발간등록번호
11-1543000-001011-01

곰취를 이용한 혈행개선용 건강기능식품 개발

(Development of health functional foods for the improvement of blood circulation from *Ligularia fischeri* extract)

(재)경기과학기술진흥원

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “곰취 (*Ligularia fischeri*)를 이용한 혈행개선용 건강기능식품 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 18일

주관연구기관명 : (재)경기과학기술진흥원
주관연구책임자 : 김 진 규
연 구 원 : 홍 성 수
권 진 관
최 춘 환
정 원 식
세부연구책임자 : 안 은 경
연 구 원 : 이 정 아
이 재 연
고 혜 진
박 영 진
협동연구기관명 : 단국대학교 산학협력단
협동연구책임자 : 서 동 완
연 구 원 : 이 하 늘
김 재 현
참 여 기 업 : (주)넥스팜코리아

요 약 문

Ⅰ. 제 목

곰취(*Ligularia fischeri*)를 이용한 혈행개선용 건강기능식품 개발

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

	특허		논문		학술발표	인력양성
	출원	등록	SCI	비SCI		
목표	2	1	3	2	0	0
성과	**3**	-	**3**	2	13	4

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

본 연구에서는 곰취 추출물을 이용하여 혈행개선용 고부가가치 기능성 소재 개발 및 제품화로 국내 농산자원을 활용한 고부가가치 기능성 식품개발을 목표로 하고 있음. 곰취 추출물의 혈행장애 관련 질환의 예방 및 개선에 미치는 효능을 규명하고 산업화하여 이를 맞춤형 건강기능식품으로 개발 및 제품화 하고자 함.

2. 연구개발 필요성

현대사회에서는 식생활의 서구화 산업화, 공업화 및 정신적 스트레스 등으로 인해 혈행장애를 동반하는 각종 대사성질환이 증가되고 있으며 우리나라 대사증후군 유병률은 지난 10년간 급격히 증가하였음 또한 국내 건강기능식품 시장 규모는 건강에 대한 관심 고조 인구 고령화 등에 힘입어 매년 성장하고 있기 때문에 국내 소재 기반 대표 브랜드 발굴 및 육성이 시급함. 또한 나고야 의정서 등 국제 협약 대응에 대한 국가 차원의 대응 방안 마련이 필요함 혈행개선은 건강기능식품을 통해 해결하고자 하는 건강문제로 조사되기도 하였다 따라서 소비자들에게 친숙하고 인지도가 높은 국내산 원료를 활용하여 다양한 효능 및 안전성의 검증을 통하여 식품 기능성을 확립하는 것은 국민건강보호 증진 및 국제경쟁력 강화를 위하여 반드시 필요함 이러한 환경에서 국내 자원을 이용하여 기능성 소재 제품개발 및 산업화는 국내농업 기반을 안정적으로 유지하는 주요한 돌파구로 판단됨 이에 소비자들이 염려하는 건강문제인 혈행 및 대사성 질환을 개선할 수 있는 건강기능 소재 및 제품개발이 요구되는 상황임.

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

○ 곰취 추출물의 지표물질 설정, 함량분석(quinic acid계열) 및 유효성분 분리

○ 유효성분의 추출효율 향상 및 대량생산을 위한 제조공정의 최적조건 확립
○ 원료 및 제조공정 표준화 및 validation
○ 곰취 추출물 및 유효 성분의 혈행개선 기능성 평가
○ 인체적용 시험 승인 신청
○ 혈행개선관련 항산화 효능 평가 및 전구지방세포에서의 지방세포로의 분화 억제 평가
○ i*n vitro* 항혈전 효능 및 혈소판 응집 억제 평가
○ *in vivo* 혈행개선 효능 평가
○ 혈관내피세포를 이용하여 *in vitro* 효능 평가

Ⅴ. 연구개발결과

○ 곰취 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리
- 곰취 추출물로부터 지표성분을 chlorogenic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid로 설정하고 유효성분 총 12종의 화합물을 분리정제 하였음.

○ 표준화된 최적 공정 확립
곰취 용매별 추출을 실시하고, 각 추출물별 효능을 검증하여 최적 수율 및 효능을 검토하고 곰취 추출물 제조의 최적 공정을 확립하였음.

○ 대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보
표준화된 최적 공정법을 이용하여 곰취의 대량생산 공정을 실시하였고 pilot 추출물을 확보하였음.

○ 최적 추출물속 유효성분 분리 및 분석 완료
최적 추출물로부터 지표 및 유효성분을 포함하여 총 12종의 화합물을 분리정제 하였으며 HPLC를 이용하여 최적 분석 조건을 확립 하였다. 유효성분 및 지표물질들의 HPLC 등 분석기기를 이용한 최적 분리 및 분석 조건을 확립함.

○ 원료 규격 표준화 및 원료 validation
HPLC를 이용하여 지표성분의 최적 분석 조건을 확립하고 원료 및 지표성분에 대한 분석법 validation을 통해서 원료 규격 표준화를 실시하였음.

○ 곰취 추추물의 혈행개선관련 항산화 효능 평가
곰취 추출물을 산지별 농도별에 따라 항산화 유효성 평가를 실시한 결과 인제산 50% 에탄올 추출물에서 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

○ 곰취 추추물 및 유효물질의 전구지방세포에서의 지방세포로의 분화 억제 평가
곰취 추출물 및 유효물질인 ethyl caffeate를 처리하여 전구지방세포에서 지방세포로의

분화억제를 평가해본 결과, 두 시료 모두에서 농도 의존적으로 지방량의 축적을 억제시키는 효과를 관찰하였다. 특히 ethyl caffeate의 경우, 지방세포분화와 연관된 다양한 유전자들의 발현도 억제시키것으로 나타났다.

○ 곰취 추추물 및 유효물질의 *in vitro* 항혈전 효능 및 혈소판 응집 억제 평가
곰취 추출물 및 그 속의 유효물질들에 대해 콜라젠을 이용 혈소판 응집억제 활성을 확인해본 결과, 곰취 50% 에탄올 추출물 100 μg/ml, caffeic acid 5 μM, ethyl caffeate 5μM, chlorogenic acid 10 μM에서 각각 혈소판 응집억제활성이 나타난 반면 혈전 용해능 평가를 해본 결과에서는, 모든 시료에서 효과가 나타나지 않았다.

○ 곰취 추추물을 이용한 *in vivo* 혈행개선 효능 평가
고탄수화물 식이로 고콜레스테롤과 고중성지방혈증이 유발된 동물을 이용하여 12주동안 곰취 추출물을 경구 투여한 후 혈액내 관련 유전자의 변화를 측정하였다. 그 결과 처리농도인 100, 200, 400, 800 mg/kg 모두에서 대조군에 비해 혈중 콜레스테롤과 고중성지방 수치가 감소되는 것이 관찰되었다. 이와 관련된 동맥경화지수인 AI와 심혈관위험지수 CRF 수치 모두 800 mg/kg 처리군에서 감소되는 것으로 관찰되었다.

○ 혈관내피세포를 이용하여 *in vitro* 효능 평가
곰취를 이용하여 혈관내피세포를 통해 혈관신생관련 *in vitro* 효능 평가를 추가적으로 수행한 본 결과, 곰취 추출물이 세포 독성을 야기하지 않고 혈관신생을 효율적으로 제어함으로써 혈행개선 관련 건강기능식품으로서의 곰취의 우수성 뿐 만 아니라, 혈관신생 관련 질환인 악성종양을 예방 또는 치료할 수 있는 신규 효능과 의약품으로서의 개발 가능성을 추가적으로 제시한 좋은 사례라고 판단됨.

Ⅵ. 연구성과활용 계획

곰취 추출물은 원료표준화(지표 및 유효성분 규명)연구를 진행하였고, *in-vitro* 실험을 통해 항혈전 효능, 혈소판 응집 억제 및 혈전 용해능 활성 효과에 대해서 입증했으며, 안전성이 확보되고 부작용이 적은 혈행개선용 개별인정형 건강기능식품 개발 가능성을 입증하였다. 이에 혈행개선에 도움을 줄 수 있는 제품개발에 활용할 계획이다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Development of health functional foods for the improvement of blood circulation from *Ligularia fischeri* extract

II. Achivements of Research Development and Implementation Performance

Contents	*Patent*		*Publication*		*Presentation*	*HμMan Resource Development*
	Application	*Registration*	*SCI*	*KSCI*		
Goal	2	1	3	2	0	0
Achivement	**3**	**0**	**3**	**2**	**13**	**4**

III. Objectives and necessity of the research

1. Research Objectives

The final goal of this research is to develop health-functional food for improving blood circulation using Ligularia fischeri extracts and to establish a mass production and safety assessment of functional ingredient. This research was performed to be acquired for individual health-functional food ingredients by proving the scientific evidence and efficacy evaluation of domestic agricultural resources. In addition, this research was intended for industrialization of personalized health-functional food.

2. Necessity of the research

In modern society, metabolic syndrome accompanied with blood circulation disorder is increasing due to westernization diet, industrialization and emotional sterss. Also, the prevalence rate of metabolic syndrome increased dramatically over the past decade in Korea. Therefore, establishment of the efficacy and safety of a variety of health food is required in order to protect health of people and to strength national competitiveness. In addition, because abdominal obesity and obese children are growing as social problems, the development of health-functional food for improving blood circulation and lipid metabolism by the domestic agricultural resources is required.

IV. The contents of the study

○ Identification of marker compounds for standardization of as functional ingredient

- Determination and analysis of active components
- Optimization of extrraction process of functional ingredients
- Development of protocol for clinical trial

○ Establishment of standardized optimal extraction process
○ Pilot scale extraction with mass-up process
○ Isolation and analysis of bioactive components from optimal extracts
○ Standardizing of specifications for raw materials and validation of raw materials
○ Design of hμMan trial and approval of IRB
○ The evaluation of anti-oxidant effect using the *Ligularia fischeri* extract(LFE)
○ The evaluation of inhibitory effect of LFE and active compound (ethyl caffeate) on adipocyte differentiation in preadipocytes
○ The evaluation of inhibitory effect on platelet agglutination and antithrombotic effect using LFE and active compounds *in vitro*
○ *In vivo* evaluation test for improvement of blood circulation using LFE
○ Investigation of efficacy and functional maechanism of *Ligularia fischeri* extract for improving blood circulation
○ Active components of *Ligularia fischeri* in regulating angiogenesis and cancer progression

V. The results of Research and Development

○ Isolation of 12 compounds including marker and bioactive components. Establishment of optimization analytical condition using HPLC for marker and bioactive components.

○ Establishment of optimization analytical condition using HPLC and standardizing of specifications for raw materials according to HPLC method validation for raw materials and marker compounds.

○ Pilot scale extraction with mass-up process using standardized optimal extraction process.

○ The evaluation of anti-oxidant effect using the *Ligularia fischeri* extract (LFE)
We examined the tasting for free radical scavenging activity with ABTS and DPPH assay, to confirm the anti-oxidant effect of LFE depending on region and dosage. As a result, we showed the Inje regional sample (50% EtoH extract of *Ligularia fischeri*) has the strongest anti-oxidant effect.

○ The evaluation of inhibitory effect of LFE and active compound (ethyl caffeate) on adipocyte differentiation in preadipocytes
To measure the adipogenic effect of LFE and active compound, we examined the testing for adipocyte differentiation. LFE and compounds treatment resulted in the dose-dependent decrease of triglyceride accμMulation. Especially, ethyl caffeate suppressed the expression of adipogenic marker genes and also inhibited the expression of PPARɣ and CEBPα at both mRNA and protein levels in preadipocytes.

○ The evaluation of inhibitory effect on platelet agglutination and antithrombotic effect using LFE and active compounds *in vitro*

As a result, we observed that treatment with 100μg/ml of LFE (50% EtOH extract of *Ligularia fischeri*) have the inhibitory effect on platelet agglutination. And active compounds such caffeic acid (5μM), ethyl caffeate (5μM) and chlorogenic acid (10μM) also suppressed platelet agglutination activity, respectively. However, Any treated samples did not show the antithrombotic effect from *in vitro* evaluation.

○ *In vivo* evaluation test for improvement of blood circulation using LFE

After we made the hypercholesteremia and hypertriglyceridemia mouse model using a high-carbohydrate diet, modeling mice were treated with LFE (50% EtOH extract of *Ligularia fischeri*) using oral administration for 12 weeks. And than we analyzed the effect the improvement of blood circulation of LFE. Consequently, LEF from the concentration of 100, 200, 400 and up to 800 mg/kg have the effect on reducing level of total cholesterol and triglyceride values in the blood from mouse model. We also confirmed the low values about the atherogenic index (AI) and cardiac risk fator (CRF), which have related to LEF effectiveness.

○ In addition to biological activity improving blood circulation, we report novel roles and molecular mechanisms of the extracts and biologically active components of *Ligularia fischeri* in regulating angiogenesis and cancer progression. These findings warrant further evaluation and development of *Ligularia fischeri* for the prevention and treatment of pathological states associated with angiogenesis as well as for blood circulation improvement.

VI. Plans for utilizing the results

This research has established activ components, standardized functional ingredients, mase production of functional materials, and also identified the functional mechanism of Ligularia fischeri extracts based on the in vitro study and experimental animal study. These findings sμggested global competitiveness of health-functional food by presenting international and domestic journals and conferences, which has promoted the utilization and export possibility of functional foods made in Korea. Also, Th research has contributed to industrial development by hμMan resource development for future growth.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the Research and Development projects ····· 10
Section 1. The research goal ····· 10
Section 2. The significance of the research ····· 10
Section 3. The research scope ····· 12

Chapter 2. The current Research status ····· 14
Section 1. Current Technical Developments and problem in domestic and global ····· 14

Chapter 3. Results and Contents of Research and Development ····· 21
Section 1. Compounds isolation from *L. fischeri* extracts ····· 21
Section 2. Standardizing of specifications for raw materials and pilot scale process ····· 40
Section 3. Stability assessment of formulations and Standard specification ····· 75
Section 4. Design of human trial and approval of IRB ····· 92
Section 5. Effect of blood flow improvement of *L. fischeri* extracts ····· 101
Section 6. The anti-angiogenesis and anti-cancer effect of *L. fischeri* extracts ····· 138

Chapter 4. Contribution to the Achievements in the related Fields ····· 149
Section 1. Purpose ····· 149
Section 2. Contributions ····· 151

Chapter 5. Achievements of Research and Development and the applicable planning 152
Section 1. Annual aims and outcomes ····· 152
Section 2. The plan for utilizing the outcomes ····· 157

Chapter 6. Collected Foreign scientific technology information for studying ····· 158

Chapter 7. Current Status of Research Installation ····· 159

Chapter 8. Implementation Performance of Safety Managements of Laboratory ····· 160

Chapter 9. References ····· 163

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 10
제 1 절 연구개발 목적 ····· 10
제 2 절 연구개발 필요성 ····· 10
제 3 절 연구개발 범위 ····· 12

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 14
제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점 ····· 14

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 21
제 1 절 곰취 추출물의 성분연구 ····· 21
제 2 절 곰취 추출물의 원료표준화 및 pilot scale 추출공정 연구 ····· 40
제 3 절 곰취 추출물의 안정성 시험 및 기준규격 ····· 75
제 4 절 인체적용시험 및 IRB 승인 신청 ····· 92
제 5 절 곰취 추출물의 혈행개선관련 활성에 대한 기능성 평가 ····· 101
제 6 절 곰취 추출물의 혈관신생 제어 및 항암효능 평가 ····· 138

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 149
제 1 절 목표달성도 ····· 149
제 2 절 관련분야에의 기여도 ····· 151

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 152
제 1 절 연차별 연구성과 목표 및 성과 ····· 152
제 2 절 성과 활용 계획 ····· 157

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 158

제 7 장 연구시설·장비현황 ····· 159

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 ····· 160

제 9 장 참고문헌 ····· 163

[별첨] 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

제 1 장　연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 곰취 추출물을 이용하여 지표물질 설정에 따른 원료표준화 연구를 진행하고 혈액순환(혈행개선 등)과 관련된 활성을 평가한 후, 안정성 분석을 통해 인체적용 시험진행을 위한 시제품을 제작 완료하여 지질 관련 및 혈행개선 완화 및 예방 기능과 안정성을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발하여 건강기능성식품의 제조 노하우를 축적하고, 향후 이를 타 천연물 신약 및 식품 개발에 확대시켜서 국내 천연물 기반 기능성 식품산업의 기술력 강화 및 국제 경쟁력을 높이는 것을 그 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

우리나라에서도 경제수준의 향상으로 인하여 고영양, 고단백 등 식생활 양상의 변화에 따라 선진국과 같이 심혈관계 질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가하고 있다. 우리나라의 사망 및 사망원인에 대한 통계결과를 보면, 암·뇌혈관질환·심장질환 순으로 나타났다. 이를 단일 질환별 사망률로 보면, 순환계질환이 가장 앞선다. 또한 지난 10년간 추이를 살펴봐도 여전히 심혈관계 질환이 주요 사망원인별 사망률 1위를 유지하고 있다.

○ 국민건강영양 조사 자료에 따르면, 우리나라의 경우 급속한 경제 성장 및 가족 형태의 변화 등에 따라 식습관도 점차 서구화되어 2000년 이전에 비해 유류 및 육류 등 동물성 식품 섭취량이 증가되고, 나트륨 섭취량이 권장량에 비해 과다되는 등 심혈관 질환 발생을 증가시키는 바람직하지 못한 방향으로 식습관이 변화되고 있는 추세이다(Korea Centers for Disease Control and Preventi on 2008).

○ 따라서 심혈관 질환으로인한 삶의 질 저하와 의료비 증가를 방지하기 위해 심혈관 질환의 위험요인을 조기에 예방하기 위한 다각적인 노력이 시도되고 있다. 고지혈증은 심혈관 질환의 대표적 위험요인으로서 혈중 LDL-cholesterol 농도는 심혈관 질환의 이환율과 사망률에 큰 영향을 끼침(National Cholesterol Education Program).

○ 혈전증은 생체내의 심혈관 및 혈관 내에서 혈액의 응고, 즉 혈전이 형성된 것으로 혈액이 혈관계 내를 흐르는 동안 생리적 손상을 받을 경우 혈액 성분의 하나인 혈소판이 침착하는 기전으로부터 발생된다. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며, 정상적으로 순환되는 동안에는 혈전이 형성되지 않으나 여러 가지 병적인 요인으로 인해 균형이 깨지게 되면, 혈액의 흐름이 원활하지 못하게 되고 이로 인한 심혈관계 질환이 발생하게 됨.

○ 혈행 장애는 혈류의 항상성이 파괴된 상태로서, 정상적인 상태에서는 혈관 내 지혈 작용과 억제작용이 균형을 이루며, 정상적인 혈류의 흐름을 유지 함. 그러나 혈액 응고 인자가 지나치게 활성화되거나 혈소판 응집이 촉진되면 혈류의 항상성이 깨지면서 혈행 이상이 발생

되고, 그 결과 혈전증(thrombosis) 및 색전증(embolism)이 초래되는 것으로 알려져 있음(Yun EJ 2003).

○ 따라서 치료적 차원에서의 식사요법 적용이 고지혈증과 혈행 장애 개선을 위한 생활습관 조정의 하나로 중요한 역할을 차지할 것임을 간접적으로 시사해 주며 이에 많은 선행 연구들은 지질강하와 혈행 개선의 효과가 기대되는 식품 및 영양소에 관심을 두고, 이를 함유한 건강기능식품 등의 섭취를 통해 지질강하와 혈행 장애 개선을 시도해 오고 있음.

○ 현재까지 혈전질환의 예방 및 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 그리고 이미 형성된 혈전을 용해하는 혈전용해제 등으로 나누어져 있음. 특히 항혈소판제의 대표적인 약물로 사용되고 있는 아스피린은 항응고 효과성이 탁월하지만 위장 장애 등의 부작용을 일으키며, 그 외에 항응고제로 사용하고 있는 헤파린이나 쿠마린 등은 너무 고가의 약물이기 때문에 손쉽게 사용하기 어려움.

○ 따라서 약물의 부작용을 줄이면서도 동일한 효능을 보이는 물질을 찾기 위하여 천연물 또는 한방처방으로부터 혈액순환 개선 작용을 하는 물질에 대한 탐색 연구가 활발히 진행되고 있음.

○ 항혈전제의 세계시장은 약 7조원 규모이며, 국내시장은 1천억원 규모이나 건강기능식품시장에서는 개발품목이 전무한 상태고, 예방의학차원에서 기능식품의 필요성이 대두되고 있어 시장성이 매우 큰 상태.

○ 최근 한국보건산업진흥원에서는 '국내외 천연물의약품 시장동향'이라는 보고서에서 '국내 및 다국적 제약사들이 화학, 합성 신약개발에 비해 천연물제제에 대한 관심이 늦은 상태고, 아직 미개척분야로 조기에 국제경쟁력을 확보할 수 있는 분야'라고 평가해 의미를 더하고 있음.

또한, 취나물은 혈액청정을 방해하는 지방을 효과적으로 배출해주는데, 취나물을 흰쥐에게 섭취시킨 후 조사한 결과, 변을 통해 중성지방과 콜레스테롤이 빠져 나가는 결과가 보고 됨.

○ 취나물에 들어있는 식이섬유와 플라노보이드와 같은 폴리페놀이 혈액청정에 도움을 주며 플라노보이드를 포함한 식품 내 수용성 폴리페놀류와 농축된 탄닌류가 변으로의 지방 배설을 증가시켜 혈장, 간의 지질 수준을 낮추어 줌. 국내 연구에 의하면 체내 총 콜레스테롤, 중성지방, 인지질의 농도를 낮추고 HDL-콜레스테롤 수준을 높여 지질대사를 개선시켰다는 보고가 있음.

따라서 본 연구에서는 곰취 추출물을 이용하여 혈행개선 관련 다양한 효능을 평가하고 효능을 극대화 할 수 있는 최적의 표준화된 추출공정을 통해 부작용이 없으며, 안전성 및 안정성이 입증된 건강기능식품을 개발하여 국내 원료의 고부가가치화로 농가소득을 증대시키고 관련 기업의 매출기여에 기여하고자 한다.

제 3 절 연구개발의 범위

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발의 범위
1차년도 (2012 ~2013)	곰취 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리	○ 자료조사를 통한 최적의 지표물질 설정 (quinic acid계 성분) ○ 선정된 지표물질의 추출조건별 함량비교 ○ 추출물로부터 항염활성을 가지는 물질탐색 ○ 혈행개선관련 효능을 갖는 기능성 성분의 분리 및 구조 규명
	제조공정 표준화	○ 최적의 유효성분 추출조건 확립 ○ 이를 통해 얻어진 유효성분 및 지표물질의 함량분석 ○ 추출 효율이 극대화 된 제조공정의 표준화
	혈행개선 관련 Biomaker 탐색 및 유효성분 분리를 위한 bio-assay guided 세포레벨 평가	○ Serotonin 측정 ○ Thromboxane A2(TxA2)측정 ○ 유효물질 탐색을 위한 세포레벨에서 전구지방세포의 분화최적시기의 지방량 대비 축적 억제 평가
2차년도 (2013 ~2014)	대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보	○ 최적 추출 조건에 따른 pilot scale 추출법 확립
	Pilot 추출물에 대한 validation	○ 분석법 검증(validation) - 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성등 분석
	안정성 평가 (I)	○ 장기보존 시험 수행 ○ 가속시험 및 가혹시험
	혈행개선 관련 혈전 및 혈액응고 형성 억제 활성 *in vitro* 유효성 평가	○ 혈소판 응집 억제 평가 ○ 혈액응고 억제 평가
	혈행개선 관련 혈중 중성지방 개선 *in vivo* 유효성 평가	○ 고중성지방혈증 동물 모델 제작 ○ 곰취 추출물의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 억제효능을 양성대조군인 정어리정제어유 (개별인정형 기능성 인정 원료, DHA EPA) 또는 오마코(오메가-3) 와 비교 평가
	추출물 및 화합물의 기능성 평가	○ 추출물 및 화합물의 종양세포주에 대한 효능평가 - 증식제어, 단백질 발현 억제, 세포신호전달기전, 세포부착제어효과 등 분석

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발의 범위
3차년도 (2014 ~2015)	안정성 평가 (Ⅱ)	○ 장기보존시험 ○ 시제품에 사용될 제형의 물리 화학적 장기보존 평가
	혈행개선 관련 혈전 및 혈액응고 형성 억제 활성 *in vivo* 유효성 평가	○ *In vivo* 내 혈액속 혈전(Arterial thrombosis) 억제 활성을 양성대조군인 정어리정제어유 (DHA EPA) 기능성 원료와 비교 평가 ○ 활성 유전자 탐색
	혈행개선 관련 혈중 중성지방 개선 *in vivo* 유효성 평가 2 및 작용기전 탐색	○ 양성대조군인 정어리정제어유 (DHA EPA) 또는 오마코(오메가-3)를 이용하여 곰취 추출물의 혈중중성지방 개선 유효성 평가 진행
	유효성분의 혈관신생 억제효능평가	○ 추출물의 독성평가 및 혈관신생 억제 효능평가 ○ 분리된 화합물의 폐암세포의 증식, 침윤억제 효능평가
	시제품 제작 및 생산	○ 인체적용시험에 사용될 시제품 제작
	IRB 승인 신청	○ 개별인정 획득을 위한 인체적용시험을 위한 IRB 승인 신청

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

1. 국내외 연구 및 시장동향

일본, 미국, 유럽 등에서의 식품산업 관련기술은 단순한 식량 확보 자원이 아닌 노화억제, 장수, 안전, 건강수명 연장 관련 식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들 식품개발을 위한 식품생명공학 기술 개발에 연구역량을 집중하고 있다.
건강기능식품 소재화 기술에 대한 해외 특허는 1991년부터 최근까지 총 4,456건이며 2000년대 초반 이후 매년 300건 이상 출원되는 것으로 보아 꾸준히 성장을 하는 추세이다.

가. 미국
미국식품과학회 (IFT)에 따르면 미국 기능성식품의 키워드는 아동, 파이토케미컬즈(phytochemicals), 50대 이상의 실버 세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐 제거, 자연친화 등이라고 보고하였다. 미국의 기능성식품 트렌드는 건강기능식품 품목의 다양화, 라이프 스타일을 향상시킬 수 있는 기능성식품의 소비, 스포츠 시장과의 연계 및 어린이 건강시장규모 확대, 성별, 연령 및 인종에 따른 기능성 식품의 차별화, 체중조절제품, 포만감지속/식욕저하 제품의 성장, 자연식품 의 선호 등으로 정리할 수 있다.

나. 일본
일본 기능성식품의 키워드는 피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 맨탈케어, 면역 등으로 정리할 수 있다. 초고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 이로 인해 일본의 건강기능식품에 대한 소비자 1인당 지출 비용은 전 세계에서 가장 높고, 건강유지와 질병의 예방 차원에서 건강 기능식품을 소비하고 있다.

다. 중국
중국 기능성 식품의 키워드는 급성장, 기능성 음료, 노인인구 증가, 질병 케어 등이다. 여성미용 관련, 신장병 및 당뇨병 예방, 수면 개선, 소화계통 개선 등의 기능성이 주요부분을 차지하고 있다. 중국의 특색 보건식품으로 약주, 중약성분이 함유된 영양보충제와 초목채출물 등이 왕성하게 발전 중이며, 주로 약주, 중약성분, 다이어트차, 인삼, 은행추출물 등이다.

라. 서유럽
서유럽 지역 기능성 식품의 키워드는 비만, 인터넷, 대체요법, 고품격 등으로 정리할 수 있다. 영국의 경우 3분의 1수준이 과체중이며, 20% 정도가 위험한 비만 수준으로 비만과 다이어트에 대한 관심이 급증하고 있으며, 독일의 경우 비타민과 무기질, 강장제 이외에 대체요법, 허브요법이 각광받고 있다. 스위스의 경우 '프리미엄 라인'이라는 이름으로 고급 식품이 대성공을 거두었으며, 주된 타깃은 유제품, 웰빙식품, 기능성식품 분야이다.

[국가별 기능성식품 키워드]

	기능성 식품 키워드
미국	파이토케미컬, 50대이상 실버세대, 유기농, 스포츠 연계, 저지방, 무설탕, 저인슐린, 글루텐제거, 자연친화
일본	피부미용, 실버세대, 관절, 음료, 대사증후군, 아이케어, 맨탈케어, 면역
중국	기능성 음료, 노인인구 증가, 질병케어
서유럽	비만, 인터넷, 대체요법

2. 국외 시장 동향

웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가, 가속화되는 고령화 등의 이유로 (현재 20% 이상의 유럽인구가 65세 이상이고, 2030년에는 30%를 넘을 것으로 예상) 기능성식품의 성장 잠재력은 높게 인식되어지고 있다. 건강기능식품의 분류기준에 따라 세계시장규모의 추정에는 차이가 있으며, 국내건강기능식품의 정의에 부합하는 제품의 생산실적을 비교하는데 어려움이 있으나 Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면 2010년 건강기능식품 세계시장 규모는 약 845억 달러로 추정되며, 세계건강기능식품 시장규모는 2009년 대비 802억 달러로 5.4%의 성장을 보이고 있다. 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 수준이며, 최근 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥 개발국이 잠재력이 높은 시장으로 경제성장과 함께 수요가 크게 증가하는 추세이다. 이러한 건강기능식품 시장의 높은 성장세는 '건강 지향적 소비자'의 증가에 따라 지속·확대 될 것으로 예상된다.
건강기능식품의 대표상품으로 이미 소비자들에게 깊게 인식된 비타민과 미네랄이 가장 큰 규모의 시장으로 2011년 36십억 달러이며 전년대비 5.3%의 성장률을 기록하였다. 또한 최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 체중 조절과 체력 향상을 돕는 Performance enhancers, Muscle builders, Weight gainers 등 건강 증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 스포츠 영양제 (Sports nutrition) 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록하였다.

가. 미국
칼슘, 무기질, 프로바이오틱스 제품, 비타민이 주류를 이루고 있으며, 노화에 따른 질병인 관절염, 골다공증 및 갱년기 등과 관련된 보조제 (칼슘, 글루코사민)의 소비가 증가하고 있다. 2008년 미국 기능성식품 시장은 전년 대비 8.8% 성장한 1,040억불로 집계되었으며, 소아비만, 체중과다, 성인병 등에 대한 경각심과 인구의 고령화 및 건강보험료에 대한 부담 등으로 인하여 질병의 예방에 대한 관심이 높아지고 있는 점 등을 미루어 볼 때 미국 기능성식품 시장은 향후에도 지속적으로 성장할 것이며, 이에 따라 미국은 2008년 대비 63.5% 성장한 1,700억 달러를 형성할 것으로 전망하고 있다 (Nutrition Business Journal).

나. 일본

단일국가로는 미국 다음으로 큰 시장을 형성하고 있는 일본 건강식품 시장은 건강식품에 대한 법규제 및 행정 감시 강화 (2004년 4월부터 2005년 6월 보건기능식품 관리제도와 법규를 재정비함), 부정 상법 적발 등에 의한 소비자 심리의 악화 등으로 2006년부터 2009년까지 4년 연속 하락을 지속하다 2010년에는 고령화 사회의 확대, 경제 환경의 악화로 인한 의료, 복지, 건강정책 불안, 건강식품에 대한 소비자의 기대치 상승 등의 원인으로 전년 대비 6.0% 성장을 하며 1조 1800억엔(약 146억불) 시장을 형성하였다. 미용, 관절이 시장의 키워드로 자리매김하면서 콜라겐, 히알루론산, 글루코사민 등의 인기가 특히 높아지고 있다(Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012).

다. 중국

노령 소비자들은 중국 전통 의약품을 더 선호하며, 한방/한의학에 대한 오랜 전통, 명절용 선물로 보건기능식품을 주고받는 것이 일상화되어있다. 비타민, 글루코사민, 오메가3 등 전 세계 기능식품 원료의 절반이상이 중국에서 생산, 관련사업의 규모가 크다. 대다수 다국적 기업이 중국에 지사를 설립, 현재 가장 역동적인 모습을 보이고 있다.

라. 독일

프로바이오틱 음료수, 프로바이오틱 요구르트, 소화 촉진기능 식품, 콜레스테롤 수치를 낮춰주는 바이오 식품이 가장 많이 팔리고 있으며, 주요 소비자는 웰빙 및 건강을 중시하는 젊은 중산층이 대다수이다.

마. 영국

포장에 '자연'을 강조한 제품이 주류를 이루며, 아침식사 대용의 시리얼, 요거트, 유산균음료, 저지방 마가린 등에 주로 함유된다. 질병 및 건강 악화에 대한 소비자들의 걱정이 과다 약물복용대신 기능성 식품으로 건강을 유지하는 방향으로 향하고 있다.

바. 대만

정부의 규제가 최소화되어 업체 간의 자유경쟁환경이 이루어지고 있다. 전통적으로 일본제품에 대해 절대적으로 선호하는 경향이 있으며, 일본에서 유행한 제품은 대만에서도 유행한다. 소비자 요구가 까다로워 세계 유명 브랜드들의 테스트마켓 기능을 할 정도로 경쟁이 치열하다. 미용·편의용품 전문 유통업체 COSMED(康是美)의 분석에 따르면 현지 소비자들은 불경기로 인한 피로회복 관련 간기능 개선 제품을 선호한다.

3. 국내 연구동향

건강기능식품 관련 논문들은 주로 의학, 농학, 생물학 분야로 논문들이 발표되며, 의약 관련 학문인 약리학, 독성학, 생화학 분야의 논문도 많이 발표되는 것으로 보아 건강기능식품 연구는 질병과 그 관련 기능에 초점을 맞추어 연구가 이루어지고 있다.

건강기능식품 관련 논문 중 피인용이 가장 많이 된 논문은 식이섭취와 에너지 소비와 관련된 기전을 통해 비만을 규명한것과 관련된 것이며, 대부분의 논문들은 동물실험용 설치류 식이구성, 유

전적 차이에 따른 식이의 관련성, 건강기능식품의 인체시험 관련 논문이 주를 이루고 있다. 우리나라 저자가 참여하여 발표한 논문은 1992년부터 최근까지 총 2,136편으로 1990년대 중반부터 본격적으로 시작되어 2006년 이후부터는 급격히 증가하여 논문이 발표되고 있으며, 국내 건강기능식품 관련 피인용이 가장 많이 된 논문은 비만 예방 관련 기전과 관련된 논문으로 피인용 해외논문 역시 비만과 관련된 논문이었던 것으로 보아 유사한 양상을 가진다. 또한 비만 및 당뇨병과 관련된 기전 연구 및 항산화관련 논문들이 피인용되고 있다.
건강기능식품 소재화 기술과 관련된 국내특허는 152건으로 조사되었으며, 주로 기능성에 따른 영양소의 처리방법 등에 대한 내용이 있으며 바이오 관련 기업과 연구원에서 특허를 보유하고 있다(BT 기술동향 보고서, 2012). 1990년대에는 관련 특허가 미미하다가 2000년대 초반 이후 관련 특허가 빠르게 증가하는 양상을 보이며 이는 해외 특허연도별 출원 동향과 유사한 양상을 보이고 있다. 국내건강기능식품 소재화 기술 관련하여 주요하게 활동하고 있는 기관은 Digital Biotech사로 5개의 특허를 보유하였고, 이외에도 RNL Bio사, 한국한의학연구원, Lifetree Bio등 국내 바이오 관련기업에서 특허보유가 두드러지고 있다.

4. 국내 시장동향

식품의약품안전처가 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년 (1조 4,091억원)에 비해 5% 증가하였다. 2013년도의 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 개별인정형제품 (전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품 (전년대비 55% 증가)이 주도하고 있다. 2013년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억원으로 조사되어, 2009년 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있다. 수출은 754억원으로 2012년 (584억원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억원으로 2012년 (3,532억원)보다 9% 증가하였다.
홍삼제품은 5,869억원으로 전체 (1조 4,820억원)의 40%를 차지하여 여전히 가장 높은 점유율을 보였으나, 그 규모는 2011년 이후 지속적으로 감소하고 있다. 홍삼 다음으로는 ▲개별인정형 16%(2,324억원) ▲비타민·무기질 12%(1,747억원) ▲프로바이오틱스 5% (804억원) ▲알로에 4% (628억원) 제품 순으로 나타났다.
생산액 상위 10개 품목 중 2012년 대비 생산이 급증한 제품으로는 밀크씨슬추출물 제품이 128% (135억원→308억원)로 가장 높았고, 프로바이오틱스 제품 55% (518억원→804억원), 개별인정형 제품29% (1,807억원→2,324억원) 순이었다.
기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순이었다.
2013년도 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 2012년 1,807억원에 비해 29% 증가하였으며, 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30% (704억원)를 차지하여 가장 많았다.

5. 기술개발 현황

○ 해외에서는 비만 대사증후군 심혈관계 질환 관련 기술 동향은 유전자 정보를 활용하는 생명공학의 첨단 기술을 식품 분야와 연관시켜 식품 과 인간유전체간 관련성 영양관련 질병 제어 및 맞춤형 처방 분야로 응용하는 연구가 핵심 연구 분야로 부상 중임

○ 혈관계 질환의 연구가 활발히 진행되고 있는데 심혈관 질환과 관련 대사증후군 및 혈행 연구는 주로 독일 프랑스 벨기에 등의 유럽지역과 미국이 연구를 주도하여 왔으며 일본도 많은 성과를 보임

○ 미국의 Hua Cai 연구팀은 혈관의 산화적 스트레스가 비만 및 대사증후군에 미치는 역할 을 발표하였으며, 결론적으로 혈관의 산화적 스트레스는 비만과 대사증후군을 동반하며 혈관 염증과 지방합성에도 관여 한다 라고 보고 하였음 이 논문은 2014년 국제저명학술지 Diabetes에 게재됨

○ 미국 Swapan KµMar Dasgupta와 PerµMal Thiagarajan D 박사팀의 연구보고에 의하면 MFG-E8은 당단백질의 세포성장인자로서 유방 상피조직 표면을 포함한 여러 조직의 세포막에 위치하며 각종 조직의 전반에 걸쳐 다양하게 분포하는데 조직생성, 신생혈관 형성, 회복 등 의생리학적 기능이 있다 이외에도 혈액응고 및 지혈에도 관여하는 것으로 최근 보고됨

○ 독일의 안드레아스 자이오 그룹을 중심으로 약 1000명 이상의 대규모 심혈관계 질환 관련 임상연구을 계획하고 있음 또한 프랑스 필립 메나쉬 박사 연구팀은 2000년 초반부터 심혈관계 질환 관련 임상연구를 실시 중임

○ 일본은 청부차원에서 비만 당뇨병 심혈관계 질환을 포함한 생활습관병의 연구개발을 지원하고 있으며 2011년에는 그 지원액이 34억 엔이었다 따라서 대사증후군 가족의 genome 해석 및 exon 시퀀스를 통한 유전자 연구 및 신규 바이오 마커 도출 연구가 진행 중임.

○ JPPP 연구에 따르면 일본 고령자에서 저용량 아스피린에 의한 심혈관 질환 예방 효과는 없고 오히려 출혈 위험만 증가함 또한 고혈압이나 고지혈증 등의 위험인자가 있는 60세 이상 노인을 대상으로 한 대규모 연구 결과 저용량 아스피린군에서 아스피린 비복용군에 비해 심혈관으로 인한 사망률과 비치명적인 심근경색 및 뇌졸중 위험이 감소하지 않았음

6. 문제점 및 발전방향

현재 식약처에서 인정하고 있는 건강기능식품의 기능성 내용은 32가지로 다음 표와 같다. (2015. 1월 기준) 하지만 다른 나라의 경우 매우 세분화된 기능성 내용을 제시하고 있다. 유럽의 경우를 예를 들면 기억력 개선에 관한 영역에서도 정상적인 인지기능의 유지, 인지 기능의 향상, 신경계 기능 향상, 주의력 향상, 정신에너지 향상 등으로 기능성의 내용(claim)을 구체적으로 제시하고 있다. 2014년 9월 30일에 이루어진 건강기능식품에 관한 법률 입법예고에 의하면 기존 기능성의 범위가 영양소 조절, 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과에 한정지어졌다면, 질병의 치료 또는 예방 기능 등 성행위와 관련된 기능 이외에는 기능성을 인정하는 것으로 개정안이 발의되었다. 즉 기 인정된 32개의 기능성 이외에 다양한 기능성이 인정 가능하다는 것이다. 따라서 원료의 기능성의 내용을 구체화하여 정확한 정보를 제공하고 소비자들이 맞춤형으로 필요에 맞게 선택할 수 있도록 해야 할 것이다.

또한 성별, 연령별, 직업별 등 다양한 소비자의 욕구에 맞는 기능성 영역 및 내용을 설정하는 방향으로 나아감을 통해 시장을 확대할 수 있을 것이다. 또한 세계 진출을 위하여 세계 시장의 흐름을 파악하고 각국의 문화에 맞춘 다양한 기능성 영역을 개척해나가야 할 것이다.

[건강기능식품 기능성 내용]

번호	영역	기능성 내용
1	간 건강	간 건강에 도움
		알콜성 손상으로부터 간을 보호하는 데 도움
2	갱년기 여성 건강	갱년기 여성의 건강에 도움
3	관절/뼈 건강	관절 건강에 도움
		뼈 건강에 도움
4	기억력 개선	기억력 개선에 도움
5	긴장 완화	스트레스로 인한 긴장 완화에 도움
6	눈 건강	눈의 피로도 개선에 도움
		황반색소밀도를 유지하여 눈 건강에 도움
7	면역 기능	면역력 증진에 도움
		면역과민반응개선에 도움
8	위건강/소화 기능	소화기능 개선에 도움/위점막을 보호하여 위건강에 도움
9	배뇨기능	방광에 의한 배뇨기능 개선에 도움
10	요로 건강	요로의 유해균 흡착 억제로 요로건강에 도움을 줄 수 있음
11	운동수행능력	운동능력 향상에 도움
		지구력 증진에 도움
12	인지능력 개선	인지능력 개선에 도움
13	장건강	장내 유익균 증식 및 유해균 억제에 도움
		면역을 조절하여 장 건강에 도움
		배변활동 원활에 도움
14	전립선 건강	전립선 건강 유지에 도움
15	체지방 감소	체지방 감소에 도움
16	치아 건강	충치발생위험 감소에 도움
17	칼슘 흡수	칼슘 흡수에 도움
18	혈중 콜레스테롤 개선	혈중 콜레스테롤 개선에 도움
19	피로 개선	피로 개선에 도움
20	피부 건강	자외선에 의한 피부손상으로부터 피부 건강을 유지하는데 도움
		피부 보습에 도움
21	항산화	항산화에 도움
22	혈당 조절	식후 혈당상승 억제에 도움
23	혈압 조절	높은 혈압 감소에 도움
24	혈중 중성지방 개선	혈중중성지방 개선에 도움
25	혈행 개선	혈행 개선에 도움
26	과민피부상태 개선	면역과민반응에 의한 피부 상태 개선에 도움
26	갱년기 남성 건강	갱년기 남성의 건강에 도움
28	월경전 불편감 개선	
29	정자 운동성 개선	
30	유산균 증식을 통한 여성 질 건강	
31	어린이 키성장 개선	
32	수면의 질 개선	

출처: 식품의약안전처

7. 향후 전망

만성퇴행성질환 및 신종 질병예방에 대한 욕구 증대와 국제적 시장 개방으로 건강기능식품산업 시장 규모는 앞으로도 꾸준히 성장할 것이다. 또한 BT산업의 확대 발전으로 건강기능성 식품산업은 성장 잠재력이 매우 높은 산업으로 전망된다. 과거 표준화된 제품과 단순한 건강관리 차원에서의 건강기능식품을 넘어 피부미용 및 개선, 노화 방지에 이르기까지 각 연령별 특성에 맞는 다양화된 제품을 생산하는 형태로 변화할 전망이다. 또한 최근 삶의 질 개선을 추구하는 소비자의 다양한 욕구에 발맞춰 기능성 원료 인정이 활발해질 것이다. 과거엔 단일 기능성 성분의 제품이 주를 이루었다면, 앞으로는 두 가지 이상의 기능성 역할을 할 수 있는 제품이 등장할 것으로 기대된다. 홍삼, 알로에 등 단일제품 중심에서 벗어난 시장의 확대, 식품업계의 진출과 더불어 다이어트 제품 및 야채 섭취 보조제품 등 다양한 건강기능식품이 등장하는 등 패러다임이 변화하고 있다.

세계의 건강기능식품의 규제 및 정의는 국가마다 조금씩 다르게 적용하고 있으므로 이에 따라 각국의 문화에 맞춘 세계진출과 다양한 건강기능식품 개발이 필요하다. 예를 들면 미국의 경우 스포츠 영양제가 수년간 건강기능식품 시장에서 중요한 범주로 자리 잡고 있었으나, 유럽의 많은 선진국은 최근에 와서야 새롭고 중요한 범주로 생각하고 있다. 또한 단백질의 경우 미국(71%)과 스웨덴(69%), 러시아(64%)에서 선호도가 높은 것으로 나타났으며, 많은 여성과 고령의 유럽인들은 근육량을 유지하기 위해 단백질 건강기능식품에 많은 관심을 보이고 있다. 이에 따라 건강기능식품의 세계시장 진출을 위해 국가별로 상이한 시장현황과 성장 가능성이 있는 건강기능식품을 심도 있게 분석할 필요가 있다. 또한 무엇보다 국가 입장에서 공통의 관심사인 안전과 품질을 강화해야 한다. 또한 제조업체들도 우수 건강기능식품제조기준(GMP)을 따라 GMP의 필요성에 대해 인지하고 실천이 중요하게 되었다.

우리나라는 전통적인 천연물을 바탕으로 한 신소재 물질개발 및 제품화로 세계시장에서 우수한 경쟁력을 확보할 수 있는 위치에 있다. 하지만 아직까지도 국내 자체개발 건강기능식품원료는 30% 내외이다. 무엇보다 세계경쟁력 있는 국내 자체개발 기능성원료 확대가 필요하며 이에 대한 국가지원정책을 비롯한 각계의 노력이 필요하다. 최근 백수오 사건을 통해 건강기능식품에 대해 다시 질문을 던지고 있다. 무엇보다 기능성 원료의 원재료 관리, 안정적 원료 확보를 위한 제도와 국가적 지원이 필요하며 동시에 효능에 대한 과학적 경쟁력을 갖추는 일이 더욱 절실한 때이다. 잘 갖춰진 제도적, 과학적 인프라야말로 우리 건강기능식품의 안전성과 기능성을 확실히 인정받을 수 있는 초석이 될 것이다.

제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 곰취 추출물의 성분연구

1. 곰취 추출조건 확립 및 지표물질의 함량비교

- 적절한 추출조건 획립을 위해 건조한 곰취 500 g씩을 취하여 에탄올 농도별 추출하였다. HPLC 분석을 바탕으로 50% EtOH 와 70% EtOH 용매비율에서 지표물질의 함량이 높게 측정되었으며 항산화 효능평가와 추출수율 등을 고려하여 최종적으로 50% EtOH 추출을 최적의 추출용매로 선정함.
- 활성시험에서 30%, 50% 추출물의 항산화 활성이 가장 우수하였으며 추출 수율은 표 2. 와 같이 50% 추출물이 가장 높았다. 따라서 본 연구과제에서는 50% EtOH로 최종 농도를 선정함.

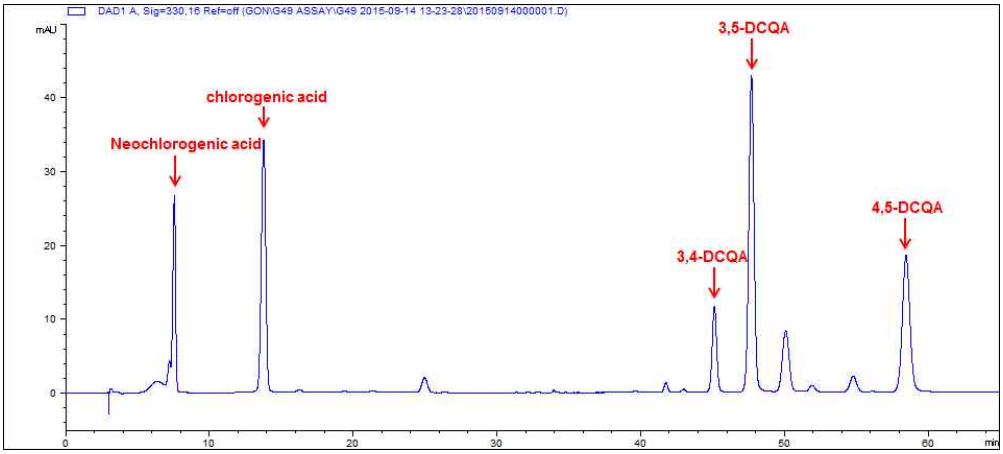


그림 1. 곰취 지표물질(standard)의 HPLC chromatogram

표 1. EtOH 농도별 추출물의 함량비교

	0% EtOH	30% EtOH	50% EtOH	70% EtOH	100% EtOH
추출물 수율	5.18%	5.62%	**5.84%**	4.69%	2.04%

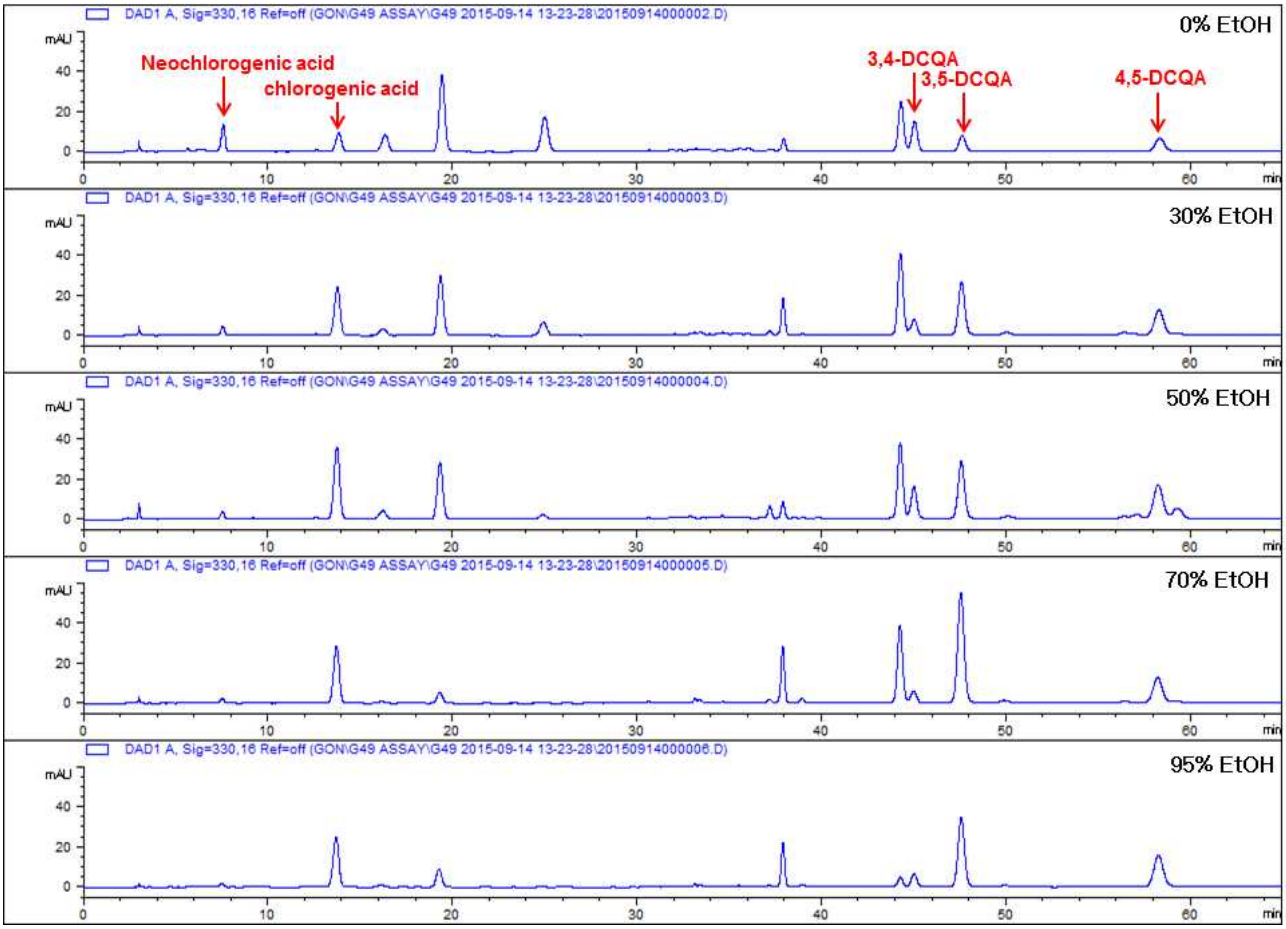


그림 2. 용매농도별 곰취 추출물의 HPLC chromatogram

표 2. EtOH 농도별 주요성분의 함량비교

Compound	0% EtOH	30% EtOH	50% EtOH	70% EtOH	100% EtOH
Chlorogenic acid	0.74%	1.92%	2.42%	2.12%	1.71%
Neochlorogenic acid	1.08%	0.34%	0.25%	0.17%	0.12%
Isochlorogenic acid A (3,5-DCQA)	0.68%	2.30%	2.08%	4.50%	2.59%
Isochlorogenic acid B (3,4-DCQA)	1.05%	0.43%	0.90%	0.33%	0.42%
Isochlorogenic acid C (4,5-DCQA)	0.79%	1.47%	1.51%	1.37%	1.65%

2. 지역별 곰취 추출물의 지표물질 함량비교

- 지역별로 생산되는 곰취의 지표성분의 함량을 비교하기 위해 강원도 5곳 (태백, 정선, 양구, 평창, 인제)을 선정하여 추출을 진행하였다. 추출물의 지표성분의 함량 비교결과 인제산 곰취 추출물의 함량이 다른 곳에 비해 높게 측정되었다. 따라서 활성시험 및 연구진행을 위한 추

출물은 인제산 곰취 50%추출물로 진행함.

