

11-1543000
-
001875-01

발간등록번호

11-1543000-001875-01

산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의
기억력 개선 건강기능식품 개발

2017

농림축산식품부

고부가가치식품개발사업 R&D Report

산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의 기억력 개선 건강기능식품개발 최종보고서

2017. 11. 06.

주관연구기관 / 대화제약(주)

협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의 기억력 개선 건강기능 식품 개발”(개발기간 : 2013. 07. 16 ~ 2017. 07. 15)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 11. 06.

주관연구기관명 : 대화제약(주) (대표자) 노병태, 김은석

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 홍 충 선

참여기관명 : 대화제약(주) (대표자) 노병태, 김은석

주관연구책임자 : 정 인 호

협동연구책임자 : 장 대 식

참여기관책임자 : 정 인 호

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

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	113036-4	해 당 단 계 연구 기 간	2013.07.16.~ 2017.07.15	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발			
연구과제명	대 과 제 명	산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의 기억력 개선 건강기능식품 개발			
	제 1세부	산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의 기억력 개선 건강기능식품 개발			
	제 1협동	산조인 유효성분을 함유한 고령사회 대비 성인의 기억력 개선 건강기능식품 개발			
연구책임자	정 인 호	해당단계 참 여 연구원 수	총: 42명 내부: 42명 외부: 명	해당단계 연구 개발비	정부:800,000천원 민간:533,600천원 계:1,333,600천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 42명 내부: 42명 외부: 명	총 연구개 발비	정부:800,000천원 민간:533,600천원 계:1,333,600천원
연구기관명 및 소속부서명	대화제약(주) 연구소			대화제약(주)	
협 동 연 구	연구기관명: 경희대학교			연구책임자: 장대식	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 과제는 천연물 소재를 이용하여 기억력 개선 건강기능식품개발을 위한 연구를 진행하였으며, 후보물질에 대해 기억력 감퇴 모델에서 인지기능 개선에 대한 효능연구를 통해 최종 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)을 도출함 ○ 원생약 함유성분의 분리/구조동정을 수행하였고, 다양한 모델로부터 뇌신경세포 보호와 인지능력 개선에 관한 활성의 작용기전을 규명하였으며, DHP1402의 장기간 반복 경구투여 독성시험을 통해 안전성을 확보함 ○ 효능 및 독성시험을 근거로 인체적용시험의 용량을 설정하고 DHP1402의 경도인지장애 대상자에서 인지기능개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위해 24주간 인체적용시험을 완료하였음 ○ 원생약의 표준화 및 품질관리를 위한 성분프로파일 분석법과 종 구분을 위한 DNA 유전자 분석법을 개발하였으며, 원료와 인체적용 시제품에 대해 기준 규격을 설정하고 24개월간의 안정성을 확보함 ○ 본 연구에 대한 지식재산권 8건 출원 중/1건 등록을 완료 및 6편의 SCI급 학술지에 등재 및 3편의 국내·외 학술대회 발표를 통해 과학적이고 객관적인 연구결과를 입증함 				<p>보고서 면수: 252</p>	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>본 과제에서는 천연물 소재를 이용하여 다양한 기억력 감퇴모델에서 기억력 개선 효능을 평가하였으며, 유효성과 안전성이 확보된 소재를 이용한 기억력개선 건강기능식품을 개발을 위해 다음과 같은 연구를 진행함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 원료 규격 확립 및 대량생산 제조공정 확립 <input type="checkbox"/> 유효 활성물질 분리 <input type="checkbox"/> 다양한 기억력 감퇴모델을 통한 최종 후보물질 도출 <input type="checkbox"/> 유효 활성성분 탐색 및 기억력 개선 활성에 대한 기전연구 <input type="checkbox"/> 후보물질에 대한 독성연구 <input type="checkbox"/> 제제화 연구 및 시제품 안정성 시험 <input type="checkbox"/> 유효성 및 안전성 평가를 위한 24주간 인체적용시험 <input type="checkbox"/> 기능성원료 인정 및 건강기능식품 인정을 위한 자료 확보 <input type="checkbox"/> 제품 개발 및 상용화를 위한 시제품 개발 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 산조인 양유근 원생약 표준화를 위한 HPLC 패턴 분석법 및 종 구분을 위한 DNA 분자표지법 개발 <input type="checkbox"/> 산조인 양유근 함유성분 15종의 성분 분리 및 구조동정과 지표성분 스피노신, 로베티올린 분석법 확립 <input type="checkbox"/> 기억력 감퇴 <i>in vivo</i> 모델, <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> 효능연구를 통한 최종 후보물질 DHP1402 도출 <input type="checkbox"/> 원료의 물리적, 화학적 특성 연구 및 첨가제와의 적합성 평가를 통한 제제연구 <input type="checkbox"/> 완제 생산을 위한 제조공정 확립과 인체적용시험용 시제품 생산 및 24개월 안정성 확보 <input type="checkbox"/> 유효활성성분 Spinosin에 대한 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>, <i>ex vivo</i> 모델을 이용하여 기억력 개선에 대한 효능 평가 <input type="checkbox"/> 유효활성성분 Spinosin의 기억력 개선 효능 작용기전 규명 <input type="checkbox"/> 복귀돌연변이 시험, 설치류 단회 및 반복경구투여 독성시험을 통한 안전성 확보 <input type="checkbox"/> 경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능개선 등 기능성 및 안전성 평가에 대한 24주간 인체적용시험 완료 <input type="checkbox"/> 기능성원료 개별인정 신청을 위한 자료 확보 <input type="checkbox"/> 건강기능식품 제품개발을 위한 시제품 개발 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 기억력 개선 효능의 생물학적 활성검증 체계 마련 <input type="checkbox"/> 효능 검색 모델 및 평가법 제시 <input type="checkbox"/> 산조인 유효 활성성분을 포함한 인지능 및 기억력 개선 건강기능식품 개발 <input type="checkbox"/> 활성성분의 기억력 개선 기전 연구를 통한 추가 제품 개발 모색 <input type="checkbox"/> 농작물을 이용한 제품개발로 농가소득 증대 및 지역경제 활성화 					
중심어 (5개 이내)	건강기능식품	산조인	양유근	기억력	스피노신	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>This research was performed to develop a functional food contained cognitive enhancement using natural product which is established efficacy and safety through various memory impairment experimental models.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Establishment of standard for raw material and the mass-up manufacturing process <input type="checkbox"/> Isolation of the active component <input type="checkbox"/> Deduction of final candidate using various memory impairment experimental models <input type="checkbox"/> Searching of an active component and investigation of attenuating mechanism on memory impairment <input type="checkbox"/> Toxicity test of DHP1402 <input type="checkbox"/> Formulation study and stability test for the experimental product <input type="checkbox"/> Clinical trial for the evaluation of the efficacy and safety <input type="checkbox"/> Approval of functional ingredients and secure the data for approval of functional ingredients <input type="checkbox"/> Manufacturing of the experimental product for development of health functional food and commercialization 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Development of the analytical method using HPLC for standardization of <i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> and <i>Codonopsis lanceolata</i> and DNA molecular biomarker for classification of species <input type="checkbox"/> Isolation of 15 compounds from raw materials. Establishment of optimization analytical condition using HPLC for markers (spinosin and lobetyolin). <input type="checkbox"/> Elicitation of DHP1402, final candidate, using scopolamine or amyloid beta treated memory impairment <i>in vivo</i> model, <i>in vitro</i> or <i>ex vivo</i> tasks <input type="checkbox"/> Study for the chemical and physical properties and formulation study through the suitability evaluation of additives <input type="checkbox"/> Establishment of the manufacturing process for final product, production of the experimental product for clinical trial, and securement the stability for 24 months <input type="checkbox"/> Evaluation of attenuating effects of spinosin using <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, and <i>ex vivo</i> tasks <input type="checkbox"/> Investigation of attenuating mechanism of spinosin on memory impairment <input type="checkbox"/> Securement the safety through reverse mutation assay and the single dose oral and repeated dose oral toxicity study in rodents <input type="checkbox"/> Completion of clinical trial of the efficacy and safety in the mild cognitive impairment subjects for 24 weeks <input type="checkbox"/> Securement the data for approval of functional ingredients <input type="checkbox"/> Development of the experimental product for health functional food 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Establishment of the bio-active evaluation system for memory-enhancing effect <input type="checkbox"/> Suggestion of screening model and evaluation method for memory-enhancing effect <input type="checkbox"/> Development of health functional food including active component of <i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> for attenuation of cognitive deficit <input type="checkbox"/> Investigation of additional products through investigation of attenuating mechanism of active component on memory impairment <input type="checkbox"/> Raising farm income and regional economy activation through development of product using crops 				
Keywords	Health functional foods	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Memory	Spinosin

6. 영문 목차

< **CONTENTS** >

1. Introduction	7
2. Current status of domestic and international R&D	28
3. Contents and results of R&D	34
4. Achievement and contribution in the related field	230
5. Application plan of R&D results	239
6. References of scientific and technology in abroad	240
7. Security level of R&D accomplishment	240
8. Laboratory facility and equipment status registered in NTIS	240
9. Compliance with safety instructions of the laboratory	241
10. Representative accomplishments	247
11. Additional issues	250
12. References	251

<Attachment> Self-evaluation report

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	28
3. 연구수행 내용 및 결과	34
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	230
5. 연구결과의 활용계획 등	239
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	240
7. 연구개발성과의 보안등급	240
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	240
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	241
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	247
11. 기타사항	250
12. 참고문헌	251

<별첨> 자체평가의견서

1장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제1절 연구개발의 목적

현대사회는 의학의 발전과 과학기술의 발달로 인해 인간의 수명이 증가되고 있으며 인지기능과 기억력은 고령화된 사회에서 중요한 관심 대상이 되고 있음, 특히 노인성 질환 중 관심이 집중되고 있는 치매는 다양한 원인에 의해 뇌기능이 손상되어 기억력, 언어 능력, 판단력, 사고력 등의 지적 기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 나타나는 장애로 특징되며, 기억력과 인지기능의 감퇴현상은 치매 질환의 일차적인 증상과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있음

현재 개발되어 치매 치료에 사용되고 있는 치료제는 병의 진행 속도를 늦출 뿐 완치는 어려운 상황이며, 메스꺼움, 구토, 설사, 서맥, 식욕감퇴, 어지럼증, 수면장애 등의 부작용을 동반함. 이러한 이유로 치매의 예방과 근본적으로 치료할 수 있는 새로운 치료제 개발이 시급히 요구되고 있음

본 과제에서는 천연물 소재를 이용하여 기억력 개선에 대한 다양한 모델을 통해 유효성과 안전성이 확보된 인지기능개선 및 기억력 개선 건강기능식품을 개발을 위해 다음과 같은 연구를 진행함

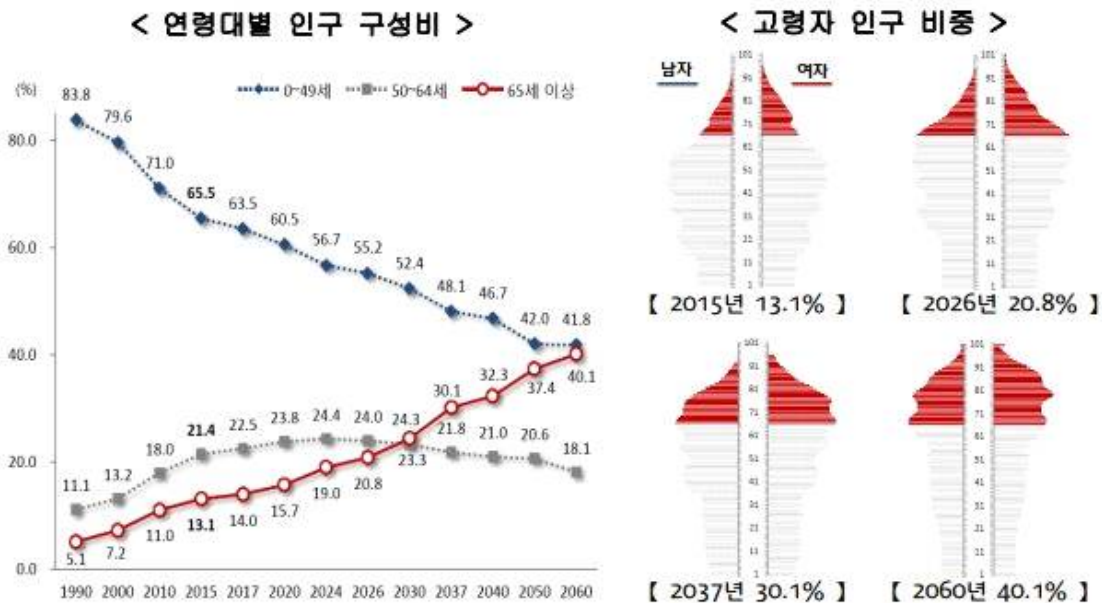
- 원료 규격 확립 및 대량생산 제조공정 확립
- 유효 활성물질 분리 및 분석
- 다양한 기억력 감퇴모델을 통한 최종 후보물질 도출
- 유효 활성성분 탐색 및 기억력 개선 활성에 대한 기전연구
- 후보물질에 대한 독성연구
- 제제화 연구 및 시제품 안정성 시험
- 유효성 및 안전성 평가를 위한 인체적용시험
- 기능성원료 인정 및 건강기능식품 인정을 위한 자료 확보
- 제품 개발 및 상용화를 위한 시제품 개발

제2절 연구개발의 필요성

1. 우리나라의 평균 수명연장 및 고령화 시대 돌입

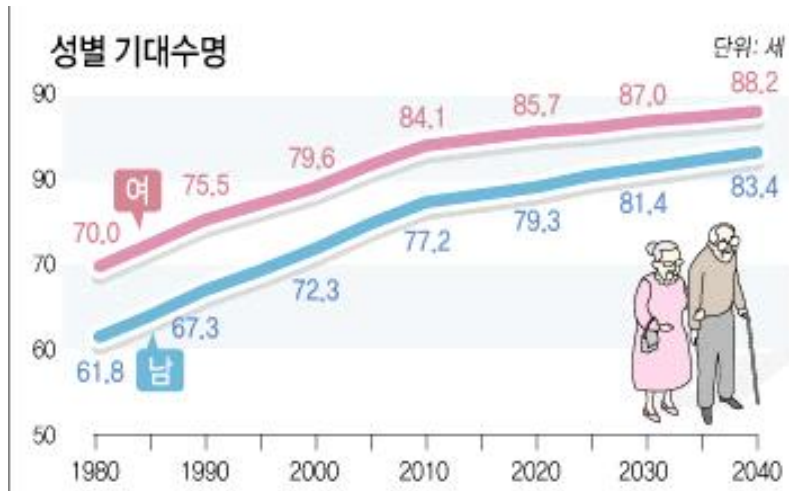
가. 평균 수명 연장 및 노인인구 비율의 증가

국제연합(United nation, UN)이 정의한 바에 의하면, 65세 이상 노인 인구 비율이 전체 인구의 7%이상을 차지하는 사회를 고령화 사회 또는 노령화 사회라고 하고, 14% 이상이면 고령사회, 21%이상이면 초고령 사회라고 함. 2015년 65세 이상 인구는 전체 인구의 13.1%로 10년 전(2005년)보다 약 200만명 증가한 662만 4천명이며, 2060년에는 40%대까지 늘어날 전망이다



<국내 65세 이상의 노인인구 비율 및 예측 비율, 통계청 2015>

급격한 출산율 저하와 기대수명의 연장으로 매우 빠른 속도로 국내 인구 고령화가 진행되고 있음. 2030년에는 우리나라의 고령자 인구 비중이 21%가 넘는 초고령화 사회로 진입한다고 예상되며 2060년도에는 고령자 인구 비중이 40%까지 도달한다고 추산됨

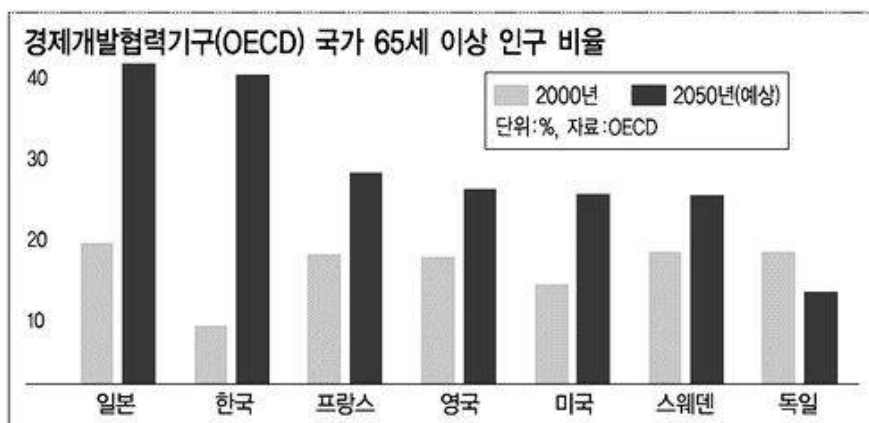


<국내 기대수명의 변화추세 및 예상, 통계청 2011>

나. 고령화 사회의 도래와 사회문제

(1) 65세 이상 인구비율 증가

- (가) 우리나라는 저출산으로 인해 0~14세 비율이 줄어들고, 생산가능인구도 2016년을 정점(3,619만 명)으로 2030년에는 61.8%까지 감소할 전망이다. 노동력의 주축인 핵심생산가능인구(25~49세)는 2007년을 정점(2,066만 명)으로 감소하고 있는 추세임. 이로 인해 15세~64세 인구의 감소 및 65세 이상 인구비율의 증가 예상된다
- (나) 노인인구의 증가는 범세계적 현상으로 대부분의 국가가 증가하는 추세이며 특히 한국은 타 OECD 국가에 비해 그 정도가 크다고 추어됨
- (다) 국내 65세 이상 인구 비율은 2035년 40%에 육박할 것으로 예상. 총인구 감소와 함께 빠르게 고령화가 진행될 것이 예상된다



<OECE 국가의 65세 이상 인구비율, OECD 2011>



<장래인구추계, 통계청 2016>

(2) 고령화로 인한 노인 진료비 부담 증가

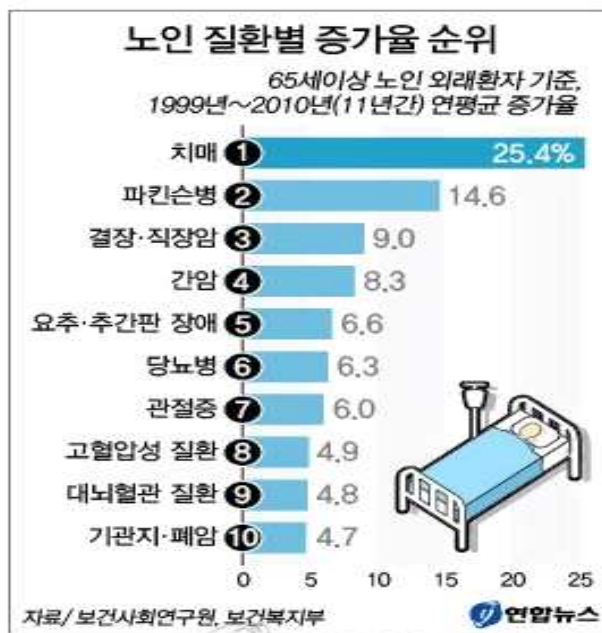
- (가) 급속한 인구 고령화는 우리나라 경제활동인구인 청·장년층의 노인부양부담을 가중시키고, 사회·경제적 활력을 급속히 감퇴시키는 심각한 부작용을 초래할 것으로 예상됨
- (나) 평균수명은 연장되었으나, 고령화로 인한 노인성 질환들이 늘어남으로 인해 그 부담은 더욱 늘어날 것임. 특히 치매를 비롯한 노인성 질환이 적절히 관리되지 못할 경우, 이런 부작용은 더욱 심각해질 것으로 예상됨
- (다) 세계적으로 연간 1000억 달러 이상의 막대한 예산을 노인들의 치매치료에 소요되고 있는 실정이나 아직까지 이를 예방, 혹은 치료할 방법이 없어 노인부양부담에 중요성과 함께 무게가 가중됨
- (라) 우리나라의 경우, 2005년~2010년 동안 총 진료비는 1.76배 증가하였지만, 동 기간 65세 이상 노인 진료비는 2.28배 증가하고, 전체 진료비 중 노인진료비가 차지하는 비중도 1.3배 증가하였음. 사망 전 시기(75세 이상)에 대한 진료비가 평균수명이 점점 더 늘어남에 따라 이 계층의 의료비 지출이 국가재정에 큰 부담으로 작용할 전망이다



<2005~2010년 동안의 총 진료비와 65세 이상 노인진료비 비교, 건강보험심사평가원, 진료비통계지표 2011>

(3) 노령에 따른 치매 등의 질환 발병의 증가

- (가) 노인성 질환이라 함은 노화현상에 의해 신체기능이 감소하는 노인층에게 잘 발생하는 질병을 통칭하는데, 당뇨병, 고혈압 등의 만성질환과 노인특유의 병적상태인 노인성치매, 퇴행성질환 등을 포함함
- (나) 국내 65세 이상 노인들 가운데 만성질환으로 고통을 받는 환자가 지속적으로 증가하고 있음. 2005~2010년 65세 이상 인구층에서 치매 등의 만성질환 유병률이 65세 노인인구 수 증가 속도보다 빠르게 증가하고 있음
(2005~2010년 65세 인구증가율: 22.7%, 치매 증가율: 25.4%)
- (다) 세계보건기구(World Health Organization, WHO)가 치매와 파킨슨병을 공중보건의 우선과제로 선정하였으며, 치매와 파킨슨병이 빠르게 확산중임. 노인장기요양보험대상에서 해당하는 질병(치매, 뇌혈관질환, 파킨슨병, 기타 퇴행성질환) 중 진료건수가 가장 많은 질병은 뇌혈관 질환이지만, 최근 들어 치매와 파킨슨병으로 진료받는 사람이 급증하고 있음. 65세 이상 인구층의 치매 유병률은 2012년 기준 9.1%로 추산되지만, 2050년에는 13.2%로 증가할 전망이다



<1999년~2010년(11년간) 65세 이상 노인환자의 연평균 증가율, 보건사회연구원, 보건복지부 2011>

- (라) 보건복지부에서 제공한 1999년~2010년까지 11년간 65세 이상 노인환자의 연평균 증가율을 보면 치매가 최근에 많이 급증하였음을 감안하더라도 다른 노인 질환인 파킨슨, 암질환, 혈관질환에 비해 가장 많이 급증하고 있음

65세 이상 인구 중 노인성질환으로 진료 받은 사람 수

(단위: 명, %)

구분	치매	뇌혈관질환	파킨슨병	기타 퇴행성질환
2005년	83,646	582,655	45,325	990
2007년	135,219	697,844	59,512	1,346
2009년	215,459	792,243	76,226	1,356
2010년	261,550	843,655	76,226	1,519
2005~2010년 증가율	212.7	44.8	82.9	53.4

<65세 이상 인구 중 노인성질환으로 진료 받은 사람 수, 국민건강보험
건강보험정책연구원 2010>

(마) 65세 이상 인구 중 노인성질환으로 진료 받은 사람 수 중 절대적인 질환자 수는 뇌혈관질환자가 높으나 타 질환에 비해 치매의 증가률(212.7%)이 매우 큼을 확인할 수 있음

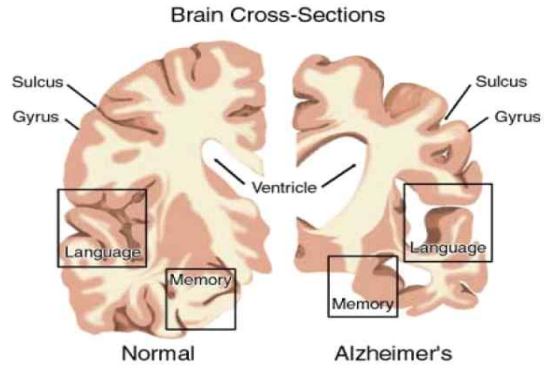
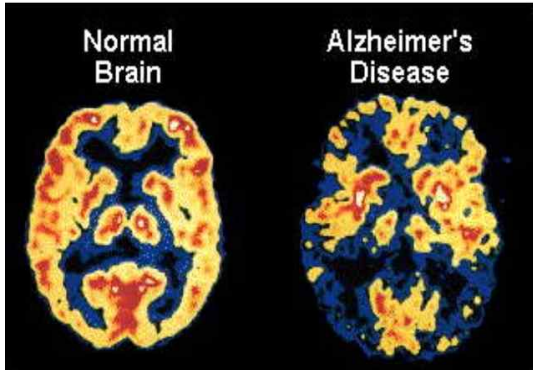
2. 치매

가. 정의

- (1) WHO의 질병 분류에 따르면 ‘치매’는 뇌질환으로 인해 생기는 하나의 증후군으로 대개 만성적이고 진행성으로 나타나며 기억력, 사고력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 뇌기능의 다발성 장애로 일컬어짐
- (2) 특히, 나이가 들면 자주 발생하는 노인성 치매인 알츠하이머병의 경우 21세기 고령화 사회에서 인류를 가장 괴롭힐 것으로 예측되어 ‘21세기 질환’이란 이름으로 불리고 있음

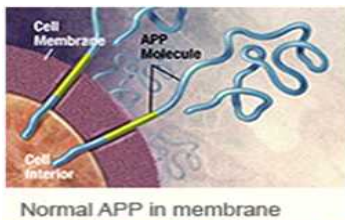
나. 치매의 원인 및 알츠하이머병

- (1) 치매는 그 발생 원인이 아직 정확히 규명되지 않았으나 뇌 속에 독성 단백질이 축적돼 발생하는 알츠하이머성(노인성) 치매와 뇌중풍 등으로 발생하는 뇌혈관성 치매가 전체 치매 환자의 80~90%를 차지하며 나머지는 수두증이나 감염성 질환 등에 의한 것으로 알려져 있음
- (2) 알츠하이머병(Alzheimer’s disease, AD)은 심장병, 암 등과 함께 65세 이상에서 사망률이 높은 5대 주요 질병의 하나로, 뇌신경계의 정보전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소로 인하여 증상이 나타남. 노인 인구가 급증하고 있는 현대사회에서 환자 수는 크게 증가할 것으로 예측되며 치료에 많은 시간과 경제적 부담이 요구되고, 노동력 상실이라는 사회적인 문제를 유발하고 있음

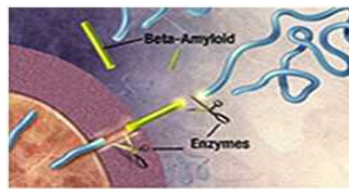


<알츠하이머가 진행된 병변된 뇌의 모습(좌),
알츠하이머 진행시 약화된 기능과 뇌의 구역(우)>

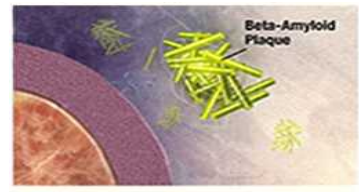
- (3) 알츠하이머형 치매는 노인반(senile plaques) 및 신경원섬유의 변화(neurofibrillary tangle)로 정의하며 ¹⁾(Alzheimer, A., 1907), 원인 유전자로는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP), presenilin 1, 2가 알려져 있음 ²⁾(Waring, SC et al, 2008). 이들 유전자에 있어서 병원성 변이가 모두 β -amyloid의 축적을 촉진한다는 것이 분명해졌고, β -amyloid가 알츠하이머성 치매 발증 기구에 있어서 중심적인 역할을 담당한다는 것이 확인되었음 ³⁾(Shen, ZX et al, 2004)
- (4) 노인반은 베타 아밀로이드 단백질의 축적으로 발생하는데, 베타 아밀로이드 단백질은 전구체 단백질로부터 secretase로 총칭되는 protease로 끊어져 나옴으로써 생성되며⁴⁾(Nikolaev, Aet al), 전구체 단백질의 물성은 용해도가 낮을뿐더러 수용액 속에서 서서히 β 시트 구조의 비율이 증가하는 경향이 있기 때문에 응집이 용이함. 정상상태에서는 합성 후 응집, 축적하기 전에 신속하게 분해되는 것으로 생각되나 전구체 단백질의 42위 C-terminal을 절단하는 presenilin, nicastrin, ACH-1, PEN-2를 포함한 단백질 복합체인 γ -secretase의 높은 응집성에 의해 베타 아밀로이드 단백질의 축적이 발생하며 ⁵⁾(Shioi, J. et al) 많은 가족성 알츠하이머성 치매의 변이가 42위에서의 절단을 촉진한다는 사실이 판명된 점에서 다방면의 관심을 모으고 있음



Normal APP in membrane



Enzyme forming beta-amyloid



Formation of beta-amyloid plaque

<Formation of senile plaque, NIH>

다. 치매 치료제

- (1) 치매의 치료제로서 현재 가장 진전되고 있는 것이 콜린계 약제임. 그 중에서도 알츠하이머병에서 인식된 신경전달물질인 아세틸콜린(Acetylcholine, Ach)의 분해를 방지하여 뇌 내의 ACh량을 증가시키는 “아세틸콜린분해효소(Acetylcholinesterase, AChE) 저해제”가 대표적인 치매치료제로 사용되고 있음
- (2) 이러한 약물 중에 아세틸콜린의 분해효소인 AChE의 활성을 억제해 통해 아세틸콜린의 농도를 유지하여 인지기능을 증진시킬 수 있는 치료제로써 미국 식품의약청(FDA)의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용 중인 도네페질(donepezil, 제품명: 아리셉트정)등이 판매되고 있음
- (3) 다른 작용기전의 치매치료제로서는 과도한 NMDA(*N*-methyl-D-aspartate) 수용체의 작용을 억제하여 중증도의 환자에서 신경세포 독성을 경감시킬 수 있는 메만틴(memantine, 제품명: 에빅사정)이 판매 사용되고 있음



	Donepezil	Rivastigmine	Galantamine	Memantine
작용기전	AChE inhibition	AChE + BChE inhibition	AChE inhibition + nACh Receptor modulator	NMDA Receptor antagonist
혈중 반감기/용량	70hr/ 5-10 mg qd	10hr/ 1.5-6 mg bid	6-8hr/ 8-12 mg bid	60-80hr/ 5-10 mg bid
FDA 승인년도	1996	2000	2001	2003
위해작용	오심, 설사, 수면 장애, 서맥	오심, 설사, 무력증, 소화장애, 서맥	오심, 구토, 발열, 서맥	불안

<미국 FDA 승인 치매 치료제, FDA 2017>

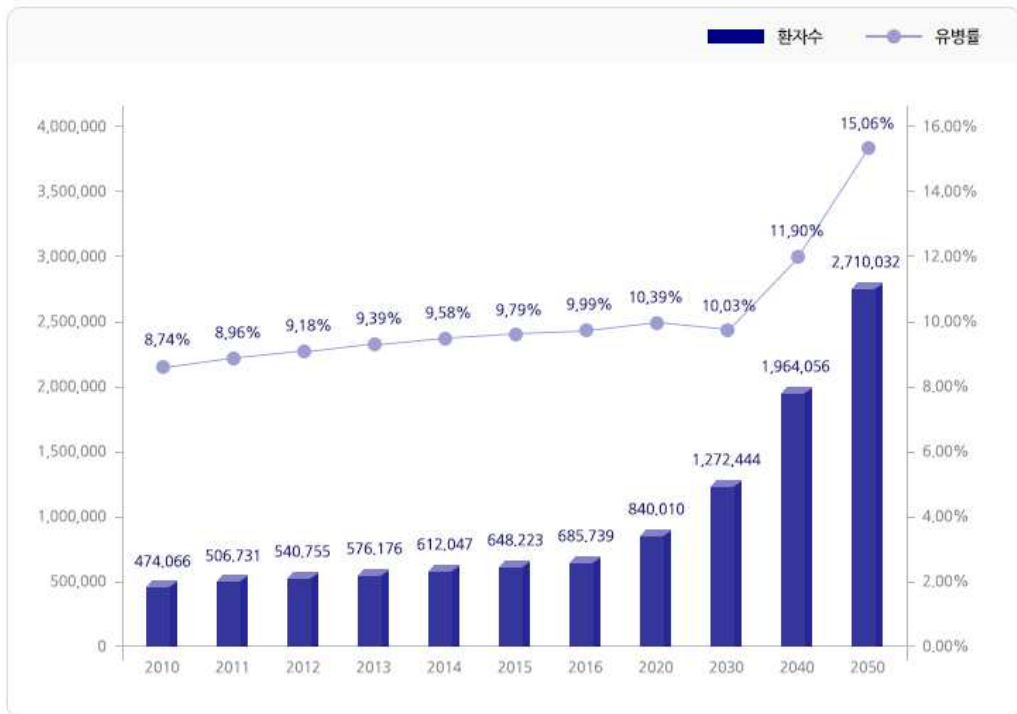
- (4) 그러나, 대표적인 AChE 저해제인 도네페질(donepezil)은 근육 경련, 피로감, 불면증, 어지러움 등의 정신신경계의 장애와 수지진전, 운동장애 등의 추체외로장애, 설사, 구역, 구토 등의 소화기계의 장애, 또는 서맥 등의 위해작용이 나타나는 것으로 알려져 있음
- (5) 중증도의 치매 환자에 사용되는 메만틴(memantine) 역시 NMDA 수용체 길항작용으로 유발되는 불안 등의 정신계 장애등의 위해작용이 보고되고 있음
- (6) 또한, 두 종류의 치매치료제는 현재 근본적인 치료가 아닌 병의 증상을 완화하는 효능만 있어 치매를 근본적으로 치료하지 못함

- (7) 이외에도 ACh 합성능력을 증가시키는 약물, 치매 원인물질 중 하나인 베타아밀로이드를 제거해 주는 약물, Tau 단백질을 타겟으로 하는 약물, 유전자치료, 줄기세포를 이용한 약물이 개발 중에 있으나 아직은 주목할 만한 결과가 나타나지 않고 있음
- (8) 상기와 같이 개발된 약물의 제한적인 약리 효능 외에도 약물의 투여 시 심각한 부작용을 극복하기 위하여 식품 및 천연물 소재 치매를 예방 또는 치료 효능이 있는 건강기능식품과 천연물 신약 개발 연구가 전 세계적으로 주목을 받고 있음

3. 국내외 치매 관련 시장

가. 국내 치매 관련 시장

2012년 보건복지부에서 실시한 치매유병률조사 결과에 따르면, 2012년 65세 이상 노인 중 치매환자의 유병률은 9.18%로 환자수는 약 54만 명에 이를 것으로 추정된다고 보고됨. 또한 치매의 위험이 높은 경도인지장애는 65세 이상 노인 중 1/4에 이를 것으로 추정되고, 고령자일수록, 남성보다는 여성이, 고학력자보다는 저학력자일 경우에 치매 위험이 더 높다는 연구 자료가 보고됨



<65세 이상 한국 노인의 치매 유병률 및 치매 환자수 추이, 보건복지부 2012>

현재까지 무작위 추출된 지역사회 거주 노인을 대상으로 시행된 국내 치매 유병률 연구는 모두 11건으로, 진단방법, 대상 특성 등 연구방법에 따라 국내 65세 이상 치매 유병률은 6.3~13.0%로 추정됨

연구자	지역	연령	표본수	선별도구	진단기준	유병률			유형별 분률		
						남성	여성	전체	알츠하이머	혈관성치매	기타
주진형 등 (2008) ^{8†}	성남	65+	1118	-*	DSM-IV	2.6	8.8	6.3	75.7	18.9	5.4
김정순 등 (2003) ^{31†}	부산	65+	1230	MMSE-K	DSM-III-R	2.7	10.0	8.0	-	-	-
서국희 등 (2003) ^{34†}	연천	65+	1217	PAS-K	DSM-III-R	6.3	7.1	6.8	61.7	35.3	3.0
고금자 등 (2003) ¹¹⁴	제주	65+	590	MMSE-K	-	2.9	16.3	12.4	-	-	-
이동영 등 (2002) ^{9†}	서울	65+	953	MMSE-KC	DSM-IV	4.5	10.4	8.2	65.4	24.7	9.9
신일선 등 (2002) ¹¹⁵	광주	65+	1598	MMSE-K	DSM-IV	-	-	11.6	53.6	18.6	27.8
윤수진 등 (2002) ¹¹³	부천	65+	1015	MMSE-K	-	-	-	11.5	-	-	-
김동현 등 (1999) ¹¹⁶	광명	65+	946	K-MMSE	DSM-IV	7.5	15.9	13.0	39.8	37.5	22.5
우종인 등 (1998) ^{32†}	연천	65+	1674	MMSE-K	DSM-III-R	8.8	9.9	9.5	47.4	26.3	22.7
보건사회연구원 (1997)	전국	65+	27884	MMSE-K	-	-	-	8.3	-	-	-
박종환 등 (1994) ^{33†}	영일	65+	766	MMSE-K	DSM-III-R	7.2	14.5	10.8	60.0	12.0	38.0

*Single phase design - 선별검사를 시행하지 않고 CERAD-K 평가점을 이용해 전문가가 대상자 전체를 정밀검진함.

†SCI급 국제학술지에 등재된 논문

<국내치매 유병률 연구현황, 보건복지부 2008>

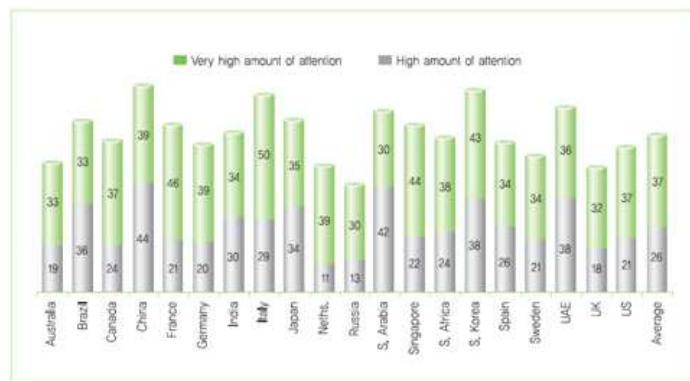
나. 해외 치매 관련 시장

- (1) 급격한 고령화와 수명 연장으로 범세계적으로 치매 환자가 급증할 것으로 예상됨. 2005년 세계 치매 유병률에 대한 Delphi Consensus Study에 의하면, 매 해 세계적으로 460만 명의 새로운 치매 환자가 발생하여 그 수가 급증할 것으로 예상하여 2025년에는 2200만 명 정도의 발생할 것으로 추정되어짐
- (2) 미국 민간연구단체 랜드코퍼레이션의 뉴잉글랜드의학저널에 발표한 보고서에 따르면, 알츠하이머 등 치매 증세를 가진 환자를 위해 가족과 사회가 지불하는 비용이 연간 1570억~2150억 달러(약176조~231조원)에 이른다. 이 중 약물 구입과 요양원 이용 등의 직접비용이 1090억 달러(2010년 기준)이고 앞으로 더 커질 것으로 예상된다
- (3) 고령화 인구의 증가 추세와 함께 2040년에는 그 비용이 두 배가 될 것으로 예상. 70세 이상 연령 인구의 15% 정도가 치매로 고통을 받고 있고, 치매 환자 1인당 연간 치료비는 4만1000~5만6000달러 정도로 집계되고 있음
- (4) 치매의 가장 보편적 증상인 알츠하이머는 현재 미국에서 530만 명이 앓고 있으며, 미국인의 사망 원인 중 6위를 차지함. 현재 치료법은 일시적으로 증상을 완화시킬 뿐 진행을 늦추지는 못하고, 확진 판결 후 평균 4~8년 생존하는 것으로 알려짐

4. 건강기능식품산업 필요성 및 동향

가. 건강기능식품 산업 시장

- (1) 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 건강기능식품이 포함된 건강기능식품의 시장규모는 최근 고성장세를 지속하고 있음
- (2) 건강기능식품 시장의 높은 성장세는 ‘건강 지향적 소비자’의 증가에 따라 지속·확대될 것으로 예상됨. Datamonitor(2010)의 조사에 따르면 소비자의 약 60%는 평소에 건강에 대한 관심이 매우 높았으며, 개인의 건강관리 방법으로 건강기능식품이 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 파악됨



자료: Datamonitor consumer survey, July/August 2010

<국가별 건강에 대한 관심도 경향, Datamonitor consumer survey 2010>

(가) 건강기능식품의 세계 시장

2014년 총 1,100억불의 시장을 형성한 세계기능성 식품시장은 매년 꾸준히 7% 성장이 예상되어 2020년도에는 1,677억불 정도의 시장규모로 성장할 것으로 사료됨

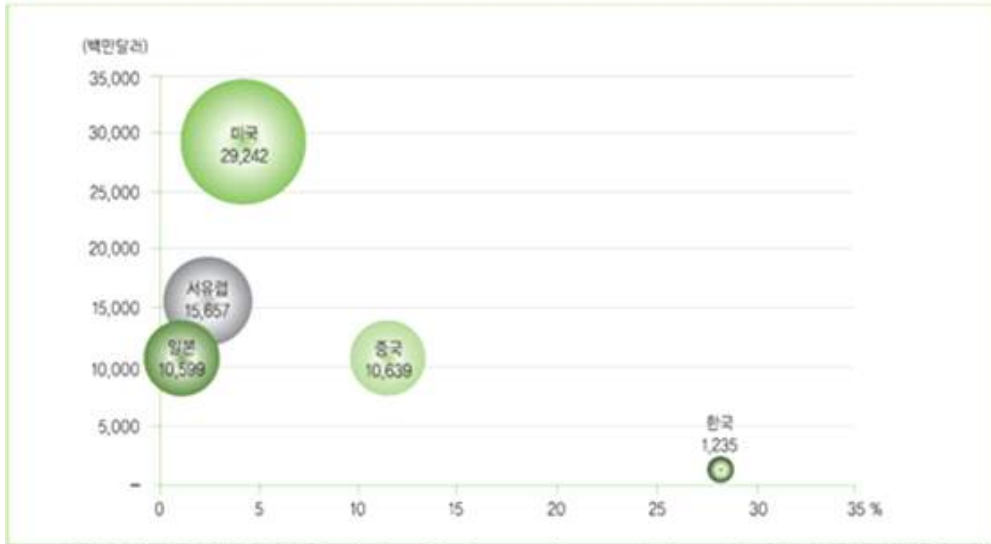


(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

세계 건강기능식품 시장 규모 및 성장률 (2009년~2020년)

<NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report, Nutrition Business Journal, 2014>

2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과를 살펴보면 미국이 전년대비 4.2% 성장한 29,242백만 달러로 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지하고 있으며, 15,657백만 달러로 서유럽이 2위를 차지함. 아시아에서는 중국이 10,639백만 달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며 전년대비 11.5%의 성장률로 급속한 성장세를 나타내고 있음



<2011년 건강기능식품 생산실적분석결과 발표. 식품의약품안전처 2012>

(단위 : 억 달러 또는 %)

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

<국가별 건강기능식품 시장 규모 및 전망, 식품의약품안전처 2015>

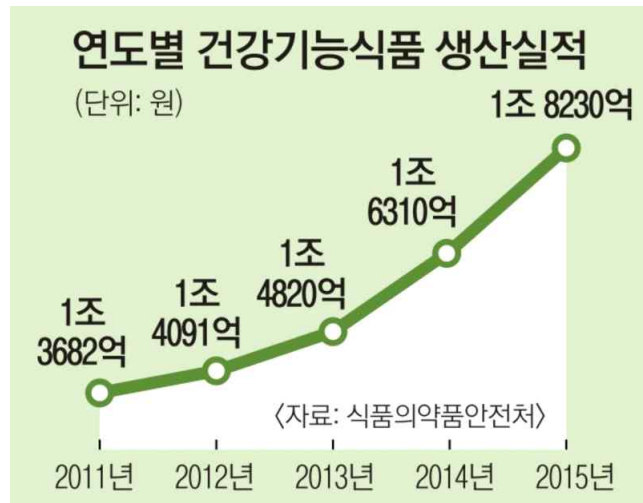
2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과와 2015년 국가별 건강기능식품 시장 규모 및 전망, 현재 가장 큰 시장은 미국 및 유럽이지만, 국내 건강기능식품 역시 앞으로 성장가능성이 높은 것으로 예측됨

(나) 건강기능식품의 국내 시장

2015년 국내 건강기능식품 시장은 1조 8,230억 원으로 집계됨. 전년 대비 성장률은 11.8%로 높은 수치를 보이며 점차 가파른 성장곡선을 그리고 있는 것으로 보아 앞으로 시장이 더욱 확대될 것으로 예측됨

소비자 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 이용한 개별인정형 제품의 시장이 새롭게 부각되고 있음

국민소득수준의 증가와 삶의 질 향상, 고령화 사회 진입에 따라 건강의 유지 및 증진이 무엇보다도 중요하다는 사회적 트렌드가 형성되면서 건강기능식품산업에 대한 관심이 더욱 높아짐. 현재 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장 간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이뤄지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망됨



<연도별 건강기능식품 생산실적, 식품의약품안전처 2016>

나. 건강기능식품 산업 시장

- (1) 인구 고령화와 만성질환자의 증가로 건강기능식품의 수요가 점점 늘어나고 있음
- (2) 우리나라의 식사패턴이 노인들에게 충분한 영양공급을 하기에는 영양소의 밀도가 낮기 때문에 영양섭취가 불량할 가능성이 높음
- (3) 건강기능식품으로 질병예방에 효능을 얻게 된다면 기하급수적으로 늘어 가는 의료비를 억제하고 국민건강유지 및 증진을 할 수 있어 국가경제에 크게 기여할 것임

5. 천연물 유래 건강기능식품/의약품 개발 현황 및 장점

가. 천연물 건강기능식품

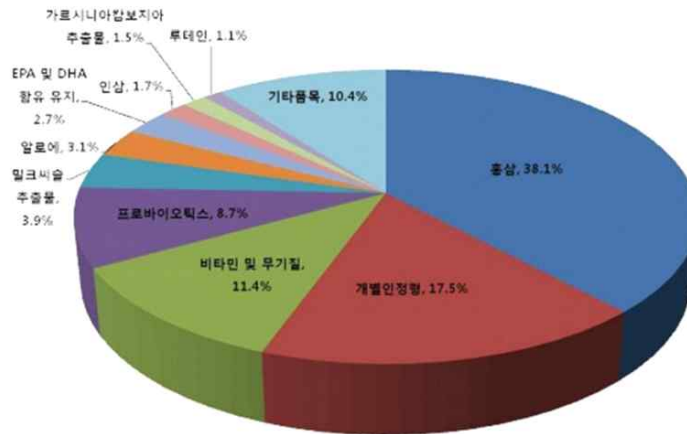
국내 건강기능식품 시장은 1990년대 중반 건강보조식품에서 출발하여 계속 성장세를 가지고 있으며, 시장에서 선호되는 건강기능식품 품목군은 소비자들을 대상으로 한

조사 등에서 글루코사민, 허브, 천연칼슘 등의 천연물 건강기능식품을 선호하는 것으로 나타남

인삼류 제품이나 알로에 관련 제품, 스쿠알렌을 이용한 건강기능식품 등 단일 품목 중심의 천연물 건강기능식품 시장이 형성되어, 천연추출물의 제형화 방식을 선택하고 있는 등 건강기능식품의 다양화가 추진되고 있음

['15년 품목별 점유율]

(‘15.12.31.기준, 출처: 식약처)



<2015년 건강기능식품 품목별 점유율 현황, 식품의약품안전처 2015>

비타민 및 무기질 일부의 합성 건강기능식품을 제외하면 대부분이 식물추출물(홍삼, 밀크씨슬, 알로에, 인삼, 가르시니아 캄보지아, 프로폴리스 등)이 큰 비중을 가지고 있음을 확인할 수 있음

(‘15.12.31.기준, 출처: 식약처, 단위 : 억원)

순위	구분	2015		2014	2013	2012	2011	
		점유율 (%)	증감률 (%)					
	계	18,230	100	11.8	16,310	14,820	14,091	13,682
1	홍삼	6,943	38.1	9.7	6,330	5,869	6,464	7,191
2	개별인정형+	3,195	17.5	0.6	3,177	2,324	1,807	1,433
3	비타민 및 무기질	2,079	11.4	46.9	1,415	1,747	1,646	1,561
4	프로바이오틱스	1,579	8.7	13.8	1,388	804	518	405
5	밀크씨슬 추출물	705	3.9	4.3	676	308	135	138
	누계 (5품목)	14,501	79.5	11.7	12,987	11,052	10,590	10,728
6	알로에	560	3.1	△2.6	575	628	687	692
7	EPA 및 DHA 함유 유지	485	2.7	22.5	396	490	497	509
8	인삼	307	1.7	△27.9	426	466	450	381
9	가르시니아 캄보지아추출물	277	1.5	25.3	221	541	440	207
10	루테인	204	1.1	83.8	111	95	118	52
	누계 (10품목)	16,333	89.6	11.0	14,716	13,272	12,762	12,589
11	기타품목	1,897	10.4	19.0	1,594	1,548	1,314	1,113

<건강기능식품 품목별 생산실적, 식품의약품안전처 2015>

나. 세계 천연물신약 현황

2008년 세계 제약시장은 7730억 달러를 기록했으며, 2010년 8746억 달러, 2013년경에는 9750억 달러 규모로 연 4~7%의 성장을 지속할 것으로 예상되고 있으며, 2020년에는 1조 3000억 달러까지 성장할 것으로 전망되고 있음

이중 고령화 사회로 인한 노인병 및 만성질환의 증가하고, 치료의학에서 예방의학으로 의료 환경 변화하는 추세에 따라 동시에 동물, 식물에서 추출된 천연물 약물 또는 건강 보조 식품에 대한 시장이 커지고 있음

WHO에 따르면 천연물의약품 시장은 600억 달러 이상의 가치를 가지며, 전 세계의 인구 중 80%가 1차적인 healthcare로 천연물의약품을 사용한다고 밝힘

세계 천연물의약품 시장은 2011년도 약 260억 달러로 추계됨

다. 국내 천연물신약 현황

한국은 전통의약에 대한 정보 및 인프라가 풍부하다고 평가되고 있음. 전통의약에 대한 역사가 오래되었고, 우수 연구자들의 노하우 및 기술, 제약회사의 우수한 생산시설 등을 갖추고 있으나 천연물신약 개발에서는 미흡한 상태임

최근 천연물 연구에 중요성을 인식하고 천연물신약연구개발에 관심이 집중되고 있음 천연물의 약리 활성 또는 생물활성 유효성분 연구에서부터 천연물신약 연구 개발에 집중할 필요성이 있음

현재까지 허가되어 시판중인 천연물의약품은 8종이 있음

제품명	기업명	적응증	주요성분	허가일자
조인스정	SK케미칼	골관절증	위령선, 팔루근, 하고초	2001. 7
스티렌정	동아제약	위염	애엽	2002. 6
아피톡신주	구주제약	골관절염	봉독	2003. 5
신바로캡슐	녹십자	골관절증	구척, 오가피, 우슬 등	2011. 1
시네츄라시럽	안국약품	기관지염	아이비엽, 황련	2011. 3
모티리튼정	동아제약	기능성 소화불량증	견우자, 현호색	2011. 5
레일라정	한국피엠지	골관절증	당귀, 목과, 방풍 등	2012. 3
유도마외용액	영진약품	아토피 피부염	돼지피 추출물	2012. 11

▲ 천연물의약품의 국내 허가현황 (출처: MFDS)

<현재 시판되고 있는 천연물의약품 현황, 식품의약품안전처 2013>

국내 제약사들이 천연물신약으로 개발한 품목들의 매출액이 급성장하고 있음. 2001년 SK케미칼이 출시한 관절염 치료제 조인스정 200 mg은 하고초, 위령선, 팔루근, 등 주변에서 쉽게 볼 수 있는 식물을 원료로 만들어져, 2012년 까지 누적 매출이 1000억 원대에 달하고, 2005년 동아제약이 쑥(애엽)을 원료로 개발한 위염치료제인 스티렌은 누

적매출액이 4960억 원을 넘어섰음

새롭게 출시된 천연물 신약인 시네츄라시럽, 모티리톤정, 레일라정, 신바로캡슐도 현재 안정적인 판매를 보이고 있는 중임.

업체	품목	2013	2012	증감률
동아ST	스티렌	44968	57636	-22.0%
SK케미칼	조인스	24729	25727	-3.9%
안국약품	시네츄라	23208	30714	-24.4%
동아ST	모티리톤	15508	11271	37.6%
피엠지제약	레일라	6323	345	1732.8%
녹십자	신바로	5152	3864	33.3%

▲ 국산 천연물신약 2013년 실적(단위=백만원, ims)

<천연물신약 6개 제품 원외처방조제약, IMS 2014>

라. 천연물 유래 건강기능식품 장점

- (1) 천연물 유래 관련 제품은 부작용이 적으며 오랜 기간에 걸친 경험에 의해 효능이 증명된 전통적 처방이 존재함으로 안전성과 유효성이 입증됨
- (2) 합성 신약에 비하여 상대적으로 적은 개발비용과 짧은 연구기간이 소요됨. 즉, 한약, 생약과 관련한 서적 등에서 출처하는 기본적인 임상 및 독성 기록에 대한 정보를 근거로 하기 때문에 제품 개발 시기를 단축할 수 있음
- (3) 기존 자료들을 바탕으로 효능 탐색 후 물질을 선택할 수 있어 충분히 기능성 여부에 대한 확신을 가지고 개발 진행가능하며, 따라서 성공 가능성이 높음
- (4) 최신 생명공학 기술을 활용한 의약품과 건강기능식품의 경계가 모호해지면서 기술적 융합가능성도 높아지고 있으며 천연물을 기반으로 한 건강기능식품의 연구가 점점 더 활성화 되고 있음
- (5) 건강기능식품 산업에서 기술개발 가능성은 무한한 상태이며, 우리나라는 새로운 원료의 발견과 유기농 원료 및 약재를 동원하여 참신하고 효력이 검증된 완제품을 개발하여 고부가가치의 천연물을 기반으로 한 건강기능식품에 참여하여 경쟁력을 가질 수 있음

6. 치매 질환 관련 연구개발과 치매 예방 건강기능식품의 필요성

가. 치매 예방의 필요성

- (1) 치매는 발병 시 치료되기가 매우 어려운 질병이고, 치료비 뿐 아니라 요양 및 관리 비용이 많이 드는 난치성 노인질환이므로 이를 예방하는 것이 매우 중요함

나. 치매 치료 약물의 심각한 부작용

- (1) 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)의 승인을 받은 치매 치료제는 4가지로, 모두 병의 근본적 치료가 아닌 주로 증상을 완화시키는 용도로 쓰이고 있고, 여성 호르몬인 에스트로겐이나 비타민-E가 치매 예방기능이 있는 것으로 알려져 있지만 치매가 유전자들의 복합작용에 의해 발병하는 것이어서 완전한 예방효능을 얻기 어려울 뿐만 아니라 과다복용에 따른 부작용 때문에 권장되고 있지 않음
- (2) 대표적인 치매 치료제인 아세틸콜린 분해효소 저해제의 심각한 부작용 때문에, 식품 및 천연물 소재로 치매를 예방하는 건강기능식품의 연구에 전 세계가 관심을 가지고 있음

다. 식품을 통한 치매예방의 관심 증가

- (1) 인간의 생명연장과 삶의 질 향상으로 사회가 고령화됨에 따라, 자연스레 건강에 대한 관심이 증가하고 이로 인해 질병이 발생하기 전 예방을 위해 복용하는 건강보조식품에 대한 관심도 증가하고 있음
- (2) 특히, 건강한 정신적 삶과 직결되는 뇌질환 예방을 위한 건강기능식품의 관심에 집중되고 있으며 인공식품에 대응하여 천연물질을 이용한 치료제로서 약리작용과 인체기관의 보호효능에 대한 건강기능식품의 연구에 의한 신제품개발이 요구됨
- (3) 뇌신경세포를 보호하고 활성화하는 인자의 생성을 촉진하는 것 그리고 운동과 식이요법의 병행을 통해서 뇌질환을 예방할 수 있는데, 현대인의 불규칙한 식습관 및 운동부족 습관으로 충분한 예방이 부족한 상황임
- (4) 치매 예방을 위한 식품들에 대한 연구가 많이 진행되고 있음. 매일 우유를 마시면 알츠하이머성 치매의 위험이 65% 감소한다는 연구보고와 채소와 과일의 항산화물질로 뇌의 노화가 억제되는 원리로 매일 채소와 과일을 충분한 양을 섭취 시에 치매가 발생할 확률이 30% 낮다는 보고도 있음
- (5) 이외에도 오메가-3, 비타민 E와 C, 견과류, 커피 등 식품 및 비타민에 대해 보조적 효능이 많이 언급되고 있지만, 뇌신경세포에 작용하는 기전 등이 밝혀진 건강보조식품은 없는 상황임
- (6) 일반적인 기능성식품소재의 제품화와 달리 인지능력개선 및 뇌기능강화와 관련된 기능성식품은 활용하면 다양한 산업으로 응용가능 함
- (7) 치매 관련 건강기능식품 분야에서 우리나라의 식물 혹은 알려지지 않은 새로운 효능을 바탕으로 천연물 신약 및 건강기능식품으로 개발하고 그 자원을 먼저 산업재산권화 하여 시장을 확보하는 것이 중요함

제3절 연구개발의 범위

세부연구목표	연구개발의 수행내용
원료 규격 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인, 양유근 원생약 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC 패턴분석법 확립 - 면산조인, 원산조인 유사도 분석 - 양유근, 사삼 유사도 분석 ○ 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 원산조인과 면산조인 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발 - 양유근과 사삼 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발
함유 성분 분리 및 기준 및 시험법 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 함유성분의 물질분리 및 구조동정 <ul style="list-style-type: none"> - 산조인에서 spinosin 등 7종 성분 분리 - 양유근에서 8종 성분 분리 - 분광학적 데이터를 이용한 분리된 성분들의 구조동정 ○ 기준 및 시험법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 스피노신, 로베티올린 함량 분석법 확립 - 함량 기준 및 이화학적 규격 설정
제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 3Lot 생산 ○ 추출용매 배율 및 추출시간에 따른 원료 수득률 비교 ○ 추출용매 배율 및 추출시간에 따른 지표성분 함량 비교
제제화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 물리적 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 입도분석, 흡습성, 흐름성, 압축성 용해도 평가 ○ 화학적 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 고형분 안정성, 용액 안정성 평가 ○ 적합성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 추출원료의 특성을 파악하여 장용용제, 부형제, 결합제 등 다종의 첨가제와의 적합성 평가 ○ 복용편의성, 안정성을 고려한 제형 결정 <ul style="list-style-type: none"> - Preformulation과 compatibility study를 고려한 완제 및 위약 최적의 제형 결정 ○ 인체적용 시험용 제품 생산
대량생산 제조 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전체공정도 완성 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 첨가제 선정, 제조방법 확립 연구 ○ 완제 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - GMP시설에서 생산 - 완제의 기준 및 시험법 설정 및 관리

<p>원료 및 완제 안정성 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료 및 완제 안정성 연구 - 장기보존(25±2℃ 60±5% RH) 보관조건에서의 안정성 연구 - 제제균일성, 함량, 분해, 미생물 검사 - 이화학적 검사
<p>산조인 추출물의 기억력 개선 관련 기능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vitro</i> 연구 - MTT assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - LDH assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - ThT assay를 이용한 아밀로이드 베타 응집 저해 효능 평가 ○ 산조인 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vivo</i> 연구 - 동물행동실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 - 동물행동실험을 이용한 아밀로이드 베타 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 - Western blot을 이용한 산조인 원료 추출물의 기억력 개선 효능의 기전 연구
<p>산조인 유효활성성분 규명 및 규명된 유효활성성분의 기능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인 활성성분의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i> 연구 - 수동회피실험을 이용한 산조인 함유성분들의 감퇴 개선 효능 평가 - 동물행동실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 개선 감퇴 평가 - ThT assay를 이용한 아밀로이드 베타 응집 저해 효능 평가 - 동물행동실험을 이용한 아밀로이드 베타 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 - Western blot 및 면역조직화학법을 이용한 아밀로이드 베타 투여 유도 신경세포 염증 억제 효능 평가 - 수동회피실험을 이용한 기억력 증강 효능 평가 ○ 산조인 유효 활성성분의 spinosin의 기억력 개선 기전 연구 - Western blot을 이용한 기억력 개선 효능의 기전 연구 - 수동회피 실험을 이용한 Antagonism 연구 - 전기생리실험을 이용한 장기기억강화(Long-term potentiation, LTP)에 대한 효능 평가
<p>양유근 추출물의 기억력 개선 관련 기능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vitro</i> 연구 - MTT assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - LDH assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 ○ 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vivo</i> 연구 - 수동회피실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가

<p>산조인 양유근 복합물(DHP1402)의 최적 후보물질 도출</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인과 양유근의 병용투여 시 기억력 개선 상승 (synergistic) 효과를 보이는 원료조성비 탐색 - 수동회피 실험을 이용한 상승 효능 원료조성비 탐색 - Y자 미로 실험을 이용한 상승 효능 원료조성비 탐색
<p>산조인 양유근 복합추출물(DHP1402) 의 기억력 개선관련 활성에 대한 기능성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 <i>in vitro</i> 연구 - MTT assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - LDH assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - Acetylcholinesterase inhibition assay를 이용한 효소 저해 저해 효능 평가 ○ 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 <i>ex vivo</i> 연구 - <i>ex vivo</i> Acetylcholinesterase inhibition assay를 이용한 효소 저해 저해 효능 평가 ○ 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 <i>in vivo</i> 연구 - 동물행동실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 개선 감퇴 평가 - 동물행동실험을 이용한 아밀로이드 베타 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 - Western blot을 이용한 기억력 개선 효능의 기전 연구 - 수동회피 시험을 이용한 Antagonism 연구 - 전기생리실험을 이용한 장기기억강화(Long-term potentiation, LTP)에 대한 효능 평가
<p>비임상 독성시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 설치류 단회투여독성시험 ○ 복귀돌연변이 시험 ○ 설치류 4주 DRF 반복투여독성시험 - ‘식품의약품안전처’ 면담 및 기능성원료개별인정 의사결정도에 따라 선정
<p>인체적용시험 기관 및 CRO 선정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험을 위한 기관 및 CRO 기관선정 ○ 기능성식품 인체적용시험 기관 선정
<p>인체적용시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험을 위한 프로토콜 개발 - 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용 시험 진행 ○ 인체적용시험 진행 및 완료 - 경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성 평가 - 대상자 수 및 복용기간: 80명, 24주(6개월) 복용 - 1차 기능성 평가: Baseline 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억

	<p>요인 변화량 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2차 기능성 평가: 시험군 및 대조군 비교 Baseline 대비 12주 및 24주 후 ADAS-Kcog 총점, 언어유창성, 전두엽 기능, 노인우울척도 변화량 평가 - 안전성 평가: 인체적용시험 식품 투여 전과 투여 중, 24주 후 이상반응 평가 - 통계분석 Safety군, FAS(full analysis)군, PP(Per Protocol) 및 보고서 작성
기능성 원료 인정 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성분에 대한 규격 및 시험 ○ 기능성내용에 관한 시험
건강기능식품 기능성 원료 인정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개별인정형 원료 허가 신청 및 기능성 원료 인정 - 원료의 기준규격, 안전성, 기능성 자료 확보를 통한 개별인정 신청을 위한 자료 확보
건강기능식품 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ DHP1402를 이용한 제품개발 - 제제 제형화 연구를 바탕으로 제형 선정 - 소비자의 성별, 나이, 복용편의성 등 선호도를 고려한 제품 디자인 설정

2장 국내외 기술개발 현황

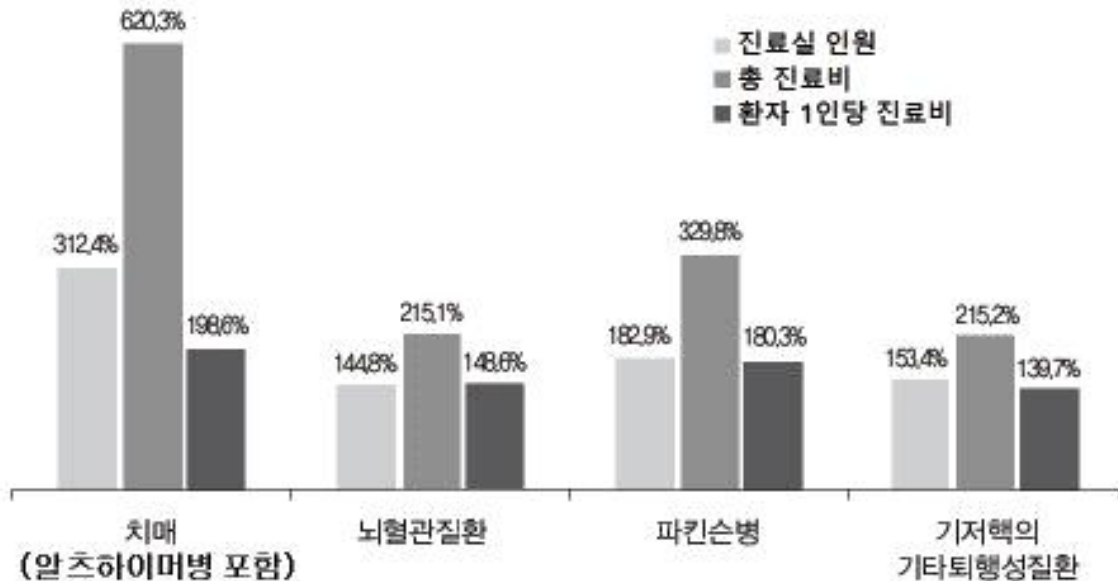
코드번호

D-04

제1절 국내외 퇴행성 신경질환 치료제 기술개발 현황

1. 세계 퇴행성 신경질환 시장 현황

세계적으로 고령화가 빠르게 진행되면서 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 퇴행성 신경질환 환자가 급속히 증가하고 있음. 국내의 경우 2013년 6세 인구가 전체의 12.2%를 차지해 이미 고령화 국가에 진입하였으며 2030년에는 초고령 국가가 될 것으로 예상. 고령인구가 증가할수록 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환 환자의 유병율이 급격히 증가하므로 급속한 인구의 고령화는 보건의료학적인 문제를 넘어서 심각한 사회, 경제적인 부담을 초래함



<2005년 대비 2010년 노인성 질환별 의료이용 증가율>

(노화와 관련된 질환연구의 현황 및 시사점 재가공, KISTEP, 2012년)

노인성 질환에 관한 세계시장은 2012년 88억 달러에서 연평균 3.8%의 성장률로 2018년 110억 달러 이상의 시장을 형성할 것으로 전망. 이는 세계 의약품 시장 7,156억 달러의 약 1.2%에 해당하는 점유율을 차지하고 있음. 2012년부터 15년까지는 1.8%의 연평균 성장률이 예상되었으며, 2015년부터 18년까지는 신규 파이프라인의 약물개발로 인해 보다 높은 5.9%의 성장률일 것으로 전망됨



<퇴행성 신경질환 치료제의 시장 규모 및 전망>
(퇴행성 뇌질환 치료제 개발동향 재가공, KISTI, 2013년)

2. 세계 퇴행성 신경질환 치료제 연구개발 현황

퇴행성 신경질환 치료제로 개발 중인 약물은 678개에 이르는데, 대부분 알츠하이머병과 파킨슨병에 관련됨

약물	작용기전	대표약물
알츠하이머병 치료제	Acetylcholinesterase Inhibitors	Aricept, Reminyl/Razadyne, Exelon
	N-methyl, D-aspartate Receptor Antagonists	Namenda, Ebixa, Axura
파킨슨병 치료제	Dopaminergics	Madopar, Sinemet
	Dopamine Agonists	Mirapex, Cabser/Dostinex, Requip
	Catechol-o-methyltransferase inhibitors	Comtan, Stalevo
루게릭병 치료제	Stem cell therapy	Neuronata-R
	Glutamate antagonist	Riluzole
헌팅틴병 치료제	dopamine D2 receptor antagonist	Xenazine

<퇴행성 신경질환 치료제 현황>
(퇴행성 뇌질환 치료제의 개발환경 재가공, KISTI, 2013년)

퇴행성 신경질환 치료제 시장은 끊임없는 수요가 발생하고 있음에도 근본적인 치료제가 없어 수요를 충족시키지 못한 상황임

기억력 개선에 관련된 건강기능식품 기능성원료 인정 현황으로는 유해물질을 조절하여 인지 능력의 유지에 도움을 줌, 뇌의 신경전달물질을 조절하여 저하된 인지능력을 개선하는데 도움을 줌 등의 기능성으로 2004년부터 2016년까지 12종의 원료가 등록됨

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	테아닌등복합 추출물	제2004-3호	생리활성기능 3등급	① L-theanine ② GABA	테아닌등복합 추출물 로서 210 mg/일	테아닌은 카페인과 결합작용이 있으므로 섭취 시 카페인 함유음료 (커피, 홍차, 녹차) 섭취 삼가
2	피브로인 효소 가수분해물	제2005-6호	생리활성기능 2등급	"Gly-Ala-Gly-Ala-Gly -Tyr"의 아미노산 서 열을 가지는 펩타이드	피브로인효소가수 분해물 로서 200~400 mg/일	① 성장기 어린이의 기억력 증진 효과가 아님 ② 많이 먹는다고 기억력이 더 좋아지는 것은 아님
		제2007-5호		① Tyrosine ② Alanine		
		제2009-46호		① Tyrosine ② Alanine	피브로인효소가수 분해물 로서 400 mg/일	임산부 및 수유여성 섭취 주의
		제2014-24호				
3	원지추출분말	제2009-12호	생리활성기능 2등급	TMCA(Trimethoxy cinnamic acid)	원지추출분말 로서 300 mg/일	① 과다 섭취 시 구토, 설사, 메스꺼움 등의 위장장애가 나타날 수 있으며 위장장애가 있는 분은 섭취에 주의 ② 임산부, 수유 여성, 어린이는 섭취에 주의
4	홍심농축액 (고시된 원료로 전환 : 홍심)	제2009-29호	생리활성기능 2등급	Rg1과 Rb1의 합	Rg1+Rb 로서 0.16~5.6 mg/일	-
5	인삼가시 오갈피등 혼합추출물	제2009-79호	생리활성기능 3등급	① Ligustilide ② Eleutheroside E ③ Ginsenoside Rg1과 Rb1의 합 ④ Baicalin	인삼가시오갈피 등 혼합추출물 로서 5.2 g/일	① 과량 섭취 시 체질에 따라 소화기 증상이 발생할 수 있으므로 주의 ② 6세 미만 소아는 섭취 전 의사와 상담
6	은행잎추출물 (고시된 원료로 전환)	제2010-22호	생리활성기능 2등급	플라보놀배당체 (Flavonol glycosides) (Kaempferol, Quercetin,	은행잎추출물 로서 120 mg/일	① 어린이, 임산부, 수유부 섭취 주의 ② 수술 전후에는 섭취에 주의 ③ 항응고제 복용시 섭취 주의
		제2010-31호				

