

계피와 금앵자추출물을 이용한 인지기능개선건강기능성식품개발 최종보고서

2017

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

계피와 금앵자추출물을 이용한 인지기능 개선 건강기능성 식품 개발 최종보고서

2017. 09. 14.

주관연구기관 / (주)네추럴웨이
협동연구기관 / 고려대학교
가톨릭대학교

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

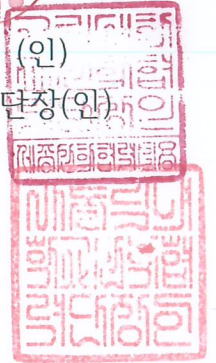
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “계피와 금앵자추출물을 이용한 인지기능 개선 건강기능성 식품 개발”(개발기간 : 2014.08.01 ~ 2017.07.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 14.

주관연구기관명 : (주)네추럴웨이 (대표자) 최종현 (인)
협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (대표자) 고제상 (인)
협동연구기관명 : 가톨릭대학교 산학협력단 (대표자) 산학협력단장(인)

주관연구책임자 : 유상우
협동연구책임자 : 신동훈
협동연구책임자 : 송상욱



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	114026-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.08.01.- 2017.07.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연 구 사 업 명	중 사 업 명	농림축산식품연구개발사업			
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	계피와 금앵자추출물을 이용한 인지기능 개선 건강기능성 식품 개발			
	세부 과제명				
연 구 책 임 자	해당단계 참 여 연구원 수	총: 20명 내부: 17명 외부: 3명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:240,000천원 민간:80,000천원 계:320,000천원	
	총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 25명 내부: 22명 외부: 3명	총 연구개발비	정부:720,000천원 민간:240,000천원 계:960,000천원	
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)네추럴웨이, 고려대학교, 가톨릭대학교			참여기업명	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	
<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능성 소재의 공업적 활용에 따라 Bench scale 추출조건 확립 및 공업적 순도 정제 방법 확립 계피의 정제 및 구조 규명, 추출물의 기억력 test 및 상승효과 확인 - 계피 정제물질의 활성 확인 - 계피, 금앵자의 최적비율 및 농도 설정 - 인체적용시험 자료수집 및 통계분석 진행하여 결과보고서 및 논문 작성 (SCI급 3편) - 본 연구로 분리한 활성물질에 대한 기존 특허 물질과 마찰을 일으키지 않는 신규물질의 국내 특허 출원 (총 2건) - 국내 학술회의발표 (총 21건) 				보고서 면수	

-
- 계피·금앵자 추출물 함량시험법 설정 및 분석법 밸리데이션 확립
 - 시료의 물리적, 화학적 특성에 맞게 extract, 기호음료, tablet, capsule 형태로의 시약품 제작
 - 인지기능의 변화 및 뇌구조의 변화를 평가하는 인체적용시험 진행
-

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구는 천연 식용식물자원인 계피를 이용하여 퇴행성 뇌 질환인 알츠하이머형 치매의 예방용 활성물질을 생리활성 원료로 소재화 시키고 계피와 금앵자 추출물의 상승효과를 건강기능성 복합제품으로 개발하는데 최종목표를 두고 있다. <계피 유래 뇌신호 전달물질 분해효소 억제효과를 갖는 유효물질의 건강기능성 제품 소재화> <ul style="list-style-type: none"> - Acetylcholinesterase (AChE) 활성억제 기능성 소재 개발 - 계피로부터 AChE 저해 및 억제작용 지표 물질의 규명 - 정제된 유효물질을 동물에 투여, in vivo 행동실험을 통한 기억력 개선 확인 - AChE의 억제효과를 갖는 물질의 공업적 실용화 시험 - AChE의 억제효과를 갖는 물질의 고기능성 소재화 시험 - 건강기능성 제품 개발 <계피, 금앵자 혼합물의 활성 상승효과 확인 및 이를 이용한 노인성 뇌질환 개선용 건강기능성 제품 개발> <ul style="list-style-type: none"> - Amyloid β의 독성 저해 효과 물질을 함유한 금앵자와 계피로부터 AChE를 억제하는 유효물질 혼합 시 뇌질환 개선 상승효과 - 계피와 금앵자 추출물을 혼합한 식이를 투여, in vivo 행동실험을 통한 기억력 개선 확인 - AChE 저해효과와 Amyloid β의 독성 저해 효과를 갖는 물질의 공업적 실용화 시험 - 건강기능성 제품 개발 <식품의약품안전처로부터 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 신청> <ul style="list-style-type: none"> 지표 성분 규격 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 임상 및 안전성에 관한 시험 - 기능성 내용 및 그에 관한 자료조사 - 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 시험 - 보존기준 유통기간 및 그 설정에 관한 시험 - 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료조사 활성 성분의 기능성 확인 		
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능성 소재의 공업적 활용에 따라 Bench scale 추출조건 확립 및 공업적 순도 정제 방법 확립 계피의 정제 및 구조 규명, 추출물의 기억력 test 및 상승효과 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 계피 정제물질의 활성 확인 - 계피, 금앵자의 최적비율 및 농도 설정 - 인체적용시험 자료수집 및 통계분석 진행하여 결과보고서 및 논문 작성 (SCI 급 3편) - 본 연구로 분리한 활성물질에 대한 기존 특허 물질과 마찰을 일으키지 않는 신규물질의 국내 특허 출원 (총 2건) - 국내 학술회의발표 (총 21건) - 계피·금앵자 추출물 함량시험법 설정 및 분석법 밸리데이션 확립 - 시료의 물리적, 화학적 특성에 맞게 extract, 기호음료, tablet, capsule 형태로 		

	<p>의 시작품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> - 인지기능의 변화 및 뇌구조의 변화를 평가하는 인체적용시험 진행 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 계피·금앵자 추출물로부터 뇌세포 손상 보호에 상승효과를 갖는 최적비율로의 혼합을 통해 전처리부터 제품화 단계까지 다양한 공정기술과 연구기법이 사용됨으로서 1차 농산물의 부가가치 제고와 우리 식품의 우수성을 밝혀내어 체계적이고 과학적인 데이터 제공을 통해 우리 고유 식품을 세계화시키는데 기대된다. - 이번 연구는 알츠하이머성 질환을 치료하는 원천 기술에 해당되며, 활용 범위를 확대하여 파킨슨병, 헌팅톤병, 소뇌위축증, 근위축성측삭경화증(루게릭병) 등의 퇴행성 뇌질환 분야와 청소년기의 기억력과 학습능력을 개선시켜주는 집중력 강화 등에 대한 뇌기능 강화식품으로의 응용개발이 가능할 것으로 보인다. - 국내 및 국외시장 분석결과 뇌신경전달물질인 아세틸콜린의 분해를 억제시키는 물질을 치료제나 예방제의 성분으로 많이 사용되고 있으나, 현재 계속되는 부작용과 과다 복용했을 경우 간독성, 오심과 구토 현상이 일어나고 있으며 안전성이 확보된 신물질 요구가 증가되고 있다. 본 연구는 인류가 오랫동안 섭취해오고 있는 식용 식물을 대상으로 연구함으로써 부작용을 최소화 할 것이다. - 계피를 식품의약 및 건강기능식품의 원료로 소재화 함에 있어 최종물질의 안전성을 확보하고, 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며, 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안으로 식용식물자원을 대상으로 신 물질을 탐색하고 개발하고자 한다. - 소재의 출처 상 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 화학적인 합성에 의한 물질들보다 안전성의 확보가 용이할 것으로 예상하고 있으며 그만큼 제품화 하는데 부담이 감소될 수 있도록 개발을 추진할 계획이다. - 제품화를 할 때에 노인성치매가 걸리는 주 대상 연령층을 고려해 부담 없이 마실 수 있는 차형태의 제품이나 섭취하기 편한 형태인 드링크, 캡슐 형 제품개발이 검토될 것이다. - 제품 개발 시 단독 및 기존에 많이 이용되는 소재인 금앵자와 복합제품 형태로 추진방향을 잡아 신소재에 대한 거부감을 감소시키고 기 연구된 금앵자의 뇌 신경세포 보호효과와 상승효과를 갖는 제품을 개발하고자 한다. - 건강기능을 표방하는 식품이 범람하고 있고, 기존의 건강기능식품 중 일부가 허위 과대광고를 함으로써 건강기능식품 전체에 대한 소비자들의 부정적인 인식이 나타나고 있다. 따라서 성공적으로 시장을 개척해 나가기 위해서는 풍부한 임상자료와 과학적 근거 자료를 바탕으로 소비자들에게 어필할 필요가 있다. 이에 과학적 근거를 바탕으로 식품의약품안전처에 개별인정을 추진하고자 한다. - 건강기능식품 소재를 실용화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시키고자 한다. 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>계피</p>	<p>알츠하이머형 치매</p>	<p>기능성식품</p>	<p>산업화</p>	<p>기억력 개선</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>The aim of this research is to develop brain enhancement functional food which has anti-dementia, especially Alzheimer's disease, properties by using synergistic effect of bio-reactive materials from both Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl and Guemengja (<i>Rosae Laevigatae</i> Michx.)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of functional food material for preventing dementia from Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl <ul style="list-style-type: none"> - Identify the bio-reactive material from Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl with neuroprotective activity. - Confirm learning and memory improvement by administrating the bio-reactive material derived from Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl <i>in vivo</i>. - Study on the materialization and commercialization using of purified natural product. - Develop cognitive enhancing functional food. ○ Developing functional food for anti-senile dementia by using synergistic effects of Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl and Guemengja (<i>Rosae Laevigatae</i> Michx.) extracts. <ul style="list-style-type: none"> - Evaluate synergistic effects of Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl which has inhibitory effects against AChE and Guemengja (<i>Rosae Laevigatae</i> Michx.) which has protecting effects against Amyloid β peptides. - Confirm learning and memory improvement by administrating extracts complex derived from Chinese cinnamon <i>Cinnamomum cassia</i>(L.) Presl and Guemengja (<i>Rosae Laevigatae</i> Michx.) <i>in vivo</i>. - Study on the materialization and commercialization of the bio-reactive material mixture. - Develop functional food for anti-senile dementia. ○ Apply for approval of the functional ingredient for health functional foods by Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). <ul style="list-style-type: none"> - Standardize the functional ingredient. - Investigate human clinical trials. - Evaluate the efficacy and safety of the ingredient. - Explore indications and effective doses, and directions for the consumption of the ingredient. 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> - The main purpose of this research is to develop functional food for anti-dementia via preventing breakdown of ACh, a neurotransmitter essential for processing memory and learning, and protecting neuronal 		

	<p>cells from dementia causative agent while reducing side effects. Furthermore, we are expecting to identify noble substance for anti-dementia and to acquire patent.</p> <ul style="list-style-type: none"> - This research is primarily focusing on preventing Alzheimer's disease, however, its application can be extended to the other neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Huntington's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis and etc. In addition, it can be applied for brain boosting food for youth to help their learning ability. - Several cholinesterase inhibitors has widely used for either treatment or prevention of Alzheimer's disease, however, they showed severe adverse effects including vomiting, diarrhea, dizziness, hepatotoxicity and seizures. Due to concerns over safety, development of safe functional material for anti-dementia has been highly required. Therefore, it can minimize side effects with bio-reactive material contained in the natural resources. - When it comes to commercialize, several types of products such as tea, drink and capsules, are considered to reflect consumers' demand. - This health benefit substance will be proved scientifically with sound scientific evidences in order to get approval by MFDS. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ The strategies of industrialization. <ul style="list-style-type: none"> - Standardize <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assay models for preventing and alleviating dementia phytochemicals. - Produce effective substances for anti-dementia through simple isolating process. - Process functional materials to several types of products including tablets, capsules, powders, granules, jellies, bars and drinks. ○ The strategies of commercialization. <ul style="list-style-type: none"> - Confirm its safety to reduce burden of commercialization. - Use noble ingredient to avoid conflicts of interest in patent. - Minimize adverse effects by extracting from natural resources. - Lessen repulsion by making complex product with familiar resource. <p>Suggesting the model for development of the physiologically and/or pharmaceutically bio-reactive functional materials from Korean edible resources.</p> <p>Promoting growth of food industry through development of high value-added food technology.</p>				
Keywords	<i>Cinnamon</i>	anti-dementia	functional product	acetylcholinest erase inhibitory activity	memory enhancing

6. 영문목차

7. 본문목차

< 목 차 >

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

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

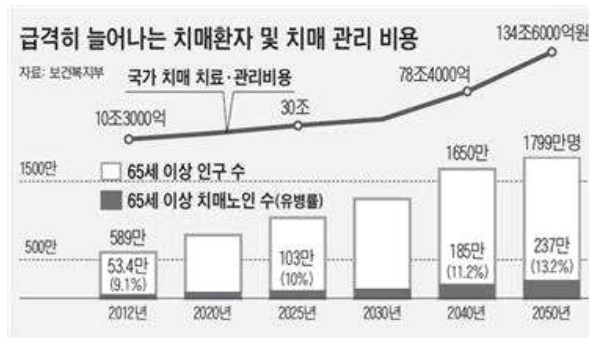
1-1. 연구개발 목적

○ 본 연구는 천연 식용식물자원인 계피를 이용하여 퇴행성 뇌 질환인 알츠하이머형 치매의 예방용 활성물질을 생리활성 원료로 소재화 시키고 계피와 금앵자 추출물의 상승효과를 건강기능성 복합제품으로 개발 목적

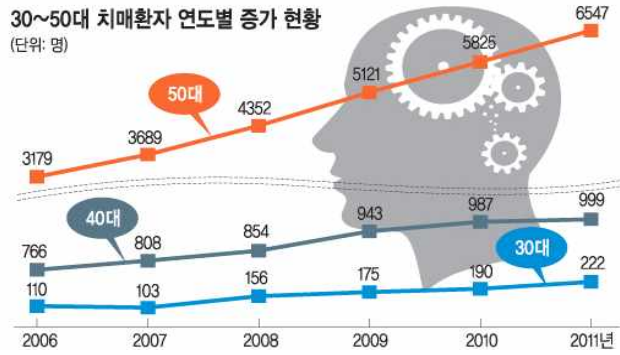
1-2. 연구개발의 필요성

○가. 연구의 필요성

급변하는 21세기 한국 사회는 급격한 경제성장을 통해 국민의 생활수준이 높아지고 의료기술도 발달되어 인간의 평균 수명이 크게 늘어남에 따라 노인인구가 급증하면서 고령화에 의한 뇌질환과 관련된 노인성, 퇴행성 질환 발병률이 급격한 증가추세를 나타내고 있다. 우리나라 총 인구 중 65세 인구가 차지하는 비율이 10.3%이며 1995년의 노인인구 비율이 5.9%인 것에 비해 많이 증가하였다. 또한 우리나라는 지난 2000년에 이미 고령화 사회에 진입하였으며, 향후 10년 후에는 14% 이상으로 고령사회에, 2026년에는 20%이상으로 초 고령사회에 도달할 것으로 전망되고 있다. 특히 치매노인 인구의 비율이 높아짐에 따라 심각한 사회적, 가정적 문제로 대두되고 있다. 보건복지부에 발표한 바에 따르면, 2012년 치매환자는 53만여 명으로 최근 4년 사이 10만 명 이상 늘었고, 2025년이면 100만 명이 넘을 것으로 전망했으며 치매 건강보험 환자 수의 증가로 사회적 비용도 급증하고 있다(Scheme 1). 또한 한 창 일할 나이인 30~50대 ‘젊은 치매’(초로기 치매 혹은 조발성 치매) 환자들이 늘고 있다. 국민건강보험공단에 따르면 30~50대 치매 환자는 2006년 4055명에서 지난해 7768명으로 크게 증가했다. 특히 50대의 경우 2006년 3179명에서 지난해 6547명으로 2배 이상 급증했다. 대개 알츠하이머 치매가 50~60%, 전두·측두엽 치매가 20%, 혈관성 치매가 15~20%를 각각 차지한다(Scheme 2).

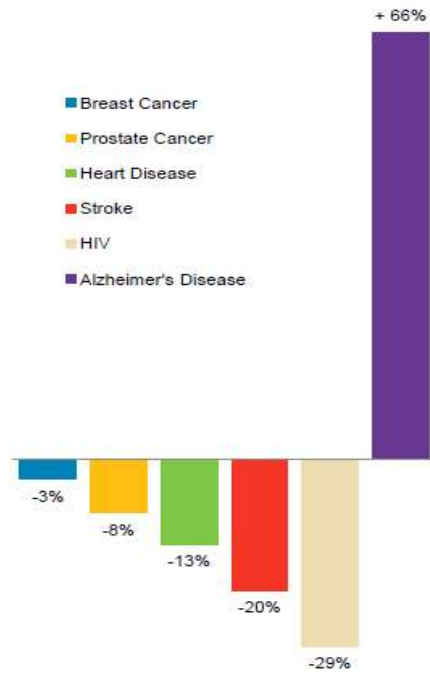


Scheme 1. 65세 이상 치매환자 및 치매 관리 비용 (보건복지부, 2012)



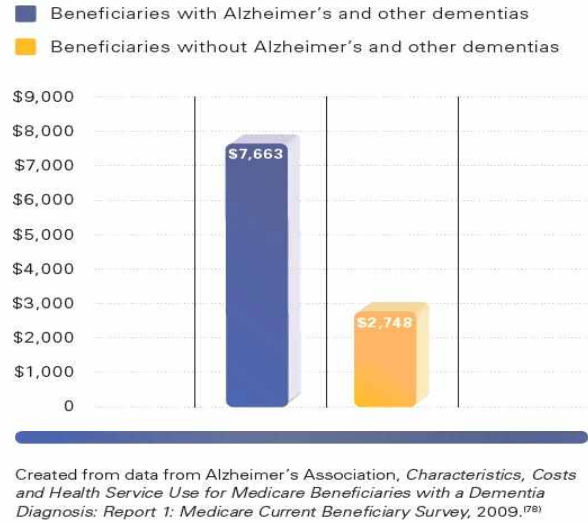
Scheme 2. 30~50대 치매환자 연도별 증가 현황 (국민건강보험공단, 2012년)

미국의 경우, Alzheimer's disease (AD)는 전체 인구의 사망 원인 중 심혈관질환, 악성종양, 뇌졸중에 이어 제4위를 차지하며, 치료경비 면에서도 암, 심장병에 이어 제 3위를 점유하고 있고, 몇 년간 주요 사망원인의 퍼센트 변화가 알츠하이머병에서는 66% 증가한 것으로 보아 사회, 경제적으로 미치는 영향이 매우 크다(Scheme 3).



Scheme 3. 주요 사망원인 질병의 퍼센트 변화 (미국, 2000~2008년)

2011년에 미국 AD 환자에게 쓰인 비용은 183백만달러로 작년에 비해 11백만달러가 증가하였다. 한명 당 약 4만 달러의 의료비 지출 및 사회적 경비가 소모되는 것으로 추산되며 질병으로 인한 수입의 감소와 환자 자신의 사회적 기능 상실을 고려한다면 이러한 비용은 약 17만 달러에 이를 만큼 큰 손실이 예상된다(Schemes 4, 5).



Scheme 4. 알츠하이머병과 그 밖의 질병의 노인의료보험금 지급 평균액 비교 (미국)

Healthcare Service	Average per Person Payment for Those with No Alzheimer's or Other Dementia	Average per Person Payment for Those with Alzheimer's or Other Dementia
Hospital	\$2,748	\$7,663
Medical provider*	3,097	4,355
Skilled nursing facility	333	3,030
Home health care	282	1,256
Prescription medications**	1,728	2,509

*"Medical provider" includes physician, other medical provider and laboratory services and medical equipment and supplies.

**Information on payments for prescription drugs is only available for people who were living in the community; that is, not in a nursing home or assisted living facility.

Created from data from Alzheimer's Association, *Characteristics, Costs and Health Service Use for Medicare Beneficiaries with a Dementia Diagnosis: Report 1: Medicare Current Beneficiary Survey, 2009.*⁽⁷⁸⁾

Scheme 5. 알츠하이머를 포함한 기타 뇌질환과 그 밖의 질병의 의료비용 비교 (미국)

근래 식품성분에 대한 새로운 관점의 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라, 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 생체 방어계, 세포분화 등 각종 생리기능 조절계에 작용하여 직, 간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계의 조절이 가능하게 된다면 그것은 건강유지를 위한 최적의 수단이 될 수 있음을 의미할 것이다. 식품에 도입되고 있는 생체 조절성 3차 기능은 질병을 발병의 전 단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로, 실제로 와인이나 과채류에 풍부한 폴리페놀과 카레에 포함되어 있는 curcumin은 AD의 발병률을 낮추는데 효과가 있는 것으로 역학조사결과 보고된 바 있으며, 향후 고령화 사회에서 건강기능식품 및 식품의약의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로 그 파급효과가 예측되고 있기도 하다. 한편, AD 치료에 관련된 국내·외 연구동향은 cholinesterase inhibitors (ChEIs)가 주류를 이루고 있는데, 제 1세대 ChEIs로서 최초로 항치매 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 monitoring의 번거로움이 있다. 최근 주목받고 있는 제 2세대 ChEIs로는 일본 예자이사에서 개발되어 96년 말 미국 FDA 승인을 받았고 97년부터 세계 30여국에서 판매되고 있는 donepezil로 하루 한번 복용할 수 있고, 선택적인 저해로 말초 부작용을 줄였다. 또 하나의 항치매 성분으로 choline

acetyltransferase (ChAT) activator가 있지만 ChEIs처럼 많은 물질들이 개발되어 있지는 않고, 현재 FDA 승인 약품도 없다. 일본에는 한약재에서의 ChAT activator가, 우리나라의 경우는 원광대 한의대에서 개발된 ‘치매단’이 있을 뿐, 국내 항치매 성분과 뇌신경 피사 저해인자의 연구는 아직 체계적으로 진행되지 않고 있는 실정이다. 현재 노인성 치매에 있어 완전한 치료는 불가능하지만 초기-중기의 치매환자에서 인지적, 비인지적 증상을 개선하기 위한 노력은 계속되고 있다.

○ 고령화 현상과 노령화 질환에 대한 관심고조

최근 생활수준의 향상과 의학기술의 발달에 따라 인구의 고령화 현상이 두드러지고 있으며 조직사회의 치열한 경쟁화에 따른 극심한 스트레스로 인한 성인병의 발병률 또한 급격한 증가 추세를 보인다. 사망원인의 경우, 과거 주원인이었던 감염형 질환에서 성인병질환에 의한 사망이 전체의 절반을 넘겼다. 이에 건강한 생활을 지속적으로 가능하게 할 수 있는 생활방식인 LOHAS (lifestyles of health and sustainability)가 하나의 큰 관심사로 대두하게 되고, 장수에 대한 욕구 증가로 일상 생활을 통한 노인성 질환에 대한 예방에 관심이 고조되고 있다.

○ 경제, 산업적 측면; 블루오션 창출의 기회

천연자원으로부터의 고부가가치성 물질 개발은 국내 농·임업을 유지, 발전시키는 대안 중의 하나가 될 수 있다. 식용식물자원은 가격의 등락이 심한 1차 산물이기 때문에 본 연구를 통해 농·임업과 가공제조업을 연계시킴으로써 생산농가의 영농의욕을 고취, 농가소득 향상과 더불어 식용식물자원 가격의 안정화에 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 또한 1차 상품인 식용식물자원을 고부가가치성 물질로 소재화하여 제품화함으로써 낮은 시장 경쟁성을 높일 수 있고, 이는 타 약용작물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 획기적으로 도모할 수 있다. 한편 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해 산업으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것으로 예상된다. 위에서 언급된 치매치료제들은 2003년 기준으로 연매출 100억 원 이상이며 전 세계 치매 신약시장은 약 600억 달러의 대규모이다. 이러한 대규모 시장의 점유를 위한 부작용이 감약된 천연 약리·생리활성 물질의 개발은 매우 큰 경제, 산업적인 당위성을 가진다. 특히 본 연구에서 활용되는 기술은, 제조공정상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 가지는 중·소기업 형 산업으로 분류할 수 있다. 더불어 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 섭취해온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고령화 사회에서 질병예방용 식품과 의약품의 수요증가와 함께 거대 수출품목이 될 것으로 기대된다. 의약분업의 실시와 함께 국제유가 급등에 의한 물류비 증가로 수익악화에 처한 국내 제약과 식품업체들이 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 됨으로써 블루오션 창출의 계기가 될 것이며 이는 국내 BT산업 육성이라는 국가정책에 부응한다고 할 수 있다.

이상에서와 같이 고령화로 인한 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 소재를 개발하고 이를 이용한 식품의약, 건강기능식품 등의 상품화는 개인 및 가정적인 측면에서는 물론 사회 및 국가적인 측면에서도 절실히 요구되는 연구개발 분야라 할 수 있다. 특히, 노인성 치매는 만성적, 퇴행적이므로 환자들을 보호하고 수용하는 차원의 수동적인 대책으로는 폭발적으로 증가하는 환자수와 사회적 비용

을 감당할 수 없을 것이다. 또한 외국에서 그 치료법이나 약물의 개발을 기다리고 이를 수입한다면, 막대한 외화지출은 물론 우리나라의 실정에 맞지 않을 수도 있다. 따라서 현재까지 국내에서 학제적으로 이 분야에 대한 천연 신소재 개발 연구가 활발하지 못했던 점을 고려할 때 본 사업을 통하여 해당 분야의 연구를 촉진시키고 관련 학·연·산·관계의 관심과 연구를 활성화시키는 계기를 마련할 수 있을 것은 물론, 미래형 기술로 경제, 사회, 기술적 파급 효과가 지대할 것으로 기대된다.

나. 퇴행성 뇌질환과 치매

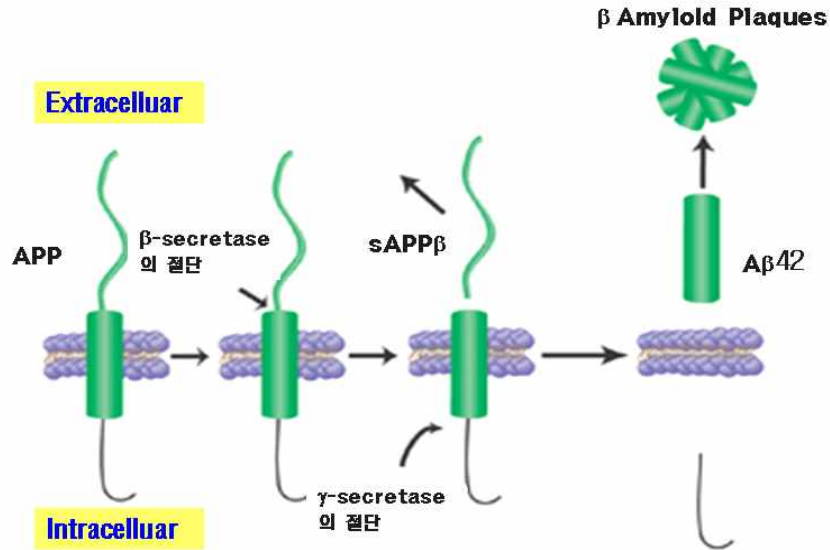
퇴행성 뇌질환(progressive neurodegenerative diseases)이란 원인 모르게 뇌의 특정부위의 신경세포가 사멸되어 가는 질환들을 말한다. 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 소뇌 위축증, 근위축성 측삭경화증(루게릭병) 등이 이 질환의 범위에 속한다. 가장 대표적인 퇴행성 뇌질환이 치매를 유발하는 알츠하이머병으로 이 병은 대뇌피질의 신경세포가 점차 죽어가면서 기억력장애를 포함한 인지기능의 장애를 초래하는 질환으로 전체 치매의 60~70%를 차지할 만큼 치매 유발 원인 중 가장 높은 비율을 차지하는 질병이다.

치매(dementia)는 정상적인 지적능력을 유지하던 사람이 다양한 후천적인 원인으로 인해 뇌기능이 손상되면서 기억력, 언어 능력, 판단력, 사고력 등의 지적기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 일상생활에 상당한 지장이 초래되는 상태를 말한다. 치매의 원인은 다양해서 약 50% 정도는 알츠하이머형, 20~30%는 혈관성, 그리고 알코올성, 파킨슨병 등이 있는데, 약 15~20%는 알츠하이머형과 혈관성 양쪽을 다 앓고 있는 것으로 알려져 있으며, 뇌종양, 감염, 외상 등의 원인에 의해서도 치매가 올 수 있다. 혈관성 치매 등은 뇌혈관 경색이나 뇌출혈 등에 의해 신경세포가 사멸하여 증상을 일으키는 것으로 그 예방·치료방법이 비교적 확실하므로 환자의 치매 원인을 정확히 파악하여 치료하고 있는 것에 비하여, 알츠하이머성 치매는 아직도 병의 발생 원인이나 치료법이 확실하게 밝혀지지 않음으로 질병의 진행을 막거나 지연시키려는 연구도 치료법과 함께 개발 중이다.

○ 알츠하이머병

치매의 가장 중요한 원인 질환인 알츠하이머병은 노인성치매질환이라고도 하는데 아직까지 발병원인이 정확하게 밝혀지지 않았으나, 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병은 대개 만성적이고 진행성으로 나타나며 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 뇌기능의 다발성 장애를 의미한다. 즉, 이전에 정상적인 지적능력을 유지해 오던 사람이 후천적인 뇌질환으로 인해 점진적인 기억력 장애 및 다른 지적능력의 상실로 통상적인 사회생활, 직업적 업무수행 또는 대인 관계 등을 적절히 할 수 없는 상태가 된다. 보통, 병의 초기에는 주로 인지기능의 장애를 보이다가 후기에 신체변화가 나타나는데 시간이 지날수록 보행 장애로 인해 주로 앉아있거나 누워있기만 하게 되어 전신의 근육경직이 나타나 대소변을 못 가리게 된다. 일부 환자에서는 경련성 발작이 나타나기도 한다. 말기에는 알츠하이머병 자체에 의한 사망보다는 폐렴, 요로감염증, 욕창 등으로 인해 사망하게 된다.

○ Amyloid β peptide



Scheme 6. APP로부터 Aβ가 생성되는 과정

알츠하이머병은 아직까지 발병 원인이 정확하게 규명되지 않았지만 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병 환자의 뇌에서 특징적으로 발견되는 세포외에 침착된 Amyloid β peptide(A β)와 세포내에 축적되는 신경섬유 다발성 병변(neurofibrillary tangles; NFT)이 노화 과정에서 뇌에 축적되고 엉키게 되며, 이러한 현상이 신경 세포에 독성을 주는 주요 원인으로 보고 있다. A β 는 amyloid precursor protein(APP)으로부터 세포내 단백질분해효소인 β -secretase, γ -secretase의 2단계의 절단 작용에 의해 생성되는 불용성 펩타이드다. A β 생성에 대한 제 1단계에는 단백질 분해 효소인 β -secretase(BACE1)에 의한 β 절단(β cleavage)이 일어나고, 2단계는 생성된 C 말단을 presenilin을 포함한 γ -secretase가 잘라서 40 또는 42개의 아미노산으로 구성된 peptide를 만들게 된다(Scheme 6). 이렇게 생성된 베타-아밀로이드 펩타이드들의 축적은 노인 반으로 불리는 amyloid plaques를 형성하며 알츠하이머병을 일으키게 된다.

○ 아세틸콜린(acetylcholine; Ach)과 Ach에스테라제(AchE) 억제제

알츠하이머병 환자의 기저핵 신경세포에는 아세틸콜린(acetylcholine; Ach)의 농도가 감소되어 있고, 콜린 아세틸트랜스페라제(choline acetyltransferase)의 활성이 저하되어 있는데, 이것이 이 질환의 원인인지 혹은 결과인지는 아직 명확하지 않으나, 이러한 점을 착안하여 아세틸콜린의 농도를 높이려는 choline의 전구물질인 lecithin이나 콜린 에스테라제 저해제(cholinesterase inhibitor) 등의 투여가 시도되고 있다. 구체적인 방법으로 알츠하이머 치매 치료를 위해서 cholinergic agonist, ACh 전구체, AChE inhibitors를 사용하여 뇌의 콜린성 작용을 활성화하는 연구가 수행되고 있다. 특히, 주요 약물로 개발되고 있는 AChE inhibitor는 ACh의 가수분해를 억제하여 대뇌의 ACh 수준을 증가시켜 콜린성 신경전달물질의 활성을 회복시키는 것으로, 실제로 이러한 콜린에스테라제 억제제들이 미국 FDA의 승인을 받아 전 세계적으로 시판 중이다(tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine). 하지만 이 효소의 억제는 치매를 일으키는 근본적인 원인을 제거하는 것은 아니라, 이 효소를 저해함으로써 알츠하이머성 치매 환자에게 나타나는 아세틸콜린이라는 신경전달물질 저하현상을 억제하여 정상적인 생활이 가능하도록 유도하는 역할만을 할 뿐이다. 아직까지는 치매라는 질환의 원인을 근본적으로 되돌려 정상상태로 만들어주는 약물은 없다.

○ 중추신경계의 퇴행성 변화의 일반적 특징

중추신경계의 aging에 따른 퇴행성 변화에 의한 질환은 여러 종류가 알려지고 있으나, 사람의 지적 또는 정신적 능력과 사회적 활동을 할 수 있는 정상 능력의 소실에 의한 일상생활의 장애를 가져올 때, 집합적으로 일컬어 치매(dementia)라고 칭한다. 과거 우리나라 사람들은 치매를 노망이라고 부르면서 나이를 들게 되면 필연적으로 오는 것으로 생각했다. 하지만 지금은 치매는 단지 나이가 들어 발생하는 생리적인 현상이 아니라 중추신경계의 퇴행성 변화는 기질적인 원인에 의해서 젊은 연령에서도 발생할 수 있다고 알려졌다. 치매의 증상들은 원인 질환의 종류와 정도에 따라 다양하게 기억장애 외에도, 사고력, 추리력 및 언어능력 등인데, 인격 장애, 성격의 변화와 비정상적인 행동들도 치매가 진행됨에 따라 나타날 수 있다.

치매의 원인에는 Alzheimer's disease (AD), vascular dementia, 파킨슨 질환, Diffuse Lewy body dementia, Huntington's disease, Creutzfeldt-Jakob's disease, Pick's disease 등이 알려지고 있으며, 초기부터 치매의 증상을 보이는 것이 아니라, 말기에 증상을 보이는 것으로 알려지고 있다. 이외, 만성 알코올 중독을 포함한 독성 물질에 의한 뇌 기능장애 또는 다른 이유로 사용하는 약물에 의해서도 인지장애나 치매 증상도 나타날 수 있다. AD는 치매를 일으키는 많은 질환들 중에 가장 흔한 원인으로 어떤 비정상적인 물질들이 모여 있는 집합체들과 신경세포 안에서 신경원 섬유들이 비정상적으로 보인다.

이 질환의 특징적인 변화는 기억과 지적능력을 유지하는데 뇌 중심영역의 신경 세포들이 많이 없어지고, 신경세포에서 복잡한 신호들, 특히 G-protein과 관련된 post-receptor signal transduction 등의 양이 많이 떨어져있는 것으로 알려졌다. AD의 첫 증상은 가벼운 건망증 등으로 시작되나, 병이 진행하면서 언어 구사력, 이해력, 읽고 쓰기 능력 등의 장애가 오고 환자들이 불안해하기도 하고, 공격적이 되기도 하며 길을 잃어버리고 거리를 방황할 수도 있다. AD 다음으로 흔하다고 알려진 치매의 원인으로 혈관성 치매도 원인에 따라 여러 종류로 분류되는데, 뇌에 혈액을 공급하는 뇌혈관들이 막히거나 좁아져서 나타나는데, 반복되는 뇌졸중, 중풍 또는 풍의 형태를 보이기도 한다. 뇌혈관의 활성화도 유무에 따라 가끔 인지능력이나 정신능력이 약간 악화되었다가 증상의 호전이 보이기도 하는 증상의 변화를 보인다. 혈관성 치매는 일단 발생하면 완치될 수 없으나, 초기의 적절한 치료로 더 이상의 악화는 막을 수 있다고 알려져 있다. 파킨슨 질환도 중요한 진행성 퇴행성 뇌 질환의 하나로 30-40% 정도가 파킨슨 질환 말기에 치매의 증상을 보인다고 알려졌다. 이런 질환 외에 치매 증상을 보이는 상태는 뇌종양, 두부 손상, 대사성 뇌 질환, 영양결핍증 등이 있으며, 만성 알코올 중독을 포함한 독성 물질에 의한 뇌 기능 장애 또는 다른 약물에 의해서도 치매증상이 나타날 수 있다고 알려졌다. 이들 중 일부는 치료 가능한 질환이다.

다. 계피, 금앵자

동서양에서 흔하게 사용되는 계피(Cinnamon bark)는 아열대 작물이라 동남아, 중국남부에서 주로 생산되고 있고, 전 세계적으로 가장 좋은 품질은 베트남의 엔바이(Yen Bai) 지역에서 재배되는 것들이다. 우리나라 곳곳에 있는 계수나무는 약으로는 사용되지 않으며 제주지역에서 계피나무를 시험 재배하는 정도다. 계피는 블루베리보다 항산화효과수치가 28배 높은 만큼 항암작용 및 노화방지에 대표적인 음식이며, 영양적 가치가 높은 것으로 여겨지므로 현대인들에게 흔히 있는 질환에 적용 가능한 기능성 소재라고 생각된다. 하지만 각 질환에 대한 특이적 작용점 및 기전에 대한 연구가 부족한 상황으로, 각종 질환에의 적용가능성은 확인되었으나 건강기능식품 개발 수준의 연구

는 아직 미비하다고 볼 수 있다. 여기에 기존 산화적 스트레스로부터 뇌신경세포 보호능이 밝혀진 금앵자(*Rosa laevigata*)과 혼합물로 조제한 건강기능성 복합제품 개발은 장기복용에 따른 부작용을 최소화하면서 두 시료의 시너지 항치매 효과뿐 아니라 파킨슨병, 헌팅톤병, 소뇌위축증, 루게릭병 등의 퇴행성 뇌질환 분야와 청소년기의 기억력과 학습능력을 개선시켜주는 집중력강화 등에 대한 뇌기능 강화식품으로의 응용개발이 가능할 것으로 보인다.