- 농가에서 판매되고 있는 건조시료는 blanching(데침) 공정 후 건조시킨 것으로 각 농가별 blanching 시간 및 염분 첨가 등 조건이 상이하고 blanching 작업 후 손실되는 성분들이 시료에 다시 흡수되어 성분 함량의 변이가 심하여 지역별 비교는 큰 의미가 없으며 향후, 원료 표준화가 어려울 것으로 판단됨.
- 주요 성분의 함량이 가장 높았던 인제산 곰취를 대상으로 하우스, 노지, 산지 등의 재배지별 지표성분의 함량 비교에서 면적값으로 비교했을 때 재배지별 큰 차이를 나태내지는 않음.
- 또한 인제산 곰취의 잎, 줄기 추출물을 비교해 본 결과(표 5), 줄기는 전체적으로 구성성분의 함량이 낮아 향후 산업화시에는 줄기부분을 제거 후 이용하는 것이 바람직할 것으로 사료됨.
- 곰취는 일반적으로 장기간 보관할 때 생산지에서는 주로 blanching 과정을 거친다. 따라서 blanching의 과정 후 지표성분들의 변화를 분석함. 실험 결과 blanching 작업을 한 곰취에서 주요성분들의 함량이 급격히 감소한 것으로 나타났다. 또한, blenching한 후 손실된 성분들이 곰취시료에 혼합되어 함량의 변화가 심해 질 수 있어 표준화하기에는 어려움.

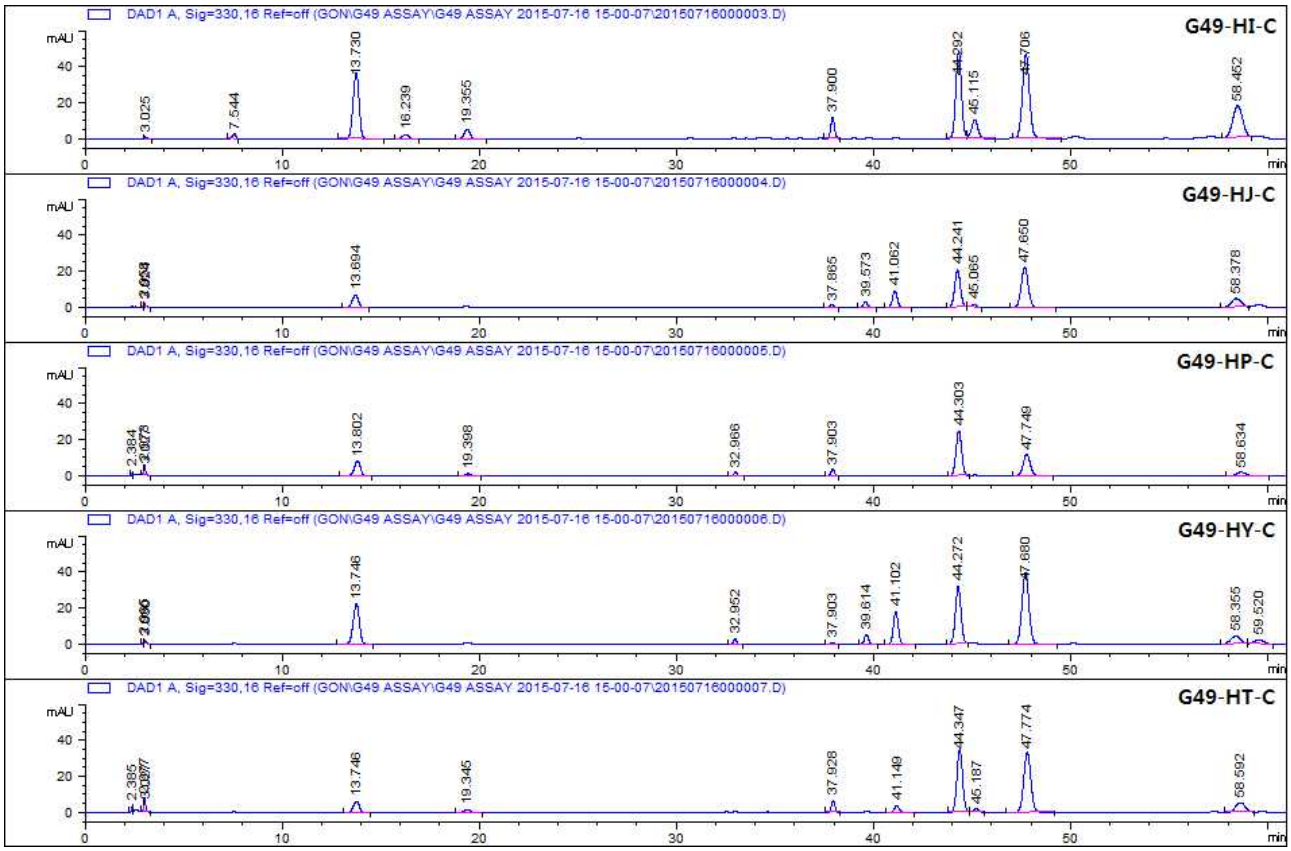


그림 3. 지역별 50% EtOH 추출물의 HPLC chromatogram (G49-HI-C: 인제, G49-HJ-C: 정선, G49-HP-C: 평창, G49-HY-C: 양구, G49-HT-C: 태백)

표 3. 지역별 50% EtOH 추출물의 지표성분 함량비교

Compound	**G49-HI-C**	G49-HJ-C	G49-HP-C	G49-HY-C	G49-HT-C
Chlorogenic acid	**2.376%**	0.455%	0.515%	1.391%	0.391%
Neochlorogenic acid	**0.148%**	0.020%	0.004%	0.034%	0.021%
Isochlorogenic acid A	**2.755%**	1.358%	0.689%	2.236%	1.916%
Isochlorogenic acid B	**0.532%**	0.062%	0.014%	0.021%	0.096%
Isochlorogenic acid C	**1.543%**	0.413%	0.174%	0.357%	0.444%

표 4. 재배지별 곰취 추출물의 지표성분 분석

(Area)

Compound	하우스	노지	산지
Chlorogenic acid	4172.5	9252.4	9164.2
Neochlorogenic acid	-	-	-
Isochlorogenic acid A	18893.1	27112.9	20429.8
Isochlorogenic acid B	16192.4	16272.3	13195.9
Isochlorogenic acid C	2262.5	4514.7	6469.2

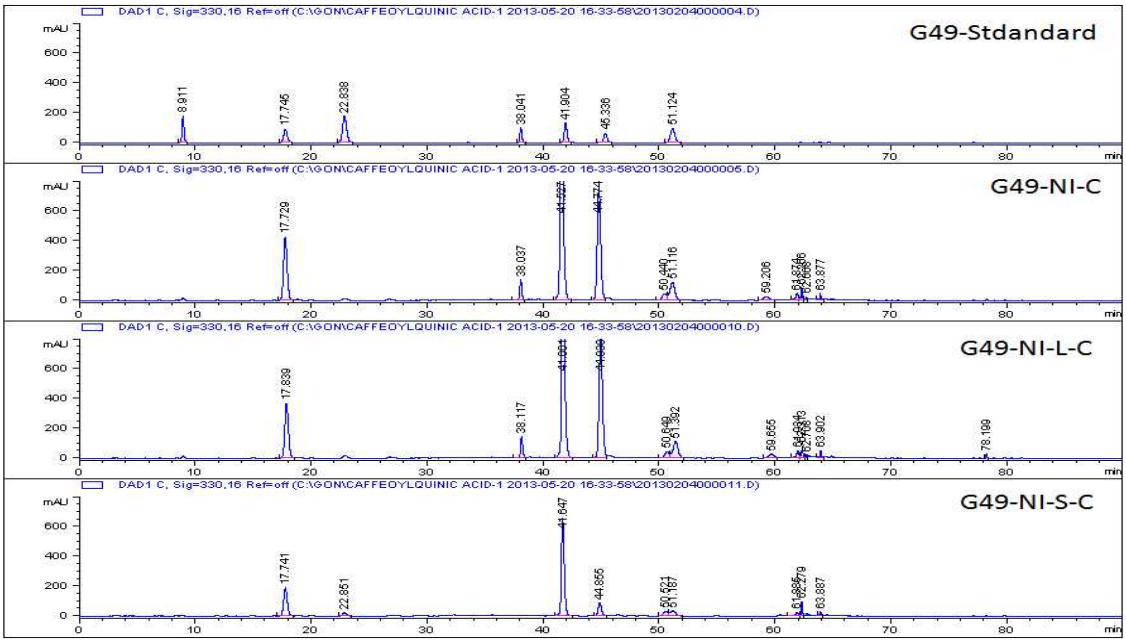


그림 4. 인제산 곰취 부위별 추출물 HPLC chromatogram (G49-NI-C: 인제산 곰취 추출물, G49-NI-L-C: 인제산 곰취 잎 추출물, G49-NI-S-C: 인제산 곰취 줄기 추출물)

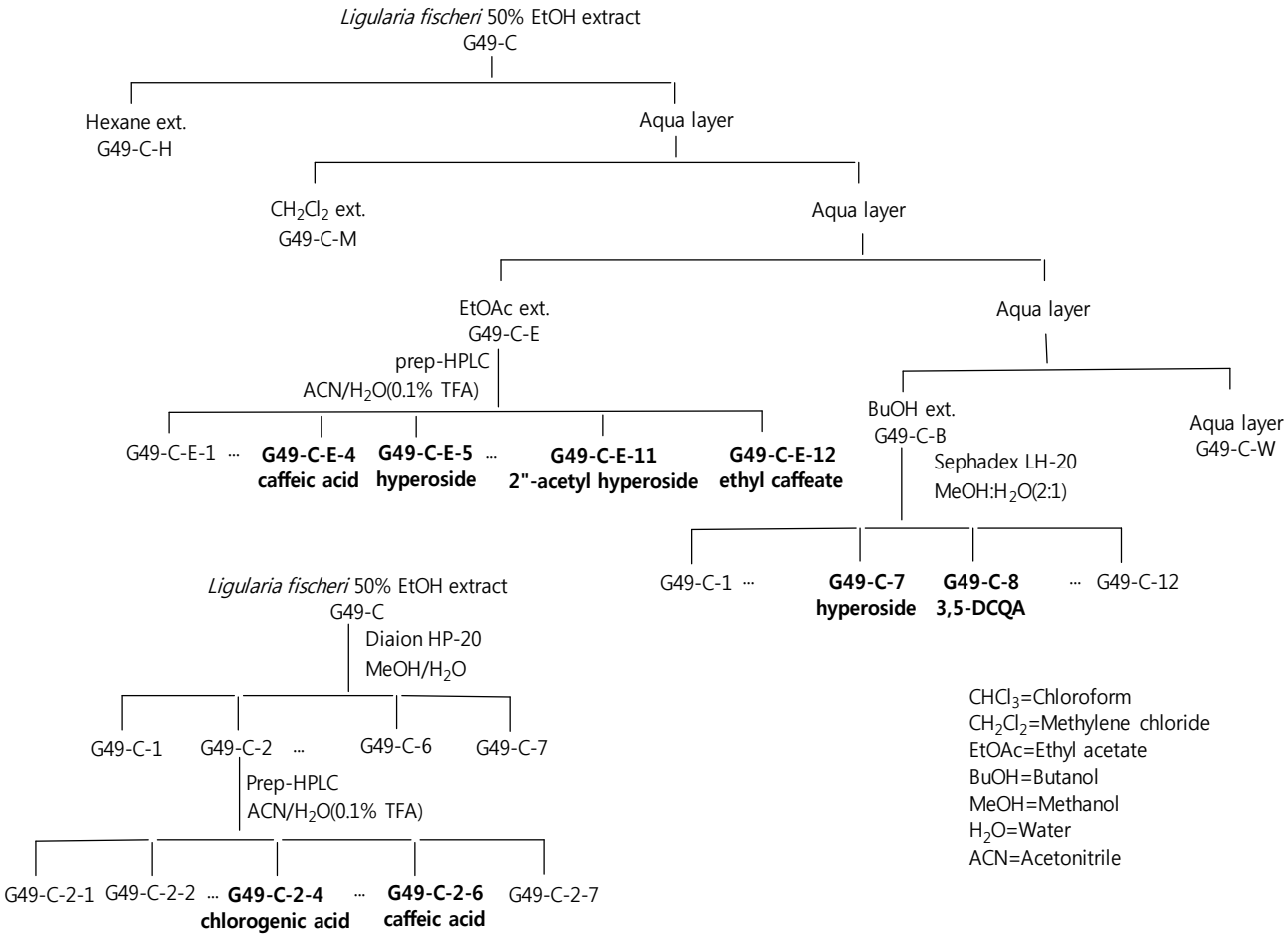
표 5. 인제산 곰취 추출물과 부위별에 따른 함량 비교

Compound	G49-NI-C	G49-NI-L-C	G49-NI-S-C
Chlorogenic acid	6.29%	5.53%	2.26%
Neochlorogenic acid	-	-	-
Isochlorogenic acid A	15.45%	16.79%	1.32%
Isochlorogenic acid B	16.96%	16.15%	5.76%
Isochlorogenic acid C	2.50%	2.45%	0.92%

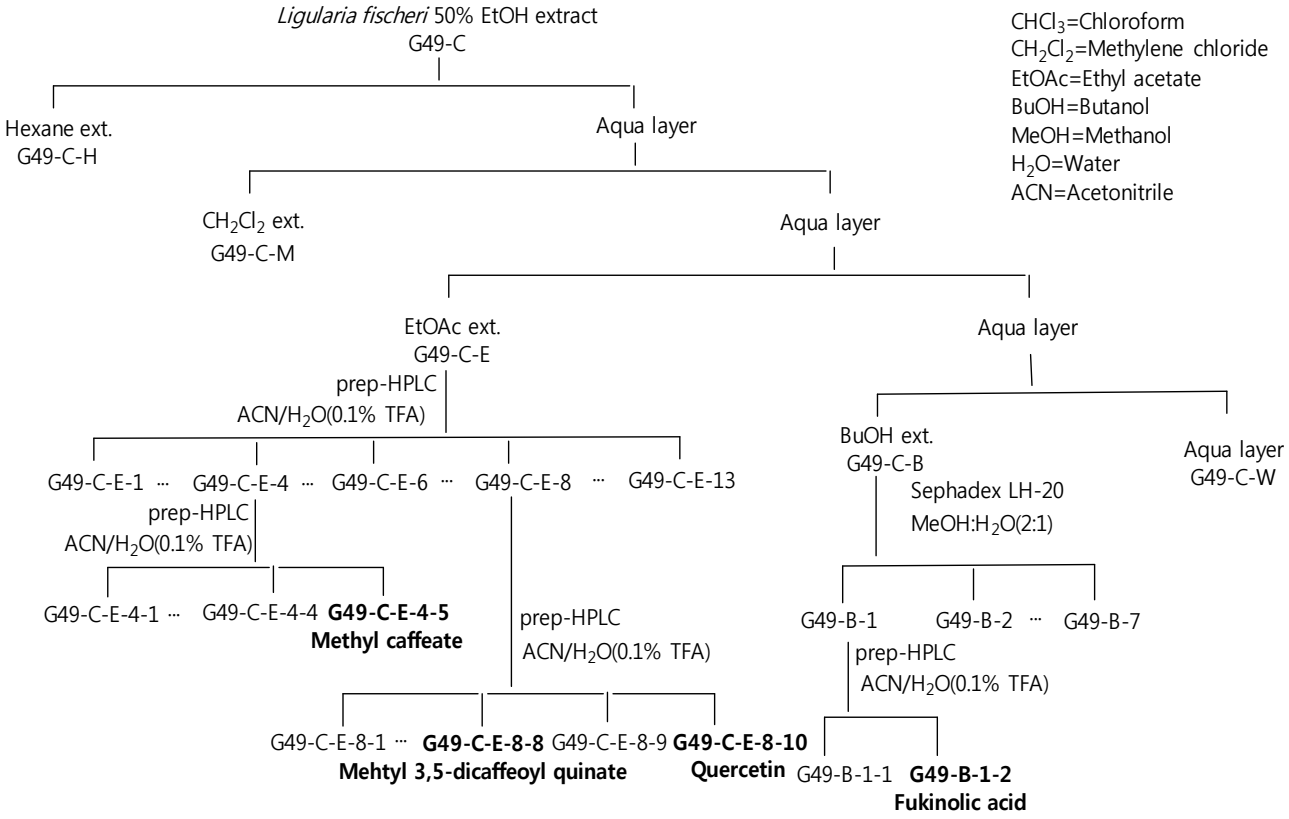
3. 곰취의 추출물로부터 활성 물질의 분리 및 구조규명

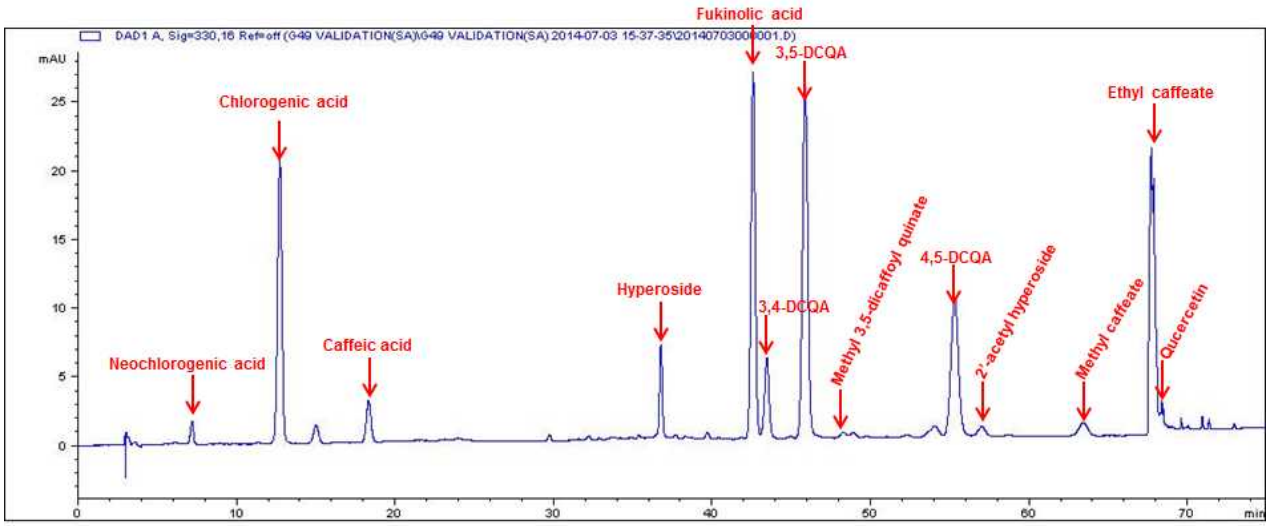
가. 곰취 에탄올 추출물, 용매 분획물 제조 및 유효성분의 분리 • 정제

- 곰취에 50% 에탄올을 가하고 24시간 실온에서 추출하였다. 추출액을 감압상태에서 농축시켜 에탄올 추출물(G49-C)을 얻었음. 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획하였음.
- 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고, 에탄올(G49-C), 에틸아세테이트 (G49-C-E)와 부탄올(G46-C-B) 추출물은 칼럼 크로마토그래프를 실시하였음.
- 각각의 소분획물에 대하여 prep-HPLC를 실행하여 순수 화합물을 얻었음 (도식 1,2)



도식 1. 활성물질 isolation scheme.





도식 2. 화합물의 분리도 및 HPLC 크로마토그램

나. 분광학적 분석 data를 통한 분리정제 단일화합물의 구조 규명

- 본 연구소에 구축된 700 MHz NMR (cryo probe)을 이용하여 분석한 NMR data (^{1}H-, ^{13}C-NMR, 1H-1H COSY, HSQC, HMBC)를 통한 proton과 carbon의 connectivity에 대한 정보 및 mass data를 이용한 molecular formula의 확인.
- 결정된 구조에 대한 data를 기존 문헌과 비교 확인.

(1) Identification of hyperoside

• ^{1}H NMR (700 MHz, Acetone-d_6) δ: 7.57 (1H, dd, J = 9.0 and 2.0 Hz, H-6′), 7.99 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2′), 6.93 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5′), 6.51 (1H, s, H-8), 6.26 (1H, s, H-6), 5.17 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1″), 3.49 ~ 3.94 (6H, m, H-2″~6″). ^{13}C NMR (176 MHz, Acetone-d_6) δ:157.3 (C-2), 134.4 (C-3), 178.1 (C-4), 161.3 (C-5), 98.8 (C-6), 164.6 (C-7), 93.8 (C-8), 156.9 (C-9), 104.2 (C-10), 121.3 (C-1′), 115.1 (C-2′), 144.4 (C-3′), 148.7 (C-4′), 116.9 (C-5′), 121.5 (C-6′), 103.9 (C1″), 71.7 (C-2″), 73.5 (C-3″), 68.0 (C-4″), 75.5 (C-5″), 60.1 (C-6″). ESI-MS, m/z: 465 $[M-H]^{+}$. Compared with the ^{1}H NMR spectrμM of hyperoside, an additional singlet at δ 6.85 ppm (2H) and a remarkable downfield shift of the galactoses´ 2″-H (dd, δ 5.12 ppm) and the anomeric 1″-H (d, δ 5.30 ppm), indicating acylation at C-2″, were bserved.

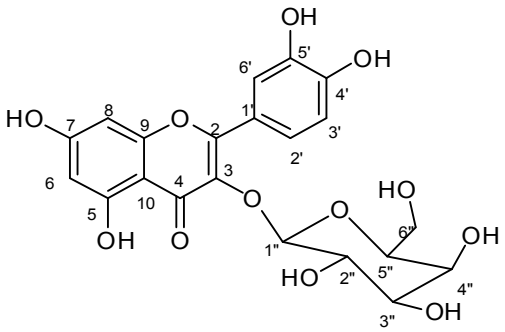


그림 5. Hyperoside의 구조

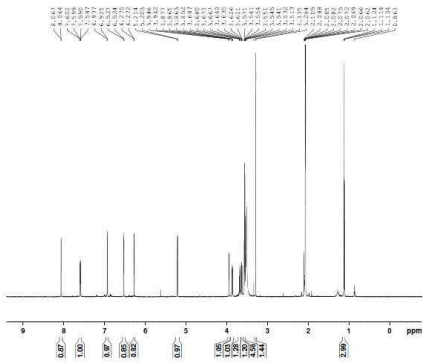


그림 6. ^{1}H-NMR spectrμM

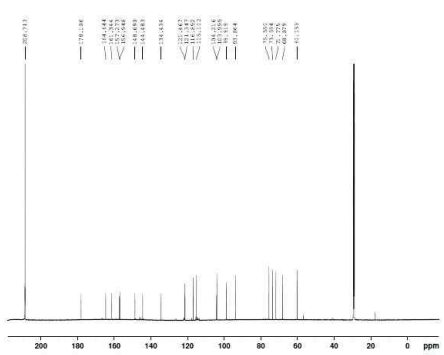


그림 7. ^{13}C-NMR spectrμM

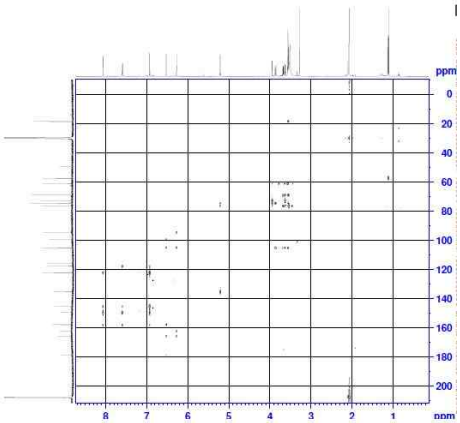


그림 8. HMBC NMR spectrμM

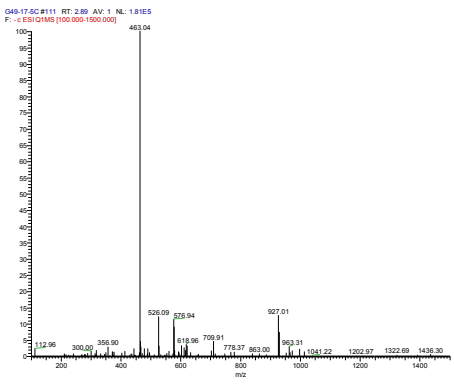
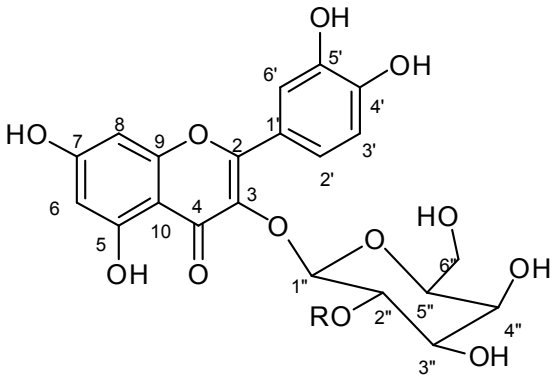


그림 9. Mass spectrμM

(2) Identification of 2″-acetyl hyperoside

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.71 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2′),7.57 (1H, dd, J = 8.4 and 2.1 Hz, H-6′), 6.99 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5′), 6.40 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-6), 5.43 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1″), 5.31 (1H, dd, J = 8.4 and 9.8 Hz,H-2″), 3.91 (1H, br d, J = 2.8 Hz, H-4″), 3.74 (1H, dd, J = 3.5 and 14.0 Hz, H-3″), 3.66 (1H, dd, J = 6.3 and 11.2 Hz, H-6″a), 3.60 (1H, dd, J = 6.3 and 11.2 Hz, H-6″b), 3.52 (1H, m, H-5″), 2.16 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ:157.0 (C-2), 133.8 (C-3), 177.9 (C-4), 161.7 (C-5), 98.3 (C-6), 164.4 (C-7), 93.1 (C-8), 156.9 (C-9), 104.4 (C-10), 121.5 (C-1′), 114.7 (C-2′), 144.5 (C-3′), 148.4 (C-4′), 115.9 (C-5′), 121.6 (C-6′), 100.3 (C1″), 72.7 (C-2″), 71.6 (C-3″), 68.8 (C-4″), 75.8 (C-5″), 60.4 (C-6″), 19.8 (CH_3CO), 171.2 (CH_3CO). ESI-MS, m/z: 505.03 $[M-H]^+$.



R = acetyl

그림 10. 2″-acetyl hyperoside의 구조

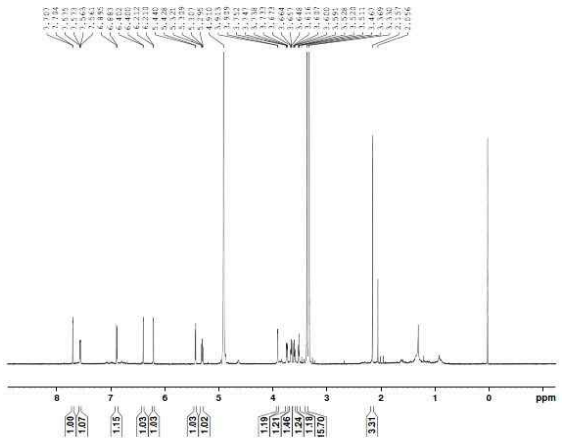


그림 11. ^{1}H-NMR spectrμM

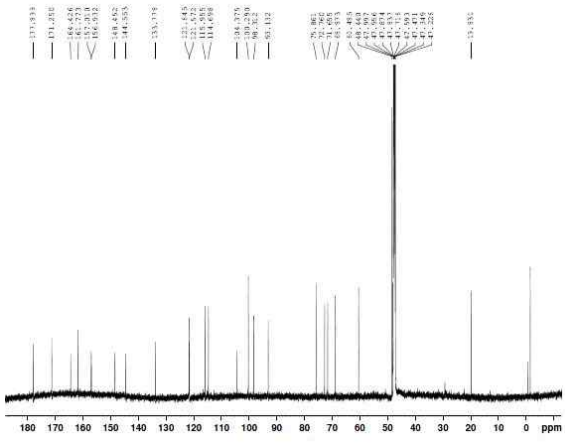


그림 12. ^{13}C-NMR spectrμM

(3) Identification of caffeic acid

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.55 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.05 (1H, br s, H-2), 6.95 (1H, br d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.24 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ:126.4 (C-1), 113.6 (C-2), 145.4 (C-3), 148.1 (C-4), 115.1 (C-5), 121.4 (C-6), 145.6 (C-7), 114.1 (C-8), 169.6 (C-9).

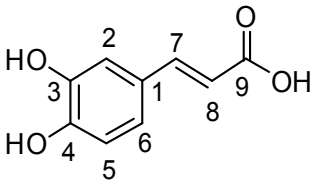


그림 13. Caffeic acid의 구조

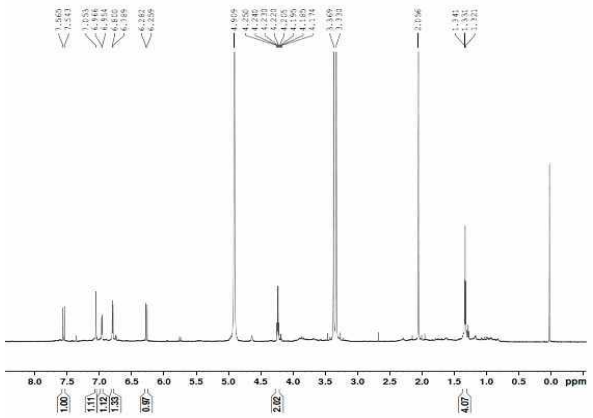


그림 14. ^{1}H-NMR spectrμM

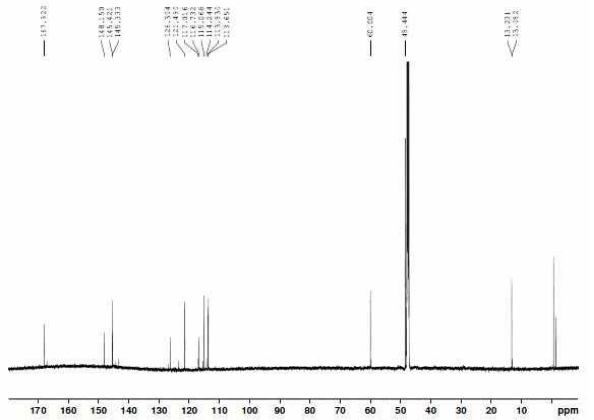


그림 15. ^{13}C-NMR spectrμM

(4) Identification of caffeic acid ethyl ester

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) : δ 7.55 (1H, d, J=16.0 Hz, H-7), 7.05 (1H, d, J=2. 1Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, J=2.1, 8.2Hz, H-6), 6.96 (1H, d ,J=8.4Hz, H-5), 6.27 (1H, d, J=16.0Hz, H-8), 4.23 (2H, q, J=7.0Hz, H-10), 1.33 (3H, t ,J=7.0Hz, H-11). ^{13}C NMR (176MHz, MeOH-d_4) δ 167.9 (C, C-9), 148.1 (C, C-4), 145.4 (C, C-3), 145.3 (CH, C-7), 126.3 (C, C-1), 121.4 (CH, C-6), 115.0 (CH, C-5), 113.6 (CH, C-8), 113.3 (CH, C-2), 60.0 (CH_2, C-10), 13.2 (CH_3, C-11). (-)-ESIMS m/z : 207.07 $[M-H]^-$

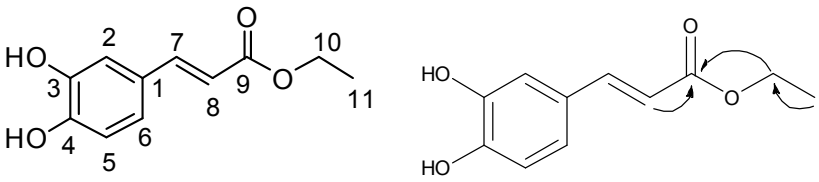


그림 16. Caffeic acid ethyl ester의 구조 및 HMBC correlation

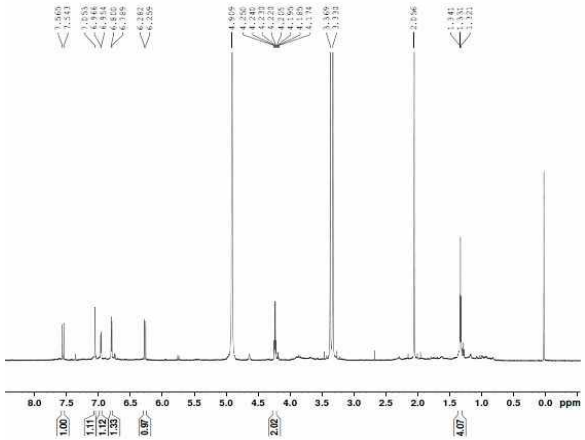


그림 17. ^{1}H-NMR spectrμM

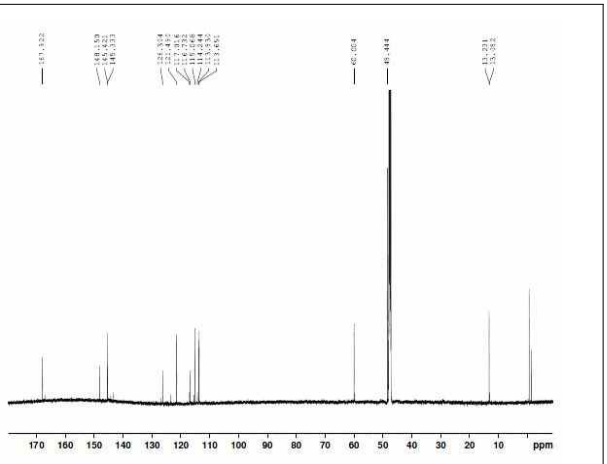


그림 18. ^{13}C-NMR spectrμM

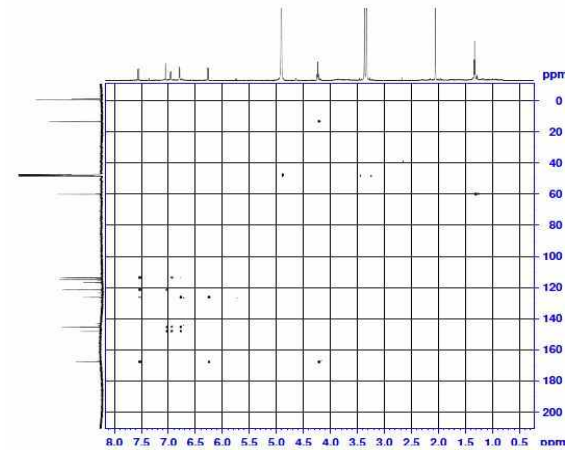


그림 19. HMBC NMR spectrμM

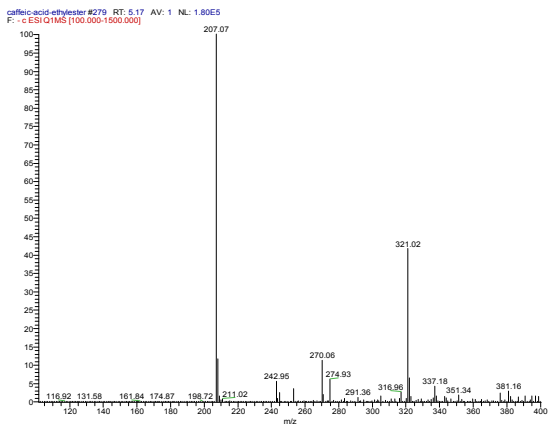
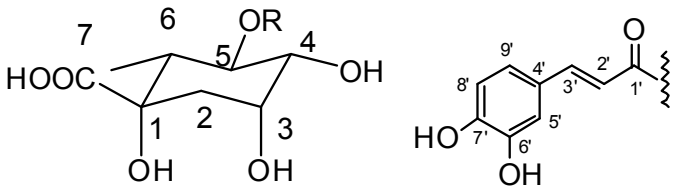


그림 20. Mass spectrμM

(5) Identification of chlorogenic acid



Caffeoyl

R = caffeoyl

그림 21. Chlorogenic acid의 구조

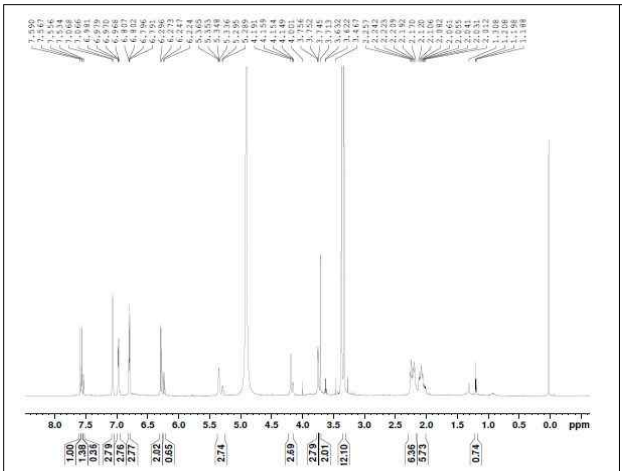


그림 22. ^{1}H-NMR spectrμM

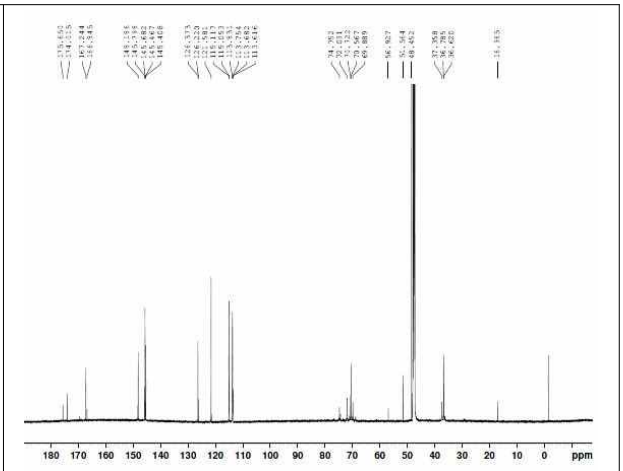


그림 23. ^{13}C-NMR spectrμM

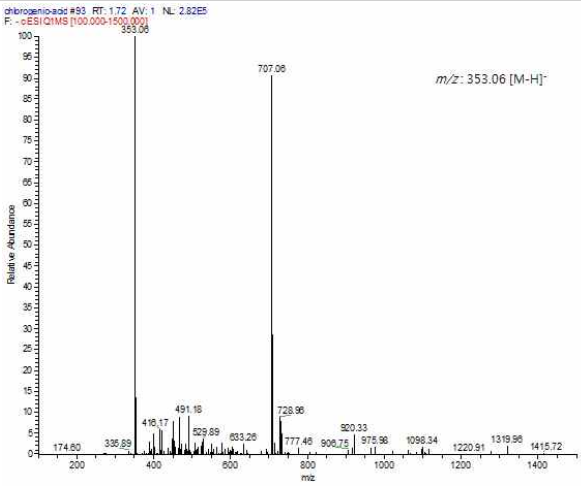


그림 24. Mass spectrμM

(6) Identification of neochlorogenic acid

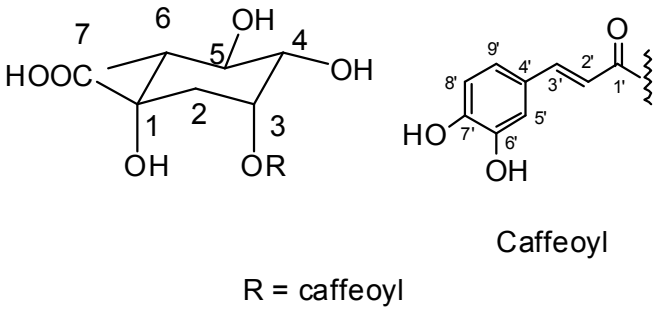


그림 25. Neochlorogenic acid의 구조

표 6. ^{1}H and ^{13}C NMR data of chlorogenic acid and neochlorogenic acid

	Chlorogenic acid[a]		Neochlorogenic acid[a]	
Caffeoyl	^{13}C	^{1}H	^{13}C	^{1}H
1	125.6		125.7	
2	114.3	7.03	114.6	7.02 d 2.0
3	145		144.3	
4	148.4		148.1	
5	115.8	6.76 d 8.0	115.8	6.76 d 8.0
6	121.4	6.98 dd 8,2	121.1	6.97 dd 8,2
7	145.6	7.42 d 16	145.5	7.46 d 16
8	114.8	6.15 d 16	115	6.20 d 16
9	165.8		166.1	
COOH	175		176	
Quinic				
1	73.5		72.9	
2	36.2	2.03 - 1.77	35.1	2.02 - 1.85
3	68	5.06 m	71	5.17 m
4	70.9	3.42 br s	71.2	3.54 dd 4.0
5	70.3	3.92 br s	67.2	3.86 dd 12,4
6	37.2	2.03 - 1.77	39.5	2.02 - 1.85

^{1}H=700 MHz, ^{13}C=176 MHz, [a]MeOH-d_4

(7) Identification of isochlorogenic acid A

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) 7.62 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3′), 7.57 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3′), 7.07 (1H, d, J = 1.70 Hz, H-5′), 7.07 (1H, d, J =1.7 Hz, H-5′), 6.98 (1H, dd, J = 1.7, 8.2 Hz, H-9′), 6.96 (1H, dd, J = 1.7, 8.2 Hz, H-9′), 6.78 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8′), 6.78 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8′), 6.35 (1H, d, 15.9 Hz, H-2′), 6.26 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2) (caffeoyl groups); 5.43 (1H, ddd J = 3.2, 3.9, 7.1 Hz, H-5), 5.38 (1H, m, H-3), 3.97 (1H, dd, J = 3.2, 7.4 Hz, H-4), 2.32 (1H, dd, J = 3.9, 13.8 Hz, H-6a), 2.25 (2H, m, H-2), 2.17 (1H, dd, J = 7.1, 13.8 Hz, H-6b) (quinic qcid moiety); ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4): 177.5 (C-7), 169.0 (C-1′), 168.5 (C-1′), 149.8 (C-7′), 149.7 (C-7′), 147.4 (C-3′), 147.2 (C-3′), 147.0 (C-6′), 147.0 (C-6′), 128.1 (C-4′), 128.0 (C-4′), 123.2 (C-9′), 123.1 (C-9′), 116.6 (C-8′), 116.6 (C-8′), 115.8 (C-2′), 115.4 (C-5′), 115.3 (C-5′), 115.3 (C-2′) (caffeoyl groups); 74.8 (C-1), 72.7 (C-5), 72.3 (C-3), 70.8 (C-4), 38.0 (C-2), 36.1 (C-6) (quinic acid moiety); (-)-ESIMS m/z : 515.12 $[M-H]^-$

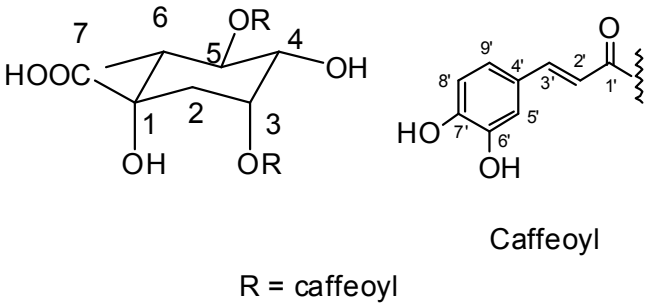


그림 25. Isochlorogenic acid A의 구조

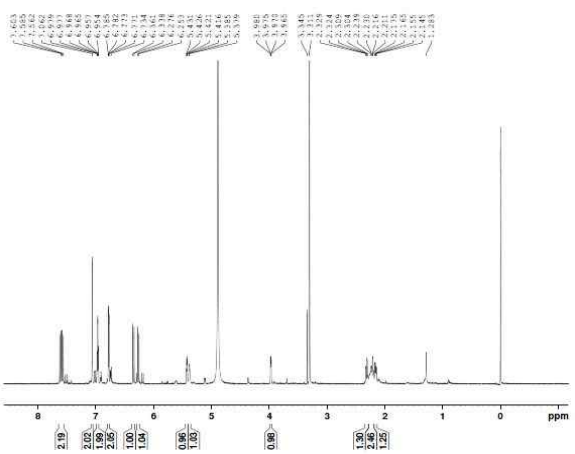


그림 26. ^{1}H-NMR spectrµM

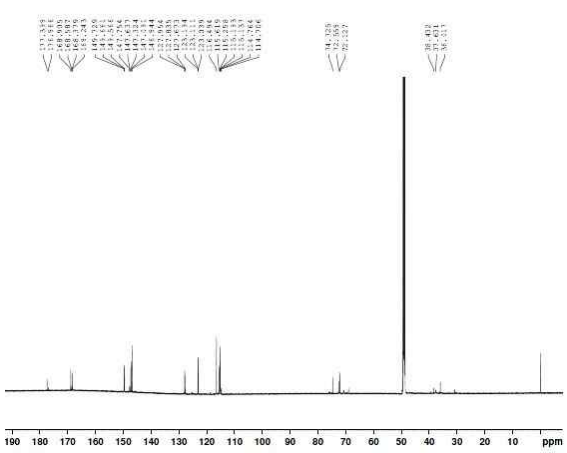


그림 27. ^{13}C-NMR spectrµM

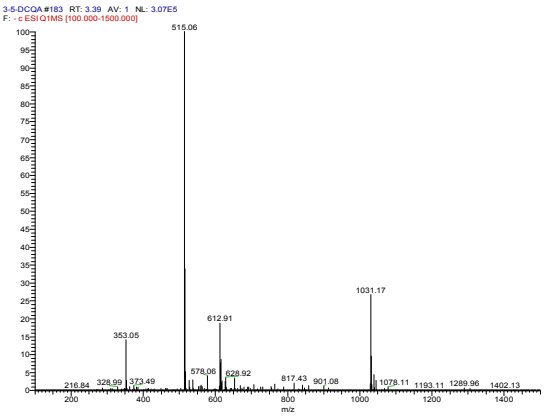
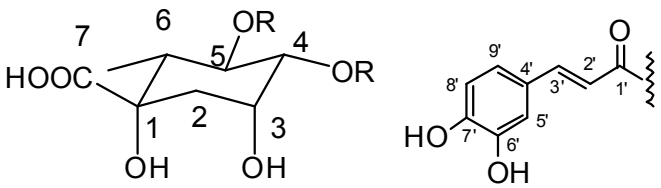


그림 28. Mass spectrµM

(8) Identification of isochlorogenic acid C



R = caffeoyl

그림 29. Isochlorogenic acid C 의 구조

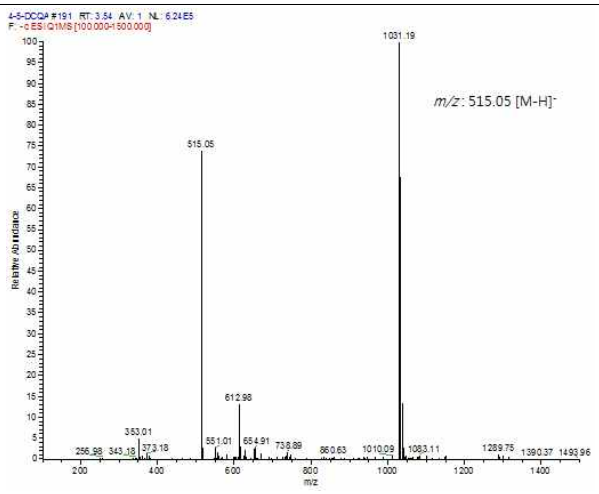


그림 30. Mass spectrum

(9) Identification of quercetin

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.73 (1H, d, J = 2.18 Hz, H-2′), 7.64 (1H, dd, J = 2.23, 6.28 Hz, H-6′), 6.88 (1H, d, J = 8.47 Hz, H-5′), 6.38 (1H, d, J = 2.03 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, J = 2.04 Hz, H-6). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ: 177.4 (C-4), 165.6 (C-7), 162.6 (C-5), 158.3 (C-9), 148.8 (C-4′), 148.0 (C-2), 146.3 (C-3′), 137.3 (C-3), 124.1 (C-1′), 121.7 (C-6′), 116.3 (C-5′), 116.0 (C-2′), 104.5 (C-10), 99.3 (C-6), 94.4 (C-8). ESI-MS, m/z: 304 $[M-H]^{+}$.

