

11-1543  
000-001  
404-01

발간등록번호

11-1543000-001404-01

베타카틴 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재  
탐색 및 양모기능성 스킨케어 제품개발 최종보고서

2016

농림축산식품부

# 고부가가치식품개발사업 R&D Report

## 베타카틴 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발

최종보고서

2016 . 08 . 30 .

주관연구기관 / ㈜내츄럴엔도텍  
협동연구기관 / ㈜켄온

고부가가치식품기술개발사업

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발”(개발기간 : 2013. 7. 16 ~ 2016. 7. 15)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 8. 30.

주관연구기관명 : (주)내츄럴엔도텍 (대표자) 김재수

협동연구기관명 : (주)켄온 (대표자) 송시환



주관연구책임자 : 홍 준 기

협동연구책임자 : 이 현 걸

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서  
열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	113011-3	해 당 단 계 연구 기 간	2013. 7. 16~ 2016. 7. 15	단 계 구 분	1 / 1
연구 사업 명	중 사업 명				
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과제 명				
	세부 과제명	베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발			
연구 책임자	홍준기	해당단계 참여 연구원 수	총: 51명 내부: 51명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부: 510,000천원 민간: 340,200천원 계: 850,200천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 51명 내부: 51명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 510,000천원 민간: 340,200천원 계: 850,200천원
연구기관명 및 소속 부서 명	(주)내츄럴엔도텍 생약호르몬연구소			참여기업명: (주)내츄럴엔도텍	
협 동 연 구	연구기관명: (주)캠온			연구책임자: 이현걸	

### 요약

본 과제에서는 안전성이 입증된 생약 천연물 식품소재의 추출물을 대상으로 베타카테닌 신호활성을 유도하는 후보군을 도출하고 이를 이용해서 탈모예방 활성을 지닌 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발을 위한 연구를 진행하였다. 비임상 효력시험을 통하여 최종 소재를 선정하여 독성시험을 완료하였으며, 개발소재의 품질관리설정 및 표준화를 통하여 시제품 제형결정 및 개발제품의 안정성시험을 진행하였다. 또한 간이 인체적용시험을 통해 홍반, 가피, 부종 등의 부작용이 확인되지 않아 안전한 소재임을 재확인하였다.

추가적으로 피부투과율을 높일 수 있는 피부투과 촉진 인핸서를 개발하여 제조공정을 구축하고 국제 화장품 원료집 (INCI)에 등재 하였다.

개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표를 통하여 과학적 근거자료를 마련하였다.

보고서 면수: 80

# 국문 요약문

		코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>탈모는 생명을 위협하는 질환이 아니므로 발모촉진 약제의 부작용을 감수하면서 사용하기에는 적절치 않아 최근에는 안전성이 확보되고 발모효과를 기대할 수 있는 천연물 유래의 발모촉진 소재 탐색개발이 매우 활발히 진행되고 있다. 본 과제에서는 안전성이 입증되어 다양한 식품원료로 사용되는 생약 천연물 식품소재의 추출물 또는 추출분획을 대상으로 베타카테닌 (beta-catenin) 신호활성을 유도하는 추출물 분획을 탐색하여 후보군을 도출하고 이를 이용해서 탈모예방 활성을 지닌 기능성 양모제품의 전임상 개발까지 완료하는 것을 목표로 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발을 위한 다음과 같은 연구를 진행하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 피부투과 촉진 인해서 제조라인(Pilot) 구축 및 생산</li> <li><input type="checkbox"/> 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련)</li> <li><input type="checkbox"/> 개발소재의 품질관리설정 및 표준화(물질특성연구 등)</li> <li><input type="checkbox"/> 시제품 양모효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보(허가제출 자료)</li> <li><input type="checkbox"/> 비임상 효력시험 및 독성시험 완료 (후속 개발을 통해 인체효력시험 진행이 가능한 수준의 개발자료 확보)</li> </ul>		
<p>연구개발성과</p>	<p>식품으로 사용 가능한 소재를 탐색하고 총 211가지의 후보 생약소재를 스크리닝하여 추출물을 제조하였다. 스크리닝 소재의 효능평가를 위하여 Wnt/<math>\beta</math>-catenin 신호 유도 촉진 활성 평가법과 5<math>\alpha</math>-reductase inhibition 효능평가법을 구축하여 두 in vitro 평가에서 우수한 활성을 보이는 생약을 선별 한 후, 각 소재에 대한 문헌 및 특허기술을 검토하여 향후 개발가능성이 높은 후보생약을 위주로 최종 4종의 양모 기능성 후보 생약소재 (곽향, 두충, 대황, 감송향)를 선정하였다.</p> <p><b>1. 개발 소재의 품질관리설정 및 표준화</b></p> <p><b>(1) 생약원료 선정구매/ in vitro 효능평가 탐색 평가용 시료제조</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 탈모 예방용 의약외품 및 생약소재를 참조하여 식품으로 사용 가능한 소재를 탐색하여 후보 생약소재 원료 선정.</li> <li>- Wnt/<math>\beta</math>-catenin 신호 유도 촉진 활성 평가 시스템 구축 및 활성 평가.</li> <li>- 5<math>\alpha</math> reductase inhibition 활성평가 시스템 구축 및 활성 평가.</li> <li>- 개발 가능성이 높은 생약소재 4종 (곽향, 두충, 감송향, 대황) 선정.</li> <li>- 4종에 대한 추출물 및 각 분획물의 in vitro 활성평가와 동물시험 결과 시제품 생산 후보 생약을 (중)대황과 감송향으로 최종 선정.</li> </ul> <p><b>(2) 시작품의 제품화 연구 및 활용기술개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대황 및 감송향 복합추출물(이하 대감 복합추출물)의 최적 추출 조건 확립.</li> <li>- 대감 복합추출물 Scale-up 생산.</li> <li>- 대감 복합추출물의 품질규격 설정.</li> <li>- 색상, 향취 및 탁도의 정도가 가장 좋고 침전물이 생성되지 않는 조건 확립.</li> </ul>		

연구개발성과

- 액상제제로서 손쉽게 두피에 분사하여 흡수되도록 디자인.

## 2. 시제품 제형결정 및 개발제품의 안정성시험(허가제출 자료)

### (1) 제품개발 CMC 자료준비

- '의약외품 품목허가·신고·심사·규정'에 따라 안전성·유효성 심사 자료 준비.
- 원료 및 완제의 물리·화학적 (Chemistry) 자료, 제조공정 (Manufacturing)에 관한 자료, 기준 및 규격설정과 안정성 (Controls)에 관한 자료 준비.

### (2) 제품개발 CMC 패키지

- 발모제 시작품을 생산하여 독성시험과 피부감작성 시험 진행.
- 원료와 완제의 품질관리 기준 및 안정성 확보.
- 원료 및 완제의 제조공정, 지표성분 선정, 분석법 검증, 기준 및 규격 설정, 안정성 평가 진행.

### (3) 원료 및 완제 안정성시험

- 장기보존조건 (25±5°C, 60±5% RH)과 가속조건 (40±5°C, 75±5% RH)에서 안정성 시험 진행.
- 원료(최대 15개월), 완제(최대 6개월)에서 지표성분의 유의적 함량변화 없음.
- 원료와 완제의 안정성 확보로 보관조건 및 유통기한 설정을 위한 데이터베이스 구축.

## 3. 비임상 효력시험 완료 및 독성시험 완료

### (1) 경피 흡수 후보제형의 예비효력시험

- 선별된 대항, 감송향, 광향, 두층 4종에 단일 및 복합추출물을 대상으로 설치류 발모동물을 이용해 예비 1차, 2차 동물효력 평가.
- 설치류 발모동물모델 효력평가 본시험을 통하여 발모 효력이 유의적으로 높았던 대항, 감송향 복합추출물 최종 원료 선정.

### (2) 비임상 독성시험

- SD-Rat를 이용한 단회 경피투여 독성시험 완료.
- SD-Rat를 이용한 2 주 반복 경피투여 독성시험(DRF) 완료.
- 국소독성시험 - 안점막자극시험 완료.
- 국소독성시험 - 피부자극시험 완료.
- SD-Rat 를 이용한 4주간 반복 경피투여 독성시험 및 2주 회복시험 완료.
- Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성 시험(Buehler 법) 완료.
- 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험 완료.
- 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 완료.
- 간이 인체적용 시험 완료.

## 4. 피부투과 촉진 인핸서 제조라인 구축 및 생산

### (1) 피부투과 촉진 conjugate enhancer 제조 및 물성연구

연구개발성과

- 피부투과율 증진 conjugate enhancer 제조라인 구축.
- 키토올리고당(COS), 페놀류 및 지방산의 컨쥬게이트 인핸서(COS-phenol- fatty acid) 개발.
- 정성 및 정량 분석법 확립.
- 피부투과율 비교실험을 통해 물성 평가.
- 컨쥬게이션 인핸서 구성 성분들의 항균력 평가.

## (2) 인핸서 물성연구

- 키토올리고당(COS)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인핸서 평가.
- 키토올리고당(COS)-페놀류(OA)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인핸서 평가.
- 최종 컨쥬게이션 인핸서의 광(光) 흡수평가.

## (3) conjugate enhancer 제조공정 구축

- 항산화 효과가 우수한 ferulic acid와 linoleic acid를 접합시킨 twosome에 키토올리고당(COS)을 접합시켜 threesome을 제조하는 방법으로 컨쥬게이션 인핸서의 제조공정 구축.
- 각 단계별 HPLC-RP분석으로 접합 확인.
- 페룰류-지방산의 Twosome 제조 및 평가.
- 키토올리고당-페룰류-지방산의 Threesome 제조 및 평가.
- 키토올리고당-페룰류-지방산의 Threesome 정제.

## (4) 생약 복합물제제의 경피 흡수 제형연구

- 대항, 감송향 추출물의 적절농도 및 에탄올 농도 설정.
- 매트릭스 배합 및 평가.
- 양모 활성성분의 추가배합 및 분무도 평가.
- 관능적 평가로 멘톨 및 착향료 첨가에 따른 향 masking 평가.

## (5) 인핸서 소재(기술)의 국제 화장품 원료집(INCI) 등재

- PCPC(personal care products council)에 INCI Name: Hydrolyzed Chitosan Ferulyl Linoleate, Trade Name: NE-201 등재.
- 국제 화장품 성분사전(the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Hand book), 웹기반 사전 wINCI(web-based Dictionary wINCI), 인포베이스(the Council's On-Line INFOBASE) 등에 등재되어 검색용이.

## 5. 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표

- 특허 : 7건 출원 1건 등록
- 논문발표 : 2건 투고 중
- 홍보 : 관련 학회 3회 실시

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p><b>[활용계획]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 무독성(저독성) 탈모예방 기능성 생약소재 추출물의 제조 및 효능평가 노하우 확보로 신제품 개발, 양산화 및 약효, 독성 데이터 확보</li> <li>- 탈모예방 기능성 원료사업화</li> <li>- 고부가가치 기능성 핵심소재/ 완제품의 국내외 매출확대</li> <li>- 경피 흡수 인핸서 기술개발/ 제품화기술적용</li> <li>- 피부투과효율 증진, 양모제품의 경쟁력 향상</li> </ul> <p><b>[기대 효과]</b></p> <p><b>1. 기술적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경피 흡수율이 증진된 탈모예방 천연 생약 추출물 제조기술 확보</li> <li>- 탈모억제 기전에 근거한 생약유레소재 제품화 및 핵심기술력 확보</li> <li>- 피부투과효율 증진기술</li> <li>- 화장품, 의약품 등 타 산업분야로 응용확대</li> <li>- 임상시험을 위한 신뢰성 있는 독성학적 기초자료를 확보함으로써, 의약외품 IND에 필요한 근거 자료 제공</li> </ul> <p><b>2. 경제적 · 산업적 측면</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경제적 고부가가치 창출 및 외화 수익 모델</li> <li>- 국내산 고품질 식품생약조달 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 농민 소득 증대 기여</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>탈모 예방</p>	<p>양모</p>	<p>베타카테닌 신호활성</p>	<p>기능성 스킨케어</p>	<p>생약</p>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>Alopecia is not a life-threatening disease. Therefore, it is inappropriate to take the risk of side effects by taking medications for hair growth. As a result, there is active research on searching for safe and effective remedies from natural ingredients for hair growth. In this study, extracted fractions inducing beta-catenin signaling activity were selected from natural herbal medicine ingredients safe to be used as food. The purpose of this study was to select candidate ingredients and develop a hair growth enhancing product with the goal of obtaining scientific data up to preclinical study to commercialize functional skincare product for hair growth.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Establishment of manufacturing process (pilot) and production for skin penetrating stimulation enhancer</li> <li><input type="checkbox"/> Utility patent and journal publication (for scientific evidence) of the developed product</li> <li><input type="checkbox"/> Establishment of quality control standard and standardization (research on material property) of the developed product</li> <li><input type="checkbox"/> Efficacy evaluation, formulation selection, and stability data (for regulatory documents) of sample product</li> <li><input type="checkbox"/> Non-clinical efficacy and toxicity studies (sufficient preliminary data for future clinical efficacy studies)</li> </ul>		
Results	<p>Ingredients allowed as food ingredient were searched, and 211 candidates of herbal medicine ingredients were screened and extracted for evaluation. To evaluate the efficacy of the screened ingredients, efficacy evaluation of Wnt/ b-catenin signaling activation and 5<math>\alpha</math>-reductase inhibition were studied in vitro. Ingredients with superior efficacy were selected, and related reference and patents were reviewed to select 4 candidates with higher potential for development of hair growth enhancing material (Agastachis Herba, Eucommiae Cortex, Rhei Rhizoma, Nardostachyos Rhizoma).</p>		



Results	<p><b>1. Establishment of quality control standard and standardization</b></p> <p><b>(1) Selection of herbal medicine ingredient / sample preparation for in vitro efficacy evaluation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Screening and selection of herbal medicine ingredients based on the ingredients allowed to be used as food and other quasi-drugs for alopecia prevention</li> <li>- Establishment and evaluation of Wnt/<math>\beta</math>-catenin signaling activity stimulation enhancement</li> <li>- Establishment and evaluation of 5<math>\alpha</math> reductase inhibition activity</li> <li>- Selection of 4 herbal medicine ingredients with high potential for development (Agastachis Herba, Eucommiae Cortex, Rhei Rhizoma, and Nardostachyos Rhizoma)</li> <li>- Final selection of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma for production of sample products after evaluating the extracts and fractions of 4 herbal medicine ingredients by in vitro and in vivo studies</li> </ul> <p><b>(2) Sample product commercialization and development of utilization technology</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establishment of optimal extraction conditions for mixed extract of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma.</li> <li>- Scale-up production of the mixed extract of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma</li> <li>- Establishment of quality control standards for the mixed extract of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma</li> <li>- Establishment of optimal conditions for the best color, odor, and transparency with low precipitation</li> <li>- Design for easy use in liquid form by spraying on the scalp</li> </ul> <p><b>2. Formulation selection and stability data of sample product (regulatory documents)</b></p> <p><b>(1) Preparation of CMC documents for product development</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Preparation of documents for safety and efficacy evaluation based on 'Regulation on registration, evaluation, and approval of quasi-drug products'</li> <li>- Preparation of documents for ingredient and finished product about physicochemistry, manufacturing documents, establishment of specifications and safety control</li> </ul>
---------	--

Results	<p><b>(2) CMC Package for product development</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manufacture of sample product and implementation of skin sensitization test and toxicity test</li> <li>- Establishment of Specifications for quality control and stability of ingredient and finished product</li> <li>- Establishment of manufacturing process, selection of marker compounds, analytical method validation, specifications, and stability study</li> </ul> <p><b>(3) Stability study of ingredient and finished product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stability test of real-time condition (25±5°C, 60±5% RH) and accelerated condition (40±5°C, 75±5% RH)</li> <li>- No significant change in marker compounds in the ingredient (up to 15 months) and the finished product (up to 6 months)</li> <li>- Establishment of storage condition and expiry of the ingredient and the finished product from the stability study database</li> </ul> <p><b>3. Completion of non-clinical efficacy and toxicity studies</b></p> <p><b>(1) Preliminary efficacy study for transdermal absorption candidate formulation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluation of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> efficacy pre-test on animals (rodents) with single or mixed extracts of Agastachis Herba, Eucommiae Cortex, Rhei Rhizoma, and Nardostachyos Rhizoma</li> <li>- Selection of final ingredients of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma with highest efficacy on hair growth efficacy testing</li> </ul> <p><b>(2) Non-clinical toxicity study</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Completion of single-dose toxicity study with transdermal administration on SD-Rat</li> <li>- Completion of 2-week repeated-dose toxicity study (DRF) with transdermal administration on SD-Rat</li> <li>- Completion of local toxicity study – eye irritation test</li> <li>- Completion of local toxicity study – skin irritation test</li> <li>- Completion of 4-week repeated-dose toxicity study and 2-week recovery study on SD-Rat</li> <li>- Completion of skin sensitization test (Buehler method) on Hartley guinea pigs</li> <li>- Completion of bacterial reverse mutation test</li> <li>- Completion of chromosomal aberration test on mammalian cultured cells</li> <li>- Completion of pre-clinical study</li> </ul>
---------	--

Results	<p><b>4. Skin penetrating stimulation enhancer</b></p> <p><b>(1) Manufacture and property study of skin penetrating stimulation conjugate enhancer</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establishment of manufacturing line of conjugate enhancer for increased transdermal penetrating rate</li> <li>- Development of conjugate enhancer of chitooligosaccharide (COD, ferulic acid, and fatty acid (COS-phenol- fatty acid)</li> <li>- Establishment of qualitative and quantitative analytical methods</li> <li>- Evaluation of physical property by transdermal penetrating test</li> <li>- Evaluation of antibiotic effects of the compounds in conjugation enhancer</li> </ul> <p><b>(2) Property study of enhancer</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluation of conjugate enhancer, chitooligosaccharide (COS) - fatty acid (PUFA)</li> <li>- Evaluation of conjugate enhancer, chitooligosaccharide (COS) - ferulic compound (OA) - fatty acid (PUFA)</li> <li>- Evaluation of optical absorption of final conjugation enhancer</li> </ul> <p><b>(3) Establishment of manufacturing process of conjugate enhancer</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establishment of manufacturing process of conjugation enhancer by manufacturing threesome by adding chitooligosaccharide (COS) to twosome of ferulic acid and fatty acid with high antioxidant activity</li> <li>- Confirmation of conjugation by HPLC-RP analysis of each procedure</li> <li>- Manufacture and evaluation of ferulic acid-fatty acid (twosome)</li> <li>- Manufacture and evaluation of chitooligosaccharide-ferulic acid-fatty acid (threesome)</li> <li>- Purification of chitooligosaccharide-ferulic acid-fatty acid (threesome)</li> </ul> <p><b>(4) Formulation study of transdermal absorption of mixed extract of herbal medicine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Establishment of the concentration of the mixed extract of Rhei Rhizoma and Nardostachyos Rhizoma and the concentration of ethanol</li> <li>- Formulation and evaluation by matrix</li> <li>- Evaluation of other hair growth enhancing compounds and spray pattern</li> <li>- Evaluation of odor masking from sensory evaluation of menthol and other flavoring additives.</li> </ul>
---------	---

Results	<p><b>(5) Registration of enhancer material (technology) in INCI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Registration of INCI name (Hydrolyzed Chitosan Ferulyl Linoleate) and trade name (NE-201) in PCPC(personal care products council)</li> <li>- Easy searching by registering in the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Hand book, wINCI (web-based Dictionary wINCI), INFOBASE (the Council's On-Line INFOBASE)</li> </ul> <p><b>5. Utility patent application and journal publication of developed material</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Patent : 7 Applications, 1 registration</li> <li>- Publication : 2 publications in process</li> <li>- Advertisement : 3 presentations at conferences</li> </ul>
Expected Contribution	<p><b>[Application plan]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manufacture and efficacy study of non-toxic (low toxic) functional herbal medicine extract for prevention of alopecia for new product development, mass production, efficacy and toxicity data</li> <li>- Commercialization of functional ingredient for prevention of alopecia</li> <li>- Increased sales from high added value functional ingredient and its finished product</li> <li>- Technology development and technology application of transdermal absorption enhancer</li> <li>- Increased transdermal penetration efficacy and hair growth product competitiveness</li> </ul> <p><b>[Expected outcome]</b></p> <p><b>1. Technological outcome</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Natural herbal extract for prevention of alopecia through increased transdermal absorption</li> <li>- Core technological development and commercialization based on natural herbal extract based on the mechanism of alopecia inhibition</li> <li>- Increased transdermal delivery efficacy</li> <li>- Expanded usage in cosmetics and pharmaceutical industry</li> <li>- Provision of reference for IND of quasi-drugs based on reliable toxicity studies prior to clinical studies</li> </ul>

<p>Expected Contribution</p>	<p><b>2. Economic and Industrial outcome</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Economic, high added value product and foreign currency profit model</li> <li>- Increased agricultural income for high quality domestic herbal medicine supply and cultivation</li> </ul>				
<p>Keywords</p>	<p>Prevention of alopecia</p>	<p>hair growth</p>	<p>Signaling activation of beta-catenin</p>	<p>Functional skincare</p>	<p>Herbal medicine</p>

## 영문목차

### < Contents >

1. Introduction .....	1
2. Current status of domestic and international R&D .....	5
3. R&D content and result .....	7
4. Accomplishment and contribution in the related field .....	76
5. Application plan .....	77
6. Overseas scientific technology reference .....	77
7. Security level of R&D accomplishments .....	77
8. Laboratory facility and equipment status registered in NTIS .....	77
9. Compliance with safety instructions of the laboratory .....	78
10. Representative accomplishments .....	79
11. Additional information .....	79
12. Reference .....	80

<Appendix> Self-evaluation statement

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	5
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	7
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	76
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	77
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	77
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	77
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	77
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	78
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	79
11. 기타사항 .....	79
12. 참고문헌 .....	80

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

- 피부투과 촉진 인해서 제조라인 (Pilot) 구축 및 생산
- 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표 (과학적 근거자료 마련)
- 개발소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질 특성연구 등)
- 시제품 양모효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보 (허가용 제출자료)
- 비임상 효력시험 및 독성시험 완료  
(후속 개발을 통해 인체효력시험 진행이 가능한 수준의 개발자료 확보)

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 기술(제품)개발 배경

본 과제에서는 안전성이 입증되어 다양한 식품원료로 사용되는 생약 천연물 식품소재의 추출물 또는 추출분획을 대상으로 베타카테닌 (beta-catenin) 신호 (signaling) 활성을 유도하는 추출물 분획을 탐색 발굴하고 이를 이용해서 탈모예방 활성을 지닌 기능성 양모제품의 전 임상 개발까지 완료하는 것을 목표로 함.

모발성장 관련하여 최근 많은 연구자들이 Wnt/beta-catenin canonical pathway 가 발모기전과 밀접히 관련되어 있다는 연구결과 보고를 하였고<sup>1)</sup> 특히 dermal papillar cell에서 ALP 발현은 모발성장 유도의 지표로서 간주하고 있음<sup>2)</sup>. 이에 당사는 주요 식품생약소재들이 이러한 기작과 직간접적으로 연관되고 있음을 사전 문헌조사 등을 통해 확인.

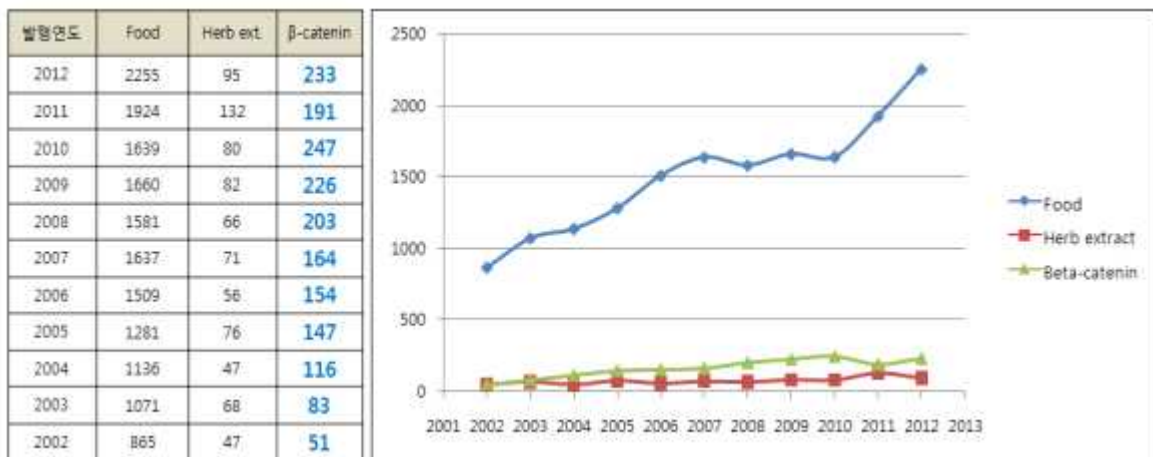


표. 사이언스다이렉트에서 탈모 관련 검색어 조사 결과



상기의 그림은 해외 학술문헌 DB인 사이언스다이렉트(science-direct)에서 탈모(hair loss)와 표기된 검색어를 중심으로 탈모분야의 발표논문 추세를 조사한 자료임. 추세를 보면 탈모와 식품 연계 분야에서 많은 연구가 진행되고 있음을 확인할 수 있고 천연추출물과 카테닌 신호전달 관련성 연구는 지속적으로 증가하고 있음을 확인.

□ 기존 발모제품의 소개, 개발동향 및 문제점

단일 화합물 관점에서 현재까지 미국 FDA가 공식 승인한 발모제는 미국 머크社의 Propecia와 업존社가 개발한 Minoxidil이 있음. 전자는 전립선 비대증 치료제 그리고 후자는 고혈압 치료제의 임상개발 과정에서 부작용으로 나타난 발모촉진 현상을 신제품으로 추가 개발한 대표적 사례임. 특히 피부에 바르는 제품으로는 미녹시딜이 유일.

미녹시딜 제제는 2% 및 5% 용액제로 개발되었으며 모발개선 효과를 기대하기 위해서는 최소 4개월 이상 지속적인 사용이 권장. 미녹시딜 제제의 알려진 부작용으로서는 국소적으로는 가려움증, 홍반, 피부염, 모낭염, 두드러기와 부종 같은 알레르기성이 있고 전신반응으로는 빈맥, 협심증, 전색, 부종 등이 나타날 수 있다고 알려져 있음.

최근 연구보고에 따르면 천연 생약추출물의 발모촉진 효과는 세포 내 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달 과정을 통해 모발성장이 촉진되는 기전이 제시. *Aconiti ciliare Tuber* (토부자) 추출물의 발모 유도효과는 Wnt/beta-catenin 신호전달체계의 활성화에 의해 진행된다고 발표<sup>3)</sup>. 토부자 추출물은 neural progenitor cell의 분화를 촉진하였고 처리 용량에 의존적으로 iDPC (immortalized dermal papilla cell)의 증식과 ALP 활성을 증대시켰으며 이러한 자극은 최종 실험용 쥐(C57BL/6)에서 발모 촉진 효과로 나타났음.

다른 문헌보고는 *Polygonum multiflorum* (하수오) 추출물을 상기와 동일한 종류의 실험용 쥐 피부에 도포하였을 때 Shh(Sonic hedgehog)와 beta-catenin의 상승 발현 조절작용을 통해 발모 성장을 유도한다고 발표하였음<sup>4)</sup>. 하수오는 동양에서 전통적으로 탈모를 치유하는 용도로 사용되어 온 천연 생약재임.

최근 수십년간 간질 (epilepsy) 및 우울증 (bipolar disorders) 치료제로 처방되어 온 valproic acid (VPA, histone deacetylase inhibitor)는 몇 개의 신호전달 체계, 즉, PKC, ERK, Wnt/ $\beta$ -catenin 등에 관여하는 것으로 알려졌다. 문헌보고에 따르면 인간 dermal papilla cell을 이용한 VPA의 발모 촉진 효과시험에서 Wnt/ $\beta$ -catenin signaling이 활성화되었고 동시에 ALP (alkaline phosphatase)의 발현량이 증가됨이 확인되었음. 이는 ALP 발현량 증가에 있어서 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계가 활용된다는 의미이며 그 결과로서 dermal papilla cell의 성장을 통해 모발성장이 촉진되는 것으로 판단됨. 사실상 ALP는 human dermal papillar cell의 전형적인 마커로서 보고되었음<sup>5)</sup>.

Hair loss 는 생명을 위협하는 질환이 아니므로 발모촉진 약제의 부작용을 굳이 감수하면서

사용하기에는 적절치 않음. 따라서 최근에는 안전성이 확보되고 발모효과를 기대할 수 있는 천연물 유래의 발모촉진 소재 탐색개발이 매우 활발히 진행되고 있음.

미녹시딜과 유사한 경구용 발모제로 승인받은 미국 머크社의 프로페시아 (propecia) 제품은 finasteride 물질을 함유하는데 이는 Type II 5 $\alpha$ -reductase의 억제제로서 작용하며 체내의 testosterone이 DHT (dihydrotestosterone)으로 전환되는 과정을 조절함. 최근 Naphatsorn Kumar 등 연구자 들은 *Carthamus tinctorius* L (홍화), 일명 인디안 구스베리(indian gooseberry)로 호칭되는 *Phyllanthus emblica* L (서양까치밥) 그리고 *Alpinia galanga* Swartz (고량강) 등 전통적으로 민간 처방에서 많이 사용되는 수십 가지 식물추출물 들이 5 $\alpha$ -reductase 억제효과를 가지고 있음을 밝혀 이를 학계에 보고하였음<sup>6)</sup>.

· 주요 시판 제품



마이녹실 (현대약품)



프로페시아 (한국 MSD)

이러한 천연물의 5 $\alpha$ -reductase 억제효과를 천연물 제품으로 개발한 사례로서는 미국에서만 연간 2백만명 복용하는 *Serenoa repens* (*Sabal serrutala*) 추출물 (saw palmetto 톱야자나무) 이 있는데 이는 임상효력시험 개발을 거쳐 표준화되어 Permixon® 라는 제품으로 전립선비대증 치유목적으로 판매 중임.

· 주요 시판 제품의 부작용 현황

미녹시딜	프로페시아
① 입술, 혀, 안면, 목 부종 (swelling of the lips, tongue, face, throat)	① 알러지 증상: 입술, 혀, 안면, 목 부종 (swelling of the lips, tongue, face, throat), 두드러기 (hives)
② 두드러기 (hives), 가려움증 (itching)	② 남성 유방암 증상: 유방 종괴 (breast lumps), 통증 (pain), 유두 분비물 (nipple discharge)
③ 호흡곤란 (difficulty breathing)	③ 발기부전 (Impotence), 성욕 감퇴 (loss of interest in sex)
④ 머리가 어질한 증상 (lightheadedness)	④ 어지럼증 (Dizziness), 두통 (headache), 콧물 (runny nose), 피부 발진 (skin rash)
⑤ 불규칙한 심박동 (irregular heartbeat)	
⑥ 어지러움 (dizziness), 가슴통증 (chest pain), 두통 (headache)	
⑦ 홍반 (redness), 건선 (dryness)	
⑧ 두피박편 (flaking of the scalp)	

이에 본 과제에서는 식품 생약소재를 대상으로 베타카테닌 신호활성을 유도하는 후보군을 도출하고 이의 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발을 위한 연구를 진행하였음.

