

(옆면)

(앞면)

121038

총총
갈고리
둥굴레를
이용한
수면건강
기능식품
산업화
기술개발

최
종
보
고
서

2022

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

(건고덕
17p)

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
유용 농생명자원산업화 기술개발 사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004373-01

총총갈고리둥굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발

납본일자: 2023.06.13

주관연구기관 / (주) 농심
협동연구기관 / 고려대학교

농 립 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

최종보고서							보안등급			
							일반[√], 보안[]			
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명	유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업				
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원				내역사업명 (해당 시 작성)	유용 농생명자원 산업화 기술개발				
공고번호	농축2021-24호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호		121038				
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801	60%	2순위 LA0906	40%					
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0201	60%	2순위 CA0105	30%	3순위 CA0105	10%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문								
		영문								
연구개발과제명		국문		총총갈고리동굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발						
		영문		Development of industrial technology for sleep health functional foods using <i>Polygonatum sibiricum</i>						
주관연구개발기관		기관명	(주) 농심		사업자등록번호	118-81-03914				
		주소	(우)07057 서울시 동작구 여의대방로 112 농심사옥		법인등록번호	110111-0057574				
연구책임자		성명	손석준		직위					
		연락처	직장전화			휴대전화				
			전자우편			국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)						
		단계 (해당 시 작성)	1단계							
		2단계								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	지방자치단체	기타()		합계		
		총계	525,000	65,000	985,000			590,000	985,000	1,575,000
1단계	1년차	225,000	-	420,000				225,000	420,000	645,000
	2년차	300,000	65,000	565,000				365,000	565,000	930,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편	비고		
		공동연구개발기관	고려대학교		서형주	정교수			역할	기관유형
		위탁연구개발기관	코아시스템온 (주)		이현걸	연구소장			위탁	기업
연구개발담당자 실무담당자		성명	전상덕		직위					
		연락처	직장전화			휴대전화				
			전자우편			국가연구자번호				

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

2023 년 5 월 15 일

연구책임자: 손 석 준

주관연구개발기관의 장: 이 병 학 (직인)

공동연구개발기관의 장: 권 정 환 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 양 길 안 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

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

(22쪽 중 2쪽)

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “층층갈고리등굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발”(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2022.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자: 2023년 5월 15일

주관연구기관명 : (주) 농심 (대표자) 이병학
협동연구기관명 : 고려대학교 (대표자) 권정환
위탁연구기관명 : 코아스탬캠온(주) (대표자) 양길안



주관연구책임자 : 손석준
협동연구책임자 : 서형주
참여기관책임자 : 이현걸

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

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “층층갈고리등굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발”(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2022.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자: 2023년 6월 13일

주관연구기관명 : (주) 농심 (대표자) 이병학 (인)
협동연구기관명 : 고려대학교 (대표자) 권정환 (인)

주관연구책임자 : 손석준
협동연구책임자 : 서형주

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



평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서

□ 평가의견에 대한 조치

평가의견	조치내용	비고
○ 수면효능의 작용기전에 대한 분석이 더 세심하게 추가되어야 할 것으로 사료됨	○ 농심 제공 항정(충충갈고리등굴레) 추출물의 수면증진 기작과 추정활성물질에 의한 작용기전 분석을 첨부하였음.(최종보고서 50-51쪽에 제시함)	
○ 천연물의 특성상 활성성분의 명확한 설정은 어렵지만, 추출물 대비 분리된 물질에서의 활성, 그리고 그 생체내 기전 등에 대한 연구는 최대한 많이 제시하는 것이 좋을 것이라 생각됨	○ 농심 제공 항정(충충갈고리등굴레) 추출물의 수면증진 기작과 추정활성물질에 의한 작용기전 분석을 첨부하였음.(최종보고서 50-51쪽에 제시함)	
식약처 개별인정형 보완 및 품목제조 허가 등의 절차는 계획보다 늦어질 수 있기 때문에, 좀더 세심한 제품개발 스케줄 관리가 필요할 것임. 추후 개별 인정 및 제품 등록 매출에 대한 추적 관찰이 필요함	○ 개별인정신청 및 제품화에 대한 일정(스케줄)을 추가하였습니다. 최대한 제시한 일정에 맞춰서 진행할 수 있도록 하겠습니다. (최종보고서 63 쪽에 제시함)	
○ 개발된 제품의 상품화 및 매출 달성을 위한 식약처 개별인정 확보가 필요함	○ 개별인정신청 및 제품화에 대한 일정(스케줄)을 추가하였습니다. 일정부분에 목표 매출 등도 제시하였습니다. (최종보고서 63 쪽에 제시함)	
○ 식약처 개별인정 신청 하였으나 등록하지 못한점에 대한 해결을 조속히 수행이 요구됨	○ 개별인정신청 및 제품화에 대한 일정(스케줄)을 추가하였습니다. 최대한 제시한 일정에 맞춰서 진행할 수 있도록 하겠습니다. (최종보고서 63 쪽에 제시함)	
○ 원료에 대한 표준화 및 제품화에 미해결 부분을 조속히 해결 방안이 요구됨	○ 원료에 대한 표준화는 지표성분인 GABA를 활용하여 연구가 어느정도 완료되었습니다. 제품화 부분은 개별인정 확보 후 진행할 예정입니다.	

□ 개인정보 삭제 확인

본인은 연구과제 최종보고서의 개인정보(주민등록번호 등)를 삭제하여 제출함을 확인합니다.

2023.05.15.

주관연구책임자 : 손석준



최종보고서							보안등급				
							일반[√], 보안[]				
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명	사업명		유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업				
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		유용 농생명자원 산업화 기술개발				
공고번호		농축2021-24호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호		121038					
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801	60%	2순위 LA0906	40%						
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0201	60%	2순위 CA0105	30%	3순위 CA0105	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문	총총갈고리동굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발								
		영문	Development of industrial technology for sleep health functional foods using <i>Polygonatum sibiricum</i>								
주관연구개발기관		기관명	(주) 농심		사업자등록번호		118-81-03914				
		주소	(우)07057 서울시 동작구 여의대방로 112 농심사옥		법인등록번호		110111-0057574				
연구책임자		성명	손석준		직위						
		연락처	직장전화			휴대전화					
			전자우편			국가연구자번호					
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)								
		단계 (해당 시 작성)	1단계								
			2단계								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계	연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물			현금
총계		525,000	65,000	985,000					590,000	985,000	1,575,000
1단계	1년차	225,000	-	420,000					225,000	420,000	645,000
	2년차	300,000	65,000	565,000					365,000	565,000	930,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
							역할	기관유형			
공동연구개발기관		고려대학교	서형주	정교수			공동	대학			
위탁연구개발기관		코아시스템컴온 (주)	이현걸	연구소장			위탁	기업			
연구개발담당자 실무담당자		성명	전상덕		직위						
		연락처	직장전화			휴대전화					
			전자우편			국가연구자번호					

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

2023 년 5 월 15 일

연구책임자: 손 석 준 (인)

주관연구개발기관의 장: 이 병 학 (직인)

공동연구개발기관의 장: 권 정 환 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 양 길 안 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		유용농생명자원 산업화 기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		121038
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801	60%	2순위 LA0906	40%			
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0201	60%	2순위 CA0105	30%	3순위 CA0105	10%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		층층갈고리둥굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 ~ 2022. 12. 31 (21개월)						
총 연구개발비		총 1,575,000 천원 (정부지원연구개발비: 525,000 천원, 기관부담연구개발비: 1,050,000 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		1. 층층갈고리둥굴레 추출분말의 수면건강 식약처 개별인정 확보 2. 건강기능식품 제품 개발 및 생산 3. 지표물질 확보 및 제품 효능 향상을 위한 부원료 소재 확보 4. 소재의 섭취안전성 확보 5. 국내 농산자원인 층층갈고리둥굴레를 활용한 수면 건강기능식품 상품화				
		전체 내용		■ 주관기관 (농심) 1. 분말 생산 품질 지표 개발 및 확보 - 지표성분 2종(polygonatine A, GABA)분석법 도입 및 최적화 - 분석법 검증을 통한 생산 품질 규격 설정 - 현장 생산제품(분말) 분석 (지표성분, 미생물, 중금속 등) 2. 층층갈고리둥굴레 추출분말 생산공정 개발 - 원료 전처리 공정 최적화 - 현장(Plant) 규모 생산 테스트 진행 및 샘플 확보 - 수급원료 및 생산제품(분말) 규격 설정 3. 건강기능식품 제형 개발 - 수면건강 맞춤형 건강기능식품 제형 개발 (액상, 캔디, 젤리, 필름 등 섭취 편의성 고려) - 제형에 맞는 제품 처방 개발 및 관능평가 진행 - Lab-scale 기기 활용 시제품 제조 및 평가 4. 건강기능식품 시제품 생산 - GMP 시설을 보유 기업 활용 Pilot-scale 생산테스트 진행 및 시제품 평가 - 원료 활용 시제품 현장 (Plant) 생산 테스트 진행 및 평가 - 현장생산 테스트를 위한 품질 및 처방 개선 진행 (고려대 확보 부원료 활용) 5. 수면건강 식약처 개별인정 신청 - 개별인정 신청을 위한 서류준비 (안전성, 기능성, 기준규격 관련 필요서류 확보) - 식약처 사전검토 신청 (필요서류 체크리스트 확인) - 식약처 기능성원료 개별인정 신청				

		<p>■ 협동기관 (고려대)</p> <p>1. 수면건강 기능성분 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quercetin-3-glucuronide(Q3G), ferulic acid, apigenin 등 수면건강 기능성분 규명 - 식용 식물 함유 수면건강 기능성분 물질인 apigenin, ferulic acid, rosmaric acid, EGCG에 대한 수면 증진 활성 평가 진행 rosmaric acid와 EGCG의 수면 활성 우수성 확인. <p>2. 수면건강 기능 부원료 소재 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quercetin-3-glucuronide(Q3G) 함유 상추를 대상 수면활성 및 작용기전을 규명 - 부원료 소재 병풍쌈, 며느리배꽃 소재 선정 (1차년도) : 수면 기능성 물질 Q3G와 ferulic acid 고함유 소재 - EGCG와 rosmaric acid 함유 카테킨 추출물(EGCG 46.6% 함유 추출물)과 로즈마리 추출물(rosmaric acid 10% 함유 추출물)의 수면 증진 활성 확인. <p>3. 농심원료+부원료 시너지 효과 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 농심 제공 층층갈고리둥글레 추출물과 로즈마리 추출물 또는 카테킨 추출물을 5:1 비율로 혼합사용시 160 mg/kg 경구 투여시 수면 증진에 대한 시너지 효과 확인. <p>■ 위탁기관 (켄온)</p> <p>1. 일반독성 실험활용 섭취 안전성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 설치류 (SD Rat) 단회투여 독성 시험: 최대 5,000 mg/kg/day에서 안전성 확보 - 설치류 (SD Rat) 반복투여 독성 시험: 최대 5,000 mg/kg/day에서 안전성 확보 - 유전 독성 시험: 복귀 돌연변이, 염색체 이상시험, 소핵시험 전체 용량에서 안전성 확보 <p>2. 생식발생독성(배태자 발생) 실험 활용 섭취 안전성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 설치류 (SD Rat) 실험 : 최대 5,000 mg/kg/day에서 안전성 확보 - 토끼 (NZW) 실험 : 최대 2,000 mg/kg/day에서 안전성 확보
--	--	---

연구개발성과	<p>○ 주관기관 (농심)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 신규 지표성분 Polygonatine A 발굴 및 기능성분 GABA 분석법 개발을 통한 층층갈고리추출분말 최종 품질지표 확보 - 원료 전처리 및 제조공정별 품질 확인 및 효능 확인 - 당해년도 원료 대상 현장수준 공정개발 및 품질 확보 - 건강기능식품 제형 개발 (엠펙, 스틱젤리, 구미젤리, 필름) 및 시제품의 유통기한 테스트를 통한 저장 안정성 확보 - 수면건강기능 식약처 건강기능식품 개별인정 신청 <p>○ 협동기관 (고려대)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 부원료로 quercetin-3-glucuronide(Q3G) 함유한 상추를 대상으로 수면활성 및 작용기전을 확인. - 수면 증진 목적의 부원료로 적합한 소재 탐색 결과 Q3G와 ferulic acid를 높은 수준으로 함유한 병풍쌈과 며느리배꽃이 적합 소재로 선정. - 지표성분 분석을 위한 전처리 과정으로 산가수분해 후의 진행이 적합함. - EGCG와 rosmaric acid 함유 카테킨 추출물((EGCG 46.6% 함유)과 로즈마리 추출물(rosmaric acid 10% 함유)의 수면 증진 활성 확인 - 농심 제공 추출물과 로즈마리/카테킨 추출물을 5:1 비율로 혼합사용시 160 mg/kg 경구투여 시 수면 증진에 대한 시너지 효과 확인. <p>○ 위탁기관 (켄온)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 층층갈고리둥글레 추출분말 일반독성 안전성 확보
--------	---

	<p>: 단회, 반복, 유전독성 실험 진행 및 섭취 안전성 확보</p> <p>- 층층갈고리동굴레 추출분말 생식독성 안전성 확보</p> <p>: 랫드 및 토끼 활용 생식독성 (배태자 발생) 진행 및 섭취 안전성 확보</p> <p>- 층층갈고리동굴레 추출분말 생식독성 안전성 확보</p> <p>: 랫드 및 토끼 활용 생식독성 (배태자 발생) 진행 및 섭취 안전성 확보</p>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 안전성이 확보된 국내 천연물로부터 소재 생산 기술 및 수면건강 소재 스크리닝 기술 확보 및 발전 - 천연물 기반 지표성분 개발법 확보 및 지표물질 분석법 확보 - 국내 건강기능식품 세계화를 위한 기능 맞춤형 제형 제조 기술 확보 <p>○ 산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수면관련 건강기능식품 출시를 통하여 국내 시장 확장 및 글로벌 시장 진출 - 국내 생산 농산물을 활용하여 농가, 생산업체, 유통업체 동반 성장 및 일자리 창출 가능 - 국내 생산 소재의 산업화를 통하여 소재 및 관련 농업/식품 산업 경쟁력 강화 <p>○ 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제품 개발을 통하여 수면장애를 겪고 있는 사람들의 사회적, 개인적 의료비용 감소 및 국가 의료비 지출 감소 - 수면과 관련된 개인의 건강 개선으로 삶의 질 향상 - 수면제 건강기능식품 전환을 통하여 수면제와 관련된 사회적, 의료적 부작용 경감

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
3												
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	층층갈고리 동굴레		건강기능식품		유용약용 생명자원		수면장애		수면개선			
영문핵심어 (5개 이내)	Polygonatum sibiricum		Health functional food		Natural food&medical resources		Sleep disturbance		Sleep Improvement			

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

요약문 작성 요령(작성 요령은 제출하지 않습니다)

1. 사업명: 해당 연구개발과제의 사업명을 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
2. 내역사업명: 해당 연구개발과제의 내역사업명을 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
3. 총괄연구개발 식별번호: 총괄연구개발명에 부여되는 번호를 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
4. 연구개발과제번호: 연구개발과제 선정 시 부여되는 번호를 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
5. 기술분류: 연구개발계획서 표지에 기재한 기술분류를 기재합니다.
6. 총괄연구개발명: 연구개발계획서 표지에 기재한 총괄연구개발명을 기재합니다.
7. 연구개발과제명: 연구개발계획서 표지에 기재한 연구개발과제명을 기재합니다.
8. 전체 연구개발기간: 연구개발계획서 표지에 기재한 연구개발과제의 전체 연구개발기간을 기재합니다.
9. 총 연구개발비(해당단계, 해당연도): 연구개발계획서 표지에 기재한 연구개발과제의 총(해당단계, 해당연도) 연구개발비를 기재합니다.
10. 연구개발단계: 해당되는 연구개발과제의 연구개발단계 유형에 [√] 표시합니다.
 - 1) 기초연구단계란 특수한 응용 또는 사업을 직접적 목표로 하지 아니하고 현상 및 관찰 가능한 사실에 대한 새로운 지식을 얻기 위하여 수행하는 이론적 또는 실험적 연구단계를 의미합니다.
 - 2) 응용연구단계란 기초연구단계에서 얻어진 지식을 이용하여 주로 실용적인 목적으로 새로운 과학적 지식을 얻기 위하여 수행하는 독창적인 연구단계를 의미합니다.
 - 3) 개발연구단계란 기초연구단계, 응용연구단계 및 실제 경험에서 얻어진 지식을 이용하여 새로운 제품, 장치 및 서비스를 생산하거나 이미 생산되거나 설치된 것을 실질적으로 개선하기 위하여 수행하는 체계적 연구단계를 의미합니다.
 - 4) 기타는 기초, 응용, 개발 등 3가지 단계에 해당하지 않는 경우를 의미합니다.
11. 기술성숙도: 특정기술(재료, 부품, 소자, 시스템 등)의 성숙도로서 최종 연구개발 목표, 내용, 최종 결과물 등을 고려하여 아래의 9단계 중 해당하는 단계를 선택합니다(특정기술의 개발을 목적으로 하는 연구개발과제의 경우에만 작성).
 - 1) 기초연구단계: 1단계(기초 이론 · 실험), 2단계(실용 목적의 아이디어, 특허 등 개념 정립)
 - 2) 실험단계: 3단계(연구실 규모의 기본성능 검증), 4단계(연구실 규모의 소재 · 부품 · 시스템 핵심성능 평가)
 - 3) 시제품단계: 5단계(확정된 소재 · 부품 · 시스템 시제품 제작 및 성능 평가), 6단계(시범규모의 시제품 제작 및 성능 평가)
 - 4) 제품화단계: 7단계(신뢰성평가 및 수요기업 평가), 8단계(시제품 인증 및 표준화)
 - 5) 사업화단계: 9단계(사업화)
12. 연구개발과제 유형: 중앙행정기관이 연구개발과제 공고 시 자율적으로 구분한 유형을 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
13. 연구개발과제 특성: 중앙행정기관이 연구개발과제 공고 시 기재한 연구개발과제의 특성을 기재합니다(연구자 직접 기입 불필요).
14. 연구개발 목표: 연구개발과제의 목표를 500자 내외로 기재합니다.
15. 연구개발 내용: 연구개발과제의 내용을 1,000자 내외로 기재합니다.
16. 연구개발성과: 연구개발과제 수행에 따른 정량적 · 정성적 성과에 대하여 500자 내외로 기재합니다(연구개발과제가 단계로 구분되는 경우에는 전체 연구개발기간 동안 단계별로 연구개발성과 항목별 목표를 나타내는 표를 포함).
17. 연구개발성과 활용계획 및 기대효과: 연구개발성과의 수요처, 활용내용, 경제적 파급효과 등을 500자 내외로 기재합니다(연구시설 · 장비 구축을 목적으로 하는 연구개발과제의 경우에는 연구시설 · 장비를 활용한 성과관리 및 자립운영계획, 수입금 관리 및 운영계획 등).
18. 연구개발성과의 비공개여부 및 사유(해당 시 작성) : 영 제35조 제2항 각 호의 어느 하나에 해당하는 기술인 경우 '비공개'로 기재하고 그 사유를 작성합니다.
19. 연구개발성과의 등록 · 기탁 건수 : 연구개발성과를 등록 및 기탁한 건수를 기재합니다.
20. 연구시설 · 장비 종합정보시스템 등록현황 : 연구개발 수행기간 중 연구시설 · 장비의 등록 현황을 기재합니다.

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

※ 각 항목에서 요구하는 정보를 포함하여 연구개발과제의 특성에 따라 항목을 추가하거나 항목의 순서와 구성을 변경하는 등 서식을 수정하여 사용하거나 별도의 첨부자료 활용이 가능합니다.
다만, '1.3) 세부 정량적 연구개발성과' 항목은 2021.1.4.부터 2021.12.31.까지 수정 사용 가능합니다.

1. 연구개발과제의 개요

(1) 국내 생산 약용작물 유통 및 시장 현황

- 국내에서 유통되는 약용작물들은 전통적인 한약 시장에서의 활용뿐만 아니라 그 효능으로 다양한 산업계로 확장하고 있다. 건강기능식품, 화장품, 제약 제품의 주요 원료로 사용되고, 한방 제조업 및 서비스업 등에서 주목받고 있음.
- 우리 고유의 약용 작물들을 활용한 건강기능식품, 기능성화장품, 생활용품 등은 소비자들에게 좋은 평을 받으며, 여러 기업에서 제품 원료로서의 연구를 진행 중임 (표1-1).

표 1-1. 약용 작물을 활용한 기능성 제품

설화수 자음생크림 (홍삼)	려 탈모증상케어 라인 (인삼)	정관장 홍삼정	애경 2080동의생약열 (은행잎 등)
			

- 최근에는, AI나 IoT기술을 적용한 스마트팜으로 약용작물의 생산시설이나 가공기술이 발달되어 우리나라 약용 작물의 품질을 알릴 수 있는 기반이 만들어 지고 있음.
- 국내 농생명 소재산업 중 기능성 식품은 천연 바이오 의약품, 천연 바이오 화장품 등과 함께 가장 큰 시장으로 평가 되고 있으며, 2014년 1.5조원에서 2022년 3.3조원 이상으로 추정되며, 시장의 연평균 증가율은 10 %이상에 이를 것으로 예상됨(표 1-2).

표 1-2. 국내 농생명 소재산업 시장 규모

산업분류	시장규모 (조원)		연평균 증가율 ('14~'22)
	2014년	2022년	
기능성 식품	1.49	3.30	10.5%
천연 바이오 의약품	0.71	3.05	20.0%
천연 바이오 화장품	2.97	11.39	18.3%
천연 바이오 비료농약	0.13	0.20	5.7%
바이오 플라스틱(섬유)	0.06	0.10	6.6%
바이오 사료	1.89	3.55	8.2%
기타 농생명 소재	0.66	1.31	8.9%
합계	7.91	22.91	14.2%

- 코로나 이후에 K-푸드에 대한 관심이 높아지고 있으며, K-푸드 중 건강기능식품 시장에 대한 관심도 높아지고 있음. 이는 대한민국에서 제조한 건강기능식품의 품질관리 및 인증 수준이 높아 품질을 믿을 수 있으며, 건강기능식품 효능이 검증된 편이기 때문으로 판단되고 있음. 2020년 발간한 식품 및 식품첨가물 생산실적에 따르면, 수출 실적이 100만불이 넘는 국내 농생명자원 활용 건강기능식품은 총 4종이며, 그중 홍삼, 당귀 등의 매출 규모가 큰 것으로 나타났음 (그림 1-1).