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
		제2010-56호		Isorhamnetin의 합		④ 질환자의 경우 섭취 전에 의사와 상담
		제2010-57호				
		제2010-58호				
		제2010-63호				
		제2010-64호				
		제2010-65호				
		제2010-66호				
		제2010-67호				
		제2010-68호				
		제2011-13호				
		제2011-19호				
		제2012-29호				
		제2012-34호		① 어린이, 임신부, 수유부 섭취주의 ② 수술 전후에 섭취 주의 ③ 항응고제 복용시 섭취 주의		
7	녹차추출물 / 테아닌복합물	제2010-51호	생리활성기능 3등급	① 카테킨 ② L-테아닌	녹차추출물/ 테아닌복합물 로서 1,680 mg/일	① 임신부, 수유부 및 어린이 기타 질병을 가지고 있는 사람 섭취 전 의사와 상담 ② 수술 전후 섭취 주의 ③ 과량 섭취시 위장장애, 어지러움 등의 증상이 나타날 수 있음 ④ 카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음 ⑤ 별도 카페인 함유식품과 병용 섭취 삼가
8	당귀등추출 복합물	제2011-3호	생리활성기능 2등급	① 데쿠르신 (Decursin) ② 사우치논 (Sauchinone)	당귀등추출 복합물 로서 800 mg/일	항응고제와 병용 시 주의

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
				① 쉬잔드린 (Schizandrin)		
9	EPA 및 DHA 함유 유지(오메가- 3지방산함유 유지) (고시된 원료로 전환 :EPA 및 DHA 함유 유지)	제2014-10호 제2014-36호 제2014-37호 제2014-41호 제2014-42호 제2014-54호 제2014-55호 제2014-63호 제2015-3호 제2015-8호 제2015-21호 제2016-4호 제2016-5호 제2016-7호 제2016-9호 제2016-12호 제2016-14호 제2016-17호 제2016-19호 제2016-20호 제2016-21호 제2016-22호	생리활성기능 2등급	「건강기능식품의 기준 및 규격」 제3.2.2-16 오메가-3지방산함유유 지 적용	DHA와 EPA의 합 으로서 0.9~2 g/일	-
10	비파엽추출물	제2014-46호	생리활성기능 2등급	Quercetin	비파엽추출물 로서 1.5 g	-
11	구기자추출물	제2014-51호	생리활성기능 2등급	Betaine	구기자추출물 로서 1,425 mg	영유아 및 임신부, 수유부는 의사와 상담 후 섭취
12	천마등복합 추출물	제2015-17호	생리활성기능 2등급	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gastrodin ▪ Salvanolic acid B ▪ Ellagic acid ▪ Spicatoside A 	천마 등 복합 추출물 (HX106) 으로서 1,1 g/일	임산부 및 수유부는 섭취에 주의

<기억력 개선 기능성 원료 현황, 식품의약품안전처 2016>

출시된 기억력 개선제로는 포스파티딜세린 제제, 아세틸엘카르니틴 제제 등 다양한 제품이 있음. 포스파티딜세린은 신경전달 촉진, 기억력·학습능력 향상, 치매 예방, 주의력 결핍 개선, 항우울증 등의 효과가 있는 물질로 알려졌다. 미국 식품의약품안전청(Food and Drug Administration, FDA)에서도 인지기능 개선과 조기 치매 환자의 기억력을 높여 치매 진행을 늦추는 데 도움이 된다고 효능을 인정함

아세틸엘카르니틴은 아미노산의 일종인 ‘엘카르니틴’이 세포의 미토콘드리아 내부에서 효소 작용에 의해 아세틸(-COCH₃)화되면서 전환됨. 엘카르니틴과는 달리 혈액뇌관문이라고 하는 ‘BBB(Blood Brain Barrier)’를 통과할 수 있고, 뇌에서 강력한 항산화제로 작용해 뇌세포의 손상을 방지하는 데 도움이 되는 역할을 함. 동아제약의 ‘니세틸정’, 한국파비스제약의 ‘롱큐원’ 등이 아세틸엘카르니틴을 주성분으로 하는 대표적인 제품임. 이 밖에 우리딘, 시티딘, 글루타민을 함유하는 제품, 피브로인 추출물 제품 등이 있음

주성분	제품명	제약사	분류
포스파티딜세린	생생한인지력1899	종근당	기능성식품
아세틸엘카르니틴	니세틸	동아제약	전문의약품
	롱큐원	한국파비스제약	기능성식품
우리딘, 시티딘, 글루타민	브레인업	한미약품	기능성식품
	아이큐플러스	부광약품	일반의약품
피브로인	파워토닉	광동제약	기능성식품
코엔자임Q10	브레인플래쉬	대웅제약	기능성식품
HX106	공신보감	바이로메드	기능성식품

<기억력 개선제 주성분, 식품의약품안전처 2016>

3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제1절 원료 규격 확립

1. 복합물 소재 선정

- 가. 산조인(酸棗仁)은 갈매나무과에 속하는 산조(*Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa* Hu 산조인 효능연구에서 우수한 기억력 개선능을 확인하였으나 산조인은 ⁶⁾[식품의 기준 및 규격 고시전문_식품의약품안전처 고시 제2016-43호]에서 “식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료”로 등재되어 있어 단독으로는 건강기능식품으로 개발이 불가능함
- 나. 따라서 산조인의 효능을 상승시키는 효과를 나타내는 여러 소재에 대해 신경세포 보호 효과, 수동회피실험, 기억력 개선의 효과가 있는 생약을 연구하여 최종적으로 양유근을 복합 소재로 선정함
- 다. 양유근(羊乳根)은 초롱꽃과[*Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.) Trautv., 더덕]로 분류되며 식품으로 사용가능한 소재로써 전통적으로 해열(解熱), 거담(去痰), 해독(解毒), 배농(排膿) 등의 효과가 있으며, 본 연구를 통하여 양유근이 기억력 개선에 우수한 효능이 있음을 확인함
- 라. 전통적으로 안신(安神), 진정최면(鎮靜催眠)의 약제로 사용되어왔던 생약인 산조인(酸棗仁)과 양유근(羊乳根)을 이용한 기억력 개선의 효능연구에서 효과를 입증하였으며, 이 두 소재를 활용하여 다양한 조합비와 추출 제조방법에 따른 약리작용을 연구하여 최종적으로 산조인, 양유근 복합추출물(DHP1402)을 도출함
- 마. 산조인, 양유근을 특정 비율로 배합한 추출물의 효능을 스코폴라민을 이용한 콜린성 신경전달 억제제를 통한 기억력 감퇴 모델과 β -amyloid(1-42) 단백질로 유도된 신경세포 사멸에 의한 기억력 감퇴모델 등 다양한 평가를 통해 우수한 효능을 확인하였으며, DHP1402이 기억력개선에 도움을 주는 건강기능식품으로 개발가능성이 높을 것으로 판단함
- 바. 산조인, 양유근 복합소재 개발에 따른 장점으로는 산조인, 양유근 단독추출물보다 용량이 1/2로 감소한 반면 효능은 증가되어 두 가지 생약의 상승 효과로 우수한 기억력 개선의 효과가 우수함
- 사. 산조인 단독추출물의 경우 수율이 약 8%이었으나 산조인, 양유근의 복합추출물 소재는 수율이 12%로 증가하고 이로 인해 생산원가 절감의 효과와 산조인은 수입생약으로 중국의 시장변화로 인해 수입가격이 급등하는 추세이며, 양유근은 국내 농가에서 많이 재배하고 있어 안정적인 소재확보가 용이하고 농가의 소득증대 효과가 기대됨

2. 소재 생약에 대한 정보

가. 산조인(酸棗仁)

산조인(酸棗仁)은 갈매나무과에 속하는 산조(*Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa* Hu ex H. F. Chou)의 종자를 건조한 것으로 대조(大棗)와 유사하나 종자가 큼. 산조인의 주된 효능은 신경과민, 불면증 및 건망증치료 등임. 기억력을 좋게 하고 머리를 맑게 하기 때문에 수험생이나 주부 등에게 많이 사용되며, 널리 알려진 총명탕의 재료임


계통분류	피자식물문(Angiospermae) 이판화아강(갈매나무목) 갈매나무과(Archichlamydeae) Rhamnales(갈매나무목)	 <p><산조인 외부형태(한약재진 위감별도감)></p>
식물명	뽕대추	
학명	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>spinosa</i> Hu ex H. F. Chou	
latin명	Zizyphi Semen	
설명	우리나라 각 처의 산기슭 양지, 바닷가 사구, 주로 건조한 곳에 나는 낙엽 교목. 가지 끝과 잎 뒷면에 털이 조금 있거나 없음. 잎은 호생, 난형이며, 윤택이 나고, 밑동에서부터 3맥이 발달, 가장자리에 둔한 톱니가 있으며, 잎자루는 길이 2-5mm, 턱잎은 흔히 강모로 변함. 꽃은 양성, 옅은 황록색, 지름 5-6mm, 취산화서, 2-3송이씩 붙고, 짧은 꽃자루가 있음. 열매는 핵과, 둥근 모양, 길이 1.5-2.5cm, 자갈색, 암갈색으로 익음. 개화기 5-6월, 결실기 9-10월	
생약명	산조인	
성미	性은 平하고 味는 甘·酸하다	
함유성분	Betulic acid, Betulin, Fatty oil, β -Sistosterol, Protein, Organic acid.	
효능/효과	養心安神, 益陰斂汗, 鎮靜, 血壓降下, 子宮興奮.	
채취시기	가을(9-10월)	
국내주요산지	대량재배지 없고 주로 수입에 의존함	
재배시험장	옥천약용식물재배시험장	

<산조인 생약정보(식품의약품안전처 생약DB정보)>

또한 여러 연구들이 산조인의 항산화 효과에 대해 증명하였고, 항산화 효과가 뇌세포에 영향을 끼침으로써 뇌신경의 파괴를 막으며, 인지기능을 개선시킨다는 효능도 보고된 바 있음. 자사에서 진행한 산조인 효능시험 선행연구에서 기억력 개선 효과를 확인하였으므로 기억력 개선 건강기능식품의 소재로 적합하다고 사료되어 선정함

나. 양유근(羊乳根)

양유근[*Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.) Trautv., 더덕]은 식품으로 사용가능한 소재이며 전통적으로 해열(解熱), 거담(去痰), 해독(解毒), 배농(排膿) 등의 효과가 있으며, 본 연구를 통하여 양유근이 기억력 개선에 우수한 효능이 있음을 확인함

계통분류	피자식물문(Angiospermae) 합관화아강 (Sympetalae(Gamopetalae)) 초롱꽃목(Campanulales) 초롱꽃과(Campanulaceae)	 <p>양유 양유 거피</p> <p><양유근 외부형태(식품의약품안전처 알기쉬운 한약재 감별법)></p>
식물명	더덕	
학명	<i>Codonopsis lanceolata</i> (Siebold & Zucc.) Trautv.	
latin명	Codonopsidis Radix	
설명	우리 나라 각처의 숲속에 나는 다년생 덩굴식물. 뿌리는 도라지처럼 굵고, 덩굴을 자르면 흰 유액이 나옴. 잎은 호생, 짧은 가지 끝에서는 4장의 잎이 서로 접근하여 대생하므로 밀생한 것 같고, 피침형, 긴 타원형, 길이 3-10cm, 폭 1.5-4cm, 가장자리는 밋밋하고, 표면은 녹색, 뒷면은 분배색, 털은 없음. 꽃의 겉은 연한 녹색, 안쪽에는 자갈색점이 있고, 짧은 가지 끝에서 아래로 향하여 뿜. 꽃받침은 5갈래, 갈래는 끝이 뾰족하고, 녹색, 길이 2-2.5cm, 폭 6-10mm, 화관의 길이 2.7-3.5cm, 끝이 5갈래, 뒤로 말림. 열매는 삭과, 원추형, 꽃받침이 남아 있음. 개화기 8-9월, 결실기 10월	
생약명	양유근(사업삼)	
성미	性은 平하고 味는 甘하다	
함유성분	α-Spinasterol, Stigmasterol, Oleanolic acid, Albigenic acid, Apigenin.	
효능/효과	催乳, 解毒, 祛痰, 潤肺, 頭痛.	
채취시기	가을	
국내주요산지	울릉도, 횡성, 진부지역	
재배시험장	옥천약용식물재배시험장, 양구약용식물재배시험장	

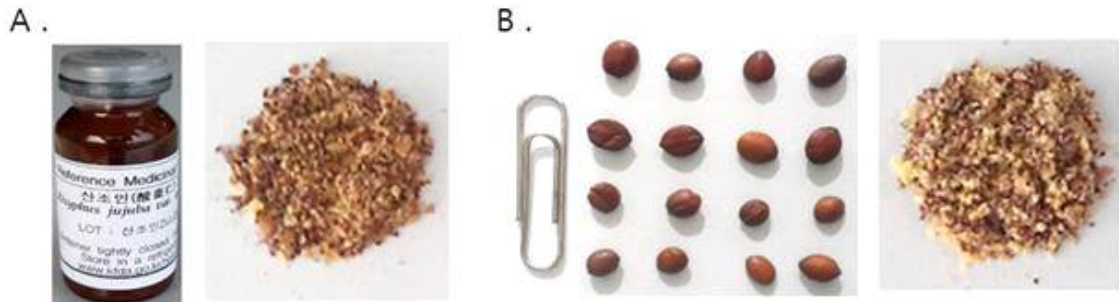
<양유근 생약정보(식품의약품안전처 생약DB정보)>

3. 산조인, 양유근 원생약 표준화

가. 산조인 표준화 연구

(1) 실험목적

산조인은 면산조인(*Zizyphus mauritiana* Lam.)과 원산조인(*Zizyphus jujuba* var. *spinosa*)이 혼용되어 유통되고 있고, 정상 차이도 뚜렷하지 않음. 이에 ‘원산조인’으로 유통되는 생약에 대한 표준화를 위해 유사도 평가를 진행하여 원료의 동등성을 확보함



<A 식약처 분양 표준생약과 B 시험생약의 비교>

(2) 실험방법

(가) 표준용액(control)의 제조

‘식품의약품안전처’에서 분양받은 원산조인(3 g, 표준생약) 0.3 g을 5 mL 용량 플라스크에 기준하여 100% MeOH로 잘 녹임. 이 용액을 0.45 μm syringe filter 로 여과하여 표준용액으로 사용함

(나) 시험용액의 제조

각 산조인 생약을 표준생약과 유사한 정도로 파쇄한 다음 6 g씩 칭량하여 100 mL 용량 플라스크에 기준하여 100% MeOH로 잘 녹임. 이 용액을 0.45 μm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용함

(다) 유사도 평가 분석법(HPLC)

	Time (min)	A% (0.1% formic acid in water)	B% (ACN)
Mobile Phase	0	90	10
	30	80	20
	90	76	24
Detector	UV-280 nm		
Flow rate	0.5 mL/min		
Column temp.	35°C		
Injection volume	10 μL		
Device	HPLC: Agilent 1100 series		
Column	C ₁₈ (4.6 * 250 mm, 5 μm)		

(라) 계산식

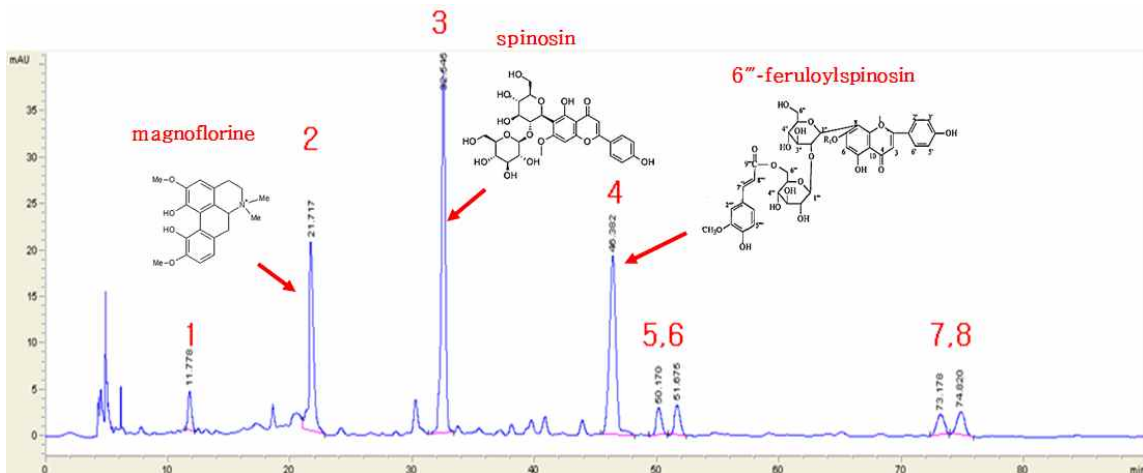
유사도 평가를 위하여 총 8개의 peak를 비교분석하였으며, retention time과 area 값을 하기 계산식에 대입하여 산정된 수치를 바탕으로 평가를 진행함

$$r = \frac{\sum X \times Y - \frac{\sum X \times \sum Y}{N}}{(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N})(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N})}$$

r : 동등상관계수(correlation coefficient)
X : 표준물질에 대한 피크면적(중간값 또는 평균값이 사용 가능함)
Y : 시험물질에 대한 피크면적

(3) 결과 및 고찰

설정된 분석법으로 유사도 평가를 실시한 결과, 표준생약을 포함한 원산조인 (*Zizyphus jujuba* var. *spinosa*) 분석에서 다음의 8개 peak가 재현성을 보이며 관찰되었음



<원산조인에 대한 유사도 평가 분석 peak>

설정된 분석법을 통해 원산조인과 면산조인의 기원이 뚜렷하게 구분되었으며, peak 1, 5, 6, 7, 8 이 원산조인에서만 관찰 가능한 고유 peak라고 확인됨. 또한 제시된 계산식을 바탕으로 원산조인의 유사도 평가를 진행한 결과, ‘식품의약품안전처’에서 분양받은 원산조인 표준생약과 선행연구에서 사용된 원산조인 ‘Sample 21’을 제외한 산조인은 0.9 이상의 유사도를 보여 동일한 생약으로 확인됨. 또한 유통 중인 산조인 27종을 분석한 결과, 그 중 16종이 원산조인(*Zizyphus jujuba* var. *spinosa*)으로 분석되었고, 나머지 11종은 면산조인(*Zizyphus mauritiana*)으로 확인됨



<원산조인과 면산조인의 분석 패턴 비교>

구분	원산지	입수시기	유사도
표준생약	식품의약품안전처	표준생약(2014)	1
Sample 1	중국	유통품(2013)	0.97
Sample 2	미얀마	유통품(2013.11)	0.99
Sample 3	미얀마	유통품(2013.12)	-
Sample 4	중국		0.93
Sample 5	미얀마	유통품(2014.01)	0.99
Sample 6	중국		0.99
Sample 7	미얀마		-
Sample 8	베트남		-
Sample 9	베트남		-
Sample 10	미얀마		-
Sample 11	미얀마		-
Sample 12	중국		-
Sample 13	미얀마		-
Sample 14	중국		0.98
Sample 15	미얀마	유통품(2014.02)	-
Sample 16	중국(산동성 교남)		0.97
Sample 17	중국	유통품(2014.03)	0.98
Sample 18	중국	유통품(2014.04)	
Sample 19	중국(하북성)	채집품(2014.04)	0.99
Sample 20	중국(산동성)		0.97
Sample 21	중국(동북삼성)		0.41
Sample 22	중국(하남성)		0.99
Sample 23	중국(산동성)	채집품(2015.03)	0.94
Sample 24	중국	유통품(2015.03)	0.95
Sample 25	중국(요령성)	채집품(2015.05)	0.99
Sample 26	중국(산동성)		0.97
Sample 27	중국(하남성)		0.97

<원산조인에 대한 유사도 평가 결과값>

* 원생약의 유사도 평가는 표준생약 대비 유사도 값이 0.9 이상일 경우 동일한 생약으로 판단함

산조인의 표준화 연구를 통해 산조인의 감별방법을 확립하였으며, 원생약의 동등성을 확보함

나. 양유근 표준화 연구

(1) 실험목적

양유근(*Codonopsis lanceolata*)의 성상은 인삼과 흡사하며 약재시장에서는 사삼 [*Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. var. *japonica* H. Hara]으로 혼용되어 유통되어지는 일이 빈번히 발생되고 있음. 이에 ‘양유근’으로 유통되는 생약에 대한 유사도 평가를 진행하여 소재의 기원을 명확히 규명하고, 결과값을 바탕으로 제품의 연구개발을 위해 양유근에 대한 표준화 규격화를 설정 하고 규격에 적합한 원생약을 선정하고자 함



A. 양유근 유통품



B. 사삼 유통품

<표준생약과 시험생약의 비교>

(2) 실험방법

(가) 시험용액의 제조

각 구입처의 양유근 생약을 파쇄한 다음 6 g씩 칭량하여 100 mL 용량 플라스크에 기준하여 100% MeOH로 잘 녹임. 이 용액을 0.45 μm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용함

(나) 유사도 평가 분석법(HPLC)

Mobile Phase	Time (min)	A% (0.1% formic acid in water)	B% (ACN)
	0	90	10
	30	85	15
	40	83	17
	70	60	40
Detector	UV-267 nm		
Flow rate	0.5 mL/min		
Column temp.	35°C		
Injection volume	10 μL		
Device	HPLC: Agilent 1100 series		
Column	C ₁₈ (4.6 * 250 mm, 5 μm)		

(다) 계산식

유사도 평가를 위하여 총 8개의 peak를 비교분석하였으며, retention time과 area 값을 계산식에 대입하여 산정된 수치를 바탕으로 평가를 진행함

$$r = \frac{\sum X \times Y - \frac{\sum X \times \sum Y}{N}}{(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N})(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N})}$$

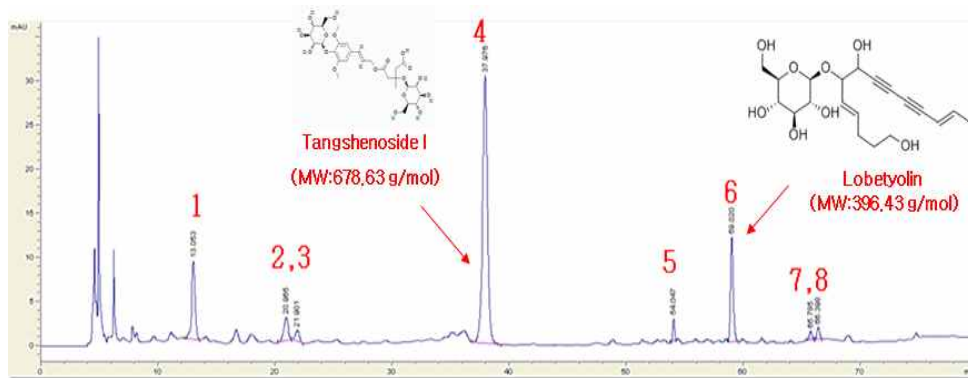
r : 동등상관계수(correlation coefficient)

X : 표준물질에 대한 피크면적(중간값 또는 평균값이 사용 가능함)

Y : 시험물질에 대한 피크면적

(3) 결과 및 고찰

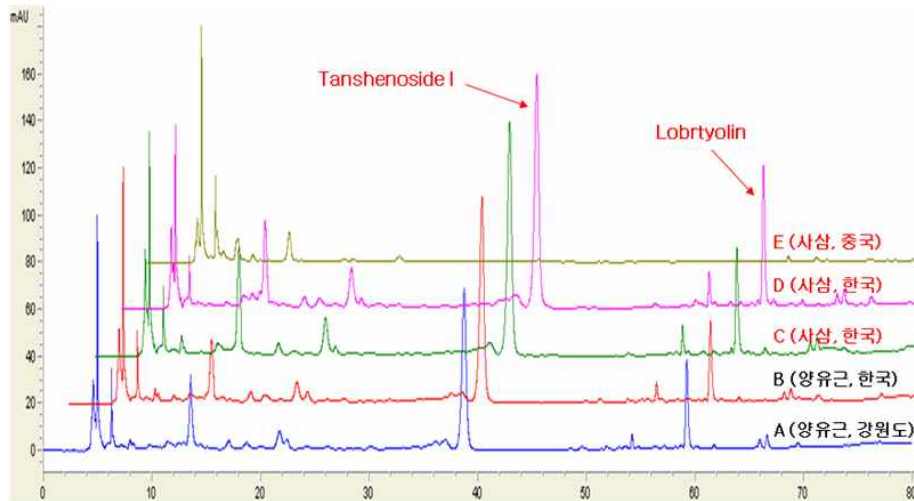
설정된 분석법으로 유사도 평가를 실시한 결과, 양유근(*Codonopsis lanceolata*) 분석에서 다음의 8개 peak가 재현성을 보이며 관찰되었음



<양유근에 대한 유사도 평가 분석 peak>

설정된 분석법을 통해 양유근의 주성분으로 알려진 탄세노사이드 I(peak 4)과 로베티올린(peak 6)의 피크가 뚜렷이 관찰되는 것을 확인함. 이를 바탕으로 양유근과 사삼의 성분 프로파일링을 진행하여 두 생약의 기원을 밝히고자함

기원이 분명한 양유근 A를 control로 하여 산지에 따른 양유근과 사삼의 수집품을 분석한 결과 한국에서 재배된 양유근과 사삼(B-D)은 A와 0.9이상의 유사도를 보여 동일한 생약으로 확인됨. 중국에서 재배된 사삼 E의 경우 탄세노사이드 I과 로베티올린이 관찰되지 않았으며, 0.1 정도의 유사도 값을 나타내어 양유근이 아님을 확인함. 이 결과를 근거로 한국에서 재배된 양유근 및 사삼 4종이 양유근(*Codonopsis lanceolata*)으로 분석되었고, 중국에서 재배된 1종은 사삼(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)인 것으로 확인됨



<양유근과 사삼의 분석 패턴 비교>

구분	원산지	감별 전	유사도	감별 후
A	한국	양유근	1	양유근
B	한국	양유근	0.99	양유근
C	한국	사삼	0.99	양유근
D	한국	사삼	0.99	양유근
E	중국	사삼	0.11	사삼

<양유근에 대한 유사도 평가 결과 값>

* 원생약의 유사도 평가는 control 대비 유사도 값이 0.9 이상일 경우 동일한 생약으로 판단함

유사도 평가 결과와 양유근과 사삼의 구분은 산지에 따라 진행되어야하며, 본 소재를 위한 양유근 수급은 control로 사용된 양유근 'A'를 수급함

양유근의 표준화 연구를 통해 양유근의 감별방법을 확립하였으며, 원생약의 동등성을 확보함

4. 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발

가. 원산조인과 면산조인 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발

(1) 연구배경 및 목적

앞서 원산조인과 면산조인, 양유근과 사삼을 구분하기 위한 HPLC 유사도평가 분석법을 개발하였음

그러나 다수의 시료를 유사도 평가법으로 식별하기는 매우 어렵고, 기준에 따라 구분이 모호하기 때문에 정확한 종 구분을 위하여 분자표지를 이용한 기술을 도입하

였음

DNA 분자표지를 이용한 종 구분 기술은 식물 종간의 유전적 유사성이 매우 높아 표현형에 큰 차이를 보이지 않으며, 종 간의 식별이 어려운 경우 이용될 수 있음, 근래에 식물자원의 구분에 대한 필요성이 증대됨에 따라 정확한 종 구분을 위한 방법으로 분자표지 기술이 대두되고 있음

식물 세포핵의 염색체에는 rRNA(ribosomal RNA)를 암호화하는 18S, 5.8S, 25S(동물에서는 28S) rDNA가 chromosome 상에 순서대로 배열되어 있음. 각각의 rDNA 사이에는 일부 간격이 있는데, 이 간격을 아이티에스(Internal Transcribed Spacer, ITS) 라고 하며, 18S와 5.8S rDNA 사이를 ITS1, 5.8S와 25S rDNA 사이를 ITS2라 함. ITS 부위는 rDNA 유전자에 비해 진화의 속도가 빨라서 서열 변이가 많이 일어나므로 종 또는 변종 구분을 위한 분자표지로 사용되고 있음

엽록체는 식물세포 내에 있는 세포 소기관으로 광합성을 담당하며, 대략 160 kb 정도의 유전체를 갖고 있음

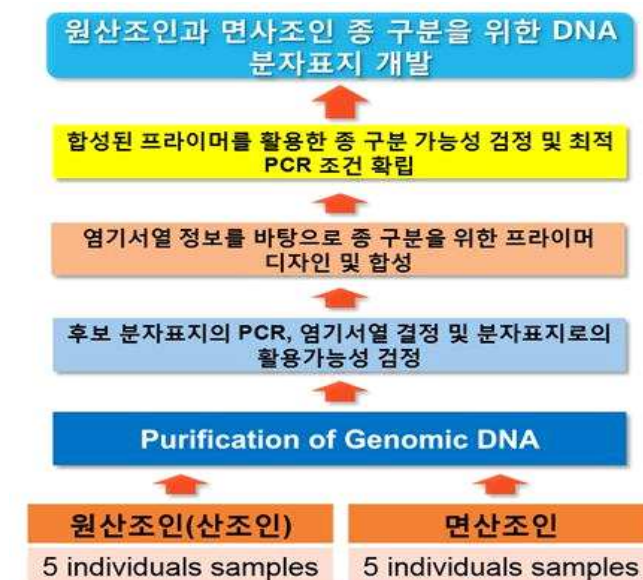
엽록체 유전체에 존재하는 유전자간 서열(intergenic spacer, IGS)이나 인트론(intron)은 진화의 속도가 빨라서 알려진 종 또는 변종들의 구분, 미지 종의 동정, 종/변종들에 대한 계통·분류학적 분석 등을 위한 DNA 바코딩 마커(barcoding marker)로 활발히 활용되고 있음

IGS나 인트론에는 종 또는 변종 간에 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이나 Insertion-Deletion(InDel) 변이가 존재하며 이를 활용하여 DNA 분자표지로 개발되고 있음

본 연구에서는 원산조인(*Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou)과 면산조인(*Zizyphus mauritiana* Lam.)의 종 구분을 위하여 핵 ITS1/2 서열 및 엽록체 IGS(*psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *atpF-atpH* 등) 서열에서의 변이를 탐색하고 이를 종 구분을 위한 DNA 분자표지로 개발하고자 함

(2) 연구추진 전략 및 방법

(가) 추진전략



(나) 재료

3종 [*Zizyphus jujuba* 2종(식약처로부터 분양받은 powder 형태의 control, 조직 상태의 원산조인 시료-5개체 선별, *Zizyphus mauritiana* 1종-5개체 선별)

(다) 방법

① Genomic DNA Extraction

준비된 조직의 일부를 채취하여 genomic DNA(gDNA) 추출에 사용함
조직을 액체 질소에 급속 동결 시킨 후 tissue lyser(TACO prep Bead Beater, Taiwan)에 넣고 40초 간격으로 3번 정도 조직을 잘게 분쇄함

잘게 분쇄된 조직은 Biomedic®PlantgDNAExtractionKit(Biomedic, Korea)을 이용하여, 제공된 방법에 따라 gDNA를 추출함. 분쇄된 조직에 200 µl의 BDE 완충용액과 20 µl의 proteinase K(20 mg/ml) 넣고 잘 섞은 후 65 °C에서 30분간 반응시킴

반응 후 400 µl의 BDB 완충용액을 넣고 잘 섞은 후 용액을 spin column으로 옮긴 후 상온에서 2분간 반응시킴

반응 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고(Ependorff, Germany), 원심분리 후 collection tube의 flow-through를 제거함

Collection tube를 다시 spin column과 결합 후 500 µl의 BWB1 완충용액을 spin column에 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리함. 원심분리 후 collection tube의 flow-through를 제거한 다음 750 µl의 BWB2 완충용액을 spin column에 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리함

원심분리 후 flow-through를 제거한 뒤 최대 rpm으로 2분간 원심분리하여 남은 완충용액을 완전히 제거함

이후 spin column을 새로운 1.5 ml e-tube에 결합하고 spin column에 100 µl의 EB 완충용액을 넣은 후 2분간 방치한 다음, 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 gDNA를 회수함

분리한 gDNA는 DS-11+ nano drop(DeNovix, USA)을 이용하여 정성/정량 분석을 한 다음 실험에 사용함

② 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) Amplification

시료로부터 추출한 gDNA 1 µl(>100 ng/µl)를 취하여 PCR 반응에 사용함

5 µl의 10 x PCR 반응용액, 4 µl의 2.5 mM dNTP, 1 µl의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머, 5 unit의 HS Taq 중합효소를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 50 µl로 맞춘 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함

95°C 10 분, 95°C 30초, 55°C 30초, 그리고 72°C 60초 30회 반복, 마지막으로 72°C 5분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여, 목적 fragment를 확인 후, Biomedic®Gel/PCR Purification Kit(Biomedic, Korea)을 이용, agarose gel로부터 목적 DNA를 분리하여, TA cloning에 사용함

③ TA cloning

순수 분리된 ITS PCR 산물과 pGEM-T easy 벡터(Promega, USA)를 이용하여 cloning을 수행함

Insert ITS와 T-vector를 3:1의 비율로 섞은 후 2 x Rapid Ligation 완충용액, 1 µl T4 DNA ligase(10 unit/µl)를 넣고 최종부피를 10 µl로 맞추는 후, 상온에서 2 시간 ligation 반응한 다음 형질전환을 수행함

형질전환 반응은 준비된, 대장균 competent cell 에 ligation 산물을 섞은 후 ice에서 30분간 반응, 42°C에서 90초 반응 후 다시 ice에서 15분간 반응 후 1 ml LB 배지를 넣고 37°C에서 1시간 동안 진탕배양함

일부 배양액을 X-gal/IPTG가 포함된 고체LB 배지(Amp+)에 도말한 후, 37°C에서 overnight 배양 후 blue/white colony를 선별함

④ Plasmid preparation

White colony를 선별한 후 LB 액체배지(Amp+)에 colony를 접종한 후 37°C에서 overnight 진탕 배양함

1.5 ml의 세포 현탁액을 e-tube에 옮긴 후 10,000 rpm, 5분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 pellet을 취하여 plasmid를 추출하는데 사용함. Plasmid 추출은 Biomedic® Plasmid DNA Miniprep Kit(Biomedic, Korea)를 이용하여, 제공된 방법으로 추출함

Pellet에 200 µl의 BMR 완충용액을 넣고, pellet을 완충용액에 풀어준 다음 200 µl의 BML을 넣고 5-10회 정도 invert하여 용액을 섞어줌

이후 300 µl의 BMP용액을 넣고, 10회 정도 조심스럽게 invert하여 섞은 다음 최대 rpm으로 10분간 원심분리하여 cell debris를 침전시킴. 상층액을 P-spin column에 옮긴 후 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 flow-through를 제거하고 P-spin column에 750 µl의 BMW 완충용액을 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 flow-through를 제거하고, 최대 rpm으로 2분간 추가 원심분리하여 남은 용액을 완전히 제거함

이후 P-spin column에 50 µl의 EB 완충용액을 넣고 1분간 방치한 후, 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 plasmid DNA를 회수함. 분리된 plasmid DNA는 DS-11+ nano drop(DeNovix, USA)을 이용하여 정성/정량 분석을 한 다음 전기영동으로 확인한 후 염기서열 분석에 사용함

⑤ Sequencing Analysis

순수 분리된 plasmid DNA에 대하여 M13 F/R 프라이머를 사용하여 BigDye Terminator v3.1(AppliedBiosystems, USA)을 이용한 방법으로 염기서열 분석용 PCR반응을 수행한 후 3730 DNA analyzer(AppliedBiosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 분석함

염기서열 분석 결과는 Lasergene SeqMan과 MultAlin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) 프로그램을 이용하여 각각의 염기서열의 변이를 분석함

⑥ Development of DNA markers

결정된 염기서열로부터 원산조인과 면산조인 간에 서열 변이를 보이는 부분을 확보하고 이들 부분을 기초로 프라이머(표)를 제작하여 원산조인 혹은 면산조인을 특이적으로 증폭시키거나 크기 차이를 보이도록 증폭시킬 수 있는지의 여부를 판단하고 최종 DNA 표지를 선발함

⑦ Primer Design

Control 시료, 원산조인과 면산조인 특이적 마커 제작을 위해 NCBI database 검색을 통해 원산조인 전체 엽록체 서열과 면산조인 일부 엽록체 서열을 확보후 비교 분석을 통해 원산조인과 면산조인의 구분 가능할 것으로 예측되는 ITS, trnL-trnF, psbA-trnH, 그리고 atpF-atpH 부위를 선정하고 염기서열을 확보하기 위해 Primer3Plus([http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus .cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi))를 이용하여 프라이머를 제작함

⑧ Specific Marker Design

Control, 원산조인과 면산조인 시료로부터 ITS, trnL-trnF, psbA-trnH, 그리고 atpF-atpH 부위에 대한 염기서열을 확보하고, DNASTAR SeqMan 프로그램을 이용하여 multiple sequence alignment를 수행함. 분석을 통해 원산조인과 면산조인의 변이 부위를 확인하고, 각각을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작함

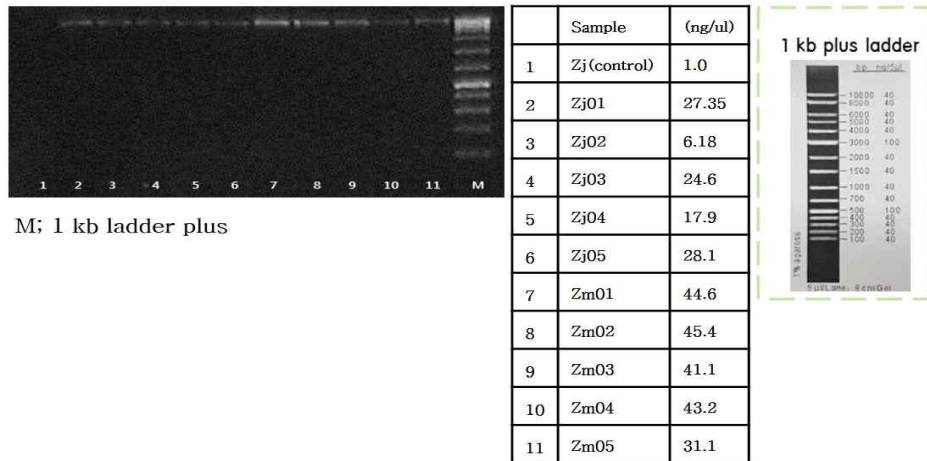
Marker	Primer	Sequence(5'→3')	Amplicon size(bp)	Remarks
DH-1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		염기서열 확보
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
	Zj_ITS(F)	GGTCTGCACCTCGCGCCT	366 bp	원산조인 특이적
	Zj_ITS(R)	CTCGAGGTCGAGGTTGGGAT		
	Zm_ITS(F)	GGGGTTGCATCCCACGCA	179 bp	면산조인 특이적
	Zm_ITS(R)	GAGTCGTTTTGACATATAAGAC		
DH-2	trnL	CAAAAAGGCCCATTTGATTCCC		염기서열 확보
	trnF	TTTCAGTCCTYTGCTYTACCAG		
	Zj_trnL-trnF(F)	TTATTTTTCACAAGCCTTGTGATATATAT	223 bp	원산조인 특이적
	Zm_trnL-trnF(F)	TTCTTTTTCACAAGCCTTTTGATATATAC	222 bp	면산조인 특이적
	Zj/Zm_trnL-trnF(R)	GATGACTTGGGTCTATGTCAAT		원산조인/면산조인 공용
DH-3	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC		염기서열 확보
	trnH	CGGCATGGTGGATTACAAAATC		
	Zj/Zm_psbA-trnH(F)	AGATCTAGCTGCGGTGCAAG	203 bp	원산조인/면산조인 공용
	Zj_psbA-trnH(R)	TCTACATAACGAAAGTATGGGTATG		원산조인 특이적
	Zm_psbA-trnH(R)	GAATGAGAAGAGGATATCGAAAAT	229 bp	면산조인 특이적
DH-4	atpF	ACTCGCACACTCCCTTTCC		염기서열 확보
	atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT		
	Zj_atpF-atpH(F)	ATTAAGATTTCACTCCTACAATTTTCG	333 bp	원산조인 특이적
	Zj_atpF-atpH(R)	TCTATTATTTTTCTAAATTAATAGGAATAG		
	Zm_atpF-atpH(F)	ATTAAGATTTCACTCCGACAATTTCT	342 bp	면산조인 특이적
	Zm_atpF-atpH(R)	CTATTATTTTTCTAAATTAATAGGGTAAAA		

<본 실험에 사용된 프라이머 목록>

(3) 결과

(가) gDNA 추출

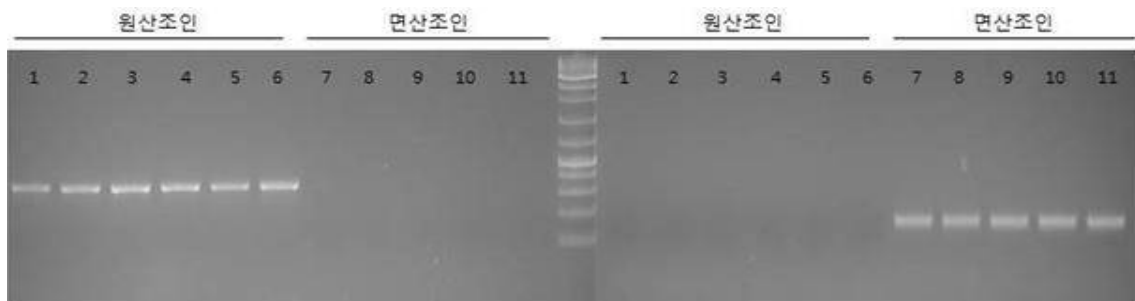
식약처로부터 분양받은 control 시료의 powder와 원산조인/면산조인으로 표시된 조직 시료로부터 각각 50 mg을 취하여 Biomedic®PlantgDNAExtractionKit (Biomedic,Korea)를 사용하여 제공된 방법을 이용하여 gDNA를 추출함. 40 µl TE buffer를 사용하여 gDNA를 elution 한 다음 1 µl씩 취하여 2% agarose gel에서 전기영동을 수행함



<표준시료(Control), 원산조인(Zj), 면산조인(Zm) 시료로부터 추출한 gDNA>

(나) Marker DH-1(ITS-region) 결과

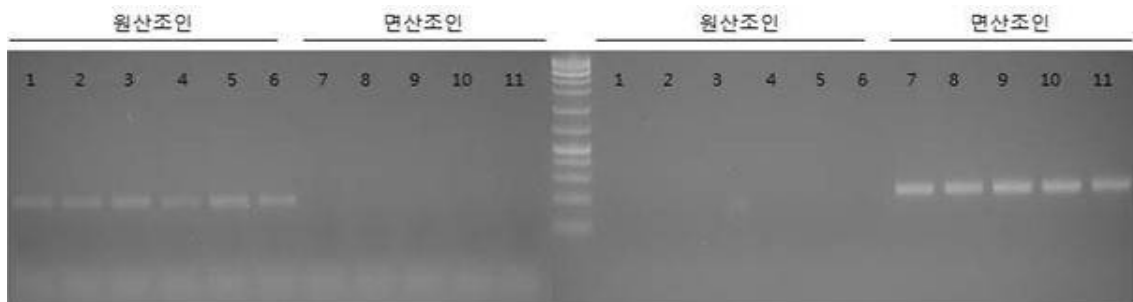
시료로부터 추출한 gDNA 1 µl(>100 ng/µl)를 취하여 PCR 반응에 사용함. 12.5 µl의 2 x HS mix 반응용액, 0.5 µl의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 µl로 맞추는 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94°C 5 분, 94°C 30초, 60°C 30초, 그리고 72°C 30초 27회 반복, 마지막으로 72°C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 원산조인 특이적 마커인 Zj_ITS(F/R)은 원산조인 시료에서만, 면산조인 특이적 마커인 Zm_ITS(F/R)는 면산조인에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker DH-1을 이용한 PCR 증폭. Lane 1, Control 시료; lanes 2-6, 원산조인 시료; lanes 7-11, 면산조인 시료>

(다) Marker DH-2(trnL-trnF-region) 결과

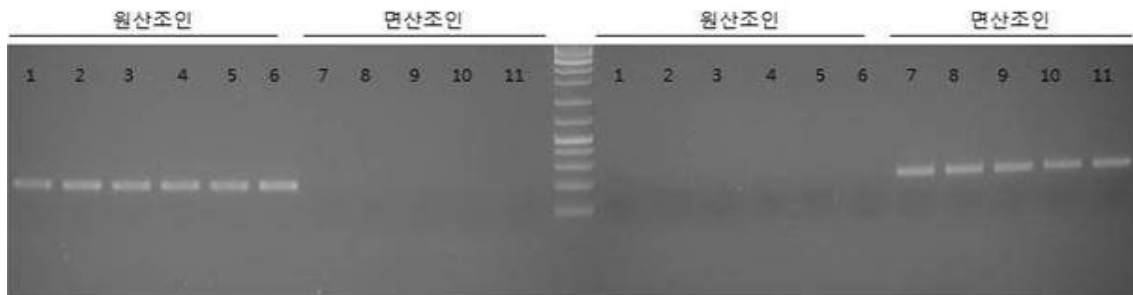
시료로부터 추출한 gDNA 1 μ l(>100 ng/ μ l)를 취하여 PCR 반응에 사용함. 12.5 μ l의 2 x HS mix 반응용액, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞추는 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5 분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 35회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 원산조인 특이적 마커인 Zj_trnL-trnF(F/R)은 원산조인 시료에서만, 면산조인 특이적 마커인 Zm_trnL-trnF(F/R)는 면산조인에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker DH-2을 이용한 PCR 증폭. Lane 1, Control 시료; lanes 2-6, 원산조인 시료; lanes 7-11, 면산조인 시료>

(라) Marker DH-3(psbA-trnH region) 결과

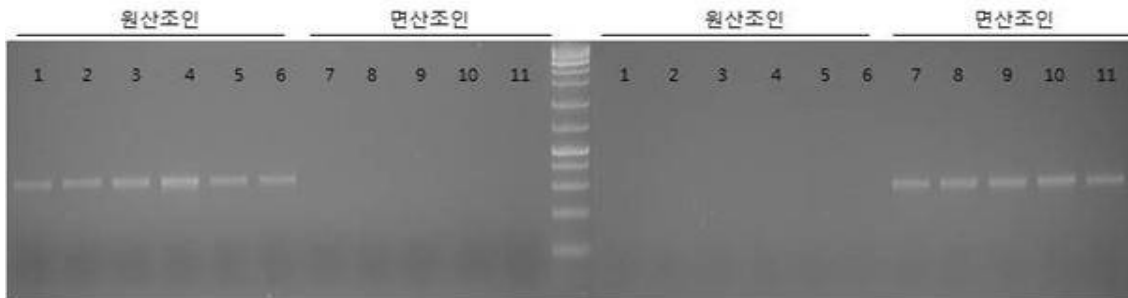
시료로부터 추출한 gDNA 1 μ l(>100 ng/ μ l)를 취하여 PCR 반응에 사용함. 12.5 μ l의 2 x HS mix 반응용액, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞추는 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5 분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 30회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 원산조인 특이적 마커인 Zj_psbA-trnH(F/R)은 원산조인 시료에서만, 면산조인 특이적 마커인 Zm_psbA-trnH(F/R)는 면산조인에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker DH-3을 이용한 PCR 증폭. Lane 1, Control 시료; lanes 2-6, 원산조인 시료; lanes 7-11, 면산조인 시료>

(마) Marker DH-4(atpF-atpH region) 결과

시료로부터 추출한 gDNA 1 µl(>100 ng/µl)를 취하여 PCR 반응에 사용함. 12.5 µl의 2 x HS mix 반응용액, 0.5 µl의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 µl로 맞춘 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94°C 5 분, 94°C 30초, 53°C 30초, 그리고 72°C 30초 35회 반복, 마지막으로 72°C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 원산조인 특이적 마커인 Zj_atpF-atpH(F/R)은 원산조인 시료에서만, 면산조인 특이적 마커인 Zm_atpF-atpH(F/R)는 면산조인에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker DH-4을 이용한 PCR 증폭. Lane 1, Control 시료; lanes 2-6, 원산조인 시료; lanes 7-11, 면산조인 시료>

(4) 결론

원산조인/면산조인을 구분할 수 있는 분자마커 개발을 위해 받은 3종[식약처 분양 표준시료(powder), 원산조인 조직시료(종자), 면산조인 조직시료(종자)]의 시료로부터 gDNA를 추출하고 이를 주형으로 하여 *in silico* 분석을 통해 분자마커로 사용가능한 부위에 대한 프라이머를 제작하여 PCR 증폭을 수행한 다음 염기서열 분석을 수행함. 분석된 염기서열을 토대로 원산조인/면산조인에 대한 구별이 가능한 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 부위를 포함하는 프라이머 쌍들을 제작하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 원산조인 특이 마커는 원산조인에서만 해당 유전자를 증폭시키고, 면산조인 특이 마커는 면산조인에서만 해당 유전자를 증폭시킴을 확인함

따라서 상기 실험을 통해 선별된 DH-1, -2, -3, 그리고 -4 이 총 4개의 마커를 사용하면 원산조인과 면산조인의 구분이 가능한 것으로 판단됨

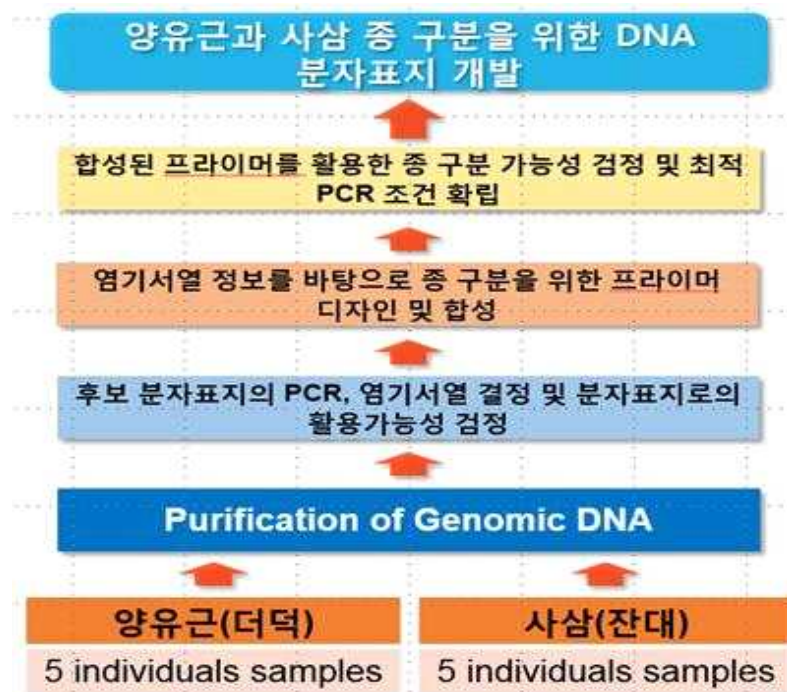
나. 양유근과 사삼 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발

(1) 연구배경 및 목적

본 연구에서는 양유근[식물학적 명칭-더덕; 학명-*Codonopsis lanceolata*]과 사삼(식물학적 명칭-잔대; 학명-*Adenophora triphylla* var. *japonica*)의 종 구분을 위하여 엽록체의 IGS(*psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *atpF-atpH*)와 *rbcL* 유전자 서열에서의 변이를 탐색하고 이를 종 구분을 위한 DNA 분자표지로 개발하고자 함.

(2) 연구 추진전략 및 방법

(가) 추진전략



(나) 재료

중국산 사삼(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)과 국내산 양유근(*Codonopsis lanceolata*) 조직 시료부터 각각 5개의 시료를 사용하여 수행

(다) 방법

① Genomic DNA Extraction ~ Sequencing Analysis

산조인에서 사용한 방법과 동일함

② Development of DNA markers

결정된 염기서열로부터 양유근과 사삼 간에 서열 변이를 보이는 부분을 확보하고 이들 부분을 기초로 프라이머(표)를 제작하여 양유근 혹은 사삼을 특이적으로 증폭시키거나 크기 차이를 보이도록 증폭시킬 수 있는지의 여부를 판단하고 최종 DNA 표지를 선발함

③ Primer Design

양유근과 사삼 특이적 마커 제작을 위해 NCBI database 검색을 통해 사삼 일부

엽록체 서열과 양유근 일부 엽록체 서열을 확보 후 비교 분석을 통해 양유근과 사삼의 구분 가능할 것으로 예측되는 atpF-atpH, matK, psbA-trnH, rbcL 부위를 선정하고 염기서열을 확보하기 위해 Primer3Plus(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)를 이용하여 프라이머를 제작함

④ Specific Marker Design

사삼과 양유근 시료로부터 atpF-atpH, matK, psbA-trnH, rbcL 부위에 대한 염기서열을 확보하고, DNASTAR SeqMan v7.1 프로그램을 이용하여 align 분석함. 분석을 통해 사삼과 양유근의 변이 부위를 확인하고, 각각을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작함

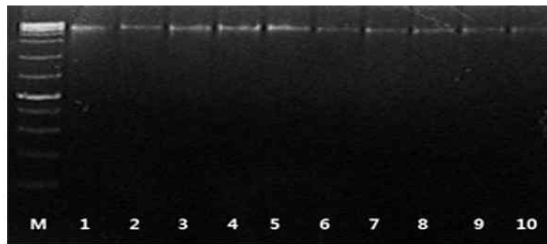
Marker	Primer	Sequence(5'→3')	Amplicon size(bp)	Remarks
CL-1	atpF	ACTCGCACACACTCCCTTTCC		염기서열 확보
	atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT		
	At_atpF-atpH(F)	ATTCTGATTTTCCCATTTCTTCC	293 bp	사삼 특이적
	At_atpF-atpH(R)	CTTTTGTTTAATCTTCGAAATTTGCA		
	Cl_atpF-atpH(F)	CCAAGGGCTTCCTTAGATTAC	208 bp	양유근 특이적
	Cl_atpF-atpH(R)	CTTTTGTTTAATCTTAAGAAAGATGCTT		
CL-2	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG		염기서열 확보
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC		
	At_matK(F)	CTTAATAGCATTATCACTTAGAAATAA	293 bp	사삼 특이적
	At_matK(R)	AAGGCAATCTATGGATATTCACC		
	Cl_matK(F)	GACTAGCATTATCGCTTAGAAATGC	290 bp	양유근 특이적
	Cl_matK(R)	ACCCAATTTGTGGGTGTTTCGAG		
CL-3	rbcL(F)	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC		염기서열 확보
	rbcL(R)	GTAAAATCAAGTCCACCRG		
	At_rbcL(F)	ATTTTGGCAGCCTTTTCGAGTC	342 bp	사삼 특이적
	At_rbcL(R)	TTGAAATGTTTTAATATACGCAGTT		
	Cl_rbcL(F)	ATTTTGGCAGCATTCCGCGTA	340 bp	양유근 특이적
	Cl_rbcL(R)	GGAAAGTTTTTCACATACGCAGGC		
CL-4	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC		염기서열 확보
	trnH	CGCGCATGGTGGATTACAATCC		
	At_psbA-trnH(F)	GGGCGTTTTTCTTCCTCTCTTT	169 bp	사삼 특이적
	At_psbA-trnH(R)	CCTAATAGAAAAGAAAAATCTTCATTTTG		
	Cl_psbA-trnH(F)	GCGTTATTGGTCCCCCATT	152 bp	양유근 특이적
	Cl_psbA-trnH(R)	TCCAACCTTCTGTTATTGCACA		

<본 실험에 사용된 프라이머 목록>

(3) 결과

(가) gDNA 추출

국내산 양유근과 중국산 사삼 조직 시료로부터 각각 50 mg을 취하여 Biomedic®PlantgDNAExtractionKit(Biomedic,Korea)를 사용하여 제공된 방법을 이용하여 gDNA를 추출함. 40 μ l TE buffer를 사용하여 genomic DNA를 elution 한 다음 1 μ l 씩 취하여 2% agarose gel에서 전기영동을 수행함



M; 1 kb ladder plus

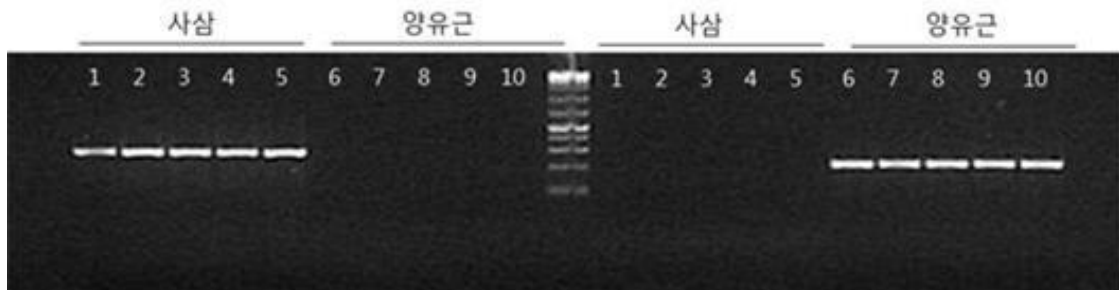
	Sample	(ng/ μ l)
1	At01	54.46
2	At02	41.17
3	At03	50.75
4	At04	47.31
5	At05	60.5
6	Cl01	25.32
7	Cl02	29.25
8	Cl03	37.89
9	Cl04	22.18
10	Cl05	34.73



<사삼과 양유근 시료로부터 추출한 gDNA>

(나) Marker CL-1(atpF-atpH region) 결과

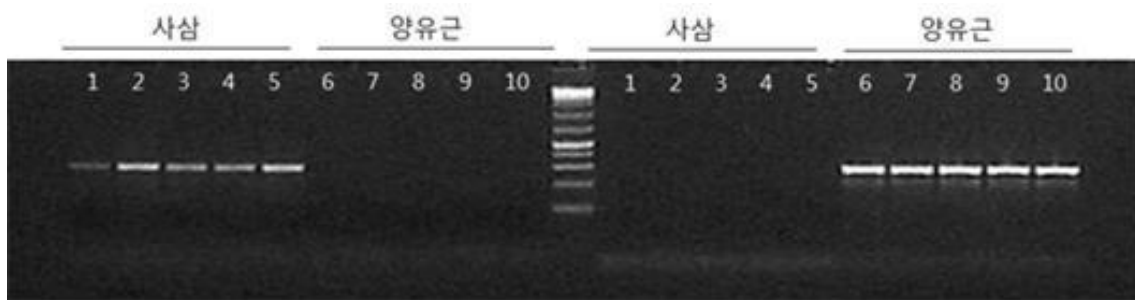
시료로부터 추출한 gDNA를 사용하여 PCR 반응을 수행함. 12.5 μ l의 2x HS Taq mix 반응용액, 0.5 μ l의 gDNA, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞춘 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 35회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 사삼 특이적 마커인 At_atpF-atpH(F/R)은 사삼 시료에서만, 양유근 특이적 마커인 Cl_atpF-atpH(F/R)는 양유근에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker CL-1을 이용한 PCR 증폭. Lanes 1-5, 사삼 시료; lanes 6-10, 양유근 시료>

(다) Marker CL-2(matK region) 결과

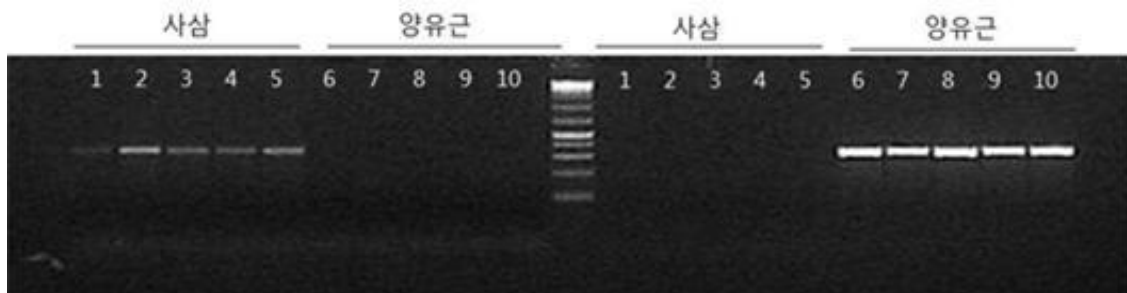
시료로부터 추출한 gDNA를 사용하여 PCR 반응을 수행함. 12.5 μ l의 2x HS Taq mix 반응용액, 0.5 μ l의 gDNA, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞추는 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 35회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 사삼 특이적 마커인 At_matK(F/R)은 사삼 시료에서만, 양유근 특이적 마커인 CL_matK(F/R)는 양유근에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker CL-2을 이용한 PCR 증폭. Lanes 1-5, 사삼 시료; lanes 6-10, 양유근 시료>

(라) Marker CL-3(rbcL region) 결과

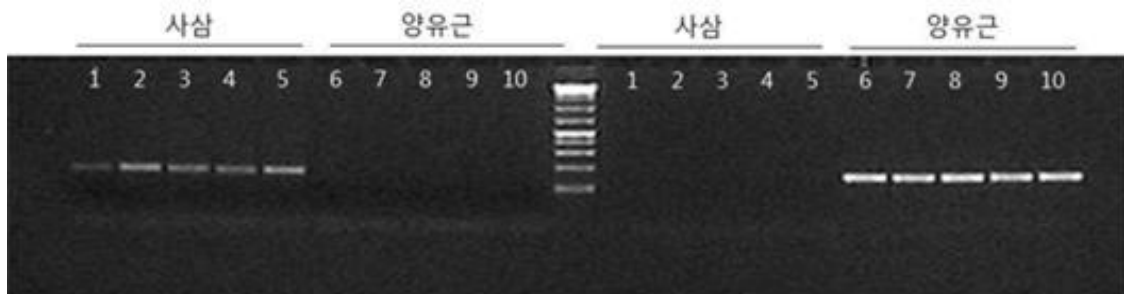
시료로부터 추출한 gDNA를 사용하여 PCR 반응을 수행함. 12.5 μ l의 2x HS Taq mix 반응용액, 0.5 μ l의 gDNA, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞추는 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 27회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 사삼 특이적 마커인 At_rbcL(F/R)은 사삼 시료에서만, 양유근 특이적 마커인 CL_rbcL(F/R)는 양유근에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker CL-3을 이용한 PCR 증폭. Lanes 1-5, 사삼 시료; lanes 6-10, 양유근 시료>

(마) Marker CL-4(psbA-trnH region) 결과

시료로부터 추출한 gDNA를 사용하여 PCR 반응을 수행함. 12.5 μ l의 2 x HS Taq mix 반응용액, 0.5 μ l의 gDNA, 0.5 μ l의 10 pmole 정방향/역방향 프라이머를 섞은 후 멸균된 증류수로 최종 25 μ l로 맞춘 후, 다음과 같은 과정으로 PCR을 수행함. 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C 30초 27회 반복, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C 7분. 반응이 끝난 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 PCR 산물을 확인함. 전기영동 확인 결과, 사삼 특이적 마커인 At_psbA-trnH(F/R)은 사삼 시료에서만, 양유근 특이적 마커인 CL_psbA-trnH(F/R)는 양유근에서만 PCR 증폭이 되는 것을 확인함



<Marker CL-4을 이용한 PCR 증폭. Lanes 1-5, 사삼 시료; lanes 6-10, 양유근 시료>

(4) 결론

양유근과 사삼을 구분할 수 있는 분자마커 개발을 위해 2종[양유근 조직시료 5개, 사삼 조직시료 5개]의 시료로부터 gDNA를 추출하고 이를 주형으로 분자마커로 개발이 가능한 부위를 결정하고, PCR 반응을 수행, 염기서열을 분석함. 분석된 염기서열을 바탕으로 양유근과 사삼에 대한 종 구분이 가능한 특이 프라이머를 제작하였고, PCR 증폭을 수행하여 양유근과 사삼 각각에서 특이적인 밴드를 확인함

위와 같은 실험을 통해 양유근과 사삼에 대해 종 구분이 가능한 4개의 분자마커를 확보하였고, 이를 이용하여 양유근(5개체)과 사삼(5개체) gDNA에 대해 PCR을 수행, 전기영동을 통하여 확인한 결과 양유근과 사삼 특이적인 4개의 분자마커는 해당 종에서만 특이적으로 증폭시킴을 확인함

이러한 결과는, 상기 실험을 통해 발굴된 총 4개의 분자마커(CL-1, -2, -3, 그리고 -4)는 양유근과 사삼의 종 구분에 활용 가능한 것으로 판단됨

제2절 함유 성분 분리 및 기준 및 시험법 확립

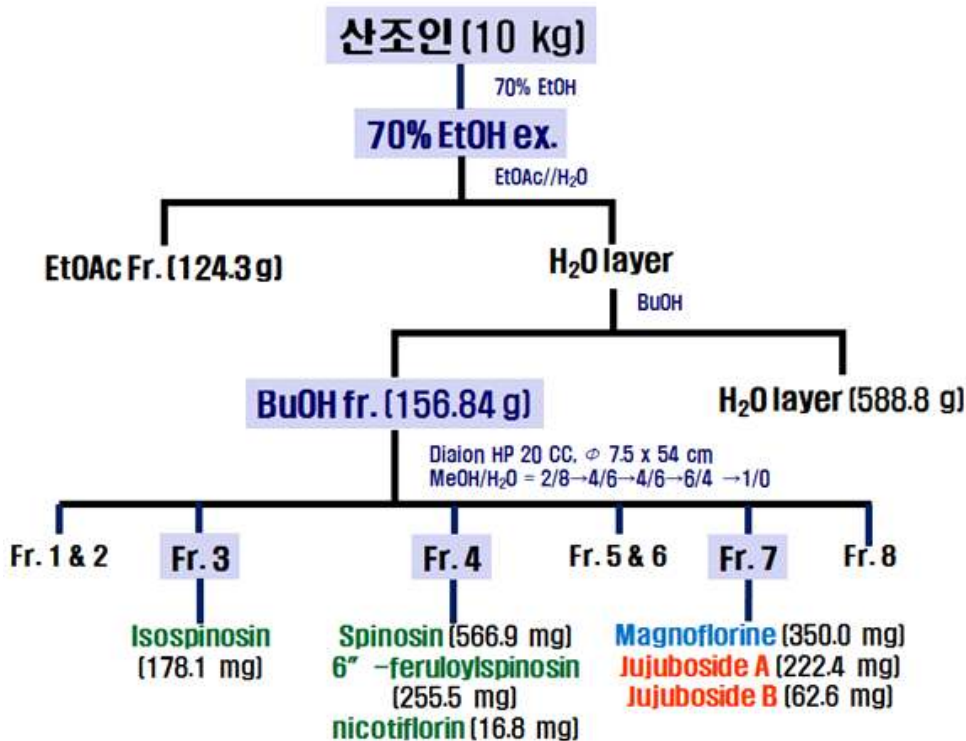
1. 함유 성분 분리

가. 산조인 성분 분리

(1) 실험목적

산조인 추출물의 용매 분획물에서 기능성분을 분리하여 기억력 보호 효능 평가 및 기억력 증강 평가를 실시함

(2) 실험방법



<산조인 성분 분리 과정>

(가) Spinosin의 분리

- ① 부탄올 분획물을 MeOH-H₂O 혼합용매[2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 0:1 각각 4000 mL 씩]를 이동상으로 하여 Diaion HP20 column chromatography(∅7.5×54 cm)를 실시 후 8개의 소분획물로 나눔. 이 중 소분획물 F4를 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매[8:1.8:0.2, 7:2.7:0.3, 6:3.6:0.4, 0:1 각각 5000 mL씩]를 이동상으로 silica gel column chromatography(∅6.3×34 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 14개의 소분획물로 나눔.
- ② 이 중 소분획물 F4-9에서 얻어진 MeOH-insoluble fraction을 0.1% TFA가 함유된 MeOH-H₂O 혼합용매(2:8, 4:6 각각 1000 mL씩 용리)를 이동상으로 한

RP18 glass column chromatography($\varnothing 4.1 \times 47.7$ cm)를 실시하여 spinosin을 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

(나) Isospinosin의 분리

- ① 부탄올 분획물을 Diaion HP20 column chromatography CC($\varnothing 7.5 \times 54$ cm)을 이용하여 8개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F3을 silica gel CC($\varnothing 4.7 \times 37.9$ cm, 230-400 mesh)을 이용하여 다시 7개의 소분획물로 나눔.
- ② 이 중 소분획물 F3-5로부터 MeOH 재결정을 실시하여 isospinosin을 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

(다) 6''-Feruloyl spinosin의 분리

- ① 부탄올 분획물을 Diaion HP20 CC($\varnothing 7.5 \times 54$ cm)을 이용하여 8개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F4에 대해서 silica gel CC($\varnothing 6.3 \times 34$ cm, 230-400 mesh)를 실시하여 다시 14개의 소분획물로 나눔.
- ② 이 중 소분획물 F4-7에서 RP18 reverse-phased CC($\varnothing 4.1 \times 47.7$ cm)을 이용하여 feruloyl spinosin을 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

(라) Nicotiflorin의 분리

- ① 부탄올 분획물을 Diaion HP20 CC($\varnothing 7.5 \times 54$ cm)을 이용하여 8개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F4를 silica gel CC($\varnothing 6.3 \times 34$ cm, 230-400 mesh)을 이용하여 다시 14개의 소분획물로 나눔.
- ② 이 중 소분획물 F4-7에서 RP18 reverse-phased CC($\varnothing 4.1 \times 47.7$ cm)을 이용하여 feruloyl spinosin을 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

(마) Magnoflorin의 분리

- ① 부탄올 분획물을 Diaion HP20 column chromatography CC($\varnothing 7.5 \times 54$ cm)을 이용하여 8개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F7을 silica gel CC($\varnothing 4.7 \times 37.9$ cm, 230-400 mesh)을 이용하여 magnoflorin을 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