### 1-3. 연구개발 범위

연차	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 생약식품소재 선정/검증 및 원료구매</li> <li>· 열수추출/용매별 추출분획 등 평가시료 제조 및 탐색분석</li> <li>· 활성분획의 원료표준화연구(분석)</li> <li>· 피부투과율 증진 인핸서(enhancer) 제조기술 공정확립(scale-up) 및 시작품 제조평가</li> <li>· 인핸서 개발물질의 물성연구</li> <li>· INCI (국제화장품원료집) 등재</li> <li>· DPC (Dermal papilla cell) culture 및 평가법 확립/검증: Wnt/beta-catenin canonical pathway 활성인자 탐색 (위탁개발)</li> <li>· 5-<math>\alpha</math>-reductase inhibition assay 천연 생약소재 활성탐색(위탁개발)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 조사대상 생약원료의 분류 형태학적 구분 및 검증</li> <li>· 생약활성분획의 기준설정과 규격화</li> <li>· 다단계 유기용매 분획 추출 및 열수추출</li> <li>· 지방산유도체 개발 선행연구결과에 근거하여 평가용 시료공급에 적합한 규모의 생산공정 개발</li> <li>· 미국화장품협회에 원료등재신청 전문가 패널 리뷰 및 등록추진</li> <li>· DPC cell line 확보 및 세포배양 생약추출물 소재의 탐색분석: beta-catenin 신호체계 활성물질탐색</li> <li>· 탈모관련 signaling pathway 분석을 통한 메카니즘 연구</li> </ul>
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 시제품 개발을 위한 천연복합제제 제형 연구 및 예비효력시험</li> <li>· 소재개발 특허출원 및 문헌발표</li> <li>· 양모제 개발 식약처 가이드라인에 따른 동물효력시험 진행(본시험)</li> <li>· 제품개발 CMC (Chemistry, manufacture and control) 자료준비</li> <li>· 제형원료 생산라인 구축(pilot)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· PUFA 지방산의 유도체가 포함된 제형탐색 및 후보시제품의 효력탐색</li> <li>· 발굴된 천연생약 식품소재의 작용기전 학술지 보고 및 용도특허 출원</li> <li>· 표준화된 시험방법의 의거하여 탈모 예방에 대한 동물효력 시험 진행</li> <li>· 식약처 제품허가승인 신청절차에 따른 관련 패키지 서식구비</li> <li>· 제조공장 pilot 설비도입</li> </ul>
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 비임상 탈모억제 효력시험 결과</li> <li>· GLP 독성시험 (단회피하, 4주 반복경피, 토끼안점막, 피부자극, 피부감작성)</li> <li>· 독성시험 결과보고서</li> <li>· 시제품 안정성 평가 (효력시험포함)</li> <li>· 제품개발 CMC (Chemistry, Manufacture and control) 자료</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 탈모억제 효력시험 보고서 filing</li> <li>· 독성시험 결과보고서 filing</li> <li>· 제품 안정성 평가 중 potency test는 동물 효력시험으로 수행예정</li> <li>· 개발 자료에 패키지 문서화 (regulatory affairs 업무)</li> </ul>

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 2-1. 국내 탈모 시장의 규모 및 성장성

- 국내 탈모시장 규모는 2012년 3조원대를 형성하고 있고 향후 지속적으로 성장하여 2017년에 3조 9천억원대까지 증가하여 30%의 성장을 이룰 것으로 예측 (아시아경제 12.06.19).
- 국내 탈모 환자 수는 누적 기준으로 1,000만명이며 ‘탈모질환’의 진료환자는 2009년 기준 18만 1000명으로 집계 (국민건강보험공단 2011년 3월 자료).
- 탈모 진료환자 수는 최근 5년간 24.8% 증가하였고 2005년 102억원대의 탈모 진료비는 2009년 153억원으로 50% 증가.
- 진료 연령대도 점차 낮아져 전체 진료환자 중 20~30대 진료환자의 비율이 8만 8000명으로 전체의 48.4%를 차지.

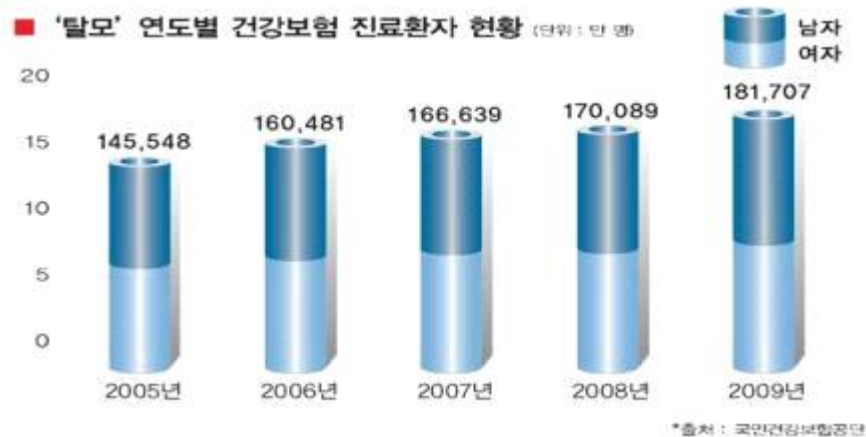


그림. 연도별 탈모 질환에 대한 건강보험 진료 환자 현황 (출처: 국민건강보험공단)

### 2-2. 해외 탈모시장의 규모 및 성장성

(단위: 억원/억불/위안)

구분	현재의 시장규모	예상 시장규모
일본	2012년 4300억엔 (6조원, 헬스조선)	
		2005년 40~50억불
중국	2010년 200억 위안	
		2006년 100억 위안, 2008년 140억 위안(홍콩두피모발연구소)
글로벌	2010년 676억불 (Dow Corning/hair care)	2015년 843억불 (Dow Corning/hair care)
		2014년 476억불 (Datamonitor)

□ 국외 탈모예방 제품동향

탈모억제와 관련된 제품으로는 국내 시장 동향과 유사하게 Nutritional dietary supplement 중심으로 온라인 및 오프라인에서 제품이 판매되고 있음.

□ Porcerin 제품

두 가지로 구성되어 있는 제품이며 경구투여로 두피 모발 건강에 영양을 공급하는 제품과 두피에 직접 도포하는 topical solution으로 세트로 구성됨. 본 제품의 탈모억제 작용기전은 풍부한 영양공급과 동시에 천연형 DHT (dihydrotestosterone) 생성을 억제하는 기능성분들인 azelaic acid, vitamin B6와 아연(zinc) 등이 함유되어 있음. DHT생성을 억제하는 saw palmetto가 주성분으로 포함된 제품으로 남성형 탈모증 제품.

□ Profollica activator gel 제품

본 제품은 샴푸와 경구제 그리고 topical gel의 세트로 구성되어 있음. 샴푸를 한 후 세척된 두피부위에 topical gel 제품을 도포하고 도포전후로 경구제를 복용하는 사용법임. 기능적으로 샴푸는 두피의 피지(sebum)를 제거하며 촉촉한 두피에 Gingko Biloba(은행잎추출물) and Panax Ginseng(인삼추출물) 등이 포함된 젤을 마사지 법으로 도포. 기타 성분으로는 Arginine, Acetyl Tyrosine, Arctium Majus Root Extract, Kigelia Africana Fruit Extract들도 포함되어 있으며 이들 성분들은 두피에서 DHT 생성을 억제함.

□ 식품 영양학적으로 탈모예방에 도움이 되는 알려진 영양성분은 다음과 같음.

- ① Saw Palmetto (톱야자열매분말) : dihydrotestosterone (DHT) 생성억제
- ② Beta Sitosterol : testosterone 수용체를 억제
- ③ Copper : 아연과 더불어 모발성장 세포를 자극하며 모발의 강도를 개선함
- ④ Zinc : 구리와 유사한 기능수행. 특히 비타민 B6와 함께 작용하여 DHT 생성을 억제함
- ⑤ B-vitamins : B군 비타민은 모발성장과 연관됨. B1, B5, Pyridoxine, B6, B9, B12.

□ DHT 생성억제 기능을 갖는 천연성분이 포함된 제품들은 다음과 같음.

*Serenoa repens Sabal serrutala* (Saw palmetto)

□ Permixon은 saw palmetto를 주원료로 사용하며 미국에서 임상검증을 거쳐 DHT 생성억제 기능성 식품으로 판매되고 있는 제품.

A.



Pygeum africanum

B.



Hypoxis rooper

C.



유럽 등지에서 OTC로 판매되는  
의약품으로 허가된 제품

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 3-1. 후보 생약선정 및 개발 후보군 (추출물) 도출

##### 가. 양모 기능성 후보생약 소재 탐색 및 선정

##### (1) 양모 기능성 후보생약 스크리닝

양모 시장에 출시된 탈모 예방용 의약품 및 생약소재를 참조하여 식품으로 사용 가능한 소재를 탐색하여 총 211가지의 후보 생약소재를 스크리닝 하였음. 각 후보생약들의 추출물을 제조하고 1~7차에 걸친 Wnt/beta-catenin 신호 유도 촉진 활성을 평가를 통해 높은 활성을 가진 생약들을 스크리닝 하였고, 양모의 기능성이 연구된 생약을 추가하여 **1차적으로 선별한 결과 총 30종의 생약 (산수유, 쇠비름, 하고초, 곽향, 두충, 상백피, 비파엽, 의이인, 울금, 은행나무잎, 잔대, 짚신나물, 회화나무, 동과자, 지황, 건강, 굴핵, 대황, 감수, 사상자, 감송향, 오약, 백강잠, 빈랑자, 절패모, 호장근, 차전자, 여주, 연자육, 구기자)**이 양모의 효력을 가질 것으로 예상하였음.

30가지의 생약을 대상으로 추출물 또는 분획물을 제조하여 Wnt/beta-catenin 신호 유도 촉진 활성과 5 $\alpha$ -reductase inhibition 효능평가를 함께 진행하였고, 두 *in vitro* 평가에서 우수한 활성을 보이는 생약을 **2차적으로 선별한 결과 총 8종의 생약 (울금, 쇠비름, 감송향, 사상자, 지황, 건강, 굴핵, 대황)**이었으며 각 소재에 대한 문헌 및 특허기술을 검토한 후 향후 개발 가능성이 높은 후보생약을 위주로 하여 **최종 4종의 양모 기능성 후보 생약소재 (곽향, 두충, 대황, 감송향)를 선정**하였음.

그림. 후보 소재 선정 프로토콜

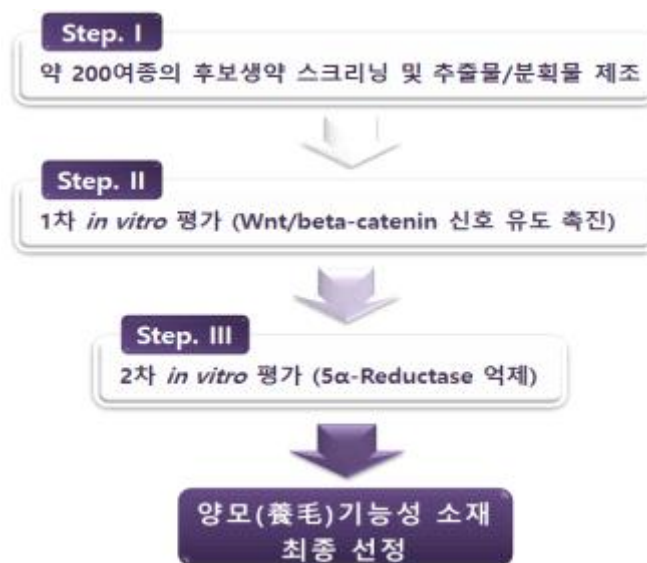


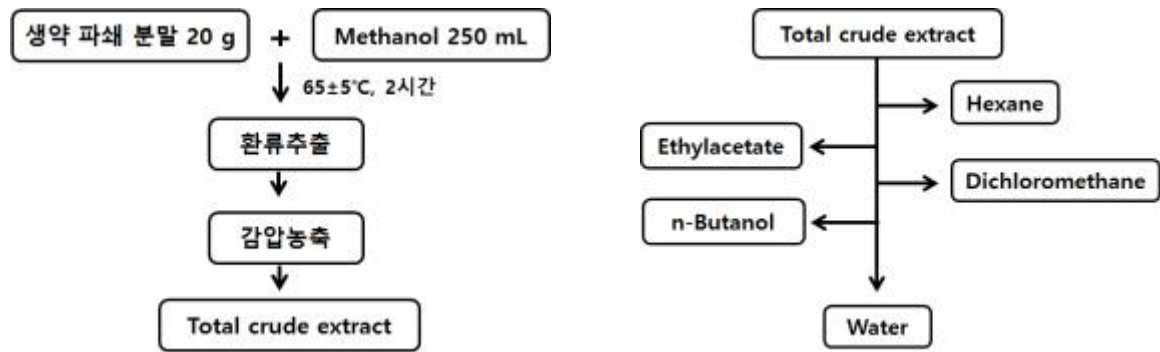
표. 후보 소재 스크리닝

NO	Name	NO.	Name	NO.	Name	NO.	Name	NO.	Name
1.	가자	51.	더덕	101.	상기생	151.	은행나무잎	201.	홍화자
2.	갈대뿌리	52.	도근	102.	상륙	152.	의이인	202.	화살나무
3.	갈화	53.	도인	103.	상백피	153.	이엽우피소	203.	황금
4.	감나무잎	54.	독활	104.	상심자	154.	이질풀	204.	황기
5.	감송향	55.	동과자	105.	서리태	155.	익모초	205.	황련
6.	감수	56.	두충	106.	서목태	156.	인동초	206.	황정
7.	감초	57.	둥굴레	107.	석창포	157.	자근	207.	황칠
8.	강향	58.	마가목	108.	선복화	158.	자소엽	208.	회향
9.	강황	59.	마황	109.	솔잎	159.	자소자	209.	회화나무
10.	개똥쭉	60.	메밀	110.	쇠뜨기풀	160.	작약	210.	후추
11.	개자	61.	모과	111.	쇠비름	161.	잔대	211.	희림
12.	건강	62.	목단피	112.	수세미	162.	저실자		
13.	검인	63.	목천료	113.	신선초	163.	적소두		
14.	견우자	64.	목향	114.	신이	164.	적하수오		
15.	결명자	65.	몰약	115.	싸주아리쭉	165.	절패모		
16.	계지	66.	미후도	116.	씀바귀	166.	정력자		
17.	계피	67.	박하	117.	아풀	167.	조구등		
18.	고량감	68.	반대해	118.	애엽	168.	죽여		
19.	고본	69.	반지련	119.	야관문	169.	줄풀		
20.	고삼	70.	방기	120.	양제근	170.	지각		
21.	곡기생	71.	방풍	121.	어성초	171.	지골피		
22.	골담초근	72.	백강잠	122.	엄나무껍질	172.	지유		
23.	골쇄보	73.	백단향	123.	여정실	173.	지황		
24.	공사인	74.	백렴	124.	여주	174.	짚신나물		
25.	곽향	75.	백모근	125.	연교	175.	차전자		
26.	괴화	76.	백목련	126.	연잎	176.	차전초		
27.	구기자	77.	백미	127.	연자육	177.	창이자		
28.	구맥	78.	백부근	128.	오갈피나무	178.	천궁		
29.	구자	79.	백부자	129.	오리나무	179.	천마		
30.	구절초	80.	백선피	130.	오매	180.	천문동		
31.	구척	81.	백전	131.	오미자	181.	청피		
32.	국우	82.	백지	132.	오수유	182.	초도구		
33.	굴핵	83.	백출	133.	오약	183.	초석잠		
34.	금앵자	84.	백편두	134.	옥수수수염	184.	초오		
35.	급성자	85.	복신	135.	옥촉서예	185.	충위자		
36.	길경	86.	비파엽	136.	옻나무	186.	측백엽		
37.	까마중	87.	비해	137.	용아초	187.	치자		
38.	꾸지뽕	88.	빈랑자	138.	용안육	188.	취		
39.	꾸지뽕잎	89.	뽕나무가지	139.	우방자	189.	택란		
40.	나복자	90.	뽕나무잎	140.	우슬	190.	토복령		
41.	노근	91.	사삼	141.	옥리인	191.	관람금		
42.	녹차	92.	사상자	142.	울금	192.	포공영		
43.	닥나무	93.	사철쭉	143.	월견자	193.	하고초		
44.	단삼	94.	산두근	144.	위령선	194.	한속단		
45.	닭의장품	95.	산사	145.	유근피	195.	함초		
46.	대계근	96.	산수유	146.	유백피	196.	행인		
47.	대두황권	97.	산약	147.	육계	197.	지구목		
48.	대추	98.	산죽	148.	육두구	198.	지구자		
49.	대풍자	99.	산초	149.	은시호	199.	형개		
50.	대황	100.	삼백초	150.	은행	200.	호장근		

(가) 활성평가용 시료 제조

211종에 해당생약은 아래와 같은 공정으로 추출물을 얻었고, total crude extract로 명명함. 본 시료는 Wnt/beta-catenin 신호 활성평가를 통해 높은 활성을 나타내는 생약들에 한하여 각각 hexane, ethylacetate, dichloromethane 및 n-butanol 분획물을 제조하였으며, Wnt/beta-catenin 신호 활성 평가와 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가를 추가적으로 실시하여 가장 양모기능성이 우수한 생약소재를 선별하였음.

그림. 단일 추출물 제조 및 분획물 제조 공정

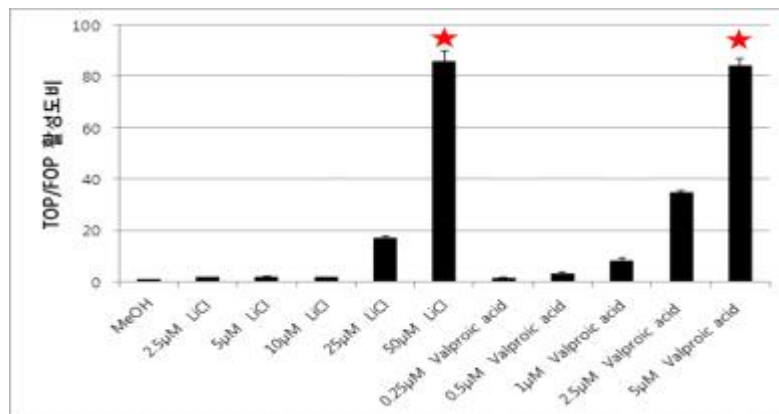


(나) 후보생약 1차 스크리닝

① 양성 시험군 및 농도 설정

양성 실험군으로서 일반적으로 Wnt 신호 전달 체계를 활성화 시킨다고 알려진 Lithium chloride (이하 LiCl)와 Valproic acid를 이용하여 분석법을 검증하였고, 결과 해석은 Dual-Luciferase Assay System (Promega, USA)의 표준 방법대로 lysis 해서 활성도를 측정하였음. Renilla luciferase 활성도는 transfection efficiency를 normalization 하기 위해 사용되었음. TOP/renilla 활성도 비를 FOP/renilla 활성도 비로 나눈 후 MeOH 실험군의 값을 1로 변환하여 상대적인 TOP/FOP 활성도 비를 구하였음.

그림. 양성 시험군 Lithium chloride (이하 LiCl) 및 Valproic acid의 활성평가 농도 확인



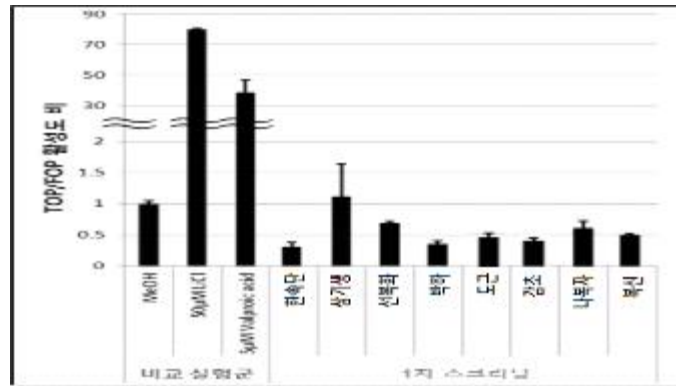


양성 시험군의 활성농도는 실험을 통해 최종적으로 활성도 비가 가장 높게 나타난 50  $\mu$ M 의 LiCl과 5  $\mu$ M의 Valproic acid를 선정하였음.

② 1차 소재 스크리닝

1차 스크리닝 대상 생약인 한속단, 상기생, 선복화, 박하, 도근, 감초, 나복자 및 복신을 평가한 결과 비교 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 값을 보이는 생약은 나타나지 않았음.

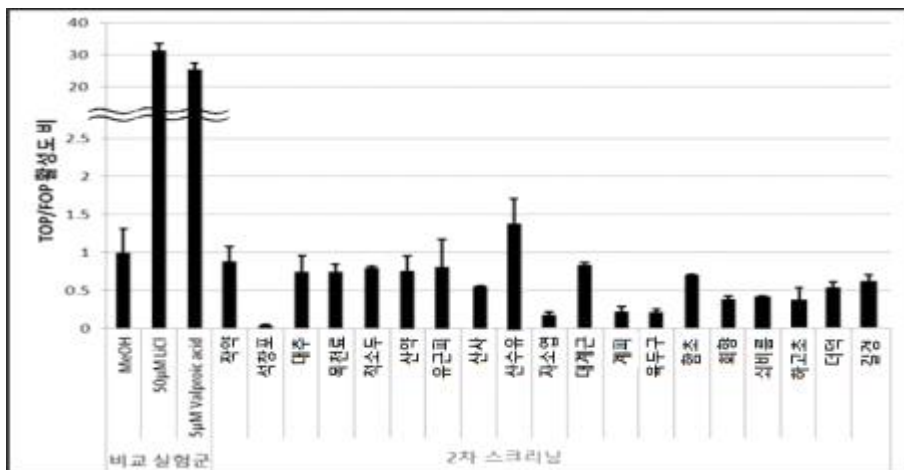
그림. 1차 스크리닝 결과



③ 2차 스크리닝

2차 스크리닝 대상 생약인 작약, 석창포, 대추, 목천료, 적소두, 산약, 유근피, 산사, 산수유, 자소엽, 대계근, 계피, 육두구, 함초, 회향, 쇠비름, 하고초, 더덕, 길경을 평가한 결과 **산수유**에서만 비교 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 활성도를 나타내었음.

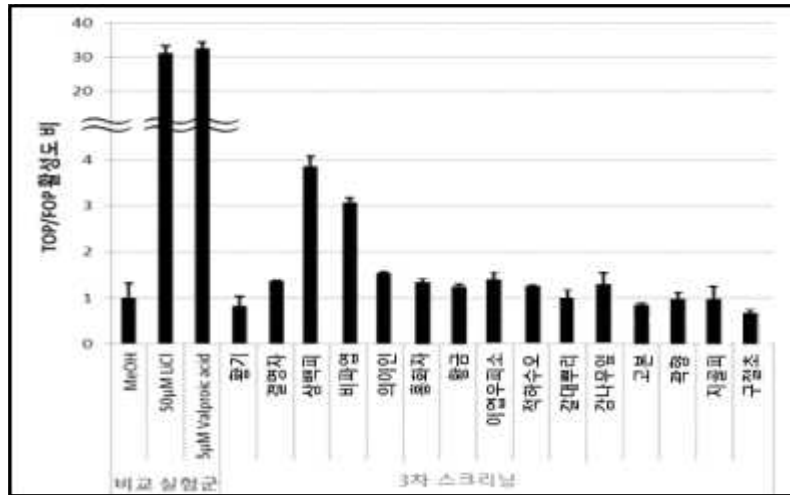
그림. 2차 스크리닝 결과



④ 3차 스크리닝

3차 스크리닝 대상 생약인 황기, 결명자, 상백피, 비파엽, 의이인, 홍화자, 황금, 이엽우피소, 적하수오, 갈대뿌리, 감나무잎, 고본, 곽향, 지골피, 구절초를 평가한 결과 **상백피, 비파엽 및 의이인**에서 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 활성도를 나타내었음.

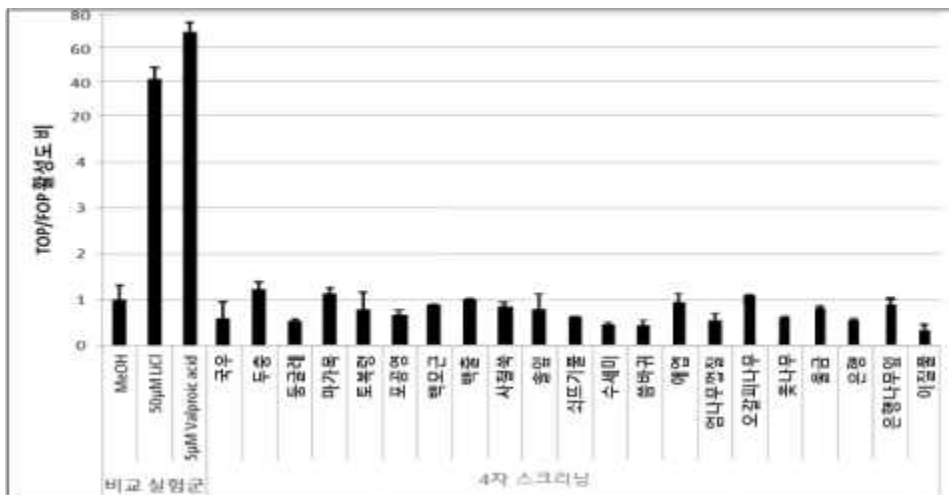
그림. 3차 스크리닝 결과



⑤ 4차 스크리닝

4차 스크리닝 대상 생약인 국우, 두충, 둥글레, 마가목, 토복령, 포공영, 백모근, 백출, 사철쭉, 솔잎, 쇠뜨기풀, 수세미, 씬바귀, 애역, 엄나무껍질, 오갈피나무, 옷나무, 울금, 은행엽, 이질풀을 비교 평가한 결과 비교 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 값을 보이는 생약은 나타나지 않았음.

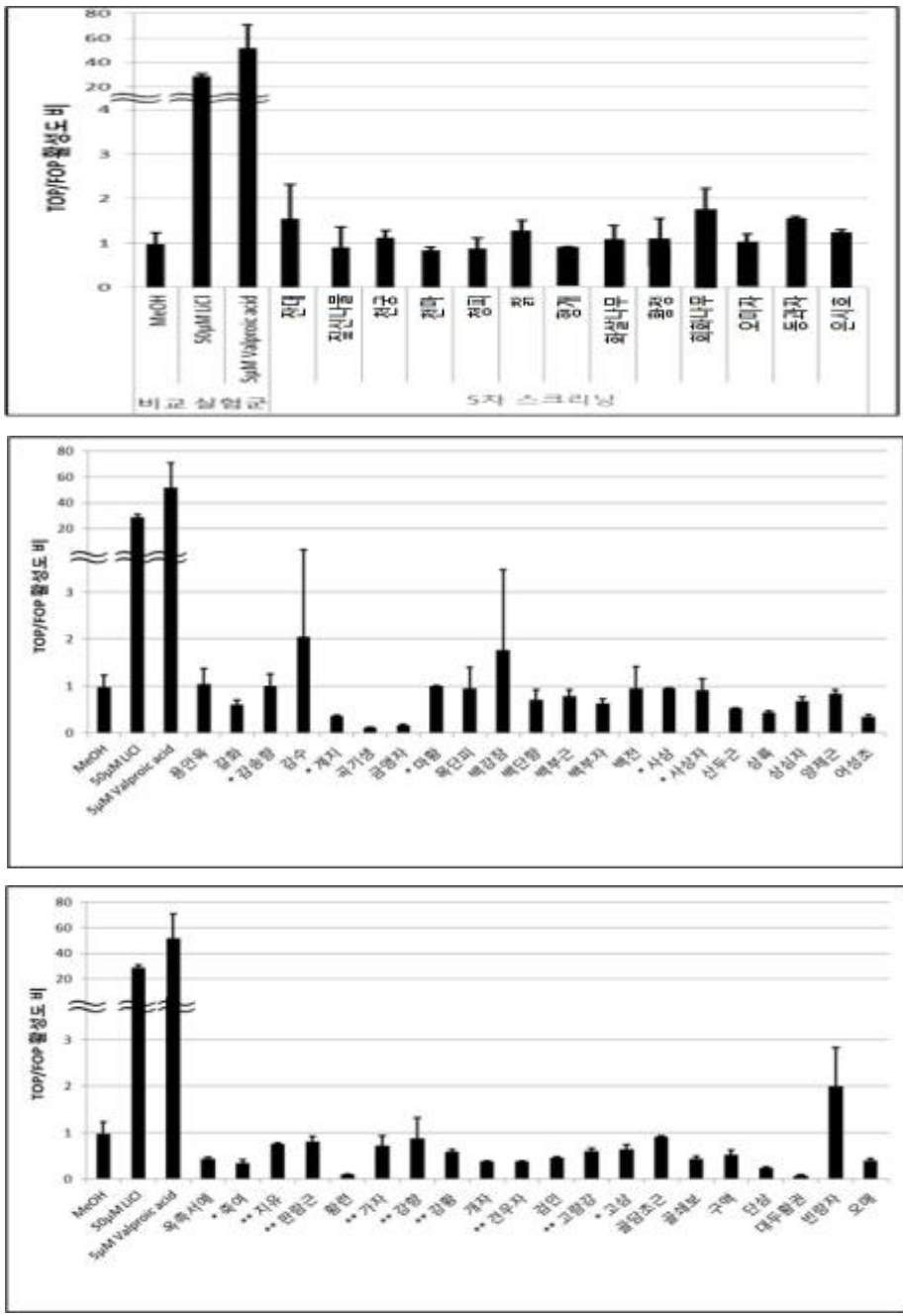
그림. 4차 스크리닝 결과



⑥ 5차 스크리닝

5차 스크리닝 대상 생약인 잔대, 짚신나물, 천궁, 천마, 청피, 칩, 형개, 화살나무, 황정, 회화나무, 오미자, 동과자, 은시호, 용안육, 갈화, 감송향, 감수, 계지, 곡기생, 금명자, 마황, 목단피, 백강장, 백단향, 백부근, 백부자, 백천, 사삼, 사상자, 산두근, 상륙, 상심자, 양제근, 어성초, 옥축서예, 죽여, 지유, 판랍근, 황련, 가자, 강황, 개자, 견우자, 검인, 고랑강, 고삼, 골담초근, 골쇄보, 구맥, 단삼, 대두황권, 빈랑자, 오매를 비교 평가한 결과 **잔대, 회화나무, 동과자, 감수, 백강장 및 빈랑자**에서 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 활성도를 나타내었음.