계피는 한약재와 식품 등 다양하게 활용되지만 현재 국내 재배가 드물어 수입에 의존하고 있다. 이에 본 연구팀은 계피의 고령화 질환의 예방 및 개선 효능 검증으로 계피의 국내 재배를 증가시켜 대량 상용화로 발전시키고 국내산 농산물의 소비 촉진 및 소득 증대시키고자 한다. 천연자원(계피, 금앵자)을 대상으로 하기 때문에 본 연구는 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높일 수 있을 뿐만 아니라 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 획기적인 대안이 될 것이다. 그러므로 본 연구가 성공적으로 수행되었을 경우, 해외에서도 널리 소비되고 있는 천연자원의 수출 시장의 확대 및 다각화에 기여할 것이다.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

○ 국내 제품생산 및 시장 현황

계속되는 노인성 질환, 치매에 대한 연구에도 불구하고, 아직까지 완전하게 치매를 치료할 방법이나 제약은 개발되어 있지 않다. 다만 병이 더 이상 진행되지 않도록 정신 기능을 담당하고 있는 뇌세포에 혈액 순환을 원활하게 하고 기억력을 향상시킬 수 있는 약물 또는 영양소를 공급하여 자신이 누구인지 자신의 힘으로 최소한의 생활을 영위할 수 있게 하는 것이 지금으로선 최선의 치료 방법이라 할 수 있겠다. 최근 연구동향은 Aβ에 의한 뇌신경세포 보호물질을 찾거나 ChAT의 활성화 또는 AChE의 억제를 통한 신호전달성분의 수준을 높이는 방향으로 많이 연구되어지고 있다. 국내에서는 천연물 및 한약재가 치료제로 개발되고 있으며, 이러한 개발물질은 국내뿐 아니라 유럽 및 미국에서도 사용되고 있다. 실질적인 예로 은행잎 추출물은 유럽에서 뇌일혈 환자의 회복 및 치매병 치료에 효과가 있다고 여러 연구 기관에서 보고하고 있고, 현재 사용 중에 있다. 이러한 시점에서 원광대학교 연구팀이 개발한 치매단은 생약 성분으로 간독성이 나타나지 않았으며 그 밖에 어지럼증, 떨림증, 구토증 등과 같은 부작용이 전혀 나타나지 않기 때문에 조기 치료 및 예방 약품으로 매우 가치 있는 것으로 판단된다. 그리고 식약청 2008년도 식품의약품통계연보에 따르면 치매치료약으로서 간독성이 없는 것으로 밝혀진 대응제약의 아리셉트(aricept)정이 348억 원의 매출로 1위를 차지하고 있으며, 의약품 판매액 기준 상위 20개 품목에 등재되었다(Scheme 7). 다만 국내 건강기능식품 및 의약품에 사용될 신소재 개발 산업은 전반적으로 기술수준이 주요 선진국에 비해 절반정도의 수준에 머물러 있고, 치매관련 의약품은 전량 수입에 의존하거나, 비싼 기술 로열티를 지불하고 국내에 공급하는 실정이다. 그러나 정부의 뇌 과학 육성을 위한 적극적인 지원과 우수한 인력자원을 보유하고 있는 점은 향후 발전 가능성을 높이는 장점으로 인정된다. 앞으로 이러한 약품이나 건강기능 식품의 일반적 보급이 시급하며 더욱더 개발하여, 수출할 수 있는 정도의 수준이 되면 국가 경제적으로도 많은 도움이 될 것이다.

단위 : 백만원		Unit : million won		
구 분 Classification	회 사 명 Company name	2006	2007	증가율(%) Rate of increase
박카스디백 Bacchus-D	동아제약 Dong-A Pharm Co.	124,078	126,918	2.29
퀸박셀주 Quinvaxem inj	베르나바이오텍 코리아 Berna Biotech Korea Corp.	21,708	81,646	276.11
스티렌정 Stilen	동아제약 Dong-A Pharm Co.	51,779	76,407	47.56
아리셉트정 Aricept	대웅제약 Daewoong Pharm Co.	-	34,833	-

Scheme 7. 2007년도 치매 치료약(아리셉트) 생산액1)

그 외 뇌졸중 치료제로서 BMS의 플라빅스가 7백억 원의 매출을 나타내었다(Scheme 8). 또한, 국내에서 2007년도 중추신경제용 의약품 생산액은 1조2천억 원에 달하며, 치매 관련 치료제의 시장은 약 1,500억 원 정도의 규모로 추정된다(Scheme 9).

단위 : 십억 달러		Unit : billion US dollars	
구 분 Classification	개발회사 Company name	작 용 Effect	매출액 Sales
Lipitor	Pfizer	본태성 고콜레스테롤혈증	13.5
Plavix	Bristol-Myers Squibb	뇌졸중	7.3

Scheme 8. 2007년도 뇌졸중 치료약 (플라빅스) 매출액2)

단위 : 건, 백만원		Unit : cases, million won	
분류 번호 Code No.	약 효 별 Classification by therapeutic area	생산 품목수 No. of products	생산금액 Production amount
	총 계 Total	16,011	11,415,011
110	중추신경제용 약 Central nervous system drugs	2,230	1,263,718
120	말초신경제용 약 Local nervous system drugs	601	212,684
130	감각기관용 약 Sensory organ drugs	331	144,337
140	알레르기용 약 Allergy drugs	275	182,731
190	기타 신경계 감각기관용 약 Miscellaneous neuromuscular system drugs	66	5,099

Scheme 9. 2007년도 중추신경제용 의약품 생산액3)

한편, 건강기능식품의 경우 치매 예방이나 치료보다는 뇌기능의 개선 및 강화와 관련된 제품이 다수이고 약 500억 원 규모의 시장이 형성되어 있다. 이에, 치매 관련 치료 의약품 및 뇌기능 개선관련 건강기능식품의 국내시장 총규모는 약 2,000억 원 규모로 추정할 수 있으나, 향후 시장의 수요는 급속히 증가할 것으로 예상된다. 그 이유는 노인 장기요양보험의 실시로 치매환자에 대한 적극적인 치료가 확대되고 있고, 이는 시장의 수요로 연결될 것으로 판단된다. 이와 같은 예상은 한국치매가족협회가 국민건강보험공단이 전국의료 기관에서 진료를 받은 치매환자 609명의 보호자 등을 대상으로 설문 조사를 통해 발간한 '치매환자의 사회·경제적 비용 보고서(2007)'를 분석한 결과 보고서(2008)

에서 근거를 찾을 수 있다. 치매환자 1인당 연평균 의료비는 507만3000여원, 교통비·식비·간병비·보조용품 구입비·대체 의료 사용비 등은 191만7000여원, 치매 환자 본인이나 부양자의 임금 손실액이 88만1000여원으로 집계되었다. 연평균 치매환자 비용은 치매에 걸린 지 1년 이내 714만7000여원, 1~2년 693만7000여원에서 2년 이상 915만3000여원으로 급속히 증가했다. 또 의료 기관에 입원하지 않는 치매환자의 경우 연평균 비용이 414만6000여원에 그쳤지만, 2~3개월 입원하면 1,303만1,000여원, 4~6개월 입원하면 1,927만여 원, 7개월 이상 장기 입원자는 3,060만여 원이 드는 것으로 조사됐다. 보고서는 2008년도 기준 치매환자수가 전체노인의 8.3%인 약36만 명이며 비 노인층 환자까지 포함하면 최대 56만 명에 달하는 것으로 추산했다. 이에 따라 치매로 인한 총비용은 연간 3조 4000억~4조4000억 원 정도가 소요된다고 분석했다. 이러한 치매치료 비용이 부담되어 그동안 치료에 적극적이지 않았으나, 노인 장기요양보험의 실시로 환자가족의 부담이 경감됨에 따라 향후에는 치료뿐만 아니라 예방에도 많은 관심을 갖게 될 것이며, 이는 뇌기능 보호 건강기능식품 또는 예방 의약품의 수요로 연결될 것이다.

최신자료는 아니지만 통상적인 의약품 개발기간이 10~15년이 소요됨을 감안할 때 2005년도에 발표된 데이터모니터 자료로부터 뇌·신경질환 관련 의약품을 개발하는 외국의 주요 제약사들이 집중하고 있는 치료범위를 살펴볼 수 있다. 2005년 사노피아벤티스는 31개의 R&D 프로젝트로 가장 많은 프로젝트를 수행하고 있으며, 신경질환과 정신질환에 집중하고 있다(Scheme 10).

[단위 : 백만달러, %]

프로젝트 개수 제약회사	신경질환 (Neurology)	정신질환 (Psychiatry)	통증 (Pain)	미발표 (Undisclosed)	총계
Sanofi-Synthelabo	15	15	1	0	31
GlaxoSmithKline	9	13	1	0	23
Neurogen	9	7	0	0	16
Johnson & Johnson	7	4	2	0	13
Solvay	2	10	0	0	12
Neo Therapeutics	10	1	0	0	11
Pfizer	4	5	1	0	10
Sepracor	3	5	1	1	10
Eli Lilly	1	9	0	0	10
AstraZeneca	0	7	1	1	9
Shire	5	4	0	0	9
Novartis	4	2	2	0	8
Merk & Co	2	4	2	0	8

Scheme 10. 주요 제약회사의 치료 범위별 R&D 프로젝트 포트폴리오⁴⁾

그러나, 최근 발표에 따르면 막대한 자금을 투입하여 야심적으로 추진하던 신약개발 프로젝트가 모두 실패하면서 자금난에 빠져 어려움을 겪고 있는 것으로 알려지고 있다. 2009년 사노피아벤티스는 신물질 확보를 위해 한국 벤처기업의 기술개발에 700억불을 투자하기로 결정하였고, 이를 위한 세부 계획이 현재 추진되고 있다. 그 외 아스트라제네카는 정신질환에, 노바티스 및 머크사는 통증에 비교적 활발한 연구를 진행 중이다. 화이자는 알츠하이머 임상실험을 위해 한국에 2006년부터 5년간 총 3억 달러의 R&D 자금을 투자하기 보건복지부와 MOU를 체결한 바 있다. 국내 산업계에서는 바이오 벤처기업 진매트릭스가 뇌졸중과 대장암의 발병여부를 알 수 있는 진단키트를 개발하였으며, 프라임

팜택이 서울대병원과 공동으로 뇌경색 치료물질을 개발하고 있다. 뉴로테크는 2006년 11월에 "Neu2000"이라는 뇌졸중치료제를 미국 FDA로부터 임상시험 승인을 받아 임상시험을 수행하고 있다. 삼천리 제약과 한양대 의대는 뇌질환을 치료하는 펩타이드 개발을 수행하고 있다. 국내 뇌 관련 기업의 현황은 다음과 같다(Scheme 11).

기업명	주요제품 및 개발내용	설립년월
디지털바이오텍 (메디프론·디비타)	TRPV1 리간드계 진통제, 치매치료제 및 예방제, 치매진단키트, 급만성 고도 통증 진통제	1999.12
뉴로넥스	항우울제 물질 개발	2000.7
뉴로제넥스	천연물 유래 노인성 치매치료제 개발	2000.5
뉴로테크	뇌졸중, 척추손상, 루게릭병 치료제(Neu2000)개발, 치매치료제 AAD-2004 개발, 침해성 통증 및 신경병증 진통제(NP-2007) 개발	1998.4
바이오시너젠	천연물 추출 치매치료제 개발	2000.5
싸이제닉	치매치료제 및 예방제 개발	1999.12
코스바이오텍	뇌졸중치료제, 치매치료제 개발	2001.10
크리스탈지노믹스	파킨스씨병 치료제 개발	2000.7

Scheme 11. 뇌 연구 관련 국내기업 현황⁵⁾

한편, 식품의약품안전처에 따르면 건강기능식품 생산액은 건강기능식품 제도가 시행된 2004년 2,506억 원에서 2010년에는 제도 도입이후 처음으로 1조원 시장을 넘어선 것으로 나타났으며 2011년 1조3682억 원에 이어 2012년에는 1조4091억 원으로 늘어난 것으로 분석됐다. 품목별로는 2012년도 전체 건강기능식품 생산액(1조4,091억원) 중 46%를 차지한 홍삼제품이 가장 높은 점유율을 보였지만 2011년도의 53% 점유율에 비해서는 크게 감소하였다. 그 뒤를 이어 비타민·무기질 11.7%, 알로에 4.9%, 프로바이오틱스 3.7%, 오메가-3지방산함유유지 3.5% 제품 순으로 나타났다. 급격한 성장세를 나타낸 제품은 가르시니아카보지아 추출물 제품이 1136%로 가장 높았고, 식이섬유 제품 45%, 프로바이오틱스 제품 28% 순으로 조사되었다.

이중 개별인정형 건강기능식품의 경우 2008년에서 2011년까지 건강기능식품의 연평균성장률 약 19%정도 성장하였다(Scheme 12). 그리고 2011년에 비해 12년도 1,807억 원으로 약 26% 증가하였으며 본과제가 성공적으로 이루어질 경우 개별인정형 원료의 경우 본 원료의 효과에 정확한 클레임을 받아 마케팅 수단에 적극적으로 이용되고 있기 때문 기존 원료에 비해 적극적인 마케팅 방법들을 활용하여 시장진입이 더욱 수월할 것이라 예상된다.

1) 2007년도 치매 치료약(아리셉트) 생산액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)
 2) 2007년도 뇌졸중 치료약 (플라빅스) 매출액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)
 3) 2007년도 중추신경계용 의약품 생산액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)
 4) 주요 제약회사의 치료 범위별 R&D 프로젝트 포트폴리오 (출처: "Strategic Perspectives 2005 : CNS Market and Pipeline Overview", Datamonitor, 2007)
 5) 뇌 연구 관련 국내기업 현황 (출처: "BT 기술동향보고서, 국가생명공학정책연구센터, 2008)

구분	2008 (단위 : 천원)	2011 (단위 : 천원)	CAGR
비타민 및 무기질	53,114,467	156,102,278	43.24%
인삼	41,266,746	38,127,932	-2.60%
홍삼	418,394,393	719,064,925	19.78%
스피루리나/클로렐라	19,994,895	11,348,757	-17.20%
알로에	63,854,143	69,154,474	2.69%
프로폴리스추출물	4,916,944	11,380,995	32.28%
오케가-3 지방산 함유 유지	26,594,201	50,865,884	24.13%
감마리놀렌산 함유 유지	14,517,637	22,364,947	15.49%
식이섬유	120,831	11,551,365	357.25%
키토산/키토올리고당	8,621,070	10,616,673	7.19%
프로바이오틱스	19,015,722	40,487,779	28.65%
가르시니아카모보지아추출물	-	20,724,425	-
개별인정형	41,639,135	143,479,074	51.04%
전체	803,067,010	1,368,187,564	19.43%

Scheme 12. 건강기능식품 주요 원료별 시장규모 동향⁶⁾

뇌기능 개선을 위한 제품으로서 대표적으로 대두 포스파티딜세린과 누에고치 추출물인 피브로인 추출물, 그리고 DHA 제품이 판매되고 있다. 포스파티딜세린은 동물과 미생물 등의 생체막에 존재하고 있으며, 특히 사람의 경우 뇌에 높은 농도로 존재하는 것으로 알려져 있다. 대두에서 유래한 포스파티딜세린이 개발되기 이전에는 소의 뇌에서 유래한 포스파티딜세린의 기능성에 대한 연구가 활발하게 이루어졌다. 소의 뇌에서 추출한 포스파티딜세린을 섭취시킨 동물을 이용하여 수동회피시험을 수행한 결과, 행동이 유의적으로 개선되는 것이 관찰되었으며, 대두 유래와 소의 뇌유래 포스파티딜세린의 인지능력 개선 효과가 거의 유사하다는 것이 기반연구를 통하여 확인되었다. 실제로 인지능력이 약간 저하된 노인들을 대상으로 수행한 인체적용연구를 통하여 소의 뇌에서 유래한 포스파티딜세린과 대두에서 유래한 포스파티딜세린이 모두 노인의 인지능력을 개선시키는 것으로 확인됨에 따라 “노인의 인지능력 개선에 도움이 될 수 있다”는 기능성 표시가 허용되었다. “피브로인추출물 BF-7”은 누에고치를 정련하고 효소 가수분해하여 만들어진다. 작용 기전이 명확하게 밝혀지지 않았으나, 피브로인추출물 BF-7이 신경세포의 손상과 손상된 뇌 기능을 회복시키는 것이 동물시험과 *in vitro* 시험을 통하여 확인되었다. 또한, 피브로인추출물 BF-7의 인체적용연구에서, 피브로인추출물 BF-7의 보충은 일반인과 노인 등 다양한 인구 집단을 대상으로 검증된 질문 방법을 통해 기억력 개선이 확인됨에 따라 “기억력 개선에 도움을 줄 수 있다”는 기능성 표시가 허용되었다. DHA는 뇌의 중요 구성성분이라는 점에서 두뇌에 영양공급을 한다는 기능성 표시가 허용되어 있다. 따라서, 평가신청 기술인 두충추출물을 이용한 퇴행성 뇌질환, 특히 알츠하이머에 대한 예방 및 치료개선 건강기능식품 분야는 개발 완료 후 사업화 시 강력한 시장지배자가 존재하지 않으며 신청과제를 포함한 소수의 경쟁자가 적절하게 시장을 분할할 것으로 예상된다.

2011년 기준 기억력 및 인지능력에 관한 개별인정형 기능성원료 및 제품 인정 현황은 전체 139종의 기능성 원료 중 녹차추출물/테아닌 복합물 외 9종이 있어 전체 개별인정형 기능성 원료 중 7.2%

를 차지하고 있다(Scheme 13).

기능성 원료	품목수	기능성 내용
녹차추출물/테아닌복합물	1	기억력 개선
당귀등추출복합물	1	기억력 개선
은행잎추출물	13	기억력 개선
인삼가시오갈피등혼합추출물	1	기억력 개선
홍삼농축액	1	기억력 개선
원지추출분말	1	기억력 개선
대두포스파티딜세린	4	인지능력 개선
피브로인추출물BF-7	3	기억력 개선
INM176참당귀주정추출분말	1	인지능력 저하의 개선
씨제이테아닌등복합추출물	1	기억력 개선
총 10종		총 27품목

Scheme 13. 기억력 및 인지능력 관련 개별인정형 기능성원료 현황⁷⁾

국내 건강기능식품 중 기준규격형 제품 중에서 뇌기능 개선, 기억력 향상과 관련된 제품군은 DHA 함유제품이 두뇌·망막의 구성성분, 두뇌영양공급에 도움이 된다는 기능성 표시가 허용되어 있고, 레시틴 제품에 두뇌영양공급에 도움이 된다는 기능성 표시가 허용되어 있다. 2007년에 EPA 및 DHA 함유제품이 국내제조 167억 원, 수입제품 326억 원의 매출을 보였고, 레시틴 제품은 국내제조 25억 원, 수입제품 6억5천만 원의 매출을 기록하였다. 따라서 건강기능식품 중 기준규격형 제품에서 뇌기능 개선관련 제품의 총 시장은 약 525억 원의 시장규모를 나타내었다. 또한, 개별인정형 제품으로는 대두 포스파티딜세린에 노인의 인지능력 개선에 도움이 될 수 있다는 표시가 허용되었고, 선경트레이딩, 두산R&D센터, 한국인삼공사 등이 허가를 받았다. 그리고 (주)바이오그랜드가 개발한 누에고치 추출물의 가수 분해로 생산되는 피브로인추출물 BF-7에 기억력 개선에 도움을 줄 수 있다는 표시가 허용되었다. 개별인정형 제품의 시장규모는 국내제조 264억원, 수입제품 160억원을 기록함에 따라 총규모는 424억 원 규모이다. 그러나, 개별인정형 허가 제품수가 152개에 달하고, 시판되는 제품은 대두 포스파티딜세린 1제품에 그치고 있어, 뇌기능 개선관련 제품의 시장은 3% 수준인 12억 원 규모를 넘기는 어려울 것으로 추산된다. 따라서, 건강기능식품 중 뇌기능 관련 제품시장의 총규모는 537억 원 규모로 추산할 수 있다(Scheme 14).

개별인정형 시장은 매년 신 원료 및 신제품이 추가되고 있어 시장규모는 증가할 것으로 추정되나, 비교 가능한 데이터는 발표되지 않고 있다. 따라서 최근 3년간 동 업종 매출 성장률이 평균 경제 성장률에는 미치지 못하나, 여건이 개선되면 향후 성장률이 평균 경제성장률 또는 그 이상의 수준으로 증가할 것으로 기대된다(Scheme 15).

6) 건강기능식품 주요 원료별 시장규모 동향 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)

7) 기억력 및 인지능력 관련 개별인정형 기능성원료 현황 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)

8) 2007년도 건강기능식품 매출액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008)

단위 : 천원, 1달러

Unit : thousand won, one dollars

구분 Classification	소계 Subtotal	국내판매액 Domestic sales	수출액 Export earning	
			\$	천원
총계 Total	723,454,140	688,836,608	37,143,275	34,617,532
영양보충용제품 Nutritional Supplement Products	78,522,639	78,009,739	550,322	512,900
인삼제품 Ginseng Products	34,962,242	17,416,850	18,825,528	17,545,392
홍삼제품 Red Ginseng Products	326,987,926	317,508,011	10,171,583	9,479,915
EPA 및 DHA 함유제품 EPA/DHA Fish Oil Products	16,689,361	16,294,878	423,265	394,483
로얄젤리제품 Royal Jelly Products	724,072	724,072	-	-
효모제품 Yeast Products	14,759,172	14,751,675	8,044	7,497
화분제품 Pollen Products	3,738,472	3,731,413	7,574	7,059
스쿠알렌함유제품 Squalene Products	8,441,870	8,295,800	156,728	146,070
효소함유제품 Product of Digestive Enzyme	5,371,160	5,371,160	-	-
유산균함유제품 Edible Lactic Acid Forming Bacteria Products	17,453,355	11,953,442	5,901,194	5,499,913
클로렐라제품 Chlorella Products	18,653,855	18,483,953	182,298	169,902
스피루리나제품 Spirulina Products	4,389,771	4,388,093	1,800	1,678
감마리놀렌산함유제품 Edible Oil Containing Gama-linolenic Acid Products	16,501,850	16,497,790	4,356	4,060
배아유제품 Wheat Germ / Rice Bran Oil Products	130,633	130,633	-	-
배아제품 Products with Wheat Germ and/or Others	75,596	75,596	-	-
레시틴제품 Egg and/or Soybean Lecithin Products	2,508,241	2,508,241	-	-
옥타코사놀함유제품 Octacosanol Products	1,097,582	1,097,582	-	-
알코시글리세롤함유제품 Alkoxy-glycerol Products	2,850,415	2,807,161	46,410	43,254
포도씨유제품 Grape Seed Oil Products	146,899	146,899	-	-
식물추출물발효제품 Fermented Vegetable extract Products	752,330	752,330	-	-
뮤코다당 단백질제품 Muco-polysaccharide Protein Products	935,453	935,453	-	-
엽록소함유제품 Chlorophyll Containing Products	1,667,931	1,659,077	9,500	8,854
버섯제품 Mushroom Processed Products	1,909,833	1,906,804	3,250	3,029
알로에 제품 Aloe Products	79,699,059	79,629,230	74,924	69,829
매실추출물제품 Plum Products	1,822,362	1,452,391	396,965	369,971
자라제품 Turtle Products	6,245,398	6,241,577	4,100	3,821
베타카로틴함유제품 Beta-carotene Products	1,577,014	1,577,014	-	-
키토산함유제품 Chitosan Products	2,501,045	2,392,546	116,415	108,499
키토올리고당함유제품 Chito-oligo-saccharide Products	10,010,692	9,901,689	116,956	109,003
글루코사민함유제품 Glucosamine Products	27,015,583	26,927,998	93,975	87,585
프로폴리스추출물제품 Propolis Extract Products	6,373,212	6,373,094	127	118
녹차추출물제품 Green Tea Extracts And Its Their Products	2,170,182	2,170,182	-	-
대두단백함유제품 Soyprotein And Its Products	15,864	15,864	-	-
프락토올리고당함유제품 Fructooligosaccharide And Its Products	244,045	244,045	-	-
홍곡제품 Red Rice And Its Products	93,281	93,281	-	-
개별인정형제품 Products-Specific	26,415,745	26,371,045	47,961	44,700

Scheme 14. 2007년도 건강기능식품 매출액⁸⁾

9) 뇌기능 개선 건강기능식품 매출액 추이 (출처: 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2006~2008년도)

10) 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년) (출처: "CNS Disorders - Current market landscape & dynamics", Business Insights, 2007)

11) 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년) (출처: "CAGR - Compound Annual Growth Rate", Business Insights, 2007)

12) 뇌·신경질환별 세계시장 전망 (출처: "The CNS Market Outlook to 2010 - Health Care", Business Insights, 2007)

13) 뇌·신경질환별 세계시장 전망 (출처: "CAGR - Compound Annual Growth Rate of Market outlook to 2010", Business Insights, 2007)

14) 뇌·신경질환 관련 상위 10개사의 판매액(2004~2005년) (출처: "Top CNS Portfolios in 2005 - The Industry Gold Standards", Datamonitor, 2007)

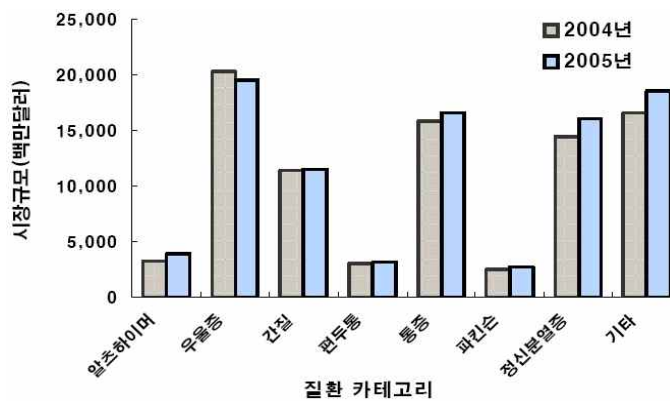
	2005년도	2006년도	2007년도
EPA 및 DHA 함유식품	15,338,815	15,240,950	16,689,361
레스틴제품	2,620,066	3,898,852	2,508,241
계	17,958,881	19,139,802	19,197,602
신장율		6.5%	0.3%

Scheme 15. 뇌기능 개선 건강기능식품 매출액 추이⁹⁾

○ 국외 제품생산 및 시장 현황

뇌·신경 질환 관련 의약품 세계시장은 2005년에 923억 달러 규모를 형성하였다. 뇌·신경 관련 질환 카테고리 중 2004년과 2005년 가장 큰 시장을 형성하는 분야는 항우울제 및 안정제로 200억 달러의 시장규모를 보이고 있다(Scheme 16). 2001년~2005년 사이 가장 증가율이 높은 시장은 알츠하이머형 치매에 대한 시장으로 연평균 34.5%의 성장률을 나타내었다(Scheme 17).

이런 추세로 볼 때 뇌·신경 질환 관련 의약품 세계시장은 1,000억 달러 규모를 넘어설 전망이다. 알츠하이머와 정신분열증 관련 의약품 시장이 각각 연평균 성장률 15.8%와 8.2%로 비교적 빠른 성장세를 나타낼 것으로 예측되고 있다. 또한, 주요 뇌·신경질환으로 구분되지 못한 기타 질환에 대한 시장성장이 비교적 큰 것으로 보아 기타질환에 대한 의약품 개발이 활발할 것으로 예상되었다(Schemes 18, 19).



Scheme 16. 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년)¹⁰⁾

[단위 : 백만달러]

질병	2004년	2005년	Growth 2004-5년	CAGR 2001-5년
알츠하이머(Alzheimer's)	3,275	3,929	20.0%	34.5%
우울증(Depression/Anxiety)	20,311	19,617	-3.4%	5.5%
간질(Epilepsy)	11,418	11,574	1.4%	17.6%
편두통(Migraine)	3,052	3,164	3.7%	7.6%
통증(Pain)	15,896	16,643	4.7%	10.9%
파킨슨씨(Parkinson's)	2,504	2,747	9.7%	12.9%
정신분열증(Schizophrenia)	14,477	16,063	11.0%	19.5%
기타	16,606	18,618	12.1%	13.9%
총합계	87,539	92,355	5.5%	12.8%

Scheme 17. 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년)¹¹⁾



Scheme 18. 뇌·신경질환별 세계시장 전망¹²⁾

[단위 : 백만달러]

질병	2004년	2006년	2008년	2010년	CAGR 2004-10년
알츠하이머(Alzheimer's)	2,719	4,483	5,848	6,564	15.8
우울증(Depression/Anxiety)	17,861	17,821	17,381	15,768	-2.1
간질(Epilepsy)	10,398	13,165	15,208	13,176	4.0
편두통(Migraine)	2,712	2,687	2,497	2,531	-1.1
통증(Pain)	13,852	15,209	15,470	16,200	2.6
파킨슨씨(Parkinson's)	2,137	2,463	2,504	2,350	1.6
정신분열증(Schizophrenia)	12,476	16,219	19,469	21,839	8.2
기타	14,951	17,844	20,277	22,462	7.0
총합계	77,106	89,892	98,654	100,890	4.6

Scheme 19. 뇌·신경질환별 세계시장 전망¹³⁾

뇌·신경질환 관련 의약품을 개발하는 주요 제약사들의 뇌·신경질환 치료제의 판매액을 살펴보면 화이자가 가장 큰 매출을 보였다. 2004년 가장 큰 매출을 보인 GSK는 2004년과 비슷한 수준의 뇌·신경질환 치료제 매출을 보였다. 2005년 화이자(70.8%)와 함께 존슨앤존슨(22.3%), 와이어스(21.0%), 포레스트(30.9%)로서 제약사들의 뇌·신경질환 치료제 판매액은 2002년 대비 20%가 넘는 매출성장을 나타내었다(Scheme 20).

회사명	2004년	2005년	Growth('04→'05)
Pfizer	5,826	9,948	70.8
GlaxoSmithKline	7,367	7,276	-1.2
Johnson & Johnson	5,676	6,942	22.3
Eli Lilly	4,668	5,533	18.5
Sanofi-Aventis	4,459	4,337	-2.7
Wyeth	2,723	3,295	21.0
Merck & Co.	2,811	2,870	2.1
Astrazeneca	2,418	2,833	17.2
Forest	1,697	2,221	30.9
Abbott	1,825	1,972	8.1

Scheme 20. 뇌·신경질환 관련 상위 10개사의 판매액(2004~2005년)¹⁴⁾

하지만, 현재 판매되고 있는 ChEIs는 알츠하이머병에서 인식된 신경전달물질인 아세틸콜린(ACh)의 분해를 방지하여 뇌 내의 ACh량을 증가시키는 것으로 FDA에서 허가된 약품은 Cognex 와 Aricept 두 종류이다. Cognex(성분명은 tarcrine)의 경우 치매 병이 초기 및 중간 단계의 환자들에게 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 그 부작용이 너무 심해 떨림증, 현기증, 구토증, 간독성 등은 우려할 만한 부작용으로 알려져 있다. 효능과 부작용에서 개선된 새로운 제품으로 1996년에 일본의 Eisai사가 개발한 Aricept(성분명은 donepezil) 제품이 시판되었으며 이 제품은 Cognex 보다 훨씬 선택성이 우수하여 부작용이 적어졌으나 이 제품 역시 현기증, 구토증, 설사 등의 부작용이 있다고 보고되고 있고 미국을 비롯한 55개국 이상에서 판매되는 대표적인 치매 치료제로서 연간 10조원 이상의 매출을 기록하고 있다. 이 계통의 새로운 제약들이 개발, 최종 단계에 들어 있는 것으로 베이어제약에서 Metrifonate라는 제품과 Sandoz에서 END-713, Forest사의 physostigmine SR, Astra Arcus사의 NXX-066, Janssen사의 galanthamine 등이 있다. 그밖에 뇌신경전달물질인 아세틸콜린 양을 증가시키는 제약으로 개발중인 약품으로는 Eli Lilly사의 Xanomeline, Parke-Davis사 제품인 milameline, Smithkline Beecham 사의 SB-202026, Suow Brand producto사의 AF-102B와 Abbott사의 ABT-418등이 개발되고 있는 실정이다. 또한 최근 피부에 붙이는 패취형 치매 치료제가 나왔는데, 노바티스의 엑셀론 패취이다. 엑셀론 패취는 콜린분해효소억제제 계열의 약물로 뇌의 신경전달물질인 아세틸콜린의 활성을 증가시키는 작용을 한다. 전문의약품으로 의사 처방을 받아 사용할 수 있으며 1

일 1회 1매씩 허리, 등이나 팔뚝 등에 부착하도록 되어 있다. 하지만 아직까지 ChAT를 활성화 시켜 주는 연구는 genetic approach에 한해서 국내 연구진에서도 비교적 활발히 이루어지고 있는 반면, 개발된 신소재나 drug은 현재 전무한 실정이다.

○ 국내·외 연구현황

기술 내용은 천연물의 본체가 되는 물질에 따라 식물, 동물 또는 미생물을 이용하는 것으로 나타났다. 식물의 경우에는 추출물 자체, 추출물의 농축액, 발효 조성물 등이 사용되었고, 동물의 경우에는 생체 기관, 껍질 또는 분비물 등이 사용되었다. 미생물의 경우에는 주로 버섯을 이용한 경우가 많았으며, 그 외에 균주 추출물, 해조류 등도 사용되었다. 식물의 경우 식물로부터 천연물을 추출하는 방법에 있어서도 열수 추출, 유기 용매를 이용한 추출 이외에도 추출 효율을 높이거나 약리 성분을 부분 추출하기 위한 여러 가지 시도가 진행되고 있는 것으로 나타났다. 현재 기억력 및 인지능력에 관한 개별인정형 기능성원료 및 제품인정 현황은 전체 139종의 기능성 원료 중 10종으로 전체 기능성원료의 7.2%를 차지하고 있다.

미국은 천연약초약품규정(Botanical Drugs Guidance for Industry)을 만들어 전통 약물을 포함하는 약초 원료를 이용한 천연물 신약에 대한 등록 허가 요건 규정을 만들어 세계 전통 약물의 현대화 및 산업화를 주도할 수 있는 토대를 마련하였다. 추후 미국이 한약을 이용한 새로운 건강 보조 식품이나 신약 개발에 있어서 주도적인 역할과 거대한 경제적인 이익을 취하는 목표를 실현하기 위한 것으로 사료된다.

유럽의 국가들은 천연약물, 건강보조식품 등 각종 천연물 사업이 오랜 전통을 갖고 있다. 예로 유럽에서 최초로 은행잎으로부터 징코 플라본 성분을 이용하여 말초혈관 개선제를 개발하였다. 유럽 EU 회원국의 각 국가에는 천연물 관련 단체와 모임이 많고 천연물 관련 표준 규격과 통일된 규정을 제정하여 운영하려는 노력을 진행하고 있다. 중국은 각종 천연물 제품의 개발과 연구를 정책적으로 지원하고 있으며, 이를 통해 한약 사업의 국제화 노력을 추진하고 있다. 중국은 국가적 지원이 집중되어 있고 시설과 장비면에서도 우수하며, 고도의 전문 기술 인력을 보유하고 있다는 점에서 향후 천연물 산업 기반을 확고하게 구축할 수 있을 것으로 판단된다. 일본은 미생물 발효 공업에 초점을 두어, 항생제, 합성 약품 및 유전자 조작을 이용한 생명공학 제품으로 발전하고 있기 때문에, 한약 제품이 차지하는 비중은 다른 나라에 비하여 상대적으로 낮다. 그러나 최근 미국의 보완-대체 의학의 연구 경향에 따라 전통 의학의 개발에도 집중하고 있는 것으로 판단된다.

본 연구를 통해 개발된 제품의 목표 시장은 알츠하이머병 및 도파민 퇴행, 중독성 약물 등 퇴행성 뇌질환으로 고통 받는 환자들과 위와 같은 뇌질환을 예방하고자 하는 중장년층 이상의 사람들을 목표 시장으로 설정하고 있다. 식약청의 개별인정형 건강 기능식품의 판매액이 2007년 기준 264억 원으로 이중 노화에 관련된 시장의 규모는 약 50% 이상이다. 건강기능식품 시장 환경의 변화에 따라 2030세대의 건강기능식품 구입률이 매년 증가하는 추세이며, 이들 2030세대가 건강기능식품 시장의 주요 고객으로 부상하고 있다.

치매 치료제의 특허 출원을 살펴보면 전체 2,039건 중 미국이 40.8%를 차지하고 있으며 유럽이 29.0%, 일본이 17.3%로 그 뒤를 잇고 있다. 이를 보면 미국과 유럽의 선도적인 기술을 짐작할 수 있다. 또한 특허 출원이 본격적으로 시작된 시점을 보아도 미국이 가장 앞서고 있으며 유럽, 일본이 그 뒤를 따르고 있다. 이는 고령화 사회로 먼저 진입한 구미 선진국이 치매에 대한 연구 및 치료제 개발을 활발히 하고 있다는 사실로 해석된다. 이러한 점은 외국 제품들이 국내 치매 치료제 시장을 장악하고 있고 특허 출원 역시 외국에 편중되어 있다는 상황을 보여준다. 하지만 천연물을 활용하는 치료약물 개발에 있어서는 외국 선진기술에 비해 국내 연구진이 충분한 우수성을 가진 분

야로 판단되며, 본 연구팀의 연구 개발을 통해 천연자원에서 검색된 물질은 기존의 외국특허와도 마찰을 일으키지 않을 가능성이 높다. 또한 이를 이용하여 건강기능식품의 출시 시 그 파급력은 매우 클 것으로 생각된다.

건강기능식품은 지난 10년간 꾸준한 성장을 해오고 있으나, 세계시장에 비추면 매우 미약한 시장을 형성하고 있으며, 소재부분은 수입 원료의 의존도가 매우 높아 국내 생산 건강기능식품의 국제 경쟁력은 미약할 수밖에 없는 실정이다. 국내 건강기능식품산업은 2002년 건강기능식품법 제정을 통하여 세계 속의 기능식품 시장에 진입하는 제도적 장치는 마련되었다. 하지만, 건강기능식품법은 본 법의 입법취지를 달성하기 위하여 질병관련 허위·과대광고 등과 관련하여 매우 강한 규제성 조항으로 규정되어 있고, 영업자의 영업활동과 관련된 사항도 강력한 규제조항을 담고 있으며, 건강기능식품의 안전성, 기능성을 입증하기 위한 과학적인 연구 자료의 첨부도 의무화되어 있어, 건강기능식품산업계에는 큰 부담으로 작용할 수도 있으므로 정부기관과 산업계 및 소비자 단체의 의견 조율을 통한 문제점 해결이 중요할 것으로 보인다.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

○ 연구 개발 추진전략 및 방법

1. 향치매(인지능 개선) 소재 개발

가. *In vitro* assay계 확립

- 천연물을 대상으로 추출조건과 방법에 따라 시료를 추출한 후 노인성 뇌장애 개선 활성화 성분을 다음과 같이 검색함. PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^7 - 10^8 cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 뇌세포 신호전달성분 분해효소를 조제한다. Ellman 법을 응용하여 신호전달성분 분해효소와 기질용액 (500 μ M ACh, 1 mM DTNB, 50 mM sodium phosphate buffer), 식물 추출액 (1 mg/ml)을 96 well plate의 각 well에 넣은 후 37°C에서 microplate reader로 흡광도(405 nm)를 측정 하여 추출물의 ACh 분해효소 억제활성을 측정함.
- 여러 추출조건과 방법에 따라 추출 희분을 조제한 후 뇌세포신호전달성분 분해효소 활성 억제능을 확립된 assay를 통해 측정함.