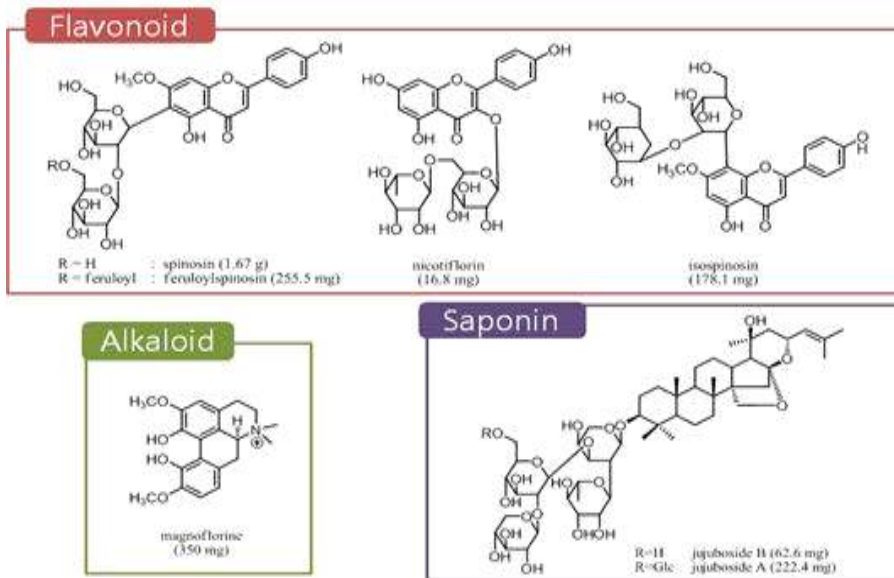
(바) Jujuboside A와 B의 분리

- ① 부탄올 분획물을 Diaion HP20 CC($\varnothing 7.5 \times 54$ cm)를 실시하여 8개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F7을 silica gel CC($\varnothing 5 \times 32$ cm, 230-400 mesh)을 이용하여 다시 8개의 소분획물로 나눔.
- ② 이 중 소분획물 F5에서 RP18 reverse-phased CC($\varnothing 5.5 \times 45.5$ cm)을 이용하여 jujuboside A, B를 분리함. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정함

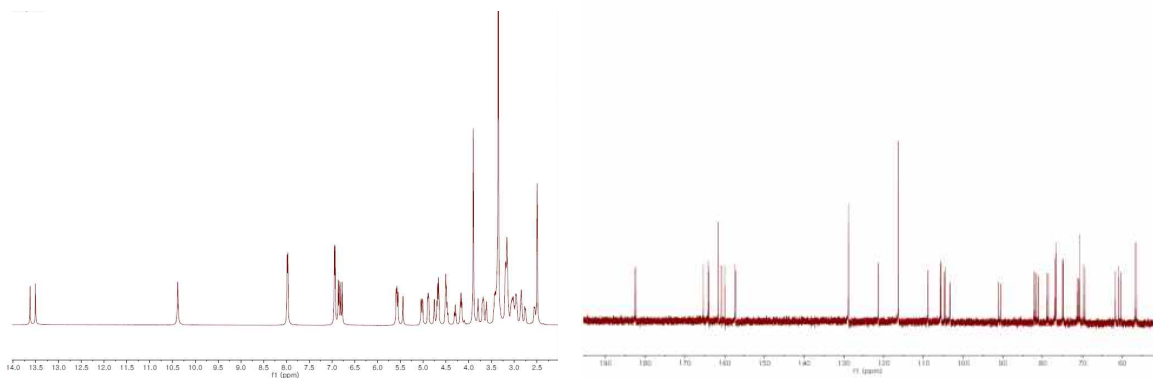
(3) 결과 및 고찰

BuOH 분획물(156.84g) 중 소분획물 F4(13.92 g)을 silica gel column chromatography를 실시하여 14개의 소분획물(소분획물 F4-1 - 소분획물 F4-9)로

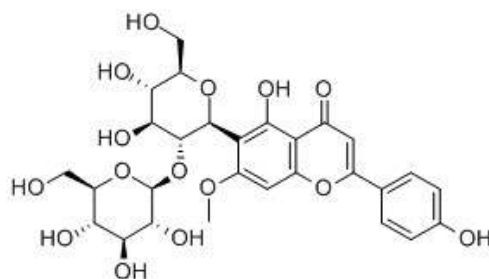
나누었고, 이 중 소분획물 F4-9와 소분획물 F4-10에서 MeOH-insoluble fraction (767.39 mg)을 RP18 glass column chromatography를 실시하여 spinosin(566.9 mg)을 분리함. 산조인 부탄올 분획물에서 반복적인 column chromatography를 이용하여 isospinosin(178.1 mg), 6'''-feruloyl spinosin(255.5 mg), nicotiflorine(16.8 mg), magnoflorine(350.0 mg), jujuboside A(222.4 mg), jujuboside B(62.6 mg)를 분리 및 구조동정함



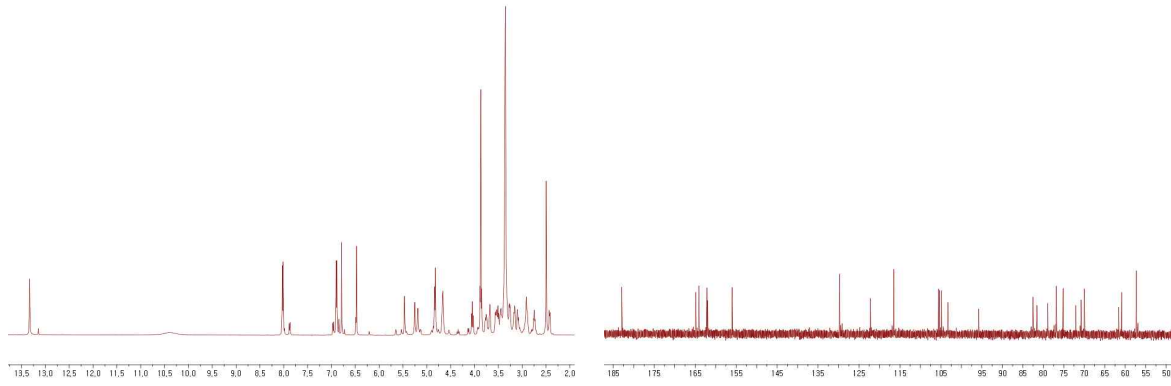
<산조인에서 분리한 물질들의 화학구조>



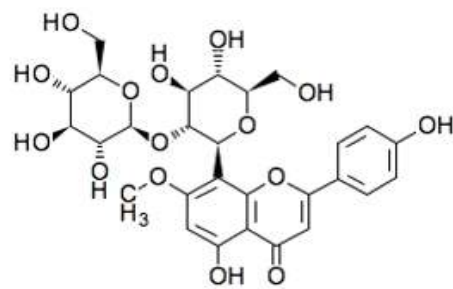
<산조인에서 분리한 Spinosin의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼>



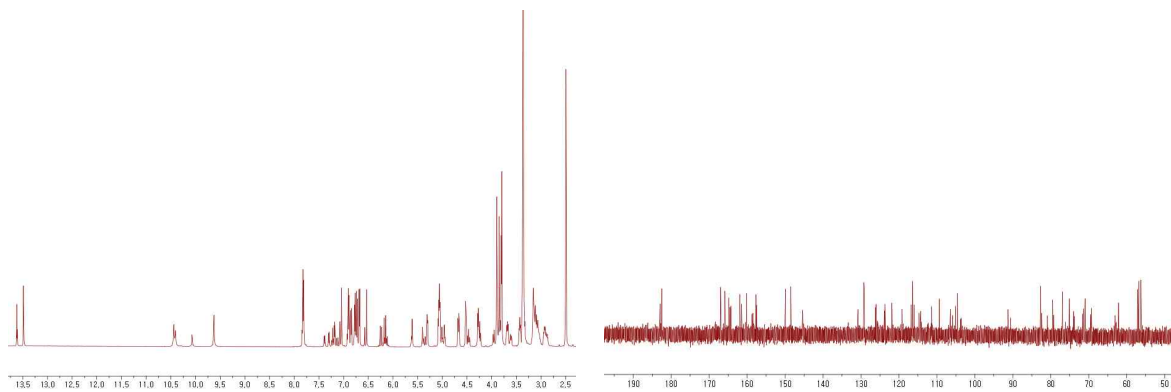
<산조인에서 분리한 Spinosin의 화학구조>



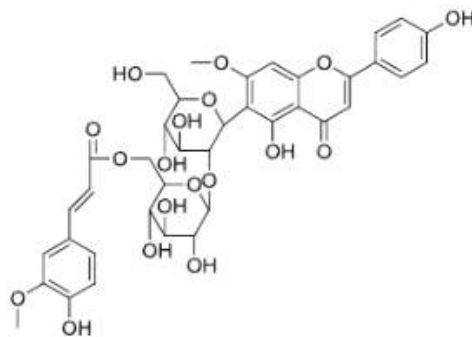
<산조인에서 분리한 Isospinosin의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



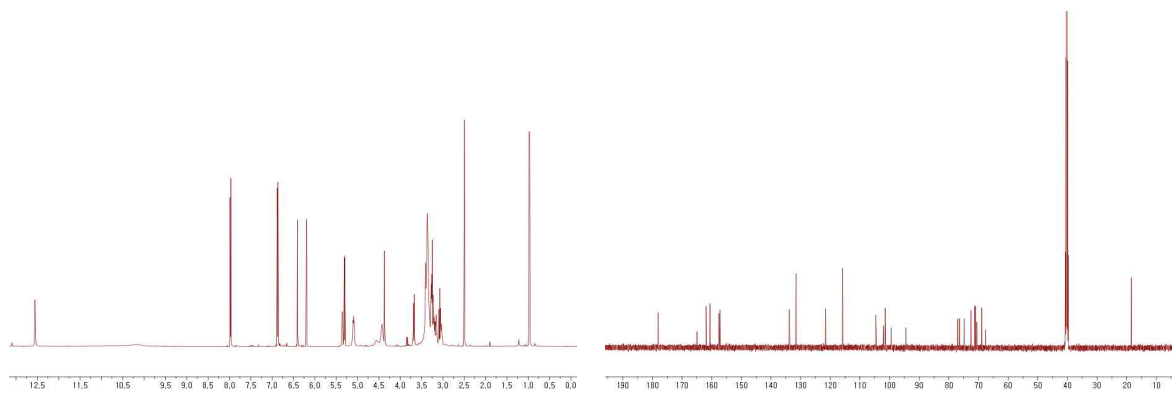
<산조인에서 분리한 Isospinosin의 화학구조>



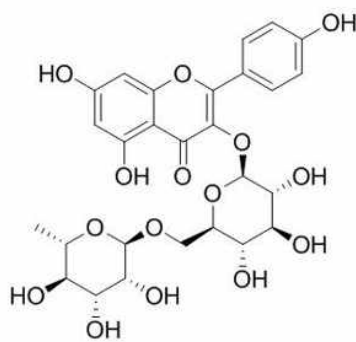
<산조인에서 분리한 6'''-Feruloyl spinosin의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



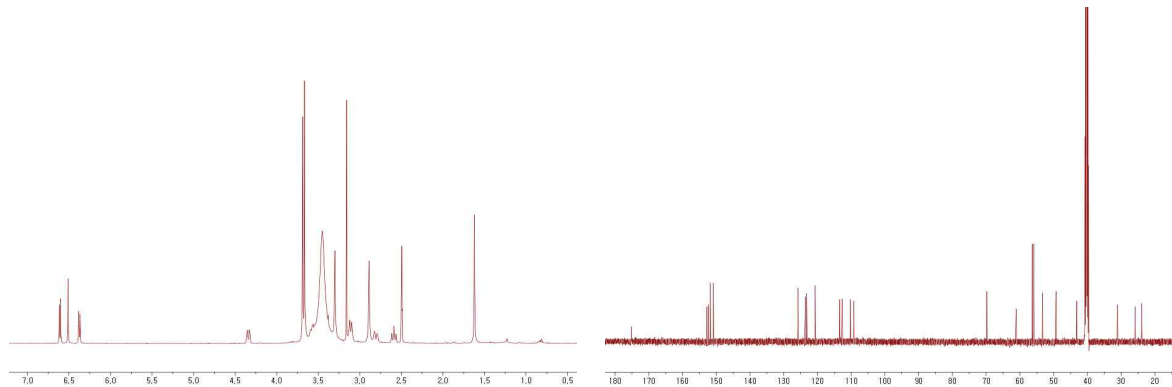
<산조인에서 분리한 6'''-Feruloyl spinosin의 화학구조>



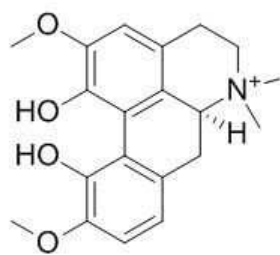
<산조인에서 분리한 Nicotiflorin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



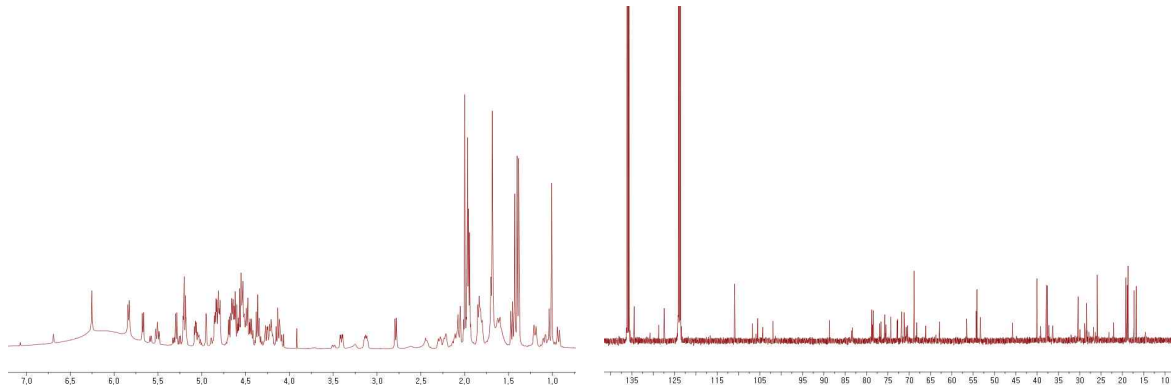
<산조인에서 분리한 Nicotiflorin의 화학구조>



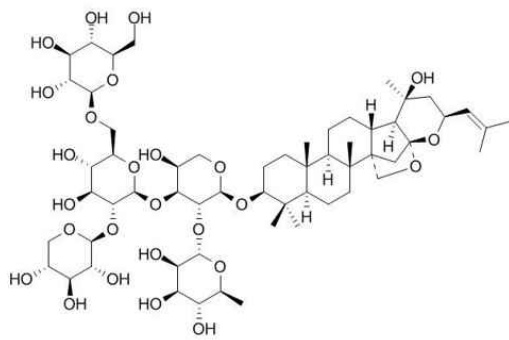
<산조인에서 분리한 Magnoflorin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



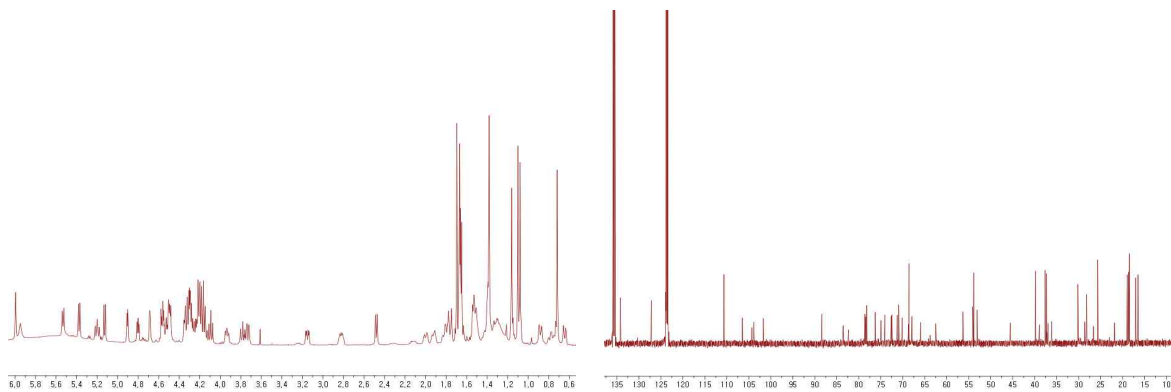
<산조인에서 분리한 Magnoflorin의 화학구조>



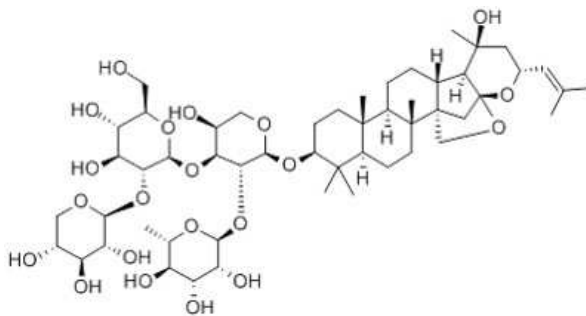
<산조인에서 분리한 Jujuboside A의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



<산조인에서 분리한 Jujuboside A의 화학구조>



<산조인에서 분리한 Jujuboside B의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



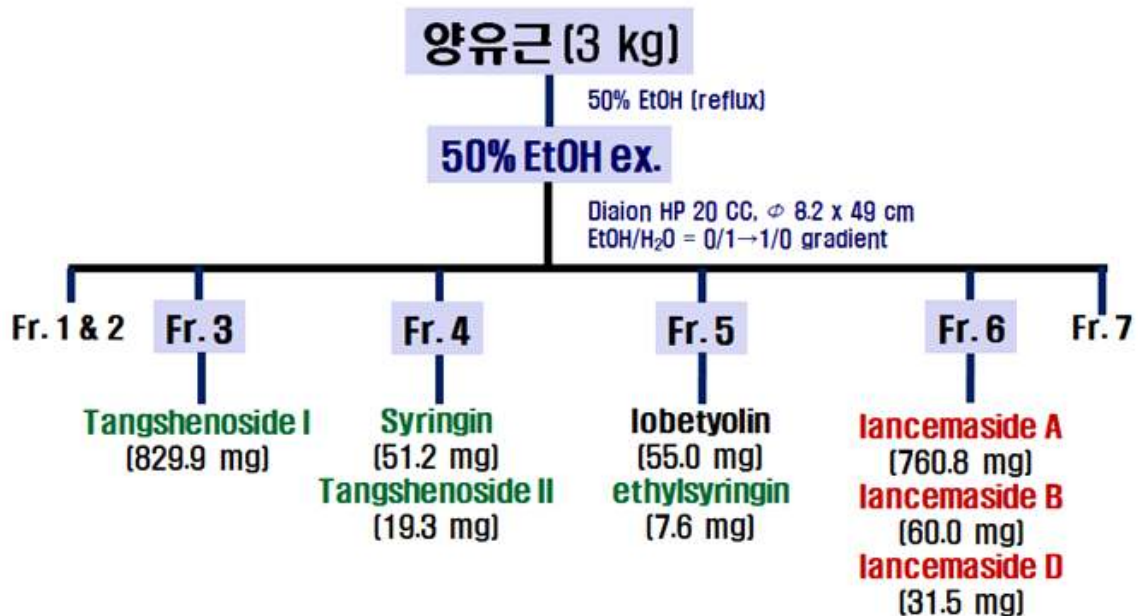
<산조인에서 분리한 Jujuboside B의 화학구조>

나. 양유근 성분 분리

(1) 실험목적

DHP1402 복합추출물의 구성 생약인 양유근 성분을 용매 분획을 통하여 분리하고 구조동정을 실시하여 성분을 규명함

(2) 실험방법



<양유근 성분 분리 과정>

(가) Lobetyolin의 분리

③ 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 column chromatography(CC, ϕ 8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F5을 Silica gel CC(ϕ 5.4×38cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 13개의 소분획물로 나눔. 이 중 소분획물 F9을 HPLC [이동상: 각각 0.1% formic acid가 첨가된 water(A)와 MeOH(B), 조성비율: 40-50%(70min) → 70-100%(5min) → 100%(15min), 유속 7ml/min]를 통해 lobetyolin을 분리함(1차 분리 : 34.5mg)

④ 이 후 소분획물 F10-12에 대하여 Sephadex CC(ϕ 4.6×52m)를 이용하여 총 9개의 소분획물로 나눔. 이 중 lobetyolin함량이 가장 높은 소분획물을 위와 동일한 방법으로 HPLC를 이용하여 추가적으로 lobetyolin을 분리함(2차 분리 : 20.4mg)

(나) Lancemaside A의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(ϕ 8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F6을 Silica gel CC(ϕ 5.2×31cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 14개의 소분획물로 나눔. 소분획물 F13에 대하여 Silica gel CC (ϕ 4.7×38.5cm, 230-400 mesh)을 이용하여 lancemaside A를 분리함(760.8mg)

(다) Lancemaside B의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F6을 Silica gel CC(∅5.2×31cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 14개의 소분획물로 나눔. 그 후 소분획물 F13을 다시 Silica gel CC(∅4.7×38.5cm, 230-400 mesh)을 이용하여 5개의 소분획물로 나누었고, 소분획물 F5를 MPLC(C18, 43g, MeOH:Water = 45:55 → 65:35)를 이용하여 lancemaside B를 분리함(60.0mg)

(라) Lancemaside D의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F6을 Silica gel CC(∅5.2×31cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 14개의 소분획물로 나눔. 이 중 소분획물 F6을 MPLC(C18, 43g, MeOH:Water = 35:65 → 60:40)를 이용하여 lancemaside D를 분리함(31.5mg)

(마) Ethylsyringin의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F5를 Silica gel CC(∅5.4×38cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 13개의 소분획물로 나눔. 소분획물 F6에 대하여 Sephadex CC (∅2.3×41cm)를 이용하여 나눈 후, 소분획물 F3에 대하여 HPLC [이동상: 각각 0.1% formic acid가 첨가된 water(A)와 MeOH(B), 조성비율: 51%(60min) → 51-100%(5min) → 100%(15min), 유속 7ml/min]를 이용하여 ethylsyringin을 분리함(7.6mg)

(바) Syringin의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F4를 Silica gel CC(∅5.4×38cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 6개의 소분획물로 나눔. 소분획물 F1에 대하여 Silica gel CC(∅5.4×38cm, 230-400 mesh)을 이용한 후, 정제를 위하여 HPLC [이동상: 각각 0.1% formic acid가 첨가된 water(A)와 THF(B), 조성비율: 10%(60min) → 10-100%(5min) → 100%(15min), 유속 6ml/min]를 이용하여 syringin을 분리함(51.2mg)

(사) Tangshenoside II의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 소분획물 F4에 대하여 Silica gel CC(∅5.4×38cm, 70-230 mesh)를 이용하여 다시 6개의 소분획물로 나눔. 소분획물 F1에 대하여 Silica gel CC(∅5.4×38cm, 230-400 mesh)을 이용한 후 정제를 위하여 HPLC [이동상: 각각 0.1% formic acid가 첨가된 water(A)와 THF(B), 조성비율: 10%(60min) → 10-100%(5min) → 100%(15min), 유속 6ml/min]를 이용하여 tangshenoside II를 분리함(19.3mg)

(아) Tangshenoside I의 분리

① 양유근 50% 에탄올 추출물을 Diaion HP20 CC(∅8.2×49 cm)을 이용하여 7개의 소분획물로 나눈 후 silica gel CC(∅6.5×42.5 cm, 70-230 mesh)을 이용하여 다시 6개의 소분획물로 나눔. 이 중 소분획물에서 silica gel CC(∅3.9×28 cm,

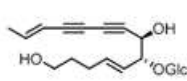
230-400 mesh)를 실시하여 Tangshenoside I 을 분리함(829.9 mg)

(3) 결과 및 고찰

(가) 양유근의 활성물질분리 및 구조동정

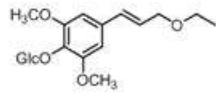
① 양유근 50% 에탄올 추출물을 대상으로 각각 반복적인 column chromatography 를 이용하여 lobetyolin, lancemaside A, lancemaside B, lancemaside D, ethylsyringin, syringin, tangshenoside I, tangshenoside II 를 순수 분리하였음. 이들의 화학적 구조는 물리학적 자료 및 분광학적 자료($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) 분석과 함께 기존문헌에 보고된 자료와의 비교분석을 통하여 구조동정함

polyacetylene

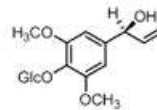


Lobetyolin

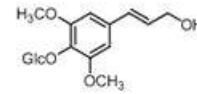
phenylpropanoid



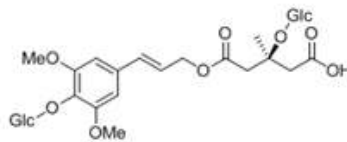
Ethylsyringin



Tangshenoside II

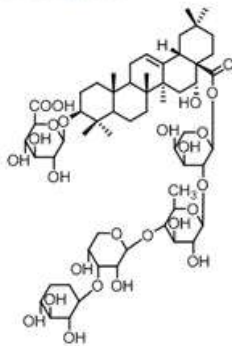


Syringin

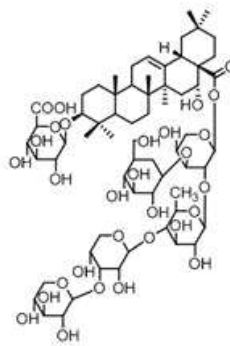


Tangshenoside I

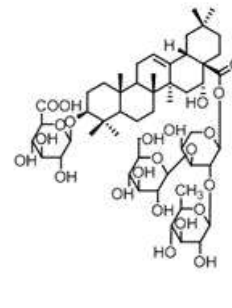
triterpene



Lancemaside A

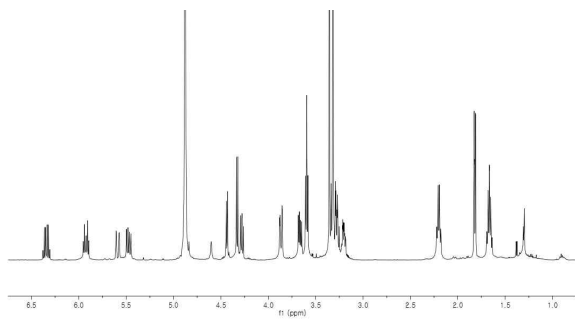


Lancemaside B

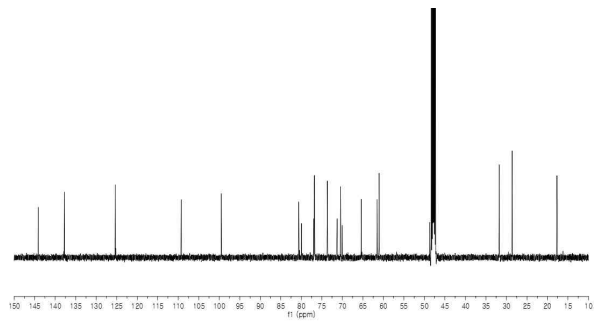


Lancemaside D

<양유근으로부터 분리된 화합물의 구조>

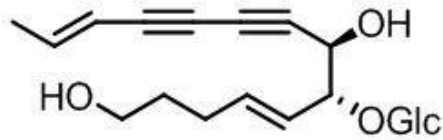


$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **1**(MeOD, 500MHz)



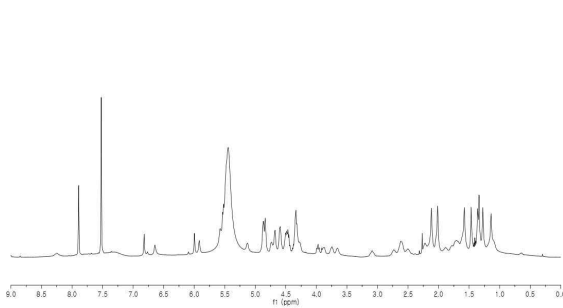
$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **1**(MeOD, 125MHz)

<양유근에서 분리한 lobetyolin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>

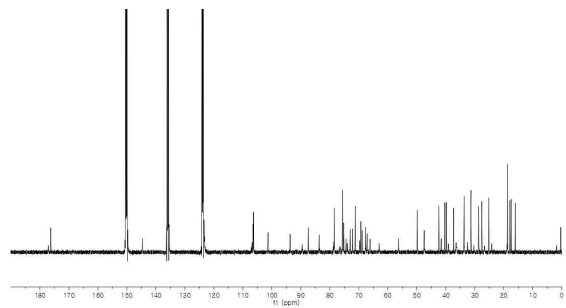


Lobetyolin

<양유근에서 분리한 lobetyolin의 화학구조>

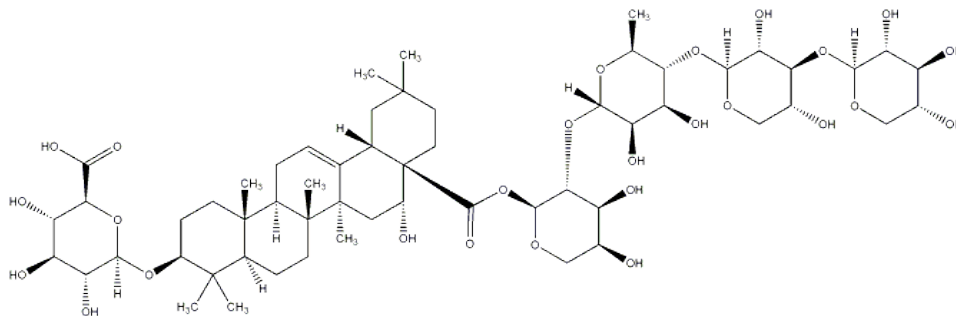


$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **2**(pyridine- d_5 , 500MHz)

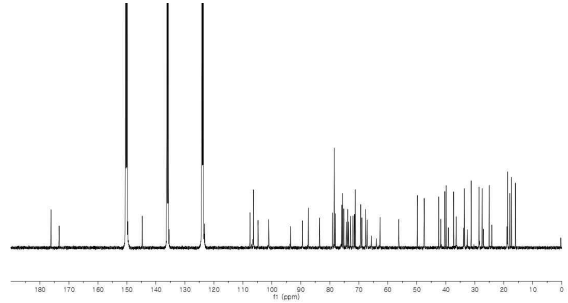
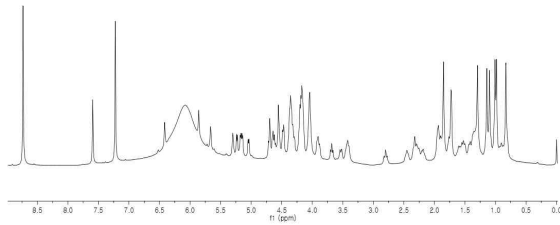


$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **2**(pyridine- d_5 , 125MHz)

<양유근에서 분리한 lancemaside A의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



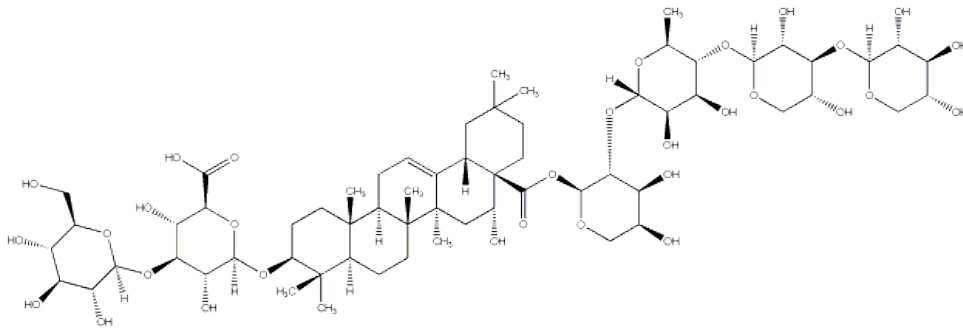
<양유근에서 분리한 lancemaside A의 화학구조>



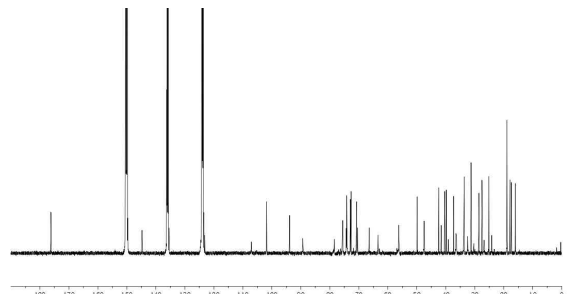
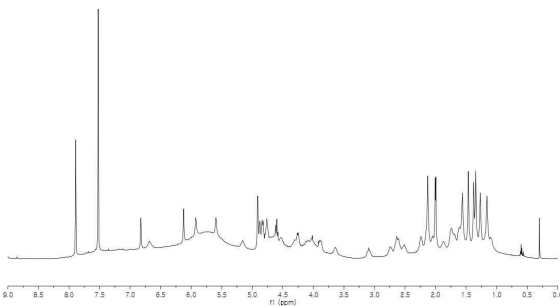
^1H -NMR spectrum of compound **3**(pyridine- d_5 , 500MHz)

^{13}C -NMR spectrum of compound**3**(pyridine- d_5 , 125MHz)

<양유근에서 분리한 lancemaside B의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



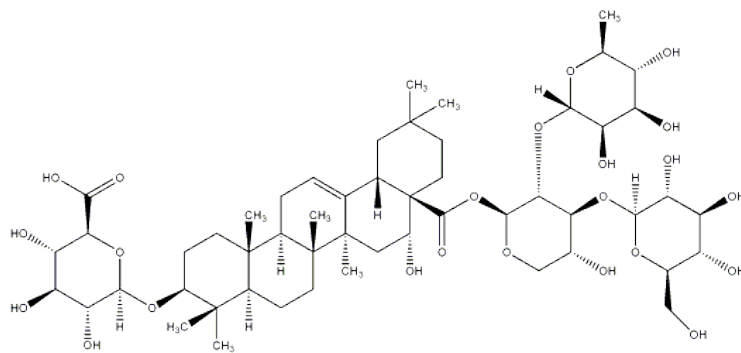
<양유근에서 분리한 lancemaside B의 화학구조>



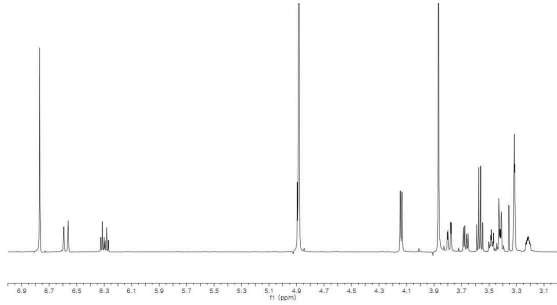
^1H -NMR spectrum of compound**4**(pyridine- d_5 , 500MHz)

^{13}C -NMR spectrum of compound**4**(pyridine- d_5 , 125MHz)

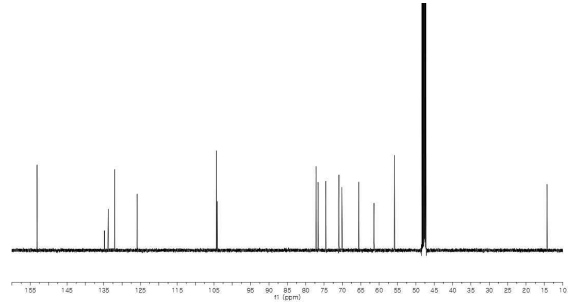
<양유근에서 분리한 lancemaside D의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>



<양유근에서 분리한 lancemaside D의 화학구조>

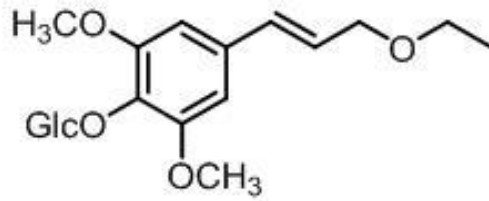


^1H -NMR spectrum of compound **5**(MeOD, 500MHz)



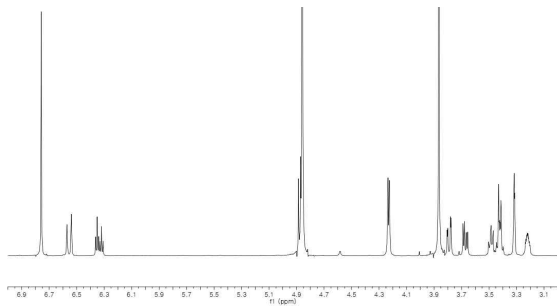
^{13}C -NMR spectrum of compound **5**(MeOD, 125MHz)

<양유근에서 분리한 ethylsyringin의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>

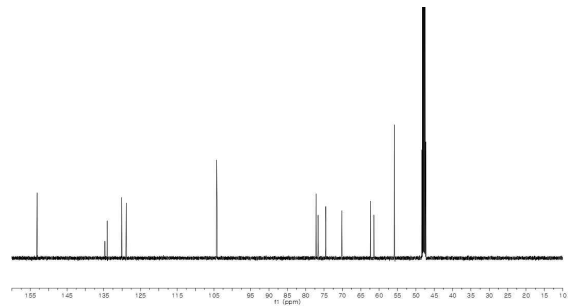


Ethylsyringin

<양유근에서 분리한 ethylsyringin의 화학구조>

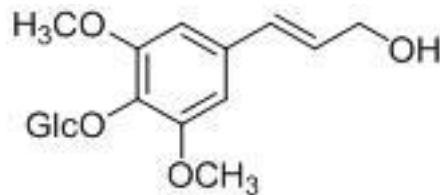


^1H -NMR spectrum of compound **6**(MeOD, 500MHz)



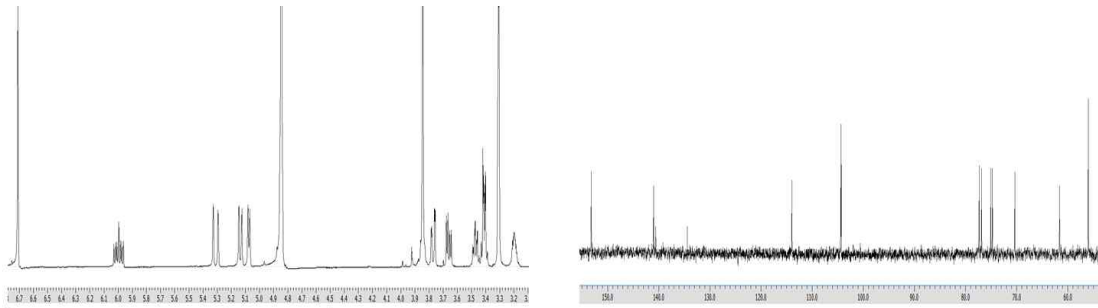
^{13}C -NMR spectrum of compound **6**(MeOD, 125MHz)

<양유근에서 분리한 syringin의 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼>

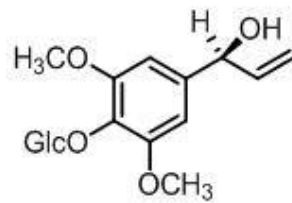


Syringin

<양유근에서 분리한 syringin의 화학구조>

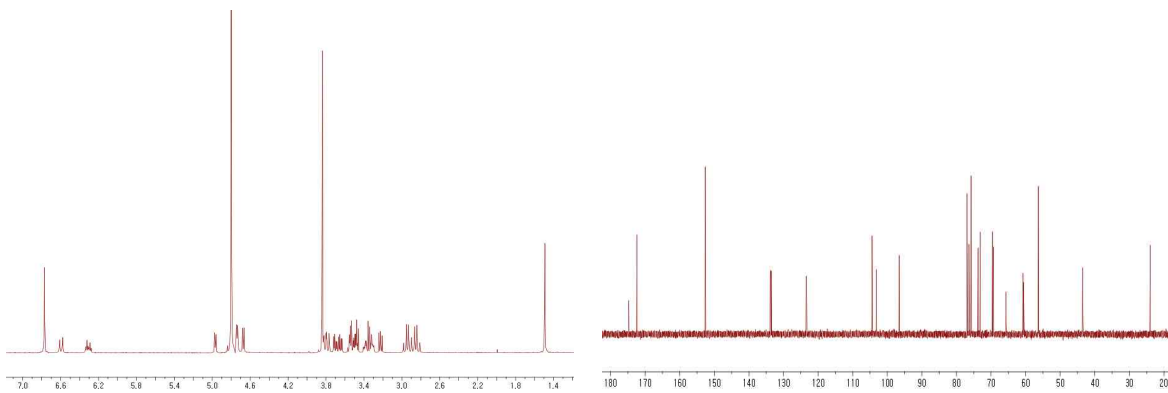


$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 7(MeOD, 500MHz) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 7(MeOD, 125MHz)
 <양유근에서 분리한 tangshenoside II의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>

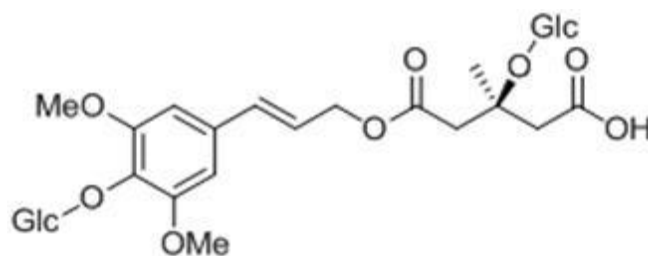


Tangshenoside II

<양유근에서 분리한 tangshenoside II의 화학구조>



<양유근에서 분리한 tangshenoside I의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



<양유근에서 분리한 tangshenoside I의 화학구조>

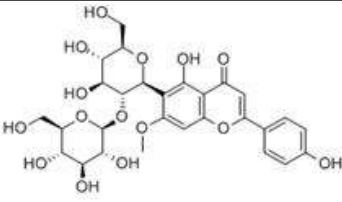
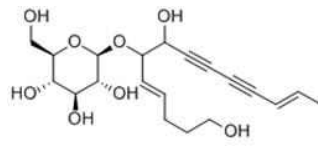
2. 기준 및 시험법 확립

가. 지표성분 선정

식품의약품안전처 고시 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에 따르면 두 가지 이상의 생약 복합 추출물일 경우 각 생약에 대하여 한 가지 이상의 지표성분을 설정하도록 되어있음. DHP1402의 경우 산조인, 양유근 복합추출물로서 산조인의 활성 및 지표 성분인 스피노신과 양유근의 대표성분인 로베티올린을 지표성분으로 선정하여 DHP1402의 규격화를 진행함

항목	생약	기준	
지표성분 함량	산조인	스피노신(C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅)	0.4% 이상
	양유근	로베티올린(C ₂₀ H ₂₈ O ₈)	0.04% 이상

<DHP1402의 지표성분 함량기준>

생약		설명
산조인		1) CAS NO.: 72063-39-9 2) 명칭: spinosin 3) 분자식: C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ 4) 분자량: 608.546
양유근		1) CAS NO.: 136085-37-5 2) 명칭: lobetyolin 3) 분자식: C ₂₀ H ₂₈ O ₈ 4) 분자량: 396.433

<지표성분의 구조화학적 정보>

나. 함량 분석법 설정

(1) Spinosin

(가) 실험목적

원료 및 완제의 표준화된 관리를 위해 산조인의 지표성분인 스피노신의 함량시험 분석법을 설정함

(나) 실험방법

① 표준액의 조제

스피노신(C₂₈H₃₂O₁₅; 608.54) 정량용 표준품을 1.0 mg 취해 10.0 mL 용량플라스크에 따로 넣고 50% 메탄올에 완전히 녹인 후 표선 및 여과하여 표준액으로 함 (스피노신 100 µg/mL)

② 검액의 조제

이 약 1.0 g을 취해 100 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올 80 mL을 가해 완전히 녹인 후 표선 및 여과하여 검액으로 함(10 mg/mL)

③ 조작

Mobile Phase	Time (min)	A% (water with 0.1% formic acid)	B% (ACN)
	0	85	15
	20	80	20
	22	85	15
Detector	UV-340 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Column temp.	35°C		
Injection volume	10 µL		
Column	C ₁₈ (4.6 * 150 mm, 5 µm)		

(a) Lobetyolin

(가) 실험목적

원료 및 완제의 표준화된 관리를 위해 양유근의 지표성분인 로베티올린의 함량 시험 분석법을 설정함

(나) 실험목적

① 표준액의 조제

로베티올린(C₂₀H₂₈O₈ : 396.433) 정량용 표준품을 1.0 mg 취해 10.0 mL 용량 플라스크에 따로 넣고 50% 메탄올에 완전히 녹인 후 표선 및 여과하여 표준액으로 함(로베티올린 100 µg/mL)

② 검액의 조제

이 약 1.0 g을 취해 100 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올 80 mL을 가해 완전히 녹인 후 표선 및 여과하여 검액으로 함(10 mg/mL)

③ 조작

Mobile Phase	Time(min)	A%(0.1% phosphoric acid in water)	B%(ACN)
	0	90	10
	13	80	20
	36	80	20
	37	30	70
	38	30	70
	39	90	10
	45	90	10
Detector	UV-267 nm		
Flow rate	0.7 mL/min		
Column temp.	35°C		
Injection volume	10 µL		
Column	Agilent, eclipse XDB-C ₁₈ (4.6 * 250 mm, 5 µm)		

다. 시험법 공인기관 의뢰 및 함량 분석법 확립

(1) Spinosin

(가) 함량 분석법 확립

설정된 스피노신 함량 분석법을 공인기관(한국건강기능식품연구원)에 시험법 검토 의뢰, spinosin peak의 분리도는 문제점이 없으며 적절한 시험법으로 확인

시험법 검토 보고서

시험물질 :	Spinosin	검체명 :	산조인양유근복합추출물 (DHP1402)
식품재형 :	분말	시험날짜 :	2017-02-06-2017-02-12
보관조건 :	실온		

시험법 근거 : (주)대화제약에서 제공한 시험법에 준함.

1. 실험 목적

산조인양유근복합추출물에 함유된 Spinosin 함량을 업체에서 제공한 시험법에 준하여 실험하고 그 결과를 도출하여 함량을 측정함에 있어서 적절한 시험법인가 확인하는 것을 목적으로 한다.

2. 실험방법(업체제공 분석 조건)

2.1 실험개요

시료를 50% 메탄올로 추출하고 Column은 Agilent Eclipse XDB C18(5um, 4.6*150mm)으로 고속액체크로마토그래프 UV 340nm에서 시료 중의 Spinosin을 분리하고 표준물질의 검량선을 이용하여 시료 중의 Spinosin 함량을 산출한다.

2.2 실험과정

1) 시약 및 시액

- (1) 표준품 : Spinosin, Chemfaces, CFN99600, CFS201401, 98%
- (2) Methanol : Duksan, HPLC grade
- (3) Acetonitrile : J.T Baker, HPLC Grade
- (4) Formic acid : Junsei, reagent grade
- (5) 3차 증류수(DW)

2) 표준용액의 제조

표준물질 약 3mg을 정밀하게 달아 20mL 정용플라스크에 50% 메탄올과 넣어 용해 후 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

<Spinosin 시험법 검토 보고서>

3. 실험결과

3-1) 산조인양유근복합추출물 중 Spinosin 의 분석가능여부 확인

표준물질 Spinosin을 340nm에서 분석한 결과 7.227분에 Spinosin Peak가 나타났고, 시험용액에서 Spinosin은 7.287분에 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 샘플 중 Spinosin Peak 분리도는 문제점이 없는 것으로 확인되었다. 표준용액 및 시험용액의 크로마토그램과 스펙트럼은 아래와 같다(Fig.1.-2.).

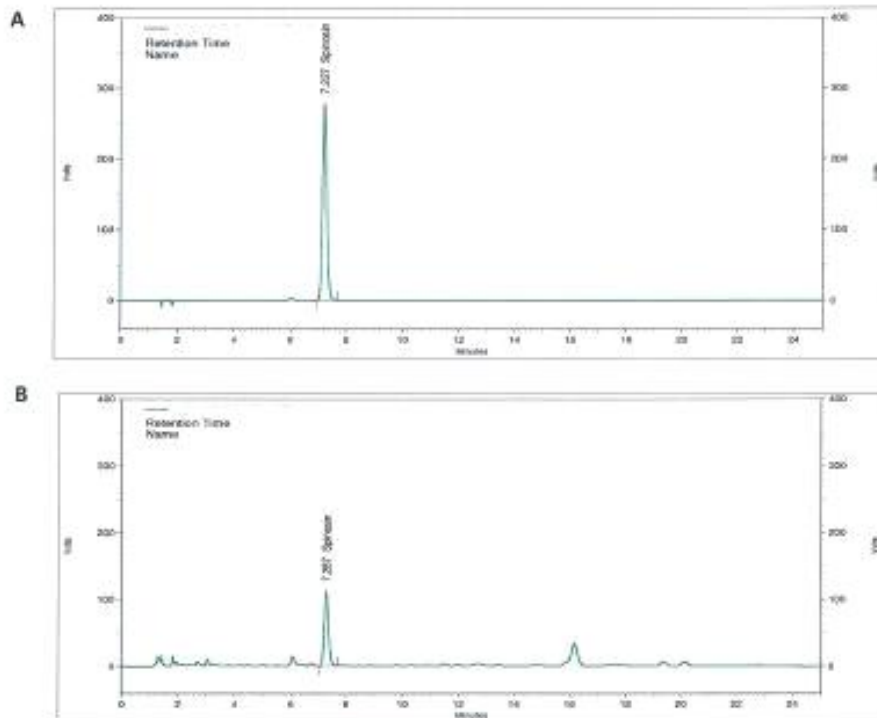


Fig. 1. 표준용액과 시험용액 중 Spinosin의 크로마토그램.
(A: 표준용액, B: 시험용액)

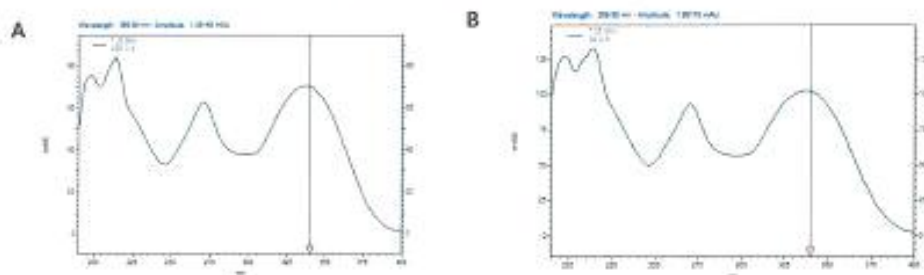


Fig. 2. 표준용액과 시험용액 중 Spinosin의 스펙트럼.
(A: 표준용액, B: 시험용액)

- 3 -

<표준용액과 시험용액의 Spinosin 크로마토그램>

(2) Lobetyolin

(가) 함량 분석법 확립

설정한 로베티올린 함량 분석법을 공인기관(한국건강기능식품연구원)에 시험법 검토 의뢰, Lobetyolin peak의 분리도는 문제점이 없으며 적절한 시험법으로 확인

시험법 검토 보고서

시 험 물 질 :	Lobetyolin	검 체 명 :	산조인양유근복합추출물 (DHP1402)
식 품 제 형 :	분말	시 험 날 짜 :	2017-04-11~2017-04-20
보 관 조 건 :	실온		

시험법 근거 : (주)대화제약에서 제공한 시험법에 준함.

1. 실험 목적

산조인양유근복합추출물에 함유된 Lobetyolin 함량을 업체에서 제공한 시험법에 준하여 실험하고 그 결과를 도출하여 함량을 측정함에 있어서 적절한 시험법인가 확인하는 것을 목적으로 한다.

2. 실험방법(업체제공 분석 조건)

2.1 실험개요

시료를 메탄올로 추출하고 Column은 Agilent Eclipse XDB C18(5um, 4.6*250mm)으로 고속액체크로마토그래프 UV 267nm에서 시료 중의 Lobetyolin을 분리하고 표준물질의 검량선을 이용하여 시료 중의 Lobetyolin 함량을 산출한다.

2.2 실험과정

1) 시약 및 시액

- (1) 표준품 : Lobetyolin, Chemfaces, CFN99104, CFS201503, 98%
- (2) Methanol : Duksan, HPLC grade
- (3) Acetonitrile : J.T Baker, HPLC Grade
- (4) Phosphoric acid : Junsei, reagent grade
- (5) 3차 증류수(DW)

2) 표준용액의 제조

표준물질 약 3mg을 정밀하게 달아 25mL 정용플라스크에 메탄올과 넣어 용해 후 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

<Lobetyolin 시험법 검토 보고서>

3. 실험결과

3-1) 산조인양유근복합추출물 중 Lobetyolin 의 분석가능여부 확인

표준물질 Lobetyolin을 267nm에서 분석한 결과 31.207분에 Lobetyolin Peak가 나타났고, 시험용액에서 Lobetyolin은 31.227분에 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 샘플 중 Lobetyolin Peak 분리도는 문제점이 없는 것으로 확인되었다. 표준용액 및 시험용액의 크로마토그램과 스펙트럼은 아래와 같다(Fig.1~2).

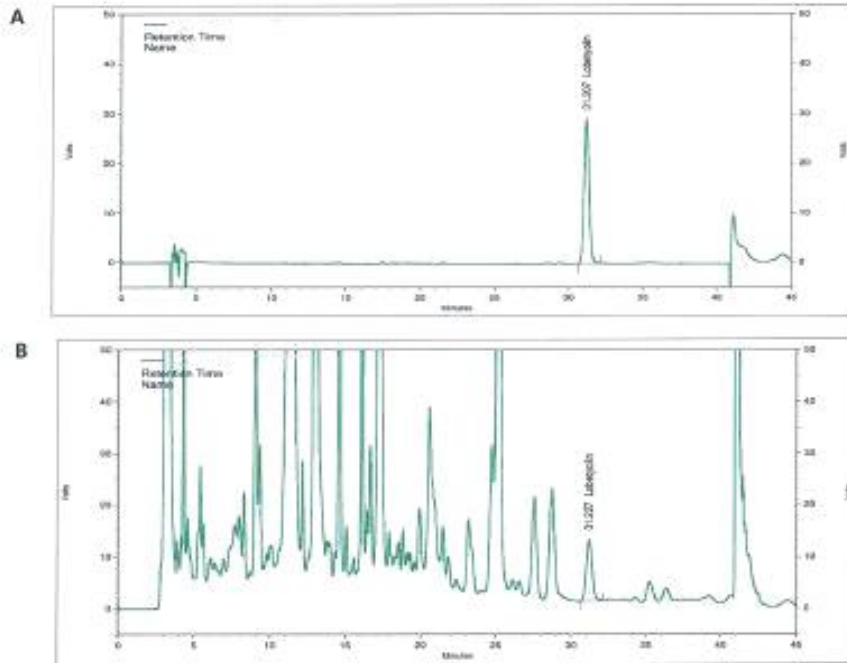


Fig. 1. 표준용액과 시험용액 중 Lobetyolin의 크로마토그램.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

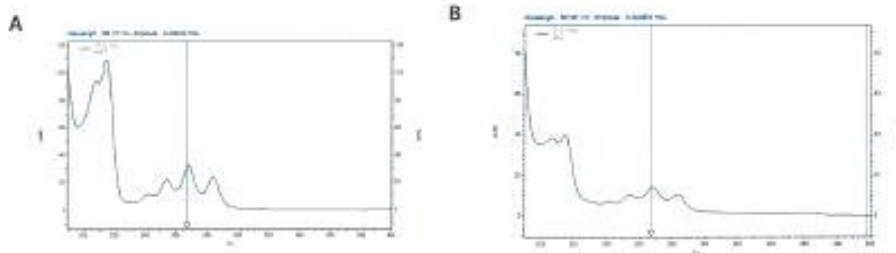


Fig. 2. 표준용액과 시험용액 중 Lobetyolin의 스펙트럼.

(A: 표준용액, B: 시험용액)

<표준용액과 시험용액의 Lobetyolin 크로마토그램>

라. Spinosin, Lobetyolin 분석법의 method validation

(1) Spinosin

(가) 시스템 적합성

- 시험방법: 스피노신 표준액 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 상기의 조작조건으로 6회 반복할 때 표준액 분석값의 RSD%는 2.0이하이어야 함
- 판정: 표준액 분석값의 RSD%는 2.0이하이므로 시스템은 적합함

번호	표준액 분석값(스피노신)
1	2564.94312
2	2568.41772
3	2567.01929
4	2565.32666
5	2565.14282
6	2566.88745
평균	2566.28951
편차	1.377
RSD%	0.054

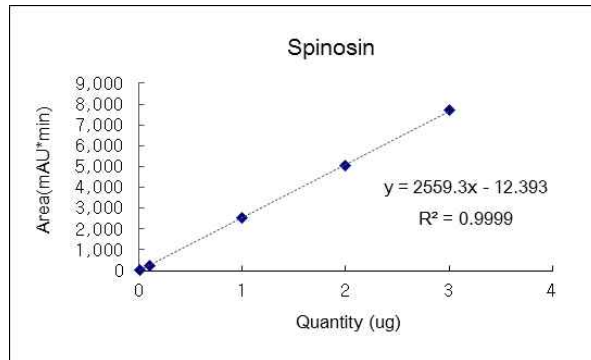
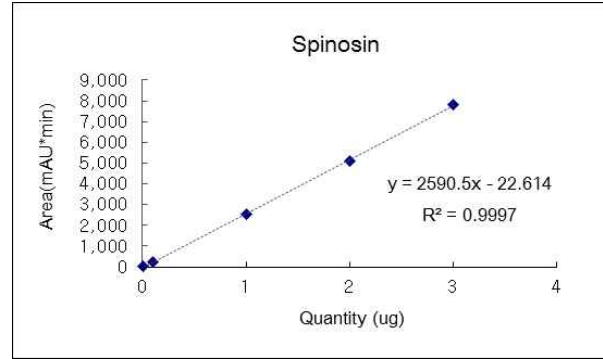
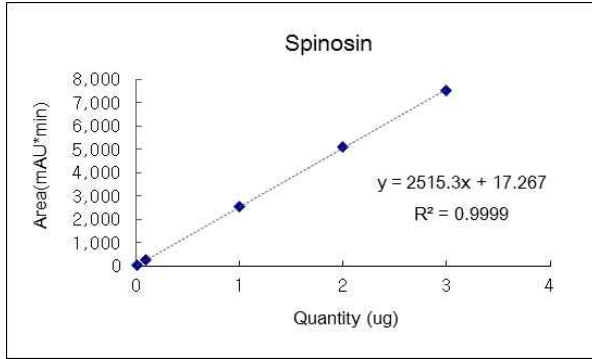
(나) 특이성

- 시험방법: Blank액(50% 메탄올), 표준액($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 검액($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 조제하여 각 3회씩 분석함
- 판정: 서로 간섭현상이 없으므로 분석값에 영향을 주는 요소는 없음을 확인함

번호	유지시간(스피노신)
Blank-1	-
Blank-2	-
Blank-3	-
STD-1	6.952
STD-2	6.925
STD-3	6.886
Sample-1	6.943
Sample-2	6.923
Sample-3	6.906

(다) 직선성

- 시험방법: 스피노신 표준액을 0.3, 0.2, 0.1, 0.01, 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 조제하여 각 3회씩 분석함
- 판정: 스피노신 R^2 : 0.9999, 0.9997, 0.9999로 0.9990 이상임



(라) 정확성

- 시험방법: 스피노신 표준액과 검액을 혼합한 spiking액을 각 3회씩 분석함
- 판정: 총 회수율 97.0 ~ 103.0 % 범위에 속하고, 회수율의 RSD%가 2.0이하 이므로 정확성은 입증됨

Spiking 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	회수율	평균	편차	RSD
0.012	1	101.06	101.23	0.153	0.151
	2	101.28			
	3	101.36			
0.01	1	101.04	101.38	0.297	0.292
	2	101.57			
	3	101.52			
0.008	1	98.48	98.98	0.429	0.433
	2	99.20			
	3	99.24			

(마) 검출한계 및 정량한계

y절편의 SD	기울기평균	검출한계 (LOD)	정량한계 (LOQ)
20.715	2555.028	0.027	0.081

(바) 정밀성

- 시험방법: 0.012, 0.01, 0.008 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 표준액 각 3회, 검액 각 6회씩 분석함
- 판정: 표준액 및 검액 분석값의 RSD%가 2.0이하이므로 기준에 적합함

표준액 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	분석값	평균	편차	%RSD
0.012	1	307.97250	308.64295	0.622	0.201
	2	308.75635			
	3	309.20001			
0.01	1	253.6947	254.53436	0.873	0.343
	2	254.47058			
	3	255.43781			
0.008	1	199.59601	200.08259	0.434	0.217
	2	200.22394			
	3	200.42781			

번호	검액 분석값(스피노신)
1	1071.31702
2	1071.26636
3	1069.49243
4	1069.672
5	1068.75232
6	1060.41138
평균	1068.48525
편차	4.085
RSD%	0.382

(2) Lobetyolin

(가) 시스템 적합성

- 시험방법: 로베티올린 표준액 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 상기의 조작조건으로 6회 반복할 때 표준액 분석값의 RSD%는 2.0이하이어야 함

- 판정: 표준액 분석값의 RSD%는 2.0이하이므로 시스템은 적합함

번호	표준액 분석값(로베티올린)
1	1432.91882
2	1435.07300
3	1437.20508
4	1438.47534
5	1436.74634
6	1424.91736
평균	1434.22266
편차	4.947
RSD%	0.345

(나) 특이성

- 시험방법: Blank액(50% 메탄올), 표준액($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 검액($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 조제하여
각 3회씩 분석함

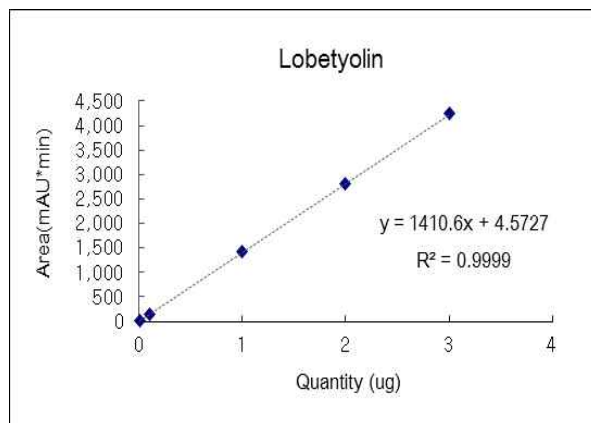
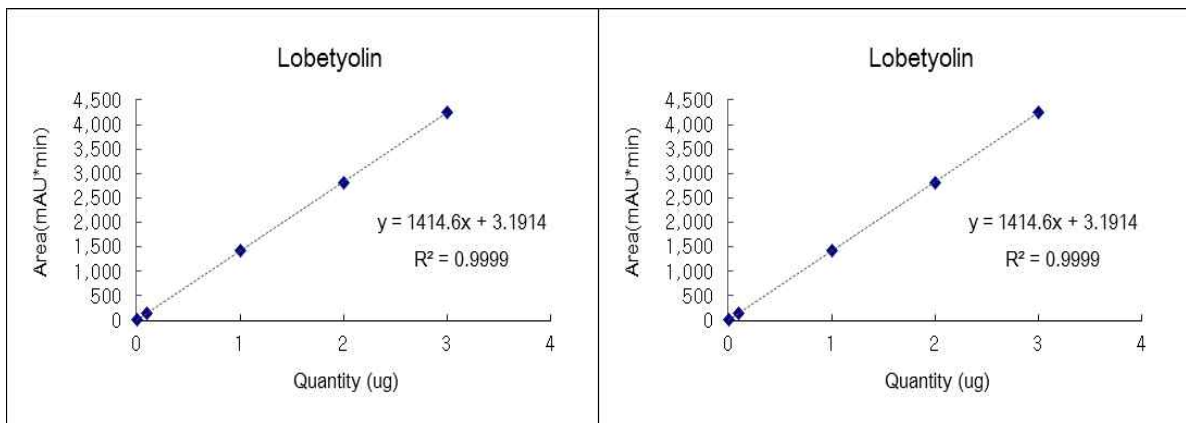
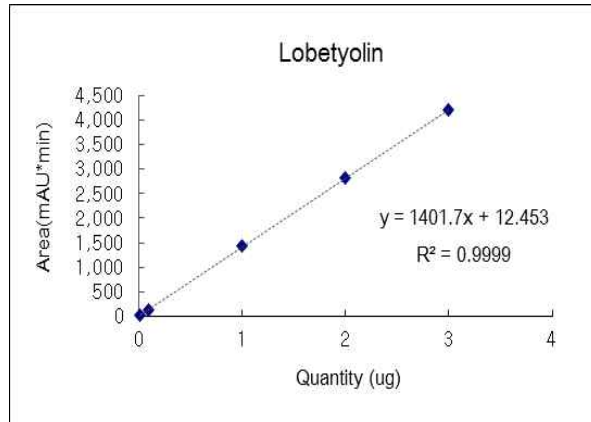
- 판정: 서로 간섭현상이 없으므로 분석값에 영향을 주는 요소는 없음을 확인함

번호	유지시간(로베티올린)
Blank-1	-
Blank-2	-
Blank-3	-
STD-1	32.516
STD-2	32.570
STD-3	32.609
Sample-1	32.515
Sample-2	32.451
Sample-3	32.456

(다) 직선성

- 시험방법: 로베티올린 표준액을 0.3, 0.2, 0.1, 0.01, $0.001\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 조제하여
각 3회씩 분석함

- 판정: 로베티올린 R^2 : 0.9999, 0.9999, 0.9999로 0.9990 이상임



(라) 정확성

- 시험방법: 로베티올린 표준액과 검액을 혼합한 spiking액을 각 3회씩 분석함
- 판정: 총 회수율 97.0 ~ 103.0 % 범위에 속하고, 회수율의 RSD%가 2.0이하
이므로 정확성은 입증됨

Spiking 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	회수율	평균	편차	RSD
0.012	1	98.09	99.60	1.395	1.401
	2	100.85			
	3	99.85			
0.01	1	100.78	100.62	0.149	0.148
	2	100.49			
	3	100.58			
0.008	1	101.09	99.92	1.152	1.153
	2	99.88			
	3	98.79			

(마) 검출한계 및 정량한계

y절편의 SD	기울기평균	검출한계(LOD)	정량한계(LOQ)
4.996	1408.966	0.012	0.035

(바) 정밀성

- 시험방법: 0.012, 0.01, 0.008 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 표준액 각 3회, 검액 각 6회씩 분석함
- 판정: 표준액 및 검액 분석값의 RSD%가 2.0이하이므로 기준에 적합함

표준액 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	No.	분석값	평균	편차	%RSD
0.012	1	170.66734	169.13149	2.874	1.699
	2	170.91151			
	3	165.81563			
0.01	1	139.54333	140.56269	0.883	0.628
	2	141.04205			
	3	141.10268			
0.008	1	111.68922	113.62735	1.692	1.489
	2	114.81311			
	3	114.37971			

번호	검액 분석값(로베티올린)
1	81.00877
2	82.88998
3	80.51385
4	80.25392
5	81.19427
6	80.37975
평균	81.04009
편차	0.978
RSD%	1.206

마. 함량 기준 설정

DHP1402원료 3 batch의 함량을 공인기관(한국기능식품연구원)에 의뢰, 평균 함량의 80~120%를 함량 기준으로 설정

Batch No.	스피노신 함량(%)	로베티올린 함량(%)
201501001	0.475	0.060
201503002	0.528	0.061
201506003	0.505	0.061
평균 함량	0.503	0.060

스피노신의 3 batch 평균 함량이 0.503%이므로 함량 기준은 0.402~0.603%로 설정, 로베티올린 3 batch 평균 함량이 0.060%이므로 함량 기준은 0.0485~0.0728%로 설정

제 D2017051149 호
본시험장

시험·검사성적서

제품명	DHP1402(당초인양물과특정추출물)	제조업체 (주용기원)	
원재료	1차원료제사	성명	노영태,김주식
주소	광역시 남동구 대왕로로 7001(양정동,고려아파트리조트1동C-301)		
제품번호	20150903	검수년월일	2017-05-17
입사시험일자	제출일	검수번호	D2017051149

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2017-05-24
 시험·검사 책임자 : 이영주 검사원인 중 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법
Spinosin(mg/g)	4.77mg/g	표준법
Robesylolone(g)	0.06mg/g	표준법

본시험·검체제출

2017년 5월 24일
한국기능식품연구원
(4차)한국기능식품연구원 품질 관리부(시험연구부) http://www.khssi.or.kr | 전화번호 02-922-0820-1 | 1022-0820-1

제 D2017051151 호
본시험장

시험·검사성적서

제품명	DHP1402(당초인양물과특정추출물)	제조업체 (주용기원)	
원재료	1차원료제사	성명	노영태,김주식
주소	광역시 남동구 대왕로로 7001(양정동,고려아파트리조트1동C-301)		
제품번호	20150903	검수년월일	2017-05-17
입사시험일자	제출일	검수번호	D2017051151

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2017-05-24
 시험·검사 책임자 : 이영주 검사원인 중 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법
Spinosin(mg/g)	5.05mg/g	표준법
Robesylolone(g)	0.06mg/g	표준법

본시험·검체제출

2017년 5월 24일
한국기능식품연구원
(4차)한국기능식품연구원 품질 관리부(시험연구부) http://www.khssi.or.kr | 전화번호 02-922-0820-1 | 1022-0820-1

제 D2017051150 호
본시험장

시험·검사성적서

제품명	DHP1402(당초인양물과특정추출물)	제조업체 (주용기원)	
원재료	1차원료제사	성명	노영태,김주식
주소	광역시 남동구 대왕로로 7001(양정동,고려아파트리조트1동C-301)		
제품번호	20150903	검수년월일	2017-05-17
입사시험일자	제출일	검수번호	D2017051150

귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2017-05-24
 시험·검사 책임자 : 이영주 검사원인 중 책임자 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법
Spinosin(mg/g)	5.28mg/g	표준법
Robesylolone(g)	0.06mg/g	표준법

본시험·검체제출

2017년 5월 24일
한국기능식품연구원
(4차)한국기능식품연구원 품질 관리부(시험연구부) http://www.khssi.or.kr | 전화번호 02-922-0820-1 | 1022-0820-1

<DHP1402 3 batch 각 함량 시험성적서>

바. 추출물의 이화학적 규격 확립

중금속, 잔류농약, 대장균군 등 국가공인기관(한국기능식품연구원)의 시험성적서를 확보하여 이화학 규격을 확립함

사. DHP1402의 기준 및 시험법 확립

중금속 등 이화학 규격은 ‘식품공전’ 중 일반시험법 과 건조감량은 ‘대한민국약전’일반 시험법 중 생약시험법에 따라 실시하였으며, 지표성분 함량 시험은 자사기준으로 설정함

