

RS-
2021-IP
821059

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
기술사업화지원 사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004707-01

지초
복합물
활용
근건강
개선용
개별
인정형
건강기능
식품
개발

지초복합물 활용 근건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발

2024.07.09.

2024

주관연구기관 / (주)데이젠
공동연구기관 / 한국식품연구원

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “지초복합물 활용 근건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 09.

주관연구기관명 : (주) 데이젠 (대표자) 이강희 (인)
공동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 백형희 (인)

주관연구책임자 : 전연정
공동연구책임자 : 안지윤

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	기술사업화지원				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)	민간중심R&D 사업화지원				연구개발과제번호		821059
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801 (기능성 식품)	60 %	2순위 LB1805 (식품의 영양기능성 평 가)	40 %	3순위 소분류 코드명	%
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0201 (기능성식품 및 소 재)	60 %	2순위 PA0204 (영양 기능성 평가)	40 %	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		지초복합물 활용 근건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)					
총 연구개발비		총 1,050,668 천원 (정부지원연구개발비: 803,000 천원, 기관부담연구개발비 :247,668 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	근육 기능 개선 효능을 지닌 지초복합물 소재를 활용한 일반식 품, 건강기능식품 상품화 및 근력 개선용 개별인정형 건강기능 식품 개발					
	전체 내용	<p>(1) 1차년도</p> <p>가. 근위축 개선용 지초 복합물 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 복합물 후보 선정 - 소재 혼합 비율에 따른 활성 상승 효과 측정 - 복합물 제조 위한 최적 혼합 비율 도출 - 지초 복합물의 근위축 개선 활성 검증 - 지초 복합물의 근세포 분화 증진 활성 검증 <p>나. 지초 복합물의 원재료 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 지표성분 분석법 validation - 유해물질 항목 분석 - 영양성분 분석 <p>다. 지초 복합물의 제조공정 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료 제조 공정 개발 - 제조공정별 지표성분 함량 분석 - 대량 생산 QC <p>라. 근육 건강 관련 파생상품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 약국유통용 제품 2종 개발 - 일반유통용 제품 3종 개발 - 마케팅 및 판매 전략 수립 <p>(2) 2차년도</p> <p>가. 지초 복합물의 근육 건강 조절 활성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 지초 복합물의 근위축 개선 활성 검증 (계속) - C. elegans 활용 노화성 근감소 개선 효능 검증 - 지초 복합물의 근위축 개선 기전 구명 					

- 나. 인체적용시험 프로토콜 개발
 - 피험자 선정/제외 기준 설정 및 모집 공고문 작성
 - 연구계획서 작성을 위한 시험 디자인 개발
 - 시험자 선정
 - 분석 마커 항목 선정
 - 기록 측정 자료 작성

- 다. 인체적용시험 생명윤리위원회(IRB) 심의 승인
 - 심의 신청서 작성 및 제출
 - 시정/보완 계획 제출

- 라. 인체적용시험 수행
 - 피험자 모집

- 마. 지초복합물 활용 파생상품 개발
 - 고령자 대상 제품 2종 개발
 - 마케팅 및 판매 전략 수립

- 바. 개별인정형 건강기능식품 제형 개발
 - 소재 특성에 맞춘 최적 제형 선정
 - 지표성분 함량 분석
 - 인체적용시험용 제형 생산

(3) 3차년도

- 가. 인체적용시험 수행 (계속)
 - 피험자 모집 계속
 - 실험기록지, 증례기록서 작성
 - 의뢰자 모니터링
 - 시험 항목 분석 및 통계 분석

- 나. 지표/기능성분의 근육 건강 개선 효능 평가 & 식약처 개별인정 획득
 - 지표/기능성분의 근위축 개선 활성 측정
 - 지표/기능성분의 근위축 개선 기전 구명
 - 인체적용시험 결과 및 지표 기능성분의 효능을 기반으로 식약처 개별인정 획득

- 다. 지초 복합물 활용 건강기능식품 상품화
 - 상표 개발
 - 제품 디자인 개발
 - 소비자 선호도 분석
 - 지초 복합물 활용 상품 개발
 - 마케팅 전략 수립

(4) 연구 개발 예상 성과목표

- 가. 학술적 성과
 - SCI 논문 2건 게재
 - 학술발표 2건
 - 인력양성 3명
- 나. 산업적 성과
 - 지적재산권 확보 (출원 2건, 등록 2건)
 - 기술실시이전 1건
 - 파생상품 9종 개발 (일반식품, 건강기능식품 등)
 - 매출액 70억

			다. 고용창출 성과 - 신규 인력 채용(고용창출) 3명
	1단계 (해당 시 작성)	목표	- 근위축 개선용 지초 복합물 개발 및 원료 표준화 - 지초복합물의 근육건강 활성 평가 및 인체적용시험 준비
		내용	- 근위축 개선용 지초 복합물 개발 - 지초 복합물의 원재료 표준화 - 지초 복합물의 제조공정 표준화 - 근육 건강 관련 파생상품 개발 - 지초 복합물의 근육 건강 조절 활성 평가 - 인체적용시험 프로토콜 개발 - 인체적용시험 생명윤리위원회(IRB) 심의 승인 - 지초복합물 활용 파생상품 개발 - 건강기능식품 제형 개발
	2단계 (해당 시 작성)	목표	- 지초 복합물의 인체적용시험 수행 및 근육 건강 개선 효능평가 - 건강기능식품 제품화
내용		- 인체적용시험 수행 - 지표/기능성분의 근육 건강 개선 효능 평가 & 식약처 개별인정획득 준비 - 지초 복합물 활용 건강기능식품 상품화	

연구개발성과	성과지표	1단계				2단계		
		1차년도(2021년)		2차년도(2022년)		3차년도(2023년)		
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	
	기술실시 이전	1	1	-	-	-	1	
	사업화 제품화(시제품)	5	4	2	0	2	5	
	고용창출	1	3	1	1	1	1	
	매출액 (천원)	3,500,000	93,000	3,500,000	60,577	3,500,000	55,000	
	수출액 (천원)	-	-	-	-	300,000	0	
	인력양성	1	0	1	0	1	0	
	지식재산권	출원	-	-	2	0	-	2
		등록	-	-	-	-	2	2
	학술	학술발표	-	1	1	1	1	1
		논문	-	-	1	0	1	2

○ 활용계획

- 근기능 개선 효능을 지닌 신규 기능성 복합물 소재 개발 및 기능성 자료 확보로 근육건강 관련 일반식품, 건강기능식품, 개별인정형 건강기능식품의 상품 고도화 가능
- 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료 개발 및 표준화된 농식품 기능 소재의 해외시장 경쟁력 증대
- 논문게재/ 학술발표자료 등은 제품의 국내외 홍보자료로 활용, 수요확대 가능
- 우수 홍보자료를 활용하여 On/Off 홍보가능하며 매출극대화에 기여
- 해외시장개척 및 수요처 발굴로 제품의 수출판로 확보가능
- 사업활성화로 신규 일자리 창출가능

○ 기대효과

- 근기능 개선 관련 기능성 소재, 일반식품 및 건강기능식품 개발
- 근육건강관련 체계화된 기능성 자료 확보로 근육건강관련 건기식 산업화 핵심 기술 보유 가능
- 신시장 창출 및 국내외 근육건강 관련 시장선도 가능 기대
- 근육건강 건강기능식품 시장 활성화로 인한 자사 및 국내 일자리 창출

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	2	2										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	지초		근력 개선		건강기능식품		근감소증		제품개발			
영문핵심어 (5개 이내)	Lithospermum erythrorhizon		muscle strength		health functional food		sarcopenia		product development			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	11
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	82
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	92
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	94
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	95

최종보고서					모인등급					
					일반(√), 보완()					
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	기술사업화지원					
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	민간중심R&D 사업화지원					
공고번호	제 농축2021-78호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
				연구개발과제번호	821059					
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1801 (기능성 식품)	60 %	2순위 LB1805 (식품의 영양기능성 평가)	40 %	3순위 소분류 코드명 %				
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0201 (기능성식품 및 소재)	60 %	2순위 PA0204 (영양 기능성 평가)	40 %	3순위 소분류 코드명 %				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문									
	영문									
연구개발과제명	국문	지초복합물 활용 근건강 개선을 개별인정형 건강기능식품 개발								
	영문	Development of muscle health functional food using <i>Lithospermum erythrorhizon</i> complex								
주관연구개발기관	기관명	㈜데이전		사업자등록번호	547-88-02126					
	주소	경기도 안양시 동안구 별말로 126, 2009호		법인등록번호	134511-049058E					
연구책임자	성명	전연정		직위	책임연구원					
	연락처	직장전화	[REDACTED]		휴대전화	[REDACTED]				
		전자우편	[REDACTED]		국가연구자번호	[REDACTED]				
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2 년 9 개월)								
	1 단계	1년차	2021. 04. 01 - 2021. 12. 31 (9 개월)							
		2년차	2022. 01. 01 - 2022. 12. 31 (1년 개월)							
	2 단계	3년차	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 개월)							
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				연구비 외 의 지원금			
	현금	현금	현물	현금	현물	현금		현물	합계	
총계										
1단계	1년차	219,000	7,300	65,700				226,300	65,700	292,000
	2년차	292,000		97,334				292,000	97,334	389,334
2단계	3년차	292,000	7,734	69,600				299,734	69,600	369,334
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
공동연구개발기관	한국식품 연구원	안지윤	책임연구원	[REDACTED]	[REDACTED]	역할	공동 정부 출연연			
위탁연구개발기관										
연구개발기관 외 기관										
연구개발담당자 실무담당자	성명	조한성		직위	주임연구원					
	연락처	직장전화	[REDACTED]		휴대전화	[REDACTED]				
		전자우편	[REDACTED]		국가연구자번호	[REDACTED]				

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

2024 년 02 월 29 일

연구책임자: 전 연 정 (인)

주관연구개발기관의 장: ㈜ 데이전 이 감 희
공동연구개발기관의 장: 한국식품연구원 백 형 희



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

1. 연구개발과제의 개요

가. 초고령화 시대의 근건강 관리의 중요성

- 고령화 사회로 노령인구의 급속한 증가 현상이 나타남. 한국은 10년 이내 고령의 비경제활동 (65세 이상) 인구수가 전체 인구의 25% 이상을 차지하며 초고령사회로 진입하게 될 전망이다
- 유병장수의 시대에서 증가된 수명 길이만큼 질병으로 고통받는 시간도 길어지고 있음. 특히 노인 인구에게 다발하는 근육 기능의 저하는 (근육량 감소 및 근력 약화) 삶의 질 하락 및 사망률 증가의 원인이 되고 있음
- 따라서 건강한 노년의 일상생활을 유지하고 삶의 질을 높이는 방법으로 '근감소증(sarcopenia)' 관리에 주목하기 시작하였음. 근감소증은 노화에 따른 근력 저하 및 이동반되어 나타나는 신체기능의 저하 현상을 말하며, 미국의 질병통제예방센터(CDC)와 세계보건기구(WHO)는 2016년 근감소증을 질환으로 분류하고 정식 질병으로 인정 (진단 코드(ICD-10-MC))
- 노화성 근감소증은 대부분의 노인들에게 있어서 피할 수 없는 질환임에도 불구하고, 치매, 심혈관질환 및 골다공증과 같은 다른 노인성 질환에 비해서 그 중요성이 간과되고 있음
- 노화성 근감소증의 예방 및 치료 연구를 통해서 노인들의 건강하고 자립적인 노후 생활을 보장함으로써 건강수명을 연장하고, 고령인구의 삶의 질 향상에 기여할 것임
- 50대 후반부터 나타나는 빠른 근육 노화(근 감소증)로 인해 건강수명이 짧아지고 노인성질환에 노출되어 의료사회비용 증가가 큰 문제로 대두 되고 있음. 따라서 젊은 층 뿐만 아닌 노인층에서도 운동수행능력(근 기능)과 관련된 건강기능식품 시장의 필요성 및 중요성이 부각되고 있음
- 근감소증에 의해 지출되는 사회적 비용이 미국에서 2000년도 기준으로 185억 달러에 이르지만, 현재까지 근감소증을 극복할 수 있는 어떠한 유효 약물도 개발되지 않은 실정이며, 안전성이 검증된 식품 또는 천연물로부터 근감소증을 예방할 수 있는 소재가 개발된 적이 없는 실정임. 따라서 근육 기능을 조절할 수 있는 소재를 개발하는 것이 시급한 과제임

나. 노년 삶의 질과 밀접한 관련이 있는 근감소증

- 근감소증(sarcopenia)은 그리스어에서 기원한 muscle을 뜻하는 “sarco” 와 감소되어 있다는 뜻의 “penia” 가 합성된 단어로써 근육량과 기능의 소실로서 정의되며 전신에서 발생하는 노화에 따른 근육 쇠약을 말함
- 근감소증(sarcopenia)은 근육 섬유 수 및 단면적의 감소로 인한 골격근의 근육량 감

소를 의미함. 그러나 최근에는 근육량이 아닌 근기능 저하의 개념으로 해석되면서, 각 단체에 따라 정의는 조금씩 다르나 근육량 감소와 더불어 근력의 약화 또는 보행속도/신체 활동 수행능력으로 대변되는 신체기능의 저하가 동반된 경우를 의미함 (대한신경과학회지, 2017)

- 근육의 감소는 관절염, 허리통증, 만성통증을 더 증가시키는 원인이 되며, 복부비만에 의한 요실금 증세도 악화시킬 수 있고, 골절에 의한 부상은 노년의 우울증을 증가시켜 사망에 이를 수 있기 때문에 노년의 근감소증은 다양한 질환과 연계되어 삶의 질을 떨어뜨리는 주요 원인으로 간주됨

다. 근력개선 신규 소재로 지초복합물 개발 필요성

(1) 지초

- 지초는 자초라고도 불리우며 학명은 *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini 로 한국, 일본, 중국 등의 동아시아 지역에 주로 분포되어 있음
- 우리나라에 자생하는 지치과의 다년생풀로서 1년생 주근은 굵기 10 mm, 길이 10~20 cm로 표면이 적자색임
- 동의보감, 본초강목에서 강장 해독 등에 효과가 있다고 알려져, 예부터 민간에서는 지초를 산삼에 못지 않은 ‘신비한 약초’로 여김
- 전통적으로 해독, 해열, 피부병 등에 한약재로 사용되거나 자주빛 염료로 사용되어 왔음
- 항균, 항염증 및 항종양 효과가 알려져 있으며, 심장을 강화하고 어혈을 제거해 혈액순환을 개선시키는 것이 알려져 있음
- 국내에서는 지초 뿌리를 이용해 만드는 증류주인 진도 홍주의 주재료로 사용되고 있으며 이 외에도 약재 및 염색재료의 이용가치가 높음
- 뿌리인 지초근에 함유된 자색 색소인 시코닌(shikonin)은 naphthoquinone 화합물로 지초의 대표적 기능성분으로 알려져 있으며 acetylshikonin, isobutyroylshikonin의 유도체로 존재하며 항염, 항균, 세포 재생 등 다양한 약리학적 효과가 보고되어 있음
- 중국 약용식물 사전인 Zicao에서는 Jilin산 지초에 7.49 ± 0.11 의 acetylshikonin이 함유되어 있다고 제시
- 원재료명은 지치로, 뿌리(자근)이 식품 원료로 사용 가능함
- 아래의 원료별 정보(식품원료로 등록이 되어 있고 피부보습에 도움을 줄수 있음으로 개별인정형 원료로 등록되어 있음) 및 식약처에서 제시하는 기능성원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도에 의하면 별도의 독성시험은 필요치 않음

(2) 지초 국내 생산 동향

- 우리나라에서는 강원도, 제천 등의 야생에 주로 자생하고, 현재 제천, 진도, 정선, 금산 등에서 재배되고 있음
- 1950년대 까지만 해도 진도에서 많은 양이 자생하고 있었으나 산림 황폐화, 기후변화, 환경오염, 무분별한 채취로 인해 멸종위기
- 기존에는 중국 수입에 의존하였으나 (21,566 kg, 2만 3천 달러), 노지 재배법 확립에 따라 국내에서도 재배 가능해 짐
- 전남 진도군은 농촌진흥청 경쟁력 제고 사업을 통해 지초 생산기반 사업을 확보함

(3) 개별인정형 원료로서 지초 복합물 개발의 필요성

- 국내산 지초의 가격은 kg당 50,000원의 고가로 단일 소재로 접근하기에는 원료비 소요가 매우 높아 산업적 메리트가 적음
- 이를 해결하기 위해서는 지초보다 단가가 낮으면서도 기능성이 확인된 타소재를 추가하여 단일 추출물보다 시너지 효과를 나타낼 수 있는 지초 복합물 형태의 원료가 개발된다면, 효능을 높일 뿐 아니라 생산단가를 줄여 개발 효율성 제고 확보 가능.
- 선행연구는 지초추출물의 비만성 근감소 효능을 검증한 것으로, 이 외에 타 원인에 의한 근위축에 대한 효능이나 노화성 근감소에 대한 효능 평가의 추가 구명 필요
- 기능성 원료 인정에 필수적인 원재료 표준화 및 제조공정 표준화를 통한 대량 생산 공정의 추가 확립도 실시되어야 함
- 최종적으로 개발된 원료는 인체적용시험을 통해 인체에서의 생리학적 활성에 대한 과학적 데이터가 제시되어야만 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정받을 수 있음
- 따라서, 지초복합물 개발, 원료 표준화, 추가 기능성 기반 자료 확보 및 인체적용 시험을 통해 건강기능식품 기능성 원료로 인정 및 이를 활용한 제품 개발이 추가적으로 진행되어야 함

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

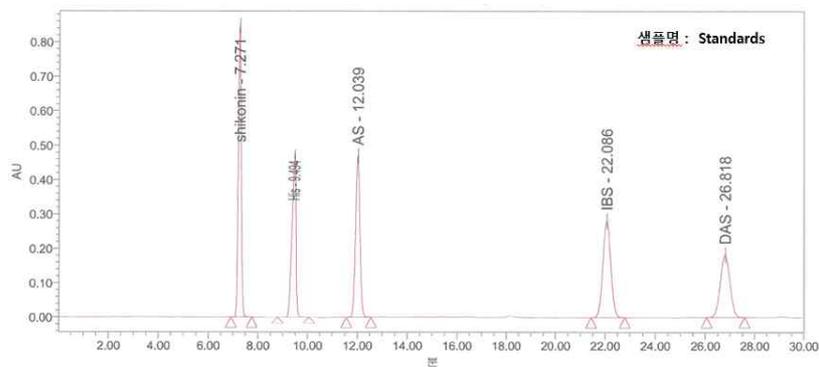
가. 지초복합물의 원재료 표준화

(1) 지표(기능)성분 분석법 validation

(가) 지초추출물의 지표성분 선정

(가-1) 지초추출물 shikonin 선정 및 문제점

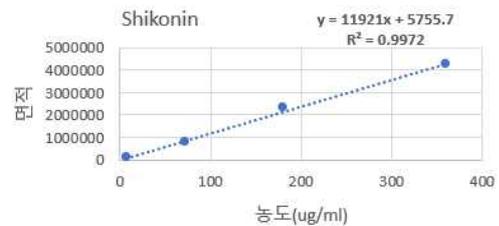
- 지초추출물의 지표(기능)성분은 1차년도 연구에서 shikonin, β -Hydroxyisovalerylshikonin, Acetylshikonin, Isobutyrylshikonin 및 β, β -Dimethylacrylshikonin 총 5가지를 설정하여 확인하였음



- 표준물질(5가지) Shikonin, β -Hydroxyisovalerylshikonin, Acetylshikonin, Isobutyrylshikonin 및 β, β -Dimethylacrylshikonin 을 농도별로 적절하게 희석하여 직선성을 확인하였음

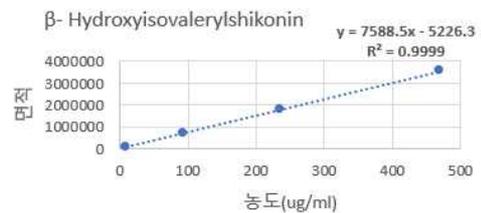
① Shikonin

농도(ug/ml)	면적
7.2	71637
72	799534
180	2293787
360	4239339
기울기(a)	11921
Y절편	5755.7



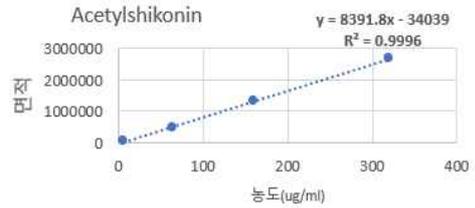
② β - Hydroxyisovalerylshikonin

농도(ug/ml)	면적
9.4	69560
94	692539
235	1796169
470	3555335
기울기(a)	7588.5
Y절편	-5226.3



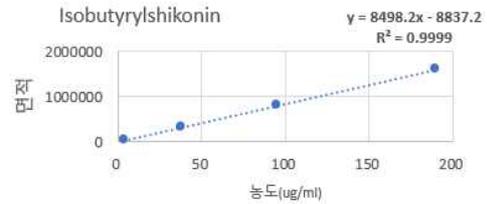
③ Acetylshikonin

농도(ug/ml)	면적
6.4	44920
64	473856
160	1305851
320	2658079
기울기(a)	8391.8
Y절편	-34039



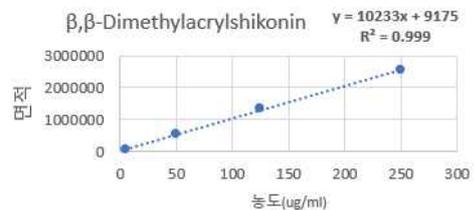
④ Isobutyrylshikonin

농도(ug/ml)	면적
3.80	29055
38	306027
95	800420
190	1606350
기울기(a)	8498.2
Y절편	-8837.2



⑤ β, β -Dimethylacrylshikonin

농도(ug/ml)	면적
5	47528
50	504599
125	1339390
250	2545407
기울기(a)	10233
Y절편	9175



○ 1차년도에 설정한 지초추출물의 지표(기능)성분 shiokonin 물질은 naphthoquinone pigment 화합물의 일종으로 색소 물질이며, 80°C 이상에서는 불안정함. 또한 shiokonin 물질은 지용성이고 물에 극히 소량 녹으며, 온도, 산소 pH에 따라 안정성에 영향을 크게 미침

○ Shiokonin 유도체의 함은 5종으로 추후 건강기능식품 개별인정형 취득을 위한 지표(기능) 성분으로 나타내기에 어려움이 따름. 또한, 5가지 표준물질 구입 비용(약 400만원 이상) 및 각 성분별 함량 관리에 어려움이 있으므로 다른 지표성분으로 선정하고자 함

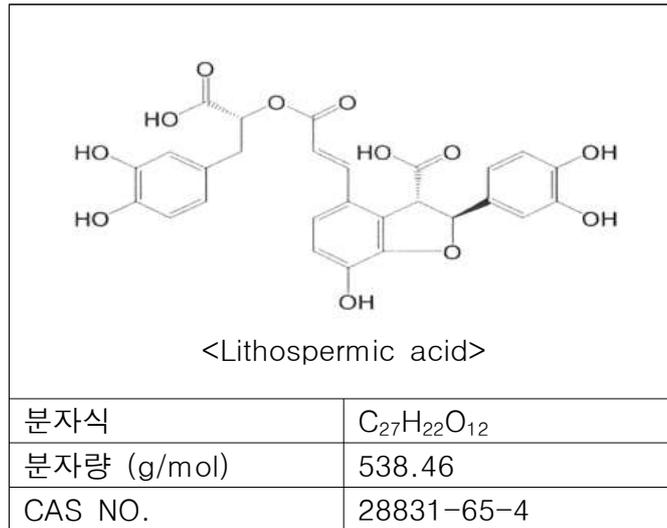
(가-2) 지초추출물 Lithospermic acid 선정

○ Scale-up 시험결과 제조공정 중 농축단계에서 추출물의 색상이 변화되며, 시코닌 및 유도체 함량이 감소됨을 확인하였음. 농축액 색상이 검정색으로 확인될 경우 시코닌 및 유도체 함량은 불검출 되었으며 수율도 감소함

○ 생산공정에 있어 현재 농축온도 40°C 이하 기준은 생산용 농축기 시설설비 부분 및 제조 단가 부분을 고려한다면 현실적으로 반영하기 어려운 상황임. OEM 업체 실무자들과 제조공정도를 검토 및 의논하였을 때 농축온도는 일반적으로 약 60°C를 반영한다고 하였다. 농축온도는 시코닌 및 유도체 함량에 영향을 줄 수 있어 이후 지표물질 선정에 있어 온도에 안정한 성분을 선택하는 방향으로 진행하여 변경하였음

○ 공동 연구기관 한국식품연구원 효능 시험(근위축 개선 효과 및 근세포 위축개선) 결과 지초추출물분말(=지초표준추출물)의 지표성분으로 Lithospermic acid를 확인하였음. 기존 지표물질로 선정한 시코닌 및 유도체 함량은 온도에 불안정하여 기능성원료 제조에 어려움이 있으며, 제조공정상 농축 및 살균에 있어 열이 가해지는 부분으로 공정상 열제어에 어려움이 있어 지표물질 변경이 필요하였음

○ 지초추출물의 지표성분 Lithospermic acid로 최종 선정



(나) 인동추출물의 지표성분 Loganin 설정

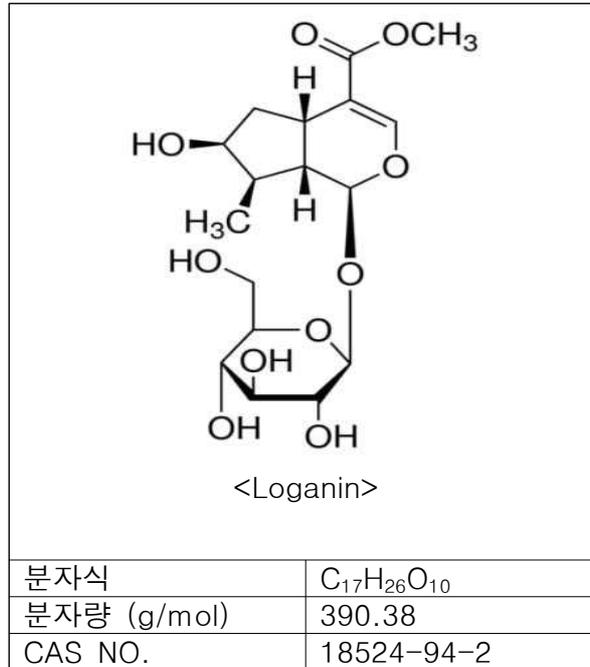
○ 원재료인 인동은 식품에 사용할 수 있는 원료(사용부위: 꽃봉오리, 잎 및 줄기)로 등재되어 있으며, 대한약전에는 “인동” 으로 등재되어 있음.

