

118041-03

농 소
업 재
부 산
개 발
물 발
을 및
활 제
용 품
한 화
현 연
행 개
개 구
선
식 의
약

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003557-01

농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발 및
제품화 연구

2021. 06. 07

주관연구기관 / (유)한풍제약
협동연구기관 / 원광대학교

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발 및 제품화 연구”
(개발기간 : 2018. 04. ~ 2020. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 06. 07.

주관연구기관명 : 유한회사 한풍제약 (대표자) 조인식, 조형권

협동연구기관명 : 원광대학교산학협력단 (대표자) 최병관



주관연구책임자 : 김대성

협동연구책임자 : 김성연

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

요약

보고서 면수 : 180

- 연구 목적 : 농업 부산물의 기능성 검증으로 고부가가치 건강기능식품으로 개발하여 국민보건향상과 농가의 소득증대에 기여하고자 함
- 연구 내용 :
 - 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화
 - 포도 잎 추출물 안전성 및 안정성 자료 확보
 - 포도 잎 추출물에 대한 공인기관성적서 확보
 - 혈행개선 소재 효능평가 자료 확보
 - 포도잎 추출물의 혈행개선 인체적용시험
 - 포도잎 추출물의 혈행개선 기능성 개별인정소재 신청

요 약 문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구 목적 : 농업 부산물의 기능성 검증으로 고부가가치 건강기능식품으로 개발하여 국민보건향상과 농가의 소득증대에 기여하고자 함 ▪ 연구 내용 : <ul style="list-style-type: none"> - 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화 - 포도 잎 추출물 안전성 및 안정성 자료 확보 - 포도 잎 추출물에 대한 공인기관성적서 확보 - 혈행개선 소재 효능평가 자료 확보 - 포도잎 추출물의 혈행개선 인체적용시험 - 포도잎 추출물의 혈행개선 기능성 개별인정소재 신청
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 혈행개선 소재의 기준규격 및 확보 ▪ 혈행개선 소재의 GLP 독성자료 확보 ▪ 인체적용시험 계획서 및 승인서 확보 ▪ 혈행개선효능평가자료 확보 (용량의존성 실험자료) ▪ 공인기관성적서 확보 ▪ 인체적용시험 식품(대조약 포함) 생산 및 인체적용시험 수행 ▪ 혈행개선 기전연구 자료 확보 ▪ 기허가 제품과 비교 실험자료 확보 및 신규소재 효능평가 자료 확보 ▪ 신규 소재 혈행개선 효능평가 자료 확보 ▪ 혈행개선 소재의 지표성분 시험법 밸리데이션 자료 확보 ▪ 인체적용시험보고서 확보 ▪ 개별인정신청 및 접수 완료
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인체적용시험 결과 혈소판응집 억제 효과, 혈액응고(aPTT) 억제 효과, 수축기 혈압 개선 효과 및 혈중 COX-2 억제 효과를 나타내었음. 이러한 결과는 건강기능식품 개별인정을 받을 수 있을 것으로 예상되며, 행정처리 기간 동안 원료 확보를 위해 국내 농가 및 지역 농협 등을 통해 원료 확보를 해나갈 계획임 ▪ 포도 잎 추출물은 본태성 고혈압 모델에서 의미있는 결과를 보였고, 인체적용시험에서 수축기 혈압을 개선하는 결과를 보였음. 또한 평활근으로 이뤄진 혈관의 이완효과를 보였음. 이러한 결과는 포도잎 추출물이 혈압조절 효과를 나타냄을 보여주는 것으로 추가 인체적용시험을 통해 기능성을 확대해 나갈 계획임 ▪ 국내 농업 부산물의 생리활성 물질의 최적 추출방법을 제시하고 지표 성분 또는 효능성분을 표준화하여 기능성 원료 또는 의약품의 소재로 활용할 수 있는 가능성을 제시할 것으로 기대 ▪ 버려지거나 활용도가 적은 부산물들을 고부가가치 기능성 소재로 산업적 가치를 증대시킴으로써 시장의 수요를 불러일으킬 수 있고, 농가의 새로운 수입원을 창출할 수 있을 것으로 기대 ▪ 국내산 원료를 이용한 혈행개선 효능을 국제 저널에 게재함으로써 국내산 기능성 소재를 국제적으로 알리고 국산 소재를 수출할 수 있는

	<p>기반을 마련할 것으로 기대</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 수입에 의존하던 혈행개선용 기능성 원료를 내수시장에서 확보하여 다국적 기업들이 주도하고 있는 건강기능식품 시장에서 수입대체 효과 기대 ▪ 기능성 소재의 개발을 통해 예방의학의 발달을 기대할 수 있으며, 국내 사망 원인 상위 3대 사인 유발을 완화함으로써 국민들의 건강 지향적 삶을 영위할 수 있을 것으로 기대 				
국문핵심어 (5개 이내)	혈행개선	포도 잎	건강식품	식의약 소재	농업 부산물

목 차

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	30
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	177
4. 연구결과의 활용 계획 등	180

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 포도 잎 추출물의 혈행개선 효능을 고지혈증 병증 모델을 통해 재확인 및 인체에서의 최적 유효농도 도출과 표준화를 확립하고, 인체에서의 유효성 확인을 통해 고부가가치 제품을 개발하고자 함
- 농업부산물 중 혈행개선의 효능을 갖는 추가 소재를 도출하여 부가가치를 높일 수 있는 기능성 식의약 소재 발굴



1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구 배경

- 전 세계적으로 현대의학의 발전과 더불어 경제 수준 향상으로 인해 현대사회는 고령화로 접어들고 있으며, 건강에 대한 의식 수준 또한 향상되고 있음. 이러한 현상은 국가별 주요 사망원인 질환에 대한 예방 및 치료에 대한 관심으로 이어지며, 식생활개선 및 건강기능식품을 찾는 수요 또한 증가하게 됨
- 심근경색, 협심증, 뇌혈관질환, 심혈관질환, 고혈압, 동맥경화, 콜레스테롤 등의 심혈관 질환은 현재 우리나라에서 암과 더불어 주요 사망원인으로 파악되고 있음. 통계청 자료에 의하면 현재 심뇌혈관 질환은 한국인의 사망 10대 원인에서 상위 3개 원인에 포함되고 있으며, 특히 심장질환의 경우 암에 이어 두 번째로 높은 위치를 차지하고 있음



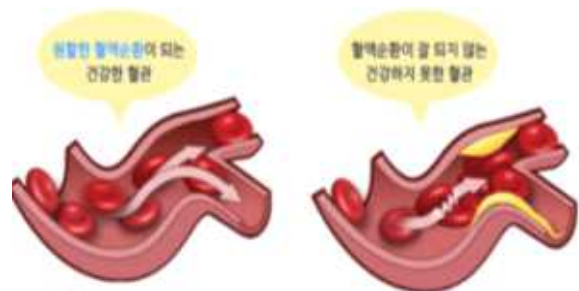
[그림 2] 2016년 성별 사망 원인 순위

[자료 : 2016년 사망원인 통계, 통계청, 2016]

- 최근 심혈관 질환과 같은 순환기 질환에 의한 사망비율이 급증하여 선진국에서는 사망률이 20~30%에 달하며, 우리나라에서도 전체 사망률의 25%를 점유하고 있기 때문에 심각한 사회문제가 되고 있음
- 2015년 순환기 계통에 의한 사망은 10만 명당 116.9명이었고, 그중에서 심장질환으로 인한 사망은 10만 명당 55.6명, 뇌혈관질환으로 인한 사망은 10만 명당 48.0명임
- 비정상적인 혈액의 순환으로 발병되는 심혈관계 질환인 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 등은 고령화 사회의 성인병 중에서도 가장 흔한 병이며 그 환자수도 급격하게 증가하고 있음. 그러나 이에 대한 근원적인 치료의약은 아직 개발되지 않고 있어 그 근원이라 할 수 있는 혈행개선의 예방책과 개선책의 마련이 시급함

1) 혈행(血行, blood circulation)

가) 혈액은 신체의 각 조직으로 산소와 영양분을 공급하고, 세포에서 만들어낸 노폐물을 제거해 주며, 우리 몸에 필요한 호르몬을 운반하고, 외부 유해물질로부터 세포를 방어하며, 적당한 체온을 유지시켜주고, 지혈작용을 하는 등 신체내의 항상성을 유지시켜주는 역할을 함. 따라서 원활한 혈액의 흐름은 신체기능을 유지하는데 매우 중요함. 혈행의 장애가 나타나면 전신피로, 브레인포그(brain fog)¹⁾ 등 전신에 영향을 미치게 됨



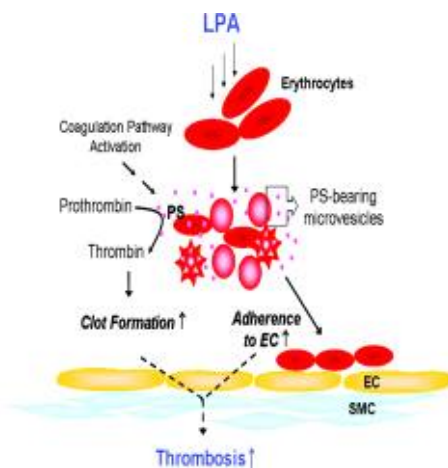
[그림 3] 건강한 혈관 vs 건강하지 못한 혈관

2) 혈행 장애의 원인 및 기전

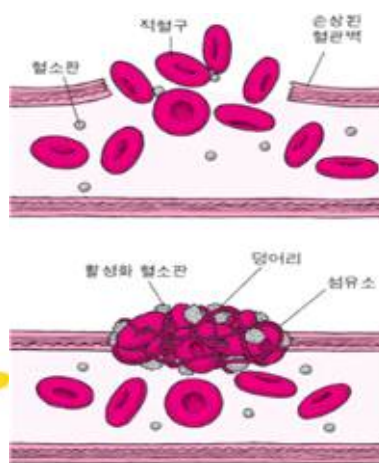
1) 브레인 포그(brain fog) : 혼란, 건망증, 집중력 및 정신적 명료성 저하의 느낌

가) 혈행장애의 주 원인은 적혈구의 변형능력 저하, 과도한 혈액응고 반응 및 혈전생성, 내피 세포의 기능이상, 혈관 탄력성 저하가 있으며, 관련 기전은 다음과 같음

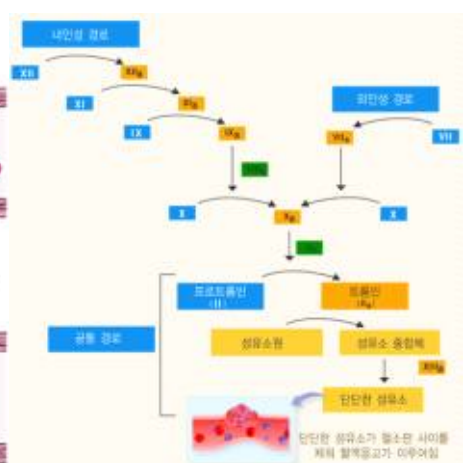
혈행장애 주원인	관련 기전
적혈구의 변형능력 저하	<ul style="list-style-type: none"> 단백질 또는 지방이 산화되거나 세포막의 유동성이 변화되는 경우, 적혈구의 변형력이 현저히 감소하여 혈액 흐름이 느려지거나 전단응력의 발생 적혈구가 외부 자극에 의해 손상 및 영향을 받게 되면 이와 같은 적혈구의 비대칭 구조가 파괴되어 포스파티딜세린(Phosphatidylserine, PS)이 밖으로 노출
과도한 혈액응고 반응 및 혈전생성	<ul style="list-style-type: none"> 혈소판의 점착성과 응집성이 과도하게 일어날 경우 혈관의 지름이 좁아져 혈액의 흐름 방해 혈소판 활성화 시 여러 가지 혈관조절인자들(serotonin, TXA₂, platelet activating factor 등)이 유리되어 혈관을 수축함
내피세포의 기능 이상	<ul style="list-style-type: none"> 염증성 자극(예를 들어 산화 스트레스, 염증성 사이토카인, 병원성 물질에의 노출 등)이 지속될 경우 내피세포가 과도하게 활성화되거나 활성화 상태가 만성적으로 지속되면서, 내피 기능이상 초래함 염증성 자극이 증폭되면서 내피세포로부터 von Willebrand factor뿐만 아니라 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin과 같은 수용성 부착 분자(soluble adhesion molecule)의 분비가 과도하게 증가 손상된 부위로 산화된 콜레스테롤이 쌓여 플라크를 형성하면서 혈관 내 벽이 부풀어 오르고, 결국 혈관이 좁아져 혈행 장애 발생
혈관 탄력성 저하	<ul style="list-style-type: none"> 혈관 벽에 반복적인 혈관 수축/이완으로 인한 장력 (shear force)과 탄성 성질(elastic recoil)에 의해 중심 혈관 벽의 경직도 (stiffness) 증가 노화로 인한 엘라스틴 (elastin)의 분절과 감소, 혈관 벽 내 콜라겐(collagen)의 증가, 혈중 크레아티닌 (creatinine)과 노르에피네프린(norepinephrine)의 증가, 평활근 세포의 베타수용체(beta receptor) 긴장도의 감소, NO의 분비 감소, 엔도텔린(endothelin)의 분비 증가



[그림 4] 적혈구 변형 저하



[그림 5] 혈액응고



[그림 6] 혈액응고기전

나) 혈행장애가 발생하는 혈관의 종류에 따라 동맥순환장애와 정맥순환장애로 분류할 수 있음

혈행장애	원인	증상
동맥 순환장애	<ul style="list-style-type: none"> 동맥벽 내에 콜레스테롤과 같은 지질 축적, 심장 기능 저하 	<ul style="list-style-type: none"> 통증과 마비 증상 손, 발 등 말초 부위의 혈액순환이 원활하지 않으면 저림 증상이나 냉증 발생 심장을 지나는 관상동맥이나 뇌동맥이 좁아지면 협심증이나 뇌경색 발생
정맥 순환장애	<ul style="list-style-type: none"> 정맥 탄력 감소로 인한 혈관이 확장 및 정맥 내의 판막 약화 	<ul style="list-style-type: none"> 다리부종(경련, 감각 이상 발생) 하지궤양

다) 주요 기전에 따라 아래 표와 같이 세부적으로 분류될 수 있음

분류	세부 분류	주요 작용기전 및 효능	대표 성분
동맥 순환 장애	동맥경화제용제	지질대사를 개선하여 동맥경화에 의한 혈행장애 개선	비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 홍화유, 콩기름불검화물
	혈행개선제	말초동맥의 혈행개선으로 산혈성 과행증 치료, 손발저림, 수종내증 등의 증상 개선	은행엽엑스, 마늘유, 비타민 E, 비타민 A, 셀레늄, 서양산사엑스, 멜리사엽엑스, 감마오리자놀
	항혈소판제	혈소판 응집 물질의 형성을 억제하여 심근경색, 일과성 허혈발작 등의 예방 또는 재발 방지	아스피린
정맥 순환 장애	혈관보강제	모세혈관 강화로 하지부종 개선	디오스민, 미세정제 플라보노이드 분획물
	정맥혈액순환제	정맥의 탄력성 증가 및 투과성 정상화를 통해 정맥순환장애에 의한 하지부종, 통증 등 치료	포도엿엑스, 센텔라아시아티카추출물
기타		심근의 에너지 대사를 개선하여 수축력 및 심근대사를 회복, 허혈성 심질환(협심증, 심근경색)에 의한 심근 대사장애 개선	L-카르티닌

3) 천연물 소재 혈행개선제제

가) 혈행개선제는 주로 말초동맥의 혈행을 개선하여 손발저림, 수족냉증 등의 증상을 개선함. 단일제로 쓰이는 경우도 있으나, 주로 다양한 작용기전의 복합성분 제제가 많음

혈행개선제제	주요성분	특징
은행엽엑스	flavone glycosides와 terpe-noids	<ul style="list-style-type: none"> 혈소판 응집 억제작용으로 혈전 생성을 방지하여 관상동맥 질환 및 심장마비 등을 억제하고, 플라보노이드의 강력한 유해 산소 억제효과로 심장, 혈관, 뇌 등에서 유해산소에 의한 DNA 및 세포 손상을 방지 심혈관계에 대한 항경련작용 및 진정효과를 가지며, 신경계에 대한 부활작용 인슐린의 소비를 감소시켜 당뇨병성 혈관장애의 치료에도 사용함 혈전증으로부터 회복된 환자에서 혈압을 저하시키고 말초혈관을 확장시키며, 뇌혈액 공급장애 환자에서 결막의 미세혈액순환을 촉진시키는 것으로 알려져 있음
마늘유	아조엔(ajoene), 유기텔루륨(tellurium) 화합물, 메틸알릴트리설파이드(methyl allyl trisulfide)등	<ul style="list-style-type: none"> 혈소판에 존재하는 피브리노겐 수용체를 저해하여 강한 항트롬빈 효과 유기텔루륨 화합물은 콜레스테롤 합성에 관여하는 최종 효소인 스쿠알렌 에폭시다제(squalene epoxidase)를 억제하여 콜레스테롤을 저하 메틸알릴트리설파이드는 혈압저하 효과를 나타냄. 뿐만 아니라, 마늘유는 동맥에서 프로스타글란딘의 합성을 억제하여 혈소판 응집능을 저해하고, 콜레스테롤의 배설을 촉진시켜 콜레스테롤로 인한 동맥경화를 방지
서양산사	프로안토시아닌(proanthocyanidin) 등과 같은 플라보노이드	<ul style="list-style-type: none"> 초혈관의 저항을 낮춰줌으로써 본태성이든 속발성이든 고혈압을 내리고 혈행을 개선 노령이나 급성 감염증으로 심근이 쇠약해질 때 심근 강화제로 사용되며 협심증, 심장 판막장애, 심계항진 등을 개선에 사용함 관상동맥혈관을 이완시켜 말초저항을 감소시키고 관상동맥 혈류량을 증가시키며, 심기능 부전에도 사용
셀레늄		<ul style="list-style-type: none"> 프로스타글란딘이나 류코트리엔(leukotriene)의 합성에 영향을 미치고, 글루타치온 과산화효소(glutathione peroxidase)의 구성성분 수소 및 지질의 과산화를 감소시켜 혈소판응집을
멜리사엽엑스		<ul style="list-style-type: none"> 혈액순환 증가, 임파환류 개선, 혈관투과성 개선, 조직 교질 삼투압 상승 억제, 염증부위의 대사기능 항진작용 마늘유, 은행엽, 서양산사자의 복합제 사용함
감마오리자놀		<ul style="list-style-type: none"> 콜레스테롤의 흡수를 감소시켜 콜레스테롤 수치를 낮추고, 항산화작용 및 혈소판 응집 억제효과 토리잘골드연질캡슐, 새로콤연질캡슐 등과 같이 주로 항산화 비타민류나 혈행개선 효과가 있는 성분들과의 복합제로 말초 혈행 장애에 의한 손 발저림 및 수족냉증 등에 사용

나. 연구의 필요성

- 우리나라는 현재 고령사회에 접어든 상태이며 향후 2026년에는 초고령화 사회에 도달할 것으로 보임. 이러한 급속 고령화에 따라 만성질환이 급속하게 증가하고 있어 관련 질환 예방을 위한 해결책이 요구될 것으로 예상됨
- 향후 고령화의 지속으로 초고령화 사회 도달 시 정부의 예방 의학 정책 등에 따라 혈행 개선 관련 제품시장 또한 지속적으로 성장할 것으로 분석되어 이 분야에 대한 연구 및 제품 개발이 요구되고 있음
- 혈행 장애로 발병하는 심장 순환기 질환은 한번 발병하면 근본적인 치료가 어려우므로 예방의학적 측면이 크게 요구되고 있고, 이에 따라 건강한 식습관과 더불어 보다 안전하고 쉽게 접할 수 있는 건강보조 및 기능성 식품의 역할이 새롭게 인식되고 있음
- 혈행개선 효과가 알려져 있는 소재는 너무 고가이거나(홍삼), 국내에서 구입이 용이하지 않은 실정(은행잎 추출물)이어서 가격이 적절하고 생산 및 유통이 활발하여 식품으로 개발되었을 때 대량생산 및 고부가가치를 창출할 수 있는 새로운 천연소재가 필요함
- 현대인의 건강 의식수준 향상으로 인해 화학적 합성물보다는 천연물의 유용물질을 선호하는 추세이며, 이에 따라 천연식물에서 유래한 기능성 식품의 연구가 증가되고 있음. 하지만 천연식물의 기능성에 대한 확실한 과학적 근거 및 그 작용기전은 명확히 규명되지 않고 있으며, 인체적용시험에 대한 연구는 현저히 부족한 실정임
- 치료효과와 부작용의 판별이 어려워 무분별하게 사용될 우려가 있으므로 체계적인 연구 수행이 필요하며, 천연물 소재의 표준화를 위해 품질관리에 대한 개념을 도입함으로써 품질 저하로 인한 부작용 또는 기능성이 떨어지는 등의 문제를 해결해야 함

- 국내에서 재배되고 있는 천연물 소재(포도잎, 고구마 지상부, 칩잎 등)를 후보소재로 활용하여 농생명 자원의 부가가치를 높일 수 있는 핵심기술을 개발하고자 함
 - 혈행개선 효능을 검증하고 기능/지표성분을 표준화하며 안전성 시험 및 인체적용 시험 실시



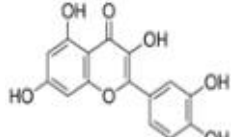
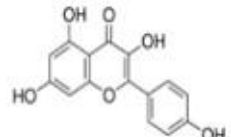
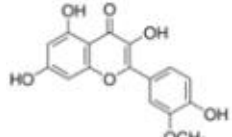
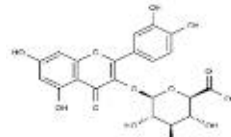
다. 본 연구의 차별성

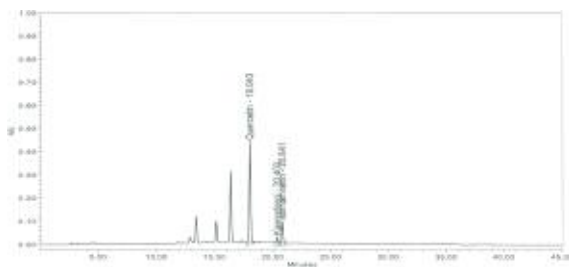
1) 선행연구결과

가) 포도 잎

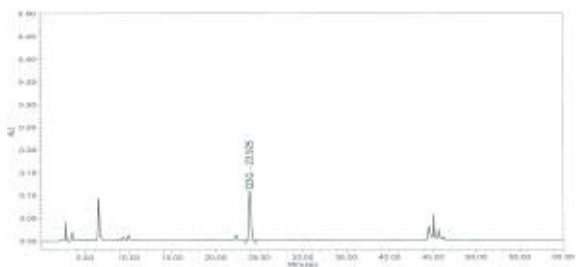
(1) 선행연구에서 포도 잎의 기능성분(또는 지표성분)은 플라보놀배당체(quercetin, kaempferol, isorhamnetin) 및 quercetin-3-O-glucuronide로 선정하고 분석법을 개발한바 있음

[표 10] 포도 잎 추출물 중 플라보놀배당체

일반명	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	quercetin-3-O-glucuronide
분자량	302.24	286.24	316.26	478.37
분자식	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
구조				



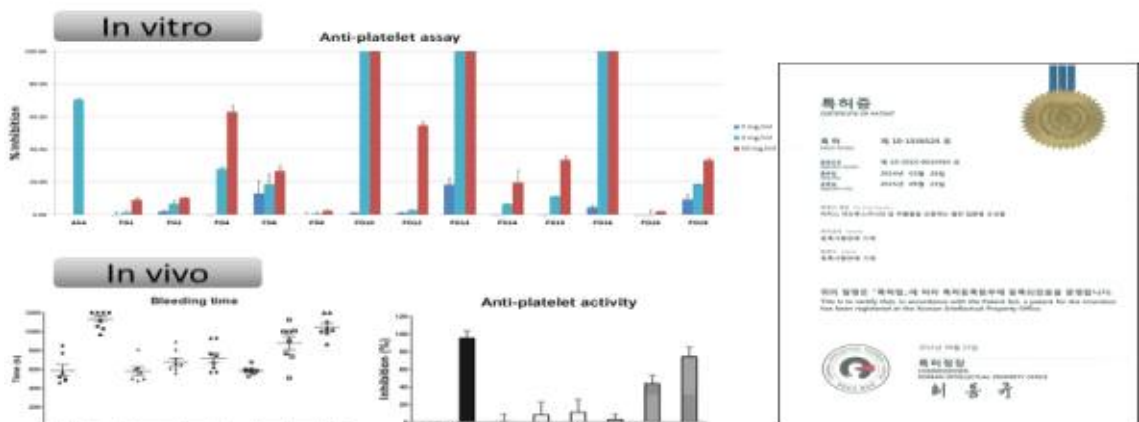
[Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin]



[Quercetin-3-O-glucuronide]

[그림 7] 포도잎 기능성분 크로마토그램

(2) 포도 잎은 물 또는 주정 추출(PD6)만으로는 혈행개선 효능이 높지 않지만 특화된 추출방법(PD10)을 적용할 경우 혈행개선 효능이 증가함을 *in-vitro*와 *in-vivo* 실험으로 확인하였으며, 특허등록(등록번호 101556524)을 완료하였음



[그림 8] 포도잎 선행연구 성과물

나) 칩덩굴

- (1) 칩덩굴은 왕성한 번식과 빠른 성장으로 자연 미관을 저해하고 조림목 성장을 방해하며 가로수 등에 피해를 주고 있어 전국 시군구에서는 매년 5-6월과 9-10월 사이 집중적으로 칩덩굴 제거를 추진하고 있음
- (2) 2007년부터 약품을 사용한 제거를 일체 금지하여 인력으로만 제거해왔으며, 전라남도의 경우 연간 3천명을 투입하여 칩덩굴 제거 작업을 하고 있음
- (3) 칩뿌리는 갈근, 칩꽃은 갈화라 하여 한약재로 널리 사용되고 있으나 칩덩굴이나 칩잎과 같은 부산물은 활용가치가 없었음



전남도는 칩덩굴 제거를 위해 3월 말까지 시군별 전문작업단을 구성, 새순이 돋는 3월부터 올리브 잎법과 진황경 약제를 이용한 화학적 방법을 함께 추진한다고 4일 밝혔다.

칩덩굴 제거에는 연간 3000여명을 투입해 5-6월과 9-10월 사이에 집중적으로 추진한다.

[그림 9] 칩덩굴 제거작업(뉴스1, '18.3.4.)

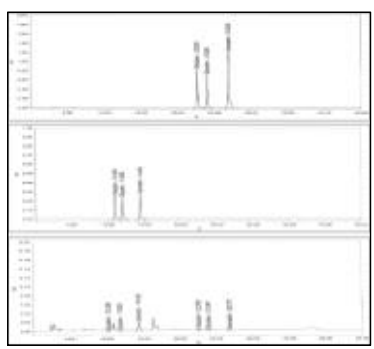
- (4) 칩덩굴 제거작업 후 부산물로 버려지는 칩잎(갈엽)이나 칩덩굴(갈만)을 활용할 방안을 마련하여 부가가치를 창출하는 것이 필요함
- (5) 버려지는 칩잎을 활용하기 위하여 식약처에 칩잎을 식품원료로 등재시키고 숙취해소 음료를 개발한바 있으며, 칩덩굴을 활용하기 위한 연구로 갈만 미백화장품을 개발하여 미백기능성 화장품으로 허가를 받았음
- (6) 칩잎은 혈소판응집 억제 효능평가에서도 특화된 추출방법을 적용 시 효능이 증대되어 혈행개선 식의약소재로서 개발가능성이 있음을 확인하였음



[칩잎 식품원료 등재]



[숙취해소 음료 개발]



[칩잎 중 이소플라본 배당체 및 비배당체]

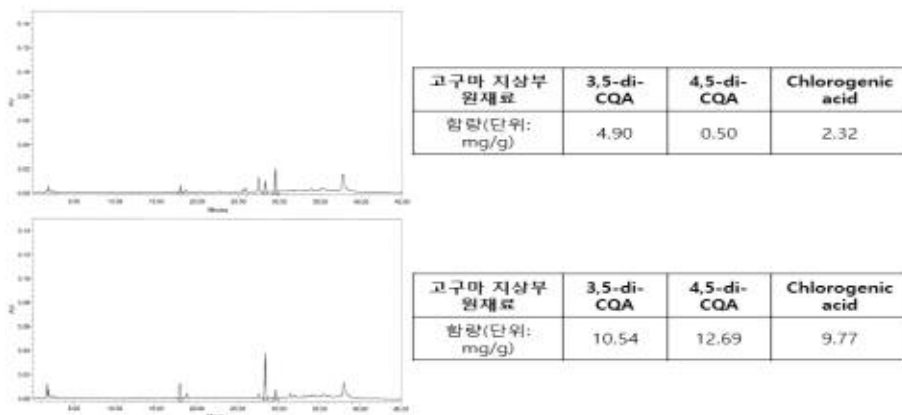


[첨일 식품원료 등재 증빙자료]

[그림 10] 첨일 선행연구 성과물

다) 고구마 지상부

- (1) 고구마는 국내에서는 지하부(괴근)를 주로 사용하고 있으나 동남아시아나 아프리카 등에서는 잎을 채소로 더 많이 이용하고 있음
- (2) 2016년 고구마 생산량은 34만 1천 톤 이었으나 지상부는 일부 채소로 식용하거나 사료로 사용되고 대부분은 폐기되고 있는 실정임
- (3) 고구마 잎에는 단백질뿐만 아니라 주로 비타민 A의 전구체인 beta-carotene과 폴리페놀, 페놀화합물인 chlorogenic acid가 다량 존재하는 것으로 알려져 있음
- (4) 고구마 지상부 또한 혈행개선 선행연구 결과 혈소판응집 억제 효능이 있는 것으로 확인되었으며, 지상부 원재료와 추출물에서 지표성분 분석법을 설정한바 있음

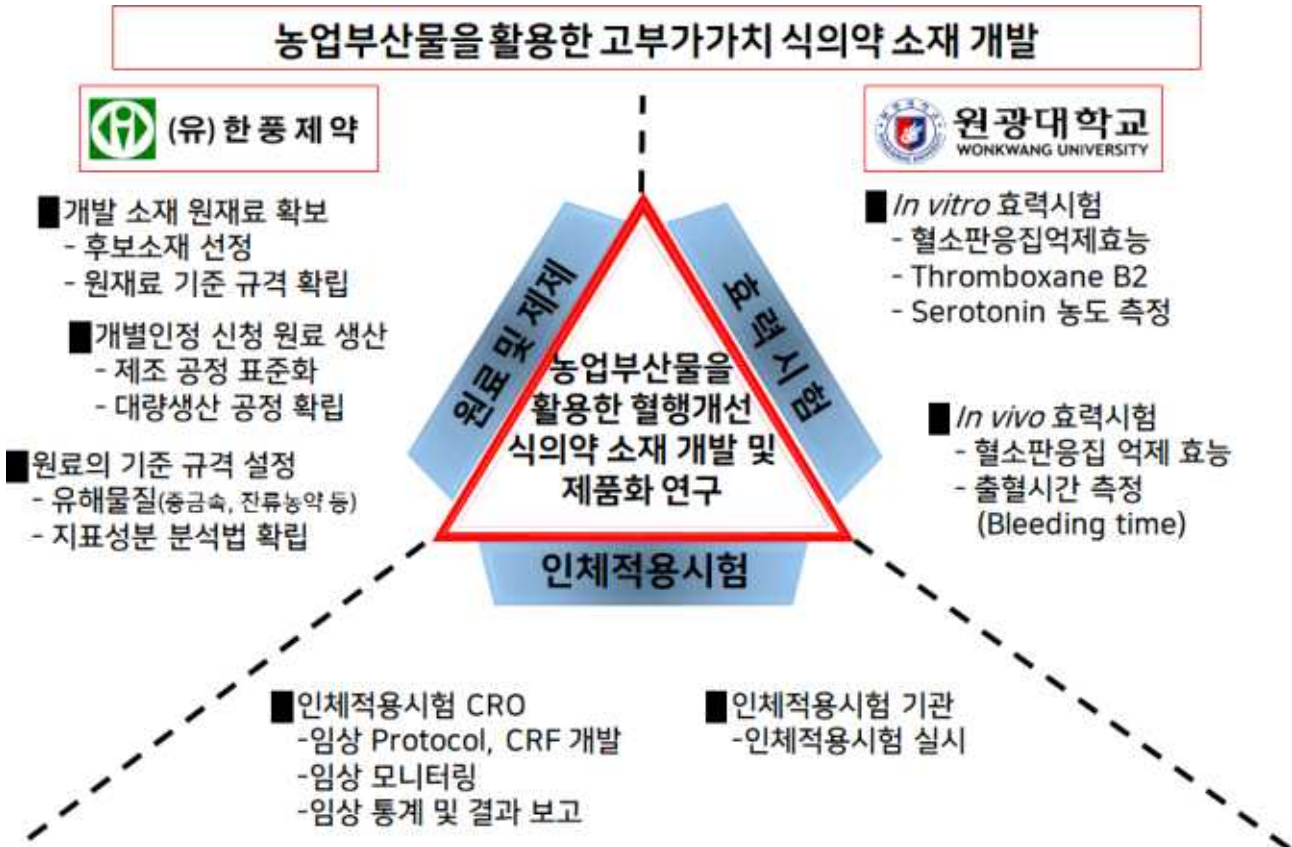


[그림 11] 고구마 선행연구 성과물

1-3. 연구개발 범위

가. 최종목표

- 농업부산물을 활용한 고부가가치 식의약 소재 개발



나. 세부목표

- 농업부산물의 혈행개선 전임상 효능 검증을 통한 식의약 소재 도출
- 효능이 확인된 소재의 제조공정 및 기준 규격 확립
- 효능기전 연구 및 인체적용시험 실시
- 포도 잎 후보소재의 건강기능식품 개별인정 원료 신청
- 신규 소재로서 칩잎 및 고구마지상부의 혈행개선 효능 검증
- 개발 소재의 지식재산권 확보 및 논문 투고

2-2. 연차별 개발목표 및 내용

구분 (연도)	연구기관	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차년도 (2018)	주관 연구기관 (유)한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> · 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화 · 안전성 자료 확보 · 인체적용시험 계획 	<ul style="list-style-type: none"> · 원재료의 기준 규격 설정 및 제조공정 확립 · 효능시험용 샘플 제조 및 제공 · GLP기관에서의 단회투여 독성시험 수행 · CRO 기관 선정 및 인체적용 시험 계획서 개발
	1협동 연구기관 원광대학교	<ul style="list-style-type: none"> · 고지혈증 모델에서 포도 잎 추출물 및 지표성분의 혈행개선 효능시험 	<ul style="list-style-type: none"> · 고지방식으로 유도된 고지혈증 동물모델에서 용량의존성 시험
2차년도 (2019)	주관 연구기관 (유)한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎 추출물의 제조공정 확립 및 기준·규격 설정 · 안정성 자료 확보 · 공인분석기관 성적서 확보 · 포도 잎 추출물의 인체적용시험 진입 	<ul style="list-style-type: none"> · 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조 · 공인분석기관 분석의뢰 · 신청원료 및 시험식품의 장기보존시험 24개월 실시 · 인체적용시험 IRB 심의 통과 · 혈행개선 효능시험용 신규 소재 추출물 제조 및 제공
	1협동 연구기관 원광대학교	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎과 기허가 제품간의 효능 비교 시험 및 기전 연구 · 신규소재 혈행개선 효능평가 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎의 혈행개선 관련 기전연구 · 포도 잎 추출물과 기허가 제품과의 효능 비교 평가 · 신규 소재의 혈행개선 효능평가(in vitro)
3차년도 (2020)	주관 연구기관 (유)한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎 추출물의 개별인정 신청 · 신규 소재의 기준 규격 설정 	<ul style="list-style-type: none"> · 신청 원료 및 시험식품의 안정성 시험 계속 · 시험방법 밸리데이션 · 인체적용시험 결과보고서 및 개별인정 신청 자료 작성 · 개별인정 원료 신청 · 신규 소재의 기준 규격 설정
	1협동 연구기관 원광대학교	<ul style="list-style-type: none"> · 개별인정 신청 자료 준비 · 신규소재 혈행개선 효능평가 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> · 포도잎 추출물에 대한 전임상 효능 및 기전에 대한 개별인정 신청 자료 작성 · 칩잎, 고구마 지상부의 혈행개선 효능평가(in vivo)

<1차년도>

가. 연구개발 목표



- 1) 주관연구기관(한풍제약)
 - 가) 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화
- 2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)
 - 가) 고지혈증 모델에서 혈행개선 효능시험

나. 개발 내용 및 범위

기관명	목표	개발 내용 및 범위
한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> · 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화 · 안전성 자료 확보 · 인체적용시험 계획 	<ul style="list-style-type: none"> · 원재료의 기준 규격 설정 및 제조공정 확립 · 효능시험용 샘플 제조 및 제공 · GLP기관에서의 단회투여 독성시험 수행 · CRO 기관 선정 및 인체적용 시험 계획서 개발
원광대학교 산학협력단	<ul style="list-style-type: none"> · 고지혈증 모델에서 혈행개선 효능시험 	<ul style="list-style-type: none"> · 고지방식이로 유도된 고지혈증 동물모델에서 용량 의존성 시험

1) 주관연구기관(한풍제약)

가) 원재료의 기준 규격 설정 및 제조공정 설정

(1) 원료 표준화

(가) 포도 잎 원재료 확보

- ① 포도산지는 전국적으로 분포되어 있으나 주로 아산, 함안, 상주, 김천, 무안, 임실, 영동, 양양, 홍천, 안성 등이 지역 대표 특산물로 생산되고 있음
- ② 2018년 포도 재배면적은 1만 2,925ha로 추정되며 지역별 재배 면적은 [표 27]과 같으며 영남지방이 국내 포도 재배면적의 대부분을 차지하고 있음

[표 11] 국내 지역별 포도 재배면적 (단위 : ha)

구 분	경기·강원	충청	호남	영남	계
2018년	2,199	2,193	1,264	7,269	12,925

[자료 : 농업관측본부 4월 27일 기준 표본농가 및 모니터 조사치]

- ③ 포도 출하 시기는 지역에 따라 상이하나 크게 4~5월, 6월 7~9월로 순차적으로 출하되고 있음
- ④ 포도 농사는 가지치기이후 포도 알이 크기 전에 육손제거-순치기-지네발제거 작업이 지속적으로 이루어져야 하며, 이 때 농협조합 또는 포도영농조합과의 사전 협의를 통해 포도 잎을 수거하여 원료 확보

(나) 포도 잎 원료의 기준 규격 설정

- ① 지역별 포도 잎 원료 확보 및 비교 분석
- ② 지표성분 분석을 통한 원료의 함량 기준 설정

[표 12] 포도 잎 지표성분

원료명	지표성분(또는 기능성분)
포도 잎	flavonol glycoside(querletin, kaempferol, isorhamnetin), querletin-3-O-glucuronide

- ③ 시험 항목은 식품공전을 참고하여 선정
- ④ 중금속(납, 카드뮴, 수은, 비소) 및 잔류농약 분석을 실시하고 식품규격에 적합한 허용치 내에서 규격을 설정함
- ⑤ 이화학적 기준 설정
 - ㉞ 성장, 미생물(일반세균, 대장균 등), 이물, 수분 등은 식품공전의 시험법을 적용하여 기준을 설정함

(다) 포도 잎 추출물 제조공정 설정 연구

- ① 효능을 극대화 할 수 있는 최적의 비율 및 추출용매를 결정하여 추출조건 설정
- ② 조건 설정 실험은 추출온도, 추출용매(물, 25~50% 주정 등), 추출시간(1~24h), 추출횟수(1~3차), 원료 분쇄도 등의 다양한 조건을 실험 항목으로 설정
- ③ 상기 열거한 실험 항목에 대한 결과 중 가장 효과적인 추출법으로 판단된 추출 공정을 선정하고, 그에 따른 추출 공정 조건을 변화시키면서 최적화 함

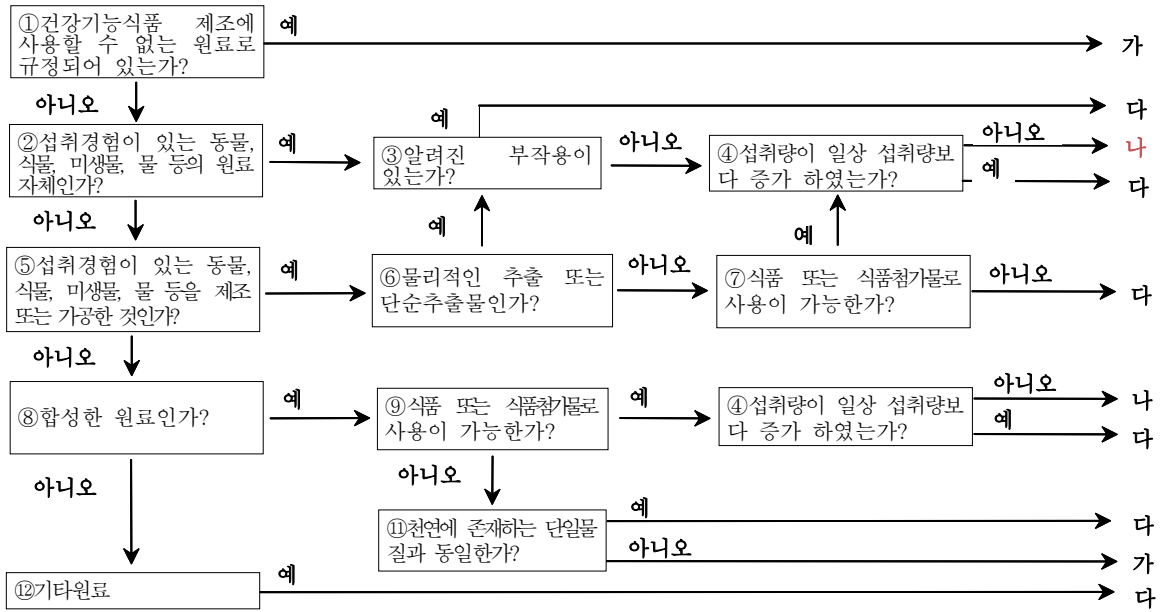
(라) 개발 소재의 경제성 평가

- ① 농업부산물을 활용한 식의약 소재 개발에 앞서 추출 공정의 최적화를 통해 가격 경쟁력이 있는 제품을 만드는 것 또한 중요함
- ② 임가공비의 차이는 주정 함량 또는 용매 비율에 따라 큰 차이가 있으므로 수율 및 지표성분의 함량 그리고 주정 함량을 고려하여 예산 단가 산출
- ③ 제품화를 위한 개별인정신청 후보 원료인 포도 잎의 생산(제조) 단가와 기존 시중에서 유통되고 있는 혈행개선 천연물(은행잎 등)과의 비교를 통하여 경제성 평가 수행

(2) 안전성 자료 확보

(가) 포도 잎 추출물의 안전성 평가

- ① 본 과제에 사용될 예정인 포도 잎의 사용부위는 식용 가능한 식품 원료로 등재 되어 있어 안전성이 확보된 원료임
- ② 고문헌 및 데이터베이스 검색을 통해 식경험 또는 사용근거 자료를 수집하여 안전성평가 자료 확보
- ③ GLP 기관에서 단회투여 독성시험을 실시
- ④ [그림 22]의 ‘건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 (제2016-141호)’ 중 [별표 3. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도]에 따르면 ‘나’ 에 해당됨(독성시험자료 면제)
- ⑤ 이에 추출물의 안전성을 검증하기 위해 섭취근거 자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보자료, 섭취량 평가자료 등을 확보



제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다
건강기능식품으로 신청할 수 없음	✓		
섭취 근거 자료 ²⁾		✓	✓
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 ³⁾		✓	✓
섭취량평가자료 ⁴⁾		✓	✓
인체적용시험자료 ⁵⁾			✓
독성시험자료 ⁶⁾			✓

[그림 12] 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도
(제14조제7호나목 관련)

(3) CRO 기관 선정 및 인체적용시험 계획서 개발

(가) 바우처 참여기관인 임상시험수탁기관(CRO; Contract Research Organization)은 개발 단계에서 주관기관의 의뢰를 받아 인체적용시험 진행의 설계, 컨설팅, 모니터링, 데이터 관리, 허가 등의 업무를 대행

(나) CRO 기관은 혈행개선 건강기능식품 개발경험이 있는 기관으로 선정

(다) 인체적용시험 계획서 및 ICF 작성 시 식품의약품안전처 사전상담 실시
: 전임상 및 인체적용시험 효능평가 지표 점검 및 기준규격 설정에 대한 검토

(라) CRO 기관의 업무 범위는 [표 30]과 같으며, 연구 착수 시 인체적용시험기간 및

- 2) 섭취경험이 있음을 증명하는 근거자료로서 「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」 자료; 전통적 사용이 기록되어 있는 과학적 자료 또는 역사적 사용 기록; 국외 정부기관의 인정 자료 등
- 3) 각종 문헌 또는 데이터베이스에서 원료 또는 성분에 대한 독성, 안전성 또는 다른 성분(영양성분, 의약품 성분 등)과의 상호작용에 관한 자료를 검색한 자료
- 4) 국민영양조사결과, 섭취량 실태조사결과 등을 근거로 평균 섭취량과 제안된 섭취량을 비교·분석한 자료. 단, 식검험이 없는 원료는 제출대상에서 제외
- 5) 원료로 실험된 안전성 및 기능성을 확인한 자료(인체적용시험자료)
- 6) 독성시험자료는 단위투여독성시험(설치류, 비설치류), 90일 반복투여독성자료(설치류), 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)을 기본으로 하며, 원료의 특성에 따라 생식독성, 항원성, 면역독성, 발암성시험을 추가로 시험하여야 함. 단, 기타 안전성 자료로 안전성이 확보되었음을 입증할 수 있는 경우에는 예외 적용 가능함

피험자 수, 프로토콜(연구계획서), 검사 항목 변경 등에 따라 가변적일 수 있음

[표 14] CRO 기관 업무 범위

I. Project Management
1.1 Project Management
1.1.1 인체시험 전반 진도 및 수행 관리
1.1.2 시험기관 & CRC 관리
1.2 Regular Meeting
1.2.1 계획서 수립 협의
1.2.2 계획서 발표 회의(연구자 전체 회의)
1.2.3 수시 회의
1.2.4 종료 회의
II. Project Setup
2.1 Strategy for Design
2.1.1.자료검색/조사/정리
2.1.2 전략 수립/인체시험계획 디자인
2.2 Search for site & investigator
2.2.1 연구자 및 연구기관 조사 / 과제 협의
2.2.2 연구비 계산/협의
2.2.3 연구기관 계약업무 대행
2.3 Protocol & CRF Development
2.3.1 연구계획서
2.3.2 샘플 사이즈 산정 및 분석 모델 디자인
2.3.3 IB/시험식품/맹검봉투/무작위배정 지도
2.3.4 증례기록서(CRF) 디자인
2.3.5 동의서 등 각종 양식
2.3.6 각종 study material 제작
III. Regulatory Affairs
3.1 IRB submission
3.1.1 초심의용/수정/변경 서류 제작/제출
3.1.2 시험종료 보고
3.1.3 지속심의/연차심의/중간보고 심의
IV. Initiation Activities
4.1 시험기관/CRC 교육
4.2 인체시험 개시 회의/보고서 및 개시 방문/보고서
V. Study Stage
5.1 모니터링 방문 및 유선 모니터링(뉴스레터)
5.2 환자증례기록 내용 검증(Source Documents Verification)
5.3 모니터링 방문 보고서
5.4 CRF 배포/관리/회수
5.5 종료 방문(연구문서 점검)
5.6 시험물질 관리/수불 (약국) 모니터링
VI. Data Management
6.1 DB 디자인 및 구축
6.2 데이터 입력, 검증 및 확정
6.3 데이터 인코딩 및 이상반응 코딩
VII. Statistical Analysis
7.1 최종 통계 분석
7.2 통계분석 결과표 작성
VIII. Clinical Study Report
8.1 Table & Figure 제작
8.2 결과 보고서 작성 및 제작 자료 검증
IX. IRB submission of CSR
9.1 시험결과보고서 제작/IRB 제출

2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)

가) 고지혈증 동물모델에서 포도 잎 추출물 및 지표성분의 혈행개선 효능시험

포도 잎 추출물 및 지표성분의 혈행개선 효능을 확인하기 위해 고지방식이로 유도된 고지혈증 동물을 대상으로 효능시험 및 용량의존성 시험 수행

나) 실험방법

(1) 실험동물

고지방식이 공급으로 고지혈증이 유도된 실험동물을 활용하여 포도 잎 추출물이 일반 또는 고지혈증상태에서 혈행개선에 미치는 영향을 분석함

(2) 체중, 지방 조직량, 간 조직 무게 측정

(3) 혈중 중성지방 측정 총 콜레스테롤 량 측정

시험관에 혈청 또는 순차적 농도로 희석한 표준 cholesterol 용액을 20 μ L 넣고 kit에 포함된 효소시액을 3 mL 첨가한 후 교반하고 37° C에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용하여 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정함. 혈청 total cholesterol의 농도는 표준 cholesterol의 표준곡선을 이용하여 계산함

(4) Serotonin 분비 측정

분리된 혈소판에 시험물질과 대조군 DHA (5, 10 μ M) 농도로 3 7°C 10분 처리 후 collagen 5 μ g/ml 37°C 3분 처리 후 5 mM EDTA 넣고 반응을 종결시킴. serotonin ELISA kit (abcam #ab133053, cambridge, UK)를 사용하여 serotonin 양을 정량함

(5) Thromboxane B2 측정

serotonin 분석 방법과 같이 Thromboxane B2 ELISA kit (Enzolifescience #ADI-900-002, Lausen, Switzerland)를 사용하여 실험방법에 따라 TXB2양을 정량함

(6) Prothrombin time(PT)

외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 방법으로, 혈장 70 μ l와 다양한 농도의 시료 10 μ l를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C 에서 3분간 가온 후, 130 μ l의 PT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(7) Activated partial thromboplastin time(aPTT)

내인성 경로 에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 μ l와 다양한 농도의 마가자 추출물 및 분획물 시료 10 μ l를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C 에서 3분 간 가온 후, 65 μ l의 aPTT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 다시 37°C 에서 3분간 반응. 이후 65 μ l CaCl₂(35 mM) 을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(8) 혈전용해능

흡수된 최종소재 및 그 대사물의 생체 내에서 의 혈전용해능을 측정하기 위해 FDPs (fibrin degradation products), D-dimer, fibrinogen을 측정

(9) 피부 출혈시간

측정 당일 오전에 실험동물을 절식시킨 후 ketamine, atropin, xylazine을 혼합주사하여

마취한 후 blade를 이용해 동물의 꼬리를 5 mm 절단하고 미리 37℃ 온도로 맞추어 놓은 saline에 꼬리를 담가 30초 이상 혈액이 흐르지 않는 시간을 최대 30분까지 측정함

<2차년도>

가. 연구개발 목표

1) 주관연구기관(한풍제약)

- 가) 포도 잎 추출물의 제조공정 확립 및 기준·규격 설정
- 나) 공인분석기관 성적서 확보
- 다) 포도 잎 추출물의 인체적용시험 진입
- 라) 안정성 자료 확보

2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)

- 가) 포도 잎의 혈행개선 기전 연구 및 기허가 제품 간의 효능 비교 시험
- 나) 신규 소재의 혈행개선 효능 평가



나. 개발 내용 및 범위

기관명	목표	개발 내용 및 범위
한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎 추출물의 제조공정 확립 및 기준·규격 설정 · 공인분석기관 성적서 확보 · 포도 잎 추출물의 인체적용시험 진입 · 안정성 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> · 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조 · 공인분석기관 분석의뢰 · 신청원료 및 시험식품의 장기보존시험 24개월 실시 · 인체적용시험 IRB 심의 통과 · 혈행개선 효능시험용 신규 소재 추출물 제조 및 제공
원광대학교 산학협력단	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎의 혈행개선 기전 연구 및 기허가 제품 간의 효능 비교 시험 · 신규소재 혈행개선 효능평가 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> · 포도 잎의 혈행개선 관련 기전연구 · 포도 잎 추출물과 기허가 제품과의 효능 비교 평가 · 신규 소재의 혈행개선 효능평가(<i>in vitro</i>)

1) 주관연구기관(한풍제약)

가) 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조

(1) 제조공정 확립

(가) 포도 잎 추출물의 3Lot 제조를 통한 제조공정 확립

- ① 설정된 제조공정에 따라 3 Lot 제조
- ② 제조 공정 중 주요 파라미터에 대한 기록 및 기준 수율 확정

(2) 인체적용시험 용량 설정

전임상 효능평가를 통해 얻어진 유효농도로부터 체표면적환산으로 인체적용농도 (HED; Human Equivalent Dos)를 산출함

(3) 제제학적 검토

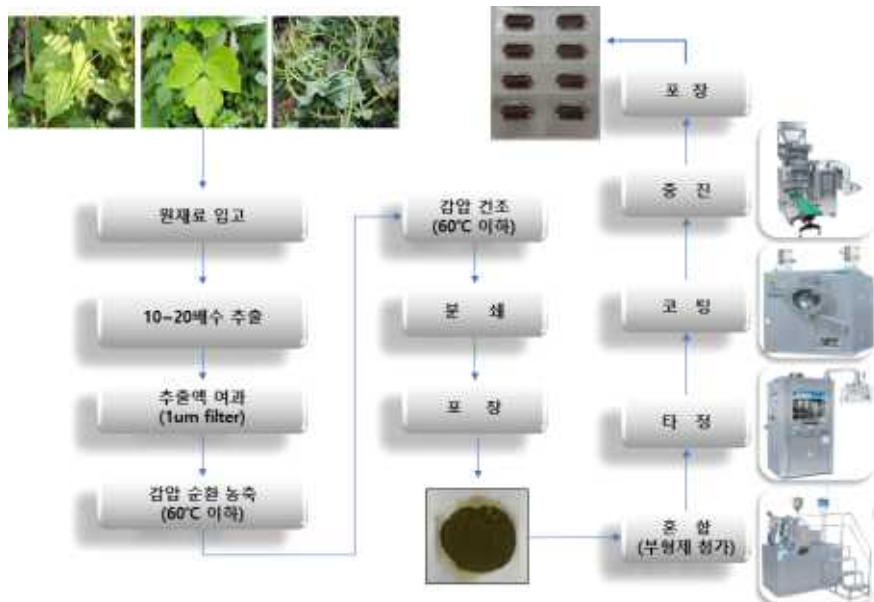
(가) 인체적용시험 시 맹검 유지에 유리한 정제를 기본 제형으로 고려할 것임

(나) 시험식품은 경도, 마손도, 안식각, 수분, 입도, 충전성, 분해, 안정성 등 다양한 요인들을 고려하여 최적 배합비를 선정

(다) 대조식품은 천연물의 특성상 색과 향이 존재하므로 시험식품의 특성을 masking 할 수 있도록 부형제의 배합비를 선정

(4) 시험식품 및 대조식품 제조

(가) 인체적용시험 수행 및 제제의 안정성 시험을 진행 할 수 있는 충분한 양을 제조함



[그림 14] 제조공정도

나) 기준 규격 확립

(1) 공인분석기관 시험법 검토

설정된 지표성분 분석법을 공인분석기관의 시험법 검토를 통해 시험방법 확립

(2) 개별인정 신청 원료의 기준규격 설정 근거 자료 확보

3 Lot. 3회 시험한 실측치의 평균을 기준으로 80~120%로 규격 설정

다) 공인분석기관 시험 성적서 확보

(1) 지표성분 시험법 검토

(2) 영양성분 및 성상

(3) 중금속 : 납, 비소, 카드뮴, 수은

(4) 잔류농약 : 식품의 기준 및 규격에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우 5가지(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)를 분석, 농약의 잔류허용기준이 있는 경우 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목 58종 분석

(5) 대장균군

라) 신규 소재 샘플 제조 및 제공

혈행개선 신규 후보소재인 칩잎과 고구마 지상부의 단일 또는 혼합추출물에 대한 효능실험을 위해 샘플 제조 및 제공

마) 인체적용시험 진입

(1) 인체적용시험자자료집 작성

(가) 총괄요약

(나) 기원, 개발경위, 국내/외 인정 및 사용현황

(다) 원료의 물리화학적 성질에 관한 자료

(라) 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

(마) 기능성 및 그에 관한 자료(*In vitro*, *In vivo* 자료)

(바) 안전성 및 그에 관한 자료

(사) 임상시험용 식품의 제조방법 및 그에 관한자료

(2) 인체적용시험계획서 확립

(가) 이상시험계획서 작성 - 예상 피험자수, 안전성 제외기준, 투약기간, 용량, 용량결정 방법 등 투약계획에 집중하여야 하며, 필수적인 생명징후 모니터링 및 혈액화학 검사 등과 같은 안전성에 중요한 요소들에 대해서 자세히 기술

(나) 식약처 모뎀토의 또는 인체적용시험 계획서 사전검토 실시

(다) CRF 및 ICF 작성

(3) 인체적용시험 사이트 선정 및 연구자 미팅

(4) IRB 심의 후 인체적용시험 실시

바) 포도 잎 추출물 및 시험식품의 안정성 시험

- (1) 개별인정신청을 위한 자료로써 포도 잎 추출물 3Lot. 이상에 대해 안정성 시험 24개월을 실시함으로써 시험결과를 안정성 근거자료로 확보
- (2) 인체적용시험을 위한 시험식품에 대해 3Lot. 이상에 대한 안정성 시험 24개월(장기 보존) 진행 예정

[표 15] 안정성 시험 주기(안)