나. 천연 식용 식물자원의 cell 독성 검사

: MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 등과 같은 cytotoxicity test 방법으로 시료의 cell 독성여부를 검사함.

다. *In vivo* assay 계의 확립 및 최종시료의 *in vivo* test를 통한 그 효과 검증

: 조추출물을 이용한 1차 *in vivo* test, 활성 물질을 이용한 2차 *in vivo* test

<Y-maze test>

- ICR-male mice는 식이와 선정시료를 약 3주-4주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 뇌세포상해 유발성 물질로는 TMT (trimethyltin) 또는 scopolamine 등을 각각 2-3일 전에 또는 실험 30분 전에 injection하여 기억력 실험 및 행동실험을 실시한다. ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-미로를 이용하여 시행하여 각 arm에 이동한 횟수를 파악해 수치된 결과를 각 그룹별로 비교해 본다.

<Passive avoidance test>

- 위의 조건처럼 ICR-male mice는 feed와 선정시료를 약 3주-4주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 뇌세포상해 유발성 물질로는 TMT 또는 scopolamine 등을 각각 2-3일 전에 또는 실험 30분 전에 injection하여 기억력 실험 및 행동실험을 실시한다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 electric shock (0.25 mA 또는 0.5 mA)에 대한 기억을 training을 통해 인지를 시킨 다음 behavioral test를 실시한다.

<In vivo상에서의 시료에 대한 독성 측정>

- ICR-male mice는 식이와 선정시료를 농도별로 구성하여 약 3주-4주간 *ad lib*의 상태로 공급한다. 식이 후 채혈하여 간 손상 시 생성되는 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST) 및 생존율을 측정하여 시료에 대한 독성 정도를 측정한다.

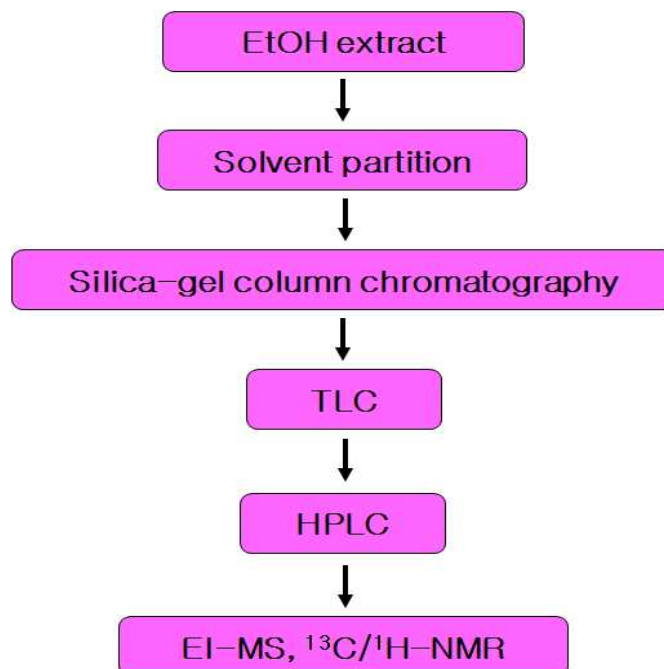
라. 계피와 금앵자 추출 혼합물을 이용한 상승효과 확인

- Acetylcholinesterase (AChE)의 저해 효과 물질을 금앵자의 뇌신경세포 보호 물질 혼합 시 뇌질환 개선 상승효과 *in vitro* 확인 (AChE 저해능 및 독성여부 확인)
- 계피와 석류 추출물을 혼합한 식이를 투여, *in vivo* 행동실험을 통한 기억력 test
- 간 독성실험 및 뇌에서의 시료의 효과를 측정하기위해 biochemical parameter 시행

2. 향치매(인지능 개선) 효과 활성물질 분리, 정제 및 구조규명

가. 추출법 확립 및 예비 정제

- 최종 선정된 계피를 핸드 믹서로 곱게 마쇄한 후에 계피 조말을 g당 5배 부피의 70% ethanol로 24시간 동안 흔들어 추출한 후 filtering 시킴. 이 과정을 5회 반복하여 추출한 후 감압 농축하여 시료 ethanol 추출물을 조제함.
- 본 정제 과정에 들어가기 전 예비정제를 통하여 알맞은 조건 찾음.



나. 선정된 시료에서의 분해효소 억제 및 제어 성분의 분리 및 정제

- 최종 선정된 시료를 대상으로 억제 및 제어 성분의 최적 추출조건을 검토, 확립하고 신속한 정제를 목적으로 추출 획분의 중량당 활성, 즉 비활성을 조사함.
- 추출물의 정성분석을 통하여 활성본체(carotenoid, flavonoid, alkaloid, terpenoid, phytosterol, chlorophyll, hetero-polysaccharide, proteoglycan, flavonoglycoside 등)를 예비 동정함.
- TLC와 각종의 수지를 사용하여 예비분리조건을 검토한 후 open column chromatography, TLC, prep-HPLC, analytical-HPLC 등을 사용하여 구조분석이 가능한 수준까지 정제함.

다. 선정 시료에서 분리, 정제한 억제 및 제어 성분의 구조분석 및 수식

- 다당류인 경우 backbone의 구성당 순위, 당쇄결합, anomer의 배위 등의 구조를 규명함.
- 정제된 성분이 phytosterol인 경우 기존 보고된 물질과의 동일성 여부와 신규화합물일 가능성을 밝히고 물질의 구조를 IR, NMR, FAB-MASS, HPLC, UV 등을 사용하여 규명함.
- 정제된 물질이 flavonol 또는 flavonoglycoside일 경우 IR, NMR, FAB-MASS, HPLC, UV 등을 사용하여 전 구조를 규명함.
- 정제된 성분이 flavonoglycoside일 경우 구성당의 종류별 flavonoglycoside를 유기합성한 후 *in vivo* 및 *in vitro*계에서 활성의 증감을 검토함.
- 정제된 성분이 펩타이드 또는 flavonoglycoside일 경우 전 구조를 결정하고, 활성과 구조간의 상관성 및 고활성 활성물질의 창출을 위해 아미노산 또는 구성당이 치환된 펩타이드와 flavonoglycoside를 유기합성한 후 이들의 유용성 여부를 *in vivo*, *in vitro*계에서 확인함.
- 정제된 성분의 작용기작과 활성부위 및 구조의 상관성을 sulfation, *o*-desulfation, deacetylation 등의 화학수식과 효소적 partial hydrolysis를 통해 해명함.

3. 제품 개발을 위한 실험

가. 제품화를 위한 공업적 활용 및 가공적성 검토

- Bench scale의 추출 최적조건 확립 및 pilot plant scale의 추출공정 확립
- 공업적 순도수준의 정제방법을 확립
- 중간원료로서 물질 안정성 및 타 소재들 내에서의 물성, 가공적성 검토
- 액상, granule, tablet, capsule 형태의 시제품화 시 저장적성을 검토

나. 시작품 제작

- Extract, 기호음료, tablet, capsule 형태로의 시작품 제작
- 시작품 가공, 품질 및 저장적성 검토
- 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 시험
- 보존기준 유통기간 및 그 설정에 관한 시험
- 유해물질에 대한 규격 및 그 설정에 관한 자료

4. 개별인정형 추진을 위한 실험

가. 건강 기능 식품소재의 제조 방법 확보

- 원재료 표준화: 식물 종, 사용부위, 채취시기, 원산지 등에 따른 일정한 활성 및 높은 유효성분 함량을 가진 최적의 원료를 선정하고 대량 수급 경로 확보
- 제조공정 표준화: 원료의 수율 최적화 공정 확립

나. 지표 물질 선정 및 표준물질 확보

- 지표물질 선정: 식용식물 추출물의 활성 지표물질을 선정하기 위해 추출 및 정제를 시행한 후, 분리된 활성물질의 순도를 높이기 위해 HPLC를 통해 분석함. 성분 peak들 중에서 분석법 설정과 정제분리의 용이성을 고려하여 지표물질로 선정함.
- 지표물질 규명: 식용식물 추출물로부터 최종 정제된 활성물질을 기존 보고된 물질과의 동일성 여부와 신규화합물일 가능성을 밝히고 물질의 구조와 mass size를 IR, NMR, FAB-MASS, HPLC 등을 사용하여 규명함.
- 표준물질 분리 공정법 개발 및 표준물질 확보
 - 지표성분 분리·정제 공정: 건강기능식품의 품질관리(QC)를 위해서 선정된 지표성분의 표준물질 확보가 필요함. 선정된 식용식물 주정추출물을 이용하여 solvent partition, silica-gel open column chromatography, TLC, HPLC를 통하여 약리·생리활성을 가지는 소재를 정제 분리하는 공정법을 확립함.
 - 지표성분의 표준품 제조: 상기 기술된 분리 공정법을 통해 표준물질 정제 및 분리한 후, 고순도의 표준물질을 획득하여 표준품을 제조함.
 - 표준물질 안정성 시험: 표준물질의 보관 조건 설정을 위해 분석조건 용매에 녹인 후 상온과 냉장보관 조건에서 시험함. HPLC 분석을 통해 시기별로 표준물질의 변성 유무를 확인하고, 크로마토그램상의 area값이 일정한 경향을 보이며 안정성을 나타내는 조건을 표준물질의 보관 조건으로 설정함.

다. 함량시험법 설정 및 분석법 밸리데이션

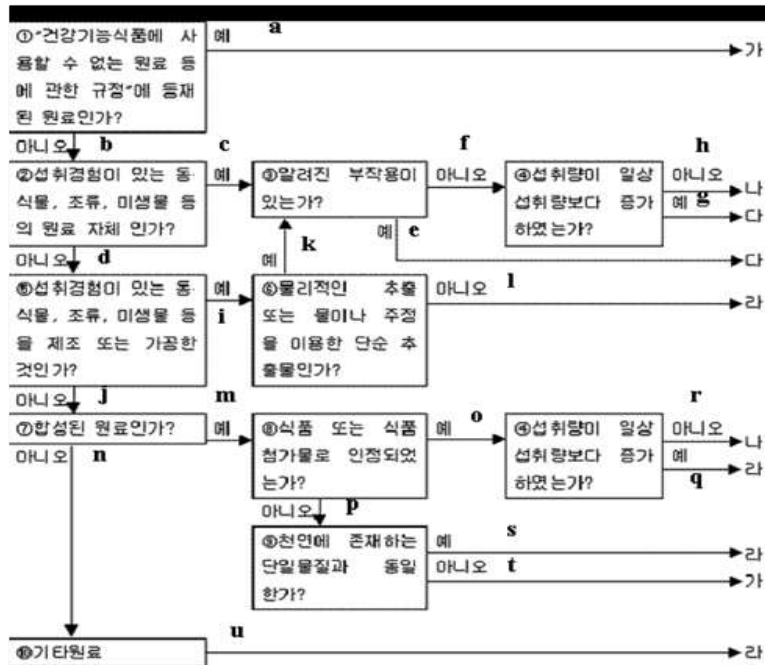
- 표준물질의 함량시험 분석법 설정: 건강기능식품에서 지표성분인 표준물질의 함량을 정확히 측정하기 위해서는 적절한 분석법 설정이 필요함. 이를 위해 검액 제조, 용매, 컬럼, 분석과장, 온도에 대한 조건별 시험을 통해 최적의 HPLC 분석법을 설정함.
- 분석법 밸리데이션
 - 특이성(Specificity): 시험용액의 건강기능식품과 표준물질을 1:1(v:v)로 섞은 후 3회 분석하여 실측함량비율 및 변동계수를 확인함.
 - 직선성(Linearity): 표준물질 시료를 농도별(최소 5개)로 희석하여 3회 분석한 후 상관계수 (R^2)를 통해 직선성 여부를 확인하고 회귀방정식으로부터 역산출한 농도값에 대한 이론상 농도 값의 상대오차값을 확인함.
 - 정확성(Accuracy): 농도별 표준물질 시료와 조제한 건강기능식품을 1:1(v:v) 비율로 혼합 후, 각 3회 분석하여 검량선을 이용하여 역산된 평균농도와 이론치의 상대오차, 변동계수를 확인하여 정확성의 허용기준 (상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만)에 적합한지 확인함.
 - 정밀성(Precision)
 - * 반복성: 표준물질을 일정농도에 대하여 10회 분석하여 유지시간 측정값의 변동계수와 분석면적 측정값의 변동계수를 허용기준 (유지시간 변동계수: 1% 미만, 분석면적 변동계수: 2% 미만)에 적합한지 확인함.
 - * 일내정밀성: 농도별 표준물질 용액을 짧은 시간차로 반복 분석하여 얻은 측정값들 사이의 상대오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만).
 - * 일간정밀성: 농도별 표준물질 용액을 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 분석장비 등을 이용하여 분석 실험한 측정값들 사이의 상대오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만).
 - 범위(Range): 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성이 입증되는 표준물질의 농도의 상한 및 하한 값 사이의 영역을 설정함.
 - 완건성 (Robustness): 농도별 표준물질 용액을 설정한 분석법에서 이동상의 pH 및 조성, 컬

림, 분석온도, 유속 등 임의로 변경하여 각각 분석한 이론상 농도대비 상대오차 및 변동계수를 확인함.

라. 식품의약품안전처로부터 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 추진

- 제출자료 전체의 총괄 요약본
- 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황
- 제조방법 및 그에 관한 자료
- 원료의 특성에 관한 자료
- 기능성 성분 (또는 지표성분)에 관한 자료: 지표성분의 함유량 측정, 정제 방법에 따른 성분 추출 수율 변화 확인, 원재료 확보 시료생산, 기능성분 규격 설정 실험 실시
- 유해물질에 대한 규격 및 그 설정에 관한 자료
- 임상 및 안전성에 관한 시험: 식약처 제시 안전성 평가를 위한 의사결정도 참고 후 추가 독성 실험 여부 판단함

식약처 제시 안전성 평가를 위한 의사결정도



제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료 ¹⁾		√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 ²⁾		√	√	√
섭취량평가자료 ³⁾		√	√	√
영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료 ⁴⁾			√	√
독성시험자료 ⁵⁾				√

- 기능성 내용 및 그에 관한 자료조사
- 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 시험

- 보존기준 유통기간 및 그 설정에 관한 시험
- 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료조사

마. 경증의 인지기능장애에 대한 식용식물 추출물의 안전성 및 효능평가를 위한 이중맹검, 대조물질대조, 무작위배정 인체적용시험

- 일차목적: 경증의 인지기능장애를 가진 피험자에서 식용식물 추출물을 12주간 복용한 군과 대조물질을 복용한 군간 복용 전·후의 인지기능개선효과 평가
- 이차목적
 - 식용식물 추출물 복용에 대한 12주간 복용한 군과 대조물질을 복용한 군간 복용전후의 전반적퇴화척도(GDS) 평가, 뇌영상학적 검사를 통한 구조적, 기능적 변화 분석
 - 식용식물 추출물 복용에 대한 안전성 평가
- 시험디자인: 다기관 (가톨릭대학교 서울성모병원, 가톨릭대학교 성빈센트병원), 이중맹검, 대조물질대조, 무작위배정, 인체적용시험
- 인체적용시험용건강식품
 - 시험건강기능성식품: 제품성상, 성분/함량, 저장방법, 용법용량 제시
 - 대조기능성식품(주성분을 제외한 성상은 시험건강기능성식품과 동일)
- 인체적용시험건강식품: 시료 추출물 또는 대조물질 캡슐; 2Cap./회, 하루 3회 식후투여
- 유효성 평가변수
 - 1차 유효성평가변수: 인체적용시험건강식품 시료 추출물 복용 후 인지기능개선율
 - 2차 유효성 평가변수: 전반적퇴화척도(GDS) 점수의 복용전·후 군간 변화, Brain SPECT, Brain MRI
- 안전성 평가변수: 이상반응, 활력징후 및 임상적 실험실적 검사 결과
- 선정기준
 - 만 50세 이상의 남, 여 피험자
 - 선별검사인 Korean Version of Mini Mental Status Examination in the Korean version of CERAD Assessment Packet (MMSE-KC) 기준 27점 이하이고 24점 이상인 자. (통상의 치매의 진단을 위한 MMSE-KC의 선별기준은 24점 이하로 본 임상시험에서는 경도 인지저하 환자 중 주관적 인지기능 저하를 호소하는 자를 대상으로 함)

(a) 인체적용시험 연구일정

- 본 연구의 성공적인 수행을 위해서는 뇌구조의 변화 뿐 아니라 인지기능 측정, 심혈관 위험도 분석, 심리검사 등을 종합적으로 고려해야 하며 이를 위한 장비, 인력이 이미 확보된 상태로 본 연구는 이러한 연구 지원 체계를 심분 발휘하여 원활하게 연구를 진행할 예정임.
- 연구자 소속기관에 보유한 다양한 영상분석 프로그램을 이용하여 뇌 자기공명영상 자료의 분석이 가능하며 가톨릭대학교 부속병원과 건강검진 센터의 인프라를 활용한 다기관 연구가 가능함. 따라서 환자군과 정상대조군 확보 및 연구 진행, 결과 분석 진행을 일정대로 수행할 수 있을 것으로 예상됨.
- 인체적용시험용 기능성식품의 투약은 피험자가 동의서에 서명하고 스크린을 통하여 선정/제외기준에 부합하는 피험자들을 시험군과 대조군으로 무작위 배정하여, 양쪽군 동일하게 시험건강기능성 식품인 계피와 금앵자 혼합추출물 캡슐과 동일한 복용방법(2Tab./회, 하루 3회)으로 식후에 투약되고 인체적용시험 기간인 12주 동안 복용한다. 시험건강기능성 식품과 대조기능성식품의 복용 순응도는 반납되는 인체 적용시험용 기능성식품의 수량을 기준으로 한다. 피험

자당 12주간의 연구 일정이 소요될 예정이다.

(b) 인체적용시험 연구기간

- 본 인체적용시험의 관찰기간은 투약 시작 후 12주이며, 전체 인체적용시험기간은 첫번째 피험자 등록 후 6개월로 계획되어 있다. 하지만 피험자 등록기간의 연장 등의 사유로 전체 인체적용시험 기간은 연장 될 수 있다. 본 시험은 계피와 금앵자 혼합추출물과 대조기능성식품간의 인지기능개선에 대한 안전성과 유효성을 비교 평가를 위한 단일기관, 이중맹검, 대조물질대조, 무작위 배정 인체적용시험으로 예정이다. 시험은 2개의 시험기관에서 진행될 예정이며, 선정 및 제외기준을 만족하는 총 100명의 예상 피험자가 등록되어 1:1의 비율로 시험용 건강기능식품 또는 대조 건강기능식품을 12주 동안 복용할 예정이다.
- 목표한 피험자의 수 및 그 근거

	시험군	대조군	총 피험자 수
유효성 평가례수	40명	40명	80명
Drop-out(20%)을 포함한 예수	50명	55명	100명

(c) 인체적용연구시험 이중맹검 및 무작위배정

인체적용시험에 자의적으로 참여할 것을 동의하고, 동의서에 서명한 피험자 중 선정 및 제외기준을 만족하는 피험자는 시험용 기능성식품 또는 대조용 기능성식품 군에 무작위로 배정될 것이다. 본 인체적용시험은 이중맹검 시험으로 본 인체적용시험을 과학적이고 객관적으로 시행하기 위해 블록 무작위 배정(Stratified Block Randomization)방법에 의하여 무작위 배정표를 작성한다. 이때 각 기관에 따라 미리 지정한 블록크기를 고려하여 충분한 크기의 무작위 배정표를 발생한다. 의뢰자/CRO는 사전에 무작위배정봉투에 따라 준비하고 공급한다.

(d) 인체적용연구시험 병용약물 및 병용기능식품

본 인체적용시험은 통상적인 진료 상황에서 이루어지는 인체적용시험으로 인체적용시험의 결과에 영향을 미치는 기능성식품을 제외한 나머지 기능성식품은 연구자의 임상적 판단에 따라 처방이 가능하며, 처방 내역을 증례기록지에 기록하여야 한다. 본 인체적용시험의 선정/제외기준 및 인체적용시험용 기능성식품과 함께 처방하는 것이 금지인 의약품 및 건강기능식품의 내역은 아래와 같으며 경구용 혈당강하제와 혈압조절의약품은 시험 기간 동안 가능한 일정 용법/용량이 유지되어야 한다.

제외 기준

- 1) DSM-IV 치매 선정 기준에 포함된다
- 2) 신경 또는 정신의학적으로 중요한 병이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 환자(우울증, 정신분열병, 간질, 알코올 중독, 약물남용 혹은 중독)
- 3) 심질환 (심부전, 협심증, 심근경색)진전된 동맥 경화증 환자
- 4) 악성종양 또는 폐질환이 있는자
- 5) 심한 신 기능 장애가 있는 환자 (serum creatinin 이 2.0mg/dl이상)
- 6) 심한 간 기능 장애가 있는 환자(AST, ALT Bilirubin 중 정상 상한치의 2.5배 이상)
- 7) 계피와 금앵자 혼합추출물에 과민증이 있는자
- 8) 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장 마비의 병력이 있는 자

- 9) 최근 1개월 이내에 본 인체시험에 영향을 미칠 수 있는 치매와 기억력 향상에 도움이 되는 대표적인 의약품이나 건강 기능식품 등을 복용한 경험이 있는 자
- 10) 현재 다른 임상시험 또는 인체 시험에 참여하고 있거나 최근 1개월 이내에 임상시험 또는 인체 시험에 참여하고 있는 자
- 11) 문맹자
- 12) 인체 시험 담당자의 소견으로 볼 때 시험의 준수 사항을 따를 수 없다고 판단 되는 자

<비용금지약물>

- A. 치매치료제
- B. 우울증 치료제
- C. 인지기능향상의 기능을 가진 기능성건강식품 (당귀추출물)

피험자의 의학적 상태에 따라 상기 비용금지 약물을 연구자판단에 따라 투여하여야 하는 경우, 해당 피험자의 인체적용시험 참여중단을 고려하여야 한다.

(e) 인체적용시험 일정표

시 험 항 목	Screening	Baseline	Treatment	Treatment	End-Visit
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5
	첫 투여 전 14일 이내	Week 0 (Day 0)	Week 4 (±3 Days)	Week 8 (±3 Days)	Week 12 (±3 Days)
서면동의 ¹⁾	✓				
인구학적 조사 ²⁾	✓				
병력·약물력 조사 (시험참여4주이내)	✓				
활력징후 ³⁾	✓	✓	✓	✓	✓
신체검사 ⁴⁾	✓	✓	✓	✓	✓
신경심리학적 검사 ⁵⁾	✓				✓
GDS검사 ⁶⁾	✓				✓
노인우울척도 검사	✓				
실험실 검사 ⁷⁾	✓		✓	✓	✓
선정/제외기준 ⁸⁾	✓	✓			
무작위 배정		✓	✓	✓	
인체적용시험용 건강기능 식품처방 및 교부		✓	✓	✓	
인체적용 시험용 건강기능 식품 반납 및 순응도 평가			✓	✓	✓
비용 약물 조사	✓	✓	✓	✓	✓
이상반응 확인		✓	✓	✓	✓
인체적용시험 종료 평가					✓

(1) 인체적용시험에 들어가기 전에 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 피험자 및 보호자에게 상세히 설명한 후, 각각에 대하여 문서로서 동의를 받는다. 서면동의를 어떠한 과정보다 앞서서 이루어져야 한다. 동의서는 피험자 및 보호자 (법적대리인)가 직접 서명 및 날짜를 기입하는 것을 원칙으로 한다.

(2) 모든 동의를 취득한후, 성별 및 나이 등 정보를 조사한다.

- (3) 수축기/이완기 혈압, 맥박 및 체온 등을 측정한다.
- (4) 시험책임자 또는 시험담당자가 피험자에게 문진, 사진, 촉진 등 청진기증의 검사를 통해 얻게 되는 정보이다.
- (5) 신경심리학적 검사(CERAD-K)는 시험자 또는 위임받은 전문검사자가 실시 평가한다.
- (6) 전반적퇴화척도(GDS) 검사는 시험자 또는 위임받은 전문검사자가 실시한다.
- (7) 피험자는 다음의 항목을 검사한다.

혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).

혈액 화학적 검사: ALT, AST, ALP, total bilirubin, albumin, BUN, γ -GT, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

뇨검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilirubin

- (8) 선정/제외기준은 Screening 방문 시에 확인한다. 기준에 적합한 피험자는 순차적으로 피험자 등록번호가 부여된다.

(f) 인체적용시험 관찰일정항목

방문 1 : 시험 건강기능식품 첫 투여 전 14일 이내 (Screening 방문)

동의서에 서명을 취득하고 약물투여가 시행되기 14일 이전에 다음의 자료가 수집되고 연구가 진행될 예정이다.

- ① 서면동의서 작성
- ② 인구학적 조사(성별, 나이 등)
- ③ 병력·약물력 조사
- ④ 활력징후(혈압, 맥박, 체온)
- ⑤ 신체검사(신장, 체중 조사: 스크리닝 검사와 마지막 방문)
- ⑥ CERAD-K 검사
- ⑦ GDS검사
- ⑧ 실험실검사

혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).

혈액 화학적 검사: ALT, AST, ALP, total bilirubin, albumin, BUN, γ -GT, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

뇨검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilirubi

- ⑨ 피임여부 및 임신검사: Urine HCG (가임기여성만 실시한다.)
- ⑩ 선정 및 제외기준 조사
- ⑪ 병용약물 및 병용건강기능식품 조사

방문 2 : 0주 (baseline 방문)

방문1의 결과를 확인하고 선정/제외기준이 확인되는 경우, 방문2와 함께 진행할 수 있다. Screening 방문 2주 이내의 기간에 피험자는 두 번째 방문을 실시하여 다음 항목을 조사·확인 받아 시험건강기능식품 또는 대조 건강기능식품을 투여 받게 된다. 또한 시험 군과 대조군에서 각각

10명씩 추출하여 SPECT 및 Brain MRI검사를 실시한다.

- ① 활력징후 (혈압, 맥박, 체온)
- ② 선정 및 제외기준 확인
- ③ 무작위배정
- ④ 인체적용시험용기능성식품 처방 및 교부
- ⑤ 병용약물 조사
- ⑥ 이상반응

방문 3 : 4주± 3일 (Treatment 방문)

두 번째 방문시점으로부터 4주째인 세 번째 방문에서는 다음 항목을 조사 한다.

- ① 활력징후 (혈압, 맥박, 체온)
- ② 실험실검사
- ③ 인체적용시험용기능성식품 처방 및 교부
- ④ 인체적용시험용기능성식품 반납 및 순응도 평가
- ⑤ 병용약물 및 병용건강기능식품 조사
- ⑥ 이상반응 조사

방문 4 : 12주± 3일 (Final 방문)

종료방문으로 다음 항목을 조사 확인한다.

- ① 활력징후(혈압, 맥박, 체온)
- ② 신체검사(신장, 체중 조사: 스크리닝 검사와 마지막 방문)
- ③ CERAD-K 검사
- ④ GDS검사
- ⑤ 실험실검사
 - 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count (neutro, eosino, baso, lympho, mono).
 - 혈액 화학적 검사: ALT, AST, ALP, total bilirubin, albumin, BUN, γ -GT, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol
 - 뇨검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilirubin
- ⑥ 피임여부 및 임신검사: Urine HCG (가임기여성만 실시한다.)
- ⑦ Brain SPECT, Brain MRI
- ⑧ 이상반응조사
- ⑨ 인체적용시험 종료평가

(g) 유효성 및 안전성 평가변수, 평가방법 및 해석방법 (예정)

- ① 유효성평가변수
 - Korean Version of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

(CERAD-K)

- 뇌 단일광자 단층촬영 Brain Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)
- 뇌 자기공명영상 Brain Magnetic resonance imaging

▪ 1차 유효성 평가변수

인체적용 시험 건강기능식품 계피와 금앵자 혼합추출물 복용 후 인지기능 개선을

▶ CERAD-K score를 이용하여 개선여부 측정

개선 : CERAD-K score가 기저시점에 비해 종료시점에서 증가하거나, 변화 없음

비개선 : CERAD-K score가 기저시점에 비해 종료시점에서 감소

- 1) Verbal Fluency
- 2) Boston Naming Test
- 3) Mini-mental State Exam
- 4) Word List Memory
- 5) Constructional Praxis
- 6) Word List Recall
- 7) Word List Recognition
- 8) Recall of Constructional Praxis

▪ 2차 유효성 평가변수

- 전반적퇴화척도(GDS) score의 복용 전·후 구간 변화
- 뇌 단일광자 단층촬영 Brain Single Photon Emission Computed Tomography(SPECT)
- 뇌 자기공명영상 Brain Magnetic resonance imaging
- 1) 화소기반 형태분석(voxel-based morphometry ; VBM)
- 2) Surface based analysis를 이용한 회색질의 두께 차이 분석
- 3) TBSS (Tract Based Spatial Statistics)

② 안전성평가변수

- 이상반응
- 활력징후
- 임상실험실검사

③ 포함되는 피험자 집단 (Study Population)

피험자로부터 얻어진 자료는 Safety Set, FAS (Full Analysis Set), ITTS (Intention-to-Treatment Set), PPS (Per- Protocol Set)으로 나뉜다.

본 임상시험의 주 분석 집단 (Main Population) 은 ITTS (Intention-to-Treatment Set)로 정의한다. FAS (Full Analysis Set) 군 분석도 함께하여 결과를 비교하되 크게 차이를 보이는 경우에는 각 분석 대상자의 결과를 예시한다. ITT (Intention-to-Treat)원칙을 따르며 본 인체적용시험에 사용되는 기능성식품을 한 번이라도 복용한 피험자 중 Baseline 이후에 적어도 한번 이상 1차 유효성 평가변수의 값이 측정된 피험자 군을 대상으로 한다. PP (Per-Protocol)원칙을 따르며 인체적용시

험계획서대로 인체적용시험을 완료한 피험자 군으로 다음에 해당하는 경우를 제외시킨다.

- ① 인체적용시험계획서에서 명시한 기간을 채우지 못하고 인체적용시험에서 중도 탈락한 피험자
- ② 병용 금지약물을 복용한 피험자
- ③ 복약순응도 70% 미만 피험자
- ④ 그 외 중대한 계획서 위반을 한 피험자

본 인체적용시험에 등재한 모든 피험자 중 선정/제외 기준을 만족하고, 치료를 시작한 후 안전성 관련 데이터를 최소한 한 번 이상 확인한 피험자에 한한다.

④ 결측치 처리 방법

어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 인체적용시험이 종료되기 전에 피험자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당시점에서 얻어진 것처럼 자료 분석을 실시한다 (Last Observation Carried Forward; LOCF).

⑤ 자료와 임상병력 자료

환자의 기저상태 특성을 시험군 별로 적절한 기술적 통계방법을 이용하여 요약한다. 연속형 자료는 평균, 표준편차, 최소, 최대치 등을 구하고, 범주형 자료는 빈도와 백분율을 계산한다. 두 군간에 비교는 자료의 정규성 여부에 따라 연속형 변수는 two-sample t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test에 의해 비교하며, 범주형 변수는 chi-square test 또는 fisher's exact test를 이용하여 비교한다.

⑥ 평가분석방법

▪ 1차 유효성 평가변수

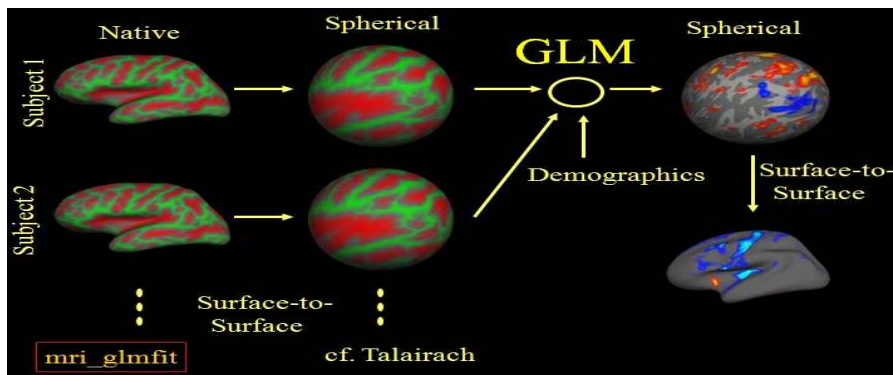
1차 유효성 평가변수인 건강기능식품 계피와 금앵자 혼합추출물 투여 후 인지기능 개선률이 대조용 건강기능식품에 비해 시험용 건강기능식품이 우월함을 보이기 위함하므로, CERAD-K 를 사용하여 1)기억력 2)언어능력 3)시공간 기능 4)주의력 5)수행능력 6)MMSE-KC의 각 영역에 대한 인지 기능을 측정된 것을 유효성 평가로 정의한다. 각 영역에 대한 검사 결과는 백분율로 제시된다. 주 분석방법은 Chi-Square Test 또는 Fisher's Exact Test를 시행하여, p-value가 양측 유의수준 0.05보다 작음을 보일 것이다. 추가적으로 투여 전(Visit 1) CERAD-K score와 투여 후(Visit 4) CERAD-K score 의 변화량이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Student T-Test 또는 비모수 검정법인 Mann-Whitney U-Test를 이용하여 양측 유의수준 5%에서 검정한다. 또한, 기저시점 대비 종료시점의 CERAD-K score의 군내 변화량에 유의한 차이가 있는지 각 군간 Paired T-Test 또는 Wilcoxon Signed Rank Test를 양측 유의수준 5%에서 시행한다.

▪ 2차 유효성 평가변수

투여 전(Visit 1) 전반적퇴화척도(GDS) score와 투여 후(Visit 4) 전반적퇴화척도(GDS) score 의 변화량이 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Two sample T-Test 또는 비모수 검정법

인 Mann-Whitney U-Test를 이용하여 양측 유의수준 5%에서 검정한다. 또한, 기저시점 대비 종료시점의 전반적퇴화척도(GDS) score의 군내 변화량에 유의한 차이가 있는지 각 군간 Paired T-Test 또는 Wilcoxon Signed Rank Test를 양측 유의수준 5%에서 검정한다. 또 다른 유효성 변수인 SPECT검사는 투여 전후의 뇌 활성화 정도를 Statistical Parametric Mapping(SPM)을 이용한 paired t test를 실시하고 군간 비교는 ANCOVA방법으로 비교한다. 또한 MRI는 Voxel based morphometry 방법을 이용하여 뇌 용적의 변화 속도를 대조군과 비교한다.

- 화소기반 형태분석(voxel-based morphometry ; VBM) 방법 : 자기공명 데이터를 이용한 화소기반 형태분석은 MATLAB (Mathworks Inc., USA)상에서 구현되는 SPM (Institute of Neurology, University College of London, UK)을 이용한다. DICOM 포맷의 MR 영상을 헤더 정보와 영상정보를 분리하여 Analyze 형식으로 변환하고, 각 대상자에 대한 움직임과 파일크기에 대한 교란변수들을 교정하기 위해 정합 보정하고 동일한 MRI 표준판(template)의 표준 공간으로 공간정규화(spatial normalization)한다. 정규화 된 영상에서 회색질을 추출하여 표준판을 이용한 그룹간의 차이를 통계적 분석방법을 통해 국소화 하고 정상그룹과 비교하여 두드러지게 차이가 나는 회색질 영역이 어디인지를 통계적 파라미터 지도 작성법으로 나타낸다.
- Surface based analysis를 이용한 회색질의 두께 차이 분석: MPRAGE 이미지에서 Freesurfer 프로그램을 이용한 뇌 표면 분석(surface based analysis)을 시행하며, 이를 통하여 체질량지수 및 지방분포 양상에 따른 회색질의 두께(cortical thickness)차를 분석한다.
- 확산 텐서 영상(Diffusion Tensor Imaging)은 TBSS (Tract Based Spatial Statistics) 방법을 이용하여 분석함으로써 백색질의 구조 및 형태 이상을 확인한다.



뇌 표면 분석 방법을 이용한 회색질 두께 변화 분석의 흐름도

▪ 안전성 평가분석방법

안전성 분석의 대상은 Safety Set으로 하고 대상이 되는 자료는 기능성식품을 1회라도 복용한 후 새로이 발생한 이상반응과 각 방문 시 실시한 임상검사 및 실험실 검사 결과 등이다. 각각의 이상반응에 대해 한 번 이상의 이상반응을 경험한 피험자 수 및 백분율을 시술한 인체적용 시험용 건강 기능식품 별로 나누어 기술하고, 이상반응의 중대성(Seriousness), 위중도(Severity), 인체적용시험용 기능성식품과의 연관성, 재시술 여부 및 그 결과에 대해서 복용한 인체적용시험용 기능성식품 별로 구분하여 보고한 피험자 수 및 백분율을 정리한다.

▪ 실험실검사 및 활력징후, 신체검사

실험실 검사와 활력징후, 신체검사의 결과는 연속형 자료의 경우 평균, 표준편차와 최소값, 최대값을 군별로 정리하고 군간 차이는 Two Sample T-Test 또는 Wilcoxon's Rank Sum Test를 시행하고, 군내 복용전과 후의 차이는 Paired T-Test 또는 Wilcoxon's Signed Rank Test로 검정한다. 또한, 복용 전·후의 정상범주를 벗어난 피험자들의 빈도수 및 백분율을 구한다. 실험실검사 가운데 범주형 자료는 정상과 비정상으로 나누어서 군간 차이는 Chi-Square Test 혹은 Fisher's Exact Test를 사용하여 검정하고, 투약 전·후의 차이는 McNemar's Test로 분석한다.