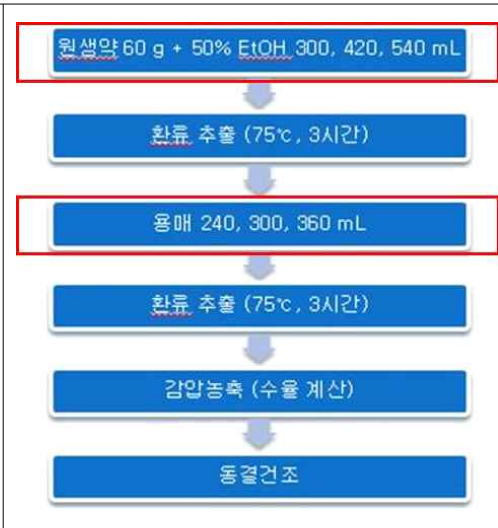

시험 항목	시험법	기준	
성상	원료의 색, 향, 맛	미색 ~ 미황색의 분말	
납	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
총비소	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
카드뮴	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	0.5 ppm 이하	
총수은	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	0.5 ppm 이하	
건조감량	‘대한민국약전’일반시험법 중 생약시험법 건조감량에 따라 시험	5.4% 이하	
대장균군	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	음성	
잔류농약	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	불검출	
함량시험	자사기준	스피노신	0.4% 이상
		로베티올린	0.04% 이상

<DHP1402의 기준 및 시험법>

제3절 제조공정 확립

1. 최적추출공정 탐색

산조인과 양유근 단독 추출물에 대한 기억력 개선의 효과를 평가하였으며, 산조인과 양유근 복합추출물에 대한 기억력 개선의 상승효과를 확인하고자 산조인:양유근의 조성비 3:1, 4:1, 5:1, 6:1의 비율로 추출하여 복합추출물에 대해 수동회피시험 및 Y자 미로시험을 통해 기억력 개선 효과를 평가하였음, 실험 결과 산조인과 양유근을 5:1로 배합하였을 때 단독추출물 투여보다 기억력 개선 및 상승효과가 확인되어 최종 5:1비율의 복합물 조성을 확립하고 용매 양 및 추출 시간에 따른 최적추출공정 실험을 아래와 같이 설계하였음

조건	추출 방법
<p>용매 양</p> <p>최적의 효능을 나타내는 원생약 조성비 및 추출시간을 동일 하고 추출용매의 양(5, 7, 9배수)일 변경하여 수득률 및 지표성분 함량을 평가하여 최적의 용매 양 조건을 설정하고자 함</p>	 <pre> graph TD A[원생약 60 g + 50% EtOH, 300, 420, 540 mL] --> B[환류 추출 (75°C, 3시간)] B --> C[용매 240, 300, 360 mL] C --> D[환류 추출 (75°C, 3시간)] D --> E[감압농축 (수율 계산)] E --> F[동결건조] </pre>
<p>시간</p> <p>최적의 효능을 나타내는 원생약 조성비 및 추출용매의 양을 5배수로 고정하고 추출시간(3, 4, 5시간)을 변경하여 수득률 및 지표성분 함량을 평가하여 최적의 추출시간 조건을 설정하고자 함</p>	 <pre> graph TD A[원생약 60 g + 50% EtOH, 300 mL] --> B[환류 추출 (75°C, 3, 4, 5시간)] B --> C[용매 240 mL] C --> D[환류 추출 (75°C, 3, 4, 5시간)] D --> E[감압농축 (수율 계산)] E --> F[동결건조] </pre>

<DHP1402 최적추출공정 탐색>

2. DHP1402 추출법에 따른 원료 수득률 비교

가. 실험 목적

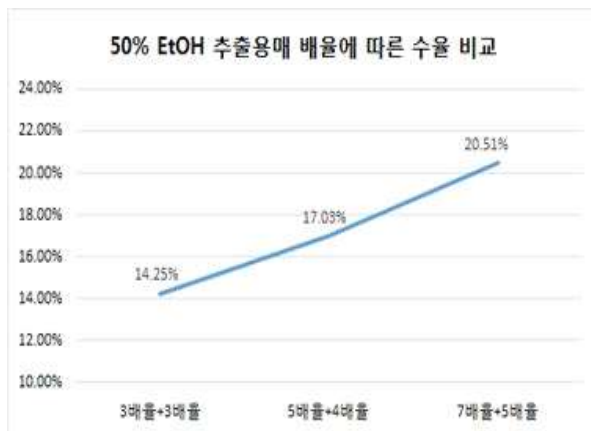
설계된 조건에 따른 추출법에 대한 원료 수득률 비교를 통해 효능 및 제품생산의 경제성·효율성을 고려한 추출법을 선정하고자 함

나. 실험 방법

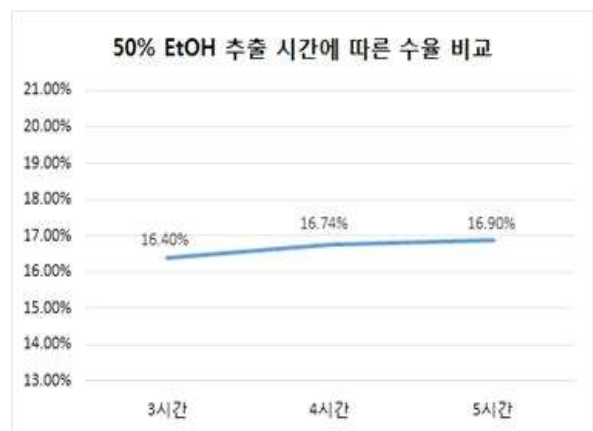
위에서 제시된 추출법을 따라 추출물을 3반복 생산하여 각각의 수득률을 비교함

다. 결과 및 고찰

추출시간 및 용매 양에 따른 DHP1402의 수득률 비교 결과 시간에 따른 수득률은 거의 차이가 나타나질 않았으며 50% EtOH 추출용매 배율에 따른 수율 비교 결과, 7배율+5배율로 추출하였을 때 가장 수율이 높았음. 생산 공정에서의 경제성, 효율성 및 지표성분 함량을 평가하여 최적 추출공정을 확립하고자 함



<용매 양에 따른 DHP1402의 수득률 비교>



<추출시간에 따른 DHP1402의 수득률 비교>

3. DHP1402 추출법에 따른 지표성분 함량 비교

가. 실험 목적

최적추출공정 탐색을 통해 제조된 각 공정별 추출물에 대해 선행연구를 바탕으로 정한 지표성분에 대한 함량평가 시험을 진행하여 기억력 개선 효능시험 결과와 더불어 최적의 추출법을 모색하고자 함

나. 실험 방법

(1) 표준용액의 조제

스피노신, 로베티올린 표준물질(순도 98% 이상)을 각각 1 mg을 칭량하여 50%

MeOH로 10 mL 용량 플라스크에 표선하여 잘 녹임. 각 용액에서 1 mL씩 취한 것을 표준용액으로 함

(2) 시험용액의 조제

추출물들을 각각 500 mg 칭량하여 50 mL 용량플라스크에 표선하여 잘 녹임. 0.45 µm syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 함

(3) 검액 및 표준액을 지표성분 함량평가 분석법 중 스피노신과 로베티올린 분석법에 따름

다. 결과 및 고찰

(1) 추출용매 배율에 따른 지표성분 함량 변화(추출시간은 3시간 X 2로 고정)

추출조건	스피노신 함량(%)	로베티올린 함량(%)
3+3배율	0.476	0.049
5+4배율	0.493	0.058
7+5배율	0.473	0.056

(2) 추출시간에 따른 지표성분 함량 변화(추출용매는 5+4배율로 고정)

추출시간	스피노신 함량(%)	로베티올린 함량(%)
3시간 x 2	0.512	0.053
4시간 x 2	0.476	0.040
5시간 x 2	0.493	0.048

추출시간 및 용매 양에 따른 DHP1402 원료의 지표성분 함량 비교 시 5+4배율의 용매 양 조건과, 3시간 X 2의 시간 조건에서 스피노신 및 로베티올린의 함량이 가장 높음. 5+4배율과 7+5배율의 수율 차이가 약간 나지만 효능연구결과 5+4배율이 더 좋았으며, 7+5배율은 용매 단가에 의한 영향과 공정비용의 상승으로 인해 생산 단가가 높아지기 때문에 효능과 지표성분 함량 및 경제성을 고려하여 5+4배율의 용매 양 조건과 3시간 X 2시간의 시간 조건으로 최적 추출공정을 확립함

제4절 원료 대량생산 제조 공정 확립

1. 전체공정도 완성

가. 완제 제조 공정 완성(완제 및 위약)

선행 연구를 통해 추출방법, 건조방법에 따른 수율, 지표 및 활성성분 함량, 효능연구를 바탕으로 최적의 제조방법을 확립하고 원료의 대량생산 제조공정도를 완성함

나. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402) 제조공정

제조공정	조건	배율
산조인양유근 복합물 추출물		
원생약(산조인 + 양유근)	180 kg	
↓		
1차 추출	80~85℃, 3시간	50% EtOH 원생약 대비 5배율 (900 L)
↓		
2차 추출	80~85℃, 3시간	50% EtOH 원생약 대비 4배율 (720 L)
↓		
여과	4 μm 여지 규조토(여과보조제), 여과액량의 1~2%	
↓		
농축	50±5℃, 30 torr Solid 35~40%	
↓		
살균	85~90℃ 40분 2회	
↓		
분무건조 및 분말화	Spray Dryer inlet 185±5℃, outlet 85±5℃	
↓		
산조인 + 양유근 추출분말	22 kg	

2. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402) 원료 생산

확립한 제조공정에 따라 (주)보락 bGMP 시설에서 3 Lot를 생산함

가. 제조지시기 및 기록서

문서번호	BPR-CO-001
시행일자	2015.01.19
제·개정번호	01

15. 제조지시 및 기록서

제품명	산조인양유근 복합추출물(DHP1402)
품목코드	82601501
제조번호	201501001
제조일자	2015. 01. 12

(주)보락 BGMP 규정에 의하여 제조관리와 품질관리로
생산된 제품임을 확인함

	세소부서책임자	품질(모습)부서책임자
성명	이일영	권은옥
서명	이일영	권은옥
일자	2015. 01. 16	2015. 01. 16



제조 지시 및 기록서

Page:

1/11

문서번호	BPR-CO-001	계량번호	01
제품명	산조인양유근 복합추출물(DHP1402)	채법(채원)	추출(분말)
제조번호	20150112	제조단위	16.56 Kg
제조일자	2015. 01. 12	사용기한	24개월
성상	미색~미황색의 분말		

제조지시 및 원료 투입내역

제조지시자	성명 : 이 일 명	제조지시일 : 2015. 01. 12	서명 : 이 일 명
-------	------------	----------------------	------------

NO	품목코드	원료명	규격	허가치량 16.56kg중	기준량 16.56kg중	사용량	단위	시행번호	칭량자	확인자
1	11004500	산조인	KP	120	120	120	Kg		유학동	김현우
2	82601602	양유근	KP	24	24	24	kg		유학동	김현우
3	10503100	에탄올	KP	681.11	1.748	1.748	L	2014/12/16-03	유학동	김현우
4	12300100	정제수	KP	613.91	613.91	613.91	L	2014/12/20-04	유학동	김현우
<div style="position: absolute; top: 50%; left: 50%; transform: translate(-50%, -50%); opacity: 0.5; font-size: 4em;">/</div>										

지시 사항	<ul style="list-style-type: none"> - 제조지시 내용대로 원료약품 사용할 것. - 작업 중 이상 발생 시 즉시 보고할 것. - 미생물 오염에 주의할 것.
-------	---

원료수령일자	2015. 01. 12	원료인계자	이 일 명
원료인수자	유학동	인수확인자	김현우

BLG-05

(주)보락

나. 제품시험성적서



경기도 화성시 양감면 초북로 720-37
 전 화 : (031) 350-3411 ~ 3
 Fax : (031) 353-6011

제 품 시 험 성 적 서

제 품 명	산조인 양유근 건조엑스		
거 래 처	대화제약	출하 일자	2015. 01. 23
시험의뢰번호	20150119403	시험 완료 일자	2015. 01. 23
제조 일자	2015. 01. 12	시 험 자	유 수 진
제조 번호	201501001	유형(분류)	건강기능식품

제 품 사 험 결 과

시험항목	규 격(자가규격)	결 과
성 상	갈색분말	적 합
기능성분함량	스피노신 0.4% 이상	0.8 %
	로베티올린 0.04% 이상	0.17 %
납	1.0 mg/kg 이하	0.2 mg/kg
중비소	1.0 mg/kg 이하	불검출
카드뮴	0.5 mg/kg 이하	0.004 mg/kg
중수은	0.5 mg/kg 이하	불검출
건조감량	참고치	0.9 %
대장균군	음 성	음 성
잔류농약	규격 내	적 합

특기사항 :

상기 제품 시험 결과를 보증합니다.

품 질 관 리 팀



제5절 제제화 연구

DHP1402의 원료 특성을 파악하고 Preformulation study와 Compatibility study를 통하여 제형화를 위한 최적의 부형제 선정에 관한 정보를 얻음

항 목	정 보	
원료명	산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)	
성 상	미색~미황색의 분말	
지표성분 함량	스피노신(C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅)	0.4% 이상
	로베티올린(C ₂₀ H ₂₈ O ₈)	0.04% 이상

<원료 정보>

3. 물리적 연구(Physical Study)

가. 입도분석

(1) 실험목적

DHP1402의 입자크기 측정을 함으로써 정제 조제 시 원활한 작업환경을 구축하기 위한 최적의 부형제 선정에 하고자 함

(2) 실험방법

약 3 g 정도의 시료를 입도분석기를 통하여 분석함

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 입도분석결과 13.20 um 보다 큰 입자가 90% 존재하고, 29.79 um 보다 큰 입자가 50% 존재함. 또한 59.30 um 보다 큰 입자는 10% 존재함

결과적으로 DHP1402의 입자크기는 매우 미세하며 원활한 타정을 위해서는 입자의 크기를 늘릴 수 있는 부형제 선정이 고려되어야 할 것으로 판단됨

시험횟수	D ₁₀ (um)	D ₅₀ (um)	D ₉₀ (um)
1회	13.23	29.46	59.26
2회	13.20	29.82	60.21
3회	13.18	30.08	58.42
평균	13.20	29.79	59.30

<DHP1402의 입도 분석 결과>

나. 흡습성

(1) 실험목적

DHP1402의 흡습성 측정을 통해 원료의 특성을 파악하고 원료 보관과 정제 조제 시 작업환경 및 완제 보관조건 선정하고자 함

(2) 실험방법

- (가) 흡습을 관찰할 보관조건과 경과시간에 맞도록 시료와 패트리디쉬를 준비함
- (나) 각 패트리디쉬에 최초의 무게를 측정하고 약 3 g 정도의 시료를 각각 소분함
- (다) 알루미늄 호일에 구멍을 뚫어 각 패트리디쉬를 살짝 덮음
- (라) 보관조건과 경과시간에 맞추어 여러 개의 패트리디쉬를 안정성 챔버에 보관함
- (마) 경과시간에 따라 보관된 패트리디쉬의 무게를 측정하고 최초 원료 무게와 비교하여 원료의 흡습정도를 계산함

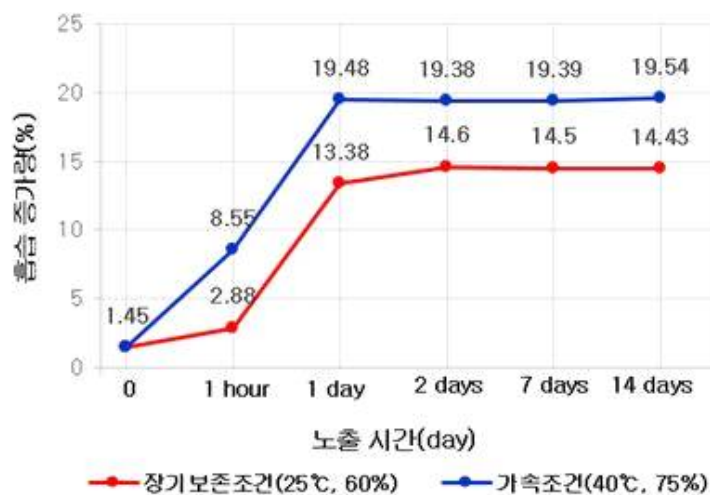
(3) 결과 및 고찰

장기보존조건 및 가속조건에서 DHP1402를 보관 시 2일 경과부터 흡습량의 큰 변화는 관찰 되지 않았으며, 2주간 흡습을 관찰한 결과 장기보존조건과 가속조건에서 DHP1402를 노출시켰을 때 각각 최대 흡습치는 약 14%와 19%로 확인함

DHP1402는 원료 특성상 높은 흡습성을 가지기에 원료 보관 시 습기에 각별히 주의해야함

시간 경과	장기보존조건(25±2℃, 60±5%)		가속조건(40±2℃, 75±5%)	
	증가된 원료무게(g)	흡습정도(%)	증가된 원료무게(g)	흡습정도(%)
초기	1.45%(칼피셔측정)			
1시간	+0.10 g	2.88%	+0.30 g	8.55%
1일	+0.42 g	13.38%	+0.60 g	19.48%
2일	+0.46 g	14.60%	+0.62 g	19.38%
1주일	+0.46 g	14.51%	+0.64 g	19.39%
2주일	+0.44 g	14.43%	+0.60 g	19.54%

<DHP1402 보관조건에 따른 흡습량 평가>



<DHP1402 보관조건에 따른 흡습량 평가 그래프>

다. 흐름성

(1) 실험목적

원료의 흐름성은 정제 조제 시 작업환경의 효율을 높이기 위하여 평가되며, 적합한 흐름성을 가지는 원료는 균질한 정제가 조제되며 원료의 사용에 있어 높은 효율을 나타냄

(2) 실험방법

(가) 원료를 약 20 cm 높이에서 자유낙하 시킬 수 있도록 깔때기를 스탠드에 고정시킴

(나) 원료 약 40 g을 칭량하여 약 20 cm 높이에서 천천히 자유낙하 시킴

(다) 원료가 충분히 쌓인 지점에 지름과 높이를 삼면에서 각각 측정함

(라) 측정된 반지름과 높이를 이용하여 안식각을 구함

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 안식각 측정 결과 삼면의 안식각의 평균은 각각 47.40°, 48.03°, 47.77°의 결과값을 나타내었고, DHP1402의 안식각은 약 47°로 판단됨

안식각의 결과 기준 값은 35°이므로 이 이상의 각도에서는 원료의 흐름성이 떨어지는 것으로 판단할 수 있으며, 이는 타정 시 원료의 흐름이 원활하지 않을 것으로 예상됨. 따라서 원료의 흐름성을 개선시킬 수 있는 제제연구가 이루어져야 함

안식각(°)
= degrees[atan{High*(cm)/Radius*(cm)}]
35° ≤ 이상 Poor flow

<안식각 계산식>

* High= 입자의 경사 높이(cm), Radius= 경사진 입자의 반지름(cm)

시험 횟수	X 방향		Y 방향		Z 방향	
	반지름(cm)	높이(cm)	반지름(cm)	높이(cm)	반지름(cm)	높이(cm)
1회	5.00	5.5	5.50	6.3	5.25	5.8
2회	5.18	5.5	5.75	6.3	5.40	5.8
3회	5.00	5.5	5.67	6.3	5.15	5.8

<DHP1402의 방향에 따른 반지름과 높이>

시험횟수	안식각(°)			
	X 방향	Y 방향	Z 방향	3방향 평균
1회	47.73	47.61	47.85	47.73
2회	46.74	48.88	47.05	47.56
3회	47.73	47.61	48.40	47.91
각방향 평균	47.40	48.03	47.77	47.73

<DHP1402의 안식각 결과>

라. 압축성

(1) 실험목적

원료의 압축성 평가는 균질한 정제 조제를 위해 평가되어야하는 항목으로써 높은 압축성은 낮은 흐름성을 갖기 때문에 작업환경에서 원료끼리 뭉침 현상이 발생할 가능성이 큼. 따라서 압축성을 평가를 통해 작업환경에 적합한 첨가제를 선정하여야함

(2) 실험방법

- (가) 원료를 약 5 g 칭량하여 유리 메스실린더에 채운 뒤 부피를 측정함
- (나) 평평한 곳에서 일정한 속도와 힘, 횟수로 반복하여 두들겨 부피를 측정함
- (다) (가),(나)번의 부피를 이용하여 density를 구함

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 압축성 평가를 위해 Carr's index와 Hausner ratio를 측정한 결과 각 28.15%, ratio 1.45의 결과값으로 큰 압축성을 나타냄

앞서 평가한 흐름성을 통해 DHP1402이 낮은 흐름성과 높은 압축성임을 확인하였고, 이는 균질한 정제와 효율적인 작업환경에 영향을 미칠 것으로 예상되어 첨가제 선정 시 흐름성과 압축성을 개선할 수 있는 적절한 첨가제를 선정하여야함

Carr's index(%)	
(tapped density-bulk density)/tapped density X 100	
5~10: Excellent	18~21: Fair
12~16: Good	23이상: Poor flow

<Carr's Index 계산식>

Hausner ratio	
tapped density(mL)/bulk density(mL)	
Free flow 이하 ≤ 1.25 ≤ 이상 Poor flow	

<Hausner ratio 계산식>

* tapped density= 시료 채취 량(g)/ 압축 후 부피(mL)

* bulk density= 시료 채취 량(g)/ 압축 전 부피(mL)

시험횟수	Bulk Density(g/mL)	Tapped Density(g/mL)
1회	0.49	0.65
2회	0.48	0.68
3회	0.46	0.73

<DHP1402의 Bulk-Tapped Density 측정 결과>

구 분	Carr's index(%)
1회	24.62
2회	29.41
3회	30.43
평균	28.15

<DHP1402의 Carr's Index 측정 결과>

구 분	Hausner ratio
1회	1.33
2회	1.42
3회	1.59
평균	1.45

<DHP1402의 Hausner ratio 측정 결과>

마. 용해도

(1) 실험목적

DHP1402의 용해도 평가는 최적의 정제 조제 방식을 선정하기 위하여 평가되며, 습식과립 시 용매의 선정과 용매 량 설정에 있어 기초 데이터가 됨

(2) 실험방법

(가) 시료를 약 1 g정도 50 mL 비커에 넣은 후 해당 용매를 일정량 투입함

(나) 일정속도와 시간으로 교반 후 바닥에 검체가 있는지 육안으로 관찰함

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 용해도 평가 결과 증류수에서 잘 녹는 성질을 가지고 있으며, 유기용매에서는 녹기 어려움. 또한 pH를 조절한 증류수의 경우 산성과 염기성 모두 잘 녹는 것을 관찰하였으나, 염기성용매의 경우 이취가 나고 갈변현상이 관찰됨

DHP1402에 가용화 할 수 있는 용매로는 증류수임을 확인함. 반면 염기성 용매에서는 원료의 분해로 이취가 나고 갈변 현상이 동반되는 것으로 확인함. 따라서 타정시 원료의 성질에 맞추어 가용용매를 선정해야 함

용매조건	용질 1 g을 녹이는데 필요한 용매량(mL)	관정
상온 증류수(25℃)	10 mL~30 mL 미만	녹는다
가온 증류수(60℃)	1 mL~10 mL 미만	잘 녹는다
산성 증류수(pH2)	10 mL~30 mL 미만	녹는다
염기성 증류수(pH11)	1 mL~10 mL 미만	잘 녹는다
95% 에탄올	1 L~10 L 미만	매우 녹기 어렵다
50% 에탄올	100 mL~1 L 미만	녹기 어렵다
99% 메탄올	1 L~10 L 미만	매우 녹기 어렵다
50% 메탄올	30 mL~100 mL 미만	조금 녹는다

<DHP1402의 용해도 평가 결과>

4. 화학적 연구(Chemical Study)

가. 고형분 안정성

(1) 실험목적

물리적인 조건변화에서 DHP1402의 화학적인 변화를 관찰하여 원료와 지표성분의 안정성을 파악하고 원료 및 완제의 최적 보관조건과 작업환경을 선정하기 위함

(2) 실험방법

(가) DHP1402를 일정량 칭량하여 용량플라스크에 넣음

(나) 관찰하고자 하는 조건에 일정기간 방치함

(다) DHP1402의 기준 및 시험법 중 함량시험법에 따라 스피노신과 로베티올린의 함량을 평가함

평가항목	보관조건	방치시간
수분	60±5%, RH	3일
열	60±2℃	3일
	80±2℃	3일
수분 + 열	40±2℃, 75±5%, RH	3일
광(光)학	직광선 노출	12주
	직광선 방어	12주

<DHP1402의 고형분 안정성 평가용 보관조건>

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 고형분 안정성 평가결과 수분, 열, 수분+열, 광학의 조건에서 스피노신과 로베티올린 함량이 기준에 적합한 것으로 확인됨
이를 근거로 DHP1402의 지표성분인 스피노신과 로베티올린이 열과 수분, 열+수분, 광(光)조건에서 안정함을 확인함. 정제 시 해당 조건의 열과 수분, 직광선에서는 안정한 것으로 판단됨

평가항목	보관조건	스피노신 함량(%) 0.4% 이상	로베티올린 함량(%) 0.04% 이상
수분	60±5%, RH	0.45	0.064
열	60±2℃	0.46	0.063
	80±2℃	0.44	0.056
수분 + 열	40±2℃, 75±5%, RH	0.45	0.063
광(光)학	직광선 노출	0.43	0.058
	직광선 방어	0.43	0.063

<DHP1402의 고형분 안정성 평가결과>

나. 용액 안정성

(1) 실험목적

용액에 대한 pH와 용매의 종류, 온도 등의 조건에서 원료와 지표성분의 안정성을 파악하여 최적의 정제 조제 방법을 선정하기 위하여 원료에 대한 용액안정성이 평가됨

(2) 실험방법

(가) DHP1402를 일정량 칭량하여 용량플라스크에 넣음

(나) 관찰하고자 하는 용매조건으로 추출함

(다) DHP1402의 기준 및 시험법 중 함량시험법에 따라 스피노신과 로베티올린의 함량을 평가함

평가항목	처리방법	최종용매
상온조건	상온 증류수(25℃)	50% 메탄올
가온조건	가온 증류수(65℃)	
산성조건	포름산으로 pH조정	
염기성조건	수산화나트륨으로 pH조정	
산화조건	3% 과산화수소로 조정	

<DHP1402의 용액안정성 평가용 용매조건>

(3) 결과 및 고찰

DHP1402의 용액안정성 평가결과 염기성조건을 제외한 4가지 조건(상온조건, 가온 조건, 산성조건, 산화조건)에서 안정함을 확인함. 염기성조건의 경우 스피노신의 분해로 유연물질이 생성되는 것을 확인함

DHP1402 정제 조제 및 분석 시 염기성 용매조건에 유의하여 작업을 진행해야함

평가항목	처리방법	스피노신 함량(%)	로베티올린 함량(%)
		0.4% 이상	0.04% 이상
상온조건	상온 증류수(25℃)	0.45	0.06
가온조건	가온 증류수(65℃)	0.45	0.07
산성조건	포름산으로 pH조정	0.49	0.07
염기성조건	수산화나트륨으로 pH조정	0.02	0.06
산화조건	3% 과산화수소로 조정	0.46	0.07

<DHP1402의 용액안정성 평가결과>

5. 적합성 연구(Compatibility Study)

가. 실험목적

원료(DHP1402)와 부형제의 Binary mixture를 가속조건(40±2℃, RH 75±5%)에서 개봉, 미개봉 상태로 4주간 보관하며 1주, 2주, 4주 간격으로 지표성분의 함량을 확인하여 지표성분 함량변화의 경향성을 평가하여 적절한 부형제를 선택하고 제제연구를 진행하고자 함

나. 실험방법

- (1) 원료와 부형제를 1:1 비율로 혼합한 샘플을 각각 2개씩 조제함
- (2) 하나의 샘플은 50 mL 코니칼튜브에 넣은 후 개방하고, 동일한 다른 하나의 샘플

- (3) 은 알루미늄 포장으로 미개봉 상태로 준비함
- (4) 각 샘플을 가속조건(40±2℃, RH 75±5%) 안정성 챔버에 보관하고 1주, 2주, 4주
- (5) 간격으로 각 지표성분(스피노신, 로베티올린)의 함량변화 경향을 관찰함

다. 결과 및 고찰

Binary mixture의 적합성 평가로써 스피노신의 함량변화를 관찰한 결과, 열과 수분조건에서 전분글리콘산(붕해제), PVP, HPC, HPMC(결합제) mixture에서 스피노신의 함량이 감소하여 적합성이 낮은 첨가제임을 확인함

	상대적으로 원료의 안정성을 떨어지게 만드는 부형제
	적합하지 않은 부형제

구분	종류	개봉			미개봉		
		1 주	2주	4주	1 주	2주	4주
활택제	탈크	0.51	0.55	0.53	0.53	0.52	0.45
	스테아르산	-	-	0.55	-	-	0.41
	경질무수규산	0.47	0.52	0.47	0.53	0.53	0.45
붕해제	크로스카멜로스	0.52	0.52	0.49	0.53	0.53	0.45
	전분글리콘산	0.40	0.36	0.31	0.53	0.53	0.45
	CMC-Ca	0.49	0.53	0.45	0.53	0.52	0.45
	크로스포비돈	0.53	0.53	0.46	0.53	0.52	0.45
결합제	MCC	0.53	0.54	0.49	0.53	0.53	0.43
	PVP	0.36	0.27	0.26	0.52	0.53	0.45
	HPC	0.38	0.25	0.60	0.40	0.47	0.34
	HPMC	0.26	0.21	0.35	0.46	0.35	0.30
부형제	전호화전분	0.40	0.51	0.45	0.53	0.52	0.51
	유당	0.56	0.57	0.54	0.53	0.52	0.45
	디-만니톨	0.52	0.53	0.42	0.50	0.52	0.45
	옥수수전분	0.54	0.53	0.50	0.53	0.53	0.46
	L-HPC	0.53	0.54	0.16	0.53	0.50	0.45
	무수인산수소	0.47	0.54	0.51	0.53	0.52	0.45

<DHP1402의 적합성 평가 결과(스피노신)>

스피노신과 로베티올린의 함량변화를 종합하여 DHP1402에 적합한 첨가제를 스크리닝한 결과, 탈크(활택제), 전분글리콘산(붕해제), PVP, HPC, HPMC(결합제), L-HPC, 무수인산수소(부형제)를 제외하고 사용된 첨가제들은 모두 적합한 것으로 사료됨. 이 연구결과 바탕으로 DHP1402 처방연구를 진행함

구분	종류	스피노신	로베티올린	종합
활택제	탈크	○	X	X
	스테아르산	△	△	△
	경질무수규산	○	○	○
붕해제	크로스카멜로스	○	○	○
	전분글리콘산	X	X	X
	CMC-Ca	○	△	△
	크로스포비돈	○	○	○
결합제	MCC	○	○	○
	PVP	X	X	X
	HPC	X	X	X
	HPMC	X	X	X
부형제	전호화전분	○	○	○
	유당	○	○	○
	디-만니톨	△	△	△
	옥수수전분	○	△	△
	L-HPC	X	X	X
	무수인산수소	○	X	X

<DHP1402의 적합성 평가 결과(스피노신, 로베티올린)>

6. 인체적용시험용 식품 용량설정 및 제형 결정

기존의 제제화 연구(Preformulation study, Compatibility study)를 통해 얻은 결과를 바탕으로 최적의 첨가제를 선정하고 비임상시험 독성 및 효능연구를 바탕으로 원료 및 분량을 결정함

가. 인체적용시험용 식품 용량설정

(1) 비임상 독성시험을 통한 안전용량 설정

설치류 단회 및 4주간 반복경구투여 독성시험 시 시험물질을 5,000 mg/kg의 최고용량을 설정하고 시험한 결과 시험물질에 의한 사망개체 및 독성학적으로 의미 있는 변화가 관찰되지 않았으므로 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD) 및 무독성량(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 5,000 mg/kg으로 산출되어 동물의 체표면적을 사람의 체표면적으로 환산하였을 때 하루 최대 복용량을 4,800 mg/day로 산정됨

(가) $5,000 \text{ mg/kg in rats (NOAEL)} \times 0.16 \text{ (HED 변환 factor)} = 800 \text{ mg/kg (HED)}$

(나) $\text{Patient (60 kg)} : 800 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} \div 10 \text{ (safety factor)} = 4,800 \text{ mg/man}$

∴ 인체적용시험 시 최대용량으로 4,800 mg/day/man으로 설정할 수 있음.

(2) 비임상시험 효력연구를 통한 유효용량 설정

비임상시험 효능연구에서 Scopolamine 유도 기억력 감퇴 모델 및 Aβ₁₋₄₂유도 치매 모델에서의 수동회피, Y자 미로시험, 수증미로시험, 새로운 물체탐색시험에서 DHP1401의 가장 좋은 효능을 보인 용량은 200 mg/kg으로 이를 근거로 사람의 체

표면적으로 환산하여 인체적용시험 용량을 산출한 결과 1일 960 mg/day 이상으로 산출되었음

(가) 200 mg/kg in mouse x 0.08 (HED 변환 factor) = 16 mg/kg (HED)

(나) Patient (60 kg) : 16 mg/kg x 60 kg = 960 mg/man

∴ 동물모델시험으로부터 HED(Human Equivalent Doses)를 구한 결과 인체적용시험 용량은 960 mg/man 이상으로 설정할 수 있음.

(3) 인체적용시험식품 용량설정

비임상시험 독성 및 효능연구를 근거로 인체적용시험 식품의 용량을 산출하여 1일 2회 1회 500 mg/1회로 하여 하루 복용량을 1,000 mg/day로 산출함

나. 제형결정

(1) 원료 및 그 분량(완제: 1정 499 mg 중 DHP1402 250 mg)

1정(499 mg) 중				
원료명	배합목적	규격	분량	단위
산조인 양유근 복합추출물	주성분	별규	250	밀리그램
유당수화물	부형제	KP	200	밀리그램
크로스카멜로오스나트륨	붕해제	NF	10	밀리그램
경질무수규산	활택제	KP	6	밀리그램
스테아르산마그네슘	활택제	KP	6	밀리그램
오파드라이화이트(03B28796)	활택제	별규	26	밀리그램
적색산화철	착색제	NF	0.5	밀리그램
황색산화철	착색제	NF	0.5	밀리그램

(2) 원료 및 그 분량(위약)

1정(499 mg) 중				
원료명	배합목적	규격	분량	단위
유당수화물	부형제	별규	447.3	밀리그램
크로스카멜로오스나트륨	붕해제	KP	10	밀리그램
경질무수규산	활택제	NF	6	밀리그램
스테아르산마그네슘	활택제	KP	6	밀리그램
황색산화철	착색제	NF	2	밀리그램
적색산화철	착색제	NF	0.45	밀리그램
흑색산화철	착색제	NF	0.25	밀리그램
오파드라이화이트(03B28796)	제피제	별규	26	밀리그램
적색산화철	착색제	NF	0.5	밀리그램
황색산화철	착색제	NF	0.5	밀리그램

7. 인체적용시험용 제품 생산

대화제약(주) 횡성공장(bGMP 시설)에서 확립된 제조공정을 바탕으로 완제 및 위약 생산

다. 완제 생산(제조지시 및 기록서, 48,000정)

제조지시 및 기록서



Ver No. : 00

제품코드	제품명	제조번호	제조단위	성상
9674000	DHP1402 (산조인양유근복합추출물) (임상시험용)	5001	48,000정 /23,952g	적갈색의 장방형 필름코팅정

사용(유효)기간	제조년월일	사용(유효)기한	제조지시일자	제조지시자	발행자
/	2015.08.17.	/	2015.08.17.	njw	[Signature]

생산현황 보고서

1. 공정관리수율						
공정명	이론량(인수량)	실생산량		공정수율	확인자	
		생산량	검체량			
혼합	22.656 kg	22.61 kg	45 g	100.0 %	[Signature]	
타정	47.902 정	43,006 정	247 정	90.3 %	이승기	
선별	42,857 정	40,040 정	/	93.4 %	남경우	
포장	360정/PTP	40,040 정	111 개	420 정	100.8 %	[Signature]
		111 개				

공정관리수율 계산공식 = [(생산량 + 검체량) / 인수량] x 100

2. 최종생산수율				
포장단위	실생산량		최종생산수율	확인자
	생산량	검체량		
360정/PTP	111 개	420 정	84.1 %	[Signature]

최종생산수율 계산공식 = [(생산량 x 포장단위) + 검체량] / 제조단위 x 100
단, 검체량은 포장공정 중 검체량에 한함.

특기사항
N.A

작성자	검토자	검토자	제조부서책임자	품질(보증)부서책임자
원영권 2015.07.30	추성남 2015.07.31	김홍민 2015.07.31	남경우 njw 2015.7.31	양재권 2015.07.31

라. 위약 생산(제조지시 및 기록서, 50,000정)

제조지시 및 기록서



Ver No. : 00

제품코드	제품명	제조번호	제조단위	성상
	DHP1402 (산조인양유근복합추출물) (placebo)	5001	50,000정 /24.95kg	적갈색의 장방형 필름코팅:

사용(유효)기간	제조년월일	사용(유효)기한	제조지시일자	제조지시자	발행자
	2015.08.19.		2015.08.19.	<i>NgWoo</i>	<i>[Signature]</i>

생산현황 보고서

공정명	이론량(인수량)	실생산량		공정수율	확인자	
		생산량	검채량			
혼합	23.60 kg	23.56 kg	76 g	100.0 %	<i>[Signature]</i>	
타정	49.915 정	44.915 정	236 정	90.5 %	<i>이승우</i>	
선별	44,889 정	44,488 정		99.1 %	<i>남재권</i>	
포장	360정/PTP	44,488 정	130 갑	60 정	105.3 %	<i>[Signature]</i>
		123 갑				

공정관리수율 계산공식 = [(생산량 + 검채량) / 인수량] x 100

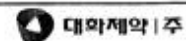
포장단위	실생산량		최종생산수율	확인자
	생산량	검채량		
360정/PTP	130 갑	60 정	93.7 %	<i>[Signature]</i>

최종생산수율 계산공식 = [(생산량 x 포장단위) + 검채량] / 제조단위 x 100
단, 검채량은 포장공정 중 검채량에 한함.

특기사항
D. A

제조지시(유효)기간으로부터 시작				
작성자	검토자	검토자	제조부서책임자	품질(보증)부서책임자
<i>원영권</i> 2015.08.18.	<i>추성남</i> 2015.08.18	<i>김형민</i> 2015.08.18.	<i>남정우 NgWoo</i> 2015. 8. 18.	<i>임재권</i> 2015.09.17.

201-01:02



제6절 완제 대량생산 제조 공정 확립

8. 전체공정도 완성

다. 완제 제조 공정 완성(완제 및 위약)

DHP1402 의 제제화 연구(preformulation study 및 compatibility study)를 바탕으로 최적의 첨가제를 선정하고, 제조방법을 확립하여 완제의 대량생산 제조공정도를 완성함

(1) 제조방법(완제 및 위약)

공정 번호	공정 명칭	원료 · 시약 · 용매 등	
		DHP1402 완제	DHP1402 위약
1	원료 칭량	주성분 : 산조인 양유근 복합추출물 부형제 : 유당수화물 봉해제 : 크로스카멜로오스나트륨 활택제 : 경질무수규산 활택제 : 스테아르산마그네슘 제피제 : 오파드라이화이트(03B28796) 착색제 : 적색산화철 착색제 : 황색산화철 용 제 : 에탄올(KP) 286 mg 용 제 : 정제수	부형제 : 유당수화물 봉해제 : 크로스카멜로오스나트륨 활택제 : 경질무수규산 활택제 : 스테아르산마그네슘 착색제 : 황색산화철 착색제 : 적색산화철 착색제 : 흑색산화철 제피제 : 오파드라이화이트(03B28796) 착색제 : 적색산화철 착색제 : 황색산화철 용 제 : 에탄올(KP) 286 mg 용 제 : 정제수
2	혼합	주성분 : 산조인 양유근 복합추출물 부형제 : 유당수화물 봉해제 : 크로스카멜로오스나트륨 활택제 : 경질무수규산 활택제 : 스테아르산마그네슘	부형제 : 유당수화물 봉해제 : 크로스카멜로오스나트륨 활택제 : 경질무수규산 활택제 : 스테아르산마그네슘 착색제 : 황색산화철 착색제 : 적색산화철 착색제 : 흑색산화철
3	타정	공정 2의 혼합물	공정 2의 혼합물
4	필름 코팅 액 조제	제피제 : 오파드라이화이트(03B28796) 착색제 : 적색산화철 착색제 : 황색산화철 용 제 : 에탄올(KP) 286 mg 용 제 : 정제수	제피제 : 오파드라이화이트(03B28796) 착색제 : 적색산화철 착색제 : 황색산화철 용 제 : 에탄올(KP) 286 mg 용 제 : 정제수
5	필름 코팅	공정 3의 반제품 공정 4의 필름코팅액	공정 3의 반제품 공정 4의 필름코팅액
6	선별	공정 5의 반제품	공정 5의 반제품
7	포장	(Bottle: HDPE(Bottle), LDPE(Cap)) Blister: Aluminium Foil, PVC, PVDC, Alu-Alu	(Bottle: HDPE(Bottle), LDPE(Cap)) Blister: Aluminium Foil, PVC, PVDC, Alu-Alu

제7절 원료 및 완제 안정성 연구

DHP1402의 원료 및 완제의 기준 및 시험방법을 설정하고, 장기보존조건(25±2℃, 60±5% RH)에서의 안정성 연구를 진행하여 24개월간 품질변화를 평가함. 다만, 「한약재 제조 및 품질관리 기준」(식약처, 2013.12)에 따라 경시변화가 예상되지 않는 항목에 대하여 최초시점과 종료시점만 시험함

1. DHP1402 안정성 기준 및 시험법

가. DHP1402 원료의 기준 및 시험법

시험 항목	시험법	기준	
성상	원료의 색, 향, 맛	미색 ~ 미황색의 분말	
납	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
총비소	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
카드뮴	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	0.5 ppm 이하	
총수은	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	0.5 ppm 이하	
건조감량	‘대한민국약전’ 일반시험법 중 생약시험법 건조감량에 따라 시험	5.4% 이하	
대장균 균	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	음성	
잔류농약	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	불검출	
함량시험	자사기준	스피노신	0.4% 이상
		로베티올린	0.04% 이상

나. DHP1402 완제의 기준 및 시험법

시험 항목	시험법	기준	
성상	원료의 색, 향, 맛	적갈색의 장방형 필름코팅정	
납	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	3.0 ppm 이하	
총비소	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	3.0 ppm 이하	
카드뮴	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
총수은	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	1.0 ppm 이하	
제제균일성	평균질량 값과 개개의 질량과의 편차가 ±5%	질량편차 5% 이하	
대장균 균	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	음성	
붕해	‘식품공전’ 중 일반시험법에 따라 시험	60분 이내 붕해	
함량시험	자사기준	스피노신	1.0mg/tablet 이상
		로베티올린	0.1mg/tablet 이상

2. DHP1402 원료 및 완제의 안정성시험

가. DHP1402 원료의 안정성시험

(1) DHP1402 원료의 안정성시험 요약서

장기보존조건에서 DHP1402원료의 안정성시험을 실시하여, 24개월 동안 보관하였을 때 품질변화를 평가함. 현재 24개월까지 DHP1402 원료의 안정성을 확보함

원 료 명	DHP1402 원료		
보관 조건	장기보존 (25±2°C, 60±5% RH)	포장 조건	Bottle
시험시작일	2015. 04. 15	시험종료일	2017. 04. 14

시험항목	기준	시험결과						
		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상	미색 또는 미황색의 가루	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
중금속	①납: 1.0 ppm 이하 ②총 비소: 1.0 ppm 이하 ③카드뮴: 0.5 ppm 이하 ④총 수은: 0.5 ppm 이하	적합	-	-	-	-	-	-
잔류농약	비에이치씨 외 49종 불검출	적합	-	-	-	-	-	-
건조감량	5.4%이하	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
함량	①스피노신 : 0.4% 이상 ②로베티올린 : 0.04% 이상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

(가) 순도시험(중금속 및 잔류농약) 및 대장균군 시험(초기 실험 결과 데이터)

제 D2015041872 호			
검 사 성 적 서			
김체명	산조인양유근복합추출물	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)대화제약	
	주 소	경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 (삼평동, 코리아바이오파크1동C-901)	
	성 명	노병태, 김은석	
제조번호	DHP1402	접수년월일	2015-04-27
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2015041872
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 황갈색의 분말	김혜윤	
대장균군	음성	이정환	
납(mg/kg)	0.0746mg/kg	류미진	
카드뮴(mg/kg)	0.0038mg/kg	류미진	
중비소(mg/kg)	0.7173mg/kg	류미진	
총수은(mg/kg)	불검출	박새롬이	
BHC(mg/kg)	불검출	김용수	
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미	
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수	
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수	
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Cyprodinil(mg/kg)	불검출	김용수	
DDT(mg/kg)	불검출	김용수	
Diazinon(mg/kg)	불검출	김용수	
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수	
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수	
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenarimol(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenpropathrin(mg/kg)	불검출	김용수	
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수	

귀하가 우리 연구원에 감사의외한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 희

시험항목	결과	검사담당자
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Isoprothiorane(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methonyl(mg/kg)	불검출	이선미
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Pirimicarb(mg/kg)	불검출	김용수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	이선미
Boscalid(mg/kg)	불검출	이선미
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	이선미
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Iprovalicarb(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Captan(mg/kg)	불검출	김용수
Tolclofos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxan(mg/kg)	불검출	이선미
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Hexafumuron(mg/kg)	불검출	이선미

2015년 5월 4일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 051-628-0400-1

(나) 건조감량

원료시험일지

검 체 명	산조인양유근복합추출물	시험번호	DHP1402-initia
코드번호	DHP1402	시험날짜	2015. 04 08
시험항목	건조감량 시험	시 험 자	김 지 만

항 목	기준 및 시험방법		
	구 분	기준	결과
건조 감량	기준 및 시험방법에 따라 시험하였을 때 건조감량은 5.4% 이하		3.984%

<시험방법>
 ① 검체 3.0 g을 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 건조감량에 따라 105℃에서 4시간동안 노출시켰을 때 그 계산 값이 5.4% 이하이어야 함

<시험결과>

항목	시험 값
A : 건조 전 시료의 무게(g)	3.162g
B : 건조 후 시료의 무게(g)	3.036g

<계산식>

$$\text{건조감량 (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

건조감량시험

$$\text{Sample} = \frac{3.162g - 3.036g}{3.162g} \times 100 = 3.984\%$$

* 건조감량: 3.984 %

-MOISTURE DETERMINATION-
 METTLER TOLEDO HB43-S
 SNR B323404714
 SW 2.01
 Name DHP1401-
 modified
 Target weight 3.000 g
 Drying program STD
 Temperature 105 °C
 Switch-off mode Timed
 Time 240 min
 Display mode %MC
 Free factor Off
 Initial wt. 3.162 g
 Total time 240:00 min
 Dry weight 3.036 g
 Result -3.98 %MC
 Sample ID:
 Comment:
 Signature:
 ---04.08.2015---18:01---



(다) 함량

원료시험일지

검체명	산조인양유근복합추출물	시험번호	DHP1402-initia
코드번호	DHP1402	시험날짜	2015.04.17
시험항목	함량시험	시험자	김지민

항목	기준 및 시험방법			
정량	구분	기준	결과	
	정량	스피노신의 함량은 0.4% 이상임	0.479%	
		로베티올린의 함량은 0.04% 이상임	0.068%	
	<시험방법>			
	1) 검액 검체를 1.0 g을 취해 100 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올 80mL을 가해 완전히 녹여 표선 후 여과한 액을 검액으로 함 (10 mg/mL)			
	2) 표준액 스피노신 (C ₂₀ H ₃₂ O ₁₅ : 608.546)과 로베티올린 (C ₂₀ H ₂₈ O ₈ : 396.433) 정량용 표준품 1.0 mg씩을 각각 취해 10 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올에 완전히 녹여 표선 한 액을 표준액으로 함 (각 표준품 농도 100 µg/mL)			
	3) 조작법 검액과 표준액을 기준 및 시험방법의 정량 액체크로마토그래프법에 따라 시험함			
	<시험결과>			
	항목	sample 1	sample 2	sample 3
	스피노신(1)			
A _T -1 : 검액의 주피크 면적(mAU*s)	123.42554	1231.35400	1242.52749	
A _S -1 : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)	2504.98454	2504.98454	2504.98454	
C _S -1 : 표준품 농도(mg/mL)	0.100 mg/mL	0.100 mg/mL	0.100 mg/mL	
C _T -1 : 검체 농도(mg/mL)	10.0459 mg/mL	10.0490 mg/mL	10.0264 mg/mL	
P-1 : 표준품의 순도(%)	98	98	98	
로베티올린(2)				
A _T -2 : 검액의 주피크 면적(mAU*s)	45.52123	59.38184	62.60000	
A _S -2 : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)	803.07284	803.07284	803.07284	
C _S -2 : 표준품 농도(mg/mL)	0.100 mg/mL	0.100 mg/mL	0.100 mg/mL	
C _T -2 : 검체 농도(mg/mL)	10.0459 mg/mL	10.0490 mg/mL	10.0264 mg/mL	
P-2 : 표준품의 순도(%)	98	98	98	

<계산식>

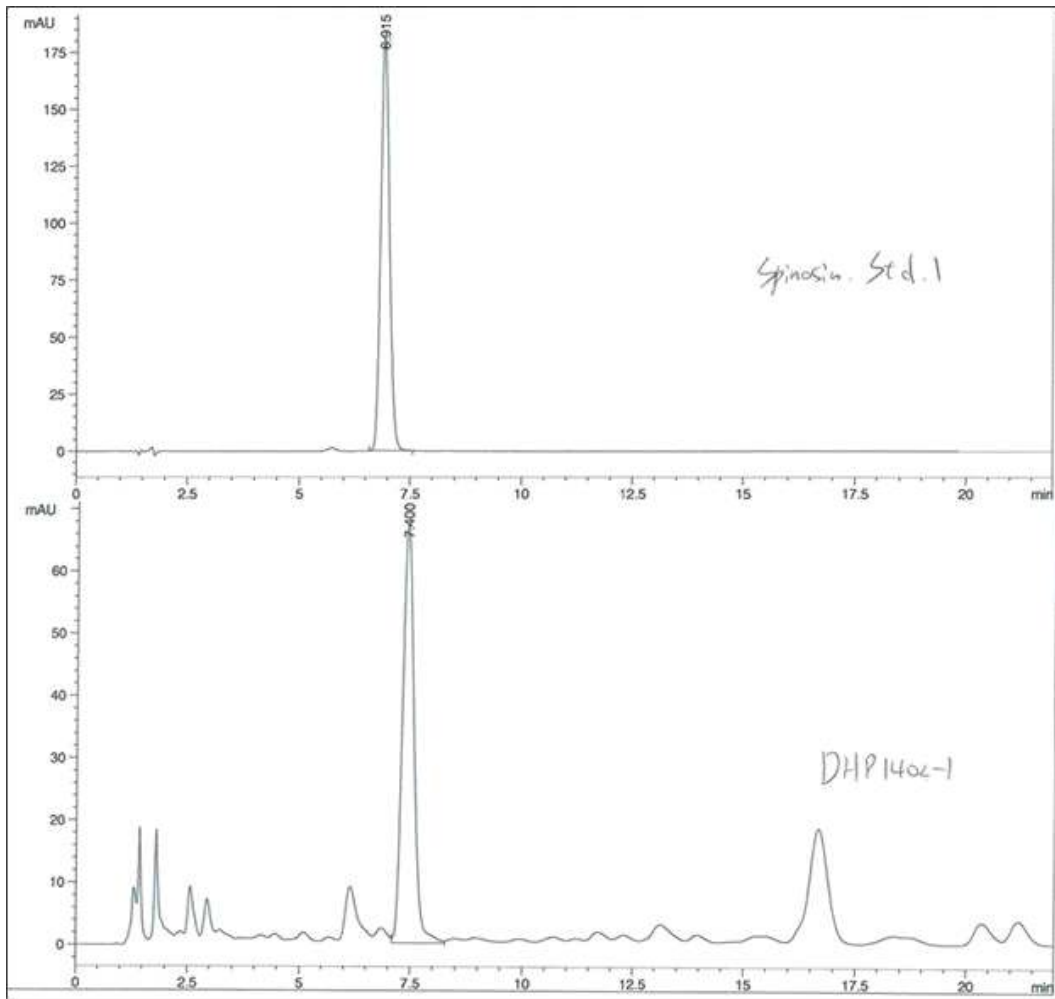
$$\text{스피노신 함량 (\%)} = \frac{A_{T-1}}{A_{S-1}} \times \frac{C_{S-1}}{C_{T-1}} \times P-1$$

$$\text{Sample 1} = \frac{1213.42554}{2504.98454} \times \frac{0.1000\text{mg/L}}{10.0457\text{mg/L}} \times 98\% = 0.472\%$$

$$\text{Sample 2} = \frac{1231.35400}{2504.98454} \times \frac{0.1000\text{mg/L}}{10.0470\text{mg/L}} \times 98\% = 0.479\%$$

$$\text{Sample 3} = \frac{1242.52747}{2504.98454} \times \frac{0.1000\text{mg/L}}{10.0264\text{mg/L}} \times 98\% = 0.485\%$$

* 스피노신 함량 3회 시험 평균 : 0.479%



<계산식>

$$\text{로베티올린 함량 (\%)} = \frac{A_{r-2}}{A_{s-2}} \times \frac{C_{s-2}}{C_{t-2}} \times P-2$$

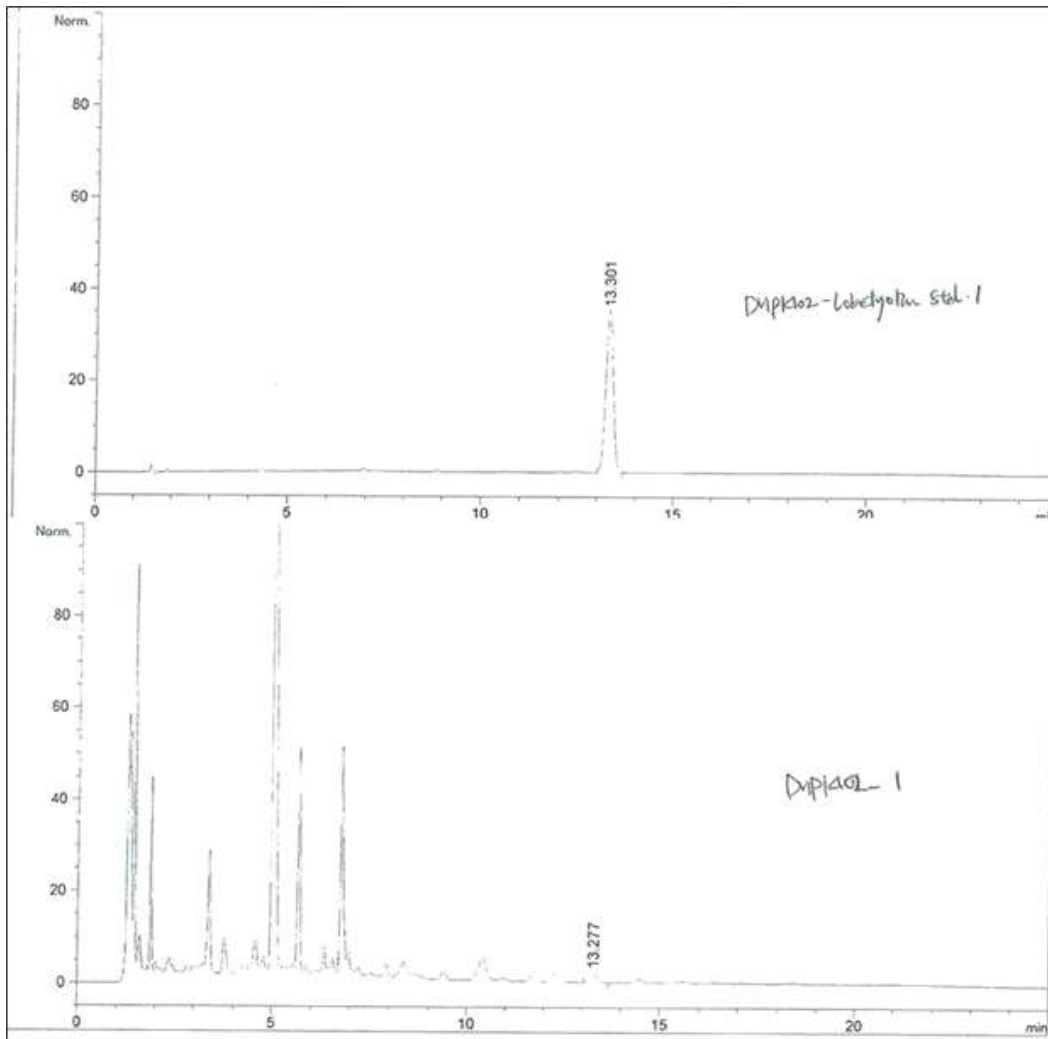
$$\text{Sample 1} = \frac{45.5223}{803.07284} \times \frac{0.10349\text{g/L}}{10.0457\text{g/L}} \times 98\% = 0.055\%$$

$$\text{Sample 2} = \frac{59.38184}{803.07284} \times \frac{0.10043\text{g/L}}{10.0410\text{g/L}} \times 98\% = 0.072\%$$

$$\text{Sample 3} = \frac{62.60006}{803.07284} \times \frac{0.10043\text{g/L}}{10.0164\text{g/L}} \times 98\% = 0.076\%$$

정량

* 로베티올린 함량 3회 시험 평균 : 0.068 %



나. DHP1402 완제의 안정성시험

(1) DHP1402 완제의 안정성시험 요약서

장기보존조건에서 DHP1402완제의 안정성시험을 실시하여, 24개월 동안 보관하였을 때 품질변화를 평가함. 현재 24개월까지 DHP1402 완제의 안정성을 확보함

제 품 명	DHP1402 완제		
보관 조건	장기보존 (25±2°C, 60±5% RH)	포장 조건	Blister
시험시작일	2015. 08. 27	시험종료일	2017. 08. 26

시험항목	기준	시험결과						
		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상	적갈색의 장방형 필름코팅정	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
중금속	①납: 3.0 ppm 이하 ②총 비소: 3.0 ppm 이하 ③카드뮴: 1.0 ppm 이하 ④총 수은: 1.0 ppm 이하	적합	-	-	-	-	-	-
붕해	60분 이내 붕해	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
제제 균일성	질량편차 5% 이하	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
함량	①스피노신 1.0mg/tablet 이상 ②로베티올린 0.1mg/tablet 이상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

(가) 성장, 붕해, 제제균일성(초기 실험 결과 데이터)

필름코팅 공장검사 기록서 검사일자 : 2016. 09. 25.

지시 및 주의사항

1. 성상은 기준과 일치하는지 육안으로 확인하여 결과를 적는다.
2. 붕해시험은 6정을 시험하여 그 값을 적는다.
3. 질량편차는 20 점의 개개의 그 값을 측정한다.
4. 검사항목 중 일탈 발생시, 즉시 QC 책임자 및 생산관리책임자에게 보고하고, 일탈관리 규정에 따라 처리한다.

검사항목	기준	결과	점검자	확인자	
성 상	적갈색의 장방형 필름코팅정	적갈색의 장방형 필름코팅정	성영자	○	
붕 해 도	60 분 이내	1) 분 34 초	성영자	○	
질량편차	482 mg ~ 516 mg (± 3.5 %)	최소값	483 mg	성영자	○
		최대값	509 mg	성영자	○
		평균값	497 mg	성영자	○
특기사항 N/A					

(나) 대장균군, 중금속

제 D2015091430 호 **검 사 성 적 서**

업체명	DRP1402정(산조인양유근복합추출물 코팅정제)	제조일자 (유통기한)	2015-08-27 (2017-08-26)
의뢰인	업체명	대화제약(주)	
	주 소	강원도 횡성군 횡성읍 한우로 495 대화제약(주)	
	성 명	노병태, 김은석	
제조번호		검수년월일	2015-09-21
검사의뢰목적	제출용	검체검수번호	D2015091430

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

시험항목	결과	검사담당자
대장균군	음성	이태영
중비소(mg/kg)	0.2985mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0348mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0026mg/kg	류미진
중수은(mg/kg)	0.001mg/kg	박재용이

2015 년 10 월 1 일
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.co.kr> 전화번호 051-031-1628-0400-1

(다) 함량

완제시험일지

검 체 명	DHP1402 정	시험번호	E6150026017
제조번호	5001	시험날짜	15.9.16
시험항목	함량	시험자	최려준

항 목	기준 및 시험방법			
정 량	구 분	기준	결과	
	함 량	1정당 스피노신의 함량은 1 mg 이상	1.35mg	
<시험방법>				
1) 검액				
① 이 약 20정을 정밀히 달아 50 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올 45 mL를 가해 완전히 녹여 표선 후 여과한 액을 검액으로 함 (10 mg/mL)				
2) 표준액				
① 스피노신 (C ₂₀ H ₃₂ O ₁₅ : 608.546) 정량용 표준품 1.0 mg을 취해 10 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올에 완전히 녹여 표선 한 액을 표준액으로 함 (100 µg/mL)				
3) 조작법				
① 검액과 표준액을 기준 및 시험방법의 함량을 액체크로마토그래프법에 따라 시험 함				
<시험결과>				
	항 목	sample 1	sample 2	sample 3
	A _r : 검액의 주피크 면적(mAU*s)	281.93039	279.02599	278.47333
	A _s : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)	1002.6721	1002.6721	1002.6721
	C _s : 표준품 농도(mg/mL)	0.1	0.1	0.1
	C _t : 검체 농도(mg/mL)	10.093	10.048	10.119
	P : 표준품의 순도(%)	98	98	98
$\text{스피노신 함량 (mg)} = \frac{A_r}{A_s} \times \frac{C_s}{C_t} \times \frac{P}{100} \times 499$				

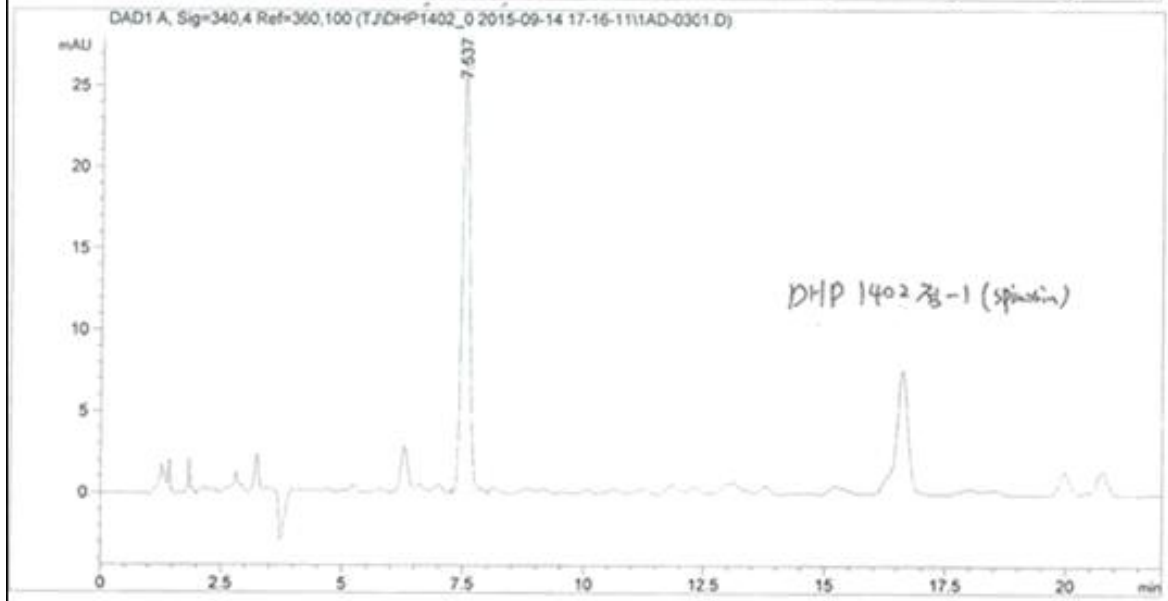
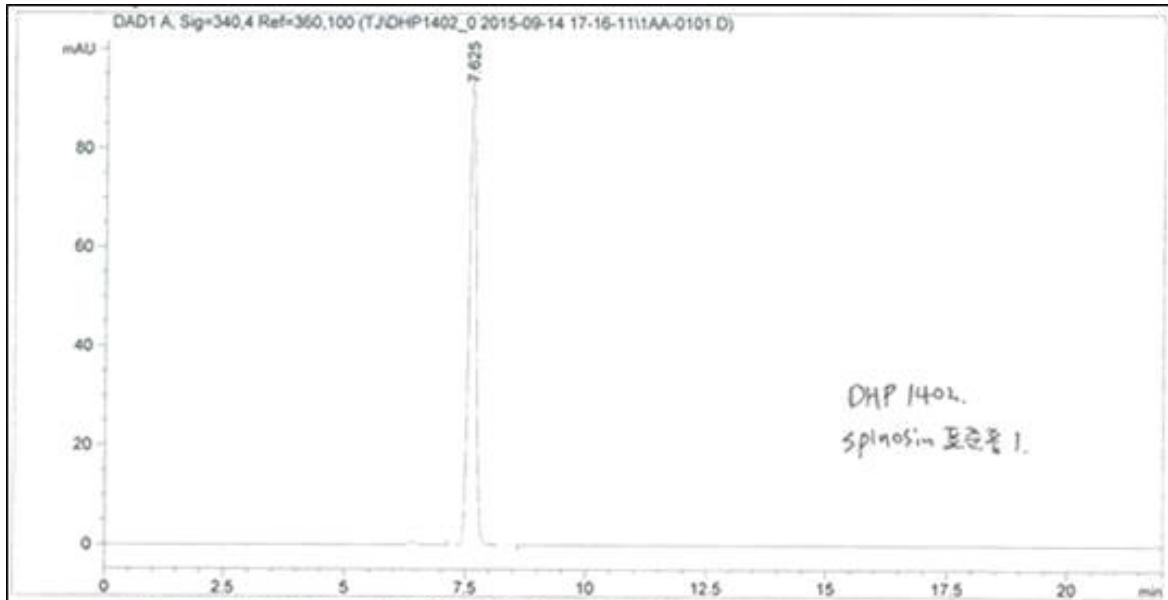
$$\text{Sample 1} = \frac{281.93039}{1002.67211} \times \frac{0.1}{10.093} \times \frac{98}{100} \times 499 = 1.36 \text{ mg}$$

$$\text{Sample 2} = \frac{279.02499}{1002.67211} \times \frac{0.1}{10.048} \times \frac{98}{100} \times 499 = 1.35 \text{ mg}$$

$$\text{Sample 3} = \frac{278.49333}{1002.67211} \times \frac{0.1}{10.119} \times \frac{98}{100} \times 499 = 1.34 \text{ mg}$$

• 스피노신 함량 3회 시험 평균 : 1.35 mg

14.Sep 2015	11:15	
N	504.64 mg	
14.Sep 2015	11:18	DH 21402
N	502.39 mg	
14.Sep 2015	11:21	21402
N	505.97 mg	
14.Sep 2015	11:28	SPININ
N	1.00 mg	21402



완제시험일지

검 체 명	DHP1402 정	시험번호	E6150826017
제조번호	5001	시험날짜	15.9.10
시험항목	항량	시 험 자	최태권

항 목	기준 및 시험방법																										
정 량	구 분	기준	결과																								
	항 량	로베티올린의 함량은 0.1 mg 이상	0.250mg																								
<p><시험방법></p> <p>1) 검역</p> <p>① 이 약 20정을 정밀히 달아 50 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올 45 mL를 가해 완전히 녹여 표선 후 여과한 액을 검역으로 함 (10 mg/mL)</p> <p>2) 표준액</p> <p>① 로베티올린 (C₂₀H₂₈O₈ : 396.433) 정량용 표준품 1.0 mg을 취해 10 mL 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올에 완전히 녹여 표선 한 액을 표준액으로 함 (100 µg/mL)</p> <p>3) 조작법</p> <p>① 검역과 표준액을 기준 및 시험방법의 함량을 역체크로마토그래프법에 따라 시험 함</p> <p><시험결과></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 5px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">항 목</th> <th style="width: 15%;">sample 1</th> <th style="width: 15%;">sample 2</th> <th style="width: 15%;">sample 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A_r : 검역의 주피크 면적(mAU*s)</td> <td style="text-align: center;">22.96170</td> <td style="text-align: center;">22.65072</td> <td style="text-align: center;">22.42897</td> </tr> <tr> <td>A_s : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)</td> <td style="text-align: center;">439.32031</td> <td style="text-align: center;">439.32031</td> <td style="text-align: center;">439.32031</td> </tr> <tr> <td>C_s : 표준품 농도(mg/mL)</td> <td style="text-align: center;">0.1</td> <td style="text-align: center;">0.1</td> <td style="text-align: center;">0.1</td> </tr> <tr> <td>C_r : 검체 농도(mg/mL)</td> <td style="text-align: center;">10.093</td> <td style="text-align: center;">10.048</td> <td style="text-align: center;">10.114</td> </tr> <tr> <td>P : 표준품의 순도(%)</td> <td style="text-align: center;">98</td> <td style="text-align: center;">98</td> <td style="text-align: center;">98</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;"> $\text{로베티올린 함량 (mg)} = \frac{A_r}{A_s} \times \frac{C_s}{C_r} \times \frac{P}{100} \times 499$ </p>				항 목	sample 1	sample 2	sample 3	A _r : 검역의 주피크 면적(mAU*s)	22.96170	22.65072	22.42897	A _s : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)	439.32031	439.32031	439.32031	C _s : 표준품 농도(mg/mL)	0.1	0.1	0.1	C _r : 검체 농도(mg/mL)	10.093	10.048	10.114	P : 표준품의 순도(%)	98	98	98
항 목	sample 1	sample 2	sample 3																								
A _r : 검역의 주피크 면적(mAU*s)	22.96170	22.65072	22.42897																								
A _s : 표준액의 주피크 면적(mAU*s)	439.32031	439.32031	439.32031																								
C _s : 표준품 농도(mg/mL)	0.1	0.1	0.1																								
C _r : 검체 농도(mg/mL)	10.093	10.048	10.114																								
P : 표준품의 순도(%)	98	98	98																								

$$\text{Sample 1} = \frac{22.98170}{439.32031} \times \frac{0.1}{10.093} \times \frac{98}{100} \times 499 = 0.253 \text{ mg}$$

$$\text{Sample 2} = \frac{22.65072}{439.32031} \times \frac{0.1}{10.048} \times \frac{98}{100} \times 499 = 0.251 \text{ mg}$$

$$\text{Sample 3} = \frac{22.42897}{439.32031} \times \frac{0.1}{10.119} \times \frac{98}{100} \times 499 = 0.247 \text{ mg}$$