구 분 \ 일 정	2019년				2020년				2021년			
	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
최초시험 ('19.07)												
3개월 ('19.10)												
6개월 ('20.01)												
9개월 ('20.04)												
12개월 ('20.08)												
18개월 ('21.01)												
24개월 ('21.08)												

(3) 안정성 시험 항목 및 조건

(가) 포도 잎 추출물

- ① 포장재 : 알루미늄 포일(Al-Foil)
- ② 온도/습도 : 25 °C ± 2 / RH 60 % ± 5
- ③ 시험 간격(개월) : 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
- ④ 안정성 시험 항목
 - ㉠ 0, 24개월 : 성장, 납, 비소, 카드뮴, 수은, 함량, 수분, 잔류농약, 대장균 시험
 - ㉡ 3, 6, 9, 12, 18, 24개월 : 성장, 함량, 수분, 대장균 시험
 - ㉢ 시험항목 생략 이유 : 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은) 및 잔류농약은 장기보존 조건에서 외관, 기능적 시험의 변화 관찰에 영향을 미치지 않는 항목으로 판단되어 장기보존 0개월, 24개월만 시행

(나) 인체적용시험용 시험식품

- ① 포장재 : PE병
- ② 온도/습도 : 25 °C ± 2 / RH 60 % ± 5
- ③ 시험 간격(개월) : 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
- ④ 안정성 시험 항목
 - ㉠ 0, 24개월 : 성장, 질량편차, 봉해, 납, 비소, 카드뮴, 수은, 함량, 대장균 시험
 - ㉡ 3, 6, 9, 12, 18, 24개월 : 성장, 질량편차, 봉해, 함량, 대장균 시험
 - ㉢ 시험항목 생략 이유 : 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은)은 장기보존 조건에서 외관, 기능적 시험의 변화 관찰에 영향을 미치지 않는 항목으로 판단되어 장기보존

0개월, 24개월만 시행

2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)

(1) 포도 잎의 혈행개선 기전 연구 및 기허가 제품 간의 효능 비교 시험

개별인정신청 후보 원료인 포도 잎 추출물이 혈행개선에 미치는 영향에 대한 기전을 규명하고, 나아가 기존 시중에서 유통되고 있는 혈행개선 기허가 제품(은행잎 등)과의 효능 비교 시험을 통해 원료의 경제성 평가 지표 및 효능검증 자료를 확보하고자 함. 인체적용시험을 위한 시험식품과 포도 잎 추출물을 대상으로 아래 실험방법에 따라 효능비교 시험 및 기전연구 수행

(2) 신규 소재(쑤잎, 고구마지상부)의 효능평가 (*in vitro*)

기존 혈행개선 기능성 원료(은행잎 등)들은 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이며, 수입에 의한 높은 관세, 유통비 등으로 높은 가격대에 판매되고 있음. 이에 따라 국내 자생 천연물의 혈행개선 신규 소재발굴이 필요함. 본 연구에서 최종 선정된 쑤잎, 고구마지상부의 혈행개선 효능평가를 통해 혈행개선 기능성 소재로서의 가능성을 검증하고자 함. 1차년도에 수행된 쑤잎과 고구마지상부의 단일 추출물 및 복합물을 대상으로 아래 실험방법에 따라 *in vitro* 효능평가 실험을 수행

(3) 실험방법

(가) Washed platelets의 분리

실험동물은 male Sprague-Dawley rats를 사용예정임, 사육장의 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 유지하였고 충분한 물과 사료를 공급하여 사육함. 체중이 300~400g이 되는 것을 줄레틸과 럼폰으로 마취시킨 후 항응고제로 0.15 M sodium citrate (vacutainer, Becton dickinson, franklin Lakes, NJ, USA)를 혈액과 1:9(v/v)의 비율이 복대동맥에서 18G 주사기를 이용하여 혈액을 채취함. 200g에서 15분간 원심 분리하여 상층액의 platelet rich plasma (PRP) 얻고 다시 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻어 실험에 사용함

(나) Serotonin 분비 측정

분리된 혈소판에 시험물질과 대조군 DHA (5, 10 μM) 농도로 37°C 10분 처리 후 collagen 5 $\mu\text{g/ml}$ 37°C 3분 처리 후 5 mM EDTA 넣고 반응을 종결시킴. serotonin ELISA kit (abcam #ab133053, cambridge, UK)를 사용하여 serotonin 양을 정량함

(다) Thromboxane B2 측정

serotonin 분석 방법과 같이 Thromboxane B2 ELISA kit (Enzolifescience #ADI-900-002, Lausen, Switzerland)를 사용하여 실험방법에 따라 TXB2양을 정량함

(라) Prothrombin time(PT)

외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 방법으로, 혈장 70 μ l와 다양한 농도의 시료 10 μ l를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 μ l의 PT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(마) Activated partial thromboplastin time(aPTT)

내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정[3]의 경우에는, 표준혈장 70 μ l와 다양한 농도의 마가자 추출물 및 분획물 시료 10 μ l를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 μ l의 aPTT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응시킴. 이후 65 μ l CaCl₂(35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(바) 혈소판 응집 측정

실험물질을 녹여서 Chrono-Log aggregometer model 700-2(Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 혈소판을 stir bars (Chrono-Log Co.,USA)를 넣은 plastic cuvettes (Chrono-Log Co., USA)에 시험물질을 넣고 37°C에서 1분 30 초정도 base line 확인 후 혈소판 응집 촉진물질인 collagen 5 μ g/ml을 가하여 6분간 반응시켜 응집을 유도하여 대조군에 대한 응집억제 정도를 비교

<3차년도>

가. 연구개발 목표

- 1) 주관연구기관(한풍제약)
 - 가) 포도잎 추출물의 개별인정원료 신청
 - 나) 신규 소재의 기준 규격 설정

- 2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)
 - 가) 칩잎, 고구마 지상부의 혈행개선 효능평가(*in vivo*)



나. 개발 내용 및 범위

기관명	목표	개발 내용 및 범위
한풍제약	<ul style="list-style-type: none"> • 포도 잎 추출물의 개별인정 신청 • 신규 소재의 기준·규격 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 포도잎 추출물 및 시험식품의 안정성 시험 계속 • 포도잎 추출물의 시험방법 밸리데이션 • 인체적용시험 결과보고서 및 개별인정 신청 자료 작성 • 개별인정 원료 신청 • 신규 소재의 기준 규격 설정
원광대학교 산학협력단	<ul style="list-style-type: none"> • 개별인정 신청자료 준비 • 신규소재 혈행개선 효능평가 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 포도잎 추출물에 대한 전임상 효능 및 기전에 대한 개별인정 신청 자료 작성 • 칩잎, 고구마 지상부의 혈행개선 효능평가(<i>in vivo</i>) <ul style="list-style-type: none"> - Prothrombin time(PT) - Activated partial thromboplastin time(aPTT) - 혈소판 응집 측정

1) 주관연구기관(한풍제약)

가) 안정성 시험

- (1) 개별인정 신청원료의 안정성 시험 24개월 계속
- (2) 인체시험용 시험식품에 대한 안정성시험 24개월 계속

나) 시험방법 밸리데이션 실시

원재료(포도잎 추출물)에 대한 시험방법 밸리데이션을 다음과 같은 항목에 준하여 실시

(1) 특이성

- (가) 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있어야 함
- (나) 표준용액과 시험용액의 HPLC 분석 시 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인
- (다) 표준용액과 시험용액에서 해당 성분의 머무름 시간 및 스펙트럼의 패턴 확인

(2) 정확성

- (가) 검체 중 이미 알고 있는 분석물질 함량의 50%, 100%, 150% 등 3개 이상으로 첨가하여 3회 이상 반복 측정하고 회수율을 구함

* 회수율 계산식

$$\text{회수율(\%)} = C_f / C_u \times 100$$

C_f ; 분석한 분석대상물질의 함량

C_u ; 첨가한 분석대상물질의 함량

(3) 정밀성

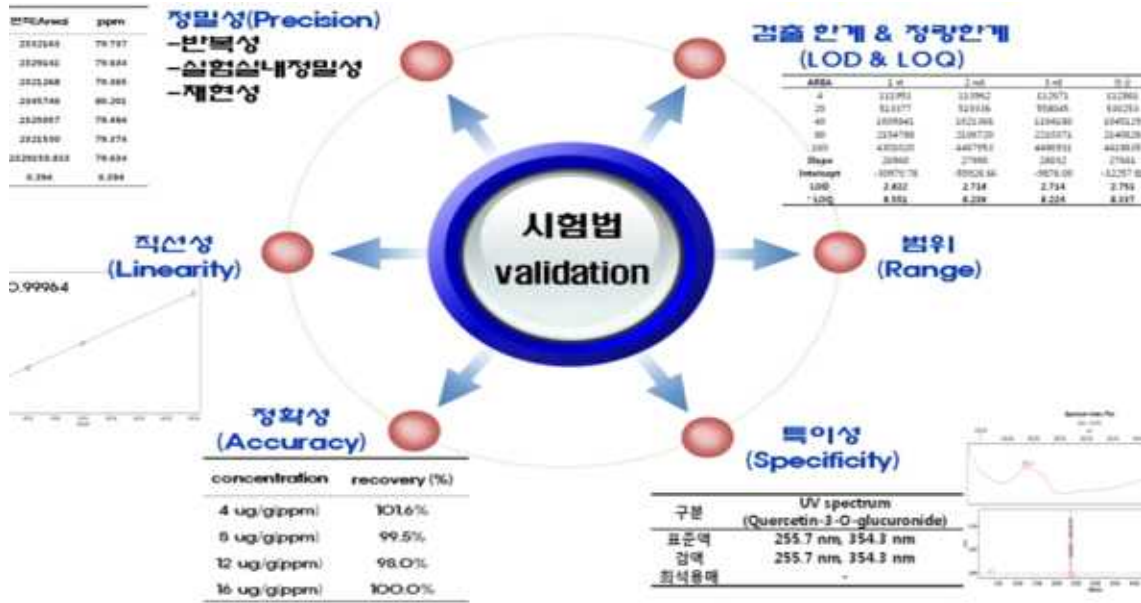
- (가) 반복성 - 3개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정 후 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함
- (나) 재현성 - 각 실험실 간 1개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함

(4) 정량한계

- (가) 정량 값으로 표현할 수 있는 대상물질의 최소량

(5) 직선성

- (가) 분석대상물질의 함량을 5개 이상으로 하며, 측정하고자 하는 함량 범위에 고르게 분포하도록 하고 최소 2회 이상 반복 측정
- (나) 정확도 및 정밀도를 확인할 수 있는 범위를 포함
- (다) 결정계수(r^2) 0.990 이상



다) 신규 소재의 제조공정 및 기준·규격 설정

(1) 신규 소재의 제조공정 설정

- (가) 신규로 도출한 농업부산물(참외, 고구마지상부) 소재의 제조공정도 제시
- (나) 제조공정에 따른 pilot 단위의 제조로 제조공정 설정

(2) 기준 규격 설정

Pilot 단위 생산 샘플에서 시험항목 설정 및 지표성분 분석을 통한 신규소재의 기준 규격 설정

라) 인체적용시험 완료

(1) 통계 분석 및 보고서 작성

- (가) 유효성 평가분석의 주 분석 대상은 FA set으로 하고, PP set을 추가적으로 실시하여 평가함
- (나) 투여 전·후 분석 : Paired t-test
- (다) 투여 군 간의 차이 분석 : Two-sample t-test, Wilcoxon rank sum test
- (라) 안전성 분석은 시험 식품을 1회 이상 섭취한 모든 군을 평가대상으로 함

(2) 완료 보고서 IRB 제출

- (가) 통계분석 결과를 바탕으로 인체적용시험 보고서를 작성, IRB에 최종 보고 함
- (나) IRB 최종 승인을 받은 보고서를 건강기능식품 개별인정 신청 자료로써 식약처에 제출

마) 포도 잎 추출물의 개별인정 신청자료 작성 및 신청

[표 16] 개별인정신청 자료 작성 내용

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료		
2.1	기원	
2.2	개발경위	
2.3	국내·외 인정·허가 현황	
2.4	국내·외 사용 현황	
3. 제조방법 및 그에 관한 자료		
3.1	제조공정표	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	
3.5	주요공정별 수율 변화	
4. 원료의 특성에 관한 자료		
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	
4.3	영양성분정보자료	
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료		
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	
	* 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)	
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료		
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	
	* 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	
	* 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)		
7.1	섭취근거 정보	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	
7.3	섭취량 평가 정보	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	
7.5	* GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험
		3개월 반복투여독성시험
		유전독성시험
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료		
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.2	동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.3	인체적용시험 :	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) * 인체적용시험기관
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료		
9.1	섭취량 및 근거	
9.2	섭취방법 및 근거	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료		

10.1	1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부
10.2	2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

2) 1협동연구기관 (원광대학교 산학협력단)

가) 신규 농업부산물 소재의 혈행개선 효능시험

본 연구에서 추가 선정된 칩잎, 고구마지상부의 혈행개선 효능평가를 통해 혈행개선 기능성 소재로서의 가능성을 검증하고자 함. 2차년도에 수행된 칩잎과 고구마지상부의 단일 추출물 또는 복합물을 대상으로 아래 실험방법에 따라 *in vivo* 효능평가 실험을 수행

나) 실험방법

(1) 실험동물

(가) 실험동물에 실험물질을 1주일간 동일 시간에 경구로 1일 1회 투약함. 실험 마지막 날 쥐를 희생시키고 항응고제로 3.2% 소듐시트레이트를 혈액과 1:9 비율이 되도록 함유한 PT 관을 이용하여 복대 동맥에서 채혈한 혈액을 넣고 원심 분리하여 PRP 와 PPP를 수득하여 추가 실험을 진행

(2) Prothrombin time(PT)

외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 방법으로, 혈장 70 μ l와 다양한 농도의 시료 10 μ l를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 μ l의 PT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(3) Activated partial thromboplastin time(aPTT)

내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 μ l와 다양한 농도의 마가자 추출물 및 분획물 시료 10 μ l를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 μ l의 aPTT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응시킴. 이후 65 μ l CaCl₂(35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

(4) 혈소판 응집 측정

실험물질을 녹여서 Chrono-Log aggregometer model 700-2(Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 혈소판을 stir bars (Chrono-Log Co.,USA)를 넣은 plastic cuvettes (Chrono-Log Co., USA)에 시험물질을 넣고 37°C에서 1분 30 초정도 base line 확인 후 혈소판 응집 촉진물질인 collagen 5 μ g/ml을 가하여 6분간 반응시켜 응집을 유도하여 대조군에 대한 응집억제 정도를 비교

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화

가. 혈행개선 소재 확보 및 원료 기준규격 설정

1) 포도 잎

가) 원재료 확보

포도 산지는 전국적으로 분포되어 있으나 주로 아산, 함안, 상주, 김천, 무안, 임실, 영동, 화성, 김제, 양양, 홍천, 안성 등이 지역 대표 특산물로 생산되고 있음. 2018년 포도 재배면적은 1만 2,925ha로 추정되며 지역별 재배면적은 아래 표와 같으며 영남 지방이 국내 포도 재배면적의 대부분을 차지하고 있음

[표 17] 국내 지역별 포도 재배면적 (단위 : ha)

구 분	경기·강원	충청	호남	영남	계
2018년	2,199	2,193	1,264	7,269	12,925

[자료 : 농업관측본부 표본농가 및 모니터 조사치]

포도 출하 시기는 지역에 따라 상이하나 크게 4~5월, 6월 7~9월로 순차적으로 출하되고 있으며, 포도 농사는 가지치기 이후 포도 알이 크기 전에 육손제거-순치기-지네발제거 작업이 지속적으로 이루어져야 함. 포도 순을 치는 시기에 맞추어 경기도 지역과 전라도 지역으로 구분하여 원료확보를 진행하였으며, 포도 종간의 함량 비교를 위해 전라도 지역권 내에서 총 6가지 포도 품종을 추가로 확보하였음



[농가 입구 1]



[농가 전경 1]



[농가 전경 2]



[농가 전경 3]



[농가 전경 4]



[원료 확보]

[그림 15] 캠벨얼리(경기도, 6월) 포도 농가



[농가 전경 1]



[농가 전경 2]



[농가 전경 3]



[원료 확보]

[그림 16] 켄밸얼리(경기도, 10월) 포도 농가



[농가 전경 1]



[농가 전경 2]



[농가 전경 3]



[원료 확보]

[그림 17] 거봉(전라도, 9월) 포도 농가



[농가 전경 1]



[농가 전경 2]



[농가 전경 3(캠벨)]



[농가 전경 4(머루)]



[원료 확보-캠벨]



[원료 확보-머루]

[그림 18] 캠벨얼리, 머루(전라도, 10월) 포도 농가



[농가 전경 1]



[농가 전경 2]



[농가 전경 3(청포도)]



[농가 전경 4(스튜벤)]



[원료 확보-청포도]



[원료 확보-스튜벤]

[그림 19] 스텐, 청포도(전라도, 10월) 포도 농가



[농가 전경 3]



[농가 전경 4]



[농가 전경 5]



[농가 전경 6]



[대봉 잎]



[원료 확보]

[그림 20] 대봉(전라도, 10월) 포도 농가



[켄벨얼리]



[거봉]



[스튜벤]



[청포도]



[머루]



[대봉]

[그림 21] 포도 품종 별 원료 확보 현황(건조 전)

나) 원재료 건조 감량 확인

포도 잎 품종별, 산지별, 시기별로 총 8가지의 원료를 확보하였으며, 유효성분 함량분석 및 추출물 제조에 앞서 건조 공정을 진행하였으며, 그 결과는 아래 표와 같음

[표 18] 포도 잎 품종별, 산지별, 시기별 원료의 건조감량

번호	지역	품종	채취시기	건조 전	건조 후	건조감량
1	경기도	캠벨얼리	2018.06.27	128.20 kg	31.90 kg	96.3 kg(75.12%)
2	전라도	거봉	2018.09.12	4.38 kg	1.10 kg	3.28 kg(74.89%)
3	경기도	캠벨얼리	2018.10.10	14.52 kg	4.70 kg	9.82 kg(67.63%)
4	전라도	캠벨얼리	2018.10.11	2.24 kg	0.80 kg	1.44 kg(64.29%)
5	전라도	스튜벤		2.08 kg	0.65 kg	1.43 kg(68.75%)
6	전라도	청포도		0.53 kg	0.20 kg	0.33 kg(62.26%)
7	전라도	머루		0.25 kg	0.10 kg	0.15 kg(60.0%)
8	전라도	대봉		8.08 kg	2.60 kg	5.48 kg(67.82%)



[캠벨얼리]



[거봉]



[스튜벤]



[청포도]



[머루]



[대봉]

[그림 22] 포도 품종 별 원료 확보 현황(건조 후)



[캠벨얼리(경기도, 6월) 건조 전]



[캠벨얼리(경기도, 6월) 건조 후]



[캠벨얼리(경기도, 10월) 건조 전]



[캠벨얼리(경기도, 10월) 건조 후]



[거봉(전라도, 9월) 건조 전]



[거봉(전라도, 9월) 건조 후]



[캠벨얼리(전라도, 10월) 건조 전]



[캠벨얼리(전라도, 10월) 건조 후]



[머루(전라도, 10월) 건조 전]



[머루(전라도, 10월) 건조 후]



[청포도(전라도, 10월) 건조 전]



[청포도(전라도, 10월) 건조 후]



[스튜벤(전라도, 10월) 건조 전]



[스튜벤(전라도, 10월) 건조 후]



[대봉(전라도, 10월) 건조 전]



[대봉(전라도, 10월) 건조 후]

[그림 23] 포도 잎 품종별, 산지별, 시기별 원료의 건조 전·후

다) 원재료 기준규격 설정

(1) 원재료 성상



[Lot. 001]



[Lot. 002]



[Lot. 003]

(2) 수분 설정

식품공전 II.1 식품분석시험법 1.1.1 수분 항에 따라 시험함. 기존 선행연구 결과를 바탕으로 기준 적합 확인하였음

(3) 지표성분 기준규격 설정

포도 잎 추출물로서 선행 연구 결과를 바탕으로 포도 잎 중 총 플라보놀배당체 (Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin의 합)과 Quercetin-3-O-glucuronide를 지표성분으로 하여 원재료 기준규격 설정하고자 하였음

[표 19] 포도 잎 추출물 중 유효성분

일반명	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	quercetin-3-O-glucuronide
분자량	302.24	286.24	316.26	478.37
분자식	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
구조				

(4) 분석방법

(가) 총 플라보놀배당체(quercetin, kaempferol, isorhamnetin)

: 건강기능식품공전 제 4.3-66 총 플라보놀 배당체 시험법

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

1.1.1 부피플라스크(10 mL, 50 mL)

1.1.2 메스실린더(200 mL)

1.1.3 삼각플라스크

1.1.4 용매용 일회용 실린지

1.1.5 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터

1.1.6 액체크로마토그래피용 유리병

1.1.7 수욕조(water bath)

1.2 분석장비

1.2.1 고속액체크로마토그래피

1.2.2 자외부흡광광도 검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)

1.2.3 Capcellpak C18 UG120 컬럼(4.6 mm, 250 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

1.3 분석장비의 준비

이동상으로서 0.1% 인산을 함유한 아세트니트릴과 0.1% 인산용액을 40:60으로 혼합하여 분당 1.0 mL씩 흘러넘으로서 칼럼과 기기를 안정화 시킨다.

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

2.1.1 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 : C₁₅H₁₀O₇·2H₂O, 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3

2.1.2 캄페롤(Kaempferol)

분자식 : C₁₅H₁₀O₆, 분자량 : 286.24, CAS No. : 520-18-3

2.1.3 이소람네틴(Isorhamnetin)

분자식 : C₁₆H₁₂O₇, 분자량 : 316.26, CAS No. : 480-19-3

2.2 일반시약

2.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)

2.2.2 인산(Phosphoric acid)

2.2.3 증류수(Distilled water)

2.2.4 염산(Hydrochloric acid)

2.2.5 에탄올(Ethanol)

3. 시험과정

3.1 희석용액의 조제

3.1.1 희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)
200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣는다.

3.2 표준용액의 조제

3.2.1 퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다(퀘르세틴 이수화물(mg) × 302/338 = Quercetin(mg)).

3.2.2 캬페롤 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

3.2.3 이소람네틴 25 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

3.2.4 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

3.3 플라보놀 배당체(캬페롤, 퀘르세틴, 이소람네틴) 시험용액 제조

3.3.1 시료 약 300 mg을 칭량하여 가수분해용 삼각플라스크에 취한 후 10 mL 희석용액을 가한다.

3.3.2 90°C 수용상에서 1시간 동안 가수분해한다.

3.3.3 위의 용액을 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올로 표선까지 맞춘다.

3.3.4 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

고속액체크로마토그래피 조건(예)

항목	조건
주입량	20 μL
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35°C
이동상	0.1% 인산을 함유한 아세토니트릴 : 0.1% 인산용액 = 40 : 60
유속	1.0 mL/분

4.2 계산

4.2.1 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 함량은 캬페롤, 퀘르세틴, 이소람네틴의 합으로 계산한다.

$$\text{각각의 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 함량(mg)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 각각의 플라보놀배당체의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504,isorhamnetin = 2.437)

E : 시료무게(g)

(나) Quercetin-3-O-glucuronide

1. 장비와 재료
 - 1.1 실험실 장비 및 소모품
 - 1.1.1 부피플라스크(50 mL)
 - 1.1.2 액체크로마토그래피용 유리병
 - 1.1.3 용매용 나일론 멤브레인필터(0.45 μ m)
 - 1.1.4 용매용 여과기
 - 1.1.5 일회용 실린지
 - 1.1.6 멤브레인필터(PTFE, 0.45 μ m)
 - 1.1.7 초음파진탕기
 - 1.2 분석장비
 - 1.2.1 고속액체크로마토그래피
 - 1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)
 - 1.2.3 Waters Xbridge Shield RP18 컬럼(4.6mm I.D. \times 150mm, 3.5 μ m) 또는 이와 동등한 것
2. 표준물질 및 일반시약
 - 2.1 표준물질
 - 2.1.1 퀘르세틴-3-O-글루쿠로니드(Quercetin-3-O-glucuronide)
분자식 : $C_{21}H_{18}O_{13}$, 분자량 : 478.37, CAS No. : 22688-79-5
 - 2.2 일반시약
 - 2.2.1 메탄올(Methanol, HPLC grade)
 - 2.2.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
 - 2.2.3 포름산(Formic acid, Extra grade)
 - 2.2.4 증류수(Distilled water)
3. 시험과정
 - 3.1 표준용액 제조
 - 3.1.1 표준물질 약 3.2 mg을 취하여 부피플라스크에 넣고 메탄올로 20mL 정용한다 (0.16 mg/mL).
 - 3.1.2 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다 (0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.004 mg/mL).
 - 3.2 시험용액 제조
 - 3.2.1 검체 약 0.25g을 취한 후 50 mL 부피플라스크에 넣는다.(5 mg/mL)
 - 3.2.2 메탄올로 표선까지 맞춘다.
 - 3.2.3 초음파진탕기에서 1시간 동안 추출 한다.
 - 3.2.4 상기용액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

[고속액체크로마토그래프 조건]

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	35 $^{\circ}$ C
이동상	A 용매 - 0.1% 포름산 B 용매 - 아세트니트릴
유속	0.6 mL/분
검출기 파장	330 nm

[이동상 조건]

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	85	15
40	75	25
42	0	100
50	85	15
60	85	15

4.2 계산

퀘르세틴-3-O-글루쿠로니드(Quercetin-3-O-glucuronide) 함량(mg/g)

$$= \frac{A \times B \times C}{E \times 1,000}$$

A : 시험용액중의 퀘르세틴-3-O-글루쿠로니드 농도(μ g/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

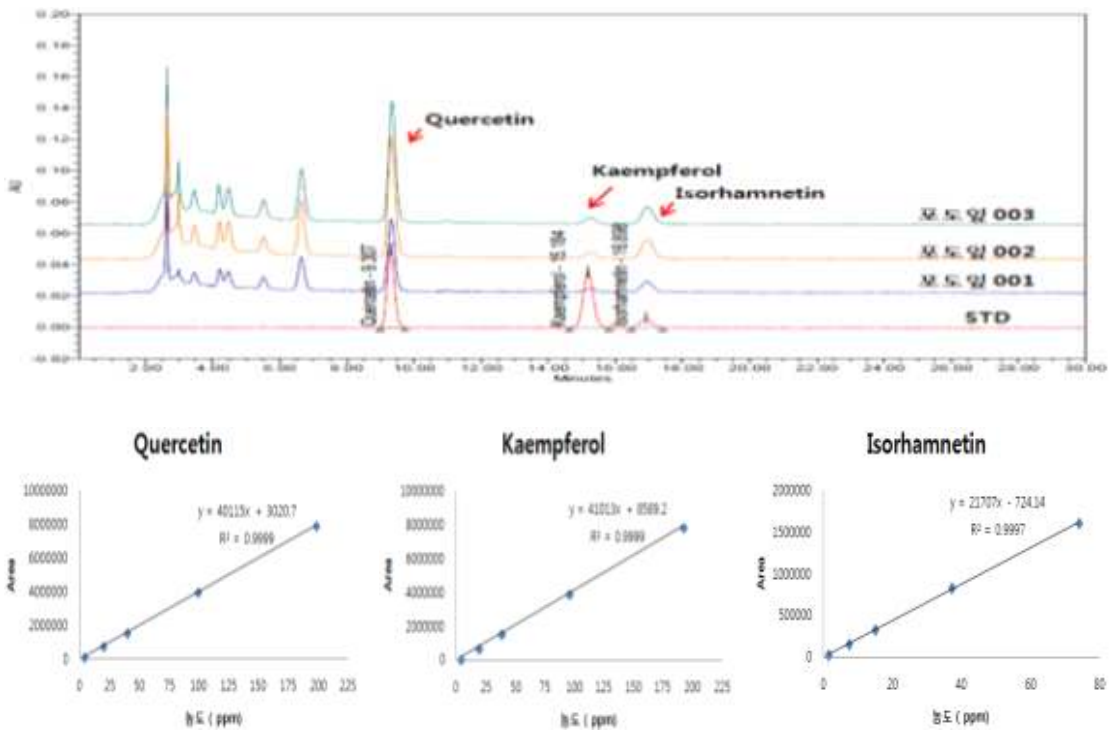
E : 시료무게(g)

(5) 분석결과

6월 포도 순치기 기간에 경기도 화성시 소재의 포도 농가에서 확보한 캠벨얼리 품종을 대상으로 3 Lot., 3반복으로 포도 잎 유효성분 함량을 분석하였으며, 그 결과는 아래 표 및 그림과 같음. 분석결과 총 플라보놀배당체의 경우 6.60 mg/g, Quercetin-3-O-glucuronide의 경우 2.00 mg/g으로 확인되었음

[표 20] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 총 플라보놀배당체 함량

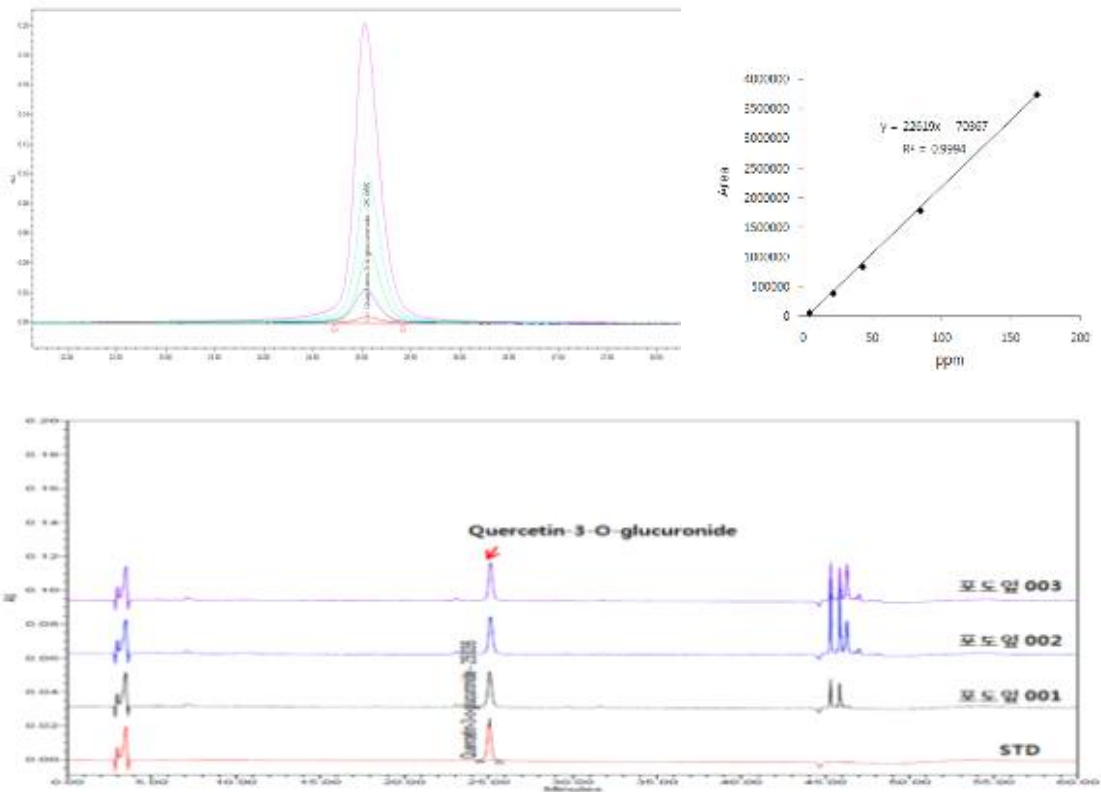
Lot No. 반복수	1 (Lot. 001)	2 (Lot. 002)	3 (Lot. 003)	평균(mg/g)
1반복	6.28	6.90	6.54	
2반복	6.26	6.98	6.83	
3반복	6.12	7.03	6.44	
평균(mg/g)	6.22	6.97	6.60	6.60



[그림 24] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 총 플라보놀배당체 크로마토그램

[표 21] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 Quercetin-3-O-glucuronide 함량

Lot No. 반복수	1 (Lot. 001)	2 (Lot. 002)	3 (Lot. 003)	평균(mg/g)
1반복	1.98	1.98	2.00	
2반복	2.02	2.00	2.02	
3반복	1.98	1.97	2.04	
평균(mg/g)	1.99	1.98	2.02	2.00



[그림 25] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 Quercetin-3-O-glucuronide 크로마토그램

(6) 원재료 성적서 작성

실험결과를 바탕으로 경기도 화성시 소재의 포도 농가에서 확보한 캠벨얼리 품종에 대한 원료 성적서를 작성함

내역번호/품명	원재료명	규격	수량	단위	비고
1. 1. 1. 1.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 2.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 3.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 4.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 5.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 6.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 7.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 8.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 9.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 10.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 11.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 12.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 13.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 14.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 15.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 16.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 17.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 18.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 19.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	
1. 1. 1. 20.	캠벨얼리 포도 잎	1kg	100	kg	

[Lot. 001] [Lot. 002] [Lot. 003]

[그림 26] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 원재료 성적서

라) 포도잎 표준화를 위한 채취시기별 함량검토

- 포도잎 추출물의 표준화를 위하여 머루, 캠벨을 채취시기별로 채취하여 원료 및 추출물에서의 지표물질 함량을 검토하였음.

(1) 머루(*Vitis coignetiae*), 캠벨(*Vitis labruscana* B.) 채취

2020년도 김제시 포도농가에서 7월(결실기), 8월(착색기), 9월(성숙기)에 머루 및 캠벨 중의 포도잎을 채취하였음



[머루 포도잎 1 (2020년 7월)]



[머루 포도잎 2 (2020년 8월)]



[머루 포도잎 3((2020년 9월))



[캠벨 포도잎 1((2020년 7월))



[캠벨 포도잎 2(2020년 8월)]



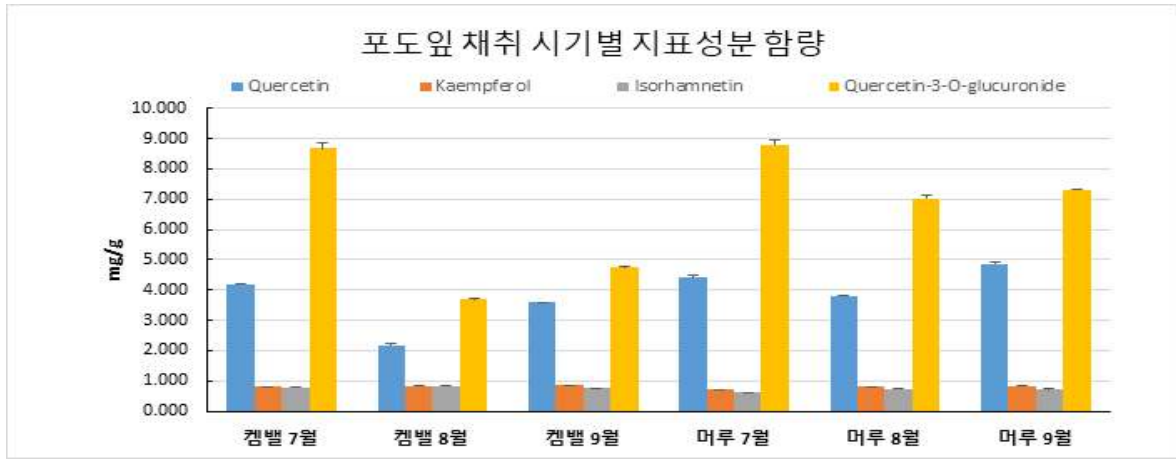
[캠벨 포도잎 3 2020년 9월]]

[그림 13] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎의 원재료 성적서

(2) 함량분석결과

[단위: mg/g]

	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	Quercetin-3-O-glucuronide
캠벨 7월	4.183±0.031	0.810±0.001	0.789±0.001	8.679±0.195
캠벨 8월	2.165±0.046	0.828±0.002	0.839±0.002	3.684±0.037
캠벨 9월	3.591±0.001	0.843±0.002	0.755±0.001	4.740±0.053
머루 7월	4.398±0.105	0.711±0.002	0.623±0.001	8.793±0.148
머루 8월	3.796±0.016	0.814±0.002	0.737±0.001	7.017±0.117
머루 9월	4.850±0.081	0.826±0.005	0.721±0.003	7.304±0.015



2) 고구마 지상부

가) 원재료 확보

고구마는 전국적으로 고르게 재배되고 있으며 국내에서는 지하부(괴근)를 주로 사용하고 있으나 동남아시아나 아프리카 등에서는 잎을 채소로 더 많이 이용하고 있음. 2016년 고구마 생산량은 34만 1천 톤이었으나 지상부는 일부 채소로 식용하거나 사료로 사용되고 대부분은 폐기되고 있는 실정임

혈행개선 식의약 소재 개발을 위한 후보소재로서의 가능성을 확인하고자 고구마 지상부 원재료에 대한 유효성분 함량분석을 실시하였으며, 고구마 지상부는 전남 광주 고구마 줄기협회로부터 원료를 확보하였음

나) 원재료 건조 감량 확인

고구마 지상부 유효성분 함량분석 및 추출물 제조에 앞서 건조 공정을 진행하였으며, 그 결과는 아래 표와 같음

[표 23] 고구마 지상부 원료의 건조 감량

확보시기	건조 전	건조 후	건조감량
2018.06.22	18.80 kg	1.30 kg	17.50 kg(93.09%)



[건조 전]



[건조 후]

[그림 33] 고구마 지상부 원료의 건조 전·후

다) 원재료 기준규격 설정

고구마 잎에는 단백질뿐만 아니라 주로 비타민 A의 전구체인 beta-carotene과 폴리페놀, 페놀화합물인 chlorogenic acid가 다량 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이에 따라 고구마 지상부의 유효성분 함량을 분석하였음

(1) 원재료 성상



[Lot. 001]



[Lot. 002]



[Lot. 003]

(2) 수분 설정

식품공전 II.1 식품분석시험법 1.1.1 수분 항에 따라 시험한다.

Lot No.	1	2	3	평균
반복수	(Lot.001)	(Lot. 002)	(Lot. 003)	
1반복	4.8	4.7	4.8	
2반복	4.6	4.6	4.9	
3반복	5.3	4.8	5.1	
평균	4.9	4.7	4.9	4.8

(3) 지표성분 기준규격 설정

Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid (CQA)를 검토하였고, 원재료에서 각각의 함량이 낮아 3가지 성분의 합으로 지표성분을 설정함

(4) 분석방법

<p>1. 장비와 재료</p> <p>1.1 실험실 장비 및 소모품</p> <p>1.1.1 부피플라스크(50 mL)</p> <p>1.1.2 액체크로마토그래피용 유리병</p> <p>1.1.3 용매용 나일론 멤브레인필터(0.45 μm)</p> <p>1.1.4 용매용 여과기</p> <p>1.1.5 일회용 실린지</p> <p>1.1.6 멤브레인필터(PTFE, 0.45 μm)</p> <p>1.1.7 삼각플라스크</p>

1.2 분석장비

1.2.1 고속액체크로마토그래피

1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)

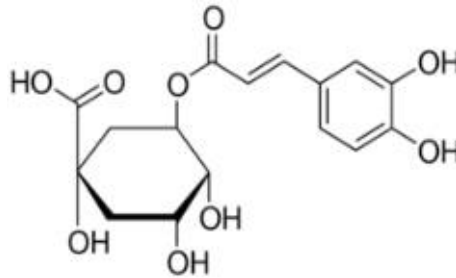
1.2.3 CAPCELL PACK C18 UG80 4.6×150mm, 5 μm 또는 이와 동등한 것

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

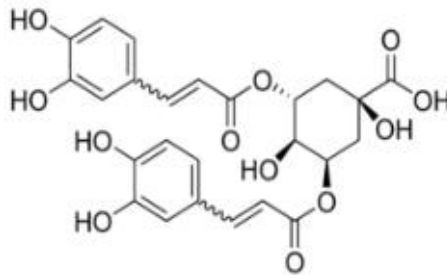
2.1.1 Chlorogenic acid

분자식 : $C_{16}H_{18}O_9$, 분자량 : 354.31, CAS No. : 206-325-6



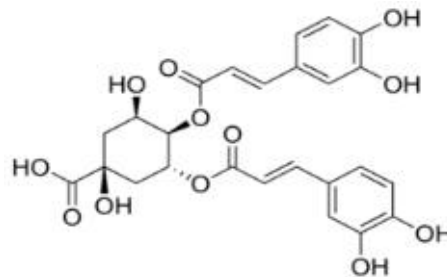
2.1.2 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)

분자식 : $C_{25}H_{24}O_{12}$, 분자량 : 516.45, CAS No. : 2450-53-5



2.1.3 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)

분자식 : $C_{25}H_{24}O_{12}$, 분자량 : 516.45, CAS No. : 14534-61-3



2.2 일반시약

2.2.1 메탄올(Methanol)

2.2.2 증류수(Distilled water)

2.2.3 인산(Phosphoric acid, 85%)

2.2.4 아세토니트릴(Acetonitrile)

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

3.1.1 Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA) 표준물질 각각 약 5 mg을 취하여 부피플라스크에 넣고 메탄올로 50 mL 정용한다 (100 mg/L).

3.1.2 위의 표준원액을 각각 동일하게 취하여 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

3.1.2.1 표준용액 제조(예)

(단위: µg/mL)	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
Chlorogenic acid	5.42	10.83	21.67	43.33	86.67
3,5-di-CQA	2.08	4.17	8.33	16.67	33.33
4,5-di-CQA	2.60	5.21	10.42	20.83	41.67

3.2 시험용액 제조

3.2.1. 원료

3.2.1.1 검체 약 0.5 취한 후 삼각플라스크에 넣는다.

3.2.1.2 메탄올을 약 40 mL 넣고 1시간 동안 초음파 추출한다.

3.2.1.3 이 액을 50 mL 용량플라스크에 옮겨담고, 메탄올로 정용한다.

3.2.1.4 상기용액을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

[고속액체크로마토그래프 조건]

항목	조건		
주입량	5 µL		
칼럼온도	35 °C		
	Time(min)	% A	% B
이동상	0	100	0
	10	95	5
	20	80	20
	25	75	25
	35	50	50
	40	100	0
유속	1.0 mL/분		
검출기 파장	330 nm		

4.2 계산

4.2.1 함량은 Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)의 합으로 계산한다.

$$\text{각각의 플라보놀 배당체(Flavonol glycosides) 함량(mg)} = \frac{A \times B \times C}{D}$$

A : 시험용액중의 각각의 Chlorogenic acid, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA의 농도(µg/mL)

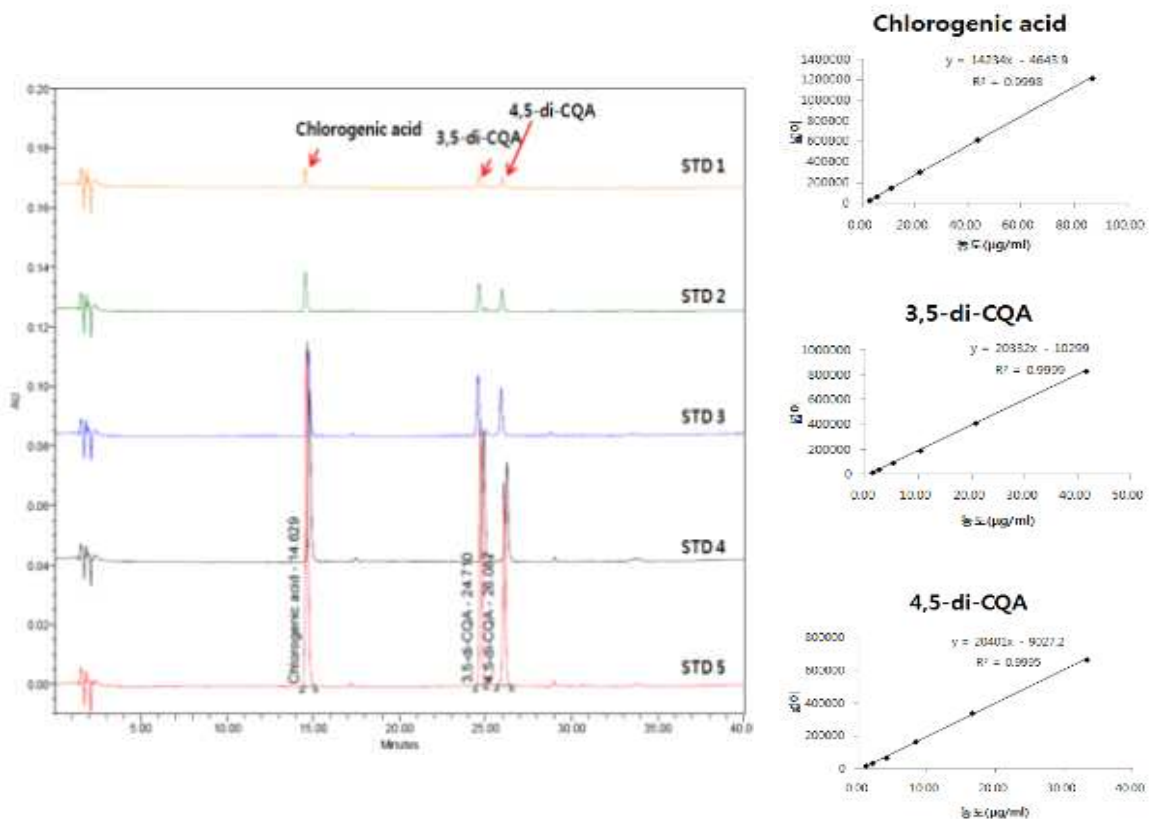
B : 시험용액 전량(mL)
 C : 희석배수
 E : 시료무게(g)

(5) 분석결과

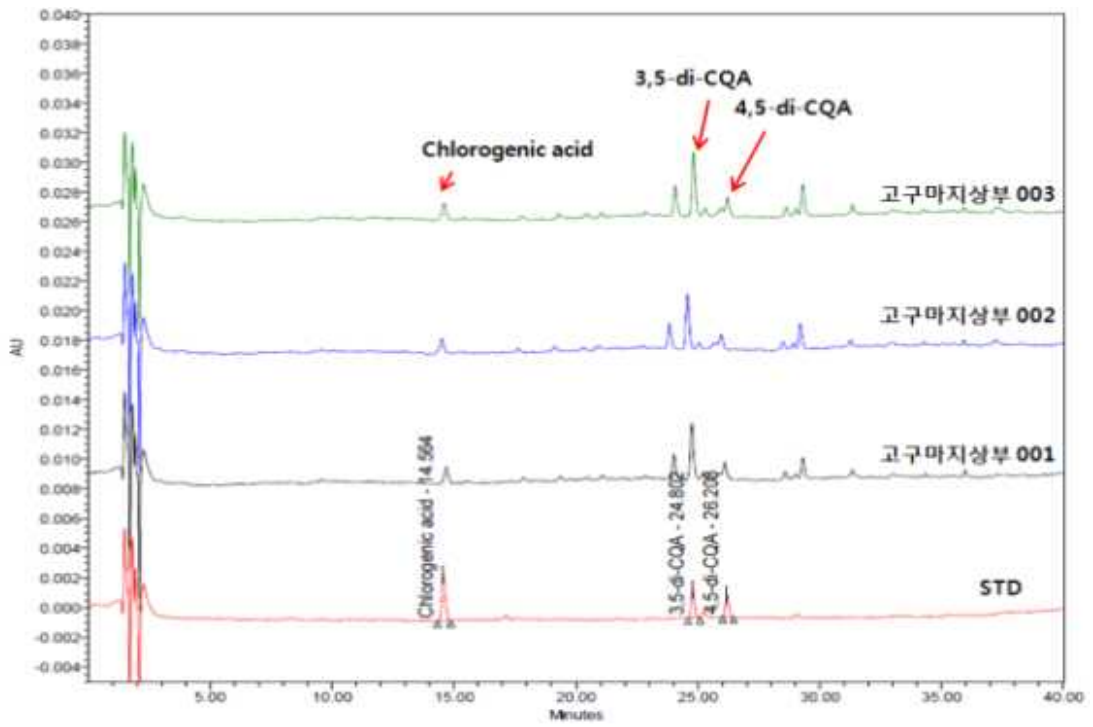
3가지의 고구마 지상부 원재료를 3반복 실험하여 함량분석을 진행하였으며, 그 결과는 아래 표와 같음. 함량은 Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid (CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)의 합으로 산출하였으며, 평균 0.45 mg/g으로 확인되었음

[표 24] 고구마 지상부의 유효성분 함량

Lot No.	1 (Lot.001)	2 (Lot. 002)	3 (Lot. 003)	평균(mg/g)
반복수				
1반복	0.44	0.43	0.48	
2반복	0.44	0.44	0.48	
3반복	0.43	0.42	0.47	
평균(mg/g)	0.44	0.43	0.48	0.45



[그림 34] 고구마 지상부의 유효성분 함량 크로마토그램-1



[그림 35] 고구마 지상부의 유효성분 함량 크로마토그램-2

(6) 원재료 성적서 작성

실험결과를 바탕으로 전남 광주 고구마줄기협회로부터 확보한 고구마 지상부에 대한 원료 성적서를 작성함

내용사항	원재료명	규격	수량	단위	비고
고구마지상부 001	고구마지상부 001	1kg	100	kg	
고구마지상부 002	고구마지상부 002	1kg	100	kg	
고구마지상부 003	고구마지상부 003	1kg	100	kg	

[Lot. 001]

[Lot. 002]

[Lot. 003]

[그림 36] 고구마 지상부의 원재료 성적서

3) 표고버섯

가) 원재료 확보

혈행개선 식의약 소재 개발을 위한 후보 소재로서의 가능성을 확인하고자 표고버섯 원재료에 대한 유효성분 함량 분석을 실시하였으며, 표고버섯은 전북 진안 마이햇살 농장으로부터 건조된 원료를 확보하였음

나) 원재료 기준규격 설정

(1) 원재료 성상



[Lot. 1]



[Lot. 2]



[Lot. 3]



[표고버섯(꼭지제거)]



[표고버섯(파절)]

(2) 수분 설정

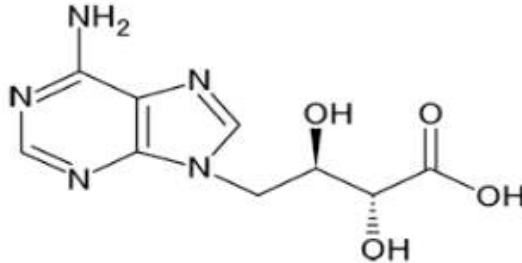
식품공전 II.1 식품분석시험법 1.1.1 수분 함에 따라 시험한다.

Lot No.	1	2	3	평균(%)
반복수	(Lot.001)	(Lot. 002)	(Lot. 003)	
1반복	8.6	8.0	8.0	
2반복	8.8	8.6	8.3	
3반복	8.9	8.3	8.4	
평균(%)	8.8	8.3	8.2	8.4

(3) 지표성분 기준규격 설정

(가) 지표성분 설정 근거

표고버섯에 대한 선행연구 검토 결과 표고버섯에는 eritadenine이 함유되어 있어 지방간 및 혈중 콜레스테롤 개선에 효과가 있다고 보고되어, 논문을 바탕으로 eritadenine을 표고버섯의 지표성분으로 설정하여 시험법 검토를 진행하였음



[그림 37] 표고버섯 지표성분
eritadenine

(나) 시험법 개발

표고버섯으로부터 eritadenin 분석한 여러 논문들을 바탕으로 이동상의 pH, 컬럼의 종류, 전처리 방법(5% 에탄올, MeOH 초음파추출, 5%에탄올, 물, 초음파추출, 환류추출) 고려하여 시험법 검토를 진행하여(본 자료는 연구 노트에 기록되어있음), 분리능이 좋은 Xbrige Shield RP18 C₁₈컬럼 (4.6mm I.D. × 250mm, 3.5 μm)을 가지고, 물로 환류 추출하는 조건에서 표고버섯에서의 eritadenine을 분석할 수 있었음

(4) 분석방법

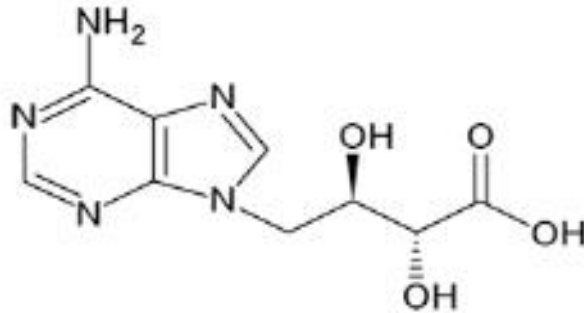
1. 장비와 재료
 - 1.1 실험실 장비 및 소모품
 - 1.1.1 부피플라스크(50 mL)
 - 1.1.2 액체크로마토그래피용 유리병
 - 1.1.3 용매용 나일론 멤브레인필터(0.45 μm)
 - 1.1.4 용매용 여과기
 - 1.1.5 일회용 실린지
 - 1.1.6 멤브레인필터(PTFE, 0.45 μm)
 - 1.1.7 환류추출기
 - 1.1.8 등근바닥플라스크
 - 1.2 분석장비
 - 1.2.1 고속액체크로마토그래피
 - 1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector) 또는 포토다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)
 - 1.2.3 Xbrige Shield RP18 C₁₈컬럼 (4.6mm I.D. × 250mm, 3.5 μm) 또는 이와 동등한 것

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

2.1.1 에리타데닌(D-Eritadenine)

분자식 : $C_9H_{11}N_5O_4$, 분자량 : 253.21, CAS No. : 23918-98-1



2.2 일반시약

2.2.1 인산칼륨(Monopotassium phosphate, KH_2PO_4)

2.2.2 증류수(Distilled water)

2.2.3 인산(Phosphoric acid, 85%)

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

3.1.1 에리타데닌 표준물질 약 3.1 mg을 취하여 부피플라스크에 넣고 이동상(0.1M 인산 칼륨용액, pH4.67)로 20 mL 정용한다 (0.155 mg/mL).

3.1.2 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

3.1.2.1 표준용액 제조(예)

(단위: $\mu\text{g/mL}$)	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
에리타데닌	4.84	19.38	38.75	46.50	77.50

3.2 시험용액 제조

3.2.1. 표고버섯 원료

3.2.1.1 검체 약 1.0 g을 취한 후 100 mL 둥근바닥플라스크에 넣는다 (20 mg/mL).

3.2.1.2 정제수를 약 50 mL 넣고 1시간 30분 동안 환류추출 한다(85°C).

3.2.1.3 실온에서 방냉한다.

