and the verum group take a capsule of agrimony extract(40% agrimony extract and 60% maltodextrin) twice a day for eight weeks, and the control group take a placebo consisted of maltodextrin twice a day for eight weeks.

The result of the study showed no statistically significant reduction of ALT in taking agrimony extract. We estimated several reasons ; first, eight weeks of medication period was shorten than twenty four weeks of general anti-hepatotoxic or other substances medication period. Second reason is dosage amount. The prior pilot study showed that ALT decreased in 4 weeks of dosage, but ALT increased after 8 weeks of dosage, assuming the amount of supplement in 8 weeks was overdose. Third, this liver functional supplement influenced a placebo effect on the study which aimed at mild liver disfunction participants with high ALT, other than severely liver damaged patients.

We found no consistent evidence of benefit from agrimony extract in mild damaged liver. The results mentioned there was no predominant effectivity or safety of hepatic functional supplement group, and drug effect was similar between agrimony extract and placebo. Further studies on agrimony extract of hepatic functional effect are considered to be necessary.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary (korean) -----	3
Summary (english) -----	6
Contents (english) -----	8
Contents (korean) -----	10
Chapter 1. Outlines of Project -----	12
I. Objective of project -----	12
II. Necessities of project -----	12
III. Scopes of project -----	16
Chapter 2. R&D Status in Korea and Overseas -----	18
I. R&D Status in Korea -----	18
II. R&D Status in overseas -----	18
Chapter 3. Contents and Results of R&D -----	19
I. Establishment of cultivation protocols and large-scale cultivation -----	19
1. Identification of the agrimony by molecular markers -----	19
2. Enhancement of germination rate by pre-treatments of seeds -----	22
3. Optimum planting density -----	24
4. Integrated cultivation methods -----	25
5. Large-scale plantation -----	26
II. Evaluation of the liver function improvement and research on their mechanisms ---	32
1. material and methods -----	32
2. results -----	34
3. discussions -----	42
III. Standardization of agrimony extract -----	43
1. separation and identification of flavonoid compounds from agrimony extract -----	43
2. development of standard test methods for quality control of agrimony extract ----	54
3. large-scale preparation of marker compound -----	62
4. records on preparations of extracts and marker compounds -----	63
IV. Research on large-scale extraction. -----	64
1. Optimization of extraction process -----	64
2. Research on large-scale extraction process -----	68
3. Validation of standard test methods for a functional food material -----	69

V. Clinical-trials on liver function improvement of agrimony extract -----	76
1. Pre-clinical trial for dose-finding -----	76
2. Clinical trial -----	80
Chapter 4. Achievement and Contribution to related field -----	93
Chapter 5. Achievement of R&D and application plan -----	94
Chapter 6. Collection of foreign information -----	106
Chapter 7. Equipments and facilities to be registered -----	107
Chapter 8. References -----	108

목 차

요약 (국문) -----	3
요약 (영문) -----	6
목차 (영문) -----	8
목차 (국문) -----	10
제 1 장. 연구개발과제의 개요 -----	12
제1절. 연구개발의 목적 -----	12
제2절. 연구개발의 필요성 -----	12
제3절. 연구개발의 범위 -----	16
제 2 장. 국내외 기술개발 현황 -----	18
제1절. 국내 관련분야에 대한 기술개발 현황 -----	18
제2절. 국외 관련분야에 대한 기술개발 현황 -----	18
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과 -----	19
제1절. 큰등골짚신나물의 대량재배법 확립 및 대규모 재배 -----	19
1. Barcoing marker에 의한 종의 동정 -----	19
2. 종자발아처리에 의한 발아율의 향상 시험 -----	22
3. 적정재식거리 규명 -----	24
4. 재배법 확립 -----	25
5. 대량재배 기반 조성사업 -----	26
제2절. 동물실험에 의한 큰등골짚신나물의 간기능 개선 효능 평가 및 작용기전 규명 ---	32
1. 재료 및 방법 -----	34
2. 실험결과 -----	34
3. 결론 -----	42
제3절. 큰등골짚신나물 추출물의 표준화방법 확립 -----	43
1. 지표성분 선정 및 화합물의 분리 -----	43
2. 품질관리를 위한 시험법결정 -----	43
3. 지표성분의 대량분리법 확립 -----	62
4. 활성시험용 추출물 및 화합물의 제공 -----	63
제4절. 큰등골짚신나물 추출물의 대량생산연구 -----	64
1. 최적추출 공정 연구 -----	64
2. scale-up 및 최적 공정 연구 -----	68
3. 기능성원료의 기준시험법 연구 -----	69

제5절. 큰등골짚신나물의 간손상 개선능에 대한 인체적용시험 -----	76
1. 복용량 결정을 위한 전인체적용시험 -----	76
2. 본인체적용시험 -----	80
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	93
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	94
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	106
제 7 장. 연구시설·장비 현황 -----	107
제 8 장. 참고문헌 -----	108

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 수추출물로부터 간기능손상으로부터 개선능을 가진 건강기능성 식품을 개발하고자 함.

제2절 연구개발의 필요성

1. 보건의료적 측면

□ 다양한 기능을 가진 인체 주요 장기 간

○ 간은 인체 내 가장 큰 선(gland)으로 여러 대사작용, 합성작용, 저장기능, 이화과정 및 배설작용의 역할뿐만 아니라, 유해물질의 해독 역할 등 인체 기능 유지에 매우 중요한 역할을 함

□ 40대 및 50대 주요 사망원인인 간질환

○ 우리나라는 다른 나라에 비해 상대적으로 간질환 (간염, 간경화 및 간암 등) 환자의 수가 많고 이는 해마다 증가하는 추세임

○ 전 세계적으로 생활수준 향상으로 인한 육류 섭취의 증가와 복잡한 현대 생활에서 오는 많은 스트레스 및 음주 등으로 간질환 등의 성인병 증가 추세임

○ 2008년 통계청에 따르면 간질환에 의한 사망자는 인구 10만명당 14.5명으로 전체 사망률 8위를 차지하였고, 40대와 50대에 있어서는 각각 인구 10만명당 19.5명과 35.4명으로 전체 사망 원인중 3위와 2위를 차지하였음

○ 특히 우리나라의 50대 남성의 간질환 사망률은 여성의 비해 매우 높은 수치로 인구 10만명당 63.9명으로 집계되어 심각한 수준임

□ 간질환의 종류와 증상

○ 간질환은 급성 간질환과 만성 간질환으로 분류되며 급성 간질환으로는 간염 바이러스나 약물에 의한 급성간염이 대표적이고, 만성 간질환으로는 과음에 의한 지방간, 간경변증 및 간암 등이 대표적임

○ ‘침묵의 장기’라고 불리는 간의 특성상 간질환 초기에는 대부분 자각 증상이 없어 치료에 많은 어려움이 있으며 그 증상이 나타났을 때는 이미 간전반에 걸쳐 손상이 심각한 상태로 진행된 상태 <그림 1. 간 손상의 단계>가 대부분임

○ 간질환에서 나타나는 증상으로는 피로감, 전신쇠약감, 식욕감퇴, 메스꺼움, 구역, 소화불량, 복부 불편감 등이 있으나 이러한 증상들은 간질환에서만 특이적으로 나타나는 것은 아니며, 간질환에 특징적으로 나타나는 증상으로는 오른쪽 윗배에 둔탁한 통증, 눈동자와 피부가 노래지고, 소변색이 갈색으로 짙어지는 황달 등이 있음

□ 알코올성 지방간(Alcoholic fatty liver)

○ 지방간은 간세포의 세포질 내에 중성지방 및 콜레스테롤 등의 비정상적 축적으로 일어나며, 임상적으로 간조직의 생검이나 간절제술 검체의 상당수에서 소량의 지방 축적이 관찰됨. 특히 지방간은 알코올성 간질환 중 흔히 볼 수 있는 소견이며(전체 간질환에서도

두 번째로 높은 빈도), 비만이나 당뇨 및 약물 그림 1

들에 의해서도 유발됨

○ 잦은 음주로 인한 알코올성 지방간의 경우 대부분의 지방간은 특별한 임상증상이 없으며 일부의 경우 가벼운 피로감이나 우상복부의 불편감이 있지만 가역적 변화로서 원인을 제거하면 다시 정상 간으로 비교적 쉽게 회복되므로 임상에서는 지방간 자체를 심각하게 여기지 않고 있음. 그러나 지방간이 심해지면 세



포 속의 축적된 지방으로 인하여 간세포 사이에 있는 미세혈관과 임파선을 압박하여 간내의 혈액과 임파액의 순환에 장애가 생기게 되며, 그 결과 간세포는 산소와 영양공급을 적절히 받을 수 없어 간기능이 저하됨

○ 지방간의 경우 간염, 외상, 속과 허혈 및 재관류 등 간의 이차적 손상이 가해질 경우 정상간에 비해 더욱 심각한 손상이 일어남. 한 예로 지방간을 가진 환자는 간 절제술 후 정상간을 가진 환자(2%)에 비해 사망률이 무려 7배 가량(14%) 높은 것으로 나타남 (Selzner & Clavien, Semin. Liver Dis., 2001, 21:105-113).

○ 최근 WHO의 전 세계 알코올 소비량에 대한 보고에서 한국은 공식적으로 2위의 술 소비량을 나타내어 알코올과 관련된 여러 건강상의 문제에 관심이 모아지고 있고, 알코올에 의한 지방간의 발병은 계속적으로 증가하고 있는 실정이나, 현재까지 알코올성 간질환에 대한 치료제는 금주와 스테로이드를 제외하곤 효과적인 치료제가 없음.

○ 다음 통계(표 1)에서 보는 바와 같이 우리나라의 알콜성 간질환이 매년 증가하고 있음을 볼 때건강 기능식품의 개발로 병변 후 치료 이전에 평소에 꾸준히 사용하게 하여, 간기능의 회복을 도와 줄 수 있도록 하여야 할 것으로 사료됨.

표1. 알코올 관련 질환 진료비 : 알코올성 간질환 (K70, 193) (단위 : 명, 일, 천원)

연도	구분	진료 실인원 (patients)	진료건수 (cases)	총 진료비 (treatment amount)	1건당 진료비	1인당 진료비
1999	계	170,695	341,958	35,283,447	103	207
	입원	20,848	27,888	19,699,845	706	945
	외래	157,588	314,070	15,583,601	50	99
2000	계	161,644	316,795	30,493,428	96	189
	입원	19,388	26,416	18,472,023	699	953
	외래	149,372	290,379	12,021,405	41	80
2001	계	169,088	346,379	30,482,167	88	180
	입원	19,304	25,893	20,591,246	795	1,067
	외래	157,387	320,486	9,890,921	31	63
2002	계	179,389	361,884	29,939,875	83	167
	입원	19,590	26,519	20,076,907	757	1,025
	외래	167,973	335,365	9,862,968	29	59
2003	계	194,908	401,624	33,447,592	83	172
	입원	20,226	27,619	22,708,302	822	1,123
	외래	183,493	374,005	10,739,290	29	59
2004	계	189,544	403,031	35,813,069	89	189
	입원	20,402	28,860	24,860,983	861	1,219
	외래	178,203	374,171	10,952,086	29	61
2005	계	188,174	402,485	37,838,898	94	201
	입원	20,248	28,029	26,235,938	936	1,296
	외래	177,078	374,456	11,602,960	31	66
2006	계	180,623	391,306	44,305,303	113	245
	입원	19,832	28,037	32,225,181	1,149	1,625
	외래	170,075	363,269	12,080,122	33	71
2007	계	189,350	441,869	49,749,161	113	263
	입원	20,200	29,080	36,600,737	1,259	1,812
	외래	178,818	412,789	13,148,424	32	74

출처 : 국민건강보험공단, 건강보험통계연보, 각년도

주 : 1) 1건당 진료비= 진료건수/총 진료비

2) 1인당 진료비= 진료실인원/총 진료비

2. 사회, 문화적 측면

□ 질병 예방을 통한 삶의 질 향상에 대한 관심 고조

- 현대에는 질병의 치료보다는 예방에 대한 중요성이 강조되고 있음
- 특히, 간질환의 심각성에 비해 뚜렷한 치료법이 없으므로 건강기능식품을 포함한 예방 차원 및 간기능 개선에 대한 관심이 높아짐

□ 안전성 및 유효성이 검증된 간기능 개선제 및 간질환 치료제 필요

- 간기능 개선을 위한 여러 방안들이 제시되고 있으나 뚜렷한 치료법이 없는 가운데 관심에 비례하여 많은 기능 증진 식품들이 판매되고 있는 현황임
- 최근 효능과 안전성이 검증되지 않은 간질환 치료제 및 기능성 식품 등이 난립하고 있으며 이들의 과장, 허위 광고로 국민 건강이 큰 혼란에 처해 있음

3. 산업, 경제적 측면

□ 간질환에 따른 잠재적인 경제적 피해

- 경제활동 주체인 40대와 50대의 환자가 특히 많아 잠재적인 경제적 피해가 막대함

□ 간질환의 지속적 증가에 따른 국민 의료비 증가

- 간질환이 진행되면 간경화가 발생되고 다양한 합병증을 초래함

○ 간경화는 말기 간질환의 공통적 특징으로 이는 더 이상의 치료가 불가능하여 간이식 수술을 통해서만 치료됨(End Stage Liver Disease: ESLD)

□ 국내외 간기능 개선 건강기능식품 개발로 시장성 확보 및 고부가가치 창출

○ 최근 간보호 기능시장의 성공사례를 보면 한국야구르트가 출시하여 수천억원대의 매출을 이룬 쿠파스의 주원료인 헛개나무열매의 사례처럼 시장성이 매우 큼

○ 농가의 소득증대를 위해서는 시장수요가 있으면서 수익성이 보장되는 신규 특용작물의 발굴이 필요함.

○ 큰등골짚신나물은 다년생풀로서 생약규격집에 수재된 약재이며 식품공전에 식용가능 식물로 등재되어 있으나, 재배가 이루어지지 않고 있어 특용작물로 개발 가능함.

4. 과학기술적 측면

□ 탁월한 간기능 개선 및 간질환 치료제 부족

○ 현재 과학적으로 효능이 입증되지 않은 간장 기능성 식품이 난무하고 있는 상태이며, 국내외에서 간질환 치료제로 이용되는 합성 약물로는 malotilate 와 interferon이 있으나 이들은 간독성 물질에 대한 보호 작용만으로 유효성을 인정받고 있는 수준이며 많은 경우 인체에 독성을 나타내고, 치료 중단시 rebound 현상이 발생하기도 함

□ 천연물로부터 간기능 개선 및 간질환 치료제 개발의 필요성

○ 천연물은 화학 물질에 비해 부작용이 적고, 고래로부터 이미 임상 효과가 증명되어 있으며 최근 과학적 연구가 활발히 이루어지고 있어 간기능 개선 및 치료제 개발에 매우 유리함

○ 국내외에서 간질환 치료제로 이용되고 있는 약물에는 천연물 유래 합성 간질환 치료제인 DDB를 비롯하여 천연물로부터 분리된 물질이 높은 비중을 차지하고 있음

○ 본 연구진은 2005년부터 식품의약품안전청 주관 “한약재 평가 기술 과학화사업”의 수행으로 전통적 사용에 근거한 한약재를 현대 과학 기술을 이용하여 효능을 과학적으로 규명하고 있음

□ 큰등골짚신나물의 적합성

○ 선학초는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 속근초로서 짚신나물(*Agrimonia pilosa* Ledebour) 또는 기타 동속식물의 전초를 말하며 이를 통틀어 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초 등으로 불리움. 짚신나물(*A. pilosa*), 큰등골짚신나물(*A. eupatoria* L.), 산짚신나물(*A. coreana* Nakai.) 등이 이에 속함 <그림 2. 큰등골짚신나물>

○ 전통적으로 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지형, 지사, 토혈, 혈뇨, 자궁출혈, 결기 등의 약용으로 널리 이용되어 왔으며, 항바이러스 효과, 항종양효과, 당뇨치료의 효과가 보고된 바 있음.

○ 본 과제의 연구진은 큰등골짚신나물의 수용성 추출물이 화학적으로 간장해가 유도된 동물 시험모델에서 대표적 간손상 지표인 AST, ALT의 수치의 상승을 억제시킴으로써 간기능 보호효과를 나타내는 것을 보고함(Kang *et al.*, 생약학회지, 2006, 37(1) : 28~32, 논문 첨부함)

○ 선학초의 일종인 짚신나물(*A. pilosa*)의 뿌리 추출물이 LPS로 유도된 세포독성 모델에서 iNOS의 발현억제와 활성 산소 생성 억제로 염증반응을 억제함이 보고됨(Jung *et al.*,



Immunological Investigations, 2010, 39(2) : 159-170)

○ 짚신나물(*A. pilosa*)의 활성성분인 agrimonolide는 isocoumarin계열로서 tacrine으로 유도된 간세포 독성모델과 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 간세포 독성모델에서 간보호 효과를 나타내었음이 보고됨(Park et al., Arch. Pharm. Res., 2004, 27: 944-946)

5. 세부과제의 개별적 필요성 측면

□ 건강기능식품으로서 개별인증 획득 필요성

○ 선학초는 중국약전에 해독작용이 있는 것으로 소개되어 있으나 현재 간보호 기능이 밝혀져 현재 국내에 관련 특허 2건(바이오코리아 등록)이 등록되어 있음.

○ 특허등록에 의해 보호되는 큰등골짚신나물의 안전성과 효능은 이미 국내 최대 규모의 건강기능식품회사인 한국인삼공사에서 재확인되어 신제품개발을 완료하고 제품출시를 조율 중이나, 본격적인 시장 확대를 위해서는 효능 광고를 할 수 있는 개별인증형 획득이 절실함.

□ 종자의 발아율 향상, 재배법확립의 필요성

○ 큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 자연발아율은 상당히 불량하여 종자발아율 향상실험이 필요함.

○ 선학초들 중 *Agrimonia pilosa*(짚신나물)의 경우 재배법이 확립되어 있으나, 정작 간보호 기능이 뛰어나 특허가 획득된 큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*)의 경우 재배법이 확립되어 있지 않음.

○ 현재 큰등골짚신나물 계약재배를 위해 (주)지유본초가 충남 홍성(2만평), 경남 함양(3만평), 경북 영양(15만평)을 확보한 상황으로 원활한 농가재배를 위해서는 대규모 재배법 및 친환경농법에 의한 고부가가치의 재배법을 확립하는 것이 필요함

□ 스케일업의 필요성

○ 큰등골짚신나물 추출물은 전초를 수추출하여 분말화시키는 실험실 규모의 공정은 확립되어 있으나, 상업용도의 대량추출기술은 개발이 필요함.

제3절 연구개발의 범위

□ 큰등골짚신나물의 재배법 확립 및 대량재배 기반 조성

- 실험 대상인 짚신나물의 동정
- 재배단계에서 핵심적인 발아촉진 방법의 탐색
- 본밭재배에서 적정 재식거리 규명
- 큰등골짚신나물의 재배법 확립
- 대량재배 기반 조성

□ 큰등골짚신나물 수추출물의 지표성분의 확립 및 기준시험법 연구

- 큰등골짚신나물 추출물로부터 지표성분 후보의 분리 및 구조 규명
- 큰등골짚신나물 추출물의 품질관리를 위한 기준시험법 개발
- 지표성분 대량분리

- 큰등골짚신나물의 간손상 개선능을 동물실험으로 유효성 및 작용기작 연구
 - 알코올성 간손상에 대한 개선능의 유효성 입증
 - 알코올성 간손상에 대한 기작의 혈액학적, 유전학적 연구

- 큰등골짚신나물 수추출물 제조에 있어서 scale-up 공정 확립 연구
 - 최적 추출방법의 연구
 - 스케일업 공정 연구
 - 완제품으로서의 원료에 대한 기준시험법의 밸리데이션

- 큰등골짚신나물의 간손상 개선능에 대한 인체적용시험 연구
 - 적정 복용량 결정을 위한 전인체적용시험 연구
 - 간손상 개선능에 대한 본 인체적용시험

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제1절. 국내 관련분야에 대한 기술개발 현황

현재 국내적으로 일부 한국산 짚신나물(*Agrimonia pilosa*)에 대해서는 음식재료로서의 연구와 분류 및 재배법 등으로 조사된 적이 있으나, 큰등골짚신나물에 대한 연구개발은 전무한 상황이다.

간기능 개선에 대한 연구는 1990년대에 본격적으로 진행되기 시작했으며 2000년대에 눈에 띄게 증가하였으나 2010년 전후로 그 수는 줄어든다. 그러나 내용에 있어서 초기에는 한국 천연자원을 이용한 간기능개선의 규명에 초점이 맞추어졌다면 현재는 완제품으로서의 개발과제들이 주를 이루고 있다.

간기능 개선 개별인정형 건강기능식품의 개발은 한국 성인의 3번째 성인사망률을 차지하고 있는 만큼 그에 대한 연구개발은 활발한 편이다. 이미 2008년 생명의나무에서 헛개나무과병 추출물로 알콜성간손상의 보호기능으로 개별인정을 획득했으며, 야구르트 음료의 주성분으로 상업화되어 시장에서 선도적인 위치를 차지하고 있다. 표고버섯균사추출물로 마그나스히디스에서 간건강에 도움을 줌으로 2009년 개별인증을 받았으며, 렉스타이오텍 등에서 밀크씨슬추출물로 2009년 간건강에 도움으로 또한 개별인증을 획득하였다. 헛개나무과병 추출물 이후에 많은 간기능개선원료물질이 인정되었는데, 브로콜리스프라우트 분말, 복분자추출분말, 유산균발효다시마추출물이 이들이다. 현재까지 개발된 간기능개선 및 보호용의 기능식품은 간세포가 쉽게 파괴되지 않도록 생존률을 높이는데 도움을 주는 것으로 나타난다.(식품의약품 안전청 홈페이지)

최근에는 전남 화순 한국인스팜은 발효 울금으로부터 간 기능 개선능을 확인하고, 간기능 개선 생리활성 개별인정형 건강기능식품 인정을 2013년에 획득했다.

제2절. 국외 관련분야에 대한 기술개발 현황

해외에서 간기능개선능에 대한 연구는 식품연구보다는 의학과 약학에서 활발하게 이루어지고 있다. 현재 국내에서 높은 점유율을 보이는 UDCA(우루사, 대웅제약), DDB(부광약품, 레가논), Silymarin(태평양제약, 리비탈)등이 이러한 연구개발로부터 출발하였다. 이러한 의약품으로서의 간기능개선물질을 탐색하고 개발하는 회사로는 독일회사인 Merck, Hoechst Aktiengesellschaft이 70~80년대를 전후에서 연구개발을 시작하였으며, 90년대 들어서 Schering, Ono Pharmaceutical, 베링거 인겔하임, 캘리포니아 대학 등이 주도로 간기능 관련 연구개발을 지속적으로 진행해오고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 큰등골짚신나물의 대량재배법 확립 및 대규모 재배

1. Barcoding marker에 의한 종의 동정

가. 연구방법

○ 적정 Barcoding 타겟 유전자조사

- matK, trnL, rbcL, ITS 유전자의 genbank 등록 염기서열을 대상으로 *Agrimonia* 내 종간 변이를 분석하여 적절한 타겟 유전자를 조사한다.

○ ITS 유전자에 의한 염기서열 결정

- DNAeasy Plant DNA Mini kit(Quiagen)를 이용하여 큰등골짚신나물과 야생에서 채취된 *Agrimonia pilosa*의 채취된 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다.
- ITS region은 ITS1.LEU(5'-GTCCACTGAACCTTATCATTTAG-3', Urbatsch et al, 2000) ITS4(5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3', white et al. 1990) primer로 유전자로 증폭(94°C, 3min.; 35 cycles of(94°C, 40sec.; 55°C, 40sec., 72°C, 1min.); 72°C, 10min.)하고, Dyne PCR purification kit(DyneBio)로 정제하였다. ITS1.LEU, ITS4, ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), ITS3B(5'-GCATCGATGAAGAACGTAGC-3') 4개의 primer를 사용하여 증폭되게 염기서열을 분석하였다.

○ 집괴분석(Cluster analysis)

- 분석된 ITS유전자를 다른 *Agrimonia* 종들과 유연관계를 분석하기 위하여 alignment(clustalW program)하고, Kimura distance를 구해 Neighbor joining algorithm(Phydit program)에 의해 phylogenetic tree를 구성하였다.

○ Barcoding marker 탐색조사

- 현재 장미과의 분류 및 동정에 많이 쓰이고 있는 유전자를 genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)로부터 검색하였으며, 탐색을 고려할만한 유전자로서 chloroplast DNA에 encoding 되어 있는 tRNA-Lys유전자의 intron 내에 위치한 maturase K gene(*matK*), chloroplast DNA의 ribulose-bisphosphate carboxylase Large subunit gene(*rbcL*), chloroplast DNA의 tRNA-Leu gene (*trnL*) 및 internal transcribed spacer(ITS)를 선택하였다. 각 유전자의 속내 종간 변이도를 측정하기 위해 분석한 염기서열은 다음과 같다(표 1.1).

나. 결과

표 1.1. *Agrimonia* 속 종의 계통분류학적 연구 및 종간 변이 연구를 위해 사용된 유전자 목록.

Title	Accession Number	Species	sequence size
matK			
<i>A. eupatoria</i> 1	JN893958	<i>A. eupatoria</i> NMW4404	809
<i>A. eupatoria</i> 2	JN894402	<i>A. eupatoria</i> NMW009	688
<i>A. pilosa</i> 1	GQ434190	<i>A. pilosa</i> var. <i>pilosa</i> PS1087MT03	739
<i>A. pilosa</i> 2	GU363764	<i>A. pilosa</i> var. <i>pilosa</i> PS1087MT08	834
<i>A. nipponica</i>	AB073682	<i>A. nipponica</i>	1488
<i>A. gryposepala</i>	HQ593157	<i>A. gryposepala</i> AP223	776
rbcl			
<i>A. eupatoria</i> 1	JN891277	<i>A. eupatoria</i>	542
<i>A. eupatoria</i> 2	JN890695	<i>A. eupatoria</i>	524
<i>A. pilosa</i>	GU363799	<i>A. pilosa</i> var. <i>pilosa</i>	703
<i>A. parviflora</i>	U06791	<i>A. parviflora</i>	1398
<i>A. gryposepala</i>	HQ589939	<i>A. gryposepala</i>	607
trnL			
<i>A. eupatoria</i>	AJ512216	<i>A. eupatoria</i>	910
<i>A. coreana</i>	HQ853220	<i>A. coreana</i>	935
<i>A. incisa</i>	HQ853221	<i>A. incisa</i>	892
ITS			
<i>Aremonia agrimonioides</i>	U90799	<i>Aremonia agrimonioides</i>	598
<i>A. eupatoria</i>	U90798	<i>A. eupatoria</i>	660
<i>A. pilosa</i>	GU363705	<i>Agrimonia pilosa</i> var. <i>pilosa</i>	287
<i>A. parviflora</i>	AY634863	<i>A. parviflora</i>	687

- 각 유전자별로 alignment(clustalW program)를 하고, 유사도를 측정하였다.(표 1.2)

표 1.2. *Agrimonia* 속내에서 각 유전자들의 유사도 표. 대각선 아래쪽에는 염기서열 유사도를 대각선 위부분은 유전자의 비교염기서열수 중에 차이가 나는 염기서열의 수를 표시한다.

a) matK gene							c) trnL gene			
	<i>A. eupatoria</i> 1	<i>A. eupatoria</i> 2	<i>A. pilosa</i> 1	<i>A. pilosa</i> 2	<i>A. nipponica</i>	<i>A. gryposepala</i>		<i>A. eupatoria</i>	<i>A. coreana</i>	<i>A. incisa</i>
<i>A. eupatoria</i> 1	---	1/687	0/670	0/688	0/688	1/688	<i>A. eupatoria</i>	---	2/909	3/879
<i>A. eupatoria</i> 2	99.85	---	1/739	2/806	2/809	2/746	<i>A. coreana</i>	99.78	---	4/891
<i>A. pilosa</i> 1	100	99.86	---	0/739	0/739	1/729	<i>A. incisa</i>	99.66	99.55	---
<i>A. pilosa</i> 2	100	99.75	100	---	0/834	1/774				
<i>A. nipponica</i>	100	99.75	100	100	---	1/776				
<i>A. gryposepala</i>	99.85	99.73	99.86	99.87	99.87	---				

b) rbcL gene					d) ITS				
	<i>A. eupatoria</i> 1	<i>A. eupatoria</i> 2	<i>A. pilosa</i>	<i>A. parviflora</i>	<i>A. gryposepala</i>		<i>A.eupatori</i>	<i>A.pilosa</i>	<i>A.parviflo</i>
<i>A. eupatoria</i> 1	---	0/524	3/542	1/538	1/542	<i>A.eupatori</i>	---	12/151	119/601
<i>A. eupatoria</i> 2	100	---	3/524	1/524	1/524	<i>A.pilosa</i>	92.05	---	33/161
<i>A. pilosa</i>	99.45	99.43	---	2/693	2/607	<i>A.parviflo</i>	80.2	79.5	---
<i>A. parviflora</i>	99.81	99.81	99.71	---	0/603				
<i>A. gryposepala</i>	99.82	99.81	99.67	100	---				

- 기존의 Rosacease(장미과)에서 분자생물학적 분류에 관련한 기존 연구들에서와 마찬가지로, *matK*, *trnL*, *rbcL* 유전자는 *Agrimonia* 속 내에서 종간 구분을 위한 마커로는 부적합하게 나타났다. *matK*의 경우 1~2 bp, *trnL*의 경우 2~4 bp, *rbcL*의 경우 1~3bp의 염기서열에서만 변이가 나타나, *Agrimonia* 속을 다른 속으로부터 구분하기 위한 마커로는 유효하나 종간 DNA barcoding 용으로는 부적합하였다. 그에 반해 유일하게 ITS region의 경우 12~119 bp의 차이가 나서 종간 구분에 충분한 변이를 제공하였다. 따라서, 큰등골짚신나물의 DNA barcoding을 위해서 ITS를 증폭하여 염기서열을 분석하거나 RFLP 분석을 실시

하기로 결정하였다..

○ ITS 유전자의 염기서열 결정

- ITS(internal transcribed sequece)를 분자생물학적 종동정을 위한 유전자로 선택하였다.
- DNA는 DNAeasy Plant DNA Mini kit(Quiagen)를 이용하여 재배된 큰등골짚신나물의 채취된 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. ITS유전자는 ITS1.LEU (Urbatsch *et al*, 2000) ITS4(white *et al*. 1990) primer로 유전자로 증폭하였다. 증폭된 유전자는 약 0.8kb의 크기였다. Dyne PCR purification kit(DyneBio)로 정제하였고 각 방향으로 중복하여 염기서열을 분석하였다(그림 1-1)

```
GTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTC
CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTGACCTGCCCGCAGAACG
ACCCGAGAACCCGTTTCGACGCTCGGGGACGGAGGGGGCCCAAGCGGTCG
CCCCGTCCCCGCATCTCGGGAGGCGAGGGCCTATGAAAACGCGTGTGCGG
CCTCGGCGCTTACGCCCGGCCGAGCCTCCCGGGCGTACCGAACACCGGCG
TGAATTGCGCCAAGGAACGTGAACGGAAGGGCGTTCCCCCGCCGTCCCG
GAGACGGTGTCCGTGCGGGCGGGCTGCGTCGCCTTCGATATGTCTAAACG
ACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA
AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTT
GAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGG
CGTCACACGTCGTTGTCCCGCCCCGACACGTCCTCTCGTAAAAGGGAGGC
GGGTCTGGACGGGACGGATGATGGCCTCCCGTGTGCCCGTCACGCGGCC
GGTATAAAAACAGAGTCCTCGGCGCCAACGCCTCGACGATCGGTGGTTG
TCCAGACCTCGGTTTCCCGTCGTGCGGGGCGTCGTCCGTGGGGCTTTCC
CGATGCGCGTCGGTTCCGACGCTCCCAACGCGACCCAGGTCAGGCGGGG
TCACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA-3'
```

그림 1-1. 과제에서 사용된 *Agrimonia* 재배종의 ITS 염기서열

- 분석된 ITS region를 다른 *Agrimonia* 종들과 유연관계를 분석하기 위하여 alignment(clustalW program)하고, Kimura distance를 구해 Neighbor joining algorithm(Phydit program)에 의해 phylogenetic tree를 구성하였다(그림 1-2).