그림 1-1. 국내 농생명 자원을 이용한 건강기능식품 수출 규모

- 홍삼 등을 통하여 국내 건강기능식품의 품질을 인정받은 바가 있고, 국내 농생명자원 중 홍삼 등 외에도 충분히 건강기능식품으로 잠재성이 있는 소재들이 있을 것으로 생각됨. 따라서 국내 농생명자원을 이용하여 건강기능식품을 개발하는 업무는, 국내 농가의 소득증대를 이룰 수 있을 뿐만 아니라, 국내 농생명자원의 해외 인지도 구축, 농업/식품산업/유통/무역 등 관련된 여러 분야에 산업적 시너지를 낼 수 있다고 판단됨.
- 이에 홍삼, 당귀 이외에 K-푸드 건강기능식품 시장을 이끌어갈 국내 농생명자원을 발굴하여 산업화 하는 것이 매우 중요할 것으로 예상됨.
- 대표적 약용작물 중 하나인 층층갈고리둥굴레는 동의보감 등 전통문헌에서는 황정으로 불리고 있으며, 우리나라 강원, 충북, 충남 등지에서 많이 재배되고 있음. 2018년도 농림축산식품부가 발표한 약용작물 생산실적에 따르면 황정은 전체 약용작물 생산량 59,444톤 가운데 104톤을 차지한 것으로 나타남.
- 층층갈고리둥굴레는 항균, 항진균, 혈압강하 작용이 있으며 섭취 시 면역력 증진, 소화기능 강화 및 정력개선 등의 효과가 있다는 여러 연구결과가 존재함.
- 특별히 층층갈고리둥굴레는 몇 년간의 선행연구 결과를 통하여 수면개선에 관한 효과를 확인하였고, 이에 우리나라 불면증 및 수면장애를 겪은 환자의 수가 꾸준히 증가하는 상황임을 고려한다면 층층갈고리둥굴레가 수면관련 건강기능식품의 원료로 더욱 주목받을 수 있을 것으로 생각됨.
- 층층갈고리둥굴레 추출분말의 건강기능식품 개발을 통하여 국내 농생명자원의 산업화를 이룰 수 있을 뿐만 아니라 홍삼 등을 이을 수 있는 건강 기능성 소재로 활용할 수 있다고 판단됨.

(2) 수면관련 건강기능식품의 시장성

1) 수면에 대한 중요성 대두

- 수면은 인간 생존에 필요 불가결한 행동으로 피로를 해소하고 뇌 속 노폐물을 제거하며 활력을 회복시키는 필수적인 휴식 수단임.
- 수면이 부족하면 판단력이 흐려지고, 신체의 면역기능, 감정조절능이 저해되며 우울증 등의 기분장애, 불안장애 등이 포함된 정신질환의 유병률이 높아짐.
- 이로 인해, 업무와 학업 효율이 떨어지고 사고 위험이 커지며 일상생활을 제대로 지속하기 어려워져 삶의 질도 급격히 떨어짐.



그림 1-2. 수면장애 관련 연도별 환자 수

- 수면시간이 짧을수록 경제적으로 악영향이 나타나며 수면시간을 1주당 1시간 늘리면 단기적으로 1.1%, 장기적으로는 약 5%의 생산성 향상 효과가 나타난다는 연구 결과도 존재함.
- 하지만 우리나라 성인의 경우, 평균 수면 시간이 7시간 41분으로 경제협력개발기구(OECD) 회원국의 평균 수면시간인 8시간 22분에 비해 40여분 부족한 실정임.
- 특별히, 황정은 수면증진에 관한 효과가 있을 것으로 기대되는데 실제로 우리나라 불면증 및 수면장애를 겪은 환자의 수가 연평균 9.2%씩 꾸준히 증가하는 상황 (2010년 28만 8천여 명에서 2019년 63만 7천여 명)임을 고려한다면 황정의 수면개선효과의 관한 규명이 필요해 보임.
- 이렇듯, 현대사회를 살아가는 사람들은 바쁜 일상생활 및 스트레스로 인해 충분한 수면을 취하지 못하고 불면증 및 이에 유발되는 다양한 수면장애를 겪고 있음.
- 실제로, 건강보험심사평가원에 따르면 불면증 및 수면장애를 겪어 병원을 찾은 환자의 수는 2010년 33만 7천여 명에서 꾸준히 증가하여 2019년 72만 4천여 명으로 115.2%나 늘어났으며 연평균 9.2%씩 상승중임 (그림 1-2).
- 이러한 결과를 종합해 보면, 우리나라도 선진국에 비해서 수면장애 등을 겪고 있는 인구가 적다고 할 수 없으며, 개인적 삶의 질과 사회적 비용의 측면으로 보았을 때, 수면건강의 중요성은 커지고 있다고 할 수 있음.

2) 수면관련 시장 동향

- 수면에 대한 중요성이 대두됨에 따라 수면관련 시장은 계속해서 증가하고 있음.
- 국내외 소비자들은 수면에 대한 관심에 증가함에 따라서 수면건강에 많은 시간과 에너지, 비용을 지불하고 있음. 시장조사 업체인 Profshare의 조사에 따르면 2020년 현재 글로벌 수면보조제 시장은 82.7조에 이르며, 연평균 14% 이상 성장할 것으로 생각됨 (그림 1-3). 수면보조제 이외에도 수면 관련된 용품과 서비스는 점점 늘어나는 추세에 있음. 대한수면협회의 조사에 따르면 국내에도 수면관련 시장이 2조원 이상으로 추정되고 있음.

수면보조제 시장 규모

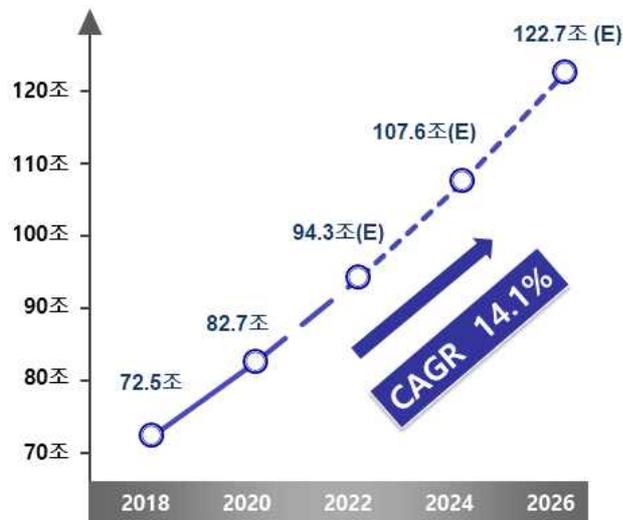


그림 1-3. 글로벌 수면보조제(sleeping aids) 시장규모
(단위: 조원, 출처 Profshare)

- 이러한 수면장애, 수면질환들을 해결하기 위하여 다양한 형태의 수면유도 의약품(수면제)이 존재함.
- 수면제 중, 벤조디아제핀계 약물은 중추신경계의 흥분을 감소시키는 신경전달물질인 가바(γ -aminobutyric acid, GABA)의 기능을 강화시키는 작용을 하며 항불안제로 진정, 항경련, 근이완 효과를 나타냄.
- 이 외에도, 이미다조피리딘계열 약물로 졸피뎀이 있으며 독세핀 및 멜라토닌계열 또한 수면유도 약물로 많이 사용됨.
- 현재 우리나라에서 불면증과 관련해 처방되는 수면제로는 졸피뎀 성분(zolpidem tartrate)의 스틸녹스(한독), 졸피드(한미약품), 졸피람(환인제약) 등과 Triazolam(트리아졸람) 성분의 할시온(한국화이자), 졸민(명인제약), 트리람(환인제약) 등이 존재함.
- 하지만 수면유도 의약품은 행동 문제(충동성 증가, 기억하지 못하는 폭력적 행동 등), 졸음, 숙취, 건망증과 드물게는 피부발진, 위장장애 등의 부작용을 나타내며 다른 중추신경 억제제와 시 중독(addiction), 의존성(dependence) 및 내성(tolerance)이 관찰됨.
- 약물은 내성이나 의존성이 없고 다른 질환에 영향을 끼치지 않아야 하지만, 현재 이러한 이상적인 불면증 치료 약제는 존재하지 않으며 모든 요건을 만족하는 약의 개발은 실질적으로 어려움.
- 따라서 이러한 부작용으로 인해 소비자들은 수면유도 의약품에 대해 부정적인 인식을 가지고 있는 현실이며 수면을 유도하면서 부작용 부담을 최소화 할 수 있는 천연 추출물 기반 건강기능식품을 통해서 수면건강을 유지하려는 시장 흐름을 보이고 있음.

3) 수면개선 건강기능식품의 대두

- 수면건강 기능식의 판매 증가 이유는 처방이 필요한 수면제(전문약)나 수면유도제(일반약)와 달리 장기간 섭취가 가능한데다 부작용이 없다는 점이 꼽힘.
- 현재 국내에는 식품의약품안전처에서 지정한 '수면질 개선' 기능을 가진 개별 인정원료로는 '감태추출물', '미강(쌀겨)주정추출물', '유단백 가수분해물(락티움)' 등 3가지가 존재함.



제품명	슬립밸런스	리얼슬립	수면엔	이지슬립	데이 엔딩 슬립 스타트
제품사진					
사용원료	감태추출물		미강추출물		락티움

그림 1-4. 수면에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료를 사용하여 제조한 대표적인 건강기능식품

- 감태에는 해양 폴리페놀의 일종인 ‘플로로타닌’ 이 풍부하게 함유돼 숙면에 도움을 주는 것으로 확인되며 감태추출물을 주원료로 한 제품들 중엔 2018년 출시된 슬립밸런스가 가장 많은 생산량과 판매량을 기록하고 있는 것으로 알려짐.
- 미강(쌀겨)주정추출물 성분으로는 그린스토어가 2019년 7월에 출시한 '수면엔'이 대표적으로 전국 1만 여개 약국에서 매출액 120억원을 넘기며 순항 중임.
- 미강에 존재하는 감마-오리자놀(γ -oryzanol)과 파이토스테롤(phytosterol) 성분이 수면 리듬을 잡는데 도움을 주는 것으로 알려져 있음.
- 락티움은 GABA수용체를 활성화 시키는 것으로 알려져 있으며 이는 대표적 수면제인 벤조디아제핀계열과 같은 기전으로 작용하므로 기능적 측면에서 매우 우수한 원료로 생각됨.
- 하지만 이들도 부작용이 존재하는데 감태추출물의 경우 차가운 성질로 인해 위장관 질환 및 장애를 유발할 수 있으며 갑상선 질환 환자는 특별히 섭취시 주의를 요함. 미강 또한 지방함유량이 높아 설사와 복통을 유발시킬 수 있으며 락티움 성분은 그 자체가 우유단백질에서 유래한 성분이기 때문에 우유와 같은 유제품 알레르기, 유당불내증이 있는 경우는 섭취를 피해야 함.
- 또한, 감태추출물의 경우 기능적 측면, 미강추출물의 경우 섭취 용이성 및 섭취량 측면, 락티움의 경우 단가 측면에서 약점을 가짐.
- 따라서 소비자들이 수면개선 관련 제품을 결정하는데 있어서 선택의 폭을 넓힐 수 있으며 저렴한 단가와 섭취 용이성이 강점인 수면개선에 효과가 있는 새로운 개별 인정원료의 개발이 필요함.

SPEC	감태추출물	미강주정추출물	유단백 가수분해물
기능성	● ●	● ● ●	● ● ● ● ▶ 총 수면시간 외 4종
섭취량	● ● ● ● ▶ 500mg/일	● ● ● ● ▶ 1,000mg/일	● ● ● ● ● ● ▶ 300mg/일
단가	● ● ● ● ▶ 타정기준: 75,000원/개월	● ● ● ● ● ● ▶ 타정기준: 60,000원/개월	● ● ● ● ▶ 타정기준: 100,000원/개월
섭취 용이성	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ● ● ●

그림 1-5. 수면건강에 효과가 있는 기능성 원료별 사양

(3) 추가 연구 필요성

- 연구계획서에 기술한 것과 같이 층층갈고리등굴레 추출분말 및 천연물 소재와 관련하여 수면개선 효능 기능성과 관련된 연구를 진행하였으나, 다음과 같은 내용의 연구가 추가로 필요하다고 판단됨.

○ 추가 지표성분발굴

- 현재 층층갈고리등굴레 추출분말의 지표성분으로써 β -sitosterol을 발굴하고 분석법 검증은 마쳤으나, 함량이 0.1~0.2mg/g 수준으로 타 건기식 소재 지표에 비해서는 낮은 수준임. 또한 전처리 과정으로 인해서 분석기관마다 오차가 발생할 수 있는 위험성이 있음. 분말 내에 분석이 용이하고 함량이 높은 지표를 찾는다면 품질관리가 더 용이할 것으로 생각됨.

○ 안전성 부분 확인

- 식약처 개별인정 신청시 층층갈고리등굴레 추출분말에 포함된 Azetidine-2-carboxylic acid라는 물질이 생식독성이 있다는 보고가 있어, 이에 대한 안전성 평가(독성실험)이 필요하다는 의견을 전달하였음. 선행연구결과와 비교하였을 때, 함량이 미량이기 때문에 독성이 없을 것으로 판단되나, 식약처 요청에 따라 안전성 평가가 필요하다고 판단됨.

○ 제품의 수면관련 효능 증대

- 층층갈고리등굴레 추출분말의 수면개선 효능은 충분하다고 판단됨. 하지만 현재 판매되고 있는 여러 가지 수면관련 건강기능식품 제품의 후기를 살펴보면 일부 또는 다수의 소비자가 체감되는 효능을 느끼지 못하는 경우가 많음. 이는 인체내에 수면과 관련된 메커니즘이 다양하고, 개인마다 장애가 발생하는 기작이 다르기 때문이라고 판단됨. 따라서 본 제품의 수면 기작을 보강해 줄 수 있는 부원료가 있다면 체감 효능에 도움을 줄 수 있다고 판단됨.

○ 수면건강 맞춤형 건강기능식품 제형 개발

- 현재 시중에 판매되고 있는 수면건강 건강기능식품은 대부분 타정(알약)제형에 해당됨. 이는 타정제형이 섭취가 간편하다는 장점이 있기 때문임. 반면에 타정 제형은 기존에 판매되는 수면제와 제형이 같아 의약품으로 생각하거나, 이에 따라 거부감이 있는 소비자가 있을 것이라고 생각됨. 또한 수면관련 건강기능식품은 체감효능이 다른 기능보다 빠르게 나타나야 하는 부분이 존재함. 따라서 저녁이후에 섭취가 편하면서 제품의 흡수가 빠른 건강기능식품 제형을 개발할 필요가 있음.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

■ 농심 연구내용 (주관기관)

(1) 분말 생산 품질 지표 개발 및 확보

1) 지표성분 Polygonatine A 분석법 도입 및 최적화

• 배경

- Polygonatine A는 동굴레속에서 발견되는 Alkaloid 물질. 따라서 동굴레속에 포함되는 층층갈고리동굴레 추출분말에서도 Polygonatine A가 포함되어 있음. 선행연구 결과에서 층층갈고리동굴레 메탄올 추출에서 발견하는 것을 확인하였음 (Ahmad Jarallah Almalki, 2015). Polygonatine A에 대한 정보는 그림 2-1에 표시하였음.

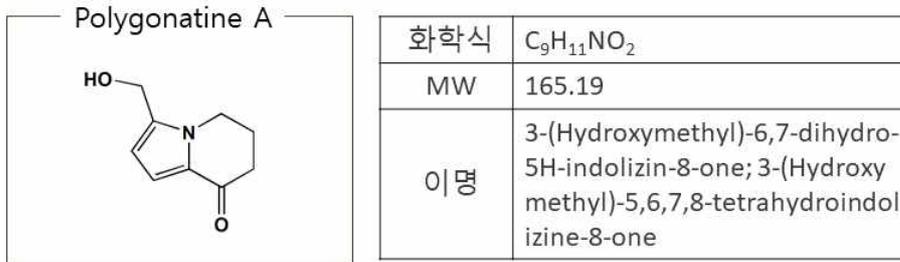


그림 2-1. Polygonatine A의 분자구조 및 정보

- 열수추출물인 개발소재에서도 Polygonatine A가 함유되어 있는지 정성적으로 확인하기 위하여 HRMS와 Compact mass spectrometer를 활용하였음. 또한 polygonatine A LC 분석법을 개발하고자 하였음.

① 정성분석 (HRMS 활용 프로그램 분석)

• 연구방법

- 분석조건 및 분석기기는 다음과 같음 (그림 2-2).

	<p>Polygonatin A 지표성분 측정 조건 (HRMS)</p> <p># 용매 A= 0.1% formic acid (70%) 용매 B= methanol (30%)</p> <p># Flow rate= 0.2 mL/min</p> <p># Column temp.= 25 °C</p> <p># Sample conc.= 2% w/v</p> <p># Column= Kinetex C18 100Å 250 x 4.6 mm</p>
---	---

그림 2-2. Polygonatine A HRMS 분석기기 (좌), 분석조건 (우)

- 분석된 데이터를 바탕으로 Thermo Fisher사의 Thermo Scientific Compound Discoverer 분석 소프트웨어를 통하여 소재내 포함된 물질을 예측함.

• 결과

- HRMS 결과 분석된 미지의 물질 중 소프트웨어에서 스크리닝 시스템을 통하여 Main compound를 탐지함. MS 데이터를 바탕으로 예측된 물질들의 종류는 다음과 같음 (표 2-1).

표 2-1. MS 데이터를 기반으로 예측한 분말 내 주요물질

Name	Formula	Annot. Source: Predicted Compositions	FISh Coverage	Annot. DeltaMassCalc. [ppm]	MW	RT [min]	Area (Max.)
	C6 H11 N3 O2	Full match		-1.84157.0848	3.8	5874056904	
	C5 H13 N 0	Full match		-2.14103.0995	2.634	2862800041	
	C6 H12 N4 P2	Full match		-4.25202.0529	3.402	1357716422	

(Nitroimino)dimethanol	C2 H6 N2 O4	Full match			0.4122.0328	3.782	934292644.6
Polygonatine A	C9 H11 N O2	Full match	27.63	-1.46165.0787	6.402	904560150	
Uridine	C9 H12 N2 O6	Full match		-1.39244.0692	9.413	408016340.4	
	C20 H35 N2 O13 P	Full match		-0.37542.1875	7.048	100960287.9	
DL-Ornithine	C5 H12 N2 O2	Full match		-1.08132.0897	3.853	75270085.8	
	C2 H8 N2 O5	Full match		0.19140.0434	3.798	70946350.85	
dopamine	C8 H11 N O2	Full match		-1.58153.0787	4.595	58548677.02	
N(4)-phosphoagmatine	C5 H15 N4 O3 P	Full match		-0.23210.0881	3.857	42226226.48	
	C4 H10 N O5 P5	Full match		1.26306.9251	10.451	26765966.73	
	C6 H8 N2 O11	Full match		-3.49284.0118	3.804	10362503.02	

- 분석결과 Uridine, Ornithine, dopamine 등과 함께 Polygonatine A가 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었음. Polygonatine A는 등굴레 속에서 발견되는 물질로 선행연구 결과에서 보고되어 있어 (Haroon Khan, 2012) 후보군 소재로 타당하다고 판단되어 정량분석을 진행하였음.

② 정량분석 (HPLC)

• 연구방법

- 정량분석 방법은 선행연구를 바탕으로 최적화하였음. (Ahmad Jarallah Almalki, 2015). 샘플의 분석을 위하여 충분한 정제방법이 필요함. 이는 C18 컬럼에서 분석시 동일하거나 비슷한 RT값에서 다른 물질들이 검출되어 정확한 정량을 위해서 실시함.
- 전처리 방법은 표 2-2에 기술함.

표 2-2. 층층갈고리 추출분말의 Polygonatine A 분석을 위한 전처리 방법

전처리 방법
1. 샘플 번호 별로 샘플을 채취하여 유리관에 투입
2. 10ml DW를 넣고 10분간 Sonication을 진행
3. 10ml CCl ₄ 처리 후 충분히 혼합
4. 3분간 rpm 1,000으로 centrifugation 진행
5. CCl ₄ 부분을 분리함 (pipet 활용)
6. 농축 진행 (질소가스 사용)
7. 0.1% formic acid에 용해 (1ml)
8. Filtering (0.2 μm)
9. LC 분석 진행

- 최적화한 분석방법은 표 2-3에 기술함.

표 2-3. Polygonatine A HPLC 분석 조건

분석 조건	시간(min)	용매 A (%)	용매 B (%)
# 용매 A: 0.1% formic acid 용매 B: methanol	0	100	0
# Flow rate: 0.8 ml/min	12	90	10
# Column temp: 25°C	16	40	60
# Sample conc: 2% w/v	40	0	100
# DAD Signal: 270.0nm	50	0	100
# Column information: Agilent사 C18 100A 250 x 4.6mm	60	100	0

- 분석방법을 통하여 확인한 LC 크로마토그램 결과는 그림 2-3에 표시함. Polygonatine A 표준품은 외부 제조사를 통하여 주문제작하여 사용함. QC 분석을 통하여 분석한 결과, 표준품은 86%의 purity를

나타냄.

- LC 분석결과 19.02 min의 RT에서 peak를 확인할 수 있었음. 층층갈고리추출분말은 정제를 하였음에도 불구하고 잔피크가 발견되어, 추후 밸리데이션을 위해서는 정제 과정을 추가하거나, 컬럼 및 조건을 최적화 할 필요가 있음.

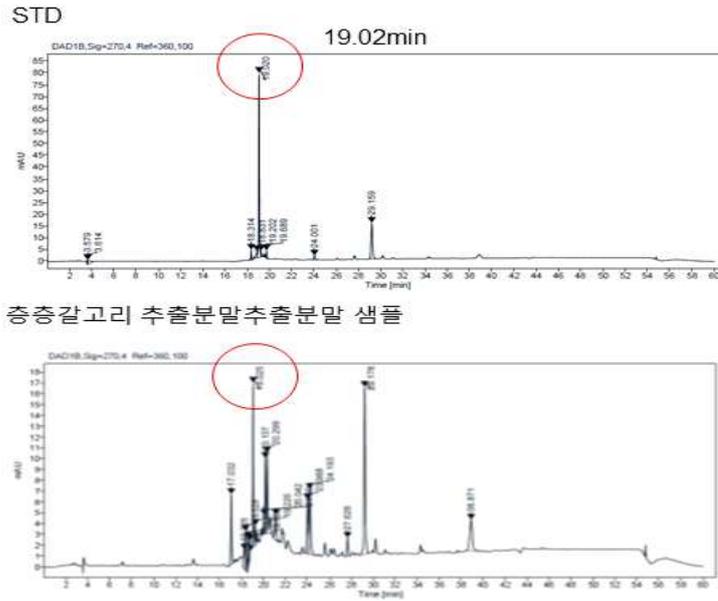


그림 2-3. Polygonatine A 크로마토그램 (상: 표준품, 하: 샘플)

- 개발한 분석방법을 통하여 기존에 생산한 생산품의 함량을 측정하였음. 현재 보유하고 있는 생산품은 4lot로 2016년부터 생산한 샘플을 보유하고 있음. 결과는 그림 2-4에 표시함.
- 2020년도 샘플의 분석치가 가장 높았고 (6.44mg/ml), 2019년도 샘플이 가장 낮았음 (3.52mg/ml).

