

발간등록번호

11-1543000-001705-01

노인성 만성질환 (혈액순환, 고지혈·혈압, 당뇨 등) 완화를 위한 복합식품 개발

최종보고서

2017. 03. 31

주관연구기관 / 고려대학교 산학협력단
협동연구기관 / 한국산업기술대학교 산학협력단
한국식품연구원
참여기관명: (주)국전약품
(주)파마크로

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “노인성 만성질환(혈액순환, 고지혈·혈압, 당뇨 등)완화를 위한 복합식품 개발”
(개발기간 : 2013. 11. 20 ~ 2016. 11. 19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 03. 31.

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

고 제 상

협동연구기관명 : 한국산업기술대학교 산학협력단

조 진 기

한국식품연구원

박 용 곤

참여기관명 : (주)국전약품

홍 종 호

(주)파마크로

김 남 식

주관연구책임자: 고려대학교 산학협력단

임 영 희

협동연구책임자: 한국산업기술대학교 산학협력단

김 정 근

한국식품연구원

김 인 호

참여기관책임자: (주)국전약품

윤 치 흥

(주)파마크로

김 남 식

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

보고서 요약서

과제고유번호	313028-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2013.11.20. ~ 2016.11.19.	단 계 구 분	3/3
연구사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명				
연구과제명	대 과제명	노인성 만성질환(혈액순환, 고지혈·혈압, 당뇨 등)완화를 위한 복합식품 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	임 영 희	해당단계 참 여 연구원 수	총: 29명 내부: 5명 외부: 24명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 387,500 천원 민간: 130,000 천원 계: 517,500 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 86명 내부: 15명 외부: 71명	총 연구개발비	정부: 1,125,000 천원 민간: 380,000 천원 계: 1,505,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 산학협력단			참여기업명 (주)국전약품 (주)파마크로	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수: 272면	

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>상백피와 상지는 진해, 소염, 진정, 혈압강하, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재료, 대한약전수제 생약일 뿐만 아니라 식품공전 별표1에 "식품에 사용할 수 있는 원료"로 등재된 식품원료이다. 특히 유효성분인 옥시레스베라트롤을 가장 많이 함유한 상지(뽕나무 가지)를 주정으로 추출하여 제조된 상지주정추출물의 혈액순환개선, 고지혈증 개선, 항산화 기능 증진 효과, 장관 면역기능 개선을 연구하여 이를 통해 노인성 만성 질환인 혈액순환 및 고지혈증의 개선 및 항산화기능을 증진시키기 위한 천연물 유래 복합기능성 건강기능식품을 개발하는 것이 본연구의 목적이다.</p>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 뽕나무의 여러 부위(상백피, 상지, 뽕잎, 오디)의 유효물질 함량 조사를 통해 옥시레스베라트롤을 유효물질 및 지표물질로 선정함 ▪ 유효성분을 다량 함유한 상지를 원료로 선정하였음 ▪ 대량생산 체제에서의 공정 최적화 조건 검토 후 추출물 제조공정의 최적화 및 대량생산 공정을 확립하였음 ▪ 상지주정 추출물의 복합 기능성을 평가하고 검증함 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 효과를 확인함 - 혈행개선 효과 검증 완료 - 콜레스테롤 개선 효과 검증 완료 - 장관 면역증강 효과 검증 완료 - 혈당강하 효과 검증 완료 ▪ 약동력학적 평가 ▪ 상지주정추출물의 콜레스테롤 개선 인체 적용시험 완료 ▪ 기능성물질을 함유한 추출물을 이용한 건강기능식품 개발을 위한 레시피 개발 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 부작용이 적고 안전성이 검증된 상지 주정추출물을 기능성 식품 원료로 개발할 수 있을 것으로 기대됨 ▪ 유효성분인 옥시레스베라트롤의 의약품 보조제 물질로의 이용성 증대를 도모함 ▪ 활용가치가 낮은 국내 뽕나무 가지의 사용으로 농산자원의 고부가가치화를 도모함 ▪ 옥시레스베라트롤을 함유하는 천연물 유래 소재로의 연구 확대를 통한 새로운 기능성 식품 소재 발굴에 활용 ▪ 연구에 참여한 인력의 전문성 향상에 의한 전문 연구 인력의 양성에 기여 ▪ 연구에 참여한 기업의 기능성 물질에 대한 산업화로 기업의 가치 향상 및 국내 관련 산업의 활성화에 기여 ▪ 연구결과의 학술논문 발표 및 지적재산권 확보 등에 활용함 					
중심어 (5개 이내)	상지추출물	이중기능성	콜레스테롤 저하	혈행개선	고령화	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p><i>Morus alba</i> root and <i>Ramulus mori</i> are traditional medicinal herbs known to have pharmacological actions such as cough remedy, anti-inflammatory, sedative, hypotensive, and antibacterial effects. They are listed on the Korean Pharmacopoeia and have been approved as food raw materials by KFDA. In particular, <i>Ramulus mori</i> contains a high concentration of an active component, oxyresveratrol. In this study, ethanol extract of <i>R. mori</i> was prepared and evaluated various health improving effects such as the improvement of blood circulation and hyperlipemia, the enhancement of antioxidant function, and the improvement of the intestinal immune function. The purpose of this study is to develop a multi-functional health functional food derived from natural products to improve blood circulation and hyperlipidemia and to enhance antioxidant action for the aged.</p>		
Results	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Effective substance content of mulberry (roots, branches, leaves, fruits) was investigated and oxyresveratrol was selected as an effective and index substance. ▪ <i>Ramulus mori</i> contained the highest concentration of oxyresveratrol was selected as the raw material for the research. ▪ After evaluating the process conditions in the mass production system, optimization of the manufacturing process of the extract and mass production process were established. ▪ Ethanol extract of <i>R. mori</i> (ERM) was evaluated its health promoting effects as follows: <ul style="list-style-type: none"> - ERM shows a high antioxidant activity - ERM shows antihyperlipidemic effects - ERM improves blood circulation - ERM enhances intestinal immunity - ERM lowers blood sugar ▪ Evaluation of pharmacokinetics ▪ Progress for approval of functional ingredient for health functional food ▪ Complete an intervention study to evaluate efficacy on antihyperlipidemic effects of ERM 		

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Development of recipes for the production of functional foods containing ERM as a functional ingredient 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contribution to develop healthy functional foods with ethanol extract of <i>R. mori</i> with low side effects ▪ Providing the increase use of an active component (oxyresveratrol) proven in this study as a functional food ingredient and a pharmaceutical adjuvant material ▪ Contribution to develop high value-added food sources by using domestic mulberry branches with a low-value utilization ▪ Contribution to develop new functional food sources by expanding research on natural sources containing oxyresveratrol ▪ Contribution to the training of professional researchers involved in the research by improving their practical skills and research ability. ▪ Contribution to the enhancement of corporate value of companies participated in the research by production of health products containing effective component of <i>R. mori</i> ▪ Utilization of the results obtained from this study to publish research papers and to acquire intellectual property rights 				
Keywords	Ethanol extract of <i>Ramulus mori</i>	Dual claim	Cholesterol lowering	Improving blood circulation	Aging

영문목차

Chapter 1 Overview of Research and Objectives	1
Section 1 Objectives of Research and Development	1
Section 2 Necessity of Research	1
Chapter 2 R&D Status in Domestic and Abroad	6
Section 1 Domestic R&D Status	6
Section 2 Abroad R&D Status	11
Section 3 Changes of anti-aging Industry in domestic and abroad	15
Chapter 3 Research Contents and Results	17
Section 1 Research Contents	17
Section 2 Roles of Research groups	18
Section 3 Research Methods	19
Section 4 Results of the Research	100
Chapter 4 Achievement and Contribution	261
Section 1 Achievement of Goals	261
Section 2 Contribution to Related Parts	262
Chapter 5 Plans for the Practical Use of Results	263
Chapter 6 Information of International Science and Technology	263
Chapter 7 Security levels of the Research	265
Chapter 8 Facilities and Equipments	265
Chapter 9 Safety Management of Lab	266
Chapter 10 Significant Research outcomes	269
Chapter 11 Others	270
Chapter 12 References	271

< 목 차 >

제 1장 연구개발 과제의 개요	1
제 1절 연구개발 목적	1
제 2절 연구개발의 필요성	1
제 2장 국내외 기술개발 현황	6
제 1절 국내 현황	6
제 2절 해외 현황	11
제 3절 국내외 항노화 산업의 환경변화	15
제 3장 연구수행 내용 및 결과	17
제 1절 연구개발수행 내용	17
제 2절 기관별 역할 확립	18
제 3절 연구개발 수행방법	19
제 4절 연구개발 수행결과	100
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	261
제 1절 목표달성도	261
제 2절 관련분야에의 기여도	262
제 5장 연구결과의 활용계획	263
제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	263
제 7장 연구개발성과의 보안등급	265
제 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	265
제 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적	266
제 1절 실험실 안전 관리 현황	266
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	269
제 11장 기타사항	270
제 12장 참고문헌	271

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발 목적

상백피와 상지는 진해, 소염, 진정, 혈압강하, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재로, 대한약전수재 생약일 뿐만 아니라 식품공전 별표1에 "식품에 사용할 수 있는 원료"로 등재된 식품원료이다. 특히 유효성분인 oxyresveratrol을 가장 많이 함유한 상지(뽕나무 가지)를 알코올로 추출하여 제조된 상지주정추출물의 혈액순환개선, 고지혈증 개선, 항산화 기능 증진 효과, 장관 면역기능 개선을 연구하여 이를 통해 노인성 만성 질환인 혈액순환 및 고지혈증의 개선 및 항산화기능을 증진시키기 위한 천연물 유래 복합기능성 건강기능식품을 개발하는 것이 본 연구의 목적이다.



- ▶ 급속히 진행되는 인구 고령화
- ▶ 노인성 만성질환(혈액순환, 고지혈, 고혈압, 당뇨 등) 복합 유병률 68.3%
- ▶ 복합 만성질환에 대한 처방약을 복용하는 노인이 84%에 달함

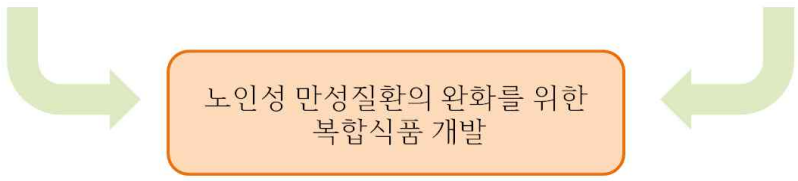


뽕나무 가지 (상지)

- ▶ 뽕나무는 열매, 잎, 어린 가지, 뿌리껍질이 모두 식용가능 원료로 인정
- ▶ 수천 년간 중국, 한국, 인도 등에서 사용하고 있는 생약재
- ▶ Oxyresveratrol, flavonoid 등 다량 함유

복합 만성질환의 예방 및 완화가 필요

식용 원료로 다양한 효능이 입증된 상지

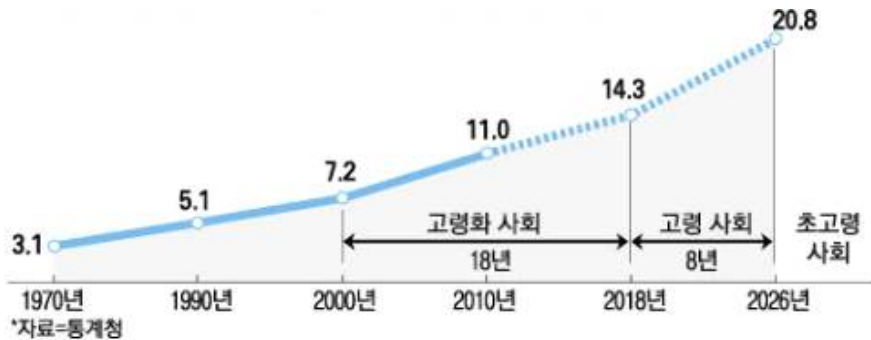


제 2절 연구개발의 필요성

1. 세계적인 인구 고령화 및 노인성 만성질환의 증가

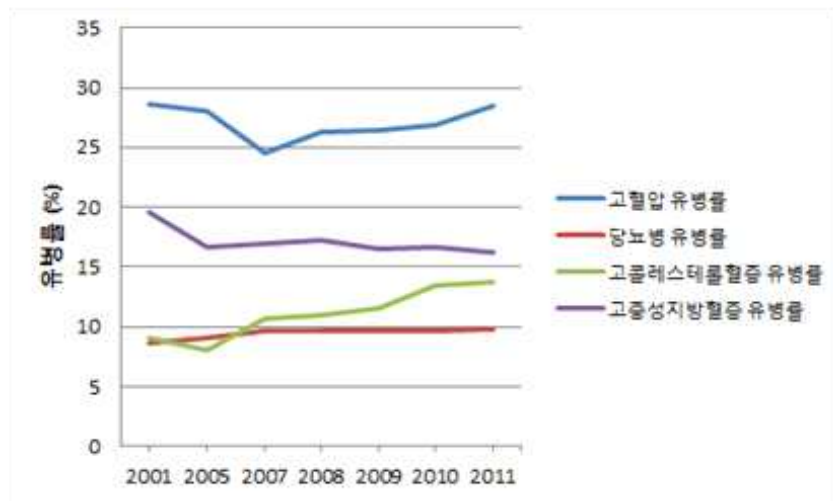
가. 식생활 개선과 급속히 발전해 온 생명과학 덕분에 인간의 생명은 점점 연장되고 있음.

나. 65세 이상 인구 비율의 변화 : 3.8%(1980) → 5.1%(1990) → 7.2%(2000) → 11.0%(2010) → 14.0%(2018) → 20.8%(2026)로 예상



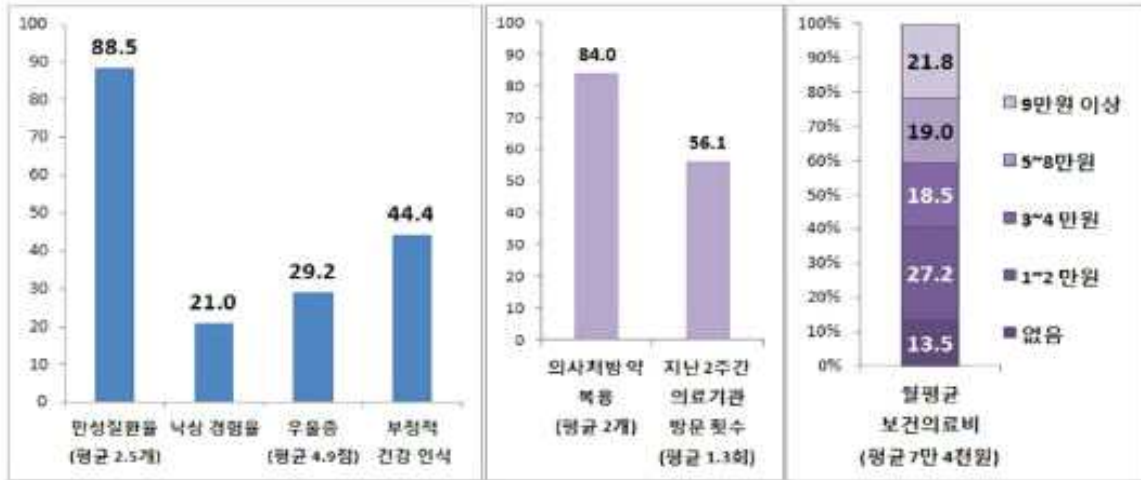
다. 최근 급속히 진행되는 인구고령화로 인해 노인인구의 보건문제가 가장 중요한 정책과제 중 하나로 대두되고 있으며, 그 중 노인성 만성질환(혈액순환, 관절/뼈, 고지혈, 고혈압, 당뇨 등)은 복합 유병률이 68.3%에 달하며, 복합 만성질환에 대한 처방약을 복용하는 노인이 84%에 달함.

라. 국내 고지혈증 환자발생 현황을 보면 환자 발생이 증가하고 있음



[출처: 국민건강보험공단 통계]

마. 우리나라뿐 아니라 미국의 경우 전체 보건의료지출의 3/4은 만성질환에 쓰이고, 미국 인구의 45%, 65세 이상 인구의 88%는 만성질환환자이나 이들의 절반 이상이 복합 만성질환 환자임에 따라 이미 복합만성질환은 세계적으로 심각한 문제임.



[노인의 건강상태 및 의료이용 실태, 보건복지부 2012]

2. 노인성 만성질환의 개인적 고통과 사회적 부담 축소 방안 필요

- 가. 노인성 복합 만성질환을 가진 환자는 여러 처방약을 함께 복용하기 때문에 처방약 간의 상호작용에 따른 부작용 발생의 위험이 높아 각별한 복약지도와 관리가 요구됨.
- 나. 질환에 의해 삶의 질이 저하될 뿐만 아니라 개인과 국가의 의료비가 증가됨. 만성 질환자 및 고령인구 증가로 요양서비스 등 사회적 비용의 증가가 예상됨.
- 다. 국회 예산정책서가 발간한 ‘2014년 재정운용 방향 및 주요현안’에 따르면 인구고령화로 인한 노인성질환 및 만성질환 증가추세를 감안하면 건강보험의 재정여력이 급속히 악화될 수 있다고 지적했으며, 실제로 2011년 기준 전체인구의 10.5%를 차지하는 노인인구는 전체 건보재정의 33.3%를 구성하고 있고, 노인 1인당 진료비 (2,966,000원)도 전체 평균(937,000원)에 비해 3.2배 높은 실정으로 그 대안이 요구됨.

3. 이중 기능성 활성 소재 개발의 필요

- 가. 사회의 급격한 고령화로 인해 노인 맞춤형 기능성식품에 대한 연구의 필요성이 증대하고 있음.
- 나. 안전한 식품 소재를 통해 노인의 복합 만성질환의 예방 및 완화가 사회적으로 필요하며, 복합 만성질환에 맞춘 이중 기능성 활성 소재가 특히 필요한 실정임.

다. 콜레스테롤(cholesterol)은 체내에서 세포막의 구성성분으로 작용하며 생리 생화학 적 반응에 관여하는 중요한 물질이나 과잉으로 존재하면 혈관내피 세포나 혈관내 막에서 축적되어 동맥경화소를 형성하여 고지혈증과 같은 혈관질환을 유발하고 고 지혈증은 동맥경화, 고혈압, 비만, 당뇨 등과 같은 이차적인 질환을 유발함. 현재 가 장 많이 쓰이고 효과를 보이는 콜레스테롤 저해제는 statin계 물질이나, 부작용으로 간독성과 근육질환을 일으킬 수 있는 위험이 있음.

라. 혈중 총 콜레스테롤은 관상동맥 질환 발생과 밀접한 상관성을 나타내므로 혈중 콜레스테롤의 항상성을 유지하는 것은 매우 중요하며, 안전하고 새로운 콜레스테롤 저해제의 개발을 통해 혈액순환, 고지혈증, 고혈압, 당뇨를 개선할 수 있는 다중 기 능성 활성 소재로 이용할 수 있음.

4. 안전성이 확보된 천연물유래 건강기능식품의 필요성 증대

가. 안전성이 확보된 천연물 유래의 건강기능식품 개발이 필요. 천연물의 유효성분의 건강기능성 향상에 대한 평가를 수행하여 건강기능식품 소재로 개발할 필요성 증 대.

나. 건강을 증진시키는 물질로서 천연물에 존재하는 파이토케미컬(phytochemicals)인 스틸벤(stilbene), 플라보노이드(flavonoid), 카테킨(catechin) 등의 중요성이 점차 증가하고 있음(1)

다. 고령인구를 중심으로 증가하고 있는 퇴행성 질환을 예방하기 위해, 성인병 예방 효 과를 보이는 것으로 알려진 상지를 원료로 한 발효 상지 유효성분 함유 제품개발에 대한 지원이 필요함.

(1) 뽕나무는 열매, 잎, 어린가지, 뿌리껍질이 모두 식용가능 원료로 인정되고 있음

(2) 상지는 뽕나무(Morus alba L.) 잔가지로 만든 약재로 혈압강하 작용, 피부 보습 과 미백, 이뇨작용, 항염증작용, 항균작용 및 진해, 진통, 해열 작용 등을 가지고 있는 것으로 알려져 있음.

● 식품 원재료명 검색

동 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 **식용가능여부 판단**을 위해서는 반드시 **식품의약품안전처**로 질의하여 주시기 부탁드립니다.

통합검색	상세검색	식물	동물	미생물	수산물
이름구분 : 전체	식용여부 : 전체				
원재료 분류 : 전체	공전등록여부 : 전체	상백피	[검색]		

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
가새꽃(Kuwa)	가새꽃나무	<i>Morus bombycis</i> Koidzumi for dissecta Nakai (<i>M. bombycis</i> Koidzumi for. kase Uyekl)	상백피(桑白皮), 상엽(桑葉), 상지(桑枝), 상심자(桑心子)			
뽕나무	오디나무, 상지, White Mulberry 상백피: 상근백피(桑根白皮), 상근, 묵맥, 오목이, 뽕나무껍질, 누 상엽: 칠선자(雛扇子), 경상상엽(經書桑葉), Sang ye, 오디나무, 백상(白桑)엽, 뽕나무잎 상지: 눈상지(嫩桑枝), 상조(桑條), 뽕나무 가지, Mulberry twig, Sang zhi(상지/桑枝), 자명심 상심자: 오디	<i>Morus alba</i> L.	상백피(桑白皮, Mori Cortex), 상엽(桑葉, Mori Folium), 상지(桑枝, Mori Ramulus), 상심자(桑心子, Mori Fructus), 상실(桑實, 오디)	열매 / 잎 / 어린 가지 / 뿌리껍질		
산뽕나무	Bombycis mulberry, 뽕나무, 상수피, 검뽕나무, 산상	<i>Morus bombycis</i> Koidz...	상백피(桑白皮), 상엽(桑葉), 상지(桑枝), 상심자(桑心子)	열매 / 잎		

※ 식용여부가 공란인 원료(부위)를 식용으로 사용하기 위해서는 사전 검토가 필요함을 알려드립니다.
※ 원재료명을 클릭하면 상세정보를 보실 수 있습니다.

- (3) 발효 상백피, 상지, 뽕잎, 오디 유래 성분 중 활성산소 제거 기능이 있는 기능성 물질 소재화의 일환으로 혈액순환 개선, 콜레스테롤 개선, 면역력 증가 효과에 대한 검증을 통해 노인성 만성질환 예방과 완화를 위한 건강기능식품을 개발할 필요가 있음.

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 현황

1. 국내 건강기능식품 시장 현황

가. 고령화 시대에 발맞추어 건강기능식품시장의 수요가 꾸준히 증가하는 추세이고, 매해 시장규모가 지속적으로 커지고 있으며, 생산량 또한 증가 추세를 보임.

나. 식품의약품안전청에서 발표한 자료에 의하면, 국내 건강기능식품 시장 규모는 2009년 1조 1,600억, 2010년도 1조 2,804억, 2011년도 1조 6,855억, 2012년도 1조 7,039억, 2013년도 1조 7,920억이었으며, 2015년도 건강기능식품 시장 규모는 2조 3천억 원으로 전년(2조 52억 원)보다 16.2% 늘어남.

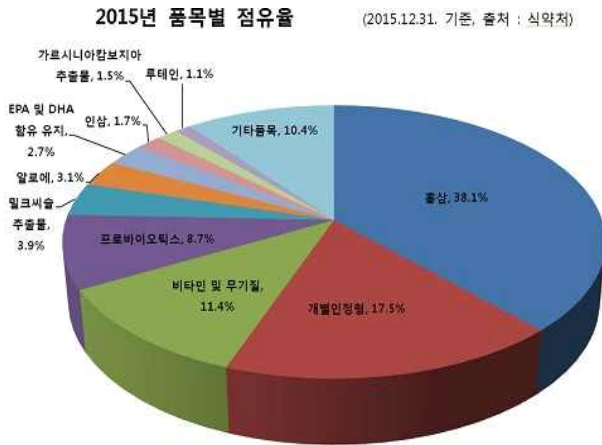


다. 주요 제품별 생산 비중을 살펴보면, 홍삼이 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 홍삼에 뒤이어 개별인정형 제품, 비타민 및 무기질 제품, 프로바이오틱스 제품, 알로에 관련 제품, 기타 순서로 비중을 차지하고 있음.

라. 식약처 조사 자료에 따르면, 2013년 12월 31일 기준 건강기능식품 중 생산액 증감률에서 확인할 수 있듯이 개별인정형 제품과 프로바이오틱스 제품 생산량이 대폭적으로 증가하는 추세임.

마. 특히, 새로운 기능성을 나타내는 개별인정형 제품에 대한 관심이 증가 추세로 2013년 개별인정형 건강기능식품의 생산은 ('11) 1,435억 원(27%) → ('12) 1,807억 원(26%) → ('13) 2,324억 원(29%) 증가함.

바. 건강기능성 제품에 대한 인식이 과거 비타민류 및 홍삼제품 등에서 현재는 유효성분을 함유한 다양한 천연물유래의 건강기능식품 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.



(‘13.12.31. 기준, 출처: 식약처)

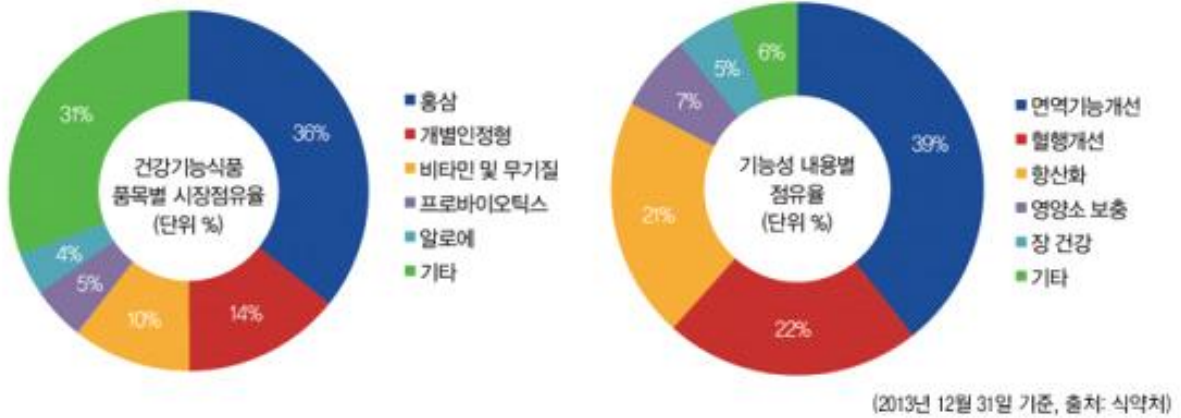
순위	구분	총 생산액(억원)		증감률 (‘13/‘12, %)
		‘13년	점유율(%)	
1	홍삼	5,869	39.6	△9.5
2	개별인정형	2,324	15.7	28.6
3	비타민 및 무기질	1,747	11.8	6.1
4	프로바이오틱스	804	5.4	55.2
5	알로에	628	4.2	△8.6

사. 2013년 12월 31일 기준 식약처 자료에 따르면, 기능성별 건강기능식품 생산실적이 면역기능 개선 관련 건강기능식품이 가장 높았고, 그 다음으로 혈행 개선, 항산화, 영양소 보충, 장 건강, 기타 순으로 생산실적이 높음.

아. 2015년도에도 면역기능 개선 제품의 수요가 증가하였으며, 이와 관련되어 홍삼제품의 생산실적이 6,943억 원으로 '14년(6,330억 원)에 비해 9.7% 증가하였고, 개별인정형 원료인 당귀혼합추출물의 생산실적은 '14년 396억 원에서 '15년 714억 원으로 80% 급증함.

자. 식약처에서는 2015년 가짜 백수오 사태 이후에도 시장이 성장한 데는 일상 속 건강관리에 대한 수요가 증가하였기 때문으로 보고 있음.

차. 2015년 국내 제조업 GDP의 성장률이 2.3%인데 비해 건강기능식품 생산은 11.8% 증가한 사실로 미루어 볼 때, 건강기능식품시장은 꾸준히 고속 성장 할 것으로 보임.



2. 국내 노인성 만성질환 관련 제품생산 현황

가. 2000년대 사회성, 공익성을 추구하는 LOHAS (Lifestyle of health and sustainability) 시대가 도래 하여, 천연물 유래 기능성 식품에 대한 요구가 높아짐.

나. 한국생명공학연구원은 어성초 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난 계열 화합물인 디하이드로구아이아레트산(dihydroguaiaretic acid)을 유효성분으로 하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관해 발명을 시행하였음. 또한 흑양과 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중조절 및 비만 예방 및 치료용 조성물을 개발하였는데, 상세하게는 고지방식이를 섭취한 마우스의 체중을 감소시키는 효과를 나타내는 흑양과 추출물을 이용한 비만을 예방하고 치료하는 약학 조성물에 관한 것임.

다. 재단법인 진안홍삼연구소는 고지혈증의 예방과 치료를 위한 조성물을 개발하였음. 이는 고지방 식이에 따른 체중의 증가를 예방하고, 혈중에서 총 콜레스테롤, 저밀도 지단백질(LDL) 및 C-반응 단백질을 감소시키는, 홍삼, 천마 및 하수오 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증의 예방과 치료를 위한 조성물에 관한 것임.

라. 주식회사 의림바이오텍은 황기를 아밀라아제 및/또는 셀룰라아제로 가수분해하여 불용성 물질의 추출 회수율을 높이는 것을 특징으로 하는 효소전환 황기 추출물 제

조 방법을 개발함. 상기 효소전환 황기 추출물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤과 중성지방 강하용 조성물 및 지방간, 고지혈증, 동맥경화 및/또는 심장병의 예방, 완화, 개선 및/또는 치료용 건강기능식품 및 약학 조성물을 제공함.

마. STR Biotech에서는 현미에 홍국균을 배양하여 발효시킨 ‘에스티알 홍국’을 만들어 콜레스테롤 저하소재로 시판 중에 있음. 이는 식약청 규격 이상의 홍국 함량을 가지고 있음.

3. 국내 노인성 만성질환 관련 특허 출원 검색 결과

가. 검색 DB : 특허정보넷 KIPRIS (Korea Intellectual Property Rights Information Service), <http://www.kipris.or.kr/khome/main.jsp>

나. 검색어 및 검색 결과

(1) 노인성

(가) ‘노인성’과 관련되어 총 1,857건의 특허가 등록 상태이며, 연도별로 살펴 본 결과, 2010년도 70 건, 2011년도 123 건, 2012년도 227 건, 2013년도 256 건, 2014년도 286 건, 2015년도 231 건, 2016년도 246 건 등록됨.

(나) 등록된 특허는 ‘홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 노인성 난청 또는 어지럼증의 예방 또는 치료용 조성물’, ‘노인성 치매에 의한 신경세포손상 및 기억력 감퇴를 개선시키는 동충하초 추출물’, ‘퇴행성 신경계 뇌 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물’, ‘뇌기능 개선 효과가 있는 갈화 추출물 및 이의 제조방법’, ‘항유 추출물을 포함하는 당뇨병 합병증의 억제용 조성물’, ‘치매의 개선 및 치료 효과와 인지기억능 향상효과를 가지는 양강추출물’ 등이 있으며, 노인성과 관련되어서는 대부분 난청, 시력, 치매 등의 뇌질환 등과 관련된 특허가 대부분임.

(2) 혈액순환 +추출물

(가) ‘혈액순환’과 관련되어 총 14,082 건의 특허가 등록되어 있으며, 혈액순환을 돕는 소재부터 치료제까지 다양한 특허가 등록되어 있음.

(나) ‘혈액순환, 추출물’ 특허 검색 결과, 4,968건의 특허가 등록되어 있으며, 이를 연도별로 살펴 본 결과, 2010년도 232 건, 2011년도 367 건, 2012년도 557 건,

2013년도 682 건, 2014년도 789 건, 2015년도 606 건, 2016년도 644 건 등록됨.

- (다) 등록된 특허는 ‘동백나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈액순환장애성 질환의 예방 또는 개선용 조성물’, ‘감잎 추출물을 포함하는 혈액순환 장애 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물’, ‘혈액순환장애의 예방 및 증상개선을 위한 오디 추출물’ 등이 있음.

(3) 고지혈증 + 추출물

- (가) ‘고지혈증’과 관련되어 총 3,014 건의 특허가 등록되어 있음.

- (나) ‘고지혈증, 추출물’ 특허 검색 결과, 1,793 건의 특허가 등록되어 있으며, 연도별로 살펴보면 2010년도 87 건, 2011년도 152 건, 2012년도 214 건, 2013년도 241 건, 2014년도 300 건, 2015년도 233 건, 2016년도 215 건 등록됨.

- (다) 등록된 특허는 ‘자단향추출물을 포함하는 고지혈증 및 지방간의 예방 및 치료용 조성물’, ‘황칠나무 추출물을 포함하는 고지혈증 예방용 식품 조성물’, ‘발효 흑마늘 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 조성물’, ‘갈근 또는 갈화 추출물의 발효물을 함유하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 조성물’ 등이 있음.

(4) 혈압 + 추출물

- (가) ‘혈압’과 관련되어 총 15,534 건의 특허가 등록되어 있음.

- (나) ‘혈압, 추출물’ 특허 검색 결과, 6,911 건의 특허가 등록되어 있으며, 연도별로 살펴보면 2010년도 302 건, 2011년도 543 건, 2012년도 748 건, 2013년도 953 건, 2014년도 1,156 건, 2015년도 817 건, 2016년도 827 건 등록됨.

- (다) 등록된 특허는 ‘해표초 추출물을 유효성분으로 함유하는 폐기종 및 폐고혈압 예방 및 치료용 조성물’, ‘익모초 추출물을 함유하는 고혈압의 예방 및 치료용 약학 조성물’, ‘새싹보리 추출물을 포함하는 고혈압 치료용 약학 조성물’, ‘발아 검은콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 항고혈압 조성물’ 등이 있음.

(5) 추출물 + 혈액순환 + 고지혈증 + 혈압

- (가) ‘혈액순환, 고지혈증, 혈압’ 특허 검색 결과, 총 811 건의 특허가 검색됨.

- (나) ‘추출물, 혈액순환, 고지혈증, 혈압’ 특허 검색 결과, 548 건의 특허가 등록되어 있었으며, 연도별로 살펴보면 2010년도 31 건, 2011년도 45 건, 2012년도 57

건, 2013년도 66 건, 2014년도 98 건, 2015년도 80 건, 2016년도 63 건 등록됨.
(다) 등록된 특허는 ‘뇌졸중, 고혈압, 동맥경화 및 고지혈증에 효능이 있는 혼합조성물 및 이의 제조방법’, ‘오징어젓 분말, 오징어젓 극성용매 가용 추출물 및 극성용매 불용성 추출 잔여물을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 고지혈증 및 동맥경화성 혈관계 질환의 예방 및 치료용 조성물’ 등이 있으며, 대부분 고지혈증과 관련된 특허가 검색되었음.

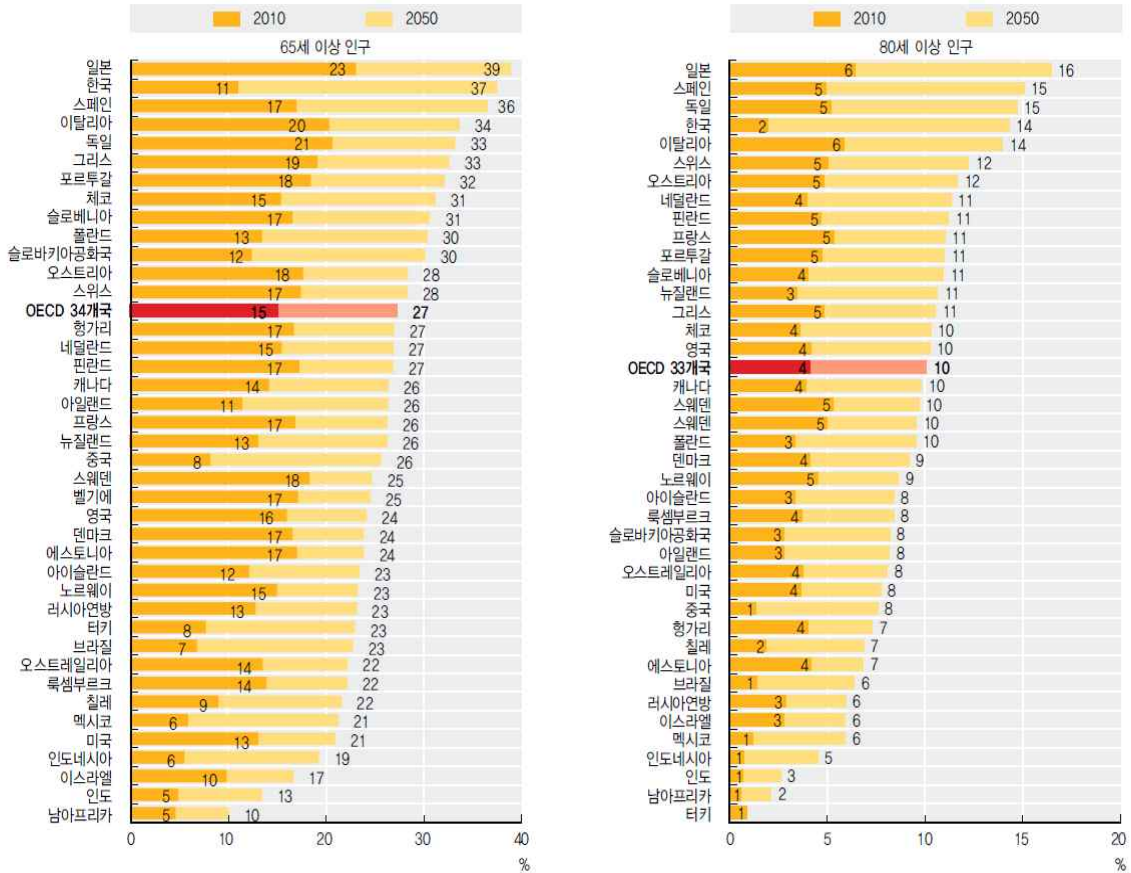
- 다. 노인성 만성질환에서 대표적으로 언급하는 혈액순환, 고지혈증, 혈압과 관련되어 국내 특허 등록 추이를 살펴본 결과, 건강기능식품의 수요가 증가함에 따라 특허 등록 건수도 증가하여 2012년 이후로는 매해 비슷한 수로 특허가 등록되고 있음.
- 라. 세 질병과 관련된 추출물 특허 등록 수는 혈압과 관련된 특허가 가장 많았으며, 그 다음으로 혈액순환과 고지혈증 순이었음.
- 마. 노인성 만성질환에서 대표적으로 언급되는 위의 세 질병에 복합적으로 작용하는 조성물에 대한 특허는 ‘뇌졸중, 고혈압, 동맥경화 및 고지혈증에 효능이 있는 혼합 조성물 및 이의 제조방법’이 유일하였음.

제 2절 해외 현황

1. 세계 노인성 질환 발병률

- 가. OECD 회원국 평균 65세 이상 인구의 비율은 1960년 9% 미만에서 2015년 15%로 증가하였으며, 2050년경에는 27%에 육박할 것으로 전망되고 있음.
- 나. 국가 별 고령화 진행 속도는 차이가 있지만, 대부분의 국가가 인구 고령화의 영향을 받을 것으로 보이며, 특히 유럽의 경우 80세 이상 인구비율이 1960년 1.5%에서 2010년 5%, 2050년 11%로 증가 될 것으로 예상됨.

8.1.1. 65세와 80세 이상 인구 비율, 2010년과 2050년



[65세와 80세 이상 인구비율 ,OECD Historical Population Data and Projections Database, 2013]

다. 미국에서 2001년 수행된 OECD 연구에 따르면, 류머티즘이 고령층에서 나타나는 주된 장애의 원인이었으며, 일상생활에 제약을 받는다고 보고한 65세 이상의 노인 연령 중 30%가 이에 해당하였으며, 류머티즘에 뒤이어 심장질환, 고혈압, 척추 문제, 당뇨, 시력 장애, 폐와 호흡기 질환, 골절, 뇌졸중, 청력장애가 주된 장애의 원인으로 꼽혔음.

2. 세계 건강기능식품 시장 현황

가. 전 세계적으로 가속화 중인 고령화와 건강한 삶에 대한 수요의 증가로 기능성 식품 시장은 꾸준히 시장규모가 증가하고 있음.

나. 2012년 기준 국가별 건강기능식품 시장 규모를 살펴보면, 미국이 33.8%로 가장 높은 비중을 차지하고 있으며, 그 다음으로는 서유럽(16.5%), 중국(12.4%), 일본(11%), 기타 아시아(9.4%) 순으로 비중을 차지하고 있음.



(단위 : 억 달러)

구분	매출액	비중(%)
미국	325	33.8
서유럽	159	16.5
중국	119	12.4
일본	106	11.0
기타아시아	90	9.4
남미	63	6.6
동유럽/러시아	45	4.7
호주/뉴질랜드	20	2.1
캐나다	16	1.7
중동	10	1.0
아프리카	8	0.8
총합계	961	100.0

주: Supplements 기준.
 자료 : 한국건강기능식품협회, 2014 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사, 2014.11.

[국가별 건강기능식품 시장규모, 2014]

- 다. 전 세계 건강 기능성 식품 시장규모 전망은 2012년-2016년을 기준으로 연평균 4.1%의 성장률을 보였음.
- 라. 제품유형별 시장규모는 비타민과 무기질이 가장 컸으며, 그 다음으로 허브/식물류, 스포츠류/특수식이 뒤를 이어, 한국과는 다른 양상을 보임.

(단위: 백만달러, 억원)

개요	년도	시장 규모					연평균성장률
		2012	2013	2014	2015	2016	
세계 시장		47,032	48,960	50,967	53,057	55,232	4.1%
국내 시장*		14,091	14,796	15,535	16,312	17,128	5.0%

자료 : "Global supplement & nutrition industry report", NBJ (2012).

"Global Nutraceutical Industry", Frost and Sullivan (2010).

"건강기능식품 국내 생산액", 식약처 (2012)

* 신고된 생산액은 건강기능 식품이 아닌 기능성 식품 소재 등을 포함하고 있을 가능성 있음.

[건강 기능성 식품 시장규모 전망]

제품유형	2007	2008	2009	2010
비타민&무기질	29,618	31,593	33,092	34,838
허브/식물류	20,218	20,871	21,624	22,459
스포츠류&특수식	22,462	24,027	25,469	27,204
총 판매액	72,297	76,491	80,185	84,500

(출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

[세계 건강기능식품 규모, 단위: 백만달러]

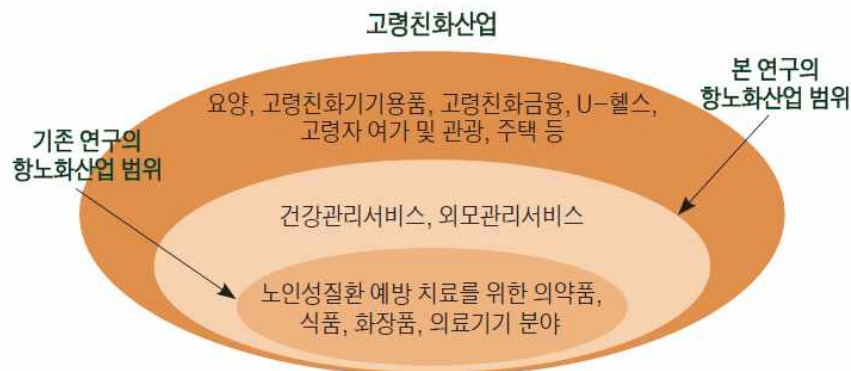
- 마. 미국의 기능성식품 시장 트렌드는 건강기능식품 품목의 다양화, 라이프스타일을 향상시킬 수 있는 기능성식품의 소비, 스포츠 시장과의 연계 및 어린이 건강시장규모 확대, 성별, 연령 및 인종에 따른 기능성 식품의 차별화, 식욕저하 제품의 성장, 자연식품의 선호 등으로 정리할 수 있으며, 약 32%에 해당하는 미국 인구가 식이 보충용 제품을 자주 섭취하는 것으로 나타남.
- 바. 일본은 초 고령화 사회의 도래로 인해 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 이로 인해 일본의 건강기능식품에 대한 소비자 1인당 지출 비용은 전 세계에서 가장 높고, 건강유지와 질병의 예방 차원에서 건강기능식품을 소비하고 있음. 식품과 먹거리를 통한 영양 보충, 기능성 니즈 충족에 대한 관심이 높은 편이나 최근 식품안전에 대한 위기의식 강화와 경기침체로 인해 건강기능식품 시장이 일부 감소하였음.
- 사. 중국은 소득수준의 증가, 건강에 대한 관심 고조, 노령인구 증가에 따라 보건식품의 성장이 점차 예상되고 있으며, 특히 여성, 어린이, 중년, 고령 인구를 중심으로 보건식품 소비가 이루어지고 있음. 보건식품 전문연구소사(2009)에 따르면, 건강식품을 사용하는 주 연령층에 대한 질문에 응답자의 63.5%가 노년층임. 또한, 보건식품

품을 소비하는 소비자들은 국내에서 생산된 제품보다 외국에서 수입된 제품을 선호하는 것으로 나타났으나 노령 소비자들은 국내에서 생산된 제품이나 외국 수입 제품 보다 중국 전통 의약품(Traditional chinese medicine)을 더 선호하는 것으로 나타났음.

아. 베트남은 경제성장으로 인해 국민들의 생활수준이 향상되고 있고, 이에 따라 소비자들은 건강에 관심이 높아지고 있으며 관련품목의 매출이 증가하였음. 건강관련 제품에 대한 소비는 2009년 이후 급증했으며, 소비자들의 건강에 대한 기준도 크게 향상 되고 있음.

제 3절 국내외 항노화 산업의 환경변화

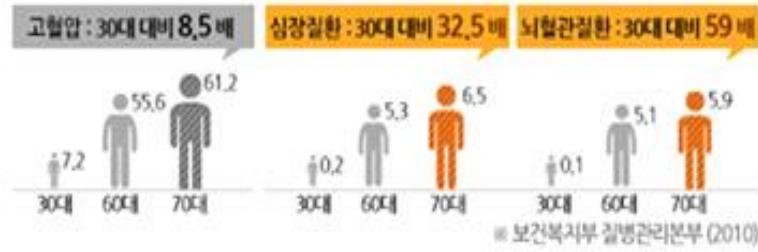
1. 전 세계적으로 인구고령화 현상이 급속히 진행되고 소득증대로 건강한 노년생활에 대한 관심의 증가로 인해 항노화 산업이 주요 산업분야로 부상함.



[항노화산업의 범위, 산업연구원, 2013]

2. 고령인구를 표적으로 한 생활 용품, 의약품 및 의료기기, 항노화 식품 및 화장품 등의 잠재적 수요 증대가 예상됨.
3. 인구고령화에 따른 만성질환 환자가 급속히 증가하는 추세로 고령인구의 만성질환증가율을 억제하기 위한 예방책에 대한 연구가 활발히 진행되어 관련 논문, 특허, 제품 개발이 빠른 속도로 증가하고 있음.
4. 고령인구의 만성질환 유병률은 젊은층에 비해 높은 유병률을 보이는 추세이므로 고령인구에서 높은 비율로 발생하는 만성질환(고콜레스테롤혈증, 당뇨, 심장질환 등)을 개선하기 위한 제품개발이 시급함.

주요 만성질환 연령별 유병률



[연령별 고콜레스테롤혈증 유병률, 보건복지부 국민건강영양조사, 2010]

5. 특히 항노화 제품으로 노화방지 건강기능식품, 건강증진용 보조식품분야에 관심이 증가되고 있음.
6. 국내도 급속한 고령화 진행 및 생활습관 및 식습관의 변화로 만성질환이 크게 증가하는 사회적 현상을 개선하기 위해 예방을 위한 다양한 대책마련이 시급한 실정임.
7. 노인성 만성질환 중 하나인 고지혈증 예방과 관련된 개별인정형 제품의 경우, 오메가-3 지방산 함유제품이 가장 점유율이 높음.
8. 국내건강기능식품 산업은 수입의존도가 높았으나 최근에는 자체 연구개발을 통한 신제품 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 해외의 경우도 국내와 마찬가지로 예방을 위한 건강기능식품에 대한 연구 및 투자가 활발히 이루어지고 있는 실정임.
9. 전 세계적으로 건강에 대한 관심은 꾸준히 증가 할 것이므로 건강기능성 식품 시장에 대한 성장 가능성은 매우 높으며, 특히 고령인구를 표적으로 한 건강기능성 식품의 수요가 급속히 증가하고 있음.
10. 하지만 소비자의 인식변화에 따라, 건강기능식품의 효능에 대한 과학적인 근거를 명확히 제시하지 않은 경우 소비자의 신뢰를 얻기 어려움.
11. 따라서 건강기능성 식품, 특히 개별인정형 제품의 경우 명확한 과학적인 근거 제시를 통한 효능 검증을 통해 소비자의 신뢰를 확보한 제품 개발에 주력해야 함.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발수행 내용

1. 상백피, 상지, 뽕잎, 오디로부터 유효성분을 다량 함유한 원료 선정
 - 가. 재료의 유효성분 함량
 - 나. 선정된 원료로부터 유효성분의 분리 및 표준품 제조

2. 추출물제조 공정의 최적화 및 대량생산 공정 확립
 - 가. 실험실 스케일의 공정 최적화 조건 검토
 - 나. 대량생산 체제에서의 공정 최적화 조건 검토
 - 다. 대량생산 체제 공정도 작성

3. 기능성 물질 함유 추출물의 활성산소 제거 기전 규명 및 다중 기능성 평가
 - 가. 활성산소 제거 기전 규명
 - 나. 혈행개선 효과
 - 다. 항산화 효과
 - 라. 면역증강 효과
 - 마. 혈당강하 효과
 - 바. 약동력학적 평가

4. 기능성 물질의 개별인정 신청 추진
 - 가. 지표물질의 안전성 및 안정성 검토 (보존온도, 보존 pH, 보존 기간, 광선)
 - 나. 기능성 원료의 표준화 : 지표성분설정, 유효성분을 다량 함유하는 원재료 표준화, 제조공정 표준화, 기능성 평가

5. 인체적용시험을 통한 이중기능성 평가
 - 가. IRB 승인 획득 후 인체적용시험 평가

6. 기능성물질을 함유한 추출물을 이용한 건강기능식품 개발
 - 가. 건강기능식품 레시피 개발
 - 나. 건강기능식품 제형개발 (연질캡슐형)

제 2절 기관별 역할 확립

가. 주관연구기관: 고려대학교 산학협력단

- (1) 과제 총괄기관 업무 수행
- (2) 상지주정추출분말의 복합 기능성 검증 및 기전 연구: 항산화, 혈중 지질 개선, 혈행개선 및 면역증강 효과 검증
- (3) 약동력학 시험

나. 제1협동: 한국산업기술대학교 산학협력단

- (1) 원료의 선정
- (2) 유효물질 분석 및 표준품 제조
- (3) Oxyresveratrol 함유 상지주정추출분말의 제조 및 제조공정 확립

다. 제2협동: (주)국전약품

- (1) 기능성성분의 기준 및 시험법 확립
- (2) 기능성성분의 안정성 시험
- (3) 상지주정추출물 함유 레시피 개발 및 시제품제조
- (4) 기능성원료의 개별인정 신청 추진 (식품의약품안전처 기준)

라. 제3협동: (주)파마크로

- (1) 인체적용시험 수행

마. 제4협동: 한국식품연구원

- (1) 인체적용시험 수행 상지주정추출물의 안전성 시험
- (2) 소재에 대한 이화학적 안전성 및 미생물학적 안전성 분석
- (3) 혈당강화 효과 측정

제 3절 연구개발 수행 방법

1. 상지로부터 기능성 물질 제조

가. 상지의 품종 선정

(1) 시료

본 실험에는 국내에서 생산된 산뽕나무(*Morus bombycis* Koidz. var. *bombycis*; 전북 남원 (청명약초), 지리산(지리산한방식품), 충남 광천(채집)) 3종과 뽕나무(*Morus alba* L.; 충북 제천 (영창물산), 지리산(지리산청정약초), 상주(지리산한약나라), 충남 광천(채집)) 4종, 꾸지뽕 (충북 괴산, 충북 제천, 지리산) 3종, 오디(충남 광천(채집)), 뽕잎(전북 남원, 청명약초), 상백피(지리산)를 구입 및 채집하여 사용하였다(Fig. 3.1-1,2,3,4).



Fig. 3.1-1. 뽕나무상지(백상)



Fig. 3.1-2. 산뽕나무상지(산상)



Fig. 3.1-3. 꾸지뽕가지 (꾸지뽕)



Fig. 3.1-4. 충남광천에서 채집된 백상 상지

(2) 시약

본 연구의 HPLC 분석에서 사용된 acetonitrile, ethanol, methanol은 J. T. Baker사에서 구매한 HPLC급 용매를 사용하였다. Phosphoric acid는 덕산화학(주)에서 구입하였다. Trizma base, β -ME(β -mercaptoethanol), PMSF((PhenylMethaneSulfonylFluoride) Ascorbic acid, NAC(N-acetyl cysteine)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였고, CoenzymeQ10은 대웅제약(한국), Oxyresveratrol은 SAMKYUNG COSTECH사, HCl (Hydrogen chloride)은 DUKSAN PHARMACEUTICAL Co.(한국)사, Triton X-100는 Amersham Biosciences (USA)사 제품을 사용하였다.

(3) 시료의 제조

시료를 제조하기 위한 상지는 충청남도 홍천군 광천읍의 5-15 mm 두께의 뽕나무 가지를 채집하여 사용하였다. 채집한 상지는 55℃ 열풍건조기에서 3일간 건조 후 잘게 잘라 사용하였다. 상지주정추출분말의 제조는 잘게 잘린 상지 1,000 g을 증류수로 깨끗하게 세척한 후, 80% 주정용 에탄올 8 L를 첨가하여 초음파 세척기(H0429115, Hwashin Instrument Co.)에서 48시간 추출하였다. 추출이 끝난 주정추출물은 GFC 여과지(Cat No. 1822-047, Whatman®)를 이용하여 감압 여과 후 감압 증류기(N-1000, Eyela)를 사용하여 약 500 mL까지 감압 농축 하였다. 농축된 추출물은 -80℃ 초저온냉동고(DF8520, Ilshin Lab Co.)에서 동결 후, 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co.)를 사용하여 48시간 건조하였다.

나. 상지의 유효성분 함량

(1) 상지주정추출물의 oxyresveratrol, mulberroside A, resveratrol 분석

Oxyresveratrol, mulberroside A, resveratrol 함량 분석은 HPLC(YL9100, 영린기기)를 이용하여 수행하였다(Fig. 3.1-5). 분석에 사용된 이동상은 CH₃CN:10 mM H₃PO₄ = 35:65 (v/v)로 사용하였으며, 컬럼은 Luna C₁₈(5 μm, 4.6x250 mm, Cosmosil), 컬럼온도는 30℃, 이동속도는 1.0 mL/min, 검출과장은 325 nm를 사용하였다.

MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-Mass는 서울대학교 농생명과학공동기기원에서 보유하고 있는 Applied Biosystems Inc.(USA)의 Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation을 사용하였으며, ¹H NMR와 C-NMR은 한양대학교 공동장비센터에서 보유하고 있는 Varian Inc.(USA)의 Varian 400-MR(500 MHz)를 사용하였다.

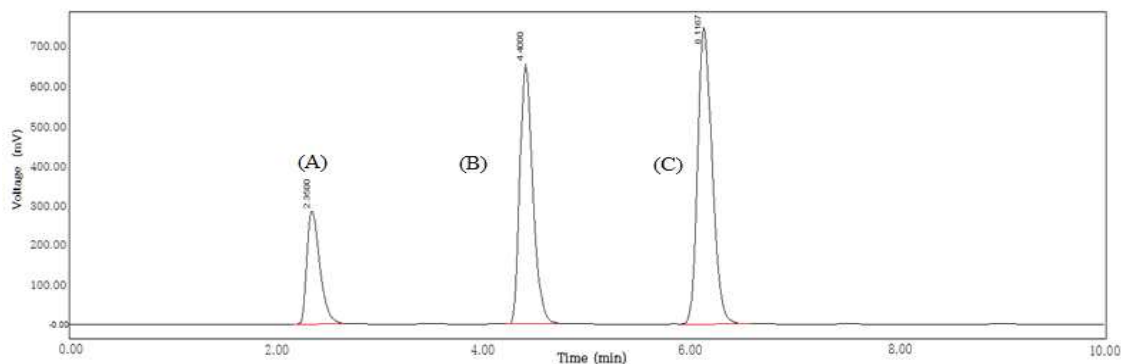


Fig. 3.1-5. HPLC profiles of (A) mulberroside A, (B) oxyresveratrol, (C) resveratrol standard

(2) 총 폴리페놀 함량 측정

상지주정추출분말의 총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 Folin-Denis 방법을 변형하여 분석하였다(2). 96-well plate에 농도별 시료 30 μ L와 2 N Folin 시약 30 μ L를 혼합한 뒤 5분간 실온에서 반응시킨 후, 7% (w/v) Na_2CO_3 용액 100 μ L와 증류수 90 μ L를 첨가하여 25 $^\circ\text{C}$, 암소에서 90분간 반응 후, microplate reader를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 표준물질에 함유된 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (7.8125-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 표준곡선을 통하여 시료 μg 당 gallic acid equivalent(G.A.E.) μg 으로 나타내었다.

(3) 총 플라보노이드 함량

상지주정추출분말의 총 플라보노이드 함량을 구하기 위해 Kamran 등의 방법(3)을 변형하여 사용하였다. 총 플라보노이드 함량은 농도별 시료 150 μ L와 10% (w/v) aluminium nitrate 30 μ L, 1 M potassium acetate 30 μ L, ethanol 40 μ L를 혼합하여 60분간 실온에서 반응시킨 후, 415 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료에 함유된 총 플라보노이드 함량은 quercetin (3.9-31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 표준 곡선을 통하여 시료 μg 당 quercetin equivalent(Q.E.) μg 으로 나타내었다.

2. 추출물 공정의 최적화 및 대량생산 공정 확립

가. 추출물 공정의 최적화

(1) 시료 및 시약

본 실험에서는 국내에서 체계적으로 뽕나무를 재배중인 충남 농업기술원 잠사곤충연구소와 경기 양평 지역에서 재배된 뽕나무 가지(상지, *Ramulus Mori*)를 사용하였다.

본 연구의 HPLC 분석에서 사용된 acetonitrile, ethanol, methanol은 J. T. Baker사에서 구입하여 사용하였고, oxyresveratrol 표준품은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

(2) 상지주정추출액 제조

상지주정추출액은 1000 mL 둥근 플라스크에 절단된 상지 시료 50 g과 80% 주정용 에탄올 400 mL를 첨가하여 95°C 항온수조(J-BS3D, Jisico, Korea)에서 2시간 동안 환류 추출하여 제조하였다. 상지주정추출액은 샘플당 3개를 추출하여 HPLC 분석하였다.

(3) HPLC 분석 조건

상지주정추출액내의 옥시레스베라트롤은 HPLC(YL9100 HPLC system, 영린기기)를 이용하여 분석하였다(Table 3.2-1). 분석 조건으로 컬럼은 Luna C₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm, Phenomenex, USA), 컬럼온도는 35°C, 자외선 검출파장은 325 nm, 유속은 0.7 mL/min, 샘플 주입량은 100 μL로 30분 동안 분석하였다. 이동상은 CH₃CN(A):10 mM H₃PO₄(B) 10:90(v/v)을 시작으로 하여 10분까지 A:B=25:75(v/v), 30분까지 A:B=50:50(v/v)의 기울기 조건으로 수행하였다.

Table 3.2-1. HPLC operating condition.

Parameter	Condition
Instrument	HPLC-UV/VIS (YL9100 HPLC system, Younglin Inst. Korea)
Column	Luna C ₁₈ (5 μm, 4.6×250 mm, 100 Å, Phenomenex, USA)
Mobile phase	Acetonitrile:10 mM H ₃ PO ₄ (v/v) 0 min, 10:90 0-10 min, 25:75 10-30 min, 50:50
Column temperature	35°C
Wavelength	325 nm
Injection volume	100 μL
flow rate	0.7 mL/min

(4) 표준물질 용액의 제조

옥시레스베라트롤의 직선성, 검출한계, 정량한계를 확인하기 위하여 10 mg 옥시레스베라

트를을 CH₃CN:10 mM H₃PO₄=35:65 (v/v) 용매 100 mL에 녹여 100 µg/mL 농도로 제조하였다. 제조된 표준용액을 2배씩 희석하여 1.56-50 µg/mL의 옥시레스베라트를 용액을 만들었다. 그 후 0.2 µm PTFE syringe filter (Chromafil O-20/15 MS, Macherey-Nagel, USA)로 여과하여 HPLC를 수행하였다.

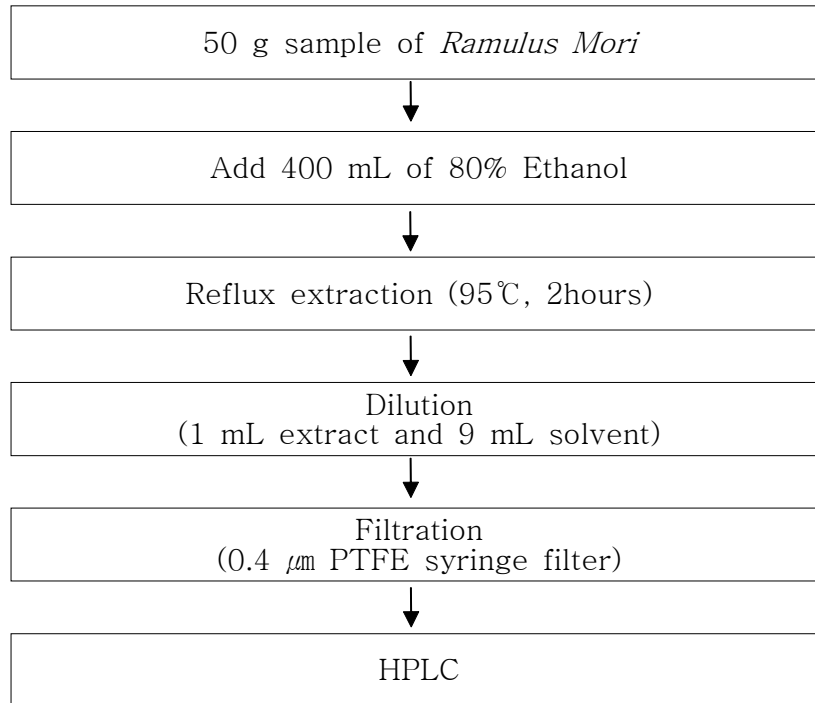
(5) HPLC에 의한 상지의 옥시레스베라트를 함량 분석

상지주정추출액은 HPLC 분석 시 CH₃CN:10 mM H₃PO₄=35:65 (v/v) 용매로 10배 희석한 후 행하였다. 즉, 상지주정추출액 1 mL에 상기용매 9 mL 첨가하여 10배 희석한 후, 0.2 µm PTFE syringe filter (Chromafil O-20/15 MS, Macherey-Nagel, USA)로 여과 후 HPLC를 수행하였다. 상지내의 옥시레스베라트를 함량은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{함량}(\mu\text{g}/\text{g D.W.}) = \frac{100 \times ((\text{면적} \times \text{희석배수}) - \text{절편}) \times \text{추출량}(\text{mL})}{\text{기울기} \times (\text{샘플량}(\text{g}) \times (100 - \text{수분함량}(\%)))}$$

(6) 상지 수분 함량 분석

상지의 옥시레스베라트를 량을 µg/g D.W로 나타내기 위하여 상지의 수분함량을 측정하였다. 수분 함량의 측정은 적외선 수분측정기(FD-610, KETT, Japan)를 이용하여 측정하였다. 약 5 g의 상지시료를 정확하게 단 후, 130°C에서 2분간 무게의 변화가 없는 조건으로 수분의 함량을 측정하였다. 상지시료의 수분 측정은 샘플 당 3회 수행하여 통계 처리하였다.



[상지주정추출물의 분석용 시료 제조]

(7) 숙성시간에 따른 유효성분 변화

숙성시간에 따른 상지의 유효성분 증가 실험은 30°C 배양기(KDO-150, Kukje)를 사용하여 각각 0일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 숙성 후에 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레스베라트를 함량을 분석하였다.

(8) 절편 길이에 따른 유효성분 변화

절편 길이에 따른 상지의 숙성 효과 실험은 전지가위(WS-904, 화신공업)를 사용하여 상지의 길이를 1-6 mm, 7-18 mm, 20-30 mm로 절단한 후 각각의 길이 샘플을 30°C 배양기에서 5일, 10일간 숙성 후 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레스베라트를 함량을 분석하였다.

(9) 미생물에 발효에 의한 유효성분 변화

미생물 발효 실험은 안전하다고 인정하는 미생물(Generally Recognized As Safe, GRAS)로

알려진 *Bacillus coagulans*, *Streptococcus*, *Rhodococcus capsulatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*를 사용하였다. 균의 접종은 각 제품 1 g을 증류수 100 mL에 용해한 후 분무기를 이용하여 500 g 상지에 접종하였다. 미생물을 접종한 각각의 상지 샘플은 30°C 배양기에서 6일, 12일간 숙성후 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레스베라트를 함량을 분석하였다.

(10) 상지 채집시기에 따른 숙성

채집시기에 따라 상지내의 옥시레스베라트량 차이가 다르다는 보고에 따라 1월, 2월, 4월, 8월, 10월, 11월, 12월 상지를 채집하여 채집시기에 따른 상지의 숙성 효과를 확인하였다.

시기에 따라 채집된 상지 샘플은 30°C 배양기에서 7일간 숙성 후 수분측정 및 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레스베라트 함량을 분석하였다.

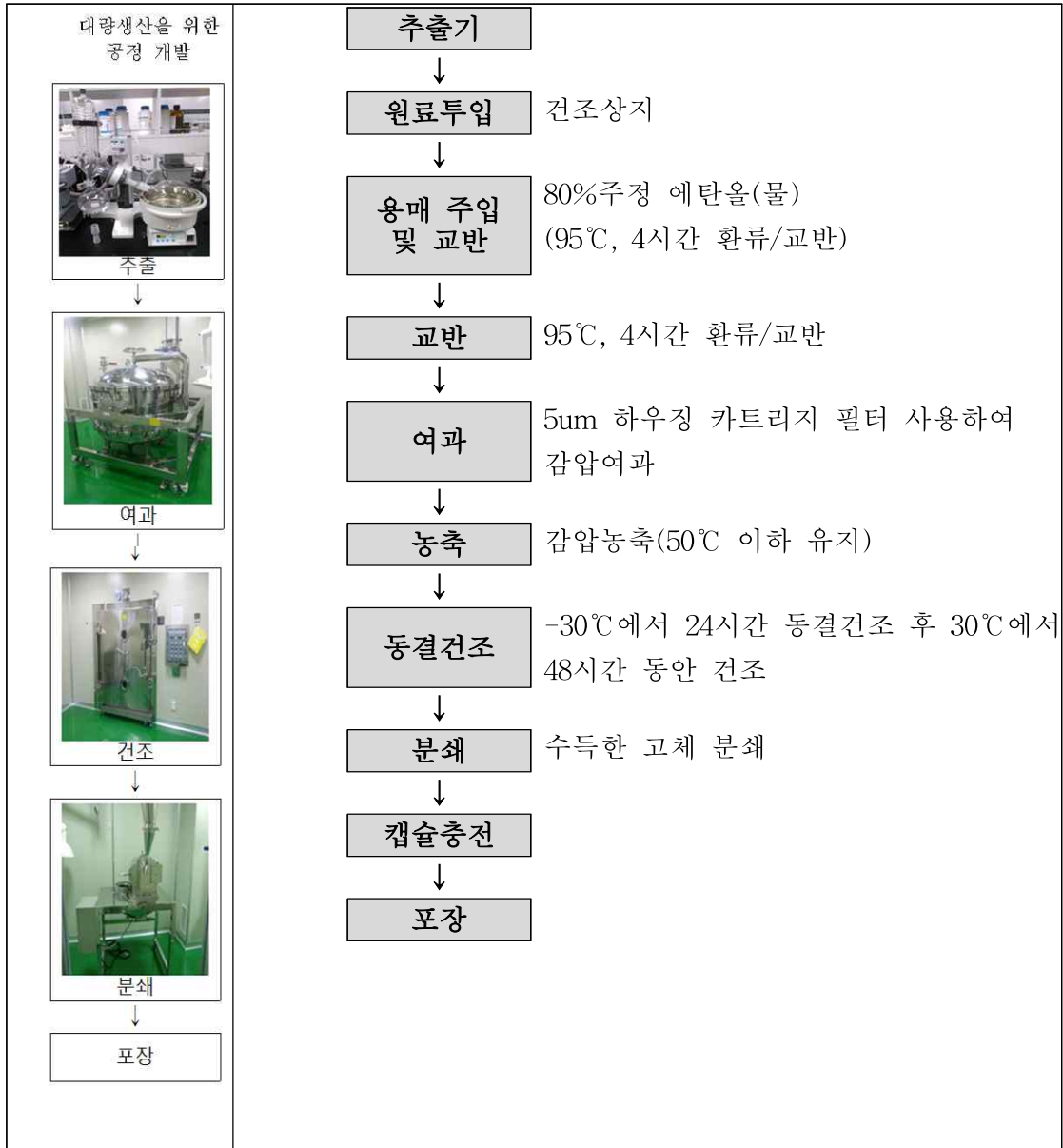
(11) 대량 상지의 숙성 효과

250 kg의 수원뽕 및 청일뽕 상지를 채집하여 대량 숙성시의 축적 효과를 확인하였다. 2월 24일 상지를 채집한 후 고압세척기로 세척하고 이를 15-30 mm 길이로 절단하였다. 절단된 상지샘플을 32.5°C 배양기(영농조합 제품명)에서 5일 숙성 후 수분을 측정하고 상지주정추출액을 제조하여 HPLC를 사용하여 옥시레스베라트 함량을 분석하였다.

(12) 통계 처리

실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS software (version 12.0, SPSS Inc.)을 이용하여 표준편차와 평균을 그래프로 나타내었다. 또한 유의적 차이가 있는 항목은 Duncan's multiple test로 $p < 0.05$ 수준으로 통계적 유의성으로 검정하였다.

나. 대량 생산 조건 확립



3. 기능성 물질 함유 추출물의 다중 기능성 평가

가. 상지주정추출물의 항산화 효과

(1) 시약

항산화능 분석에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3-

ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), oxyresveratrol, resveratrol, L-ascorbic acid, quercetin, rutin hydrate, kaempferol, (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid(trolox), gallic acid, Folin & Ciocalteu's phenol reagent는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 이들 이외의 항산화능 분석에 사용된 potassium persulfate, sodium acetate trihydrate, iron(III) chloride hexahydrate, aluminium nitrate nonahydrate, potassium acetate, methyl alcohol, Fluorescein은 대정화금(주), hydrochloric acid, sodium carbohydrate anhydrous, iron(II) sulfate, Potassium phosphate-monobasic, Potassium phosphate-dibasic는 덕산화학(주)에서 구입하였다. ORAC assay에 사용된 AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Ascorbic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였고 oxyresveratrol은 SAMKYUNG COSTECH 사 제품을 사용하였다. SOD activity assay에 사용된 SOD assay kit 는 Biovision(USA)사 제품을 사용하였다. 또한 mouse 유래의 3T3-L1 cell (KCLB 10092.1)을 sample로 사용하였다. Trizma base, β -ME(β -mercaptoethanol), PMSF((PhenylMethaneSulfonylFluoride) Ascorbic acid, NAC(N-acetyl cysteine)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였고, Coenzyme Q10은 대응제약(한국), HCl (Hydrogen chloride)은 DUKSAN PHARMACEUTICAL co.(한국)사, Triton X-100는 Amersham Biosciences (USA) 사 제품을 사용하였다.

β -Carotene, ascorbic acid, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), horseradish peroxidase, resveratrol, quercetin, sodium hypochlorite은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, linoleic acid, taurine, chloroform, isopropyl alcohol은 DAEJUNG CHEMICALS (한국), BHT(Butylated Hydroxy Toluene), hydrogen peroxide, sodium hydroxide, potassium iodide, DMSO (Dimethyl sulfoxide)는 SAMCHUN PURE CHEMICALS Co. (한국), tween 40은 DUKSAN PHARMACEUTICAL Co. (한국), PBS(Phosphate buffered saline)은 AMRESCO (USA), phenol red는 JUNSEI, H2DCF-DA는 Invitrogen, MEM(Minimum essential medium), FBS(Fetal bovine serum), trypsin EDTA, Penicillin streptomycin, HBSS(Hank's balanced salt solution)는 GE Healthcare Life Science 제품을 사용하였다.

(2) DPPH 라디칼 소거능 측정

시료의 전자공여능을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다(4).

항산화 물질의 가장 큰 특징적인 기작은 자유 라디칼 (free radical)과 반응하는 것이며, 이 기작을 이용하여 항산화 활성이 있다고 생각되는 물질의 항산화능을 측정한다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 화학적으로 안정화된 수용성 라디칼이며 보라색을 띠는 화합물이다. 이 라디칼은 알코올 등 유기용매에서 안정하며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나서 환원되면 옅은 노란색으로 변하게 된다. 이러한 색의 변화는 항산화능의 척도로서, 항산화능이 뛰어난 시료 또는 농도가 진한 시료를 처리하면 색의 변화가 뚜렷하고 효과가 떨어지는 시료나 농도가 옅은 시료를 처리하면 보라색에서 많은 변화가 일어나지 않는다. 이렇듯 DPPH assay는 육안으로도 색의 변화를 통해 항산화능을 알 수 있지만 특별히 보라색이 517 nm에서 감지된다는 점을 이용하여 spectrophotometer를 통해 측정이 가능하다.

96-well plate에 농도별 시료 100 μ L와 0.1 mM DPPH 용액 100 μ L를 첨가한 후, 실온에서 10분간 반응시켰다. Microplate reader (UVM 340, Biochrom)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀ (Inhibitory concentration 50%)을 사용하였다.

(3) ABTS 라디칼 소거능 측정

시료의 ABTS 라디칼 소거능을 보기 위해 Roberta 등의 방법(5)을 본 실험에 맞게 변형하여 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능은 DPPH assay와 원리는 동일하다. 인체 내에서 생성되는 라디칼로 실험하는 것이 어렵기 때문에 다른 라디칼을 대상으로 in vitro 실험을 하여 인체 내에서의 라디칼 소거능 (radical scavenging activity)을 간접적으로 확인하는 방법이다. ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)]는 Potassium persulfate와 반응 시 산화되어 ABTS radical cation으로 변화되고, 이는 734 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 청록색 화합물이다. 이러한 ABTS radical cation은 항산화 활성이 있는 물질과 만나서 ABTS로 환원되면서 옅어지게 되고 이러한 색의 변화를 통해 육안으로 시료의 항산

화능을 알 수 있다. 또한 spectrophotometer를 통해 734 nm에서의 흡광도를 통해 항산화능을 측정할 수 있다.

96-well plate에 농도별 시료 50 μ L와 ABTS 라디칼 용액 150 μ L를 첨가한 후 실온에서 6분간 반응시켰다. Microplate reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 ABTS 라디칼 소거능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 산출하였다.

$$\text{라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀ (Inhibitory concentration 50%)을 사용하였다.

(4) FRAP 분석

시료의 FRAP 분석은 Sean 등의 방법(6)을 변형하여 분석하였다. FRAP assay는 The Ferric Reducing Antioxidant Power assay 의 약자로서 항산화 활성이 있는 물질에 의해 ferric ion(Fe³⁺)이 ferrous(Fe²⁺)로 전환 되어지는 과정을 분석함으로써 시료내의 총 항산화능을 측정하는 방법이다. 대부분의 항산화제(antioxidant)가 환원력(reducing power)을 가지고 있다는 점에서 착안하여 낮은 pH 에서 환원제에 의해 3가철[Fe(III)]이 2가철Fe[(II)]로 환원되는 원리를 기초로 고안되어진 방법이다. 593 nm에서 감지되는 ferrous TPTZ complex [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺의 광흡수를 통해 항산화능을 측정한다. 다른 Total antioxidant measurement와 비교했을 때 반응성이 약한 ROS에 대한 항산화능을 측정하기에 효과적이다. 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 10 mM TPTZ 용액, 20 mM FeCl₃·6H₂O 용액을 10:1:1(v:v:v) 비율로 혼합한 FRAP 용액을 분석하기 전에 만들어 30분간 35°C에서 반응시켰다. 96-well plate에 농도별 시료 30 μ L와 FRAP 용액 225 μ L를 첨가하여 실온에서 8분간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화능은 FeSO₄·7H₂O의 표준곡선을 통하여 시료 μ g당 iron(II) sulfate equivalent(I.S.E.) μ g으로 나타내었다.

(5) ORAC assay

ORAC assay는 Oxygen Radical Antioxidant Capacity assay의 약자로서 AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride)에 의해 생성된 peroxy radical (ROO⁻)로 인해 Fluorescein이 산화되어 형광을 잃는 반응을 이용한다. 이 반응 중에 항산화 활성이 있는 물질이 첨가되어지면 Fluorescein의 oxidative degradation을 저해하게 되고 이에 따라 Fluorescein이 형광을 잃는 속도를 지연시키게 되는데 이러한 지연 정도에 따라 다양한 물질의 항산화능을 측정할 수 있다. 이 방법의 장점은 항산화 작용의 지연시간을 계산에 넣는다는 것이다. 따라서 식품이나 식품 첨가물과 같이 복잡한 성분들이 서로 다른 반응 속도로 작용할 때 이러한 각 성분들이 결합되어 나타내는 종합적인 항산화 효과를 측정할 때 효과적인 방법이다.

먼저 potassium phosphate-monobasic과 potassium phosphate-dibasic을 이용하여 Phosphate buffer (75 mM pH 7.4)를 제조하고 이를 이용하여 AAPH solution 40 mM (peroxy radical generator)를 제조하였다. 본 실험에서는 상지주정추출물과 유효성분인 oxyresveratrol, 양성 대조군으로 항산화 활성이 있다고 알려진 물질인 ascorbic acid와 trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)를 사용하였다. 96-well plate에 methanol에 녹인 Fluorescein 50 nM을 120 μ l씩 분주하였고 동일하게 methanol에 녹인 상지 추출물, oxyresveratrol, ascorbic acid, trolox를 serial dilution을 이용해 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 20 μ l씩 더하여 총 140 μ l의 볼륨(Fluorescein 120 μ l+ sample 20 μ l)을 맞추고 차광하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 preincubate 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정했다. 그 후 제조된 AAPH solution 40 mM을 각 well에 60 μ l씩 첨가하고 (Ex/Em : 485 / 528 nm)에서 60min 동안 kinetic assay로 측정하였다. Kinetic assay로 측정된 값을 이용해 graph를 그리고 곡선의 아래 면적, 즉 AUC (Area Under the Curve)의 값을 sample과 blank 각각에서 구하고 그 값의 차인 Net AUC 값을 통해 항산화능을 측정하였다. 항산화능 지수로는 양성 대조군으로 사용된 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)를 기준으로 한 TE (Trolox Equivalent)를 사용하였다.