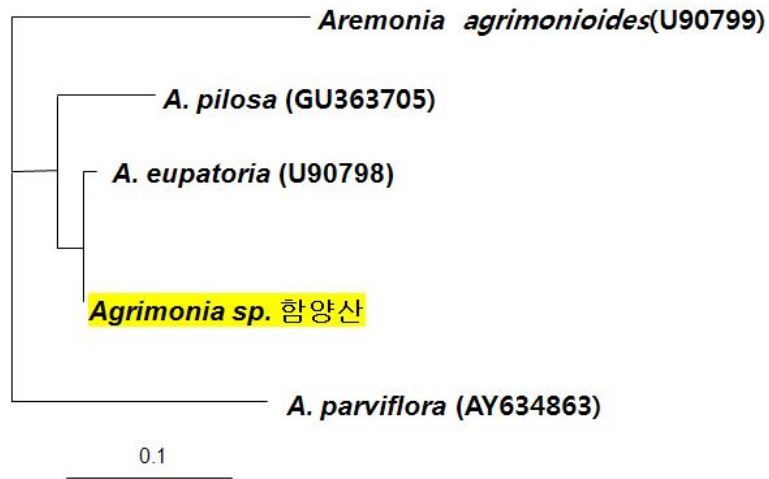


그림 1-2. 해당 *Agrimonia* 종과 *Agrimonia* 속 근연종의 Neighbor joining tree. Genebank 등록번호는 괄호 안에 표시된다. 외그룹으로 *Aremonia agrimonioides*가 사용되었다.

- 본 종의 염기서열은 *A. eupatoria*의 기준종과 3 bp(99.5% similarity)만 차이가 날 뿐이어서, 본 종도 역시 *A. eupatoria*임을 확인하였고, *A. pilosa*와는 비교된 202 bp 중 12 bp(93.6% similarity), *A. parviflora*(90.0%)와는 68/687의 차이가 나, ITS유전자가 충분히 finger print를 위한 유전자로 사용할 수 있음을 확인하였다. ITS유전자는 원료관리를 위한 좋은 방법임을 알 수 있었다. 향후 이는 *A. pilosa*가 대부분을 차지하는 국내의 다른 야생에 서식하는 또는 재배되고 있는 *Agrimonia* 종으로부터 본 과제의 식품원료로 사용되는 큰등골짚신나물을 구별하기 위한 기본자료로 이용될 수 있다. 품질관리 측면에서는 HaeIII 등의 제한효소에 의해 빠른 시간에 원료의 품질검사 방법을 제공한다.

2. 종자발아처리에 의한 발아율의 향상 시험

가. 연구방법

○ 저온층적처리 및 무처리 그리고, 냉동처리에 의한 종자의 휴먼타파를 시험하였다. 종자는 전년에 시험재배단지에서 수확하여 실내상온에서 보관하였던 종자를 사용하였다.

- 방법1: 저온층적처리

저온층적처리는 사각상자에 모래와 종자를 혼합하고 물을 충분히 준 다음 4℃ 냉장고에 넣은 후 표면이 마르지 않도록 5일 간격으로 수분을 공급하였다. 처리방법은 얇은 망사 자루에 넣은 후 흐르는 수돗물에 2일간 방치하여 유수처리 하였으며, 저온처리는 2일간 유수처리 한 종자를 젖은 신문지에 싼후 4℃ 냉장고에서 2일간 처리하였다.

- 방법2: 노지직파

채종되어 상온에서 보관된 종자를 특별한 처리 없이 바로 모종상에 3~5알씩 파종하였다.

- 방법3: 냉동처리

상온에서 보관된 종자를 물에 담근후 바로 꺼내 물기를 털 후에 냉장고에 4시간(-20C) 처리한 후에 24시간 냉장고에 보관하는 것을 2번 반복 한 후 즉시 파종상에 3~4알씩 파종하였다.

○ 모종상 파종

- 처리방법에 따른 발아후의 생육을 알아보기 위한 포장시험은 발아실험에서 처리한 종자를 모래:산흙:피트모스를 1:1:1로 배합한 상토를 넣은 모종상에 과중하고 온실에서 40일간 배양하며 발아한 비율을 측정하였다.

- 발아처리방법에 따른 발아후의 생육을 알아보기 위한 포장시험은 발아실험에서 처리한 종자를 모래:산흙:피트모스를 1:1:1로 배합한 상토 및 시중에서 쉽게 구할 수 있는 재료인 펄라이트:질석:피트모스를 1:1:1로 배합한 상토에 구분하고 연결트레이에 3~5알씩 조파하여 40일간 배양하여 발아한 비율을 측정하였다.

나. 결과

- *Agrimonia pilosa*(짚신나물)의 경우 저온처리를 하면 발아율 13%, 발아소요기간 27일이 걸리던 것을 20일간의 저온층적처리(stratification)를 하면 발아율이 80~86%로 높아지고, 발아소요기간은 10일로 짧아지는 것이 밝혀져 있었다(선학초 순화재배법 확립과 부가가치 향상을 위한 기능성물질 탐색 및 제품개발, 경상대학 농림부 연구보고서, 2008). 그러나 아직 큰등골짚신나물의 경우 그러한 시도가 없었고, 본 과제의 대상인 큰등골짚신나물(*A. euparia*)의 경우 현재까지 노지에 직파를 실시해오고 있었다. 충남 홍천군에 농민과 계약재배를 하고자 노지에 직파를 하였으나 심각한 발아율의 부진과 장시간(약 40일)의 발아기간으로 말미암아 발아되기 전에 잡초가 우세하여 재배를 포기한 경우도 있었다. 이에 큰등골짚신나물의 저온층적처리 및 무처리 그리고, 냉동처리에 의한 종자의 휴면타파를 시험하였다. 종자는 전년에 시험재배단지에서 수확하여 실내상온에서 보관하였던 종자를 사용하였다.

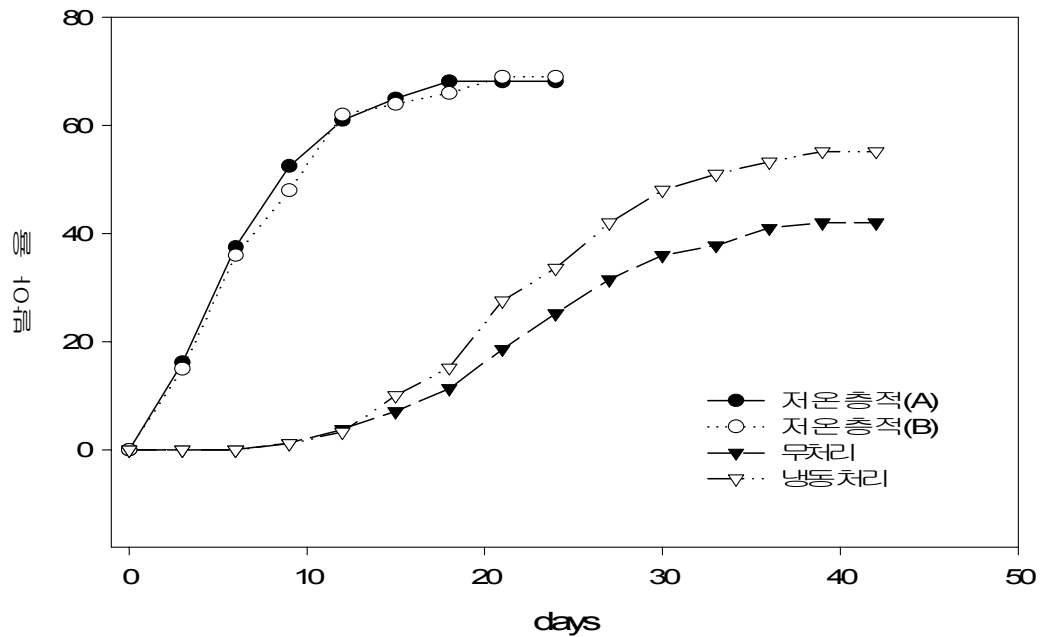


그림 1-3. 발아처리 및 배양토에 따른 발아율의 조사

저온층적(A) - 20일간 저온층적 처리후, 산흙:모래:피트모스(1:1:1)로 섞은 배양토에 파종

저온층적(B) - 20일간 저온층적 처리후, 펄라이트:질석:피트모스(1:1:1)로 섞은 배양토에 파종

무처리 - 발아처리 하지 않고, 산흙:모래:피트모스(1:1:1)의 배양토에 파종

냉동처리 - 냉동(3hr)처리와 냉장(21hr)처리를 2회반복한 후, 산흙:모래:피트모스(1:1:1)의 배양토에 파종

○ *A. pilosa*(짚신나물)과 비슷하게, 무처리에 비해서 저온층적처리는 발아율을 높이고 발아소요기간을 단축시키는 효과를 나타냈다. 무처리의 경우 발아율은 최종 42%를 나타내었지만, 저온층적처리를 20일간 하면 68~69%의 높은 발아율을 보여주었다. 또한 무처리의 경우 40%의 발아율을 보이기까지 약 40일이 걸렸으나 저온층적처리를 하게 되면 50% 발아율을 나타내는데 9일 60%의 발아율을 나타내는데 12일이 걸렸다. 즉, 별도로 저온층적처리를 해야만 긴 발아기간으로 인한 잡초의 피해를 막을 수 있음을 알 수 있었다.

냉동처리에 의한 2인간의 발아처리는 발아처리가 짧은 경제적인 방법이었지만 예상과는 다르게, 55%의 최종 발아율과 50% 발아하는데 33일간의 긴 발아소요시간이 필요하여 소요시간과 편이성에서 경제적이지 못한 것으로 나타났다.

○ 파종용 배양토는 2가지의 경우를 시험하였는데, 이는 산흙과 모래를 시중에서 쉽게 구하지 못하는 문제가 있어서 현재 상용으로 쉽게 구할 수 있는 재료를 가지고 배양토를 구성하여 실제 재배농가에서 적용가능성을 테스트하기 위함이었다. 결과(그림 1)에서 보는 바와 같이 2가지 배양토는 최종발아율과 발아소요시간이 거의 비슷하였다. 따라서 농가 재배시 필요에 따라 배양토를 선택하여 적용 가능함을 확인하였다.

3. 적정 재식거리 규명

가. 방법

○ 재배법은 이용호 등에 의한 재배법을 따라 진행하였으며, 기존에 시험재배되고 있는

큰등골짚신나물(2008년 파종)의 뿌리를 싹이 트기전에 적정이식거리로 이식하여, 8월 30일부터 9월 2일에 걸쳐서 전초를 수확하여 수확량과 관리용이성에 비추어서 큰등골짚신나물의 적정 재식거리를 조사하였다. 각 테스트 재식거리를 위하여 30m²를 5구역씩 조성하고 전초의 수확량을 조사하였다.

나. 결과

- 현재 육묘 후 재배법은 선행연구를 통하여 이미 확립되었으나, 본밭 이식시 기존 30cm x 30cm 거리로 정식재배는 1~2년생의 큰등골짚신나물에서 가장 높은 수확량을 보여주었으나 본밭 이식후 3년차를 넘어가면서 가지가 과도하게 성장하면서 제초작업 및 그루 사이의 물리적 간섭으로 인한 성장억제로 재배관리에 어려움을 가져오고 있다. 이에 2년생의 뿌리를 성장하기 전에 일정한 간격으로 이식하여 수확량을 비교할 필요가 있었다.
- 적정재식거리 규명에 관한 선행연구 결과와 마찬가지로 30cmx30cm에서 가장 높은 수확량을 나타냈다. 그러나 45cmx45cm는 93%정도의 수확량을 나타내서 30cmx30cm와 유의차이를 보이지 않았다. 30cmx15cm와 60cmx60cm의 경우 30cmx30cm에 비해 각각 65%, 78%의 수확량을 나타내서 3년차 이상의 재배시에는 30cmx30cm, 45x45cm가 적정재식거리임을 알 수 있었다. 따라서, 제초작업 등 재배관리를 고려한다면 45cmx45cm로 재배하는 것이 경제적인 측면에서 유리할 것으로 사료된다.

재식거리	수확량(kg/30m ²)	수확량(kg/10a)
30cm x 15cm	6.7±0.9	225
30cm x 30 cm	10.4±1.7	348
45cm x 45 cm	9.7±1.6	325
60cm x 60 cm	8.1±1.6	271

표 1-3. 2년생 뿌리를 각 재식거리군에 대하여 구획당 30m²로 5구획씩 임의적으로 재배하여 10월 중순에 수확한 건초의 수확량 비교

4. 재배법 확립

- 현재 확립된 재배법은 다음과 같다.

큰등골짚신나물(=agrimony)의 재배법

- 채종 : 8~9월
- 파종 및 발아
 - 노천매장 : 채취한 종자를 2~3배의 모래와 섞어 망에 넣은 후 납작하게 하여 배수가 잘 되는 양지 15~20cm 밑에 월동시킨 후 파종하면 발아가 10~20일 걸린다.
 - 저온저장 후 흐르는 물처리 : 종자를 종이로 포장하여 4℃ 냉장고에 20~45일간 처리후 흐르는 물에 3~5일 경과 후 파종하면 발아가 10~20일 걸린다.
 - 상온저장 흐르는 물처리 : 종자를 종이로 포장하여 상온에서 겨울을 나고 흐르는 물에 3~5일 경과 후 파종하면 발아가 40~50일 걸린다.
 - 자연발아 : 성숙한 종자를 채취하여 늦가을에 파종하면 다음해 봄(3월 하순)에 발아한다.
- 육묘
 - 50일간 온실(20~30℃)에서 육묘(플러그묘, 상자묘, 온상묘)한다.
 - 상토는 모래:황토:피트모스=1:1:1, 일반상토로 한다.
- 직파

- 노지에서는 직파한다. 1m정도의 나비로 두둑을 만들고, 간격 40cm로 골을 탄 후 주간거리가 20~30cm정도 되도록 구덩이를 파고 한 구덩이에 종자 5~6개씩 넣고 2cm정도로 덮어준다.

○ 정식(300평 기준)

- 퇴비 : 완숙퇴비(농협퇴비 20kg) 토양비옥도에 따라 사용
- 재식거리 : 40x50cm(5,000주)
- 종자 필요량(1구 3립) : 4,950구 14,850립(297g)
 ※ 보통 1구 5립 투여 : 4,950구 24,750립(495g)
 <참조> 1,000립 : 20g, 50립 : 1g

○ 관리

- 잡초제거 : 싹이 15cm 자랄 때부터 3회 정도 한다.
- 물관리 : 멀칭하면 큰 문제가 없으나 가뭄이 지속되면 관수한다.

○ 시비 : 5월 초순경 완숙 퇴비나 복합비료 등을 준다.

○ 병충해 : 병충해에 강하여 별다른 걱정이 없으나 흰가루병은 주의해야 한다.

○ 수확 및 이용

- 수확 : 성숙기인 8월 중순~9월 초순 전초를 수확한다. 10a당 재식거리 40x50cm로 했을 때 당년은 300kg/10a정도이나 점차 증가하여 4년차에는 800kg/10a에 이른다.
- 이용 : 건강보조식품, 약용, 조경용

5. 대량재배 기반 조성사업

- 과제 시작시 2011년 1곳, 1,700평의 재배단지에서부터 2013년 현재까지 5곳 27,400평으로 재배단지를 확대하였다. 재배단지 관리 및 확대사업을 년도 별로 정리한다.

가. 1차년도

□ 재배단지

○ 경상남도 함양군 1,700평 재배단지 조성 운영

- 경상남도 함양군에 시제품 및 연구용 추출물 생산을 위한 1,700평의 재배단지를 운영하고 제2협동연구과제에 큰등골짚신나물추출물을 제조하기 건조형태의 원재료를 공급하였다..

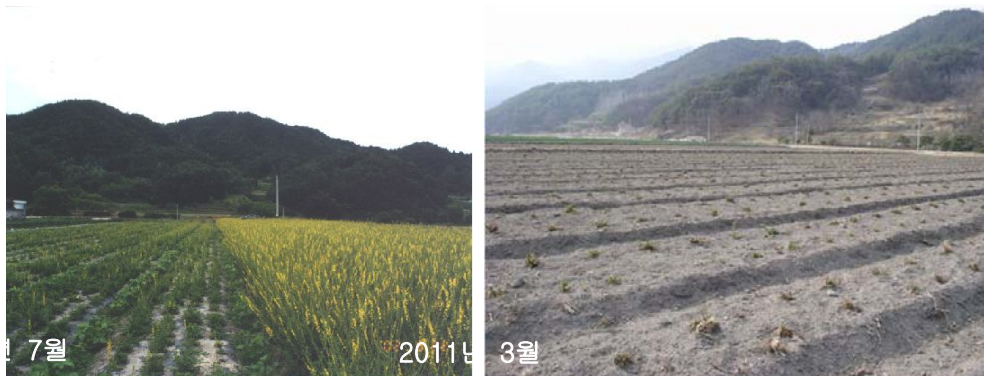


그림1-4. 경상남도 함양군 재배단지

○ 경기 평택시 700평 종자채취용 재배단지 조성 시작함

- 경기도 평택시에 3차년도 대규모 재배에 필요한 종자채취용 700평의 재배단지를 현지 농민과 재배계약을 맺었으며 2011년 재배기술 지도 및 본밭 준비를 진행하고 있다.

□ 수확 및 원료 공급

- 경상남도 함양군으로부터 재배 수확 후, 건조 원료 500kg 연구개발에 공급하였다.

나. 2차년도

□ 재배단지

- 경남 함양군 1,700평 대상, 종자 채종지 지속 관리
- 경기 평택시 송담리 700평 대상, 종자 채종지 조성



그림 1-5. 경기도 평택시 송담리 700평 재배단지 조성.

- 강원 양구군 6,000평 대상, 육묘 중
 - 강원도 양구군 방산면 고대리 299-1번지에 6,000평의 재배단지를 새롭게 조성하고, 1차 년도에 확립된 저온층정법에 의해 발아와 육묘가 현재 진행중.(그림 1-6)



그림 1-6. 양구군 방산면 재배단지의 전경과 육묘관리 모습

- 경북 칠곡군 지천면 1만 7,000평 대상 육묘 중

- 경북 칠곡군 지천면에 17,000평에 재배단지를 조성하고, 1차년도에 확립된 저온층적법에 의해 밭아와 육묘가 진행되었다.



그림 1-7. 경북 칠곡군 재배단지

- 강원 강릉시 옥계리에 5,500평 대상, 재배 계약 추진 중
- 수확 및 원료 공급
 - 종자의 대량확보(채종)
 - 경남 함양군 1,700평 으로부터 10월초, 약 11kg의 씨앗을 채종하고 이를 대규모 재배를 위해 종자로 사용하였다. 강원도 양구군과 경북 칠곡군 재배단지에 종자를 공급하였다.

다. 3차년도

- 재배단지
 - 경남 함양군 1,200평 대상, 종자 채종지 지속 관리



그림 1-8. 경남 함양 재배단지의 전경과 육묘관리 모습

○ 경기 평택시 송담리 700평 대상, 종자 채종지 지속 관리



그림 1-9. 경기 평택시 재배단지의 전경과 육묘관리 모습

- 강원 양구군 방산리 고대리 299-1번지에 6,000평의 재배단지를 새롭게 조성하고, 1차년도에 확립된 저온적층법에 의해 발아와 육묘가 현재 진행중.



그림 1-10. 경기도 남양주시 재배단지의 전경과 육묘관리 모습

- 경북 칠곡군 지천면 1만 7,000평, 지속 관리
- 경기도 남양주시 별내면 용암리에 2,500평, 새로 조성, 육묘 진행 중



그림 1-11. 경기도 남양주시 재배단지의 전경과 육묘관리 모습

라. 재배단지 조성 진행

○ 향후 대량 원료 수급에 대비하기 위해, 점차적으로 재배단지를 확대하였으며, 진행 상황을 간단히 아래 표에 요약하였다.

주소	평수	재배년도			비고
		2011	2012	2013	
경상남도 함양군 안의면 월림리	1,700				
경기도 평택시 송담리	700				종자채종지
강원도 양구군 방산면 고대리	6,000				
경기도 남양주시 별내면 용암리	2,500				
경상북도 칠곡군 지천면	17,000				
합계		1,700	2,400	27,900	

표 1-4. 재배단지 조성 진행상황표

제 2 절. 동물실험에 의한 큰등골짚신나물의 간기능 개선 효능 평가 및 작용기전 규명

1. 재료 및 방법

가. 알코올성 지방간 유도

- 지방간을 유도하기 위하여 흰쥐에 총 칼로리의 36%를 알코올로 대체한 liquid Lieber DeCarli diet(Diets Inc, PA, USA)를 총 투여기간 8주간 1일 1회 투여하였으며 (ED), 대조군은 알코올과 같은 칼로리의 maltodextran을 함유한 diet를 투여하였음 (CD). 모든 실험물질은 각각 적합한 vehicle에 녹여 조제하였음. Agrimonia 및 Hovenia (한국야쿠르트, 서울, 대한민국)는 생리식염수 용액에 녹였으며, silymarin(Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 0.5% MC (methyl cellulose, Sigma-Aldrich, MO, USA)에 현탁시켜 8주간 매일 1회 경구 투여하였음. 투여 부피는 투여 당일에 측정된 체중에 따라 산출하였고, 알코올 단독 처치군은 생리식염수 용액만을 투여하였음.

나. 혈액 검사 및 조직 병리학적 평가

1. 혈청 내 ALT 및 AST 활성

- ALT 및 AST 활성은 IVD Lab kit(아이비랩, 한국)을 사용하여 spectrophotometer (UV-1610. Simadzu, 일본)로 측정하였음.

2. H&E 염색

- 간의 좌엽 부분을 10% 중성 완충 포르말린(Sigma - Aldrich)으로 고정시킨 후 파라핀에 넣어 5 μ m의 관상 절편으로 제작하였음. Xylene으로 파라핀을 제거하고, 알코올로 친수화시킨 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경(OLYMPUS OPTICAL Co., Tokyo, Japan)을 통해 간 조직을 관찰하였음.

3. Oil Red O 염색

- 간의 좌엽 부분을 동결 절편으로 제작한 후, Oil Red O(Sigma - Aldrich)로 염색하여 광학현미경(OLYMPUS OPTICAL Co., Tokyo, Japan)을 통해 간 조직을 관찰하였음.

다. 지질 조성 함량 측정

1. 간조직 및 혈청내 중성지방 (TG) 함량

- 간 조직 중 50 mg을 적출하여 분쇄한 후, chloroform-methanol (2:1) 용액을 첨가하고 원심 분리하여, 간 조직 내 함유되어 있는 지질 성분을 추출하였음. 지질 추출액 및 혈액을 원심 분리하여 얻은 혈청을 IVD Lab Kit (아이비랩)를 사용하여 spectrophotometer (UV-1610. Simadzu, 일본)로 측정하였음.

2. 간조직 및 혈청내 총 콜레스테롤 (TC) 함량

- 간 조직 중 50 mg을 적출하여 분쇄한 후, chloroform-methanol (2:1) 용액을 첨가하고 원심 분리하여, 간 조직 내 함유되어 있는 지질 성분을 추출하였음. 지질 추출액 및 혈액을 원심 분리하여 얻은 혈청을 IVD Lab Kit (아이비랩)를 사용하여 spectrophotometer (UV-1610. Simadzu, 일본)로 측정하였음.

라. 혈중 싸이토카인 (TNF- α , IL-6) 농도 측정

- 혈액의 TNF- α , IL-6 농도는 ELISA assay kit (eBiosciences Co., CA, USA)를 사용하여 측정하였음.

마. 산화적 손상 지표 측정

1. 간 조직 지질 과산화물 (MDA) 측정

- 간장 내 지질 과산화 함량은 thiobarbituric acid reactive substances 의 형광법으로 측정하였으며, 표준물질로서는 malondialdehyde를 사용하였음.

2. 간 조직 glutathione (GSH) 함량 측정

- 간 조직중 100 mg을 적출하여 1% picric acid 용액에 분쇄한 후, 상층액에 glutathione reductase, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 및 NADPH를 가하여 흡광도 변화량을 이용하여 총 glutathione 측정하였음. 환원된 glutathione은 2-vinylpyrine을 이용하여 같은 방법으로 측정하였음. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 사용하여 측정하였다.

3. CYP2E1 활성도 측정

- 간 조직중 100 mg을 적출하여 KCl용액에 분쇄한후 ultracentrifuge하여 microsome 분획을 분리하였음. microsome의 CYP2E1 활성도는 hydroxylation에 의해 4-aminophenol에서 p-aminophenol로 생성도를 흡광도로 정량하였음.

바. 염증 전사 인자 (NF- κ B) 측정

- 간 조직중 100 mg을 적출하여 NE-PER 용액에 분쇄한 후, 원심분리하여 핵 단백질 분획을 분리하였음. 정량한 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후 Semi-Dry TransBlot Cell를 이용하여 PVDF membrane (Millipore, USA)에 전기영동하고 membrane을 TBS/T (Tris-Buffered Saline/Tween-20)으로 세척한 후 5%(w/v) skim milk를 넣은 TBS/T로 상온에서 1시간동안 blocking하였음. 1차 항체와 4°C에서 12시간 반응시킨후 HRP-conjugated 2차항체와 반응시켜 ECL detection system을 이용하여 발색시켰음. 각각의 밴드는 Imagequant™ 밀도측정 방법으로 평가하였음. 사용한 1차항체는 다음과 같음: nuclear factor kappa B (NF- κ B, 1:1000희석).

사. 염증 매개 인자 (iNOS, COX-2) 및 염증 매개 신호 전달 인자 (TLR4, MyD88, TRIF 등)

1. 간조직중 iNOS, COX-2, TLR4, MyD88, 및 TRIF의 단백질 발현량 측정

- 간 조직중 100 mg을 적출하여 PRO-PREP 용액에 분쇄한 후,정량한 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 후 Semi-Dry TransBlot Cell를 이용하여 PVDF membrane (Millipore, USA)에 전기영동하고 membrane을 TBS/T (Tris-Buffered Saline/Tween-20)으로 세척한 후 5%(w/v) skim milk를 넣은 TBS/T로 상온에서 1시간동안 blocking하였음. 1차 항체와 4°C에서 12시간 반응시킨후 HRP-conjugated 2차항체와 반응시켜 ECL detection system을 이용하여 발색시켰음. 각각의 밴드는 Imagequant™ 밀도측정 방법으로 평가하였음. 사용한 1차항체는 다음과 같음: inducible nitric oxide synthase (iNOS, 1:500 희석), cyclooxygenase-2 (COX-2, 1:1000 희석), Toll-like receptor 4 (TLR4, 1:1000 희석), Myeloid differentiation factor 88 (MyD88, 1:2000 희석), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF, 1:1000 희석).

아. 염증성 인자 유전자 발현 측정 (TNF- α , IL-6, COX-2, 및 iNOS)

○ 추출된 RNA를 주형으로 oligo dT-adaptor primer 및 AMV 역전사 효소를 이용하여 RNA 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였음 (TaKara Bio Inc.). 합성된 cDNA는 PCR을 통해 증폭하였으며, 총 반응액은 10 μ l로 하였다. PCR반응 조건은 GeneAmp 2700 termocycler (Applied Biosystems)을 이용해서 94 $^{\circ}$ C, 5분간 denaturation, 72 $^{\circ}$ C, 7분간 extension하였으며, 각각의 primer에 대한 증폭 주기의 조건은 다음과 같음: TNF- α , 32주기 94 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초; IL-6, 32주기 94 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 30초; COX-2 및 iNOS, 32주기 94 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초; β -actin, 25주기 94 $^{\circ}$ C 30초, 62 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초. 사용한 primer의 배열은 다음과 같음; TNF- α , 5' primer: GTAGCCCACGTCGTAGCAAAA, 3' primer: CCCTTCTCCAGC TGGA AGAC; IL-6, 5' primer: CATAGCACACTACGTTTGCC, 3' primer: GAAAGTCAACTCCATCTGCC; COX-2, 5' primer: CAAGCAGT GGCAAAGGCCTCCATT, 3' primer: TAGTCTGGAGTGGGAGGC ACTTGC; iNOS, 5' primer: TTCTTTGCTTGTGTGCTAATGCG, 3' primer: GTTGTGCTGAACTTCCAATCGT; β -actin, 5' primer: TTGTAACCAACTGGGACGATATGG, 3' primer: GATCTTGATCTTC ATGGTGCTAG. PCR 반응 후 생성물의 10 μ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며, EtBr염색하여 UV하에서 촬영하였음. 모든 PCR반응의 결과는 β -actin의 발현량을 기준으로 표준화하였음.

2. 실험결과

가. 혈액 검사 평가 - 혈중 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성

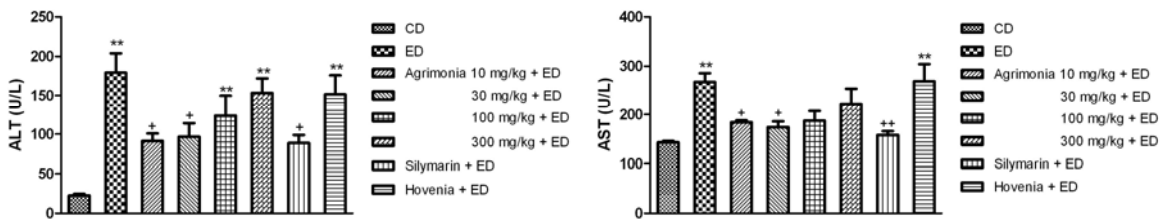


Figure 2-1. Effect of *Agrimonia* on serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities in chronic ethanol-fed rat. Values are means \pm S.E.M. for 8-10 rats per group.

**Significantly different ($P < 0.01$) from each CD group.

+,**Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from ED group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 큰등골쥘신나물 추출물(이하 *Agrimonia*)을 투여하여 혈중 ALT 및 AST의 활성을 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 2-1). 약물 및 알코올 처치를 하지 않은 정상 대조군의 ALT 및 AST 활성은 각각 22.7 ± 1.9 U/L와 158.1 ± 7.9 U/L로 낮은 수치를 나타내었으나, 알코올 단독 처치군에서는 179.3 ± 24.8 U/L와 267.8 ± 18.0 U/L로 대조군에 비해 ALT와 AST 활성이 현저히 증가하였음. 이러한 증가는 ALT 활성의 경우 *Agrimonia* 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각

각 91.1 ± 9.7 , 96.5 ± 17.3 , 123.4 ± 26.2 및 153.3 ± 18.7 U/L로 Agrimonia 10 mg/kg 및 30 mg/kg 투여군에서 알코올 단독 처치군에 비해 현저한 억제를 나타내었음. 또한 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군은 88.6 ± 10.3 U/L로 현저한 억제를 나타내었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군은 151.4 ± 24.5 U/L로 별다른 차이를 나타내지 않았음. AST 활성의 경우 Agrimonia 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 183.9 ± 3.8 , 174.0 ± 11.7 , 187.1 ± 20.1 및 222.5 ± 31.3 U/L로 Agrimonia 10 mg/kg 및 30 mg/kg 투여군에서 알코올 단독 처치군에 비해 현저한 억제를 나타내었으며, Agrimonia 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서는 억제 경향만을 나타내었음. 또한 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군은 158.1 ± 7.9 U/L로 현저한 억제를 나타내었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군은 269.3 ± 35.1 U/L로 별다른 차이를 나타내지 않았음.