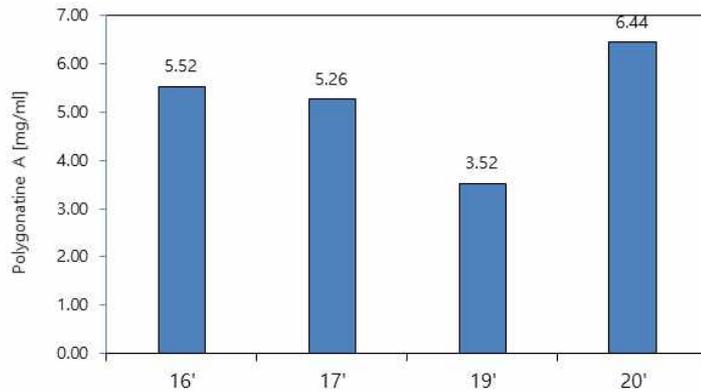


그림 2-4. 생산 년도별 생산품의 Polygonatine A 농도

4가지 lot를 결과로 하여 건기식 규격인 70~130%안에 모든 샘플이 포함됨. 표준품의 peak를 기반으로 정량을 한 결과 함량은 0.025mg/g수준으로 분석됨.

정성분석 (Compact mass spectrometer)

- 연구방법
 - 분석조건 및 분석기기는 다음과 같음 (그림 2-5)
 - 표준품과 샘플을 각각 분석을 진행함



장비	Advion CMS-L
Ion Source	ASAP (Positive 측정)
APCI condition	<ul style="list-style-type: none"> • Capillary Temp :250°C • Capillary Voltage :180 • N2 gas temp : 350°C • Span :30 • Off set : 20

그림 2-5. Compact mass spectrometer 분석기기 (좌), 분석조건 (우)

연구결과

- 분석결과는 그림 2-6에 표시하였음.

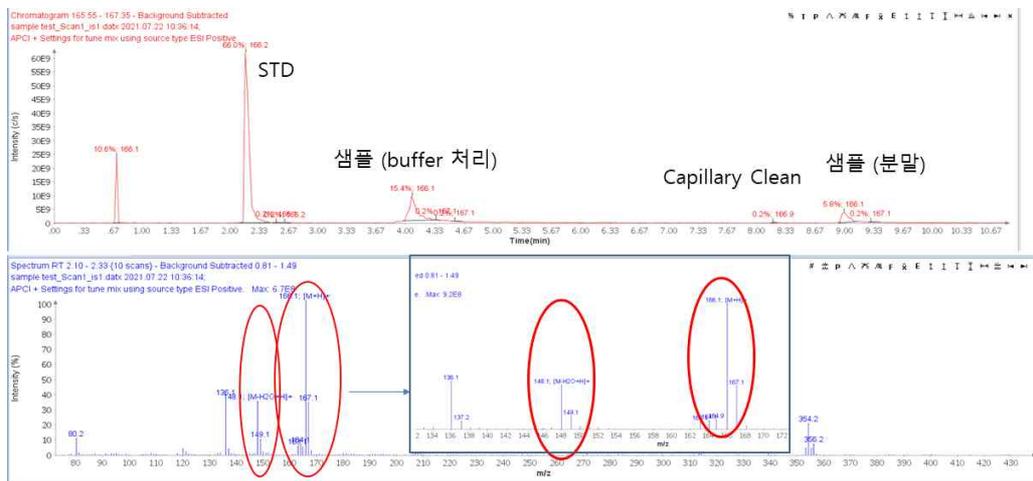


그림 2-6. Compact mass spectrometer를 이용한 분석결과

- 표준품 샘플을 분석한 결과 예상하였던 MS 패턴을 확인할 수 있었음. 따라서 표준품 안에 포함된 대부분의 물질이 Polygonatine A로 확인됨. 또한 LC에 활용한 샘플을 측정한 결과에서도 표준품과 MS가 일치하는 물질이 있는 것을 확인할 수 있었음. 분말에 비하여 샘플에서 함량이 높은 것을 확인할 수 있었음.

2) GABA 분석법 개발

- **배경**
 - GABA는 γ -AminoButyric Acid로써 비단백 아미노산의 일종임. GABA는 대표적인 신경억제 전달물질로 알려져 있음. GABA는 신경억제역할을 하는 GABA receptor와 결합하여 신체의 억제작용을 나타나게 하며, 휴식, 나른함, 졸림, 침착한 기분을 나타낼 수 있음. 기존에 층층갈고리등굴레 추출분말의 지표성분으로 β -sitosterol을 사용하였으나, 여러 가지 이유로 인해 품질지표인 GABA를 지표성분으로 사용하고자 하였음 (그림 2-7).
- **연구방법**
 - 층층갈고리등굴레 추출분말 내 GABA 함량분석 방법은 표 2-4에 표시하였음. GABA는 아미노산의 종류이기 때문에 DAD를 이용한 아미노산 분석방법을 활용하였음.

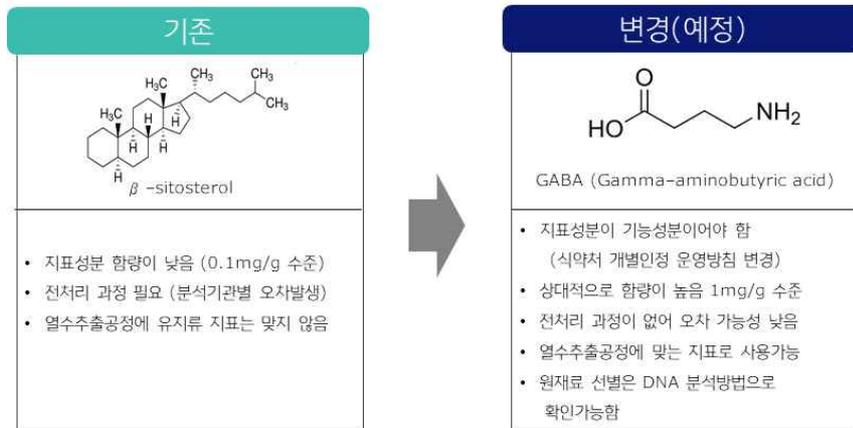


그림 2-7. 지표성분 변경 사유

표 2-4. GABA 분석 조건

<p>표준물질</p> <p>-GABA(Gamma-Aminobutyric acid)</p> <p>분자식 : C₄H₉O₂, 분자량 : 103.12, CAS No. : 56-12-2</p> <p>- 500, 200, 50, 10, 2 mg/L로 희석하여 분석</p>	<p>전처리</p> <p>- 5-sulfosalicylic acid dehydrate (2%)를 제조한 시험용액과 같이 1:1 비율로 처리.</p> <p>- 필터 여과 진행</p> <p>- OPA, FMOC reagent를 이용하여 유도체화 후 분석</p>	
고속액체크로마토그래프 조건		
항목	조건	
주입량	20 μ l	
칼럼온도	40°C	
이동상	A 용매 - 40mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.8 B 용매 - Acetonitrile : MeOH : DW = 45: 45 :10	
유속	2.0 ml/min	
검출기 파장	338 nm	
이동상 조건		
항목	조건	
	A (%)	B (%)
0	100	0
1.9	100	0
18.10	43	57
18.60	0	100
22.30	0	100
23.20	100	0
26.00	100	0

• 연구결과

- Lot별 GABA 함량 분석결과를 그림 2-8에 표시함.

원료내 GABA 함량 (mg/g)

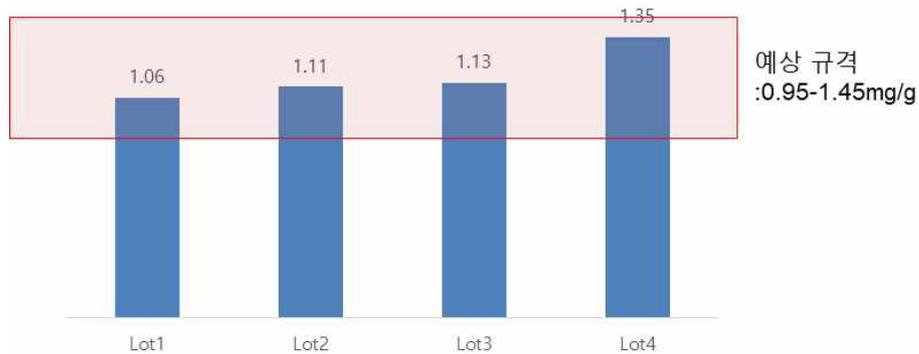


그림 2-8. Lot별 GABA 함량 및 예상규격

- 분석결과 Lot별 1.06에서 1.35mg/g수준으로 분석됨. 분석치를 기준으로 예상규격을 설정하면 0.95-1.45mg/g으로 규격을 설정할 수 있음. 연도별 분말의 함량은 비교적 일정하게 분석되는 것을 확인할 수 있음. GABA 분석방법은 아미노산 분석법에 널리 사용되고 있어. 기존의 분석법을 그대로 사용할 수 있다는 장점이 있음.
- GABA의 개별인정형 소재 지표성분 설정을 위하여 식약처와 민원상담을 진행하여 GABA를 지표성분으로 사용가능함을 확인하였음. 최근 식약처에서 기능성분을 지표성분으로 설정하려는 기초에 따라 GABA를 품질지표로 설정한다면 수면건강과 관련된 품질과 직접적으로 연관되므로, 품질지표로써는 타당하다고 할 수 있음.

(2) 총총갈고리동굴레 추출분말 생산공정 개발

1) 원료 전처리 공정 최적화

• 배경

- 총총갈고리동굴레는 뿌리줄기에 해당하는 원료로 농가에서 1차가공 (수확 → 수세 → 절단 → 건조)를 진행하여 보관함. 이후에 가공에 맞게 2차 가공을 하기 때문에, 이때 품질이 상이할 수 있음. 따라서 1차 가공 원료의 품질 및 전처리 공정을 규격화 할 필요 있음.

• 연구방법

- 1차 가공된 원료에 증기를 가하여 (증숙공정), 물성을 말랑말랑하게 한 뒤, 절단을 진행함 (그림 2-9). 원료의 전처리 가공이 가능한 업체를 탐색하여 전처리를 진행하였음. 전처리시 증숙 공정 시간별 원료 (10분, 1시간, 2시간)를 확보하여 추출물의 GABA 함량을 측정함. 또한 증숙 후 절단 길이별 (미절단, 4-5cm절단, 1cm 절단) 샘플을 확보하여 추출물의 GABA 함량을 측정함.



그림 2-9. 원료 입고 및 전처리 공정

- 2차 가공공정은 다음과 같음. 증숙은 호스를 통해 증기를 투입함. 일일 최대 800kg, 최대 온도는 150 °C, 처리 시간은 10분에서 2시간까지 처리 가능함. 증숙과 절단이 끝난 황정 원료는 건조기로

수송하여 65 °C에서 최대 8시간까지 건조하여 지대 포장을 진행하였음. 각 샘플을 확보하여 Lab수준으로 추출테스트를 진행한 후 분말의 지표성분 함량을 확인하였음.

• 연구결과

- 증숙 시간별 지표성분 GABA 함량은 다음과 같음 (그림 2-10). 원료 자체의 GABA함량이 높은편이었는데, 증숙을 진행하면서 함량이 낮아지는 것을 확인할 수 있음. 전문가 자문 결과, 증숙이 되면서 수분이 원료에 들어가면 효소반응 등이 일어나면서 여러 가지 성분변화가 일어날 수 있다는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 원료의 지표성분 함량을 유지하고 싶다면 증숙 시간을 짧게 하거나, 증숙 공정을 생략하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있었음. 반면 지표성분 관리를 위해서 함량이 높은 원료의 경우 증숙 공정을 통해서 관리가 가능하다는 것을 확인함.

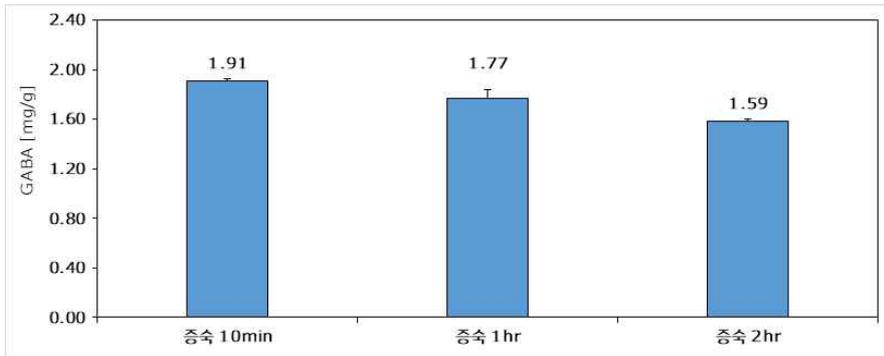


그림 2-10. 증숙 시간별 지표성분 함량

- 증숙 후 절단 크기별 지표성분 함량 분석을 진행하였음 (그림 2-11). 미절단 원료는 전처리를 하지 않은 원료임. 원료가 작게 절단될수록 수율은 상대적으로 높아지고, 지표성분은 감소하는 경향을 보임. 따라서 원료의 절단 크기는 수율과 지표성분에 영향을 준다는 사실을 확인할 수 있음.

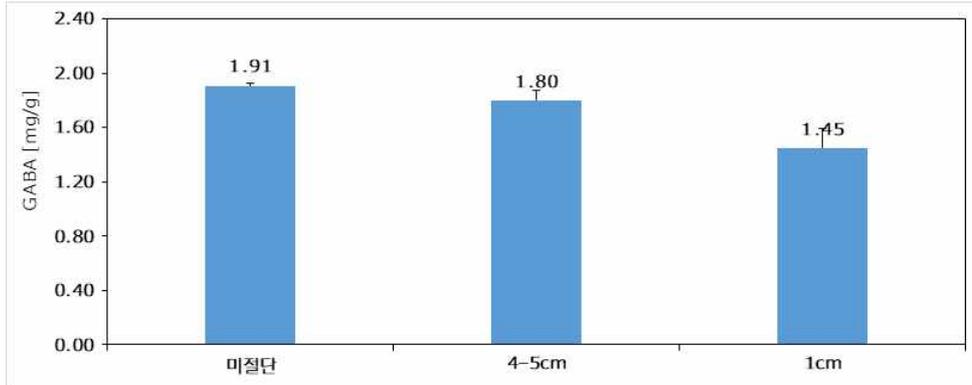


그림 2-11. 증숙 후 절단 길이별 지표성분 함량

2) 현장(Plant) 규모 생산 테스트 진행 및 샘플 확보

• 배경

- 원료의 전처리공정에 따른 지표성분 함량 차이를 확인하여, 전처리를 최소화 할 수 있는 설비의 필요성이 있음. 기존의 설비의 경우 절단을 하지 않는 경우 막힘 현상이 일어날 수 있어, 생산을 위한 신규업체를 탐색하였음. 신규 업체의 경우 그림 2-12와 같이 CAGE를 활용하여 원료를 투입하고, 이후에 가수하여 추출하는 방법으로 공정을 진행함. 협동기관인 고려대에 CAGE 추출물을 기존 추출물과 수면효능을 비교한 결과, CAGE 추출의 경우 수면효능이 증가하는 것을 알 수 있었음 (총 수면시간 증가, 그림 2-13).



그림 2-12. CAGE설비 (좌: Lab 설비, 우: Plant 설비)

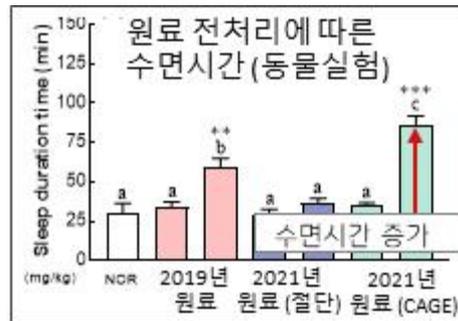


그림 2-13. CAGE를 활용한 원료 추출의 수면 효능 비교 (총 수면시간)

• 연구방법

- 선정된 위탁가공업체에서 전처리된 원물을 크기별(미절단, 절단) 추출 테스트를 진행하였음. 그림 2-14는 위탁업체A의 설비사진임. 업체별, 원료별로 수율 및 지표성분 함량 및 공정의 적합성을 확인하였음.



그림 2-14. 위탁생산 업체(A) 설비 사진

- 현장테스트는 아래 그림과 같이 설정한 공정을 통하여 진행하였고 미절단 샘플은 5cm 내외, 절단 샘플은 1cm 내외로 구분하여 그림 2-15의 공정에 맞춰 생산테스트를 진행하였음 .
- 개별인정신청 시에는, 공정별(추출, 농축 등 전 과정) 지표성분 및 수율 함량을 공인분석기관에서 측정하여 각각의 성적서와 제조공정도를 제출하였음.



그림 2-15. 총총갈고리동굴레 추출분말 생산공정

- 황정 원료의 현장테스트 GABA 분석값은 그림 2-16에 표기함.

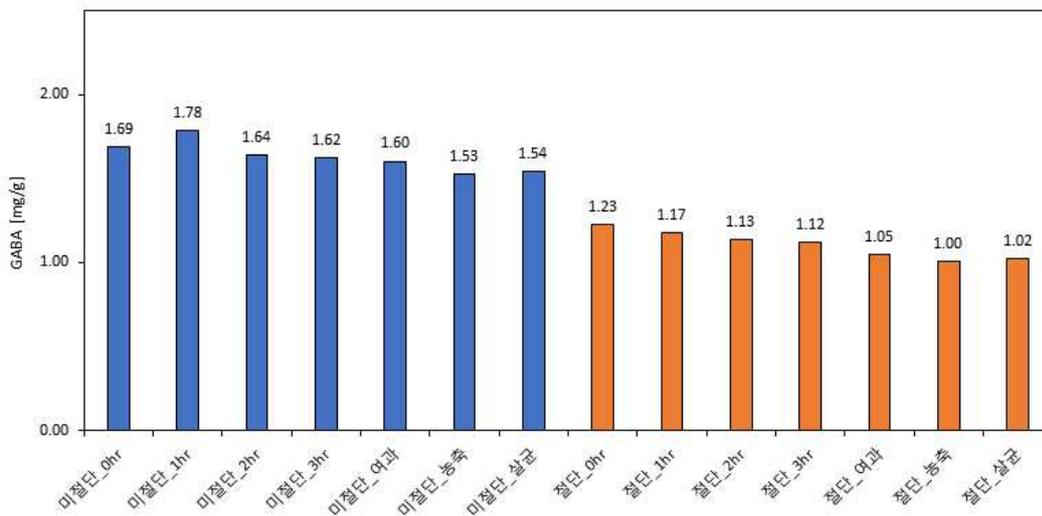


그림 2-16. 공정별 지표성분(GABA) 분석 결과

- 지표성분 함량은 거의 일정한 수준이나 미세하게 줄어드는 경향이 있고 절단 샘플의 수율은 크게 증가하나 지표성분은 감소하는 것으로 확인되었음.
- 절단된 황정원료의 농축액 수율은 49%, 미절단된 황정 원료의 수율은 27%로 낮게 측정되었음. 지표 성분은 수율과 반비례관계를 보였고, 생산량*지표성분은 거의 일정한 수준으로 분석됨.
- 미절단된 황정 농축액의 지표성분 함량은 1.30 mg/g 수준이었고, 분말의 수율은 28.5%로 측정되었음. 절단된 원료의 경우 지표성분 함량이 0.88mg/g 수준이었고, 수율은 41%로 측정되었음.
- 업체별 생산품질의 차이를 확인하기 위하여 업체A에 비교하여, 업체B에서 생산테스트를 진행하였음. 업체 B도 마찬가지로 CAGE 설비가 있어 동일한 공정으로 추출테스트를 진행할 수 있었음. 업체 B에 보유한 시설은 그림 2-17와 같음.

설비	보유대수	규격
추출기	3기	10ton
농축기	3기	2,000L/hr 연속식
저장조	8기	10ton (5기), 5ton, 4 톤 (2기)
여과기	1기	하우징 필터
혼합기	1기	1000L/hr
살균기	1기	300L/hr UHT 살균
건조기	1기	500kg/day

그림 2-17. 위탁생산 업체(B) 설비 현황

- 업체B에서 10t 추출조를 활용하여 추출을 진행함. 최종적으로 농축액의 추출 수율은 33%이며 분말 수율은 31.3%, 지표성분인 GABA 함량은 1.15 mg/g으로 분석됨. 업체B의 경우 교반장치가 존재하여 교반에 따라 추출 수율이 증가된 것으로 생각이 되며 생산 테스트시에 필터 내압의 증가나 용액의 막힘은 확인되지 않았음. 현장테스트 결과 가공업체별 품질차이는 크지 않았고, 관련하여 단가 및 품질관리 역량 등을 고려하여 가공업체를 선정함.

(3) 건강기능식품 제형 개발

1) 타정제형 개발

- 배경
 - 수면건강기능식품 상품화를 위하여 상품화 제형 개발을 진행함. 제형개발은 건기식 생산업체와 공동으로 개발을 진행하였음.
- 연구방법
 - 타정은 소비자들이 보편적으로 섭취하기 쉬운 형태로 제조하였으며, 삼키기 좋은 수준의 타정(1g 미만)으로 설정하였음. 등글레라는 이미지와 유사한 색으로 코팅하였고 한방소재에 대한 관심 및 수용도가 높은 장년층에서 주로 소비될 것으로 보임.
 - 수면에 효능을 가졌다고 알려진 마그네슘, 니코틴산아미드, L-트립토판 등을 수면의 부원료로 첨가하였음.
 - 유통기한 설정실험은 식약처의 가이드라인에 따라 3가지 온도를 정하고, 정해진 습도의 범위 내에서 시제품을 보관하면서 각 샘플을 2개월마다 샘플링하여 지표성분 및 규격 분석을 진행함.
- 연구결과
 - 타정은 건강기능식품 생산업체인 (주)노바렉스에서 시생산 테스트를 진행하였음.
 - 처방개발을 통하여 제조한 시제품은 **그림 2-18**에 표시하였음.
 - 시생산된 타정의 유통기한 테스트를 위하여 6개월간 가속테스트를 진행하였음.