3.2.1.4 상기용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

[고속액체크로마토그래프 조건]

항목	조건
주입량	10 µL
칼럼온도	30℃
이동상	0.1 M 인산칼륨용액(KH ₂ PO ₄ , pH4.67) *pH는 인산(85%)으로 조정한다.
유속	0.6 mL/분
검출기 파장	260 nm

4.2 계산

4.2.1 에리타데닌(Eritadenine) 함량(mg/g)

$$= \frac{A \times B \times C \times F}{E \times 1,000}$$

A : 시험용액중의 에리타데닌 농도(µg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 회석배수

E : 시료무게(g)

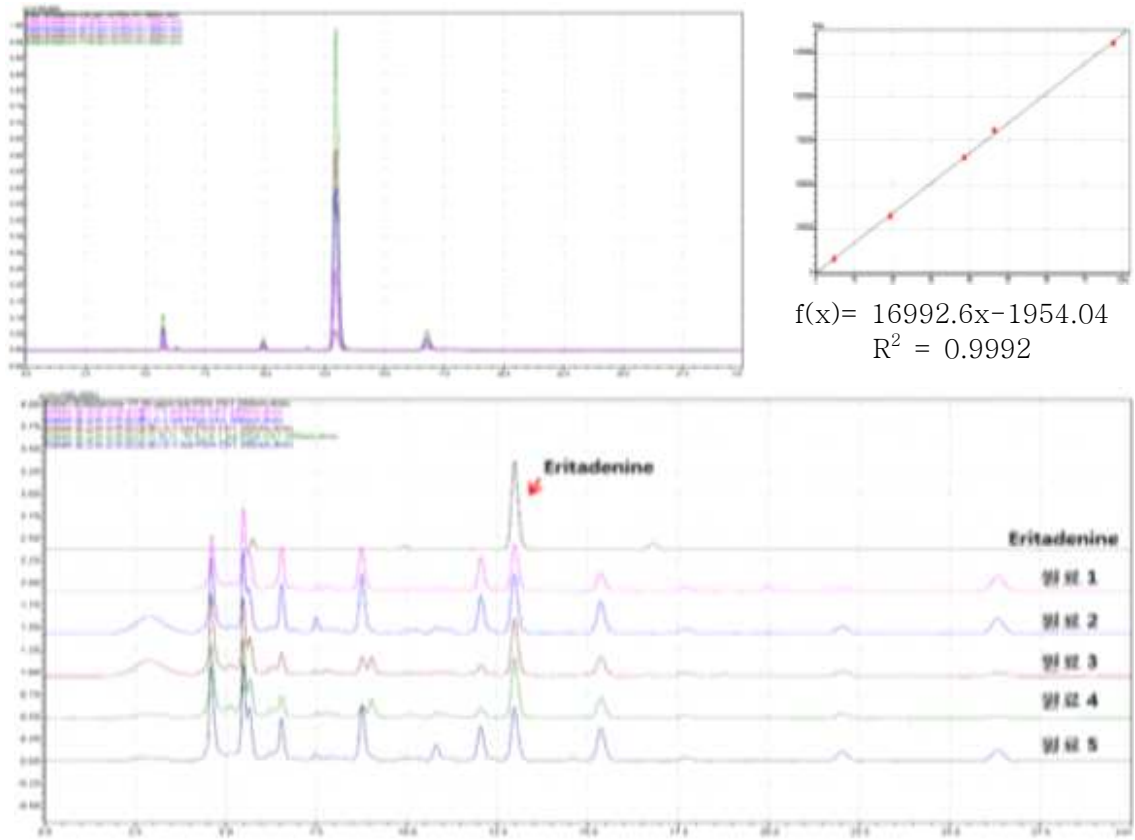
F : 표준품 순도(%)

(5) 분석결과

5가지의 표고버섯 원재료를 3반복 실험하여 함량분석을 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같으며 평균 2.00 mg/g으로 확인되었음

[표 25] 표고버섯의 eritadenin 함량

Lot No. 반복수	1 (Lot.001)	2 (Lot. 002)	3 (Lot. 003)	4 (꼭지제거)	5 (과절)	평균(mg/g)
1반복	1.84	2.03	2.03	2.10	2.00	
2반복	1.85	2.03	2.03	2.09	2.00	
3반복	1.85	2.03	2.03	2.09	2.00	
평균(mg/g)	1.85	2.03	2.03	2.09	2.00	2.00



[그림 38] 표고버섯의 eritadenin 함량 크로마토그램

(6) 원재료 성적서 작성

실험결과를 바탕으로 전북 진안 마이산헛살농장으로부터 확보한 표고버섯에 대한 원료 성적서를 작성함

내역번호	원재료서명	수량	단위	비고
1	표고버섯	100	g	
2	표고버섯	100	g	
3	표고버섯	100	g	
4	표고버섯	100	g	
5	표고버섯	100	g	
6	표고버섯	100	g	
7	표고버섯	100	g	
8	표고버섯	100	g	
9	표고버섯	100	g	
10	표고버섯	100	g	
11	표고버섯	100	g	
12	표고버섯	100	g	
13	표고버섯	100	g	
14	표고버섯	100	g	
15	표고버섯	100	g	
16	표고버섯	100	g	
17	표고버섯	100	g	
18	표고버섯	100	g	
19	표고버섯	100	g	
20	표고버섯	100	g	
21	표고버섯	100	g	
22	표고버섯	100	g	
23	표고버섯	100	g	
24	표고버섯	100	g	
25	표고버섯	100	g	
26	표고버섯	100	g	
27	표고버섯	100	g	
28	표고버섯	100	g	
29	표고버섯	100	g	
30	표고버섯	100	g	
31	표고버섯	100	g	
32	표고버섯	100	g	
33	표고버섯	100	g	
34	표고버섯	100	g	
35	표고버섯	100	g	
36	표고버섯	100	g	
37	표고버섯	100	g	
38	표고버섯	100	g	
39	표고버섯	100	g	
40	표고버섯	100	g	
41	표고버섯	100	g	
42	표고버섯	100	g	
43	표고버섯	100	g	
44	표고버섯	100	g	
45	표고버섯	100	g	
46	표고버섯	100	g	
47	표고버섯	100	g	
48	표고버섯	100	g	
49	표고버섯	100	g	
50	표고버섯	100	g	
51	표고버섯	100	g	
52	표고버섯	100	g	
53	표고버섯	100	g	
54	표고버섯	100	g	
55	표고버섯	100	g	
56	표고버섯	100	g	
57	표고버섯	100	g	
58	표고버섯	100	g	
59	표고버섯	100	g	
60	표고버섯	100	g	
61	표고버섯	100	g	
62	표고버섯	100	g	
63	표고버섯	100	g	
64	표고버섯	100	g	
65	표고버섯	100	g	
66	표고버섯	100	g	
67	표고버섯	100	g	
68	표고버섯	100	g	
69	표고버섯	100	g	
70	표고버섯	100	g	
71	표고버섯	100	g	
72	표고버섯	100	g	
73	표고버섯	100	g	
74	표고버섯	100	g	
75	표고버섯	100	g	
76	표고버섯	100	g	
77	표고버섯	100	g	
78	표고버섯	100	g	
79	표고버섯	100	g	
80	표고버섯	100	g	
81	표고버섯	100	g	
82	표고버섯	100	g	
83	표고버섯	100	g	
84	표고버섯	100	g	
85	표고버섯	100	g	
86	표고버섯	100	g	
87	표고버섯	100	g	
88	표고버섯	100	g	
89	표고버섯	100	g	
90	표고버섯	100	g	
91	표고버섯	100	g	
92	표고버섯	100	g	
93	표고버섯	100	g	
94	표고버섯	100	g	
95	표고버섯	100	g	
96	표고버섯	100	g	
97	표고버섯	100	g	
98	표고버섯	100	g	
99	표고버섯	100	g	
100	표고버섯	100	g	

[Lot. 001]

[Lot. 002]

[Lot. 003]

[그림 39] 표고버섯의 원재료 성적서

4) 칩 잎

가) 원재료 확보

혈행개선 식의약 소재 개발을 위한 후보소재로서의 가능성을 확인하고자 칩 잎 원재료에 대한 유효성분 함량 분석을 실시하였으며, 칩잎은 전북 봉동읍 소재의 야산에서 직접 채취하여 원료를 확보하였음

나) 원재료 건조 감량 확인

칩잎 유효성분 함량분석 및 추출물 제조에 앞서 건조 공정을 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같음

[표 26] 칩잎 원료의 건조감량

확보시기	건조 전	건조 후	건조감량
2018.06.22	3.2 kg	1.0 kg	2.2 kg (68.75%)



[칩 잎 건조 전]



[칩 잎 건조 후]

[그림 40] 칩잎 원료의 건조 전·후

다) 원재료 기준규격 설정

(1) 원재료 성상

잎은 원형, 원난형이며 3~5갈래로 얇게 갈라지며, 각 열편은 심장모양이고 표면에 털이 없으며 뒷면에는 항상 거미줄같은 면모로 덮여있고, 잎은 엽병이 있으며 톱니가 있음

(2) 수분

식품공전 II.2 식품성분시험법 2.1.1 수분에 따라 시험한다.

1 (Lot.001)	2 (Lot. 002)	3 (Lot. 003)	평균
14.83 %	14.95 %	14.93 %	14.90 %

(3) 지표성분 기준규격 설정

원재료에서 Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein 성분의 합으로 총 이소플라본을 지표성분으로 설정함

(4) 분석방법

건강기능식품공전 제 4.3-54-1 이소플라본(제1법) 시험법에 따라 시험한다.

(5) 분석결과

3가지의 최유효 원재료를 3반복 실험하여 함량 분석을 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같음. 함량은 총이소플라본의 합으로 산출하였으며, 평균 0.223 mg/g으로 확인되었음

[표 27] 최유효의 유효성분 함량

Lot No.	1	2	3	평균(mg/g)
반복수	(Lot.001)	(Lot. 002)	(Lot. 003)	
1반복	0.222	0.218	0.227	
2반복	0.224	0.210	0.232	
3반복	0.229	0.216	0.232	
평균(mg/g)	0.225	0.215	0.230	0.223

(6) 원재료 성적서 작성

실험결과를 바탕으로 전북 봉동읍 소재로부터 확보한 최유효의 원료 성적서를 작성함



[그림 41] 최유효의 원재료 성적서

5) 연잎(하엽)

가) 원재료 확보

혈행개선 식의약 소재 개발을 위한 후보소재로서의 가능성을 확인하고자 연잎 원재료에 대한 유효성분 함량 분석을 실시하였으며, 연잎은 제천한방약초에서 원료를 확보하였음.



[그림 42] 연잎 원료

다) 원재료 기준규격 설정

(1) 원재료 성상



나. 혈행개선 소재 추출물 규격화·표준화

1) 포도 잎 추출물

가) 제조공정 확립

포도 잎을 원료로 효능실험을 위한 추출물을 제조하였으며 Lab. scale 수준의 조건을 적용하여 총 2번의 반복 생산을 진행하였음. 반복 생산을 통해 설정한 각각의 공정 및 수율은 다음과 같음

제조공정	공정	수율(g)
포도잎	포도잎	200
↓		
추출	80~90℃가운, 50%주정, 3%빙초산(식첨), 20배수, 2회, 3시간,	
↓		
여과	1차: 카트리지여과(5µm 필터) 2차: 원심분리(상온, 1200-1500 rpm)	
↓		
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하	
↓		
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상	
↓		
포도잎 추출물		30.3 (15.15%))

나) 함량분석

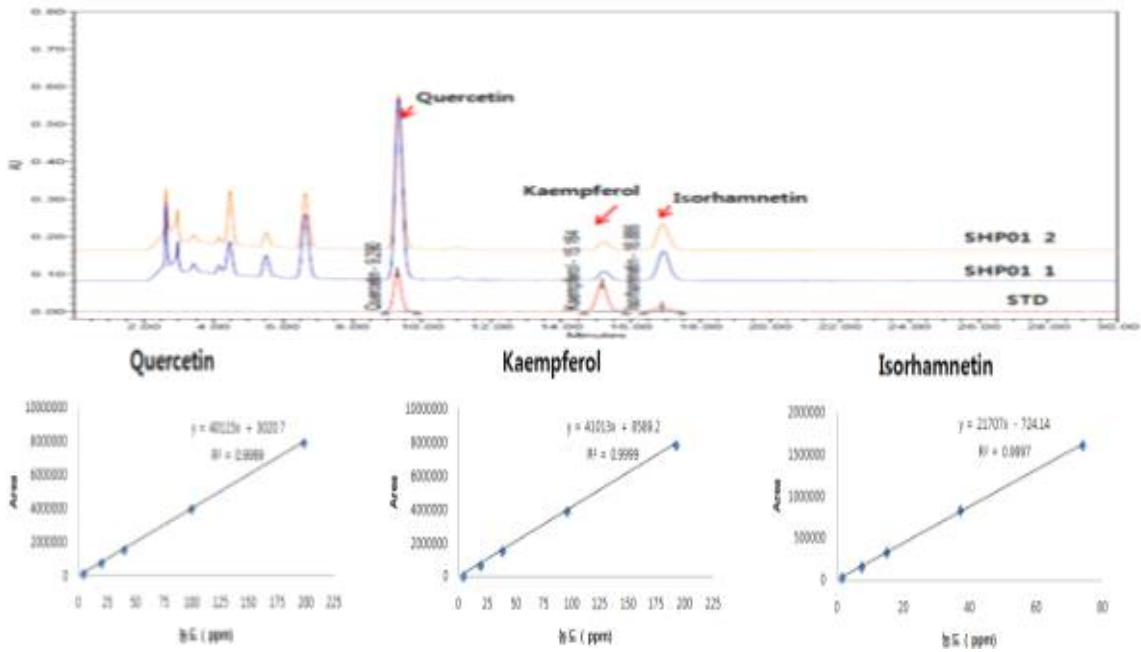
포도 잎 추출물의 유효성분 함량은 아래와 같음. 총 플라보놀 배당체의 경우 평균 36.54 mg/g이었으며, Quercetin-3-O-glucuronide의 경우 평균 26.71 mg/g으로 확인되었음

[표 29] 캠벨얼리(경기도) 포도 잎 추출물의 총 플라보놀배당체 함량

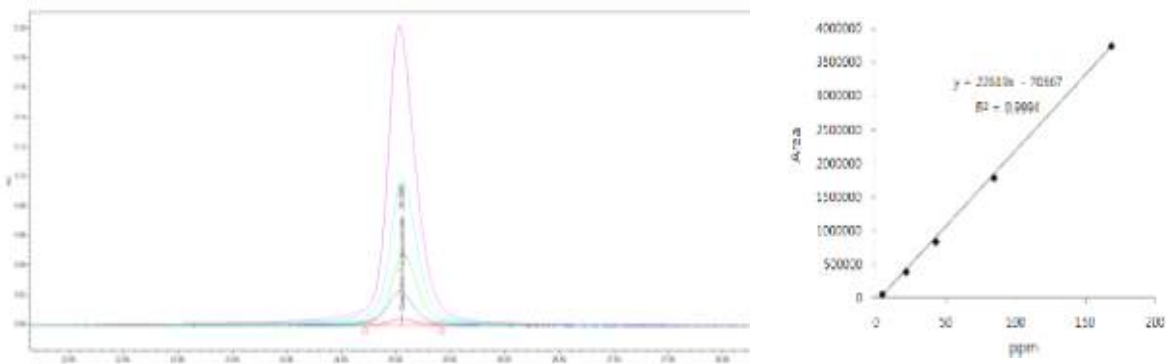
Lot No.	1 (Lot. SHP01-1)	2 (Lot. SHP01-2)	평균(mg/g)
반복수			
1반복	38.78	35.09	
2반복	78.78	34.65	
3반복	39.04	32.87	
평균(mg/g)	38.87	34.20	36.54

[표 30] 캠밸얼리(경기도) 포도 잎 추출물의 Quercetin-3-O-glucuronide 함량

Lot No.	1 (Lot. SHP01-1)	2 (Lot. SHP01-2)	평균(mg/g)
반복수			
1반복	27.10	26.70	
2반복	26.97	26.84	
3반복	26.61	26.65	
평균(mg/g)	26.89	26.73	26.71



[그림 45] 캠밸얼리(경기도) 포도 잎 추출물의 총 플라보놀 배당체 크로마토그램



[그림 46] 캠밸얼리(경기도) 포도 잎 추출물의 Quercetin-3-O-glucuronide 크로마토그램

다) 포도 잎 원료별 추출물 지표성분 검토

포도 산지 및 품종에 따른 포도 잎 추출물의 지표성분 함량 비교 분석을 위해 추가로 10월에 확보한 지역별, 품종별 각 원료를 Lab. scale 수준으로 생산하였으며, 제조공정 및 수율은 아래 표와 같음. 생산된 각 원료의 추출물에 대해 Quercetin-3-O-glucuronide 및 총 플라보놀 배당체 함량을 분석하여 원료 간 패턴을 비교 분석하였음

[표 31] 포도 잎 원료별 추출 수율 비교

제조공정	품 종	원료량(g)	건조엑스량(g)	수득률(%)	평균(%)
포도 잎 ↓ 추출	캠벨얼리/경기도	5,000	5190	10.38	10.94
		5,000	626.6	12.53	
		5,000	495.0	9.9	
↓ 여과	거봉/전라도	100	30.6	30.6	29.55
		100	28.5	28.5	
↓ 농축	캠벨얼리/전라도	100	35.0	35.0	35.65
		100	36.3	36.3	
↓ 건조	스튜벤/전라도	100	29.0	29.0	29.40
		100	29.8	29.8	
↓ 포도 잎 추출물	청포도/전라도	100	33.3	33.3	33.30
		100	33.3	33.3	
↓ 포도 잎 추출물	머루/전라도	60	19.2	32.0	32.00
		100	32.0	32.0	

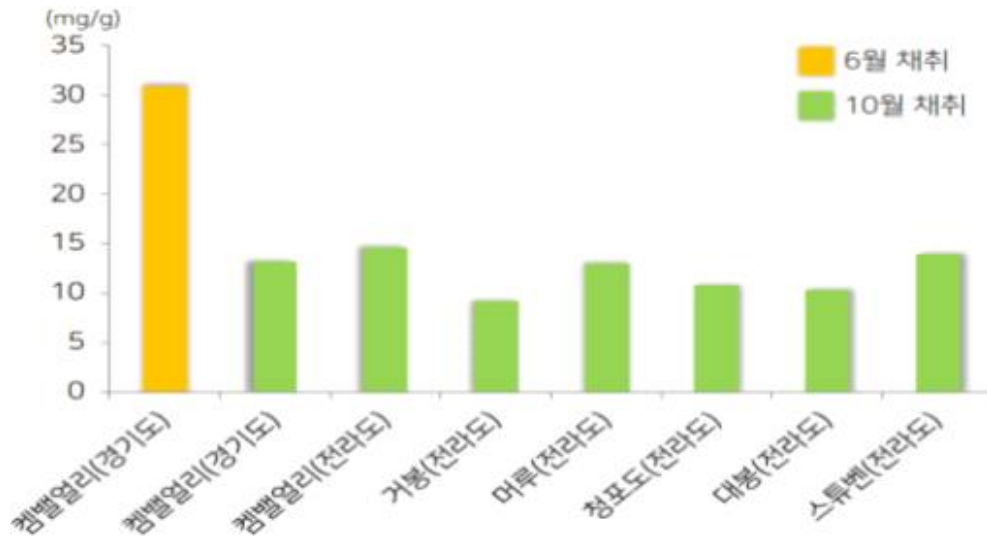
* 캠벨얼리(경기도), 캠벨얼리(전라도), 거봉, 스투벤, 대봉은 2로트 3반복 분석결과 평균값 산출

* 캠벨얼리/경기도 원료의 경우 GLP 독성실험을 위한 Pilot 수준으로 생산하여, 3로트 3회 반복 분석 결과 값의 평균 값

(1) Quercetin-3-O-glucuronide

포도 잎 원료별 추출물에 대한 Quercetin-3-O-glucuronide 함량 분석결과는 다음과 같음. 같은 캠벨얼리 종의 경우 경기도와 전라도 지역 간에 큰 함량 차이는 없었지만, 원료 함량 비교와는 반대로 추출물에서는 전라도 지역의 Quercetin-3-O-glucuronide 함량이 더 높은 것으로 확인되었음

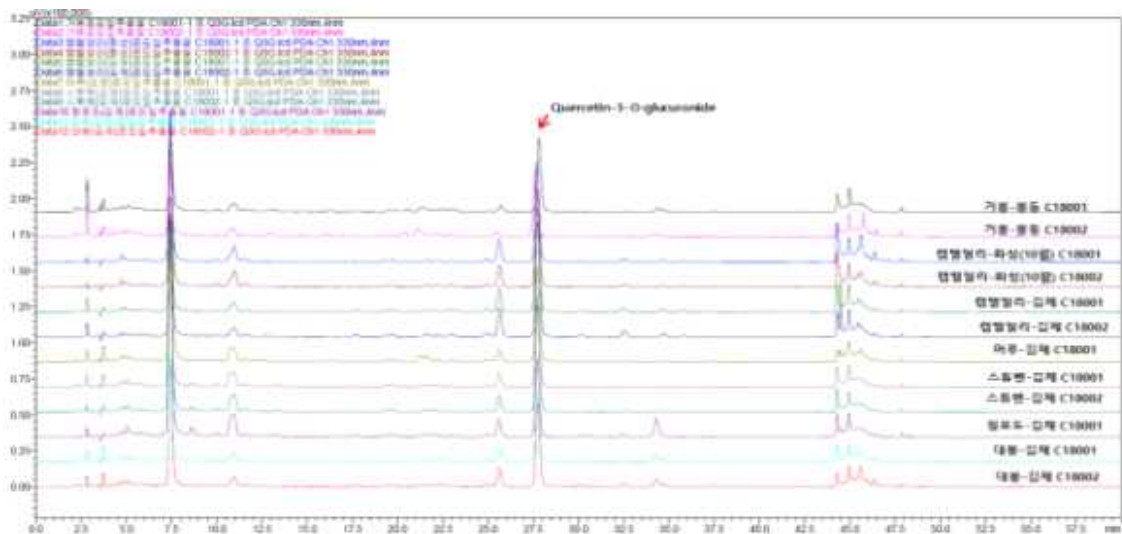
같은 지역권 내에서 품종별 함량을 비교한 결과 캠벨얼리가 가장 높았으며, 거봉이 가장 낮은 것으로 확인되었음. 그 외 품종은 비슷한 수준으로 큰 차이는 없는 것으로 확인됨



[그림 47] 포도 잎 원료 추출물별 Quercetin-3-O-glucuronide 함량 비교

[표 32] 포도 잎 추출물 중 quercetin-3-O-glucuronide 함량 분석

분 류			quercetin-3-O-glucuronide (mg/g)
채취 시기	지역	품종	
2018.06	경기도 1	캠벨얼리	30.77
2018.10	경기도 1	캠벨얼리	13.13
2018.10	전라도 1	캠벨얼리	14.58
2018.09	전라도 2	거 봉	9.20
2018.10	전라도 1	머 루	12.99
2018.10	전라도 3	청 포 도	10.74
2018.10	전라도 4	대 봉	10.31
2018.10	전라도 3	스 튜 벤	13.88



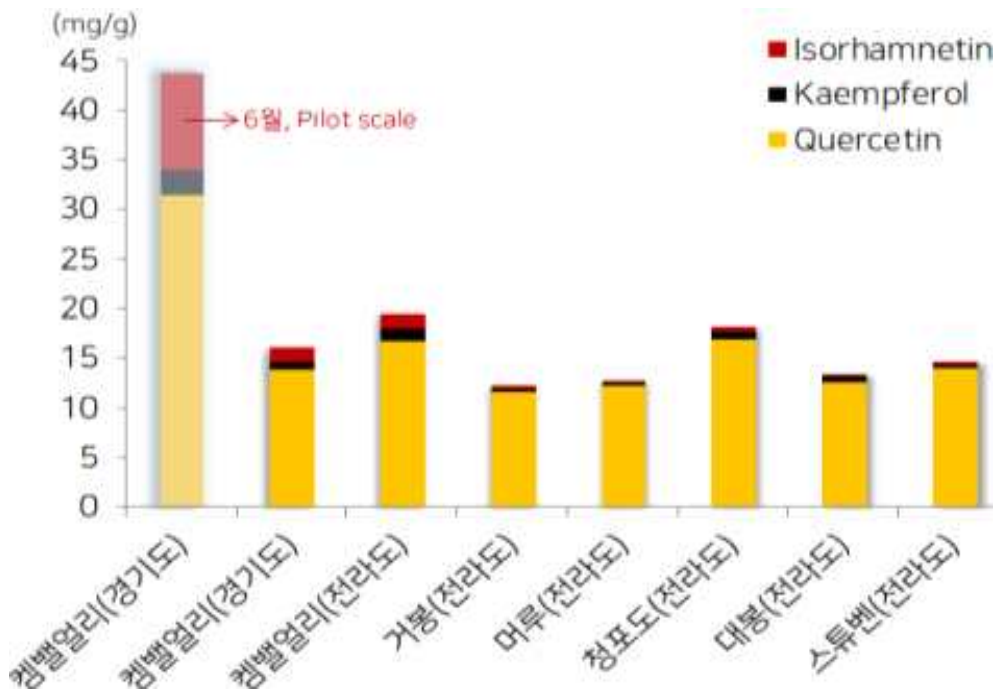
[그림 48] 포도 잎 추출물 중 Quercetin-3-O-glucuronide 크로마토그램

(2) 총 플라보놀 배당체

포도 잎 원료별 추출물의 총 플라보놀 배당체 함량에 대한 분석결과는 다음과 같음. 각 원료별 총 플라보놀 배당체의 구성 비율은 비슷한 수준이나, 6월 경기도 지역에서 채취한 캠벨얼리 종의 경우 Isorhamnetin 함량이 비교적 높은 것으로 확인되었음

같은 캠벨얼리 종의 경우 경기도와 전라도 지역 간에 총 플라보놀 배당체의 함량 차이는 크게 없었지만, 전라도 지역의 함량이 경기도 지역에 비해 약 20% 정도 더 높은 것으로 확인되었음

같은 지역권 내에서 품종별 함량을 비교한 결과 캠벨얼리가 가장 높았으며, 거봉이 가장 낮은 것으로 확인되었음. 그 외 품종은 비슷한 수준으로 큰 차이는 없는 것으로 확인됨



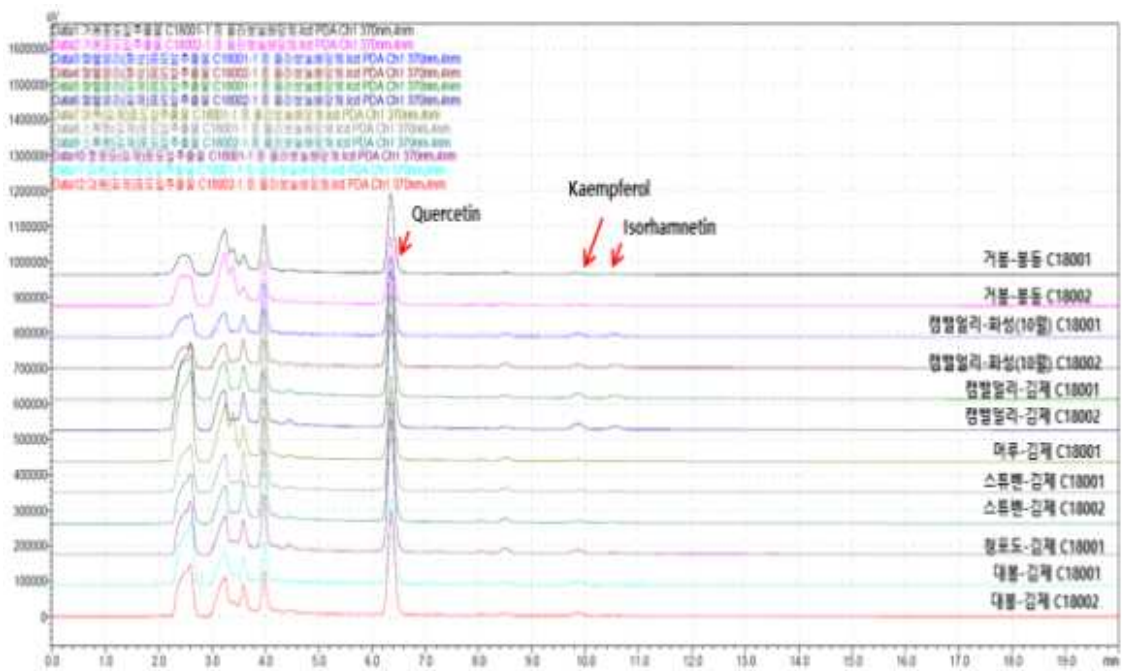
[그림 49] 포도 잎 원료 추출물 중 총 플라보놀 배당체 함량 비교

[표 33] 포도 잎 원료별 총 플라보놀 배당체 함량 분석

[단위 : mg/g(%)]

분 류			Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	총 플라보놀 배당체 합
채취 시기	지역	품종				
2018.06	경기도 1	캠벨얼리	31.429(71.92)	2.517(5.76)	9.753(22.32)	43.699
2018.10	경기도 1	캠벨얼리	13.913(86.40)	0.762(4.73)	1.428(8.87)	16.103
2018.10	전라도 1	캠벨얼리	16.747(85.77)	1.311(6.71)	1.468(7.52)	19.526
2018.09	전라도 2	거 봉	11.697(95.15)	0.315(2.56)	0.282(2.29)	12.294
2018.10	전라도 1	머 루	12.272(95.90)	0.268(2.09)	0.257(2.01)	12.797
2018.10	전라도 3	청 포 도	16.963(93.52)	0.753(4.15)	0.423(2.33)	18.139
2018.10	전라도 4	대 봉	12.543(93.33)	0.639(4.76)	0.257(1.91)	13.439
2018.10	전라도 3	스 튜 벤	13.965(95.49)	0.330(2.26)	0.329(2.25)	14.624

* 캠벨얼리(경기도), 캠벨얼리(전라도), 거봉, 스투벤, 대봉은 2로트 3반복 분석결과 평균값 산출
 * 캠벨얼리/경기도 원료의 경우 GLP 독성실험을 위한 Pilot 수준으로 생산하여, 3로트 3회 반복 분석 결과 값의 평균 값

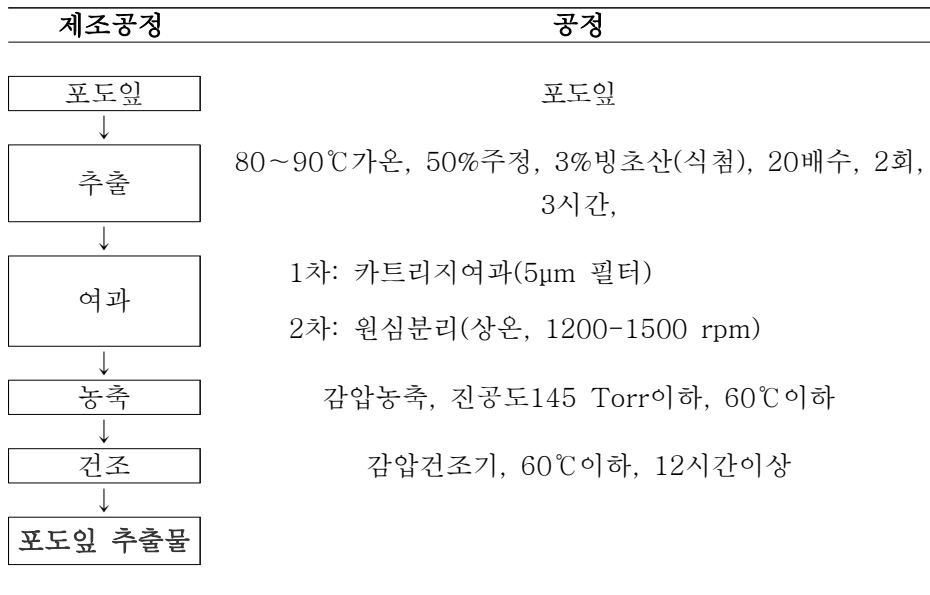


[그림 50] 포도 잎 원료별 총 플라보놀 배당체 크로마토그램

라) 포도잎 추출물 표준화 검토

포도잎 추출물의 표준화를 위하여 머루, 캠벨을 채취시기별로 채취하여 추출물에서의 지표물질 함량과 효능비교를 위해 진행하였음.

(1) 제조공정



(2) 머루, 캠벨 포도잎 추출물의 채취 시기별 수율 비교

채취시기	캠벨 (<i>Vitis labruscana</i> B.)	머루 (<i>Vitis coignetiae</i>)	비고
7월	25.26%	28.46%	결실기
8월	26.19%	26.15%	착색기
9월	28.22%	30.13%	성숙기

(3) 머루, 캠벨 포도잎 추출물의 채취시기별 성상



[머루, 2020년 7월]



[머루, 2020년 8월]



[머루, 2020년 9월]



[캠벨, 2020년 7월]



[캠벨, 2020년 8월]

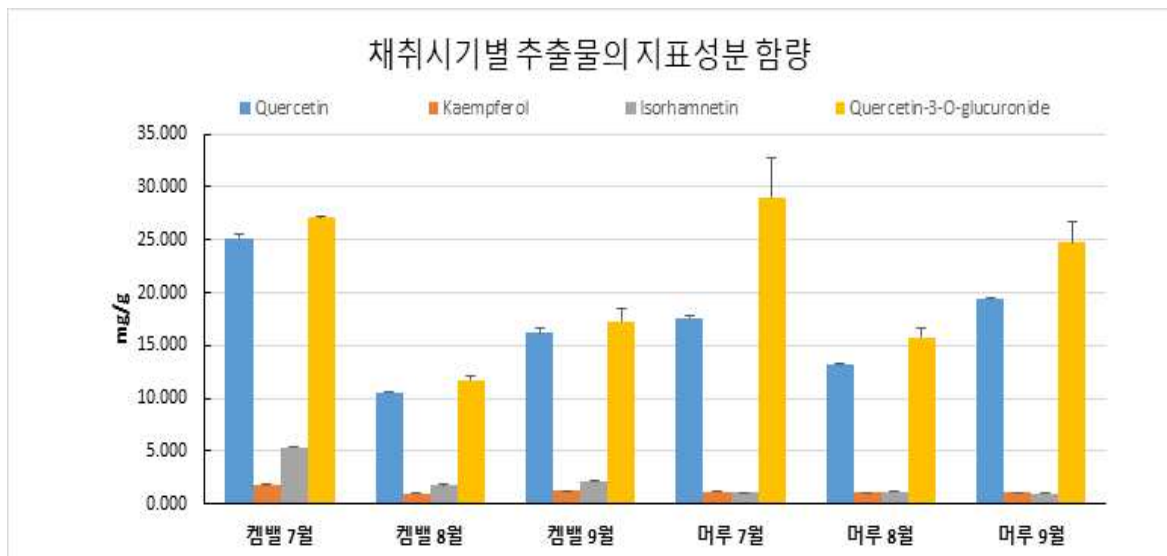


[캠벨, 2020년 9월]

(4) 함량분석결과

[단위 : mg/g]

	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin	Quercetin-3-O-glucuronide
캠벨 7월	25.168±0.293	1.768±0.077	5.309±0.042	27.096±0.138
캠벨 8월	10.575±0.088	1.001±0.008	1.772±0.013	11.713±0.359
캠벨 9월	16.142±0.504	1.218±0.010	2.075±0.041	17.246±1.291
머루 7월	17.612±0.275	1.134±0.007	1.051±0.004	29.056±3.681
머루 8월	13.190±0.067	1.018±0.003	1.177±0.006	15.755±0.825
머루 9월	19.399±0.121	1.070±0.007	0.967±0.005	24.744±1.940



마) 포도 잎 추출물 공인시험기관 성적서 확보

포도 잎 추출물의 영양성분(열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨), 대장균군(정성), 성장, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약 58종, Quercetin-3-O-glucuronide에 대한 공인분석기관(한국기능식품연구원) 시험 성적서를 확보하였음.

(1) 영양성분

- 개별인정신청자료를 확보하기 위하여 19001로트에 대해 추가 확보함.



[18001]



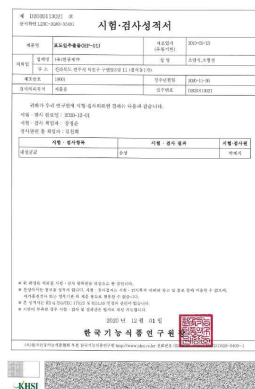
[19001]

(2) 대장균군

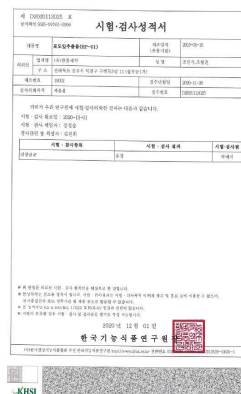
기준	18001	19001	19002	19003
대장균군 -음성	음성	음성	음성	음성



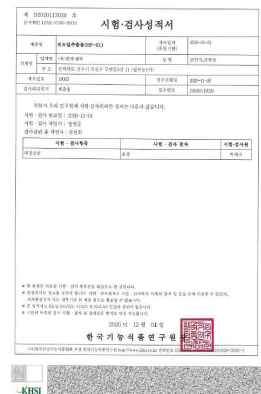
[18001]



[19001]



[19002]



[19003]

(3) 정상 및 중금속 : 납, 비소, 카드뮴, 수은

Lot. No. 검사항목	18001	18002	18003	평균
납(mg/kg)	0.2121	0.1872	0.1815	0.1936
총비소(mg/kg)	0.0765	0.1100	0.0811	0.0892
카드뮴(mg/kg)	0.0209	0.0114	0.0138	0.0154
총수은(mg/kg)	0.0032	불검출	불검출	0.0011
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 녹색색의 분말			

시험-검사결과서

주요사항: 납, 비소, 카드뮴, 수은

항목	단위	결과	비고
납	mg/kg	0.2121	합격
비소	mg/kg	0.0765	합격
카드뮴	mg/kg	0.0209	합격
수은	mg/kg	0.0032	합격

한국기술연구원

[18001]

시험-검사결과서

주요사항: 납, 비소, 카드뮴, 수은

항목	단위	결과	비고
납	mg/kg	0.1872	합격
비소	mg/kg	0.1100	합격
카드뮴	mg/kg	0.0114	합격
수은	mg/kg	불검출	합격

한국기술연구원

[18002]

시험-검사결과서

주요사항: 납, 비소, 카드뮴, 수은

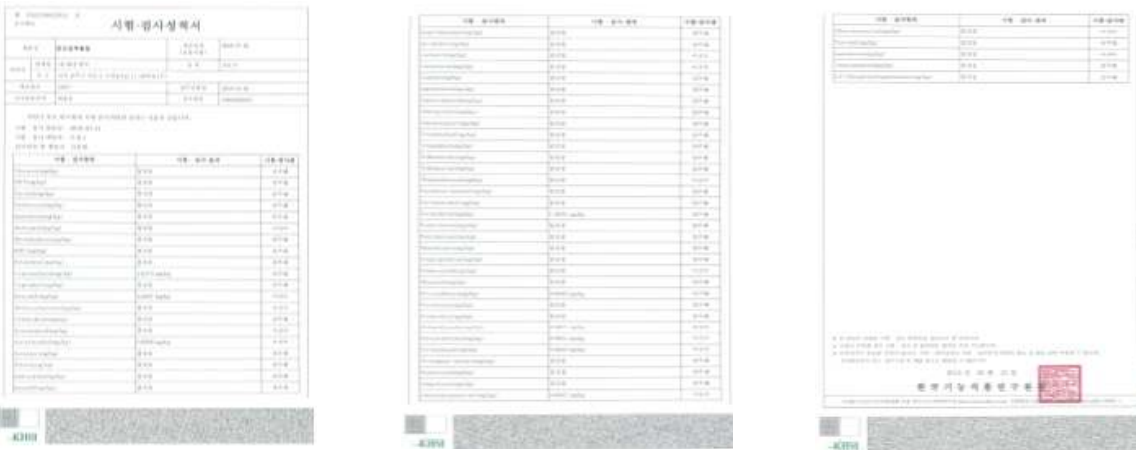
항목	단위	결과	비고
납	mg/kg	0.1815	합격
비소	mg/kg	0.0811	합격
카드뮴	mg/kg	0.0138	합격
수은	mg/kg	불검출	합격

한국기술연구원

[18003]

(4) 잔류농약

- 58종7)



- 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT) 3 로트 시험성적서 확보

* 2차년도에 58종 잔류농약 검토하였으나, 개별인정신청 자료 중 포도잎추출물은 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우에 해당되어 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 시험분석 자료가 요구됨.

시험-검사성적서			
제출번호	포도잎추출물(1901-01)	제출일자	2020-09-23
제출명	포도잎추출물	성격	종전(1)호출물
제출처	충청북도 공주시농업기술센터(충청북도 11 농촌진흥청)	제출인원	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26

[19001]

시험-검사성적서			
제출번호	포도잎추출물(1902-01)	제출일자	2020-09-24
제출명	포도잎추출물	성격	종전(1)호출물
제출처	충청북도 공주시농업기술센터(충청북도 11 농촌진흥청)	제출인원	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26

[19002]

시험-검사성적서			
제출번호	포도잎추출물(1903-01)	제출일자	2020-09-24
제출명	포도잎추출물	성격	종전(1)호출물
제출처	충청북도 공주시농업기술센터(충청북도 11 농촌진흥청)	제출인원	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26
검사항목	엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT	검사항목	2020-10-26

[19003]

7) 잔류농약 58종 : 다이아지논(Diazinon), 디디티(DDT), 디코폴(Dicofol), 디크로보스(Dichlorvos), 말라치온(Malathion), 메소밀(Methomyl), 메톡시페노자이드(Methoxyfenozide), 메티다치온(Methidathion), 보스칼리드(Boscalid), 비에치퍼(BHC), 비펜스린(Bifenthrin), 싸이퍼메스린(Cypermethrin), 싸이프로디닐(Cyprodinil), 싸이할로쓰린(Cyhalothrin), 아세타미프리트(Acetamidprid), 아조시스트로빈(Azoxystrobin), 아트라진(Atrazine), 에치온(Ethion), 엔도설향(Endosulfan), 이마자릴(Imazalil), 이소프로치오란(Isoprothiolane), 이프로디온(Iprodione), 카바릴(Carbaryl), 카보후란(Carbofuran), 캡탄(Captan), 퀸토젠(Quintozene), 클로로타로닐(Chlorothalonil), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 클로르헨나피르(Chlorfenapyr), 트리다이메폰(Triadimefon), 트리아조포스(Triazophos), 트리프로미줄(Triflumizole), 트리플루무론(Triflumuron), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 파라티온-메틸(Parathion-Methyl), 파클로부트라졸(Paclobutrazol), 페메스린(Permethrin), 페니트로치온(Fenitrothion), 펜발라레이트(Fenvalerate), 펜토에이트(Phenthoate), 펜프로파스린(Fenpropathrin), 펜헥사미드(Fenhexamid), 포스메트(Phosmet), 프로시미돈(Procymidone), 프로클로라즈(Prochloraz), 프로페노포스(Profenofos), 플루벤디아마이드(Flubendiamide), 피라크로스트로빈(Pyraclostrobin), 피리메타닐(Pyrimethanil), 피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl), 후루디옥소닐(Fludioxonil), 디메토에이트(Dimethoate), 클로란트라닐리프롤(Chlorantraniliprole), 클로로벤주론(Chlorobenzuron), 피프로닐(Fipronil), 루페뉴론(Lufenuron), 테부코나졸(Tebuconazole), 이육-디아이피엔(2,6-Diisopropyl-naphthalene)

(5) Quercetin-3-O-glucuronide

반복수 \ Lot. No.	19001	19002	19003	평균
1반복	14.49	12.58	12.55	
2반복	14.68	13.40	13.44	
3반복	15.05	12.86	12.72	
평균	14.74	12.95	12.90	13.53

제 10202090101 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 합격
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
Quercetin-3-O-glucuronide	HPLC	합격

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19001]

제 10202090170 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 합격
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
Quercetin-3-O-glucuronide	HPLC	합격

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19002]

제 10202090171 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 합격
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
Quercetin-3-O-glucuronide	HPLC	합격

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19003]

(6) 이산화황

기준	19001	19002	19003
30 ppm이하	불검출	불검출	불검출

제 10202013023 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 불검출
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
이산화황	HPLC	불검출

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19001]

제 10202013027 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 불검출
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
이산화황	HPLC	불검출

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19002]

제 10202013023 호
등록번호 1020-1001-0001

시험-검사성적서

제출자	표준화물(제1020-1001-0001)	제출일자	2020-09-12
발탁자	국립보건연구원	검정	국립보건연구원
목적	품질관리	검정방법	HPLC
주요	국립보건연구원(국립보건연구원 11(서울특별시))	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원
주요	국립보건연구원	검정위치	국립보건연구원

본 시험은 국립보건연구원 시험실에서의 시험 결과에 따라 실시됩니다.
시험 일자: 2020-09-12
시험 결과: 불검출
검정위치: 국립보건연구원

시험-검사항목	시험-검사 방법	시험-검사 결과
이산화황	HPLC	불검출

2020년 09월 12일
한국기술시험연구원

[19003]

(7) 벤조피렌

기준	19001	19002	19003
2.33 ppb이하 ¹⁾ (µg/kg, ppb)	0.63	0.44	0.78
노출안전역(MOE)	3.70×10^6	5.30×10^6	2.99×10^6

¹⁾ 기준설정 : 포도잎추출물 1일 섭취량(1.8g/day)에 대한 벤조피렌의 노출안전역(MOE) 1×10^6 이하로 설정함[$4.2 \times 10^6 \text{ ng} / 1 \times 10^6 / 1.8 \text{ g(1일 최대복용량)} = 2.33 \text{ ppb}$].

제 190001(19001) 호 한국식품안전관리인증번호			
시험·검사성적서			
제출명	포도잎추출물(DP-01)	제출일자	2020-08-13 (2020.08.13)
발주명	신원식품주식회사	농장	신원식초농장
주 소	경기도 양주시 덕양구 구룡로 11-1(남양주시)	검사일자	2020-08-20
검사소	2001	검사내역	19001-001
주제사자명	최종우	검사번호	190001001
2020년 12월 03일 한국기능식품연구원			

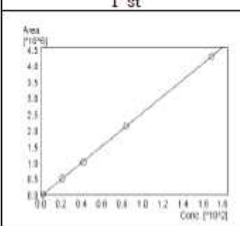
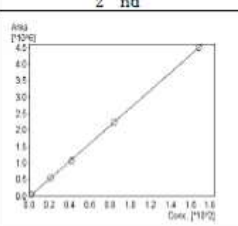
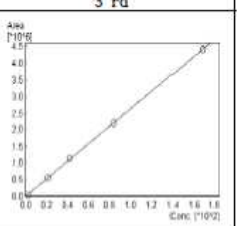
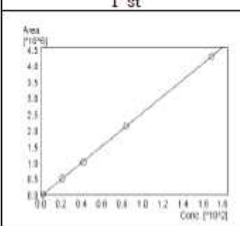
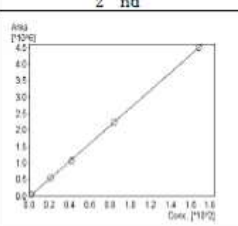
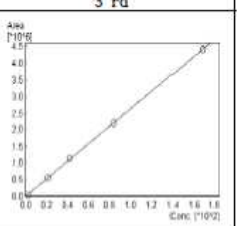
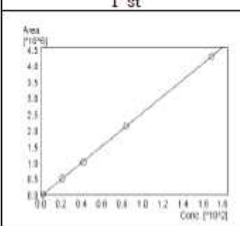
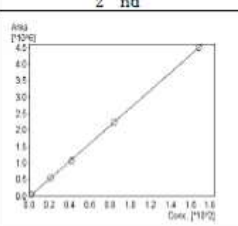
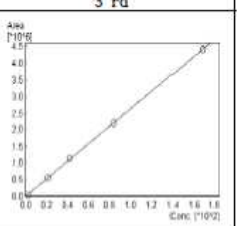
[19001]

제 190002(19002) 호 한국식품안전관리인증번호			
시험·검사성적서			
제출명	포도잎추출물(DP-01)	제출일자	2020-08-16 (2020.08.16)
발주명	신원식초농장	농장	신원식초농장
주 소	경기도 양주시 덕양구 구룡로 11-1(남양주시)	검사일자	2020-08-20
검사소	2001	검사내역	19002-001
주제사자명	최종우	검사번호	190002001
2020년 12월 03일 한국기능식품연구원			

[19002]

제 190003(19003) 호 한국식품안전관리인증번호			
시험·검사성적서			
제출명	포도잎추출물(DP-01)	제출일자	2020-09-01 (2020.09.01)
발주명	신원식초농장	농장	신원식초농장
주 소	경기도 양주시 덕양구 구룡로 11-1(남양주시)	검사일자	2020-09-01
검사소	2001	검사내역	19003-001
주제사자명	최종우	검사번호	190003001
2020년 12월 03일 한국기능식품연구원			

[19003]

정밀성	<table border="1"> <tr> <td>분석일</td> <td>2020.06.24</td> <td>2020.06.24</td> <td>2020.06.26</td> </tr> <tr> <td>분석자</td> <td>유진주</td> <td>유진주</td> <td>유승엽</td> </tr> <tr> <td>분석기기</td> <td>HPLC-9/A1201-11 (shimabzu LC-2030C 3D)</td> <td>HPLC-8/A1201-10 (shimabzu LC-2030C)</td> <td>HPLC-14/A1201-17 (Waters 2695)</td> </tr> <tr> <td>분석컬럼</td> <td colspan="3">Waters Xbridge Shield RP18 컬럼 (4.6mm I.D. × 150mm, 3.5µm)</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3">함량(mg/g)</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>16.03</td> <td>15.40</td> <td>15.57</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>16.02</td> <td>15.12</td> <td>15.62</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>15.99</td> <td>15.27</td> <td>15.60</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>15.87</td> <td>15.12</td> <td>15.73</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>15.66</td> <td>14.90</td> <td>15.58</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>15.64</td> <td>14.91</td> <td>15.48</td> </tr> <tr> <td>평균</td> <td>15.87</td> <td>15.12</td> <td>15.60</td> </tr> <tr> <td>표준편차</td> <td>0.179</td> <td>0.197</td> <td>0.081</td> </tr> <tr> <td>RSD(%)</td> <td>1.13</td> <td>1.30</td> <td>0.52</td> </tr> <tr> <td>총 평균</td> <td colspan="3">15.53</td> </tr> <tr> <td>표준편차</td> <td colspan="3">0.35</td> </tr> <tr> <td>RSD</td> <td colspan="3">2.27</td> </tr> </table>			분석일	2020.06.24	2020.06.24	2020.06.26	분석자	유진주	유진주	유승엽	분석기기	HPLC-9/A1201-11 (shimabzu LC-2030C 3D)	HPLC-8/A1201-10 (shimabzu LC-2030C)	HPLC-14/A1201-17 (Waters 2695)	분석컬럼	Waters Xbridge Shield RP18 컬럼 (4.6mm I.D. × 150mm, 3.5µm)				함량(mg/g)			1	16.03	15.40	15.57	2	16.02	15.12	15.62	3	15.99	15.27	15.60	4	15.87	15.12	15.73	5	15.66	14.90	15.58	6	15.64	14.91	15.48	평균	15.87	15.12	15.60	표준편차	0.179	0.197	0.081	RSD(%)	1.13	1.30	0.52	총 평균	15.53			표준편차	0.35			RSD	2.27																						
	분석일	2020.06.24	2020.06.24	2020.06.26																																																																																							
	분석자	유진주	유진주	유승엽																																																																																							
	분석기기	HPLC-9/A1201-11 (shimabzu LC-2030C 3D)	HPLC-8/A1201-10 (shimabzu LC-2030C)	HPLC-14/A1201-17 (Waters 2695)																																																																																							
	분석컬럼	Waters Xbridge Shield RP18 컬럼 (4.6mm I.D. × 150mm, 3.5µm)																																																																																									
		함량(mg/g)																																																																																									
	1	16.03	15.40	15.57																																																																																							
	2	16.02	15.12	15.62																																																																																							
	3	15.99	15.27	15.60																																																																																							
	4	15.87	15.12	15.73																																																																																							
	5	15.66	14.90	15.58																																																																																							
	6	15.64	14.91	15.48																																																																																							
	평균	15.87	15.12	15.60																																																																																							
표준편차	0.179	0.197	0.081																																																																																								
RSD(%)	1.13	1.30	0.52																																																																																								
총 평균	15.53																																																																																										
표준편차	0.35																																																																																										
RSD	2.27																																																																																										
직선성	기 준	R2 ≥ 0.999 (n=3)																																																																																									
	결 과	R2 ≥ 0.999 (n=3)																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>AREA</th> <th>1 st</th> <th>2 nd</th> <th>3 rd</th> <th>평균</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Slope</td> <td>25733.70</td> <td>26932.46</td> <td>26203.62</td> <td>26289.93</td> </tr> <tr> <td>Intercept</td> <td>-18030.62</td> <td>-32164.76</td> <td>6439.30</td> <td>-14585.36</td> </tr> <tr> <td>R²</td> <td>0.999694</td> <td>0.998907</td> <td>0.999931</td> <td>0.999511</td> </tr> <tr> <td>Regression equation</td> <td>Y = 25733.7*x-18030.7</td> <td>Y = 26932.5*x-32164.8</td> <td>Y = 26203.6*x+6439.59</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				AREA	1 st	2 nd	3 rd	평균	Slope	25733.70	26932.46	26203.62	26289.93	Intercept	-18030.62	-32164.76	6439.30	-14585.36	R ²	0.999694	0.998907	0.999931	0.999511	Regression equation	Y = 25733.7*x-18030.7	Y = 26932.5*x-32164.8	Y = 26203.6*x+6439.59																																																															
	AREA	1 st	2 nd	3 rd	평균																																																																																						
Slope	25733.70	26932.46	26203.62	26289.93																																																																																							
Intercept	-18030.62	-32164.76	6439.30	-14585.36																																																																																							
R ²	0.999694	0.998907	0.999931	0.999511																																																																																							
Regression equation	Y = 25733.7*x-18030.7	Y = 26932.5*x-32164.8	Y = 26203.6*x+6439.59																																																																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Calibration Curve</th> </tr> <tr> <th>1 st</th> <th>2 nd</th> <th>3 rd</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>R² = 0.9999</td> <td>R² = 0.99982</td> <td>R² = 0.99980</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Calibration Curve				1 st	2 nd	3 rd						R ² = 0.9999	R ² = 0.99982	R ² = 0.99980																																																																									
Calibration Curve																																																																																											
1 st	2 nd	3 rd																																																																																									
																																																																																											
R ² = 0.9999	R ² = 0.99982	R ² = 0.99980																																																																																									
정확성	기 준	평균회수율 90.0~110.0%																																																																																									
	결 과	96.89 ~ 106.11%																																																																																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>생분양 (ppm)⁽¹⁾</th> <th>spiked 양 (ppm)</th> <th>검출량 (ppm)</th> <th>회수율 (%)</th> <th>평균(%)</th> <th>RSD (%)</th> <th>표준 편차</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">정확성 시험용액1</td> <td>1-1</td> <td rowspan="3">9.617</td> <td>4.8</td> <td>14.629</td> <td>104.42</td> <td rowspan="3">102.91</td> <td rowspan="3">1.3</td> </tr> <tr> <td>1-2</td> <td>4.8</td> <td>14.514</td> <td>102.02</td> </tr> <tr> <td>1-3</td> <td>4.8</td> <td>14.527</td> <td>102.29</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">정확성 시험용액2</td> <td>2-1</td> <td rowspan="3">9.617</td> <td>9.6</td> <td>19.804</td> <td>106.11</td> <td rowspan="3">104.76</td> <td rowspan="3">1.2</td> </tr> <tr> <td>2-2</td> <td>9.6</td> <td>19.579</td> <td>103.77</td> </tr> <tr> <td>2-3</td> <td>9.6</td> <td>19.639</td> <td>104.40</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">정확성 시험용액3</td> <td>3-1</td> <td rowspan="3">9.617</td> <td>14.4</td> <td>23.569</td> <td>96.89</td> <td rowspan="3">97.18</td> <td rowspan="3">0.3</td> </tr> <tr> <td>3-2</td> <td>14.4</td> <td>23.637</td> <td>97.36</td> </tr> <tr> <td>3-3</td> <td>14.4</td> <td>23.628</td> <td>97.30</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">정확성 시험용액4</td> <td>4-1</td> <td rowspan="3">9.617</td> <td>19.2</td> <td>28.525</td> <td>98.48</td> <td rowspan="3">100.43</td> <td rowspan="3">2.7</td> </tr> <tr> <td>4-2</td> <td>19.2</td> <td>28.671</td> <td>99.24</td> </tr> <tr> <td>4-3</td> <td>19.2</td> <td>29.501</td> <td>103.56</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">정확성 시험용액5</td> <td>5-1</td> <td rowspan="3">9.617</td> <td>24</td> <td>33.737</td> <td>100.50</td> <td rowspan="3">101.54</td> <td rowspan="3">1.6</td> </tr> <tr> <td>5-2</td> <td>24</td> <td>33.797</td> <td>100.75</td> </tr> <tr> <td>5-3</td> <td>24</td> <td>34.426</td> <td>103.37</td> </tr> </tbody> </table>					생분양 (ppm) ⁽¹⁾	spiked 양 (ppm)	검출량 (ppm)	회수율 (%)	평균(%)	RSD (%)	표준 편차	정확성 시험용액1	1-1	9.617	4.8	14.629	104.42	102.91	1.3	1-2	4.8	14.514	102.02	1-3	4.8	14.527	102.29	정확성 시험용액2	2-1	9.617	9.6	19.804	106.11	104.76	1.2	2-2	9.6	19.579	103.77	2-3	9.6	19.639	104.40	정확성 시험용액3	3-1	9.617	14.4	23.569	96.89	97.18	0.3	3-2	14.4	23.637	97.36	3-3	14.4	23.628	97.30	정확성 시험용액4	4-1	9.617	19.2	28.525	98.48	100.43	2.7	4-2	19.2	28.671	99.24	4-3	19.2	29.501	103.56	정확성 시험용액5	5-1	9.617	24	33.737	100.50	101.54	1.6	5-2	24	33.797	100.75	5-3	24	34.426
	생분양 (ppm) ⁽¹⁾	spiked 양 (ppm)	검출량 (ppm)	회수율 (%)	평균(%)	RSD (%)	표준 편차																																																																																				
정확성 시험용액1	1-1	9.617	4.8	14.629	104.42	102.91	1.3																																																																																				
	1-2		4.8	14.514	102.02																																																																																						
	1-3		4.8	14.527	102.29																																																																																						
정확성 시험용액2	2-1	9.617	9.6	19.804	106.11	104.76	1.2																																																																																				
	2-2		9.6	19.579	103.77																																																																																						
	2-3		9.6	19.639	104.40																																																																																						
정확성 시험용액3	3-1	9.617	14.4	23.569	96.89	97.18	0.3																																																																																				
	3-2		14.4	23.637	97.36																																																																																						
	3-3		14.4	23.628	97.30																																																																																						
정확성 시험용액4	4-1	9.617	19.2	28.525	98.48	100.43	2.7																																																																																				
	4-2		19.2	28.671	99.24																																																																																						
	4-3		19.2	29.501	103.56																																																																																						
정확성 시험용액5	5-1	9.617	24	33.737	100.50	101.54	1.6																																																																																				
	5-2		24	33.797	100.75																																																																																						
	5-3		24	34.426	103.37																																																																																						
정량한계	산출방법	표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법																																																																																									

검출한계		검출한계(LOD): $3.3 \times \sigma / S$, 정량한계(LOQ): $10 \times \sigma / S$ (σ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)					
	결 과	검출한계 : Quercetin-3-o-glucuronide 2.452 $\mu\text{g/mL}$,					
		정량한계 : Quercetin-3-o-glucuronide 7.432 $\mu\text{g/mL}$					
		AREA	1 st	2 nd	3 rd	평균	표준편차
		2.1	38552	40395	41532	40160	1503.87
		21	534968	548646	554248	545954	9917.90
		42	1035384	1057373	1147854	1080204	59609.60
		84	2157647	2234346	2189939	2193977	38508.64
		168	4303452	4498699	4407792	4403314	97700.49
		Slope	25734	26932	26204	26290	-
		Intercept	-18030.62	-32164.76	6439.30	-14585.36	19531.28
		LOD	2.505	2.393	2.460	2.452	-
		LOQ	7.590	7.252	7.454	7.432	-

(3) 자사 시험법 밸리데이션 보고서

1802-1973 한정제약	시험법 밸리데이션 보고서 (Analytical Procedure Validation Report)				
대상 포도잎추출물(HP-01)중 Quercetin-3-o-glucuronide	회사번호 AVR-018	제품번호 00			
시험법 밸리데이션 보고서 Analytical Procedure Validation Report					
제품명 포도잎추출물(HP-01)					
대상 Quercetin-3-o-glucuronide					