(6) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

SOD(Superoxide dismutase)는 가장 중요한 항산화 효소의 하나로 superoxide anion(O⁻)을 Hydrogen peroxide(H₂O₂)와 Oxygen(O₂)으로 분해한다. SOD의 활성을 측정하기 위한 것으로 몇 가지 직접/간접적인 측정 방법이 고안되었는데 그중에서도 WST-1 (Water

Soluble Tetrazolium salt, (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl) -5-(2,4-disulfo-phenyl) -2H-tetrazolium, monosodium salt)를 이용한 측정방법이 많이 사용된다. WST-1은 superoxide anion에 의해 환원되어 수용성의 formazan dye를 생성한다. 이렇게 WST-1이 환원되는 속도는 xanthine oxidase(XO)의 활성화에 비례하게 되는데 SOD는 이러한 XO의 활성을 저해시키게 되는데 이러한 저해율(inhibition rate)을 통해 SOD activity를 간접적으로 측정할 수 있다.

Sample preparation으로 mouse 유래의 3T3-L1 cell(5.0×10^6 cell)을 차가운 lysis buffer (0.1M Tris/HCl, pH 7.4 containing 0.5% Triton X-100, 5 mM β -ME, 0.1 mg/ml PMSF) 1 ml 에 넣고 centrifuge($14000 \times g$, 5 min, $4^\circ C$)하여 lysate를 생성하였다. 이때 cell debris(pellet)는 버리고 위에 뜨는 상층액(supernatant)을 모아서 ice에 두고 사용하였다. 본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지 추출물과 유효 성분인 oxyresveratrol이고 양성 대조군으로 항산화 활성이 있다고 알려진 물질인 ascorbic acid(Vitamin C)와 NAC(N-acetyl cysteine)를 사용하였다. 또한 시중에서 판매되고 있는 CoQ10을 함께 사용하여 비교하였다. 물질의 최종농도는 상지 추출물 20 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$, NAC 5 mM, Ascorbic acid 20 $\mu g/ml$, Oxyresveratrol 20 $\mu g/ml$, CoQ10 74 $\mu g/ml$ (총량 370 mg 중 CoQ10 함량 100 mg)로 제조하였다. 96-well plate에 각 well당 총 부피 240 μl 중, Enzyme working solution (Superoxide) 20 μl , 각각의 물질 10 μl , WST working solution 200 μl 를 넣고 한 그룹(S)은 Sample solution (Supernatant) 20 μl 씩, 다른 그룹(B1)은 Sample solution 대신 D.W. 20 μl 씩 분주한 후 잘 섞고 $37^\circ C$, 20 min에서 incubate 시킨 후 Spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. S그룹과 B1그룹은 각자의 blank 값인 B2 (Sample sol 20 μl + WST 200 μl + Dilution buffer 20 μl)와 B3(D.W. 20 μl + WST 200 μl + Dilution buffer 20 μl)를 측정하여 흡광도 값을 조정하였다. 50% 저해 반응을 보이는 농도를 1 U으로 정하였다.

【수식 1】

$$SOD \text{ activity (inhibition rate \%)} = \frac{(B1 - B3) - (S - B2)}{(B1 - B3)} \times 100$$

(7) β -Carotene bleaching assay

β -Carotene bleaching assay는 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 food chemistry 분야에서 많이 사용되는 방법이다. β -carotene은 vitamin A의 전구체로서 π -conjugation

structure를 갖고 있는 유기화합물이다. β -carotene은 자유라디칼과 반응하여 π -conjugation structure 내의 C=C 이중결합이 깨지면서 변색되게 되는데 이러한 색의 변화를 통해 항산화능을 측정할 수 있다. 자유라디칼은 Linoleic acid의 autoxidation을 통해 생성된다. Linoleic acid는 공기 중의 산소와 반응하여 상온에서 autoxidation을 일으키고 이러한 반응을 통해 lipid radical 또는 lipid peroxy radical ($L\cdot$ or $LOO\cdot$)을 생성한다. 이렇게 생성된 자유라디칼은 β -carotene과 반응하여 변색을 일으키는데 함께 처리된 antioxidant는 이 반응을 저해하고 이러한 변색반응의 저해정도를 Microplate reader를 이용해 470 nm에서 측정된 흡광도를 통해 항산화능을 측정할 수 있다.

먼저 chloroform에 β -carotene을 1 mg/ml의 농도로 녹인 β -carotene solution을 만들었다. 이러한 β -carotene solution 300 μ l에 linoleic acid 22 μ l와 200 μ l의 Tween 40을 첨가하여 β -carotene/linoleic acid mixture를 만든 후 이를 삼각플라스크에 넣고 증류수로 희석(OD : 0.6~0.7) 한 후 산소와 충분히 반응할 수 있도록 shaking incubator를 통해 saturation 시켰다. 96-well plate에 β -carotene/linoleic acid mixture를 180 μ l씩 분주하였고 methanol에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, BHT를 serial dilution 하여 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 20 μ l씩 더하여 총 200 μ l (β -carotene/linoleic acid mixture 180 μ l + sample 20 μ l)로 맞추고 차광하였다. 이를 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 45°C에서 5분 간격으로 2시간 동안 470 nm에서 Kinetic assay로 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample } (S_0 - S_2)}{\text{Negative control } (N_0 - N_2)}\right) \times 100$$

처음 측정된 흡광도값 (S_0)에서 2시간 후의 흡광도값 (S_2)의 차 ($S_0 - S_2$)를 계산하고 음성대조군에 대해 시료물질이 반응의 50%를 억제한 농도인 IC_{50} (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다.

본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 양성 대조군으로 항산화 활성이 있다고 알려진 물질인 BHT (Butylated Hydroxy Toluene)를 사용하여 BE (BHT equivalent)로 나타내었다.

(8) HRPO assay

HRPO assay는 Horseradish peroxidase-mediated oxidation 반응에 기초한 항산화능 측정 방법이다. Horseradish peroxidase는 서양고추냉이 (horseradish)에 함유하고 있는 과산화효소로서 hydrogen peroxide의 존재 하에 substrate의 산화를 촉진하는 효소이다. 주로 pH indicator로 사용되고 있는 phenol red(phenolsulfonphthalein)는 산화환원 반응에 따라 색이 변하게 되는데 이러한 성질을 이용하면 horseradish peroxidase-mediated oxidation의 산화 정도를 측정할 수 있다. 이 때 antioxidant를 함께 처리하면 antioxidant는 hydrogen peroxide를 scavenging하여 phenol red의 산화를 저해하고 이러한 변색반응의 저해 정도를 microplate reader를 이용해 610 nm에서 측정된 흡광도를 통해 항산화능을 측정할 수 있다.

먼저 96-well plate에 각각 10 μ l의 hydrogen peroxide와 80 μ l의 PBS (pH 7.4)를 넣고 methanol에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, resveratrol, ascorbic acid, trolox를 serial dilution하여 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 10 μ l씩 더하여 총 100 μ l의 (H₂O₂ 10 μ l + sample 10 μ l + PBS (pH 7.4) 80 μ l) 반응액을 만들고 37°C에서 15분 동안 방치한다. 이어서 Phenol red (0.4mg/ml) 50 μ l와 HRPO (17 U/ml) 50 μ l를 각각 첨가하여 총 볼륨 200 μ l를 맞추고 15분 동안 반응시킨 후 NaOH (400 mM) 50 μ l를 넣고 차광하였다. 이를 microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample}}{\text{Negative control}}\right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀ (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다.

본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 항산화 활성이 있다고 알려진 ascorbic acid, resveratrol, trolox와 비교하기 위해 TE(Trolox equivalent)로 나타내었다.

(9) Taurine Test

Taurine test는 hypochlorous acid와 taurine의 반응에 기초한 항산화능 측정 방법이다. Taurine은 담즙으로부터 분리된 황 아미노산의 일종으로 다른 아미노산과 구별되는 특이한 화학적, 생물학적 특성을 지니고 있다. Taurine은 생체 내에서 여러 가지 생리 활성 기능을 갖고 있는데 그 중 하나는 염증반응에서 생성되는 HOCl (hypochlorous acid)로부터 세포를 보호하는 기능이다. 염증반응이 일어나게 되면 염증 관련 세포 (다형핵호중구, 대식세포, 단세포 등)가 활성화 되고 이로 인해 세포독성이 매우 강한 HOCl의 생성 및 분비가 증가된다.

이때 taurine은 HOCl과 반응하여 taurine chloramine을 형성함으로써 일차적으로 독성이 강한 HOCl을 제거하고 세포를 보호하게 된다. 한편 이렇게 생성된 taurine chloramine은 potassium iodide와 반응하여 350 nm에서 흡광수를 갖고 생성된 taurine chloramine이 많을수록 흡광도 값은 높게 된다. 따라서 antioxidant가 HOCl을 소거하면 taurine chloramine의 생성이 억제되고 potassium iodide와의 반응도 줄어들게 되어 이를 이용하여 항산화능을 측정할 수 있게 된다.

먼저 96-well plate에 methanol에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, resveratrol, ascorbic acid, trolox를 serial dilution 하여 여러 농도로 제조하여 각 농도별로 10 μ l씩 넣고 taurine(150 mM)을 10 μ l씩 각각 넣어주고 이어서 sodium hypochlorite(3 mM) 10 μ l와 PBS (pH 7.4) 70 μ l를 더하여 총 100 μ l의 (HOCl 10 μ l + sample 10 μ l + PBS (pH 7.4) 70 μ l) 반응액을 만들고 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 이어서 potassium iodide (4 mM) 100 μ l를 넣고 차광하였다. 이를 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 350 nm에서 흡광도를 측정했다. 시료의 항산화능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample}}{\text{Negative control}}\right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀ (50% Inhibitory concentration)을 사용하였다.

본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 항산화 활성이 있다고 알려진 ascorbic acid, resveratrol, trolox와 비교하기 위해 TE (Trolox equivalent)로 나타내었다.

(10) CAA assay

CAA assay는 Cellular Antioxidant Activity assay의 약자로서 cell 내에서의 항산화능을 측정할 수 있는 방법이다. 기존의 *in vitro* 항산화능 측정 방법들은 물질간의 직접적인 반응 (처리한 시료가 ROS와 직접 반응하여 환원)을 통해 항산화능을 측정하는 chemical-based assay였다면 CAA assay는 세포 내에서의 흡수와 반응 등의 bioavailability를 고려한 cellular-based assay 라고 할 수 있다. 기본적인 측정원리는 HepG2 cell에 DCFH₂-DA (dichlorofluorescein diacetate)라는 형광 dye를 넣으면 DCFH₂ 형태로 세포막을 통과하고 세포 내에 있는 ROS에 의해 DCF 형태로 산화되어 발광하게 된다. ROS의 극대화를 위해서 free radical generator로 AAPH (2,2'-azobis 2-amidino-propane dihydrochloride)를 함께 넣어주는데 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical (ROO⁻)로 인해 DCFH₂-DA를 산화시킨다. 이때 함께 넣어준 compound는 세포내로 흡수되어 세포내에 있는 ROS를 소거함에 따라 DCF의 산화를 저해하여 발광량을 줄이게 된다. 줄어든 발광량은 물질의 항산화능과 비례하기 때문에 이를 이용하여 세포내에서 물질의 항산화능을 측정할 수 있다.

먼저 96-well plate의 각 well 마다 HepG2 cell을 6×10^4 개만큼 seeding 한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator 안에서 배양시켰다. 이때 배지는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin-streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 사용하였다. 24시간 후에 100 μ l PBS로 washing 해주고 다시 100 μ l의 MEM 배지에 25 μ M의 DCFH₂-DA와 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, quercetin을 serial dilution 하여 여러 농도가 되도록 제조하여 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator 안에서 1시간 동안 배양하였다. 이때 사용하는 배지는 FBS가 첨가되지 않는 배지를 사용해야 하는데 그 이유는 FBS가 DCFH₂-DA를 산화시키기 때문이다. 1시간 후에 100 μ l PBS로 washing 해주고 HBSS에 녹인 600 μ M의 AAPH를 각 well에 넣어주었다. 차광상태에서 Microplate reader (Spectra MAX M5, Molecular Devices)를 이용해 1시간 동안 5분 간격으로 형광 (ex : 485 nm em: 535 nm)을 측정하였다. 측정된 fluorescence 값을 시간에 따른 곡선그래프를 그려 각 물질의 처리농도에 따른 AUC(Area under the curve) 값을 구하였다. 그 후 아래 식을 이용하여 CAA 값을 구하였다.

$$CAA \text{ unit} = \left(1 - \frac{\text{시료의 AUC 값}}{\text{대조군의 AUC 값}} \right) \times 100$$

항산화능 지수로는 시료물질의 최대 효과의 50%를 나타내는 농도인 EC₅₀ (half maximal effective concentration)을 사용하였다.

본 실험에서 항산화능을 측정하고자 하는 물질은 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO)과 그 유효 성분인 oxyresveratrol이고 항산화 활성이 있다고 알려진 quercetin을 양성대조군으로 사용하여 QE (quercetin equivalent)로 나타내었다.

나. 상지주정추출물의 혈행개선 효과

(1) 실험방법

상지 주정 추출물이 혈행개선에 도움이 되는지 확인하기 위해 앞서 혈소판에 대한 독성시험을 실시하였고, 시험동물에 21일간 물질을 투여한 후 항 혈전시험, 혈소판 및 혈액응고 억제 시험을 수행하였다.

(가) 재료 및 동물실험

실험에 사용할 상지 주정 추출분말의 제조는 잘게 잘린 상지 1,000 g을 증류수로 깨끗하게 세척한 후, 80 % 주정용 에탄올 8,000 mL를 첨가하여 초음파 세척기(H0429115, Hwashin Instrument Co.)에서 48 시간 추출하였다. 추출이 끝난 주정추출물은 GFC 여과지 (Cat No. 1822-047, Whatman®)를 이용하여 감압 여과 후 감압 증류기(N-1000, Eyla)를 사용하여 약 500 mL까지 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 80 °C 초저온냉동고(DF8520, Ilshin Lab Co.)에서 동결 후, 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co.)를 사용하여 48 시간 동안 건조하였다. 양성대조군으로 사용한 은행나무 추출물은 GNC(Pittsburgh, PA, USA)의 Ginkgo Biloba를 이용하였다. 실험동물인 5주령 수컷 Spague-Dewley (SD) rat은 ㈜대한바이오링크에서 구입하였고, 7주령 수컷 SD rat과 8주령 ICR mouse는 ㈜코아텍에서 구입하여 1주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육장의 실내 온도는 20~24°C, 상대습도는 45.0~55.0%, 조도는 200~300 Lux로 12시간 명암주기가 되도록 조절하였다. 체중 측정은 시험물질 투여 개시 전에 측정하고 시험물질 투여 후 주 2회 측정하였다. 본 연구에서의 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리 위원회의 승인 (승인번호: KUIACUC-20140515-2) 하에 수행되었다.

(나) 세포독성시험

세포막의 손상으로 인한 세포내의 Lactate dehydrogenase (LDH) 유리를 혈소판 손상의 지표로 이용하였다. 200~250g인 8주령 수컷 SD rat의 복대정맥에서 혈액을 얻어 항응고제 3.8% Sodium citrate 처리를 한 후, 950 rpm으로 10분간 원심분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 분리하고, 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 혈구계수기(MELET SCHLOESING Laboratories, Osny, France)를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되도록 희석하고, 2시간 이내에 사용하였다. 희석한 PRP에 0.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml의 농도로 물질을 가하여 37°C에서 5분 동안 incubation 후, 1분 동안 10,000 g에서 원심분리 하였다. 원심분리한 상등액 50 μl 를 tris-EDTA buffer (56mM Tris base, 5.6mM EDTA, pH 7.4)에 β -NADH (sigma)를 0.17 mM로 녹인 용액 1.8 ml에 가한 다음 37°C에서 5분 동안 incubation 하였다. 여기에 37°C에서 미리 incubation 해 놓은 14mM pyruvate (sigma) 용액 100 μl 를 가하고, 즉시 340 nm의 파장에서 흡광도 감소율을 측정하였다. 세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 0.5% Triton X-100을 처리하여 모든 혈소판이 죽었을 때를 100%로 기준하여 환산하였다.

(다) 항 혈전 활성 시험

180~200g인 6주령 수컷 SD rat을 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3개 시험물질 투여군과 용매대조군 및 은행잎추출물 (100 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였다. 각 군당 6마리씩 구성하여 투여시 체중을 측정하고 10 ml/kg으로 환산하여, 매 1회, 21일간 경구 투여하였다. 시험물질 마지막 경구투여 45분 후에 Isoflurane (Piramal, PA, USA)로 흡입마취하고 목을 절개하여 경동맥을 노출시킨다. 시험물질 투여 60분후에 70% FeCl_3 를 적신 2 mm²의 Whatman No.1 filter paper를 경동맥에 올려놓고 혈류측정기(Omegawave, Tokyo, Japan)를 이용하여 혈류를 측정하였다. 10분후 Whatman filter paper를 제거하고 50분 동안 (총 60분) 혈류량을 기록하였다. 처음 혈류량의 10%가 되었을 때를 경동맥 폐색이 일어난 것으로 판단하였다.

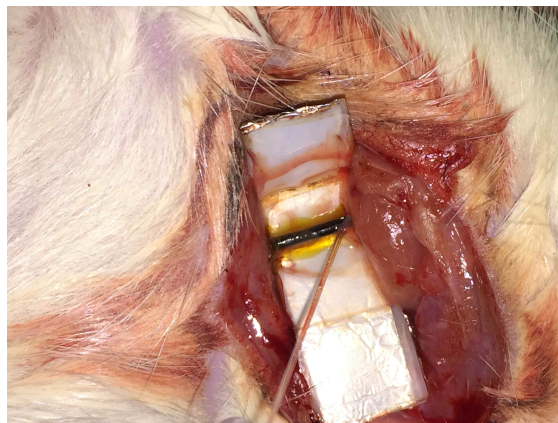
<항혈전 시험을 위한 혈류측정 관련 사진>



A) 혈관 노출 후, FeCl_3 를 적신 종이를 붙여서 혈전을 유도하기 시작함. 혈관을 노출시켜 고정시키기 위해 혈관 아래쪽으로 혈류흐름에 방해가 되지 않도록 지지구조물을 삽입한 상태임.



B) FeCl_3 를 적신 종이를 막 떼어낸 사진으로, 종이를 부착했던 혈관부분에 혈전이 생성되기 시작한 것을 볼 수 있음.



C) 혈전이 생성되어 선홍빛이었던 혈관이 전부 까맣게 변한 상태임.



[혈류측정기]

(라) 혈소판 응집 억제 시험

180~200g인 6주령 수컷 SD rat을 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3개 시험물질 투여 군과 용매대조군 및 은행잎추출물 (100 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였다. 각 군당 6마리씩 구성하여 투여시 체중을 측정하고 10 ml/kg으로 환산하여, 매 1회, 21일간 경구 투여하였다. 시험물질 경구투여 1시간 후에 시험동물의 복대정맥에서 혈액 9 ml을 채취하고 항응고제 3.8% Sodium citrate 1ml을 처리하였다. 950rpm으로 10분간 원심분리하여 PRP) 분리하고, 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 PPP) 얻었다. PRP는 혈구계수기를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 3×10^8 /ml가 되도록 희석하였다. 혈소판 응집은 Chrono-Log aggregometer(Chrono-Log, Havertown, USA)를 사용하여 측정하였다. 정량된 혈소판을 cuvette에 넣고 37°C에서 10분간 incubation한 후 1200 rpm으로 교반하면서 baseline이 안정화 되면 혈소판 응집촉진물질인 adenosine diphosphate(ADP)와 Collagen을 넣고 반응하여 10분간 응집률을 측정하였다.



[혈행개선 시험에 사용된 aggregometer]

(마) 혈액 응고 억제 시험

혈액응고에 대한 효과를 평가하고자 prothrombin time (PT)과 plasma-activated partial thromboplastin time (aPTT)을 자동혈액응고분석기 ACL100 (Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)로 측정하였다. PPP를 37°C에서 7분간 incubation 하여 50 μ l PPP와 PT reagent (RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory) 100 μ l을 섞어 응고까지의 시간을 측정하였다. APTT 또한 혈장과 시료를 섞어 37°C에서 7분간 incubation하여 혈장 50 μ l에 APTT reagent (SynthASil, Instrumentation Laboratory) 53 μ l를 첨가한 후 CaCl₂ 50 μ l를 넣어 응고까지의 시간을 측정하였다.

(바) 출혈지연시간 측정

30~35g의 수컷 ICR mouse를 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 3개 시험물질 투여군과 용매대조군 및 aspirin (50 mg/kg)의 양성대조군으로 설정하였고, 시료를 경구투여 하였다. 2시간 후 에테르로 마취하여 37°C로 체온을 유지시키고 꼬리를 끝에서 3 mm 자른 후 식염수가 들어있는 투명한 15 ml tube에 꼬리 끝을 넣고 관찰하였다. 혈액이 퍼지는 것을 확인하고 혈액이 더 이상 퍼지지 않고 출혈이 멈춘 시간을 측정하였다.

(사) 통계처리

One-way analysis of variation(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 용매대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test를 실시하였다 ($p < 0.05$)

다. 상지주정추출물의 콜레스테롤 저하 효과

(가) 시약 및 재료

상지주정추출물의 콜레스테롤 저하 동물실험에 대조군으로 사용된 Simvastatin과 Oxyresveratrol은 Sigma(St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였고, Omega-3는 V-Plus High Strength OMEGA-3 (Green Health PTY Ltd, Seven Hills, NSW 2147, Australia) 제품을 사용하였다.

(나) 실험동물

본 실험에 사용된 100~110g의 Sprague Dawley Rat은 코아텍에서 48마리를 분양 받았다.

(다) 실험동물 사육

약 100~110 g의 5주령 음성 Sprague Dawley Rat을 분양받은 후 바로 동물실험실로 옮겨 1주일간 순화사육 과정을 거쳤다. 동물 실험실의 환경은 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 환기회수 15 회/h, 조도 150~300 Lux, 조명주기 12 시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 물을 자유롭게 공급하였다. 사료는 피드랩사에서 주문한 일반 사료와 고콜레스테롤 사료 (Fig. 3.3-1)를 제조하여 사용하였고 매일 일정한 시간에 사료 섭취량을 확인 하였으며, 멸균된 깔짚과 polycarbonate재질의 투명한 케이지를 사용하여 바깥에서 동물의 상태를 살피기에 용이하게 하였다. 물통은 실리콘 재질의 뚜껑을 사용하여 누수를 방지하고, 500 mL부피에 정수된 물을 공급하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리 위원회의 승인 (승인번호: KUIACUC-2014-43) 하에 수행되었다.



Fig. 3.3-1. 실험에 사용된 조제 사료

(라) 동물 실험 과정

① 실험 동물 사육 및 상지 추출물의 투여

상지 추출물의 콜레스테롤 저하 효과를 시험하기 위하여 1주간 순화사육 과정을 거친 Rat들을 각각 6마리씩 8개의 그룹으로 나누었다. Group I은 음성대조군으로 10 mL/kg의 증류수를 rat전용 위관(zonde)을 사용하여 경구투여 하였고, 일반 사료를 공급하였다. Group II(Model Control)은 10 mL/kg의 증류수를 경구투여 하였고, 고콜레스테롤 사료(Table 3.3-1)를 공급하였다. Group III은 1 mg/kg의 simvastatin, Group IV는 2.5 mg/kg의 oxyresveratrol, Group V, VI 그리고 VII은 각각 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg의 상지추출물, Group VIII은 100 mg/kg Omega-3(V-Plus High Strength OMEGA-3, Green Health PTY Ltd, Seven Hills, NSW 2147, Australia)(Fig. 3.3-2)를 10 mL/kg의 증류수(증류수:DMSO, 9:1 v/v)에 녹여 경구투여 하였고, 고콜레스테롤 사료를 공급하였다(Table 3.3-2). 이와 같은 방법으로 28일 동안, 매일 일정한 시간에 경구투여 및 사료 섭취량을 측정하였다. 28일 째, 마지막 경구투여가 끝난 후 공급한 사료를 제거하여 식이섭취를 제한하였다. 식이 제한을 시킨 지 18시간 후에 동물을 이소플루란(Terrell, USA)(Fig. 3.3-3) 흡입마취제를 사용하여 마취 후 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 4시간 동안 응고를 시킨 뒤, 10,000 × g, 20분간 원심 분리하여 얻은 상층의 혈청을 혈액분석에 사용하였다. 혈청은 분석 시까지 -70℃에 보관하였다. 또한, 간 및 동맥 분석을 위하여, 간과 동맥을 적출하였고, 간과 동맥도 분석 시까지 -70℃에 보관하였다.



Fig. 3.3-2. Omega-3



Fig. 3.3-3. Isoflurane

Table 3.3-1. 사료의 조성

Components	Normal diet (g/100g)	Cholesterol diet (g/100g)
Casein	18.00	18.00
Mineral mix	4.00	4.00
Vitamin mix	1.00	1.00
Corn oil	5.00	5.00
Sucrose	5.00	5.00
Starch	61.80	60.55
Sodium cholate	-	0.25
Methionine	0.20	0.20
Cholesterol	-	1.00
Cellulose	5.00	5.00

Table 3.3-2. 실험군의 지정과 상지 주정 추출물의 복용량

Treatment groups	Diet	Treatment of test compound
음성대조군(NC)	정상 식이	증류수 10 ml/kg B.W
Model	고콜레스테롤 식이	증류수 10 ml/kg B.W
양성대조군(PC)	고콜레스테롤 식이	심바스타틴 1 mg/kg B.W
Oxy 2.5	고콜레스테롤 식이	옥시레스베라트롤 2.5 mg/kg B.W
상지 20	고콜레스테롤 식이	상지 주정 추출물 20 mg/kg B.W
상지 50	고콜레스테롤 식이	상지 주정 추출물 50 mg/kg B.W
상지 100	고콜레스테롤 식이	상지 주정 추출물 100 mg/kg B.W
Omega-3	고콜레스테롤 식이	Omega-3 100 mg/kg B.W

라. 상지주정추출물의 면역증강 효과

염증반응은 우리 몸의 감염 또는 조직의 손상을 통해 일어나게 되며, 염증성 장질환, 다발성 경화증 (multiple sclerosis) 및 자가면역질환 (autoimmune disease) 등의 원인이 된다. 이러한 반응은 macrophage, neutrophil 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, prostaglandin(PG)E₂, nitric oxide (NO) 등의 염증매개물질들을 분비하여 발생하게 된다. 이에 본 실험실에서는 RAW 264.7 mouse macrophage cell line을 이용하여 oxyresveratrol의 항염증효과를 측정하였다.

(1) 상지의 RAW 264.7 세포에 대한 세포 증식능 및 독성 실험

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml

streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.25 × 10⁵cells/ml로 cell수를 조정 한 후, 96 well 에 200 µl씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell 에 상지를 12.5~100 µg/ml을 처리하였다. 24시간 후, 상등액을 제거하고 5 mg/ml stock MTT (Amresco, USA)를 배지에 1/40 희석해서 넣은 후, 37°C incubator에서 1시간 반응시켰다. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거 한 후 DMSO를 100 µl 넣고 microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장으로 OD 값을 측정하였다. LDH는 상지 처리 후 24시간 후에, EZ-LDH cytotoxicity assay kit (Daeil Lab, Korea)를 이용하여 측정하였다.

(2) Nitric Oxide (NO) 측정

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10 % FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0 × 10⁶cells/ml로 cell수를 조정 한 후, 96 well 에 200 µl 씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell에 상지를 12.5, 25, 50 µg/ml 처리하였다. 과면역 유도를 위해 상지 처리 1시간 후, 1 µg/ml의 LPS를 처리하였다. 처리 후 24 시간 후, Sodium nitrite (NaNO₂)를 표준 물질로 사용하여 standard curve를 그려 이를 기준으로 상등액의 NO를 측정하였다. 측정 방법은 100 µl의 상등액에 동량의 Griess (1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₂PO₄) 시약을 섞은 후, 10분간 상온에서 반응한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Pro-inflammatory cytokines (TNF-α, MCP-1, IL-6 측정)

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0 × 10⁶cells/ml로 cell 수를 조정 한 후, 96 well에 200 µl씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell에 상지를 12.5, 25, 50 µg/ml 처리하였다. 과면역 유도를 위해 상지 처리 1시

간 후, 1 µg/ml의 LPS를 처리하였다. TNF-α (6 h), MCP-1 (12 h), IL-6 (24 h) 반응 후, 상등액에서 cytokine을 측정하였다. 측정방법은 제조사의 instruction을 참고하였다 (ELISA set, BD Biosciences, Oxnard, CA).

(4) Real-time PCR

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0 × 10⁶cells/ml로 cell 수를 조정 한 후, 6-well 에 2 ml 씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell 에 상지를 12.5, 25, 50 µg/ml 처리하였다. 과면역 유도를 위해 상지 처리 1 시간 후, 1 µg/ml의 LPS를 처리하였다. 24 시간 후, trizol을 이용하여 RNA를 분리한다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamo™HS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 StepOnePlus™Real-TimePCR System (Applied Biosystems, FosterCity,CA,USA) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다.

사용된 primer의 sequence는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Sense: 5' - AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC -3', Antisense: 5' - GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT -3'), COX-2 (Sense: 5' - CCC AGA GCT CCT TTT CAA CC -3', Antisense: 5' - ATT TGG CAC ATT TCT TCC CC -3'), iNOS2 (Sense: 5' - CTC CCC TCT CTC CCT TTC CT -3', Antisense: 5' - TGG AAA TTG GGG TAG GAA GG -3')이다. PCR 반응조건은 95°C 에서 10분간 pre-heat 과정을 거친 후, 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec , 72°C for 30 sec에서 40 cycle 반응시켰다. 결과는 ΔΔCt 값으로 상대 정량하였다.

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_{t_{\text{treated}}} - \Delta C_{t_{\text{untreated}}})$$

(5) Western blot

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5%CO₂-95% air조 성으로 배양하였다. Cell이

80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0×10^6 cells/ml로 cell 수를 조정 한 후, 60 mm dish에 4 ml 씩 seeding 한다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell 에 상지를 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리하였다. 과면역 유도를 위해 상지 처리 1 시간 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리하였다. 24 시간 후, Pro-prep (intron, Korea)을 이용하여 cell 안의 단백질을 얻었다. Bradford assay를 이용하여 각 sample의 protein 양을 측정 후 loading 양을 조정하였다. 사용된 1차 Ab는 GAPDH (Thermo MA5-15738, 1: 5,000), iNOS (Santa Cruze Biotechnology SC-650, 1:200), COX-2 (Novus Bio NB100-689, 1:2000) 이다. 사용된 2차 Ab는 Anti-mouse (Thermo NCI1430KR, 1:50,000), Anti-rabbit (Thermo NCI1460KR, 1: 10,000) 이다. 결합된 Ab는 WesternBright Sirius western blotting detection kit (Advansta, CA, USA)의 용액을 이용하여 FluorChem E (Proteinsimple, CA, USA)로 검출하였다.

마. 상지주정추출물과 oxyresveratrol의 장 기능 정상화 효과

장 상피세포층의 세포간극 (tight junction)의 개폐는 장관 내부로 식품 allergen의 이동과 관련이 있으며 장 상피세포의 tight junction이 손상을 입게 되면 장 투과도가 증가하게 된다. 증가된 장 투과도로 인해 내 독소와 같은 유해물질의 흡수가 증가되어 염증반응을 일으키게 되고 그로 인해 알레르기, 자가면역 질환 등이 발생한다. 또한 장 투과도 증가에 의해 크론병 (Crohn's disease)과 궤양성 대장염 (Ulcerative colitis) 을 비롯하여 당뇨와 같은 대사질환이 발병하는 것으로 알려져 있다. 크론병 (Crohn's disease)과 궤양성 대장염 (Ulcerative colitis)은 원인 불명인 만성질환으로 한번 걸리면 완치가 어렵고 재발을 반복함으로 이에 대한 예방법이 중요시 여겨지고 있다. 따라서 본 실험에서는 oxyresveratrol이 장 상피세포층의 세포간극(tight junction)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 human intestinal Caco-2 epithelial cell을 이용하여 tight junction과 관련이 되어 있는 유전자들의 발현량을 알아보았다. 또한 염증성 장질환 환자에서 뮤신의 생성으로 인한 점막층의 치유는 장 기능을 정상화 시키는데 가장 중요한 요소이다. 그러므로 human goblet cell-like 세포주인 LS 174T 세포를 이용하여 oxyresveratrol 이 뮤신생성을 증가시키는지 알아보았다.

(1) oxyresveratrol 에 의한 세포간극의 안정화 효과

(가) Cell viability (MTT assay)

MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양된 Caco-2 cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.25×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정한 후, 96 well에 200 µl 씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell 에 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하였다. 24 시간 후, 상등액을 제거하고 5 mg/ml stock MTT (Amresco, USA)를 MEM 배지에 1/40 희석해서 넣은 후, 37°C incubator에서 1 시간 반응시켰다. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거 한 후 DMSO를 100 µl 넣고 microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장으로 OD 값을 측정하였다.

(나) Transepithelial electric resistance (TEER)

MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양된 Caco-2 cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내었다. 7×10^4 cells/ml로 cell 수를 조정하여, Trans 24 well insert에 300 µl 씩 분주하였다. Basolateral에는 media 900 µl 분주하였다. 2~3일 마다 media를 이용하여 washing하면서 14일간 배양 한 후 모든 well 이 600~700 Ω의 값에 도달하면, 실험에 사용하였다. Trans 24 well insert에 cold HBSS (hank's balanced salt solution)을 270 µl 넣고 300 µl의 cold HBSS가 들어 있는 새로운 Trans 24 well에 옮겨주고 30분간 안정화 후, HBSS에 희석시킨 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리한 후, 4 시간 마다 TEER 값을 측정하였다.

(다) Real time PCR

Caco-2 cell은 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시켰다. 다음날

아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 24 시간 동안 배양 시켰다. 이후, trizol 을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamo™HS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, FosterCity,CA, USA) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 GAPDH (Sense: 5' - AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC -3', Antisense: 5' - GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT -3'), Occludin (Sense: 5' - TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA -3', Antisense: 5' - TCA TTC ACT TTG CCA TTG GA T -3'), Claudin 1 (Sense: 5' - CGA TGA GGT GCA GAA GAT GA -3', Antisense: 5' - CCA GTG AAG AGA GCC TGA CC -3')와 ZO-1 (Sense: 5' - TGA GGC AGC TCA CAT AAT GC -3', Antisense: 5' - GGT CTC TGC TGG CTT GTT TC -3') 이다.

(라) Western blot

Caco-2 cell은 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 60 mm dish에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화 시켰다. 다음날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 48 시간 동안 배양 시켰다. 이후, Pro-prep (intron, Korea)을 이용하여 cell 안의 단백질을 얻었다. Bradford assay를 이용하여 각 sample의 protein loading 양을 조정하였다. 사용된 1차 Ab는 GAPDH (Thermo MA5-15738, 1: 5,000), Claudin 1 (GeneTex GTX15098, 1:100), Occludin (GeneTex GTX114949, Zo-1 (GeneTex GTX108592, 1:2,000)이고, 2차 Ab는 Anti-mouse (Thermo NCI1430KR, 1:50,000), Anti-rabbit (Thermo NCI1460KR, 1: 10,000) 이다.

(마) Immunocytochemistry (ICC)

Caco-2 cell은 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C

incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정하였다. Coverslip을 미리 깔아둔 24 well에 cell을 seeding 하였다. Tight junction이 충분히 이루어 질 때까지 눈으로 관찰 하면서 배양시킨다. 10~14일간 배양 후, oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 5일 동안 배양 시켰다. 4% Formaldehyde로 고정시킨 후에 antibody를 이용해 염색하였다. 사용된 1차 Ab는 Claudin 1 (GeneTex GTX15098, 1:200) 이고 2차 Ab는 Anti-rabbit DyLight 488 conjugate (Thermo 35553 1:1,000)이다.

(바) Paracellular permeability (FITC-dextran flux assay)

MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 Caco-2 cell 을 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 7×10^4 cells/ml로 cell 수를 조정하여, Trans 24 well insert에는 cell 300 µl 씩 분주하였다. Basolateral에는 media 900 µl를 분주하고 2~3일 마다 media를 이용하여 washing하면서 10~14일간 배양 한 후 모든 well이 600~700 Ω의 값에 도달하면 실험에 사용하였다. Oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 12 시간 동안 배양 시킨 후, FITC-dextran 4 kDa (SIGMA 46944) 1 mg/ml을 처리하고 6 시간 더 배양 시켰다. Basolateral의 배지를 모아서 투과된 FITC-dextran 4 kDa의 값을 Fluorescence spectrometer로 excitation 490 nm에서 emission 520 nm의 파장으로 측정했다.

(2) Oxyresveratrol 에 의한 세포간극 안정화 효과의 기전 연구

(가) Transepithelial electric resistance (TEER)

MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양된 Caco-2 cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내었다. 7×10^4 cells/ml로 cell 수를 하였다. 2~3일 마다 media를 이용하여 washing하면서 14일간 배양 한 후 모든 well이 600~700 Ω의 값에 도달하면, 실험에 사용하였다. 기전 연구의 경우 PKC inhibitor (GF109203X)를 처리한 후 2 시간 뒤에

oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리한 후, 12 시간 마다 TEER 값을 측정하였다.

(나) Real time PCR

Caco-2 cell은 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2 × 10⁵ cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 6-well plate에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시켰다. 다음날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 24 시간 동안 배양 시켰다. 이후, trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU) 를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamoTMHS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 Step One Plus TM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, FosterCity,CA, USA) 기계를 사용하여 PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 *GAPDH* (Sense: 5' -AAG GGT CAT CAT CTC TGC CC-3', Antisense: 5' -GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT-3'), *PKC-ε* (Sense: 5' - GAA CCC GGC GAG GAA ATA CA -3', Antisense: 5' - AGG GCA GGA ATG AAG AAC CG -3'), *PKC-θ* (Sense: 5' - ATG TCG AAT CAG AAC GGG CA -3', Antisense: 5' - TAG CAT TCG GCC TTG AGG TT -3'), *PKC-δ* (Sense: 5' - CCC TTC TGT GCC GTG AAG AT -3', Antisense: 5' - GCC CGC ATT AGC ACA ATC TG -3'), *ERK-1* (Sense: 5' - TCA GAC TCC AAA GCC CTT GAC -3', Antisense: 5' - CGT GCT GTC TCC TGG AAG ATG -3'), *ERK-2* (Sense: 5' - TCC AAC AGG CCC ATC TTT CC -3', Antisense: 5' - CCA GAG CTT TGG AGT CAG CA -3'), *JNK-a1* (Sense: 5' - GCT TGG AAC ACC ATG TCC TGA -3', Antisense: 5' - GTA CGG GTG TTG GAG AGC TT -3'), *P-38* (Sense: 5' - ATG CAT AAT GGC CGA GCT GT -3', Antisense: 5' - GGT CAA CTT ACC CAG GGG ATT -3'), *cdx-2* (Sense: 5' - GCA GCC AAG TGA AAA CCA GG -3', Antisense: 5' - TTC CTC TCC TTT GCT CTG CG -3') 이다.

(다) Western blot

Caco-2 cell은 MEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mmol/l non-essential amino acids, 1 mmol/l sodium pyruvate를 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어낸 후, 2×10^5 cells/ml로 cell 수를 조정하였다. 60 mm dish에 cell을 seeding 한 후, 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨다. 다음날 아침 oxyresveratrol (10, 20, 30 µg/ml)을 처리하고 48 시간 동안 배양 시켰다. 이후, Pro-prep (intron, Korea)을 이용하여 cell 안의 단백질을 얻었다. Bradford assay를 이용하여 각 sample의 protein 양을 측정 후 loading 양을 조정하였다.

(3) 상지주정추출물에 의한 *MUC2* 와 *TFF3* 유전자의 생성

*MUC2*와 *TFF3* 유전자는 뮤신생성과 안정화에 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다. 이에 상지주정추출물에 의한 두 유전자의 발현변화를 mRNA 수준에서 측정하였다.

(가) Cell viability (MTT assay)

RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 6.25×10^4 cells/mL로 cell 수를 조정 한 후, 96 well에 200 µL 씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지주정추출물 (12.5, 25, 50 µg/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다. 상등액을 제거하고 5 mg/mL stock MTT (Amresco, USA)를 RPMI-1640 배지에 1/40 희석해서 넣고 37°C incubator에서 1 시간 반응시켰다. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거 후 DMSO를 100 µL 넣고, microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장으로 OD값을 측정하였다.

(나) Real time PCR

RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 2.5×10^5 cells/mL로 cell 수를 조정 한 후, 6 well에 2 mL 씩 seeding 하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지

주정추출물 (12.5, 25, 50 µg/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다. Trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Revert Aid First Strand cDNA kit (Fermentas, EU)를 이용하여 cDNA로 conversion 한 후, DyNamo™HS SYBR Green qPCR kit (FINNZYMES, Finland) 시약으로 StepOnePlus™Real-TimePCRSytem (AppliedBiosystems, FosterCity, CA, USA)기계를 사용하여 real time PCR을 진행하였다. 사용된 primer의 sequence는 *GAPDH* (Sense: 5' - GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT -3', Antisense: 5' - GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG -3'), *MUC2* (Sense: 5' - ACC CGC ACT ATG TCA CCT TC -3', Antisense: 5' - GGA CAG GAC ACC TTG TCG TT -3')와 *TFF3* (Sense: 5' - CAG CTT TTC TGT CCC TTT GC -3', Antisense: 5' - CAC GAC GCA GCA GAA ATA AA -3')이다.

(다) Immunocytochemistry (ICC)

RPMI-1640 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air 조성으로 배양하였다. 세포가 80% confluence하게 자라면 0.25% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 2.5 × 10⁵ cells/mL로 cell수를 조정 한 후, Coverslip을 미리 깔아둔 24 well 에 1mL씩 cell을 seeding하였다. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 후, 상지주정추출물 (12.5, 25, 50 µg/mL)을 처리한 후, 24 시간 배양하였다. 4% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후에 Antibody를 이용해 염색하였다. 사용된 1차 Ab는 anti-MUC2 (GeneTex GTX100664)이고 2차 Ab는 Anti-rabbit, DyLight (Thermo 84546)이다.

바. 상지주정추출물의 대장염 모델에서의 효과

(1) 동물실험 및 상지주정추출물의 투여

대장염모델마우스는 female C57BL/6N mice, 7주령 (16-18 g)을 사용하였다 (코아텍, 경기도, 평택, 한국). 일정한 온도 24 ± 1°C와 습도 55%에서 사육하였으며 SPF (specific pathogen free) room을 사용하였다. 모든 동물은 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있게 환경을 조성해 주었고, 고려대학교 동물윤리위원회 KUIACUC-2015-92 승인을 받아 진행하였다.

동물들은 한 그룹 당 6마리씩 무작위로 나누어 배정하였고, 3주간 상지주정추출물을 경구

투여를 통해 공급하였다. 마지막 1주 동안은 대장염을 유발하기 위해 2% DSS (dextran sulfate sodium)를 음수를 통해 공급하였다.

그룹	처리조건
I	음성 대조군
II	대장염 모델마우스 (2% DSS + 물)
III	실험군 1 (2% DSS + 20 mg/kg 상지주정추출물)
IV	실험군 2 (2% DSS + 40 mg/kg 상지주정추출물)
V	실험군 3 (2% DSS + 80 mg/kg 상지주정추출물)

(2) 몸무게 변화측정

몸무게 변화는 마지막 한주 동안 2% DSS로 대장염을 유발하면서 측정되었다. 첫 번째 날의 몸무게를 100%로 환산하여 변화량을 계산하였다.

(3) 상지주정추출물에 의한 대장염모델마우스의 질병 발병 정도 (disease activity index, DAI) 측정

질병 발병 정도의 측정은 마지막 한주 동안 2% DSS로 대장염을 유발하면서 측정되었다. 아래의 표를 근거로 몸무게 감소량, 변의 강도, 피의 유무에 따라 점수를 매겨 합산 한 뒤, 3으로 나눈다.

점수	몸무게 감소량	변의 강도	피의 유무
0	None	정상 변	없음
1	1 - 5%		
2	6 - 10%	무른 변	소량
3	11 - 20%		
4	> 20%	설사	대량

(4) 상지주정추출물에 의한 대장염모델마우스의 뮤신회복도 측정

(가) Alcian blue 염색

실험 마지막 날 대장 내 뮤신 회복도를 측정하기 위해 조직염색을 실시하였다. 분리된 대장을 10% formalin 용액에 하루 동안 고정 한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을

마이크로톰을 이용하여 절단하여 5 μm 조직절편을 만든 후 Alcian blue 염색을 하고, 현미경을 이용하여 blue pigment로 염색된 뮤신 양을 관찰하였다.

(나) 뮤신생성량 그래프화

MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 blue pigment만을 특이적으로 선택하여 그 양을 수치화 하였다.

(5) 상지주정추출물의 대장염 마우스 모델에서의 항염증 활성 측정

(가) 실험 재료 및 추출물의 조제

상지는 50 mg/ml로 증류수에 녹여 stock으로 만든 뒤, 실험에 맞게 희석하여 본 실험에 사용하였다.

(나) 실험동물 조건, 시료의 투여 및 케양성 대장염 유도

본 실험에 사용한 동물은 7주령 female C57BL/6N (Koatech, Pyeongtaek, Korea) 으로, 체중이 20 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 실험하였다. 구입한 마우스는 12시간 dark-light cycle로 조절된 실험실 내에 설치한 microventilation cage system (온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$) 내에서 물과 사료는 충분한 양을 공급하여 사육하였다. 모든 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 절차를 따라 진행되었다(IRB 승인번호: KUIACUC-2015-92). 실험동물은 1주일간의 적응기간이 끝난 뒤, 무작위로 각 군당 6마리씩 총 5군으로 나누었다. 경구투여로 각 그룹에 희석된 물질을 3주간 처리하였고, 마지막 일주일 동안 음수를 통해 2% DSS로 대장염을 유발하였다.

그룹 1: 음성대조군 (증류수 음수 + 1 ml/kg/day 증류수)

그룹 2: 양성대조군 (2% DSS + 1 ml/kg/day 증류수)

그룹 3: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 1 (2% DSS + 20 ml/kg/day 상지추출물)

그룹 4: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 2 (2% DSS + 40 ml/kg/day 상지추출물)

그룹 5: 상지추출물 (ERM) 처리그룹 3 (2% DSS + 80 ml/kg/day 상지추출물)

(다) 몸무게 측정 및 대장염증 지수 (disease activity index, DAI) 측정)

실험기간 중 1 주일에 한번 씩 동일한 시간에 개체별 체중을 측정하였다. DSS로 염증을 유발한 마지막 일주일 동안에는 매일 체중을 측정하였다. 대장염증 지수 (DAI)는 Table 3.3-3의 기준에 따라 측정되었다. 자유롭게 배출된 마우스의 변의 무르기와 피의 유무에 따라 점수를 매겼다.

Table 3.3-3. 대장염증 지수

점수	무게 감소량	변의 무르기	혈변의 유무
0	None	Normal	None
1	1 - 5%		
2	6 - 10%	Loose Stool	Occult bleeding
3	11 - 20%		
4	> 20%	Diarrhea	Gross bleeding

(라) 혈청 분리 및 대장길이, 비장무게 측정

실험동물은 희생 12시간 전부터 절식시켰다. 작두를 이용해 마우스를 희생 시킨 후, 전혈을 얻어 실온에서 30분 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후, -80℃에서 분석 전 까지 냉동 보관하였다. 장기는 동물 희생 후, 대장과 비장을 분리하여 생리식염수에 담가 곁에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거 한 뒤, 대장의 길이와 무게를 측정하였다.

(마) 조직학적 관찰

조직학적 관찰을 위해, 실험동물의 대장을 적출하여 흐르는 물에 깨끗이 씻어 10% 중성 포르말린 용액에 하루 동안 고정시켰다. 조직학적 평가를 위해 파라핀 조직표본을 제작하여 각 조직표본을 5 µm 두께로 절편 하였다. Hematoxylin & eosin (H&E), Alcian blue 염색을 진행한 뒤, 광학현미경 (Olympus, Waltham, MA, USA)을 이용하여 40×의 배율에서 관찰하였다.

(바) 대장조직에서의 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 분석

적출한 대장에서 단백질을 추출하기 위해 1 ml의 pro-prep (Intron, Seoul, Korea)을 조직에 넣고, Taco Prep bead beater (Taco, Taiwan)을 이용하여 homogenization 시킨다. 이 후 10,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 분리하여 단백질을 얻었다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 단백질 농도를 측정하여 30 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 trans-blot SD semi-dry transfer cell을 이용하여 transfer 하였다. PBS-T (PBS with 5% tween 20)에 5%로 희석된 skim milk로 4°C에서 하루 동안 blocking 시켰다. 다음날 PBS-T로 3번 washing 한 뒤, 1:200로 희석된 anti-iNOS2 항체 (SC-650, Santa Cruze Biotechnology)와 1:2,000로 희석된 anti-COX-2 항체 (NB100-689, Novus Bio)를 이용하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. Endogenous control로는 1:5,000로 희석된 anti-beta actin antibody (MA5-15739, Thermo Scientific)를 사용하였다. 반응이 끝난 후, PBS-T로 다시 3번 washing 한 뒤, iNOS2, COX2는 1:10,000로 희석된 anti-rabbit IgG로, beta actin은 1: 50,000로 희석된 anti-mouse IgG로 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 다시 3번 washing하고 WesternBright Sirius western blotting detection kit (Advansta, CA, USA)를 이용하여 밴드를 검출하였다. 이미지는 FluorChem E (Proteinsimple, CA, USA) 장비를 통해 얻었다.

(사) 혈청에서의 pro-inflammatory cytokines의 농도 측정

혈청에서 cytokine을 측정하기 위해 마우스용 inflammation cytometric bead array kit (CBA)를 이용하였다. Kit manual에 따라 혈청을 반응시킨 후, FACS를 통해 cytokines을 분석하였다.

(아) 통계처리

실험의 모든 통계처리는 SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 통해 이루어졌다. 모든 값은 평균 ± 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었고, 3번 반복한 뒤 표기하였다. 통계적인 유의성은 Student *t*-test (2 그룹)와 analysis of variance (ANOVA, 3그룹 이상)로 검증하였고, $p < 0.05$ 인 경우 유의적인 차이가 있다고 해석하였다.

사. 상지주정추출물의 혈당강하 효과

(1) 고지방 식이 유도 당뇨 모델 마우스에서 상지주정추출물의 혈당강하 효능 평가

(가) 실험동물 및 식이

C57BL/6 mouse(4주령, 수컷)를 (주)코아텍에서 구입하여 1주일 동안 검수검역 및 순화를 시켰다. 이후 난괴법으로 총 4군, 실험군당 10마리씩 배치하여 실험식이를 공급하였다. 실험식이는, 정상식이군(N), 고지방식이군(HFD), 고지방식이+0.1% 상지주정추출물(HFD+LS), 고지방식이+0.25% 상지주정추출물 0.25%(HFD+HS)군으로 나누어 12주간 급여하였으며, 물과 식이는 자유롭게 공급하였다. 고지방식이는 총 열량의 60%가 되도록 라드를 공급하였으며, 준비된 고지방식이에 상지주정추출물 분말을 0.1%, 0.25% 수준으로 혼합하여 실험식이를 제조하였다. 체중은 주2회, 식이섭취량은 일주일에 3회 측정하였다. 본 실험과정은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회의 승인 (KFRI-M-16037)하에 수행되었다.

(나) 혈액 및 장기적출

실험기간이 종료된 시점에서 12시간 동안 절식시킨 후, 마취하여 안와정맥에서 혈액을 채취하였다. 간, 복부지방, 부고환지방, 갈색지방을 적출하여 생리식염수에 세척 후 여과지로 수분을 제거하여 중량을 측정하였다.

(다) 경구당부하 검사 (Oral glucose tolerance test, OGTT)

OGTT 검사는 실험 9주차에 측정되었다. 경구당부하 검사는 12시간 금식 시킨 후, 포도당 용액(2 g/kg BW)을 경구투여 한 다음 0, 15, 30, 60, 90 및 120분에 마우스 꼬리정맥에서 채혈하여 간이 혈당측정기(지닥터TM, (주)올메디쿠스, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

(라) 공복혈당 및 당화헤모글로빈(Hemoglobin A1C) 측정

공복혈당(fasting blood glucose, FBG) 측정은 채혈 전 5시간 동안 금식 시킨 후 간이 혈당측정기를 이용하여 각 그룹에 대한 혈당 변화를 관찰하였다. 당화헤모글로빈 측정은

희생 후 안와정맥으로부터 채혈한 전혈에서 당화혈색소 측정 기기(EASY A1C, infopia, Korea)를 이용하여 측정하였다.

(마) 혈청 인슐린 농도 측정

혈청 중 인슐린의 함량은 ALPCO사 (ALPCO Diagnostic, Windham, NH, USA)의 insulin ELISA kit를 이용하였다.

(바) 혈액 생화학적 분석

실험이 종결된 후 안와정맥에서 채혈하였고, 원심분리 (4,000 rpm, 15분)하여 혈청을 얻었다. 얻어진 혈청으로 간 손상지표인 full name (GOT), full name (GPT)와 지질관련지표인 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방 측정을 위해 혈액생화학분석기 (Fujifilm DRI-CHEM 3500S, Fujifilm, Japan)를 활용하여 측정하였다. 혈중 유리지방산은 Wako사의 ELISA kit를 이용하여 분석하였다.

(사) 통계처리

본 실험결과는 SPSS 통계프로그램(version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 실험군 간의 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 one way ANOVA를 시행한 후 Tukey test를 이용하여 분석하였다.

아. 상지주정추출물의 항당뇨 효과

(1) 상지추출물의 항당뇨 in vitro 효능 평가

(가) NIT-1 세포배양

췌장 베타세포 내 독성을 확인하기 위하여 mouse 유래 insulinoma cell line인 NIT-1 cell line을 ATCC (USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. T-75 flask에 10% FBS(Gibco, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA)를 함유한 F-12K medium (Gibco, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 confluent되면

trypsin-EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 계대배양 하였으며, 배지는 2~3일에 한 번씩 교환하였다.

(나) 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT assay를 이용하여 확인하였다. NIT-1 세포를 2.0×10^4 cells/well이 되도록 한 후, 96 well plate에 분주하고 24 시간 배양하였다. 시험물질을 농도별 (0.1~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 적용한 후 다시 24시간과 48시간 배양하였다. Tunicamycin은 ER stress원으로 사용하였으며, DMSO에 1 mg/mL 농도로 녹여 F-12K medium에 희석하여 사용하였다. MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2yl]-2,5 -diphenyltetrazolium bromide) reagent(Sigma, USA)를 well당 20 μL 씩 적용시킨 후 3시간 동안 더 배양하고, 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma, USA)를 200 μL 씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, ELISA reader(Epoch, BioTek, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) 인슐린 분비능 측정

NIT-1 세포를 4.0×10^5 cells/well의 농도로 48 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 상지주정추출물과 tunicamycin을 동시에 처리하였다. 24시간 뒤 2.8 mM glucose와 0.1% BSA를 포함한 KRBB를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 2.8 mM glucose와 22.4 mM glucose를 포함한 KRBB 시약을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이후, 배양액을 1.5 mL tube에 옮긴 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 sample로 사용하였다. 인슐린 함량은 Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA kit (ALPCO, UK)로 측정하였다.

(라) DAPI staining

췌장 베타세포의 세포사멸을 측정하기 위하여 DAPI 염색을 실시하였다. 우선 poly-lysine이 처리된 8 chamber-slide(Nunc, USA)에 세포를 5.0×10^5 cells/mL 농도로 chamber 당 500 μL 씩 분주하고 24 시간 배양하였다. 상지주정추출물과 tunicamycin 처리 24시간 후, PBS로 3회 세척하고, 75 mM KCl로 5분간 반응시켰다. 이 후 fix solution(methanol : acetic acid = 3:1)으로 5분간 세포를 고정시키고 solution을 제거한 뒤

건조시켰다. DAPI solution(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 chamber당 200 μL 씩 10분간 적용시켜 염색시키고, PBS로 3회 세척하였다. Chamber를 제거한 후 slide에 glycerol을 2~3 방울 떨어뜨린 뒤 cover glass를 덮고 형광현미경 (AX10, Carl Zeiss, Germany)으로 세포를 관찰하였다.

(마) Western Blot

췌장 베타세포에서 caspase-3와 cleaved caspase-3 단백질의 발현을 western blot을 통해 측정하였다. NIT-1 세포를 2.0×10^6 cells/10 mL의 농도로 100 mm dish에 분주하여 24시간 배양한 후 상지주정추출물과 tunicamycin를 처리하였다. 24시간 뒤 cold PBS를 2 mL씩 넣고, cell scraper를 이용하여 세포를 긁어 5 mL tube로 옮기고, 13,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 RIPA buffer를 이용하여 lysis 시켰으며, Bradford assay를 이용하여 단백질 함량을 측정하였다. 각 sample를 10% SDS gel에 loading하고, membrane으로 transfer한 후, 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다.

Primary antibody로 β -actin(1:1000, Imgenex, USA), caspase-3, cleaved caspase-3 (1:1000, Cell signaling, USA)를 사용하였으며, secondary antibody는 Anti-rabbit(1:2000, Vector, USA)를 사용하였다. 반응시킨 membrane을 ECL reagent(LI-COR, USA)에 반응시킨 후, image studio software(LI-COR, USA)를 사용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

(바) 통계

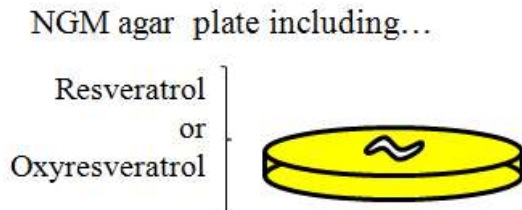
본 연구의 모든 측정값은 평균값과 표준편차로 나타내었고, 각 실험군간 유의차 검증은 one-way ANOVA를 한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Tukey test를 실시하였다.

자. Oxyresveratrol의 수명연장 효과

(1) 실험동물 배양 및 배지 제조

실험에 사용한 *Caenorhabditis elegans* (예쁜꼬마선충)은 Bristol strain N2 (wild type)으로, Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota (CGC)로부터 구입하였다. *C.*

*elegans*의 배양 배지로는 NGM (nematode growth medium, US biological)에 Oxyresveratrol (Sigma) 또는 Resveratrol (Sigma)을 0 (DMSO 0.3% v/v), 100 μM, 500 μM, 1000 μM 농도로 첨가하여 이용하였다. 먹이는 *E. coli* OP50을 이용하였고, 모든 실험에서 *C. elegans*는 25°C에서 배양하였다.



(2) 수명연장 효과 평가

Sodium hypochlorite-sodium hydroxide solution을 이용한 동기화 과정(7)을 통해 *C. elegans*의 알을 분리하고, M9 buffer에 16시간 overnight하여 부화하도록 한다. 부화하여 L1 단계가 된 선충을 1200 x g에 2분 동안 원심분리하여 상층을 버리고 남은 선충을 NGM plate에 옮겨 L4 단계가 될 때까지 2일 더 배양한다. L4 단계가 된 *C. elegans*를 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR, Sigma) (50 μM)와 Oxyresveratrol 또는 Resveratrol이 농도별로 첨가된 NGM 배지에 15마리씩 옮기고, 24시간 간격으로 관찰한다. 이때 FUdR은 새로 낳은 알이 부화하지 못하도록 작용한다(8). *C. elegans*를 picker로 건드렸을 때 움직임이 없을 때를 죽은 것으로 간주하고, 도망가거나 vulva의 생성으로 인한 죽음 등 비정상적인 죽음은 세지 않는다. 수명연장 효과 평가는 세 번 독립적으로 시행하였고, 총 100마리 이상의 *C. elegans*를 평가하였다.

Mean life span (MLS)와 Standard error (SE)는 다음 공식을 이용하여 계산하였다(9).

$$MLS = \frac{1}{N} \sum_j \frac{x_j + x_{j+1}}{2} d_j \qquad SE = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_j \left(\frac{x_j + x_{j+1}}{2} - MLS \right)^2 d_j}$$

(j =age (day), d_j (x_j, x_{j+1}) 사이에 죽은 선충 수, N =전체 선충 수)

(3) 유전자 발현 변화 측정

Oxyresveratrol 또는 Resveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 각각 24시간 또는 72시간 배양한 *C. elegans*를 M9 buffer에 모으고, R. D. Burdine과 M. J. Stern의 방법(10)을 따라 Trizol을 이용해 total RNA를 추출하였다.

Total RNA는 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit를 이용해 cDNA로 conversion한 후, 유전자 발현 변화를 측정하기 위해 SYBR green (KAPA Biosystems, USA)과 StepOnePlus real time PCR system (Applied Biosystems)을 이용해 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 진행하였고, control gene으로는 *act-2*를 이용하였다.

차. 상지주정추출물의 항비만 효과

(1) 재료 및 방법

(가) 시약

Oxyresveratrol, NAC(N-Acetyl-L-Cysteine), Oil red O, Insulin, Dexamethasone, IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였고, Isopropyl alcohol은 DAEJUNG CHEMICALS (한국), Formalin, DMSO (Dimethyl sulfoxide)는 SAMCHUN PURE CHEMICALS Co. (한국), PBS (Phosphate buffered saline)은 AMRESKO (USA), BCS (bovine calf serum)은 WELGENE (한국), EZ-CYTOX kit와 EZ-LDH kit는 DAEILLAB SERVICE Co. (한국), DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's medium), FBS (Fetal bovine serum), Trypsin EDTA, PS (Penicillin-streptomycin)는 GE Healthcare Life Science 제품을 사용하였다.

(나) 실험에 사용된 세포

본 실험에 사용된 세포는 3T3-L1 adipocyte(Fig. 3.3-4)로 ATCC에서 분양받았다. 3T3-L1 adipocyte는 mouse 지방조직 유래의 세포주 (cell line)로 지방대사 관련 연구에서 많이 사용되고 있다.

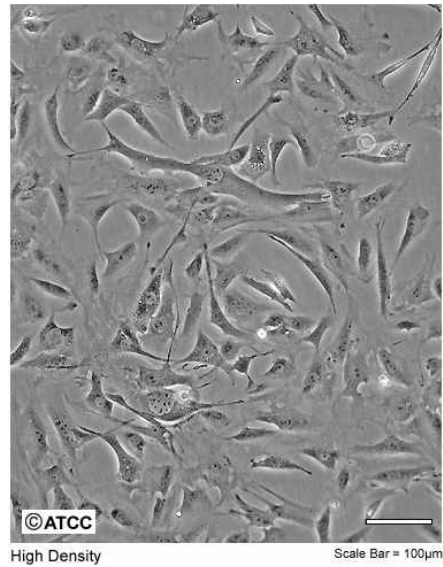


Fig. 3.3-4. 3T3-L1 cell line

(다) 실험 세포 배양 조건

3T3-L1 세포는 지방전구세포 (preadipocyte) 상태의 미분화된 세포이다. 세포 배양 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 배지에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% P/S (Penicillin-streptomycine)를 첨가하여 사용하였고 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양한다. FBS (Fetal bovine serum)는 3T3-L1에 분화를 유도 할 수 있기 때문에 BCS serum을 사용하여 미분화 상태를 유지한다.

(라) Cytotoxicity assay

세포가 apoptosis 혹은 necrosis등에 의하여 죽거나 손상되면 세포에서 Lactate dehydrogenase (LDH)를 방출하게 된다. LDH는 세포질에 존재하는 stable enzyme으로 통상적으로는 세포막을 통과하지 못하여 세포 밖으로 배출되지 않으나, 세포막이 손상되거나 세포가 죽는 경우 배지 중으로 방출된다. 그렇기 때문에 배지중의 LDH양은 죽거나 혹은 손상된 세포의 수와 비례하게 된다. EZ-LDH cytotoxicity assay kit는 세포에서 방출된 LDH의 양을 water soluble tetrazolium salt (WST)를 이용하여 흡광도 (450nm)를 측정하는 방식을 통해 세포독성을 측정할 수 있다.

96 well plate에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% P/S (Penicillin-streptomycine)를 포함한 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's medium) 배지에서 배양한 3T3-L1 세포를 5×10^3 cells/well seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 20.2% oxyresveratrol, ERMO)을 serial dilution 하여 여러 농도가 되도록 제조하고 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 60시간 동안 배양하였다. 60시간 후에 각 농도별 High control군에 lysis solution을 각각 10 μ l씩 첨가시켜 인위적으로 lysis를 유도하여, 세포에서 방출 가능한 최대의 LDH양을 측정할 수 있도록 하였다. 원심분리기(600 \times g 5 min)를 이용하여 배지 중에 떠있는 세포를 침전시킨 후 각 well의 상층액 10 μ l를 취하여 새로운 96 well plate에 옮기고 각 well에 LDH reaction mixture 100 μ l씩 첨가하여 30분간 반응시킨 후 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 세포독성은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$\% \text{ LDH release} = \frac{\text{LDH in culture medium}}{\text{LDH in culture medium} + \text{LDH in cells (High control)}} \times 100$$

(마) Cell proliferation assay

모든 세포는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 dehydrogenase를 갖고 있다. 이 효소는 대사적으로 왕성한 활동을 하는 살아있는 세포에서 유효하게 나타나므로 이를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정할 수 있다. EZ-CYTOX의 기질인 WST (water soluble tetrazolium salt)는 물에 잘 녹는 High sensitive water soluble tetrazolium salt로써 살아있는 세포의 dehydrogenase와 반응하여 오렌지색의 수용성 formazan을 생성하고 이는 살아있는 세포 수와 직선 상관관계를 가지며, 흡광도를 측정함으로써 알 수 있다.

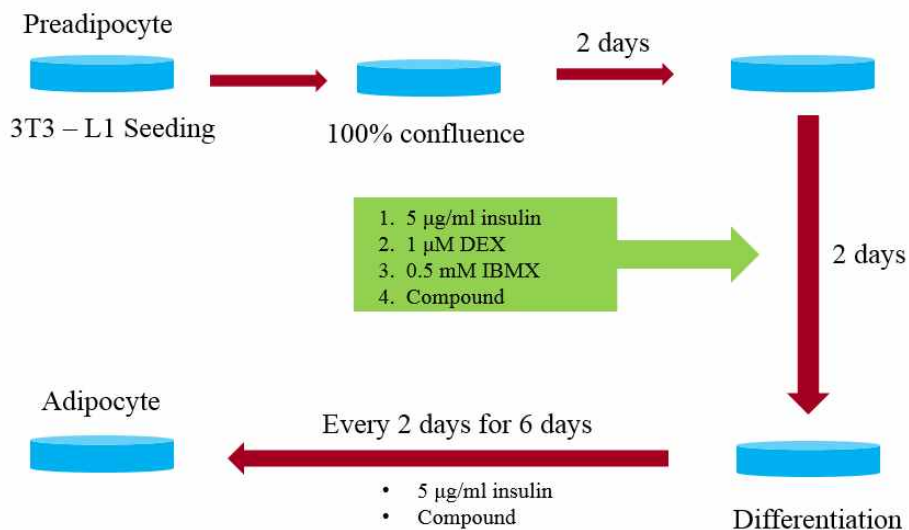
먼저 96 well plate에 10% BCS (bovine calf serum)와 1% P/S (Penicillin-streptomycine)를 포함한 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's medium) 배지에서 배양한 3T3-L1 세포를 5×10^3 cells/well seeding 하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출물 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 20.2% oxyresveratrol, ERMO)을 serial dilution 하여 여러 농도가 되도록 제조하고 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 60시간 동안 배양하였다. 60시간 후에

배지를 버리고 배지에 1/10으로 희석한 EZ-cytox solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 후 Microplate reader (Spectra MAX, Molecular Devices)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 세포활성은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Sample\ Absorbance}{control\ Absorbance} \times 100$$

(바) 3T3-L1의 분화유도

미분화상태의 3T3-L1 지방전구세포 (preadipocyte)는 여러 가지 지방분화 유도물질 (differentiation inducer)을 처리하면 지방세포 (adipocyte)로 분화된다. 먼저 cell culture dish(60 mm)에 $2\sim3 \times 10^5$ 개의 세포를 seeding 한 후 3~4 일간 배양하여 100% confluent 상태가 되도록 하고 그 후 2일 동안 더 배양하여 contact inhibition을 유도하였다. 1% P/S (Penicillin-streptomycine)와 10% FBS (Fetal bovine serum)를 포함한 DMEM 배지에 3가지 분화유도 물질 (5 μ g/ml insulin + 1 μ M Dexamethasone + 0.5 mM IBMX)과 함께 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹인 상지주정추출분말 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 20.2% oxyresveratrol, ERMO)을 serial dilution 하여 여러 농도 (ERMO : 20, 39, 40 μ g/ml)가 되도록 제조하고 각 dish에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator 안에서 2일 동안 배양하였다. 그 후에 동일한 배지에 5 μ g/ml insulin과 상지주정추출분말만 포함하여 2일에 한 번씩 배지를 갈아주며 6 일 동안 배양하였다.



(사) Oil red O staining

Oil red O는 sudan staining의 염색약 중 하나로 중성지방 (neutral triglycerides)과 지질 (lipid)을 염색하는 붉은색 염료이고 500 nm에서 광흡수를 갖는다. Oil red O를 사용하면 3T3-L1 분화과정에서 생성되는 세포 내의 지방구 (주로 triglyceride)를 염색할 수 있다. 염색된 지방구에서 Oil red O를 다시 isopropyl alcohol에 녹여 용리시킨 후 흡광도를 측정하면 정량화 할 수 있는데 이를 통해 지방분화 (adipogenesis) 억제 효과를 측정할 수 있다.

3T3-L1 분화 유도를 마친 후 4 ml PBS로 2번 washing한 후 4 ml의 10% formalin을 넣고 상온에 10분간 둔 후 formalin을 제거하고 다시 4 ml의 10% formalin을 넣고 최소 한 시간 이상 상온에서 고정시켰다. Formalin을 제거하고 4 ml의 증류수로 2번 washing한 후 4 ml의 60% isopropyl alcohol을 넣고 상온에 10분간 방치하였다. Isopropyl alcohol을 제거하고 상온에서 완전히 건조시킨 후 2.5 ml의 Oil red O working solution (in 60 % isopropyl alcohol)을 넣고 상온에서 10분간 염색하였다. Oil red O working solution을 제거하고 4 ml의 증류수로 4번 washing 하였다. 증류수를 제거하고 상온에서 완전히 건조시킨 후 5 ml 100% isopropyl alcohol을 넣고 10분간 살살 흔들며 용리시켰다. 100% isopropyl alcohol을 blank로 하여 Microplate reader를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

카. 상지주정추출물의 약동력학적 평가

상지주정추출물 내 oxyresveratrol의 생체 내 흡수 및 배출에 관해 추적하기 위해, 약동력학 동물실험이 수행되었다. 180~200g인 6주령 수컷 SD rat을 2 그룹으로 나누어, 용매대조군을 투여한 군과 200 mg/kg의 상지 투여군으로 설정하였다. 동물은 일주일간의 적응기를 거친 후 실험에 투입되었으며, 각 군당 3마리씩 구성하였다. 음수공급은 자유롭게 하였으며, 모든 동물은 경구투여 전 16 시간과 경구투여 후 2 시간, 총 18 시간 금식하였다. 소변과 대변은 경구투여 후 metabolic cage에 동물을 넣어 0-2, 2-5, 5-8, 8-12, 12-24 시간 간격으로 채취하였다. 모든 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 절차를 따라 진행되었다. (IRB 승인번호: KUIACUC-20160528-1)

모든 sample은 HPLC 분석을 위해 전처리 과정을 거쳤다. 소변은 500 µl의 소변을 ACN (Acetonitrile) 1 ml과 함께 Ep tube에 담은 후 13,000 g에서 10분간 원심분리하여, 상층액을 HPLC 시료로 이용하였고 대변은 대변 1 g당 5 ml의 70% ACN을 넣고 homogenize 한 후 원심분리하여 상층액을 이용하였다.

4. 기능성 물질의 개별인정 신청 추진

가. 기능성 물질의 유해물질 함량 분석

유해물질이란 원재료 또는 제조과정 중 오염 또는 잔류의 가능성이 있어 인체에 유해한 물질로서 미생물, 중금속, 잔류농약, 잔류용매 등을 말한다. 식약처에서는 기능성 원료에 대해 원재료 또는 제조과정으로 인한 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 미생물, 중금속, 잔류용매, 동물용의약품, 곰팡이독소, 방사능, 잔류농약 등의 규격을 정하고 있다. 이에 본 연구에서는 해당원료의 안전성 확보를 위하여 원재료인 상지와 개별인정형 기능성 원료로 인정받고자 하는 상지주정추출물에 대해 유해물질을 분석하였다.

(1) 상지의 유해물질 함량 분석

(가) 재료

본 연구에서 상지는 영농법인 양평에서 구입하였다. 먼저, 흐르는 물에 세척하였고 건조·분쇄한 후, 이를 밀봉하여 냉동 보관하였다.

(나) 유해물질 분석 항목 설정 및 분석법

원재료 상지는 한약재에 해당하므로 대한약전외한약 (생약) 규격에 적합해야 한다. 따라서, 납, 비소, 수은, 카드뮴 중금속 4종과 총디디티 (DDT), 디엘드린 (Dieldrin), 총비에이치씨 (BHC), 알드린 (Aldrin), 엔도설판 (Endosulfan) 엔드린 (Endrin)의 잔류농약 6종, 이산화황으로 분석항목을 정하였다. 추후 개별인정 신청시 근거자료로 사용하기 위해 의약품 공인분석기관인 한국의약품시험연구원에 분석을 의뢰하였다.

납, 비소, 카드뮴 함량을 분석하기 위하여 먼저, 상지 0.5 g에 질산 12 ml를 넣어 방치한 뒤 마이크로파로 분해하였다. 질산 휘발을 위해 방냉 후, 분해된 용액을 용적플라스크에 넣고 증류수로 정확히 50 ml으로 맞춰 검액으로 사용하였다. 시험용액은 ICP-OES (Optima

7300DV, Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 각각의 파장(납 200.353 nm, 카드뮴 228.802 nm, 비소 193.696 nm)에서 측정하였다. 수은 함량 분석은 균질화된 시료 약 0.01 g을 직접 수은분석기(Mercury analyzer-2, Japan)에 주입하여 가열기화금아말감법으로 측정하였다.

잔류농약 분석 방법은 다음과 같다. 먼저 시료를 정밀히 달아 증류수 40 ml과 같이 균질기에 넣고 4시간 방치하였다. 여기에 아세톤 90 ml을 넣고 2~3분간 균질화한 후 감압여과 하였다. 분액여두에 여액을 옮기고 포화염화나트륨용액 50 ml, 물 100 ml 및 디클로로메탄 70 ml를 넣고 진탕 추출하였고, 층이 완전히 분리될 때까지 정치시켰다. 디클로로메탄층을 합하여 무수황산나트륨으로 탈수, 여과한 후 40℃ 이하의 수욕 중에서 감압농축하였고, 잔사를 헥산으로 녹였다.

미리 후로리실 카트리지에 헥산 6 ml과 헥산: 아세톤 (8:2) 6 ml를 순서대로 유출한 뒤, 추출 및 농축과정을 거쳐 녹인 여액을 유출시켜 수기에 모았다. 다시 카트리지에 헥산: 디클로로메탄:아세톤 (50:48:1.5) 10 ml를 용출시켜 받았고, 40℃ 이하에서 감압 농축하였다. 이를 일정량의 20% 아세톤 함유 헥산에 녹여 GC 분석용 시험액으로 사용하였다. 기기조건은 다음과 같다.

Conditions of GC/ECD

Instrument	Agilent 6890N, micro-ECD
Column	DB-17. DB-5
Carrier gas/Flow	N ₂ : 1 ml/min
Injection Vol.	1µl
Oven Temp.	80℃ (2min) → 5℃/min → 280℃ (15 min)
Inlet mode/Temp.	split mode(30:1)/250℃
Detector Temp.	300℃

(2) 상지주정추출물에 대한 유해물질 함량 분석

(가) 재료

상지주정추출물은 (주)국진약품에서 제공하였다.

(나) 유해물질 분석 항목 설정 및 분석법

식약처는 건강기능식품 기능성 원료에 대한 유해물질로 중금속, 미생물, 잔류용매, 동물용의약품, 곰팡이 독소, 방사능 오염으로 구분하여 Table 3.4-1과 같이 규격을 정하고 있다. 반면, 잔류농약은 규격으로 설정하고 있지 않지만, 식품공전에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우에는 엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT 5종을 분석하여 개별인정 시, 시험결과를 제출하도록 하고 있다. 따라서 본 연구에서는 대장균군, 중금속 4종 (납, 비소, 카드뮴, 총수은), 잔류농약 5종을 상지주정추출물의 유해물질 분석항목으로 정하였고, 추후 개별인정 신청시 근거자료로 활용하기 위해 건강기능식품 공인분석기관인 한국기능식품연구원 (건강기능식품 협회)에 의뢰하였다.