그림 2-18. 타정 시제품 (좌: 포장도안, 우: 시제품 생상품)

- 타정 시제품의 유통기한 가속테스트 결과는 다음과 같음. 지표성분 분석 결과는 그림 2-19와 같음. 15, 20°C의 경우에는 6개월간 가속테스트를 진행하여도 지표성분이 10% 이내로 감소하는 것을 알 수 있음. 그에 반해 40°C 가속테스트에서는 지표성분이 최대 0.92mg/g까지 감소해, 지표성분의 예비 규격내에는 들어오나, 0개월 샘플의 지표성분에 비하여 20%이상 감소한 것을 알 수 있음. 따라서 고온의 경우 지표성분의 저장성이 다소 떨어지는 것을 알 수 있음.

개월	AVG				STDEV			
	0	2	4	6	0	2	4	6
15°C	1.30	1.24	1.26	1.30	0.08	0.01	0.01	0.02
20°C	1.30	1.22	1.24	1.32	0.08	0.04	0.03	0.05
40°C	1.30	1.02	0.92	0.99	0.08	0.04	0.02	0.02

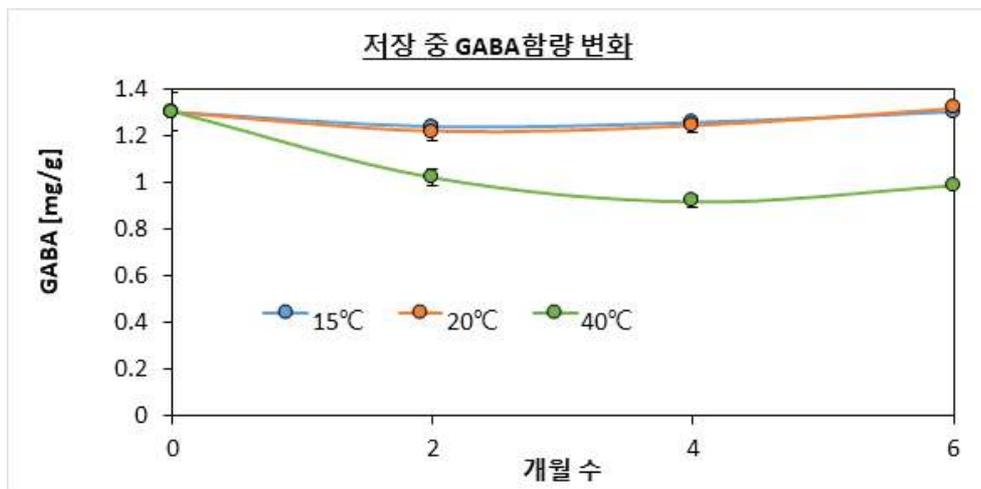


그림 2-19. 타정제형 유통기한 가속 테스트 지표성분 결과

- 타정 시제품의 미생물 및 중금속 분석 결과, 중금속 4종 (수은, 카드뮴, 납, 비소)는 검출되지 않았음. 건강기능식품 규격에 해당하는 대장균군은 모든 실험군에서 음성으로 분석되었고, 일반세균도 10²이하로 관리됨을 확인할 수 있었음 (표. 2-5)

표 2-5. 타정제형 유통기한 가속 테스트 세균수 및 증균속 결과

		일반세균수	바실루스세레우스	대장균군
0개월	미생물	60	240	음성
	증균속 4종 불검출			
2개월	15 °C	60	240	음성
	20 °C	150	200	음성
	40 °C	70	170	음성
4개월	15 °C	60	60	음성
	20 °C	2.7*10 ²	110	음성
	40 °C	1.2*10 ²	90	음성
6개월	15 °C	50	110	음성
	20 °C	40	190	음성
	40 °C	70	130	음성

2) 구미젤리 제형개발

• 배경

- 수면건강기능식품 상품화를 위하여 상품화 제형 개발을 진행함. 제형개발은 건기식 생산업체와 공동으로 개발을 진행하였음.

• 타겟층

- 구미젤리제형은 비교적 젊은 2030을 타겟으로 설계함. 타겟 소비자는 스트레스 및 불규칙한 생활습관으로 수면 부족에 시달리는 경우가 많음. 또한 새로운 제품에 대한 관심도가 높고, 구매 및 섭취가 간편한 제품을 선호하는 경향이 있음.

• 연구결과

- 구미젤리 제형은 에스디푸드에서 시제품으로 제조하였으며, 전형적인 과일맛이면서 신맛이 약간 있어 한방소재에 대한 거부감이 있는 소비자들에게 좋을 것으로 생각됨.

- 처방개발을 통하여 제조한 시제품은 그림 2-20에 표시하였음.

- 1일 1회, 1회 3구미(1구미당 3.6g) 섭취 기준

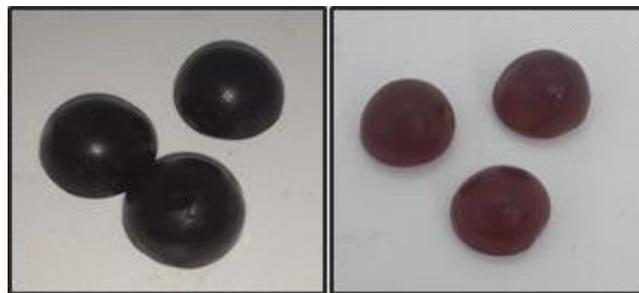


그림 2-20. 포도맛 구미젤리(좌), 딸기맛 구미젤리(우)

- 지표성분인 GABA 분석시 분석이 가능하며 기준치 내 분석됨을 확인하였음.

3) 필름 제형 개발

• 배경

- 수면건강기능식품 상품화를 위하여 상품화 제형 개발을 진행함. 제형개발은 건기식 생산업체와 공동으로 개발을 진행하였음.

• 타겟층

- 필름제형의 경우, 간편하게 휴대하여 언제 어디서든 섭취할 수 있는 제형임. 타겟층은 밤낮이 바뀌는

특수근무자나 여행 및 출장 등으로 건강기능식품의 휴대가 어려운 소비자임.

• **연구결과**

- 필름제형은 건강기능식품 필름제형 전문제조 업체 (주)씨엘팜에서 시제품을 제조하였음.
- 필름은 물 없이 섭취가 가능하며, 독특하면서도 이에 달라붙거나 거부감이 없는 제형이라 할 수 있음. 게다가 흡수 속도를 높여 체험 효능을 증대시킨다는 장점도 알려져 있음.
- 1차 시제품 시식시, 젤리처럼 필름이 말려올라가는 것이 확인되어 필름에 포함되는 함량기준을 낮추어 2장으로 제조하였음.
- 2차 샘플은 젤리의 점착성이 줄어들어 섭취할 때, 이나 입천장에 달라붙는 것이 적어 섭취하는데 용이할 것으로 생각됨.
- 필름은 곡물맛으로 층층갈고리동굴레추출물 고유의 향미를 크게 바꾸지 않고 미세조정하여 소비자들이 섭취하도록 하였음

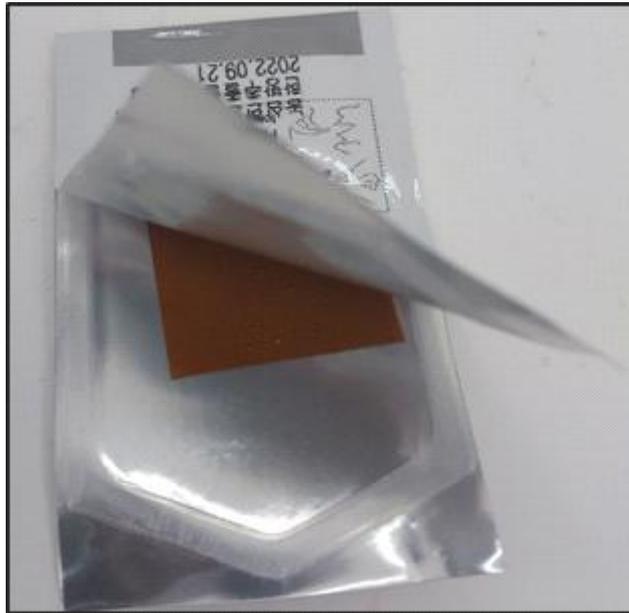


그림 2-21. 필름제형 시제품

4) 스틱젤리 제형 개발

• **배경**

- 수면건강기능식품 상품화를 위하여 상품화 제형 개발을 추가로 진행함. 제형개발은 건기식 생산업체와 공동으로 개발을 진행하였음.

• **타겟층**

- 스틱젤리는 어디서든 물 없이 섭취가 가능한 제형으로, 이가 아프거나 목 넘김에 거부감이 있는 소비자층에서 찾고 있음
- 최근 제로 칼로리 혹은 제로 당에 대한 소비자 층이 증가하고 있어 추후 처방에서는 이를 고려하여 개선할 예정임

• **연구결과**

- 20g 스틱 젤리는 기본적인 망고맛 베이스로 제조를 하였으며, 하부 원료에 전체적인 맛을 더할 수 있는 과일 농축액(배 등)을 활용하였음.
- 층층갈고리동굴레(황정)은 고소한 맛을 나타내고 열을 받으면 색이 진해지는 경향이 있고, 점착성이 높아지므로 이를 마스킹 할 수 있는 클라우디 타입의 망고 농축액을 선정하였음.
- 향은 자극적이지 않고 신맛이 덜한 망고향과 복숭아향을 조합하였으며, 두 개 향을 합쳐 1.5% 내외로 첨가하였음.

(4) 수면건강 식약처 개별인정 신청

1) 개별인정 신청을 위한 서류준비 (안전성, 기능성, 기준규격 관련 필요서류 확보)

- 수면건강 건강기능식품 출시를 위해서 식약처 기능성 개별인정확보가 필수적임. 식약처 개별인정은 식약처에서 해당소재에 대한 기능성, 안전성, 기준규격을 확인한 제품으로, GMP시설을 통하여 품질이 검증되었으며, 반복적으로 섭취하여도 이상이 없으며, 섭취하였을 때, 해당기능성으로 생리적 효능을 줄 수 있음을 확인할 수 있음. 또한 제품에 기능성과 관련된 클레임 및 광고를 할 수 있기 때문에 그 효용성이 매우 큼.
- 반면 식약처 개별인정 신청을 위해서는 필요서류가 다수 있으며, 가이드라인에 맞게 서류와 자료를 체계적으로 준비해야 하기 때문에 식약처 담당자와 상시적인 피드백을 통하여 점검사항을 확인하였음. 개발소재인 중증갈고리동굴레 추출분말도 인체실험 보고서에 대한 보고서 재작성에 대한 의견이 있어서 그에 맞춰 보고서를 재 작성하여 서류를 제출하였음.

① 안전성

- 안전성 확보를 위해서 위탁기관 캡온에서 진행한 독성실험 자료를 활용하였음. 제출한 독성실험 자료의 주요내용은 표 2-6.와 같음. 독성실험 결과 안전성을 확보함.

표 2-6. 신청원료 독성실험 자료 요약본

시험종류		종 및 계통	투여 방법	투여기간	시험물질, 용량	시험결과
단회 투여	설치류	SD Rat (군당 암수 각 5마리)	경구	1회	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 1250, 2500, 5000 mg/kg bw	· 음성(사망동물이 관찰되지 않음) · LD ₅₀ > 5000 mg/kg
90일 반복 투여	설치류	SD Rat (군당 암수 각 10마리)	경구	13주	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 1250, 2500, 5000 mg/kg bw	· 음성(독성학적으로 유해한 결과 관찰되지 않음) · NOAEL > 5000 mg/kg/day
유전 독성	복귀 돌연변이	· <i>Staphy aureus</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 · <i>Escherichia coli</i> WP2uvrA		1회	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 37.04 ~ 3000 ug/plate	· 음성(복귀돌연변이를 유발하지 않음)
	염색체 이상시험	Chinese Hamster Lung (CH) ovs		1회	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 0, 1250, 2500, 5000 ug/mL	· 음성(CH 세포에 염색제이상을 유발하지 않음)
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포	경구/복강	1회	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 0, 1250, 2500, 5000mg/kg/day	· 음성(수컷 ICR 마우스 체내 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨)
기타 독성	생식발생 (배태자)	SD Rat	경구	임신 6-17일	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 0, 500, 1250, 2500, 5000mg/kg/day	· 음성(독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않음) · 5000mg/kg/day에서 가습생 형태이상 (misshapen thymus)이 부형제 대조군 대비 유의하게 높았으나, 위양성으로 판단 (근거자료 첨부) · NOAEL = 5000 mg/kg/day
		NZW 토끼		임신 6-19일	· 중증갈고리동굴레 추출분말 · 투여량= 0, 500, 1000, 2000mg/kg/day	· 음성(임신모체 및 배태자발생에 대한 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음) · NOAEL = 2000 mg/kg/day

② 기능성

- 기능성은 신청원료의 기능성을 입증하기 위하여 동물(In-vivo), 인체실험에 대한 자료임. 식약처 의견을 확인하여 인체실험보고서를 재작성하였음. 재작성 내용은 통계처리방법에 따른 주요 지표를 재분석하였으며, 연구계획서와 보고서 항목을 일치하는 작업을 진행하였음 (표 2-6).

표 2-6. 신청원료 인체실험 자료 요약본

① 주관적 수면평가:
- 아테네 불면 척도: 유의적 감소 (대조군 대비, p<0.05)

항목	대조식품	황정추출물	P ³	P ⁴	P ⁵	P ⁶
아테네 불면 척도, 총점			0.037			
Week 0	6.28(2.41)	7.60(3.05)				
Week 4	5.14(2.11)	5.36(3.51)		0.036	0.035	0.029
P ²	0.033	0.003				

- 피츠버그 수면의 질 지표: 유의차 없음
- 불면증 심각지표: 유의차 없음

② 객관적 수면평가
1) 수면각성활동량검사
- 총 수면시간: 유의적 증가 (대조군 대비, p<0.05)

항목	대조식품	황정추출물	P ³	P ⁴	P ⁶
총 수면 시간(분)			0.464		
Week 0	354(71.0)	365(66.0)			
Week 3	339(61.4)	367(57.1)			
Week 4	346(60.7)	373(68.9)		0.045	0.046
P ²	0.636	0.589			

- 수면 효율: 유의차 없음
- 수면 후 각성 시간: 유의차 없음

③ 다중뇌자기공명영상:
- 기능적 뇌영상: 내측 전전두엽 혈류량이 유의적 증가 (대조군 대비, p<0.05)
- 구조적, 화학적 뇌영상: 유의차 없음

인체실험보고서 재작성
1. 통계처리방법에 따른 주요 지표 확인
2. 연구계획서 vs 보고서 항목 일치

③ 기준 규격

- 기준규격은 신청원료의 제조공정 및 품질 규격을 설정하여, 품질규격 안에서 제조, 유통하기 위한 규격치를 설정하였음. 시생산 제품의 품질이 규격내 분석되는 것을 확인하기 위하여, 공인분석기관을 활용하여, 신청원료를 분석하고 성적서를 제출함. 총총갈고리등굴레 추출분말은 표 2-7의 기준규격을 설정하여 진행함.

표 2-7. 신청원료 총총갈고리등굴레 추출분말 제안 기준규격

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
규격항목	성상	이마이취가 없고, 고유의 향미가 있는 밝은 회황색의 분말	이마이취가 없고, 고유의 향미가 있는 밝은 회황색의 분말			
	기능성분(mg/g) GABA	1.15 (표시량의 80~120%)	1.26	1.04	1.14	
	중금속 (mg/kg)	납	0.5 이하	0.1530	0.1726	0.1124
		총비소	1.0 이하	0.0895	0.1480	0.1019
		카드뮴	0.5 이하	0.0869	0.0529	0.0638
		총수은	0.2 이하	불검출	불검출	0.0106
미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성	
곰팡이 독소	총 아플라톡신 (B1, B2, G1 및 G2의 합)	15.0 µg/kg, 단, B1은 10.0 이하	불검출	불검출	불검출	
규격 미설정 항목	진류농약	5종 (생약규격)	총비에치씨 0.2 ppm 이하, 총디디티 0.1 ppm 이하, 알드린 0.01 ppm 이하, 엔드린 0.01 ppm 이하, 디멜드린 0.01 ppm 이하	불검출		
		69종	불검출	불검출		

- 이외에 식약처 가이드라인에 따른 자료 및 서류를 준비하여 개별인정신청을 진행하였으며, 현재 신청 단계로 진행결과를 기다리고 있음. 개별인정 신청에 대한 심의 후, 등록이 완료되면 이후 상품화 스케줄에 맞춰서 제품생산 및 출시를 준비중임.

■ 고려대 연구내용 (협동기관)

(1) 층층갈고리둥굴레 추출분말 지표성분 후보군 발굴 및 분석

1) Liquid-liquid separation을 통한 지표 성분 후보군 탐색

• 실험방법

- **용매별 분획물 제조:** 층층갈고리둥굴레 열수 추출물의 용매별 분획물은 용매의 극성차를 이용하여 비극성 용매로부터 극성 용매 순으로 분리하였음. 층층갈고리 열수추출물 5 g을 물 100 mL에 용해시켜 분액 깔대기에 넣고 100 mL의 n-hexane으로 2회 반복 추출하여 n-hexane 분획물을 얻었음. 그 후 물층을 다시 분액 깔대기에 넣고 위와 같은 방법으로 chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 aqueous 분획을 차례대로 얻은 후 감압 농축한 후 N₂ purging하여 분말화하였음.
- **용매별 분획물의 폴리페놀 함량 분석:** HPLC을 통해 측정. YMC-triart C18 column(250 x 4.6 mm, 5 μm)에 유속 0.8 mL/min으로 이동상을 흘려주었으며 컬럼 온도는 35°C로 유지하였음. 이동상으로는 0.2% formic acid를 함유하는 (A)water와 (B)acetonitrile를 사용함. UV detector의 파장은 260 nm, 310 nm, 및 360 nm로 분석하였음. Gallic acid, dihydrobenzoic acid, rutin, Q3G, 및 chrysin은 260 nm, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, trans-ferulic acid, 및 apigenin은 310 nm, quercetin 및 kaempferol은 365 nm에서 표준품의 검량곡선에 따라 분획물 내의 폴리페놀 화합물의 함량을 계산하였음.

• 실험결과

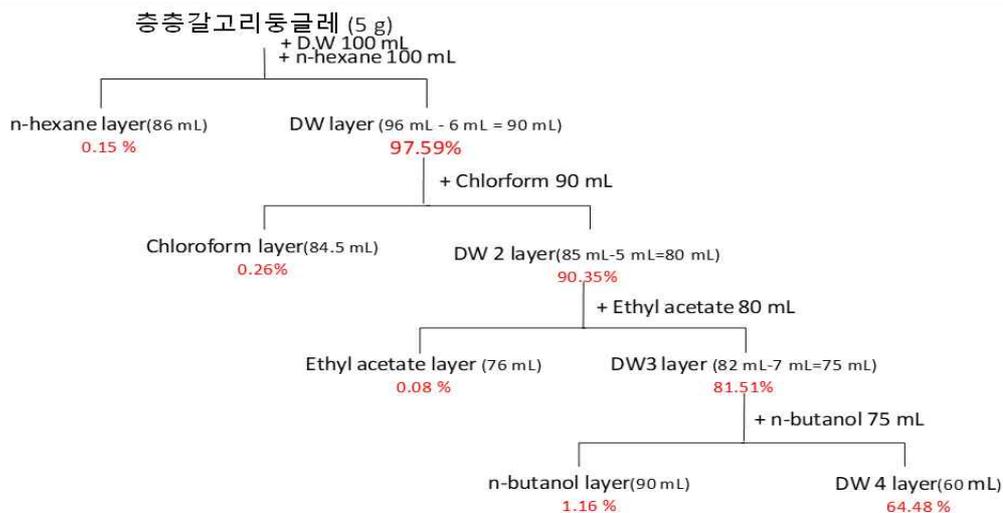


그림 2-22. Flow diagram for liquid-liquid separation of *Polygonatum sibiricum* water extract

- 층층갈고리둥굴레 열수 추출물의 용매별 분획물의 수율은 hexane층(0.15%), chloroform층(0.26%), ethyl acetate층(0.08%), 및 butanol층(1.16%)으로 나타났으며, butanol층에서 가장 높은 수율을 보였으나 약 1% 정도로 낮은 수준이었음 (그림 2-22).
- liquid-liquid separation을 통한 polyphenol 분석결과, butanol층에서 총 polyphenol 함량이 3.388 μg/mg으로 가장 높게 나타났으며, chlorogenic acid(1.011 μg/mg), dihydrobenzoic acid(0.768 μg/mg), gallic acid(0.732μg/mg), caffeic acid(0.657 μg/mg), 및 trans-ferulic acid(0.221 μg/mg)이 butanol층에서 검출되었음 (표 2-6).
- Butanol 층에서 검출되었던 chlorogenic acid가 다른 flavonoids에 비해 높은 함량을 보이지만 소량

검출됨에 따라 추가 후보 지표 물질 탐색이 필요함 (그림 2-23).