2) 고구마 지상부 추출물

가) 제조공정 확립

고구마 지상부를 원료로 효능실험을 위한 추출물을 제조하였으며 Lab. scale 수준의 조건을 적용하여 총 2번의 반복 생산을 진행하였음. 반복 생산을 통해 설정한 각각의 공정 및 수율은 다음과 같음

제조공정	공정	지표성분 *함량변화(mg/g)	수율(g)
고구마지상부	고구마지상부	0.45	200
↓			
추출	80~90℃가온, 50%주정, 3%빙초산(식첨), 20배수, 2회, 3시간,		
↓			
여과	1차: 5µm 여과 2차: 원심분리(상온, 1200-1500 rpm)		
↓			
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
↓			
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
↓			
고구마지상부 추출물		1.34	59.7 (29.85%)

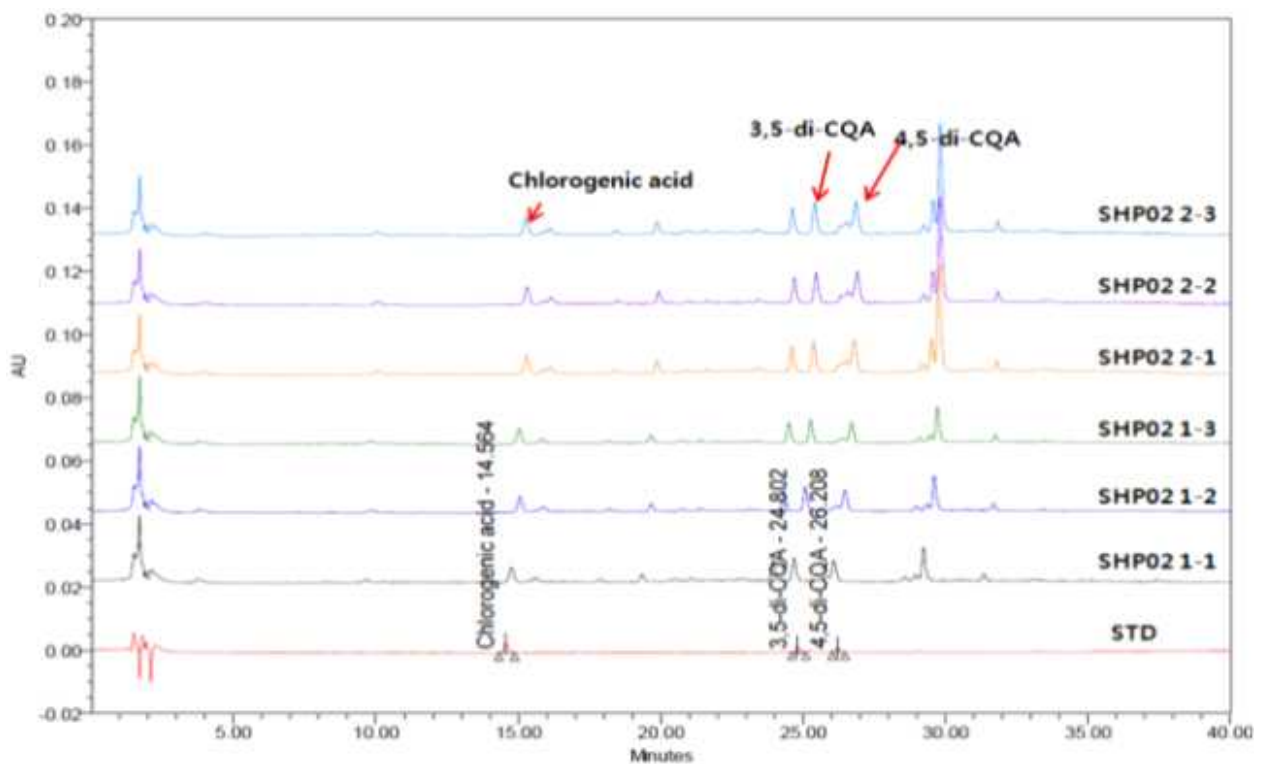
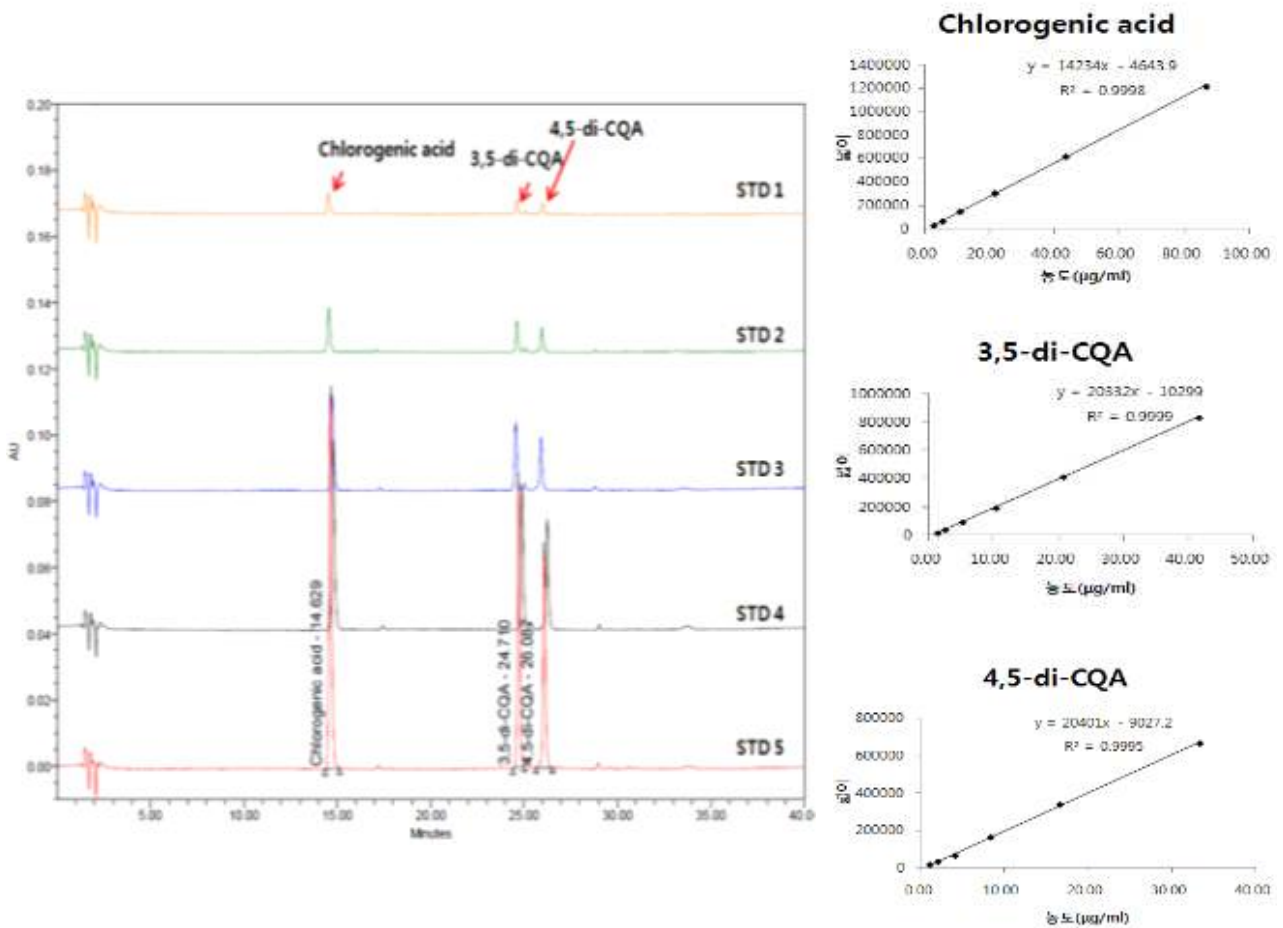
* 지표성분 : Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)의 합

나) 함량분석

고구마 지상부 추출물의 유효성분 함량은 아래와 같음. 고구마 지상부의 유효성분은 Chlorogenic acid, 3,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA), 4,5-di-Caffeoylquinic acid(CQA)의 합으로 나타냈으며, 평균 1.34 mg/g으로 확인되었음

[표 54] 고구마 지상부 추출물의 총 플라보놀배당체 함량

Lot No. 반복수	1 (Lot. SHP02-1)	2 (Lot. SHP02-2)	평균(mg/g)
1반복	1.15	1.50	
2반복	1.16	1.49	
3반복	1.19	1.53	
평균(mg/g)	1.17	1.51	1.34



[그림 90] 고구마 지상부 추출물의 유효성분 크로마토그램

3) 표고버섯 추출물

가) 제조공정

표고버섯을 원료로 효능실험을 위한 추출물을 제조하였으며 Lab. scale 수준의 조건을 적용하여 물 추출과 50% EtOH 추출 두 가지 방법으로 생산을 진행하였으며, 설정한 각각의 공정 및 수율은 다음과 같음

[표 55] 표고버섯 물 추출 제조공정

제조공정	공정	지표성분 *함량변화(mg/g)	수율(g)
표고버섯	표고버섯	2.00 (Eritadenine으로서)	100
↓			
추출	85~95℃가온, 상수, 10배수, 1회, 3시간		
↓			
여과	5μm 여과		
↓			
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
↓			
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
↓			
표고버섯 물 추출물		5.98 (Eritadenine으로서)	20.6 (20.60%)

[표 56] 표고버섯 50% 에탄올 추출 제조과정

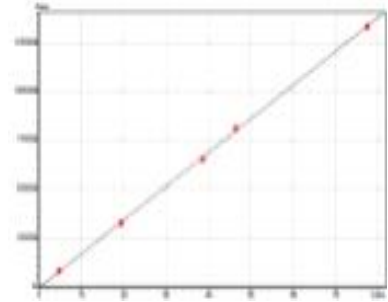
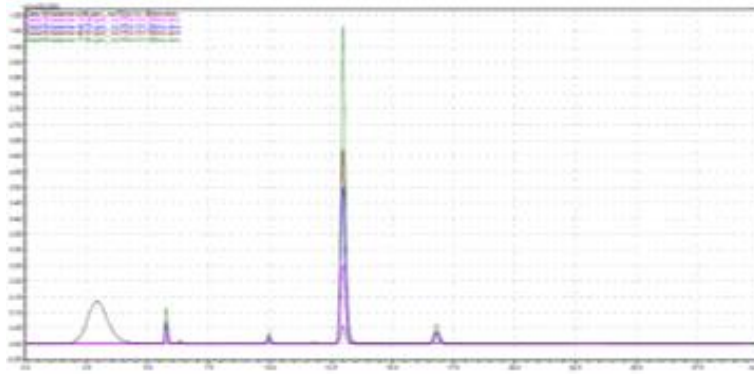
제조과정	공정	지표성분 *함량변화(mg/g)	수율(g)
표고버섯	표고버섯	2.00 (Eritadenine으로서)	100
↓			
추출	80~90℃가온, 50%에탄올, 10배수, 1회, 3시간		
↓			
여과	5μm 여과		
↓			
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
↓			
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
↓			
표고버섯 50%에탄올 추출물		5.77 (Eritadenine으로서)	25.6 (25.60%))

나) 함량분석

표고버섯 추출물의 Eritadenine 함량은 아래와 같음. 표고버섯 추출물의 Eritadenine 함량은 물 추출물의 경우 평균 5.98 mg/g, 50% 에탄올 추출물의 경우 평균 5.77 mg/g 으로 확인되었음

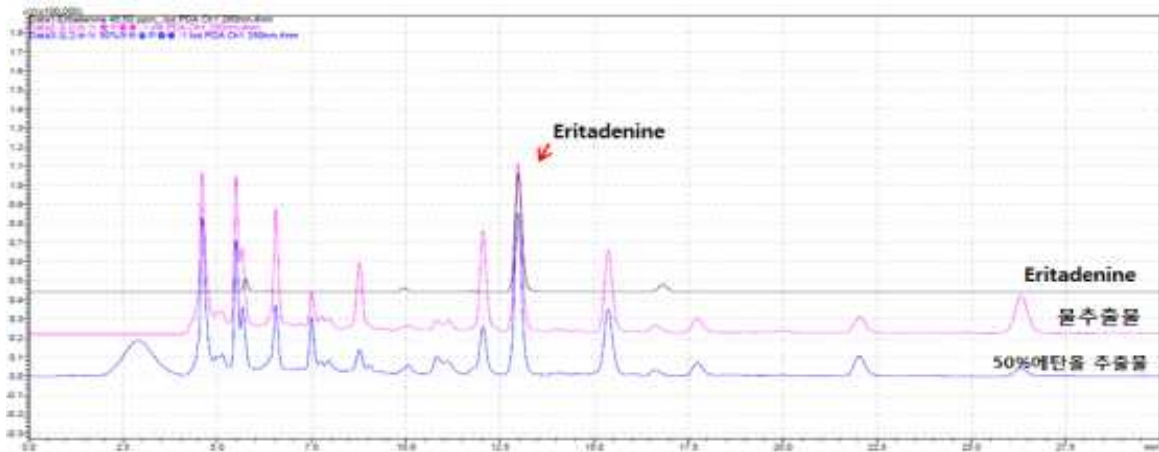
[표 57] 표고버섯 추출물의 Eritadenine 함량

반복수	Lot No.	물 추출물	50% 에탄올추출물
1반복		5.99	5.79
2반복		5.98	5.76
3반복		5.98	5.77
평균(mg/g)		5.98	5.77



$$f(x) = 17332.4x - 8060.48$$

$$R^2 = 0.9996$$



[그림 91] 표고버섯 추출물의 Eritadenine 크로마토그램

4) 칩잎 추출물

가) 제조공정

칩잎의 효능실험을 위한 추출물을 제조하였으며 Lab. scale 수준의 조건을 적용하여 물 추출, 50% EtOH 추출, 50% EtOH+3% 빙초산 추출 세 가지 방법으로 생산을 진행하였으며, 설정한 각각의 공정 및 수율은 다음과 같음

[표 58] 칩잎 물 추출 제조공정

제조공정	공정	지표성분 함량변화(mg/g)	수율(g)
칭량	칩잎 100 g	0.223 (총 이소플라본함으로서)	100
↓			
추출	85~95℃가운, 상수, 20배수, 2회, 3시간		
↓			
여과	1µm 여과		
↓			
원심분리	4,000 rpm, 10℃, 15분간 원심분리		
↓			
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
↓			
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
↓			
칩잎 물 추출물		0.560 (총 이소플라본함으로서)	15 (15.0%)

[표 59] 칩잎 50% EtOH 추출 제조공정

제조공정	공정	지표성분 함량변화(mg/g)	수율(g)
칭량	칩잎 100 g	0.223 (총 이소플라본함으로서)	100
↓			
추출	85~95℃가운, 50%EtOH, 20배수, 2회, 3시간		
↓			
여과	1µm 여과		
↓			
원심분리	4,000 rpm, 10℃, 15분간 원심분리		
↓			
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
↓			
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
↓			
칩잎 50% EtOH 추출물		0.604 (총 이소플라본함으로서)	13 (13.0%)

[표 60] 칩잎 50% EtOH + 3% 빙초산 추출 제조과정

제조과정	공정	지표성분 함량변화(mg/g)	수율(g)
칭량	칩잎 100 g	0.223 (총 이소플라본함으로서)	100
추출	85~95℃가운, 50%EtOH+ 3%빙초산 20배수, 2회, 3시간		
여과	1µm 여과		
원심분리	4,000 rpm, 10℃, 15분간 원심분리		
농축	감압농축, 진공도145 Torr이하, 60℃이하		
건조	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상		
칩잎 50% EtOH + 3%빙초산추출 물		0.686 (총 이소플라본함으로서)	13.2 (13.2%)



[그림 92] 혈행개선 신규소재 칩잎 건조엑스

나) 함량분석





칩잎 추출물의 총이소플라본 함량은 아래와 같음. 칩잎 추출물의 총 이소플라본 함량은 물 추출물의 경우 평균 0.560 mg/g, 50% 에탄올 추출물의 경우 평균 0.604 mg/g, 50% 에탄올 + 3% 빙초산 추출물의 경우 0.686 mg/g으로 확인되었음

[표 61] 칩잎의 총 이소플라본 함량 (단위: mg/g)

반복수 \ Lot No.	물 추출물	50% 에탄올추출물	50%에탄올 +3% 빙초산 추출물
1반복	0.565	0.601	0.668
2반복	0.565	0.612	0.691
3반복	0.551	0.600	0.699
평균(mg/g)	0.560	0.604	0.686

5) 연잎(하엽) 추출물

가) 제조방법 및 수율

	물		30%EtOH		60%EtOH		95%EtOH	
원료량(g)	200		200		200		200	
용매	물	주정	물	주정	물	주정	물	주정
용매량(mL)	4,000	-	2,736	1,264	1,474	2,526	-	4,000
추출온도	100℃		85℃		50℃		15~25℃(상온)	
추출시간	3시간		3시간		3시간		72시간	
여과	200 mesh		200 mesh		200 mesh		200 mesh	
여액량(mL)	2,800		2,900		2,800		3,450	
Brix	0.9		12.9		20.0		19.9	
건조량(g)	30.5		35.7		38.7		12.9	
수율	15.25 %		17.85 %		19.35		6.45 %	
성상								

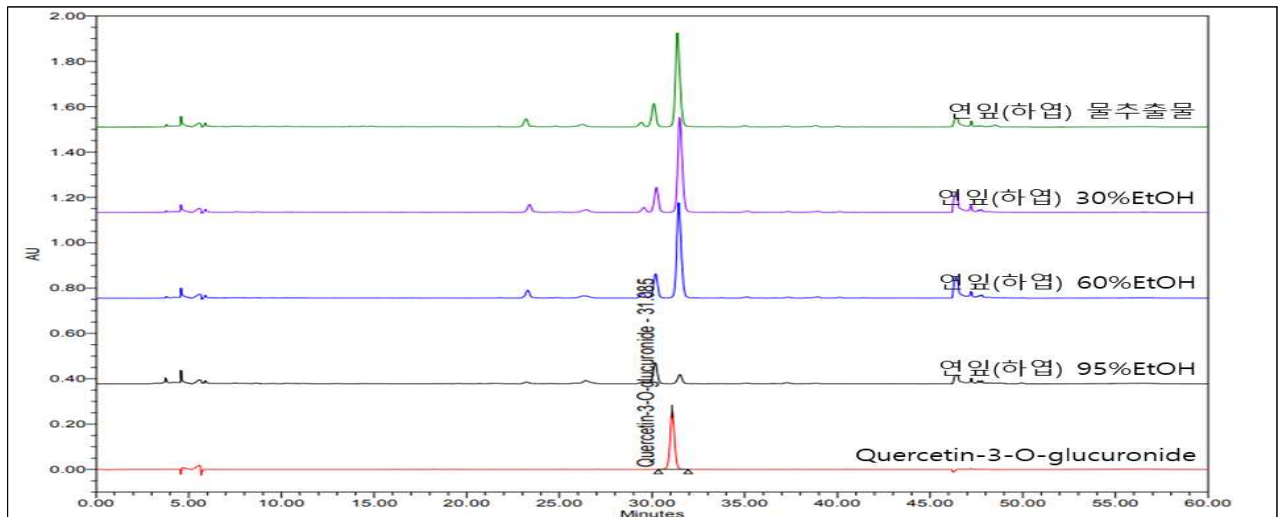
나) 함량분석

(1) 함량분석결과

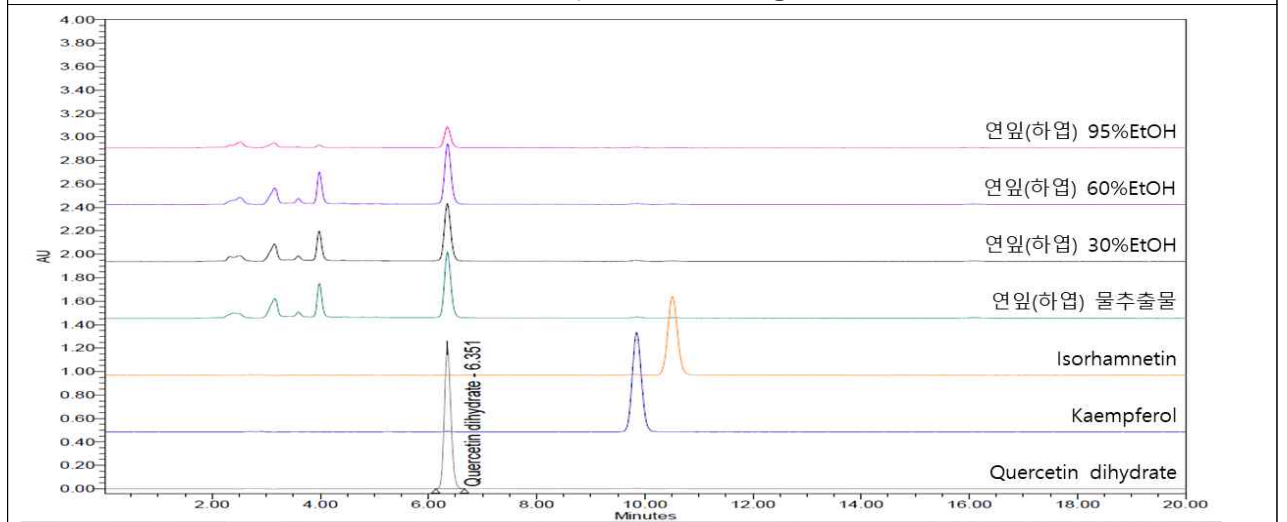
[단위 : mg/g]

	Quercetin-3-O-glucuronide	플라보놀 배당체		
		Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin
하엽 물추출물	55.8	32.69	0.62	0.28
하엽 30%에탄올추출물	56.5	28.55	0.52	0.21
하엽 60%에탄올추출물	56.9	30.31	0.71	0.28
하엽 95%에탄올추출물	5.2	10.36	0.32	0.10

(2) 크로마토그램



연잎 추출물 중 Quercetin-3-O-glucuronide




연잎 추출물 중 플라보놀배당체

2-2. 포도 잎 추출물 안전성 · 안정성

1) 안전성

- GLP기관 : 대구가톨릭대학교 GLP센터

GLP기관명	대구가톨릭대학교 GLP센터	<p style="text-align: center;">최 종 보 고 서</p> <p style="text-align: center;">포도잎 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회경구투여 독성시험</p>  <p style="text-align: center;">시 험 번 호 : 18-SD07-009 최종보고서 발행일 : 2018. 11. 5 시 험 의 의 과 기 관 : (유)한풍제약 / 전북 완주군 완주산단 6로 301 시 험 기 관 : 대구가톨릭대학교 (GLP센터) / 경북 경산시 중앙로 13-13</p> <p style="text-align: right; font-size: small;">대구가톨릭대학교 GLP 센터</p>
시험물질명	포도잎추출물 18001	
시험번호	18-S00T-009	
시험완료일	2018.11.05	
시험목적	포도잎추출물을 8주령 SD 랫드에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 평가하고, 개략치사량(ALD)를 추정하기 위해 수행됨.	
시험결과	<p>시험물질을 0, 5000 mg/kg의 용량으로 군당 암수 각 5마리에 단회경구투여하였고, 독성지표를 확인하기 위해 시험물질 투여 후 14일 동안 사망률, 일반증상 관찰, 체중변화를 관찰하였다.</p> <p>시험결과 시험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았고, 실험기간 중 시험물질의 영향으로 보이는 특이증상 및 부검결과 이상소견은 발생되지 않았다. 체중변화 및 증체량을 확인한 결과 암수모두 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$).</p> <p>따라서, 본 시험 조건에서 SD 랫드에 대한 포도잎 추출물의 ALD는 암수모두 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.</p>	

2) 포도잎 추출물의 안정성시험

(1) 안정성 시험(장기보존시험) 시험계획

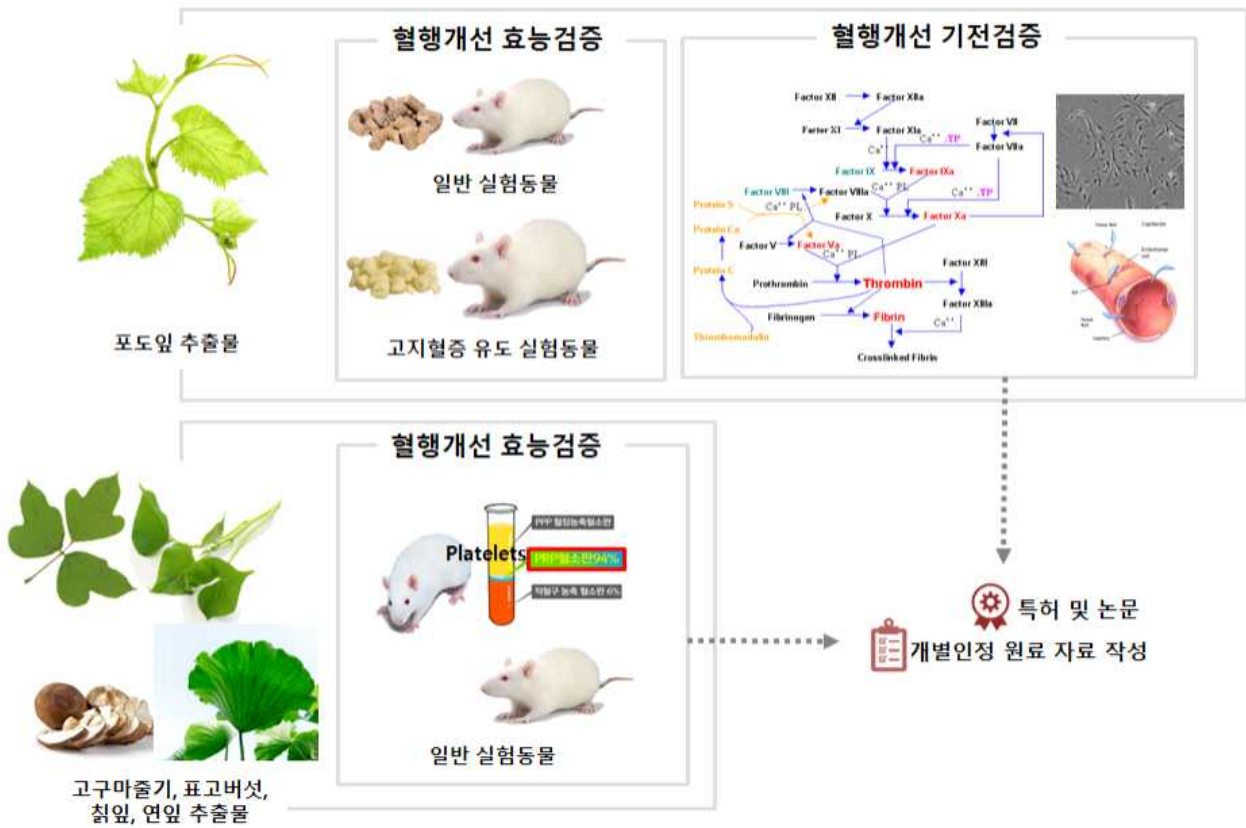
제조번호	시험일자	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
18001 18002	18.08.28 (보관일 18.09.06)	18.12.06	19.03.06	19.06.06	19.09.06	20.03.06	20.09.06
18003	18.08.28 (보관일 18.11.09)	19.02.09	19.05.09	19.08.09	19.11.09	20.05.09	20.11.09

(2) 안정성 시험(장기보존시험) 시험결과

시험구분	장기보존시험
자료종류	국내실시[안정성시험기준에 적합, 기초자료 첨부]
시험기관	(유)한풍제약
제조사 / 소재지	(유)한풍제약 / 전북 완주군 완주산단 6로 301
제조번호 / 제조일자	18001, 18002, 18003
시험자	유진주






시험기간		2018.08 - 2020.11.						
저장방법		기밀용기, 실온(1 ~ 30 ℃), 차광보존						
시험 약물	약물명	제품명	포도잎추출물		지표성 분명	Quercetin-3-o-glucuronide		
	함량	Quercetin-3-o-glucuronide 으로서 11.3-16.9 mg/g						
	포장	1) 용기의 재질 : 알루미늄호일(AL-Foil) 2) 포장단위 : 1.0 kg						
시험 조건	온도	25 ℃ ± 2						
	습도	RH 60 % ± 5						
	시험간격	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 (개월)						
기시법 시험항목		성상, 수분, 이물, 대장균군, 총플라보놀배당체, Quercetin-3-o-glucuronide, 납, 비소, 카드뮴, 총비소, 총수은, 잔류농약						
안정성 시험항목	0,3,6,9,12,18,24개월	성상, 수분, 이물, 대장균군, 총플라보놀배당체, Quercetin-3-o-glucuronide, 납, 비소, 카드뮴, 총비소, 총수은, 잔류농약						
시험 항목	기준	0개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상	이미, 이취가 없고 향미가 있는 흑갈색 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 분말
수분	8.2 % 이하	5.80 5.15 5.99	5.71 5.40 5.63	5.58 5.62 5.18	5.10 5.44 5.47	5.40 5.11 5.16	5.33 5.23 5.43	6.32 6.27 6.44
이물	금속성 이물로 10.0 mg/kg이하 크기 2.0 mm 이하	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
Quercetin-3-o-glucuronide	11.3-16.9 mg/g	15.05 14.36 14.05	14.46 14.18 14.06	14.49 14.33 14.21	15.52 14.49 14.07	15.02 14.22 14.17	15.41 14.29 14.22	15.02 14.43 14.48
납	2.0 mg/kg 이하	0.266 0.497 0.702	0.346 0.389 불검출	1.556 0.098 0.604	0.275 0.181 0.515	불검출 불검출 0.376	0.945 0.859 0.605	0.0135 0.1148 0.1428
카드뮴	0.5 mg/kg 이하	0.038 0.019 불검출	0.027 0.025 불검출	0.050 0.036 0.015	0.056 0.047 불검출	0.023 불검출 0.057	불검출 0.020 0.006	0.0166 0.0094 0.0273
총 비소	0.5 mg/kg 이하	0.238 불검출 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 0.206 0.402	0.195 0.351 불검출	불검출 불검출 불검출	불검출 불검출 0.183	0.0066 불검출 0.3026
총 수은	0.2 mg/kg 이하	0.002 0.000 0.020	0.001 0.001 0.006	0.001 0.001 0.001	0.000 0.000 0.002	0.000 0.000 0.001	0.003 0.002 0.004	0.003 0.003 0.000
잔류 농약	총디디티 (0.1 ppm 이하)	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	디엘드린 (0.01)	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

2-3. 혈행개선 소재의 효능평가




- 고지혈증 동물모델에서 포도 잎 추출물의 혈행개선 효능검증
- 본태성 고혈압 동물모델에서 포도 잎 추출물의 혈행개선 효능검증
- 포도 잎의 혈행개선 기전 연구 및 기허가 제품 간의 효능 비교 시험
- 신규 소재의 혈행개선 효능 평가
 - 고구마줄기, 표고버섯, 칩잎, 연잎

가. 효능평가 샘플

코드명	SHP01	SHP02	SHP03	SHP04	PD10
소재	포도잎	고구마줄기	표고 물 추출	표고 50% EtOH 추출	포도잎
사진					
보관조건	냉장(4℃) 보관				

코드명	GK	SHP05	SHP06	SHP07
소재	은행잎	취잎 물 추출	취잎 50%EtOH 추출	취잎 50%EtOH + 3%초산 추출
사진				
보관조건	냉장(4℃) 보관			

코드명	연잎 0	연잎 30	연잎 60	연잎 90
소재	연잎 물 추출	연잎 30% EtOH 추출	연잎 60% EtOH 추출	연잎 90% EtOH 추출
사진				
보관조건	냉장(4℃) 보관			

나. 연구내용

1) 항산화능 측정

DPPH 용액과 시험물질은 1:1로 혼합하여 암실에서 30분 방치하고 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)로 520 nm에서 흡광도를 측정. 시험물질은 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하였으며, 흡광도 측정 시 시험물질의 색을 보정하기 위해 각 시료와 메탄올을 1:1로 혼합하여 그 값을 보정함. 양성대조군으로는 Vitamin C(Ascorbic acid) 50 μM 을 사용함

$$\text{Hydroxyl radical scavenging ratio(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도

SOD(superoxide dismutase) 유사 활성은 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA)를 사용함. 시료를 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별로 희석하여 96 well plate에 20 μL 씩 분주한 후, 200 μL WST 용액과 20 μL enzyme을 넣고 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trolox를 사용함

$$\text{Superoxide radical scavenging ratio(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도

2) 혈관 내피세포 활성 억제능 평가

가) 세포 및 배양법

마우스 혈관 내피세포인 SVEC세포를 실험에 사용함. 계대수가 3에서 10 사이의 세포를 실험에 사용함. SVEC은 20% 소태아혈청(fetalbovine serum(FBS), Welgene, Seoul, Korea) 과 항생제(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin/streptomycin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g/l, Welgene)을 이용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양함

나) 혈관내피세포 활성관련 인자 측정

혈관 내피 세포를 96 well에 2×10^4 cells/well로 분주한 후세포가 70% 정도 자라면 serum free Medium 200과 함께 시험물질을 농도별로 4 시간 동안 전 처리하고, $\text{TNF-}\alpha$ 를 최종농도 10 ng/ml이 되도록 가하여 20 시간 더 배양함. 세포를 수확한 뒤, Easy blue 시약을 통해 mRNA를 분리하고 Realtime PCR을 수행하여 혈관내피 세포 관련 인자인 ICAM, VCAM vonW, Selectin의 증감을 확인하였음

다) 혈관내피세포의 세포이동 검사

$\text{TNF-}\alpha$ 에 의한 내피세포의 이동 억제 여부를 관찰하기 위하여 배양한 내피세포로 wound healing assay를 시행함. 6 well dish에 세포를 8×10^4 cells/well씩 넣고 overnight culture로 부착시킨 후 이튿날 dish 가운데에 yellow tip으로 그어서 상처를 주고, 시험물질을 처리함. $\text{TNF-}\alpha$ 10 ng/ml을 첨가한 것을 대조군으로 하고, 실험군으로는 $\text{TNF-}\alpha$ 와 함께 배양액에 시험물질을 각각 첨가함. 24시간 뒤 세포이동 간격을 Image J로 수치화함

3) 혈행개선능 평가(일반모델)

SD RATs를 일주일간 순화한 뒤, 시험물질을 경구로 7일간 투약함. 8일째 혈소판 및 생체


조직을 샘플링하여 분석에 사용함



[그림 121] 혈행개선능 평가(일반모델) 실험방법

4) 고지혈증 유도 모델

SD RATs에 45% high fat diet(중양실험동물)을 섭취시키면서 몸무게 및 혈중 TG 및 총 콜레스테롤을 측정하여 고지혈증 유도 정도를 확인함. 고지혈증이 유도된 시점부터 시험 물질을 10 mL/kg의 용량으로 1주 또는 2주 동안 경구 투약함

Cat no.	이미지	Fat 함량(gm%)	Fat 함량(kcal%)	보관
#D12451		24%	45%	냉장

실험 종료 시점에서 혈액 및 간 조직을 채취하여 시험물질의 혈행개선 및 고지혈증 개선에 대한 효능을 평가함



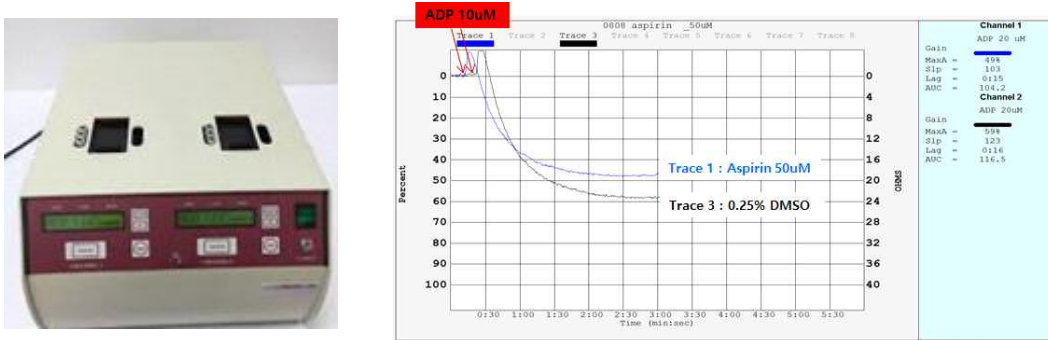
[그림 122] 혈행개선능 평가(고지혈증 유도 모델) 실험방법

5) 혈소판 분리

SD RATs을 ether 마취 후 복대동맥 채혈을 수행함. 이후 전혈 및 항응고제인 Sodium citrate 를 9:1의 비율로 혼합하여줌. 이후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리를 수행하여 PRP를 수득함. PRP를 분리하고 남은 혈액은 다시 3,000 rpm에서 10분간 재 원심분리 하여 PPP를 얻음. 이후 혈소판 수를 측정하여 혈장 내 혈소판의 수가 3×10^8 /mL이 되도록 희석하여 사용함

6) 혈소판 응집반응

Chrono-Log aggregometer model 700-2(Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 혈소판 응집능을 평가함. stir bars를 넣은 plastic cuvettes(Chrono-Log Co., USA)에 시험물질 및 3×10^8 /mL이 되도록 희석한 혈소판을 넣고 37°C에서 5분간 반응시킴. 이후 Chrono-Log aggregometer의 Base line을 설정한 뒤 혈소판 응집 촉진물질인 ADP 10 μ M 또는 collagen 5 μ g/mL을 가하여 5분간 반응시켜 응집을 유도하여 대조군에 대한 응집 억제 정도를 비교함



[그림 123] 혈액응고 장치(Chrono-Log aggregometer model) 및 데이터 수집

7) Prothrombin time(PT)

외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 방법으로, 혈장 22.5 μ l와 다양한 농도의 시료 2.5 μ l를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 25 μ l의 PT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정함

8) Activated partial thromboplastin time(aPTT)

내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 22.5 μ l와 다양한 농도의 마가자 추출물 및 분획물 시료 2.5 μ l를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 5분 간 가온 후, 25 μ l의 aPTT reagent(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 다시 37°C에서 5분간 반응시킴. 이후 25 μ l CaCl_2 을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정

9) 피부 출혈시간

실험종료 전에 실험동물은 ketamin/rumpum으로 마취하고 꼬리 끝은 5mm 자른 뒤 37°C 향온 수조에 넣고 혈액이 응고되는 시간을 관찰함

10) 혈액생화학적 분석

복대동맥을 통해 채혈한 전혈은 3,000 rpm 30분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 ALT, AST는 자동분석장치인 HITACHI 7600으로 분석함, TG, Cholesterol은 아산제약시약을 활용하여 측정하였음

11) 산화적 간 손상 보호능 평가

Lipid peroxidation(LPO)는 thiobarbituric acid 반응을 이용한 Ohkawa(1979)법으로 측정함. Tetraethoxypropane을 표준액으로 사용하였으며, 간 균질액에 SDS(8.1%, 0.2ml), thiobarbituric acid(0.67% 1.5ml), acetic acid(pH 3.5, 1.5ml)과 물(0.6ml)을 넣고 95°C에서 1시간 동안 반응 후, 얼음에서 식히고, n-butanol(5ml)를 섞음. 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 532 nm에서 측정함

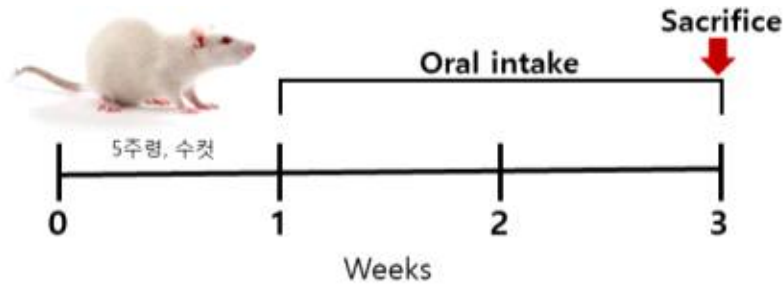
Glutathione은 enzymatic recycling method를 사용함. 랫트의 간 조직 2 g에 EDTA 2 mM이 함유된 1 M HClO₄ 용액을 5 ml 가하고 Polytron(IKA-WERKE)으로 분쇄하여 20% homogenate를 만듦. Homogenate를 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해서 phosphate 완충액을 이용하여 glutathione 농도가 표준 검량선 농도 범위 내에 들도록 희석한 후 총 glutathione정량을 위한 검체로 사용함. Microcuvette에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 ml, 6 mM DTNB 용액 0.1 ml에 검체 또는 glutathione 표준액 0.2 ml을 가해서 섞은 후 상온에서 4분간 방치함. 여기에 glutathione reductase(50 unit/ml)을 가해서 섞어준 후 412nm에서 약 1분간 흡광도의 변화를 측정하여 기울기 변화를 구함

12) 포도 잎 추출물의 항고혈압 효능 평가

가) 실험동물 및 시료처리

실험동물은 5주령의 수컷 본태성 고혈압쥐(Spontaneously hypertensive rats; SHR /NCrlCrlj)와 그 모태종인 정상대조군 일반쥐(Wistar-koyto, WKY)를 일본 Charles river사에서 구입하여 1주일간 환경에 적응시킨 후 초기 혈압을 기준으로 난괴법에 따라 4군으로 나누었음. 실험군은 정상대조군(WKY), 고혈압군(SHR), 양성대조군(Losartan potassium, 20 mg/kg/day, SHR+Losa) 및 SHP-1 투여군(100 mg/kg/day, SHR+SHP1)으로 나누어 실험을 진행함

양성대조군으로 사용한 Losartan potassium은 항고혈압제로서 경구적으로 유효한 nonpeptide angiotensin II (AII) receptor antagonist로서, 이 약물은 AII subtype 1(AT1) receptor에 경쟁적이고 선택적으로 결합함으로써 AII에 기인하는 생리적 효과를 차단하는 기능을 하기때문에 양성대조군으로서 Losartan을 선택하여 본태성 고혈압쥐에 있어서 HP-1이 고혈압치료제와 상응하는 효과를 보이는지 확인하였음. 사육 기간 중 실험동물의 체중은 주 1회 측정하였으며, 약물은 주 7회 일정 시간에 정량을 투여함. 정상대조군과 SHR군은 증류수를 1 ml 투여하였으며, 양성대조군과 SHP-1은 각각 20 mg/kg 및 100 mg/kg를 증류수 1 ml 농도로 녹여 경구 투여하였음



- (1) WKY (Wistar Kyoto rat, n=10)
- (2) SHR (Spontaneously Hypertensive rat, n=15)
- (3) SHR + Losartan (20 mg/kg/day, n=12)
- (4) SHR + HP-1 (100 mg/ml/day, n=12)

[그림 124] 본태성 고혈압 동물 모델에서 SHP-1의 효과

나) 혈압측정

실험동물의 혈압은 주 1회 측정하였으며 실험동물의 측정 시스템에 적응을 위하여 적응기 동안 총 3회 적응훈련을 거친 후 본 실험을 실시하였음. 실험동물을 혈압측정용 용기에 고정시킨 다음 37°C로 설정된 warming plat에 올려놓고 15분간 안정화시킨 다음 Non-invasive Blood Pressure System (CODA® High Throughput System, Kent Scientific corporation, Torrington, CT, USA)을 이용하여 꼬리정맥에서 심박동수, 수축기 혈압 및 이완기 혈압을 측정하였으며 10회 이상 반복 측정하여 평균값을 산출함



[그림 125] 본태성 고혈압 모델 혈압 측정 장치

다) 시료 채취

사육이 끝난 실험동물은 약 12시간 절식시키고, 흡입마취기를 이용하여 마취한 후 개복하여 복부 대동맥에서 혈액을 채취하고 혈관과 심장을 적출하였음. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였고, 심장과 혈관은 생리식염수 냉용액에 세척하여 trimming 후 여과지로 표면의 수분을 제거하고 무게를 측정함

라) 혈관 항상성 조절 기전 흥부 대동맥의 분리

-*ex vivo* : 건강한 수컷 백서 (Sprague-Dawley, 몸무게 약 250 - 300 g)의 두부를 탈골시킨 후 흉곽을 절제하고 흥부 대동맥을 분리하였음. HP-1을 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} 및 10^{-3} g/ml의 총 9개의 농도도 처리하여 혈관이완 효과를 확인하였음

-*in vivo* : 적응기 포함 총 4주의 시간이 지난 동물의 혈액을 채취한 후 흉곽을 개방하여 흥부대동맥을 분리하였음

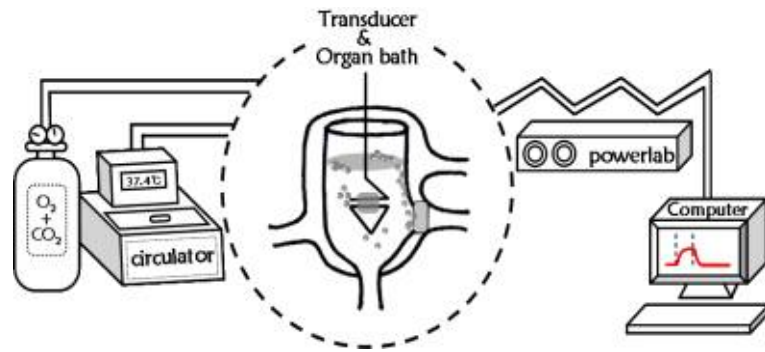
신속하게 분리된 흥부 대동맥을 95% O₂와 5% CO₂의 혼합기체로 포화된 ice-cold Krebs 용액 (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.1mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 1.5mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 10 mM glucose, pH 7.4)에 넣고 내부의 혈액과 혈관 주위 지방 및 결합조직을 제거한 후 약 3 mm 길이의 절편으로 만들었음. 이때 혈관 내피세포의 보존을 위해 혈관 내벽을 손상시키지 않도록 신중을 기하였음. 목적에 따라 혈관 내에 200 μ m의 steel을 집어넣어 물리적인 방법으로 혈관 내피세포를 제거하였음

마) 흥부대동맥 장력의 측정

준비된 흥부 대동맥 절편은 organ chamber 안 95% O₂, 5% CO₂혼합가스로 포화시킨 37°C의 Krebs 용액에서 고정시킨 후 isometric tension을 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계 (Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 측정하였음. 이때 heat/circulator (Model CW-10GL, JEIO TECH, Korea)에 의해 일정한 온도를 유지하였음. 본 실험을 시작하기 전에 90분 동안 방치하여 평형상태에 도달하게 하였는데, 초기 60분간 점진적으로 tension을 증가시켜 1 g의 optimum tension에 도달하도록 하였음

-*ex vivo* : optimum tension에 도달한 백서의 흥부대동맥은 본 실험에 들어가기 이전에 앞서 이완 반응을 살펴본 후 내피세포의 상태를 판단하였음. 먼저 10^{-6} M의 phenylephrine (PE)으로 수축시킨 후 평형에 도달하였을 때 1×10^{-6} M의 acetylcholine(ACh)에 의한 이완 반응을 관찰하고, 90 %이상 이완률을 보인 혈관만을 이용하여 추가 연구를 진행하였음. 이완상태를 확인한 혈관을 washing 한 후 30분 동안 안정화를 시켜주고 HP-1을 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} 및 10^{-3} g/ml의 총 9개의 농도도 처리하여 혈관이완 효과를 확인하였음

-*in vivo* : optimum tension에 도달한 고혈압 백서의 흥부대동맥을 PE 10^{-6} M을 처리하여 수축을 유도한 후 ACh을 농도별로 처리하여 혈관의 상태를 확인하였음. ACh의 농도는 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 및 3×10^{-7} M의 9가지 농도로 실험을 진행하였음



[그림 126] 혈관 장력 측정장치 모식도

바) 조직 절편 제작과 hematoxylin-eosin (H&E) 염색

적출된 흉부대동맥을 10% 포르말린 (pH 7.4)에 3일 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였음. 50% 알코올에서부터 100% 알코올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였음. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였음. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기(microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 6-7 μm 으로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착시켜 실온에서 3일 동안 건조시킴. 절편된 조직이 붙어있는 슬라이드를 xylene 용액에 넣고 파라핀을 제거한 후 100%, 80%, 70% 알코올 순으로 탈 xylene, 함수 과정을 거쳤으며 수돗물에 세척하였음. 핵 염색을 위해 Harris hematoxylin solution (Sigma, USA)에 8분 동안 슬라이드를 침적시킨 후 수돗물에 세척하였음. 감별 탈색을 위해 1% HCl-Alcohol에 5초씩 2번 침적시켜 수돗물로 세척하였음. 0.5% Ammonium Water로 중화 현색한 뒤 수돗물에 세척하고, 세포질 염색을 1% eosin Y solution (Muto, Japan)에 2분 동안 침적시킨 후 60%, 80%, 90%, 100% 알코올 순으로 탈 수 과정을 진행하였음. xylene 용액에서 투명 과정을 거쳐 봉입제로 봉합한 후 광학현미경으로 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였음(BX41, Olympus, Japan)

13) 통계분석

시험에 얻어진 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, student *t*-test를 수행하여 유의성을 검증함. 통계적인 유의성은 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정하였음

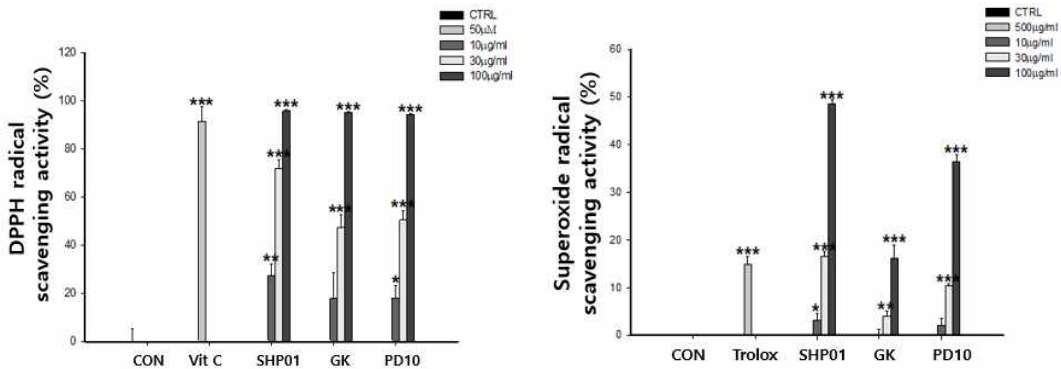
다. 연구결과

1) 포도잎 추출물 및 기허가 제품의 혈행개선 효능검증

시험 소재	포도잎 추출물(SHP01) 및 기허가 제품(은행잎 추출물:Ginko, GK)
시험 항목	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 항산화능 평가(non cell system) ▪ 혈소판 기능 평가(<i>in vitro</i>) ▪ 일반 실험동물에서의 혈소판 기능 평가(<i>in vivo</i>) ▪ 고지혈증 유도 실험동물에서의 혈행개선능 평가(<i>in vivo</i>) ▪ 혈관내피세포 관련 평가

• 포도잎 추출물(SHP01) 항산화능 평가(non cell system)

- 시험 약물에서 농도 의존적인 hydroxyl radical 소거능을 나타냄. 모든 추출물 100 μ g/mL(포도잎; $95.7 \pm 0.7\%$, 은행잎 추출물(GK); $95.1 \pm 0.5\%$, PD10; $94.3 \pm 0.2\%$)에서 양성대조군인 VitC 50 μ M와 유사한 항산화 효과를 보임. 포도잎 추출물은 저농도인 30 μ g/mL에서 $71.8 \pm 3.8\%$ 로 약 70%의 높은 hydroxyl radical 소거능을 나타냄
- 시험 약물에서 superoxide radical 소거능이 농도 의존적으로 증가하였으며 음성대조군 대비 유의적 차이를 보임. 그 중 가장 높은 항산화능을 나타낸 100 μ g/mL 포도잎 ($48.5 \pm 0.8\%$), PD10($36.4 \pm 1.6\%$)에서 양성 대조군인 500 μ g/mL trolox($14.8 \pm 1.7\%$)와 SOD 활성 비교 시 각각 3배, 2배 이상의 superoxide radical 소거능 효과를 나타냄

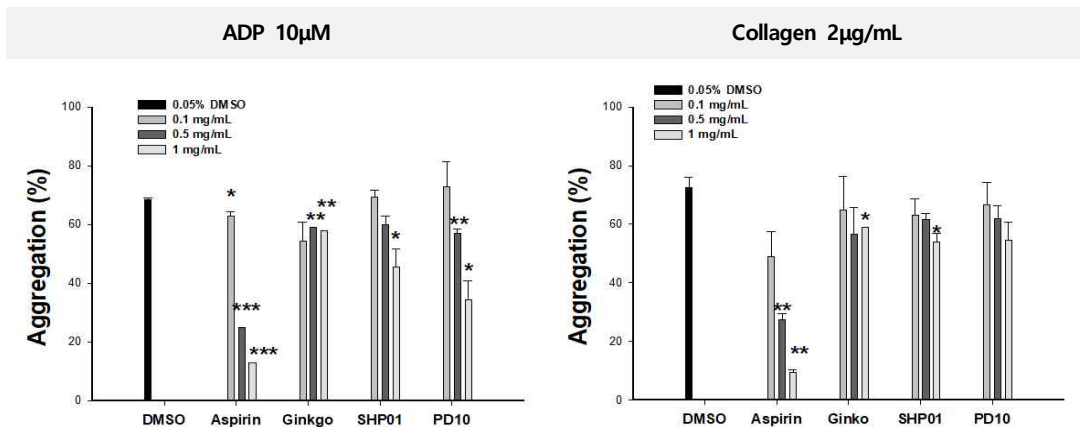


[그림 127] 포도잎 추출물(SHP01)의 항산화능 평가

포도잎 추출물(SHP01)은 기존 소재인 은행잎 추출물(GK)과 유사한 항산화 효능을 나타냄

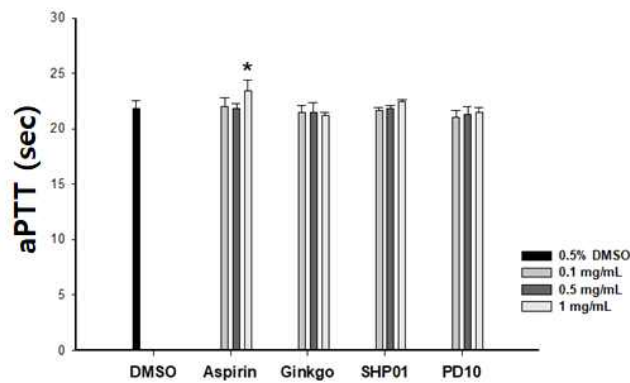
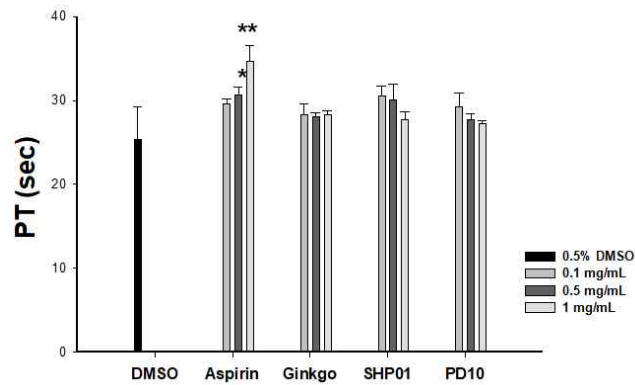
• 포도잎 추출물(SHP01)의 혈소판 기능 평가(*in vitro*)

- 포도잎(SHP01), 은행잎 및 PD10에 대한 혈소판 응집을 비교 평가함. 음성대조군은 시료를 용해할 때 사용한 DMSO의 동일농도(0.5%)가 포함된 용액을 사용하였음. 양성대조군으로는 아스피린을 시료와 같은 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 사용하였음. 응집유도제로는 ADP 및 Collagen을 각각 사용하여 혈소판 응집을 평가함
- 시험 결과 양성대조군으로 사양한 아스피린의 경우 ADP를 처리한 그룹에서 농도 의존적으로 8, 63, 81%p의 응집 억제율을, collagen을 처리한 그룹에서는 농도별로 각각 32, 62, 86%p의 응집 억제율을 나타냄
- ADP를 응집유도제로 사용한 그룹에서는 은행잎을 0.5, 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 각각 13.0, 15.2%, 포도잎 추출물을 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 33%, PD10을 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리한 그룹에서 각각 16, 49%로 유의적인 혈소판 응집을 나타냄
- Collagen을 응집유도제로 사용한 그룹에서는 은행잎 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 18%, 포도잎 추출물을 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 25.1%의 유의적인 혈소판 응집이 나타남



[그림 130] 포도잎 추출물(SHP01)의 혈소판 응집 평가(*in vitro*)

- PT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 0.5, 1mg/mL의 농도에서 각각 30.6, 34.7초로 음성대조군(25.3초) 대비 유의적 증가가 관찰됨. 모든 시료에서 PT 지연은 관찰되지 않음
- aPTT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 1mg/mL의 농도에서 23.4%로 음성대조군(21.8초) 대비 유의적 지연이 관찰됨. 모든 시료에서 aPTT 지연은 관찰되지 않음