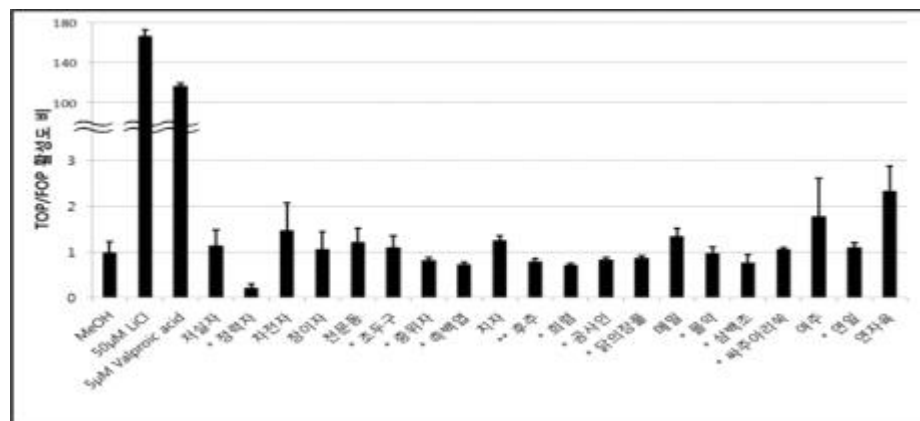
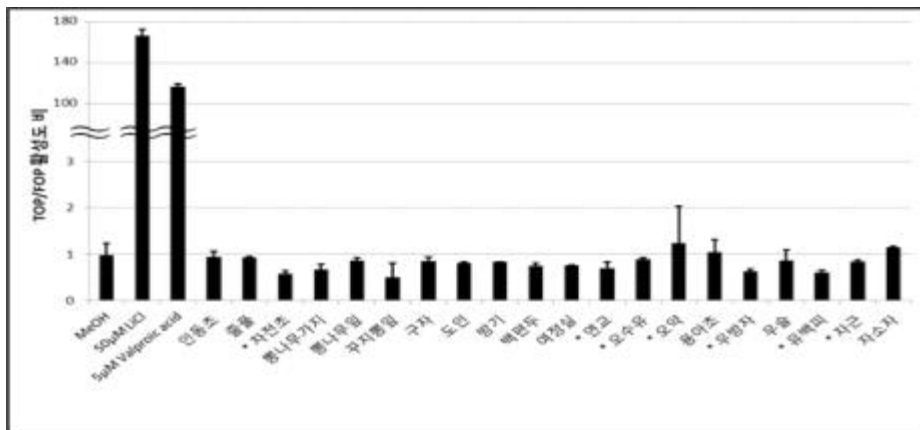
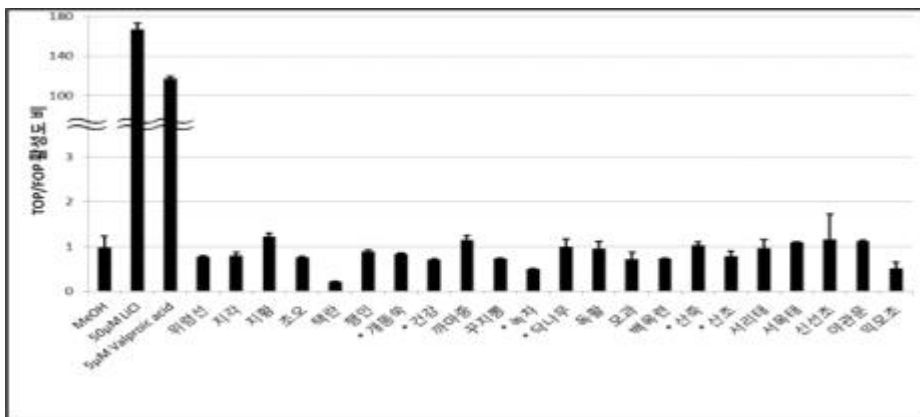
그림. 5차 스크리닝 결과



⑦ 6차 스크리닝

6차 스크리닝 대상 생약인 위령선, 지각, 지황, 초오, 택란, 형인, 개똥썩, 건강, 까마중, 꾸지뽕, 녹차, 닥나무, 독활, 모과, 백목련, 산초, 서리태, 서목태, 신선초, 야관문, 익모초, 인동초, 줄풀, 차전초, 뽕나무가지, 뽕나무잎, 구자, 도인, 방기, 백편두, 여정실, 연교, 오수유, 오약, 용마초, 우방자, 우슬, 우백피, 자근, 자소자, 저실자, 정력자, 차전자, 창이자, 천문동, 초두구, 중위자, 측백엽, 치자, 후추, 회령, 공사인, 닭의장풀, 메밀, 몰약, 삼백초, 싸주아리썩, 여주, 연잎, 연자육을 비교 평가한 결과 **차전자, 여주 및 연자육** 에서 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 활성도를 나타내었음.

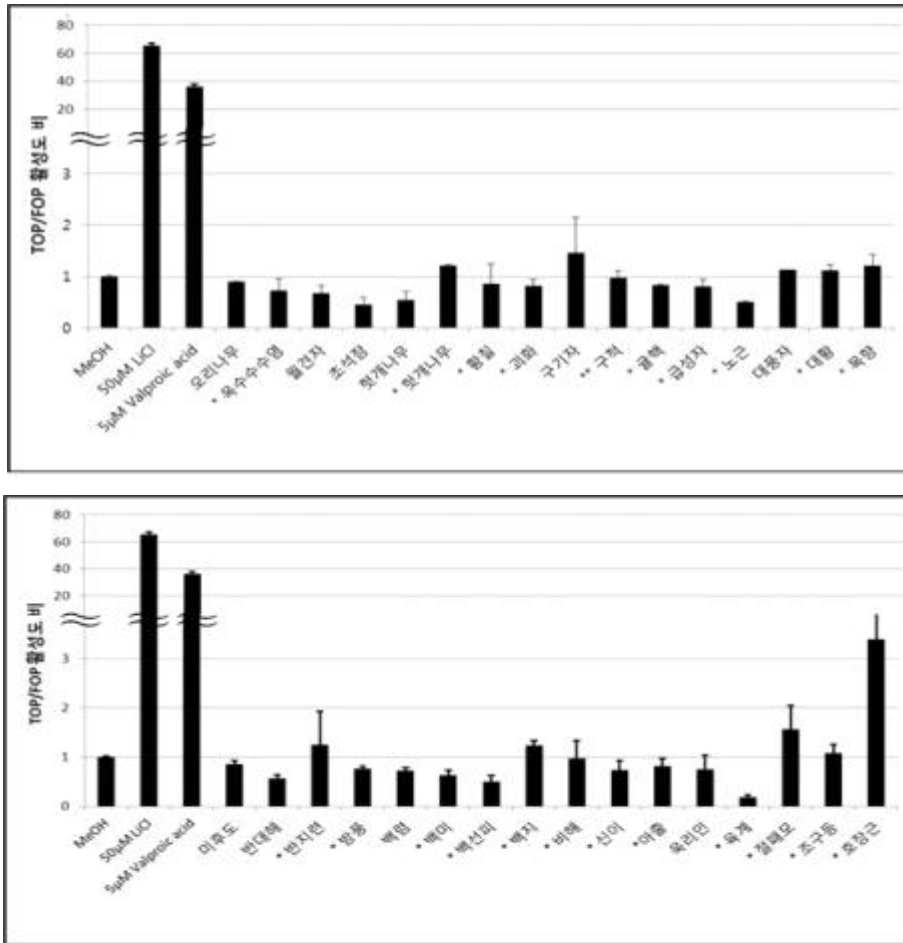
그림. 6차 스크리닝 결과



⑧ 7차 스크리닝

7차 스크리닝 대상 생약인 오리나무, 옥수수수염, 월견자, 초석잠, 헛개나무, 황칠, 괴화, 구기자, 구척, 굴핵, 급성자, 노근, 대풍자, 대황, 목향, 미후도, 반대해, 반지련, 방풍, 백렴, 백미, 백선피, 백지, 비해, 신미, 아출, 목리인, 육계, 절패모, 초구등, 호장근을 비교 평가한 결과 **구기자, 절패모 및 호장근**에서 실험군 대비 1.5 이상의 TOP/FOP 활성도를 나타내었음.

그림. 7차 스크리닝 결과



1~7차의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성평가를 통해 총 16종의 생약들 (**산수유, 상백피, 비파엽, 의이인, 잔대, 회화나무, 동과자, 감수, 백강잠, 빈랑자, 차전자, 여주, 연자육, 구기자, 절패모, 호장근**)을 선별하였음.

8차 스크리닝은 1~7차에서 선별한 16종의 생약들과 더불어 양모의 효능이 연구된 생약 14종 (**두충, 짚신나물, 곽향, 쇠비름, 감송향, 사상자, 건강, 굴핵, 울금, 은행나무잎, 대황, 지황, 오약, 하고초**)을 추가적으로 스크리닝 하였으며, 8차 스크리닝에서는 각 생약의 추출물 또는 분획물을 대상으로 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성 평가를 진행하였음.

(다) 선별 후보생약 8차 스크리닝

No.	생약명	학명	비고
1	산수유	<i>Cornus officinalis</i>	
2	쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i>	특허 3건 <sup>7),8),9)</sup> , 문헌 2건 <sup>10),11)</sup>
3	하고초	<i>Prunella vulgaris</i>	문헌 2건 <sup>12),13)</sup>
4	곽향	<i>Teucrium veronicoides</i>	특허 1건 <sup>14)</sup> , 처방 1건 <sup>25)</sup>
5	두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	특허 1건 <sup>15)</sup>
6	상백피	<i>Morus alba</i>	특허 1건 <sup>14)</sup> , 문헌 1건 <sup>16)</sup> , 처방 1건 <sup>25)</sup>
7	비파엽	<i>Eriobotrya japonica</i>	
8	의이인	<i>Coix lacryma-jobi</i>	문헌 1건 <sup>16)</sup>
9	울금	<i>Curcuma longa</i>	특허 2건 <sup>15),9)</sup> , 문헌 1건 <sup>17)</sup>
10	은행나무잎	<i>Ginkgo biloba</i>	특허 2건 <sup>18),19)</sup> , 문헌 1건 <sup>20)</sup>
11	잔대	<i>Adenophora triphylla</i>	
12	짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i>	특허 1건 <sup>21)</sup>
13	회화나무	<i>Styphnolobium japonicum</i>	
14	동과자	<i>Benincasa cerifera</i>	
15	지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	특허 2건 <sup>19),22)</sup> , 문헌 1건 <sup>16)</sup> , 처방 2건 <sup>25)</sup>
16	진강	<i>Zingiber officinale</i>	문헌 1건 <sup>16)</sup> , 처방 3건 <sup>25)</sup>
17	귤핵	<i>Citrus unshiu Markovich</i>	
18	대황	<i>Rheum rhabarbarum</i>	특허 1건 <sup>18)</sup> , 처방 1건 <sup>25)</sup>
19	감수	<i>Euphorbia kansui</i>	
20	사상자	<i>Torilis japonica</i>	특허 1건 <sup>23)</sup>
21	감송향	<i>Nardostachys chinensis</i>	특허 1건 <sup>24)</sup>
22	오약	<i>Lindera aggregata</i>	
23	백강잠	<i>Bombyx mori</i>	
24	빈랑자	<i>Areca catechu</i>	
25	절패모	<i>Fritillaria thunbergii</i>	
26	호장근	<i>Fallopia japonica</i>	
27	차전자	<i>Plantago ovata</i>	
28	여주	<i>Momordica charantia</i>	
29	연자육	<i>Nelumbo nucifera</i>	
30	구기자	<i>Lycium barbarum</i>	특허 2건 <sup>15),19)</sup> , 문헌 1건 <sup>16)</sup>

① Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성평가

후보생약 211종 중 최초 스크리닝 과정을 통해 선별된 30종의 후보생약을 대상으로 Wnt/beta-catenin 신호 유도 촉진 활성 재평가를 통해 비교생약들 중 비교적 가장 우수한 활성을 보이는 후보생약 10종 (상백피, 비파엽, 두충, 울금, 은행나무잎, 짚신나물, 백강잠, 빈랑자, 오약, 구기자)을 선별하였음.

그림. 산수유, 쇠비름, 하고초, 괄향, 두충의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도촉진 활성 재평가

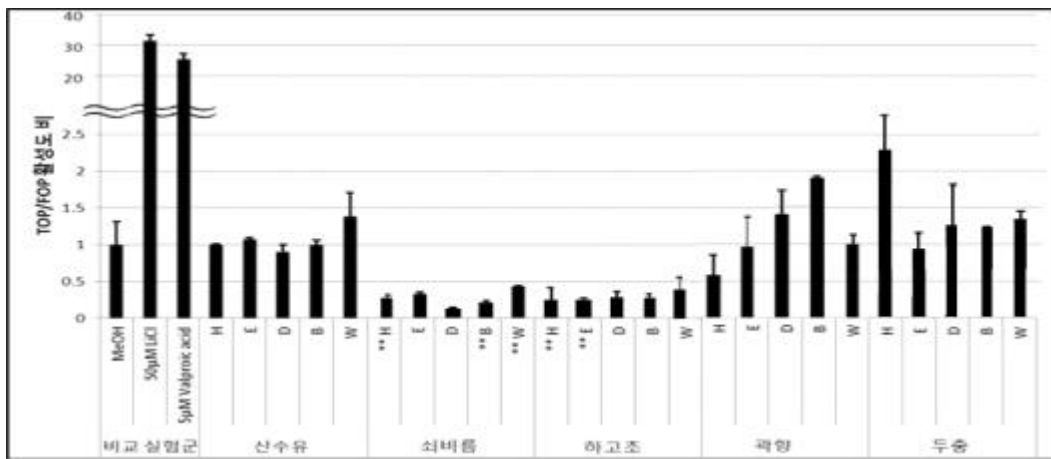


그림. 상백피, 비파엽, 의이인, 울금, 은행엽의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도촉진 활성 재평가

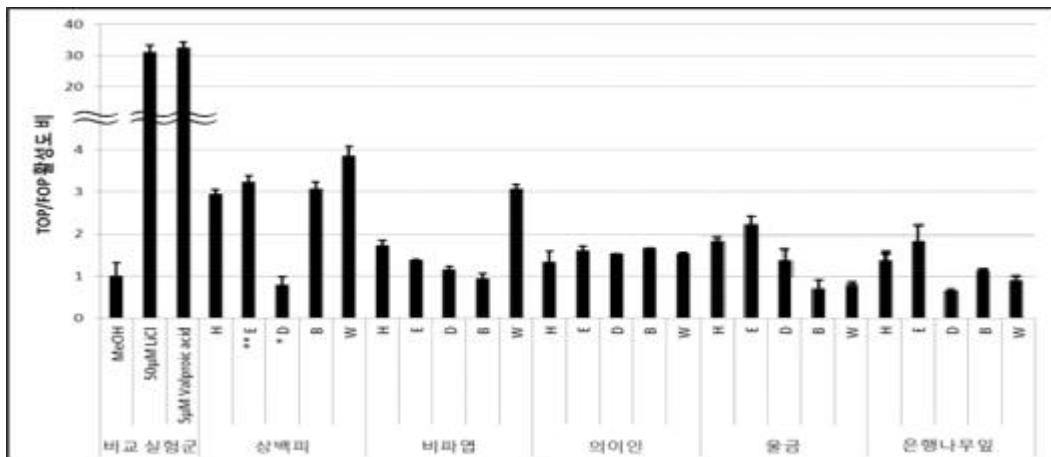
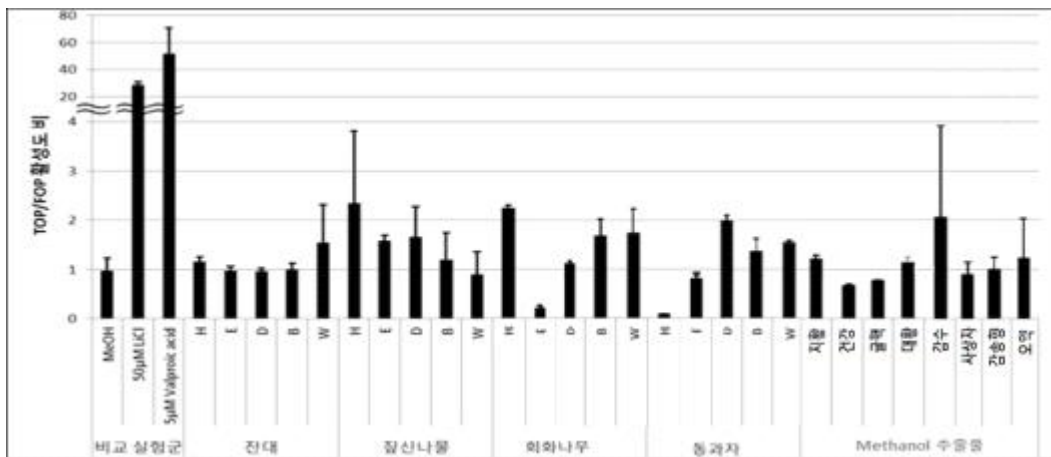


그림. 잔대, 짚신나물, 회화나무, 동과자 및 생약의 MeOH 추출물<sup>1)</sup>의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도촉진 활성 재평가



※ <sup>1)</sup>생약의 MeOH 추출물: 문헌상 양모의 기능을 확인한 생약으로 분획물 제조 전 추출물에 대하여 활성을 재평가함

그림. 백강잠, 빈랑자, 절패모, 호장근의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도촉진 활성 재평가

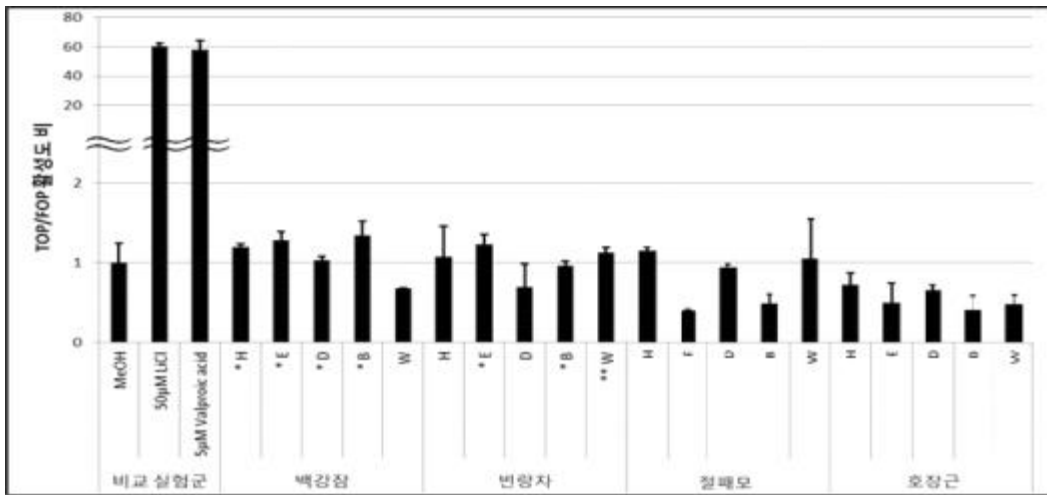
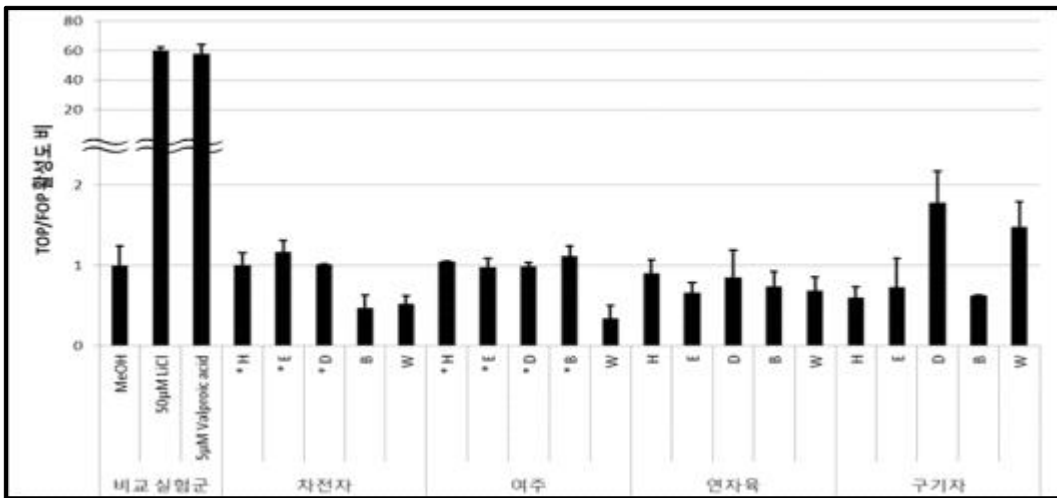


그림. 차전자, 여주, 연자육, 구기자의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도촉진 활성 재평가



② 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가

Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성 재평가를 통해 비교생약들 중 비교적 가장 우수한 활성을 보이는 후보생약 10종 (상백피, 비파엽, 두충, 울금, 은행나무잎, 쑥신나물, 백강잠, 빈랑자, 오약, 구기자)과 양모의 효능이 연구된 생약 중 비교적 높은 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성이 확인된 후보생약 8종 (쇠비름, 곱향, 감송향, 사상자, 지황, 건강, 굴핵, 대황)에 대하여 양모의 효능평가 중 하나인 5 $\alpha$ -reductase inhibition activity (%) 활성평가를 진행하였음.

그 결과 **우수한 5 $\alpha$ -reductase inhibition activity (%)를 보이는 생약은 8종 (울금, 쇠비름, 감송향, 사상자, 지황, 건강, 굴핵, 대황) 이었음.**



그림. 상백피, 비파엽, 두충, 울금, 은행엽, 짚신나물, 백강잠, 빈향자, 오약, 구기자의 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가

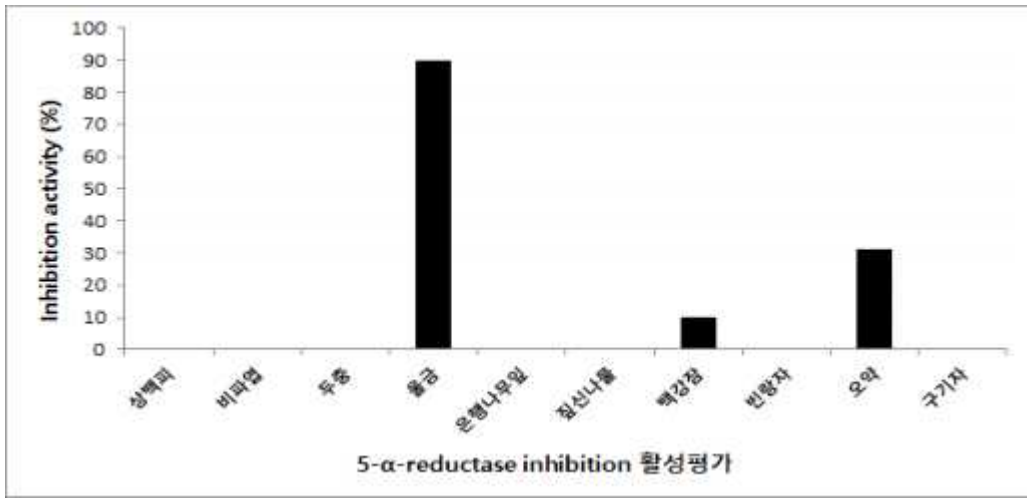
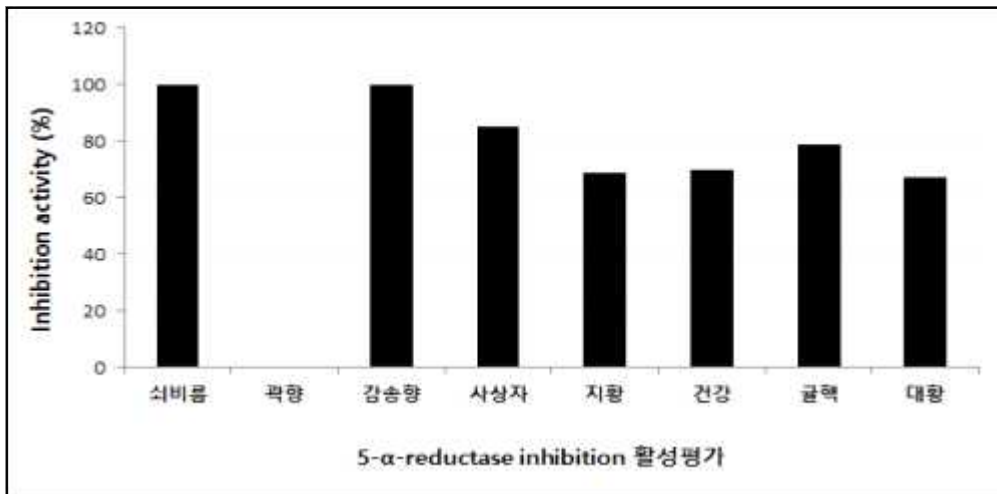


그림. 쇠비름, 곱향, 감송향, 사상자, 지황, 건강, 굴핵, 대황의 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가



(라) 양모 기능성 후보 생약소재 최종선정

총 18종의 후보 생약소재의 두 가지 *In vitro* 활성평가 (Wnt/beta-catenin 신호 유도촉진 및 5 $\alpha$ -reductase 억제 활성) 결과와 문헌을 통하여 양모 기능성을 가진 발모제 개발에 가능성이 높은 생약소재 4종 (곱향, 두충, 감송향, 대황)을 최종 선정하였음.

표. 양모 기능성 후보 생약소재의 *in vitro* 활성평가 결과

생약	<i>In vitro</i> 활성평가 결과		생약	<i>In vitro</i> 활성평가 결과	
	W/ $\beta$ <sup>1)</sup>	5 $\alpha$ <sup>2)</sup>		W/ $\beta$ <sup>1)</sup>	5 $\alpha$ <sup>2)</sup>
쇠비름	-	++	백잠강	+	-
상백피	++	-	사상자	-	++
비파엽	++	-	빈랑자	++	-
곽향	+	-	지황	+	++
두충	+	-	건강	-	++
울금	-	+	오약	+	+
은행나무잎	-	-	구기자	+	-
짚신나무	-	-	굴핵	-	++
감송향	+	++	대황	+	++

<sup>1)</sup>W/ $\beta$ : Wnt/ $\beta$ -catenin 유도 촉진 활성 평가

<sup>2)</sup>5 $\alpha$ : 5 $\alpha$ -Reductase inhibitor 활성 평가

※ 기준: W/ $\beta$ 의 top/fop 활성도비가 2 > x  $\geq$  1 일 때, (+) / x  $\geq$  2 일 때, (++)

: 5 $\alpha$ 의 % inhibition 값이 50 > x  $\geq$  20 일 때, (+) / x  $\geq$  50 일 때, (++)

## (2) 양모 기능성 최종 후보생약 소재 선정

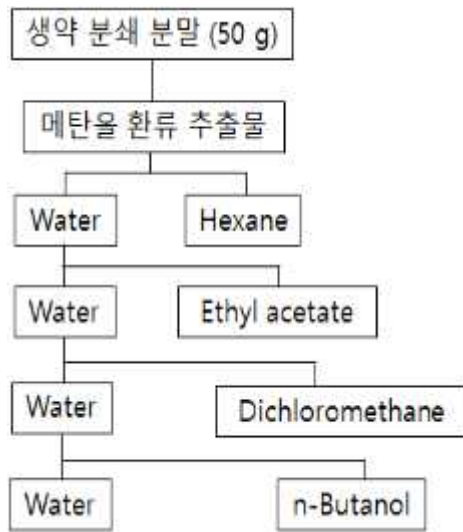
후보생약 스크리닝에서 최종적으로 선정된 4종(대황, 감송향, 곽향, 두충)의 생약을 이용하여 최적의 양모의 기능성을 가진 복합물을 제조하기 위해 각 생약의 추출물과 분획물을 제조하고, *in vitro* (Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성 및 5 $\alpha$ -reductase 억제 활성) 평가를 종합하여 양모 기능성 최종 후보소재를 선별하였음.

### (가) 4가지 단일(생약) 추출물 및 분획물 제조

대황, 감송향, 곽향, 두충의 각 50 g을 분쇄하여 500 ~ 600 mL의 메탄올을 가한 후, 65 °C 중탕에서 4시간 동안 환류추출을 진행하였음. 이후 감압농축을 통해 추출물을 완전 농축하고 얻은 농축물은 증류수(DW)를 이용해 완전 용해시킨 후 헥산(Hexane), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 디클로로메탄(Dichloromethane) 그리고 부탄올(n-Butanol)로 차례로 분획을 제조한 후 감압 농축하여 분획물을 제조하였음.

그림. 단일(생약)추출물/ 분획물 제조 (A) 및 분획 과정 (B)

A



B



(나) 4가지 단일(생약) 추출물 및 분획물의 *in vitro* 활성평가

① Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성평가

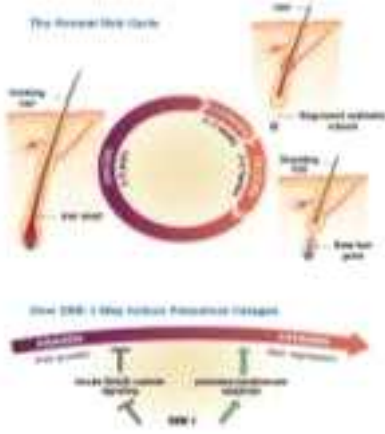
모발은 발육기(anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기(telogen)의 성장 cycle을 보이는데, 이와 관련하여 Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway가 발모 기전과 밀접하게 관련되어 있다는 연구 결과가 보고되어 있음. 이러한 연구 결과에 따라 생약 소재의 추출물 또는 용매별 추출분획을 대상으로 베타카테닌( $\beta$ -catenin) 신호(signaling) 활성을 유도하는 탐색 평가를 진행하였음.

Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway는 Wnt ligand가 없을시  $\beta$ -catenin이 분해되어 타겟 유전자의 전사가 일어나지 않는 반면 Wnt ligand가 존재하게 되면  $\beta$ -catenin이 안정화되어 전사 인자 중 하나인 TCF4와 결합하여 타겟 유전자의 전사를 활성화시키게 됨. 이와 같은 원리를 이용하여 Wnt 신호 전달 체계를 활성화시키는 천연 물질을 함유한 생약 추출물을 스크리닝하기 위해서 Wnt reporter 분석 방법 체계를 확립하였음.

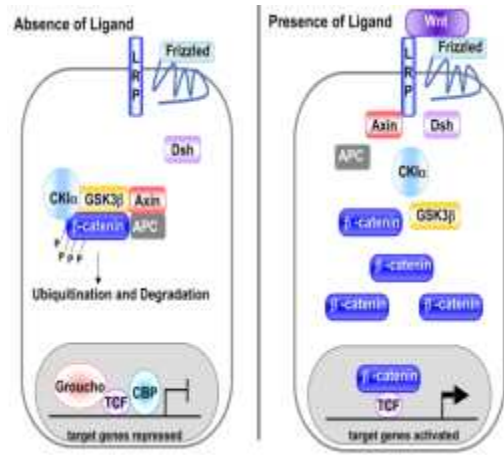
Wnt ligand에 반응을 보이는 TOPFlash reporter vector는 Wnt 신호 전달 체계의 하위 전사인자인 TCF4가 결합할 수 있는 site가 존재하여 luciferase 발광효소가 전사됨. 즉, Wnt 신호 전달 체계가 활성화될수록 높은 발광 활성을 보이도록 제작되었으며, FOPFlash control vector는 TOPFlash vector와 동일한 구조이되 TCF4가 결합하는 site가 들연변이 되어 Wnt ligand가 존재하여도 활성을 나타내지 않게 제작되었음. 높은 효율과 재현성으로 외래유전자 도입 실험에 많이 사용되는 HEK 293T 세포에 재조합된 Wnt reporter vector를 transfection 하여 생약 추출물에 의한 활성을 분석하였으며 transfection 효율을 보정하기 위하여 pCMV renilla vector를 이용하여 동시 실험을 진행하였음.