원재료명	인동덩굴
학 명	<i>Lonicera japonica</i> Thunberg
라 틴 명	<i>Lonicerae Flos</i>
이 명	금은화, 인동, 농박나무
식용가능여부	가능
용 도(사용부위)	꽃봉오리, 잎 및 줄기
식용근거	한국 식품공전 식품원료 등재
주요성분	Loganin, Secologanin, Chlorogenic acid, Loniceroside A, C 등

○ 유사원료(인동덩굴꽃봉오리추출물(그린세라-F))가 위 점막을 보호하여 위 건강에 도움을 줄 수 있음으로 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 있음

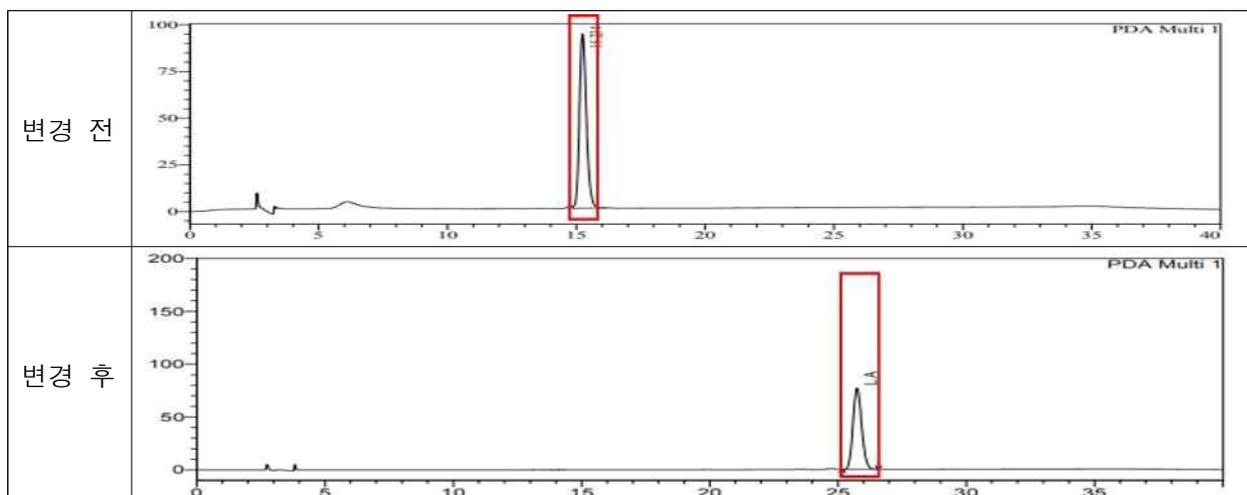
○ 인동추출물의 지표(기능)성분은 Loganin으로, 식품의약품안전평가원 생약연구과에서 제시한 인동의 지표성분 4종 중 추천 물질이며 대한민국 약전 내 “인동” 의 지표성분으로 설정되어 가이드라인 및 표준화 되어 있는 성분이므로 지표성분으로 설정하였음

② 표준물질

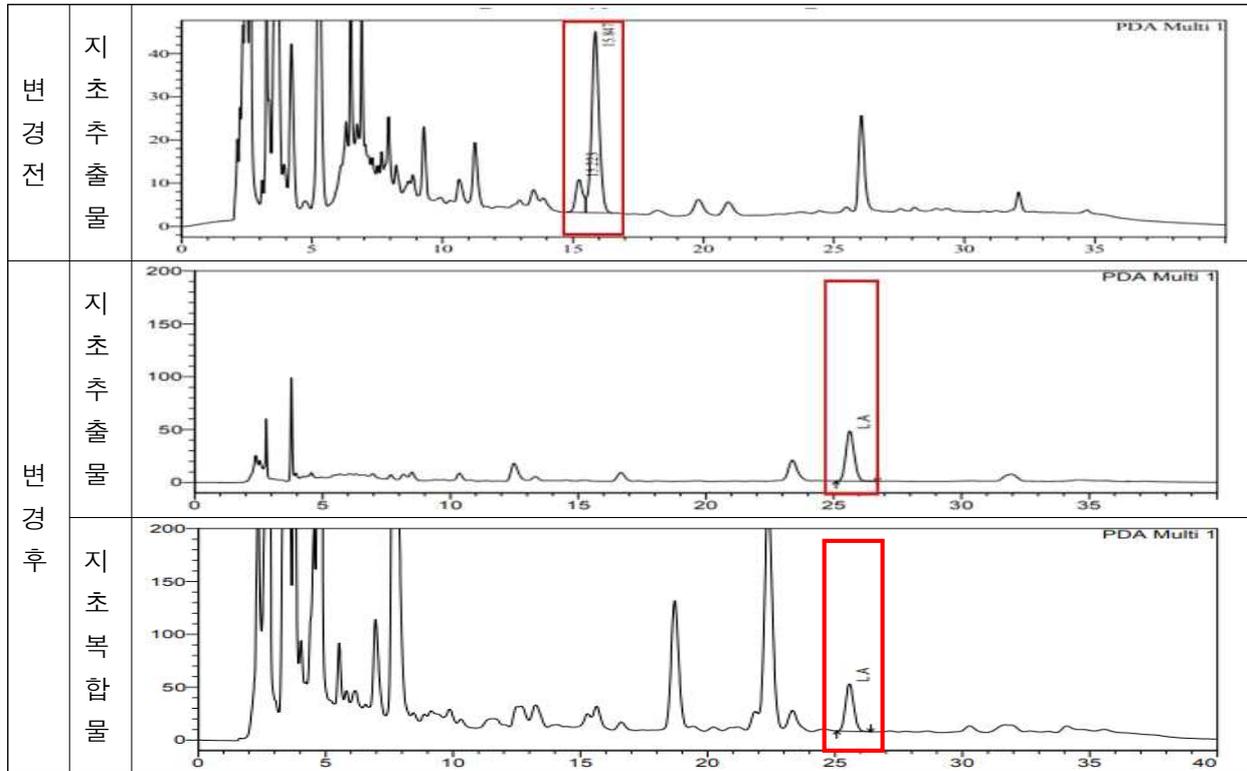


(다) 지초복합물 내 지표성분 분석법 검토

- 기존 분석법을 통하여 Lithospermic acid를 분석을 진행하였으나 해당 peak의 분리도가 낮아 지표성분 함량이 일관적이지 않음을 확인하여, 분석법을 검토하여 peak 분리도를 개선하는 시험을 진행하였음.
- 분석법 변경에 따른 피크분리도
- ① 지초복합물 중 지초 지표물질 Lithospermic acid 분석법 검토
 - 표준품 크로마토그램

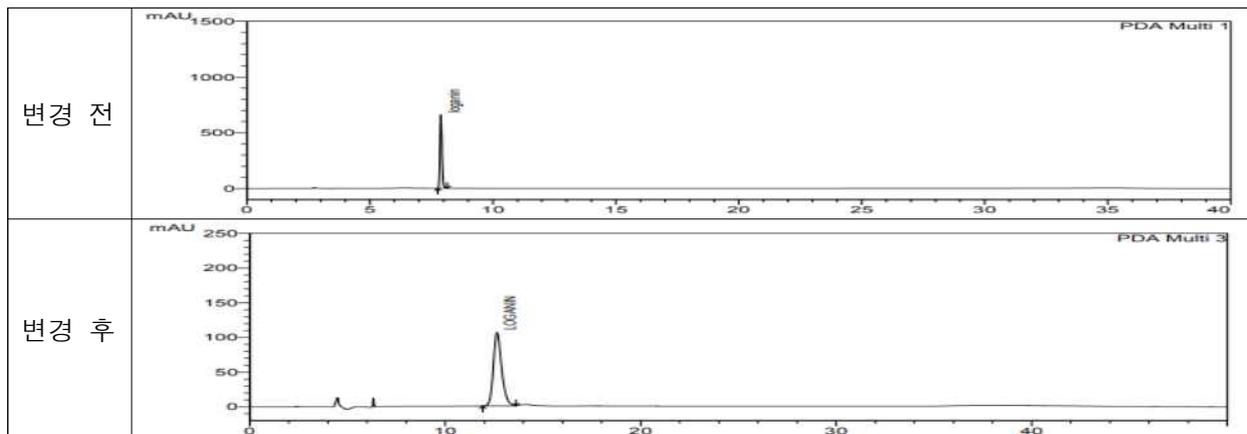


- 샘플(지초추출물) 크로마토그램

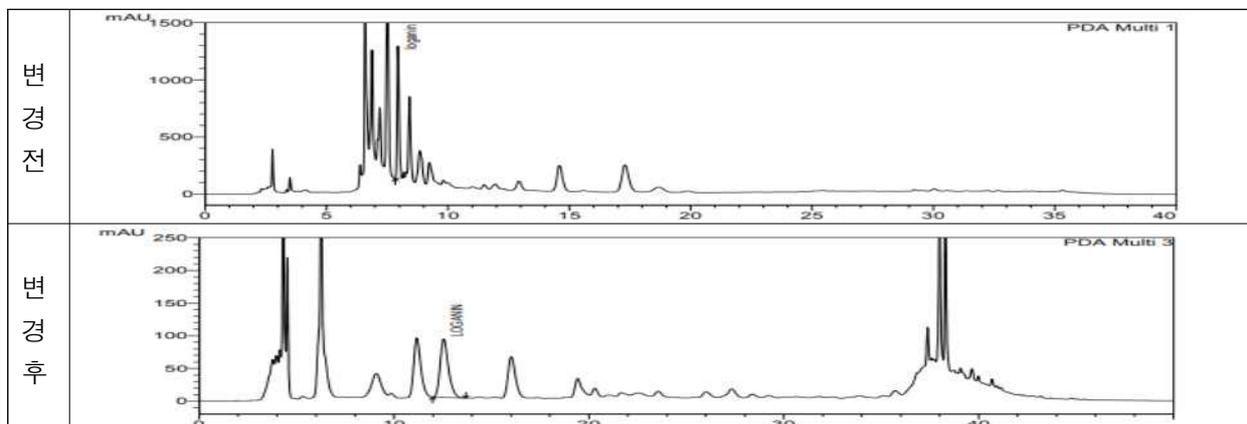


② 지초복합물 중 인동 지표물질 Loganin 분석법 검토

- 표준품 크로마토그램



- 샘플(인동추출물) 크로마토그램

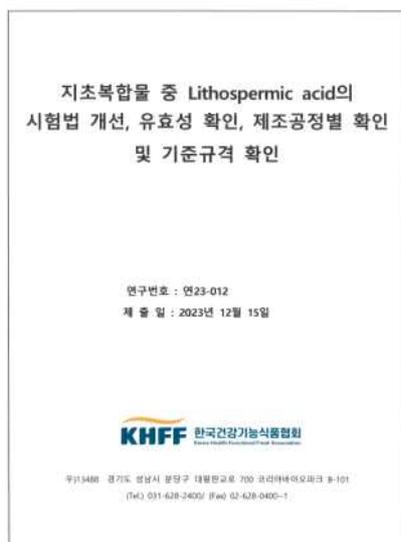


- 지표성분 함량의 차이가 발생으로 기존 지초 및 인동추출물의 data를 기반으로 하여 지초추출물의 지표성분 함량을 재확인하여 최종 추출조건을 설정하였음
- Lithospermic acid, Loganin 분석법에 대한 신뢰성 확보를 위하여 공인기관 한국건강기능식품연구원을 통하여 지표성분 분석법 검토 및 밸리데이션을 진행하였음
- 분석법 변경에 따른 지표성분 분석 결과
 - 지초추출물 내 Lithospermic acid 함량 분석 결과 주정 농도에 따른 함량은 거의 비슷하거나 조건 2의 주정 농도에서 조금 함량이 높은 것으로 확인되었음
 - 인동추출물 내 Loganin 함량 분석 결과 주정 농도에 따른 함량의 차이를 확인하였고 조건 2의 주정 농도에서 함량이 높은 것으로 확인되었음

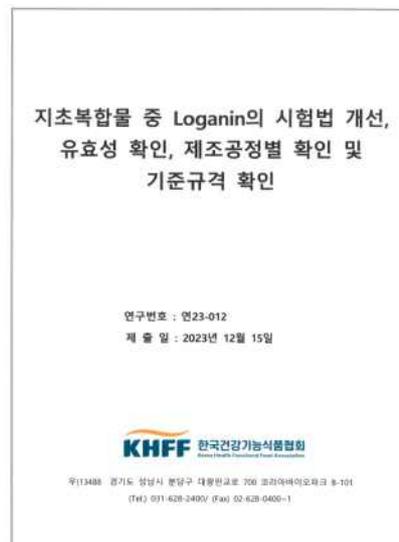
지초추출물	조건 1-1	0.88
	조건 2-1	1.16
	조건 2-2	1.10
	조건 1-1	1.11
인동추출물	조건 1-1	19.3
	조건 2-1	23.2
	조건 2-2	30.6
	조건 1-2	18.8

(라) 지초복합물의 지표성분 분석법 설정

- 지초복합물의 지표성분 분석법 신뢰성을 확보하고자 공인기관(한국건강기능식품연구원)에 지초추출물, 인동추출물의 각각 지표성분인 Lithospermic acid 및 Loganin 분석법 및 밸리데이션을 의뢰하여 지표성분 분석법에 대해 검증하였음



Lithospermic acid 시험법



Loganin 시험법

(라-1) 지초복합물 내 지초추출물 지표성분 밸리데이션

○ 지초추출물의 지표성분 Lithospermic acid은 공인된 분석법이 제시되어 있지 않음. 따라서 지초추출물과 지초복합물 내 지표성분 밸리데이션을 진행하여 분석법을 설정하였음

○ 시험방법

① 분석장비

- HPLC (고성능 액체 크로마토그래피)
- UV detector 또는 DAD detector

② 시약 및 용매

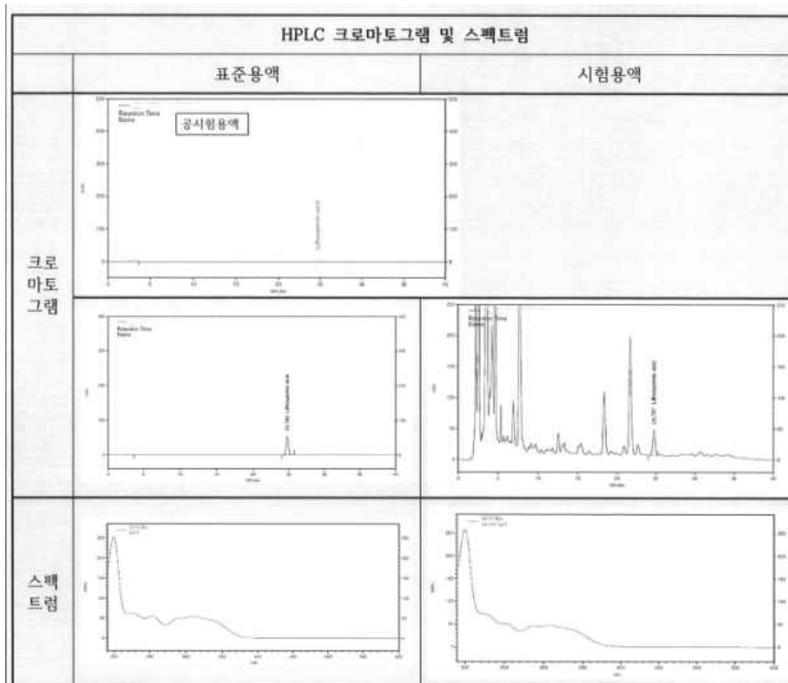
- Acetonitrile (HPLC grade)
- Methanol (HPLC grade)
- Formic acid
- Distilled water

○ Lithospermic acid 시험법 밸리데이션

① 특이성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분)		유해물질 (정량시험)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예

- 공시험용액을 분석하여 표준용액, 시험용액 분석에 간섭현상이 없음을 확인하였고 표준용액, 시험용액 머플름시간은 25min으로 유사하게 확인되었고 스펙트럼이 일치하는 것을 확인함



② 직선성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	지표성분 확인시험	유해물질 (정량시험)
직선성 (Linearity)	적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예

- 결정계수 0.999 이상 확인됨

Lithos-permic acid	1회		2회		3회	
	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적
1	18.5000	332326	18.0625	623940	18.2500	614615
2	37.0000	632205	36.1250	1262154	36.5000	1273208
3	74.0000	1221320	72.2500	2508634	73.0000	2457433
4	148.0000	2452120	144.5000	4935548	146.0000	4895750
5	296.0000	4661455	289.0000	9947213	292.0000	9821264
기울기	15629.8368		34342.4282		33550.9328	
y절편	67142.9167		9575.1250		16165.9583	
r ²	0.9994		1.0000		1.0000	
검량선						

③ 정확도

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	지표성분 확인시험	유해물질 (정량시험)
정확도 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참조 값에 근접한 정도	예	아니오	예

- 회수율은 90.95 ~96.21%, AOAC 기준 적합함

Spike Conc. (µg/mL)	회수율 [(B-A)/C] × 100 (%)	평균 회수율 (%)	표준 편차 (SD)	상대 표준 편차 (%RSD)
Sample + 저농도	91.13	92.03	1.73	1.87
	90.95			
	94.02			
Sample + 중농도	95.10	95.25	0.13	0.14
	95.35			
	95.30			
Sample + 고농도	96.21	94.79	1.64	1.73
	95.16			
	92.99			

◆ 회수율 기준

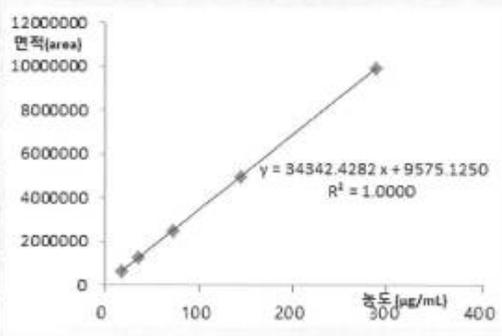
농도(Concentration)	회수율(%)
100%(100 g/100 g)	98 ~ 101
≥ 10%(10 g/100 g)	95 ~ 102
≥ 1%(1 g/100 g)	92 ~ 105
≥ 0.1%(1 mg/g)	90 ~ 108
0.01%(0.1 mg/g)	85 ~ 110
10 mg/kg	80 ~ 115
1 mg/kg	75 ~ 120
10 µg/kg	70 ~ 125

④ 정밀도 (반복성 및 재현성)

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	유해물질 확인시험	유해물질 (정량시험)
정밀도 (Precision)	균일한 검체로 부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예

- 반복성: 상대표준편차(RSD%)는 0.7%로 나타나, AOAC 기준 일 때 적합함

표준 편차	0.0134	0.0043	0.0096
RSD (%)	2.53	0.82	1.80
전체 평균값 (mg/g)	0.5292		
전체 표준 편차	0.0037		
전체 RSD (%)	0.70		

반복수	표준용액농도 (µg/mL)	피크면적	정밀도 중 반복성 측정에 사용된 검량선 
1	18.0625	623940	
2	36.1250	1262154	
3	72.2500	2508634	
4	144.5000	4935548	
5	289.0000	9947213	
기울기	34342.4282		
y절편	9575.1250		
r ²	1.0000		

◆ 반복성 및 재현성 기준

함량	반복성(%)	재현성(%)
100%(100 g/100 g)	1	2
10%(10 g/100 g)	1.5	3
1%(1 g/100 g)	2	4
0.1%(1 mg/g)	3	6
0.01%(0.1 mg/g)	4	8
10 mg/kg	6	11
1 mg/kg	8	16
10 µg/kg	15	32

(라-2) 지초복합물 내 인동추출물 지표성분 밸리데이션

○ 인동추출물의 지표성분 Loganin는 대한약전 내 “인동”의 지표성분으로 설정되어 가이드라인 및 표준화되어 있으나 지초복합물 내에서 안정성을 확인하고자 밸리데이션을 진행하였음

○ 시험방법

① 분석장비

- HPLC (고성능 액체 크로마토그래피)
- UV detector 또는 DAD detector

② 시약 및 용매

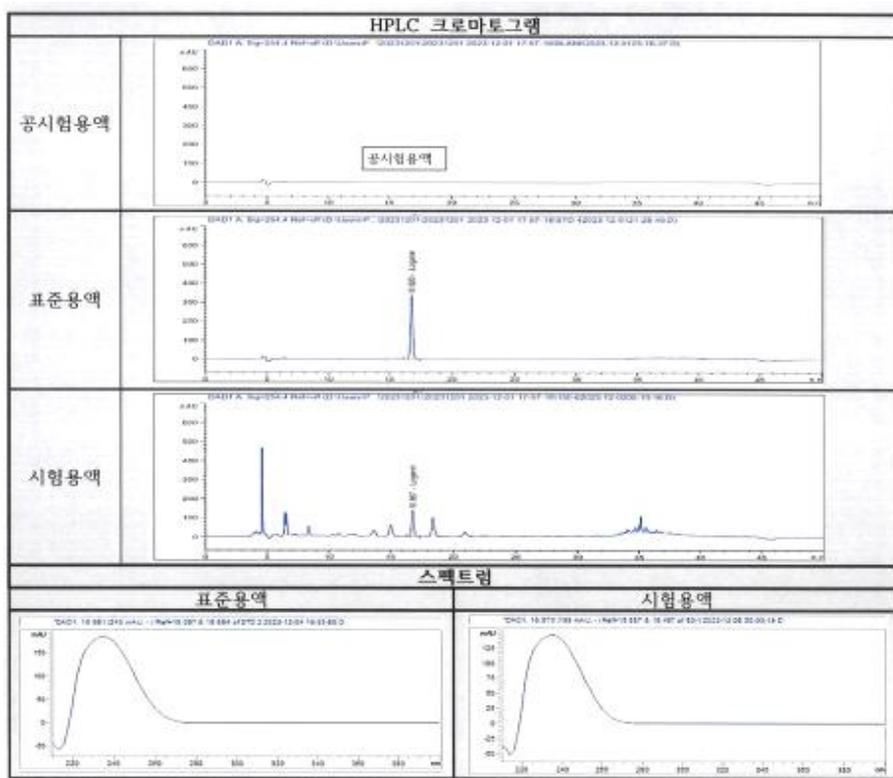
- Acetonitrile (HPLC grade)
- Methanol (HPLC grade)
- Formic acid
- Distilled water

○ Loganin 시험법 밸리데이션

① 특이성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	확인시험	유해물질 (정량시험)
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예

- 공시험용액을 분석하여 표준용액, 시험용액 분석에 간섭현상이 없음을 확인하였고, 표준용액, 시험용액 머무름시간, 스펙트럼 등이 일치하는 것을 확인함



② 직선성

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	확인시험	유해물질 (정량시험)
직선성 (Linearity)	적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예

- 결정계수 0.999 이상 확인됨

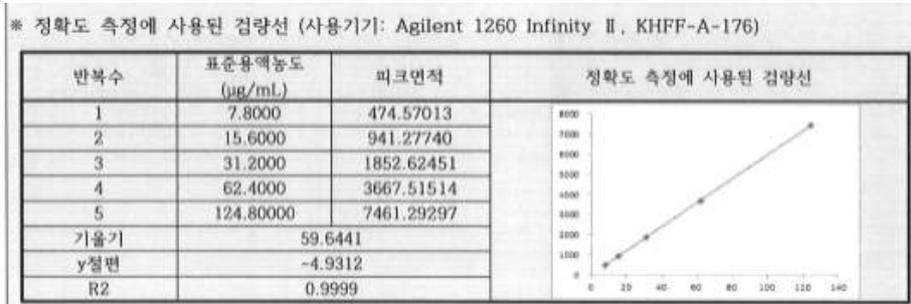
Loganin	1회(사용기기: Agilent 1260 Infinity, KHFF-A-176)		2회(사용기기: Agilent 1260 Infinity, KHFF-A-176)		2회(사용기기: Agilent 1260 Infinity, KHFF-A-212)	
	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적	농도 (µg/mL)	피크면적
1	7.8000	474.57013	8.1875	492.27875	7.8000	557.30841
2	15.6000	941.27740	16.3750	987.15344	15.6000	1124.78894
3	31.2000	1852.62451	32.7500	2004.64148	31.2000	2204.24438
4	62.4000	3667.51514	65.5000	4109.14014	62.4000	4437.23193
5	124.8000	7461.29297	131.0000	8092.70459	124.8000	8834.09863
기울기	59.6441		62.0445		70.7280	
y절편	-4.9312		-12.3518		11.1291	
R2	0.9999		0.9999		1.0000	
검량선						

③ 정확도

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	확인시험	유해물질 (정량시험)
정확도 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참조 값에 근접한 정도	예	아니오	예

- 회수율은 100.0569 ~103.7062%, AOAC 기준 적합함

Spike conc. (µg/mL)	회수율 {[B-A]/[C]} *100 (%)	평균 회수율 (%)	표준 편차 (SD)	상대 표준 편차 (%RSD)
Sample + 저농도	100.0619	102.0419	1.7174	1.6830
	103.1270			
	102.9370			
Sample + 중농도	102.3873	102.3561	0.6229	0.6086
	101.7182			
	102.9628			
Sample + 고농도	103.6666	103.5995	0.1558	0.1504
	103.4214			
	103.7104			



◆ 회수율 기준

농도(Concentration)	회수율(%)
100%(100 g/100 g)	98 ~ 101
≥ 10%(10 g/100 g)	95 ~ 102
≥ 1%(1 g/100 g)	92 ~ 105
≥ 0.1%(1 mg/g)	90 ~ 108
0.01%(0.1 mg/g)	85 ~ 110
10 mg/kg	80 ~ 115
1 mg/kg	75 ~ 120
10 µg/kg	70 ~ 125

④ 정밀도 (반복성 및 재현성)

항목	정의	적용		
		기능성분(또는 지표성분) 정량시험	확인시험	유해물질 (정량시험)
정밀도 (Precision)	균일한 검체로 부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예

- 반복성: 상대표준편차(RSD%)는 0.8738%로 나타나, AOAC 기준 일 때 적합함

사용 기기	시험자	피크 면적	표준 편차	%RSD	전체 평균 분석값 (mg/g)	전체 표준 편차	전체 %RSD	
Agilent 1260 Infinity II (KHFF-A-212)	A (1 day)	1	1787.27393	0.1515	1.2968	11.6475	0.1551	1.3316
		2	1591.43970					
		3	1738.10779					
		4	1684.25281					
		5	1665.67981					
Agilent 1260 Infinity II (KHFF-A-176)	A (2 day)	1	1,333.20923	0.1850	1.6118			
		2	1,394.05493					
		3	1,537.45300					
		4	1,458.62207					
		5	1,381.70776					
	B (3 day)	1	1474.06555	0.1659	1.4081			
		2	1747.74207					
		3	1574.43115					
		4	1492.27637					
		5	1499.39160					

◆ 반복성 및 재현성 기준

함량	반복성(%)	재현성(%)
100%(100 g/100 g)	1	2
10%(10 g/100 g)	1.5	3
1%(1 g/100 g)	2	4
0.1%(1 mg/g)	3	6
0.01%(0.1 mg/g)	4	8
10 mg/kg	6	11
1 mg/kg	8	16
10 µg/kg	15	32

(2) 원재료 유해물질 항목 분석

(가) 유해물질 항목 설정

○ 유해물질에 대한 규격 설정은 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」(식약처 고시 2021-25호)의 유해물질규격설정항목에 근거한다.

① 중금속 (납, 총비소, 카드뮴, 총수은)

- 원재료가 생약인 경우 「대한민국약전」 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」의 잔류농약 기준도 적용한다.

- 모든 원료에 대한 중금속 규격설정은 아래와 같다. 실측치를 고려하여 가능한 낮은 규격으로 설정하고, 일일 최대섭취량을 제안한 기준규격에 대비했을 때 그에 따른 제안규격에 의한 일일 최대섭취량이 규정에서 정해진 일일 규정규격 이내로 설정되었는지 확인한다.

② 잔류농약

- 신청원료의 원재료에 대해서 「식품의 기준 및 규격」에 잔류농약 허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등 검사에 관한 규정」[별표3] 정밀검사대상 잔류농약 검사항목*에 대하여, 잔류허용 기준이 없는 경우에는 5종 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 시험결과와 분석자료 제출한다.
- 원재료가 생약인 경우 「대한민국약전」 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」의 잔류농약 기준도 적용한다.

③ 미생물

- 모든 원료에 대해 대장균군 “음성” 규격 이어야 한다.

④ 기타(곰팡이독소 등)

- 「식품의 기준 및 규격」에 따라 모든 식물성 원료에 대해 총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합)은 기준 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 단, B1은 10.0 이하로 기준 규격이 설정되어 있다.

⑤ 이산화황

- 원재료가 생약인 경우, 「대한민국약전」 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」에 순도시험 이산화황 규격이 있는 경우 시험결과를 제출한다.

⑥ 잔류용매

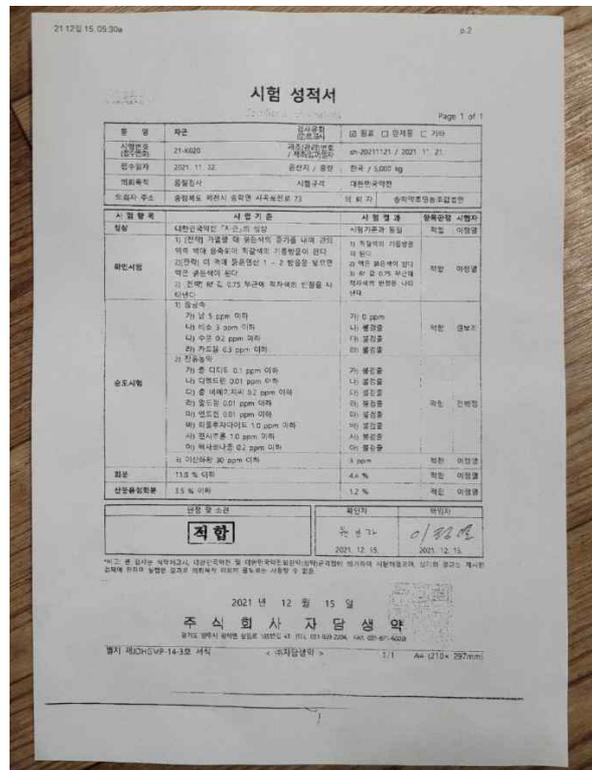
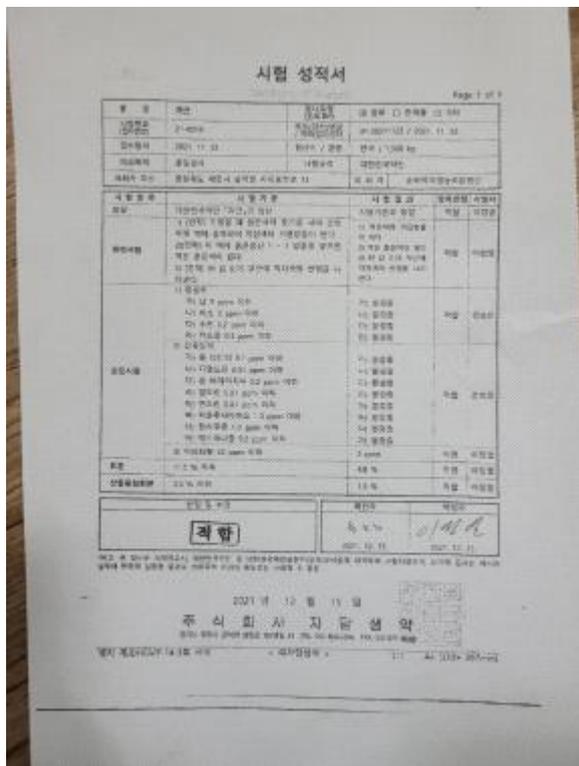
- 원료 제조에 물, 주정 이외의 용매를 사용한 원료의 경우 해당 용매에 대한 규격을 설정한다 (예. 헥산 규격 0.005 g/kg)
- 지초복합물의 경우 주정을 용매로 사용하였기 때문에 해당되지 않음

○ 유해물질 분석 결과

① 지초복합물의 원재료 “지초” 유해물질 분석 결과

- 지초(원재료)의 유해물질 분석 방법은 원재료가 생약이므로, 「대한민국약전」 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」에 따라 기준 규격을 설정하여 분석하였음.
- 기준규격 신뢰성을 확보하기 위하여 지초복합물의 원재료인 지초에 대하여 유해물질 분석을 외부기관에 분석을 의뢰하였음.