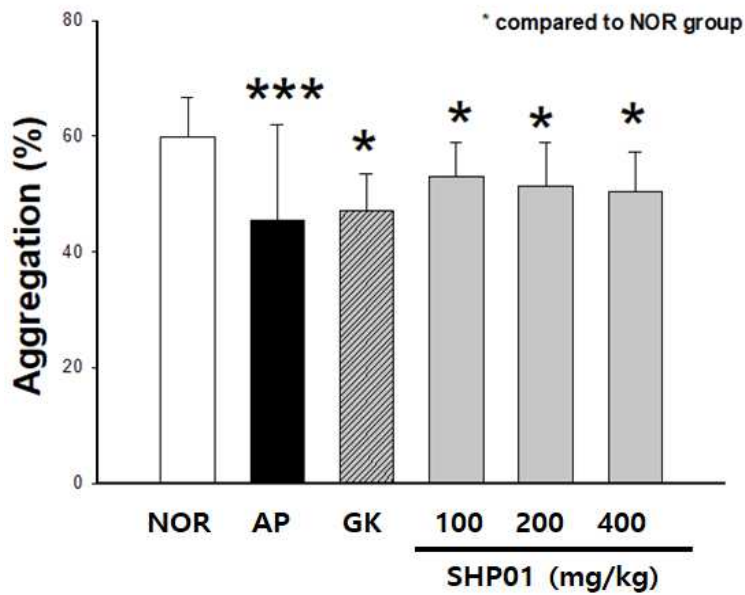


포도잎 추출물의 혈액응고시간 평가(*in vitro*)

분리된 혈소판에 포도잎 추출물(SHP01) 처리 시 혈소판 응집능 억제를 나타냄. 하지만 혈액응고시간(PT 및 aPTT)에는 유의적 차이가 없음

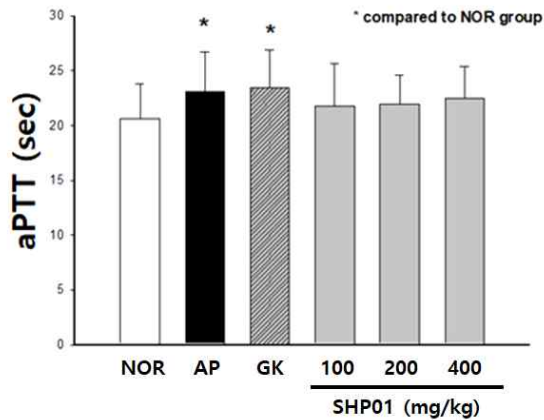
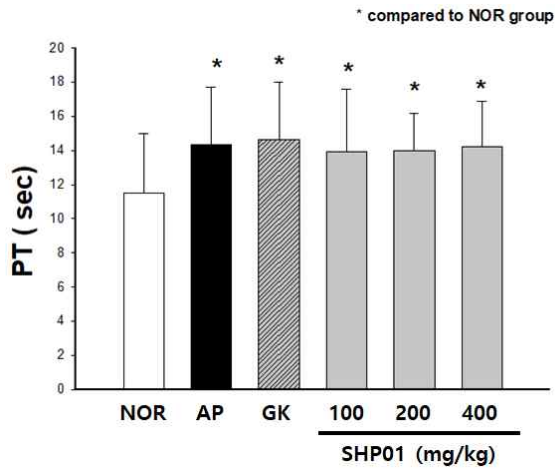
• 포도잎 추출물(SHP01)의 용량별 혈행 개선능(*in vivo*)

- 그룹당 동물은 각 10마리씩 구성하고 아스피린 40 mg/kg, 은행잎(Gingko, GK) 50 mg/kg, 포도잎 추출물 100, 200, 400mg/kg을 경구로 7일간 투약하고 8일째 되는 날 복대 정맥에서 혈액을 채취하여 혈소판을 분리하고 혈행개선능을 평가함
- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 ADP로 응집유도 시 정상군(Nor) 대비 23.8%p의 유의적인 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 포도잎 추출물의 경우 각각 6.7, 8.5, 9.4%p의 농도의존적인 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 기존 소재인 은행잎 (12.8%p)과 유사한 혈소판 응집 효과를 나타냄



[그림 133] 포도잎 추출물(SHP01) 7일 투여에 따른 혈소판 응집 평가

- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 PT는 14.3초로 정상군(11.5초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 포도잎 추출물의 경우 각각 13.9, 14.0, 14.2초로 모든 농도에서 PT의 지연을 나타냄. 기존 소재인 은행잎(14.6초)과의 유사한 PT를 나타냄



[그림 134] 포도잎 추출물(SHP01) 7일 투여에 따른 혈액응고시간 평가

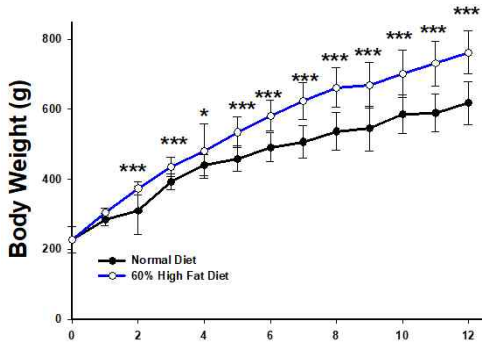
- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 aPTT의 경우 23.1초로 정상군(20.7초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 기존 소재인 은행잎 추출물은 23.4초로 정상군 대비 유의적인 지연을 나타냄. 하지만 포도잎 추출물의 경우 유의적인 aPTT 지연은 나타내지 않음

SD rat에 포도잎 추출물(SHP01)을 7일간 투여 시 혈소판 응집능 억제 및 PT 시간을 지연시킴에 따라 혈행개선능이 있는 것으로 판단. 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄

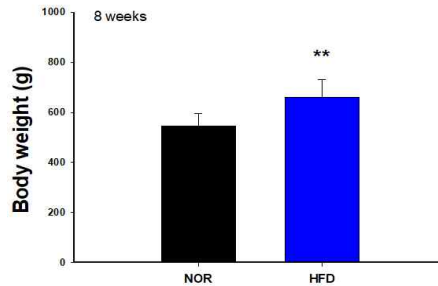
• 고지방 식이 섭취에 따른 고지혈증 유도 모델 확립

- 몸무게 변화량

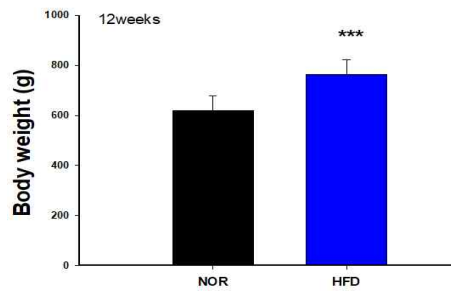
0 주차 실험동물의 몸무게는 $227.1 \pm 37.9(g)$ 으로 실험을 시작함. 2주차부터 일반식이 섭취군(NOR: 310.6 ± 68.7) 대비 고지방식이 섭취군(HFD: 373.5 ± 19.6)에서 유의적 차이가 관찰됨. 8, 12주차에는 고지방식이 섭취군에서 일반식이군 대비 각각 23.2, 23.4%p의 몸무게 증가를 나타냄. 12주간 증가 몸무게는 일반식이군은 390.4 ± 21.4 , 고지방식이군은 $535.2 \pm 32.4 g$ 이었음



[그림 137] 고지방 식이 섭취에 따른 주차별 몸무게



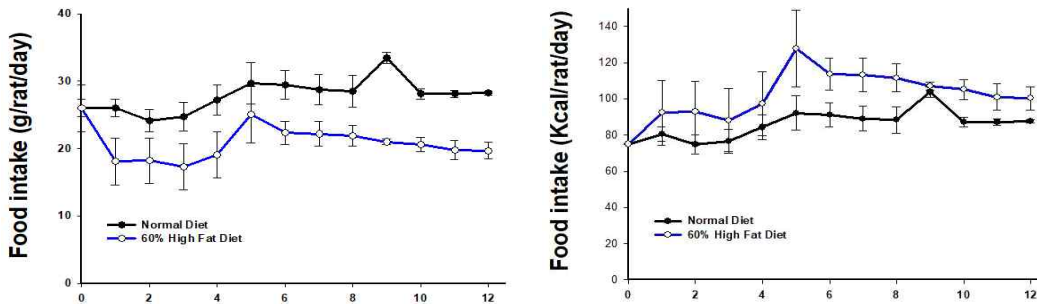
[그림 138] 고지방식이 섭취 8주차 몸무게



[그림 139] 고지방식이 섭취 12주차 몸무게

- 먹이섭취량

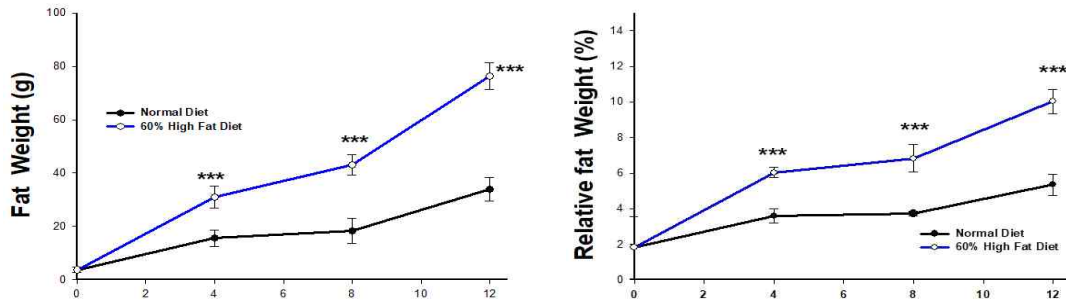
정상식이 섭취 무게 1 g당 3.1 kcal, 고지방식은 무게 1 g당 5.1 kcal임. 0 주차 실험동물의 식이 섭취량은 $75.2 \pm 0.2 kcal(26.0 \pm 1.2 g)$ 임. 몸무게가 증가됨에 따라 먹이 섭취량이 증가 되었으나 주차별 유의적 차이는 없었으며 정상 식이군은 평균 $83.6 \pm 7.0 kcal(27.2 \pm 2.0 g)$, 고지방 식이군은 평균 $101.3 \pm 16.3 kcal(21.2 \pm 3.1g)$ 의 먹이를 섭취함



[그림 140] 고지방 식이 섭취에 따른 주차별 식이 섭취량 및 칼로리

- 지방무게

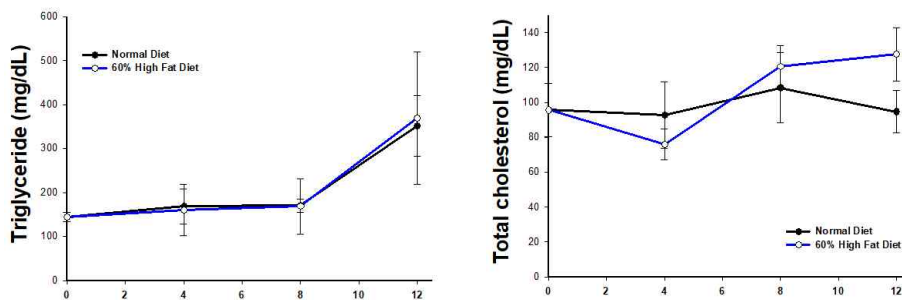
0, 4, 8주차에 그룹당 3-5마리 희생하여 부고환 지방 및 복부지방을 적출하고 무게를 합산하여 지방무게를 측정함. 절대 지방무게(상대적(몸무게대비) 지방무게)는 4주차부터 일반식이 섭취군(15.5 ± 3.1 g, $3.5 \pm 0.4\%$) 대비 고지방식이 섭취군(30.9 ± 4.0 g, $6.03 \pm 0.7\%$)에서 유의적 차이가 관찰됨. 8주차에는 고지방식이군에서 일반식이군 대비 절대 무게는 2.3배, 상대적 지방무게는 1.8배 증가되었음. 12주차에는 고지방식이군에서 일반식이군 대비 절대 무게는 2.24배, 상대적 지방무게는 1.8배 증가되었음



[그림 141] 고지방 식이 섭취에 따른 주차별 지방량 측정

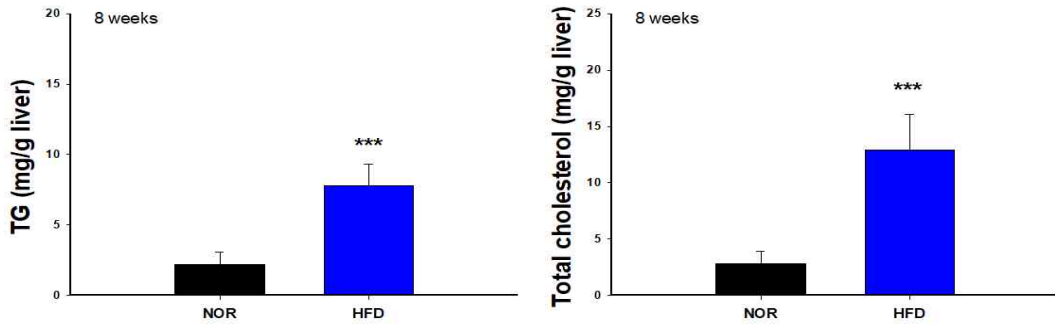
- 고지혈증 관련 지표 측정

고지혈증의 지표라 할 수 있는 혈중 triglyceride(TG) 및 total cholesterol을 측정함. 고지방식이 섭취기간 동안 정상 먹이군 대비 증가되는 경향은 나타내지만, 유의적인 차이는 아님

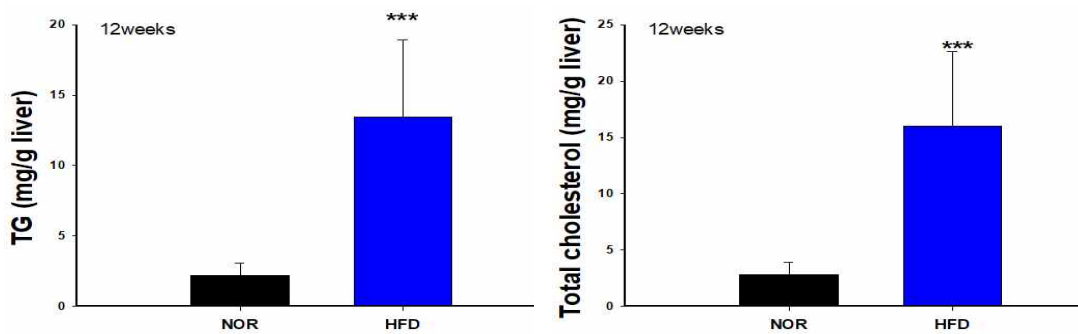


[그림 142] 고지방 식이 섭취에 따른 주차별 혈액중 고지혈증 관련 지표 변화

간 조직에서 측정된 TG 및 total cholesterol을 측정한 결과, 8주차에는 고지방식이 섭취군의 TG는 3.37배, total cholesterol은 5.7배 유의적으로 증가함. 12주차에는 TG는 6.13배, total cholesterol은 5.74배 유의적으로 증가함



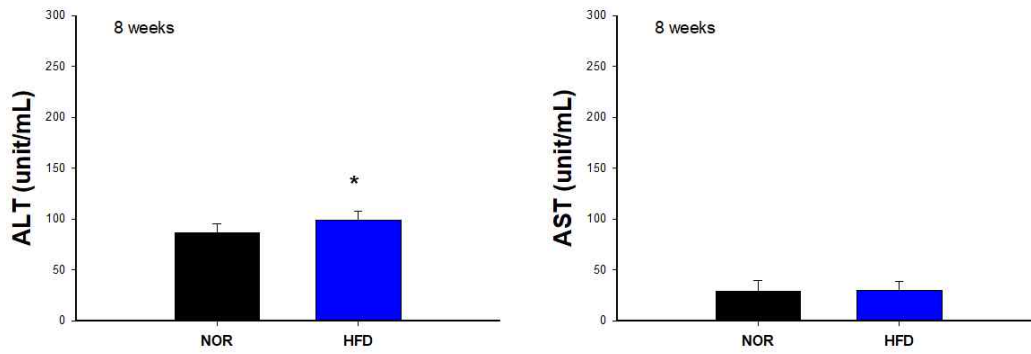
[그림 145] 고지방 식이 섭취에 따른 8주차 간 조직 중 고지혈증 관련 지표 변화



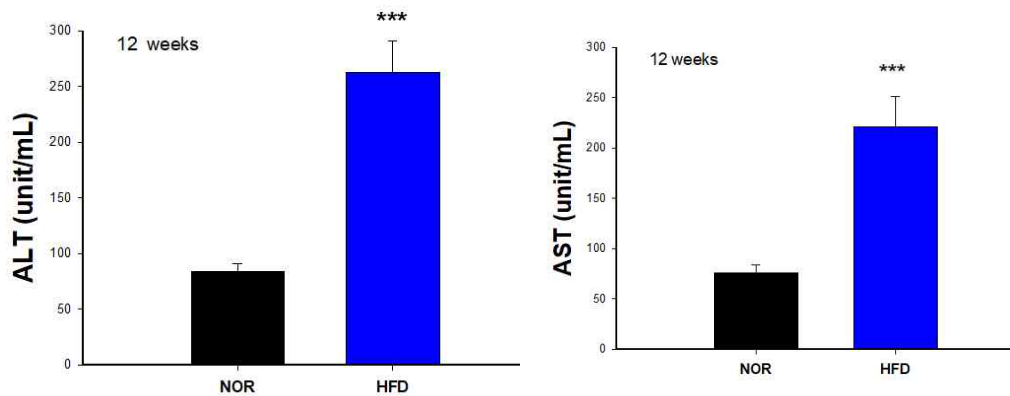
[그림 146] 고지방 식이 섭취에 따른 12주차 간 조직 중 고지혈증 관련 지표 변화

- 간기능 관련 지표 측정

혈액 중 간 기능 관련 지표를 측정하기 위해 혈액에 대한 ALT 및 AST를 측정하였음. 8주차 고지방 식이를 섭취한 그룹에서 ALT의 값이 14%p 유의적으로 증가함. 고지방 식이에 따른 AST 변화는 관찰되지 않음. 12주차 고지방 식이 섭취한 그룹(ALT: 262.6 ± 8.2 unit/mL, AST: 220.7 ± 30.3 unit/mL)은 대조군 대비 ALT: 75.2 ± 7.2 unit/mL, AST: 76.3 ± 7.9 unit/mL)으로 ALT, AST 각각 3.1배, 2.9배 유의적 증가를 나타냄

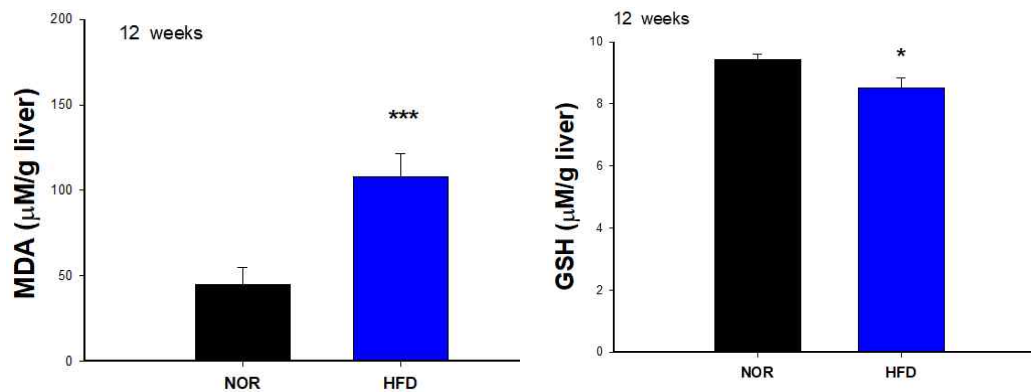


[그림 147] 고지방 식이 섭취에 따른 8주차 간기능 관련 지표



[그림 148] 고지방 식이 섭취에 따른 12주차 간기능 관련 지표

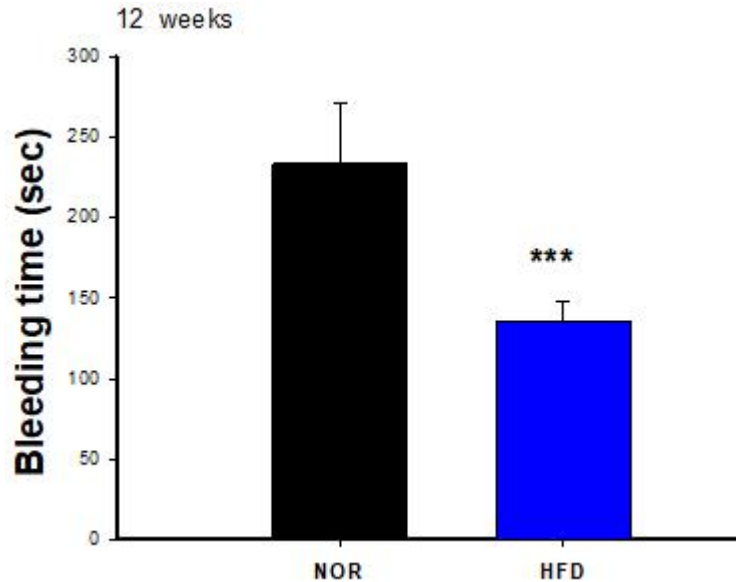
고지방식이 섭취 시간 내 산화적 스트레스 지표를 측정하기 위해 간 조직 내 MDA, GSH를 측정함. 고지방식이 12주 섭취 시 일반식이 섭취군 대비 MDA는 2.4배 증가, GSH는 10%p 감소를 나타냄



[그림 149] 고지방 식이 섭취에 따른 12주차 간기능 관련 지표

- 출혈시간

마취한 실험동물의 꼬리 끝을 1.5mm 자르고 항온수조에 넣어 출혈이 멈추는 시간을 측정함. 고지방식이 12주간 섭취한 실험동물의 출혈시간은 135.7 ± 11.2 초로 정상식이군(233.2 ± 37.2)그룹대비 42.8%p 감소되었음



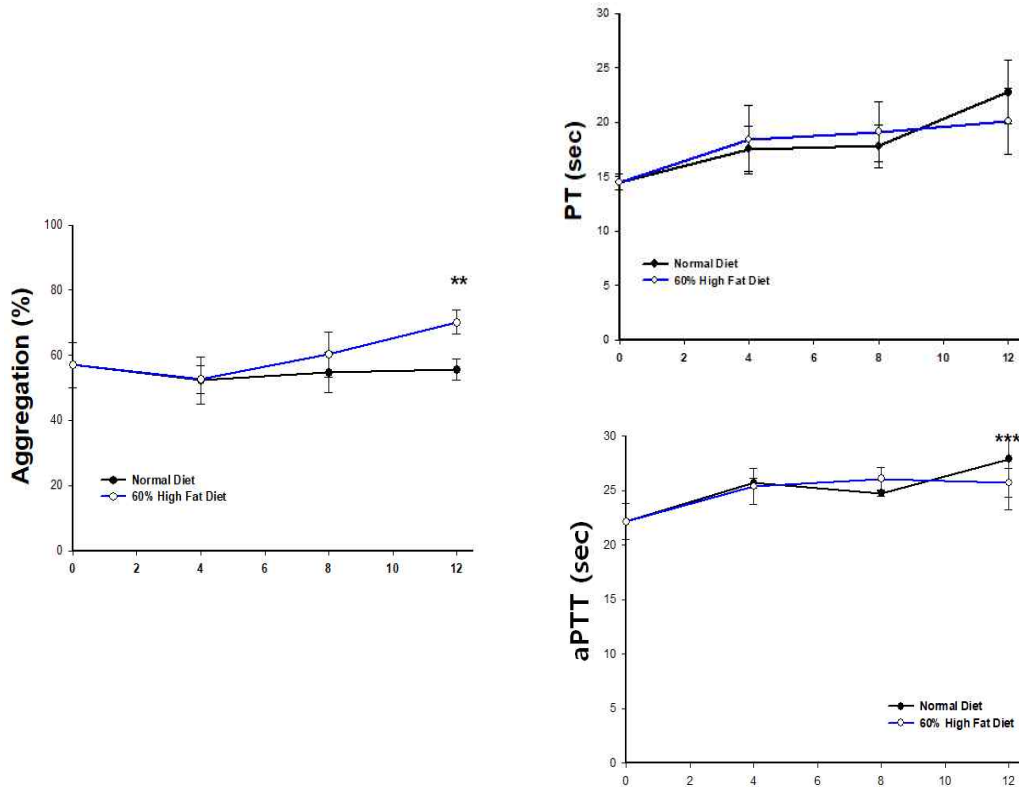
- 혈액응고 관련 지표 측정

고지방식이 섭취 후 0, 4, 8주에 쥐를 희생하여 혈액응고 관련 지표(혈소판응집, PT, aPTT)을 평가함

0 주차 혈소판응집은 일반식이(57.0 ± 6.8 %) 대비 고지방식이 섭취군(57.2 ± 2.4)로 유의적 차이 없었음. 8 주차에 고지방식이 군의 혈소판 응집능이 60.2 ± 7.0 으로 일반식이(54.7 ± 6.3) 대비 10.0%p 증가를 나타내었으나 유의적 차이는 아님. 12 주차에 고지방식이 군의 혈소판응집능이 70.2 ± 3.0 으로 일반식이(55.7 ± 3.2) 대비 26.0%p 유의적 증가를 나타냄

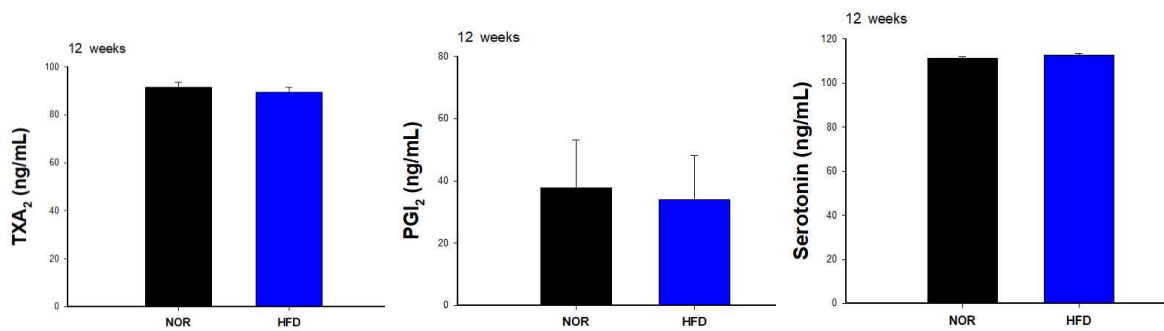
PT의 경우 0 주차 혈소판 응집은 일반식이(14.4 ± 0.7 sec) 대비 고지방식이 섭취군(14.6 ± 3.2 sec)로 유의적 차이 없었음. 12 주차에 고지방식이 군의 PT는 22.7 ± 2.9 sec로 일반식이(20.0 ± 3.0 sec) 대비 12.6%p 감소를 나타냄

aPTT의 경우 0 주차 혈소판응집은 일반식이(22.1 ± 1.7 sec) 대비 고지방식이 섭취군(22.2 ± 1.7 sec)로 유의적 차이 없었음. 8 주차에 고지방식이 군의 aPTT는 26.1 ± 1.8 sec로 일반식이(24.8 ± 0.3 sec)대비 5%p 증가의 유의적 차이를 나타내었음. 12주차 고지방식이군 aPTT는 25.7 ± 1.3 sec로 대조군(27.9 ± 4.7 sec) 대비 유의적인 aPTT 시간 단축이 유도됨



[그림 151] 고지방식이 섭취에 따른 혈소판 응집을 및 혈액응고시간

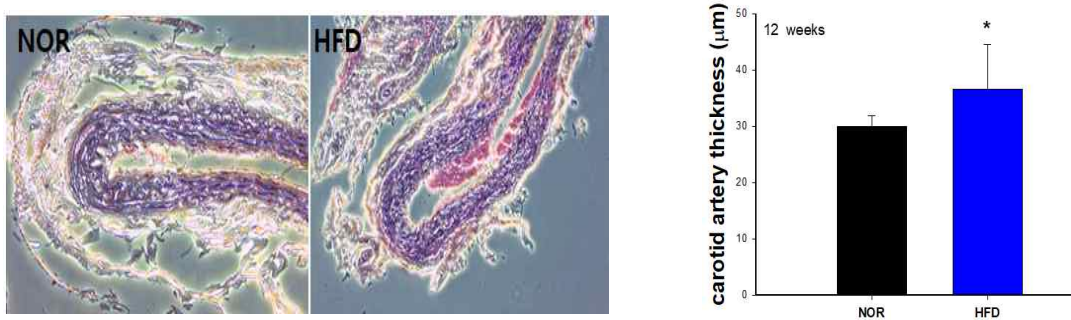
- 혈관 내 혈액응고/혈전생성을 유도하는 물질인 TXA₂, PGI₂, Serotonin을 혈청중에 측정하였으나 고지방식이 12주 섭취로는 유도되지 않았음



[그림 152] 고지방 식이 섭취에 따른 12주차 혈행관련 인자

- 혈관벽 두께 측정

실험동물의 경동맥 혈관을 분리하여 고지방식이 섭취에 따른 혈관벽 두께의 변화를 관찰함. 고지방식이 섭취군(36.5 ± 8.0 mm)은 정상군 대비(29.9 ± 2.0 mm) 22.1%p 증가됨



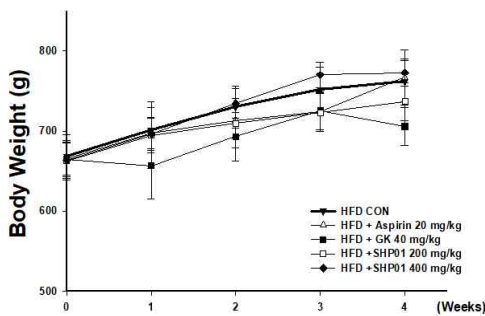
[그림 153] 고지방 식이 섭취에 따른 12주차 혈관벽 두께 변화

고지방식이 섭취 8주차 부터에 고지혈 및 혈소판관련 지표들의 유의적인 차이가 관찰됨에 따라 고지혈증이 유발된 것으로 판단하고, 8주차 이후 포도잎 추출물(SHP01)의 투약을 설정함

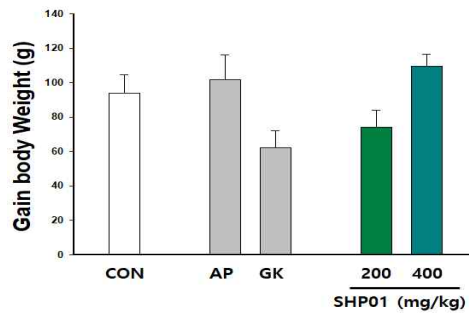
• 고지혈증 유도 모델에서 포도잎 추출물(SHP01)의 농도별 혈행개선능 평가

- 몸무게 변화량

고지방식이 섭이 8주차에 투여 개시함. 그룹 간 평균 몸무게 665.0 ± 21.8 (g)임. 양성 대조군으로 아스피린(AP) 20mg/kg, 기존 소재 은행잎 추출물(GK) 40mg/kg, 포도잎 추출물 200, 400 mg/kg으로 3주간 투여하였음. 투여 기간동안 몸무게의 그룹간 유의적 차이는 관찰되지 않았음. 시험 기간동안 고지혈증 유도 대조군(CON) 그룹의 몸무게는 93.8 ± 10.7 g이 증가함. 고지혈증 유도 대조군그룹 대비 은행잎군(62.1 ± 9.8 g), 포도잎 추출물(SHP01) 200 mg/kg 투여군(73.9 ± 9.8 g)은 각각 33.8%p, 21.2%p 몸무게가 감소 되는 경향을 나타냄



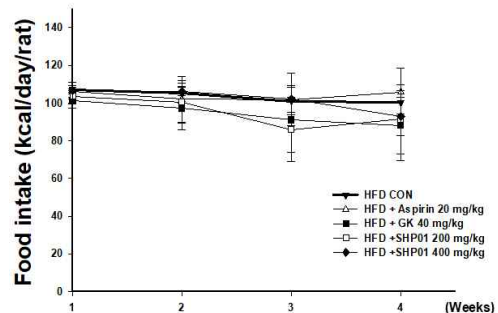
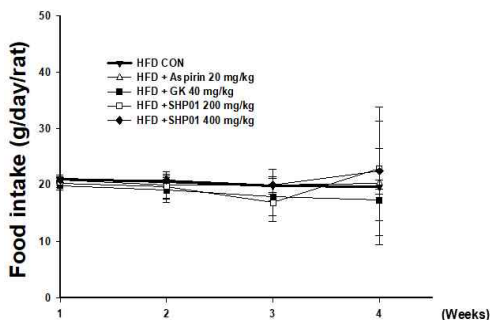
[그림 154] 고지혈증 유도 모델에서 주차별 몸무게



[그림 155] 몸무게 증가량

- 먹이 섭취량

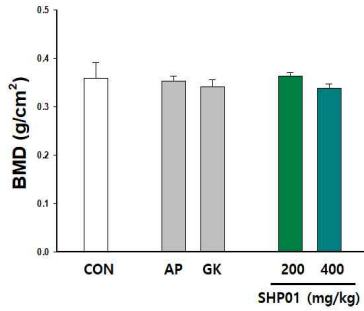
고지방식이는 무게 1 g당 5.1 kcal임. 시험물질 투약으로 인한 먹이 섭취 변화는 관찰 되지 않았음. 고지방 식이군은 평균 101.3 ± 16.3 kcal(21.2 ± 3.1 g)의 먹이를 섭취함



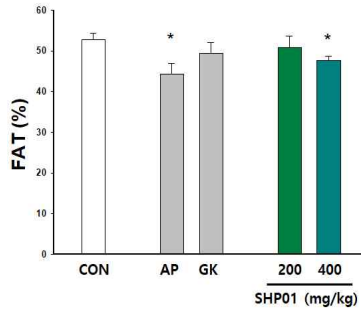
[그림 156] 고지혈증 유도 모델에서 주차별 식이 섭취량 및 칼로리

- 체성분 분석

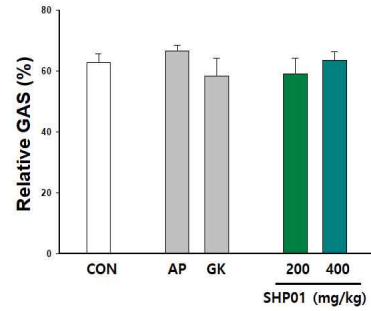
3주간의 투여 기간이 끝난 뒤 실험동물을 마취하고 pDEXA 장비를 활용하여 대퇴의 골밀도, 몸 전체의 체지방량, 종아리근육 부분의 근육량을 측정하였음. 시험물질 투약에 의한 골밀도 및 종아리근 증가는 관찰되지 않았으나 아스피린 및 포도잎 추출물 고농도 투여군에서 각각 16.0, 9.5%p 유의적 감소가 관찰되었음



[그림 157] 골밀도



[그림 158] 체지방량

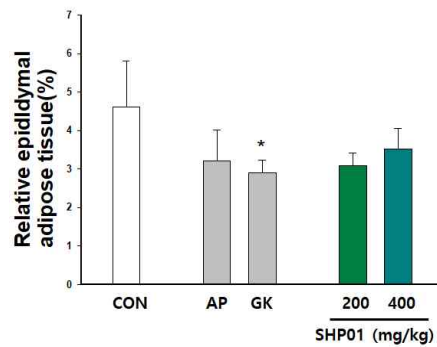
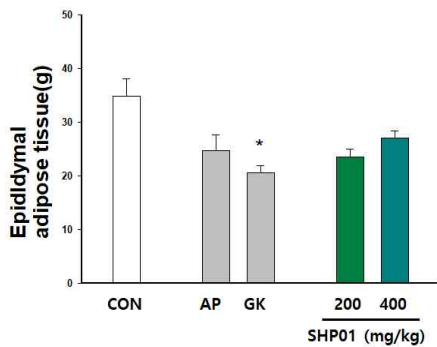


[그림 159] 종아리 근육량

- 장기 및 지방 무게 변화

3주간의 투여 기간이 끝난 뒤 간, 비장, 신장, 고환, 심장, 폐, 근육을 적출하여 무게를 정량함. 하지만 시험물질 투약에 의한 절대 및 상대적 장기 무게의 차이는 관찰되지 않았음

부고환 지방은 고지혈증 유도 대조군 대비 아스피린군에서 30.6%p, 은행잎 추출물에서 37.2%p 포도잎 추출물은 농도 별로 33.1, 23.9%p 지방량이 감소하였으며, 은행잎 추출물에서만 유의적 차이를 나타내었음

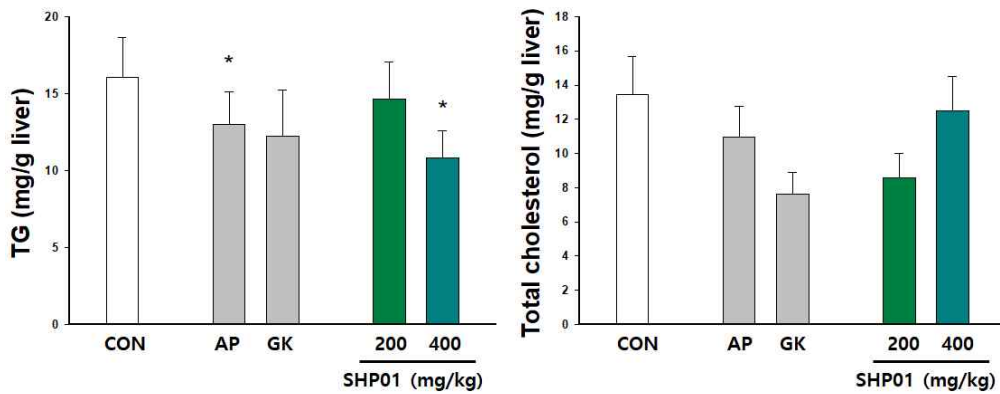


[그림 160] 고지혈증 유도 모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 절대 및 상대적 지방무게

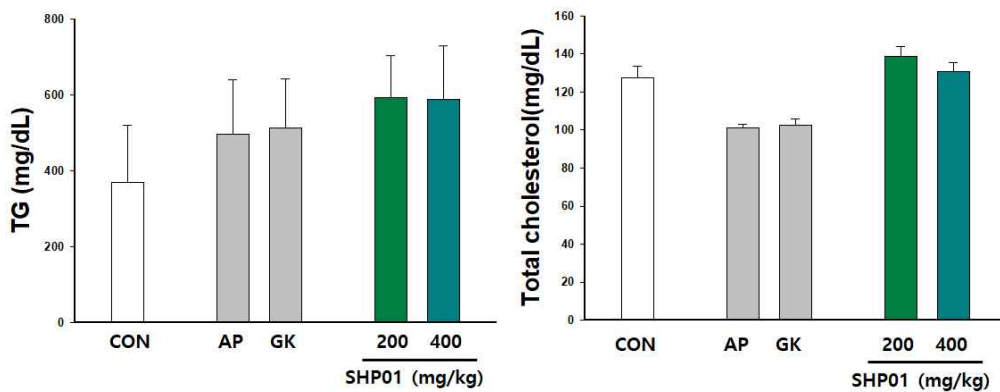
- 고지혈증 관련 지표 측정

고지방식이 섭취로 유도된 간 조직 내 TG는 아스피린에 의해 19.1%p, 은행잎 추출물에 의해 23.6%p, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 8.5, 32.4%p 감소시켰으며, 아스피린 및 포도잎 추출물의 고농도에서 유의적 차이를 나타내었음

간 조직 내 total cholesterol을 측정한 결과, 아스피린에 의해 18.1%p, 은행잎 추출물에 의해 43.2%p, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 36.2, 7.1%p 감소시켰으나 유의적 차이는 관찰되지 않았음. 혈중 TG 및 total cholesterol은 시험물질 투여군에서 고지혈증 유도 대조군 대비 감소되는 그룹은 없었음



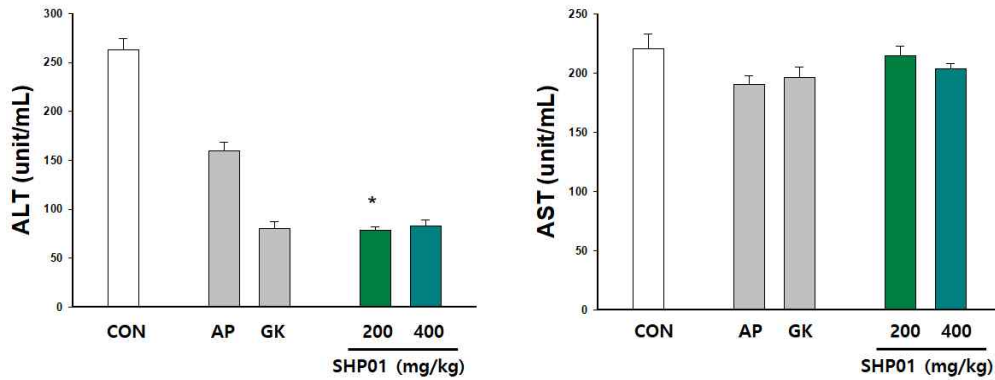
[그림 161] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 간 조직 중 고지혈증 관련 지표 변화



[그림 162] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 혈액 중 고지혈증 관련 지표 변화

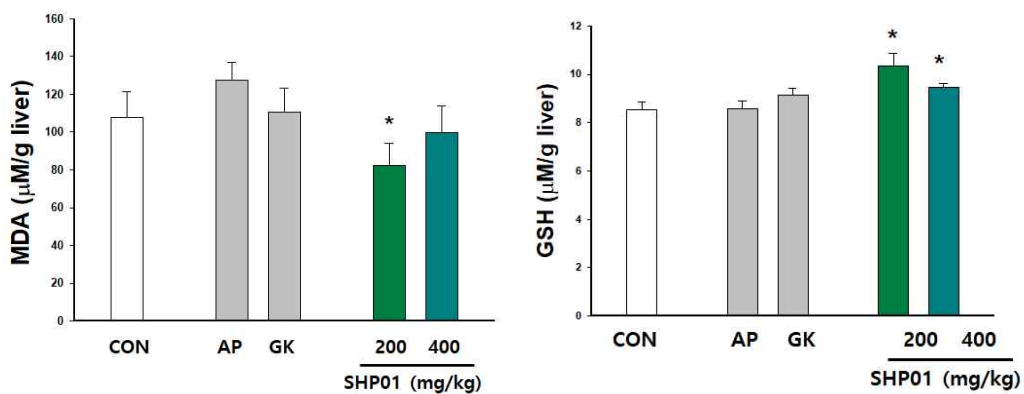
- 간기능 및 산화적 스트레스 관련 지표 측정

고지방식이 섭취로 유도된 혈액 내 ALT는 아스피린에 의해 39.2%p, 은행잎 추출물에 의해 69.3%p, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 70.2, 68.4%p 감소시켰으며, 포도잎 추출물의 저농도에서 유의적 차이를 나타내었음. AST는 시험물질에 의한 감소는 관찰되지 않았음



[그림 165] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 간기능 개선 관련 지표 변화

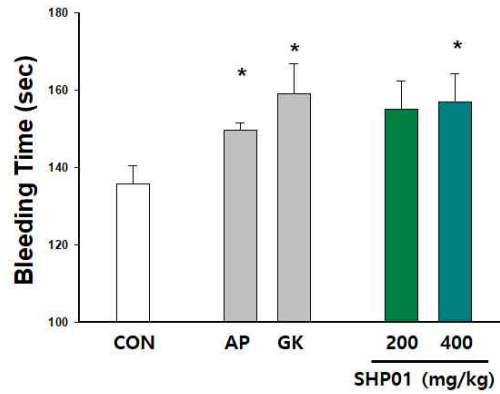
산화적 스트레스 지표인 MDA는 고지방식이 섭취에 따라 증가되며, 포도잎 추출물에서 각 농도 별로 23.7, 7.4%p 감소되었으며, 포도잎 추출물 100 mg/kg에서 유의적 차이를 나타냄. 포도잎 추출물에서 산화적 스트레스에 의해 감소되는 GSH를 유의적으로 각각 21.6, 10.9 %p 증가시켰음



[그림 166] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 간 조직 내 산화적 스트레스 관련 지표 변화

- 출혈시간

마취한 실험동물의 꼬리 끝을 1.5mm 자르고 항온 수조에 넣어 출혈이 멈추는 시간을 측정함. 고지방식이를 섭취에 따라 증가한 출혈 시간을 아스피린에 의해 10.3%p, 은행잎 추출물에 의해 17.1%p, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 14.3, 15.6%p 감소시켰으며, 아스피린, 은행잎 추출물, 포도잎 추출물 고농도에서 유의적 차이를 나타내었음

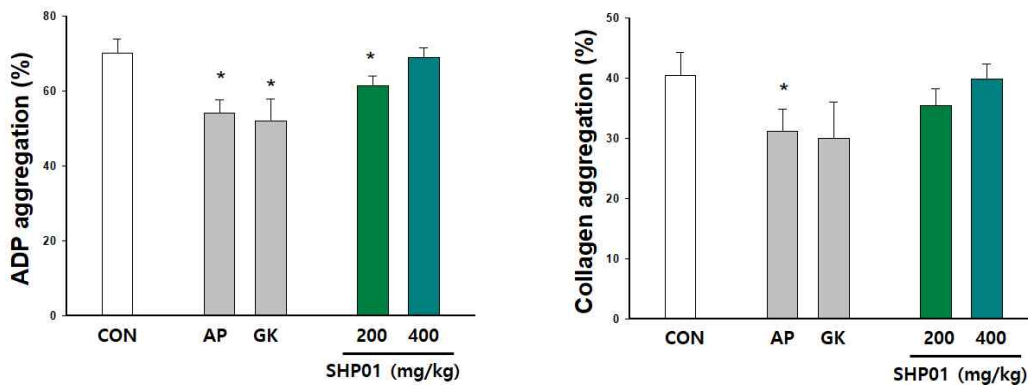


[그림 169] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 출혈시간

- 혈액응고 관련 지표 측정

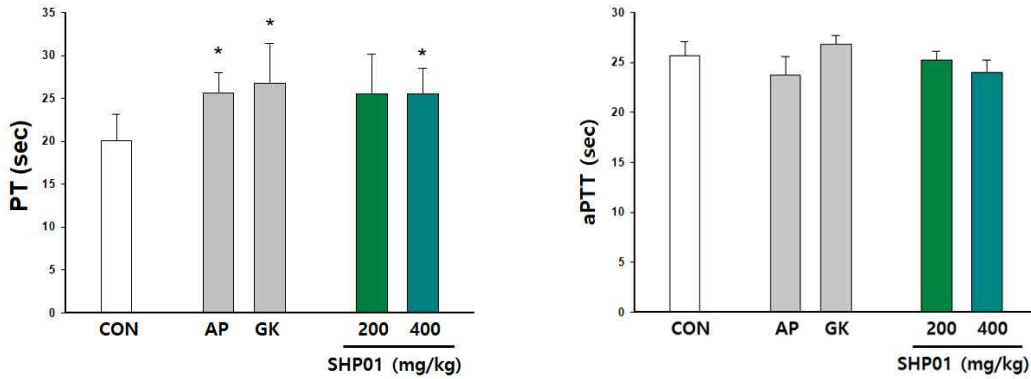
ADP를 사용한 혈소판 응집을 유도한 시험은 고지방식이를 섭취군 대비 아스피린에 의해 22.9, 은행잎 추출물에 의해 25.9, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 12.5, 1.7%p 감소시켰으며, 아스피린, 은행잎 추출물, 포도잎 추출물 저농도에서 유의적 차이를 나타내었음

Collagen를 사용한 혈소판 응집을 유도한 시험은 고지방식이를 섭취군 대비 아스피린에 의해 23.2 은행잎 추출물에 의해 26.3, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 11.5, 1.4%p 감소시켰으며, 아스피린에서만 유의적 차이를 나타내었음



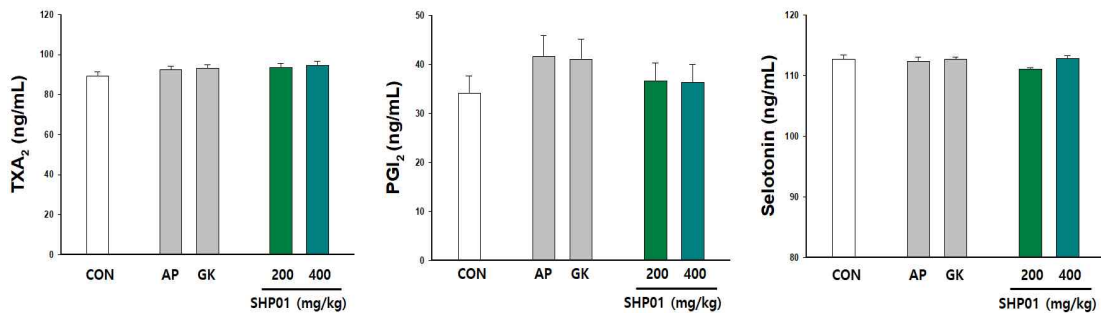
[그림 171] 고지혈증 유도모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 혈소판 응집율

고지방식이 섭취로 감소된 PT를 아스피린에 의해 5.6, 은행잎 추출물에 의해 6.73, 포도잎 추출물에 의해 각 농도별로 5.5, 5.4초 지연시켰으며, 아스피린, 은행잎 추출물, 포도잎 추출물 고농도에서 유의적 차이를 나타내었음. 고지방식이 섭취로 감소된 aPTT는 은행잎 추출물에 의해 1.09초 지연되었으나 유의적 차이는 아니었음



[그림 172] 고지혈증 유도 모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 혈액응고시간

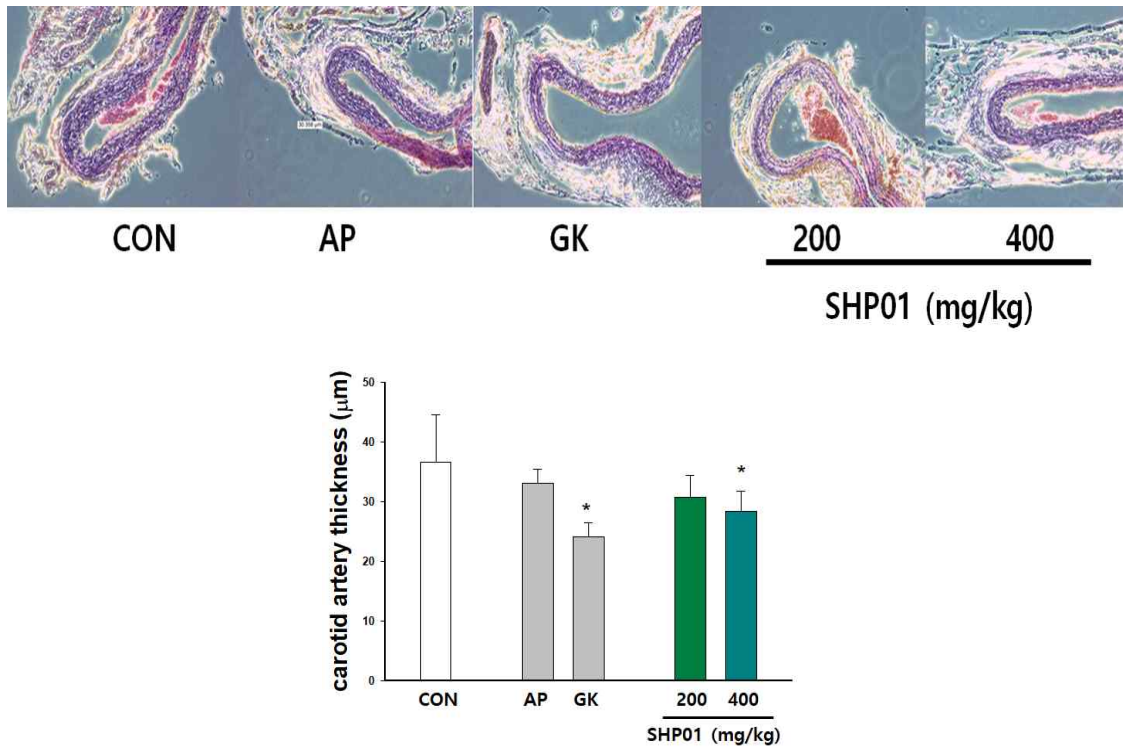
혈관 내 혈액응고/혈전생성을 유도하는 물질인 TXA₂, PGI₂, Serotonin을 혈청 중에 측정하였으나 고지방식이 대조군 그룹대비 유의적 증감은 관찰되지 않음



[그림 173] 고지혈증 유도 모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 혈행관련 인자

- 혈관벽 두께 측정

실험동물의 경동맥 혈관을 분리하여 고지방식이 섭취에 따른 혈관벽 두께의 변화를 관찰함. 은행잎 추출물($24.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$) 및 포도잎 추출물 고농도($28.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$) 군에서 고지혈증 유도 대조군($36.5 \pm 8.0 \mu\text{m}$) 대비 34.2, 22.3%p로 유의적 감소를 나타냄



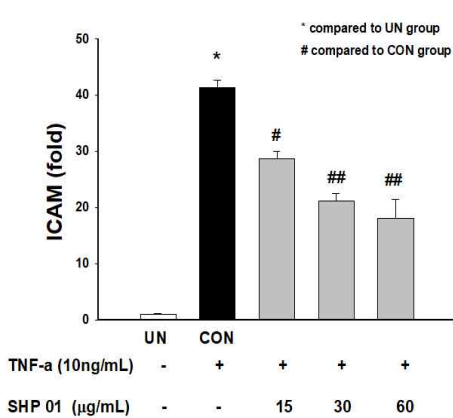
[그림 174] 고지혈증 유도 모델에서 포도잎 추출물(SHP01) 투여군의 혈관벽 두께 변화

포도잎 추출물의 투여는 고지혈 동물모델에서 유도되는 혈행 및 지질 관련 장애를 개선함. 포도잎 추출물의 혈행개선능은 직접적인 혈액응고 인자의 관여보다는 항산화 및 지질 개선을 통해 기인하는 것으로 사료됨

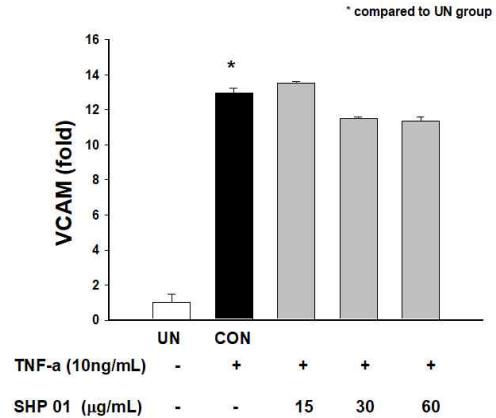
그 외, 고지혈 동물모델에서 혈관벽 두께 감소 및 *in vitro*에서 혈관내피세포 활성을 억제하는 효능이 확인됨에 따라 포도잎 추출물의 혈관내피세포 관련 심화 연구가 필요함

• 포도잎 추출물(SHP01)의 혈관 내피세포 활성화 기전 평가(*in vitro*)

- 혈관내피 세포에 시험 시료 2,000mg/mL까지 처리하여 시험물질의 세포 안전성을 확보하고자 하였음. UN그룹의 O.D. 값을 100%로 환산하여 세포 생존율 80% 이하를 세포 독성이 있는 약물 및 농도로 판단함. 대조군으로 사용한 10 ng/mL TNF- α 의 세포 독성이 관찰되지 않았음. 포도잎 추출물의 경우 64 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 판단함
- 동맥 경화증과 같은 혈액순환 장애 시 혈관 협착 및 혈전형성은 세포접착 단백질 ICAM-1, VCAM-1의 발현 증가 및 이에 따른 세포 간 접착 증가에 의해 유도될 수 있음. 혈관내피세포에서 TNF- α 가 유도하는 세포접착 단백질의 발현에 미치는 포도잎 추출물의 영향을 확인함. SVEC에 TNF- α (10 ng/mL) 및 포도잎 추출물(15, 30, 60 μ g/mL)을 처리하고 12시간 배양 후 세포를 회수하고 세포접착 단백질 ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인함. 포도잎 추출물은 TNF- α 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현을 농도의존적으로 감소시킴



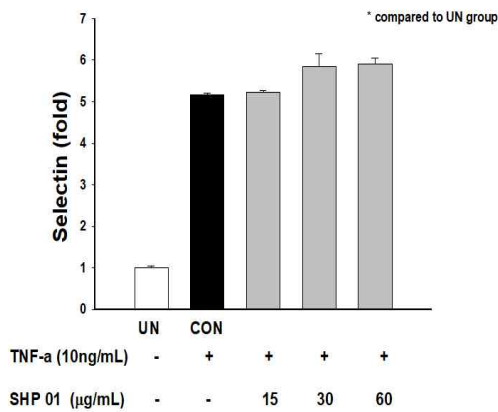
[그림 175] SHP01의 ICAM 발현 억제



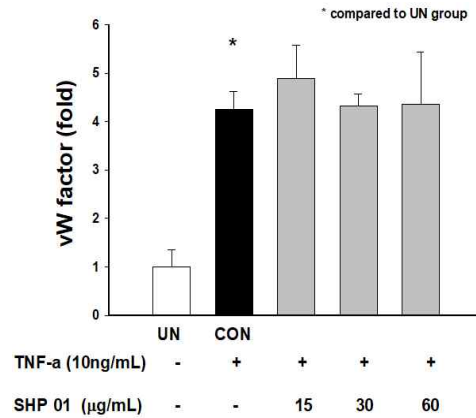
[그림 176] SHP01의 VCAM 발현 억제

- Selectin은 활성화된 혈관 내피세포의 표면에서 세포부착분자로써 작용하여, 혈관 내피세포의 활성화를 나타내는 지표임. TNF- α 에 의해 5.1배 증가하였으나, 포도잎 추출물에 의한 selectin 유전자 발현의 억제는 없었음
- von Willebrand factor는 지혈작용에 관여하는 혈중 당단백질임. 일반적으로 혈관에 손상이 있는 경우 출혈이 시작되고 혈소판이 서로 엉키게 되면서 출혈 부위를 막게 되어 출혈이 멈추게 됨. TNF- α 에 의해 4배 증가하였으나, 포도잎 추출물에 의한 von Willebrand factor의 유전자 발현의 억제는 관찰할 수 없었음
- TNF- α 에 의한 내피세포의 이동 억제 여부를 관찰하기 위하여 배양한 내피세포로