(5) MKT전략 또는 사업화 전략

(가) 사업화 전략을 위한 MKT 일정 Process

① 시장 분석 및 기회도출

- 내부 전략가설 공유 및 Key Man Interview
- 국내외 관련시장 트렌드 분석, 2차 자료 분석
- U&A 조사 (On Line Survey)
- 국내시장 주요 경쟁자 분석/자사분석
- 해외시장 주요 브랜드 벤치마킹
- 네추럴웨이 시장 기회 도출

② 혁신 아이디어 및 컨셉 도출

2-1) Product Hit Idea

- Key Hit Point 도출
- 상품화 아이디어 개발
- 아이디어 스크리닝

2-2) Hit Concept

- Hit Concept 개발
- Main Benefit 도출
- USP 도출

2-3) 검증 및 정교화

- 가설 컨셉 검증 (FGD : Focus Group Discussion)
- 컨셉 수정 및 정교화 : Winning Concept 설정

③ 브랜드 개발

- 브랜드 Identity 설계
- Brand Textbook
- 신규 브랜드 네임 & 디자인 개발

④ STP 전략

- Sales Communication Target 규정
- Positioning 목표 설정

⑤ 상품화

5-1) 내용물 개발

- 인허가 (임상)
- 제형 및 응용방법 결정 및 처방확정

5-2) 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test(HUT 조사 : Home Using Test)

⑥ 런칭

- 가격 전략
- 유통 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 판촉물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

⑦ 출시 후 관리

- 런칭 후 Brand Tracking
- 2차 상품화 준비

(나) Sales & Public Relations 전략

① 인터넷 쇼핑몰 구축

- 네추럴웨이 홈페이지 카테고리 및 구성 요소 변경
- 컨셉에 맞는 쇼핑몰 디자인 및 Tone&Manner 변경
- 별도의 온라인 홈페이지 구축 및 현재 홈페이지에 카테고리 개설
- 온라인 상의 이벤트를 위한 마이크로 사이트 제작

② TV 홈쇼핑 광고

- 벤더사와의 전략적 제휴를 통한 홈쇼핑 채널을 탐색
- 제품을 효과적으로 알리기 위한 최적의 컨셉을 설정
- 제품을 효과적으로 전달할 수 있는 출연진 섭외
- 홈쇼핑 채널을 통한 런칭 및 광고

③ 소셜미디어 및 검색엔진 최적화

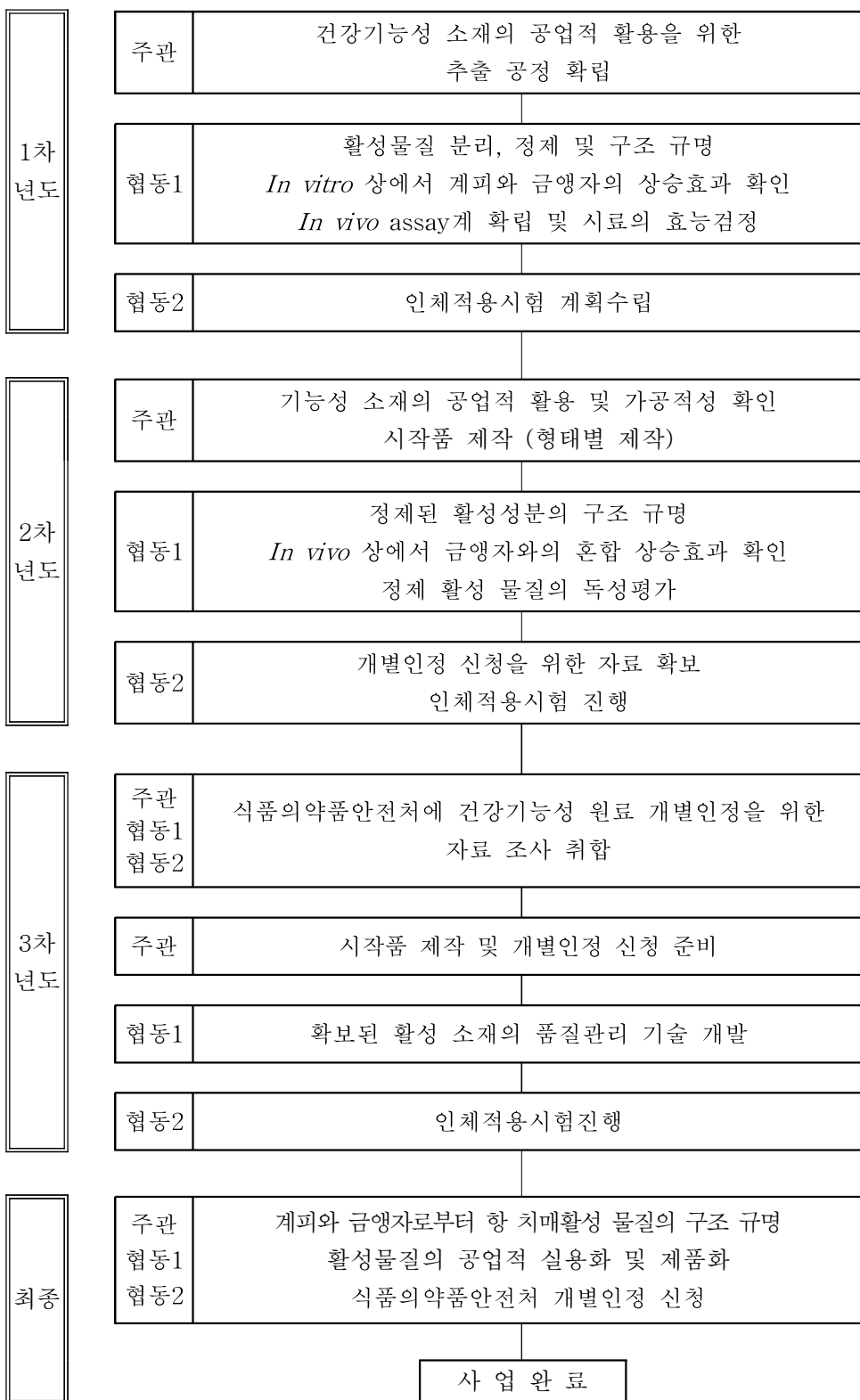
- 파워블로거 및 온라인 상의 영향력 있는 유저 섭외
- 제품에 대한 특성이나 소개글들을 블로그에 포스팅하여 포털사이트에 노출
- 제품과 연관되는 연관검색어를 별도로 설정하여 이슈화
- 제품에 대한 블로그 및 페이스북 운영하여 소통의 극대화

④ 오프라인 프로모션

- 내부인력과 외주업체가 아이디어 협의하여 프로모션 방향 설정
- 도출된 아이디어를 통한 구체적인 세트 제작 및 프로모션 진행

○ 연구개발 추진 체계

<계피와 금앵자추출물을 이용한 인지기능 개선 건강기능성 식품 개발>



○ 연구개발 추진일정

1차년도													
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Bench scale 추출조건 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	공업적 순도 정제방법 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3	AChE 저해 물질의 구조규명	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	계피 추출물을 이용한 행동실험 및 독성 실험(in vivo)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	계피, 금앵자의 혼합 상승효과 확인(in vivo)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	인체적용시험 계획수립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2차년도													
1	건강기능성 소재의 공업적 활용 및 가공적성 확인	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	계피, 금앵자 활성 물질의 혼합 상승효과 확인	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3	유효성분 정제 및 구조, 질량 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	인체적용시험 진행 및 개별인정 준비	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3차년도													
1	시작품 제작	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	건강기능성 원료 개별인정 신청 준비	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3	함량시험법 설정	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	분석법 밸리데이션	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5	인체적용시험 진행(인체시험 대상자 모집)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	시험결과 data management, 유효성 및 이상반응 평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	통계분석 및 결과보고서 작성	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

○ 연구개발성과

<1차년도>

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표1										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과		교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 호 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SC I	비 SC I						
최종목표	2			1		1						2	1	25	1	5	1	1	1
1 차 년 도													1	5		1			
달성률(%)												100		120		100			

1. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI 여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Characterization of Nutritional Composition Anti-oxidative Capacity, and Sensory Attributes of <i>Seomae</i> mugwort, a Native Korean Variety of <i>Artemisia argyi</i> H. Lev. & Vaniot	<i>Journal of Analytical Methods in Chemistry</i>	신동훈	Accepted (Article ID 916346)	미국	Hindawi Publishing Corporation	SCI	2015.05.25

15) (최초) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료 (변경) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

Research Article

Characterization of Nutritional Composition, Antioxidative Capacity, and Sensory Attributes of *Seomae* Mugwort, a Native Korean Variety of *Artemisia argyi* H. Lév. & Vaniot

Jae Kyeom Kim,¹ Eui-Cheol Shin,² Ho-Jeong Lim,² Soo Jung Choi,³ Cho Rong Kim,⁴
Soo Hwan Suh,⁵ Chang-Ju Kim,⁶ Gwi Gun Park,⁷ Cheung-Seog Park,⁸ Hye Kyung Kim,⁹
Jong Hun Choi,¹⁰ Sang-Wook Song,¹¹ and Dong-Hoon Shin⁴

¹ Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, Saint Paul, MN 55108, USA

² Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Republic of Korea

³ Functional Food Research Center, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

⁴ Department of Food and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

⁵ National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Osong 363-700, Republic of Korea

⁶ Department of Physiology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

⁷ Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Republic of Korea

⁸ Department of Microbiology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

⁹ Department of Food Biotechnology, Hanseo University, Seosan 356-706, Republic of Korea

¹⁰ Natural Way Company, Pocheon 83-135, Republic of Korea

¹¹ Department of Family Medicine, The Catholic University of Korea, Suwon 442-723, Republic of Korea

Correspondence should be addressed to Dong-Hoon Shin; dhshin@korea.ac.kr

Received 16 March 2015; Revised 21 May 2015; Accepted 25 May 2015

Academic Editor: Mengxia Xie

Copyright © 2015 Jae Kyeom Kim et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Few studies have investigated *Seomae* mugwort (a Korean native mugwort variety of *Artemisia argyi* H. Lév. & Vaniot), exclusively cultivated in the southern Korean peninsula, and the possibility of its use as a food resource. In the present study, we compared the nutritional and chemical properties as well as sensory attributes of *Seomae* mugwort and the commonly consumed species *Artemisia princeps* Pamp. In comparison with *A. princeps*, *Seomae* mugwort had higher contents of polyunsaturated fatty acids, total phenolic compounds, vitamin C, and essential amino acids. In addition, *Seomae* mugwort had better radical scavenging activity and more diverse volatile compounds than *A. princeps* as well as favorable sensory attributes when consumed as tea. Given that scant information is available regarding the *Seomae* mugwort and its biological, chemical, and sensory characteristics, the results herein may provide important characterization data for further industrial and research applications of this mugwort variety.

1. Introduction

Mugworts (the genus *Artemisia*) have been widely used as tea, spices, and food ingredients in East Asia. Much attention has been recently paid to their multiple health benefits including anti-tumor-promoting effects [1], induction of apoptosis in various types of cancer cells [2, 3], antidiabetic effects [4], anti-inflammatory effects [5], and anticoagulant/antiplatelet activities [6]. Amongst a plethora of *Artemisia* species,

Artemisia princeps Pamp., which is widely consumed in Korea, and its bioactive compounds (e.g., eupatilin and jaceosidin) have been most extensively studied in various experimental models [5, 6], yet little information is available regarding the Korean native mugwort variety (also known as *Seomae* mugwort) of *Artemisia argyi* H. Lév. & Vaniot, cultivated in the southern Korean peninsula.

Considering that (1) environmental factors play a significant role in growth as well as the content of active

2. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The Korean Society of Food Science and Nutrition	이규승	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국
2	The Korean Society of Food Science and Nutrition	박찬규	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국
3	The Korean Society of Food Science and Nutrition	김희석	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국
4	The Korean Society of Food Science and Nutrition	이상일	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국
5	The Korean Society of Food Science and Nutrition	권윤경	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국
6	The Korean Society of Food Science and Nutrition	김초롱	2014.10.28	대전컨벤션센터	대한민국

3. 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	양성	2014		1			1			1				

<2차년도>

(단위 : 건수)

성과목 표	사업화지표1										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	2			1		1						2	1	25	1	5	1	1	1
2 차 년 도	목 표	1										1		10		4			
	실 적	1										1		10		4			
달성률(%)	100											100		100		100			

1. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI 여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	<i>Cinnamomum loureirii</i> extract inhibits acetylcholine esterase activity and ameliorates cognitive dysfunction in TMT-induced mice	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>	신동훈	39(7)	일본	The Pharmaceutical Society of Japan	SCI	2016.03.31

Vol. 39, No. 7

Biol. Pharm. Bull. 39, 1–7 (2016)

Regular Article

1
8_b16-0004†
5/20/2016
1st proof

Cinnamomum loureirii Extract Inhibits Acetylcholinesterase Activity and Ameliorates Trimethyltin-Induced Cognitive Dysfunction in Mice

Cho Rong Kim,^{a,†} Soo Jung Choi,^b Yoon Kyung Kwon,^a Jae Kyeom Kim,^c Youn-Jung Kim,^d Gwi Gun Park,^e and Dong-Hoon Shin^{*a}

^aDepartment of Food and Biotechnology, Korea University; Seoul 136–701, Korea; ^bFunctional Food Research Center, Korea University; Seoul 136–701, Korea; ^cSchool of Human Environmental Sciences, University of Arkansas; Fayetteville 72701, AR, U.S.A.; ^dCollege of Nursing Science, Kyunghee University; Seoul 136–701, Korea; and ^eDepartment of Food Science and Biotechnology, Gachon University; Seongnam 461–701, Korea.
Received January 14, 2016; accepted March 31, 2016

The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) has been linked to the deficiency of neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the brain, and the main treatment strategy for improving AD symptoms is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity. In the present study, we aimed to identify potent AChE inhibitors from *Cinnamomum loureirii* extract via bioassay-guided fractionation. We demonstrated that the most potent AChE inhibitor present in the *C. loureirii* extract was 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol. To confirm the anti-amnesic effects of the ethanol extract of *C. loureirii*, mice were intraperitoneally injected with the neurotoxin trimethyltin (2.5 mg/kg) to induce cognitive dysfunction, and performance in the Y-maze and passive avoidance tests was assessed. Treatment with *C. loureirii* extract significantly improved performance in both behavioral tests, suggesting that this extract may be neuroprotective and therefore beneficial in preventing or ameliorating the degenerative processes of AD, potentially by restoring cholinergic function.

Key words Alzheimer's disease; *Cinnamomum loureirii*; acetylcholine; acetylcholinesterase inhibitor

The pathophysiology of Alzheimer's disease (AD), a type of dementia in the elderly, is highly complex. This progressive degenerative disorder was first discovered by Dr. Alois Alzheimer in 1907 and is characterized by incapacitating memory and language losses and impairments in cognitive and behavioral functions. A neuropathological diagnosis of AD includes deposition of extracellular β -amyloid ($A\beta$) plaques in the cerebral cortex and hippocampus areas, accumulation of intracellular neurofibrillary tangles of abnormally phosphorylated τ , astrocytic gliosis, inflammatory cascades, and degeneration of basal forebrain cholinergic neurons.^{1–3}

Cholinergic neurotransmission in the central nervous system (CNS) involves release of acetylcholine (ACh) from presynaptic terminals, binding of ACh to cognate receptors on postsynaptic cells, and downstream signal transduction.⁴ To date, the most significant and best approach for the prevention and treatment of AD is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE).⁵ AChEs are present in the synaptic cleft of cholinergic synapses and rapidly degrade ACh into choline and acetic acid.⁶ These enzymes decrease the concentration of ACh in the synapse and downregulate ACh-induced signaling pathways.⁷ Currently, many studies have focused on the use of AChE inhibitors (AChEIs) to reverse abnormally elevated AChE activity in patients with AD, thereby restoring ACh levels and ameliorating AD.^{8,9}

Traditionally, various edible plants have been used as medicinal remedies in Asian countries, including Korea, since they are rich sources of diverse secondary metabolites, often called phytochemicals. Notably, *Cinnamomum loureirii* is one of the most widely used herbal medicines in Korea. The inner bark of *C. loureirii* is obtained from the trees belonging to

the family Lauraceae¹⁰ and is often used as a spice and flavoring agent. *C. loureirii* contains large amounts of bioactive molecules, including essential oils, tannin, mucus, and coumarins.¹¹ Previous studies demonstrated that *C. loureirii* might be effective in the treatment of gastritis, dyspepsia, inflammatory diseases, and blood circulation disturbances and may possess anti-pyretic, analgesic, anti-allergic, and anti-ulcerogenic effects.^{12,13} To the best of our knowledge, however, no study has investigated the inhibitory effects of *C. loureirii* on AChE activity utilizing *in vitro* and *in vivo* models.

The aim of the present study was to identify AChEIs from *C. loureirii*. In order to isolate a candidate AChEI, the ethanol extract of *C. loureirii* was subjected to solvent partitioning, open column chromatography, TLC, and HPLC.^{14,15} The chemical structure of the purified active compound was determined using GC-MS and NMR spectroscopy. In addition, the memory enhancing effect of *C. loureirii* in trimethyltin (TMT)-induced cognitive dysfunction was assessed using two behavioral tests, the Y-maze test and passive avoidance test.

MATERIALS AND METHODS

Materials Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium, heat-inactivated horse serum (HS), fetal bovine serum (FBS), and antibiotic-antimycotic were purchased from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, U.S.A.). Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-(2-nitro)benzoic acid (DTNB), 1,5-bis-(4-allyldimethylammoniumphenyl)-pentane-3-one dibromide (BW 284c51), tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine), dimethyl sulfoxide (DMSO), and TMT chloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). All other chemicals used were of analytical grade purity unless otherwise specified.

Cell Culture Rat pheochromocytoma (PC12; ATCC,

[†]Present address: 612 College of Life Sciences, Korea University; 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136–701, Republic of Korea.

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: dhshin@korea.ac.kr

2. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The Korean Society of Food Science and Nutrition	이상일	2015.08.26	평창	대한민국
2	The Korean Society of Food Science and Nutrition	김희석	2015.08.26	평창	대한민국
3	The Korean Society of Food Science and Nutrition	이규승	2015.08.26	평창	대한민국
4	The Korean Society of Food Science and Nutrition	권윤경	2015.08.26	평창	대한민국
5	The Korean Society of Food Science and Nutrition	박찬규	2015.08.26	평창	대한민국
6	Korean Society of Food Science and Technology	최수정	2016.05.17	대구	대한민국
7	Korean Society of Food Science and Technology	김초롱	2016.05.17	대구	대한민국
8	Korean Society of Food Science and Technology	권윤경	2016.05.17	대구	대한민국
9	Korean Society of Food Science and Technology	박찬규	2016.05.17	대구	대한민국
10	Korean Society of Food Science and Technology	홍민기	2016.05.17	대구	대한민국

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	계피 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌 질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물	대한민국	신동훈 최중현 김초롱 최수정	2015.10.15	10-2015-0144029				100

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2015.10.15
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(P15U13C1277)
 출원번호 10-2015-0144029 (접수번호 1-1-2015-0997239-21)
 출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
 발명자성명 신동훈 최종현 김초롱 최수정
 발명의명칭 커피 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

4. 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	양성	2016	1	3			3	1		4			

<3차년도>

(단위 : 건수)

성과목 표	사업화지표1										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이진)		사업화					기술 인증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SC I	비 SC I						
최종목표	2			1		1						2	1	25	1	5	1	1	1
3 차 년 도	1											1		10					
달성률(%)	100											100		100					

1. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI 여부 (SCI/ 비SC I)	게재일
1	2,4-Bis(1,1-dimethyl) phenol from <i>Cinnamomum loureirii</i> Improves Cognitive Deficit, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Damage in TMT-Treated Mice	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>	신동훈	40(6)	일본	The Pharmaceutical Society of Japan	SCI	2017.03.17
2	Ameliorating Effects of <i>Cinnamomum loureirii</i>	Korean Journal of	신동훈	-	한국	한국약용작물학회	비SC I	In press

	and <i>Rosa laevigata</i> extracts against Trimethyltin-induced Learning and Memory Impairment	Medicinal Crop Science						
--	--	---------------------------	--	--	--	--	--	--

Ameliorating Effects of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata*
extracts against Trimethyltin-induced Learning and Memory
Impairment

Soo Jung Choi*, ChoRongKim**, Chan Kyu Park**, Min Chul Gim**,
Jong Hun Choi***, Dong-Hoon Shin**†

*Functional Food Research Center, Korea University, Seoul 02841,
Republic of Korea

**Department of Food and Biotechnology, Korea University, Seoul
02841, Republic of Korea

***Natural Way Co. LTD, Pocheon-si 11160, Republic of Korea

Note

2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol from *Cinnamomum loureirii* Improves Cognitive Deficit, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Damage in TMT-Treated Mice

Cho Rong Kim,^{a,†} Soo Jung Choi,^b Jae Kyeom Kim,^c Chan Kyu Park,^a Min Chul Gim,^a
Youn-Jung Kim,^d Gwi Gun Park,^e and Dong-Hoon Shin^{*a}

^aDepartment of Food and Biotechnology, Korea University; Seoul 136–701, Korea; ^bFunctional Food Research Center, Korea University; Seoul 136–701, Korea; ^cSchool of Human Environmental Sciences, University of Arkansas; Fayetteville, AR 72701, U.S.A.; ^dCollege of Nursing Science, Kyunghee University; Seoul 136–701, Korea; and ^eDepartment of Food Science and Biotechnology, Gachon University; Seongnam 461–701, Korea.
Received December 19, 2016; accepted March 17, 2017

We previously reported that the extract of *Cinnamomum loureirii* (*C. loureirii*) significantly inhibited acetylcholinesterase (AChE), and identified 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol (BP) from *C. loureirii* as a potential AChE inhibitor. The present study, therefore was undertaken to demonstrate the effects of BP from *C. loureirii* on learning and memory impairment in trimethyltin (TMT)-treated ICR mice. Y-maze and passive avoidance tests were used to test cognitive ability. Further, changes in biochemical parameters in the brain tissue were also assessed in response to TMT injection and BP intervention. BP pre-administration (20, 40 mg/kg/d) in mice significantly protected cognitive dysfunction induced by TMT ($p < 0.05$). Moreover, BP reduced AChE activity and lipid peroxidation but increased acetylcholine levels in the brain. In conclusion, we suggested that BP protected against TMT-induced cognitive dysfunction, and might be a potential agent for alleviating symptoms of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, via modulating cholinergic functions.

Key words Alzheimer's disease; acetylcholinesterase inhibitor; *Cinnamomum loureirii*; 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol; cognitive dysfunction; trimethyltin

Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disorder, is the most common form of dementia in the elderly. The major pathological characteristics of AD include senile plaques, neurofibrillary tangles, and synapse loss.¹⁾ The cholinergic system is involved in central cognitive processes, such as learning and memory.²⁾ And a deficiency of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) is closely related with the severity of cognitive dysfunction in AD.³⁾ One of the major therapeutic strategies is, therefore the enhancement of ACh levels in the brain by the inhibition of the catabolic enzyme acetylcholinesterase (AChE).⁴⁾

Traditionally, plants are a rich source of AChE inhibitors, and plant-derived drugs (e.g., galantamine isolated from dafodil bulbs) are used for the symptomatic treatment of AD.⁵⁾ However, these drugs have known limitations owing to their side effects, and many researchers have focused on other natural sources of newer, potent, and long-lasting compounds with anti-AChE activity.⁶⁾ As part of such efforts, we previously demonstrated that *C. loureirii* extract significantly inhibited AChE *in vitro* and was neuroprotective against trimethyltin (TMT)-induced cognitive dysfunction in mice. In addition, we identified 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol (BP) as the potential AChE inhibitor in *C. loureirii* extract.⁷⁾

BP is a phenolic compound present in various plants.^{8,9)} The compound has been suggested to represent antioxidant, antibacterial, and antifungal activities.^{10–12)} To the best of our knowledge, there are no available reports on the effects of BP against TMT-induced cognitive impairment in the context of

AChE inhibition. The aim of the present work was therefore to investigate the possible cognitive protection of BP against neurodegeneration induced by TMT. In addition to mice behavioral tests, we further analyzed *ex vivo* AChE activity, ACh levels, and malondialdehyde (MDA) levels in the brain tissue of amnesic mice.

MATERIALS AND METHODS

Materials Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-(2-nitro)benzoic acid (DTNB), BP, TMT chloride, and MDA were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). All other chemicals used were of analytical grade purity unless otherwise specified.

Animal Treatment Male ICR mice (5 weeks old) were obtained from DBL Co. (Chungbuk, Korea). Animals were maintained in a 12h light/dark cycle in controlled environment (temperature, 23±1°C; humidity, 55%), and were allowed free access to food and water. The animals were divided into 5 groups and fed either a standard diet (for negative and positive control groups) or a standard diet supplemented with various concentrations of BP (10, 20, 40 mg/kg body weight (b.w.) per day) for 3 weeks.¹³⁾ After 3 weeks, the positive control group (TMT-treated group) and intervention groups were intraperitoneally injected with TMT (2.5 mg/kg b.w.), as described elsewhere.¹⁴⁾ The negative control group received an injection of 0.85% saline. The behavioral tests were conducted 2d after TMT injection. All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Korea University and performed according to animal use regulations.

Y-Maze Test Short-term spatial memory performance

[†]Present address: 612 R&D Center, Korea University; 145 Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul 136–701, Republic of Korea.

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: dhshin@korea.ac.kr

2. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The Korean Society of Food Science and Nutrition	최수정	2016.10.31	제주ICC	대한민국
2	The Korean Society of Food Science and Nutrition	김초롱	2016.10.31	제주ICC	대한민국
3	The Korean Society of Food Science and Nutrition	박찬규	2016.10.31	제주ICC	대한민국
4	The Korean Society of Food Science and Nutrition	홍민기	2016.10.31	제주ICC	대한민국
5	The Korean Society of Food Science and Nutrition	김민철	2016.10.31	제주ICC	대한민국
6	Korean Society of Food Science and Technology	최수정	2017.06	제주ICC	대한민국
7	Korean Society of Food Science and Technology	박찬규	2017.06	제주ICC	대한민국
8	Korean Society of Food Science and Technology	박찬규	2017.06	제주ICC	대한민국
9	Korean Society of Food Science and Technology	김민철	2017.06	제주ICC	대한민국
10	Korean Society of Food Science and Technology	김민철	2017.06	제주ICC	대한민국

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	계피 추출물 및 금앵자 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물	대한민국	고려대학교 세종산학협력단	2016.12.26	10-2016-0179021				100

○ 연구개발 결과

[1세부 : (주)네추럴웨이]

<1차년도>

1. 계피와 금앵자 제조방법 설정

1) 추출 조건 시험

곱게 파쇄한 계피와 금앵자를 각각 추출용매인 주정을 5배수 가하여 5회 반복 추출하였고, 추출액은 여과 후 감압농축을 거쳐 추출물을 제조하였다. 추출 수율 및 제조공정의 편이성 등을 고려하여 계피와 금앵자를 최종 100% 주정을 용매로 2회 반복 추출 후 감압 농축하여 분키는 방법을 결정하였음 (Table 3).

Table 3. 조건별 추출물에 대한 수율

추출 횟수	수율(%)	
	계피	금앵자
1	8.50	10.95
2	2.82	4.38
3	1.03	1.92
4	0.61	1.62
5	0.21	0.75

2) 식물혼합농축액 NA-0001(계피 금앵자) - 품목제조신고서 (농축액)

식품위생법 시행규칙 [별시 제45호(식품)] 제45조제1항

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 최 중 헌	생년월일 1956년 10월 12일		
	주소 서울특별시 강남구 압구정동 426 현대아파트 102-306	전화번호 031-535-7674 휴대전화 010-8638-7624		
영업소	명칭(상호) (주)네추럴웨이			
	소재지 경기도 포천시 설운동 해릉로 83-135			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업신고 번호	제 106-1-37 호
	제품명	식물혼합농축액 NA-0001		
	유통기한	제조일부터 1년		
	품질유지기한	제조일부터 1년		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨		
	용도 용법	별첨		
	보관방법 및 포장재질	별첨		
	포장방법 및 포장단위	별첨		
	성상	별첨		
고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음			
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 신고를 보고합니다.

2015년 06월 10일

보고인

최중헌 (서명)

특별자치도지사 · 시장 · 군수 · 구청장 귀하

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
유의사항	

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

210mm×297mm[일반용지 60g/㎡ (재활용품)]

확인자: 최중헌(인)

제조방법 설명서

1. 제품명 : 식물혼합농축액 NA-0001
2. 식품의 유형 : 기타가공품
3. 원재료명 및 배합비율 : 계 100%

NO	원재료명	배합비율(%)
1	계피 나무껍질	11.55
2	금앵자 열매	5.117
3	주정	83.333
합계		100

4. 제조방법

- (1) 선별 : 원재료 속에 혼입된 이물질 등을 분리한다.
- (2) 추출-1 : 계피 나무껍질에 주정을 일정량 가하여 추출기에서 추출한다.
- (3) 여과 : 여과기를 이용하여 여과한다.
- (4) 추출-2 : 금앵자 열매에 주정을 일정량 가하여 추출기에서 추출한다.
- (5) 혼합 : 추출-1과 추출-2를 7:3 비율로 혼합한다.
- (4) 농축 : 농축기를 이용하여 감압 농축한다.
- (5) 포장 : 품질검사가 끝난 제품은 식품 위생 용기에 규격대로 포장한다.

5. 용도·용법 : 가공식품 및 건강기능식품 원료로 적정량 사용.

6. 보관방법 및 포장재질

- 1) 보관방법 : 실온보관
- 2) 포장재질 : 내면도장관, 폴리에틸렌

7. 포장방법 및 포장단위

- 1) 포장방법 : 밀봉포장
- 2) 포장단위 : 5Kg, 10Kg, 15Kg, 20Kg

8. 색상 : 암갈색의 액상

9. 보존(보관) 및 유통기한

습기를 피하여 건조하고 서늘한 곳에 보관하며, 제조일로부터 실온에서 12개월



유통기한 설정 사유서

제 품 명	식물혼합농축액 NA-0001
식품의 유형	기타가공품
보존 및 유통방법	실온(○) / 상온() / 냉장() / 냉동() / 기타()
유통 기 한	제조일로부터 12 개월
실험수행기관종류	자사() / 의뢰() / 생략(○)
실험수행기관명	

유통기한 설정근거

1. 제품의 원료 및 보존 특성

- 원료의 입고부터 포장에 이르기까지 모든 제조 공정이 미생물등의 오염이 없도록 철저히 관리되며 각공정 단계별로 철저한 품질관리(미생물, 이화학시험 등)를 실시하고 있어 최종제품의 품질 보존에도 문제가 없음.
- 내포장재질이 내면도장관, 폴리에틸렌 포장으로 이루어져 있기 때문에 제품에 함유된 영양성분들의 각 제조공정에 따른 물리적 또는 화학적 변화가 최소화 되며, 당해규격에 적합하도록 중간 품질 관리를 실시 하고 있어 최종제품 의 품질보존에도 문제가 없음.

2. 유사제품과의 비교

구 분	신 규 제 품	기 존 유통제 품
제 품 명	식물혼합농축액 NA-0001	식물혼합농축액 COS-10672
제 조 사	(주)네추럴웨이	(주)코시스
식품유형	기타가공품	기타가공품
성 상	암갈색의 액상	암갈색의 액상
내포장재질	내면도장관, 폴리에틸렌	내면도장관, 폴리에틸렌
포장방법	밀봉포장	밀봉포장
보존 및 유통온도	실온	실온
보존료 사용여부	미사용	미사용
유당·유처리	-	-
살균 또는 멸균방법	-	-
유통기한	제조일로부터 12개월	제조일로부터 12개월

3. 종합판단

원료의 입고부터 포장에 이르기까지 철저한 품질관리가 이루어지며 공기 및 습기를 차단할 수 있는 밀봉포장으로 품질변화를 최소화한 제품으로 제품의 안전성과 품질에 별다른 문제점이 없을 것으로 판단되어 식품의 유통기한 설정기준(II.1.바.3)에 따라 유통기한 설정실험을 생략하고 본 제품의 유통기한을 제조일로부터 12개월로 설정합니다.

상기와 같이 유통기한 설정사유서를 제출합니다.

2015년 6월
제 출 인 : 최 중 현



3) 추출 및 농축 작업일보

추출 작업 일보				작업자	금영호,신승호			
				일자	2015.06.15(월)			
업체명(원료)	네추럴웨이 (계피,금앵자)-1	순환 추출기 구분	4.5t 순환추출 system					
원료 입고 일자	2015.06.12(금)	원료량(kg)	200kg					
작업기간	2015.06.15(월)~2015.06.15(월)							
작업공정	투입원료량(kg)/ 용매량(L)	전처리 여부	비고					
	200kg/4,100L	-	계피140kg+ 금앵자60kg					
* 작업 공정 FLOW								
원료(250KG) / 주정 (4,050L) $\frac{100^{\circ}\text{C}}{24\text{시간}}$ 추출 -> 부직포, 1um filter 1ea ->2차 이송 ->농축								
추출공정								
횟수	용매명 - 용매량(L)				온도	압력	시간	비고
	용매1	용매2	용매3	계				
1#	주정			주정	100℃	-	11:50~ 21:50	
	4,100L			4100 L			~	
					추출량 2,000 L	Brix 1Brix	고형분량 20kg	수율 10%
2#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분량	수율
3#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분량	수율
특이사항								

농축 작업 일보				작업자				
				금영호,신승호				
				일자				
				2015.06.16(화)				
업체명(원료)	네추럴웨이 (계피,금앵자)-1	순환 농축기 구분	4.5t 순환농축 system					
원료 입고 일자	2015.06.12(금)	원료량(L)	2000L	여 과	부직포.1um 필터			
작업기간	2015.06.16(화)~2015.06.16(화)							
농축공정								
시각 (시:분)	온도(℃)			진공도 (mmHg)	Brix	농축 액량 (L)	공급량 (L)/h	비고
	원액	농축액	냉각수					
10:15	농축시작			700	1Brix	-	400	
11:00	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
12:00	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
14:00	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
14:50	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
15:50	최종 농축물 11brix 200L							
농축결과								
농축결과	농축			농축액				
	Brix	액량(L)		Brix	액량(L)	포장 단위		
계피,금앵자-1	1Brix	2000L		11Brix	250L			
특이사항 고흡분 대비 말토텍스트린20% 혼합 후 분무건조기로 이송시킨다.								

4) 계피, 금앵자 추출분말 - 품목제조신고서 (추출분말)

식품위생법 시행규칙 [별시 제45조시행] 개정 2011.0.19

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인			
영업소	명칭(상호) (주)네추럴웨이		
	소재지 경기도 포천시 설운동 해릉로 83-135		
제품정보	식품의 유형	기타가공품	영업신고 번호 제 106-1-37 호
	제품명	계피, 금앵자 추출분말	
	유통기한	제조일부터	2년
	품질유지기한	제조일부터	2년
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨	
	용도 용법	별첨	
	보관방법 및 포장재질	별첨	
	포장방법 및 포장단위	별첨	
	성상	별첨	
고열량·저영양 식품 해당 여부	[]에 []아니오 [O]해당 없음		
기타			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 신고를 보고합니다.

2015년 06월 26일

보고인

최종현 (서명) (인)

특별자치도지사 · 시장 · 군수 · 구청장 귀하

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
------	--

유의사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

210mm×297mm[일반용지 60g/m² (재활용품)]

확인자 보건6급 최준호 (인)

제조방법 설명서

1. 제품명 : 계피,금앵자 추출분말
2. 식품의 유형 : 기타가공품
3. 원재료명 및 배합비율 : 계 100%

NO	원재료명	배합비율(%)
1	계피 나무껍질	58.34
2	금앵자 열매	25
3	말토덱스트린	16.66
	합계	100

4. 제조방법

- (1) 선별 : 원재료 속에 혼입된 이물질 등을 분리한다.
- (2) 추출 : 계피 및 금앵자를 혼합하여 주정을 일정량 가하여 95±5℃에서 24시간 동안 추출 후 여과 한다
- (3) 여과 : 여과기를 이용하여 여과한다.
- (4) 농축 : 농축기를 이용하여 감압 농축한다.
- (5) 분무건조 : 농축액에 말토덱스트린을 혼합하여 분무건조기를 이용하여 분말화 한다.
- (6) 검사,포장 : 분말을 규격 및 기준에 따라 시험하고 적합여부를 확인한후 포장한다
- (7) 최종 제품의 이상유무를 확인하여 이상이 없을시 출고한다.

5. 용도·용법 : 일반가공식품 및 건강기능식품 원료로 적정량 사용.