Table 3.4-1. 기능성 원료 유해물질 규격 설정항목

원료	항목	규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8 μ g/일
		총비소	< 150 μ g/일
		카드뮴	< 3.0 μ g/일
		총수은	< 2.1 μ g/일
	미생물	대장균군	음성
세균수		\leq 100/g	액상제품에 한함
용매를 사용한 원료	잔류용매	헥산	< 0.005g/kg
		이소프로필알콜	
		초산에틸	\leq 0.05g/kg
		메틸알콜	
		아세톤	\leq 0.03g/kg
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	곰팡이 독소	동물용의약품	
		총아플라톡신 (B1, B2, G1 및 G2의 합)	
		파툴린	「식품의 기준 및 규격」에 따름
		오크라톡신	
	기타곰팡이독소		
방사능 오염	131I		
		134Cs+137Cs	

(출처: 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정, 식약처 고시)

대장균군, 납, 비소, 카드뮴, 총수은은 식품공전에 제시된 시험법에 근거하여 분석하였고, 잔류농약 5종은 대학약전에 제시된 시험법에 근거하여 분석하였다. 대장균군은 시험액 10, 1,

01 ml씩 5개를 튜브관을 넣은 brilliant-green bile lactose broth (BGLB)에 접종하고, 36℃에서 48시간 배양하여 가스의 발생 여부를 확인하였다. 납, 비소, 카드뮴 분석을 위하여, 상지주정추출물 분말을 일정량 취하여 질산 7 ml 및 증류수 3 ml로 처리하여 마이크로웨이브로 분해하였고, 용적플라스크에 옮겨 일정량을 시험용약으로 사용하였다. 분석은 ICP-MS (Agilent 7700, USA)를 이용하여 실시하였고, 총 수은 함량 분석은 Mercury analyzer을 이용하였다. 잔류농약 분석 방법은 위의 원재료 상지와 동일하다.

나. 기능성 물질의 동물실험 및 안전성

(1) 상지주정추출물의 세포독성 검사 (Chang liver cell line)

(가) 재료

본 실험에 사용한 천연물은 상지(뽕나무 가지)이며, 상지를 구입하여 35℃에서 3일간 건조한 후 분쇄하여 80% 주정을 가하여 추출하였다. 양성대조군으로 녹차 (아모레퍼시픽-오설록, Korea)를 구입하여 80% 주정을 가하여 추출하였다. 주정추출액을 실온에서 ultrasonication 한 뒤, 감압 농축하여 주정을 제거하고 -80℃ deep freezer에서 동결 후 동결 건조하여 분말상태로 획득하여 실험에 사용하였다.

(나) 세포실험용 검액 제조

동결 건조하여 분말상태로 얻은 대상 천연물 및 양성대조군을 DMSO에 용해한 후 희석하여 농도별로 사용하였고, DMSO의 최종농도는 0.1% 이하로 하였다.

(다) 세포계 활성화 시스템 및 검색

① Chang Liver cell (normal hepatic cell) 배양

대상 천연물의 세포내 독성을 확인하기 위하여 normal hepatic cell line인 Chang Liver cell line을 미국세포주은행 (ATCC, USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. T-75 flask에 10% FBS (Gibco, USA), 1% AA(antibiotic-antimycotic; Gibco, USA)를 함유한 DMEM

medium (ATCC, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 confluent되면 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였으며 배지는 2~3일에 한 번씩 교환하였다.

② 세포 생존능 측정

세포 생존능은 Carmichael의 방법(11)을 응용하여 MTT assay와 WST-1 assay 두 가지 방법으로 측정하였다. 우선 세포가 1.0×10⁴ cells/well이 되도록 조절하여 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 배양액으로만 세포배양한 시험군을 대조군으로 하고, sample 군은 농도별 (1.0×10⁻⁶~1.0×10¹ mg/mL)로 적용한 후 다시 24시간 배양한 후 세포독성 실험에 적용하여 분석하였다.

③ MTT Assay

분석당일 MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, U.S.A) solution (0.3 mg/mL. final conc.)을 well당 20 μl씩 적용시킨 후 4시간동안 배양하고 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide(DMSO)를 150 μl씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, 5분후 ELISA reader로 흡광도(450nm, 25°C)를 측정하여 control of % 비로 비교하였다.

④ WST-1 Assay

분석 당일 WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3 - benzene disulfonate) reagent (Roche, Germany)를 well당 10 μL씩 적용시킨 후 4시간 동안 배양하고 ELISA reader로 흡광도(420 nm)를 측정하여 control % 비로 비교하였다.

(2) 상지주정추출물의 세포독성 검사 (EA. hy926 cell line)

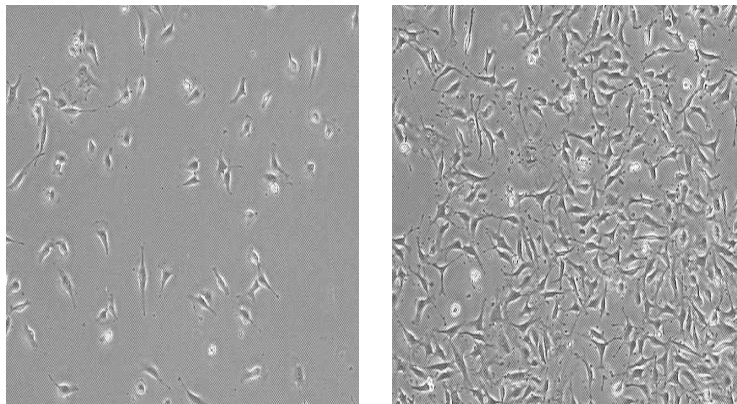
(가) 재료

상지주정추출물은 (주)국전약품(MAEXT01)에서 제공 받았다. 본 실험에서는

상지주정추출물이 가공에 따른 변화가 안전성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 가열온도 및 pH를 달리하여 시험물질을 제조하였다. 즉, 일정량의 시료를 60℃, 80℃, 100℃에 2, 5, 10분간 처리하였고, 100℃의 가혹조건하에서 시간을 달리 처리하여 (2~10분) 시험물질을 제조하였다. 또한, 산성, 중성, 염기성(pH2, pH7, pH10)의 조건에서 상지주정추출물 처리한 다음, 건조하여 사용하였다.

(나) EA.hy926 세포배양

대상 천연물의 혈관세포 내 독성을 확인하기 위하여 사람의 제대정맥내피세포 (human umbilical vein cells line; HUVECs line)인 EA.hy926 cell line(Fig. 3.4-1)을 ATCC (USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. T-75 flask에 10% FBS (Gibco, USA), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)를 함유한 DMEM medium (Gibco, USA)을 이용하여 37℃, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 confluent되면 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였으며 배지는 2~3일에 한 번씩 교환하였다.



Low Density of EA.hy926 High Density of EA.hy926

Fig. 3.4-1. Morphology of EA.hy926 cell line.

(다) 세포독성 측정

세포독성은 Carmichael의 방법(12)을 응용하여 WST-1 assay로 측정하였다. 우선 세포가 2.0×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 시험물질을 농도별 ($1.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^2$ µg/mL)로 적용한 후 다시 24시간 배양하였다. WST-1 (4-[3-{4-Iodophenyl}-2- {4-nitrophenyl}- 2H-5- tetrazolio]-1,3 - benzene disulfonate) reagent (Roche, Germany)를 well당 10 µL씩 적용시킨 후 4시간 동안

배양하고, ELISA reader로 흡광도를 측정하여 control % 비로 비교하였다.

(라) 통계처리

본 연구의 모든 측정값은 평균값과 표준편차로 나타내었고, 각 실험군간 통계학적 분석은 Window용 SPSS 12.0 package program software를 이용하여 one-way ANOVA, Tukey test로 검증하였다.

(3) 천연물 추출물의 이화학적 변화에 따른 세포 생존능

(가) 온도에 따른 세포 생존능 변화

천연물 추출물의 가공 중 안정성을 조사하기 위하여 가열온도에 따른 세포 생존능을 조사하였다. 일정량의 시료를 60℃, 80℃, 100℃에 2, 5, 10분간 처리하였고, 100℃의 가혹조건 하에서 시간을 달리 처리하여 (2~10분) 세포 증식능을 측정하였다.

(나) pH에 따른 세포 생존능 변화

천연물 추출물의 체내 활성 및 세포독성을 간접 시험하고자 산성, 중성, 염기성의 조건에서 시료의 pH 변화에 세포생존능을 조사하였다. 각 pH 용액 (pH2, pH7, pH10)에 10%의 농도로 시료를 2분 이내로 soaking 한 다음 동결 건조하여 세포 증식능을 측정하였다.

(다) 통계처리

본 연구의 모든 측정값은 평균값(mean)과 표준편차(SEM)로 나타내었고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS 12.0 package program software를 이용하여 one-way ANOVA (Tukey's test)로 검증하였다.

(4) 소재의 동물실험 및 안전성

(가) 복귀돌연변이 시험

① 실험방법

복귀돌연변이 시험은 Ames test에 따라 실시하였다. 시험용 균주로는 *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli* WP2uvrA을 이용하였고, 돌연변이원성의 검사를 위해서 S9 mix를 사용하였다. 또한 미생물 복귀돌연변이를 유도하는 양성 대조물질인 sodium azide, 2-aminoanthracene, benzo[a]pyrene, 2-nitrofluorene, 4-nitroquinoline-1-oxide, acridine mutagen ICR 191은 모두 sigma-aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 상지주정추출물은 S9 mix 첨가 혹은 미첨가군에서 시험물질 최고용량인 5,000 ug/plate부터 1500, 500, 150, 50, 15 ug/plate 가 되게 처리하였다. 결과의 판정은 대사활성체인 S9 첨가 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 평판 당 복귀된 집락 수에 있어서 농도 의존적이거나 1개 이상 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 또한, 음성 결과에 대해서는 필요에 따라 재현성을 확인하였다. 본 실험은 식약처에서 GLP기관으로 인증 받은 (주)캠온에 의뢰하여 실시하였다.

(나) 상지주정추출물의 독성시험

본 연구는 상지주정추출물의 안전성에 대한 과학적 근거를 확보하기 위해, 식품의약품안전처 “비임상시험관리기준” 및 “의약품등의 독성시험 기준”에 따라 단회 및 반복투여(28일) 독성시험을 수행하였다.

① 단회투여독성시험

6주령 SD rat를 1주일간 검역 및 순화과정을 거친 뒤, 체중감소가 없는 건강한 동물을 선택하여 무작위법으로 군을 정하였다. 시험동물은 각 군에 암수 각 5마리를 사용하였고, 밤새 절식시킨 후 시료처리하지 않은 대조군과 시험군(1250, 2500, 5000 mg/kg)을 1회 경구투여하고, 4시간 후 사료를 재급여 하였다. 투여 후 14일 동안 일반증상, 체중변화, 식이섭취량, 시험 중 동물의 사망유무와 사망동물 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다. 본 시험과정은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다. 통계는 SPSS program을 사용하였고, 각 군간 유의성은 one-way ANOVA, Tukey test로 분석하였다.

② 28일 반복투여 독성시험

6주령 암수, 80마리, SD rat를 (주)코아텍에서 구입하여 1주일 동안 검수검역 및 순화를 시켰다. 체중에 따라 무작위로 암수 각 4군, 군당 10마리로 시험군을 구성하였다. 일반적으로 천연물추출물의 경우에는 예상 임상용량이 높을 수 있기 때문에 가능한 높은 NOEL을 얻기 위해 반복투여독성시험에서 일반적으로 이용되고 있는 한계용량인 1,000 mg/kg/day보다 2배 높은 2,000 mg/kg/day 최고용량으로 하여 1,000, 500 mg/kg/day을 중용량군, 저용량군으로 각각 설정하였다. 용량별 상지추출물은 28일 동안 경구투여 하였으며, 시험기간 동안 일반증상, 체중변화, 식이섭취량, 사망유무 등을 관찰하였다.


부검 전날 절식시킨 후, 안정맥에서 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 위한 채혈을 실시하였다. 부검시 적출한 뇌, 흉선, 갑상선, 비장, 폐, 심장, 간, 신장, 전립선, 고환, 자궁, 난소를 전자저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 혈액학적 검사 항목으로 적혈구(RBC), 백혈구(WBC), 헤마토크릿(Hct) 헤모글로빈(Hb), MCV, MCH, MCH, 혈소판 및 백혈구감별 계수(neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil)을 측정하였다. 동시에 혈액생화학적 검사로는 총 단백질, 알부민, A/G비, 혈당, 콜레스테롤, 중성지방, bilirubin, creatinine, AST, ALT, ALP, 염소, 칼슘, 칼륨, 인산, BUN 등의 검사를 실시하였다. 본 실험은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었으며, 통계는 SPSS program을 사용하였고, 각 군간 유의성은 one-way ANOVA, Tukey test로 분석하였다.

다. 유효성분의 기준, 시험법 확립 및 안정성 확인

상지추출물 (Mori Ramulus)


Stability Test Protocol



	상지추출물 Stability Test Protocol	문서번호 : STP-SJC-1401
		개정번호 : 00
		작성일 : 2014.03.13.(Thu)
		페이지 : 4 of 11

- 목차 -

1. 목적	5
2. 시험 개요.....	5
3. 시험 항목 및 시험 기준	6
4. 시험방법.....	7
5. 시험결과의 기록 및 조치.....	7
6. 별첨문서.....	8

	상지추출물 Stability Test Protocol	문서번호 : STP-SJC-1401
		개정번호 : 00
		작성일 : 2014.03.13.(Thu)
		페이지 : 5 of 11

1. 목적

1.1. 본 시험은 "의약품 등 제조업 및 제조품목 허가 등 지침1"의 규정에 따라 신규 제조품목에 안정성 시험을 실시하여 생산된 제품의 사용기간의 확립과 품질보증을 통해 제품의 품질관리 자료로 활용하기 위함이다.

2. 시험 개요

2.1. 시험 검체


구 분	내 용
제 품 명	상지추출물
검체의 포장 구분	포장비닐, 알루미늄백, 화이바드럼(차광기밀)

2.2. 시험 검체 제조번호

No.	제조번호	제조일자	제조단위
1	SJC-14-S001		
2	SJC-14-S002		
3	SJC-14-S003		

2.3. 보존조건

구 분	내 용
<input checked="" type="checkbox"/> 장기보존 <input checked="" type="checkbox"/> 가속시험 <input type="checkbox"/> 가혹시험	장기보존: 25 °C / 60 % 가속시험: 40 °C / 75 %

	상지추출물 Stability Test Protocol	문서번호 : STP-SJC-1401
		개정번호 : 00
		작성일 : 2014.03.13.(Thu)
		페이지 : 6 of 11


2.4. 시험 주기

구 분	내 용
<input checked="" type="checkbox"/> 장기보존 <input checked="" type="checkbox"/> 가속시험 <input type="checkbox"/> 가혹시험	장기보존: 36개월(최초, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36) 가속시험: 6개월(최초, 3, 6)

3. 시험 항목 및 시험 기준

3.1. 시험 항목 및 기준(별규)

시험항목			기준	
정상				
순도 시험	중금속	납	5 ppm 이하	
		비소	3 ppm 이하	
		수은	0.2 ppm 이하	
		카드뮴	0.3 ppm 이하	
	잔류 농약	총 디디티	0.1 ppm 이하	
		디엘드린	0.01 ppm 이하	
		총 비에이치씨	0.2 ppm 이하	
		알드린	0.01 ppm 이하	
		엔도설판	0.2 ppm 이하	
		엔드린	0.01 ppm 이하	
	이산화황	-	30 ppm 이하	
	정량			~ %

	상지추출물 Stability Test Protocol	문서번호 : STP-SJC-1401
		개정번호 : 00
		작성일 : 2014.03.13.(Thu)
		페이지 : 7 of 11

3.2. 시험 주기 별 시험 항목

3.2.1. 장기보존시험

시험 주기	시험 항목
제조시	성상, 순도시험, 정량
3개월	성상, 순도시험, 정량
6개월	성상, 순도시험, 정량
9개월	성상, 순도시험, 정량
12개월	성상, 순도시험, 정량
18개월	성상, 순도시험, 정량
24개월	성상, 순도시험, 정량
36개월	성상, 순도시험, 정량

3.2.2. 가속시험

시험 주기	시험 항목
제조시	성상, 순도시험, 정량
3개월	성상, 순도시험, 정량
6개월	성상, 순도시험, 정량

4. 시험방법

4.1. 상지추출물의 기준 및 시험방법에 따라 시험한다.

5. 시험결과의 기록 및 조치

5.1. 시험결과에 따라 유효(사용)기간의 연장, 단축 또는 저장방법의 변경 등이 필요하다고 판단될

	상지추출물 Stability Test Protocol	문서번호 : STP-SJC-1401
		개정번호 : 00
		작성일 : 2014.03.13.(Thu)
		페이지 : 8 of 11

경우 시험기간의 연장 또는 별도의 시험계획서에 의해 설정 조건을 변경하여 재시험을 실시한다.

6. 별첨문서

6.1. 별첨1: 안정성시험 계획표

별첨1: 안정성 시험 계획표(1)

제품명	상지추출물		
보관조건	25°C / 65%	시험구분	■장기보존 □가속시험 □가혹시험
사용기한	제조일로부터 36개월	시험기간	36 개월
검체 채취량	20g X 7EA X 3Lot	포장상태	포장비닐, 알루미늄백, 화이바드럼(차광기밀)

1. 시험목적	■신제품, □처방변경, □경시변화, □공정변경, □기타()
2. 시험개요	사용기간 동안 제품의 안정성 확인

3. 안정성 시험 계획표				
주기	시험실시일			시험항목
	SJC-14-S001	SJC-14-S002	SJC-14-S003	
제조시				성상, 순도시험, 정량
3개월				성상, 순도시험, 정량
6개월				성상, 순도시험, 정량
9개월				성상, 순도시험, 정량
12개월				성상, 순도시험, 정량
18개월				성상, 순도시험, 정량
24개월				성상, 순도시험, 정량
36개월				성상, 순도시험, 정량

4. 시험항목 및 기준				
시험항목			시험기준	비고
성상				
순도시험	중금속	납	5 ppm 이하	
		비소	3 ppm 이하	
		수은	0.2 ppm 이하	
		카드뮴	0.3 ppm 이하	
	잔류농약	총 디디티	0.1 ppm 이하	
		디엘드린	0.01 ppm 이하	
		총 비에이치씨	0.2 ppm 이하	

		알드린	0.01 ppm 이하	
		엔도설판	0.2 ppm 이하	
		엔드린	0.01 ppm 이하	
	이산화황		30 ppm 이하	
정량시험		~ %		

안정성 시험 계획표(2)

제품명	상지추출물		
보관조건	40 °C / 75 %	시험구분	<input type="checkbox"/> 장기보존 <input checked="" type="checkbox"/> 가속시험 <input type="checkbox"/> 중간시험 <input type="checkbox"/> 가혹시험
사용기한	제조일로부터 36개월	시험기간	6 개월
검체 채취량	20g X 3EA X 3Lot	포장상태	포장비닐, 알루미늄백, 화이바드럼(차광기밀)

1. 시험목적	■신제품, <input type="checkbox"/> 처방변경, <input type="checkbox"/> 경시변화, <input type="checkbox"/> 공정변경, <input type="checkbox"/> 기타()
2. 시험개요	사용기간 동안 제품의 안정성 확인

3. 안정성 시험 계획표				
주기	시험실시일			시험항목
	SJC-14-S001	SJC-14-S002	SJC-14-S003	
제조시				성상, 순도시험, 정량
3개월				성상, 순도시험, 정량
6개월				성상, 순도시험, 정량

4. 시험항목 및 기준				
시험항목			시험기준	비고
성상				
순도시험	중금속	납	5 ppm 이하	
		비소	3 ppm 이하	
		수은	0.2 ppm 이하	
		카드뮴	0.3 ppm 이하	
	잔류농약	총 디디티	0.1 ppm 이하	
		디엘드린	0.01 ppm 이하	
		총 비에이치씨	0.2 ppm 이하	
		알드린	0.01 ppm 이하	
		엔도설판	0.2 ppm 이하	
		엔드린	0.01 ppm 이하	
이산화황		30 ppm 이하		
정량시험			~ %	

라. 기능성 원료의 개별인정 신청

(1) 개별인정 허가에 필요한 각종 서류 검토

(가) 제출자료의 총괄 요약본

① 신청원료 개요

(■최초, □변경)

회 사 명		000			
영업허가(신고번호)		제조업 ■	제00	수입업 □	
주소 및 연락처		00000 (연락처) 000 (팩 스) 000			
		담당자	(이름) 000	(연락처) 000	
신청 원료명		00000			
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 ■	신청 기능성	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	
			신청 섭취량	1000 mg/일	
	고시된 원료	·기능성 추가 □ ·섭취량 변경 □ ·제조방법 변경 □ ·기준규격 변경 □ ·시험방법 변경 □	(변경 전)		
			(변경 후)		
고시된 원료	·기능성 추가 □ ·섭취량 변경 □ ·제조방법 변경 □ ·기준규격 변경 □ ·시험방법 변경 □	(변경 전)			
		(변경 후)			
국내제조 ■ 수입 □	수 입 인 경 우	수리번호		수출국	
		제조회사			
		소재지			
모듬토의 □		실시 날짜:			
품목설명회 □		희망 날짜:			

② 제출자료 체크리스트

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		■예 □아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	■국내 □국외		
2.2	개발경위	■국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	□국내 □국외		
2.4	국내·외 사용 현황	□국내 □국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	원재료	■예 □아니오		
3.2	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■예 □아니오		
3.3	개요			
3.4	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명 (제조공정표)	■예 □아니오		
	주요공정별 기능성분 (또는 지표성분) 함량변화	■예 □아니오		
	주요공정별 수율 변화	■예 □아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □아니오		
4.2	기능성분 (또는 지표성분) 및 근거	■예 □아니오 □기능성분 ■지표성분		
4.3	영양성분 정보자료	■예 □아니오		
5. 지표성분 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	지표성분의 규격 및 근거	■예 □아니오		
	※ 지표성분의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 3 LOT의 공인기관 시험성적서 제출	■예 □아니오		
5.2	표준품 정보	■예 □아니오 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분 (또는 지표성분)의 시험방법	■예 □아니오 □ 공인 시험방법 ■자사 시험방법		
	밸리테이션 자료	■예 □아니오		
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료				
6.1	유해물질 규격 항목 (납, 카드뮴, 총비소, 총	■예 □아니오		

	수은)의 규격 및 근거			
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		■예 □아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목 (잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료		■예 □아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거		■예 □아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함		■예 □아니오	대장 균균
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도: 다)				
7.1	섭취근거 정보		■예 □아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보		■예 □아니오	
7.3	섭취량 평가 정보		■예 □아니오	
7.4	인체적용시험 정보		■예 □아니오	
7.5	독성 시험	단회투여 독성시험	□예 ■아니오	해당 사항 없음
		4주 반복투여 독성시험	■예 □아니오	지표 성분으로 수행
	*GLP 기관 확인 여부	유전독성시험	□예 ■아니오	해당 사항 없음
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	□예 ■아니오	해당 사항 없음
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료				
8.1	제안 기능성 내용		■예 □아니오	
8.2	일일섭취량		■예 □아니오	
8.3	기능성 제출자료		■예 □아니오	
	시험 관 시험	■ 신청원료 (논문 편) * 시험기관:		
		■ 기능성분 (논문 편)		
	동물시험	■ 신청원료 (논문 편) * 시험기관:		
		■ 기능성분 (논문 편)		
	인 체 적 용	■ 신청원료 (논문 편)		

	시험	* 인체적용시험기관		
8.4	작용기전		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료				
	섭취량 및 근거		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	섭취방법 및 근거		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	섭취 시 주의사항 및 근거		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				
	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	

5. 인체적용시험을 통한 이중기능성 평가

가. 인체적용 시험을 위한 준비

(1) 인체적용 시험 (콜레스테롤 개선)

경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 총 콜레스테롤의 개선에 대한 “상지 주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험과 관련된 절차:

- (가) 연구자 미팅 및 병원 방문 후, 병원 및 연구자 선정함
- (나) Statistic Analysis Plan (SAP) 및 Data management plan (DMP) 작성 완료
- (다) 콜레스테롤 개선 인체적용시험 계획서(protocol) 작성 및 증례기록지 (case report form) 작성
- (라) 연구자자료집(investigator's brochure) 작성 및 IRB 서류 작성
- (마) IRB서류 접수 및 승인 : 양지병원 IRB 접수 후 결과 통보 (2015.04)



양지병원임상시험심사위원회 Ver.0 (서식YICTC_IRB_019)

심사결과 통보서

과제번호	C15003			
수신	시험책임자	김창호	직위	과장
	의뢰기관	㈜국전약품		
연구과제명	경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 중 콜레스테롤의 개선에 대한 "상지주정주출물"의 가능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험			
	Protocol NO.	MAEXT01	Version NO.	1.0
심의 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			
회의소집요청일	2015년 04월 17일			
연구정보	평가대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 기타		
	성분명	상지주정주출물		
	상품명	MAEXT01		
	연구단계	<input type="checkbox"/> 제1상 생물학적동등성시험 <input type="checkbox"/> 제1상 임상시험 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (인체적용시험)		
연구주도	<input checked="" type="checkbox"/> 의뢰자 주도임상 (SIT) <input type="checkbox"/> 연구자 주도 임상 (ITT)			
용도	<input type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외허가용			
심의일자	2015년 04월 24일			
제출서류목록	1. 연구계획서 요약			
	2. 연구계획서			
	3. 대상자 설명문 및 동의서			
	4. 대상자 모집 문건 (모집예체)			
	5. 중례기록서			
	6. 피해 보상에 관한 규약			
	7. 보험증 사본			
	8. 임상시험자자료집			
	9. 시험책임자의 최근 이력 또는 기타경력에 관한 문서			
	10. 연구비내역서			
	11. 이해상충 서약서			
	12. 기타 (개인정보사용동의서, 식이요법교육지)			
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 또는 보류			
승인일자	2015년 04월 27일			



양지병원임상시험심사위원회 Ver.0 (서식YICTC_IRB_019)

참석위원	양정선(의장), 김은순(부의장), 이해리(위원), 홍순재(위원), 손경은(위원), 김은희(위원)
심의의견	식이요법 및 대상자 준수사항에 대한 전달을 명확히 하시고 건강식품이기는 하지만 혹시 모를 이상반응에 대한 대비를 철저히 하여 시험진행 바랍니다.

*귀하가 신청하신 심의안에 대하여 본 심사위원회의 심의결과를 위와 같이 알려드립니다. 시험 책 임자는 IRB 심의 결과에 이의가 있는 경우 IRB 통보일로부터 2주 이내에 서면으로 이의 사유를 기록 하여 이의를 제기할 수 있습니다. 단, 동일 사항에 대하여 2회 연속으로 이의신청을 할 수 없습니다

2015년 04월 27일

임상시험심사위원회
양지병원장



(바) 개시미팅 진행(2015.05)

(사) 대상자 첫 대상자 스크리닝 시작 : 2015.06/ 첫 대상자 등록 : 2015.07

(아) 대상자 모집 완료(58명) : 2015.07

(자) 모니터링 2회 진행(2015.07/ 2015.08)

(2) 콜레스테롤 개선 관련 인체적용 시험 프로토콜 작성

인 체 적 용 시 험 계 획 서

고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증의 복합형(IIb형) 대상자를 대상으로
중성지방의 개선에 대한 “상지주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한
단일기관 인체적용시험

시 험 계 획 서 번 호 MAEXT01

버 전 (작 성 일) 1.0 (2014.09.17)

인 체 적 용 시 험 단 계 인체적용시험

인 체 적 용 시 험 의 리 자 주식회사 국전약품

기 밀 문 서

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

(3) 인체시험자자료집

Protocol No.MAEXT01
Investigator's-Brochure(ver1.0)

CONFIDENTIAL

인체시험자자료집
Investigator's Brochure
(상지주정추출물(MAEXT01))

Ver 1.0

September 17, 2014

(주)국전약품

1

(4) IRB 승인 획득 준비

(가) 시험 병원 (양지병원)과의 계약 완료

나. 인체적용시험을 통한 기능성 평가

(1) CLINICAL STUDY REPORT

인체적용시험 제목 (Study Title)	경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 총 콜레스테롤의 개선에 대한 “상지주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험
인체적용시험용 제품 (Investigational Product)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시험제품: 상지주정추출물(MAEXT01) ▪ 대조제품: 위약
인체적용시험 디자인 (Study Design)	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중눈가림, 인체적용시험
인체적용시험 책임자 (Principal Investigator)	에이치플러스 양지병원 임상연구센터
인체적용시험 공동연구자 (Sub Investigator)	에이치플러스 양지병원 임상연구센터
인체적용시험담당자	에이치플러스 양지병원 임상연구센터 에이치플러스 양지병원 임상연구센터 에이치플러스 양지병원 임상연구센터 에이치플러스 양지병원 임상연구센터
인체적용시험 실시기관	에이치플러스 양지병원 서울시 관악구 남부순환로 1636
의뢰자 (Name of Sponsor)	의뢰자명: (주)국전약품 주소: 경기도 안양시 동안구 학의로 282
IRB 승인일 (IRB Approval Date)	초기심의 승인: 2015년 04월 27일 1차 변경 승인: 2015년 05월 11일 2차 변경 승인: 2015년 05월 26일 3차 변경 승인: 2015년 07월 20일 종료보고 승인: 2015년 12월 21일
인체적용시험 시작일 (Study Initiation Date)	2015년 06월 09일 (First patient first visit)
인체적용시험 종료일 (Study Completion Date)	2015년 09월 19일 (Last patient last visit)

(2) 인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목: 경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 총 콜레스테롤의 개선에 대한 “상지주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험

인체적용시험 번호: MAEXT01

인체적용시험 제품: 상지주정추출물(MAEXT01)

인체적용시험 의뢰자: (주)국전약품

본 인체적용시험은 “의약품 임상시험 관리기준” (KGCP, 의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표4, 개정 2014.08.21)을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체적용시험보고서를 (주)국전약품에 제출하는 바입니다.

에이치플러스 양지병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인합니다.

2016년 04월

인체적용시험 책임자

에이치플러스 양지병원 임상연구센터

일시: _____년 ____월 ____일

인체적용시험 제목: 경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 총

콜레스테롤의 개선에 대한 “상지주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험

인체적용시험 번호: MAEXT01

인체적용시험 제품: 상지주정추출물(MAEXT01)

인체적용시험 책임자: 에이치플러스 양지병원

본 인체적용시험보고서를 에이치플러스 양지병원으로부터 제출 받았으며, 에이치플러스 양지병원에서 수행된 본 인체적용시험의 보고서 내용에 대하여 의뢰자로서 최종 확인하였습니다.

2016년 04월

인체적용시험 의뢰자

(주)국전약품

일시: _____년 ____월 ____일

서명: _____

(2) 복합기능성 (혈행개선)에 대한 인체적용시험 계획서

인 체 적 용 시 험 계 획 서

대사증후군 대상자에서 “상지주정추출물 MAEXT02”의 혈행개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한
단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Intervention Study to evaluate
Efficacy on Blood circulation and Safety of “MAEXT02” in subject with Metabolic Syndrome

시험계획서번호	MAEXT02-01
버전(작성일)	1.0 (2016.11.21)
인체적용시험의뢰자	(주)국전약품
인체적용시험수탁기관	(주)파마크로(PharmaCRO)

기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 기관윤리심의위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식품을 복용하는 대상자에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 (주)국전약품 및 (주)파마크로(PharmaCRO)의 사전서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

❖ 인체적용시험 흐름도

시험항목	스크리닝	복용기간				Follow up ¹⁰
	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4 ⁹	추가 방문	
	-2 주 ~ 0 주	0 주	4 주(±5 일)	8 주(±5 일)	필요 시	
대상자 동의서 취득	○					
인구학적 조사 ¹	○					
신체검사 ²	○			○		
이학적 검사	○	○	○	○	○	
활력징후 ³	○	○	○	○	○	
병력 및 동반질환	○					
생활습관 조사 ⁴		○		○		
임상실험실 검사 ⁵	○	○	○	○	○	
임신여부 검사 ⁶	○	○	○	○	○	
대상자 적합성 평가 ⁷	○					
무작위배정		○				
혈액 응고/혈행 검사 ⁸		○		○		
선행/병용약물 조사	○	○	○	○	○	
인체적용시험용 식품 처방 및 교부		○	○			
인체적용시험용 식품 반납/복용순응도			○	○		
이상반응 확인			○	○	○	

1) 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사한다.
 2) 신체검사(신장, 체중, 허리둘레): 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용해야 하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정한다. 허리둘레는 동일한 측정자가 허리(배꼽중심)를 줄자를 이용하여 cm 단위로 측정한다. 방문 4에서는 체중만 측정한다.
 3) 활력징후(혈압, 맥박수, 체온): 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.
 4) 생활습관 조사: 방문 2, 방문 4 에서 시행하며, 대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관에 대하여 조사한다.
 5) 임상실험실 검사: 방문 1 이전 2 주 내에 본원에서 실시한 임상실험실 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 1 에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다. 임상실험실 검사 당일 방문 전에는 최소 4 시간 이상 인체적용시험용 식품 복용 시를 제외하고 물이나 음식은 섭취하지 않아야 한다.
 • 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets, WBC differential count
 • 혈액화학적 검사: BUN, Albumin, Total bilirubin, AST, ALT, ALP, r-GT, Triglyceride, T. cholesterol, LDL, HDL, creatinine, glucose, HbA1c
 • 소변 검사: pH, RBC, WBC, Protein, Glucose
 • CRP 검사: hs-CRP (방문 2 와 방문 4 에 실시)
 6) 임신여부 검사: 대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 각 방문 시 임신여부를 확인한다.
 7) 대상자 적합성 평가: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 방문2 이전에 실시한다.
 8) 혈액 응고/혈행 검사: 방문2와 방문4에만 ADP induced platelet aggregation, FDP, PT, aPTT, Serotonin, t-PA 검사를 실시한다.
 9) 조기 종료 시 종료방문과 동일한 검사 및 평가를 수행한다.
 10) Follow up 방문: 이상반응이 있거나 임상실험실 검사 이상으로 연구자 판단에 따라 follow up이 필요하다고 여겨지는 경우 4주 이내 실시한다.

6. 기능성물질 함유 추출물을 이용한 건강기능식품 개발

가. 원료 타당성 검토 및 원래에 대한 시제품 제조

뽕나무 가지(상지)의 크기는 되도록 지름 15 mm 이하를 사용한다. 상지는 잔류농약과 중금속이 기준 이하이고 oxyresveratrol 역가가 2000 ug/g dry weight 이상을 사용한다. 자를 때 길이는 상관이 없다.

- 1차 상지 절단: 200 kg (2/26, 목)
- 2차 상지 절단: 300 kg (2/28 토)
- 3차 상지 절단: 150 kg (3/6 목)

채집된 상지는 실온(20-25℃)에서 5-7일간 숙성 건조한다. 일주간 방치된 상지는 고압세척기를 사용하여 깨끗하게 세척 후, 길이 15 mm이하의 절편으로 아래 그림과 같이 분쇄한다. 이때 세척에 사용된 물은 음료 기준에 적합해야 한다.



분쇄된 상지는 25-30℃에서 5일 숙성 건조(냉풍제습건조기 사용)한 후, 적외선 수분계(FD-610, KETT)를 사용하여 숙성 상지의 수분 함량을 측정한다(수분 함량 : 약 8% 이하).

- 1차 건조상지: 163.9 kg 수득
- 2차 건조상지: 135.6 kg 수득
- 3차 건조상지: 58.4 kg 수득



분쇄 건조된 상지는 80% 주정용 에탄올을 넣고 추출기에서(외부온도: 95℃, 내부온도: 85℃ 이상) 4시간 동안 환류 추출한다. (용매부피/상지시료의 양 = 8배).

상지추출: 건조 상지(357.9 kg), 주정에탄올(2,434 L), 물(457 L), 4시간 환류

추출이 끝난 상지주정추출물은 5 um 하우징 카트리지 필터를 이용하여 감압 여과 후, 추출기에서 감압 농축한다. 약 1/10-1/15 수준까지 감압농축(이때 내부온도 50℃ 미만을 유지)한다.

이때 280 L 까지 농축 후 물 500 L 붓고 200 L 까지 재농축하고, 이러한 재농축 과정을 1 회 더 반복 실행하여 마지막에는 140 L 까지 농축한다.

- 상지농축액: 최종 부피 140 L

농축된 추출액은 -30℃ 저온냉동고에서 24시간 동결 시킨 후, 동결건조기 오븐온도 30℃ 이하에서 48 시간 동안 건조 후, 수득한 고체를 분쇄 한다.

- 상지주정추출분말: 14.4 kg (수율 4%)
- BT 번호
- (MAX-15-M001 4.8 kg, MAX-15-M002 4.8 kg, MAX-15-M003 4.8 kg)

제품 생산에 따른 검사 진행. (결과 참고)

상지주정추출물 250 mg/캡슐, 10,000캡슐 생산한다.

생산된 캡슐을 10캡슐/PTP 포장하여, 13 PTP/박스 포장한다(진약, 위약 각각 65박스)



제 4절 연구결과 수행 결과

1. 상지로부터 기능성 물질 제조

가. 상지로부터 기능성 물질 제조

(1) 연구결과

(가) 상지의 품종 선정

뽕나무 중에서 지표물질인 oxyresveratrol을 다량 함유한 재료를 선정하고자 열매인 오디, 가지인 상지, 잎인 상잎, 뿌리인 상백피 등을 구입하여 80% 주정용 에탄올로 추출 후 oxyresveratrol 함량을 HPLC로 분석하였다(Table 4.1-1, Fig. 4.1-1,2). 분석 결과, 상지는 oxyresveratrol 함량도 가장 높을 뿐만 아니라 스틸벤중 oxyresveratrol 함량비율이 약 90% 이상의 높은 수준을 나타내어 지표물질인 oxyresveratrol을 다량 함유한 뽕나무 소재로 선정하였다. 상지(Ramulus mori)는 5-15mm의 뽕나무(Morus alba L.) 가지로 식품공전에 등재된 식품 원료이기 때문에 개별인정형 건강기능성 식품으로 개발시 장점을 가진 물질이다. 뽕나무가지는 뿌리인 상백피와는 달리 채집이 쉬우며 나무의 손상이 없이 다량 얻을 수 있는 장점이 있다. 한편, 상백피는 oxyresveratrol 대신에 배당체인 mulberroside A를 함유하여 효소 혹은 미생물에 의한 발효에 의해 oxyresveratrol로 전환이 가능하지만 oxyresveratrol 고함유 상지는 생물전환방법을 사용하지 않고 oxyresveratrol을 얻을 수 있다는 점에서 안전성을 우선시하는 식약청 허가시에도 매우 유리한 소재로 사료된다.

Table 4.1-1. 오디, 뽕잎, 상지, 상백피의 oxyresveratrol 량 비교

Sample	Mulberroside A	Oxyresveratrol	Resveratrol
	μg/g	μg/g	μg/g
Mulberry fruits	0.78	9.17	0.00
Mulberry leaves	40.79	83.99	0.00
Mulberry root bark	56.95	263.03	0.00
Mori Ramulus	111.42	975.13	0.00



상백피(뽕나무뿌리외피)



상지(뽕나무가지)



상잎(뽕나무 잎)



오디 (뽕나무 열매)

Fig. 4.1-1. 샘플로 사용된 상백피, 상지, 상잎, 오디의 사진

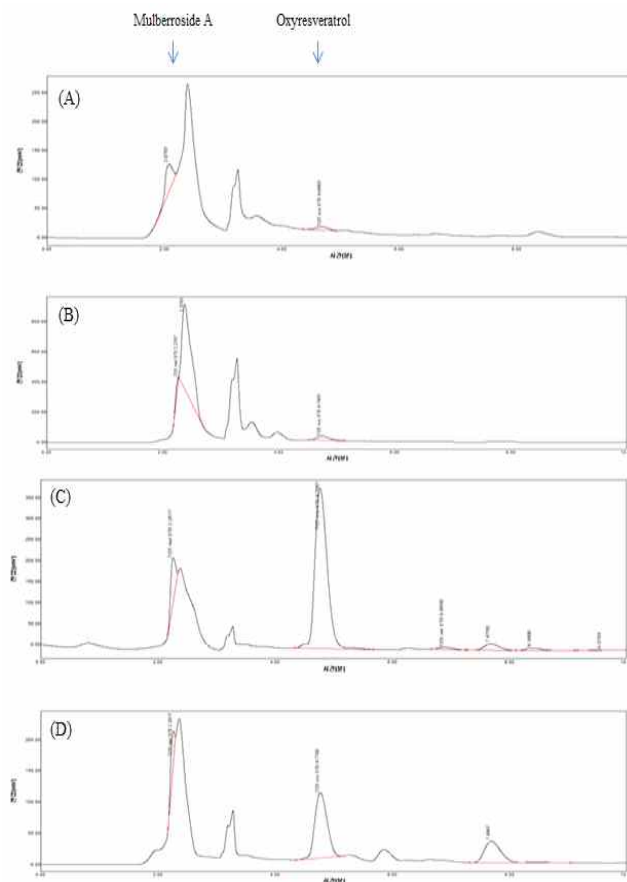


Fig. 4.1-2. 오디(A), 상잎(B), 상지(C), 상백피(D) HPLC profile

(나) 발효를 위한 원료의 유효성분 함량 측정

발효를 통해 배당체인 mulberroside A를 비배당체인 oxyresveratrol로 전환하기 위해 오디, 상지, 상잎, 상백피내의 mulberroside A 및 oxyresveratrol의 함량을 측정하였다. 각 시료 75g을 80% 주정용 에탄올로 추출하여 oxyresveratrol과 mulberroside A 함량을 분석한 결과, 상지의 경우 타 시료에 비해 oxyresveratrol의 양이 월등히 높게 나타났으며 mulberroside A 함량은 낮게 나타났다(Table 4.1-2, Fig. 4.1-3). 한편, 오디, 상잎, 상백피의 경우는 oxyresveratrol의 함량뿐만 아니라 mulberroside A의 함량도 상지에 비해 현저히 낮은 함량을 보여 오디, 상잎, 상백피의 경우는 발효를 통해 유효성분인 oxyresveratrol로 전환하는 것이 의미가 없을 것으로 생각되며 상지의 경우도 mulberroside A의 함량이 낮아 발효를 통해 oxyresveratrol을 생성하는 것은 의미가 크지 않을 것으로 생각된다. 특히 상지의 경우는 주정을 이용하여 추출물을 제조하고 이를 발효를 통해 mulberroside A를

oxyresveratrol로 전환하는 과정없이 고 함량의 oxyresveratrol 함유 주정 추출물을 제조할 수 있었다. 발효의 목적은 Mulberroside A를 oxyresveratrol로 생물전환하는 것이었다. 따라서 발효과정을 통한 배당체의 비배당체로의 생물전환 과정에 의해 효능을 상승시키는 연구는 의미가 없을 것으로 생각되었다. 또한 발효제품 허가를 위해서는 안전성 등의 허가 사항이 강화되므로 개발 후 허가시 비용이 급격히 상승하며 발효공정에 의해 제품의 단가가 상승하는 요인으로 작용 할 것이다. 따라서 상지로부터 발효과정 없이 고함량의 유효성분 함유 원료를 제조 할 수 있으므로 차후의 실험은 상지주정추출물을 이용하여 수행하였다.

Table 4.1-2. 오디, 상지, 상잎, 상백피내의 oxyresveratrol과 mulberroside A 함량 비교

	샘플무게 (g)	(mg)		
		Oxyresveratrol	Mulberroside A	oxyresveratrol+ mulberroside A
오디	75g	0	0.84	0.84
상잎	75g	0	2.04	2.04
상지(지리산)	75g	44.0	9.96	53.96
상지(광천산)	75g	216.0	19.1	235.1
상백피	75g	9.8	28.74	38.54

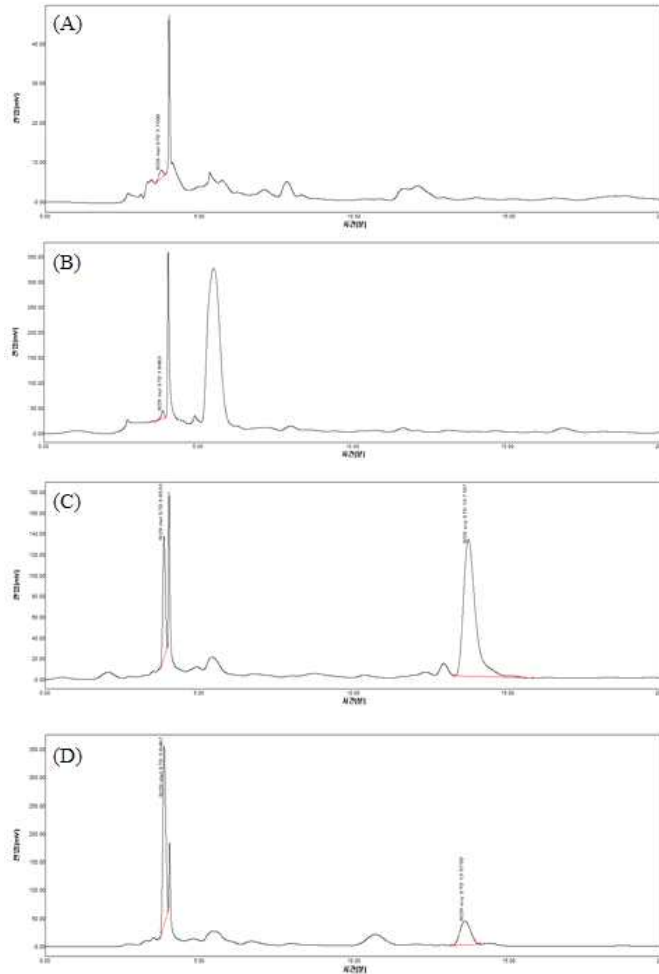


Fig. 4.1-3. 시료 에탄올 추출물의 HPLC profile. (A) 오디; (B) 뽕잎; (C) 상지; (D) 상백피

(2) 상지의 유효성분 함량

앞서 oxyresveratrol 함량 및 구성비율이 높은 뽕나무 소재로 선정된 상지의 품종별, 산지별 oxyresveratrol 함량을 HPLC로 분석하였다. 뽕나무중 백상(*Morus alba* L.; 충북 제천, 지리산, 상주, 충남 광천) 4종, 산상(*Morus bombycis* Koidz. var. *bombycis*; 전북 남원, 지리산, 충남 광천) 3종, 꾸지뽕 (*Cudrania tricuspidata*, 충북 괴산, 충북 제천, 지리산) 3종 등 총 10종의 상지 및 꾸지뽕가지를 80% 주정을 사용하여 추출한 후 oxyresveratrol 함량을 HPLC 사용하여 비교 분석하였다(Table 4.1-3, Fig. 4.1-4,5). 상지의 oxyresveratrol 함량은 품종과 생산지에 따라 큰 차이를 나타내었다. 상지중에서 백상(*Morus alba* L.) 품종의 충남 광천산 상지는 9종의 다른 시료보다 oxyresveratrol의 함량이 높게 측정되어 이를 사용하여 계절별 oxyresveratrol 함량의 변화와 상지주정추출분말을 제조하였다.

Table 4.1-3. 10종 상지의 품종별, 지역별 oxyresveratrol 함량 비교

Species	Area	Mulberroside A	Oxyresveratrol	Resveratrol
		µg/g	µg/g	µg/g
Morus. alba L	경북 상주	1,602.0	568.6	0.0
	충북 제천	2,437.1	234.9	0.0
	지리산	104.99	295.1	0.0
	충남 광천	429.84	4,687.5	9.4
Morus bombycis	전북 남원	2,970.6	978.04	0.0
	지리산	158.4	159.2	0.0
Cudrania tricuspidata (꾸지뽕)	충남 광천	2,124.3	1,674.5	0.0
	충북 괴산	230.0	0	0.0
	충북 제천	300.3	328.8	0.0
	지리산	300.5	330.9	0.0

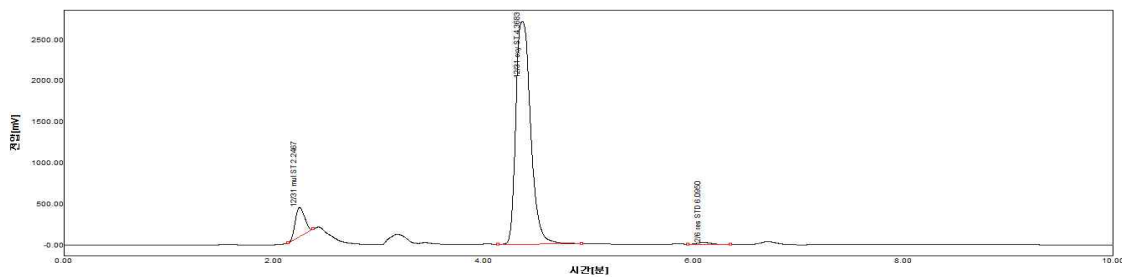


Fig. 4.1-4. 광천상지의 80% 주정추출 후 HPLC profile

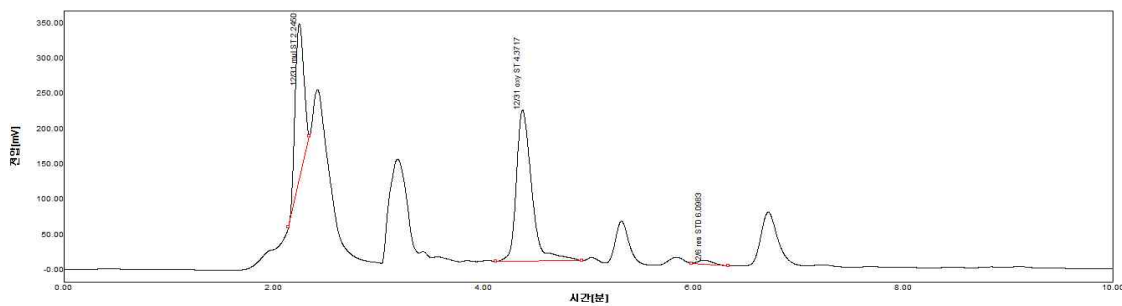


Fig. 4.1-5. 상백피 80% 주정추출 후 HPLC profile

(가) 상백피 주정추출물의 효소를 이용한 가수분해에 의한 oxyresveratrol 생성

상백피 주정추출물을 Pectinex[®] (Novozymes, DENMARK) 효소를 사용하여 가수분해한 후 유효 물질의 변화를 HPLC로 확인하였다(Fig. 4.1-6). 효소량은 반응액량 대비 1%, 반응 온도 5°C, pH 4.5, 반응시간 4시간으로 반응하면서 상백피 추출물로부터 생성물의 변화를 확인한 결과, 2.1분의 mulberroside A는 완전분해되어 4.5분의 oxyresveratrol로 전환되었다(Fig. 4.1-7). 본 연구에 사용된 Novozyme사의 Pectinex[®]는 FDA로부터 안전성, 안정성을 인정받아 오렌지 주스 청징화 등 식품용으로 널리 사용 중인 효소이기 때문에 식품 제조에 사용해도 문제가 없다고 사료되었다. 그러나 본 연구에서는 뽕나무 소재로 선택된 상지는 oxyresveratrol함량이 높을 뿐만 아니라 구성비율도 약 91% 이상을 나타내어 효소에 의한 가수분해에 의해 mulberroside A를 가수분해할 이유가 없다고 판단된다. 상지는 식품 공전에 등재되어 있는 식품 원료이기 때문에 주정으로 추출한 상지주정추출물은 중금속, 잔류농약, 미생물에서 문제가 없다면 식품으로 사용할 수 있다. 그러나 효소에 의한 생물전환 제품은 식품공전에 등재되어 있지 않아 다양한 인체 독성, 실험을 통하여 안전성을 확보해야 하고 이러한 문제를 통과한 후에도 식품허가를 받지 위해서 여러 가지 어려움이 있다고 판단되어 oxyresveratrol 고함유 상지를 원료를 효소가수분해 없이 사용하기로 결정하였다.

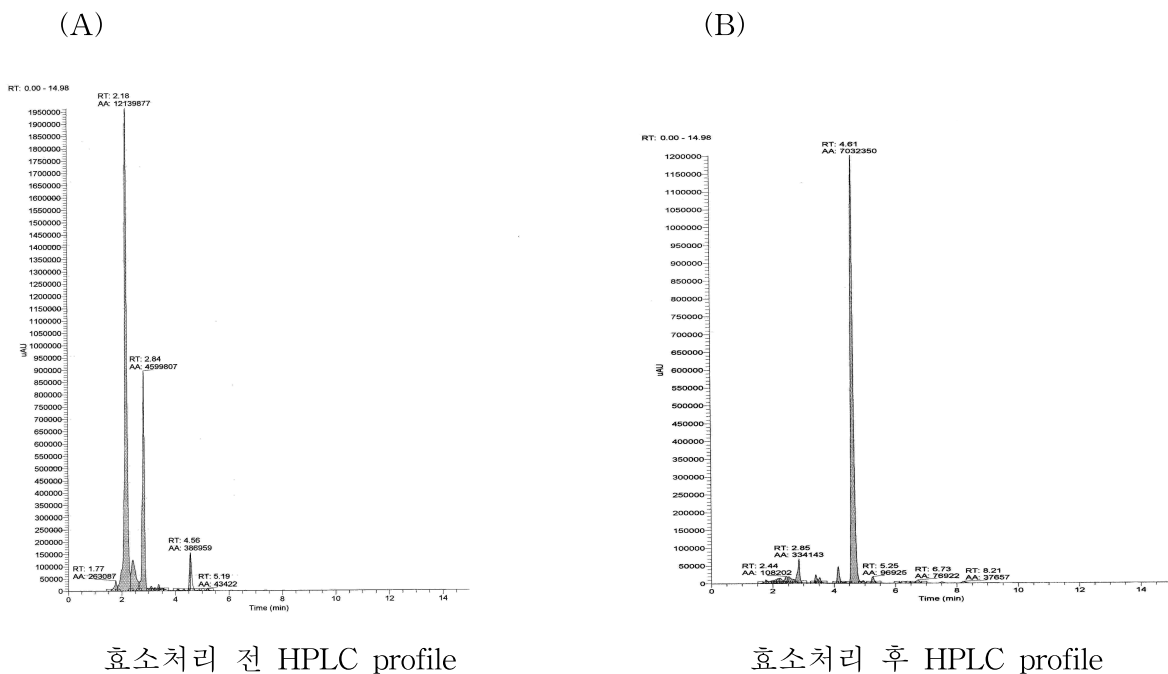
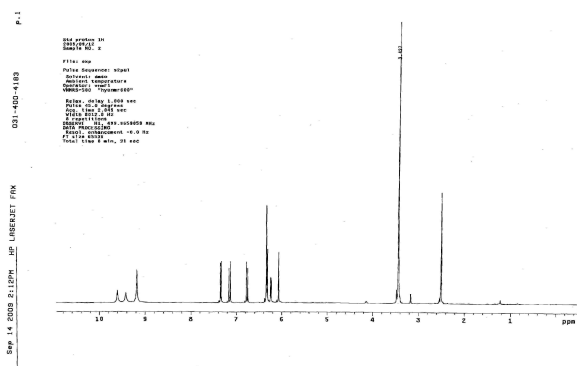
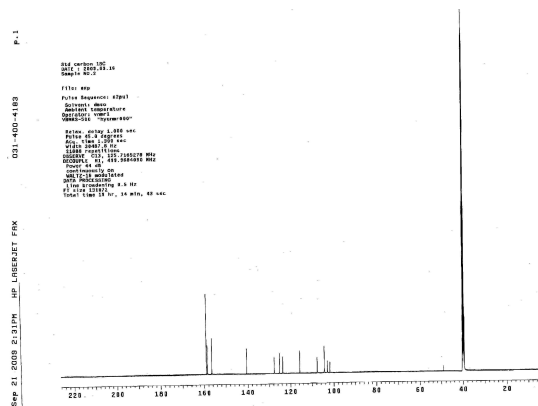


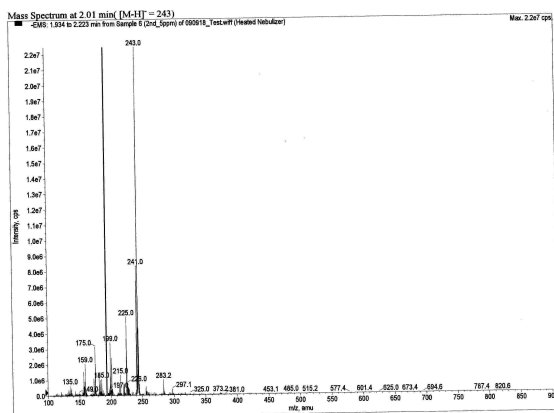
Fig. 4.1-6. 상백피 80% 주정추출 후 HPLC profile



(A) 효소전환 후의 정제물(oxyresveratrol)의 ¹H-NMR spectrum.



(B) 효소전환 후의 정제물(oxyresveratrol)의 ¹³C-NMR spectrum.



(C) 효소전환 후의 정제물(oxyresveratrol)의 Mass spectrum.

Fig. 4.1-7. 효소가수분해에 의한 mulberroside A로부터 oxyresveratrol 생성 확인

(나) 계절에 따른 상지의 oxyresveratrol 함량 변화

뽕나무의 스틸벤 함량은 계절에 따라 크게 변한다는 보고에 따라 충남 광천산 백상(*Morus alba* L.) 상지의 채취 시기별 oxyresveratrol, mulberroside A, resveratrol 함량 변화를 HPLC로 분석하였다. 실험 결과, 늦은 가을(11월 25일) 상지의 oxyresveratrol 함량은 4,687 µg/g로 가장 높았으며 스틸벤중 oxyresveratrol 구성비율도 91.9%로 가장 우수하였다(Table 4.1-4). 한편, 여름(8월 29일) 상지(Fig 4.1-8)의 oxyresveratrol 함량은 79.8 µg/g로 늦은 가을(11월 25일) 상지의 약 1.7%, 늦은 겨울(2월 24일) 상지의 약 3.1% 수준의 매우 낮은 수준의 함량을 나타내었다. 또한 잎이 나오는 시기인 늦은 봄(5월 1일) 상지의 oxyresveratrol 함량은 늦은 가을(11월 25일) 상지의 약 20.9% 수준이었으나 mulberroside A의 함량은 898.7

µg/g로 가장 높게 나타났다. 같은 품종, 같은 지역에서도 상지의 채집 시기에 따라 지표물질인 oxyresveratrol 함량의 차이가 커 채집시기의 선정이 중요한 것으로 나타났다. 따라서 상지의 채집시기는 oxyresveratrol 함량이 높은 늦가을(11월 말)에서 겨울(1월 말)이 가장 적절하다고 사료되었다.

Table 4.1-4. 계절별 상지의 oxyresveratrol 함량 변화

Species Area	Season (date)	Mulberroside A (µg/g)	Oxyresveratrol (µg/g)	Resveratrol (µg/g)
Morus alba L. (광천산)	Winter (24th, Feb)	296.6	2,523.7	21.9
	Spring (1st, May)	898.7	979.7	0.0
	Summer (29th, Aug)	210.2	79.8	0.6
	Fall (25th, Nov)	429.8	4,687.5	9.4



Fig. 4.1-8. 충남광천에서 채집된 여름(8월 29일) 상지의 모양

광천상지 1번, 2번, 3번, 4번 샘플의 8월 29일 oxyresveratrol량을 5월1일 샘플과 비교한 결과, 1번은 8.5% 수준, 2번은 15.9% 수준, 3번은 75.9%, 4번은 6.9%로 현저히 감소하였다(Table 4.1-5). 여름 상지의 oxyresveratrol 량은 봄의 상지의 약 1/10 수준으로 나타났다. 따라서 여름 상지는 oxyresveratrol 량의 감소로 약효가 겨울상지에 비해 매우 낮다고 사료된다.

Table 4.1-5. 봄(5월1일), 여름(8월 29일) 채취된 광천상지의 oxyresveratrol 함량

샘플 (100 g)	주정 추출액 (ml)	Oxyresveratrol		Mulberroside A	
		추출액 역가 ($\mu\text{g/ml}$)	상지역가 ($\mu\text{g/g}$)	추출액 역가 ($\mu\text{g/ml}$)	상지역가 ($\mu\text{g/g}$)
광천상지 1번 5월 1일	800	116.4	931.2	105.5	844.0
광천상지 1번 8월 29일	800	9.97	79.7	26.3	210.4
광천상지 2번 5월 1일	800	53.3	426.4	121.3	970.4
광천상지 2번 8월 29일	800	8.5	67.9	12.5	123.6
광천상지 3번(삼손) 5월 1일	800	54.7	437.6	184.9	1479.2
광천상지 3번(삼손) 8월 29일	800	41.5	332.2	50.4	402.9
광천상지 4번 5월 1일	800	202.5	1620.0	248.1	1984.8
광천상지 4번 8월 29일	800	14.0	112.3	41.9	335.7

(다) 주정 혹은 열수추출에 의한 상지주정추출물내의 oxyresveratrol 함량

100 g의 지리산상지에 800 mL의 80% 주정과 물을 첨가한 후 80% 주정추출은 초음파세척기에서 열수추출은 100°C에서 환류냉각하면서 24시간 각각 추출한 후 HPLC로 oxyresveratrol 량을 비교한 결과, 80% 주정추출은 물에 의한 열수 추출에 비하여 약 22.4배 oxyresveratrol 함량이 높았다(Table 4.1-6, Fig. 4.1-9,10). 따라서 상지로부터 지표물질인 oxyresveratrol의 추출은 열수추출보다는 80% 주정추출이 효과적인 방법으로 나타났다. 비배당체인 oxyresveratrol은 배당체인 mulberroside A보다 비극성 물질로 열수에 의해 추출시 용출되지 않았거나 열에 의해 파괴가 된 것으로 사료되었다. 따라서 oxyresveratrol의 100°C 물에서의 온도 안정성을 검토할 필요가 있다고 사료되었다.

Table 4.1-6. 주정, 열수추출에 의한 상지주정추출물내의 oxyresveratrol 함량 비교

	액량 (ml)	Oxyresveratrol		Mulberroside A	
		역가($\mu\text{g/ml}$)	총역가(μg)	역가($\mu\text{g/ml}$)	총역가(μg)
열수 추출	800	2.4	1,920	0.33	264
80% 주정	800	53.8	43,040	3.71	2,968

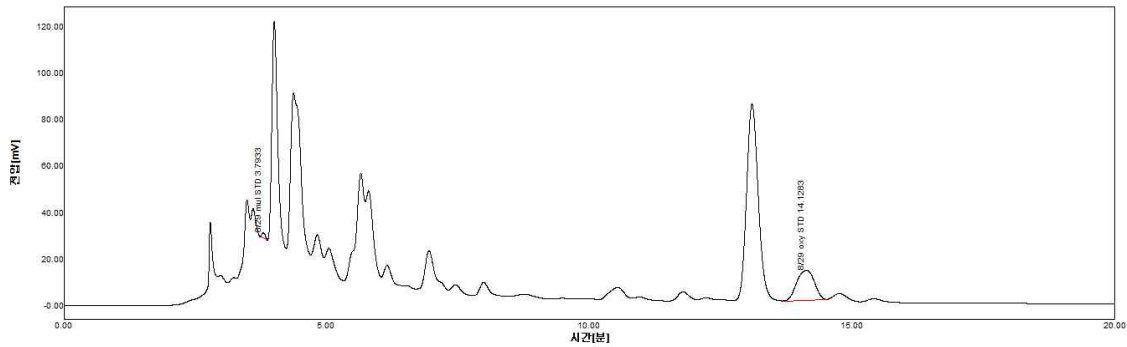


Fig. 4.1-9. 열수환류추출에 의한 상지열수추출물 HPLC profile

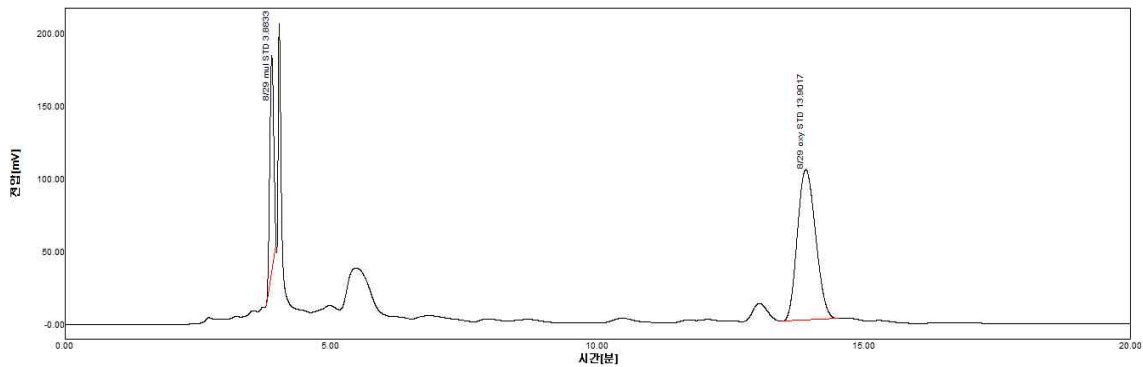


Fig. 4.1-10. 80% 주정추출에 의한 상지추출물 HPLC profile

(라) 주정추출농도에 따른 상지주정추출물내의 oxyresveratrol 함량

앞서 뽕나무 소재로 선정된 충청도 광천에서 채배된 상지를 사용하여 50, 60, 70, 80% 주정으로 추출 후 oxyresveratrol과 mulberroside A 추출량을 분석한 결과, 80% 주정 사용시에 oxyresveratrol 함량은 가장 높게 나타났으며 mulberroside A 함량은 가장 낮게 나타났다

(Table 4.1-6, Fig. 4.1-11,12,13,14). 비배당체인 oxyresveratrol은 배당체인 mulberroside A보다 비극성 물질이기 때문에 60% 주정보다 80% 주정에 잘 용출되었으나 배당체인 mulberroside A은 60% 주정에서 더 많이 용출되었다. 따라서 oxyresveratrol을 용출하기 위한 주정의 농도는 80%로 결정하였다.

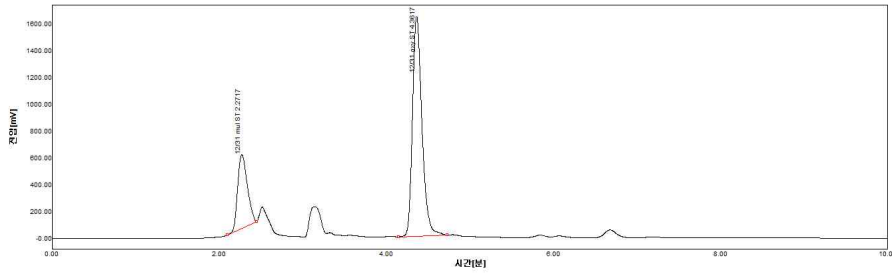


Fig. 4.1-11. 광천 상지의 50% 에탄올 추출후 HPLC profile

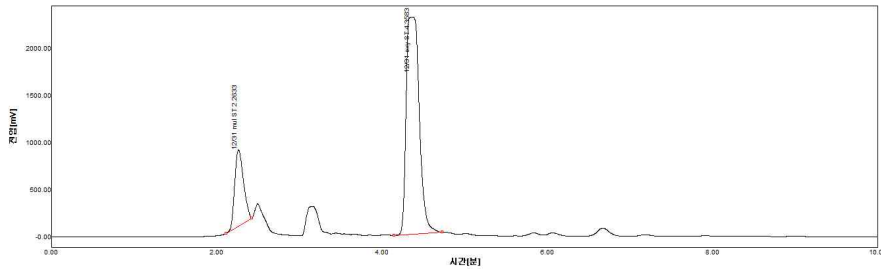


Fig. 4.1-12. 광천 상지의 60% 에탄올 추출후 HPLC profile

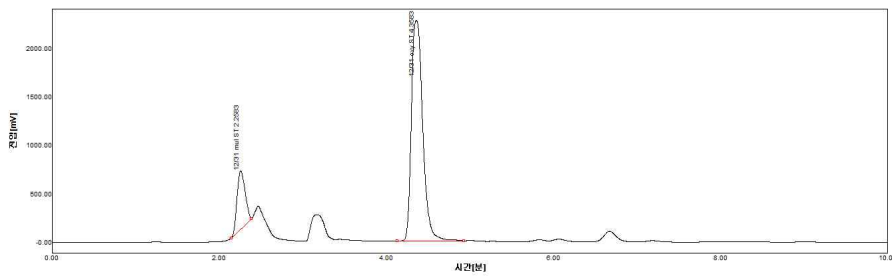


Fig. 4.1-13. 광천 상지의 70% 에탄올 추출후 HPLC profile

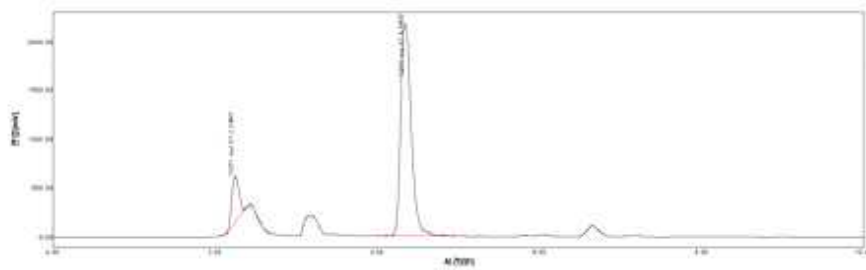


Fig. 4.1-14 .광천 상지의 80% 에탄올 추출후 HPLC profile

55℃의 dry oven에서 3일간 건조한 후 이를 잘게 자른 후 상지 100 g을 수돗물로 깨끗하게 세척하여 이물질을 제거한 후 80% 주정 800 mL를 붓고 초음파 세척기(1일 8시간 추출)하였다. 추출시간별에 따른 oxyresveratrol 양을 HPLC 분석한 결과, 168 시간까지 지속적으로 oxyresveratrol 양은 증가하였다(Table 4.1-7). 그러나 72 시간 이후는 oxyresveratrol 양의 증가는 크지 않았다. 추출시간을 감소시키기 위해서는 상지의 크기를 작게 잘라 표면적을 극대화하는 방법, 추출온도를 높이는 방법, 추출시 가압 혹은 감압 그리고 교반 등의 다양한 방법을 검토할 필요가 있다. 상지의 추출시간은 제품생산시 중요한 원가요소이기 때문에 상지 구입시 잘게 파쇄하여 표면적을 최대한 높이고 교반 등의 방법을 선택하면 보다 짧은 시간에 보다 많은 oxyresveratrol 양을 얻을 수 있다고 사료되어 다양한 실험이 필요하다. 한편, 제2협동 연구기관인 국전약품에서는 추출방법에 대한 검토를 실시하여 잘게 자른 상지를 60℃에서 교반하면서 8시간 추출시 oxyresveratrol 양이 정점에 도달하여 8시간 추출법을 개발하였다.

Table 4.1-7. 추출시간에 따른 상지주정추출물내의 oxyresveratrol 함량

추출시간(h)	추출액량(ml)	Oxyresveratrol		Mulberroside A	
		양(μg/ml)	총량(g)	양(μg/ml)	총량(g)
24	650	185.1	0.120	22.4	0.015
48	650	215.5	0.140	32.2	0.021
72	650	233.0	0.151	35.3	0.029
96	650	241.5	0.157	37.2	0.024
168	650	248.0	0.161	40.5	0.026

나. 추출물 공정의 최적화 및 대량생산 공정 확립

(1) 대량생산 조건 확립

(가) Oxyresveratrol 고함유 뽕나무 품종 및 생산 산지 선정

천연물 내 polyphenol 함량은 품종, 산지, 생산시기, 기후, 영양 상태, 수분상태, 미생물의 감

염 등에 다양한 요인에 의해 영향을 받는다. 1차년 (2014년 11월 26일 채집) 연구 결과에 따르면 국내에서 재배되는 뽕나무 품종중 양평의 수원뽕의 상지내 oxyresveratrol 함량이 가장 높았으며 채집시기도 2월 중순이 좋은 것으로 나타났다. 그러나 상지내 oxyresveratrol의 함량은 수확한 해의 기후, 토지의 영양 상태, 채집시기 등에 따라 oxyresveratrol 량이 차이를 나타낼 수 있다. 따라서 2차년에는 2월 중순 충남 잠사곤충사업장에서 7품종 및 양평 오디 영농조합 사업장에서 2품종(Fig. 4.1-15,16)을 채집하여 상지내 oxyresveratrol의 함량을 HPLC로 분석하였다. 실험결과, 충남 잠사곤충사업장의 8품종 중에서 대심(148 ug/g DW), 수성뽕 (122 ug/g DW), 청일뽕 (75 ug/g DW) 품종의 oxyresveratrol 함량이 높은 것으로 나타났다. 그러나 이는 양평 오디영농 조합의 수원뽕 (1512 ug/g DW)의 1/10-1/15 수준의 낮은 oxyresveratrol 함량이었다. 또한 양평의 청일뽕(1062 ug/g DW)과 충남 잠사곤충 사업장의 청일뽕 (75 ug/g DW)의 함량은 같은 품종이지만 재배지에 따라 15배의 차이를 나타내어 품종뿐 아니라 재배지의 영향도 크다고 사료되었다(Table 4.1-8).



Fig. 4.1-15. 충남 잠사곤충사업장(공주)



Fig. 4.1-16. 양평 오디 영농조합 농가

Table 4.1-8. 뽕나무 품종 및 채집 지역별 oxyresveratrol 함량 분석.

품종명	채집장소	Oxyresveratrol ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	
		2014. 11. 26 채집	2016. 2.11 채집
수성뽕	충남 잠사곶충사업장	29.7	122.4
수원노상	충남 잠사곶충사업장	8.9	45.1
청일뽕	충남 잠사곶충사업장	128.0	75.5
개량뽕	충남 잠사곶충사업장	88.0	49.0
대심	충남 잠사곶충사업장	130.6	148.1
상천조생	충남 잠사곶충사업장	30.5	58.8
청울뽕	충남 잠사곶충사업장	128.0	55.6
청일뽕	경기 양평 농가	377.1	1,062.1
수원뽕	경기 양평 농가	611.3	1,512.3

(나) 채집시기별 상지의 oxyresveratrol 함량 변화

1차년 연구에서 광천 야생종 상지를 이용하여 채집시기별 oxyresveratrol 함량을 분석한 결과, 12월, 2월의 겨울에 높은 것으로 나타났다. 그러나 상지주정 추출물 제조 품종으로 선정된 경기도 양평지역의 수원뽕의 채집시기는 1차년 실험한 야생종과는 다를 것으로 사료되어 1월, 2월, 4월, 8월, 10월, 11월, 12월에 채집하여 oxyresveratrol 함량을 HPLC로 분석하였다(Fig. 4.1-17). 실험결과, 수원뽕 상지내의 oxyresveratrol 함량은 봄(4월), 여름(8월), 가을(10월, 11월)보다 겨울(12월, 1월, 2월)이 높은 것으로 나타났다. 특히, 1월 상지는 $1,387.2 \mu\text{g/g}$ dry weight, 2월 상지는 $1,652.0 \mu\text{g/g}$ dry weight, 4월 상지는 $1233.7 \mu\text{g/g}$ dry weight으로 1년 중 2월의 oxyresveratrol 함량이 가장 높게 나타나 수원뽕 상지의 채집시기를 2월 말-3월초로 결정하였다. 한편, 여름인 8월 상지는 $47.6 \mu\text{g/g}$ dry weight, 10월 상지는 $27.9 \mu\text{g/g}$ dry weight, 11월 상지는 $184.4 \mu\text{g/g}$ dry weight으로 겨울 상지에 비해 매우 낮은 수준으로 나타났다. 따라서 수원뽕 상지의 oxyresveratrol 함량은 채집시기에 매우 의존적이며 상지내의 oxyresveratrol 함량은 강한 추위를 겪으면서 축적되는 것으로 사료되었다.

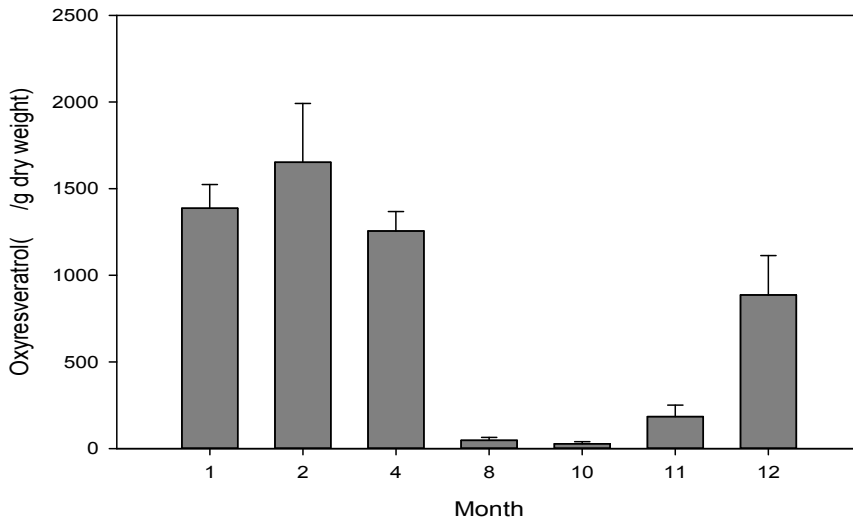


Fig. 4.1-17. 상지의 채집시기별 oxyresveratrol의 역가 변화

(다) 상지의 숙성에 의한 oxyresveratrol 함량 변화

포도, 땅콩, 아몬드, 사탕수수내의 resveratrol, piceatannol 등과 같은 스티벤 물질은 건조 온도, 건조 시간, 자외선, 미생물 감염, 화학물질 자극 등의 숙성방법 (Postharvest)에 따라 그 함량이 크게 증가한다고 보고하고 있다.

2015년 11월 26일 충남 잠사곤충사업장에서 채집된 상지와 양평군 계정리 농가에서 채집된 상지를 6-15 mm의 크기로 절단한 후 30°C에서 7일 숙성시킨 후 품종별 숙성에 의한 oxyresveratrol 함량 변화를 HPLC로 분석하였다(Fig. 4.1-18).

실험 결과, 충남 잠사곤충사업장의 7종 뽕나무 품종을 30°C, 7일 숙성할 시 oxyresveratrol 함량이 1-3.5 배 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 경기도 양평군 양동면 계정리에서 채집된 수원뽕 상지(YS)의 oxyresveratrol은 65.7 µg/g dry weight에서 632.3 µg/g dry weight으로 약 9.6배 증가, 청일뽕 상지(YC)의 oxyresveratrol은 79.1 µg/g dry weight에서 562.3 µg/g dry weight로 약 7배 증가하였다.

이 결과로부터 상지 숙성의 최적의 물리적, 생물학적 조건 찾아낸다면 상지내 oxyresveratrol 함량을 크게 높일 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 상지내 oxyresveratrol 함량을 증가시키기 위해 숙성방법(숙성 온도, 숙성시간, 수분함량, UV 조사, 미생물 접종) 등에

대한 검토가 필요하였다.