나. 조직 병리학적 평가

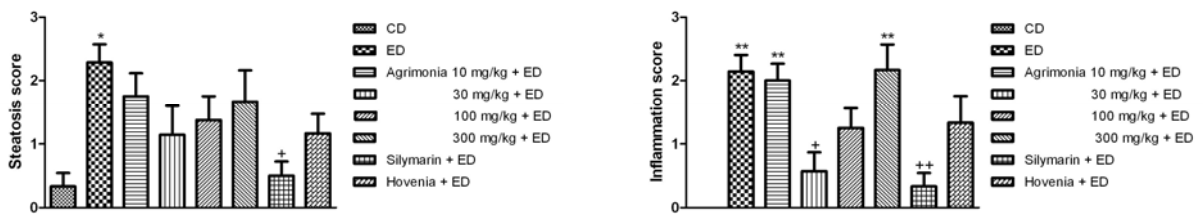


Figure 2-2. Effects of *Agrimonia* on histological score in chronic ethanol-fed rat.

- *. **Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from CD group.
- +. **Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from ED group.

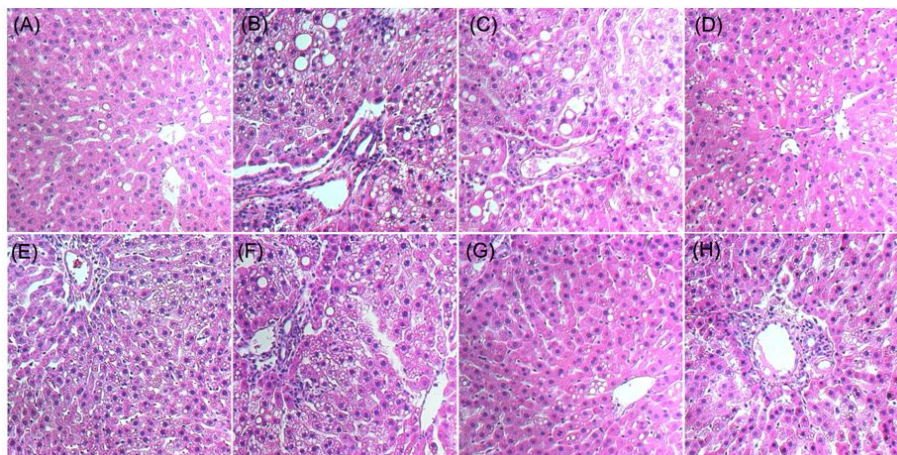


Figure 2-3. Effect of *Agrimonia* on histological changes in chronic ethanol-fed rat (Hematoxylin and eosin staining). (A) The control group; (B) the vehicle-treated ethanol group; (C-F) *Agrimonia* 10, 30, 100 and 300 mg/kg treated ethanol group; (G) Silymarin 100 mg/kg treated ethanol group; (H) *Hovenia* 100 mg/kg treated ethanol group.

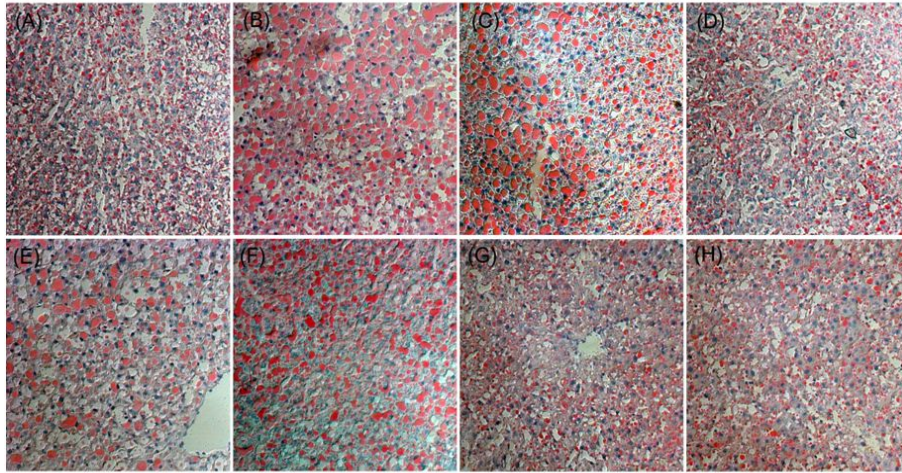


Figure 2-4. Effect of Agrimonia on fat accumulation in chronic ethanol-fed rat (Oil Red O staining). (A) The control group; (B) the vehicle-treated ethanol group; (C-F) Agrimonia 10, 30, 100 and 300 mg/kg treated ethanol group; (G) Silymarin 100 mg/kg treated ethanol group; (H) Hovenia 100 mg/kg treated ethanol group.

- 정상 대조군에 비하여 알코올 단독 처치군은 현저한 세포의 괴사 및 염증성 침윤을 나타내었음. Agrimonia 100 mg/kg 투여군은 알코올성 유도 지방간의 세포괴사 및 염증성 침윤을 억제하는 경향을 보였으며, 더 나아가 Agrimonia 30 mg/kg 투여군 에서도 이러한 반응을 현저히 억제하였음. 또한 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군은 알코올성 유도 지방간의 세포괴사 및 염증성 침윤의 현저한 억제를 보였으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군은 억제 경향만을 나타내었음 (그림 2-3).
- 정상 대조군에 비하여 알코올 단독 처치군은 현저한 지방증을 나타내었음. Agrimonia 투여군은 모든 용량군에서 알코올 유도 지방간을 억제하는 경향을 보였으며, 이에서 특히 Agrimonia 30 mg/kg 및 100mg/kg 투여군은 알코올 단독 처치군에 비해 뚜렷한 억제 경향을 보였음. 또한 양성대조군인 Silymarin 100mg/kg 투여군은 알코올 유도 지방간의 현저한 억제를 보였으며, Hovenia 100 mg/kg 투여군은 억제 경향만을 나타 내었음 (그림 2-4).

다. Liver/body weight ratio

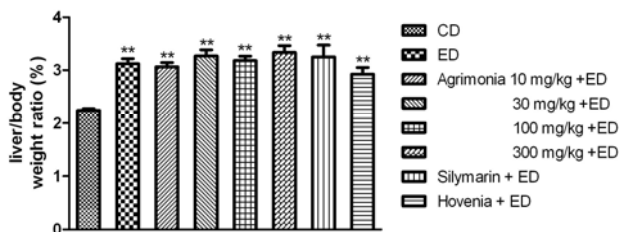


Figure 2-5. Effect of Agrimonia on liver/body weight ratio in chronic ethanol-fed rat. Values are means \pm S.E.M. for 8-10 rats per group. **Significantly different ($P < 0.01$) from each CD group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 Agrimonia를 투여하여 liver/body weight ratio 를 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 2-5). 약물 및 알코올 처치를 하지 않은 정상 대조군의 liver/body weight ratio는 $2.24 \pm 0.04\%$ 로 낮은 수치를 보였으나, 알코올 단독 처치군 에서는 $3.12 \pm 0.10\%$ 로 대조군에 비해 현저하게 증가되었음. 이러한 증가는 Agrimonia 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 3.06 ± 0.08 , 3.27 ± 0.12 , 3.18 ± 0.08 및 $3.33 \pm 0.13 \%$ 로 알코올 단독 처치군과 별다른 차이를 나타내지 않았음. 또한 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 및 Hovenia 100 mg/kg 투여군 에서도 $3.25 \pm 0.23 \%$ 및 $2.92 \pm 0.13\%$ 로 별다른 차이를 나타내지 않았음.

라. 간 조직내 중성지방 함량 및 총 콜레스테롤 함량

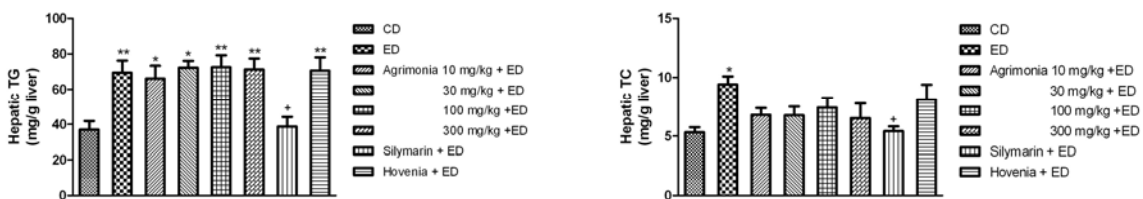


Figure 2-6. Effect of Agrimonia on hepatic triglyceride (TG) and hepatic total cholesterol (TC) contents in chronic ethanol-fed rat. Values are means \pm S.E.M. for 8-10 rats per group.

***Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from each CD group.

+Significantly different ($P < 0.05$) from ED group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 Agrimonia를 투여하여 간 조직내 중성지방함량 및 총 콜레스테롤 함량 변화를 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 2-6). 약물 및 알코올 처치를 하지 않은 정상 대조군의 간 조직내 중성지방함량 및 총 콜레스테롤은 37.0 ± 4.9 mg/g liver 및 5.31 ± 0.44 mg/g liver 로 낮은 수치를 보였으나, 알코올 단독 처치군에서는 69.4 ± 6.8 mg/g liver 및 9.41 ± 0.68 mg/g liver 으로 대조군에 비해 현저하게 증가되었음. 이러한 증가는 간 조직내 중성지방의 함량의 경우 Agrimonia 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군 에서는 각각 72.6 ± 6.7 mg/g liver 및 71.3 ± 6.1 mg/g liver로 별다른 차이를 나타내지 않았으나 Agrimonia 10 mg/kg 및 30 mg/kg 투여군에서는 각각 66.1 ± 7.2 mg/g liver 및 72.3 ± 3.9 mg/g liver로 감소하는 경향을 나타냄. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군에서의 간 조직내 중성지방 함량은 38.7 ± 5.5 mg/g liver로 대조군에 비해 현저하게 감소되었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군에서는 70.6 ± 7.5 mg/g liver로 별다른 차이를 나타내지 않았음. 간 조직내 총 콜레스테롤 함량이 경우 Agrimonia 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 6.80 ± 0.58 , 6.77 ± 0.75 , 7.43 ± 0.86 및 6.53 ± 1.26 mg/g liver로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었음. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군에서 간 조직내 총 콜레스테롤 함량은 5.41 ± 0.40 mg/g liver로 대조군에 비해 현저한 감소를 나타내었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군 에서는 8.13 ± 1.26 mg/g liver로 감소하는 경향만을 보였음

마. 혈청 중 중성지방 함량 및 총 콜레스테롤 함량

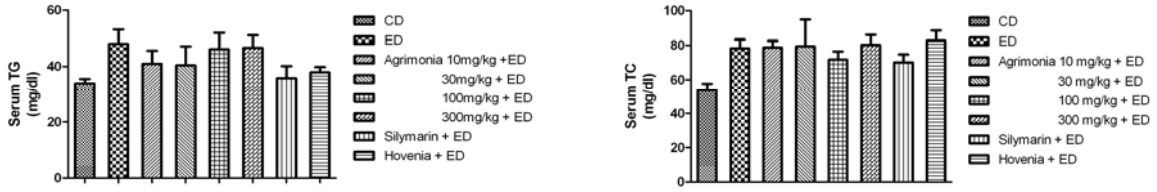


Figure 2-7. Effect of Agrimonia on serum TG and serum TC contents chronic ethanol-fed rat. Values are means ± S.E.M. for 8-10 rats per group.

- 대조군의 혈청 중 중성지방 함량은 34.0 ± 1.5 mg/dl이었으며, 알코올 단독 처치시 48.0 ± 5.1 mg/dl로 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었음. Agrimonia 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 41.0 ± 4.7 , 40.4 ± 6.8 , 46.1 ± 5.8 및 46.7 ± 4.4 mg/dl로 알코올 단독 처치군과 별다른 차이를 나타내지 않았음. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군과 Hovenia 100 mg/kg 투여군 에서도 각각 35.9 ± 4.3 mg/dl 및 37.9 ± 1.9 mg/dl로 별다른 차이를 나타내지 않았음.
- 대조군의 혈청 중 총 콜레스테롤 함량은 53.8 ± 3.9 mg/dl으로 이었으며, 알코올 단독 처치시 78.2 ± 5.2 mg/dl로 대조군에 비해 증가하는 경향을 보임. Agrimonia 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 78.7 ± 3.8 , 79.4 ± 15.5 , 71.7 ± 4.8 및 80.3 ± 5.9 mg/dl로 알코올 단독 처치 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않았음. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군과 Hovenia 100 mg/kg 투여군에서도 각각 70.1 ± 4.6 mg/dl 및 82.7 ± 5.9 mg/dl로 별다른 차이를 나타내지 않았음.

바. 혈중 싸이토카인 농도

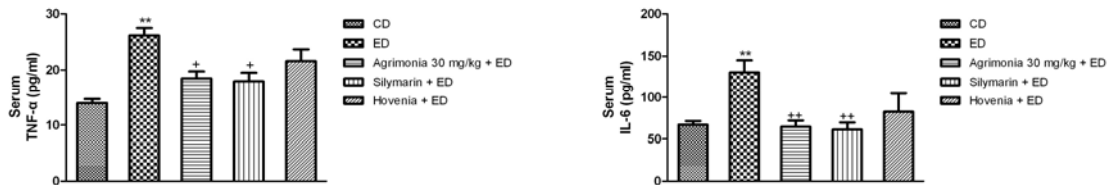


Figure 2-8. Effect of Agrimonia on serum TNF and IL-6 levels in chronic ethanol-fed rat. Values are means ± S.E.M. for 8-10 rats per group.

**Significantly different ($P < 0.01$) from each CD group.

*,**Significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$) from ED group.

- 대조군의 혈청 중 TNF의 농도는 14.0 ± 0.7 pg/ml로 낮은 경향을 보였으나, 알코올 단독 처치시 26.1 ± 1.3 pg/ml로 대조군에 비해 현저히 증가하였음. 이러한 증가는 Agrimonia 30 mg/kg 투여군에서 18.5 ± 1.3 pg/ml로 현저한 억제를 나타내었음. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군에서도 18.0 ± 1.5 pg/ml로 현저한 억제를 나타내었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군에서는 21.6 ± 2.1 pg/ml로 억제 경향만을 나타내었음.
- 대조군의 혈청 중 IL-6의 농도는 66.9 ± 4.5 pg/ml로 낮은 경향을 보였으나, 알코올 단독 처치시 130.6 ± 14.5 pg/ml로 대조군에 비해 현저히 증가하였음. 이러한 증가는 Agrimonia 30 mg/kg 투여군에서 64.6 ± 7.5 pg/ml로 현저한 억제를 나타내었음. 양성 대조군인 Silymarin 100 mg/kg 투여군에서도 61.3 ± 8.4 pg/ml로 현저한 억제를 나타내

었으나, Hovenia 100 mg/kg 투여군에서는 82.6 ± 22.2 pg/ml로 억제 경향만을 나타내었음.

사. 산화적 손상 지표

Table 2-1. Effects of AE on lipid peroxidation, hepatic GSH content, and microsomal CYP2E1 activity after chronic ethanol consumption

Groups	Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mg protein) ^B	GSH (nmol/mg protein) ^B	Aniline <i>p</i> -hydroxylase (nmol/min/mg protein)
Control		0.35 ± 0.03	9.21 ± 1.03	0.70 ± 0.24
Ethanol	Vehicle	$0.93 \pm 0.15^{**}$	$3.23 \pm 0.72^{**}$	$3.04 \pm 0.34^{**}$
	AE 30	$0.46 \pm 0.08^+$	$6.72 \pm 0.38^+$	$1.54 \pm 0.26^+$

^A The results are presented as mean \pm S.E.M of 8 - 10 animals per group.

^B MDA: malondialdehyde; GSH: reduced glutathione.

^{**}Denotes significant differences ($p < 0.01$) compared with the control group;

⁺Denotes significant differences ($p < 0.05$) compared with the ethanol group.

- 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직의 MDA 및 GSH 함량에 대한 큰등골짚신나물 추출물(이하 AE)의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (표 2-1). 약물 및 알코올 처치를 하지 않은 정상 대조군의 MDA 함량은 0.35 ± 0.03 nmol/mg protein으로 낮은 수치를 나타내었으나 알코올 단독 처치군에서는 0.93 ± 0.15 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 현저히 증가하였음. 이러한 증가는 AE 투여군에서 0.46 ± 0.08 nmol/mg protein로 알코올 단독 처치군에 비해 현저한 억제를 나타내었음. 약물 및 알코올 처치를 하지 않은 정상 대조군의 간장내 GSH 함량은 9.21 ± 1.03 nmol/mg protein을 나타내었으나, 알코올 단독 처치군에서는 3.23 ± 0.72 nmol/mg protein로 대조군에 비해 현저한 감소를 보였음. 이러한 감소는 AE 투여군에서 6.72 ± 0.38 nmol/mg protein으로 알코올 단독 처치군에 비해 현저한 증가를 나타내었음.
- 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직의 CYP2E1활성에 대한 AE의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (표 1). 약물 및 알코올 처치를 하지않은 정상 대조군의 CYP2E1 활성은 0.70 ± 0.24 nmol/min/mg protein으로 낮은 수치를 나타내었으나 알코올 단독 처치군에서는 3.04 ± 0.34 nmol/min/mg protein으로 대조군에 비해 현저히 증가하였음. 이러한 증가는 AE 투여군에서 1.54 ± 0.26 nmol/min/mg protein으로 알코올 단독 처치군에 비해 현저한 감소를 보였음.

아. 염증 매개 신호 전달 인자 (TLR4, MyD88, 및 TRIF)

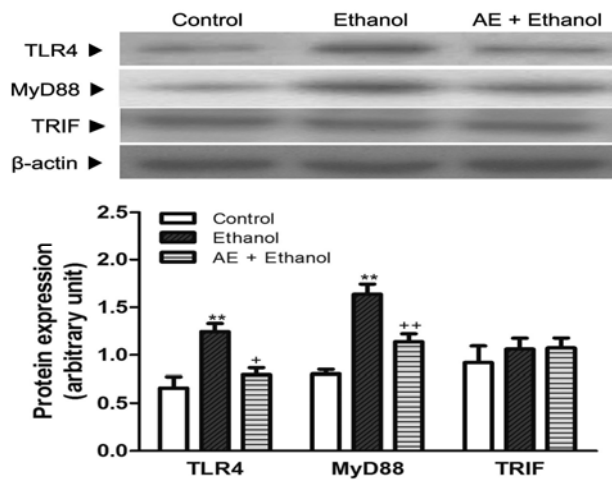


Figure 2-9. Effects of AE (30 mg/kg) on TLR4, MyD88, and TRIF protein expression after chronic ethanol consumption. Each protein expression in the liver was measured by Western blot analysis. The results are presented as mean \pm S.E.M of 8-10 animals per group. **Denotes significant differences ($p < 0.01$) compared with the control group; +, ++ Denote

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직의 염증 매개 신호 전달 인자(TLR4, MyD88, 및 TRIF)의 발현에 대한 AE의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 2-9). TLR4 및 MyD88의 단백질 발현량은 알코올 단독 처치시 대조군에 비해 현저히 증가하였으나, 이러한 증가들은 AE 투여군에서 알코올 단독 처치군에 비해 현저히 억제 되었음. TRIF의 단백질 발현량은 모든 실험군에서 별다른 차이를 보이지 않았음.

차. 염증 매개 인자 (iNOS 및 COX-2)

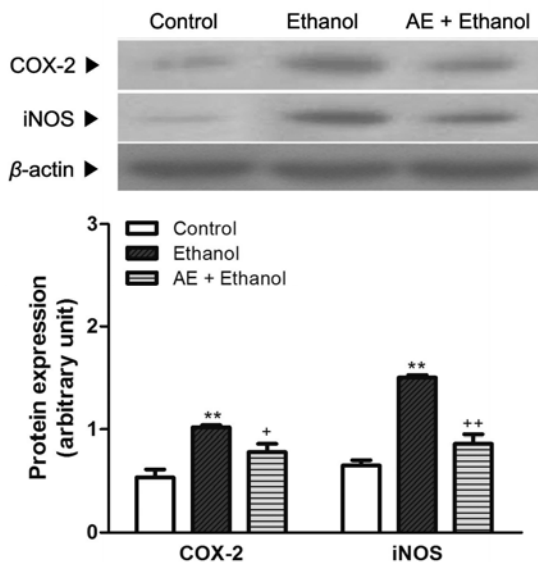


Figure 2-10. Effects of AE (30 mg/kg) on COX-2, and iNOS protein expression after chronic ethanol consumption. The results are presented as mean \pm S.E.M of 8-10 animals per group. **Denotes significant differences ($p < 0.01$) compared with the control group; +, ++Denote significant differences ($p < 0.05$, $p < 0.01$) compared with the ethanol group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직의 염증 매개 인자(iNOS 및 COX-2)의 발현에 대한 AE의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 2). iNOS 및 COX-2의 단백질 발현량은 알코올 단독 처치군에서 대조군에 비해 현저히 증가하였고, 이러한 증가들은 AE 투여군에서 현저한 억제를 나타내었음.

차. 염증 전사 인자 측정

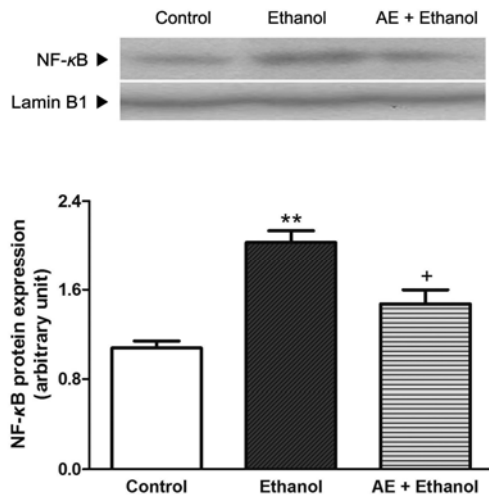


Figure 2-11. Effects of AE (30 mg/kg) on the nuclear NF-κB translocation. Western blot analysis for NF-κB was performed on the nuclear extracts from liver. The results are presented as mean \pm S.E.M of 8-10 animals per group. **Denotes significant differences ($p < 0.01$) compared with the control group; +Denotes significant differences ($p < 0.01$) compared with the ethanol group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직의 염증 전사 인자(NF-κB)의 조절에 대한 AE의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 3). 알코올 단독 처치군에서는 염증 전사인자인 NF-κB가 대조군에 비해 핵 내로의 이동이 현저히 증가하였으나, 이러한 증가는 AE 투여군에서 현저한 억제 효과를 나타내었음.

5. 염증성 인자 유전자 발현 측정

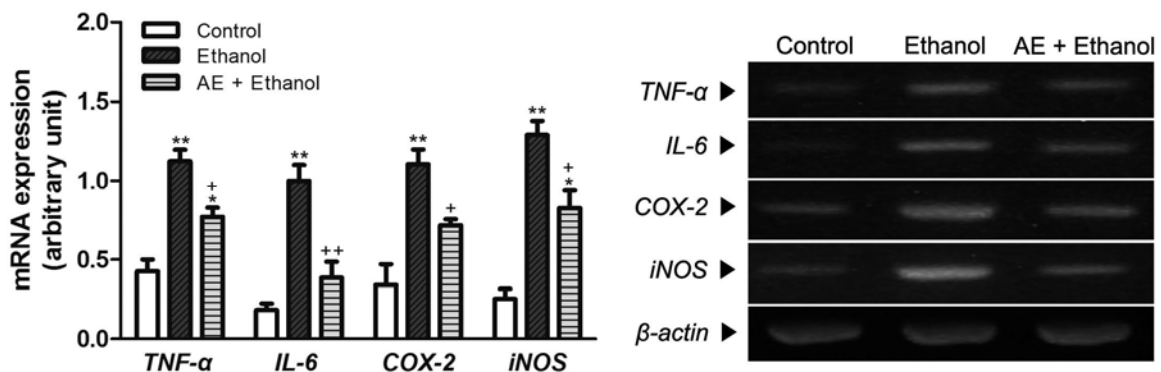


Figure 2-12. Effects of AE (30 mg/kg) on the TNF- α , IL-6, COX-2, and iNOS mRNA expression after chronic ethanol consumption. TNF- α , IL-6, COX-2, and iNOS mRNA expression in the liver were measured by RT-PCR analysis. The results are presented as mean \pm S.E.M of 8-10 animals per group. *, **denote significant differences ($p < 0.05$, $p < 0.01$) compared with the control group; +, ++denote significant differences ($p < 0.05$, $p < 0.01$) compared with the ethanol group.

○ 흰쥐의 알코올 유도 지방간 모델에서 간조직 염증성 인자(TNF- α , IL-6, COX-2, 및 iNOS)의 유전자 발현량 조절에 대한 AE의 영향을 관찰한 결과는 다음과 같음 (그림 4).

염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 유전자 발현량은 알코올 단독 처치시 대조군에 비해 현저히 증가하였고, 이러한 증가들은 AE 투여군에서 현저한 억제를 나타내었음. 염증성 매개 인자인 COX-2 및 iNOS의 유전자 발현량은 알코올 단독 처치시 대조군에 비해 현저히 증가하였고, 이러한 증가들은 AE 투여군에서 현저한 억제를 나타내었음.

3. 결론

- 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올에 의해 유도된 혈중 ALT, AST 및 염증성 사이토카인의 증가 억제를 통한 간 손상 개선효능을 나타내었으며, 산화성 손상 지표인 MDA 및 CYP2E1의 활성 억제 효능을 나타냈음.
- 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올성 간질환 모델에서 중심적인 역할을 하는 염증 매개 신호 전달 인자인 Toll-like receptor 4 및 이의 하위기전들의 억제 효능을 보였음.
- 종합적으로 큰등골짚신나물 추출물은 만성 알코올 간손상 개선에 탁월한 효과를 나타내며, 이는 아마도 산화적 손상과 Toll-like receptor에 의한 염증성 신호경로를 억제함으로써 나타내는 것으로 판단됨.

제 3 절. 큰등골짚신나물 추출물의 표준화방법 확립

1. 지표성분 선정 및 화합물의분리

가. 원료의 수집

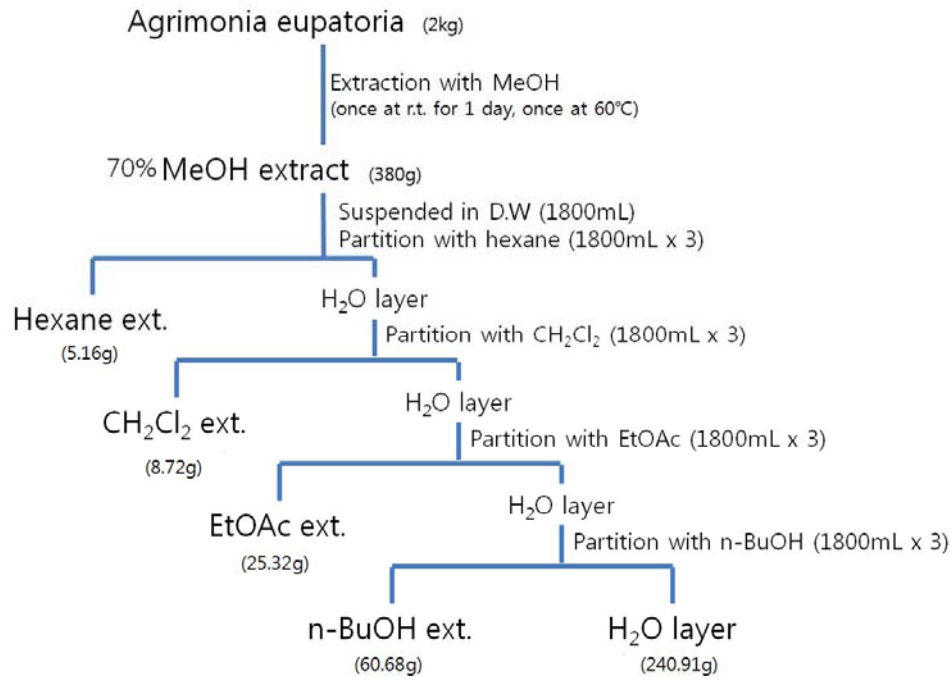
- 경남 함안에서 재배하고 있는 큰등골짚신나물의 지상부사용 (개화기)
- 정확한 기원 및 이물 혼입 여부 확인
- 음건한 후 세절하여 실험에 사용

나. 추출 및 분리

2회에 걸쳐 추출을 진행하였다. 1차는 100% MeOH로 추출을 진행하였으며, 2차는 70% MeOH에 추출을 진행하였다.

(1) 1차 추출 및 분리

- 추출
 - 큰등골짚신나물(*Agrimonia eupatoria*) 2.14kg을 취함
 - 지표성분 분리에 사용할 시료의 추출용매는 가장 보편적으로 사용되는 100% MeOH 사용
 - MeOH 16L로 실온에서 2회 추출하고 55℃ 수욕상에서 추출한 후 여과, 감압 농축
 - MeOH extract 288.52g 얻음
- 용매 분획
 - MeOH extract를 DW 1800mL에 현탁하였다.
 - 상법에 따라 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc 및 n-BuOH를 이용한 순차적 분획(hexane ext.: 12.89g; CH₂Cl₂ ext.: 15.89g; EtOAc ext.: 21.55g; n-BuOH ext.: 63.33g; H₂O ext.: 133.76g)을 실시하였다.

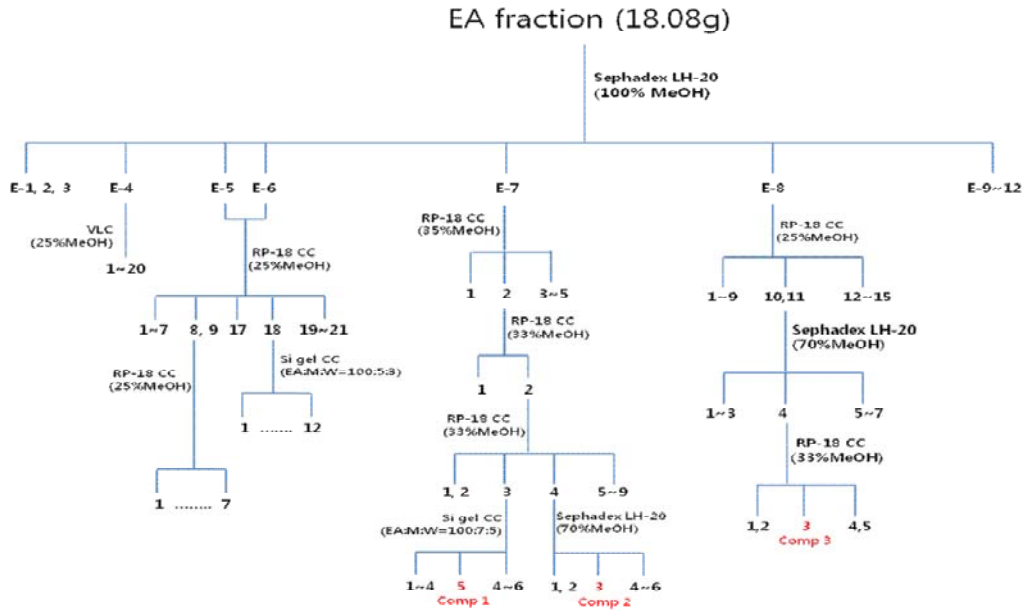


Scheme 3-1. Extraction and solvent partition of agrimony extract

○ 화합물 분리

[EtOAc분획]

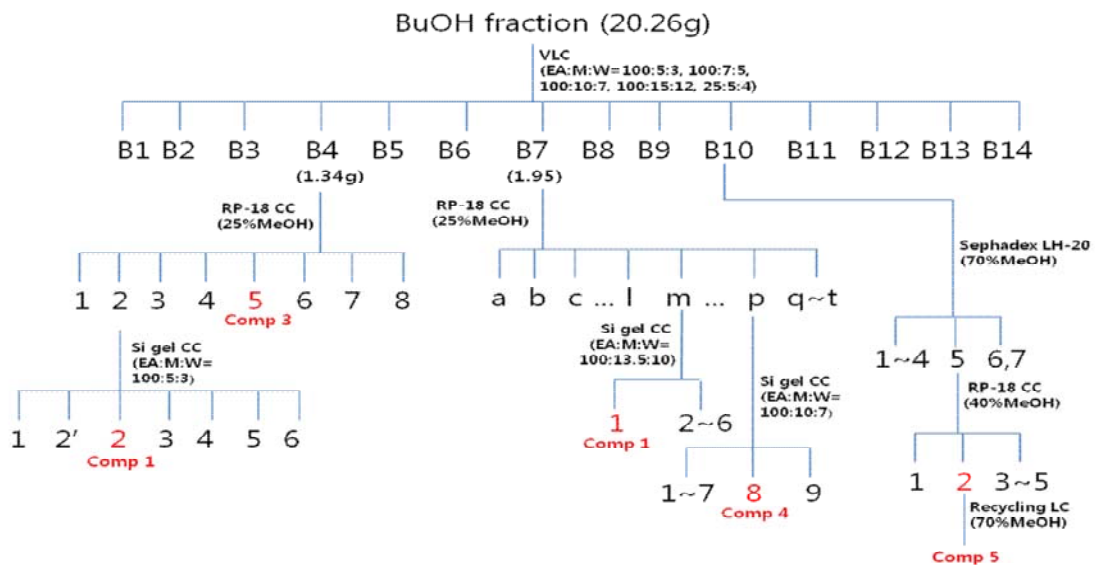
- EtOAc 분획 (18.08g)을 100% MeOH로 Sephadex LH-20 column chromatography 하여 12개의 소분획 (E-1 ~ E-12)을 얻었다.
- 소분획 E-7을 RP-18 column에 수회 반복 적용하여 9개의 분획으로 나누었으며
- 3번째 분획과 4번째 분획을 각각 silica gel column (EtOAc/MeOH/H₂O=100:7:5)과 Sephadex LH-20 column (70% MeOH)에 적용하여 화합물 1, 2 를 얻었다.
- 화합물 3은 소분획 E-8을 RP-18 column (25%MeOH), Sephadex LH-20 column (70%MeOH), RP-18 column (33%MeOH)에 차례로 적용하여 분리하였다.