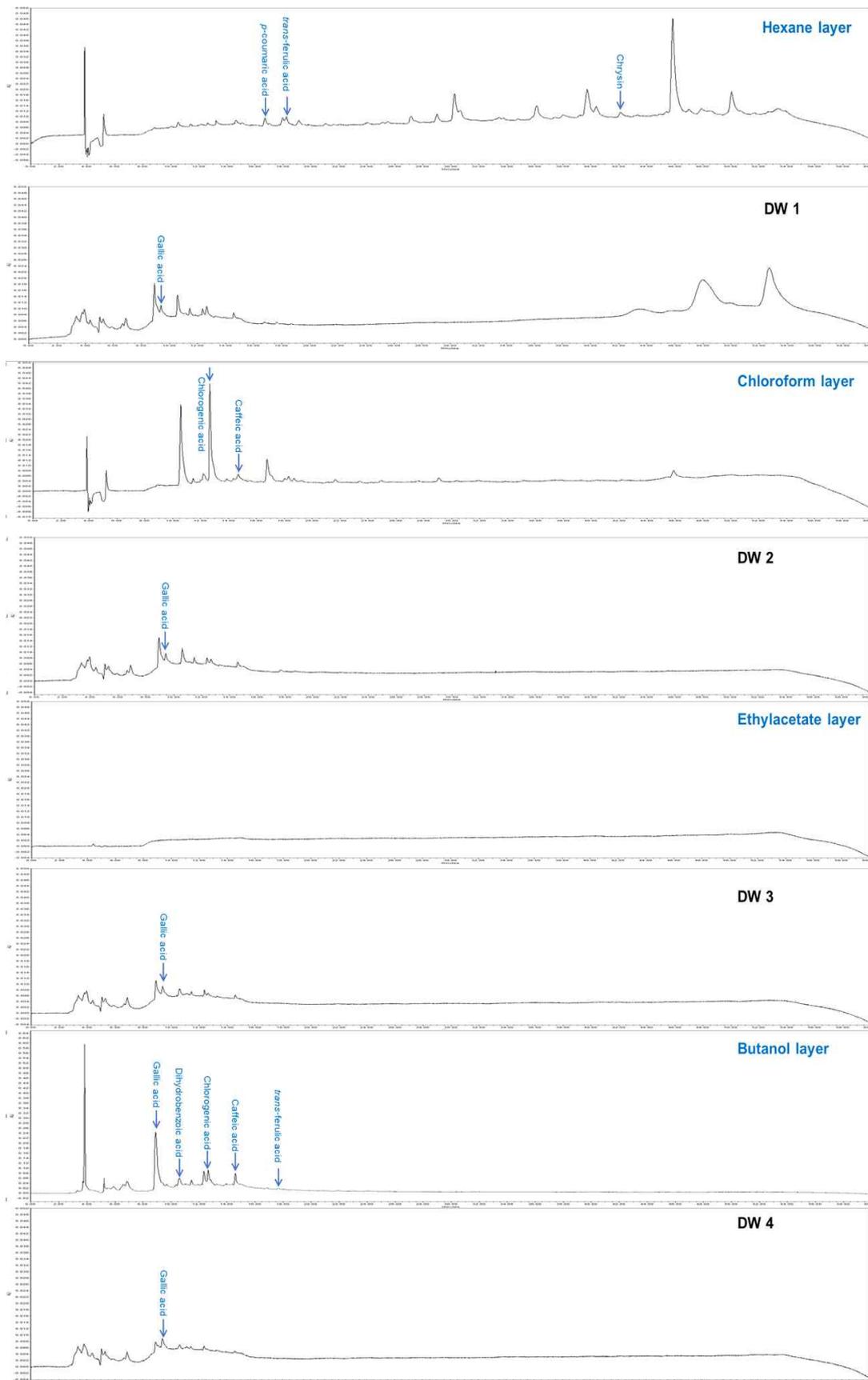


그림 2-23. HPLC chromatogram of solvent fractions from *Polygonatum sibiricum* water extract for the analysis of polyphenol compounds.

표 2-6. The contents of polyphenol compounds in solvent (hexane, chloroform, ethyl acetate, and butanol) fractions from *Polygonatum sibiricum* water extract

Contents (µg/mg of extract)		Hexane	DW 1	Chloroform	DW 2	Ethyl acetate	DW 3	Butanol	DW4
1	Gallic acid	N.D.	0.039±0.001	N.D.	0.034±0.001	N.D.	0.029±0.001	0.732±0.018	0.022±0.001
2	Dihydrobenzoic acid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.768±0.029	N.D.
3	Chlorogenic acid	N.D.	N.D.	0.268±0.006	N.D.	N.D.	N.D.	1.011±0.081	N.D.
4	Caffeic acid	N.D.	N.D.	0.073±0.005	N.D.	N.D.	N.D.	0.657±0.070	N.D.
5	Rutin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	Q3G	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	p-coumaric acid	0.121±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	trans-ferulic acid	0.203±0.002	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.221±0.006	N.D.
9	Quercetin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	Apigenin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	Chrysin	0.045±0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total flavonoid		0.368±0.002	0.039±0.001	0.341±0.006	0.034±0.001		0.029±0.001	3.388±0.173	0.022±0.001

Values are presented as mean ± SD (n= 3). N.D., Not detected.

2) 산가수분해 및 알칼리가수 분해후 flavonoids 분석을 통한 지표 성분 후보군 탐색

• 실험방법

- 산 가수분해: 200 mg/mL의 층층갈고리 열수 추출물에 2 N HCl을 15 mL(v/v=1:15) 가하여 30분간 가열한 후, 가수분해물에 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 2회 추출 진행하였음.
- 알칼리 가수분해: 200 mg/ml 의 층층갈고리 열수 추출물에 0.5 N NaOH 2.5 mL (v/v=1:2.5) 가하여 22°C에서 15분간 방치한 후 가수분해물에 ethyl acetate를 첨가하여 2회 추출 진행하였음.
- 산 또는 알칼리 가수분해물의 ethyl acetate 추출물은 농축 후 N2 purging을 통해 분말화하였으며 앞선 방법에 따라 HPLC를 이용하여 추출물 내의 polyphenol compounds의 함량을 분석하였음.

• 실험결과

표 2-7. The contents of polyphenol compounds in ethyl acetate extract of acid and alkaline hydrolyzate from *Polygonatum sibiricum*

Compound	Contents (µg/mg of extract)		
	원물	산가수분해물	알칼리가수분해물
		Ethyl acetate층	Ethyl acetate층
Gallic acid	0.1777±0.0033	1.7285±0.0097	0.7657±0.0011
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0.0546 ± 0.0001	0	0.0750 ± 0.0005
Rutin	ND	0.3485 ± 0.0033	0.4031 ± 0.0011
Quercetin-3-glucuronide	0.1705 ± 0.0003	1.9965 ± 0.0060	1.0649 ± 0.0037
Chrysin	0.1902 ± 0.0052	0	0.3004 ± 0.0019
Chlorogenic acid	0.1363 ± 0.0005	0.4750 ± 0.0053	0.3103 ± 0.0028
Caffeic acid	0	0.1605 ± 0.0114	0
p-coumaric acid	0	0.1027 ± 0.0016	0.0660 ± 0.0020

trans-ferulic acid	0.0772 ± 0.0001	0.2424 ± 0.0074	0
Apigenin	0	0.3830 ± 0.0012	0.3868 ± 0.0003
Quercetin	0.2643 ± 0.0007	0.4968 ± 0.0018	0.4419 ± 0.0003
Kaempferol	0.1322 ± 0.0002	0.2462 ± 0.0008	0.2578 ± 0.0008
Total polyphenol	1.2029 ± 0.0053	6.1801 ± 0.0393	4.0719 ± 0.0011

Values are presented as mean ± SD (n= 3).

- 천연물 내 폴리페놀 화합물의 경우 대부분 배당체로 존재하지만, 배당체를 형성하고 있는 당류는 산, 알칼리, 또는 효소 처리를 통해 쉽게 분해되므로 aglycon 형태로 전환할 수 있음.
- 산 가수분해 후에 총 polyphenol 함량이 1.20 µg/mg에서 6.18 µg/mg으로 원물 대비 5배 가량 증가하였음. 특히 산 가수분해 후에 gallic acid 함량이 0.18 µg/mg에서 1.73 µg/mg으로 증가하였으며, Q3G의 함량도 0.17 µg/mg에서 1.99 µg/mg으로 증가하였음 (표 2-7).
- 알칼리 가수분해 후에도 총 polyphenol 함량이 4.07 µg/mg으로 원물 대비 약 3배가량 높은 수준이었으며, gallic acid 함량은 0.77 µg/mg, Q3G의 함량은 1.06 µg/mg으로 원물대비 증가하였음 (표 2-7).
- 산 가수분해물의 polyphenol chromatogram을 보면 12분대에 큰 피크가 생성되는데 이는 여러 성분이 분리되지 못하고 합쳐서 나오는 것으로 사료됨. 또한 25분대에는 원물이나 알칼리 가수분해물에는 존재하지 않는 비교적 큰 피크가 생성되므로 피크에 해당하는 물질 추정이 필요함 (그림 2-24).

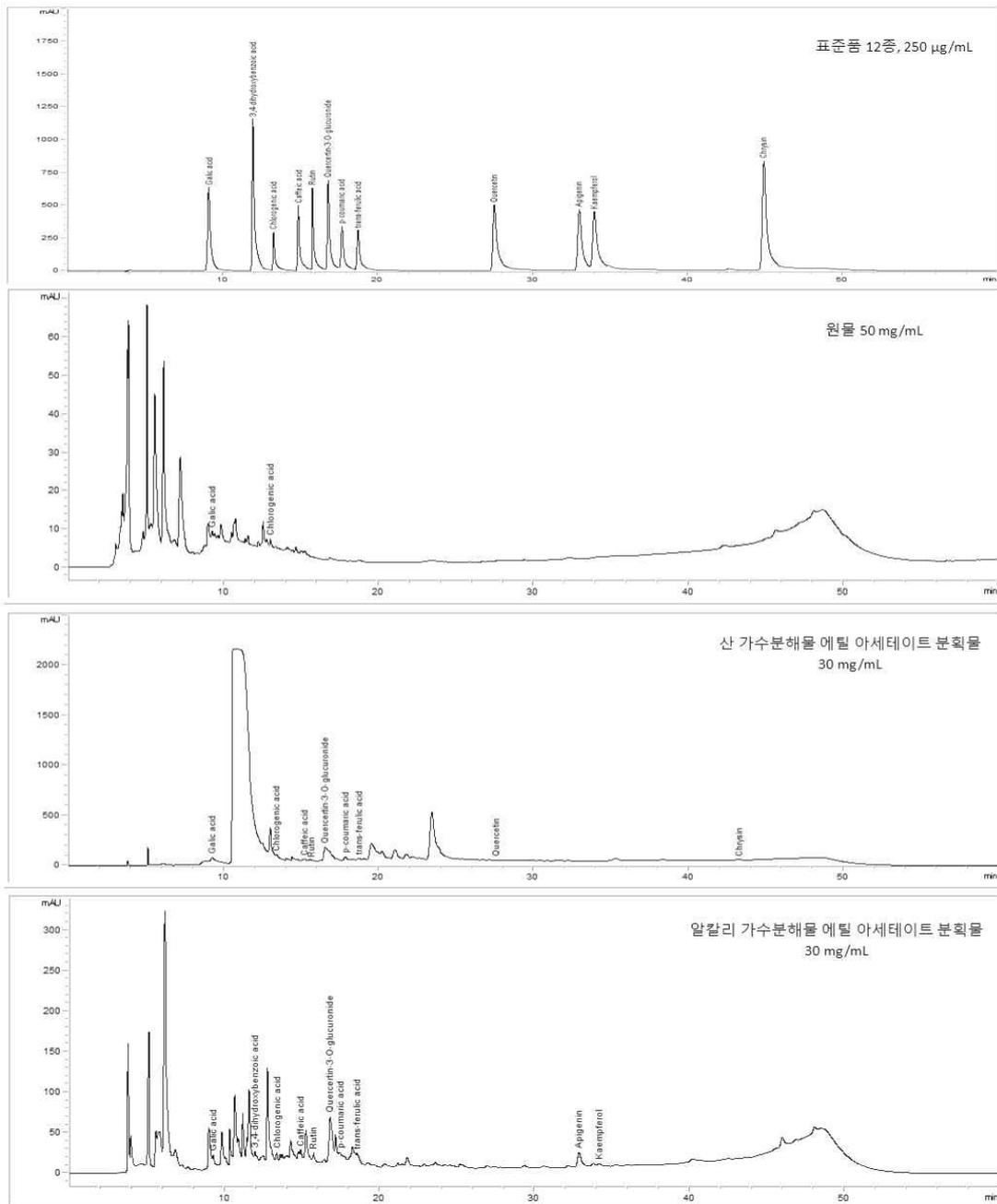


그림 2-24. HPLC Chromatogram of ethyl acetate extract of acid and alkaline hydrolyzate from *Polygonatum sibiricum* for analysis of polyphenol compounds.

(2) 수면 건강기능식품 제품 출시를 위한 부원료 탐색 및 개발

1) 부원료 발굴을 위한 활성물질 quercetin-3-glucuronide(Q3G) 및 폴리페놀 함량 분석

• 실험방법

- 대상 소재 중 상추(*Lactuca sativa* L) 추출물을 제조하여 활성물질 분석 및 수면증진 활성을 평가함.
- 청상추 잎을 dry oven (60°C)에서 24시간 동안 건조함. 말린 상추잎(100 g)에 70% 에탄올 500 mL을 첨가하여 70°C에서 2시간 동안 환류 추출을 총 3회 반복 수행함. 추출물을 paper filter(Whatman No. 1)를 이용해 여과하고, 감압 농축 후 동결건조하여 분말화함.
- 상추 추출물의 Q3G 및 폴리페놀(gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, rutin, scutellarin, quercetin) 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였으며 앞선 분석 방법과 동일한 방법으로 수행함.

• 실험결과

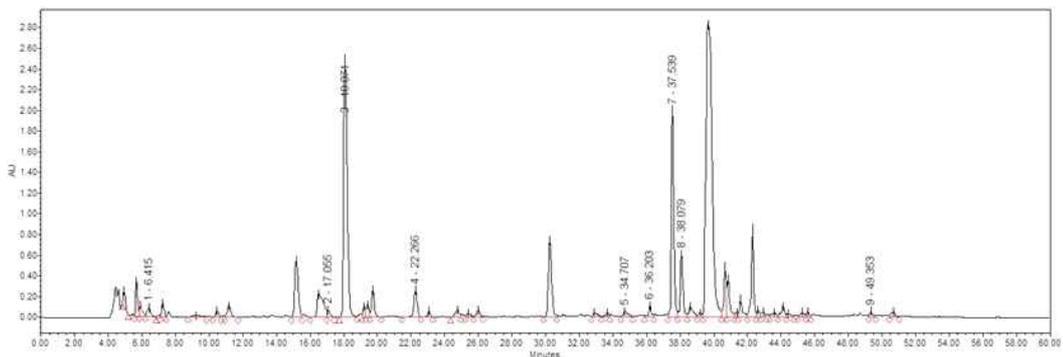
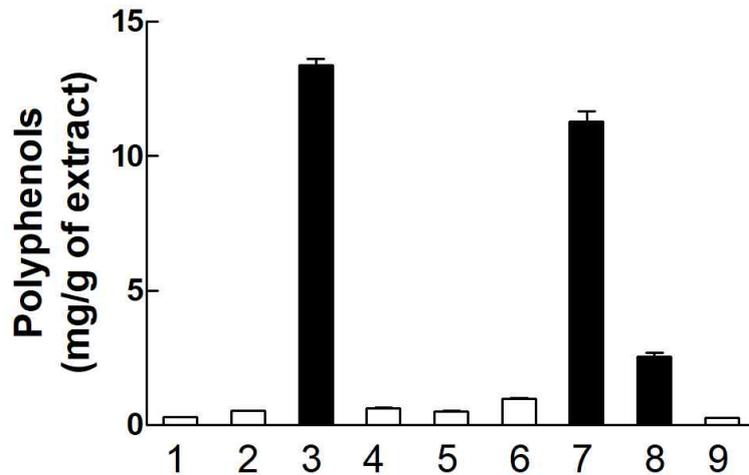


그림 2-25. HPLC chromatogram of green lettuce leaf extract (GLE) for the analysis of polyphenols (1: gallic acid, 2: catechin, 3: chlorogenic acid, 4: caffeic acid, 5: ellagic acid, 6: rutin, 7: quercetin-3-glucuronide, 8: scutellarin, 9: quercetin).

- 상추 추출물의 예상 활성물질인 quercetin-3-glucuronide의 함량은 11.29 ± 0.39 mg/g of extract로 다른 폴리페놀에 비해 상대적으로 높은 함량은 나타냈으며, 이외에도 수면 또는 진정효과가 있는 것으로 알려진 chlorogenic acid와 scutellarin은 각각 13.37 ± 0.24 , 2.57 ± 0.12 mg/g of extract 함유되어있는 것을 확인함(그림 2-25).

2) 대상소재 추출물의 라디칼 소거능 평가

• 실험방법

- 상추 추출물의 라디칼 소거 활성은 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 분석을 통해 측정하였음. ABTS 및 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration)으로 표시하였으며 ascorbic acid를 표준물질로 이용함.

• 실험결과

- 상추 추출물의 항산화능을 평가한 결과, ascorbic acid의 IC₅₀(ABTS: 0.64 ± 0.02 mg/mL, DPPH: 0.26 ± 0.01 mg/mL)와 비교하여 상추 추출물의 IC₅₀값은 ABTS 분석결과 1.57 ± 0.03 mg/mL, DPPH 분석결과 1.20 ± 0.09 mg/mL으로 상대적으로 높은 항산화 활성을 나타내며 이는 상추 추출물에 함유된 폴리페놀에 기인한 것으로 예측함.

3) 대상 소재 추출물의 수면 증진활성 평가

• 실험방법

- Pentobarbital-induced sleep test를 통해 상추 추출물의 수면 증진활성을 평가함.
- 실험동물은 ICR mouse (25 g, 6주령) 수컷을 오리엔탈바이오에서 구입하여 고려대학교 보건과학대학 실험동물자원센터에서 사육하였음. 동물 사육실 환경 온도는 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도는 55%, 명암은 12시간 주기로 조절하였고 음수와 사료는 자유 급식으로 하였음.
- 실험동물은 일주일간의 적응 기간을 거친 뒤, 실험 전 24시간 동안 절식시켜 오후 1시에서 6시 사이의 일정한 시간 내 실험을 진행하며, 상추 추출물(GLE80: 상추 추출물 80 mg/kg, GLE120: 상추 추출물 120 mg/kg)은 pentobarbital 투여 40분 전에 경구투여(p.o.: oral administration)하며 pentobarbital은 42 mg/kg의 농도로 복강 주사함. pentobarbital 투여 후 모든 개체는 독립된 공간으로 옮겨 입면시간(sleep latency)와 수면시간(total sleeping time)을 측정하였음. 수면 시간은 직립반사의 회복까지를 기록하였으며, pentobarbital 투여 후 10분 이내에 수면이 유도되지 않는 실험동물은 실험에서 제외하였음(Yang et al., 2013).

• 실험결과

- Pentobarbital 유도 수면실험 결과, 입면시간이 정상 대조군(NOR) 대비 120 mg/kg의 고농도 상추 추출물(GLE120) 경구투여시 유의적으로 감소함 (그림 2-25A, $p < 0.01$).
- 총 수면시간은 상추 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 대조군 대비 각각 1.27배($p < 0.05$), 1.63배($p < 0.01$) 유의적인 증가를 확인함(그림 2-25B).

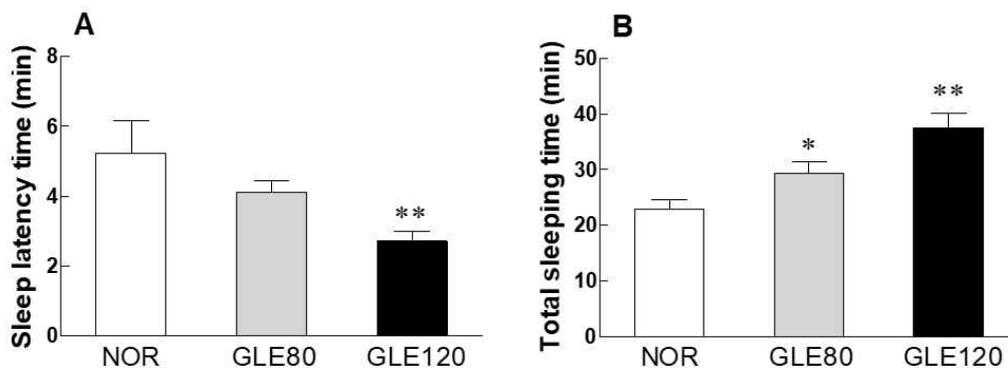


그림 2-25. Effects of green lettuce leaf extract (GLE) on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). Experimental groups include the normal group (NOR), GLE (green lettuce leaf extract)-treated groups (80 and 120 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, $n=7$. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the NOR group (ANOVA followed by post-hoc Tukey's test).

• 실험방법

- 문헌을 통해 상추 추출물에 함유된 폴리페놀 중 진정 및 수면활성 증진 효과를 나타내는 것으로 알려진 quercetin-3-glucuronide(Jager et al., 2011; Cheng et al., 2015; Manach et al., 2004; Costa et al., 2016; Ferri et al., 2015), chlorogenic acid(Park et al., 2017; Jager et al., 2011) 및 scuteallarin(You et al., 2020; Tang et al., 2015)의 수면증진 활성을 pentobarbital 수면 유도시험을

통해 평가함.

- Quercetin-3-glucuronide, chlorogenic acid 및 scutellarin을 각각 5, 10, 20 mg/kg을 pentobarbital 투여 40분 전에 경구투여(p.o.: oral administration)하며 pentobarbital은 42 mg/kg의 농도로 복강 주사함.

• 실험결과

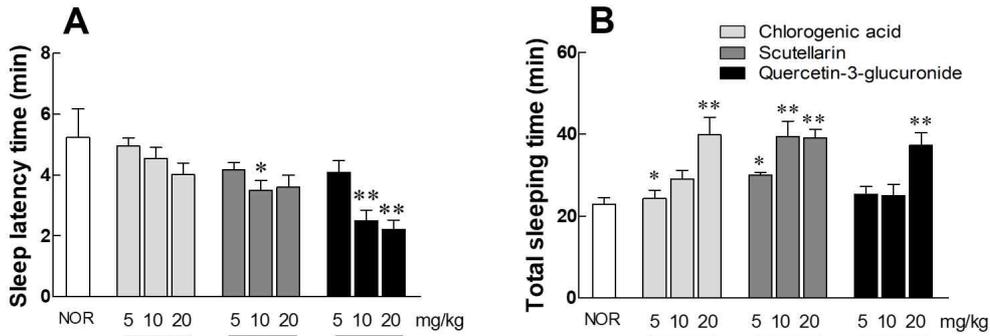


그림 2-26. Effects of chlorogenic acid, scutellarin, and quercetin-3-glucuronide (Q3G) on (A) sleep latency time and (B) total sleep time in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). Experimental groups include the normal group (NOR), chlorogenic acid, scutellarin, and Q3G-treated groups (5, 10, and 20 mg/kg). Values are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. *p<0.05 and **p<0.01 when compared with the NOR group (ANOVA followed by post-hoc Tukey’s test).

- Pentobarbital 유도 수면실험 결과, scutellarin(10 mg/kg) 및 Q3G(10, 20 mg/kg)은 NOR군과 비교하여 입면시간이 유의적으로 감소함(그림 2-26A, p<0.05 & p<0.01). 특히 Q3G 10 mg/kg 경구투여시 입면시간은 2.5±0.35분으로 고농도의 GLE처리군(GLE120, 2.71±0.29분)과 유사한 수준을 나타냄.
- 또한 총 수면시간은 NOR군에 비해 chlorogenic acid, scutellarin 및 고농도의 Q3G처리군(20 mg/kg)에서 유의적으로 증가함(그림 2-26B, p<0.01).