• 로베티올린 함량 3회 시험 평균 : 0.250 mg

14.Sep 2015

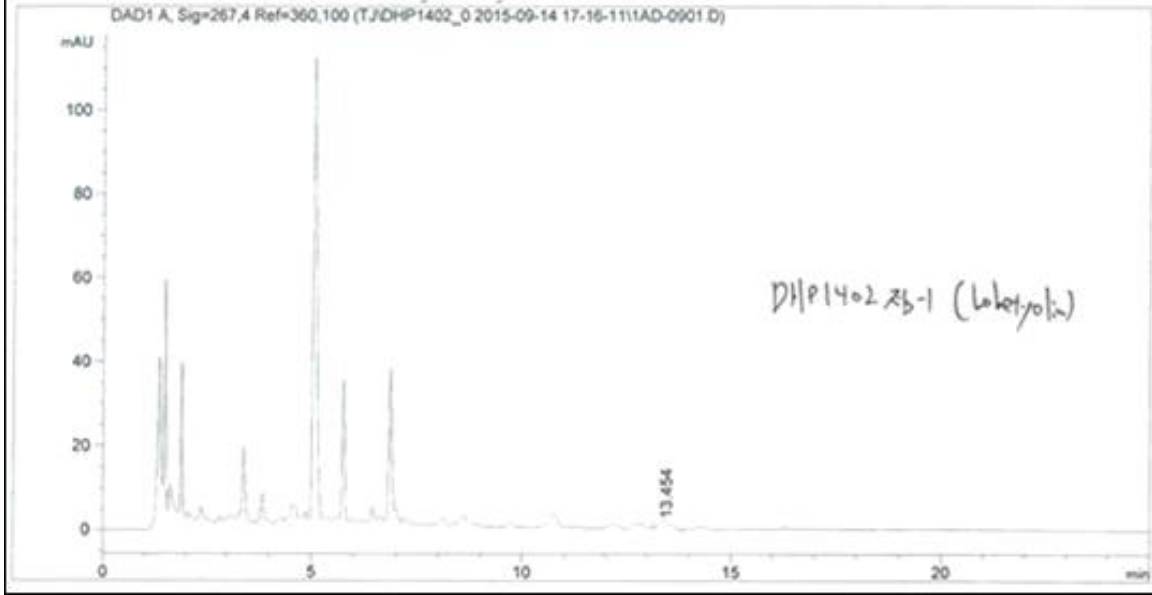
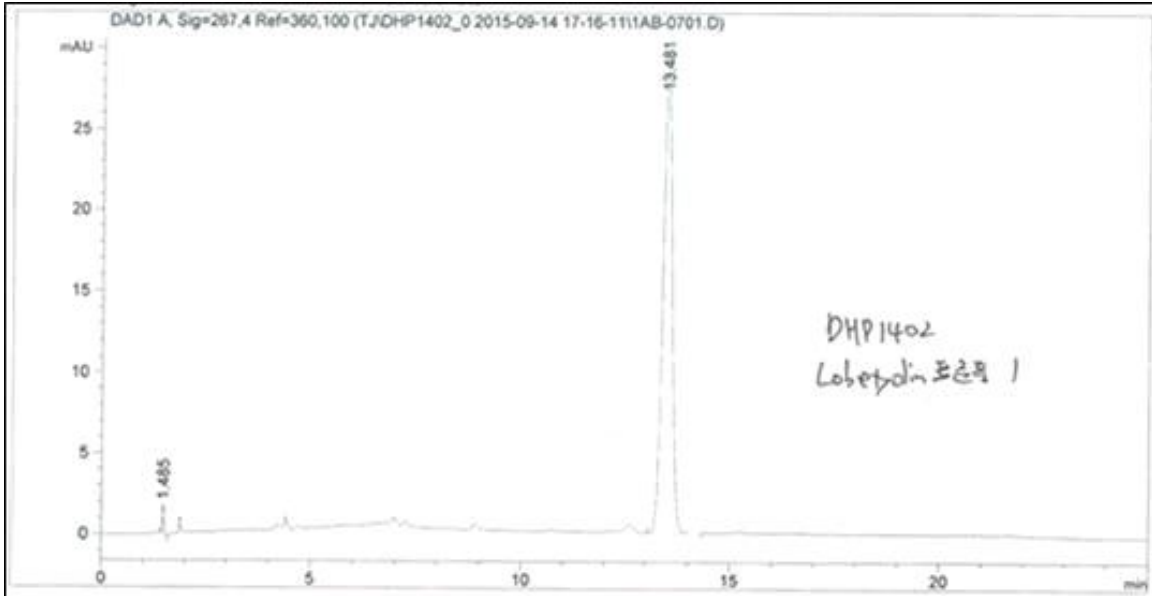
11:33

U

1.00 ng

치레온

Lobetyol



제8절 산조인 추출물의 기억력 개선 관련 기능성 평가

1. 산조인 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vitro* 연구

가. 산조인 추출물의 신경세포 보호효과 확인

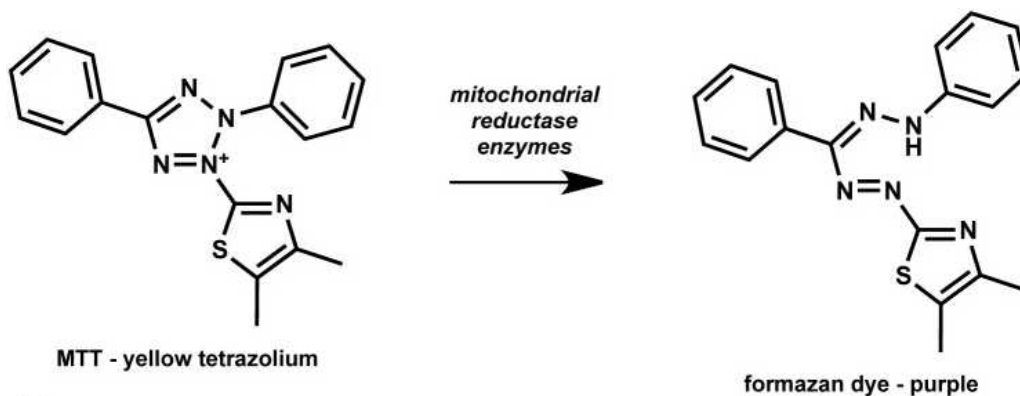
(1) MTT assay

(가) 실험 목적

응집된 베타 아밀로이드로 유발되는 신경세포 독성으로 인한 신경세포사멸은 알츠하이머성 치매의 발병에 있어서 중요한 요인으로 알려져 있는데, ⁷⁾(Lee YS., et al, 2012) 문헌을 토대로 설계한 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 분석법을 이용하여 산조인 추출물의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성의 보호효능을 평가하고자 함

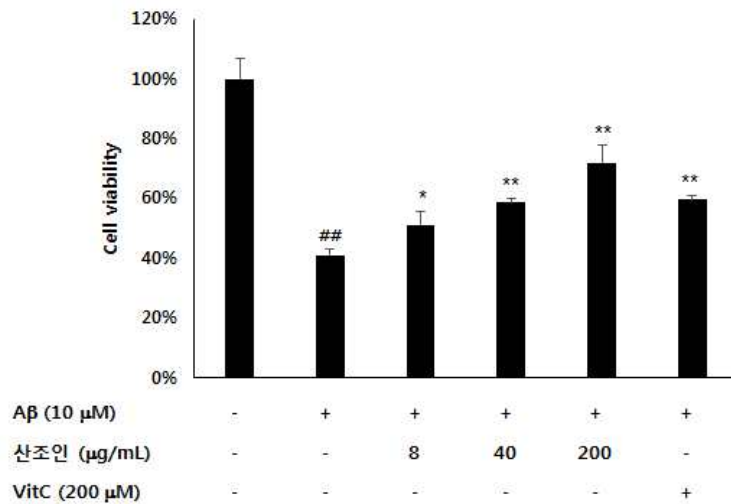
(나) 실험 방법

- ① 양성대조물질인 Vitamin C와, 산조인 추출물을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid $\beta(1-42)$ 는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 인산완충용액(Phosphate Buffer Solution, PBS)로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μ M이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μ L를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 Amyloid $\beta(1-42)$ 를 20 μ L씩 처리하여 24시간 배양한 후 MTT 5 mg/mL in PBS를 각 20 μ L씩 각 well에 처리하여 상층액을 제거하고 100% DMSO를 첨가하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포활성도를 측정함



<MTT assay의 개요>

(다) 실험 결과 및 고찰: PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 세포 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 낮아진 것을 확인하였으며(##, $p < 0.01$ vs. 대조군), 산조인 추출물을 8, 40 그리고 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) 세포활성도를 증가시켰으므로 산조인 추출물이 아밀로이드 베타 처리로 유도한 독성에 대해 신경세포 보호효능이 있는 것을 확인함



<MTT assay를 이용한 산조인 추출물의 신경세포 보호 효과>

(2) LDH assay

(가) 실험 목적

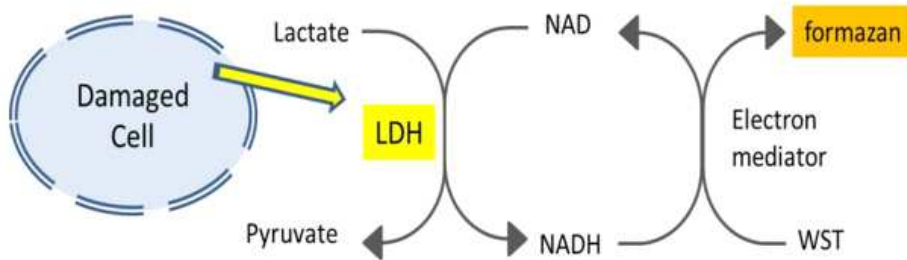
LDH(Lactate dehydrogenase)는 세포질에서 안정한 효소이지만 세포막의 손상으로 인해서 급격히 방출되는 효소이기 때문에 LDH의 급격한 방출은 신경세포의 세포막 손상과 관련이 있음. 세포막 손상이 일어나게 되면 세포사멸이 일어나며 신경세포의 세포사멸은 알츠하이머 치매를 유발하는 중요한 요인으로 알려져 있는데, ⁸⁾(Li J., et al, 2014) 문헌을 토대로 설계한 LDH분석법을 이용하여 산조인 추출물의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성의 보호효능을 평가하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 양성대조물질인 Vitamin C와, 산조인 추출물을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid $\beta(1-42)$ 는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μM 이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μL 를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한

Amyloid $\beta(1-42)$ 를 20 μL 씩 처리하여 24시간 배양한 후 96 well plate에 키트에 포함되어 있는 용해 완충액을 10 μL 첨가하여 가볍게 교반한 뒤 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45분간 세포를 용해함

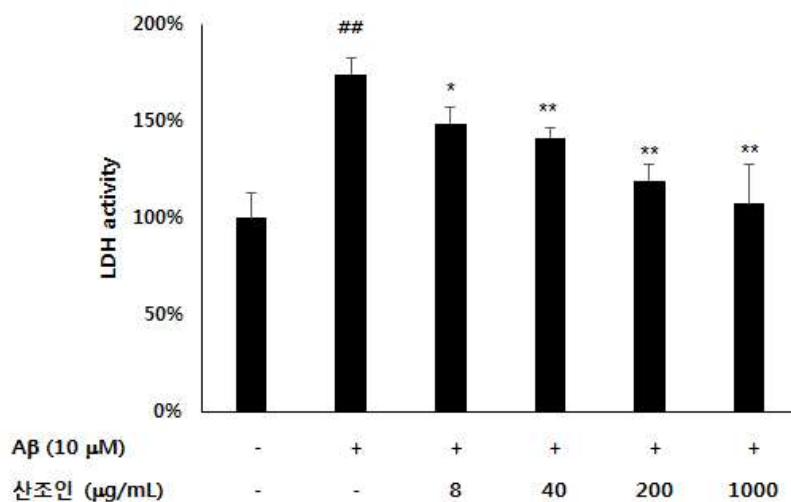
- ④ 상층액을 96 well plate로 옮겨 반응 혼합물을 첨가한 후 차광하여 30분간 배양한 것을 각각 490 nm와 680 nm의 흡광도를 측정하여 결과값을 계산함. LDH 활성도가 낮을수록 세포 독성이 적음을 나타냄



<LDH assay의 개요>

(다) 실험 결과 및 고찰

PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 LDH 활성도가 대조군에서 유의적으로 높아진 것을 확인하였으며(##, $p < 0.01$ vs. 대조군), 산조인 추출물을 8, 40, 200 그리고 1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) LDH 활성도를 감소시켰으므로 산조인 추출물의 아밀로이드 베타로 유도한 세포독성을 낮추는 효능을 확인함



<LDH assay를 이용한 산조인 추출물의 신경세포 보호 효과>

나. 산조인 추출물의 베타 아밀로이드 단백질 응집 억제 효능 평가

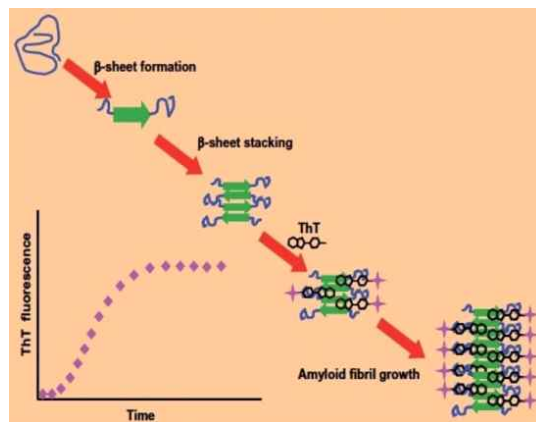
(1) ThT assay

(가) 실험 목적

티오플라빈 티(thioflavin T, ThT) 분석법을, ⁷⁾(Lee YS., et al) 이용하여 산조인 추출물이 베타아밀로이드 단백질 응집 억제능에 미치는 영향을 평가함

(나) 실험 방법

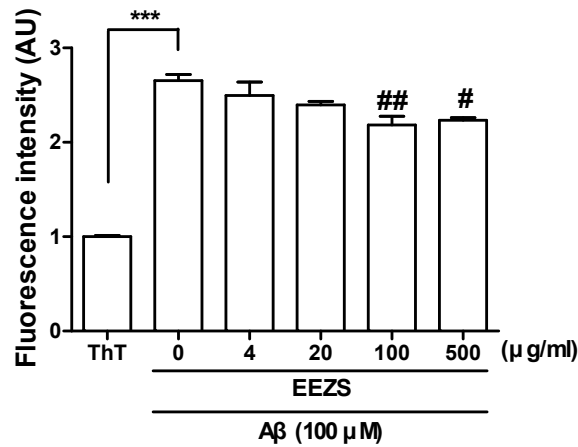
- ① 시험물질인 산조인 추출물을 4, 20, 100 또는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제작하고, A β oligomer는 A β fragment 1-42(Sigma) 1 mg를 HFIP(hexafluoroisopropanol) 1 mL로 녹여 차광 후 3일간 실온에서 보관함
- ② 그 후, A β oligomer 50 μg 을 DMSO 4.43 μL (최종농도1%)로 녹여 125 μM 가 되도록 하여 ThT는 5 mM의 농도가 되도록 조정함
- ③ A β 와 산조인은 ThT를 1:7.5(20 μL : 150 μL)로 섞어 black plate에 넣고 1 시간 동안 반응 후 형광 흡광도를 측정함(excitation: 470 nm, emission: 520 nm)



<ThT assay의 개요>

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과, 음성 대조군에 비하여 베타 아밀로이드 단백질 처리군에서 유의적으로 증가한(***, $p < 0.001$ vs. 대조군) 단백질의 응집도가 산조인 추출물의 처리에 의해 용량 의존적으로 베타 아밀로이드 단백질의 응집이 억제되었고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용량 이상에서 통계적 유의성이 있었음(#, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, ##, $p < 0.01$ vs. 음성대조군). 치매 환자에 있어 베타 아밀로이드 단백질의 응집은 산화적 손상을 일으켜 신경세포가 사멸하는 주요한 원인 중의 하나이며 이는 기억력을 감퇴 할 수 있음. 베타 아밀로이드 단백질 투여로 인해 제작된 치매 모델 마우스에서 산조인의 기억력 개선 효과의 일부는 베타 아밀로이드 단백질의 응집 억제에 의한 것으로 판단됨



<산조인 추출물의 아밀로이드 베타 응집 억제 능력>

2. 산조인 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vivo* 연구

가. 산조인 원료 추출조건에 따른 scopolamine 투여로 유도한 기억력 감퇴 개선 평가

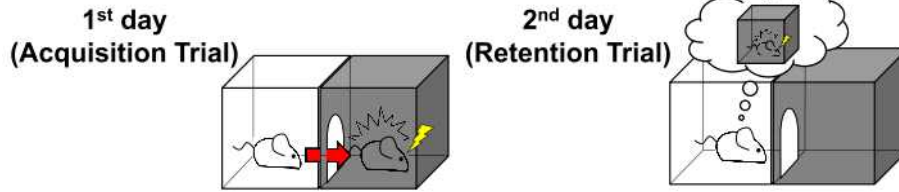
(1) 수동회피 실험

(가) 실험 목적

스코폴라민 유도 건망증 모델 마우스에서 산조인의 추출 용매조건, 추출 방법, 그리고 건조 방법에 따른 각각의 추출물에 대한 기억력 개선 효능,⁹⁾(Lee HE., et al, 2013)을 수동회피 실험을 통해 비교함으로써 가장 효과적인 추출 조건을 확립하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 훈련 1시간 전 각 추출조건별(침지, 탈지 후 침지, 환류, 분무 및 동결건조) 산조인 원료 추출물을 100 mg/kg 농도로 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하였고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함. 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타냄

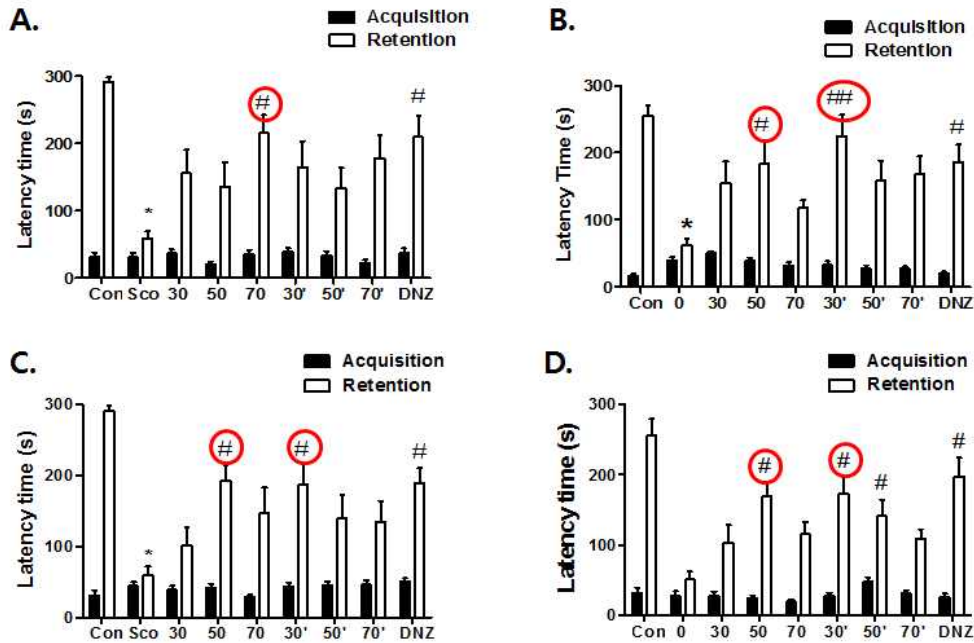


<수동회피 실험의 개요>

(다) 실험 결과 및 고찰

① 침지 추출 및 탈지 후 침지 추출

6가지의 다른 조건으로 추출한 산조인 추출물 100 mg/kg 용량에서의 효과를 비교하였을 때 총 4회의 시험(A-D) 중 3회에서 산조인의 50% EtOH 추출물과 탈지한 산조인의 30% EtOH 추출물에서 동일하게 유의적인 기억력 개선 효과(#, $p < 0.05$ vs. 대조군, ##, $p < 0.01$ vs. 대조군)가 관찰되었음



Con : 대조군	DNZ : 도네페질 투여군(양성 대조군)
Sco : 스코폴라민 투여군(음성 대조군)	30' : 탈지한 산조인의 30% EtOH 추출물
30 : 산조인의 30% EtOH 추출물	50' : 탈지한 산조인의 50% EtOH 추출물
50 : 산조인의 50% EtOH 추출물	70' : 탈지한 산조인의 70% EtOH 추출물
70 : 산조인의 70% EtOH 추출물	

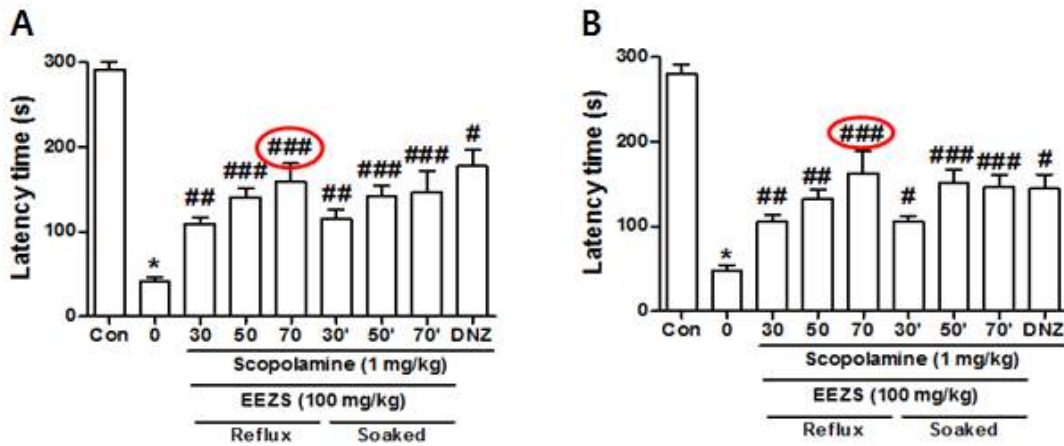
A,B,C,D: 본 실험의 1,2,3,4 회차 실험

<추출 조건에 따른 산조인 추출물의 기억력 개선 효과 비교>

② 침지 추출 및 환류 추출

스코폴라민 유도 인지능 감퇴 모델 마우스에서 환류 추출법과 침지 추출법으로 추출한 산조인 추출물의 기억력 개선 효과를 비교하였음. 총 2회 반복된 실험 A

실험 B를 종합한 결과, 두 가지의 추출 방법 모두에서 유의적인 기억력 개선 효과(#, $p < 0.05$ vs. 대조군, ##, $p < 0.01$ vs. 대조군, ###, $p < 0.001$ vs. 대조군,)를 확인할 수 있었으며, 환류 추출물의 경우 용매인 EtOH의 비율에 따라 의존적으로 기억력 개선 효과가 증가하는 경향을 확인하였음. 반면, 침지 추출물의 경우 2회의 실험 결과가 일치하지는 않았으며, 환류추출물과 비교하여 동등하거나 유사한 인지능 개선효능을 관찰할 수 있었음



Con. Control	30'. 침지 30% 투여군
0. Scopolamin 유도 치매모델	50'. 침지 50% 투여군
30. 환류 30% 투여군	70'. 침지 70% 투여군
50. 환류 50% 투여군	DNZ. 도네페질 투여군
70. 환류 70% 투여군	

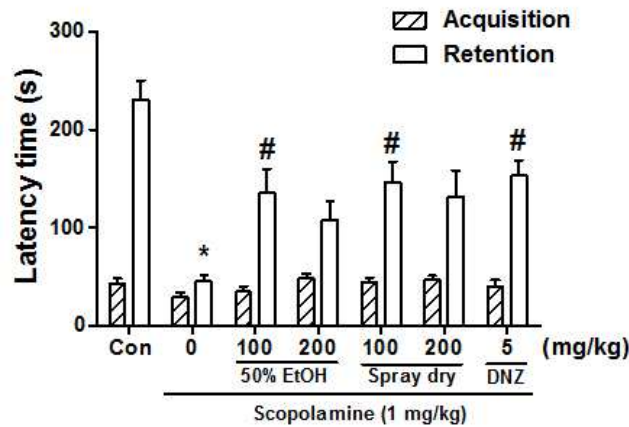
A,B: 본 실험의 1,2 회차 실험

<추출 방법에 따른 산조인 추출물의 기억력 개선 효과 비교>

효능 확인실험에서 추출법의 차이가 인지능 개선 효능에 미치는 영향이 거의 없음을 관찰함. 또한 인지능 개선 효능 확인실험에서 50% EtOH과 70% EtOH 추출물이 양성대조군인 도네페질과 유사한 인지능 개선 효능을 나타냄을 확인하였기 때문에 제조공정 시 따르는 경제적인 측면을 고려하였을 때 최적 추출공정으로서 50% EtOH 환류 추출조건이 적합하다고 사료되어 이후의 실험에서 50% EtOH 환류조건으로 추출된 것으로 실험을 수행하였음

③ 분무건조 및 동결건조

스코폴라민 유도 건망증 모델 마우스에서 건조방법에 따른 산조인 추출물의 기억력 개선능을 비교하였음. 산조인 추출물의 건조는 동결건조와 분무건조 두 가지 공정으로 진행되었으며, 두 공정 모두 양성대조군인 도네페질과 유사한 기억력 개선 효능을 확인할 수 있었으며, 두 공정 간의 기억력 개선 효능의 차이는 크지 않았으나 공정 시 원료생산 공정비용 등 경제적인 측면을 고려하여 분무건조의 공정을 선정함



<동결건조와 분무건조(spray dry) 공정에 따른 산조인 추출물의 기억력 개선 효과 비교>

나. 산조인 추출물의 아밀로이드 베타 투여로 유도한 기억력 감퇴 개선 효과 확인

(1) 동물행동실험

(가) 실험 목적

치매의 직접적인 원인으로 알려져 있는 베타 아밀로이드 단백질 1-42 fragment를 ICR 마우스 뇌실에 투여하여 치매 모델 마우스를 제작하고, ⁹⁾(Lee HE., et al, 2013) 동물행동실험인 수동 회피실험, Y-자 미로 실험을 통하여 산조인 추출물의 기억력 개선 효능을 확인함

(나) 수동회피실험 방법

- ① 베타 아밀로이드 단백질을 투여한 치매 마우스 모델에서 2주간 산조인 추출물 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(다) Y자 미로 실험 방법

- ① 베타 아밀로이드 단백질 1-42 fragment를 oligomer 형태로 만들어 50 μ M의 농도로 실험동물의 뇌실에 투여하여 기억력 감퇴 동물모델을 제작하였음
- ② 2주간 산조인 추출물 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 마우스에 경구투여 하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함

- ③ Y자 미로시험에 이용되는 기구는 3개의 가지로 구성되어 있으며, 각 가지(arm)의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 팔이 접하는 각도는 120°임. 모든 실험 장치는 검정색의 폴리비닐 플라스틱(polyvinyl plastic)으로 장치함
- ④ Y자 미로의 가지를 임의로 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록함. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록함. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산하여 결과를 도출함

$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최대변경(maximum alternation)}} \times 100$$

(최대변경 : 총 출입횟수 - 2)

- ⑤ 변경 행동력(Spontaneous alternation)이 증가한다는 것은 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 의미하는 반면, 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 총 출입수(total entry)에 변화가 없는 것은 변경 행동력(spontaneous alternation)이 마우스의 활동성에 영향이 없음을 나타냄

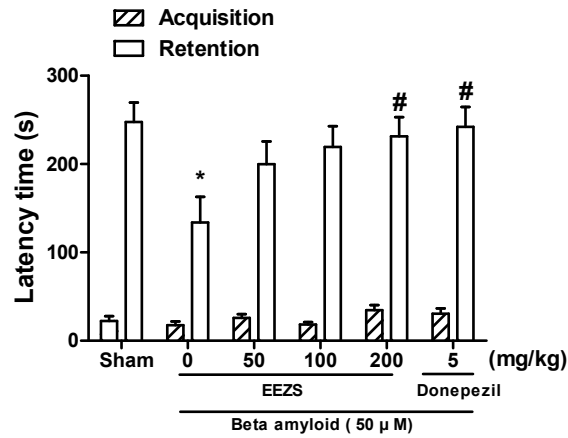


<Y자 미로>

(라) 실험 결과 및 고찰

① 수동회피실험 결과

수동회피 실험 결과, 2주 간의 산조인 추출물의 투여에 의해 용량 의존적으로 베타 아밀로이드 단백질의 투여에 의해 실험동물이 전기 충격을 받았던 어두운 방에 들어가기까지 걸리는 시간(latency time)이 정상동물군에 비하여 유의적으로 감소하였으며(*, $p < 0.05$ vs. 대조군), 2주간의 산조인 추출물의 투여에 의해 용량 의존적으로 밝은 방에서의 머무름 시간이 회복되었음. 산조인 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 양성 대조군인 도네페질 수준까지 유의적인 회복 효능이 있음을 확인함(#, $p < 0.05$ vs. 음성대조군)

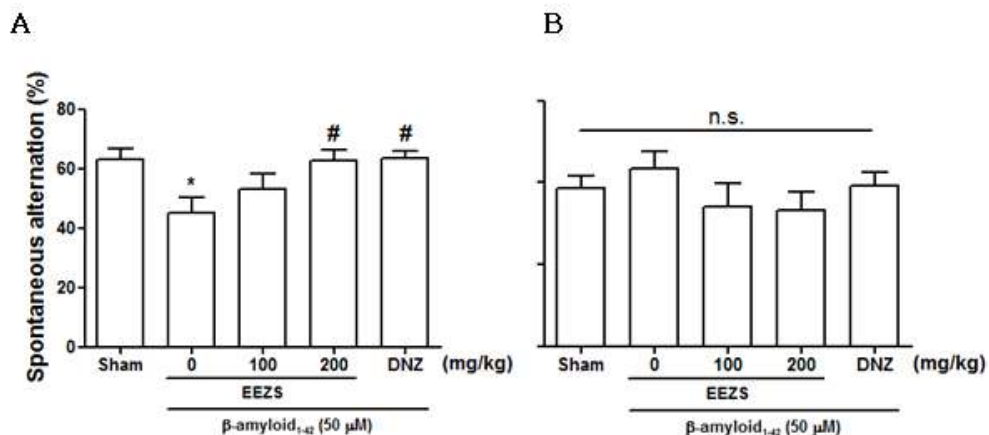


<수동회피실험에서 베타 아밀로이드 단백질 유도 치매 마우스 모델에서 산조인 추출물의 투여로 인한 기억력 회복>

② Y-자 미로 실험 결과

베타 아밀로이드 단백질의 투여에 의해 변경 행동력이 정상동물군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 2주간의 산조인 추출물의 투여에 의해 용량 의존적으로 변경행동력이 회복되었으며, 산조인 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 양성 대조군 수준의 유의적인 회복을 확인하였음(#, $p < 0.05$ vs. 음성대조군)

반면, 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 총 출입 수에는 유의적인 변화가 없는 것으로 나타나(n.s.:no significant, $p > 0.05$ vs. 대조군), 산조인 추출물에 의하여 개선된 변경 행동력이 마우스의 활동성에 영향이 없음을 알 수 있었음
동물행동실험의 결과로 산조인 추출물의 2주 투여를 통하여 베타 아밀로이드 단백질 투여로 유도한 치매 모델에서 기억력 개선 효능을 나타냄을 확인할 수 있었음



A: Y자 미로실험에서 변경행동력 평가, B: 출입한 총 가지 횟수

<Y자 미로 실험에서 베타 아밀로이드 단백질 유도 치매 마우스 모델에서 산조인 추출물의 투여로 인한 기억력 회복>

다. 산조인 추출물의 기억력 개선 효능의 기전 연구

(1) Western blot

(가) 실험 목적

산조인 추출물이 기억력 개선 효능이 나타나는 기전을 알아보기 위해 *in vivo* 해마 조직에서 세포 신호 변화를 탐구하기 위해 ^{11),12)}(Tao X et al., 1998, Zheng F et al., 2012) 문헌에 의하여 기억력과 관련이 있다고 알려져 있는 인자인 brain-derived neurotropic factor(BDNF), extracellular signal-regulated kinase(ERK) 와 cAMP response element-binding protein(CREB)의 활성 정도를 ⁹⁾(Lee HE., et al, 2013) Western blot 분석법을 이용하여 단백질 수준에서 확인함

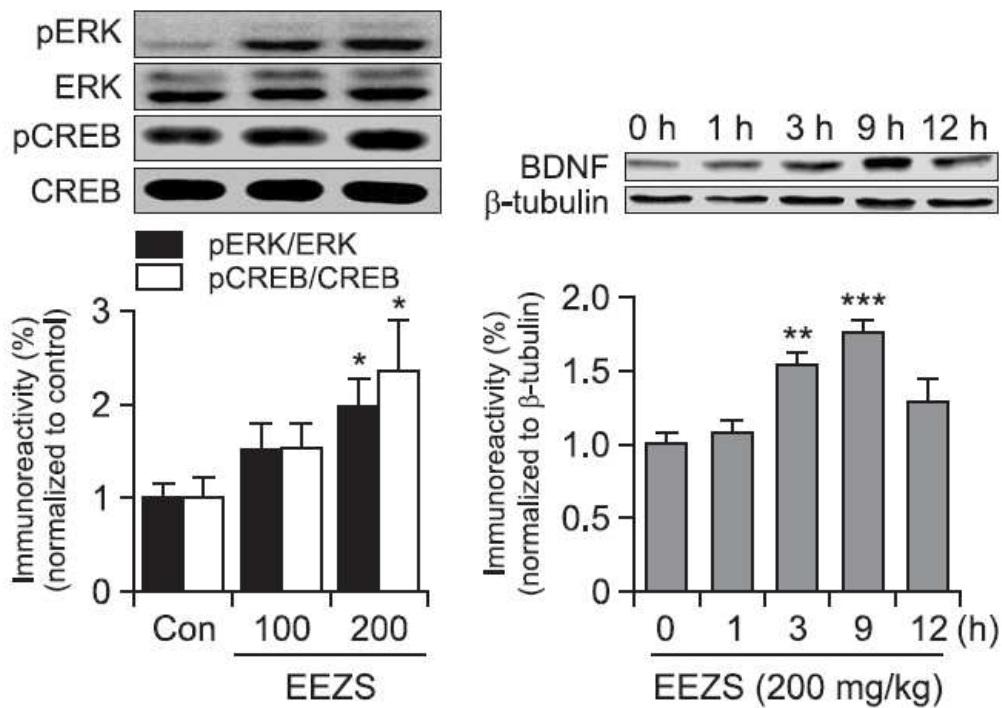
(나) 실험 방법

- ① 산조인 추출물의 투여 1시간 후 pERK 또는 pCREB, 또는 투여 후 0, 1, 3, 9, 12 시간 후 BDNF(brain-derived neurotropic factor)에 마우스를 희생시켜 대뇌를 적출한 뒤 해마를 분리하여 western blot sample을 얻음
- ② 이를 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 50 mM NaF 과 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris - HCl buffer(20 mM, pH 7.4)에 넣고 균질화함. 균질액은 10분간 얼음 속에 방치 후 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 같은 조건으로 한번 더 원심분리를 수행함
- ③ 단백질 정량을 수행하여 단백질(15µg)을 SDS-polyacrylamide gel(8%)에 reducing condition에서 전기 영동함
- ④ 단백질을 PVDF membrane에 transfer buffer [192mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시킴. Blocking solution(5% skim milk)으로 3시간 동안 상온에서 blocking을 실시하고 이후 1:5000으로 희석한 pERK 및 ERK 또는 1:3000으로 희석한 pCREB 및 CREB 또는 1:1000으로 희석한 BDNF 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation함
- ⑤ Tris-buffered saline/ Tween 20로 10회 세척 후 1:5000으로 희석한 peroxidase-conjugated 2차 항체로 membrane을 상온에서 2시간 동안 incubation함. 이후 chemiluminescence(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)으로 발광시켜 LAS-4000 mini(Fujifilm Lifescience USA, Stamford, CT) 을 이용하여 결과를 분석하였음

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 산조인 추출물의 투여는 대조군에 비하여 유의적으로 ERK와 CREB의 인산화(phosphorylation)를 증가시켰음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 또한, 기억력 형성과 유지에 중요한 역할을 한다고 알려진 BDNF 또한 산조인의 투여 후 3시간, 9시간 뒤 유의적으로 증가하는 것을(**, $p < 0.01$ vs. 대조군, ***, $p < 0.001$ vs. 대조군) 확인하였음. 산조인 추출물의 기억력 저해 개선 효능이 sub-effective

용량의 NMDA 수용체 길항제인 MK-801로 투여로 의하여 사라진다는 선행 연구 결과와 종합하여, 산조인의 기억력 보호 및 개선 효능의 기전은 NMDA 수용체를 경유하여 ERK-CREB-BDNF 신호를 활성화하여 작용하는 것이라고 추정할 수 있음. ^{13),14)}(Muller D et al., 2002, Ying SW et al., 1988) 문헌에 의하면 NMDA 수용체 및 ERK-CREB-BDNF 신호는 해마의 시냅스에서 기억력의 장기기억강화(Long-term potentiation, LTP) 와 깊은 관련성이 있으며, 본 실험 결과를 통해 산조인의 기억력 개선효능이 장기기억강화에 영향을 주어 효능이 나타나는 것 일 수 있음을 확인함



<산조인 추출물의 ERK, CREB의 인산화 및 BDNF 단백질 발현량에 미치는 영향>

제9절 산조인 유효활성성분 규명 및 규명된 유효 활성성분의 기능성 평가

1. 산조인 활성성분의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 *in vivo, in vitro* 연구

가. 동물행동실험에서 산조인의 함유성분 중 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 개선 효능 평가를 이용한 유효활성 성분 규명

(1) 동물행동실험

(가) 실험 목적

스코폴라민을 투여한 치매 모델에서 산조인 유효성분인 스피노신과(spinosin) 스피노신의 체내 대사체중 하나인 스웨르티신(swertisin)과 산조인의 함유성분인 마그니플로린(magniflorin), 주주보사이드 A(Jujuboside A), 주주보사이드 B(Jujuboside B)가 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 개선 효과가 있는지의 여부를 수동 회피 시험을 이용하여 확인하고자 함

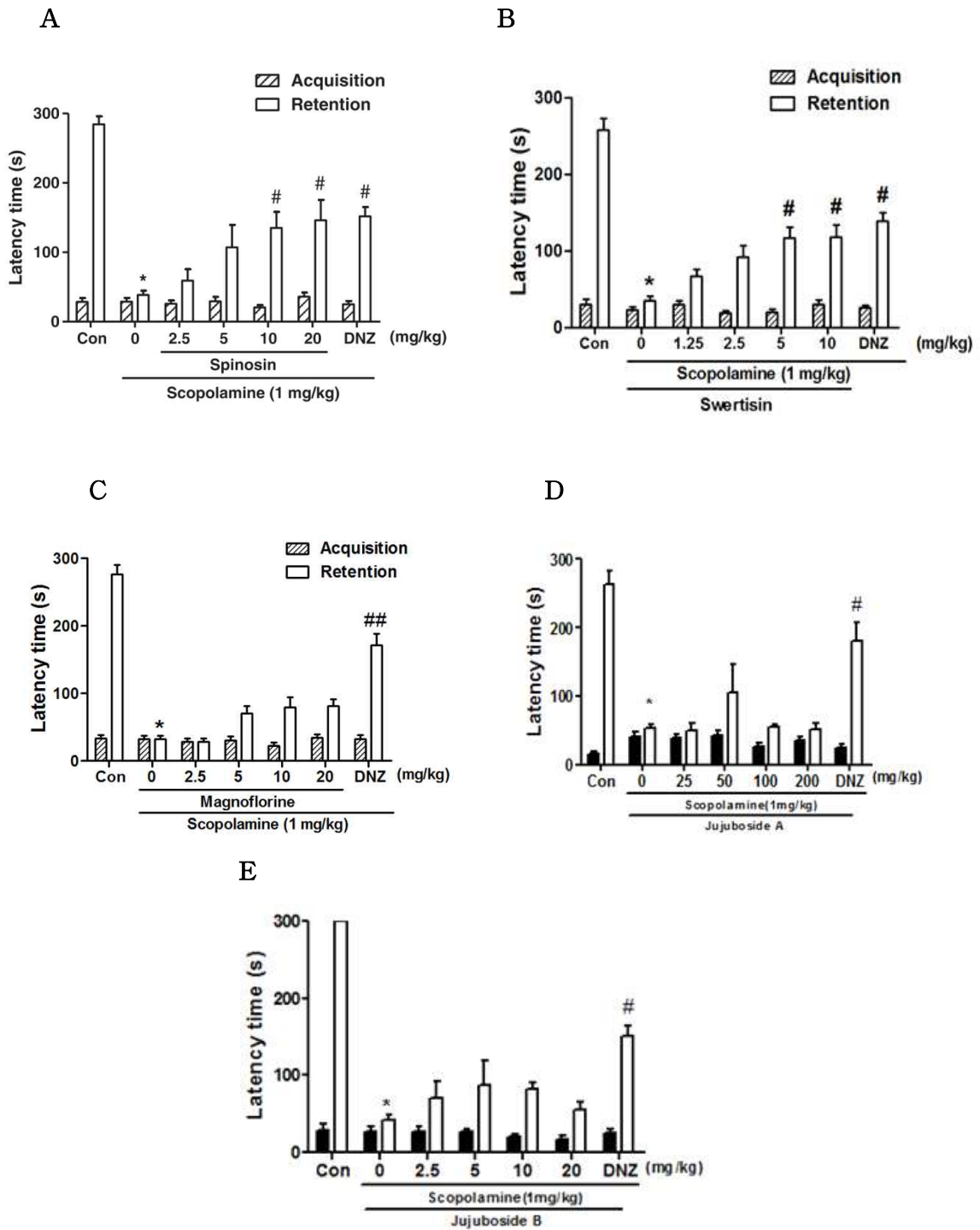
(나) 수동회피실험 방법

- ① 훈련 1시간 전 스피노신 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg, 스웨르티신 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/kg과 마그니플로린 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg을, 주주보사이드 A를 25, 50, 100 및 200 mg/kg를, 주주보사이드 B를 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과, 스키폴라민의 투여에 의해 밝은 공간에 머무르는 시간(latency time)이 정상동물군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 스피노신 및 스웨르티신 투여군에서는 음성 대조군과 비교하여 밝은 공간에 머무르는 시간을 유의하게 증가시켰으며(#, $p < 0.05$ vs. 대조군), 마그니플로린, 주주보사이드 A,B 투여군은 스키폴라민 투여군에 비해 통계적으로 유의적인 기억력 개선 효과가 나타나지 않았음. 따라서 Spinosin이 산조인의 기억력 개선효능을 나타내는 유효 활성성분이라고 사료되어 추가적인 행동실험을 통해 효능을

평가하였고 이에 대한 기전 탐색을 위한 연구를 수행하였음



A: Spinosin의 수동회피실험 결과, B: Swertisin의 수동회피실험 결과

C: Magniflorin의 수동회피실험 결과, D: Jujuboside A의 수동회피실험 결과

E: Jujuboside B의 수동회피실험 결과

<스코폴라민 유도한 기억력 감퇴 마우스에서 산조인 함유성분들의 기억력 개선 효능 평가>

나. 수동회피실험을 통해 규명된 산조인의 유효활성성분인 spinosin의 scopolamine 투여로 유도한 기억력 감퇴 개선 효과 확인

(1) 동물행동실험

(가) 실험 목적

스코폴라민을 투여한 건망증 마우스 모델을 만들고 산조인 원료의 기능성분인 spinosin이 기억력 보호 효과가 있는지의 여부를 Y자 미로 시험 및 ⁹⁾(Lee HE., et al, 2013) 모리스 수중미로 실험을 이용하여 평가하고자 함

(나) Y자 미로 실험 방법

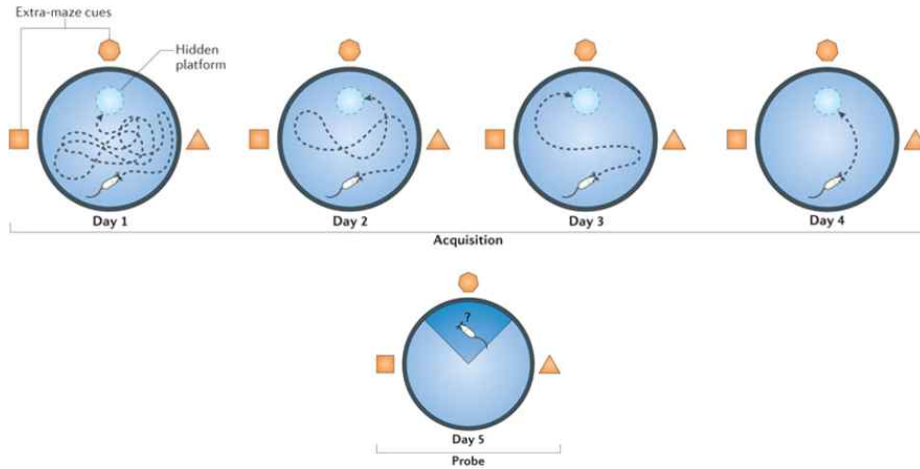
- ① 스코폴라민 투여한 치매 마우스 모델에서 시험 1시간 전 spinosin 10 mg/kg 및 20 mg/kg을 마우스에 경구투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② Y자 미로의 가지를 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록함
- ③ 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록함. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산함

$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최대변경(maximum alternation)}} \times 100$

(최대변경 : 총 출입횟수 - 2)

(다) 모리스 수중미로 실험 방법

- ① 총 4일간 실시된 훈련 기간 동안 훈련 1시간 전 spinosin 10 mg/kg 및 20 mg/kg을 마우스에 경구투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 지름 90 cm, 높이 45 cm인 원형 풀에 각각 별, 네모, 세모, 원의 네 가지 표지를 같은 간격으로 붙이고 이 중 별 아래에 29 cm 높이의 플랫폼(platform)을 위치 시킴. 플랫폼 보다 0.5 cm 윗부분까지 물을 채우고(수온 21 ± 1 °C), 색소를 이용하여 물을 흐리게 하여 수면에서 플랫폼이 보이지 않게 함
- ③ 마우스를 풀의 한 구획에 조심스럽게 내려놓은 다음 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ④ 30초 후 다시 같은 위치에 마우스를 내려놓고 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ⑤ 위의 과정을 4번 반복하고, 총 4일 동안 표지를 확인할 수 있는 위치를 바꿔가며 실시함
- ⑥ 4일의 훈련이 끝난 후 플랫폼을 제거하고 마우스가 1분간의 유영시간 중 목표사분면에 머무르는 시간을 측정함

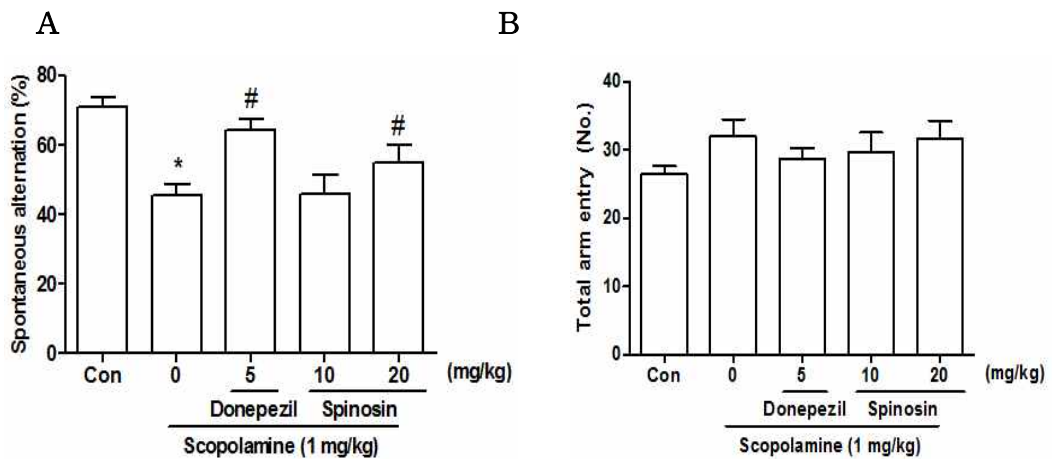


<모리스 수중미로 실험>

(라) 실험 결과 및 고찰

① Y-자 미로 실험 결과

Y자 미로 실험 결과, 스코폴라민의 투여에 의해 변경 행동력이 정상동물군에 비해 통계적으로 유의적으로 감소하였음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). Spinosin의 20 mg/kg 농도의 투여에 의해 실험동물의 변경 행동력이 유의적으로 회복하였고(#, $p < 0.05$ vs. 대조군), 이는 양성대조군의 도네페질과 유사한 수준임. 반면, 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 총 가지 출입 수에는 유의적인 변화가 없는 것으로 나타나(n.s.:no significant, $p > 0.05$ vs. 대조군) spinosin의 투여로 개선된 변경 행동력이 마우스의 활동성에 영향이 없음을 알 수 있었음



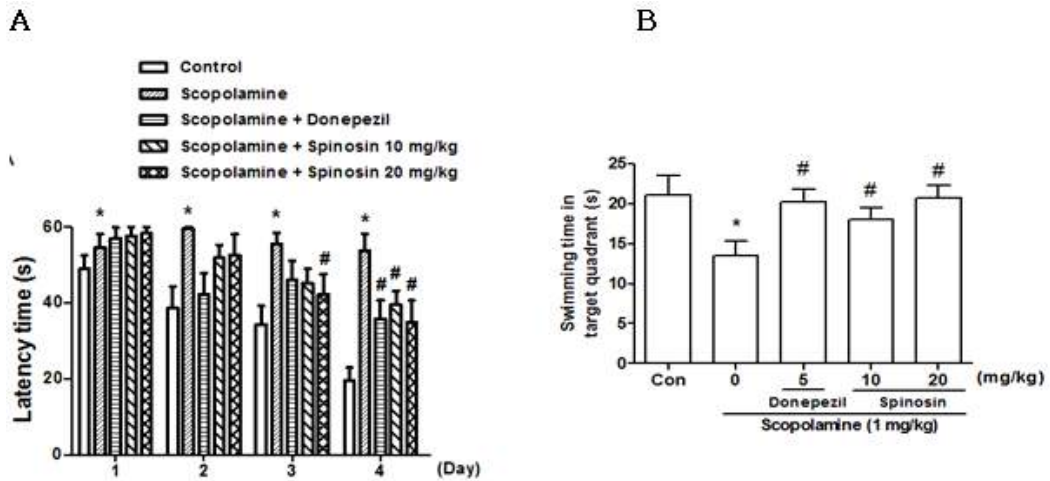
A: Y자 미로실험에서 변경행동력 평가 B: 출입한 총 가지 출입 횟수

<Y자 미로 실험에서 스코폴라민 유도 건망증 마우스 모델에서 spinosin의 투여로 인한 기억력 회복>

② 모리스 수중미로 실험 결과

모리스 수중미로 실험 결과, 스코폴라민을 투여한 건망증 마우스 모델에서 스코

폴라민 투여군에 비해 spinosin 투여군에서 플랫폼을 찾는 시간이 양성 대조군인 도네페질 수준까지 감소함(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 훈련 5일차에 플랫폼을 제거하고 플랫폼이 있던 사분면에 실험동물이 머무르는 시간을 관찰하였을 때 spinosin 투여군은 스코폴라민 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 플랫폼이 있던 사분면에 머무는 시간이 증가함. 본 실험 결과로 산조인의 실험동물모델의 기억력 감퇴를 회복하는 유효활성성분은 spinosin이며 동물행동실험들을 통해 spinosin의 기억력 개선 효능을 평가하였음



A: 훈련기간 동안 숨겨진 플랫폼에 도달하기까지 걸린 시간, B: Probe 실험에서 플랫폼이 있었던 사분면에 머무르는 시간
 <모리스 수중미로 실험에서 스코폴라민 유도 건망증 마우스 모델에서 spinosin의 투여로 인한 기억력 회복>

다. 산조인 유효활성성분 spinosin의 아밀로이드 베타 응집 억제효능

(1) ThT assay

가) 실험 목적

ThT 분석법을 이용하여 스피노신의 베타 아밀로이드 단백질 응집 억제능을 평가하여 스피노신이 베타 아밀로이드 단백질의 응집에 직접적으로 미치는 영향을 평가함

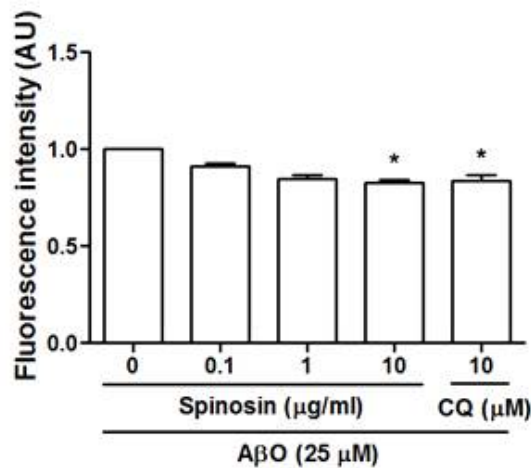
나) 실험 방법

- ① 시험물질인 스피노신은 최종 농도가 0.1, 1, 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되도록 제작하고 양성대조군인 CQ(Clioquinol)은 최종농도가 10 μM 이 되도록 제작, A β oligomer는 A β fragment 1-42(Sigma) 1mg를 HFIP 1mL로 녹여 차광 후 3일간 실온에서 보관함
- ② 그 후, A β oligomer를 DMSO(최종 농도: 1% DMSO)에 용해하여 최종 농도가 25 μM 가 되도록 하고 ThT는 최종농도가 5 mM의 농도가 되도록 조정함
- ③ A β 와 산조인은 ThT를 1:7.5(20 μL : 150 μL)로 섞어 black plate에 넣고 1 시간

동안 반응 후 형광 흡광도를 측정함(excitation: 470 nm, emission: 520 nm)

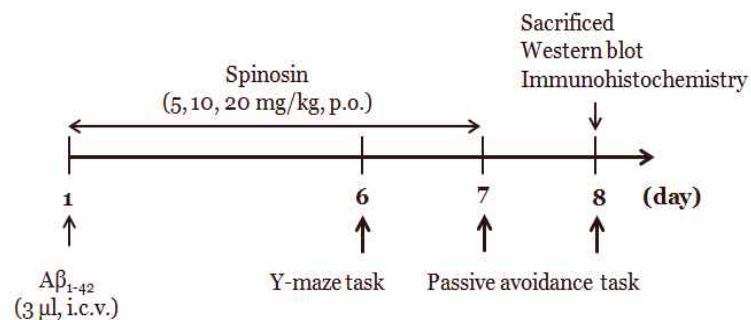
다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과, 스피노신의 처리에 의해 용량 의존적으로 베타 아밀로이드 단백질의 응집이 억제되었고, 10 µg/mL의 용량에서는 통계적 유의하게 감소되었음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군), 이는 베타 아밀로이드 응집 억제능이 있다고 발표된 대조군으로 사용된 10 µM 농도의 CQ과 동등한 수준이었음. 치매 환자에 있어 베타 아밀로이드 단백질의 응집은 산화적 손상을 일으켜 신경세포가 사멸하는 주요한 원인 중의 하나이며 이는 기억력을 감퇴 할 수 있음. 본 실험 결과를 통하여, 베타 아밀로이드 단백질 응집을 spinosin이 저해함으로써 신경세포 사멸을 보호하여 인지능 저하를 개선할 수 있다고 사료됨



<스피노신의 베타 아밀로이드 응집 억제 효능>

라. 산조인 유효활성성분 Spinosin의 베타 아밀로이드 투여로 유도한 치매 동물모델의 기억력 감퇴 개선 효과 및 확인



<베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 spinosin의 기억력 개선 효능 평가 실험 일정>

(1) 수동회피 실험 및 Y자미로 실험

(가) 실험 목적

베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 산조인의 유효성분인 스피노신이 기억력 보호 효과가 있는지의 여부를 행동실험을 통해 평가하고자 함.

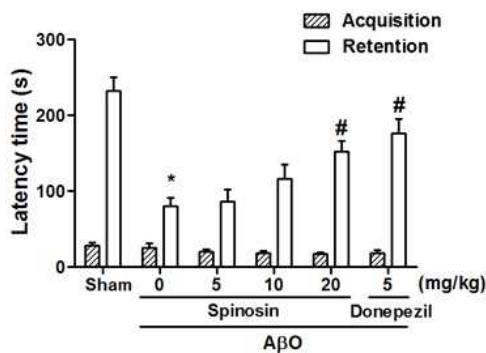
(나) 수동회피 실험 및 Y자 미로 실험 방법

- ① 아밀로이드 베타가 투여된 치매 마우스 모델에서 spinosin 5, 10 및 20 mg/kg을 마우스에 경구로 1주일간 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 상기에 표기된 실험 일정에 맞춰 수동회피 실험 및 Y-자 실험을 수행하고 결과를 도출함

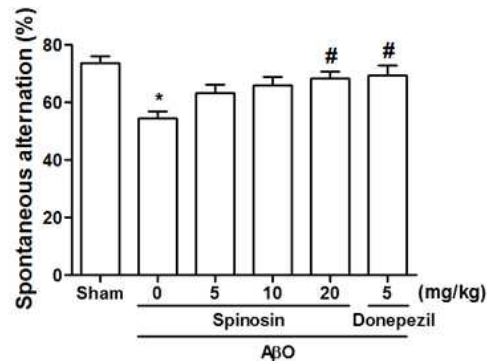
(다) 실험 결과 및 고찰

베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 산조인의 유효성분인 스피노신이 기억력 보호 효과가 있는지의 여부를 행동시험을 통해 평가하였음. 그 결과, 스피노신은 수동 회피 시험 및 Y자 미로 시험 모두에서 베타 아밀로이드 단백질로 유도한 유의적인 인지능 저하에(*, $p < 0.05$ vs. 대조군)에 대한 유의적인 개선 효능이(#, $p < 0.05$ vs. 대조군) 있는 것으로 확인되었음

A



B



A: 수동회피실험 결과, B: Y자 미로 실험 결과

<베타 아밀로이드 유도 치매 동물 모델에서 스피노신의 기억력 감퇴 개선 효과>

(2) Western blot 및 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)

(가) 실험 목적

산조인의 유효성분인 스피노신이 아밀로이드 베타로 투여로 유도한 염증반응성 신경세포 사멸로 인한 기억력 감퇴를 보호하는 효과가 있는지 Western blot 및 면역조직화학염색법을 통해 평가하고자 함

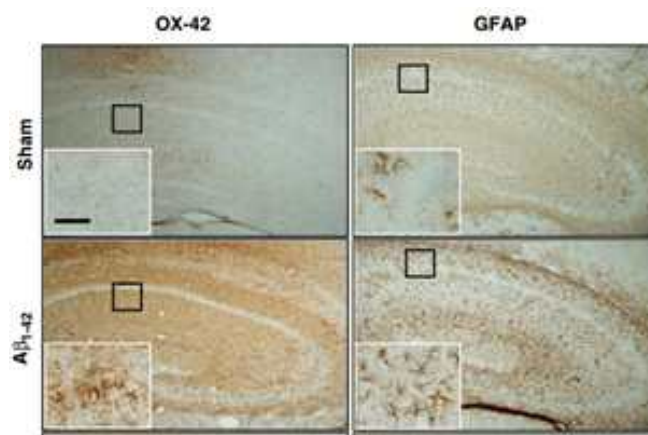
(나) Western blot 실험 방법

- ① 산조인 추출물의 투여 1시간 후 pERK 또는 pCREB, 또는 투여 후 0, 1, 3, 9, 12 시간 후 BDNF에 마우스를 희생시켜 대뇌를 적출한 뒤 해마를 분리하여 western blot sample을 얻음
- ② 이를 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 50 mM NaF 과 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris - HCl buffer(20 mM, pH 7.4)에 넣고 균질화함. 균질액은 10분간 얼음 속에 방치 후 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 같은 조건으로 한번 더 원심분리를 수행함

- ③ 단백질을 정량을 수행하여 단백질(15 µg)을 SDS-polyacrylamide gel(8%)에 reducing condition에서 전기 영동함
- ④ 단백질을 PVDF membrane에 transfer buffer [192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시킴. Blocking solution(5% skim milk)으로 3시간 동안 상온에서 blocking을 실시하고 이후 1:3000으로 희석한 pCREB 또는 CREB, 1:5000으로 희석한 pERK 및 ERK, 또는 1:1000으로 희석한 BDNF 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation함
- ⑤ Tris-buffered saline/ Tween 20로 10회 세척 후 1:5000으로 희석한 peroxidase-conjugated 2차 항체로 membrane을 상온에서 2시간 동안 incubation함. 이후 chemiluminescence(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)으로 발광시켜 LAS-4000 mini(Fujifilm Lifescience USA, Stamford, CT)을 이용하여 결과를 분석하였음

(다) 면역조직화학염색 실험 방법

- ① 실험 일정에 맞춰 실험 및 투여가 끝난 후 마우스를 희생하여 관류방법을 이용하여 대뇌를 적출함
- ② 적출된 대뇌를 4% paraformaldehyde에 하루 동안 보정함
- ③ 보정된 해마는 sucrose solution에 보관하였다가 OCT compound로 동결 및 고정 후 cryosection기를 이용하여 절편으로 만들어 면역화학염색 실험을 위한 sample을 얻음. 이 조직을 뇌에서의 면역염증반응과 관련된 세포를 염색할 수 있는 GFAP 및 OX-42와 아세틸콜린을 합성하는 효소인 ChAT(Cholineacetyltransferase) 등을 면역염색을 통해 확인하여 실험 결과를 도출함

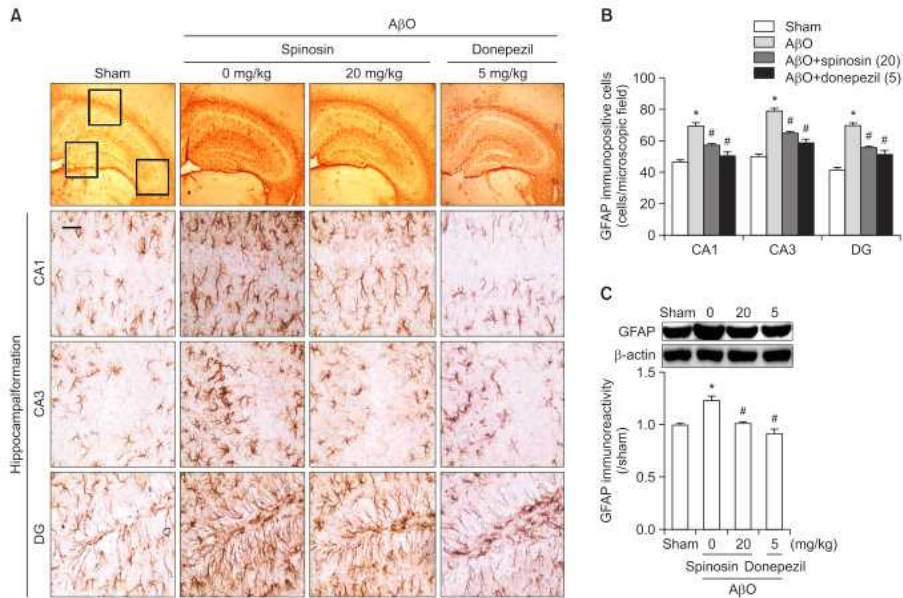


<베타 아밀로이드 단백질의 투여로 인해 증가한 정상교세포 및 미세교세포>

(라) 실험 결과 및 고찰

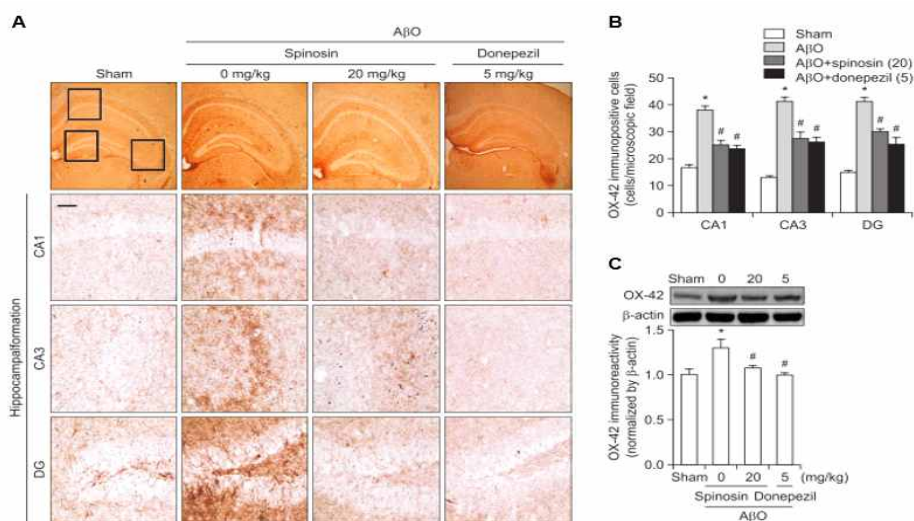
베타아밀로이드의 투여로 유도한 신경 세포 독성으로 유발되는 염증반응이 유의적으로 증가되었음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 스피노신 투여군에서 아밀로이드

베타 투여군에 비해 염증반응이 있을 시 활성화되는 성상교세포 및 미세교세포의 유의적인 감소를 통해(#, $p < 0.05$ vs. 대조군) 스피노신의 아밀로이드 베타 독성에 대한 신경세포 보호 효능을 확인함. 또한, 기억력에 밀접한 연관이 있는 아세틸콜린을 합성하는 효소인 ChAT의 아밀로이드 베타로 투여한 유의적인 감소를(*, $p < 0.05$ vs. 대조군) 통계적으로 유의하게 회복하였음(#, $p < 0.05$ vs. 대조군). 본 실험결과를 통해 산조인의 활성성분인 스피노신이 베타 아밀로이드로 유발된 염증반응성 신경세포 사멸로 인한 인지능 감퇴를 개선할 수 있다고 사료됨



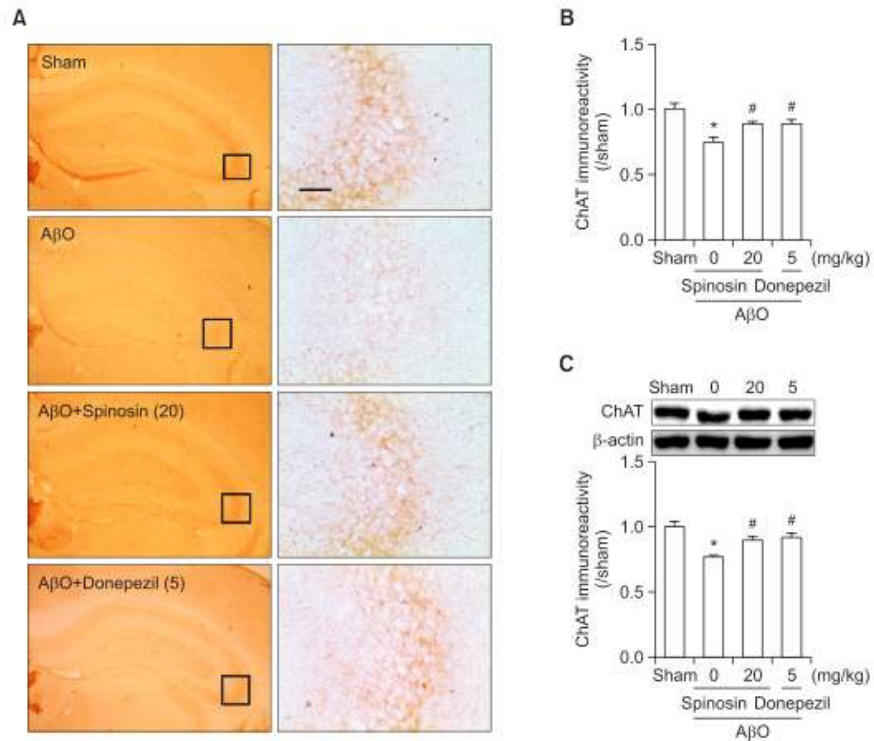
A: 면역조직화학염색법에서의 GFAP의 변화량 평가, B: Western blot에서 GFAP 단백질 변화량 평가

<베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 스피노신의 성상교세포 활성화 경감>



A: 면역조직화학염색법에서의 OX-42 변화량 평가, B: Western blot에서 OX-42 단백질 변화량 평가

<베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 스피노신의 미세교세포 활성화 경감>



A. 면역조직화학염색법을 이용한 ChAT의 발현량 평가, B: Western blot에서 ChAT 단백질 변화량 평가

<베타 아밀로이드 유도 치매 모델에서 스피노신의 아세틸콜린 합성 효소 회복>

마. 산조인 유효 활성성분 spinosin의 기억력 증강 효능

(1) 기억력 증강 평가 수동회피실험

(가) 실험 목적

산조인 유효 활성성분인 spinosin이 정상 동물에서 기억력 증강 효과가 있는지의 여부를 수동회피 시험을 이용하여 확인함

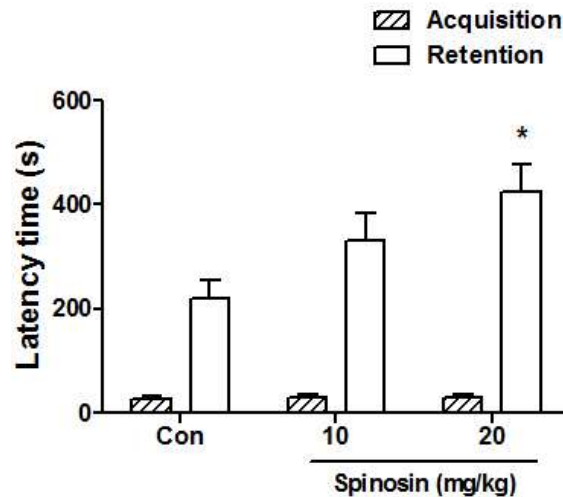
(나) 실험 방법

- ① 시험 1시간 전 spinosin 10 mg/kg 및 20 mg/kg 을 마우스에 경구 투여하였으며, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여하였음
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.25 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency

time : 머무름 시간)을 600초까지 측정함

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과, spinosin 투여군에서 음성 대조군과 비교하여 밝은 공간에 머무르는 시간을 증가시킴(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 본 실험 결과로 spinosin의 투여가 정상 동물에서 기억력 증강 효과가 있음을 확인함



<정상동물 마우스 모델에서 spinosin의 투여로 인한 기억력 증강 평가>

2. 산조인 유효 활성성분의 spinosin의 기억력 개선 기전 연구

가. 산조인 유효 활성성분 spinosin의 기억력 개선 기전 확인

(1) Western blot

(가) 실험 목적

산조인 유효 활성성분인 spinosin이 기억력 개선 효능이 나타나는 기전을 알아보기 위해 *in vivo* 해마 조직에서 세포 신호 변화를 탐구하기 위해 기억력과 관련이 있다고 알려져 있는 인자인 ERK(extracellular signal-regulated kinase)와 CREB(cAMP response element-binding protein)의 활성 정도를 Western blot 분석법을 이용하여 단백질 수준에서 확인함

(나) 실험 방법

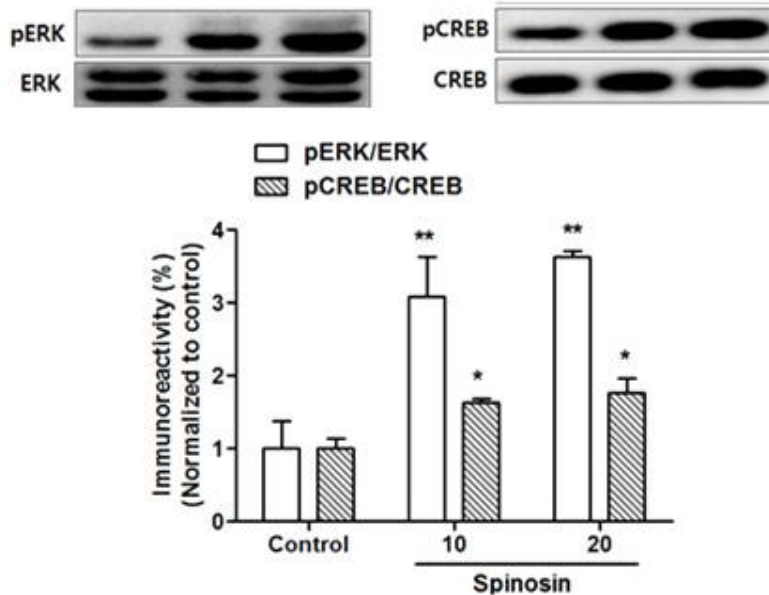
- ① 산조인 추출물의 투여 1시간 후 마우스를 희생시켜 대뇌를 적출한 뒤 해마를 분리하여 western blot sample을 얻음
- ② 이를 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 50 mM NaF 과 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris - HCl buffer(20 mM, pH 7.4)에 넣고 균질화함. 균질액은 10분간 얼음 속에 방치 후 4℃에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 같은 조건으로 한 번 더 원심분리를 수행함
- ③ 단백질 정량을 수행하여 단백질(15 μ g)을 SDS-polyacrylamide gel(8%)에

reducing condition에서 전기 영동함.