Scheme 3-2. Isolation of compounds from the EtOAc fraction of agrimony extract

[BuOH분획]

- BuOH 분획 20.26g을 혼합용매 EtOAc/MeOH/H₂O=100:5:3, 100:7:5, 100:10:7, 100:15:12, 25:5:4로 vacuum liquid chromatography하여 14개의 소분획 (B-1 ~ B-14)을 얻었다.
- B-4 소분획을 RP-18 column chromatography (25% MeOH)하여 compound 3과 그 외의 분획을 얻었으며, 분획 하나로부터 silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH/H₂O=100:5:3)하여 화합물 1을 분리하였다.
- 화합물 4는 소분획 B-7의 RP-18 column chromatography (25% MeOH)와 silica gel column chromatography (EtOAc/MeOH/H₂O=100:10:7)로부터 얻어졌다.
- 소분획 B-10을 Sephadex LH-20 (70% MeOH), RP-18 (40% MeOH) column에 적용한 후 70% MeOH 용매로 recycling HPLC하여 화합물 5를 분리 정제하였다.



Scheme 3-3. Isolation of compounds from the BuOH fraction of agrimony extract

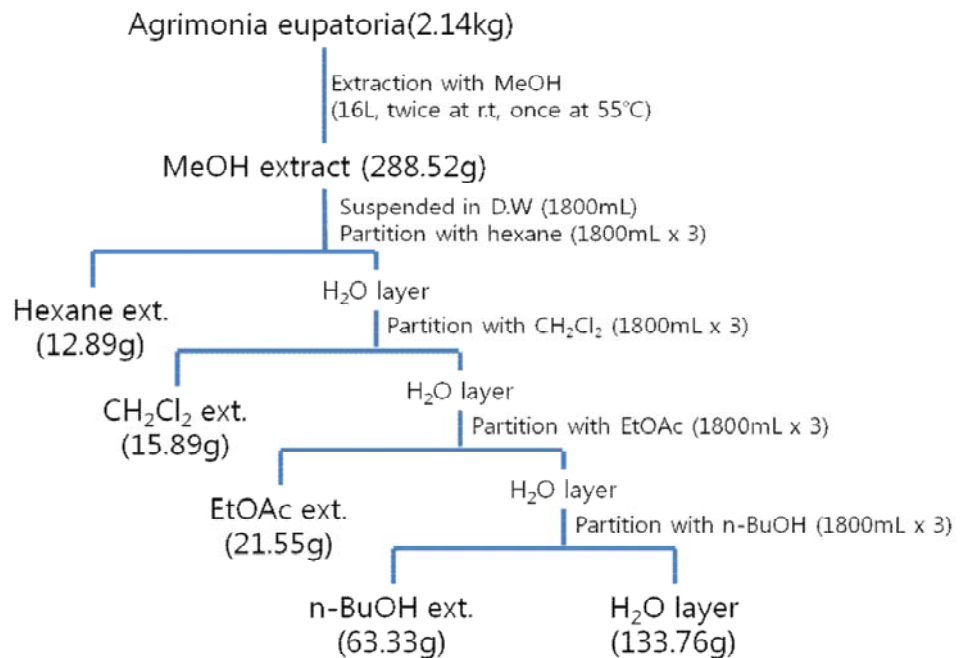
(2) 2차 추출 및 분리

○ 추출

- 큰등골좁신나물(*Agrimonia eupatoria*) 2kg을 취함
- 70% MeOH 16L로 실온에서 2회 추출하고 60°C 수욕상에서 추출한 후 여과, 감압 농축
- 70%MeOH extract 380g 얻음

○ 용매분획

- 70%MeOH extract를 DW 1800mL에 현탁
- 상법에 따라 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc 및 n-BuOH를 이용한 순차적 분획(hexane ext.: 5.16g; CH₂Cl₂ ext.: 8.72g; EtOAc ext.: 25.32g; n-BuOH ext.: 60.68g; H₂O ext.: 240.91g)



Scheme 3-4. Extraction and solvent partition of agrimony extract

○. 화합물의 분리

[EtOAc분획]

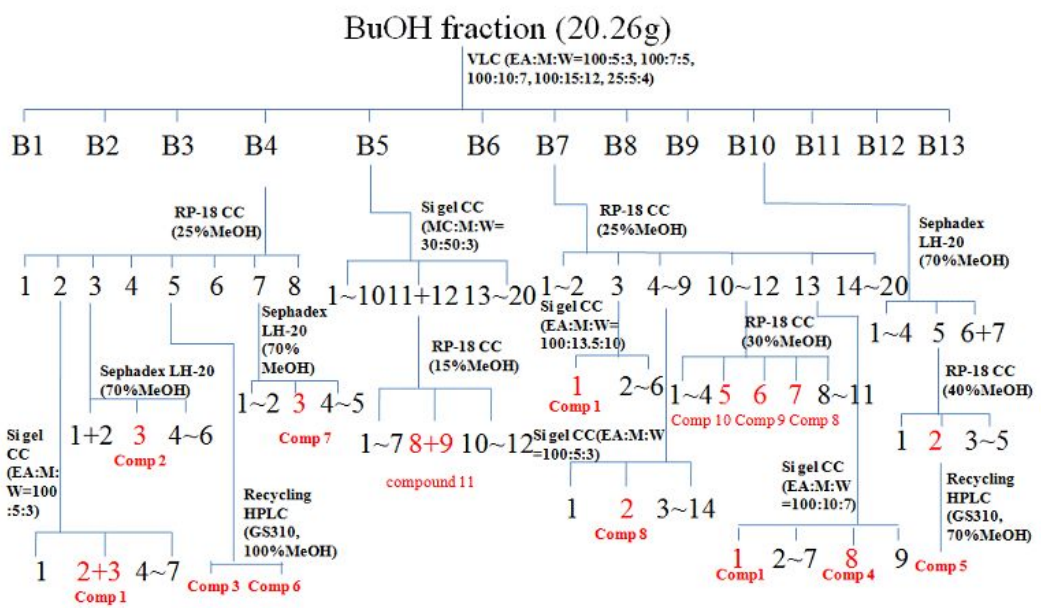
- 2차에서 EtOAc 분획은 더 이상 사용되지 않았다.

[BuOH 분획]

- n-BuOH 총 60.68g 중 분획 활성 의뢰와 보관용 시료를 제외한 20.26g을 혼합용매 EtOAc/MeOH/H₂O=100:5:3, 100:7:5, 100:10:7, 100:15:12, 25:5:4로 vacuum liquid chromatography하여 13개의 소분획(B1 ~ B13)으로 나누었다.
- 이 중 4번째, 5번째, 7번째 그리고 10번째 fraction 을 각종 column chromatography와 recycling HPLC를 이용하여 B4에서는 2개의 compound 6, 7을, B5에서는 1개의 compound 11를, B7에서는 3개의 compound 8, 9, 10을 얻었다.
- B4 소분획을 RP-18 column chromatography (25% MeOH)에 적용하여 얻은 5번째

subfraction을 recycling HPLC (GS-310, 100% MeOH)를 이용해 compound 6을 얻었다. 7 번째 subfraction을 sephadex LH-20 (70% MeOH)에 적용하여 compound 7을 얻었다.

- B5 소분획을 silica gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O=30:50:3)와 RP-18 column chromatography (15% MeOH)에 순차적으로 적용하여 compound 11를 얻었다.
- B7 소분획을 RP-18 column chromatography (25% MeOH)에 적용하여 얻은 4번째에서 9번째 subfraction을 합쳐 silica gel column chromatography (EtOAc:MeOH:H₂O=100:5:3)에 적용하여 compound 8을 얻었다. 10번째에서 12번째 subfraction을 RP-18 column chromatography (30% MeOH)에 적용하여 compound 8, 9, 10을 얻었다.



Scheme 3-5. Isolation of compounds from the BuOH fraction of agrimony extract

다.. 기기분석 및 구조 규명

(1) 기기분석

○ 분리된 화합물의 구조를 규명하기 위해 ESI-MS, ¹H 및 ¹³C-NMR의 기기분석을 수행하였다. 다음은 요약된 그 결과들이다.

◎ Compound 1 (taxifolin 3-glucoside)

Yellowish brown amorphous powder

ESI-MS(positive) m/z : 489 [M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 465 [M-H]⁻

¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ :

2.80~3.75(5H, m, Glc-H), 4.56(1H, d, J=8.0Hz, H-1''), 4.73(1H, d, J=5.5Hz, H-3), 5.52(1H, d, J=5.5Hz, H-2), 5.86(1H, d, J=1.5Hz, H-6), 5.90(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.64(1H, d, J=8.5Hz, 1.5Hz, H-6), 6.68(H, d, J=8.0Hz, H-5), 6.75(1H, d, J=1.5Hz, H-2), 11.60(1H, brs, 5-OH)

¹³C-NMR (125MHz, DMSO-d₆) δ :

61.3(C-6''), 70.1(C-4''), 73.5(C-2''), 75.3(C-3), 76.8(C-5''), 77.2(C-3''), 81.3(C-2), 95.2(C-8), 96.0(C-6), 101.0(C-10), 102.8(C-1''), 114.8(C-2'), 115.4(C-5'), 118.6(C-6'), 126.4(C-1'), 145.1(C-3'), 145.6(C-4'), 161.7(C-9), 163.7(C-5), 167.5(C-7), 192.7(C-4)

© Compound 2 (aromadendrin 3-glucoside)

Yellowish amorphous powder

ESI-MS(positive) m/z : 473 [M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 449 [M-H]⁻

¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ :

2.80~3.75(5H, m, Glc-H), 4.60(1H, d, J=7.5Hz, H-1''), 4.95(1H, d, J=7.0Hz, H-3), 5.50(1H, d, J=7.0Hz, H-2), 5.89(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.90(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.72(2H, d, J=8.5Hz, H-3', 5'), 7.23(2H, d, J=9.0Hz, H-2', 6'), 11.63(1H, brs, 5-OH)

¹³C-NMR (125MHz, DMSO-d₆) δ :

61.5(C-6''), 70.2(C-4''), 73.7(C-3), 74.6(C-3), 76.7(C-5''), 77.2(C-3''), 81.3(C-2), 95.1(C-8), 96.1(C-6), 100.9(C-10), 102.7(C-1''), 115.0(C-3', 5'), 126.0(C-1'), 129.2(C-2', 6'), 157.6(C-4'), 161.9(C-9), 163.6(C-5), 167.5(C-7), 193.8(C-4)

© Compound 3 (quercetin 3-glucoside)

Yellow amorphous powder

ESI-MS(positive) m/z : 487[M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 463[M-H]⁻

¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ :

3.0~3.70(5H, m, Glc-H), 5.45(1H, d, J=7.5Hz, H-1''), 6.18(1H, d, J=2.5Hz, H-6), 6.38(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.82(1H, d, J=8.5Hz, H-5'), 7.55(2H, m, H-2', 6'), 12.63(1H, brs, 5-OH)

¹³C-NMR (125MHz, DMSO-d₆) δ :

61.0(C-6''), 69.9(C-4''), 74.1(C-2''), 76.5(C-3''), 77.5(C-5''), 93.5(C-8), 98.6(C-6), 100.9(C-1''), 104.0(C-10), 115.2(C-5'), 116.2(C-2'), 121.2(C-1'), 121.6(C-6'), 133.3(C-3), 144.8(C-3'), 148.4(C-4'), 156.1(C-9), 156.3(C-2), 161.2(C-5), 164.1(C-7), 177.4(C-4)

© Compound 4 (apigenin 7-glucuronide)

Yellowish amorphous powder

ESI-MS(positive) m/z : 469[M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 445[M-H]⁻

¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ :

3.20~3.85(4H, m, Glucu-H), 5.13(1H, d, J=7.0Hz, H-1''), 6.42(1H, d, J=1.5Hz, H-6), 6.81(1H, d, J=1.5Hz, H-8), 6.82(1H, s, H-3), 6.91(2H, d, J=9.0Hz, H-3', 5'), 7.92(2H, d, J=8.5Hz, H-2', 6'), 12.94(1H, brs, 5-OH)

¹³C-NMR (125MHz, DMSO-d₆) δ :

71.7(C-2''), 72.9(C-3''), 74.4(C-5''), 76.1(C-4''), 94.6(C-8), 99.4(C-6), 99.5(C-1''), 102.9(C-3), 105.3(C-10), 116.0(C-3', 5'), 120.6(C-1'), 128.6(C-2', 6'), 156.9(C-9), 161.0(C-5), 161.7(C-4'), 164.3(C-2), 171.7(C-6''), 181.9(C-4)

◎ Compound 8 (apigenin 7-glucuronide methyl ester)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ :

3.25~3.45(3H, m, H-2'', 3'', 4''), 3.61(3H, s, CooMe), 4.19(1H, d, J=9.5Hz, H-5''), 5.30(1H, d, J=7.5Hz, H-1''), 6.45(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 6.84(1H, d, J=2.0Hz, H-5), 6.84(1H, s, H-3), 6.93(1H, d, J=8.8Hz, H-3', 5'), 7.94(2H, d, J=8.8Hz, H-2', 6'), 12.96(1H, br s, 5-OH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125MHz) δ :

52.7(CooMe), 72.0(C-2''), 73.4(C-3''), 75.9(C-5''), 76.1(C-4''), 95.3(C-8), 99.8(C-6), 100.0(C-1''), 103.8(C-3), 106.2(C-10), 116.7(C-3', 5'), 121.7(C-1'), 129.3(C-2', 6'), 157.7(C-9), 161.9(C-5), 162.1(C-4'), 163.1(C-2), 165.0(C-7), 169.9(C-6''), 182.7(C-4)

◎ Compound 9 (luteolin 7-glucuronide methyl ester)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ :

3.20~3.50(3H, m, H-2'', 3'', 4''), 4.19(1H, d, J=9.5Hz, H-5''), 5.31(1H, d, J=7.5Hz, H-1''), 6.45(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 6.73(1H, s, H-3), 6.80(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.90(1H, d, J=8.0Hz, H-5'), 7.41(1H, d, J=2.0Hz, H-2'), 7.43(1H, dd, J=8.0, 2.0Hz, H-6'), 12.98(1H, br s, 5-OH)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125MHz) δ :

52.7(CooMe), 72.0(C-2''), 73.4(C-3''), 75.9(C-5''), 76.1(C-4''), 95.2(C-8), 99.8(C-6), 100.0(C-1''), 103.9(C-3), 106.2(C-10), 114.3(C-2'), 116.7(C-5'), 119.9(C-1'), 122.1(C-6'), 146.5(C-3'), 150.7(C-4'), 157.7(C-9), 161.9(C-5), 163.1(C-7), 165.2(C-2), 169.9(C-6''), 182.6(C-4)

◎ Compound 10 (kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside)

Yellowish amorphous powder

UV λ_{max} (MeOH)nm: 256, 297sh, 350

ESI-MS(positive) m/z : 471[M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 447[M-H]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ :

3.05~3.65(6H, m, Glc.-H), 5.45(1H, d, J=7.0Hz, H-1''), 6.20(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 6.42(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.88(2H, d, J=8.6Hz, H-3', 5'), 8.03(2H, d, J=8.6Hz, H-2', 6'), 12.59(1H, br s, 5-OH)

◎ Compound 11 (epiaromadendrin)

White amorphous powder

ESI-MS(positive) m/z : 311[M+Na]⁺

ESI-MS(negative) m/z : 287[M-H]⁻

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500MHz) δ :

5.05(1H, d, J=5.8Hz, H-3), 5.68(1H, d, J=5.8Hz, H-2), 5.89(1H, d, J=2.0Hz, H-6), 5.94(1H, d, J=2.0Hz, H-8), 6.75(2H, d, J=8.5Hz, H-3', 5'), 7.20(2H, d, J=8.5Hz, H-2', 6')

(2). 화합물의 구조 규명

○ 분리된 화합물 1~11은 ESI-MS, ¹H 및 ¹³C-NMR 등의 기기분석 data로부터 그 구조를 결정하였으며 문헌 기재 spectral data와 비교로부터 각각의 화합물을 동정하였다.

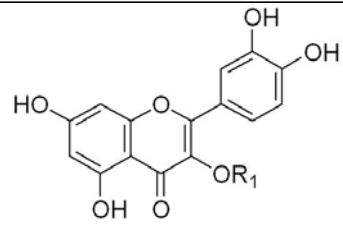
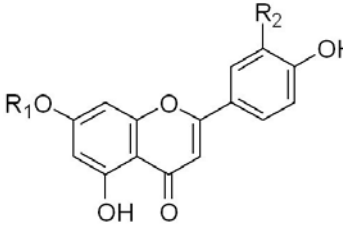
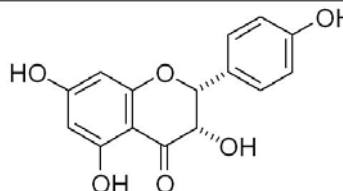
○ 분리된 화합물은 강한 UV 흡수와 발색양상 등으로부터 flavonoid 계열의 물질로 추정할

수 있었다. 각각의 ESI-MS에서 분자량과 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 나타난 flavonoid A 및 B ring의 치환 양상, 그리고 화합물 1~3에서 보여지는 glucose에 의한 6개의 carbon signal 등으로부터 각 화합물의 구조를 추정할 수 있었다. 화합물 4 및 5는 flavone 유도체로 결합된 당은 glucuronic acid임을 알 수 있었고 그 결합위치는 7번 탄소의 -OH에 존재함을 짐작할 수 있었다. 화합물 1, 2는 NMR spectra에서 나타난 특징적인 2, 3번 proton 및 carbon signal로부터 flavanonol류의 화합물임을 알 수 있었고 이는 본 식물에서 처음으로 분리 보고되는 물질이다.

- 두 차례에 걸쳐서 분리된 화합물 1~11은 ESI-MS, ^1H 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 기기분석 data와 문헌에 기재된 spectral data를 종합하여 다음과 같이 확인 동정되었다.

Table 3.1. The list of the compounds isolated from the 100% or 70% MeOH extract of agrimony

No.	Name	Structures
compound 1	Taxifolin 3-glucoside	
compound 2	Aromadendrin 3-glucoside	
compound 3	Quercetin 3-glucoside	
compound 4	Apigenin 7-glucuronide	
compound 5	Luteolin 7-glucuronide	

compound 6	Quercetin 3-galactoside	 <p>R₁ = galactose for comp. 5 R₁ = rhamnose for comp. 7</p>
compound 7	Quercetin 3-rhamnoside	
compound 8	Apigenin 7-glucuronide methyl ester	 <p>R₁= glucuronic acid Me ester, R₂= H for comp. 8 R₁= glucuronic acid Me ester, R₂= H for comp. 9 R₁=glucose, R₂= H for comp. 10</p>
compound 9	Luteolin 7-glucuronide methyl ester	
compound 10	Kaempferol 3-O-β-D glucopyranoside	
compound 11	Epiaromadendrin	

라. 지표물질 후보 선정

- 분리된 화합물과 표준열수추출물의 역상 HPLC 분석결과 화합물 4와 5, 즉 apigenin 3-glucuronide 및 luteolin 3-glucuronide가 덜 일반화된 성분이었으며 분석의 용이성과 표준열수추출물에서 다량 함유된 점으로부터 함량분석 및 확인시험을 위한 지표성분 및 표준품으로 선정하였음.

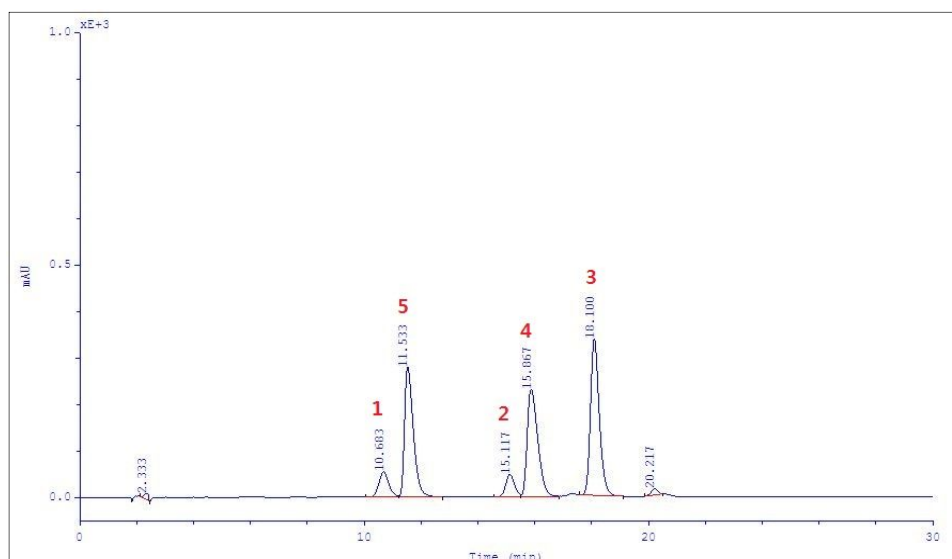


Figure 3-3. HPLC-chromatogram of pure standards

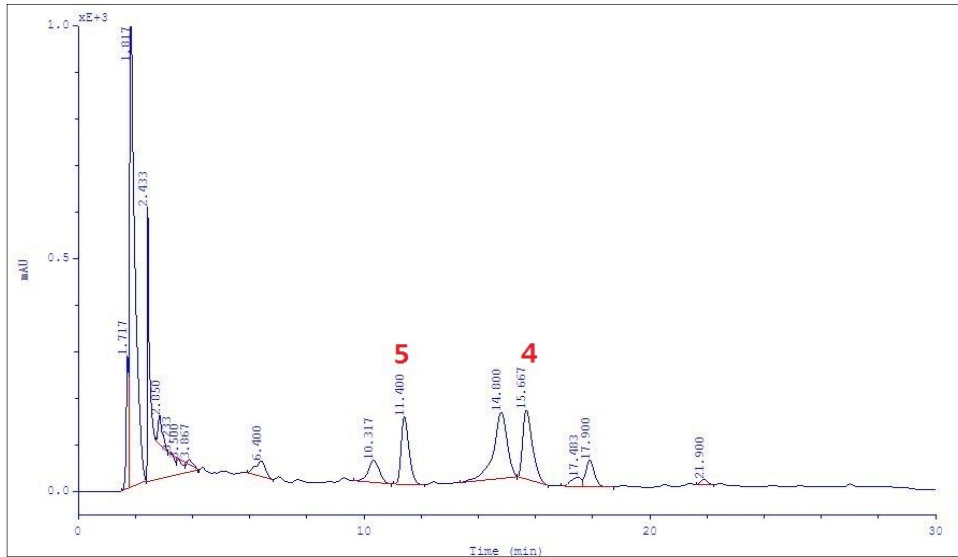


Figure 3-4. HPLC-chromatogram of sample

2. 품질관리를 위한 시험법결정

가. 함량분석법 작성

- 이동상, 고정상, 검출기 및 기타 조건의 최적화를 통해 함량을 평가위한 HPLC조건을 확립하였다.
- HPLC 기기 및 분석 조건
 - Column은 phenomenex[®] Gemini 5 μ C18 110A (150 x 4.6mm)을 사용하였고 detection은 UV 254nm였으며 flow rate는 1.0 ml/min에서 분석을 실시하였음.
 - 이동상은 linear gradient elution system을 사용하였으며 mobile phase A는 acetonitrile 그리고 B는 20 mM KH₂PO₄ 이고 time schedule은 다음에 기록한 HPLC condition과 같다.

Table 3-2. HPLC instrument and conditions

Instrument	Knauer Smartline Pump 1000
	Knauer Smartline Pump 1000
	Knauer Smartline Manager 5000
	Knauer Smartline UV Detector 2500
	Knauer Injection & Switching Valves
	Knauer Smartline Column Thermostat 4000
	(Column : phenomenex® Gemini 5 μ C18 110A, 150X4.6mm)
Conditions	-Linear gradient elution system
	mobile phase A : acetonitrile
	mobile phase B : 20 mM KH ₂ PO ₄
	0-15min : 15% A → 20% A
	15-25min : 20% A → 30% A
	25-30min : 30% A → 15% A
	- Detection : UV 254 nm
- Injection volume : 20 μ l	
- Flow rate : 1.0 ml/min	

나. 함량 평가를 위한 표준추출물의 제조

○ 표준추출물의 제조는 다음과 같다.

- 3종의 배치에서 각각 3종의 시료를 취하여 총 9개의 함량분석용 표준 열수 추출물 제조
- 각 시료를 분쇄기를 이용하여 조말로 하고 정확히 10g을 취한 후 증류수 100ml을 가하고 수욕상에서 5시간동안 2회 반복 추출하였고 열시에 여과하였다.
- 얻어진 여액은 동결 건조하여 함량 평가용 시료로 사용함

○ 표준추출물의 고형분 수율을 조사하였다.

- 표준 열수추출물로부터 평균수율을 계산한 결과 17.1367 %의 수율을 나타내었다.

Table 3-5 Yield of the water extract for *Agrimonia eupatoria* (w/w%)

Batch	Average(%)	Standard deviation
A	17.9033	0.3602
B	17.1067	0.9604
C	16.40	0.3051
Total	17.1367	0.8430

다. HPLC 동시분석법에 의한 함량평가

○ 동시분석법의 밸리데이션

- 큰등골짚신나물 추출물의 지표성분인 화합물 4(apigenin 7-glucuronide), 5(luteolin

- 7-glucuronide)는 넓은 범위에서 좋은 직선성을 보였다.
- 결정된 동시분석법은 정밀성과 정확성이 양호하였다.
 - 지표성분의 calibration curve는 양호한 직선성과 상관계수를 나타냈다.
 - 화합물 4와 5는 큰등골짚신나물 표준열수추출물에서 각각 1.04~1.31%, 0.68~0.98%를 함유하고 있으며 평균함량은 각각 1.18%, 0.83%였다.