시험항목	시험 기준·규격	시험 방법
성상	대한민국약전(KP)_"자근"성상 항목	대한민국약전 및 식품의 기준 및 규격 시험방법에 준한다.
확인시험	대한민국약전(KP)_"자근" 확인시험	
중금속	카드뮴 0.3 ppm 이하	
	납 5 ppm 이하	
	비소 3 ppm 이하	
	수은 0.2 ppm 이하	
잔류농약	총 BHC(α,β,γ 및 δ-BHC의 합) 0.2 ppm 이하	
	총 DDT (p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT,p,p'-DDT의합) 0.1 ppm 이하	
	Aldrin 0.01 ppm 이하	
	Dieldrin 0.01 ppm 이하	
	Endrin 0.01 ppm 이하	
	Thifluzamide 1.0 ppm 이하	
Pencycuron 1.0 ppm 이하		
Hexaconazole 0.2 ppm 이하		
이산화황	30 ppm 이하	
회분	11.0% 이하	
산불용성 회분	3.5% 이하	
수분함량	10% 이하	



지초(원물)성적서, 재배지 : 횡성
 그림 1. 지초 계약재배(횡성,평창)를 통하여 2021년에 수확한 지초 원물 성적서

② 지초복합물의 원재료 “인동” 유해물질 분석 결과

- 인동(원재료)의 유해물질 분석 방법은 원재료가 생약이므로, 「대한민국약전」 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」에 따라 기준 규격을 설정하여 분석하였음
- 기준규격 신뢰성을 확보하기 위하여 지초복합물의 원재료 인동에 대하여 유해물질 분석을 외부기관에 분석을 의뢰하였음

시험항목	시험 기준•규격	시험 방법
성상	대한민국약전(KP)_"인동"성상 항목	대한민국약전 및 식품의 기준 및 규격 시험방법에 준한다.
확인시험	대한민국약전(KP)_"인동" 확인시험	
중금속	카드뮴 0.3 ppm 이하	
	납 5 ppm 이하	
	비소 3 ppm 이하	
	수은 0.2 ppm 이하	
잔류농약	총 BHC(α,β,γ 및 δ-BHC의 합) 0.2 ppm 이하	
	총 DDT (p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT,p,p'-DDT의합) 0.1 ppm 이하	
	Aldrin 0.01 ppm 이하	
	Dieldrin 0.01 ppm 이하	
	Endrin 0.01 ppm 이하	
이산화황	30 ppm 이하	
건조감량	12.0% 이하	
회분	9% 이하	
산불용성회분	1% 이하	
물은에탄올엑스	12% 이상	
로가닌	0.1% 이상	



참용용 시험성적서

문서확인번호 : CUAM-POGU-BCC2-JXII

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

발행번호	R20220810-0003	접수번호	220401075-001
검사완료일	2022-08-10	접수연월일	2022-07-29
제품명	인동(대한민국)		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·품목명	인동		
제조(수입)일		유통(품질유지)기한	
성명	이강희		
소재지	충청남도 연기시 수지구 공교중앙로 338 경교우이뉴브 A동 421호		
전화번호	031-215-8814	팩스번호	031-215-8815
업체명		제조국	정지우관
소재지			
시험목적	한약재 기타(참고)		

시험 항목	시험 기준	시험 결과	비고
확인시험	검액에서 알은 여러 개의 알침은 인동표준생약에서 알은 반점과 색상이 같고, 그 중 러 값 0.25 부근에서 로가닌의 반침을 각각 확인할 수 있다.	일치	
납	5 ppm 이하	2 ppm	
비소	3 ppm 이하	0 ppm	
수은	0.2 ppm 이하	0.0 ppm	
카드뮴	0.3 ppm 이하	0.3 ppm	
총디디티(총DDT)	0.1 ppm 이하	불검출	
디엘드린	0.01 ppm 이하	불검출	
총비에이지제(총BHC : α, β,γ 및 δ-BHC의 합계)	0.2 ppm 이하	불검출	
알드린	0.01 ppm 이하	불검출	
델드린	0.01 ppm 이하	불검출	
이산화황	30 ppm 이하	2 ppm	

본 성적서는 전자문자로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 원본을 확인할 수 있습니다. 또한, 문서확인의 메크도문도 신뢰확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 이용하실 수 있습니다. Page 1 of 2

문서확인번호 : CUAM-POGU-BCC2-JXII

시험 항목	시험 기준	시험 결과	비고
건조감량	12.0% 이하 (6 시간)	5.1 %	
회분	9.0% 이하	4.1 %	
산불용성회분	1.0% 이하	0.4 %	
물은에탄올엑스	12.0% 이상	16.3 %	
로가닌	0.1% 이상	1.0 %	

총관리관 : 상기실험확인관
 시험검사관 : 김동욱, 김주현, 이시웅, 정태현, 정현영, 표지혜 시험검사책임자 : 김병기
 비고 : 접수번호 : 참고22-0664

※ 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

2022년08월10일

(주)동의한약분석센터장



47340 부산광역시 부산진구 영광로 176 (가야동, 생활과학관 9층 901호-907호, T:051-890-2939 F:051-890-2943 911호)

본 성적서는 전자문자로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 원본을 확인할 수 있습니다. 또한, 문서확인의 메크도문도 신뢰확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 이용하실 수 있습니다. http://lms.mfds.go.kr Page 2 of 2

그림 2. 인동(원물)성적서

나. 지초 복합물의 제조공정 표준화

(1) 원료 제조 공정 개발

(가) Lab scale을 통한 최적 추출 조건 최적화

○ 지초추출분말

① Lab scale 제조 방법

- 건조시킨 지초의 뿌리를 10~100 v/v% 에탄올을 가하여 조건별 추출한 후, 이로부터 여과한 상등액을 감압건조기로 농축시킨 뒤 분무건조하여 지초추출분말을 제조함.
- 추후 생산공정에 적용하기 위해서 건조 작업성 및 수율을 높이기 위해 텍스트린을 첨가하며, 건조작업 전에 가열살균 공정을 추가하여 sample 제조함.

② 추출시간에 따른 수율 확인

- 지초(국산) 원물 약 100g에 에탄올 용매를 준비하여 조건별로 추출하였음. 추출물을 1um 필터로 여과하여 감압농축기로 농축 시킨 후 수율 확인함

표 1. 추출시간에 따른 수율 확인

추출 시험 조건	수율(%)
조건 1	47.2
조건 2	44.1
조건 3	19.3
조건 4	16.9

○ 인동추출분말

① Lab scale 제조 방법

- 건조시킨 인동의 줄기를 분쇄하고 10~100 v/v % 에탄올을 가하여 추출한 후, 이로부터 여과한 상등액을 감압건조기로 농축시킨 뒤 분무건조하여 인동추출분말을 제조함
- 추후 생산공정에 적용하기 위해서 건조 작업성 및 수율을 높이기 위해 텍스트린을 첨가하여 건조작업 전에 가열살균 공정을 추가하여 sample 제조함

② 추출용매에 따른 수율 확인

- 인동을 사용하여 추출조건을 확립하기 위하여 물과 에탄올을 사용하여 가열하여 추출함. 추출물을 1μm 필터로 여과하여 감압농축기로 농축시킨 후 수율 확인함

표 2. 추출용매에 따른 수율 확인

	원물량(g)	농축액량(g)	고형분 함량 (%)	당도(Brix)	수율(%)
조건 1	50	25	20.4	22.6	5.1
조건 2	100	15	35.6	38.3	5.34
조건 3	50	21	31.2	33.6	6.55
조건 4	50	26	25	27.9	6.5

③ 추출온도에 따른 수율 확인

- 인동(국산) 원물 100g에 물과 에탄올을 사용하여 온도 조건을 설정하여 추출함. 수율을 확인한 결과는 [표 3]과 같음. 동일한 배수 및 에탄올 농도에서 추출 시 온도에 변수를 주었는데, 조건 3에서 수율이 7.36%로 가장 높게 나타났으며, 조건 1에서 수율이 6.08% 가장 적게 나타났음. 수율로 보았을 때 조건3에서 추출하는 것이 적절한 것으로 판단됨

표 3. 추출온도에 따른 수율 확인

추출온도(°C)	원물량(g)	추출량(g)	고형분 함량 (%)	당도(Brix)	수율 (%)
조건 1	100	405	1.5	16.7	6.08
조건 2	100	368	1.9	19.1	6.99
조건 3	100	263	2.8	19.5	7.36
조건 4	100	239	2.8	16.8	6.69

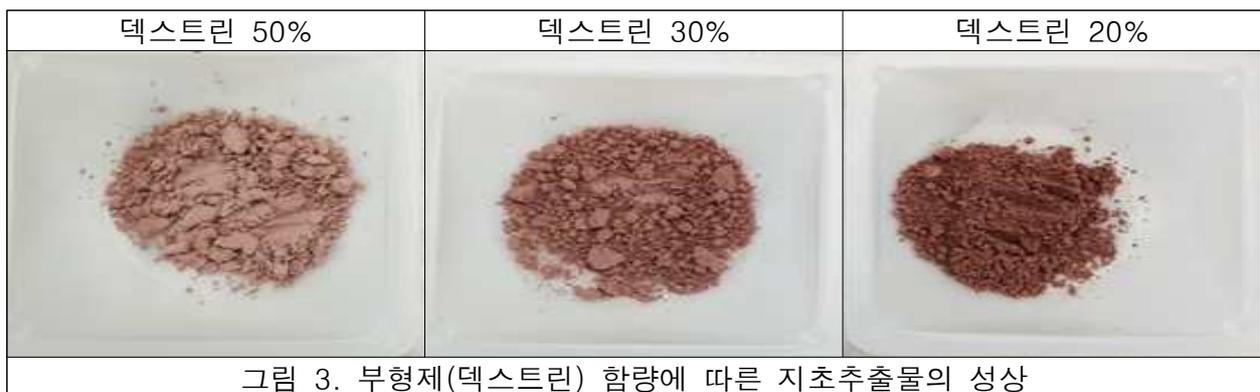
(나) 건조방법에 따른 관능 특성 확인

- 지초복합물 사업성을 위해 제조단가를 낮출 수 있는 방법으로 건조방법을 분무건조로 진행하여 분말의 특성을 확인하였음

○ 지초추출분말

- Lab scale 제조공정 결과 추출조건은 수율 및 지표성분을 감안하여 최적추출조건을 설정하였음. 이를 반영하여 제형화를 확인하기 위해 분무건조기를 사용하여 고형분 대비 부형제(덱스트린) 함량별 Lab scale test 진행하였음.
- 분무건조기 설정 조건

INLET	OUTLET	PUMP	ASPIRATOR
180°C	90°C	30%	90°C
기기명 : BUCHI Mini spray dryer B-290			



- 덱스트린 10%의 경우 분무건조 공정 과정 중 분말이 벽에 붙어버리는 현상으로 샘플을 회수하기 어려웠으며 실 생산 시 큰 소실이 우려됨. 회수한 지초추출분말도 서로 엉겨붙어 제형화의 어려움이 있음
- 덱스트린 20%의 경우 분무건조 공정에서 달라붙는 현상이 크게 감소하였으며 분말의 형태를 유지하였음. 지초추출물의 부형제 비율은 20~30% 이상이 적당하다고 생각됨

○ 인동추출분말

- Lab scale 제조공정 결과 추출조건은 수율 및 지표성분을 감안하여 최적추출조건을 설정하였음. 이를 반영하여 제형화를 확인하기 위해 분무건조기를 사용하여 고형분 대비

부형제(덱스트린) 함량별 Lab scale test 진행하였음

- 분무건조기 설정 조건

INLET	OUTLET	PUMP	ASPIRATOR
180℃	90℃	30%	90℃
기기명 : BUCHI Mini spray dryer B-290			

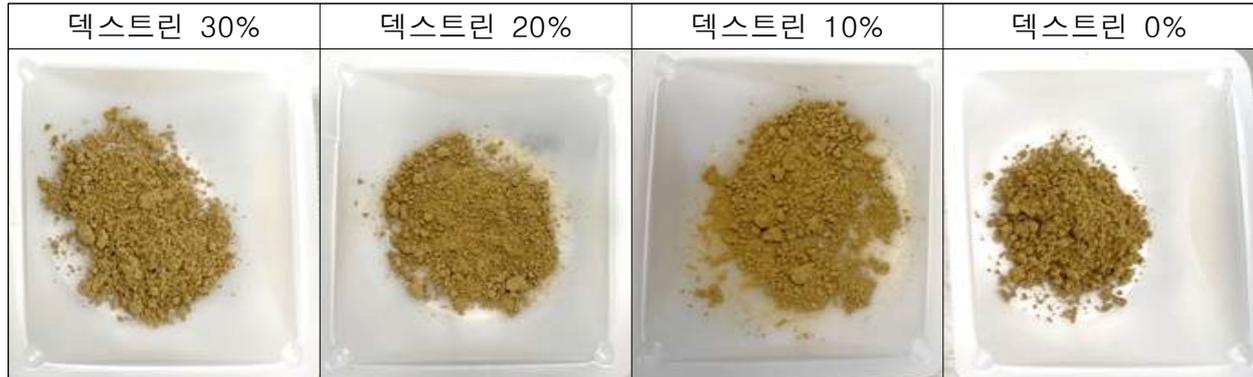


그림 4. 부형제(덱스트린) 함량에 따른 인동추출물의 성상

- 부형제 10% 이하의 경우 성상에는 문제가 없으나 분무건조 공정 시 벽면에 붙는 현상이 발생함. 실 생산 시 소실이 우려됨. 부형제 비율은 20% 이상이 적당하다고 생각됨

(다) 지초복합물의 최적 추출 조건 설정

○ 지초복합물의 원료 소재의 가격 경쟁력과 공정의 안전성 등을 고려하여 지초복합물 내 지초추출물과 인동추출물의 최적 추출 조건을 설정하였음

2) 제조공정별 지표(기능)성분 함량 분석

○ 지초복합물의 제조공정도

- 지초, 인동 추출분말의 대량생산을 진행하였으며 지표성분 및 수율을 확인하였음

- 지초의 지표(기능)성분은 Lithospermic acid로 다시 분석하였음



표 4. 지초복합물 제조공정도

(3) 대량생산 QC

○ 지초추출분말

- 지초추출물의 품질규격 신뢰성을 확보하고자 공인기관에 영양성분, 중금속, 잔류농약 5종, 대장균군, 총 아플라톡신을 분석의뢰하였음

구분	기준규격	결과	
대장균군	음성	음성	
총 아플라톡신	불검출	불검출	
중금속	납 (mg/kg)	1.0 이하	0.0178
	총비소 (mg/kg)	1.0 이하	0.0572
	카드뮴 (mg/kg)	1.0 이하	0.0006
	총수은 (mg/kg)	0.1 이하	0.0018
잔류농약 (mg/kg)	허용치 미만	불검출	

중금속	잔류농약	대장균군	총 아플라톡신	영양성분
				

그림 5. 지초추출물의 품질규격 성적서

○ 인동추출분말

- 인동추출물의 품질규격 신뢰성을 확보하고자 공인기관에 영양성분, 중금속, 잔류농약 5종, 대장균군, 총 아플라톡신을 분석의뢰하였음

구분	기준규격	결과
대장균군	음성	음성
총 아플라톡신	불검출	불검출
중금속	납 (mg/kg)	1.0 이하 0.0926
	총비소 (mg/kg)	1.0 이하 0.1034
	카드뮴 (mg/kg)	1.0 이하 0.0102
	총수은 (mg/kg)	0.1 이하 0.0018
잔류농약 (mg/kg)	허용치 미만	불검출

중금속	잔류농약	대장균군	총 아플라톡신	영양성분
				

그림 6. 인동추출물의 품질규격 성적서

○ 지초복합물

- 지초복합물의 품질규격 신뢰성을 확보하고자 공인기관에 영양성분, 중금속, 잔류농약 5종, 대장균군, 총 아플라톡신을 분석의뢰하였음

구분	기준규격	결과
대장균군	음성	음성
총 아플라톡신	불검출	불검출
중금속	납 (mg/kg)	1.0 이하 0.0607
	총비소 (mg/kg)	1.0 이하 0.0693
	카드뮴 (mg/kg)	1.0 이하 0.069
	총수은 (mg/kg)	0.1 이하 0.0015
잔류농약 (mg/kg)	허용치 미만	불검출

다. 지초복합물의 근 기능 개선 효능평가

(1) 근위축 개선용 지초 복합물 개발

(가) 복합물 후보 소재 선정

- 근기능 개선용 지초 복합물 개발을 위해 식품원료로 등재된 원료 중 선행 기술 조사 및 특허 검색을 통해 5종의 복합물 후보 소재를 선정하였다.

○ 두충(Eucommia ulmoides, EU)

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
두충	-	Eucommia	Eucommia ulmoides Oliv.	두충(수피)	0	X	수피※(두충), 잎	-	-

(출처: 식품안전나라)

- 두충 물추출물은 랫드에서 좌골신경 손상에 의한 근위축 감소 효과(동의생리병리학회지, 2008)
- 두충 물추출물은 랫드에서 불용에 의한 비복근(gastromemius) 감소 억제(대한통합의학회, 2017)
- 복합 추출물(오미자, 구기자 및 두충)의 근위축 예방, 치료 또는 개선용 조성물(특허 10-2018-0010961)

○ 인동(Lonicera japonica, LJ)

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
인동덩굴	-	금은화, 인동, 농박나무, Golden-and-silver flower	Lonicera japonica Thunberg	꽃봉오리 (금은화), 잎 및 줄기(인동)	X	0	꽃봉오리, 잎 및 줄기	상세페이지 확인	-

(출처: 식품안전나라)

- 인동꽃 추출물의 항산화 효과(Arch Pharm Res, 2007)
- 인동 물추출물의 항산화 및 위점막 손상 보호 효과(대한분초학회지, 2019)
- 마우스의 혈당 및 혈청 콜레스테롤 수치 저하(Guangzhou Medicine, 1998)

○ 천궁(Cnidium officinale, CO)

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
천궁	-	-	Cnidium officinale Makino	뿌리줄기 (천궁)	X	0	뿌리줄기	상세페이지 확인	-

(출처: 식품안전나라)

- 천궁 메탄올 추출물은 진정 작용 보유(대한소아치과학회지, 2005)
- 당귀, 천궁, 작약 추출물을 포함하는 근력 개선 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 조성물(특허 10-2020-0114852)
- 진정, 진통, 두통, 빈혈증, 부인병에 효과(조선왕조실록)
- 난소절제 마우스의 후지 허혈 감소 효과(Integ Med Res, 2019)

○ 칩(Pueraria lobata, PL)

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
칩	-	갈근, East Asian arrow root	Pueraria lobata (Wild.) Ohwi	갈근(뿌리)	0	X	뿌리※(갈근, 앞)	-	-

(출처: 식품안전나라)

- 칩 물추출물은 골격근의 에너지 대사를 증가시켜 비만 예방(Nutrients, 2017)
- 칩 뿌리 부위가 항산화 활성이 가장 높음(Molecules, 2019)
- 랫드에서 항염 활성 통해 당뇨성 신증 개선(J Pharm Pharmacol, 2018)

○ 천마(Gastrodia elata Blume, GB)

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
천마	-	Cheonma	Gastrodia elata Blume	천마(뿌리)	0	X	뿌리※(천마)	-	-

(출처: 식품안전나라)

- 천마 물추출물은 동맥경화, 이상지질혈증, 인슐린 저항성 개선(EBCAD, 2017)
- 천마 물추출물은 신정보호 및 기억력 개선(Lab Ani Res, 2015)
- 천마 추출물은 선행연구 결과를 통해 근위축 개선

(2) 복합물 후보 소재의 근위축 개선 효능 평가

(가) 복합물 후보 소재 추출물 제조

○ 추출 방법

- 시료 180 g을 10배수의 70% 주정으로 70℃ 온도에서 6시간 추출 후 감압농축한 뒤, 동결 건조하여 사용 시까지 -20℃ 냉동 보관하였다.

○ 실험 결과

- 5종 후보소재의 추출물의 수율은 표 5과 같다.

표 5. 후보소재의 추출 수율

소재명	수율(%)
두충(EU)	8.56
인동(LJ)	13.30
천궁(CO)	26.16
칩(PL)	25.65
천마(GB)	37.10

(나) 복합물 후보 소재의 세포 독성 평가

○ 실험 방법

- 마우스 myoblast 세포주인 C2C12 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (PS)가 첨가된 High glucose dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지로 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 후보소재 5종은 0.5 - 10

mg/mL로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 준비하였다. 세포 독성 평가를 위해 C2C12 세포를 96 well plate에 1×10^4 /well로 seeding하고, 24시간 후 5종의 추출물을 최종 농도 0.5 - 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 다양한 농도로 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 반응시킨 후 MTT solution (5 mg in phosphate buffer (PBS)을 1/10 volume으로 처리하였다. 4시간 반응 후 배지를 완전히 제거하고 DMSO 200 μL 를 넣고 1분간 shaking하였다. 570 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

○ 실험 결과

- 후보 소재 5종 모두 0.5 - 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다 (그림 11).

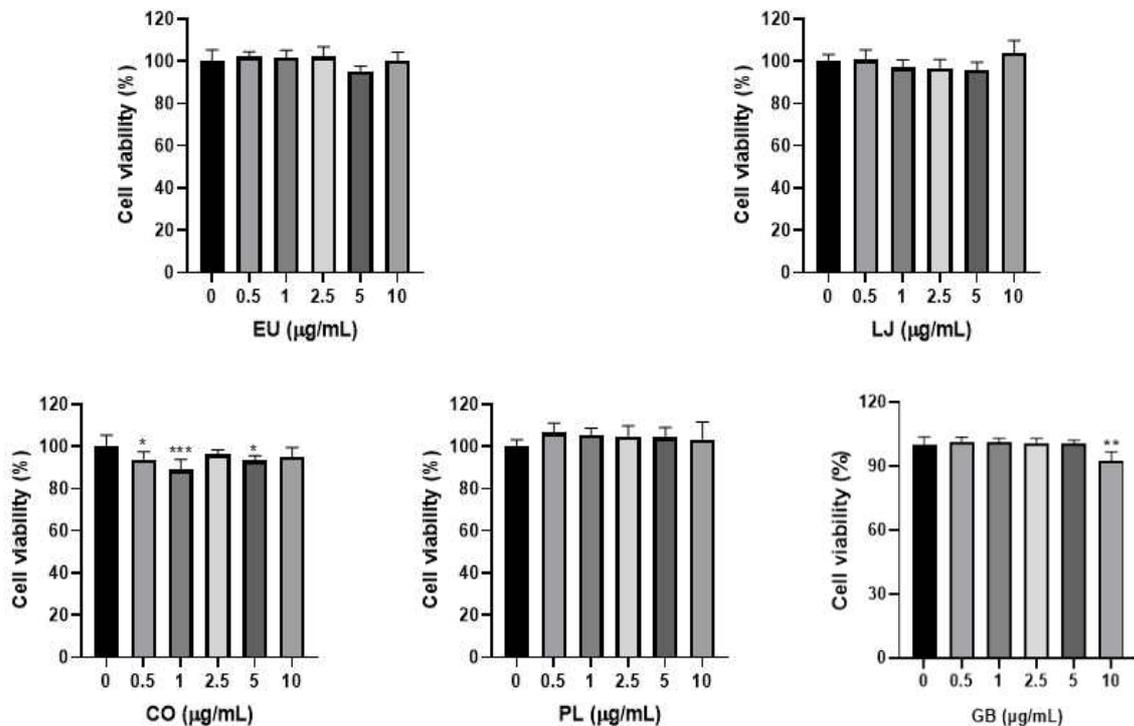


그림 11. 후보소재 5종의 세포 독성

(다) 후보소재의 근세포 위축 개선 활성 평가

○ 실험 방법

- 마우스 myoblast 세포주인 C2C12 세포를 10% FBS, 1% PS가 첨가된 High glucose DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Myotube로 분화시키기 위해서 6 well plate에 4×10^5 /well로 seeding하였다. Confluency 100%가 되면 2% horse serum (HS), 1% PS가 첨가된 High glucose DMEM 배지로 4일 동안 매일 배지를 바꿔주며 분화를 유도하였다. 분화 4일차에 후보소재 추출물과 근위축을 유발하는 덱사메타손 (dexamethasone, DEX)을 50 μM 농도로 24시간 처리한 후 근위축 바이오마커인 muscle atrophy F-box (MAFbx/Atrogin-1)과 muscle RING-finger protein 1 (MuRF1)의 mRNA 발현량을 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 통해 확인하였다. Atrogin-1과 MuRF1의 프라이머(primer) 정보는 표 6와 같다.

표 6. Primer sequence 정보

Gene		Primer Sequence
Atrogin-1	Forward	5'- AAGGCTGTTGGAGCTGATAGCA -3'
	Reverse	5'- CACCCACATGTTAATGTTGCC -3'
MuRF1	Forward	5'- TGTCTCACGTGTGAGGTGCCTA -3'
	Reverse	5'- CACCAGCATGGAGATGCAGTTAC -3'
18s	Forward	5'- CTCAACACGGGA AACCTCAC -3'
	Reverse	5'- CGCTCCACCAACTAAGAACG -3'

○ 실험 결과

- 두충 추출물(EU)은 DEX 처리에 의해 증가한 Atrogin-1과 MuRF1 억제 활성 측면에서 저농도에서는 효능을 보였으나 농도가 증가할수록 오히려 효능이 감소되는 경향을 보여 복합물 후보 소재로 적당하지 않았다 (그림 12).

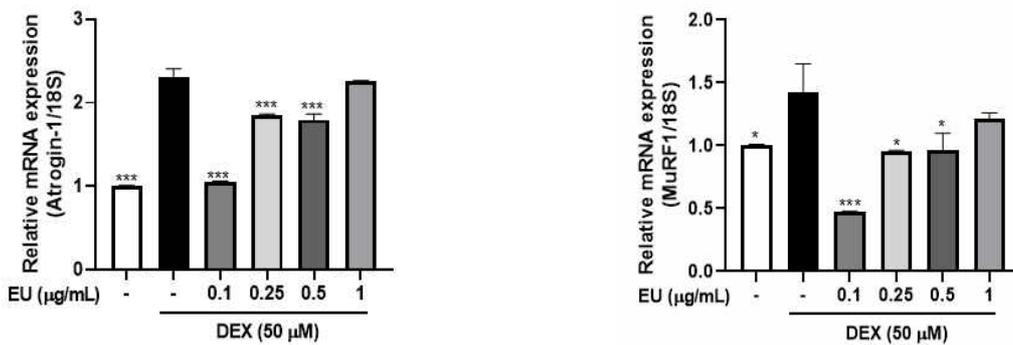


그림 12. 두충 추출물(EU)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

- 인동추출물(LJ)은 DEX 처리에 의해 증가한 Atrogin-1과 MuRF1을 0.1 - 1 μg/mL 농도에서 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타나 복합물 후보 소재로 선정하였다 (그림 13).

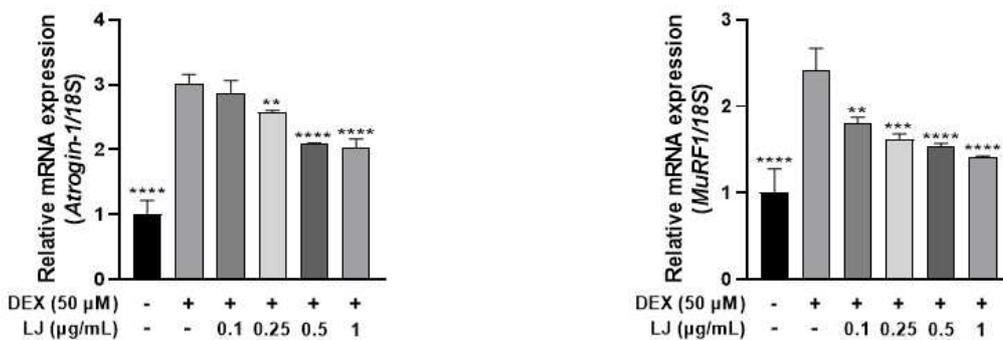


그림 13. 인동 추출물(LJ)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

- 천궁 추출물(CO)은 DEX 처리에 의해 증가한 Atrogin-1과 MuRF1을 0.1 및 0.25 농도에서는 오히려 근위축 마커를 증가시켰으며 1 μg/mL 농도에서만 유의적으로 발현을 감소시켜 복합물 후보 소재에서 제외하였다 (그림 14).

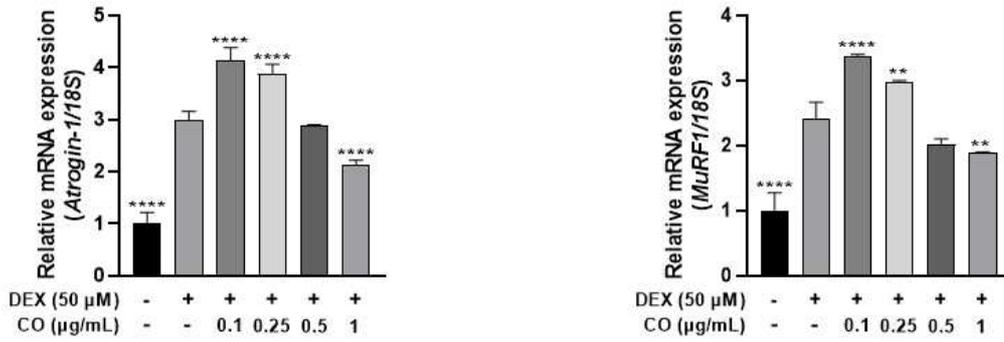


그림 14. 천궁 추출물(CO)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

- 칩 추출물(PL)은 DEX 처리에 의해 증가한 Atrogin-1의 경우 1에서는 효과가 없었고, 2.5 μg/mL 농도에서만 유의적으로 감소시켰으며 MuRF1의 경우는 1 및 2.5 μg/mL 농도에서 유의적으로 감소시켰다. 다른 후보 소재에 비해 고농도에서 효능을 나타내 복합물 후보 소재에서 제외하였다 (그림 15)

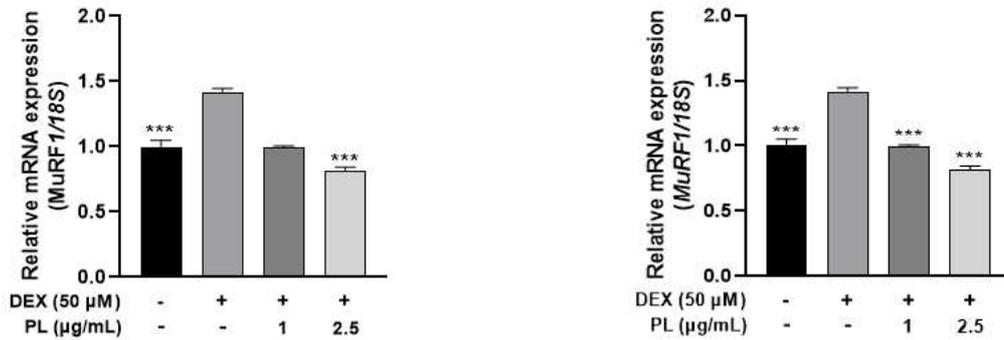


그림 15. 칩 추출물(PL)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

- 천마 추출물(GB)는 DEX 처리에 의해 증가한 Atrogin-1과 MuRF1에 대해 0.1 및 2.5 μg/mL 농도에서는 오히려 유전자 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 1 μg/mL 농도에서만 Atrogin-1 과 MuRF1의 발현을 모두 유의적으로 억제하여, 복합물 후보 소재에서 제외하였다 (그림 16).

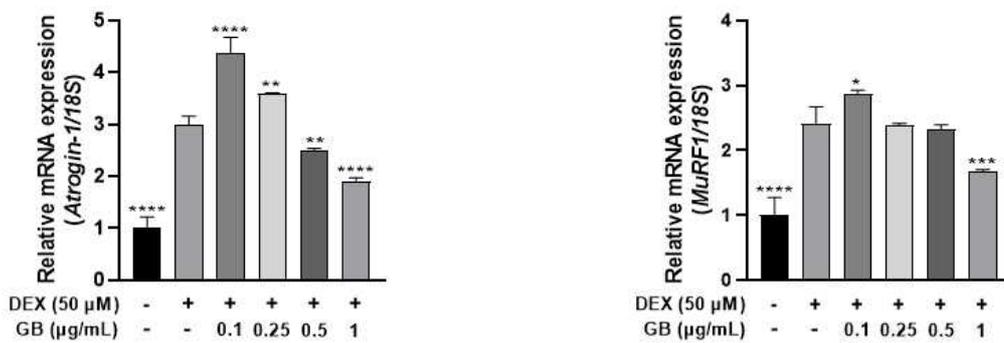


그림 16. 천마 추출물(GB)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

- (3) 혼합 비율에 따른 상승효과 측정
 - (가) 지초 표준 추출물의 근세포 위축 억제 활성
 - 실험 방법

- 세포 독성 평가를 위해 C2C12 세포를 96 well plate에 1×10^4 /well로 seeding하고, 24시간 후 지초 표준 추출물(DGL)을 최종 농도 0.1 - 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 다양한 농도로 처리하였다. 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 반응시킨 후 MTT solution (5 mg in PBS)을 1/10 volume으로 처리하였다. 4시간 반응 후 배지를 완전히 제거한 뒤 DMSO 200 μL 를 넣고 1분간 shaking하였다. 570 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.
- 근세포 위축 억제 활성 평가를 위해 C2C12 세포를 6 well plate에 4×10^5 /well로 seeding하였다. Confluency 100%가 되면 2% HS, 1% PS가 첨가된 High glucose DMEM 배지로 4일 동안 매일 배지를 바꿔주며 myotube 분화를 유도하였다. 분화 4일차에 DGL과 근위축을 유발하는 DEX 50 μM 을 24시간 처리 후 근위축 바이오마커인 Atrogin-1과 MuRF1의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

○ 실험결과

- DGL의 세포 독성 측정 결과, 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 활성을 다소 증가시켰다 (그림 17).