6. 보관방법 및 포장재질

- 1) 보관방법 : 실온보관
- 2) 포장재질 : 폴리에틸렌

7. 포장방법 및 포장단위

- 포장 재질 : 1차, 2차 - 폴리에틸렌(PE) 소재의 비닐,
3차 - 플라스틱 컨테이너 혹은 종이박스
- 단위 :1,5,10,20,50 kg

8. 성상 : 암갈색의 액상

9. 보존(보관) 및 유통기한

습기를 피하여 건조하고 서늘한 곳에 보관하며, 제조일로부터 실온에서 24개월



유통기한 설정 사유서

제 품 명	계피, 금앵자 추출분말																																					
식품의 유형	기타가공품																																					
보존 및 유통방법	실온(○) / 상온() / 냉장() / 냉동() / 기타()																																					
유통 기 한	제조일로부터 24 개월																																					
실험수행기관종류	자사() / 의뢰() / 생략(○)																																					
실험수행기관명																																						
유통기한 설정근거																																						
<p>1. 제품의 원료 및 보존 특성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료의 입고부터 포장에 이르기까지 모든 제조 공정이 미생물등의 오염이 없도록 철저히 관리되며 각공정 단계별로 철저한 품질관리(미생물, 이화학시험 등)를 실시하고 있어 최종제품의 품질 보존에도 문제가 없음. - 내포장재질이 PE 포장으로 이루어져 있기 때문에 제품에 함유된 영양성분들의 각 제조공정에 따른 물리적 또는 화학적 변화가 최소화 되며, 당해규격에 적합하도록 중간 품질 관리를 실시 하고 있어 최종제품 의 품질보존에도 문제가 없음. <p>2. 유사제품과의 비교</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">구 분</th> <th style="width: 40%;">신 규 제 품</th> <th style="width: 40%;">기 존 유통제 품</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>제 품 명</td> <td>계피, 금앵자 추출분말</td> <td>비수리추출분말</td> </tr> <tr> <td>제 조 사</td> <td>(주)네추럴웨이</td> <td>(주)네추럴웨이</td> </tr> <tr> <td>식품유형</td> <td>기타가공품</td> <td>기타가공품</td> </tr> <tr> <td>성 상</td> <td>암갈색의분말</td> <td>황갈색의분말</td> </tr> <tr> <td>내포장재질</td> <td>PE</td> <td>PE</td> </tr> <tr> <td>포장방법</td> <td>PE(내포장재질)비닐포장</td> <td>PE(내포장재질)비닐포장</td> </tr> <tr> <td>보존 및 유통온도</td> <td>실온</td> <td>실온</td> </tr> <tr> <td>보존료 사용여부</td> <td>미사용</td> <td>미사용</td> </tr> <tr> <td>유당·유처리</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>살균 또는 멸균방법</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td>제조일로부터 24개월</td> <td>제조일로부터 24개월</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. 종합판단</p> <p>원료의 입고부터 포장에 이르기까지 철저한 품질관리가 이루어지며 공기 및 습기를 차단할 수 있는 PE(내포장재질)비닐포장으로 품질변화를 최소화한 제품으로 제품의 안전성과 품질에 별다른 문제점이 없을 것으로 판단되어 식품의 유통기한 설정기준(II.1.바.3)에 따라 유통기한 설정실험을 생략하고 본 제품의 유통기한을 제조일로부터 24개월로 설정합니다.</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 유통기한 설정사유서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: right;">2015년 6월 26일 제 출 인 : 최 중 현 (인)</p>			구 분	신 규 제 품	기 존 유통제 품	제 품 명	계피, 금앵자 추출분말	비수리추출분말	제 조 사	(주)네추럴웨이	(주)네추럴웨이	식품유형	기타가공품	기타가공품	성 상	암갈색의분말	황갈색의분말	내포장재질	PE	PE	포장방법	PE(내포장재질)비닐포장	PE(내포장재질)비닐포장	보존 및 유통온도	실온	실온	보존료 사용여부	미사용	미사용	유당·유처리	-	-	살균 또는 멸균방법	-	-	유통기한	제조일로부터 24개월	제조일로부터 24개월
구 분	신 규 제 품	기 존 유통제 품																																				
제 품 명	계피, 금앵자 추출분말	비수리추출분말																																				
제 조 사	(주)네추럴웨이	(주)네추럴웨이																																				
식품유형	기타가공품	기타가공품																																				
성 상	암갈색의분말	황갈색의분말																																				
내포장재질	PE	PE																																				
포장방법	PE(내포장재질)비닐포장	PE(내포장재질)비닐포장																																				
보존 및 유통온도	실온	실온																																				
보존료 사용여부	미사용	미사용																																				
유당·유처리	-	-																																				
살균 또는 멸균방법	-	-																																				
유통기한	제조일로부터 24개월	제조일로부터 24개월																																				

5) 시제품 방향설정

가) 정제type: 760mg × 2정 × 3회 / 1일

성분명	합량
계피금앵자 농축액	3,800mg
결정셀룰로오스	670mg
HPMC	90mg
계	4,560mg

나) 농축액 : 3.6g / 1일

성분명	합량
계피금앵자 농축액	3,000mg
프락토올리고당	500mg
감미료(미정)	100mg
계	3,600mg

다) 분말type: 2.3g 스틱 × 2회 / 1일

성분명	합량
계피금앵자 농축분말	3,800mg
포도당	600mg
기타 감미료	200mg
계	4,600mg

5) 제품화 시 실질적인 단가산출서를 통한 가격전략

<경쟁제품군>

회사명	제품명	제품사진	주원료	판매가
통근당건강	브레인Q		피브로인추출물BF-7	120,000원
현대약품	스펙타민		테아닌, 옥타코사놀 등	90,000원
유유제약	하이유정		은행잎추출, 메타카로틴 등	300,000원

계피 금앵자 정제 단가산출서

제형	정제	세트구성	750mg*180정/병	135g/set			
정당중량	750mg	1일섭취량	4500mg	6정/일			
No.	원료명	배합비	1세트 기준		1set 투입량(g)	세트당 원가 (VAT제외)	비 고
			kg당단가(원) VAT제외	1일섭취량 (mg)			
1	계피금앵자 추출분말	84.45	120,000	3,800.3	114.0	13,680.90	
2	결정셀룰로오스	10.80	5,500	486.0	14.6	80.19	
3	히드록시프로필메틸셀룰로오스	1.70	27,000	76.5	2.3	61.97	
4	스테아린산마그네슘	1.05	9,000	47.3	1.4	12.76	
5	카르복시메틸셀룰로오스 칼슘	2.00	16,000	90.0	2.7	43.20	
6				-	-	-	
7				-	-	-	
8				-	-	-	
원재료비 계		100.00		4,500.0	135.0	13,879.01	
No.	재료품	규격	단가	소요수량	세트당원가 (VAT제외)		
1	병		250.0	1.00	250.00		
2	지함		400.0	1.00	400.00		
3	스티커		10.0	1.00	10.00		
4	수송용상자	30입	700.0	0.03	21.00		
5					-		
6					-		
부재료비 계					681.00		
임가공비					8,000.00		
합 계					22,560		부가세포함 24,816

<예시제품>



- 색상: 둥근 타원형의 갈색 필름코팅정제
- 제형: 필름코팅정
- 모양: 타원형

계피 금앵자 과립 단가산출서

제형	과립	세트구성	4600mg*30포/세트	138g/set			
포당중량	2300mg	1일섭취량	4600mg	2포/일			
No.	원료명	배합비	1세트 기준		세트당 원가 (VAT제외)	비 고	
			kg당단가(원) VAT제외	1일섭취량 (mg)			1set 투입량(g)
1	계피금앵자 추출분말	82.61	120,000	3,800.1	114.0	13,680.22	
2	무수결정포도당	6.40	1,400	294.4	8.8	12.36	
3	에리스리톨	5.29	6,200	243.3	7.3	45.26	
4	자일리톨분말	4.20	6,000	193.2	5.8	34.78	
5	대추농축액분말	1.50	12,000	69.0	2.1	24.84	
6				-	-	-	
7				-	-	-	
8				-	-	-	
9				-	-	-	
원재료비 계		100.00		4,600.0	138.0	13,797.46	
No.	재료품	규격	단가	소요수량		세트당원가 (VAT제외)	
1	포		12.0	30.00		360.00	
2	세트지함	30입	600.0	1.00		600.00	
3	스티커		10.0	2.00		20.00	
4	수송용상자	10입	700.0	0.10		70.00	
5						-	
부재료비 계						1,050.00	
임가공비						8,000.00	
합 계						22,847	부가세포함 25,132

<예시제품>



- 색상: 암갈색의 분말
- 제형: 과립형 분말
- 모양: 스틱형 파우치 타입

계피 금앵자 농축액 단가산출서

제형	농축액	세트구성	3600mg*30포/세트	108g/set			
포당중량	3600mg	1일섭취량	3600mg	1포/일			
No.	원료명	배합비	1세트 기준			세트당 원가 (VAT제외)	비 고
			kg당단가(원) VAT제외	1일섭취량 (mg)	1set 투입량(g)		
1	계피금앵자 농축액	83.34	80,000	3,000.2	900.1	7,200.58	
2	프락토올리고당(액상)	10.80	1,100	388.8	116.6	12.83	
3	에리스리톨	4.66	6,200	167.8	50.3	31.20	
4	효소처리스테비아	1.20	33,000	43.2	13.0	42.77	
5				-	-	-	
6				-	-	-	
7				-	-	-	
8				-	-	-	
원재료비 계		100.00		3,600.0	1,080.0	7,287.98	
No.	재료품	규격	단가	소요수량	세트당원가 (VAT제외)		
1	포		25.0	30.00	750.00		
2	세트지함	30입	600.0	1.00	600.00		
3	스티커		10.0	2.00	20.00		
4	수송용상자	10입	700.0	0.10	70.00		
5					-		
6					-		
부재료비 계					1,440.00		
임가공비					8,000.00		
합 계						16,727	부가세포함 18,400

<예시제품>



- 정상: 암갈색의 액상
- 제형: 액상
- 모양: 액상형 파우치 또는 150ml 반투명 유리병

<2차년도>

○ 원료로서의 상태 점검

1) 안전성

추출 수율 및 제조공정의 편이성 등을 고려하여 곱게 파쇄한 계피와 금앵자를 주정 70%를 사용하여 85°C에서 12시간 동안 추출한다. 각 원료는 따로 추출하여 70:30 비율로 혼합하였다.

→ 분말화 효율을 높이기 위해 말토덱스트린 20% 혼합 후 건조하였음.

2) 물성

농축액 : 100% 농축액을 72시간 상온에서 방치하였으나 분리되지 않았다.

분말 : 분말 색상을 보았을 때 편중되는 경향은 보이지 않았다.

정제 : 고른 분포도를 보였다.

Fig. 11. 정제 사진



○ 농도에 따른 관능테스트

- 혼합 농도 : 10%, 50%, 80%, 90%
- 제품 시생산 배합비율에 따라서 농도 범위 결정
- 5점법(1:아주좋음, 2:좋음, 3:보통, 4:나쁨, 5:아주나쁨)

Fig. 16. 5점 관능평가 설문지

각 시료의 선호도를 작성해 주시기 바랍니다.

시료번호 :

이미

아주좋음	좋음	보통	나쁨	아주나쁨
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

이취

아주좋음	좋음	보통	나쁨	아주나쁨
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

식감성

아주좋음	좋음	보통	나쁨	아주나쁨
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1) 정제

Table 7. 정제 관능평가 결과

농도	이미	이취	식감성
10%	3	3	3
50%	3	3	2
80%	3	2	2
90%	4	3	3

- 혼합 농도가 높아질수록 맛의 선호도가 떨어지고 냄새와 식감성은 선호도에 큰 차이가 발생하지 않았다.

2) 농축액

Table 8. 농축액 관능평가 결과

농도	침전물	이미	이취	식감성
10%	2	4	4	2
50%	2	3	3	2
80%	2	3	3	3
90%	3	4	4	4

- 혼합 농도가 높아질수록 침전물이 발생하는 것을 확인 하였으며 이미지와 이취를 강하게 느껴 선호도가 떨어짐을 확인하였다. 다만, 액상형이기 때문에 식감성은 좋아졌다.

3) 분말

Table 9. 분말 관능평가 결과

농도	이미	이취	식감성
10%	3	3	3
50%	2	2	2
80%	2	2	2
90%	4	3	3

- 혼합 농도가 높아질수록 이미가 강해져 선호도가 떨어지나 냄새나 식감성에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 50%, 80%에서 높은 선호도를 보였다.

○ 부원료 성분별 저장적성

탄수화물, 단백질, 지방질 원료와 계피금앵자농축액을 2:8 비율로 평균적으로 혼합하여 실온에 80일간 방치하면서 10일 주기로 검사를 실시한다.

1) 탄수화물성 원료

Table 10. 탄수화물성 원료 배합비

No.	원료명	배합비
1	계피금앵자농축액	80%
2	볶은검은콩분말	20%

Table 11. 탄수화물성 원료 혼합후 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.975	0.035
10	변화없음	음성	2.895	0.032
20	변화없음	음성	2.988	0.034
30	변화없음	음성	2.952	0.031
40	변화없음	음성	2.897	0.030
50	변화없음	음성	2.931	0.032
60	변화없음	음성	2.943	0.033
70	변화없음	음성	2.954	0.034
80	변화없음	음성	2.962	0.032

- 성상, 대장균군, Cinnamaldehyde와 Chlorogenic acid의 함량변화는 없는 것으로 확인하였다.

2) 단백질성 원료

Table 12. 단백질성 원료 배합비

No.	원료명	배합비
1	계피금앵자농축액	80%
2	난단백질	20%

Table 13. 단백질성 원료 혼합후 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.945	0.034
10	변화없음	음성	2.925	0.033
20	변화없음	음성	2.934	0.036
30	변화없음	음성	2.947	0.037
40	변화없음	음성	2.952	0.035
50	변화없음	음성	2.898	0.034
60	변화없음	음성	2.948	0.032
70	변화없음	음성	2.935	0.033
80	변화없음	음성	2.952	0.035

- 성상, 대장균군, Cinnamaldehyde와 Chlorogenic acid의 함량변화는 없는 것으로 확인하였다.

3) 지방성 원료

Table 14. 지방성 원료 배합비

No.	원료명	배합비
1	계피금앵자농축액	80%
2	식물성크리머	20%

Table 15. 지방성 원료 혼합후 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.897	0.035
10	변화없음	음성	2.923	0.035
20	변화없음	음성	2.945	0.034
30	변화없음	음성	2.932	0.035
40	변화없음	음성	2.942	0.036
50	변화없음	음성	2.939	0.036
60	변화없음	음성	2.948	0.037
70	변화없음	음성	2.937	0.037
80	변화없음	음성	2.949	0.036

- 성상, 대장균군, Cinnamaldehyde와 Chlorogenic acid의 함량변화는 없는 것으로 확인하였다.

○ 제형별 저장적성

탄수화물, 단백질, 지방질 원료와 계피금앵자농축액을 2:8 비율로 평균적으로 혼합하여 45°C, 80%의 조건에서 60일간 방치하면서 10일 주기로 검사를 실시하였다.

1) 가미 농축액 : 3.6g / 1일

Table 16. 농축액 배합비

성분명	함량
계피금앵자 농축액	3,000mg
프락토올리고당	500mg
감미료(미정)	100mg
계	3,600mg

Table 17. 농축액 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.934	0.035
10	변화없음	음성	2.935	0.034
20	변화없음	음성	2.937	0.033
30	변화없음	음성	2.941	0.035
40	변화없음	음성	2.936	0.035
50	변화없음	음성	2.939	0.036
60	변화없음	음성	2.940	0.036

2) 분말type: 2.3g 스틱 × 2회 / 1일

Table 18. 분말 배합비

성분명	함량
계피금앵자 농축분말	3,800mg
포도당	600mg
기타 감미료	200mg
계	4,600mg

Table 19. 분말 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.942	0.036
10	변화없음	음성	2.941	0.034
20	변화없음	음성	2.939	0.035
30	변화없음	음성	2.940	0.034
40	변화없음	음성	2.943	0.036
50	변화없음	음성	2.942	0.035
60	변화없음	음성	2.941	0.034

3) 정제type: 760mg × 2정 × 3회 / 1일

Table 20. 분말 배합비

성분명	함량
계피금앵자 농축액	3,800mg
결정셀룰로오스	670mg
HPMC	90mg
계	4,560mg

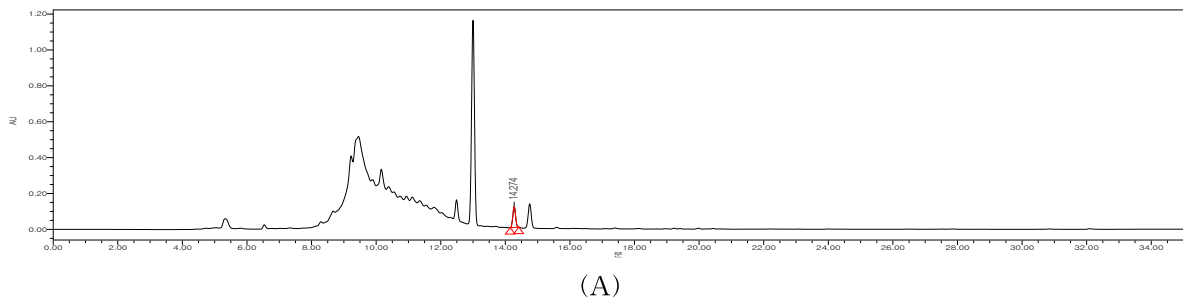
Table 21. 분말 저장성 확인(계피 금앵자 농축액기준)

일자(일)	성상	대장균군	Cinnamaldehyde 함량(mg/g)	Chlorogenic acid 함량(mg/g)
0	변화없음	음성	2.939	0.035
10	변화없음	음성	2.942	0.035
20	변화없음	음성	2.938	0.034
30	변화없음	음성	2.941	0.034
40	변화없음	음성	2.942	0.036
50	변화없음	음성	2.941	0.035
60	변화없음	음성	2.940	0.036

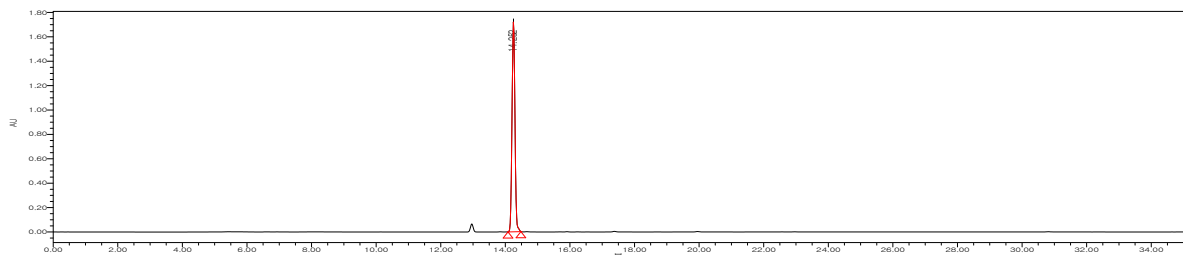
○ 계피 금앵자 추출물에서의 지표성분 함량 측정

- 1) Cinnamaldehyde는 spike test결과 확인되었으며, 본 추출물에 2.971 mg/g extract 있는 것으로 확인됨(Fig. 12).
- 2) Chlorogenic acid는 본 추출물에 0.037 mg/g extract 있는 것으로 확인됨(Fig. 13).

<Cinnamaldehyde [100% MeOH]>



(A)



(B)

Fig. 12. Chromatograms of 계피금앵자추출물(A) and cinnamaldehyde (B)

<Chlorogenic acid [100% water]>

(A)

(B)

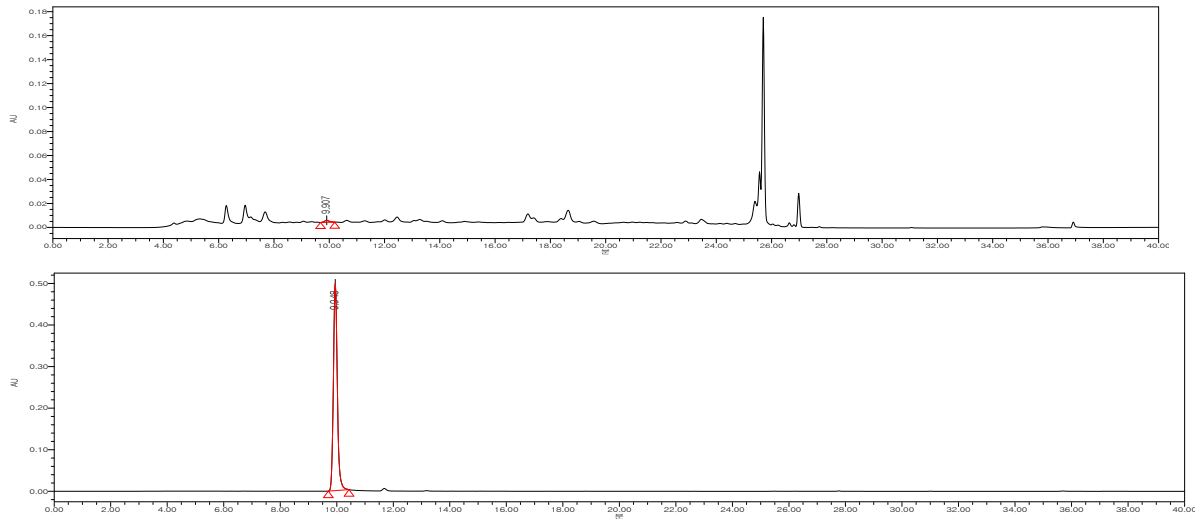


Fig. 13. Chromatograms of 계피금앵자추출물(A) and chlorogenic acid (B)

○ 시험성적서

1) 계피 금앵자 농축액 원료 시험성적서(Lot L-001)

항목	규격	결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 농축액	적합
Cinnamaldehyde 함량	2.3768 ~ 3.5652 mg/g	2.971 mg/g
Chlorogenic acid 함량	0.0296 ~ 0.0444 mg/g	0.037 mg/g
대장균군	음성	음성

2) 계피 금앵자 정제 시험성적서(Lot L-002)

항목	규격	결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 농축액	적합
Cinnamaldehyde 함량	1.97 ~ 2.96 mg/g	2.45 mg/g
Chlorogenic acid 함량	0.025 ~ 0.037 mg/g	0.31 mg/g
대장균군	음성	음성
붕해시험		적합

3) 계피 금앵자 농축액 시험성적서(Lot L-003)

항목	규격	결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 농축액	적합
Cinnamaldehyde 함량	1.90 ~ 2.96 mg/g	2.46 mg/g
Chlorogenic acid 함량	0.025 ~ 0.037 mg/g	0.30 mg/g
대장균군	음성	음성

4) 계피 금앵자 분말 시험성적서(Lot L-004)

항목	규격	결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색 농축액	적합
Cinnamaldehyde 함량	1.90 ~ 2.96 mg/g	2.53mg/g
Chlorogenic acid 함량	0.025 ~ 0.037 mg/g	0.32 mg/g
대장균군	음성	음성

<3차년도>

시작품 제작
건강기능성 원료 개별인정 신청 준비

1. extract, tablet, granule 시작품 제작

형태	정제	과립
사진		 

2. 개별인정 신청 준비

1. 1. 제출자료의 총괄 요약본

신청원료 개요

(최초, 변경¹⁵⁾)

회 사 명		(주)네추럴웨이 (대표이사 : 최중헌)				
영업허가(신고번호)		제조업 <input checked="" type="checkbox"/>	제 2004-서울청-0013호	수입업 <input type="checkbox"/>		
주소 및 연락처		* 경기 포천시 해룡로 83-135 * (연락처) 031-535-7674 (팩스) 031-534-8114				
		담당자	(이름) 유상우 (연락처)			
신청 원료명		계피와 금앵자 추출 분말				
심사 대상 분류	개별인정 원료	새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	인지기능 개선에 도움을 줌		
			신청 섭취량	계피금앵자 추출분말로써 1일 3g		
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>		(변경 전)				
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)				
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 전)				
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)				
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 전)				
국내제조 <input checked="" type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국		
		제조회사				
		소재지				
모듈도의 <input type="checkbox"/>	실시 날짜 :					
품목설명회 <input type="checkbox"/>	희망 날짜 :					

제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분	비고
----	------	------	-----	----

		호	
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		■예 □ 아니 오	
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 □ 아니 오	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □ 아니 오	
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니 오	
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니 오	
4. 원료의 특성에 관한 자료			
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □ 아니 오	
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니 오 □기능성분 ■지표성분	
4.3	영양성분정보자료	■예 □ 아니 오	
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료			
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니 오	
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □ 아니 오	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □ 아니 오 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품	
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니 오 □ 공인 시험방법 ■ 자사 시험방법	
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)		

연번	제출자료	제출여부	첨부번호
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
	* 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오	
	* 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
7. 안전성에 관한 자료 [의사결정도 :]			
7.1	섭취근거 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
7.3	섭취량 평가 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오
		3개월 반복투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오
		유전독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오
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 type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.3	인체적용시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 :	
		<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"/> 아니 오	
9.2	섭취방법 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니 오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	2. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	
10.2	3. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니 오	

□ 전체 내용 요약

항 목	4. 주요 내용	
1. 원료명	계피금앵자 추출분말	
2. 원재료	계피 (학명: <i>Cinnamomum cassis</i> L Presl , 사용부위 : 껍질) 금앵자 (학명: <i>Rosa laevigata</i> , 사용부위 : 열매)	
3.기능 (지표)성분	지표성분 : 신남산(Cinnamic acid), 클로로게닉산(Chlorogenic acid)	
4. 제조 공정	원재료(계피, 금앵자) → 세척 → 분쇄 → 주정추출 → 여과 → 감압농축 → 분무건조 → 계피금앵자 추출 분말	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 노란 주황색의 분말 2) cinnamic acid(지표성분) : 0.233 mg/g chlorogenic acid(지표성분) : 0.0729 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	1)자사시험방법 2)기기분석 조건(Chlorogenic acid : UV 324nm, Aegispak C18-L (4.6 × 250mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것), (Cinnamic acid : UV 280nm, Aegispak C18-L (4.6 × 250mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것)
	규격외 (잔류농약)	건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없으며, 이에 따라 잔류농약 58종에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 ‘불검출’ 임을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취 경험이 있는 계피(<i>Cinnamomum cassis</i> L Presl)와 금앵자(<i>Rosa laevigata</i>)를 주정을 이용하여 단순 추출, 건조한 것으로 섭취량이 일상 섭취량

		보다 증가하였다 판단하여 의사결정도의 '다'에 해당됨.
	섭취 근거	<p><인정현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 -신청원료는 일반가공식품(기타가공품)으로 품목제조신고하여 식품의 원료로 사용 가능함 ◦중국 : 중국약전 및 보건식품으로 등재 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 : 신청원료는 건강기능식품 및 일반식품의 부원료로 판매되고 있음 ◦미국, 일본, 중국 등 : 식품으로 판매 중
	안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> ◦임산부와 수유부는 사용을 피할 것 ◦계피알레르기를 가진 사람은 사용을 피할 것
	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 3g/일 - 계피의 일일 섭취 적정량: 10g • 유사원료(기능성원료, 제2014-14호) 1일섭취량 : 0.336g/일 • 계피 원물로 환산시, 10 g/일에 해당 • 3g <p>⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배이내 이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임</p>
	인 체 적 용 시 험	심각한 이상반응은 확인되지 않음 (3g/일 섭취 기준)
	독성 시험	계피 추출물에 대해 급성 독성 실험을 실시한 결과, 실험 전·후의 비정상적인 체중 변화는 없었으며 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였고 Serum의 GOT, GPT 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않았다. → 선정된 계피 추출물의 독성은 없는 것으로 판명
	기타 사항	없음
	섭 취 시 주 의 사항	<ul style="list-style-type: none"> ◦임산부와 수유부는 사용을 피할 것 ◦계피알레르기를 가진 사람은 사용을 피할 것
7. 기능성	신청 기능성	인지기능 개선에 도움을 줌
	신청 일일섭취량	계피금양자 추출분말로서 3g/일

시험관시험	없음
동물시험	<p>[신청원료 : 계피와 금앵자 추출분말]</p> <p>♂4주령 ICR-male mouse 20-24℃, 30-70℃의 상대습도를 갖는 12hr-photoperiod chamber에서 사육하며 계피 정제물질 2,4-di-tert-butylphenol을 사료에 농도별(5, 10, 20, 40 mg/kg body weight per day) 섞어 3주간 ad lib 상태로 공급. 식이 시작 후 21일째에 치매 유발성 물질인 trimethyltin(TMT)을 복강주사</p> <ul style="list-style-type: none"> -TMT 저행 활성 극복시키거나 보완/예방 활성 유의적 증가(대조군 대비, p<0.05) -뇌신경 손상 저해 효과를 막아 뇌세포 신호전달을 보호 유의적 증가(대조군 대비, p<0.05)
인체적용시험	<p>[신청원료 : 계피와 금앵자 추출분말]</p> <p>♂만 50세 이상의 성인 남녀 중 선별검사인 Korean Version of Mini Mental Status Examination(MMSEKC) 기준 24점이상 27점 이하인 자(n=78), 3g/일, 12주(RCT, DB)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 음주여부, 알코올 섭취량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 없다. - 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. - CERAD-K 변화량은 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. - CDR 변화량은 모든 대상자가 기저 시점과 12주후에 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다. - 뇌 영상 변화는 0.739로 통계적 유의성은 보이지 않았다. <p>※인체적용시험기관 : 가톨릭대학교 서울성모병원, 가톨릭대학교 성빈센트병원, 시험책임자 : 송상욱</p>
기타 사항	없음

2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

2.1. 기원

○ 원재료 : 계피(*Cinnamomum cassis*(L) Presl, 금앵자(*Rosa laevigata* Michaux)

<원재료의 기원에 관한 정보>

[참고 : 식품의약품안전처 DB]

원재료명	계피	금앵자
학명	<i>Cinnamomum cassis</i> (L) Presl	<i>Rosa laevigata</i> Michaux
사용부위	가지, 줄기껍질	열매
원재료 분류	식물	식물

- 동서양에서 흔하게 사용되는 계피(Cinnamon bark)는 아열대 작물이라 동남아, 중국 남부에서 주로 생산되고 있고, 전 세계적으로 가장 좋은 품질은 베트남의 엔바이(Yen Bai) 지역에서 재배되는 것들이다. 우리나라 곳곳에 있는 계수나무는 약으로는 사용되지 않으며 제주지역에서 계피나무를 시험 재배하는 정도다. 계피는 블루베리보다 항산화효과수치가 28배 높은 만큼 항암작용 및 노화방지에 대표적인 음식이며, 영양적 가치가 높은 것으로 여겨지므로 현대인들에게 흔히 있는 질환에 적용 가능한 기능성 소재라고 생각된다. 하지만 각 질환에 대한 특이적 작용점 및 기전에 대한 연구가 부족한 상황으로, 각종 질환에의 적용가능성은 확인되었으나 건강기능식품 개발 수준의 연구는 아직 미비하다고 볼 수 있다. 여기에 기존 산화적 스트레스로부터 뇌신경세포 보호능이 밝혀진 금앵자(*Rosa laevigata*)과 혼합물로 조제된 건강기능성 복합제품 개발은 장기복용에 따른 부작용을 최소화하면서 두 시료의 시너지 향치매 효과뿐 아니라 파킨슨병, 헌팅톤병, 소뇌위축증, 루게릭병 등의 퇴행성 뇌질환 분야와 청소년기의 기억력과 학습능력을 개선시켜주는 집중력강화 등에 대한 뇌기능 강화식품으로의 응용개발이 가능할 것으로 보인다. 계피는 한약재와 식품 등 다양하게 활용되지만 현재 국내 재배가 드물어 수입에 의존하고 있다. 이에 본 연구팀은 계피의 고령화 질환의 예방 및 개선 효능 검증으로 계피의 국내 재배를 증가시켜 대량 상용화로 발전시키고 국내산 농산물의 소비 촉진 및 소득 증대시키고자 한다. 천연자원(계피, 금앵자)을 대상으로 하기 때문에 본 연구는 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높일 수 있을 뿐만 아니라 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 획기적인 대안이 될 것이다. 그러므로 본 연구가 성공적으로 수행되었을 경우, 해외에서도 널리 소비되고 있는 천연자원의 수출 시장의 확대 및 다각화에 기여할 것이다.

2.2. 개발경위

- 급변하는 21세기 한국 사회는 급격한 경제성장을 통해 국민의 생활수준이 높아지고 의료기술도 발달되어 인간의 평균 수명이 크게 늘어남에 따라 노인인구가 급증하면서 고령화에 의한 뇌질환과 관련된 노인성, 퇴행성 질환 발병률이 급격한 증가 추세를 나타내고 있다. 우리나라 총 인구 중 65세 인구가 차지하는 비율이 10.3%이며 1995년의 노인인구 비율이 5.9%인 것에 비해 많이 증가하였다. 또한 우리나라는 지난 2000년에 이미 고령화 사회에 진입하였으며, 향후 10년 후에는 14%이

상으로 고령사회에, 2026년에는 20%이상으로 초 고령사회에 도달할 것으로 전망되고 있다. 특히 치매노인 인구의 비율이 높아짐에 따라 심각한 사회적, 가정적 문제로 대두되고 있다. 보건복지부에 발표한 바에 따르면, 2012년 치매환자는 53만여 명으로 최근 4년 사이 10만 명 이상 늘었고, 2025년이면 100만 명이 넘을 것으로 전망했으며 치매 건강보험 환자 수의 증가로 사회적 비용도 급증하고 있다(Scheme 1). 또한 한 창 일할 나이인 30~50대 ‘젊은 치매’(초로기 치매 혹은 조발성 치매) 환자들이 늘고 있다. 국민건강보험공단에 따르면 30~50대 치매 환자는 2006년 4055명에서 지난해 7768명으로 크게 증가했다. 특히 50대의 경우 2006년 3179명에서 지난해 6547명으로 2배 이상 급증했다. 대개 알츠하이머 치매가 50~60%, 전두·측두엽 치매가 20%, 혈관성 치매가 15~20%를 각각 차지한다.

2.3. 국내·외 인정·허가 현황

2.3.1. 국내

○ 원재료(계피, 금앵자)

- 계피(가지, 줄기껍질), 금앵자(열매)는 식품의 원료로 사용 가능함[식품의 기준 및 규격 제 2016-43호, ‘2016.05.31.]



(기능성원료 인정 내용)

- 계피추출분말 (인정번호 : 제2014-14호)
 - 기능성 : 혈당조절에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생리활성기능 3등급) (일일 섭취량 : 계피추출분말로서 336mg/일)

2.4. 국내·외 사용 현황

2.4.1. 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	수정과 풍미의 곶감 계피차	썬키스 트				액상차		
	계피 가루	자연 달음				분말가루		

2.4.2. 국외

<유통 판매 현황 표>

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
미국		유기농 허브 워터 터시나 몬	herbal water				혼합음료		
벨기에		퓨로 사 과-계피 홍차	MIKO KOFFIE NV				침출차		
대만		계피호 떡	RANDE FOOD CO, LTD				빵류(그외 빵류)		

3. 제조방법 및 그에 관한 자료

3.1. 원재료

- 계피(*Cinnamomum cassis*) : 금앵자(*Rosa laevigata*) = 7 : 3

3.2. 개요

- 상기의 원재료를 주정 추출 후, 농축하고 동결건조하여 제조함

3.3. 제조공정표

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(%)	수율(kg)
계피, 금앵자				
↓				
세척				
↓				
분쇄				
↓				
추출	100% 주정	100℃, 24시간		16.72%
↓				
여과				
↓				
감압농축				
↓				
분무건조				
↓				
계피금앵자 추출분말			Cinnamic acid 2% Chlorogenic acid 0.7%	

○ 주정은 국내 규격에 적합함을 확인하였음

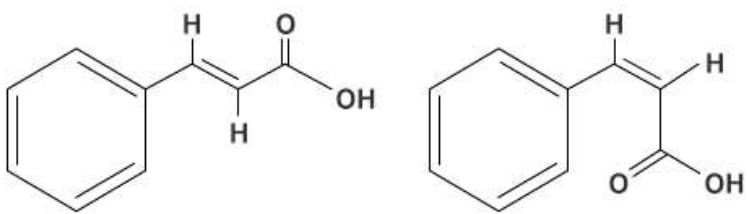
4. 원료의 특성에 관한 자료

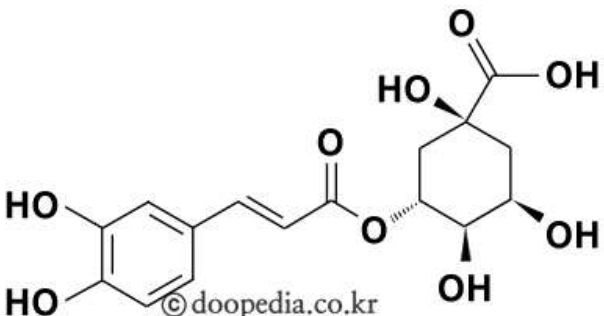
4.1. 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등

○ 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진노란색의 분말

4.2. 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

○ 지표성분 : Cinnamic acid, Chlorogenic acid

구조	 <p>트랜스형 <i>trans</i>-Cinnamic acid</p> <p>시스형 <i>cis</i>-Cinnamic acid</p>
일반명	Cinnamic acid
분자식	C ₉ H ₈ O ₂
분자량	148.16

구조	 <p>© doopedia.co.kr</p>
일반명	Chlorogenic acid
분자식	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
분자량	354.31

○ 지표 성분 설정근거 : 계피, 금앵자의 대표성분을 지표성분으로 함

4.3. 영양성분정보자료

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	39.19Kcal/100g	수분(%)	89.90%
탄수화물(%)	8.94%	회분(%)	0.69%
조지방(%)	0.31%	나트륨(mg/100g)	21.45mg/100g
조단백질(%)	0.16%		

5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

5.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

5.1.1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격

○ 지표성분 : Cinnamic acid 0.233 mg/g, Chlorogenic acid 0.0729 mg/g

5.1.2. 설정근거

1) ooo : oo 시험기관 성적서 [첨부]

○cinnamic acid

[검사기관명 :]

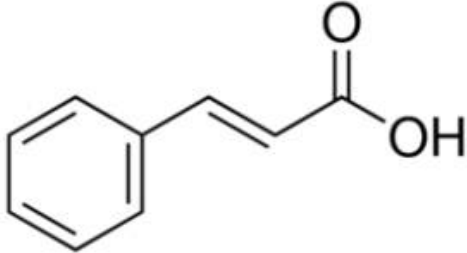
Lot No. 반복수	1 (Lot)	2 (Lot)	3 (Lot)	평균
1반복				/
2반복				
3반복				
평균				

○chlorogenic acid

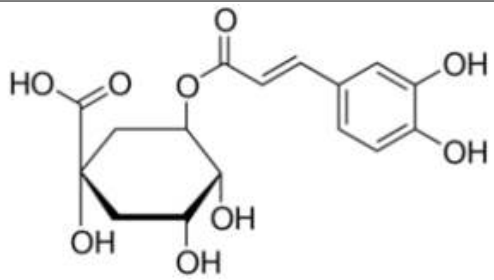
Lot No. 반복수	1 (Lot)	2 (Lot)	3 (Lot)	평균
1반복				/
2반복				
3반복				
평균				

5.2. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보

○ Cinnamic acid

■ 시판되는 표준품	표준품명	trans-cinnamic acid
	제조·판매회사명	시그마알드리치코리아
	구조식	
	CAS No.	140-10-3

○ Chlorogenic acid

■ 시판되는 표준품	표준품명	chlorogenic acid
	제조·판매회사명	시그마알드리치코리아
	구조식	
	CAS No.	327-97-9

5.3. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

<input type="checkbox"/> 공인시험방법	출처:
<input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법	■ 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부
<p><시험방법></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; background-color: #f0f0f0;"> <p>1. 장치 : HPLC</p> <p>2. 표준물질 및 일반시약</p> <p>2.1 표준물질</p> <p>2.1.1 cinnamic acid(순도 99%) 분자식 : C₉H₈O₂, 분자량 : 148.16, CAS No. : 140-10-3</p> <p>2.1.2 chlorogenic acid(순도 95%) 분자식 : C₁₆H₁₈O₉, 분자량 : 354.31, CAS No : 327-97-9</p> <p>2.2 일반시약</p> <p>2.2.1 Acetic acid</p> <p>2.2.2 Methanol</p> <p>2.2.3 증류수(Distilled water)</p> <p>3. 시험과정</p> <p>3.1 표준용액 제조</p> <p>3.1.1 표준품 cinnamic acid/chlorogenic acid 1mg을 정밀하게 달아 이를 4ml 용량 tube에 넣고 100% methanol로 녹인 후 이를 표준원액으로 하였다.(250μg/ml)</p> <p>3.1.2 상기 용액을 증류수로 희석하여 표준용액으로 한다.(10, 25, 50, 100, 125 μg/ml)</p> </div>	

3.2 시험용액 제조

3.1.1 계피금양자 추출물 30mg에 methanol 1ml을 넣어 완전히 녹인 후 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

4. 기기분석 조건

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건
주입량	10 μ l
칼럼온도	25 $^{\circ}$ C
이동상	A 용매 - Water(1% Acetic acid) B 용매 - ACN(1% Acetic acid)
유속	1 ml/min
검출기 파장	280 nm

표 2. 이동상 조건

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	95	5
20	0	100
25	0	100
30	95	5
35	95	5

4.2 계산

$$\text{Cinnamic acid/Chlorogenic acid(mg/g)} = A \times \frac{B}{S} \times P$$

A : 시험 용액 중 Cinnamic acid/Chlorogenic acid 농도(μ g/ml)

B : 시험 용액의 전량(ml)

S : 시료 채취량(mg)

P : 표준품의 순도

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

6.1.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군)규격

- 1) 납 : 1ppm 이하
- 2) 총비소 : 1ppm 이하
- 3) 카드뮴 : 1ppm 이하
- 4) 총수은 : 1ppm 이하
- 5) 대장균군 : 음성

6.1.2. 설정근거 : 국내 시험기관 성적서 [첨부 6-1]

1) 중금속 4종 설정근거 : 신청원료 중 중금속의 1일 노출량(D)이 1일 최대 노출허용량(E)을 초과하지 않으므로 제안 규격은 적절하다고 판단된다.