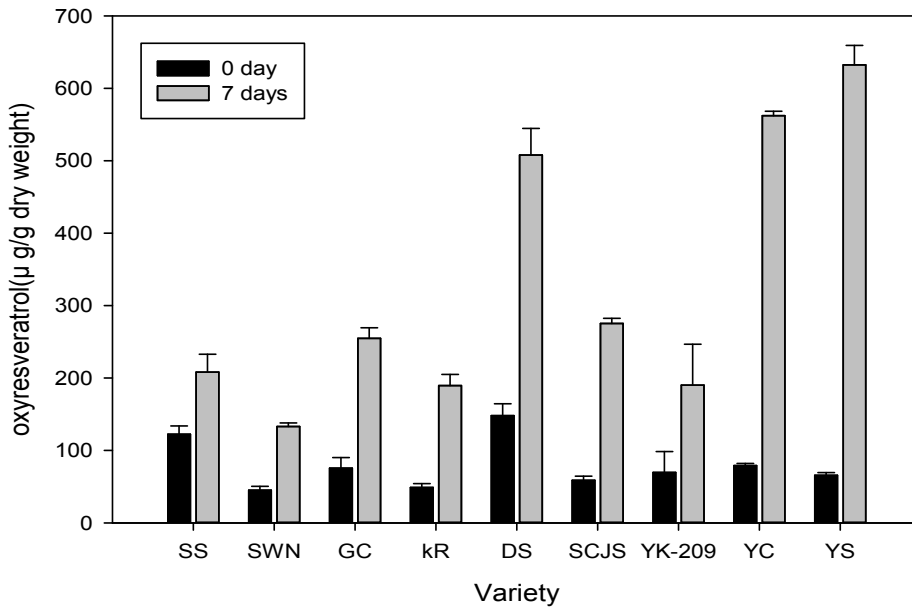


Fig. 4.1-18. 뽕나무 품종별 숙성에 의한 oxyresveratrol 함량 비교
 SS: Suseong, SWN: Suwon-No-sang, GC: Gongju-Cheongil, KR: Kaeryang, DS: Daesim, SCJS: Sangcheonjosaeng, YC: Yangpyeong-Chungil, YS: Yangpyeong-Suwon.

(라) 숙성시간에 따른 상지의 oxyresveratrol 함량 변화

경기도 양평 계정리의 수원뽕과 청일뽕은 다른 지역, 다른 품종에 비해 oxyresveratrol 함량이 높은 것으로 확인됨에 따라 수원뽕 상지와 청일뽕 상지를 사용하여 숙성 기간(0, 2, 4, 6, 8, 10일)에 따른 축적되는 oxyresveratrol 함량 변화를 HPLC로 조사하였다(Fig. 4.1-19). 11월 채집된 수원뽕과 청일뽕을 30°C에서 숙성한 결과, 6일까지 숙성 기간이 증가함에 따라 oxyresveratrol 함량이 증가하였으며 8일차에서는 oxyresveratrol 함량이 감소하는 것으로 나타났다.

수원뽕 상지의 경우 6일 숙성시 옥시레스베라트롤 함량은 940.6 μg/g dry weight로 0일차 (65.7 μg/g dry weight)보다 약 14배 증가하였다. 한편, 청일뽕 상지의 경우는 6일 숙성시 oxyresveratrol 함량은 562.3 μg/g dry weight로 0일차 (79.1 μg/g dry weight) 보다 약 7.1배 증가하여 수원뽕 상지가 청일뽕 상지보다 숙성 중에 oxyresveratrol을 더 많이 축적하는 것으로 밝혀졌다.

본 실험 결과, 30°C 건조하에서 숙성 기간으로 6일이 적절하다고 사료되었다.

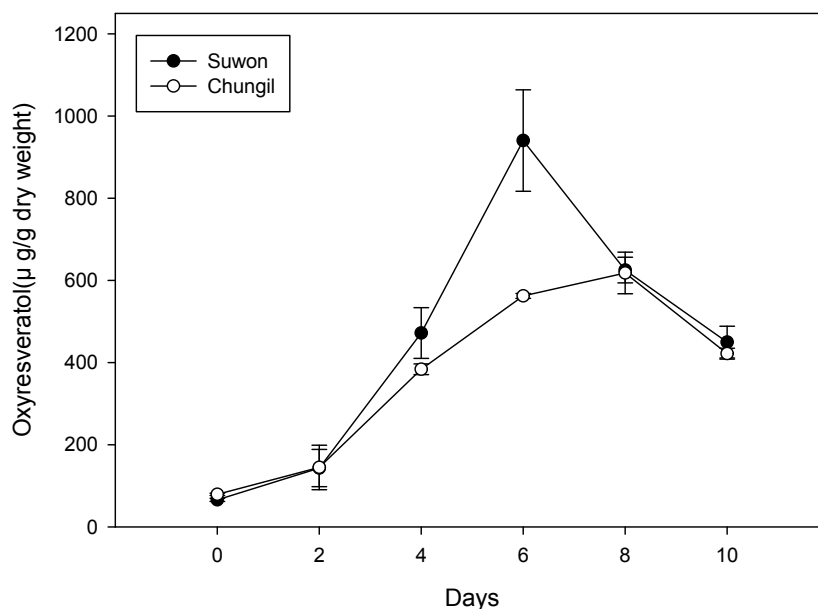


Fig. 4.1-19. 수원뽕 상지와 청일뽕 상지의 숙성기간에 따른 oxyresveratrol 축적 효과

(마) 상지의 절편 크기에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

Boue 등(13)의 사탕수수 postharvest 연구논문에 따르면 절편의 크기가 작아질수록 piceatannol 량이 축적이 증가한다고 보고하였다. 따라서 수원뽕 상지를 6 mm 이하, 7~18 mm, 및 20~30 mm의 크기로 절단한 후, 30°C에서 숙성 기간에 따른 oxyresveratrol 함량 변화를 확인하였다(Fig. 4.1-20).

숙성중 축적된 상지 중의 oxyresveratrol 함량을 분석한 결과, 6 mm 이하의 상지는 6일 숙성 시 oxyresveratrol 함량이 1,987.3 μg/g D.W.로 가장 높게 나타났다. 7~18 mm의 상지에서는 8일간 숙성 시 oxyresveratrol 함량(2,060 μg/g D.W)이 가장 높게 나타났다.

20~30 mm의 상지의 경우는 10일 숙성시 oxyresveratrol 함량이 2,230.6 μg/g D.W.로 가장 높게 나타나 절편의 크기가 증가함에 따라 숙성일수도 증가하는 것으로 나타났다. 이에 따라 절편이 길이에 따라 숙성 시간을 달리 해야 할 것으로 사료된다.

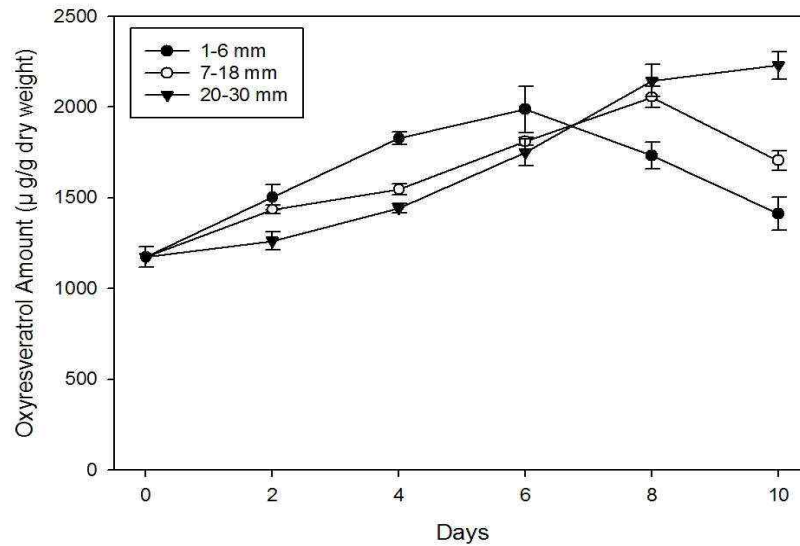


Fig. 4.1-20. 상지의 절편크기에 따른 oxyresveratrol 역가변화.

(바) 하절기 상지의 oxyresveratrol 역가 및 postharvest 효과

국내에서 오디의 수확은 주로 6월에 이루어지고 있다. 오디 수확 후 내년도 오디의 다량 수확을 위해 오디를 딴 상지는 절지를 하여 새로운 상지가 나오도록 유도한다. 따라서 오디농가에서는 7월 다량의 상지가 폐기물로 만들어지고 있다. 하절기 폐기물로 나오는 상지의 이용 가능성을 검토하기 위하여 하절기 8월 수원뽕과 청일뽕 상지의 oxyresveratrol 함량을 검토하였다(Table 4.1-9). 조사결과, 8월 수원뽕과 청일뽕 상지의 oxyresveratrol 함량은 동절기에 비해 1/10-1/30 수준의 매우 낮은 역가를 나타내었다. 이를 5일 postharvest 한 결과, 수원뽕은 1255.7 ug/g dry weight, 청일뽕은 818.1 ug/g dry weight를 나타내었다. 또한 10일 postharvest한 결과, 수원뽕은 1247.0 ug/g dry weight, 청일뽕은 968.8 ug/g dry weight를 나타내어 하절기 상지를 사용하기 위해서 앞으로 postharvest 연구가 더 필요하다고 사료되었다(Fig. 4.1-21,22).

Table 4.1-9. 하절기 수원뽕과 청일뽕 상지의 oxyresveratrol 역가 및 postharvest 효과

	Oxyresveratrol(µg/g dry weight)					
	0 일	수분함량(%)	5 일	수분함량(%)	10 일	수분함량(%)
수원뽕	47.5	56.1	1,255.7	8.4	1,247.0	5.7
청일뽕	104.8	68.8	818.1	8.4	968.8	6.9

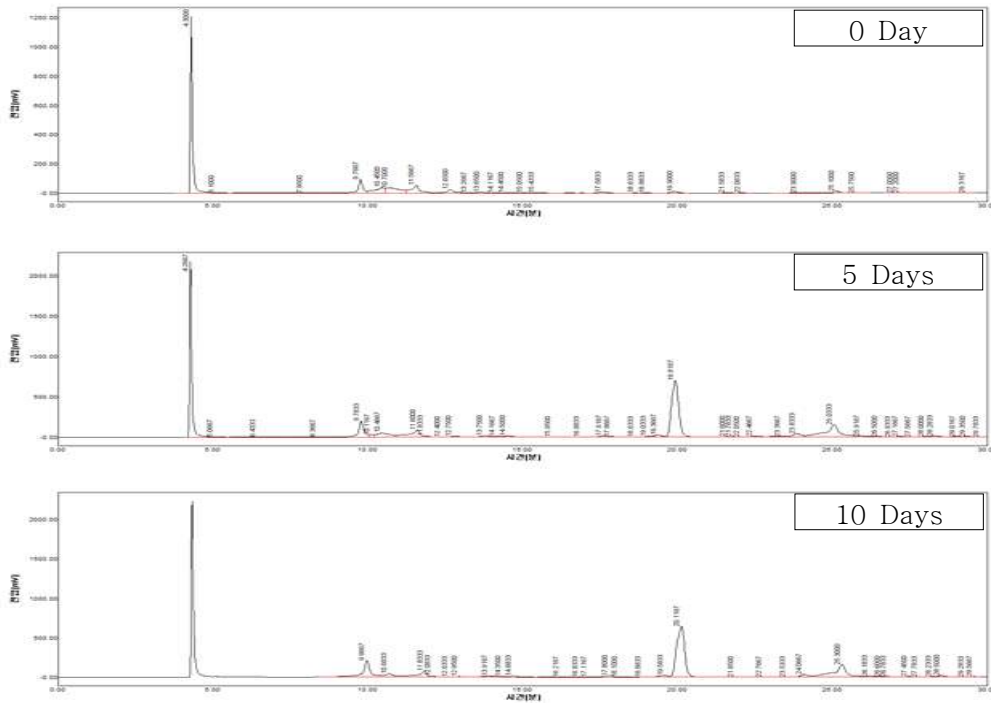


Fig. 4.1-21. 하절기 수원뽕 상지의 postharvest 효과

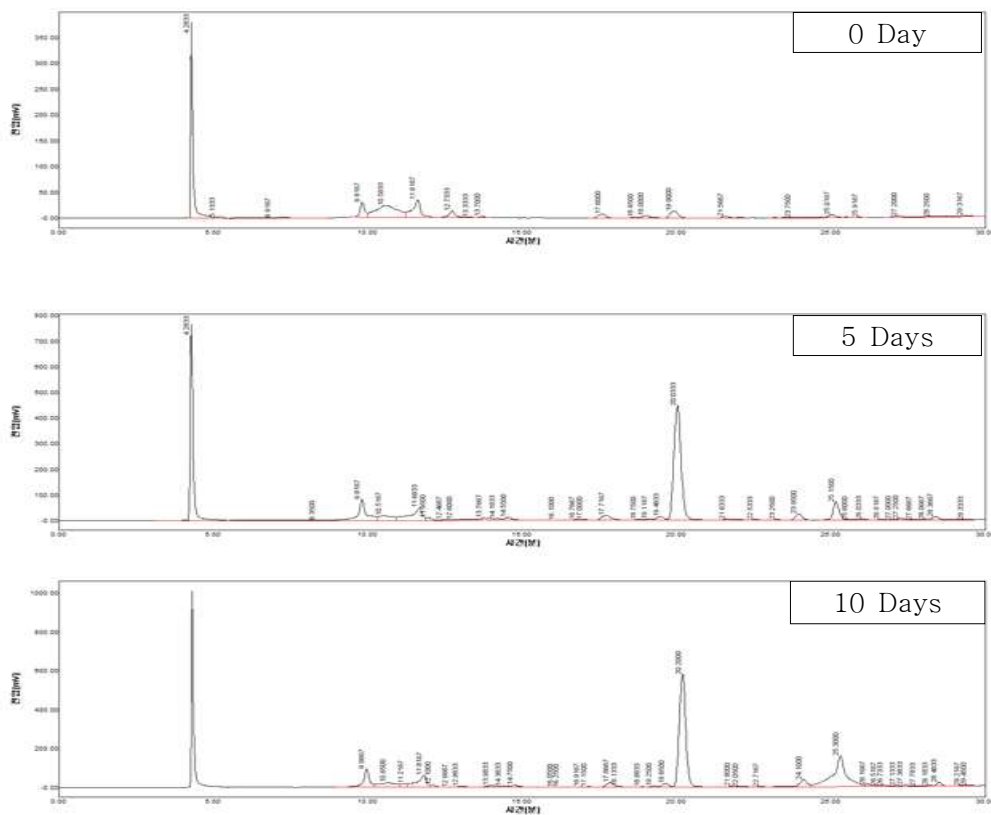


Fig. 4.1-22. 하절기 청일뽕 상지의 postharvest 효과

(사) 건조시간에 따른 수분함량과 oxyresveratrol 함량 비교

따라서 본 실험에서는 양평지역에서 재배된 수원뽕 상지를 일정 크기로 절단(6-15 mm) 후 숙성 기간(0, 2, 4, 6, 8일)에 따른 축적되는 oxyresveratrol 변화와 수분함량의 변화를 조사하였다(Fig. 4.1-23,24).

25°C의 경우는 32.5°C보다 수분함량이 감소하는 속도가 느려서 수분함량이 더 이상 감소하지 않는 때가 될 때까지 5일 정도가 걸렸고, 32.5°C는 3일 만에 더 이상 수분이 감소하지 않았다. 이에 따른 역가를 비교하여 보면 25°C는 수분 함량이 5.5%인 4일 차에 oxyresveratrol의 함량이 최대였다. 그 후에는 수분함량의 변화가 없었지만 함량은 점점 감소하는 양상을 보였다. 32.5°C의 함량은 4일차에 감소하였다가 다시 증가하는 양상을 보였는데 실험 과정에서 오류로 인한 것으로 사료된다.

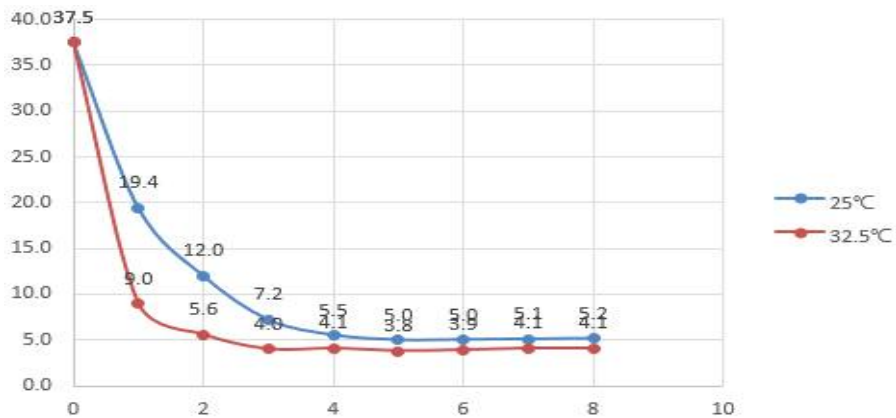


Fig. 4.1-23. 건조시간에 따른 수분함량 변화

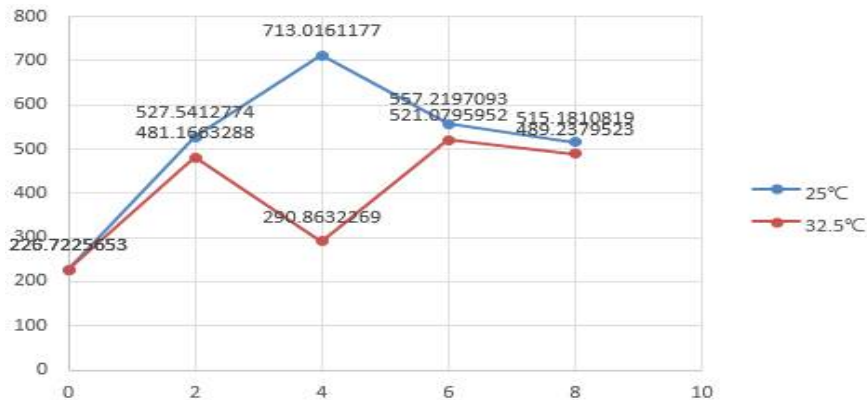


Fig. 4.1-24. 건조시간에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

(아) 미생물 발효에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

사탕수수의 피세아탄올과 레스베라트롤의 축적 연구에서 *Collectotrichum falcatum*으로 오염되어 7일간 숙성 시, 피세아탄올은 약 50배, 레스베라트롤은 약 6배 증가하였다(13).

따라서 본 실험에서는 양평군 계정리에서 1월 말에 채집된 수원뽕 상지를 사용하여 미생물에 의한 oxyresveratrol 축적을 검토하였다. 본 실험에서는 식품의 안전을 위해 곰팡이를 제외하고 안전하다고 인정된 미생물(Generally Recognized As Safe, GRAS)로 알려진 6종의 세균 및 효모를 접종한 후 30°C에서 11일간 숙성하면서 oxyresveratrol 함량 변화를 확인하였다(Fig. 4.1-25).

6종의 미생물중 *B. coagulans*에서 가장 높은 oxyresveratrol 축적을 나타내었다. 7일 숙성시 물을 접종한 실험구의 oxyresveratrol 함량은 480 µg/g D.W인 반면에 *B. coagulans*를 접종한 실험구는 1510 µg/g D.W를 나타내어 세균 미접종시보다 약 3배 oxyresveratrol 함량이 증가하였다. 11일 숙성시 물을 접종한 실험구의 oxyresveratrol 함량은 460 µg/g D.W인 반면에 *B. coagulans*를 접종한 실험구는 2100 µg/g D.W를 나타내어 약 4배 증가하였다. 한편, *L. acidophilus*를 감염시킨 상지에서는 7일 숙성시 oxyresveratrol 함량은 1210 µg/g D.W로 약 2.5 배 증가하였다. 그밖에 *S. cerevisiae*와 *Pichia* 등의 효모 접종은 *B. coagulans* 혹은 *L. acidophilus*에 비하여 oxyresveratrol 축적이 많지 않았다.

실험 결과, 상지에 미생물의 접종은 스트레스로 작용하여 oxyresveratrol 축적을 촉진함을 확인할 수 있었다. 또한 사용한 균종에 따라 oxyresveratrol 축적이 다름을 확인하였다.

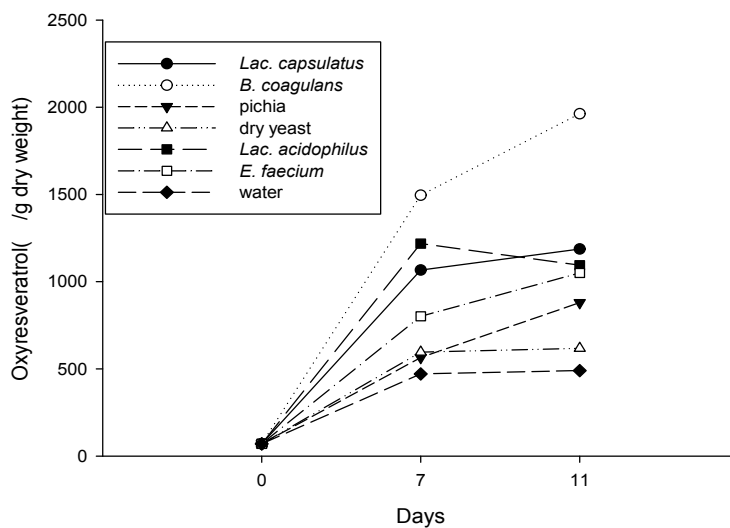


Fig. 4.1-25. 미생물을 이용한 숙성에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

(자) *B. subtilis* 접종 후 숙성온도에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

GRAS (Generally Recognized As Safe)로 알려진 6종의 세균 및 효모를 접종 실험에서 oxyresveratrol 함량 증가에 가장 효과를 나타낸 *B. subtilis*를 접종한 후 25, 30, 35, 40°C에서의 숙성 효과를 확인하였다(Fig. 4.1-26).

실험 결과, 25°C에서 숙성할 시 가장 높은 oxyresveratrol 함량 증가를 나타내었다. *B. subtilis*가 잘 자라는 온도인 40°C에서의 oxyresveratrol 함량은 25°C에 비해 약 1/3 의 낮은 oxyresveratrol 함량을 나타내었다. 그러므로, *B. couagulans*를 접종시킨 후 oxyresveratrol 함량을 높이기 위해서는 25°C에서 숙성시키는 것이 가장 효과적인 것으로 사료되었다.

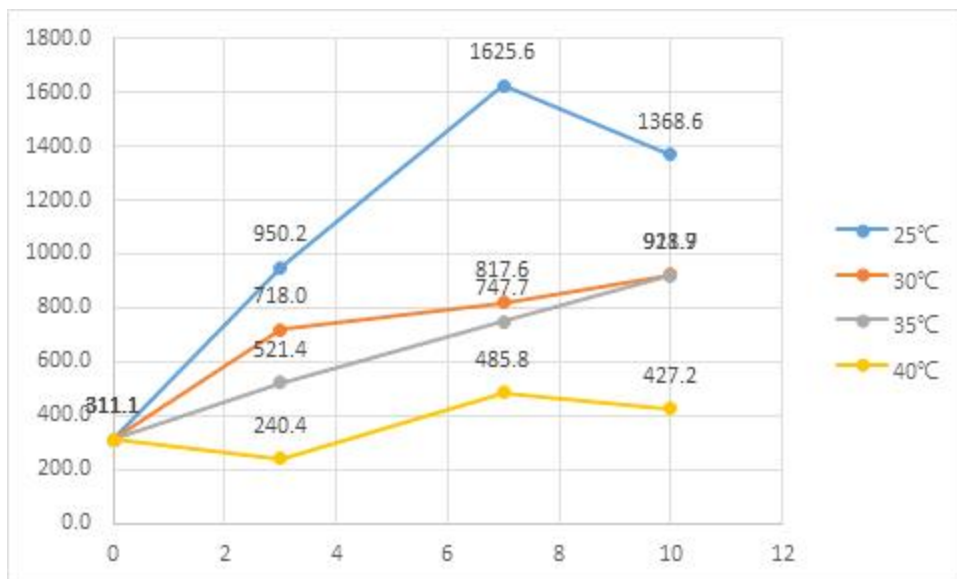


Fig. 4.1-26. *B. subtilis* 접종 후 숙성온도에 따른 oxyresveratrol 함량 변화

(차) 대량 상지의 숙성에 따른 oxyresveratrol 역가 변화

경기도 양평군 계정리의 수원뽕과 청일뽕 상지를 250 kg씩 2월에 채집한 후 고압세척기로 세척후 15-30 mm 길이로 자르고, 30°C에서 5일간 숙성하면서 oxyresveratrol 축적 효과를 확인하였다(Fig. 4.1-27). 5일 숙성 시 수원뽕 상지의 oxyresveratrol 3,353.8 µg/g D.W.로 숙성 전(1,512.3 µg/g D.W.)보다 약 2.2배, 청일뽕 상지는 1,611.2 µg/g D.W.로 숙성 전(1,062.1

µg/g D.W.)보다 약 1.5배 증가하였다. 따라서 대량의 상지를 이용한 숙성 실험 결과, 실험실 조건과 비슷한 oxyresveratrol 축적 효과를 확인하였다.

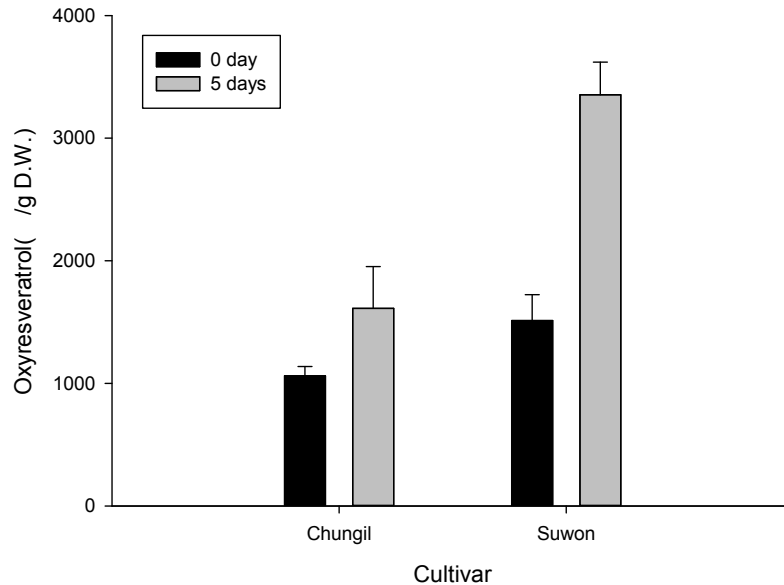


Fig. 4.1-27. 대량의 상지의 숙성을 통한 oxyresveratrol 함량 변화

2. 추출물 공정의 최적화 및 대량생산 공정 확립

(1) 상지주정추출분말 제조공정의 표준화

유효성분을 가장 많이 함유하는 원료, 추출조건 및 숙성조건에 대한 실험 결과를 바탕으로, 상지주정추출분말 제조공정을 다음과 같이 표준화 하였다(Fig. 4.2-1).

1. 2월중 산지로부터 상지를 채집한 후 oxyresveratrol 함량을 분석한다(0일차 1000 µg/g dry weight 이상). Oxyresveratrol의 역가, 중금속 등을 분석하여 생산여부를 결정한다.
2. 채집된 상지를 고압세척기를 이용하여 수돗물로 깨끗하게 철저히 세척한다.
3. 세척된 상지는 15-30 mm 크기로 절단기를 이용하여 절단한다.
4. 절단 상지에 *B. coagulans*를 접종한 후 건조기를 이용하여 30°C에서 5일 숙성 건조한다. 적외선 수분 측정기를 이용하여 수분 함량이 5% 이상이면 1일 더 건조한다.
5. 숙성 건조된 상지의 무게 대비 약 10배의 80% 주정을 붓고 95도씨에서 4-5시간 환류 추

출한다.

6. 주정 추출액을 0.45 μm 필터 혹은 세라믹 필터를 이용하여 여과하여 이물질 제거한다.
7. 여과된 추출액은 감압농축기에서 50-60℃로 감압 농축한다. 이때 알콜 측정기를 이용하여 주정 알코올이 2% 이하 일 때까지 농축한다. 동결 건조를 위한 감압 농축액은 -30℃ 이하의 냉동고에서 동결한다.
8. 동결건조는 heating 온도 30℃로 1-2일 행한다.
9. 동결 건조된 샘플은 oxyresveratrol 함량, 미생물, 중금속등의 검사를 실시한다.

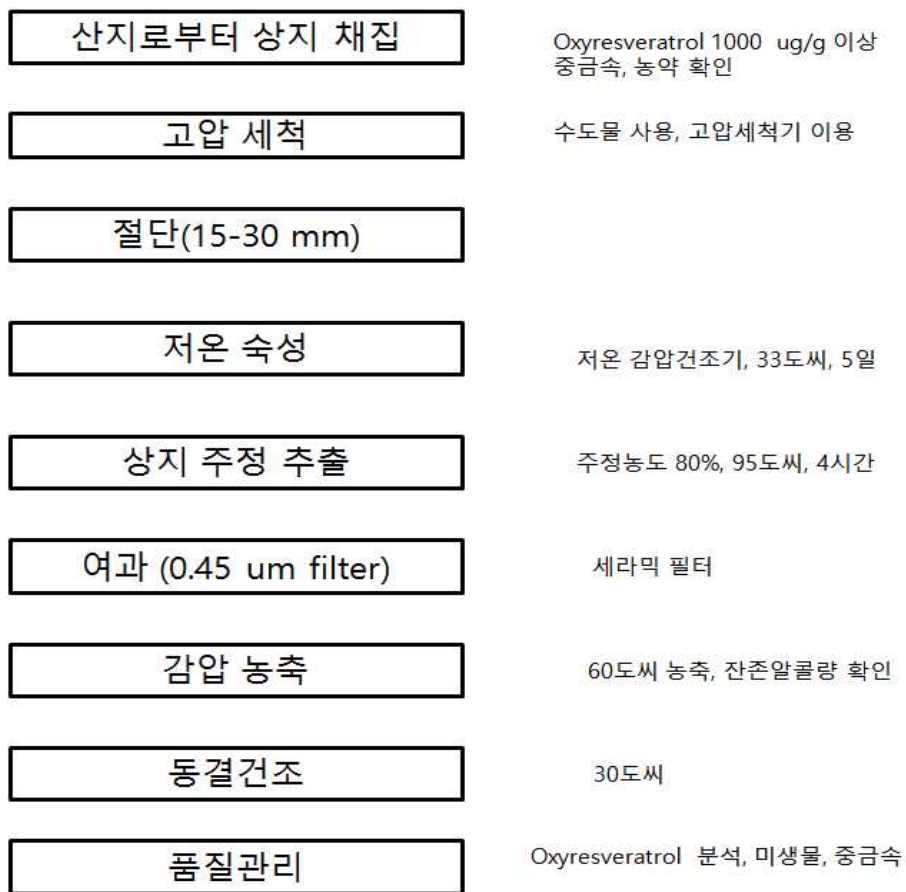


Fig. 4.2-1. 상지주정추출분말의 제조과정

(2) 표준용액 제조 및 검량곡선 유도

Oxyresveratrol (≥97.0% (HPLC), sigma, catalog No. 91211) 표준물질 4 mg을 HPLC용 메탄올 10 ml에 녹여 400 μg/ml 용액을 만든 후 희석시켜가며 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml

g/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml을 만들었다. 이렇게 7개의 농도 샘플을 가지고 각각 세 번씩 HPLC 분석을 반복하였다. 이 결과의 평균값을 토대로 검량곡선을 작성하고 그 방정식을 유도하였다(Fig. 4.2-2).

HPLC Analysis conditions

- Column phenomenex ROP-18 250 × 4.6 mm (5 m)
- Detector - Waters 2998 PDA (320 nm)
- Pump - Waters 1525
- Temperature : Room Temp.
- Injection volume : 20 µl
- Run time : 40 min
- Flow rate : 1 ml/min
- Solvent system

Time (min)	% ACN	% H ₂ O
0	20	80
10	20	80
20	40	60
30	60	40
40	20	80

(가) Calibration curve of Oxyresveratrol

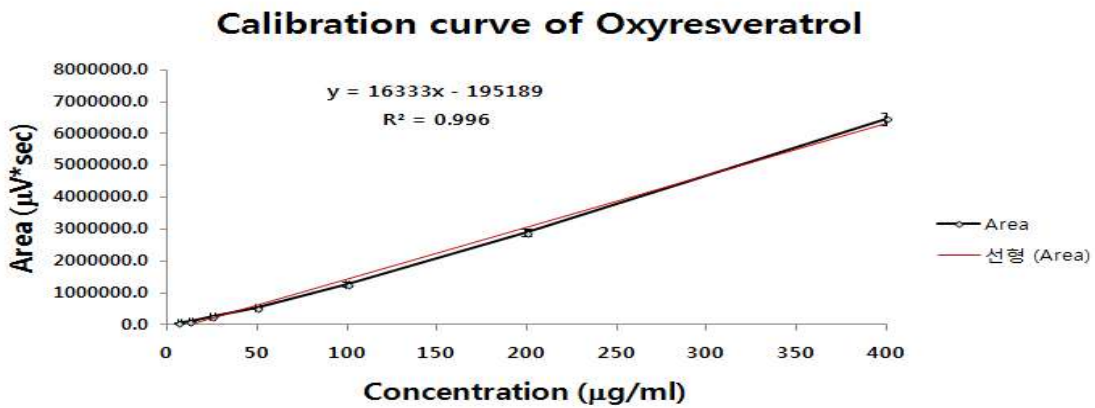


Fig. 4.2-2. Calibration curve of oxyresveratrol

(나) 직선성 (linearity)

6.25~400 ug/ml 농도의 표준액 Oxyresveratrol(ORT)을 제조하여 확립된 분석법을 이용하여 3회 주입하였다. 이를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선으로부터 직선식의 상관계

수 (correlation coefficient)를 구하여 직선성 ($R^2 = 0.996$)을 확인하였다.

(다) 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)의 결정

검량선의 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$\triangleright \text{LOD} = 3.3 * \sigma / S1) ; \text{LOQ} = 10 * \sigma / S1)$$

(σ : y 절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

- 식품의약품안전처 의약품평가부 : 의약품등 분석법의 벨리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약품안전처 1(2004)
- 기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차 (σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y 절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용하였다.
- LOD = 6.19 ug/ml, LOQ = 18.8 ug/ml

(라) 시료처리

- 시료제조의 최적화

- 경상남도 산청군 지리산 상지를 사용하였고, 추출의 극대화를 위하여 건조된 시료를 분쇄기를 이용하여 잘게 분쇄하여 추출에 사용하였다.

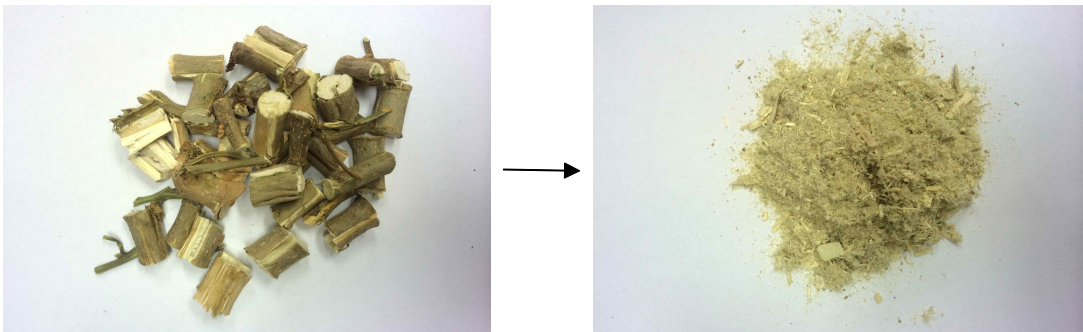


Fig. 4.2-3. 상지의 분쇄 과정

(마) 추출 과정의 최적화 연구

<HPLC Analysis conditions>

- Column phenomenex ROP-18 250 × 4.6 mm(5 m)
- Detector - Waters 2998 PDA (320 nm)
- Pump - Waters 1525
- Temperature : Room Temp.
- Injection volume : 20 µl
- Run time : 60 min
- Flow rate : 1 ml/min
- Solvent system : gradient syster

Time (min)	% ACN	%H ₂ O
0	20	80
10	20	80
20	40	60
30	60	40
40	20	80

(바) 용매의 함수 30, 50, 70, 80 및 94% ethanol의 조건 변화

추출조건 : 상지 분말 5 g/ EtOH 150 ml (30배수), 12 h, 60°C, 200 rpm

EtOH 농도	ORT mg/상지 100 g
30%	40.97
50%	47.55
70%	51.48
80%	50.16
94%	46.49

70%, 80% 에탄올 조건이 추출효율이 높음.

(사) 에탄올의 농도를 70%와 80%로 고정한 후, 온도 및 시간조건 변화

추출조건 : 상지 분말 5 g/ EtOH 100 ml, 200 rpm

		< ORT mg/상지100 g >							
시간	온도	Room Temp.		40 °C		60 °C		80 °C	
	용매	EtOH		EtOH		EtOH		EtOH	
		70%	80%	70%	80%	70%	80%	70%	80%
4 hr	1 st	37.91	35.34	39.70	38.15	42.17	38.69	36.02	38.33
	2 nd	39.00	41.41	-	-	44.78	-	37.60	35.48
8 hr	1 st	35.45	36.10	41.82	42.86	45.27	37.86	41.10	36.23
	2 nd	35.06	34.09	-	-	43.47	-	37.74	33.55
12 hr		40.19	36.64	42.51	40.15	46.00	35.94	42.92	40.27
24 hr	1 st	33.29	32.43	40.74	40.15	38.90	38.23	34.07	33.72
	2 nd	35.70	33.47	-	-	43.06	-	37.80	36.94
96 hr		32.98	32.48

(아) 용매의 함수 30, 50, 70, 80 및 94% ethanol의 조건 변화

추출조건 : 상지 분말 5 g/ EtOH 150 ml, 12 h, 60°C, 200 rpm

EtOH 농도	ORT mg/상지 100 g
30%	40.97
50%	47.55
70%	51.48
80%	50.16
94%	46.49

(ORT = Oxyresveratrol)

⇒ 70%, 80% 에탄올 조건이 추출효율이 높음.

(자) 에탄올의 농도를 70%와 80%로 고정 한 후, 온도의 함수(40, 60 및 80°C)와 시간의 함수(4, 8, 12, 24 및 96 시간) 조건을 변화

추출조건 : 상지 분말 5 g/ EtOH 100 ml, 200 rpm

1 st		< ORT mg/상지100 g >							
온도	Room Temp.		40 °C		60 °C		80 °C		
	용매	70% EtOH	80% EtOH	70% EtOH	80% EtOH	70% EtOH	80% EtOH	70% EtOH	80% EtOH
시간									
4 hr	37.91	35.34	39.70	38.15	42.17	38.69	36.02	38.33	
8 hr	35.45	36.10	41.82	42.86	45.27	37.86	41.10	36.23	
12 hr	40.19	36.64	42.51	40.15	46.00	35.94	42.92	40.27	
24 hr	33.29	32.43	40.74	40.15	38.90	38.23	34.07	33.72	
96 hr	32.98	32.48	

(차) 용매/시료의 함수: 7, 10, 15, 20 mL/g의 조건 변화

시료(상지)의 양을 5 g 으로 고정시켜 놓고, 용매(70% 에탄올)의 양을 7배, 10배, 15배, 20배로 변화시키며 60°C, 200 rpm 에서 아래 시간동안 교반시켰다.

- 추출조건 : 상지 분말 5 g, 70% 에탄올, 60 °C, 200 rpm

		< ORT mg/상지 100 g >			
용매량		7배	10배	15배	20배
		35 ml	50 ml	75 ml	100 ml
시간	1 st	42.74	31.68	33.44	42.17
	2 nd		28.95	33.44	44.78
3 rd	30.14		35.46	-	
4 th	41.76		-	-	
Aver±STD			33.13±5.86	34.11±1.17	43.48±1.85
8 hr	1 st	50.56	35.67	34.01	45.27
	2 nd		33.31	34.25	43.47
	3 rd		30.87	34.99	-
	4 th		41.34	-	-
	Aver±STD		35.30±4.48	34.42±0.51	44.37±1.27

- 7 배 용매를 사용하였을 시에는, 사진과 같이 모든 상지가 용매에 잠기지 않은 채로 추출이 진행되어 적합하지 않다고 판단하였다.
- 용매량이 많을수록 추출되는 ORT의 양이 증가하지만, 늘어난 용매 비율만큼 ORT 함량이 효율적으로 증가되지는 않았다. 따라서 대량스케일로 추출하는 경우, 용매량을 줄이는 것이 더 합리적이다.
- 10배 용매와, 15배 용매를 사용하여 추출하였을 경우를 비교하면, 용매량은 1.5배 차이가 나지만, ORT 함량은 1.17배 정도밖에 차이가 나지 않는다. 따라서 10배 용매량을 사용하는 것이 가장 경제적인 추출 조건이라고 판단된다.

(카) 한국산업기술대학교(산기대)의 상지 추출 결과와 비교

- 산기대 추출조건과 유사한 45℃, 80% 에탄올, 72 시간으로 추출해보았다.
- 산기대는 상지 5 g 에 에탄올용액 100 ml를 사용해 200 rpm으로 교반하여 추출하였으며, 결과는 다음과 같다.

45℃, 80%, 72 hr -ORT -mg/상지 100g	35.56
----------------------------------	-------

- 차이점 : 같지 않은 상지 사용, 소량의 용매 사용, 추출시 sonicator 사용

(타) 추출 횟수의 함수 : 1차, 2차 추출액에서 oxyresveratrol 함량 분석

- 앞서 확인한 결과들 중에서 가장 효율적이라고 판단된 조건인 60℃, 70℃ 에탄올, 10배 용매로 200rpm으로 교반하며 4시간씩 연속으로 두 번 추출해 보았다.
- 상지 100g에 에탄올용매 1000ml를 사용하여, 처음 네 시간 동안 추출 후 용액은 감압조건에서 membrane filter로 여과한다. 남은 상지에 다시 1000ml 에탄올 용매를 부어 4시간 동안 추출하고, 같은 방식으로 추출액만을 얻어내 농축시켰다.
- 추출조건 : 상지 분말 100 g, 70% 에탄올 1000 ml, 4 시간, 60℃, 200 rpm

추출횟수		< ORT mg/상지 100 g >	추출물 (g)	총 수득율(%)
1차	1 st	36.89	5.6980	9.5
	2 nd	18.14	3.5793	
2차	1 st	26.52	5.3896	9.0
	2 nd	18.03	3.5789	
3차	1 st	32.64	5.3106	8.8
	2 nd	16.70	3.4688	

- 세 번의 반복 실험 결과, ORT 함량은 균일하지 않았지만, 추출 농축물(추출물)의 경우 비슷한 양으로 보아 상지의 특정 부분에 따른 ORT 함량의 차이라고 추정된다.

(과) 산기대의 추출 조건과 비교해 보기 위해, 같지 않은 상지로도 추출

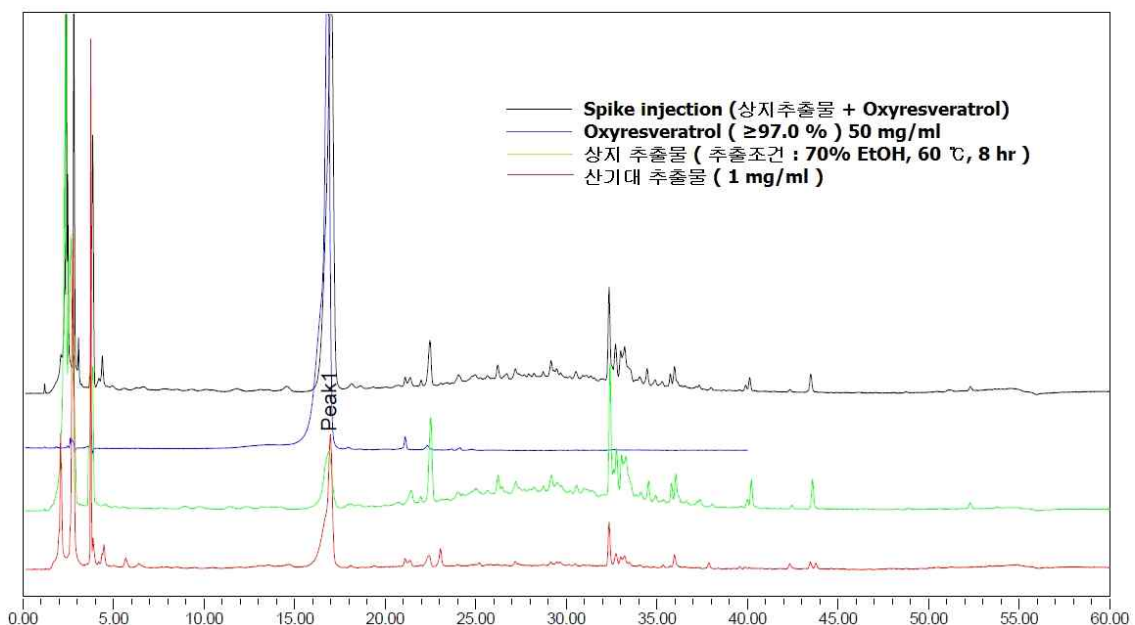
같지 않은 상지 5 g, 70% 에탄올 50 ml (10배 용매), 60 °C, 200 rpm 으로 교반하여 추출해 보았다. 4시간 교반시킨 뒤 샘플을 얻고, 이어서 계속 4시간 더 교반하여 8시간 샘플 또한 얻었다.

추출조건 : 같지 않은 상지 5 g/ EtOH 50 ml, 70% 에탄올, 60 °C, 200 rpm

시간	Oxyresveratrol(ORT)의 양 (mg/상지 100 g)			
	1 ST	2 nd	3 rd	Aver±STD
4 hr	19.80	16.37	26.41	20.86 ± 5.10
8 hr	23.98	18.00	32.15	24.71 ± 7.10

같지 않은 상지이기 때문에 표면적이 작아 ORT 추출 효율이 낮다. 각 추출 시 마다 ORT의 양이 크게 상이하다.

(하) 추출물 내의 Oxyresveratrol 확인



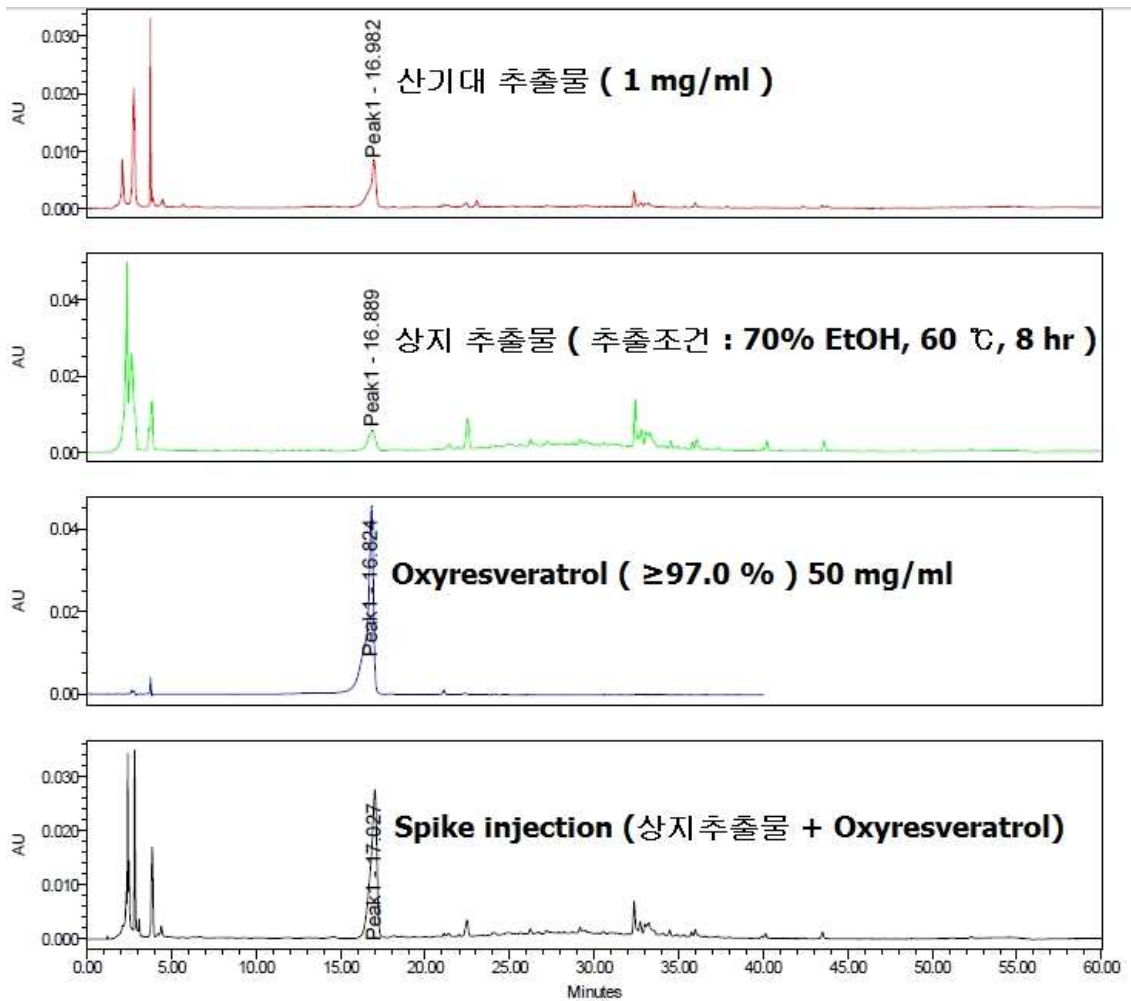


Fig. 4.2-4. 추출물 내의 Oxyresveratrol 함량

위 스펙트럼은 추출물 안의 ORT 존재 여부를 확인하기 위하여 10 μ l의 ORT 표준물질 (50 μ l/ml)과 상지추출물(60 $^{\circ}$ C, 70% 에탄올, 8 hr) 10 μ l를 동시에 HPLC로 분석한 결과이다. Spike injection 했을 시에, 추출물의 스펙트럼에 있던 하나의 peak의 높이가 급격히 상승하는 것을 볼 수 있다. 또한 이 peak의 위치(retention time)가 ORT 표준물질의 peak 위치와 일치하므로 우리 추출물 속에 ORT가 함유되어 있음을 알 수 있다.

(3) 대량생산 공정 최적화

(가) 대량추출 조건 및 사전 추출

- 상지 5g scale로 추출 실험한 결과, oxyresveratrol 추출의 최적 조건은 다음과 같다.
- 용 매 : 70% 에탄올

- 용매부피 : 15배 (용매부피/시료 양)
- 온 도 : 60℃
- 교반기 속도 : 200rpm
- <ORT mg/상지 100 g>

시간 \ 용매	온도	60 ℃
	용매	70% EtOH
4 hr		42.17
8 hr		45.27
12 hr		46.00

대량 scale로 추출이 진행될 경우 에탄올의 사용량을 줄이는 것이 경제적인 것이라고 판단, 용매량(용매/시료)을 변화시켜가며 한 번 더 추출을 진행해 보았다. 그 결과, 10배 용매량을 사용하는 것이 가장 효율적이라는 결론 도출함.

위의 결과들을 바탕으로 scale을 키워, 상지 100 g, 70% 에탄올을 10배 용매량(용매/시료=10) 사용하여 60℃, 200 rpm에서 4 시간 씩 연속으로 두 번 추출하였다.

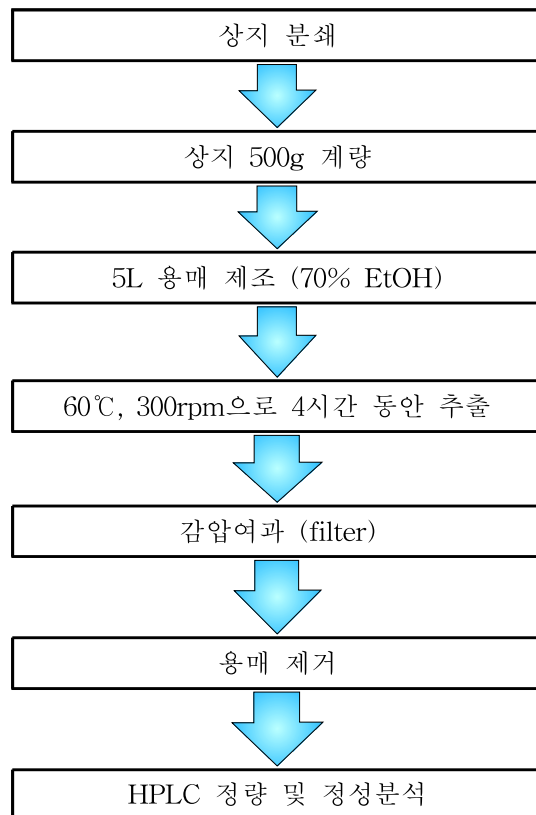
횟 수	Oxyresveratrol(ORT)의 양 (mg/상지 100 g; n= 3)				추출물 (g)			
	1 st	2 nd	3 rd	Aver±STD	1 st	2 nd	3 rd	Aver±STD
1회	36.89	26.52	32.64	32.0±5.2	5.70	5.39	5.32	5.5±0.2
2회	18.14	18.03	16.70	17.6±0.8	3.58	3.58	3.47	3.5±0.06

이 결과로 보아, 8시간 동안 4 시간씩 연속적으로 두 번 추출하는 것 보다, 새로운 상지로 4 시간씩 각각 두 번 추출하는 것이 ORT 함량의 측면에서 더 높은 수득률을 보인다. 또한 연속으로 두 번 추출할 경우, 추출액을 필터하는 과정이 두 번 필요하게 됨으로 대량 추출 공정에서 비효율적이며, 따라서 4시간 동안 한번 추출 하는 방법이 효율성 측면에서 옳은 방법이다.

(나) 대량 추출의 목적 및 설계

이번 추출의 목적은 동물실험을 위해 필요한 상지 추출물 150g과 size up test에 있다. 이전 실험에서 상지 100g 당 평균 5g 의 추출물을 얻었으므로, 150g을 얻기 위해서는 상지 3kg을 추출 하여야 한다. 따라서 500g size로 하여 총 6번의 추출을 진행하였다.(교반기의 rpm의 경우 200->300으로 변경하여 진행)

(다) 추출 공정도



(라) 각 추출 별 추출물 무게, ORT 함량 및 수득률
- 각 추출물별 무게 및 ORT 함량

	추출물 농축 무게 (g)	수득률	Oxyresveratrol (ORT)의 양		
			% 함량	ORT mg/상지 500g	ORT mg/상지 100g
1 st	25.6561	6.19	0.03177	158.85	31.77
2 nd	31.3879	4.67	0.02932	146.60	29.32
3 rd	28.5937	4.46	0.02550	127.50	25.50
4 th	28.4515	6.49	0.03693	184.65	36.93
5 th	29.376	5.67	0.03332	166.60	33.32
6 th	24.6089	5.99	0.02950	147.50	29.50
AVER ± STD	28.01235 ± 2.4867	5.58± 0.83	0.03106 ± 0.039085	155.28± 19.55036	31.06 ± 3.9085
SUM	168.0741			931.7229	

- 500g size *6 batch 로 추출한 상지 추출물의 경우 총 168.0741g을 얻었으며, ORT 함량의 경우 931.7229mg이며, 평균 수득률 5.58% 이다.

3. 기능성 물질 함유 추출물의 다중 기능성 평가

가. 상지추출물의 항산화 효과

(1) DPPH 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

3종의 상지주정추출분말(oxyresveratrol 함량 ; 2.54%, 6.66%, 15.30%)의 DPPH 분석법에 의한 전자 공여능을 ascorbic acid, oxyresveratrol, resveratrol, quercetin, trolox 등의 항산화물질과 비교 분석하였다(Table 4.3-1). 실험 결과, oxyresveratrol은 resveratrol에 비해서는 약 2배 강한 전자 공여능을 나타냈으나 quercetin의 약 1/2.4 배 수준이었다. Oxyresveratrol 함량이 2.54%, 6.66%, 15.30%인 상지주정추출분말의 IC₅₀은 각각 205 µg/mL, 105 µg/mL, 47 µg/mL로 상지주정추출분말의 DPPH 전자공여능은 oxyresveratrol 농도에 의존적인 것으로 사료되었다

(2) ABTS 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

3종의 상지주정추출분말(oxyresveratrol 함량 ; 2.54%, 6.66%, 15.30%)의 ABTS 라디칼 소거능을 ascorbic acid, oxyresveratrol, resveratrol, quercetin, trolox 등의 항산화물질과 비교 분석하였다(Table 4.3-1). Oxyresveratrol 함량이 2.54%, 6.66%, 15.3% 인 상지주정추출분말의 ABTS IC₅₀은 52.21 µg/mL, 28.91 µg/mL, 13.53 µg/mL로 상지주정추출분말에 존재하는 oxyresveratrol 함량에 의존하여 증가하였다. ABTS 라디칼 소거능 실험결과, oxyresveratrol 은 resveratrol보다 약 2배, ascorbic acid 혹은 trolox보다 약 3배의 강한 라디칼 소거능을 가진 물질로 밝혀졌다. 한편, 3종 상지주정추출물(oxyresveratrol 함량 : 2.54%, 6.66%, 15.3%)의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 oxyresveratrol 함량으로부터 온 것으로 사료되었다. 항산화능 측정 방법에 따라 radical의 종류 및 분석시료의 용해도의 차이 때문에 다른 결과를 보일 수 있는데 DPPH는 친수성 물질의 측정에, ABTS는 물에 용해도가 낮은 물질의 항산화능 측정에 적합한 방법이므로 oxyresveratrol의 경우 물에 용해도가 낮은 물질이므로 ABTS 결과는 DPPH assay에서와는 다른 경향으로 나타났다.

Table 4.3-1. 상지주정추출분말의 DPPH 및 ABTS 라디칼소거능 IC₅₀값

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	ABTS
Ascorbic acid	5.06 ± 0.54	6.08 ± 0.91
Trolox	4.95 ± 0.43	6.94 ± 1.21
Oxyresveratrol	7.68 ± 0.88	2.08 ± 0.54
Resveratrol	14.29 ± 2.06	4.16 ± 0.62
Quercetin	3.22 ± 0.52	0.61 ± 0.18
Mori Ramulus ethanol extract (oxy 2.54%) ¹	205.04 ± 20.29	52.21 ± 3.45
Mori Ramulus ethanol extract (oxy 6.66%) ²	105.32 ± 10.84	28.91 ± 3.00
Mori Ramulus ethanol extract (oxy 15.3%) ³	47.47 ± 2.52	6.72 ± 0.39

Data were the mean(±SD) of three separate experiments. Oxyresveratrol contents in Mori Ramulus ethanol extracts are ¹2.54%, ²6.66%, ³15.3%. DPPH assay showed significant differences among the materials at the level of $p < 0.05$. ABTS assay showed significant

differences except between ascorbic acid and trolox at the level of $p < 0.05$.

(3) FRAP 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

FRAP(Ferric reducing antioxidant potential) 분석법에 의한 oxyresveratrol의 항산화력은 resveratrol의 약 1.4 배, ascorbic acid의 약 0.92 배, trolox의 약 0.88 배 수준이었다. 한편, 상지주정추출분말(oxyresveratrol 함량 ; 2.54%, 6.66%, 15.3%)의 항산화력은 oxyresveratrol의 약 0.05배, 0.15배, 0.20배 수준으로, FRAP 분석에서도 추출분말의 항산화력이 oxyresveratrol의 농도에 의존하는 것으로 나타났다(Fig. 4.3-1).

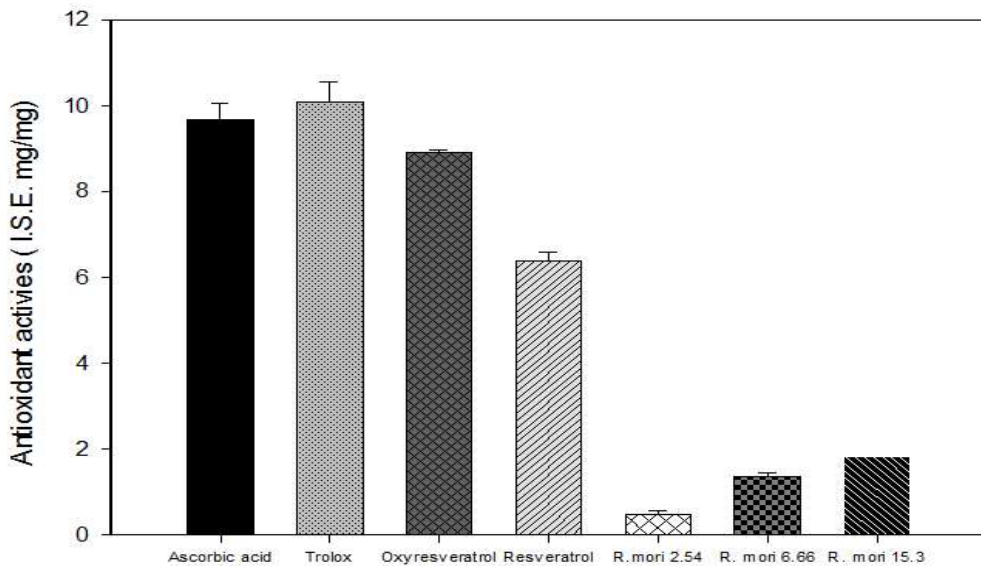


Fig. 4.3-1. 상지주정추출분말(oxyresveratrol 함량: 2.54%, 6.66%, 15.3%)의 FRAP 분석

The data are displayed with mean±standard deviation(bars) of three replications. FRAP assay showed significant differences except between ascorbic acid and trolox at the level of $p < 0.05$.

(4) ORAC 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

ORAC는 free radical 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 항산화능 측정 방법이다. ORAC는 Trolox를 표준물질로 사용하여 AAPH에 의해 생성된 peroxy radical에 대한 소거활성을 나타낸다. ORAC 라디칼 소거능 실험결과, ascorbic acid는 0.61 Trolox equivalent였으며 상지추출물은 2.19 Trolox equivalent를 나타내었다(Table 4.3-2).

Table 4.3-2. ORAC 분석법에 의한 항산화능 분석

	Slope	ORAC (g TE /g)	CV (%)
Ascorbic acid	18.07 ± 0.43	0.61 ± 0.06	8.99 %
Oxyresveratrol	106.94 ± 3.07	5.92 ± 0.20	3.35%
상지 추출물	39.62 ± 1.17	2.19 ± 0.05	2.47 %

(5) SOD 활성 측정 결과

상지주정추출물에 처리에 의한 SOD 활성을 보면 상지 추출물을 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 sample의 SOD activity는 각각 0.15, 1.58, 1.63 U/ml이었다. 상지 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 sample의 경우 ascorbic acid (1.93 U/ml)보다는 낮은 활성이었으나 대조군인 NAC (1.41 U/ml), Coenzyme Q10 (1.59 U/ml)보다는 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4.3-2).

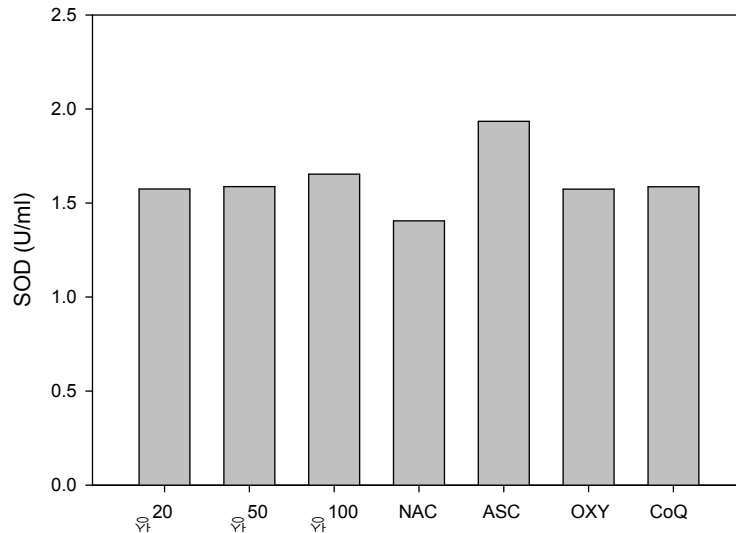


Fig. 4.3-2. 상지주정추출분말(oxyresveratrol 함량 : 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)에 의한 SOD 활성

(6) β -Carotene bleaching 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

β -Carotene bleaching assay에 의해 측정된 상지주정추출분말 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, BHT의 항산화능은 다음과 같다.

실험 결과, oxyresveratrol의 IC_{50} 은 BHT에 비해 약 4.5배로 높았고 항산화력은 BHT의 약

0.2배로 나타났다. 상지주정추출분말의 IC₅₀은 BHT에 비해 약 15.6배로 높았고 항산화력은 BHT의 약 0.06배로 나타났다. β-carotene bleaching assay를 통해 상지주정추출분말의 항산화능, 특히 지질과산화를 억제하는 효과를 확인할 수 있다(Table 4.3-3).

Table 4.3-3. 상지주정추출물의 항산화능 (β-carotene bleaching 분석)

Compound	Antioxidant activity	
	IC ₅₀ (μg/ml)	BHT equivalents (mg BE/g)
BHT	1.1 ± 0.1	-
Oxyresveratrol	5.0 ± 0.2	224.3 ± 19.1
ERMO (oxy 15.3%)	17.2 ± 1.6	65.7 ± 1.8

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean ± SD, n=3)

(7) HRPO 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

HRPO assay에 의해 측정된 상지주정추출분말 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, ascorbic acid, resveratrol, trolox의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 IC₅₀은 trolox에 비해 약 1.1배로 높았고 H₂O₂ 소거능은 trolox의 약 0.8배로 나타났다. 상지주정추출분말의 IC₅₀은 trolox에 비해 약 3.8배로 높았고 H₂O₂ 소거능은 trolox의 약 0.3배로 나타났다(Table 4.3-4).

Table 4.3-4. 상지주정추출물의 항산화능 (HRPO test)

Compound	Antioxidant activity	
	IC ₅₀ (μg/ml)	Trolox equivalents (g TE/100 g)
Trolox	18.7 ± 0.9	-
Ascorbic acid	16.9 ± 0.2	110.6 ± 6.1
Oxyresveratrol	21.0 ± 0.6	88.9 ± 2.6
Resveratrol	15.4 ± 0.2	121.3 ± 8.2
ERMO (oxy 15.3%)	70.5 ± 0.3	26.6 ± 1.5

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean ± SD, n=3)

(8) Taurine 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

Taurine test에 의해 측정된 상지주정추출분말 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, ascorbic acid, resveratrol, trolox의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 IC₅₀은 trolox에 비해 약 0.2배로 나왔고 HOCl 소거능은 Trolox의 약 4.8배로 나타났다(Table 4.3-5).

상지주정추출분말의 IC₅₀ 은 trolox에 비해 약 0.7배로 나왔고 HOCl 소거능은 trolox의 약 1.5배로 나타났다. HOCl(치아염소산)은 염증반응 시 생체내의 면역세포인 호중구가 만들어내는 강력한 살균물질이다. 이러한 HOCl 소거능의 측정을 통해 다른 항산화 물질에 비해 우수한 상지주정추출분말의 항염증 효과를 확인할 수 있다.

Table 4.3-5. 상지주정추출물의 항산화능 (Taurine test)

Compound	Antioxidant activity	
	IC ₅₀ (µg/ml)	Trolox equivalents (g TE/100 g)
Trolox	21.1 ± 0.4	-
Ascorbic acid	15.5 ± 0.9	137.0 ± 8.1
Oxyresveratrol	4.4 ± 0.2	484.3 ± 16.0
Resveratrol	3.3 ± 0.2	639.5 ± 43.8
ERMO (oxy 15.3%)	14.3 ± 0.3	147.4 ± 4.7

Note : A lower IC₅₀ value indicates greater antioxidant activity. (Mean ± SD, n=3)

(9) CAA 분석법에 의한 상지주정추출분말의 항산화능 분석

CAA assay에 의해 측정된 상지주정추출분말 (ethanol extracts of *Ramulus mori* 15.3% oxyresveratrol, ERMO), oxyresveratrol, quercetin의 항산화능은 다음과 같다. 실험 결과, oxyresveratrol의 EC₅₀은 quercetin에 비해 약 0.5배로 나왔고 peroxy radical 소거능은 quercetin의 약 1.9배로 나타났다. 상지주정추출분말의 EC₅₀은 quercetin에 비해 약 5.4배로 나왔고 peroxy radical 소거능은 quercetin의 약 0.2배로 나타났다(Table 4.3-6).

Table 4.3-6. 상지주정추출물의 항산화능 (CAA assay)

Compound	Antioxidant activity	
	EC ₅₀ (µg/ml)	Quercetin equivalents (g QE/100 g)
Quercetin	8.9 ± 0.8	-
Oxyresveratrol	4.7 ± 0.3	187.2 ± 8.0
ERMO (oxy 15.3%)	47.9 ± 2.4	18.5 ± 2.1

EC₅₀ Values for the inhibition of Peroxyl Radical-induced DCFH₂-DA oxidation by Compounds. (Mean ± SD, n=3)

(10) 연구결과 요약

상지주정추출물의 항산화력을 측정한 결과, chemical-based assay인 β-carotene bleaching assay, HRPO assay, Taurine test에서 항산화 활성을 나타내었고 특히 Taurine test에서 측정한 HOCl 소거능은 trolox 보다 1.5배의 높은 항산화력을 나타내어 우수한 항염증 효과를 확인하였다. 또한 cellular-based assay인 CAA assay에서도 우수한 항산화력을 나타내어, 단순히 시험관 내에서 뿐만 아니라 살아있는 세포내에서의 항산화 효과를 확인하였다.

나. 상지주정추출물의 항혈소판 작용에 의한 혈행개선 효과

(1) 세포독성시험

상지추출물의 혈소판에 대한 세포독성을 평가하기 위해 혈소판의 LDH 유리 정도를 지표로 이용하였다. 혈소판에 상지추출물을 농도별로 가한 후 LDH 유리 정도를 측정한 결과, 0.5 mg/ml (6.5 ± 4.8%), 1.25 mg/ml (12.9 ± 3.5), 2.5 mg/ml (9.9 ± 3.5%)에서 모두 대조군(9.9 ± 2.4%)과 비교하였을 때, 유의적인 LDH 유출이 없었다 (Fig. 4.3-3).

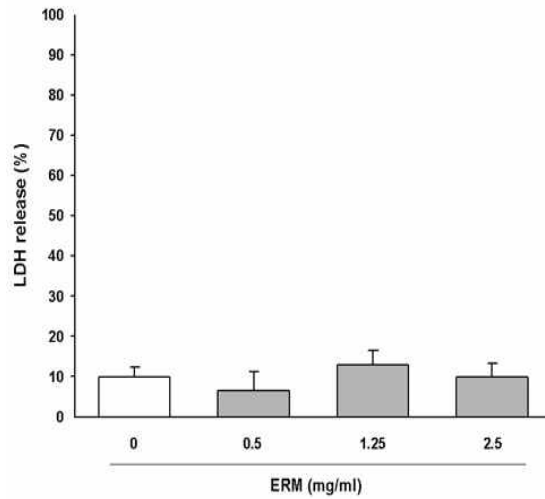


Fig. 4.3-3. Effects of ERM on LDH release by platelet. LDH release was measured after incubating rat platelet rich plasma (PRP) (2×10^8 cells/ml) with vehicle or samples for 5min. 0.5% tritonX-100 was used as positive control and calculated as 100% of LDH release. Data represent means \pm SD.

(2) 항혈전 활성 시험

(가) 실험기간 중 시험동물의 체중 변화

시험기간 중 용매대조군(ERM0)과 시험물질 및 양성대조군(GE 100)을 투여한 시험동물의 체중을 분석한 결과, 각 군간 차이를 보이지 않았다(Fig. 4.3-4, Table 4.3-7).

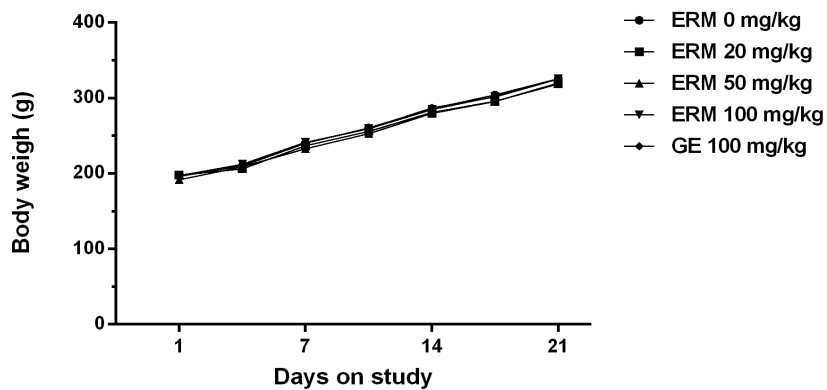


Fig. 4.3-4. Body weight of SD Rat on FeCl_3 -induced carotid artery thrombosis model. (N=6)
 ERM 0 : Morus ext. 0 mg/kg, ERM 20 : Morus ext. 20 mg/kg, ERM 50 : Morus ext. 50 mg/kg, ERM 100 : Morus ext. 100 mg/kg, GE 100 : Ginkgo ext. 100 mg/kg

Table 4.3-7. Body weight of SD Rats on FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model (g).

Dose (mg/kg)	ERM				GE
	0	20	50	100	100
Day 0	197.8± 6.5	197.9± 4.7	191.7± 9.8	197.0± 6.6	196.3± 3.4
3	210.2± 6.3	206.3± 7.2	209.0± 6.0	212.3± 6.8	210.0± 2.4
7	240.2±10.0	236.8± 6.9	232.9± 8.6	241.2± 5.8	240.7± 4.5
10	260.4±11.3	255.8± 8.4	252.7± 7.5	259.4± 5.9	259.4± 9.6
14	286.0±11.7	280.9±10.3	279.7± 9.0	284.8±10.5	287.0±11.8
17	304.3±12.6	295.8±10.4	295.4± 9.3	302.1±10.4	301.4±16.3
21	325.8±11.1	318.7±11.5	319.9± 9.9	325.8±15.5	325.4±18.0

The values are mean ± SE, N=6

(나) 항 혈전 활성 시험

상지추출물을 시험동물에 21일간 경구투여 후 경동맥에 70% FeCl₃를 10분간 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 시험물질이 혈류의 흐름에 미치는 영향을 60분 동안 평가하였다. 혈관이 폐쇄되는 시점은 FeCl₃를 처리하기 전 혈류량을 기준으로 10%이하가 되는 시간을 기준으로 하였다. 용매대조군의 혈관 폐색이 일어나는 시간은 18.7 ± 6.1 min이었고 시험물질 20 mg/kg 투여군은 37.3 ± 14.9 min으로 증가되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 시험물질 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군은 각각 54.2 ± 14.1, 54.3 ± 14.0 min으로 혈관 폐색이 지연되었으며 통계적인 유의성을 보였다. 양성대조군으로 사용된 은행잎추출물 또한 41.5 ± 16.8 min으로 용매대조군에 비해 통계적으로 유의하게 혈관 폐색시간이 지연되었다(Fig. 4.3-5, Table 4.3-8).

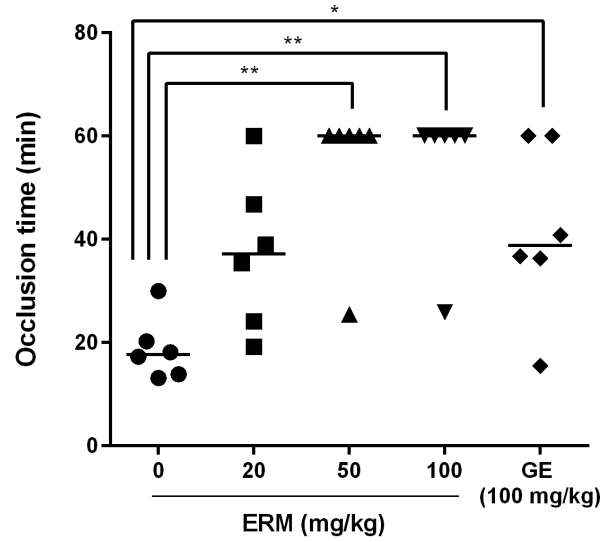


Fig. 4.3-5. *in vivo* antithrombotic effect of ERM and Gingko extract. The time to vessel occlusion are reported and the median times calculated. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N=6).

Table 4.3-8. *in vivo* antithrombotic effect of Morus and Gingko extract (min)

Dose (mg/kg)	ERM				GE
	0	20	50	100	100
Occlusion time (min)	18.7 ± 6.1	37.3 ± 14.9	54.2 ± 14.1**	54.3 ± 14.0**	41.5 ± 16.8*

The values are mean±SE. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N=6).

(3) 혈소판 응집 억제 시험

(가) 실험기간 중 시험동물의 체중 변화

시험기간 중 용매대조군(ERM0)과 시험물질 및 양성대조군(GE 100)을 투여한 시험동물의 체중은 차이를 보이지 않았다(Fig. 4.3-6, Table 4.3-9).

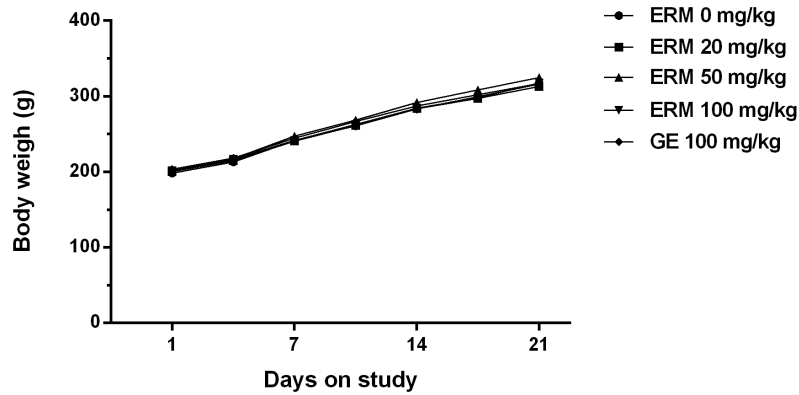


Fig. 4.3-6. Body weight of SD Rats on platelet aggregation and blood coagulation (N=6).