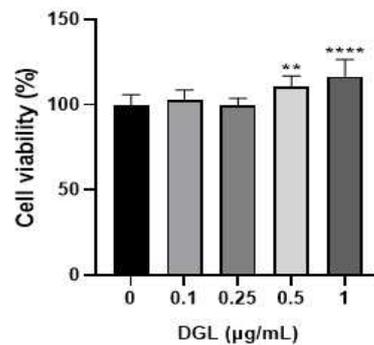


그림 17. 지초표준추출물의 세포 독성

- DGL의 근육세포 위축에 미치는 영향을 측정한 결과, DGL 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 은 MuRF1 발현만 유의적으로 감소시켰으나, 0.25 - 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 Atrogin-1 및 MuRF1 두 유전자 발현 증가를 동시에 효과적으로 억제하였다 (그림 18).

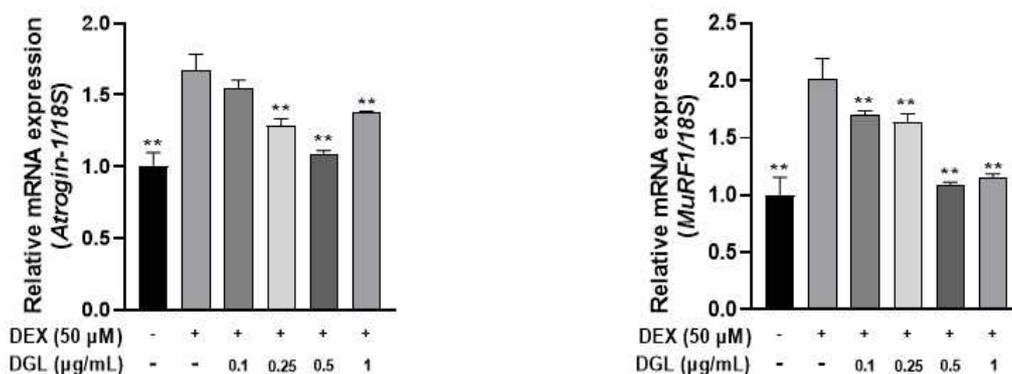


그림 18. 지초표준추출물이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

(나) 지초표준추출물의 근위축 마커 억제 IC50

- DGL의 대표적 근위축 마커 2종인 Atrogin-1 및 MuRF1의 발현 억제 활성의 IC50 측정 결과, Atrogin-1의 경우 0.44 $\mu\text{g/mL}$, MuRF1의 경우 0.34 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다 (그림 19).

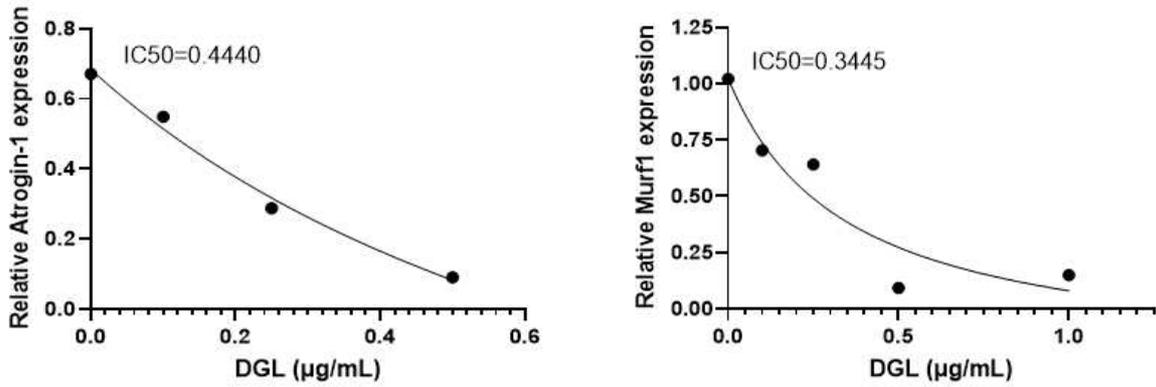


그림 9. 지초표준추출물의 근위축 마커 억제 IC50

(다) 혼합 비율에 따른 근위축 마커 억제 활성 비교

○ 지초 표준 추출물과 인동의 1:1 조합

- DGL과 LJ를 1:1로 0.125 - 1 µg/mL의 농도로 혼합한 복합물(Cx)의 활성과 DGL 또는 LJ 단독 투여군의 활성과 비교하였다. 실험 처리군 구성은 표 7과 같다.

표 7. 지초 표준 추출물과 인동의 1:1 복합물 조성

	DGL	LJ
DGL	0.125	
	0.25	
	0.5	
	1	
LJ		0.125
		0.25
		0.5
		1
DGL+LJ (Cx)	0.125	0.125
	0.25	0.25
	0.5	0.5
	1	1

○ 1:1 지초복합물(Cx)의 근위축 마커 억제 활성

- DGL과 LJ 단독 투여 시 DEX에 의한 근위축 마커인 Atrogin-1과 MuRF1의 상승을 효과적으로 억제하였다. DGL과 LJ를 1:1로 혼합한 Cx의 경우 0.125 - 1 µg/mL의 농도에서 근위축 마커인 Atrogin-1과 MuRF1의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다 (그림 20).

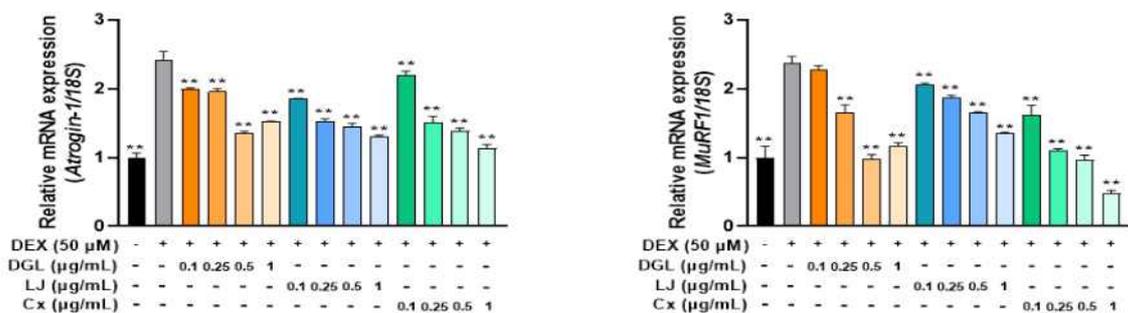


그림 20. 지초복합물(Cx)이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

○ 1:1 지초복합물의 근위축 개선 상승효과

- 복합물의 상승효과를 검증하는 방법으로 콜비식(COLBY S. R., Calculating synergistic and antagonistic response of herbicide combinations, Weeds 15, 20-22, 1967)을 이용하였다 (그림 21).

$$E = X + Y - \frac{X \cdot Y}{100}$$

X = 활성 화합물 A 적용시 비처리 대조군에 대한 효율(%)
 Y = 활성 화합물 B 적용시 비처리 대조군에 대한 효율(%)
 E = A+B 복합물 적용시 대조군에 대한 효율(%)로 계산될 수 있다.
 복합물이 E값을 초과하는 경우 상승효과로 인정된다.

그림 21. 복합물의 상승효과 검증을 위한 콜비식

- 1:1 Cx의 상승효과 유무를 평가하기 위해 DGJ 및 LJ 단독 투여시의 Atrogin-1 또는 MuRF1의 억제 활성 효율을 %로 계산한 후 1:1 Cx의 Atrogin-1 또는 MuRF1의 억제 활성 효율 %와 비교하였다.
- 표 5에서 나타낸 바와 같이, Atrogin-1의 경우 1:1 Cx 1 μ g/mL 처리군에서 90.12%로 E값인 92.13% 와 유사한 값으로 나타났으나 상승효과는 관찰되지 않았다 (표 8).

표 8. 1:1 Cx의 Atrogin-1 억제 효과 비교

Atrogin-1				
μ g/mL	0.125	0.25	0.5	1
DGL	29.79	32.88	74.66	63.62
LJ	40.09	63.01	68.54	78.36
E	57.94	75.17	92.03	92.13
1:1 Cx	15.46	64.18	73.40	90.12

- 다음으로 1:1 Cx의 MuRF1 억제에 대한 상승효과를 계산해 본 결과, 1:1 Cx 1 μ g/mL 처리군에서 136.3%로 E값인 97.05%보다 크게 증가하는 것으로 나타났다(표 9). 따라서 DGL과 LJ를 1:1로 혼합한 복합물은 각각을 1 μ g/mL씩 혼합한 농도에서 상승효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

표 9. 1:1 Cx의 MuRF1 억제 효과 비교

MuRF1				
μ g/mL	0.125	0.25	0.5	1
DGL	10.81	54.25	101.24	88.17
LJ	25.79	38.67	54.26	75.10
E	33.81	71.94	100.57	97.05
1:1 Cx	56.09	92.29	102.24	136.30

○ IC50 고려한 지초복합물의 근위축 개선 효능 평가

- MuRF1에 대한 DGL의 IC50을 고려하여 DGL과 LJ의 혼합물을 표 10과 같이 제조하였다.

표 10. DGL의 IC50을 고려한 복합물 제조

	DGL	LJ
IC50 고려한 Cx	0.3	0.3
	0.2	0.1
	0.1	0.2
	0	0.3

- 그 결과 DGL 단독 투여군에 비해 LJ 단독 또는 Cx 에서 근위축 마커 억제 활성이 떨어지는 것으로 관찰되었다 (그림 22).
- 이상의 결과에 따라, 지초 복합물의 최적 비율은 DGL : LJ = 1:1로 도출되었다.

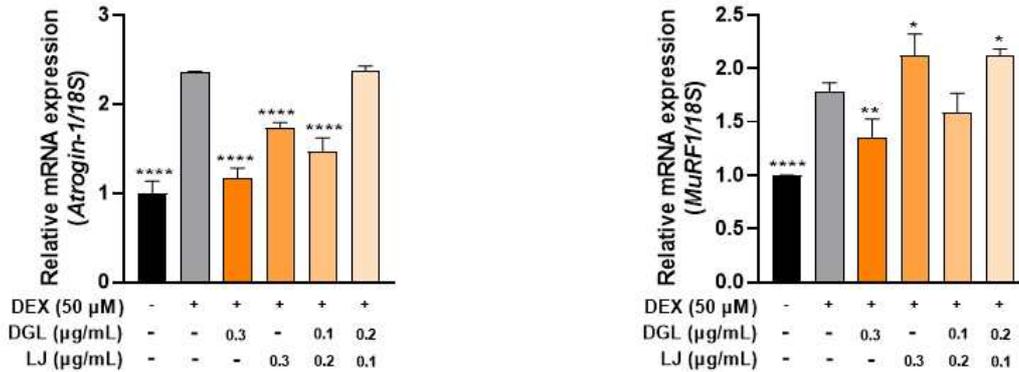


그림 22. IC50 고려한 지초복합물이 근위축 마커 발현에 미치는 영향

(4) 지초복합물(Cx)의 근기능 개선 효능 평가

(가) 지초복합물의 근세포 위축 개선 활성 검증

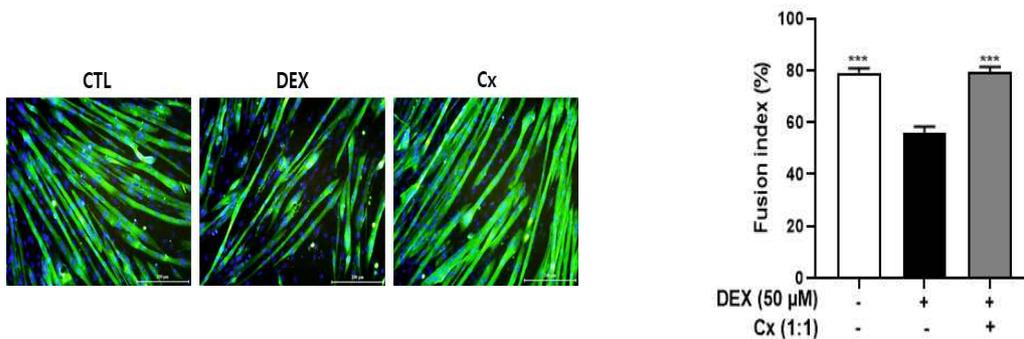
○ 실험방법

- 마우스 myoblast 세포주인 C2C12 세포를 10% FBS, 1% PS 첨가 된 High glucose DMEM 배지로 37°C, 5% CO2 incubator에서 배양하였다. 근세포 위축 개선 활성 평가를 위해 C2C12 세포를 6 well plate에 4x10⁵/well로 seeding하였다. Confluency 100%가 되면 2% HS, 1% PS 첨가된 High glucose DMEM 배지로 4일 동안 매일 배지를 바꿔주며 myotube분화를 유도하였다. 분화 4일차에 지초복합물 (2 μg/mL)와 근위축을 유발하는 DEX 50 μM을 24시간 처리하였다. 24시간 후 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 및 phenotype 확인을 위한 IF stain을 진행하여 확인하였다.
- IF stain은 다음 순서로 진행하였다. 배지를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 4% 포르말린 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 차가운 메탄올 용액을 1 mL 넣고 -20°C에서 10분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 0.05% 사포닌 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 1% bovine serum albumin (BSA) 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 1차 total myosin heavy chain (T-MHC) antibody (1:200 in 1% BSA 용액)를 1 mL 넣고 4°C에서 오버나잇(overnight)하였다. 1차 항체를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척한 뒤, 2차 Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:500 in 1% BSA 용액)를 넣고 상온에서 60분 반응하였다. 2차 항체를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척한 뒤, 4',6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI, 1:10000 in PBS) 용액을 넣고 1분간 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 3번 세척 후 건조 시킨 후 현미경 관찰하였다.

- 또한, 근위축 개선 활성 검증을 위해 T-MHC, MHC I, MHC II α , MHC II β , β -actin의 단백질 발현량을 western blot을 통해 확인하였다.

○ 실험결과

- 지초와 인동을 각각 1 μ g/mL로 혼합한 Cx가 DEX 유도 근위축에 미치는 영향을 측정 한 결과, Cx는 DEX에 의한 근육세포 위축을 효과적으로 억제하였다(그림 13, 좌). Fusion index의 경우 DEX 처리에 의해 대조군 79.11%에서 DEX 처리 55.95%로 23.16% 감소하였으나 Cx 처리에 의해 다시 79.28%까지 회복되었다 (그림 23, 우).
- Cx는 또한 DEX에 의한 T-MHC, MHCIIa, 및 MHCIIb의 감소도 억제하는 활성이 있는 것으로 관찰되었다 (그림 24).



(좌)면역형광염색 현미경 관찰 사진

(우)Fusion index

그림 23. Cx의 근육세포 위축 개선 효능

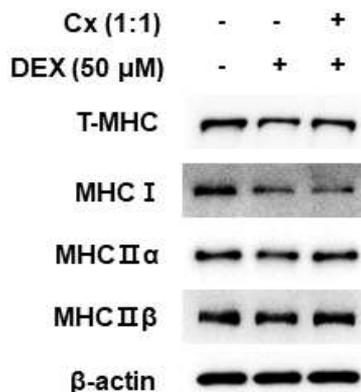


그림 24. Cx가 MHC 발현에 미치는 영향

(나) 지초 복합물의 근세포 분화 증진능 검증

○ 실험방법

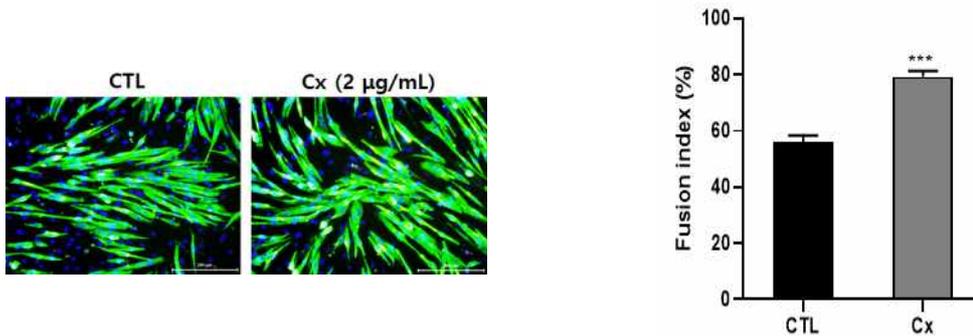
- 마우스 myoblast 세포주인 C2C12 세포를 10% FBS, 1% PS 첨가 된 High glucose DMEM 배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 근세포 위축 개선 활성 평가를 위해 C2C12 세포를 6 well plate에 4x10⁵/well로 seeding하였다. Confluency 100%가 되면 2% HS, 1% PS 첨가된 High glucose DMEM 배지로 2일 동안 매일 배지를 바꿔주며 myotube분화를 유도하였다. 이 때, 복합물을 2 μ g/mL 농도로 함께 처리하였다. 분화 유도 2일째 phenotype 확인을 위한 IF stain과 근세포 분화 증진 바이오마커인 MyoG와 MyoD의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. Myogenin (MyoG)와 myoblast determination protein 1 (MyoD)의 프라이머(primer) 정보는 표 11과 같다.

표 11. Primer sequence 정보

Gene		Primer Sequence
MyoG	Forward	5'- GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC -3'
	Reverse	5'- CCACGATGGACGTAAGGGAG -3'
MyoD	Forward	5'- CCGTGTTCGACTCACCAGA -3'
	Reverse	5'- GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC -3'
18s	Forward	5'- CTCAACACGGGA AACCTCAC -3'
	Reverse	5'- CGCTCCACCAACTAAGAACG -3'

○ 실험방법

- Cx은 C2C12 myoblast의 분화를 촉진시켜 fusion index를 55.95%에서 79.28%로 141% 증가시켰다 (그림 25).
- 또한 근육세포 분화 조절인자인 MyoG와 MyoD의 발현도 대조군에 비해 각각 196%와 141% 증가시켰다 (그림 26).



(좌)면역형광염색 현미경 관찰 사진 (우)Fusion index
그림 25. Cx의 근육세포 분화 증진 효능

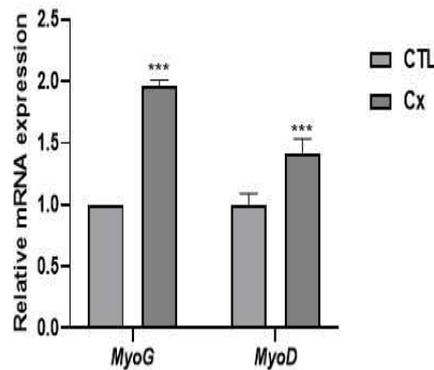


그림 26. 근육세포 분화 마커 mRNA 발현

(다) 지초 복합물의 근육 기능 개선 효능 평가

- *In vitro* 실험을 통해 근육세포 위축 개선 및 근육세포 분화 증진 활성이 검증된 Cx의 근력 개선 효능 검증을 위한 동물실험계획서를 작성하고 IACUC 승인을 완료하였다 (그림 27). 승인받은 계획서대로 2차년도에 Cx의 근력 개선 효능 평가를 수행할 계획이다.

한국식품연구원 IACUC 동물실험계획 승인서

1. 연구책임자

책임자명	안지윤
소속/직위	한국식품연구원/책임급
휴대전화 (유선전화)	
E-mail	
교육이수 번호	IACUCE2021-017

2. 동물실험계획서

접수번호	2021-0073
과제명 (한국)	지초복합물 활용 근건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발
과제명 (영문)	Development of muscle health functional food using Lithospermum erythrorhizon complex
실험기간	2021-12-23~2022-12-21
사용 동물종류	Mouse male 100마리
통증 및 스트레스정도	Grade D

3. 승인사항

심의일자	2021-12-23
승인일자	2021-12-23
승인번호	KFRI-M-21064

동물실험윤리위원회에서는 상기의 동물실험계획을 승인합니다.

발급일: 2021-12-23

동물실험윤리위원회 위원장

그림 27. IACUC 동물실험계획 승인서

(5) 지초 복합물의 근육 건강 조절 활성 평가

(가) 지초 복합물의 근위축 개선 활성 검증

- 지초복합물의 근위축 개선 효능을 검증하기 위해 C57BL/6 마우스를 이용하여 DEX 투여에 의한 근위축 개선 효능평가를 하였다. 5주령의 C57BL/6 마우스를 일주일간 적응을 시킨 뒤, 10주간 실험 식이를 급여하였다. 실험 식이는 AIN-93M diet 조성에 의거하여 조제하였으며, 실험군은 정상 마우스군(Con), DEX 투여군(Dexa), DEX을 투여하면서 농도별 지초복합물 첨가 식이군(0.1%, 0.2% 지초복합물 첨가, C1, C2로 각각 표시)로 나누어 실험하였다. 실험종료 38일 전부터는 DEX를 15 mg/kg/day 농도로 복강 내 주사하여 근위축을 유도하였으며, Con군은 같은 용량의 주사용수를 주사하였다. 모든 동물은 온도 23±1℃, 습도 50±1% 내외, 그리고 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 사육되었고, 실험기간 동안 실험동물의 체중은 주 1회 일정한 시간에 측정하였고, 식이 섭취량은 이틀마다 측정하였다. 실험사육이 완료되는 시점에 혈액 및 근육조직을 채취하여 무게를 측정하였고 분석 시까지 -80℃에 보관하였다.

(나) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 신체 근육량에 미치는 효과

○ 실험방법

- 사육 마지막 주차에 체성분을 측정하였다. 측정 중 움직임을 방지하기 위해 마우스를 2% isoflurane로 마취시켰으며 dual energy X-ray absorptiometry를 사용하는 InAlyzer를 사용하여 이미지를 스캔하고 조직 내 지방(%) 혹은 제지방 무게(%)를 측정하였다.

○ 실험결과

- Con군과 Dexa군과의 제지방 무게(%)에는 유의적 차이를 보이지 않았지만 C1군 및 C2

군에서는 Dexa군에 비해 제지방 무게(%)가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(그림 28).

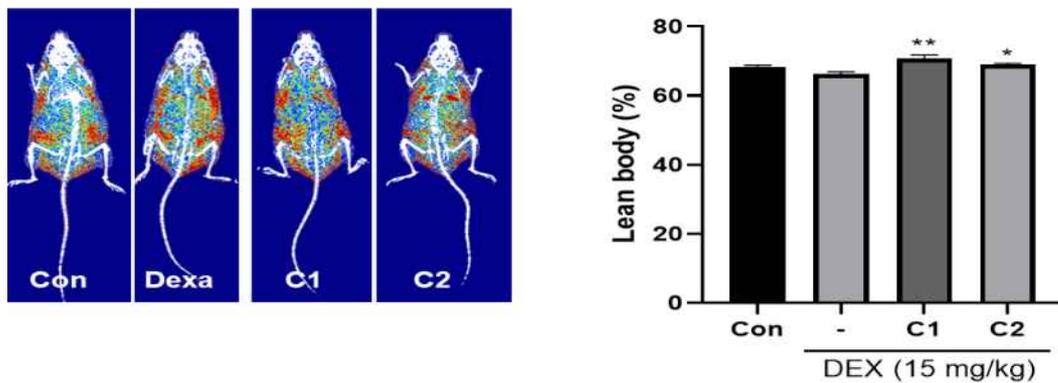


그림 28. 지초복합물의 체질량 증진 효과

(다) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 근력 및 운동수행능에 미치는 효과

○ 실험방법

- 마우스용 악력측정기를 사용하여 사육 마지막 주차에 마우스의 악력(grip strength test)을 측정하였다. 구체적으로, 힘의 세기를 모니터링 할 수 있는 계기판이 부착된 철망 위에 마우스의 발을 올려놓고 꼬리를 잡아 뒤 쪽으로 끌어당기면서 마우스가 철망을 잡는 힘을 측정하였다. 테스트는 연속적으로 5회 측정하였으며, 가장 높은 값과 작은 값을 빼 평균으로 계산하였다. 실험결과를 표준화하기 위하여 악력을 체중으로 나누어 계산하였다.
- 마우스의 근지구력을 측정하기 위하여 마우스 전용 트레드밀(treadmill test)기기를 사용하여 사육 마지막 주차에 달리기를 한 시간 및 거리를 측정하였다. 마우스용 treadmill에 총 이틀 동안 연습을 시킨 후 본 실험을 진행하였다. 연습 첫째 날은 경사로 없이 5 m/min 속도로 10분간 시켰으며, 두 번째 날에는 5° 경사도에서 5 m/min 속도로 10분간 연습을 시켰다. 본 실험 날에는 5° 경사도에서 5 m/min 속도로 시작하여 5분간 달리게 한 뒤 2분마다 2 m/min씩 속도를 증가시켰고, 최대 20분을 넘기지 않았다. 최대 운동 수행 능은 운동을 멈춘 후 그리드(grid)에 10초 이상 머무를 때까지의 달린 시간 및 거리로 환산하였다.

○ 실험결과

- 제지방 무게(%) 뿐만 아니라 근력을 확인해보기 위해 악력 및 달리기 검사를 수행하였다. 사육 10주차에 악력 및 달리기 검사를 수행한 결과 Con군에 비해 Dexa군에서 유의적으로 악력 및 달리기 검사 시간 및 거리가 감소한 것을 확인하였다. 반면에 지초복합물을 섭취한 마우스를 대상으로 순간적으로 잡아당기는 최대 힘을 측정하는 악력을 측정한 결과 Dexa군의 악력에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한 마우스의 근지구력을 측정하기 위하여 달리기를 한 시간(min) 및 거리(m)를 측정한 결과에서는 지초복합물군에서 Dexa군에 비해 시간 및 거리 모두 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 지초복합물군의 텍사메타손으로 인한 근력감소 억제 효과가 있음을 확인하였다 (그림 29).

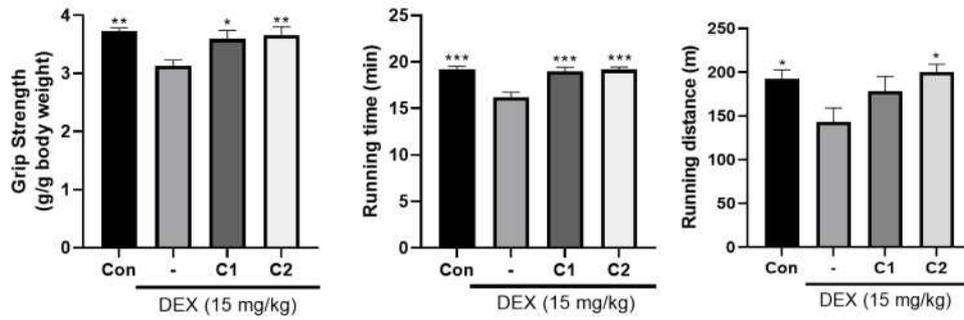


그림 29. 지초복합물의 근력 및 운동수행능 증진 효과

(라) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 단면적 변화 개선 효과

○ 실험방법

- 근섬유 단면적(CSA)을 측정하기 위해 비복근을 Tissue-Tek OCT compound을 이용하여 고정하고 액체질소에서 급속 동결한 다음 -80°C 에서 보관하였다. 실험 당일에 -20°C cryo - microtome을 사용하여 동결된 조직 블록을 $7\ \mu\text{m}$ 의 섹션으로 절단하고 슬라이드에 올렸다. 조직 절편은 차가운 20% 아세톤으로 20분 동안 고정하고 실온에서 10% FBS로 1시간동안 blocking 한 뒤 1차 항체인 laminin을 4°C 에서 오버나잇(overnight), 2차 항체인 Alexa Fluro 488 goat anti-rabbit IgG를 상온에서 30분 동안 부착하였다. 조직을 PBS로 2회 세척한 후 fluoroshield를 이용해 커버글라스를 장착하였다. 염색된 조직의 이미지는 공초점 현미경(Digital Eclipse C1 plus, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 얻었다.

○ 실험결과

- 지초복합물에 의한 근육량 증대 효과를 확인하기 위해 Con군, Dexa군, C1군, C2군에 해당하는 근섬유의 단면적 크기를 확인하였다. 그 결과, 마우스의 근육조직을 염색하여 근섬유 크기를 분석한 결과, Con군에 비하여 Dexa군에서는 근섬유 단면적의 크기가 감소하는 것을 확인하였다. 반면에 C1군 및 C2군에서는 Dexa군에 비해서 근섬유 단면적의 크기가 증가하는 것을 확인하였다 (그림 30).

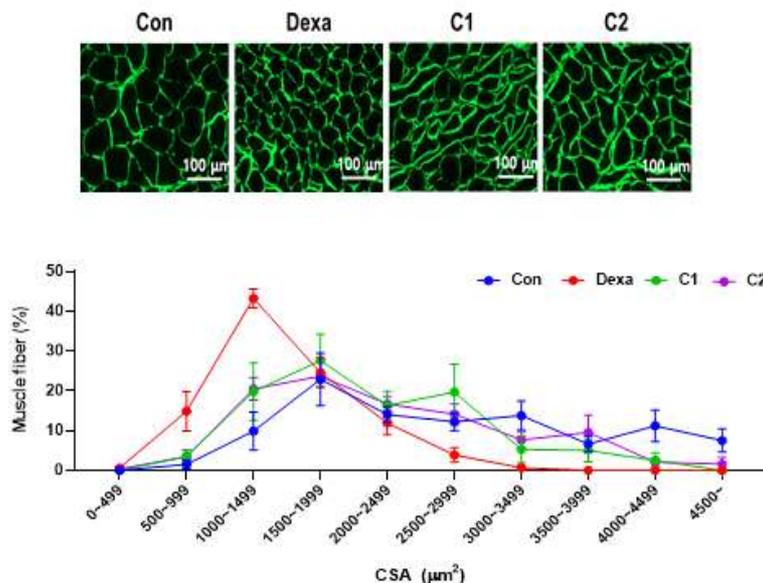


그림 30. 지초복합물의 근섬유 크기 증가 효과

(마) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 근육 무게에 미치는 효과

○ DEX 투여로 인한 근손실을 확인하기 위하여 체중으로 보정한 근육무게를 확인해본 결과, Con군에 비해 Dexa군에서 대부분의 골격근들(전경골근(tibialis anterior), 장지신근(extensor digitorum longus), 비복근(gastrocnemius), 대퇴사두근(quadriceps), 삼두박근(triceps))이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 그에 반해 지초복합물군에서는 텍사메타손에 의한 근육무게 감소가 완화되는 것을 확인하였는데, 특히 대퇴사두근(quadricpt)에서 보이는 것을 확인하였다 (그림 31).