4) Q3G 함유 소재의 수면의 질 평가

• 실험방법

- 고정 스트레스로 불면을 유도한 랫드모델에서 상추 추출물 경구투여시 수면패턴 및 질의 변화를 뇌전도 (electroencephalogram, EEG) 분석을 통해 확인함.
- 실험동물은 SD-rat(250 g, 5주령) 수컷을 오리엔탈바이오에서 구입하여 고려대학교 보건과학대학 실험 동물자원센터에서 사육하였음.
- 랫드는 고정 케이지(너비 8 cm, 길이 12 cm, 높이 12 cm)에서 14일 동안 매일 7시간(10:00~17:00) 동안 스트레스를 유발시킴. 고정 스트레스가 없는 대조군(NIC, no immobilization-stress control)은 일반 케이지에서 어떤 유형의 스트레스도 받지 않음(Hegde et al., 2008).
- 고정 스트레스 유도 후 9일 동안 오전 9시에 상추 추출물(80, 120 mg/kg)을 경구투여하였으며, 대조군은 식염수를 경구투여함.
- 고정 스트레스 유도 일주일 전에 전극 삽입 수술을 시행함. 전극 삽입 수술시 isoflurane을 통한 흡입마취 후 정위고정기(stereotaxic device)에 고정하여 Paxinos 및 Watson 해부도에 따라 전극을 삽입함. 수술이 끝난 동물은 일주일간 회복 시간을 거친 후 뇌전도 무선 송출기(EEG transmitter)를 부착시키고,

정상대조군(NIC), 음성대조군(CON, stress-induced immobilization), 상추 추출물 경구투여한 시점을 기준으로 하루 24시간 수행함.

- 수면구조 분석은 FFT(Fast fourier transform) 알고리즘에 의해 수행하였으며, ecgAUTO3 프로그램(Ver, 3.3, emka Technologies, Paris, Franca)을 사용하였으며, 뇌전도 측정 후 기준기록(baseline recording), 대조기록(control recording), 실험기록(experimental recording)을 통한 뇌파의 전위 분석으로 총 수면시간(total sleep) 및 수면의 질(sleep quality)을 분석하여 소재의 수면 유도 활성을 평가함(Jo et al., 2018).

• 실험결과

- 고정 스트레스 대조군(CON)은 정상대조군(NIC)과 비교하여 각성시간이 14.7% 증가하고 수면시간이 10.1% 유의하게 감소함(그림 2-27A, B, $p < 0.05$).
- 스트레스를 받은 그룹(CON)에서 수면시간의 감소는 깊은 수면인 non-rapid eye movement(NREM) 수면시간의 유의적인 감소에 기인한 것을 확인함(그림 2-27A, $p < 0.05$).
- 고정스트레스와 함께 고농도의 상추 추출물을 처리한 그룹(GLE120)은 스트레스로 인해 감소된 수면시간을 유의적으로 회복하였으며($p < 0.01$), 이는 정상대조군(NIC) 보다 증가된 수면시간을 나타냄($p < 0.05$).
- 이러한 GLE120군은 CON군 대비 NREM 수면이 68.8% 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), NREM 수면 중 깊은 수면 상태인 델타파가 CON군에 비해 유의적으로 증가함(Fig. 7E, $p < 0.01$) 반면 REM 수면은 감소한 것을 확인함(그림 2-27B, $p < 0.05$).
- 따라서 상추 추출물을 투여했을 때 수면시간의 증진뿐만 아니라 수면의 질이 향상됨을 확인함.

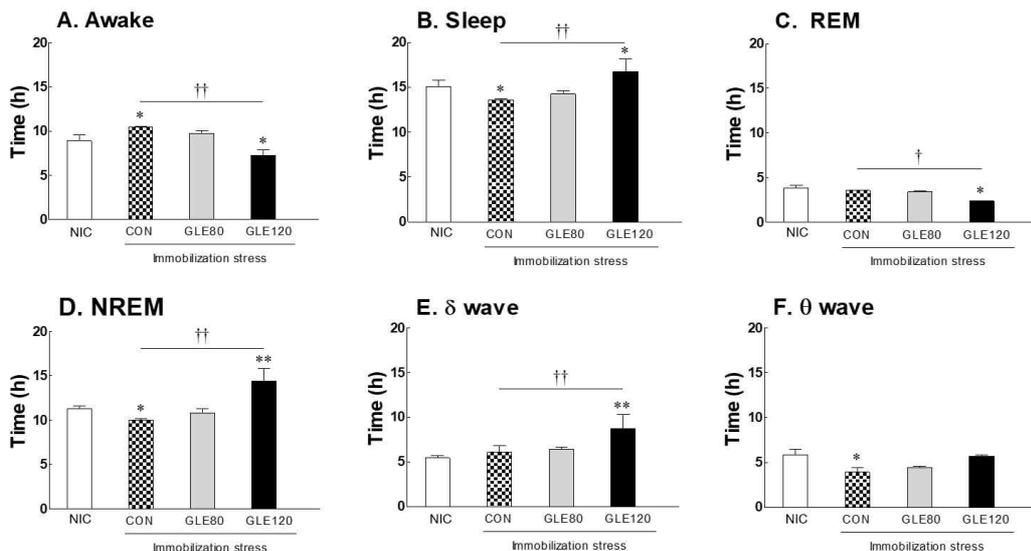


그림 2-27. Effects of GLE (green lettuce leaf extract) on (A) awake, (B) sleep, (C) REM, (D) NREM, (E) δ -wave, and (F) θ -wave sleep pattern changed by immobilization stress in rats. EEG analyses were conducted for 9 days, and GLE was administered orally. Experimental groups include the no immobilization-stress control group (NIC), control group (CON, stress-induced immobilization), and GLE (green lettuce leaf extract)-treated groups with stress (80 and 120 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, $n=8$. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the NIC group. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ when compared with the CON group (ANOVA followed by post-hoc Tukey's test).

• 실험방법

- 상추 추출물 및 Q3G, chlorogenic acid, scutellarin의 GABA_A-benzodiazepine(BDZ) 수용체의 결합력을 정량적으로 분석하기 위하여 동위원소를 이용한 binding assay를 진행하였음.
- SD rat의 cerebral cortex, hippocampus, striatum을 적출한 후 즉시 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4, keep at 4°C) 20 mL에 넣어 균질화시킴.
- Ultracentrifuge(1,000 rpm, 4°C, 10분)를 이용해 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 다시 buffer를 5 mL을 더하여 48,000 rpm, 4°C 조건에서 15분간 원심분리함. 상등액을 제거하고 buffer 5 mL을 더하여 48,000 rpm, 4°C 조건에서 15분간 원심분리 하는 과정을 2번 더 반복함.
- 뇌 조직의 endogenous GABA를 제거하기 위하여 37°C의 water bath에서 30분간 incubation 시키고 원심분리한 후 상등액을 제거하고 pellet을 수집함.
- Pellet에 buffer 10 mL을 넣고 washing 한 후 48,000 rpm, 4°C 조건에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 Tris-HCl(50 mM, pH 7.4) 15 mL을 넣어 -80°C deep freezer에 보관함.
- 동결된 membrane을 해동시킨 후 50 mM Tris-citrate buffer(pH 7.1, keep at 4°C) 4 mL을 첨가한 후 48,000 rpm, 4°C 조건에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 제거함.
- 50 mM Tris-citrate buffer를 4 mL씩 분주한 후 동일한 조건에서 원심분리하여 상등액을 제거한 후 30 mM Tris-HCl을 2 mL씩 분주함.
- Pellet이 풀어질 수 있게 vortexing 한 후, 상추 추출물 및 활성물질(0.1, 1, 10 mg/mL), buffer, [³H]-flumazenil(Ro 15-1788, 1 nM, final concentration)을 넣고 ice에서 40분간 incubation 함.
- 이후 glass fiber filter(GF/C, Whatman)을 이용하여 harvest한 후 샘플의 radioactivity는 Liquid Scintillation Analyzers(Hidex, Turku, Finland)를 통해 측정함.
- 비특이적 결합(nonspecific binding, NSB)은 benzodiazepine을 이용하여 그 값을 계산함.

• 실험결과

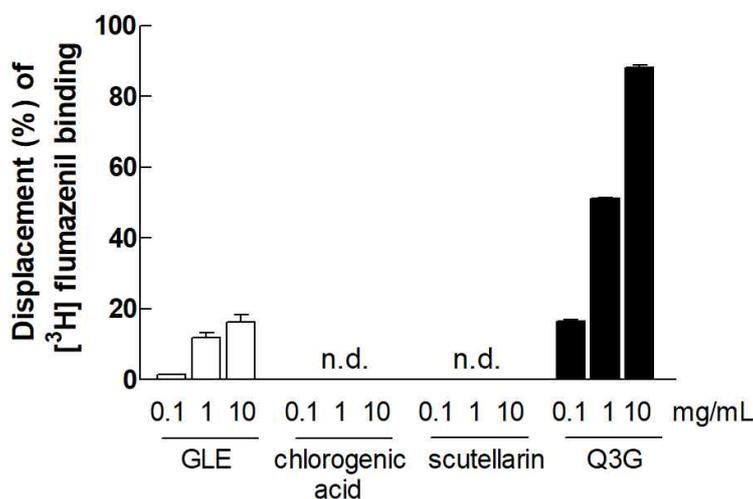


그림 2-28. Displacement (%) of [³H]-flumazenil binding of green lettuce leaf extract (GLE), chlorogenic acid, scutellarin, and quercetin-3-glucuronide (Q3G) through GABA_A-benzodiazepine receptor assay. Values are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=3. n.d., not detected.

- 상추 추출물은 농도 의존적으로 GABA_A-BDZ receptor에 결합하는 능력이 1.36에서 16.17%로 증가하는 경향을 나타냄 (그림 2-28).
- 반면, chlorogenic acid 및 scutellarin은 에 대한 결합 활성을 보이지 않음.
- Q3G의 농도를 0.1-10 mg/mL 처리시 결합능은 16.58에서 88.13%로 크게 증가했으며, 특히 10 mg/mL의 농도에서 Q3G는 상추 추출물에 비해 약 5.45배 정도 결합 활성이 증가함을 확인함.
- 이러한 결과는 상추 추출물이 GABA_A 수용체에 효과적으로 결합하고, 추출물에 함유된 Q3G가 수면 활성을 나타내는 주요 활성물질임을 나타냄.

5) 부원료 발굴을 위한 활성물질로 알려진 rutin, trans-ferulic acid, apigenein, quercetin-3-glucuronide(Q3G), quercetin, kaempferol 분석

- 대상 소재: 거북꼬리(*Boehmeria tricuspis*), 병풍쌈[*Cacalia firma* Kom.(*Miricacalia firma* (Kom) Nakai), 솔방울고랭이(*Scirpus karuizawensis* Makino), 어리연꽃[*Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze], 단풍터리풀[*Filipendula multijuga* Max.(*Filipendula palmata* (Pall.) Maxim)], 뱀무(*Geum japonicum* Thunb), 터리풀[*Filipendula glaberrima* (Nakai) Naka], 며느리배꼽(*Persicaria perfoliata*)
- Flavonoids 분석: YMC-triart C18 column(250 x 4.6 mm, 5 μm), Mobile phase(A: 0.2% formic acid in water, B: 0.2% formic acid in acetonitrile), injection volume 10 μL, flow rate(0.8 mL/min), UV detector at 260, 310, 365 nm.

• 실험결과

표 2-8. Polyphenol contents in various natural products

Sample	Contents (μg/mg of extract)						
	Rutin	trans-ferulic acid	Apigenin	Q3G	Quercetin	Kaempferol	
GB 0011 거북꼬리	2.33±0.00 ₇	0.84±0.001	0.67±0.001	3.12±0.06	0.47±0.00 ₉	L.O.Q.	
GB 0031 병풍쌈	0.24±0.00 ₂	14.08±0.03	N.D.	10.95±0.06	0.66±0.00 ₁	N.D.	
GB 0089 솔방울고랭이	0.22±0.00 ₁	L.O.Q.	L.O.Q.	1.77±0.01	0.83±0.00 ₁	L.O.Q.	
GB 0092 어리연꽃	0.23±0.00 ₅	5.80±0.07	L.O.Q.	3.13±0.28	L.O.Q.	L.O.Q.	
GB 0112 단풍터리풀	L.O.Q.	1.47±0.028	L.O.Q.	14.10±0.09	0.36±0.00 ₇	L.O.Q.	
GB 0116 뱀무	L.O.Q.	0.48±0.003	N.D.	3.46±0.24	L.O.Q.	L.O.Q.	
GB 0213 터리풀	L.O.Q.	1.46±0.011	N.D.	4.63±0.31	L.O.Q.	N.D.	
GB 0387 며느리배꼽	0.23±0.00 ₅	5.80±0.07	L.O.Q.	45.37±0.04	L.O.Q.	L.O.Q.	

Values are presented as mean ± SD (n= 3). N.D., not detected; L.O.Q., limit of quantification.

- trans-ferulic acid는 병풍쌈(14.08 μg/mg), 어리연꽃(5.80 μg/mg), 며느리배꽃(5.80 μg/mg)에서 높은 함량을 보였음 (표 2-8).
- Q3G는 병풍쌈(10.95 μg/mg), 단풍터리풀(14.10 μg/mg), 및 며느리배꼽(45.37 μg/mg)에서 높은 함량을 보였음.
- 따라서 수면증진 활성이 있는 것으로 보고된 trans-ferulic acid와 Q3G 모두를 다량 함유하고 있는 병풍쌈과 며느리 배꽃이 부원료 후보 소재로 적합한 것으로 사료됨.

(3) 식용 식물에 함유된 수면 활성물질 apigenin, ferulic acid, epigallocatechin gallate(EGCG), rosmarinic acid에 대한 수면증진활성

1) Pentobarbital induced model에서의 Apigenin, ferulic acid, EGCG, rosmarinic acid의 수면증진활성 평가

• 실험방법

- Pentobarbital-induced sleep test를 통해 4가지 chemicals의 수면 증진활성을 평가함.
- 실험동물은 ICR mouse (25 g, 6주령) 수컷을 오리엔탈바이오에서 구입하여 고려대학교 보건과학대학 실험동물자원센터에서 사육하였음. 동물 사육실 환경 온도는 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 55%, 명암은 12시간 주기로 조절하였고 음수와 사료는 자유 급식으로 하였음. 본 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KUIACUC-2021-0100)을 받아 진행하였음.
- 실험동물은 일주일간의 적응 기간을 거친 뒤, 실험 전 24시간 동안 절식시켜 오후 1시에서 6시 사이의 일정한 시간 내 실험을 진행하며, Apigenin(30, 50 mg/kg), Ferulic acid(15, 30 mg/kg), EGCG(10, 20 mg/kg), Rosmarinic acid(2, 5 mg/kg)은 pentobarbital 투여 40분 전에 경구투여(p.o.: oral administration)하며 pentobarbital은 42 mg/kg의 농도로 복강 주사함. pentobarbital 투여 후 모든 개체는 독립된 공간으로 옮겨 입면시간(sleep latency)와 수면시간(total sleeping time)을 측정하였음. 수면 시간은 직립반사의 회복까지를 기록하였으며, pentobarbital 투여 후 10분 이내에 수면이 유도되지 않는 실험동물은 실험에서 제외하였음(Yang et al., 2013).

• 실험결과

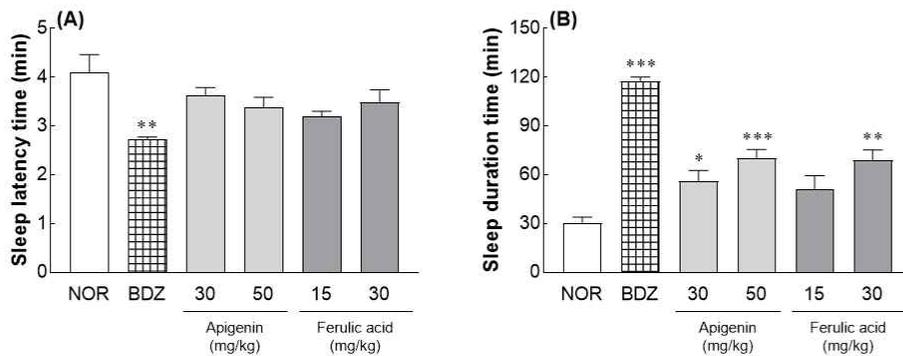


그림 2-29. Effect of apigenin and ferulic acid on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), BDZ: benzodiazepine treatment (positive control, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Apigenin: apigenin treatment (30 and 50 mg/kg), Ferulic acid: ferulic acid treatment (15 and 30 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the NOR group according to Tukey's test.

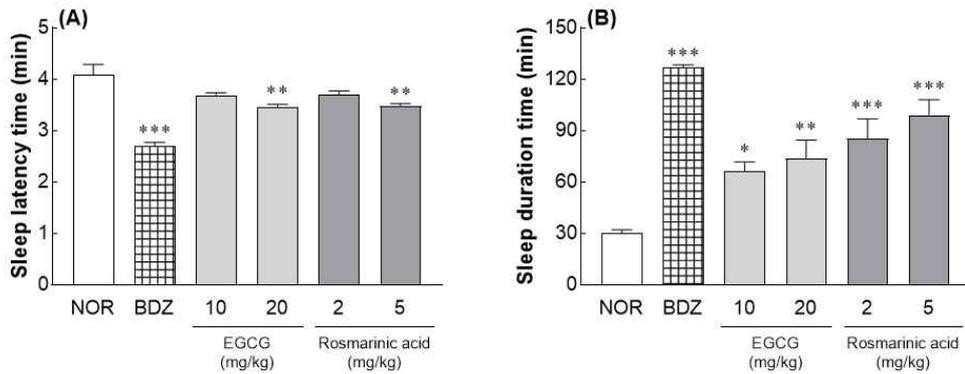


그림 2-30. Effect of EGCG and rosmarinic acid on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), BDZ: benzodiazepine treatment (positive control, 200 μ g/kg), EGCG: epigallocatechin gallate treatment (10 and 20 mg/kg), Rosmarinic acid: rosmarinic acid treatment (2 and 5 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the NOR group according to Tukey's test.

- Pentobarbital 유도 수면실험 결과, Apigenin과 ferulic acid 투여시 sleep latency time은 Normal(NOR) 대비하여 줄어드는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없음(그림 2-29A), 반면 EGCG와 rosmarinic acid를 각각 20 mg/kg과 5 mg/kg을 경구투여한 경우 sleep latency time은 NOR 대비하여 유의적으로 감소함(p<0.01).
- Sleep duration time 측정시 apigenin, ferulic acid, EGCG, rosmarinic acid 투여 농도가 증가할수록 수면 시간이 증가하는 경향을 보였으며(그림 2-29B, 30B), EGCG와 rosmarinic acid는 apigenin과 ferulic acid 투여시 보다 낮은 투여 농도에서 수면시간의 증가를 보였음(그림 2-29B, 30B).
- Pentobarbital induced sleep model에서 수면 증진활성 평가시 EGCG와 rosmarinic acid가 우수한 수면증진활성을 보임.

2) EEG분석을 통한 EGCG, rosmarinic acid의 수면의 질 평가

• 실험방법

- 경구투여시 수면패턴 및 질의 변화를 뇌전도(electroencephalogram, EEG) 분석을 통해 확인함.
- 실험 동물은 SD-rat(200 g, 6주령) 수컷을 오리엔탈바이오에서 구입하여 고려대학교 보건과학대학 실험동물자원센터에서 사육하였음. 동물 사육실 환경 온도는 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도는 50~55%, 명암은 12 시간 주기로 조절하였고 음수와 사료는 자유 급식으로 하였음. 본 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(KUIACUC-2021-0100)을 받아 진행하였음.
- 실험동물은 일주일간의 적응기간이 지난 후, isoflurane을 통한 흡입마취 후 정위 고정기(stereotaxic device)에 고정하여 Paxinos 및 Watson 해부도에 따라 뇌전도(Electroencephalogram, EEG) 전극을 삽입함. 수술 후 랫드는 일주일간 회복 시간을 거친 후 뇌전도 무선 송출기(EEG transmitter)를 부착시키고, 시료를 경구 투여한 시점을 기준으로 오전 10시부터 오후 5시까지 총 7시간 동안 15 mm/sec으로 총 6일 간 뇌전도 측정함.
- 수면구조 분석은 FFT(Fast fourier transform) 알고리즘에 의해 수행하였으며, ecgAUTO3 프로그램(Ver, 3.3, emka Technologies, Paris, France)을 사용하였으며, 뇌전도 측정 후 기준기록(baseline recording), 대조기록(control recording), 실험기록(experimental recording)을 통한 뇌파의 전위 분석으로 총 수면시간(total sleep) 및 수면의 질(sleep quality)을 분석하여 소재의 수면 유도 활성을 평가함

• 실험결과

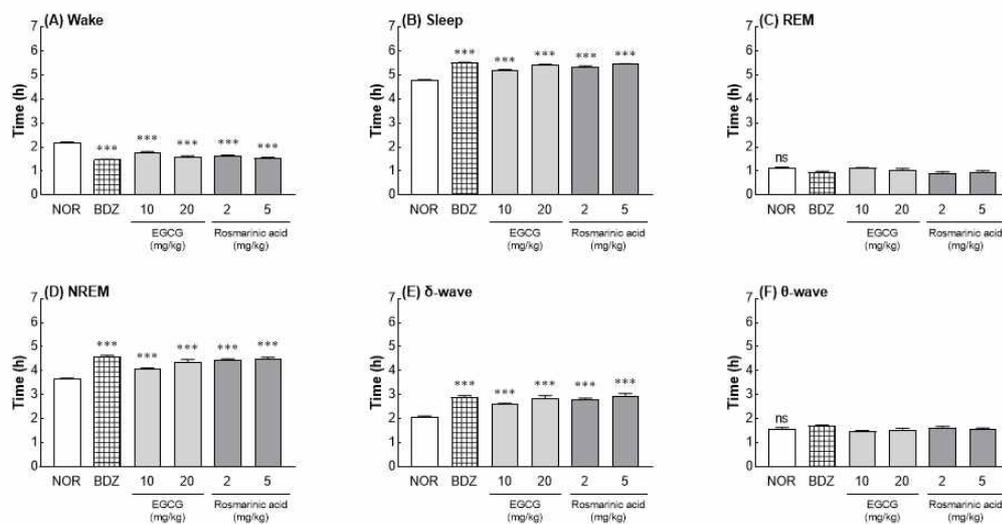


그림 2-31. Effect of EGCG and rosmarinic acid on electrophysiologic pattern in rats.

Electroencephalography (EEG) analyses were conducted for 6 days. (A) awake time, (B) sleep time, (C) duration of REM (rapid eye movement), (D) duration of NREM (non-rapid eye movement), (E) δ wave of NREM, and (F) θ wave of NREM. NOR: normal group; BDZ: benzodiazepine (0.2 mg/kg); EGCG: epigallocatechin (10, 20 mg/kg); rosmarinic acid: 2, 5 mg/kg. Values are means ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=6. Asterisks indicate significant differences: ***p<0.001 as compared with the NOR group according to Tukey's test. ns, not significant.