■ 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치 ^{a)} (mg/kg)	최대 섭취량 ^{b)} (g)	제안규격 ^{c)} ($\mu\text{g/g}$)	제안규격에 의한 일일 노출량 ^{d)} (μg)	1일 최대 노출허용량(μg)
납	0.0345	3	1	3	10.8
총비소	0.0251		1	3	150
카드뮴	0.0321		1	3	3.0
총수은	0.005		1	3	2.1

^{a)}실측치 : 한국기능식품연구원 3LOT 실측치의 평균값

^{b)}최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 g/일으로 설정 (신청사, 최대섭취량 g으로 신청함)

^{c)}제안규격 : 신청인이 제안한 규격

^{d)}제안규격에 의한 일일노출량 : $b \times c$

2) 대장균군 : 대장균은 식품 위생 관리에 가장 기본적인 지표로서 반드시 음성으로 관리되어야 하며, 본 신청원료의 1lot, 1반복의 한국기능식품연구원 실험결과를 토대로 음성으로 규격 설정하였다.

6.2. 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

6.2.1 잔류농약

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및규격」에 농약의 잔류허용기준이 없으며, 이에 따라 잔류농약 58종에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 ‘불검출’임을 확인하였으며, 분석 자료를 제출한다.

6.3. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

6.3.1. 납

식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.3.1 납 (Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.2. 총비소

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납 (Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.3. 카드뮴

식품공전 제 10. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1.2 금속별 시험 7.1.2.1 납 (Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법 에 준하여 시험용액 조제 후 2) 측정 ICP-MS로 측정한다.

6.3.4. 총수은

식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질시험법 7.1 중금속 시험 7.1.2.4 수은 (Hg)에 근거하여 시험한다.

6.3.5. 대장균군

식품공전 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1 정성시험 가. 유당배 지법에 준하여 시험한다.

6.3.6. 잔류농약

식품공전 제 9. 일반시험법 4. 식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다중농약다성분분석법 4.1.2.2 다중농약다성분분석법에 따라 시험한다.

■ 시험성적서 요약표

[시험기관명 : 한국기능식품연구원]

제안 기준 및 규격	시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
규격항목	성상			이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 진노란색의 분말		
	기능성분(지표성분)(mg/g)		cinnamic acid 0.233 mg/g			
			chlorogenic acid 0.0729 mg/g			
	중금속 (mg/kg)	납	1ppm	0.0345ppm		
		총비소	1ppm	0.0251ppm		
		카드뮴	1ppm	0.0321ppm		
		총수은	1ppm	0.005ppm		
	미생물	대장균군	음성	음성		
		세균수(cfu/g)	-			
	곰팡이 독소	독소명 기재	-			
잔류용매	용매명 :	-				
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-			
	잔류농약	58종	불검출			

7. 안전성에 관한 자료

◆ 안정성에 관한 제출 자료의 범위

○ 섭취 경험이 있는 계피(*Cinnamomum cassis*), 금앵자(*Rosa laevigata*)를 주정을 이용하여 단순 추출, 건조한 것으로 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하였다 판단하여 의사결정도 '다'에 해당됨. 「건강기능식품 기능성원료 및 기준규격 인정에 관한 규정」 별표 3. 의사결정도 '다'에 해당됨.

따라서 안전성에 관한 자료 제출범위는 섭취근거자료, 해당 기능성분 또는 관련 물질에 대한 안정성 정보 자료, 섭취량 평가자료, 영양평가자료, 생물학적 유용성 자료, 인체적용시험자료 임.

7.1. 섭취근거 정보

2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음

7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Pubmed	(cinnamic acid or chlorogenic acid or cinnamon or Rosa laevigata) And (safety of adverse or toxic)	O	O	
natural medicines	cinnamic acid or chlorogenic acid or cinnamon or Rosa laevigata	O	O	
toxline	cinnamic acid or chlorogenic acid or cinnamon or Rosa laevigata	O	O	
PDR health	cinnamomum cassia	X	X	

* 논문 : Subchronic toxicity study of the total flavonoids from Rosa laevigata Michx fruit in rats

7.3. 섭취량 평가 정보

○ 계피금앵자 추출분말의 1일 섭취량은 3g.

- 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 3g/일
 - 계피의 일일 섭취 적정량: 10g
- 유사원료(기능성원료, 제2014-14호) 1일섭취량 : 0.336g/일
- 계피 원물로 환산시, 10 g/일에 해당
- 3g

⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배이내이고), 최대 안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임

※ 신청원료의 제안 섭취량

- 일일 섭취량 : 3000mg/일
- 계피 원물로 환산 시 : 10g/일 (수율 30 % 기준)

7.4. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

○ 인체적용시험 정보

- 안정성 평가변수 : 이상반응, 실험실적 검사(혈액화학적검사, 혈액화학적 검사, Fasting Insulin, TSH, 소변검사), 활력징후(혈압, 맥박, 체온), 이학적 검사(알러지, 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관계/간 및 담도계, 대사계/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관 검진)

[안전성 평가를 위한 인체적용시험 요약]

디자인	대상자(탈락율)	시험물질 섭취량/섭취기간	안전성지표	결과	비고
DB, RCT	만 50세 이상의 성인 남녀 중 선별검사인 MMSE-KC 기준 24점 이상 27점 이하인 자, 총 60명(군당 30명), 중도탈락율 15% 포함	계피금앵자 농축액/ 1일 3g/ 12주	이상반응, 실험실적 검사, 활력징후, 이학 적 검사	- 음주여부, 알코올 섭취 량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간 통계 적으로 유의한 차이는 없 다. - 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군 간 통계적으로 유의한 차	

				이를 보이지 않았다. - CERAD-K 변화량은 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. - CDR 변화량은 모든 대상자가 기저 시점과 12주후에 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다. - 뇌 영상 변화는 0.739로 통계적 유의성은 보이지 않았다.
--	--	--	--	---

7.5. 독성시험

○농도별 계피 추출물(400, 800, 1200mg/kg)로 실시된 급성 독성 실험을 제출함.

[안전성 평가를 위한 독성시험자료 요약표]

시험종류	종 및 계통	투여 방법	투여 기간	시험물질, 용량	시험결과	비고
단회투여	설치류	ICR mice	경구	1회	계피 추출물/400, 800, 1200mg/kg	농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였다. Serum의 GOT, GPT변화도 유의성을 보이지 않으므로 선정된 계피 추출물의 독성은 없는 것으로 판명되었다.

8. 기능성에 관한 자료

■ 제안된 기능성내용 및 섭취량

- 기능성 내용 : 인지기능 개선에 도움을 줌
- 일일 섭취량 : 계피금앵자 추출분말로서 3g

■ 기능성 제출자료

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료				
참고자료				

■ 추측 가능한 작용기전

○ 계피금양자 추출 분말은 AChE 활성 저해효과, TMT의 저해활성 극복 or 보완/예방, 뇌세포 신호전달 안정적으로 보호, MDA 농도 감소시켜 인지기능 개선에 도움을 준다고 판단됨.

○ 작용기전 설명자료

-퇴행성 뇌질환이 치매를 유발하는 알츠하이머병은 대뇌피질의 신경세포가 점차 죽어가면서 기억력장애를 포함한 인지기능의 장애를 초래하는 질환으로 뇌 중심영역의 신경 세포들과 신경세포에서 복잡한 신호들(G-protein과 관련된 post-receptor signal transduction 등)과 관련이 있다.

-알츠하이머병 환자의 뇌에서 특징적으로 세포외에 침착된 Amyloid β peptide(A β)와 세포내에 축적되는 신경섬유 다발성 병변(neurofibrillary tangles; NFT)이 노화 과정에서 뇌에 축적되고 엉키게 되며, 이러한 현상이 신경 세포에 독성을 주는 주요 원인으로 보고 있다.

또한 알츠하이머병 환자의 기저핵 신경세포에는 아세틸콜린(acetylcholine; Ach)의 농도가 감소되어 있고, 콜린 아세틸랜스페라제(choline acetyltransferase)의 활성이 저하되어 있다.

-Cinnamomum loureirii 추출물은 AChE 활성을 저해하며 C.loureirii에서 추출된 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol(BP)는 잠재적인 AChE 저해제로 확인되었다. C.loureirii로부터 추출된 BP가 ICR mice에 TMT를 주입하여 학습과 기억력이 손상되는 것을 저해하는 효과가 있는지 입증하였다.

계피추출물로부터 정제된 AChE 저해활성물질인 2,4-*di-tert*-butylphenol의 저해활성을 확인하기 위해 ICR-male mouse(4주령)을 대상으로 한 동물 실험에서 정제물질의 농도가 높아짐에 따라 저해활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 TMT group(대조군)과 2,4-*di-tert*-butylphenol+ TMT group의 passive avoidance test 결과 2,4-*di-tert*-butylphenol를 섞은 사료를 먹인 그룹이 대조군을 상회하는 인지능력의 회복을 보여주었다. 2,4-*di-tert*-butylphenol가 TMT의 뇌신경 손상 저해 효과(인지능력의 상

실유도)를 blocking하는 대조군이 보여주는 인지능력을 나타내어줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호시켜줌을 확인하였다.

○ 인구학적 조사 및 신체계측

-인체적용시험대상자의 평균연령(\pm SD)은 계피/금앵자 복용군에서 65.10세 (\pm 6.85)였고, 대조군은 64.92세(\pm 6.31)였다. 남자는 계피/금앵자 복용군, 대조군에서 각각 8명(20.00%), 12명(31.58%)이었으며, 평균 교육년수는 시험군에서 12.95년(\pm 3.84), 대조군에서 12.00년(\pm 3.30)이었다. 음주여부, 알코올 섭취량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

○ 1차 유효성 평가

- 기저 시점 대비 12주 후의 CERAD-K 변화량

ITT 분석 대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CERAD-K 총점 I 의 변화량은 계피/금앵자 복용군의 경우 5.43 ± 6.01 점 증가 ($p < 0.001$), 대조군의 경우 5.37 ± 5.42 점이 증가 ($p < 0.001$)하였지만 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. CERAD-K 총점 II 의 변화량은 계피/금앵자복용군의 경우 6.10 ± 6.54 점 증가 ($p < 0.001$), 대조군의 경우 5.37 ± 5.55 점이 증가 ($p < 0.001$)하였지만 두군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. CERAD-K 항목별 점수변화량을 보면, 언어유창성, 보스톤 이름대기, 간이정신상태(MMSE-KC), 단어목록기억, 구성행동, 단어목록회상, 단어목록재인, 구성회상, 길만들기 검사, 스트룹검사(단어, 색깔) 등 모든 세부검사 항목에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

○ 2차 유효성 평가

- 기저 시점 대비 12주 후의 CDR 변화량

ITT 분석대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CDR 결과의 변화량은 0점으로 통계적 산출은 적용되지 않았으며, 모든 대상자가 기저 시점에서 0점이었으며, 12주후 측정에서도 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다.

- 기저 시점 대비 12주 후의 뇌 영상 변화

구조적 MRI 분석을 통해 관련 영역의 해부학적 정량을 측정한 결과 대조

군에서 계피/금앵자 복용군보다 뇌용적이 더 크게 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다(PBVC -0.48 ± 0.715 vs -0.64 ± 1.656 , $p=0.739$).

○ 안전성 평가

- ITT 분석 대상군 78명 중 17명(21.79%)에서 총 28 건의 이상약물반응이 발생하였으며 복용 군별로는 계피/금앵자 복용군 10명(25.00%), 대조군 7명(18.42%)이었고, 이상약물반응이 발생한 시험대상자의 비율에 대한 복용군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.4818$). 이상약물반응의 증증도로 구분하였을 때 경증이 25건, 중등증은 3건, 중증은 발생하지 않았으며, 사망을 포함한 중대한 이상약물반응은 보고되지 않았다. 인체적용 시험용 식품의 영구중단을 초래한 이상약물반응은 시험군에서 위장장애를 호소한 1건으로 중증은 아니었으며 복용 중단 후 완전 회복되었다.

8.1. 동물시험

○ 개별적인 기능성자료의 시험동물, 시험물질, 바이오마커, 시험결과 등에 대하여 바이오마커의 유의적 변화 위주로 개조식 서술

[신청원료]

[동물시험자료 요약]

시험 물질	실험동물	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
계피금앵자추출물	ICR-male mouse	50mg/kg /4주	AChE 저해 활성, TMT의 뇌신경 손상 저해, 뇌세포 신호전달		

8.2. 인체적용시험

[신청원료]

[인체적용시험자료 요약]

시험 물질	디자인	대상자	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
계피금앵자추출분말(신청원료)	DB, RCT	만 50세 이상의 성인 남녀 중 선별 검사인 MMSE-KC 기준 24점 이상 27점 이하인 자, 총 60명(군당 30명), 중도 탈락율 15% 포함	1일 3g/ 12주	[유효성 마커] CERAD-K 변화량, CDR 변화량, 뇌영상의 구조적/기능적(뇌실질 부피, 회색질 두께, 기능 활성)변화 [안전성 마커] 이상반응, 실험실적 검사, 활력징후, 이학적 검사	- 음주여부, 알코올 섭취량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 없다. - 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. - CERAD-K 변화량은 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. - CDR 변화량은 모든 대상자가 기저 시점과 12주후에 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다. - 뇌 영상 변화는 0.739로 통계적 유의성은 보이지 않았다.	

9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

9.1. 섭취량 및 근거

- 섭취량 : 계피금앵자농축분말로서 3g
- 설정근거 : 기능성이 확인된 동물실험 결과의 섭취량을 고려하여 설정함.
동물실험 결과, 계피 : 금앵자 = 70 : 30 비율의 혼합물 50mg/kg body seight per day 용량 선정 → 성인 60kg 기준으로 계피금앵자농축액 1인 기준량 3,000mg 선정

9.2. 섭취 시 주의사항 및 근거

- 섭취 시 주의사항 : 임산부, 수유부 또는 계피알레르기를 가진 사람은 섭취 시 주의
- 근거내용 : 임산부는 안전성 및 기능성에 대한 별도의 연구가 없으므로 본 원료의 섭취가 주의되어 주의사항으로 설정하였다.

10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

10.1. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 계피, 금앵자 및 지표성분인 cinnamic acid, chlorogenic acid는 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약청 고시 제 2013-207호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않음

10.2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 계피, 금앵자 및 지표성분인 cinnamic acid, chlorogenic acid는 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약청 고시 제2013-2017호, '13.08.16)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음

단회투여독성 시험자료 요약서(설치류)

민원번호: 필수 선택

1. 원료명	계피 추출물										
2. 시험기관	고려대학교										
3. 자료의 요건	<input type="checkbox"/> GLP 기관보고서 <input checked="" type="checkbox"/> 논문 <input type="checkbox"/> 기타										
4. 시험물질 (배합비 포함)	계피추출물(400, 800, 1200mg/kg)										
5. 시험동물	종	<input checked="" type="checkbox"/> 마우스 <input type="checkbox"/> 랫드 <input type="checkbox"/> 기니픽 <input type="checkbox"/> 기타 ()									
	계통	ICR				주령	4주령				
	동물수	수컷	40			암컷					
6. 투여경로	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 기타 ()										
7. 관찰 기간	<input type="checkbox"/> 14일 <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (1)일										
8. 실험내용	실험군	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	투여용량 (mg/kg)	400		800		1200		Control		TMT	
	실험동물	암	수	암	수	암	수	암	수	암	수
	군당 동물수		8		8		8		8		8
	사망동물수										
9. 평가항목	<input checked="" type="checkbox"/> 사망 개체 수 <input checked="" type="checkbox"/> 임상증상 <input checked="" type="checkbox"/> 체중측정 <input checked="" type="checkbox"/> 육안적 소견 <input checked="" type="checkbox"/> 병리조직학적검사 <input type="checkbox"/> 기타 ()										
10. 시험결과 (치사량 포함)	실험 전·후의 비정상적인 체중 변화는 없었으며 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였다. Serum의 GOT, GPT 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않으므로 선정된 계피 추출물의 독성은 없는 것으로 판명됨.										
11. 시험자결론											
12. 검토의견	작성하지 않음										

기능성 시놉시스

a. 동물시험

[첨부 -1]

학술지정보	Biological and Pharmaceutical Bulletin					
	Vol	39(7)	게재연도	2016	시작페이지	1
논문제목	Cinnamomum loureirii Extract Inhibits Acetylcholinesterase Activity and Ameliorates Trimethyltin-Induced Cognitive Dysfunction in Mice					
연구목적	Cinnamomum loureirii 추출물의 AChE 활성 저해 효과와 TMT에 의해 유발된 인지 기능 장애 개선효과를 동물실험을 통해 확인					
연구유형	동물시험					
Species	mice		Age	4주령		
Strain	ICR		Sex	<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질	에탄올로 추출한 농도별 C.loureirii(400, 800, 1200mg/kg body weight)					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	n=8, 정상 식이			
		positive	n=8, TMT 식이			
		negative				
	시험군	농도별 8마리 계피추출물 400, 800, 1200mg/kg + TMT 식이				
	디자인	총 40마리의 mice을 5그룹(대조군, TMT그룹, 계피추출물 400, 800, 1200mg/kg+ TMT 그룹)으로 나누어 식이를 3주 동안 공급함.	섭취량	400, 800, 1200mg/kg		
	식이조절					
바이오마커	AChE 저해효과, 자발적 교체 행동, 잠재적인 수동적 회피능력					
통계처리	ANOVA, 유의수준 $p < 0.05$					
시험결과	<p>1) AChE의 저해제 BP</p> <ul style="list-style-type: none"> - C.loureirii로부터 추출된 BP를 TMT를 주입한 ICR mice에 주입하여 학습과 기억력이 손상되는 것을 저해하는 활성에 유의적 차이가 있었다. <p>2) C.loureirii 추출물의 작용</p> <ul style="list-style-type: none"> - C.loureirii 추출물은 TMT그룹에 비해 높은 자발적 교체행동을 보였다. - 총 arm entries 수, 자극, 주의력, 감각기능을 포함한 비특이성 과정은 그룹 사이에서 유의적 차이를 보이지 않았다. - C.loureirii 추출물은 TMT 그룹보다 잠재적인 수동적 회피능력에 유의적 증가가 나타났다. 					
비고						

[첨부 -2]

학술지정보	Biological and Pharmaceutical Bulletin					
	Vol	40	게재연도	2017	시작페이지	932
논문제목	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol from Cinnamomum loureirii Improves cognitive deficit, cholinergic dysfunction, and oxidative damage in TMT-treated mice					
연구목적	C.loureireii에 있는 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol은 TMT를 주사한 mice의 인지결함, 콜린성 기능장애, 산화적 손상을 개선시킨다는 것을 동물실험을 통해 확인					
연구유형	동물시험					
Species	mice	Age	5주령			
Strain	ICR	Sex	<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female			
시험물질	C.loureireii에서 분리한 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo				
		positive	TMT 2.5mg/kg			
		negative	0.85% saline			
	시험군	BP 10, 20, 40mg/kg				
	디자인	mice을 5그룹(positive대조군, negative대조군, BP 10, 20, 40mg/kg그룹)으로 나누어 식이를 3주 동안 공급함.			섭취량	10, 20, 40mg/kg
			섭취기간	3주		
식이조절						
바이오마커	자발적 교체 행동, 잠재적인 수동적 회피능력, AChE활성, 뇌의 ACh 농도, 지질 과산화					
통계처리	ANOVA, 유의수준 $p < 0.05$					
시험결과	1) 기억 손상을 유발하는 TMT에 대한 BP의 효과 - BP 식이 그룹이 TMT 식이 그룹에 비해 높은 자발적 교체행동을 보였고 이는 유의적으로 증가하였다. - BP 40mg/kg 그룹은 TMT 그룹보다 잠재적인 수동적 회피능력에 유의적 증가가 나타났다. 2) BP가 생화학적 지수에 미치는 영향 - BP그룹은 콜린성계의 ACh를 증가시키고 AChE를 저해하는데 유의적 차이가 있었다. - BP 20, 40mg/kg 그룹은 mice의 뇌 조직에서 지질 산화를 저해하였다.					
비고						

[첨부 -3] : 논문 게재 후 작성 예정

학술지정보		Vol		게재연도		시작페이지		
논문제목								
연구목적								
연구유형								
Species				Age				
Strain				Sex		<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질								
투입형태		<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타						
시험디자인	대조군	placebo						
		positive						
		negative						
	시험군							
	디자인			섭취량				
		섭취기간						
식이조절								
바이오마커								
통계처리								
시험결과								
비고								

b. 인체적용시험 요약본

학술지정보	보고서(가톨릭대학교 서울성모병원 / 시험책임자 : 송상욱)				
	Vol		계재연도	2017	시작페이지
논문제목	인지능 개선에 미치는 계피/금앵자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험				
연구목적	계피/금앵자 추출물 복용에 대한 안전성을 평가하고 경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금앵자 추출물 또는 위약을 12주간 복용 후 인지기능개선 효과를 비교 평가 및 뇌영상학적 검사를 통한 구조적, 기능적 변화 비교 분석하는 것을 목적으로 함				
연구유형	인체적용시험			IRB 구성 및 승인	Y
실험설계	double-blind		randomized		parallel
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	<p>[선정기준]</p> <p>(1) 만 50세 이상의 성인 남녀</p> <p>(2) 선별검사인 Korean Version of Mini Mental Status Examination(MMSE-KC) 기준 24점 이상 27점 이하인 자</p> <p>(3) 본 인체적용시험에 대하여 자세한 설명을 들은 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <p>[제외기준]</p> <p>(1) DSM-IV 치매 선정 기준에 포함된 자</p> <p>(2) HADS의 불안 또는 우울 점수가 하나라도 11점 이상인 자</p> <p>(3) CDR의 Global Score이 0.5점 이상인 자</p> <p>(4) 신경 또는 정신의학적으로 중요한 병이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 자(우울증, 정신분열병, 간질, 알코올 중독, 약물남용 혹은 중독)</p> <p>(5) 중증 심혈관질환(심부전, 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 진단된 동맥 경화증) 병력이 있는 자</p> <p>(6) 악성종양 또는 폐질환이 있는자</p> <p>(7) 심한 신 기능 장애가 있는 자(serum creatinin 이 2.0mg/dl 이상)</p> <p>(8) 심한 간 기능 장애가 있는 자(AST, ALT Bilirubin 중 하나라도 정상 상한치의 2.5배 이상)</p> <p>(9) 계피와 금앵자 혼합추출물에 과민증이 있는자</p> <p>(10) 최근 1개월 이내에 본 인체시험에 영향을 미칠 수 있는 치매와 기억력 향상에 도움이 되는 대표적인 의약품이나 건강 기능식품 등을 복용한 경험이 있는 자</p> <p>(11) 현재 다른 임상시험 또는 인체시험에 참여하고 있거나 최근 1개월 이내에 임상시험 또는 인체적용시험에 참여하고 있는 자</p> <p>(12) 임부 또는 수유부</p> <p>(13) 시험담당자의 소견으로 볼 때 시험의 준수 사항을 따를 수 없다고 판단 되는 자</p>			

	특징	만 50세 이상의 MMSE-KC 기준 24점이상 27점 이하인 성인		
	시험물질	시험식품 : 계피금앵자추출분말(신청원료) 3g 함유 대조식품 : 위약(계피금앵자추출물을 제외하고 시험식품과 동일한 성분 함유)		
시험 디자인	대조군	placebo	n=33명, 1일 3회 2정 섭취	
		positive		
		negative		
	시험군	n=33, 1일 3회 2정 섭취		
디자인		섭취량	계피금앵자추출분말 3g/일	
		섭취기간	12주	
	식이조절			
	바이오마커	1차 유효성 평가 : CERAD-K 변화량 2차 유효성 평가 : CDR(임상적 치매 척도), Brain MRI 안전성 평가 : 이학적 검사, 활력징후, 실험실적 검사(혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, TSH, Fasting Insulin, 소변검사), 이상반응		
	통계처리	섭취 전/후 군 내 차이 검정 : paired t-test or Wilcoxon's signed rank test 범주형 자료의 경우 섭취 전/후 군 내 차이 검정 : Chi-square test or Fisher's exact test 그룹 간의 검정 : ANCOVA		
	시험결과	<p>1. 인구학적 조사 및 신체계측</p> <p>인체적용시험대상자의 평균연령(±SD)은 계피/금앵자 복용군에서 65.10세(±6.85)였고, 대조군은 64.92세(±6.31)였다. 남자는 계피/금앵자 복용군, 대조군에서 각각 8명(20.00%), 12명(31.58%)이었으며, 평균 교육년수는 시험군에서 12.95년(±3.84), 대조군에서 12.00년(±3.30)이었다. 음주여부, 알코올 섭취량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.</p> <p>2. 1차 유효성 평가</p> <p>(1) 기저 시점 대비 12주 후의 CERAD-K 변화량</p> <p>ITT 분석 대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CERAD-K 총점 I의 변화량은 계피/금앵자 복용군의 경우 5.43 ± 6.01 점 증가 (p <0.001), 대조군의 경우 5.37 ± 5.42 점이 증가 (p <0.001)하였지만 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. CERAD-K 총점 II의 변화량은 계피/금앵자복용군의 경우 6.10 ± 6.54 점 증가 (p <0.001), 대조군의 경우 5.37 ± 5.55 점이 증</p>		

가 ($p < 0.001$)하였지만 두군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. CERAD-K 항목별 점수변화량을 보면, 언어유창성, 보스톤 이름대기, 간이정신상태 (MMSE-KC), 단어목록기억, 구성행동, 단어목록회상, 단어목록재인, 구성회상, 길만들기 검사, 스트룹검사(단어, 색깔) 등 모든 세부검사 항목에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

3. 2차 유효성 평가

(1) 기저 시점 대비 12주 후의 CDR 변화량

ITT 분석대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CDR 결과의 변화량은 0점으로 통계적 산출은 적용되지 않았으며, 모든 대상자가 기저 시점에서 0점이었으며, 12주후 측정에서도 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다.

(2) 기저 시점 대비 12주 후의 뇌 영상 변화

구조적 MRI 분석을 통해 관련 영역의 해부학적 정량을 측정한 결과 대조군에서 계피/금앵자 복용군보다 뇌용적이 더 크게 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다(PBVC -0.48 ± 0.715 vs -0.64 ± 1.656 , $p=0.739$).

4. 안전성 평가

ITT 분석 대상군 78명 중 17명(21.79%)에서 총 28 건의 이상약물반응이 발생하였으며 복용 군별로는 계피/금앵자 복용군 10명(25.00%), 대조군 7명(18.42%)이었고, 이상약물반응이 발생한 시험대상자의 비율에 대한 복용군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.4818$). 이상약물반응의 중증도로 구분하였을 때 경증이 25건, 중등증은 3건, 중증은 발생하지 않았으며, 사망을 포함한 중대한 이상약물반응은 보고되지 않았다. 인체적용시험용 식품의 영구중단을 초래한 이상약물반응은 시험군에서 위장장애를 호소한 1건으로 중증은 아니었으며 복용 중단 후 완전 회복되었다.

비고	
----	--

[제 1협동 : 고려대학교]

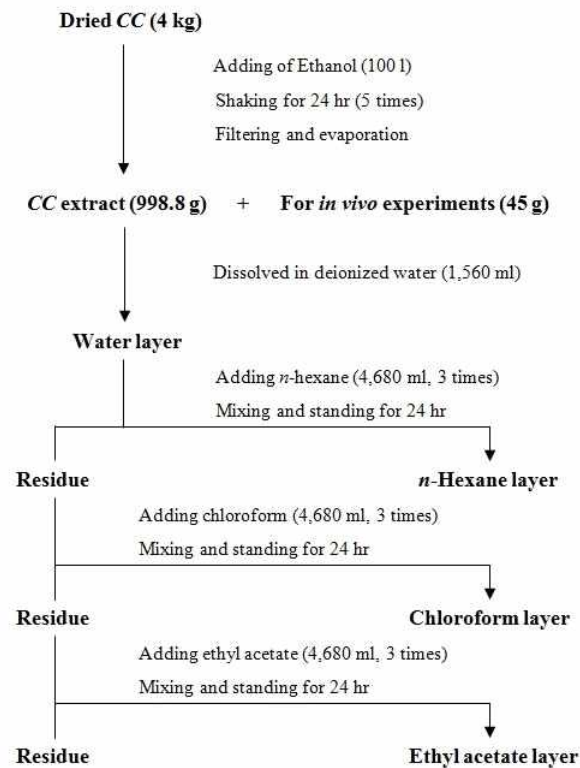
< 1차년도 >

1. *Cinnamomum loureirii*로부터 활성 phytochemicals의 추출 및 정제

가. 최종 선정시료 계피의 대량추출

선정 시료인 계피(4 kg)를 핸드 믹서로 곱게 분쇄한 후, 시료의 5배 부피로 ethanol을 넣고 24시간 동안 shaking하였다. 그 후, 추출된 용매를 filtering하여 걸러져 나온 용매는 수거하고, 시료에는 다시 같은 부피의 ethanol을 넣어 shaking하였다. 이 과정을 총 5회 반복하였고, 추출된 용2매는 감압 하에서 농축하여 계피 ethanol 추출물을 조제하였다. 농축 결과 4 kg의 계피에서 998.8 g의 추출물이 나왔다. 이를 이용해 solvent partition을 실시하였다.

나. Solvent partition에 의한 계피 추출물의 AChE에 대한 저해 활성
 계피 에탄올 추출물을 이용하여 Scheme 21와 같이 solvent partition을 실시하였다. 농축시킨 계피 추출물(953 g)을 적당량의 증류수에 완전히 분산시킨 후, 사용된 증류수의 양의 3배에 해당하는 용매를 극성에 따라 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate의 순으로 3회씩 분획하였다. 각 분획의 AChE에 대한 저해 활성을 검색한 결과, 활성이 가장 높은 chloroform로부터 추출한 분획을 선택하였다(Fig. 1).



Scheme 21. Solvent partitioning of *Cinnamomum loureirii* extract

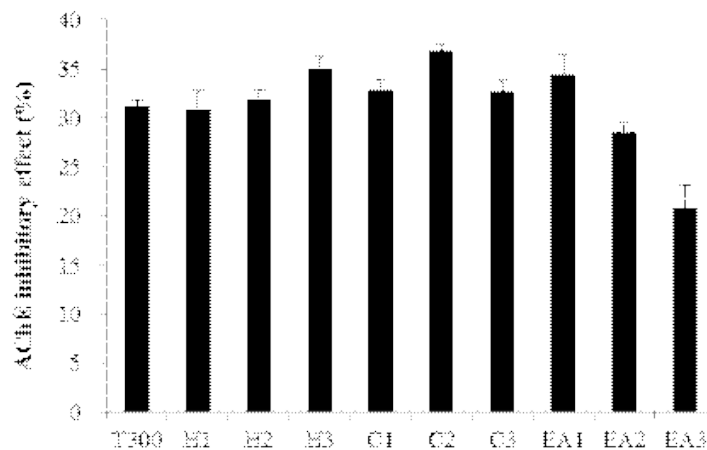


Fig. 1. Effects of *Cinnamomum loureirii* extract from solvent partitioning on AChE activity. The value (%) of enzyme activity for each fraction was calculated as compared with the

control activity (100%). The T300 group was positive control and 300 nM of tacrine, specific AChE inhibitor. The ethanol extract of *Cinnamomum loureirii* was suspended in water and partitioned successively with *n*-hexane (H1, H2, H3), chloroform (C1, C2, C3), and ethyl acetate (EA1, EA2, EA3), respectively. Solvent partitioning was individually performed 3 times. Values represent the mean \pm SD (n = 3).

다. The first silica-gel column chromatography에 의한 계피 추출물의 AChE에 대한 저해 활성

Solvent partitioning 한 후의 가장 높은 저해 활성을 보인 chloroform의 두 번째 분획을 이용해 첫 번째 오픈컬럼을 시행하였다. 분획의 구성비율은 CHCl_3 : EtOH(100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 및 0:100)의 11개 분획에 대해 각각의 분획을 3번씩 시행하였다. 총 33개의 소분획으로 나누었으며 각각의 저해 활성을 측정 한 결과, 소분획 중에서 CHCl_3 : EtOH의 90:10의 두 번째 분획이 AChE의 활성을 유의성 있게 저해시킴을 확인하였다 (Fig. 2).

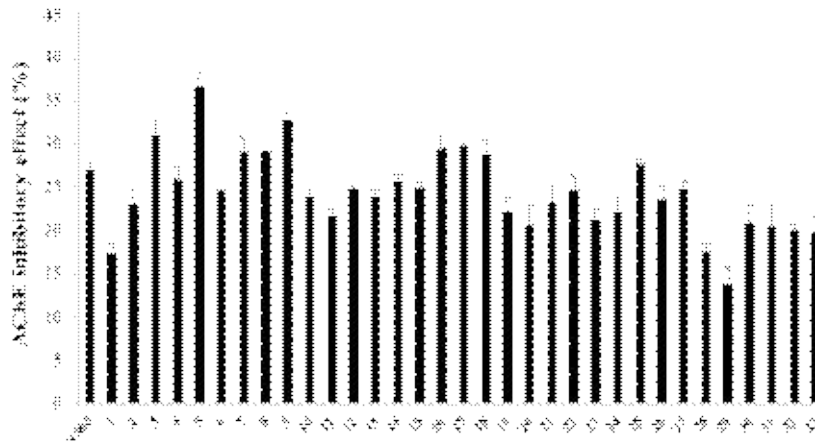


Fig. 2. Effects of various subfractions from *Cinnamomum loureirii* extract on AChE activity. The value (%) of enzyme activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). The T300 group was positive control and 300 nM of tacrine, specific AChE inhibitor. The sample groups were fractionated with the eluents that the mixture of CHCl_3 and EtOH (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100, respectively, 3 times; v/v). Values represent the mean \pm S.D (n = 3).

라. The second silica-gel column chromatography에 의한 계피 추출물의 AChE에 대한 저해 활성

첫 번째 silica-gel column chromatography를 시행한 후의 소분획 (CHCl_3 : EtOH = 90:10 ②) 을 두 번째 silica-gel column chromatography를 시행하였다. 분획의 구성비율은 CHCl_3 :

EtOH(100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 84:16, 82:18, 80:2)의 11개 분획에 대해 각각의 분획을 1번씩 시행하였다. 그 결과 총 11개의 소분획 중에서 CHCl₃ : EtOH의 94:6의 분획에서 가장 좋은 저해 활성을 보였다(Fig. 3).

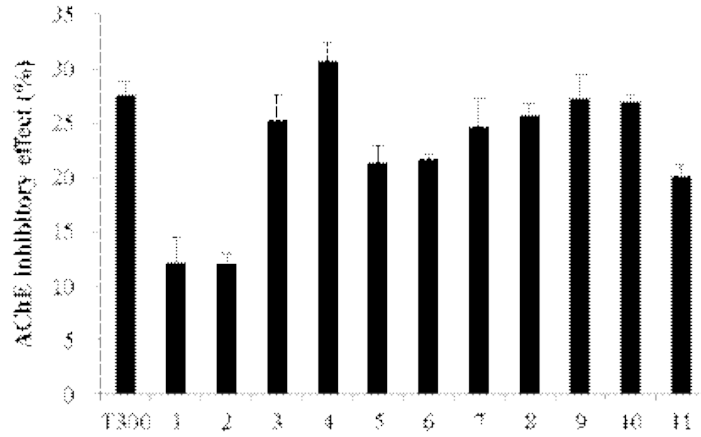


Fig. 3. Effects of various subfractions from *Cinnamomum loureirii* extract on AChE activity. The value (%) of enzyme activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). The T300 group was positive control and 300 nM of tacrine, specific AChE inhibitor. The sample groups were fractionated with the eluents that the mixture of CHCl₃ and EtOH (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 84:16, 82:18, 80:2, v/v). Values represent the mean \pm S.D (n = 3).

마. The third silica-gel column chromatography에 의한 계피 추출물의 AChE에 대한 저해 활성

두 번째 silica-gel column chromatography를 시행한 후의 소분획 (CHCl₃ : EtOH = 94:6)을 세 번째 silica-gel column chromatography를 시행하였다. 분획의 구성비율은 CHCl₃ : EtOH(97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8)의 11개 분획에 대해 각각의 분획을 1번씩 시행하였다. 그 결과 총 6개의 소분획 중에서 CHCl₃ : EtOH의 96:4의 분획에서 가장 좋은 저해 활성을 보였으며 이 분획을 이용하여 다음 정제단계인 TLC를 진행하였다(Fig. 4).

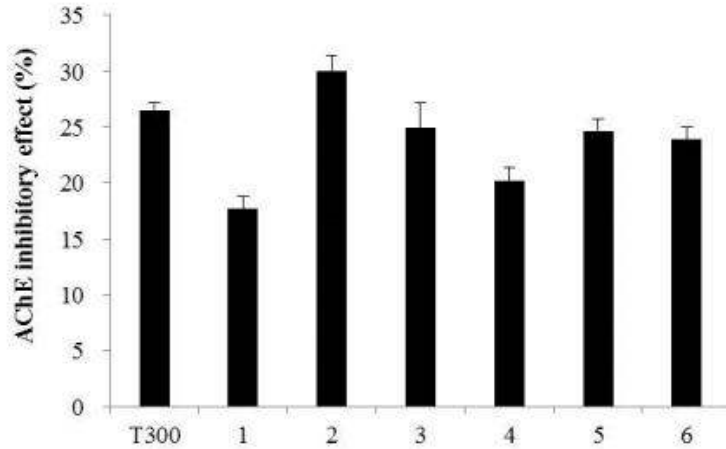


Fig. 4. Effects of various subfractions from *Cinnamomum loureirii* extract on AChE activity. The value (%) of enzyme activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). The T300 group was positive control and 300 nM of tacrine, specific AChE inhibitor. The sample groups were fractionated with the eluents that the mixture of CHCl_3 and EtOH (97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, v/v). Values represent the mean \pm S.D (n = 3).