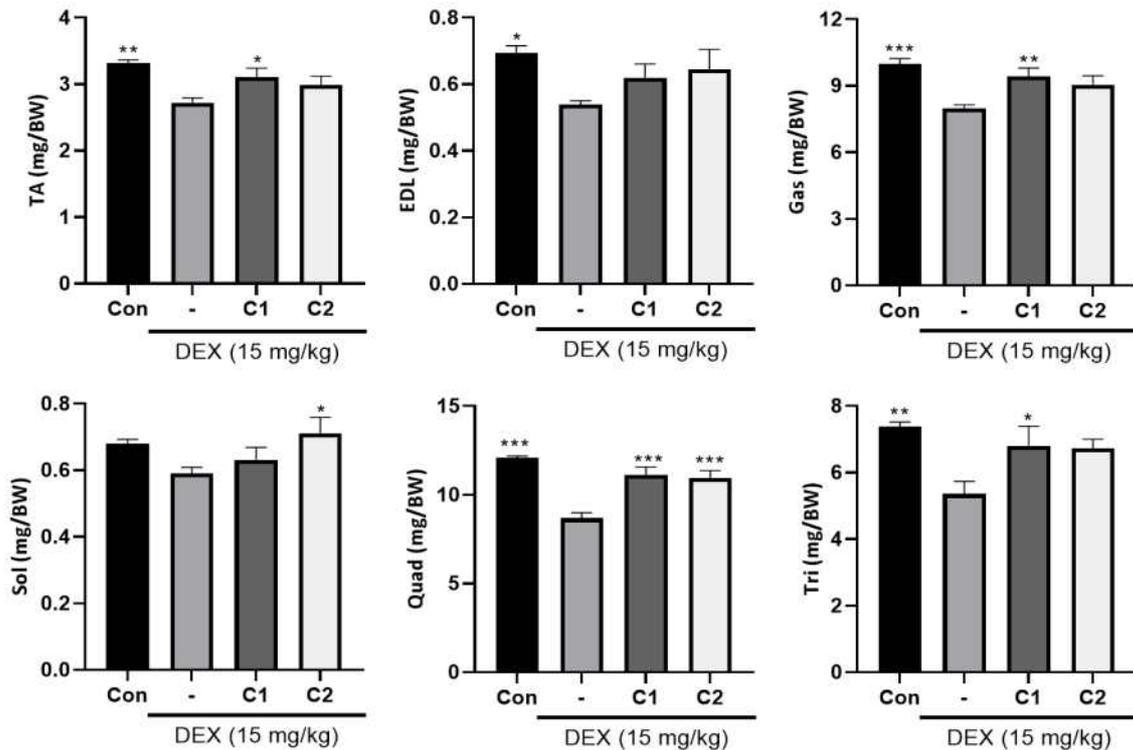


그림 31. 지초복합물의 근육무게 증가 효과

(바) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 근위축 개선 효과

○ 실험방법

- 근육조직을 RIPA 완충액으로 용해하여 단백질을 추출한 후, SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 이후 단백질이 옮겨진 멤브레인(membrane)을 5% 스킴 밀크(skim milk)로 1시간 동안 blocking하였고, 1차 항체를 4°C 에서 오버나잇(overnight), 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 부착한 후 증강 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 용액을 이용하여 단백질의 발현(western blot)을 측정하였다.

○ 실험결과

- 근육 단백질 분해 관련 마커인 Myostatin, Atrogin-1, MuRF1의 단백질 발현 정도를 확인해보았다. 그 결과, DEX 투여는 Con군에 비해 Myostatin 및 MuRF1이 유의적으로 증가한 것을 확인하였고, 지초복합물군에서는 Dexa군에서 비해서 Myostatin, Atrogin-1, MuRF1 모두 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 지초복합물군이 텍사메타손에 의한 근위축 개선 효과가 있음을 확인하였다 (그림 32).

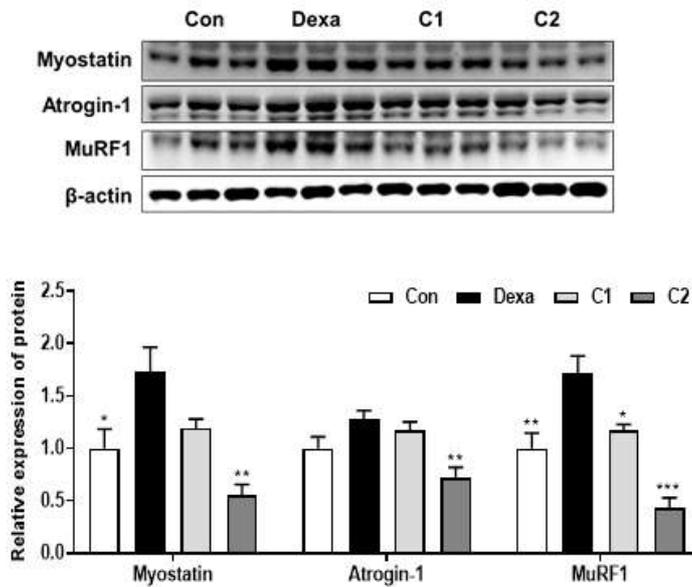


그림 32. 지초복합물의 근위축 관련 마커 억제 효과

(사) 지초복합물의 테사메타손으로 인한 myosin heavy chain 발현 변화

- 지초복합물을 섭취한 마우스군에서 Dexa군에 비해 근육관련 단백질인 Total MHC, MHC I, IIa, IIb의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 33).

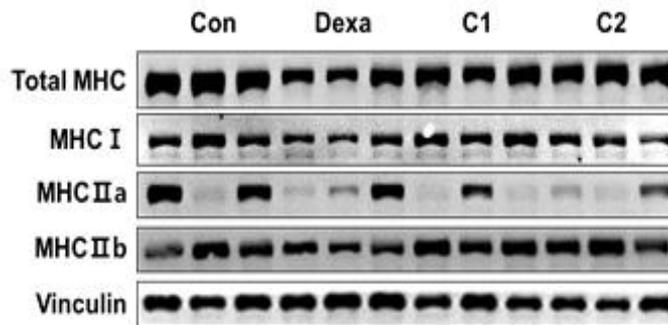


그림 33. 지초복합물의 MHC 단백질 발현 조절 결과

(6) 지초복합물의 *C. elegans* 활용 노화성 근감소 개선 효능 검증

(가) 근육노화 관련 운동성 테스트

- 실험방법

- 지초복합물의 노화성 근육 운동 감소에 미치는 영향을 평가하기 위해서 *C. elegans*를 배양하는 nematode growth medium (NGM) 배지에 지초복합물을 처리하고, *C. elegans*를 control NGM 배지와 지초복합물 처리 NGM 배지에서 각각 성장시켰다. 이후, 근육 노화가 발생하는 시기에(Adult 8 day), control group과 지초복합물 처리 group간의 운동 능력을 비교 분석하였다. 운동능력은 M9 buffer (liquid 상태)에서 10초간의 body bending 수로 측정하였다.

- 실험결과

- 지초복합물의 노화성 근육운동능력 감소에 미치는 영향을 평가하기 위해 *C. elegans* 모델을 활용하여 지초복합물군의 운동성 영향을 평가한 결과, 그림 34A와 같이 두 그

룹간의 전체 운동성에서는 통계적으로 not significant (n.s) 차이가 나타났지만, 운동기능이 완전히 상실된 경우를 비교해 보면, 대조군에서 복합물 그룹보다 운동기능상실률이 더 높게 관찰되었다(그림 34B). 이러한 결과는 독립적인 다른 실험 세트에서도 재현성 있게 관찰되었다. 이를 통해, 지초복합물 처리가 *C. elegans*의 근육노화를 늦추는 효과가 있음을 확인하였다.

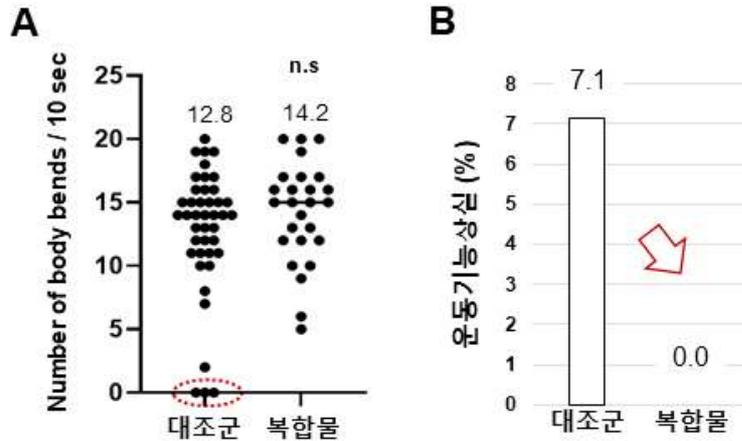


그림 34. 지초복합물의 *C. elegans* 근육노화 억제 효과

(나) 수명 측정 실험

○ 실험방법

- 지초복합물이 근육노화에 미치는 영향 외에도 수명에 미치는 영향을 평가하기 위해서 *C. elegans*를 배양하는 NGM 배지에 지초복합물을 처리하고, *C. elegans*를 control NGM 배지와 지초복합물 처리 NGM 배지에서 각각 성장시켰다. 이후, *C. elegans*의 수명을 관찰하였다. *C. elegans*의 죽음을 확인하기 위해서, 백금선을 이용하여 *C. elegans*를 건드려보고 움직임이 없는 경우 죽었다고 관찰하였다. Internal hatching이나 배지의 벽을 타고 죽은 경우들은 자연사의 경우에서 배제하였다. 수명 측정은 20도 조건에서 진행되었다.

○ 실험결과

- 지초복합물이 *C. elegans*의 수명길이에 미치는 영향을 평가하기 위해 대조군과 지초복합물 처리 그룹간의 생존율을 평가한 결과, 그림 35와 같이, 지초복합물 처리군이 대조군에 비해 약 20%의 평균 수명이 증가한 것을 확인하였다.

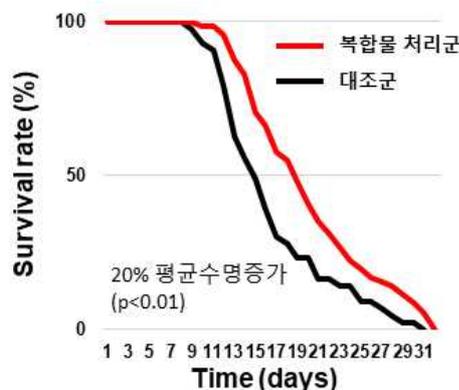


그림 35. 지초복합물의 *C. elegans* 수명 증진 효과

(7) 지초 복합물의 근위축 개선 기전 구명

(가) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 glucocorticoid receptor 및 forkhead box protein O3 단백질의 발현 변화

- DEX의 투여가 glucocorticoid receptor (GR)을 세포질에서 핵으로 전위시키는지의 여부를 조사하기 위해 마우스의 근육 조직에서 핵과 세포질을 분리하여 이용하였다. Dexa 군은 Con군에 비해 핵으로의 GR 단백질 전위가 증가하는 것을 확인하였고, 지초복합물 군에서는 텍사메타손 투여군에 비해 감소하는 것을 확인하였다. 또한 텍사메타손 투여에 의해서 핵 내의 forkhead box protein O3 (FoxO3) 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 지초복합물군에서는 Dexa군에 비해 FoxO3 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(그림 36).

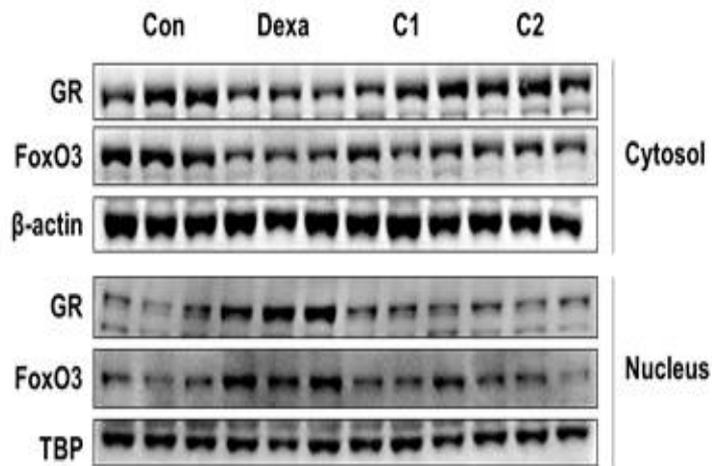


그림 36. 지초복합물의 glucocorticoid receptor 및 FoxO3의 핵내 이동 억제 효과

(나) 지초복합물의 텍사메타손으로 인한 단백질 대사 장애 개선효과

- 단백질 합성능을 측정하기 위해 puromycin을 사용하는 SUnSET assay를 수행하였다. Puromycin 처리는 전체 단백질 합성 속도를 반영하게 되는데, 지초복합물 처리는 puromycin 및 텍사메타손 처리에 비해 단백질 합성률을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 37).

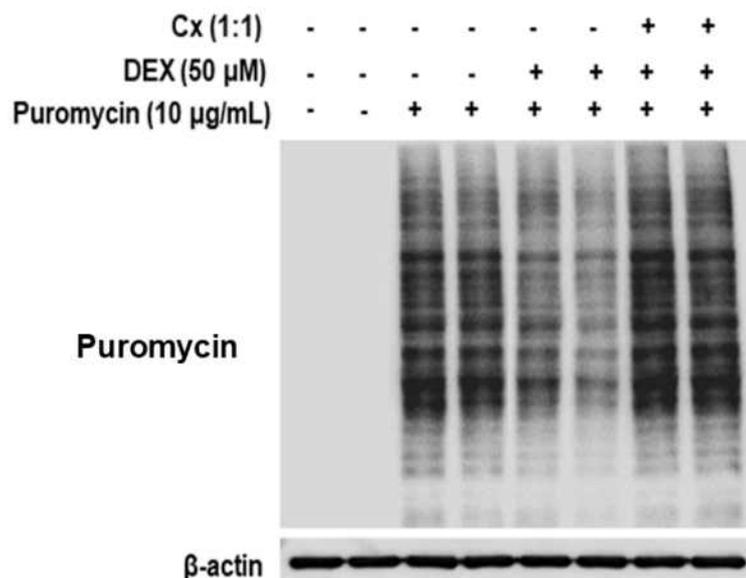


그림 37. 지초복합물의 단백질 생성 증진 효과

- 또한 근육단백질 합성에 관여하는 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K) 및 eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1)의 인산화 및 그의 상위에 있다고 알려진 the mammalian target of rapamycin (mTOR) 및 Akt의 인산화 정도를 확인해본 결과, Dexa군에서 Con군에 비해 mTOR, Akt, S6K 및 4EBP1의 인산화가 감소하는 반면 지초복합물군에서는 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 지초복합물은 단백질 합성인자를 활성화시켜 근육의 비대(hypertrophy)를 유도하는 것으로 판단할 수 있었다 (그림 38).

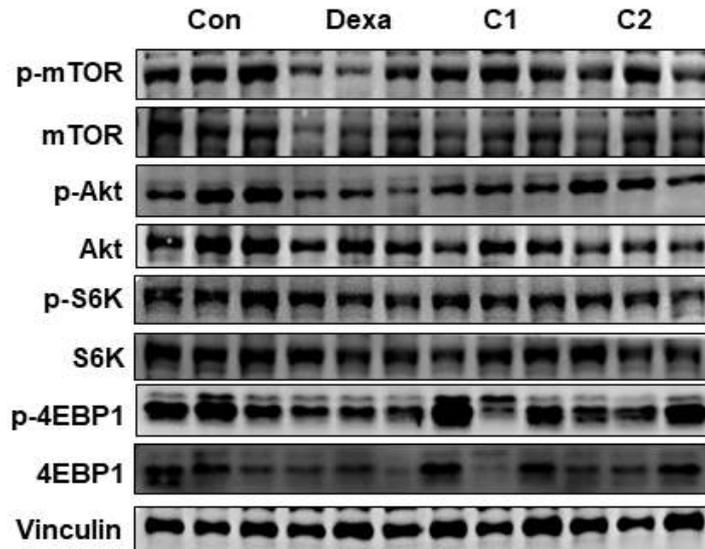


그림 38. 지초복합물의 mTOR 신호 조절 통한 단백질 합성 증진 효과

(8) 지표/기능성분의 근육 건강 개선 효능 평가

(가) 지표/기능성분의 근위축 개선 활성 측정

○ 실험방법

- 지초복합물 추출물에서 loganin 및 lithospermic acid (LA)의 함량은 C18 분석 컬럼(250 x 4.6mm I.D. 5 μ m, YMC, Kyoto, Japan)을 갖춘 Agilent 1200 series HPLC 시스템 (Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. Loganin 및 lithospermic acid의 흡광도는 diode array detector (Agilent Technologies)를 사용하여 각각 254 nm와 312 nm에서 측정하였다. Loganin의 경우, H₂O에 0.1% 포름산으로 구성된 용매 A와 아세트니트릴에 0.1% 포름산으로 구성된 용매B를 이동상으로 사용하였다. Gradient 프로그램은 처음 5분 동안 85:15의 등용매 A/B 비율로 시작하여 10분까지 82:18의 A/B 비율로 전환되었으며 10 - 15분 동안 이 비율로 유지되었다. 이 단계 후에 기울기는 15 - 25분에서 80:20의 A/B 비율로 이동한 다음 35분까지 30:70의 A/B 비율로 전환하고 35 - 40분에서 이 비율을 유지하였다. 그 후, 기울기는 40 - 45분에서 85:15의 A/B 비율로 다시 이동하고 50분까지 안정적으로 유지되었다. Lithospermic acid의 경우 H₂O에 0.1% 포름산으로 구성된 용매 A와 아세트니트릴인 용매B를 이동상으로 사용하였다. Gradient 프로그램은 처음 5분 동안 80:20의 등용매 A/B 비율로 시작한 다음 75:25의 A/B 비율로 전환되어 5 - 30분 동안 유지되었다. 이 단계 후에 기울기는 30 - 35분에서 80:20의 A/B 비율로 이동하고 35 - 40분에서는 80:20의 등용매 A/B 비율로 마무리되었다. 두 경우 모두 컬럼 온도는 30° C로 유지되었으며 유속과 주입량은 각각 1 mL/min과 10 μ L로 설정되었다.

○ 실험결과

- 지초복합물에서 생리활성 화합물로 loganin과 lithospermic acid를 확인하였다. Loganin의 경우, 대한약전에 인동추출물의 생리활성물질로 지정되어 있어 본 연구에 활용하였다. 또한 본 실험에서는 지초추출물의 지표성분으로 잘 알려진 주요 색소 성분인 shikonin은 검출되지 않았는데 shikonin은 멸균 온도인 80℃ 이상의 고온에서는 불안정하다고 알려져 있기 때문에 검출되지 않은 것으로 보인다. 따라서 지초복합물의 생리활성 화합물로는 shikonin 유도체 대신 lithospermic acid를 사용하였다. 본 실험 결과, 지초복합물군의 생리활성 화합물인 loganin과 lithospermic acid의 함량은 각각 11.65, 0.5 mg/g으로 측정되었다 (그림 39).

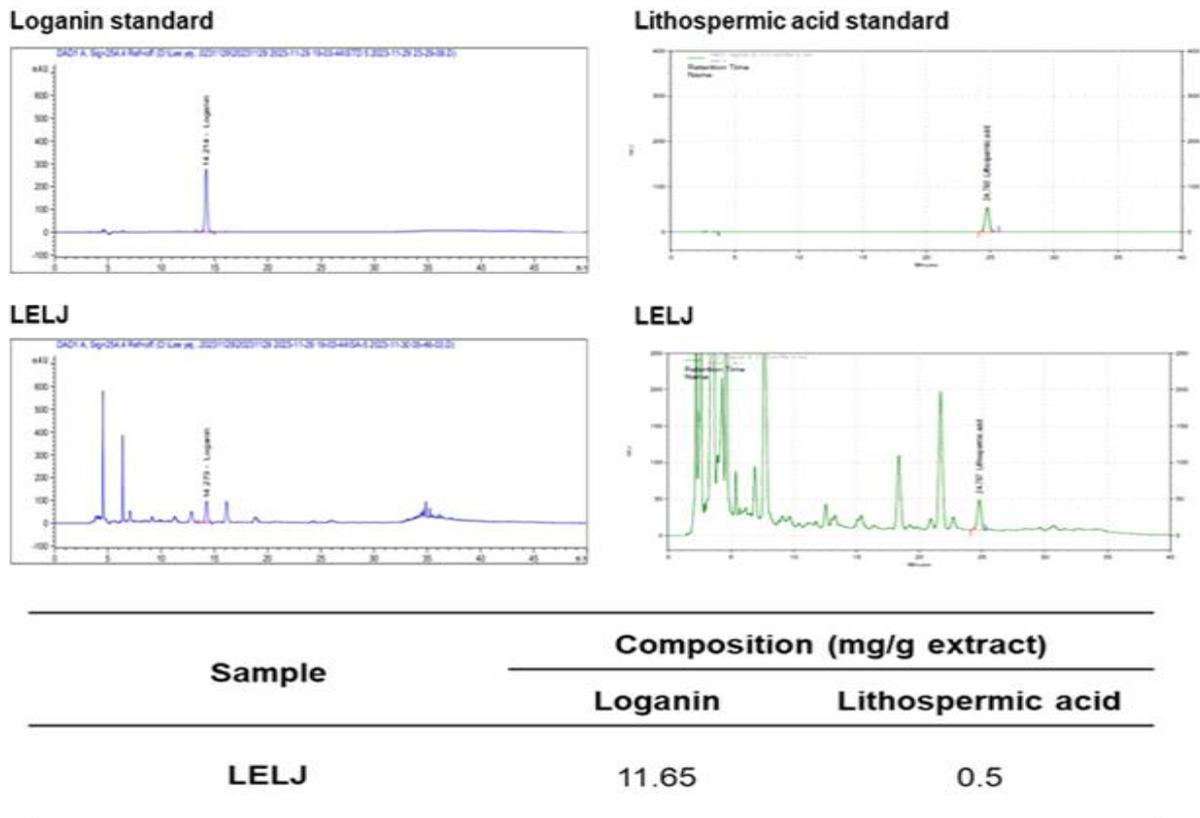


그림 39. 지초복합추출물에서 loganin과 lithospermic acid의 정량적 HPLC 분석

(나) 지표/기능성분의 세포 독성 평가

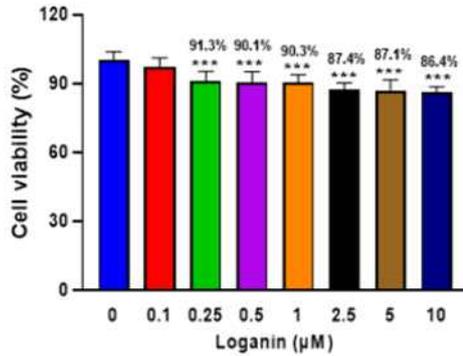
○ 실험방법

- 세포 독성 평가를 위해 C2C12 세포를 96 well plate에 1×10^4 /well로 seeding하고, 24시간 후 loganin과 lithospermic acid의 최종 농도를 0.1 - 10 μ M의 농도로 처리하였다. 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 반응시킨 후 MTT solution (5 mg in PBS)을 1/10 volume으로 처리하였다. 4시간 반응 후 배지를 완전히 제거하고 DMSO 200 μ L를 넣고 1분간 shaking하였다. 570 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

○ 실험결과

- Loganin과 lithospermic acid 모두 0.1 - 10 μ M의 모든 농도에서 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 세포 생존율을 80%이상 유지하며 세포 독성을 나타내지 않았다 (그림 40).

A



B

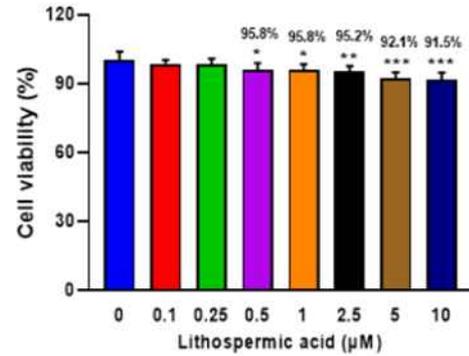


그림 40. Loganin과 lithospermic acid의 세포 독성

(다) 지표/기능성분의 근육세포 분화 조절 활성 평가

○ 실험방법

- 근세포 분화 증진 활성 평가를 위해 C2C12 세포를 6 well plate에 4×10^5 /well로 seeding 하였다. Confluency 100%가 되면 2% HS, 1% PS 첨가된 High glucose DMEM 배지로 2 일 동안 매일 배지를 바꿔주며 loganin과 lithospermic acid를 같이 처리하였다. 2일 후 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 및 phenotype 확인을 위한 IF stain을 진행하여 확인 하였다.
- IF stain은 다음 순서로 진행하였다. 배지를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 4% 포름알데하이드 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 차가운 메탄올 용액을 1 mL 넣고 -20°C 에서 10분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 0.05% 사포닌 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척하였다. 1% BSA 용액을 1 mL 넣고 상온에서 30분 반응하였다. 용액을 제거 후 1차 T-MHC antibody (1:200 in 1% BSA 용액)를 1 mL 넣고 4°C 에서 오버나잇(overnight)하였다. 1차 항체를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척한 뒤, 2차 Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:500 in 1% BSA 용액)를 넣고 상온에서 60분 반응하였다. 2차 항체를 제거 후 PBS 1 mL씩 2번 세척한 뒤, DAPI (1:10000 in PBS)용액을 넣고 1분간 반응하였다. 용액을 제거 후 PBS 1 mL씩 3번 세척 후 건조 시킨 후 현미경 관찰하였다.

○ 실험결과

- Loganin과 lithospermic acid의 근육세포 분화 증진 효능을 평가하기 위해 fusion index를 측정하였다. Fusion index는 전체 핵에서 근관에 있는 핵을 백분율로 나타내며 세포의 분화의 정도를 나타내는 지표이다. 결과에 의하면 Loganin과 lithospermic acid 처리는 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 fusion index가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (그림 41).

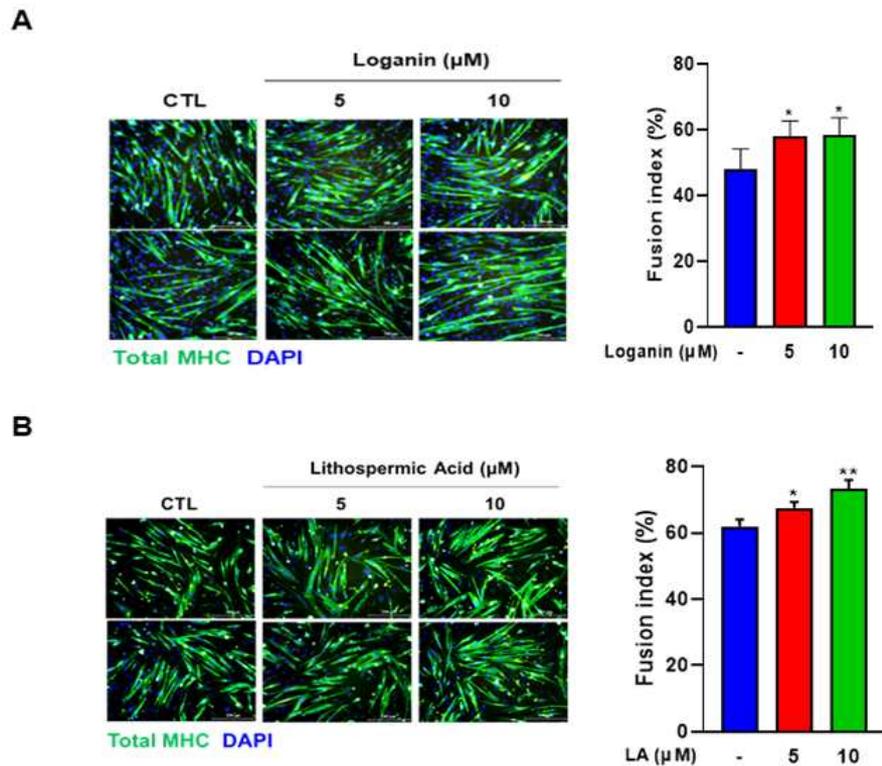


그림 41. Loganin과 lithospermic acid의 근육세포 분화 증진 효능

(라) 지표/기능성분의 근육세포 분화 관련 마커 변화 분석

○ 실험방법

- 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 후에는 초기분화마커인 MyoD, MyoG의 mRNA 발현량 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

○ 실험결과

- Loganin과 lithospermic acid 처리는 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 초기분화마커인 MyoD 및 MyoG 모두 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다 (그림 42).

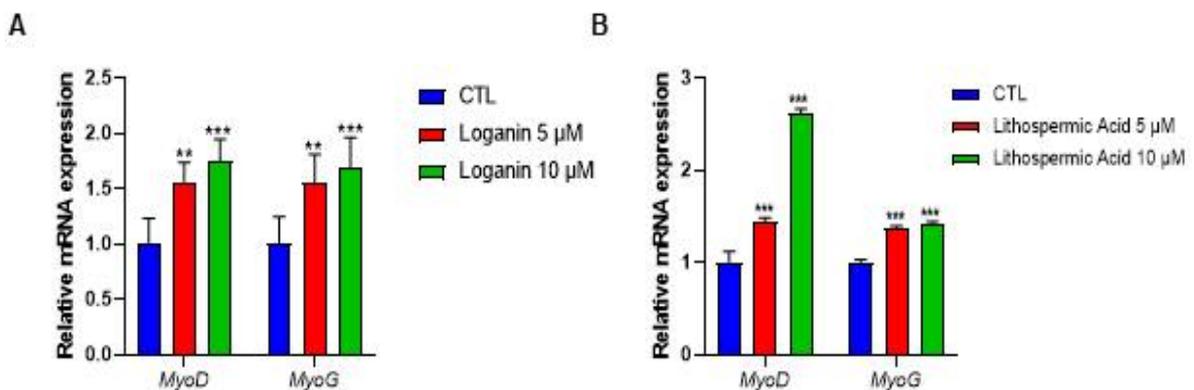


그림 42. Loganin과 lithospermic acid의 근육세포 초기분화 마커 mRNA 발현

(마) 지표/기능성분의 근위축 개선 활성 평가

○ 실험방법

- 근세포 위축 개선 활성 평가를 위해 C2C12 세포를 6 well plate에 4×10^5 /well로 seeding 하였다. Confluency 100%가 되면 2% HS, 1% PS 첨가된 High glucose DMEM 배지로 4

일 동안 매일 배지를 바꿔주며 myotube분화를 유도하였다. 분화 4일차에 loganin과 lithospermic acid (5, 10 μ M)와 근위축을 유발하는 DEX 50 μ M을 24시간 처리하였다. 24시간 후 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 및 phenotype 확인을 위한 IF stain을 진행하여 확인 하였다. IF stain은 위의 방법과 같다.