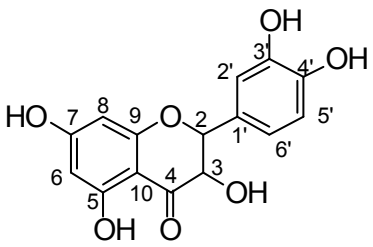


그림 31. Quercetin의 구조

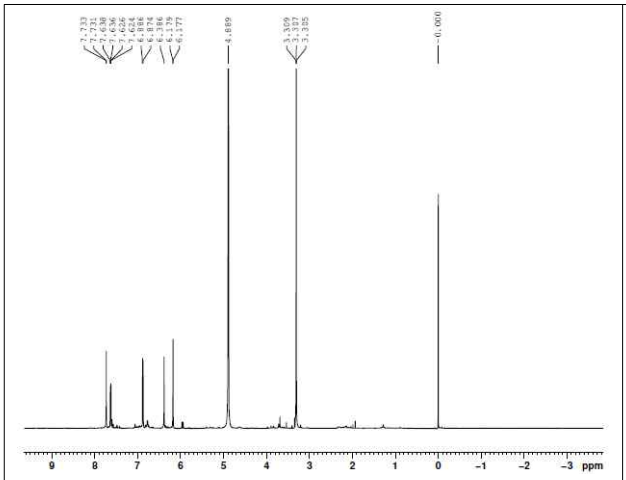


그림 32. ^{1}H-NMR spectrμM

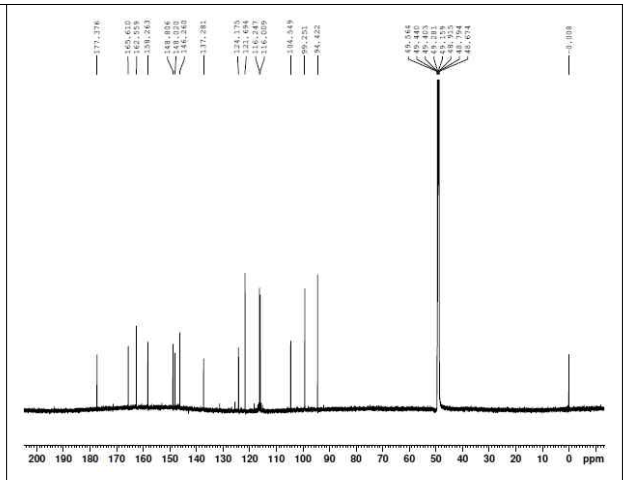


그림 33. ^{13}C-NMR spectrμM

(10) Identification of methyl 3,5-dicaffeoyl quinate

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.63 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3″), 7.55 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-3′), 7.06 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5″), 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5′, 6.97 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-9″), 6.95 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-9′), 6.78 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-8″ and H-8′), 6.35 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2″), 6.23 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-2′), 5.43 (1H, dd, J = 13.0, 7.8 Hz, H-3), 5.39 (1H, dd, J = 8.1, 3.1 Hz, H-4), 5.30 (1H, dt, J = 6.5, 3.3 Hz, H-5), 3.69 (3H, s, OCH3), 2.33 (1H, dd, J = 13.9, 3.4 Hz, 6-Hax), 2.17 (2H, dd, J = 12.5, 8.6 Hz, 2-H), 2.03 (1H, dd, J = 13.9, 6.3 Hz, 6-Heq). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ: 175.7 (s, C-7), 168.8 (s, C-1″), 167.9 (s, C-1′), 149.8 (d, C-7′ and C-7″), 147.4 (d, C-3′ and C-3″), 146.9 (d, C-6′ and C-6″), 127.8 (d, C-4″ and C-4′), 123.3 (s, C-9′ and C-9″), 116.5 (d, C-8′ and C-8″), 115.3 (d, C-5′ and C-5″), 114.8 (s, C-2″), 114.8 (s, C-2′), 74.7 (s, C-1), 72.3 (d, C-4), 71.9 (d, C-3), 68.5 (d, C-5), 53.1 (q, OCH3), 46.4 (s, C-2), 35.7 (s, C-6). ESI-MS, m/z: 530.14 $[M-H]^{+}$.

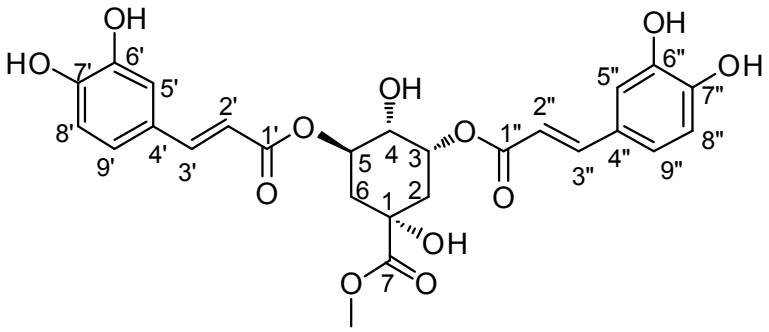


그림 34. Methyl 3,5-dicaffeoyl quinate 의 구조

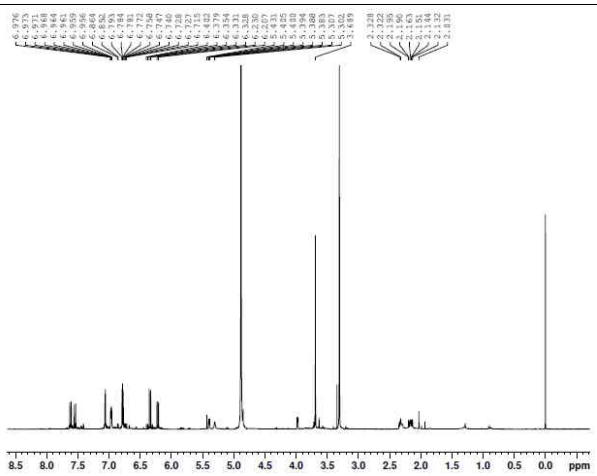


그림 35. ^{1}H-NMR spectrµM

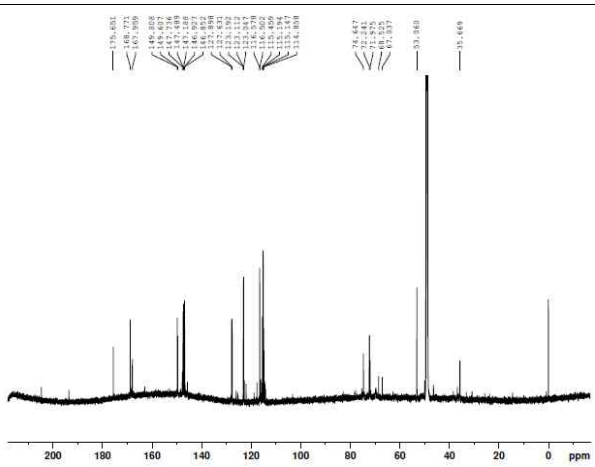


그림 36. ^{13}C-NMR spectrµM

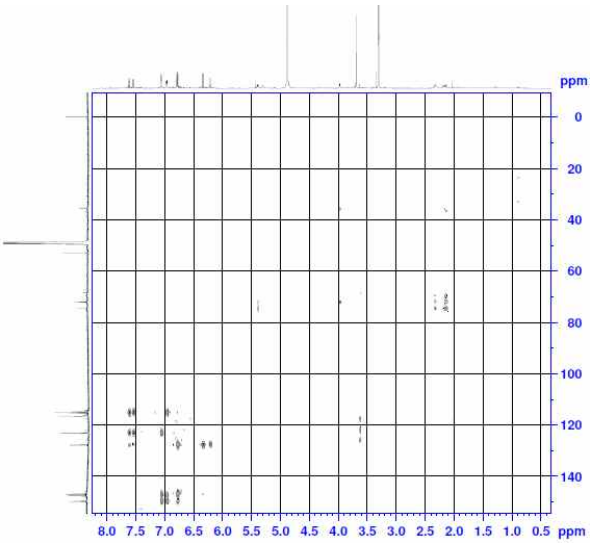


그림 37. HSQC NMR spectrµM

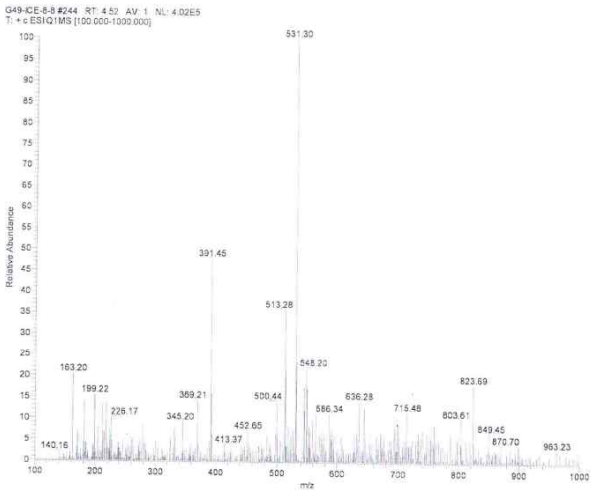


그림 38. Mass spectrµM

(11) Identification of methyl 3,5-dicaffeoyl quinate

- ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.53 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.02 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-6), 6.93 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-2), 6.76 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 6.25 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 3.31 (3H, s, H-10). ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ: 169.8 (C-9), 149.6 (C-4), 146.9 (C-5), 146.8 (C-7), 127.7 (C-1), 122.9 (C-2), 116.5 (C-3), 115.1 (C-6), 114.8 (C-8), 52.0 (C-10). ESI-MS, m/z: 194 $[M-H]^{+}$

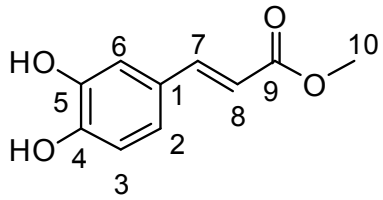


그림 39. Methyl 3,5-dicaffeoyl quinate의 구조

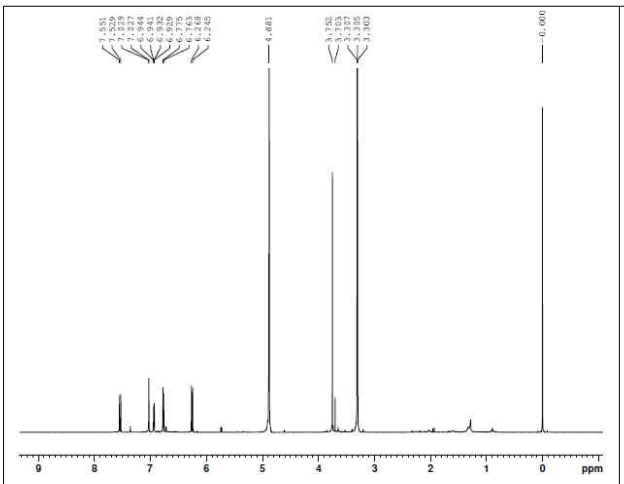


그림 40. ^{1}H-NMR spectrμM

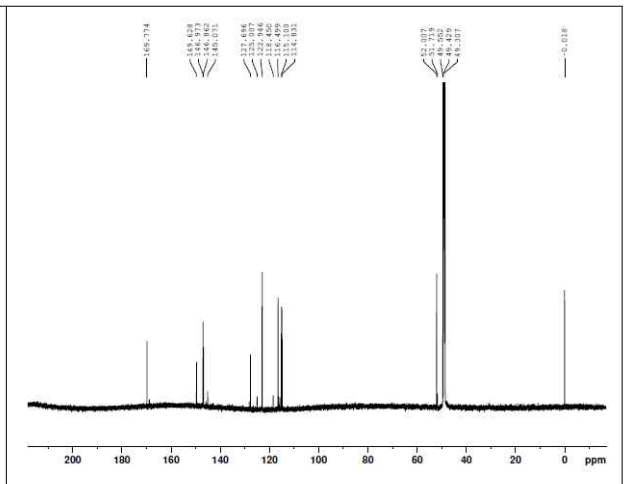


그림 41. ^{13}C-NMR spectrμM

(12) Identification of fukinolic acid

• ^{1}H NMR (700 MHz, MeOH-d_4) δ: 7.72 (1H, d, J = 16.1 Hz, H-7″), 7.10 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2″), 7.01 (1H, dd, J = 2.3, 8.3 Hz, H-6″), 6.80 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5″), 6.74 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-2′), 6.64 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5′), 6.59 (1H, dd, J = 2.2, 8.2 Hz, H-6′), 6.42 (1H, H-8″), 5.65 (1H, H-2), 2.95a, 3.08b (d, J = 13.5 Hz, H-4), ^{13}C NMR (176 MHz, MeOH-d_4) δ: 174.8 (C-5), 170.9 (C-1), 168.3 (C-9″), 149.8 (C-4″), 148.2 (d, C-7″), 146.9 (C-3″), 145.7 (C-3′), 145.3 (C-4′), 128.0 (C-1′), 127.9 (C-1″), 123.3 (dd, C-6″), 123.1 (dd, C-6′), 118.8 (d, C-2′), 116.6 (d, C-5″), 115.9 (d, C-5′), 115.3 (d, C-2″), 114.3 (d, C-8″), 80.4 (d, C-2), 78.3 (s, C-3), 42.2 (d, C-4). ESI-MS, m/z: 457.05 $[M-H]^{+}$.

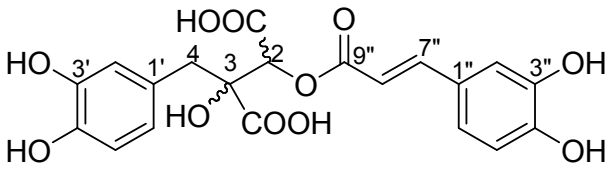


그림 42. Fukinolic acid의 구조

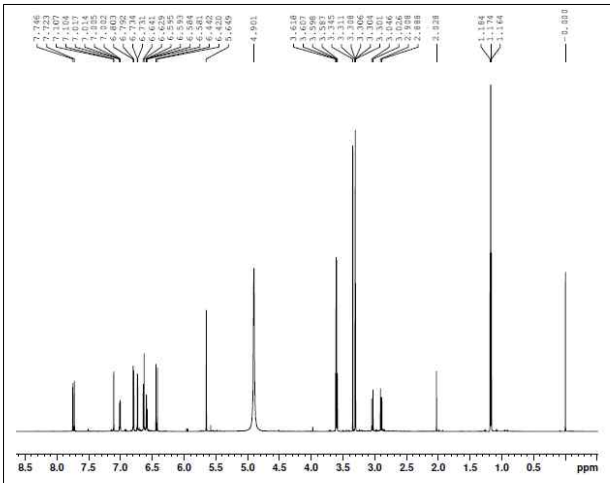


그림 43. ^{1}H-NMR spectrμM

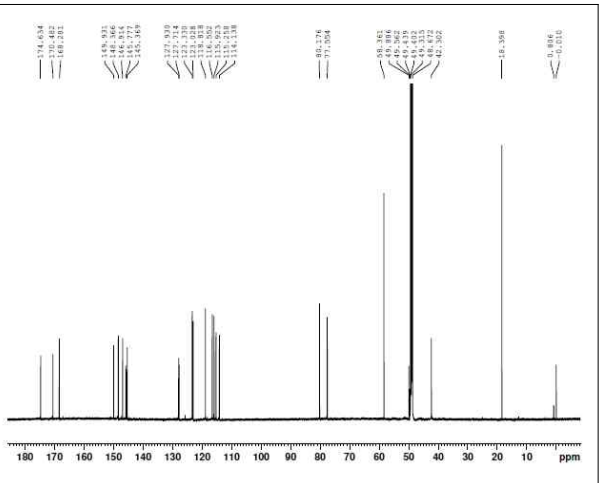


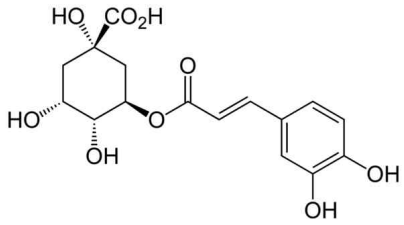
그림 44. ^{13}C-NMR spectrμM

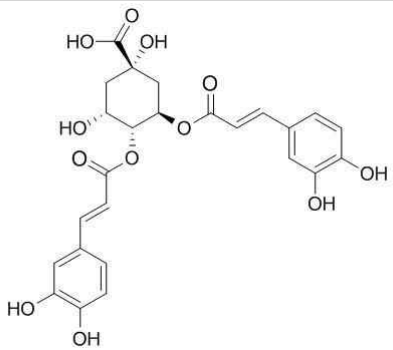
제 2 절 곰취 추출물의 원료표준화 및 pilot scale 추출공정 연구

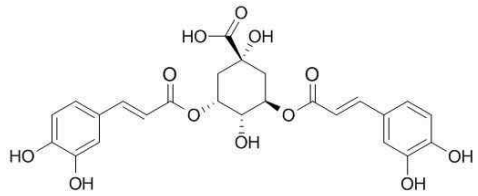
1. 지표물질 설정

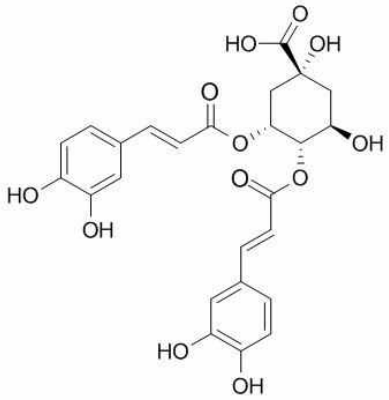
- 곰취 추출물의 지표성분으로 선정한 caffeoyl quinic acid 계열 중 추출물에서도 검출하기가 용이하고 함량이 높고, HPLC 분리능이 양호한 4종 (chlorogenic acid, 3,4-di-caffeoyl quinic acid, 3,5-di-caffeoyl quinic acid 및 4,5-di-caffeoyl quinic acid)을 지표물질로 선정하였음.

가. 표준품(지표성분) 정보

시판되는 표준품	표준품명	Chlorogenic acid (3-caffeoyl quinic acid)
	제조・판매회사명	SHENZHEN CHEMSTRONG SCIENTIFIC
	구조식	
	분자식	$C_{16}H_{18}O_9$
	CAS No.	327-97-9

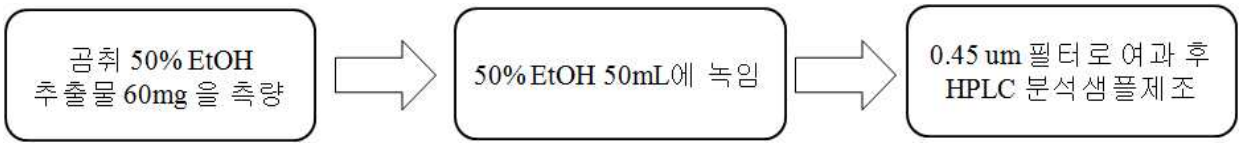
시판되는 표준품	표준품명	3,4-di-caffeoyl quinic acid (Isochlorogenic acid B)
	제조・판매회사명	SHENZHEN CHEMSTRONG SCIENTIFIC
	구조식	
	분자식	$C_{25}H_{24}O_{12}$
	CAS No.	14534-61-3

시판되는 표준품	표준품명	3,5-di-caffeoyl quinic acid (Isochlorogenic acid A)
	제조・판매회사명	SHENZHEN CHEMSTRONG SCIENTIFIC
	구조식	
	분자식	$C_{25}H_{24}O_{12}$
	CAS No.	2450-53-5

시판되는 표준품	표준품명	4,5-di-*O*-caffeoyl quinic acid (Isochlorogenic acid C)
	제조・판매회사명	SHENZHEN CHEMSTRONG SCIENTIFIC
	구조식	
	분자식	$C_{25}H_{24}O_{12}$
	CAS No.	32451-88-0

나. HPLC 분석법 확립

(1) 시료 전처리 방법



(2) HPLC 분석조건

InstrµMent	Conditions		
HPLC system	Agilent 1100-DAD		
ColµMn	Kormasil 100-5C_{18}. 5㎛, 4.6 × 250 mm		
ColµMn temp.	30℃		
Mobile phase	Time	Water (0.1% TFA)	Acetonitrile
	0	90	10
	20	90	10
	30	82	18
	64	82	18
	65	0	100
	75	0	100
Detector	330 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volµMe	10 ㎕		

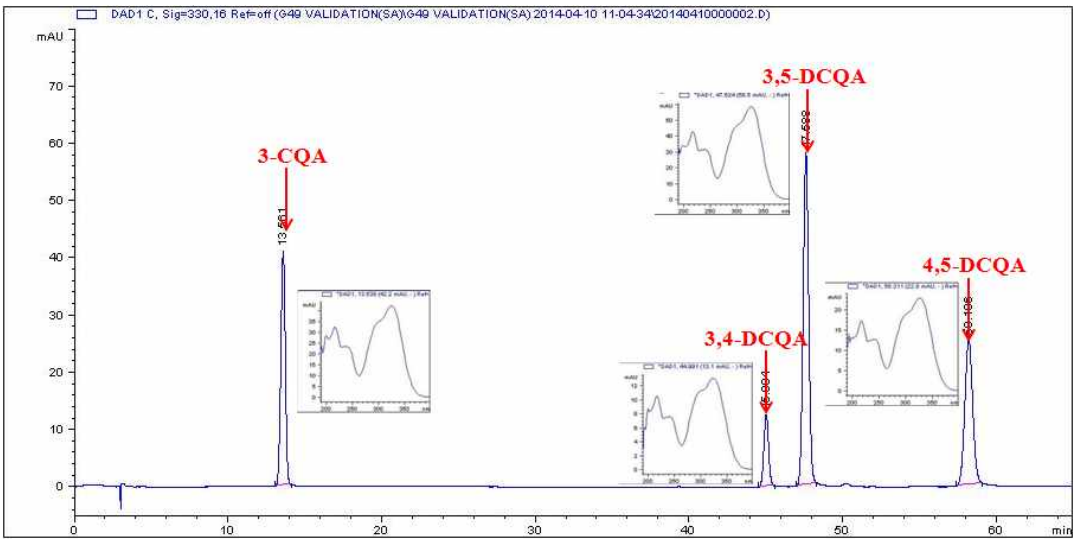


그림 45. 지표성분들의 HPLC chromatogram과 UV spectrum

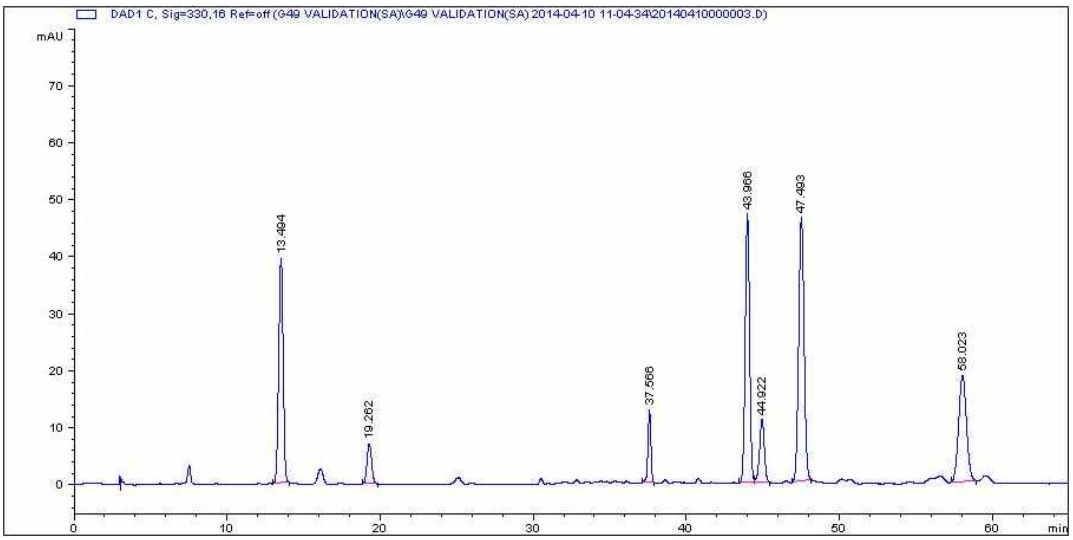


그림 46. 곰취 추출물의 HPLC chromatogram

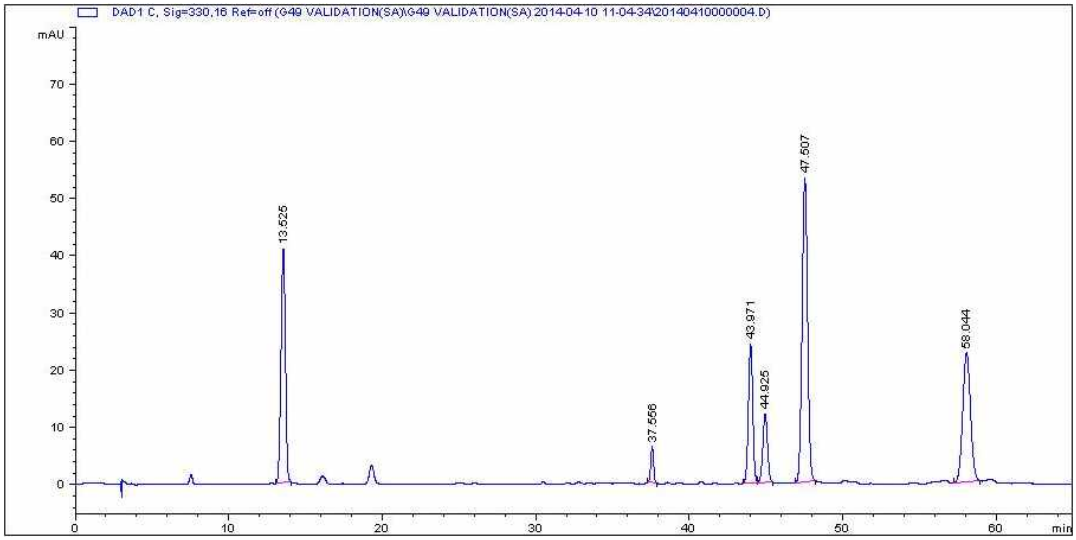


그림 47. 지표성분들과 곰취 추출물의 HPLC chromatogram

2. 원료 규격 표준화 및 원료 validation

- 곰취 추출물의 기준 및 시험방법에 대한 밸리데이션 test 시험결과

가. 목적

- 곰취 추출물의 기준 및 시험방법을 자사에서 확립하고 이에 대한 시험법을 검증하고자 본 밸리데이션시험을 실시하였음.

나. 재료

- 곰취 추출물(GMP 시설에서 추출된 추출물)
- chlorogenic acid (3-caffeoyl quinic acid) 표준품
- 3,4-dicaffeoylquinic acid 표준품
- 3,5-dicaffeoylquinic acid 표준품
- 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준품

다. 밸리데이션 시험방법 및 시험결과

(1) 밸리데이션 시험항목대상물질

- 주성분인 chlorogenic acid, 3,4-di-caffeoylquinic acid, 3,5-di-caffeoylquinic acid 4,5-di-caffeoylquinic acid 함량.

(2) 밸리데이션 시험항목

- 기준 및 시험항목에 기재된 시험법 중 함량시험에 대한 직선성, 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성에 대한 시험을 시험하였음.

(3) 시험방법

(가) 시험방법 및 분석기기조건

- 함량시험에 대한 시료전처리조건 및 분석기기조건은 자사에서 설정한 기준 및 시험방법에 기술한 조건으로 시험하였음.

표 7. 시료전처리조건 및 분석기기조건

컬럼	Kromasil 100-5C_{18} (4.6 × 250 mm, 5 μm)
이동상	A : 0.1% TFA in H_2O B : 아세토니트릴
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 : 330 nm)
유속	1.0 mL/min
주입량	10 μL
사용한 HPLC System	Agilent 1100-DAD

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	90	10
20	90	10
30	82	18
64	82	18
65	0	100
75	0	100

라. 밸리데이션 시험방법 및 결과

(1) 특이성 시험

(가) 시험 방법

① Blank의 확인

- 50% EtOH이 본 함량시험법에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여 함량시험법의 기

기조건에 따라 시험하여 얻어진 피크의 유지시간이 chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid의 피크와 겹치지 않음을 확인함.

② chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준액의 조제

- chlorogenic acid 표준품 7.9mg, 3,4-dicaffeoylquinic acid 표준품 2.6mg, 3,5-dicaffeoylquinic acid 표준품 11.0mg, 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준품 7.2mg을 정밀히 달아 50% EtOH로 녹여 정확히 50mL로 한다. 이 액을 표준원액이라 한다. 표준원액 10mL을 50% EtOH로 50mL로 한다. 이 액을 표준액 이라 함.

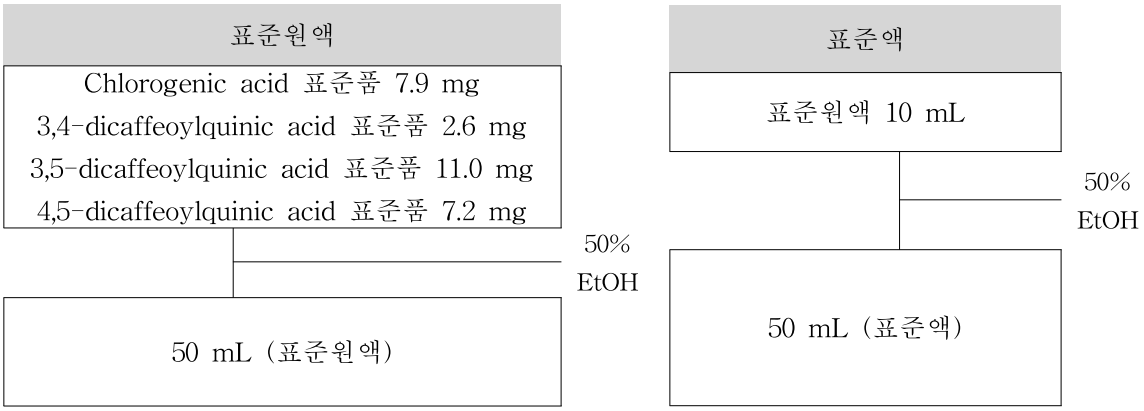


그림 48. 표준액의 조제 방법

③ 곰취 추출물 : 검액의 조제

- 곰취 추출물 약 60mg을 정밀하게 취하여 50%EtOH로 정확히 50mL로 한다. 이 액을 가지고 함량기시법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.

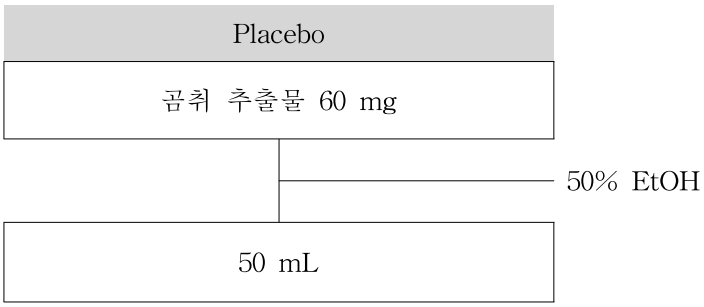


그림 49. 곰취 추출물 검액 조제 방법

④ 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

- 위에서 제조한 표준원액 5 mL과 곰취 추출물 30 mg을 취하여 50% EtOH로 정확히 50 mL로 한다. 이 액을 가지고 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.

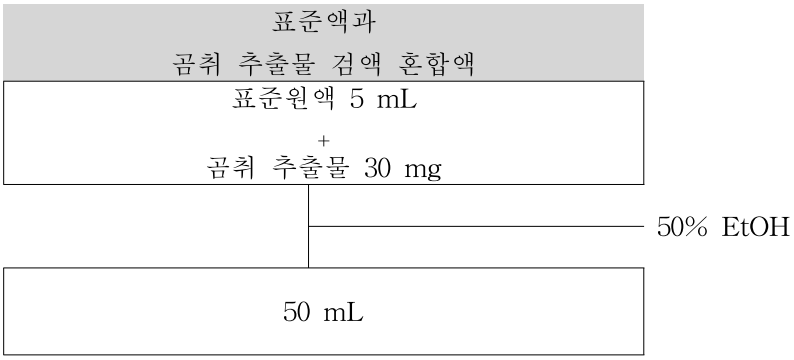


그림 50. 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물 조제 방법

(나) 결 과

① Chlorogenic acid

표 8. Chlorogenic acid 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (50% EtOH)	-	-	-
Chlorogenic acid 표준액	13.561	832.94257	-
곰취 추출물	13.494	802.39148	2.86
Chlorogenic acid 표준액 + 곰취 추출물	13.525	824.29498	101.40

표 9. Chlorogenic acid 피크유지시간

원료명	피크유지시간 (분)
Chlorogenic acid	13.561

- 위의 결과표에서 보듯이 chlorogenic acid은 완전히 분리되며 Blank에서는 Chlorogenic acid 과 겹치는 피크가 없었으며 chlorogenic acid 표준액 + 곰취 추출물 시험결과 그의 회수율은 100.81%로서 양호한 결과를 얻었다. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 chlorogenic acid을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있음.

② 3,4-dicaffeoylquinic acid

표 10. 3,4-dicaffeoylquinic acid 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (50% EtOH)	-	-	-
3,4-dicaffeoylquinic acid 표준액	45.004	268.93582	-
곰취 추출물	44.922	228.16481	0.73
3,4-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물	44.925	253.49188	101.99

표 11. 3,4-dicaffeoylquinic acid 피크유지시간

원료명	피크유지시간 (분)
3,4-dicaffeoylquinic acid	45.004

- 위의 결과표에서 보듯이 3,4-dicaffeoylquinic acid은 완전히 분리되며 Blank에서는 3,4-dicaffeoylquinic acid과 겹치는 피크가 없었으며 3,4-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물 시험결과 그의 회수율은 101.99%로서 양호한 결과를 얻었다. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 3,5-dicaffeoylquinic acid을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있음.

③ 3,5-dicaffeoylquinic acid

표 12. 3,5-dicaffeoylquinic acid 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (50% EtOH)	-	-	-
3,5-dicaffeoylquinic acid 표준액	47.588	1457.14490	-
곰취 추출물	47.493	1145.96582	2.86
3,5-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물	47.507	1319.79285	101.40

표 13. 3,5-dicaffeoylquinic acid 피크유지시간

원료명	피크유지시간 (분)
3,5-dicaffeoylquinic acid	47.588

- 위의 결과표에서 보듯이 3,5-dicaffeoylquinic acid은 완전히 분리되며 Blank에서는 3,5-dicaffeoylquinic acid과 겹치는 피크가 없었으며 3,5-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물 시험결과 그의 회수율은 101.40%로서 양호한 결과를 얻었다. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 3,5-dicaffeoylquinic acid을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있다.

④ 4,5-dicaffeoylquinic acid

표 14. 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준액과 곰취 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (50% EtOH)	-	-	-
4,5-dicaffeoylquinic acid 표준액	58.186	914.22198	-
곰취 추출물	58.023	668.56744	1.74
4,5-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물	58.044	804.55951	101.66

표 15. 4,5-dicaffeoylquinic acid 피크유지시간

원료명	피크유지시간 (분)
4,5-dicaffeoylquinic acid	58.186

- 위의 결과표에서 보듯이 4,5-dicaffeoylquinic acid은 완전히 분리되며 Blank에서는 4,5-dicaffeoylquinic acid과 겹치는 피크가 없었으며 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준액 + 곰취 추출물 시험결과 그의 회수율은 101.66%로서 양호한 결과를 얻었다. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 4,5-dicaffeoylquinic acid을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있음.

(2) 직선성 시험

(가) 곰취 추출물 함량시험

① 곰취 추출물를 가지고 함량시험농도의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.

② 직선성 시험용액의 조제
- 곰취 추출물을 각각 약 24mg, 42mg, 60mg, 78mg, 96mg를 정확히 취한 다음 50% 에탄올에 녹여 50mL로 한다. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임. (3 group 으로 나누어 3회 측정실시)

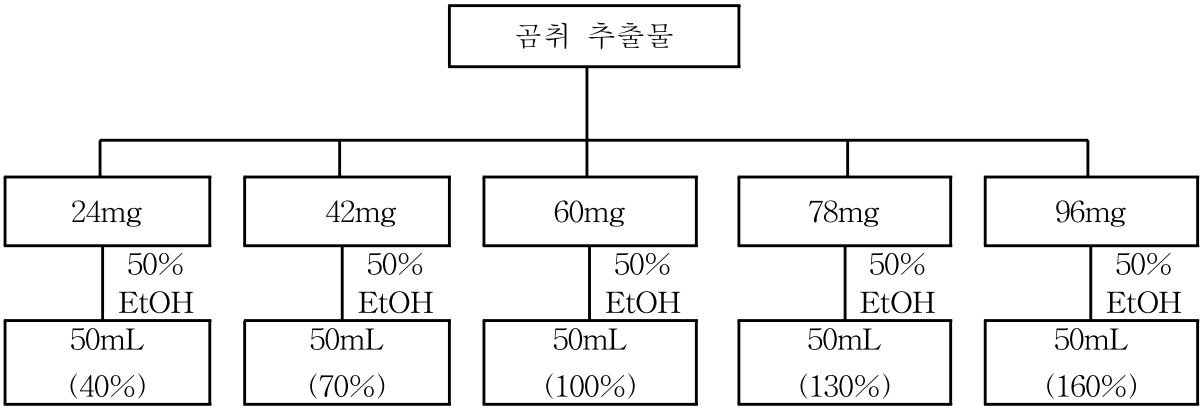


그림 51. 직선성 시험용액의 조제방법

☞ 각 곰취 추출물의 실제 취한 양

Group 1

곰취 추출물 : 24.0 mg, 42.1 mg, 59.8 mg, 78.3 mg, 95.8 mg

Group 2

곰취 추출물 : 24.0 mg, 41.9 mg, 59.9 mg, 78.1 mg, 95.9 mg

Group 3

곰취 추출물 : 24.0 mg, 42.0 mg, 60.0 mg, 78.0 mg, 96.1 mg

(나) 직선성시험 결과

① Chlorogenic acid

○ Group 1의 직선성시험결과 (1회 분석)

Group 1	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	318.94409
Cal 1 - 2	42.1	570.58484
Cal 1 - 3	59.8	814.40491
Cal 1 - 4	78.3	1077.46533
Cal 1 - 5	95.8	1317.11890
기울기	13.92280	
y 절편	-15.66441	
R^2	0.99997	

※ Cal : calibration

검량선식

Group 1 y = 13.92280 x - 15.66441 (R^2 = 0.99997)

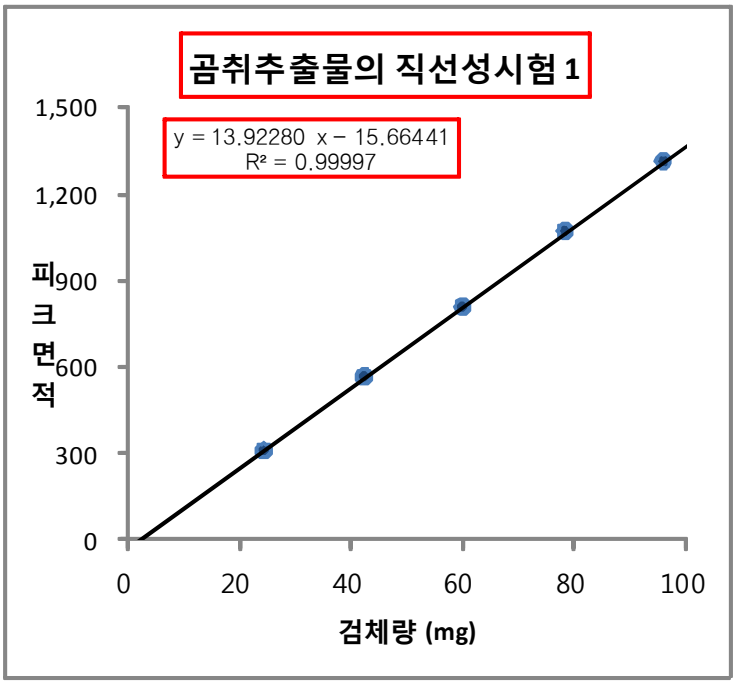


그림 52. Group 1 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 2의 직선성시험결과 (2회 분석)

Group 2	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	321.14316
Cal 1 - 2	41.9	565.51227
Cal 1 - 3	59.9	819.06488
Cal 1 - 4	78.1	1069.12476
Cal 1 - 5	95.9	1312.13477
기울기	13.80895	
y 절편	-10.58874	
R^2	0.99997	

검량선식

Group 2 y = 13.80895 x - 10.58874 (R^2 = 0.99997)

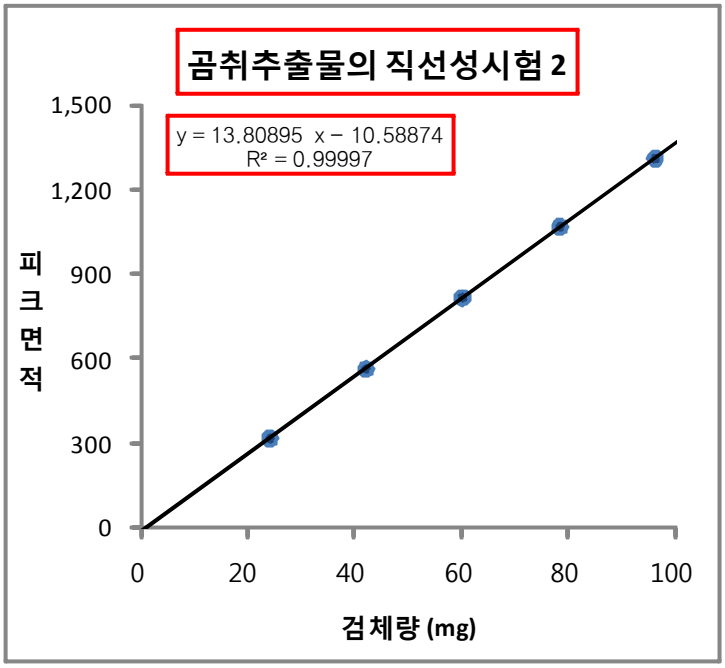


그림 53. Group 2 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 3의 직선성시험결과 (3회 분석)

Group 3	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	320.98260
Cal 1 - 2	42.0	569.69543
Cal 1 - 3	60.0	820.39923
Cal 1 - 4	78.0	1069.06287
Cal 1 - 5	96.1	1317.20239
기울기	13.82797	
y 절편	-10.48635	
R^2	0.99999	

검량선식

Group 3 y = 13.82797 x - 10.48635 (R^2 = 0.99999)

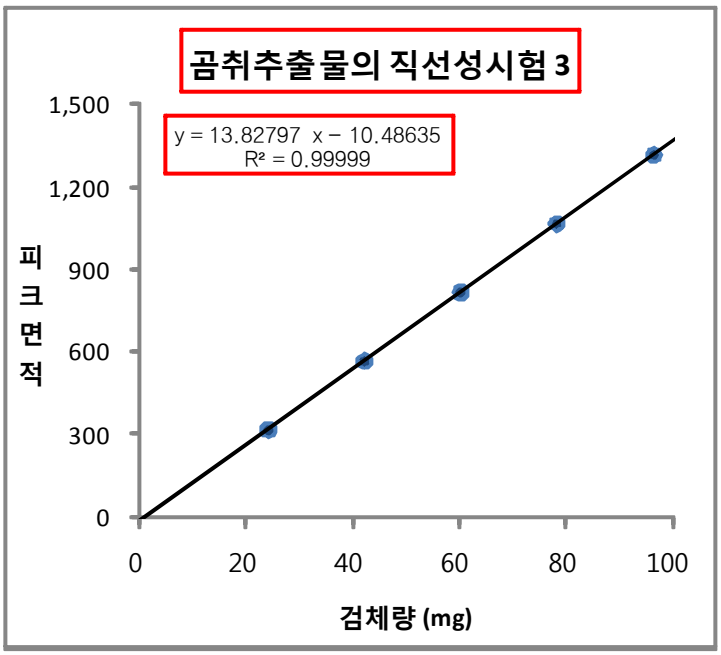


그림 54. Group 3 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

표 16. 곰취 추출물의 직선성시험 종합결과 (Chlorogenic acid)

직선성시험 종합결과	곰취 추출물		
	기울기	y 절편	R^2
직선성시험 1	13.92280	-15.66441	0.99997
직선성시험 2	13.80895	-10.58874	0.99997
직선성시험 3	13.82797	-10.48635	0.99999
평 균	13.85324	-12.24650	0.99998
표준편차	0.060986	2.96044	0.00001
종합 검량선	y = 13.85324 x - 12.24650 (R^2 = 0.99998)		

② 3,4-dicaffeoylquinic acid

○ Group 1의 직선성시험결과 (1회 분석)

Group 1	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	85.52621
Cal 1 - 2	42.1	153.64682
Cal 1 - 3	59.8	220.54462
Cal 1 - 4	78.3	292.79163
Cal 1 - 5	95.8	359.21024
기울기	3.81830	
y 절편	-6.75401	
R^2	0.99996	

검량선식

Group 1 y = 3.81830 x - 6.75401 (R^2 = 0.99996)

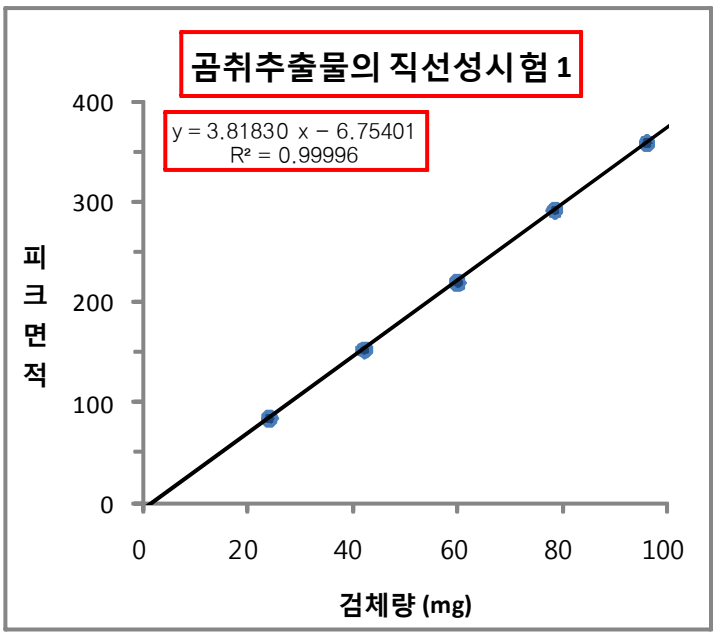


그림 55. Group 1 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 2의 직선성시험결과 (2회 분석)

Group 2	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	87.50437
Cal 1 - 2	41.9	153.64087
Cal 1 - 3	59.9	224.17053
Cal 1 - 4	78.1	294.12518
Cal 1 - 5	95.9	363.33035
기울기	3.84523	
y 절편	-6.00562	
R^2	0.99992	

검량선식

Group 2 y = 3.84523 x - 6.00562 (R^2 = 0.99992)

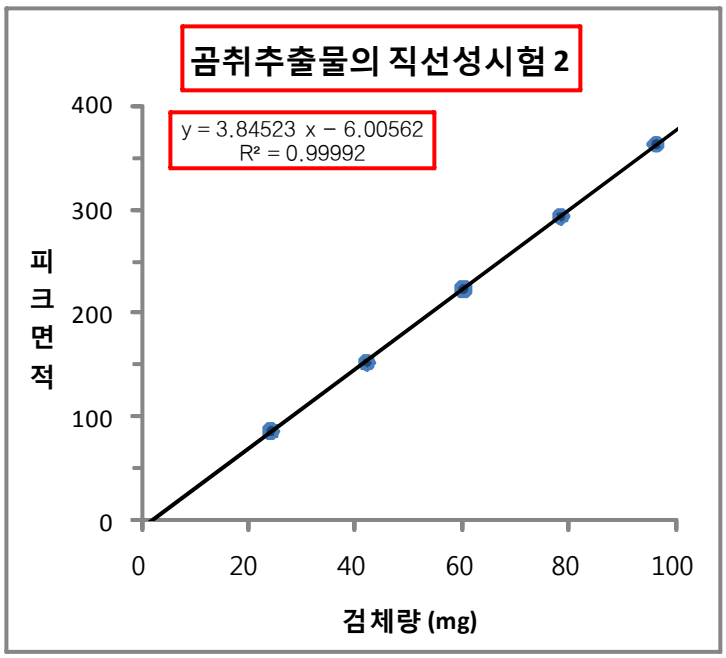


그림 56. Group 2 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 3의 직선성시험결과 (3회 분석)

Group 3	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	88.51643
Cal 1 - 2	42.0	156.69781
Cal 1 - 3	60.0	225.86133
Cal 1 - 4	78.0	294.91907
Cal 1 - 5	96.1	364.38464
기울기	3.82885	
y 절편	-3.73166	
R^2	0.99999	

검량선식

Group 3 y = 3.82885 x - 3.73166 (R^2 = 0.99999)

(

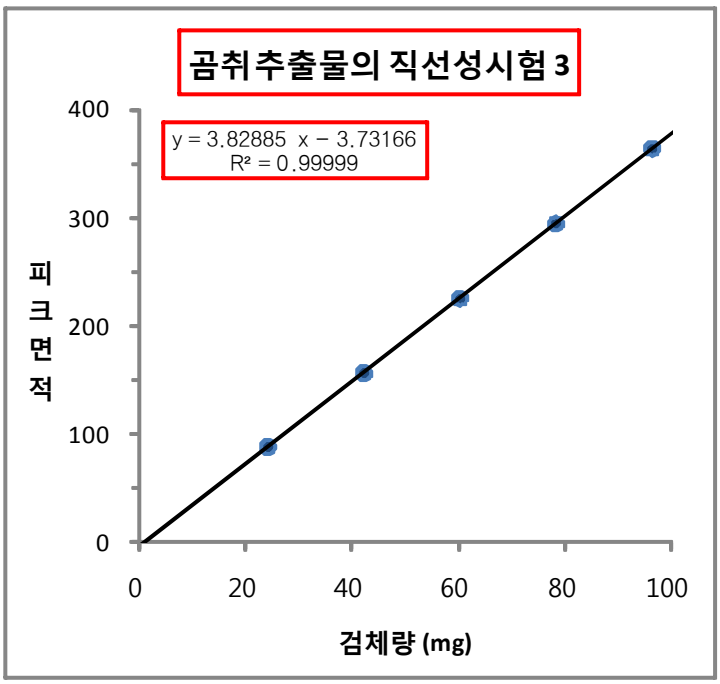


그림 57. Group 3 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

표 17. 곰취 추출물의 직선성시험 종합결과 (3,4-dicaffeoylquinic acid)

직선성시험 종합결과	곰취 추출물		
	기울기	y 절편	R^2
직선성시험 1	3.81830	-6.75401	0.99996
직선성시험 2	3.84523	-6.00562	0.99992
직선성시험 3	3.82885	-3.73166	0.99999
평 균	3.83079	-5.49710	0.99996
표준편차	0.013569	1.57404	0.00004
종합 검량선	y = 3.83079 x - 5.49710 (R^2 = 0.99996)		

③ 3,5-dicaffeoylquinic acid

○ Group 1의 직선성시험결과 (1회 분석)

Group 1	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	467.38849
Cal 1 - 2	42.1	839.88135
Cal 1 - 3	59.8	1206.07959
Cal 1 - 4	78.3	1599.54663
Cal 1 - 5	95.8	1950.29407
기울기	20.72118	
y 절편	-30.63264	
R^2	0.99994	

검량선식

Group 1 y = 20.72118 x - 30.63264 (R^2 = 0.99994)