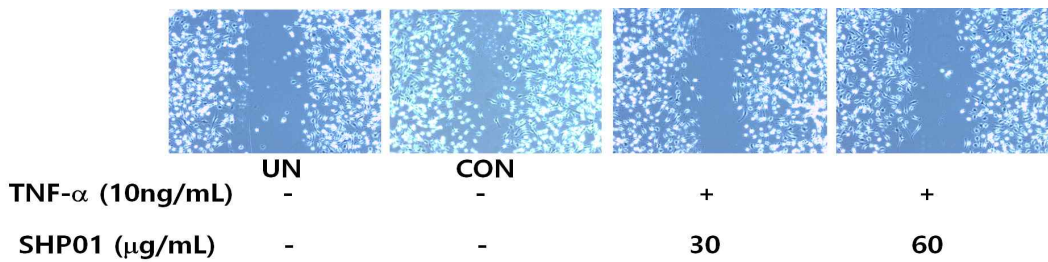
wound healing assay를 수행한 결과 포도잎 추출물에 의한 내피세포 이동 억제가 확인됨



[그림 177] SHP01의 Selectin 발현 억제



[그림 178] SHP01의 vonWillebrand 발현 억제



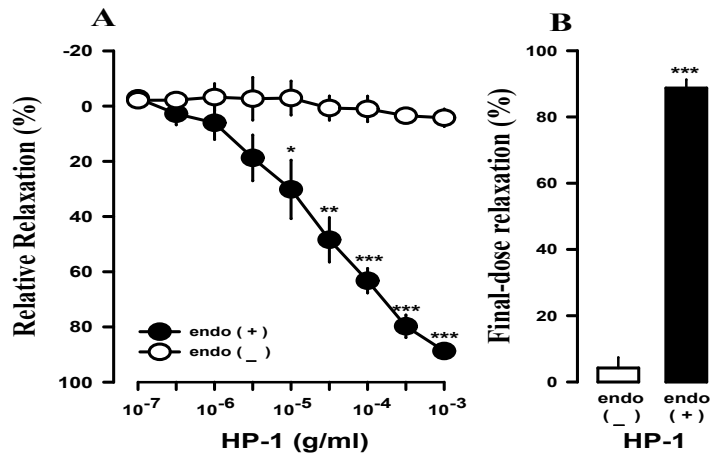
[그림 179] SHP01의 세포 이동성 시험

포도잎 추출물은 혈관내피세포에 TNF- α 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현을 억제 및 내피세포 이동억제를 나타냄

• 포도잎 추출물(SHP01)의 항고혈압 효능 평가(*ex-vivo* / *in-vivo*)

- 일반 백서 흉부대동맥에서 SHP-1의 농도 의존성 혈관 확장 효과(*ex vivo*)

일반 백서의 흉부대동맥을 적출하여 organ bath에 고정하고 phenylephrine(1×10^{-6} M)으로 수축을 유도한 뒤 SHP-1을 직접적으로 처리하여 효과를 확인하였음. SHP-1을 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} 및 10^{-3} g/ml의 총 9개의 농도로 처리하여 혈관이완 효과를 확인한 결과 농도 의존적인 이완 효과를 보였으며, 혈관 내피세포를 제거하였을 때 이완 효과는 현저히 억제되었음. 따라서 혈관계 질환에 효과가 있는 것으로 보고, 본태성 고혈압 모델인 SHR rat를 이용한 생체 내 실험(*in vivo*)에 적용시켜 연구를 진행하였음



[그림 180] 일반 백서 흉부대동맥에서의 HP-1의 이완효과

- 본태성 고혈압 동물 모델에서 SHP-1에 의한 몸무게의 변화 (*in vivo*)

SHP-1의 고혈압 개선 효능을 살펴보기 위하여 본태성 고혈압 모델을 이용한 연구를 진행하였음. 군은 총 4군으로 1. WKY(정상대조군), 2. SHR(고혈압군), 3. SHR+Losartan (20 mg/kg/day, 양성대조군, 안지오텐신 전환효소 억제제) 및 4. SHR+SHP-1(100 mg/kg/day)으로 나누어 진행하였음. 1주간의 적응기 기간과 3주간의 약물 투여기간 동안의 몸무게 변화를 살펴본 결과 각 군간의 유의적인 차이는 보이지 않았음

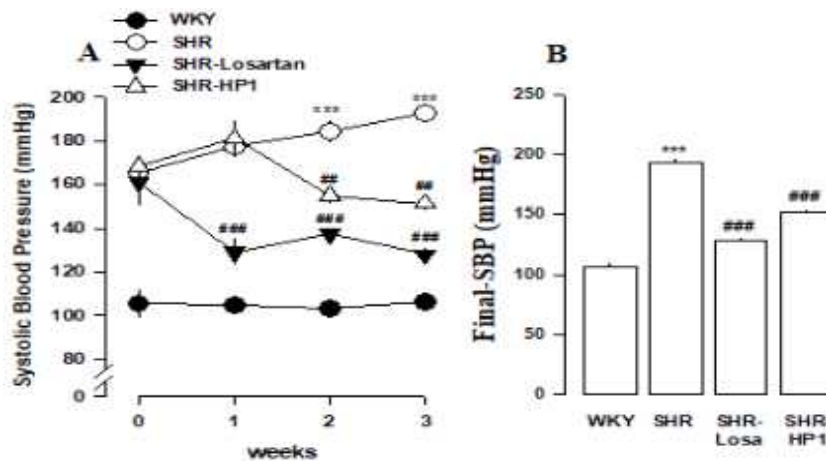
[표 76] 본태성 고혈압 모델에서 SHP-1의 몸무게 변화

	Body weight(g)			
	0 W	1 W	2 W	3 W
WKY	114.3±3.8	153.8±2.3	186.7±2.8	217.1±3.5
SHR	118.2±1.2	168.1±3.4	199.6±3.8	226.5±4.5
SHR-Losa.	117.1±1.4	164.4±2.6	195.5±2.9	231.2±4.4
SHR-HP1	110.3±1.6	158.6±2.5	192.0±3.2	226.7±3.9

- 본태성 고혈압 모델에서 SHP-1에 의한 혈압 변화

본태성 고혈압 모델(SHR, 5주령)에서 SHP-1에 의한 혈압 강하 효과를 보기 위하여 3주간 약물을 투여하여 혈압 변화를 측정하였음. 5주령의 SHR을 구입하여 1주의 적응 기간 이후 약물을 경구 투여하였으며, 총 4주 동안 매주 1회 혈압을 측정함

심장이 수축한 다음 이어서 확장될 때의 혈관 내 압력을 나타내는 확장기 혈압 (diastolic blood pressure, DBP), 심근의 수축에 의해서 심실내의 혈액이 대동맥으로 방출될 때의 혈관 내 최고압력을 나타내는 수축기 혈압(systolic blood pressure, SBP)과 순간적으로 측정된 최고 동맥압, 평균동맥압(mean arterial pressure, MAP), 심박동수 (Heart rate)와 심장 내 혈액량(volume)을 측정하였음. 그 결과, 3주간의 실험기간 동안 정상대조군에 비하여 SHR군의 수축기 혈압은 3주 동안 꾸준히 증가하였음. 양성대조군인 losartan을 투여한 군과 SHP-1군은 최종적으로 수축기 혈압, 심박동수, 심장 내 혈액량이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었음. 따라서 SHP-1은 고혈압 모델에서 꾸준히 증가하던 수축기 혈압을 낮춰주는 효과가 있음을 확인함



[그림 181] 본태성 고혈압 모델에서 SHP-1의 3주간 혈압강하 효과

[표 77] 본태성 고혈압 모델에서 HP-1의 최종 3주차 혈압강하 효과

	SBP	DBP	MAP	HR	Flow	Volume
WKY	106.31±3.82	94.68±5.00	100.03±4.6 1	353.30±8.24	2.23±0.3 9	3.26±1.29
SHR	192.79±4.06** *	167.18±5.5 3	170.51±5.3 7	477.03±8.49* *	5.08±1.0 8	10.01±1.90* *
SHR-Los a.	147.93±3.09###	135.03±4.1 1	129.12±3.6 0	377.31±9.82#	6.79±1.7 2	5.44±1.80#
SHR-HP 1	151.23±3.50###	120.86±7.3 5	152.98±6.8 2	365.61±9.30#	3.87±0.8 1	7.72±1.77#

- 본태성 고혈압 모델에서 HP-1 처리에 의한 조직무게 변화

병적으로 고혈압이나 폐동맥 협착증·대동맥 협착증 등 심장관막 질환이 있을 때 심장이 비대 될 수 있음. 심장 중 특히 좌심실벽(근육)이 두꺼워짐으로써 심근의 무게가 증가하게 되는데, 비대(hypertrophy)의 기본 개념은 어떤 원인에 의하여 특정 장기가 세포 수의 변화와 상관없이, 즉 개개 세포의 용적 증가로 인하여 커지는 경우를 말함

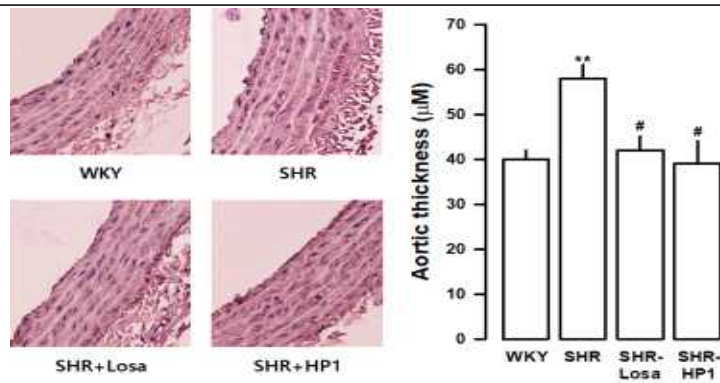
고혈압 상태가 되면 심장이 비후해 지는 현상이 발생하게 되는데 그 현상을 확인하기 위하여 흉부를 절개하여 적출한 심장의 무게를 비교하였음. 그 결과, 본태성 고혈압 군에서 심장의 무게가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 구획별로 살펴봤을 때 좌심실의 무게가 증가하는 것으로 보아 고혈압 발생으로 인한 심장 비대 현상이 일어났음을 알 수 있었음. 이러한 증상은 SHP-1의 처리로 인하여 유의적으로 심장의 무게가 감소함으로써 고혈압의 증후를 개선시키는 효능이 있다고 볼 수 있음

[표 78] 본태성 고혈압 모델에서 HP-1의 심장 조직 무게의 변화

	Left atrium	Right atrium	Left ventricle	Right ventricle	Septa	Whole Heart
WKY	0.017±0.00 1	0.019±0.00 2	0.388±0.021	0.128±0.00 9	0.146±0.012	0.699±0.015
SHR	0.015±0.00 1	0.023±0.00 1	0.515±0.01**	0.153±0.00 6	0.177±0.01**	0.882±0.005 **
SHR-Los a.	0.013±0.00 1	0.018±0.00 1	0.415±0.012 #	0.146±0.00 4	0.153±0.001 #	0.746±0.016 #
SHR-HP1	0.015±0.00 1	0.020±0.00 1	0.429±0.031 #	0.149±0.01 0	0.170±0.01#	0.782±0.032 #

- 본태성 고혈압 모델에서 SHP-1에 의한 조직학적 변화

본태성 고혈압 모델에서 SHP-1 투여에 의한 효능을 분석하기 위하여 흉부대동맥을 적출한 후, H&E staining을 실시하였음. 정상군에서는 혈관병변이 나타나지 않았으나, 고혈압군 흉부대동맥의 내피층 표면은 정상대조군(WKY)에 비하여 거칠고, 평활근은 비후해짐을 확인할 수 있었음. 한편 양성대조군인 losartan군과 SHP-1 투여군에서 모두 혈관 내막의 병변은 없으며 비후도는 고혈압군에 비하여 유의적으로 감소하였음. 따라서 SHP-1 투여군이 본태성 고혈압 모델에서 혈관 병변을 회복시키는 기능을 할 것으로 사료됨

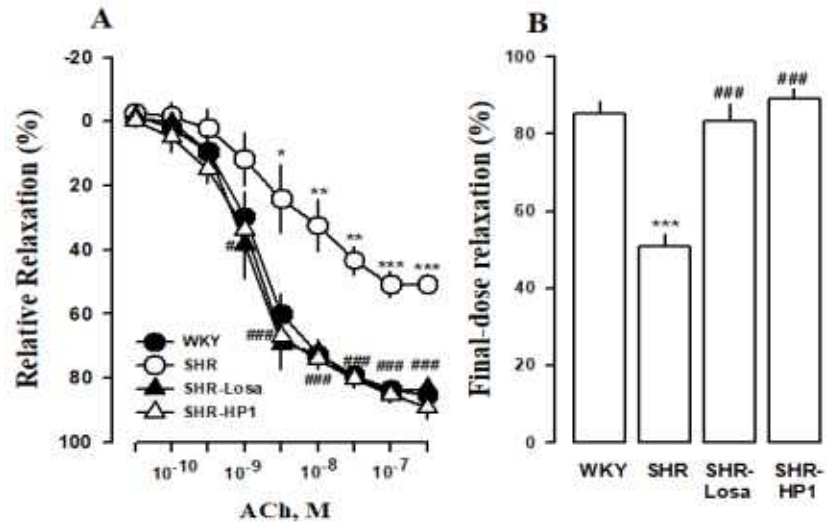


[그림 182] 본태성 고혈압 모델에서 HP-1의 조직학적 변화

- 본태성 고혈압 모델에서 SHP-1에 의한 혈관 내피세포 손상 확인

SHP-1이 본태성 고혈압 모델에 있어 혈관 내피세포 손상을 억제하는 효과를 보이는지 측정하기 위하여 각 군의 흉부 대동맥을 적출하여 혈관 장력을 측정함. 각 군의 동물의 흉부대동맥을 적출하여 organ bath에 고정하여 혈관을 1 g의 힘까지 당겨준 후 일정한 안정기에 들어서면 PE(10^{-6} M)로 최대한 수축시키고 흉부대동맥에서 내피세포 의존성 혈관 이완 인자인 ACh을 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 및 3×10^{-7} M 농도로 용량 의존적으로 첨가하여 혈관의 이완 효과를 관찰함.

각 농도별 이완율은 PE에 의한 수축에 대해 백분율(%)로 계산함. 그 결과, 정상군은 $85.23 \pm 3.15\%$ 의 이완 효과를 보였으며, 그에 비하여 SHR군은 $50.72 \pm 2.53\%$ 의 이완 효과를 보임으로써 혈관 손상이 일어났음을 확인할 수 있었고, SHR+Losartan군 $83.24 \pm 1.58\%$ 과 SHP-1군 $89.23 \pm 3.25\%$ 은 개선시키는 이완효과를 보인 것으로 확인할 수 있었음. 따라서 SHP-1은 고혈압 모델에 있어서 혈관 기능 이상을 개선시키는 효능이 있는 것으로 사료됨



[그림 183] 본태성 고혈압에서 HP-1의 혈관 내피세포 손상 확인

SHP1의 투여는 본태성 고혈압 동물모델에서 꾸준히 증가하던 수축기 혈압을 낮춰주는 효과가 있으며, 고혈압으로 인해 유도되는 심장이 비후해 지는 현상을 저감함으로써 고혈압의 증후를 개선함

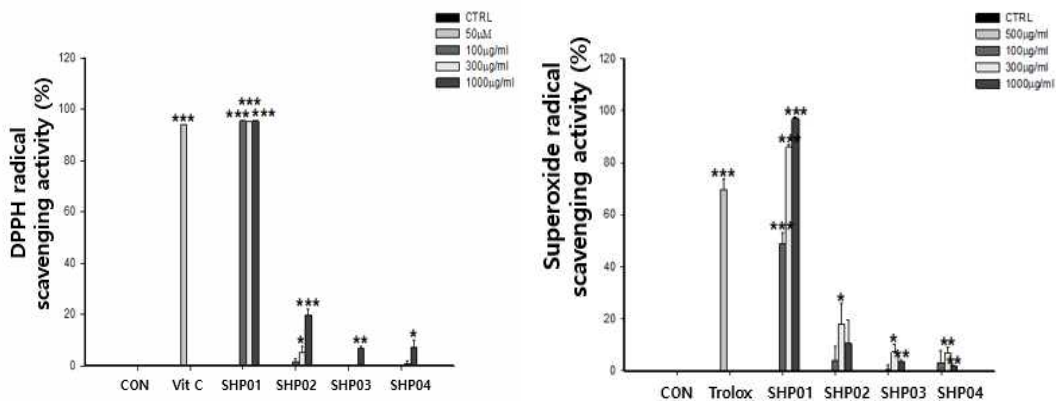
그 외, SHP1의 투여는 본태성 고혈압 모델에서 혈관병변을 회복시키는 기능 및 혈관 기능 이상을 개선시키는 효능이 있는 것으로 사료됨

2) 1차 신규소재(SHP02, SHP03, SHP04)의 혈행개선 효능검증

시험 소재	고구마 지상부 추출물(SHP02) 표고버섯 물 추출물(SHP03) 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04)
시험 항목	항산화능 혈소판 기능 평가 (<i>in vitro</i>) 혈관내피세포 관련 평가

• SHP 02, 03, 04의 항산화능 (non cell system)

- SHP 02, 03, 04는 농도 의존적인 hydroxyl radical 소거능을 나타냄. 포도잎 추출물 (SHP01) 모든 농도에서 양성대조군인 Vitamin C 50 μ M와 유사한 hydroxyl radical 소거능 효과를 보임
- SHP 02, 03, 04는 superoxide radical 소거능이 음성 대조군 대비 유의적 차이를 나타냄. 포도잎 추출물(SHP01) 모든 농도에서 양성대조군인 500 μ g/mL trolox (69.4 \pm 4.2%)와 유사한 SOD 활성을 나타냄

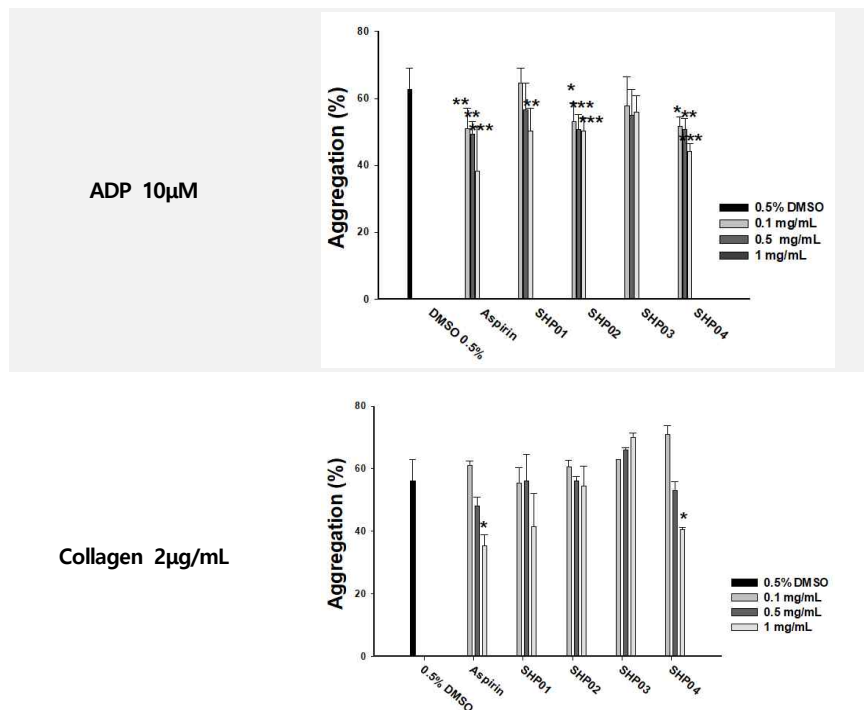


[그림 184] SHP 02, 03, 04의 항산화능

고구마 지상부 추출물(SHP02), 표고버섯 물 추출물(SHP03), 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04)은 유의적인 항산화능을 나타냄

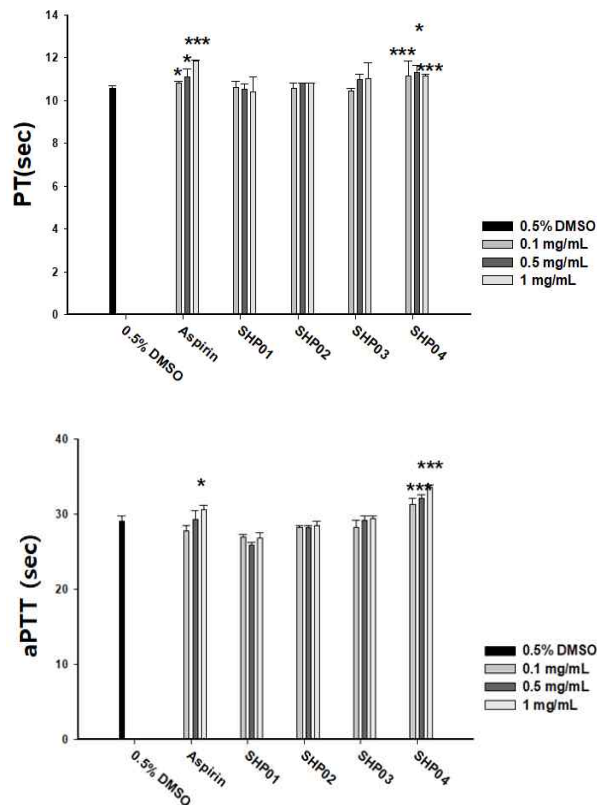
▪ SHP 02, 03, 04의 혈소판 기능 평가(*in vitro*)

- SHP 02, 03, 04에 대한 혈소판 응집능을 포도잎 추출물 및 아스피린과 비교 평가함. 음성대조군은 시료를 용해할 때 사용한 DMSO의 동일농도(0.5%)가 포함된 용액을 사용하였음. 양성대조군으로는 아스피린을 시료와 같은 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 사용하였음. 응집유도제로는 ADP 및 Collagen을 각각 사용하여 혈소판 응집을 평가함
- 시험 결과 양성대조군으로 사양한 아스피린의 경우 ADP를 처리한 그룹에서 농도 의존적으로 7, 21, 50%의 응집억제율을, collagen을 처리한 그룹에서는 농도별로 각각 0, 14.2, 36.6%의 응집억제율을 나타냄
- 스크리닝 시료 중 ADP를 응집 유도제로 사용한 그룹에서는 포도잎 추출물을 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 28.0%, SHP 02을 0.5, 1 mg/mL로 처리한 그룹에서 각각 21, 20%, SHP 04를 1 mg/mL의 농도로 처리한 그룹에서 27%로 유의적인 혈소판 응집을 나타냄
- Collagen을 응집유도제로 사용한 그룹에서는 SHP 04를 1 mg/mL로 처리한 그룹에서만 27.6%의 유의적인 혈소판 응집이 나타남



[그림 185] SHP 02, 03, 04의 혈소판 응집 평가

- PT 시간의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 농도별로 각각 10.8, 11.1, 11.8초로 음성대조군(10.5초) 대비 유의적 증가가 관찰됨. SHP01-03은 유의적인 PT시간의 지연이 관찰되지 않음. SHP 04의 경우 농도별로 각각 11.1, 11.3, 11.1으로 음성대조군 대비 유의적 PT시간 지연이 관찰되었음
- aPTT시간의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 1 mg/mL의 농도에서 30.6%로 음성대조군(29.0초) 대비 유의적 지연이 관찰됨. SHP01-03은 유의적인 aPTT시간의 지연이 관찰되지 않음. SHP04의 경우 0.85, 1 mg/mL의 농도에서 각각 32.1, 33.5초로 음성대조군 대비 유의적 aPTT시간 지연이 관찰되었음

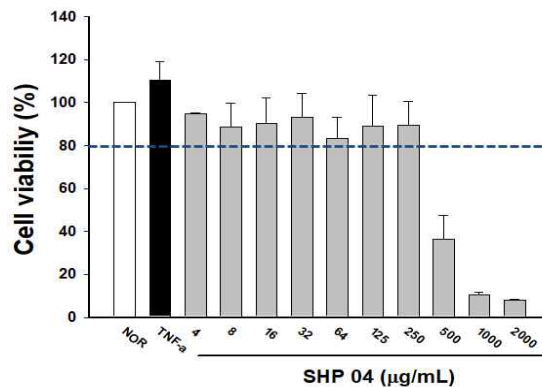


[그림 186] SHP 02, 03, 04의 혈액응고시간 평가

혈소판 응집능의 경우, SHP 02, 04에서 유의적 차이를 나타냄. 혈액응고시간은 SHP 04에서 유의적 차이를 나타냄. SHP 04(표고버섯 50% 에탄올 추출물)에서 혈행개선 효과가 있는 것으로 판단됨

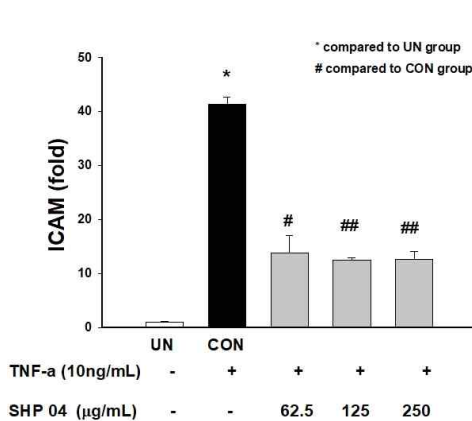
▪ 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04)의 혈관내피세포 증식 억제능(*in vitro*)

- 혈관내피 세포에 시험시료 2,000mg/mL까지 처리하여 시험물질의 세포안전성을 확보하고자 하였음. UN그룹의 O.D. 값을 100%로 환산하여 세포 생존율 80% 이하를 세포 독성이 있는 약물 및 농도로 판단함. 대조군으로 사용한 10 ng/mL TNF- α 의 세포 독성이 관찰되지 않았음. 표고버섯 50% 에탄올 추출물의 경우 65 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 판단함

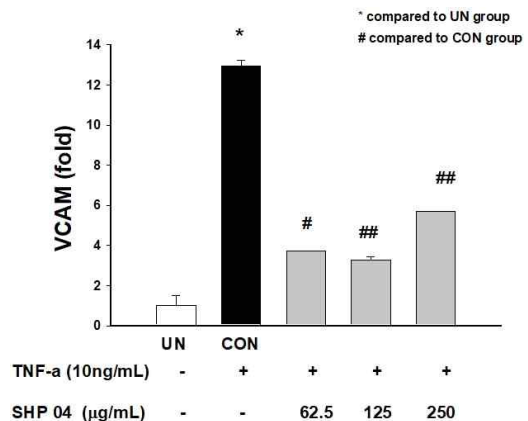


[그림 187] 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04)의 세포 안전성

- SVEC에 TNF- α (10 ng/mL) 및 표고버섯 50% 에탄올 추출물(60, 125, 250 μ g/mL)을 처리하고 12시간 배양 후 세포를 회수하고 세포접착단백질 ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인함. 표고버섯 50% 에탄올 추출물은 TNF- α 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현을 유의적으로 감소시킴

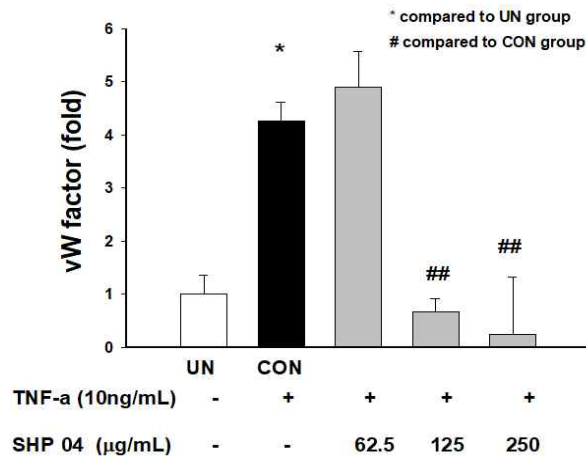


[그림 188] SHP04의 ICAM 발현 억제

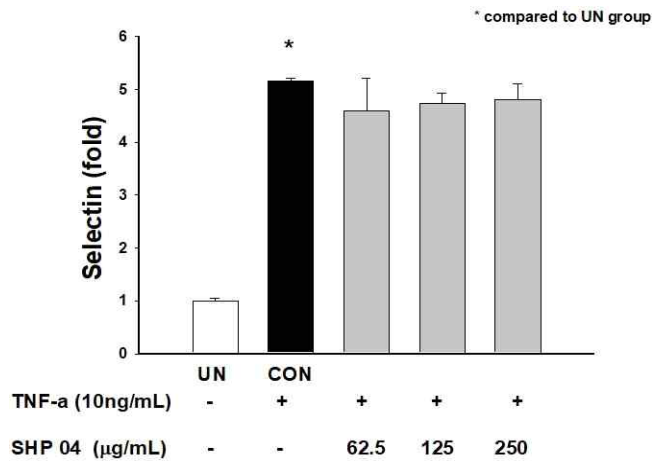


[그림 189] SHP04의 VCAM 발현 억제

- Selectin은 $TNF-\alpha$ 에 의해 5.1배증가 하였으나, 표고버섯 50% 에탄올 추출물에 의한 selcetin 유전자 발현의 억제는 없었음
- von Willebrand factor는 $TNF-\alpha$ 에 의해 4배증가 하였으며, 표고버섯 50% 에탄올 추출물 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 von Willebrand factor의 유전자 발현을 9.7배 감소 시킴



[그림 190] SHP04의 Selelctin 발현 억제



[그림 191] SHP04의 vonWillebrand 발현 억제

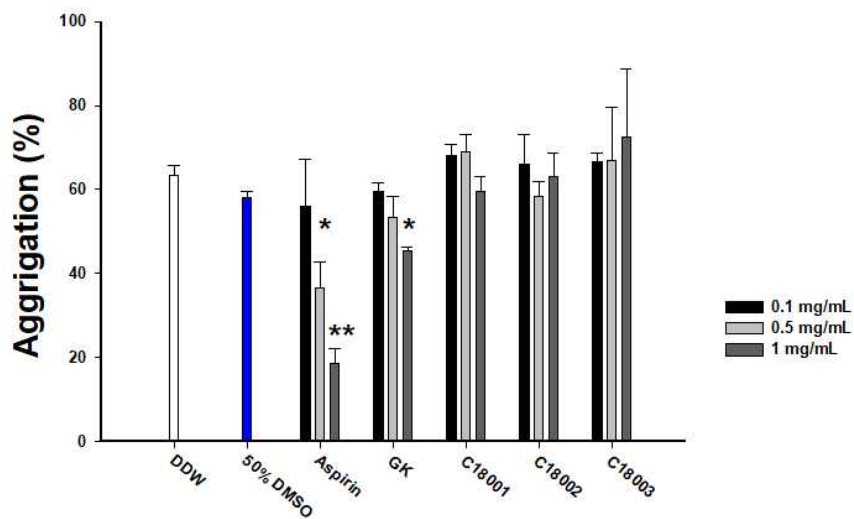
혈관 내피세포에 $TNF-\alpha$ 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1, von Willebrand factor 유전자 발현을 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04) 처리에 의해 유의적으로 감소됨

3) 2차 신규소재의 혈행개선 효능검증

시험 소재	칩잎 물 추출물(SHP05; C18001) 칩잎 에탄올 추출물(SHP06; C18002) 칩잎 에탄올 + 산처리 추출물(SHP07; C18003)
시험 항목	혈소판 기능 평가 (<i>in vitro</i>) 혈관내피세포 관련 평가

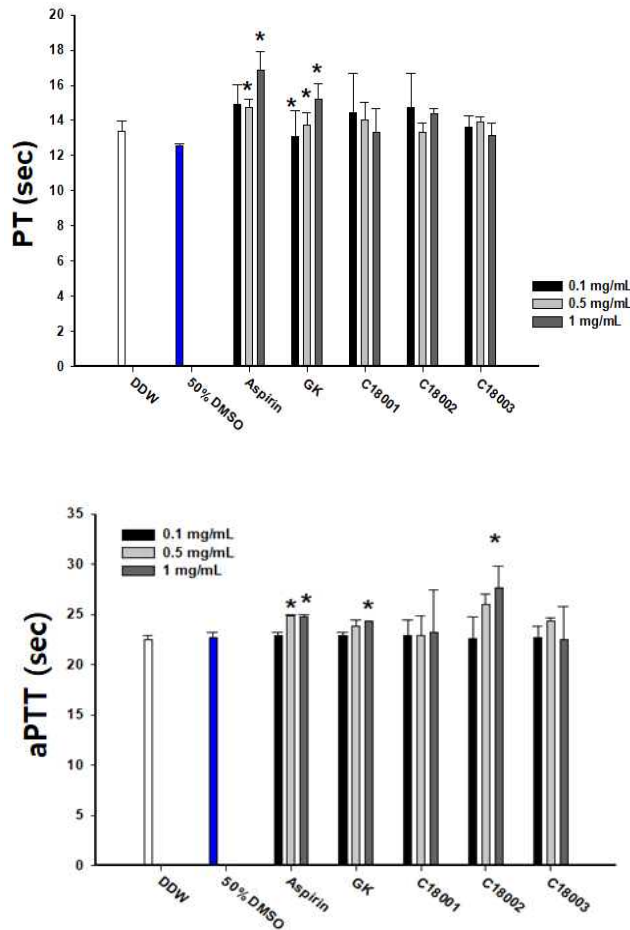
• 칩잎 추출물 3종(SHP05, 06, 07)의 혈행 개선능(*in vitro*)

- 칩잎 3종에 대한 혈소판 응집능을 평가함. 음성대조군은 시료를 용해할 때 사용한 DMSO의 동일농도(0.5%)가 포함된 용액을 사용하였음. 양성대조군으로는 아스피린을 시료와 같은 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 사용하였음. 응집 유도제로는 ADP를 각각 사용하여 혈소판 응집을 평가함
- 시험 결과 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 ADP를 처리한 그룹에서 농도의존적으로 3.4, 37.1, 68.1%의 응집 억제율을 나타냄. 스크리닝 시료 중 ADP를 응집유도제로 사용한 그룹에서는 3종의 칩잎 추출물에서는 혈소판 응집능은 관찰되지 않음



[그림 192] 칩잎 추출물의 혈소판 응집 평가

- PT 시간의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 농도별로 각각 14.9, 14.7, 16.8초로 음성대조군(12.5초) 대비 농도의존적인 증가가 관찰됨. 칙잎 추출물에 의한 유의적인 PT 시간의 지연이 관찰되지 않음
- aPTT시간의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 0.5, 1mg/mL의 농도에서 각각 24.8, 24.7초로 음성대조군(22.7초) 대비 유의적 지연이 관찰됨. 칙잎 에탄올 추출물 1 mg/mL의 농도에서 27.6초로 유의적 증가를 나타내었으나, 그 외 추출물에서 aPTT 시간의 지연은 관찰되지 않음

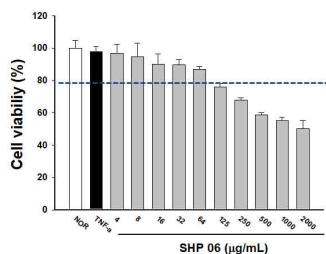


[그림 193] 칙잎 추출물의 혈액응고시간 평가

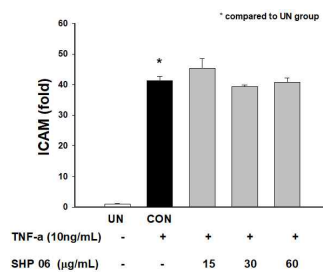
칙잎 에탄올 추출물(SHP06; C18002)의 경우 혈소판 응집 개선능은 없음. 혈액 응고 시간(aPTT)의 지연을 나타냄

▪ SHP06의 혈관내피세포 증식 억제능(*in vitro*)

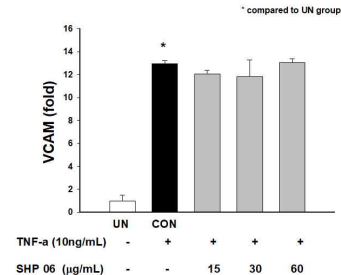
- 혈관내피 세포에 시험시료 2,000mg/mL까지 처리하여 시험물질의 세포안전성을 확보하고자 하였음. UN그룹의 O.D. 값을 100%로 환산하여 세포 생존율 80% 이하를 세포 독성이 있는 약물 및 농도로 판단함. 대조군으로 사용한 10 ng/mL TNF- α 의 세포 독성이 관찰되지 않았음. SHP06의 경우 64 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 판단함
- SVEC에 TNF- α (10 ng/mL) 및 SHP06 (15, 30, 60 μ g/mL)을 처리하고 12시간 배양 후 세포를 회수하고 세포접착단백질 ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인함. TNF- α 에 의해 ICAM-1, VCAM-1 유전자는 각각 UN 그룹 대비 41, 12.9배 증가하였으나, SHP06에 의한 유전자 발현억제는 관찰되지 않음
- Selectin은 TNF- α 에 의해 5.1배증가 하였으나, SHP06에 의한 selctin 유전자 발현의 억제는 없었음. von Willebrand factor는 TNF- α 에 의해 4배 증가하였으며, SHP06에 의한 von Willebrand factor의 유전자 발현의 억제는 없었음



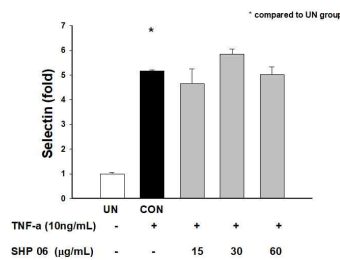
[그림 194] SHP06의 세포 안전성



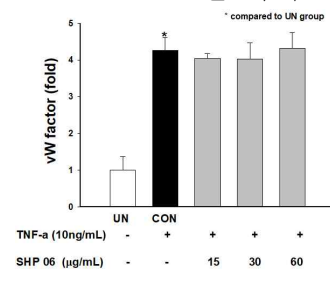
[그림 195] SHP06의 ICAM 발현 억제



[그림 196] SHP06의 VCAM 발현 억제



[그림 197] SHP06의 Selectin 발현 억제



[그림 198] SHP06의 vonWillebrand 발현 억제

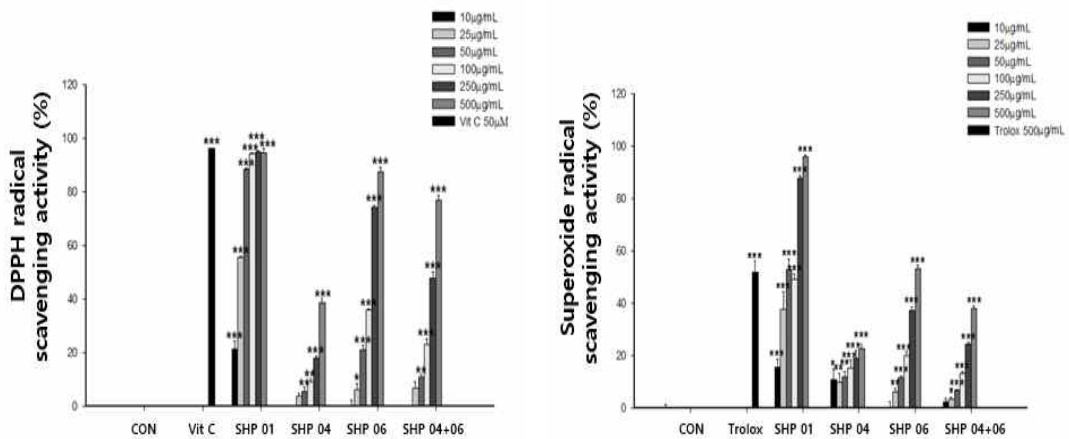
최일 에탄올 추출물의 경우 혈관내피세포에 영향을 미치지 않음

4) 3차 신규소재의 혈행개선 효능검증

시험 소재	포고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04) + 칩잎 에탄올 추출물(SHP06; C18002)
시험 항목	항산화능 평가(non cell system) 혈소판 기능 평가 (<i>in vitro</i>) 혈관내피세포 관련 평가

• SHP 04+06 추출물의 항산화능 평가(non cell system)

- 실험 그룹에는 SHP 04+06 추출물을 각각 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 씩 처리함. 대조군 대비, ascorbic acid는 96%의 hydroxyl radical 제거능을 보이며, 포도잎 추출물이 가장 높은 hydroxyl radical 소거능을 나타내며, SHP06 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 항산화 효과를 나타냄. 하지만 SHP04+06의 경우 SHP06과 비교해 감소됨
- SHP 04+06 추출물은 superoxide radical 소거능이 음성 대조군 대비 유의적 차이를 보임. 포도잎 추출물이 가장 높은 superoxide radical 소거능을 나타내며, SHP06, SHP04+06, SHP04순의 superoxide radical 소거능을 나타냄

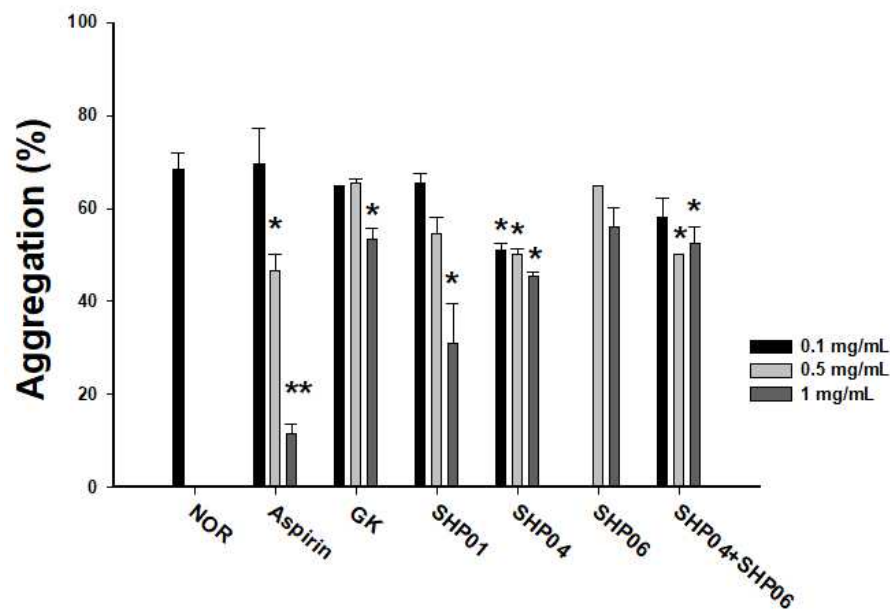


[그림 199] SHP 04+06의 항산화능 평가

SHP 04+06은 농도의존적인 항산화능을 나타냄. 하지만 SHP 06의 단독 처리 군보다 낮은 항산화능을 나타냄

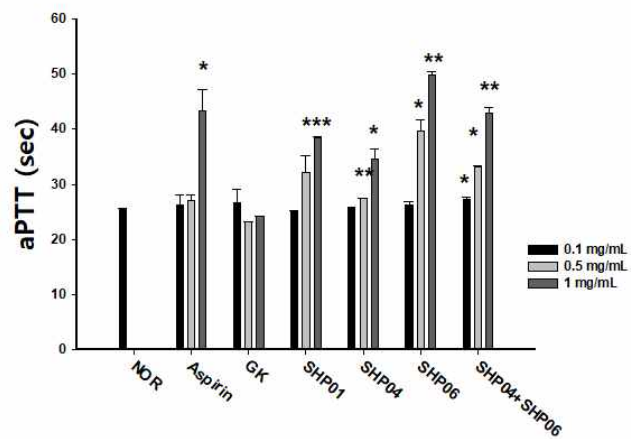
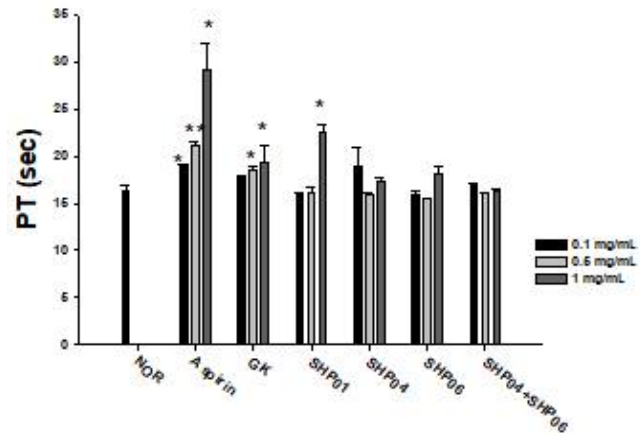
▪ SHP 04+06의 혈소판 기능 평가 (*in vitro*)

- 음성대조군은 시료를 용해할 때 사용한 DMSO의 동일농도(0.5%)가 포함된 용액을 사용하였음. 양성대조군으로는 아스피린을 시료와 같은 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 사용하였음. 응집유도제로는 ADP를 사용하여 혈소판 응집을 평가함
- 시험 결과 양성대조군으로 사양한 아스피린의 경우 ADP를 처리한 그룹에서 농도의존적으로 -1.5, 32.1, 83.2%의 응집억제율을 나타냄. SHP04+06은 0.5, 1mg/mL의 농도에서 27.0, 23.4%p의 억제율을 나타냄
- SHP04의 경우 모든 농도에서 각각 25.5, 27.4, 33.6%p로 유의적인 억제율을 나타냄. SHP06은 혈소판응집 억제를 나타내지 않음. 포도잎 추출물의 경우 1 mg/mL농도에서 54.7%p 억제를 나타냄



[그림 200] SHP 04+06의 혈소판 응집 평가

- PT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 0.1, 0.5, 1mg/mL의 농도에서 각각 19.0, 21.1, 29.1초로 음성대조군(16.3초) 대비 유의적 증가가 관찰됨. 포도잎 추출물 1mg/mL의 농도에서 22.4초로 유의적 증가 확인되었으나, SHP 04+06 및 04, 06 처리시 PT시간의 연장은 관찰되지 않음.
- aPTT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 1mg/mL의 농도에서 43.2%로 음성대조군(25.3초) 대비 유의적 지연이 관찰됨. SHP 04+06에서도 농도의존적인 aPTT 시간의 연장이 관찰됨. 포도잎 추출물 1mg/mL의 농도에서 38.3초, SHP04는 0.5 1mg/mL의 농도에서 각각 27.4, 34.6초로 유의적 증가가 관찰됨. SHP06, SHP04+06에서도 농도의존적인 APTT 시간의 연장이 관찰됨

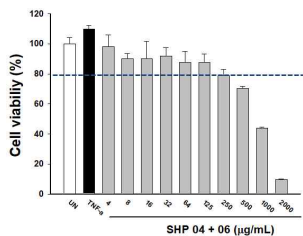


[그림 201] SHP 04+06의 혈액응고시간 평가

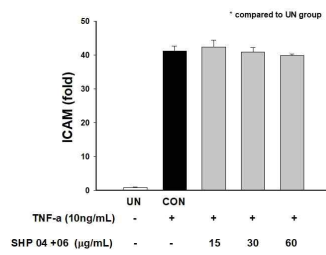
SHP 04+06은 혈소판 응집능 개선 및 aPTT 지연으로 혈행개선 효능을 나타내는 것으로 판단됨

▪ SHP 04+06의 혈관내피세포 증식 억제능(*in vitro*)

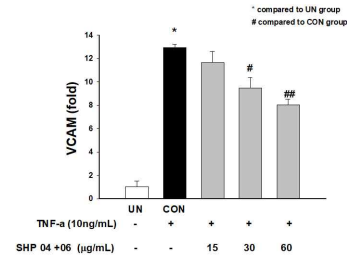
- 혈관내피 세포에 시험시료 2,000 mg/mL까지 처리하여 시험물질의 세포안전성을 확보하고자 하였음. UN그룹의 O.D. 값을 100%로 환산하여 세포 생존율 80% 이하를 세포 독성이 있는 약물 및 농도로 판단함. 대조군으로 사용한 10 ng/mL TNF- α 의 세포 독성이 관찰되지 않았음. SHP04 + 06의 경우 250 μ g/mL 이하의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 판단함
- SVEC에 TNF- α (10 ng/mL) 및 SHP04 + 06 (15, 30, 60 μ g/mL)을 처리하고 12시간 배양 후 세포를 회수하고 세포접착 단백질 ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 확인함. TNF- α 에 의해 ICAM-1, VCAM-1 유전자는 각각 UN 그룹 대비 41, 12.9배 증가를 나타냄. VCAM 유전자 발현은 SHP04 + 06 30, 60 μ g/mL 처리군에서 유의적으로 감소함. ICAM 유전자 발현억제는 관찰되지 않음
- Selectin은 TNF- α 에 의해 5.1배 증가 하였으나, SHP04 + 06에 의한 selcetin 유전자 발현의 억제는 없었음. von Willebrand factor는 TNF- α 에 의해 4배 증가 하였으며, SHP04 + 06에 의한 von Willebrand factor의 유전자 발현의 억제는 없었음



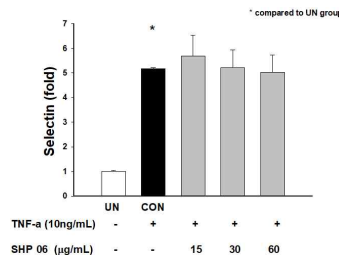
[그림 202] SHP04 + 06의 세포 안전성



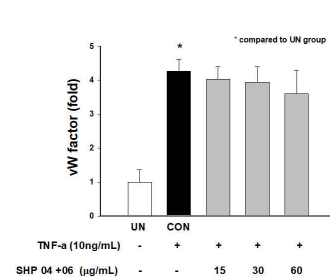
[그림 203] SHP04 + 06의 ICAM 발현 억제



[그림 204] SHP04 + 06의 VCAM 발현 억제



[그림 205] SHP 04 + 06의 Selectin 발현 억제



[그림 206] SHP04 + 06의 vonW 발현 억제

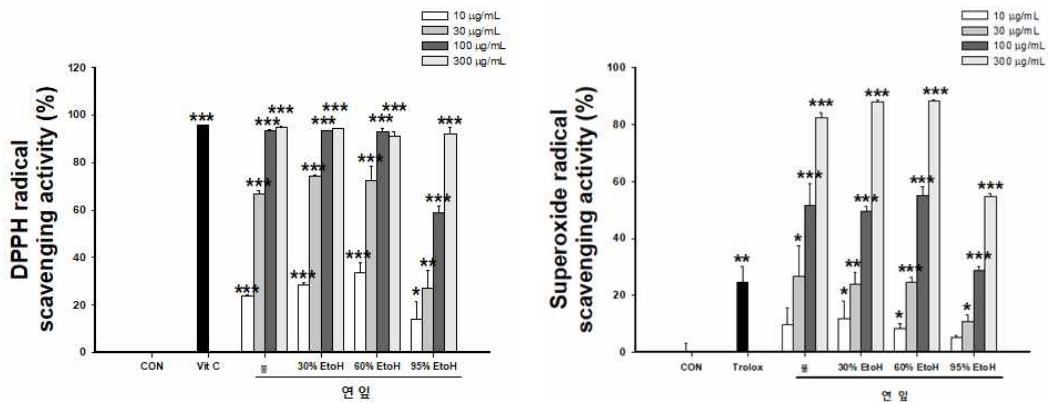
SHP 04+06은 혈관내피세포에 VCAM-1유전자 발현만을 유의적으로 감소시킴

5) 4차 신규소재의 혈행개선 효능검증

시험 소재	연잎 물 추출물
	연잎 30% 에탄올 추출물
	연잎 60% 에탄올 추출물
	연잎 95% 에탄올 추출물
시험 항목	항산화능 평가(non cell system)
	혈소판 기능 평가(<i>in vitro</i>)
	일반 실험동물에서의 혈소판 기능 평가(<i>in vivo</i>)

• 연잎 추출물의 항산화능 평가(non cell system)

- 실험 그룹에는 물 추출물, 30%, 60%, 95% 에탄올 연잎 추출물을 각각 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/mL}$ 씩 처리함. 대조군 대비, ascorbic acid는 95%의 hydroxyl radical 제거능을 보이며, 모든 추출물 300 $\mu\text{g/mL}$ (물 추출물; $94.9 \pm 0.2\%$, 연잎 30% 에탄올 추출물; $94.2 \pm 0.2\%$, 연잎 60% 에탄올 추출물; $91.1 \pm 1.6\%$, 연잎 95% 에탄올 추출물; $92.1 \pm 2.9\%$)에서 양성 대조군인 Vit C 50 μM 와 유사한 항산화 효과를 보임. 연잎 30, 60% 에탄올 추출물은 저농도인 30 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 $74.1 \pm 0.5\%$, $72.3 \pm 6.2\%$ 로 약 70%의 높은 hydroxyl radical 소거능을 나타냄
- 모든 시험 약물에서 superoxide radical 소거능이 음성 대조군 대비 유의적 차이를 보임. 그 중 가장 높은 superoxide radical 소거능을 나타낸 300 $\mu\text{g/mL}$ 연잎 60% 에탄올 추출물($88.2 \pm 0.5\%$)에서 양성 대조군인 500 $\mu\text{g/mL}$ trolox($24.5 \pm 5.7\%$)와 SOD 활성 비교 시 약 3.6배 이상의 항산화 효과를 나타냄

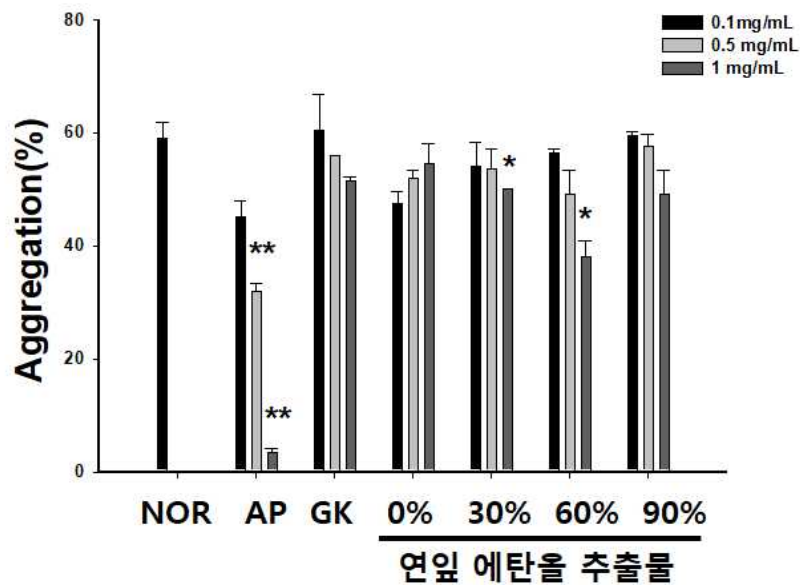


[그림 207] 연잎 용매별 추출물의 항산화능 평가

연잎 추출물은 양성대조군과 유사한 항산화능을 나타냄

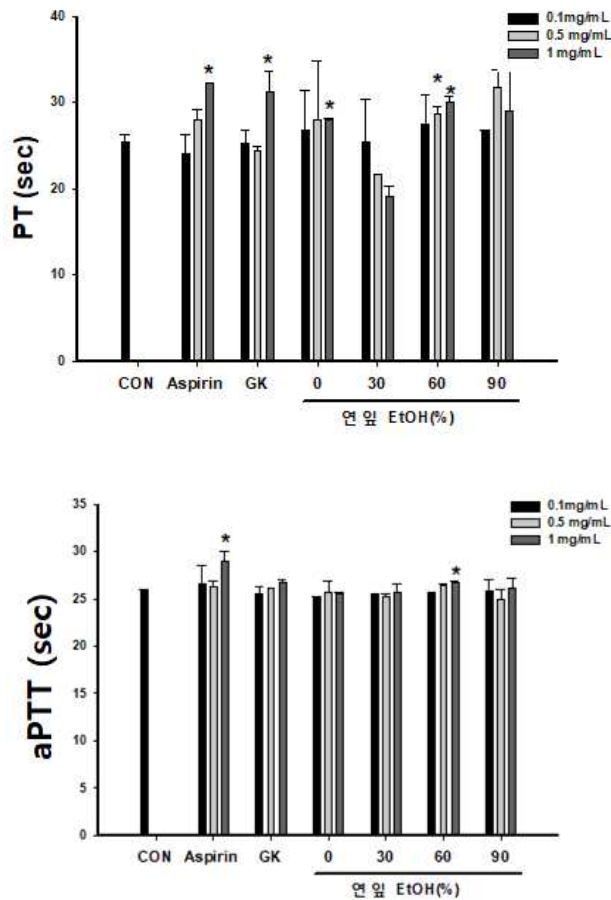
▪ 연잎 용매별 추출물의 혈행 개선능(*in vitro*)

- 연잎 용매별 추출물에 대한 혈소판 응집을 비교 평가함. 음성대조군은 시료를 용해할 때 사용한 DMSO의 동일농도(0.5%)가 포함된 용액을 사용하였음. 양성대조군으로는 아스피린을 시료와 같은 농도(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 사용하였음. 응집유도제로는 ADP를 각각 사용하여 혈소판 응집을 평가함
- 시험 결과 양성대조군으로 사양한 아스피린의 경우 ADP를 처리한 그룹에서 농도의존적으로 23.7, 45.8, 94.1%의 응집 억제율을 나타냄. ADP를 응집유도제로 사용한 그룹에서는 은행잎을 0.5, 1mg/mL로 처리한 그룹에서 각각 5.1, 12.7% 응집 억제능을 나타냄. 연잎 물 추출물의 경우 응집 감소는 나타나지 않음
- 연잎 30% 에탄올 추출물에서 농도 별로 각각 8.5, 10.2, 15.3%의 응집 억제능을, 연잎 60% 에탄올 추출물 그룹에서 농도 별로 각각 4.2, 16.9, 35.6%의 응집 억제능을, 연잎 95% 에탄올 추출물 그룹에서는 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 각각 2.5, 16.9%의 응집 억제능을 나타내었으며, 그 중 연잎 30%, 60% 추출물의 1 mg/mL의 농도 처리군에서 유의적 감소를 나타내었음