그림. The hair growth cycle and DKK-1 (A) 및 Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway (B)

A

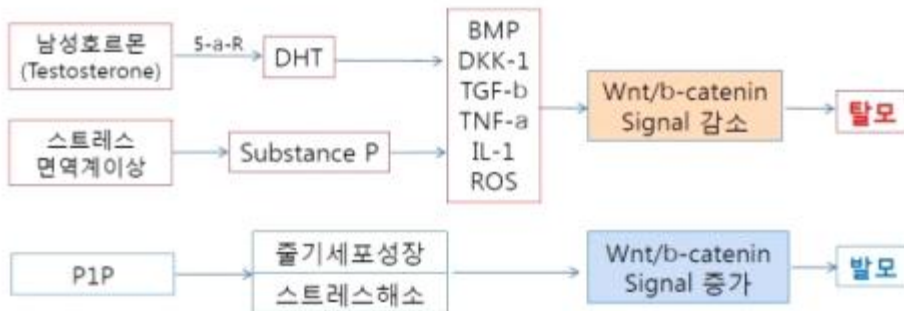


B



최종 후보생약 4종(대황, 감송향, 광향, 두충)의 추출물 및 분획물을 대상으로 HEK-293T(인간 배아신장세포)를 이용해 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 전달 유도 활성을 평가하였음. 대조군으로는 증류수와 DMSO를, 양성대조군으로써는 Wnt 신호전달 체계를 활성화시킨다고 알려져 있는 리튬클로라이드(LiCl)와 발프론산(Valproic acid)을 각각 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M로 하여 사용하여 실험을 진행하였음. 활성도 평가는 상대적인 TOP/FOP 활성도 비를 구하여 4종의 후보생약을 비교 평가하였음.

그림. Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 전달 유도 활성 평가 기전

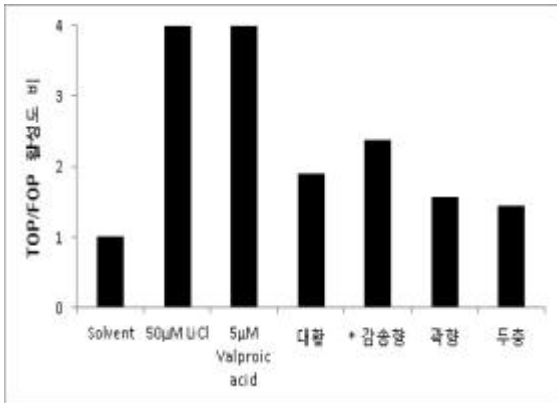


㉔ 4종 생약에 물 추출물 평가

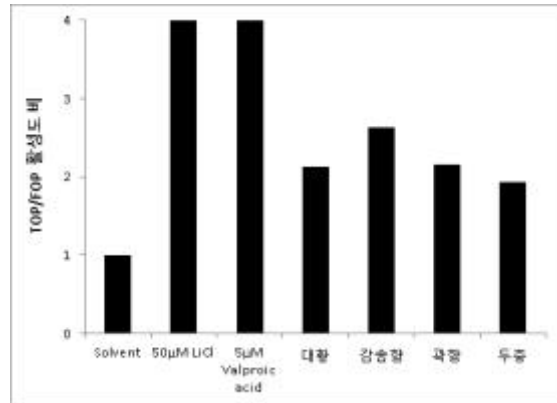
4종의 생약에 물 추출물들을 대상으로 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성평가 결과 4종 생약 모두 control(증류수)에 비하여 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도가 촉진되는 것을 확인하였고, 대황과 감송향의 경우 신호 유도 촉진정도가 뛰어났으며, 감송향은 control(증류수)에 비해 2.0배 이상 신호 유도의 촉진을 나타내었음.

그림. 각 시료의 증류수 용해 시료 (A)와 50%에탄올 용해 시료 (B)의 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성 비교평가

A.



B.

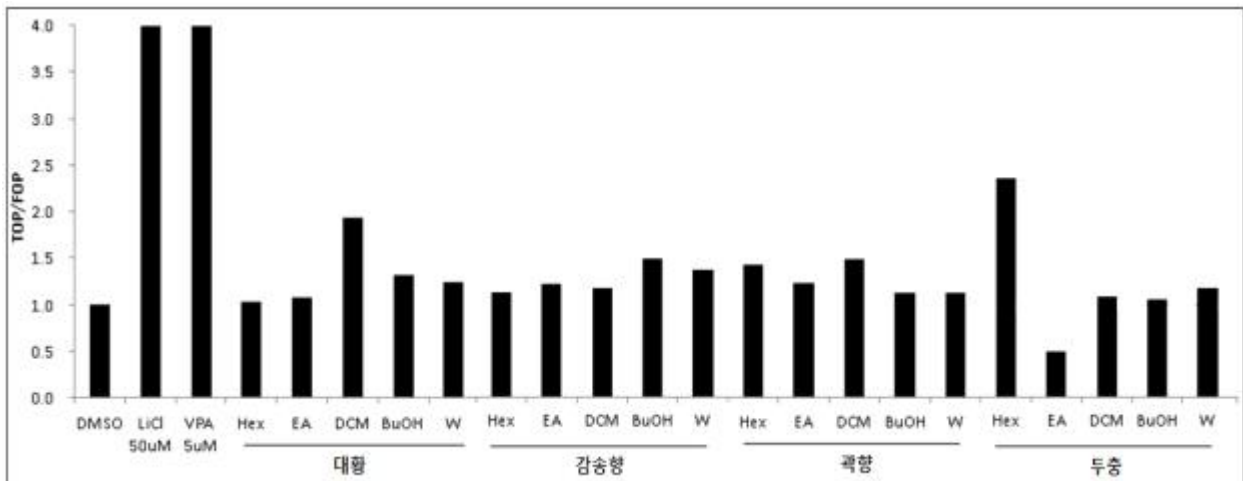


※ 대황, 곽향, 두충에서 얻은 물 추출물을 0.02 mg/mL, 감송향은 0.2 mg/mL의 농도로 48 hr 동안 세포에 처리한 후 Dual-Luciferase를 분석하였음.

㉠ 4종 생약에 분획물 평가

대황, 감송향, 곽향, 두충의 각 분획물 (헥산, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 부탄올, 물)들은 50 µg/mL(in DMSO)의 농도로 처리하여 Wnt/beta-catenin 신호 전달 유도 활성을 탐색한 결과, 대황의 디클로로메탄(DCM), 감송향의 부탄올(n-BuOH), 곽향의 디클로로메탄(DCM)과 두충의 헥산(Hexane) 분획물에서 TOP/FOP의 비율이 DMSO control 대비 1.5 ~ 2.5배 이상 활성이 증가하였음.

그림. 4종 생약에 분획물들의 Wnt/beta-catenin 신호 유도 촉진 활성 비교평가



## ② 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가

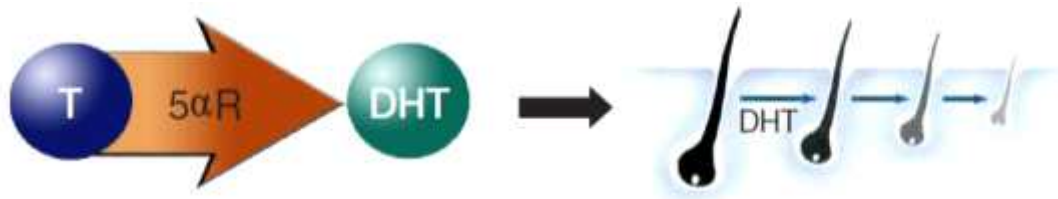
사람의 모발은 고유한 모낭 주기를 가지고 있어 지속적으로 성장과 탈락을 반복함. 그러나 더 이상 모발의 성장과 재생이 일어나지 않게 되면 정상적으로 모발이 존재해야할 부위에 모발이 없는 상태인 탈모가 됨. DHT (Dihydrotestosterone)는 직접적인 탈모를 일으키는 호르몬으로 정상적인 모발이 DHT와 결합해 모낭의 퇴화가 시작되고 지속적인 퇴화를 거쳐 더 이상 모발이 자라지 않는 모낭의 형태가 되어 탈모가 일어나게 됨.

5 $\alpha$ -Reductase는 testosterone을 DHT로 전환하는 효소로 탈모증은 이 5 $\alpha$ -Reductase에 의해 과다하게 생성된 DHT가 중요한 역할을 하기 때문에 이 효소를 억제하는 것이 탈모 치료에 효과적이라 할 수 있음. 이와 같은 원리를 이용하여 5 $\alpha$ -Reductase의 활성을 억제시키는 천연 물질을 함유한 생약 추출물을 스크리닝하기 위해서 5 $\alpha$ -Reductase inhibition 탐색방법을 확립하였음.

5 $\alpha$ -Reductase inhibition 분석 방법은 testosterone, 5 $\alpha$ -Reductase 효소, 억제 후보 물질과 효소 반응에 필요한 phosphate buffer, NADPH를 모두 섞어주고 함께 반응 시킨 후 lipid 추출을 수행하여 HPLC로 효소 반응 후 반응되지 않고 남아있는 testosterone 피크의 면적을 비교함으로써 후보 물질이 5 $\alpha$ -Reductase에 대한 억제 효과가 있는지 확인하는 실험 방법이며, 동일한 시료량이 injection 되었음을 확인하는 내부 대조군으로는 propyl-p-hydroxybenzoate를 사용하였음.

또한 테스트를 진행한 결과, 5 $\alpha$ -Reductase 발현 동물 세포 lysate는 충분한 효소 활성을 얻기 힘들다고 판단하여 높은 5 $\alpha$ -Reductase 효소 활성을 보인다고 알려져 있는 생쥐의 간에서 얻어지는 microsome을 사용하여 실험을 진행하였음.

그림. Hair follicle miniaturization induced by dihydrotestosterone (DHT).

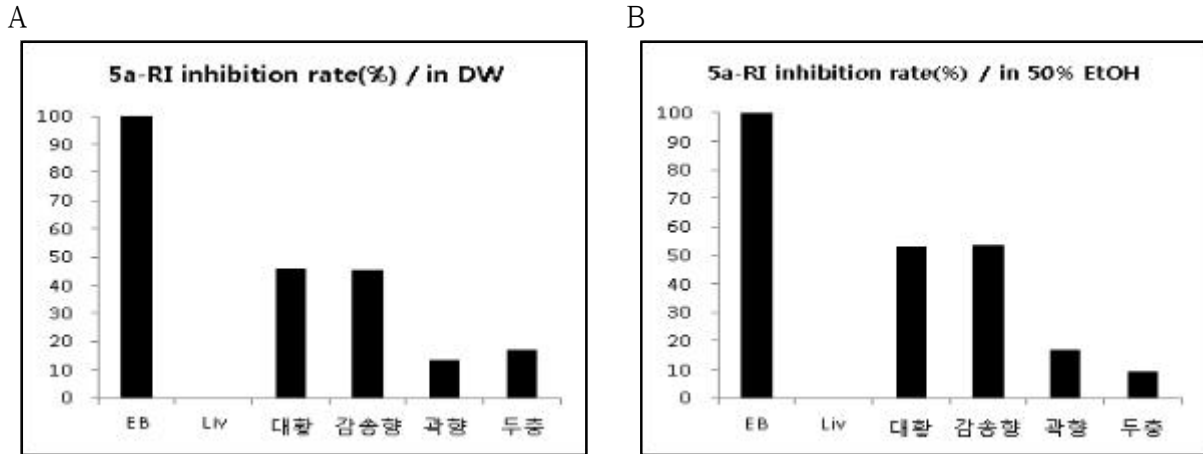


4종의 생약에 물 추출물들을 대상으로 5 $\alpha$ -reductase에 대한 억제효과를 확인하기 위하여, 추출물 처리 시 생쥐의 간 마이크로솜 (microsome)에서 얻어지는 5 $\alpha$ -reductase가 testosterone의 감소를 억제하는 정도를 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 측정하였음. 내부대조군으로 프로필-p-히드록시벤조에이트 (propyl-p-hydroxybenzoate)를 사용하여 testosterone의 양을 보정하였고, 비교대조군으로써 버퍼만 넣은 효소 블랭크 (enzyme blank)를 사용해 상대적인 testosterone/내부대조군의 비(ratio)로써 저해 활성 (inhibition activity)을 비교 평가하였음.

㉔ 4종 생약에 물 추출물 평가

4종의 생약에 물 추출물들을 대상으로 증류수와 50% 에탄올에 각각 용해시켜 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성을 평가한 결과, 대황 및 감송향 추출물에서는 40~50%에 해당하는 반응 저해율을 확인하였으나, 곽향과 두충에서는 낮은 저해율을 보였음.

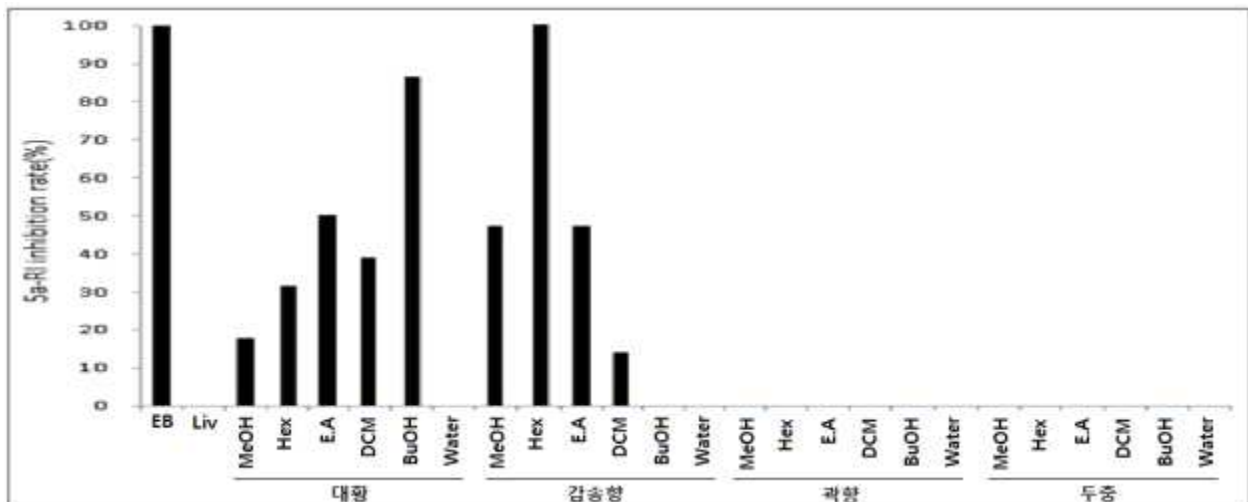
그림. 각 시료의 증류수 용해 시료 (A)와 50%에탄올 용해 시료 (B)의 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성 비교평가



㉕ 4종 생약에 분획물 평가

대황, 감송향, 곽향, 두충 각 분획물들을 대상으로 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가 결과 4종 생약에 물 추출물 평가결과와 동일하게 대황과 감송향의 분획물에서 높은 저해율을 보였으며, 곽향과 두충 분획물의 저해활성은 매우 낮았음.

그림. 단일(생약) 4종 분획물의 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가



③ 4종 생약에 물 추출물 및 각 분획물의 *in vitro* 활성평가 결론

Wnt/ $\beta$ -catenin 전달유도 및 5 $\alpha$ -Reductase 저해 활성평가의 *in vitro* 세포실험을 비교한 결과 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 유도 촉진 활성평가에서 대황, 감송향, 곽향 및 두충의 물 추출물과 분획물은 1.5~2배 수준의 비슷한 정도의 활성을 나타내었으나, 5 $\alpha$ -reductase inhibition 활성평가에서는 4종의 생약 중 대황과 감송향의 물 추출물이 곽향과 두충의 물 추출물 보다 높은 저해율을 보였음.

이 결과를 모두 종합하여 **양모 기능성 시제품 생산을 위한 후보 생약을 (중)대황과 감송향으로 예상하였으며, 비임상 효력시험을 통해 최종 선정**하였음.

표. 시작품 제작 원료 최종선정 *in vitro* 평가 요약

시험 항목	추출물 및 분획물			
	대황	감송향	곽향	두충
Wnt/ $\beta$ -catenin 활성유도	+	++	+	+
5 $\alpha$ -Reductase 저해	++	++	+	+

(다) 최종 후보생약 소재의 비임상 동물효력시험

동물효력 평가를 위해 200여종의 후보생약 중 *in vitro* 스크리닝으로 선별된 대황, 감송향, 곽향, 두충 4종의 단일 및 복합추출물을 대상으로 설치류 발모동물을 이용해 예비 1차, 2차 동물효력 평가 후 가장 뚜렷한 발모효력을 보이는 단일 혹은 복합추출물을 선정하여 본시험을 진행하였음.

표. 발모 비임상 동물효력 평가 요약

	1차 예비 동물효력시험	2차 예비 동물 효력시험	동물효력 본시험
시험의뢰	큐베스트컨설팅	(주)켄온	(주)켄온
시험물질 및 대조물질	○ 시험물질 대황, 감송향, 곽향, 두충, 대황+감송향, 곽향+두충, 대황+감송향+곽향+두충 ○ 양성대조물질: 마이녹실 3% (현대약품)	○ 시험물질 대황, 감송향, 곽향, 두충, 대황+감송향, 곽향+두충, 대황+감송향+곽향+두충 ○ 양성대조물질: 마이녹실 3% (현대약품)	○ 시험물질: 대황+감송향 복합추출물 ○ 양성대조물질: 마이녹실 3% (현대약품)
시험 동물/사육 관리	• 동물: 5주령/웅성마우스 • 먹이: 사료 및 음료 자율	• 동물: 6주령/웅성마우스 • 먹이: 사료 및 음료 자율	• 동물: 6주령/웅성마우스 • 먹이: 사료 및 음료 자율



<b>시험방법</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험물질 및 대조물질은 정해놓은 부형제에 맞춰 제조 후 냉장보관</li> <li>제모한 마우스 등 부위에 1일/1회, 총 3주간 피부도포 후 발모효력 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험물질 및 대조물질은 정해놓은 부형제에 맞춰 제조 후 냉장보관</li> <li>제모한 마우스 등 부위에 1일/1회/200 μL씩, 총 2주간 피부도포 후 발모효력 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험물질 및 대조물질은 정해놓은 부형제에 맞춰 제조 후 냉장보관</li> <li>제모한 마우스 등 부위에 1일/1회/200 μL씩, 총 2주간 피부도포 후 발모효력 관찰</li> </ul>
<b>관찰항목</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사망, 임상증상, 체중</li> <li>제모부위 피부색 변화</li> <li>제모부위 발모면적</li> <li>조직병리: 성장기 모낭</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사망, 임상증상, 체중</li> <li>제모부위 피부색 변화</li> <li>제모부위 발모면적</li> <li>조직병리: 성장기 모낭</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>사망, 임상증상, 체중</li> <li>제모부위 피부색 변화</li> <li>제모부위 발모면적</li> <li>조직병리: 성장기 모낭</li> </ul>

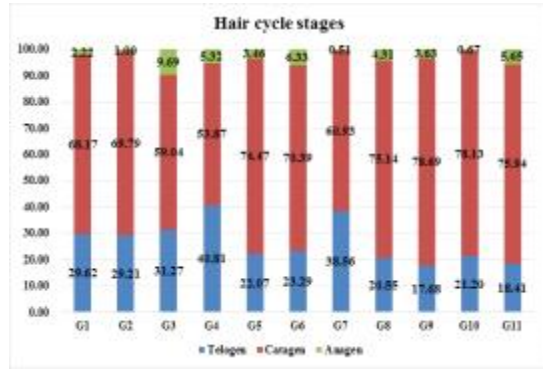
① 1차 예비 동물효력시험 결과

시험 항목	내용	결과
<b>사망, 임상증상, 체중</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>모든 시험군 사망개체 없음</li> <li>특이적 임상증상 없음</li> <li>정상적 체중변화 관찰됨</li> </ul>	-
<b>제모부위 피부색 변화(%)<sup>1)</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>5일차 피부색 변화시작</li> <li>8일차 광향+두충(G8), 대황+감송향+광향+두충(G9)도포군에서 32% 이상 변화</li> <li>12일차 대부분 시험군 피부색 급변</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Day 12</p>
<b>제모부위 발모면적(%)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8일차 발모 관찰 시작 광향+두충, 감송향, 대황+감송향, 대황+감송향+광향+두충군 발모 증가</li> <li>12일차 대부분 시험군 발모 급증. 광향+두충(G8) 유의적 증가 관찰. 감송향(G4), 대황+감송향(G7) 증가</li> <li>22일차 모든 시험군 발모</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Day 12</p>

- 시험군간 모낭의 발육단계 퇴행기(catagen)-휴지기(telogen)-발육기(anagen) 순으로 큰 차이 없음.

**조직병리<sup>2)</sup>**

- 퇴행기에 이어 휴기지 모낭 빈도가 높은 것으로 미루어 제모 후 발모가 상당히 진행됨. 시험기간의 단축 필요.



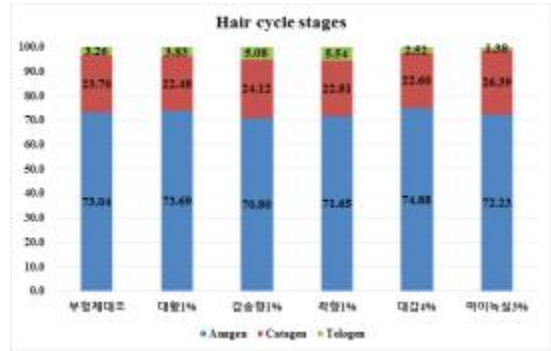
- 1) 주 2회 제모 부위의 피부색 변화를 관찰하여 0~7점으로 점수화하여 백분율로 환산.
- 2) 투여 종료 후 피부를 적출하여 H&E 염색 슬라이드를 제작하여 발육단계의 모낭 수를 세어 백분율로 환산.

**② 2차 예비 동물효력시험 결과**

시험 항목	내용	결과
사망, 임상증상, 체중	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 7일차: 좌향 투여군 사망개체 1건</li> <li>· 특이적 임상증상 없음</li> <li>· 정상적 체중변화 관찰됨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 사망개체 1건: 시험물질이 원인이 아닌 우발적, 물리적인 원인으로 확인.</li> </ul>
제모부위 모발 scoring <sup>1)</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 13일차 대황+감송향(G7), 마이녹실(G14)에서 유의적 발모 score 증가</li> <li>· 15일차 대부분 시험군 발모 score 증가</li> </ul>	
제모부위 발모면적(%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 13일차 대황+감송향(G7), 마이녹실(G14)에서 유의적 발모 면적 증가</li> <li>· 15일차 대황+감송향(G7) 발모 면적 증가 경향 확인</li> </ul>	

조직병리<sup>2)</sup>

- 모든군에서 성장기(anagen) 모발의 빈도가 높았으며 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않음.



1) 0, 3, 7, 10, 13, 15일 총 6회 변화를 관찰하여 0~4점으로 점수화하여 백분율로 환산.

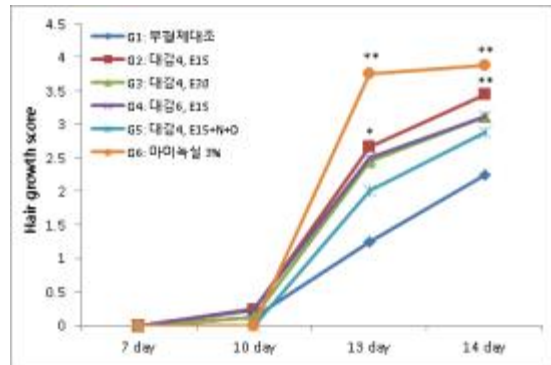
2) 투여 종료 후 피부를 적출하여 H&E 염색 슬라이드를 제작하여 발육단계의 모낭 수를 세어 백분율로 환산.

③ 동물효력 분시험 결과

시험 항목	내용	결과
사망, 임상증상, 체중	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모든 투여군 사망개체 없음</li> <li>• 특이적 임상증상 없음</li> <li>• 정상적 체중변화 관찰됨</li> </ul>	-

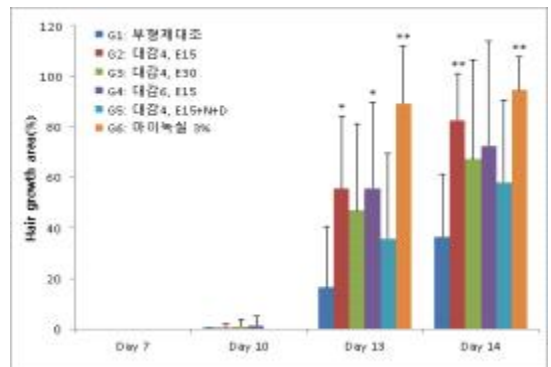
제모부위 모발 scoring<sup>1)</sup>

- 13,14일차 대황+감송향 복합추출물 4%(G2), 마이녹실 투여군에서 유의적 발모 score 증가.
- 이외 투여군(G3, G4, G5)에서도 발모 score 증가 경향 관찰.



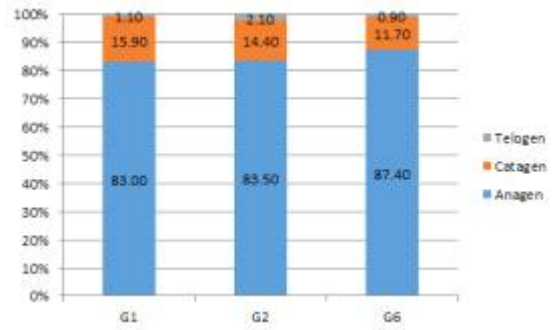
제모부위 발모면적(%)

- 13일차 대황+감송향 복합추출물4%(G2), 6%(G4), 마이녹실 투여군에서 유의적 발모면적 증가.
- 이외 투여군(G3, G5)에서도 발모 면적 증가 경향 관찰.



## 조직병리<sup>2)</sup>

- 모든군에서 성장기(anagen) 모발의 빈도가 높았으며, 부형제투여군(G1)과 대황+감송향 복합추출물 4%(G2) 군간에 주목할 만한 차이는 확인되지 않음.



1) 0, 3, 7, 10, 13, 15일 총 6회 변화를 관찰하여 0~4점으로 점수화하여 백분율로 환산.

2) 투여 종료 후 피부를 적출하여 H&E 염색 슬라이드를 제작하여 발육단계의 모낭 수를 세어 백분율로 환산.

## ④ 결론

○ 약 200종의 스크리닝을 통하여 선별된 대황, 감송향, 곽향, 두충의 단일 및 복합추출물을 대상으로 설치류 발모동물모델 효력평가 예비 1차, 2차 시험 및 본시험을 통하여 **발모 효력이 유의적으로 높았던 대황, 감송향 복합추출물을 본 과제의 최종 원료로 선정하였음.**

## 나. 시작품 제작

### (1) 최종 생약소재(복합) 추출물 제조

#### (가) 최적 추출조건 탐색

4종(대황, 감송향, 곽향, 두충)의 추출물에 대한 *In vitro*, *In vivo* 활성평가 결과에 의하여, 최종적으로 대황 및 감송향의 복합추출물 (이하 대감 복합추출물)을 본 연구의 최종 원료로 선정하였으며, 대감 추출물의 최적 추출조건을 탐색하기 위해 추출온도, 추출시간 및 추출횟수를 조절하여 수율(%)의 변화를 관찰하였고, 최종의 추출조건 선정은 경제적 측면과 효율성 측면을 함께 고려하여 확립하였음.

### ① 원생약 정보

#### ㉞ (중)대황(大黃)

이 약은 중대황 *Rheum undulaum* L.(마디풀과 Polygenaceae)의 뿌리줄기로서 뿌리줄기를 그대로 또는 껍질을 깎아서 모양을 다듬거나 또는 그대로 가로로 자르거나 세로로 쪼개어 말린 것. 이 약은 뿌리줄기로 원반상, 원주상 등으로 그 형태가 고르지 않으며, 원반상의 것은 지름 3~10 cm, 두께 5~30 mm 이고 가는 것은 거의 원주상이며, 지름 1~3 cm, 길이 5~8 cm이나 때로 세로로 쪼개진 것도 있음. 이 약의 횡단면은 회갈색~황갈색이고 형성층 부근

은 갈색을 띤 환층이 명확함. 측면은 어두운 갈색이며, 가로 주름이 있고 껍질을 벗긴 것은 황갈색임. 목부의 지름은 피부의 약 3~4 배이며, 바깥면은 매우 단단하나 섬유성이 아니고 유세포속에는 수산칼슘의 집정, 갈색으로 착색된 물질과 전분립 등이 있음. 이 약은 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 떫고 쓰며 씹으면 가는 모래를 씹는 것 같고 침을 노랗게 물들임. 한의학적으로 종대황은 뜨거워진 혈을 식히는 양혈(凉血)의 효능과 해독(解毒)의 효능으로 많이 사용되었으며, 열기를 식혀 열로 인한 변비를 치료하거나 혈이 막혀서 발생하는 월경통을 완화시키는데 사용되었음. 이 약의 주성분은 anthraquinone 유도체로서 총량의 약 3~5%에 달하며 대부분 포도당과 결합하여 anthracene glycosides 형태로 존재하여 사하 작용을 일으키며 senoside A, B, C, D, E 및 F는 미량 존재하나 강력한 사하작용을 일으키는 것으로 보고되어 있음. 그 밖에 tannin류, 유기산 등이 함유되어 있음.

그림. (중)대황의 식물 및 생약 사진



(중)대황 식물 일체



(중)대황의 꽃



(중)대황의 잎 및 줄기



(중)대황의 뿌리

[출처: 한약약리학, 한국전통지식포탈, 한약재관능검사 지침, 대한약전외한약(생약)규격집(KHP)]

#### ㊤ 감송향(甘松香)

이 약은 감송 *Nardostachys chinensis* Batal. 또는 시엽감송 *Nardostachys jatamansi* DC.(마타리과 Valerianaceae)의 뿌리 및 뿌리줄기로 대개 구부러진 원뿔모양으로 길이가 5~18 cm이고, 짧고 작은 뿌리줄기에는 잔기가 남아있으며, 바깥 면은 황갈색~흑갈색으로 자른 면은 황색 내지 갈색임. 이 식물의 뿌리는 하나이거나 수 개가 같이 붙어 곁뿌리가 달려 있으며 지름은 3~10 mm로 바깥 면이 주름진 자갈색에 잔뿌리와 수염뿌리가 달려있고, 질이 부드러워 꺾이기 쉬움. 이 약은 특유한 냄새가 있으며, 맛은 쓰고 매우나 청량감을 줌. 한의학적으로 감송향은 소화계통에 작용하는 약재로 위의 내용물을 게워내게 하는 구토(嘔吐)작용과 입맛이 없는 증상을 완화해주는 불사식(不思食)의 효능을 가지며, 기(氣)의 흐름을 원만하게 하여 통증을 멎게 하는 약재로 사용됨. 이 약의 주성분으로는 deoxonarquinol A, narchinol A, nardosinonic acid 및 nardostachin 등의 monoterpeneoid류와 kanshone A, B, C, D 및 E 등 다수의 sesquiterpenoids류 성분들이 함유되어 있음.

그림. 감송 및 시엽감송의 식물 및 생약 사진



시엽감송 식물 일체



감송 식물 일체



감송의 꽃



감송의 뿌리줄기

[출처: 한국전통지식포탈, 한약재관능검사 지침, 대한약전의한약(생약)규격집(KHP)]

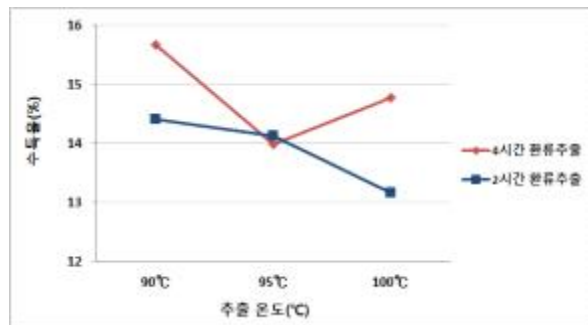
② 최적 추출물 제조공정 확립

㉠ 추출 온도 및 시간 비교평가

추출시간을 평가하기 위하여 대황 및 감송향의 원물을 각각 세절하여 중량비로 1:1로 혼합하고 10배수에 달하는 증류수를 투입하여 90℃, 95℃, 100℃에서 각각 2시간 4시간 동안 환류추출을 진행하고, 추출완류 후 여과지를 이용해 여과한 뒤 여액만을 모아 감압농축의 방법으로 용매를 완전 건조하였으며, 각 샘플의 투여량 대비 건조물을 계산하여 최종 수율을 평가하였음.