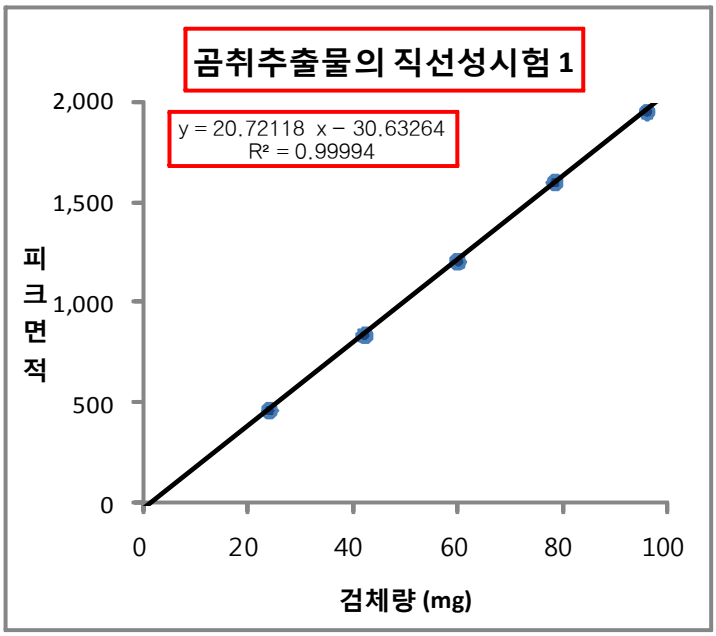


그림 58. Group 1 검량선 그래프

- 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 2의 직선성시험결과 (2회 분석)

Group 2	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	471.97900
Cal 1 - 2	41.9	832.05249
Cal 1 - 3	59.9	1213.40479
Cal 1 - 4	78.1	1591.76953
Cal 1 - 5	95.9	1960.11536
기울기	20.75572	
y 절편	-30.64895	
R^2	0.99995	

검량선식

Group 2 y = 20.75572 x - 30.64895 (R^2 = 0.99995)

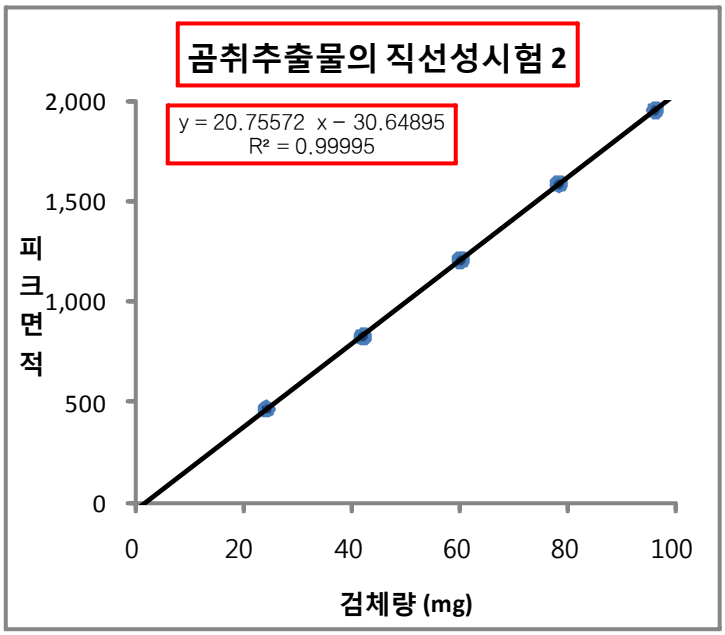


그림 59. Group 2 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 3의 직선성시험결과 (3회 분석)

Group 3	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	472.54904
Cal 1 - 2	42.0	841.07623
Cal 1 - 3	60.0	1213.14563
Cal 1 - 4	78.0	1584.04297
Cal 1 - 5	96.1	1960.21509
기울기	20.63434	
y 절편	-24.26704	
R^2	0.99999	

검량선식

Group 3 y = 20.63434 x - 24.26704 (R^2 = 0.99999)

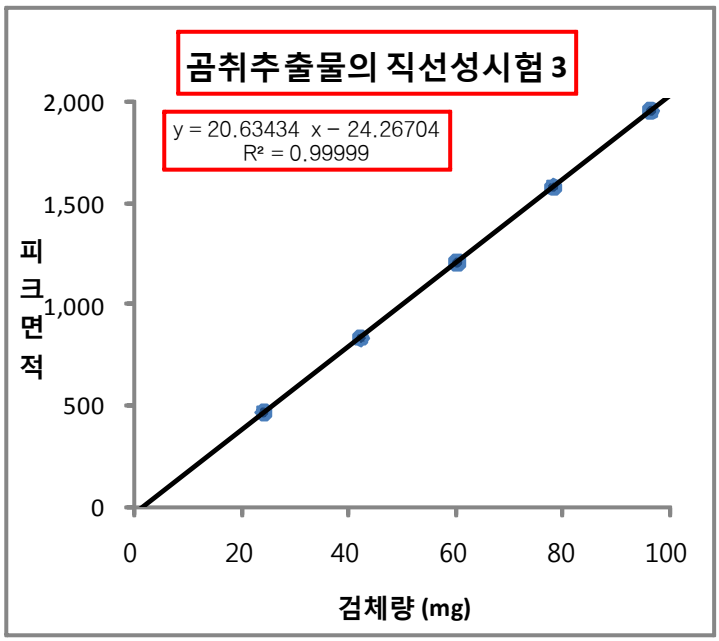


그림 60. Group 3 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

표 18. 곰취 추출물의 직선성시험 종합결과 (3,5-dicaffeoylquinic acid)

직선성시험 종합결과	곰취 추출물		
	기울기	y 절편	R^2
직선성시험 1	3.81830	-6.75401	0.99996
직선성시험 2	3.84523	-6.00562	0.99992
직선성시험 3	3.82885	-3.73166	0.99999
평 균	3.83079	-5.49710	0.99996
표준편차	0.013569	1.57404	0.00004
종합 검량선	y = 3.83079 x - 5.49710 (R^2 = 0.99996)		

(4) 4,5-dicaffeoylquinic acid

○ Group 1의 직선성시험결과 (1회 분석)

Group 1	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	238.71913
Cal 1 - 2	42.1	438.82770
Cal 1 - 3	59.8	639.34540
Cal 1 - 4	78.3	855.50940
Cal 1 - 5	95.8	1052.73193
기울기	11.37243	
y 절편	-37.31933	
R^2	0.99992	

검량선식

Group 1 y = 11.37243 x - 37.31933 (R^2 = 0.99992)

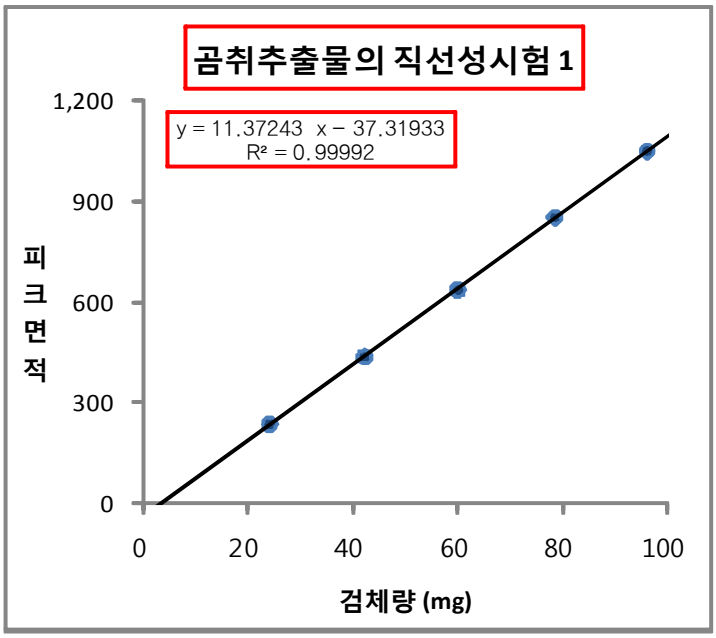


그림 61. Group 1 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 2의 직선성시험결과 (2회 분석)

Group 2	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	246.70906
Cal 1 - 2	41.9	442.75818
Cal 1 - 3	59.9	653.06323
Cal 1 - 4	78.1	865.12994
Cal 1 - 5	95.9	1068.75293
기울기	11.48056	
y 절편	-33.09173	
R^2	0.99988	

검량선식

Group 2 y = 11.48056 x - 33.09173 (R^2 = 0.99988)

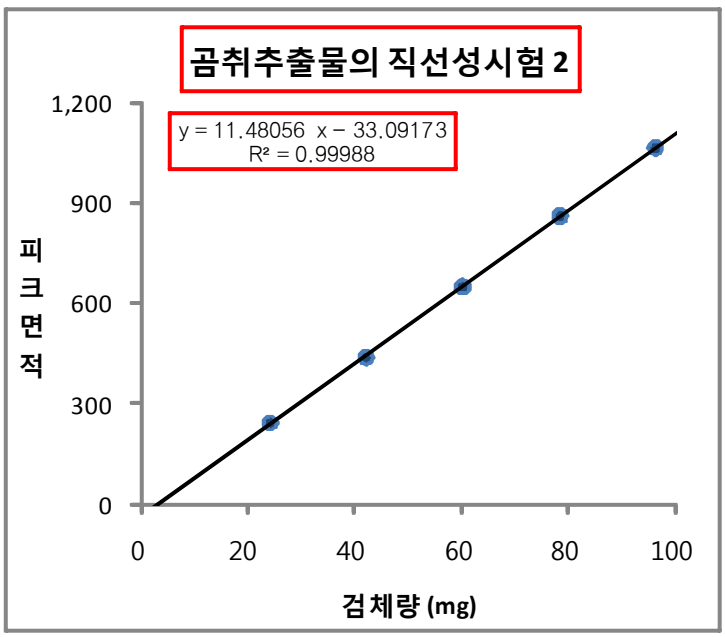


그림 62. Group 2 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

○ Group 3의 직선성시험결과 (3회 분석)

Group 3	곰취 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	24.0	252.14136
Cal 1 - 2	42.0	453.66229
Cal 1 - 3	60.0	660.48230
Cal 1 - 4	78.0	868.59924
Cal 1 - 5	96.1	1078.67346
기울기	11.47620	
y 절편	-26.08995	
R^2	0.99995	

검량선식

Group 3 y = 11.47620 x - 26.08995 (R^2 = 0.99995)

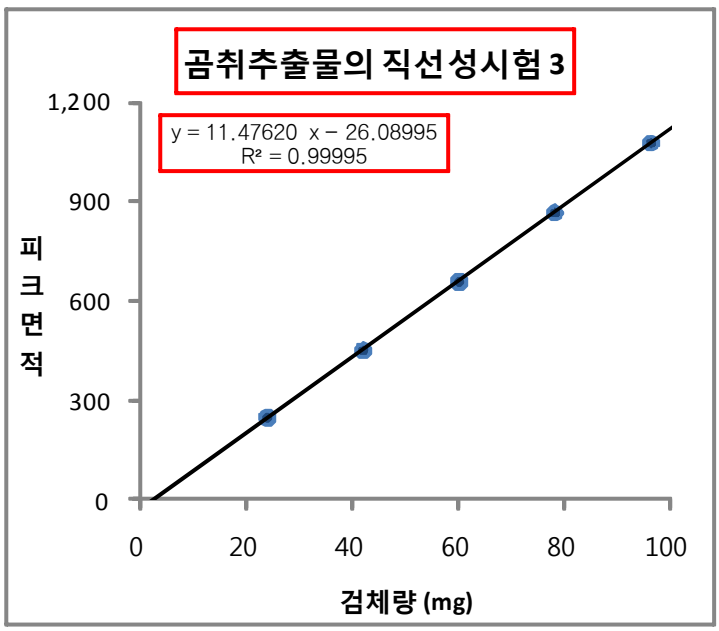


그림 63. Group 3 검량선 그래프

○ 곰취 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

표 19. 곰취 추출물의 직선성시험 종합결과 (4,5-dicaffeoylquinic acid)

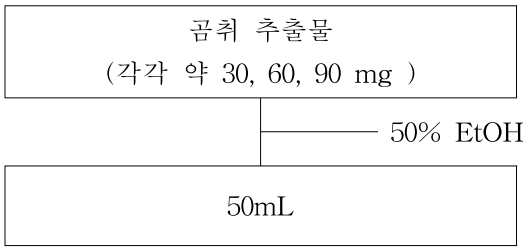
직선성시험 종합결과	곰취 추출물		
	기울기	y 절편	R^2
직선성시험 1	11.37243	-37.31933	0.99992
직선성시험 2	11.48056	-33.09173	0.99988
직선성시험 3	11.47620	-26.08995	0.99995
평 균	11.44307	-32.16700	0.99992
표준편차	0.061208	5.67151	0.00004
종합 검량선	y = 11.44307 x - 32.16700 (R^2 = 0.99992)		

(3) 정확성 및 정밀성 시험

(가) 곰취 추출물 중 Chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid

○ 곰취 추출물을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPCL조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였음.

○ 정확성 및 정밀성 시험용액 조제



(나) 시험결과에 대한 평가방법

위의 시험방법의 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액"을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

① 정확, 정밀성시험 결과

○ Chlorogenic acid

- 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 곰취 추출물의 정확성과 회수율(%)

표 20. Chlorogenic acid 의 정확성(50%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 1 (50%)	30.0	404.98462	30.1179	100.39
		403.73175	30.0275	100.09
		404.20609	30.0617	100.21
		404.37640	30.0740	100.25
		404.57672	30.0885	100.29
		404.54416	30.0861	100.29
			평 균	100.25
			표준편차	0.10
			RSD (%)	0.10

표 21. Chlorogenic acid 의 정확성(100%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 2 (100%)	60.1	825.57654	60.4785	100.63
		827.06213	60.5857	100.81
		827.69849	60.6317	100.88
		828.00836	60.6540	100.92
		827.33728	60.6056	100.84
		826.98254	60.5800	100.80
			평 균	100.81
			표준편차	0.10
			RSD (%)	0.10

표 22. Chlorogenic acid 의 정확성(150%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 3 (150%)	90.0	1242.93982	90.6060	100.67
		1241.53198	90.5043	100.56
		1242.51001	90.5749	100.64
		1242.62048	90.5829	100.65
		1241.69922	90.5164	100.57
		1243.10022	90.6175	100.67
			평 균	100.63
			표준편차	0.05
			RSD (%)	0.05

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0% 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

- 곰취 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	곰취 추출물					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	13.488	404.98462	13.556	825.57654	13.481	1242.93982
2회	13.567	403.73175	13.558	827.06213	13.483	1241.53198
3회	13.545	404.20609	13.544	827.69849	13.497	1242.51001
4회	13.555	404.37640	13.536	828.00836	13.490	1242.62048
5회	13.557	404.57672	13.519	827.33728	13.510	1241.69922
6회	13.567	404.54416	13.514	826.98254	13.511	1243.10022
평균	13.547	404.40329	13.538	827.11089	13.495	1242.40029
표준편차	0.030	0.42	0.018	0.85	0.013	0.65
RSD (%)	0.22	0.10	0.14	0.10	0.10	0.05
시험기준 RSD (%)	2.0% 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

○ 3,4-dicaffeoylquinic acid

- 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 곰취 추출물의 정확성과 회수율(%)

표 23. 3,4-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(50%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 1 (50%)	30.0	112.16628	30.7152	102.38
		112.24353	30.7353	102.45
		112.00549	30.6732	102.24
		112.45836	30.7914	102.64
		112.46738	30.7938	102.65
		112.71296	30.8579	102.86
			평 균	102.54
			표준편차	0.22
			RSD (%)	0.21

표 24. 3,4-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(100%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 2 (100%)	60.1	227.66316	60.8648	101.27
		228.50285	61.0840	101.64
		228.69373	61.1338	101.72
		229.28627	61.2885	101.98
		229.16582	61.2570	101.93
		229.84399	61.4341	102.22
			평 균	101.79
			표준편차	0.33
			RSD (%)	0.32

표 25. 3,4-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(150%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 3 (150%)	90.0	345.58389	91.6471	101.83
		346.27731	91.8281	102.03
		346.43814	91.8701	102.08
		346.45105	91.8735	102.08
		346.14679	91.7940	101.99
		347.36877	92.1130	102.35
			평 균	102.06
			표준편차	0.17
			RSD (%)	0.16

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0% 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

- 곰취 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	곰취 추출물					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	44.848	112.16628	44.862	227.66316	44.862	345.58389
2회	44.930	112.24353	44.880	228.50285	44.861	346.27731
3회	44.919	112.00549	44.872	228.69373	44.886	346.43814
4회	44.903	112.45836	44.852	229.28627	44.885	346.45105
5회	44.887	112.46738	44.851	229.16582	44.877	346.14679
6회	44.875	112.71296	44.836	229.84399	44.828	347.36877
평균	44.894	112.34233	44.859	228.85930	44.867	346.37766
표준편차	0.030	0.25	0.016	0.75	0.022	0.58
RSD (%)	0.07	0.23	0.04	0.33	0.05	0.17
시험기준 RSD (%)	2.0% 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본

시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

○ 3,5-dicaffeoylquinic acid

- 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 곰취 추출물의 정확성과 회수율(%)

표 26. 3,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(50%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 1 (50%)	30.0	592.99921	30.0195	100.06
		590.76276	29.9114	99.70
		588.33795	29.7943	99.31
		589.22028	29.8369	99.46
		589.08844	29.8306	99.44
		587.43237	29.7506	99.17
			평 균	99.52
			표준편차	0.32
			RSD (%)	0.32

표 27. 3,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(100%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 2 (100%)	60.1	1212.47009	59.9402	99.73
		1213.34790	59.9826	99.80
		1213.24792	59.9778	99.80
		1213.73999	60.0015	99.84
		1211.45007	59.8909	99.65
		1212.98486	59.9650	99.78
			평 균	99.77
			표준편차	0.07
			RSD (%)	0.07

표 28. 3,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(150%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 3 (150%)	90.0	1830.02441	89.7683	99.74
		1828.19104	89.6798	99.64
		1829.32239	89.7344	99.70
		1828.25366	89.6828	99.65
		1823.43079	89.4499	99.39
		1823.61548	89.4588	99.40
			평 균	99.59
			표준편차	0.15
			RSD (%)	0.16

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0% 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

- 곰취 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	곰취 추출물					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	47.459	592.99921	47.459	1212.47009	47.447	1830.02441
2회	47.527	590.76276	47.477	1213.34790	47.446	1828.19104
3회	47.517	588.33795	47.467	1213.24792	47.471	1829.32239
4회	47.499	589.22028	47.444	1213.73999	47.473	1828.25366
5회	47.486	589.08844	47.446	1211.45007	47.467	1823.43079
6회	47.472	587.43237	47.423	1212.98486	47.412	1823.61548
평균	47.493	589.64017	47.453	1212.87347	47.453	1827.13963
표준편차	0.026	1.98	0.019	0.81	0.023	2.88
RSD (%)	0.06	0.34	0.04	0.07	0.05	0.16
시험기준 RSD (%)	2.0% 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

○ 4,5-dicaffeoylquinic acid

- 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 곰취 추출물의 정확성과 회수율(%)

표 29. 4,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(50%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 1 (50%)	30.0	321.02808	30.8654	102.88
		320.47351	30.8170	102.72
		321.18344	30.8790	102.93
		320.35544	30.8066	102.69
		321.33719	30.8924	102.97
		321.05872	30.8681	102.89
			평 균	102.85
			표준편차	0.12
			RSD (%)	0.11

표 30. 4,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(100%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 2 (100%)	60.1	666.46814	61.0531	101.59
		669.17883	61.2900	101.98
		671.85529	61.5239	102.37
		672.88654	61.6140	102.52
		673.91638	61.7040	102.67
		676.10150	61.8950	102.99
			평 균	102.35
			표준편차	0.50
			RSD (%)	0.49

표 31. 4,5-dicaffeoylquinic acid 의 정확성(150%) 과 회수율(%)

	곰취 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정 확 성 - 3 (150%)	90.0	1025.57495	92.4352	102.71
		1027.40027	92.5947	102.88
		1029.35120	92.7652	103.07
		1030.74976	92.8874	103.21
		1030.07910	92.8288	103.14
		1033.31177	93.1113	103.46
			평 균	103.08
			표준편차	0.26
			RSD (%)	0.25

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0% 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

- 곰취 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	곰취 추출물					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	58.003	321.02808	57.892	666.46814	57.899	1025.57495
2회	58.015	320.47351	57.915	669.17883	57.906	1027.40027
3회	57.982	321.18344	57.859	671.85529	57.943	1029.35120
4회	57.959	320.35544	57.867	672.88654	57.968	1030.74976
5회	57.934	321.33719	57.892	673.91638	57.914	1030.07910
6회	57.904	321.05872	57.863	676.10150	57.820	1033.31177
평균	57.966	320.90606	57.881	671.73445	57.908	1029.41118
표준편차	0.042	0.40	0.022	3.45	0.050	2.69
RSD (%)	0.07	0.12	0.04	0.51	0.09	0.26
시험기준 RSD (%)	2.0% 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 곰취 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

(4) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- 곰취 추출물의 직선성 시험용액 3개의 Group을 가지고 각 Group에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 이들 각각 3개의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 ICH에서 규정한대로 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였음.

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times \text{y 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times \text{y 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

표 32. Chlorogenic acid의 검량선

① Group 1	y = 13.92280 x - 15.66441 (R^2=0.99997)
② Group 2	y = 13.80895 x - 10.58874 (R^2=0.99997)
③ Group 3	y = 13.82797 x - 10.48635 (R^2=0.99999)
종합 검량선	y = 13.85324 x - 12.24650 (R^2=0.99998)
검량선 기울기의 평균값	13.85324
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	2.96044

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 2.96044}{13.85324} = 2.14\text{mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 2.96044}{13.85324} = 0.71\text{mg/50mL}$$

표 33. 3,4-dicaffeoylquinic acid의 검량선

① Group 1	y = 3.81830 x - 6.75401 (R^2=0.99996)
② Group 2	y = 3.84523 x - 6.00562 (R^2=0.99992)
③ Group 3	y = 3.82885 x - 3.73166 (R^2=0.99999)
종합 검량선	y = 3.83079 x - 5.49710 (R^2=0.99996)
검량선 기울기의 평균값	3.83079
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	1.57404

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 1.57404}{3.83079} = 4.11\text{mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 1.57404}{3.83079} = 1.36\text{mg/50mL}$$

표 34. 3,5-dicaffeoylquinic acid의 검량선

① Group 1	y = 20.72118 x - 30.63264 (R^2=0.99994)
② Group 2	y = 20.75572 x - 30.64895 (R^2=0.99995)
③ Group 3	y = 20.63434 x - 24.26704 (R^2=0.99999)
종합 검량선	y = 20.70375 x - 28.51621 (R^2=0.99996)
검량선 기울기의 평균값	20.70375
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	3.67990

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 3.67990}{20.70375} = 1.78\text{mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 3.67990}{20.70375} = 0.59\text{mg/50mL}$$

표 35. 4,5-dicaffeoylquinic acid의 검량선

① Group 1	y = 11.37243 x - 37.31933 (R^2=0.99992)
② Group 2	y = 11.48056 x - 33.09173 (R^2=0.99988)
③ Group 3	y = 11.47620 x - 26.08995 (R^2=0.99995)
종합 검량선	y = 11.44307 x - 32.16700 (R^2=0.99992)
검량선 기울기의 평균값	11.44307
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	5.67151

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 5.67151}{11.44307} = 4.96\text{mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 5.67151}{11.44307} = 1.64\text{mg/50mL}$$

마. 밸리데이션시험 결론

- 곰취 추출물 중 Chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid 함량밸리데이션 시험방법에 대하여 자사에서 선정한 분석방법을 검토한 결과 다음과 같이 요약 할 수 있으며, 곰취 추출물 함량 밸리데이션 시험법은 적합하다고 판단됨.

(1) 특이성시험

- 곰취 추출물 시험용액을 만들 때 사용하는 50% EtOH에서 Chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid의 피크와 겹침을 확인 한 결과 이들 분석하고자하는 Chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid 피크가 겹치지 않는다는 것을 확인하였고, 또한 곰취 추출물에서의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 로서 본 시험법은 특이성이 있음을 확인하였음.

(2) 직선성시험

- 직선성시험에서는 곰취 추출물의 별도 3 Group의 직선성 시험용액을 만들고 이들을 가지고

시험한 결과 3 Group 모두 양호한 직선성을 나타내어 본 시험법의 직선성 기준에 적합한 것으로 나타났음.

☞ 곰취 추출물 중 Chlorogenic acid의 상관계수 (R^2) = 0.99998

☞ 곰취 추출물 중 3,4-dicaffeoylquinic acid의 상관계수 (R^2) = 0.99996

☞ 곰취 추출물 중 3,5-dicaffeoylquinic acid의 상관계수 (R^2) = 0.99996

☞ 곰취 추출물 중 4,5-dicaffeoylquinic acid의 상관계수 (R^2) = 0.99992

(3) 정확성시험

- 정확성시험에서는 직선성 시험에서 얻은 검량선으로 정확성 시험용액에서 얻은 피크면적을 대입하여 검량선법에 의해 얻어진 결과 값과, 실제로 취한 양을 가지고 계산한 결과 값을 비교해 보았을 때 그의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 의 범위 안에 있으며, 회수율의 상대표준편차가 2.0% 이하로서 본 시험법의 정확성을 확인 할 수 있었음.

(4) 피크유지시간 및 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

- 정확성 및 정밀성의 3가지 시험농도용액(50%, 100%, 150%용액)을 HPLC에 각각 6회 반복 주입하여 얻어진 총 18개의 크로마토그램 중 피크의 유지시간 및 피크면적에 대한 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 정밀성을 확인할 수가 있었음.

(5) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- 위의 직선성시험에서 얻은 검량선을 이용하여 ICH에서 규정하는 방법으로 검출한계(DL) 및 정량한계(QL)을 구하였다. 그의 결과는 다음과 같음.

① 곰취 추출물 중 Chlorogenic acid
정량한계 : 2.14 mg/50 mL
검출한계 : 0.71 mg/50 mL

② 곰취 추출물 중 3,4-dicaffeoylquinic acid
정량한계 : 4.11 mg/50 mL
검출한계 : 1.36 mg/50 mL

③ 곰취 추출물 중 3,5-dicaffeoylquinic acid
정량한계 : 1.78 mg/50 mL
검출한계 : 0.59 mg/50 mL

④ 곰취 추출물 중 4,5-dicaffeoylquinic acid
정량한계 : 4.96 mg/50 mL
검출한계 : 1.64 mg/50 mL

3. 곰취 pilot 추출 공정개발 및 추출물 제조와 관련 곰취 추출물 연구용 재공품 제조기록서

가. 곰취 Pilot추출 제조공정

- 곰취 원재료 100 kg을 50% 주정(원물대비 20배이상) 약 2,000L로 배합하여 실온에서 침지 추출을 실시함. 곰취 추출물을 10~13 ㎛ cartridge filter를 이용하여 여과하고 여과액을 40~45℃에서 감압 농축실시. 농축된 농축물은 동결건조를 통해서 건조, 분말화하여 최종 건조된 건조물 25 kg을 얻음.

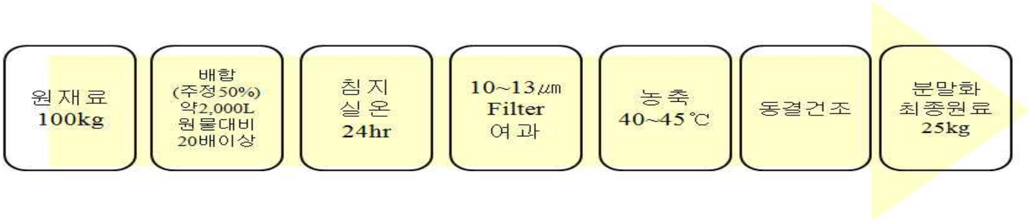
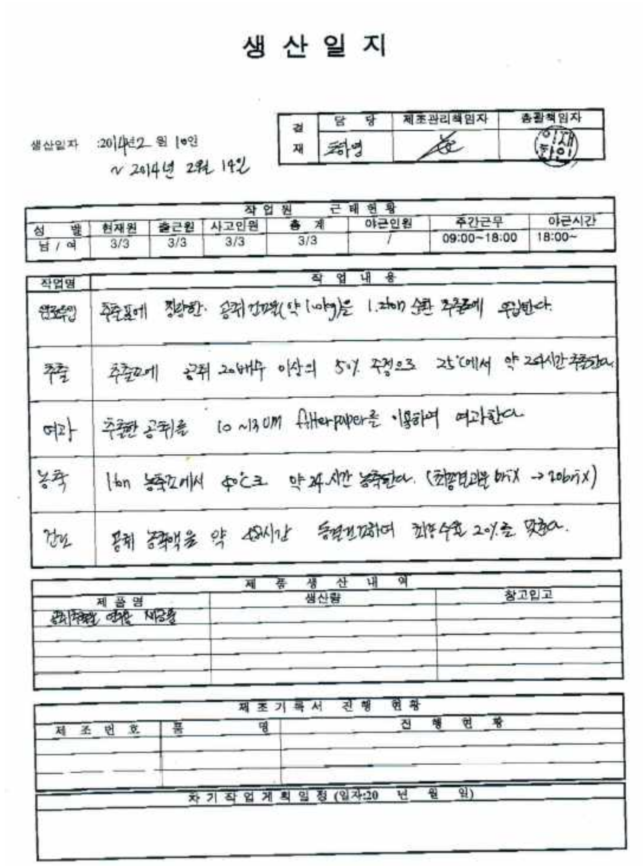


그림 64. 곰취 Pilot 추출 제조공정

나. 곰취 추출물 생산일지 및 확인서



생 산 일 지

생산일자 :2014년 2월 10일 ~ 2014년 2월 14일

결재	담당	제조관리책임자	총괄책임자
	하영	(서명)	(인)

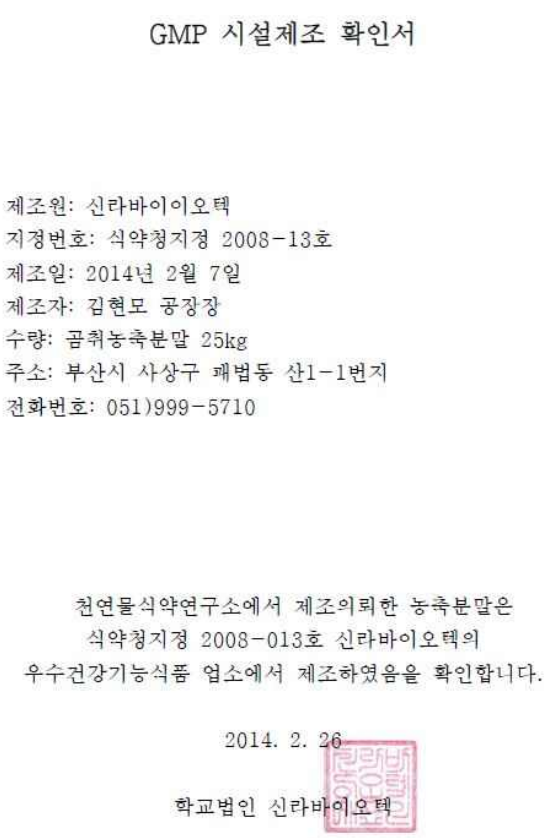
작업원 근태현황							
성별	현재원	출근원	사고인원	총계	야근인원	주간근무	야근시간
남 / 여	3/3	3/3	3/3	3/3	/	09:00~18:00	18:00~

작업명	작업내용
원료투입	추출조에 칭량한 곰취 건조원료(약 100kg)을 1.2ton 추출조에 투입한다.
추출	추출조에 곰취 20배수 이상의 50% 주정으로 25℃에서 약 24시간 추출한다.
여과	추출한 곰취를 10~13㎛ filterpaper를 이용하여 여과한다.
농축	1ton 농축조에서 40℃로 약 24시간 농축한다. (최종농도는 brix → 20brix)
건조	곰취 농축액을 약 48시간 동결건조하여 최종수분 20%를 맞춘다.

제품생산내역		
제품명	생산량	참고입고
곰취추출물 연구용 재공품		

제조기록서 진행현황		
제조번호	품명	진행현황

차기작업계획일정 (일자:20 년 월 일)



GMP 시설제조 확인서

제조원: 신라바이이오텍
지정번호: 식약청지정 2008-13호
제조일: 2014년 2월 7일
제조자: 김현모 공장장
수량: 곰취농축분말 25kg
주소: 부산시 사상구 괘법동 산1-1번지
전화번호: 051)999-5710

천연물식약연구소에서 제조의뢰한 농축분말은
식약청지정 2008-013호 신라바이오텍의
우수건강기능식품 업소에서 제조하였음을 확인합니다.

2014. 2. 26

학교법인 신라바이오텍

제 3 절 곰취 추출물의 안정성 시험 및 기준규격

1. 곰취 추출물의 가속시험 및 장기보존시험

가. 가속시험: 곰취 추출물을 대상으로 습도 75%, 온도 40℃의 조건에서 6개월 동안 2개월 단위로 지표성분의 함량 변이를 측정한다.

나. 장기보존시험: 곰취 추출물을 온도 25℃, 습도 60%의 조건에서 6개월 동안 2개월 단위로 지표성분의 함량 변이를 측정한다.

시 험 성 적 서(Initial)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.10.28 ~ 2014.10.29	발행일자	2015.03.06

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2014.10.28
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.612%	2014.10.29
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.649%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.359%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.888%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	-
시험일자	2014.10.28 ~ 10.29	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

Ⅰ. 시험방법 및 시험결과

가. 확인시험

⑴ 아래의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

☞ 시험결과 : 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

나. 함량시험 : Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상
3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상
3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상
4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상

① 표준액조제 : Chlorogenic acid 표준품 7.4mg, 3,4-dicaffeoylquinic acid 표준품 2.7mg, 3,5-dicaffeoylquinic acid 표준품 9.8mg, 4,5-dicaffeoylquinic acid 표준품 5.9mg을 정밀히 달아 50% EtOH로 녹여 정확히 50mL로 한다. 이 액 10mL을 50% EtOH로 50mL로 한다.

② 검액(SA)조제 : 곰취 추출물 60mg을 취하여 50% EtOH로 정확히 50mL로 한다.

③ 분석조건

㉠ 검출기 : 330nm ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5μM)

㉢ 이동상 A : 0.1% TFA in H_2O ㉣ 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	90	10
20	90	10
30	82	18
64	82	18
65	0	100
75	0	100

㉤ 유 속 : 1.0mL/min ㉥ 주입량 : 10uL

④ 함량계산

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50 x 10/50 x SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50 x 표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	-
시험일자	2014.10.28 ~ 10.29	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	7.4	767.34491
표준액 2		7.3	755.42975
평 균		7.35	761.38733
SA1		60	814.55585
SA2		60	819.38074
SA3		60	830.51892
평균함량		**2.612%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.7	296.87939
표준액 2		2.6	290.06403
평 균		2.65	293.47171
SA1		60	217.27562
SA2		60	218.41983
SA3		60	221.80043
평균함량		**0.649%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	9.8	1160.30029
표준액 2		9.8	1144.09448
평 균		9.8	1152.197385
SA1		60	1188.82227
SA2		60	1195.08215
SA3		60	1216.76282
평균함량		**3.359%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	5.9	688.01331
표준액 2		5.8	675.73352
평 균		5.85	681.873415
SA1		60	659.25122
SA2		60	663.21356
SA3		60	675.90869
평균함량		**1.888%**	

시 험 성 적 서(가속 2개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.12.29 ~ 2014.12.30	발행일자	2015.03.06

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2014.12.29
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.630%	2014.12.30
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.640%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.369%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.920%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	-
시험일자	2014.12.29 ~ 12.30	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

함량 결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	7.3	744.24603
표준액 2		7.3	746.55127
평 균		7.3	745.39865
SA1		60	824.08807
SA2		60	848.37946
SA3		60	817.82770
평균함량		**2.630%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.7	288.17245
표준액 2		2.7	288.50494
평 균		2.7	288.33869
SA1		60	209.29111
SA2		60	215.25241
SA3		60	212.09200
평균함량		**0.640%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	9.7	1116.70789
표준액 2		9.7	1118.95386
평 균		9.7	1117.830875
SA1		60	1179.13232
SA2		60	1226.42310
SA3		60	1179.15784
평균함량		**3.369%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	5.8	670.82953
표준액 2		5.8	671.19983
평 균		9.7	1117.830875
SA1		60	677.55359
SA2		60	694.14099
SA3		60	682.21863
평균함량		**1.920%**	

시 험 성 적 서(가속 4개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2015.03.02 ~ 2014.03.05	발행일자	2015.03.06

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2015.03.04
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.579%	2015.03.05
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.613%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.304%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.896%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	-
시험일자	2015.03.02 ~ 03.05	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	6.0	621.56189
표준액 2		6.0	621.94910
평 균		6.0	621.755495
SA1		60	813.43677
SA2		60	841.74719
SA3		60	822.30182
평균함량		**2.579%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.0	229.81808
표준액 2		2.0	229.31035
평 균		2.0	229.564215
SA1		60	212.83231
SA2		60	223.65436
SA3		60	217.97708
평균함량		**0.613%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	7.3	849.08142
표준액 2		7.2	845.42346
평 균		7.25	847.25244
SA1		60	1168.50708
SA2		60	1219.35083
SA3		60	1194.92212
평균함량		**3.304%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	4.5	530.66968
표준액 2		4.4	528.83844
평 균		4.45	529.75406
SA1		60	678.01508
SA2		60	711.90356
SA3		60	695.96338
평균함량		1.896%	

시 험 성 적 서(가속 6개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2015.04.28 ~ 2014.04.29	발행일자	2015.06.16

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2015.04.28
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.509%	2015.04.29
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.611%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.117%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.983%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	-
시험일자	2015.04.28 ~ 04.29	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

지표성분의 함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	5.8	605.49188
표준액 2		5.9	606.91699
평 균		5.85	606.204435
SA1		60	779.65460
SA2		60	796.29578
SA3		60	810.50690
평균함량		**2.509%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.0	222.01392
표준액 2		1.9	221.89496
평 균		1.95	221.95444
SA1		60	209.10794
SA2		60	214.40971
SA3		60	217.14032
평균함량		**0.611%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	7.0	819.47009
표준액 2		7.0	819.65503
평 균		7.0	819.56256
SA1		60	1102.48059
SA2		60	1123.07239
SA3		60	1127.86719
평균함량		**3.117%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	4.2	513.85345
표준액 2		4.2	511.32504
평 균		4.2	512.589245
SA1		60	725.40924
SA2		60	743.48706
SA3		60	746.24640
평균함량		**1.983%**	

시 험 성 적 서(장기 2개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.12.29 ~ 2014.12.30	발행일자	2015.03.06

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2014.12.29
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.642%	2014.12.30
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.639%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.411%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.892%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 6
시험일자	2014.12.29 ~ 12.30	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

지표성분의 함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	7.3	744.24603
표준액 2		7.3	746.55127
평 균		7.3	745.39865
SA1		60	811.28644
SA2		60	843.82672
SA3		60	822.43268
평균함량		**2.642%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.7	288.17245
표준액 2		2.7	288.50494
평 균		2.7	288.338695
SA1		60	207,07619
SA2		60	213.51787
SA3		60	208.30698
평균함량		**0.639%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	9.7	1116.70789
표준액 2		9.7	1118.95386
평 균		9.7	1117.830875
SA1		60	1184.28381
SA2		60	1230.73340
SA3		60	1198.45740
평균함량		**3.411%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	5.8	670.82953
표준액 2		5.8	671.19983
평 균		5.8	671.01468
SA1		60	657.35132
SA2		60	681.95465
SA3		60	665.12085
평균함량		**1.892%**	

시 험 성 적 서(장기 4개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2015.03.02 ~ 2014.03.05	발행일자	2015.03.06

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2015.03.04
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.606%	2015.03.05
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.604%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.359%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.854%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 6
시험일자	2015.03.02 ~ 03.05	시험규격	별첨	작성일자	2015.03.06

지표성분의 함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	6.0	621.56189
표준액 2		6.0	621.94910
평 균		6.0	621.755495
SA1		60	845.45154
SA2		60	829,94586
SA3		60	825.44562
평균함량		**2.606%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.0	229.81808
표준액 2		2.0	229.31035
평 균		2.0	229.564215
SA1		60	218.44104
SA2		60	214.94099
SA3		60	214.50040
평균함량		**0.604%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	7.3	849.08142
표준액 2		7.2	845.42346
평 균		7.25	847.25244
SA1		60	1232.94543
SA2		60	1215.66626
SA3		60	1205.24609
평균함량		**3.359%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	4.5	530.66968
표준액 2		4.4	528.83844
평 균		4.45	529.75406
SA1		60	684.39258
SA2		60	680.94043
SA3		60	680.39221
평균함량		**1.854%**	

시 험 성 적 서(장기 6개월)

검 체 명	G49	제조번호	001
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2015.04.28 ~ 2014.04.29	발행일자	2015.06.16

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2015.04.28
2	함량시험	Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)으로서 2.0% 이상	2.532%	2015.04.29
		3,4-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 0.5% 이상	0.596%	
		3,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 2.7% 이상	3.276%	
		4,5-dicaffeoylquinic acid ($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)으로서 1.5% 이상	1.854%	

시 험 기 록 서

검체명	G49(001)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 6
시험일자	2015.04.28 ~ 04.29	시험규격	별첨	작성일자	2015.06.16

지표성분의 함량결과

* Chlorogenic acid($C_{16}H_{18}O_9$: 354.31)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.3	5.8	605.49188
표준액 2		5.9	606.91699
평 균		5.85	606.204435
SA1		60	794.17743
SA2		60	801.78058
SA3		60	873.32104
평균함량		**2.532%**	

* 3,4-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	98.9	2.0	222.01392
표준액 2		1.9	221.89496
평 균		1.95	221.95444
SA1		60	204.77802
SA2		60	207.43884
SA3		60	228.55199
평균함량		**0.596%**	

* 3,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.2	7.0	819.47009
표준액 2		7.0	819.65503
평 균		7.0	819.56256
SA1		60	1160.32507
SA2		60	1176.50464
SA3		60	1276.22119
평균함량		**3.276%**	

* 4,5-dicaffeoylquinic acid($C_{25}H_{24}O_{12}$: 516.45)

	순도(%)	취한량(mg)	피크면적
표준액 1	99.6	4.2	513.85345
표준액 2		4.2	511.32504
평 균		4.2	512.589245
SA1		60	671.89618
SA2		60	682.05865
SA3		60	770.59235
평균함량		**1.854%**	

2. 곰취 추출물의 기준규격

가. 영양성분 분석(분석기관: 한국기능식품연구원)

제 D2015020445 호

검 사 성 적 서

검체명	천연물추출물	제조일자 (유통기한)	2014-02-26
의뢰인 업체명	재단법인경기과학기술진흥원		
의뢰인 주 소	경기도 수원시 영통구 광교로 147 (이의동)		
의뢰인 성 명	곽재원		
제조번호		접수년월일	2015-02-09
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015020445

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
열량(Kcal/100g)	331.59Kcal/100g	한아름
탄수화물(%)	63.05%	한아름
조단백질(%)	9.43%	이경민
조지방(%)	4.63%	주은선
수분(%)	6.28%	김혜윤
회분(%)	16.61%	김혜윤
나트륨(mg/100g)	40.23mg/100g	김세미
납(mg/kg)	0.7903mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0397mg/kg	류미진
총수은(mg/kg)	0.017mg/kg	박새롬이
총비소(mg/kg)	0.2436mg/kg	류미진
대장균군	음성	장정순

2015 년 2 월 17 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2900 FAX(031)628-0400-1

나. 곰취 원료의 기준규격 설정

항 목	기 준	비 고
성상	녹색~암녹색을 가지는 분말	
Chlorogenic aicde (지표성분 1)	2.08 ~ 3.13%	
3,4-dicaffeoyl quinic acid (지표성분 2)	0.51 ~ 0.77%	
3,5-dicaffeoyl quinic acid (지표성분 3)	2.68 ~ 4.03%	
4,5-dicaffeoyl quinic acid (지표성분 4)	1.51 ~ 2.26%	
수분	6.28%	10% 이하
중금속	납 0.7903 mg/kg	3.0 mg/kg 이하
	카드뮴 0.0397 mg/kg	0.5 mg/kg 이하
	총수은 0.017 mg/kg	0.5 mg/kg 이하
	총비소 0.2435 mg/kg	20 mg/kg 이하
영양성분	열량 331.59 Kcal/100g	
	탄수화무 63.05%	
	조단백질 9.43%	
	조지방 4.63%	
	회분 16.61%	
	나트륨 40.23 mg/kg	
대장균수	음성	음성

제조공정

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 수율 (kg)
원재료	곰취 100Kg	
↓		
추출	50% 주정 1,000L (24 hr)	
↓		
여과		
↓		
농축	감압 농축(20 Brix)	
↓		
건조	동결건조	
↓		
원료		25% (25 Kg)

섭취근거 및 섭취량

▪ 민간에서는 봄에 어린잎을 채취하여 쌈을 싸먹거나 그대로 무쳐서 나물 로 먹기도 하였으며, 녹즙의 형태 또는 가공제품으로 광범위하게 섭취. (Choi MS, Yang JK (2008) Industrial potentiality of wildedible greens. J Food Research Technol, 21, 1-7)

▪ 하루 4~12그램을 물로 달여서 복용하거나 가루내어 충복(沖服) 즉 물에 타서 복용<약초의 성분과이용>

▪ 허리와 다리가 아픈 요퇴통(腰腿痛)에는 "곰취 80 g을 가루내어 1일 2회, 1회에 8g을 맹물을 끓여 식힌 백탕과 함께 충복(沖服) 즉 물에 타서 복 용한다."고 기록하고 있다.<합서중초약-중국>

▪ 임상시험 섭취량 : 200 mg/2회/day

제 4 절 인체적용시험 및 IRB승인 신청

1. 제형 연구 및 시제품 제작

가. 시제품 제형 개발

- 캡슐제형 : 원활한 인체적용시험을 위한 시제품으로 곰취 원료가 포함된 캡슐형태의 제형개발

나. 제조원가

구분		곰취추출물		
		단가(원)	사용량	수율 25%
원재료	곰취	5,000	100.0	500,000
	에탄올	3,800	500.0	1,900,000
				0
	소계			2,400,000
인건비	생산직	100,000	3.0	300,000
	소계			300,000
장비 및 부자재	추출/농축	356,250	1.0	356,250
	열풍건조기	110,000	3.0	330,000
	포장지 5kg	200	5.0	1,000
	캡슐제작	180	1,000.0	180,000
	박스 10kg	1,500	3.0	4,500
	운송비	4,000	3.0	12,000
				0
	소계			883,750
합계				3,583,750
kg당 제조원가				143,350

2. 인체적용시험 계획서

인 체 적 용 시 험 계 획 서

심혈관 질환 위험 인자를 가진 대상자에서 "곰취추출물"의 혈행개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A single center, randomized double-blind placebo controlled trial to evaluate the efficacy and the safety of "LF01" in healthy subjects with high Risked Cardio-vascular Disease

시험계획서번호	LF-01
버전(작성일)	1.0 (2015.07.08)
인체적용시험의뢰자	경기과학기술진흥원
인체적용시험수탁기관	㈜파마크로(PharmaCRO)

기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 제품을 복용 받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 경기과학기술진흥원 및 ㈜파마크로(PharmaCRO)의 사전서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

❖ 본 인체적용시험계획서에 사용된 약어 및 용어정의

약어 및 용어	정 의
시험의뢰자	경기과학기술진흥원
시험군	LF-01
대조군	Placebo, 대조제품
임상실험실 검사	혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변검사
활력징후	혈압, 맥박수 등
ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Events
ALT (SGPT)	Alanine Aminotransferase: GPT
ALP	Alkaline Phosphatase
AST (SGOT)	Aspartate Aminotransferase: GOT
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRA	Clinical Research Associate (임상시험 모니터 요원)
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
DBP	Diastolic Blood Pressure, 이완기 혈압
FAS	Full Analysis set
Hb	Hemoglobin
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
Hct	Hematocrit
HDL cholesterol	High density Lipoprotein cholesterol
IRB	Institutional Review Board (임상시험심사위원회)
ITT	Intention To Treat
KGCP	Korean good clinical practice
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
LDL cholesterol	Low density Lipoprotein cholesterol
PP	Per protocol
RBC	Red Blood Cell
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase
TG	Triglyceride
Wash-out period	약물투여 중지기간
WBC	White Blood Cell

❖인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 제 목	심혈관 질환 위험 인자를 가진 대상자에서 "곰취추출물"의 혈행개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책 임 자	양지병원 가정의학과 김창오 MD
인체적용시험 공동 연구자	양지병원 외과 강승현 MD
인체적용시험 의 뢰 자	경기과학기술진흥원
인체적용시험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 18 개월
인체적용시험 대 상	만 40 세 이상 만 75 세 미만의 남녀로 심혈관 질환 위험 인자 가진 대상자
인체적용시험 목 적	심혈관 질환 위험 인자 대상자에게 LF-01 을 경구 투여한 후 혈행 개선 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다
인체적용시험 디 자 인	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용 제 품	• 시험군: LF-01 • 위약군: 대조제품(위약)
용법 · 용량 및 복용방법	아침, 저녁 식전 30분에 1캡슐씩 1일 2회,(하루 총 2캡슐/일)복용
복 용 기 간	8 주 복용
대 상 자 수	총 60 예
선 정 기 준	***선정기준*** (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다) 1) 만 20세 이상 만 65세 미만의 남성 또는 여성 2) 다음 심혈관 질환 위험인자 중 2 가지 이상 해당하는 대상자 (a) 혈압이 높은 자(수축기 135mmHg이상 160mmHg이하, 이완기 85mmHg이상 95mmHg이하) (b) 혈중 콜레스테롤 수치가 높은 자(LDL 130~200mg/dL) (c) 공복 혈당이 100mg/dL 이상 130mg/dL이하 인 자 3) 본 인체적용시험에 참여할 것을 자발적으로 서면 동의한 대상자
제 외 기 준	***제외기준*** (다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다)

1) 천연물에 대한 알레르기 등 과민반응 병력이 있는 자
2) 12주 이내 마취를 요하는 수술 병력이 있는 자
3) 스크리닝 이전 2주 이내에 오메가-3 지방산 함유 유지, 감마리놀렌산 함유 유지, 홍삼, 인삼, 영지버섯 자실체 추출물, 은행잎 추출물 등과 같은 혈액 흐름에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품을 섭취하였거나 섭취중인 자
4) 스크리닝 이전 2주 이내에 아스피린, 항응고제, 항혈소판 제제를 투여하였거나 투여중인 자
5) 조절되지 않는 고혈압 환자(수축기 혈압 160mmHg이상 또는 이완기 혈압 95mmHg 이상)
6) 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복혈당 180mg/dl 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우)
7) 스크리닝 이전 4주 이내에 다른 임상(인체적용)시험에 참여한 자
8) 임상적으로 유의한 신기능 장애(Serum Creatinine이 2.0mg/dl 이상)가 있는 자
9) 임상적으로 유의한 간 기능 장애(혈청 내 간수치(ALT, AST, γ-GT)가 정상의 상한선보다 2.5배 이상)가 있는 자
10) 임부, 수유부 및 의학적으로 신뢰할 만한 피임 방법(콘돔, 살정제, 자궁 내 피임 장치, 경구피임제, 주사, 호르몬 이식, 불임수술 등)을 사용하지 않는 가임여성
11) 기타 인체적용시험 책임자 및 담당자가 판단할 때 본 인체적용시험의 결과 평가에 영향을 미칠 수 있는 조건을 가지고 있다고 판단되는 자

시험방법

Screening 방문	중간방문			Follow-up 방문
Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	필요 시
−2주~ 0일	0주(0일)	4주(±7일)	8주(±7일)	

Visit 2 에서 대상자 적합성 평가에 적합한 대상자는 시험군 또는 위약군에 각각 1:1 로 무작위 배정되어 해당하는 인체적용시험용제품을 교부 받는다. 이후 8 주간 시험제품 혹은 대조제품을 복용하게 되며, 8 주간 복용 후 방문하여 기능성과 안전성을 평가하고 인체적용시험을 종료한다.