Table 3-6. Content of standards in the water extract of *Agrimonia eupatoria*

Batch	Compound 4		Compound 5	
	Average	Standard deviation	Average	Standard deviation
A	1.10	0.079	0.93	0.055
B	1.26	0.061	0.71	0.037
C	1.19	0.046	0.87	0.069
Total	1.18	0.087	0.83	0.11

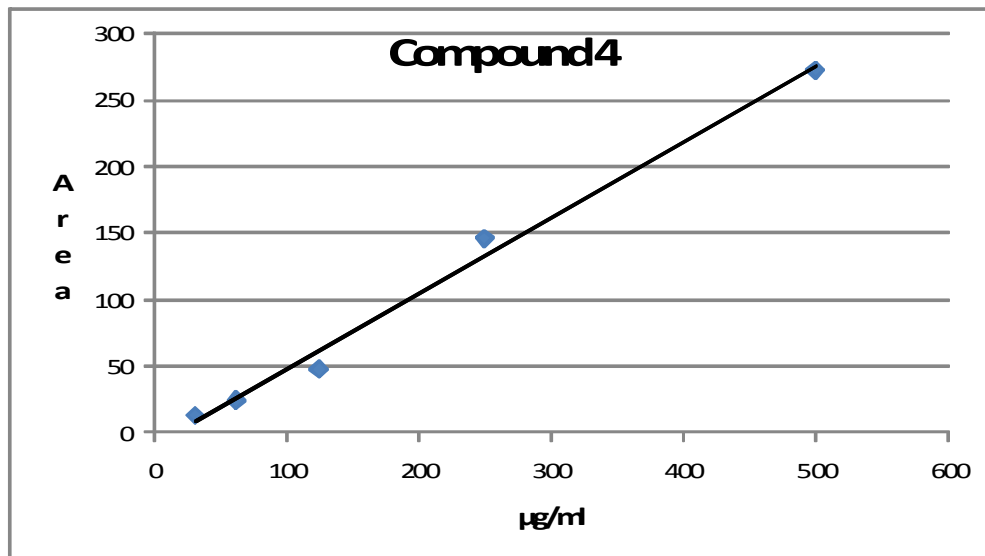


Figure 3-3. Calibration curve of compound 4

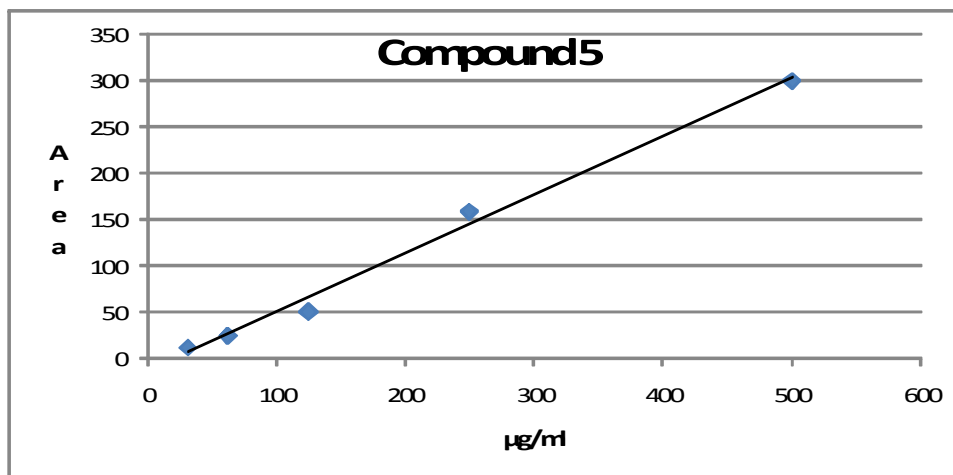


Figure 3-4. Calibration curve of compound 5

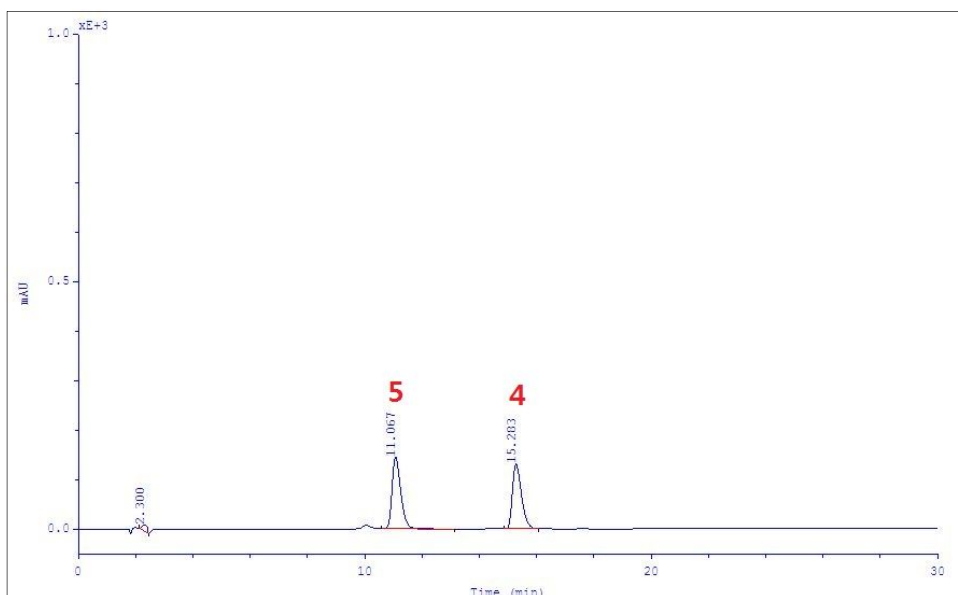


Figure 3-5. HPLC-chromatogram of standards

Table 3-7. Characteristic parameters of calibration curves

Compound	Retention time(min)	Regression equation ^a	Correlation coefficient(r^2)
4	15.283	$y = 0.5697x - 9.6509$	0.9917
5	11.067	$y = 0.633x - 12.876$	0.9918

^a y=peak area, x=amount(µg/ml)

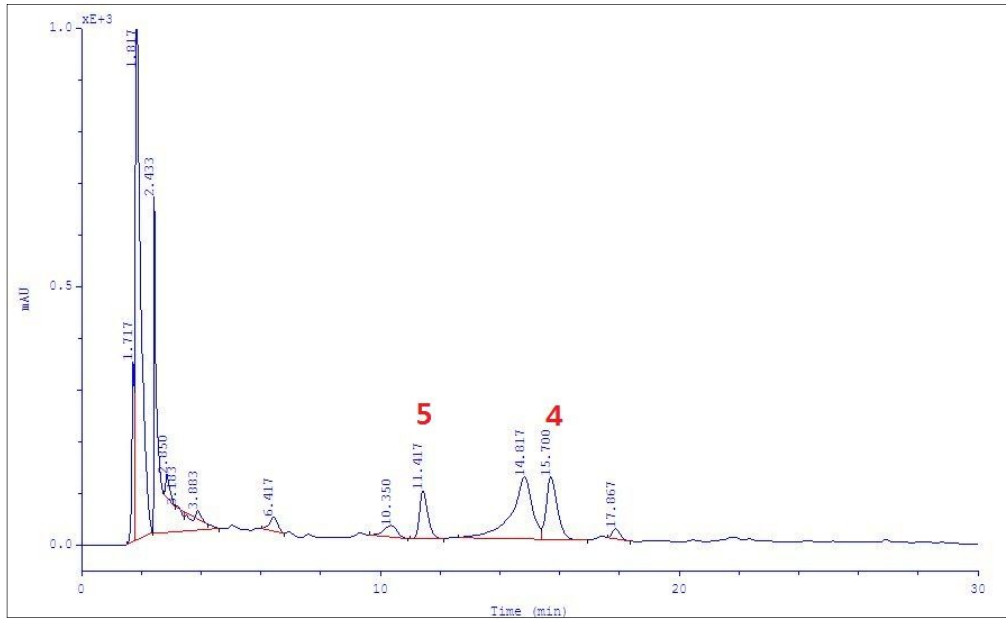


Figure 3-6. HPLC-chromatogram of sample

라. 지표물질의 결정과 함량 평가

○ 표준시험법을 위한 지표물질의 결정의 근거

- compound 4(apigenin 7-glucuronide), compound 5(luteolin 7-glucuronide)는 직선성, 정밀성, 정확성 측면에서 모두 우수한 결과를 나타냈으나, 두 가지의 지표성분으로는 대량 생산에 있어서 두 가지 지표성분의 함량을 동시에 충족시키는 품질관리가 어렵고, 지표성분을 모두 자가제조 해야 하는 점 때문에 한 가지를 선택하는 것이 유리하다 할 것이다. 이에, 우리는 특이성 측면에서 이웃 peak와 겹침이 없는 compound 5를 지표성분으로 활용하기로 결정하였다.

○ 지표물질의 함량 평가

- Luteolin 7-glucuronide는 큰등골짚신나물 표준열수추출물에서 0.68~0.98%를 함유하고 있으며 평균함량은 0.83%였다. (표 3-3)

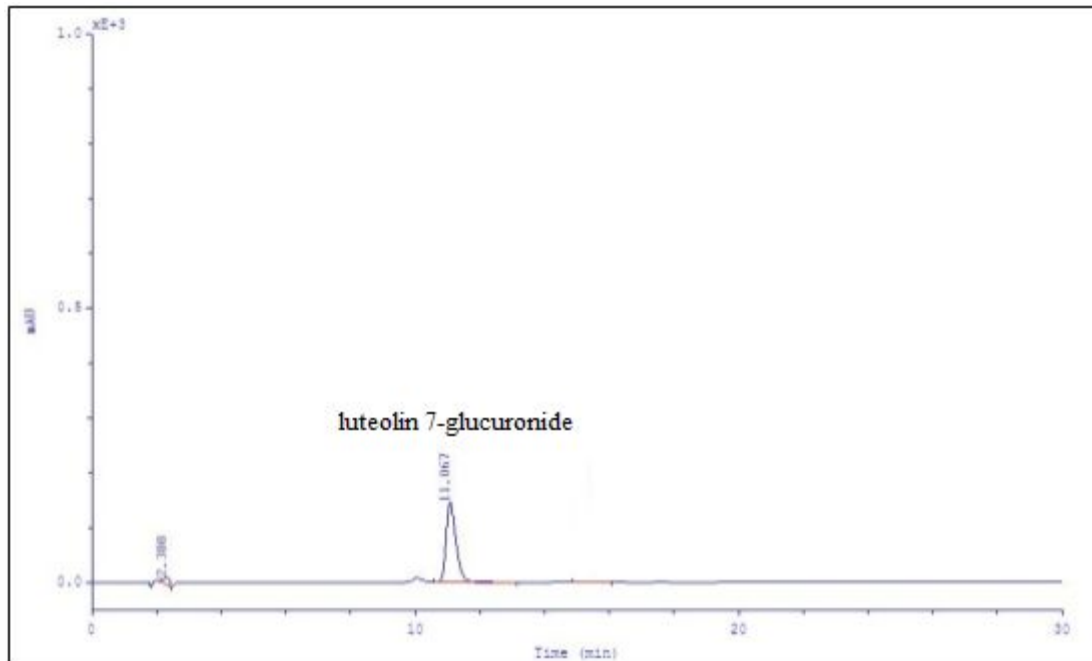


Figure 3-7. HPLC-chromatogram of luteolin 7-glucuronide

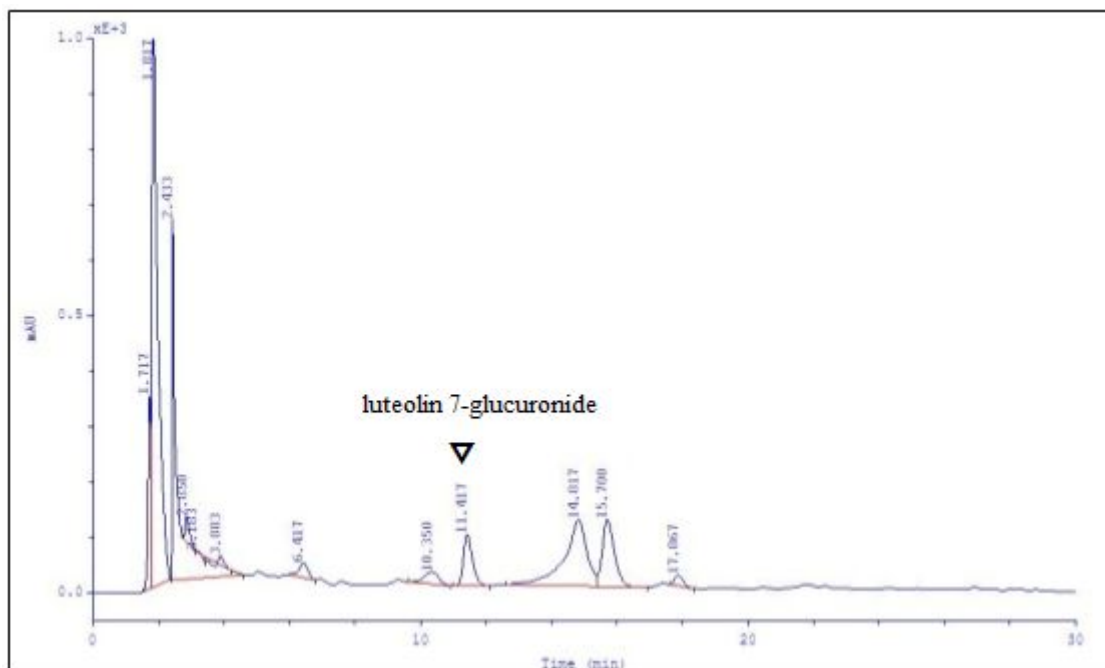


Figure 3-8. HPLC-chromatogram of sample

마. 품질관리를 위한 확인 시험법결정

○ 간편 확인시험법의 검토

- HPLC/UVD에 의한 지표성분의 결정은 정확한 값을 보여주는 데 반해, TLC에 의한 간편 확인시험법은 빠른 시간에 정성적인 정보를 제공해준다. 따라서 향후 대량 제조공정 중에 빠른 확인을 요하거나 원료 관리 측면의 용이성에서 TLC에 의한 확인시험법을 작성하기로 하였다.

- TLC법에서 고정상 및 이동상, 검출방법 등을 최적화하였다.
- 고정상의 선택
 - 다양한 고정상 중 가장 보편적이고 경제적인 silica gel plate를 사용하였다.
- 이동상의 선정
 - 표준품 및 대조생약 표준액과 비교 확인에 적절한 용매 선정하기 위하여 다양한 전개 용매조건을 검토하였고, 최종적으로 두 가지 혼합용매로 압축하여 비교 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}=35:20:2:1$; $\text{BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}=30:5:2$) 실험하였다.
- 검출방법의 결정
 - 다양한 방법 중 표준품이 강한 UV흡수를 가짐에 따라 UV 254nm에서의 검출법을 적용하였으며 anisaldehyde- H_2SO_4 용액을 발색시약으로 사용한 방법을 함께 검토 실험하였다.
- 표준품들의 TLC 결과
 - 기존에 분리되었던 화합물 comp. 1, 2, 3, 4, 5(표 3-1)를 TLC에 점적하여 그들의 분리도를 측정하였다.

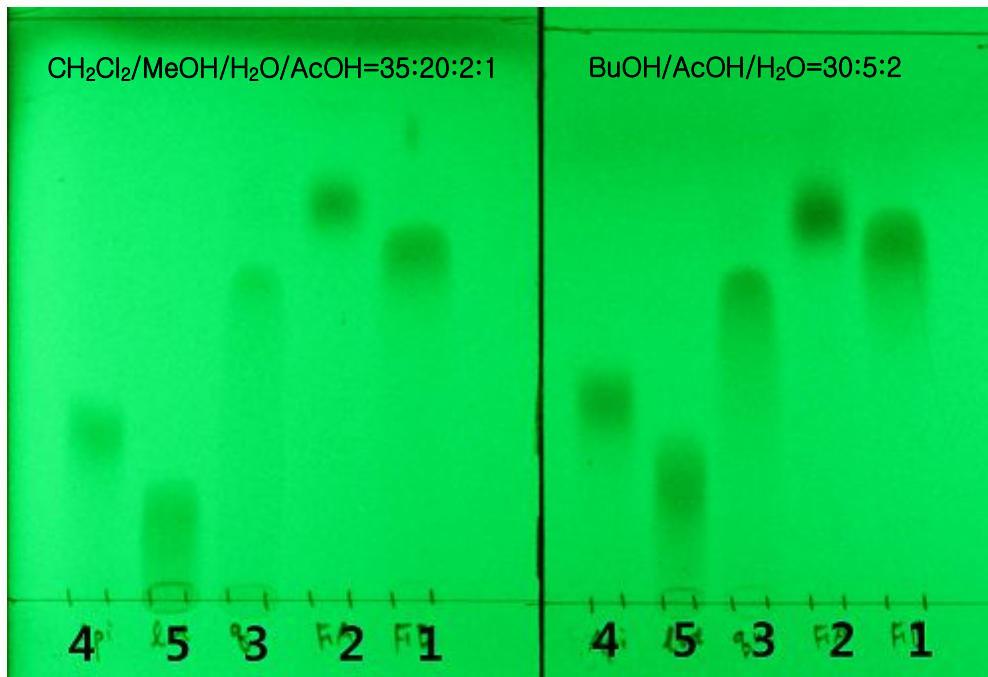


Figure 3-9. TLC chromatogram for pure standards (UV 254nm)

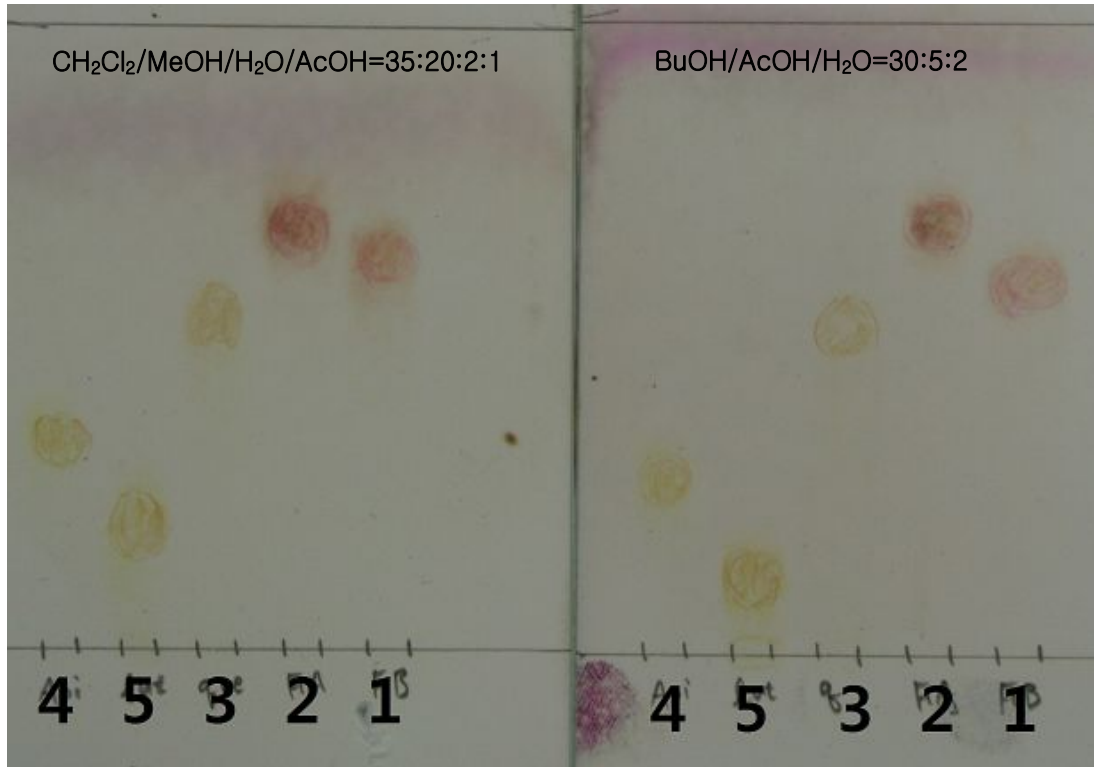


Figure 3-10. TLC chromatogram for pure standards (anisaldehyde- H_2SO_4)

- UV(254nm)보다는 anisaldehyde- H_2SO_4 로 처리하여 확인하는 것이 해상도 측면에서 좋은 결과를 나타냈다.
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}=35:20:2:1$ 와 $\text{BuOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}=30:5:2$ 은 5개의 화합물의 분리도 면에서 차이를 나타내지 않았다.
- compound 1,2,3,4,5 모두 적당히 분리되어 TLC에서 확인할 수 있었으나, compound 1과 compound 2는 과량이 점적되면 분리되지 않을 수 있음을 시사했다.
- 표준품들 중 지표성분 후보 물질과 추출물의 TLC 결과
 - 현재, HPLC 법에 의한 표준시험법의 지표물질 후보로 선정된 compound 4와 compound에 대해서 표준열수추출물과 함께 TLC 결과를 비교하였다.

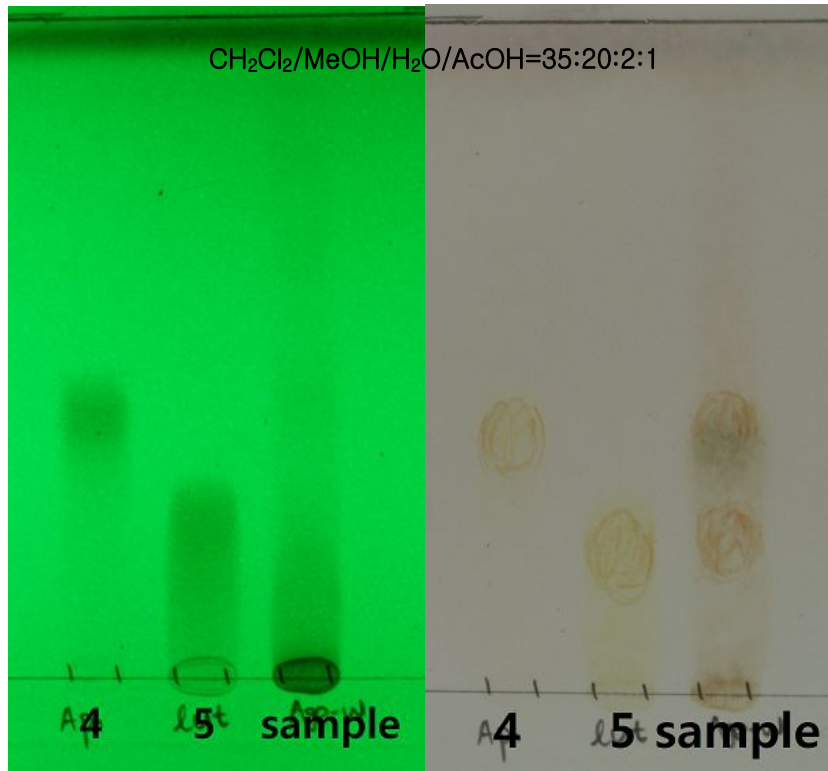


Figure 3-11. TLC chromatogram for standards and sample (UV 254nm, anisaldehyde-H₂SO₄)

- silica gel TLC plate 및 전개용매 CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/AcOH=35:20:2:1에서 표준품 화합물 4, 5는 각각 Rf값 0.38 및 0.21을 가지며 이와 동일 Rf값 및 동일 색상을 갖는 반점이 큰등골짚신나물 표준열수추출물의 검액에도 존재하였다..
- 큰등골짚신나물 대조생약 표준액에서 얻은 반점과, 반점의 색상 및 Rf값은 큰등골짚신나물 표준열수추출물 검액에서 동일하게 존재하였다.
- 따라서, 간편한 확인시험법으로서 제시된 TLC 확인법이 유용함을 확인하였다.

3. 지표성분의 대량분리법 확립

- 큰등골짚신나물의 70% MeOH 추출물을 상법에 따라 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc 및 n-BuOH를 이용하여 순차적으로 분획하였다. 이때 얻어진 n-BuOH 분획을 Diaion HP-20 column에 적용하고 H₂O, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, MeOH, Acetone을 이용하여 순차적으로 용출하여 6개의 소분획을 얻었다.
- 얻어진 소분획 중 50% 및 70% MeOH 용출 소분획을 합친 후 Sephadex LH-20 column chromatography (70% MeOH)에 적용하고 이때 얻어진 분획 중 지표성분이 함유된 부분을 다시 RP-18 column chromatography (40% MeOH), silica gel column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O=70:30:3) 및 silica gel column chromatography (EtOAc:MeOH:H₂O=100:10:7)에 순차적으로 적용하여 지표성분인 luteolin 7-glucuronide를 분리 정제 할 수 있었다.
- 각각의 column chromatography에서 얻어진 소분획 중 지표물질이 함유하는 fraction은 luteolin 7-glucuronide 표준액과 비교 TLC로부터 확인할 수 있었다.

4. 활성시험용 추출물 및 화합물의 제공

○ 활성시험용 표준추출물의 제조 및 제공

- 큰등골짚신나물의 열수추출물 제조 : 큰등골짚신나물 1kg을 세절한 후 증류수 10L를 가하고 수용상에서 5시간동안 2회반복 열수추출하며 열시여과하고 여액을 동결건조하여 추출물 제조하였다.
- 큰등골짚신나물의 열수추출물 107.73g을 동물시험용으로 활성팀(제1협동)에 제공하였다.

○ 큰등골짚신나물의 열수추출물 추가제공

- 큰등골짚신나물 100g을 세절한 후 증류수 1L를 가하고 수용상에서 5시간동안 2회반복 열수추출하며 열시여과하고 여액을 동결건조하여 추출물 제조하였다.
- 큰등골짚신나물의 열수추출물 130.5mg, 138.5mg을 활성팀(제1협동)에 제공하였다.

○ 화합물의 제공

- n-BuOH분획을 각종 chromatography에 적용하여 분리된 화합물 중 apigenin 7-glucuronide와 luteolin 7-glucuronide 각각 10.3mg 및 10.0mg을 활성팀(제1협동)에 제공하였다.

제 4 절. 큰등골짚신나물 추출물의 대량생산연구

1. 최적추출공정 연구

가. pilot-scale 시험[1차시도]

- lab scale에서 시행하였을 때, 물 100%로 추출을 하는 것이 추출효율과 HepG2 cell로 본 간보호 효과가 가장 높음을 확인하였으며, pilot scale로 스케일업을 시도하였다.
- 첫 번째로 시도한 pilot scale의 추출공정방법은 다음과 같다.

원료로서 2009년 함양에서 수확한 큰등골짚신나물 지상부의 건조 50kg을 사용하였다. 추출은 2차로 나누어 진행하였으며, 1차추출은 30배의 정제수, 2차추출은 10배의 정제수로 진행하였다. 추출온도는 추출시 다당류가 함께 추출됨으로써 여과 작업에서 어려움 및 이후 공정에서 비용의 증가를 피하기 위해 60℃의 온도를 사용하였다. 1,2차 공히 60℃, 2시간씩 물 100%에서 추출하였다. 건조는 감압조건에서 진공건조방법으로 시행하였다.

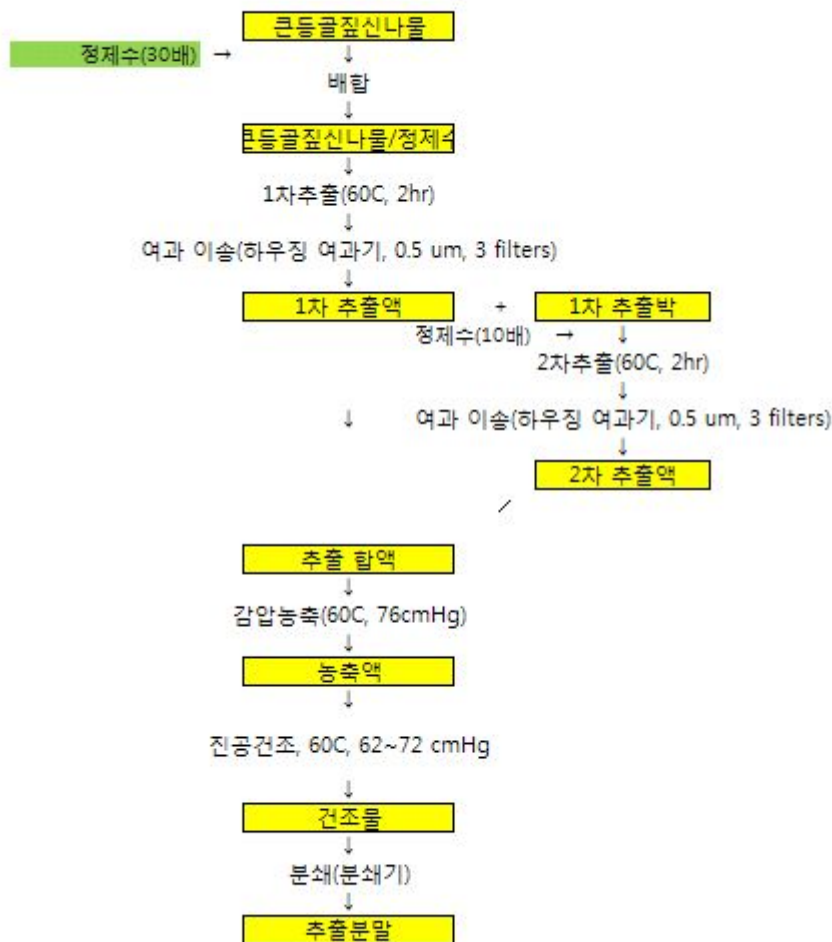


그림 4-1. 1차 시도한 pilot-scale 추출의 공정도

- 마지막 최종생산물은 흑갈색의 분말로서 3.75kg이 생산되었다. 50kg의 큰등골짚신나물추출물에서 3.75kg(7.5%)의 고형분의 수율을 나타내서, lab-scale에서 100℃로 2시간 추출했을 때의 효율인 17.1%의 1/2에도 못미치는 생산수율을 나타냈다.

이는 추출의 온도조건을 60°C에서 시행함으로써 고형분 중에 다당류가 상대적으로 많이 추출됨으로써 추출효율이 낮아진 것으로 생각된다.

○ 추출과정 중 많은 문제점들이 도출되었는데 이는 다음과 같다.

- 진공 건조시 추출물의 건조형태가 물엿처럼 끈적한 상태로 건조가 되었으며, 또한 상부는 피막을 형성하여 내부의 수분을 증발시키는 데 어려움이 있어 건조시간이 많이 소요되었다. 실제 본 실험에서 65시간의 과도한 시간이 필요하여 건조공정의 재검토가 필요하였다.

- 농축액의 건조품을 분쇄시, 흡습성이 강하여 바로 흡습 및 녹아나는 현상이 발생하고 이로 인해 분쇄의 어려움이 있었으며, 또한 분쇄 후 포장시에도 같은 현상이 발생하였다.

- 최종생산물인 추출분말에서 호기성 미생물(PCA agar에서 배양) 4.6×10^3 /g로 다량 오염되어 살균 공정이 추가가 되어야 할 것으로 생각되었다.

나. pilot-scale 추출과정에서 미생물 오염의 원인 파악

○ 60°C에서의 추출과정 중에서 미생물 오염의 원인을 파악하기 위하여 pilot-scale 추출과정을 lab-scale로 시뮬레이션하였다. 추가로 70% EtOH에서 저온살균의 효과를 알아보기 위해 농축 후에 저온살균의 단계를 추가하고 중요단계에서 sample을 3반복으로 회수하여 PCA media에서 호기성 미생물 수의 추이를 확인하였다.

표 4-1. 1차 시도 pilot-scale 추출의 방법과 세부단계의 오염균수 측정

공정단계	세부방법	호기성 미생물균수
원료	50 g	$5.6 \pm 2.0 \times 10^7$ /g
1차추출	1.5L, 60°C, 2hr	
2차추출	0.5L, 60°C, 2hr	
여과	Watmann No. 2	$1.6 \pm 0.4 \times 10^5$ /g
농축	55~60°C, Rotary evaporator 2.0L → 50 ml	
저온살균	EtOH 2.3vol, 70°C, 2hr	$2.9 \pm 0.7 \times 10^2$ /g
건조	vacuum oven, 55°C	
추출물	2.17g	$2.6 \pm 0.4 \times 10^2$ /g

○ 오염균의 분석결과, 2종 이상의 균종이 섞여 있었으며, 대부분의 콜로니는 회색~흰색의 넓은 모양을 이루고 bacillus 특유의 이취로 미루어 bacillus 계통으로 결론지었다. 이들은 원료 자체에서부터 발생하였고 저온살균시 90% 정도의 사멸효과를 보였으나 여전히 높은 오염수를 보여 에탄올처리에 이은 저온살균의 효과가 오염균 제어에 확실한 수단이 되지 못했다.

○ 결론: 오염균이 원료자체에서 발생하기 때문에, 이를 확실히 묶을 수단으로서 추출시 가온의 온도를 높이는 것이 제안되었다. 이는 지표물질 확보 및 기준시험법에서 사용되는 것처럼 온도를 100°C로 처리되어도 지표물질을 포함한 flavonoid 물질들이 추출과정 중에 줄어들지 않았고, 재현성 있는 함량을 나타내었기 때문이다. 60°C에서 추출함으로써 얻어지는 이점은 추출비의 저비용이 가장 큰 이점이라 하겠다. 다당류가 적게 추출됨으로서 여과과정이 수월하다는 점과 저온추출에서 얻어지는 경제성 확보가

이것이다. 그러나, 원료자체에서 발생하는 오염균의 문제는 100℃로 추출을 진행할 수 밖에 없게 만들었다. 따라서, 이후 지표물질 함량 및 추출수율의 확인 및 임상진행을 위한 샘플의 확보는 모두 100℃의 물추출물로 진행되었으며, 100℃ 물 추출물의 쉬운 건조를 위해 건조는 분무건조법을 채택하였다.

다. 부형제에 의한 안정성 테스트

(1) 연구방법

- 부형제의 함량 및 건조방법을 달리하여 효율 및 추출물의 조작편이성을 조사하였다. 제1세부과제로부터 받은 큰등골짚신나물 건조를 정제수로 원료를 깨끗이 세척하고, 250 mesh의 체로 물을 제거한 후, 50℃에서 24시간 건조하였다. 큰등골짚신나물 건조의 7배의 정제수를 투입하고 104℃에서 4시간 끓인 다음, 53µm의 필터로 여과하여 추출액을 얻었다. 추출액을 Brix 20~40이 될 때까지 76mmHg, 60C로 감압농축을 실시하고, 건조방법과 부형제의 비율에 의한 효율을 테스트하기 위하여 농축액에 정해진 양의 maltodextrin(d.e.=12)을 첨가하여 200~100℃에서 spray drying을 실시하거나, -40℃에서 동결건조를 실시하여 건조분말을 얻었다. 최종 수율과 조작편이성으로 부형제 함량의 적정량을 평가하였다.
- 흡습성을 측정하기 위해서, 분말 1g을 증류수를 채운 데시케이터에 넣고 1시간 간격으로 7시간 동안 흡습에 따른 무게증가를 측정하여 습기에 의한 안정성을 평가하였다.
- 또한, 부형제의 함량 및 건조방법을 달리하여 효율 및 추출물의 조작편이성을 조사하였다.