[그림 210] 연잎 용매별 추출물의 혈소판 응집능

- PT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 1 mg/mL의 농도에서 33.4 초로 음성대조군(26.7초) 대비 유의적 증가가 관찰됨. 연잎 물 추출물 1 mg/mL 및 연잎 60% 에탄올 추출물에서 각각 28.4, 30.7초로 음성 대조군 대비 유의적 차이를 나타냄
- aPTT의 경우 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 1 mg/mL의 농도에서 28.7초로 음성대조군(25.9초) 대비 유의적 지연이 관찰됨. 연잎 60% 에탄올 추출물에서 27.1초로 음성 대조군 대비 유의적 차이를 나타냄

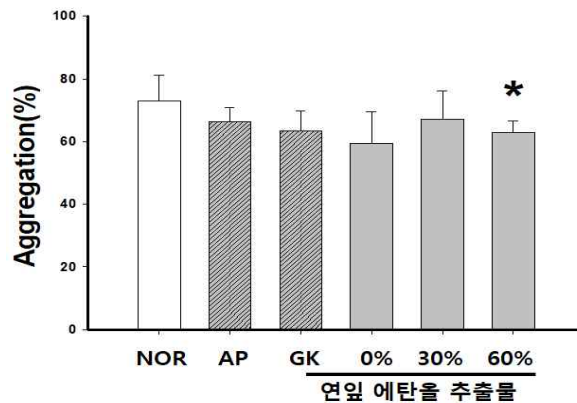


[그림 211] 연잎 용매별 추출물의 혈액응고시간 평가

연잎 30% 및 60% 에탄올 추출물에서 혈소판 응집율의 감소 및 연잎 60% 에탄올 추출물에서 혈액응고시간(PT, aPTT)의 지연을 나타냄

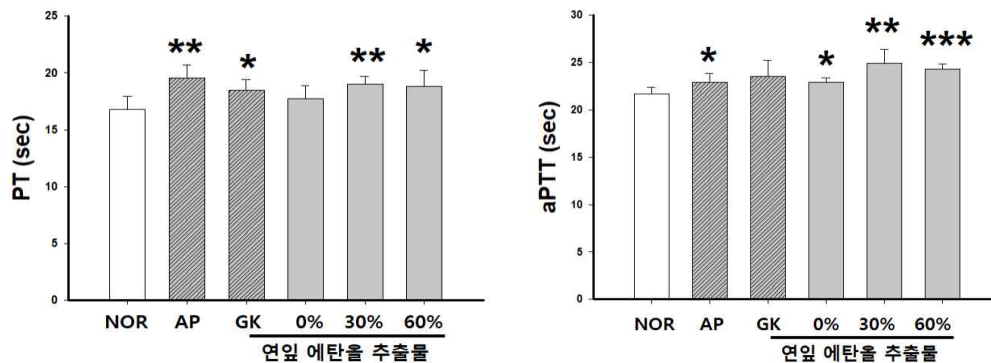
• 일반 실험동물에서의 연잎 추출물별 혈소판 기능 평가(*in vivo*)

- 그룹당 동물은 각 5마리씩 구성하고 아스피린 40 mg/kg, 은행잎 50 mg/kg, 연잎 추출물, 30% 에탄올 추출물 및 60% 에탄올 추출물을 모두 200 mg/kg의 동일 농도로 경구로 7일간 투약하고 8일째 되는 날 복대정맥에서 혈액을 채취하여 혈소판을 분리하고 혈행 개선능을 평가함
- 양성대조군으로 사용한 아스피린(AS)의 경우 ADP로 응집유도 시 정상군(NOR) 대비 9.0%p의 유의적인 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 연잎 추출물은 용매별로 각각 18.4, 7.8, 13.8%p 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 그 중 연잎 60% 에탄올 추출물에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물(12.9%p)과의 유사한 혈소판 응집 효과를 나타냄



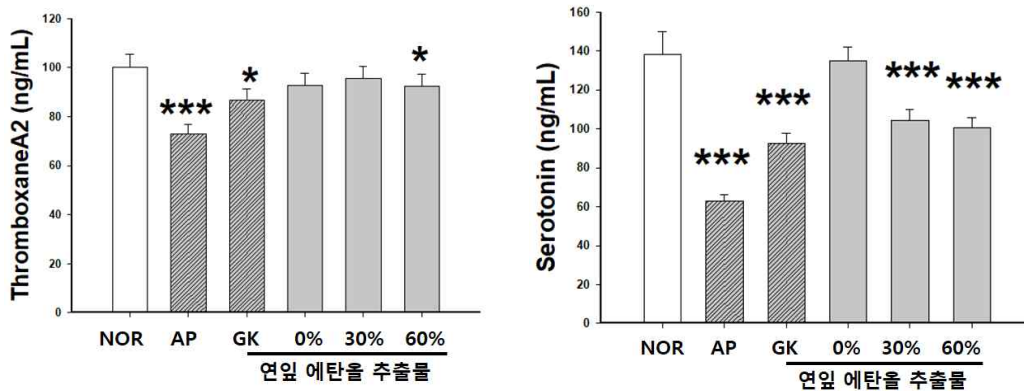
[그림 212] 연잎 추출물의 7일 투여에 따른 혈소판 응집능 평가

- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 PT는 19.6초로 정상군(16.8초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 연잎 추출물은 각각 17.8, 19.0, 18.9 초의 PT 값을 나타냄. 그 중 30% 및 60% 에탄올 추출물에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물 (18.5%p)과의 유사한 PT를 나타냄. 양성대조군으로 사용한 Aspirin의 aPTT의 경우 22.9초로 Nor군(21.7초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 연잎 추출물은 용매별로 각각 22.9, 24.9, 24.3 초의 aPTT 값을 나타냄. 기존 소재인 은행잎 추출물은 23.5초로 Nor대비 지연을 나타냄



[그림 213] 연잎 추출물의 7일 투여에 따른 혈액응고시간 평가

- 혈관 내 혈액응고/혈전생성을 유도하는 물질인 TXA2, Serotonin을 혈청중에 측정함. 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 TXA2는 73.0 ± 3.9 ng/mL로 정상군 (100.0 ± 5.4 ng/mL) 대비 유의적인 감소를 나타냄. 연잎 추출물은 각각 92.9 ± 5.0 ng/mL, 95.4 ± 5.1 ng/mL, 92.3 ± 4.9 ng/mL의 TXA2 농도를 나타냄. 그 중 60% 에탄올 추출물에서 유의적 차이가 관찰됨
- 기존 소재인 은행잎 추출물의 경우 86.7 ± 4.6 ng/mL의 TXA2 농도를 나타냄. 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 Serotonin는 62.8 ± 3.4 ng/mL로 정상군 (138.1 ± 11.9 ng/mL) 대비 유의적인 감소를 나타냄. 연잎 추출물은 각각 135.0 ± 7.2 ng/mL, 104.3 ± 5.6 ng/mL, 100.4 ± 5.4 ng/mL의 Serotonin 농도를 나타냄. 그 중 30% 및 60% 에탄올 추출물에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물의 경우 92.5 ± 5.0 μ g/mL의 Serotonin 농도를 나타냄

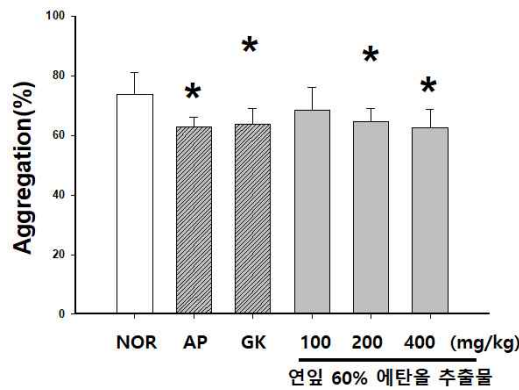


[그림 214] 연잎 추출물의 7일 투여에 따른 TXA2 및 Serotonin 변화

일반동물 모델에 연잎 용매별 추출물을 7일간 투여 시 연잎 30%, 60% 에탄올 추출물 처리군에서 혈소판 응집능 억제, PT 시간을 지연 및 TXA2, Serotonin 분비 억제에 따라 혈행응고 및 혈전 개선 효과가 있는 것으로 판단. 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄

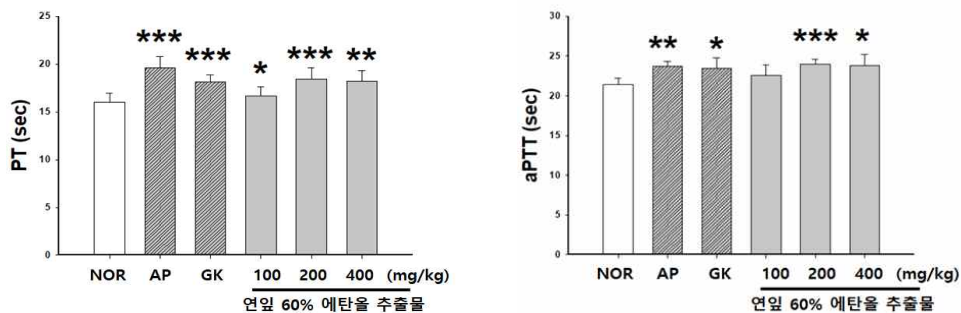
• 연잎 60% 에탄올 추출물의 농도별 혈행 개선능(*in vivo*)

- 그룹 당 동물은 각 10마리씩 구성하고 아스피린 40 mg/kg, 은행잎 50mg/kg, 연잎 60% 에탄올 추출물을 모두 100, 200, 400 mg/kg의 농도로 경구로 7일간 투약하고 8일째 되는 날 복대정맥에서 혈액을 채취하여 혈소판을 분리하고 혈행개선능을 평가함
- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 ADP로 응집유도 시 정상군 대비 14.9%p의 유의적인 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 연잎 60% 에탄올 추출물은 농도별로 각각 7.2, 12.4, 15.4%p 혈소판 응집 억제율을 나타냄. 그 중 200, 400 mg/kg의 농도에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물(13.6%p)과의 유사한 혈소판 응집 효과를 나타냄



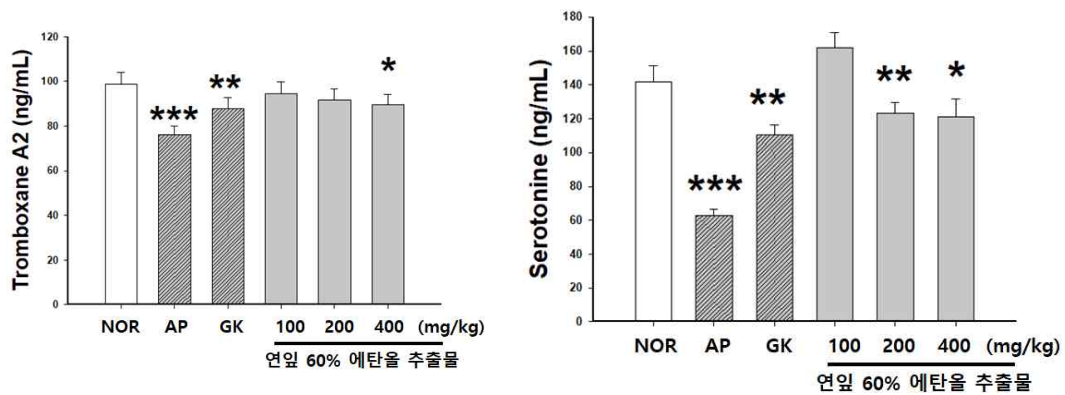
[그림 215] 연잎 60%에탄올 추출물의 7일 투여에 따른 혈소판 응집 평가

- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 PT는 19.6초로 정상군(15.9초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 연잎 60% 에탄올 추출물은 농도별로 각각 16.7, 18.5, 18.2초의 PT 값을 나타냄. 모든 시험 농도에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물 (18.1%p)과의 유사한 PT를 나타냄. 양성대조군으로 사용한 아스피린의 aPTT의 경우 23.7초로 정상군(21.4초) 대비 유의적인 지연을 나타냄. 연잎 60% 에탄올 추출물은 농도별로 각각 22.6, 23.9, 23.7 초의 aPTT 값을 나타냄. 200, 400 mg/kg 농도에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물(23.5초)과 유사한 aPTT 지연을 나타냄



[그림 216] 연잎 60%에탄올 추출물의 7일 투여에 따른 혈액응고시간 평가

- 혈관 내 혈액응고/혈전생성을 유도하는 물질인 TXA2, Serotonin을 혈청 중에 측정함. 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 TXA2는 76.0 ± 4.1 ng/mL로 정상군 (98.8 ± 5.3 ng/mL) 대비 유의적인 감소를 나타냄. 연잎 60% 에탄올 추출물은 농도별로 각각 94.6 ± 5.1 ng/mL, 91.6 ± 4.9 ng/mL, 89.4 ± 4.8 ng/mL의 TXA2 농도를 나타냄. 그 중 200 mg/kg 군에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물의 경우 87.9 ± 4.7 ng/mL의 TXA2 농도를 나타냄
- 양성대조군으로 사용한 아스피린의 경우 serotonin는 63.0 ± 3.4 ng/mL로 Nor군 (141.7 ± 9.7 ng/mL) 대비 유의적인 감소를 나타냄. 연잎 추출물은 각각 162.1 ± 8.7 ng/mL, 123.0 ± 6.6 ng/mL, 121.0 ± 10.5 ng/mL의 serotonin 농도를 나타냄. 그 중 200, 400 mg/kg의 농도에서 유의적 차이가 관찰됨. 기존 소재인 은행잎 추출물의 경우 110.4 ± 5.9 μ g/mL의 serotonin 농도를 나타냄



[그림 217] 연잎 60%에탄올 추출물의 7일 투여에 따른 TXA2 및 Serotonin 변화

일반 동물 모델에 연잎 60% 에탄올 추출물을 100, 200, 400 mg/kg의 농도로 7일간 투여 시 200 및 400 mg/kg의 농도에서 처리군에서 혈소판 응집능 억제, 혈액응고 시간 지연 및 TXA2, Serotonin 분비 억제에 따라 혈행응고 및 혈전 개선 효과가 있는 것으로 판단. 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄

2-4. 포도 잎 추출물의 혈행개선능 인체적용시험

가. 인체적용시험용 식품 제조 및 기준규격 설정 (1차년도, 2차년도)

가) 인체적용시험용 시험식품 섭취량 및 섭취방법 설정 (1차년도)

(1) 섭취근거 자료

포도 잎은 [동의보감], [한의학대사전], [중약대사전]에 수종, 부종, 배뇨장애, 결막염, 부스럼 등에 사용하고, 하루 12~20g을 물로 달여서 복용하거나 찜어서 즙을 복용한다고 기록하고 있음. “포도 잎”은 식품원재료 DB에 포도(*Vitis vinifera* L., *Vitis labrusca* L.)로 식용 가능한 것으로 등재되어 있으며, 사용 부위는 열매, 잎, 씨로 제한되어 있음. “김치백과사전(유한문화사, 2004)”에 의하면 “포도 잎 절임”을 김치의 한 종류로 보고하고 있음. 현재 국내에는 포도엽 엑스를 주원료로 한 의약품이 시판 중이며, 대한약전외한약(생약)규격집에 포도엽 엑스가 등재되어 있음

(2) 섭취량 및 섭취방법

(가) 섭취량 : 포도 잎 추출물(HP-01)로서 1,800 mg

(나) 섭취방법 : 1일 3회, 1회 2정 섭취

(3) 설정 근거

동물실험에서 유의한 혈행개선 효능을 나타낸 HP-01의 투여 용량은 100~200 mg/kg (rat)이며 체표면적환산표로 인체투여용량으로 환산할 경우 약 973 ~ 1,946 mg/60kg bw /day [HED(mg/kg) = 100 ~ 200 mg/kg × 6/37 × 60]의 값을 얻을 수 있음. 하지만 랫드가 사람에 비해 약물 대사 속도가 월등히 높고 또한 약물 순응도에 대한 중간 특이성을 고려하여 인체적용시험 투여농도를 1,800 mg /day으로 설정하였음. 이는 전통적인 일일 최대 섭취량인 9-20 g 이하이므로 포도 잎 추출물(HP-01) 섭취량은 안전하다고 판단됨

원재료 (사용부위)	KFDA 식품 원재료 DB	임상 예정 섭취량 (g)	수율 (%)	원재료 섭취량 (g)	일반의약품 섭취량 (수율감안한 원재료섭취량)	동의 보감 (g/일)	중약 대사전 (g/일)	한의학 대사전 (g/일)
포도(잎)	식품원료 (열매, 잎, 씨)	1.8	10.9	16.51	360 mg/일 (수율10.9%: 3.3 g/day)	12~20	11.25~ 18.75	9~15

(4) 섭취 시 주의사항

(가) 포도에 알레르기가 있는 사람은 섭취 시 주의하시기 바랍니다.

(나) 수술 전·후 또는 출혈이 있는 경우 반드시 전문의와 상담 후 섭취하시기 바랍니다.

(다) 천연물 소재의 추출물 복용 시 있을 수 있는 경미한 소화불량이 있을 수 있습니다.

(5) 임상시험자료집 및 임상시험계획서

CRO기관 : 네오뉴트라	
<p>인체적용시험자 자료집</p> <p>(Investigator's Brochure)</p> <p>HP-01 (포도일 추출물)</p> <p>Version No. : 1.0 Version Date : 2019. 06.14</p> <p>(유) 한풍제약</p> <p>1</p>	<p>인체적용시험계획서</p> <p>출혈 개선에 미치는 HP-1의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 B주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험</p> <p>Protocol No. : HPPF-HP-1 Version No. : 1.0 Version Date : 2018년 10월 30일</p> <p>(유)한풍제약 소유</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>Confidential</p> <p>본 인체적용시험계획서에 포함되어 있지 않은 정보는 이해당사자(연구원, 임상조사원, 의료진, 연구자, 환자, 후원자, 투자자, 언론인, 일반인 등)에게 공개되어서는 안 됩니다. 본 계획서에 포함되어 있지 않은 정보는 사전에 동의 없이 외부에 공개될 수 없습니다. (유)한풍제약의 사전 서면동의 없이 제3자에게 제공될 수 없습니다.</p> </div> <p>네오뉴트라 (유)한풍제약 소유</p>
[임상시험자료집]	[임상시험계획서]

나) 포도잎추출물 생산 (HP-01)

(1) 제조공정도

제조공정	공정	지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
포도잎	포도잎	1.98	5.0
추출	80~90℃가온, 50%주정, 3%빙초산(식첨), 20배수, 2회, 3시간,	-	100
여과	1차: 카트리지여과(5μm 필터)	1차 0.12	79.00 L
	2차: 원심분리(상온, 1200-1500 rpm)	2차 0.03 원심분리 0.10	88.3 L 154.3 L
	감압농축, 진공도 145 Torr이하, 60℃이하 부원료 혼합(미결정셀룰로오스)	2.54	4.94
건조/분쇄	감압건조기, 60℃이하, 12시간이상	14.97	0.68
포도잎 추출물		14.97	0.68

(2) 성적서

원료시험성적서

검체명	포도잎추출물	Code 번호	E-HP-01
제조번호	19001	원료부서	개발부
시험일자	20190910	시험일자	2019.09.10
시험목적	원료검정	시험단위	말
시험항목	시용량	기준값	시험결과
1. 색	색상은 흰색, 불투명하며, 1.5cm 직경의 원형 시용량 1.1g을 채워 관찰	2019.09.10 기준	2019.09.10 기준
2. 수분	수분 함량 시험을 위해 100℃에서 2시간 동안 건조한 후 무게를 측정함	5.2%	5.2%
3. 이물	시용량 1.1g을 10배수 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무용물	무용물
4. 대량균	시용량 1.1g을 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무균	무균
5. Quercetin (mg/kg)	Quercetin 함량	11.3 ~ 16.9 mg/kg	14.30 mg/kg
6. IGF (mg/kg)	IGF 함량	2.6 mg/kg	2.60 mg/kg
7. 카데킨 (mg/kg)	카데킨 함량	0.5 mg/kg	0.50 mg/kg
8. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
9. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
10. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg
11. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg

원료시험성적서

검체명	포도잎추출물	Code 번호	E-HP-01
제조번호	19002	원료부서	개발부
시험일자	20190910	시험일자	2019.09.10
시험목적	원료검정	시험단위	말
시험항목	시용량	기준값	시험결과
1. 색	색상은 흰색, 불투명하며, 1.5cm 직경의 원형 시용량 1.1g을 채워 관찰	2019.09.10 기준	2019.09.10 기준
2. 수분	수분 함량 시험을 위해 100℃에서 2시간 동안 건조한 후 무게를 측정함	5.2%	5.2%
3. 이물	시용량 1.1g을 10배수 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무용물	무용물
4. 대량균	시용량 1.1g을 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무균	무균
5. Quercetin (mg/kg)	Quercetin 함량	71.3 ~ 81.9 mg/kg	73.00 mg/kg
6. IGF (mg/kg)	IGF 함량	2.1 mg/kg	2.10 mg/kg
7. 카데킨 (mg/kg)	카데킨 함량	0.5 mg/kg	0.50 mg/kg
8. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
9. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
10. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg
11. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg

원료시험성적서

검체명	포도잎추출물	Code 번호	E-HP-01
제조번호	19003	원료부서	개발부
시험일자	20190910	시험일자	2019.09.10
시험목적	원료검정	시험단위	말
시험항목	시용량	기준값	시험결과
1. 색	색상은 흰색, 불투명하며, 1.5cm 직경의 원형 시용량 1.1g을 채워 관찰	2019.09.10 기준	2019.09.10 기준
2. 수분	수분 함량 시험을 위해 100℃에서 2시간 동안 건조한 후 무게를 측정함	5.2%	5.2%
3. 이물	시용량 1.1g을 10배수 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무용물	무용물
4. 대량균	시용량 1.1g을 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무균	무균
5. Quercetin (mg/kg)	Quercetin 함량	71.3 ~ 81.9 mg/kg	73.00 mg/kg
6. IGF (mg/kg)	IGF 함량	2.1 mg/kg	2.10 mg/kg
7. 카데킨 (mg/kg)	카데킨 함량	0.5 mg/kg	0.50 mg/kg
8. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
9. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
10. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg
11. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg

원료시험성적서

검체명	포도잎추출물	Code 번호	E-HP-01
제조번호	19004	원료부서	개발부
시험일자	20190910	시험일자	2019.09.10
시험목적	원료검정	시험단위	말
시험항목	시용량	기준값	시험결과
1. 색	색상은 흰색, 불투명하며, 1.5cm 직경의 원형 시용량 1.1g을 채워 관찰	2019.09.10 기준	2019.09.10 기준
2. 수분	수분 함량 시험을 위해 100℃에서 2시간 동안 건조한 후 무게를 측정함	5.2%	5.2%
3. 이물	시용량 1.1g을 10배수 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무용물	무용물
4. 대량균	시용량 1.1g을 증류수 11.0g에 용해하여 관찰	무균	무균
5. Quercetin (mg/kg)	Quercetin 함량	71.3 ~ 81.9 mg/kg	73.00 mg/kg
6. IGF (mg/kg)	IGF 함량	2.1 mg/kg	2.10 mg/kg
7. 카데킨 (mg/kg)	카데킨 함량	0.5 mg/kg	0.50 mg/kg
8. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
9. 총수분 (mg/kg)	총수분 함량	0.2 mg/kg	0.20 mg/kg
10. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg
11. 잔류물	잔류물 함량	0.001 ~ 0.005 mg/kg	0.001 mg/kg

[19001]

[19002]

[19003]

[19004]

나) HP-01(포도 잎 추출물)의 시험식품 및 대조식품에 대한 제제학적 검토

(1) 목적

(가) HP-01(포도 잎 추출물) 제형(정제)을 진행하고자함

(나) 제형규격 확인으로 마손도, 경도, 붕해 시험을 통하여 최적의 원료 분량 설정

(2) 분량(기준규격) 설정

(가) 시험식품: 600 mg[유색(녹색) 코팅정] : 1일 3회, 1회 2정(총 6정)

: HP-01(포도 잎 추출물)로 1일 총 1,800 mg 섭취 (1일 6정, 1정당 주성분 300 mg)

(나) 대조식품: 600 mg[유색(녹색) 코팅정] : 1일 3회, 1회 2정(총 6정)

(3) 제형규격

구분	내용	비고
경도(KP)	나정:15~17, 코팅정:23~24	
마손도(%)	0.02	0.5% 이하
붕해도(분)	나정:15~16, 코팅정:16~17	60분 이내
나정 두께(mm)	4.68mm	-
성상 및 제형	갈색의 제피한 장방형의 정제	

(4) 성상확인

인체적용 시험용 식품	성상	비고
시험식품 코팅 (녹색)		정제의 상·하 성상이 양호함
대조식품 코팅 (녹색)		

다) 제조공정 확립

(1) 시험식품

(가) 주성분명 : HP-01(포도 잎 추출물)

(나) 원료 및 배합비율 (1정 당)

원료명	배합비율(%)	합량(mg)
HP-01(포도 잎 추출물)	50.00	300.0
결정셀룰로오스	31.66	190.0
옥수수전분	11.67	70.0
이산화규소	1.50	9.0
스테아린산마그네슘	0.33	2.0
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	2.33	14.0
HPMC	1.67	10.0
이산화티타늄	0.47	2.8
글리세린지방산에스테르	0.15	0.9
식용색소 녹색 3호	0.17	1.0
식용색소 녹색 40호	0.05	0.3
합 계	100.00	600.0

(다) 제조공정

1. 원료의 칭량	
주성분	HP-01(포도잎추출물)
부형제	결정셀룰로오스, 옥수수전분
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘
활택제	이산화규소, 스테아린산마그네슘
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
용 제	에탄올(KP), 정제수(KP)
2. 혼합	
공정 1의 주성분	
공정 1의 부형제	
공정 1의 붕해제	
3. 후혼합	
공정 1의 활택제	
공정 2의 혼합물	
4. 타정	
공정 3의 혼합물	
5. 코팅액 조제	
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
용 제	에탄올(KP) 152mg/정, 정제수(KP) 48mg/정
6. 코팅	
공정 4의 반제품	
공정 5의 코팅액	
7. 선별	
공정 6의 반제품	
8. 포장(병포장)	
공정 7의 반제품	[직접용기.포장의 재질: PE, PVDC]

(2) 대조식품

(가) 주성분명 : 결정셀룰로오스

(나) 원료 및 배합비율 (1정 당)

원료명	배합비율(%)	mg
카라멜색소	2.00	12.0
결정셀룰로오스	51.67	310.0
옥수수전분	39.66	238.0
이산화규소	1.50	9.0
스테아린산마그네슘	0.33	2.0
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	2.33	14.0
HPMC	1.67	10.0
이산화티타늄	0.47	2.8
글리세린지방산에스테르	0.15	0.9
식용색소 녹색 3호	0.17	1.0
식용색소 적색 40호	0.05	0.3
합 계	100.00	600.0

(다) 제조공정

1. 원료의 칭량	
주성분	HP-01(포도잎추출물)
부형제	결정셀룰로오스, 말토덱스트린, 옥수수전분, 카라멜색소
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘
활택제	이산화규소, 스테아린산마그네슘
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
용 제	에탄올(KP), 정제수(KP)
2. 혼합	
공정 1의 부형제	
공정 1의 붕해제	
3. 후혼합	
공정 1의 활택제	
공정 2의 혼합물	
4. 타정	
공정 3의 혼합물	
5. 코팅액 조제	
코팅제	히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린지방산에스테르, 이산화티타늄, 치자그린색소
용 제	에탄올(KP) 152mg/정, 정제수(KP) 48mg/정
6. 코팅	
공정 4의 반제품	
공정 5의 코팅액	
7. 선별	
공정 6의 반제품	
8. 포장(병포장)	
공정 7의 반제품	[직접용기.포장의 재질: PE, PVDC]



[그림 223] 인체적용시험용 시험약 제조공정도



[그림 224] 인체적용시험용 대조약 제조공정도

2) 인체적용시험용 식품 기준규격 설정

항 목	기준규격
1. 정상	녹색의 필름코팅된 장방형 정제
2. 분해	60분 이내
3. 질량편차	5%이하
4. 대장균군	음성
5. Quercetin-3-o-glucuronide	3.4-5.0 mg/정
6. 납	2.0 mg/kg 이하
7. 카드뮴	0.5 mg/kg 이하
8. 총 비소	0.5 mg/kg 이하
9. 총 수은	0.2 mg/kg 이하

시험식품

대조식품

인체적용시험성적서

구분	시험번호	시험대상	시험일자
시험대상	19001-1	19001-1	19.07.19
시험대상	19001-2	19001-2	19.08.08
시험대상	19001-3	19001-3	19.09.18
시험대상	19001-4	19001-4	19.10.01

인체적용시험성적서

구분	시험번호	시험대상	시험일자
시험대상	19002-1	19002-1	20.01.01
시험대상	19002-2	19002-2	20.04.01
시험대상	19002-3	19002-3	20.07.01
시험대상	19002-4	19002-4	20.10.01

인체적용시험성적서

구분	시험번호	시험대상	시험일자
시험대상	19001-1	19001-1	19.07.19
시험대상	19001-2	19001-2	19.08.08
시험대상	19001-3	19001-3	19.09.18
시험대상	19001-4	19001-4	19.10.01

[19001]

[19002]

[19001]

[그림 225] 인체적용시험용 식품 시험성적서

3) 인체적용시험용 식품 또는 대조식품



라. 인체적용시험 식품 안정성시험

(1) 안정성 시험(장기보존시험) 시험계획

제조번호	시험일자	3개월	6개월	9개월	12개월
19001	19.07.19 (보관일19.08.08)	19.11.08	20.02.08	20.05.08	20.08.08
19002	19.09.18 (보관일19.10.01)	20.01.01	20.04.01	20.07.01	20.10.01*

*인체적용시험 종료일(2020.09.10., 마지막 인체적용시험 대상자 시험종료일)을 기점으로 안정성시험 중단하였음.

(2) 안정성 시험(장기보존시험) 시험결과

시험구분		장기보존시험				
자료종류		국내실시[안정성시험기준에 적합, 기초자료 첨부]				
시험기관		(유)한풍제약				
제조사 / 소재지		(유)한풍제약 / 전북 완주군 완주산단 6로 301				
제조번호 / 제조일자		19001, 19002				
시험자		유진주				
시험기간		2019.07 - 2022.10				
저장방법		기밀용기, 실온(1 ~ 30 ℃), 차광보존				
시험 약물	약물명	제품명	HP-01정	지표성 분명	Quercetin-3-o-glucuronide	
	함량	1정 중 Quercetin-3-o-glucuronide으로서 3.4-5.0 mg				
	포장	1) 용기의 재질 : 병(PE) 2) 포장단위 : 자사포장				
시험 조건	온도	25 ℃ ± 2				
	습도	RH 60 % ± 5				
	시험간격	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 (개월)				
기시법 시험항목		성상, 붕해, 질량편차, 대장균군, Quercetin-3-o-glucuronide, 납, 비소, 카드뮴, 총비소, 총수은, 잔류농약				
안정성 시험항목	0,3,6,9,12,18,24개월	성상, 붕해, 질량편차, 대장균군, Quercetin-3-o-glucuronide, 납, 비소, 카드뮴, 총비소, 총수은				
시험항목	기준	0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
성상	녹색의 필름코팅된 장방형 정제	녹색의 필름코팅된 장방형 정제	녹색의 필름코팅된 장방형 정제	녹색의 필름코팅된 장방형 정제	녹색의 필름코팅된 장방형 정제	녹색의 필름코팅된 장방형 정제
붕해	60분 이내	27분 32분	25분 30분	25분 32분	28분 25분	30분
질량편차	5%이하	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성
Quercetin-3-o-glucuronide	3.4-5.0 mg/정	4.18 4.42	4.22 4.40	4.22 4.31	4.25 4.44	4.29
납	2.0 mg/kg 이하	0.460 0.211	0.522 불검출	불검출 불검출	불검출 0.0283	0.0821
카드뮴	0.5 mg/kg 이하	불검출 0.003	불검출 0.003	0.029 0.051	불검출 0.0041	0.0016
총 비소	0.5 mg/kg 이하	불검출 0.143	불검출 0.501	불검출 불검출	0.051 0.052	0.0803
총 수은	0.2 mg/kg 이하	0.003 0.001	0.000 0.000	0.000 0.054	0.005 0.013	0.001
판정		적합	적합	적합	적합	적합
시험일자		2019.07.19. 2019.09.18	2019.11.22. 2020.01.02	2020.02.07. 2020.04.01	2020.05.08 2020.07.01	2020.08.07
시험자		유진주	유진주	유진주	유진주	유진주
확인자		김지환	김지환	배현정	배현정 전기용	전기용
시험자결론	합량시험결과 초기 함량으로부터 9개월 되는 시점까지 일반적인 약물의 변화와 별 다른 차이를 볼 수 없었고 다른 기시법 항목도 적합하였다. 시험결과를 통해 HP-01정은 초기 함량으로부터 9개월 동안 장기보존 시험한 결과 안정한 상태를 보여주고 있다.					

(3) 시험성적서

장3		장6	
<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>
<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>
<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>
<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>	<p>1901</p> <p>1902</p>

나. 인체적용시험계획

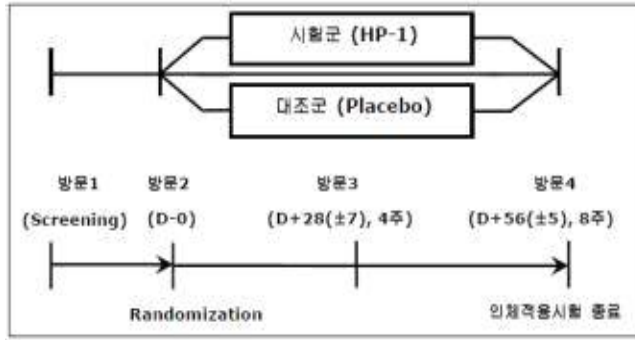
(1) 인체적용시험 계획



(2) 요약

인체적용시험 제목	혈행 개선에 미치는 HP-1의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	혈소관 응집능이 높은 만 35세 이상, 만 75세 이하의 남녀
인체적용시험 목적	혈소관 응집능이 높은 성인 남녀를 대상으로 HP-1을 섭취했을 때 대조식품(placebo)과 비교하여 혈행 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가한다.
인체적용시험 단계 및 디자인	단계: 기타 (건강기능식품) 디자인: 8주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조
인체적용시험용 식품	시험식품: HP-1 (포도잎추출물) 대조식품: Placebo
인체적용시험용 식품 섭취방법	<ul style="list-style-type: none"> 시험군(시험식품): 미정 대조군(Placebo): 시험군과 동일한 방법으로 섭취
인체적용시험용 식품 섭취기간	8주

**인체적용시험
방법**



인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체 적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 한다. 배정된 인체적용시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.

시험대상자 수

구 분	시험군	대조군	총 시험 대상자 수
최종 평가 레수(PP Set)	37	37	74
Drop-out(25% 고려예수)	50	50	100

선정기준

- 만 35세 이상, 만 75세 이하의 성인 남, 녀
- 다음 기술된 조건에 1가지 이상 해당이 되는 사람 중 스크리닝 시에 혈소판 응집능이 55%* 이상인 자 (*Collagen 및 ADP inducer 모두 만족하는 경우)
 - 가. 1년 이상 하루 평균 흡연량이 10개비 이상인 자
 - 나. 체질량지수(BMI)가 25 kg/m² 이상, 30 kg/m² 미만인 자
 - 다. 조절되는 고혈압(121 ~ 139/89 mmHg 이하) 또는 당뇨(당화혈색소 6.0% 이하 또는 공복혈당 101 ~ 125mg/dL) 또는 고지혈증(LDLcholesterol 130 mg/dL ~ 159 mg/dL 또는 Total cholesterol 200 mg/dL ~ 239 mg/dL)인 자
 - 라. 대사증후군(Metabolic syndrome)으로 진단받은 자 이 중 3개 이상 해당 시 대사 증후군으로 진단한다.
 - 허리둘레 남자 90 cm 이상, 여자 85 cm 이상
 - TG(Triglyceride) 150 mg/dL 이상
 - HDL-cholesterol 남자 40 mg/dL 미만, 여자 50 mg/dL 미만
 - 혈압 130/85 mmHg 이상
 - 공복혈당 100 mg/dL 이상
- 3) 시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent form)를 작성한 자

<p style="text-align: center;">제외기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 최근 6개월 이내에 중증의 악성종양, 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등) 등의 병력이 있는 자(단, 임상적으로 안정된 시험 대상자의 경우는 시험자 판단에 의해 시험에 참여할 수 있다.) 2) 본 인체적용시험 전 2주 이내에 항응고제(와파린 등), 항혈소판제제(아스피린, 클로피도그렐 등), 칼슘길항제, 베타차단제를 투여한 자 3) 본 인체적용시험 전 2주 이내에 홍삼, 인삼, 닛토 등과 같은 혈액 흐름에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취한 자 4) 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정기준) 5) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dl 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우) 6) TSH 0.1 μIU/ml 이하이거나, 10 μIU/ml 이상인 자 7) Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상 자 8) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상 상한치의 3배 이상인 자 9) 본 인체적용시험 전 3개월 이내에 수술병력이 있는 자 10) 본 인체적용시험 전 3개월 이내에 고지혈증 약물을 새로 투여하는 경우 11) 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자 12) 본 인체적용시험 전 3개월 이내 다른 인체적용시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 중에 다른 인체적용시험에 참가할 계획이 있는 자 13) 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 자
<p style="text-align: center;">유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 유효성 평가 변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) 혈소판 응집능 평가(Collagen, ADP, TRAP) • 2차 유효성 평가 변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) PAC-1(ADP/TRAP) 2) P-selectin(ADP/TRAP) 3) Thromboxane B2, Serotonin 4) NO 5) cGMP 6) Endothelin-1 7) CRP 8) 혈액 응고 검사(blood coagulation test): Prothrombin Time(PT), activated Partial Thromboplastin Time(aPTT) 9) 지질 검사(lipid test): Total cholesterol, Triglyceride(TG), HDL cholesterol, LDL- cholesterol
<p style="text-align: center;">안전성 평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 이상반응 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) 3) 활력징후(혈압, 맥박), 체중

통계분석	4) 심전도검사
	<p>1. 유효성</p> <p>1) 1차 유효성 평가 변수 분석 1차 유효성 평가 변수인 혈소판 응집능 평가(Collagen, ADP, TRAP)의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각시점에서 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 검정을 통해 정규성이 위배되면 Two sample t-test 대신 Wilcoxon' s rank sum test를 실시한다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가 변수 분석 2차 유효성 평가 변수인 PAC-1, P-selectin, Thromboxane B2, Serotonin, NO, cGMP, Endothelin-1, CRP, 혈액응고검사(Prothrombin Time, activated Partial Thromboplastin Time), 지질 검사(Total cholesterol, Triglyceride, HDL- cholesterol, LDL-cholesterol)의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 검정을 통해 정규성이 위배되면 Two sample t-test 대신 Wilcoxon' s rank sum test를 실시한다.</p> <p>2. 안전성</p> <p>1) 이상반응 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding하며, 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher' s exact test)을 이용하여 비교 분석한다.</p> <p>2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample ttest를 이용하여 분석한다. 뇨검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.</p> <p>3) 활력징후(혈압, 맥박), 체중 활력징후(혈압, 맥박), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간</p>

비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다.

4) 심전도검사

심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 섭취 전과 후의 군내 변화에 차이가 있는지 McNemar test를 이용하여 확인한다.

혈행 개선 위한 건강기능식품

인체적용시험 참여자 모집

혈행 개선에 미치는 포도알주효소의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

- 인체적용시험 목적**
혈행 개선에 필요한 상한 농도를 대상으로 시험이용인 포도알주효소(94-01)를 섭취하였을 때 대조시험(placebo)과 비교하여 혈행 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하고자 합니다.
- 인체적용시험 방법**
- 시험군 또는 대조군에 1:1로 무작위배정됩니다.
- 참여기간은 약 12주~15주로 총 3~4회 방문 예정이며, 방문 시 소요시간은 1~2시간입니다.
- 방문 시 조식, 간식, 수화물(음료) 섭취 제한, 흡연, 알코올 섭취 금지, 심전도검사 등을 하게 됩니다.
- 참여대상**
- 만 25세 이상, 만 70세 이하의 성인 남녀
- 최근 1개월 이내에 중증의 만성질환, 수술을 받은 적이 없거나 없었던 자
- 최근 2주 이내에 항응고제(와파린 등), 항혈소판제(아스피린, 클로피도그렐 등), 칼슘길항제, 베타차단제를 투여하지 않은 자
- 최근 2주 이내에 동성, 여성, 남부 등과 같은 건강기능식품을 섭취하지 않은 자
- 최근 1개월 이내에 건강기능식품을 사용 후유증이 없었거나
- 수면, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하지 않는 자
- 현재 임신 중이거나 임신 가능성이 있는 자 제외
- 모유를 양육 중인 아동이 있거나 입양자가 없는 자
- 최근 3개월 이내에 수술력이 없는 자
- 배제 가능한 특징**
- 질병이나 체질적 양한 개인에 따라 개인별을 나타낼 수 있습니다.
- 현재까지 심각한 중증질환 시 있을 수 있는 기타의 소위질환이 있을 수 있습니다.
- 참여기간 시 고통을 유발할 수 있는 활동, 참여 불가능할 수 있습니다.
- 예상되지 못한 부작용이 발생할 수 있습니다.
- 참여 시 제공사항**
- 본 인체적용시험에 참여 시 건강 보험권을 통해 진료 및 검사료 별도의 비용없이 제공하며, 소정의 교통비가 지급되거나 편의성은 제공은 없습니다.
- 인체적용시험기관 및 책임자**
- 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구원 교수
- 주소: 전라북도 전주시 덕진구 신지동202 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 - 연락처 : 063-259-3040
- 문의자 정보**
이우영(연구지원센터) 전주시 덕진구 구룡동길 11, 063-211-0254
- 지원 방법 및 문의전화**
상기 인체적용시험에 지원하고자 하는 분은 본 인체적용시험에 대해 자세한 정보를 원하시는 분들의 연락처로 문의하시기 바랍니다.
전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
박대영 시험담당자(063-259-3581)

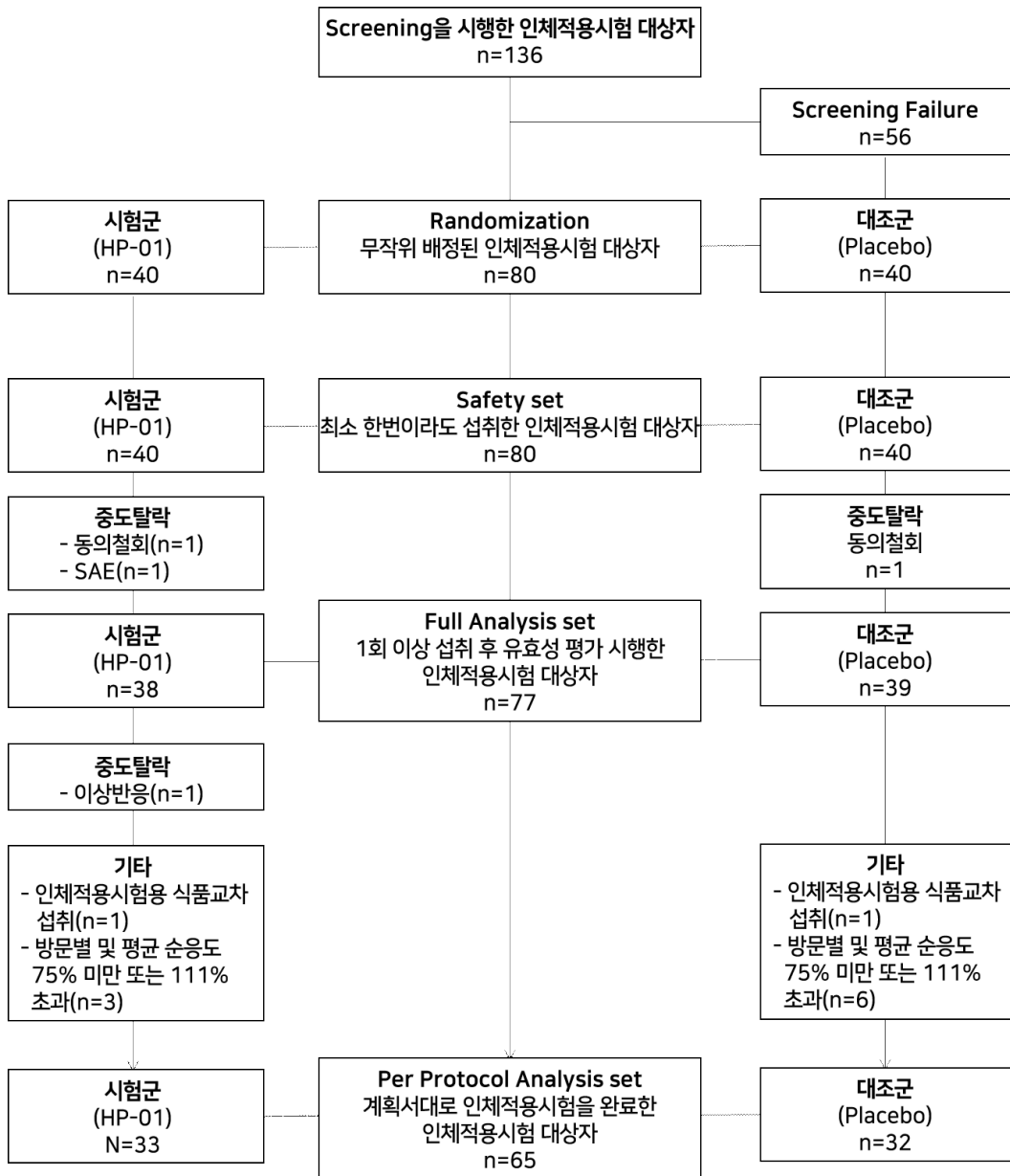
[그림 234] 인체적용시험 피험자 모집 포스터

다. 인체적용시험 결과

- (1) 인체시험 시작일 : 2019.10.30. (첫 인체적용시험 대상자 시험시작일)
- (2) 인체적용시험 종료일 : 2020.09.10. (마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)
- (3) 인체적용시험 실시기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
- (4) 결과

본 인체적용시험은 혈행개선에 미치는 포도잎 추출물(HP-01)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위해 만 25세 이상, 만 70세 이하의 성인 남녀 80명을 대상으로, 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조로 설계되었으며, 포도잎 추출물(HP-01)로서 1일 1,800 mg에 해당하는 양의 정제(1정 중 포도잎 추출물 300 mg)를 섭취하도록 하여(1일 3회, 1회 2정씩 섭취) 인체적용시험을 진행하였음

본 인체적용시험에서는 적합한 인체적용시험 대상자를 선정하기 위해 총 136명의 인체적용시험 대상자에 대해서 스크리닝 평가를 실시하였음. 스크리닝 탈락 56명으로 총 80명(시험군 40명, 대조군 40명)이 무작위배정 되었고, 이 중 시험군에서 동의철회 1명, 이상반응 2명, 대조군에서 동의철회 1명으로 총 4명이 중도탈락하여 인체적용시험을 완료한 인체적용시험 대상자는 총 76명이었음(시험군 37명, 대조군 39명)



[그림 235] 인체적용시험 대상자 인체적용시험 참여상태 및 분석군

아래 표는 인체적용시험 대상자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성을 비교한 것으로 본 인체적용시험에 참여한 인체적용시험 대상자의 인구학적 정보를 포함한 섭취 전 모든 특성을 섭취 군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였음

섭취 전 인체적용시험 대상자들의 인구학적 정보와 특성에 대하여 조사한 결과 성별에서는 시험군의 경우 남성이 11명(33.33%), 여성이 22명(66.67%)이 포함되었고, 대조군의 경우 남성이 5명(15.63%), 여성이 27명(84.38%) 포함되었으며, 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(p=0.0975). 연령에서는 시험군이 평균 53.97±9.35세, 대조군이 평균 52.34±9.91세로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음(p=0.6085)

그 밖에 음주력, 운동 여부, 흡연력, 흡연량, 흡연 기간, 고지방식 섭취 여부에서 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않아 구간 비교성(comparability)을 가정할 수 있었음

[표 93] 인체적용시험 대상자의 인구통계학적 정보 및 섭취전 특성(PP set)

항목		시험군 (n=33)	대조군 (n=32)	합계 (n=65)	p-value
성별 n(%)	남	11(33.33)	5 (15.63)	16 (24.62)	0.0975 [†]
	여	22(66.67)	27 (84.38)	49 (75.38)	
연령(세)	Mean± SD	53.97±9.35	52.34±9.91	53.17±9.59	0.6085 ^{&}
	Min, Max	36.00, 68.00	30.00, 65.00	30.00, 68.00	
음주력 n(%)	아니오	13 (39.39)	15 (46.88)	28 (43.08)	0.2504 [‡]
	끊었다	4 (12.12)	0 (0.00)	4 (6.15)	
	1병 미만/일주일	14 (42.42)	14 (43.75)	28 (43.08)	
	1병~3병/일주일	2 (6.06)	3 (9.38)	5 (7.69)	
	4병 이상/일주일	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
운동여부 n(%)	아니오	10 (30.30)	10 (31.25)	20 (30.77)	0.2356 [‡]
	1~2회/주	12 (36.36)	6 (18.75)	18 (27.69)	
	3~4회/주	7 (21.21)	7 (21.88)	14 (21.54)	
	5~6회/주	1 (3.03)	6 (18.75)	7 (10.77)	
	매일	3 (9.09)	3 (9.38)	6 (9.23)	
흡연력 n(%)	아니오(Non-Smoker)	27 (81.82)	28 (87.50)	55 (84.62)	0.4752 [‡]
	Ex-Smoker(6개월 이상 금연)	6 (18.18)	3 (9.38)	9 (13.85)	
	Smoker	0 (0.00)	1 (3.13)	1 (1.54)	
흡연량	흡연하는 대상자 중, ()개비/1일				-
	Mean± SD	-	20.00	20.00	
흡연기간	흡연하는 대상자 중, ()년				-
	Mean± SD	-	30.00	30.00	
고지방식 ^a 섭취여부 n(%)	섭취하지 않는다	6 (18.18)	5 (15.63)	11 (16.92)	0.1488 [‡]
	1~2회/주	23 (69.70)	27 (84.38)	50 (76.92)	
	3회 이상/주	4 (12.12)	0 (0.00)	4 (6.15)	

a: 고지방식 예: 삼겹살, 튀김, 피자, 치킨, 햄버거, 케이크, 자장면 등

&: p-value for Wilcoxon rank sum test

†: p-value for Chi-square test

‡: p-value for Fisher's exact test

유효성 평가지표의 인체적용시험 결과는 다음과 같음.