기능성평가

① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):
- 혈소판 응집능(ADP induced platelet aggregation) 의 변화치

② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):
- Prothrombin time, Activated partial thromboplastin time 의 변화율
- Lipid profiles 의 변화치
- CRP(C-reactive protein) 의 변화치
- Serotonin의 변화치

	혈압(수축기 및 이완기)의 변화치
안전성 평가	시험제품 복용 전과 복용 중, 복용 8 주 후에 임상실험실 검사, 활력 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.
병용금기 약물	다음 약물의 사용은 시험제품의 안전성 또는 기능성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서, 이러한 약물은 인체적용시험 종료 시까지 금지되며, 다음 약물을 복용하는 대상자는 인체적용시험에서 제외되어야 한다. 1) 혈행 개선에 도움을 주는 건강기능식품 2) 와파린, 헤파린 등의 항응고제(anticoagulants) 3) 아스피린 등 항혈소판제(antiplatelet drugs) 4) 혈전용해제(thrombolytic agent) 5) 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs) 6) 항히스타민제(antihistamines) 7) 삼환계 항우울제(TCAS) 8) 혈관 수축제 및 혈관 확장제(vasopressor, vasodilator) 이외의 연구자 판단에 따른 약물의 흡수, 대시 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물

❖ 인체적용시험 흐름도

시험항목	Screening	Treatment			Follow-up
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4 [8]	방문 [9]
	-2주~ 0일	0주(0일)	4주(±5일)	8주(±5일)	필요 시
대상자 동의서 취득	O				
인구학적 조사 [1]	O				
신체 검사 [2]	O			O	
활력징후 [3]	O	O	O	O	O
병력 및 동반질환	O				
생활습관 조사		O		O	
임상실험실 검사 [4]	O	O	O	O	O
임신여부 검사[5]	O	O	O	O	O
대상자 적합성 평가[6]	O				
무작위 배정		O			
혈액 응고 검사[7]		O		O	O
Serotonin 및 CRP 측정		O		O	
신행/병용 약물 조사	O	O	O	O	O
IP 교부		O	O		
IP 반납/복용 순응도			O	O	
이상반응 확인			O	O	O

1) 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사한다.
2) 신체검사(신장, 체중): 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용해야 하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정한다. 방문 4에서는 체중만 측정한다.
3) 활력징후(혈압, 맥박수, 체온): 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.
4) 임상 실험실 검사: 방문1 이전 2주 내에 본원에서 실시한 임상실험실 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문2 에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.
   혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets count, ESR, WBC Differential count
   혈액화학적 검사: Total bilirubin, ALP, Total Protein, Albumin, AST, ALT, r-GTP, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL, HDL, FBS, HbA1C
   소변검사: Protein(=Albumin), Glucose, RBC, WBC,
5) 임신여부 검사: 불임수술 및 폐경이 확인된 대상자를 제외하고, 효과적인 피임법을 실시하지 않은 가임 여성에 한하여 urine β HCG pregnancy test를 통해 임신여부를 확인 한다.
6) 대상자 적합성 평가: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 방문 2 이전에 실시한다.
7) 혈액 응고 검사: 혈소판 응집능, PT, aPTT
8) 조기 종료 시 종료방문과 동일한 검사 및 평가를 수행한다.
9) Follow up 방문: 이상반응이 있거나 임상실험실 검사 이상으로 follow up이 필요한 경우 실시한다.

3. IRB 승인

에이치플러스 양지병원 임상시험심사위원회
H PLUS YANGJI HOSPITAL INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

[서식14]

심사결과 통지서

과제번호	-			
수 신	시험책임자	김창오	직위	과장
	의뢰기관	경기과학기술진흥원 천연물신약연구소		
연구과제 명	심혈관 질환 위험 인자를 가진 대상자에서 "곰취추출물"의 혈행개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험			
	Protocol NO.	LF-01		
심의 종류	■ 정규심의 □ 신속심의			
회의소집요청일	2015년 07월 09일			
연구정보	평가대상	□ 의약품 □ 생물학적 제제 ■ 건강기능식품 □ 기타		
	성분명	곰취추출물		
	상품명	-		
	연구단계	□ 제1상 생물학적동등성시험 □ 제1상 임상시험 □ 제2상 □ 제3상 □ 제4상 □ PMS ■ 기타 (인체적용시험)		
	연구주도	■ 의뢰자 주도임상(SIT) □ 연구자 주도 임상 (IIT)		
	용도	■ 학술용 □ 국내허가용(KFDA) □ 해외허가용		
심의일자	2015년 07월 16일			
제출서류목록 및 버전번호	1. 연구계획서 요약 2. 연구계획서 3. 대상자 설명문 및 동의서 4. 대상자 모집 문건 (모집매체) 5. 증례기록서 6. 피해 보상에 관한 규약 7. 보험증 사본 8. 임상시험자자료집 9. 시험책임자의 최근 이력 또는 기타경력에 관한 문서 10. 연구비내역서 11. 이해상충 서약서			
심의결과	■ 승인 □ 시정승인 □ 보완 □ 반려 □ 중지 또는 보류			
승인일자	2015 년 07 월 20 일			
심의위원	양정선(의장), 김은순(부의장), 이해리(위원), 홍순재(위원), 최경석(위원), 김은희(위원)			
심의의견	1. 관련규정을 근거로 검토한 결과 IRB 에서는 해당 연구의 진행을 승인 하기로 결정 하였으며, 연구 진행 시 대상자의 중대한 이상반응 및 안전과 관련된 문제가 발생 하였을 경우 심사위원회에 신속히 보고하여 주시기 바랍니다. 2. 연구자는 KGCP 규정을 준수하여 시험 진행 바랍니다.			

H+YJH IRB SOP
Version 2.2 (26 June 2015)

	연구자는 예상되는 이상반응에 대한 대처 방안을 세워 안전에 문제가 없도록 진행 하여 주시기 바라며, 이에 따른 근거자료를 자세하게 기록해 주시길 바랍니다.
본 임상시험심사위원회는 국제표준화추진회의(ICH), 의약품임상시험관리기준 및 생명윤리및안전에관한법률 등 관련 법규를 준수합니다. 본 시험과 이해상충관계가 있는 위원이 있을 경우 해당 위원은 시험의 심사에서 배제 하였습니다.	

임 상 시 험 심 사 위 원 회
에 이 치 플 러 스 양 지 병 원 장 (직인)

제 5 절 곰취 추출물의 혈행개선 관련 활성에 대한 기능성 평가

1. 곰취 추출물의 혈행개선 *in vitro* 효능 평가방법

가. 항산화 실험

(1) ABTS assay

7 mM ABTS buffer와 2.45 mM potassiμM persulfate buffer ($K_2S_2O_8$) 제조 후 ABTS : $K_2S_2O_8$= 2 : 1 ratio로 섞은 후 12-16시간 차광하여 반응시킨다. stock buffer를 734nm에서 측정한 O.D. 값이 0.70±0.02가 나오도록 희석하고 buffer 100 ul 농도별로 희석한 추출물 시료 100 ul를 첨가하고 실온에서 6분간 반응시킨다. 이 시료를 96well plate로 옮겨 734 nm에서 흡광도를 측정하고 양성대조군으로 항산화제인 BHA를 사용하였고, 각각의 시료에 대한 IC_{50} 값을 구해 평가하였음.

Inhibition % = (Control-sample) / Control X 100

(2) DPPH assay

200 μM DPPH solution 만든 후 DPPH buffer와 농도별로 희석한 시료를 넣어서 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정한다. 양성대조군으로 항산화제인 BHA (Butylated hydroxyanisole)를 사용하였고, 각각의 시료에 대한 IC_{50} 값을 구해 평가하였음.

Inhibition % = [(C-D)-(A-B)] / (C-D) X 100

	DPPH	시 료	MeOH	시료용해 용매
A	100 ㎕	100 ㎕		
B		100 ㎕	100 ㎕	
C	100 ㎕			100 ㎕
D			100 ㎕	100 ㎕

나. 지방량 및 지질 축적 억제 효능 평가 실험

(1) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도

마우스 전구지방세포인 3T3-L1을 10 % BCS DMEM 배지를 넣고 37℃, 5% CO_2의 조건에서 배양한다. 3T3-L1 전구지방세포를 24 well plate에 5×10^4/well의 세포 수로 분주 후, 100 % confluency 시점이 되자 2일 동안 더 유지시킨다. 전구지방세포는 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μM dexamethasone, 1 μg/ml 인슐린)를 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48 시간 후 1 μg/ml 인슐린이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양한다. 그 후 2일 마다 4일 동안 10

% FBS DMEM 배양액으로 교체하고 지방세포 분화를 유도하는 동안 시료를 농도별로 처리하고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포 분화 정도를 관찰하였음.

(2) Oil red O 염색 및 분석

지방의 축적 정도를 확인하기 위해 오일레드 O 염색을 실시한다. 상기 전구지방세포 분화 유도방법과 마찬가지로 지방세포의 분화 정도를 오일 레드 O 염색을 통해 1차적으로 현미경을 통해 확인하고, 지방세포 염색 정도는 510 nm 흡광도에서 세포의 분화 된 지방의 양을 측정하였음.

(3) Real time PCR

지방세포 분화 유도 방법과 같이 시료를 처리 한 후 8일 동안 분화를 시켜 분화가 완벽히 된 3T3-L1 세포를 PBS로 두 번 washing하고 cell pellet을 모아 RNA prep kit를 사용하여 RNA만 분리한다. 추출된 RNA를 1 μg 사용하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 primer를 이용하여 유전자 발현양을 측정한다. 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하고 C/EBPα와 PPARɣ, 지방 세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현 정도를 Real-time PCR로 확인하였음.

(4) Western blotting

지방세포 분화 유도 방법과 같이 3T3-L1 세포에 시료를 이틀 간격으로 처리한 후 세포를 PBS로 두 번 washing하고 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM sodiμM chloride, 1 % NP-40, 0.5 % sodiμM dexycholate, 0.1 % sodiμM dodecyl sulfate, protease inhibitor)를 이용하여 세포를 용해시킨다. 13000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 단백질을 추출 정량하여 10 % SDS-PAGE gel을 이용하여 전기 영동한다. 전기 영동된 protein들을 membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 포함하는 TBST로 blocking 한다. 1차 항체와 2차 항체로 반응시킨 후 ECL Thermo scientific을 통해 PPARɣ 및 C/EBPα 단백질의 발현 정도를 β-actin의 발현 정도와 비교하여 평가하였음.

다. 곰취 추출물의 혈행개선 *ex-vivo* 효능 평가

(1) Washed platelets의 분리

실험동물은 male Sprague-Daweley rats를 사용하였으며, 사육장의 온도는 22 ± 2℃, 습도는 55 ± 5%로 유지하였고 충분한 물과 사료를 공급하여 사육하였다. 체중이 300-400g이 되는 것을 졸레틸과 럼푼으로 마취시킨 후 항응고제로 0.15 M sodiμM citrate (vacutainer, Becton dickinson, franklin Lakes, NJ, USA)를 혈액과 1:9(v/v)의 비율이 복대동맥에서 18G 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 200g에서 15분간 원심분리하여 상층액의 platelet rich plasma (PRP) 얻었고 다시 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻어 실험에 사용하였음.

(2) 혈소판 응집 측정

혈소판의 응집능은 혈소판의 응집에 따라 형성되는 두 전극 사이에 형성된 전기적 저항(ohm)의 변화로 나타내었다. 시험물질을 50% EtOH에 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℃에서 1분 30초정도 base line 확인 후 혈소판 응집 촉진물질인 collagen 5 μg/ml을 가하여 6분간 반응시켜 응집을 유도하였고 대조군에 대한 응집억제 정도를 비교하였음.

(3) 혈전 용해능 측정

PBS로 fibrinogen의 최종 농도가 0.6%가 되도록 완전히 용해시킨 후 1ml씩 6 well plate에 옮기고 thrombin 용액 50NIH units와 직경 6mm filer paper disc를 넣고 30분 이상 상온에 방치하여 고화시켰다. 대조군인 plasmin과 시료를 각각 점적하여 fibrin plate상에 놓고 37℃에서 6시간동안 반응시킨 후 fibrin plate가 용해되어 형성된 투명환의 넓이를 측정하여 비교하였음.

(4) Serotonin 분비 측정

분리된 혈소판에 곰취 추출물 (500, 1000, 2000 μg/ml)과 대조군 DHA (5, 10 μM) 농도로 37℃ 10분 처리 후 collagen 5 μg/ml 37℃ 3분 처리 후 5 mM EDTA 넣고 반응을 종결시킨다. serotonin ELISA kit (abcam #ab133053, cambridge, UK)를 사용하여 serotonin 양을 정량하였음.

(5) Thromboxane B_2 측정

serotonin 분석 방법과 같이 Thromboxane B_2 ELISA kit (Enzolifescience #ADI-900-002, Lausen, Switzerland)를 사용하여 실험방법에 따라 TXB_2양을 정량함.

(6) ICAM-1 and VCAM-1 발현 측정

12 well plate에 커버글라스를 넣고 HUVEC 세포를 $6X10^4$/well seeding 후 TNF-α 처리한 serμM free 배지에 곰취 추출물과 DHA를 처리후 24시간 배양한다. 세포를 고정시킨 후 PBS로 두 번 washing 하여 5% BSA in PBS로 blocking 후 1차 항체와 2차 항체로 반응시킨 후 DAB 발색을 통해 ICAM-1과 VCAM-1 발현 정도를 현미경으로 사진 찍어 관찰 하였음.

2. 곰취 추출물의 *in vivo* 혈행개선 유효성 평가

가. 사용동물 및 환경조건

○ 사용동물

(1) 종 및 계통 : C57BL/6

(2) 공급 및 생산처

명 칭 : 대한바이오링크

주 소 : 충북 음성군 삼성면 대야리 113

(3) 입수 시 주령(성별) 및 체중범위 : 6주령(수컷), 20-23 g

(4) 순화방법 및 기간

일주간의 검역, 순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시. 반입 시 및 검역, 순화기간 종료시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였음.

(5) 군분리

투여 전일에 체중을 측정하고 excel program을 이용하여, 각 군간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리하였음.

(6) 개체식별

개체식별은 미부 표시법 및 사육상자 별 개체식별카드 표시법을 이용하였다.

○ 환경조건

(1) 온습도 범위 : 온도 22±2℃, 상대습도 45±10%

(2) 환기횟수 : 10~15 회/시간

(3) 조명시간 및 명암주기 : 혈광등조명 12 hr

(4) 조도 : 150 ~ 205 Lux

(5) 소음 : 50 dB이하

(6) 사육 상자 및 사육밀도

폴리카보네이트 사육상자(143 W × 256 L × 127 H (mm), Jeung-Do B&P), cage당 3마리씩 수용 하였음.

(7) 사료 및 음수의 공급

사료는 일반식이, 음수는 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(250 mL)에 넣어 자율 급이하였음.

○ 사료

(1) 일반식이 : 18% Protein (2918C), Adjusted Calories Diet (TD.88137)

(2) 사료 공급 및 생산처

명 칭 : Harlan Laboratories Inc, USA 8520 Allison

주 소 : Pointe Bivd,suite 400, Indianapolis,IN 46250

< 사료조성표 >

18% Protein, 2918C		Adjusted Calories Diet, TD.88137	
Macronutrients	%	Macronutrients	%
Crude Protein	18.6	Protein	17.3
Fat (ether extract)	6.2	Carbohydrate	48.5
Carbohydrate	44.2	Fat	21.2
Crude Fiber	3.5		
Neutral Detergent Fiber	14.7	Formula	g/Kg
Ash	5.3	Casein	195.0
CalciμM	1	DL-Methionine	3.0
Phosphorus	0.7	Sucrose	341.46
Non-Phytate Phosphorus	0.4	Com Starch	150.0
SodiμM	0.2	Andydrous Milkfat	210.0
PotassμM	0.6	Cholesterol	1.5
Chloride	0.4	Cellulos	50.0
MagensiμM	0.2	Mineral Mix, AIN-76 (170915)	35.0
Etc	4	CalciμM Carbonate	4.0
		Vitamin Mix, Teklad (40060)	10.0
		Ethoxyquin	0.04

○ 시료

곰취 50% 에탄올 추출물은 제1세부 연구기관 책임자로부터 공급받아 사용하였음.

시험물질명	외관/성상	제공자	수급량
곰취 50%에탄올추출물	분말상태	주관연구책임자	42.11g

나. 3주 MTD (MaximμM Tolerated Dose) 평가

1주일 동안의 순화기간이 끝난 수컷 마우스를 무작위 법을 이용하여 군 분리 이후 3주일 동안 매일 같은 시간에 경구투여용 존데를 이용하여 각 용량에 따라 50% 곰취 추출물을 경구투여 하였다. 주 3회 몸무게를 측정하였으며 동물 희생 후 혈액을 채취하여 생화학분석을 실시하였다.

다. High Carbohydrate Diet로 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)과 고중성지방혈증(dyslipidemia)을 유도시킨 마우스에서의 곰취 에탄올 추출물의 유효성 평가

6주령의 C57 BL/6 마우스를 12주간 고탄수화물식이를 이용하여 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증 유도하였다. 군 분리는 12주간 고탄수화물 식이를 섭취한 동물을 대상으로 체중이 높은 순으로 배열하고 분리하여 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 하였다. 이후 12주간 고지방 식이와 함께 하루 한번 50% 에탄올 곰취 추출물을 용량별로 존데를 이용하여 경구투여 하였고 12주 동안의 경구투여 후 동물을 희생하여 혈액을 채취하고 혈액 생화학분석을 실시하여 혈중 다양한 요소들의 함량을 분석하였음.

- 시험군의 구성

6주령 C57BL/6 수컷 마우스를 다음과 같은 군으로 구성하여 시험을 수행하였음.

Group	Treatment	No. of Mouse
1	정상군	10
2	대조군 (고중성지방혈증유발군)	10
3	곰취 100 mg/kg	10
4	곰취 200 mg/kg	10
5	곰취 400 mg/kg	10
6	곰취 800 mg/kg	10
7	오마코 660 mg/kg	10

라. 평가방법

(1) 혈액 생화학적 분석 시험

관찰기간 종료 시 생존동물은 졸레틸(Zoletil, Vurbac, France) 마취 하에서 복대동(abdominal aorta)으로부터 채혈하였고, 채혈한 혈액은 혈액학적 검사를 위하여 항응고제인 EDTA가 들어있는 모세혈관채혈튜브(BD Caribe.Ltd.USA)에 넣어 원심분리기(Centrifuge 5415R, eppendorf)를 이용하여 3,000rpm으로 원심 분리하여 얻은 혈장에 대하여 자동분석기(7020, HITACHI, JAPAN)를 이용하여 다음의 항목을 측정하였음.

생화학적 분석 아이템	
항목	**검사의 의의**
Glucose (GLU)	당뇨병 진단
LDL	관상동맥 질환 및 이상지질혈증의 발병위험도 평가
HDL	허혈성 심질환 및 뇌졸증의 발병 위험도 평가
Triglyceride (TG)	고중성지방혈증의 진단 및 치료 경과 관찰
Total cholesterol (T.CHO)	고혈압, 동맥경화, 혈행장애등의 진단과 치료경과 관찰

(2) 심혈관위험지수 및 동맥경화지수 분석

심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(atherogenic index, AI)와 심혈관위험지수(cardiac risk factor, CRF)는 다음의 식에 의하여 계산하여 분석하였음.

$$AI = \frac{(\text{total cholesterol} - \text{HDL})}{\text{HDL}} \qquad CRF = \frac{\text{total cholesterol}}{\text{HDL}}$$

(3) Mouse diabetes biomaker bio-plex 분석

Recombinant standard를 녹인 후 1-3초간 vortex 후 ice에서 30분간 incubation 후 serial dilution하여 준비하고, 분석할 시료는 sample diluent로 희석하여 시료를 준비한다. 1 X로 dilution 해 놓은 bead를 30초간 vortex 하고, 각 well 당 50ul 씩 분주하였다. 2번 washing 후 각 well에 50ul의 standard, blank, sample 등을 분주하여 300rpm 1시간 상온에서 반응시킨다. 3번 washing 후 1 X detection antibody 25ul씩 분주하여 300rpm 30분간 상온에서 반응시켰다. 3번 washing 후 streptavidin-PE 50ul를 분주하여 300rpm 10분간 상온에서 반응시키고 3번 washing 후 assay buffer 125ul 분주 후 1100rpm 30초 shaking 후 당뇨 관련 바이오마커 데이터 분석하였음.

(4) adiponectin 분석

마우스 혈장으로 mouse adiponectin ELISA kit (Milipore, #EZMADP-60K, MA, USA)를 이용하여 제조사 의거에 의해 정량함.

○ 실험 결과

1. 곰취 추출물의 산지별 항산화 효능 평가 결과

곰취 시료를 영월, 화천, 평창, 태백, 정선, 양구, 인제 산지별로 준비한 후 각각의 원물의 최적 추출 조건을 알아보기 위하여 에탄올과 메탄올 등의 용매를 이용하여 추출물들을 다양한 조건에 따라 준비한 후 항산화 평가를 진행하였다. 먼저 positive control로 기존에 알려진 항산화제인 BHA를 사용하여 각각의 조건별로 준비된 추출물들을 평가한 결과, 다른 조건의 곰취 추출물들에 비해 인제산 50% EtOH 추출물에서 ABTS 와 DPPH assay 모두 가장 우수한 항산화 효능을 나타냈고 (표 36), 이를 바탕으로 곰취 인제산 50% EtOH 추출물을 MeOH을 이용하여 fraction으로 분리한 시료들의 항산화 효과를 측정한 결과에서는 40% 와 60% MeOH fraction에서 항산화 효능이 우수한 것으로 관찰되었다 (표 39). 최종적으로 다양한 조건에서 추출된 시료들을 평가한 결과 표 6에서 나타나듯이 인제산 곰취 50% EtOH 추출물에서 가장 좋은 항산화 효능이 확인되었다. 추출물속 항산화를 나타내는 유효물질들을 알아보기 위해 표 42과 같이 원료로부터 분리된 다양한 compound들을 1세부로부터 제공받아 항산화능을 평가한 결과 chlorogenic acid, neochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C와 compound G49-19-4 and G49-19-5 시료에서 ABTS and DPPH assay 에 대한 항산화 효능이 우수한 것으로 관찰되었음 (표 42).

표 36. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-6-1 (영월산 95% EtOH)	56.22	>100
G49-6-2 (화천산 95% EtOH)	53.84	>100
G49-6-3 (평창산 95% EtOH)	36.84	>100
G49-6-4 (태백산 95% EtOH)	47.33	>100
G49-6-5 (태백산 95% EtOH)	96.32	>100
G49-1-1 (인제산 열수추출)	14.13	>100
G49-1-2 (인제산 30% EtOH)	10.93	38.65
G49-1-3 (인제산 50% EtOH)	11.59	37.99
G49-1-4 (인제산 70% EtOH)	11.05	41.53
G49-5 (인제산 80% EtOH)	16.24	39.24
G49-1-5 (인제산 95% EtOH)	20.71	63.79
BHA	3.38	15.22

* IC_{50} values represent the concentration requires for 50% inhibition of radical scavenging.

표 37. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-1-1 (곰취 열수추출 reflux)	15.75	>100
G49-1-2 (30% EtOH reflux)	13.97	>100
G49-1-3 (50% EtOH reflux)	15.05	45.25
G49-1-4 (70% EtOH reflux)	16.64	39.43
G49-1-5 (95% EtOH reflux)	28.35	78.39
G49-4 (인제산 95% EtOH)	30	79.49
G49-5 (인제산 80% EtOH)	19.77	49.29
G49-7-1 (인제산 30% EtOH)	14	46.15
BHA	3.03	17.26

표 38. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-7-1 (인제산(생) 30% EtOH)	15.66	36.62
G49-4 (인제산(생) 95% EtOH)	51.75	>100
G49-5 (인제산(생) 80% EtOH)	22.05	48.86
G49-13-1 (인제산(생) 50% EtOH)	13.95	38.64
G49-13-2 (인제산(생) 70% EtOH)	22.64	73.24
G49-14-1 (평창산 30% EtOH)	8.39	17.24
G49-14-2 (평창산 50% EtOH)	8.20	18.75
G49-14-3 (평창산 70% EtOH)	9.17	23.42
G49-6-3 (평창산 95% EtOH)	71.73	>100
BHA	3.35	17.17

표 39. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-15-1 (인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C H_2O fr.)	37.22	>100
G49-15-2(인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 20% MeOH fr.)	7.84	10.06
G49-15-3(인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 40% MeOH fr.)	7.22	15.02
G49-15-4(인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 60% MeOH fr.)	6.04	13.88
G49-15-5(인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 80% MeOH fr.)	11.29	32.68
G49-15-6(인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 100% MeOH fr.)	62.58	>100
BHA	3.45	18.23

표 40. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-1-1 (인제산 열수추출)	15.87	>100
G49-1-2(인제산 30% EtOH reflux)	15.07	>100
G49-7-1(인제산 30% EtOH)	15.60	>100
G49-9-1(영월산 30% EtOH)	19.14	>100
G49-9-2(화천산 30% EtOH)	22.11	>100
G49-9-3(평창산 30% EtOH)	8.32	20.26
G49-9-4(태백산 30% EtOH)	25.34	>100
G49-9-5(정선산 30% EtOH)	32.77	>100
BHA	3.35	16.82

표 41. ABTS and DPPH free radical scavenging activity of *Ligularia fischeri* ethanol extracts.

Sample	ABTS(μg/ml)	DPPH(μg/ml)
G49-23-1 (태백 생곰취 50% EtOH)	31.74	>100
G49-23-2 (정선 생곰취 50% EtOH)	39.59	>100
G49-23-2(2) (정선 생곰취 50% EtOH)	41.88	>100
G49-23-3 (양구 생곰취 50% EtOH)	32.25	70.68
G49-23-4 (평창 생곰취 50% EtOH)	49.77	>100
G49-23-5 (인제 생곰취 50% EtOH)	13.03	22.53
G49-23-1(2) (태백 생곰취 50% EtOH)	35.92	84.10
G49-23-2(2) (정선 생곰취 50% EtOH)	50.89	>100
G49-23-3(2) (양구 생곰취 50% EtOH)	36.28	73.21
G49-23-4(2) (평창 생곰취 50% EtOH)	60.32	>100
G49-23-5(2) (인제 생곰취 50% EtOH)	18.87	>100
BHA	3.57	18.16

표 42. Effects of compounds isolated from *Ligularia fischeri* on ABTS and DPPH free radical scavenging activity.

Sample	ABTS(μM)	DPPH(μM)
G49-17-4C	45.44	33.56
G49-17-5C	17.35	79.62
G49-17-12C	71.89	>100
G49-19-1	43.81	73.71
G49-19-2	43.01	80.09
G49-19-3	40.92	>100
G49-19-4	16.16	38.37
G49-19-5	12.20	38.36
G49-19-6	36.49	67.58
Chlorogenic acid	19.16	35.21
Neochlorogenic acid	18.99	34.96
Isochlorogenic acid A	10.20	18.21
Isochlorogenic acid B	9.29	17.77
Isochlorogenic acid C	6.05	16.97
BHA	17.36	24.63

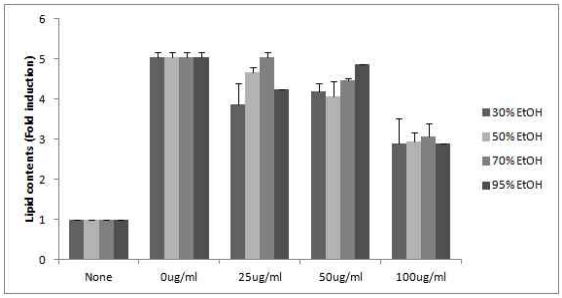
2. 곰취 추출물의 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제 효과

가. 곰취 추출물의 농도별 지방세포 분화 억제 효과

마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 곰취 추출물의 에탄올 농도별 지방세포로의 분화억제 효과를 확인해 보았다. 인제산 곰취 추출물을 30, 50, 70, 95% 농도로 지방세포 분화 억제 효과를 확인해 본 결과 4가지 농도 모두에서 지방세포 분화 억제 효과가 비슷하게 나타났다(그림 65).

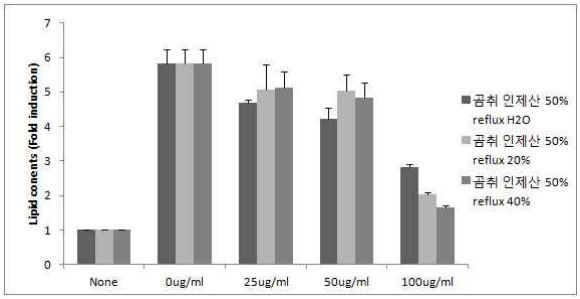
나. 곰취 추출 분획별 지방세포 분화 억제 효과

추출물의 분리 및 분획 조건을 변화시켜 인제산 곰취 에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 효과를 확인하였고 항산화 효능과 지방축적 억제 효능이 모두 우수한 인제산 곰취 50% 에탄올 추출물을 최종 농도로 선정하였다(그림 70). 3T3-L1 세포에서 곰취의 분획별(Hex, MC, EtOAc, BuOH, H_2O) 분화억제 활성을 확인해 본 결과 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 세포독성이 있는 MC층을 제외하고는 지방세포 분화억제 효능이 나타났다.



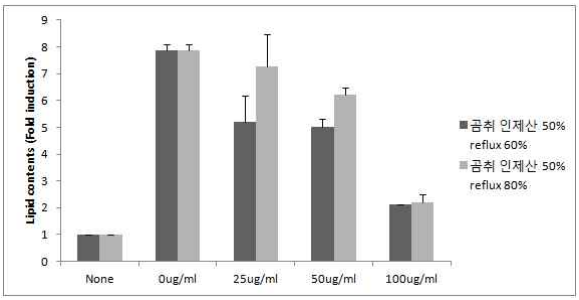
·G49-1-2 : 인제산 30% EtOH ex.
·G49-1-3 : 인제산 50% EtOH ex.
·G49-1-4 : 인제산 70% EtOH ex.
·G49-1-5 : 인제산 95% EtOH ex.

그림 65. Effect of various EtOH extracts of *Ligularia fischeri* on differentiation in 3T3-L1 cells.



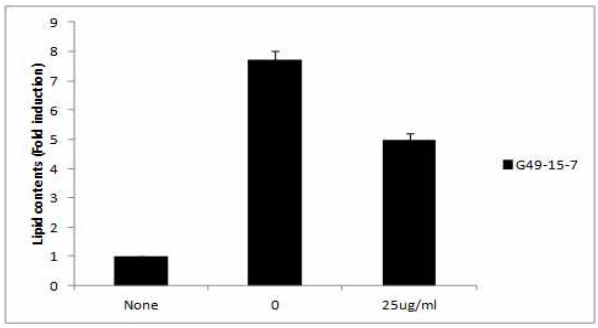
·G49-15-1 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C H2O fr.
·G49-15-2 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 20% MeOH fr.
·G49-15-3 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 40% MeOH fr.

그림 66. Effect of fractions isolated from *Ligularia fischeri* extract on differentiation in 3T3-L1 cells.



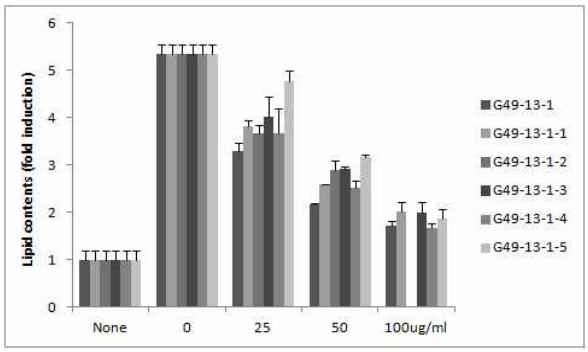
·G49-15-4 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 60% MeOH fr.
·G49-15-5 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 80% MeOH fr.
·G49-15-6 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 C.C 100% MeOH fr. (독성으로 평가 불가능)

그림 67. Effect of fractions isolated from *Ligularia fischeri* extract on differentiation in 3T3-L1 cells.



·G49-15-7 : 인제산 50% EtOH reflux HP-20 c.c Acetone
(50, 100 μg/ml 농도에서는 독성으로 평가 불가능)

그림 68. Effect of fractions isolated from *Ligularia fischeri* extract and on differentiation in 3T3-L1 cells.



·G49-13-1: 인제, 50% EtOH extract
·G49-13-1-1: 인제, 50% EtOH extract Hexane
·G49-13-1-2: 인제, 50% EtOH extract MC (100 μg/ml 독성)
·G49-13-1-3: 인제, 50% EtOH extract EtOAc
·G49-13-1-4: 인제, 50% EtOH extract BuOH
·G49-13-1-5: 인제, 50% EtOH extract H_2O

그림 69. Effects of fractions isolated from *Ligularia fischeri* extract on differentiation in 3T3-L1 cells.

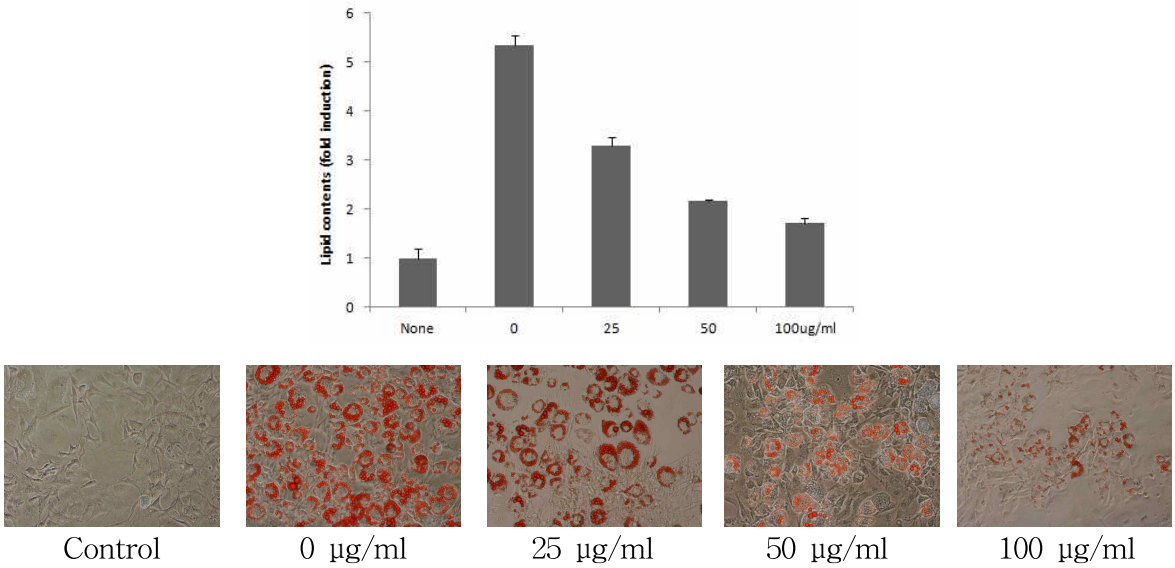


그림 70. Effect of *Ligularia fischeri* extract on lipid accμMulation in 3T3-L1 cells.

(3) 곰취에서 분리된 유효물질들의 지방세포 분화 억제 효과

곰취 추출물에서 분리된 유효물질 12종에 대해 지방세포 분화억제 효능을 확인해 본 결과 G49-17-12C (ethyl caffeate)가 지방세포로의 분화 효능이 가장 우수한 것으로 나타났다(그림 71, 72).

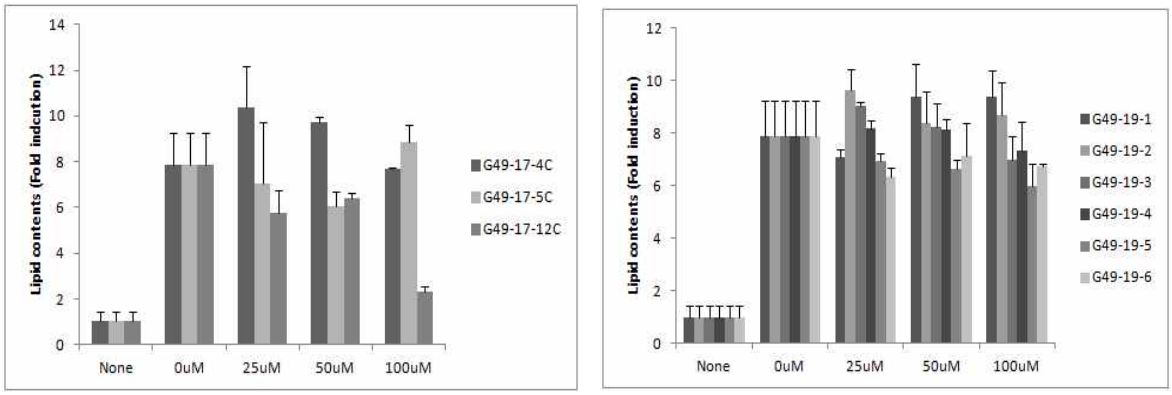


그림 71. Effect of compounds isolated from *Ligularia fischeri* on differentiation in 3T3-L1 cells.

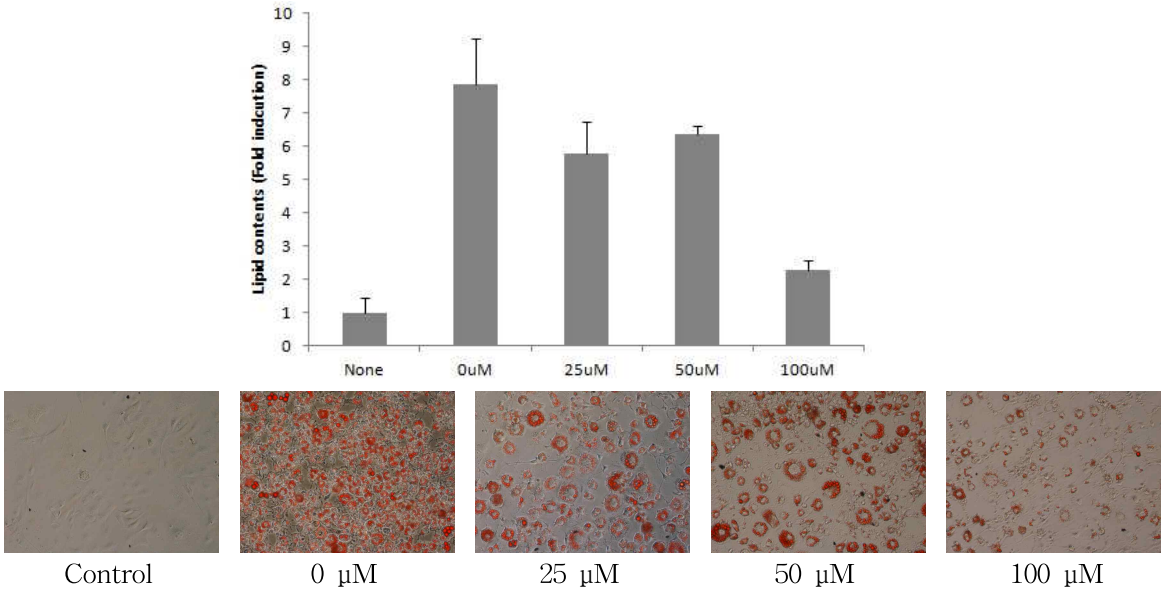


그림 72. Effect of G49-17-12C isolated from *Ligularia fischeri* on lipid accμMulation in 3T3-L1 cells.

3. 곰취 추출물속 유효성분의 작용 기전 연구

가. 곰취 추출물속 유효성분(G49-17-12C)에 의한 비만 관련 유전자 및 단백질 발현 억제 활성

앞선 실험에서 G49-17-12C(ethyl caffeate)의 지방세포 분화억제 효능을 Oil Red O assay를 통해 확인한 후(그림 72), 지방 축적 관련 작용기전을 알아보기 위해 전구지방세포에서 지방세포로 분화하는 단계에 관여하는 대표적인 transcriptional factor인 PPARɣ, C/EBRα와 adipokine 유전자들의 발현 여부에 대한 효과를 알아보았다. 전구지방세포의 분화를 유도하여 G49-17-12C를 50, 100 μM 농도로 처리 한 후 8일 동안 전구지방세포를 분화시켜 PPARɣ, C/EBRα 및 aP2, adiponectin 등 유전자의 발현 정도를 Real-time PCR로 확인한 결과, 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포에서 G49-17-12C가 농도 의존적으로 활성을 억

제시키는 것을 확인하였고(그림 73) PPARɣ, C/EBPα는 단백질 수준에서도 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(그림 74). 곰취 추출물속 유효물질에 대한 활성 결과는 본 사업의 1차년도 성과로 특허 출원이 완료되었다. (출원번호: 10-2013-0065107)

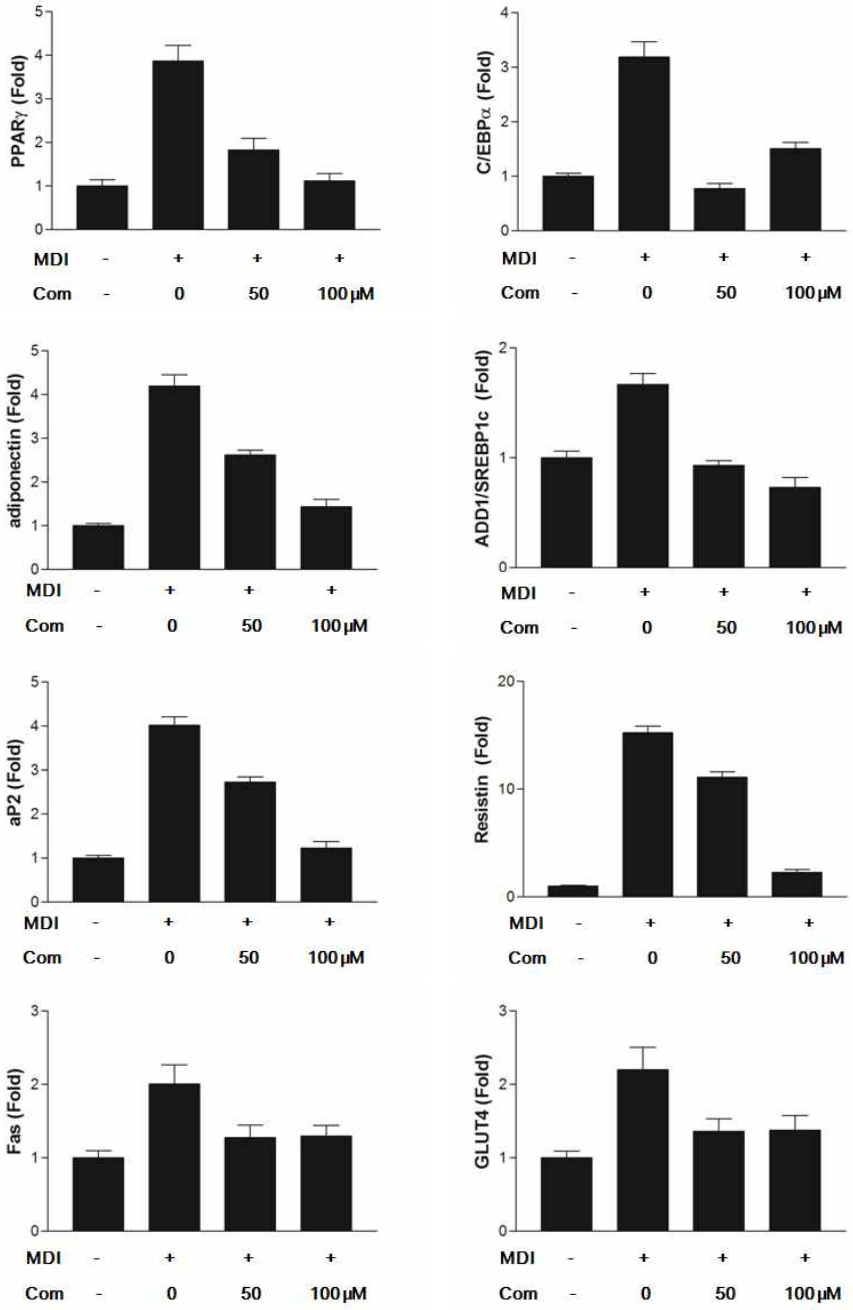


그림 73. Effect of G49-17-12C compound on expression of adipogenic factors in 3T3-L1 cells.

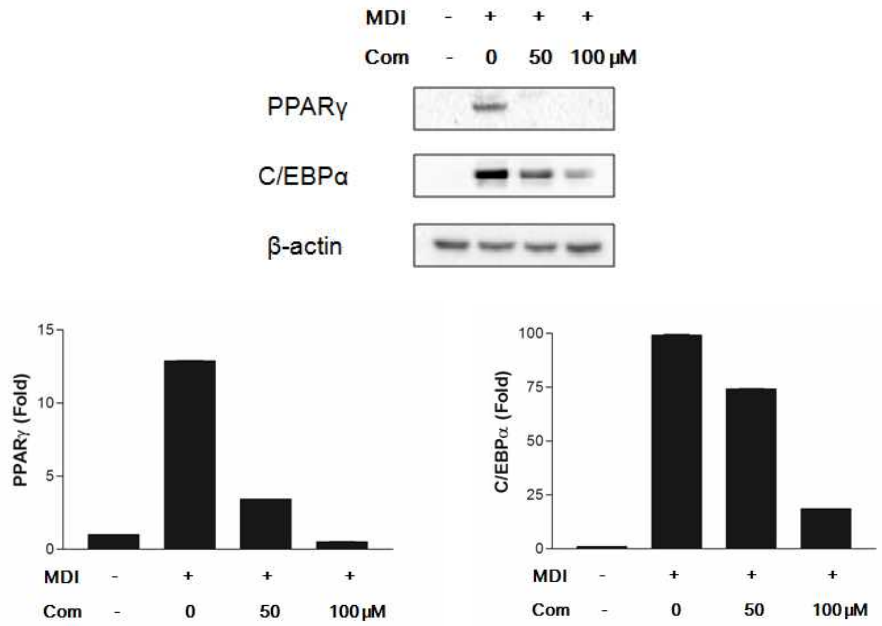


그림 74. Effect of G49-17-12C compound on expression of PPARɣ and CEBPα in 3T3-L1 cells.

4. 곰취 유효물질의 항혈전 효능 및 혈소판 응집 억제 평가

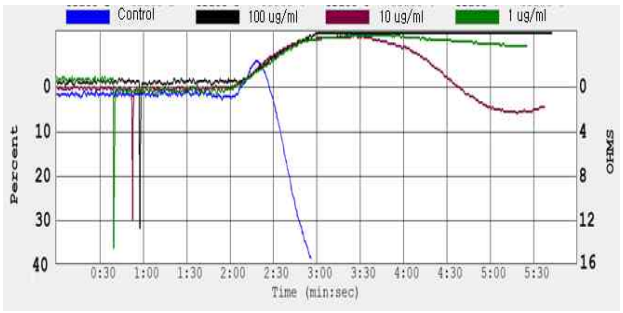
가. 혈소판 응집 반응을 최대로 일으키는 collagen 농도 결정

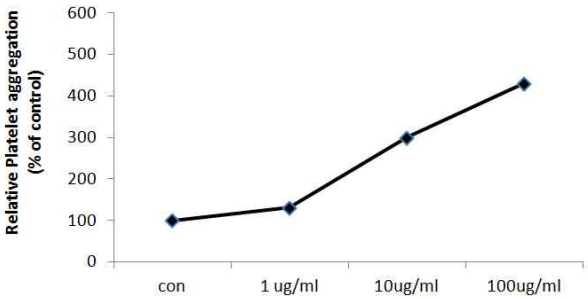
고혈압, 고지혈증, 흡연 등의 혈관 손상인자들에 의해서 혈관이 손상되었을 때 혈관내피세포로부터 돌출되거나 분비되는 collagen에 의해서 혈관에서 순환하던 혈소판이 최초로 응집된다. collagen과 혈소판의 상호 작용에 의한 혈소판 응집 반응은 혈전증, 심근경색 또는 동맥경화 발생의 원인으로 collagen에 의해 발생된 혈소판 응집 관련 활성을 aggrometer로 측정했다. Rat으로부터 혈액 채취 후 PRP를 분리하여 collagen을 농도별로 처리한 후 혈소판의 응집이 최대로 일어나는 농도로 5 μg/ml 확인하였음.

나. 곰취로부터 분리된 화합물 8종의 혈소판 응집능 측정

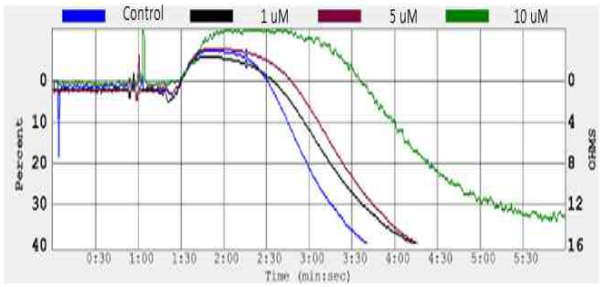
Rat으로부터 얻은 혈소판 (200개 platelets/ml)에 collagen 5 μg/ml 농도 첨가하여 혈소판 응집 반응을 일으킨 후 50% EtOH 추출물과 곰취 추출물로부터 분리된 8개의 시료를 넣어 혈소판의 응집에 따라 형성 되는 두 전극 사이에 형성된 전기적 저항의 변화를 확인하였다. 혈소판 응집에 대한 작용을 살펴보기 위해 혈소판 응집 억제 활성을 분석한 결과 곰취 추출물 100 μg/ml, caffeic acid 5 μM, Ethyl caffeate 5μM, chlorogenic acid 10 μM에서 양성대조군인 DHA 비해 혈소판 응집 억제 효능 나타나는 것이 확인되었음 (그림 75).