○ 실험결과

- 결과에 의하면 DEX 유도로 인한 근육세포 위축은 세포의 분화 정도를 유의하게 억제하는 반면 loganin과 lithospermic acid 처리에 의해서는 세포의 분화 정도가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (그림 43).

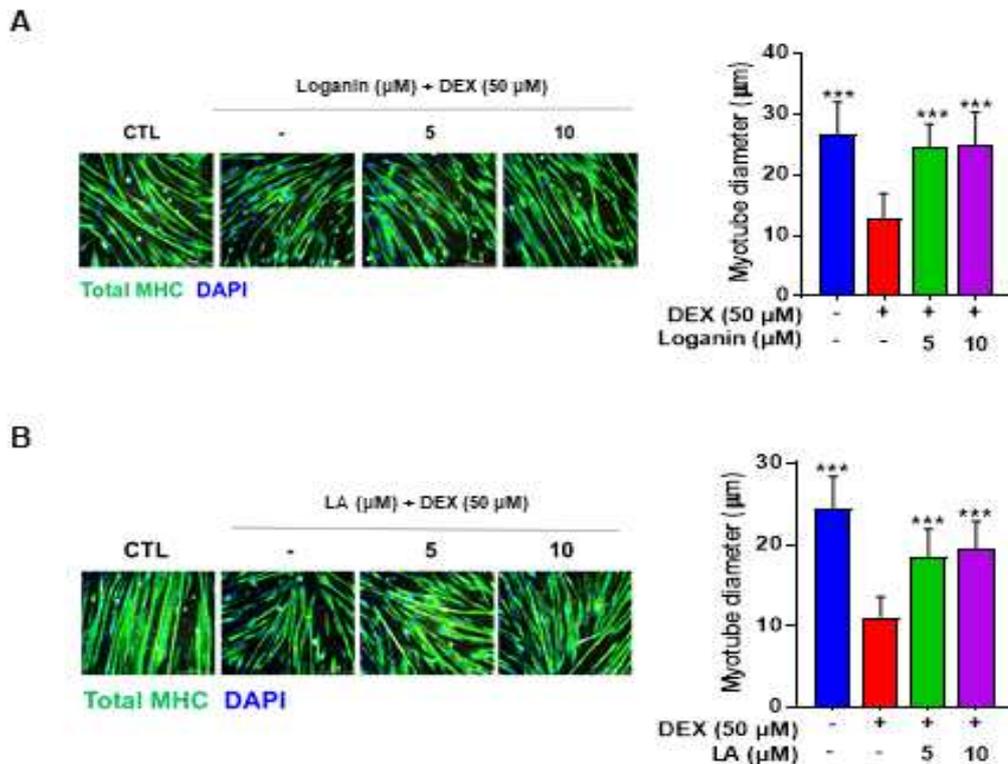


그림 43. Loganin과 lithospermic acid의 근육세포 위축 개선 효능

(바) 지표/기능성분의 근위축 관련 유전자 발현 분석

○ 실험방법

- 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 후에는 근위축 마커인 Atrogin-1 및 MuRF1의 mRNA 발현량 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

○ 실험결과

- C2C12 세포에 DEX로 유도된 근육세포 위축 모델에서 loganin과 lithospermic acid이 Atrogin-1 및 MuRF1의 유전자 발현을 모두 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다(그림 44).

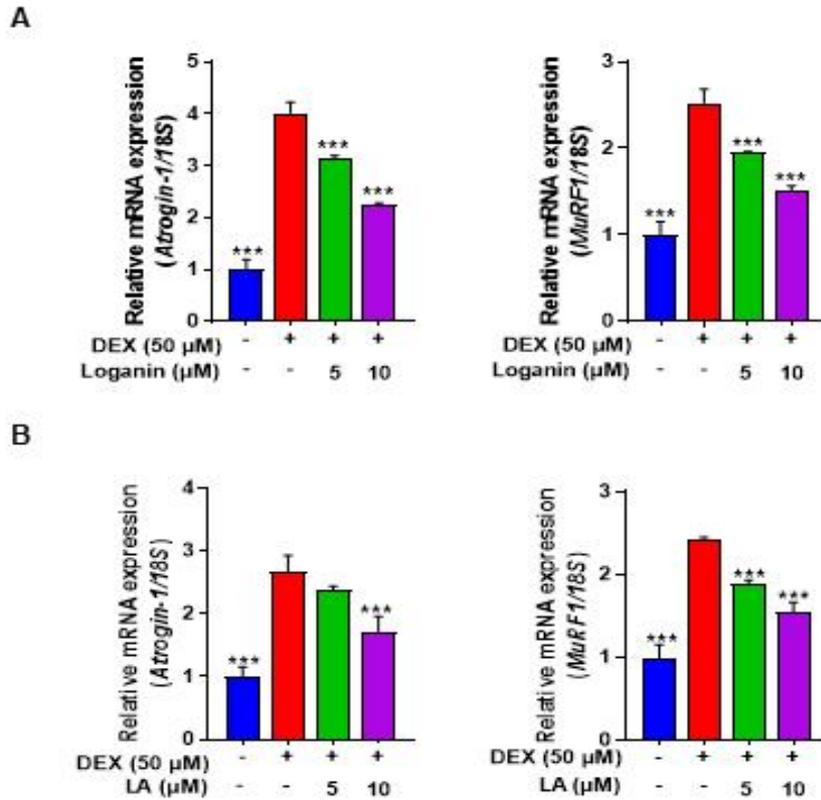


그림 44. Logenin과 lithospermic acid의 근위축 관련 마커 억제 효과

(2) 지표/기능성분의 근위축 개선 기전 구명

(가) 지초복합물의 근위축 개선 기전과 관련성 검토

○ 실험방법

- 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 후에는 T-MHC, MHC I, MHC II α , MHC II β , Atrogin-1, MuRF1, β -actin의 단백질 발현량을 western blot을 통해 확인하였다.

○ 실험결과

- T-MHC, MHC I, MHC II α , MHC II β 의 단백질 발현에서는 fusion index와 같은 경향을 나타냈으며, logenin과 lithospermic acid 처리는 DEX에 의하여 감소된 MHC isoform들을 증가시키는 것을 확인하였다. 반면 근위축 마커인 Atrogin-1 및 MuRF1 단백질 발현에서는 DEX 처리에 의해 근위축 마커들이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, logenin과 lithospermic acid 처리에 의해서는 감소됨을 확인하였다 (그림 45).

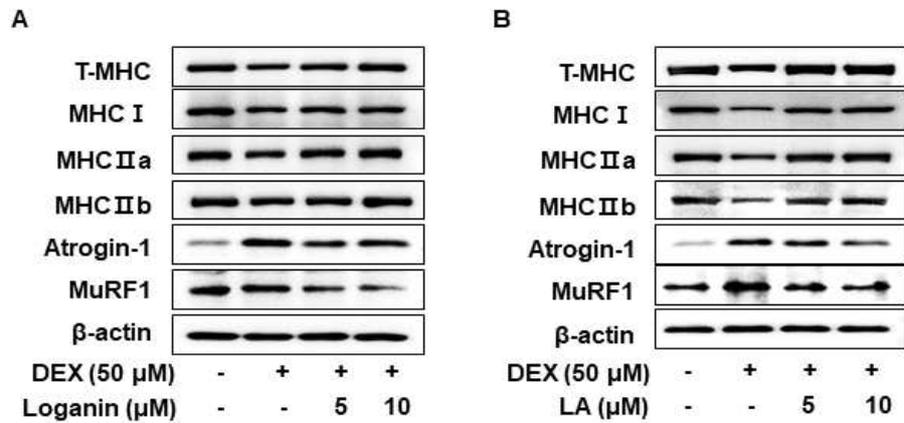


그림 45. Loganin과 lithospermic acid의 MHC 및 근위축 관련 마커 발현 조절 결과

(나) 지표/기능성분의 단백질생성을 조절하는 mTOR 신호 관련 마커 분석

○ 실험방법

- 기전 분석을 위한 샘플 하비스트 후에는 단백질 생성을 조절하는 mTOR 신호관련 단백질 발현량을 western blot을 통해 확인하였으며 단백질 합성능을 측정하기 위해 puromycin을 사용하여 SUnSET assay를 수행하였다.

○ 실험결과

- 근육단백질 합성에 관여하는 4EBP1 및 S6K의 인산화 및 그의 상위에 있다고 알려진 mTOR 및 Akt의 인산화 정도를 확인해본 결과, DEX 처리에 의해 mTOR, Akt, 4EBP1 및 S6K의 인산화가 감소하는 반면 loganin과 lithospermic acid 처리에 의해서는 DEX 처리에 비해 증가하는 것을 확인하였다 (그림 46).

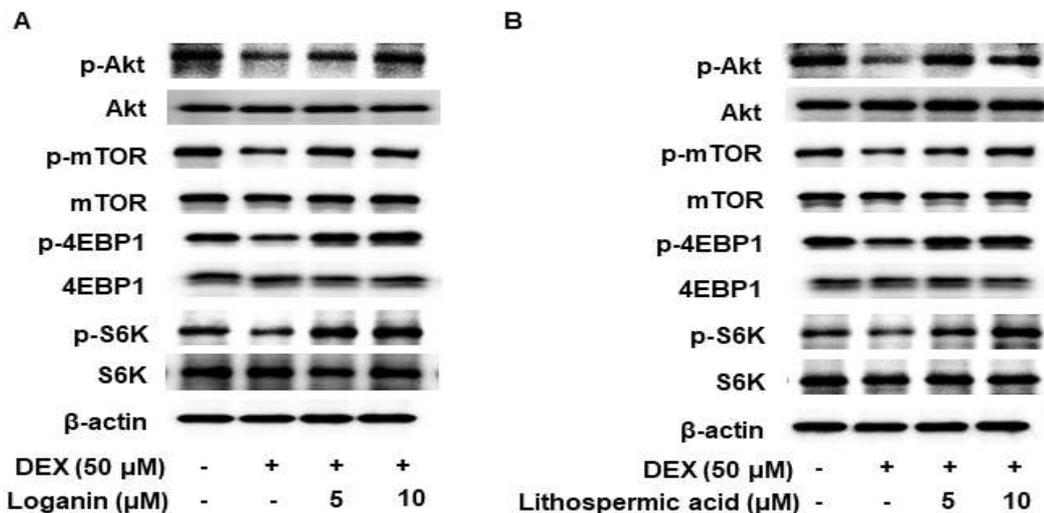


그림 46. Loganin과 lithospermic acid의 mTOR 신호 조절 통한 단백질 생성 증진 효과

- 단백질 합성능을 측정하기 위해 puromycin을 사용하는 SUnSET assay를 수행하였다. Puromycin 처리는 전체 단백질 합성 속도를 반영하게 되는데, loganin과 lithospermic acid 처리는 puromycin 및 DEX 처리에 비해 단백질 합성률을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 47).

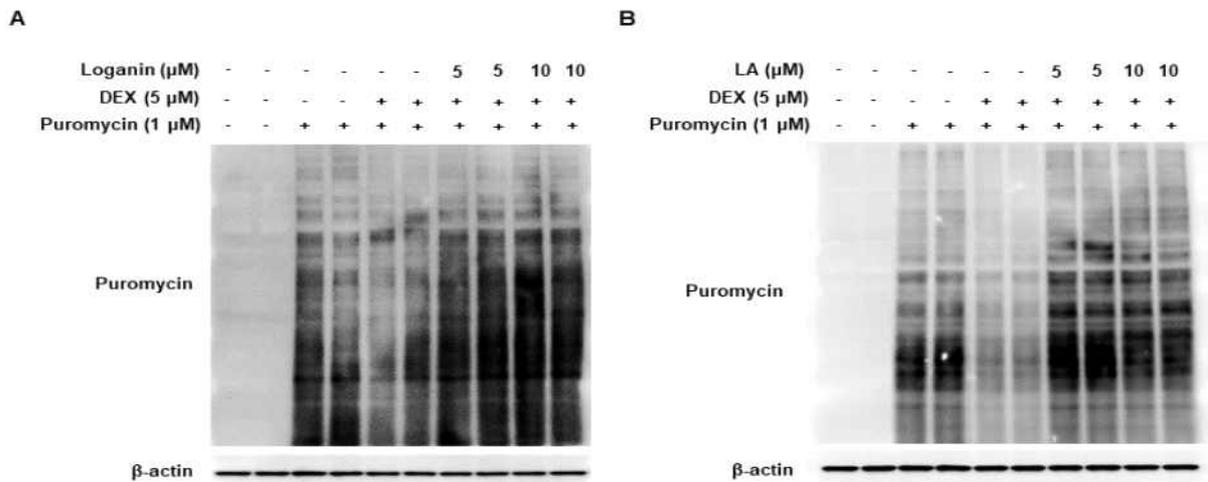


그림 47. Loganin과 lithospermic acid의 단백질 생성 증진 효과

(다) 지표/기능성분의 미토콘드리아 기능 개선 평가

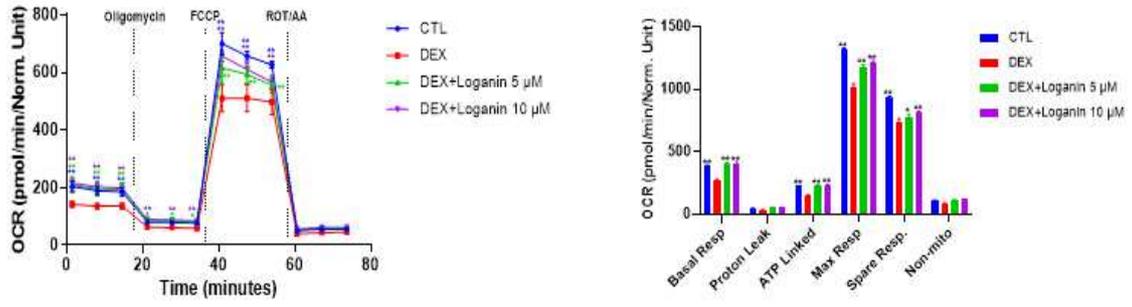
○ 실험방법

- XF analyzer (Seahorse Bioscience, USA)을 이용하여 loganin과 lithospermic acid의 호흡률 즉 산소 소비 속도(Oxygen Consumption Rate, OCR)을 측정하였다. C2C12 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에 배양하였다. XF-96 FluxPak (Seahorse, Agilent, USA)의 지침에 따라 세포를 seeding하여 준비하였다. DEX와 loganin 혹은 lithospermic acid을 5, 10 μM 처리 24시간 뒤 중탄산염 제외 배지(bicarbonate-free medium)로 교체한 뒤 CO_2 없이 세포 배양기에서 1시간 배양하였다. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent, USA)를 사용하여 1.5 μM oligomycin, 2 μM carbonyl cyanide - 4 - (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), 1 μM rotenone의 호흡사슬 억제제를 순서대로 처리하면서 OCR 변화량을 측정하였다.

○ 실험결과

- C2C12 세포에서 loganin과 lithospermic acid 처리에 따른 미토콘드리아 호흡률에 미치는 영향을 확인하였다. C2C12 세포에 DEX과 loganin 혹은 lithospermic acid 처리하였을 때 loganin 및 lithospermic acid 처리는 DEX 처리에 의하여 감소된 호흡률을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 48).

A



B

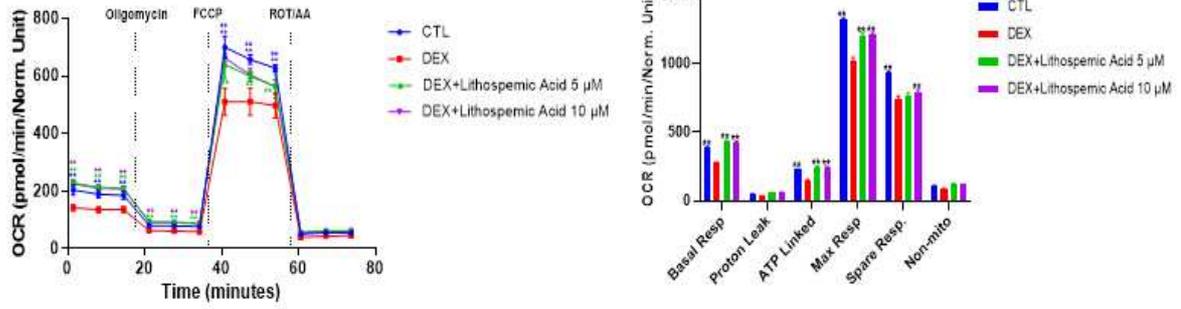


그림 48. Loganin과 lithospermic acid의 미토콘드리아 호흡에 대한 효과

라. 인체적용시험 프로토콜 개발 및 수행

(1) 인체적용시험 프로토콜 개발

- 프로토콜 개발은 사람이 참여하는 시험을 설계, 수행, 기록, 보고하기 위해 국제적으로 통용되는 윤리적·과학적 기준인 GCP 원칙에 따라 작성하였으며, 문헌조사를 통한 유효성과 안전성 검토와 검사도구 일치성 및 대상자산출 후보 연구들을 정리하여 다음과 같이 개발하였음

(가) 피험자 선정/제외 기준 설정 및 모집 공고문 작성

- 인체적용시험의 피험자는 ‘지초복합물’의 효과를 입증하고자 연령, 성별, 체중, 체질량지수, 혈중 지질과 같은 혈액학적 특성, 선행질환, 약물복용 여부, 다른 건강기능식품의 섭취여부, 알러지, 신체활동 정도, 흡연여부, 음주여부 등을 고려하여 선정 제외기준을 설정함

인체적용시험대상자 모집 공고
지초복합물의 근력개선 인체적용시험

대전대학교에서 인체적용시험을 위한 자원자를 모집합니다

모집기간 : 2022년 ~모집시까지
 연구기간 2022년 12월 15일~2023년 12월 12월 31일

인체적용시험 목적

지초복합물의 근력개선효과 검증

주요선정/제외기준

선정기준
 만 50세이상 만 65세 이하의 건강한 성인
 근력차이치: 약력 남자 26kg미만, 여자 18kg 미만

제외기준
 허자골격계, 소화기계, 간, 신장, 혈액학적 질환 자 및 알코올 중독자
 자해, 파킨슨병으로 대표나 모험이 불가능한자

시험식품의 적용

시험약: 지초복합물 500mg/day1일 1회 1캡슐

방문일정

시험은 총 12주간 진행되고, 6주에 한 번씩 방문하여야 합니다(방문은 3~4회입니다). 무작위 배정된 두어군에 따라 시험식품 또는 대조식품을 적용시험 일정에 따라 1일 1회 정기하게 받으셔서 인체적용시험을 수행합니다. 이후 2차 방문, 3차방문시여 체중의 순증량 검사를 감산과 함께 실시합니다

참여하신분 혜택

본인체적용시험에 참여하신 분께는 전문의의 체계적인 상담, 진료 및 검사료 무료로 받으시므로 건강관리에 도움이 되실 것 입니다

지침방법

인체적용시험 담당자: 광은별 교수

추천기관

지원: 중대이전
 시행: 대전대학교



그림 49. 인체적용시험대상자 모집공고문

(나) 연구계획서 작성을 위한 시험 디자인 개발

- 인체적용시험의 계획, 시행, 분석 및 결과 해석 등의 과정에서 효과의 추정치를 참값에서 벗어나게 만드는 요소들의 계통적인 경향 비뚤림(bias)을 최소화하는 것이 중요. 이를 위해 중요한 설계 방법은 눈가림(blinding)과 무작위배정방법(randomization)이며 이번 연구에서 사용된 설계 방법은 아래와 같이 설정하였음

- 이중눈가림(double blinding)
- 무작위배정(randomization)
- 평행설계(Parallel design): 위약대조, 배정비 1:1

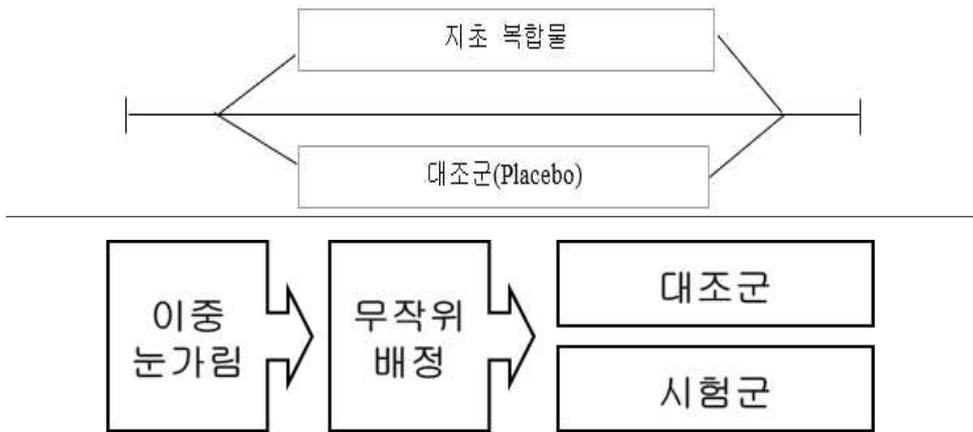


그림 50. 인체적용시험설계

(다) 시험자 선정

- 시험자 후보와 예비 인체적용시험 실시기관을 선정하기 위한 타당성 조사는 다음의 평가항목을 고려하였다.
 - 시험자 후보는 수행할 임상시험을 위해 적합한 학력, 교육, 경험을 고려하여 선정
 - 예비 임상시험실시기관의 임상시험심사위원회는 관련 법률과 ICH-GCP 요구사항을 충족
 - 예비 임상시험실시기관은 수행할 임상시험에 적합한 시설과 기자재를 보유 여부
 - 시험자 후보가 임상시험에 참여했던 경험이 있다면 시험자 후보가 만들어낸 결과물이 시한 내이고, 정확하며, 완결된, 신뢰할 만한 수준이었는지 검토
- 시험책임자 및 임상시험실시기관의 장과 합의사항
 - 임상시험관리기준, 관계법령, 임상시험 계획서 및 심사위원회의 승인 사항에 따라 임상시험을 실시할 것
 - 자료의 기록 및 보고에 관한 절차를 준수할 것
 - 모니터링 및 점검에 따를 것
 - 해당 임상시험 관련 기본문서와 그밖의 자료를 보관할 것
- 위 사항을 고려하여 ‘대전대학교 강은범 교수’를 연구책임자로 선정함

(라) 분석 마커 항목 선정

○ 본 인체적용시험은 기초복합물을 위약대조 비교를 통하여 근력개선에 관한 유효성 평가 및 안전성을 검증하기 위한 목적으로, 인체적용시험 대상자는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명한 후, 방문평가를 통해 선정/제외 기준 적합 여부를 판정함

○ 적합한 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위 배정될 것이며, 시험기간동안 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다. 시험식품 섭취와 운동 중재에 따른 유효성 평가 및 안전성 평가를 진행하였음

(마) 기록 측정 자료(증례기록서 CRF) 작성

○ 증례기록서(Case report form)는 인체적용시험계획서에 따라 대상자들로부터 수집되는 자료를 기록하기 위해 사용하는 도구이며, 인체적용시험에서 자료수집과정을 표준화하고 데이터 관리 및 통계 과정에서 요구하는 사항들을 만족시키고자 다음과 같이 작성하였다

(바) 인체적용시험 계획서 개발

○ 인체적용시험 계획서는 연구대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성하였음

연구계획서 개요(Synopsis)												
연구 과제 제목	기초복합물의 근력개선 인체적용시험 : 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 중심 연구											
연구 목적 (구체적으로, 측정변수가 포함된 기술 중심으로)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 연구목적 본 인체적용시험의 목적은 12주간 기초복합물의 섭취와 규칙적인 저항성 밴드운동의 총재를 격용한 후 위약 대조군과 비교를 통하여 근력개선에 관한 기초복합물의 유효성과 안전성을 평가하는 것이다. ■ 1차 목적 발목, 대퇴부, 목의 근력 개선에 대한 유효성 및 안전성을 대조군과 비교-평가 한다. ■ 2차 목적 신체기능평가, 골격근량, 체지방비, 사지근육량, 혈중 요인의 근력 개선에 대한 유효성 및 안전성을 대조군과 비교-평가 한다. ■ 연구가설 극무가설 - 기초복합물을 투여한 시험군과 위약용(placebo)을 투여한 대조군의 대퇴근역 변화량 동등성이 같다. 대립가설 - 기초복합물을 투여한 시험군과 위약용(placebo)을 투여한 대조군의 대퇴근역 변화량의 평균값이 다르다. 											
연구 예정기간	기관생명윤리위원회(IRB)의 승인일로부터 12개월											
연구 대상자 연구 참여기간 및 시간	12주											
연구 디자인 (연구 설계)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 단계 : 기타(건강기능식품) ■ 연구설계 : 평행설계, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 (시험군, 대조군 예수비율 1 : 1) 											
대상자와 샘플 크기	<p>본 인체적용시험 대상자 수 산출은 "건강기능식품 인체적용시험 '설계안내서'에서 제시한 유의수준(알파 5.0%(0.025)) 검정력(80%)을 기준으로 하고, 선행연구 T. Y. H. Cho, et al(2021). Effect of Schisandra chinensis Ballon extracts and regular low-intensity exercise on muscle strength and mass in older adults. 를 바탕으로 최소 74명으로 나타나 탈락률 20%와 불복 무작위배정을 고려하여 최소 대상자 수를 100명 이상으로 결정하였다.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">시험군</th> <th colspan="2">면원수</th> </tr> <tr> <th>최소사비</th> <th>20% 탈락률 고려</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>시험군</td> <td>37명</td> <td>47명</td> </tr> <tr> <td>대조군</td> <td>37명</td> <td>47명</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> ■ 연구설계 	시험군	면원수		최소사비	20% 탈락률 고려	시험군	37명	47명	대조군	37명	47명
시험군	면원수											
	최소사비	20% 탈락률 고려										
시험군	37명	47명										
대조군	37명	47명										

그림 51. 인체적용시험설계 인체적용시험 계획서

(2) 인체적용시험 생명윤리위원회(IRB) 심의 결과

○ 본 연구의 인체적용시험 실시 기관인 대전대학교 인체적용시험 생명윤리위원회(IRB)는 인간을 대상으로 하는 연구는 수행 전 기관생명윤리위원회의 승인이 인정받아 인체적용시험 수행이 결정되었음

기관생명윤리위원회 심의결과 안내서

1. 연구과제 개요

과제관리번호	1040647-202212-HR-008-02			
연구과제명	[국문] 지초복합물의 근력개선 인체적용시험: 무작위배정, 이중맹검, 대조군 비교 중성 연구 [영문] Human study for improving Muscle Strength of Lithoperman erythrorizin Complex: randomized, double-blind, control clinical trials			
연구책임자	성명	강은범	소속	대전대학교 체육학과
연구기간	윤리위원회의 승인일 - 2023년 12월 31일			
심의신청일	2022년 12월 05일	심의일	2023년 1월 10일	결과확정일 2023년 1월 20일
심의종류	() 심의연계			
	(●) 재심의			
	(●) 정규심의 () 신속심의			
() 지속심의 * 심의 주기: () 3개월 () 6개월 () 12개월 () 기타: _____				
연구정보	목적	(●) 학술용 () 기타: _____		
	종류	(●) 인간대상연구	() 실험군-대조군 연구 () 코호트 연구 () 기타	() 단변조사연구 () 설문조사 () 행동관찰 () 면담조사
연구비	지원기관	☞ 내야별		연구비

2. 심의 내용

연구계획서	<ul style="list-style-type: none"> 지초복합물의 안전성에 식용기준 및 규격 등의 근거로 용량을 산출하여 안전하게 적용함을 제시하였음.
연구대상자 안전/개인정보 보호 대책 확인	<ul style="list-style-type: none"> 대상자의 연구 할 때 안전과 관련한 이상반응 및 부작용에 대한 기준과 대책들이 잘 제시되었으며 피해 발생 시 보상책임을 명확하게 기술하였음.
결과	<ul style="list-style-type: none"> 위의 사항을 총합하여 이 연구계획서는 승인으로 판단함.

3. 심의 결과

심의 유형	정규심의
-------	------

그림 52. IRB 승인 통지서

심의 결과	(●) 승인 () 조건부 승인 () 보완 후 재심의 [신속/정규] () 부결 () 연구의 중지 또는 보류
승인 번호	1040647-202212-HR-008-03
유효 기간	2023년 1월 20일 - 2024년 1월 19일
총합 의견	위의 사항을 총합하여 이 연구계획서는 승인으로 판단함.

4. 심의 결과 후 과정

- 승인 연구의 경우는 연구계획서대로 연구를 진행하시면 됩니다. 연구 종료시 연구 결과보고서 (서식19, 서식20)를 제출하십시오. 연구 중 변경 사항이 있는 경우에는 재심의 신청하십시오.
- 조건부 승인, 보완후 재심의인 경우 수정사항을 수정한 후 연구계획서를 2주 내에 다시 제출하십시오.
- 동일 연구계획서에 대하여 2회 이상의 재심은 하지 않습니다. 2회 재심을 받은 경우, 신규 연구 계획서로 다시 제출하여야 합니다.
- 심의 결과에 이의가 있을 경우 통보일로부터 2주 이내에 이의 신청서(서식28)를 할 수 있습니다.

귀하가 요청한 연구 계획의 심의 결과를 위와 같이 안내합니다.

2023년 1월 20일

대전대학교 기관생명윤리위원회 위원장



(3) 인체적용시험용 식품 생산

○ 본 인체적용시험에 사용되는 시험식품과 대조식품은 건강기능식품 GMP (Good Manufacturing Practice) 관리 규정에 따라 제조·공급하였음.