표/그림. 대감 추출물의 최적 추출시간 평가

추출온도 \ 추출 시간	90℃	95℃	100℃
2시간 추출 시 수득율(%)	14.41	14.13	13.16
4시간 추출 시 수득율(%)	15.67	13.98	14.77

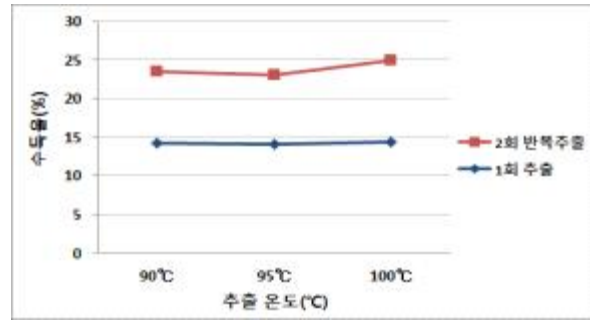


㉡ 추출 횟수 비교평가

추출 온도 및 시간 비교평가의 결과를 종합하여 추출시간을 설정하였고, 추가적으로 추출 횟수를 비교평가 하여 추출 온도와 횟수를 결정하였음. 대황 및 감송향의 원물을 각각 세절하여 중량비로 1:1로 혼합하고 10배수에 달하는 증류수를 투입해 90℃, 95℃ 및 100℃의 추출 온도별로 추출횟수를 각각 1회, 2회 반복하여 환류추출을 진행하고, 추출완류 후 여과지를 이용해 여과한 뒤 여액만을 모아 감압농축의 방법으로 용매를 완전 건조하였으며, 각 샘플의 투여량 대비 건조물을 계산하여 최종 수율을 평가하였음.

표/그림. 대감 추출물의 최적 추출온도와 추출횟수 평가

추출온도 추출 횟수	90℃	95℃	100℃
1회 추출 시 수득율(%)	14.29	14.07	14.36
2회 추출 시 수득율(%)	23.46	23.08	24.87



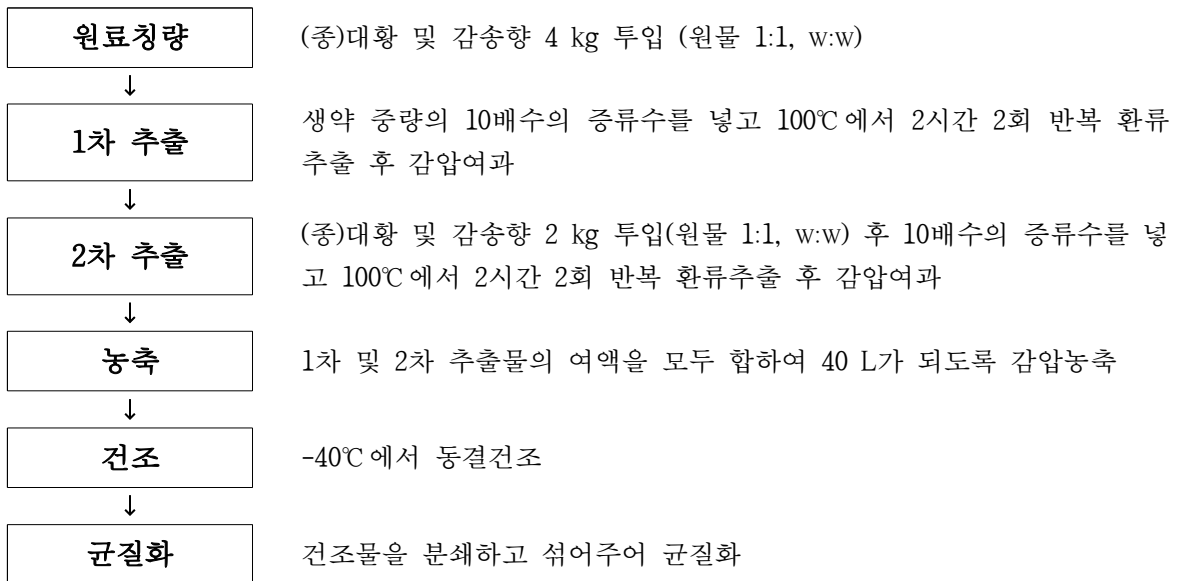
㉔ 최적 추출물 제조공정 확립결과

대감 추출물의 최적 추출조건 선정은 경제적 측면과 효율성 측면을 함께 고려하였으며, 추출 시간의 증가에 따라 수득율(%) 증가정도는 미비하여 경제적인 면을 고려해 추출시간을 2시간으로 고정하였음. 그 외 추출 온도와 반복 횟수는 높은 수득율(%) 나타내는 조건을 선정하여 **최종적으로 대감 복합추출물의 제조공정은 100℃에서 2시간씩 2회 반복 환류추출로 추출 조건을 확립하였음.**

(2) 대감 복합추출물의 Scale-up 생산

대감 복합추출물 (이하 원료)을 이용한 양모 기능성 발모제 시제품 개발을 위해 외주를 통해 원료의 Scale-up 생산을 진행하였음. 원료의 생산공정은 아래의 공정도와 같이 진행되었으며, 최종적으로 6 kg에 달하는 대황 및 감송향의 원물 (1:1, w:w)로 부터 1.57 kg의 원료 (수득율: 26%)를 얻었고, 이 원료를 RN이라 명명하였음.

그림. 대감 복합추출물 (RN)의 Scale-up 생산공정도



### (3) 대감 복합추출물의 품질규격 설정

대감 복합추출물의 Scale-up 생산을 통해 얻은 RN에 대하여 품질규격 성적서를 발행하기 위해 내부 및 외부 공인기관을 통해 분석시험을 진행하였으며, RN의 성적서는 이 후 진행한 비임상 독성시험 시 제출 자료로 활용되었음. 품질규격의 시험항목과 시험방법은 아래와 같으며, 모든 시험결과는 기준 및 규격에 적합하였음.

표. RN의 기준 및 규격

시험항목	기준 및 규격
성상	황색의 고운 분말
확인	기준항에 적합 (라폰틴 확인)
pH	pH 4.5 ~ 6
중금속	중금속(납) 30 mg/kg 이하
건조감량	8.0% 이하
회분	30.0% 이하
잔류농약	- Aldrin, Endrin, Dieldrin 0.01 mg/kg 이하 - 총 DDT 0.1 mg/kg 이하 - 총 BHC 0.2 mg/kg 이하
미생물한도	세균 $1 \times 10^5$ cfu/g 이하 진균 $1 \times 10^2$ cfu/g 이하 대장균, 살모넬라, 녹농균 및 황색포도상구균 불검출
정량	총 폴리페놀로서 18.0% 이상 라폰틴 ( $C_{21}H_{24}O_9$ : 420.41)으로서 8.0% 이상

#### (가) 시험방법

##### ① 성상

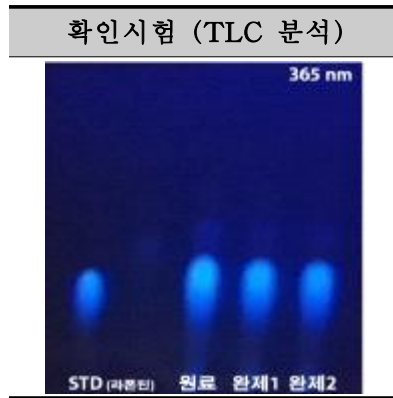
색상, 형상 냄새 그리고 맛 등의 4가지 관능평가 결과를 종합하여 판단하였음.

##### ② 확인시험

대한민국약전의 생약규격집 중 ‘중대황 확인시험법’에 따라 박층크로마토그래피 (Thin layer chromatography, TLC)법을 사용하여 평가하며, 라폰틴(Rhapontin)을 표준품으로 RN과 각각 1 mg/mL, 5 mg/mL의 농도로 에탄올에 녹여 표준액과 검액으로 하고 박층판에 함께 점적하여 이소프로필에테르, n-부탄올, 메탄올의 혼합액 (26 : 7 : 7)을 전개용매로 약 10 cm를 전개한 뒤 꺼내어 건조 후 자외선 (주파장 액 365 nm)을 가할 때 검액에서 얻은 여러 개의 밴드 중 1개의 밴드가 표준액에서 얻은 밴드와 색상 및 Rf 값이 일치하였음.



표. RN의 확인시험 (TLC) 결과



③ pH

RN을 증류수에 녹여 0.5%, 1%의 용액을 각각 제조하여 calibration을 끝낸 pH meter (pH/Ion S220, Mettler Toledo)로 동일 샘플 내에서 3회 취하여 전극 (pH electrode)을 서서히 저어주며 3반복 측정한 결과 RN의 평균적 pH는 4.93이었음.

④ 중금속

대한민국약전 중 ‘생약등의잔류오염물질기준및시험방법’에 따라 RN 내에 잔류되어 있는 납, 비소, 수은, 카드뮴 등의 항목을 ‘순천향대 화장품 분석기관(BRIC)’에 분석 의뢰한 결과, 중금속(납) 30 mg/kg 이하의 기준에 적합하였음.

⑤ 건조감량

RN 내의 수분함량 (Loss on drying)을 측정하기 위해 0.5 ~ 1.0 g에 달하는 RN을 알루미늄판에 고르게 분산시키고, 측정온도 105°C, 측정시간 4시간으로 설정하여 3회 반복 측정한 결과 RN의 평균적 수분함량은 약 5.0%이었음.

⑥ 회분

대한민국약전 일반시험법 중 ‘23.생약시험법의 회분’ 시험법에 따라 RN의 회분을 측정하기 위해 ‘순천향대 화장품 분석기관(BRIC)’에 분석 의뢰한 결과, RN의 회분은 26.39%이었음.

⑦ 잔류농약

대한민국약전 중 ‘생약등의잔류오염물질기준및시험방법’에 따라 RN 내에 잔류되어 있는 농약 5종 (알드린, 엔드린, 디엘드린, 총 DDT 및 총 BHC)을 측정하기 위해 ‘순천향대 화장품 분석기관(BRIC)’에 분석 의뢰한 결과, 기준에 적합하였음.

⑧ 미생물한도

대한민국약전 일반시험법 중 ‘12. 미생물한도시험법의 생약(한약)추출물 한도기준’에 따라 RN 내에 미생물을 측정하기 위해 ‘순천향대 화장품 분석기관(BRIC)’에 분석 의뢰한 결과, 기준에 적합하였음.

⑨ 정량

㉑ 총 폴리페놀

- 표준액 제조

1 mg의 탄닌산을 정확히 달아 10 mL의 부피플라스크에 넣은 후 증류수 7 mL을 첨가해 초음파 추출로 녹인 후 증류수로 표선하여 표준원액으로 하고, 표준곡선을 확보할 수 있는 농도로 표준원액을 적절히 희석하여 표준액을 제조하였음.

- 검액의 제조

100 mg에 해당하는 RN을 정확히 달아 100 mL의 부피플라스크에 넣은 후 증류수 70 mL을 첨가해 초음파 추출로 용해시킨 후 증류수로 표선한 뒤 실린지 필터 하여 검액을 제조.

- 시험조작

증류수 7.5 mL을 코니칼 튜브에 넣고 표준액과 검액을 각각 1 mL씩 첨가한 후 Folin-denis 시약을 0.5 mL, 35% 탄산나트륨을 1 mL 순서대로 가하여 잘 혼합하여 암소에서 1시간 방치 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였음.

- 표준품: 탄닌산 (Tannic acid,  $C_{76}H_{52}O_{46}$ , MV: 17701.2)
- 시료: RN (대감추출물)
- 시약: Folin-denis, 35%  $NaCO_3$
- 검출기: UV-photometer (주파장: 760 nm)
- 함량계산:

$$\text{총 폴리페놀 함량 (mg/g)} = \frac{A \times B \times C}{D}$$

A : 시험용액의 전량 (mL)

B : 희석배수

C : 시험용액중의 총 폴리페놀 농도 (mg/mL)

D : 시료 채취량 (g 또는 mL)

㉒ 라폰틴 (Rhapontin)

- 표준액 제조

10 mg의 라폰틴 표준품을 정확히 달아 5 mL의 부피플라스크에 넣고, 메탄올을 이용해 완전히 녹인 후 표선하여 표준원액으로 하였고, 검량선을 확보할 수 있는 적절한 농도로 표준원액을 희석하여 표준액을 제조하였음.

- 검액의 제조 (원료)

약 1 g에 해당하는 20150105-RN (원료)을 정확히 달아 100 mL의 부피플라스크에 넣고, 메탄올 70 mL을 첨가해 초음파 추출로 용해시켜 표선한 뒤 실린지 필터 후 원료의 검액으로 하였음.

- 검액의 제조 (완제)

대감, 감송향 복합추출물이 0.30% 함유되어 있는 완제 (액제)의 일정량을 취하여 감압농축을 통해 용매를 완전히 날린 후 메탄올을 사용해 최종 분석 농도를 5 mg/mL ~ 10 mg/mL로 맞추어 필터 후 완제의 검액으로 하였음.

- HPLC 조작조건

- 컬럼: Capcell pak C18 5.0  $\mu$ m (250 mm X 4.5 mm) 또는 이와 동등한 컬럼
- 검출기: UV-vis (340 nm)
- 주입량: 10  $\mu$ L
- 유속: 1.0 mL/min
- 온도: 30  $^{\circ}$ C
- 이동상
  - A: 1% acetic acid with water
  - B: acetonitrile

<농도구배>

T(time)	%B
0	20
25	20
27	100
35	100
37	20
45	20

• 계산식

$$\text{라폰틴의 양 (mg)} = \frac{A - B}{C \times D \times 1000}$$

A: 검액의 면적 (mAU)

B: 검량선의 y절편 (intercept)



C: 검량선의 기울기 (slope)

D: 검액의 농도 (mg/mL)

**(나) RN의 품질규격 성적서 (CoA)**

내부 분석 결과 및 외부공인기관(아산, 순천향대학교 화장품분석기과, BRIC)에 의뢰하여 얻은 결과를 종합하여 RN의 품질규격 성적서를 아래와 같이 작성하였으며, 추후 진행할 독성시험 시 RN의 시험성적서로 제출하였음.

표. RN의 성상 및 CoA

원료 (20150105-RN)	원료 (20150105-RN) CoA
	

**(3) 시제품의 제형 및 처방연구**

양모 기능성 발모제의 원료 선정 및 생산을 완료하고 시제품 생산에 앞서 현 발모제 시장의 제품 동향과 트렌드를 파악하고자 제형에 대한 사전조사를 실시하고 이를 바탕으로 시작품의 제형 및 처방연구를 진행하였음.

국내 탈모방지를 위한 제품들은 의약외품으로 등록되어, 샴푸, 에센스, 세럼, 토닉 등을 주를 이루며 판매되고 있음. 이들에 주원료로서 생약추출물을 보편적으로 사용하며, 추가적으로 탈모방지, 양모에 도움을 줄 수 있다고 알려진 텍스판테놀, 나이아신아미드, 살리실산, 비오틴 등이 사용됨.

기 출시된 양모에 도움을 줄 수 있는 제품들은 주기적인 사용으로 일차적인 두피 케어 효과와 이차적인 탈모방지, 양모 및 육모 효과를 기대하고자 창포, 황금, 은행잎 및 알로에 등 두피 또는 모발에 도움을 줄 수 있다고 알려진 다양한 생약 추출물들과 성분들을 원료로 사용하고 있으며, 과거 노년층에 국한되었던 발모제품은 현재 젊은층의 탈모가 확산되며 발모제의 소비는 나날이 증가하는 추세임.

표. 기 출시된 발모 관련 제품

기 출시된 발모 제품		
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 리피움 벨로케어</li> <li>· 유 형: 탈모방지 샴푸</li> <li>· 제조원: (주)씨맥스코리아</li> <li>· 특 성: 비듬 케어, 가려움 진정, 두피안정</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 세티니크 안티</li> <li>· 유 형: 헤어폴 샴푸</li> <li>· 제조원: 엘엘씨</li> <li>· 특 성: 가늘고 힘없는 모발, 탈모</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 리피움 벨로케어</li> <li>· 유 형: 두피에센스</li> <li>· 제조원: (주)씨맥스코리아</li> <li>· 특 성: 가늘어진 모발강화, 영양공급</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 헤어 뉴트리언트</li> <li>· 유 형: 세럼액</li> <li>· 제조원: (주)이엔비에스</li> <li>· 특 성: 두피재생, 혈행개선, 두피보호, 영양공급</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 에쏘피스칼프클리닉</li> <li>· 유 형: 헤어토닉</li> <li>· 제조원: (주)웰코스</li> <li>· 특 성: 탈모방지, 양모효과, 쿨링케어, 영양공급</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품명: 세티니크스칼프토닉</li> <li>· 유 형: 헤어토닉</li> <li>· 제조원: 엘엘씨</li> <li>· 특 성: 탈모방지, 모발굵기 증가, 영양공급</li> <li>· 품 목: 의약외품</li> </ul>

(가) 처방연구

20150105-RN을 원료로 완제의 base 처방을 확립하기 위해 원료의 농도별로 에탄올 비율에 따라 추출하였을 때, 원료 특유의 향의 변화를 관찰하고 장기간 보관 시 이물의 생성 여부를 관찰하였음. 평가결과 **0.3%의 원료를 10% 에탄올로 초음파 추출 후 원심 분리한 상등액**을 취하였을 때, 원료 특유의 군내 및 신내의 향취가 가장 낮았으며, 20일 보관 시, 침전물의 생성도 확인되지 않았음.

완제의 base 처방 중 하나로 발림성을 좋게하고 혼합을 돕는 역할을 하는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 글리세린(glycerin) 및 CPC(1-hexadecyl pridinium chloride)를 농도별로 평가하여 보관 중 샘플의 색상, 향취, 탁도 및 침전물 생성여부를 평가하였을 때, **1%의 프로필렌글리콜 및 글리세린 처방과, CPC로 tween 20을 사용해 0.02%로 처방**하였을 때, 색상, 향취 및 탁도의 정도가 가장 좋았고 침전물이 생성되지 않았음.

표. 개발 양모기능성 발모제의 Base 처방

발모제 Base 처방			
처방	구분	배합비	용도
20150105-RN	주원료	0.3%	• 대황, 감송향 복합추출물
Propylene glycol	윤활제	1.0%	• 점성 증가, 발림성 완화
Glycerin	윤활제	1.0%	• 점성 증가, 발림성 완화
Tween 20	보존제	0.02%	• 보존 및 유화증가
10% 에탄올	-	97.68%	-
합계		100%	

(나) 제형연구

시작품 제작을 위하여 발모제의 제형 및 처방연구를 진행하였음. 시중에 판매되는 발모제의 제형은 샴푸, 에센스 또는 토닉의 점성이 약하거나 거의 없는 액상제제로써 **본 연구에서 주목하고자 하였던 지방산 유도체 enhancer와는 다른 유형의 제형이었으며, enhancer의 특성상 수용성 물질과 혼합되지 않는 점을 감안하여 최종 시작품의 제형은 액상제제로서 손쉽게 두피에 분사하여 흡수되도록 디자인되었음.**

표. 제형연구 시 평가 요소

평가 요소	항 목
물리적 평가	분산성
	발림성
	휘발성
	보존성
화학적 평가	활성성분의 추가배합
관능적 평가	향취

제형선정과 더불어 시작품의 처방연구는 아래와 같은 물리 · 화학적 및 관능적 항목을 고려하여 진행되었으며, 감송향의 군내의 경우 소비자들에게 다소 높은 불쾌감을 줄 것으로 예상, 관능평가를 통해 향취를 masking 하는데 심여를 기울였음.

① 물리적 평가

분무형 양모제 개발을 위해 점도 값이 다양한 HEC (Hydroxyethyl Cellulose, 1500, 2500, 4500~6500 cP) 와 HPMC (Hydroxypropyl Methyl Cellulose, 4000 cP)를 0.05, 0.1, 0.2, 0.4% 농도로 조제하여 분무시켜 확산도, 뭉침 및 점성의 정도를 평가해 분산성과 발림성을 평가하였을 때, **0.1% HEC 2500 cP 와 HEC 4500~6500 cP가 가장 분무기준에 적합하였으나, 주원료**

**와 함께 혼합하였을 경우 침전물 생성 정도가 높아 base 처방에서 제외하였음.**

② 화학적 평가

양모의 기능과 함께 보습 및 항균효과를 가지는 히알루론산 (hyaluronic acid)을 base로 처방하였을 때 분무도에 끼치는 영양을 확인하고자 0.1, 0.5, 1.0, 1.5% 히알루론산을 조제하여 분무 시 확산도, 분침 정도 및 점성을 평가한 결과, **히알루론산의 전반적인 평가농도에서 모두 분무기준에 적합**하였음.

양모의 효능이 알려진 니코틴산아미드 (Nicotinaide, Vitamin B<sub>3</sub>), 덱스판테놀 (Dexpanthenol, Vitamin B<sub>5</sub> 전구체), 비오틴 (Biotin, Vitamin H) 및 멘톨 (Menthol)을 함께 처방하였을 때, 배합별 색상, 침전 정도 및 스프레이 성능 등을 평가한 결과, **0.2% 니코틴산아미드와 1% 덱스판테놀을 처방하였을 때 가장 분무기준에 적합**하였음.

표. 본 개발 양모 기능성 발모제의 최종 처방

최종 발모제 처방			
처방	구분	배합비	용도
20150105-RN	주원료	0.3%	· 대항, 감송향 복합추출물
Propylene glycol	윤활제	1%	· 점성 증가, 발림성 완화
Glycerin	윤활제	1%	· 점성 증가, 발림성 완화
Tween 20	유화제	0.02%	· 보존 및 계면활성제
Nicotinamide	효능제	0.2%	· 양모효능 증가
Dexpanthenol	효능제	1%	· 양모효능 증가
10% 에탄올	휘발제	96.48%	· 피부 도포 시 향취의 휘발유도
합계		100%	

③ 관능적 평가

처방 및 제형연구를 통해 최종적으로 액상제제 양모기능성 발모제 처방을 확립하였고, 관능 평가를 통해 품질 높은 제품을 개발하고자 하였음. 본 제품의 주원료인 20150105-RN은 대항 및 감송향의 복합추출물로서 감송향 특유의 자체 군내를 masking 하고자 각 0.1%의 멘톨, 식품유레 착향료 및 화장품유레 착향료를 적용하여 관능 평가를 실시하였음.

착향료 추가 처방의 관능평가 결과, 릴리+국화의 착향료와 릴리+장미의 착향료를 추가적으로 처방하였을 경우 완제의 특유 군내가 사라지고 은은한 릴리의 향이 조화를 이루어 **착향료로써 릴리, 국화 또는 장미를 혼합하여 사용하는 것이 가장 바람직하였음.**

표. 착향료 종류

항목	종류
청량감 착향료	멘톨
식품유래 착향료	쌍화차향
	쌍화향
	솔향 #1
	솔향 #2
화장품유래 착향료	대추후레바
	릴리
	장미
	라벤더
	국화
	보존료 (pentylene glycol)
	보존료 (phenoxy ethanol)

3-2 비임상시험 및 허가자료 준비

가. 비임상 독성시험

(1) SD-Rat를 이용한 단회 경피투여 독성시험

(가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)을 SD 랫드에 단회 경피투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위하여 실시하였음.

(나) 시험방법

① 시험계

- 종(계통) : 특정병원체부재(SPF) 랫드(SD)
- 성별 및 입수 시 주령 : 수컷 7 주령, 암컷 11 주령
- 투여개시 시 주령 및 체중범위 : 수컷 8 주령, 암컷 12 주령, 평균  $\pm$  20 % g

② 투여방법 (투여경로) : 경피

③ 투여횟수 및 투여기간: 투여 당일 1 회 투여

④ 측정 및 관찰항목

- 일반증상 : 모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시함. 단 투여 당일에는 투여직후와, 이후 매시간 간격으로 6 회 이상 관찰. 일반증상관찰은 투여 후 15 일까지 실시.
- 체중측정 : 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 2, 4, 8 및 15 일에 측정.
- 부검 : 투여 후 15 일째에 모든 생존동물을 CO<sub>2</sub>로 마취한 후 개복하여 후대정맥 및 복대정맥을 절단하는 방법으로 방혈치사 시켜 육안적으로 모든 장기를 검사.



⑤ 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/head/day)	투여량 (mg/kg)
G1 (N.C)	male	5	1-5	8	0
	female	5	21-25	8	0
G2	male	5	6-10	8	625
	female	5	26-30	8	625
G3	male	5	11-15	8	1250
	female	5	31-35	8	1250
G4	male	5	16-20	8	2500
	female	5	36-40	8	2500

(다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN)을 Sprague-Dawley 랫드에 625, 1250, 2500 mg/kg의 농도로 단회 경피 투여하였을 때, 시험물질에 의한 문제는 관찰되지 않았으며, **본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose; ALD)은 암수 모두 2,500 mg/kg을 상회하는 것으로 판단.**

(2) SD-Rat를 이용한 2 주 반복 경피투여 독성시험(DRF)

(가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)을 SD 랫드에 2 주간 반복 경피투여 하였을 때 나타나는 아급성 독성을 검사하고 추후 있을 4 주간 시험의 용량을 결정하기 위한 예비시험으로 수행.

(나) 시험방법

① 시험계

- 종(계통) : 특정병원체부재(SPF) 랫드(SD)
- 성별 및 입수시 주령 : 수컷 7 주령, 암컷 11 주령
- 투여개시 시 주령 및 체중범위 : 수컷 8 주령, 암컷 12 주령, 평균 ± 20 % g

② 투여방법 (투여경로) : 경피

③ 투여횟수 및 투여기간: 1회/1일, 7일/1주, 2주간

④ 측정 및 관찰항목

- 일반증상 : 모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 관찰하고 개체 별로 기록.
- 체중측정 : 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 8 및 15 일에 측정.
- 부검 : 투여 후 15 일째에 모든 생존동물을 CO<sub>2</sub>로 마취한 후 회복하여 후대정맥 및 복대정맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사.

⑤ 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/head/day)	투여량 (mg/kg)
G1 (N.C)	male	3	1-3	8	0
	female	3	13-15	8	0
G2	male	3	4-6	8	625
	female	3	16-18	8	625
G3	male	3	7-9	8	1250
	female	3	19-21	8	1250
G4	male	3	10-12	8	2500
	female	3	22-24	8	2500

(다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN)을 Sprague-Dawley 랫드에 625, 1250, 2500 mg/kg의 농도로 2 주간 반복 경피투여 하였을 때, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았으며, 본 시험결과를 바탕으로 추후 **반복시험에서는 고용량군의 투여량을 2500 mg/kg으로 설정하고, 공비 2로 아래에 2 개의 군을 설정하여 진행하는 것이 바람직하다고 판단.**

(3) 국소독성시험 - 안점막자극시험

(가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)의 New Zealand White계 토끼를 이용한 안점막 자극성 반응을 알아보기 위하여 실시.

(나) 시험방법

① 시험계

- 종(계통) : 토끼-New Zealand White 계
- 입수시 성별 및 주령 : 수컷 2~3 kg
- 투여 개시 시 주령 : 평균체중 ± 20 %

② 처치방법

- 처치경로 : 안점막 적용
- 처치 횟수 및 처치기간 : 1 회 적용한 후 세안군(G1)은 30 초 후 미온 생리 식염수로 1 분간 세척하고 미세안군(G2)은 그대로 둠.
- 처치방법 : 좌안의 하안검을 안구로부터 당겨서 결막낭내로 시험물질을 투여하고 상하안검을 약 1 초간 서로 맞춘. 우안은 미처치 그대로 두어 무처치 대조안으로 함.
- 처치시간 : 처치 당일 오전에 처치하는 것을 원칙으로 함.
- 처치액량 : Draize 방법에 따라 마리당 1 회 0.1 g씩 시험물질을 처치.

③ 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여부위	투여물질
G1 (세안군)	male	3	1-3	좌안 우안	시험물질 무처리
G2 (미세안군)	male	6	4-9	좌안 우안	시험물질 무처리

④ 측정 및 관찰항목

- 일반증상 : 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 일반증상과 사망 및 빈사유무를 관찰.
- 체중 : 시험물질 적용일 및 적용 후 3 및 7 일에 측정.
- 안반응 관찰방법 : 시험물질 적용 후 1, 2, 3, 4 및 7 일에 토끼의 눈 주위, 안구 및 행동을 관찰. 안구는 혼탁된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안적으로 관찰.

(다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN) 적용과 관련한 일반증상의 이상변화는 관찰되지 않았으며, 미세안군에서 관찰된 체중감소는 연관된 일반증상이나 다른 요인이 관찰되지 않았고, 그 감소의 정도가 경미하여 독성학적 의미는 없는 것으로 판단되었음.

**시험물질 적용 후 안반응 관찰 결과, 급성 안자극지수는 세안군 0, 미세안군 2.7 으로 낮은 수치로 평가되어, 대감 복합추출분말은 무자극물로 판단하였음.**

(4) 국소독성시험 - 피부자극시험

(가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)의 New Zealand White계 토끼를 이용한 피부 자극성 반응을 알아보기 위하여 실시.

(나) 시험방법

① 시험계

- 11중(계통) : 토끼-New Zealand White 계
- 입수시 성별 및 주령 : 수컷 2~3 kg
- 투여 개시 시 주령 : 평균체중 ± 20 %

② 처치방법

- 처치경로 : 피부 적용
- 처치 횟수 및 처치기간 : 1 회 적용하여 24 시간 유지시킴.
- 처치부위 및 처치방법 : 시험물질 처치 24 시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 피부에 상처가 나지 않도록 가로 세로 약 10 cm 씩의 제모된 건강한 피부를 만듦. 제모된

피부는 좌우로 나누어 좌를 투여구획 우를 대조구획으로 하고, 투여구획과 대조구획의 건강피부 또는 찰과 피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여, 2.5 × 2.5 cm의 건강(비찰과)피부 2 개소와 찰과 피부 2 개소를 유성펜으로 표시. 찰과 피부는 주사기 바늘 끝을 이용하여, 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않도록 피가 나지 않는 정도로 찰과상을 입혀서 만듦. 처치방법으로는 가로 세로 2.5 cm의 투여구획 피부 부위에 0.5 mL의 시험물질을 적용 후 가아제를 덮어 시험물질과 피부가 잘 접촉할 수 있도록 함. 가아제의 위에는 시험물질의 증발을 막기 위해 침투성이 없고 자극성이 낮은 테이프로 감아줌.

- 처치시간 : 처치 당일 오전에 처치하는 것을 원칙으로 함.
- 처치액량 : Darize 방법에 따라 마리당 적용부위 1 회 0.5 g 씩 처치함.

### ③ 측정 및 관찰항목

- 일반증상: 시험기간 중 전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 일반증상과 사망 및 빈사유무를 관찰.
- 체중 : 시험물질 적용일 및 적용 후 3 일에 측정.
- 피부 반응의 판정 : 시험물질은 적용 24 시간 경과 후 제거하고, 피검 시험물질이 잔류하지 않도록 증류수나 생리식염수로 가볍게 씻어냄. 시험물질 적용 후 24 시간(시험물질 제거 30 분 후) 및 72 시간째에 도포 국소 부위의 홍반, 부종 출혈, 가피형성 등의 변화를 육안적으로 관찰. 홍반과 가피형성 및 부종의 출현은 염증 반응을 근거하여 판정하는 것으로 홍반은 육안적으로, 부종은 가벼운 촉진을 병행하여 판정. 피부 반응의 정도는 적용 후 24 시간 및 72 시간에 피부반응 기준에 따라 채점하여 기록.