Dose		ERM				GE
(mg/kg)		0	20	50	100	100
Day	0	198.3± 5.5	200.5± 7.0	202.7± 6.9	201.8± 7.2	203.5± 7.5
	3	213.0± 5.9	214.9± 7.4	217.5± 7.5	216.8± 7.8	218.2± 7.8
	7	241.5± 7.8	240.8± 9.7	247.3± 9.5	241.7±12.3	244.5± 7.2
	10	261.1± 8.7	261.1±11.8	268.5±13.8	262.6±14.8	266.8± 7.7
	14	283.4±13.4	283.7±15.7	291.9±19.7	284.2±19.6	287.2± 8.9
	17	299.3±14.5	297.3±19.2	308.5±22.1	298.1±22.2	302.1±10.8
	21	316.2±16.3	313.0±20.2	324.9±29.5	317.4±25.0	316.9±10.7

The values are mean ± SE, N=6

ERM 0 : Morus ext. 0 mg/kg, ERM 20 : Morus ext. 20 mg/kg, ERM 50 : Morus ext. 50 mg/kg, ERM 100 : Morus ext. 100 mg/kg, GE 100 : Ginkgo ext. 100 mg/kg

(나) 혈소판 응집 억제 시험

상지추출물을 시험동물에 21일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈소판을 분리하여 agonist 인 ADP와 Collagen으로 반응하여 혈소판 응집률을 aggregometer로 측정하였다. 용매대조군의 ADP에 대한 응집률은 43.7 ± 3.1%이고 시험물질 20 mg/kg 투여군의 응집률은 43.8 ± 2.7%로 차이가 없었다. 시험물질 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군에서는 각각 20.8 ± 11.1%, 16.3 ± 3.7%로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 양성대조군으로 사용된 은행잎추출물 또한 15.5 ± 5.0%로 통계적으로 유의하게 감소하였다.

용매대조군의 Collagen에 대한 응집률은 47.5 ± 3.8%이고 시험물질 20 mg/kg 투여군의 응집률은 20.0 ± 21.0%로 유의하게 감소하였고 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군은 0.3 ± 0.5%, 0.0 ± 0.0%로 응집반응이 일어나지 않았다. 양성대조군 은행잎 추출물의 응집률은 4.2 ± 10.2%

로 통계적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 4.3-7, Table 4.3-10).

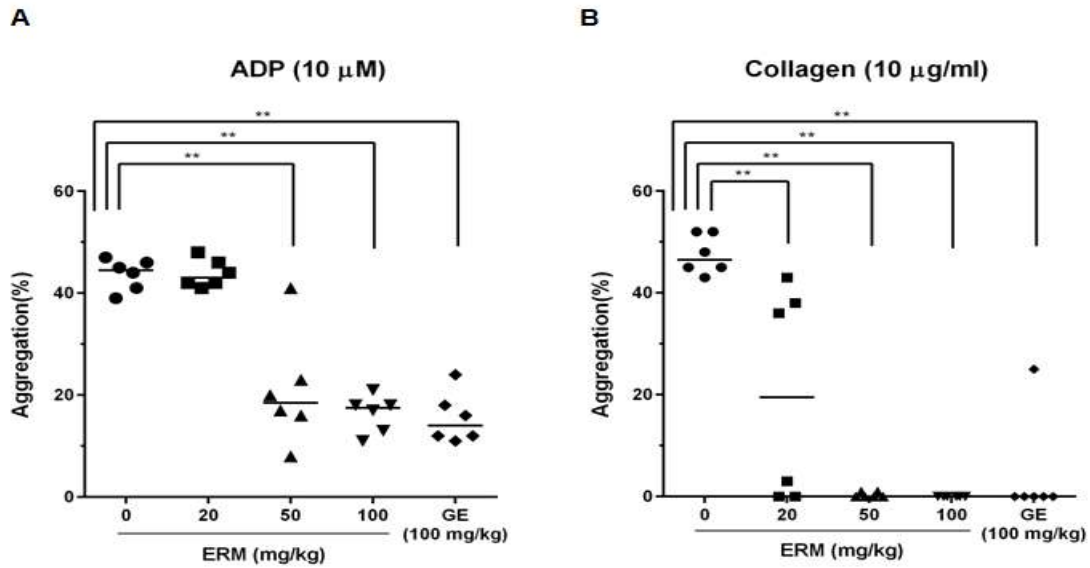


Fig. 4.3-7. ex vivo antiplatelet effect of ERM and Ginkgo extract. Platelet aggregation was induced by ADP (10 μ M) (A) and Collagen (10 μ g/ml) (B). The aggregation rates of platelet are reported and the median calculated. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (** $p < 0.01$, N=6).

Table 4.3-10. ex vivo antiplatelet effect of Morus and Ginkgo extract (%).

Dose (mg/kg)	ERM				GE
	0	20	50	100	100
ADP	43.7 \pm 3.1	43.8 \pm 2.7	20.8 \pm 11.1**	16.3 \pm 3.7**	15.5 \pm 5.0**
Collagen	43.8 \pm 2.8	20.0 \pm 21.0**	0.3 \pm 0.5**	0.0 \pm 0.0**	4.2 \pm 10.2**

The values are mean \pm SE. Significant difference from Vehicle(ERM 0) by Dunnet's t-test (** $p < 0.01$, N=6).

(4) 혈액 응고 억제 시험

상지추출물을 시험동물에 21일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 prothrombin time (PT)과 activated partial thromboplastin time (aPTT)를 측정하여 시험물

질이 혈액응고에 미치는 영향을 평가하였다. 용매대조군의 PT는 9.4 ± 0.4 sec이고 모든 시험물질 투여군에서 유의성이 없었다. aPTT는 용매대조군에 비하여 시험물질 투여군에서 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 양성대조군인 은행잎추출물 투여군에서는 PT, aPTT 모두 통계적으로 유의하게 응고 시간이 지연되었다(Fig. 4.3-8, Table 4.3-11).

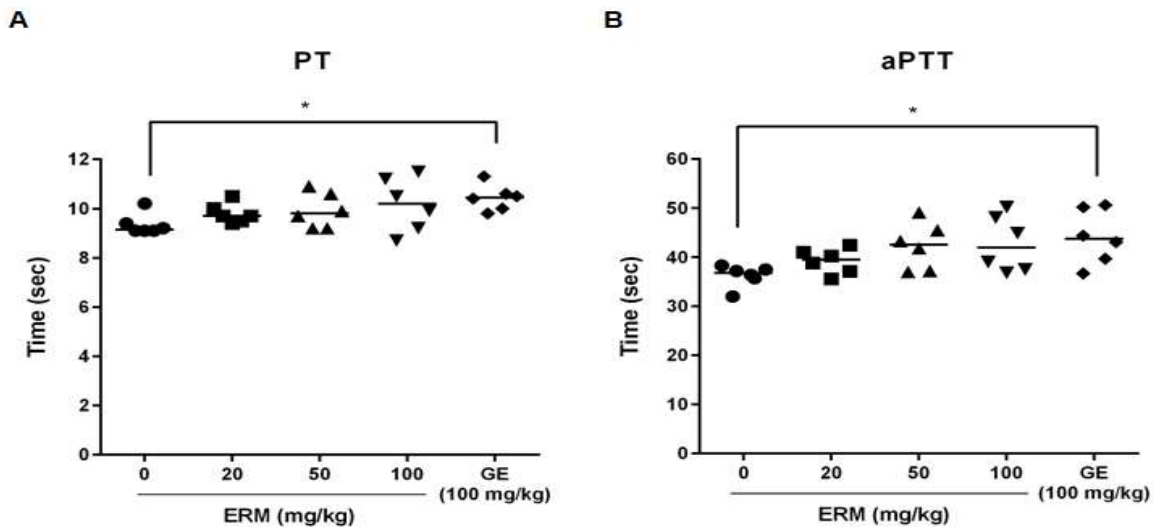


Fig. 4.3-8. *ex vivo* anticoagulation effect of ERM and Ginkgo extract. The coagulation times are reported and the median calculated. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (** $p < 0.01$, N=6).

Table 4.3-11. *ex vivo* anticoagulation effect of ERM and Ginkgo extract (sec).

Dose (mg/kg)	ERM				GE
	0	20	50	100	100
PT	9.3±0.4	9.8±0.4	9.9±0.7	10.2±1.1	10.4±0.5*
aPTT	36.2±2.2	39.2±2.5	42.3±4.7	42.7±5.8	44.1±5.5*

The values are mean \pm SE. Significant difference from Vehicle (Morus 0) by Dunnet's t-test (* $p < 0.05$, N=6).

(5) 출혈지연시간 측정

상지추출물의 항혈소판 효과가 혈액응고 지연시간에 영향을 주는지 알아보기 위해 tail

bleeding time을 평가한 결과 대조군 (66.2 ± 4.96 초)와 마찬가지로 20 mg/kg (76.7 ± 18.15 초), 50 mg/kg (65.2 ± 9.35 초), 100 mg/kg (71.8 ± 13.39 초)로 출혈지연반응이 나타나지 않았으므로 출혈지연에 대한 부작용은 없음을 확인할 수 있다. 양성 대조군인 aspirin (50 mg/kg)은 193.2 ± 16.24 초로 유의하게 증가하였다(Fig. 4.3-9).

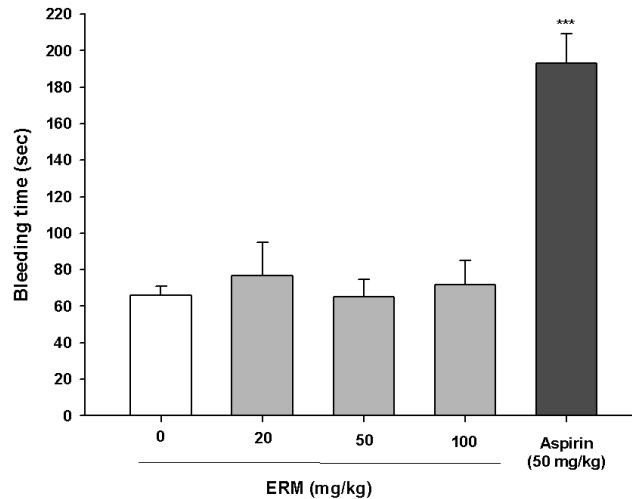


Fig. 4.3-9. Effects of ERM on mouse tail bleeding times (ERM=Morus ext). Ramulus Mori extracts, vehicle or aspirin (50 mg/kg) were orally administered to mice 2 hr before the experiments. Data represent means \pm SD (***) $p < 0.001$, N = 6)

(6) 연구요약

상지추출물이 혈행개선에 효과가 있는지 확인하기 위해 항 혈전 시험, 혈소판 및 혈액응고 억제 시험, 혈소판에 대한 독성 시험, 출혈지연시간 측정을 하였다. 상지추출물은 혈소판에 대한 세포 독성을 갖지 않으면서 출혈을 지연시키는 부작용을 초래하지도 않았다. 또한, 시험동물의 경동맥에 70% FeCl₃를 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 혈전이 형성되는 시간은 혈류를 측정하여 평가한 항혈전 시험 결과, 용매대조군 (상지추출물 0 mg/kg)에서 혈전 생성으로 혈관 폐색이 일어나는 시간은 18.7 ± 6.1 min이었고, 상지추출물 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간은 각각 54.2 ± 14.1 , 54.3 ± 14.0 min으로 용매대조군에 비하여 3배 지연되었다. 혈소판응고 억제 시험에서 ADP에 의한 혈소판의 응집률은 용매대조군에서 $43.7 \pm 3.1\%$ 이고, 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군에서는 각각 20.8 ± 11.1 , $16.3 \pm 3.7\%$ 로 감소하였으며, collagen에 의한 응집률은 용매대조군에서 $43.8 \pm 2.8\%$ 이고 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군에서는 각각 0.3 ± 0.5 , $0.0 \pm 0.0\%$ 로 현저히 감소하였다. 하지만 혈액응고

억제 시험에서 PT 및 aPTT는 시험물질 투여군과 용매대조군이 차이가 없었다.

혈관에 손상이 일어날 경우 혈관 내피세포에 혈소판이 점착, 활성화, 응집 되면서 혈소판이 활성화되어 ADP와 thromboxane A₂ (TXA₂)등이 분비되고 혈소판은 더욱 활성화되어 주위 다른 혈소판의 응집을 증폭시키고, 혈장에 존재하는 coagulation factor와 반응하여 clot을 형성함으로써 지혈이 빨리 진행되도록 한다. FeCl₃로 혈전을 유도하였을 때 상지추출물을 50mg/kg이상 투여한 군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간이 지연되는 것은 시험물질이 항응고 보다는 항혈소판 응집에 더 효과가 있기 때문이고, 따라서 상지추출물의 투여는 혈소판 응집을 저해하여 혈행 개선하는 효과가 있는 것을 알 수 있다.

다. 상지주정추출물의 콜레스테롤 저하 효과

(1) 혈중지질 측정 및 결과

Fig. 4.3-10에 나타난 바와 같이, 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에서 정상군(NC)보다 혈청 총 콜레스테롤 농도가 높아졌음을 확인할 수 있었고, 고콜레스테롤식으로 인하여 증가된 혈청 총콜레스테롤은 상지 주정 추출물을 함께 섭취하는 경우 유의적($p < 0.05$)으로 감소됨을 알 수 있었다. 6.0%의 옥시레스베라트롤을 함유하는 상지 주정 추출물은 투여 농도에 따라 총콜레스테롤 농도가 낮아지는 것을 확인하였으며, 특히 고콜레스테롤증 유도 모델 동물에 상지 주정 추출물 100mg/kg/day 투여시, 대조군(Model)에 비해 총 콜레스테롤이 39.4% 감소되는 것을 확인하였다. 한편 양성대조군으로 사용한 omega-3 투여군의 경우는 콜레스테롤 감소 효과를 거의 나타내지 못함을 알 수 있었는데 (6.2% 감소), omega-3 투여군에 비해 33.2% 더 높은 콜레스테롤 감소 효과를 보였다.

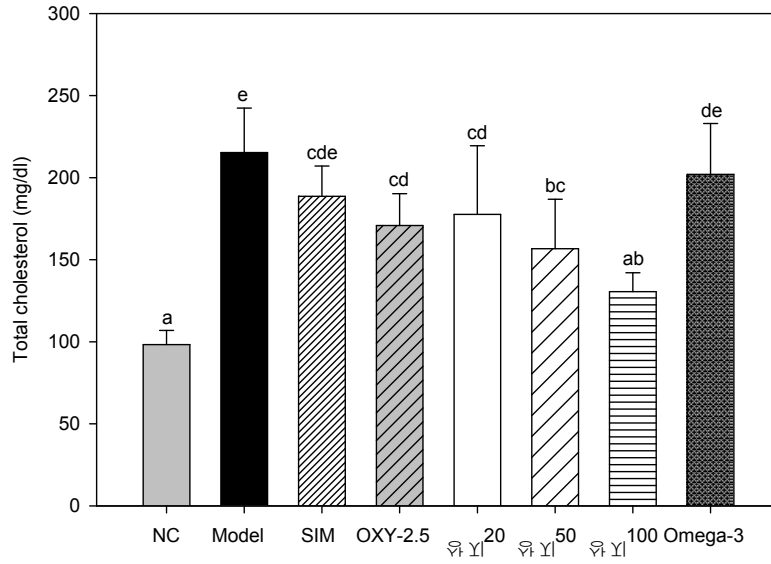


Fig. 4.3-10. 고콜레스테롤식이 모델에서 총콜레스테롤 농도 변화

(가) 중성지방 함량 측정

Fig. 4.3-11에 나타난 바와 같이, 상지 주정 추출물 20-100mg/kg/day 투여군에서 중성지방이 감소하는 것을 확인하였다. 상지 주정 추출 100mg/kg/day 투여군에서는 모델 대조군에 비해 중성지방이 39.7% 감소함을 알 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 omega-3 투여군과 비교해서도 13.9% 더 높은 중성지방 감소 효과를 보였다.

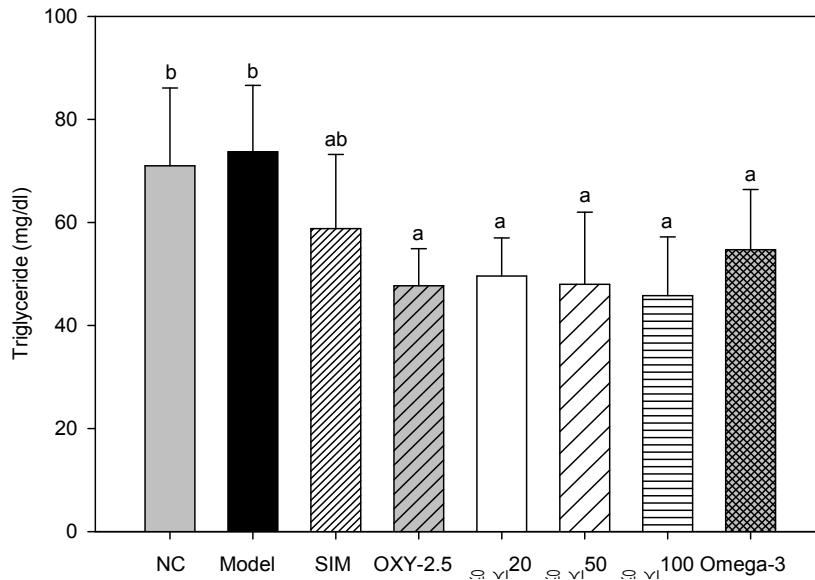


Fig. 4.3-11. 고콜레스테롤식이 모델에서 중성지방 농도 변화

(나) HDL, 콜레스테롤 함량, LDL 콜레스테롤 함량, 동맥경화 지수 및 관상동맥질환 위험지수의 산출

혈청중의 HDL 콜레스테롤 함량은 Fusi Dri-Chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(Slide kit)를 이용하여 반자동으로 각각의 혈중 함량을 mg/dl로 표시하였다. 혈청 중의 LDL 콜레스테롤 함량은 Fiedewald식 총콜레스테롤(HDL + 중성지방/5) 계산법을 이용하여 산출하였다. 동맥경화 지수(atherogenic index : AI)는 LDL/HDL 식으로 각각 산출하였으며, 관상동맥질환 위험지수(coronary risk index, CRI)는 총콜레스테롤/HDL 식으로 계산하여 그 결과를 Table 4.3-12에 나타내었다.

그 결과, HDL 콜레스테롤의 농도는 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에 비해 상지 주정 추출물을 농도에 따라 처리하였을 때, 증가하는 것을 확인하였다. LDL 콜레스테롤의 농도는 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에 비하여 상지 주정 추출물을 함께 섭취하는 경우 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 상지 주정 추출물 100 mg/kg/day 투여시 model 대조군에 비해 LDL 콜레스테롤이 42.7% 감소하였다.

Table 4.3-12. HDL 콜레스테롤 함량, LDL 콜레스테롤 함량, 동맥경화 지수 및 관상동맥질환 위험지수

Treatment groups	Mean value ± SD (mg/dl)		AI	CRI
	HDL	LDL		
음성대조군(NC)	60.5 ± 6.9 ^{ab}	21.9 ± 4.0 ^a	0.37 ± 0.08 ^a	1.63 ± 0.08 ^a
Model	59.8 ± 13.1 ^{ab}	144.1 ± 22.5 ^d	2.69 ± 0.54 ^c	3.90 ± 0.56 ^c
양성대조군(PC)	50.7 ± 9.5 ^a	123.9 ± 16.4 ^{cd}	2.40 ± 0.54 ^c	3.63 ± 0.59 ^c
Oxy 2.5	58.2 ± 13.0 ^{ab}	99.8 ± 17.3 ^{bc}	1.60 ± 0.26 ^b	2.75 ± 0.27 ^b
상지 20	66.7 ± 15.9 ^{ab}	117.6 ± 39.4 ^{bcd}	1.54 ± 0.54 ^b	2.52 ± 0.57 ^b
상지 50	62.7 ± 11.7 ^{ab}	102.3 ± 38.3 ^{bc}	1.40 ± 0.50 ^b	2.53 ± 0.57 ^b
상지 100	63.3 ± 3.2 ^{ab}	82.6 ± 27.6 ^b	1.09 ± 0.50 ^b	2.23 ± 0.50 ^{ab}
Omega-3 100	84.3 ± 8.0 ^c	110.0 ± 27.7 ^{bcd}	1.37 ± 0.28 ^b	2.50 ± 0.28 ^b

동맥경화 지수는 상지 주정 추출물 투여시, 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에 비해 농도의존적으로 동맥경화 지수가 크게 감소한 것을 확인하였다. 상지 주정 추출물 100 mg/kg/day 투여시 model 대조군에 비해 위험도가 59.5% 감소하였다. 관상동맥질환 위험지수의 경우에도 상지 주정 추출물 100 mg/kg/day 투여시 model 대조군에 비해 위험도가 42.8% 감소하였다. 동맥경화 지수 및 관상동맥질환 위험지수 모두 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에 비해 농도의존적으로 위험지수가 감소한 것을 확인하였다.

(다) 체중변화 및 간독성 시험

상지 주정 추출물의 만성독성에 대한 설계를 위해서 4주 동안 실시한 동물실험 결과를 독성여부 판정의 근거로 하여 실시한 결과를 Table 4.3-13에 나타내었다. 체중증가량과 상대적인 간 무게는 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{체중증가량} = \frac{(\text{29일째 체중} - \text{1일째 체중})}{\text{1일째 체중}} \times 100$$

$$\text{상대적 간 무게} = \frac{\text{흰쥐 간 무게}(g)}{\text{29일째 체중}(g)} \times 100$$

Aspartate aminotransferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT) 함량은 Fusi Dri-chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 측정 후 측정기기에 내장된 프로그램내의 공식에 의해 자

동으로 계산되어 각각의 혈중 함량을 IU/ℓ 로 표시하였다.

Table 4.3-13. 상지 주정 추출물에 의한 독성 시험

Treatment groups	% Δweight	Relative liver weight	Daily food consumption (g/day)	AST (IU/ℓ)	ALT (IU/ℓ)
Negative control	78.9 ± 8.9 ^b	2.76 ± 0.15 ^a	12.6 ± 2.5	80.2 ± 14.8	45.8 ± 9.9
Model	59.7 ± 12.5 ^a	4.42 ± 0.48 ^c	10.9 ± 4.0	84.8 ± 22.5	51.5 ± 16.1
Positive control	61.8 ± 6.3 ^a	3.98 ± 0.20 ^b	14.4 ± 5.3	87.3 ± 18.8	47.4 ± 9.6
OXY 2.5	57.1 ± 11.3 ^a	4.02 ± 0.31 ^{bc}	9.9 ± 5.2	83.2 ± 11.2	51.0 ± 11.2
상지 20	57.1 ± 12.1 ^a	4.40 ± 0.29 ^c	9.3 ± 4.3	71.3 ± 17.6	42.5 ± 7.9
상지 50	67.3 ± 17.2 ^{ab}	4.14 ± 0.34 ^{bc}	14.0 ± 4.3	69.8 ± 9.5	41.2 ± 12.0
상지 100	51.0 ± 14.9 ^a	3.93 ± 0.41 ^b	9.1 ± 4.1	74.6 ± 11.7	44.8 ± 12.0

일반사료 섭취군(NC)과 상지 주정 추출물을 각각 20, 50, 100 mg/kg body weight 농도로 투여한 군간의 사료섭취량에는 차이가 없었으며, 체중증가량 측정 결과 각 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 상대적 간 무게의 경우는 양성대조군 및 상지 주정 추출물을 20, 50, 100 mg/kg body weight 농도로 투여한 군이 대조군(Model)에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 혈청의 AST, ALT 효소 활성 등을 비교한 결과 대조군에 비해 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 상지 주정 추출물의 장기 복용으로 인한 독성은 없는 것으로 관찰되었다.

(라) 간 조직에서 지방구 감소

간조직에서의 지방구를 측정하기 위해 4주 동안 실험한 흰쥐의 간을 적출하여 10% formalin 용액에 고정한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 마이크로 톰을 이용하여 절단하여 5μm 조직절편을 만든 후 H&E (Hematoxylin-Eosin) 염색을 하고, 현미경을 이용하여 200배 확대하여 조직의 모양을 관찰하여 지방구 감소 정도를 측정하였다.

그 결과, Fig. 4.3-12에 나타낸 바와 같이, 상지 주정 추출물 투여군에서 농도 의존적으로

간조직 내의 지방구들이 현저히 감소함을 확인하였다. 특히 상지주정추출물을 각각 100 mg/kg 처리한 군에서는 normal diet를 식이한 그룹과 같이 지방구가 거의 관찰되지 않았다. 양성대조군으로 사용한 omega-3투여군에 비해서도 감소 효과가 뛰어났다.

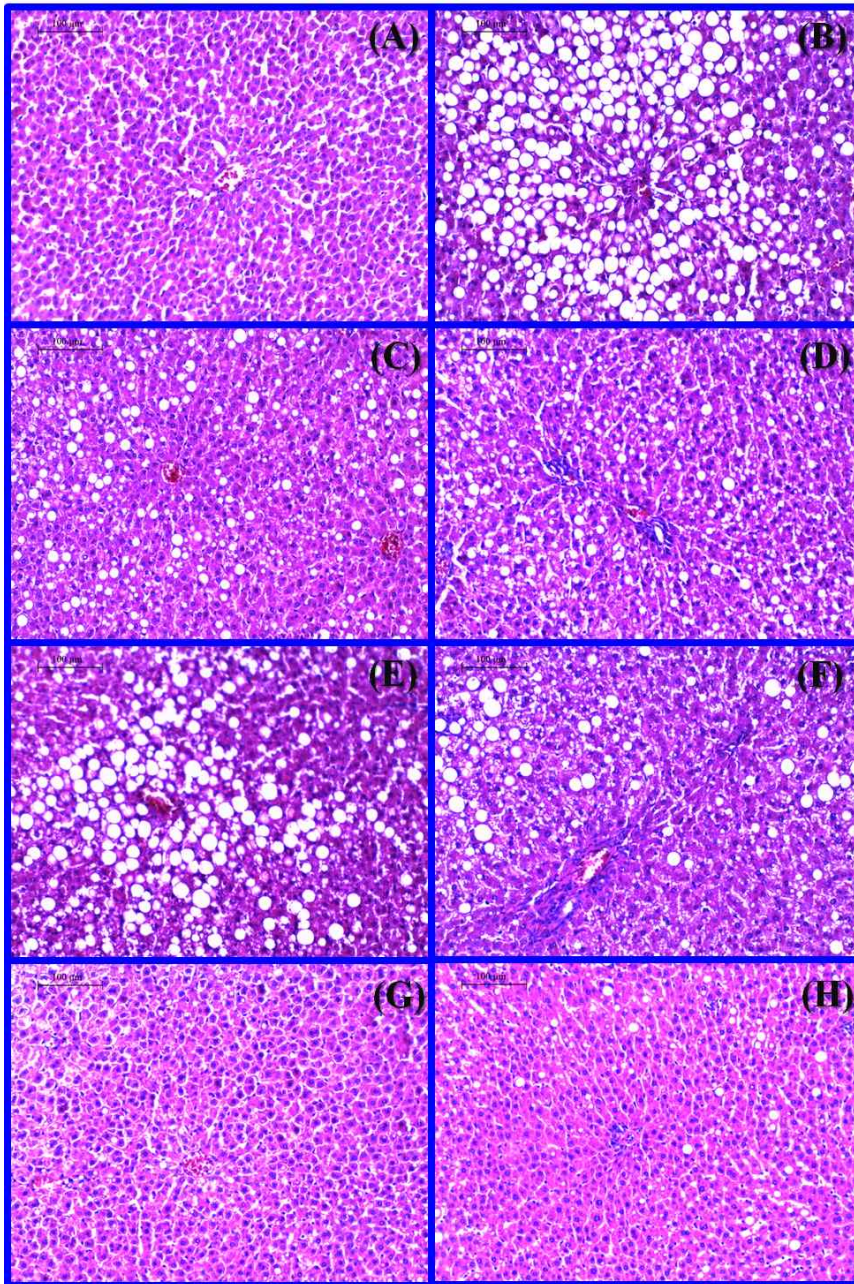


Fig. 4.3-12. Histological analysis of the liver from hyperlipidemic rats fed a HCD and treated with simvastatin, oxyresveratrol, ethanol extract of *Morus alba* stem, or omega-3. A, normal diet; B, HCD; C, HCD+1 mg/kg/day simvastatin; D, HCD+2.5 mg/kg/day oxyresveratrol; E, HCD+20 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; F, HCD+50 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; G, HCD+100 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; H, HCD+100 mg/kg/day omega-3. All images are shown at 200× magnification.

(마) 동맥 조직에서 거품세포 (foam cell) 감소

동맥경화는 염증반응으로 인한 혈액내의 단핵구가 혈관벽 안으로 이동하면 대식세포로 형질이 변환되고 혈관내의 산화된 콜레스테롤을 청소수용체(Scavenger receptor) B-1 등의 수용체를 통해 세포 내로 섭취되어 결국 거품 세포로 전환되고 혈관 내 축적되었던 콜레스테롤은 ATP-binding cassette class A-1 수송체 또는 앞서와는 역으로 청소수용체(Scavenger receptor) B-1에 의해 다시 유출될 수 있다. 동맥조직에서의 거품세포를 측정하기 위해 4주 동안 실험한 흰쥐의 동맥을 적출하여 10% formalin 용액에 고정한 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 마이크로톰을 이용하여 절단하여 5 μ m 조직절편을 만든 후 H&E (Hematoxylin-Eosin) 염색을 하고, 현미경을 이용하여 400배 확대하여 조직의 모양을 관찰하여 거품세포 감소 정도를 측정하였다.

그 결과, Fig. 4.3-13에 나타낸 바와 같이, 상지 주정 추출물 투여군에서 농도 의존적으로 동맥조직내의 거품세포들이 현저히 감소함을 확인하였다.

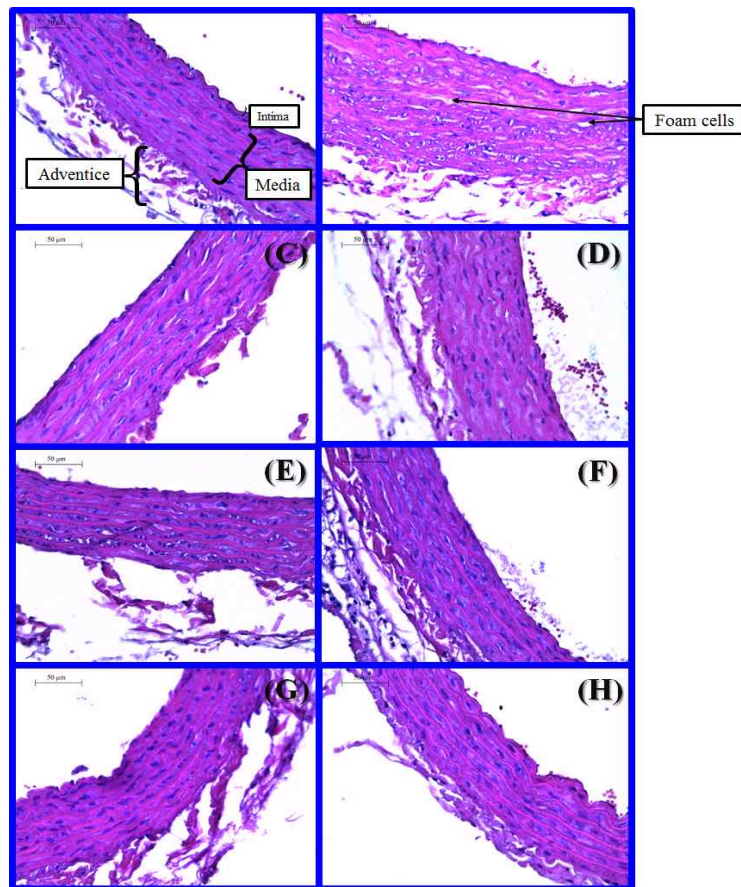


Fig. 4.3-13. Histological analysis of aorta tissues from hyperlipidemic rats fed a HCD and treated with simvastatin, oxyresveratrol, ethanol extract of *Morus alba* stem, or

omega-3. A, normal diet; B, HCD; C, HCD+1 mg/kg/day simvastatin; D, HCD+2.5 mg/kg/day oxyresveratrol; E, HCD+20 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; F, HCD+50 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; G, HCD+100 mg/kg/day ethanol extract of *Morus alba* stem; H, HCD+100 mg

(바) 상지주정추출물에 의한 cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) 및 Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)의 발현

상지 주정 추출물의 cholesterol 7 α -hydroxylase(CYP7A1) 및 Lecithin cholesterol acyltransferase(LCAT)의 발현 측정을 위해서 4주 동안 실시한 흰쥐의 간을 적출하여 -70°C deep freezer에 보관하였다가 Trizol을 이용하여 RNA를 추출한 후 5 μ g의 RNA를 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit를 활용하여 cDNA로 전환시켰다. 이 전환된 cDNA를 500 ng의 농도를 사용하여 담즙산 생합성 효소인 cholesterol 7 α -hydroxylase(CYP7A1) 및 Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)에 대한 real time PCR을 실시하였으며 GAPDH를 House keeping gene으로 사용하였다. PCR에 사용된 Gene 과 Primer는 Table 4.3-14와 같다.

Table 4.3-14. Oligonucleotide primers for real time PCR analysis

Gene	Primers	Sequence(5' → 3')
GAPDH	Sense	AGACAGCCGCATCTTCTTGT
	Antisense	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
CYP7A1	Sense	CACCATTCTGCAACCTTTT
	Antisense	GTACCGGCAGGTCATTCAGT
LCAT	Sense	CTGGCTTTGGCAAGACCTAC
	Antisense	TACCAGTCCTGCCAGCTTCT

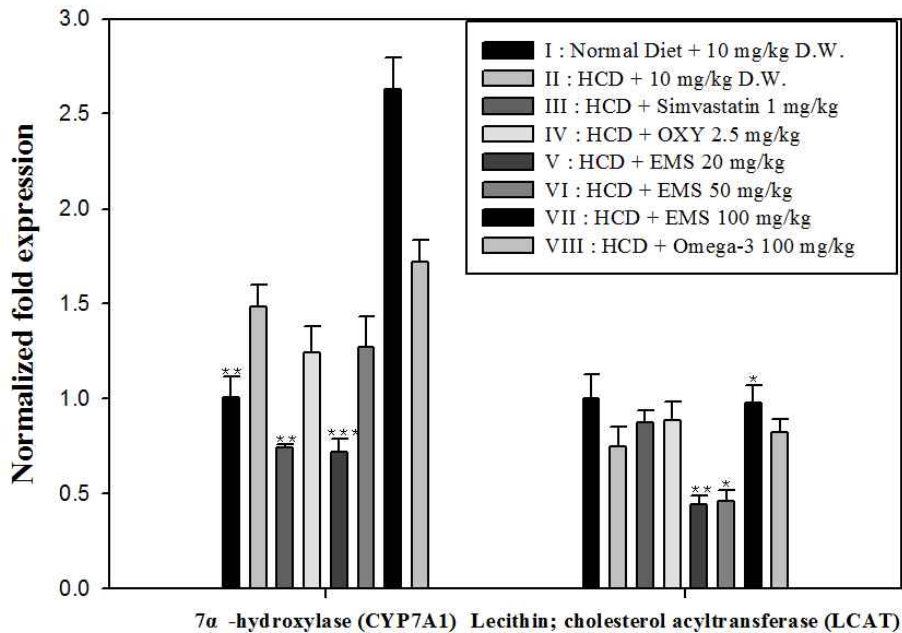


Fig. 4.3-14. Quantitative real-time RT-PCR of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT).

- ^a Significantly different ($p < 0.05$) compared with Group II.
- ^b Significantly different ($p < 0.01$) compared with Group II.
- ^c Significantly different ($p < 0.001$) compared with Group II.

그 결과, Fig. 4.3-14에 나타난 바와 같이, 상지 주정 추출물 투여군에서 농도 의존적으로 cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) 및 Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)에 대한 발현이 증가한 것을 확인하였다. 이러한 Cholesterol 7-hydroxylase (CYP7A1)는 콜레스테롤을 담즙산으로 이화시키는 과정에서 rate-limiting enzyme으로 작용한다. Cholesterol 7 α -hydroxylase 유전자는 간에서만 특이적으로 발현되며 콜레스테롤의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하는데, 햄스터에게 cholesterol 7 α -hydroxylase이 과잉 발현되었을 경우, 혈중 콜레스테롤 농도가 저하되는 결과는 cholesterol 7 α -hydroxylase가 콜레스테롤 대사의 중추적인 역할을 한다는 것을 뒷받침해 주는 것으로 알려져 있고, LCAT효소는 free cholesterol을 지용성인 cholesteryl ester로 변환시킨다. Cholesteryl ester는 지용성이므로 HDL표면에 존재하지 못하고 내부로 삽입되어 결과적으로 HDL을 구형으로 변화시키고, 상기 구형의 HDL은 SR-B1과 ABCG1 등의 수용체에 도킹하여 추가로 콜레스테롤을 흡수한 후 간으로 향하는 메커니즘을 수행하여 혈관 질환의 위험성을 감소시킬 수 있다.

라. 상지주정추출물의 면역증강 효과

(1) 상지의 RAW 264.7 세포에 대한 세포 증식능 및 독성 실험

세포 증식능 (cell proliferation)의 결과는 막대그래프, 세포독성 (LDH release)의 결과는 실선으로 나타내었다. 세포에 대한 증식능과 독성 측정은 RAW 264.7에 상지와 과면역유도를 위한 LPS를 동시에 처리한 후 24시간 뒤에 측정하였다. 그 결과 상지 12.5~100 µg/ml에서 LPS만을 처리한 positive control과 비교하였을 때 세포독성과 증식능 억제는 관찰되지 않았다(Fig. 4.3-15). 각각의 값은 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 통계처리를 위하여 SPSS를 통한 ANOVA 분석을 하였다. 다른 알파벳으로 표시되어 있는 것은 각각 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 뜻한다. ($p < 0.05$)

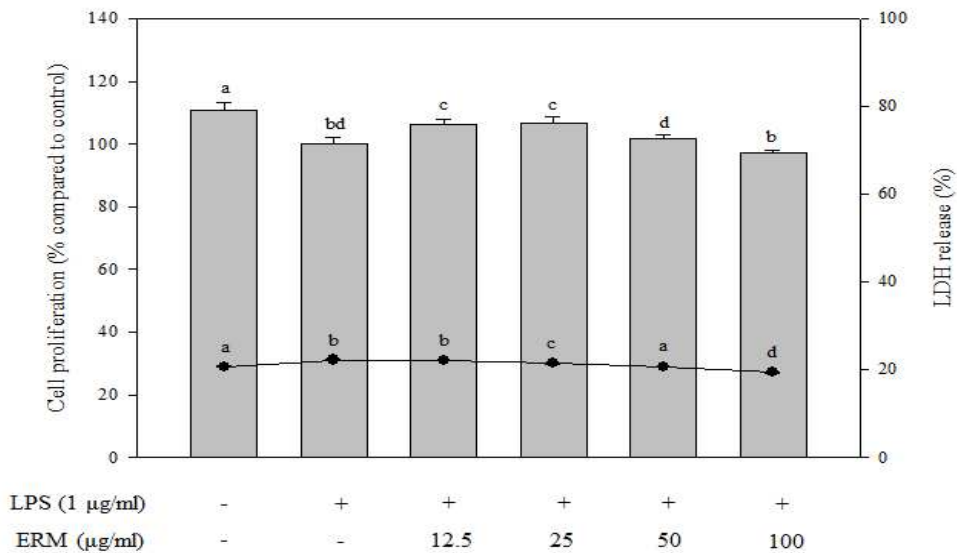


Fig. 4.3-15. 상지의 RAW 264.7 세포에 대한 세포 증식능 및 독성 실험

(2) Nitric Oxide (NO) 측정

NO 측정은 RAW 264.7에 상지와 과면역유도를 위한 LPS를 동시에 처리한 후 24시간 뒤에 분비된 세포의 상등액에서 측정하였다. LPS를 유도시 RAW264.7 세포의 NO 생성이 확연히

증가하였다. 상지 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS만을 처리한 positive control과 비교하였을 때 NO 생성이 유의적으로 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 4.3-16).

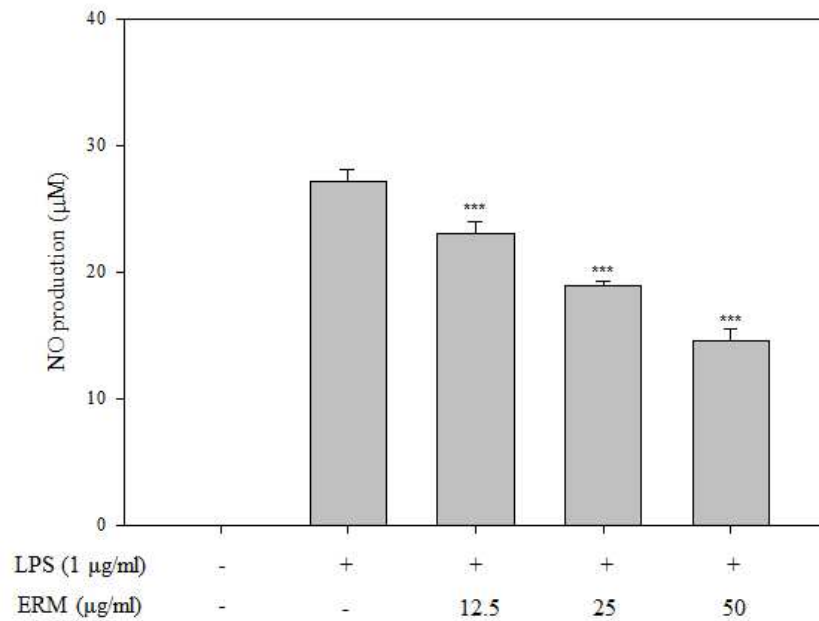


Fig. 4.3-16. 상지의 RAW 264.7 세포에 대한 NO 발현량
 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

(3) Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , MCP-1, IL-6 측정)

Cytokine 측정은 RAW 264.7에 상지와 과면역유도를 위한 LPS를 동시에 처리한 후 분비된 상등액에서 측정하였다. 각각의 그래프는 (A) TNF- α (B) IL-6 (C)MCP-1 이다. 그 결과 상지 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS만을 처리한 positive control과 비교하였을 때 cytokine 생성이 유의적으로 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 4.3-17).

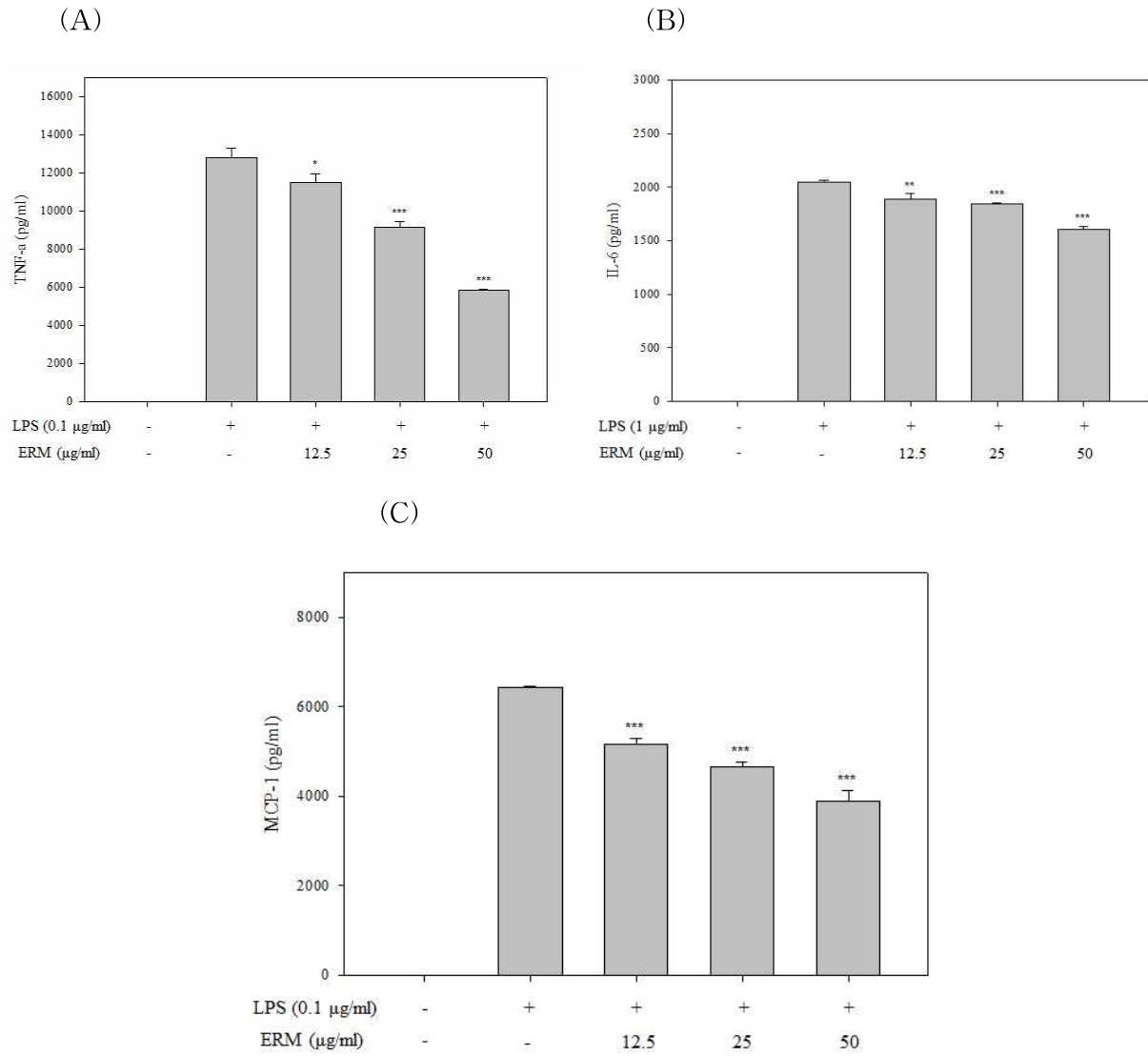


Fig. 4.3-17. Pro-inflammatory cytokine 측정

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(4) Real-time PCR

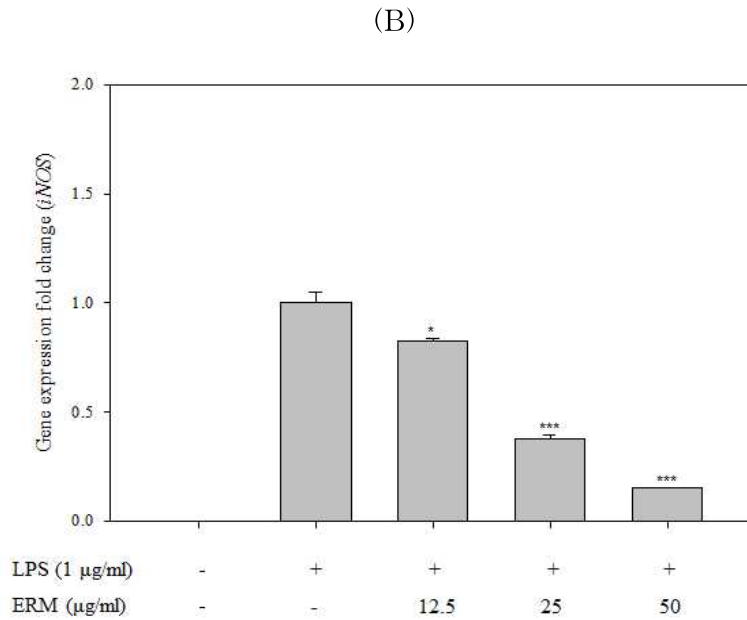
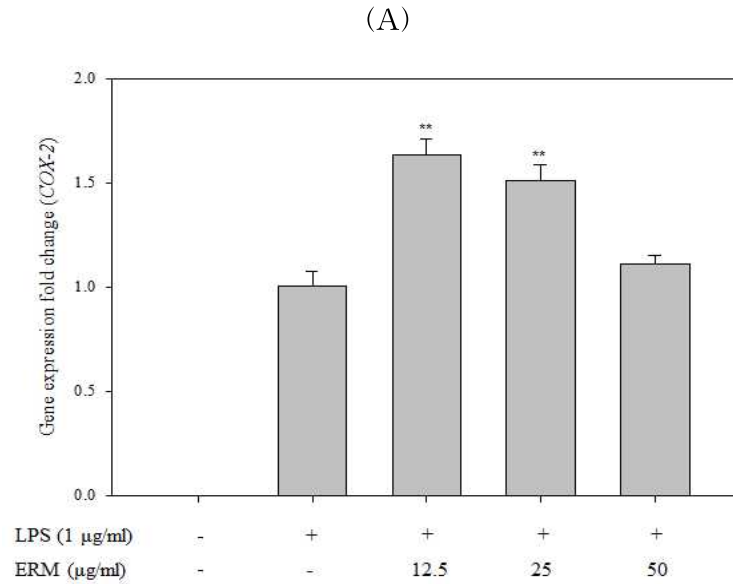


Fig. 4.3-18. Real-time PCR

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

COX-2, *iNOS*는 염증반응을 일으킨다고 알려져 있는 대표적인 유전자이다. 상지가 이를 어떻게 저해시키는지 알아보기 위해 RAW 264.7에 상지와 과 면역유도를 위한 LPS를 동시에 처리한 후 24시간 뒤에 세포에서 유전자 발현을 측정하였다. 그 결과 상지 12.5~50 μ

g/ml에서 LPS만을 처리한 positive control과 비교하였을 때 *iNOS* 유전자 발현이 유의적으로 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 4.3-18).

(5) Western blot

상지가 COX-2, *iNOS* 단백질 발현량을 어떻게 저해시키는지 알아보기 위해 RAW 264.7에 상지와 과 면역유도를 위한 LPS를 동시에 처리한 후 24시간 뒤에 세포에서 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 상지 12.5~50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 LPS만을 처리한 positive control과 비교하였을 때 *iNOS*의 단백질 발현이 유의적으로 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 4.3-19). LPS만을 처리한 sample을 100%로 밴드의 density를 측정하여 수치로 나타내었다.

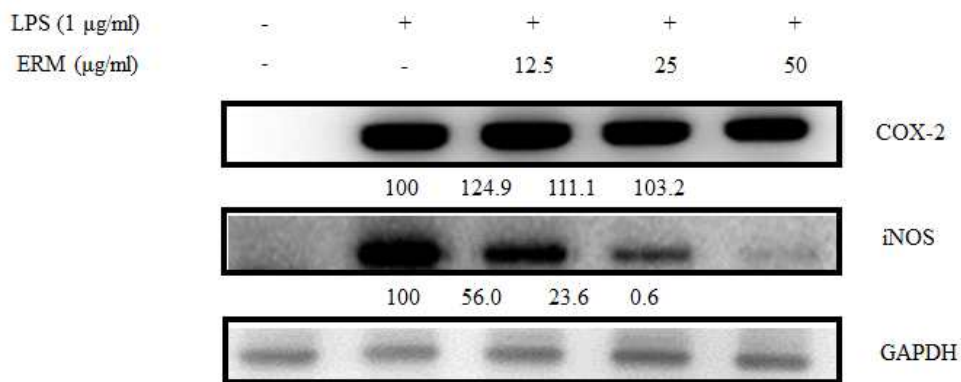


Fig. 4.3-19. Western blot

(6) 연구 결과 요약

상지의 항염증 효과를 측정하기 위해 RAW 264.7 mouse macrophage cell line을 이용하였다. 세포 증식능 및 독성 실험 결과 12.5 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 상지는 RAW 264.7 에서 세포 증식능 억제와 독성을 나타내지 않았다. 염증매개물질인 nitric oxide (NO)와 pro-cytokine (TNF- α , MCP-1, IL-6) 의 측정 결과 상지는 LPS로 유도된 과 면역을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 또 다른 염증매개물질인 *iNOS*, COX-2를 gene level과 protein level에서 real-time PCR과 western-blot을 통해 측정한 결과 상지는 LPS로 유도된 과 면역을 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 그러므로 상지는 RAW 264.7 mouse macrophage cell

line에서 농도 의존적으로 염증을 억제하는 항염증효과가 있음을 증명할 수 있었다.

마. 상지주정추출물과 oxyresveratrol의 장기능 정상화 효과

(1) oxyresveratrol 에 의한 세포간극의 안정화 효과

(가) Cell viability (MTT assay)

Oxyresveratrol가 caco-2 cell에 미치는 독성에 대해 알아보기 위해 oxyresveratrol (10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$) 을 농도별로 처리하여 MTT assay를 하였다. negative control과 비교 했을 때 oxyresveratrol 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 4.3-20). 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)와 *t*-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 없음을 확인 할 수 있었다.

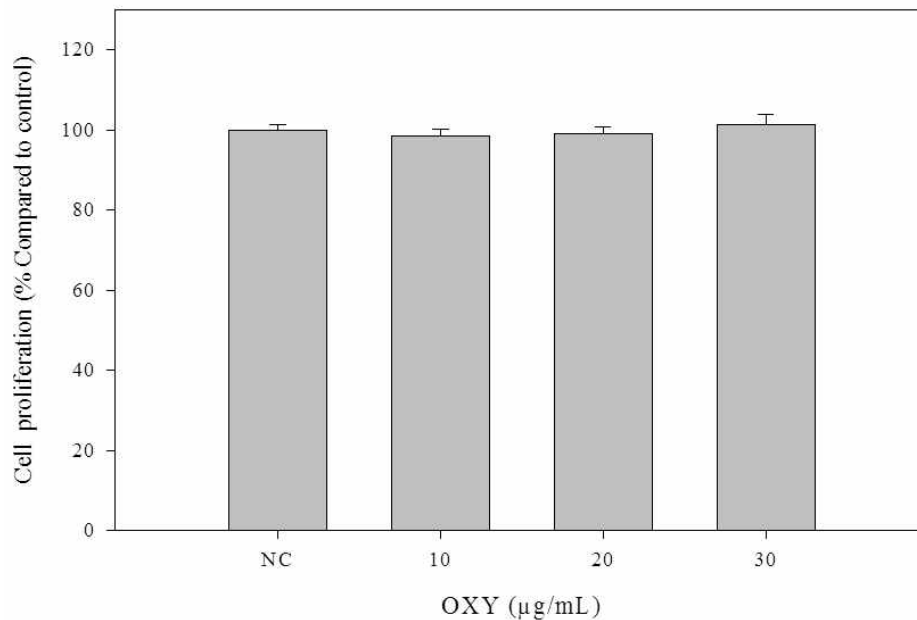


Fig. 4.3-20. Caco-2 cell에 대한 Oxyresveratrol의 cell viability. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(나) Transepithelial electric resistance (TEER)

Oxyresveratrol의 tight junction 유지 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해, 전류를 흘려 세포간극의 저항 값을 측정하였다. 그 결과, Oxyresveratrol 이 농도별로 tight junction 을 유지시켜주는 효과를 확인 할 수 있었는데, 특히 Oxyresveratrol 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 tight junction의 유지효과가 눈에 띄게 좋은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4.3-21). 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)와 *t*-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 있음 확인 할 수 있었다.

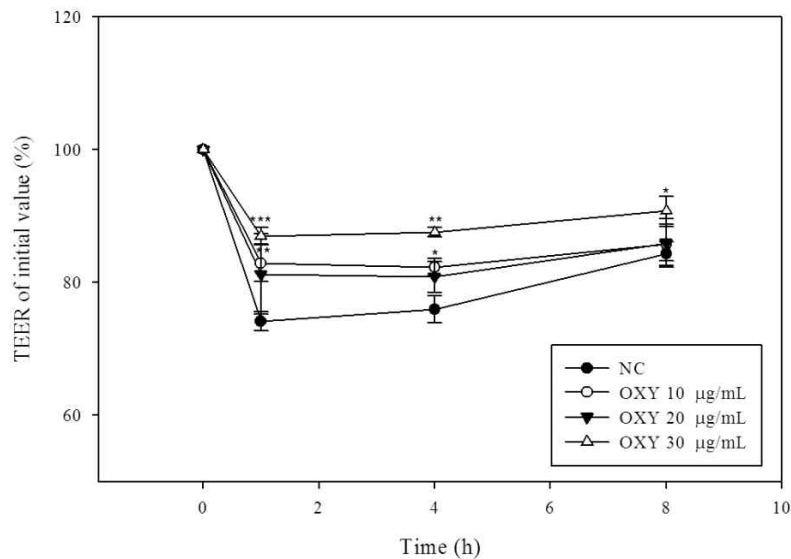


Fig. 4.3-21. Oxyresveratrol이 tight junction 유지 효과에 미치는 영향.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(다) Real time PCR

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 유전자의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다. 특히 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 효과가 가장 좋았고, 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)와 *t*-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의하게 증가하였음을 확인 할 수 있었다(Fig. 4.3-22).

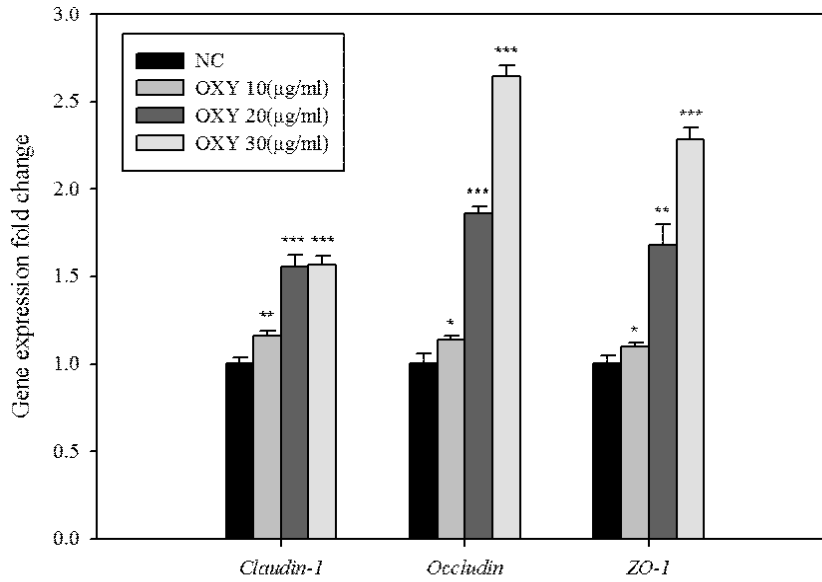


Fig. 4.3-22. Oxyresveratrol의 tight junction 관련 유전자 (*Claudin 1*, *Occludin*, *ZO-1*)의 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

(라) Western blot

Oxyresveratrol은 tight junction과 관련된 단백질의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다. 특히 oxyresveratrol 30 µg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았다(Fig. 4.3-23).

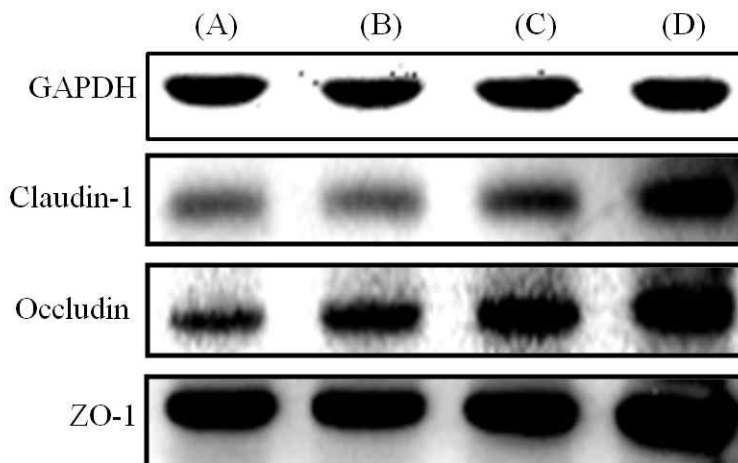


Fig. 4.3-23. (A) Negative control (NC); (B) OXY 10 µg/ml; (C) OXY 20 µg/ml; and (D) OXY 30 µg/ml.

(마) Immunocytochemistry (ICC)

Oxyresveratrol이 tight junction 관련 단백질 Claudin 1에 미치는 영향을 Immunocytochemistry을 통해 관찰한 결과, 아무것도 처리하지 않은 negative control에 비해 농도 의존적으로 Claudin 1이 두껍게 형성되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4.3-24).

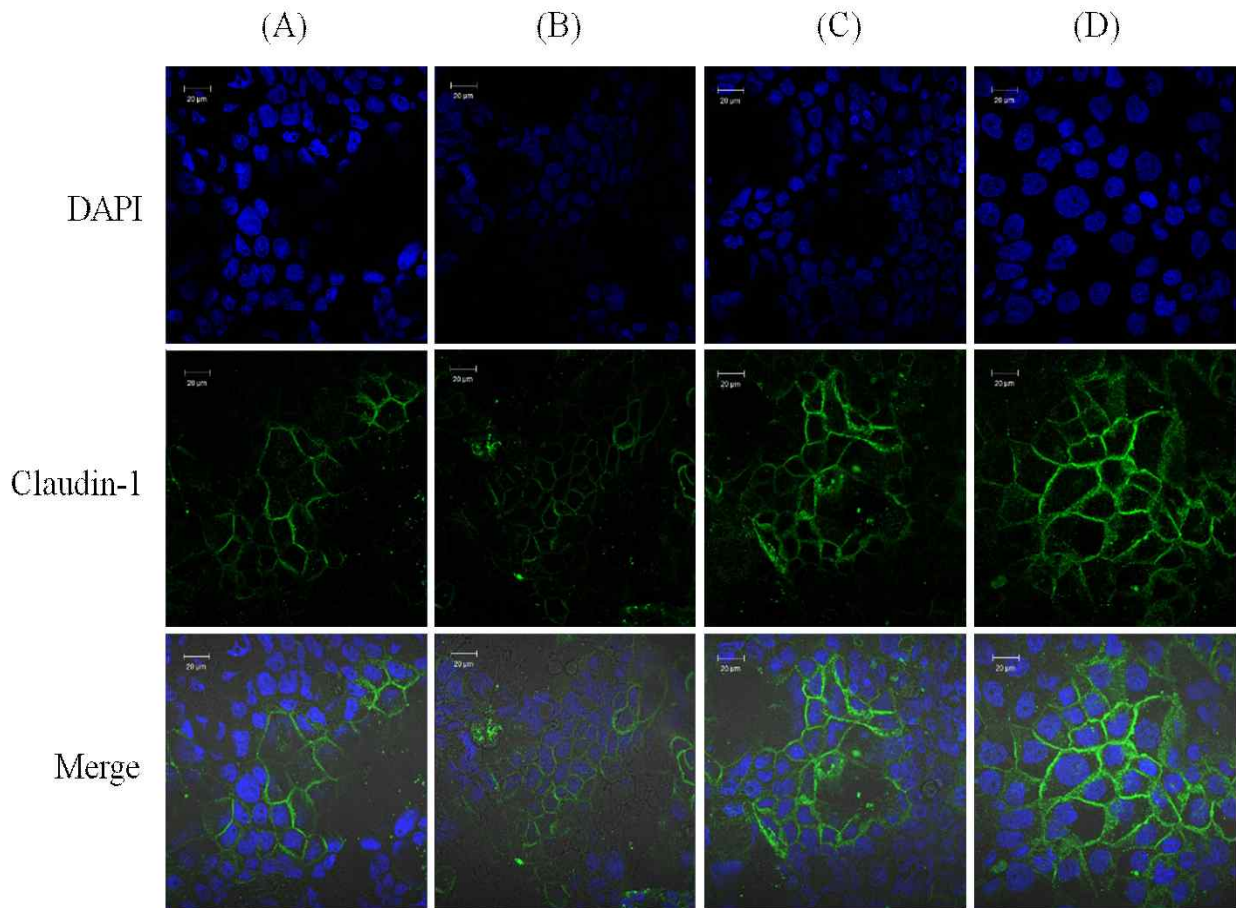


Fig. 4.3-24. Caco2 세포의 Claudin 1 ICC 염색 결과

(바) Paracellular permeability (FITC-dextran flux assay)

Oxyresveratrol 이 투과성에 미치는 영향을 FITC-dextran 4 kDa를 통해 관찰한 결과, 아

무것도 처리하지 않은 negative control (NC) 에 비해 농도 의존적으로 투과성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4.3-25). 아무것도 처리하지 않은 negative control (NC)와 *t*-test 검정을 한 결과 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 확인 할 수 있었다.

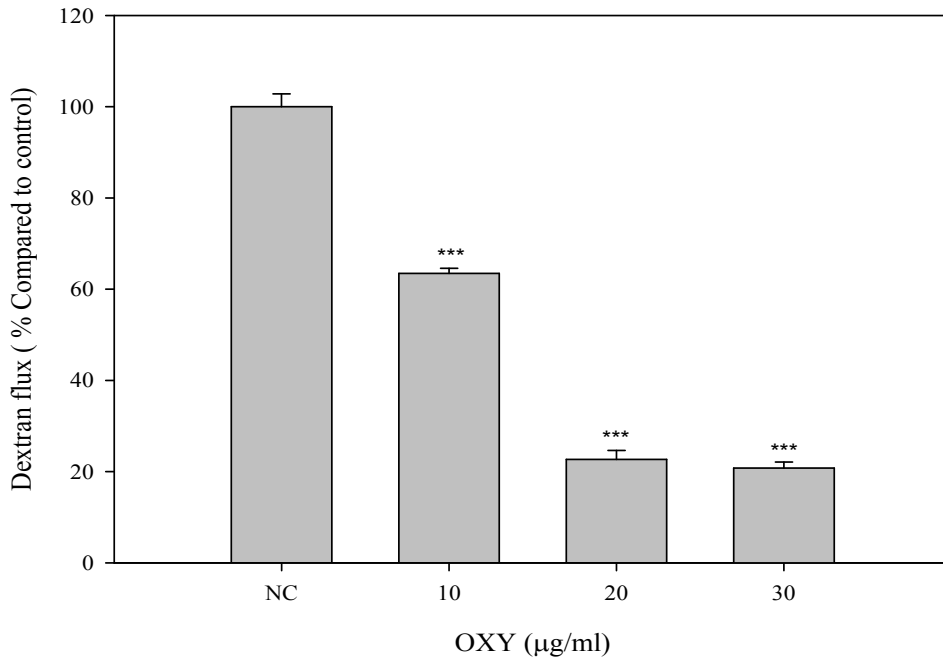


Fig. 4.3-25. Oxyresveratrol의 투과성에 미치는 영향.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(2) oxyresveratrol 에 의한 세포간극 안정화 효과의 기전 연구

(가) Transepithelial electric resistance (TEER)

PKC inhibitor(GF109203X) 의 tight junction 형성 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해, 전류를 흘려 세포간극의 저항 값을 측정하였다(Fig. 4.3-26). 그 결과, PKC inhibitor (GF109203X)와 oxyresveratrol 30 µg/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 µg/ml만 처리한 군 보다 모든 측정 시간에서 낮은 결과 값을 보였다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X) 만 처리한 군에서는 아무것도 처리하지 않은 negative control 보다 더 낮은 값을 보였다. 이는 PKC inhibitor 에 의한 PKC 경로의 억제는 세포간극의 형성에 영향을 미치는 것을 보여준다.

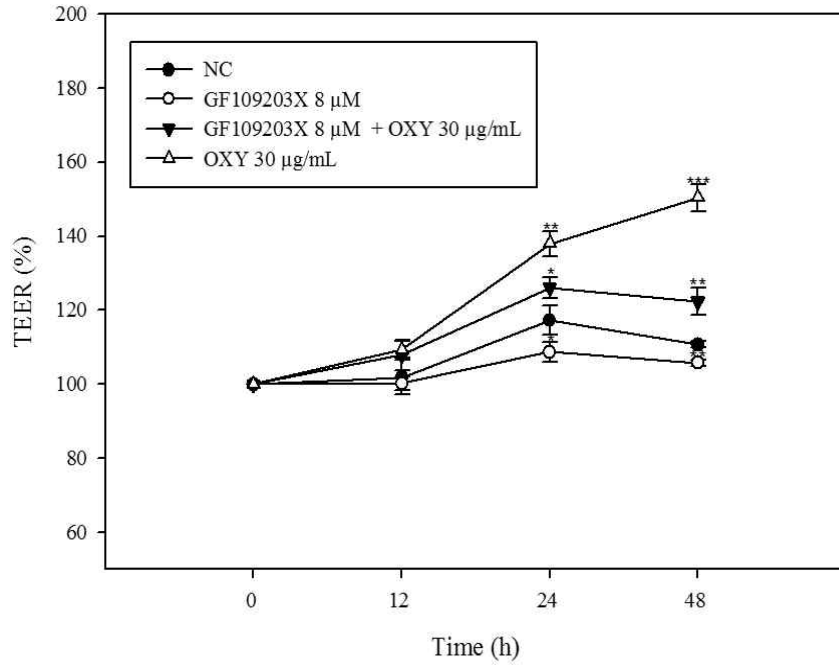


Fig. 4.3-26. PKC 경로가 tight junction 유지 효과에 미치는 영향.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(나) Real time PCR

Oxyresveratrol은 PKC, MAPK 경로와 관련된 유전자와 Cdx-2 의 유전자의 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig.4.3-27, 28). 특히 oxyresveratrol 30 μg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았다. 이를 통해 oxyresveratrol은 PKC, MAPK 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Cdx-2 의 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

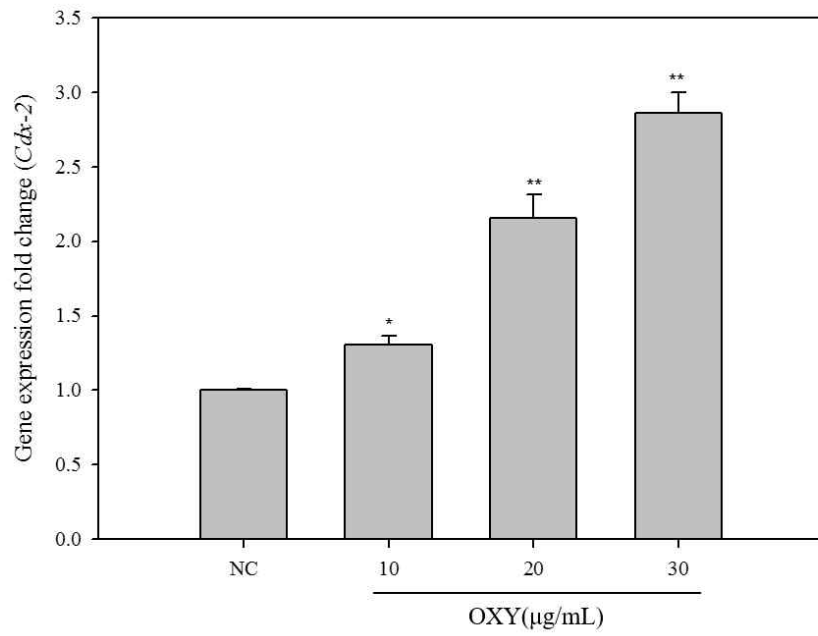
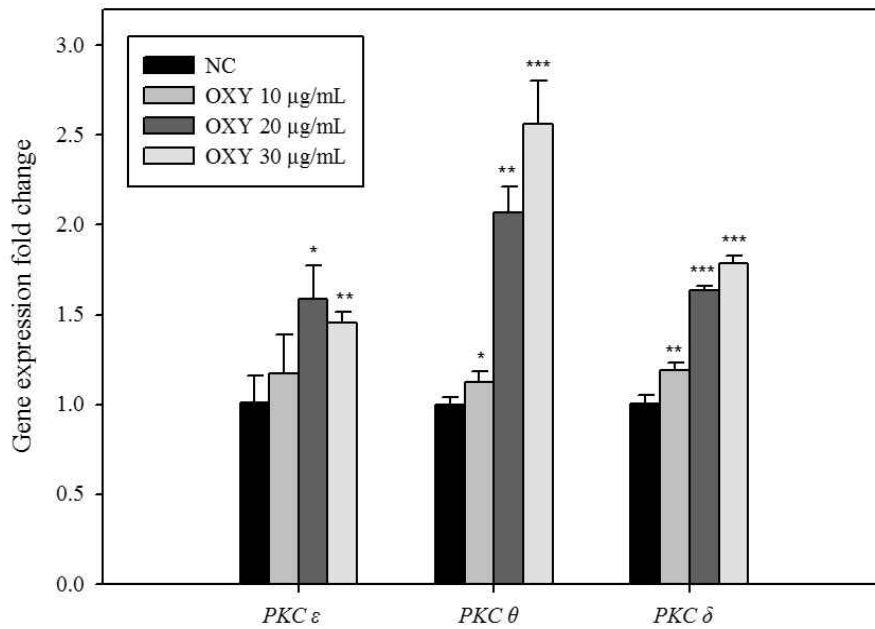


Fig. 4.3-27. Oxyresveratrol의 유전자의 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(A)



(B)

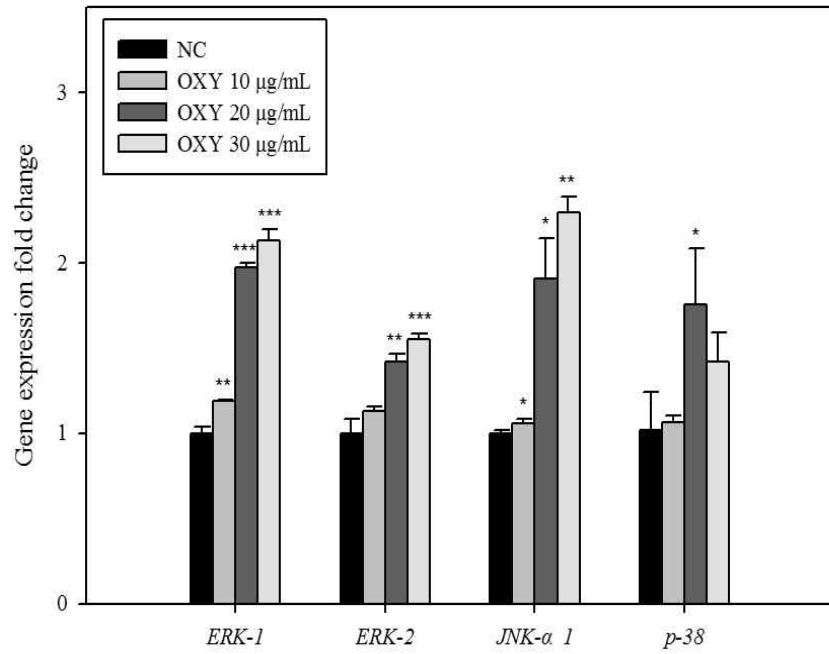


Fig. 4.3-28. Oxyresveratrol의 PKC (A), MAPK (B) 경로 관련 유전자의 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

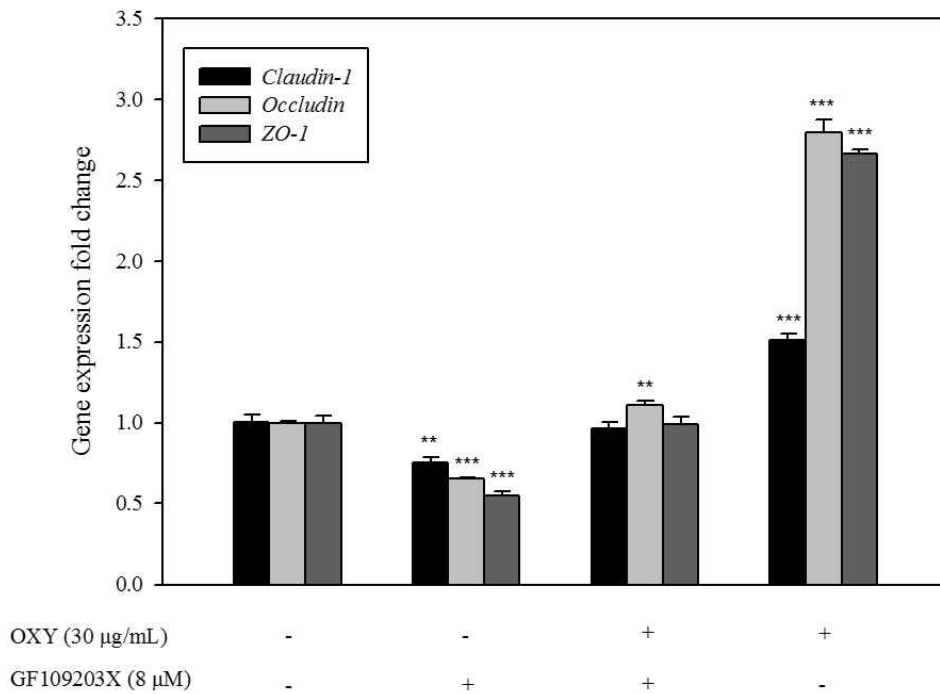


Fig. 4.3-29. PKC 경로억제제의 tight junction 관련 유전자 (*Claudin 1*, *Occludin*, *ZO-1*)의 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 µg/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 µg/ml만 처리한 군 보다 세포간극(tight junction)관련 유전자 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다(Fig.4.3-29). 이 결과는, oxyresveratrol 에 의한 세포간극 유도는 PKC 경로 활성화에 의해 유도된다는 것을 보여준다.

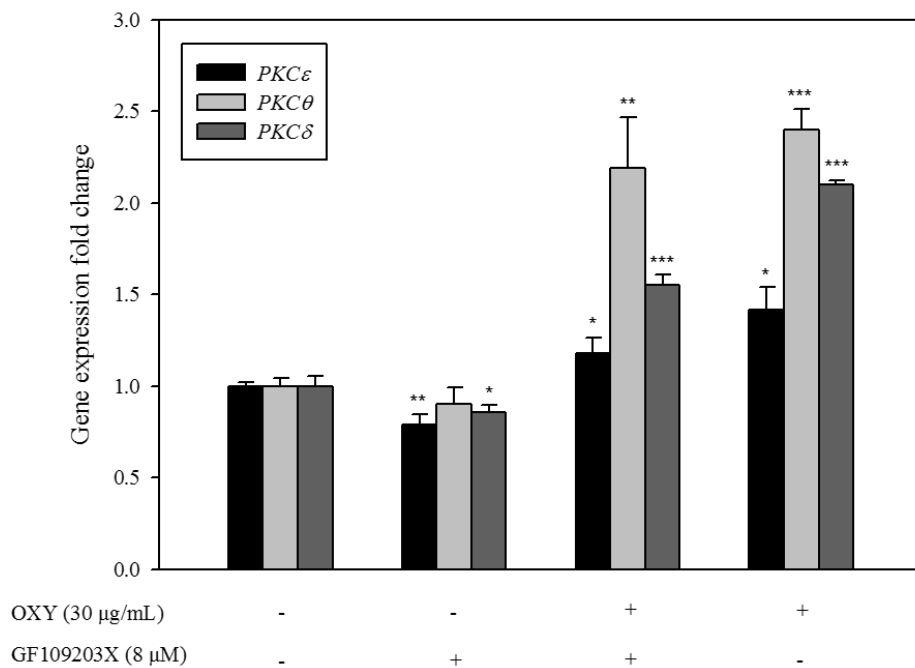


Fig. 4.3-30. PKC 경로억제제의 PKC 경로 관련 유전자의 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 µg/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 µg/ml만 처리한 군 보다 PKC 경로 유전자 관련 유전자 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다(Fig.4.3-30).