○ 인체적용시험 제품 라벨링 정보

1. "인체적용시험용"이라는 표시
2. 제품의 코드명 (고유코드번호/무작위배정번호)
3. 인체적용시험번호
4. 성분명/코드명
5. 제조번호
6. 보관방법
7. 유효기간
8. 섭취방법
9. "인체적용시험외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시

1. "인체적용시험용"이라는 표시	
2. 제품의 코드명	
3. 인체적용시험번호	
4. 성분명/코드명	
5. 제조번호	
6. 보관방법	
7. 유효기간	
8. 섭취방법	
9. "인체적용시험외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시	

○ 인체적용시험용 식품 제형 검토

- 인체적용시험용 식품은 피험자가 섭취하기 용이하며 시험 식품과 대조 식품이 서로 구별되지 않도록 하였음. 또한, 검체의 투여경로는 경구투여로 한정되어 있기때문에 지초 복합물 분말은 캡슐제로 제조하였음
- 동물시험결과를 토대로 1회 섭취 복용량을 다음과 같이 설정하였으며, 대조식품의 경우 색상, 맛, 냄새 등이 동일하여 육안으로 구별할 수 없는 형태의 위약을 제작하여 인체적용시험 시험식품으로 제조하였음



위약

진약

그림 53. 인체적용시험용 식품

○ 인체시험용 식품 전달

- 제조된 인체시험용 식품은 수행기관 대전대학교에 시험군 및 대조군을 발송하고, 수령증으로 확인하였음



그림 54. 인체적용시험 식품 인수증

(4) 인체적용시험 수행

(가) 피험자 모집

- 본 인체 적용시험은 유목적표집법(purposal sampling)을 이용하여 경기, 충청, 대전지역 등에 거주하고 있는 50세 ~ 85세 이하의 성인 남녀 모집단으로 설정한 다음 선정/제외 기준을 준거 및 연구자의 임상적 판단에 따라 대상자를 모집하였음

(나) 의뢰자 모니터링

- 인체적용시험 대상자 선정/제외 기준에 적합한 100명을 확보하여 인체적용시험용 식품을 섭취하도록 하였으며, 모니터링에 대한 신뢰성을 보증하기 위해 CRO 전문기관인 (주)아리비앤씨에서 연구 전반 과정에 대한 모니터링을 실시하였음
- 실시기관 최초방문(SIV)과 정규방문(IMV)으로 구분하여 모니터링을 진행하고, 인체적용시험 계획서대로 실시기관에서 수행되고 있는지 점검하였음

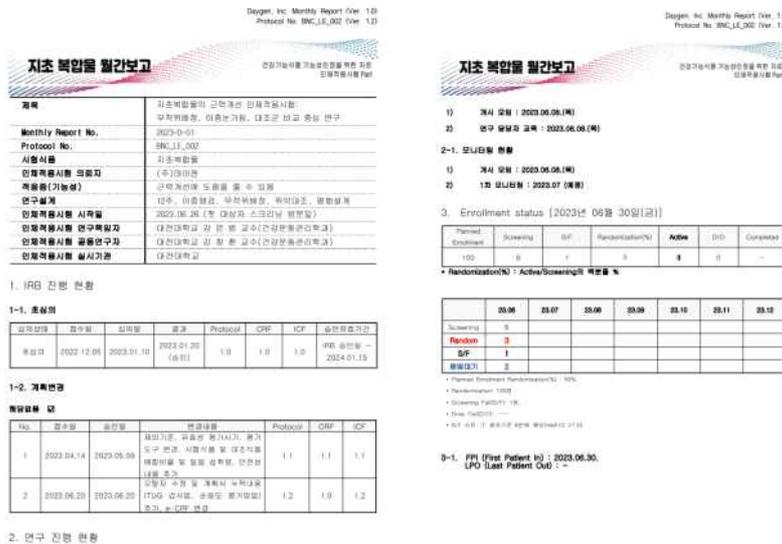


그림 55.모니터링 월간 보고서 (예)

(다) 시험 항목 분석 및 통계 분석

- 지초복합물의 인체적용시험은 2023년 12월 종료되었으며 DM(Data Management), Blind 해제 및 유효성 평가 확인을 위한 통계 분석 진행하였음

(라) 지초복합물의 근력개선 유의성 확인

- 본 연구과제 종료 이후 이중맹검해제를 진행하였으며 유의성 확인을 위한 통계분석을 진행하였음
- 지초복합물의 인체적용시험 대상자 100명 중 15명이 중도 탈락하였으며 85명 대상으로 통계분석을 진행하여 유의성 평가를 진행하였음. 통계분석보고서에 의하면 지초복합물이 근력개선 바이오마커 중 일부 유의적인 결과를 나타내는 것을 확인하였으며 최종결과보고서를 작성 중임

마. 제품 개발

(1) 근육 건강 관련 파생상품 개발

(가) 약국유통용 제품 개발

제품명	관절케어 플렉스	우먼케어 플렉스
이미지		
제조사	우리바이오(주)	우리바이오(주)
유통사	(주)데이젠	(주)데이젠
제형	정제	정제
규격	750mg*120정*2개입(180g)	700mg*60정*2개입(84g)
기능성	[MSM] 관절 및 연골건강에 도움을 줄 수 있음	[회화나무열매추출물] 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음 [홍삼] ①면역력 증진, 피로개선, 혈소판 응집억제를 통한 혈액흐름, 기억력 개선, 항산화에 도움을 줄 수 있음 [비타민 D] ①칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요②뼈의 형성과 유지에 필요③골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌 [대두이소플라본] ①뼈 건강에 도움을 줄 수 있음
원재료명 및 함량	MSM, 포도당, 보스웰리아추출물분말, 산호칼슘, 지초추출물분말 4% , 스테아린산마그네슘, 이산화규소, 10곡발효효소분말, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 아보카도플렉스, 생선콜라겐, 산화마그네슘, 비타민 C, 비타민D3 분말, 황산망간	회화나무열매추출물, 홍삼농축액분말, 비타민 D혼합제분말, 대두이소플라본, 포도당, 감태추출물분말, 스테아린산마그네슘, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 이산화규소, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 지초추출물분말 0.1% , 석류추출물분, 비타민 E 혼합분말, 건조효모(셀렌함유), 비오틴
1일 섭취량	4정(3000mg)	2정(1400mg)

제품명	홍경천 더블 임팩트	덴티케어 플렉스
이미지		
제조사	우리바이오(주)	우리바이오(주)
유통사	(주)데이젠	(주)데이젠
제형	정제	정제
규격	800mg*120정*2개입(192g)	900mg*60정*2개입(108g)
기능성	[홍경천 추출물] 스트레스로 인한 피로 개선에 도움을 줄 수 있음 [비타민 B ₁] 탄수화물과 에너지 대사에 필요 [비타민 B ₂] 체내 에너지 생성에 필요 [나이아신] 체내 에너지 생성에 필요 [판토텐산] 지방, 탄수화물, 단백질 대사와 에너지 생성에 필요 [비타민 B ₆] ①단백질 및 아미노산 이용에 필요 ②혈액의 호모시스테인 수준을 정상으로 유지하는데 필요	[프로폴리스 추출물] 항산화에 도움을 줄 수 있음 [비타민 D] ①칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 ②뼈의 형성과 유지에 필요 ③골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌 [칼슘] ①뼈와 치아 형성에 필요 ②신경과 근육 기능 유지에 필요 ③정상적인 혈액응고에 필요 ④골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌

	[엽산] ①세포와 혈액생성에 필요 ②태아 신경관의 정상 발달에 필요 ③혈액의 호모시스테인 수준을 정상으로 유지하는데 필요 [비타민 B ₁₂] 정상적인 엽산 대사에 필요 [비오틴] 지방, 탄수화물, 단백질 대사와 에너지 생성에 필요	
원재료명 및 함량	홍경천 추출물, 비타민 B ₁ , 비타민 B ₂ , 나이아신, 판토텐산, 비타민 B ₆ , 엽산, 비타민 B ₁₂ , 비오틴, 정제포도당, 결정셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 이산화규소, 산화마그네슘, 비타민, L-테아닌, 감태추출물분말, 산화아연, 건조효모셀렌, 지초추출물분말 0.009% , L-아르지닌, 타우린	프로폴리스추출물, 비타민 D, 칼슘, 정제포도당, 아보카도플렉스, 스테아린산마그네슘, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 자일리톨, 이산화규소, 옥수수수염추출분말, 리소짐, 생선콜라겐분말, 지초추출물분말 0.2% , 감태추출물분말, 비타민 C, 코엔자임 Q10, 산화마그네슘
1일 섭취량	4정(3200mg)	2정(1800mg)

(나) 일반유통용 제품 개발

○ 시제품 개발 (클리어 단백질)

	구분	내용
	제품명(가칭)	클리어 단백질(청포도맛)
	식품유형	단백질(건강기능식품)
	제형	분말
	섭취방법	1일 2회/1회 1포
	중량	22g/1포
	특징	<ul style="list-style-type: none"> - 자사 개발원료 “지초추출물분말”과 단백질 원료를 혼합한 데일리 프로틴 - 함량이 보장된 단백질 제품 (하루섭취량 기준 단백질 함량 20g 보장) - 용해도가 높은 수용성 단백질 - 기존 단백질 제품과는 차별화된 클리어 단백질

성분 및 배합 비율		
원료유형	원료명	배합비율(%)
주원료	가수분해유청단백	63.14
	결정과당	5.0
	결정(분말)포도당(무수)	22.2090
	비타민D3혼합제제분말	0.001
	L-시스틴	0.35
	L-히스티딘	0.7
	포도과즙분말	2.5
	청포도향분말(M-22054)	4.0
	효소처리스테비아	1.0
	지초추출물분말	0.1
	이산화규소	1.0
합계		100

(2) 지초복합물 활용 파생상품 개발

(가) 고령자 대상 제품 및 지초복합물 활용한 제품 개발

헬로 더 건강한 기억력	헬로 더 건강한 관절	헬로 더 날씬한 다이어트	헬로 마그	헬로 엠에스엠

제품명	헬로 더 건강한 기억력	헬로 더 건강한 관절	헬로 더 날씬한 다이어트
이미지			
제조사	바이오티피씨(주)	바이오티피씨(주)	바이오티피씨(주)
유통사	에이블비제(주)	에이블비제(주)	에이블비제(주)
제형	정제	정제	정제
규격	500mg*30정 (15g)	800mg*60정 (48g)	500mg*120정 (60g)
기능성	[은행잎추출물] 기억력개선 · 혈행개선에 도움을 줄 수 있음	[MSM] 관절 및 연골건강에 도움을 줄 수 있음	[가르시니아카ம்ப로지아추출물] 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방감소에 도움을 줄 수 있음
원재료명 및 함량	은행잎추출물(미국산), 결정셀룰로스, 치커리추출물(벨기에산), 카복시메틸셀룰로스칼슘, 인산화규소, 아미노산혼합제제(L-글루타민, L-이소로이신, L-로이신, L-라이신염산염, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-트레오닌, L-트립토판, L-발린), 스테아린산마그네슘, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 바나바잎추출분말(인도네시아산), 뽕나무잎추출분말, 대양발아귀리추출분말, 지초추출분말, 인동추출분말, 녹차추출분말	MSM(미국산), 결정셀룰로스, 이산화규소, 대양발아귀리추출분말(국내산), 지초추출분말(국내산), 인동추출분말(국내산)	가르시니아카ம்ப로지아추출물(인도산), 결정셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스칼슘, 이산화규소, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 스테아린산마그네슘, 모로블러드오렌지추출분말(모로오렌지농축액/이탈리아산), 아미노산혼합제제(L-글루타민, L-이소로이신, L-로이신, L-라이신염산염, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-트레오닌, L-트립토판, L-발린), 치커리추출분말(벨기에산), 흰강낭콩추출분말, 과라나추출분말, 대양발아귀리추출분말, 지초추출분말, 인동추출분말
1일 섭취량	1정 (500mg)	2정 (1600mg)	4정 (2000mg)

제품명	헬로 마그	헬로 엠에스엠
이미지		
제조사	노바렉스(주)	노바렉스(주)
유통사	에이블비제(주)	에이블비제(주)
제형	액상	액상
규격	30ml*10병(300ml)	30ml*10병(300ml)
기능성	[마그네슘] 에너지 이용에 필요, 신경과 근육 기능 유지에 필요 [비타민B6] 단백질 및 아미노산 이용에 필요, 혈액의 호모시스테인 수준을 정상으로 유지하는데 필요 [비타민B1] 탄수화물과 에너지 대사에 필요 [비타민B2] 체내 에너지 생성에 필요	[엠에스엠] 관절 및 연골건강에 도움을 줄 수 있음
원재료명 및 함량	혼합제제(수산화마그네슘, 아라비아검), 비타민B6염산염, 비타민B1질산염, 비타민B2, 정제수, 프락토올리고당, 오렌지농축액, 결정과당, 무수구연산, 시클로덱스트린시럽, 오렌지향(향료), 지치뿌리추출분말, 인동추출분말 , 올리브오일혼합액, 진탄검, L-아르지닌, 복합황금추출물, 수크랄로스(감미료), 수박과 피추출물분말, 발아귀리추출물분말, L-로이신, L-이소로이신, L-발린	엠에스엠, 정제수, 시클로덱스트린시럽, 포도당액, 블루베리농축액, 향료제제(프로필렌글리콜, 주정, 정제수, 합성향료, 글리세린, 블루베리주스농축액, 천연향료, 젖산, 트리아세틴), 지치뿌리추출분말, 인동추출분말 , 올리브오일혼합액, 진탄검, 효소처리스테비아, 무수구연산, 복합황금추출물, 소금, 수크랄로스(감미료), 피쉬콜라겐, N-아세틸글루코사민, 발아귀리추출분말, 해조갈슘, 상어연골분말, 보스웰리아추출물
1일 섭취량	1병(30ml)	1병(30ml)

(3) 지초복합물 활용 건강기능식품 상품화

(가) 상표개발

- 데이젠은 제품을 브랜드화하기 위하여 “퍼플루트” 상표를 등록하였음
- 등록번호 4019776320000

 퍼플루트	 공보
 <p> 상품분류: 05 출원(국제등록)번호: 4020210084768 등록번호: 4019776320000 출원공고번호: 4020220132142 도형코드: </p>	<p> 출원인: 주식회사데이젠 출원(국제등록)일자: 2021.04.23 등록일자: 2023.02.16 출원공고일자: 2022.10.12 대리인: 박효연 </p>

(나) 제품 디자인 개발

- 제품 디자인 개발을 위해 외부 단케이스의 색, 디자인, 사이즈 및 칼선 등 외적인 부분을 협력 업체와 함께 검토하여 선정하였음



(다) 소비자 선호도 분석

(1) 소재 특성에 맞춘 최적 제형 선정

- 건강기능식품 선호 제형
 - SNS 후기에 많이 언급되는 건강기능식품의 제형 조사 결과 분말이 32.6%로 가장 많았으며, 캡슐 25.8%로 두 제형에 선호도가 매우 높음. 분말 제형은 최근 인기가 높아진 프리바이오틱스와 비타민 제품군으로 인해 분말 제형의 선호도가 높아졌으며, 일반적인 건강기능식품으로 섭취하는 캡슐 제형이 선호도가 높음



- 지초복합물의 섭취 및 보관의 용이성을 생각하여 소비자들의 선호에 맞추어 캡슐, 정제형으로 제형 선정하여 제품 개발에 적용하였음
- 최근에는 섭취 편의성이나 맛과 재미를 느낄 수 있는 스틱형이나 젤리 제형도 선호도가 높아지는 추세임. 추후에 소비자들의 선호도에 따라 다양한 유형의 제형의 지초복합물의 제품 개발 고려하고자 함

(라) 마케팅 및 판매 전략 수립

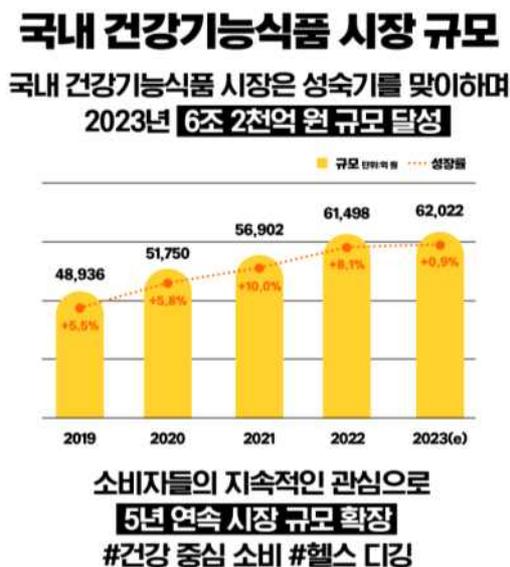
○ 최근 시장 현황 조사

① 세계 건강기능식품 시장

- 2019년 세계 건강기능식품 시장 규모는 전년 대비(1,355억 달러) 5.6%성장한 1,432억 달러로, 2013년 1,000억 달러 시장 규모를 돌파한 이후 매년 5%이상의 성장세를 유지하고 있음.
- 미국이 489억달러 매출 규모를 보이며 가장높은 시장 점유율(34.1%)를 차지하고, 다음으로는 중국(216억 달러,15.1%)>일본(113억 달러, 7.9%) 순으로 조사됨.
- 세계인의 건강에 대한 꾸준한 관심과 건강관리의 수단으로 건강기능식품이 주목받으며, 2022년에는 1,700억 달러 시장 규모로 기대함.
- 서유럽의 경우 동 지역에서의 건강기능식품 시장 성장이 어려움에 직면했다는 지표들이 확인되고 있으며, 서유럽만이 2018년 3.5%에서 2019년 2.1%로 성장세가 감소하는 상황을 보임.
- 2019년 동유럽,러시아 건강기능식품 시장은 전년대비 4.6%(74억 달러) 성장하여 77억 달러 규모 및 세계 건강기능식품 시장에서 5.4%점유율을 보이며, 스포츠 `스페셜티` 등 품목의 비중이 두드러짐.
- 아시아 건강기능식품 시장은 세계 건강기능식품 시장에서 34% 비중을 보이며, 스포츠 `스페셜티` 및 허브 `보타니칼` 품목이 성장함. 2019년 중국이 44.3%로 아시아 시장 점유율이 가장높게 나타났으며, 일본 23.2%,인도 20.0% 순으로 나타남.

② 국내 건강기능식품 시장

- 한국건강기능식품협회는 2023년 국내 건강기능식품 시장 규모가 6조 2000억원 규모를 달성하였으며, 이는 5년 전인 2019년과 비교해보면 약 27% 성장하였음
- 국내 건강기능식품 시장은 건강을 중심으로 소비하는 “헬스디깅(Health digging)” 트렌드에 힘입어 지속적으로 성장세를 나타냄



- 2023년 건강기능식품 구매 경험률은 81.2%를 기록하며, 10가구 중 8가구 이상이 1년에 한 번 이상 건강기능식품을 구매하는 것으로 확인 됨. 가구당 예상 평균 구매액은 36만원으로 2019년부터 소비력(평균 구매액)이 지속적으로 강화되는 것으로 나타남

○ 건강기능식품 개별인정형 인정 현황

- 개별인정형 품목은 매년 증가하는 추세이며, 개별인정형 원료 인증 현황도 증가하고 있음

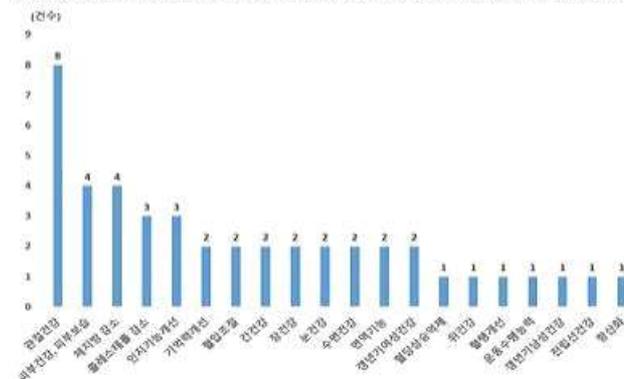
개별인정형 원료 인정 현황('04년~'19년)

구분	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'17	'18	'19
당해연도 건수	9	23	29	36	84	97	68	42	38	37	66	31	21	6	14	31
신규원료 인정 건수	9	15	20	16	17	30	22	13	10	18	25	11	2	2	9	23
누적 건수	9	32	61	97	181	278	346	388	426	463	529	560	581	587	601	632

단위:건

- 2004~2019년까지 가장 많이 인증받은 기능성은 체지방감소(96건)이며, 그 다음으로 관절/뼈 건강(64건), 눈건강(52건), 기억력개선(48건) 순으로 조사되었음. 체지방감소는 다이어트에 대한 노력에 관심을 갖는 소비자들의 니즈가 반영된 결과로 판단되며, 관절/뼈 건강은 2019년 65세 이상 고령자가 전체인구 14.9%(출처:통계청)를 차지하는 고령사회 진입에 따른 소비자들의 연령층이 반영된 결과로 예측함.
- 2022년도 기능성 내용별 원료 인정 건수는 관절건강(8건), 체지방감소·피부건강(각 4건), 인지기능개선·혈중콜레스테롤 감소(각 3건)순으로 확인하였음

< 기능성 내용별 인정 현황 (2022년) >



- 2022년 건강기능식품 기능성 원료 인정 건수 현황 자료 중 기능성원료 신청 현황으로는 근력개선 5건, 기억력·인지기능 개선, 갱년기·남성건강 3건으로 신청되었으며, 2023년도 건강기능식품 기능성 원료로 36건 중 피부보습 7건, 체지방감소 7건으로 식약처 식품공전 기반 추출물이 주를 이루었으며, 남성·여성 갱년기, 관절건강, 기억력 개선 원료들이 신규 등재되어 특정 계층에 도움을 줄 수 있는 기능성에 대한 관심이 증가하고 있는 것을 알 수 있음

○ 건강기능식품 마케팅 및 판매 전략 현황

- 코로나19 영향으로 건강식품 광고비가 크게 증가하는 추세임
- 건강관리에 대한 MZ세대의 관심이 높아지며 중요한 고객층으로 부상되므로 MZ 세대의 눈길을 사로잡기 위한 선호모델 기용, 콘텐츠 사업 전개가 이어지고 있음
- 과거 건강기능식품업종의 퍼포먼스 마케팅은 콜 영업을 위한 고객 DB수집이 일반적이었으나 최근에는 온라인 채널을 활용한 방식으로 퍼포먼스 마케팅전략이 다각화 되는

추세임

- 최근 라이브커머스가 효과적인 판매채널로 각광받으며 건강기능식품업종에서도 활용하는 사례가 증가함. 판매성과를 위해 쇼호스트 섭외를 하거나 콘텐츠 개발을 하는 트렌드임. 실시간 상품 노출과 고객과의 소통에서 구매까지 연결되어 효과적인 마케팅 및 유통채널로 이용됨

주요라이브커머스미디어			
 네이버라이브커머스	 카카오라이브커머스	 배민의민족라이브커머스	 라이브커머스 단일 플랫폼 1위 '그립'
스마트스토어 파워등급 확보 시 방송 가능 네이버 페이 연동 가능하여 다양한 혜택 제공	카카오 TV, 특채널 메시지, 쇼핑 탭 등 다양한 서비스를 통해 사전 홍보 가능	로열티 높은 배민 유저 대상으로 라이브 진행 방송 시 '특가' 탭에 소개되어 유입률 높음	그립 공식 인증 쇼호스트(그리퍼)와 협업하여 단기간 내 임팩트 있게 관심 유도
운영 포인트	운영 포인트	운영 포인트	운영 포인트
스토어 단골 고객에게 네이버 앱 PUSH 발송하여 혜택 알림 → 구매 전환율 상승	플친 메시지로 기존 고객 유입 유도 할인 쿠폰 이벤트 진행 시 신규 고객 확보 기대	배민 쿠폰 프로모션 진행 구매 금액에 따라 단계별 혜택 지급하여 판매 활성화	브랜드에 적합한 그리퍼를 섭외하여 방송 진행 특가 할인 프로모션 적용하여 판매 촉진

- 건강기능식품 마케팅 트렌드에 적합한 디지털 미디어가 추천되며, 타겟 트렌드를 반영한 콘텐츠 기획 및 운영이 필요함
- '건강한 라이프 스타일의 이점에 대한 인식이 점차 소비자들 사이에서 증가하고 있으며, 소비자는 텔레비전, 인터넷 및 기타 미디어를 통해 건강 및 웰니스에 대한 정보에 더 많이 노출됨
- 건강한 라이프 스타일, 노령 인구 증가, 신흥 경제국에서의 가처분 소득 증가, 웰빙 제품에 대한 인식 증가, 관리에서 예방 건강으로의 전환은 건강보조식품 시장의 성장을 주도하는 주요 요인임.
- 또한, 개발도상국에서의 높은 성장 잠재력, 새롭고 더 혁신적인 제품으로의 점진적인 변화, 건강 장애의 증가와 같은 요인은 건강보조식품 시장에서 주요 성장 기회임.

- 홍보활동
- ① 보도자료



인터넷기사_국토매일_21.06.21

데이젠, 관절-연골 위한 건기식 '관절케어' 약국 유통

강신국 기자 2021-07-12 16:21:39

가 가

MSM 1일 최대 섭취량 2000mg 함유



[데일리팜=강신국 기자] 건강기능식품전문 기업인 데이젠은 '관절케어 플렉스'를 15일 출시한다.

이런 신제품은 식약처에서 인정한 관절 및 연골건강에 도움을 주는 기능성원료인 MSM(Methyl Sulfonylethane, 디메틸설포닐)을 주원료로 만든 건강기능식품이다.

관절케어 플렉스는 MSM 일일섭취량 최대치인 2000mg 함유해 효과를 극대화했을 뿐만 아니라 보스웰리아추출분말, 산호칼슘, 지조추출분말, 저분자피쉬콜라겐, 10곡 발효소분말, 비타민C, 비타민D3, 비타민E 등 양질의 부원료를 함께 담아 하루에 2회, 1회 2정 섭취하면 된다. 또한, 소비자 편의성을 위해 간편하고 위생적인 FFP 형태로 2개월분으로 구성됐다.

데이젠의 관계자는 "고령화 시대가 가속화 되고 있고, 코로나로 외부활동이 저지되는 현재, 관절과 연골 건강에 관심을 갖는 소비자들이 늘고 있다"며 "관절 관리가 필요한 중장년층은 물론, 평년기 여성, 관절을 많이 사용하거나 운동을 즐기는 젊은 소비자들에게도 권장하는 제품"이라고 말했다.

관절케어 플렉스는 약국에서 구매 가능하며, 더 자세한 정보는 데이젠 공식홈페이지(www.dajen.co.kr) 제품안내자 찾아보기 에서 확인할 수 있다.

강신국 기자 (ksk@dailypharm.com) [기자의 특별한 보기]

인터넷기사_데일리팜_21.07.12

▶ "영양 개선에 확대돼는 농가 소득직접으로 기대"



농업인신문 2021년 08월 21일

전문 제조업체 지초(전), 지초 또는 지초를 활용한 건강기능식품이 개발되면서 관련기업과 제조업자의 계약체제가 이뤄졌다. 지초 사재는 농산물의 고부가가치화를 위한 농업계 지원과 밀접 연계를 축전해서 정부 지원이 주목된다.

농업기술진흥특별프로그램의 우수농가연구 지원 프로그램으로 인준받은 지초(전)은 지초 추출물을 모토로한 건강기능식품을 개발해 지난 6월에 출시했다. 지초 추출물은 원래 농업진흥특별프로그램에서 추진하는 "지초특별출품 품종 근간 건강 개선용 개발인형형 건강기능식품 개발" 연구사업을 통해 출품했다.

지초는 반향에서 근력, 운동, 활력, 체력, 정력, 활력, 건강, 노인 등의 약제로 사용되고 있다. 영문 내리고 유수 흡수율, 영문 흡수율과 세 흡수율 등 여러 가지 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 특히 지초에서 주로 추출되는 지초(Diapakomin)은 항진, 항염증, 항암, 항산화 효과를 가지고 있다.

지초는 1950년대 미국 샌디에고에서 개발하는 약제로 알려져 있다. 그러나 기후변화와 환경오염, 무분별한 개발로 인해 약재 지초는 찾아보기가 어렵다. 이에 대안으로 중국에서 지초를 생산하고, 중국 정부, 광부 정부 등에서 지초를 개발하기 위해 지초(Diapakomin)의 계약체결을 하고 있다.

대안으로 개발하는 "지초"의 계약체결을 시작으로 5년 후 50ha 이상 지초 재배를 확대할 계획을 가지고 있다"면서 "이 경우 지초가 농업인의 새로운 소득작목이 될 수 있을 것으로 기대된다"고 밝혔다.

[신상품] 화이트진로 '로르아 와인', 대이젠 '우먼케어 플렉스', 투썸 '홍차·녹차'



백미로 만든 화이트진로, 사소한 풍미를 떨어뜨리고 있다. 신장기능을 높여주는 백미로 만든 화이트진로, 사소한 풍미를 떨어뜨리고 있다. 신장기능을 높여주는 백미로 만든 화이트진로, 사소한 풍미를 떨어뜨리고 있다. 신장기능을 높여주는 백미로 만든 화이트진로, 사소한 풍미를 떨어뜨리고 있다.