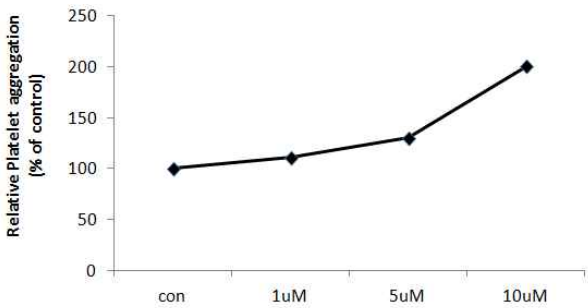
< 곰취 50% EtOH >



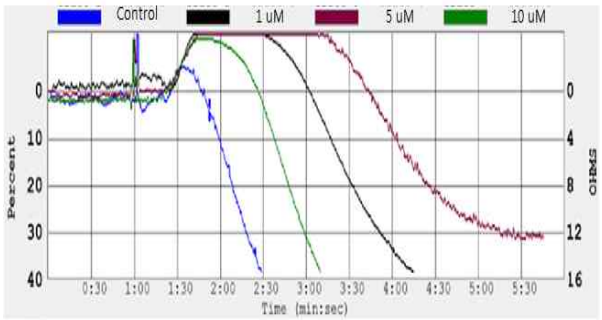


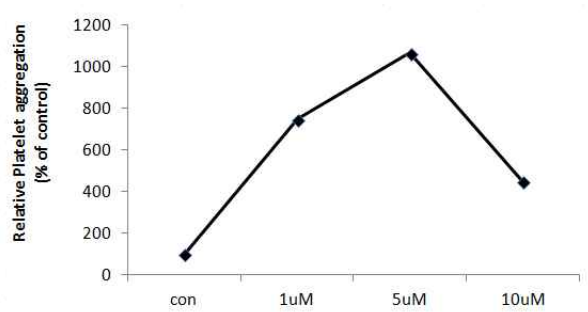
< Hyperoside >



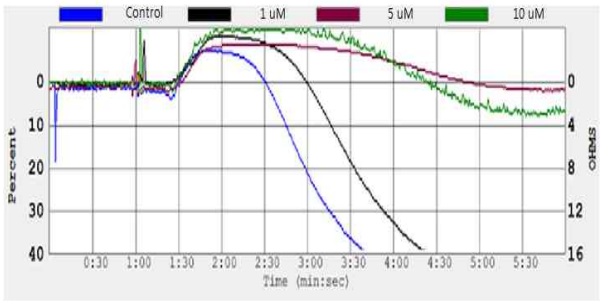


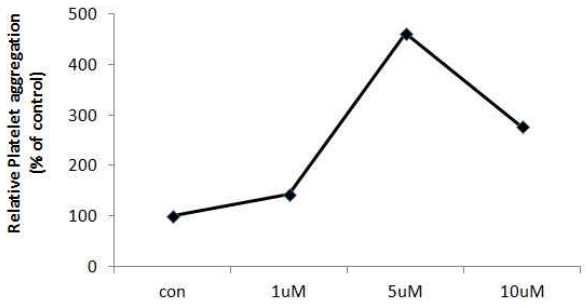
< Caffeic acid >



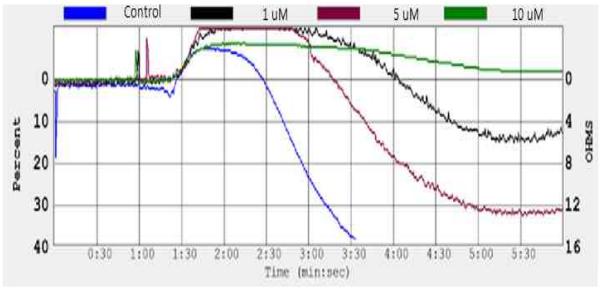


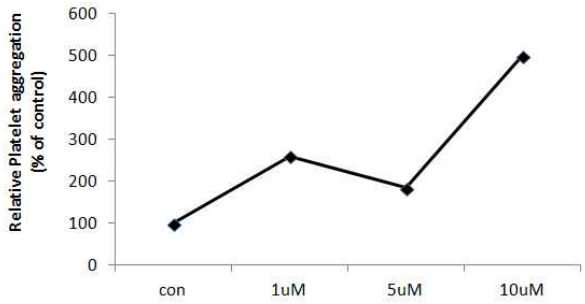
< Ethyl caffeate>



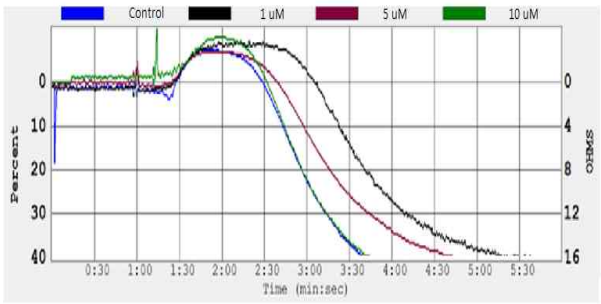


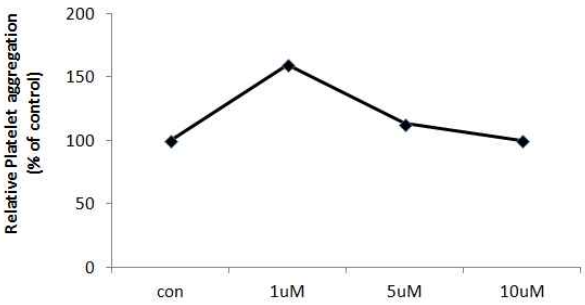
< Chlorogenic acid>



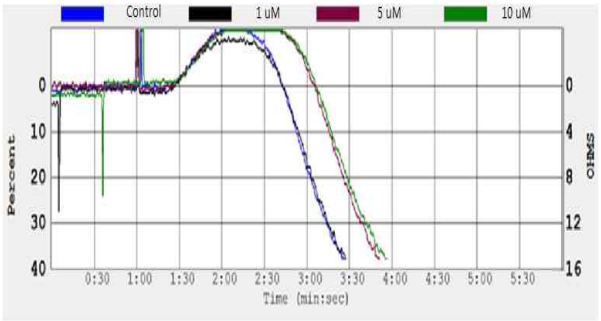


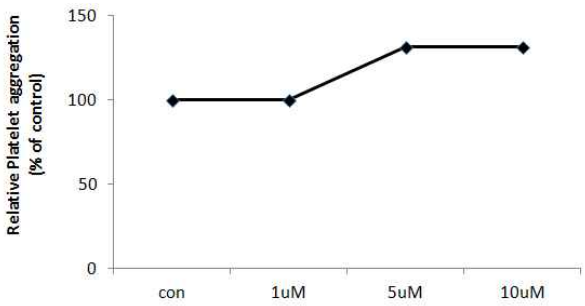
< Isohlorogenic acid A >



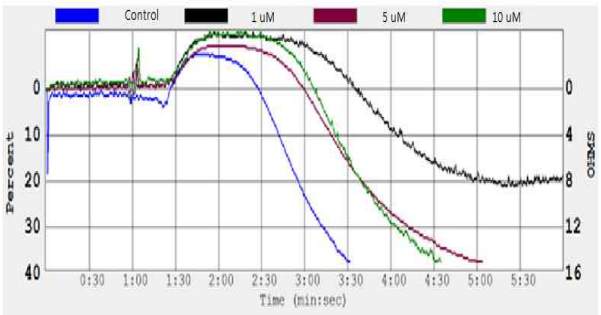


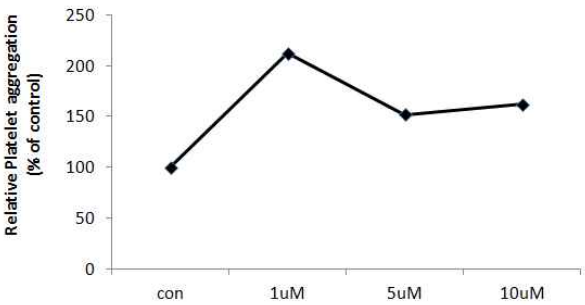
< Isohlorogenic acid B >



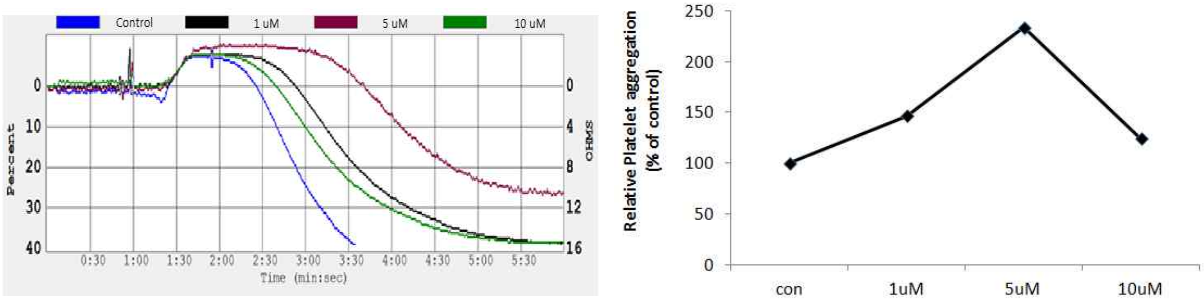


< Isohlorogenic acid C >





< 2″-acetyl hyperoside >



< 양성 대조군 : DHA >

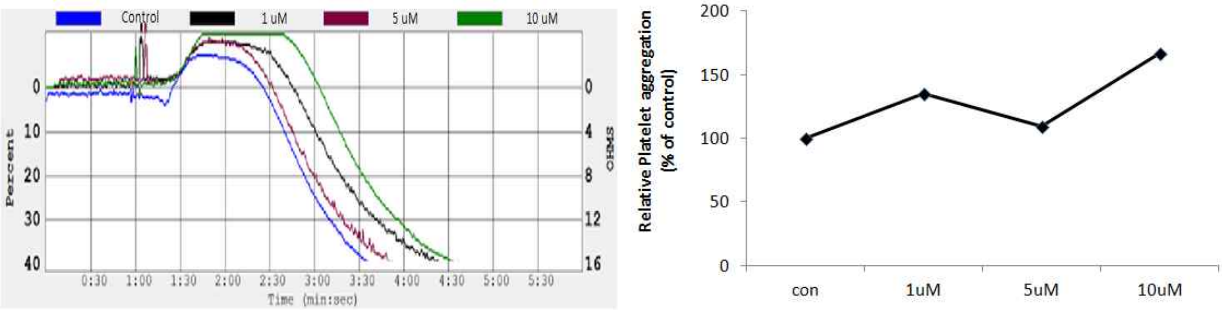


그림 75. Effect of isolated compounds from *Ligularia fischeri* on platelets aggregation induced by collagen.

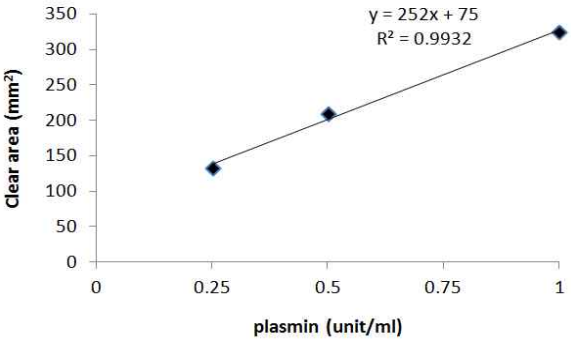
다. 곰취 추출물 및 유효물질의 혈전 용해능 측정

혈전증이란 심장과 혈관내에서 혈액이 굳어 혈관을 막고 있는 상태를 말하며 이 혈액 덩어리를 혈전이라한다. 이러한 성상으로 인하여 혈액순환장애, 혈행속도감소, 혈액점도이상 등으로 조직기관의 병리 변화상태 등의 많은 문제점이 발생한다. 따라서 인공혈전을 이용하여 곰취 추출물 및 유효 물질로부터 혈전용해 활성을 확인하고자 평가를 진행하였다. Fibrin plate에 응고된 paper disc위에 시료를 농도별로 분주하고 37℃ incubator에 두어 6시간 동안 반응 후 양성대조군인 plasmin이 fibrin plate가 용해되어 형성된 투명환의 넓이를 측정하여 혈전 용해에 대한 활성을 검증하여 standard curve를 완성하였다. 실험물질인 곰취 에탄올 추출물을 이용하여 같은 방법에 적용 활성평가를 수행한 결과 2mg/ml 농도에서 혈전용해도가 150 mm^2로 plasmin 0.29 unit/ml 와 같은 혈전용해 활성을 나타내었으며, 화합물의 경우는 1 mM 에서는 혈전용해 활성이 다소 관찰되었음 (그림 76).

< 양성대조군 : plasmin >

Control	Plasmin 0.25 unit/ml	Plasmin 0.5 unit/ml	Plasmin 1 unit/ml

- Plasmin standard curve



Plasmin	Clear area (mm^2)
0.25 unit/ml	132
0.5 unit/ml	210
1 unit/ml	324

< 곰취 50% EtOH 추출물 >

Control	1 mg/ml	2 mg/ml

Sample	Clear area (mm^2)	Plasmin (unit/ml)
곰취 추출물 2 mg/ml	150	0.29

< Hyperoside >

Control	500 μM	1 mM

< Caffeic acid >

Control	500 μM	1 mM

< Ethyl caffeate >

Control	500 μM	1 mM

< Chlorogenic acid >

Control	500 μM	1 mM

< Isochlorogenic acid A >

Control	500 μM	1 mM

< Isochlorogenic acid B >

Control	500 μM	1 mM

< Isochlorogenic acid C >

Control	500 μM	1 mM

< 2″-acetyl hyperoside >

Control	500 μM	1 mM

그림 76. Fibrinolytic activity of *Ligularia fischeri* extract and compounds on fibrin plate.

라. 혈행개선 관련 biomaker 확인

혈전증 (thrombosis)은 혈관 안쪽에 덩어리가 생기거나 혈전이 생겨서 혈액의 흐름이 막힌 것을 말한다. 혈관에 상처가 생기면 혈관은 수축하게 되며, 상처부로 드러나게된 콜라겐 섬유 (collagen gibrers)에 혈소판이 달라붙어 혈관 수축 물질인 세로토닌 (serotonin)과 아데노신 디포스페이트 (adenosine diphosphate, ADP) 그리고 Thromboxane A2를 방출한다. ADP는 더 많은 혈소판들이 달라붙게 하며, Thromboxane A2는 혈소판들이 응집되도록 작용하여 혈관은 수축하게 된다. 따라서 랫드의 혈액을 채취하여 혈소판 분리 후 시험관에서 혈행개선 활성을 간접적으로 평가하였음.

(1) 곰취 추출물의 serotonin 분비 측정

혈액의 혈소판 등은 활성화되면 혈액 내 serotonin을 분비하며 이는 인접세포를 자극하여 혈행을 저하시킨다. 곰취 추출물이 collagen에 의해 유도되는 혈소판 응집을 저해하였으므로 collagen에 의해 혈소판이 활성화 될 때 나타나는 여러 가지 현상 중 혈소판의 granule에 저장되어 있다가 agonist 자극에 의해 활성화되면 granule과 세포막의 융합에 의해 혈소판 밖으로 분비되어 혈소판 활성화 및 혈관 수축을 유발하는 serotonin 분비에 대한 곰취 추출물의 효과를 실험하였다. 곰취 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 혈소판에서 분비하는 serotonin 양을 측정한 결과 곰취 추출물 500, 1,000, 2,000 μg/ml 농도 모두 serotonin 분비를 억제하는 것으로 관찰되었으며, 양성 대조군인 DHA와 비교했을 때도 다소 억제하는 활성을 나타내는 것으로 관찰되었음 (그림 77).

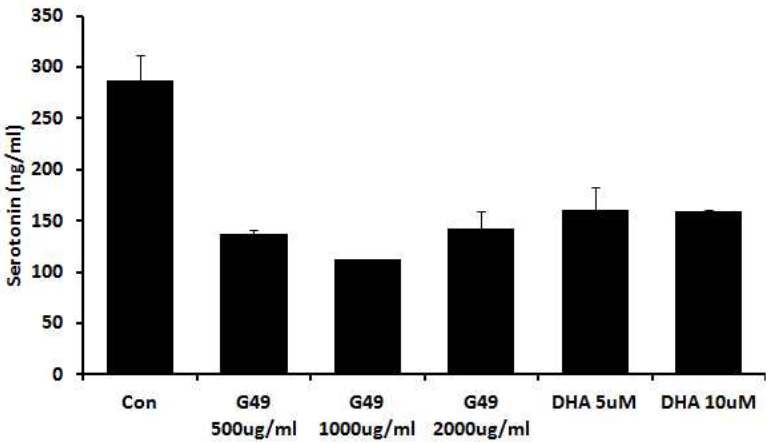


그림 77. Inhibitory effect of *Ligularia fischeri* extract on collagen-induced serotonin secretion from washed platelets.

(2) 곰취 추출물의 Thromboxane B_2 (TxB_2) 정량

혈소판이 활성화 되면, phospholipid membrane으로부터 arachidonic acid를 기질로 cyclooxygenase에 의해 생성되는 PGH_2로부터 thromboxane A_2 (TxA_2)가 만들어진다. 이

TxA_2 는 불안정한 물질로서 반감기가 짧기 때문에 안정한 대사체인 thromboxane B2를 정량하여 간접적으로 측정한다. 따라서 곰취 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 혈소판 응집 혈관 수축 작용으로 혈전형성에 관여하는 TxB_2 양을 측정한 결과, 곰취 추출물의 고농도인 2,000μg/ml의 농도에서 control 대비 TxB_2 양이 감소하는 것으로 확인되었음 (그림 78).

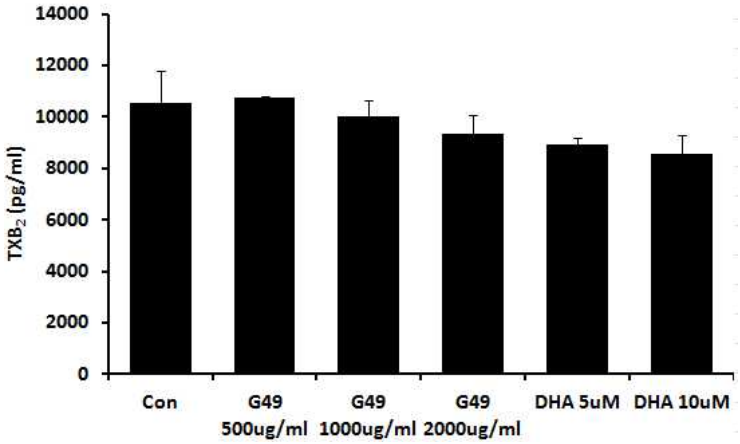
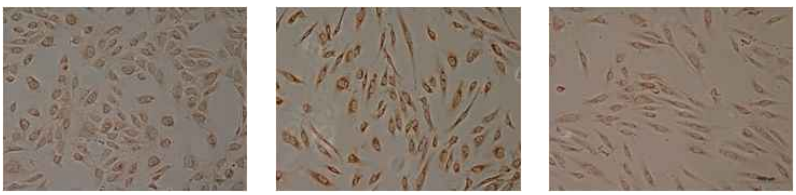


그림 78. Inhibitory effect of *Ligularia fischeri* extract on collagen-induced thromboxane B_2 secretion from washed platelets.

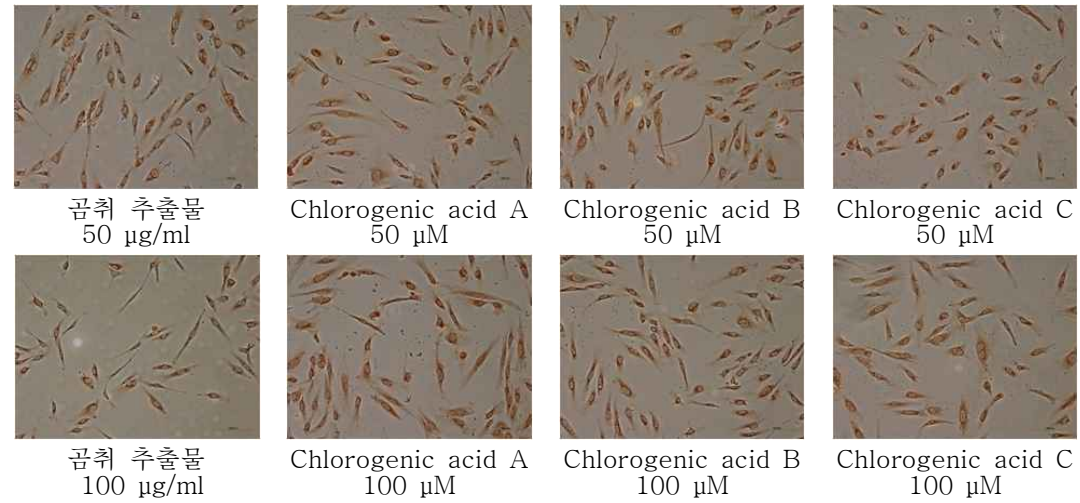
(3) 곰취 추출물 및 유효물질의 ICAM-1 및 VCAM-1 발현 측정

인간 제대정맥혈관내피세포인 HUVEC 세포를 이용하여 TNF-α에 의해 활성화된 상태에서의 세포 접착단백질이며 동맥경화증에서 혈관협착에 관여하는 ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)과 VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) 의 발현을 억제하는 효능을 측정하기 위해 면역세포화학염색법을 실시하였다. 그림 15에서 보여지듯이 HUVEC 세포에서의 ICAM-1과 VCAM-1 발현이 된 세포가 극소수 이지만 TNF-α에 의해 활성화한 세포군은 진한 갈색으로 나타나는 것으로 보아 발현이 증가하였으며, 양성대조군인 DHA를 처리했을때는 발현량이 억제되는 것을 확인하였다. 다만 곰취 추출물과 화화물들의 처리시에는 발현량이 감소되지 않는 것으로 보아 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현억제에는 활성을 나타내지 않는 것으로 사료됨.

▫ ICAM-1 발현 측정



Control TNF-α 1μg/ml DHA 10 μM



▫ VCAM-1 발현 측정

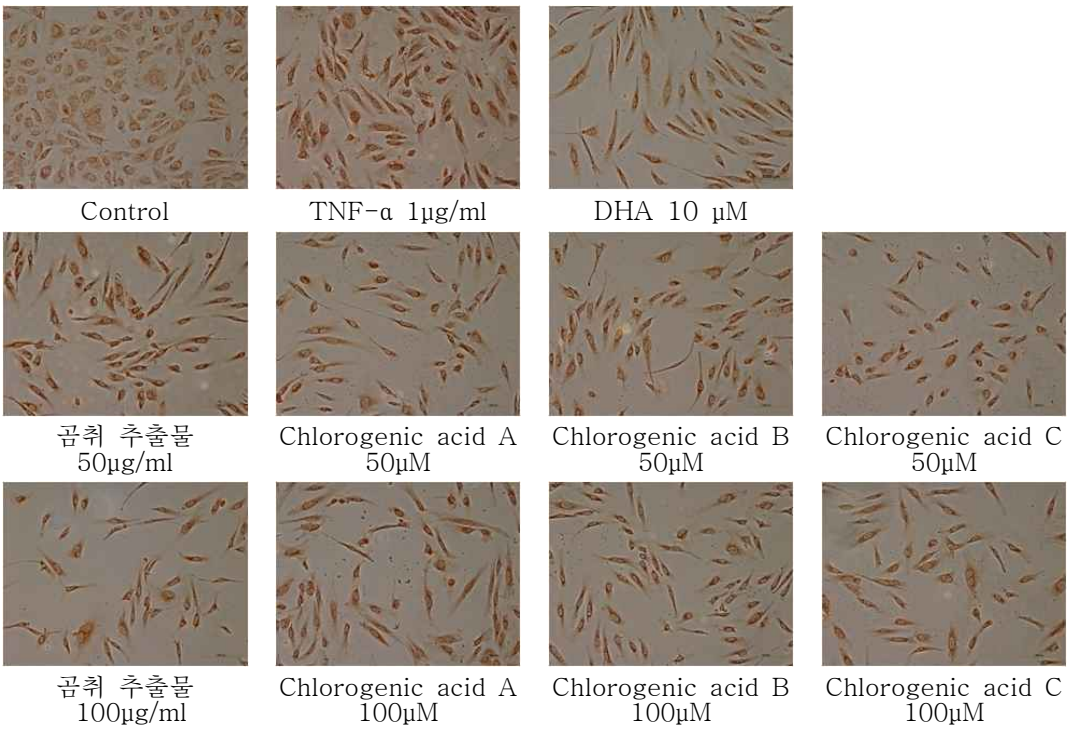


그림 79. Effect of *Ligularia fischeri* extract and compounds on expression of adhesion molecules as ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC cells.

5. 곰취 에탄올 추출물에 대한 in vivo MTD 및 혈행개선 유효성 평가 결과

가. 곰취 에탄올 추출물에 대한 *in vivo* MTD 결과

최적 추출 공정법을 통해 대량 생산된 곰취 50% 에탄올 추출물을 이용 간이독성평가를 진행하여 향후 유효성 평가에 사용될 농도의 안전성을 알아보기 위하여 MTD (MaxiμM Tolerated Dose) 시험을 진행하였다. C57BL/6 마우스를 이용하여 곰취 50% EtOH 추출물

을 50 mg/kg~2000 mg/kg의 용량까지 3주간 반복 경구 투여 한 결과 모든 투여군에서 체중 변화량과 사망률이 대조군과 비교하여 유의한 체중변화가 나타나지 않았고, 사망한 개체도 발생하지 않았음 (그림 80).

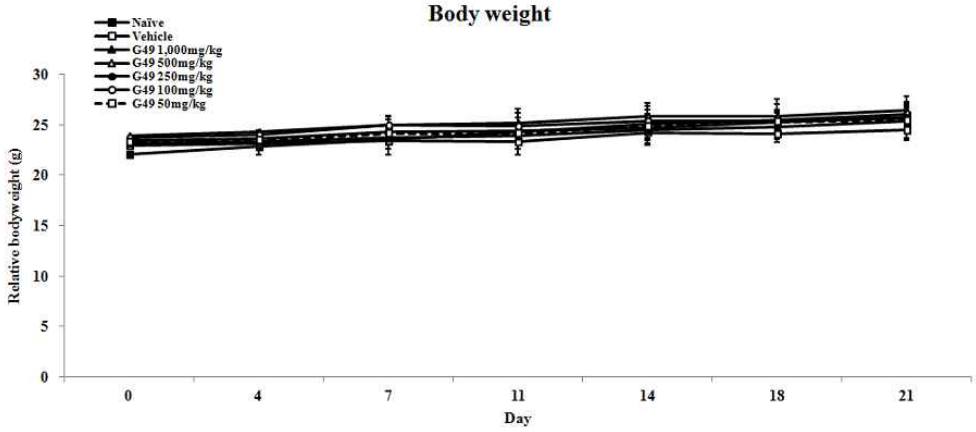


그림 80. Body weights change of male C57BL/6 mice during oral administration treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

표 43. Body weights change of male C57BL/6 mice during oral administration treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

Dose	Body weight (g) (first day)	Body weight (g) (after 3 weeks)	Change in body weight at end of study (g)	Mortality
Naive	22.83 ± 0.67	25.99 ± 1.09	+3.16	0.0
Vehicle	22.98 ± 0.60	24.53 ± 0.40	+1.55	0.0
50 mg/kg	22.48 ± 1.45	24.31 ± 1.83	+1.83	0.0
100 mg/kg	23.26 ± 2.26	25.43 ± 2.16	+3.16	0.0
250 mg/kg	23.66 ± 1.95	25.67 ± 0.99	+2.17	0.0
500 mg/kg	23.40 ± 0.97	25.70 ± 0.44	+2.30	0.0
1000 mg/kg	23.92 ± 1.38	26.37 ± 1.63	+2.45	0.0

3주후 동물을 하룻밤 절식시킨 후 졸레틸 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈구자동계측장치(BECKMAN Coulter, USA)를 이용 WBC(white blood cell) count, RBC(red blood cell) count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volμMe), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentraion), Platelet을 측정하였다. 그 결과 모든 투여군의 검사항목에서 추출물 투여와 관련된 일관성 있는 변화가 관찰되지 않았으며, 최고농도 1,000mg/kg까지 투여하였을 때도 유의성 있는 수치 변화가 없는 것으로 관찰되었으므로 향후 유효성 평가를 진행할시 최고농도를 800mg/kg로 설정하여 평가를 진행하였음 (그

림 81, 82).

표 44. Hematological analysis of male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

Dose	WBC (X10^3/㎕)	RBC (X10^6/㎕)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Vehicle	4.76 ± 0.92	9.68 ± 0.46	14.33 ± 0.93	45.51 ± 2.59
50 mg/kg	4.38 ± 1.19	9.60 ± 0.29	14.41 ± 0.52	45.26 ± 1.41
100 mg/kg	4.89 ± 1.89	9.79 ± 0.39	14.48 ± 0.59	45.98 ±1.92
250 mg/kg	4.39 ± 1.25	9.72 ± 0.41	14.25 ± 0.63	45.53 ± 2.16
500 mg/kg	3.42 ± 1.57	8.78 ± 3.39	12.84 ± 4.95	41.17 ± 15.83
1000 mg/kg	2.61 ± 0.89	9.74 ± 0.30	14.16 ± 0.44	45.71 ± 1.52

Dose	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (X10^3/㎕)
Vehicle	46.99 ± 0.62	14.80 ± 0.43	31.50 ± 0.84	1036.71 ± 302.76
50 mg/kg	47.20 ± 0.29	15.01 ± 0.16	31.82 ± 0.37	1224.75 ± 60.20
100 mg/kg	46.92 ± 0.32	14.75 ± 0.21	31.47 ± 0.30	1227.38 ± 67.28
250 mg/kg	46.80 ± 0.45	14.65 ± 0.09	31.30 ± 0.26	1358.5 ± 89.02
500 mg/kg	41.03 ± 16.39	12.79 ± 5.13	27.34 ± 10.94	1195.13 ± 475.03
1000 mg/kg	47.85 ± 2.35	15.92 ± 4.11	33.03 ± 6.33	1323.88 ± 314.86

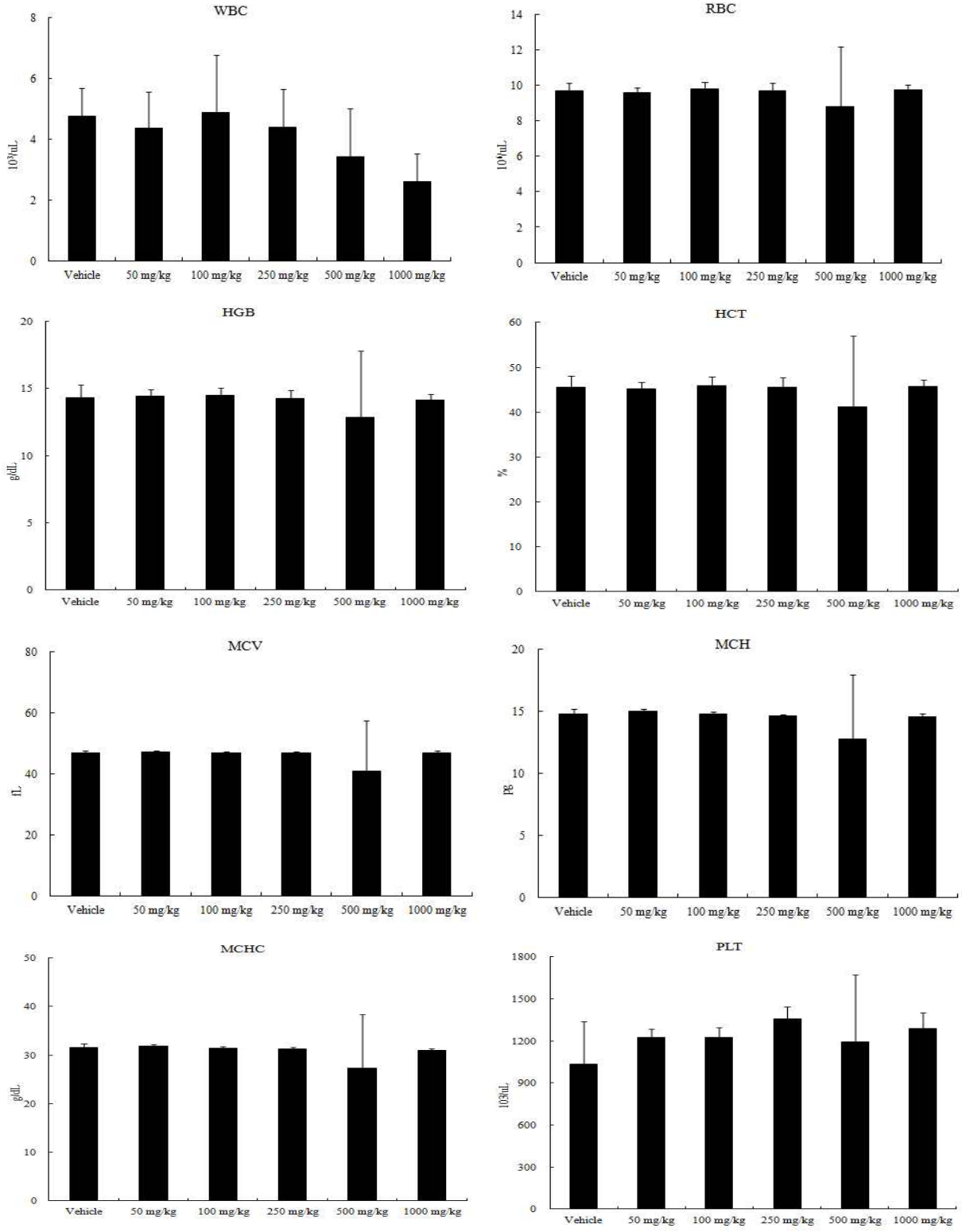


그림 81. Hematological analysis of male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

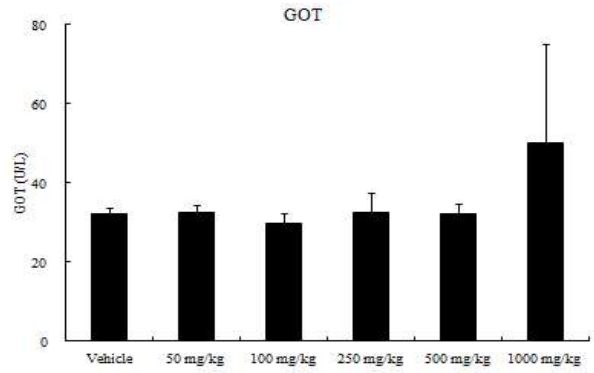
표 45. SerμM biological analysis of male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

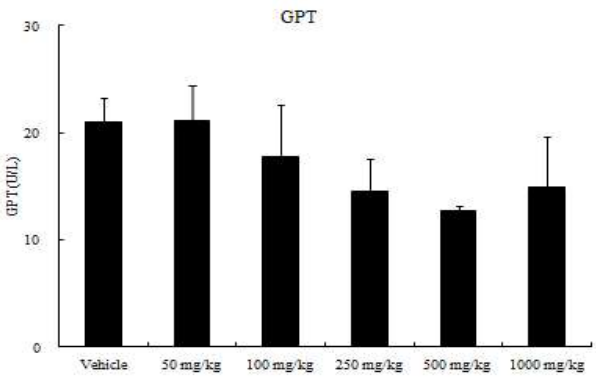
Dose	GOT (U/L)	GPT (U/L)	T-BIL (mg/dL)	T.CHO (mg/dL)
Vehicle	32.11 ± 1.61	21.02 ± 2.30	0.06 ± 0.01	141.41 ± 10.92
50 mg/kg	32.59 ± 1.91	21.16 ± 3.33	0.09 ± 0.03	143.98 ± 20.76
100 mg/kg	29.94 ± 2.32	17.81 ± 14.59	0.07 ± 0.03	135.47 ± 4.75
250 mg/kg	32.67 ± 4.83	14.59 ± 2.93	0.04 ± 0.01	135.51 ± 14.70
500 mg/kg	32.26 ± 2.61	12.74 ± 0.40	0.05 ± 0.01	133.33 ± 15.81
1000 mg/kg	50.02 ± 25.16	14.98 ± 4.70	0.04 ± 0.03	127.42 ± 10.84

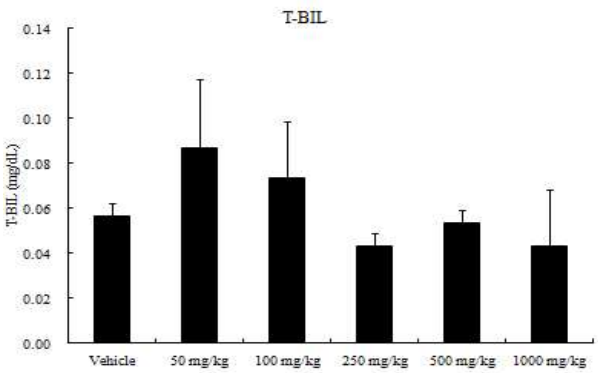
Dose	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	BUN (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Vehicle	48.26 ± 5.80	130.08 ± 4.56	34.94 ± 3.03	13.51 ± 14.38
50 mg/kg	62.99 ± 9.05	138.63 ± 26.57	28.53 ± 4.37	14.38 ± 2.64
100 mg/kg	67.61 ± 27.31	124.25 ± 7.06	31.29 ± 7.48	15.11 ± 0.34
250 mg/kg	43.69 ± 1.75	127.59 ± 15.53	31.75 ± 1.05	14.30 ± 0.61
500 mg/kg	60.13 ± 12.63	123.52 ± 9.54	33.32 ± 2.31	13.84 ± 0.81
1000 mg/kg	47.91 ± 15.64	123.80 ± 13.06	30.65 ± 4.84	12.14 ± 0.35

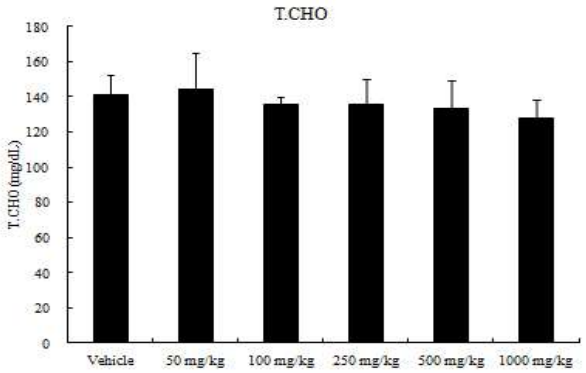
Dose	IP (mg/dL)	D-BIL (mg/dL)	UA (mg/dL)
Vehicle	21.15 ± 3.14	0.16 ± 0.02	0.36 ± 0.32
50 mg/kg	20.50 ± 1.67	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.06
100 mg/kg	18.98 ± 0.90	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.07
250 mg/kg	16.51 ± 1.21	0.17 ± 0.02	0.43 ± 0.13
500 mg/kg	16.22 ± 0.98	0.18 ± 0.02	0.36 ± 0.10
1000 mg/kg	14.86 ± 1.38	0.16 ± 0.03	0.93 ± 0.91

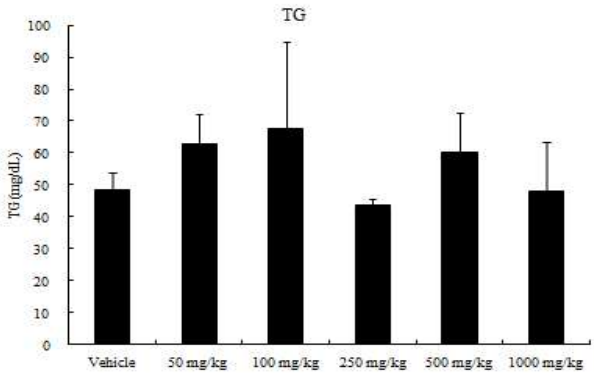
Dose	GLU (mg/dL)	CREA (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)
Vehicle	241.35 ± 82.89	0.97 ± 0.06	4.42 ± 0.03	1.85 ± 0.01
50 mg/kg	233.84 ± 179.83	0.98 ± 0.11	4.59 ± 0.58	1.89 ± 0.16
100 mg/kg	262.58 ± 95.71	1.02 ± 0.11	4.47 ± 0.37	1.80 ± 0.13
250 mg/kg	335.68 ± 8.92	1.09 ± 0.14	4.37 ± 0.41	1.78 ± 0.11
500 mg/kg	374.93 ± 23.64	0.98 ± 0.02	4.41 ± 0.47	1.79 ± 0.14
1000 mg/kg	321.62 ± 22.85	0.99 ± 0.06	4.26 ± 0.45	1.73 ± 0.17

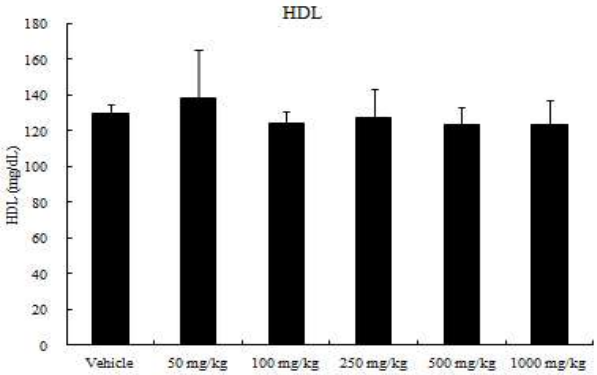

GOT
GOT (U/L)
80
60
40
20
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg

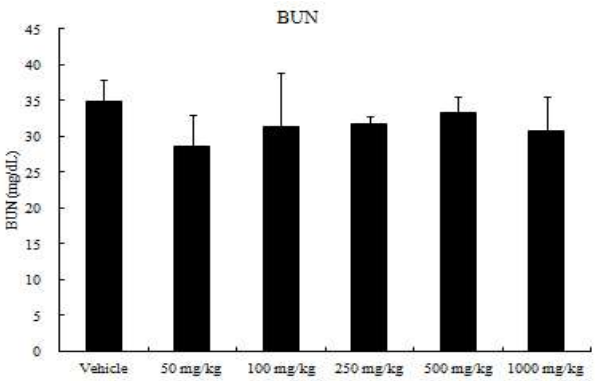

GPT
GPT (U/L)
30
20
10
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg

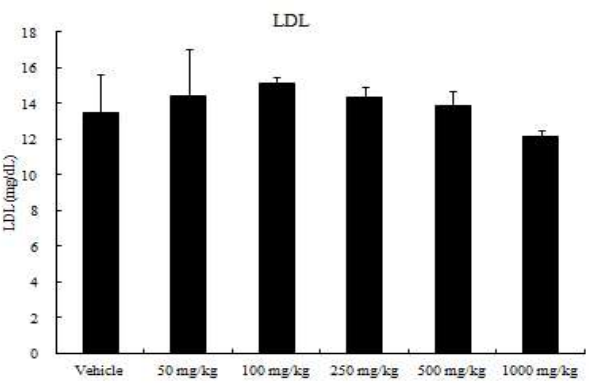

T-BIL
T-BIL (mg/dL)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg


T.CHO
T.CHO (mg/dL)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg


TG
TG (mg/dL)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg


HDL
HDL (mg/dL)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg


BUN
BUN (mg/dL)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg


LDL
LDL (mg/dL)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Vehicle
50 mg/kg
100 mg/kg
250 mg/kg
500 mg/kg
1000 mg/kg

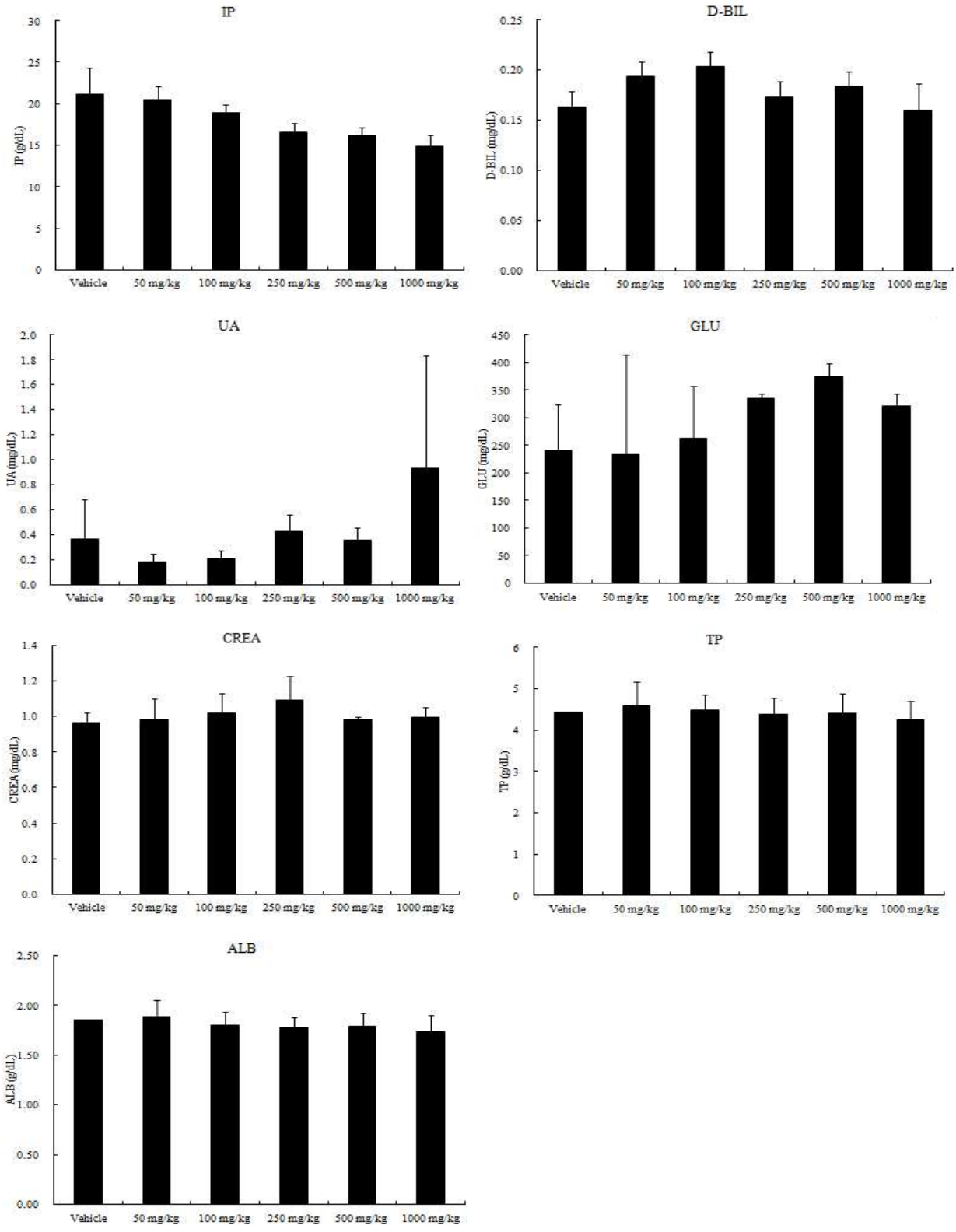


그림 82. SerμM biological analysis of male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 3 weeks.

6. 곰취 추출 시료에 대한 혈행개선 관련 고중성지방혈증 in vivo 유효성 평가 결과

가. 고중성지방혈증 동물 모델

6주령의 C57BL/6 마우스를 체중이 높은 순으로 배열하고 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리한 이후 12주간 고탄수화물 식이로 Harlan사의 멸균된 고형사료(TD.88137)를 배식하여 고중성지방혈증을 유도하였다. 실험군으로는 일반사료인 정상식이를 급여하는 정상군과 고탄수화물식이를 먹인 실험군으로 나뉘며 양성대조군인 positive controls로 오마코(omega-3; 고트리글리세라이드혈증에 대한 전문의약품)를 사용하였다. 시험은 12주동안 진행되었으며 시료 투여군으로 곰취 50% 에탄올 추출물을 각각 100, 200, 400, 800mg/kg에 따라 농도별로 경구 투여하였다. 체중은 실험 시작시, 실험경과 3일마다 총 24회 측정하였으며 12주 투여 후 내장 지방량의 변화를 알아보기 위해 동물을 희생하여 복부 내장지방과 간을 적출하여 10% Formalin에 고정하였으며 채취된 혈액은 생화학 분석을 실시하였음.

나. 고중성지방혈증 마우스를 이용한 곰취 투여군과 대조군의 체중 변화

고 탄수화물 식이를 12주간 진행한 결과 Vehicle군, 오마코군, 곰취 추출물 투여군(100, 200, 400, 800 mg/kg)은 정상식이를 한 군과 비교하여 평균 5 ~ 7g의 체중 증가가 관찰되었으나 같은 고 탄수화물 식이를 한 군에서는 시료의 효능에 따라 각각 약간의 체중변화를 나타내었음 (그림 83).

고탄수화물 식이 또한 비만을 유발할 수 있으므로 내장지방량등의 변화를 알아본 결과, Vehicle군과 곰취 추출물 투여군에서 부고환지방, 피하지방, 복막하지방의 지방량이 정상식이를 한 군만 제외하고 다 증가했으며, 곰취 추출물을 투여서 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었음 (표 46, 그림 84).

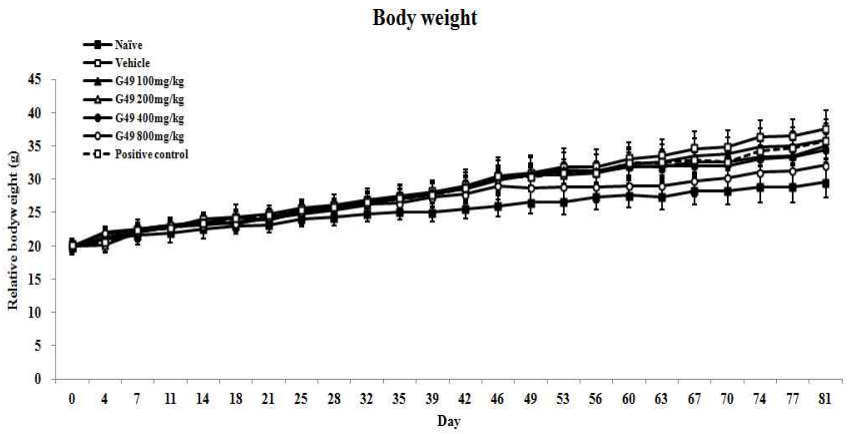


그림 83. Body weights change of male C57BL/6 mice during oral administration treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract for 12 weeks.

표 46. Analysis of body fat weights in male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract during 12 weeks.

Dose	Subcutaneous fat weight (mg)	Peritoneal fat weight (mg)	Epididymal fat weight (mg)
Naive	767.4 ± 182.4	480.4 ± 137.6	978.0 ± 350.7
Vehicle	1,988.6 ± 509.4	899.9 ± 186.7	2,071. ± 439.0
G49 100mg/kg	1,753.0 ± 508.6	863.0 ± 180.5	1,937.9 ± 376.5
G49 200mg/kg	1,727.0 ± 551.9	909.7 ± 217.8	1,948.0 ± 261.1
G49 400mg/kg	1,492.4 ± 407.4	729.3 ± 196.3	1,661.4 ± 414.7
G49 800mg/kg	1,064.4 ± 345.9	630.1 ± 258.8	1,479.6 ± 560.4
Positive control	1,673.7 ± 475.3	889.3 ± 119.4	2,000.3 ± 197.8

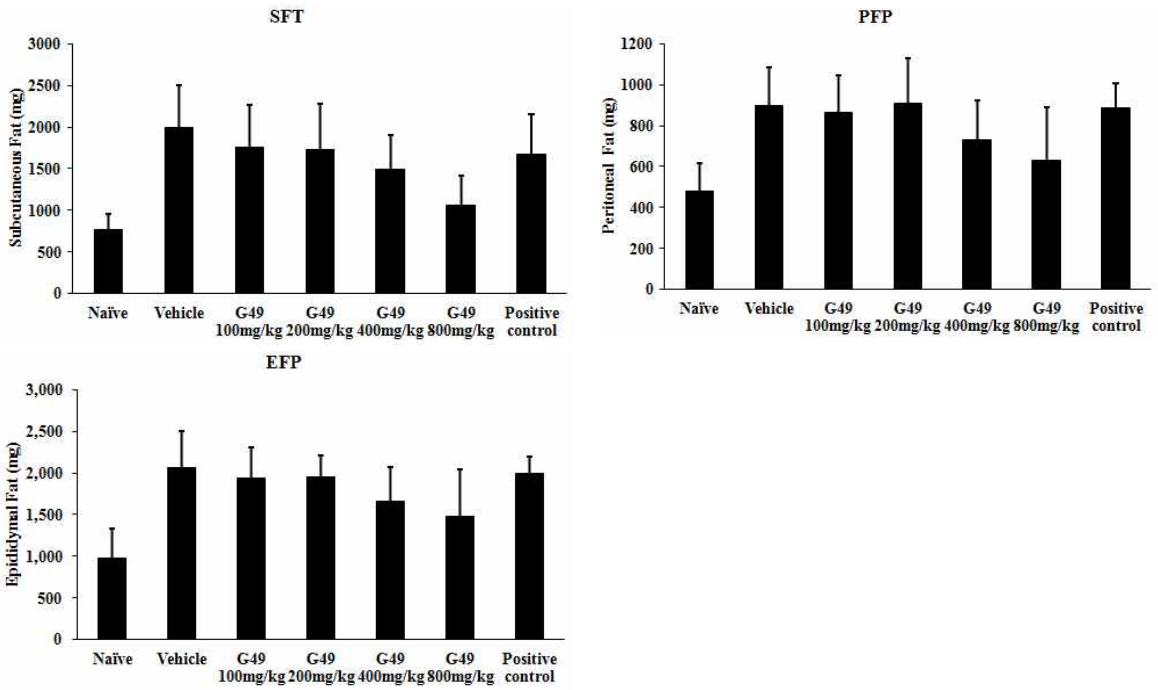


그림 84. Analysis of body fat weights in male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract during 12 weeks.