- ④ 단백질을 PVDF membrane에 transfer buffer [192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시킴. Blocking solution(5% skim milk)으로 3시간 동안 상온에서 blocking을 실시하고 이후 1:5000으로 희석한 pERK 및 ERK 또는 1:3000으로 희석한 pCREB 및 CREB 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation 함 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation 함
- ⑤ Tris-buffered saline/ Tween 20로 10회 세척 후 1:5000으로 희석한 peroxidase-conjugated 2차 항체로 membrane을 상온에서 2시간 동안 incubation 함. 이후 chemiluminescence(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)으로 발광시켜 LAS-4000 mini(Fujifilm Lifescience USA, Stamford, CT) 을 이용하여 결과를 분석하였음

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 spinosin 투여는 대조군에 비하여 유의적으로 ERK와 CREB의 인산화(phosphorylation)를 증가시켰음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군, **, $p < 0.01$ vs. 대조군). 본 결과를 토대로 spinosin의 기억력 감퇴에 대한 개선 효능이 ERK-CREB 신호를 활성화하여 작용하는 것이라고 사료되며 이는 기억력개선이 장기기억강화에 관련되어 있음을 확인함



<스피노신의 기억력 개선 관련 인자 활성화>

(2) 수동회피실험 Antagonism 연구

(가) 실험 목적

스코폴라민을 투여한 인지 능력 저하 모델에서 산조인의 유효 활성성분인 스피

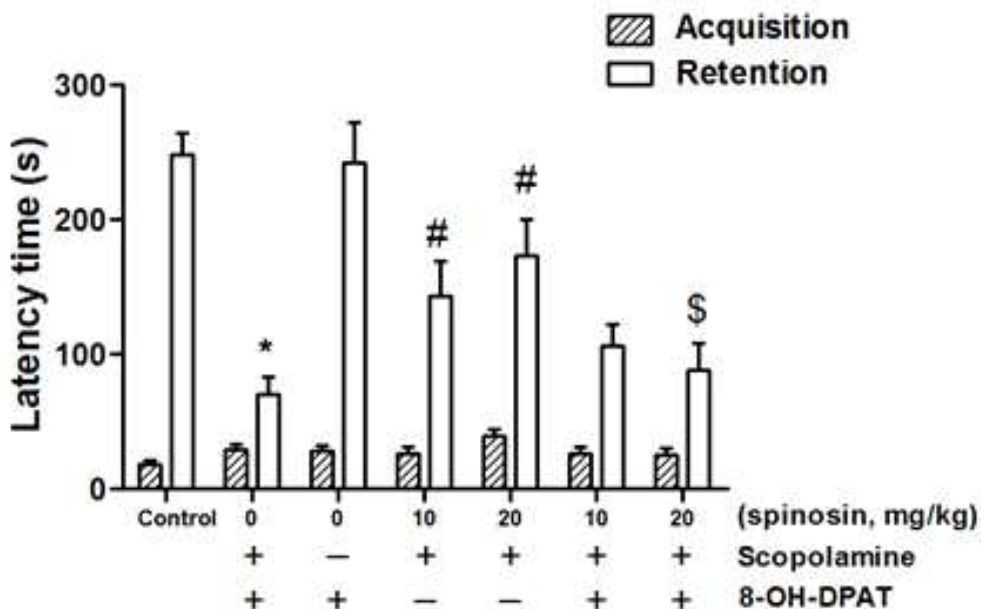
노신의 기억력 보호 효과가 어떠한 수용체를 경유하는지의 여부를 antagonism 수동회피실험을 이용하여 평가하였음

(나) 실험 방법

- ① Spinosin은 실험 1시간 전에 경구투여하고 세로토닌 1A 수용체 저해제인 8-OH-DPAT(8-Hydroxy 2-(dipropylamino)tetralin)를 인지능에 영향을 미치지 않는 sub-effective인 0.5 mg/kg 용량으로 준비하고 실험 수행 30분 전에 복강 투여함
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함.

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 scopolamine으로 투여로 유도한 인지능 감퇴(*, $p < 0.05$ vs. 대조군)를 유의적으로 회복하는 spinosin의 효능이(#, $p < 0.05$ vs. 대조군) sub-effective 용량의 8-OH-DPAT 투여로 차단되었음을 확인하였음(\$, $p < 0.05$ vs. 대조군). 이는 spinosin의 기억력 개선 효능이 세로토닌 수용체 중 하나인 세로토닌 1A 수용체를 경유하여 효과가 나타난다고 사료 됨



<스피노신의 기억력 개선 효과와 세로토닌 1A 수용체와의 상관관계>

(3) 전기생리실험을 이용한 장기기억강화(Long-term potentiation, LTP)에 대한 효능 평가

(가) 실험 목적

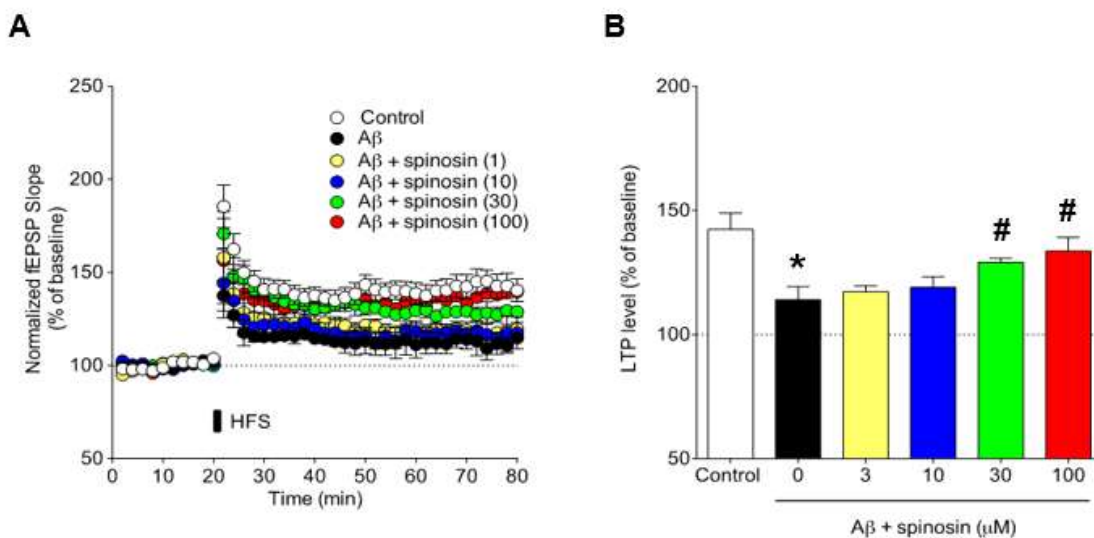
전기생리실험,¹⁰⁾(Yi JH et al., 2015)을 통해 해마조직에 아밀로이드 베타 처리로 유도하여 감소된 fEPSP(Field excitatory postsynaptic potential)를 spinosin의 처리를 통하여 개선할 수 있는지 평가하고자 함

(나) 실험 방법

- ① fEPSP는 해마 조직에서 CA1 영역의 stratum pyramidale에서 측정함
- ② 먼저 Stimulating electrode를 Schaffer collateral-commissural 경로에 위치시킨 후 자극은 30초 간격으로 일정하게 유지함
- ③ Recording electrode는 stratum pyramidale에 위치하여 반응을 측정. 해마 조직을 spinosin이 포함된 인공뇌척수액에 2시간 동안 배양한 후 recording chamber에 옮겨 fEPSP를 측정함. 20분간 baseline을 잡고 LTP를 유도하기 위해 high frequency stimulation(100 Hz, 100 pulse, 2 trains)을 가한 후 1시간 동안 반응의 추이를 기록함
- ④ fEPSP 기록 시작 80분 후의 fEPSP 반응의 변화로 LTP 유도 정도를 평가할 수 있음

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 아밀로이드 베타 처리로 유도한 fEPSP 저하(*, $p < 0.05$ vs. 대조군)를 spinosin 30 μ M부터 유의적으로 증가시키는 효능을(#, $p < 0.05$ vs. 음성대조군) 확인되므로 spinosin의 치매 동물 모델에서의 기억력 개선 효능은 해마에서의 장기기억강화를 유도하여 효능이 나타나는 것임을 규명함



A: 80분 동안 측정된 fEPSP slope, B: 80분에 측정된 LTP level
<Spinosin의 처리가 해마조직에서 장기기억강화에 미치는 영향>

제10절 양유근 추출물의 기억력 개선 관련 기능성 평가

1. 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vitro* 연구

가. 양유근 추출물의 신경세포 보호효과 확인

(1) MTT assay

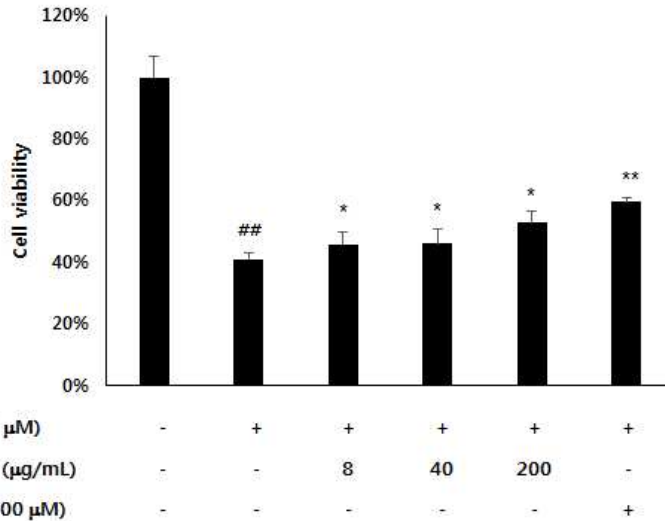
(가) 실험 목적

응집된 베타 아밀로이드로 유발되는 신경세포 독성으로 인한 신경세포사멸은 알츠하이머성 치매의 발병에 있어서 중요한 요인으로 알려져 있는데, MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 분석법을 이용하여 양유근 추출물의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성의 보호효능을 평가하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 양성대조물질인 Vitamin C와, 양유근 추출물을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid $\beta(1-42)$ 는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 인산완충용 PBS로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μ M 이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μ L 를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 Amyloid $\beta(1-42)$ 를 20 μ L씩 처리하여 24시간 배양한 후 MTT 5 mg/mL in PBS를 각 20 μ L씩 각 well에 처리하여 상층액을 제거하고 100% DMSO를 첨가하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포활성도를 측정함

(다) 실험 결과 및 고찰: PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 세포 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 낮아진 것을 확인하였으며(##, $p < 0.01$ vs. 대조군), 양유근 추출물을 8, 40 그리고 200 μ g/mL 농도로 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) 세포활성도를 증가시켰으므로 양유근 추출물이 아밀로이드 베타 처리로 유도한 독성에 대해 신경세포 보호효능이 있는 것을 확인함



<MTT assay를 이용한 양유근 추출물의 신경세포 보호 효과>

(1) LDH assay

(가) 실험 목적

LDH(Lactate dehydrogenase)는 세포질에서 안정한 효소이지만 세포막의 손상으로 인해서 급격히 방출되는 효소이기 때문에 LDH의 급격한 방출은 신경세포의 세포막 손상과 관련이 있음. 세포막 손상이 일어나게 되면 세포사멸이 일어나며 신경세포의 세포사멸은 알츠하이머 치매를 유발하는 중요한 요인으로 알려져 있는데, LDH분석법을 이용하여 양유근 추출물의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성에 대한 보호효능을 평가하고자 함

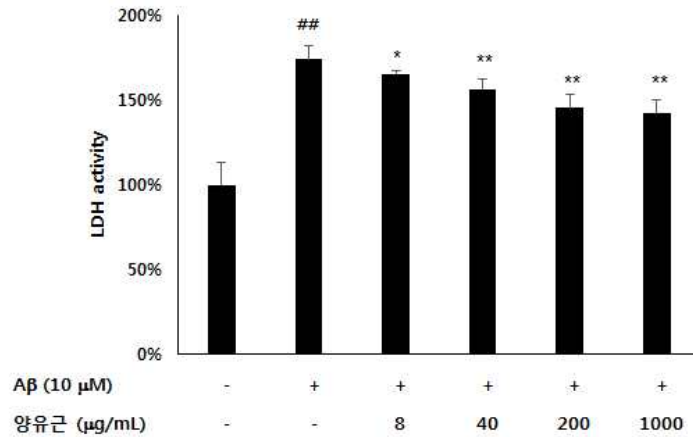
(나) 실험 방법

- ① 양성대조물질인 Vitamin C와, 양유근 추출물을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid β(1-42)는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μM이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μL를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 Amyloid β(1-42)를 20 μL씩 처리하여 24시간 배양한 후 96 well plate에 키트에 포함되어 있는 용해 완충액을 10μL 첨가하여 가볍게 교반한 뒤 37°C에서 45분간 세포를 용해함
- ④ 상층액을 96 well plate로 옮겨 반응 혼합물을 첨가한 후 차광하여 30분간 배양한 것을 각각 490 nm와 680 nm의 흡광도를 측정하여 결과값을 계산함. LDH활성도가 낮을수록 세포 독성이 적음을 나타냄

(다) 실험 결과 및 고찰

- (1) PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 LDH 활성도가 대조군에서 유의적으로 높아진 것을 확인하였으며(##, *p*<0.01 vs. 대조군),

산조인 추출물을 8, 40, 200 그리고 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) LDH 활성도를 감소시켰으므로 양유근 추출물의 아밀로이드 베타로 유도한 세포독성을 낮추는 효능을 확인함



<LDH assay를 이용한 산조인 추출물의 신경세포 보호 효과>

2. 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vivo* 연구

가. 동물행동실험에서 양유근 추출물의 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 개선 효능 평가

(1) 수동회피실험

(가) 실험 목적

스코폴라민을 투여한 치매 모델에서 양유근 추출물의 기억력 감퇴 개선 효과가 있는지의 여부를 수동 회피 시험을 이용하여 확인하고자 함

(나) 실험 방법

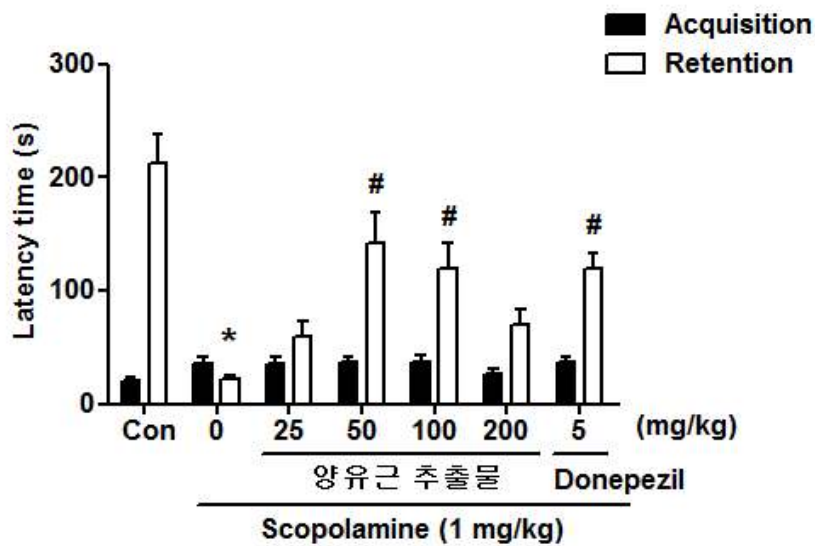
- ① 훈련 1시간 전 양유근 추출물 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg, 스웨르티신 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/kg과 마그니플로린 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg을, 주주보사이드 A를 25, 50, 100 및 200 mg/kg를, 주주보사이드 B를 2.5, 5, 10 및 20 mg/kg 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60 초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후

길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(라) 실험 결과 및 고

실험 결과, 스코폴라민의 투여에 의해 밝은 공간에 머무르는 시간(latency time)이 정상동물군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군). 양유근 추출물 50 및 100 mg/kg 농도에서 음성 대조군과 비교하여 밝은 공간에 머무르는 시간을 유의하게 증가시켰음(#, $p < 0.05$ vs. 대조군).

상기 실험을 통하여 양유근 추출물이 신경세포 보호 효능과 기억력 개선 효능이 있음을 확인되었기에, 산조인과의 복합으로 기억력 개선 효능을 상승시킬 수 있는 소재로 양유근을 선정하였음.



<스코폴라민 유도 인지능 저하 모델에서 양유근 추출물의 수동회피시험>

제11절 산조인 양유근 복합물 DHP1402의 최적 후보물질 도출

1. 산조인과 양유근의 병용투여 시 기억력 개선 상승(synergistic) 효과를 보이는 원료 조성비 탐색

가. Scopolamine 투여로 유도한 인지능 감퇴를 단일 추출물에 비하여 상승적으로 개선하는 효과를 보이는 원료 조성비 탐색

(1) 수동회피 실험 및 Y자 미로 실험

(가) 실험 목적

Scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 산조인과 양유근의 배합으로 단일 추출물에 비하여 상승적으로 효능이 나타나는 배합 비를 도출하고자 함

(나) 수동회피실험 방법

- ① 실험 1시간 전 산조인과 양유근의 배합비율 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 비율의 복합물을 각 100 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(다) Y자 미로 실험 방법

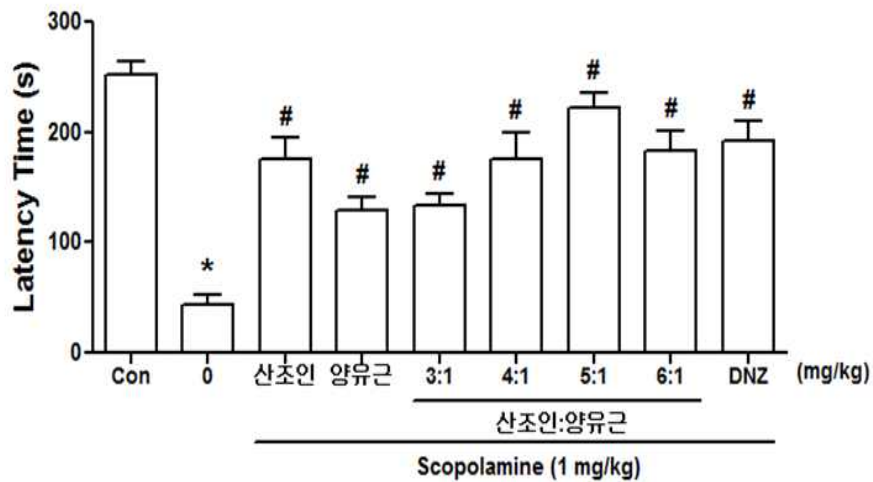
- ① 실험 1시간 전 산조인과 양유근의 배합비율 3:1, 4:1, 5:1, 6:1 비율의 복합물을 각 100 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음
- ② Y자 미로의 가지를 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록함
- ③ 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록함. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산함

$$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최대변경(maximum alternation)} - 1} \times 100$$

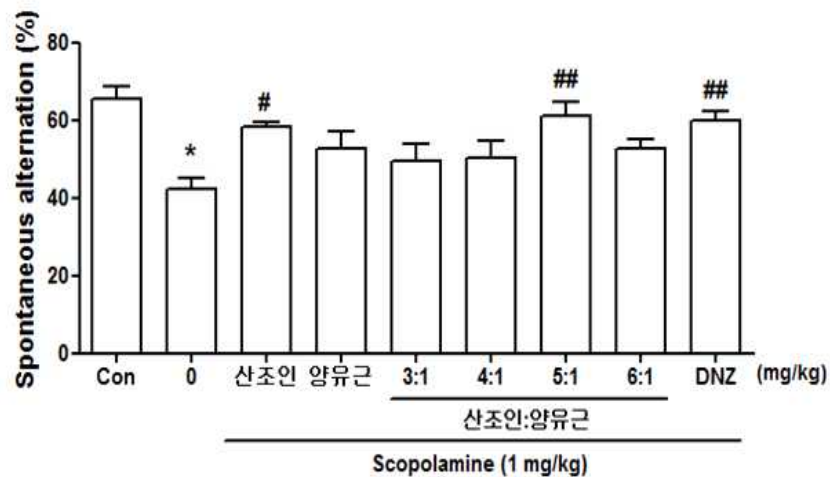
(최대변경 : 총 출입횟수 - 2)

(라) 실험 결과 및 고찰

스코폴라민으로 유도한 치매 모델에서 최적의 효능을 갖는 원료조성비를 확정하고자 수동회피 실험과 Y자 미로 시험을 시행함. 수동회피 실험의 경우 각 추출물을 투여 후 retention trial에서 latency time(밝은 공간에 머무른 시간) 측정 결과 산조인과 양유근을 5:1로 혼합하여 50% 에탄올 추출물을 제조하였을 때 단독투여와 비교하여 상승 효과가 나타나는 것으로 확인되었음. Y자 미로 시험에서는 변경행동력(Spontaneous alternation)을 도출한 결과 산조인과 양유근을 5:1로 혼합하여 50% 에탄올 추출물을 제조하였을 때 단독투여와 비교하여 상승 효과가 나타나는 것으로 확인되었음. 이상의 실험 결과를 바탕으로 최적의 효능을 갖는 원생약 조성비를 5:1 조성비로 확립하고 이를 DHP1402라 함



<스코폴라민 유도 인지능 저하 모델에서 원생약 배합 비에 따른 추출물의 수동회피시험>



<스코폴라민 유도 인지능 저하 모델에서 원생약 배합 비에 따른 추출물의 Y자 미로 시험>

제12절 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 개선관련 활성에 대한 기능성 평가

1. 산조인 양유근 포함한 복합추출물(DHP1402)의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vitro* 연구

가. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 신경세포 보호효과 확인

(1) MTT assay

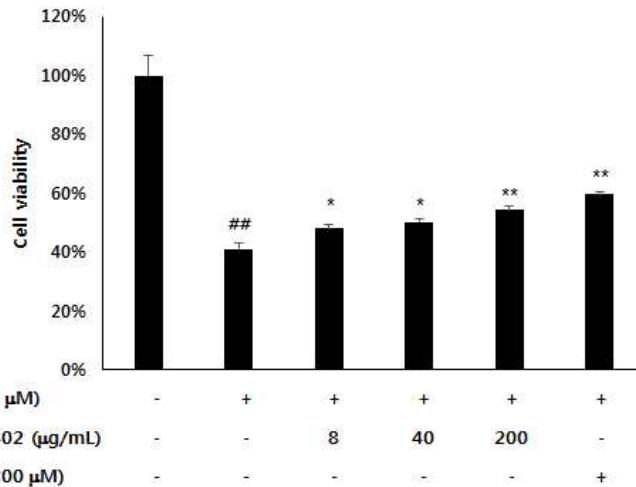
(가) 실험 목적

응집된 베타 아밀로이드로 유발되는 신경세포의 세포사멸은 알츠하이머성 치매의 발병에 있어서 중요한 요인으로 알려져 있는데, MTT 분석법을 이용하여 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성의 보호효능을 평가 및 비교하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 양성대조물질로 사용된 Vitamin C와 시험물질인 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid $\beta(1-42)$ 는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μ M이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μ L를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 Amyloid $\beta(1-42)$ 를 20 μ L씩 처리하여 24시간 배양한 후 MTT 5 mg/mL in PBS를 각 20 μ L씩 각 well에 처리하여 상층액을 제거하고 100% DMSO를 첨가하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포활성도를 측정함

(다) 실험 결과 및 고찰: PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 세포 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 낮아진 것을 확인하였으며(##, $p < 0.01$ vs. 대조군), DHP1402를 8, 40 그리고 200 μ g/mL 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) 세포활성도를 증가시켰으므로 아밀로이드 베타 처리로 유도한 세포 독성에 보호효능이 있는 것을 확인함



<MTT assay에서의 DHP1402의 신경세포 보호 효과>

(2) LDH assay

(가) 실험 목적:

LDH(Lactate dehydrogenase)는 세포질에서 안정한 효소이지만 세포막의 손상으로 인해서 급격히 방출되는 효소이기 때문에 LDH의 급격한 방출은 신경세포의 세포막 손상과 관련이 있음. 세포막 손상이 일어나게 되면 세포사멸이 일어나며 신경세포의 세포사멸은 알츠하이머 치매를 유발하는 중요한 요인으로 알려져 있는데, LDH분석법을 이용하여 DHP1402의 베타 아밀로이드로 유발시킨 신경세포(PC-12 세포주) 독성의 보호효능을 평가하고자 함

(나) 실험 방법

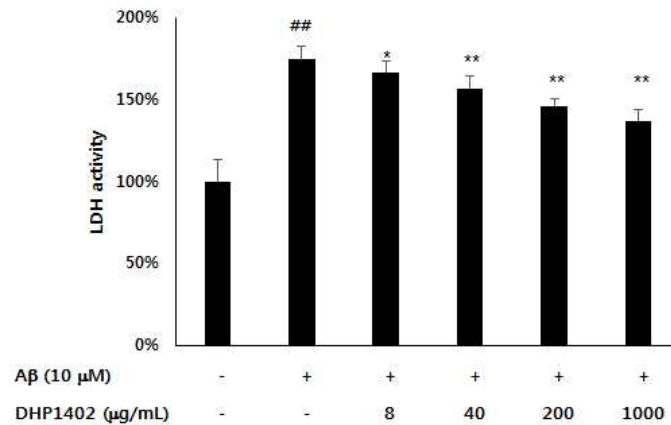
- ① 양성대조물질로 사용된 Vitamin C와 시험물질인 DHP1402을 시험 농도에 맞게 조제하였으며 Amyloid β(1-42)는 HFIP 1 mg/mL에 용해한 후 3일 뒤 증발시켜 PBS로 희석한 액을 4°C에서 24시간 배양하여 올리고머화한 것을 최종 10 μM이 되도록 사용하였음
- ② PC-12 세포를 96 well plate에 1.5 X 10⁴ cells/mL 의 농도로 균질하게 170 μL를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 것을 사용함
- ③ 시험군의 농도에 맞춰 30분 동안 시험 물질을 전처리한 후 올리고머화한 Amyloid β(1-42)를 20 μL씩 처리하여 24시간 배양한 후 96 well plate에 키트에 포함되어 있는 용해 완충액을 10μL 첨가하여 가볍게 교반한 뒤 37°C에서 45분간 세포를 용해함
- ④ 상층액을 96 well plate로 옮겨 반응 혼합물을 첨가한 후 차광하여 30분간 배양한 것을 각각 490 nm와 680 nm의 흡광도를 측정하여 결과값을 계산함. LDH활성도가 낮을수록 세포 독성이 적음을 나타냄

(다) 실험 결과 및 고찰

PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 LDH 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 높아진 것을 확인하였으며(##, *p*<0.01 vs. 대조군),

DHP1402을 8, 40, 200 그리고 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게(*, $p < 0.05$ vs. 음성대조군, **, $p < 0.01$ vs. 음성대조군) LDH 활성도를 감소시켰으므로 아밀로이드 베타의 독성을 억제하는 효능을 확인함

MTT 분석법 및 LDH 분석법을 이용한 세포보호 효능 확인 결과 산조인과 양유근 단독추출물에 비해 복합추출물이 상승작용을 나타내진 않았지만, DHP1402 역시 단일 추출물들과 유사한 정도의 아밀로이드 베타 처리로 유도한 신경세포 사멸을 유의적으로 보호함이 확인되었음



<LDH assay에서의 DHP1402의 신경세포 보호 효과>

나. 산조인, 양유근 및 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 아세틸콜린분해효소 (Acetylcholinesterase) 저해 능력 확인

(1) 아세틸콜린분해효소(Acetylcholinesterase, AChE) inhibition assay

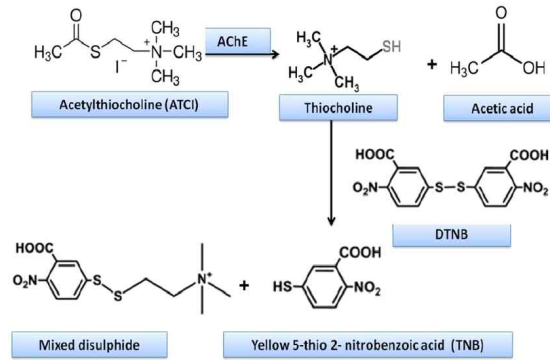
(가) 실험 목적

아세틸콜린은 기억을 형성하는 역할을 하는 대표적인 신경전달물질이며, 현재 대표적인 치매치료제인 도네페질의 기전은 아세틸콜린을 분해하는 효소를 저해하여 기억력 감퇴를 개선하고 치매의 진행을 늦추는 AChE inhibitor임. 본 실험을 통하여 DHP1402에서 AChE 저해 효과가 있는지 그리고 산조인, 양유근 단일추출물보다 DHP1402가 상승적인 효과를 보이는지를 비교평가 하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 각 시료를 실험농도에 맞게 조제 함
- ② 96well에 먼저 PB 0.1M pH 8.0 Buffer와 DTNB(5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))를 농도에 맞게 처리함
- ③ 1mg/ml의 Bovine serum albumin(BSA)가 용해된 PB 0.1M pH 7.0 Buffer에 실험을 위해 도출된 Unit에 맞게 Enzyme을 희석함
- ④ 해당 실험 약물을 농도에 맞게 처리한 후 Acetylthiocholine으로 반응을 유도하고 10분 뒤 Neostigmine으로 반응을 종결시킴

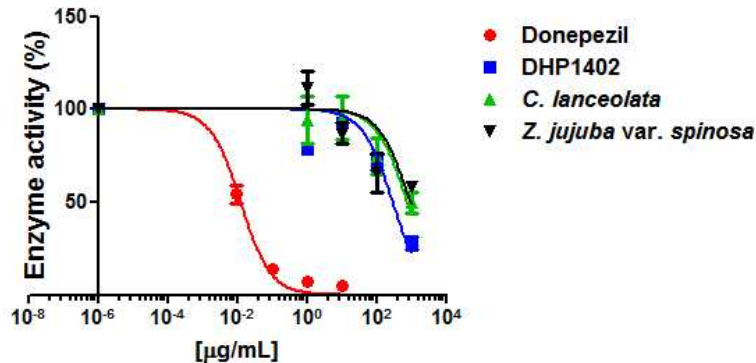
⑤ 412nm 흡광도에서 흡광도를 확인하여 대조군 및 양성대조군의 IC₅₀을 도출



<In vitro AChE 저해 평가>

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과, AChE 저해 효능 평가에서 DHP1402는 양 산조인 및 양유근 각각의 단일 추출물에 비해 상승적인 저해 효능을 나타냈으며 양성대조군인 도네페질에 상당하는 효능은 보이지 못했지만, 단일 화합물이 아닌 추출물인 것을 감안했을 때 AChE 저해 효능이 있다고 사료됨



	Donepezil	DHP1402	C. lanceolata	Z. jujuba var. spinosa
IC ₅₀	0.01258	302.2	777.7	956.6

<In vitro AChE 저해 평가 산조인, 양유근, DHP1402의 AChE 저해 효능>

2. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 인지능력 개선 효능에 대한 ex vivo 연구

가. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 아세틸콜린분해효소 (Acetylcholinesterase) 저해 능력 확인

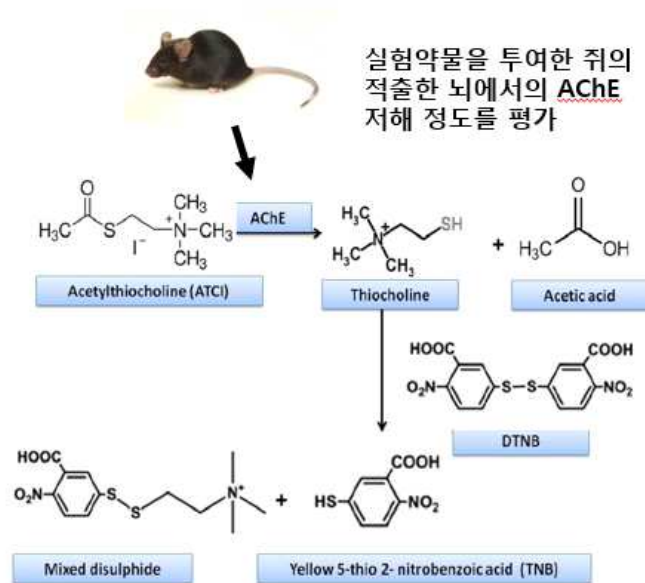
(1) ex-vivo 아세틸콜린분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 저해 평가

(가) 실험 목적

*in vitro*의 AChE inhibition본 실험을 통하여 DHP1402에서 AChE 저해 효과가 있음을 확인함. *ex vivo* AChE 저해 평가를 수행하여 동물에게 투여하여 동물의 뇌에서 AChE가 실제로 얼마나 저해되었는지 평가하고자 함

(나) 실험 방법

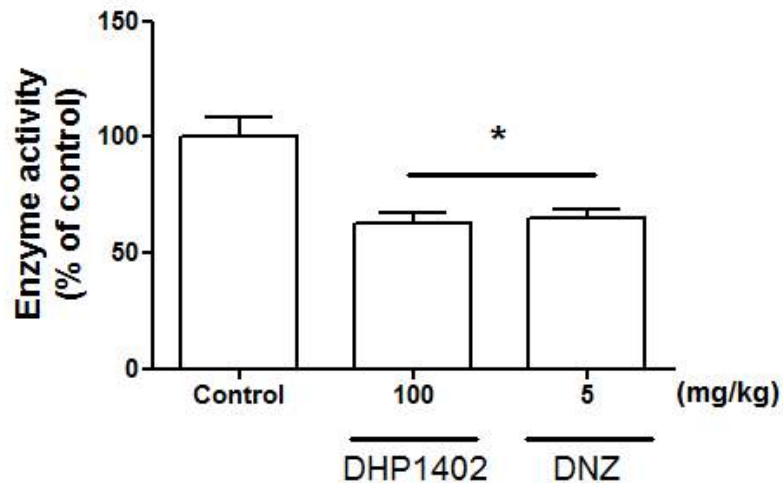
- ① 실험동물에 경구투여로 약물 및 양성대조군인 도네페질을 투여 1시간 후 동물을 희생시킴
- ② 희생시킨 동물에서 즉시 뇌 전체를 적출하고 후각신경구(olfactory bulb)와 소뇌를 제거 한 후 무게를 재로 무게(mg)*100 μL 부피의 pH 8.0 0.1M Phosphate buffer를 넣은 직후 Homogenization을 수행하고 4℃, 14000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취함
- ③ BSA 정량으로 단백질 양을 정량하고 *in vitro* AChE 저해 평가에서 사용되었던 정제된 AChE 대신 brain sample을 효소로 사용함
- ④ Acetylthiocholine으로 반응을 시작하고 neostigmine으로 반응을 종결시킨 후 412nm에서 흡광도를 찍은 후 정량된 단백질 값으로 흡광도 값을 보정하여 최종 결과를 산출함



<Ex vivo AChE 저해 평가>

(다) 실험 결과 및 고찰

실험결과 DHP1402는 도네페질과 동등한 AChE 저해 억제 효능이(*, $p < 0.05$ vs. 대조군) 나타남을 확인되었으므로, DHP1402의 기억력 감퇴에 대한 개선 효능이 아세틸콜린의 분해를 억제하여 나타나는 것임을 규명함



<Ex vivo AChE 저해 평가에서 DHP1402의 AChE 저해 효능>

3. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 인지능력 개선 효능에 대한 *in vivo* 연구

가. Scopolamine 투여로 유도한 인지능 저하 모델에서 DHP1402의 효능 평가

(1) 동물행동실험

(가) 실험 목적

DHP1402의 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴에 대한 개선 효능을 평가하고자 함

(나) 수동회피실험 방법

- ① 실험 1시간 전 DHP1402를 50, 100, 200 및 400 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotine door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(다) Y자 미로 실험 방법

- ① 실험 1시간 전 DHP1402를 50, 100, 200 및 400 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군

에는 0.5% CMC를 투여하였음

- ② Y자 미로의 가지를 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록함
- ③ 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록함. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산함

$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최대변경(maximum alternation)}} \times 100$

(최대변경 : 총 출입횟수 - 2)

(라) 모리스 수중미로 실험 방법

- ① 총 4일간 실시된 훈련 기간 동안 훈련 1시간 전 DHP1402 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 지름 90 cm, 높이 45 cm인 원형 풀에 각각 별, 네모, 세모, 원의 네 가지 표지를 같은 간격으로 붙이고 이 중 별 아래에 29 cm 높이의 플랫폼(platform)을 위치시킴. 플랫폼 보다 0.5 cm 윗부분까지 물을 채우고(수온 21 ± 1 °C), 색소를 이용하여 물을 흐리게 하여 수면에서 플랫폼이 보이지 않게 함
- ③ 마우스를 풀의 한 구획에 조심스럽게 내려놓은 다음 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ④ 30초 후 다시 같은 위치에 마우스를 내려놓고 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ⑤ 위의 과정을 4번 반복하고, 총 5일 동안 표지를 확인할 수 있는 위치를 바꿔가며 실시함
- ⑥ 5일의 훈련이 끝난 후 플랫폼을 제거하고 마우스가 1분간의 유영시간 중 목표사분면에 머무르는 시간을 측정함

(마) 새로운 물체인식실험 방법

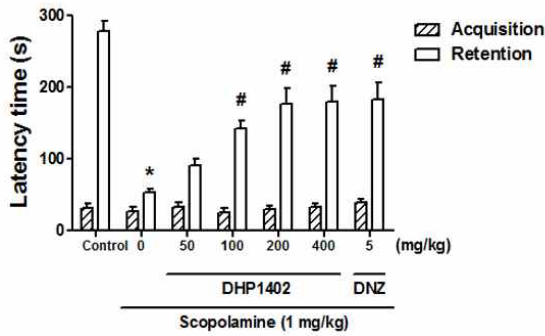
- ① 실험동물에게 훈련 1시간 전 DHP1402 100 mg/kg 및 200 mg/kg을 마우스에 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 10% 트윈 80을 투여함
- ② 실험약물 투여 한 시간 후 10분간 같은 2개의 물체를 상자 안에 두고 인식시키는 훈련을 수행함
- ③ 2일 뒤 하나를 기존 물체와 다른 모양의 물체를 넣고 탐색 시간을 비교함
- ④ 총 탐색시간 중 기존 물체와 새로운 물체에 대한 탐색 시간에 대한 비율(Discrimination ratio)을 구함

(바) 실험 결과 및 고찰

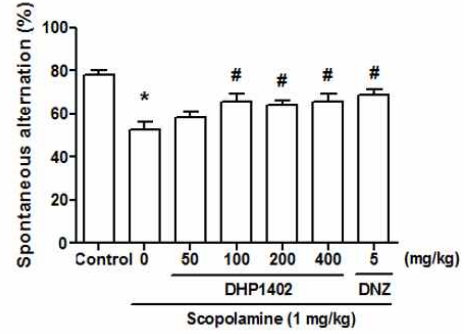
DHP1402를 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴를 수동회피실험, Y자 미로실험, 수중미로실험 및 새로운 물체인식실험을 통해 기억력 개선 효능을 평가하였

을 때 수동회피실험, Y자 미로실험, 수중미로실험에서 DHP1402 100 mg/kg 농도부터 농도 의존적이고 유의적인 기억력 회복 효능을 보임을 확인하였고 ($p < 0.05$) 새로운 물체 인식 실험에서는 200 mg/kg 농도에서 유의적인 기억력 회복 효능이 확인되었음 ($p < 0.05$)

A



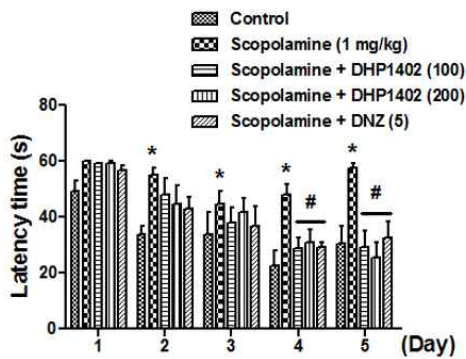
B



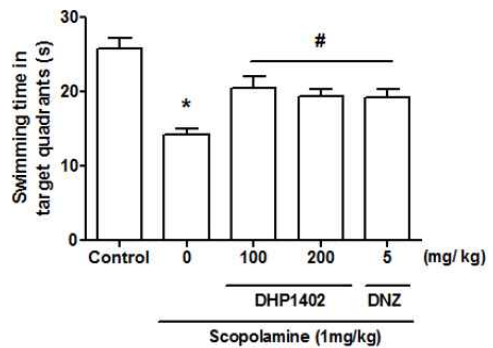
A: 수동회피실험 결과 B: Y자 미로실험 결과

<동물 행동실험에서 DHP1402의 scopolamine으로 유도한 인지능 감퇴 개선 효능>

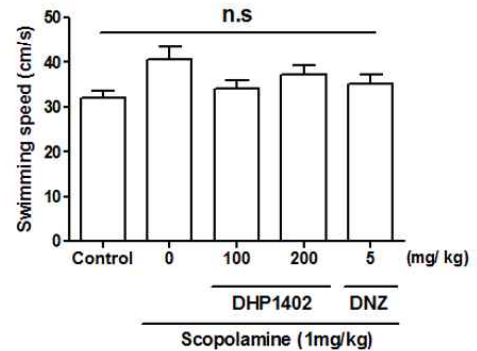
A



B

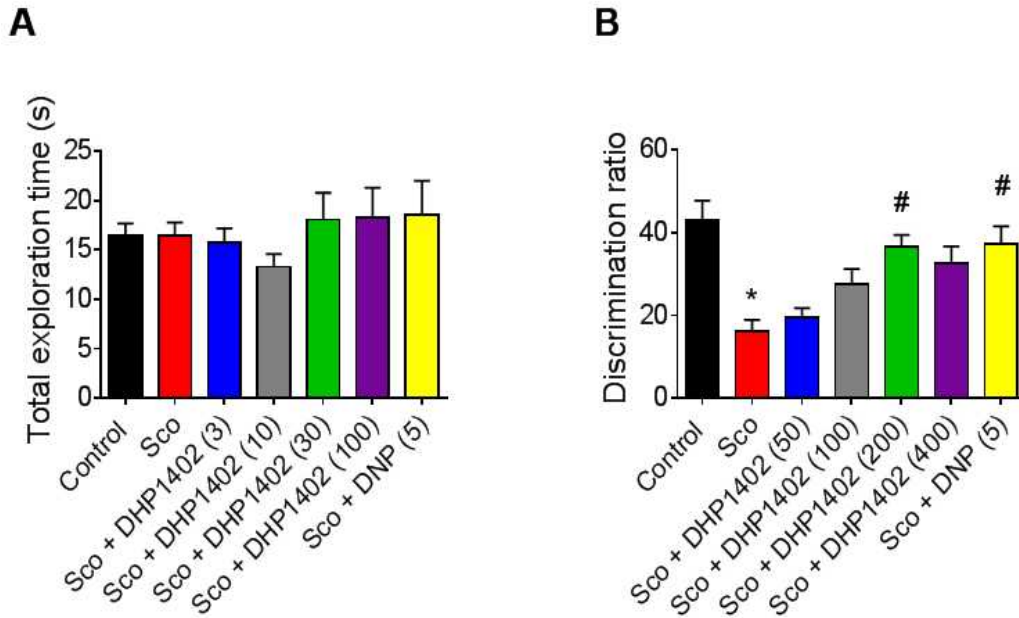


C



A: 훈련기간 동안 숨겨진 플랫폼에 도달하기까지 걸린 시간, B: Probe 실험에서 플랫폼이 있었던 사분면에 머무르는 시간, C: 각 군별 실험동물들의 수영속도

<수중미로 실험에서 DHP1402의 scopolamine으로 유도한 인지능 감퇴 개선 효능>



A: 총 물체 탐색 시간, B: 새로운 물체 식별 비율

<새로운 물체 인식 실험에서 DHP1402의 scopolamine으로 유도한 인지능 감퇴 개선 효능>

나. 아밀로이드 베타 투여로 유도한 인지능 저하 모델에서 DHP1402의 인지능력 개선 효능 평가

(1) 동물행동실험

(가) 실험 목적

DHP1402의 아밀로이드 베타로 유도한 치매 모델에서 인지능 감퇴 개선 효능을 동물행동실험을 통해 평가하고자 함

(나) 실험 방법

- ① 베타 아밀로이드(1-42)를 3 ug을 뇌실 내에 투여하여 치매를 유도하였음
- ② 시험물질 50, 100, 200, 400 mg/kg을 1일, 1회, 7일간 경구 투여하였으며, 양성 대조군은 도네페질(donepezil) 5 mg/kg을 투여하고, 음성 대조군에는 0.5% CMC를 투여하였음

(다) 수동회피실험 방법

- ① 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60 초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ② 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(라) Y자 미로 실험 방법

- ① Y자 미로의 가지를 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음, 마우스가 들어간 가지를 기록함
- ② 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록함. 세 개의 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 하기 수학적식에 의해 계산함

$\text{변경 행동력(\%)} = \frac{\text{실제변경(actual alternation)}}{\text{최대변경(maximum alternation)} } \times 100$
--

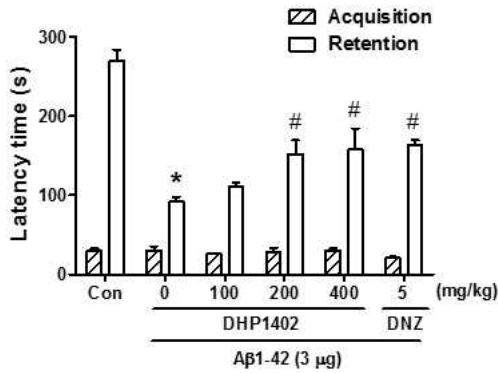
(최대변경 : 총 출입횟수 - 2)

(마) 모리스 수중미로 실험 방법

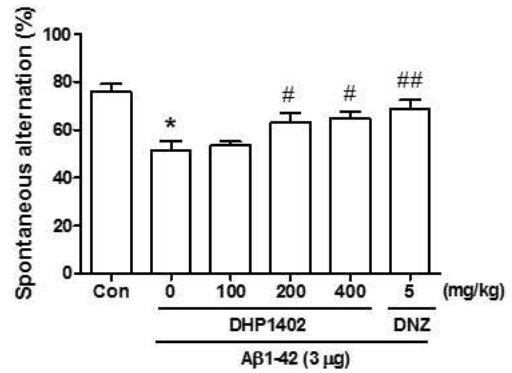
- ① 지름 90 cm, 높이 45 cm인 원형 풀에 각각 별, 네모, 세모, 원의 네 가지 표지를 같은 간격으로 붙이고 이 중 별 아래에 29 cm 높이의 플랫폼(platform)을 위치 시킴. 플랫폼 보다 0.5 cm 윗부분까지 물을 채우고(수온 21 ± 1 °C), 색소를 이용하여 물을 흐리게 하여 수면에서 플랫폼이 보이지 않게 함
- ② 마우스를 풀의 한 구획에 조심스럽게 내려놓은 다음 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ③ 30초 후 다시 같은 위치에 마우스를 내려놓고 플랫폼까지 찾아가는 시간을 60초 동안 측정함
- ④ 위의 과정을 4번 반복하고, 총 4일 동안 표지를 확인할 수 있는 위치를 바꿔가며 실시함
- ⑤ 4일의 훈련이 끝난 후 플랫폼을 제거하고 마우스가 1분간의 유영시간 중 목표사분면에 머무르는 시간을 측정함

(바) 실험 결과 및 고찰

DHP1402를 아밀로이드 베타로 유도한 기억력 감퇴를 수동회피실험, Y-자 미로 실험 및 수중미로실험을 통해 기억력 개선 효능을 평가하였을 때 수동회피실험 및 Y-자 미로실험에서 DHP1402 200 mg/kg 농도에서 농도 의존적이고 유의적인 기억력 회복 효능을 보임을 확인하였음($p < 0.05$). 수중미로 실험에서는 훈련 기간 및 probe 실험에서 100 mg/kg 농도에서 유의적인 기억력 개선 효능이 있음을 확인하였음($p < 0.05$)

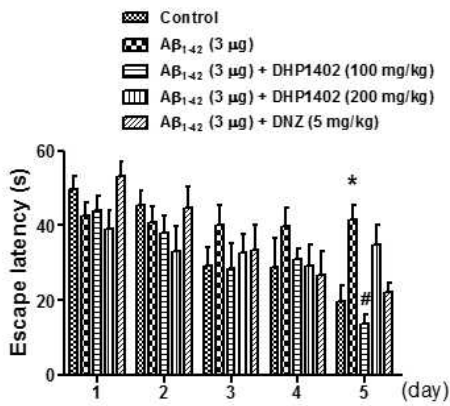
A

A: 수동회피실험 결과

B

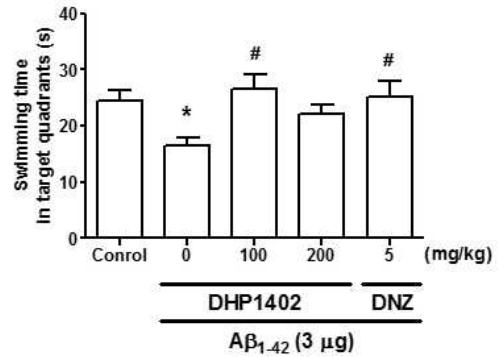
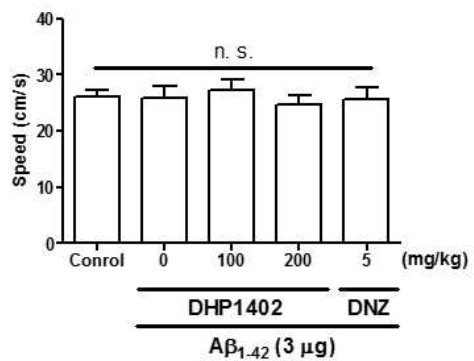
B: Y자 미로실험 결과

<수동회피 실험 및 Y-자 미로 실험에서 DHP1402의 아밀로이드 베타로 유도한 기억력 감퇴 개선 효능>

A

A: 훈련기간 동안 숨겨진 플랫폼에 도달하기까지 걸린 시간, B: Probe 실험에서 플랫폼이 있었던 사분면에 머무르는 시간, C: 각 군별 실험동물들의 유영속도

<모리스 수중미로 실험에서 DHP1402의 아밀로이드 베타로 유도한 기억력 감퇴 개선 효능>

B**C**

다. DHP1402의 기억력 개선 효능 기전 확인

(1) Western blot

(가) 실험 목적

DHP1402의 기억력 개선 효능이 나타나는 기전을 알아보기 위해 *in vivo* 해마 조직에서 세포 신호 변화를 기억력과 관련이 있다고 알려져 있는 인자인 PKA(protein kinase A), ERK(extracellular signal-regulated kinase)와 CREB(cAMP response element-binding protein)의 활성 정도를 Western blot 분석법을 이용하여 단백질 수준에서 확인하였고 동일 농도의 단일 추출물에 비해 상승적 효능이 나타나는지 평가하려고 함

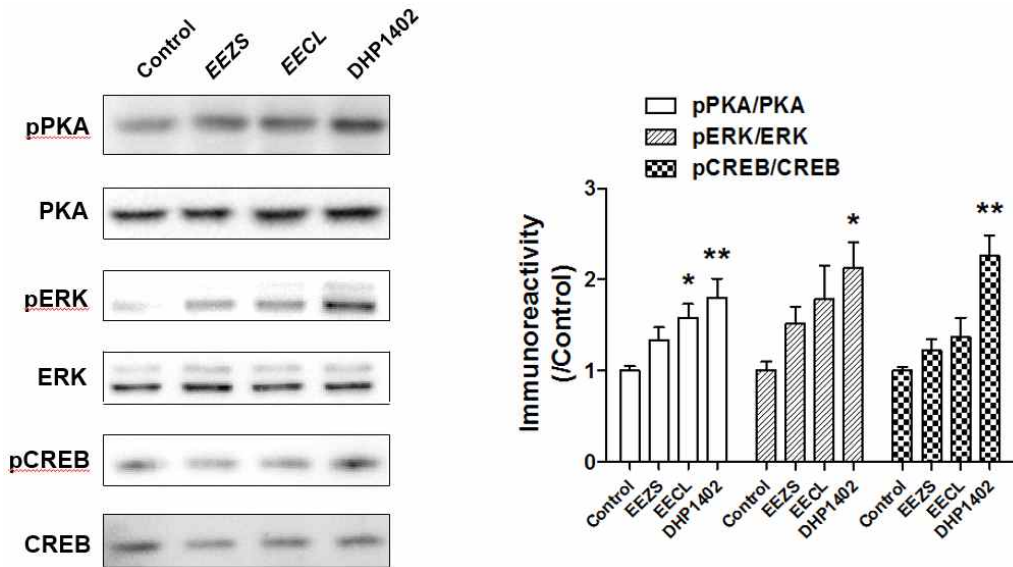
(나) 실험 방법

- ① 농도가 100 mg/kg 산조인 추출물(EEZS), 양유근 추출물(EECL) 및 DHP1402를 각각 실험군에 투여하고 1시간 후 마우스를 희생시켜 대뇌를 적출한 뒤 해마를 분리하여 western blot sample을 얻음
- ② 이를 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM PMSF, 50 mM NaF 과 1 mM sodium orthovanadate가 함유된 ice-chilled Tris - HCl buffer(20 mM, pH 7.4)에 넣고 균질화함. 균질액은 10분간 얼음 속에 방치 후 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮겨 같은 조건으로 한번 더 원심분리를 수행함
- ③ 단백질 정량을 수행하여 단백질(15 µg)을 SDS-polyacrylamide gel(8%)에 reducing condition에서 전기 영동함
- ④ 단백질을 PVDF membrane에 transfer buffer [192 mM glycine 및 20% v/v methanol을 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)]를 이용하여 100 V로 4°C에서 2시간 동안 이전시킴. Blocking solution(5% skim milk)으로 3시간 동안 상온에서 blocking을 실시하고 이후 1:1000으로 희석한 pPKA 및 PKA 또는 1:5000으로 희석한 pERK 및 ERK 또는 1:3000으로 희석한 pCREB 및 CREB 1차 항체를 가하여 4°C에서 하룻밤 incubation 함
- ⑤ Tris-buffered saline/ Tween 20로 10회 세척 후 1:5000으로 희석한 peroxidase-conjugated 2차 항체로 membrane을 상온에서 2시간 동안 incubation함. 이후 chemiluminescence(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)으로 발광시켜 LAS-4000 mini(Fujifilm Lifescience USA, Stamford, CT) 을 이용하여 결과를 분석하였음

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 DHP1402 투여는 대조군에 비하여 유의적으로 PKA, ERK와 CREB의 인산화(phosphorylation)를 증가시켰음(*, $p < 0.05$ vs. 대조군, **, $p < 0.01$ vs. 대조군). 본 결과를 토대로 DHP1402의 기억력 감퇴에 대한 개선 효능이 PKA-ERK-CREB 신호를 활성화하여 작용하는 것이라고 사료됨. 또한, 각각의 동일 용량인 산조인(EEZS) 및 양유근(EECL) 단일추출물에 비해 DHP1402이 보다 유의적으로 기억력과 관련된 신호들의 인산화를 증가시킨 것으로 보아

DHP1402의 상승적인 기억력 개선 효능 증대가 기억력과 관련된 신호의 상승적인 변화에 기인하는 것이라 사료됨



<DHP1402의 기억력 개선 관련 인자 활성화>

(2) 수동회피실험 Antagonism 연구

(가) 실험 목적

스코폴라민을 투여한 인지능 저하 모델에서 DHP1402의 인지능 개선 효과가 어떠한 수용체를 경유하는지의 여부를 ⁷⁾(Lee HE et al., 2013) 문헌을 토대로 설계한 antagonism 수동회피실험을 이용하여 평가하였음

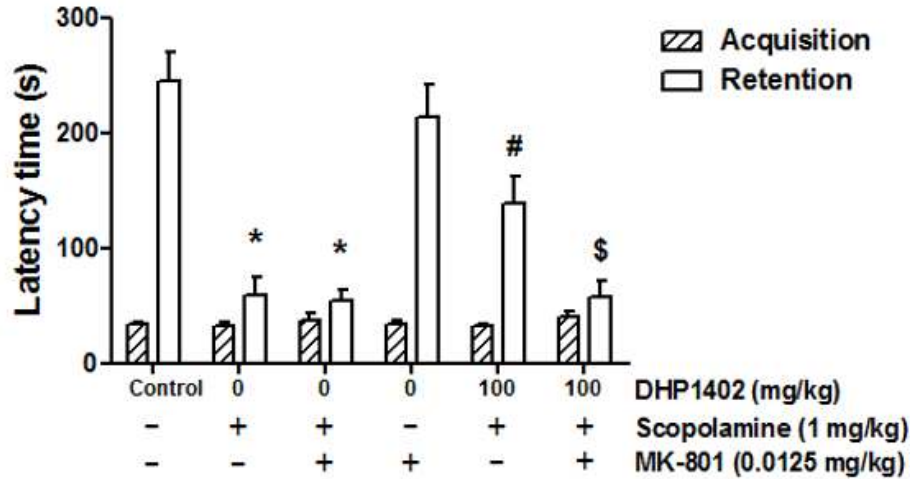
(나) 실험 방법

- ① DHP1402는 실험 1시간 전에 경구투여하고 scopolamine 1mg/kg 용량을 실험 30분 전에 투여함. Scopolamine 투여 후 5분 뒤 NMDA 수용체 저해제인 MK-801을 인지능에 영향을 미치지 않는 sub-effective 용량인 0.0125 mg/kg로 피하 투여함
- ② 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후 길로틴문(guillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함. 이 때 길로틴문이 열린 후 60초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시킴. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함. 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이러한 전기작용을 기억하게 됨
- ③ 학습 시험이 끝나고 24시간 후에 본 실험을 시행함. 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정함

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 scopolamine으로 투여로 유도한 인지능 감퇴(*, $p < 0.05$ vs. 대조군)를 유의적으로 회복하는 DHP1402의 효능이(#, $p < 0.05$ vs. 대조군) sub-effective

용량의 NMDA 수용체 길항제 투여로 차단되었음을 확인하였음(\$, $p < 0.05$ vs. 대조군). 이는 DHP1402의 기억력 개선 효능이 기억력 및 장기기억 강화와 연관이 깊은 NMDA 수용체를 경유하여 효과가 나타난다고 사료 됨



<DHP1402의 기억력 개선 효과와 NMDA 수용체와의 상관관계 평가>

(3) 전기생리실험을 통한 장기기억강화(Long-term potentiation, LTP)에 대한 효능 평가

(가) 실험 목적

해마조직에 아밀로이드 베타 처리로 유도하여 감소된 fEPSP(Field excitatory postsynaptic potential)를 DHP1402가 개선할 수 있는지 평가하고자 함

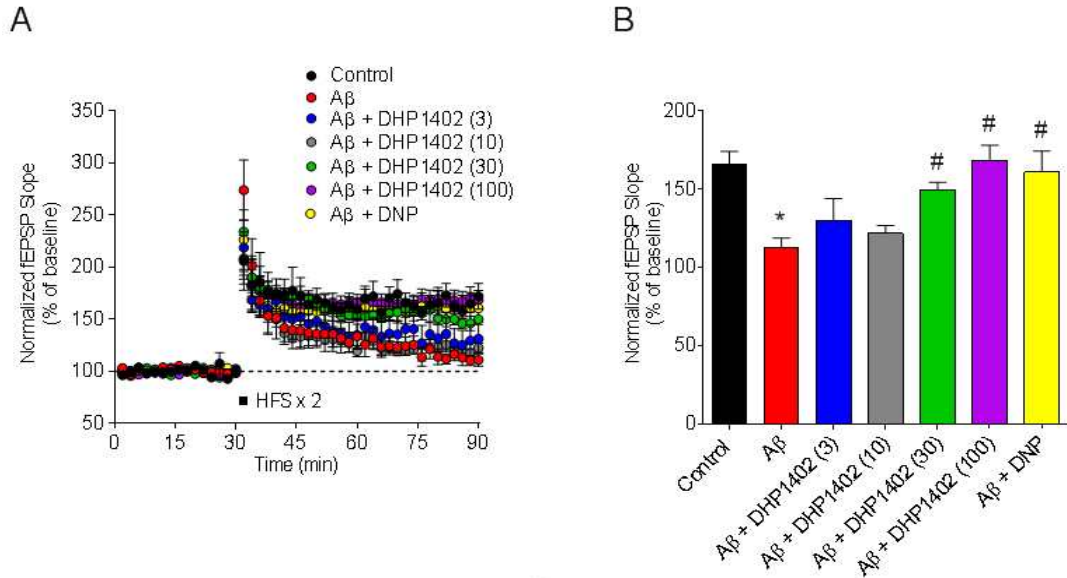
(나) 실험 방법

- ① fEPSP는 해마 조직에서 CA1 영역의 stratum pyramidale에서 측정함
- ② 먼저 Stimulating electrode를 Schaffer collateral-commissural 경로에 위치시킨 후 자극은 30초 간격으로 일정하게 유지함
- ③ Recording electrode는 stratum pyramidale에 위치하여 반응을 측정. 해마 조직을 DHP1402가 포함된 인공뇌척수액에 2시간 동안 배양한 후 recording chamber에 옮겨 fEPSP를 측정함. 20분간 baseline을 잡고 LTP를 유도하기 위해 high frequency stimulation(100 Hz, 100 pulse, 2 trains)을 가한 후 1시간 동안 반응의 추이를 기록함.
- ④ fEPSP 기록 시작 80분 후의 fEPSP 반응의 변화로 LTP 유도 정도를 평가할 수 있음

(다) 실험 결과 및 고찰

실험 결과 아밀로이드 베타 처리로 유도한 fEPSP 저하(*, $p < 0.05$ vs. 대조군)를 DHP1402 30 $\mu\text{g/ml}$ 부터 유의적으로 증가시키는 효능을(#, $p < 0.05$ vs. 음성대조군) 확인하였음. 따라서 DHP1402의 기억력을 개선시키는 작용기전 중 하나가 장기기억 강화에 작용하여 나타나는 것이라 사료되며, 이는 DHP1402가 기억력의 장기기억강화와 관련이 있는 PKA-ERK-CREB 신호의 인산화를 증가시키

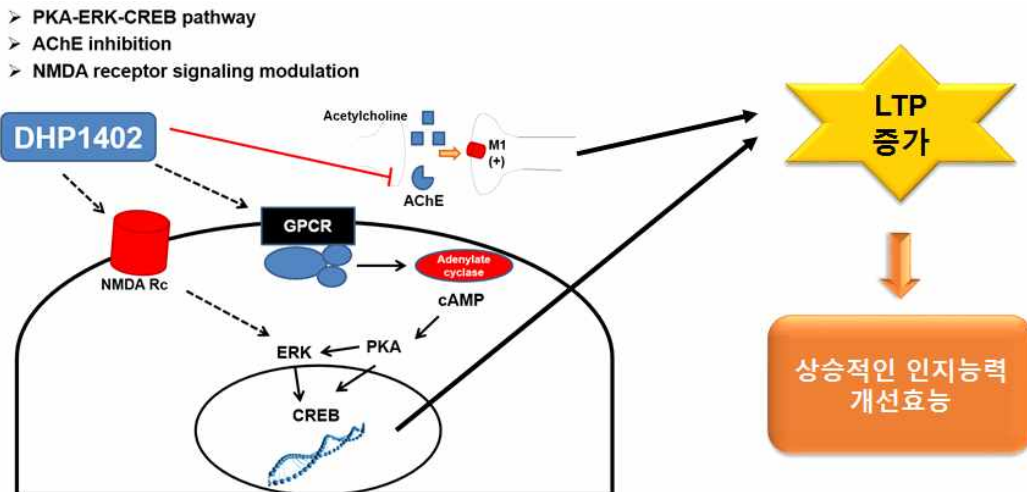
는 것과 NMDA 수용체 길항제를 처리했을 때 DHP1402의 기억력 개선 효능이 저해되는 antagonism 연구에 부합하는 결과임으로, DHP1402의 기억력 개선 기전은 장기기억 강화를 유도하여 그 효능이 나타나는 것임을 규명하였음



A: 80분 동안 측정된 fEPSP slope, B: 80분에 측정된 LTP level
 <DHP1402의 처리가 해마조직에서 장기기억강화에 미치는 영향>

(4) DHP1402의 기전연구 종합

(가) 위의 DHP1402의 기억력 개선 효능기전연구결과를 종합하여 도식화하였음



<DHP1402의 기전 규명>

(나) DHP1402는 PKA-ERK-CREB 신호의 인산화 증가와 아세틸콜린의 분해 억제, NMDA 수용체 조절의 복합 작용으로 유도된 장기기억강화로 기억력 감퇴개선 효능을 나타냄을 확인하였음.

제13절 비임상 독성시험

본 시험은 비임상시험관리기준(제2014-67호, MFDS, 2014년 02월 12일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice(1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행하였음. 상기 시험은 승인된 시험계획서와 (주)캠온 비임상연구소 SOP에 따라 수행하였고, 시험계획서에 명시된 목적을 달성하였음. 기타 시험자료의 신뢰성을 저해할 만한 상황은 발생하지 않았음

1. DHP1402의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

가. 시험 목적

본 시험은 시험물질 DHP1402의 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 단회 경구 투여 하였을 때 나타나는 독성을 조사하기 위해 수행함

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질 및 부형제

(가) 시험물질

명 칭:	산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)
코드번호:	C-1855
제조번호:	201501001
입 수 일:	2015년 02월 10일
입 수 량:	400 g/ bottle x 1 bottle, 600 g/ bottle x 1 bottle
성 상:	미색~미황색의 분말
함 량:	스피노신 0.9 %, 로베티올린 0.06 %
보관조건:	실온, 방습
공 급 원:	대화제약(주)

(나) 부형제

명 칭:	0.5% CMC-Na in D.W.
제조번호:	CMC-Na; C0080LC, 멸균주사용수; 17N9F21
공 급 원:	실온(조제 후 냉장)
보관조건:	CMC-Na; 대정화금(주), 멸균주사용수; 대한약품공업(주)
선택이유:	본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험의뢰자의 요청에 의해 선택하였음.