바. TLC에 의한 계피 에탄올 추출물의 AChE에 대한 저해 활성

Open column chromatography 후, 가장 좋은 효과를 보인 CHCl_3 : EtOH의 96:4의 분획을 이용하여 TLC를 실시하였다. 분리된 band는 가시광선과 자외선(365 nm, 254 nm)을 이용하여 확인하였고, 각 band별로 모아 chloroform과 ethanol에 추출시켜 AChE 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 9번째 band (Rf value = 0.64)에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 5).

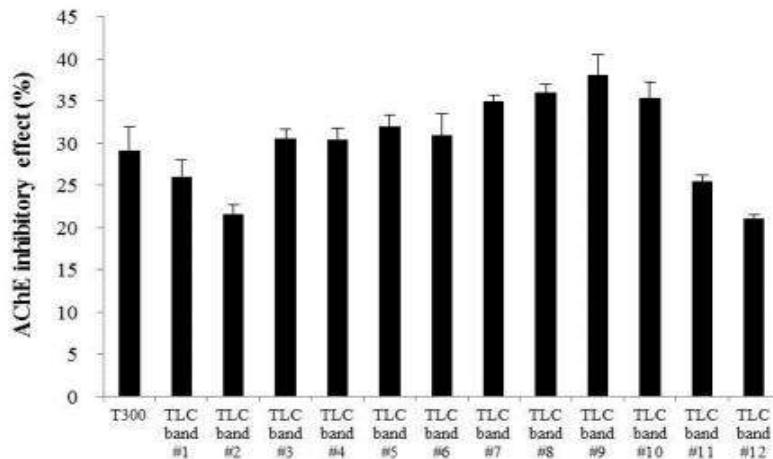


Fig. 5. AChE inhibitory effect of *Cinnamomum loureirii* extract separated by TLC. The value (%) of enzyme activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). The T300 group was positive control and 300 nM of tacrine, specific AChE inhibitor. The sample groups were fractionated with the eluents that the

mixture of CHCl₃ and EtOH (97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, v/v). Values represent the mean ± S.D (n = 3).

사. HPLC에 의한 계피 추출물의 저해 활성물질 분리

분리된 활성물질의 순도를 높이기 위해 Rf 값이 0.64인 band를 추출하여 μ-Bondapak™ C₁₈ revers phase(3.9 × 300 mm) column을 이용한 HPLC를 실시하였다. 100% 특급 ethanol과 3차 증류수를 이용하여 0-100%의 ethanol과 물의 직선 농도 구배로 변화를 주어 90분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml씩 흘려주었으며 20 μl씩 시료 주입을 하였다. PDA detector로 확인한 결과, 290 nm 파장에서 31 분경에 유의적인 peak이 확인되었다(Fig. 6).

Table 1. Condition of the analytic HPLC for purification of active component isolated from *Cinnamomum loureirii*.

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (at 200-800 nm)
Column	C ₁₈ μbondapak™ (reverse phase column, size : 3.9 × 300 mm)
Mobile phase	0-100% ethanol (gradient elution)
Flow rate	0.5 ml/min
Run time	90 min
Injection volume	20 μl

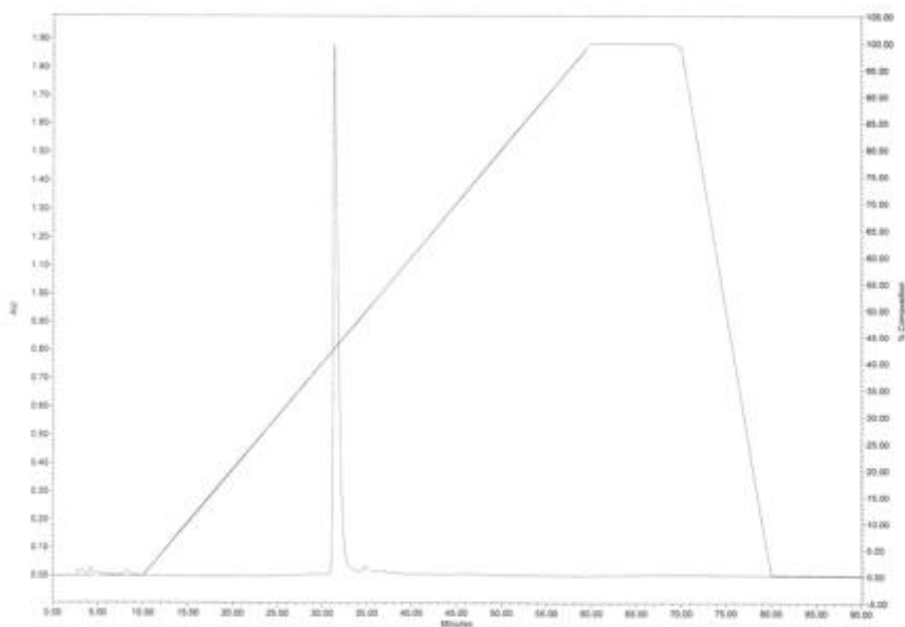


Fig. 6. Isolation of AChE inhibitor from *Cinnamomum loureirii* extract using HPLC
 Column: μ -Bondapak™ C₁₈ column (3.9 × 300 mm), Flow rate: 1.0 ml/min, Injection
 volume: 20 μ l, Mobile phase: 90 min of 0-100% ethanol in water, Detector: PDA

2. 선정된 시료로부터 정제된 활성물질 구조분석

계피에서 분리한 뇌 신경세포의 AChE 저해성 활성 물질의 분자량을 GC/MS, NMR을 통해 분석
 한 결과, 206.3 m/z 정도의 페놀류(2,4-*di-tert*-butylphenol)로 확인되었다(Figs. 7, 8).

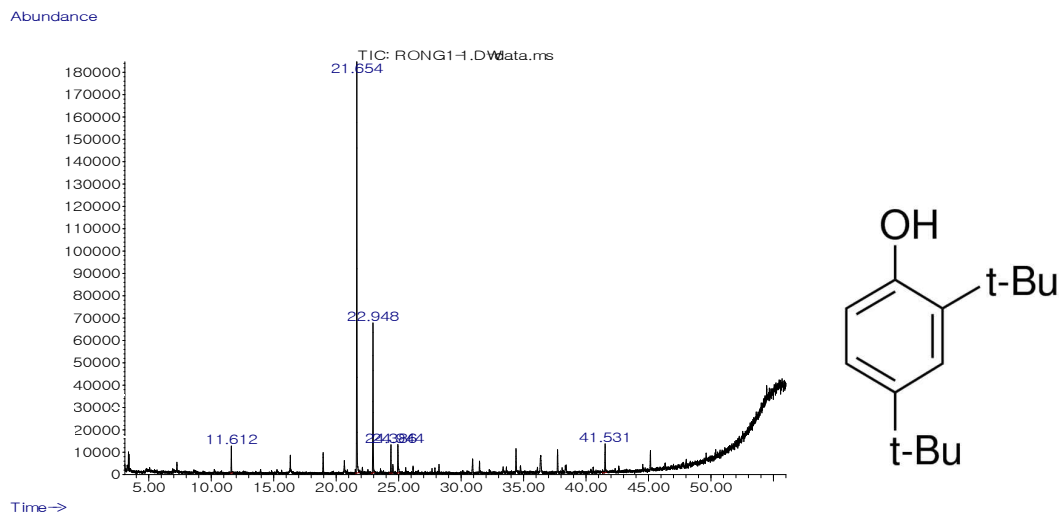
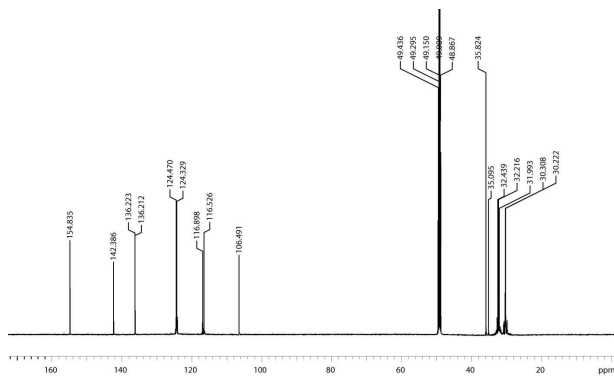


Fig. 7. EI/MS spectrum of active compound from *Cinnamomum loureirii* extract

The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer. Sample was dissolved
 in methanol. The remarkable peak showed at 21.65 min. Molecular weight of putative
 active compound was to be 2,4-*di-tert*-butylphenol.

(A)



(B)

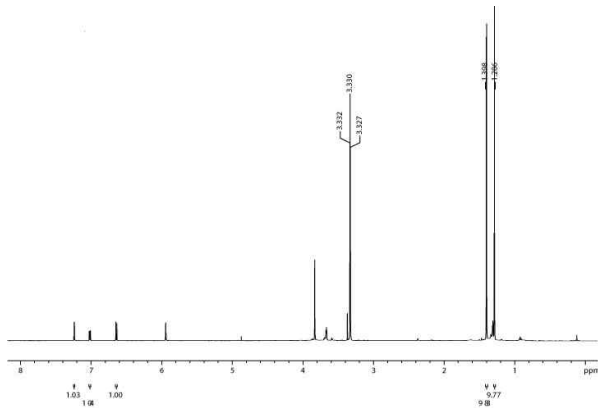


Fig. 8. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR spectrum of active compound from *Cinnamomum loureirii* extract
The component purified from *C. loureirii* extract was dissolved in MeOD and recorded on high resolution NMR spectrometer operating at 600 MHz and 25°C.

3. *In vivo* test를 통한 계피 추출물의 효과 확인 및 독성검사

가. Y-maze test에서의 계피 추출물의 기억력 증진 효과

생체 내 치매 모델인 mouse에서 계피추출물의 AChE 활성 저해효과를 확인하기 위해 자발적 대안 행동 및 Y-maze test를 시행한 결과, 일반 식이를 하며 TMT를 투여한 실험군은 대조군에 비해 20% 정도 감소했지만, 샘플이 공급된 group에서는 이러한 감소를 저해시켰다. 특히 800, 1200 mg/kg 농도의 계피 추출물 그룹에서는 기억 상실을 유도한 mouse에서의 회복 효과를 보였다(Fig. 9). Arms에 들어간 횟수는 그룹간의 유의적인 차이를 보이지 않았으므로 TMT와 계피추출물이 mouse의 운동능력에는 영향을 주지 않았음을 확인하였다(Fig. 10).

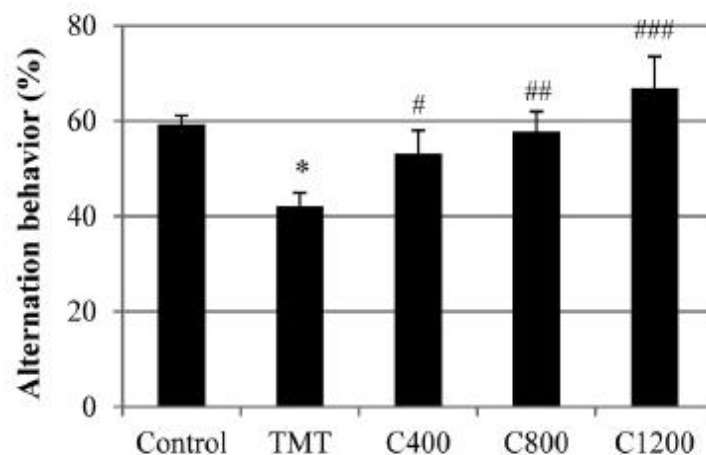


Fig. 9. Effect of *Cinnamomum loureirii* extract on spontaneous alternation behavior in the TMT-pretreated mice.

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (CC400, CC800, CC1200) were injected with TMT after supplied

with ethanol extract of *C. loureirii* (400, 800, 1,200 mg/kg body weight per day). The spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. (* $P < 0.05$ as compared with that of control group, # $P < 0.05$ as compared with that of TMT group).

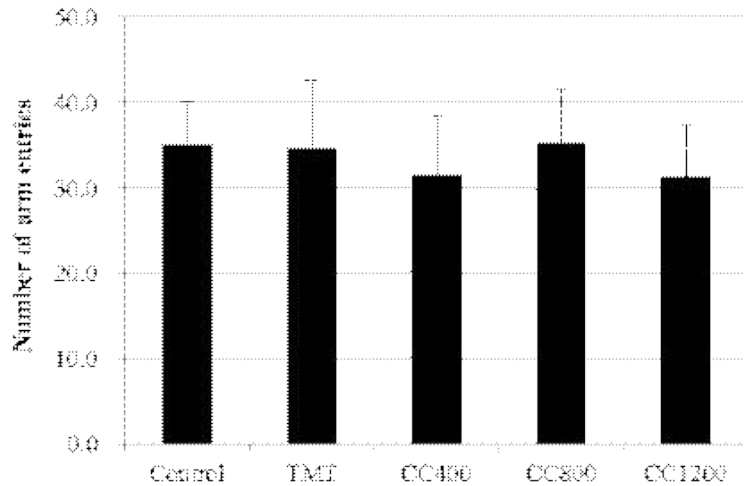


Fig. 10. The number of arm entries in the Y-maze test

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (CC400, CC800, CC1200) were injected with TMT after supplied with ethanol extract of *C. loureirii* (400, 800, 1,200 mg/kg body weight per day). Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) shows no significant differences ($P < 0.05$).

나. Passive avoidance test에서의 계피 추출물의 효과

Passive avoidance test에서 step-through latency(sec)는 일반 식이에 RMR 투여한 그룹은 latency time이 감소하였다. 이에 비해 3주간 계피추출물을 섭취한 그룹에서 손상된 인지능력이 농도에 따라 회복되었음을 확인하였다. 특히 800, 1200 mg/kg 농도의 계피추출물을 섭취한 그룹은 대조군보다 더 좋은 학습효과가 나타났다. 이는 계피추출물이 TMT의 기억학습능력 저해 효과(인지능력과 학습능력의 상실유도)를 보호하여 control group이 보여주는 인지능력을 나타내줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호시켜주는 것을 알 수 있다(Fig. 11).

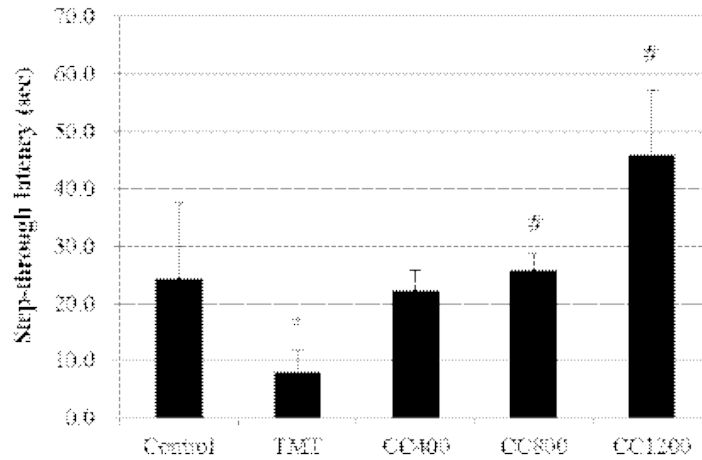


Fig. 11. Effect of *Cinnamomum loureirii* extract on step-through latency

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (CC400, CC800, CC1200) were injected with TMT after supplied with ethanol extract of *CC* (400, 800, 1,200 mg/kg body weight per day). The step-through latency was measured during 5 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. (* $P < 0.05$ as compared with that of control group, # $P < 0.05$ as compared with that of TMT group).

다. 계피 추출물의 독성 확인

계피 추출물에 대해 농도별 (400, 800, 1200 mg/kg)로 급성 독성 실험을 실시한 결과, 실험 전·후의 비정상적인 체중 변화는 없었으며 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였다(Table 2). Serum의 GOT, GPT 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않으므로 선정된 계피 추출물의 독성은 없는 것으로 판명되었다(Figs. 12, 13).

Table 2. Body weight and survival rate of experimental mice orally administrated *Cinnamomum loureirii* on acute toxicity

Group	No. of mice	Body weight (g)	Brain weight (g)	No. of survival mice	Survival rate (%)
Control	8	34.6 \pm 0.75	0.49 \pm 0.01	8	100
TMT	8	34.8 \pm 1.26	0.48 \pm 0.01	8	100
400 mg/kg	8	33.4 \pm 0.89	0.47 \pm 0.02	8	100
800 mg/kg	8	35.7 \pm 1.56	0.45 \pm 0.02	8	100
1200 mg/kg	8	32.9 \pm 0.88	0.47 \pm 0.02	8	100

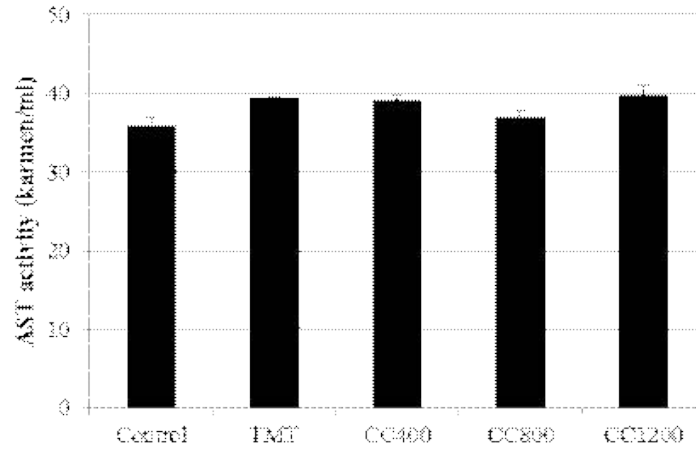


Fig. 12. Aspartate aminotransferase activity in the serum of ICR mice
 Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no significant difference ($p < 0.05$). Values represent the mean ($n=4$) \pm S.D.

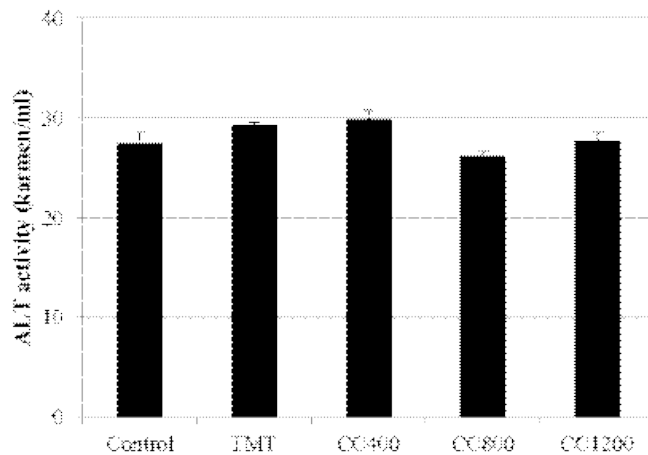


Fig. 13. Alanine aminotransferase activity in the serum of ICR mice
 Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no significant difference ($p < 0.05$). Values represent the mean ($n=4$) \pm S.D.

라. 계피와 금앵자 추출물 혼합의 상승효과 검증

(1). *In vitro* 상에서의 최적비율 검토

계피와 금앵자 추출물 혼합의 AChE 저해활성 상승효과를 확인하기 위해, 계피와 금앵자를 100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100의 비율로 혼합하여 *in vitro* test를 시행하였다. 최적 비율을 검토한 결과 계피:금앵자 = 70:30 비율의 혼합물에서 가장 높은 저해활성 상승효과를 나타내었다(Fig. 14).

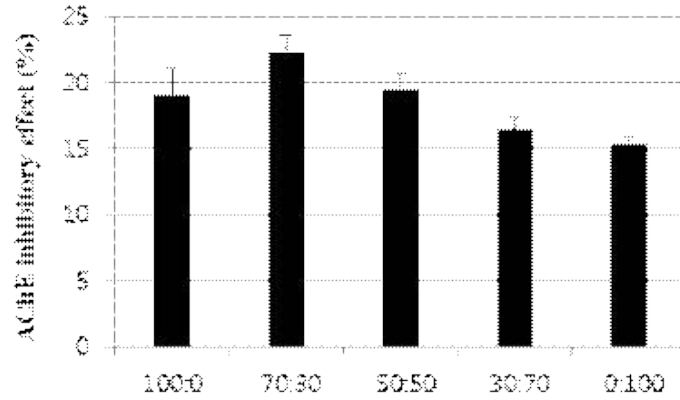


Fig. 14. Synergistic effect of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts against AChE

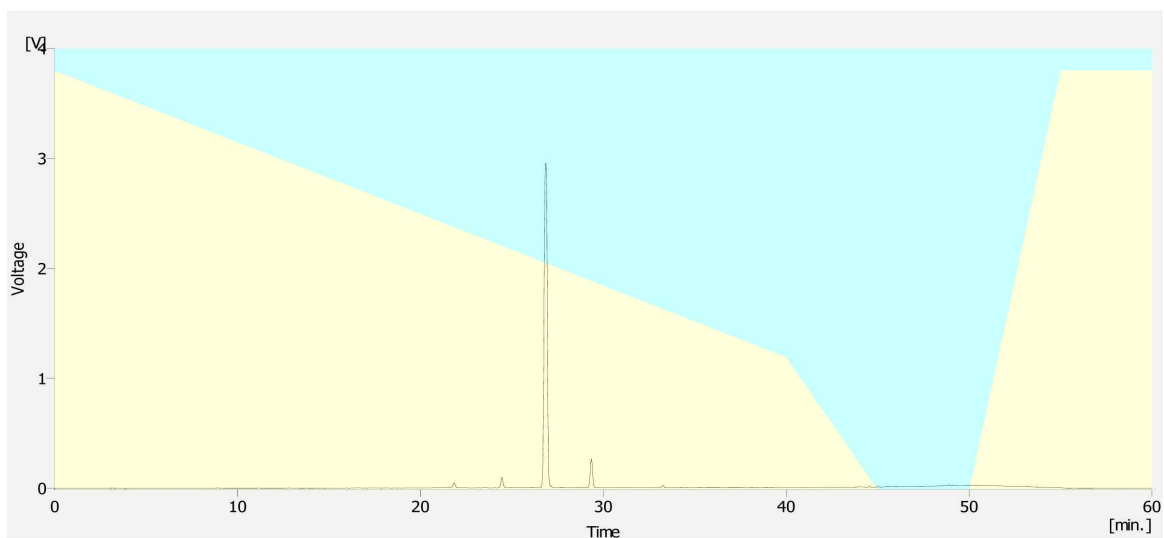
The value (%) of AChE activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). Sample groups were the ethanol extracts of plants at concentration of 1 mg/ml. Each value represents the mean \pm SD for four independent experiments.

마. 지표성분 검색

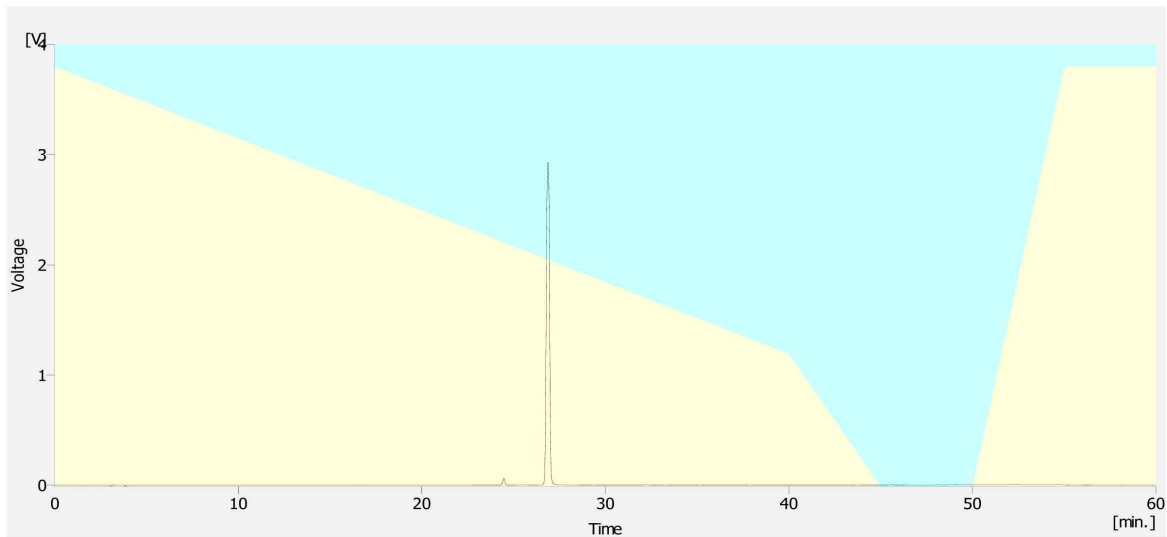
(1). 계피 지표성분 검색

Instrument	YL9100 HPLC system
Detector	YL9160 PDA Detector
Column	Aegispak C18-L (reverse phase column, 4.6 × 250 mm)
Mobile phase	1% aqueous acetic acid : 1% acetic acid in acetonitrile (gradient elution)
Flow rate	0.5 ml/min

<계피추출물 HPLC data>



<계피 지표성분 cinnamaldehyde HPLC data>



(2). 금앵자 지표성분 검색

- 금앵자 추출물을 식이 섭취한 mice 행동실험

뇌신경세포 독성을 갖는 amyloid β 를 주사한 후 기억학습능력을 확인하였다. $A\beta$ 를 injection하지 않은 control group은 $A\beta$ 를 투여한 negative group에 비해서 높은 인지능을 나타내었고, 금앵자 추출물을 식이한 group은 control group과 비교할 때 거의 비슷한 수준의 인지능을 보였다(Fig. 15). Passive avoidance test 결과, $A\beta$ 를 주사하지 않은 control group은 $A\beta$ 를 투여한 negative group에 비해서 안정된 기억학습능력을 나타내었고 금앵자를 투여한 group은 활성물질의 농도가 높아질수록 기억학습능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이는 금앵자에서 정제된 활성물질이 $A\beta$ 의 기억학습능력 저해 효과 (학습능력의 상실유도)를 blocking하여 손상된 뇌기능을 회복하는 것을 확인시켜주는 결과이다(Fig. 16).

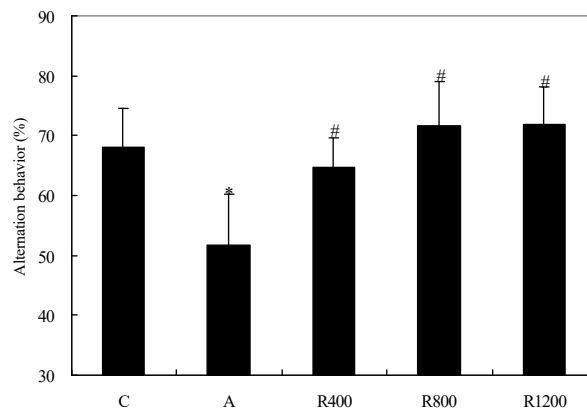


Fig. 15. Effects of *Rosa laevigata* extract on spontaneous alternation behavior.

Protective effect of *Rosa laevigata* extract against the $A\beta_{1-42}$ -induced memory impairment in Y-maze test. Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.01 vs. Control group, #P < 0.01 vs. $A\beta$ group).

C (Control): Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

R 400: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (400 mg/kg)

R 800: Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (800 mg/kg)
 R 1200: Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (1200 mg/kg)

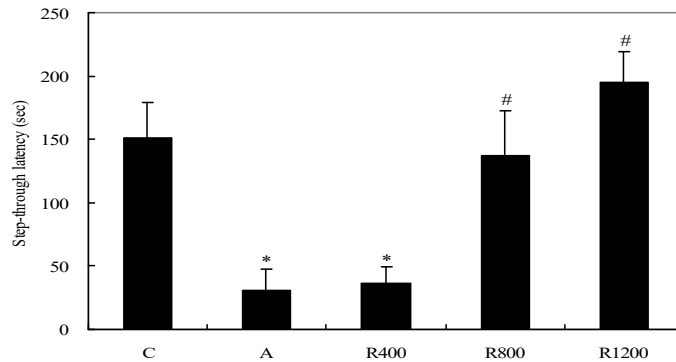


Fig. 16. Effect of *Rosa laevigata* extract on step-through latency in the passive avoidance test. Protective effect of *Rosa laevigata* extract against the A β ₁₋₄₂-induced memory impairment in passive avoidance test. The testing trial was given 1 day after the training trial. Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.01 vs. Control group, #P < 0.01 vs. A β group).

C (Control): Treated A β ₄₂₋₁ group and normal diet
 A (A β group): Treated with A β ₁₋₄₂ and normal diet
 R 400: Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (400 mg/kg)
 R 800: Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (800 mg/kg)
 R 1200: Treated with A β ₁₋₄₂ and diet group (1200 mg/kg)

- 금앵자로부터 활성물질의 정제

건조된 금앵자를 70% 에탄올을 이용하여 추출, 농축시켜 제조한 금앵자 추출물 620 g에 적당량의 증류수에 완전히 분산시킨 후 사용된 물의 양의 3배에 해당하는 용매 hexane (C₆H₁₄), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtAOc)의 순서대로 3회씩 실시하였고 나누어진 분획을 각각 일정량 취하여 농축시킨 후, DCF 형성과 세포독성 저해활성을 확인하였다. Figs. 17, 18에서 보는 바와 같이 solvent partition 후 chloroform 두 번째 fraction에서 가장 높은 저해활성을 보였다. Chloroform fraction을 감압 농축하여 open silica gel column chromatography를 시행하여 33개의 소분획 (CHCl₃ : EtOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획하였다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량 취하여 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 시행하고, 그 중 가장 높은 세포 보호효과를 보이는 분획을 선정하였다(Fig. 19). Open column chromatography를 통해 얻은 시료의 활성을 확인한 후, 선정된 획분 (fraction 7)을 preparative silica-gel plate (glass, 200 × 200 mm)를 이용하여 TLC를 실시하고 분리된 밴드를 대상으로 DCF-DA, MTT reduction assay를 수행하였다(Figs. 20, 21). 그 결과 좋은 활성을 갖는 R_f=0.54의 band를 HPLC로 분리하여 활성물질인 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester (dinonyl phthalate)를 획득하였다(Figs. 22, 23).

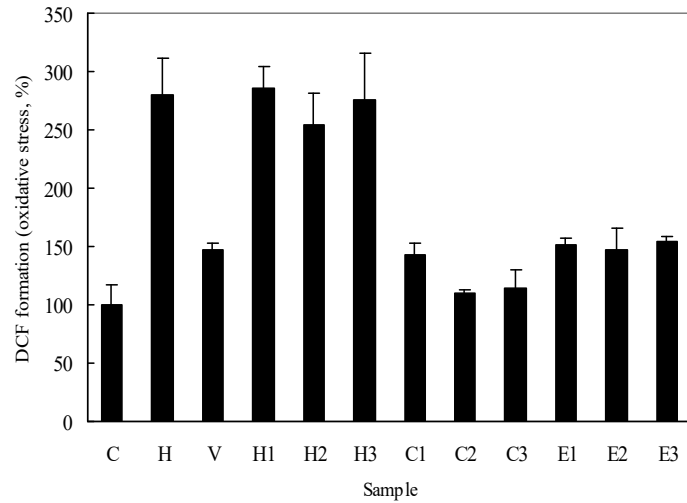


Fig. 17. H₂O₂로부터 생성된 oxidative stress에 대한 solvent partition된 금앵자 추출물의 보호효과
 C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리
 V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리
 H1-E3: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, solvent partition 용매별 분획을 각각 1 mg/ml로 전처리
 H1-3: hexane 분획, C1-3: chloroform 분획, E1-3: ethyl acetate 분획

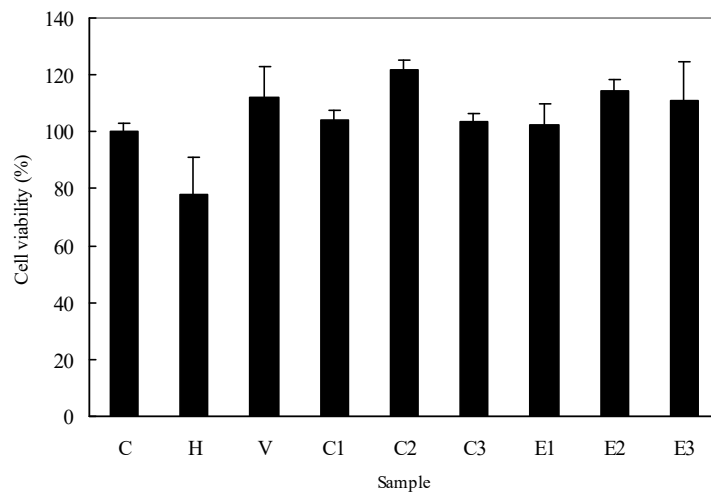


Fig. 18. H₂O₂에 유도된 세포독성에 대한 solvent partition된 금앵자 추출물의 보호효과
 C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리
 V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리
 H1-E3: H₂O₂를 처리하기 48시간 전, solvent partition 용매별 분획을 각각 1 mg/ml로 전처리
 H1-3: hexane 분획, C1-3: chloroform 분획, E1-3: ethyl acetate 분획

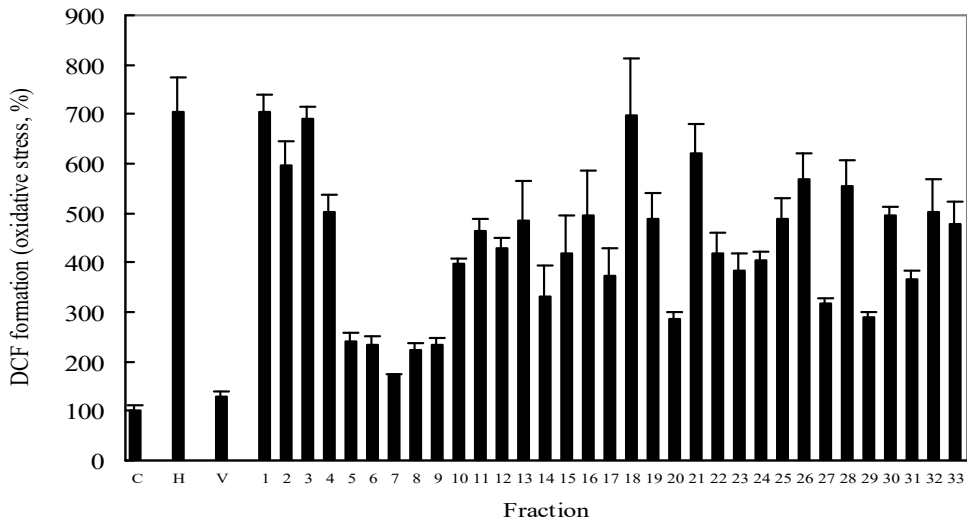


Fig. 19. Silica-gel open column chromatography fraction의 oxidative stress에 대한 억제효과.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

1~33: Sample groups. H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리

각각의 fractions은 CHCl₃과 EtOH을 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100의 비율을 각각 3번씩 반복 (33개 fractions)

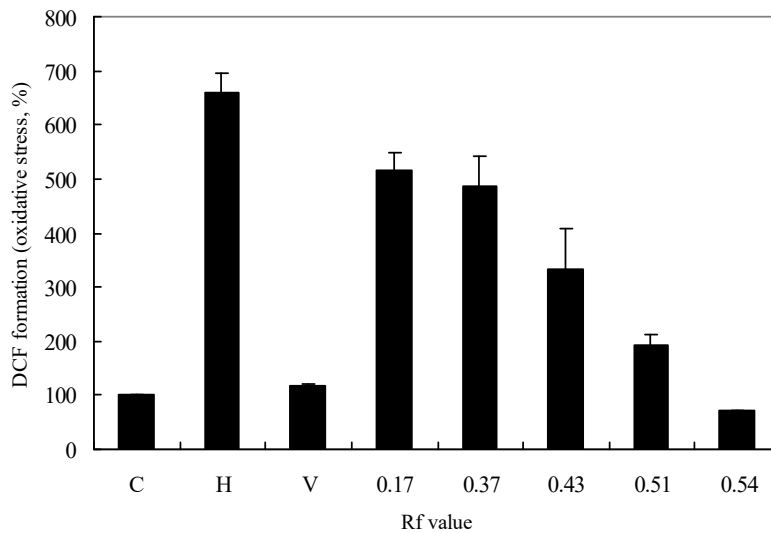


Fig. 20. Protective effect of *Rosa laevigata* extract separated using TLC against H₂O₂-induced oxidative stress.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

Samples: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 20 μl를 처리

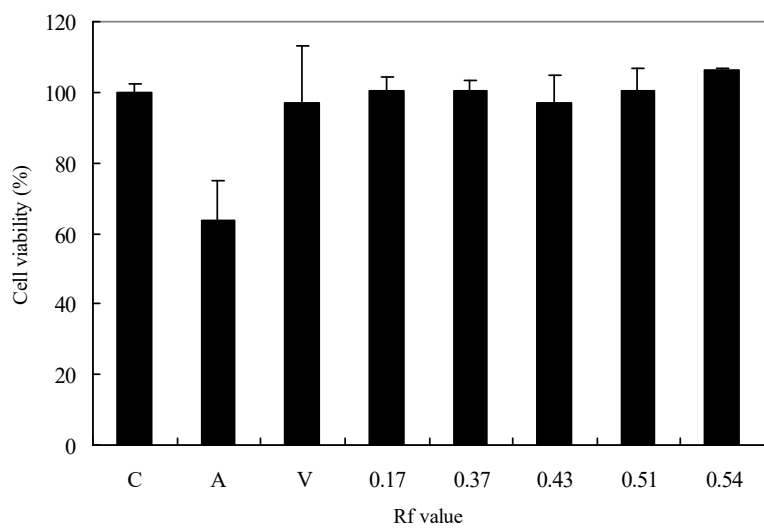


Fig. 21. Protective effect of *Rosa laevigata* extract separated using TLC against H₂O₂-induced cytotoxicity.