다. 곰취 추출물 투여군에서의 혈액내 총 콜레스테롤과 중성지방 변화 측정

고중성지방혈증 동물을 4시간 절식시킨 후 졸레틸(Zoletil) 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈장을 분리하였다. 혈장 생화학분석 결과, 혈행개선의 주요 측정 지표인 총 콜레스테롤 수치와 트리글리세라이드 수치가 음성대조군(Vehicle)에 비해 곰취 추출물 투여군에서 감소하는 것을 확인하였고, 높은 농도로 갈수록 양성대조군과 비슷한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었음 (그림 85).

표 47. Analysis of cholesterol and triglyceride in male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract during 12 weeks.

Dose	Total cholesterol	Triglyceride	HDL cholesterol	LDL cholesterol
Naive	111.0 ± 12.0	50.9 ± 19.9	77.3 ± 6.5	5.5 ± 1.6
Vehicle	384.9 ± 64.1	100.9 ± 45.1	243.6 ± 35.4	31.2 ± 6.8
G49 100 mg/kg	197.8 ± 34.6	64.4 ± 21.6	122.2 ± 13.5	17.4 ± 6.9
G49 200 mg/kg	224.2 ± 39.4	45.7 ± 17.1	135.9 ± 14.1	19.7 ± 7.3
G49 400 mg/kg	198.9 ± 31.3	37.6 ± 7.9	125.4 ± 24.0	18.5 ± 4.1
G49 800 mg/kg	187.8 ± 37.7	36.0 ± 8.3	123.4 ± 22.9	15.3 ± 4.4
Positive control	184.9 ± 27.5	50.6 ± 15.1	113.1 ± 14.3	17.5 ± 4.2

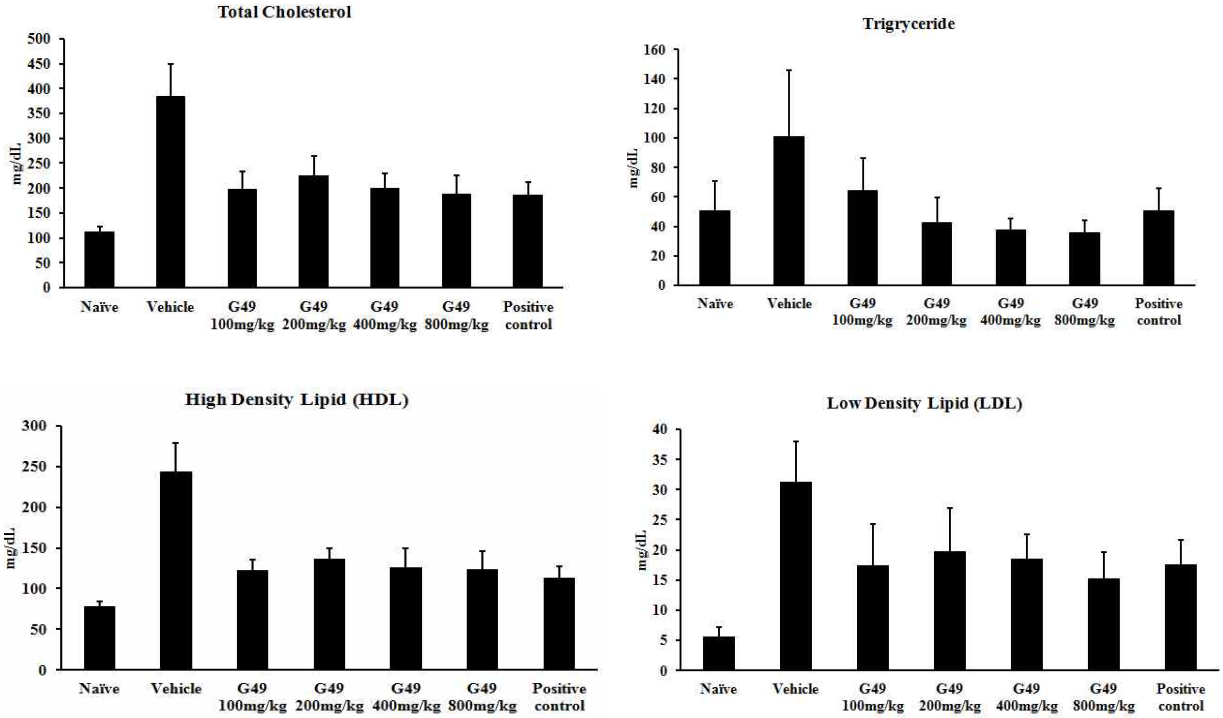


그림 85. Analysis of cholesterol and triglyceride in male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract during 12 weeks.

라. 곰취 추출물 투여군에서의 심혈관위험지수 및 동맥경화지수 분석

혈액 순환 장애를 유발하여 향후 심혈관계 질환을 일으킬 수 있어 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(atherogenic index, AI)와 심혈관위험지수(cardiac risk factor, CRF) 측정한 결과, vehicle군에 비해 곰취 추출물 고농도 투여군 (800 mg/kg)에서 다소 낮은 수치를 나타내어 심혈관계 질환 위험도도 낮추는 것으로 관찰되었음 (그림 86).

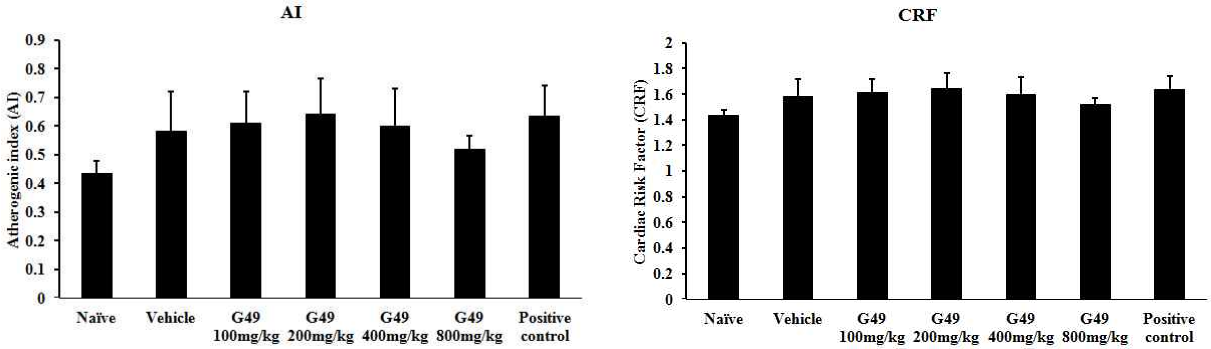
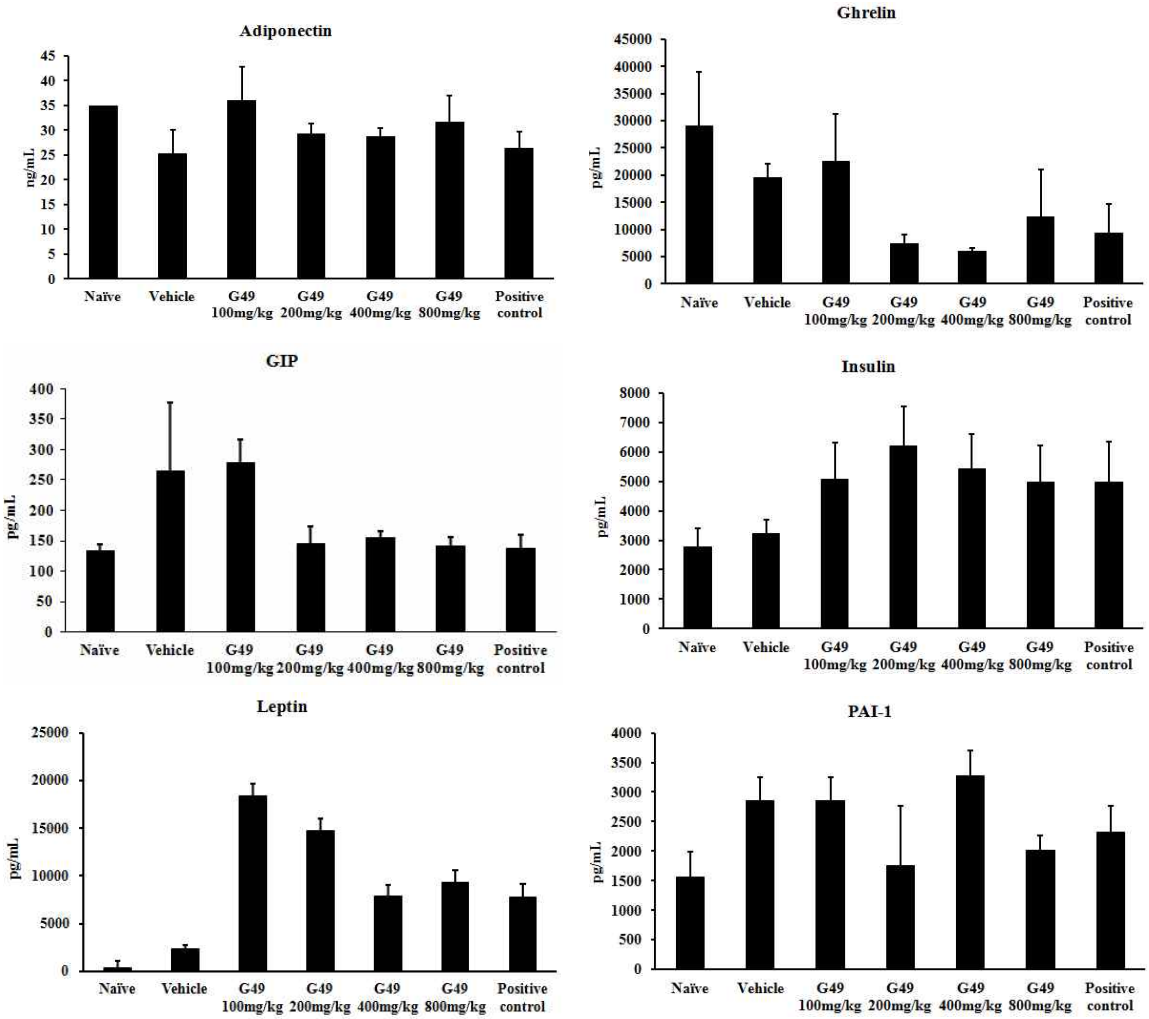


그림 86. Values of atherogenic index (AI) and cardiac risk factor (CRF).

마. 곰취 추출물 투여군에서의 diabetes biomaker 분석

추가적으로 향후 혈행 장애로 유발되는 대사증후군에 대한 활성도도 알아보기 위하여 바이오마커 탐색도 진행하였다. 관련 유전자 탐색은 제2형 당뇨병, 비만과 같은 다인성 대사질환을 예측하고 치료하는 과정에서 중요한 역할을 하기에 시료의 적은 양으로 여러 가지 biomolecules 분석이 가능한 Bioplex assay 실험을 통해 당뇨 biomaker인 adiponectin, gherlin, GIP, Insulin, leptin, PAI-1, Resistin, glucagon에 대한 곰취 추출물의 영향을 분석하였다. Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 아디포카인으로서, 항염증 효과 및 항동맥경화 효과가 있는 것으로 알려져 있고 간에서 인슐린 감수성과 지방산 산화를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), leptin, resistin은 인슐린 저항성에 중요한 역할을 한다. 따라서 곰취 추출물군은 ghrelin, GIP, leptin, PAI-1, resistine, glucagon 발현을 억제시키고 adiponectin, insulin 발현은 증가시킴으로서 혈행장애로 유발될수 있는 2차 발병 질환인 당뇨에도 효과가 있는 것으로 확인되었음 (그림 87).



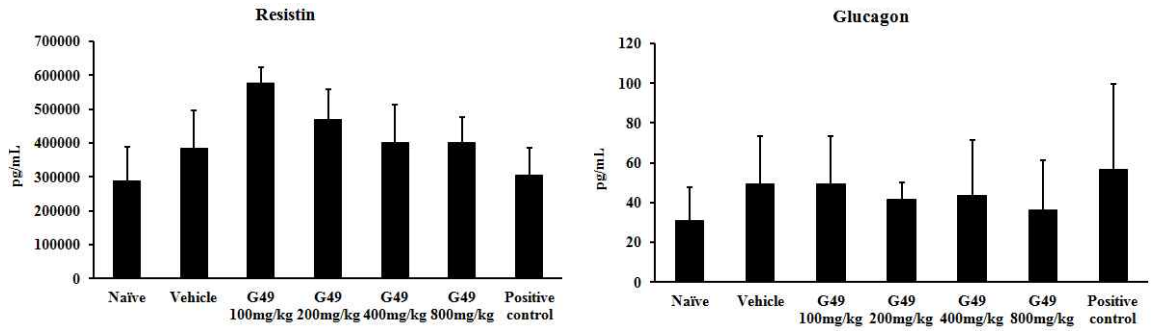


그림 87. Analysis of diabetes biomakers in male C57BL/6 mice treated with *Ligularia fischeri* ethanol extract during 12 weeks.

○ 결론

본 연구는 곰취 추출물을 이용하여 혈행개선 관련 건강기능 제품 개발을 위한 비임상 *in vitro & in vivo* 유효성 평가를 진행하였다. 우선 곰취 추출물의 산지별 에탄올 추출물과 그 속에서 분리된 유효물질들을 이용하여 모든 질환의 근원이 될 수 있는 산화작용에 대한 억제활성을 항산화 assay로 수행하여 평가 후 확인하였다. 다음으로 혈행개선에 대한 *in vitro* 평가는 혈행개선 관련 혈소판 응고 억제 활성 과 혈류개선을 위한 혈전 용해, 전구지방세포를 이용하여 지방세포로의 분화 억제활성을 확인함으로서 혈행개선에 대한 다양한 유효성 평가를 진행하였다. *in vitro* level에서의 우수한 활성 데이터를 기반으로 최근 대체의약이 없으며, 판매량도 높은 혈행개선 전문의약품인 오마코를 타깃으로 고중성지방혈증 완화에 대한 유효성 평가를 위한 동물 모델을 제작하여 본 시험 *in vivo* 시험에 적용하였다. 그 결과 곰취 50% 에탄올 추출물은 고탄수화물식이로 증가된 혈액 속 콜레스테롤과 중성지방의 수치를 농도에 의존적으로 억제하며, 이후 진행된 당뇨관련 바이오마커들의 활성도 억제하는 것으로 확인되었다. 본 결과를 바탕으로 곰취 추출물은 혈행개선 기능 중 고 콜레스테롤 수치와 고 중성지방 수치를 낮춤으로서 혈액순환을 원활이 할 수 있는 활성을 나타내는 것으로 비임상 유효성 평가 결과를 확인되었다. 향후 본 연구결과는 개별인정형 건강기능식품을 개발하기 위한 인체적용시험의 진단 factor들을 선정하는데 비임상 자료로 유용하게 활용될 것이며, 식약처 인증 자료로도 논문에 published 되어 제출될 수 있을 것으로 사료됨.

제 6 절 곰취 추출물의 혈관신생 제어 및 항암 효능 평가

1. 연구방법

가. 세포 배양

제대정맥 혈관내피세포 (hμMan μMbilical vein endothelial cell, HUVEC)는 Lonza (Walkersville, MD, USA)로부터 구입하여 EGM-2 BulletKit mediμM (Lonza)으로 배양하였고, 폐암세포주인 A549, H1299는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 10% fetal bovine serμM-Dulbecco's Modified Eagle's MediμM (10% FBS-DMEM, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)으로 배양한 후, 실험에 사용하였음.

나. 세포 증식 분석

제대정맥 혈관내피세포 (HUVEC)를 6-well plates (1 x 10^5 cells/well)에 plating하고, 기본 EBM-2 배지로 세포들을 G_1/G_0 phase로 동기화 (14시간)한 후, 곰취 추출물 (1-100 μg/ml)을 처리한 세포를 EGM-2 BulletKit 배지로 24시간 동안 자극하고, 세포증식 제어 효과를 측정하였다. 폐암세포주 (A549, H1299)를 6-well plates (5 x 10^4 cells/well)에 plating하고, 기본 DMEM 배지로 세포들을 G_1/G_0 phase로 동기화 (24시간)한 후, 곰취 추출물 (10 μg/ml) 또는 단일 화합물 (1-50 μM)을 30분 전처리 하고 10% FBS로 24시간 자극하여 세포 증식 제어효과를 측정하였다. 세포 증식 변화는 trypan blue dye를 이용하여 세포수를 직접 계수하여 측정하였음.

다. 세포 이동 분석

세포 이동 변화는 monolayer wound healing assay를 이용하여 측정하였다. 혈관내피세포 및 폐암세포주 (A549, H1299)를 48-well plates (5 x 10^4 또는 8 x 10^4 cells/well)에 배양한 후, 200 μl pipette-tip으로 중앙부분을 일직선으로 상처를 내고 혈청 등 세포자극인자가 없는 기본 EBM-2 배지 (혈관내피세포용) 또는 기본 DMEM 배지 (종양세포용)로 교환하고 2시간 동안 배양하였다. 새로운 기본 EBM-2 (혈관내피세포용 배지) 또는 DMEM 배지 (종양세포용 배지)로 교환한 후, 곰취 추출물 (시료를 1-100 μg/ml의 농도로 30분 전처리 하고 EGM-2 BulletKit (혈관내피세포용) 또는 10% FBS (종양세포용)로 15시간 자극시키고 세포 이동 변화를 관찰하였다. 세포는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하고 methanol로 10분간 고정한 후, Giemsa staining 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 염색하고 세포 이동 거리를 측정하였다. 실험 조건에 따라 mitomycin C를 (5μg/ml) 처리하여 세포 증식으로 인한 이동의 변화가 아닌 독립적인 이동 억제 효과를 확인하고자 하였음.

라. 세포 부착 분석

폐암세포주 (A549, H1299)를 trypsin으로 떼어낸 후, 10% FBS-DMEM으로 1시간 동안 처리하여 세포표면을 회복시켰다. 기본 DMEM 배지로 세포를 세척하고 곰취 추출물을 함유한 10% FBS-DMEM 배지에 현탁화시킨 후, 96-well plates (1.5 x 10^4 cells/well)에 plating하고 1시간 동안 배양하였다. 부착하지 못한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하고, 부착한 세포들을 methanol로 10분간 고정한 후, Giemsa staining 용액으로 염색하고 현미경을 통하여 (X 200배) 부착세포의 수를 측정하였음.

마. 세포 주기 분석

제대정맥 혈관내피세포(HUVEC)를 100 mm culture dish (1 x 10^6 cells/well)에 plating하고, 기본 EBM-2 배지로 세포들을 G_1/G_0 phase로 동기화 (14시간)한 후, 곰취 추출물 (10 μg/ml)을 처치하고 세포증식 유도 인자로 24시간 자극한 뒤, trypsin-EDTA로 세포를 수확하고 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 3시간 고정시킨 후, PBS로 세척하고 Muse™ cell cycle reagent로 30분간 염색하고, Muse™ cell analyzer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)로 세포주기 변화를 측정하였음.

바. 세포 침윤 분석

Upper side transwell insert (Costar, 6.5 mm diameter insert, 8 μm pore size) (Corning Inc., Corning, NY, USA)를 50 μl of 1 mg/ml의 조건으로 기본 EBM-2 media 및 serμM이 없는 기본 DMEM으로 희석시켜 Matrigel (BD Biosciences)을 코팅한 후에 insert 위쪽에는 HUVEC, A549, H1299 세포 (5 x 10^4 cells/ml) 100 μl 넣어주고, 아래쪽에는 기본 EBM-2 및 DMEM을 600 μl 넣어주었다. 2시간 starvation 과정을 거치고 나서 곰취 추출물 (10 μg/ml) 및 5-CQA (10 μM)를 동시 및 30분 전처리 해주며 세포증식 유도 인자 및 10% FBS로 16시간 자극시켜주었다. Insert의 아랫부분으로 이동한 세포를 methanol로 고정시켜 주고 cotton-tipped swab을 이용하여 membrane의 위쪽에 침투되지 않은 세포는 제거해준 후에 0.04% Giemsa staining 용액으로 염색 시키고 현미경(X 200배)으로 서로 다른 6 부분을 관찰하여 침윤된 세포를 측정하였음.

사. 세포 맥관 형성 분석

Matrigel (10.4 mg/ml, BD sciences, Bedford, MA, USA)을 하루 동안 4℃에서 용해한 뒤 24-well plate에 200 μl씩 coating하여 37℃에서 굳게 하였다. 혈관내피세포를 (4 x 10^4 cells/well) 씩 Matrigel이 coating 되어 있는 well에 plating하고 1% FBS가 포함된 기본 EBM-2 배지로 2시간동안 G_1/G_0 phase로 동기화 한 후, 다시 세포증식 유도 인자가 포함된 EBM-2배지와 시료를 동시 처리하여 6시간 동안 자극하고 맥관 형성 변화를 측정하였음.

아. Immunoblot 분석

HUVEC, A549, H1299를 실험 조건에 따라 처치한 후, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, [pH 7.4], 150 mM sodiμM choloride, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 100 μg/ml 4-(2-aminoethyl)benzene-sulfonyl fluoride, 10 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin A, 0.5 μg/ml leupeptin, 80 mM β-glycerophosphate, 25 mM sodiμM fluoride, 1 mM sodiμM orthovanadate)로 융해시키고, 원심분리하여 세포 추출물을 획득하였다. Immunoblot 분석을 통하여, 세포주기 관련 단백질인 retinoblastoma protein (pRb), cyclin-dependent kinases (CDKs), cyclins의 발현과, 세포 이동 및 침윤 관련 단백질인 MMP-2, MMP-9 의 발현, extracelluar signal-regulated kinase (ERK), Akt, $p70^{s6k}$, $p38^{MAPK}$ 등의 발현 및 활성 변화를 관찰하였음.

자. Immunofluorescence 분석

HUVEC을 gelatin coating된 cover glass에 seeding 한 후 실험 조건에 따라 처치하였다. PBS로 세척하고 4% formalin 으로 고정한 후, first antibody인 VE-cadherin antibody와 FITC-conjμgated secondary antibody로 반응시키고 DAPI staining을 하고 mounting 과정을 거친 후 형광현미경으로 분석하였음.

2. 연구결과

가. 혈관내피세포에 대한 효능평가

혈관내피세포를 이용하여, 곰취 추출물의 세포의 증식, 침윤 및 맥관형성에 대한 효과와 작용기전에 대한 실험을 수행하였음.

- 혈관내피세포에 대한 증식 제어 및 세포 독성 효과

곰취 시료의 혈관내피세포의 증식 제어 효과를 알아보기 위해 다양한 세포증식 유도인자 (Growth factors)의 존재 하에서 곰취 추출물(LF, 1-10 μg/ml)을 처리하여 관찰하였다. 세포증식 유도인자에 의해 유도된 세포증식은 곰취 추출물에 의해 강력하게 억제되었으며 (그림 88), 실험에 사용한 최고 농도 (10 μg/ml)에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으므로 세포 독성은 없는 것으로 판단됨 (그림 89).

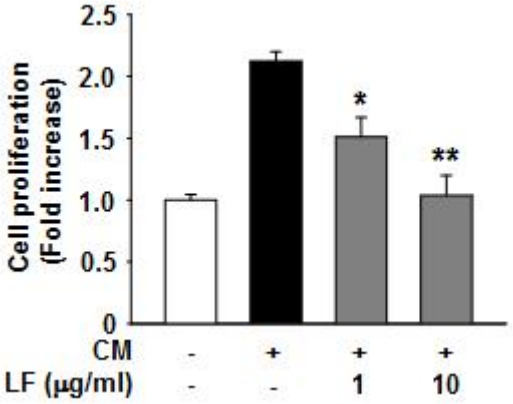


그림 88. 곰취 추출물에 의한 세포 증식 제어 효과

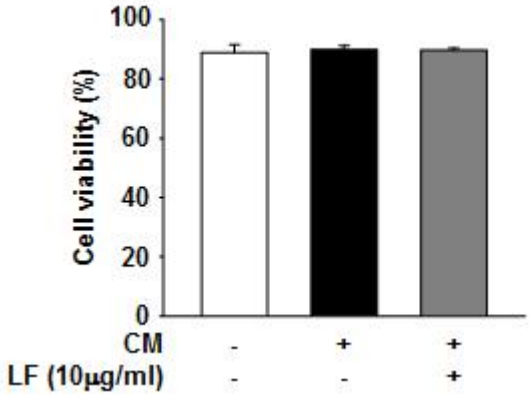


그림 89. 곰취 추출물에 의한 세포 독성 효과

- 혈관내피세포에 대한 곰취 추출물의 세포주기 조절 효과

곰취 추출물의 세포 증식 억제 효능을 관찰하였으므로, 이와 관련한 세포주기 분석을 시행하였다. 곰취 추출물 (10 μg/ml)을 처리한 결과, 세포증식 유도인자에 의해 유도된 S, G_2/M 주기의 증가가 G_0/G_1 주기로 고정되는 것이 관찰되었다 (그림 90). 본 연구 결과는 곰취 추출물에 의한 세포 증식 억제 효능은 세포주기 조절 억제에 기인한 것임을 확인하였음.

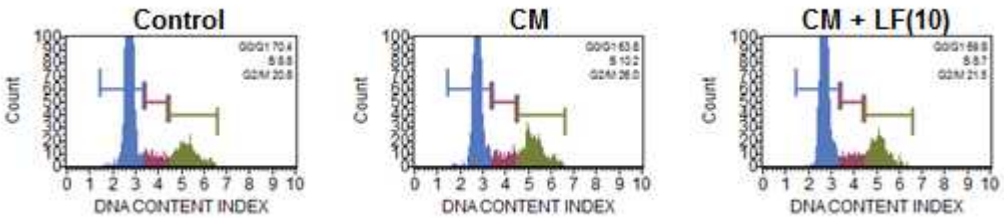


그림 90. 곰취 추출물에 의한 세포주기 조절 효과

- 곰취 추출물의 세포증식 제어 효능과 세포주기 조절 단백질 발현 상관성 연구

곰취 추출물 처리에 의한 세포 증식 억제 효능이 세포주기 조절과 관련 있으므로, 세포주기 조절 단백질 발현 변화를 탐색하고자 하였다. 곰취 추출물(10 μg/ml) 처리는 세포주기 진행 단백질인 Cdk4, Cdk2, cyclin D 및 cyclin E를 음성대조군 수준으로 현저히 억제하였으나,

세포주기 억제 단백질인 $p27^{kip1}$의 발현은 증가시켰다. 이에 따른 결과로 Cdk-cyclin complex의 기질인 종양억제 유전자 pRb 단백질의 인산화가 억제되는 것이 관찰되었다. 결론적으로 곰취 추출물은 세포주기 관련 단백질 발현을 조절함으로써 Rb 단백질 인산화를 억제하고 세포주기 진행을 차단, 세포증식을 억제하는 것으로 사료됨 (그림 91).

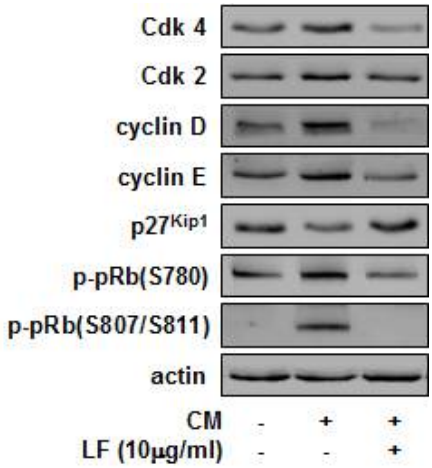


그림 91. 곰취 추출물에 의한 세포주기 관련 단백질 발현 제어 효과

- 곰취 추출물의 세포 침윤 제어 효과

곰취 추출물 (1-10 μg/ml) 처리는 용량 의존적으로 세포 침윤 억제 효과를 나타냄 (그림 92).

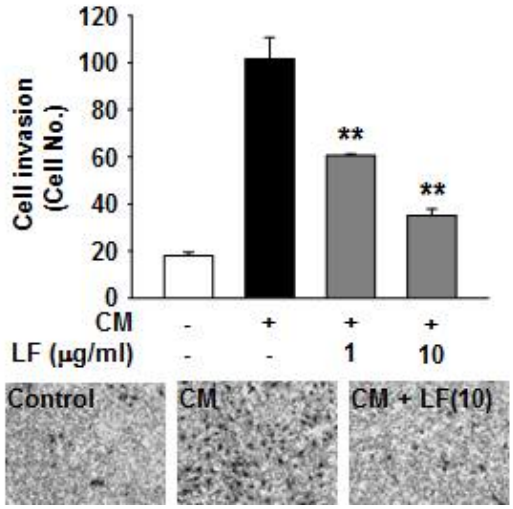


그림 92. 곰취 추출물에 의한 세포 침윤 제어 효과

- 곰취 추출물의 세포 침윤 관련 단백질 MMP-2 및 MMP-9의 발현 제어 효과

곰취 추출물 (10 μg/ml) 처리는 MMP-2와 MMP-9의 발현을 억제하였으며, 이러한 억제효과가 세포 침윤 억제 현상을 매개하는 것으로 사료됨 (그림 93).

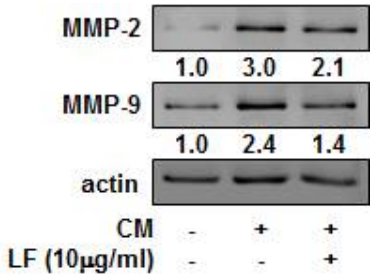


그림 93. 곰취 추출물에 의한 MMP 단백질 발현 제어 효과

- 곰취 추출물의 맥관 형성 제어 효과

곰취 추출물(1-10 μg/ml) 처리는 용량 의존적으로 맥관 형성이 억제하였음 (그림 94).

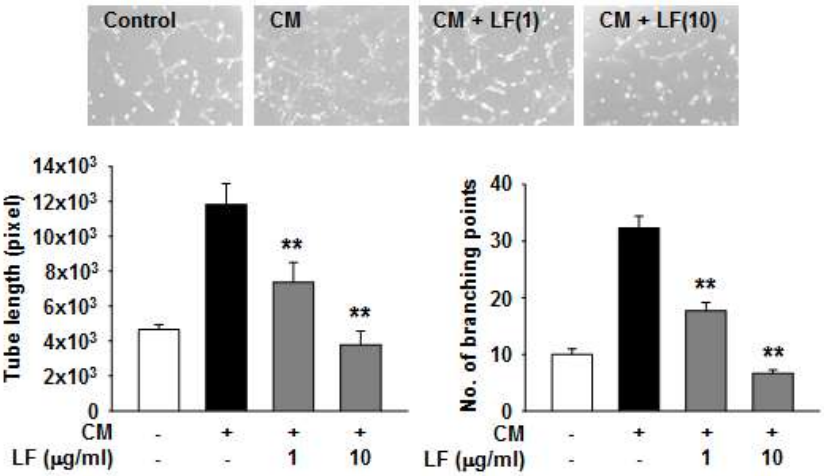


그림 94. 곰취 추출물에 의한 혈관내피세포의 맥관 형성 제어 효과

- 곰취 추출물의 세포 부착 단백질 제어 효과

곰취 추출물 (10 μg/ml) 처리는 세포 부착 단백질 VE-cadherin의 세포간 접촉면으로 분포시킴으로써, 혈관신생 관련 세포투과성, 세포이동 및 침윤 현상을 제어하는 것으로 추정할 수 있었음 (그림 95).

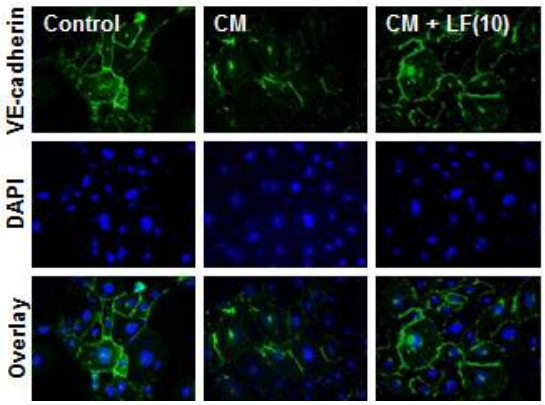


그림 95. 곰취 추출물에 의한 VE-cadherin 분포 조절 효과

- 세포 신호전달 기전 연구

곰취 추출물의 세포 증식, 침윤 및 맥관 형성 제어 효능과 관련한 작용 기전을 규명하기 위하여, 신호전달 관련 효소의 활성 변화를 관찰하였다 (그림 9). 세포증식 유도 인자로 유도된 ERK, Akt, $p70^{s6k}$, $p38^{MAPK}$의 인산화 활성이 곰취 추출물에 의하여 모두 활성이 억제되는 것을 확인하였음.

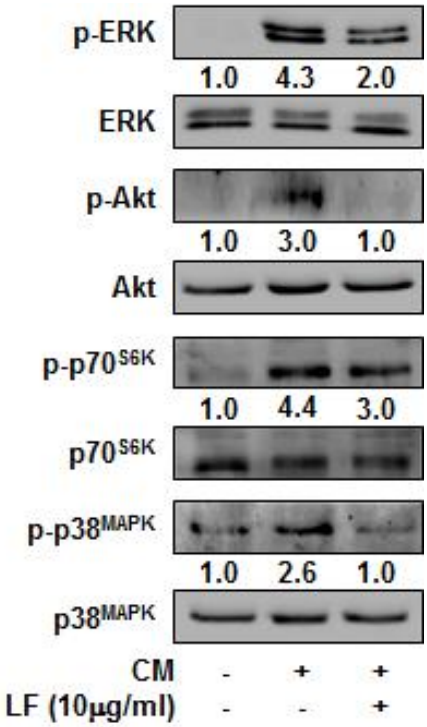


그림 96. 곰취 추출물에 의한 세포 신호 전달 기전 연구

나. 종양세포주에 대한 효능평가

곰취 추출물과 추출물 유래 분리 화합물 (ethyl caffeate)의 폐암 및 난소암에 대한 항암 효능과 작용기전을 규명한 논문 (Genes & Genomics (2013) 35: 741-746; Chemico-Biological Interactions (2014) 219: 151-158)에 근거하여, 추가적으로 분리한 화합물 methyl caffeate (MC)와 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA)의 폐암세포주 (A549, H1299)에 대한 효능을 평가하고자 하였음.

(1) Methyl caffeate (MC)

- 종양세포에 대한 증식 제어 효과

Methyl caffeate (MC, 0.1-50 μM) 처리는 용량 의존적으로 폐암세포의 증식을 억제하였다 (그림 10). MC에 의한 세포증식 억제 효과는 종양억제유전자 p53을 발현하는 A549 세포주보다는 p53이 결핍된 H1299 세포주에서 좀 더 강한 것으로 관찰되었음.

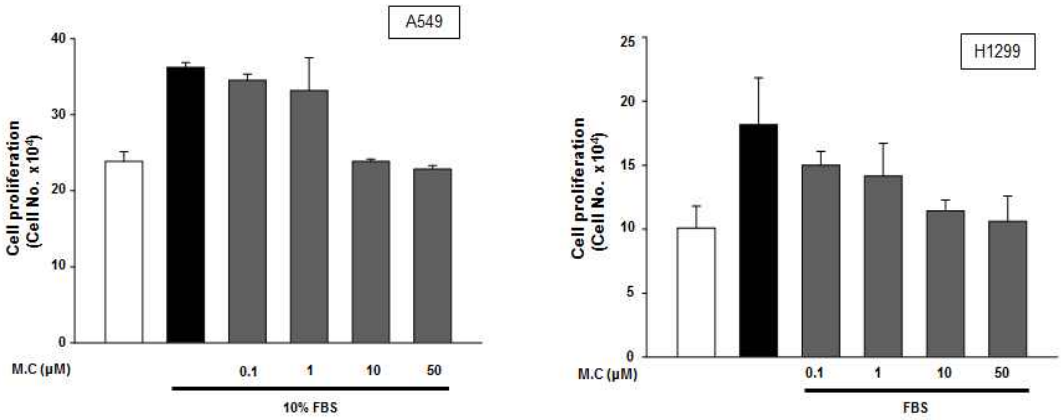


그림 97. MC에 의한 세포 증식 제어 효과

- MC의 세포증식 제어 효능과 세포주기 조절 단백질 발현 상관성 연구

MC (10-50 μM) 처리는 10% FBS에 의한 Cdk2, Cdk4 및 cyclin E의 발현을 강력하게 억제 하였고 (그림 98), 이러한 세포주기 진행 단백질의 발현 억제 효과가 세포주기 진행을 차단, 세포증식을 억제하는 것으로 사료됨..

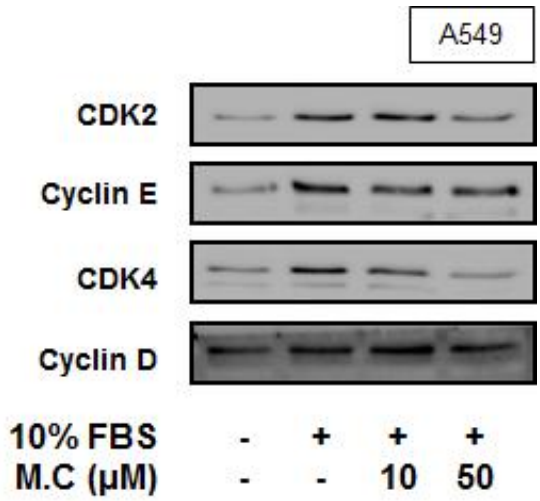


그림 98. MC에 의한 세포주기 관련 단백질 발현 억제 효과

- MC에 의한 세포 신호전달 경로 제어 연구

MC에 의한 폐암세포 (A549)의 증식 억제 관련 신호전달 기전을 규명하기 위하여, MC (10-50 μM)를 처리하고 10% FBS로 15분간 자극한 후 신호전달 관련 효소의 활성 변화를 관찰하였다. MC (50 μM)에서 ERK, Akt, $p70^{s6k}$, $p38^{MAPK}$의 인산화 활성이 억제되는 것을 확인하였음 (그림 99).

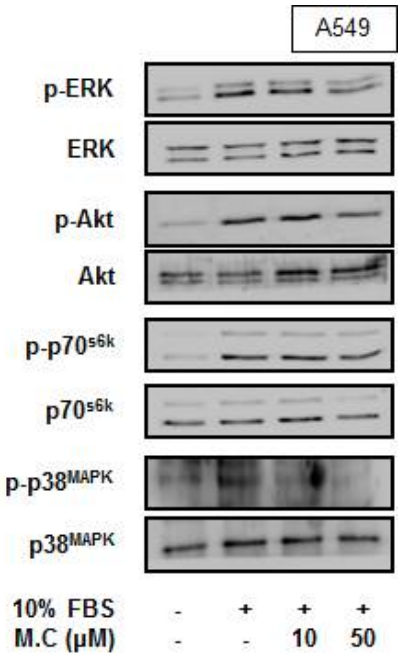


그림 99. MC에 의한 세포 신호 전달 기전 연구

(2) 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA)

- 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA)의 세포 독성 (생존율) 평가
  5-CQA (0.1-10 μM)에 의한 세포독성은 관찰되지 않았음 (그림 100).

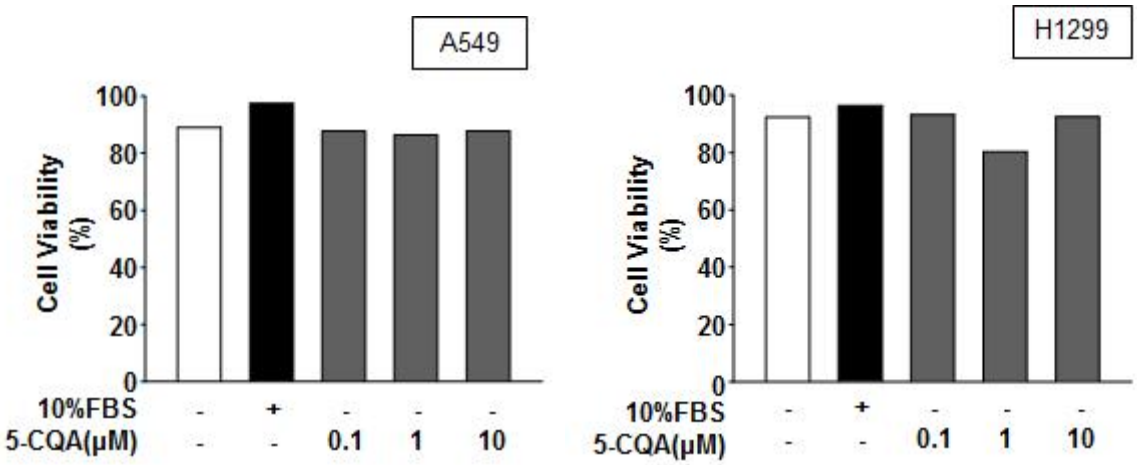


그림 100. 5-CQA에 의한 세포 독성 평가

- 5-CQA의 세포 부착 제어 효과
  5-CQA (10 μM) 처리는 폐암세포의 부착에는 유의미한 영향을 미치지는 않았다 (그림 101).

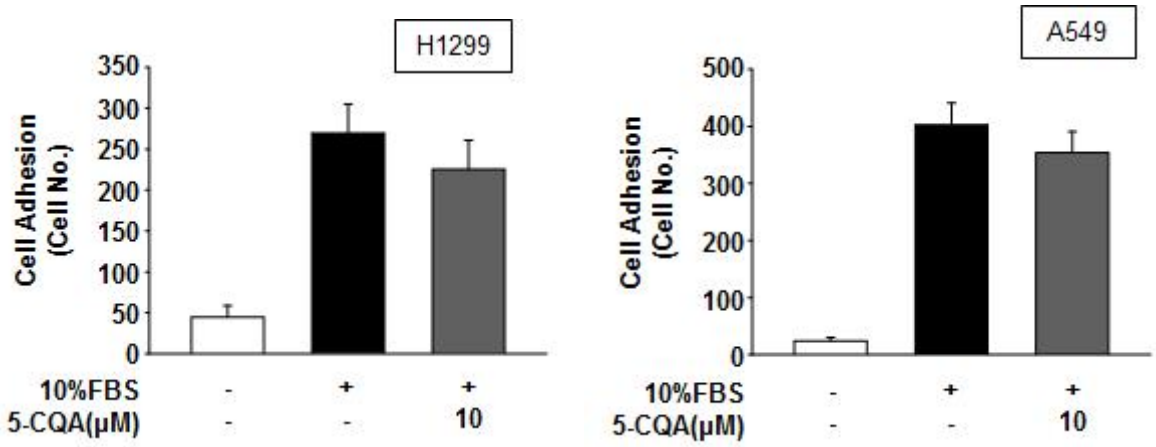


그림 101. 5-CQA에 의한 세포 부착 제어 효과

- 곰취 추출물의 세포 침윤 제어 효과

5-CQA (10 μM) 처리는 폐암세포주의 침윤 능력에 대하여 강력한 억제 효과를 나타내었다 (그림 102). 이러한 억제 효과는 종양억제유전자 p53의 발현 유무와는 관련이 없는 것으로 사료됨.