(2) 시험계

(가) 시험계: S.D 랫드 7주령 암컷, 수컷

(3) 시험군 구성, 투여량 설정, 투여

(가) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(m L/kg)	투여량(mg/ kg)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 21-25	20	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 26-30	20	1,250
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	20	2,500
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	20	5,000

* G1: 부형제대조군(멸균주사용수)

(나) 투여량 설정

본 시험물질을 2000, 5000 mg/kg으로 암수 각 1 마리에 예비 투여한 결과, 사망 동물 및 이상증상은 관찰되지 않음. 시험물질이 천연물인 점을 감안하여 5000 mg/kg을 고용량으로 하고, 공비를 2로 하여 그 아래로 2개의 군을 설정함. 또한 부형제(0.5% CMC-Na in D.W.)만을 투여하는 부형제 대조군을 설정함

(다) 투여경로 및 투여 횟수

임상예정 경로인 경구투여를 1회 실시함

(4) 관찰 및 검사

(가) 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 실시함. 단 투여 당일에는 투여 후 1시간까지는 지속적으로, 6 시간까지는 매 시간마다 관찰함. 이 때, 투여 일을 Day 1으로 설정하며 Day 15까지 시험을 수행함

(나) 체중변화 관찰

모든 동물에 대하여 Day 1(투여 전), 2, 4, 8 및 15에 측정함

(다) 부검

Day 15에 모든 생존동물을 CO₂를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 육안으로 모든 장기를 검사함

(5) 통계분석

측정결과는 SPSS(ver 10.1K)를 사용하여, 모수적인 다중비교 또는 비모수적인 다중비교를 통하여 군간 비교하고, P<0.05인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정함. 사망동물 발생 시 반수치사량의 산출은 probit법을 참고함. 기타 통계학적 방법을 사용한 경우에는 최종보고서에 상세히 기술함

다. 결과

본 시험은 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행함
시험물질인 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)를 0(부형제대조군), 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 군당 10 마리(암수 각 5마리)에 단회 경구투여 하였고, 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며,

그 결과는 다음과 같음

- (1) 사망동물: 사망동물은 관찰되지 않음
- (2) 일반증상 관찰 결과: 일반증상 관찰 결과, 5000 mg/kg 투여군 암수 전 레에서 Day2에 설사(diarrhea)가 관찰되었음
- (3) 체중변화 관찰 결과: 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않음
- (4) 부검소견 관찰 결과: 이상소견은 관찰되지 않음

라. 고찰 및 결론

본 시험에서는 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중 및 부검소견에서도 시험물질과 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않음. 일반증상 관찰결과, 5000 mg/kg 투여군 암수 전 레에서 Day2에 일시적으로 관찰된 설사는 절식 상태에서 과량의 시험물질투여에 의한 영향으로 판단하며, 체중 및 부검소견에서 유의한 변화를 동반하지 않음. 이상의 결과로 보아, 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)를 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구 투여하였을 때, 사망동물은 관찰되지 않기에, 본 시험조건 하에서 개략의 치사량 ALD(Approximate Lethal Dose)은 암수 모두 5000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단함

2. 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

가. 시험 목적

시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)이 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium*의 4 개 TA 균주와 트립토판 요구성 균주 *E. coli* WP2 *uvrA*에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시함

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질 및 대조물질

(가) 시험물질

명 칭:	산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)
코드번호:	C-1855
제조번호:	201501001
입 수 일:	2015 년 03 월 04 일
입 수 량:	400 g/ bottle x 1 bottle, 600 g/ bottle x 1 bottle
성 상:	미색~미황색의 분말
함 량:	스피노신 0.9 %, 로베티올린 0.06 %
보관조건:	실온, 방습
공 급 원:	멸균주사용수

(나) 부형제

명 칭:	멸균주사용수
제조번호:	17N9F21
공 급 원:	대한약품공업(주)
보관조건:	실온(개봉 후 냉장)
선택이유:	본 부형제는 널리 사용되는 부형제의 하나이며, 시험물질이 잘 현탁되어 선택하였음

(다) 양성대조물질

대사활성계	양성대조물질(약칭)	CAS No.	적용균주	농도(μg/plate)
+	2-Aminoanthracene (2-AA)	613-13-8	TA100	1
			TA1535	2
			TA1537	1
			WP2 uvrA	6
	Benzo[a]pyrene (B[a]P)	50-32-8	TA98	1
-	Sodium azide(SA)	26628-22-8	TA100	0.5
			TA1535	0.5
	2-Nitrofluorene (2-NF)	607-57-8	TA98	2
	4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)	56-57-5	WP2 uvrA	0.5
	Acridine Mutagen ICR 191(ICR-191)	17070-45-0	TA1537	0.5

(2) 시험계

(가) 시험계

히스티딘 요구성 균주인 Salmonella typhimurium은 TA100, TA1535, TA98, TA1537(Maron and Ames, 1983) 및 트립토판 요구성 균주인 Escherichia coli WP2 uvrA(Greend and Muriel, 1976)를 사용함. 이 균주들은 전술한 MFDS 고시 및 OECD guideline 복귀돌연변이 시험용 균주로 예시되어 있음. 이들 균주는 다양한 화학물질의 변이원성을 민감하게 검출할 수 있음이 입증됨

(3) 시험방법

(가) 농도군 설정

본시험에서는 다음과 같이 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조균을 포함하며, 농도군당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험함

균주명	S9 mix	농도군(μg/plate)				
TA strains	+/-	50	150	500	1500	5000
WP2 uvrA	+/-	50	150	500	1500	5000

(나) 시험물질 처리 및 평판(plate) 제작

시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지(2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator(37 ± 2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전 배양하였으며, 전 배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관함

온도 $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube(12 x 75 mm)에 고압증기 멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL(대사활성계 비적용 시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 균게 함

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시함

시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작함

처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 50 ± 2 시간 배양한 후 복귀돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수함

(다) 평판의 구별

평판에 유성펜으로 시험번호 균주명, 농도, S9 mix 처리여부 등의 내용을 구별할 수 있도록 기입함

(라) 관찰 항목

시험물질 처리 시 시험물질액을 top agar에 혼합할 때 침전 생성 여부를 관찰함. 육안으로 확인 가능한 입자가 관찰되면 침전으로 판단하였음

집락은 육안으로 계수하였고 집락 계수 시 각 평판의 기본성장균층(background lawn)의 형성 여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였음

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였음

① 기본성장균층이 옅어지거나 없어지면서 집락 수의 감소가 나타날 경우

② 미세집락(microcolony)이 나타날 경우

집락 수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 편의상 집락 수가 음성대조군에서 나타난 집락 수 평균치의 50 % 미만으로 감소한 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우를 세포독성으로 판단하였음

(마) 결과의 표시

시험 결과는 각 농도군 당 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균 \pm 표준편차 및 음성대조군에 대한 증가 배수로 나타내었으며, 집락 수의 실측치도 아울러 제시하였음

(바) 시험 타당성 기준

다음 기준을 모두 만족할 때 본 시험은 타당한 것으로 간주하고 결과를 판정하였음

① 플레이트 당 처리한 생균의 수가 0.5×10^8 CFU이상일 것

② 시험물질 처리군 중 세포독성을 나타내지 않는 농도가 최소한 3 단계 이상일 것

③ 음성대조군의 집락 수가 아래 범위일 것

균주명	집락 수
TA100	75 - 200
TA1535	3 - 37
TA98	15 - 60
TA1537	4 - 31
WP2 uvrA	5 - 40

④ 모든 양성대조군의 평균 집락 수가 음성대조군의 2 배 이상일 것. 이 때 2-AA 및 B[a]P 처리군에서 나타난 집락 수의 분명한 증가는 S9 mix의 활성화에 대한 증거가 됨

⑤ 시험물질과 S9 mix의 무균성 확인을 위한 플레이트에서 미생물 집락이 없을 것

(4) 결과의 평가 및 통계

대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1 개 균주에서 시험물질 처리군의 평균 집락 수가 농도 의존적으로 증가하거나 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정함

양성판정 기준을 만족하지 못할 경우 음성으로 판정하였으며, 시험물질은 본 시험에 사용한 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단함. 생물학적 연관성 또한 판정에 참고함

다. 결과

시험물질은 부형제에 현탁되었으며, 모든 농도군의 조제물질에서 침전은 관찰되지 않았음. 또한 조제물을 top agar와 혼합할 때 및 모든 농도군에서 혼탁이나 침전은 관찰되지 않았음. 집락계수 시에도 모든 플레이트에서 침전이나 기타 이상은 관찰되지 않았으며, 시험물질 최고농도 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 플레이트에서 미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았고 모든 시험균주에서 세포독성은 나타나지 않았음

*Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98, TA1537의 4 개의 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용 시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았음

E. coli WP2 uvrA에서도 대사활성계 적용 및 비적용 시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락 수의 증가는 나타나지 않았음

한편, 모든 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었음

시험에 사용한 5 개 균주는 파장 600 nm에서의 흡광도 기준으로 생균수 측정 결과 0.57-3.59 x 10⁹(TA균주) 및 1.32 x 10⁹(*E. coli*) CFU/mL 이었으며, 모든 플레이트 당 처리된 생균수는 0.5 x 10⁸CFU이상이었음

라. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)이 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 uvrA)에 복귀돌연변이를 유발하는

가를 알아보기 위하여 실시함

대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였음. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시함

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락 수의 증가는 관찰되지 않았으며, 세포독성도 관찰되지 않음. 한편 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰됨. 이상의 결과로, 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료됨

3. DHP1402의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주간 반복경구투여 DRF 독성시험

가. 시험 목적

본 시험은 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)의 Sprague-Dawley 랫드에 4주간 반복 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 추후에 있을 반복 경구투여 독성시험에서의 투여량을 설정하기 위하여 수행함

나. 재료 및 방법

(1) 시험물질 및 부형제

(가) 시험물질

명 칭:	산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)
코드번호:	C-1855
제조번호:	201501001
입 수 일:	2015 년 02 월 10 일
입 수 량:	400 g/ bottle x 1 bottle, 600 g/ bottle x 1 bottle
성 상:	미색~미황색의 분말
함 량:	스피노신 0.9 %, 로베티올린 0.06 %
보관조건:	실온, 방습
공 급 원:	멸균주사용수

(나) 부형제

명 칭:	0.5% CMC-Na in D.W.
제조번호:	CMC-Na; C0080LC, 멸균주사용수; 17N9F21
공 급 원:	실온(조제 후 냉장)
보관조건:	CMC-Na; 대정화금(주), 멸균주사용수; 대한약품공업(주)
선택이유:	본 부형제는 실험동물에 독성을 나타내지 않으며, 시험의뢰자의 요청에 의해 선택하였다.

(2) 시험계

(가) 시험계: S.D 랫드 7주령 암컷, 수컷

(3) 시험군 구성, 투여량 설정, 투여경로 및 투여

(가) 시험군 구성

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(m L/kg)	투여량(mg/ kg)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 26-30	10	0
G2	M / F	5 / 5	6-10 / 31-35	10	625
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 36-40	10	1,250
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 41-45	10	2,500
G5	M / F	5 / 5	21-25 / 46-50	10	5,000

* G1: 부형제대조군(별군주사용수)

(나) 투여량 설정

본 시험물질을 5000 mg/kg으로 Sprague-Dawley 랫드에 예비투여를 실시한 결과, 사망동물은 관찰되지 않았으며, 투여 후 Day 2에 연변 및 설사가 관찰되었음. 상기 예비투여 결과를 반영하여 시험의뢰자와 협의 후, 시험물질이 천연물임을 고려하여 5000 mg/kg/day를 최고용량군으로 설정하였고, 아래로 공비를 2로 하여 2500, 1250 및 625 mg/kg/day 투여군을 설정하였음. 또한, 0.5 % CMC-Na in D.W.만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였음

(다) 투여경로 및 투여 횟수

임상예정 경로인 경구투여를 1회 실시함

(4) 관찰 및 검사

(가) 일반증상

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1일 1회 이상 관찰하고, 개체 별로 기록함. 일반증상이 악화된 개체는 격리하고, 빈사동물 및 사망동물은 계획부검 동물에 준하여 처리함. 투여 개시일을 Day 1으로 정함

(나) 체중측정

투여개시일(투여 전)에 측정하며 그 이후에는 주 1회 및 부검일에 측정함. 부검일은 절식시킨 체중을 측정함

(다) 사료 및 물 섭취량 측정

투여 개시일에 측정하며, 그 이후에는 주 1회 측정함. 사료 및 물을 정량 급여한 다음 날 잔량을 사육 상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하고, 마리당 평균 섭취량으로 산출함

(라) 안과학적 검사

관찰 최종 주에 모든 동물에 대하여 눈의 외안검사를 실시함. 안구의 이상이 관찰되면, 모든 투여군에 대하여 안저검사를 확대 실시함

(5) 임상병리

(가) 채뇨 및 채혈

① 채뇨

관찰 최종 주에 모든 동물에 대하여 70% 알코올로 소독한 스테인레스제 망 사육상자에 1 마리씩 수용함. 채뇨한 신선뇨 중 약(0.3 mL)를 취하여 요검사를 실시함

② 채혈

동물은 채혈 전에 하룻밤 동안 절식(물은 제공)함. 부검일에 동물을 Isoflurane으로 흡입마취하고, 후대정맥에서 주사기를 이용하여 채혈함

(나) 요검사

요색소(urine color)	빌리루빈(BIL)	pH	아질산염(NIT)
투명도(clarity)	케톤체(KET)	요단백(PRO)	잠혈(BLO)
요당(GLU)	요비중(SG)	유로빌리노젠(URO)	백혈구(LEU)

(다) 혈액학적 검사

적혈구(RBC)	적혈구분포폭(RDW)	림프구(LYM)
적혈구용적율(HCT)	혈색소분포폭(HDW)	단핵구(MONO)
혈색소(HGB)	평균혈소판용적(MPV)	호산구(EOS)
평균적혈구용적(MCV)	혈소판(PLT)	호염기구(BASO)
평균적혈구혈색소(MCH)	백혈구(WBC)	대형비염색성세포(LUC)
평균적혈구혈색소농도(MCHC)	호중구(NEU)	

(라) 혈액학적 검사

아스파테이트 아미노기전이효소(AST)	총콜레스테롤(TCHO)	크레아티닌(CRE)
알라닌 아미노기전이효소(ALT)	중성지방(TG)	무기인(IP)
알칼라인 포스파타제(ALP)	총단백(TP)	칼슘 이온(Ca ²⁺)
크레아틴인산활성효소(CPK)	알부민(ALB)	나트륨 이온(Na ⁺)
총빌리루빈(TBIL)	알부민/글로불린 비(A/G ratio)	칼륨 이온(K ⁺)
혈당(GLU)	혈액요소질소(BUN)	염소 이온(Cl ⁻)

(6) 조직병리

(가) 부검

임상병리 검사를 위한 채혈 후, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사 시킨 다음, 체표, 피하, 두부, 흉강 및 복강의 모든 장기 및 투여부위를 관찰하고,

부검소견을 기록함

(나) 장기중량 측정

모든 동물의 아래 장기에 대한 중량을 측정(양측성 장기는 각각 측정)하고, 각 장기의 중량으로 체중에 대한 상대중량을 산출함

폐(lung)	비장(spleen)	간장(liver)
심장(heart)	신장(kidney)	가슴샘(thymus)

(다) 조직 및 장기의 보존

모든 동물의 장기중량을 측정한 장기 및 이상 장기를 10% 중성완충포름알데히드 용액에 고정하되, 고환과 부고환은 Bouin's 용액에, 안구는 Davidson's 용액에 고정함

(라) 조직병리학적 검사

부형제대조균 및 시험물질 최고용량군의 고정된 모든 장기와 육안적 이상소견을 보인 장기에 대하여 조직슬라이드를 제작하고, 조직병리학적 검사를 실시함
조직병리학적 소견은 Pristima®(xybion,USA)프로그램에 입력하여 처리하였고, 진단용어는 Pristima®의 Lexicon에 제시된 것을 우선적으로 사용하였음. 필요시 미국독성병리학회의 Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria: Guides for Toxicologic Pathology 및 Covance 사의 Covance Glossary 등을 참고하였음

병변 정도의 등급매기기는 Pristima® program에 따라서 5 등급으로 실시되었음. 일반적으로 등급매기기는 미약한(minimal) 병변을 +1로, 현저한(massive) 병변을 +5로 하여 두 변화 사이를 정비례로 균등하게 5 등분하여 반정량적으로 실시되었음

(7) 통계분석

측정결과는 SPSS(ver 10.1K)를 사용하여, 모수적인 다중비교 또는 비모수적인 다중비교를 통하여 군간 비교하고, P<0.05인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정함
기타 통계학적 방법을 사용한 경우에는 최종보고서에 상세히 기술함

다. 결과

(1) 통계분석

5000 mg/kg 투여군 수컷에서 Day 12에 사망동물이 1 레(# 25)가 관찰되었음. 해당 동물의 부검소견 관찰 결과, 흉강 내 연한 빨간색조의 흉수가 차있는 소견(red colored pleural fluid), 기관이 찢어져 있는 소견(tear)이 관찰되었고, 생식기, 비장, 부신, 좌우측 신장, 간 좌엽, 방광, 정낭, 장과 대퇴근 일부 또는 전체 섭식(cannibalism)의 소견이 관찰되었음. 단, 사망 전 특이 증상이 관찰되지 않았고 발생 레가 1 레로 적었으며 조직병리학적 검사결과 특이 사항이 관찰되지 않아 시험물질

과 무관한 사망으로 판단함

(2) 일반증상

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

(3) 체중

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

(4) 사료섭취량

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 Day 27에 사료섭취량의 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$), 용량-반응 상관성이 없었고, (주)캠온의 Historical data7)의 정상범위 이내의 변화로 시험물질과 무관한 변화로 판단함

(5) 물 섭취량

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

(6) 안과학적 검사

시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음

(7) 요검사

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

625, 1250 mg/kg/day 투여군 수컷에서 SG 수치가 유의하게 낮았으며 ($P < 0.05$), 1250, 2500 mg/kg/day 투여군 수컷에서 pH가 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$), 용량-반응 상관성이 관찰되지 않아 시험물질과 무관한 변화로 판단함

(8) 혈액학적 검사

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

625, 1250 및 2500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 LYM 수가, 625 및 2500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 WBC, MONO 수가, 1250 및 2500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 RBC 수가, 1250 mg/kg/day 투여군 암컷에서 RDW 수치가, 2500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 HGB 및 HCT 농도가 유의하게 높았음 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

상기의 변화는 용량-반응 상관성이 관찰되지 않았고 (주)캠온의 Historical data7)의 정상범위 이내의 변화로 시험물질과 무관한 변화로 판단함

(9) 혈액생화학적 검사

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

2500 mg/kg/day 투여군 암컷에서 A/G ratio가 유의하게 높았으나 ($P < 0.05$), 용량-반응 상관성이 관찰되지 않았고, (주)캠온의 Historical data7)의 정상범위 이내의 변화로 시험물질과 무관한 변화로 판단함

(10) 장기중량

시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았음

625 mg/kg/day 투여군 암컷에서 좌측 신장의 상대중량이 유의하게 높았고, 5000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 우측 신장의 상대중량이 유의하게 낮았음 ($P < 0.05$). 상기의 변화는 용량-반응 상관성이 없었고, (주)캠온의 Historical data7)의 정상범위 이내의 변화로 조직병리학적 검사 결과 신장과 연관된 변화가 동반되지 않아 시험물질과 무관한 변화로 판단함

(11) 부검소견

시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음

(12) 조직병리학적 검사

5000 mg/kg/day 투여군 암수 모두에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았고, 그 밖에 동일 주령의 Sprague-Dawley 랫드에서 자연발생적으로 발생하는 소견이 관찰되었음

라. 고찰 및 결론

본 시험은 시험물질 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)을 Sprague-Dawley 랫드에 4 주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하고, 추후에 진행될 반복 경구 투여 독성시험에서의 투여량을 설정하기 위하여 수행하였음

본 시험에서 체중, 사료 및 물 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생 화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견 관찰 및 조직병리학적 검사에서 시험물질과 관련된 특이한 변화는 관찰되지 않았음

5000 mg/kg 투여군 수컷에서 Day 12에 관찰된 사망동물 1 레(# 25)의 경우, 육안적으로 관찰된 기관이 찢어진 부검소견과 조직병리학적으로 관찰된 기관벽 파열의 소견을 종합하여 볼 때, 투여실수에 의한 사망으로 판단함

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 산조인 양유근 복합추출물(DHP1402)을 Sprague-Dawley 랫드에 625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day으로 4 주간 반복 경구 투여하였을 때, 시험물질에 의한 독성학적으로 의미 있는 변화가 관찰되지 않았으므로, 본 시험의 여건하에서 무독성량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 5000 mg/kg/day로 판단되고, 표적장기는 관찰하지 못했음

상기 시험결과를 토대로, 추후 실시할 반복투여 독성시험에서는 독성이 관찰될 것으로 예측되는 용량인 5000 mg/kg/day를 고용량군으로 두고 그 아래로 공비 2로 두 개 군을 설정하는 것을 추천함

제14절 인체적용시험

1. DHP1402의 인체적용시험 CRO 기관 선정/계약

가. 알츠하이머성 치매치료제 임상시험 참여경험과 모니터링 방법, 모니터링 요원의 관련 교육 수준 등에 대한 수행능력을 평가하여 최적의 CRO 기관을 선정함

- (1) DHP1402의 인체적용시험 수행을 위해 후보 CRO 중 2업체를 일차 선정하여 각 업체별로 선정미팅을 진행함
- (2) 회사의 내부 표준작업지침서의 CRO 선정과 관련된 체크리스트와 절차에 평가하였으며 수행 경험과 연구의 적정성을 평가하여 최종 A사로 선정함

제안서의 질적 수준(Quality of Proposal)
1. 시험대상자 모집기간 및 임상기관 수는 타당하고 합리적인가?
2. 프로토콜 개발 시 전문적인 supporting이 가능하겠는가?
3. 프로토콜 개발에 소요되는 기간은 얼마나 필요한가?
4. 예상되는 자료 수집 능력과 본 프로젝트 집중도는?
임상시험 수행 경험도
1. 치매치료제(또는 신경과) 관련 임상시험 수행경험은 있는지?
2. 식약처 및 임상기관에 대한 실사 경험 및 대처능력은?
업무 수행 핵심 인력의 경험도
1. 본 프로젝트에 관여할 인력규모와 전문성?(CV 입수여부)
2. 본 프로젝트를 수행할 핵심인력의 치매치료제(또는 신경과) 임상 수행 경험 은?
3. CRA 이직률과 관리는 어떻게 이루어지고 있는지?(CRA 교육 및 모니터링 방법, 전문성)
4. 해당 CRO에서 현재 진행하는 타 연구과제의 수와 규모는?
제안 비용의 구조 및 내용
1. 전체 비용은 타 회사 견적과 비교 시 어떤 수준인가?
2. 실비(Pass-through fee)의 포함 여부와 항목의 구성은?
3. 견적서에 나와 있는 비용 외 향후 추가될 사항이 있는가?
CRO 회사의 내부구조
1. 의약품 임상시험 관련 조직체계는 잘 이루어져 있는가?(조직도 공유 가능 여부)
2. 관련 SOP 구축은 잘 이루어져 있는가?(SOP 사전 검토 가능 여부)
3. CRO에서 시험을 수행하기 위한 적절한 Facility를 갖추고 있는가?(Ex. Fax 및 OS 등)
4. 내부 품질보증(QA) 시스템은 보유하고 있는가?
프로젝트 수행까지의 예상 기간
1. 예상하는 기간 내 프로젝트 완료가 가능하겠는가?
2. 예상기간이 지연되었을 때 대처방법 및 예상대처능력은?(Ex. 환자모집 지연 등)
외부평판
1. 업계 내 인지도 및 외부 평판은 어떠한가?

<표준작업지침서에 따른 CRO 선정 관련 리스트>

2. DHP1402의 임상시험기관 및 연구자 선정

가. 임상시험 실시기관에 대한 feasibility test를 통해 선정

- (1) 임상시험 승인기관의 신경과를 대상으로 하여 인지기능개선 인체적용시험 경험, 연구자의 우수성과 적절성 및 신경심리 교육이수 연구자를 보유한 기관을 평가하여 최적의 에이치플러스 양지병원을 선정하여 임상시험을 진행함

INVESTIGATOR AND STAFF
1. 연구자는 본 임상시험을 수행할만한 충분한 연구 및 임상경험을 가지고 있는가?
2. 연구자는 본 임상시험을 적절히 수행하기 위한 충분한 시간을 가지고 있는가?
3. 기관에서 완료된 연구가 있는가?
4. 연구자는 본 연구에 대해 흥미를 가지고 있는가?
5. 연구책임자는 GCP에 따른 책임을 인지하고 있는가?
6. 기관은 본 연구를 수행하기 위해 적절하고 경험이 풍부하고 잘 훈련된 연구진 (CRC 포함)들을 보유하고 있는가?
7. 연구자 및 연구진은 임상시험계획서와 시험물질(약) 대해 충분히 논의하였는가?
8. 연구책임자 및 연구진은 이상반응 보고 절차에 대해 논의하였는가?
FACILITIES
9. 기관은 적절하고 대상자 투약 장소, 실험실 또는 본 연구에 필수적인 시설을 보유하고 있는가?
10. 시험약을 적절하게 보관 및 유지할 시설을 보유하고 있는가?
11. 실험실은 적절한 보증서를 보유하고 있는가?(보증서 사본 요청)
12. 기관은 각 임상시험계획서 특성에 맞도록 수행할 수 있는가?
13. 모니터링을 할 수 있는 공간을 보유하고 있는가?
14. 증례기록서와 각종 환자들의 자료를 보관할 수 있는 보안이 유지된 장소가 있는가?
15. 맹검이 유지된 무작위배정 코드가 연구자와 관리약사에 제공되었는가?
STUDY PATIENT POPULATION
16. 환자 선정제외 기준은 논의되었는가?
17. 연구자는 대상 환자군을 예상기간 동안 등록할 수 있는가?
18. 예상되는 환자 등록율은 산정되었는가?
SOURCE DOCUMENTATION
19. 임상시험계획서에 기술된 근거문서에 대해 논의하였는가?
REGULATORY REQUIREMENTS
20. 본 연구를 검토할 IRB의 명단은 확보하였는가?
21. IRB는 GCP에 의거한 적절한 자격을 보유한 자들로 구성되어 있는가?
22. IRB는 최근 3년 내에 식약처 정기 실사를 받았는가?
23. 연구책임자에게 임상시험계획서 사본을 제공하였는가?
24. 연구자는 의뢰자와 연구 예산과 관련하여 논의하였는가?

<표준작업지침서에 따른 연구자 선정 관련 체크리스트>

3. DHP1402의 인체적용시험계획서

인 체 적 용 시 험 계 획 서

경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기
위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Intervention Study of the
Efficacy and Safety of "DHP1402" in the Mild Cognitive Impairment Subject

시험계획서번호	DHP1402
버전(작성일)	3.0(2016.03.07)
인체적용시험의뢰자	대화제약(주)
인체적용시험수탁기 관	(주)파마크로(PharmaCRO)

기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식품을 투여 받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 대화제약(주) 및 (주)파마크로(PharmaCRO)의 사전 서면 동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

가. 인체적용시험계획서 개요

인 체 적 용 시 험 제	경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 책 임 자	양지병원 신경과 강석재
실 시 기 관	양지병원, 서울특별시 관악구 남부순환로 1636
인 체 적 용 시 험 의 회 자	대화제약(주)
인 체 적 용 시 험 디 자 인	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 약 24개월 예정
인 체 적 용 시 험 대 상	경도인지장애 증상을 가진 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성
대 상 자 수	총 80예 [최종 평가가능 예수 72예, 10% 탈락율 고려 시]
인 체 적 용 시 험 식 품	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군: DHP1402(산조인 양유근 복합추출물) • 위약군: 대조식품(위약)
용 법 용 량 및 투 여 방 법	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군: 아침, 저녁 2정씩 1일 2회, 총 4정 경구 투여 • 위약군: 아침, 저녁 2정씩 1일 2회, 총 4정 경구 투여
투 여 기 간	총 24주 투여
선 정 기 준	<p>선정기준(대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 2) 경도인지장애(CERAD-K-NP 중 categorical fluency test, boston naming test, word list memory test, constructional praxis test, word list recall test, word list recognition test, constructional recall test, trail making A test 총 8개 test 중 중 한 개 이상의 test에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 사람)로 진단된 자 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제 외 기 준	제외기준

- 1) 의약품, 건강기능식품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 대상자
- 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받았거나 방문 1 기준 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 대상자
- 3) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장 (narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압(혈압강하제의 지속적인 복용에도 불구하고 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이고 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 경우) 대상자 또는 폐질환이 있는 대상자
- 4) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 대상자(serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST 중 정상 상한치 2.5배 이상)
- 5) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우(혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dl 이상) 또는 혈소판(14만/mm³ 이하) 수치가 비정상인 대상자
- 6) 주요 위장관 질환(위장관 질환으로 인하여 약물을 복용하고 있는 자) 혹은 주요 정신과 질환의 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자(조현병, 간질, 알코올 중독, 거식증, 이상 식욕 항진 등)
- 7) 방문 1 기준 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용 하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험(인체적용시험)에 참여한 경험이 있는 대상자
- 8) 방문 1 기준 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강기능식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 대상자
- 9) 다른 질병에 의한 뇌기능 및 인지기능 저하로 판단되는 대상자
- 10) 임신부, 수유부 및 적절한 피임방법(예를 들면 여성피임약을 제외한 호르몬 이식, 자궁내 기구, 살정제, 콘돔 등)에 동의하지 않은 가임 여성
- 11) 인체적용시험기간 중 병용금지 약물을 복용해야 하는 대상자
- 12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 본 연구 참여가 부적합하다고 판단되는 대상자

시 험 방 법

대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과 선정기준에 적절한 대상자에 한하여 무작위 배정된다

무작위 배정된 대상자는 총 24주간 시험식품 또는 대조식품을 복용하게 된다

방문 1 (-2주~0일)	방문 2 0주(0일)	방문 3 12주(±5일)	방문 4 24주(±5일)
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문
		복 용	

기 능 성 평 가

• 1차 기능성 평가 변수:

- 1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량
 ADAS-Kcog 기억요인: 단어 회상 과제, 지남력, 단어 재인 과제, 검사 지시 기억

	<ul style="list-style-type: none"> • 2차 기능성 평가 변수: <ul style="list-style-type: none"> - 시험군 및 대조군 12주 비교 <ol style="list-style-type: none"> 1) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량 2) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량 3) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량 4) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량 - 시험군 및 대조군 24주 비교 <ol style="list-style-type: none"> 1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량 2) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량 3) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량 4) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량
<p>안 전 성 평 가</p>	<p>인체적용시험 식품 투여 전과 투여 중, 투여 24주 후에 임상실험실 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.</p>
<p>병 용 금 기 약 물</p>	<p>인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물과 혈액희석제, 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물 및 침술이나 호르몬요법, 건강기능식품(포스파티딜세린, 참당귀뿌리추출물, 피브로인호소 가수분해물, 원지추출분말, 오메가3, 홍삼 성분 함유 제품 등 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품), 암페타민, 모든 항우울제, 고용량의 항경련제와 수면제, 항세로토닌약, 항정신병약, 아세틸콜린에스테라아제 억제제, NMDA 수용체 길항제, 항파킨슨용제, 항불안제, 콜린성약물, 항전간제 등은 본 시험기간 동안 투약할 수 없다</p> <p>본 시험기간 중 대상자의 사정에 의해 상기 약물을 복용 하고자 하는 경우 연구자와 상의를 하여야 하며 복용한 경우는 시험을 중단하여야 한다. 단, 연구자 판단에 따라 연구시작 3개월 전부터 연구기간 내내 지속적으로 같은 약을 용량 변동 없이 복용하는 경우는 복용이 가능하며, 치매 치료제 약물(cholinesterase inhibitor, 항산화제, NMDA 수용체 길항제)을 복용하는 경우 시험참여 전 6개월 이상 투여하고 있으며, 4개월 이상 용법, 용량 변동 없이 안정적으로 투여를 유지하는 경우 복용이 가능하다</p>

나. 용법 용량 및 투여방법

투여군 투여시기	위약군	시험군
아침	△ △	○ ○
저녁	△ △	○ ○

△ 위약, ○ DHP1402 250mg/정

- (1) 시험군: 아침, 저녁 2정씩 1일 2회, 총 4정 복용
- (2) 위약군: 아침, 저녁 2정씩 1일 2회, 총 4정 복용

다. 시험 진행 모식도



라. 인체적용시험 흐름

시험항목	Screening	Administration			Follow-up ¹
	-2주~0일	0주(0일)	12주(±5일)	24주(±5일)	0
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	필요 시
대상자 동의서 취득	V				
인구학적 조사	V				
신체검사 ¹	V			V	V
활력징후 ²	V	V	V	V	V
선행/병용약물 조사	V	V	V	V	V
병력 및 동반질환	V				
생활습관 조사 ³		V	V	V	
임상실험실 검사 ⁴	V	V ⁵	V	V	V ¹¹
스크리닝 평가 검사 ⁶	V				
기능성 평가 검사 ⁷		V	V	V	
대상자 적합성 평가	V	V ⁸			
무작위배정		V			
IP 교부 ⁹		V	V		
IP 반납/복약순응도			V	V	
이상반응 확인			V	V	V

1: 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정하며, 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하여 측정한다. 방문 4에서는 체중만 측정한다.

2: 체온, 혈압, 맥박: 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.

3: 생활습관 조사는 방문 2, 3, 4에서 시행하며, 대상자의 흡연, 음주, 식사, 운동 습관, 카페인 섭취량에 대하여 조사한다.

4: 임상실험실 검사는 매 방문 시 실시한다.

스크리닝 시 임상실험실 결과는 2주 이내 본원에서 실시한 검사 결과를 사용할 수 있다.

방문 전 8시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식을 금기하여 공복 채혈하도록 한다.

혈액학적 검사:	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
혈액화학적 검사:	Total protein, ALT, AST, r-GT, BUN, Creatinine, glucose, Uric acid, Total cholesterol, Triglyceride, LDL cholesterol, HDL cholesterol
소변검사:	Protein, Glucose, pH, Specific gravity, WBC, RBC HCG 임신검사(대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 각 방문 시 임신여부를 확인한다)

5: 방문 1 이후 7일 이내에 방문 2를 진행한 경우 방문 2에서 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.

6: 대상자 선정을 위하여 스크리닝 시 CERAD-K 검사 검사를 실시한다.

*단, 스크리닝 4주전 CERAD-K 검사 평가결과가 있을 경우 해당 검사 결과를 사용할 수 있다.

7: ADAS-Kcog검사, 언어 유창성 검사, 전두엽 기능 검사, 노인우울척도 검사가 시행되며 0주, 12주, 24주에 실시한다.

*단, 방문 2에서 언어 유창성 검사 및 구성행동은 스크리닝 시 평가한 검사 결과로 대체할 수 있다.

8: 방문 2에 대한 선정/제외기준을 확인한다.

9: 인체적용시험용 식품 복용은 방문 다음날 아침부터 다음 방문 전날 저녁까지 복용하도록 지시한다.

10: 인체적용시험용 식품을 최종 투여 후 혹은 조기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 연구자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우나 필요에 따라 실시한다.

11. 연구자 판단 하에 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 항목만 실시한다.

4. 임상시험심사위원회(IRB)승인 및 변경

가. 임상시험심사위원회(IRB) 시험계획서 승인

DHP1402의 인지기능개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 프로토콜을 CRO기관(파마크로(주)) 및 인체적용시험 실시기관(양지병원)과 협업하여 개발하였으며, 본 연구계획서를 토대로 최초(Version 1.0)으로 IRB 승인(2015. 08. 28)을 받았음



에이지플러스 양지병원 임상시험심사위원회
H PLUS YANGJI HOSPITAL INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

[서식 14]

심사결과 통지서

과제번호	C15008			
수신	시험책임자	감석재	직위	교장
	의뢰기관	대화제약(주)		
연구과제명	경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위해 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용 시험			
	Protocol NO.	DHP1402		
심의 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			
회의소집요청일	2015년 08월 21일			
연구정보	평가대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 기타		
	성분명	산조인양유근 복합추출물		
	상품명	DHP1402		
	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 (IIT)		
용도	<input type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내허가용(MFDS) <input type="checkbox"/> 해외허가용			
심의일자	2015년 08월 28일			
제출서류목록 및 버전번호	1. 연구계획서 (Ver 1.0) 2. 대상자 설명문 및 동의서 3. 대상자 모집 문건(모집 매체) 4. 중례기록서 5. 식약처 또는 주관연구부서 승인서 6. 시험책임자의 최근 이력 또는 기타경력에 관한 문서 7. 연구계획서 요약 8. 피해보상에 관한 규약 9. 보험증 사본 10. 연구비 내역서 11. 이해상충 서약서 12. 기타(스크리닝 및 기능성 평가지, 개인정보사용동의서)			
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 08월 28일			
심의위원	양정선(의정), 김은순(부의장), 이해리(위원), 홍순재(위원), 최경석(위원), 손경은(위원), 김은희(위원)			
심의의견	예상되는 이상반응에 대한 대비를 철저히 하시어 시험 진행 바랍니다.			
<small>본 임상시험심사위원회는 국제표준화추진회의(ICH), 의약품임상시험관리기준 및 생명관리및안전예약관한법을 등 관련 법규를 준수합니다. 본 시험과 이해상충관계가 있는 위원이 있을 경우 해당 위원은 시험의 심사에서 배제 하였습니다.</small>				

임상시험심사위원회
에이지플러스양지병원



H PLUS IRB SOP
Version 2.0 (26 Feb, 2015)

나. 임상시험심사위원회(IRB) 변경심의 승인

원활한 연구수행을 위해 최초 승인된 계획서의 모든 중요 변경 사항에 대해 임상 시험심사위원회의 승인을 받은 후 진행하였으며 총 4차에 걸쳐 최종(Version 3.0)으로 IRB 변경승인을 받아 24주간 인체적용시험을 진행하였음

IRB 심의	신청일	승인일	변경사유
초기심의	2015. 08. 21	2015. 08. 28	승인
1차변경	2015. 10. 23	2015. 10. 26	연구계획서변경, 증례기록서 변경, 기타(스크리닝 평가지, 기능성 평가지)
2차변경	2015. 11. 19	2015. 11. 30	증례기록서 변경, 대상자모집 공고 안, 기타 연구간호사 추가(인체적용시험 실시기관 및 인체적용시험 관련 담당자 연락처 변경)
3차변경	2015. 12. 11	2015. 12. 21	연구계획서 변경, 동의서 설명문, 증례기록서 변경 기타(스크리닝 평가지)
위반보고 (2건)	2016. 01. 26	2016. 02. 11	R101, R102, R103 대상자 적합성 평가 전 인체적용시험용 식품 처방함. R101~R126 대상자 기능성 평가 검사 중 노인우울척도 검사 미수행
위반보고	2016. 07. 21	2016. 08. 01	2016년 05월 26일까지 진행된 R101~R162, R165, R166, R168 대상자(총 65명)의 Visit3 방문 시 2차 기능성 평가 변수 검사 항목 중 하나인 언어유창성 검사의 평가가 누락됨
4차변경	2016. 07. 21	2016. 08. 01	연구계획서 변경(Ver 3.0), 기타(의뢰자 담당자 추가 및 이메일 변경, 담당CRA 변경(인체적용시험 실시기관 및 인체적용시험 관련 담당자 연락처))

5. 인체적용시험 결과보고서

인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서 Clinical Study Report

경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을
평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Intervention Study of
the Efficacy and Safety of "DHP1402" in the Mild Cognitive Impairment Subject

양지병원

2017 년 06 월

대화제약(주)

CONFIDENTIAL

본 최종보고서와 관련된 정보는 기밀사항입니다

시험결과보고서는 대화제약(주)와 ㈜파마크로의 재산으로 기밀 서류입니다. 수용한다는 것은 공개적으로는 가용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을 보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는데 대한 동의를 의미합니다. IRB 에게는 비밀의 유지가 요구되며 또 기대됩니다. 위 회사의 동의 없이는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

CLINICAL STUDY REPORT

인체적용시험 제목 (Study Title)	경도인지장애 대상자에서 DHP1402 의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험	
인체적용시험용 제품 (Investigational Product)	산조인양유근 복합추출물 또는 대조제품(위약)	
인체적용시험 디자인 (Study Design)	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험	
인체적용시험 책임자 (Principal Investigator)	양지병원 신경과 강석재	
인체적용시험 공동연구자 (Co/Sub Investigator)	양지병원 김창오 양지병원 강승현	
인체적용시험 담당자	양지병원 윤현근 양지병원 정영임	
인체적용시험 실시기관	양지병원	서울시 관악구 남부순환로 1636
의뢰자 (Name of Sponsor)	대화제약(주) 강원도 횡성군 횡성읍 한우로 495	
의뢰자의 담당자 (Contact at Sponsor)	김동호 CRA	
IRB 승인일 (IRB Approval Date)	2015.08.28	
인체적용시험 시작일 (Study Initiation Date)	2015.11.24(First subject Screened)	
인체적용시험 종료일 (Study Completion Date)	2016.09.18(Last subject last visit)	

인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목: 경도인지장애 대상자에서 DHP1402 의 인지기능 개선 등
기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중
눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

최종 계획서번호: DHP1402(V 3.0)

인체적용시험용 제품: 산조인양유근 복합추출물


인체적용시험 의뢰자: 대화제약(주)

인체적용시험은 “의약품 임상시험 관리기준” (KGCP, 약사법 시행규칙 별표 4, 2014.08.21)을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체적용시험 보고서를 (주)대화제약에 제출하는 바입니다. 에이치플러스양지병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인 합니다.

인체적용시험 책임자

에이치플러스양지병원 신경과 과장 강 석 재

일시: 2017년 06월 23일

서명: 

인체적용시험 확인서

인체적용시험 제목: 경도인지장애 대상자에서 DHP1402 의 인지기능 개선 등
기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중
눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

최종 계획서번호: DHP1402(V 3.0)

인체적용시험용 제품: 산조인양유근 복합추출물

인체적용시험 의뢰자: 대화제약(주)

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

대화제약(주) 연구개발본부장 장준희

일시: 2019년 6월 26일

서명: 장준희

요약

인체 적용시험 제 목	경도인지장애 대상자에서 DHP1402 의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체 적용시험 책임 자	양지병원 신경과 강석재
인체 적용시험 의뢰 자	(주)대화제약
인체 적용시험 기 간	IRB 최초 승인일로부터 약 24 개월 예정
인체 적용시험 대 상	경도인지장애 증상을 가진 문맹자를 제외한 만 40 세 이상 80 세 미만의 남성 및 여성
인체 적용시험 목적	경도인지장애 증상을 가진 대상자에게 산조인양유근 복합추출물을 투여했을 때 경도인지장애 증상 개선 및 안전성을 평가하고자 하였다.
인체 적용시험 디 자 인	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용 제 품	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군: DHP1402 산조인양유근 복합추출물 • 위약군: 대조제품(위약)
용 법 · 용 량 및 복용방법	아침, 저녁 2 정씩 1 일 2 회, 하루 총 4 정을 경구 복용하였다.
복 용 기 간	24 주
대 상 자 수	총 80 예 [최종 평가가능 예수 72 예, 10% 탈락율 고려 시]
선 정 기 준	<p><u>선정기준</u> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 40세 이상 80세 미만의 남성 및 여성 2) 경도인지장애 (CERAD-K-NP 중 categorical fluency test, boston naming test, word list memory test, constructional praxis test, word list recall test, word list recognition test, constructional recall test, trail making A test 총 8개 test 중 한 개 이상의 test에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 사람)로 진단된 자 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제 외 기 준	<p><u>제외기준</u> (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 의약품, 건강기능식품 등 복용 시 알레르기 등 이상반응을 경험한 대상자 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받았거나 방문 1 기준 3개월 이내에 호르몬 대체요

- 법을 시행했거나 시행중인 대상자
- 3) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압(혈압강하제의 지속적인 복용에도 불구하고 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이고 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 경우) 대상자 또는 폐질환이 있는 대상자
 - 4) 심한 신기능 장애나 간 기능장애가 있는 대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST 중 정상 상한치 2.5배 이상)
 - 5) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우(혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160mg/dl 이상) 또는 혈소판(14만/mm³ 이하) 수치가 비정상인 대상자
 - 6) 주요 위장관 질환(위장관 질환으로 인하여 약물을 복용하고 있는 자) 혹은 주요 정신과 질환의 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자(조현병, 간질, 알코올 중독, 거식증, 이상 식욕 항진 등)
 - 7) 방문 1 기준 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험(인체적용시험)에 참여한 경험이 있는 대상자
 - 8) 방문 1 기준 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 뇌기능 개선 목적의 치료 또는 건강기능식품, 남용우려 있는 약물 투여)를 받고 있는 대상자
 - 9) 다른 질병에 의한 뇌기능 및 인지기능 저하로 판단되는 대상자
 - 10) 임신부, 수유부 및 적절한 피임방법(예를 들면 여성피임약을 제외한 호르몬 이식, 자궁내 기구, 살정제, 콘돔 등)에 동의하지 않은 가임 여성
 - 11) 인체적용시험기간 중 병용금지 약물을 복용해야 하는 대상자
 - 12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 본 연구 참여가 부적합하다고 판단되는 대상자

대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과 선정기준에 적절한 대상자에 한하여 무작위 배정하였다.

시 험 방 법

무작위 배정된 대상자는 총 24 주간 시험식품 또는 대조식품을 복용하였다.

방문 1 (-2 주~0 일)	방문 2 0 주(0 일)	방문 3 12 주(±5 일)	방문 4 24 주(±5 일)
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문
복 용			

기능성 평가 • 1차 기능성 평가 변수:

	<ul style="list-style-type: none">1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량 ADAS-Kcog 기억요인: 단어 회상 과제, 지남력, 단어 재인 과제, 검사 지시 기억• 2차 기능성 평가 변수:<ul style="list-style-type: none">- 시험군 및 대조군 12주 비교1) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량2) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량3) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량4) 방문 2(Baseline) 대비 12주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량- 시험군 및 대조군 24주 비교1) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 ADAS-Kcog 총점 변화량2) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 언어 유창성 과제(Verbal Fluency Test): 범주 유창성(Category Fluency) 변화량3) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 전두엽 기능 검사(Frontal Assessment Battery) 변화량4) 방문 2(Baseline) 대비 24주 후 노인우울척도(Geriatric Depression Screening Scale-Kr) 변화량
안전성 평가	<p>인체적용시험 식품 투여 전과 투여 중, 투여 24 주 후에 임상실험실 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.</p>
병용금지 약물	<p>인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물과 혈액희석제, 약물의 흡수, 대사 또는 배설에 영향을 줄 수 있는 약물 및 침술이나 호르몬요법, 건강기능식품(포스파티딜세린, 참당귀뿌리추출물, 피브로인효소 가수분해물, 원지추출분말, 오메가 3, 홍삼 성분 함유 제품 등 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품), 암페타민, 모든 항우울제, 고용량의 항경련제와 수면제, 항세로토닌약, 항정신병약, 아세틸콜린에스테라아제 억제제, NMDA 수용체 길항제, 항파킨슨용제, 항불안제, 콜린성약물, 항전간제 등은 본 시험기간 동안 투약할 수 없었다.</p> <p>본 시험기간 중 대상자의 사정에 의해 상기 약물을 복용 하고자 하는 경우 연구자와 상의를 하여야 하며 복용한 경우는 시험을 중단하여야 하였다. 단, 연구자 판단에 따라 연구시작 3개월 전부터 연구기간 내내 지속적으로 같은 약을 용량 변동 없이 복용하는 경우는 복용이 가능하며, 치매 치료제 약물(cholinesterase inhibitor, 항산화제, NMDA 수용체 길항제)을 복용하는 경우 시험참여 전 6개월 이상 투여하고 있으며, 4개월 이상 용법, 용량 변동 없이 안정적으로 투여를 유지하는 경우 복용이 가능하였다.</p>

결 과

본 연구는 문맹자를 제외한 만 40 세 이상 80 세 미만의 남성 및 여성을 대상으로 경도인지장애 즉, CERAD-K-NP 에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 대상자에서 24 주간 DHP1402 또는 위약을 투여하고 인지기능 개선 등에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험이다. 기능성평가 분석은 FA 군과 PP 군 모두에서 실시하여 결과를 제시하였고, 분석 결과에 대한 해석은 주 분석군인 FA 군을 중심으로 분석하였고 PP 군의 결과에 대한 해석은 FA 군의 결과와 상이한 경우에만 그 차이에 대해 분석하였다.

기능성 평가 결과, 일차 기능성 평가 변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 (V2) 대비 복용 24 주 (V4) 후 시점에서의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량이며, 대조군에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하는 것이었다. FA 분석결과, 인체적용시험용 식품 복용 전 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 9.70 ± 2.55 , 대조군의 경우 10.23 ± 1.77 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 24 주 후 시험군의 경우 5.35 ± 1.70 , 대조군의 경우 5.38 ± 1.55 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ADAS-Kcog 기억요인 점수의 각 군내 변화량은 시험군의 경우 -4.35 ± 2.99 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우도 -4.85 ± 1.66 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한 복용 후 시험군 대조군 간에 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다. FA 군 및 PP 군 분석 결과 모두에서 시험군 및 대조군의 군내 및 군간 통계적으로 의미있는 변화량의 차이를 볼 수 있었으나, 시험군에 비해 대조군에서 상대적으로 큰 변화량의 차이가 나타났으므로 시험식품의 효과를 입증하기 어려운 것으로 판단된다.

시험식품 복용 12 주 후 각 항목의 FA 분석 결과, ADAS-Kcog 총점은 복용 전 시험군의 경우 14.23 ± 3.70 , 대조군의 경우 15.44 ± 3.28 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 12 주 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 10.60 ± 3.23 , 대조군의 경우 9.28 ± 2.90 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 12 주 후 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -3.63 ± 4.06 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -6.15 ± 2.80 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고 군 간 차이도 통계적으로 유의하였다. FA 분석 결과로 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치는 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 범주 유창성 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 3.81 ± 3.15 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 2.36 ± 3.10 로 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었으나 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 전두엽 기능 검사 수치 변화량은 군내 및 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량도 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 각 군 내 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -4.48 ± 5.37 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -3.50 ± 4.21 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

시험식품 복용 24 후 각 항목의 FA 분석 결과, ADAS-Kcog 총점 수치 변화량은 복용전 시험군과 대조군 각각 14.23 ± 3.70 과 15.44 ± 3.28 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 후 시험군과 대조군 각각 8.78 ± 2.66 과 8.85 ± 2.40 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 변화량은 시험군이 -5.45 ± 3.97 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -6.59 ± 2.49 로 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의 하지 않았다. 그러나 시험식품 복용 24 후 PP 군 분석결과 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의 하였다. 복용 24 주 후 언어 유창성 과제: 범주 유창성 수치 변화량은 복용 전 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 복용 후에 시험군과 대조군 각각 군내에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 전두엽 기능 검사 수치 변화량은 복용 전 후 군내 및 군간 통계적인 차이를 보여주지 않았다. 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량은 복용 전 후 군내 비교에서 시험군 대조군 모두에서 통계적인 차이를 보여 주었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

안전성과 관련하여 인체적용시험용식품 복용 후 발생한 이상반응 및 약물유해반응에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 시험군에서 발생한 이상반응은 r-GTP 상승으로 중증도 이었으며, 음주에 의한 것으로 후유증 없이 회복되었다. 또한 인체적용시험용 식품 복용 전과 후의 활력징후 분석 결과, 실험실적 검사 결과 등에서 통계적인 차이를 보이는 항목들이 보고되었으나 대부분 정상범위 이내에서의 변화였으며 임상적인 의미를 적어 안전한 식품으로 판단된다.

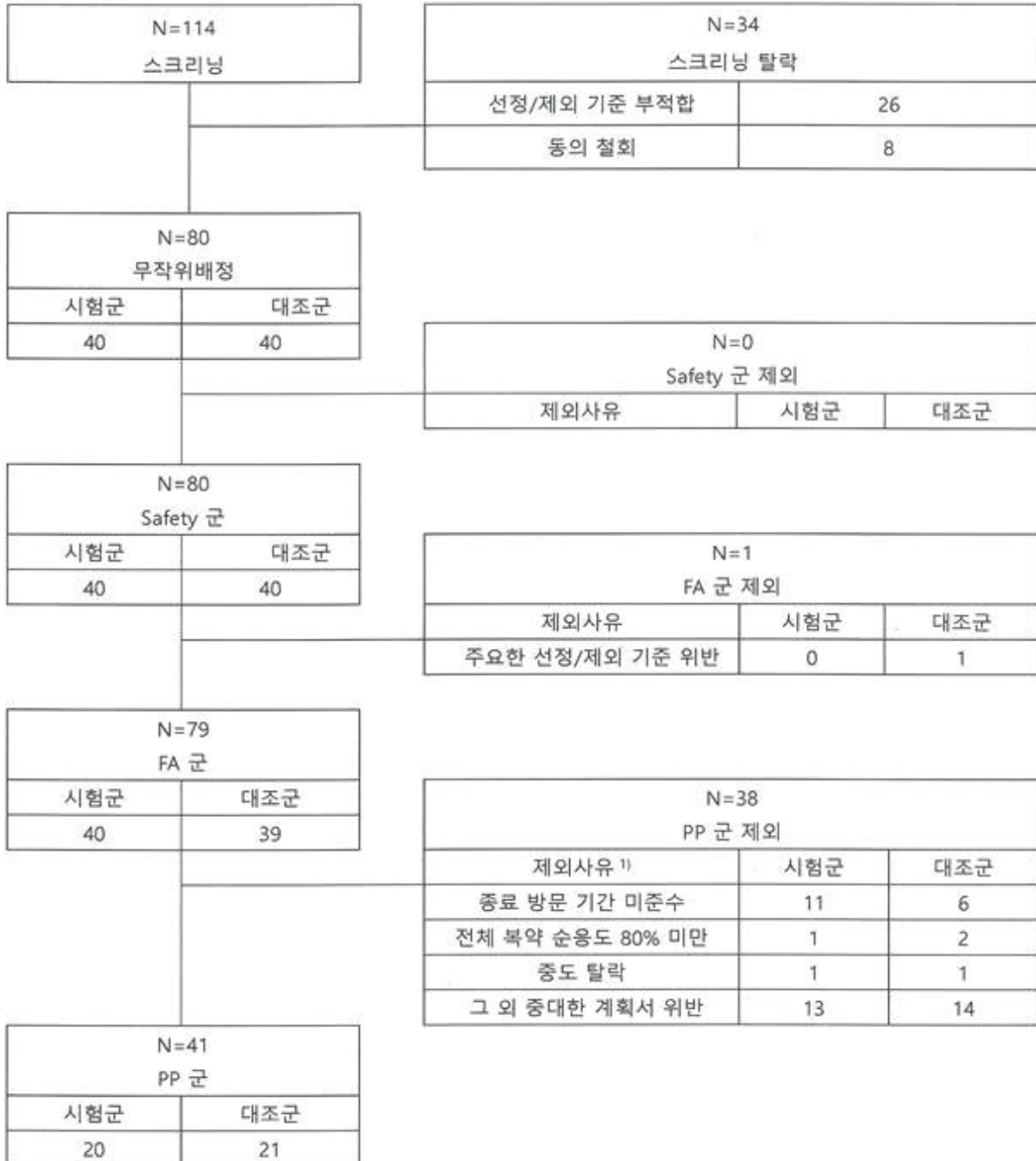
4. 인체적용시험의 분석군

4.1. 인체적용시험 대상자 참여상태

그림 1. 인체적용시험 대상자 참여 현황



그림 2. 인체적용시험 대상자의 분석군 별 참여 현황



1) 중복 집계 가능

표 2. 무작위 배정된 인체적용시험 대상자의 분석군 별 참여 현황

분석 대상군	시험군		대조군		합계	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
무작위배정	40	(100.0)	40	(100.0)	80	(100.0)
Safety 군						
포함 ¹⁾	40	(100.0)	40	(100.0)	80	(100.0)
FA 군						
포함 ¹⁾	40	(100.0)	39	(97.50)	79	(98.75)
제외 ¹⁾	0	(0.00)	1	(2.50)	1	(1.25)
주요한 선정/제외 기준 위반 ²⁾	0	(0.00)	1	(100.0)	1	(100.0)
PP 군						
포함 ¹⁾	20	(50.00)	21	(53.85)	41	(51.90)
제외 ¹⁾	20	(50.00)	18	(46.15)	38	(48.10)
종료 방문 기간 미준수 ³⁾	11	(55.00)	6	(33.33)	17	(44.74)
전체 복용 순응도 80% 미만 ³⁾	1	(5.00)	2	(11.11)	3	(7.89)
중도 탈락 ³⁾	1	(5.00)	1	(5.56)	2	(5.26)
그 외 중대한 계획서 위반 ³⁾	13	(65.00)	14	(77.78)	27	(71.05)

- 1) 각 처치군 내 무작위 배정된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산
- 2) 각 처치군 내 FA 분석군에서 제외된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산
- 3) 각 처치군 내 PP 분석군에서 제외된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산
- 4) 각 처치군 내 안전성 분석군에서 제외된 인체적용시험 대상자를 기준으로 비율 계산

5. 인체적용시험 결과(기능성)

5.1. 기능성 평가분석 방법

본 인체적용시험의 기능성평가 분석은 FA 군과 PP 군 모두에서 실시하여 결과를 제시하였고, 분석 결과에 대한 해석은 주 분석군인 FA 군을 중심으로 기술하였다. PP 군의 결과에 대한 해석은 FA 군의 결과와 상이한 경우에만 그 차이에 대해 기술하였다.

모든 기능성평가 분석은 인체적용시험용 식품 복용 전 시점으로 V2 (0 주) 그리고 인체적용시험용 식품 복용 후 시점으로 종료 시점인 V3 (무작위 배정 12 주 후) 자료를 이용하여 분석하였다. 분석은 SAS 시스템 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)로 수행하였고 기술통계량으로 연속형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N), 평균 (Mean), 표준편차 (SD), 중앙값 (Median), 최소값 (Min), 최대값 (Max), 범주형 자료의 경우 시험 대상자 수 (N)와 비율 (%)을 제시하였다. 통계적 유의성은 유의수준 5% 하에서 단측 검정으로 수행하였고, 두 군 간 차이 비교는 Independent two sample t-test 또는 Mann-Whitney U test, 각 군 내 비교는 Paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용해 검정하였다. FA 군에 한해서 종료 시점인 V4 의 유효성 자료가 부재한 경우 LOCF (Last Observation Carried Forward)를 적용해 대체하였다.

5.2. 일차 기능성 평가분석

5.2.1. Visit 2 대비 종료시점(24 주)의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량

본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 (V2) 대비 복용 24 주 (V4) 후 시점에서의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량 (ADAS-Kcog 기억요인 at V4 – ADAS-Kcog 기억요인 at V2)이며, 위약에 비해 시험약이 우월한지를 입증하는 것이었다.

표 4 에 요약된 FA 군의 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 분석 결과를 살펴보면, 인체적용시험용 식품 복용 전 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 9.70 ± 2.55 , 대조군의 경우 10.23 ± 1.77 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 인체적용시험용 식품 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 5.35 ± 1.70 , 대조군의 경우 5.38 ± 1.55 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. (기저: p -value = 0.0299, 종료: p -value = 0.3931)

각 군 내 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량은 시험군의 경우 -4.35 ± 2.99 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -4.85 ± 1.66 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (시험군: p -value = <0.0001, 대조군: p -value = <0.0001) 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (p -value = 0.0269)

표 4. Visit 2 대비 종료시점(24 주)의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량 (FA & PP 군)

ADAS-Kcog 기억요인		시험군		대조군		군간 p-value
FA 군		N=	40	N=	39	
	n	40		39		
Baseline	Mean±SD	9.70	2.55	10.23	1.77	0.0299^b
	Median	9.00		10.00		
	Min, Max	6.00	16.00	7.00	15.00	
	n	40		39		
24 weeks	Mean±SD	5.35	1.70	5.38	1.55	0.3931 ^b
	Median	5.00		5.00		
	Min, Max	3.00	12.00	2.00	10.00	
	n	40		39		
Change	Mean±SD	-4.35	2.99	-4.85	1.66	0.0269^b
	Median	-3.50		-5.00		
	Min, Max	-11.00	1.00	-9.00	-2.00	
군내 p-value		<0.0001^d		<0.0001^d		
PP 군		N=	20	N=	21	
	n	20		21		
Baseline	Mean±SD	9.00	1.52	10.14	1.46	0.0093^a
	Median	9.00		10.00		
	Min, Max	7.00	12.00	7.00	14.00	
	n	20		21		
24 weeks	Mean±SD	5.25	1.55	5.10	1.30	0.3653 ^a
	Median	5.00		5.00		
	Min, Max	3.00	8.00	2.00	8.00	
	n	20		21		
Change	Mean±SD	-3.75	1.68	-5.05	1.53	0.0068^a
	Median	-3.50		-5.00		
	Min, Max	-8.00	-1.00	-9.00	-3.00	
군내 p-value		<0.0001^c		<0.0001^c		

Change = 24 weeks - Baseline

a: Independent two-sample t-test

b: Mann-Whitney U test

c: paired t-test

d: Wilcoxon's signed rank test

6. 인체적용시험 결과(안전성)

6.1. 이상반응 요약

인체적용시험용식품 복용 후 발생한 이상반응을 표 13 에 요약하였다. 이상반응은 시험군에서 1 명 (2.50%)의 대상자에게 총 1 건이 발생하였다. 이상반응 발현에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. (p -value = 1.0000)

약물유해반응을 살펴보면, r-GTP 상승으로 시험군 1 명 (2.50%)의 대상자에서 총 1 건이 발생하였으나 후유증 없이 회복되었다. 이는 시험약물과 관련성이 적은 것으로 판단되었으며 약물유해반응에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. (p -value = 1.0000) 그 외 중대한 이상반응 대상자, 예상하지 못한 약물유해반응, 중도 탈락의 원인이 된 이상반응은 보고 되지 않았다.

시험군에서 발생한 이상반응은 r-GTP 상승으로 중증도 이었으나 음주에 의한 것으로 판단되며, 후유증 없이 회복되었다. 이상반응 처치를 살펴보면, 인체적용시험식품 복용 용량 변경 및 일시적 중단을 하였다.

표 13. 이상반응 요약 (Safety 군)

이상반응 요약	시험군		대조군		p -value
	N=40		N=40		
	n (%)	[건]	n (%)	[건]	
인체적용시험용식품 복용 이후 발생한 이상반응(TEAE)	1 (2.50)	1	0 (0.00)	0	1.0000 ^f
약물유해반응(ADR) ¹⁾	1 (2.50)	1	0 (0.00)	0	1.0000 ^f
중대한 이상반응(SAE)	0 (0.00)	0	0 (0.00)	0	—
예상하지 못한 약물유해반응(UADR) ¹⁾	0 (0.00)	0	0 (0.00)	0	—
중도탈락의 원인이 된 이상반응	0 (0.00)	0	0 (0.00)	0	—

1) 명확히 관련 있음, 관련이 있다고 생각됨, 관련 가능성이 있음, UK

e: Pearson's chi-square test

f: Fisher's exact test

7. 결과 및 고찰

본 연구는 문맹자를 제외한 만 40 세 이상 80 세 미만의 남성 및 여성을 대상으로 경도인지장애 즉, CERAD-K-NP 에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 대상자에서 24 주간 DHP1402 또는 위약을 투여하고 인지기능 개선 등에 대한 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험이다.

자발적으로 시험 참여에 동의한 114 명을 스크리닝 하여 이 중 34 명이 스크리닝 탈락되었고, 선정/제외기준에 적합한 대상자 총 80 명을 무작위배정 후 산조인양유근 추출물(산조인양유근 복합추출물로 하루 1 그램) 또는 위약을 하루 2 회 2 정씩 24 주간 복용하도록 하였다. 무작위배정을 받은 대상자 80 명은 모두 Safety 군에 포함되었으며, 80 명 중 선정/제외기준 위반으로 중도탈락 1 명이 제외되어 최종 79 명이 계획서에 따라 인체적용시험을 종료하여 FA 군으로 79 명 (시험군 40 명, 대조군 39 명)을 분석하였다. PP 군은 FA 군 포함 대상자 중 종료방문기간 미준수, 순응도 연속 80%이하, 중도탈락, 중대한 계획서 위반 등의 사유로 38 명을 제외한 총 41 명으로, 이 중 시험군은 20 명, 대조군은 21 명이었다. 인구학적 조사에서 시험 대상자의 평균 연령과 성별 모두 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며 신장, 흡연습관, 식사습관, 과거병력, 선행 약물력 등에서도 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 단, 음주습관에 대해서는 대조군이 시험군에 비해 음주를 하지 않는 대상자 비율이 높은 것으로 조사되었다.

기능성평가 분석은 FA 군과 PP 군 모두에서 실시하여 결과를 제시하였고, 분석 결과에 대한 해석은 주 분석군인 FA 군을 중심으로 분석하여 제시하였고 PP 군의 결과에 대한 해석은 FA 군의 결과와 상이한 경우에만 그 차이에 대해 분석하여 제시하였다.

본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 인체적용시험용 식품 복용 전 (V2) 대비 복용 24 주 (V4) 후 시점에서의 ADAS-Kcog 기억요인 변화량이며, 대조군에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하는 것이었다. FA 군 분석결과, 인체적용시험용 식품 복용 전 baseline 에서 ADAS-Kcog 기억요인 점수는 시험군의 경우 9.70 ± 2.55 , 대조군의 경우 10.23 ± 1.77 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었으나, 복용 24 주 후 시험군의 경우 5.35 ± 1.70 , 대조군의 경우 5.38 ± 1.55 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ADAS-Kcog 기억요인 점수의 각 군내 변화량은 시험군의 경우 -4.35 ± 2.99 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우도 -4.85 ± 1.66 로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한 복용 후 시험군과 대조군 간에 ADAS-Kcog 기억요인 점수 변화량의 군 간 차이도 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 분석되었다. 이를 종합해보았을 때, FA 군 및 PP 군 분석 결과 모두에서 시험군 및 대조군의 군내 및 군간 통계적으로 의미있는 변화량의 차이를 볼 수 있었으나, 시험군에 비해 대조군에서 상대적으로 큰 변화량의 차이가 나타났으므로 시험식품의 효과를 입증하기 어려운 것으로 판단된다. 이러한 결과는 두 군간에 시험식품 복용 전 인구학적 차이가 거의 없는 상황에서 정상인과 가까운 경도인지장애 대상자의 경우 24 주 복용 후에 수행했음에도 설문지 등에 대해 학습효과를 보인 것이 주원인으로 작용했을 것으로 추정된다. 시험식품 복용 전 측정한 ADAS-Kcog 값이 양군 간에 통계적으로 유의하게 차이가 있어 대조군에 전반적으로 유리한 상태의 대상자가 모집되었으며 또한, 음주를 하지 않는 대상자가 대조군에 많이 분포함으로써 시험 진행 중 진행된 평가에도 영향을 미쳤을 것으로 분석되었다.

본 인체적용시험의 2 차 평가변수를 살펴보면, 시험식품 복용 12 주 후 각 항목의 FA 분석 결과, ADAS-Kcog 총점은 복용 전 시험군의 경우 14.23 ± 3.70 , 대조군의 경우 15.44 ± 3.28 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 12 주 후 ADAS-Kcog 총점 수치는 시험군의 경우 10.60 ± 3.23 , 대조군의 경우 9.28 ± 2.90 으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 12 주 후 각 군 내 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -3.63 ± 4.06 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -6.15 ± 2.80 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고 두 군 간 차이도 통계적으로 유의하였다.

FA 분석 결과로 언어 유창성 과제 중 범주 유창성 수치는 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 범주 유창성 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 3.81 ± 3.15 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군에서도 2.36 ± 3.10 로 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었으며 PP 분석 결과는 시험군의 변화량이 더 큰 것으로 판단되나, 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

전두엽 기능 검사 수치 변화량은 군내 및 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량도 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 각 군 내 수치 변화량을 살펴보면, 시험군이 -4.48 ± 5.37 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -3.50 ± 4.21 로 통계적으로 유의한 차이를 보였다. PP 분석에서도 시험군에서 더 큰 차이를 보였으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

시험식품 복용 24 주 후 각 항목의 FA 분석 결과도 12 주 결과와 비슷한 양상을 보여주었다. 24 주 복용 후 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량은 복용 전 시험군과 대조군 각각 14.23 ± 3.70 과 15.44 ± 3.28 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 후 시험군과 대조군 각각 8.78 ± 2.66 과 8.85 ± 2.40 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 각 군 내 변화량은 시험군이 -5.45 ± 3.97 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군도 -6.59 ± 2.49 로 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의 하지 않았다. 그러나 시험식품 복용 24 주 후 PP 군 분석결과 ADAS-Kcog 총점 수치 변화량의 군 간 차이는 통계적으로 유의하였다. 복용 24 주 후 언어 유창성 과제 중 범주 유창성 수치 변화량은 복용 전 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 복용 후에 시험군과 대조군 각각 군내에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 전두엽 기능 검사 수치 변화량은 복용 전 후 군내 및 군간 통계적인 차이를 보여주지 않았다. 노인우울척도(GDS-Kr) 수치 변화량은 복용 전 후 군내 비교에서 시험군 대조군 모두에서 통계적인 차이를 보여 주었으나 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

선정기준인 CERAD-K-NP 의 8 개 테스트 항목 중 1 개 이상의 항목에서 연령, 성별, 교육수준 대비 1.0 SD 이상 감소한 사람이 선정되어지나 선정기준을 좀더 강화하여 평가항목 중 2 개 이상의 항목에서 선정된 대상자만을 추출하여 비교하여 보았을 때 24 주 후 시험군이 대조군에 비해 ADAS-Kcog 변화량이 높았으며, 선정 시 기억요인과 관련된 항목인 단어 목록 기억 검사, 단어 목록 회상검사, 단어 목록 재인 검사에서 1.0 SD 이상 감소되어 선정된 대상자만을 추출하여 비교하여 보았을 때 24 주 후 시험군이 대조군에 비해 ADAS-Kcog 변화량이 높았다. 또한 방문 2 에서 ADAS-Kcog 값이 평균 점수 14 점 이상인 대상자를 추출하여 비교하여 보았을 때 24 주 후 시험군이 대조군에 비해 ADAS-Kcog 변화량이 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 선정기준을 강화하고 인지능력이 정상수준보다 낮은 대상자일 수록 시험식품이

기억력 및 인지기능 개선에 좀 더 명확한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 예측할 수 있는 지표라고 할 수 있다.

안전성과 관련하여 인체적용시험용식품 복용 후 발생한 이상반응은 시험군 1 명에서 총 1 건이 발생하였다. 약물유해반응도 시험군에서 1 명의 대상자에게 총 1 건이 발생하였다. 이상반응 및 약물유해반응에 대한 군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 그 외 중대한 이상반응 대상자, 예상하지 못한 약물유해반응, 중도 탈락의 원인이 된 이상반응은 발생하지 않았다. 시험군에서 발생한 이상반응은 r-GTP 상승으로 중증도 이었으며, 시험식품에 의한 상승으로 보기 어렵고 음주에 의한 것으로 판단되며 후유증 없이 회복되었다.

인체적용시험용 식품 복용 전과 후의 활력징후 분석 결과를 살펴보면, 군 내 비교에서 체온이 시험군과 대조군 모두 0.3 도 증가하여 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 정상범위 이내에서의 변화였으며 시험시작 시점이 겨울이었고 종료되는 시점이 여름으로 계절적인 요인에 의한 변화가 더 큰 것으로 추정되며, 이 외에 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 활력징후 항목은 없었다.