### (다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN) 적용과 관련한 이상변화는 관찰되지 않았으며, 적용 후 3 일에 관찰된 체중의 감소는 시험물질 폐쇄적용에 따른 스트레스로 인한 것으로 판단.

**피부반응 평가에서 나타난 시험물질 적용부위의 홍반은 시험물질에 의한 자극보다는 시험물질과 부형제의 희석에 의해서 발생하는 점성에 의한 것으로 판단되며, 이에 대한 자극성 판정 결과, 1 차 피부자극지수(P.I.)는 0.04 로 대감 복합추출분말은 비자극성 물질로 판단함.**

### (5) SD-Rat 를 이용한 4주간 반복 경피투여 독성시험 및 2주 회복시험

#### (가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)을 SD 랫드에 4 주간 반복 경피투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 확인하고, 2 주간의 회복기간을 두어 투여종료 후의 회복성 또는 지연독성을 알아보기 위하여 실시.

#### (나) 시험방법

##### ① 시험계

- 종(계통) : 특정병원체부재(SPF) 랫드(SD)
- 성별 및 입수시 주령 : 수컷 7 주령, 암컷 11 주령

- 투여개시 시 주령 및 체중범위 : 수컷 8 주령, 암컷 12 주령, 평균  $\pm$  20 % g
- ② 투여방법 (투여경로) : 경피
- ③ 투여횟수 및 투여기간 : 1회/1일, 7일/1주, 4주간
- ④ 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (mL/head/day)	투여량 (mg/kg)
G1 (N.C)	male	15	1-15	10	0
	female	15	51-65	10	0
G2	male	10	16-25	10	700
	female	10	66-75	10	700
G3	male	10	26-35	10	1400
	female	10	76-85	10	1400
G4	male	15	36-50	10	2500
	female	15	86-100	10	2500

⑤ 측정 및 관찰항목

- 일반증상관찰 : 투여 전 기간에 걸쳐 1 일에 1 회 일반증상을 관찰. 일반 증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 개체별로 기록.
- 체중측정 : 모든 동물에 대하여 Day 1(투여 전), 투여 후 주 1 회 및 부검일에 측정.
- 사료, 물 섭취량 측정 : 투여 당일 및 투여 후 주 1 회 측정.
- 인과학적 검사 : 관찰 최종 주에 육안으로 눈의 외관을 관찰한 후 양쪽 안구에 산동제를 점적하여 동공확장을 유도한 다음, 안저 사진기로 전안부, 중간투광체 및 안저를 관찰.
- 요검사 : 투여 최종 주에 모든 생존 동물에서 채뇨한 신선뇨를 이용하여 아래의 항목을 요검사용 시험지와 요 자동분석장치(CliniTek 100, Bayer)를 이용하여 측정.  
# BIL, pH, NIT, KET, PRO, BLO, GLU, SG, URO, WBC, RBC, 요색조, 투명도, 상피세포, 원주
- 혈액학적 검사 : 계획 도살되는 동물에 대하여 혈액학적 검사를 실시. 동물을 하루 밤 절식시킨 후 Isoflurane으로 흡입마취한 뒤 회복하여 후대정맥으로부터 채혈한 혈액을 이용하여 아래의 항목에 관하여 측정을 행함. 항응고제로는 EDTA-2k를 사용.  
# RBC, RDW, NEU, HCT, HDW, LYM, HGB, MPV, MONO, MCV, PLT, EOS, MCH, RET, BASO, MCHC, WBC, LUC, 부분활성트롬보플라스틴시간, 프로트롬빈시간
- 혈액생화학적 검사 : 혈액학적 검사를 실시한 동물에 대하여 혈액생화학적 검사를 실시. 후대정맥으로부터 채혈된 혈액을 3000 rpm, 10 분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하여 아래의 항목에 관하여 측정.  
# AST, ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, CHO, PRO, CPK, ALB, BIL, A/G ratio, GLI, IP, Ca, Cl, Na, K
- 부검 : 혈액검사를 위한 채혈 후 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기를 관찰.
- 장기중량측정 : 최종 계획도살 시에 부검 후 아래의 장기를 적출하여 전자저울을 이용하

여 측정. 양측성 장기는 각각 측정.

# 뇌, 비장, 부고환, 뇌하수체, 부신, 전립샘, 폐, 신장, 난소, 심장, 간장, 자궁

- 기관 및 조직의 보존 : 모든 동물에 대해서 장기를 10 % 중성포르말린 액으로 고정시키며, 안구는 Davidson's 액에, 고환은 Bouin's 액에 고정시킴.
- 조직병리학적 검사 : 부형제대조군, 고용량군의 장기를 검사하여 시험물질에 의한 변화가 인정되는 장기는 모든 투여군의 해당 장기에 대하여 조직병리학적 검사를 실시.

#### (다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN)을 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복하여 경피로 투여하고 2 주간 회복기간을 두었을 때, 시험물질에 의한 독성 변화는 관찰되지 않았음.

**따라서 본 시험조건에서 시험물질인 RN의 표적장기는 관찰되지 않았고, 무독성량(NOAE, No Observed Adverse Effects Level)은 암수 모두 2500 mg/kg/day로 판단됨.**

#### (6) Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성 시험(Buehler 법)

##### (가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)의 Hartley계 기니픽을 이용한 피부감작성 반응을 알아보기 위하여 실시.

##### (나) 시험방법

###### ① 시험계

- 11종(계통) : 특정병원체부재(SPF) 기니피그-Hartley 계
- 입수 시 성별 및 주령 : 수컷 200~300 g
- 투여개시 시 주령 : 평균체중 ± 20 %

###### ② 처치방법

- 처치경로 : 감작 및 야기
- 처치부위 및 처치방법 :
  - 감작 : 감작 전에 좌측 측복부 10 × 10 cm 부위를 electric clipper를 사용하여 전모한 다음 투여 당일 오전에 제모를 실시. 감작부위에 시험물질, 양성대조물질 및 부형제를 각각 2 × 3 cm, 0.5 mL/site로 약 6 시간 동안 첩포용 거즈 위에 테가덤을 덮어주었고, 그 위에 코반(Coban)으로 몸통 전체를 감아 폐쇄 첩포함. 약 6 시간 후 각 물질을 제거하고 멸균주사용수를 적신 거즈를 이용하여 잔류물질을 닦아줌. 감작은 주 1 회씩 3 주간 3 회 실시.
  - 야기 : 최종 감작 2 주 후 우측 측복부를 야기 1 일 전에 전모한 다음 투여 당일 오전에 제모를 실시. 부형제대조군 및 시험물질 투여군은 우측에 각 2 개소씩, 양성대조군은 우측에 1 개소의 야기부위를 정한 뒤, 부형제대조군 및 시험물질 투여군의 경우 앞부위에는 부형제, 뒷부위에는 시험물질을, 양성대조군의 경우 양성대조물질을 2 × 3 cm, 0.5 mL/site씩 첩포용 거즈 위에 테가덤을 덮어주었고, 그 위에 코반으로 몸통 전체를 감아

약 6 시간 동안 폐쇄 첩포함.

③ 시험군의 구성, 투여액량 및 투여량

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량 (mL/site)	투여량 (%)	
					감작	야기
G1 (N.C)	male	5	1-5	0.5	Vehicle	Vehicle
						30
G2	male	10	6-15	0.5	30	Vehicle
						30
G3	male	5	16-20	0.5	0.1	0.1

④ 측정 및 관찰항목

- 일반증상: 시험기간 중 전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 관찰.
- 체중 : 시험물질 적용일, 투여 후 주 1 회 및 최종 평가일에 측정.
- 감작성 반응의 판정 : 야기 처치(폐쇄첩포) 약 6 시간 후 시험물질, 부형제 및 양성대조물질을 제거한 후 약 21 시간째에 제모를 실시. 각 물질을 제거한 후 약 24, 48 시간 후의 피부반응을 평가하고, 이를 기초로 시험물질의 피부 감작성을 평가.

(다) 시험결과

시험물질 대감 복합추출분말(RN) 적용에 의한 일반증상 및 체중변화의 이상은 관찰되지 않았으며, 야기부위에서 아무런 반응이 나타나지 않았음.

**따라서 본 시험 조건 하에서 시험물질 RN의 피부 감작용은 30 % 농도에서 '매우 약함'(I 등급)으로 판정하였음.**

(7) 세균을 이용한 복귀돌연변이 시험

(가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)의 유전자돌연변이 유발성 여부를 알아보기 위하여 히스티딘 요구성인 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균(WP2uvrA(pKM101) 균주)을 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시하였음.

(나) 시험방법

- ① 종 및 균주명: *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA1535, *Salmonella typhimurium* TA1537, *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)
- ② 용량설정시험 및 본시험
  - 용량 : 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2 와 4 로 2,500, 1,250, 312.5, 78.125 및 19.531 µg/plate의 5 용량을 설정. 또한 음성대조균 및 양성대조균을 설정.

- 본 시험의 용량설정 : 용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화비존재하 및 존재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA(pKM101)균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았음. 따라서 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였고, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였음.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5

- 본 시험은 대사활성화비존재하 및 존재하의 2 계열에 대하여 프리인큐베이션법으로 실시.

### ③ 측정 및 관찰항목

- 시험물질의 석출의 관찰 : 시험물질의 처리 시 및 콜로니수 계측 시에 시험물질의 석출 유무를 관찰.
- 콜로니수의 계측 : 배양종료 후, 복귀변이콜로니수를 육안계수를 실시.
- Background lawn의 관찰 : 계측과 동시에 background lawn으로부터 시험물질에 대한 균주의 생육저해의 유무를 관찰함. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교 시 옅어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 함.
- 대사활성계 유무와 관계없이 적어도 1 개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 1 용량 이상에서 음성대조군에 비해 2 배 이상 증가하고, 용량의존성을 보이며, 재현성이 있을 시 양성으로 판정.

### (다) 시험결과

본 시험의 결과, 시험물질군에서 대사활성화 유무와 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2 배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았음.

**따라서 본 시험조건에서 시험물질 대감 복합추출물(RN)의 유전자 돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단되었음.**

### (8) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

#### (가) 목적

시험물질 대감 복합추출물(RN)의 염색체 이상 유발성 여부를 알아보기 위하여 포유류 배양세포주(Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 염색체이상시험을 실시.

#### (나) 시험방법

- ① 세포주: Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포
- ② 세포증식억제시험 및 본시험
  - 용량 : 가이드라인에서 추천한 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고용량 으로 하고, 이하 2,500, 1,250, 625, 312.5, 78.125, 19.531  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 7 용량을 설정. 또한, 음성대조군을 설정.



- 세포증식억제시험의 결과 : 세포증식억제시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포증식을 억제하는 용량이 관찰되어, RICC(Relative increase in cell counts)을  $55 \pm 5$  % 억제하는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하는  $2,649 \mu\text{g/mL}$ , 연속처리법의 대사활성화비존재하의 경우  $2,613 \mu\text{g/mL}$ 이었음. 단, 단시간처리법의 대사활성화존재하에서는 세포증식 억제가 관찰되지 않았음.
- 본 시험의 용량설정 : 본시험(염색체이상시험)의 용량은 RICC  $55 \pm 5$  % 범위내의 값을 최고용량으로 하여 아래와 같이 설정. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정.

계열	S9 mix	본 시험의 용량 ( $\mu\text{g/mL}$ )
단시간처리법	-	2,500, 1,250, 625
	+	5,000, 2,500, 1,250
연속처리법	-	2,500, 1,250, 625

### ③ 측정 및 관찰항목

- 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량 당 200 개의 분열중기세포가 관찰 가능한 3 용량을 설정. 1개 용량 당 최소 200 개의 분열중기세포를 현미경으로 관찰.
- 구조이상으로서 염색분체절단, 염색분체교환, 염색체절단, 염색체교환, 갭 및 기타로 분류함. 기타로서 1개의 분열중기세포에 다수의 gap 및 절단 등이 있는 경우에는 단편화로 기록. gap에 대해서는 결과 기록 시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가. 또한 수적 이상으로서 배수체 및 핵내배화를 기록. 이러한 이상을 1 개 이상 가지는 세포를 이상세포 1 개로 계수하고 퍼센트 값을 구하여 이를 염색체이상빈도로 함.
- 음성대조군과 비교하였을 때 염색체이상을 가진 세포수가 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하고, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정.

### (다) 시험결과

염색체이상시험 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 처리계열에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5 % 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았음.

**이상의 결과로부터 본 시험조건 하에서 시험물질 대감 복합추출물(RN)은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단됨.**

**나. 간이 인체적용시험**

(1) **시험제목** : 인체의 피부에 대한 안전성을 평가하기 위한 간이 피부 첩포 시험

(2) **시험목적** : 후보물질의 알레르기성 접촉성 피부염의 간단한 진단을 위한 첩포 검사 실시

(3) **시험개요** : 1차 피부자극은 피부에 자극을 주는 물질의 직접 독성 작용에 의하여 발생되는데, 대항, 감송향 복합추출물을 1회 또는 누적 접촉시키고 피부 자극 반응 결과를 확인하여 안전성을 평가할 수 있으며, 이는 인체시험 본 시험을 착수하기 전 참고용 data 로 사용

**(4) 시험 디자인**

① 피험자 구성 : 신체 건강한 성인 남녀 각 10명

② 피험자 제외기준

- 생약제제에 과민반응이 있는 대상자
- 탈모 등을 이유로 발모제 사용자
- 스테로이드 계열의 약물 사용자
- 임신 또는 수유 중이거나 임신 가능성이 있는 대상자
- 기타 : 시험자가 본 연구의 참여에 부적합하다고 판단되는 경우

③ 투여 기간 : 1주 (7일)

④ 시험 방법 : 1일 1회 손목 부위에 시험약을 도포한 후 6시간 이내의 피부자극과 피부 반응을 평가방법에 따라 평가함

**(5) 용량 설정 기준**

① 안전성 평가 시험 요약표

No	시험명	시험동물	투여용량	결과
1	단회 경피투여	SD rat	625, 1250 및 2500 mg/kg	ALD 2500 mg/kg
2	단회 피부자극	토끼	0.5 g/site	피부자극 지수 낮음 P.I.I. 0.04
3	안점막 자극시험	토끼	0.5 g/site	무자극으로 확인 I.A.O.I. - 세안군 : 0 - 미세안군 : 2.7
4	2주 반복 경피투여 및 2주 회복	SD rat	625, 1250 및 2500 mg/kg	고용량 투여군을 2500 mg/kg로 설정
5	4주 반복 경피투여 및 2주 회복	SD rat	700, 1400 및 2500 mg/kg	NOAEL 2500 mg/kg

1) 시험물질에 의한 피부자극지수 (Primary Irritation Index ; P.I.I.)

2) 급성안자극지수 (The Index of Acute Ocular Irritation; I.A.O.I.)

단회 경피투여 독성시험에서 개략치사량 (ALD, Approximate Lethal Dose) 은 2500 mg/kg 으로 확인되었으며, 비설치류 (토끼)를 이용한 피부자극 및 안점막 자극 시험에서 자극이 없는 것으로 확인되었음. 또한 유전독성 시험 (Ames test)에서 유의적인 독성은 나타나지 않은 것으로 판단함.

설치류 (SD rat)를 이용한 4주 반복 경피투여 및 2주 회복시험에서 무독성 용량은 (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) 2500 mg/kg으로 확인되었음.

따라서 시험약물 RN의 최대 권고 초기용량 MRSD (Maximum Recommended Starting Dose) 설정은 4주 반복 경피투여 독성시험으로 확인한 NOAEL 값을 바탕으로 HED (Human Equivalent Dose)를 산출한 후 safety factor를 고려하여 2400 mg/patient 로 확인 하였음.

② HED의 산출

$$2500 \text{ mg/kg in rat (NOAEL)} \times 0.16 \text{ (HED 변환 factor)} = 400 \text{ mg/kg (HED)}$$

③ MRSD의 산출 (피험자 평균 체중 60kg 가정 시)

$$400 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} \div 10 \text{ (safety factor)} = 2,400 \text{ mg/patient}$$

(6) 평가방법 (피부반응 평가 기준)

(가) 홍반과 가피의 형성

반응	정도
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적) 과 가벼운 정도의 가피 형성	4

(나) 부종 형성

반응	정도
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종 (약 1mm 정도 부어올랐을 경우)	3
심한 부종 (1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4

**(다) 피부일차 자극표**

1차 피부자극 지수 <sup>a)</sup>	구분	1차 피부자극 지수	구분
0.0 ~ 0.5	비자극성	2.1 ~ 5.0	중증도 자극성
0.6 ~ 2.0	약한 자극성	5.1 ~ 8.0	강한 자극성

a) P.I.I. (Primary Irritation Index: 일차자극지수, 개체별 평균의 합을 4로 나눈 값)

**(7) 결과**

**(가) 홍반과 가피의 형성**

피험자 남녀 각 10명 중 홍반 또는 가피의 형성이 나타난 사례는 없었음

**(나) 부종 형성**

피험자 남녀 각 10명 중 부종이 형성된 사례는 없었음

**(다) 피부일차 자극 평가 결과** : 1차 피부자극 지수는 0 으로 비자극성으로 판단

**다. CMC 패키지 준비**

**(1) 시제품 생산 및 제품개발 CMC 패키지 구축**

최종 처방 및 제형연구를 통해 대항, 감송향 복합추출물을 이용한 발모제 시작품을 생산하여 추후 GLP 독성시험 기관에 의뢰하여 여러 독성시험과 피부감작성시험을 진행하였음. 또한, 원료와 완제의 품질관리를 위해 지표성분 설정과 분석법 개발 등 품질관리를 위한 기준 및 시험법 업데이트를 진행하고 안정성을 확보하였음.

표. RN 원료 및 완제 성상



(2) 발모제 제품개발 허가제출 자료

양모 기능성 발모제 품목허가를 위하여 식품의약품안전처 고시 제2014-169호인 '의약외품 품목허가·신고·심사·규정'에 따라 안전성·유효성 심사 자료를 준비하였음.

RN151103은 천연물을 조성으로 하는 양모의 기능을 가진 발모제로서, [별표 1-III] 중 새로운 조성의 복합체에 해당하는 제제이므로 아래와 같은 자료를 구비하였음.

표. 생약 복합물 발모제 개발 시 자료제출 범위

구분	제출자료	자료번호 *1												비고
		1	2	3	4*3						5	6	7	
					가	나	다	라	마	바				
신물질 함유제제		○	○	○	○	○	△	○	○	△	○	○	○	
<b>새로운 조성의 복합제</b>		○	○	○	△	△	×	×	△	×	△	○	○	
함량증감 복합제		○	○	○	△	×	×	×	△	×	○	△	○	
단일제		○	○	○	△	×	×	×	△	×	△	○	○	*2
새로운 효능·효과		○	○	×	×	×	×	×	△	×	△	○	○	
새로운 용법·용량		○	○	×	×	×	×	×	×	×	×	○	○	
새로운 제형		○	○	○	×	×	×	×	×	×	×	○	○	

○ : 자료를 제출하여야 하는 것  
 △ : 개개 품목에 따라 판단하여 제출하는 것이 무의미하거나 불가능하여 면제할 수 있는 것  
 × : 자료가 면제되는 것

표. 해당 제출자료 목록

자료번호	경시변화 유·무	제출 여부	
1.	기원 또는 발견 및 개발경위에 관한 자료	√	
2.	기준 및 시험방법에 관한 자료	√	
3.	안정성에 관한 (장기보존시험자료 또는 가속시험자료)	√	
4.	독성에 관한 자료	가. 단회투여독성시험자료	√
		나. 반복투여독성시험자료	√
		다. 생식·발생독성시험자료	-
		라. 유전독성시험자료	-
		마. 면역독성시험자료 (피부감작성시험자료 포함)	√
		바. 발암성시험자료	-
	사. 국소독성시험자료	√	
5.	효능·효과를 입증할 수 있는 자료	√	
6.	외국의 사용현황에 관한 자료	√	
7.	국내 유사제품과의 비교검토 등 그 밖의 특성에 관한 자료	√	


**라. 제품개발 CMC (chemistry manufacturing and controls) 패키지 준비**

발모제 제품개발 CMC 패키지 준비에 맞추어 원료 및 완제의 물리·화학적 (Chemistry) 자료, 제조공정 (Manufacturing)에 관한 자료, 기준 및 규격설정과 안정성 (Controls)에 관한 자료를 준비하였음.

**(1) 원료 및 완제의 제조공정**

완제의 주원료는 20150105-RN으로 대황, 감송향의 복합추출물이며 제조공정은 아래의 표와 같고, 완제는 2. 시작품 처방 및 제형연구에서 언급한 처방과 동일하게 제조하였음.

표. RN 제조공정

외형	공정항목	내용
	칭량	<ul style="list-style-type: none"> <li>· (종)대황 및 감송향 원물 1 : 1 (w:w)</li> <li>· 생약 원물 중량의 10배수의 증류수 (v:v)</li> </ul>
	1차 추출	· 100±5℃ 에서 2시간씩 2회 반복 환류 추출 여과
	2차 추출	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1차 추출 후 원물 잔사의 10배수에 해당하는 증류수 투입 (v:v)</li> <li>· 100±5℃ 에서 2시간씩 2회 반복 환류 추출</li> </ul>
	농축	· 1차, 2차 여액을 모두 합쳐 감압농축
	건조	· 최종 농축물 -40±5℃ 에서 동결건조
	균질화	· 건조물을 분쇄하여 균질화

**(2) 지표성분 선정**

원료와 완제의 품질관리를 위하여 지표성분을 선정하고 분석법을 개발하였음. 지표성분은 선행연구와 문헌을 통해 대황과 감송향의 주성분인 라폰틴과 클로로겐산을 지표성분으로 선정하였고, 공정서를 비롯한 문헌을 참고하여 고성능 액체크로마토그래피 (High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용한 각 성분들의 분석법 개발하였음. 또한 지표성분과 함께 갈릭산 (gallic acid)을 이용한 총 폴리페놀 함량을 ‘건강기능식품의기준및규격’ 중 3-64. 총 폴리페놀 시험법을 적용하여 품질관리를 진행하고자 하였음.

**(3) 분석법 검증**

원료와 완제의 지표성분으로서 라폰틴, 클로로겐산 및 총 폴리페놀 함량을 평가항목으로 선정하였으며, 각 성분들에 대하여 분석법을 개발하거나 시험법을 적용하여 평가를 진행하기 위해 분석법 검증을 실시한 결과 라폰틴, 클로로겐산 및 총 폴리페놀 모두 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성의 결과가 기준에 적합하였으므로, 개발 및 응용할 지표성분들의 분석법이 본 원료와 완제에 적합한 것을 증명하였음.

표. RN의 지표성분 및 분석법

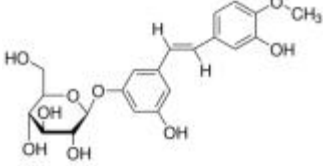
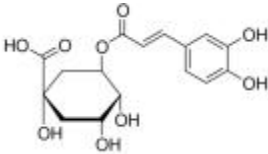
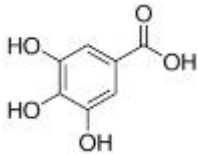
라폰틴 (rhapontin)	클로로겐산 (chlorogenic acid)	갈릭산 (gallic acid)
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAS number: 155-58-8</li> <li>• 분자량: 420.41 g/mol</li> <li>• 분자식: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAS number: 327-97-9</li> <li>• 분자량: 345.31 g/mol</li> <li>• 분자식: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CAS number: 149-91-7</li> <li>• 분자량: 170.12 g/mol</li> <li>• 분자식: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub></li> </ul>
<p>&lt;분석법&gt;</p> <p>○ 시료준비</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준액: 라폰틴 5 mg/mL</li> <li>• 검액:</li> <li>- 원료 10 mg/mL</li> <li>- 완제 5 ~ 10 mg/mL</li> </ul> <p>○ HPLC 조작조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 컬럼: ODS (250 mm x 4.5 mm) 또는 이와 동등한 컬럼</li> <li>- 검출기: UV-vis (340 nm)</li> <li>- 주입량: 10 μL</li> <li>- 유속: 1.0 mL/min</li> <li>- 온도: 30 °C</li> <li>- 이동상:</li> <li>A: 1% acetic acid with DW</li> <li>B: ACN</li> </ul>	<p>&lt;분석법&gt;</p> <p>○ 시료준비</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준액: 클로로겐산 2 mg/mL</li> <li>• 검액:</li> <li>- 원료 2 mg/mL</li> <li>- 완제 1 ~ 5 mg/mL</li> </ul> <p>○ HPLC 조작조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 컬럼: ODS (250 mm X 4.5 mm) 또는 이와 동등한 컬럼</li> <li>- 검출기: UV-vis (330 nm)</li> <li>- 주입량: 10 μL</li> <li>- 유속: 1.0 mL/min</li> <li>- 온도: 30 °C</li> <li>- 이동상:</li> <li>A: 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with DW</li> <li>B: 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with ACN</li> </ul>	<p>&lt;분석법&gt;</p> <p>○ 시료준비</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 표준액: 갈릭산 0.1 mg/mL</li> <li>• 검액:</li> <li>- 원료 2 mg/mL</li> <li>- 완제 0.1 ~ 0.5 mg/mL</li> </ul> <p>○ UV-photometer 조작조건</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 증류수 7 mL + 표준액 or 검액 1 mL + Folin-ciocalteu 0.5 mL + 35% NaCO<sub>3</sub> 1 mL</li> <li>- 시약: Folin-ciocalteu, 35% NaCO<sub>3</sub></li> <li>- 검출기: UV-photometer (760 nm)</li> </ul>

표. RN 지표성분의 분석법 검증 결과 요약

지표성분	분석법 검증 결과
라폰틴	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특이성: 대항에서만 존재하는 특이적인 성분으로, 분석 시 영향을 주는 내인성 물질은 없음.</li> <li>• 직선성: 원료 및 완제의 함량 기준을 포함하는 75 ~ 4500 ug/mL 농도범위에서 R<sup>2</sup> 값이 0.999 이상의 검량선 갖고, 정량한계는 140.313 ug/mL.</li> <li>• 정확성: 원료와 완제의 회수율은 100±5% 이내, %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> <li>• 정밀성: 원료와 완제 모두 %RSD 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> </ul>
클로로겐산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특이성: 감송항에서만 존재하는 특이적인 성분으로, 분석 시 영향을 주는 내인성 물질은 없음.</li> <li>• 직선성: 원료 및 완제의 함량 기준을 포함하는 45 ~ 1300 ug/mL 농도범위에서 R<sup>2</sup> 값이 0.999 이상의 검량선 갖고, 정량한계는 29.224 ug/mL.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 정확성: 원료와 완제의 회수율은 <math>100 \pm 5\%</math> 이내, %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> <li>· 정밀성: 원료와 완제 모두 %RSD 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> </ul>
총 폴리페놀	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 특이성: 반응 후 표준액 및 검액에서 특이적인 760 nm 흡광도 스펙트럼을 확인하였고, 분석 시 영향을 주는 내인성 물질은 없음.</li> <li>· 직선성: 원료 및 완제의 함량 기준을 포함하는 0.66 ~ 21 ug/mL 농도범위에서 <math>R^2</math> 값이 0.99 이상의 검량선 갖고, 정량한계는 0.094 ug/mL.</li> <li>· 정확성: 원료와 완제의 회수율은 <math>100 \pm 5\%</math> 이내, %RSD는 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> <li>· 정밀성: 원료와 완제 모두 %RSD 2.0% 이하로 기준에 적합.</li> </ul>

#### (4) 기준 및 규격 설정

완제와 원료의 기준 및 규격을 설정하고 이에 맞추어 품질관리와 안정성을 평가를 진행.

표. 원료 및 완제의 기준 및 규격

시험항목	기준 및 규격		경시변화 유·무
	원료 (20151015-RN)	완제 (RN151103)	
외형			무
성상 <sup>1)</sup>	황색의 고운 분말	황색내지 갈색의 액체	유
확인 <sup>2)</sup>	라폰틴 밴드 확인 (TLC 시험)	라폰틴 밴드 확인 (TLC 시험)	유
pH	pH 4.5 ~ 6	pH 4.5 ~ 6	유
중금속	중금속(납) 30 mg/kg 이하	-	무
건조감량	8.0% 이하	-	무
회분	30.0% 이하	-	무
잔류농약	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aldrin, Endrin, Dieldrin 0.01 mg/kg 이</li> <li>- 총 DDT 0.1 mg/kg 이하</li> <li>- 총 BHC 0.2 mg/kg 이하</li> </ul>	-	무
미생물한도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세균 <math>1 \times 10^5</math> cfu/g 이하</li> <li>- 진균 <math>1 \times 10^2</math> cfu/g 이하</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세균 <math>1 \times 10^5</math> cfu/g 이하</li> <li>- 진균 <math>1 \times 10^2</math> cfu/g 이하</li> </ul>	유



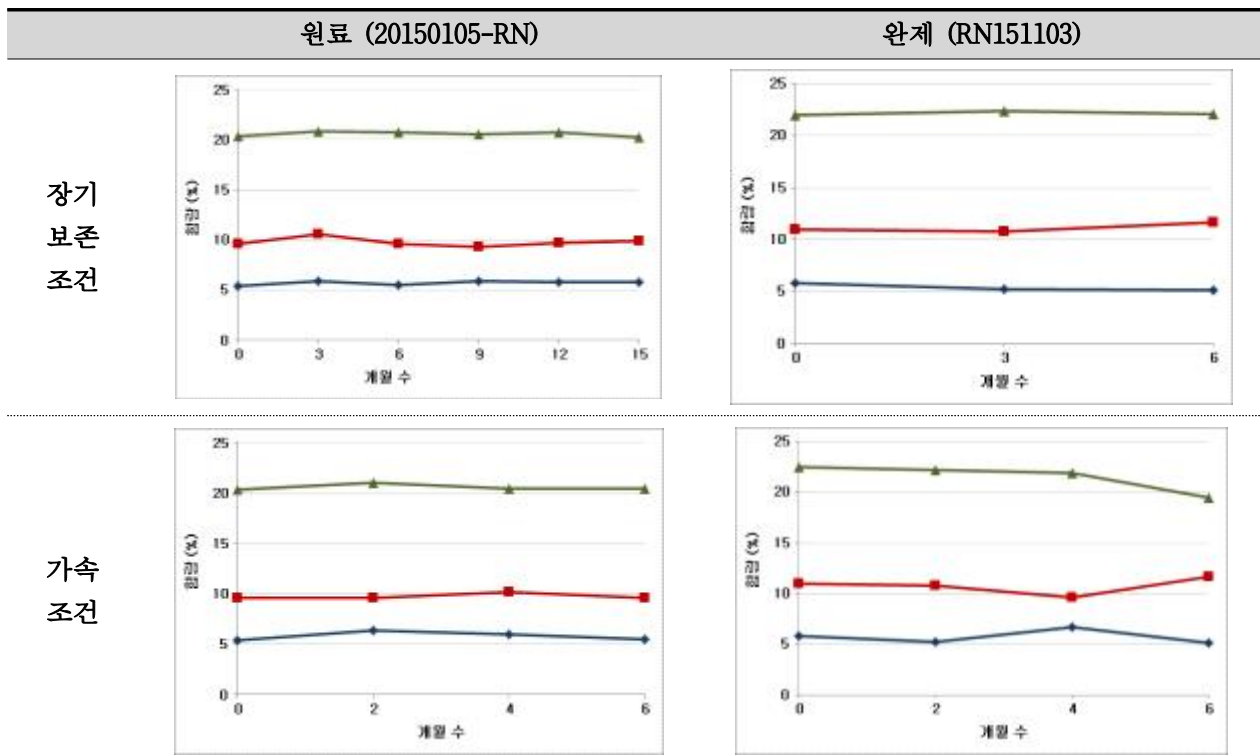


와 완제의 안정성을 확보하였고, 보관조건 및 유통기한 설정을 위한 데이터베이스를 구축하였음.