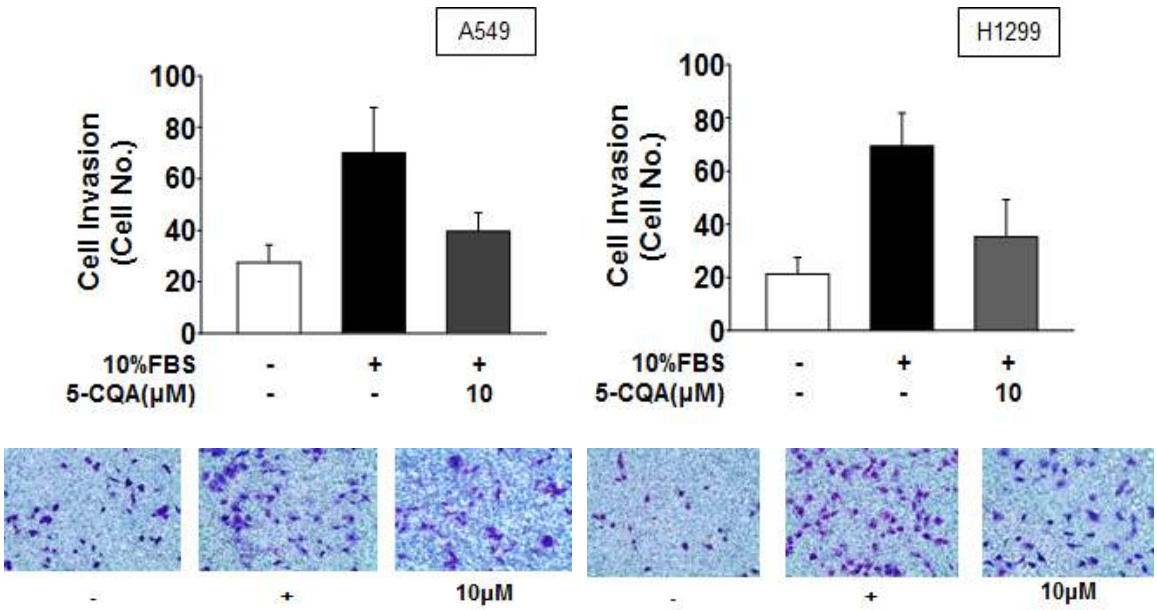


그림 102. 5-CQA에 의한 세포 침윤 제어 효과

3. 결론

혈행개선용 건강기능식품으로 개발될 곰취의 지속적 섭취로 인한 안전성 평가와 신규효능 발굴을 목적으로, **혈관의 생성과 유지에 중요한 역할을 하는 혈관내피세포를 이용하여 *in vitro* 효능 평가를 추가적으로 수행**한 본 연구결과 (Oncology Reports (2015) 34: 221-226)는 곰취 추출물이 세포 독성을 야기하지 않고 혈관신생을 효율적으로 제어함으로써, 악성종양, 당뇨병성 망막증, 류마티스 관절염, 비만, 건선 등의 난치성 질환을 개선할수 있는 제품 개발 가능성을 제시한다. 실제 곰취 유래 분리 화합물인 methyl caffeate와

5-O-caffeoylquinic acid는 폐암세포의 증식, 침윤 등에 억제 효능을 갖고 있었고, 특정 신호 전달 경로와 관련 단백질 발현의 억제 현상과 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. 본 연구결과는 혈행개선 관련 건강기능식품으로서의 곰취의 우수성 뿐 만 아니라, 혈관신생 관련 질환인 악성종양을 예방 또는 치료할 수 있는 신규 효능과 의약품으로서의 개발 가능성을 추가적으로 제시한 좋은 사례라고 판단됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차년도 (2012 ~2013)	곰취 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리	- 자료조사를 통한 최적의 지표물질 설정여부 - 유효 성분의 분리 및 구조 규명여부	100%
	제조공정 표준화	- 최적의 유효성분 추출조건 확립여부 - 추출 효율이 극대화 된 제조공정의 표준화 여부	100%
	혈행개선 관련 Biomaker 탐색 및 세포레벨 평가	- Biomaker 분석여부 - 유효물질 탐색을 위한 세포레벨에서 전구지방세포의 분화최적시기의 지방량 대비 축적 억제 평가 여부	100%
2차년도 (2013 ~2014)	대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보	- 최적 추출 조건에 따른 pilot scale 추출법 확립여부	100%
	Pilot 추출물에 대한 validation	- 분석법 검증(validation) 여부 ○ 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성등 분석	100%
	안정성 평가 (I)	- 장기보존 시험 수행 - 가속시험 및 가혹시험	100%
	혈행개선 관련 혈전 및 혈액응고 형성 억제 활성 *in vitro* 유효성 평가	- 혈소판 응집 억제 및 혈액응고 억제 평가여부	100%
	혈행개선 관련 혈중 중성지방 개선 *in vivo* 유효성 평가	- 고중성지방혈증 동물 모델 제작 여부 - 곰취 추출물의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 억제효능을 양성대조군인 정어리정제어유 (개별인정형 기능성 인정 원료, DHA EPA) 또는 오마코(오메가-3) 와 비교 평가 여부	100%
	추출물 및 화합물의 기능성 평가	- 추출물 및 화합물의 종양세포주에 대한 효능 평가 여부 ○ 증식제어, 단백질 발현 억제, 세포신호전달기전, 세포부착제어효과등 분석	100%

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
3차년도 (2014 ~2015)	안정성 평가 (Ⅱ)	- 장기보존시험 - 시제품에 사용될 제형의 물리 화학적 장기보존 평가	100%
	혈행개선 관련 혈전 및 혈액응고 형성 억제 활성 *in vivo* 유효성 평가	- 대조구와 효능평가 비교여부	100%
	혈행개선 관련 혈중 중성지방 개선 *in vivo* 유효성 평가 2 및 작용기전 탐색	- 곰취 추출물의 혈중중성지방 개선 유효성 평가 진행 여부	100%
	유효성분의 혈관신생 억제효능평가	- 추출물의 독성평가 및 혈관신생 억제 효능평가 - 분리된 화합물의 폐암세포의 증식, 침윤억제 효능평가	100%
	시제품 제작 및 생산	- 인체적용시험에 사용될 시제품 제작 여부	100%
	IRB 승인 신청	- 개별인정 획득을 위한 인체적용시험을 위한 IRB 승인 신청 여부	100%

제 2 절 관련분야에의 기여도

○ 곰취의 항산화, 혈행, 지질대사 개선, 혈관신생 등의 항암 등의 기능성을 실험 및 동물모델을 이용한 효능을 확인함으로써 국내 자생식물을 기반으로 한 기능성 식품 개발의 가능성을 제시하였으며 농가 소득 증대를 기대할 수 있는 계기를 마련하였음

○ 국내산 농산물의 생리활성 성분을 규명하고 특정 성분을 표준화하여 제조하는 원료 제조방법 연구를 수행하여 원료 표준화를 확립하였음 이렇게 제조된 원료의 품질 관리를 위한 기준규격을 설정하여 기능성 소재의 품질 관리에 중요한 지표로서 활용이 가능하도록 하였음

○ 원물소재의 특정 성분 함량을 강화하기 위하여 추출조건을 최적화하고 생산 과정을 확립함으로써 국내 자생식물의 표준화된 원료 그 자체로서의 상품성을 높였으며 쌈용으로만 한정적으로 사용되고 있는 곰취를 이용하여 지표성분 함량을 표준화하고 고부가가치 기능성 소재로 개발함으로써 감잎의 산업적 가치를 증대시킴

○ 지리적표시제가 등록되어 있는 인지도 높은 지역 강원 인제의 원료를 사용함으로써 소비자의 수용도 및 신뢰를 높이고 국내산 소재를 주원료로 하는 과학적 근거를 갖춘 고품질의 건강식품으로의 개발 가능성을 높임

○ 국내산 천연물로부터 도출된 곰취의 혈행 개선 및 항암 등의 기능성을 입증함으로써 대한민국 대 이상 성인 명 중 명이 겪고 있는 대사증후군에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련 질환의 발병률 감소와 국민건강 증진에 기여할 것임

○ 국내산 원료를 이용한 혈행 및 지질대사 개선능을 국제 저널에 게재하고 발표함으로써 국내산 기능성 소재의 가능성을 제시하고 기능성 원료개발을 통해 국내 식품관련 기술력을인정받을 수 있는 계기를 마련하였음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연차별 연구성과 목표 및 성과

1. 연구성과

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		학술발표
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1								1	0
	달성	**1**							**1**		4
2차 년도	목표	1							1	1	0
	달성	1							**1**		5
3차 년도	목표	0	1						2		0
	달성	1	-						**1**	**2**	4
계	목표	2	1						3	2	0
	달성	**3**	**0**						**3**	**2**	**13**

가. 논문

	게제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	구분
			주저자	교신 저자	공동저자			
1	2013	*Ligularia fischeri* regulates lung cancer cell proliferation and migration through down-regulation of epidermal growth factor receptor and integrin β1 expression	Young-Rak Cho	Dong-Wan Seo	Jin-Kyu Kim Jae Hyeon Kim Joa Sub Oh	Genes Genom	35 (6)	SCI

	게제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	구분
			주저자	교신 저자	공동저자			
2	2014	A mechanistic study on the anti-cancer activity of ethyl caffeate in hμMan ovarian cancer SKOV-3 cells	Ha Neul Lee	Dong -Wan Seo	Jin-Kyu Kim Jae Hyeon Kim Sang-Jin Lee Eun-Kying Ahn Joa Sub Oh	Chemico-Biological Interactions	219	SCI
3	2015	*Ligularia fischeri* inhibits endothelial cell proliferation, invasion and tube formation throμgh the inactivation of mitogenic signaling pathways and regulation of vascular endothelial cadherin distribution and matrix metalloproteinase expression	Jae Hyeon Kim Hyeon-Ju Kim	Dong-Wan Seo	Jin-Kyu Kim Eun-Kying Ahn Hye-Jin Ko Young-Rak Cho Sang-Jin Lee Gyu-Un Bae Yong Kee Kim Jong Woo Park Joa Sub Oh	Oncology Reports	34 (1)	SCI
4	2015	산지별 곰취 에탄올 추출물의 항산화 효능	이재연	오좌섭	조영락 안은경 서찬곤 김진규 서동완	한국산업 식품공학회	19 (4)	KSCI
5	2016	건강기능식품 기능성 원료로서 곰취잎 추출물의 caffeoylquinic acid계 성분 분석법 검증	권진관	오좌섭	김진규 서찬곤 홍성수 안은경 서동완	한국식품영양 과학회	in press	KSCI

Genes Genom (2013) 35:741–746
DOI 10.1007/s13258-013-0124-2

RESEARCH ARTICLE

Ligularia fischeri regulates lung cancer cell proliferation and migration through down-regulation of epidermal growth factor receptor and integrin β1 expression

Young-Rak Cho · Jin-Kyu Kim · Jae Hyeon Kim · Joa Sub Oh · Dong-Wan Seo

Received: 27 May 2013 / Accepted: 5 June 2013 / Published online: 18 June 2013
© The Genetics Society of Korea 2013

Chemico-Biological Interactions 219 (2014) 151–158

Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

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

A mechanistic study on the anti-cancer activity of ethyl caffeate in human ovarian cancer SKOV-3 cells

Ha Neul Lee [a,1], Jin-Kyu Kim [b,1], Jae Hyeon Kim [a], Sang-Jin Lee [c], Eun-Kyung Ahn [b], Joa Sub Oh [a,b,*], Dong-Wan Seo [a,*]

[a] College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea
[b] Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion, Suwon 443-270, Republic of Korea
[c] Research Center for Cell Fate Control, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Republic of Korea

ONCOLOGY REPORTS 34: 221-226, 2015

Ligularia fischeri inhibits endothelial cell proliferation, invasion and tube formation through the inactivation of mitogenic signaling pathways and regulation of vascular endothelial cadherin distribution and matrix metalloproteinase expression

JAE HYEON KIM[1*], HYEON-JU KIM[1*], JIN-KYU KIM[2], EUN-KYUNG AHN[2], HYE-JIN KO[2], YOUNG-RAK CHO[2], SANG-JIN LEE[3], GYU-UN BAE[3], YONG KEE KIM[3], JONG WOO PARK[4], JOA SUB OH[1,2] and DONG-WAN SEO[1]

[1]College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714; [2]Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science and Technology Promotion, Suwon 443-270; [3]Research Center for Cell Fate Control, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742; [4]School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea

Food Eng. Prog.
Vol. 19, No. 4. pp. 1~9 (2015.11)
DOI http://dx.doi.org/10.13050/foodengprog.2015.19.4.1
ISSN 1226-4768 (print), ISSN 2288-1247 (online)

산업식품공학 Food Engineering Progress

산지별 곰취 에탄올 추출물의 항산화 효능

이재연 · 조영락 · 안은경 · 서찬곤 · 김진규 · 서동완[1] · 오좌섭[1]*
(재)경기과학기술진흥원 바이오센터, [1]단국대학교 약학대학

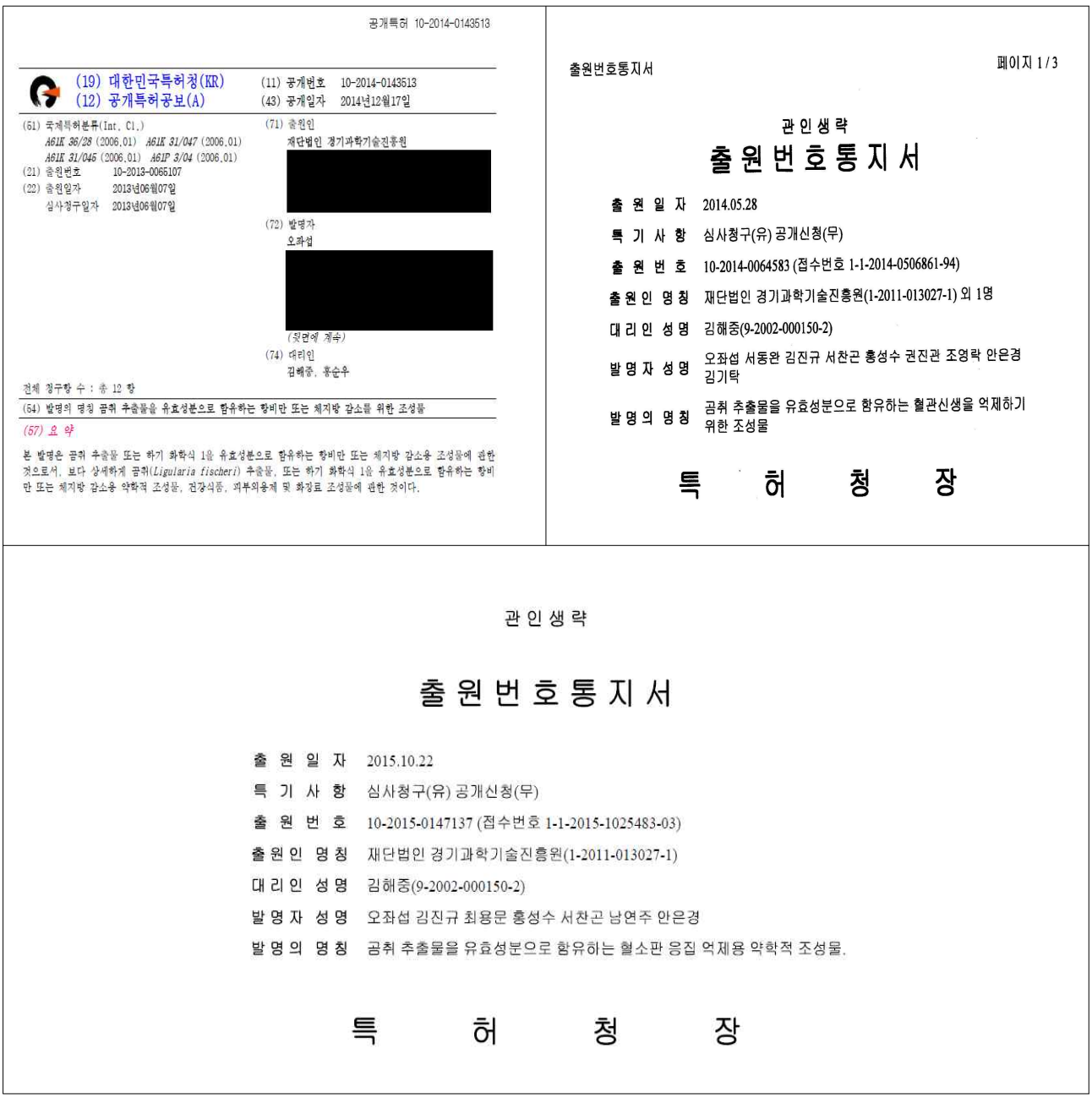
Anti-oxidant Effect of *Ligularia fischeri* Ethanol Extracts from District Areas in Korea

Jae Yeon Lee, Young-Rak Cho, Eun-Kyung Ahn, Chan Gon Seo, Jin-Kyu Kim, Dong-Wan Seo[1], and Joa Sub Oh[1]*

Bio-center, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion
[1]College of Pharmacy, Dankook University

나. 특허

	특허명	출원번호
1	곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 체지방 감소를 위한 조성물	10-2013-0065107
2	곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈관신생을 억제하기 위한 조성물	10-2014-0064583
3	곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈소판응집억제용 약학 조성물	10-2015-0147137



공개특허 10-2014-0143513

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0143513
(43) 공개일자 2014년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/28 (2006.01) *A61K 31/047* (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0065107
(22) 출원일자 2013년06월07일
심사청구일자 2013년06월07일

(71) 출원인
재단법인 경기과학기술진흥원
[redacted]

(72) 발명자
오좌섭
[redacted]
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김해중, 홍순우

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 체지방 감소를 위한 조성물

(57) 요 약

본 발명은 곰취 추출물 또는 하기 화학식 1을 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 체지방 감소용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 곰취(*Ligularia fischeri*) 추출물, 또는 하기 화학식 1을 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 체지방 감소용 약학적 조성물, 건강식품, 의부외용제 및 화장료 조성물에 관한 것이다.

출원번호통지서 페이지 1 / 3

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2014.05.28
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2014-0064583 (접수번호 1-1-2014-0506861-94)
출원인 명칭 재단법인 경기과학기술진흥원(1-2011-013027-1) 외 1명
대 리 인 성 명 김해중(9-2002-000150-2)
발 명 자 성 명 오좌섭 서동완 김진규 서찬곤 홍성수 권진관 조영락 안은경 김기탁
발 명 의 명 칭 곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈관신생을 억제하기 위한 조성물

특 허 청 장

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2015.10.22
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2015-0147137 (접수번호 1-1-2015-1025483-03)
출원인 명칭 재단법인 경기과학기술진흥원(1-2011-013027-1)
대 리 인 성 명 김해중(9-2002-000150-2)
발 명 자 성 명 오좌섭 김진규 최용문 홍성수 서찬곤 남연주 안은경
발 명 의 명 칭 곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 약학적 조성물.

특 허 청 장

다. 학술대회

	발표일	제목	학술대회명	구분
1	20130509	Phenolic Extractives from *Ligularia fischeri* Leaves	한국약용작물학회	대한민국 (전남)
2	20130509	Content of Caffeoylquinic Acid Derivatives of *Ligularia fischeri* in Different Areas	한국약용작물학회	대한민국 (전남)
3	20130628	Inhibitory Effects of *Ligularia fischeri* on Lung Cancer Cell Proliferation and Migration	한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
4	20130628	Changes in the Contents of Caffeoylquinic Acid Derivatives in *Ligularia fischeri* Depending on the Extraction Condition	한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
5	20131010	Antioxidant Effect of Secondary Metabolites from *Ligularia fischeri* Leaves	한국약용작물학회	대한민국 (산청)
6	20140417	In vitro anti-tμMor activity of ethyl caffeate against ovarian cancer cells	대한약학회	대한민국 (서울)
7	20140430	곰취 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만 또는 체지방 감소를 위한 조성물	한국생약학회	대한민국 (서울)
8	20140513	Method Validation for the Determination of Caffeoylquinic Acid Derivatives in *Ligularia fischeri*	한국약용작물학회	대한민국 (대전)
9	20140619	Ethyl caffeate suppresses proliferation and progression of hμMan ovarian cancer SKOV-3 cells throμgh down-regulation of receptor tyrosine kinases and integrin α3β1	한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
10	20141016	Isolation and Identification of Secondary Metabolites from *Ligularia fischeri* leaves	한국약용작물학회	대한민국 (정선)
11	20150226	3 weeks repeated-dose toxicity study on *Ligularia fischeri* Extract	한국실험동물학회	대한민국 (평창)

12	20150416	Anti-oxidant effect of *Ligularia fischeri* ethanol extract	대한면역학회	대한민국 (수원)
13	20150416	Ethyl caffeate isolated from *Ligularia fischeri* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells	대한면역학회	대한민국 (수원)

라. 인력양성

지원인원	지원대상(학위별, 취득자)				성별		지역별		
4	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		4			1	3			4

제 2 절 성과 활용 계획

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용계획	1	1		1		

○ 과제 종료 후 인체적용시험 결과를 통해 참여기업인 ㈜넥스팜코리아에 기술이전을 실시하고 개별인정형 건강기능식품으로 개발할 예정 임. 인체적용 시험 결과 추가 연구가 필요하다고 판단되면 보완하여 추가 시험을 수행하여 제품화 할 예정 임.

○ 과제가 종료된 후에도, 원물의 변화 및 제품 적용성을 증대시키기 위한 소재 연구를 계속 진행할 예정이며 지속적으로 연구 성과(논문 및 특허)를 발표하여 소재의 우수성을 홍보할 계획 임.

○ 본 연구를 진행하면서 얻어진 기술 및 정보는 관련 연구기관 및 산업체 연구원에게 세미나 등을 통해 홍보 및 교육을 진행할 예정.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

❍ 스타틴系 콜레스테롤 저하제들이 우회(collateral) 동맥의 형성을 촉진시켜 동맥폐쇄를 억제하고 혈행을 개선시키는 작용도 발휘할 수 있을 것임이 시사됐다.
美 매사추세츠州 보스턴 소재 터프츠大 의대의 리차드 H. 카라스 박사팀은 '美 심장저널' 최신호에 발표한 논문에서 "스타틴系 콜레스테롤 저하제들이 심장에 혈액을 공급하는 동맥이 협소해졌거나, 폐쇄된 환자들에게서 심장마비 발생률을 감소시켜 줄 수 있음이 입증됐다"고 밝혔다.

○ 미국계 제약사 릴리와 일본계 제약사 다이이찌산쿄가 공동개발한 '에피언트'는 플라빅스 출시 이후 10년 만에 나온 첫 후발신약으로 국내 시판승인도 가장 먼저 획득했음. 릴리 관계자는 28일 "에피언트를 국내 허가사항대로 75세 미만, 60㎏ 이상이면서 뇌졸중 또는 일과적 허혈성 발작이 없는 환자에게 사용할 경우 중증 출혈 위험은 플라빅스보다 증가하지 않았다. 반면 임상적 효과는 26% 높았다"며 "유전자 특성에 관계없이 일관적 효과를 낸다는 장점도 있다"고 설명.

○ 영국과 스웨덴계 합작회사인 아스트라제네카도 최근 '브릴린타'의 3상 임상시험을 마쳤다. 이 약은 전 세계 1800여명이 참석한 대규모 임상시험 결과 플라빅스에 비해 심혈관 질환에 의한 사망, 심근경색, 뇌졸중 발생률을 낮췄다는 특장점을 내세움.

○ 유럽계 제약사 노바티스는 후속신약 '엘리노그렐'의 임상 2상을 성공적으로 마치고 내년 1·4분기 중 3상 임상시험을 추진할 계획이다. 알약과 주사제 형태로 동시 개발 중인 이 약은 2상 임상을 통해 플라빅스보다 빠른 효과를 내면서 혈관내 출혈 위험을 낮춘다는 게 회사측의 설명이다. 발 빠르게 제네릭을 출시해 시장 선점에 나선 국내 제약사들도 다국적 제약사들의 개발 동향을 주시하고 있음.

혈행개선 관련 주요 의약품

제약사	제품명	비고
릴리	에피언트	국내 시판승인, 2011년 출시
아스트라제네카	브릴린타	임상 3상완료
노바티스	헤리노그렐	임상 2상 완료

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 주관기관: (재)경기과학기술진흥원

<법이행사항>

분야	이행사항	비고
안전관리위원회	「산업안전보건법」에 의거하여 '산업안전보건위원회' 운영 중	
안전교육	「산업안전보건법」에 의거하여 신규채용 시 별도 안전보건교육 실시 중 (채용시 8시간)	
점검 및 진단	2015년 전체 연구실 정밀안전진단 실시 완료하였으며, 차기년도(2016년) 정기점검 진행예정	
	2015년 정밀안전진단 실시 완료하였으며, 향후 매 2년 단위 실시예정	
안전관리예산	2014년 기관 안전예산은 계상된 사항이며 점검당시 관련내역 및 증빙자료 기제출(관련 증빙자료 재첨부)	
	기관안전예산 중 연구과제 인건비에서 취합되어 산출된 부분을 별도 표기 예정 (예산서 수정)	
건강검진	2014년 일반건강검진은 전직원 실시완료된 사항이며, 점검당시 관련내역 및 증빙자료 기제출 (관련 증빙자료 재첨부)	
	2014년 실시한 일반건강검진 결과 및 사후관리자에 대한 기록을 보관중이며 해당인원에 대한 정기보건관리를 통한 사후관리 시행중	
	2015년 특수건강검진 시행을 위한 사전 항목으로 작업환경측정 완료하였으며 작업환경측정 결과를 기준으로 연구인력 특수건강검진 시행예정	

연구실 사항

분야	이행사항	비고
일반	연구실 내 음식물 미섭취	
	기자재 이동 비치	
전기	접지형 콘센트 교체	
	콘센트 회로 추가를 통한 부하 분리	
	정기배선 정리	
	분전반 절연덮개 설치	
	회로별 부하명 부착	
	콘센트 이설 또는 방수형 교체	
화공	현재 시약장 구조적 문제(공간부족, 국소배기 미설치)로 신규 시약장 구입하여 해당 사항 조치 예정	
	미사용 시약 폐기처리	
가스	명칭 및 흐름방향 표시	
	충전기한 초과 용기의 교체	
산업위생	보호구 정위치	
생물	의료폐기물 전용용기에 해당 정보 기입	

2. 협동기관: 단국대학교 산학협력단

- 단국대학교 '연구실 안전관리 규정' (2015년 4월 1일 개정) 및 '연구실 안전환경 조성에 관한 법률' (시행 2011년 9월 10일; 법률 제10446호, 2011년 3월 9일 일부개정)에 의거하여 안전 교육 및 시설물을 정기적으로 점검함으로써, 연구 활동 종사자와 연구실의 안전을 확보하고, 연구자원을 효율적으로 관리하고 있음.

가. 연구실 안전관리 조직

- 교학부총장 및 천안부총장이 해당 캠퍼스 연구실의 안전관리를 총괄하고, 각 안전관리 책임자 (해당 부서장: 단과대학장)의 업무를 지휘 및 감독하고 있음. 각 안전관리 책임자는 연구실 안전관리 업무를 수행하고, 안전관리자 (정: 학과장(주임교수); 부: 해당 연구실 담당교수)의 업무를 총괄함.

- 연구실 안전환경 등과 관련된 주요사항을 심의하기 위하여 연구실안전관리위원회를 구성 및 운영하고 있음.

나. 안전관리 책임자, 안전관리자 및 연구활동 종사자의 임무와 안전교육

- 안전관리 책임자: 연구실별 안전관리자 선임, 연구실별 위험등급의 지정 및 이에 따른 일상점검과 정기점검 계획 수립 및 시행, 안전점검 결과 이상시 정밀안전진단 또는 이용제한/폐쇄 등의 안전 조치함.

- 안전관리자: 연구실의 안전 업무 총괄, 연구활동 종사자의 전반을 지휘 및 감독함. 연구실 안전관리 규정, 안전관리수칙, 안전표식, 물질안전보건자료 등을 비치 또는 게시하고 있음. '연구실 안전환경 조성에 관한 법률'에 규정된 내용에 따른 연구활동 종사자에 대한 안전 교육, 일상점검 및 정기점검을 실시하고 그 기록을 보관하고 있음. 연구실 안전을 위한 긴급 비상연락망을 구축하고 있음.

- 연구활동 종사자: 연구실 안전 유지 및 사고 예방을 위하여, 안전관리 규정을 준수하고 안전교육을 정기적으로 받고 있음. 사고나 상해 발생 시 응급조치법과 안전관리자 및 관계부서에 보고하는 대처 요령법을 숙지하고 있음. 연구 활동 전 안전 점검 실시 및 적절한 보호 장비를 착용함.

다. 연구실 폐기물, 시약 및 고압가스 등의 관리

- 연구실 폐기물 처리: 유해화학 폐기물은 별도로 수집하여 분별수집통에 수거, 실험고형 폐기물은 종류별로 분류 배출, 감염성 폐기물은 연구실에서 멸균처리 후 별도처리 요청함.

- 안전표시 부착: 유해위험성물질 등에 대한 안전 표식 부착, 연구실 출입구에 긴급 연락망, 실내위험물 배치도, 안전수칙 등을 부착함.

- 구급용품의 비치: 응급처치를 위한 구급함 비치.

- 시약 등의 관리: 유해등급별로 별도 보관함.

- 고압가스 안전관리: 이산화탄소 저장용기 안전시설 설치함.

- 안전시설: 유독성 가스 노출을 최소화하기 위한 전용 배기장치, 화재와 폭발을 대비한 소화설비 설치함.

라. 보험가입 및 건강검진

- 연구실의 각종 사고에 대비하여, 연구관리자 (연구실 담당 교수)는 '교직원 단체상해보험' (상해 사망, 후유장애 1억원; 질병사망, 후유장애 3천만원; 암,허혈성심질환, 뇌혈관질환 1천만원; 입원의료비 1천만원), 연구활동 종사자 (학부생, 대학원생)는 '학교 경영자 배상 책임보험'과 '연구활동 종사자 상해보험'에 가입함.

- 연구활동 종사자 건강검진: 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조 4항 및 동 법률 시행규칙 제10조에 근거하여 연구활동 종사자에 대한 건강검진 연 1회 실시함.

제 9 장 참고문헌

1. Ham SS, Lee SY, Oh DH, Jung SW, Kim SH, Chung CK, Kang IJ. 1998. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 745-750.
2. Cho SD, Kim GH. 2005. Food product development and quality characteristics of *Ligularia fischeri* for food resources. *Korean J Food Preserv* 12: 43-47.
3. Kim JW, Park IK, Youn KS. 2013. Phytochemical compounds and quality characteristics of spray-dried powders with the blanching condition and selected forming agents from pressed extracts of *Ligularia fischeri* leaves. *Korean J Food Preserv* 20: 659-667.
4. Kwon YJ, Kim KH, Kim HK. 2002. Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 9: 332-337.
5. Kim SM, Kang SW, μM BH. 2010. Extraction conditions of radical scavenging caffeoylquinic acids from gomchui(*Ligularia fischeri*) tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 399-405.
6. Bae JH, Yu SO, Kim YM, Chon SU, Kim BW, Heo BG. 2009. Physiological activity of methanol extracts from *Ligularia fischeri* and their hyperplasia inhibition activity of cancer cell. *J Bio-Environ Control* 18: 67-73.
7. Choi EM, Ding Y, Nguyen HT, Park SH, Kim YH. 2007. Antioxidant activity of gomchi (*Ligularia fischeri*) leaves. *Food Sci Biotechnol* 16: 710-714.
8. Joo EY, Park CS. Antioxidant and Fibrinolytic Activities of Extracts from Soybean and Chungkukjang (Fermented Soybean Paste). *Korean J Food Preserv.* 2011, 18(6), 930-937.
9. Kim YD, Bae ON, Chung SM, Chung JH. Improvement of Haemostasis Mediated by Anti-platelet Activities by Plant Vinegar. *J. Toxicol. Pub. Health.* 2004, 20(2), 137-142.
10. Lee JY, Lee MY, Chung SM, Chung JH. Chemically Induced Platelet Lysis Causes Vasoconstriction by Release of Serotonin. *Toxicology and applied pharmacology.* 1998, 149, 235-242.
11. Lee JW, Kim SY, Kwak CS. Effects of Vitamin C Feeding on Blood and Liver Lipid and its Peroxidation Levels, and Platelet Thromboxane A_2 Formation in Rats. *The Korean Journal of Nutrition.* 1997, 7, 639-647.
12. Son DJ, Cho MR, Jin YR, Kin SY, Park YH, Lee SH, Akiba S, Sato T. Yun YP. Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism throμgh arachidonic acid pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2004, 71(1), 25-31.
13. Yang WK, Sung YY, Choi SJ, Kim HK. Antithrombotic and Antiplatelet Activity of

Extract from *Prunella vulgaris*. *Journal of Life Science*. 2011, 21(10), 1422-1427.
14. Yang WK, Sung YY, kim HK. Antithrombotic Effect and Antiplatelet Activity of *PolygonμM cuspidatμM* Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012, 41(2), 168-173.
15. 주요국 기능성식품 소재의 동향과 소비자 트렌드, 식품산업정책팀 문주석, 보건산업 브리프 Vol. 40 , 2012. 9. 17 한국보건산업진흥원.
16. 2013 건강기능식품과 기능성식품소재 시장현황, 임팩트
17. 건강기능식품산업 글로벌 트렌드, 보건산업정보통계센터 이규환·김수범, 보건산업브리프 Vol. 36, 2012. 8. 20, 한국보건산업진흥원.
18. 2013건강기능식품 시장 현황 및 소비자 실태 조사, 건강기능식품협회
19. 2013 KHIDI 보건산업통계집
20. 2008 건강기능식품 평가의 과거 현재 미래, 식품의약품안전처
21. 2014 건강기능식품의 평가와 정책방향, 식품의약품안전처

[별첨 1]

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	곰취를 이용한 혈행개선용 건강기능식품 개발		
주관연구책임자	김진규	주관기관	(재)경기과학기술진흥원

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
곰취로부터 혈행개선용 건강기능식품개발	미국	50	70	80	
원료표준화기술	스위스	70	80	90	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		혈행개선제 식품개발	혈행개선제 식품개발
Keyword		혈행개선+식품+혈소판응집억제	Ligularia+비만
검색건수		62	19
유효특허건수		28	1
핵심특허 및 관련성	특허명	천마, 희첨 및 방풍의 추출물을 포함하는 혈행개선용 조성물	곤달비 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퍼옥시니트라이트 소거활성을 갖는 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2015	2013
	관련성(%)	30	40
	유사점	천연물의 혈행개선 효능 평가	지표성분의 구조가 유사
	차이점	복합추출물을 이용한 조성물	소재의 차이점 및 지표성분의 항비만 활성만을 평가

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

(예시)

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	한국학술정보, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	전체
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		혈행개선제 식품개발	곰취의 건강기능식품 개발
Keyword		혈행개선	"*Ligularia fischeri*"
검색건수		30	42
유효논문건수		21	15
핵심논문 및 관련성	논문명	오디 추출물의 혈행개선 효과	Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea.
	학술지명	한국식품영양과학회지	Molecules
	저 자	박연실, 강성선, 최형자, 양성준, 손호형, 서형호, 정종문	Xie WD, Li X, Weng CW, Liu SS, Row KH
	게재년도	2014	2013
	관련성(%)	20	20
	유사점	혈행개선의 효능을 평가	곰취의 생리활성평가 및 건강기능식품으로 개발가능성
	차이점	세포접착단백질, 영증관련 효소, 콜레스테롤 등으로 효능을 평가(평가방법 및 소재의 차이)	산채류 5종의 항산화 및 지방세포분화 억제효능 비교

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ IMS 자료에 따르면 국내 은행잎 혈액순환개선제 시장은 최근 3년간 연평균 13%씩 성장해 연간 280억 원 규모를 형성했다. 혈액순환 관련질환은 계속 늘고 있어 시장 규모는 계속 커질 전망 임.

○ 기넥신F는 지난해 기준, 국내 은행잎 혈액순환개선제 시장에서 47%를 점유하며 부동의 1위를 지키고 있다. 20년 간 1초에 3정씩, 현재까지 총 20억 정이 만들어졌으며 시가로는 3200억원의 매출 임 .

○ (주)이오니아와 (주)유미락바이오는 혈전용해, 기억력 개선 및 혈행 개선에 도움을 주는 건

강기능식품인 '진트롬' 캡슐을 출시.

※ '진트롬' 캡슐은 'HK나토배양물' 및 '은행잎 추출물' 등 2개 개별 기능성 인정원료와 '산사나무열매 추출물 분말' 및 '엽산' 등 총 4개 원료성분의 복합 상승작용으로 인해 혈전이 있거나 혈행 개선 및 기억력 개선에 효능이 있음(2013-09-25, 약업신문).

○ 최근 국내 건강기능식품 시장에서 '나토키나제'의 관심이 증대되고 있음. 이는 경쟁 사회에서 생활하는 현대인들은 스트레스에 의한 고혈압 및 혈전증이 발생하기 쉬운 환경에 처해 있어 이를 예방하기 위한 대안식품으로 나토키나제를 주목하고 있기 때문.

○ 실제로 고령사회에 접어들며 혈관 내 혈전용해효소 생성이 어렵게 돼 혈액이 굳어지는 혈전증으로 병원을 찾는 환자들이 매년 증가하고 있으며 의학의 진보로 혈전증으로 인해 사망하는 경우는 없지만, 그 후유증으로 뇌의 미세혈관이 막혀 일어나는 치매증은 심각한 사회문제로 대두되고 있음.

○ 보건복지부 자료에 의하면 뇌질환 및 심혈관 질환으로 인한 사회경제적 비용은 4조2000억원 규모로, 5조 5000억원에 달하는 악성 종양(암)과 유사한 막대한 수준으로 이러한 뇌질환 및 심혈관 질환의 발생 추이와 국가적 부담을 감안하면 이들 질환의 예방 및 관리대책이 절실한 실정.

○ 건강기능식품 벤처기업인 (주)미스바알텍이 혈전을 녹여 혈압을 조절할 수 있는 낫도 유래의 '나토균배양분말(나토키나제)'을 인체적용 및 동물시험 등을 통해 우수한 기능성을 세계 최초로 규명하여 식품의약품안전처로부터 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정받음.

○ 조아제약은 대두 발효 효소분말과 은행잎 추출물, 엽산 등을 함유해 혈행 및 기억력 개선에 도움을 주는 건강기능식품 ´바소칸징코´를 개발하였으며 현재까지 출시된 국내 나토키나제 제품 가운데 활성도가 매우 높음.

○ 현재 혈액순환개선제 시장규모는 총 6500억원으로 이 가운데 건강기**능식품은 2700억 정도**를 차지 하고 있으며 건강기능식품은 오메가3와 감마리놀렌산이 주요제품으로 알려져 있다(메디소비자뉴스).

○생약성분의 은행엽추출물(Extract of *Ginkgo biloba*) 시장은 SK케미칼(006120)의 기넥신 이 시장점유율 50%로 지배적 입지를 누리고 있는 가운데, 동사의 타나민이 시장점유율 27%를 차지하고 있어 이들 2개 제품이 시장을 선도하고 있음.

○ 국내 은행엽추출물 성분의 혈액순환 개선제는 급속한 고령화 추세에 힘입어 최근 4년 연평균 37.1%의 고성장세를 나타냈으며, 2005년 시장규모는 약 1,000억원으로 추정되고 있으며 향후에도 환자수가 지속적으로 증가할 전망이고 생약성분으로 장기간 복용에 따른 부작용 거의 없다는 점에서 **연평균 10% 이상의 시장성장**이 예상됨.

○ 허혈성 뇌혈관 및 심혈관 질환은 혈관의 협착으로 공급되어야 할 혈액의 양이 부족해지나

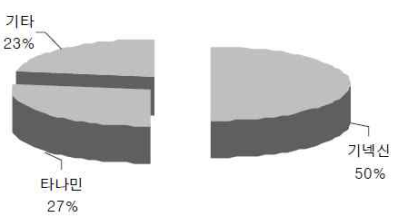
중단됨에 따라 발생되는데, 혈관 협착의 주요 원인은 동맥경화이며, 동맥경화의 위험인자는 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연, 비만, 고령 등이다. 이에 따라 항혈소판 응고제 시장은 만성 성인 질환의 성장세와 동반한 성장 추이를 나타내고 있음.

○ 2005년 국내 항혈소판 응고제 시장은 약 1,500억원으로 추산되고 있으며 사노피-아벤티스의 플라빅스(성분: 클로피도그렐)가 시장점유율 32%로 지배적 입지에 있음. 플라빅스는 원외처방 의약품 기준 국내 매출규모 3위 제품으로 강력한 항혈소판 응고 작용과 티클로피딘의 주요 부작용인 호중구(백혈구의 일종) 수치 감소의 문제를 개선했다는 점에서 시장점유율을 확대하며 시장을 선도하고 있음.

○ 크리드는 항혈소판 응고제 시장 성장에 힘입어 지난 4년 연평균 14.9%의 성장율을 기록했으나 시장점유율은 점진적으로 하락해 현재 4%대에 있으며 항혈소판 응고제 시장에서의 점유율 하락은 동사가 신제품 유크리드를 출시함에 따라 회복될 전망이며 유크리드 매출액은 2006회계연도 119억원, 2007회계연도 141억원으로 각각 전년대비 12.6%, 18.8% 증가하였음.

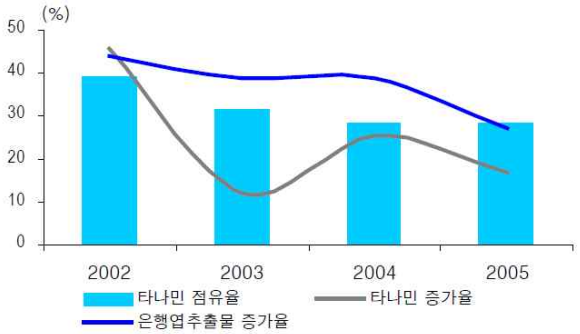
○ 또한 시장 1위 품목인 플라빅스의 경우 동맥경화치료제로서 심바스타틴과 같은 고지혈증 치료제와 병용 투여되는 경우가 많은데 약물의 상호작용으로 간기능에 치명적인 부작용을 초래할수 있다는 문제가 제기되고 있기도 함.

2005년 타나민 시장점유율 27%



자료: 이수유비케어 MDM , 굿모닝신한증권 정리

은행엽추출물 혈액순환 개선제 시장 현황



자료: 이수유비케어 MDM , 굿모닝신한증권 정리

○ SK케미칼의 혈액순환 개선제는 1992년 SK생명과학연구소가 자체 기술로 개발한 은행잎 추출물 100%로 만든 혈액순환개선제로 기넥신F는 혈소판응집억제 효과를 통해 혈액의 점도를 낮추고 혈관 확장 효과와 항산화 효과를 통해 혈액의 흐름을 개선시킨다. 즉 피를 맑게 하고 혈관을 넓혀 혈액의 흐름을 원할하게 해줌.

○ 또한 은행잎의 항산화제 작용으로 세포 보호 효과를 나타내 뇌세포 및 신경세포를 보호해 뇌의 주요한 신경 전달 물질인 아세틸콜린(acetylcholine)의 흐름을 원활하게 해 줌.

○ 기넥신F 는 혈액순환 개선 및 세포보호 효과 등 두 가지 측면에서의 약리작용으로 혈관성 및 알츠하이머성 치매에서의 인식능 저하, 뇌 혈류 부전으로 생기는 두통, 이명, 현기증, 현훈, 단기 기억

상실, 우울증 등의 치료에서 우수한 효과를 나타내며 1992년 출시 이후 국내 시장에서 지속적으로 브랜드 파워를 강화해 은행잎 혈액순환개선제 부문의 1등 브랜드로 자리잡음

○ 항혈전제는 국내에서만 현재 지난해4,000억원의 시장이 형성 되어있으며 이 가운데 사노피아벤티스사의“플라빅스”가 1,126억1원을차지하며 매년 26%의 성장률을 기록하며 각 제약회사들의 시장 참여 및 신약개발 경쟁 역시 치열함.

○ 혈행개선에 도움을 주는 건강기능식품으로 식약처에 인정받은 소재는 다음과 같이 7종이 있음.

	오메가-3지방산함유유지는 오메가-3 계열[DHA(Docosahexaenoic acid)와 EPA(Eicosapentaenic acid)]의 불포화지방산으로 식용 어류, 바닷물범, 조류(藻類)를 원재료로 하여 제조한 것임 - 일일섭취량 : DHA와 EPA의 합으로서 0.5~2.0 g/일
	감마리놀렌산함유유지는 오메가-6 장쇄 불포화 지방산으로 달맞이꽃 종자, 보리지 종자, 까막까치밥 종자를 원재료로 하여 제조한 것으로 감마리놀렌산이 70 mg/g 이상이어야 함 - 일일섭취량 : 감마리놀렌산으로서 240~300 mg/일
	홍삼은 인삼(*Panax ginseng*C.A. Meyer)을 원재료로 사용하여, 말리지 않은 수삼을 증기 또는 기타 방법으로 쪄서 익혀 말린 것으로 이를 분말화 하거나 물이나 주정으로 추출하여 제조하며, 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합이 0.8~34 mg/g임 - 일일섭취량 : 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합이 2.4~80 mg/일
	영지버섯자실체추출물은 영지버섯(*Ganoderma lucidum*또는 *Ganoderma tsugae*)의 자실체를 열수로 추출하여 제조하며, 베타글루칸이 10 mg/g이상 함유되어 있음 - 일일섭취량 : 베타글루칸으로서 24~42 mg/일
	프랑스남서부 해안에 자생하는 프랑스해안송(*Pinus pinaster*) 껍질을 주정으로 추출하여 제조하며, 총 프로시아니딘 함량이 600~800 mg/g 함유되어 있음 - 일일섭취량 : 프랑스해안송껍질추출물로서 100~300 mg/일
	나토균을 일정한 배양배지조건에서 배양하고 부형제와 혼합하여 제조하며, 피브린용해효소활성이 14,000~22,000 U/g임 - 일일섭취량 : HK나토배양물로서 133 mg/일
	은행나무(*Ginko biloba* L.) 잎을 주정으로 추출하여 플라보놀 배당체(flavonol glycosides)가 240~300 mg/g임 - 일일섭취량 : 은행잎추출물로서 120 mg/일

○ 혈행개선관련 제네릭 중에서는 동아제약의 '플라비톨정'이 올 상반기 보험청구액 208억원으

로 1위를, 삼진제약의 '플래리스정'이 199억원으로 2위를 달리고 있다. 대웅제약의 개량신약 '알비스정'(233억원)도 선전 중이며 이런 추세대로라면 플라빅스 제네릭의 성장세는 안정적인 편이지만 브랜드 파워를 가진 외국계 신약들의 진입을 의식하지 않을 수 없는 상황 임..

○ 국내 제약사 관계자는 "후발신약들이 출시되더라도 이미 시장을 선점한 품목들을 대체하기는 쉽지 않을 것"이라며 "하지만 다양한 임상적 근거가 축적돼 우수한 효과를 인정받는다면 시장점유율이 빠르게 올라갈 수 있는 만큼 주시하고 있다"고 발표.

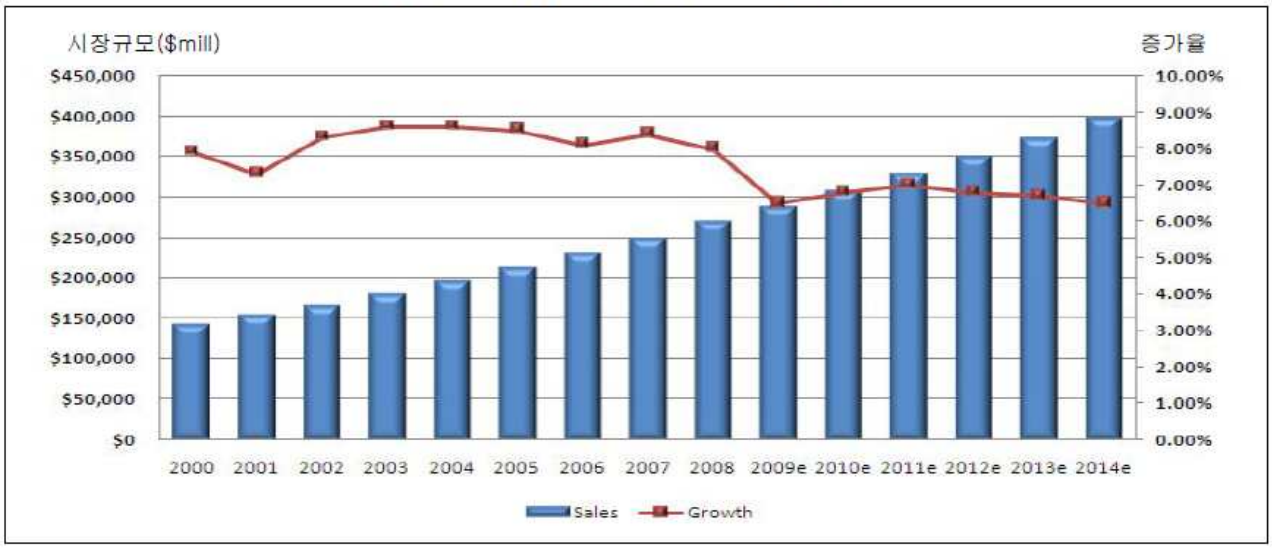
2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 130년 전통의 독일 생약전문회사 슈바베(Schwabe)는 건조된 은행엽으로부터 27단계의 추출공정을 거쳐, 57종의 성분중 유해물질(특히 알러지 유발물질로 알려진 Ginkgolic acids를 1ppm미만으로 관리하는 것이 중요)을 제거하고 31종의 약효성분만을 분리 정제하는 방법을 개발함으로써 30여년전 유럽 최초로 은행엽추출물을 의약품으로 개발하는데 성공 함.

○ 은행엽추출물질은 1) 혈소판 응집을 촉진하는 PAF(Platelet Activating Factor)의 작용을 억제하는 항혈전 작용으로 뇌와 말초 혈액순환을 원활하게 하며, 2) 자유 유리기를 포착, 제거함으로써 활성 산소로 인한 혈관의 세포막 손상과 노화를 개선시키며, 3) 허혈상태에서도 포도당이용률을 증가시켜 에너지 대사기능 장애로 인한 뇌세포 손상을 막아 주는 약리작용을 가짐

○ 세계 기능성식품 시장동향은 통계기관별로 다소 차이가 있으나 NBJ(Nutrition Business Journal, 2010)의 보고에 따르면 2000년 1,435억불 규모였던 세계기능성식품시장은 높은 성장률로 2008년 2,697억불 시장규모를 차치하였다. 세계기능성식품 시장은 지속적 성장으로 2014년도에는 3,973억불 시장을 형성 할 것으로 전망.

연도별 세계 기능성식품 시장현황



자료: NBJ(Nutrition Business Journal), 2010

○ 선진국의 경우 사망률1위는 심혈관질환이 차지하고 있으며 주요 7개국의 항혈전제 시장은 2012년 200억 달러를 넘어설 것으로 전망되며 됨.

○ 미국의 심장의 협회에 따르면 심혈관질환으로 인한 사망률이 전체 사망자의 36%를 차지하고 있으며, 약 8백만 명의 심혈관 질환환자가 존재한다고 함. 이러한 심장질환 환자에 대한 의사의 처방 중 약 72%가 건강기능보조식품을 권장하며 이러한 보조제 중 대표적인 것들은 multivitamins, omega-3, vitamin C, fiber, phytosterols, B vitamins, coenzyme Q10 (CoQ10)등이 있음.

○ 이들 심혈관관련 보조제의 미국 내 시장 규모는 2008년에 약 5억 6천만 달러, 연평균 예상 성장률은 약 20%로 추정되고 있으며 주로 판매되는 원료로는 대두류나 오메가 3 지방산 등이 있음.

○ 콩 단백질의 경우는 phytoestrogen이 매우 풍부하며 콜레스테롤 수치를 낮춰주며 lipoprotein산화를 방지하는 역할을 할 뿐만 아니라 콩 섬유질과 함께 작용할 경우 심장질환의 핵심위험요인인 homocysteine을 저감시켜주는 효과를 가지는 것으로 알려져 있음.

○ 오메가3 Fatty Acid는 건강을 유지하는데 필수적인 지방산이긴 하지만 인간의 몸에서 생성되지 않는 물질로 대양어류나 대양 미세조류, 그리고 특정한 도토리나 식물성 기름에서 얻어진다. 오메가 3 중 EPA나 DHA는 어류에서 나오지만 ALA는 식물에서 추출하는 것이 일반적임.

○ 오메가 3는 triglycerides는 줄여주는 반면에 high-density lipoprotein (HDL) cholesterol의 수치는 높여주는 것으로 분석되었으며 고혈압 예방 및 동맥경화를 불러일으킬 수 있는 arrhythmias의 위험 역시 저감시켜 주는 것으로 분석됨. 그러나 대개의 오메가 3가 열, 빛, 산소에 대단히 민감하게 반응하기 때문에 마이크로인캡슐레이션 기술에 대한 의존성이 매우 높으며 마이크로인 캡슐레이션 기술 덕분으로 인해 오메가의 활용 가능성과 그 범위가 획기적으로 확대되었음.

○ 식물 스테롤/파이토스테롤은 식물, 채소, 견과류 등에서 추출되는 것으로서 콜레스테롤과 비슷한 분자구조/기능을 가지고 있다. 파이토스테롤은 콜레스테롤 합성을 방해함으로써 전체 콜레스테롤 수준을 낮춰주는 역할을 함.

○ 사노피 아벤티스가 최초로 개발한 '플라빅스'(성분명 클로피도그렐)는 연간 1000억원대 매출로 국내 보험의약품 시장 1위를 고수해 왔다. '플라빅스'의 특허가 끝난 지난 2006년부터 국내외 제약사들은 너도나도 후발신약 또는 제네릭(복제약) 개발에 뛰어들었다. 이들 회사는 후발신약과 플라빅스의 효과를 직접비교한 임상연구 결과를 발표하는 등 시장경쟁에 불을 붙임.

○ 미국계 제약사 릴리와 일본계 제약사 다이이찌산쿄가 공동개발한 '에피언트'는 플라빅스 출시 이후 10년 만에 나온 첫 후발신약으로 국내 시판승인도 가장 먼저 획득했음. 릴리 관계자는 28일 "에피언트를 국내 허가사항대로 75세 미만, 60㎏ 이상이면서 뇌졸중 또는 일과적 허혈성 발작이 없는 환자에게 사용할 경우 중증 출혈 위험은 플라빅스보다 증가하지 않았다. 반면 임상적 효과는 26% 높았다"며 "유전자 특성에 관계없이 일관적 효과를 낸다는 장점도 있다"고 설명.

○ 영국과 스웨덴계 합작회사인 아스트라제네카도 최근 '브릴린타'의 3상 임상시험을 마쳤다. 이 약은 전 세계 1800여명이 참석한 대규모 임상시험 결과 플라빅스에 비해 심혈관 질환에 의한 사망, 심근경색, 뇌졸중 발생률을 낮췄다는 특장점을 내세움.

○ 유럽계 제약사 노바티스는 후속신약 '엘리노그렐'의 임상 2상을 성공적으로 마치고 내년 1·4분기 중 3상 임상시험을 추진할 계획이다. 알약과 주사제 형태로 동시 개발 중인 이 약은 2상 임상을 통해 플라빅스보다 빠른 효과를 내면서 혈관내 출혈 위험을 낮춘다는 게 회사측의 설명이다. 발 빠르게 제네릭을 출시해 시장 선점에 나선 국내 제약사들도 다국적 제약사들의 개발 동향을 주시하고 있음.

혈행개선 관련 주요 의약품

제약사	제품명	비고
릴리	에피언트	국내 시판승인, 2011년 출시
아스트라제네카	브릴린타	임상 3상완료
노바티스	헤리노그렐	임상 2상 완료/2011년 1분기 3상진입계획

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 국내 제약사들의 건강기능식품 시장에 대한 잰걸음이 한창이다. 이러한 움직임은 정부의 새 약가정책으로 더욱 가속화되는 분위기다. 전문의약품의 매출 비중이 높은 제약사일수록 일괄약가인하의 타격은 더욱 클 수 밖에 없다. 전문약만으로는 성장을 담보할 수 없는 상황에서 건기식이 매출 감소 만회를 위한 돌파구가 되고 있는 것이다.

○ 특히 광고비 등 마케팅 비용이 많이 들고 약국 등으로 판매가 제한된 일반의약품보다 규제가 덜하고 판로가 다양한 것도 제약사들의 시선을 끄는 이유다. 업계 관계자는 "건강기능식품 시장은 국민의 건강을 다루는 제약사로에게 안전성과 의약품 개발·생산 노하우를 활용한 품질로 충분히 승산을 볼 수 있는 것이 건강기능식품 시장이다"고 말했다.

○ 높은 시장성도 무시 못한다. 국내 건강기능식품 시장은 매년 10%씩 성장을 거듭하고 있다.

생산 규모로는 지난 2010년 처음으로 1조원을 돌파했으며 소비자 판매액 기준으로는 현재 3조원을 넘어선 것으로 추산되고 있다.

○ 국내외 제약사들의 항혈전제 시장 경쟁이 뜨거워질 전망이다. 항혈전제는 혈관이 막혀 발생하는 심근경색, 뇌졸중 등의 치료에 쓰이는 약물이다. 클로피도그렐 성분 항혈전제 국내 시장 규모는 연간 2000억원대에 달하는 최대 황금어장 중 하나다.

○ 따라서 본 연구의 결과로 나온 제품의 천연물 소재 측면을 강조하여 부작용에 대한 우려를 경감시키며, 이것이 치료의 개념이 아닌 혈행개선을 위한 보조식품으로 예방적 측면을 강조한 마케팅으로 시장진입을 시도하고자 하며 우리나라의 급속한 고령화로 인한 만성질환, 특히, 심혈관계 질환 환자의 급증은 향후 시장의 급성장이 기대 됨

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				500	1,500	2,000
경제적 파급효과				1,000	5,000	6,000
부가가치 창출액				3,000	15,000	18,000
합 계				4,500	21,500	

1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.