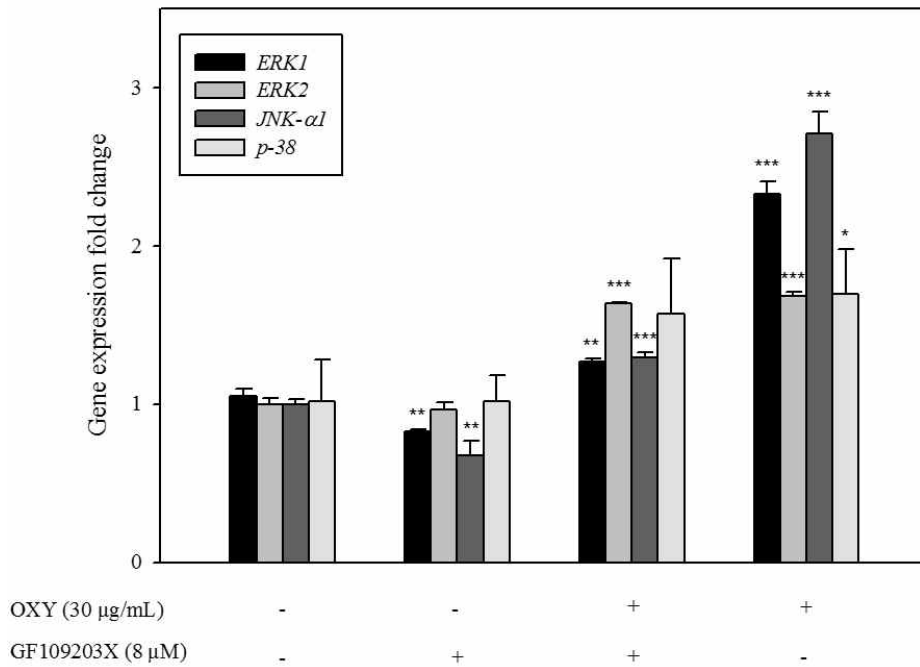


Fig. 4.3-31. PKC 경로억제제의 MAPK 경로 관련 유전자의 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 µg/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 µg/ml만 처리한 군 보다 MAPK 경로 관련 유전자 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다. 이 결과를 통해 MAPK 경로의 활성화는 PKC 경로에 의한 것임을 확인 할 수 있었다(Fig.4.3-31).

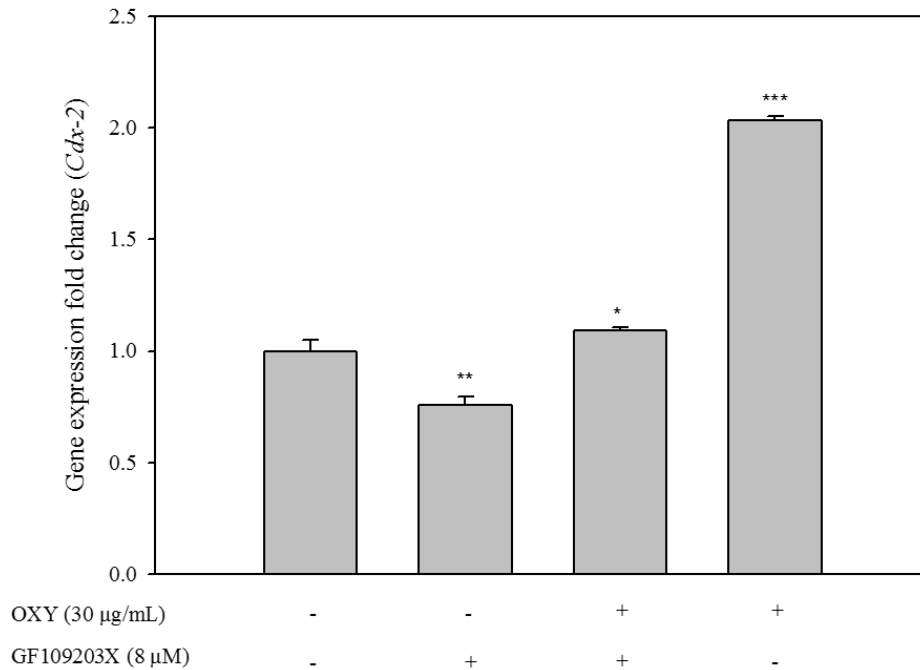


Fig. 4.3-32. PKC 경로 억제제의 Cdx-2 의 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 µg/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 µg/ml만 처리한 군 보다 Cdx-2 관련 유전자의 발현량이 낮았다(Fig.4.3-32).

(다) Western blot

Oxyresveratrol은 PKC 경로의 인산화와 Cdx-2의 단백질 발현량을 농도 의존적으로 증가시켰다. 특히 oxyresveratrol 30 µg/ml 처리군에서 효과가 가장 좋았다. 이를 통해 oxyresveratrol은 PKC 경로를 활성화 시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Cdx-2의 단백질 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig.4.3-33,34,35).

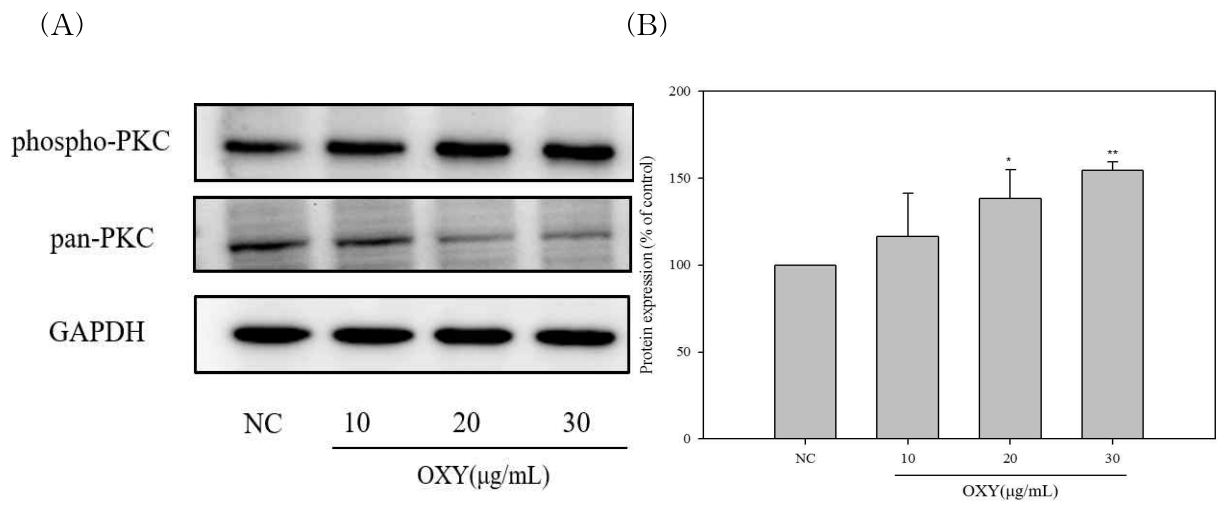


Fig. 4.3-33. Oxyresveratrol의 PKC 경로 인산화 변화.

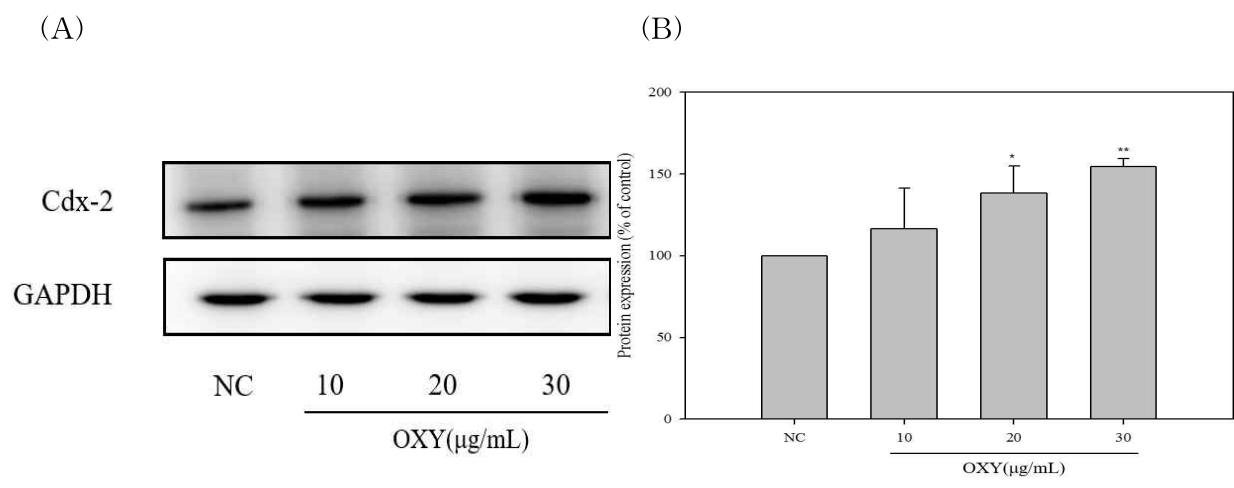


Fig. 4.3-34. Oxyresveratrol의 Cdx-2 단백질 발현량 변화.

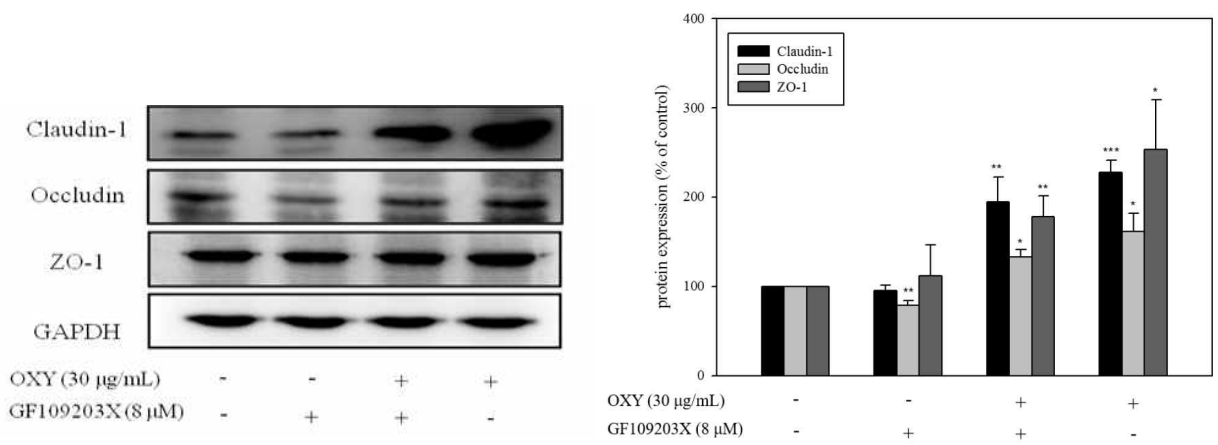


Fig. 4.3-35. PKC 경로억제제의 tight junction 관련 단백질 (Claudin 1, Occludin, ZO-1)의 발현량 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 만 처리한 군 보다 세포간극(tight junction)관련 단백질 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다(Fig.4.3-36).

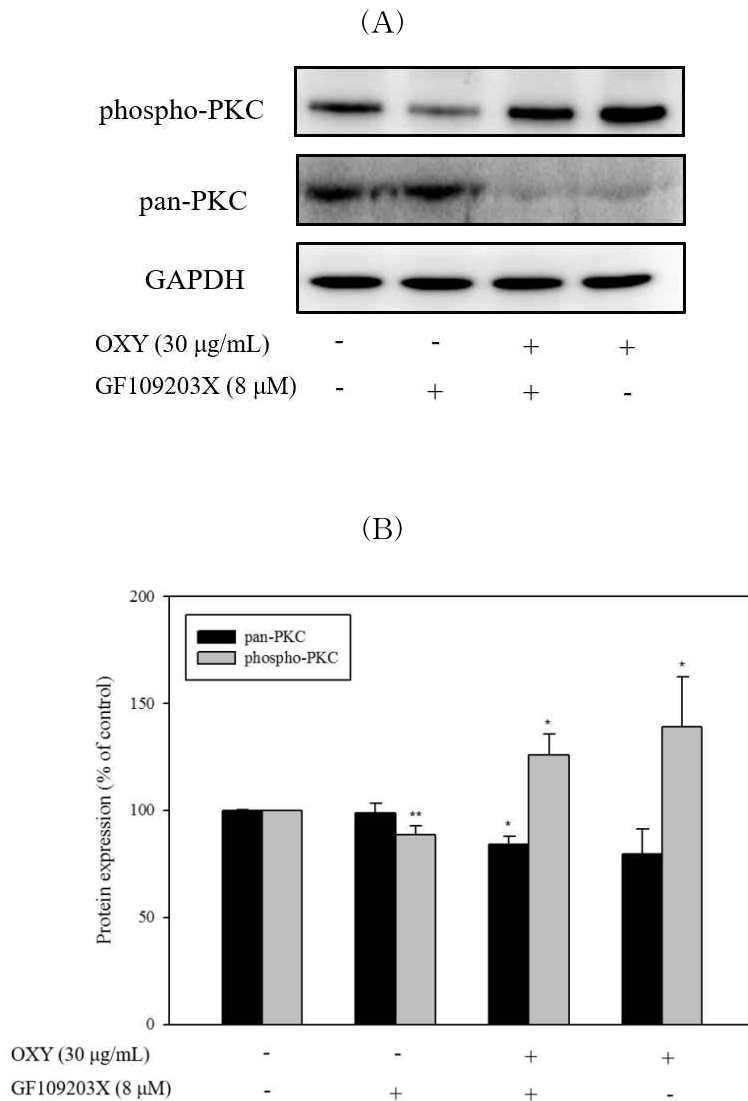


Fig. 4.3-36. PKC 경로억제제의 PKC 경로 인산화정도의 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 $\mu\text{g/ml}$ 만 처리한 군 보다 PKC 경로 유전자 관련 단백질 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다(Fig.4.3-36).

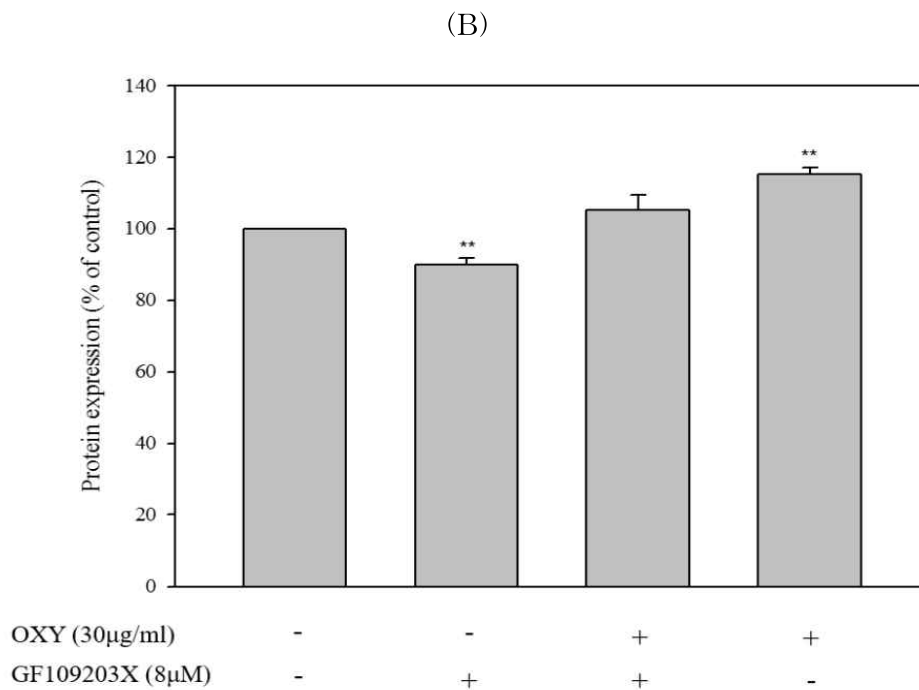
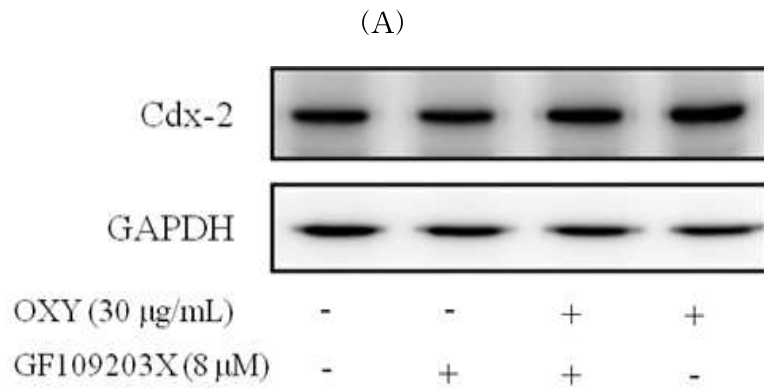


Fig. 4.3-37. PKC 경로억제제의 Cdx-2 단백질 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

PKC inhibitor(GF109203X)와 oxyresveratrol 30 μ g/ml 를 함께 처리한 군은 oxyresveratrol 30 μ g/ml만 처리한 군 보다 Cdx-2 단백질 의 발현량이 낮았다. 특히 PKC inhibitor(GF109203X)만 처리한 군에서 발현량이 가장 낮았다(Fig.4.3-37).

(라) Oxyresveratrol 에 의한 세포간극의 강화 기전 요약

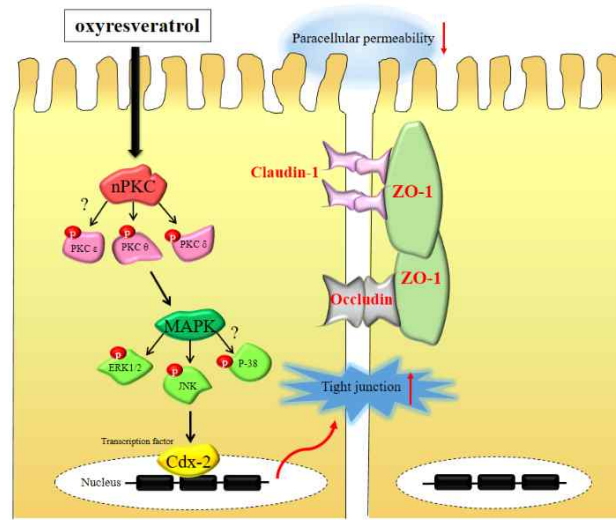


Fig. 4.3-38. Oxyresveratrol 에 의한 세포간극의 강화 기전

본 실험을 통해, oxyresveratrol은 human intestinal Caco-2 epithelial cell 의 전반적인 장 투과도를 감소시키며, 이런 효과는 oxyresveratrol이 PKC (protein kinase C) 경로를 활성화 시키고, 활성화된 PKC 경로로 인한 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 경로 활성화와 transcription factor 인 Cdx-2의 발현에 의해 최종적으로 세포간극 유전자 발현 및 단백질 발현 증가로 인한 것임을 확인할 수 있었다(Fig. 4.3-38).

(3) 상지주정추출물 에 의한 MUC2 와 TFF3 유전자의 생성

(가) Cell viability (MTT assay)

상지주정추출물이 LS174T cell에 미치는 독성에 대해 알아보기 위해 상지주정추출물을 (12.5, 25, 50 µg/mL)을 농도별로 처리하여 MTT assay를 하였다. negative control과 비교했을 때 상지주정추출물을 12.5, 25, 50 µg/mL의 농도에서 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 4.3-39).

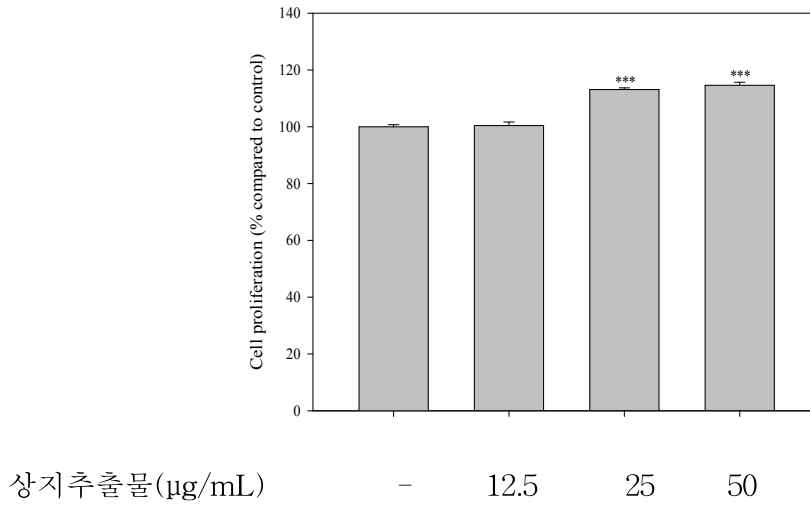


Fig.4.3-39. 상지주정추출물에 의한 LS174T cell viability

(나) Real time PCR

상지주정추출물 (12.5, 25, 50 µg/mL)을 처리한 군의 발현양이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig.4.3-40).

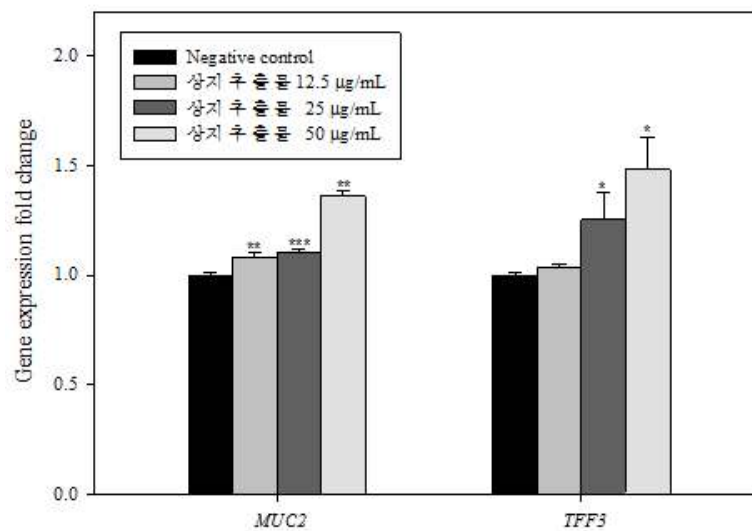


Fig. 4.3-40. 상지추출물의 MUC2 와 TFF3의 유전자 발현량 변화.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(다) Immunocytochemistry (ICC)

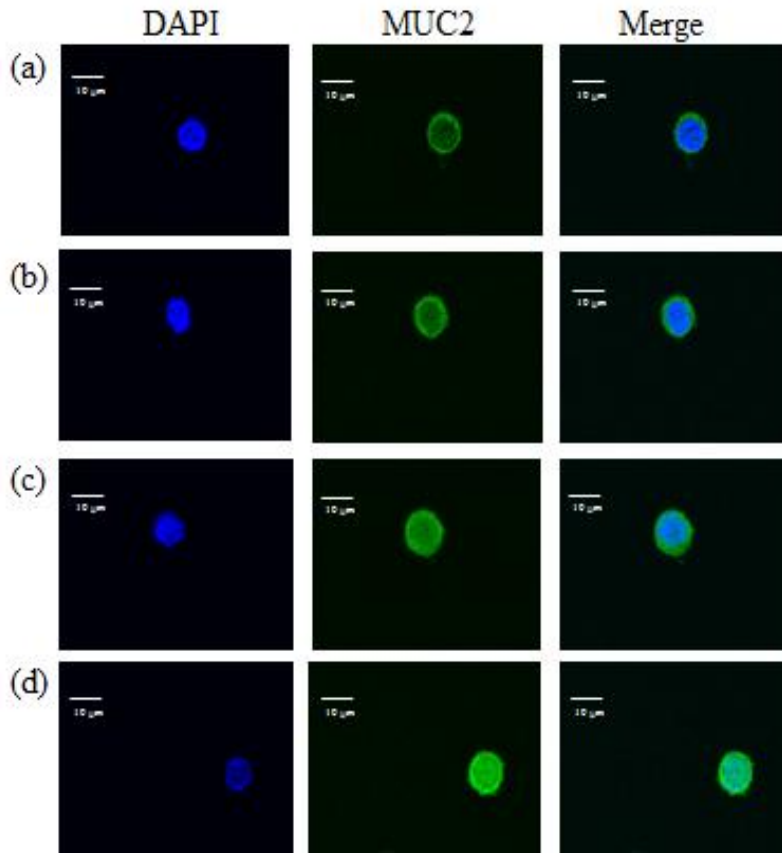


Fig. 4.3-41. 상지추출물에 의한 MUC생성
(a) Negative control (b) 상지추출물 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(c) 상지추출물 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) 상지추출물 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

상지추출물 농도 의존적으로 mucin 생성량이 증가하는 결과를 보였다 (Fig. 4.3-41).

(라) 결과 요약

세포간극 (tight junction, TJ)의 안정화는 내 독소와 같은 유해물질의 장 투과를 막아주므로 여러 가지 질병의 예방에 중요한 역할을 한다. Oxyresveratrol 의 세포간극 (TJ)의 안정화 효과를 측정하기 위해 human epithelial cell인 Caco2 cell을 이용하였다. 그 결과 oxyresveratrol은 농도 의존적으로 TJ의 생성을 증가시켰다. 이는 PKC 와 MAPK 경로에 의한 전사인자인 Cdx-2 발현량의 증가에 의한 것임이 확인 되었다. 염증성 장 질환 환자에서 뮤신의 생성으로 인한 점막층의 치유는 장 기능을 정상화 시키는데 가장 중요한 요소이

다. 그러므로 human goblet cell-like 세포주인 LS 174T 세포를 이용하여 oxyresveratrol 이 뮤신생성을 증가시키는지 알아보았다. 그 결과, oxyresveratrol은 농도 의존적으로 뮤신 생성을 담당하는 *MUC2* 유전자의 발현을 증가시켰다. 결론적으로 Oxyresveratrol과 상지는 장 세포간극의 안정화와 뮤신분비의 증가를 통해 염증성 장 질환을 치료하고 장 기능을 정상화시키는데 긍정적인 영향이 있음을 알 수 있었다.

바. 상지주정추출물의 대장염 모델에서의 효과

(1) 상지주정추출물에 의한 대장염 모델 마우스 몸무게 변화 및 뮤신 발현 측정

(가) 몸무게 측정결과

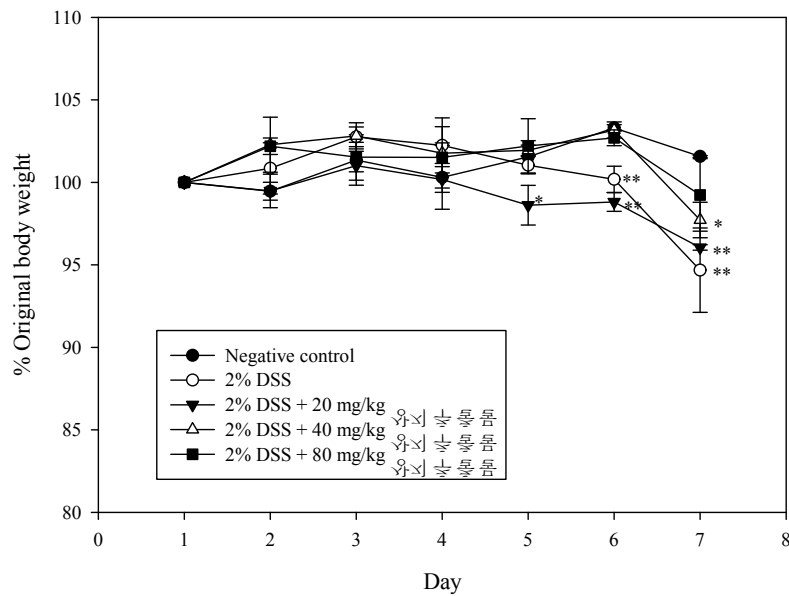


Fig. 4.3-42. 상지추출물에 따른 대장염 모델 마우스의 몸무게 변화. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

몸무게 변화는 마지막 한주동안 2% DSS로 대장염을 유발하면서 측정되었다(Fig.4.3-42). 첫 번째 날의 몸무게를 100%로 환산하여 변화량을 계산하였고, 결과에서 보인바와 같이 2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 몸무게가 감소한 반면, 상지주정추출물을 공급한 마우스의 몸무게는 그 변화량이 적은 것을 알 수 있었다.

(2) 질병 발병 정도 측정

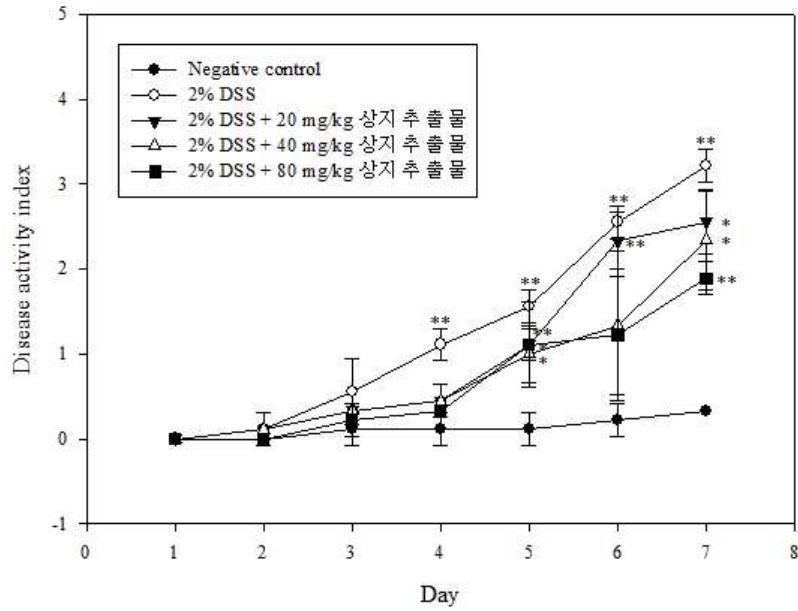


Fig. 4.3-43. 상지추출물에 따른 질병 발병 정도 측정

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 DAI값은 day가 갈수록 큰 폭으로 증가한 반면, 상지추출물을 공급한 마우스의 DAI는 그 변화량이 작은 것을 알 수 있었다(Fig.4.3-43).

(3) 상지추출물에 의한 뮤신회복도 측정

(가) Alcian blue 염색

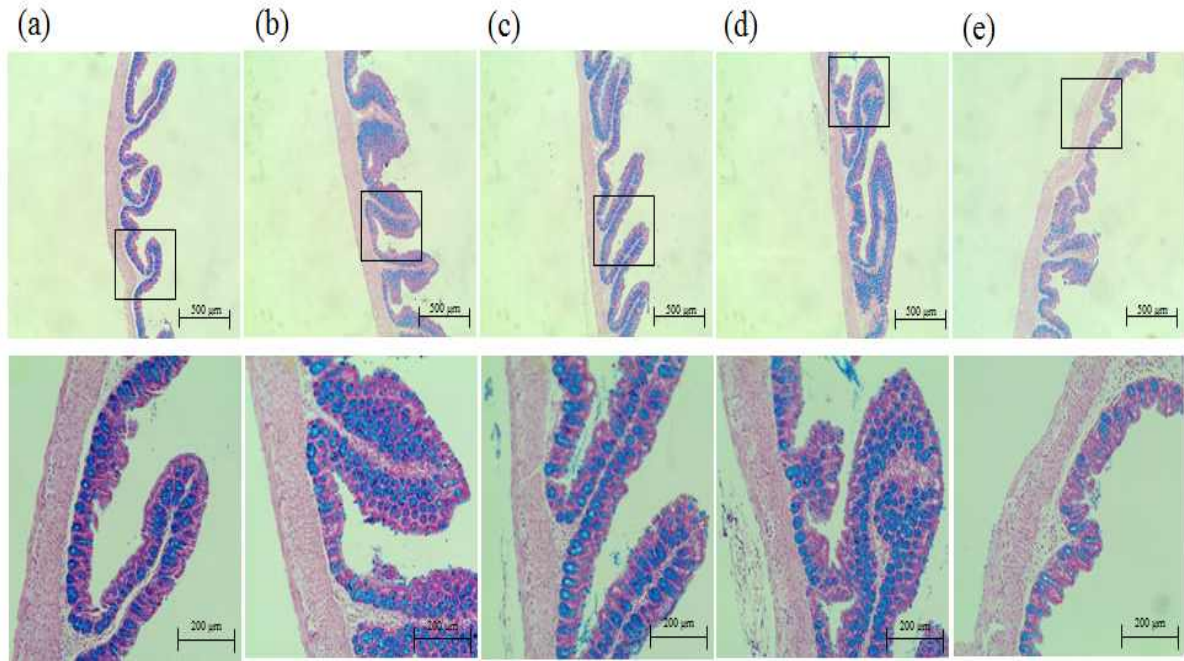


Fig.4.3-44. 마우스 장의 Alcian blue염색. (a)정상, (b)2% DSS, (c) 2% DSS+ 20 mg/kg 상지추출물, (d) 2% DSS + 40 mg/kg 상지추출물, (e) 2% DSS + 80 mg/kg 상지추출물

(나) 뮤신생성량 그래프화

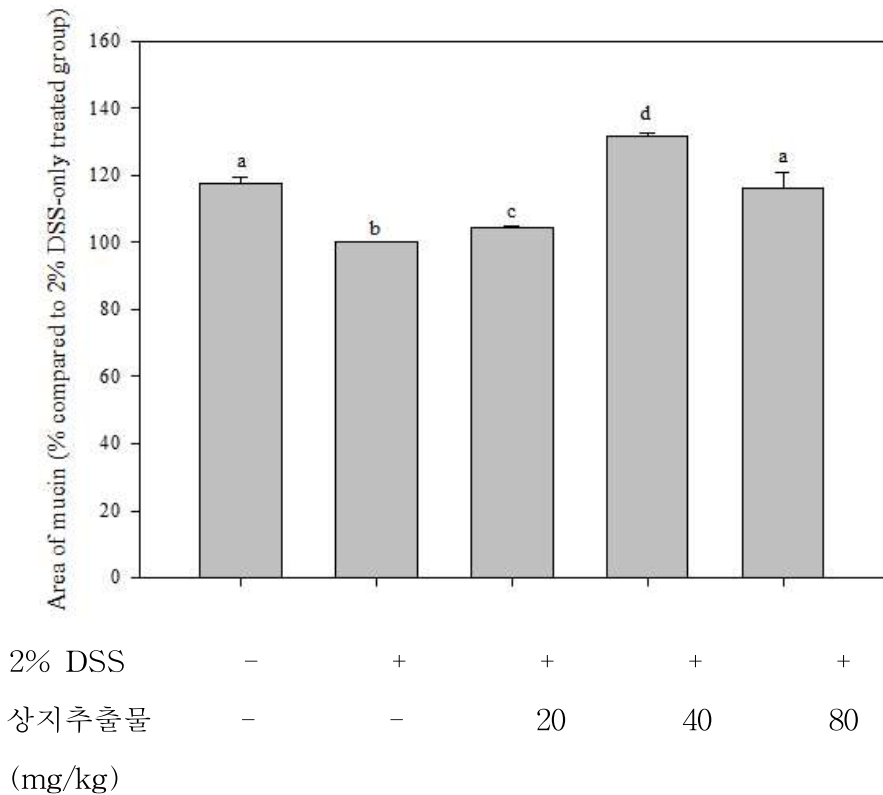


Fig. 4.3-45. 상지추출물에 의한 뮤신 발현량의 변화

2% DSS만을 공급한 대장염 마우스의 뮤신양은 통계적으로 유의하게 감소한 반면, 상지주정 추출물을 투여한 마우스의 뮤신생성량은 정상과 같은 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다 (Fig.4.3-44,45).

(4) 상지주정추출물의 대장염 마우스 모델에서의 항염증 활성 측정

(가) 상지의 대장염 모델에서의 병변 억제 효과

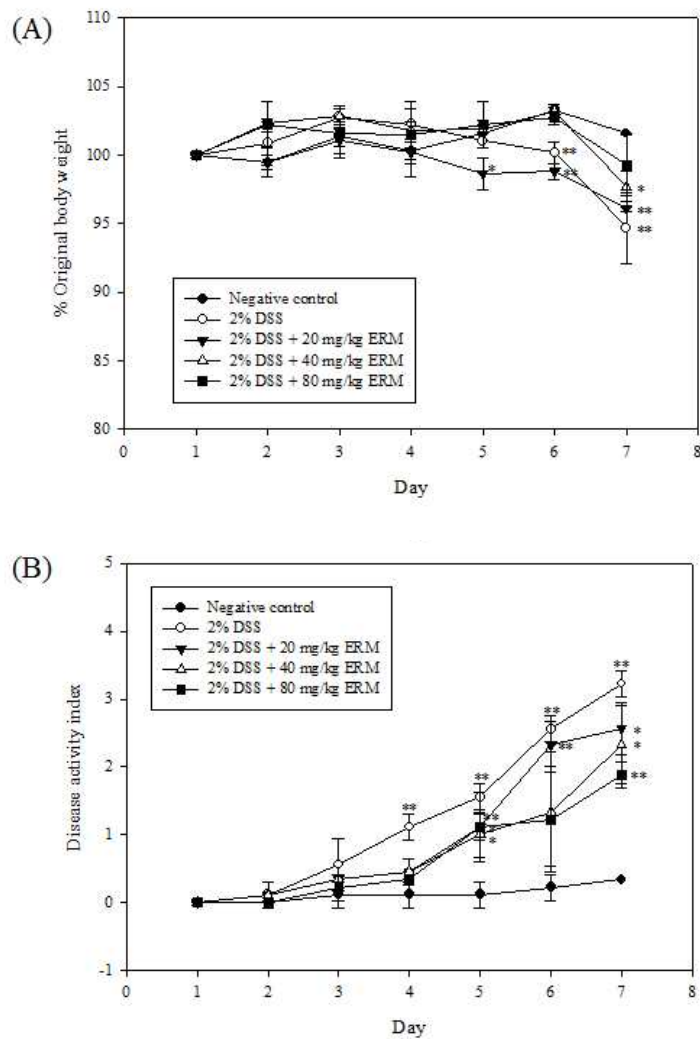


Fig.4.3-46. 대장염 모델에서의 상지추출물의 병변 억제 효과
 몸무게 측정 (A) 과 대장염증지수 (B) 측정

대장염 모델의 병리학적 완화효과를 알아보기 위해 몸무게 변화와 질병의 정도를 측정하였

다. 그 결과, 2% DSS만 공급한 양성대조군 (PC)은 물만 공급한 음성대조군 (NC, 100%)을 기준으로 몸무게가 93.2%로 감소하였지만, 상지추출물 (ERM)을 공급한 그룹은 94.5, 96.2, 97.7% (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 유지되었다(Fig.4.3-46A). 변의 무르기 정도와 피의 유무를 관찰하여 대장염증지수 (DAI)를 측정 한 결과 PC (100%)을 기준으로 ERM을 공급한 그룹은 79.3, 72.4, 58.6%로 감소되었다(Fig.4.3-46B).

(나) 대장 길이와 비장 무게에 대한 영향

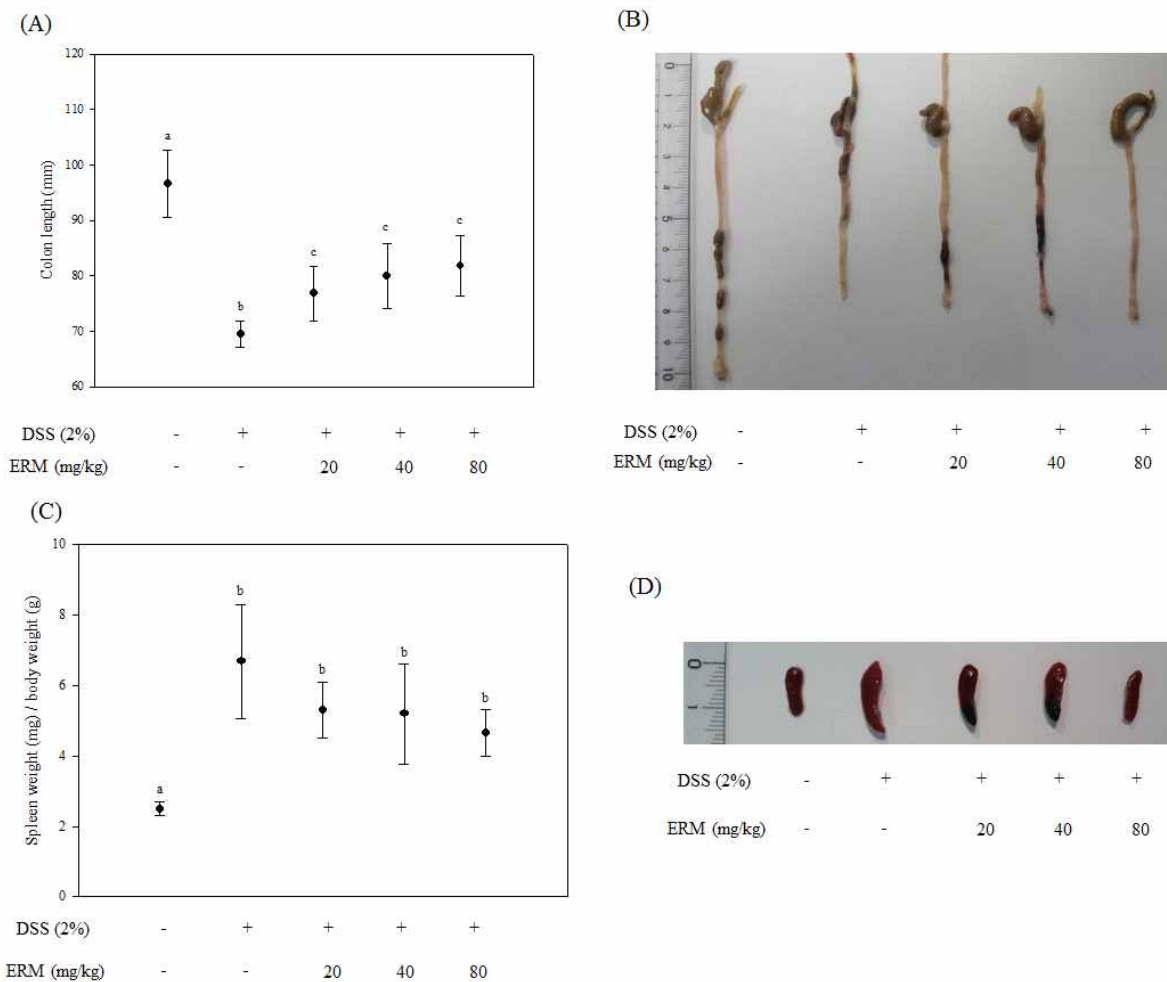


Fig.4.3-47. 상지추출물의 대장염모델의 장 길이와 비장무게 변화효과
장 길이 변화 (A, B)와 비장무게 변화 (C, D)

대장염모델의 장 길이를 측정한 결과, NC (96.7 ± 6.1 mm, 100%)에 비해 PC (69.5 ± 2.3 mm, 71.9%)의 장 길이가 상당히 감소되었다. 하지만 ERM을 처리한 그룹은 각각 76.8 ± 4.9

(79.5%), 80.0 ± 5.8 (82.8%), 81.8 ± 5.4 mm (84.7%) (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)으로 장 길이가 길게 유지되었다(Fig.4.3-47A,B). 비장 비대는 염증 정도를 반영한다. 비장 무게를 측정한 결과, NC (2.5 ± 0.2 , 100%)에 비해 PC (6.7 ± 1.6 , 267.7%)로 비장의 무게가 증가하였다. 하지만 ERM을 처리한 그룹은 각각 5.3 ± 0.8 (212.1%), 5.2 ± 1.4 (208.1%), 4.7 ± 0.7 (186.3%) (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM) 으로 감소하였다(Fig.4.3-47C,D).

(다) 장 조직에서 iNOS와 COX-2 발현에 대한 영향

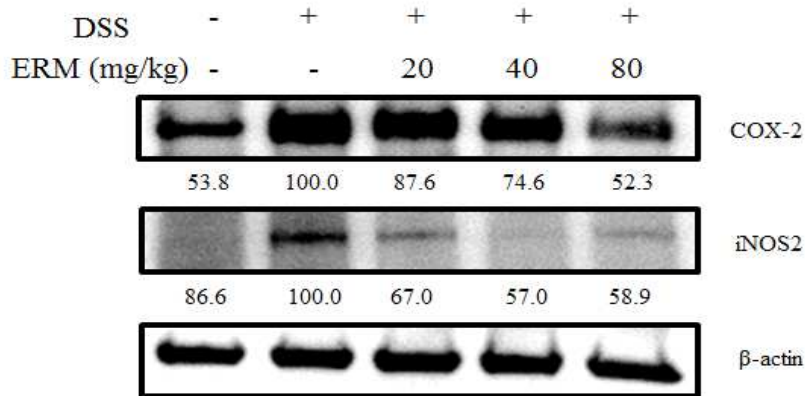


Fig. 4.3-48. 대장염모델에서의 상지추출물의 COX-2, iNOS2 억제효과

대장염모델에서 염증 매개인자인 COX-2, iNOS2를 측정하였다. 그 결과 COX-2 단백질이 12.4, 25.6, 47.7% (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 감소되었다. iNOS2 단백질도 각각 33, 43, 41.1 % (각각 20, 40, 80 mg/kg ERM)로 감소되었다(Fig. 4.3-48).

(라) 혈청에서 전 염증성 사이토카인 (IL-6)에 대한 영향

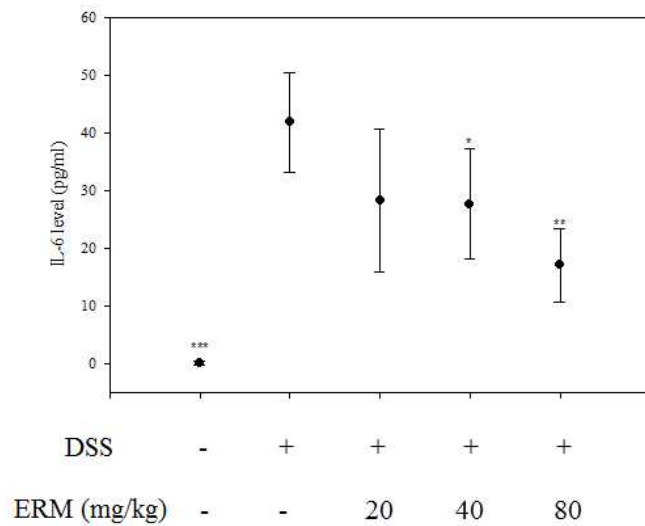


Fig. 4.3-49. 대장염모델에서의 상지추출물의 IL-6 억제효과

동물의 분리 된 혈청에서 multiplex kit를 이용하여 6개 (IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-12p70)의 싸이토카인을 측정해보았는데, 그 중 IL-6만이 검출되었다(Fig. 4.3-49). IL-6 값은 0.21 ± 0.37 (NC), 41.87 ± 8.67 (PC), 28.35 ± 12.37 (20 mg/kg ERM), 27.70 ± 9.6 (40 mg/kg ERM), 17.07 ± 6.30 (80 mg/kg ERM) pg/ml로 ERM 농도 의존적으로 감소되었다.

(5) 결과 요약

본 실험에서는 상지추출물 (ERM) 의 대장염 억제효과를 알아보았다. 유병 완화 효과를 알아보기 위해 대장염 마우스의 몸무게변화를 측정하고 변의 무르기와 피의 유무로 유병지수 점수를 매긴 결과, 상지추출물을 투여한 마우스의 몸무게는 2% DSS 만을 투여한 마우스 보다 정상에 가깝게 유지되고 유병지수 또한 낮았다. 또한, 상지추출물을 투여한 마우스의 장의 길이가 PC에 비해 정상에 가깝게 유지되었고, 비장의 무게 또한 낮게 유지되었다. 상지추출물의 염증 완화정도를 측정하기 위해 염증매개인자인 COX-2, iNOS2와 pro-cytokine인 IL-6을 측정한 결과, 이 역시 상지추출물을 투여한 마우스에서 낮게 유지되었다. 조직학적 변화에서는 alcian blue 염색을 이용하여, 뮤신생성 변화량을 비교해 보았는데, PC 마우스의 장내 뮤신생성은 NC에 비해 크게 감소된 반면, 상지추출물 투여그룹은 높게 유지되었다. 결론적으로 상지추출물은 여러 가지 염증매개인자를 감소시키고, 뮤신 생성을 증가시킴으로서

대장염을 억제시킴을 알 수 있었다.

사. 상지주정추출물의 혈당강하 효과

(1) 체중증가량 및 식이섭취량

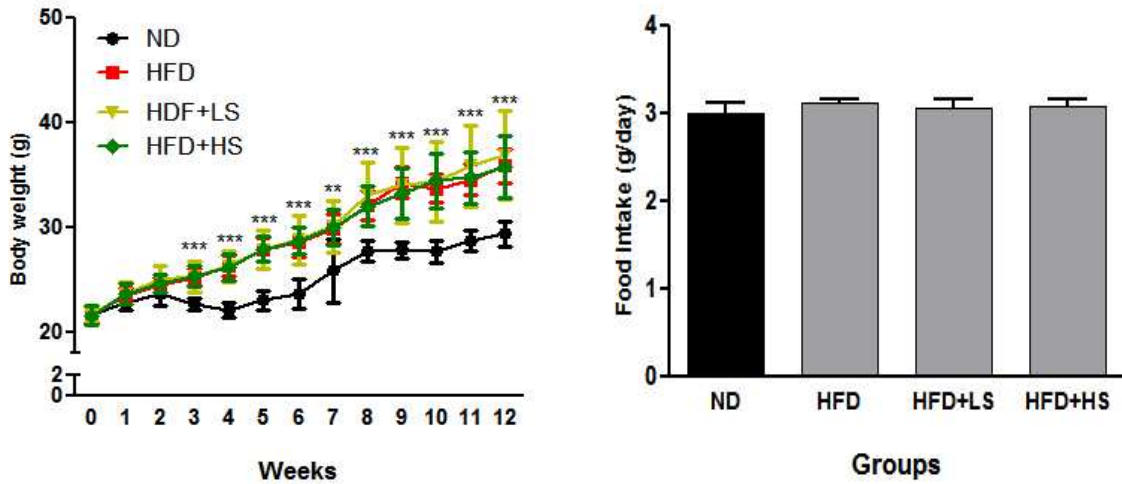


Figure 4.3-50. Effect of ME on body weight change and food intake in mice fed with experimental diet for 12 weeks. Data are presented as means \pm SD. (n=10/group). *** $p < 0.001$, compared with normal diet group.

상지주정추출물의 혈당 강하 효능을 검증하기 위하여 고지방 식이로 유발된 당뇨 C57BL/6 마우스 모델에 상지주정추출물을 식이와 혼합하여 12주간 공급하였다. 12주 동안 마우스의 체중 변화를 측정한 결과, 고지방 식이를 섭취한 실험동물은 정상식이군과 비교하여 실험식이 3주차부터 체중이 증가하여 12주까지 지속적인 증가가 관찰되었다. 반면, 상지주정추출물을 투여한 실험동물의 체중은 고지방식이군과 비교하여 통계적 유의차가 나타나지 않았다(Fig.4.3-50).

(2) 장기무게

장기무게를 측정한 결과(Fig. 4.3-51), 간의 무게는 그룹간의 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 부고환지방, 신장지방, 갈색지방의 경우, 정상식이군과 비교하여 고지방식이군에서 유의적으로 증가하였으나, 상지주정추출물 섭취에 따라 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

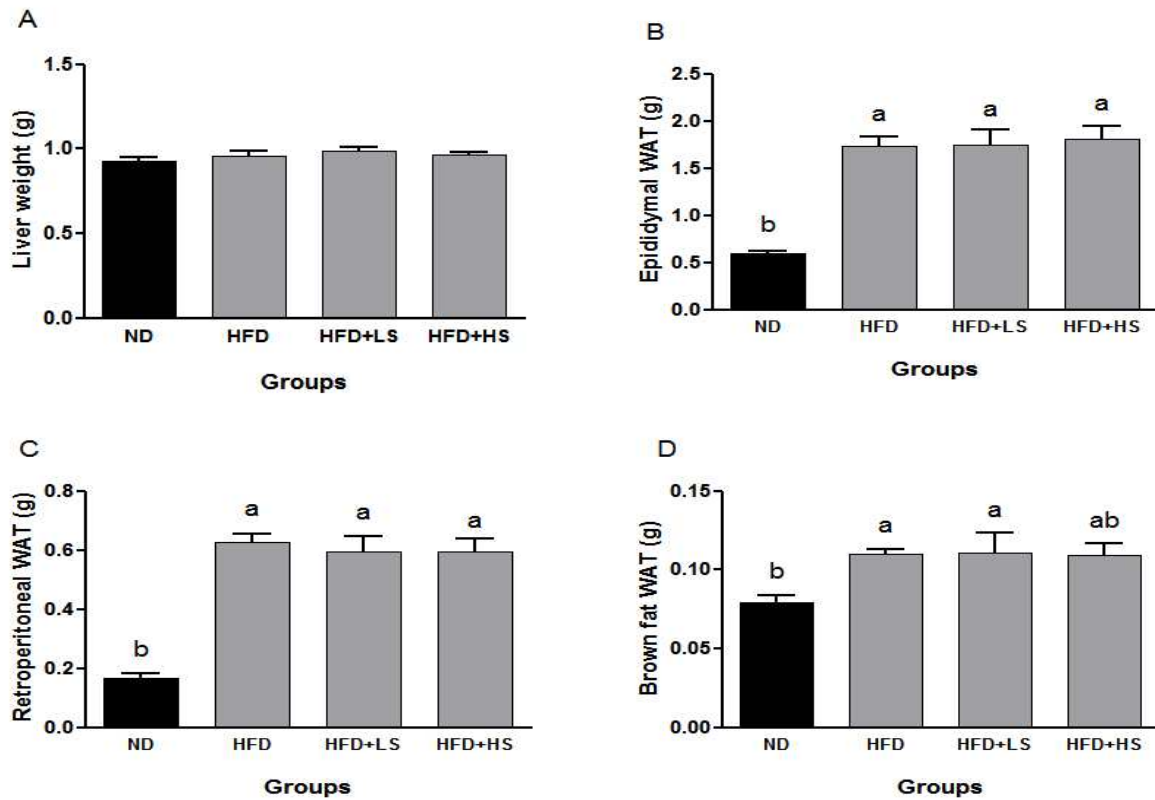


Fig. 4.3-51. Effect of ME on (A) liver weight, (B) epididymal fat weight, (C) retroperitoneal fat weight and (D) brown fat weight in high-fat diet fed C57BL/6 mice for 12 weeks. Data are presented as means \pm SD (n=10/group). Statistical analyses were performed by Tukey test after one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

(3) 경부당부하 시험에서 혈당의 변화

상지 주정추출물 섭취가 고지방식이 유도 당뇨모델의 경구 당부하시 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 4.3-52). 정상식이군의 혈당은 포도당 투여 후 30분에서 339 ± 65 mg/dL이었고, 고지방식이군은 485 ± 52 mg/dL로 유의적으로 증가하였다. 상지주정추출물을 섭취한 실험동물은 각각 415 ± 67 mg/dL (0.1% 상지주정추출물군), 425 ± 58 mg/dL(0.25% 상지주정추출물군)로 고지방식이군에 비하여 낮았으나 통계적 유의차는 관찰되지 않았다. 이를 포도당 곡선 하 면적(area under curve, AUC)으로 나타내어 분석한 결과, 고지방식이군의 AUC는 1738 ± 163 으로 정상식이군 1215 ± 169 과 비교하여 유의하게 증가하였다. 상지주정추출물의 섭취에 의해

0.1% 상지주정추출물군은 1507±194, 0.25% 상지주정추출물군은 1487±183으로 고지방식이군에 대비하여 유의적으로 감소하였다. 상지주정추출물은 고지방식이에 따른 인슐린 분비능을 개선시키는 것으로 판단된다.

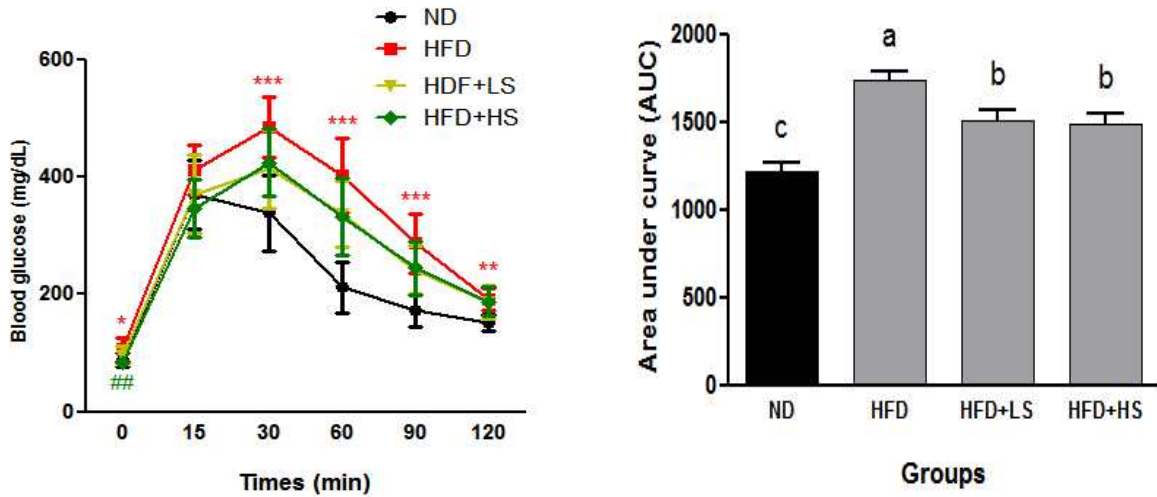


Fig. 4.3-52. Effect of ME on oral glucose tolerance test in high-fat diet fed C57BL/6 mice. Data are presented as means±SD (n=10/group). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$, compared with normal diet group, # $p < 0.01$ compared with high-fat diet group.

(4) 공복혈당, 당화혈색소 및 인슐린수준에 미치는 영향

상지주정추출물 섭취가 고지방식이로 유발된 당뇨쥐의 공복시 혈당, 당화혈색소 및 인슐린 함량을 측정하여 Fig. 4.3-53에 나타내었다. 공복시 혈당은 정상군에 비해 고지방식이군에서 유의적으로 높게 나타났고, 특히 0.25% 상지주정추출물군은 고지방식이군에 대비하여 유의적으로 19% 감소하여 가장 낮은 값을 나타내었다.

당화혈색소는 정상군에 비해 고지방식이를 섭취한 군에서 유의적으로 낮게 나타났고, 고지방식이군과 상지주정추출물 투여군 사이에 통계학적으로 유의미한 차이는 나타나지 않았다.

혈청 인슐린 함량은 정상식이군에 비하여, 고지방식이군에서 유의적으로 증가하였으나, 상지주정추출물 섭취에 따른 유의적 변화는 관찰되지 않았다.

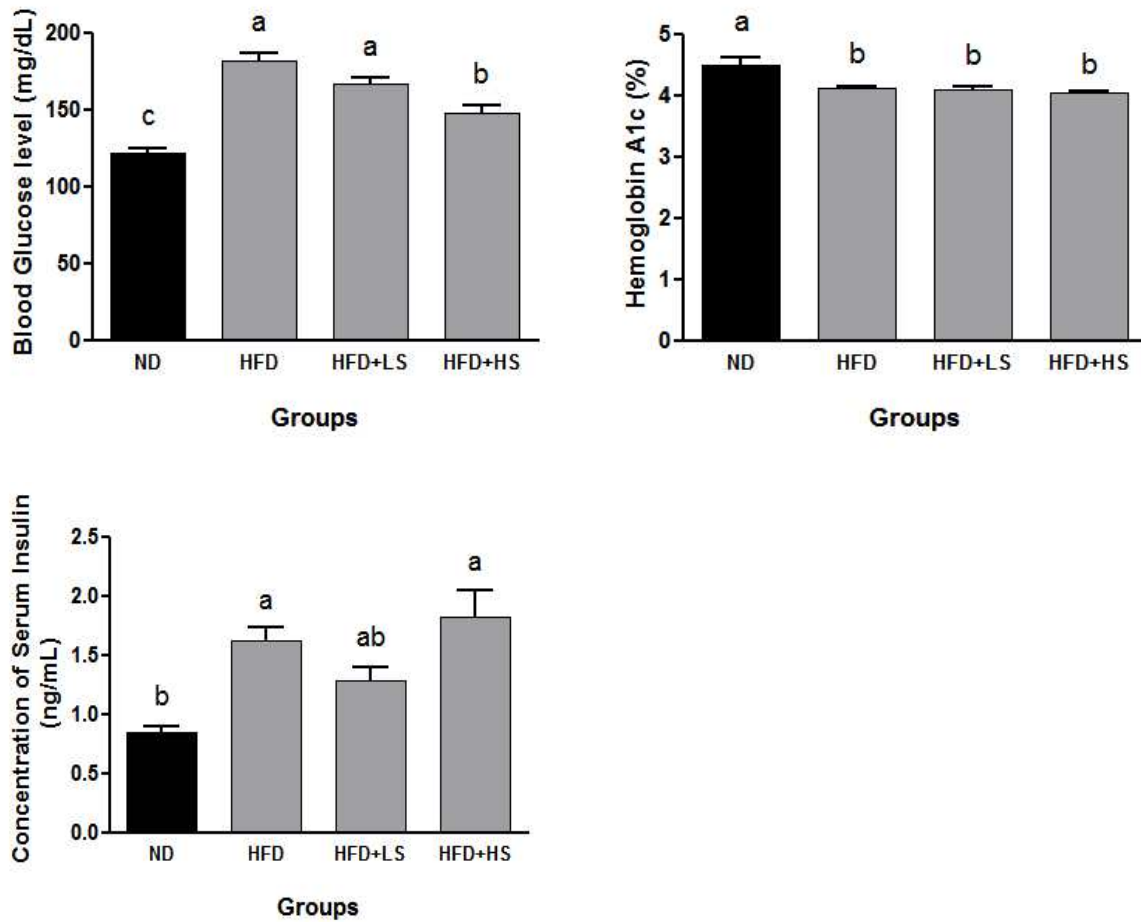


Fig. 4.3-53. Effect of ME on fasting glucose, hemoglobin A1C, and insulin levels in high-fat diet fed C57BL/6 mice for 12 weeks. Data are presented as means \pm SD (n=10/group). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

(5) 혈청 지질 함량에 미치는 영향

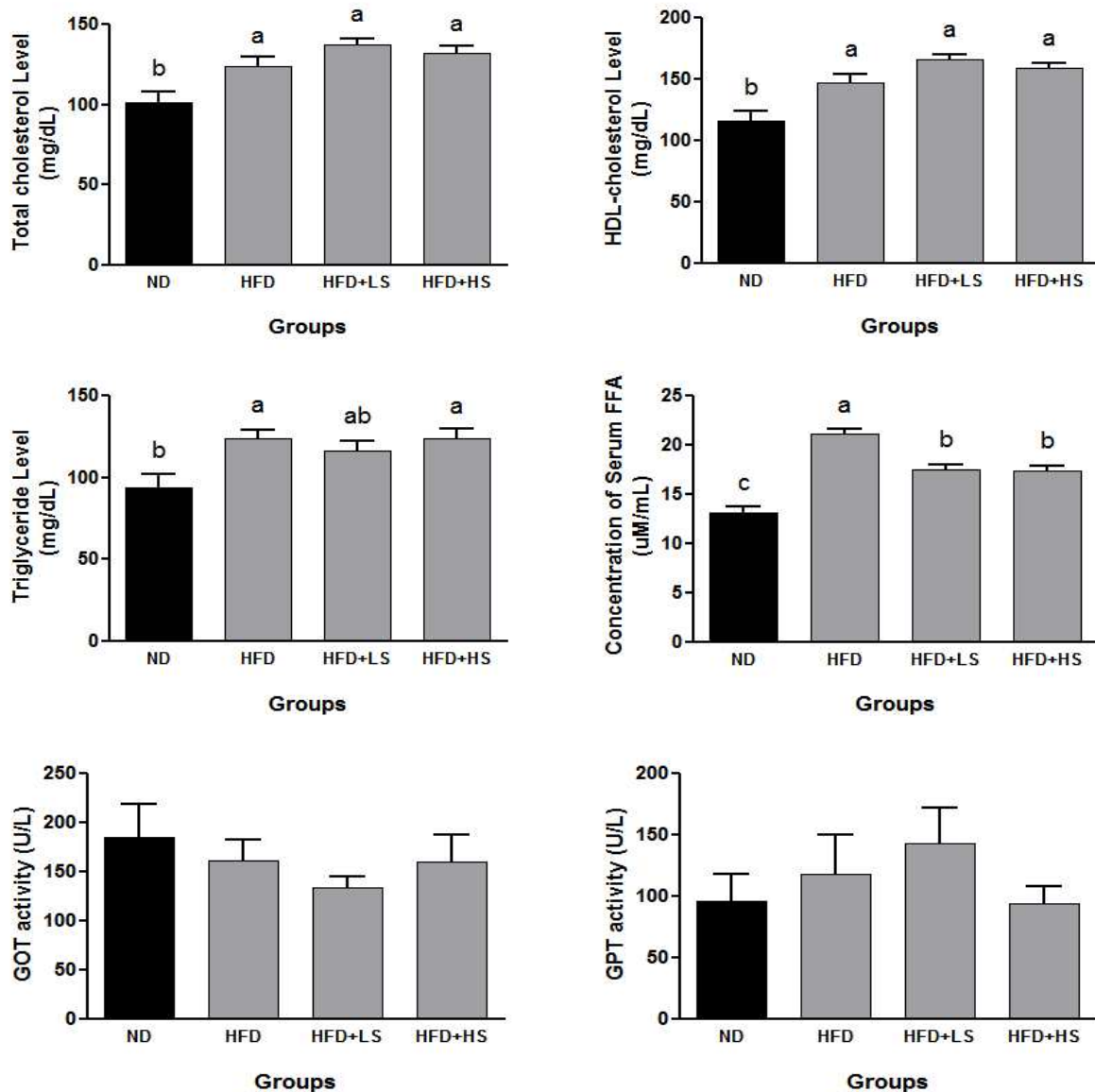


Fig. 4.3-54. Effect of ME on serum lipid profiles and GOT/GPT activity in high-fat diet fed C57BL/6 mice for 12 weeks. Data are presented as means \pm SD (n=10/group). Statistical analyses were performed by Tukey test after one-way ANOVA. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

혈청내 지질함량을 분석한 결과, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방 함량은 고지방식이에 따라 증가하였으나, 상지주정추출물 섭취에 따른 변화를 관찰되지 않았다. 반면, 혈중 유리지방산의 함량은 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의적으로 증가하였고, 상지주정추출물의 섭취에 따라 낮아져 통계적 유의차가 관찰되었다. 혈청 내 유리지방산의 증가는 인슐린 저항성의 요인으로 제시되고 있는 바, 추후 관련 유전자 발현에

대한 추가적 연구가 필요할 것으로 판단되었다. 간세포 손상 정도를 예측하는 지표인 GOT와 GPT 활성은 그룹간의 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4.3-54).

아. 상지주정추출물의 항당뇨 효과

(1) 췌장베타세포에서 상지주정추출물의 인슐린 분비능

배지의 포도당 농도가 2.8 mM 일 때 배지에 분비된 인슐린의 농도를 basal level로 판단하고, 이를 22.4 mM로 증가시키게 되면 증가된 포도당 농도에 의해 인슐린 분비가 증가하게 된다. 실험 결과, 저농도의 포도당을 처리하였을 때보다 고농도의 포도당을 처리하였을 때, 세포 배양액 내 인슐린의 분비가 유의적으로 증가하였다(Fig. 4.3-55). Tunicamycin을 처리한 경우, vehicle군과 비교하여 인슐린 분비가 유의적으로 감소하였다. 반면, 상지주정추출물 처리시 인슐린 분비가 tunicamycin 처리군에 비하여 유의적으로 증가하였다.

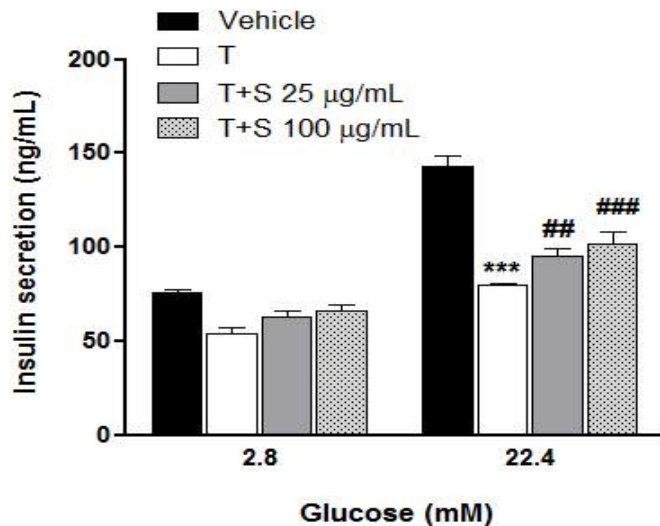


Fig. 4.3-55. Effect of ME on glucose-stimulated insulin secretion in NIT-1 cells. Data are presented as means \pm SD. *** $p < 0.001$, compared with vehicle-treated cells, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, compared with tunicamycin-treated cells.

(2) 상지주정추출물의 췌장 베타세포 보호 효과

ER stress에 의한 췌장 베타세포의 apoptosis는 결국 인슐린 양의 감소로 이어져 제2형 당

노병을 유발시킨다고 보고된 바 있다. 본 실험에서는 ER stress 유도체로 tunicamycin을 사용하였고, tunicamycin에 의한 췌장 베타세포사멸에서 상지주정추출물의 세포 보호 효과를 관찰하였다.

Tunicamycin에 의해 유도되는 췌장베타세포 apoptosis를 확인하기 위해 MTT를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. Fig. 56과 같이, tunicamycin를 처리한 결과 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 50%의 생존율을 나타내어 이를 유효농도로 설정하고 이후 실험을 진행하였다. 반면, 상지주정추출물과 tunicamycin를 동시에 처리한 결과, tunicamycin 단독처리구에 비하여 세포 생존율이 유의적으로 증가하였고, 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 4.3-56).

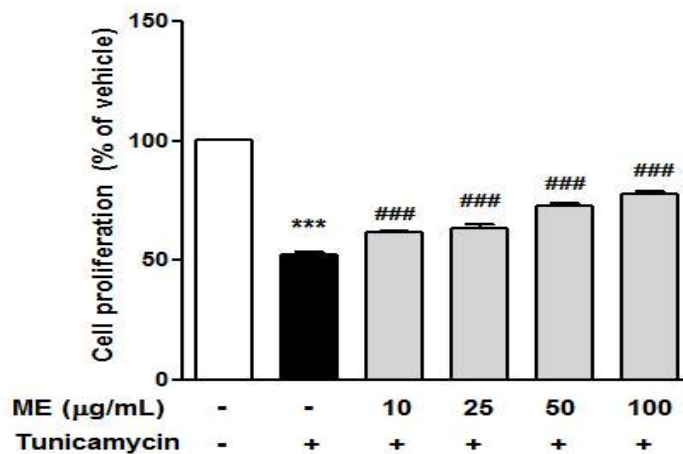
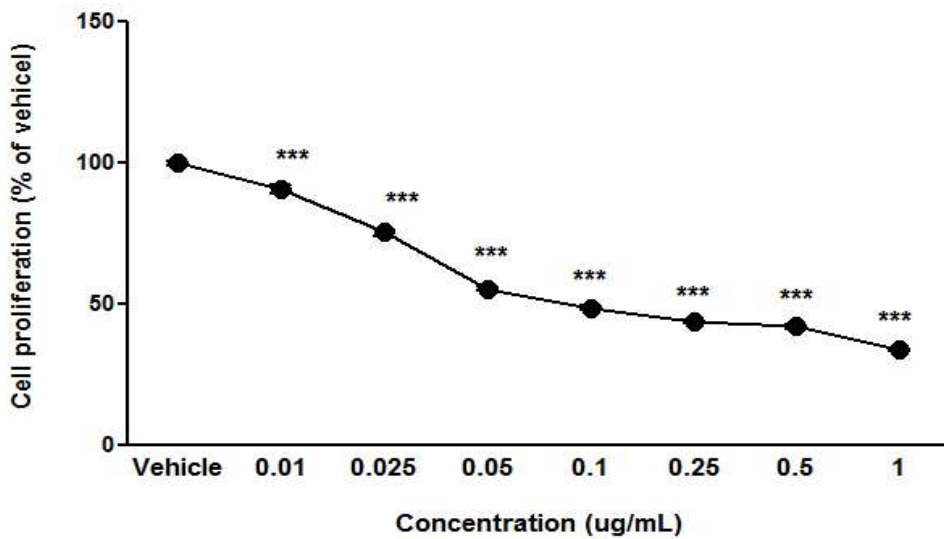


Fig. 4.3-56. (A) Cytotoxic effect of tunicamycin on NIT-1 cells. (B) Effect of ME on tunicamycin-induced cell death in NIT-1 cells. Data are presented as means \pm SD. *** $p < 0.001$, compared with vehicle-treated cells, ### $p < 0.001$, compared with tunicamycin-treated cells.

(3) 상지추정추출물의 apoptotic cell death로부터 세포보호 효과

Tunicamycin 처리에 의한 세포 사멸이 ER stress에 의한 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위해 NIT-1을 DAPI 염색하였다(Fig.4.3-57). Apoptosis는 DNA fragmentation이고 fragment가 많이 형성되면 그만큼 DNA의 말단이 많아지는 현상인데, 그 부위를 DAPI로 염색하여 apoptosis가 유도되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다. 실험 결과, tunicamycin 처리에 따라 전체적인 세포의 밀도가 감소하였고, apoptosis 유발시 특이하게 관찰되는 세포의 형태적 변형이 확인되었으나, 상지추출물 처리에 따른 효과는 관찰되지 않았다.

세포사멸 기전은 caspase라고 하는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 과정으로 caspase 활성을 통해 세포사멸의 정도를 파악할 수 있다. caspase-3는 비활성효소인 zymogen 형태로 합성이 되는데, 이는 apoptotic 자극에 의해 활성화(cleaved caspase-3) 된다. 따라서 본 연구에서는 tunicamycin 및 상지추출물 처리에 따라 apoptosis 조절인자들의 발현에 미치는 영향을 western blotting을 통해 확인하였다. 실험 결과, tunicamycin은 caspase-3 단백질에는 아무런 영향을 미치지 않았으나, 활성형인 cleaved-caspase 3 발현을 증가시켰다. 반면, 상지추출물 25, 100 µg/ml을 처리한 세포에서는 cleaved-caspase 3 발현이 감소되어 apoptosis를 억제시키는 것으로 나타났다.

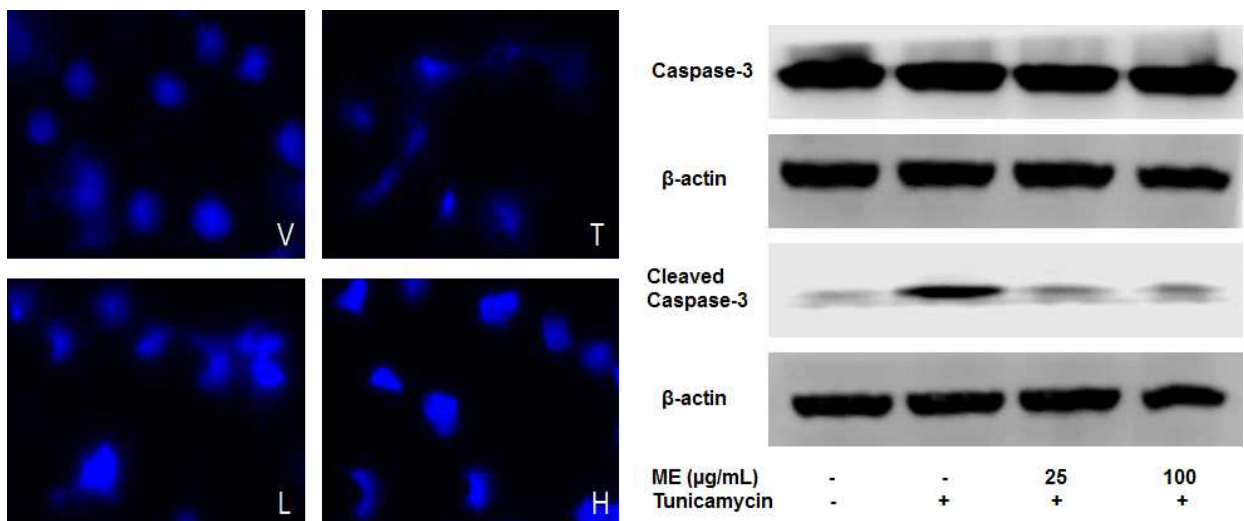


Fig. 4.3-57. Effect of ME on tunicamycin-induced apoptosis in NIT-1 cells. (A) DAPI staining (B) Western blotting V; vehicle, T; tunicamycin 0.05 µg/mL, L; T+ME 25 µg/mL, H; T+ME 100 µg/mL.

자. Oxyresveratrol의 수명연장 효과

*C. elegans*의 Oxyresveratrol에 의한 수명 연장 효과를 평가한 결과(Fig. 4.3-58), Oxyresveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 *C. elegans*를 배양한 결과, control (0.3% v/v DMSO)에 비해 첨가 농도에 따라 유의하게 수명이 연장되었다.