표. 원료 및 완제의 안정성시험 계획

시험항목	보관 및 안정성 시험 계획	
	원료 (20150105-RN)	완제 (RN151103)
장기보존 조건 (25±5℃, 60±5% RH)	0, 3, 6, 9, 12, 15 개월	0, 3, 6 개월
가속 조건 (40±5℃, 75±5% RH)	0, 2, 4, 6 개월	0, 2, 4, 6 개월

표. 원료 및 완제의 지표성분의 안정성 결과



- ▲: 총 폴리페놀 함량 (기준: 원료 및 완제 18% 이상 함유)
- : 라폰틴 함량 (기준: 원료 및 완제 9% 이상 함유)
- ◆: 클로로겐산 함량 (기준: 원료 및 완제 5% 이상 함유)

### 3-3. 피부투과 촉진 인핸서 개발

#### 가. 피부투과 촉진 컨쥬게이트 인핸서의 제조라인 구축 및 생산

##### (1) 컨쥬게이트 인핸서 제조

양모의 기능성 후보소재 탐색과 더불어 생리활성의 피부투과율을 증진시킬 수 있도록 conjugate enhancer (이하 컨쥬게이션 인핸서)의 제조라인 구축을 진행하였음.

인핸서의 개발은 당사가 보유하고 있는 공개특허[경피흡수 촉진제 및 그의 용도, 출원번호 10-2013-0021503]를 기본 바탕으로 연구되었으며, 최종 인핸서의 기본 구조인 양이온성 COS(chitooligosaccharide)에 유기산(ferulic acid 또는 caffeic acid) 그리고 불포화지방산(oleic acid 또는 linoleic acid 또는 gamma-linoleic acid) 접합체로써 가장 최적의 접합체를 탐색하고 표준화를 진행하여 제조라인을 구축하였음.

그림. 경피흡수 촉진 Conjugate enhancer 기본 구조



##### (가) 키토올리고당(chitooligosaccharide, COS)의 제조

0.4% 수용성 고분자 키토산(Water soluble chitosan-HCl) 수용액에 가성소다(Sodium hydroxide)를 첨가하여 pH를 6 내지 7 범위로 조절한 뒤 키토산 제조액 100 mL를 배양플라스크에 담고 1 M 황화철(Ferrous sulphate) 용액을 0.5 mL 투입하여 적절히 교반한 다음, 추가로 과산화수소(Hydrogen peroxide) 용액을 4 mL 투입하여 최종 반응 용액을 제조하였음. 준비된 배양플라스크를 55°C 진탕기(Shaker)에 넣고 3시간 내지 4시간 진탕 배양하여 키토올리고당 용액을 제조하고, 반응이 완료된 후, 반응 용액의 pH를 중성으로 조절한 다음 에탄올을 적절히 첨가하여 분리 정제를 진행하여 최종 정제된 키토올리고당을 감압농축을 통해 회수하였음.

회수된 키토올리고당은 3당 내지 5당으로서, 실리카 박막 크로마토그래피(Silica thin layer chromatography)로 전개하여 0.1% 닌히드린(Ninhydrin) 염색법으로 확인하였음.

##### (나) 지방산 유도체인 염화 지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)의 제조

###### ① 염화올레인산(Oleic acid chloride) 제조

40°C 수욕상에서 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM) 200 mL에 올레인산(Oleic acid, 18:1 n-9) 40 mL를 넣어 용해하고 적절히 교반하면서 염화티오닐(Thionyl chloride)을 적당량 투입하여 반응을 개시

하였음. 일정 시간 경과 후 반응 산물을 감압 농축하여 염화올레인산(oleoyl chloride)을 회수하고 지방산 유도체 제조에 사용하였음.

**② 염화감마리놀렌산(Gamma-linolenic acid chloride) 제조**

40°C 수욕상에서 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM) 200 mL에 감마-리놀렌산(Gamma-linolenic acid, 18:3 n-6) 20 mL을 넣어 용해하고 적절히 교반하면서 염화티오닐(Thionyl chloride)을 적당량 투입하여 반응을 개시하였음. 일정 시간 경과 후 반응 산물을 감압 농축하여 염화감마리놀렌산(Gamma-linolenic acid chloride)을 회수하고 지방산 유도체 제조에 사용하였음.

**③ 염화리놀렌산(Linoleyl chloride) 제조**

40°C 수욕상에서 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM) 200 mL에 리놀렌산(Linoleic acid, 18:2 n-6) 20 mL을 넣어 용해하고 적절히 교반하면서 염화티오닐(Thionyl chloride)을 적당량 투입하여 반응을 개시하였음. 일정 시간 경과 후 반응 산물을 감압 농축하여 염화리놀렌산(linoleyl chloride)을 회수하고 지방산 유도체 제조에 사용하였음.

**(다) 컨쥬게이트 인핸서 (Conjugate enhancer) 제조**

키토올리고당(COS), 페놀산 및 지방산을 접합하기 위해서는 먼저 페놀산과 지방산의 접합이 이루어지고 추가적으로 키토올리고당(COS)을 접합하기 위하여 페놀산의 카르복실기(acyl chloride reation)의 활성화를 진행하였음.

**① 페놀산(phenolic acid)-지방산의 컨쥬게이트 제조**

Conjugate enhancer 제조에 사용될 페놀산류로는 페룰산(ferulic acid), 카페인산(caffeic acid), 바닐릭산(vanilic acid), 하이드록시벤조산(4-hydroxybenzoic acid)과 쿠마릭산(p-coumarin acid) 등을 검토하였으며, 지방산으로는 ‘나’ 에서 제조한 염화 지방산들을 검토하였음.

표. 페놀산-지방산 표준 결합반응 조성

조성	첨가량
디클로로메탄 (DCM)	1 L
페놀산(Phenolic acid)	1.5g in 965 mL
트리에틸아민 (TEA)	15 mL (final pH 8)
활성화된 지방산 <sup>1)</sup>	120 mL(지방산 원액기준 6 mL)
Total	2 L

<sup>1)</sup> 지방산 유도체인 염화 지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)

페놀산-지방산의 접합체를 분리하기 위하여 7 L의 반응조에 하기의 표와 같은 구성으로 반응용액을 준비하고 200~220 rpm으로 교반하며 결합반응을 진행하였고, 반응완료 후 50°C 수욕상에서 감압 농축하였음. 얻어진 잔류물을 100 mL의 에탄올에 용해시킨 후 소수성 레진(hydrophobic interaction chromatographic media, HIC)이 채워진 오픈 컬럼(open column)을

통해 페놀산-지방산 conjugate를 분리하였음.

표. 페놀산-지방산 컨쥬게이트의 구성

페놀산류	지방산	지방산 종류
페롤산		
카페인산 바닐린산 p-히드록시벤조산 쿠마린산	올레인산	18:1(n-9)
페롤산 바닐린산 쿠마린산	리놀레인산	18:2(n-6)
페롤산 바닐린산 쿠마린산	감마-리놀렌산	18:3(n-6)
페롤산	카프릴산	8:0
페롤산	라우르산	12:0

② 페놀산(phenolic acid)-지방산 컨쥬게이트에 활성화

페놀산-지방산 컨쥬게이트에 키토올리고당(COS)을 추가적으로 접합시키기 위해 페놀산의 카르복실기(acyl chloride reation) 활성화 과정을 진행하였음.

디클로로메탄(Dichloromethane, DCM) 100 mL에 페놀산-지방산 컨쥬게이트 20 mL을 첨가하고, 적당량의 트리에틸아민(Triethylamine, TEA)과 염화티오닐(Thionyl chloride)을 넣어 교반하면서 반응을 진행하였음. 반응 완료 후 감압 농축으로 용매를 제거하고, 이후 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM) 150 mL에 활성화된 페놀산-지방산 컨쥬게이트를 녹여 다음 실험에 사용하였음.

표. 페놀산-지방산 표준 활성화 반응

구성	용량	부피	비고
디클로로메탄 (DCM)		100 mL	-
페놀산-지방산 conjugate		20 mL	1.5 mM
트리에틸아민 (TEA)		0.32 mL	2.25 mM
염화티오닐 (SOCl <sub>2</sub> )		0.12 mL	1.5 mM

③ 키토올리고당(COS)-페놀산-지방산 컨쥬게이트 인헨서 제조

최종의 컨쥬게이트 인헨서 (키토올리고당(COS)-페놀산-지방산) 제조를 위해 2 L 반응조에 하기와 같은 구성으로 각각 순차적으로 첨가한 후 약 8시간동안 적절히 교반하면서 결합반응을 진행하고, 반응완료 후 물 증만을 회수하여 감압농축을 통해 용매를 완전히 날렸음. 이후 에탄올 100 mL에 재용해 시켜 소수성 레진(hydrophobic interaction chromatographic media, HIC)이 채워진 오픈 컬럼(open column)을 통해 컨쥬게이트 인헨서를 분리하였음.

표. 세부적인 컨쥬게이트 인헨서의 구성 및 제조

키토올리고당	유기산	지방산
COS (chitooligosaccharide)	Ferulic acid	
	Caffeic acid	
	Vanilic acid	Oleic acid
	4-hydroxybenzoic acid	
	p-coumarin acid	
	Ferulic acid	
	Vanilic acid	Linoleic acid
	p-coumarin acid	
	Ferulic acid	
	Vanilic acid	$\gamma$ -linolenic acid
	p-coumarin acid	
	Ferulic acid	카프릴산 (caprylic acid)
Ferulic acid	라우르산 (lauric acid)	

나. 컨쥬게이트 인헨서 분석법 개발

(1) 키토올리고당(COS)의 정량 분석

키토올리고당(이하 COS)의 피부투과율 및 표준화를 위하여 정량적 분석법 개발을 진행하였음. COS를 정량분석하기 위하여 분광학적 검출법을 사용할 수 있도록 COS와 phenol을 결합시키는 만니히 응축 반응(Mannich condensation reaction)을 통해 발색단을 부여하였음.

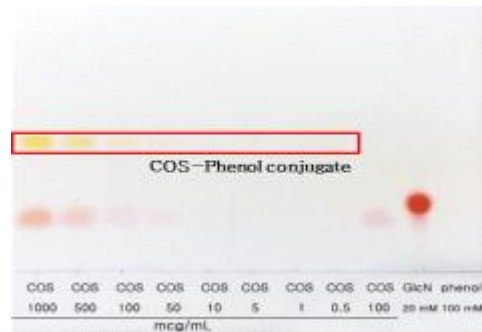
최적의 반응조건을 탐색하여 아래와 같은 반응물의 구성을 설정하였으며, 반응물을 60°C 수욕상에서 1시간 동안 응축반응을 진행하고, 반응이 완료된 시료는 프로판올/아세트산/물 (3:1:1)의 혼합용매를 전개용매로 하여 얇은판박층크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)를 전개하였으며, 이 후 닌하이드린(0.1% in EtOH)을 분무하고 가열하여 생성된 COS-phenol conjugate의 노란 spot을 확인하였음. 그 결과 용량 의존적으로 conjugate spot이 줄어들어 가는 것을 확인하였음.

표/그림. A : COS-phenol conjugate condition, B : COS-phenol conjugate TLC

A.

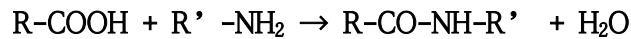
반응물	최종 투입 농도
COS	variable
페놀	100 mM
DW	variable
포름알데히드	500 mM
최종 반응 부피	1 mL

B.



## (2) 포화 및 불포화 지방산의 정량 분석

지방산의 피부투과율 및 표준화를 위하여 정량적 분석법 개발을 진행하였음. 정량분석을 위하여 분광학적 검출법을 사용할 수 있도록 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodi-imide) 촉매를 사용해 지방산의 카복실 그룹과 아닐린의 아미노 그룹 사이의 공유결합을 형성반응을 통해 발색단을 부여하였음.



\* EDC catalyst & MES buffer 존재 하 반응

지방산에 아닐린을 결합시키는 최적의 반응조건 탐색하기 위해 하기와 같은 구성으로 실험을 디자인하였으며, 각 반응물들은 실온에서 1시간 동안 방치하여 반응을 진행하였음. 반응 완료 후 헥산/디에틸에테르/아세트산(8:2:1)의 혼합용매를 전개용매로 하여 TLC를 전개하였으며, 건조 후 닌하이드린(0.1% in EtOH)을 분무해 가열시 분홍색의 아닐린 잔량을 확인하고, 10% 황산용액을 재분무하여 가열처리 시 생성된 fatty acid-aniline conjugate를 확인하였음.

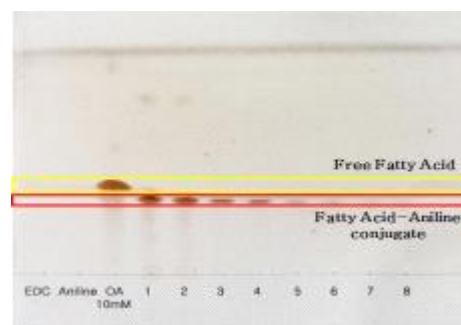
그 결과 용량 의존적으로 conjugate spot이 줄어드는 것을 확인하였음.

표/그림. A: fatty acid-aniline conjugate condition, B: fatty acid-aniline conjugate TLC

A.

반응물	최종 투입 농도
지방산	variable
MES buffer	20 mM (pH 4.5)
Aniline	50 mM
EDCI	50 mM
최종 반응 부피	all in 1 mL of 80% EtOH

B.



### (3) 컨쥬게이트 인헨서 물성연구

키토올리고당(COS), 페놀류 및 지방산의 컨쥬게이트 인헨서(COS-phenol-fatty acid, 이하CPL)를 개발하여 정성 및 정량 분석법을 확립하였으며, 개발한 인헨서의 피부투과율 비교실험을 통해 물성을 평가하였음.

#### (가) 키토올리고당(COS)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인헨서

키토올리고당(COS)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인헨서 (이하 CP 인헨서)에 대하여 물성평가를 진행하였음. 피부투과율 비교를 위해 인공 피부 막(Strat-M membrane, Millipore, USA)이 장착된 프란츠 확산 셀(Franz diffusion cell)을 사용하여 알부틴과 비타민C의 피부투과율을 비교 평가 하였음. CP 인헨서를 넣지 않은 시험군을 대조군으로,  $\gamma$ -linoelic acid를 지방산으로 컨쥬게이션 시킨 인헨서를 비교군으로 하여 알부틴과 비타민C의 투과 flux를 측정된 결과 각각 3배와 7배에 달하는 높은 투과 flux 값을 나타내었음.

표. CPL 인헨서의 알부틴 및 Vitamin C 투과 비교시험

유도체 종류	시험 항목	시험 군	투과율 (%)	투과 flux (mcg/sq.cm/hr)
COS-fatty acid	알부틴	대조군	8.1	5.7
		$\gamma$ -linoleicacid (fatty acid)	18.7	15.8
	Vitamin C	대조군	5.5	4.7
		$\gamma$ -linoleicacid (fatty acid)	34.8	29.5

#### (나) 키토올리고당(COS)-페놀류(OA)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인헨서

키토올리고당(COS)-페놀류(OA)-지방산(PUFA)의 컨쥬게이트 인헨서 (이하 COP 인헨서)에 대하여 물성평가를 위해 인공 피부 막(Strat-M membrane, Millipore, USA)이 프란츠 확산 셀(Franz diffusion cell)을 사용하여 COP 인헨서를 넣지 않은 군을 대조군으로, 키토올리고당(COS), ferulic acid(OA) 및  $\gamma$ -linoleic acid(PUFA)를 컨쥬게이션 시킨 COP 인헨서를 처리한 군을 시험군으로 하여 레스베라톨, 비타민C, 알부틴 및 코직산 등 총 4가지의 약물의 투과 flux를 측정된 결과 레스베라톨, 비타민C 그리고 알부틴의 투과 flux는 대조군에 비해 적게는 3배에서 많게는 9배 정도 높은 투과를 보였으며, 코직산의 경우 대조군에 비하여 약 20배에 달하는 높은 투과를 보였음.

표. CPL 인헨서의 알부틴 및 Vitamin C 투과 비교시험

유도체 종류	시험 항목	시험 군	투과율 (%)	투과 flux (mcg/sq.cm/hr)
COS-ferulic acid-fattyacid	레스베라톨	대조군	2.5	1.8
		linoleic acid (fatty acid)	13.1	9.5
	Vitamin C	대조군	4.7	3.0



	linoleic acid (fatty acid)	17.7	15.0
	$\gamma$ -linoleic acid (fatty acid)	27.8	17.7
알부틴	대조군		5.7
	linoleic acid (fatty acid)		25.5
코직산	대조군		0.4
	linoleic acid (fatty acid)		8.0

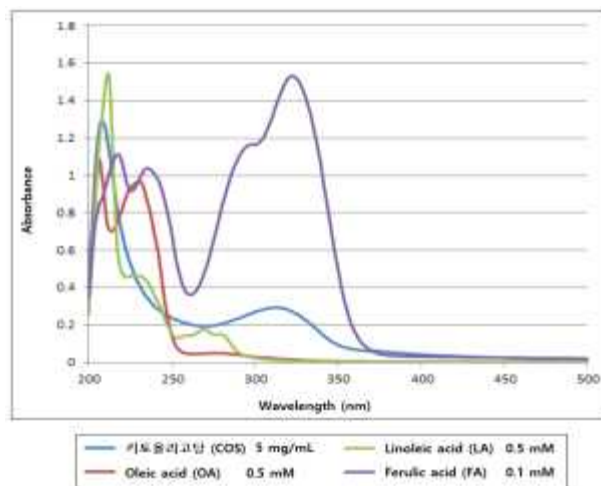
#### (다) 최종 컨쥬게이션 인헨서의 광(光) 흡수평가

본 과제 of 개발 양모 발모제는 피부에 직접 도포하는 것을 특징으로 피부투과율 촉진을 위해 지방산 유도체 인헨서를 개발하였으며, 높은 피부투과율과 더불어 유해 자외선 노출로 인한 피부건강의 지속적인 유지와 광(光)원에 의한 피부노화를 예방하는 효능을 확인하고자 인헨서의 자외선 및 가시광선 영역에서 광(光) 흡수특성을 평가하였음.

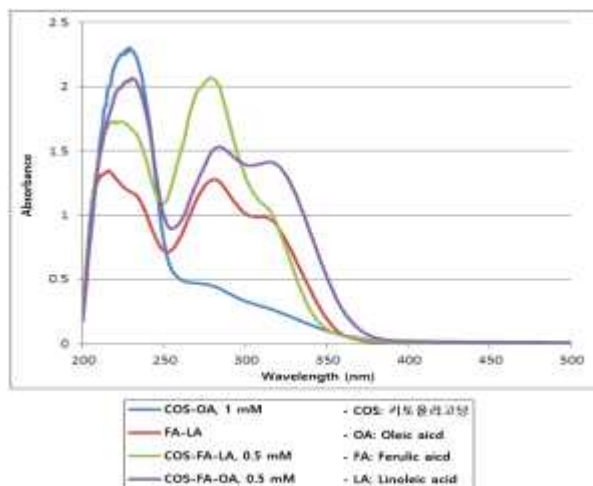
피부의 광(光)노화 유해 영역이라 알려진 UVB(280~315 nm)에서 키토올리고당(COS)-페룰산-지방산 컨쥬게이션 인헨서는 광 흡수성을 가지므로, 피부에 자외선이 직접적으로 닿는 것을 보호하여 유해광선으로부터의 피부 보호효과를 기대할 수 있을 것으로 사료하였음.

그림. 인헨서의 각 구성 성분 (A) 및 컨쥬게이션된 인헨서 (B)의 UV spectrum

A.



B.



#### 다. 컨쥬게이션 인헨서 구성 성분들의 항균력 평가

지방 유도체 인헨서의 항균력은 피부에 직접 도포되는 발모제의 특성상 양모기능 이외에 부수적인 항균효과로 두피건강 유지와 양모촉진의 효과를 동시에 기대할 수 있는 인헨서의 개발을 위하여 컨쥬게이션 인헨서를 구성하는 성분들의 항균력을 주요 피부상재 균인 *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus* 및 *Staphylococcus epidermis* 균들을 대상으로 항균활성을 평가하였음.

표. 3 종의 주요 피부상재 균의 성상 및 정보

<i>Propionibacterium acne</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
		
- 여드름 유발균	- 황색포도상구균 - 식중독 유발	- 표피포도상구균 - 패혈증, 요로감염 유발

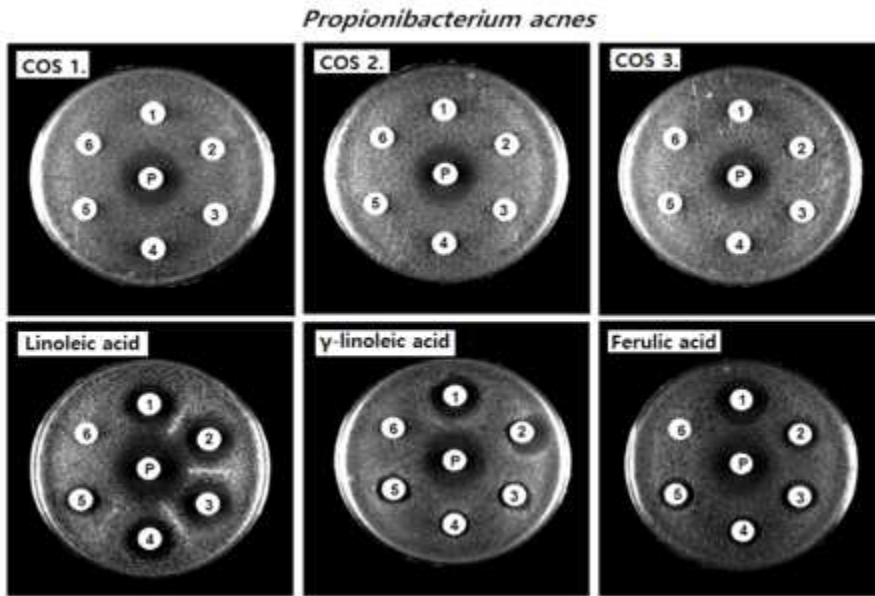
표. 항균 활성 평가 샘플 및 농도

항목	샘플	시험 농도
음성대조군	에탄올	-
양성대조군	Clindamycin (항원충제)	1.2 $\mu$ g/mL
Conjugate enhancer	키토올리고당 (COS)	HPLC 분석 시 분리되는 peak 3종
	유기산	ferulic acid
	지방산	linoleic acid, $\gamma$ -linoleic acid

(1) *Propionibacterium acne* 에 대한 항균효과

*P. acne* 균을 GAM (Gifu anaerobic medium) 고체배지에 접종하고 anaerobic 상태로 37°C 에서 48시간 배양한 후 균의 증식 억제능 측정을 위해 시료를 40  $\mu$ L씩 투여하여 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 표준방법에 따라 디스크 확산 법(Disc diffusion method)으로 항균력을 평가한 결과, 3가지의 COS는 항균 효과를 나타내지 않았고, 유기산과 지방산에서는 각각 최저농도까지 항균 활성이 나타났음.

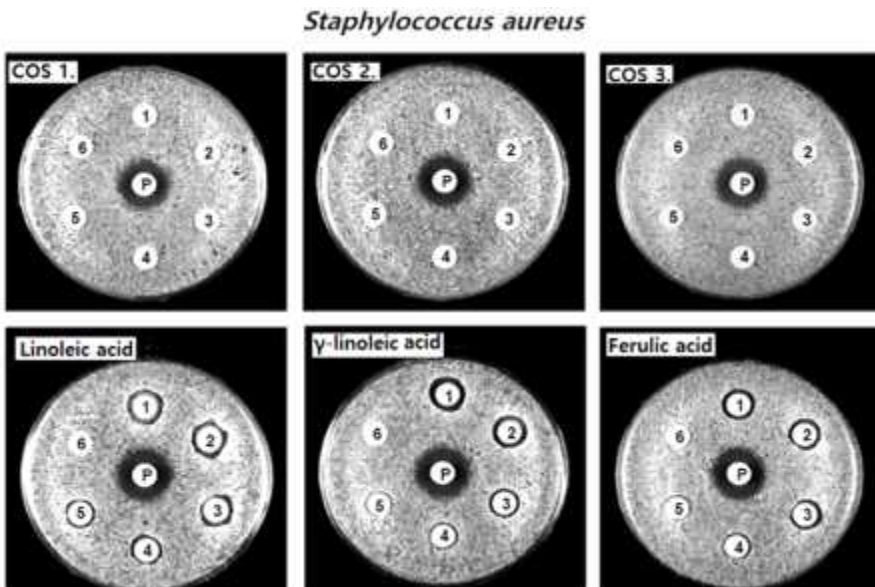
그림. P: Clindamycin, 1: 원액, 2: 1/2 희석액, 3: 1/4 희석액, 4: 1/8 희석액, 5: 1/16 희석액, 6: 에탄올



(2) *Staphylococcus aureus* 에 대한 항균효과

*S. aureus* 균을 Muller-Hinton 고체배지에 접종하고 anaerobic 상태로 37°C 에서 18~24시간 배양한 후 균의 증식 억제능 측정을 위해 시료를 40 uL씩 투여하여 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 표준방법에 따라 디스크 확산 법 (Disc diffusion method)으로 항균력을 평가한 결과, 3가지의 COS는 항균 효과를 나타내지 않았고, 유기산과 지방산 모두 낮은 농도에서도 항균 활성을 보였음.

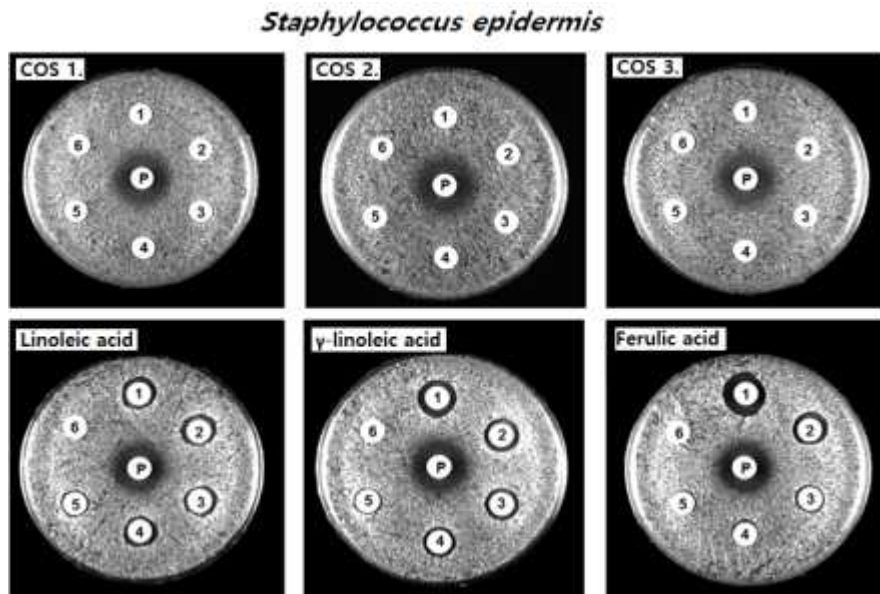
그림. P: Clindamycin, 1: 원액, 2: 1/2 희석액, 3: 1/4 희석액, 4: 1/8 희석액, 5: 1/16 희석액, 6: 에탄올



### (3) *Staphylococcus epidermis* 에 대한 항균효과

*S. epidermis* 균을 Muller-Hinton 고체배지에 접종하고 anaerobic 상태로 37°C 에서 18~24시간 배양한 후 균의 증식 억제능 측정을 위해 시료를 40 uL씩 투여하여 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 표준방법에 따라 디스크 확산 법 (Disc diffusion method)으로 항균력을 평가한 결과, 3가지의 COS는 항균 효과를 나타내지 않았고, 유기산은 10 mg/mL 농도까지, 지방산 최저농도까지 항균 활성을 보였음.

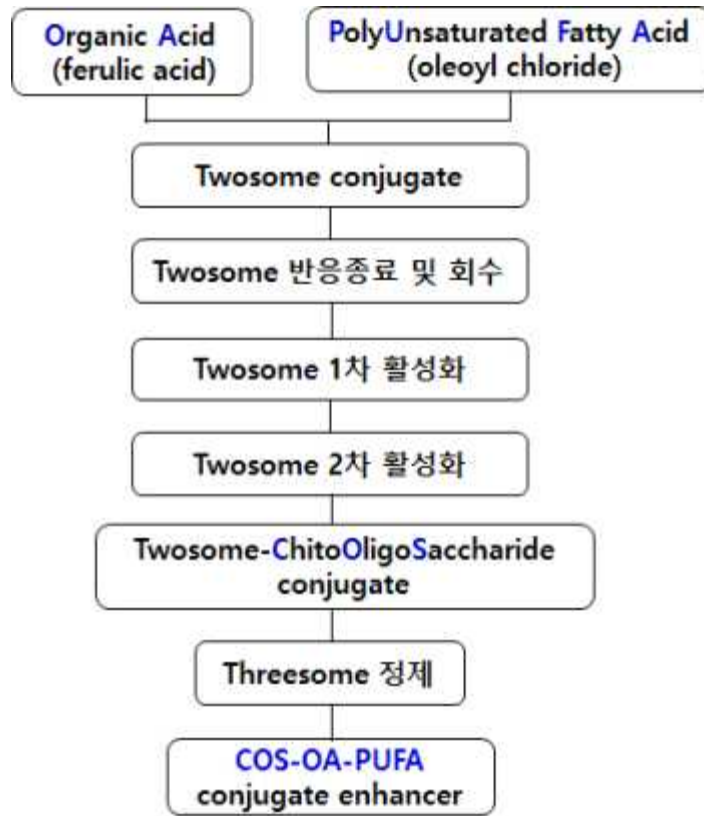
그림. P: Clindamycin, 1: 원액, 2: 1/2 희석액, 3: 1/4 희석액, 4: 1/8 희석액, 5: 1/16 희석액, 6: 에탄올



### 라. 키투게이트 인헨서 (Hydrolyzed chitosan ferulyl linoleate)의 제조공정 구축

키투게이션 인헨서의 제조공정은 아래의 모식도와 같으며, 제조 시 사용되는 유기산과 지방산은 각각 항산화 효과가 우수한 ferulic acid와 linoleic acid를 접합시킨 twosome에 키투올리고당(COS)을 접합시켜 threesome을 제조하는 방법으로 키투게이션 인헨서의 제조공정을 구축하였고, 각 단계별 HPLC-RP분석을 진행하여 접합이 바르게 이루어졌는지 확인하였음.

그림. COS-OA-PUFA 컨쥬게이션 인핸서 제조과정



(1) 페룰류-지방산의 Twosome 제조

페룰류 (organic acid)인 ferulic acid 0.1 g을 THF (tetrahydrofuran) 50 mL에 용해시켜 DCM (dichloromethane) 200 mL을 혼합하여 최종 부피가 250 mL이 되도록 하였고, 여기에 oleoyl chloride 2.2 mL과 TEA (trimethylamine) 0.74 mL을 각각 투입 후 상온에서 O/N (over night) 반응을 진행하여 페룰류와 지방산의 twosome을 컨쥬게이션 시켰음.