- Pentobarbital induced sleep model에서 수면 증진활성이 우수한 EGCG와 rosmarinic acid에 대한 수면의 질 평가를 위해 뇌파분석을 진행(그림 2-31).
- EGCG(10 & 20 mg/kg)와 rosmarinic acid(2 & 5 mg/kg) 투여시 수면 시간은 투여농도가 증가할수록 유의적으로 증가하였으면, 깨어있는 시간은 투여 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였다(그림 2-31, A, B).
- 증가된 수면시간은 비렘수면(NREM) 시간의 증가에 기인하며 비렘수면시간을 구성하는 세타파(θ wave)와 델타파(δ wave)중 깊은 잠을 의미하는 델타파의 유적인 증가가 비렘수면 증가에 기여하였다(그림 2-31C-F)
- 식용식물에 함유된 수면 활성물질인 EGCG와 rosmarinic acid는 수면증진활성을 보이며 이는 델타파에 의한 비렘수면시간 증가에 기인한다.

3) Caffeine 유도 불면 모델에서의 EGCG, rosmarinic acid의 불면 완화 효과 평가

• 실험방법

- Caffeine으로 유도된 불면모델을 이용하여 rosmarinic acid(RA) 및 EGCG의 불면 완화 효과를 평가하였음. 실험군은 총 6군으로 정상대조군(NOR), 음성대조군(CON, caffeine-treated group), 양성대조군(PC, positive control, benzodiazepine 0.2 mg/kg), RA 투여군(2 & 5 mg/kg), EGCG 투여군(10 & 20 mg/kg)임.
- NOR군을 제외한 모든 실험군에 카페인 40 mg/kg 을 투여하였음.
- 카페인과 함께 시료를 경구투여하고 40분 후 단기간 최면제인 pentobarbital(42 mg/kg)을 복강주사

하여 수면을 유도한 뒤 입면 시간(sleep latency)과 총 수면시간(sleep duration)을 측정하였음.

• 실험결과

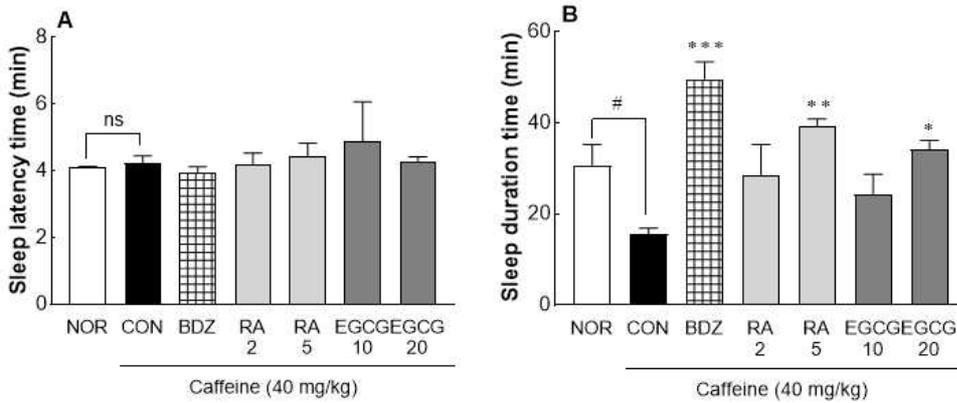


그림 2-32. Effect of rosmarinic acid and EGCG on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: normal control; CON: caffeine control (40 mg/kg) group; BDZ: benzodiazepine treatment (0.2 mg/kg, positive control); RA: rosmarinic acid and EGCG (epigallocatechin gallate). Values are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: **p<0.01 vs. NOR group, and #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs. CON group according to Tukey's test.

- 카페인 40 mg/kg을 투여하여 불면 모델을 유도하였으며, 불면 모델에서의 rosmarinic acid(RA)와 EGCG 투여에 따른 수면 증진활성을 평가하였음(그림 2-32).
- 카페인 투여에 따른 수면시간은 유의적으로 감소함(그림 2-32B)에 따라 불면 유도됨을 확인하였다.
- 불면 유도된 모델에 rosmarinic acid와 EGCG 투여 농도가 증가할수록 수면시간이 증가하는 경향을 보였으며, rosmarinic acid(RA) 5 mg/kg과 EGCG 20 mg/kg의 투여에 의해 caffeine만 투여한 CON에 비해 수면시간이 유의적으로 증가하였다(그림 2-32B). 따라서 Rosmarinic acid와 EGCG의 고농도 5 mg/kg과 20 mg/kg투여는 불면을 완화할 가능성이 높음.

4) Rosmarinic acid와 EGCG의 수면 증진 기작 규명

• 실험방법

- Picrotoxin, bicuculline, 및 flumazenil은 GABA_A receptor의 antagonist로 사용하였음.
- Rosmarinic acid의 수면 증진 기작 규명을 위해 실험군은 정상대조군(NOR), rosmarinic acid 단독 투여군(EH), picrotoxin 단독 투여군(PIX), picrotoxin 및 RA 혼합 투여군(PIX+RA), bicuculline 단독 투여군(BIC), bicuculline 및 RA 혼합 투여군(BIC+RA), flumazenil 단독 투여군(FMZ), flumazenil 및 RA 혼합 투여군(FMZ+RA)임.
- EGCG(E)의 수면 증진 기작 규명을 위해 실험군은 정상대조군(NOR), EGCG 단독 투여군(E), picrotoxin 단독 투여군(PIX), picrotoxin 및 E 혼합 투여군(PIX+E), bicuculline 단독 투여군(BIC), bicuculline 및 E 혼합 투여군(BIC+E), flumazenil 단독 투여군(FMZ), flumazenil 및 E 혼합 투여군(FMZ+E)이며, pentobarbital 수면 유도 실험과 동일한 조건에서 진행하였음,

• 실험결과

- 일반적으로 사용되는 수면제의 경우 GABA_A 수용체에 작용하므로, GABA_A 수용체에 초점을 맞추어 관련 기작 연구가 진행되고 있음. GABA_A 수용체에 작용하는 다양한 agonist와 antagonist가 밝혀져 있음.

microtoxin은 GABA_A receptor의 chloride channel 내부에 위치한 microtoxin site에 결합하는 antagonist이며, bicuculline은 GABA_A receptor의 GABA site에 결합하는 antagonist이며, flumazenil은 GABA_A receptor의 BZD site에 결합하는 antagonist로 알려져 있음(Butterweck, V. et al., 2007; Yan, M. et al., 2015).

- 입면 시간의 경우 rosmarinic acid(RA) 단독투여군과 antagonist인 PIX, BIC, 및 FMZ을 단독 투여한 군에서는 NOR군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았음(그림 2-33A). 또한 PIX와 RA 혼합 투여군(PIX+RA), BIC와 RA 혼합 투여군(BIC+RA), FMZ와 RA 혼합 투여군(FMZ+RA)을 RA 단독 투여군과 비교하였을 때 그룹 간의 유의적인 차이는 보이지 않았음(그림 2-33A).
- 수면 시간의 경우 antagonist만을 단독 투여한 PIX, BIC, 및 FMZ 군은 NOR군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았으나(그림 2-33B), RA 단독 투여군은 NOR군 대비 유의적인 수면시간의 증가를 보였음(p<0.001). PIX와 RA 혼합 투여군(PIX+RA)은 RA 단독 투여군과 비교하였을 때 수면시간이 유의적으로 감소하였음(그림 2-33B; p<0.001). 이와 유사하게 BIC와 RA 혼합 투여군(BIC+RA)과 FMZ와 RA 혼합 투여군(FMZ+RA)을 RA 단독 투여군과 비교하였을 때 수면시간이 유의적으로 감소하였음(p<0.001). 세 종류의 GABA_A receptor antagonist와 RA 혼합 투여군을 비교해보았을 때, PIX와 RA를 혼합 처리한 군에서 수면시간이 가장 낮게 나타났음.
- ECGC의 수면 기작을 평가한 결과, 입면 시간의 경우 ECGC(E)와 antagonist(PIX, BIC, 및 FMZ)를 단독 투여한 군에서는 NOR군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았음(그림 2-34A). 또한 antagonist와 E를 혼합투여한 모든군과 E 단독투여군을 비교하였을 때 그룹 간의 유의적인 차이는 보이지 않았음(그림 2-34A).
- 수면 시간의 경우 antagonist만을 단독 투여한 PIX, BIC, 및 FMZ 군은 NOR군과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았으나(그림 2-34B), E 단독 투여군은 NOR군 대비 유의적인 수면시간의 증가를 보였음(p<0.001). PIX와 E 혼합 투여군(PIX+E)은 E단독 투여군과 비교하였을 때 수면시간이 유의적으로 감소하였음(그림 2-14B; p<0.001). 이와 유사하게 BIC와 E 혼합 투여군(BIC+E)과 FMZ와 E 혼합 투여군(FMZ+E)을 E 단독 투여군과 비교하였을 때 수면시간이 유의적으로 감소하였음(p<0.001).
- 따라서 RA와 E는 GABA_A 수용체에 작용하여 수면 증진 활성을 보이는 것으로 사료되었음.

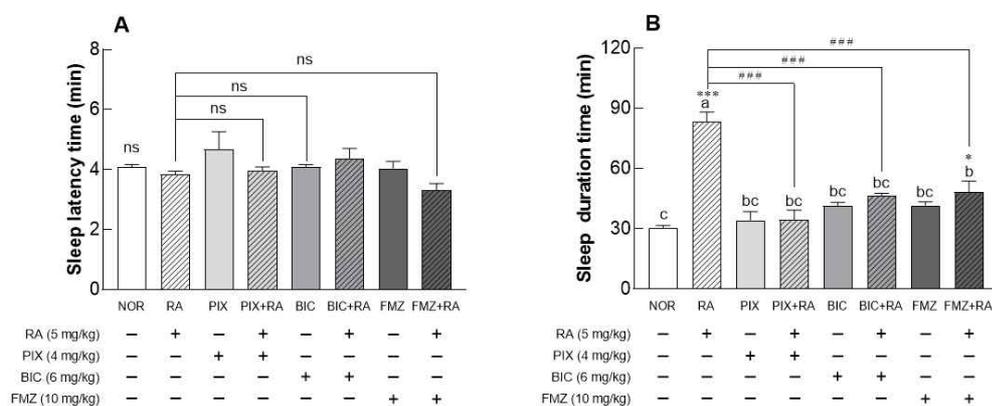


그림 2-33. Effect of GABA_A receptor antagonist on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), E: EGCG (20 mg/kg). PIX: picrotoxin (4 mg/kg), BIC: bicuculline (6 mg/kg), FMZ: flumazenil (10 mg/kg). Values are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 compared to the NOR group, ### p<0.001 between the antagonist.

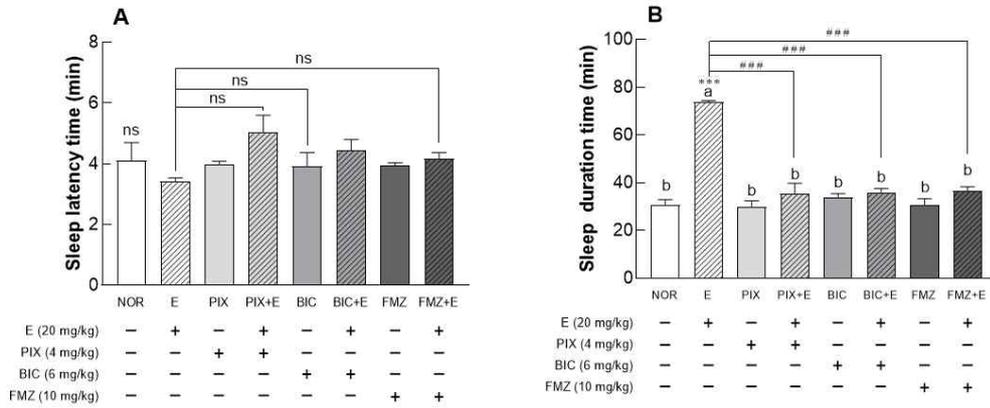


그림 2-34. Effect of GABA_A receptor antagonist on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), E: EGCG (20 mg/kg). PIX: picrotoxin (4 mg/kg), BIC: bicuculline (6 mg/kg), FMZ: flumazenil (10 mg/kg). Values are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to the NOR group, ###p<0.001 between the antagonist treatment and non antagonist treatment (E group) according to Tukey's test. ns, not significant.

5) 수면 활성물질 rosmarinic acid와 EGCG 함유 식품 소재의 수면 증진 활성 평가

• 실험방법

- Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract의 수면 증진 활성을 pentobarbital 유도 수면실험을 통해 평가하였음. 실험군은 정상대조군(NOR), rosemary extract 투여군(20, 50 mg/kg)이며, 이전 방법과 동일하게 수행하였음.

• 실험결과

- 로즈마리 추출물(rosmarinic acid 9-10%)을 대상으로 pentobarbital induced model에서 수면증진 활성 측정된 결과(그림 2-35A), 추출물의 경구투여량이 증가할수록 sleep latency time이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었음. 또한 추출물의 투여량이 증가할수록 농도 의존적으로 유의적으로 Sleep duration time이 증가하였음(그림 2-35B).

- 로즈마리 추출물의 rosmarinic acid 함량이 10%이므로 기존 화학물질인 rosmarinic acid 투여시 보다 10배 정도 투여량이 증가하였으며, 추출물 역시 동일 농도의 rosmarinic acid에 의해 수면 증진 활성을 보였음.

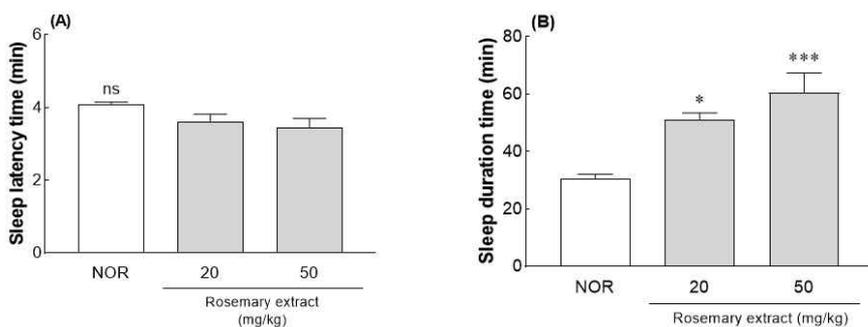


그림 2-35. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), Rosmary extract: rosemary extract (20 and 50 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the NOR group according to Tukey's test.

- EGCG 함유 카테킨 추출물(EGCG 46.6%)을 경구투여한 결과 sleep latency time은 투여농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다(그림 2-36A). 반면 sleep duration time은 카테킨 추출물 투여농도가 증가할수록 농도 의존적으로 유의적으로 증가하였음(그림 2-36B).
- 카테킨 추출물은 약 50%정도의 EGCG를 함유하므로 기존 화학물질 EGCG 투여시 보다 1.5-2배정도 투여량이 증가하였으며, 추출물 역시 동일 농도의 EGCG에 의해 수면 증진 활성을 보였음.
- 식품 소재로 활용되는 로즈마리 추출물과 카테킨 추출물의 수면 증진 활성 평가시 화학물질인 rosmarinic acid와 EGCG와 동일 농도에서 수면 증진 활성을 보였음.

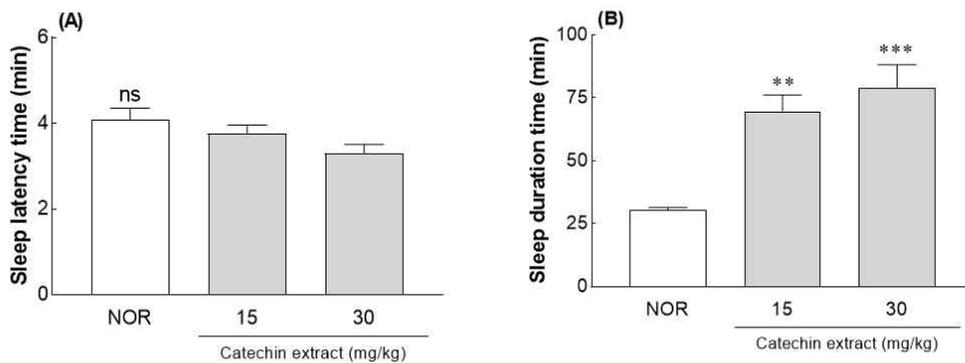


그림 2-36. Effect of catechin extract on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), Catechin extract: catechin extract (15 and 30 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Asterisks indicate significant differences: **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the NOR group according to Tukey's test.

(4) 농심 제공 황정(총총갈고리등굴레) 추출물의 수면증진 활성과 로즈마리 추출물 첨가에 의한 수면 활성의 시너지 효과 측정

• 실험방법

- 농심에서 제공하는 3가지 황정 추출물 대상으로 pentobarbital induced sleep model에서 수면 증진 활성 평가
- 농심 제공 황정 추출물에 로즈마리 추출물과 카테킨 추출 첨가시의 pentobarbital induced sleep model에서의 수면증진 활성 평가

• 실험결과

- 수면 증진활성이 측정된 로즈마리 추출물과 카테킨 추출물을 농심 제공 황정 추출물과 혼합시 수면 활성에 대한 시너지 효과를 측정함.
- 황정 추출물과 로즈마리 추출물(5:1) 또는 카테킨 추출물(5:1) 혼합시 80 mg/kg과 160 mg/kg을 각각 투여한 경우 sleep latency time과 sleep duration time에 대한 시너지 효과를 측정하였음(그림 2-37).

- 황정(PE) 단독 투여와 로즈마리 추출물과의 혼합(PE+RE) 또는 카테킨 추출물과의 혼합(PE+CE)한 경우 sleep latency time은 다소 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었음(그림 2-17A).
- 로즈마리 추출물과의 혼합(PE+RE) 또는 카테킨 추출물과의 혼합물(PE+CE)을 80 mg/kg을 투여한 경우 황정 단독(PE) 비교시 sleep duration time은 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 반면 혼합물들(PE+RE 와 PE+CE)을 160 mg/kg 투여시 황정 추출물 단독(PE)투여 보다 sleep duration time이 유의적으로 증가하였음(그림 2-37B).
- 로즈마리 추출물이나 카테킨 추출물을 황정 추출물과 1:5로 혼합하여 160 mg/kg 경구 투여시 황정 추출물 단독 사용 보다 수면 증진 활성을 기대할 수 있음.

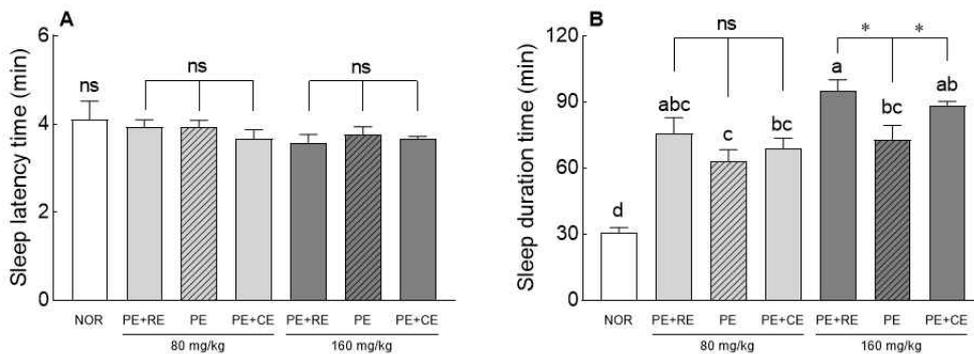


그림 2-37. Effect of PE and PE mixture on sleep latency time (A) and total sleep time (B) in mice that received a hypnotic dose of pentobarbital (42 mg/kg, i.p.). NOR: 0.9% NaCl (physiological saline) group (normal control), PE: Single PE treatment group (80, 160 mg/kg). PE+RE: Mixture of PE and RE (5:1) treatment group (80, 160 mg/kg). PE+CE: Mixture of PE and RE (5:1) treatment group (80, 160 mg/kg). Values are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for each group, n=7. Different letters indicate a significant difference of $p < 0.05$ between the experimental groups according to Tukey's test. The asterisk indicates a significant difference of $*p < 0.05$ between the PE group and the PE mixture group (PE+RE and PE+CE) according to Student's t-test. PE: *Polygonatum sibiricum* extract, RE: rosemary extract, CE: catechin extract.

(5) 농심 제공 황정(충충갈고리등글레) 추출물의 수면증진 기작과 추정활성물질에 의한 작용기전 분석

• 실험방법:

- Benzodiazepine 수용체 결합반응(receptor binding assay)을 위한 [3H]-flumazenil(Ro15-1788) 결합 반응에서는 각 시험관 당 100 μ L의 대뇌피질 조직(약 0.32 mg 단백질에 해당), 21 μ L의 방사성 동위원소와 50 μ L의 각종 약물을 사용하며, 50 mM triscitrate 완충용액을 총 부피 500 μ L가 되게 첨가함.
- 실험에 사용한 황정의 농도는 0.01 mg/mL에서 100 mg/mL까지 5 구간으로 설정하였으며, [3H]-flumazenil의 binding 억제 활성을 분석함.
- 추정 활성물질인 1-monolinolein, 2-monolinolein, oleamide에 의한 receptor binding assay도 동일 방법으로 진행함.

• 실험결과

- 황정 추출물(PSE)은 중추성 benzodiazepine 수용체의 antagonist인 [3H]-flumazenil의 수용체 결합을 5구간의 농도에서 농도의존적으로 6.25~60.30%의 억제 활성도를 나타내었으며, EC₅₀ 값은 0.8152 mg/mL이었음(그림 2-38).

- 따라서, 황정 추출물은 수면 유도 및 수면시간 증가, 수면 질의 향상에 효과가 있으며 specific antagonist를 이용한 pentobarbital 유도 수면 시험, EEG를 통한 수면 구조 분석, GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 통해 GABA_A-receptor antagonist인 flumazenil에 의해 수면 증진이 억제 되고, serotonin(5-HT_{1A}) receptor antagonist인 ρ-MPPI에 의해서는 수면 증진이 억제되지 않는 것을 확인하여 결과적으로 황정 추출물은 GABAergic 메커니즘을 통해 수면 증진 효과를 갖는 것으로 확인됨.
- GABAA-BDZ 수용체에 대한 PSE, 글리세릴 모노리놀레이트 및 올아미드의 결합 활성은 방사성리간드, [³H]-플루마제닐을 사용하여 측정하였다(그림 2-39).
- 황정 추출물의 GABA_A 수용체 결합 활성은 28±1.4%였다. 활성 물질로 추정되는 1-monolinolein 과 2-monolinolein 각각 50±1.6% 및 38±0.9%의 결합 활성을 나타냈다. 황정 추출물의 또 다른 활성 성분으로 추정되는 Oleamide는 GABA_A 수용체 결합 활성이 57±0.2%로 황정과 glyceryl monolinoleate보다 높았다(p<0.001). 이러한 결과는 황정에 함유된 glyceryl monolinoleate와 oleamide가 GABA_A 수용체에 효과적으로 결합하여 황정의 수면 촉진 효과를 담당하는 활성 물질임을 시사한다.