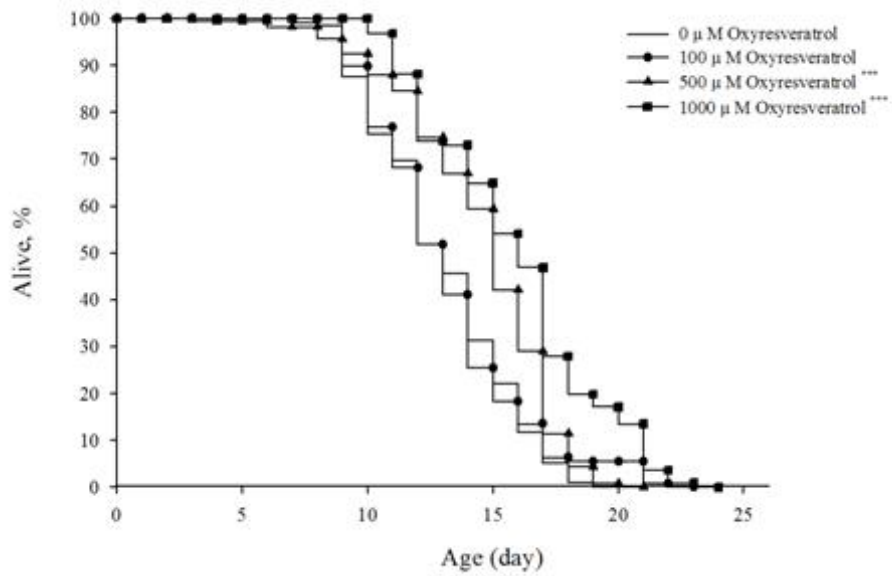


Fig. 4.3-58. Oxyresveratrol에 의한 *C. elegans*의 수명연장효과. (***) $p < 0.001$

Resveratrol이 농도별로 첨가된 배지에서 *C. elegans*를 배양한 결과, control (0.3% v/v DMSO)에 비해 첨가 농도에 따라 유의하게 수명이 연장되었다(***) $p < 0.001$ (Fig. 4.3-59).

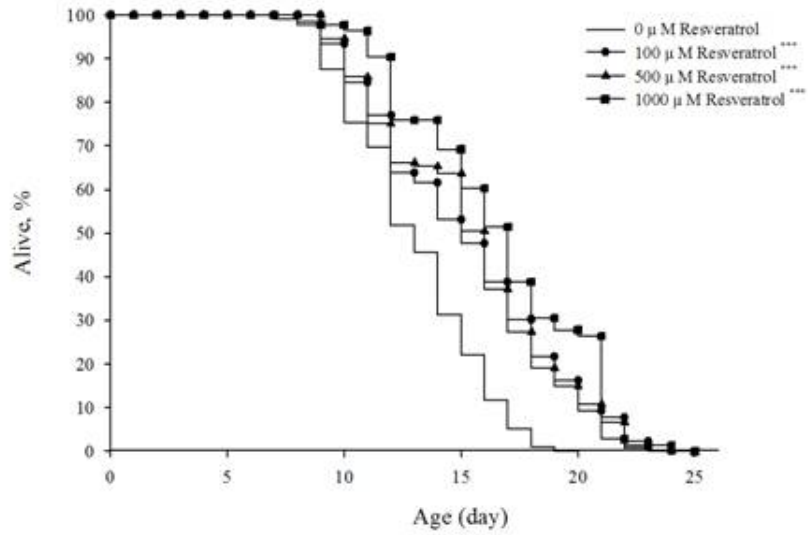


Fig. 4.3-59. Resveratrol에 의한 *C. elegans*의 수명연장 효과.
 (***) $p < 0.001$)

Control 배지에서의 평균 수명은 14.0일인 것에 비해 oxyresveratrol이 100μM 첨가된 배지에서는 14.7일, 500μM이 첨가된 배지에서는 15.7일, 1000μM이 첨가된 배지에서는 17.1일로 각각 5%, 12.1%, 22.1% 유의하게 연장된 것을 확인할 수 있었다 (Table 4.3-15). 이는 Resveratrol이 100μM 첨가된 배지에서는 16.2일, 500μM이 첨가된 배지에서는 16.3일로 각각 15.7%, 16.4% 연장된 것에 비해 낮지만, 1000μM 첨가된 배지에서 17.3일로 23.6% 연장된 것과 비슷한 정도로 연장 효과를 보였다고 할 수 있다.

Table 4.3-15. Oxyresveratrol를 먹이로 이용한 *C. elegans*의 평균수명

	MLS ± SE (day)
control (0.3% v/v DMSO)	14.0 ± 0.2
resveratrol 100μM	16.2 ± 0.35***
resveratrol 500μM	16.3 ± 0.34***
resveratrol 1000μM	17.3 ± 0.32***
oxyresveratrol 100μM	14.7 ± 0.28*
oxyresveratrol 500μM	15.7 ± 0.26***
oxyresveratrol 1000μM	17.1 ± 0.32***

(1) Oxyresveratrol에 의한 유전자 발현 변화

*C. elegans*의 Oxyresveratrol에 의한 유전자 발현 변화를 평가한 결과, Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 *C. elegans*에서는 *sir2.1* (2.9 ± 0.20 fold), *daf-2* (6.9 ± 0.33 fold), *daf-16* (1.3 ± 0.04 fold), *hif-1* (2.0 ± 0.22 fold) 유전자가 유의하게 증가하였다 (Fig. 4.3-60A). 또한 72시간 동안 배양했을 때 *sir2.1* (1.9 ± 0.14 fold) 유전자는 유의하게 증가하였으나 다른 유전자들은 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4.3-60C). *sir2.1* 유전자 발현 증가로 인한 수명연장 효과를 보인다고 밝혀진 resveratrol도 이와 유사한 결과를 보였다(Fig. 4.3-60B,D).

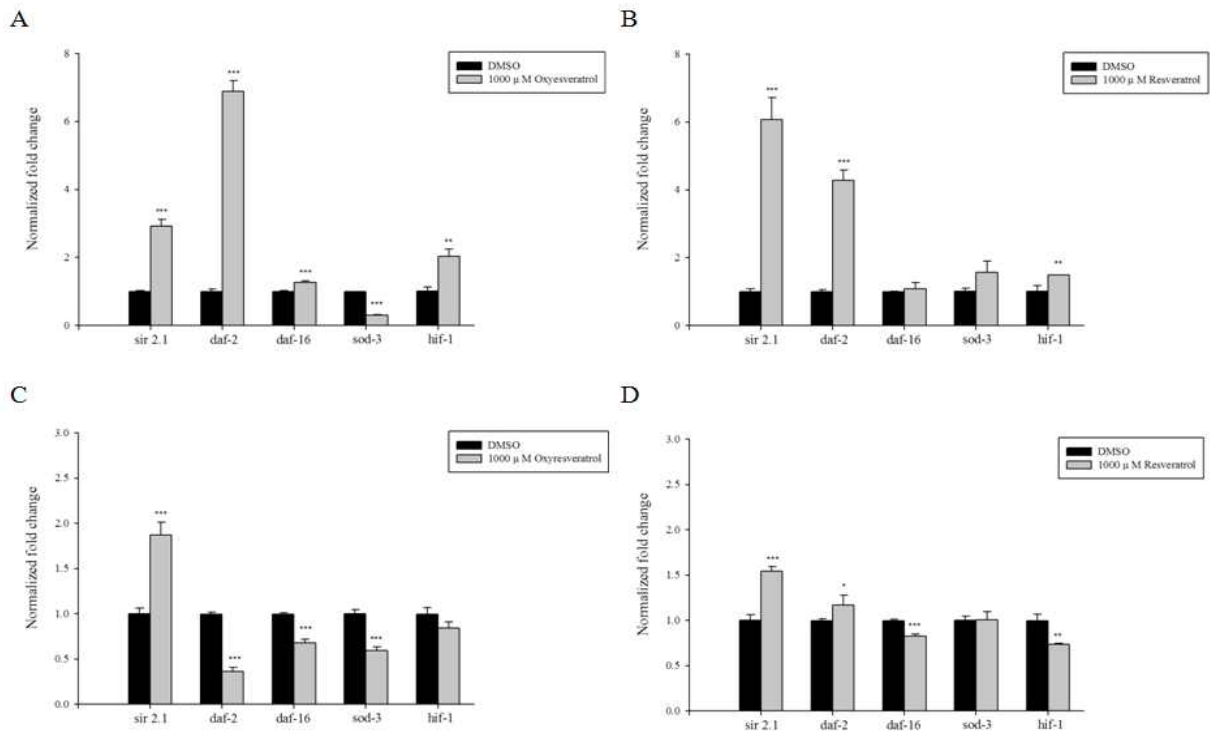


Fig. 4.3-60. Oxyresveratrol과 Resveratrol에 의한 *C. elegans*의 유전자 발현 변화. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

물질이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 결과 Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서는 control (0.3% v/v DMSO)에 비해 *sir2.1*, *daf-2*, *daf-16*, *hif-1* 유전자가 유의하게 증가하였으며, Resveratrol이 첨가된 배지에서는 control에 비해 *sir2.1*, *daf-2*, *hif-1* 유전자가 유의하게 증가하였다. 물질이 첨가된 배지에서 72시간 동안 배양한 결과 Oxyresveratrol이 첨가된

배지에서는 control에 비해 *sir2.1* 유전자는 증가하였지만, *daf-2*, *daf-16*, *sod-3*, *hif-1* 유전자가 유의하게 감소하였으며, Resveratrol이 첨가된 배지에서는 control에 비해 *sir2.1*, *daf-2* 유전자는 증가하였지만, *daf-16*, *hif-1* 유전자가 유의하게 감소하였다.

(2) 결과 요약

*C. elegans*의 Oxyresveratrol에 의한 수명 연장 효과를 평가한 결과, control 배지에서 보다 oxyresveratrol이 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M 첨가된 배지에서 각각 5%, 12.1%, 22.1% 유의하게 연장된 것을 확인할 수 있었다. 이는 Resveratrol이 첨가된 배지에서 수명이 연장된 것과 비슷한 정도로 연장 효과를 보였다고 할 수 있다. Oxyresveratrol에 의한 유전자 발현 변화를 평가한 결과, Oxyresveratrol이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 *C. elegans*에서는 *sir2.1* (2.9 ± 0.20 fold), *daf-2* (6.9 ± 0.33 fold), *daf-16* (1.3 ± 0.04 fold), *hif-1* (2.0 ± 0.22 fold) 유전자가 유의하게 증가하였다. *sir2.1* 유전자 발현 증가로 인한 수명연장 효과를 보인다고 밝혀진 resveratrol도 이와 유사한 결과를 보였다.

차. 상지주정추출물의 항비만 효과

(1) 3T3-L1의 세포독성

3T3-L1 분화유도에 사용한 상지주정추출물분말 (ERMO)의 농도 20, 30, 40 μ g/ml에서 측정된 cytotoxicity는 각각 $17.6 \pm 0.3\%$, $15.6 \pm 0.5\%$, $15.2 \pm 0.5\%$ 로 나타났고 viability는 음성 대조군에 비해 각각 $97.4 \pm 0.4\%$, $96.5 \pm 1.7\%$, $93.4 \pm 2.0\%$ 로 나타나 세포독성이 미미하여 큰 영향이 없을 것으로 사료된다(Fig. 4.3-61, Table 4.3-16).

Table 4.3-16. Cytotoxicity and viability of ERMO on 3T3-L1 cells.(Mean \pm SD, n=3)

ERMO (μ g/ml)	Viability (%)	LDH release (%)
(-) Control	100	18.0 ± 0.4
20	97.4 ± 0.4	17.6 ± 0.3
30	96.5 ± 1.7	15.6 ± 0.5
40	93.4 ± 2.0	15.2 ± 0.5
50	89.3 ± 3.4	13.8 ± 0.2
100	55.3 ± 2.3	17.0 ± 0.7
200	15.5 ± 0.5	43.3 ± 1.6

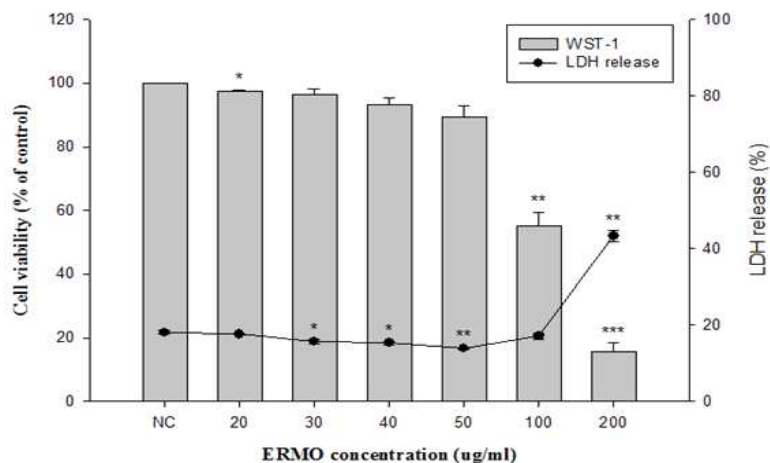


Fig. 4.3-61. Cytotoxicity and cell viability of ERMO on 3T3-L1 cells. One-way ANOVA with Dunnett T3 corrections was used to determine significance for multiple comparisons. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

(2) Oil red O staining을 통한 상지주정추출분말의 지방분화 억제능 분석

3T3-L1 분화유도 과정에서 상지주정추출분말 (ERMO)의 농도 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에 따른 분화는 Oil red O staining을 통해 육안으로(Fig. 4.3-62), 또한 inverted microscope(Fig. 4.3-63)를 통해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 흡광도를 통해 측정된 lipid accumulation 값 역시 음성대조군에 비해 각각 $72.5 \pm 1.6\%$, $25.3 \pm 11.3\%$, $14.7 \pm 7.7\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4.3-63, Table 4.3-17).

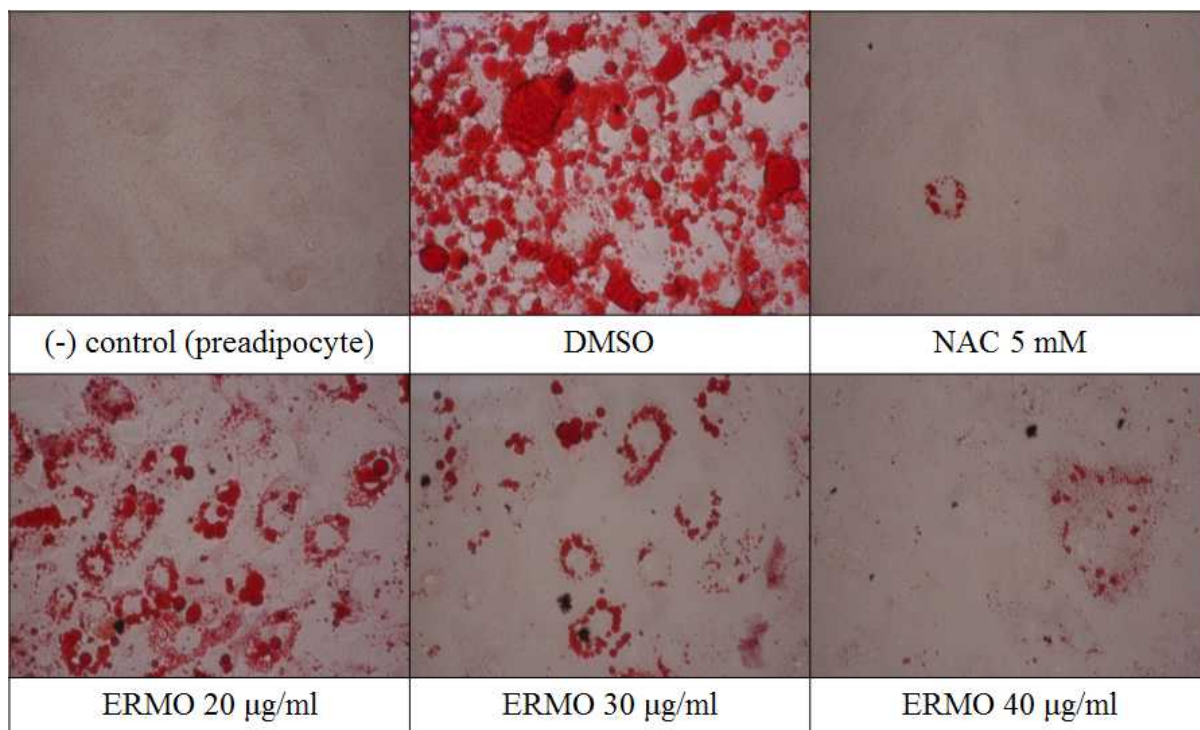


Fig. 4.3-62. The microscopic pictures were taken from ORO-stained adipocyte (400×)

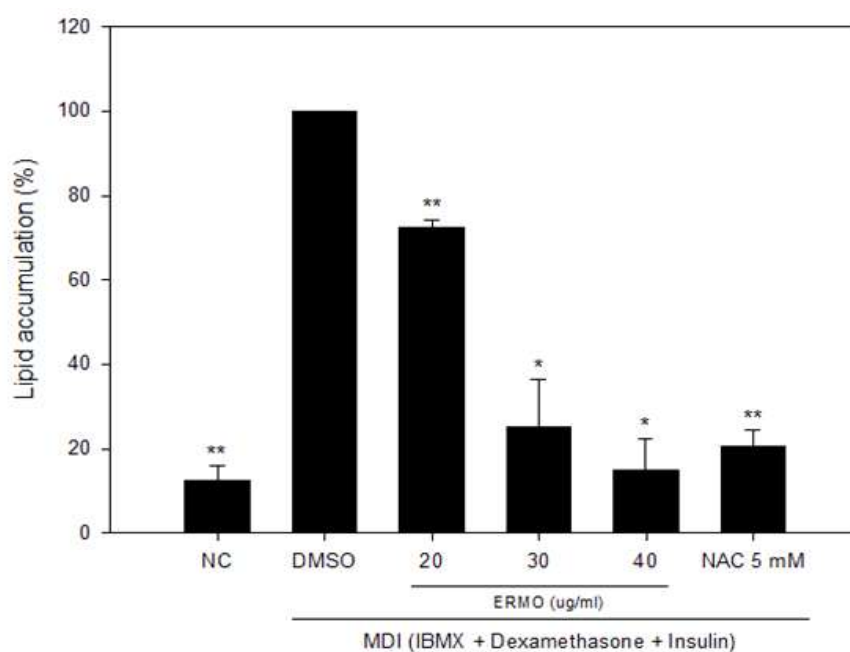


Fig. 4.3-63. Quantified ORO-stained intracellular lipids. The data were expressed as mean \pm standard deviation. One-way ANOVA with Dunnett T3 corrections was used to determine significance for multiple comparisons. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Table 4.3-17. Lipid accumulation of ERMO on 3T3-L1 cells.

ERMO ($\mu\text{g/ml}$)	Lipid accumulation (%)
(-) Control	12.5 \pm 3.6
DMSO	100.0
20	72.5 \pm 1.6
30	25.3 \pm 11.3
40	14.7 \pm 7.7
NAC 5mM	20.6 \pm 3.7

(Mean \pm SD, n=3)

(3) 결과 요약

3T3-L1을 이용한 세포실험에서 상지주정추출물의 지방분화 억제능을 측정한 결과, 해당 농도에서의 세포독성은 나타나지 않았고, lipid accumulation은 농도 의존적으로 현저히 감소함을 나타내어 우수한 항비만 효과를 확인하였다.

카. 상지주정추출물의 약동력학적 평가

(1) 소변 내 oxyresveratrol 함량 비교

Table. 4.3-18. 상지 주정추출분말 투여 후 소변 내 oxyresveratrol 함량 변화

시간	Oxyresveratrol peak area					Oxyresveratrol ($\mu\text{g/mL}$)				
	NC	상지 1	상지 2	상지 3	평균 (1-3)	NC	상지 1	상지 2	상지 3	평균 (1-3)
0-2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-5h	0	170	214	270	218	0	0.24	0.30	0.375	0.30
5-8h	0	172	252	224	216	0	0.24	0.35	0.31	0.3
8-12h	0	1974	1314	2764	2017	0	2.74	1.83	3.84	2.8
12-24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

소변 내 oxyresveratrol 함량은 상지 주정추출분말 투여 후 2-5 시간에서 0.3 µg/mL를 나타내었으나 8-12 시간에서 가장 높은 양인 2.8 µg/mL를 나타내었다. 그 후 12-24 시간에서의 소변 내 oxyresveratrol량은 0으로 나타났다.

(2) 분변 내 oxyresveratrol 함량 비교

Table. 4.3-19. 상지 주정추출분말 투여 후 분변 내 oxyresveratrol 함량 변화

시간	Oxyresveratrol conc. (ug/g wet weight)					비교
	NC	상지 1	상지 2	상지 3	평균 (1-3)	
0-2h	0	0	0	0	0	
2-5h	0	23.2	45.2	21.6	30.0	
5-8h	0	49.2	67.6	76.8	64.5	
8-12h	0	440.8	492	338.2	423.7	
12-24h	0	0	0	0	0	

분변 내 oxyresveratrol 함량은 상지 주정추출분말 투여 후 2-5 시간에서 30.0 µg/g를 나타내었으나 8-12 시간에서 가장 높은 양인 423.7 µg/g를 나타내었다. 이 후 12-24 시간에서의 분변 내 oxyresveratrol량은 0으로 나타났다.

타. 결과 요약

상지 주정추출물 내 oxyresveratrol의 생체 내 흡수 및 배출에 관해 추적하기 위해 상지 주정추출분말을 SD rat 에 경구투여 하여 시간별로 소변, 분변내의 oxyresveratrol의 양을 측정된 결과, 소변과 분변에서 8-12 시간에 가장 많은 oxyresveratrol이 측정되었다. 이 결과를 통해, 상지 주정추출물 내 유효성분인 oxyresveratrol은 경구투여시, 8 시간 이전까지 비교적 많은 양이 체내에 머물러 있다가 8 시간 이 후부터 대부분의 양이 체내에서 소변과 분변을 통해 배출되는 것이 확인되었다.

4. 기능성 물질의 개별인정 신청 추진

가. 기능성 물질의 유해물질 함량 분석

(1) 원재료 상지에 대한 유해물질 함량 분석

(가) 결과 및 고찰

중금속은 비중이 4.0 이상인 금속으로 이동성이 낮고, 축적성은 높아 자연분해나 미생물에 의한 분해가 매우 어렵다. 또한, 오염된 농수산물의 섭취로 만성 및 급성 건강장해를 일으켜, 환경오염과 더불어 최근 식품 안전상 중요한 문제로 대두되고 있다. 본 연구에서 조사된 상지의 납, 비소, 수은, 카드뮴 함량은 각각 0.4 ppm, 불검출, 0.00 ppm, 0.04 ppm으로 나타났다. 잔류농약 및 이산화황 검출 결과는 표 10과 같으며, 원재료 상지는 생약규격에 적합한 것으로 판정되었다.

Table 4.4-1. 상지의 유해물질 함량

항목	대한약전외한약(생약)규격 집	상지
납	5 ppm 이하	0.4 ppm
비소	3 ppm 이하	불검출
수은	0.2 ppm 이하	0.00 ppm
카드뮴	0.3 ppm 이하	0.04 ppm
총 디디티	0.1 ppm 이하	불검출
디엘드린	0.01 ppm 이하	불검출
총 비에이치씨	0.2 ppm 이하	불검출
알드린	0.01 ppm 이하	불검출
엔도설판	0.2 ppm 이하	불검출
엔드린	0.01 ppm 이하	불검출
이산화황	30 ppm 이하	불검출

<별지 13호 서식>



사명 한국약품수출입협회
주 소 한국약품시험연구원

시험성적서

Certificate of Analysis

Page 1 of 1

검수번호 : 004272	검수일자 : 2015. 03. 16.
의뢰자 : 한국석류연구원 박용근	의뢰목적 : 사전품질관리
주소 : 경기도 성남시 분당구 안양대로 1201번길 62	
검체명 : 상지 의뢰항목 : 순도시험(중금속, 잔류농약, 이산화황) 제조번호 : 20150203	
시험규격 : 「생규」	

시험항목	기준	시험결과	시험자
순도시험	1) 중금속 가) 납 : 5 ppm 이하 나) 비소 : 3 ppm 이하 다) 수은 : 0.2 ppm 이하 라) 카드뮴 : 0.3 ppm 이하	가) 0.4 ppm 나) 불검출 다) 0.00 ppm 라) 0.04 ppm	김정민
	2) 잔류농약 가) 총 디디티 : 0.1 ppm 이하 나) 디알드린 : 0.01 ppm 이하 다) 총 비에이치피 : 0.2 ppm 이하 라) 말드린 : 0.01 ppm 이하 마) 엔도살판 : 0.2 ppm 이하 바) 엔드린 : 0.01 ppm 이하	가) 불검출 나) 불검출 다) 불검출 라) 불검출 마) 불검출 바) 불검출	이승연
	3) 이산화황 30 ppm 이하	불검출	이승연
판정 및 소견	상기 시험결과와 같음		

확인자	신승훈 2015. 04. 03.	책임자	김경희 2015. 04. 03.
-----	--------------------------	-----	--------------------------

* 비고 : 이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 용도에 사용할 수 없음.

2015년 04월 03일

한국의약품시험연구원장

서울시 동대문구 약령동길 127 (TEL: 967-7067, FAX: 965-7459)



(나) 상지추출물에 대한 유해물질 함량 분석

① 결과 및 고찰

본 연구에서 조사된 상지주정추출물의 대장균군은 음성으로 확인되었으며, 납, 비소, 수은, 카드뮴 함량은 각각 0.0555 ppm, 0.1003 ppm, 0.0555 ppm, 0.0035 ppm으로 나타났다. 특히 중금속의 경우, 인체적용시험 일일섭취량 1000 mg을 고려하여 일일노출량을 계산 시, 일일 최대노출허용량 범위 안에 해당하였다. 잔류농약은 모든 항목에서 불검출로 판정되었다.

Table 4.4-2. 상지주정추출물의 유해물질 함량

항목	검사성적서	1일 최대 노출허용량	1일 노출량
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한황갈색의 분말	-	-
대장균군	음성	-	-
납	0.0555 mg/kg	10.8 µg	0.0555 µg
비소	0.1003 mg/kg	150 µg	0.1003 µg
수은	0.005 mg/kg	2.1 µg	0.005 µg
카드뮴	0.0035 mg/kg	3.0 µg	0.0035 µg
디디티	불검출	-	-
디엘드린	불검출	-	-
비에이치씨	불검출	-	-
알드린	불검출	-	-
엔드린	불검출	-	-

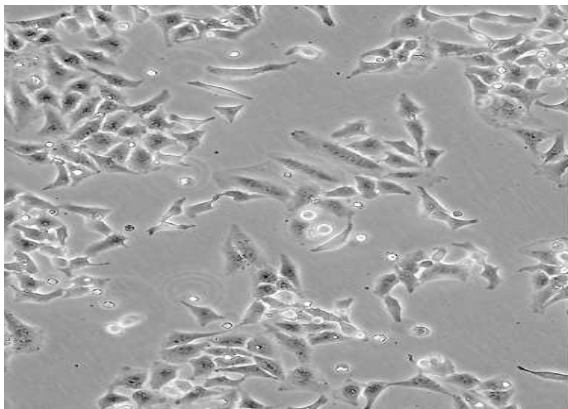
Table 44-3. 상지주정추출물 중금속 함량

중금속명	실측치 (mg/kg)	최대 섭취량 (g)	제안규격 ($\mu\text{g/g}$)	제안규격에 의한 일일 노출량 (μg)	1일 최대 노출허용량(μg)
납	0.0555	1 g/일	1	1	10.8
총비소	0.1003		1	1	150
총수은	0.005		1	1	2
카드뮴	0.0035		1	1	3.0

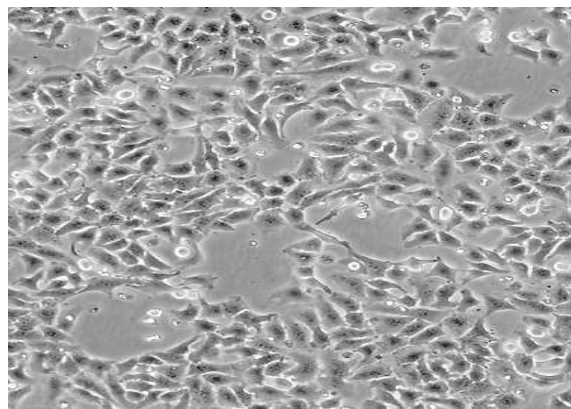
나. 기능성 물질의 동물실험 및 안전성

(1) 기능성성분의 세포독성 측정

(가) 상지주정추출물의 Chang Liver 세포생존능 측정



Low Density of Chang liver



High Density of Chang liver

Fig. 4.4-2. Morphology of Chang Liver cell line

Chang Liver cell line은 human normal hepatic cell line으로 시료의 세포 독성을 평가하

는 데 널리 사용되는 cell line이다(Fig. 4.4-2).

(2) Chang Liver 세포의 분화에 미치는 영향

상지 주정 추출물과 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 준다고 식약처에서 개별인정된 녹차 추출물을 양성대조군으로 사용하여, 세포 분화에 대한 영향과 독성을 조사할 목적으로 MTT 및 WST-1 assay를 시행하였다.

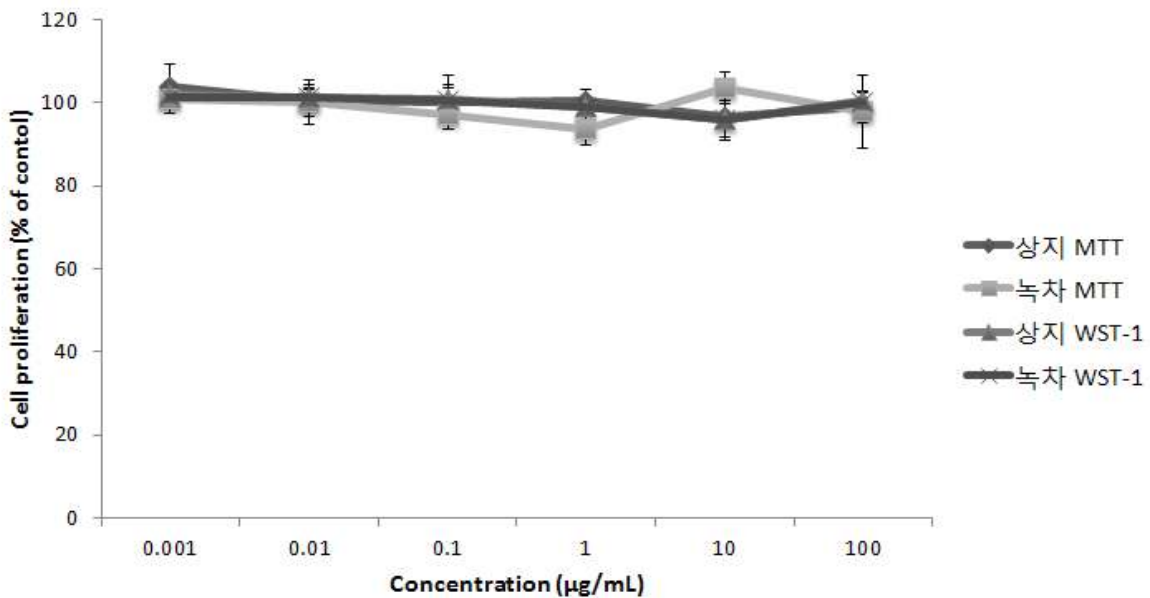


Fig. 4.4-3. Cell proliferation effects of samples on Chang liver cell. Each colume represents mean \pm SEM (n=4).

MTT assay는 정상 세포에서는 미토콘드리아의 효소에 의해 노란색 MTT 시약이 보라색으로 변하나, 손상된 세포는 색 변화가 감소되어 이를 흡광도로 측정하여 상대적인 세포 손상을 확인하는 방법으로 세포의 손상 정도를 확인하는데 보편적으로 사용되고 있는 방법이다. WST-1 assay는 MTT assay를 응용하여, 보다 쉽고 간편하게 사용되고 있는 방법이다. 실험 결과 모든 시료는 실험한 모든 농도에서 대조구 대비 유사한 세포의 증식능을 나타내었다. 또한 MTT assay와 WST-1 assay간 유의적인 차이점은 나타나지 않았다(Fig. 4.4-3).

(3) 상지주정추출물의 이화학적 변화에 따른 세포 생존능 측정

(가) 온도 변화에 따른 세포 생존능

시료의 가열 온도 및 처리 시간에 따른 세포의 생존능을 MTT assay(Fig. 4.4-4)와 WST-1 assay(Fig. 4.4-5)를 이용하여 측정하였다.

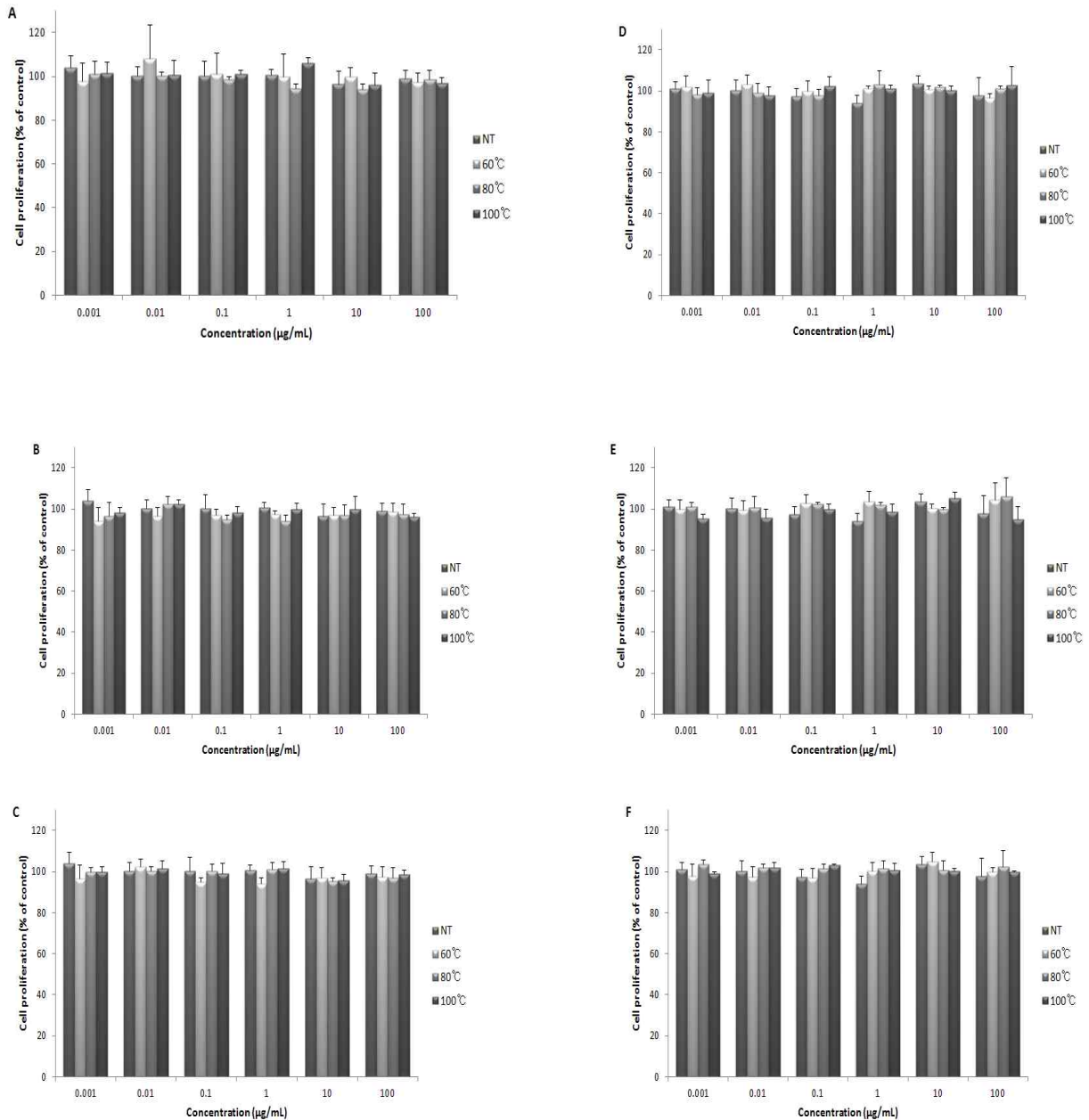


Fig. 4.4-4. Chang Liver cell proliferation of (A) Ramulus mori extract at 2 min, (B) at 5 min, (C) at 10 min and (D) Green tea extract at 2 min, (E) at 5 min and (F) at 10 min on treated various heating temperatures by MTT assay. Each column represents mean \pm

SEM (n=4). NT; not treated of heating temperature.

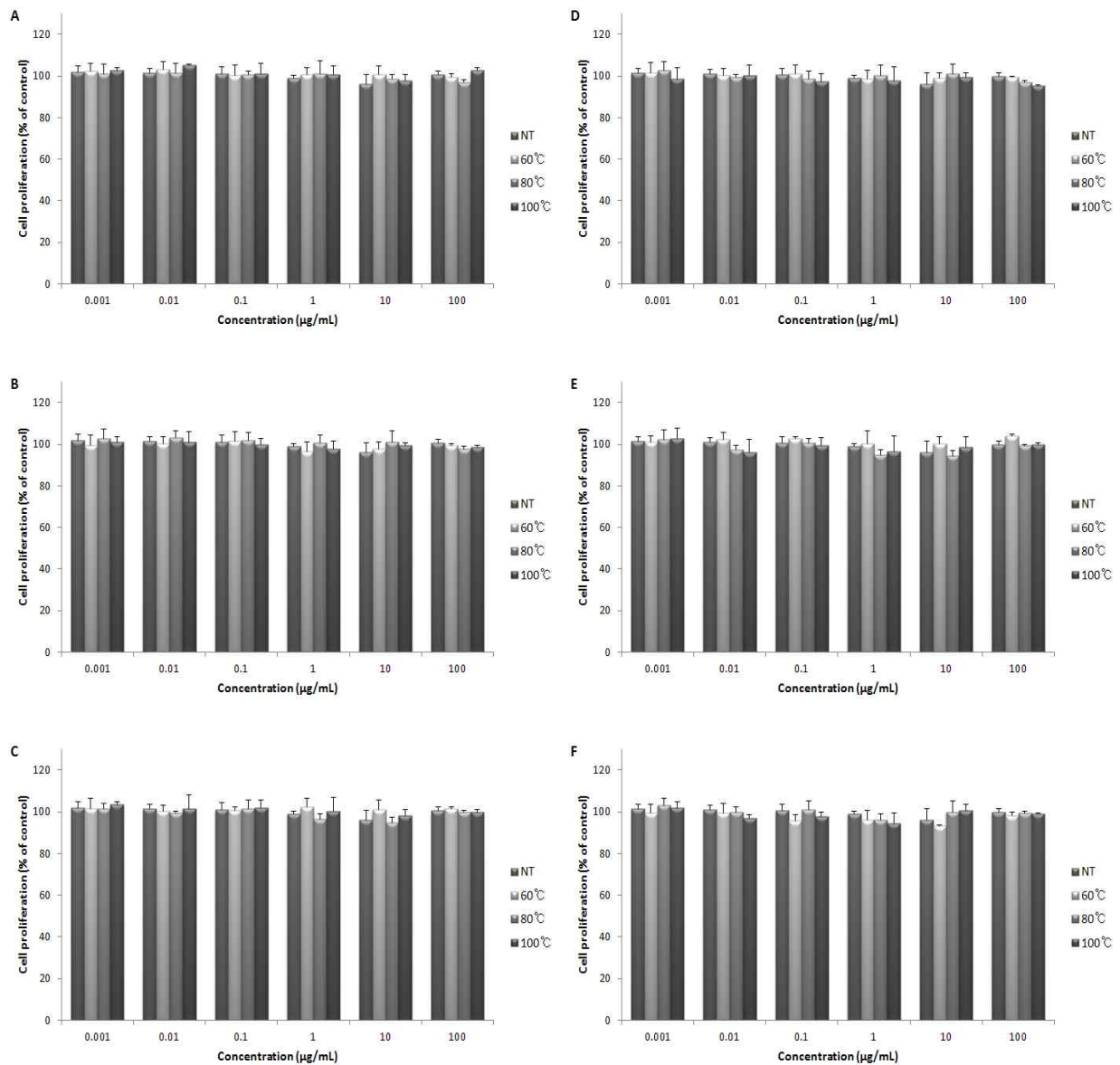


Fig. 4.4-5. Chang Liver cell proliferation of (A) Ramulus mori extract at 2 min, (B) at 5 min, (C) at 10 min and (D) Green tea extract at 2 min, (E) at 5 min and (F) at 10 min on treated various heating temperatures by WST-1 assay. Each column represents mean \pm SEM (n=4). NT; not treated of heating temperature.

온도에 따른 세포의 생존능은 온도를 60~100°C로 증가시킨 경우에도 대조군에 대비하여 90%이상 유지됨을 알 수 있었다. 또한 온도처리를 2분, 5분, 10분간 지속한 경우에도 온도처리를 하지 않은 비교군에 대비하여 유의적인 차이를 나타내지 않고, 안정적으로 세포가 유지

됨을 알 수 있었다. 또한 100℃의 고온의 가혹 처리를 한 경우도 시간에 따른 세포 생존능은 100% 전후로 대조군 및 온도처리를 하지 않은 NT군과 유의적인 차이점은 나타나지 않았다 (Fig. 4.4-6).

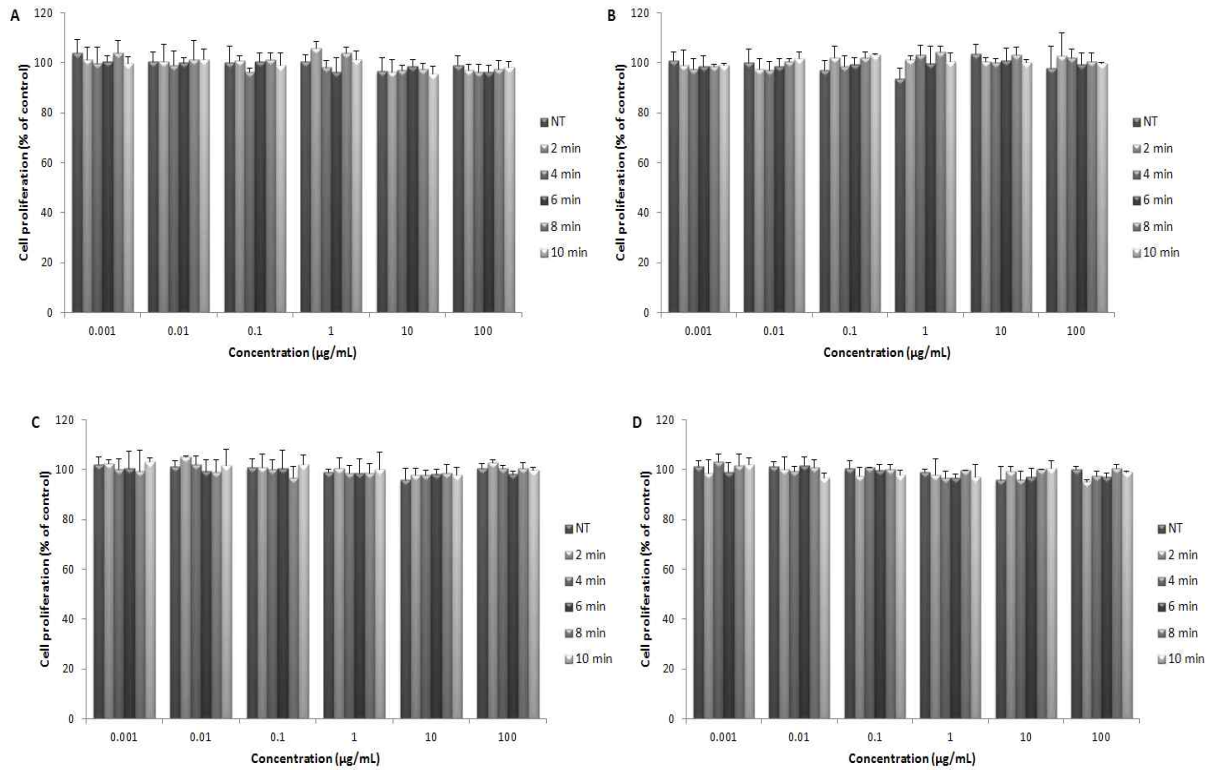


Fig. 4.4-6. Chang Liver cell proliferation of (A) Ramulus mori extract, (B) Green tea extract by MTT assay and (C) Ramulus mori extract, (D) Green tea extract by WST-1 assay on treated various heating times at 100℃. Each column represents mean \pm SEM (n=4). NT; not treated of heating temperature.

이로부터 상지 주정 추출물을 가열하는 경우에도 세포 생존능이 유지되어, 세포독성이 확인되지 않으므로 가공 중 추출물의 활성유지 가능성을 간접 확인할 수 있었다.

(나) pH 변화에 따른 세포 생존능

상지 추출물의 체내 활성을 간접 판단하고자 산성, 중성, 염기성 조건에서 추출물의 pH 변화 및 처리 시간에 따른 세포의 생존능을 MTT assay(Fig. 4.4-7)와 WST-1 assay(Fig. 4.4-8)를 이용하여 조사하였다.

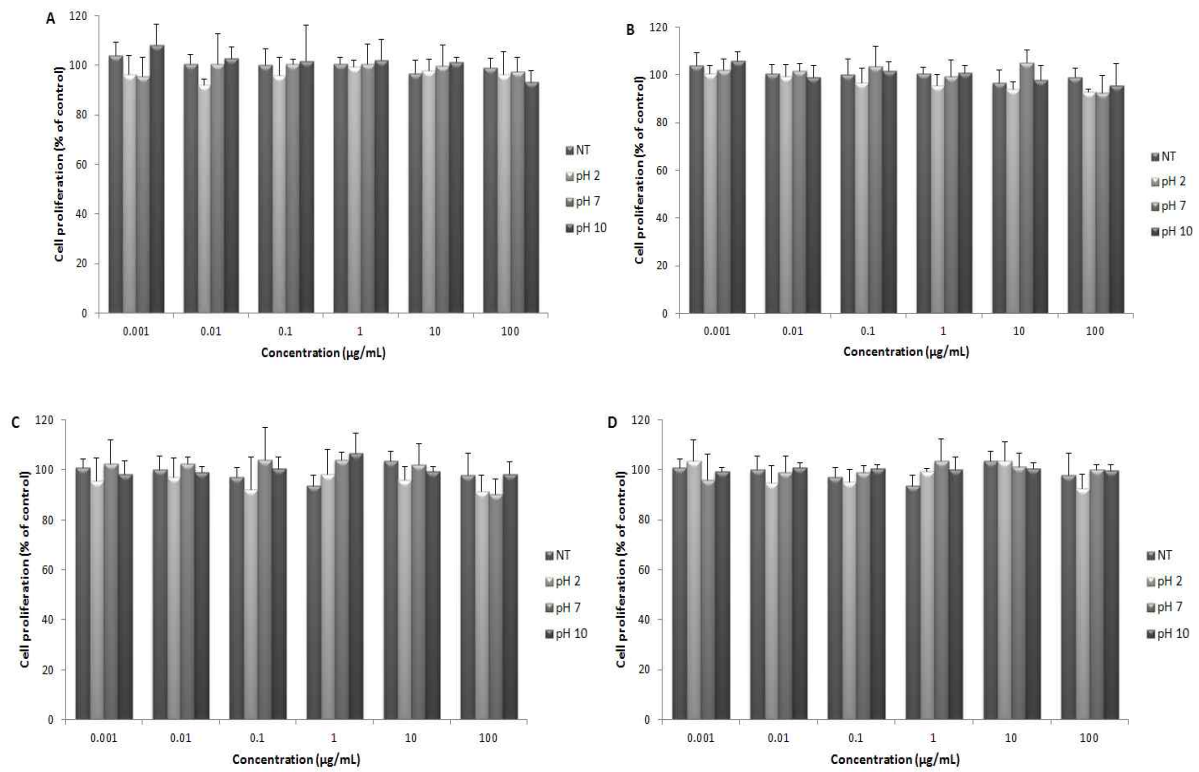
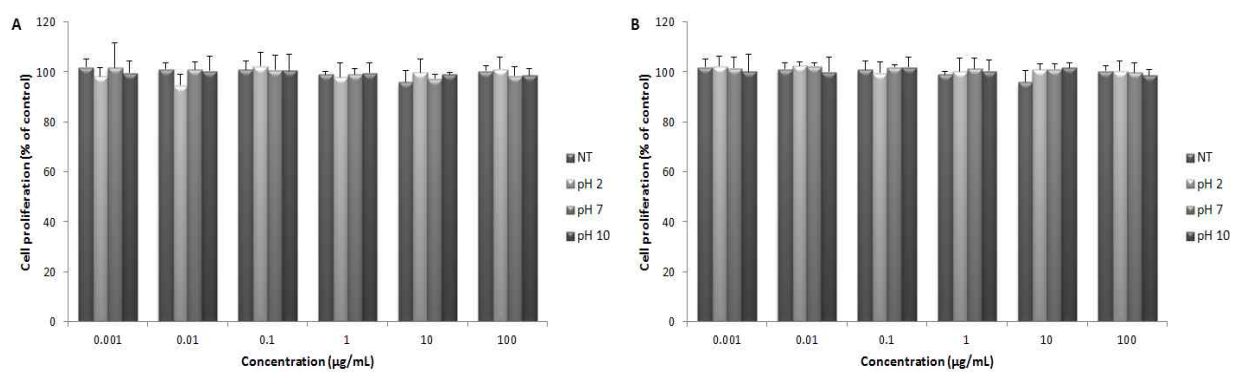


Fig. 4.4-7. Chang Liver cell proliferation of (A) Ramulus mori extract at 2 min, (B) at 5 min and (C) Green tea extract at 2 min, (D) at 5 min on various pH conditions by MTT assay. Each column represents mean \pm SEM (n=4). NT; not treated of pH condition.



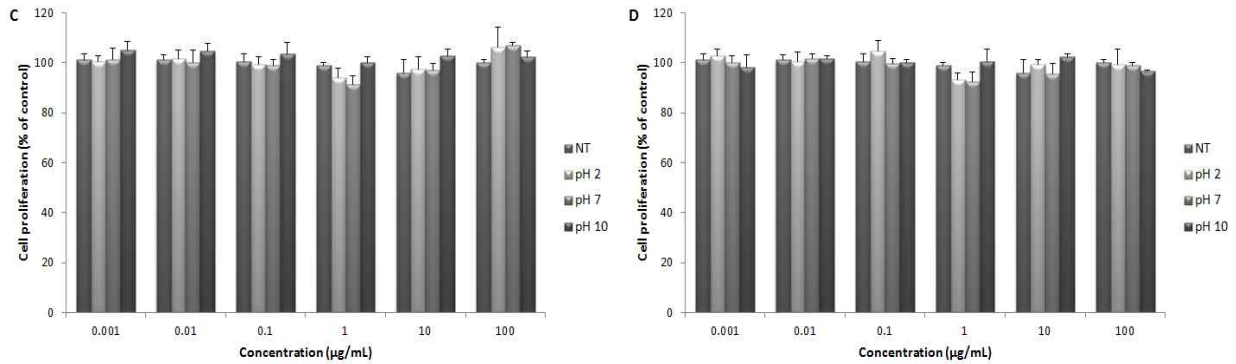


Fig. 4.4-8. Chang Liver cell proliferation of (A) Ramulus mori extract at 2 min, (B) at 5 min and (C) Green tea extract at 2 min, (D) at 5 min on various pH conditions by WST-1 assay. Each column represents mean \pm SEM (n=4). NT; not treated of pH condition.

상지 주정 추출물에 pH 변화 처리를 한 경우 실험한 모든 조건에서 대조군 및 pH 처리를 하지 않은 비교군에 대비하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 pH 처리 시간에 따른 세포 생존능도 100% 전후로 매우 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 이로부터 상지 주정 추출물의 체내 섭취시에도 추출물의 활성이 안정적으로 유지하여, 추출물이 나타내는 효과는 전반적으로 유지됨을 간접 판단할 수 있었다.

(4) 복귀돌연변이 시험

유전독성시험은 시험물질의 유전 독성 및 발암원성을 예측하는 실험법이다. 본 시험에서 *Salmonella Typhimurium* 4개 균주의 경우 대사활성화 적용 및 비적용시 모두 시험물질인 상지주정추출물의 처리 농도의 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니 수의 증가는 나타나지 않았다(Table 4.4-4). *E. coli* WP2uvrA의 경우에도 대사활성화 적용 및 비적용시 모두 상지주정추출물 농도의 증가에 따른 콜로니 수의 증가는 나타나지 않았다. 한편, 양성대조군에서는 각각의 균주에서 양성으로 판단할 수 있는 범위의 복귀돌연변이 콜로니가 유발됨으로써 본 시험은 적절히 수행되었다고 할 수 있다. 이상의 결과로 볼 때 상지주정추출물은 본 시험조건 하에서 해당 균주에 대한 복귀돌연변이를 유발하지 않음으로 음성인 결과를 보였다.

Table 4.4-4. Bacterial reverse mutation assay with ME

Metabolic activation	Dose (µg/plate)	Number of colony/plate					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	156±12	14±1	18±1	18±1	11±1	
	15	158±7	14±1	12±1	16±1	8±2	
	50	158±1	15±0	19±4	22±1	10±0	
	150	171±5	14±0	10±1	21±1	10±5	
	500	164±0	10±2	12±3	16±1	8±0	
	1500	153±3	12±5	16±4	23±2	13±4	
	5000	161±1	12±3	15±1	22±4	9±4	
S9 Mix (+)	0	143±5	11±1	21±3	24±5	15±2	
	15	167±1	12±3	16±1	29±1	13±4	
	50	141±4	14±0	18±1	19±5	13±1	
	150	180±4	15±5	13±4	27±4	13±4	
	500	181±0	15±3	16±1	33±3	15±2	
	1500	190±1	10±1	16±	25±1	13±1	
	5000	187±6	13±3	20±4	41±5	16±2	
Positive controls	S9 Mix (-)	Positive controls	SA	SA	4NQO	2-NF	ICR-91
		Dose (µg/plate)	0.5	0.5	0.5	2.0	0.5
		Number of colony	360±3	208±11	66±5	224±1	56±5
	S9 Mix (+)	Positive controls	2-AA	2-AA	2-AA	B[a]P	2-AA
		Dose (µg/plate)	0.5	0.5	2.0	1.0	1.0
		Number of colony	1764±40	136±25	114±5	170±1	60±8

Value are expressed as mean±SD

2-AA, 2-aminoanthracene; B[a]P, benzo[a]pyrene; SA, sodium azide; 2-NF, 2-nitrofluorene; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide.

(5) 단회투여 독성 시험

상지주정추출물의 단회투여 독성 및 개략적인 치사량을 조사하기 위하여, SD 암수 rat를 사용하여 시험물질을 단회 경구투여하였다. 실험결과, 모든 시험군의 실험동물에서 특이한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 4.4-5). 또한, 단회투여 후 14일까지의 체중변화를 관찰한 결과, 모든 시험군에서 시험물질 투여에 따른 체중 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아 상지주정추출물의 LD50은 5,000 mg/kg 이상인 것으로 사료된다.

Table 4.4-5. Body weight in the acute toxicity study

Group (n=10) (mg/kg/day)	Body weight (g)				
	1 day	4 day	7 day	10 day	14 day
Male					
Control	207.4±8.4	227.8±8.2	251.3±10.3	272.0±11.9	298.7±10.7
1250	206.9±6.8	227.0±8.0	249.2±9.3	267.4±10.1	289.9±11.8
2500	206.4±7.5	230.4±3.8	246.8±12.4	269.1±11.8	290.2±8.8
5000	206.7±7.0	227.6±7.5	248.3±12.4	268.4±14.9	291.8±15.6
Female					
Control	162.4±4.8	174.2±4.1	180.8±2.8	186.0±2.3	195.3±2.9
1250	162.3±4.5	174.2±6.0	184.4±9.0	189.1±13.8	199.1±10.5
2500	162.2±4.3	173.4±2.3	183.1±3.9	188.6±6.7	196.4±6.3
5000	161.8±3.8	171.1±4.5	180.9±5.5	188.9±4.3	200.9±4.0

Values are expressed as means±SD (N=5/sex/group)

(6) 28일 반복투여 독성시험

시험물질 상지주정추출물의 28일 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위해 SD 암수 rat를 사용하여 시험물질 500, 1,000 및 2,000 mg/kg 용량으로 투여군을 설정하고 대조군과 비교하였다. 각 군별 동물수는 암수 각 10마리를 사용하였고, 28일 반복 투여에 의한 사망률, 임상증상, 체중변화, 식이섭취량, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 부검소견을 관찰하였다.

시험기간 중 대조군 및 상지주정추출물 투여한 암수 모든 군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다(Fig. 4.4-9). 또한, 장기무게도

암수 모두에서 시험물질 투여에 따른 통계적 변화는 관찰되지 않았다.

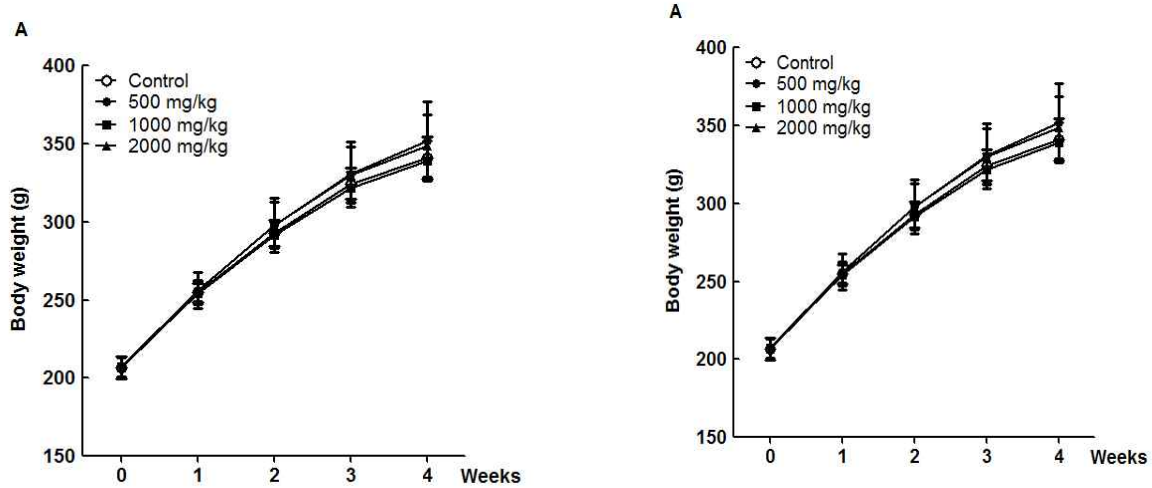


Figure 4.4-9. Mean body weight of rats during 28 days treatment with ME. (A) male (B) female.

대조군 및 시험군의 혈액학적 검사를 수행한 결과, 암수 모두에서 백혈구, 호중구, 림파구, 단핵구, 호산구, 호염구의 변화는 대조군과 비교하여 특이한 변화가 관찰되지 않았다. 한편, 암컷 rat의 2,000 mg/kg 그룹에서 혈소판 수가 유의적으로 감소하였다. 혈액생화학적 검사 결과를 살펴보면, 수컷 rat의 경우 상지주정추출물을 섭취한 모든 군의 혈액 칼륨 농도가 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였고, 혈액 중 칼슘 농도는 2,000 mg/kg군만 유의적으로 높았다. 그 외 분석항목에서는 시험물질 투여와 관련된 유의미한 변화는 관찰되지 않았다. 암컷 rat의 경우, 상지주정추출물 500 mg/kg군의 globulin과 A/G ratio에서 유의미한 변화가 관찰되었으나 이는 용량의존성이 없어 비시험물질-유래 변화로 추정된다.

Table 4.4-6. Summary organ weight in the 28-day repeated oral toxicity study.

Group (n=10) (mg/kg/day)	Organ weight									
	Brain	Liver	Kidneys	Heart	Thymus	Spleen	Lungs	Thyroid	Prostate	Testis
<i>Male</i>										
Control	1.77±	10.43	2.31±	1.05±	0.46±	0.73±	1.29±	0.62±	0.61±	3.91±
	0.06	±0.71	0.15	0.06	0.06	0.08	0.11	0.05	0.12	0.16
500	1.80±	10.51	2.36±	1.03±	0.48±	0.75±	1.34±	0.60±	0.58±	3.57±
	0.07	±1.02	0.21	0.09	0.09	0.10	0.13	0.04	0.15	0.95
1000	1.78±	9.66±	0.32±	1.00±	0.43±	0.74±	1.35±	0.62±	0.58±	3.85±
	0.06	0.98	0.15	0.05	0.08	0.09	0.10	0.06	0.06	0.27
2000	1.81±	10.14	2.31±	0.98±	0.47±	0.71±	1.29±	0.62±	0.55±	3.99±
	0.10	±0.85	0.09	0.07	0.08	.11	0.09	0.05	0.07	0.33
Group (n=10) (mg/kg/day)	Organ weight									
	Brain	Liver	Kidneys	Heart	Thymus	Spleen	Lungs	Thyroid	Uterus	Ovary
<i>Female</i>										
Control	1.68±	5.90±	1.43±	0.74±	0.32±	0.61±	1.15±	0.41±	0.49±	0.11±
	0.06	0.70	.09	0.06	0.07	0.09	0.18	0.06	0.14	0.02
500	1.64±	5.10±	1.38±	0.75±	0.29±	0.57±	1.09±	0.41±	0.39±	0.11±
	0.05	1.67	.08	0.06	0.05	0.07	0.12	0.03	0.05	0.01
1000	1.64±	5.60±	1.42±	0.71±	0.30±	0.56±	1.08±	0.39±	0.46±	0.11±
	0.08	0.51	0.13	0.06	0.07	0.07	0.07	0.03	0.11	.04
2000	1.65±	5.83±	1.42±	0.77±	0.29±	0.54±	1.14±	0.43±	0.47±	0.11±
	0.08	0.60	0.10	0.02	0.05	0.08	0.12	0.04	0.09	.02

Values are expressed as means ± SD (N=10/sex/group)

Table 4.4-7. Summary of hematological findings of SD rats in the 28-day repeated oral toxicity study.

Hematological parameters	Group			
	Control	500	1000	2000
Male				
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	8.6±0.2	8.6±0.3	8.6±0.2	8.6±0.2
WBC($10^3/\mu\text{L}$)	7.4±1.9	5.7±1.7	8.0±1.0	8.0±1.3
Hct(%)	51.0±1.2	51.1±1.0	50.7±1.8	51.0±1.3
Hb(g/dL)	16.5±0.3	16.6±0.3	16.6±0.6	6.7±0.6
MCV(fL)	59.5±1.5	59.8±1.3	58.8±1.4	59.0±1.2
MCH(pg)	19.7±0.5	19.4±0.5	19.2±0.5	19.3±0.6
MCHC(g/dL)	32.2±0.4	32.5±0.4	32.7±0.3	32.7±0.5
Platelet($10^3/\mu\text{L}$)	938.6±146.8	945.1±172.9	927.8±178.0	962.9±145.4
S.Neutrophil(%)	14.7±3.5	14.5±4.4	17.4±7.4	11.9±2.1
Lymphocyte(%)	79.9±4.0	80.8±5.5	77.7±8.6	83.7±3.3
Monocyte(%)	0.67±0.22	0.62±0.13	0.85±0.29	0.74±0.25
Eosinophil(%)	4.6±2.2	4.0±1.2	4.0±2.0	3.5±1.5
Basophil(%)	0.10±0.05	0.09±0.07	0.16±0.05	0.12±0.04
Female				
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	8.0±0.3	7.9±0.4	8.2±0.3	8.2±0.5
WBC($10^3/\mu\text{L}$)	5.3±0.9	6.0±1.3	5.9±0.7	6.3±1.3
Hct(%)	45.1±0.9	44.1±1.9	45.7±2.0	45.1±2.5
Hb(g/dL)	15.5±0.4	15.3±0.4	15.8±0.6	14.7±2.0
MCV(fL)	56.1±1.4	55.6±1.2	56.0±1.7	54.9±2.4
MCH(pg)	19.3±0.7	19.4±0.8	19.4±0.8	18.1±2.9
MCHC(g/dL)	34.4±0.8	34.8±1.0	34.6±1.1	32.8±4.6
Platelet($10^3/\mu\text{L}$)	1186.0±150.7 _a	1083.1±235.8 ^{ab}	1095.5±176.8 ^a _b	893.9±144.8 ^b
S.Neutrophil(%)	16.8±3.6	18.6±6.1	14.0±4.3	16.4±4.3
Lymphocyte(%)	79.5±3.8	75.5±7.4	80.5±5.6	77.2±5.9
Monocyte(%)	1.0±0.3	1.1±0.2	1.2±0.5	1.0±0.3
Eosinophil(%)	2.6±0.5	4.6±2.2	4.2±2.3	5.3±2.6
Basophil(%)	0.11±0.03	0.12±0.08	0.15±0.07	0.13±0.05

Values are expressed as means ± SD (N=10/sex/group) $p < 0.05$ as compared with control group.

Table 4.4-8. Summary of blood biochemical findings of male SD rats in the 28-day repeated oral toxicity study.

Biochemical parameters	Group			
	Control	500	1000	2000
Albumin(g/dL)	4.3±0.1	4.34±0.2	4.38±0.2	4.25±0.2
ALP(U/L)	138.8±19.3	140.0±21.7	128.90±9.4	130.1±10.5
AST(U/L)	116.1±8.5	121.2±11.8	119.5±21.3	100.3±7.0
ALT(U/L)	57.9±6.0	58.8±4.1	59.7±7.4	55.3±5.5
Glucose(mg/dL)	104.1±5.5	107.2±8.4	98.4±5.7	111.3±12.4
Total cholesterol (mg/dL)	103.9±11.2	109.5±10.7	114.6±13.9	98.2±15.3
Triglyceride(mg/dL)	79.8±13.8	89.0±38.6	70.8±18.9	73.3±17.5
Creatinine(mg/dL)	0.36±0.04	0.40±0.05	0.40±0.05	0.36±0.04
BUN(mg/dL)	19.0±2.6	20.7±3.0	20.0±2.8	20.3±1.2
K(mmol/L)	6.6±0.2 ^a	7.1±0.2 ^b	7.3±0.4 ^b	7.4±0.3 ^b
Cl(mmol/L)	98.4±0.8	97.8±1.1	98.5±1.3	99.1±1.1
Ca(mg/dL)	10.8±0.1 ^a	10.9±0.3 ^{ab}	11.1±0.3 ^{ab}	11.2±0.3 ^b
P(mg/dL)	9.0±0.3 ^a	10.0±0.5 ^b	10.4±0.7 ^b	10.3±0.4 ^b
T.Protein(g/dL)	6.5±0.3	6.5±0.3	6.5±0.3	6.3±0.3
Globulin(g/dL)	2.1±0.1	2.1±0.2	2.1±0.2	2.0±0.2
A/G ratio	2.0±0.1	2.1±0.2	2.1±0.1	2.1±0.1

Values are expressed as means ± SD (N=10/sex/group)

$p < 0.05$ as compared with control group.

Table 44-9. Summary of blood biochemical findings of female SD rats in the 28-day repeated oral toxicity study.

Biochemical parameters	Group			
	Control	500	1000	2000
Albumin(g/dL)	4.5±0.1	4.6±0.2	4.6±0.2	4.4±0.2
ALP(U/L)	91.5±9.6	99.8±12.6	97.1±17.2	92.1±12.0
AST(U/L)	119.7±13.5	109.7±20.0	115.4±14.5	103.0±11.1
ALT(U/L)	60.2±10.1	57.2±7.5	54.7±11.4	54.7±10.8
Glucose(mg/dL)	105.3±10.1	111.8±8.1	106.1±9.2	116.1±9.5
Total cholesterol (mg/dL)	115.2±7.8	108.6±22.5	106.4±22.0	119.4±13.9
Triglyceride(mg/dL)	48.5±10.4	42.4±9.3	40.6±9.3	40.8±5.4
Creatinine(mg/dL)	0.41±0.04	0.42±0.03	0.43±0.08	0.43±0.04
BUN(mg/dL)	18.9±2.8	19.7±2.1	20.9±5.5	21.4±4.2
K(mmol/L)	6.7±0.4	7.2±0.3	6.8±0.4	7.1±0.4
Cl(mmol/L)	97.0±5.7	99.5±1.0	99.5±1.8	99.6±1.1
Ca(mg/dL)	10.9±0.1	10.9±0.2	10.9±0.2	10.9±0.2
P(mg/dL)	8.3±0.9	8.0±0.6	8.5±0.6	8.5±0.7
T.Protein(g/dL)	6.5±0.2	6.4±0.2	6.4±0.2	6.3±0.1
Globulin(g/dL)	1.9±0.2 ^a	1.8±0.1 ^b	1.9±0.1 ^{ab}	1.9±0.2 ^{ab}
A/G ratio	2.3±0.2 ^a	2.6±0.2 ^b	2.5±0.2 ^{ab}	2.4±0.3 ^{ab}

The values are expressed as means ± SD (N=10/sex/group)

$p < 0.05$ as compared with control group.

다. 유효성분의 기준 및 시험법 확립 및 안정성 확인

(1) Oxyresveratrol 의 안정성 측정

(가) Oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화

10℃의 냉장하에서 oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화를 검토한 결과, pH 3.8의 산성 조건하에서 37일 보존할 시 oxyresveratrol의 잔존율은 95.9%를 나타내었다. 반면에 pH 7.5에서는 23일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 약 51.0%, 37일 보존시 42.8 % 나타내어 산성 조건 보다 불안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-10). pH 8.6의 약 알카리 조건하에서는 8일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 5% 미만을 나타내어 oxyresveratrol은 보존시 pH가 매우 중요한 것으로 나타났다.

Table 4.4-10. 상온차광(23~28도)에서 pH에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		23일		37일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
pH 3.8	0.49	100.0	0.46	93.88	0.45	91.84	0.45	91.84
pH 7.5	0.49	100.0	0.30	61.22	0.03	6.12	0.03	6.12
pH 8.6	0.32	100.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

(나) 40℃에서의 pH에 따른 경시 변화

40℃ 차광 조건하에서 oxyresveratrol의 pH에 따른 경시 변화를 검토한 결과, pH 3.8의 산성 조건하에서 37일 보존할 시 oxyresveratrol의 잔존율은 89.8%를 나타내었다. 반면에 pH 7.5에서는 8일 보존시 6.1%, 23일, 37일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 약 0%를 나타내어 냉장 조건보다 잔존율이 낮게 나타났다(Table 4.4-11). pH 8.6의 약 알카리 조건하에서는 8일 보존시 oxyresveratrol의 잔존율이 0% 미만을 나타내어 oxyresveratrol은 보존시 pH 뿐만 아니라 온도도 중요한 요인임을 알 수 있었다.

Table 4.4-11. 40°C에서의 pH에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		23일		37일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
PH 3.8	0.49	100.00	0.45	91.83	0.43	87.75	0.44	89.79
PH 7.5	0.49	100.00	0.03	6.12	0.00	0.00	0.00	0.00
PH 8.6	0.49	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

(2) Oxyresveratrol의 용매조건에 따른 경시 변화

(가) 냉장(10°C)에서의 용매조건에 따른 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 냉장 조건하에서 경시 변화를 살펴 본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 98% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매에 보존시 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-12).

Table 4.4-12. 냉장(10°C)에서의 용매조건에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.00	0.52	100.00	0.51	98.07	0.51	98.07
50% Ethanol	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
DMSO	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.00	0.49	98.00	0.48	96.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.00	0.47	97.90	0.47	97.90	0.46	95.83

(3) 상온차광에서 용매조건에 따른 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 상온차광 조건하에서 경시 변화를 살펴 본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 98% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매 보존시에는 상온하에서도 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-13).

Table 4.4-13. 상온차광, 용매조건하에서 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.00	0.51	98.07	0.51	98.07	0.51	98.07
50% Ethanol	0.51	100.00	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03
DMSO	0.51	100.00	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.00	0.50	100.00	0.50	100.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.00	0.46	95.83	0.46	97.90	0.45	93.75

(4) 40℃에서 유기 용매하에서 경시 변화

Oxyresveratrol을 에탄올, DMSO등의 유기 용매에 용해하여 40℃에서 경시 변화를 살펴 본 결과, 에탄올과 DMSO에 용해하여 56일 보존시에도 96% 이상의 잔존율을 나타내어 유기용매 보존시에는 40℃의 고온에서도 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-14).

Table 4.4-14. 40°C에서 용기 용매하에서 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		56일	
	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)
Ethanol	0.52	100.0	0.51	98.07	0.50	96.15	0.50	96.15
50% Ethanol	0.51	100.0	0.51	100.00	0.50	98.03	0.49	96.08
DMSO	0.51	100.0	0.51	100.00	0.50	98.03	0.50	98.03
50% DMSO	0.50	100.0	0.50	100.00	0.48	96.00	0.48	96.00
50% 1,3 BG	0.48	100.0	0.45	93.75	0.45	93.75	0.44	91.67

(5) 원료첨가에 따른 안정도 실험

(가) 냉장(10°C)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 냉장 조건하에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다. 또한 Liposome 하에는 56일 보존시 93.6%를 나타내어 비교적 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-15).

Table 4.4-15. 냉장(10°C)에서 원료첨가에 따른 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)	합량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.24	96.00	0.23	92.00	0.22	88.00	0.21	84.00	0.20	80.00
HP- β-CD	0.42	100.0	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.26	86.67	0.25	83.33
Liposome	0.63	100.0	0.60	95.24	0.62	100.0	0.60	95.23	0.59	93.65	0.59	93.65
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.41	99.59	2.24	92.56	2.20	90.90	2.13	88.01

(나) 상온차광(23~28℃)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 상온차광하에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났으나 Liposome 하에는 56일 보존시 65.1%를 나타내어 불안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-16).

Table 4.4-16. 상온차광(23~28℃)에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.20	80.00	0.17	70.83	0.16	64.00	0.15	60.00	0.10	40.00
HP-β-CD	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.26	86.67	0.26	86.67	0.24	80.00
Liposome	0.63	100.0	0.58	92.06	0.53	84.13	0.51	80.95	0.50	79.36	0.41	65.08
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.41	99.59	2.24	92.56	2.09	86.50	1.96	81.00

(다) 40℃에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 40℃에서 원료 첨가에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, HP-β-CD 하에서는 56일 보존시에도 97.6% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났으나 다른 물질들은 불안정하게 나타났다(Table 4.4-17).

Table 4.4-17. 40°C에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.25	100.0	0.17	68.00	0.15	60.00	0.13	52.00	0.11	60.00	0.07	28.00
HP-β-CD	0.42	100.0	0.42	100.0	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62	0.41	97.62
Nano capsule	0.30	100.0	0.30	100.0	0.26	86.67	0.24	80.00	0.24	80.00	0.23	76.67
Liposome	0.63	100.0	0.55	98.73	0.49	77.78	0.44	69.84	0.37	58.73	0.27	42.86
Micro capsule	2.42	100.0	2.42	100.0	2.36	97.52	2.31	95.45	2.01	83.05	1.89	78.09

(6) 제형제조에 따른 안정도 실험

(가) 냉장(10°C)에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 냉장 조건하에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 87.5% 이상의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-18).

Table 4.4-18. 냉장(10°C)에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.023	92.00	0.018	72.00	0.013	52.00	0.012	48.00	0.006	24.00
HP-β-CD	0.040	100.0	0.038	95.00	0.035	87.50	0.029	72.50	0.024	60.00	0.024	60.00
Nano capsule	0.025	100.0	0.023	92.00	0.022	88.00	0.020	80.00	0.017	68.00	0.017	68.00
Liposome	0.12	100.0	0.10	83.33	0.05	41.67	0.04	33.33	0.04	33.33	0.03	25.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.23	95.83	0.22	92.92	0.22	91.60	0.21	87.50

(나) 상온 차광에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 상온 차광하에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 70.8%의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-19).

Table 4.4-19. 상온 차광에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.010	40.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HP- β-CD	0.040	100.0	0.031	77.50	0.018	45.00	0.010	25.00	0.006	15.00	0.003	7.50
Nano capsule	0.025	100.0	0.021	84.00	0.017	68.00	0.013	52.00	0.010	40.00	0.009	36.00
Liposo me	0.12	100.0	0.05	41.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.20	83.33	0.21	82.66	0.18	75.00	0.17	70.80

(다) 40℃에서의 경시 변화

Oxyresveratrol을 40℃에서 제형제조에 따른 경시 변화를 살펴 본 결과, microcapsule 제형 제조시 56일 보존시에 62.58%의 잔존율을 나타내어 가장 안정한 것으로 나타났다(Table 4.4-20).

Table 4.4-20. 40°C에서의 경시 변화

경과일 sample	초기		8일		22일		29일		36일		56일	
	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)	함량 (%)	잔존율 (%)
Silica	0.025	100.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HP-β-CD	0.040	100.0	0.017	42.50	0.002	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nano capsule	0.025	100.0	0.016	64.00	0.006	24.00	0.004	16.00	0.002	8.00	0.00	0.00
Liposome	0.12	100.0	0.007	5.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Micro capsule	0.24	100.0	0.23	95.83	0.17	70.83	0.17	70.83	0.16	66.70	0.15	62.50

(7) Oxyresveratrol의 안정성 실험 결론

- (가) Oxyresveratrol은 중성 및 알칼리상태에서는 불안정하며, 산성에서 안정하여 pH조건을 고려하여 약산상태로의 제조가 필요하다.
- (나) 용매조건에서는 Ethanol, DMSO, 1,3 BG의 어떤 상태에서도 90%이상을 유지하며, 안정하다
- (다) 원료첨가에 따른 경시변화를 살펴본 결과, 냉장상태에서는 모두 안정하였으며 안정도 유지는 HP-β-CD > Microcapsule > Nano capsule > Liposome > Silica 순이었고 HP-β-CD 에서는 온도의 영향을 받지 않으며 가장 이상적이었다.
- (라) 제형제조에 따른 경시변화를 살펴본 결과, Microcapsule을 제외하고는 모든 제형제조에서 불안정하였다. Microcapsule > Nano capsule > HP-β-CD > Liposome > Silica 순으로 안정성이 좋게 나타났다. Capsule 방법이 제형에서는 가장 좋으며, Nanocapsule보다는 Microcapsule방법이 더욱 좋게 나타났다.