실험실적 검사 결과, 인체적용시험용 식품 복용 전 두 군 간 비교에서 Platelets 가 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한, 시험군의 군내 비교에서 RBC, Hemoglobin, Hematocrit Platelets 가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 24 주 복용 후 군 내 비교 에서 RBC, Hemoglobin, Hematocrit 이 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 모두 정상범위 이내에서의 차이로 임상적으로 의미 있는 차이는 없는 것으로 판단된다. 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용 후 실험실검사 중 혈액화학 검사 결과 식품 복용 전 두 군간 비교에서 ALT, AST 가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 복용 후 두 군간 비교에서 ALT, AST, HDL cholesterol 이 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 시험군의 군 내 비교 에서 Total protein, BUN, Creatinine, Glucose, Uric acid 가 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 군 내 비교에서 Creatinine, Uric acid, Triglyceride, HDL cholesterol 이 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한, 인체적용시험용 식품 복용 전 대비 복용 후 변화량에서 Triglyceride 가 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이 외에 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 혈액화학 항목은 없었다. 실험실검사 중 소변 검사 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다. 혈액학 검사의 정상/비정상 결과는 각 군 내 및 군 간 비교에 있어 통계적으로 유의한 차이가 관찰된 항목이 없었다.

혈액화학 검사의 정상/비정상 결과 분석에서는 시험군의 군 내 비교 에서 BUN, Glucose, Uric acid 가 통계적으로 유의한 차이가 있었고 대조군의 군 내 비교에서는 Glucose, Uric acid, Triglyceride 가 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 이러한 실험실적 검사 수치의 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 대부분 정상범위 이내에서의 변화였으며 임상적으로 의미있는 결과는 없었다.

알츠하이머병 (Alzheimer's disease)은 노인에서 가장 흔하게 발생할 수 있는 신경계 퇴행성 질환이다. 경도인지장애는 정상 노화에서 알츠하이머병으로 진행되는 중간 단계의 임상적, 병리적 특성을 갖는 질환으로, Marilyn 등에 따르면 경도인지장애 환자는 정상 노인에 비하여 약 20~30%가 알츠하이머병으로 진행되는 것으로 알려져 있으므로, 알츠하이머로 진행되는 것을 예방하는 차원에서의 이 집단에 대한

조기 발견과 치료가 매우 중요하다. 본 인체적용시험에서는 산조인 양유근 복합추출물을 투여하여 확인한 동물실험 결과인 신경세포 보호 효능과 기억력 개선 효과를 확인하여 인체적용시험에서는 경도인지장애 환자를 대상으로 24 주간 DHP1402 또는 위약을 투여하고 인지기능 개선 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 하였으나, 시험약 및 위약 복용 전부터 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 대상자군이 모집되고 음주력 등에 차이를 보임으로써 대조군에서 나타난 변화량의 차이가 보다 크게 나타나는 결과를 보였다. 결과적으로, 본 인체적용시험을 진행함에 있어 무작위배정 이중맹검으로 진행 하였으나 대상자의 음주력 등에서 차이를 보이므로 향후 연구에서는 층화 설계 등을 고려 해 보아야 할 것이며, 24 주라는 다소 짧은 기간에 걸쳐 시험이 수행됨에 따라 대상자의 학습능력이 반영되어 대조군에 보다 유리한 해석이 가능한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 단, 통계적인 의미는 없지만 전두엽 기능과 관련이 깊고 의미 기억의 손상 정도에 더 영향을 받는 것으로 알려진 언어 유창성 검사에서 대조군인 위약보다 개선될 가능성을 보여주었고 노인우울척도 에서도 개선의 가능성을 보여주었다. 또한 대상자의 선정기준을 강화하여 인지기능이 더 낮은 수준을 대상으로 후속연구를 실시할 경우 시험식품의 효과에 관하여 좀 더 확실한 판단이 가능 할 것으로 판단되므로 추가 연구 설계 시 더 낮은 인지기능 기준을 고려해 볼만 할 것으로 판단된다. 한편, 인체적용시험에서도 24 주간 복용하여도 안전성 관련하여 특별한 이상반응을 보이지 않은 안전한 식품으로 판단된다.

제15절 기능성원료인정 자료 확보

1. 제출자료의 총괄 요약본

신청원료 개요

(최초, 변경*)

회 사 명		대화제약주식회사 (대표이사 :노병태, 김은석)				
영업허가(신고번호)		제조업 <input checked="" type="checkbox"/>	133-81-22322	수입업 <input type="checkbox"/>		
주소 및 연락처		* 강원도 횡성군 횡성읍 한우로 495 *(전화) 031-8039-7123 (팩스) 031-628-0290				
		담당자	(이름) 정 인 호 (연락처) 031-8039-7123			
신청 원료명		산조인 양유근 복합추출물				
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	기억력개선에 도움을 줌		
			신청 섭취량	산조인 양유근 복합추출물로서 1,000mg/		
	·기능성 추가 <input type="checkbox"/> ·섭취량 변경 <input type="checkbox"/> ·제조방법 변경 <input type="checkbox"/> ·기준규격 변경 <input type="checkbox"/> ·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 전)				
		(변경 후)				
(변경 전)						
고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/> ·섭취량 변경 <input type="checkbox"/> ·제조방법 변경 <input type="checkbox"/> ·기준규격 변경 <input type="checkbox"/> ·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>		(변경 후)			
국내제조 <input checked="" type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국		
		제조회사				
		소재지				
모듬토의 <input type="checkbox"/>	실시 날짜 :					
품목설명회 <input type="checkbox"/>	희망 날짜 :					

*(**최초**) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료
(**변경**) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
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	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니오 ■기능성분 ■지표성분		
4.3	영양성분정보자료	■예 □ 아니오		
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □ 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □ 아니오 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니오 □ 공인 시험방법 ■ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)			

연번	제출자료	제출여부	비고
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총 비소, 총 수은)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7. 안전성에 관한 자료(의사결정도 : 다)			
7.1	섭취근거 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 GLP
		3개월 반복투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 4주 반복투여독성
		유전독성시험	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 염색체이상시험
		특수독성(생식, 항원성, 면역, 발암성)	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료(논문 편) * 시험기관 :	
		<input type="checkbox"/> 유사원료(논문 편)	
8.2	동물시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료(논문 1 편) * 시험기관 : 경희대학교, 동아대학교	
		<input checked="" type="checkbox"/> 유사원료(논문 5 편)	
8.3	인체적용시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료(IRB 승인 보고서 1편, 논문 편) * 인체적용시험기관 : 에이치플러스양지병원	
		<input type="checkbox"/> 유사원료(IRB 승인 보고서 편, 논문 편)	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오	산조인 제한적 사용
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	

2. 전체 내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	산조인 양유근 복합추출물	
2. 원재료	산조인 (학명: <i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>spinosa</i> , 사용부위 : 씨앗) 양유근 (학명: <i>Codonopsis lanceolata</i> , 사용부위 : 뿌리)	
3.기능 (지표)성분	지표성분 : Spinosin, Lobetyolin	
4. 제조 공정	원재료 → 1차 추출 → 2차 추출 → 여과 → 농축 → 살균 → 분무건조 → 분쇄 및 포장 → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 미색 또는 미황색의 가루 2) 지표성분 : Spinosin 0.40 ~ 0.60% Lobetyolin 0.049 ~ 0.073% 3) 납(mg/kg) : 1.0 ppm 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1.0 ppm 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 ppm 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.5 ppm 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표)성분 시험법	자사시험방법(HPLC UV 260nm C18 column)
	규격외 (잔류농약)	식품공전 제 10. 일반시험법 4. 식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약다성분분석법에 따라 따 라 5가지 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)외 59종에 대하여 한국기능식품연구원 검사기관 시험결과 ‘불검출’ 임 을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 산조인(학명: <i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>spinosa</i> , 식품원료 제한적 사용가능)과 양유근(학명: <i>Codonopsis lanceolata</i> 식품원료 사용가능)을 복합추출 한 것으로 의사결정도 ‘나’에 해당
	섭취 근거	<인정현황 : 산조인> ◦ 국내 : ‘산조인’은 대한민국약전에 등재되어 있는 생약이 며, 「식품공전」의 제11. 별표 2 “식품에 제한적으로 사 용할 수 있는 원료”에 등재되어 있고, 식품안전정보포털 의 식품원료-식품원료목록 DB에 ‘산조인’으로 ‘산대추 씨앗’이 식품원료 제한적 사용가능한 것으로 등재됨, 또 한 전통한의서인 동의보감, 방약합편, 세의특효방, 동의수세 보원 경약전서 등에서 단방 혹은 복방으로 다수의 사용례가 있음

		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 미국 : Herbal Medicines Compendium(https://hmc.usp.org)에 <i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i> Seed (한국명: 산조인)으로 등재됨 ◦ 캐나다 : 캐나다: Health Canada(www.hc-sc.gc.ca)에 Drugs & Health Products > Natural Health Products Ingredients Database에 'Category: Approved Herbal Name'에 등재됨 <p><인정현황 : 양유근></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내 : 양유근은 대한민국 식품공전에 등재되어 있는 원재료로 식·약 공동 한약재로 등재되어 있음 ◦ '더덕(이명: 양유근)'은 국제식품규격위원회(CODEX) 국제 식품분류에 등재됨(근채류-더덕) ◦ 미국 : US National Plant Germplasm System에 등재 FDA Poisonous Plant Database "Medicinal plants of the Ainu.(GRIN #: 104856)"에 등재됨 ◦ 캐나다: Health Canada(www.hc-sc.gc.ca)에 Drugs & Health Products > Natural Health Products Ingredients Database에 'Category: Approved Herbal Name'에 등재됨 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내 : 함유식품 유동 ◦ 국외 : 함유식품 유동
	안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 안전성 정보 DB : 식품의약품안전처 및 생약 DB 검색결과 산조인 및 양유근의 대한 안전에 우려할 만한 보고사항 없음 ◦ 섭취 시 주의사항: 양유근은 혈액응고를 느리게 할 수 있어 출혈 환자는 섭취에 주의할 것(WebMD(site))
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 1,000 mg/일 - 최대안전섭취량 4,800 mg 이내/일 - 일일허용섭취량 : 4,800 mg/일(S.D Rat 중/(5,000 mg * 0.16) * 60 /10) 개체 간 전환계수 및 안전계수 10을 적용) ◦ 산조인 양유근 원물로 환산 시 8.20 g(산조인 6.83g, 양유근 1.37 g/일, 수율 12.2 %)에 해당함 ◦ 유사원료의 사용량(다류) : 산조인 20~30 g/일 ◦ 더덕 성인 1일평균섭취량: 35 g('13년 국민건강영양조사, 한국보건산업진흥원 2015) ◦ 문헌에 의한 통상섭취량

		<p>산조인: 7.5~18.75 g/일(동의보감, 경약전서) 양유근: 3~37.5 g/일(동의보감, 경약전서) ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임</p>
	인체적용시험	심각한 이상반응은 확인되지 않음(1,000 g/일 섭취 기준)
	독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 단회 및 4주 반복투여시험에서 이상반응 및 독성 나타나지 않음 - 최소치사량 5,000 mg/kg · bw 이상, 무독성량 5,000 mg/kg · bw ◦ 유전독성시험(염색체이상시험) 결과, 염색체이상 변화가 관찰되지 않았음
	기타 사항	-
	섭취 시 주의사항	◦ 양유근은 혈액응고를 느리게 할 수 있어 출혈환자는 섭취에 주의할 것(WebMD)
7. 기능성	신청 기능성	기억력개선에 도움을 줌
	신청 일일섭취량	산조인 양유근 추출물로서 1 g/일
	시험관시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 <i>in vitro</i> 연구 - MTT assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가: PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 세포 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 낮아진 것을 확인하였으며($p < 0.01$), DHP1402를 8, 40 그리고 200 µg/mL 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) 세포활성도를 증가시킴을 확인하였음 - LDH assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가: PC-12 세포주를 이용한 신경세포 보호효능 확인 시험에서 LDH 활성도가 음성대조군에서 유의적으로 높아진 것을 확인하였으며($p < 0.01$), DHP1402를 8, 40, 200 그리고 1000 µg/mL 처리 시 음성대조군에 비해 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게($p < 0.01$) LDH 활성도를 감소시킴을 확인하였음 - Acetylcholinesterase inhibition assay를 이용한 효소 저해 저해 효능 평가: 산조인 양유근 복합추출물은 아세틸콜린분해효소에 대한 $IC_{50} = 302.2$ µg/ml 정도의 효소 저해 능력을 보였음
	동물시험	○ 동물행동실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 개선 감퇴 평가

		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Y-자미로 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 스코폴라민이 투여된 치매 ICR 모델, 1일, 경구투여: 치매모델에서 변경행동력(spontaneous alternation)이 통계적으로 유의하게 감소한 반면($p < 0.05$), 산조인 양유근 복합추출물 투여는 용량 의존적으로 변경행동력을 회복시켰으며, 100 mg/kg 용량 이상에서의 투여는 통계적으로 유의한 회복을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 양성대조군으로 사용된 5 mg/kg 도네페질 투여군과 비슷한 수준을 나타냄 ◦ 수동회피실험 <ul style="list-style-type: none"> - 스코폴라민이 투여된 치매 ICR 모델, 1일, 경구투여: 수동 회피 시험에서 대조군에 비해 전기충격을 받았던 어두운 방에 들어가기까지 걸리는 시간(latency time)이 유의하게 감소된 반면 ($p < 0.05$), 산조인 양유근 복합추출물 투여는 용량 의존적으로 latency time을 증가시켰음. 100 mg/kg 용량 이상에서의 산조인 양유근 복합추출물은 통계적으로 유의한 증가를 나타내었으며($p < 0.05$), 양성대조군인 5 mg/kg 도네페질 투여군 수준까지 latency time을 회복시킴 ◦ 모리스수중미로실험 <ul style="list-style-type: none"> - 스코폴라민이 투여된 치매 ICR 모델, 5일, 훈련 전 경구투여: 모리스 수중 미로 시험에서 훈련기간 동안 음성대조군에 비해 부표에 도달하는 시간이 유의적으로 줄어들었음($p < 0.05$). 훈련이 끝난 다음날 부표를 제거한 수중미로에서의 부표가 있던 목표 사분면에서의 유영시간이 음성대조군에 비해 유의적으로 길었음 ($p < 0.05$) ○ 동물행동실험을 이용한 아밀로이드 베타 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 ◦ 수동회피 및 Y자미로 실험 및 수중미로 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 아밀로이드 베타 3μg 뇌실 내 직접투여 ICR 치매동물모델, 7일간 경구투여: DHP1402를 아밀로이드 베타로 유도한 기억력 감퇴를 수동회피실험, Y-자 미로실험 및 수중미로실험을 통해 기억력 개선 효능을 평가하였을 때 수동회피실험 및 Y-자 미로실험에서 DHP1402 200 mg/kg 농도에서 농도 의존적이고 유의적인 기억력 회복 효능을 보임을 확인하였음($p < 0.05$). 수중미로 실험에서는 훈련 기간 및 probe 실험에서 100 mg/kg 농도에서 유의적인 기억력 개선 효능이 있음을 확인하였음 ($p < 0.05$)
--	--	---

- Western blot을 이용한 기억력 개선 효능의 기전 연구
 - ICR 정상동물, 1일, 치사 전 경구투여: 웨스턴 블랏을 통해서 기억력과 관련된 분자생물학적 신호인 PKA-ERK-CREB 신호를 산조인 양유근 복합추출물은 ERK-CREB의 유의적으로 증가하였으며, ERK-CREB 신호의 상위 시그널인 PKA에서도 유의적으로 증가했음($p < 0.01$)

- 수동회피 시험을 이용한 Antagonism 연구
 - 스키폴라민이 투여된 치매 ICR 모델, 1일, 경구투여: Latency time의 감소(*, $p < 0.05$)를 유의적으로 회복하는 산조인 양유근 복합추출물의 효능이($p < 0.05$) sub-effective 용량의 NMDA 수용체 길항제 투여로 차단되었음을 확인하였음($p < 0.05$). 이는 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 개선 효능이 기억력 및 장기기억 강화와 연관이 깊은 NMDA 수용체를 경유하는 것임

- 전기생리실험을 이용한 장기기억강화LTP(Long-term potentiation)에 대한 효능 평가
 - 정상 C57/BL6 해마조직, 실험 전 2시간 약물처리: 산조인 양유근 복합추출물 30 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군 대비 유의적인 fEPSP slope의 증가를 보였음($p < 0.05$)
 - 정상 C57/BL6 해마조직, 실험 전 2시간 약물처리: 산조인 양유근 복합추출물 30 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 아밀로이드 베타 처리로 억제된 fEPSP slope의 감소에 대한 회복을 보였음($p < 0.05$)

- 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴 개선 효능에 대한 *ex vivo* 연구
 - ICR 정상동물, 1일, 치사 전 경구투여: *ex vivo* Acetylcholinesterase inhibition assay를 이용한 효소저해 저해 효능 평가: 산조인 양유근 복합추출물은 도네페질 효능에相当하게 유의적인 AChE 저해 억제 효능이(*, $p < 0.05$ vs. 대조군) 나타남을 확인되었으므로, 산조인 양유근 복합추출물의 기억력 감퇴에 대한 개선 효능이 아세틸콜린의 분해를 억제하여 나타나는 것임을 규명함

	<p>인체적용시험</p>	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 건강한 성인 중 경도인지장애 대상자(시험군: 40, 대조군:40, n=80), 1 g/일, 24주(RCT, DB) - 일차 기능성 평가변수는 인체적용시험용 식품 복용 전(V2) 대비 복용 24주(V4) 후 시점에서의 ADAS-Kcog 기억요인(단어 회상 과제, 지남력, 단어재인 과제, 검사지시 기억) 변화량을 평가하여 대조군대비 시험군의 우월성을 입증하고자 함 ◦ 결과: FA군 분석결과 인체적용시험용 식품 복용 전 후 ADAS-Kcog 기억요인 점수의 변화 - 시험군의 경우 복용 전 9.70 ± 2.55, 복용 24주 후 5.35 ± 1.70로 군내 변화량은 -4.35 ± 2.99로 통계적으로 유의적으로 감소 함($p < 0.0001$) - 대조군의 경우 복용 전 10.23 ± 1.77 복용 24주 후 5.38 ± 1.55 군내 변화량은 -4.85 ± 1.66으로 통계적으로 유의적으로 감소 함($p < 0.0001$) - 시험식품 복용 전 시험군과 대조군은 유의적인 차이가 있었으며(시험군 대비, $p < 0.0299$), 복용 24주 후 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 ADAS-Kcog 기억요인 점수의 변화량은 시험군에 비해 대조군이 유의적인 차이를 보였음(시험군대비 대비, $p < 0.0269$) - 결론: 시험군 및 대조군은 복용 전 후 군내 변화량은 모두 유의적인 감소를 보였으나 시험군에 비해 대조군에서 상대적으로 변화량의 차이가 나타났으므로 시험군이 대조군 대비 우월성을 입증하기 어려움 <p>※인체적용시험기관: 에이치플러스양지병원('15.08 ~ '16.09), 시험책임자 : 강석제</p>
	<p>기타 사항</p>	<p>-</p>

제16절 건강기능식품 기능성원료 인정

1. 기능성원료 개별인정 신청을 위한 자료 확보

가. 제출자료 범위

[건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식약처 고시 제 2016-141호, 2016.12.21.)에 따라 ‘고시되지 않은 새로운 원료’의 인정에 대한 제출 자료를 다음과 같이 준비함

• 제12조 제1항에서 정하는 제출자료

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
3. 제조방법에 관한 자료
4. 원료의 특성에 관한 자료
5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
7. 안전성에 관한 자료
8. 기능성 내용에 관한 자료
9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

DHP1402의 기능성원료 개별인정을 신청하기위해 기원 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황, 제조방법, 원료의 특성, 기능성분(지표성분)규격/시험법, 유해물질에 대한 규격/시험법, 안전성에 관한 자료(독성시험), 기능성 내용 및 그에 관한 자료(시험관시험, 동물시험, 인체적용시험), 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항, 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 등 총 10가지의 패키지 항목에 대한 자료를 확보함

나. 인체적용시험 결과

- (1) 본 연구의 목표는 기억력개선에 대한 건강기능식품 개발을 목표로 진행하였으며 이를 위해 24주간 인체적용시험을 목표대비 완료하였음
- (2) 인체적용시험에서 전체대상자인 FA군 분석결과 인체적용시험용 식품 복용 전 후의 ADAS-Kcog 기억요인 점수의 변화는 시험군의 경우 복용 전 9.70 ± 2.55 , 복용 24주 후 5.35 ± 1.70 로 군내 변화량은 -4.35 ± 2.99 로 초기대비 44.8% 기억력이 개선되었으며 통계적으로 유의성을 보였음($p < 0.0001$)
- (3) 대조군의 경우 복용 전 10.23 ± 1.77 복용 24주 후 5.38 ± 1.55 군내 변화량은 -4.85 ± 1.66 으로 통계적으로 유의적으로 감소 함($p < 0.0001$)
- (4) 시험군 및 대조군은 복용 전 후 군내 변화량은 모두 유의적인 감소를 보였으나, 시

험군에 비해 대조군에서 상대적으로 변화량의 차이가 나타났으므로 시험군이 대조군 대비 우월성을 입증하지 못하였음

다. 기능성원료 개별인정 신청

본 연구결과에 대해 기능성원료 개별인정 신청을 위한 식약처 사전상담결과 현재 개정된 규정의 기능성 인정에 부합하지 못하므로 개별인정을 받기 어려워 기능성원료 개별인정 신청을 보류하기로 결정하였으며, 환자가 아닌 정상인을 대상으로 기억력 개선에 대한 입증이 현실적으로 어려움이 있었으나 성실히 수행함

제17절 건강기능식품 제품개발

1. 건강기능식품 제품개발을 위한 제형 연구

건강기능식품 제품화를 위해 경질캡슐, 연질캡슐, 과립 등 제제연구를 진행함. 시험디자인을 통해 각 제제 별로 첨가제 사용량을 결정하였으며, 각 제제의 샘플을 제조함

가. 경질캡슐 제제연구

(1) 유당 사용량 결정

크로스카멜로오스나트륨과 경질무수규산을 고정하고 유당 사용량을 아래 시험디자인에 따라 1캡슐 당 100, 150, 200 mg사용했을 때 혼합물의 흐름성을 평가하고자 안식각을 측정함. 그 결과 유당 사용량이 높을수록 안식각이 낮았으며 유당 최소 사용량은 1캡슐 당 150 mg 이상인 것으로 확인됨

Variables(변수)	Level(수준)		
	0	-1	-2
유당 사용량 / 1캡슐	200 mg	150 mg	100 mg
크로스카멜로오스나트륨	20 mg 고정		
경질무수규산	6 mg 고정		
Response(반응)	Goal(목표)	Acceptance range(허용범위)	
혼합물의 안식각	최소	40° 이하	

원료명	#1		#2		#3	
	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	25	250	25	250	25
유당	200	20	150	15	100	10
크로스카멜로오스나트륨	20	2	20	2	20	2
경질무수규산	5	0.5	5	0.5	5	0.5

<유당 사용량 결정을 위한 시험디자인>

(2) 크로스카멜로오스나트륨 사용량 결정

크로스카멜로오스나트륨은 붕해제로 사용되며, 일반적으로 사용되는 범위가 2~6 %임을 감안하여 아래 시험디자인으로 붕해시간을 평가하여 크로스카멜로오스나트륨의 사용량을 결정하고자 하였음. 그 결과 크로스카멜로오스나트륨 20mg 이상 사용하는 것이 바람직하여 1캡슐 당 크로스카멜로오스나트륨 사용량을 30mg으로 설정함

Variables(변수)	Level(수준)		
	0	-1	-2
크로스카멜로오스나트륨	10 mg	20 mg	30 mg
유당	180 mg 고정		
경질무수규산	5 mg 고정		
Response(반응)	Goal(목표)	Acceptance range(허용범위)	
붕해시간	최소	20분 이내	

원료명	#4		#5		#6	
	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	25	250	25	250	25
유당	180	18	180	18	180	18
크로스카멜로오스나 트륨	10	1	20	2	30	3
경질무수규산	5	0.5	5	0.5	5	0.5

<크로스카멜로오스나트륨 사용량 결정을 위한 시험디자인>

(3) 경질무수규산 사용량 결정

경질무수규산은 활택제 목적으로 제제의 1 % 사용하는 것이 바람직하여 사용량 결정을 위한 시험을 진행하지 않고 캡슐 내용량의 1 %를 사용하고자 1캡슐 당 5 mg 으로 결정함

(4) 캡슐제 재질 결정

경질캡슐제의 재질은 젤라틴캡슐과 HPMC캡슐로 나뉨. 젤라틴캡슐의 경우 수분이 약 10 % 포함되어 있는데, 산조인 양유근 복합추출물 제제연구보고서(DHP1402-1)에 의하면 수분에 안정하지만 물에 매우 잘 녹기 때문에, 수분함량이 적은 HPMC 캡슐로 결정함

(5) 경질캡슐제 샘플의 제조

최종 결정된 첨가제 조성비에 따라 1000캡슐을 제조하고자, 아래 원료를 칭량 후 mini-IBC 혼합기에 넣고 10분간 혼합함. 이후 HPMC캡슐로 충전 후 성상, 질량편차, 붕해시간, 함량을 평가결과 기준에 적합하여 시험 성적서를 발행함

원료명	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	25
유당	180	18
크로스카멜로오스나트륨	30	1
경질무수산	5	0.5
HPMC캡슐	적량	적량



<생산된 DHP1402
경질캡슐제>

시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS

품명	DHP1402 경질캡슐		규격	과사기준	
제조번호	T7001	시험일자	2017.05.29	제조사	대화제약(주)
순서	시험항목 Items	기준 Specifications : (허가기준)	시험결과 Results	시험일자	시험자
1.	성상	면한 황색의 가루가 든 적갈색의 캡슐	면한 황색의 가루가 든 적갈색의 캡슐	2017.05.29	장지현
2.	확인시험(HPLC)	표준액과 주피크 유지시간 동일	표준액과 주피크 유지시간 동일	2017.05.31	장지현
3.	분해도-물	20 분 이내	13 분 12 초	2017.05.29	장지현
4.	경질(스피노신)	1 캡슐당 스피노신의 함량은 1 mg 이상	1.354 mg	2017.05.31	장지현
5.	정량(포베티유린)	1 캡슐당 포베티유린의 함량은 0.1 mg 이상	0.273 mg	2017.05.31	장지현
6.	정량편차	-10.0 - +10.0 %	-1.83 - 1.57 (0.4662 g)	2017.05.31	장지현

첨부의견 Comment					
시험기간	2017.05.29. - 2017.05.31.	확인 Checked By	승인 Approved By	판정 Decision	적합
판정일	2017.05.31.				

대화제약 주식회사
 www.dhpharm.co.kr

<경질캡슐제 시험성적서>

나. 연질캡슐 제제연구

(1) 첨가제 사용비 결정

연질캡슐 내용액에 사용되는 첨가제 중 콩기름, 백납, 팜유의 조성비를 기본으로 설정함

원료명	비율 %
콩기름	75 %
백납	2 %
팜유	23 %

(2) 1캡슐 당 주성분 사용량 결정

산조인 양유근의 용법을 고려하여 1캡슐 당 500mg, 250mg 해당량을 조제 후 상, 중, 하 액의 함량균일성을 통해 주성분 1캡슐 당 주성분 사용량을 결정하고자 하였음. 콩기름, 백납, 팜유를 10분간 혼합 후 주성분을 가해 homo-mixer로 10분간 교반함. 이후 조제물의 상, 중, 하액을 취해 함량시험법에 따라 균일성을 확인함. 그 결과 #15는 % RSD 허용범위 내에 있으나, 보다 균일한 것이 #14이기 때문에 1캡슐 당 주성분 사용량을 250mg으로 결정함

Variables(변수)	Level(수준)	
	0	-1
유당 사용량 / 1캡슐	250 mg	500 mg
Response(반응)	Goal(목표)	Acceptance range(허용범위)
조제물 균일성 %RSD	최소	4 % 이내

원료명	#14		#15	
	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	25	500	50
콩기름	562.5	56.25	375	37.5
백납	15	1.5	10	1
팜유	172.5	17.25	115	11.5

<1캡슐 당 주성분 사용량 결정을 위한 시험디자인>

(3) 연질캡슐제 샘플의 제조

#15는 % RSD 허용범위 내에 있으나, 보다 균일한 것이 #14이기 때문에 1캡슐 당 주성분 사용량을 250mg으로 결정함



<생산된 DHP1402
연질캡슐 조제물>

시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS

품명	DHP1402 연질캡슐		규격	차시기준	
제조번호	T7001	시험일자	2017.05.29	제조사	
				대화제약(주)	
순서	시험항목 Items	기준 Specifications : (비가기준)	시험결과 Results	시험일자	시험자
1	성상	연한 황색의 내용액	연한 황색의 내용액	2017.05.29	장지선
2	확인시험(HPLC)	표준액과 주피크 유지시간 동일	표준액과 주피크 유지시간 동일	2017.05.31	장지선
3	정량(스피노신)	1g당 스피노신의 함량은 1mg 이상	1.357 mg	2017.05.31	장지선
4	정량(로베타을린)	1g당 로베타을린의 함량은 0.1mg 이상	0.278 mg	2017.05.31	장지선

첨부의견 Comment				
시험기간	2017.05.29. ~ 2017.05.31.	확인 Checked By	승인 Approved By	판정 Decision
판정일	2017.05.31.			적합
대화제약 주식회사 www.dhpharm.co.kr				

<연질캡슐제 시험성적서>

다. 과립제 제제연구

(1) 과립용매 결정

습식과립에 사용될 수 있는 용매는 에탄올과 정제수임. 이를 위해 에탄올 %에 따라 습식과립을 제조하여 과립 가능성을 평가하였음. 산조인, 양유근 복합물 + 유당 + 크로스카멜로오스나트륨 + PVP k30 + 스테비올배당체를 혼합 후 정제수, 50% 에탄올, 95% 에탄올을 각각 가하면서 연합함. 연합물을 건조기에 넣고 50℃에서 8시간 동안 건조하였음. 그 결과 연합물 건조물을 확인한 결과 정제수가 포함된 샘플에서는 과립물이 녹아 대량생산에 부적합한 것으로 확인되었고, 주성분이 녹지 않은 95% 에탄올을 과립용매로 결정함

(2) 1g 중 주성분 및 유당 사용량 결정

산조인 양유근 복합물 + 유당 + 크로스카멜로오스나트륨 + PVP k30 + 스테비올배당체를 혼합 후 에탄올을 가하면서 연합함. 연합물을 건조기에 넣고 50℃에서 8시간 동안 건조 후 18mesh(1000 μm)로 정립 후 입자크기분포를 확인한 결과, #11이 좁은 입도분포를 보이기 때문에, 1 g 중 주성분 사용량은 250 mg으로, 유당 사용량은 690 g으로 결정함

Variables(변수)	Level(수준)	
	0	1
산조인 양유근 복합물	250 mg	500 mg
유당	690 mg	440 mg
Response(반응)	Goal(목표)	Acceptance range (허용범위)
입도분포도	좁은 입도분포	과립제 기준에 적합해야 함

원료명	#10		#11	
	기준량mg	사용량g	기준량mg	사용량g
산조인 양유근 복합물	500	25	250	12.5
유당	440	22	690	34.5
크로스카멜로오스나트륨	20	1	20	1
PVP k30	30	1.5	30	1.5
스테비올배당체	10	0.5	10	0.5
에탄올	적량	적량	적량	적량

<주성분과 유당 사용량 결정을 위한 시험디자인>

(3) 1g 중 크로스카멜로오스나트륨 사용량 및 pvp k30 사용량 결정

과립제이지만 봉해가 되어야 하기 때문에 통상적으로 사용하는 2 %를 사용하였음. 따라서 과립제 1g당 크로스카멜로오스나트륨 20mg으로 결정함. 결합제인 pvp k30 결정을 위해 아래와 같은 시험디자인으로 과립제를 제조한 결과, #12는 과립이 형성되지 않았고, #14는 과립크기가 크고 끈적거리 적절하지 않았음. 따라서 제조가능성 측면에서 과립제 1g 중 pvp k30 30mg을 사용량으로 결정함

Variables (변수)	Level (수준)		
	0	1	2
PVP k30	0 %	3 %	5 %
Response (반응)	Goal (목표)	Acceptance range(허용범위)	
입도분포도	좁은 입도분포	과립제 기준에 적합해야 함	

원료명	#12		#13		#14	
	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	25	250	25	250	25
유당	720	72	690	69	670	67
크로스카멜로오스나트륨	20	2	20	2	20	2
PVP k30	0	0	30	3	50	5
스테비올배당체	10	1	10	1	10	1
에탄올	적량	적량	적량	적량	적량	적량

<결합제 pvp k30 사용량 결정을 위한 시험디자인>

(4) 과립제 샘플의 제조

최종 결정된 첨가제 조성비에 따라 과립제 1000 g을 제조하고자, 아래 원료를 칭량하고 혼합 후 연합기에서 에탄올을 가하며 연합함. 연합물을 건조기에 넣고 50℃에서 8시간 건조 후 18mesh로 정립 후 과립물을 완성함. 과립물의 성상, 입자크기분포도, 함량 평가결과 기준에 적합하여 시험 성적서를 발행함

원료명	기준량 mg	사용량 g
산조인 양유근 복합물	250	250
유당	690	690
크로스카멜로오스나트륨	20	20
PVP k30	30	30
스테비올배당체	10	10
에탄올	적량	적량



<생산된 DHP1402
과립제>

시험 성적서 CERTIFICATE OF ANALYSIS

품명	DHP1402 과립제		규격	차사기준	
제조번호	T7001	시험일자	2017.05.29	제조사	대화제약(주)
순서	시험항목 Items	기준 Specifications : (허가기준)	시험결과 Results	시험일자	시험자
1	성상	연한 황색의 과립물	연한 황색의 과립물	2017.05.29	장지선
2	확인시험(HPLC)	표준액과 주피크 유지시간 동일	표준액과 주피크 유지시간 동일	2017.05.31	장지선
3	임도시험	10 호 체를 권장 통과하고 12 호 체에 남는 것은 전체량의 5 % 이하이며, 42 호 체를 통과하는 것은 전체량의 15 % 이하일 때 적합하다.	10 호 체 권장 통과 12 호 체 권장 통과 42 호 체 3 % 통과	2017.05.29	장지선
4	평량(스피노신)	1 g당 스피노신의 함량은 1 mg 이상	1.351 mg	2017.05.31	장지선
5	평량(모베티올린)	1 g당 모베티올린의 함량은 0.1 mg 이상	0.260 mg	2017.05.31	장지선

첨부의견 Comment					
시험기간	2017.05.29. ~ 2017.05.31.	확인 Checked By	승인 Approved By	판정 Decision	적합
판정일	2017.05.31.				

대화제약 주식회사
www.dhpharm.co.kr

<과립제 시험성적서>

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발 후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	10 억원
		관련제품	개발 후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	- 억원
	시장 점유율	개발제품	개발 후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : %
		관련제품	개발 후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		총 소요예산 : 1,000백만원 소재 탐색 및 복합 후보물질 도출: 200백만원 비임상시험 : 400백만원 인체적용시험: 300백만원 시험분석 및 인허가 비용: 100백만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내		5	30
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		산조인 양유근복합물 및 최적 소재 발굴을 통한 기능성식품 개발		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)			5	20
	수 출			5	10

4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
제1절 목표달성도				
구분 (년도)	수행기관	세부연구목표	연구개발 수행내용	목표의 달성도 (%)
1차년도 (2013~ 2014)	주관기관	성분 분석 및 유사도 평가 분석법 개발	○ 산조인 함유성분 분석 - 분리한 산조인 함유성분인 spinosin 및 magnoflorine, 6''-feruloylspinosin의 확인, 추출물에서 major 성분으로 나타난 3종 성분을 확인함으로써 페틴 비교 및 기준 및 시험법의 기반 마련 ○ 유사도 평가 분석법 개발 - 면산조인과 원산조인 구분에 적합한 유사도 평가 분석법 개발	100
		원료 규격 확립	○ 기준 및 시험법 설정 - 기능성분이며 지표성분인 spinosin의 함량 분석법 확립, 함량 평가 진행 - 함량기준 및 이화학적 규격 설정	100
		제조공정 연구	○ 제조방법 연구 - 산조인 추출법에 따른 수득률을 확인하여 최적의 추출공정을 확립 - 건조법에 따른 수득률 비교, 원료의 유사도 평가, 성분 함량 분석 결과를 바탕으로 건조엑스 제조법을 분무건조법으로 선정	100
		제제화 연구	○ 제제개발 및 제조방법 확립 - 원료의 물리적·화학적 특성 연구 - Preformulation 진행 ○ 첨가제 screening - 산조인 추출원료의 특성을 감안하여 다종의 첨가제를 탐색	100
		비임상 독성시험	○ '식품의약품안전처' 면담 및 비임상 독성시험 항목 결정	100
	협동기관	유효 활성물질 분리 및 분석	○ 산조인 에탄올 추출물의 용매분획물 제조 및 물질 분리 - 산조인 에탄올 추출물을 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 분획하여 각각	100

			<p>분획물을 획득</p> <ul style="list-style-type: none"> - 부탄올 분획물을 column chromatography를 사용하여 spinosin을 분리 - 분리된 화합물은 분광학적 데이터를 통하여 구조동정 및 성분 확인 	
		<p>건망증 모델에서 유효 활성성분의 기억력 개선 효능 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 스키폴라민을 이용하여 기억력을 감퇴시킨 건망증 동물 모델에서 산조인 유효성분인 스피노신의 기억력 개선 효능 확인 - Y자 미로 시험: 스피노신이 스키폴라민으로 감소한 변경 행동력 (spontaneous alternation)을 증가시킴을 확인 - 모리스 수중미로 실험: 스피노신의 투여로 스키폴라민 유도 건망증 모델에서 기억력 보호 효과 확인 ○ 스피노신의 정상 동물에서의 기억력 증강 효능 확인 - 수동 회피 시험: 스피노신의 투여로 정상 동물에 비해 수동 회피 시험에서의 머무름 시간(latency time)이 증가함으로 기억력 증진 확인 	100
2차년도 (2014~2015)	주관기관	<p>성분 분석 및 유사도 평가 분석법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양유근 함유성분 분석 - 분리된 양유근 함유성분인 lobetyolin의 확인, 패턴 비교 및 기준 및 시험법의 기반 마련 ○ 유사도 평가 분석법 개발 - 양유근과 사삼 구분에 적합한 유사도 평가 분석법 개발 	100
		<p>제제화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 첨가제 screening - 흡수율을 향상시킬 장용용제, 부형제, 결합제 등 첨가제에 따른 적합성 평가를 통한 최적의 첨가제 선별 ○ 제형 결정 ○ 제제개발 및 제조방법 확립 - Preformulation과 붕해시간, 마손도, 용 	100

			출출, 함량 등을 고려하여 최적의 방법을 선정	
		원료 규격 확립	○ 기준 및 시험법 설정 - Spinosin 외 산조인 양유근 복합추출물의 지표성분인 lobetyolin의 함량 분석법 확립 - 함량 기준 및 규격 설정	100
		제조 공정 확립	○ 산조인 양유근 복합추출물 원료 최적 추출공정 확립 - 원료조성비, 시간, 용매 양에 따른 최적 추출공정 확립 ○ 제조법 Scale-up 실시 ○ 전체 공정도 완성 - 공정단계별 반응조건 연구 ○ 인체적용시험을 위한 원료를 bGMP시설에서 3 Lot 생산	100
		비임상 독성시험	○ 설치류 단회투여독성시험 ○ 복귀돌연변이 시험 ○ 설치류 4주 DRF 반복투여독성시험	100
		양유근 추출물의 <i>in vitro</i> 연구	○ 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vitro</i> 연구 - MTT assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가 - LDH assay를 이용한 신경세포 보호 효능 평가	100
		복합추출물에 대한 <i>in vitro</i> 연구	○ 추출물의 신경세포 보호 효과확인 - MTT assay를 이용하여 아밀로이드 베타 처리 유도 독성에 대한 신경세포 보호 효과 - LDH assay를 이용하여 밀로이드 베타 처리 유도 독성에 대한 신경세포 보호 효과	100
		인체적용시험	○ 인체적용시험을 위한 CRO 기관선정 ○ 기능성식품 임상시험센터와 연계하여 24주간 인체적용시험 실시	100
협동기관		유효 활성물질 분리 및 구조동정	○ 산조인으로부터 유효활성물질의 분리 및 구조동정 - 부탄올 분획물을 column chromatography를 사용하여 isospinosin, 6''-feruloyl spinosin,	100

			<p>nicotiflorine, magnoflorine, jujuboside A, Jujuboside B를 분리</p> <ul style="list-style-type: none"> - 분리된 화합물의 구조는 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정 ○ 양유근 50% 에탄올 추출물로부터 Tangshenoside를 분리 - 분리된 화합물의 구조는 분광학적 데이터와의 비교분석을 통하여 동정 	
		치매 모델에서 유효 활성성분의 기억력 개선 효능 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효활성성분인 spinosin과 spinosin의 체내 대사체인 swertisin 및 산조인의 다른 함유성분 magniflorine, jujuboside A, jujuboside B의 기억력 개선 효능 평가 	100
		치매모델에서 유효 활성성분의 뇌신경 세포 보호 및 기억력 개선효능 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 치매의 원인 중 하나로 알려진 베타 아밀로이드 단백질을 투여한 치매 모델에서 산조인 유효성분의 기억력 개선 및 아밀로이드 베타 처리 유도 독성에 대한 뇌신경세포 보호 효과를 확인함 	100
		유효 활성성분의 기억력 개선효능 기전 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효활성성분의 기억력 개선효능 기전 규명 - 유효활성성분인 Spinosin의 투여로 기억력과 관련된 ERK-CREB 신호의 활성화를 유도함 - Spinosin의 기억력개선 효능이 5HT-1A 수용체의 경유를 통하여 나타나는 것을 확인함 	100
		양유근 추출물의 기억력 개선 관련 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양유근 추출물의 인지능력 개선 효능에 대한 <i>in vivo</i> 연구 - 수동회피실험을 이용한 scopolamine 투여 유도 기억력 감퇴 개선 평가 	100
		산조인 양유근 (DHP1402) 병용투여에 의한 기억력 개선효능 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 스코폴라민 유도 치매 동물모델에서 최적의 효능을 갖는 원료 조성비 탐색 - 수동회피시험 - Y자 미로 시험 ○ 스코폴라민 유도 치매 동물모델 및 베타 아밀로이드 유도 치매 동물모델에서 행동실험을 이용한 DHP1402의 기억력 개 	100

			<ul style="list-style-type: none"> 선 효능 확인 - 수동회피시험 - Y자 미로 시험 	
3차년도 (2015~ 2016)	주관기관	원료 규격 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 종 구분을 위한 DNA 분자 표지 개발 - 원산조인과 면산조인 종 구분을 위한 DNA 분자표지 개발 - 양유근과 사삼 종 구분을 위한 DNA 분자 표지 개발 	100
		제제화 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형 결정 ○ 복용편의성, 안정성을 고려한 제형 개발 	100
		대량생산 제조 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전체공정도 완성 - 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건 연구 ○ 완제 대량생산 - bGMP시설에서 생산 - 완제의 기준 및 시험법 설정 및 관리 ○ 인체적용시험용 완제 생산 	100
		원료 및 완제 안정성 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장기보존(25±2℃ 60±5% RH) 보관조건에서의 안정성 연구 	100
		인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험을 위한 프로토콜 개발, ○ 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 24주간 인체적용시험 진행 	100
		기능성 원료 인정 자료 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성분에 대한 규격 및 시험 ○ 기능성내용에 관한 시험 	100
	협동기관	스코폴라민 유도 치매 모델에서의 기억력 개선 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 모리스 수중 미로 시험을 통한 장기기억 및 공간기억력 개선 평가 	100
		베타아밀로 이드 단백질 유도 치매 모델에서의 기억력 개선 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 모리스 수중 미로 시험을 통한 장기기억 및 공간기억력 개선 평가 	100
		기억력 개선 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ DHP1402의 기억력 개선 기전 규명 - 기억력 관련 인자인 PKA-ERK-CREB 신호의 활성화를 유도함 	100

			<ul style="list-style-type: none"> - 장기기억강화와 관련이 깊은 NMDA 수용체를 경유하여 기억력 개선효능이 나타남을 확인함 - Acetylcholinesterase를 저해하여 기억력 감퇴를 억제하여 기억력과 관련된 신경전달물질인 Acetylcholine의 분해를 저해함 - 3가지 기전의 복합 작용으로 나타나는 DHP1402의 기억력 개선기전 규명 	
		양유근의 성분 분리 및 구조 동정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양유근 유래 지표성분인 lobetyolin을 포함한 다양한 유효활성성분 분리 및 구조동정 	100
4차년도 (2016~ 2017)	주관기관	대량생산 제조공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제조방법 Scale-up 실시 - DHP1402의 최종 확립된 공정도에 따라 원료 대량생산 - 각 제조공정별 기준 규격 확립 	100
		안정성 연구 및 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ DHP1402의 원료 및 완제 안정성 연구 - 원료 및 완제의 유통기한 확보를 위한 장기보존 안정성 연구(25±2℃, 60±5% RH) - DHP1402의 24개월 확보(지표성분 함량, 중금속, 잔류농약, 대장균군)등 분석 ○ 제제 및 제형연구 - 복용 편의성과 안정성을 고려한 제제 및 신제형 연구 	100
		효능 및 작용기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ DHP1402의 신경세포 보호효능 및 기억력 개선효능 평가 - MTT assay를 이용하여 아밀로이드 베타 처리 유도 독성에 대한 신경세포 보호 효과 - LDH assay를 이용하여 아밀로이드 베타 처리 유도 독성에 대한 신경세포 보호 효과시험을 통한 작용기전 연구 - 기억력 감퇴 동물모델에서 새로운 물체 인식 실험을 이용한 기억력 개선효능 연구 ○ 시냅스 장기강화(LTP) 효능 및 기전 연구를 통한 DHP1402 기억력 개선 효능 및 기전 규명 	100

			<ul style="list-style-type: none"> - 치매 모델의 해마에서 학습 및 기억의 세포 기전인 시냅스 장기강화(synaptic long-term potentiation, LTP)에 미치는 효능을 연구 	
		인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체적용시험 진행 및 완료 - 경도인지장애 대상자에서 DHP1402의 인지기능개선 등 기능성 및 안전성 평가 - 대상자 수 및 복용기간: 80명, 24주간(6개월) 복용 - 1차 기능성 평가: Baseline 대비 24주 후 ADAS-Kcog 기억요인 변화량 평가 - 2차 기능성 평가: 시험군 및 대조군 비교 Baseline 대비 12주 및 24주 후 ADAS-Kcog 총점, 언어유창성, 전두엽 기능, 노인우울척도 변화량 평가 - 안전성 평가: 인체적용시험 식품 투여 전과 투여 중, 24주 후 이상반응 평가 - 통계분석 Safety군, FAS(full analysis)군, PP(Per Protocol) 및 보고서 작성 	100
		건강기능식품 기능성 원료 인정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성원료 개별인정 신청 및 승인 - 원료의 기준규격, 안전성, 기능성 자료 등 개별인정 신청 패키지 자료 확보 	90
		건강기능식품 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ DHP1402를 이용한 제품개발 - 소비자의 나이, 복용편의성 등을 고려한 제제 제형화 연구 - 경질 캡슐, 연질캡슐, 과립제 제제 개발 	90

제2절 관련분야 기여도

가. 기술적 측면

가. 국내 자생 식물자원을 활용한 건강기능식품 개발

(1) 건강기능식품 소재 발굴

산조인 및 양유근의 국내 자생 식물자원을 활용하여 과학적이고 체계적인 연구를 통한 기억력개선 예방 또는 치료용 소재에 대한 우수성을 입증하여 기능성건강식품 개발의 가능성을 제시함

(2) 식품소재의 표준화 규격화

(가) 국내산 농산물의 생리활성 성분을 규명하고 특정성분을 표준화 규격화 및 제조 공정을 확립하고 원료에 대한 기준규격을 확립하여 기능성소재의 철저한 품질 관리 기준을 마련함

(나) 원생약에 대한 유사도 평가 분석법 및 DNA유전자감별법 개발을 통하여 소재에 대한 특이적으로 발현하는 유전자마커를 확인하여 유사종과의 혼입과 오용을 방지하는 연구기법을 개발함으로써 타 연구에도 활용할 기준을 제시함

나. 기억력 개선 모델 확립 및 안전성 확보

(1) 기억력 개선 모델 확립

추출물 및 생리활성물질에 대한 시험관내 시험과 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 효능평가를 통해 과학적이고 체계적인 연구를 수행하여 기억력개선의 작용기전과 효능을 규명함으로써 기억력 개선 효능의 생물학적 활성검증 체계 마련 및 효능 검색 모델을 마련함

(2) 안전성 확보

소재에 대한 장기간 반복경구투여독성시험과 유전독성시험을 통하여 물질에 대한 유해성을 평가하고 안전성을 확보하여 타 연구에 활용 가능함

다. 인체적용시험을 통한 기능성 및 안전성 확보

(1) 인지기능개선 인체적용 프로토콜 확립 및 인체적용시험

소재에 대한 인체적용시험을 통하여 인지기능개선의 유효성과 안전성 평가하기 위한 프로토콜을 확립하였으며, 인체적용시험을 통한 인지기능 개선에 대한 효능을 입증하였으며 인체적용시험에 대한 기준을 제시함

나. 경제·산업적 측면

가. 실용화 산업화 방안

- (1) 기억력 개선 건강기능식품 시장 진출
천연물인 산조인 양유근의 추출물 및 유효 활성성분을 이용한 기억력 개선에 효능을 가진 기억력 개선용 건강기능식품을 개발로 현재 홍삼을 중심으로 원지 및 피브로인 효소가수분해물 등으로 형성된 기억력 개선 건강기능식품개발
- (2) 치매치료제 병용 건강기능식품
기존의 치매 치료제와 병용을 통한, 치료제의 용법 및 용량을 변경함으로 치료제의 심각한 부작용에 대한 환자들의 부담 경감
- (3) 치매 예방 건강기능식품
치매가 발병하고 복용하는 치료제가 아니라, 고령자를 대상으로 예방을 위해 사전 복용함으로, 기존 치매 환자뿐 아니라 치매 발병 고위험자들을 대상으로 시장이 형성됨
- (4) 건강기능식품 개발을 통한 농가소득 확대 및 우수한 품질 확보
산조인 양유근은 우리나라를 중심으로 중국, 북한 등을 중심으로 재배되는 약용식물로 상대적으로 중국산 한약 및 원료식물에 비해 안전하고 고품질로 알려진 국내산 재배를 도모하고, 상품화함으로써 농가소득에 효과를 가지며, 제품의 우수한 품질도 확보할 수 있음

나. 국민건강

- (1) 의료비 지출 경감
건강기능식품 섭취를 통한 치매의 질환의 예방으로 고령화 사회에서 기하급수적으로 늘어가는 의료비를 억제하고 나아가 국민건강유지 및 증진을 할 수 있어 국가경제에 크게 기여함
- (2) 삶의 질 향상
고령화 사회 진입에 따라 경도인지장애, 알츠하이머성 치매, 파킨슨질환 등 퇴행성 뇌질환이 증가하고 있으며 본 소재를 통한 예방 및 치료제 개발에 대한 기틀을 마련하였으며 사회경제적 비용 감소와 국민건강과 삶의 질 향상에 기여함

다. 농가소득 증대

- (1) 농가소득 증대
산조인 양유근을 활용한 건강기능식품 및 의약품 개발에 따른 약용작물 재배로 농가의 소득증대 뿐만 아니라 특화된 지역경제의 활성화에 기여함

5장 연구결과와 활용계획

코드번호	D-07
------	------

제1절 연구결과 활용 방안

1. 원생약의 표준화 규격화 활용

가. 원생약의 기원과 종 구분을 위해 성분프로파일링 및 DNA 유전자 분석법을 이용한 신규소재의 표준화 규격화 연구에 활용함

2. 기 확립한 기억력 개선 효능의 생물학적 활성 검증 체계를 통한 신소재 탐색

가. 확립된 활성검증법을 활용하여 효능과 안전성이 확보된 기억력 개선 신규소재 천연물 후보물질 탐색

나. 기억력 개선 소재 발굴을 위해 산조인 양유근 유효 활성성분 및 유도체 등을 이용한 지속적인 기억력 개선 효능연구 및 물질탐색

다. 산조인 양유근 추출물 및 유효 활성성분의 흡수율 증진을 통해 생체이용률을 높인 보다 우수한 새로운 건강기능식품으로의 후보물질을 탐색

3. 기억력개선 건강기능식품 개발

가. 기존에 확보한 연구결과와 신규 소재 개발 및 인체적용시험 프로토콜 개선을 통한 유효성 및 안전성을 입증한 기능성원료 및 건강기능식품 개발

4. 후속 건강기능식품 개발

가. 산조인 양유근을 활용하여 미국이나 일본 등에서 오래전부터 기억력 감퇴 예방과 치매개선에 효능이 있는 안전한 건강기능식품으로 알려진 포스파티딜세린 및 DHA, GABA, 은행잎 추출물 등과 고시형원료와 함께 시너지 효능을 나타내는 복합제 효능 연구 및 제제 포뮬레이션을 통한 제품 개발

나. 본 연구를 통하여 개발한 시제품의 제형인 정제, 경질캡슐, 연질캡슐, 과립제 등을 이용하여 향후 제품화 시 복용편의성을 고려한 제품 개발

5. 지식재산권 확보를 통한 산업화 추진

가. 본 연구를 통하여 확보한 SCI급 논문 6편 및 지식재산권 국내 출원 2건, 등록 1건 및 PCT 출원 2건, 해외출원 미국, 유럽, 일본, 중국 4건 등 출원한 특허를 등록하여 지식재산권과 연구논문을 활용한 산조인 양유근을 이용한 기능식품개발과 신규 소재 탐색 및 복합소재를 발굴하여 건강기능식품 제품개발 시 본 지식재산권을 활용하고자 함

6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

7장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
○ 해당사항 없음								

9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

제1절 안전조치 이행실적

1. 주관기관: 대화제약(주)

가. 실험실 안전 점검

안전조치 이행실적	내용	비고
안전교육	연구실 안전법에 제 18조제1항, 제2항 및 제3항(교육, 훈련)에 의거하여, 연구활동 종사자의 정기교육(반기별6시간 이상), 신규교육(8시간이상)을 실시 중	
일상점검	일반안전, 소방안전, 전기안전, 기뢰안전, 화공안전, 가스안전, 위생안전 등 1일 1회 일상점검 실시	
연구실 정기점검	2017년도 3월 (주)누리 & 소방 전기 안전업체로부터 정밀안전진단(정기점검내용을 포함)을 실시하였으며, 2018년도 정기점검 진행 예정	
연구실 정밀안전진단	2017년도 3월 (주) 누리 & 소방 전기 안전업체로부터 정밀안전진단을 실시하여, 2019년도 진행 예정(2년마다 1회 이상 실시 중)	
연구활동종사자 건강검진	연구실 안전법 제18조 제4항 및 제5항에 의거하여, 서울연세e의원에서 2017년 6월 건강검진 및 특수건강검진 실시	
안전관리규정의 작성 및 준수	연구실 안전법 제 6조에 의거하여, 대화제약 판교연구소 안전관리규정 및 LMO 규정 SOP 구축	
연구실 책임자	연구실 안전법 제4조 5항에 의거하여, 대화제약 연구실 책임자 지정	

나. 실험실 안전수칙

분야	내용	비고
연구실 폐기물 처리	유기용매 폐기물은 용매종류에 따라 별도로 수집, 고형폐기물은 종류별로 분류 배출, 감염성 폐기물은 연구실에서 멸균처리 후 전문 폐기업체에 위탁 처리	
구급용품의 비치	응급처치를 위한 구급함 비치	
시약 등의 관리	유해등급별로 별도 보관함에 보관	
안전시설	유독성 가스 노출을 최소화하기 위한 전용 배기장치, 화재와 폭발을 대비한 소화설비 비치	
안전보호구 설치 및 운영	안전샤워장치 설치, 방독마스크 및 장갑 등 안전장비 착용 후 실험 실시, 실험복 착용	
기타 사항	실험실내 음식물 반입 및 섭취 금지	

실험실 안전수칙



1. 실험실은 항상 정리정돈하고 바닥에 물이 고여있지 않도록 관리한다.
2. 실험복장은 단정하게 하고 장신구 및 콘택트렌즈 착용은 지양한다.
3. 실험실 내에서 취식, 취사, 흡연하지 않는다.
4. 화학물질로부터 신체를 보호하기 위해 보안경, 실험복, 보호장갑 등 안전보호구를 반드시 착용한다.
5. 화학물질의 냄새를 맡거나 맛을 보는 행동은 하지 말고, 부득이 냄새를 맡아야 할 경우 코가 있는 방향으로 증기를 날려서 맡는다.
6. 사용하는 화학물질과 고압가스의 물질안전보건자료(MSDS)를 충분히 숙지하고 실험한다.
7. 인화성 및 독성 화학물질은 흡후드 안에서 사용한다.
8. 시험관 등의 기자재는 사람의 얼굴로 향하지 않도록 주의한다.
9. 고압가스 용기는 반드시 고정거치대에 묶고 적절한 온도에서 보관하며, 가스가 누출되는지 수시로 점검하고 용기에 충격을 주지 않는다.
10. 제조한 시약병과 폐액용기는 반드시 명칭을 기록한 라벨을 부착한다.
11. 깨어진 유리조각이나 바닥에 흘린 화학물질은 즉시 제거한다.
12. 화학물질 누출 시 응급 조치할 수 있는 대응방안과 안전장비의 위치 및 사용방법 등을 비치, 숙지한다.
13. 모든 안전사고 및 화재사고는 즉시 신고하여 사고처리에 최대한 협조한다.

- 위 안전수칙을 숙지한 경우 입실이 가능합니다 -

<대화제약 연구소 내 실험실 안전수칙>

2. 협동기관: 경희대학교

가. 실험실 안전 점검 체계

구분	세부내용
일일안전 점검	점검횟수: 매일 1회 점검대상: 전체 실험 실습실 점검내용: 일일안전점검표를 이용해 실험 전·후 시약관리상태 및 정리정돈 점검 점검자: 연구활동종사자 및 연구실 책임자 주관: 연구실 책임자(주임교수)
정기안전 진단	점검횟수: 연 1회 이상 점검대상: 전체 실험 실습실 점검내용: 8개 분야 점검(일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전) 점검자: 안전진단 전문업체 위탁 주관: 사무처 관리팀
정밀안전 진단	점검횟수: 2년 1회 점검대상: 정기안전진단에 따른 1~5등급 실험실 중 위험성이 높다고 판단되는 실험실(유해화학물질 및 독성가스 취급, 위험등급이 높은 실험실 등) 점검내용: 8개분야 점검(일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전) 점검자: 안전진단 전문업체 위탁 주관: 사무처 관리팀
안전순찰	점검횟수: 상시 또는 필요시 점검대상: 전체 실험 실습실 점검내용: 연구실 관리상태 및 일일안전점검표, 퇴실체크리스트 작성여부 점검, 위험기구 사용여부 확인 점검자: 연구실 책임자(주임교수) 또는 연구실 안전환경관리자(사무처 관리팀)

나. 교육 훈련

- (1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
- (2) 홈페이지 명칭 : 경희대학교 안전정보망(<http://safety.khu.ac.kr/>)
- (3) 교육대상 : 실험 및 실습에 참여하는 모든 연구활동종사자(학부생, 대학원생, 수료생, 기타연구원 등)
- (4) 교육 이수시간 : 반기별 6시간 이상(온라인교육, 집체교육)

(5) 교육내용

- (가) 온라인 안전교육: 12과목(1학기: 공통 6과목 / 2학기: 선택 6과목)
- (나) 집체교육: 1회 이상(안전환경관리자가 집체교육이 필요하다고 판단되는 경우)
- (다) 과목 : 연구실 안전법 및 규정, 안전과 심리, 캠퍼스 안전, 전기안전, 화재 및 소방안전, 사고대응 및 처리, 기계안전, 가스안전, 화학안전, 방사성안전, 생물학안전, 연구실 관리와 MSDS, 연구실 사고대처, 연구실 사고 예방, 화재로 인한 신체 피해, 화재 및 폭발

(6) 진행사항

- (가) 교육대상자외의 기타 연구원 및 교육수강 희망자는 홈페이지에서 등록 후 수강 가능
- (나) 이수증 발급 후 제출
 - ① 온라인 안전교육 수강 후에 평가시험을 실시하여 60점 이상은 교육 이수증 발급
 - ② 발급받은 이수증은 2부를 출력하여 1부는 출입 실험실에 게시 및 보관하고, 다른 1부는 소속 행정실에서 모두 취합하여 관리팀으로 제출하여야 함

(7) 실험실 안전환경교육 미 이수자 조치사항

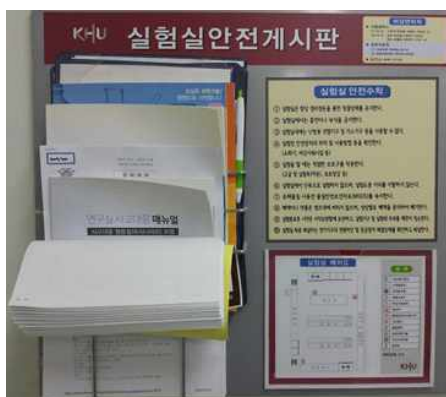
- (가) 장학금의 미배정 및 불이익
- (나) 지도교수의 개별 면담
- (다) 안전사고에 대한 보험처리 불이익

다. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
화재보험	경희대학교 전체 화재보험 가입 되어 있음		사무처 총무팀
학생단체 상해보험			학생지원처 학생지원과
연구실 안전공제	○ 사망, 후유장해 : 1억원 ○ 부상 : 1천만원 ※ 연구·실험실에서 일어난 연구활동종사자의 과실 사고까지도 보장	학부생, 대학원생, 수료생	사무처 관리팀
고가장비 보험	○ 고가장비에 대한 특약사항 보험가입 ○ 자연재해 및 화재, 폭발사고로 인한 장비 훼손 ○ 감가상각 및 취득원가에 따라 손실비용 보상	연구실 고가장비 (구입후 5년 이내, 취득원가 1억 이상	사무처 총무팀

라. 안전조치

구분	내용
연구활동종사자 일반 및 특수건강검진	○ 실험실별 사용 유해인자에 따른 건강검진 실시
실험실 환경안전지침	○ 교내 내규(실험실 안전관리 지침, 안전관리 규정)를 준수하며 실험실내 비치
고압가스 안전관리	○ 가스용기 거치대 설치 ○ 가스누설경보장치 설치
화학약품보관함 설치	○ 위험물 보관함, 산부식성물질보관함, 환기형시약장 등 설치
폐액 및 폐시약 관리	○ 실험실 클린데이 - 실험실내 불필요 시약에 대한 일괄 폐기(학기당 1회) ○ 폐액갈대기 - 폐액에서 휘발하는 증기의 위험성을 없애고, 폐액누수를 최소화 ○ 화학약품 누출대응장비 비치
화학약품에 의한 응급조치	○ 비상샤워기 및 아이샤워기 설치 ○ 응급구급함 비치
흡후드 및 블로워 보수	○ 흡후드의 제어풍속이 법정 기준치에 미달되는 설비를 보수하여 쾌적한 연구공간을 유지(포위식 포위형 - 0.4m/s 이상)
시약관리	○ 시약장 가이드바 설치 ○ 시약의 위험성 및 특성에 따른 분류 스티커 부착
실험실 안전게시판 설치	○ 교내 비상연락망 및 실험실 배치도를 통해 유사시 신속히 대응할 수 있도록 비치



실험실 안전수칙

- ① 실험실은 항상 정리정돈을 통한 청결상태를 유지한다.
- ② 실험실에서는 흡연이나 숙식을 금지한다.
- ③ 실험실내에는 난방용 전열기구 및 가스기구 등을 사용할 수 없다.
- ④ 실험전 안전장치의 위치 및 사용방법 등을 확인한다.
(소화기, 비상사위시설 등)
- ⑤ 실험을 할 때는 적절한 보호구를 착용한다.
(고글 및 실험복(까운), 보호장갑 등)
- ⑥ 실험실에서 단독으로 실험하지 않으며, 실험도중 자리를 이탈하지 않는다.
- ⑦ 유해물질 사용전 물질안전보건자료(MSDS)를 숙지한다.
- ⑧ 폐액이나 약품은 싱크대에 버리지 않으며, 성상별로 폐액을 분리하여 폐기한다.
- ⑨ 실험종료후 시약은 시약보관함에 보관하고, 실험기구 및 실험대 주위를 깨끗이 청소한다.
- ⑩ 실험실 최종 퇴실자는 전기기구의 전원차단 및 잠금장치 체결상태를 확인하고 퇴실한다.

<경희대학교 실험실 안전수칙>

10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/ 특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	플라본-6-C-글루코스 유도체를 유효성분으로 함유하는 신경정신질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물	대화제약	출원인	대한민국 출원	-	2013.08.14	단독	10-2013-0096493
2	특허	플라본-6-C-글루코스 유도체를 유효성분으로 함유하는 신경정신질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물	대화제약	출원인	PCT 출원	-	2014.08.14	단독	PCT/KR2014/007569
3	특허	인지기능장애 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	대화제약/ 경희대학교	출원인	대한민국 출원	-	2015.09.18	단독	10-2015-0132400
4	특허	인지기능장애 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	대화제약/ 경희대학교	출원인	PCT 출원	-	2016.09.13	단독	PCT/KR2016/010336
5	특허	인지기능장애 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	대화제약/ 경희대학교	출원인	대한민국 등록	-	2017.06.27	단독	1017530570000

6	특허	Pharmaceutical composition for treating or preventing neuropsychiatric disease, containing flavone-6-c-glucose derivatives as active ingredients	대화제약	출원인	일본 출원	-	2016.02.12	단독	2016-5345 34
7	특허	Pharmaceutical composition for treating or preventing neuropsychiatric disease, containing flavone-6-c-glucose derivatives as active ingredients	대화제약	출원인	유럽 출원	-	2016.03.10	단독	14836794. 9
8	특허	Pharmaceutical composition for treating or preventing neuropsychiatric disease, containing flavone-6-c-glucose derivatives as active ingredients	대화제약	출원인	미국 출원	-	2016.04.01	단독	14/912,069
9	특허	Pharmaceutical composition for treating or preventing	대화제약	출원인	중국 출원	-	2016.04.13	단독	201480056 351.2

		neuropsychiatric disease, containing flavone-6-c-glucose derivatives as active ingredients							
10	논문	Pretreatment with 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde blocks scopolamine-induced learning deficit in contextual and spatial memory in male mice	경희대학교	주저자	Pharmacology, Biochemistry and Behavior	2.781	2015.04.25	중복	SCI
11	논문	Sesquiterpenes from Rhizomes of <i>Cyperus rotundus</i> with Cytotoxic Activities on Human Cancer Cells in vitro	경희대학교	주저자	Helvetica Chimica Acta	1.138	2015.10.13	중복	SCI
12	논문	Swertisin, a C-glucosylflavone, ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice with its adenosine A1 receptor antagonistic property	경희대학교	주저자	Behavioural Brain Research	3.028	2016.03.18	중복	SCI
13	논문	A New Canthinone-Ty	경희대학교	주저자	Molecules	2.465	2016.05.16	중복	SCI

		pe Alkaloid Isolated from <i>Ailanthus altissima</i> Swingle							
14	논문	The ethanolic extract of the <i>Exlipta prostrata</i> L. ameliorates the cognitive impairment in mice induced by scopolamine	경희 대학교	주저자	Journal of Ethnophar macology	2.981	2016.06.05	단독	SCI
15	논문	The memory ameliorating effects of DHP1402, an herbal mixture, on cholinergic blockade-induc ed cognitive dysfunction in mice	경희 대학교	주저자	Journal of Ethnophar macology	2.981	2017.09.14	단독	SCI

11장 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

12장 참고문헌

코드번호

D-14

○ 참고문헌

1. Alzheimer A., Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Zentralbl. Nervenheik,(1907) 30: 177-179
2. Waring SC., Rosenberg RN., Genome-wide association studies in Alzheimer disease. Arch Neurol,(2008) 65: 329 - 334.
3. Shen ZX., Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease, Med Hypotheses(2004) 63: 308 - 321.
4. Nikolaev A. et al., N-APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases, Nature(2009) 457: 981-989.
5. Shioi J., Georgakopoulos A., Mehta P., Kouchi Z., Litterst C.M., Baki L., Robakis N.K. FAD mutants unable to increase neurotoxic A β 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on A β , J Neurochem(2006) 101: 674 - 681
6. 식품의 기준 및 규격 고시전문_식품의약품안전처 고시 제2016-43호
7. Lee YS, Kim HY, Kim Y, Seo JH, Roh EJ, Han H, Shin KJ. Small molecules that protect against β -amyloid-induced cytotoxicity by inhibiting aggregation of β -amyloid(2012) Bioorg Med Chem 20: 4921-4935
8. Li J, Wang F, Ding H, Jin C, Chen J, Zhao Y, Li X, Chen W, Sun P, Tan V, Zhang Q, Wang X, Fan A, Hua Q. Geniposide, the component of the Chinese herbal formula Tongluojiunao, protects amyloid- β (A β)1-42-mediated death of hippocampal neurons *via* the non-classical estrogen signaling pathway(2014) Neural Regen Res 9: 474-480
9. Ethanolic extract of the seed of *Zizyphus jujuba* var. spinosa ameliorates cognitive impairment induced by cholinergic blockade in mice.(2013) Biomol Ther 21(4): 299-306
10. Yi JH, Hye Jin Park, Beak SJ, Lee S, Jung JW, Kim BC, Ryu JH, Kim DH, Danggui-Jakyak-San enhances hippocampal long-term potentiation through the ERK/CREB/BDNF cascade(2015) J Ethnopharmacol, 175: 481-489
11. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism(1998) Neuron 20: 709-26
12. Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons(2012) Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 4:188-200
13. D Muller, M Joly, G Lynch, Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP(1988) Science 242: 1694-1697
14. Ying SW., Futter M., Rosenblum K., Webber M.J., Hunt S.P., Bliss T.V.P.,

Bramham C.R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis(2002) 22: 1532-1540

주 의

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