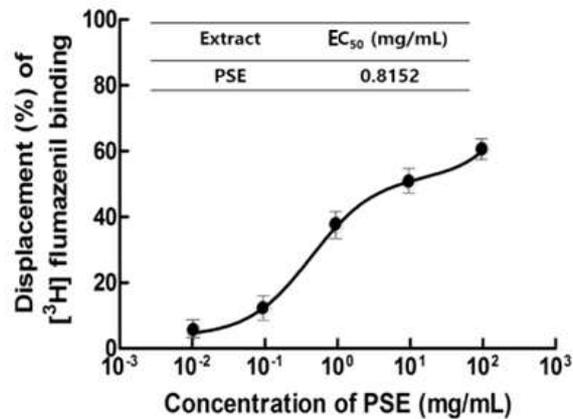


그림 2-38. Displacement of [³H]-flumazenil binding of Polygonatum sibiricum rhizome extract through GABAA-BDZ receptor binding assay.

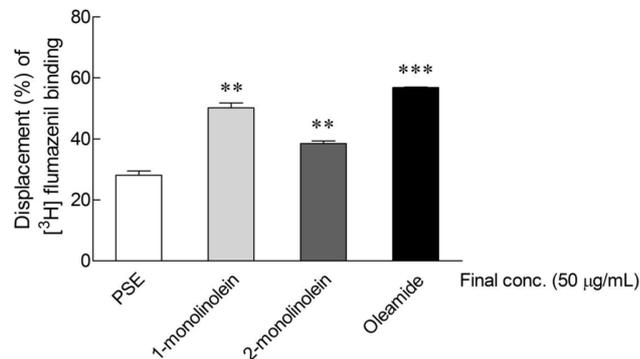


그림 2-39. Displacement of 3H flumazenil binding of PSE, glyceryl monolinoleate and oleamide through GABAA-BDZ receptor binding assay. Each data point is expressed as mean ± SD (n=3). Symbols indicate significant differences at **p<0.01, ***p<0.001 compared with control by Student's t-tests.

■ 켄온 연구내용 (위탁기관)

(1) 일반 독성시험

1) 설치류 (SD Rat) 단회투여 독성 시험

• 단회독성 의미

- 시험물질을 시험동물에 단회투여 하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사

◆ 실험방법

- 시험물질 (총총갈고리동굴레 추출분말, 이후 시험물질로 기술)을 Sprague-Dawley 랫드에 1250, 2500, 5000mg/kg의 용량으로 단회로 투여함. 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군 포함. 군당 10마리 (암수 각 5마리) 실험 진행. 시험물질 투여군과 부형제대조군의 결과를 비교함.

- **결과:** 1) 사망동물이 관찰되지 않음.

2) 일반증상에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.

3) 체중측정 결과 시험물질에 의한 영향 관찰되지 않음.

4) 부검결과 이상소견이 관찰되지 않음.

2) 설치류 (SD Rat) 반복투여 독성 시험 (완료)

◆ 반복독성 의미

- 시험물질을 시험동물에 반복투여하여 중장기간 내에 나타나는 독성을 질적, 양적으로 검사. (예비실험, 4주간 진행)

• 실험방법

- 시험물질을 Sprague-Dawley 랫드에 1250, 2500, 5000mg/kg의 용량으로 4주간 반복으로 투여함. 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군 포함. 군당 10마리 (암수 각 5마리) 실험 진행. 일반증상, 체중측정, 사료 및 물섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검 소견 및 장기중량 확인. 시험물질 투여군과 부형제대조군의 결과를 비교함.

- **결과:** 1) 사망동물이 관찰되지 않음. 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않음.

2) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.

3) 사료섭취량 및 물섭취량 결과, 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않음.

4) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않음.

5) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.

6) 혈액 생화학적 검사에서 5000mg/kg/day 투여군 수컷에서 A/G ratio 증가

7) 장기중량 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.

8) 부검소견 결과, 이상소견은 관찰되지 않음.

3) 설치류 (SD Rat) 유전독성 시험

① 복귀 돌연변이 실험

• **복귀 돌연변이 실험 의미:** 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* 균주와 트립토판 요구성 균주 *Escherichia coli* WP2 uvrA 를 사용하여 점 돌연변이(point mutation)을 야기하는 물질의 검색을 위한 가장 신속한 유전독성 시험법.

• 실험방법

- 시험물질을 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4개 균주(TA100, TA1535, TA98 및 TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA)에 복귀돌연변이를 유발을 실험함.

- 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보효소(cofactor)를 첨가한 것을 사용함. 시험은

direct plate incorporation 방법으로 실시함. 처리용 시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 조제하였음. 아래 표 2-9와 같이 설정한 농도군과 부형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험군을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용함.

표 2-9. 복귀 돌연변이 실험군 구성

균주명	S9 mix	농도군 (ug/plate)				
		37.04	111.1	333.3	1000	3000
TA strains	+/-	37.04	111.1	333.3	1000	3000
WP2 uvrA	+/-	37.04	111.1	333.3	1000	3000

• 실험결과

- TA100, TA1535 및 TA1537에서 대사활성계 적용 유무에 관계없이 3000 µg/plate에서 세포독성이 관찰되었음. 모든 균주의 모든 시험물질 처리농도에서 대사활성계 적용 유무에 관계없이 음성대조군에 비해 평균 집락 수의 실질적인 증가가 관찰되지 않음.

② 염색체 이상 시험

• **염색체 이상 실험 의미:** 포유류 배양세포를 이용하여 염색체 손상(구조이상, 염색체수의 변화)을 세포유전학적으로 평가하는 시험법.

• 실험방법

- 시험물질의 염색체 이상 유전독성 평가를 위하여 배양 Chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용하에 염색체이상시험을 수행하였음. 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도한 랫드의 간균질액에 cofactor를 첨가한 것을 사용하였음. 시험물질은 멸균주사용수로 조제하였음. 최고농도는 Relative increase in Cell Count (RICC)를 세포독성의 지표로 이용하였음. 음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 다음 표와 같이 농도군을 설정하였으며, 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였음 (표 2-10).

표 2-10. 염색체 이상실험 실험군 구성

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article (ug/mL)	Positive control and dose (ug/mL)
1	+	6-18	0, 1250, 2500, 5000	B[a]P (20)
2	-	6-18	0, 1250, 2500, 5000	4NQO (0,4)
3	-	24-0	0, 1250, 2500, 5000	4NQO (0,4)

- 활발히 증식 중인 세포를 0.1% 트립신으로 분리 후, 배양면적 25 cm² 플라스크에 5 x 10⁴ 개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3 일간 배양한 후 시험물질을 처리하였음. 처리개시로부터 24 시간 후에 염색체 검체를 제작하여, 플라스크당 150 개 (농도군당 300 개)의 중기상으로부터 염색체이상을 계수하였음. 결과는 300 개의 중기상에서 관찰되는 구조적(혹은 수적) 이상을 가진 중기상의 빈도(%)로 나타냄.

• 실험결과

- 염색체 이상을 계수한 결과, 모든 계열의 시험물질 처리군에서 구조적 및 수적 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량 의존 적으로 증가하지 않았으며, 음성대조군의 (historical control data5) 범위 내에 있었음.

- Benzo[a]pyrene 혹은 4-Nitroquinoline-1-oxide를 처리한 모든 양성대조군에서는 확실한 양성의 결과를 얻었음. 이상의 결과로 보아, 시험물질 총총갈고리동굴레 추출분말은 본 시험에 사용한 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 사료되며, 명확한 음성으로 판단됨.

③ 소핵실험

• 소핵실험 의미

- 설치류를 이용하여 생체 내 염색체 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 소핵(염색체 절편)유발성을 지표로 하여 평가하는 시험법.

• 실험방법

- 시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 투여함. 약 8 주령의 수컷 ICR 마우스(군당 6 마리)에 음성대조군(0), 시험물질 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day의 용량을 1 일 1 회, 연속 2 일간 경구 투여 하였음.
- 부형제투여군을 음성대조군으로 하였으며, 양성대조군에는 70 mg/kg의 Cyclophosphamide monohydrate 를 2 회차 투여일에 1 회 복강투여 하였음. 최종 투여로부터 약 24 시간 후에 모든 동물을 부검, 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였음.

• 실험결과

- 소핵의 평가를 위하여 개체 당 4000 개의 PCE (polychromatic erythrocyte, 다염성적혈구) 중 MNPCE (micronucleated polychromatic erythrocyte, 소핵을 가진 다염성적혈구)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 MNPCE의 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량상 관성이 없었으며, 음성대조군의 Historical control data 범위 내에 존재함. 세포독성은 PCE:RBC (red blood cell, 적혈구) 비율을 산출하여 평가하였음. 개체당 500 개의 총 적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과, 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었음.
- 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었음. 이상의 결과, 시험물질 층층갈고리등굴레 추출분말은 본 시험조건 하에서 수컷 ICR 마우스 체내 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단됨.

(2) 생식발생독성 (배태자 발생) 시험

• 생식발생독성 (배태자) 시험 의미

- 착상부터 경구개가 폐쇄되는 시기까지 임신중의 암컷에 시험물질을 투여하여 모체와 배,태자의 발생에 미치는 영향을 검사.

1) 랫드 실험

• 실험방법

- 시험물질을 임신한 랫드에 0, 625, 1250, 2500, 5000mg/kg/day로 임신 후 6일에서 17일까지 투여함. 암컷은 군당 5마리씩 실험진행. 임신동물에 대하여 일반증상, 체중측정, 사료섭취량 산출, 장기중량 측정, 부검소견 및 제왕절개 성적을 조사함. 생존태자의 체중, 태반중량, 외형이상을 조사

• 실험결과

- 임신모체

- 1) 시험물질에 의한 영향이 관찰되지 않음.
- 2) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 3) 사료섭취량 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 4) 장기중량 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 5) 부검소견 결과, 이상소견은 관찰되지 않음.

배태자

- 1) 제왕절개 성적 결과 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 2) 태자의 외형 및 골격 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 3) 태자의 내부장기 검사 결과, 5000 mg/kg/day 투여군에서 가슴샘 형태 이상이 부형제대조군 대비 통계학적으로 유의하게 높았으나, 랫드를 이용한 배태자 발생시험에서 종종 관찰되는 변화로 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단됨.

:시험물질인 층층갈고리등굴레 추출분말을 임신한 랫드에 임신 6일부터 17일까지 반복 경구투여 하였을 때, 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았으며, 이에 따라 임신 모체 및 배태자발생에 대한 무독성량(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)은 모두 5000 mg/kg/day로 판단함.

2) 토끼 실험

• 실험방법

- 시험물질을 임신한 랫드에 0, 500, 1000, 2000mg/kg/day로 임신 후 6일에서 19일까지 투여함. 암컷은 군당 5마리씩 실험진행. 임신동물에 대하여 일반증상, 체중측정, 사료섭취량 산출, 장기중량 측정, 부검소견 및 제왕절개 성적을 조사함. 생존태자의 체중, 태반중량, 외형이상을 조사

• 실험결과

- 임신모체

- 1) 시험물질에 의한 사망 혹은 유산동물은 관찰되지 않음
- 2) 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음
- 3) 체중측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음
- 4) 사료섭취량 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 5) 장기중량 측정 결과, 이상소견은 관찰되지 않음.
- 6) 부검소견 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않음.

배태자

- 1) 제왕절개 성적 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 2) 태자의 외형검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 3) 태자의 내부장기 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음.
- 4) 태자의 내부장기 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음

: 시험물질의 모체 및 배태자 발생에 대한 시험물질의 영향은 관찰되지 않음.

시험물질인 층층갈고리등굴레 추출분말을 인공수정 한 토끼에 기관형성기간 (임신 6-19일) 동안 반복 경구투여한 결과, 임신모체 및 배태자발생에 대한 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않음. 임신 모체 및 배태자발생에 대한 무독성량(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)은 모두 2000 mg/kg/day로 판단됨.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 총총갈고리동굴레 신규 지표성분 Polygonatine A 발굴 및 기능성분 GABA 분석법 개발을 통한 품질지표 확보
- 원료 전처리 및 제조공정 개선 및 현장수준 품질확보
- 건강기능식품 제형 개발 (엠펙, 스틱젤리, 구미젤리, 필름) 및 시제품의 유통기한 테스트를 통한 저장안정성 확보
- 수면건강기능 식약처 건강기능식품 개별인정 신청
- 수면활성 보유 물질 Q3G와 ferulic acid를 활용한 부원료 소재 확보.
- 우수 부원료 소재 활용 (카테킨, 로즈마리 추출물) 주원료 (총총갈고리동굴레 추출물)과 수면기능 시너지 효과 확인
- 총총갈고리동굴레 추출분말의 일반독성 및 생식독성 안전성 확보

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	목표(단계별)				
		실적(누적)			
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	목표(단계별)				
		실적(누적)			
계					

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

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

(22쪽 중 7쪽)

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Effects of Green Lettuce Leaf Extract on Sleep Disturbance Control in Oxidative Stress-Induced Invertebrate and Vertebrate Models	Antioxidants	Kyungae Jo, Singeun Kim, Yejin Ahn and Hyung Joo Suh	2021, 10, 970.	스위스	MDPI	SCIE	2021. 06	2076-3921	
2	Quercetin-3-glucuronide 함유 약용 식물의 pentobarbital 유도 수면모델에서 수면증진 활성	한국식품과학회지	박천웅, 김현경, 안예진, 홍양희, 전상덕, 신동석, 서형주	2022. 54. 594-599	한국	한국식품과학회	비SCIE	2022. 12	0367-6293	
3	복령(Poria cocos), 용안육(Longanac Arillus) 및 청피(Pericarpium Citri Reticulatae Viride) 알코올 추출물의 펜토바비탈 유도 수면 모델에서의 수면증진 활성	한국식품영양과학회지	박천웅, 김현경, 안예진, 홍양희, 전상덕, 손석준, 서형주	2023, 52(1), 1-7	한국	한국식품영양과학회	비SCIE	2023. 02	1226-3311	

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 KFN International Symposium and Annual Meeting	이효원, 장역부, 안예진, 서형주	2022. 10. 20	제주도	한국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
	기능성 식품 개별인증	식약처	수면건강에 도움을 줄 수 있음		신청중	대한민국

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)
(22쪽 중 8쪽)]

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
	수면건강 타점 제형	2022.02	(주)노바렉스		사내/외 소비자 테스트용	1년6개월 (개별인정 확보 후 상품화 행)		

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

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

사업화 현황

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

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

매출 실적(누적)

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

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]
(22쪽 중 9쪽)

사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

고용 효과

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

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

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

(22쪽 중 10쪽)

기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
		2021	박사 1	석사	학사	기타	남 1	여	수도권 1	충청권	영남권	호남권	기타
		2022	박사	석사 1	학사	기타	남	여	수도권 1	충청권	영남권	호남권	기타

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

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

(22쪽 중 12쪽)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 층층갈고리둥굴레 추출분말 현장생산 및 품질 확보	○ 전처리 및 생산공정 표준화 및 현장테스트 검증 ○ 지표성분 및 미생물, 중금속 등 품질규격 설정 및 현장생산 원료 분석 완료	100%
○ 수면건강 맞춤형 건강기능식품 제형 개발 및 생산	○ 수면건강 건강기능식품 제형 4종 개발 (타정, 스틱젤리, 구미젤리, 필름) ○ 타정제형 현장생산 진행 및 유통기한 안전성 검증	100%
○ 식약처 개별인정 신청 및 확보	○ 식약처 개별인정 신청	70%
○ 층층갈고리둥굴레 추출분말을 이용한 수면 건강기능식품 제품 상품화	○ 건강기능식품 제형 4종 개발 및 출시 준비 ○ 식약처 개별인정 확보 후 상품화 프로세스 진행 예정	80%
○ 층층갈고리둥굴레 추출분말 지표성분 후보군 발굴 및 분석	○ 지표성분 후보군 2종 (Polygonatine A, GABA) 분석법 확보 ○ 식약처 협의를 통한 GABA 지표성분 설정 가능 확인 및 품질 규격설정 (1.2mg/g ± 20%)	100%
○ 수면 건강기능식품 제품 출시를 위한 부원료 탐색 및 개발	○ Q3G 등 수면 기능성분을 기반으로 우수 부원료 병품쌈, 머느리배꽃 소재 발굴 ○ 로즈마리, 카테킨 추출물 수면개선 효능 확인	100%
○ 우수 부원료 소재 확보 및 층층갈고리둥굴레 추출분말과의 시너지 효과 검증	○ 로즈마리 추출물 또는 카테킨 추출물을 층층갈고리황정 추출물의 1/5수준으로 혼합 시 단독 사용시 보다 수면 시간이 각각 30.5%와 21.2% 증가함.	100%
○ 층층갈고리둥굴레 추출분말 안전성 확보 (단회, 반복 처리시 안전성 확보, 유전독성, 생식독성 관련 안전성 확보)	○ 일반독성 및 생식독성 섭취 안전성 확보	100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 본 과제의 목표 중 수면건강 건강기능식품 상품화는 식약처 개별인정 확보 후 가능.
- 2022년 현재 식약처와 민원상담을 통하여 인체실험 보고서에 대한 재작성 등 필요서류가 추가적으로 존재하여 이를 보완하여 신청하였음. 개별인정 심사까지 수개월이 소요됨을 감안하면 2023년내에 상품화를 진행할 수 있을 것으로 판단됨.
- 식약처 개별인정 심사는 매우 까다롭기 때문에 자료를 철저히 준비한 후 신청하는 것이 등록률을 높일 수 있는 방법이기 때문에, 식약처와 충분한 공감대 형성이 된 상황에서 진행하였음.

2) 자체 보완활동

- 식약처 개별인정 심사 상황 지속적 업데이트 진행중
- 식약처 심의 전 품목보고회를 통하여 식약처 담당자와 소통 예정
- 이와 별개로 개발된 시제품을 바탕으로 사내/외 소비자 조사를 통한 상품화 준비를 진행중임

3) 연구개발 과정의 성실성

본 과제에서 설정한 정성적 목표 및 연구개발내용은 대부분 수행 및 달성하였음. 식약처 개별 인정 확보는 대내/외 변수가 존재하는 만큼 기업에서도 가장 가능성이 높은 전략으로 진행중임.

또한 사내에서는 관련된 상품화를 위하여 연구개발 이외에 건강기능식품과 관련된 사업활동도 활발하게 진행하고 있음.

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 13쪽)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구 개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
총총갈고리등 굴레를 이용한 수면건강기능 식품 산업화 기술개발	총총갈고리등굴레 활용 수면건강기능식품 상품화	(주) 농심	기업 (영리)	1,495	445	0.25	신규 기술개발	정부지원 연구개발비 비율	25
수면건강기능 식품 산업화 기술개발	총총갈고리등굴레 추출분말 지표성분 발굴 및 수면건강 부원료 소재 평가	고려대	대학 (비영리)	80	80	1.00	신규 기술개발	해당 없음	-
계				1,575	525	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

개별인정 확보 및 상품화 일정

연도	2023년				2024년	2025년
개월	5월	6월	8월	11월		
일정	식약처 개별 인정 보완자료 제출	식약처 개별 인정 서류 검토 및 심의 진행	수면건강 개별인정 확보	건강기능식품 품목보고 및 제품 출시 진행 자사몰 및 오프라인 판매 진행 목표 매출 : 3억	건강기능식품 제품 및 라인업 확대 온라인 판매 확대 목표 매출 : 10억 기술료 납부 진행	수면건강 + α 제품 개발 및 출시 목표 매출 : 30억 기술료 납부 진행

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE		1			
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내	1				
	국외					
특허등록	국내		1			
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사		1			
사업화	시제품개발	1				
	상품출시	1	2	1	1	
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	300,000	1,000,000	3,000,000	5,000,000	80,000,000
기술료(단위 : 천원)						
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
의료기기						
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

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

본문 작성 요령(작성 요령은 제출하지 않습니다)

1. 연구개발과제의 개요: 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술하며, 선정 당시 「연구개발계획서」와 최근에 제출한 「연차보고서」 또는 「단계보고서」의 내용과 동일하게 작성합니다.
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용: 이론적·실험적 접근 방법, 연구 과정 및 내용 등을 기재합니다.
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
 - 1) 연구수행 결과: 연구개발과제 수행에 따라 발생한 정성적 연구개발성과와 해당 시 정량적 연구개발성과, 세부 정량적 연구개발성과, 계획하지 않은 성과 및 관련분야 기여사항을 기재합니다.
 - (1) 정성적 연구개발성과: 연구개발과제 수행에 따라 발생한 최종 정성적인 성과 기재합니다.
 - (2) 정량적 연구개발성과: 연구개발계획서 상의 연구개발성과표에서 목표대비 최종 발생한 실적을 기재합니다(해당 시 작성, 연구개발과제의 특성에 따라 수정 가능).
 - (3) 세부 정량적 연구개발성과: 과학적성과, 기술적성과, 표준화, 경제적성과, 사회적성과, 인프라성과, 그 밖의 성과 중 최종 발생한 성과항목이 있을 경우 선택적으로 작성하고 증빙자료 첨부, 등록·기탁 대상 연구개발성과에 대해서는 자세한 내용과 등록·기탁 번호를 기재합니다.
 - (4) 계획하지 않은 성과 및 관련분야 기여사항: 연구개발과제 수행에 따라 계획하지 않은 최종 성과가 발생한 경우 해당 성과와 관련분야 기여사항을 기재합니다.
 - 2) 목표 달성 수준: 단계별 연구목표 및 평가 착안점에 입각한 최종 연구개발 목표 대비 달성내용과 달성도(%)를 기재합니다.
4. 목표 미달 시 원인분석: 해당 시 수행기관이 자체 분석한 목표 미달 원인(사유)과 자체 보완활동의 내용 및 과제수행 과정의 성실성 등에 관하여 기재합니다.
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여: 관련 분야에 대한 기술 개발 현황과 비교하여 달성된 연구성과가 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치, 우월성, 기여한 점 등을 구체적인 근거를 제시하여 기재합니다.
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획: 성과 관리 추진체계와 예상되는 연구개발성과의 활용분야, 활용방안, 추가연구의 필요성, 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안, 기술 이전 등을 기재합니다.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업 연구개발사업 층층갈고리등 굴레를 이용한 수면건강기능식품 산업화 기술개발연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 유용농생명자원산업 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.