라. 기능성 원료의 개별인정 신청을 위한 자료

1. 원료명	상지주정추출물	
2. 원재료	상지	
3. 지표성분	Oxyresveratrol	
4. 제조공정	원재료 → 1차 열수추출 → 여과 → 농축 → 동결건조	
5. 규격 및 시험방법	정상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말 지표성분: oxyresveratrol: 1.92~2.88 mg/g (2.4 mg/g의 80~120%) 납: 5 ppm 이하 총비소: 3 ppm 이하 카드뮴: 0.3 ppm 이하 총수은: 0.2 ppm 이하 대장균군: 음성 8) 총 디디티: 0.1ppm 이하 9) 디엘드린: 0.1ppm 이하 10) 총 비에이치씨: 0.1ppm 이하 11) 알드린: 0.1ppm 이하 12) 엔도설판: 0.1ppm 이하 13) 엔드린: 0.1ppm 이하	
	지표성분 시험법	자사시험법 *시험법 검증 자료 첨부
	규격외 (잔류농약)	
6. 안전성	의사결정도	의사결정도: 다
	섭취 근거	<인정현황> 건강기능식품 확인 상지는 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 목록에 해당하지 않는다. 국내외 사용현황 식약처 식품원재료 데이터베이스에 식용이 가능한 것으로 제시되어 있다. 대한약전의한약(생약) 규격집에 '상지'로 등재되어 있으며, 그 외 중국약전, 인도에 등재되어 있다. 동의보감에서는 뽕나무 가지를 달인 차를 비만, 팔, 눈, 각기, 풍, 습기 치료에 사용하였고, 상지를 찧어서 볶은 후, 차 마시듯 물에 달여서 마시는 등 오래전부터 섭취하였음을 확인하였다. 국내에서는 상지 유사원료로서 상엽추출물(기능성원료 인정 제 2014-13호)이 식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음의 생리활성기능 2등급으로 개별인정을 획득한 바 있다.
	안전성 정보	<input type="checkbox"/> 안전성 정보 DB: 부작용이나 이상반응이 보고되지 않음.
	섭취량 평가	일일 제안섭취량: 신청원료로서 1000 mg

		<p>일상 섭취량</p> <p>. 상지주정추출물의 독성 및 부작용을 평가하기 위해 Toxline, Pubmed, KISS 등의 데이터베이스 및 모노그래프 (Natural medicine comprehensive database, Agency for healthcare research and quality, WHO monographs 등)를 분석하였다. 그 결과를 상지주정추출물의 섭취에 따른 부작용 관련 보고는 없었다.</p>
	인체적용시험	. 본 연구에서 만 19세 이상 75세 미만의 성인 남녀를 대상으로 상지주정추출물을 8주간 섭취한 인체적용시험에서 중대한 이상반응 및 심각한 부작용은 관찰되지 않았다
	독성 시험	독성시험자료는 기능성원료 섭취로 인해 발생할 수 있는 잠재적 위해를 동물시험 연구를 통해 예측하는 것이다. 단회투여독성시험(설치류), 4주 반복투여독성시험(설치류), 유전독성시험항목 중 복귀돌연변이시험을 수행하였으며, 그 결과 상지주정추출물 섭취에 따른 독성 및 부작용은 관찰되지 않았다.
	기타 사항	-
	섭취시 주의사항	
7. 기능성	신청 기능성	혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음.
	신청 일일섭취량	1000 mg
	시험관시험	<p><신청원료></p> <p>3T3-L1 세포 /</p> <p>DPPH assay . 8.78 ± 0.6 에서 IC 50을 가짐</p> <p>ABTS assay 1.00 ± 0.06 에서 IC 50을 가짐</p> <p>FRAP assay 71.95 ± 0.06 를 가짐</p> <p>-세포막이나 세포질 내에서의 고분자의 측방확산을 측정할</p> <p>ORAC assay 282.40 ± 20.04 를 가짐</p> <p>-활성산소흡수력이 높다.</p> <p>phenolred/HRPO assay 22.21 ± 0.47 에서 IC 50을 가짐</p> <p>Taurine assay 4.35 ± 0.13 에서 IC 50을 가짐</p> <p>세포독성 감소를 보임.</p> <p>β-Carotene/linoleic acid assay 4.89 ± 0.39 에서 IC 50을 가짐</p> <p>체지방 감소를 보임</p>
	동물시험	<p><신청원료></p> <p>C57BL/6J mice (고지방식이로 고지혈증 유도) / 0.1%, 0.25% / 12주</p> <p>부고환지방, 신자지방, 갈색지방의 경우 정상식이군과 유의적인 차이가 관찰되지 않음 ($p < 0.05$)</p> <p>OGTT / 인슐린 분비능을 개선시키는 것으로 판단 ($p < 0.05$)</p> <p>Hemoglobin A1C / 공복혈당 경우 유의적으로 19%감소를 나타냄 ($p < 0.05$)</p> <p>유리지방산 함량에 유의차가 관찰됨 ($p < 0.05$)</p>

인체적용시험	<신청원료> 경증의 고콜레스테롤혈증 성인 / 1000 mg/d / 8주
기타 사항	-

(1) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

(가) 기원

<원재료 정보>

원재료	상지(桑枝)
학명	Mori Ramulus
부위	뽕나무과 어린가지 (moraceae)
원산지	황성군 청일

상지는 뽕나무 *Morus alba* Linne 에 속하는 낙엽 활엽 교목. 오디나무라고도 한다. 높이는 3~4미터이며, 잎은 달걀 모양의 원형 또는 긴 타원형이다. 검게 익은 열매는 오디라고 하여 식용 및 약용한다. 잎과 어린 가지도 식품으로 쓸 수 있다. 잎은 누에의 사료로 쓴다. 북반구의 온대, 난대에 약 35종이 분포하는데 우리나라에는 산상(山桑), 노상(魯桑), 백상(白桑)의 세가지 종이 재배되며, 우리나라에서는 한약재로 사용되어 왔으며, 팔다리 저림증, 각기 등에 사용하며, 붓는 증상에도 효과가 있다. 고혈압, 팔다리 마비증에도 사용한다. 약리작용으로 지사작용, 항균작용, 장연동운동 억제작용, 혈압강하작용 등이 보고되고 있다.(한국정통지식포털사이트)

(나) 개발경위

- 서구식 식생활과 인구의 고령화로 고혈압, 동맥경화, 당뇨, 비만 등 다양한 대사성 질환의 발병이 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 심혈관계 질환은 매년 증가률을 보이며 2015년 사망 원인 중 2위를 차지하고 있음. (통계청. 사망원인통계, 2015)
- 심혈관계 질환의 주요 위험인자 중 하나인 고지혈증은 비정상적인 지방 대사로 혈액 중에 중성지방, 콜레스테롤 등 지방 수준이 높아진 상태로 정의됨. 고지혈증을

유발하는 원인이 다양하게 보고되고 있는데, 특히 식생활은 조절이 가능한 환경적 요인 중 하나로 알려져 관련 기능성 식품 개발이 활발히 진행되고 있음.

- 대부분의 고지혈증 치료 약물은 다양한 부작용이 보고되고 있어, 기능성을 나타내면서 안전하게 섭취할 수 있는 식품소재에 대한 관심이 커지고 있으며, 천연물 추출물 연구를 통하여 지질대사의 개선과 비만의 치료와 예방에 효과 등 다양한 기전으로 혈중 콜레스테롤 저하에 도움을 줄 수 있는 것으로 보고되어 있다.
- 따라서 상지를 이용한 콜레스테롤 개선 기능성 원료의 개발은 국내 고유 식품 자원을 고부가가치화 하고 국민 건강을 증진시키는데 의의가 있으므로 상지를 활용한 기능성 원료를 개발하고자 함.

(2) 국내 • 외 인정, 허가 현황

(가) 국내

- 뽕나무가지를 80%주정으로 단순 추출한 “뽕나무가지 추출물”은 식품으로 간주할 수 있음.
- 원재료인 상지는 식품으로 등재되어 있음.
- - 식품공전에 Moraceae. 종(Morus alba L.; 품목명, 뽕나무; 이명 또는 영명, 오디나무)은 “식품에 사용할 수 있는 원료”의 목록에 등재되어 열매(상심자), 잎, 어린가지(상지)및 뿌리껍질(상배피)가 사용가능함. (식품공전 (식약처 고시 제2014-117호))
- - 식품원재료데이터베이스에 따르면 Morus alba L.의 어린가지(상지)는 식품원료 목록으로 사용 가능함. [첨부 2-3]
- 식품공전에서 물, 주정 등을 사용하여 추출한 것을 단순추출물로 분류하여 식품원료로 사용가능한 것으로 정의하고 있음. (「식품공전 (식약처 고시 제2014-117호) 」 제2.식품일반에 대한 공통기준 및 규격. 2.식품원료 기준) [첨부 2-4]
- 원재료인 뽕나무가지는 대한약전에 등재되었고, 한약(생약)규격집 처방전에 포함되어 있음.
- 대한약전에는 생약 및 생약제제로서 뽕나무가지(桑枝, Mori Ramulus)가 등재되어 있고, Mori Ramulus는 뽕나무(Morus alba Linne)또는 기타 동속 근연식물의 어린가지로 정의됨. (「대한약전외한약 (규격집수재생약(KHP)) 」)

- 원재료인 상지는 예로부터 동의보감, 본초강목의 처방전에 사용되어 왔음.
- (「한글동의보감」, 「한국전통지식포탈」) [첨부 2-6, 2-7]
- 효능: 제풍습(除風濕), 해고독(解蠱毒), 이소변(利小便), 거풍습(祛風濕), 보폐(補肺), 선리관절(善利關節), 소식(消食), 이관절(利關節), 익신(益腎), 제풍(除風), 청열(淸熱), 축습(逐濕), 통관절(通關節), 통락(通絡)
- 주치병증: 관절산통마목(關節酸痛麻木), 사지구련(四肢拘攣), 수종(水腫), 풍습비통(風濕痺痛)
- 수치법: 생용(生用) 혹은 주구(酒灸) 또는 부초(麩炒)하여 사용한다. 주상지(酒桑枝) : 깨끗한 상지편(桑枝片)을 황주(黃酒)와 섞어 흡수시킨 후 약한 불로 볶아 황색이 되면 꺼내어 말림.
- 유사원료로 상업추출물이 식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음의 생리활성기능2등급으로 개별인정을 획득한 바 있다.

인정번호	원료명	지표성분	기능성내용	일일섭취량	기업명
제2014-13호	0000추출물	1-deoxy nojirimycin	식후 혈당상승 억제에 도움	상업추출물로서 6 g/일	

(나) 국외

<미국>

- Morus alba. L(뽕나무), Mori Ramulus(상지), 및 주성분인 oxyresveratrol의 FDA에 의해 'Everything Added to Food in the United States (EAFUS)' 검색을 통해 확인한 결과 자료가 없는 것으로 확인 되었다.

EAFUS

FDA가 GRAS로 인정한 식품원료 혹은 식품첨가물을 축적된 독성 정보의 수준에 따라 분류한 총 3000여종의 물질 database로써, FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN)에서 수행된 식품첨가물 평가 (Priority-based Assessment of Food Additives, PAFA) 프로그램의 일환으로 수행되었음. 독성시험의 축적 정도에 근거하여 확보된 안전성 정도에 따라 6가지 (ASP, EAF, NEW, NIL, NUL, BAN)로 분류하고 있다.

- CODEX



CODEX 규격에서 Morus alba. L(뽕나무), Mori Ramulus(상지), 및 주성분인

oxyresveratrol의 검색을 통해 확인한 결과 자료가 없는 것으로 확인 되었다.

(다) 국내·외 사용현황

<국내>

- 국내에서 상지추출물을 이용한 제품은 없으며, 단순건조 된 상지를 판매하고 있으며, 제품은 아래와 같음.

제품사진	제품명	제조사	일 일 섭취량	표시 내용	주의 사항	섭 취 용도	유 통 량	기타
	상지 (뽕나무가지)	(주)초원한방플러스	제한 없음	-	-	기타 한방 재료	-	
	상지 (뽕나무가지)	인차	-	-	-		-	

<국외>

- 상지주정추출물은 국외에서 상지추출물을 이용한 제품은 없으며, 분말 및 건조품으로서 주로 중국에서 판매되고 있으며, 제품은 아래와 같음.

제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시 내용	주의 사항	섭취 용도	유통량	기타
	상지 분말	Beijing Tianjin Shanghai		-	-	-	-	
	상지(뽕나무가지)	X i ' a n Hao-Xuan	-	-	-		-	

(3) 제조방법 및 그에 관한 자료

(가) 원재료

- 원재료: 상지(Mori Ramulus)
- 부위: 뽕나무과(Morus alba Linne) 어린가지(moraceae)
- 5~6월에 뽕나무의 어린 가지를 채취하여 사용함.
- 원산지: 국내(황성군 청일)

(나) 제조과정 중 사용 되는 원료

- 95% 주정에탄올

(다) 개요

- Mori Ramulus를 80% 주정용 에탄올로 1차 추출한 후 여과하고, 농축한 후 동결 건조함.

(라) 제조공정표

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	지표성분 함량 (mg/g)	수율 (%)
원재료	건조된 상지 (Mori Ramulus)		0.3	100
↓				
1) 1차 추출	80% 주정용 에탄올 (원재료 중량의 8배)	내부 온도 83~87℃, 4시간		
↓				
2) 여과		5 μm housing filter		
↓				
3) 농축		600~760mm Hg, (50℃이하 유지)		
↓				
4) 동결건조		-30℃ 24시간 동결 후 30℃에서 48시간 건조	2.39	4
↓				
5) 신청 원료				

(마) 세부 제조공정

- 1차 추출
80% 중조에탄올을 원재료 중량 대비 8배 넣고 추출함.
추출조건: 85℃, 4시간
- 여과
추출액을 5 μm housing filter에 여과함.
- 농축
600~760 mmHg의 압력으로 감압하여 농축함.
- 동결 건조
-30℃ 저온냉동고에서 24시간 동결 후 30℃ 48시간 건조

- 신청 원료
Mori Ramulus 추출물

(4) 원료의 특성에 관한 자료

(가) 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등

- 성상: 연갈색 또는 갈색의 분말

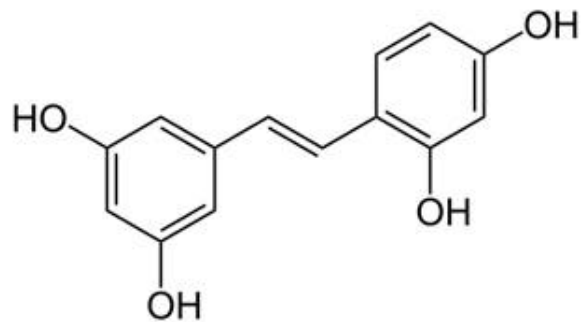
(나) 기능성분 (또는 지표성분) 및 근거

- 지표성분: Oxyresveratrol
- 설정근거

Oxyresveratrol 는 스티벤 물질의 일종으로 Mori Ramulus 추출물의 스티벤의 성분 중 함량이 가장 높고, 특히 다른 과(오디, 뽕잎, 상백피)와 비교하였을 때 함량이 최소 4배가량 높은 것으로 보고됨. 또한, 추출물내 함량이 1.92~2.88% 수준으로 함유된 것으로 분석되어 Oxyresveratrol를 지표성분으로 설정함.

특성

Structural formula :



Chemical name :	4-[(E)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol
CAS number :	29700-22-9
Molecular formular :	C14H12O4
Molar weight :	244.24 g/mol

(5) 기능 성분 (또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

(가) 기능성분 (또는 지표성분) 의 규격 및 근거

<기능성분 (또는 지표성분)의 규격>

- 지표성분인 oxyresveratrol의 함량 규격을 1.92~2.88 mg/g으로 설정함.

<설정근거>

- 신청원료 3개 Lot에서 oxyresveratrol의 함량은 2.4 ± 0.48 mg/g으로 분석됨. 분석값의 평균값, 최솟값 및 최댓값과 분석오차 20%를 고려하여 1.92 ~ 2.88 mg/g으로 설정함
- 국전약품에서의 분석 결과가 설정된 규격에 적합함을 확인함. [첨부 4-1]
- [검사기관명: 국전약품 품질관리]

(단위: mg/g)

Lot No.	Lot. 1	Lot. 2	Lot. 3	평균 ± 표준편차
분석결과	2.39	2.49	2.37	2.4 ± 0.48

(6) 기능성분 (또는 지표성분) 표준품 정보

■ 시판되는 표준품	표준품명	oxyresveratrol
	제조·판매회사명	fluka
	구조식	C ₁₄ H ₁₂ O ₄
	CAS No.	29700-22-9

(7) 기능성분 (또는 지표성분) 시험방법

(가) 시험방법

<input type="checkbox"/> 공인시험방법	출처:
<input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법	■ 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부
1. 분석장비	

1.1 장비

HPLC 107 JASCO 2000 series,

PU-2089 puls quaternary gradient pump

AS-2051 puls intelligent sampler

UV-2070 plus intelligent UV/VIS detector

CO-2060 plus intelligent column thermostat

Jasco LC-net II/ ADC

Analytical Column 옥타데실실리카화한실리카겔이 충전된 칼럼 또는 이와 동등한 컬럼

(5um, 4.6 × 250 mm)

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

2.1.1. oxyresveratrol 표준품: Fluka, 14668, LOT# BCBF5526V, 99.1%

2.2 일반시약

① Water: Samchun, HPLC급

② Ethanol: Fisher brand, HPLC급

③ acetonitrile: Samchun, HPLC급

④ 85% phosphoric acid: Samchun, EP급

⑤ 전처리용매: 1차 희석액 Water 20 mL + Ethanol 80 mL

2차 희석액 10 mM 인산용액 35 mL + acetonitrile 65 mL

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

표준품 10 mg을 정밀하게 달아 100 mL 용량 플라스크에 넣어 1차 희석액을 가하여 녹인다. 이 액 5 mL를 100 mL 용량플라스크에 넣어 2차 희석액을 넣어 녹인액을 표준액으로 한다.

3.2 시험용액 제조

이 약 100 mg을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 넣어 1차 희석액을 가하여 녹인다. 이 액 10 mL를 100 mL 용량플라스크에 넣어 2차 희석액을 넣어

녹인액을 검액으로 한다.

검액 및 표준액 20 uL 씩을 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

Instrument	HPLC system
Detector	UV detector (325 nm)
Column	옥타데실실릴화한실리카겔이 충전된 칼럼 (5 um, 4.6 × 250 mm) 또는 이와 동등한 컬럼
Injection Vol.	20 μl
Temperature	30 °C
Mobile Phase	A: 아세토니트릴 B: 10 mM 인산용액
Run Time	40 min

표 2. 이동상 조건

시간(분)	이동상 A	이동상 B
0	10	90
10	25	75
30	50	50
40	10	90

4.2 계산

옥시레스베라트롤의 함량(%) =

$$\frac{\text{검액에서의 옥시레스베라트롤의 면적}}{\text{표준액의 면적}} \times \frac{\text{표준액의 농도}}{\text{검액의 농도}} \times \text{표준품의 순도(%)}$$

① 시험방법 밸리데이션

- 함량 분석법의 특이성 (specificity), 직선성 (linearity), 정확성 (accuracy), 정밀성 (precision), 범위 (range) 등의 항목을 검토한 결과는 다음과 같음. [첨부 5-2]

항목	평가방법	설정값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석시 검출시간(Retention time)과	o 검출시간 : 약 20~21분대에 peak

		λ_{max} 으로 검토	검출 o λ_{max} : 약 325 nm
직선성 (Linearity)	표준용액	5개 농도로 3반복 직선성 확인	o 약 1.44~5.04 ug/mL에서 $R^2=1.000$
	시료	5개 농도로 3반복 직선성 확인	o 1.44~5.04 ug/mL (시험용액농도 60~210 ug/mL)에서 $R^2=1.000$
정확성 (Accuracy)		표준용액 3개 농도를 위료를 첨가하여 회수율 검토	o 추가한 표준용액 농도 1.92, 2.40, 2.88 ug/mL o 회수율: 99.47, 99.87, 98.45% o %RSD: 0.192, 0.014, 0.014 %
정밀성 (Precision)		농도별 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 분석결과 - 농도 1.92, 2.40, 2.88 ug/L, - SD 9.0, 8.5, 8.7 - %RSD: 0.19, 0.15, 0.13%
범위 (Range)		범위, 정확성, 재현성 검토	o 1.44~5.04 ug/mL

(8) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

(가) 유해물질규격항목 (납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

-
- 납: 5 ppm 이하
 - 총비소: 3 ppm 이하
 - 카드뮴: 0.3 ppm 이하
 - 총수은: 0.2 ppm 이하
 - 대장균군: 음성
-

유해물질의 규격은 「대한약전외한약(생약)규격집수재생약(KHP)」 (식약처 고시 제

2014-26호)의 [별표2] 유해물질규격설정항목에 따라 분석값과 섭취량을 고려하여 최소 함량으로 관리될 수 있도록 설정함.

(나) 중금속

- 중금속별 법적 규격에 따르면 납은 10.8 µg/일 미만, 총비소는 150 µg/일 미만, 카드뮴은 3.0 µg/일 미만, 총수은은 2.1 µg/일 미만으로 관리되어야 함.
- 따라서 신청원료의 일일섭취량 (1000 mg)과 한약 규격을 고려하여 납 5 ppm 이하, 총비소 3 ppm 이하, 카드뮴 0.5 ppm 이하, 총수은 0.2 ppm 이하로 규격을 설정함.
- 신청원료의 중금속 함량을 분석한 결과 설정한 규격에 적합함을 확인함.

(다) 미생물

- 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였으며, 검사기관에서 대장균군을 분석한 결과 음성임을 확인함.

유해물질 (중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

항목		시험법	출처
중금속	납	식품공전 일반시험법	제10.
	총비소	7. 식품 중 유해물질시험법	
	카드뮴	7.1 중금속 시험	
	총수은	식품공전 일반시험법	제10.
미생물	대장균군	3. 미생물시험법 3.7 대장균군	
잔류농약	총 디디티(DDT), 디엘드린(Dieldrin)	식품공전 일반시험법	제10.
	총 비에이치씨(총 BHC)	4. 식품 중 잔류농약분석법	
	알드린 (Aldrin)	4.1.2	
	엔도설판 (Endosulfan)	다중농약다성분분석법	
	엔드린 (Endrin)		

■ 시험성적서 요약표

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서) 1)			
규격항목	정상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말			
	지표성분 ()	1.92~2.88 mg/g	2.39	2.49	2.37	
	중금속 (mg/kg)	납	5 ppm 이하	0.0035		
		총비소	3 ppm 이하	0.0555		
		카드뮴	0.3 ppm 이하	0.1003		
		총수은	0.2 ppm 이하	0.005		
	미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
	곰팡이 독소	독소명	-	-	-	-
잔류용매	용매명:	-	-	-	-	
규격 미설정 항목	동물용 의약품	검사수:	-	-	-	-
	잔류농약	1. DDT	0.10 ppm 이하	불검출		
		2. 디엘 드린	0.01 ppm 이하	불검출		
			0.20 ppm 이하	불검출		
		3. 총 BHC	0.01 ppm 이하	불검출		
			0.20 ppm 이하	불검출		
		4. 알드 린 5. 엔도 실판 6. 엔드 린	0.01 ppm 이하	불검출		

■ 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치 (mg/kg)	최대섭취 량 (g)	제안 규격 ($\mu\text{g/g}$)	제안 규격에 의한 일일노출량 (μg)	1일 최대 노출 허용량 (μg)
납	0.0035	1.00	5 이하	5	10.8
총비소	0.0555		3 이하	3	150
카드뮴	0.1003		0.2 이하	0.2	3.0
총수은	0.005		0.3 이하	0.3	2.1

본 원료는 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정」(식약처 고시 제 2014-26호)의 제14조 제7호 및 「건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도」에 의하면 「다」 항목으로 분류됨.

- -“① 건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료로 규정되어 있는가?” [No]
- -“② 섭취경험이 있는 동식물, 조류, 미생물 등의 원료 자체인가?” [No]
- -“⑤ 섭취경험이 있는 동식물, 조류, 미생물 등을 제조 또는 가공한 것인가?” [Yes]
- -“⑥ 물리적인 추출 또는 물이나 주정을 이용한 단순 추출물인가?” [Yes]
- -“③ 알려진 부작용이 있는가?” [No]
- -“④ 섭취량이 일상섭취량보다 증가하였는가?” [Yes]

따라서 「다」 항목에 해당하는 “섭취근거자료”, “해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보자료”, “섭취량 평가자료”, “영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보”를 제출하고, 지표성분에 대한 “독성시험자료”를 추가로 제출함.

(9) 안정성에 관한 자료

(가) 섭취근거 정보 (제 2장 참조)

- 본 원료는 식품공전 및 식품원재료데이터베이스에 등재되어 있으며, 이를 물로 단순 추출한 “상지주정 추출물”은 식품으로 간주할 수 있음.
- 원재료인 상지는 대한약전에 등재되었고, 대한약전외한약에 포함되어 있음.
- 원재료인 상지는 예로부터 동의보감의 처방전에 사용되어 왔음.

(나) 기능성분 및 관련물질의 안전성 (부작용, 독성 등) DB 검색 정보

<상지의 안전성 DB 검색결과>

- 2016년 11월 10일 현재까지 검색한 결과는 다음 표와 같음.

Pubmed		4	0	
FDA poisonous plant DB		16	0	
AHRQ (Agency for Healthcare Research and Quality)	morus alba	-	-	
AHPA's Botanical Safety Handbook (AmericanHerbalProductsAssociation)	morus alba	-	-	

Expanded Commission E online	morus alba	-	-	
IOM Dietary Reference Intakes	morus alba	-	-	
Natural Medicine Comprehensive Database	morus alba and safety	-	-	
WHO monographs	morus alba	3	-	
EFSA(European Food Safety Authority)	morus alba	3	-	
GRAS(Generally recognized as safe)	morus alba	-	-	
Health Canada	morus alba	11	-	
TGA(Therapeutic Goods Administration)	morus alba	2	-	
Toxline(Toxnet)		6	-	
KISS (Koreanstudies Information Service System)	morus alba and 독성	9	1	한국약용작물학회지 13권 6호. 2005 pp.217-225
RISS	morus alba and 독성	39	1	7-5
NDSL	morus alba and 독성	41	1	7-1
DBPia	morus alba and 독성	9		7-4

- 상지주정추출물의 독성 및 부작용을 평가하기 위해 Toxline, Pubmed, KISS 등의 데이터베이스 및 모노그래프 (Natural medicine comprehensive database, Agency for healthcare research and quality, WHO monographs 등)를 분석하였다. 그 결과를 아래의 표에 제시하였으며, 상지주정추출물의 섭취에 따른 부작용 관련 보고는 없었다.
- 동물모델로 상지에 탄을추출물의 경우, 유전독성이 관찰되지 않았음

<Oxyresveratrol의 안정성 DB 검색결과>

- 2016년 11월 10일 현재까지 검색한 결과는 다음 표와 같음.

Pubmed	Oxyresveratrol and safety	5	-	-
FDA poisonous plant DB	Oxyresveratrol	1	-	-
AHRQ (Agency for Healthcare Research and Quality)		-	-	-
		-	-	-
AHPA's Botanical Safety Handbook (AmericanHerbalProducts Association)		-	-	-

			-	-
Expanded Commission E online		1	-	-
IOM Dietary Reference Intakes		-	-	-
Natural Medicine Comprehensive Database		-	-	-
WHO monographs		-	-	-
EFSA(European Food Safety Authority)		-	-	-
GRAS(Generally recognized as safe)		-	-	-
Health Canada		-	-	-
TGA(Therapeutic Goods Administration)		-	-	-
Toxline(Toxnet)	Oxyresveratrol and safety	-	-	-
KISS (Koreanstudies Information Service System)	Oxyresveratrol	12	1	7-2
RISS	Oxyresveratrol and safe	1	1	7-3
NDSL	Oxyresveratrol	182	-	
DBPia	Oxyresveratrol	11	-	

- 제외국 인정 현황은 2장에 작성함.
- Natural Medicine Comprehensive Database의 oxyresveratrol에 대한 부작용 보고는 없었음.

(다) 섭취량 평가 정보

▶ 제시한 일일섭취량
▶ 신청 원료로서 1000 mg

- 원재료 및 신청 원료에 대한 식품 및 약품으로서 섭취량 자료 없음.
시중에 판매되고 있는 제품의 섭취량 자료 없음

(10) 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

(가) 영양평가 정보

- 다른 영양소의 흡수, 대사, 배설에 미치는 영향을 평가한 자료는 없음.

① 생물학적 유용성 정보

- 생체이용율을 평가한 자료는 없음.

(나) 인체적용시험정보

- 대사증후군 또는 경증의 고콜레스테롤혈증이 있는 성인을 대상으로 수행한 인체 연구에서 신청원료 1,000 mg/d를 8 주간 섭취하였을 때, 시험식품 섭취로 인한 이상반응 및 부작용 보고 없었음.

(11) 독성시험

- 독성시험의 경우 단회투여독성시험(설치류), 4주 반복투여 독성시험(설치류), 유전 독성시험항목(복귀돌연변이시험)을 진행 하였음

시험종류	실험동물	투여방법	투여기간	시험물질, 용량	시험결과	비고
4주 반복투여	SD rat (male, female)	경구	28일	상지주정추출물 500, 1000, 2,000 mg/kg/일	-체중 및 식이섭취량에 변화 없음 - 혈액의 생화학적 분석 결과값에 변화 없었음. 혈소판 수(암컷)의 감소, 혈중 칼슘농도 증가(수컷)가 관찰되었으나 모두 정상적인 범위에서 변화임	J korean soc food sci butr 45(10), 1406~1413 (2016)
단회	SD rat (male, female)	경구	단회	상지주정추출물 LD 50은 5000 mg/kg 이상임	-사망 및 비정상적인 증상 보이지 않음 - 전체적으로 몸무게 증가는 정상적이었음. - 장기 이상 관찰되지 않음	
복귀돌연변이	Salmonella typhimurium T A 1535, 1537, 98, 100			상지주정추출물 - 0, 15, 150, 500, 1500ug /plate	-돌연변이 없음	

① 결론

- 원재료인 Morus alba L.는 국내에서 식약처 식품원재료에 식용가능한 것으로 제시됨
- 2016년 9월 20일 현재까지, 안전성 DB를 검색한 결과 Morus alba L. 및 함유성분에 대하여 안전성에 우려할만한 사항이 보고되지 않음.
- Morus alba L.에 대한 섭취량 평가 결과, 일상 섭취량에 대한 정보가 충분하지 않아 섭취량이 증가한 것으로 평가됨.
- 대사증후군 또는 경증의 고콜레스테롤혈증을 가진 성인을 대상으로 수행한 인체 연구에서 신청원료 1,000 mg/d를 8 주간 섭취하였을 때, 시험식품 섭취로 인한 이상반응 및 부작용 보고 없었음.

따라서, 신청원료를 제안 일일섭취량인 1000mg 수준으로 섭취하는 것은 안전한 것으로 평가됨.

(12) 기능성에 관한 자료

(가) 제안 기능성 내용

- 기능성 내용: 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음.

(나) 일일섭취량

- 1000 mg

(다) 기능성 제출자료

(건)

시험물질	총 제출자료	시험관시험	동물시험	인체적용시험
신청원료	8	5	3	1
참고자료 (지표성분)	1	-	1	-

• <제출자료 요약>

첨부 9-1	신청원료	J Korean Oriental Med 2002; 23 (4) : 64-72	O	in vivo	SD rat (8주)	경구	- 체중감소 - 간장중량감소 - 혈중 TC, HDL-cholesterol, triglyceride - 간장 중 fatty acid synthetase, acetyl CoA carboxylase 활성화
첨부 9-2	신청원료	대구가톨릭대학교, 식품영양학과 안은영 석사논문		in vivo	I C R mice (6주)	경구	상지 추출물 및 지표성분 (oxyreveratrol) 지질대사 -혈장 TC, TG, free fatty acid, HDL-CHO -간장 TG, TC
첨부 9-3	신청원료 지표성분	고려대학교 조성필 논문		In vivo	SD rat (5주)	경구	-혈중 TC, TG, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, -AST, ALT

(라) 작용기전

1. CYP7A1(cholesterol 7a-hydroxylase)의 농도의존적 발현
2. LCAT(Lecithin cholesterol acyltransferase)의 발현을 통해 혈중 콜레스테롤을 개선시킬 수 있음.

■ 신청 원료는 콜레스테롤의 내인성 조절 경로를 통해 체내 수준을 개선시킴.

- 정상인의 경우 식이로 섭취한 콜레스테롤의 흡수를 조절하는 외인성 경로와 체내 합성 등을 조절하는 내인성 경로를 통해 체내 콜레스테롤 수준을 일정하게 유지하게 됨.
- 그러나 이러한 조절 작용 중, 특히 내인성 경로를 통한 조절에 이상이 생기면 콜레스테롤 수준이 증가하게 됨.
- 신청 원료인 상지주정 추출물은 내인성 경로인 CYP7A1 대한 발현은 콜레스테롤을 담즙산으로 이화시키는 작용을 하며, LCAT에 대한 발현은 free cholesterol을 지용성 cholesteryl ester로 변환시켜 혈중 콜레스테롤을 개선시킴(Fig. 4.4-10).

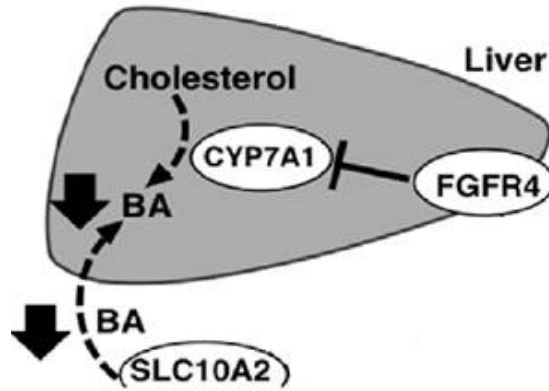


Fig. 4.4-10. 상지주정추출물의 콜레스테롤 개선 기전 (CYP7A1)
(Digestive Diseases, 29, 98-102, 2011)

1. CYP7A1의 활성화에 따라 간에서 콜레스테롤을 Bile acid로 전환시켜 콜레스테롤을 감소시킴.

- CYP7A1의 유전자는 콜레스테롤 대사 및 담즙산 합성의 초기 촉매 역할을 하고 이러한 CYP7A1의 발현은 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 요인으로 작용한다(14)

2. LCAT효소는 free cholesterol을 지용성인 cholesteryl ester로 변환시키며 HDL의 친화력 증가로 혈중 콜레스테롤의 간으로의 유입을 증가시킴.

- LCAT는 혈장중의 HDL과 친화성이 높으며, lipoprotein과 작용하여 lecithine phosphatidyl choline을 lysolecithin으로, free cholesterol을 cholesteryl ester로 변화시킨다. 이러한 cholesteryl ester는 지용성이므로 HDL표면에 존재하지 못하고 내부로 삽입되어 HDL을 구형으로 변화하고 SR-B1과 ABCG1등의 수용체에 도킹하여 추가로 콜레스테롤을 흡수한다 (15).

① 작용기전을 뒷받침 할 수 있는 내용 및 관련시험

- 기반 연구에서 신청 원료가 LCAT와 CYP7A1의 활성을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 수준을 개선시키는 것을 확인함(16,17).

② ICR mice

- 상지 추출물 및 지표성분(oxyreveratrol) 지질대사, 혈장 TC, TG, free fatty acid, HDL-CHO, 간장 TG, TC에 개선 효과를 가짐.

③ SD rat

- 혈중 TC, TG, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, AST, ALT에 대한 개선 효과를 가짐.

5. 인체적용시험을 통한 이중기능성 평가

가. 인체적용시험을 통한 기능성 평가

기반연구에서 확인된 신청원료의 혈중 콜레스테롤 감소 효과가 인체를 대상으로 한 연구에서 일관적으로 확인됨.

대상증후군인 성인 대상 연구에서 신청원료를 1000 mg/d(1일 총 4캡슐) 수준으로 8주간 섭취시켰을 때, 혈중 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 수준 등이 감소함.

(1) 연구 1

- 시험목적: 고지혈증 위험이 있는 대상자에게 상지주정 추출물이 혈중 지질 대사에 미치는 영향 평가
- 디자인: 무작위배정, 대조군 대비, 이중맹검, 병용약물
- 대상: 경증 및 중등증 콜레스테롤혈증인 성인 (총 콜레스테롤이 200~299 mg/dl)
 - 대상자 수: 58명 (대조군 29명, 시험식품 군 29명)
 - 시험물질: 상지주정 추출물 (신청원료)
 - 대조군 / 시험군
대조군: placebo (상지주정 추출물 미포함)
시험군: 상지주정 추출물 1000 mg/d
 - 섭취기간: 8주
 - 연구결과

중용량군에서 혈중 LDL 콜레스테롤 수준이 유의한 군내 차이가 관찰되지 않았다.
(섭취전 대비, $p < 0.05$).

→ 본 연구 결과를 근거로 본 실험의 섭취량을 1000 mg/d로 설정함

Variable	Morus alba L (n=29)			Placebo (n=29)		
	Baseline	9-week F/U	Difference	Baseline	9-week F/U	Difference
TC (mg/dL)	229.0±26.6	234.7±38.6 *	5.76±28.18	219.1±31.31	213.3±36.3	-5.79±29.26
TG (mg/dL)	173.0±117.2	161.2±131.59	-11.79±76.51	187.9±138.0	149.3±117.23	-38.5±133.34
H D L - C (mg/dL)	55.0±14.5	54.6±12.1 *	-0.38±6.64	57.7±15.8	56.6±12.2 *	-1.1±9.0
L D L - C (mg/dL)	139.6±29.7	144.7±39.0 *	5.10±23.95	123.0±30.3	124.4±30.7	1.41±28.74
IL-6 (pg/ml)	11.83±47.51	8.12±36.78	-3.71±13.51	3.81±8.34	1.27±0.95	-2.54±8.27
T N F - α (pg/ml)	8.13±39.79	8.68±38.77	0.55±3.73	1.02±3.27	0.85±1.65	-0.17±3.67
PT (sec)	10.71±0.51	10.56±0.41	-0.14±0.63	10.55±0.54	10.62±0.48	0.07±0.44
aPTT (sec)	28.73±3.63	29.19±3.77	0.46±3.12	27.68±3.66	28.74±3.79	1.07±2.46

* $p < 0.05$ compared with baseline. # $p < 0.05$ compared with the placebo group.

- 1차 기능성 평가 변수인 인체적용시험용 제품 복용 전과 8주 후 시점에서의 총 콜레스테롤 변화량을 통하여 시험식품이 대조식품에 비하여 우월한지 입증하고자 하였으나, 통계적으로 유의한 군간 차이가 관찰되지 않았다.

• <기능성자료 요약표>

① 인체적용시험

시험물질	디자인	대상	일일섭취량	섭취기간	바이오마커	결과	비고
신청원료	무작위배정, 위약대조, 이중맹검, 병용약물	대사증후군 성인 남녀 (n=58)	1000 mg	8주	<혈중 지질지표> - TC, LDL-C, TG/HDL-C	변화 없음	[첨부 8-1]
					<혈중 염증지표> IL-6, TNF-α	변화 없음	

② 동물시험

시험물질	실험동물	섭취량 (섭취기간)	바이오마커	결과	비고
신청원료	C57BL/6 J mice (고지방식이로 고지혈증 유도)	100mg/kg (10주)	-TC -HDL-C -간장 중량 -혈청, 총지질함량 -혈청, triglyceride 함량 -간장, acetyl-COA carboxylase -간장 fatty acid synthetase	- 감소 - 대조군의 비해 상승 - 감소 (p<0.05) - 감소 (p<0.05) - 감소 (p<0.05) - 감소 (p<0.05) - 감소 (p<0.05)	Journal of Korean Oriental Medicine v.23 no.4, pp.64 - 72, 2002, 1010-06 95 [첨부 9-1] KCI
신청원료	ICR mic (고지방식이로 고지혈증)	40 mg/k g/d (4주)	<혈중 지질지표> - TC, TG - HDL-C - FFA	- 감소, 감소경향 - 변화없음.	안은영, 대구가톨릭대학교 대학원

	유도			- 감소 (p<0.05,)	,[2015] [국내석 사] [첨 부 9-2] 학 위 논 문
지표 성분	(고 지 방 식 이 로 고 지 혈 중 유도)	1, 2.5, 5 mg/k g/day 4주	<혈중 지질지표> TC, TG HDL-C LDL-C VLDL-C AST ALT	- 감소(농도의존 적) - 감소(농도의존 적) - 감소(농도의존 적) - 감소(농도의존 적) - 감소경향 - 감소(농도의존 적)	Sung-P il Jo (고 려 대 학교 대 학원), 2015, x, 51 p, 고 려 대 학교 대 학 원 석 사 [첨 부 9-3]

(2) 주요 외국의 기능성 인정 현황

- 신청원료와 동일한 원료에 대한 혈중 콜레스테롤 감소 기능은 인정받은 바 없음.

(3) 섭취량, 섭취방법, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

(가) 섭취량, 섭취방법 및 근거

- 섭취량 및 섭취방법: 1일 1회 1000 mg씩 섭취
- 근거내용
- 고콜레스테롤 혈중 성인을 대상으로 한 인체적용시험에서 제안한 섭취량 및 섭취 방법으로 8주간 제안 섭취량 범위에서 시험 물질 섭취와 관련한 이상 반응 및 부작용 보고가 없었음.

(나) 섭취시 주의사항 및 근거

- 섭취시 주의사항: 임신부/수유부에서는 충분한 안전성 자료가 확보되지 않아 섭취시 주의해 주십시오.

(다) 제 10장. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

- 「건강기능식품 기준 및 규격 (식약처 고시 제2014-124호)」의 [별표 5] 건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료에 해당하지 않음.
- 「건강기능식품 기준 및 규격 (식약처 고시 제2014-124호)」의 제2.공통 기준 및 규격. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' '2) 의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문지식을 필요로 하는 것'에 해당하지 않음.

(4) 인체적용시험 결과

별도파일 첨부

(5) 요약

인체적용시험의 명칭	경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 총 콜레스테롤의 개선에 대한 “상지주정추출물”의 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험
인체적용시험 실시 기관	서울시 관악구 남부순환로 1636, 에이치플러스 양지병원
인체적용시험 책임자	에이치플러스 양지병원 임상연구센터 김창오 MD
인체적용시험의 목적	경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자를 대상으로 “상지주정추출물”을 투여한 후, 총 콜레스테롤 개선 효과 및 안전성을 평가하고자 하였다.
시험 설계	단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중눈가림 인체적용시험
대상자 수	58명이 등록되어 중도탈락 없이 전체 58명이 인체적용시험을 완료하였다.
연구 대상	만 19세 이상 75세 미만의 성인 남, 여로 경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자
선정 기준	<u>선정기준</u> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했다.) 1)만 19세 이상 만 75세 미만의 성인 남, 여 1. 인체적용시험 기간 동안 식이기록 및 식이관리에 동의한 대상자 2. 경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자로 공복시 방문 기준 총 콜레스테롤 수치가 200mg/dL 이상 299mg/dL 미만인 대상자

	3. 본 인체적용시험에 참가할 것을 자발적으로 서면 동의한 대상자 제외기준 (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.) 1) 급성 동맥 질환을 가진 대상자(예, 방문1 기준 3개월 이내에 불안정성 협심증, 심근 경색증, 일과성 허혈발작, 뇌혈관 질환, 관상동맥 우회술 또는 관상동맥중재술 병력을 가진 대상자) 4. 조절되지 않는 고혈압 대상자(수축기 혈압 \geq 180mmHg 이상 또는 이완기 혈압 \geq 110mmHg 이상) 또는 조절되지 않는 당뇨 대상자 5. 혈청 지질 또는 지단백에 영향을 주는 것으로 알려진 내분비 또는 대사성 질환자 6. 시험 참여 전 지질변화에 영향을 줄 수 있는 치료를 받은 대상자(예, 담즙산 sequestrants, 비만치료제, fibrates, 니아신, 전신작용을 목적으로 하는 스테로이드제제 등 복용자) 7. myopathy, rhabdomyolysis 병력이 있는 대상자 (CK가 정상치의 2배 이상인 자) 8. 방문1 기준 1개월 이내에 다른 임상시험용 의약품 또는 인체적용시험용 제품을 복용한 자 9. 천연물에 대한 알려진 과민반응을 가진 대상자 10. 중증의 신장장애 대상자(예, 혈중 크레아티닌이 정상상한치의 2배이상) 또는 간장애 대상자(예, AST 또는 ALT가 정상상한치의 2.5배 이상, 활동성 간질환 또는 만성 간질환) 11. 약물 또는 알콜 남용 병력이 있는 대상자 12. 위장관계 수술 경험이 있거나 조절되지 않는 위장관 장애 등으로 약물을 복용하고 있는 자 13. 임신부 및 수유부 여성 및 남성 14. 기타 시험책임자 또는 시험담당자가 부적당하다고 판단한 대상자
시험제품명	▪ MAEXT01 (상지주정추출물)
대조제품명	▪ 위약
투여방법 및 투여기간	• 시험군: 1일 2회 아침, 저녁 식전 2캡슐씩 경구투여 1일 MAEXT01 (상지주정추출물) 고형분 1,000 mg 복용 • 대조군 (위약군): 1일 2회 아침, 저녁 식전 2캡슐씩 경구투여 1일 MAEXT01 (상지주정추출물) 고형분 0 mg 복용
시험기간	각 대상자 별로 총 10~12주 (스크리닝 2~4주, 약제투여기간 8주)가 소요 되었으며, 목표 대상자 58명의 전체 시험기간은 2015년 06월 09일 ~ 2015년 09월 30일로 약 16주 간 진행하였다.
평가방법	기능성 (efficacy) ① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint) ① Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 총 콜레스테롤 변화치 15. 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint) 16. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 총 콜레스테롤 변화율 17. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 중성지방(TG) 변화치 및 변화율

	<p>18. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 HDL-cholesterol 변화치 및 변화율</p> <p>19. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 LDL-cholesterol 변화치 및 변화율</p> <p>20. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 IL-6 변화치 및 변화율</p> <p>21. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 TNF-α 변화치 및 변화율</p> <p>22. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 PT 변화치 및 변화율</p> <p>23. Baseline(방문2) 대비 8주 후 종료시점(방문4)의 aPTT 변화치 및 변화율</p> <p>안전성 (safety)</p> <ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험용 제품 투여 전과 투여 중 및 8주 투여 후에 이상반응(연구기간 내 이상반응을 평가한다.), 임상실험실 검사 (혈액학적/혈액생화학적 검사, 소변검사), 이학적 검사, 심전도 검사, 활력징후 측정을 실시하고 이상반응이 없는 경우라면, 종료 방문 검사로 방문을 종료하였다.
<p>결 과</p>	<p>본 연구는 만 19세 이상 만 75세 미만의 남, 여로 경증 및 중등증 고콜레스테롤혈증 대상자에게 하루 “상지주정추출물” 1 g을 8주간 투여한 시험군과 위약을 투여한 대조군을 비교하여 총 콜레스테롤 개선 효과 및 안전성을 평가하고자 단일기관 위약대조 무작위배정 이중눈가림 인체적용시험으로 설계되었다. 스크리닝 대상자 69명 중, 스크리닝 탈락 (선정/제외기준 위반 10명, 동의철회 1명) 11명을 제외한 58명이 등록되었고 8주 간의 경구 투여 후에 기능성 및 안전성을 평가하였다. 등록된 58명의 대상자 모두 FAS군, safety군에 해당하였다. 이 중에서 IP 포장 오류 및 복용순응도 연속 80% 미만으로 제외된 대상자 각 7명과 1명을 제외한 총 51명 (PP군)이 모두 시험계획서에 따라 인체적용시험을 종료하였다.</p> <p>1차 기능성 평가 변수인 인체적용시험용 제품 복용 전과 8주 후 시점에서의 총 콜레스테롤 변화량을 통하여 시험약이 위약에 비하여 우월한지 입증하고자 하였으나, 시험군에 대하여 통계적으로 유의한 군간 차이가 관찰되지 않았다. 2차 기능성 평가 변수 분석을 통하여 인체적용 시험용 제품 복용 전과 8주 후 시점에서의 변화량 및 변화율을 확인하였다. 모든 항목에서 시험군에 대하여 통계적으로 유의한 군간 차이가 관찰되지 않았으며, 중성지방, TNF-α, aPTT의 경우 대조군에 대하여 통계적으로 유의한 군내 차이가 관찰되었다.</p> <p>안전성 부분에서 8주 간의 시험 기간 동안 이상반응을 보인 대상자는 없었다. 또한 모든 시점의 활력징후, 심전도와 이학적 검사 결과가 정상적이었다.</p> <p>실험실 검사 결과, 인체적용시험용 제품 복용 전과 후의 변화를 각 군별로 분석한 결과에서는 시험군과 대조군 모두 APK, 중성지방, Glucose, aPTT에서 통계적으로 유의한 변화를 나타냈으며, 시험군은 Total bilirubin, 대조군에서는 Total protein, TNF-α에서 통계적으로</p>

유의한 군내 변화를 나타내었다. 실험실 검사 결과에서 일부 통계적으로 유의한 군내 변화를 나타내었으나, 정상범위 이내의 변화로 판단되며 임상적으로 유의한 수준의 변화가 관찰된 항목은 없었다.

본 인체적용시험을 통해 상지주정추출물의 총콜레스테롤 개선 효과를 얻고자 하였으나, 통계적으로 임상적으로 유의한 결과를 보여주지 못하여 기능성을 확인하지 못하였다. 뽕나무 가지인 상지는 mulberroside A, oxyresveratrol 등의 스틸베네올 배당체와 rutin 등의 flavonoid 배당체 등의 유효 물질 성분을 다량 함유하고 있으며, 조선시대 의서인 <동의보감> 등을 통해서도 알 수 있듯이 오래 전부터 약용으로 사용되어왔고, 진해, 소염, 진정, 혈압강하, 항균 등의 약리작용이 알려져 있는 생약재이다. 또한 대한약전외한약(생약)규격집 및 중국약전 수재되어 있으며, 종기, 고름집에 붙이는 고약으로서의 의약품으로 유통되고 있다. 또한 식품공전에 "식품에 사용할 수 있는 원료"로 등재된 식품원료이기도 하다. 오랜 시간에 걸쳐 뽕나무 가지인 상지는 다양하게 사용되어 왔다는 점으로 미루어 보아 인체적용시험 제품의 복용기간 및 복용량에 관한 검토가 좀 더 면밀하게 이루어지고 좀 더 많은 대상자를 상대로 연구가 진행 되었다면 충분히 긍정적인 결과가 나올 것으로 판단된다.

(6) 혈중 지질 개선에 대한 인체적용시험 재추진 및 혈행개선에 대한 인체적용시험 실시를 위한 전략

가. 인체적용시험 재추진시 고려해야 할 사항

동물실험에서의 효능과 인체적용시험의 결과가 차이를 보여 주었는데 이는 효과적인 투여기간, 복용량도 다를 수 있고 동물실험과 달리 식이, 운동, 습관, 스트레스, 등 아주 복잡한 변수에 영향을 받는 사람을 대상으로 하는 임상시험에서 일관성 있는 자료를 얻기에는 어려움이 따른다. 복용기간 및 용량 등에 관한 예비 자료와 충분한 통계적인 대상자 수 등을 고려하여야 하고, 경증 및 증등증의 고콜레스테롤 대상자로 평균 220 mg/dl 정도여서 임상적으로 약물 처치보단 운동 요법과 식이 개선 등으로도 충분히 개선 될 수 있는 대상자로 판단되며, 경증보다는 즉각적인 약물치료가 필요 없다고 판단되는 증등증 이상의 대상자를 대상으로 연구가 진행이 된다면 더 좋은 결과가 기대 될 것으로 생각된다. 따라서 아래의 사항을 고려하여 인체적용시험 재추진 전략을 수립하여야 할 것으로 생각된다.

- 시험대상 인원 확대
- 대상자 선별시 혈중 콜레스테롤 함량이 고지혈증 판정에 근접한 수치를 보이는 증등증 이상의 대상자를 대상으로 연구 수행
- 투여기간을 16주 이상으로 설정
- 투여량의 증가

나. 혈중 지질 개선에 대한 인체적용시험 재추진 및 혈행개선 인체적용시험 실시 전략

- 인체적용시험을 지원하는 국가 연구과제 수행을 추진
- 기능성 건강식품을 개발하고자 하는 제약회사 및 식품회사와 공동 연구를 추진

6. 기능성물질 함유 추출물을 이용한 건강기능식품 개발

가. 원료 타당성 검토 및 원료에 대한 시제품 제조

- (1) 대량생산에 따른 제조기록서
- (2) 품생산에 따른 제품 성적서


제 품 시 험 성 적 서

Certificate of Analysis

품 명 상지추출물
제 조 번 호 MAX-15-M001
제 조 일 자 2015.03.25
유 효 기 한 2017.03.24
제 조 단 위 4.8kg
규 격 별규
보 관 조 건 실온

시 험 항 목	시 험 기 준	시 험 결 과
성 상	연한 갈색 ~ 갈색의 가루	연한 갈색의 가루
확 인 시 험		
1) HPLC	검액에서 얻은 주피크이 유지시간은 표준액에서 얻은 주피크의 유지시간과 동일하다.	적합
순 도 시 험		
1) 중금속		
가) 납	5ppm 이하	5ppm 이하
나) 비소	3ppm 이하	3ppm 이하
다) 수은	0.2ppm 이하	0.2ppm 이하
라) 카드뮴	0.3ppm 이하	0.3ppm 이하
2) 잔 류 농 약 시 험	총 DDT : 0.1 ppm 이하	불검출
	디엘드린 : 0.01 ppm 이하	불검출
	총 BHC : 0.2 ppm 이하	불검출
	알드린 : 0.01 ppm 이하	불검출
	엔도설판 : 0.2ppm 이하	불검출
	엔드린 : 0.01 ppm 이하	불검출
3) 이산화황	30ppm 이하	30ppm 이하
정량	1.92 ~ 2.88%	2.39%

시험책임자
판정자


 P. Y. SOH

판정일자 :

2015.03.29

제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제 1절 목표달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
상지 내의 유효물질 조사 및 지표물질 선정	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 유효성분 및 지표물질로 oxyresveratrol을 선정
지표물질 분리 정제 및 표준품 제조	5	100	<ul style="list-style-type: none"> 유효성분 순도 90% 이상의 oxyresveratrol 표준품 제조 완료
복합 기능성 평가	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 목표의 기능성(항산화, 혈행개선, 콜레스테롤 개선, 면역 증진, 혈당 강하) 외에 추가로 2건(지방세포 분화 억제제로 비만 예방, 수명연장 효과)의 기능성 평가 및 효과 입증
기능성 물질의 기준 및 시험 방법 확립	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 식약처 기준의 기준 및 시험법 작성 완료
추출물 제조공정의 최적화 및 대량 생산 공정 확립	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 원료 선정 및 대량 생산 공정을 확립하여 이 공정을 통해 인체적용시료 제조함.
원료의 안전성시험	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 세포 독성, 단회투여 독성, 혈액학적 검사, 이화학적 변화에 따른 세포 독성 및 중금속, 잔류농약 등의 검사를 통해 안전성 확인
원료의 안정성시험	5	100	<ul style="list-style-type: none"> 온도, 빛, 보존용매 등 유효성분에 영향을 줄 수 있는 조건에서도 안정성이 우수한 것으로 확인됨.
개별인정 신청을 위한 자료 확보	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 신청 서류작성 완료
시제품 제조	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 제품생산을 위한 제품 성적서 작성 완료하고 GMP 시설에서 임상시험용 시제품제조
콜레스테롤 개선 관련 인체적용시험	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험이 양지병원 연구진에 의해 수행 완료됨
합계	100점	100	

제 2절 관련분야 기여도

- 뽕나무에 대한 연구는 주로 상백피, 오디, 뽕잎 등에 한정되어 있었으며 상지는 활용가치가 낮은 것으로 생각되어 연구가 미흡하였으나 본 연구 결과 상지에 유효성분인 oxyresveratrol이 상백피, 오디, 뽕잎에 비해 다량 함유되어 있음을 밝히고 이를 활용한 건강증진 기능성에 대한 효과를 검증하였으므로 상지의 고부가가치화에 따라 경제성이 향상되는 결과를 얻었으며 유효성분인 oxyresveratrol의 기능성에 대해 과학적인 검증을 하였으므로 이와 관련된 연구에 파급효과는 클 것으로 생각됨.
- 후숙과정 및 미생물에 의한 유효성분 함량 증가 방법 개발은 유사 기능성 성분을 이용한 유사 연구에 적용될 수 있는 유용한 기술임
- 복합 기능성 식품개발에 활용될 경우 복합질환을 보유한 고령자의 질병예방 및 치료 보조에 이용되어 의료비 절감 및 사회적 비용 절감 효과를 얻을 수 있어 의료분야에 기여도가 클 것으로 생각됨.
- 더 나아가 oxyresveratrol을 다량으로 함유하고 있는 안전성이 확보된 천연물탐색을 통한 고부가가치화 연구로 확대될 수 있어 천연물로부터 새로운 기능성 물질 탐색 분야에 기여함.
- 국내 뽕나무 생산 대단지가 전국에 걸쳐 조성되어 있으며 상지는 매년 2~3회에 걸쳐 가지치기를 하여 원료 조달이 가능하므로 원료 수급이 용이하여 나고야의정서 발효와 관계없이 국내에서 저렴한 가격으로 수급이 가능한 원료를 활용하여 복합 기능성 건강식품 개발 및 산업화에 활용이 가능하므로 관련 산업분야에 기여도가 큼.
- 유효성분을 다량 함유한 추출물을 대량생산할 수 있는 제조공정의 최적화 및 대량 생산 공정 확립으로 유사 연구에 적용 가능
- 복합 기능성(항산화, 혈중 지질 개선, 혈행개선, 장관면역기능 및 혈당강하)에 대한 효과 검증을 통해 복합 기능성의 건강 기능식품 제조 산업화를 위한 기반 마련하여 관련 산업분야 발전에 기여함

제 5장 연구결과의 활용계획

- 혈행개선에 대한 인체적용시험을 수행하여 결과를 바탕으로 혈행개선 개별인정형 건강식품 개발 및 산업화에 활용
- 항산화 효과에 대한 인체적용시험을 수행하여 결과를 바탕으로 항산화기능 개별인정형 건강식품 개발 및 산업화에 활용
- 장관면역 증진 효과의 구체적인 기전을 규명하는 연구를 계속하는데 본 연구결과를 활용
- 본 연구에서 검증된 기능성 성분을 기능성 식품 원료 및 의약품 보조제 물질로 개발 및 산업화하기 위해 기술 이전 추진
- 유효성분인 oxyresveratrol을 함유한 천연기능성 원료 탐색 연구에 활용하여 새로운 기능성 소재 발굴에 기여
- 연구결과의 학술논문 발표 및 지적재산권 확보 등에 활용함

제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 프랑스의 Bordeaux Segalen 대학과 토고의 Lome 대학 연구팀은 에탄올 추출한 *Bridelia ferruginea* Benth의 뿌리를 경구투여시 동물에서 독성을 나타내는지에 관해 실험하였다. 마우스와 랫은 각 250, 500 and 1000 mg/kg/day의 추출물을 섭취하였으며, 실험 결과 추출물은 동물에게 조직 무게, 혈액 분석, 조직학적 변화 등의 영향을 미치지 않음이 확인되었다(18).
2. 인도의 Mysore 대학 연구팀은 메탄올, 아세톤, 물에서 추출한 mulberry (*Morus indica* L.) 잎의 항산화 효능에 대하여 연구하였다. 메탄올에서 추출한 mulberry 잎에서 총 페놀 함량이 가장 높게 나타났으며, 시료의 항산화 능력은 50까지 유지되었고, 중성 pH에서 가장 높은 항산화능을 보였다(19).
3. 터키의 Ataturk 대학 연구팀은 터키 동부에서 생산된 white (*Morus alba* L.), red (*Morus rubra* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits의 화학적 조성에 관하여 연구하였다. 세 가지 mulberry를 비교한 결과, black mulberry에서 총 페놀 함량이 가장 높았으며, white mulberry는 가장 높은 지방 함량을 보였다.mulberry 열매의 지

방은 linoleic산이 가장 많았으며, 그 다음으로 palmitic산, oleic산이 높은 비중을 차지하였다(20).

4. 이탈리아 ISTM의 연구팀은 포도, 땅콩, 와인에서 발견되는 Resveratrol의 심혈관계 보호 효과에 관해 연구하였다. 세포 실험과 동물실험 결과, resveratrol은 혈관 세포의 기능을 증진시켰고, 혈소판 응집을 막았으며 허혈성 재관류 모델에서 심근의 손상을 막은 것이 확인되었다. 본 연구에서는 resveratrol의 심혈관 보호 효과에 관한 생물학적 이용 가능성과 인체 내에서도 적용 가능한지 연구가 더 필요할 것이라고 언급하였다(21).
5. 중국 Chang Gung 의과대학 연구팀은 resveratrol이 1형 당뇨병 동물 모델에서 간과 비장의 산화 스트레스와 염증 반응에 미치는 효과에 관하여 연구하였다. 연구 결과, resveratrol은 당뇨병 동물 모델의 간과 비장의 산화 스트레스를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 하지만 proinflammatory와 관련된 염증 인자들의 발현이 당뇨병 동물 모델의 비장에서는 감소하지 않았음을 확인하였다(22).
6. 독일의 Otto-von-Guericke 대학 연구팀은 oxyresveratrol이 뇌졸중 후 뇌의 손상을 보호해주는지에 관해 연구하였다. 중대뇌동맥 폐색 동물 모델에 oxyresveratrol을 투여한 결과, 뇌경색이 대략 54%, 63% 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 급성 뇌 허혈성 질환에서 oxyresveratrol을 이용한 치료 가능성에 관해 언급하였다(23).
7. 중국의 Zhejiang 대학 연구팀은 *Ramulus mori*에서 추출한 oxyresveratrol과 *cis*-mulberroside A이 에탄올로 손상된 간에 미치는 영향에 관하여 연구를 수행하였다. 에탄올로 독성이 유도되기 전, 두 물질을 처리한 동물 군에서는 에탄올로 유도된 간 손상이 줄어든 것을 확인하였다(24).
8. 캐나다의 Simon fraser 대학과 태국의 Chulalongkorn 대학 연구팀은 파이토알렉신의 일종인 resveratrol(1), oxyresveratrol(2), curcumin(3)의 항산화능에 대해 연구하였다. 연구 결과, 1, 2 모두 항산화 능력이 좋았으며, resveratrol보다는 oxyresveratrol이 curcumin과 함께 처리했을 때 synergy 효과가 좋았음이 보고되었다(25).

제 7장 연구개발결과의 보안등급

○ 해당사항 없음

제 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		
	해당사항 없음							

제 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

제 1절 실험실 안전 관리 현황

- 고려대학교 분자미생물화학연구실에는 고려대학교의 연구실안전관리위원회 운영규정 및 안전관리규정에 의하여 연구실이 운영되고 있으며, 일일 점검을 통한 안전관리 일지를 작성하고 주기적으로 안전 교육을 이수하고 있음.

가. 실험실 안전 점검

연구(실험, 실습)실 일일안전점검 체크리스트		안전담당		책임자																														
실험실명: 분자미생물화학연구실		작성방법: 양호 O, 불량 X, 해당없음 -		확인	자인																													
7월		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
구분	안전점검 항목																																	
일반 안전	1) 연구실험실 내부의 청결상태 및 청소상태와 환기는 양호한가?	O																																
	2) 개인 안전보호구 관리 및 상황에 맞는 보호구를 준비 / 착용하였는가?	O																																
	3) 연구실험실 안전수칙 및 비상 연락망(비상조치계획) 등을 게시하였는가?	O																																
화재 안전	1) 화재취약요소, 특별안전점검 지정된 장소에 화재예방 방안 및 경각 상태는 양호한가?	O																																
	2) 화재 발생 시 대피 및 화재 예방 요건과 화재를 초기적으로 진압을 하고 있는가?	O																																
전기 안전	1) 콘센트 및 전선배선 상태와 접지(아이스) 보는 콘센트 관리 상태를 확인하였는가?	O																																
	2) 공터방의 배선 및 비더 노출 배선 장의 상태는 양호한가?	O																																
기계안전	1) 연구실험실의 배선상태 및 안전구획 / 안전표지 / 전선누설 등을 비치하였는가?	O																																
	2) 고압용기 보관상태 (보호 덮, 안전표지장치, 압력계사, 미 검사 용기 등)을 안전 점검을 하였는가?	O																																
가스 안전	1) 사용 전 가스누출 확인 및 경보장치 작동상태 등 안전점검을 실시하였는가?	O																																
	2) 소화기 설치와 직용압, 위시표지, 충전압력 등 관리 상태는 양호한가?	O																																
소방 안전	1) 소화기는 모두 개량되었고, 비누용액(세) 90cm 이상은 확보되어 있는가?	O																																
	2) 개인보호를 위한 비상사태대피장치 및 세척장치는 정상 작동하는가?	O																																
위생 안전	1) 연구실험실내 및 냉장고에 음식물이나 음료의 반입 및 섭취가 금지되고 있는가?	O																																
	2) 방한성 미생물(생물학) 취급표지 및 보존처리 상태는 양호한가?	O																																
생물 (배기물) 안전	1) 방한성 미생물(생물학) 취급표지 및 보존처리 상태는 양호한가?	O																																
	2) 방한성 미생물(생물학) 취급표지 및 보존처리 상태는 양호한가?	O																																
부재항																																		

실험실 일일안전점검표 (일부)

- 일상안전점검 : 연구활동 종사자 매일 점검
- 정기안전점검 : 연 1회, 4~5월 실시(유자격자 또는 업체 위탁점검)
 - (가) 연구실 일반관리, 소방, 기계, 산업위생, 화학약품, 생물, 전기, 가스
- 특별안전점검 : 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우 실시

나. 실험실 안전교육 및 안전관리 규정

(1) 실험실 안전교육

- (가) 교육대상자 : 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구원)
- (나) 온라인 안전교육 : 전반기 6시간, 후반기 6시간
- (다) 자체교육 : 실험·실습 수업 전 5분 자체 안전교육실시(지도교수 또는 조교의 지도하에 당해 실험 주의사항)
- (라) 온라인교육 이수 홈페이지 : <http://kusafe.korea.ac.kr> (365일 교육수강 접속 가능)

(2) 상해보험 가입

(가) 대상: 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)

(나) 보상기준 및 내용

구 분		내 용
보상 기준		-연구실에서 발생한 사고로 연구활동종사자가 부상, 질병, 신체장해, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상
보상 내용	사망	1인당 1억 원
	후유 장애	1억 원을 한도로 후유장애등급별 정액 보상
	상해 의료비	1천만 원 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상

(3) 건강검진

(가) 대상 : 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)

(나) 시행 : 매년 3~4월, 교내에서 지정한 장소(2곳)

◇ 교육영상 분류(풀에서 원하는 동영상 취사선택 / 지속 업데이트)
▪ 기계분야(9개) ▪ 전기분야(11개) ▪ 화공분야(36개) ▪ 소방분야(8개) ▪ 가스분야(2개) ▪ 보건(위생)분야(5개) ▪ 생물분야(5개) ▪ 생활안전(43개) ▪ 기타분야(5개)



고려대학교

수신 수신 증명
(경유)

제목 보건의료대학 2016년도 2학기 연구실 온라인 안전교육 실시 안내

1. 연구실 안전점검 조성이 끝난 보건의료대학(교과, 학과 등)에 요거하여 보내 연구실 안전사고 예방 및 안전의식 제고를 위하여 온라인 안전교육을 실시합니다.
2. 본 교육은 보건의료대학을 반드시 교육할 이수하여야 하며, 교육 이수 현황은 안전사고 발생 시 조사가 가능하고 사고처리에 중요한 자료이므로 학부(과)에서는 모든 연구실 동종사자들에 대하여 안전교육 이수할 수 있도록 협조 바랍니다.

- 아 래 -

- 가. 교육 대상: 과학기술 분야 연구실동종사자 (박사생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 나. 교육 일정: 2016년 10월 1일 ~ 2016년 12월 31일
- 다. 교육 방법: <http://www.asfky.edu.org/>(안전교육센터) 접속 → 로그인 → 필수 2차시 + 선택 4차시 수강 → 평가(60점 이상 수료) → 이수증 출력
- 라. 기 타: 모바일(iOS 및 Android) 수강 가능.

- 붙임: 1. 연구실 안전교육 관련 사용자 매뉴얼 1부
- 2. 교육 현안문 첨부내역 1부, 끝.



보건의료대학장

수신	각 학부장 및 학과장, 대학원장, 연구원
발신부서	연구실 안전교육센터 사용자매뉴얼 - pdf, 교육 관련문 첨부내역.hwp
담당	09.20 박승이 / 과장 09.21 홍석정 / 부장 09.21 이근환 / 부장 09.21 고영학
작성	전달 09.21 김인환
시정	보건의료대학자치동부-0919 (2016.09.21) / 02841 서울특별시 송파구 인창로 145 고려대학교 / 전화 02-3290-5614 / 팩스 02-921-7448
주소	주소 / http://www.korea.ac.kr / jeeve0112@korea.ac.kr / 글개

실험실 안전교육 공문 및 안전관리 규정

연구실 안전관리 규정

2006. 4. 1 제정 2008. 4. 1 개정
2009. 4. 1 개정 2010. 4. 1 개정
2014. 11. 24 개정 2015. 7. 1 일부개정
<사전에 개정됨>

제 1 장 총 칙

- 제 1 조 (목적) 이 규정은 고려대학교 안암캠퍼스(이하 "본교"라 한다)의 연구(실)실(이하 "연구실"이라 한다) 안전관리에 관한 기준을 확립하여 사고 또는 재해를 미연에 방지하고, 적절한 처리를 함으로써 인명피해 예방을 보호·보존함을 목적으로 한다.
- 제 2 조 (적용범위) 이 규정은 본교의 연구 활동 종사자·교직원·학생 또는 당해 연구실 등에 출입하는 모든 사람에게 적용된다.
- 제 3 조 (용어의 정의) 이 규정에서 사용되는 용어의 정의는 다음과 같다.
1. "연구실"이라 함은 대학·연구기관 등의 과학기술분야 연구개발 활동을 위하여 설치된 시설·장비·연구(실)실·연구재료 등 연구시설을 말한다.
 2. "연구실의 장"이라 함은 대학·연구기관 등의 대표자 또는 해당 연구실의 소속자를 말한다.
 3. "연구실 책임자"라 함은 당해 연구실에서 연구업무 및 연구활동종사자를 직접 지휘·감독하는 권한을 가진 자를 말한다.
 4. "안전보건관리자"라 함은 연구실 안전에 관한 기술적인 사항에 대하여 연구실 책임자를 보좌하고 연구활동종사자에게 지도 및 조언을 하는 자를 말한다.
 5. "연구활동종사자"라 함은 대학·연구기관 등에서 과학기술분야 연구개발활동에 종사하는 교원·교직원·연구원·대학원생·대학원생 및 연구보조원 등을 말한다.
 6. "위험물안전관리자"란 위험물 안전관리를 위하여 선임된 자를 말하며 "위험물 안전관리보조자(경부)"란 위험물안전관리자의 감독 산하 시 그 직무의 대리자를 말하고, "구역관리책임자"란 보안업무규정 제26조에 지명된 자를 말한다.
 7. "안전관리"라 함은 연구실에서 발생할 수 있는 화재·가스폭발·화학물질·일명폐기물·방사능·비정물 누출 및 안전관리에 관한 제반사항으로 인명피해 예방과 재산상의 피해를 예방하는 일련의 조치를 말한다.
 8. "안전점검"이라 함은 결함의 기술을 갖춘 자가 육안 또는 점검기구 등에 의하여 안전을 확보하기 위해 상태를 명확히 파악하는 것으로서, 연구실에 내재되어 있는 위험요인을 사전에 발견하거나 안전상태를 조사하는 행위를 말한다.
 9. "정밀안전진단"이라 함은 연구실에서 발생할 수 있는 재해를 예방하기 위하여 상세적 위험성평가, 안전화 그 개선대책의 수립을 목적으로 대동영역이 설정하는 기준 또는 자격을 갖춘 자가 실시하는 조사·평가를 말한다.
 10. "보호구"라 함은 사고방지 및 외부의 유해한 자극을 차단하거나 그 영향을 감소시키려는 목적을 가지고, 신체 일부 또는 전체에 장착하여 사용하는 2차적인 안전장비를 말한다.
 11. "안전보건표지·표어·로스터"라 함은 연구실내 위험시설·기구·장비·위험물질·위험 물질에 대한 경고나 안내사항 또는 안전처치를 고취하기 위해 표시된 그림·기호·문자를 포함한 형태를 말한다.
 12. "사고"라 함은 연구활동종사자가 업무에 관계되는 화재·가스·중기·분



실험실 안전교육 이수증명서 (일부)

제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기 타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Antihyperlipidaemic effects of oxyresveratrol-containing Ramulus mori ethanol extract in rats fed a high-cholesterol diet	고려대학교 산학협력단	교신저자	Journal of Functional Foods	3.973	2015.12.10	사사첨부	SCI
2	논문	An ethanol extract of Ramulus mori improves blood circulation by inhibiting platelet aggregation.	고려대학교 산학협력단	교신저자	Bioscience, Biotechnology, Biochemistry	1.176	2016.02.13	사사첨부	SCI
3	논문	Conditioned medium from LS 174T goblet cells treated with oxyresveratrol strengthens tight junctions in Caco-2 cells.	고려대학교 산학협력단	교신저자	Biomedicine & Pharmacotherapy	2.326	2017.1.	사사첨부	SCI
4	특허	혈전성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물 및 혈전 생성 억제제	고려대학교 산학협력단		대한민국		2015.09.08. (출원년도)	사사첨부	
5	특허	거품세포(foam cell) 형성 억제 및 혈관 병변형성 억제 활성을 가지는 상지 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	고려대학교 산학협력단		대한민국		2016.08.01. (등록)	사사첨부	

제 11장 기타사항

- 해당사항 없음

제 12장 참고문헌

- (1) Chen YC, Tien YJ, Chen CH, Francesca NB, Evangeline CA, Wang RJ, Wu DJ, Clément M, Lin YL and Yang WC. Morus alba and active compound oxyresveratrol exert anti-inflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving MEK/ERK signaling. BMC Complement Altern. Med. 13, 45. 2013.
- (2) Naima S, Muhammad RK and Maria S. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. BMC Complement Altern. Med. 12, 221. 2012
- (3) Mari'a INM, Mari'a II, Antonio RS and Marta AV. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71, 109-114. 2000.
- (4) Kamran G, Yousef G, Abdollah E, Seyed MN, Seyed FN, Mohammad AE and Fereshteh P. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. J. Med. Plant. Res. 5, 1128-1133. 2011.
- (5) Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y and Catherine RE. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26, 1231-1237. 1999.
- (6) Sean PG and Ranjeet B. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302, 201-211. 2004.
- (7) Sulston, J. & J. Hodgkin, (1988) Methods in The Nematode *Caenorhabditis elegans* (Wood, WB, ed.) pp. 587-606. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- (8) Gruber, J., L.F. Ng, S.K. Poovathingal & B. Halliwell, (2009) Deceptively simple but simply deceptive--*Caenorhabditis elegans* lifespan studies: considerations for aging and antioxidant effects. *FEBS letters* 583: 3377-3387.
- (9) Wu, D., S.L. Rea, A.I. Yashin & T.E. Johnson, (2006) Visualizing hidden heterogeneity in isogenic populations of *C. elegans*. *Experimental gerontology* 41: 261-270.
- (10) Burdine, R.D. & M.J. Stern, (1996) Easy RNA isolation from *C. elegans*: a TRIZOL based method. *Worm Breed. Gaz* 14.
- (11) Carmichael J., Degraff WG., Gazdar AF., Minna JD., Mitchell JB., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
- (12) Carmichael J., Degraff WG., Gazdar AF., Minna JD., Mitchell JB., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
- (13) Boue SM, Shih BY, Burow ME, Eggleston G, Lingle S, Pan YB, Daigle K, Bhatnagar D. (2013) Postharvest accumulation of resveratrol and piceatannol in sugarcane with enhanced antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61, 8412-8419.
- (14) Pullinger, C.R., Eng, C., Salen, G., Shefer, S., Batta, A.K., Erickson, S.K., Verhagen, A., Rivera, C.R., Mulvihill, S.J., Malloy, M.J., *et al.* (2002). Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*

- (15) Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009 Apr; 16(2): 163 - 171, Biochemistry of atherosclerosis edited by S.K Cheema, springer,, New York,2006, 23-38
- (16) Ferrell, J.M., Boehme, S., Li, F., and Chiang, J.Y. (2016). Cholesterol 7alpha-hydroxylase-deficient mice are protected from high-fat/high-cholesterol diet-induced metabolic disorders. Journal of lipid research 57, 1144-1154.
- (17) Rousset, X., Vaisman, B., Amar, M., Sethi, A.A., and Remaley, A.T. (2009). Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 16, 163-171.
- (18) Bakoma Bl, Berké B, Eklú-Gadegbeku K, Agbonon A, Aklikokou K, Gbeassor M, Creppy EE, Moore N. Acute and sub-chronic (28days) oral toxicity evaluation of hydroethanolic extract of *Bridelia ferruginea* Benth root bark in male rodent animals. Food Chem Toxicol. 52:176-179 (2013)
- (19) Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007) Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* 102(4), 1233-1240.
- (20) Ercisli, S. and Orhan, E. (2007) Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem.* 103(4), 1380-1384.
- (21) Bradamante, S., Barengi, L. and Villa, A. (2004) Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.* 22(3), 169-188.
- (22) Chang, C. C., Chang, C. Y., Huang, J. P. and Hung, L. M. (2012) Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chin. J. Physiol.* 55(3), 192-201.
- (23) Andrabi, S.A., Spina, M.G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G., and Horn, T.F. (2004). Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain research* 1017, 98-107.
- (24) Zhang, Z., Jin, J., and Shi, L. (2008). Protective function of cis-mulberroside A and oxyresveratrol from *Ramulus mori* against ethanol-induced hepatic damage. *Environmental toxicology and pharmacology* 26, 325-330.
- (25) Aftab, N., Likhitwitayawuid, K., and Vieira, A. (2010). Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Natural product research* 24, 1726-1733.

참여연구원 명단

연구기관	연구책임자	참여연구원
고려대학교	임영희	황다현, 심인숙, 조성필, 이지윤, 황선옥, 권가영, 조현아, 박지은, 마성호, 염지아
한국산업기술대학교	김정근	김기현, 김준호, 이민영
한국식품연구원	김인호	한대석, 이창호, 김영언, 엄민영, 정민유, 한태원
(주)국전약품	윤치홍	김승한, 석진호, 박혜란, 김윤미, 이수연, 이진구, 김은정
(주)파마크로	김남식	