(2) 결과

- 건조방법 및 부형제의 첨가에 의한 추출효율의 조사

표 4-2. 건조 방법과 부형제 첨가비율에 따른 원료의 특성

건조방법 부형제비율	Freeze drying	spray drying			
		20%	40%	60%	80%
원료무게	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg
추출물의 양	260 g	197 g	308 g	615 g	1,260 g
원료 성분 의 수율	17.5 %	10.5 %	12.3 %	16.4 %	16.8 %
색깔	진갈색	갈색	갈색	연갈색	연갈색
상태	약간 굳음	양호	양호	양호	양호

- 건조의 방법으로서 동결 건조시 수율이 제일 높았지만, 상온의 상태 노출시 곧바로 굳는 단점이 있었고 또한 건조시 끈적인 액상의 상태에서 증발이 더디고 거품이 발생하여 대량 생산시 비용증가와 조작성이 어려울 것으로 예상되었다.
- 분사건조는 전반적으로 10.5~16.8 %의 수율을 보여주었다. 이는 필터링의 비용 증가 때문에 가루의 형태로 제분하지 않고 세절하여 추출을 실행하면서 추출효율이 그리 높지 않았을 것으로 예상된다. maltodextrin을 적게 넣을수록 끈적임 현상이 강하여 추출분말이 Drying chamber에 끈적한 필름막을 형성하였는데, 이것이 수율이 낮게 나오는 원인이다. 특히 20%, 40%에서는 벽에 달라 붙는 현상이 강했다.
- 따라서, 대량추출공정에 있어서 최소 60% 이상의 부형제를 넣는 것이 바람직하다 하겠다.

라. 건조방법 및 부형제의 첨가에 의한 추출분말의 안정성 조사

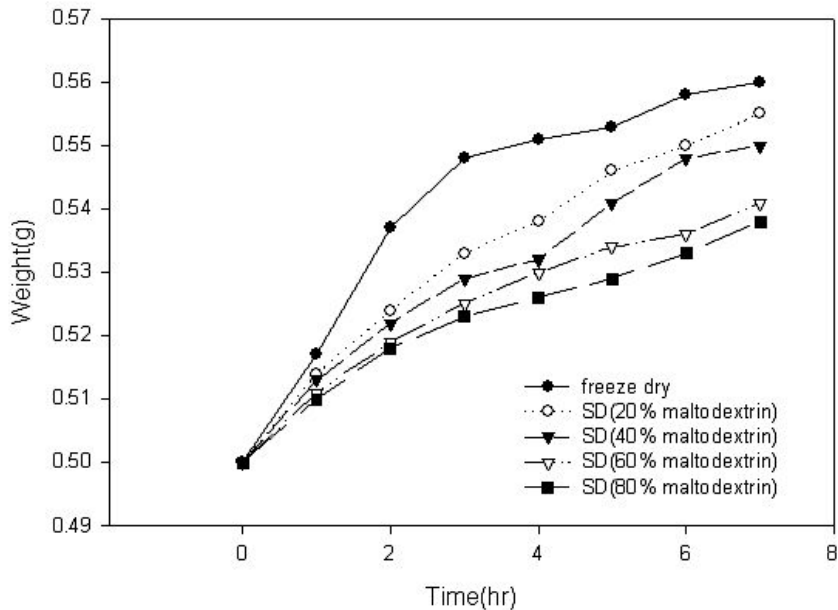


그림 4-2. 추출분말의 흡습성에 대한 부형제 maltodextrin 함량의 영향

- maltodextrin 60%나 80% 정도를 혼합하여 분사건조하는 방식이 추출분말의 흡습성이 낮아서 다루기에는 간편하나 20%와 40%는 급속하게 공기 중의 물을 흡수하는 것으로 나타나서 하루 정도가 지나면 caking 현상이 나타나서 저장안정성이 낮은 것으로 나타났다.
- 따라서 낮은 함량으로 부형제를 사용할 경우에는 저장안정성을 확보하기 위해서 밀봉에 의한 방습과 수분흡수제를 병행 사용하는 것이 더욱 필요할 것으로 판단된다.
- 결론적으로 동결건조보다는 부형제로서 maltodextrin을 60% 이상 사용하여 spray drying 하는 것이 경제성이나 조작 간편성에서 우수한 것으로 나타났다.
- 최종적으로는, 인체에 필요한 하루 유효량과 제형안정성을 고려하여 부형제의 비율이 결정되어야 할 것이다.

마. 최적추출공정 확립

- 추출방법 및 부형제 결정에 의해 확립된 추출최적화 공정은 다음과 같다.

공정단계	세부방법
원료	큰등골짚신나물(지상부, 건조)
1차추출	정제수 12배, 104℃, 4hr
2차추출	정제수 12배, 104℃, 4hr
여과	53um filter
농축	60℃, 760mmHg에서 감압농축, 25 brix 기준
건조	maltodextrin 20~60% 혼합 후, 98~220℃에서 분무건조
추출물	큰등골짚신나물 수추출 건조물

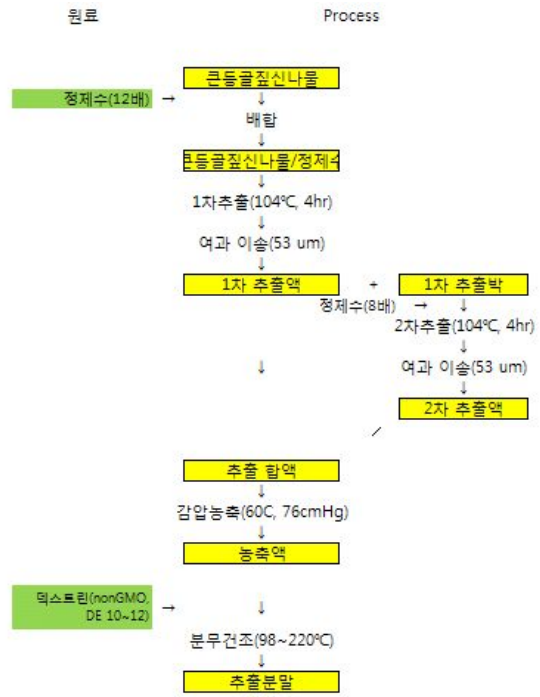


그림 4-3. 확립된 큰등골짚신나물 열추출물의 제조공정도

2. 확립된 제조공정에 의한 pilot-scale 제조과정 중 지표성분 및 함량의 변화

가. 재료 및 방법

- 200kg의 큰등골짚신나물 건조를 원료로 확립된 추출공정법에 따라 3회 실시하고, 제조공정 중간산물과 최종산물을 회수하여 각 단계에서의 고형분 수율과 Luteolin 7-glucuronide의 함량을 측정하였다.
- 생산 과정 중에 품질관리를 위하여, 각 단계별로 고형분 함량 및 지표물질 Luteolin 7-glucuronide의 함량을 측정하였다.
- 고형분의 함량은, 각 단계별로 80ml씩 회수한 후, 회전증발농축기를 사용하여 시작 부피의 1/3로 농축한 후 동결건조기를 사용하여 완전히 건조시킨 후 고형분의 무게를 측정하였다.
- 지표물질의 함량은 각 단계별 회수액을 적정 농도로 희석하여 완제품 기준시험법을 기준으로 Luteolin 7-glucuronide의 함량을 측정하였다.

나. 연구 결과

- 다음 표는 생산 공정단계별 고형분 함량 수율의 변화이다.

표 4-3. 제조공정 중 고형분 수율의 변화

제조회수	1회	2회	3회	평균+_표준편차
1차추출액	11.4 %	13.4 %	10.2 %	11.7±1.6%
2차추출액	6.1 %	4.8 %	5.4 %	5.4±0.7%
추출합액	17.9 %	17.5%	15.9 %	17.1±1.1%
농축액	20.0 %	15.9 %	21.1 %	19.0±2.7%
추출분말	19.1 %	16.3 %	20.0 %	18.5±2.0%

- 2차 추출액은 1차추출액에 비해서 약 1/1.9~1/2.8의 고형분이 추출되어서 2차 추출은 경제

적 측면에서 꼭 필요하다 하겠다. 그러나 2차 수율이 1차 수율의 일반적인 추출수율인 1/3 보다 높은 추출수율을 보인다는 점에서 1차 수율시 추출용매인 물을 증가시키는 것을 고려해볼 만하다.

○ 추출분말의 고형분의 최종 수율은 16.3~20.0%를 나타내서 실험실 스케일에서의 수율 17.1%와 비슷한 생산량을 보여주었다.

○ 다음 표는 생산 공정단계별 지표물질의 함량 변화이다.

표 4-4. 제조공정 중 지표물질 함량의 변화

제조회수	1회	2회	3회	평균±표준편차
1차추출액	1.29	1.36	1.32	1.32±0.04
2차추출액	0.41	0.44	0.49	0.45±0.04
추출합액	0.84	1.04	0.92	0.93±0.10
농축액	23.2	12.3	24.0	19.8±6.53
추출분말	29.0	32.1	33.8	31.6±2.42

○ 2차 추출액은 1차 추출액에 비해 약 1/3의 비율로 지표물질의 함량이 줄어들어서, 고형분이 추출되는 것에 비해서 지표물질의 추출비율이 줄어드는 것이 확인했다. 이는 전분 등의 일반 고형분에 비해서 지표물질인 Luteolin 7-glucuronide를 포함한 플라보노이드 물질이 1차 추출에서 상대적으로 많이 추출되는 것에서 기인한 것으로 보인다.

○ 최종 추출분말은 29.0~33.8 mg/ml의 지표물질을 함유하고 있었다. 이는 향후 건강기능식품으로 개별인증에 대한 기본함량 규정시 품질기준으로 쓰이는 중요한 기준이다.

3. 기준시험법 연구

가. 기준시험법

○ 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발할 목적으로 큰등골짚신나물 수추출물의 표준화를 위해 제2세부과제에서 Luteolin 7-glucuronide를 지표성분으로 설정한 바 있다.

○ 그러나 큰등골짚신나물을 물추출해서 동결건조한 원료와는 달리, 대량추출시 분무건조한 원료제품은 부형제로서 maltodextrin이 60% 함유되어 기존 기준시험법을 적용할 수는 없다. 이는 HPLC 용매에(acetonitrile 0~30%)에 maltodextrin이 결정화되어 flow를 막기 때문이다.

○ 따라서 부형제를 70% methanol로 제거하는 단계를 추가하고 기타 작은 수정을 거쳐 원료완제품을 위한 기준시험법을 완성하였다.

○ 다음은 완성된 기준시험법이다.

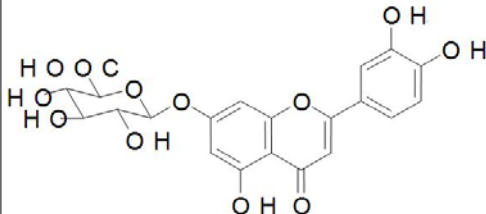
□ 검체의 종류

- 검 체 명 : 아그리모니 추출분말(큰등골짚신나물추출물)
- 시 형 물 질 : Luteolin 7-glucuronide
- 식 품 제 형 : 분말
- 시 형 날 짜 : 2013-07-01 ~ 2013-07-09
- 보 관 조 건 : 상온

□ 시험의 개요

- 큰등골짚신나물추출분말 중 luteolin 7-glucuronide를 증류수에 추출하여 C18 컬럼을 통하여 분리하는 방법으로 254nm에서 luteolin 7-glucuronide을 확인하고 표준물질의 검량선을 이용하여 시료 중 luteolin 7-glucuronide의 함량을 정량하는 것을 목적으로 한다.

□ Luteolin 7-glucuronide

이명	LUTEOLIN-7-GLUCURONIDE:Quercetin 7-Glucuronide Quercetin-7-O-glucuronide:Quercetin 7-O-β-D-Glucuronide 3',4',5-Trihydroxy-7-(β-D-glucopyranuronosyloxy)flavone 3',4',5-Trihydroxy-7-[(β-D-glucopyranuronosyl)oxy]flavone 7-(6-Oxo-β-D-glucopyranosyloxy)-3',4',5-trihydroxyflavone 3',4',5-Trihydroxyflavone-7-yl β-D-glucopyranosiduronic acid 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-4-oxo-4H-1-benzopyran-7-yl β-D-Glucopyranosiduronic Acid
분자식	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
구조	
분자량	462.36 g/mol
CAS number	38934-20-2

□ 실험방법

1) 시약 및 시액

- (1) 표준물질 : Luteolin 7-glucuronide (한방산업진흥원, purity : 95.94%)
- (2) 일반시약
 - 가. 증류수
 - 나. 메탄올(덕산, HPLC grade)
 - 다. 아세토니트릴(Burdic & Jackson)
 - 라. Potassium dihydrogen phosphate(KH₂PO₄, 덕산)

2) 표준용액의 제조

- (1) Luteolin 7-glucuronide를 일정량 취해 50% 메탄올에 넣어 용해, sonication을 3~5분간 하여 완전히 녹인 후 용량플라스크에 정용한다.
- (2) Stock solution을 50% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

3) 시험용액의 제조 (아그리모니 추출분말)

- (1) 검체 약 150 mg을 50 ml conical tube에 넣고, 증류수를 3 ml 넣어 덩어리가 없어질 때까지 교반 후, 5분간 초음파 처리한다.
- (2) HPLC grade 메탄올을 7 ml 넣고, 두 층이 잘 섞이도록 흔들어준다.(aggregation 형성됨)
- (3) 4,000 rpm, 5분간 원심분리하여 상층액을 새로운 50 ml conical tube에 모은다.
- (4) 남은 침전물에 10 ml의 70% 메탄올을 넣고, 초음파처리와 교반기를 사용하여 침전물이 풀어지도록 한다.
- (5) 4000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리 상층액과 합한다.
- (6) 약 10 ml의 증류수를 더하여 정확히 30 ml이 되도록 한다.

(7) 이것을 0.45 um syringe filtering한 여과액을 최종 시험용액으로 사용한다.

4) 기기분석조건

Instrument Agilent 1260 Infinity

Detector DAD detector

Wavelength 254 nm

Column Shiseido Capcell Pak UG80 C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)

A: 아세트니트릴, B: 20 mM KH ₂ PO ₄ , Gradient			
	min	이동상 A	이동상 B
Mobile Phase	0	15	85
	15	20	80
	20	30	70
	25	15	85
	30	15	85

Flow rate 0.65 ml/min

Injection volume 5 μl

Oven Temperature 35°C

5) 계산식

$$\text{Luteolin 7-glucuronide(mg/g)} = \text{검량선결과}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종량(ml)} \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}$$

나. 특이성(specificity) : Luteolin 7-glucuronide의 확인

- 표준용액 분석 결과 luteolin 7-glucuronide peak가 약 7분대에 나타났으며, 시험용액에서도 동일한 시간대에 peak(RT: 7.9~8.0min)가 나타났다.
- 스펙트럼 확인 결과, 시험용액과 표준용액의 spectrum 패턴도 동일한 것으로 확인 되었다. 시험용액과 표준용액의 크로마토그램은 아래와 같다.(그림 4-4)
- 따라서 완성된 기준시험법은 다른 물질이 섞이지 않은 지표물질만의 peak를 확인할 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

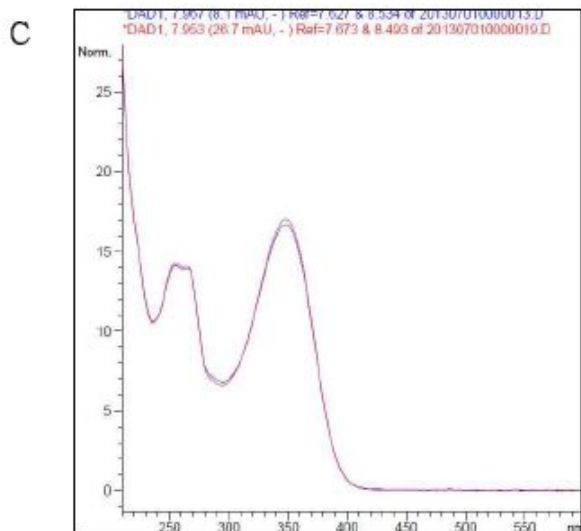
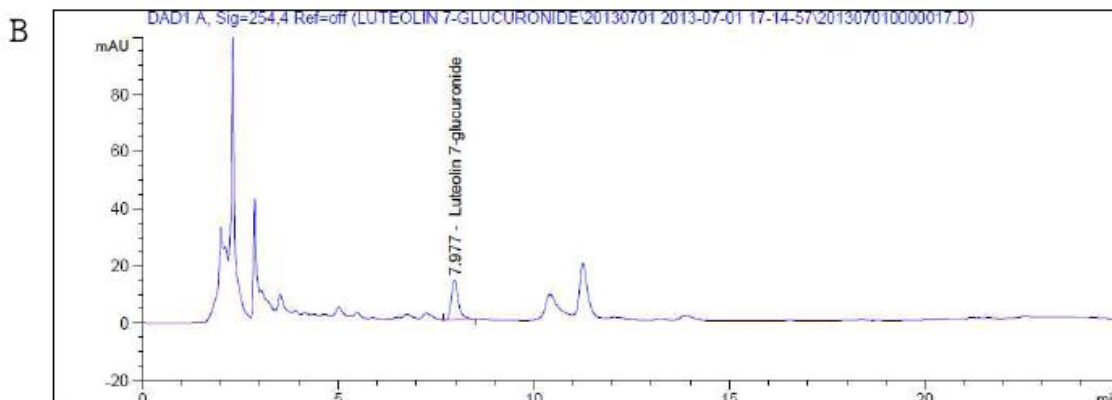
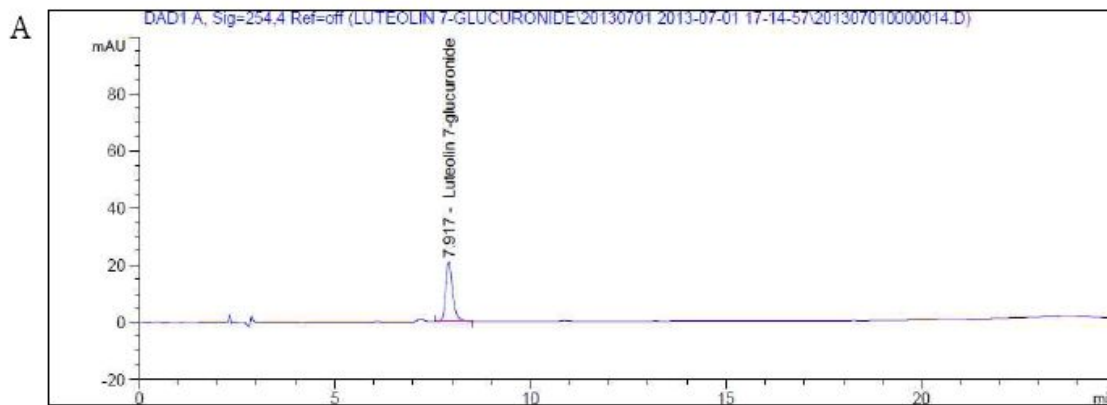


그림 4-4. HPLC chromatogram과 spectrum 비교

A. 표준품

B. 검체

C. 스펙트럼 비교

다. 선형성(Linearity)

(1) 표준용액에서의 선형성

- 표준용액의 직선성 구간을 확인하기 위해 표준용액은 조제 후 이를 적절히 희석하여 기 분석 하였다. 그 결과 0.83~83 ppm에서 직선성이 유지됨을 확인할 수 있었다.
- 표준용액의 검량선 결과는 Table 1과 같다. 상관계수(R^2)는 0.9998이었다.

표 4-5. 표준용액의 분석결과 및 검량선

STD level	농도(ug/ml)	area	검량선 결과
1	0.83	10.64105	
2	4.15	53.68938	
3	20.75	260.35297	
4	41.5	512.61609	
5	83	1001.8121	

(2) 검체 용액에서의 선형성

- 또한, 시료량에 따른 직선성을 확인하기 위하여 150mg을 100%로 보았을 때 150mg의 60~150%에 해당하는 시료량(약 90mg ~ 225mg)에 대해 실험을 진행하였다.
- 분석한 결과, 결과값의 평균은 2.766±0.110 mg/g으로 시료량에 대한 편차는 없었다. 또한 반복성 실험 결과와 비교하여도 비슷한 수준이었다.
- 다음은 직선성 실험 결과값이다 (표 4-6)

표 4-6. 검체용액 농도에 따른 측정값의 변화

	시험용액 농도 (ug/ml)	채취량 (mg)	용액량 (ml)	희석 배수	표준품 순도	Luteolin 7-glucuronide (mg/g)	
1	60%	9.2323	100.5	30	1	0.9594	2.6440
2	100%	15.21408	153.2	30	1	0.9594	2.8583
3	150%	21.9884	226.3	30	1	0.9594	2.7966
mean±S.D (mg/g)						2.766±0.110	

라. 정밀성(Precision)

(1) 일내반복성

- 같은 시료량에 따른 함량 편차여부를 확인하기 위해 시료채취량을 약 150 mg으로 하여 3반복 실험을 진행하였다. 그 결과, 같은 시료량에 따른 유의적인 편차는 나타나지 않았으며, 시료 중 luteolin 7-glucuronide의 함량은 2.645±0.040 mg/g임을 확인할 수 있었다.
- 다음은 반복성 실험 결과값이다 (Table.2). 상대표준편차(RSD)는 1.5%이었다.

표 4-7. 일내 반복성

	시험용액 농도 (ug/ml)	채취량 (mg)	용액량 (ml)	희석 배수	표준품 순도	Luteolin 7-glucuronide (mg/g)
1	13.95398	154.5	30	1	0.9594	2.5995
2	14.35323	154.6	30	1	0.9594	2.6722
3	14.30149	154.5	30	1	0.9594	2.6642
mean±S.D (mg/g)						2.645±0.040

(2) 일간반복성

- 또한 시료중 Luteolin 7 -glucuronide 정량에 따른 실험의 재현성을 확인하기 위하여, 다른 날짜에 실험한 반복성 실험 중 100%에 해당하는 시료량인 150mg을 취하여 3반복 실험하여 실험의 재현성을 확인하였다.
- 샘플을 3반복 실험한 결과 결과값 간의 평균은 2.848±0.011 mg/g으로 실험간의 편차가 없었다. 반복성, 직선성 실험결과와 비교하여도 비슷한 수준이었다. RSD=0.4%이었다.

표 4-7. 일내 반복성

	시험용액 농도 (ug/ml)	채취량 (mg)	용액량 (ml)	희석 배수	표준품 순도	Luteolin 7-glucuronide (mg/g)
1	15.21408	153.2	30	1	0.9594	2.8583
2	15.04957	152.1	30	1	0.9594	2.8478
3	15.08812	153.1	30	1	0.9594	2.8365
mean±S.D (mg/g)						2.848±0.011

마. 정확성(Accuracy)

- 정확성 측정은 3 농도에서 실험되었으며, 이미 알고 있는 Luteolin 7-glucuronide의 표준 용액을 검체에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 회수율(Recovery)을 측정하여 실시되었다.
- 약 150mg의 큰등골짚신나물을 취한 공시료에 표준용액(2mg/ml)을 3가지 농도로 첨가하고 기준시험법의 전처리법에 의해 처리한 뒤 ,HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하였다.
- 실험된 세 농도에서 99.4~101.5 %의 높은 회수율을 보여 정확성 면에서도 우수함을 확인하였다.

표 4-8. 회수율 측정

첨가 표준품 농도 (공시료지표물질에 대한 상대 농도)	회수율(%)	상대표준편차(RSD)
1mg/g (36.5%)	100.4% ± 4.6%	4.59
2 mg/g (72.9%)	101.5% ± 2.6%	2.52
4 mg/g (145.8%)	99.4% ± 4.5%	4.50

바. 기준시험법 검토 결과

- 본 시험법검토는 큰등골좁신나물 추출분말 중 luteolin 7-glucuronide의 정량 분석 가능여부를 확인하기 위해 진행되었다. 제시된 시험법에 따라 Shiseido Capcell Pak UG80 C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 시료의 반복성, 직선성, 재현성 시험법 검토를 진행하였다.
- 반복실험에 따른 정밀성을 확인하기 위하여 150 mg씩 3개의 샘플을 취하여 실험한 결과 시료 중 luteolin 7-glucuronide의 함량은 2.645±0.040 mg/g으로 정밀성을 확인할 수 있었다. 시료 채취량(90~225 mg)에 따른 편차는 나타나지 않았으며(2.766±0.110 mg/g), 표준물질과 시료 중 luteolin 7-glucuronide의 peak가 모두 약 7분대에서 동일하게 검출되었고, spectrum도 일치하여 시료 중 luteolin 7-glucuronide를 확인하였다.
- 또한, 일자간 재현성을 확인하기 위해 일자를 달리하여 반복성 실험과 다른 날짜에 세 번의 반복실험을 한 재현성 실험결과를 통하여 시료 중 luteolin 7-glucuronide의 함량이 2.848±0.011 mg/g이었으며, 반복성과 직선성 실험 결과와 비교하여 볼 때 재현성을 확인할 수 있었다.
- 위의 모든 실험결과를 종합하여 볼 때 retention time은 약 7분대 동일하게 분석이 되었으며, 분석값의 평균과 표준편차가 2.753±0.102 mg/g으로 일자간의 차이도 거의 없는 것으로 확인되어 실험의 정밀성이 확인되었다.
- 마지막으로 정확성을 측정하기 위해 표준품을 추가하여 3가지 농도에서 회수율을 측정하였을 때 99.4~101.5 %의 회수율을 보여 정확성이 확보된 방법이라 하겠다.

제 5 절. 큰등골짚신나물의 간손상 개선능에 대한 인체적용시험

1. 전 인체적용시험

- 본 인체적용시험 전에 큰등골짚신나물 추출물의 적정 복용량을 파악하기 위해, 피험자 15명을 3그룹으로 나누어 대조군, 저복용군, 고복용군으로 나누어 인체적용시험을 진행하였다.

가. 인체적용시험의 진행 요약

- (1) CRO 계약을 체결하였다.
- (2) 인체적용시험자료집 작성: 기원, 개발경위, 사용현황, 섭취량, 기능성, 안전성에 관한 문헌 및 근거자료를 수집하고 정리하여 인체적용시험자료집을 작성하였다.
- (3) 제안된 인체적용시험 계획서에 근거하여 CRO기관의 협조 하에 인체적용시험계획서의 주요내용을 작성하였다. 또한 제4협동 연구팀과 함께 인체적용시험피험자 선정 기준 및 시험항목에 대하여 협의하여 CRF(피험자증례시험보고서)등 인체적용시험에 관련된 프로토콜과 교본을 완성하였다.
- (4) IRB(임상연구 윤리심의위원회)를 신청하고 인체적용시험이 승인되었다(2012년 3월).
- (5) 피험자 모집과 함께 인체적용시험이 진행되었다.
 - ALT 50~200 U/L의 반건강인을 대상으로 인체적용시험자 모집
 - 파일럿 테스트 대상, 15명 인체적용피험자 모집 완료함.
- (5) 데이터 고정 및 인체적용시험 결과의 해석이 이루어졌다.

나. 인체 적용 시험 추출물 제조

- 확립된 대량제조법에 따라 2010년산 200kg을 40% 고형분 함유 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물 분말과 maltodextrin(대조군)을 불투명캡슐(1호)에 300mg씩 넣어 포장하였다. 포장된 시험물질과 대조물질 캡슐을 이중맹검 규칙에 따라 라벨링하여 인체적용시험 연구팀에 제공하였다.

다. 자료 검토 및 전략 수립

- 주관기관 및 CRO기관과 함께 준비한 전 인체적용자료를 기초로 한 간보호 기능의 규명에 대한 인체적용시험의 전략을 수립하고 프로토콜을 만드는 데 공동 참여하였다.
- CRO기관인 FDmate에서 인체적용시험에 대한 전인체적용자료를 기초로 한 인체 인체적용시험의 프로토콜을 작성하였다.
- 주요 복용방법으로서는, 1군(저용량시험군)은 하루에 1회 80mg의 큰등골짚신나물추출물을 포함하는 캡슐을 1회 복용케 하였으며, 2군(고용량시험군)은 하루에 2회 각각 캡슐을 복용케 해서 하루에 160mg의 큰등골짚신나물을 섭취하게 하였다. 3군(대조군)은 maltodextrin만을 넣은 위약캡슐을 하루 2번 복용케 하였다.
- 작성된 간기능 개선에 대한 인체적용시험에 따라 CRF(증례기록서)를 작성하였으며 인체적용시험시 사용할 수 있도록 하였다.
- 인체적용시험자료집의 핵심 내용은 다음과 같다.

※ Investigator's Brochure의 핵심내용

- 원료: 큰등골짚신나물 수추출물
 - 기능성: 간기능개선
 - 국내사용현황: 허브차 및 나물로 사용중
 - 안정성: 현재 식품으로 사용하고 있으며, 섭취량이 기존 약재 사용량보다 적은 양으로 따로 독성시험이 필요치 않음.
 - 섭취량: 설치류 시험을 근거로, 고형분 80mg/day 또는 160mg/day로 함.
 - 제조방법: 40% 수추출분말로 제조 후, maltodextrin과 혼합하여 26.7%로 조정함.
 - 시험물질의 지표성분 함량 : 3.32 ± 0.664 mg/g
-

라. 인체적용시험 계획서의 주요 내용

※ 인체적용시험계획서의 주요내용

- 시험목적
ALT수치가 상승된 피험자에 있어서 시험물질의 안전성, 유효성 평가
 - 시험물질
큰등골짚신나물 수추출분말
 - 유효성 평가변수
1차 유효성 평가변수: ALT
2차 유효성 평가변수: AST, Al-P, r-GT, T-bilirubin, Albumin, NFS(비알콜성지방간의 변화), 체중 및 BMI
 - 피험자 모집 기준
20~70세, $50\text{U/L} \leq \text{ALT} < 200\text{U/L}$
 - 시험군: 각 군당 5인씩 15인
시험군I(저용량군) : 큰등골짚신나물 고형분 80mg/day
시험군II(고용량군) : 큰등골짚신나물 고형분 160mg/day
시험군III(대조군) : maltodextrin
 - 시험기간
총 6주, 3주씩 2회 방문검사 실시
 - 기타: 무작위배정, 이중맹검
-

마. 인체적용시험의 결과

(1) ALT 정상화된 유효율 분석

(가) ITT 분석

- 시험 종료 시(6주) ALT수치를 측정하여 정상/비정상으로 나누어 비교한 결과, 정상화된 유효율은 대조군 40.00%, 시험군1 20.00% 그리고 시험군2는 0.00%로 세 군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.7253$).

Table 5-1. 시험 종료 시 ALT의 정상화된 유효율 (ITT)

ALT	n (%)			p-value‡
	대조군	시험군1	시험군2	
정상	2 (40.00)	1 (20.00)	0 (0.00)	0.7253
비정상	3 (60.00)	4 (82.00)	5 (100.00)	
합계	5 (100.00)	5 (100.00)	5 (100.00)	

‡: Fisher's Exact Test

* ALT 정상범위: 4~44

(나) PP 분석

- 시험 종료 시(6주) ALT수치를 측정하여 정상/비정상으로 나누어 비교한 결과, 정상화된 유효율은 대조군 40.00%, 시험군1 20.00% 그리고 시험군2는 0.00%로 세 군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.7253).

Table 5-2. 시험 종료 시 ALT의 정상화된 유효율 (PP)

ALT	n (%)			p-value‡
	대조군	시험군1	시험군2	
정상	2 (40.00)	1 (20.00)	0 (0.00)	0.7253
비정상	3 (60.00)	4 (82.00)	4 (100.00)	
합계	5 (100.00)	5 (100.00)	4 (100.00)	

‡: Fisher's Exact Test

* ALT 정상범위: 4~44

(2) ALT의 변화량 분석 (기저시점 대비 6주)

(가) ALT 기초통계량 분석

- ALT수치는 대조군에서 평균 76.80±42.89 IU/L, 시험군1은 평균 56.00±5.10 IU/L 그리고 시험군2는 평균 83.00±20.00IU/L로 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.1558).