1) 혈소판 응집능

Col/EPI으로 유도된 혈소판 응집능 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 15.48±52.93 sec 증가하였고(p=0.1698), 대조군은 9.19±30.76 sec 감소하여(p=0.1011) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타남(p=0.0252[&], 0.0398[§])

Col/ADP로 유도된 혈소판 응집능 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.70±18.30

sec 증가하였고(p=0.5979), 대조군은 1.66±24.57 sec 증가하였으나(p=0.6665) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

[표 94] 방문별 혈소판 응집능 변화량 (PP Set)

		시험군 N=33		대조군 N=32		p-value ^{&}	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Col/EPI (sec)	Baseline(방문1)	33	122.48±22.94	32	140.91±39.18	0.0257	
	12주(방문3)	33	137.97±51.29	32	131.72±42.18		
	Change from baseline	33	15.48±52.93	32	-9.19±30.76	0.0252	0.0398
			0.1698 [#]		0.1011 ^{**}		
Col/ADP (sec)	Baseline(방문1)	33	97.55±17.01	32	99.31±26.00	0.9059	
	12주(방문3)	33	99.24±22.74	32	100.97±41.20		
	Change from baseline	33	1.70±18.30	32	1.66±24.57	0.9164	0.5338
	p-value		0.5979 ^{**}		0.6665 [#]		

&: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

: Compared within groups; p-value for Wilcoxon signed rank test

§ : Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

2) 혈관내피 반응지수(PAT Index)

혈관내피 반응지수 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.08±0.61 증가하였고(p=0.4756), 대조군은 0.17±0.64 증가하였으나(p=0.1473) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

[표 95] 방문별 혈관내피반응지수(PAT Index) 변화량 (PP Set)

		시험군		대조군		p-value	p-value ^{&}
		N=33		N=32			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
	Baseline(방문1)	33	1.99±0.59	32	2.00±0.58	0.8645 ^{&}	
	12주(방문3)	33	2.07±0.56	32	2.17±0.62		
RHI	Change from baseline	33	0.08±0.61	32	0.17±0.64	0.5563 [*]	0.8422
	p-value ^{**}		0.4756		0.1473		

*: Compared between groups; p-value for Two sample t-test

&: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

\$: Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

3) MDA(malondialdehyde), 산화 저밀도지단백(Oxidized LDL)

MDA 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 3.88±12.43 nmol/mL 감소하였고(p=0.0821), 대조군은 2.77±13.78 nmol/mL 감소하였으나(p=0.2650) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

Oxidized LDL 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.96±12.13 U/L 증가하였고(p=0.1429), 대조군은 3.50±11.69 U/L 감소하였으나(p=0.2226) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

[표 96] 방문별 MDA, Oxidized LDL 변화량 (PP Set)

		시험군		대조군		p-value	p-value [‡]
		N=33		N=32			
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
MDA (nmol/ml)	Baseline(방문1)	33	85.61±31.84	32	127.63±251.52	0.8542 [Ⓚ]	
	12주(방문3)	33	81.72±28.09	32	124.86±252.84		
	Change from baseline	33	-3.88±12.43	32	-2.77±13.78	0.7321 [*]	0.8010
	p-value ^{**}	0.0821		0.2650			
Oxidized LDL (U/L)	Baseline(방문1)	33	57.55±15.62	32	59.24±17.28	0.6227 [Ⓚ]	
	12주(방문3)	33	58.51±12.28	32	55.74±13.31		
	Change from baseline	33	0.96±12.13	32	-3.50±11.69	0.0821 [Ⓚ]	0.1556
	p-value [#]	0.1429		0.2226			

*: Compared between groups; p-value for Two sample t-test

Ⓚ: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

: Compared within groups; p-value for Wilcoxon signed rank test

‡ : Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

4) 혈중지질(Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDLCholesterol)

Total Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 2.79 ± 15.35 mg/dL 증가하였고 (p=0.3047), 대조군은 4.66 ± 17.22 mg/dL 감소하였으나(p=0.1362) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 시험군은 0.03 ± 27.54 mg/dL 증가하였고 (p=0.9950), 대조군은 6.28 ± 24.55 mg/dL 감소하였으나(p=0.1579) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

Triglyceride 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 2.09 ± 59.34 mg/dL 증가하였고 (p=0.8409), 대조군은 5.44 ± 52.20 mg/dL 증가하였으나(p=0.9781) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 시험군은 32.21 ± 55.04 mg/dL 감소하였고 (p=0.0020), 대조군은 6.16 ± 51.54 mg/dL 감소하였으나(p=0.5043) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

HDL-Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 0.00 ± 7.39 mg/dL 증가하였고 (p=1.0000), 대조군은 1.53 ± 6.71 mg/dL 감소하였으나(p=0.2060) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 시험군은 2.64 ± 16.85 mg/dL 증가하였고 (p=0.8064), 대조군은 2.78 ± 7.18 mg/dL 감소하였으나(p=0.0361) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

LDL-Cholesterol 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 3.73 ± 15.97 mg/dL 증가하였고 (p=0.1279), 대조군은 3.53 ± 22.16 mg/dL 감소하였으나(p=0.3744) 섭취 기간 통계적으로

유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 시험군은 5.97 ± 27.75 mg/dL 증가하였고 ($p=0.2255$), 대조군은 5.75 ± 28.30 mg/dL 감소하였으나 ($p=0.2593$) 섭취 기간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

[표 97] 방문별 혈중지질 변화량 (PP Set)

		시험군 N=33		대조군 N=32		p-value	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Total Cholesterol (mg/dL)	Baseline(방문0)	33	204.88±23.07	32	211.81±21.29	0.0820 [△]	
	6주(방문2)	33	207.67±22.42	32	207.16±23.69		
	Change from baseline	33	2.79±15.35	32	-4.66±17.22	0.0703 [*]	0.3043
	p-value**	0.3047		0.1362			
	12주(방문3)	33	204.91±30.96	32	205.53±30.10		
	Change from baseline	33	0.03±27.54	32	-6.28±24.55	0.3337 [*]	0.3481
	p-value**	0.9950		0.1579			
Triglyceride (mg/dL)	Baseline(방문0)	33	155.82±79.02	32	124.75±56.77	0.0742 [*]	
	6주(방문2)	33	157.91±71.42	32	130.19±67.58		
	Change from baseline	33	2.09±59.34	32	5.44±52.20	0.8749 [△]	0.5772
	p-value	0.8409 ^{**}		0.9781 [#]			
	12주(방문3)	33	123.61±52.55	32	118.59±54.73		
	Change from baseline	33	-32.21±55.04	32	-6.16±51.54	0.0534 [*]	0.5272
	p-value**	0.0020		0.5043			
HDL- Cholesterol (mg/dL)	Baseline(방문0)	33	50.61±13.87	32	57.03±10.99	0.0078 [△]	
	6주(방문2)	33	50.61±14.42	32	55.50±9.82		
	Change from baseline	33	0.00±7.39	32	-1.53±6.71	0.3853 [*]	0.8314
	p-value**	1.0000		0.2060			
	12주(방문3)	33	53.24±19.44	32	54.25±12.41		
	Change from baseline	33	2.64±16.85	32	-2.78±7.18	0.0566 [△]	0.1707
	p-value	0.8064 [#]		0.0361 ^{**}			
LDL- Cholesterol (mg/dL)	Baseline(방문0)	33	136.82±25.46	32	140.97±20.73	0.4745 [*]	
	6주(방문2)	33	140.55±23.99	32	137.44±24.83		
	Change from baseline	33	3.73±15.97	32	-3.53±22.16	0.1167 [△]	0.3954
	p-value	0.1279 [#]		0.3744 ^{**}			
	12주(방문3)	33	142.79±23.30	32	135.22±31.04		
	Change from baseline	33	5.97±27.75	32	-5.75±28.30	0.0968 [*]	0.1537
	p-value**	0.2255		0.2593			

*: Compared between groups; p-value for Two sample t-test

△: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

: Compared within groups; p-value for Wilcoxon signed rank test

§: Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

5) Thromboxane B2, eNOS, COX-2

Thromboxane B2 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 1.87 ± 10.88 ng/mL 감소하였고 (p=0.3318), 대조군은 1.44 ± 10.20 ng/mL 감소하였으나 (p=0.4413) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

eNOS 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 2.04 ± 14.57 ng/mL 증가하였고 (p=0.8311), 대조군은 2.62 ± 10.53 ng/mL 감소하였으나 (p=0.2402) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

COX-2 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.68 ± 15.81 mg/dL 증가하였고 (p=0.8053), 대조군은 3.37 ± 16.28 mg/dL 감소하여 (p=0.2785) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남 (p=0.0320[§])

[표 98] 방문별 Thromboxane B2, eNOS, COX-2 변화량 (PP Set)

		시험군 N=33		대조군 N=32		p-value ^{&}	p-value [§]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
Thromboxane B2 (ng/mL)	Baseline(방문1)	33	26.49±11.49	32	29.28±10.41	0.2695	
	12주(방문3)	33	24.62±12.64	32	27.84±11.21		
	Change from baseline	33	-1.87±10.88	32	-1.44±10.20	0.8948	0.4754
	p-value		0.3318**		0.4413 [#]		
eNOS (ng/mL)	Baseline(방문1)	33	7.00±14.87	32	11.73±30.00	0.9504	
	12주(방문3)	33	9.04±18.81	32	9.11±22.56		
	Change from baseline	33	2.04±14.57	32	-2.62±10.53	0.6239	0.9992
	p-value [#]		0.8311		0.2402		
COX-2 (ng/mL)	Baseline(방문1)	33	21.20±15.08	32	24.41±22.71	0.8594	
	12주(방문3)	33	21.88±19.40	32	21.04±19.06		
	Change from baseline	33	0.68±15.81	32	-3.37±16.28	0.4273	0.0320
	p-value		0.8053**		0.2785 [#]		

&: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

: Compared within groups; p-value for Wilcoxon signed rank test

§ : Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

6) PT, aPTT

PT 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.04 ± 0.51 sec 증가하였고($p=0.6339$), 대조군은 0.05 ± 0.45 sec 증가하였으나($p=0.5113$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

aPTT 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군은 0.14 ± 1.44 sec 증가하였고($p=0.5736$), 대조군은 0.62 ± 1.50 sec 감소하여($p=0.0258$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타남 ($p=0.0402^*$)

[표 99] 방문별 PT, aPTT 변화량 (PP Set)

		시험군 N=33		대조군 N=32		p-value*	p-value‡
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
PT (sec)	Baseline(방문1)	33	11.30±0.58	32	11.32±0.52	0.9272	
	12주(방문3)	33	11.35±0.48	32	11.37±0.44		
	Change from baseline	33	0.04±0.51	32	0.05±0.45	0.9288	0.7174
	p-value**		0.6339		0.5113		
aPTT (sec)	Baseline(방문1)	33	31.64±2.64	32	31.75±2.97	0.8709	
	12주(방문3)	33	31.78±2.55	32	31.13±2.45		
	Change from baseline	33	0.14±1.44	32	-0.62±1.50	0.0402	0.0891
	p-value**		0.5736		0.0258		

*: Compared between groups; p-value for Two sample t-test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

‡: Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

7) 혈압

수축기 혈압 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 3.88 ± 8.79 mmHg 감소하였고 ($p=0.0163$), 대조군은 0.19 ± 9.84 mmHg 증가하였으나($p=0.9148$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음. 섭취 12주 후 시험군은 5.52 ± 9.85 mmHg 감소하였고 ($p=0.0026$), 대조군은 0.25 ± 9.56 mmHg 감소하여($p=0.8833$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p=0.0398^{\&}$)

이완기 혈압 변화량 분석에서 섭취 6주 후 시험군은 2.21 ± 8.33 mmHg 감소하였고 ($p=0.1370$), 대조군은 0.13 ± 9.95 mmHg 증가하였으나($p=0.9438$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 섭취 12주 후 시험군은 3.39 ± 9.50 mmHg 감소하였고 ($p=0.0484$), 대조군은 0.47 ± 8.94 mmHg 감소하였으나($p=0.7688$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음

[표 100] 방문별 혈압 변화량 (PP Set)

		시험군 N=33		대조군 N=32		p-value	p-value [‡]
		n	Mean±SD	n	Mean±SD		
수축기 혈압 (mmHg)	Baseline(방문1)	33	127.79±10.12	32	122.50±13.41	0.0770*	
	6주(방문2)	33	123.91±11.23	32	122.69±13.50		
	Change from baseline	33	-3.88±8.79	32	0.19±9.84	0.0835*	0.4043
	p-value**		0.0163		0.9148		
	12주(방문3)	33	122.27±11.58	32	122.25±13.10		
	Change from baseline	33	-5.52±9.85	32	-0.25±9.56	0.0398 ^{&}	0.3617
p-value		0.0026 [#]		0.8833**			
이완기 혈압 (mmHg)	Baseline(방문1)	33	76.82±10.30	32	73.66±11.65	0.2503*	
	6주(방문2)	33	74.61±8.50	32	73.78±11.63		
	Change from baseline	33	-2.21±8.33	32	0.13±9.95	0.3079*	0.7782
	p-value**		0.1370		0.9438		
	12주(방문3)	33	73.42±8.66	32	73.19±11.56		
	Change from baseline	33	-3.39±9.50	32	-0.47±8.94	0.2061*	0.8689
p-value**		0.0484		0.7688			

*: Compared between groups; p-value for Two sample t-test

&: Compared between groups; p-value for Wilcoxon rank sum test

** : Compared within groups; p-value for Paired t-test

: Compared within groups; p-value for Wilcoxon signed rank test

‡ : Compared between groups; p-value for GLM adjusted baseline, Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, smoking status, obesity status, hypertension status, medical history status and Triglyceride*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*HDL-Cholesterol, Total Cholesterol*LDL-Cholesterol

유효성 평가 결과, 시험군에서 HP-01 12주 섭취 후 Collagen-epinephrine으로 유도한 혈소판 응집 시간과 활성화부분트롬보플라스틴(aPTT)에 의한 혈액 응고 시간이 위약군 대비 통계적으로 유의하게 증가하였고, 수축기 혈압은 시험군에서 HP-01의 12주 섭취 후 위약군 대비 통계적으로 유의하게 감소하였음

이는 HP-01의 혈행 개선 효능 기전을 평가하기 위한 전임상 시험에서 HP-01이 항산화 활성(DPPH라디칼 소거능)을 통해 Collagen으로 유도된 혈소판 응집을 억제하고, 혈중 aPTT에 의한 혈액응고 시간을 증가시키며, 혈관 이완을 통한 혈압 감소를 확인한 전임상 시험결과와 동일한 결과로서 HP-01의 혈행 개선에 대한 유효성을 인체적용시험을 통해서도 확인된 것으로 판단됨

본 인체적용시험에서 혈중 COX-2는 시험군에서 HP-01 12주 섭취 후 위약군 대비 통계적으로 유의하게 증가하였음. 이러한 결과는 HP-01 섭취로 COX-2가 증가되고, 혈관을 확장시키는 PGI2 등이 증가되어 혈행 개선을 유도했을 가능성이 있음

COX-2는 주로 염증이나 통증 반응이 있을 때 유도되는 효소로, 아라키돈산이 세포막의 인지질에서 방출되어 대사될 때 나오는 것으로 알려져 있음. 그러나 COX-2는 염증 과정뿐만 아니라 생리적 조건하에서도 혈관세포를 포함한 일부 조직에 존재한다는 것이 발표되었으며, 건강인에서 선택적 COX-2 억제제를 쓰면 Prostacyclin(PGI2) 생산이 줄어들고 건강인에서 PGI2의 60-70%는 COX-2를 통해 만들어지는 것으로 보고되었음

또한, 최근 연구 발표에 따르면 오메가3지방산에서 COX-2에 의해 항염증 매개체를 생성한다고 보고된 바 있어 COX-2는 혈관 내피의 주요 COX isoform으로 정상 순환에서 혈소판 활성화를 억제하고 효과적인 혈관 확장제인 PGI2 생산에 직접적으로 관여할 수 있음. 추후 HP-01의 명확한 작용기전 검증을 위해 혈중 PGI2을 측정하여 HP-01의 작용기전을 확인하는 후속연구를 진행해 볼 수 있을 것으로 판단됨

이상의 결과를 요약하면, 본 인체적용시험을 통해 HP-01의 12주 섭취 후 Col/EPI으로 유도한 혈소판 응집 시간과 aPTT에 의한 혈액 응고 시간을 증가시켜 혈전 생성을 억제하고, 혈압이 감소됨을 관찰하여 HP-01의 혈행 개선 효과를 확인하였다. 또한, 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 식품과 관련 있을 가능성이 있는 것으로 판단된 이상반응이 2건 발생하였으나 완전 치유로 종결되었으며, 그 외 인체적용시험용 식품과 명확히 관련이 있으며 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화는 관찰되지 않아 HP-01 섭취가 인체에 안전하다고 판단됨.

(5) 최종 보고서 및 IRB 접수증

-최종보고서 작성일 : 2020.12.31.

-전북대학교 IRB 접수완료 : 2021.01.26

<div style="border: 1px solid black; width: 20%; margin: 0 auto; padding: 5px; background-color: #f0f0f0;"> 인체적용시험 결과보고서 </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;"> 혈행 개선에 미치는 HP-01의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험 </p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험계획서 번호</td><td>HP-01</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험해 식별</td><td>HP-01(포도알주출물)</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 의뢰자</td><td>(유)한봉제약</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 의뢰자</td><td>전라북도 전주시 덕진구 구봉동3길 11</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 시작일</td><td>2019.10.30 (첫 인체적용시험 대상자 시험 시작일)</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 종료일</td><td>2020.09.10 (마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 책임자</td><td>채수원(전북대학교병원 외상응급구호 M.D., Ph.D.)</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 실시기관</td><td>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터</td></tr> <tr><td style="font-size: small;">인체적용시험 결과보고서 작성일</td><td>전북 전주시 덕진구 전지로 20 2020.12.31</td></tr> </table> <p style="font-size: x-small; margin-top: 10px;"> 본 인체적용시험은 국제 임상시험규칙(ICH GCP)에 준하여 시행되었습니다. 본 보고서에 포함된 모든 정보는 (유)한봉제약의 서명 동의없이 공개될 수 없습니다. </p>	인체적용시험계획서 번호	HP-01	인체적용시험해 식별	HP-01(포도알주출물)	인체적용시험 의뢰자	(유)한봉제약	인체적용시험 의뢰자	전라북도 전주시 덕진구 구봉동3길 11	인체적용시험 시작일	2019.10.30 (첫 인체적용시험 대상자 시험 시작일)	인체적용시험 종료일	2020.09.10 (마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)	인체적용시험 책임자	채수원(전북대학교병원 외상응급구호 M.D., Ph.D.)	인체적용시험 실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터	인체적용시험 결과보고서 작성일	전북 전주시 덕진구 전지로 20 2020.12.31	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="font-size: small;">신청정보</td> <td style="font-size: x-small;">IRB FILE No</td> <td>2019-06-043-023</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">유형</td> <td>결과보고서</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">연구과제명</td> <td>혈행 개선에 미치는 HP-01의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">지원기관</td> <td>(유)한봉제약</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">연구책임자</td> <td>전북대학교병원 임상시험센터 채수원</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">연구담당자</td> <td>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀 최민준</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">담당요니터</td> <td>네오뉴트라 홍선하</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">연구승인기간</td> <td>2019.07.08 ~ 2021.07.07</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="font-size: x-small;">중간보고시기</td> <td>없음</td> </tr> <tr> <td style="font-size: small;">확인방법</td> <td colspan="2"> 1. 시스템 로그인 2. 좌측의 [심사조회 또는 과제조회] 클릭 3. 리스트에서 확인하고자 하는 대상클릭 </td> </tr> <tr> <td style="font-size: small;">접수정보</td> <td colspan="2"> 방문하기 http://www.e-irb.com 문의처 063-259-3339 </td> </tr> </table>	신청정보	IRB FILE No	2019-06-043-023		유형	결과보고서		연구과제명	혈행 개선에 미치는 HP-01의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		지원기관	(유)한봉제약		연구책임자	전북대학교병원 임상시험센터 채수원		연구담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀 최민준		담당요니터	네오뉴트라 홍선하		연구승인기간	2019.07.08 ~ 2021.07.07		중간보고시기	없음	확인방법	1. 시스템 로그인 2. 좌측의 [심사조회 또는 과제조회] 클릭 3. 리스트에서 확인하고자 하는 대상클릭		접수정보	방문하기 http://www.e-irb.com 문의처 063-259-3339	
인체적용시험계획서 번호	HP-01																																																			
인체적용시험해 식별	HP-01(포도알주출물)																																																			
인체적용시험 의뢰자	(유)한봉제약																																																			
인체적용시험 의뢰자	전라북도 전주시 덕진구 구봉동3길 11																																																			
인체적용시험 시작일	2019.10.30 (첫 인체적용시험 대상자 시험 시작일)																																																			
인체적용시험 종료일	2020.09.10 (마지막 인체적용시험 대상자 시험 종료일)																																																			
인체적용시험 책임자	채수원(전북대학교병원 외상응급구호 M.D., Ph.D.)																																																			
인체적용시험 실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터																																																			
인체적용시험 결과보고서 작성일	전북 전주시 덕진구 전지로 20 2020.12.31																																																			
신청정보	IRB FILE No	2019-06-043-023																																																		
	유형	결과보고서																																																		
	연구과제명	혈행 개선에 미치는 HP-01의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험																																																		
	지원기관	(유)한봉제약																																																		
	연구책임자	전북대학교병원 임상시험센터 채수원																																																		
	연구담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 임상기획팀 최민준																																																		
	담당요니터	네오뉴트라 홍선하																																																		
	연구승인기간	2019.07.08 ~ 2021.07.07																																																		
	중간보고시기	없음																																																		
확인방법	1. 시스템 로그인 2. 좌측의 [심사조회 또는 과제조회] 클릭 3. 리스트에서 확인하고자 하는 대상클릭																																																			
접수정보	방문하기 http://www.e-irb.com 문의처 063-259-3339																																																			
최종보고서	IRB접수증																																																			

2-5. 포도 잎 추출물의 혈행개선 개별인정소재 신청

신청원료명	혈소판 응집 억제를 통한 혈행개선에 도움을 줌
신청기능성	포도 잎 추출물(HP-01)로서 1,800 mg/일

가. 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부 번호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외	1,2,3,4,6,7	
2.2	개발경위	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input checked="" type="checkbox"/> 국외	2,5,9,13, 14,50	
2.4	국내·외 사용 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input checked="" type="checkbox"/> 국외	1,7,5, 10-16, 36-38	
3. 제조방법에 관한 자료				
3.1	제조공정표 • 수입건강기능식품의 경우 제조회사가 발행한 자료 • 일부 공정 위탁의 경우 수탁업체(해외제조업체 포함)가 발행한 자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	17,19, 21,30	
3.2	원재료부터 단회공정별 제조방법 설명	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	18,20,21 ,30	
3.3	사용된 원료·첨가물이 건강기능식품의 기준 및 규격, 식품의 기준 및 규격, 식품첨가물의 기준 및 규격에 적합한지 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 (오류) <input type="checkbox"/> 아니오	17, 19	
3.4	주요 제조단계별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	20, 30	
3.5	주요 제조단계별 수율 변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	18	
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특정지을 수 있는 색상, 물성 등	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 설명근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 기능성분 <input checked="" type="checkbox"/> 지표성분	22, 23	
4.3	영양성분정보자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	29	
4.4	유사원재료와 구분할 수 있는 자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
	* 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 (3분트 이상)	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	24,25, 26	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 시판 표준품 <input type="checkbox"/> 자사 표준품	26	
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 공인 시험방법 <input checked="" type="checkbox"/> 자사 시험방법	27	
	자사방법의 경우 밸리데이션 자료 추가(Raw data 포함)		27	

연번	제출자료	제출여부	항목번호
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(중금속, 미생물)의 규격 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	31, 32
	* 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	31, 32
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	33
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 잔류용매 등)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	34, 35
	* 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	34, 35
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	31-35
7. 안전성에 관한 자료(의사결정도 : 나)			
7.1	섭취근거 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	39-49
7.3	섭취량 평가 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	1, 6, 7, 14, 36
7.4	인체적용시험 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	57, 58
7.5	독성시험자료	단회투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
		90일 반복투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
		유전독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
		추가 독성시험(생식·발생, 항원성, 면역, 발암성)	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
		GLP 기관 보고서 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
8. 기능성 내용에 관한 자료			
8.1	시험관시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (논문 2 편) * 시험기관 : 원광대학교	51, 53
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.2	동물시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (논문 3 편) * 시험기관 : 원광대학교	51, 52, 53
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.3	인체적용시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 0 편) * 시험기관 : 전북대학교 기능성식품임상시험지원센터	54, 55, 56
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)	
9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 설정근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	54, 55, 56
9.2	섭취방법 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	56
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	49, 56, 57

나. 제출자료 요약본

항 목	주요 내용
1. 원료명	포도잎추출물(HP-01)
2. 원재료	포도잎 (학명: <i>Vitis labrusca</i> L., 사용부위 : 잎)
3. 기능 (지표) 성분	Quercetin-3-o-glucuronide (지표성분)
4. 제조공정	포도잎 → 추출 (80~90℃, 3시간, 2회) → 1차 여과(5 μm) → 2차여과(원심 분리) → 농축(60℃ 이하, 145 Torr이하) → 부원료 혼합 → 건조(60℃ 이하, 12시간이상) → 분쇄 → 포장 → 포도잎추출물(HP-01)
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 녹색 분말 2) Quercetin-3-o-glucuronide : 14.1 mg/g의 80~120% 3) 납(mg/kg) : 1.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 0.5 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.05 이하 7) 대장균군 : 음성 8) 잔류농약 5 종(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT): 불검출
	기능(지표) 성분 시험법 * Quercetin-3-o-glucuronide (지표성분): 자사방법 (HPLC, UV 330 nm, Xbridge Shield RP18 컬럼(4.6mm I.D.×150mm, 3.5 μm) - 밸리데이션 자료(특이성, 정확도, 정밀도, 직선성) ⇒ 적합
	규격 외 (잔류농약) 「식품의 기준 및 규격」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준이 없으며, 이에 따라 잔류농약 5종(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)을 분석한 결과, ‘불검출’ 임을 확인하였음.
6. 안전성	의사결정도 신청원료는 국내 및 국외의 섭취경험이 있는 포도(<i>Vitis labrusca</i> L, 식품원료 사용 가능)의 잎과 줄기 부위를 50% 주정(3% 빙초산, 식염)으로 추출하여 농축, 부형제 혼합, 건조하여 제조한 것으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 ‘나’에 해당함
	섭취 근거 ○ 인정현황 [국내] (원재료) - 식품공전 : 포도잎(<i>Vitis labrusca</i> L.)(사용부위 : 줄기, 잎, 열매, 씨앗)이 ‘식품에 사용할 수 있는 원료’의 목록에 등재 (고유번호 A가7660) (유사원료)(포도) - 포도종자추출물이 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 있음 * 포도종자추출물(제2005-9호) : 인체의 항산화능 증진에 도움을 줄 수 있음 * 포도종자추출물(제2008-42호) : 인체의 항산화능 증진에 도움을 줄 수 있음 * 포도종자추출물(제2013-9호) : 혈압이 높은 사함에게 도움을 줄

	<p>수 있음</p> <p>-적포도농축액이 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 있음. * 적포도발효추출물(제2014-30호) : 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음</p> <p>- 포도과피추출물이 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 있음 * 포도과피발효추출물(제2019-24호) : 건조한 눈을 개선하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음</p> <p>- 포도추출물이 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 있음 * 포도블루베리추출혼합분말(제2019-30호) : 기억력개선에 도움을 줄 수 있음</p> <p>- 포도엽건조엑스(<i>Vitis vinifera</i> L)가 의약품의 주성분으로 판매되고 있음(27품목)</p> <p>[국외] (원재료)</p> <p>- 미국 : CODEX 그룹 013 Leafy vegetables(including Brassica leafy vegetables)중 대표상품의 예로서 포도잎(Grepe leaves)이 기재 되어 있음. CODEX 식품 분류에 포도잎(grape leaves) 등재 (VL0269 grape leaves)</p> <p>○ 사용현황 (유사원료)</p> <p>- 국내 : 포도잎추출물(비티스비니페라엽, 포도엽건조엑스)이 함유된 국내 일반의 약품이 유통 판매되고 있음. 포도잎추출물로 일반식품(혼합음료, 기타가공품 등)이 유통·판매되고 있음</p> <p>- 국외 : 터키, 그리스 등에서 신청원료재료(포도잎,, <i>Vitis labrusca</i> L).로 추정되는 포도잎절임이 유통·판매되고 있음.(터키, 그리스의 대표적인 요리에 사용됨) 1994년에 발간된 요리책에도 포도 잎 요리를 Stuffed grape leaves으로 소개하고 있음</p>
안전성 정보	<p>○ 안전성 정보 DB 검색 결과 이상반응, 독성, 부작용 사례 등이 보고되지 않음</p> <p>* 의약품(항응고제/항혈소판제) 병용섭취 시 상호작용 가능성 있음 → 섭취 시 주의사항에 반영</p>
섭취량 평가	<p>○ 신청원료의 제안 섭취량</p> <p>- 포도 잎 추출물(HP-01)로서 1,800 mg/일</p> <p>- 원재료로 환산 시 13.24 g/일(수율 13.6 % 적용)</p> <p>○ 전통적 약재로서의 사용량</p> <p>- 포도잎으로서 9 ~ 18.75 g/일</p>

		<ul style="list-style-type: none"> · 중약대사전 : 11.25 ~ 18.75 g/일, 한의학대사전 : 9 ~ 15 g/일 ○ 국외 유통제품 섭취량 <ul style="list-style-type: none"> - 포도잎절임으로서 28.35 ~ 84.75 g/일(포도잎으로서 21.55 ~ 64.64 g/일) ○ 원재료 섭취량(국민영양통계) : 수치화된 자료 없음. ○ 섭취량 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 신청원료의 제안 섭취량(포도잎추출물(HP-01)로서 1,800 mg/일, 원재료로서 13.24 g/일)은 일상적으로 섭취하는 원료의 평균섭취량(서양인, 21.55 ~ 64.64 g/일)의 3배 이내임
	인체적용 시험	○ 만 25-70세의 남녀(80명)를 대상으로 신청원료 1,800 mg/일을 12주간 섭취시킨 결과, 안전성 지표(이상반응, 임상병리학적검사, 맥박, 체중, 심점도검사)에서 모두 정상 범위였으며, 신청원료의 이상반응 보고는 2건 있었음. 2건 모두 시험군(CB-R018, CB-R045) 이였으며 CB-R018 대상자는 cholestrol과 LDL-chlorestrol의 상승으로 이상반응이 발생하였으나 재검사 결과 Baseline 결과와 유사하게 감소하여 이상반응을 ‘완전치유(후유증 없음)’ 로 종결되었고, CB-R045 대상자는 교통사고로 인해 발생한 이상반응 보고임.
	독성 시험	해당사항 없음
	기타 사항	- 특이사항, 참작사항 등을 기재
	섭취 시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 영유아, 어린이, 임산부 및 수유부는 섭취에 주의 ○ 특정질환(알레르기 체질 등)이 있는 분은 섭취에 주의 ○ 천연물 소재의 추출물 복용시 있을 수 있는 경미한 소화불량이 있을 수 있음 ○ 의약품(항응고제, 항혈소판제)와 복용시 섭취에 주의 ○ 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 전문가와 상담할 것 <p>※ 7.2. 근거자료 [첨부 49] 및 인체적용시험[첨부 56]</p>
7. 기능성	신청 기능성	혈소판응집 억제를 통한 혈행개선에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	포도잎추출물(HP-01)로서 1,800 mg/일
	시험관시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ SD rat (Male)의 PRP, PPP, 1000 µg/mL 처리 <ul style="list-style-type: none"> - ADP로 유도시킨 혈소판응집 : 유의적 감소시킴(대조군 대비, p<0.01) - 콜라겐으로 유도시킨 혈소판응집: 유의적 감소시킴(대조군 대비, p<0.05)

	<ul style="list-style-type: none"> ◦ SD rat (Male)의 PRP, PPP, 1000 µg/mL 처리 <ul style="list-style-type: none"> - Thromboxane B2 : 유의적 감소시킴(대조군대비 p<0.01) - Serotonin : 유의적 감소시킴(대조군대비 p<0.01) ◦ 항산화활성 (DPPH, SOD 라디칼소거 억제능) <ul style="list-style-type: none"> -DPPH : HP01은 농도의존적으로 DPPH 라디칼소거활성능을 유의하게 증가시킴(대조군대비 <0.05) -SOD : HP01은 농도의존적으로 SOD 라디칼소거활성능을 증을 유의하게 증가시킴 (대조군대비 <0.05)
동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ SD rat, 100 mg/kg, 7 일, 경구투여 <ul style="list-style-type: none"> - 혈소판응집 : 유의적 감소(대조군 대비, p<0.05) - Tail bleeding time : 유의적 감소(대조군 대비, p<0.05) - aPTT, PT 대조군대비 미미하게 연장시켰음 ◦ 본태성고혈압 rat(SHRs), 100 mg/kg, 4 주, 경구투여 <ul style="list-style-type: none"> - 혈압 : 수축기, 확장기, 평균혈압 유의적 감소(대조군 대비, p<0.01) - 혈액흐름 : 대조군 대비 감소시켰으나 유의적이지 않음. - 흉부대동맥 두께 : 유의적으로 감소 (대조군 대비, p<0.01) - 흉부대동맥 혈관이완량 : 의적으로 증가 (대조군 대비, p<0.01) - HMGB1, TLR4, MyD88, TNF-α, IL-6 : 유의적으로 감소시킴(대조군대비 p<0.05) ◦ 고지혈증 유발한 SD rat, 200 mg/kg., 400 mg/kg, 4주, 경구투여 <ul style="list-style-type: none"> - 혈소판응집 : 유의적 감소 (대조군 대비, p<0.05) - aPTT : 유의적으로 지연시킴 (대조군 대비, p<0.05) - PT, Thromboxane A2 (TXA2), Serotonin 유의적인 변화 없음. - 경동맥 두께 : 유의적으로 감소 (대조군 대비, p<0.05) - 간조직 중 TG, TC : 유의적으로 감소(대조군 대비, p<0.05)
인체적용 시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 만25세이상, 만70세 이하의 성인남녀(n=80), 1,800 mg/일, 시험디자인 (RCT, DB, 위약대조) <ul style="list-style-type: none"> - 혈소판응집능, COX-2, aPPT: 유의적 증가(12주후 대조군 대비, p<0.05) - 수축기혈압 : 유의적 감소(12주후 대조군 대비, p<0.05) - PAT, MDA,Oxidized LDL, 혈중지질(Total cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol), Thromboxane B2, eNOS 변화

	<p>량, PT, 이완기혈압 : 12주후 대조군 대비 유의적 차이 없음. ※인체적용시험기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 시험책임자 : 채수완</p>
기타 사항	- 특이사항, 참작사항 등을 기재

다. 기능성원료 인정신청

- 1) 민원사무명 : 건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
- 2) 신청일 : 2021.01.28
- 3) 접수일 : 2021.01.28
- 4) 접수번호 : 20210053857
- 5) 처리예정일 : 2021.07.21.

<p>[별지 제1호서식] (앞쪽)</p> <p>건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서</p> <p>제외기간 130일 60일</p> <table border="1"> <tr> <td>대표자</td> <td>표연석</td> <td>영업외 자회사</td> <td>건강기능식품 영문제출일</td> </tr> <tr> <td>법정명(가맹명)</td> <td>(유)한우제약</td> <td>외가/신고/등록번호</td> <td>20190014213</td> </tr> <tr> <td>소재지</td> <td>전북 완주군 봉동읍 완주-성안로 301 (유)한우제약 (전화번호) 070-4346-225 (FAX) 070-4346-9233</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>수입관련 기능식품</td> <td>수출국</td> <td>제조회사</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>소재지</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원료명</td> <td colspan="3">포도당수출물(90% DE)</td> </tr> </table> <p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.</p> <p>신청인 2021 년 1 월 28 일</p> <p>식품의약품안전처장 귀하</p> <table border="1"> <tr> <td>구비서류</td> <td>수수료</td> </tr> <tr> <td>1. 제출자료 1부</td> <td>신규</td> </tr> <tr> <td>2. 제출자료 수료 인정제(CD 등) 1개</td> <td>1,500,000원</td> </tr> <tr> <td>3. 원료, 제품 또는 시제품</td> <td>면경</td> </tr> <tr> <td>4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품</td> <td>800,000원</td> </tr> <tr> <td>5. 국내외 시험·분석기관서 발행한 시험결과서</td> <td></td> </tr> </table> <p>※ 제출자료 1. 제품자료: 전체의 총괄 요약문 2. 기원, 재배양자, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성제 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 내용에 관한 자료 9. 일회성, 심의 시 주의사항 및 그 결정에 관한 자료</p> <p>2019년~2021년(정민증거 49)농·수산물유통관리</p> <p style="text-align: center;">신청서</p>	대표자	표연석	영업외 자회사	건강기능식품 영문제출일	법정명(가맹명)	(유)한우제약	외가/신고/등록번호	20190014213	소재지	전북 완주군 봉동읍 완주-성안로 301 (유)한우제약 (전화번호) 070-4346-225 (FAX) 070-4346-9233			수입관련 기능식품	수출국	제조회사			소재지			원료명	포도당수출물(90% DE)			구비서류	수수료	1. 제출자료 1부	신규	2. 제출자료 수료 인정제(CD 등) 1개	1,500,000원	3. 원료, 제품 또는 시제품	면경	4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품	800,000원	5. 국내외 시험·분석기관서 발행한 시험결과서		<p>접수증</p> <p>접수번호: 20210053857 접수일자: 2021.01.28</p> <table border="1"> <tr> <td>민원사무명</td> <td>건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)</td> </tr> <tr> <td>신청번호</td> <td>705014</td> </tr> <tr> <td>발행일 (재료 또는 데이터)</td> <td>조인식(20190014213)</td> </tr> <tr> <td>제외예정일</td> <td>2021.07.21</td> </tr> <tr> <td>제외주관부서</td> <td>식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품과(영양·기능성·영양기능부)</td> </tr> <tr> <td>민사사항</td> <td>※ 민원수령의 경우에는 과부담과지 하는 민원실제 후 접수증을 제출하여야 하며, 본인의 신청종류는 대서인(신청)을 작성할 경우 신청사유를 *명기하여야 합니다.</td> </tr> <tr> <td>수수료</td> <td>1,500,000</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">위 내용의 진위를 입증하여야 합니다.</p> <p style="text-align: center;">접수증</p>	민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)	신청번호	705014	발행일 (재료 또는 데이터)	조인식(20190014213)	제외예정일	2021.07.21	제외주관부서	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품과(영양·기능성·영양기능부)	민사사항	※ 민원수령의 경우에는 과부담과지 하는 민원실제 후 접수증을 제출하여야 하며, 본인의 신청종류는 대서인(신청)을 작성할 경우 신청사유를 *명기하여야 합니다.	수수료	1,500,000
대표자	표연석	영업외 자회사	건강기능식품 영문제출일																																																
법정명(가맹명)	(유)한우제약	외가/신고/등록번호	20190014213																																																
소재지	전북 완주군 봉동읍 완주-성안로 301 (유)한우제약 (전화번호) 070-4346-225 (FAX) 070-4346-9233																																																		
수입관련 기능식품	수출국	제조회사																																																	
	소재지																																																		
원료명	포도당수출물(90% DE)																																																		
구비서류	수수료																																																		
1. 제출자료 1부	신규																																																		
2. 제출자료 수료 인정제(CD 등) 1개	1,500,000원																																																		
3. 원료, 제품 또는 시제품	면경																																																		
4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품	800,000원																																																		
5. 국내외 시험·분석기관서 발행한 시험결과서																																																			
민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)																																																		
신청번호	705014																																																		
발행일 (재료 또는 데이터)	조인식(20190014213)																																																		
제외예정일	2021.07.21																																																		
제외주관부서	식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품과(영양·기능성·영양기능부)																																																		
민사사항	※ 민원수령의 경우에는 과부담과지 하는 민원실제 후 접수증을 제출하여야 하며, 본인의 신청종류는 대서인(신청)을 작성할 경우 신청사유를 *명기하여야 합니다.																																																		
수수료	1,500,000																																																		

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 연차별 목표 및 달성도

1) 1차년도(2018)

세부연구 목표	가중치 (%)	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준	내 용
원재료 표준화 및 제조공정 확립	25	25	원재료 기준규격 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 원재료의 기준규격 설정 및 제조공정 확립을 위한 포도잎 원료 채취 포도잎의 지표성분으로 설정한 quercetin, kaempferol, isorhamnetin, quercetin-3-O-glucuronide 분석 포도잎, 고구마줄기, 표고버섯 추출물 제조 및 각각의 지표성분 분석
	20	20	GLP 독성 자료	<ul style="list-style-type: none"> GLP기관에서의 단회투여 독성시 결과 개략의 치사량은 5,000 mg/kg 이상으로 안전성 확보
	25	25	인체적용시험 계획서	<ul style="list-style-type: none"> CRO 기관 선정 및 인체적용 시험 계획서 확보
혈행개선 효능 평가	30	30	용량 의존성 실험 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> In vitro상에서 혈소판응집 억제효과 및 혈액 응고 억제 활성 평가 고지방식이로 유도된 고지혈증 동물모델 확립 및 포도잎의 혈행개선 효능 평가 포도잎 추출물의 용량 의존성 효능 평가 완료

2) 2차년도(2019)

세부연구 목표	가중치 (%)	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준	내 용
제조공정 확립 및 기준 규격 확립	15	15	공인분석기관 성적서	<ul style="list-style-type: none"> 공인분석기관 성적서 확보
	15	15	인체적용시험 승인서	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험용 시제품 제조 인체적용시험 계획서 평가지표 등 보완 및 추가 인체적용시험 IRB 심의 통과
	10	10	원료 및 시험 식품의 안정성 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 신청원료 및 시험식품의 장기보존시험 12개월 시험 완료 신규소재 칩잎 추출물 제조 및 분석
혈행개선 효능 평가	25	25	혈행개선 기전 연구 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 포도 잎의 혈행개선 관련 기전연구 수행 혈관이완효과 평가 본태성 고혈압 모델에서 항고혈압 효과 확인
	25	25	기허가 제품과의 비교 실험자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 포도 잎 추출물과 은행잎 및 아스피린과 효능 비교 평가
	10	10	신규소재 혈행개선 효능 평가 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> 신규 소재 및 복합소재의 혈행개선 효능평가 (<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>)

3) 3차년도(2020)

세부연구 목표	가중치 (%)	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준	내 용
개별인정 신청	10	10	원료 및 시험 식품의 안정성 자료 확보	· 24개월 안정성 시험 완료
	20	20	밸리데이션 자료 확보	· 포도잎 추출물 시험방법 밸리데이션 완료
	20	20	인체적용시험 결과보고서	· 인체적용시험 완료, 결과보고서 작성 및 IRB 심의 완료
	20	20	개별인정신청서	· 개별인정 원료 신청 접수 완료
	10	10	신규소재 기준규격 설정	· 신규 소재 연잎 추출물 제조 및 지표성분 분석
혈행개선 효능 평가	20	20	신규소재 혈행개선 효능 평가 자료 확보	· 신규소재 연잎의 용매별 추출물의 혈행개선 효능평가(<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>) · 연잎 60% 에탄올 추출물의 용량의존성 평가

3-2. 목표 달성여부

가. 연구개발 성과

선정평가 시 제시한 성과지표 중 가중치를 부여한 목표는 모두 달성하였고, 고용 창출과 논문 IF 값은 초과 달성함

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타(타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SCI	논문 비SCI	논문 평균 IF			학술발표	정책 활용		홍보전시
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	20	0	0	0	15	0	0	20	0	0	20	10	0	0	0	0	0		
최종목표	2	2	0	1	7.35	2	1.500	0	11	0	1	2	1	4	5	0	0	0		
1차연도	목표	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
	실적	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
2차연도	목표	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	2	2	0	0	0		
	실적	1	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0		
3차연도	목표	1	1	0	1	7.35	0	0	2	0	0	1	1	2	2	0	0	0		
	실적	1	1	0	0	0	0	0	5	0	0	2	1	6.359	2	0	0	0		
소계	목표	2	1	0	1	7.35	1	0	6	0	0	2	1	4	5	0	0	0		
	실	2	1	0	0	0	1	0	11	0	0	2	1	6.3	5	0	0	0		

적														59						
종료 1차연도	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
종료 2차연도	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
종료 3차연도	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
종료 4차연도	0	0	0	0	0	0	50 0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
종료 5차연도	0	0	0	0	0	0	1,0 00	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
소 계	0	1	0	0	0	1	1,5 00	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
합 계	2	2	0	1	7.3 5	2	1,5 00	0	11	0	1	2	1	4	5	0	0	0	0	0

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 제시한 성과는 모두 달성함
- 포도잎 추출물은 혈행개선 개별인정 건강기능식품으로 신청하였음. 후속 조치 및 식약처 보완 사항에 적극대응하여 개별인정 원료로 등재될 수 있도록 할 것임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 인체적용시험 결과 혈소판응집 억제 효과, 혈액응고(aPTT) 억제 효과, 수축기 혈압 개선 효과 및 혈중 COX-2 억제 효과를 나타내었음. 이러한 결과는 건강기능식품 개별인정을 받을 수 있을 것으로 예상되며, 행정처리 기간 동안 원료 확보를 위해 국내 농가 및 지역 농협 등을 통해 원료 확보를 해나갈 계획임
- 포도 잎 추출물은 본태성 고혈압 모델에서 의미있는 결과를 보였고, 인체적용시험에서 수축기 혈압을 개선하는 결과를 보였음. 또한 평활근으로 이뤄진 혈관의 이완효과를 보였음. 이러한 결과는 포도잎 추출물이 혈압조절 효과를 나타냄을 보여주는 것으로 추가 인체적용 시험을 통해 가능성을 확대해 나갈 계획임
- 국내 농업 부산물의 생리활성 물질의 최적 추출방법을 제시하고 지표성분 또는 효능성분을 표준화하여 기능성 원료 또는 의약품의 소재로 활용할 수 있는 가능성을 제시할 것으로 기대
- 버려지거나 활용도가 적은 부산물들을 고부가가치 기능성 소재로 산업적 가치를 증대시킴으로써 시장의 수요를 불러일으킬 수 있고, 농가의 새로운 수입원을 창출할 수 있을 것으로 기대
- 국산 원료를 이용한 혈행개선 효능을 국제 저널에 게재함으로써 국내산 기능성 소재를 국제적으로 알리고 국산 소재를 수출할 수 있는 기반을 마련할 것으로 기대
- 수입에 의존하던 혈행개선용 기능성 원료를 내수시장에서 확보하여 다국적 기업들이 주도하고 있는 건강기능식품 시장에서 수입대체 효과 기대
- 기능성 소재의 개발을 통해 순환기계 질환 예방을 통한 국민 보건 향상과 삶의 질에 긍정적인 영향을 줄 것으로 기대됨
- 개발한 소재의 사업화를 위한 원료 수급을 위해 농가와 협의를 진행할 계획이며, 안정적인 수급을 위해 계약 재배 방식 협의 및 원료 공급 단가를 협의할 것임. 원료의 단가를 kg당 7,000원으로 가정할 경우 수출 13.6%를 적용한 포도잎 추출물의 1일 섭취량 주성분의 단가는 약 320원으로 예상되며 현재 유통중인 고시형 원료들과 단가를 비교했을 때 사업성이 있을 것으로 예상됨.
- 포도잎 원료의 채취 시기는 포도잎 채취시기별 지표성분 함량 비교 결과를 고려하여 7월과 9월 포도 수확 후 원료를 확보하여 두 원료를 혼합하여 사용하는 것이 일정한 품질을 유지할 수 있는 방법임.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발 및 제품화 연구 (영문) Studies on development and commercialization of blood circulation improving nutraceuticals using agricultural by-products.				
주관연구기관	(유)한풍제약		주 관 연 구 책 임 자	(소속)	(유)한풍제약
참 여 기 업				(성명)	김 O 성
총연구개발비 (천원)	계	742,500	총 연 구 기 간	2018.04. ~ 2020.12.(2년 9개월)	
	정부출연 연구개발비	550,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	10
	기업부담금	192,500		내부인원	6
	연구기관부담 금	0		외부인원	4

○ 연구개발 목표 및 성과

- 연구 목표 : 농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발
- 연구 성과 : 포도 잎 추출물을 활용한 혈행개선 기능성 검증 및 개별인정소재 신청

○ 연구내용 및 결과

- 혈행개선 소재 확보 및 규격화·표준화
 - 포도 잎, 고구마 지상부, 칩잎, 표고버섯, 연잎 5가지 원료 제조공정 및 기준규격 확립
- 포도 잎 추출물 안전성 및 안정성 자료 확보
 - GLP 기관을 통해 단회투여 독성시험 수행 결과 포도 잎 추출물의 개략 치사량(ALD)은 암·수 모두 5,000 mg/kg으로 본 연구에서 제시하는 1일 1,800 mg 섭취는 안전하다 판단
 - 설정된 기준규격에 따라 포도 잎 추출물 및 인체적용시험용 식품에 대한 24개월 안정성 자료 확보
- 포도 잎 추출물에 대한 공인기관성적서 확보
 - 포도 잎 추출물의 영양성분(열량, 탄수화물, 조단백질, 조지방, 수분, 회분, 나트륨), 대장균군(정성), 성장, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약 58종, 플라보놀 배당체에 대한 공인분석기관(한국기능식품연구원) 시험 성적서를 확보함
- 혈행개선 소재 효능평가 자료 확보
 - 포도 잎과 기허가 제품 간의 효능 비교 시험 및 기전 연구
 - : 포도 잎 추출물은 항산화 효능, 혈소판 응집능, aPTT, PT시간 지연 등의 효능평가에서 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄
 - : 포도잎 추출물은 혈관내피세포에 TNF- α 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현을 억제 및 내피세포 이동억제를 나타냄
 - 고지혈증 동물모델에서 포도 잎 추출물의 혈행개선 효능검증
 - : 포도잎 추출물의 투여는 고지혈 동물모델에서 유도되는 혈행 및 지질 관련 장애를 개선함. 포도잎 추출물의 혈행개선능은 직접적인 혈액응고 인자의 관여보다는 항산화 및 지질

개선을 통해 기인하는 것으로 사료됨

- 본태성 고혈압 동물모델에서 포도 잎 추출물의 혈행개선 효능검증

: 포도잎 추출물의 투여는 본태성 고혈압 동물모델에서 꾸준히 증가하던 수축기 혈압을 낮춰주는 효과가 있으며, 고혈압으로 인해 유도되는 심장이 비후해 지는 현상을 저감함으로써 고혈압의 증후를 개선함

: 그 외, SHP1의 투여는 본태성 고혈압 모델에서 혈관병변을 회복시키는 기능 및 혈관 기능 이상을 개선시키는 효능이 있는 것으로 사료됨

- 신규 소재의 혈행개선 효능 평가[고구마줄기, 표고버섯, 칩잎, 연잎(하엽)]

: 고구마 지상부 추출물(SHP02), 표고버섯 물 추출물(SHP03), 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04)은 유의적인 항산화능을 나타냄

: 혈소판 응집능의 경우, SHP 02, 04에서 유의적 차이를 나타냄. 혈액응고시간은 SHP 04에서 유의적 차이를 나타냄. SHP 04(표고버섯 50% 에탄올 추출물)에서 혈행개선 효과가 있는 것으로 판단됨

: 혈관 내피세포에 TNF- α 에 의해 증가되는 ICAM-1, VCAM-1, von Willebrand factor 유전자 발현을 표고버섯 50% 에탄올 추출물(SHP04) 처리에 의해 유의적으로 감소됨

: 칩잎 에탄올 추출물(SHP06; C18002)의 경우 혈소판 응집 개선능은 없으나, 혈액 응고시간(aPTT)의 지연을 나타냄

: SHP 04+06은 혈소판 응집능 개선 및 aPTT 지연으로 혈행개선 효능을 나타내는 것으로 판단됨

: SHP 04+06은 혈관내피세포에 VCAM-1유전자 발현을 유의적으로 감소시킴

: 연잎 추출물은 양성대조군인 Vit C와 유사한 항산화능을 나타냄

: 연잎 30% 및 60% 에탄올 추출물에서 혈소판 응집율의 감소 및 연잎 60% 에탄올 추출물에서 혈액응고시간(PT, aPTT)의 지연을 나타냄

: 일반동물 모델에 연잎 용매별 추출물을 7일간 투여 시 연잎 30%, 60% 에탄올 추출물 처리군에서 혈소판 응집능 억제, PT 시간을 지연 및 TXA2, Serotonin 분비 억제에 따라 혈행응고 및 혈전 개선 효과가 있는 것으로 판단. 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄

: 일반 동물 모델에 연잎 60% 에탄올 추출물을 100, 200, 400 mg/kg의 농도로 7일간 투여 시 200 및 400 mg/kg의 농도 처리군에서 혈소판 응집능 억제, 혈액응고 시간지연 및 TXA2, Serotonin 분비 억제에 따라 혈행응고 및 혈전 개선 효과가 있는 것으로 판단. 기존 소재인 은행잎 추출물과 유사한 효능을 나타냄

■ 포도잎 추출물의 혈행개선 인체적용시험

- 포도잎 추출물을 12주 섭취 시(포도 잎 추출물로서 1일 총 1,800 mg 섭취) Col/EPI으로 유도한 혈소판 응집 시간과 aPTT에 의한 혈액 응고 시간을 증가시켜 혈전 생성을 억제하고, 혈압이 감소됨을 관찰하여 포도잎 추출물의 혈행 개선 효과를 확인하였음. 또한, 인체적용시험 기간 동안 인체적용시험용 식품과 관련 있을 가능성이 있는 것으로 판단된 이상반응이 2건 발생하였으나 완전치유로 종결되었으며, 그 외 인체적용시험용 식품과 명확히 관련이 있으며 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화는 관찰되지 않아 포도잎 추출물의 섭취는 인체에 안전하다고 판단

■ 포도잎 추출물의 혈행개선 기능성 개별인정소재 신청

- 민원사무명 : 건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
- 신청일 : 2021.01.28
- 접수일 : 2021.01.28
- 접수번호 : 20210053857
- 처리예정일 : 2021.07.21.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 연구 개발된 성과는 2편의 논문게재(SCI급 2편, KCI급 2편 투고), 2편의 특허출원으로 지식재산권을 확보, 총 5회에 걸쳐 국제학회에서 연구성과를 발표하였음
- 전임상시험에서 혈관이완을 통한 혈압 감소 및 임상시험에서 수축기 혈압이 위약군 대비 통계적으로 유의하게 감소한 점을 미루어 보아, 포도 잎 추출물은 혈행개선능 외에 혈압 조절과 관련된 기능성 소재로의 후속연구 가능성을 확인하였기에, 후속연구 기초자료로써 활용할 계획

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118041-03		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발 및 제품화 연구			과제유형	개발
연구기관	(유)한풍제약			연구책임자	김대성
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.04~2018.12	150,000	52,500	202,500
	2차연도	2019.01~2019.12	200,000	70,000	270,000
	3차연도	2020.01~2020.12	200,000	70,000	270,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		550,000	192,500	742,500
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.01.30

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(유)한풍제약	부장	김대성

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김대성

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

확약	김대성
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

- 후보소재(포도잎 및 신규소재)의 혈행개선능을 성공적으로 평가함
 - 전 임상 시험의 다양한 실험모델을 통해 포도잎 추출물의 혈행개선능을 과학적이고 객관적인 결과로 제시함으로써 혈행 개선에 도움을 줄 수 있는 소재로의 가능성을 검증하였음
 - 고구마지상부, 표고버섯, 취잎, 연잎에 대한 전 임상 효능평가를 수행하였으며 그중 표고버섯 및 연잎의 높은 혈행개선능을 확인하여 연구목표를 달성함
- 포도 잎 추출물의 개별인정 신청
 - 포도 잎 추출물의 혈행개선 전임상/임상시험 결과 유의미한 결과를 얻어 해당 자료를 토대로 식약처에 혈행개선 기능성 원료 개별인정 신청을 완료함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

- 천연물 소재를 이용한 혈행 개선 연구는 많은 연구자들의 관심 받는 분야였으나, 가시적인 성과를 얻은 예가 많지 않음. 본 연구는 고지방식이 섭취에 따른 고지혈증 유도 모델을 활용하여 천연물기반 소재 포도잎 추출물의 혈행 개선능을 밝힘으로서 혈행개선에 도움을 줄 수 있는 소재 연구의 가이드라인을 제시함
- 부작용의 위험이 있는 화학적 의약품에 비해 부작용이 적고 효과가 우수한 천연물 건강기능식품 개발을 통하여 향후 건강기능성식품/천연물신약 개발의 가능성이 높다고 판단됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

- 기능성 소재(포도잎 및 신규소재)에 대한 유효성을 전임상 단계에서 식품의약품안전처의 가이드라인에 따라 규명하였으며, 이러한 연구결과는 추후 주관기관에서 진행하게 되는 임상시험 및 건강기능성식품 개발을 위한 기본데이터로 활용 가능함
- 전임상시험에서 혈관이완을 통한 혈압이 감소한 결과 및 임상시험에서 수축기 혈압이 위약군 대비 통계적으로 유의하게 감소한 점을 미루어 보아, 포도 잎 추출물은 혈행개선능 외에 혈압 조절과 관련된 기능성 소재로의 후속연구로도 활용 가능성을 확인함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

본 연구진은 당초 계획했던 연구개발목표를 이루고자 성실히 연구에 임하였음. 모든 단계에 목표하였던 연구목표를 100%이상 달성하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

- 연구 개발된 성과는 3편의 논문게재, 2편의 특허출원으로 지식재산권을 확보, 총 5회에 걸쳐 국제학회에서 연구성과를 발표하였음

전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
	1	2			5	2		1					

논문(SCI급 2건, KCI 2건(심사 중))

- Protective Effect of Vitis labrusca Leaves Extract on Cardiovascular Dysfunction through HMGB1-TLR4-NF κ B Signaling in Spontaneously Hypertensive Rats, *Nutrients* 2020, **IF 4.546**
- Vitis labrusca Extract(HP01) Improves Blood Circulation and Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Rats, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020, **IF 1.813**
- 캠벨얼리(Vitis labruscana B.)와 머루(Vitis coignetiae) 포도잎의 생육단계별 생리활성 성분 및 혈관이완능, 한국식품과학회지
- 포도잎추출물이 Isoprenaline 유도 심근병증 랫트에서 심장-신장 개선에 미치는 영향, 한국식품영양과학회, 2020.12 제출(접수번호 K20-12-13)

○ 지식재산권(출원 2건, 등록 1건)

- 고혈압 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물
(출원번호 10-2019-0136928 / 등록번호 10-2155113)
- 포도잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 발기부전 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물
(출원번호 10-2020-0187682)

○ 학술대회 5건

- Evaluation of the anitthrombotic acivity of herbal extrats via the pathway of anti-coagulation and anti platelet activation, 2018 추계 약학회(한중일 생약학회)
- Antiplatelet and Antithrombotic Activities of SHP series, 2019 춘계약학회
- SHP01 improves blood circulation and lipid metabolism in hyperlipidemic rats, 2019 추계 독성학회
- Effects of the Antiplatelet and Antithrombotic by SHP01, 2020 한국식품저장유통학회 국제학술대회
- Effect of SHP01 on Hepatic Oxidative Stress and Thrombosis in High Fat Diet-Induced Obese Rats, 2020 추계 한국식품영양과학회

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
농업부산물의 혈행개선 전임상 효능검증을 통한 식의약 소재 도출	10	10	포도 잎, 칩잎, 표고버섯, 고구마지상부, 연잎에 대한 전임상 효능 검증을 통해 식의약 소재로서의 가능성을 확인함
효능이 확인된 소재의 제조공정 및 기준 규격 확립	10	10	포도 잎, 칩잎, 표고버섯, 고구마지상부, 연잎에 대한 제조공정 및 기준규격을 확립함
효능기전 연구 및 인체적용시험 실시	30	30	포도 잎 추출물에 대한 효능기전 연구 및 기허가 소재인 은행잎 추출물과의 비교연구를 통해 유사한 효능이 있음을 확인하였으며, 인체적용시험에서 포도 잎 추출물이 혈행개선 효능이 있음을 확인함
포도 잎 후보소재의 건강기능식품 개별 인정 원료 신청	30	30	포도 잎 추출물에 대한 혈행개선 기능성 개별인정소재 신청을 접수함
신규 소재로서 칩잎 및 고구마지상부의 혈행개선 효능 검증	10	10	칩잎 및 고구마 지상부 외 추가로 표고버섯과 연잎에 대한 혈행개선 효능검증을 완료함
개발 소재의 지식재산권 확보 및 논문 투고	10	10	개발 소재에 대한 지식재산권 2건, SCI급 논문 게재 2건, KCI급 논문 투고 2건을 완료함
합계	100점	100점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

계획 이상의 성과를 거두었다고 판단되며, 새로운 타겟 발굴과 같은 연구와 더불어 효용성 증대 및 활용성 증가를 위한 실험들을 지속적으로 수행할 필요가 있을 것으로 사료됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 포도잎이 함유된 추출물 형태의 소재에 대한 유용성 검증이 핵심기술임. 단일물질과는 달리 추출물에는 수많은 종류의 물질이 있어 단일 유효성분보다 더 큰 효과를 나타내는 것이 일반적임. 하지만 최근 논문은 단일물질을 요구하는 방향으로 대부분 진행되고 있어, 높은 인용 지수의 논문게재는 어려운 상황임

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

유용성 및 안전성이 확보된 소재 포도잎 추출물을 이용해 다양한 용도의 활용 가능
: 혈행 및 간기능 개선 효과를 활용한 다양한 의약품 및 건강기능식품 소재로 사용 가능
기능성 소재(포도잎, 표고버섯, 연잎)에 대한 유효성 및 작용기전을 전 임상에서 규명하였으며 이러한 연구결과는 향후 건강기능식품 개발을 위한 후속 연구 기본데이터로 활용 가능함

IV. 보안성 검토(해당없음)

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품	
연구과제명	농업부산물을 활용한 혈행개선 식의약 소재 개발 및 제품화 연구			
주관연구기관	(유)한풍제약	주관연구책임자	김대성	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	550,000	192,500	0	742,500
연구개발기간	2018.04~2020.12(33개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 포도 잎의 혈행개선능 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 당초 계획했던 고지혈증모델 및 일반모델에서 포도잎 추출물의 혈행개선능에 대한 용량의존성 및 기허가 제품과의 효능 비교평가를 통해 과학적이고 객관적인 결과를 제시하였음
② 혈행개선능 신규소재 발굴 및 검증	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고구마 지상부, 칩잎, 표고버섯, 연잎 4종의 신규 소재에 대한 혈행개선 소재 가능성을 확인하였음
③ 포도잎추출물의 혈행개선 기능성원료 개별인정신청	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 혈행개선 인체적용시험을 통해 유의미한 결과를 얻어 혈행개선 기능성원료로써 개별인정신청을 완료함

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍 보		기타 (타연구 활용등)
	특허출원	특허등록	품질등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	20	0	0	0	15	0	0	20	0	0		20	10	0	0	0	0		
최종목표	2	2	0	1	7.3 5	2	1,5 00	0	11	0	1	2	1	4	5	0	0	0		
연구기간 내 달성실적	2	1	0	0	0	1	0	0	11	0	0	2	1	6.3 59	5	0	0	0		
달성율(%)	100	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	100	0	0	0		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	포도 잎 추출물의 혈행개선능
②	포도 잎 추출물의 혈압조절능

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화 흡수	외국기술 개선 개량	특허 출원	산업 제이전 (상품 화)	현 장 애 로 해 결	정 책 자 료	기 타
①의 기술					✓					
②의 기술					✓					

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 혈행개선 기능성 원료 개별인정소재 신청 - 기존 혈행개선 소재인 은행잎은 대부분 수출에 의지하고 있으나, 포도 잎 추출물 개별인정 허가 취득 시 국내 자생 원료를 사용함으로써 수출대체 효과를 기대할 수 있음
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 혈압조절 식의약 소재 연구 기초 자료 활용 - 국내 자생 원료를 활용하여 천연물 식의약 소재 개발 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타(연구활용)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정채 활용			홍보 전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	15	20	0	0	0	15	0	0	20	0			20	10	0	0	0	0	0	
최종목표	2	2	0	1	7.35	2	1,500	0	11	0	1	2	1	4	5	0	0	0	0	
연구기간내 달성실적	2	1	0	0	0	1	0	0	11	0	0	2	1	6.359	5	0	0	0	0	
연구종료 후 성과창출 계획	0	1	0	0	0	1	1,500	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

8. 연구결과의 기술이전조건(해당사항 없음. 자체 실시)

주 의

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