O/N 반응이 완료된 twosome은 감압건조법으로 DCM을 완전히 날리고 건조물을 회수한 뒤, 여기에 증류수를 넣어 용해시켜 DCM으로 분획처리를 하였음. 최종적으로 DCM 분획층을 모두 모아 감압건조를 진행하고 건조물을 회수하여 twosome의 반응산물로 하였음.

그림. OA-PUFA의 컨쥬게이션 전, ferulic acid peak

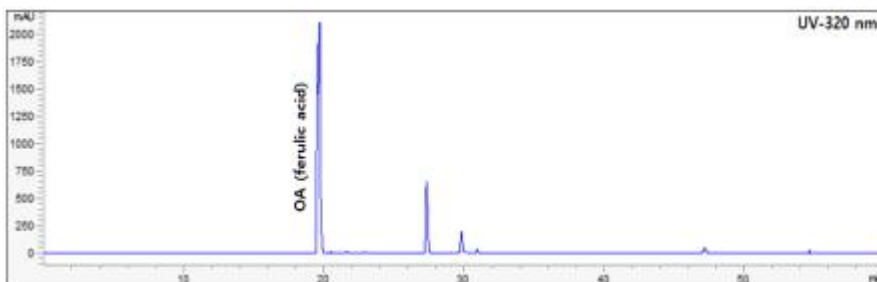
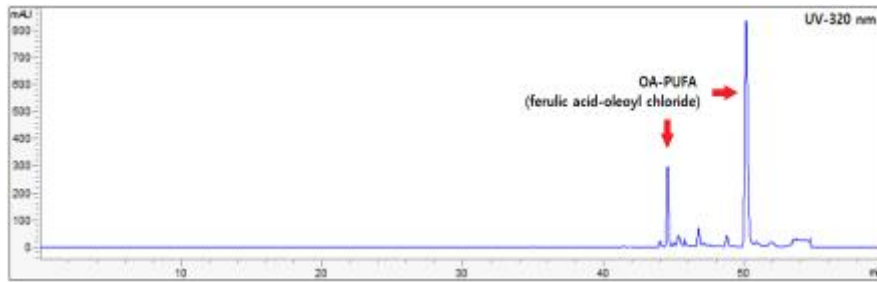


그림. OA-PUFA의 컨쥬게이션 후, twosome peaks



### (2) 키토올리고당-페룰류-지방산의 Threesome 제조

twosome에 키토올리고당 (COS)를 컨쥬게이션 시키기 위해 앞서 twosome의 1차 활성화를 위해 상기 twosome의 반응산물을 DCM 200 mL에 용해시키고, 첨가한 지방산 (oleoyl chloride)의 2배에 해당하는 몰농도의 thionyl chloride ( $\text{SOCl}_2$ )를 투입하여 상온에서 교반과 함께 O/N 반응을 진행하였음. twosome의 1차 활성화 반응완료 후 감압건조를 통해 DCM/ $\text{SOCl}_2$ 를 제거하고 건조물을 회수하여 toluene에 재용해하여 twosome의 1차 활성화 반응산물로 하였음.

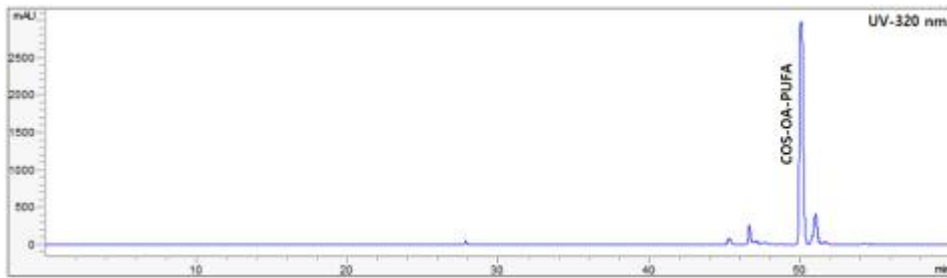
Twosome의 2차 활성화는 twosome의 imidazolides를 유도하는 것으로 imidazole 0.286 g을 toluene 100 mL에 투입하고 80°C까지 가열하며 용해시킨 후 1차 활성화된 twosome의 반응산물과 상온에서 교반과 함께 O/N 반응을 진행하였음. 반응이 완료 되면 백색침전물의 imidazole-HCl이 석출되며, 이를 원심분리 또는 필터를 이용해 제거하고 여액을 모두 모아 감압건조를 이용해 toluene을 제거하였음. 건조 후 회수한 twosome imidazolides를 DMSO 80 mL에 재용해하여 twosome의 2차 활성화 반응산물로 하였음.

2차 활성화가 완료된 twosome imidazolides에 키토올리고당 (COS)를 컨쥬게이션 시키기 위해 50 mg/mL로 조제한 COS의 1 mL을 DMSO에 용해시킨 후 50 mg/mL로 조제한 methanolic  $\text{KOCH}_3$ 를 촉매로서 3~4 방울 투입하고 90°C까지 가열과 함께 교반하면서 twosome imidazolides와 COS를 conjugation 시킴. 3~4시간동안 반응을 진행하고, 반응완료 후에는 증류수 300 mL을 넣어 반응을 종료시키고 이를 threesome으로 하였음.

### (3) 키토올리고당-페룰류-지방산의 Threesome 정제

최종 컨쥬게이션 인헨서 제조를 위해 상기의 threesome을 정제하는 과정을 진행하였으며, 증류수로 충분히 희석한 threesome을 SDR (Solvent-Detergent Removal) Chromatography resin을 충전한 glass open column에 증류수와 에탄올을 이용해 통과시키고, 60% 이상의 에탄올에서 용출되는 분획을 취해 이를 최종 COS-OA-PUFA 컨쥬게이션 인헨서라 명명하였음.

그림. SDR chromatography를 통과한 최종 컨쥬게이션 인헨서 peak




#### 마. 인헨서 소재(기술)의 국제 화장품 원료집 (INCI) 에의 등재

2014년 10월, 피부투과 증진 소재는 인헨서 소재로 활용가능성이 높은 1가지를 설정하여 PCPC(personal care products council)에 원료 등재를 신청하였으며, INCI Name: Hydrolyzed Chitosan Ferulyl Linoleate, Trade Name: NE-201으로 아래와 같이 등재되었음.

현재 국제 화장품 성분사전(the International Cosmetic Ingredient Dictionary and Hand book), 웹기반 사전 wINCI(web-based Dictionary wINCI), 인포베이스(the Council's On-Line INFOBASE) 등에 등재되어 Trade Name 등으로 검색이 용이함.

Page 2

Personal Care  Products Council  
Committed to Safety, Quality & Innovation

October 6, 2014

**Application No. 4-03-2014-1920**

**Submitted By:**  
Mr. Steve Kim  
United States

**Manufactured By:**  
Naturalendo Tech Co.Ltd  
2nd Floor Bldg.A, C'S Tower, 58 Pangyo-ro 255beon-gil  
bundang-gu  
Seongnam, 463-400  
KOREA (SOUTH)

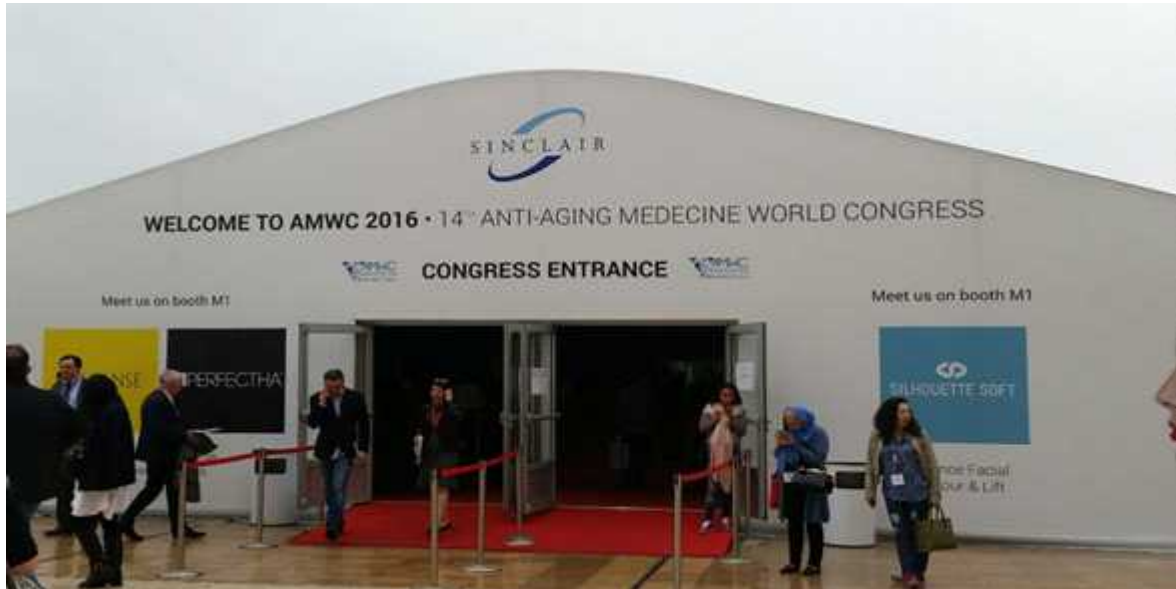
**Trade Name:**  
NE-210

**Assigned INCI Name:**  
Hydrolyzed Chitosan Ferulyl Linoleate

### 3.4 홍보 전시 (성과)

#### (1) 2016 세계미용안티에이징학회 AMWC (Aesthetic & Antiaging and Medicine World Congress)

- ① 장소: Grimaldi Forum 10, Av. Princesse Grance, Monte-Carlo, 98001, Monaco
- ② 일시: 2016 3월30~ 4월2일



#### (2) 2016 중국 상해국제미용박람회 (China Beauty Expo)

- ① 장소: Shanghai New International Expo Centre (SNIIEC), 2345 Long Yang Road, Pudong Area, Shanghai, 201204, China
- ② 일시: 2016 5월18~ 5월20일





**(3) 2016 북미코스모프로프 미용전시회 (Cosmoprof North America)**

① 장소: Mandalay Bay Convention Center, 3950 S Las Vegas Blvd, Las Vegas, NV 89119, United States

② 일시: 2016 7월24~ 7월26일



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	30 억원
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	- 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : - %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : - % 국외 : - %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		3 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	2,000 - 인체적용시험 (국내): 500백만원 - 인체적용시험 (해외): 1,000백만원 - 인허가 등: 500백만원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		-	30	110	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	-	5	30
국외		-	-	0.1	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	① 양모 소재의 다양한 제형으로의 적용 ② 피부 통과 인해서 적용을 위한 최적 소재 추 가 발굴			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년 후	5년 후	
	수입대체(내수)	-	15	50	
	수 출	-	-	10	

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
개발소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질특성 연구 등)	30	100	생약원료 선정 후 효능평가를 통하여 최종 후보 물질 도출 및 시작품의 제품화 연구와 활용기술개발
시제품 양모효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보 (허가 제출 자료)	25	100	제품개발 CMC 자료준비를 통하여 CMC 패키지준비 및 원료와 완제의 안정성시험 완료.
비임상 효력시험 및 독성시험 완료	25	100	경피 흡수 후보제형의 비임상 효력시험 및 8종의 독성시험 완료.
피부투과 촉진 인핸서 제조라인 (Pilot) 구축 및 생산	10	100	피부투과 촉진 conjugate enhancer 물성연구와 제조공정 구축 및 생약 복합물제제의 경피 흡수 제형연구 진행 완료
개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표 (과학적 근거자료 마련)	10	80	발굴소재 특허출원(7건)/등록(1건) 및 학술지 투고(2건)
합계	100점		

##### 4-2. 관련분야 기여도

###### (1) 기술적 측면

- 경피 흡수율이 증진된 탈모예방 천연 생약 추출물 제조기술 확보
- 탈모억제 기전에 근거한 생약유레소재 제품화 및 핵심기술력 확보
- 피부투과효율 증진기술 - 화장품, 의약품 등 타 산업분야로 응용확대
- 임상시험을 위한 신뢰성 있는 독성학적 기초자료를 확보함으로써, 의약외품 IND 에 필요한 근거자료를 제공

###### (2) 경제적 · 산업적 측면

- 경제적 고부가가치 창출 및 외화 수익 모델
- 국내산 고품질 식품생약조달 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 농민 소득증대 기여

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<input type="checkbox"/> 무독성(저독성) 탈모예방 기능성 생약소재 추출물의 제조 및 효능평가 노하우 확보로 신제품 개발, 양산화 및 약효, 독성 데이터 확보 <input type="checkbox"/> 탈모예방 기능성 원료사업화 <input type="checkbox"/> 고부가가치 기능성 핵심소재/ 완제품의 국내외 매출확대 <input type="checkbox"/> 경피 흡수 인핸서 기술개발/ 제품화 기술적용 <input type="checkbox"/> 피부투과 효율 증진, 양모제품의 경쟁력 향상  <input type="checkbox"/> 사업화 계획 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대황, 감송향 추출물을 도포한 동물 군에서 발모 효능이 확인(미녹시딜 비교)되었으며, 비임상 독성시험에서 안전성 관련 자료가 확보된 상태임.</li> <li>- 추후 자발적으로 탈모가 유도된 동물 모델을 섭외하여 발모의 효능을 추가적으로 확인할 계획에 있음.</li> <li>- 과제 종료 후, 허가용 인체적용시험을 실시하여 식약처 허가 신청 (의약품 또는 화장품)에 필요한 유효성, 제조, 품질관리 서류 등을 준비하여 2018년 식약처 허가 획득을 목표로 하고 있음.</li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 : 해당사항 없음

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
일반과제		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 의하여 연구실 안전관리규정을 제정하여 연구실의 안전에 관한 기준을 확립하고 안전사고방지 및 최소화에 최선을 다하였음.</p>		
<p><b>가. 기술적 위험요소 분석</b></p> <p>(1) 연구실 안전점검 실시</p> <p>    (가) 일상점검</p> <p>        ① 점검자 : 해당 연구실의 안전관리담당자</p> <p>        ② 점검시기 : 업무일마다 연구활동 시작 전 실시</p> <p>        ③ 연구실 이상 유무 확인 점검 및 미비사항 기록 보관</p> <p>    (나) 정기점검과 정밀안전진단</p> <p>        ① 정기점검 : 1년 1회 이상 실시</p> <p>        ② 정밀안전진단 : 2년 1회 이상 실시</p> <p>        ③ 2016년 5월 10일 정밀안전진단 실시(외부전문기관 안전환경원 대행)</p> <p>(2) 사전유해인자 위험분석</p> <p>    (가) 담당자 : 연구실책임자</p> <p>    (나) 국가연구안전정보시스템의 사전유해인자위험분석 보고서 작성 tool 사용</p> <p>(3) 작업환경측정 : 작업장 내 유해인자 노출도 확인</p>		
<p><b>나. 안전관리대책</b></p> <p>(1) 연구실 안전관리규정 및 조직체계 구성</p> <p>    (가) 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 의한 안전관리규정 작성 및 게시</p> <p>    (나) 연구실 안전관리위원회 구성</p> <p>        ① 연구실 안전점검 및 정밀안전진단의 실시계획 수립 및 실시</p> <p>        ② 연구실 사고 발생의 원인조사 및 안전관리 현황 관리 등</p> <p>(2) 연구 활동 종사자의 안전 교육</p> <p>    (가) 정기교육</p> <p>        ① 교육대상 : 연구활동 종사자</p> <p>        ② 교육시간 : 반기별 6시간 이상 실시</p> <p>        ③ 교육방식 : 집체 또는 온라인 교육</p> <p>    (나) 신규교육</p> <p>        ① 교육대상 : 신규 채용된 연구활동 종사자</p> <p>        ② 교육시간 : 반기별 8시간 이상</p> <p>        ③ 교육방식 : 집체 교육</p> <p>    (다) 안전교육일지(규정 내 별지3호)를 작성하여 전자문서와 출력물 형태로 관리</p>		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허출원, 등 록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	경피 흡수 촉진제 및 그의 용도	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2014.02.27	-	출원
2	특허	Trasdermal Absorbtion Accelerator and Uses Thereof	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	PCT	-	2014.02.27	-	출원
3	특허	모발성장 촉진용 조성물 (대황, 감송향)	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2015.02.27	-	출원
4	특허	모발성장 촉진용 조성물 (곽향)	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2015.04.15	-	출원
5	특허	모발성장 촉진용 조성물 (상백피)	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2015.06.17	-	출원
6	특허	모발성장 촉진용 조성물 (두충)	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2015.06.26	-	출원
7	특허	모발성장 촉진용 조성물 (대황, 감송향)	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	PCT	-	2016.02.27	-	출원
8	특허	경피 흡수 촉진제 및 그의 용도	(주)내츄럴 엔도텍	출원인	대한민국	-	2016.05.12	-	등록

## 11. 기타사항

코드번호	D-13
해당사항 없음	

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
1)	<p>HR Shin et. Identification of transcriptional targets of Wnt/<math>\beta</math>-catenin signaling in dermal papilla cells of human scalp hair follicles: EP2 is a novel transcriptional target of Wnt3a. <i>J Dermatological Science</i>, 58 (2010) 91-96</p> <p>David Enshell-Seijffers et. <math>\beta</math>-catenin Activity in the Dermal Papilla Regulates Morphogenesis and Regeneration of Hair. <i>Developmental Cell</i>. 18 (2010) 633-642</p> <p>Yadong Yang et. Versican gene: Regulation by the <math>\beta</math>-catenin signaling pathway plays a significant role in dermal papilla cell aggregative growth. <i>J Dermatological Science</i> 68 (2012) 157-163</p>
2)	<p>Chao-Chun Yang et. Review of hair follicle dermal cells. <i>J Dermatological Science</i> 57 (2010) 2-11</p>
3)	<p>Phil-June Park et. Hair growth-promoting effect of Aconiti Ciliare Tuber extract mediated by the activation of Wnt/<math>\beta</math>-catenin signaling. <i>Life Sciences</i> 91(2012) 935-943</p>
4)	<p>Hye-Jin Park et. Topical application of Polygonum multiflorum extract induces hair growth of resting hair follicles through upregulating Shh and <math>\beta</math>-catenin expression in C57BL/6 mice. <i>J Ethnopharmacology</i> 135 (2011) 369-375</p>
5)	<p>Soung-Hoon Lee et. Valproic Acid Induces Hair Regeneration in Murine Model and Activates Alkaline Phosphatase Activity in Human Dermal Papilla Cells. <i>PLoS ONE</i>. 7(3) (2012) e34152</p>
6)	<p>Naphatsorn Kumar et. <math>5\alpha</math>-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. <i>J Ethnopharmacology</i> 139 (2012) 765-771</p>
7)	<p>생약 추출물을 함유하는 탈모방지 및 육모 촉진용 피부 외용제 조성물 (1015304900000, 등록번호)</p>
8)	<p>탈모방지 및 발모촉진 조성물 그리고 이를 이용한 제품 (1012376350000, 등록번호)</p>
9)	<p>상황버섯과 천연복합물을 이용한 탈모방지 발모촉진용 화장품 조성물 및 이의 제조방법 (1020150017697, 출원번호)</p>
10)	<p>홍서영 외. 쇠비름 알코올 추출물을 이용한 두피 스케일링 연구. 서경대학교, 2012</p>
11)	<p>KH Kim. P-62 A Study of the Effectiveness of Hair Growth and the Improvement of Scalp Problem by Portulaca oleracea Extract. 人間-生活環境系シンポジウム報告集, 2014</p>
12)	<p>김진성, 하고초 추출물의 기능성 Skin food 생리활성 탐색. 경북대학교. 2012</p>
13)	<p>이은실. 하고초(<i>Prunella vulgaris</i>)의 피부 약리 메커니즘 검증과 특수제형 W1/O/W2 다중 에멀전에 관한 연구. 대구한의대. 2012</p>
14)	<p>탈모방지 및 발모조성물 및 그제조방법 (1012610130000, 등록번호)</p>
15)	<p>탈모 및 새치 방지용 천연 조성물 및 이의 제조방법 (1020110143488, 출원번호)</p>
16)	<p>JY Lim et. 탈모방지제(발모제, 육모제, 양모제)의 최신연구 동향. <i>J. Aesthet.</i> 2014. 12(6):773-786</p>
17)	<p>김규리. Effect of Curcuma Longa Linne (Turmeric) on Hair Growth Promotion in C57BL/6 Mice. 경희대학교. 2014</p>
18)	<p>구중구포 인삼 추출물과 천연 한방 추출물을 함유하는 탈모방지용 화장품 조성물 (1013901080000, 등록번호)</p>
19)	<p>한방 생약제 추출물을 포함하는 탈모방지 및 발모용세정제 조성물 및 이의 제조방법</p>

(1011940590000, 등록번호)

20) VR et. Phcog Rev.:Short Review Plants used for hair growth promotion. *J Pharmacognosy*. 2008. 2(3).

21) 탈모 방지 및 발모를 위한 한방 샴푸 조성물 및 그제조 방법 (1009308390000, 등록번호)

22) 발모, 양모 촉진 탈모방지를 위한 생약 조성물 및 이의 제조방법 (1009504370000, 등록번호)

23) 야콘, 사상자 및 석창포의 혼합추출물, 이를 함유하는 탈모 또는 전립선 비대증의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 및 탈모의 예방 또는 개선용 화장품 조성물 (1014327460000, 등록번호)

24) 탈모방지 및 발모촉진용 샴푸 조성물 (1005813160000, 등록번호)

25) 한국전통지식포털사이트, 동의보감



[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발 Discovery of hair loss-preventing natural herbs activating Wnt/b-catenin signaling pathway and its use for functional skin care development.				
주관연구기관	(주)내츄럴엔도텍		주 관 연 구	(소속) (주)내츄럴엔도텍	
참 여 기 업	(주)캠온		책 임 자	(성명) 홍준기	
총연구개발비 (850,200천원)	계	850,200천원	총 연 구 기 간	2013. 7. 16 ~ 2016. 7. 15 ( 3년 월)	
	정부출연 연구개발비	510,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	51명
	기업부담금	340,200천원		내부인원	51명
	연구기관부담금			외부인원	

○ 연구개발 목표 및 성과

본 과제에서는 안전성이 입증된 천연물 식품 소재의 추출물을 대상으로 베타카테닌 신호활성을 유도하는 후보군을 도출하고 이를 이용해서 탈모 예방 활성을 지닌 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발을 위한 연구를 진행하였다. 동물 모델을 이용한 비임상 효력시험을 통해 최종 후보물질의 효능을 확인하였으며, 후보소재의 안전성을 평가하기 위한 다양한 독성시험과 예비 인체적용시험을 통해 투여용량에서의 안전성을 확보하였다. 또한 개발 소재의 표준화 및 품질관리 기준을 설정하였으며 시제품의 제형을 결정하고 개발제품에 대한 안정성 시험을 진행하였다.

추가적으로 피부투과 촉진 인헨서를 개발하여 제조공정을 구축하고 국제 화장품 원료집에 등재 하였다. 개발소재의 용도 특허출원/등록 등을 및 학술지 투고를 통하여 과학적 근거자료를 마련하였다.

○ 연구내용 및 결과

1. 개발 소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질특성 연구 등)

- 생약원료 선정구매/ 탐색평가용 시료제조
- 시작품의 제품화 연구 및 활용기술개발

2. 시제품 제형결정 및 개발제품의 안정성시험(허가제출 자료)

- 제품개발 CMC 자료준비
- 제품개발 CMC 패키지
- 원료 및 완제 안정성시험

3. 비임상 효력시험 완료 및 독성시험 완료

- 경피 흡수 후보제형의 예비효력시험
- 비임상 독성 시험

#### 4. 피부투과 촉진 인핸서 제조라인 구축 및 생산

- 피부투과 촉진 conjugate enhancer 제조 및 물성연구
- 인핸서 물성연구
- conjugate enhancer 제조공정 구축
- 생약 복합물제제의 경피 흡수 제형연구

#### 5. 개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련)

- 발굴소재의 특허출원/등록 및 학술지 투고

#### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 무(저)독성 탈모예방 기능성 생약소재 추출물의 제조 및 효능평가 노하우 확보로 신제품 개발
- 탈모예방 기능성 원료사업화
- 고부가가치 기능성 핵심소재/완제품의 국내외 매출확대
- 경피 흡수 인핸서 기술개발/제품화기술적용
- 피부투과효율 증진, 양모제품의 경쟁력 향상
- 화장품, 의약품 등 타 산업분야로 응용확대
- 임상시험을 위한 신뢰성 있는 독성학적 기초자료를 확보함으로써, 의약외품 IND에 필요한 근거자료 제공
- 국내산 고품질 식품생약조달 및 재배권장 자원의 실용화 사업으로 농민 소득증대 기여

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
과제번호			113011-3		
사업구분	고부가가치식품기술개발 사업				
연구분야	-		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	-		총괄책임자	-	
과제명	베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨 케어 제품화 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	(주)내츄럴엔도텍		연구책임자	홍준기	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2013. 7. 16 ~ 2014. 7. 15	170,000	113,400	283,400
	2차년도	2014. 7. 16 ~ 2015. 7. 15	170,000	113,400	283,400
	3차년도	2015. 7. 16 ~ 2016. 7. 15	170,000	113,400	283,400
	계	2013. 7. 16 ~ 2016. 7. 15	510,000	340,200	850,200
참여기업	(주)캡온				
상대국	상대국연구기관				

2. 평가일 : 2016년 8월 30일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)내츄럴엔도텍	팀장	홍준기

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수

○ 실적 : 천연물을 이용한 양모기능성 원료 개발 및 피부투과율 촉진 인헨서의 개발완료 함.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수

○ 실적 : 남성뿐만 아니라 여성의 탈모 또한 대두되는 가운데, 부작용을 동반하는 화학 발모제를 대체할 천연 발모제의 연구개발은 보다 안전한 발모제 개발을 도래할 수 있으며, 피부투과율 촉진 인헨서의 개발은 비단 발모제 뿐 아니라, cosmetic 부분에서 다양한 제품에 사용될 것으로 사료됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수

○ 실적 : 발모의 기능을 가진 천연 원료 및 시제품 개발을 완료하였으나, 피부투과율 촉진 인헨서의 접목이 미흡하였으며, 이는 추후 지속적인 연구개발을 통해 보다 우수한 양모기능성 발모제 개발은 물론 다양한 cosmetic 제품에 활용가능 할 것으로 사료됨.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 아주 우수

○ 실적 : 약 211종의 천연물 스크리닝을 통하여 가장 양모의 기능이 우수한 생약을 선정하고 이를 이용한 원료 및 시제품을 생산하여 안정성을 확보하였으며 *In vitro*, *In vivo*, 비임상 독성평가 및 간이 임상시험을 통해 개발한 원료 및 시제품의 안전성 및 유효성을 확보하고 CMC 패키지를 구축함. 피부투과율 촉진 인헨서 개발을 위해 컨주게이션 인헨서의 제조공정을 확립하였으며, 각 공정의 품질관리를 위한 정량법 개발을 완료하고 개발 인헨서의 추가 효능을 평가 완료하였음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

○ 등급 : 우수

○ 실적 : 8건의 특허 출원/등록, 3건의 국외 전시회 참석 및 2건의 시제품 개발을 완료함.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
개발소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질특성연구 등)	30	100	생약원료 선정 후 효능평가를 통하여 최종 후보 물질 도출 및 시작품의 제품화 연구와 활용기술개발
시제품 양모효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보 (허가제출자료)	25	100	제품개발 CMC 자료준비를 통하여 CMC 패키지준비 및 원료와 완제의 안정성시험 완료.
비임상 효력시험 및 독성시험 완료	25	100	경피 흡수 후보제형의 비임상 효력 시험 및 8종의 독성시험 완료.
피부투과 촉진 인핸서 제조라인 (Pilot) 구축 및 생산	10	100	피부투과 촉진 conjugate enhancer 물성연구와 제조공정 구축 및 생약 복합물제제의 경피 흡수 제형연구 진행
개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표(과학적 근거자료 마련)	10	80	발굴소재 특허출원/등록 및 학술지 투고
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

211종의 방대한 천연물을 스크리닝을 통해 양모의 기능이 가장 우수한 생약을 선정하고 원료 및 시제품 개발을 성공하였으며, 유효성 및 안전성과 CMC 패키지를 구축함에 있어 본 과제의 연구를 토대로 추후 천연 발모제 개발을 성공시킬 가능성이 높게 평가됨. 추가적으로 피부투과율 촉진 인핸서의 개발은 통해 발모제를 비롯하여 국내외 cosmetic 분야에서 다양하게 적용가능 할 것임.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 양모기능을 가진 천연 발모제 개발을 최종목표로 진행되었음. 연구결과를 바탕으로 한 논문은 현재까지 작성 중에 있으며, 수준 높은 논문을 위해 추가적인 연구를 통해 올해 안에 SCI에 등재 완료 하도록 박차를 가할 것임.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

피부투과율 촉진 인핸서의 추가적인 연구를 토대로 본 연구에서 개발한 양모 기능성 발모 시제품에 적용시켜 고품질의 발모제 개발을 완료할 수 있도록 지속적인 연구를 진행할 예정임.

#### IV. 보안성 검토

해당사항 없음 : 일반과제로 진행

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모예방 무독성 식품생약소재 탐색 및 양모 기능성 스킨케어 제품화 개발			
주관연구기관	(주)내츄럴엔도텍	주관연구책임자	홍준기	
연구개발비 (천 원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	510,000	340,200		850,200
연구개발기간	2013. 7. 16 ~ 2016. 7. 15			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
개발소재의 품질관리설정 및 표준화 (물질특성연구 등)	- 생약원료 선정구매/ 탐색평가용 시료제조 - 시작품의 제품화 연구 및 활용기술 확보
시제품 양모효력평가, 제형결정 및 개발제품의 안정성시험결과 확보 (허가제출자료)	- 개발 소재 및 제품 관련 CMC 자료 확보 - 원료 및 완제 안정성 자료 확보
비임상 효력시험 및 독성시험 완료	- 동물모델을 이용한 비임상 시험 자료 및 경피 흡수 후보제형의 예비효력시험 자료 확보 - 비임상 독성시험 자료 확보
피부투과 촉진 인헨서 제조라인(Pilot) 구축 및 생산	- 피부 투과 촉진 conjugate enhancer 제조 및 물성연구 완료 → INCI 등재 완료 - 인헨서 물성연구 및 conjugate enhancer 제조공정 구축 완료
개발소재의 용도특허출원 및 학술지 발표 (과학적 근거자료 마련)	- 발굴소재 특허출원/등록 및 학술지 투고

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
												SCI	비SCI						
최종목표	6			1		1						2					2		
연구기간내 달성실적	7	1		1		2						0					3		
달성율(%)	100	-		100		200						0					150		

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	베타카테닌 신호활성을 유도하는 탈모 예방 무독성 식품생약 소재 개발
②	피부 투과 촉진 인헨서 개발

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v	v			
②의 기술		v				v				

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과 활용계획 및 기대효과
①의 기술	생약소재를 이용한 양모제 제품화 예정 (제품화 기간 : 3년 예상)
②의 기술	피부 투과 촉진 인헨서의 적용이 가능한 최적화 소재를 추가 발굴 예정



### 7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과 목표	사업화 지표										연구 기반 지표							
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문						
												SCI	비 SCI			학 술 발 표	정 책 활 용	
최종목표	6			1		1						2					2	
연구기간내 달성실적	7	1		1		2											3	
연구종료 후 성과창출 계획		3				1						2						

### 8. 연구결과의 기술이전조건 (산업체이전 및 상품화연구결과에 한함) : 자체 제품화 예정

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.