Table 5-3. ALT 기초통계량

ALT	대조군 n=5	시험군1 n=5	시험군2 n=5	p-value++
Mean±SD	76.80±42.89	56.00±5.10	83.00±20.00	0.1558
Median	59.00	56.00	85.00	
Min, Max	50.00, 153.00	50.00, 62.00	53.00, 109.00	

++: Analysis of variance Analysis (ANOVA)

(나) ITT 분석

○ 기저시점 대비 6주의 ALT 변화량은 대조군의 경우 평균 19.00±16.58 IU/L, 시험군1은 평균 7.00±7.11 IU/L 그리고 시험군2는 평균 0.60±8.17 IU/L로 ALT 변화량은 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.1558).

Table 5-4. ALT 변화량 분석 (ITT)

ALT	대조군 n=5	시험군1 n=5	시험군2 n=5	p-value*
Mean±SD	19.00±16.58	7.00±7.11	0.60±8.17	0.1558
Median	16.00	6.00	0.00	
Min, Max	3.00, 40.00	-3.00, 16.00	-8.00, 12.00	

*: Kruskal-Wallis Test

(다) PP 분석

○ 기저시점 대비 6주의 ALT 변화량은 대조군의 경우 평균 19.00±16.58 IU/L, 시험군1은 평균 7.00±7.11 IU/L 그리고 시험군2는 평균 0.75±9.43 IU/L로 ALT 변화량은 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.2550).

Table 5-5. ALT 변화량 분석 (PP)

ALT	대조군 n=5	시험군1 n=5	시험군2 n=4	p-value*
Mean±SD	19.00±16.58	7.00±7.11	0.75±9.43	0.2550
Median	16.00	6.00	-0.50	
Min, Max	3.00, 40.00	-3.00, 16.00	-8.00, 12.00	

*: Kruskal-Wallis Test

바. 결론

- 6주에 걸쳐서, 5명씩 시험군1(저용량, 80mg/day), 시험군2(고용량, 160mg/day) 모두 대조군(0mg/day)에 비해서 ALT수치가 낮아지지 않은 결과를 나타내었고 세 그룹 간에는 모두 유의할만한 차이가 나타나지 않았다.
- 오히려 단순수치로 보면 대조군의 경우가 -19.0 이 줄어들어 시험군 1, 시험군 2에 비해 ALT 수치가 낮아진 결과인데 이는 위약효과에 기인한 것으로 생각되었다. 또한 ITT, PP test에서 세 그룹간에 유의한 만한 차이가 없는 것은 안전성 측면에서 고농도에서도 독성이 없다는 것을 확인할 수 있었다..
- 결론적으로 전인체적용시험에서 우리는 어떤 특정한 경향성을 찾아낼 수 없어서 본 인체적용시험시 복용량 결정에 뚜렷한 기준을 정할 수 없었다.

Table 5-6. ALT 변화량의 요약

시험 그룹	피험자수	3주	6주
대조군	5	-21.2 ± 15.8	-19.0±16.6
시험군1(80mg/day)	5	-11.2 ± 13.9	-7.0 ± 7.1
시험군2(160mg/day)	4	-6.8 ± 17.7	-0.8 ± 9.4

제 2 절. 본 인체적용시험

- 본 인체적용시험 피험자 75명을 2그룹으로 나누어 대조군, 시험군으로 나누어 인체적용시험을 완료하였다.

가. 인체적용시험의 진행

- (1) 인체적용시험자료집 작성: 기원, 개발경위, 사용현황, 섭취량, 기능성, 안전성에 관한 문헌 및 근거자료를 수집하고 정리하여 인체적용시험자료집을 작성하였다. 인체적용시험자료집(Investigator’s Brochure)의 핵심적인 내용은 위와 같다.
- (2) 인체적용시험계획서 작성: 제안된 인체적용시험 자료집에 근거하여 CRO기관의 협조 하에 인체적용시험계획서의 주요내용을 작성하였다.
- (3) CRF 등 작성: 인체적용시험피험자 선정 기준 및 시험항목에 대하여 협의하여 CRF(피험자증례시험보고서)등 인체적용시험에 관련된 프로토콜과 교본을 완성하였다.
- (4) IRB(임상연구 윤리심의위원회)를 신청하고 인체적용시험이 승인되었다(2013년 3월)..
- (5) 피험자 모집과 함께 인체적용시험이 진행되었다.
 - ALT 45~200 U/L의 반건강인을 대상으로 인체적용 시험자 모집
 - 80명 인체적용피험자 모집완료함.
- (6) 데이터 고정 및 인체적용시험 결과의 해석이 이루어졌다.

나. 인체 적용 시험 추출물 제조

- 전인체적용시험과 마찬가지로의 방법으로 큰등골짚신나물 2010년산 200kg을 40% 고형분

함유 추출물로 제조하여 인체적용시험에 사용하였다.. 제조된 추출물 분말과 maltodextrin (대조군)을 불투명캡슐(1호)에 300mg씩 넣어 포장하였다.

- 포장된 시험물질과 대조물질 캡슐을 이중맹검 규칙에 따라 라벨링하여 인체적용시험 연구팀에 제공하였다.

나. 자료 검토 및 전략 수립

- 주관기관 및 CRO기관과 함께 준비한 전인체적용자료를 기초로 한 간보호 기능의 규명에 대한 인체적용시험의 전략을 수립하고 프로토콜을 만드는 데 공동 참여하였다.
- CRO기관인 HamiltonCS에서 인체적용시험에 대한 전인체적용자료를 기초로 한 인체적용시험의 프로토콜을 작성하였다.
- 주요 복용방법으로서는, 시험군은 하루에 2회, 80mg의 큰등골짚신나물추출물을 포함하는 캡슐을 복용케 하였으며, 대조군은 0mg(maltodextrin 100%)의 캡슐을 하루에 2회 각각 캡슐을 복용케 하였다. 작성된 간기능 개선에 대한 인체적용시험에 따라 CRF(증례기록서)를 작성하였으며 인체적용시험시 사용할 수 있도록 하였다.
- 인체적용시험자료집의 핵심 내용은 다음과 같다.

※ Investigator's Brochure의 핵심내용

- 원료: 큰등골짚신나물 수추출물
- 기능성: 간기능개선
- 국내사용현황: 허브차 및 나물로 사용중
- 안정성: 현재 식품으로 사용하고 있으며, 섭취량이 기존 약재 사용량보다 적은 양으로 따로 독성시험이 필요치 않음.
- 섭취량: 설치류 시험을 근거로, 고형분 160mg/day(80mg/day, 1일 2회)로 함.
- 제조방법: 40% 수추출분말로 제조 후, maltodextrin과 혼합하여 26.7%로 조정함.
- 시험물질의 지표성분 함량 : 3.32 ± 0.664 mg/g

다. 인체적용시험 계획서의 주요 내용

- (1) 요약 내용은 다음과 같다.

※ 인체적용시험계획서의 요약

- 시험목적
ALT수치가 상승된 피험자에 있어서 시험물질의 안전성, 유효성 평가
- 시험물질
큰등골짚신나물 수추출분말
- 유효성 평가변수
1차 유효성 평가변수: ALT
2차 유효성 평가변수: AST, Al-P, r-GT, T-bilirubin, Albumin, NFS(비알콜성지방간의 변화), 체중 및 BMI
- 피험자 모집 기준
20~70세, $45U/L \leq ALT < 135U/L$
- 시험군: 각 군당 5인씩 15인

시험군 : 큰등골짚신나물 고형분 160mg/day(80mg/1회, 2회 복용/day)

대조군 : maltodextrin 100%

◦ 시험기간

총 8주, 4주씩 2회 방문검사 실시

◦ 기타: 무작위배정, 이중맹검

(2) 선행연구결과

- 동물실험을 통하여 일반적 간손상과 알코올성 간손상에 대한 간기능 보호 및 개선 효과가 입증되었으며, 또한 최대 독성용량은 400mg/kg 으로 확인되었다. 또한, pilot study를 통해 두 가지 사용된 용량 (300, 600mg/day)의 결과를 바탕으로 이번 시험에서는 지표물질함량기준으로 160mg/day의 용량을 선정하여 시험을 실시하고자 한다.
- Pilot study에서의 용량은 capsule의 크기였으며 각각의 군에서의 지표물질 함량은 300mg/day은 80mg/day와 600mg/day은 160mg/day였다. 이에 따라 용량을 약 2/3인 120mg/day를 사용하여 시험하려 하였으나, pilot 용량의 중 high dose인 160mg/day를 사용하여 본 시험을 실시하려 하였다.

(3) 인체적용시험의 계획과 설계

- 본 인체적용시험은 혈액검사를 통해 ALT수치가 상승한 간기능장애를 가진 피험자를 대상으로 8주 동안 용아초 추출물을 투여 받은 군과 플라세보를 투여 받은 군간의 용아초 추출물에 대한 유효성 및 안정성을 평가하고자 했다. 단일기관, 이중맹검, 무작위배정, 플라세보대조, 인체적용시험이었다.
- 스크리닝 기간 동안 시험자는 각 피험자를 대상으로 실험실검사를 포함한 과거병력 조사, 이학적 검사, 기왕 약물 투여력 조사 등을 실시하여 피험자가 선정기준을 모두 만족하고 제외기준에 해당 사항이 없어 본 인체적용시험에 참여해도 좋을 것으로 판단되면 본 시험에 참여하도록 했다.
- 등록된 피험자는 무작위배정에 따라 무작위 순서에 따라 해당하는 시험물질 또는 위약을 투여 받고, 시험자는 모든 피험자를 대상으로 피험자가 매 방문 시 병용약물 투여력 및 이상 반응 여부를 평가하도록 하며, 인체적용시험 흐름도 일정에 따라 간기능검사 및 실험실 검사, 우울증검사 등을 시행했다.
- 시험물질을 투여 받기 전에 측정된 이학적 검사 및 실험실적 검사 결과를 인체적용시험 물질 투여 8주 간의 측정된 이학적 검사 및 실험실적 검사를 비교하여 시험물질의 유효성을 평가하도록 하며, 이상반응 발생 여부 등을 근거로 시험물질의 안전성을 평가했다.

(4) 인체적용시험 방법 및 대조군 선정의 근거

- 용아초는 이미 알려진 대표적인 천연물질로 이번 시험에서 ALT수치가 상승한 간기능장애 피험자에 대해 8주간 복용하도록 시험이 계획되었다.
- 이 물질에 대한 효과를 객관적으로 입증하기 위해 시험물질이 함유되지 않은 플라세보군에서의 ALT수치의 평균변화율을 대조로 하여 시험물질을 복용한 군에서의 ALT수치의 평균변화율이 우수할것을 확인하고자 했다. 따라서, 시험물질 복용군에서 ALT 감소의 평균 변화율이 우수함을 증명함으로써 시험물질의 투여가 ALT수치가 상승한 피험자에게 간기

능개선에 도움이 되는 것을 증명하려 하였다.

(5) 피험자의 선정기준과 제외 기준

○ 피험자의 선정기준은 다음과 같다.

- i. 만 20세 이상 70세 미만의 남, 여 피험자
- ii. 스크리닝 방문 시 ALT 수치가 아래사항에 해당하는 피험자 45U/L ALT 135 U/L
- iii. 본 인체적용시험에 자의로 참여를 결정하고 인체적용시험 동의서에 서명하고 동의한 피험자

○ 피험자의 제외기준은 일반적인 간기능 개선 확인 인체적용시험의 기준과 동일하게 적용하였다.

(6) 인체적용시험물질의 투여방법

○ 본 인체적용시험은 8주간, 이중맹검, 무작위배정, 플라세보 대조군 비교 인체적용시험으로 진행되었다. 피험자는 1:1의 비율로 시험군 및 대조군에 무작위 배정되었고, 피험자들은 모두 간기능개선과 관련된 약물이나 건강기능식품을 병용하지 않도록 했다.

○ 본 인체적용시험에 동의서를 작성하고 참여한 피험자 중 선정, 제외기준에 적합한 피험자를 대상으로 무작위배정에 따라 포장된 시험물질 또는 대조물질(플라세보)을 피험자에게 분배하여 하루 2번, 1회 2캡슐씩 총 하루 4캡슐의 시험물질 또는 대조물질(플라세보)를 복용하게 하였다.

○ 시험물질이나 대조물질(플라세보)은 육안이나 냄새로 구분이 되지 않도록 했다.

(7) 인체적용시험물질

○ 인체적용시험물질 및 대조물질은 다음과 같았다.

	시험건강기능성식품	대조기능성식품
코드명	용아초 추출물	대조물질
성분명	40% 아그리모니농축분말+60% Maltodextrin	-
제품성상	Capsule	시험건강기능성식품과 동일
용법	1일 2회, 1회 2캡슐	시험건강기능성식품과 동일
보관	실온	시험건강기능성식품과 동일

(8) 복용방법

○ 본 인체적용시험에서 치료군 배정방법은 Stratified Permuted Block Randomization으로, 무작위 배정표는 통계학자가 The SAS System에서 제공하는 할당코드에 의하여 4 block으로 작성하고, 시험물질 및 대조물질을 피험자번호에 1:1의 비율로 배정하기로 하였다. 실제적으로는 시험군에 40명, 대조군에 40명이 각각 배정되었다. 주관기관에서 무작위 할당된 목록에 따라 무작위배정번호를 부여한 인체적용시험용의약품을 포장한 후 인체적용시험 시

작 전 인체적용시험 실시기관에 공급하였고, 시험에 적합한 피험자에게 피험자 번호를 배정하는 것은 해당 인체적용시험기관에서 이루어졌다.

- 인체적용시험기관에서는 피험자의 동의서 수령 및 선정을 위한 검사를 시행하는 피험자에게는 Screening Number를 부여하였다. 스크리닝을 위한 모든 과정을 마치고 해당 피험자가 본 인체적용시험의 대상자로 적합한 경우에 Randomization Number를 부여하고, 번호에 해당하는 시험물질 또는 대조물질의 인체적용시험 기능성식품을 투여하였다.

(9) 주요 평가 변수

1. 유효성 평가변수

1) 1차 유효성 평가변수:

- 인체적용시험건강식품 용아초 추출물 복용 후 평균변화율의 차이
(시험군의 평균변화율과 대조군의 평균변화율의 비교)

2. 안전성 평가변수

- 1) 이상약물반응(ADR, Adverse Drug Reaction), 중대한 이상반응(SAE, Serious Adverse Events)를 포함한 이상반응(AE, Adverse Events)의 발생률 및 건수
- 2) 실험실적 검사치의 변화 및 정상/비정상 변화여부
- 3) 활력징후(체중, 맥박, SBP, DBP) 결과의 변화량

(10) 인체적용시험계획서에의 통계적 분석 방법 및 피험자수

i. 분석 접근 방법

- 유효성 평가분석을 위한 주 분석대상군은 본 인체적용시험에 등록하여 최소 한번 이상 건강기능성식품을 투여 받은 피험자를 대상으로 하는 ITT(Intention-to-Treat) set이며, PP(Per-Protocol) set을 보조분석대상으로 하였다.
- 안전성 분석대상군은 본 인체적용시험에 등록하여 최소 한번 이상 시험물질을 투여 받은 피험자를 대상으로 하는 Safety set 이다.

ii. 1차 유효성 평가변수에 대한 분석방법

- 건강기능식품 용아초 추출물 투여 후, ALT수치 평균변화율이 대조용 기능성식품에 비해 시험용기능성식품이 우월함을 Chi-Square Test 또는 Fisher's Exact Test를 시행하여 p-value가 양측 유의수준 0.05보다 작음을 보인다. 추가적으로 투여 전(Visit 1) ALT값과 투여 후(Visit 4) ALT값의 변화량이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Unpaired T-Test 또는 Wilcoxon's Rank Sum Test를 이용하여 양측 유의수준 5%에서 검정하였다.
- 또한, 기저시점 대비 종료시점의 ALT수치의 군내 변화량에 유의한 차이가 있는지 각 군 간 Paired T-Test 또는 Wilcoxon's Signed Rank Test를 양측 유의수준 5%에서 시행하였다.

iii. 안전성 자료에 대한 분석방법

- 피험자에 보고된 이상반응은 경험한 피험자 수 및 백분율을 투여한 인체적용시험용 기능성식품 별로 나누어 기술하여, 이상반응의 중대성(Seriousness), 인체적용시험용 기능성식품과의 연관성, 교정치료여부 및 그 결과에 대해서 복용한 인체적용시험용 기능성식품 별로 구분하여 보고된 피험자 수 및 백분율을 정리하였다.

- 실험실검사와 활력징후, 신체검사의 결과는 연속형 자료의 경우 평균, 표준편차와 최소값, 최대값을 군별로 정리하고 군간 차이는 Unpaired T-Test 또는 Wilcoxon's Rank Sum Test를 시행하였으며, 군내 복용전과 후의 차이는 Paired T-Test 또는 Wilcoxon's Signed Rank Test로 검정하였다. 또한, 복용 전후의 정상범주를 벗어난 피험자들의 빈도수 및 백분율을 구하였다. 실험실검사 가운데 범주형 자료는 정상과 비정상으로 나누어서 군간 차이는 Chi-Square Test 또는 Fisher's Exact Test를 사용하여 검정하였고, 투약 전후의 차이는 McNemar's Test로 분석하였다.

iv. 피험자의 수

- 본 시험에 앞서 Pilot Study를 진행한 결과, 시험물질(용아초추출물) 80mg/day 군의 경우 기저시점(Baseline) 대비 6주의 ALT 평균 변화량은 13.20±17.46 이었으며, 대조물질군의 ALT 평균 변화량은 13.75±11.71 이었다(대조물질군에 포함된 피험자들 중 ALT 수치가 현저하게 높은 수치를 나타내는 피험자가 존재하였기에 이 피험자를 제외하고 재계산한 수치임. ALT 수치가 현저하게 높은 피험자 포함 ALT 평균 변화량은 19.00±16.58).
- Pilot Study를 참고하여 본 시험에서는 시험물질 90mg/day의 기저시점 대비 8주의 ALT 평균 변화량은 15.84±8.73, 대조물질은 11.00±5.85로 가정한다. 여기서 평균은Pilot Study 결과의 20% 증가, 감소된 값으로 가정하였으며, 표본편차는 50% 감소한 값으로 가정하였다. 이는 Pilot Study 때보다 본 시험에서의 제외기준(알코올: 1일 평균 60g → 1일 평균 30g)이 더욱 강화되었으며, 시험기간(6주 → 8주) 또한 길어졌음을 감안하였다.
- 산출식은 다음과 같다.

$$n_T = n_C = \frac{(1 + \lambda) \sigma^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{\lambda d^2} = \frac{2 \times 7.29^2 \times (1.96 + 0.842)^2}{4.84^2} = 35.62301 \approx 36$$

σ: 표준편차, (8.73+5.85)/2 = 7.29

α: 제 1종 오류, 0.05

β: 제 2종 오류, 0.20

λ: 대조군에 대한 시험군 피험자 수의 비, 1 (λ=n_T/n_C)

d: 두 군간에 예상되는 효과(평균)의 차이, 4.84

- 검정력 80%, 양측 유의수준 5%를 적용하여 피험자 수를 산출한 결과, 각 군당 36명(총 72명)이 요구되며, 중도탈락을 10%를 고려하였을 때, 각 군당 40명으로 총 80명의 피험자가 본 인체적용시험에 요구되었다.

라. 피험자 모집 및 인체적용시험의 진행

- 총 235명을 대상으로 ALT수치 기타 참여제한 조건을 기본으로 스크리닝을 시행하여, 80명의 피험자를 모집하였으며 40명씩 대조군과 시험군으로 나누어 8주동안 인체적용시험을 진행하였다.
- 이 중 대조군에서 3명, 시험군에서 2명이 탈락되어 각각 37, 38명이 최종적으로 인체적용시험이 완료되었다.

Table 5-7. 인체적용시험 모집 및 중도탈락 수

Screening	Randomization(Enrollment)	시험군 (N=40)				대조군 (N=40)			
		인체적용시험 완료		중도탈락		인체적용시험 완료		중도탈락	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
235	80	38	(47.75)	2	(2.50)	37	(46.25)	3	(3.75)

마. 인체적용시험의 결과

(1) 1차 유효성 평가

- 본 인체적용시험의 1차 유효성 평가변수는 인체적용시험기능식품 용아초 추출물 또는 대조기능식품 복용 8주 후 ALT값의 평균변화량의 비교로 기저시점에 비해 종료시점에서 ALT수치가 변화한 평균변화량을 시험군과 대조군간에 비교 분석하였다.
- ITT set 대상자에 대한 분석과 PP set 대상자에 대한 분석 결과, 본 시험에 참여한 피험자의 8주후 ALT평균값의 변화는 시험초기보다 상승한 것으로 나타났다%(ITT set: 시험군 40/40명, 대조군 40/40명, PP set: 시험군 38/38명, 대조군 37/37명)

Table 5-8. 1차 유효성 평가(ITT set)

	시험군				대조군				군간 p-value
	n	Mean±SD	Median	Min, Max	n	Mean±SD	Median	Min, Max	
ITT set	N=40				N=40				
복용전	40	67.48±22.65	60.00	46.00, 135.00	40	67.35±22.19	58.00	45.00, 133.00	
복용후	40	73.88±82.35	55.00	15.00, 488.00	40	68.03±43.50	57.50	10.00, 61.00	
ALT Change	40	6.40±86.85	10.00	442.00, 98.00	40	0.68±39.93	8.00	141.00, 55.00	0.7063*
군내 p-value		0.6438**				0.9154**			

Table 5-9. 1차 유효성 평가(PP set)

	시험군				대조군				p-value	
	n	Mean±SD	Media n	Min, Max	n	Mean±SD	Media n	Min, Max		
PP set	N=38				N=37					
복용전	38	68.00±23.12	60.00	46.00, 135.00	37	67.30±21.74	59.00	45.00, 133.00		
복용후	38	74.74±84.45	54.50	15.00, 488.00	37	68.00±44.61	59.00	13.00, 212.00		
ALT	Change	38	6.74±89.15	12.00	442.00, 98.00	37	0.70±41.56	13.00	141.00, 55.00	0.7075*
	군 내	0.6441**			0.9187**					
	p-value									

Change= 복용전 - 복용후

*:Unpaired T-test

** : Paired T-Test

- ITT set 대상자에 대한 분석 결과, 시험군의 복용 전 ALT 수치는 평균 67.48±22.65, 8주 복용 후 ALT 수치는 평균73.88±82.35으로 상승했다. 대조군은 복용 전 평균67.35±22.19, 8주 복용 후 평균 68.03±43.50으로 상승한 것으로 조사되었다.
- 평균 ALT 수치의 변화량은 시험군의 경우 평균값 6.40±86.85, 대조군은 평균값0.68±39.93이 상승했다. 인체적용기능식품 복용 후 두 군 모두 ALT 수치는 증가하였으며, 두 군간의 통계적인 차이는 보이지 않았다(p=0.7063).
- PP set 대상자에 대한 분석 결과, 시험군의 복용 전 ALT 수치는 평균 68.00±23.12, 8주 복용 후 ALT 수치는 평균74.74±84.45으로 상승했다. 대조군은 복용 전 평균67.30±21.74, 8주 복용 후 평균 68.00±44.61으로 상승한 것으로 조사되었다. 평균 ALT 수치의 변화량은 시험군의 경우 평균값 6.74±89.15, 대조군은 평균값 0.70±41.56이 상승했다.
- 인체적용기능식품 복용 후 두 군 모두 ALT 수치는 증가하였으며, 두 군간의 통계적인 차이는 보이지 않았다(p=0.7075).
- 추가분석으로 ALT수치의 수치 4주간의 변화량(복용 전-복용 후)이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하였다. 추가적으로 간건강의 중요한 수치인 AST수치도 또한 검정하였다.

Table 5-10. 4주간 ALT수치 평균변화율 분석결과

혈액화학적 검사	시험약				대조약				군간 p-value
	n	Mean±SD	Median	Min, Max	n	Mean±SD	Median	Min, Max	
Safety set	N=40				N=40				
Visit 1	40	67.48±22.65	60.00	46.00, 135.00	40	67.35±22.19	58.00	45.00, 133.00	
Visit 3	40	63.40±30.26	56.00	19.00, 168.00	40	63.43±29.11	57.00	13.00, 212.00	
SGPT (ALT) Change	40	-4.08±34.38	1.50	-108.00, 88.00	40	-3.93±25.85	3.50	-75.00, 64.00	0.9825*
군내 p-value	0.4579**				0.3428**				

혈액화학적 검사	시험약				대조약				군간 p-value
	n	Mean±SD	Median	Min, Max	n	Mean±SD	Median	Min, Max	
PP set	N=38				N=37				
Visit1	38	68.00±23.12	60.00	46.00, 135.00	37	67.30±21.74	59.00	45.00, 133.00	
Visit 3	38	63.71±31.03	55.5	19.00, 168.00	37	63.03±29.26	57.00	120.00, 147.00	
SGPT (ALT) Change	38	-4.29±35.28	2.00	-108.00, 88.00	37	-4.27±26.88	5.00	-75.00, 64.00	0.9979*
군내 p-value	0.4583**				0.3403**				

○ 4주간의 시험물질과 대조물질의 ALT평균수치 변화는 모두 하락하는 결과를 보여주었으나, ITT분석과 PP분석모두에서 통계적인 의미는 나타내지 못했다.

(2) CBC 평가변수 분석결과

○ 기저시점 대비 8주의 실험실검사(CBC) 평가변수들의 수치 변화량(Baseline-8주)이 군간 차이를 보이는지 분석하였다. 기저시점 대비 8주에 조사된 CBC 평가변수들의 변화량 분석 결과 모든 평가변수가 3군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 5-11 .혈액화학적 검사 결과 분석

혈액화학적 검사	시험물질				대조물질				군간 p-value
	n	Mean±SD	Median	Min, Max	n	Mean±SD	Median	Min, Max	
Safety set	N=40				N=40				

A l k . Phosphata se	Visit 1	40	275.15±70.83	266.50	107.00, 458.00	40	271.15±82.72	247.00	154.00, 479.00	
	Visit 3	40	277.35±82.35	260.50	91.00, 463.00	40	264.78±73.22	254.50	149.00, 419.00	
	Visit 4	40	255.63±74.22	250.50	22.00, 405.00	40	255.35±81.07	243.00	22.00, 405.00	
	Change	40	-19.52±70.14	7.50	-48.00, 406.00	40	-15.80±51.43	4.50	-69.00, 192.00	0.7872*
	군 내 p-value		0.0861**				0.0592**			
BUN	Visit 1	40	15.59±18.47	12.20	6.80, 128.00	40	12.50±2.98	12.15	7.40, 19.80	
	Visit 3	40	13.47±3.00	13.00	7.50, 22.40	40	15.96±20.03	13.00	6.40, 138.00	
	Visit 4	40	13.30±3.22	13.05	7.10, 22.40	40	17.67±23.41	13.75	8.40, 161.00	
	Change	40	-2.29±18.34	-0.05	-7.60, 114.00	40	5.17±23.64	-1.45	-149.60, 5.70	0.1193*
	군 내 p-value		0.4354**				0.1748**			
Creatinine	Visit 1	40	1.27±1.49	1.00	0.70, 10.40	40	1.46±2.98	1.00	0.70, 19.80	
	Visit 3	40	13.47±3.00	13.00	7.50, 22.40	40	0.98±0.18	1.00	0.70, 1.70	
	Visit 4	40	0.92±0.13	0.90	0.60, 1.20	40	0.94±0.15	1.00	0.60, 1.20	
	Change	40	-0.35±1.49	0.10	-0.10, 9.50	40	-0.52±2.97	0.10	-0.30, 18.80	0.7545*
	군 내 p-value		0.1405**				0.2745**			
SGPT(ALT)	Visit 1	40	67.48±22.65	60.00	46.00, 135.00	40	67.35±22.19	58.00	45.00, 133.00	
	Visit 3	40	63.40±30.26	56.00	19.00, 168.00	40	63.43±29.11	57.00	13.00, 212.00	
	Visit 4	40	73.88±82.35	55.00	15.00, 488.00	40	68.03±43.50	57.50	10.00, 61.00	
	Change	40	6.40±86.85	10.00	442.00, 98.00	40	0.68±39.93	8.00	141.00, 55.00	0.7063*
	군 내 p-value		0.6438**				0.9154**			
S G O T (AST)	Visit 1	40	40.18±14.85	34.00	24.00, 76.00	40	38.35±13.65	34.50	22.00, 72.00	
	Visit 3	40	42.80±29.95	34.50	20.00, 198.00	40	37.28±14.66	33.00	19.00, 80.00	
	Visit 4	40	48.78±64.49	33.00	16.00, 402.00	40	41.30±21.90	34.50	14.00, 99.00	
	Change	40	8.60±67.01	4.00	378.00, 50.00	40	2.95±21.03	0.00	69.00, 30.00	0.6133*
	군 내 p-value		0.4219**				0.3804**			
Γ-GTP	Visit 1	40	68.70±43.12	65.00	17.00, 211.00	40	65.28±47.21	49.50	18.00, 206.00	
	Visit 3	40	72.63±63.86	54.50	15.00, 368.00	40	60.83±45.89	44.00	16.00, 197.00	
	Visit 4	40	68.18±48.62	58.50	14.00, 240.00	40	60.32±52.25	44.00	9.90, 290.00	

	Change	40	-0.52±33.95	2.00	-92.00, 129.00	40	-4.96±39.99	5.00	-185.00, 101.00	0.5950*
	군 내 p-value		0.9226**				0.4382**			
Albumin	Visit 1	40	4.90±0.36	4.90	4.20, 5.90	40	4.90±0.27	4.90	4.30, 5.50	
	Visit 3	40	4.73±0.29	4.80	4.00, 5.30	40	4.72±0.27	4.70	4.10, 5.20	
	Visit 4	40	4.74±0.29	4.80	3.90, 5.40	40	4.75±0.28	4.75	4.00, 5.30	
	Change	40	-0.16±0.24	0.20	-0.30, 0.90	40	-0.15±0.24	0.10	-0.40, 0.80	0.8900*
	군 내 p-value		0.0002**				0.0003**			
Total bilirubin	Visit 1	40	0.69±0.36	0.65	0.20, 1.80	40	0.69±0.34	0.70	0.10, 1.70	
	Visit 3	40	0.74±0.33	0.70	0.20, 1.80	40	0.74±0.30	0.70	0.30, 1.70	
	Visit 4	40	0.79±0.41	0.70	0.20, 2.20	40	0.98±1.11	0.75	0.20, 7.40	
	Change	40	-0.10±0.39	0.00	-1.80, 0.60	40	0.28±1.10	-0.10	-6.70, 0.50	0.3180*
	군 내 p-value		0.1243**				0.1096**			
Total Cholesterol	Visit 1	40	186.50±35.56	187.00	125.00, 271.00	40	200.70±33.58	199.00	125.00, 282.00	
	Visit 3	40	179.63±36.52	171.50	119.00, 251.00	40	191.60±39.97	184.50	127.00, 288.00	
	Visit 4	40	178.90±33.03	178.00	122.00, 239.00	40	175.80±27.83	174.00	127.00, 234.00	
	Change	40	-7.60±22.64	2.50	-28.00, 106.00	40	-9.10±27.25	5.00	-73.00, 87.00	0.8579*
	군 내 p-value		0.0402**				0.0412**			
Triglyceride	Visit 1	40	190.90±102.35	170.50	53.00, 471.00	40	238.63±232.13	176.00	65.00, 1470.00	
	Visit 3	40	170.53±105.09	145.50	46.00, 507.00	40	202.43±113.21	189.00	57.00, 533.00	
	Visit 4	40	186.38±139.06	142.00	68.00, 755.00	40	252.98±170.93	186.00	50.00, 688.00	
	Change	40	-4.53±99.81	1.00	-284.00, 257.00	40	14.35±260.15	-19.50	-451.00, 1366.00	0.6702*
	군 내 p-value		0.7758**				0.7291**			
HDL Cholesterol	Visit 1	40	58.00±10.60	57.00	40.00, 82.00	40	57.18±15.06	58.00	36.00, 100.00	
	Visit 3	40	56.10±9.10	56.00	38.00, 84.00	40	53.73±17.49	49.00	36.00, 139.00	
	Visit 4	40	54.40±8.77	56.00	37.00, 74.00	40	51.87±11.71	49.00	37.00, 88.00	
	Change	40	-3.60±9.51	3.50	-17.00, 24.00	40	-5.38±10.84	4.00	-28.00, 29.00	0.4386*
	군 내 p-value		0.0215**				0.0033**			

Glucose	Visit 1	40	107.28±28.45	99.50	63.00, 181.00	40	110.00±30.29	100.50	75.00, 248.00	
	Visit 3	40	102.90±24.52	95.00	73.00, 181.00	40	99.62±22.99	9.00	6.00, 16.00	
	Visit 4	40	99.88±25.32	91.00	77.00, 181.00	40	99.70±20.20	95.00	73.00, 175.00	
	Change	40	-7.40±25.29	7.50	-64.00, 84.00	40	-10.30±23.82	5.00	-32.00, 73.00	0.5990*
	군 내 p-value		0.0718**				0.0093**			
L D L Cholesterol	Visit 1	40	116.30±31.96	114.00	61.00, 202.00	40	125.38±29.38	125.50	53.00, 184.00	
	Visit 3	40	113.68±31.57	110.00	55.00, 215.00	40	120.38±29.82	118.00	69.00, 186.00	
	Visit 4	40	114.85±29.07	118.50	58.00, 178.00	40	119.28±31.44	119.50	61.00, 185.00	
	Change	40	-1.45±20.37	-3.00	-32.00, 65.00	40	-6.10±18.92	3.50	-51.00, 62.00	0.2934*
	군 내 p-value		0.6551**				0.0482**			
T o t a l protein	Visit 1	40	7.65±0.46	7.65	6.50, 8.90	40	7.56±0.36	7.60	6.80, 8.20	
	Visit 3	40	7.42±0.34	7.40	6.50, 8.10	40	7.39±0.30	7.40	6.70, 8.20	
	Visit 4	40	7.52±0.34	7.50	6.60, 8.40	40	7.43±0.34	7.45	6.80, 8.20	
	Change	40	-0.13±0.40	0.10	-0.90, 1.40	40	-0.13±0.41	0.05	-0.8, 1.10	0.8264*
	군 내 p-value		0.0369**				0.0781**			

Change=투석 전 - 투석 후

*: Unpaired T-Test

** : Paired T-Test

- 혈액화학적 검사 결과를 살펴보면, 시험군에서 기저시점 대비 week 8에 통계적으로 유의한 차이가 있었던 검사항목은 없었다.