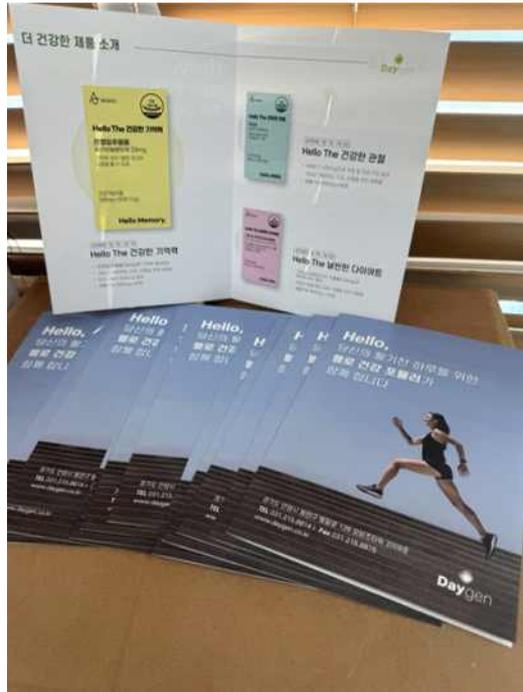
농업인신문_21.08.13

식품저널_foodnews_21.08.20

* On-line : 건기식 통합 블로그, 파워블로거 활용

② 제품 리플렛 제작

- 제품 컨셉 및 홍보를 위한 리플렛을 제작하여 소비자들에게 제공함



○ 마케팅 전략/사업화

① 제품화 마케팅

- 가공유형별, 소비자기호, MD수요, 시장현황 조사·분석 종합화를 통한 제품 홍보진행
- 국내산 원료 활용 적정 제품컨셉 설정
- 지표성분(Lithospermic acid, Loganin) 기능성분 조사
- 식품 박람회 참여를 통한 회사 및 제품홍보 진행
- 건강기능식품전문 유통판매업 업체와 협약을 통해 전략적으로 제품 유통진행

② 제품의 유통 및 판로

- 과거 건강기능식품 업종의 마케팅은 고객 DB수집이 일반적이었으나 최근 온라인 유통 채널이 다각화 되며 주 판매경로가 온라인이 대부분임
- 건강기능식품전문유통업체인 에이블비제(주)를 통해 온라인 몰(비제몰)을 통한 온라인 유통채널 개설
- 네이버 간편결제 연동(Naver PAY)를 통한 연계 유통

③ 제품 상세페이지



④ On-line 홈페이지 제작 및 활용

- 비제몰(<http://www.bizemall.shop>)



바. 기능성 원료 인정을 위한 식약처 신청 준비

(1) 기준규격 등 공인시험 자료 확보

○ 기능성 원료 인정을 위한 신청자료 목록

- 가) 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- 나) 제조방법 및 그에 관한 자료
- 다) 원료의 특성에 관한 자료
- 라) 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 마) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- 바) 안전성에 관한 자료
- 사) 기능성 내용에 관한 자료
- 아) 섭취량, 섭취 방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

○ 기능성 원료 인정을 위한 제출 자료에 필요한 자료 확보를 위하여 공인기관 한국기능식품연구원에서 분석의뢰를 하였으며 관련 성적서를 확보하였음

① 지초복합물의 성상 및 대장균군

1 LOT

2 LOT

3 LOT

② 지초복합물의 총아플라톡신

험, 동물시험 및 인체적용시험) 자료 확보 및 작용 기전 자료를 확보하였음

- 통계분석결과 보고에 의한 지초복합물의 인체적용시험 결과는 현재 개별인정형 소재로 등록된 원료와 동등·차별적인 효능을 가진 소재이며 본 연구과제 최종 목표인 개별 인정 신청 및 등록을 진행할 수 있는 결과를 확보한 것으로 매우 큰 의의가 있음

(3) 지초복합물 개별인정형 소재 개발 추진 일정

- 지초복합물 인체적용시험이 2023년 12월 종료 이후 2024년도 상반기에 통계분석을 진행하여 현재 근력개선 유의성을 확인하였음
- 추후 최종결과보고서 확보 및 IRB 결과 보고 진행 예정이며 근력개선 개별인정형 기능성 원료 신청을 진행하고자 함. 개별인정형 원료 등록은 2025년 상반기를 목표로 추진할 예정임
- 해당 연구과제를 통해 확보한 원료표준화, 비임상 기능성 평가, 인체적용시험 자료를 근거로 식품의약품안전처로부터 근력개선 개별인정형 기능성 원료로 등록하는데 큰 어려움이 없을 거라고 판단함

진행사항	2023년	2024년												2025년						
		1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월	1월	2월	3월	4월	5월	6월	
인체적용시험	시험종료	통계분석					CSR 작성 및 IRB 결과보고													
식품의약품안전처 개별인정원료 신청								신청자료 준비 및 검토		개별인정 신청 및 등록										
지초복합물 개별인정형 건강기능식품 제품화																지초복합물 개별인정형 건강기능식품 제품 개발				

지초복합물 개별인정형 원료 등록을 위한 향후 일정

바. 사업화 계획

(1) 근력개선 시장 현황

- 인구의 고령화의 가속화로 건강한 노년의 일상생활 유지· 삶의 질 향상을 위하여 근 감소에 대한 관심이 매우 증가하고 있음. 근 감소는 근력과 근육 기능의 감소로 삶의 질 저하뿐만 아니라 사망률의 증가를 초래하는 노인에게 매우 흔한 질병으로 알려져 있음
- 최근에는 과도한 다이어트와 부적절한 영양 섭취, 운동 및 신체활동 부족 등으로 인해 20-30대의 근감소증의 유병률 또한 증가하는 추세이며, 근력개선에 도움이 되는 식품에 관심이 높은 편이다.
- 근감소증을 치료할 수 있는 치료제는 아직 부재중으로 예방하는 것이 매우 중요함
- 현재까지 식품의약품안전처로부터 “근력개선”으로 기능성 인정받은 개별인정형 원료로는 총 4건으로 타 기능성에 비하여 매우 적음

	오미자추출물	강황추출물	저분자유청단백 가수분해물	발효굴추출물
인정현황	제 2018-9호	제 2023-5호	제 2023-22호	제2023-39호

- 근력개선 건강기능식품의 국내시장은 2022년 기준 997억 규모에서 연평균 7.4% 성장하여 2027년 1,424억 원 규모로 성장할 것으로 전망하고 있음

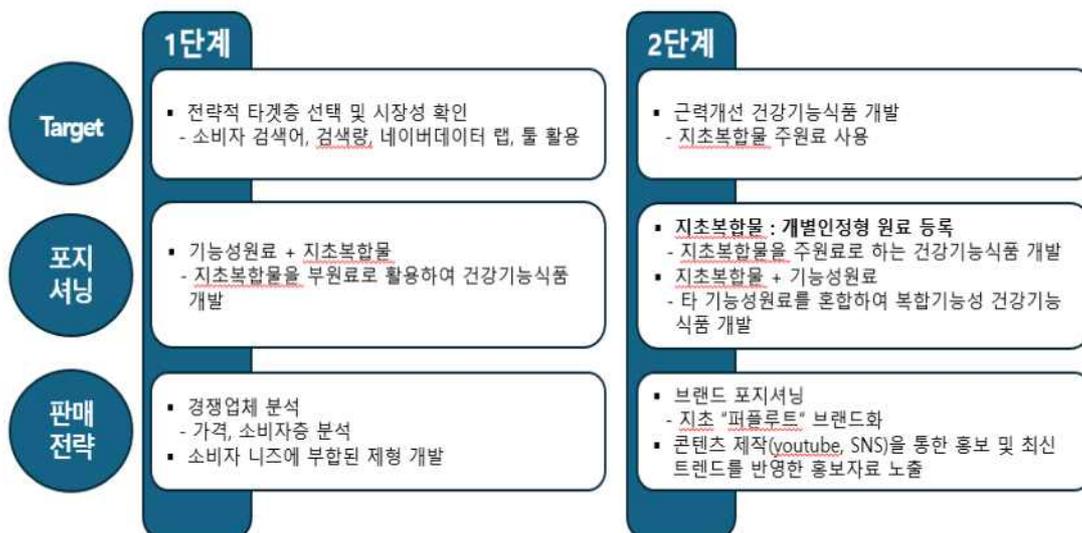


출처: 한국과학기술정보 연구원
ASTI MARKET INSIGHT 2023-195 근력개선 건기식

- 지초복합물이 개별인정형 원료 등록 이후 근력개선 원료 시장에서 활용 가치가 높은 새로운 기능성원료 소재로 자리매김을 할 수 있을 것으로 기대됨

(2) 사업화 계획

- 개별인정형 원료는 건강기능식품 기업의 핵심 경쟁력으로 독점적 경쟁력을 확보할 수 있어 개별인정형 원료의 중요성은 계속해서 커질 것으로 전망하고 있음. 또한, 근력개선 건강기능식품 시장 역시 고령화 등 사회적 현상으로 최근 주목받고 있는 분야로 향후 성장 가능성이 높을 것으로 전망하고 있음
- 본 연구과제 수행기간 중 개발된 제품들은 지초복합물을 부원료로 함유하여 제품화하였음. 향후 지초복합물이 개별인정형 원료로 등록된다면 부원료로 사용되는 지초복합물을 기능성 원료로 제품 개발이 가능하며 원료에 대한 독점으로 경쟁력 확보와 원료의 차별성으로 근력개선 건강기능식품 시장에 진입하고자 함
- “지초복합물” 원료는 신규 소재로써 이슈화뿐만 아니라 원료 소재, 가격, 효능적인 측면에서 성장 가능성이 있을 것으로 예상됨
- 지초복합물의 개별인정형 기능성 원료 등록은 2025년 상반기로 예상하고 있으며 제품 개발, 유통전문 기업들과의 협력, 공동 투자 등의 방법으로 매출 및 수출, 투자 등을 위한 방안을 모색 중에 있음
- 근력개선의 건강기능식품 시장 내 진입을 위해 1단계로 지초복합물을 부원료로 사용하여 건강기능식품을 개발하여 소비자 타겟층 및 시장성 확인, 제형의 다양화 등 소비자들의 니즈를 파악하고자 함. 향후 2단계에서 개별인정형 원료로 등록된 지초복합물 원료를 활용한 제품을 개발하여 근력개선 건강기능식품 진입과 복합기능성 제품 개발하여 시장에 진입하고자 함. 또한 브랜드화를 통하여 인지도 향상에 기여하고자 함



- 지초복합물의 개별인정형 기능성 원료 등록으로 2025년 이후 본격적으로 매출이 발생할 것으로 예상하고 있음

- 지초복합물의 개별인정형 기능성 원료 등록 이후 국내시장뿐만 아니라 해외시장 진출을 위한 미국식품원료[GRAS], 기능성식품원료[NDI] 등록을 검토하고 있으며 정부지원(한국화학융합시험연구원 등)을 활용하여 체계적으로 진행할 계획임

	개별인정 등록	개별인정 등록 1년 후	개별인정 등록 3년 후	개별인정 등록 5년 후
	2025년	2026년	2027년	2028년
매출액 (천원)	200,000	500,000	1,000,000	3,000,000
수출액 (천원)	-	-	50,000	100,000
투 자 (천원)	100,000	300,000	400,000	500,000

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

	연구 목표	세부 목표	연구 개발 목표			성과
			1차년도	2차년도	3차년도	
(주) 데이젠	원료 표준화	지초복합물 원재료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분 분석법 검증 유해물질 항목 분석 영양성분 분석 			<ul style="list-style-type: none"> 지초추출물 지표 성분 Lithospermic acid 인동추출물 지표 성분 Loganin 영양성분 공인 기관 성적서
		제조공정 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 원료 제조 공정 개발 제조공정별 지표성분 함량 분석 대량 생산 QC 			<ul style="list-style-type: none"> 지초복합물 제조공정도 확립 대량생산 3Lot 진행 지초복합물 지표성분 및 기준규격 설정 지초복합물 원료 품목제조보고
	인체 적용 시험	인체적용시험 프로토콜 개발		<ul style="list-style-type: none"> 피험자 선정/제외 기준 시험 디자인 시험자 선정 분석 마커 항목 		<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서 IRB 심의결과 통지서 인체적용시험 수행 계약서 수행기관: 아리비앤씨 실시기관: 대전대학교
		인체적용시험 IRB 신청		<ul style="list-style-type: none"> 심의신청서 작성 및 제출 시정/보완 계획 제출 		<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 완료 시험항목 분석 및 통계분석 (진행중)
		인체적용시험 수행			<ul style="list-style-type: none"> 피험자 모집 계속 실험기록지, 종례기록서 작성 의뢰자 모니터링 시험 항목 분석 및 통계 분석 개별인정 신 	

					청 및 등록	
건기식 제품 개발	근육 건강 관련 파생상품 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 약국유통용 제품 2종 개발 • 일반유통용 제품 3종 개발 • MKT/ sales 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> • 고령자 대상 제품 2종 개발 • MKT/sales 전략 수립 		<ul style="list-style-type: none"> • 상표 개발 • 제품 디자인 개발 • 마케팅 전략 수립 • 소비자 선호도 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 제품개발 총 9 종: 품목제조 신고 ✓ 상표개발: 퍼 플루트 ✓ 온라인몰
	지초복합물 활용 개별인정형 건기식 상품화		<ul style="list-style-type: none"> • 소재 특성에 맞춘 최적 제형 선정 • 지표성분 함량 분석 • 인체적용시험 용 제형 생산 			
한국식 품연 구원	지초 복합물 개발	지초복합물 최적 비율 선정	<ul style="list-style-type: none"> • 복합물 후보 소재 선정 • 혼합 비율에 따른 상승효 과 측정 • 최적 혼합 비율 도출 			<ul style="list-style-type: none"> ✓ 지초복합물 최 종 소재 : 인 동 ✓ 최적 혼합 비 율 : 1:1
	지초 복합물 근기능 개선 효능 평가	지초복합물의 근위축 개선 효능 구명	<ul style="list-style-type: none"> • 지초복합물 의 근세포 위축 개선 활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 지초 복합물의 근위축 개선 효능 검증 		<ul style="list-style-type: none"> ✓ 지초복합물의 근위축 개선 효능 검증 데 이터 ✓ 지초복합물의 근위축 개선 기전 규명
		지초복합물의 근육증진 효능 구명	<ul style="list-style-type: none"> • 지초복합물 의 근세포 분화 증진능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • C. elegans 활용한 노화성 근감소증 개선 효능 검증 		
		지초복합물의 근력 개선 작용기전 구명		<ul style="list-style-type: none"> • 지초복합물의 근력 개선 기전 구명 	<ul style="list-style-type: none"> • 기능/지표성 분의 활성 검증 • 기능/지표성 분의 작용기전 구명 	

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

< 정량적 연구개발성과 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021~2022)	2단계 (2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	학술발표	목표(단계별)	1	1	2	5
		실적(누적)	2	1	3	5
	논문 (SCI(E))	목표(단계별)	1	1	2	-
		실적(누적)	0	2	2	-
	논문평균 IF	목표(단계별)	3	3	3	5
		실적(누적)	0	3.9	3.9	5
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	특허출원	목표(단계별)	2	0	2	10
		실적(누적)	0	2	2	10
	특허등록	목표(단계별)	-	2	2	-
		실적(누적)	-	2	2	-
	기술실시	목표(단계별)	1	0	1	10
		실적(누적)	1	1	2	10
	제품화	목표(단계별)	7	2	9	15
		실적(누적)	4	5	9	15
	매출액	목표(단계별)	3,500,000	3,500,000	7,000,000	25
		실적(누적)	154,444	55,000	209,444	3.0
	고용창출	목표(단계별)	2	1	3	10
		실적(누적)	3	1	4	10
	투자유치	목표(단계별)	6,000,000	-	6,000,000	10
		실적(누적)	323,000	500,000	823,000	13.7
	수출액	목표(단계별)	-	300,000	300,000	10
		실적(누적)	-	0	0	0
	계	목표(단계별)				100
		실적(누적)				86.7

- * 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- * 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

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

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Gromwell (Lithospermum erythrorhizon) attenuates high-fat-induced skeletal muscle wasting by increasing protein synthesis and mitochondrial	Journal of microbiology and biotechnology	안지윤, 하태열, 김지선	JMB23-11	한국	한국식품연구회	SCIE	2023.12.21	1738-8872	100%

2	biogenesis Gromwell ameliorate s glucocortic oid-induce d muscle atrophy through the regulation of Akt/mTOR pathway	Chinese Medicine	안지윤, 유아영, 김정민	20(2024)	중국	한국식품연 구원	SCIE	2024. 01.29	1749-8546	100%
---	--	---------------------	---------------------	--------------	----	-------------	------	----------------	-----------	------

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회 학술대회	이현정 외	2021.10.29	부산	대한민국
2	한국식품영양학회	유아영 외	2022.10.20	제주	대한민국
3	Euromit 2023	하태열	2023.06.14.	Bologna	이탈리아

□ 기술 요약 정보

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

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	근 기능 개선 및 근력 약화 질환 예방용 조성물의 제조방법	대한민국	주식회사 데이젠, 한국식품 연구원	2023.08 .30	1020230 114373		주식회사 데이젠, 한국식품 연구원	23.12.1 2	1026143 860000	100%	Y
2	근력 약화 질환 치료용 약제학적 조성물 및 건강기능식품 조성물	대한민국	주식회사 데이젠, 한국식품 연구원	2023.08 .30	1020230 114318		주식회사 데이젠, 한국식품 연구원	23.12.1 2	1026143 820000	100%	Y

○ 지식재산권 활용 유형

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

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

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

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

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

○ 국제표준

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

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

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	퍼플루트 관절케어 플렉스	2021.06.29	우리바이오(주)	국내	건강기능식품	10개월	경인지방식품의 약품안전청장	2021.06.29
2	퍼플루트 우먼케어 플렉스	2021.07.26	우리바이오(주)	국내	건강기능식품	10개월	경인지방식품의 약품안전청장	2021.07.26
3	퍼플루트 홍경천 더블임팩트	2021.05.26	우리바이오(주)	국내	건강기능식품	10개월	경인지방식품의 약품안전청장	2021.05.26
4	퍼플루트 덴티케어 플렉스	2021.05.26	우리바이오(주)	국내	건강기능식품	10개월	경인지방식품의 약품안전청장	2021.05.26
5	헬로 마그	2023.12.01	(주)노바렉스	국내	건강기능식품	12개월	대전지방식품 의약품안전청장	2023.12.01
6	헬로 엠에스엠	2023.11.29	(주)노바렉스	국내	건강기능식품	12개월	대전지방식품 의약품안전청장	2023.11.29
7	Hello The 건강한 관절	2023.11.30	바이오디피씨(주)	국내	건강기능식품	11개월	서울지방식품 의약품안전청장	2023.11.30
8	Hello The 건강한 기억력	2023.11.30	바이오디피씨(주)	국내	건강기능식품	11개월	서울지방식품 의약품안전청장	2023.11.30
9	Hello The 날씬한 다이어트	2023.12.04	바이오디피씨(주)	국내	건강기능식품	11개월	서울지방식품 의약품안전청장	2023.12.04

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	전용실시권	지초 추출물을 유효성분으로 포함하는 근감소 예방 및 운동수행능력 향상용 조성물	(주)데이젠	2021.01.08		-
2	전용실시권	근 기능 개선 및 근력 약화 질환 예방용 조성물의 제조방법 등 2건	(주)데이젠	2023.12.08		-

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	기술사업화 지원	제품개발	(주)데이젠	93,000		2021	
60,577								2022		
55,000								2023		

* 1) 기술이전 또는 자기실시

* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
지초추출물 분말을 함유한 건강기능식품 제품 개발	2021	93,867	-	93,867	제품 9종 매출액 (관절케어플렉스, 우먼:어플렉스, 흥경천더블팩트, 덴티케어플렉스 헬로마그, 헬로엠에:엠, 더 건강한 관절, 더 건강한 기억력, 더 날카로운 다이어트)
	2022	60,577	-	60,577	
	2023	55,000	-	55,000	
합계		209,444	-	209,444	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		지초복합물 근 위축 개선 비임상 기능성 확인 지초복합물 함유 건강기능식품 제품화		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년		
	소요예산(천원)	300,000천원		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		200,000천원	1,000,000천원	3,000,000천원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내			1%	3%
국외			-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	지초복합물 근력개선 개별인정형원료 획득 후 타 기능성원료를 함유한 복합기능성 건강기능식품 제품화			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
		-	-	-
	수출	-	-	-

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2021년	2022년	2023년	
1	기술사업화지원	㈜데이젠	3	1	1	5
합계			3	1	1	5

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	2
		생산인력	
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

□ 법령 반영

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

□ 정책활용 내용

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

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

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

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	보도자료	인터넷기사_국토매일	데이젠'홍경천 더블 임팩트'출시	2021.06.21
2		인터넷기사_데일리팝	데이젠, 관절 연골 위한 건기식 '관절케어'약국 유통	2021.07.12
3		농업인신문	지초,건기식 개발_근건강 개선 등 효능	2021.08.13
4		식품저널_foodnews	[신상품]하이트진로'프로 아와인', 데이젠'우먼케어 플렉스', 투썸'홍차 녹차'	2021.08.20
5		ASTI MARKET INSIGHT	근력 개선 건기식	2023.10.19

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

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

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

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

○ 전시회 참가

번호	행사명	날짜	주관기관	장소	참가기관
1	2023 대한민국 식품대전	2023.11.15. ~ 2023.11.17	농림축산식품부, 한국농수산식품유통공사	양재at센터	(주)데이젠



2) 목표 달성 수준

추진 목표		달성 내용	달성도 (%)
1 차 년 도	○ 지초복합물의 원재료 표준화	○ 지표성분 validation ○ 유해물질 항목 분석 ○ 영양성분 분석	○ 100%
	○ 지초복합물의 제조공정 표준화	○ 원료제조 공정 개발 ○ 제조공정별 지표성분 함량 분석 ○ 대량생산 QC	○ 100%
	○ 근육 건강 관련 파생상품 개발	○ 약국유통용 제품 2종 개발 ○ 일반유통용 제품 3종 개발 ○ 마케팅 및 판매 전략 수립	○ 100%
2 차 년 도	○ 인체적용시험 프로토콜 개발	○ 피험자 선정/제외 기준 설정 및 모집 공고문 작성 ○ 연구계획서 작성을 위한 시험 디자인 개발 ○ 시험자 선정 ○ 분석 마커 항목 선정 ○ 기록 측정 자료 작성	○ 100%
	○ 인체적용시험 생명윤리 위원회(IRB) 심의 승인	○ 심의 신청서 작성 및 제출 ○ 시정/보완 계획 제출	○ 100%
	○ 인체적용시험 수행	○ 피험자 모집	○ 100%
	○ 지초복합물 활용 파생상품 개발	○ 고령자 대상 제품 2종 개발 ○ 마케팅 및 판매 전략 수립	○ 100%
	○ 개별인정형 건강기능식품 제형 개발	○ 소재 특성에 맞춘 최적 제형 선정 ○ 지표성분 함량 분석 ○ 인체적용시험용 제형 생산	○ 100%
3 차 년 도	○ 인체적용시험수행(계속)	○ 피험자 모집 (계속) ○ 실험기록지, 증례기록서 작성 ○ 의뢰자 모니터링 ○ 시험 항목 분석 및 통계 분석	○ 75%
	○ 지표/기능성분의 근육 건강 개선 효능 평가 & 식약처 개별인정 획득	○ 지표/기능성분의 근위축 개선 활성 측정 ○ 지표/기능성분의 근위축 개선 기전 구명 ○ 인체적용시험 결과 및 지표 기능성분의 효능을 기반으로 식약처 개별인정 획득	○ 67%
	○ 지초복합물 활용 건강기능식품 상품화	○ 상표 개발 ○ 제품 디자인 개발 ○ 소비자 선호도 분석 ○ 지초복합물 활용 상품 개발 ○ 마케팅 전략 수립	○ 100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 인체적용시험 결과보고서 확보

- 동물 실험 및 기전연구 결과에 대한 유의성이 있어서 인체적용시험을 진행하고자 하였으나 코로나 여파로 인하여 피험자 모집을 진행할 수 없어 불가피하게 지연되었음
- 또한, 인체적용시험 수행에 필요한 비용은 자사의 자부담으로 진행하여 코로나로 인한 경제적 어려움으로 인해 연구용역 비용 지급에 차질이 있어 계획된 일정보다 지연었음
- 현재 지초복합물의 인체적용시험은 2023년 12월로 시험 종료되었으며, 현재 blind 해제 중이며 통계분석 진행 중에 있어 상반기 내 결과보고서를 확보 예정임

○ 개별인정 신청 및 등록

- 연구개발 과제 최종 목표를 근력개선 기능성원료 획득을 목표로 설정하였으나, 기능성 원료 인정 획득을 위해서는 서류 제출 후 심사기간을 고려하여 3차년도(2023년) 내에는 인체적용시험 결과보고서 확보 및 기능성원료 관련 제출 자료가 확보되어야 했으나 연구개발 과제 진행 중 예상치 못한 제조공정상의 지표성분 변경, 기존 연구원들의 변경, 인체적용시험 일정 지연 등 여러 가지 상황으로 차질이 생겨 해당 과제 종료일까지 개별인정원료 신청 및 획득을 하는데 있어서 많은 어려움이 있었음
- 과제 종료 일정 내에 근 건강개선 개별인정형원료 신청 및 획득하지는 못하였으나 해당 목표를 달성하기 위해 공인기관을 통한 지표성분 분석법, 성적서, SCIE 논문 게재 및 유의적인 결과를 확보하였으며 추가적으로 인체적용시험 결과보고서 결과 확인 후 지초복합물의 근력개선 개별인정형 원료 인허가 서류를 작성할 예정임

○ 매출, 수출 및 투자유치

- 단순 원료 제공으로 매출액이나 투자 유치를 발생시키는데는 한계가 있었음. 다만, 인체적용시험에서 지초복합물의 근력개선 효능이 입증이 된다면 원료 및 제품화 등 영업을 통해 매출액 향상과 투자 유치 가능성이 확대될 것으로 예상됨
 - 향후 지초복합물이 기능성 원료로 인정 시, 제품 및 원료에 대한 매출을 확보가 가능하여 (주)데이젠에 전제 매출 향상, 투자 유치 등 기여도가 상승할 것으로 기대됨
-

2) 자체 보완활동

○ HACCP 및 GMP 인증을 받은 우수한 제조시설에서 지초복합물 원료를 생산하고 있으며, 지표성분 분석법, 기타 성적서 등 신뢰성을 위해 공인기관에 의뢰하여 해당 성적서를 발급받아 확보하여 인체적용시험 통계 결과가 유의적으로 나오면 식품의약품안전처에 건강기능식품 개별인정형 원료 신청 예정이며 신청을 위한 서류 작성을 준비하고 있음

○ 본 과제를 통해 생산된 제품을 판매하여 기업의 매출을 발생시키기 위해 건강기능식품 전문업체인 에이블비제(주)와 협약을 맺어 제품을 온라인으로 유통중에 있음. 제품의 차별화를 위해 신진작가들과 협업하여 소비자들에게 친근하게 접근할 패키지 디자인을 제작 중임

3) 연구개발 과정의 성실성

- Scale up하여 생산공정으로 넘어가면서 지표(기능)성분이 검출되지 않았음. 생산공정에 살균 과정(90℃, 30분)에서 이후 shikonin이 파괴되어 최종 원료인 지초추출분말에서 검출되지 않았음. 이는 시코닌(shikonin) 성분이 80℃ 이상에서 불안정하며 온도, 산소, pH에 따라 영향이 크다는 사실을 확인하였음. 따라서 시코닌(shikonin)이 지표(기능)성분이 적절치 않다고 판단하였으며 Lithospermic acid로 지표(기능)성분을 재설정하여 제조공정 표준화를 다시 진행하였음
 - 지표성분을 기존 시코닌에서 Lithospermic acid으로 변경하여 표준화 결과 3 Lot 생산에서 지표성분 분석 결과 일정하게 검출되는 것을 확인하였으며 추가적으로 기능성분으로서 적절한지 확인한 결과 기능성분으로서 유의적인 효과를 나타냈음
 - 지초복합물이 단일물을 사용하였을 때보다 세포실험에서 유의성이 더 높게 나타나 복합물로서 효과가 높은 것을 확인하였음
 - 인체적용시험용 식품 생산을 위해 여러 업체들과 함께 최적의 배합비를 설정하기 위해 진약과 위약의 외적인 형태와 맛까지 고려하여 배합비를 설정하여 피험자들에게 제공하였음
 - 지초복합물 원료를 사용한 건강기능식품을 제작하기 위해 우수한 생산시설을 통해 원료를 생산하였으며 최신 건강기능식품 생산 트렌트 및 소비자 선호도 조사보고를 통해 제형, 맛, 기능성원료 선택, 제조업체 선정 등 다방면으로 검토하여 제품을 생산하였음
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

가. 지초복합물의 근 기능 개선 효능 연구

- 기술이전 특허를 활용하여 지초추출물의 근 기능 개선과 혼합 시 근 기능 개선에 시너지 효과를 갖는 천연소재의 선정하였으며 복합물 조성비 확인하였음
- 본 연구 개발을 통해 지초복합물이 근 기능 개선 효능을 지닌 신규 기능성 복합물 소재 개발을 위한 기능성 기반 자료를 확보하였음

나. 근 기능 개선 신규 소재로써 지초복합물의 신규성

- 국내 “근력 개선”으로 기능성 개별인정형 원료로는 2018년 오미자추출물 이후로 2023년 최근에 강황추출물, 저분자유청단백가수분해물, 발효굴추출물 3건이 등록되었음. 향후 “근력개선” 건강기능식품 시장이 확대될 것으로 예상되어짐
- 향후 인체적용시험을 통해 근 기능 개선의 효능이 증명된다면 개별인정형 원료로 신규 등록이 가능하며 근력개선과 관련된 건강기능식품 시장의 확장과 새로운 방향을 제시

다. 국내 지역농가 소득 증대

- 지초의 주요 산지는 진도군과 2021년 계약재배를 시행하였음.
 - 원료공급의 안정화와 원료재배 및 표준화, 가공, 생산 물류 등 급 네트워크 사업화로 지초의 부가가치 상승 및 농가소득 증대하므로 지역사회 발전에도 기여하고자 함
 - 국내산 천연물을 활용한 근 기능 개선 제품 개발을 통해 고부가가치 소재로써 가능성을 입증하고 가치창출로 수요를 높여 국내산 천연물 생산 및 제품에 대한 생산량을 높여 지역경제 발전 및 고용 창출이 가능함
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

가. 연구성과의 활용 분야

- 근 기능 개선 효능을 지닌 신규 기능성 복합물 소재 개발 및 기능성 자료 확보로 근육 건강 관련 일반식품, 건강기능식품, 개별인정형 건강기능식품의 상품 고도화 가능
- 국내 천연자원의 활용을 통한 수입대체 및 우수원료 개발 및 표준화된 농식품 기능 소재의 해외시장 경쟁력 증대

나. 연구성과의 활용방안

- 본 연구개발을 통해 근 기능 개선 효능을 지닌 신규 기능성 복합물 소재가 개발될 수 있으며 이에 대한 기능성 기반 자료 확보가 가능함
- 건강기능식품 소재의 근 기능 증진 및 조절능을 평가할 수 있는 시스템의 개발 및 활용이 가능함
- 신규 기능성 소재는 개별인정형 건강기능식품 개발을 위한 기능성 원료로 개발에 활용할 수 있음
- 수입의존도가 높은 식품 원료산업에 국내 천연자원의 활용을 통한 수입 대체 및 우수 원료 개발 및 표준화 된 농식품 기능소재를 이용하여 해외시장 경쟁력 증대
- 기존의 기능성 식품의 천연원료 이용성 확대를 통하여 소비자 만족도 향상, 국내 식품 산업 활성화 및 식품과 농산업과의 연계성 증대

. 기업화 추진방안

- 지초복합물 내 지초와 인동은 건강기능 소재로 활용 가능한 천연물질로 오랜 기간 식용 및 약용으로 이용되어 왔으며 원료 안전성에 대해 검증된 소재임
- 향후 인체적용시험 등을 통하여 효능이 확인된 후 식약처 개별인정 소재로 등록하여 부가가치를 높이고자 함
- 현재 지초복합물을 활용한 제품은 유통전문판매원 (주)에이블비제를 통해 판매 실적이 발생할 수 있도록 마케팅을 진행하고자 함. 또한 개발 원료에 대한 영업을 위해 기술자료 작성하여 B2B 영업을 통하여 이로운 제품 및 원료에 대한 매출을 확보하여 (주)데이젠에 전체 매출 향상에 영향이 있을 것으로 예상됨
- 지초복합물이 개별인정형 기능성 원료 등록 이전에는 부원료로 활용하여 제품개발하여 매출 상승에 기여하고자 함. 또한 제품의 다양성을 위해 캡슐, 정제, 액상 외에도 환, 젤리स्ट릭 등 여러 가지 제형으로 제품을 출시하여 소비자들의 니즈를 파악하고자 함. 향후 개별인정형 기능성 원료 등록 이후에는 지초복합물을 주원료로 한 근력개선 건강기능식품 및 타 기능성 원료를 혼합한 복합기능성 제품 개발을 통하여 다양한 소비자들의 니즈를 충족시키고 지초 브랜드 인지도를 향상하고자 함

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	1
	비SCIE	
	계	
특허출원 (디자인, 상표 등)	국내	2
	국외	
	계	
특허등록 (디자인, 상표 등)	국내	1
	국외	
	계	1
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	1
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	2
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

뒷면지

주 의

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