(3) 안전성평가

- 본 인체적용시험에서 안전성 평가는 시험군 40명, 대조군 40명을 대상으로 이상반응, 실험실적 검사, 활력징후, 신체검진 결과를 근거하여 통계적/임상적으로 평가하였다. 이상반응은 시험군 40명 중 2명(5.00%, 2건), 대조군 40명 중 4명(10.00%, 4건)에서 보고되었다. 이 중 중대한 이상반응은 없었으며, 이상약물반응(ADR)도 발생하지 않았다. 두 군간의 이상반응 발생률은 통계적으로 유의한 차이는 없었으며(p=0.6752), 임상적으로도 의미 있는 차이 역시 크지 않은 것으로 사료된다.
- 실험실적 검사의 혈액 및 화학검사에 대한 분석 결과를 살펴보면, 군내/군간 기저시점 대비 week 8의 검사결과의 변화에 대한 분석 결과 검사항목에서 유의한 변화가 관찰되었지

않았다.

- 활력징후에 대한 평가결과, 기저시점 대비 week 8에서의 변화량에서 통계적, 임상적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 결론적으로, 모든 안전성 평가변수에 대해 분석하여 시험군과 대조군의 안전성을 비교 평가한 결과, 두 군간 유의한 차이는 없었음을 확인하였다.

바. 결론

- 용아초 추출물을 대상으로 ALT수치가 상승한 간기능을 가진 피험자를 대상으로 8주간 대조물질과 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 또한 AST의 경우에도 대조군 시험군 모두 시험기간 중 약간의 상승경향이 있었으나 두 군간에 유의한 차이가 없었다.

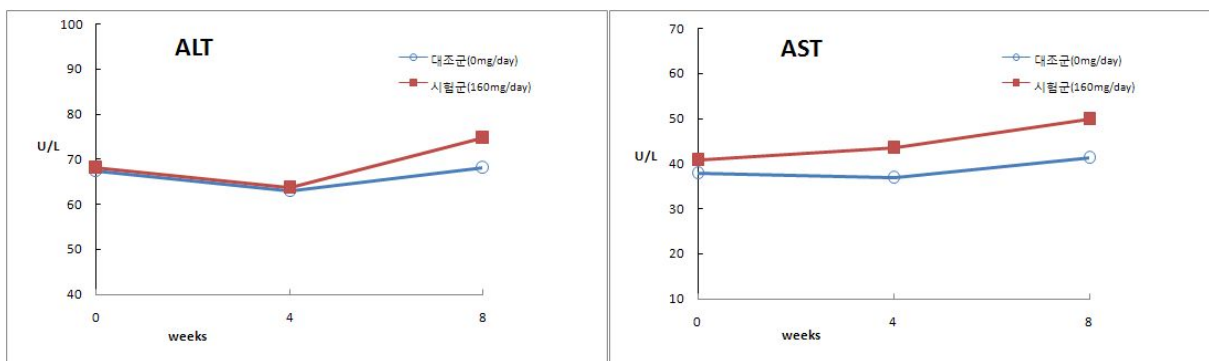


그림 5-1. 본 인체적용시험의 ALT, AST 수치의 변화의 요약

- 그 원인은 여러 가지가 있을 수 있지만, 시험물질의 투여기간이 8주로 일반적인 간기능약 물이나 기타물질의 24주 투여기간보다 짧았던 것이 하나의 요인으로 여겨지며, 또 다른 하나는 용량적인 것으로, 지난 pilot study에서 얻어진 결과와 동일하게 4주간의 투여시에는 ALT수치가 감소하였으나 8주후의 ALT수치는 상승한 것으로 나타났다. 이는 투여용량이 높았을 수 있던 것으로 사료된다.
- 그리고 ALT수치가 상승한 간기능 장애를 가진 피험자를 대상으로 연구를 하였던 결과로 중증의 간기능장애보다 심리적으로 효과가 있을 것이라는 플라세보효과도 작용했을 것으로 여겨진다.
- 따라서 본 인체적용시험에서는 용아초추출물이 대조물질에 비해 간기능향상에 도움이 되는 것을 확인하지 못했으며, 이는 짧은 투여기간과 용량설정의 문제인 것으로 판단된다. 추가적인 연구를 통해 오랜 기간, 많은 피험자를 조사하는 경우, 그 효과를 입증할 수 있을 것으로 여겨진다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	세부 연구개발의 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차년	큰등골짚신나물 정제수 추출물의 제조공정의 표준화 연구	제조공정 및 QC의 SOP	100%
1차년	원료 고형화 및 안정성 연구	함량변화가 5% 이내인 고형화 방법 확립	100%
1차년	Lieber Decarli diet 유도에 의한 알코올성 지방간 예방 및 개선 효능 평가	알코올성 지방간의 예방 및 개선 효능 평가	100%
1차년	Lieber Decarli diet 및 high fat diet 유도에 의한 알코올성지방간염의 예방 및 개선을 위한 효능 평가	알코올성 지방간염의 예방 및 개선을 위한 효능 평가	100%
1차년	지표성분의 선정을 통한 기준 및 시험방법, 표준분석법 연구	기준시험법 확립과 TLC에 의한 확인시험법	100%
1차년	발아향상법 확립	대량 발아율 80%	100%
2차년	sclae-up 및 최적공정 연구	건조중량 대비 수율 10% 이상의 대량생산방법 확립	100%
2차년	인체시험 준비	인체시험 준비	100%
2차년	급성 간질환 개선 효능 검색	급성 간질환에 대한 큰등골짚신나물 추출물의 평가 수행	100%
2차년	지표성분 대량확보방법 연구	지표성분의 대량분리 방법	100%
2차년	지표성분 다량확보	지표성분의 대량분리	100%
2차년	재배법 확립, 종자확보	대량재배법 확립(육묘, 수확, 건조, 저장, 선도 유지, 포장 및 규격화), 종자확보	100%
3차년	시제품 생산	시제품 생산	100 %
3차년	인체적용시험용 샘플	인체적용시험용 추출물 제공	100%
3차년	인체시험	알코올성 간손상의 예방 및 개선을 위한 인체시험보고서	100%
3차년	건강기능식품 개별인정 신청	건강기능식품 등록을 위한 허가자료제출	0%
3차년	큰등골짚신나물의 간 보호 작용의 효능최적화 및 작용기전 규명	간보호의 작용기전 규명	100%
3차년	큰등골짚신나물의 생리활성 성분 분리 및 구조규명	생리활성 성분의 분리와 구조 규명	100%
3차년	대규모 재배	대량생산기반조성	100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

○ 실용화

- 현재 인체적용시험에서 간기능개선능에 대해서 증명을 할 수 없었으나, 복용량의 변화로 향후 인체적용시험 계획 중
- 이후에 개별인증신청으로 간기능개선 건강기능식품 원료로 산업화 계획

○ 기술실시

- 대량제조기술 및 기준시험법 : 자체 기술이전 계획
- 개별인증신청에 대한 결과 : 추가적인 인체적용시험 후 자체 기술 이전 계획

○ 지도

- 현재 5곳에서 대량재배 중으로, 재배 농민에 실질적인 재배법 기술 전수 완료
- 이후, 작목반 구성 등 대량재배 확대로 재배법 기술 이전 확대

○ 논문발표

1. Yoon SJ, Koh EJ, Kim CS, Zee OP, Kwak JH, Jeong WJ, Kim JH, Lee SM (2012) *Agrimonia eupatoria* protects against chronic ethanol-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50:2335–2341

Food and Chemical Toxicology 50 (2012) 2335–2341



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Agrimonia eupatoria protects against chronic ethanol-induced liver injury in rats

Seong-Jin Yoon^a, Eun-Ji Koh^a, Chang-Soo Kim^a, Ok-Pyo Zee^a, Jong-Hwan Kwak^a, Won-Jin Jeong^b, Jee-Hyun Kim^b, Sun-Mee Lee^{a,*}

^a School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, South Korea
^b GUMedHerb Life Science R&D Center, Paju 413-812, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 November 2011
Accepted 3 April 2012
Available online 16 April 2012

Keywords:
Agrimonia eupatoria
Alcoholic liver disease
Inflammation
Oxidative stress
Toll-like receptor

ABSTRACT

This study examined the hepatoprotective effects of *Agrimonia eupatoria* water extract (AE) against chronic ethanol-induced liver injury. Rats were fed a Lieber–DeCarli liquid diet for 8 weeks. Animals were treated orally with AE at 10, 30, 100, and 300 mg/kg/day. After chronic consumption of ethanol, serum aminotransferase activities and pro-inflammatory cytokines markedly increased, and those increases were attenuated by AE. The cytochrome P450 2E1 activity and lipid peroxidation increased after chronic ethanol consumption, while reduced glutathione concentration decreased. Those changes were attenuated by AE. Chronic ethanol consumption increased the levels of Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 protein expression, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 protein and mRNA expression, and nuclear translocation of nuclear factor- κ B, which was attenuated by AE. Our results suggest that AE ameliorates chronic ethanol-induced liver injury, and that protection is likely due to the suppression of oxidative stress and TLR-mediated inflammatory signaling.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alcoholic liver disease (ALD) is the most common liver disease and accounts for 40% of deaths from cirrhosis or 28% of all death from liver disease (Kim et al., 2002). ALD is characterized by fat accumulation and inflammation in the liver, which leads to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The development of steatohepatitis seems to be a major rate-limiting step in the progression to cirrhosis (Diehl, 2002). Therefore, therapies protecting against the onset of steatohepatitis may be beneficial for the later stages of the disease.

Chronic and excessive ethanol consumption impairs fat oxidation and stimulates lipogenesis, thus leading to steatosis (You and Crabb, 2004). Fat accumulation in the liver increases the sensitivity of the liver to the second hit that leads to inflammatory liver cell damage (Day and James, 1998). Oxidative stress, endotoxins, and cytokines are considered to be the causes of the second hit and are related to the pathogenesis of ALD.

Intrahepatocyte formation of reactive oxygen species (ROS) by the ethanol-metabolizing cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) causes direct hepatocellular injury (Vidali et al., 2008). Both chronic ethanol-mediated bacterial overgrowth and disruption of intestinal barrier function increase the plasma levels of endotoxin/lipopolysaccharide

(LPS) in the portal circulation, thereby activating Kupffer cells (KC) via Toll-like receptor 4 (TLR4) to produce several pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Szabo and Bala, 2010). LPS recognition by TLR4 results in recruitment of the adaptor molecules myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), which activate transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Takeda and Akira, 2004). Activation of NF- κ B increases expression of inflammatory mediators, including cytokines, chemokines, enzymes such as cyclooxygenase-2 (COX-2), and adhesion molecules.

Agrimonia eupatoria has been used as a traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases such as hemorrhagic colitis, urinary disease, and liver disease (Ivanova et al., 2005). Previous studies have shown that *A. eupatoria* contains several polyphenols and flavonoids such as procyanidin, quercetin, and kaempferol which showed anti-inflammatory properties (Correia et al., 2006). *A. eupatoria* extract has been shown to possess antibacterial and free radical scavenging activities in *in vitro* assays (Copland et al., 2003). *A. eupatoria* extract has inhibitory activity on hepatitis surface antigen secretion in HepG2 cells (Kwon et al., 2005). Recently, *Agrimonia herba* showed neuroprotective effects on glutamate-induced oxidative injury in HT22 hippocampal cells (Lee et al., 2010) and inhibited LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in microglial cells (Bae et al., 2010). In our preliminary study, *A. eupatoria* water extract (AE) and luteolin 7-glucuronide, an active component of AE, attenuated the increases in serum aminotransferase activity and hepatic TNF- α production induced by acute ethanol administration.

* Corresponding author. Address: School of Pharmacy Sungkyunkwan University 300 Cheoncheon-dong, Jangan-gu Suwon-si, Gyeonggi-do 440-746, South Korea. Tel.: +82 312907712; fax: +82 312928800.

E-mail address: sunmee@skku.edu (S.-M. Lee).

○ 학회발표

1. Hyeon CY, Youn H, Lee YN, Song CS, Zee OP, Kwak JH(2012). Phenolic compounds from the aerial part of Agrimonia eupatoria

2012 Proceedings of International Congress of Korean Federation of Pharmaceutical Societies

April 19 (Thu)-21 (Sat), 2012
International Convention Center (ICC), Jeju

SHIFTING A PARADIGM FOR PROGRESSION OF PHARMACY

Host	The Pharmaceutical Society of Korea
	The Korean Society of Pharmacognosy
	The Korean Society of Food, Drug and Cosmetic Regulatory Sciences
	The Korean Society of Applied Pharmacology
	Korean Academy of Social and Managed Care Pharmacy
Sponsor	Korean College of Clinical Pharmacy
	Korean Federation of Science and Technology Societies
	Korea Food & Drug Administration
	Korea Pharmaceutical Manufacturers Association
	The Korean Pharmaceutical Association
	Jeju Special Self-Governing Province

4

P7-110 Phenolic compounds from the aerial part of *Agrimonia eupatoria*

HYEON Chang Yong, YOUN Hana¹, LEE Yu-na¹, SONG Chang-seon¹, ZEE Ok Pyo, KWAK Jong Hwan*

School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Korea, ¹College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Korea

*Corresponding author : jhkwak@skku.edu

Presenting author : jhkwak@skku.edu

Agrimonia eupatoria L. which belongs to the family Rosaceae, grows as a perennial herb, and is widely distributed in Europe, North Africa, South Africa, North Asia, and cultivated in Korea. Its whole plant has been used as a crude drug for the treatment of several cancers, tumor, ache, bleeding, diarrhea, hematemesis, hematuria and metrorrhagia. Previous studies on *Agrimonia* genus, have afforded various flavonoids, tannins, triterpenes, isocoumarins, steroids, essential oils, and phenolic compounds, and also have investigated various biological activities. In the course of a search for anti-influenza viral compounds from natural products, we have found that the methanol extract of *A. eupatoria* has anti-viral activity against influenza A virus. The MeOH extract of *A. eupatoria* was consecutively partitioned with hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and *n*-BuOH to give five solvent fractions. Among these fractions, *n*-BuOH soluble showed anti-influenza viral activity (EC₅₀: 23.73 µg/ml; SI: 11.90). Five flavonoids and two phenolic compounds were isolated from the *n*-BuOH fraction and the structures were identified by comparison of their spectral data with literature values. The anti-influenza viral activities of the isolated compounds were evaluated using neutral red assay against influenza A/NWS/33(H1N1) virus, and also isolates were subjected to inhibitory activity against neuraminidase in influenza A/NWS/33(H1N1) virus. The activity of neuraminidase decreased by several compounds with relatively high EC₅₀ values.

P7-111 Phenolic compounds from aerial bulbils of *Dioscorea batatas*

QUAN Chunlin, PYO Suhkneung, ZEE Ok Pyo, KWAK Jong Hwan*

School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Korea

*Corresponding author : jhkwak@skku.edu

Presenting author : jhkwak@skku.edu

Dioscorea batatas Decne. (Dioscoreaceae) grows as a perennial herb, and is widely distributed or cultivated in Korea, Japan and China. The rhizomes and bulbils of *D. batatas* have been used as tonics, and crude drug for the treatment of diabetes and diarrhea in the traditional Chinese medicine. Also, its rhizome is a well-known edible plant. Previous studies on *D. batatas* have afforded mainly steroids, steroid glycosides and phenanthrene derivatives, and various pharmacological effects. In our continuing studies to find bioactive compound from natural products, we have found that the MeOH extract of *D. batatas* has anti-inflammatory activity. The MeOH extract was fractionated by using Diaion HP-20 column with consecutive elution (H₂O-MeOH, and acetone). Six phenolic compounds including batatasin I, IV and 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene, were isolated from the subfractions by means of chromatographic separation. The structures of isolated compounds were identified by comparison of their spectral data with literature values.

2. Kwak JH(2011), Anti-influenza vial flavonoids from the aerial part of Agrmmonia eupatoria. 2011 American Society of Pharmacognosy Annual Meeting.

2011 AMERICAN SOCIETY OF PHARMACOGNOSY ANNUAL MEETING

New Waves of Innovation

Program



Paradise Point Resort
San Diego, California
July 30 – August 4th

- P260 MERULIN A LEAD OPTIMIZATION FOR HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS Gabriel Navarro
- P261 INSIGHTS INTO THE SAR OF MARINE ALKALOIDS WITH ACTIVITY AGAINST MU, DELTA AND KAPPA OPIOID RECEPTORS Tyler Johnson
- P262 NEUROPROTECTIVE EFFECT OF MUSK OF ONDATRA ZIBETHICUS ON TRANSIENT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS Hocheol Kim
- P263 SEARCHING FOR BIOACTIVITY COMPOUNDS FROM A BOTANICA IN PHOENIX, ARIZONA. Pedro Chavez
- P264 SESQUITERPENES FROM THE ROOTS OF AUCKLANDIA LAPPA AND THEIR REGULATORY EFFECT ON CYTOCHROME P450 Jong Hwan Kwak
- P265 ANTI-INFLUENZA VIRAL FLAVONOIDS FROM THE AERIAL PART OF AGRIMONIA EUPATORIA Jong Hwan Kwak
- P266 FIVE NEW SAPONINS FROM ANDROSACE FILIFORMIS RETZ. Jong Hwan Kwak
- P267 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL MICROTUBULE DISRUPTOR Susan Mooberry
- P268 SYNTHETIC STUDIES TOWARD THE OPTIMIZATION OF THE SELECTIVE MRSA PK INHIBITOR CIS-3,4-DIHYDROHAMACANTHIN B Wendy Strangman
- P269 IDENTIFICATION OF SMALL-MOLECULE GLYCOLYSIS INHIBITORS THROUGH BIOENERGETICS-BASED SCREENING Dale Nagle
- P270 ANTIPARASITIC ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS FROM EGYPT AGAINST LEISHMANIASIS AND SLEEPING SICKNESS Manar Salem
- P271 ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY AMONG BACTERIA RECOVERED FROM MARINE SEDIMENTS OF THE NORTHEAST COAST OF BRAZIL Paula Jimenez
- P272 BAICALEIN INDUCES APOPTOSIS IN PANCREATIC CANCER CELLS BY DOWN-REGULATION OF MCL-1 Guido Eibl
- P273 HARMINE POTENTIATES NERVE GROWTH FACTOR (NGF) STIMULATED NEURITOGENESIS IN PC12 CELLS Babu Tekwani
- P274 HYPOTENSIVE, DIURETIC AND ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORY ACTIVITIES OF CINNAMOMUM TAMALA LEAVES Qaiser Jabeen
- P275 PROANTHOCYANIDINS FROM CRANBERRY FRUIT AND LEAVES (VACCINIUM MACROCARPON): STRUCTURE VARIATION AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES Catherine Neto
- P276 ASSESSMENT OF OVA-INDUCED LUNG INFLAMMATION IN MICE TREATED WITH AYURVEDIC HERBS USING 2-D AND 3-D IMAGING Gail Mahady
- P277 INTESTINAL PERMEABILITY INTERACTION BETWEEN TRITERPENOIDS OF AMPHIPTERYGIUM ADSTRINGENS AND TWO STATINS Andres Navarrete
- P278 USING IMAGING MASS SPECTROMETRY TO DETECT THE PRODUCTION OF BACTERIAL SECONDARY METABOLITES IN A ZEBRAFISH HOST. Samantha Mascuch
- P279 ANTIANGIOGENIC PLANT EXTRACTS FOR POTENTIAL TREATMENT OF OCULAR NEOVASCULARIZATION Manar Salem

ANTI-INFLUENZA VIRAL FLAVONOIDS FROM THE AERIAL PART OF
AGRIMONIA EUPATORIA

Chang Yong Hyeon¹, Jae-chan Ahn¹, Zheng Hailing¹, Mi Young Ha¹, Hana Youn², Yu-na Lee²,
Chang-seon Song², Ok Pyo Zee¹, Jong Hwan Kwak¹



¹School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do 440-746, South Korea
²College of Veterinary Medicine, Kunkuk University, Seoul 143-701, South Korea


Agrimonia eupatoria L. which belongs to the family Rosaceae, grows as a perennial herb, and is widely distributed in Europe, North Africa, South Africa, North Asia, and cultivated in Korea. Its whole plant has been used as a Chinese crude drug for the treatment of lung cancer, liver cancer, esophageal cancer, tumor, ache, bleeding, diarrhea, hematemesis, hematuria, and metrorrhagia. Previous studies on *Agrimonia* genus, have afforded several flavonoids, tannins, triterpenes, isocoumarins, sterol and essential oils, and have investigated various biological activities. In the course of a search for anti-influenza viral compounds from natural products, we have found that the methanol extract of *A. eupatoria* has anti-viral activity against influenza A virus. The MeOH extract of *A. eupatoria* was consecutively partitioned with hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and n-BuOH to give five fractions. Among these fractions, n-BuOH-soluble showed anti-influenza viral activity (EC₅₀:23.73 μg/ml; SI:11.90). Ten flavonoids were isolated from the n-BuOH fraction and the structures were identified by comparison of their spectral data with literature values. Among the isolated compounds, apigenin 3-glucuronide, luteolin 3-glucuronide, quercetin 3-glucoside and quercetin 3-rhamnoside showed antiviral activity against influenza A/NWS/33(H1N1) virus. The anti-viral compounds were subjected to inhibitory activity on neuraminidase in influenza A/NWS/33 virus. The activity of neuraminidase decreased significantly by tested compounds, however half reduction of enzymatic activity was shown at relatively high concentration (IC₅₀:198.0 ~ 512.0 μg/ml).

2. 2012 중국상해비즈니스 상담회(2012.12.03.-07)

Seoul Smart Supplier


• 健仕康(HealthKhan®)



HEALTHKHAN®

为VVIP 顾客消除疲劳, 增强集中力, 促进健康的
健仕康 HealthKhan®!!!



BIOKOREA CO., LTD.
바이오코리아(주)

www.healthkhan.com

Seoul Smart Supplier





• 被列入2011年 KOREA GOOD BRAND "HIT 500"

• 国内外专利注册(韩国, 中国), 确保其源泉技术(市场性, 收益性, 垄断性)

• 多用途: 高营养保健食品、医药品等 皆适用

• 安全性

• 可靠性: 成均馆大学药学院, 首尔大学药学院, 京畿道医药研究中心, 韩国生命工学研究院, 天主教医学研究院等关于产学研的共同研究及国内外SCI论文及学会上发表。

• 方便性: 产品的剂型, 制剂的多样化(饮料, 茶类, 药片, 颗粒, 药丸, 片剂, 胶囊等)

竞争力: 原料植物为多年生草, 全草都有药用功效, 仅需服用少量(200mg/日)即可获得比市面既有产品更卓越的功效, 市场竞争力卓越。



健仕康(Healthkhan®)
30ml x 30 # 150,000



健仕康金装系列(HealthkhanGold®)
15ml x 100 #
零售每盒12,000元(含税)



健仕康专长系列(HealthkhanForte®)

产品特征

- 健仕康(Healthkhan®): 改善肝功能, 缓解疲劳, 解除宿醉
- 健仕康金装系列(HealthkhanGold®): 运动能量饮料
- 健仕康专长系列(HealthkhanForte®): 培强性功能

BF, Mario Tower, 222-12, Guro-dong, Guro-gu, Seoul, Korea
TEL : +82-2-538-8825 / E-mail : parrot76@empal.com / www.healthkhan.com



3. 2012년 9월~12월, 일본 해피통신 한국 우수 상품 전시관 샘플 전시



BIOKOREA CO., LTD.

■ 製造会社 概要

会社名	BIOKOREA(株)	代表取締役	イ・ヨンソ
住所	ソウル市九老区九老洞22-12 マリタワ-8階		
HP	010-6391-1609	E-mail	happy21@hcmul.com
TEL	02-538-8825	FAX	02-463-4627

■ 製品紹介

商品1: **Healthkhan®**



■ 適応症(効能・効果)
肝機能の改善、免疫増強、疲労回復、二日酔い、滋養強壮、滋養強壮、虚弱体質、肉体的疲労等

*** 特許関連事項、出願関連事項**

- 韓国特許登録 No. 10-0557015
- 中国特許登録 No. ZL02601003.5




単価表(単位: ワン(30ml/1pack)*30pack/box)

最少注文数	供給価格(FOB)	消費者価格	サンプル価格
50,000BOX	1,100ワン/1パック	100,000	40,000ワン/1BOX
1,500,000パック	33,000ワン/1BOX		

<製品の特徴および説明>

食品類型: 健康機能性飲料・韓国製
 製品構成: 30ml/1pack
 主原料: キンズヒキエキス 他
 保管方法: 高温多湿、直射日光を避けて冷蔵庫や乾燥した涼しいところで保管してください。
 賞味期限: 製造日から2年

※ バイヤーさんのご要望に応じ、飲料タイプに加えて錠剤、カプセル、顆粒製品のOEM、ODMの生産も可能です。

商品2: **HealthkhanGold®**



<製品の特徴および説明>

食品類型: 健康機能性飲料・韓国製
 製造者: バイオコア(株)
 内容量: 50ml/1本
 原材料名: キンズヒキエキス 他
 効能・効果: 疲労回復、集中力強化、健康増進等

※ バイヤーさんのご要望に応じ、飲料タイプに加えて錠剤、カプセル、顆粒製品のOEM、ODM生産可能である。



単価表(単位: ワン(100ml/1瓶)/1BOX)

最少注文数	供給価格(FOB)	消費者価格	サンプル価格
50,000BOX	2,500ワン/1瓶	100,000ワン	30,000/1BOX
500,000万本	25,000ワン/1BOX		

■ 商品に関するお問い合わせはこちらに...

韓ハッピー通信 日韓ワールドセンター
 東京都江東区青海2-7-4 the SOHOビル 701号
 担当者
 Tel : 03-3527-5955
 Fax : 03-3527-5956
 E-mail : trade@hansobuy.co.jp

※ バイヤーとして購入される場合は、購入価格には相談が必要となります。

일본어 CL



4. 강원도 바이오 일본수출 상담회 (2012년 10월 12일, 일본동경신주쿠 게이오 호텔 42층)



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 알코올성 지방간 유도

지방간을 유도하기 위하여 흰쥐에 총 칼로리의 36%를 알코올로 대체한 liquid Lieber DeCarli diet(Diets Inc, PA, USA)를 총 투여기간 8주간 1일 1회 투여하였으며 (ED), 대조군은 알코올과 같은 칼로리의 maltodextran을 함유한 diet를 투여하였음 (CD). 투여 부피는 투여 당일에 측정된 체중 및 사료 소모량에 따라 매일 산출하였음 (Lieber and DeCarli, 1989;Lieber *et al.*, 1989).

2. Microsome CYP activity

간 조직중 100 mg을 적출하여 KCl-Tris 용액 (1.15% KCl, 50 mM Tris-HCl, PH 7.4)에 분쇄한후 ultracentrifuge (105,000g 60 min)하여 microsome 분획을 분리하였음. 분리된 microsome 분획을 KCl용액 (1.15% KCl, 10 mM HEPES, 1mM EDTA, PH 7.6)에 현탁하였으며, CYP2E1 활성도는 hydroxylation에 의해 4-aminophenol에서 p-aminophenol로 생성도를 흡광도로 정량하였음 (Omura and Sato, 1964;Schenkman *et al.*, 1967).

3. 지질 과산화물 (MDA) 측정

간장 내 지질 과산화 함량은 thiobarbituric acid reactive substances 의 형광법 (535nm)으로 측정하였으며, 표준물질로서는 malondialdehyde를 사용하였음 (Buege and Aust, 1978).

4. Reduced glutathione (GSH) 함량 측정

간 조직중 100 mg을 적출하여 1% picric acid 용액에 분쇄한 후, 상층액에 glutathione reductase, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 및 NADPH를 가하여 흡광도 변화량 (412nm)을 이용하여 총 glutathione 측정하였음. 환원된 glutathione은 2-vinylpyrine을 이용하여 같은 방법으로 측정하였음 (Rahman *et al.*, 2006).

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌

- Buege JA, Aust SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.
- Chung KS, Kim YS (2000). A Taxonomy study on the genus *Agrimonia* (Rosaceae) in Korea. *Kor. J. Plant. Tax.* 30(4):315-337.
- Kang SC, Lee CM, Koo HJ, Ahn DH, Choi H, Lee JH, Bak JP, Lee MH, Choung ES, Kwak JH, Lee MK, Oh JS, Zee OP (2006). Hepatoprotective Effects of Aqueous Extract from Aerial Part of *Agrimonia*. *Kor. J. Pharmacogn.* 37(1): 28-32.
- Kwon DH, Kwon HY, Kim HJ, Chang EJ, Kim MB, Yoon SK, Song EY, Yoon DY, Lee YH, Choi IS, Choi YH (2005). Inhibition of Hapatitis B Virus by an Aqueous Extract of *Agrimonia eupatoria* L. *Phytother. Res.* 19:355-358
- Lee YH, Park JM, Lee ST, Choi JH, Chung DS (2002). Growth and Yield by Livestock Excrements Application in *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Korean J. Plant. Res.* 15:243-249
- Lieber CS, DeCarli LM (1989). Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol* 24: 197-211.
- Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF (1989). Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 10: 501-510.
- Omura T, Sato R (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1: 3159-3165.
- Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW (1967). Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* 3: 113-123.

www.kfda.go.kr 식약청 홈페이지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.