C: control group, H: H₂O₂만 처리하고 시료 대신 증류수를 처리

V: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 vitamin C (100 μM)를 전처리

Samples: H₂O₂를 처리하기 48시간 전에 1 mg/ml의 농도로 30 μl를 처리

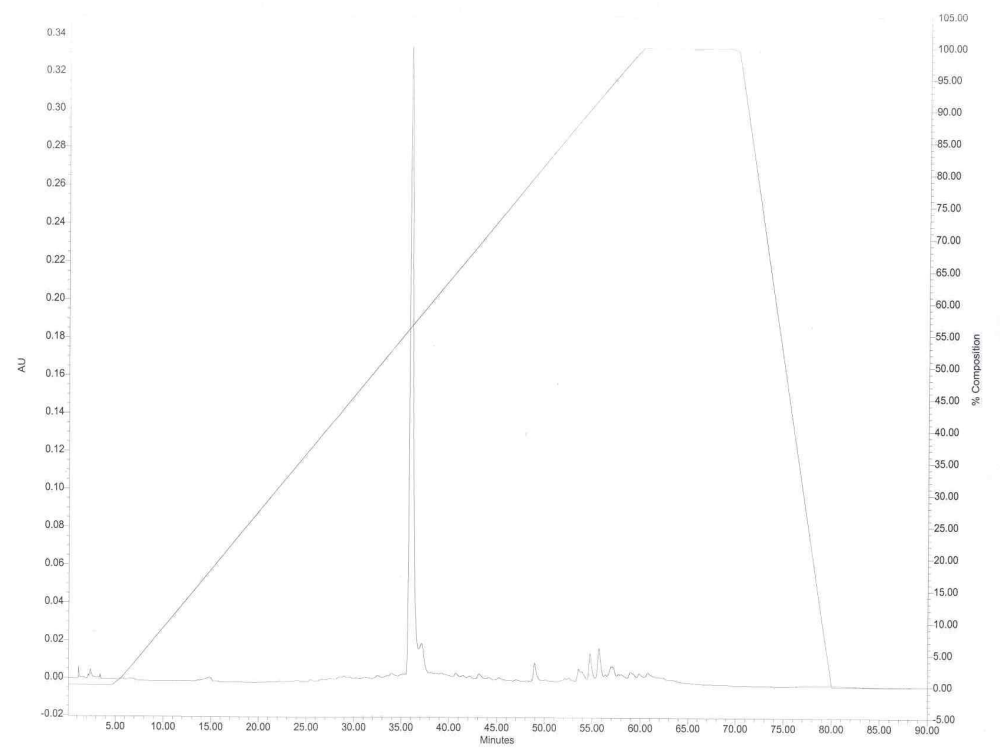


Fig. 22. Isolation of active compound from *Rosa laevigata* extract using high performance liquid chromatography.

A C₁₈ μ-Bondapak column (reversephase column; 3.9 * 300 mm) was used at a flow rate of 0.3ml=minute and a wavelength of 200 - 800 nm. The monitoring wavelength was 317.6 nm.

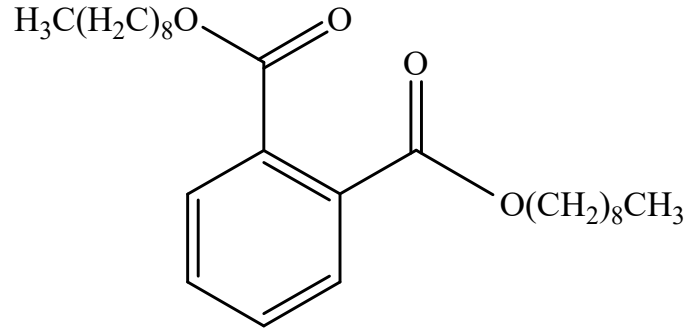


Fig. 23. A β 에 의한 신경독성에 보호효과를 가지는 활성물질, dinonyl phthalate

- 금앵자 추출물로부터 분리된 dinonyl phthalate를 식이 섭취한 mice 행동실험

뇌신경세포 독성을 갖는 amyloid β 를 주사한 후 기억학습능력을 확인하였다. A β 를 injection하지 않은 control group은 A β 를 투여한 negative group에 비해서 약 20% 높은 인지능을 나타내었고, 활성물질을 식이한 group (B20)은 control group과 비교할 때 거의 비슷한 수준의 인지능을 보였다. 이는 dinonyl phthalate가 A β 의 신경독성으로부터 보호효과를 나타내어 control 수준으로 인지능을 회복시켰음을 의미한다(Fig. 24).

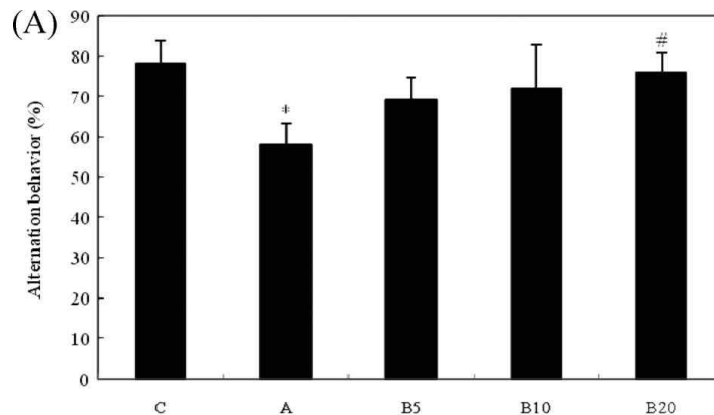


Fig. 24. Effects of dinonyl phthalate on spontaneous alternation behavior.

Protective effect of dinonyl phthalate against the A β_{1-42} -induced memory impairment in Y-maze test. Spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Data represent the mean (n=8) \pm S.D. (*P < 0.01 vs. Control group, [#]P < 0.01 vs. A β group).

C: Treated A β_{42-1} group and normal diet

A (A β group): Treated with A β_{1-42} and normal diet

B5: Treated with A β_{1-42} and diet group (5 mg/kg)

B10: Treated with A β_{1-42} and diet group (10 mg/kg)

B20: Treated with A β_{1-42} and diet group (20 mg/kg)

Passive avoidance test 결과, A β 를 주사하지 않은 control group은 A β 를 투여한 negative group에 비해서 안정된 기억학습능력을 나타내었고 활성물질을 투여한 group (B5, B10, B20)은 활성물질의 농도가 높아질수록 기억학습능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이는 금앵자에서 정제된 활성물질이 A β 의 기억학습능력 저해 효과 (학습능력의 상실유도)를 blocking하여 손상된 뇌기능을 회복하는 것을 확인시켜주는 결과이다(Fig. 25).

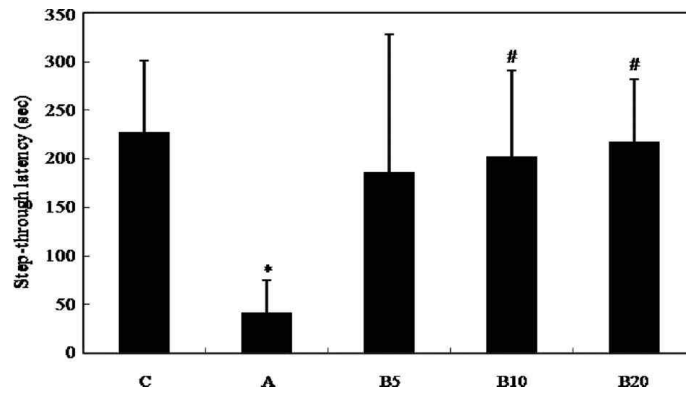


Fig. 25. Effect of dinonyl phthalate on step-through latency in the passive avoidance test. Protective effect of dinonyl phthalate against the $A\beta_{1-42}$ -induced memory impairment in passive avoidance test. The testing trial was given 1 day after the training trial. Data represent the mean ($n=8$) \pm S.D. (* $P < 0.01$ vs. Control group, # $P < 0.01$ vs. $A\beta$ group).

C: Treated $A\beta_{42-1}$ group and normal diet

A ($A\beta$ group): Treated with $A\beta_{1-42}$ and normal diet

B5: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (5 mg/kg)

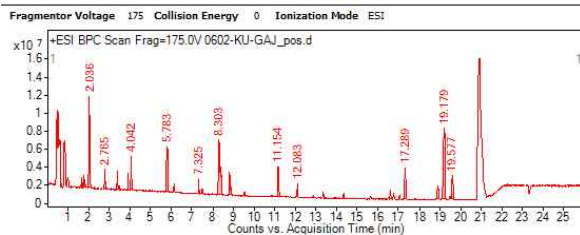
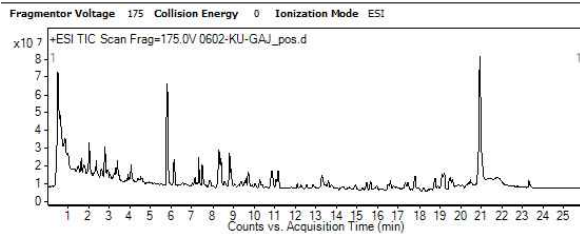
B10: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (10 mg/kg)

B20: Treated with $A\beta_{1-42}$ and diet group (20 mg/kg)

<금앵자추출물 LC/MS data>

Data Filename 0602-KU-GAJ_pos.d **Sample Name** 0602-KU-GAJ_pos
Sample Type Sample **Position** P1-C6
Instrument Name Instrument 1 **User Name**
Acq Method 0602-Pos.m **Acquired Time** 6/2/2015 6:04:58 PM
IRM Calibration Status Success **DA Method** FBI.M.m
Comment
Sample Group Info.
Acquisition SW 6200 series TOF/6500
Version series Q-TOF B.05.01
 (B5125.3)

User Chromatograms



Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	1.616	1.638	1.669	1008761.7	1354335.44	2.97
2	1.722	1.754	1.851	1331963.38	4404099.05	9.64
3	1.953	2.036	2.109	10241726.95	38772829.85	84.89
4	2.732	2.765	2.813	2163820.32	4945288.62	10.83
5	3.346	3.379	3.43	2044719.89	4184608.96	9.16
6	3.861	3.893	3.924	1846826.12	2638186.34	5.78
7	4	4.042	4.091	3787871.2	9257429.18	20.27
8	5.733	5.783	5.865	4995092.15	20805876.7	45.55
9	7.265	7.325	7.356	1673203.38	3539185.28	7.75
10	8.237	8.303	8.452	6115703.75	37347713.33	81.77
11	8.755	8.8	8.933	2499684.58	9835197.96	21.53
12	11.091	11.154	11.22	3375145.22	12319910.18	26.97
13	12.033	12.083	12.145	1503586.66	3654340.85	8
14	16.527	16.576	16.625	1025624.37	3091515.68	6.77
15	17.206	17.289	17.366	3477061.74	14532610.18	31.82
16	18.798	18.864	18.929	1486801.55	5451333.61	11.94
17	19.063	19.179	19.276	7909616.06	45673341.97	100
18	19.494	19.577	19.643	2621326.58	9834927.1	21.53

<2차년도>

1. 계피 정제물질 2,4-*di-tert*-butylphenol의 AChE에 대한 저해 활성

계피추출물로부터 정제된 AChE 저해활성물질인 2,4-*di-tert*-butylphenol의 활성을 확인하고자 AChE를 이용한 enzymatic *in vitro* assay를 시행하였다. 그 결과, 정제물질의 농도가 높아짐에 따라 저해활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Table 3).

Table 3. Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity under different concentrations of 2,4-*di-tert*-butylphenol.

Concentration of BP	AChE inhibitory activity (%)
10 mM	17.12 ± 1.33
20 mM	21.19 ± 1.39
40 mM	30.45 ± 3.41

The value (%) of AChE activity for each fraction was calculated relative to control activity (100%). Each value represents the mean ± standard deviation (SD) (n = 4).

2. 계피 정제물질을 이용한 *in vivo* tests

기억력 실험을 위해 ICR-male mouse(4주령)를 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12 hr-photoperiod chamber에서 사육하며 계피 정제물질 2,4-*di-tert*-butylphenol을 사료에 농도별로(5, 10, 20, 40 mg/kg body weight per day) 섞어 약 3 주간 ad lib의 상태로 공급하였다. 식이 시작 후 21일째에 치매 유발성 물질인 trimethyltin(TMT)을 복강주사하고, Y-maze test와 passive avoidance test를 수행하였다.

가. Y-maze test

Control group은 독성이 있는 TMT를 주사한 group에 비해서 약 20% 이상의 안정된 brain 활성을 나타내었다. 샘플이 공급된 group은 TMT group에서 나타나는 감소를 저해시켰다. 특히 20, 40 mg/kg 농도의 2,4-*di-tert*-butylphenol group에서 TMT의 저해 활성을 극복시키거나 보완/예방 활성을 보였다(Fig. 15). Arms에 들어간 횟수는 그룹간의 유의적인 차이를 보이지 않았으므로 TMT와 계피정제물질이 mouse의 운동능력에는 영향을 주지 않았음을 확인하였다(Fig. 27).

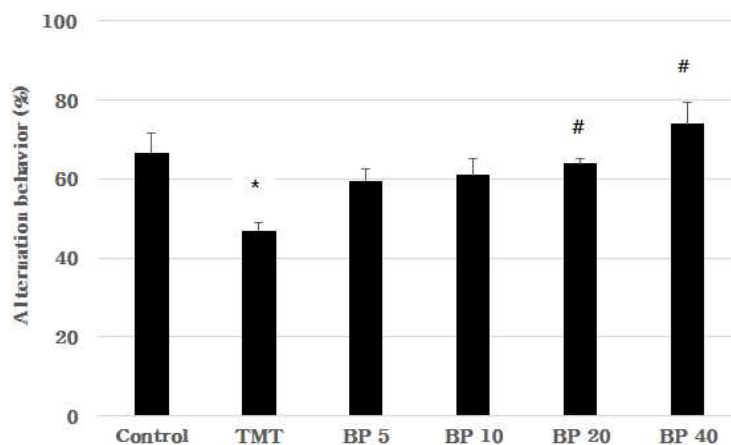


Fig. 26. Effects of 2,4-*di-tert*-butylphenol on spontaneous alternation behavior.

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (BP 5, BP 10, BP 20, BP 40) were injected with TMT after supplied with ethanol extract of 2,4-*di-tert*-butylphenol (5, 10, 20, 40 mg/kg body weight

per day). The spontaneous alternation behaviors were measured during 8 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. (* $p < 0.05$ as compared with that of control group, # $p < 0.05$ as compared with that of TMT group).

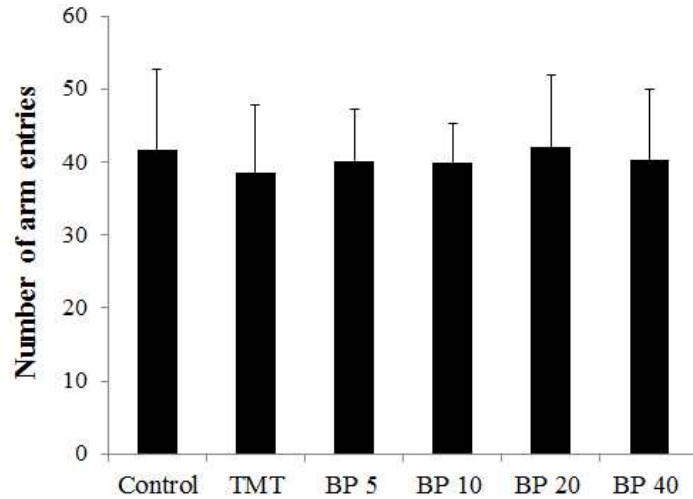


Fig. 27. Number of arm entries in Y-maze test.

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (BP 5, BP 10, BP 20, BP 40) were injected with TMT after supplied with BP (5, 10, 20, 40 mg/kg per day). Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) shows no significant differences ($p < 0.05$).

나. Passive avoidance

Passive avoidance test를 실시한 결과, TMT를 주사한 control group은 TMT group에 비해서 약 30% 정도의 안정된 학습능력을 나타내었다. 2,4-*di-tert*-butylphenol를 섞은 사료를 먹인 group은 control group의 학습능력 활성과 비교할 때 control group을 상회하는 인지능력의 회복을 보여주었다. 2,4-*di-tert*-butylphenol가 TMT의 뇌신경 손상 저해 효과 (인지능력의 상실유도)를 blocking하여 control group이 보여주는 인지 능력을 나타내어줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호시켜줌을 확인하였다(Fig. 28).

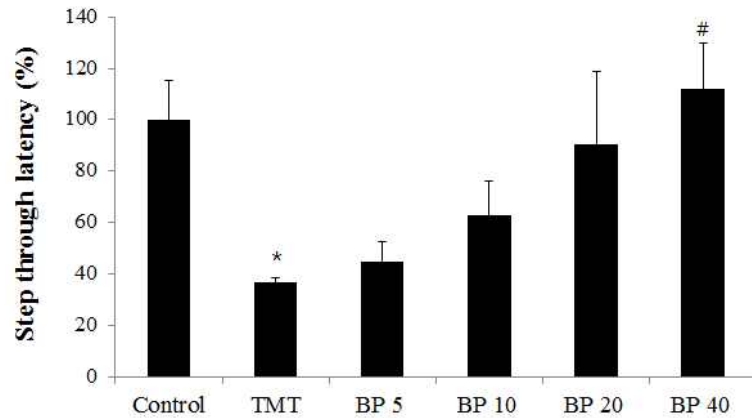


Fig. 28. Effects of 2,4-*di-tert*-butylphenol on step-through latency

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (BP 5, BP 10, BP 20, BP 40) were injected with TMT after supplied with ethanol extract of 2,4-*di-tert*-butylphenol (5, 10, 20, 40 mg/kg body weight per day). The step-through latency was measured during 5 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 8 mice. (* $p < 0.05$ as compared with that of control group, # $p < 0.05$ as compared with that of TMT group).

다. *In vivo* cytotoxicity test

2,4-*di-tert*-butylphenol을 농도별(5, 10, 20, 40 mg/kg body weight per day)로 하여 독성 검사를 실시한 결과, 체중과 뇌 무게의 비정상적인 변화는 없었으며 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였다(Table 4). Serum의 GOT, GPT 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않으므로 선정된 2,4-*di-tert*-butylphenol의 독성은 없는 것으로 판명되었다(Figs. 29, 30).

Table 4. Survival rate of experimental mice

Group	Body weight (g)	Brain weight (g)	No. of mice	No. of survival mice	Survival rate (%)
Control	36.6 ± 1.47	0.47 ± 0.01	8	8	100
TMT	36.1 ± 1.12	0.45 ± 0.01	8	8	100
BP 5	36.2 ± 0.63	0.47 ± 0.02	8	8	100
BP 10	34.2 ± 1.60	0.44 ± 0.02	8	8	100
BP 20	37.8 ± 1.11	0.45 ± 0.03	8	8	100
BP 40	36.0 ± 1.45	0.45 ± 0.02	8	8	100

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. BP groups were injected with TMT after supplied with BP (5, 10, 20, 40 mg/kg body weight per day). Each value represents the mean ± S.D. for 8 mice. The weights do not represent significant differences ($p < 0.05$).

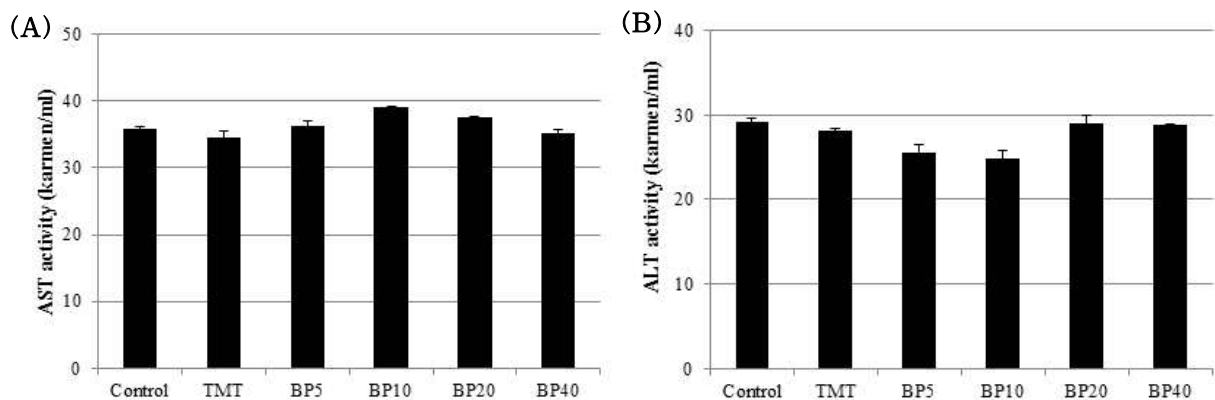


Fig. 29. Aspartate aminotransferase (A) and alanine aminotransferase (B) activity in the serum of ICR mice

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups (BP 5, BP 10, BP 20, BP 40) were injected with TMT after supplied with BP (5, 10, 20, 40 mg/kg per day). Each value represents the mean ± S.D. for 8 mice. Duncan's multiple range test of SAS (statistical analysis system) represents no significant differences ($p < 0.05$).

3. 계피와 금앵자 혼합물의 상승효과 검증

가. *In vitro* 상에서의 최적비율 검토

계피와 금앵자 추출물 혼합의 AChE 저해활성 상승효과를 통해 최적 비율을 확인하기 위해, 70% 주성으로 추출한 계피와 금앵자를 각각 100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100의 비율로 혼합하여 *in*

in vitro test를 실시하였다. 그 결과, 계피:금앵자 = 70:30 비율의 혼합물에서 가장 높은 저해활성 상승효과를 나타내었고, 두 번째로 50:50에서 높은 효과를 보였다(Fig. 30).

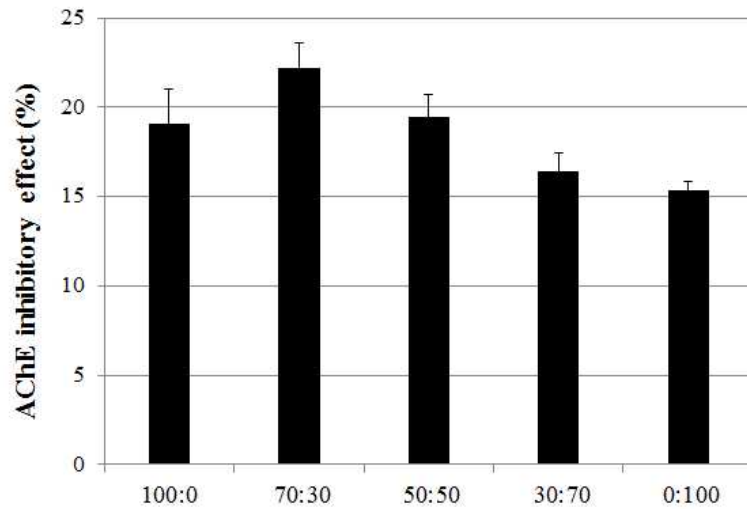


Fig. 30. Synergistic effect of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts against AChE

The value (%) of AChE activity for each fraction was calculated as compared with the control activity (100%). Sample groups were the ethanol extracts of plants at concentration of 1 mg/ml. Each value represents the mean \pm SD for four independent experiments.

나. 행동실험을 통한 임상용량설정 및 상승효과 검증

임상 실험에 사용될 시료의 일일 용량설정을 위해 동물실험을 실시하였다. *In vitro* 상에서 확인된 계피 추출물과 금앵자 추출물의 최적 비율 (계피:금앵자=70:30)을 이용하여 사료에 농도별로(30, 50 mg/kg body weight per day) 섞어 약 7 주간 *ad lib*의 상태로 공급하였다. 그리고 70:30 비율의 상승효과 확인을 위해 *in vitro* 상에서 두 번째로 효과가 좋았던 50:50 비율(50 mg/kg body weight per day)도 공급하였다. 식이 시작 후 49일째에 치매 유발성 물질인 trimethyltin(TMT)을 복강주사하고, Y-maze test와 passive avoidance test를 통해 활성 비교 및 시너지 효과를 확인하였다.

(1) Y-maze test

일반 식이를 하며 치매를 유발시킨 TMT group은 control group에 비해 20% 정도 감소한 것을 확인 할 수 있었고, 반면 sample group은 control group의 brain 활성과 비교할 때, TMT의 저해 활성을 어느 정도 예방활성을 보였다. 특히 계피와 금앵자 비율 70:30의 50 mg/kg group에서 TMT의 영향을 효과적으로 blocking하여 거의 control 수준의 brain 활성으로 회복시켰다(Fig. 31). Y-maze의 arms에 들어간 횟수는 control group과 비슷한 경향을 보였다(데이터생략).

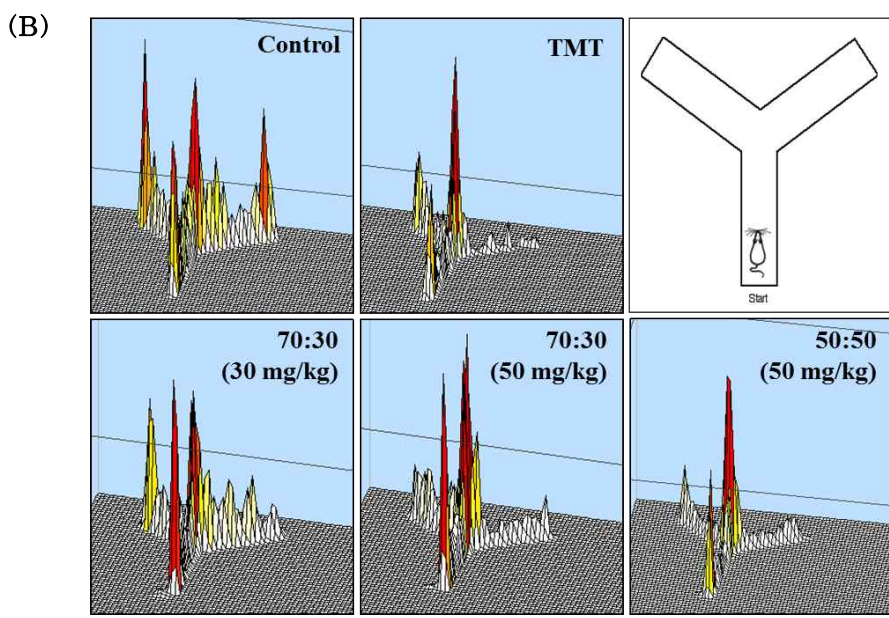
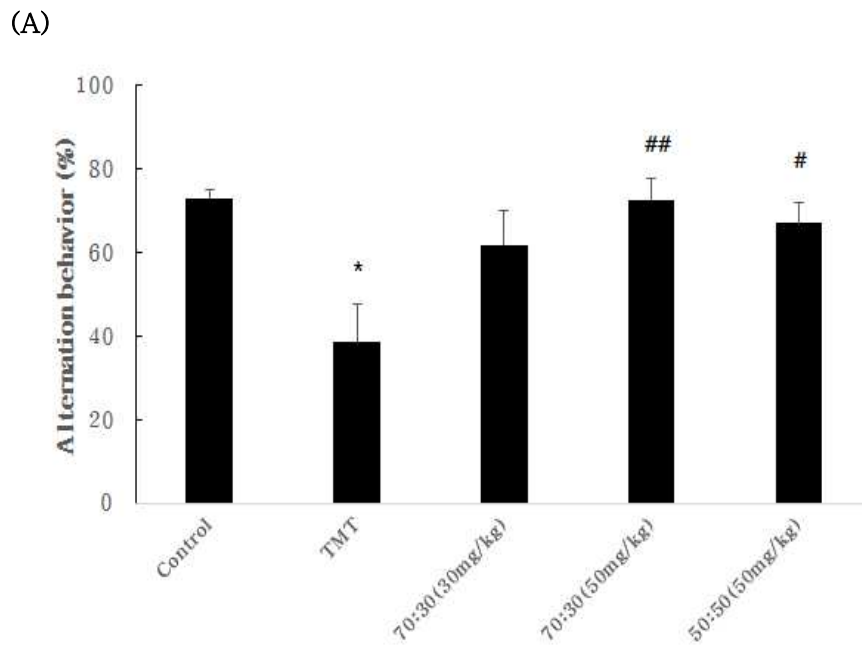


Fig. 31. Synergistic effect of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts on spontaneous alternation behavior.

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups were injected with TMT after supplied with the mixtures of *C.loureirii* (70%) and *R.laevigata* (30%) (30, 50 mg/kg body weight per day) and the mixture of *C.loureirii* (50%) and *R.laevigata* (50%) (50 mg/kg body weight per day). The spontaneous alternation behaviors (A) and moving routes (B) were measured during 8 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 9 mice. (* $p < 0.05$ as compared with that of control group, # $p < 0.05$ as compared with that of TMT group).

(2) Passive avoidance test

일반 식이를 하며 TMT를 투여한 실험군은 기억력이 손상되었는데 sample을 식이한 group은 기억력에 회복 효과를 보였다. 특히 계피와 금앵자의 70:30 비율인 group은 TMT의 저해 활성을 어느 정도 예방활성을 보였다. 따라서 계피와 금앵자 복합물이 상승작용을 통해 TMT로 인한 학습과 기억능력이 손상되는 것을 방지함을 알 수 있었다(Fig. 32). 최종적으로 계피 금앵자 추출물 비율은 70:30으로 결정하였고, 인체적용시험용 제품의 원료 분량을 설정하기 위해 하루에 50 mg/kg body weight 농도로 섭취하기로 결정하였다.

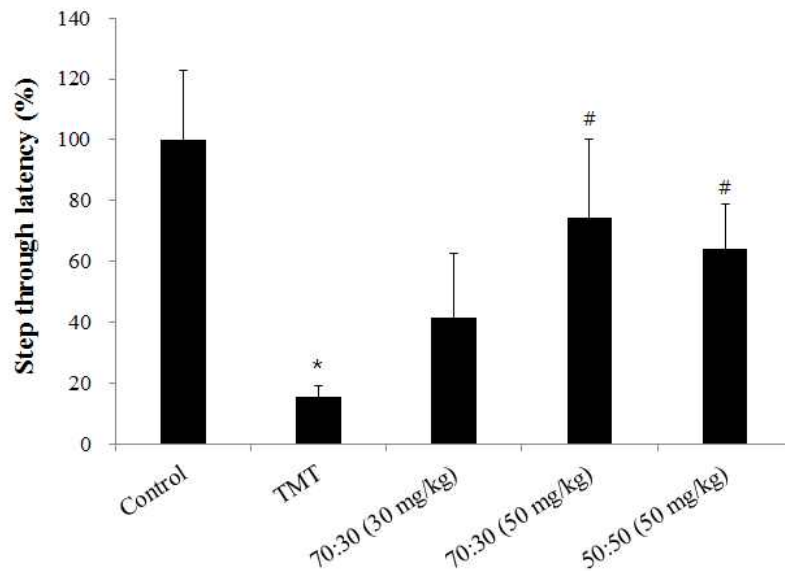


Fig. 32. Synergistic effect of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts on step-through latency

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. And sample groups were injected with TMT after supplied with the mixtures of *C.loureirii* (70%) and *R.laevigata* (30%) (30, 50 mg/kg body weight per day) and the mixture of *C.loureirii* (50%) and *R.laevigata* (50%) (50 mg/kg body weight per day). The step-through latency was measured during 5 min. Each value represents the mean \pm S.D. for 9 mice. (* $p < 0.05$ as compared with that of control group, # $p < 0.05$ as compared with that of TMT group).

다. *In vivo* cytotoxicity test

계피와 금앵자 혼합물을 비율별(70:30, 50:50), 농도별(30, 50 mg/kg body weight per day)로 하여 독성 검사를 실시한 결과, 체중과 뇌 무게의 비정상적인 변화는 없었으며 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice는 100% 생존율을 보였다(Table 5).

Table 5. Survival rate of experimental mice

Group	Body weight (g)	Brain weight (g)	No. of mice	No. of survival mice	Survival rate (%)
Control	42.3 ± 0.34	0.51 ± 0.03	9	9	100
TMT	41.5 ± 1.42	0.48 ± 0.04	9	9	100
70:30 (30 mg/kg)	40.2 ± 2.07	0.50 ± 0.03	9	9	100
70:30 (50 mg/kg)	41.0 ± 1.17	0.50 ± 0.02	9	9	100
50:50 (50 mg/kg)	41.8 ± 1.96	0.49 ± 0.04	9	9	100

Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. Sample groups were injected with TMT after supplied with 70:30 and 50:50 of *C.loureirii* and *R.laevigata* (30, 50 mg/kg body weight per day). Each value represents the mean ± S.D. for 9 mice. The weights do not represent significant differences ($p < 0.05$).

라. 적출한 뇌를 이용한 시너지 효능 검증

(1) 아세틸콜린 농도 측정

TMT는 신경세포의 신경전달물질의 원활한 소통의 장애물이 되어 신경전달물질 농도 저하를 초래하므로, 혼합물이 실제 쥐의 뇌 조직에서 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 뇌 조직 안에 들어있는 아세틸콜린 농도를 측정하였다. 그 결과 계피와 금앵자 혼합물의 식이가 아세틸콜린 농도 저하에 유의적인 보호효과를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effects of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts on acetylcholine level in TMT-induced mice brains

Group	Acetylcholine level (μmol/mg of protein)
Control	0.164 ± 0.014
TMT	0.129 ± 0.008*
70:30 (30 mg/kg)	0.136 ± 0.006
70:30 (50 mg/kg)	0.153 ± 0.008#
50:50 (50 mg/kg)	0.144 ± 0.009

The value of TBARS(%) was calculated and compared with that of the control group. Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. Sample groups were injected with TMT after supplied with 70:30 and 50:50 of *C.loureirii* and *R.laevigata* (30, 50 mg/kg body weight per day). Each value represents the mean ± S.D. for 9 mice. (* $P < 0.05$ as compared with that of control group, # $P < 0.05$ as compared with that of TMT group).

(2) 지질과산화도 측정

행동실험 완료 후, mice의 뇌조직을 적출하고 지질 산화로 생성된 malondialdehyde (MDA)는 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) 생성 정도로 확인하였다. 그 결과, TMT를 주입한 group의 뇌 조직에서 산화적 스트레스 받는 정도가 증가하여 MDA 농도가 높은 것을 확인할 수 있었고, 계피 금앵자 혼합물이 MDA 농도를 떨어뜨리는데 효과를 보였으므로 혼합물의 항산화능도 확인할 수 있었다(Fig. 33).

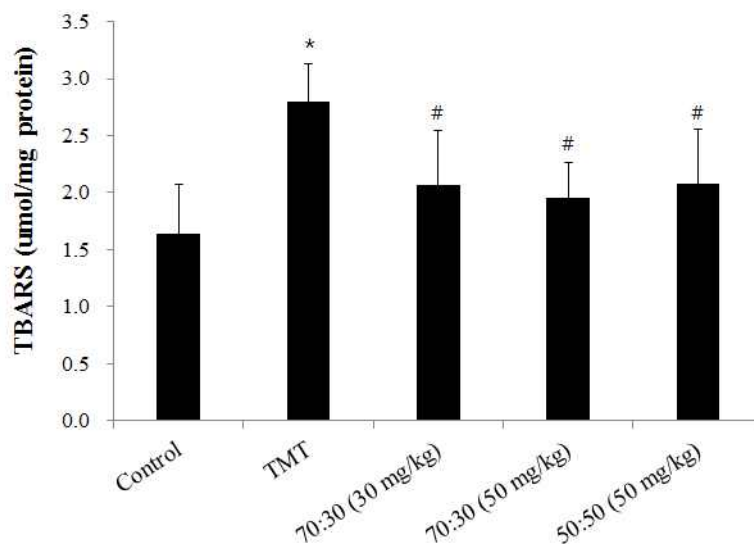


Fig. 33. Protective effects of *Cinnamomum loureirii* and *Rosa laevigata* extracts against drug-induced oxidative damage.

The value of TBARS(%) was calculated and compared with that of the control group. Control group was injected with sodium chloride solution. TMT group was injected with TMT. Sample groups were injected with TMT after supplied with 70:30 and 50:50 of *C.loureirii* and *R.laevigata* (30, 50 mg/kg body weight per day). Each value represents the mean \pm S.D. for 9 mice. (* $P < 0.05$ as compared with that of control group, # $P < 0.05$ as compared with that of TMT group).

4. 지표 물질 선정 및 표준물질 확보

가. 지표성분 및 기능성분 선정

시료의 기능성분 및 지표성분을 선정하기 위해 추출 및 정제를 통해 활성물질을 확인하였고 문헌 및 논문을 참고하여 관련 화합물을 수집하였다. 화합물 목록 중 분석법 설정과 정제분리의 용이성을 고려하여 지표성분을 선정한 결과, 계피는 지표성분으로 cinnamaldehyde, 금앵자는 지표성분으로 chlorogenic acid로 선정하였다. 범용화된 기기 사용을 위해 HPLC를 통해 분석하였다.

나. 지표성분 정보

(1) 계피 지표성분

- 일반명: Cinnamaldehyde
- 구조식: C_9H_8O
- 분자량: 132.16 g/mol
- CAS Number: 104-55-2

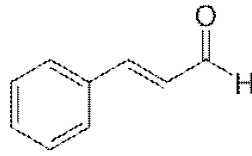


Fig. 23. 지표성분 cinnamaldehyde의 화학적 구조

(2) 금앵자 지표성분

- 일반명: Chlorogenic acid
- 구조식: $C_{16}H_{18}O_9$
- 분자량: 354.31 g/mol
- CAS Number: 327-97-9

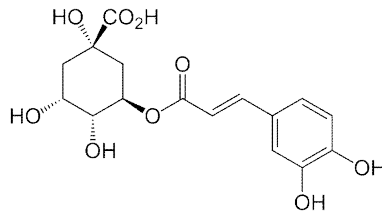


Fig. 24. 지표성분 chlorogenic acid의 화학적 구조

(3) 계피추출물과 금앵자추출물의 지표성분 함량 확인

(가) 계피 지표성분 검색

아래 Table 7의 HPLC 조건을 통해 계피추출물에 들어있는 cinnamaldehyde 함량을 확인해 본 결과, 26.857분에서 지표성분 피크를 확인할 수 있었다.

Table 7. Chromatographic conditions of the analytical HPLC

Parameter	Value
Instrument	YL9100 HPLC system
Detector	YL9160 PDA Detector
Column	Aegispak C18-L (reverse phase column, 4.6 × 250 mm)
Mobile phase A	1% acetic acid in water
Mobile phase B	1% acetic acid in acetonitrile
Gradient	0 min - 5% B 40 min - 70% B 45 min - 100% B 50 min - 100% B 55 min - 5% B 60 min - 5% B
Flow rate	0.5 ml/min
Wavelength	280 min
Retention time	26.857 min

(나) 금앵자 지표성분 검색

아래 Table 8의 HPLC 조건을 통해 금앵자추출물에 들어있는 chlorogenic acid 함량을 확인해 본 결과, 12.863분에서 지표성분 픽을 확인할 수 있었다.

Table 8. Chromatographic conditions of the analytical HPLC

Parameter	Value
Instrument	YL9100 HPLC system
Detector	YL9160 PDA Detector
Column	Aegispak C18-L (reverse phase column, 4.6 × 250 mm)
Mobile phase A	1% phosphoric acid in water
Mobile phase B	Acetonitrile
Gradient	0 min - 10% B 20 min - 20% B 25 min - 30% B 35 min - 40% B 40 min - 40% B 50 min - 100% B 60 min - 100% B
Flow rate	1.0 ml/min
Wavelength	324 nm
Retention time	12.863 min

< 3차년도 >

1. 계피·금앵자 추출물의 지표성분 함량 및 밸리테이션

가. 시험물질의 정보

- (1) 시험물질: 계피금앵자 추출물
- (2) 원재료: 계피, 금앵자
- (3) 제조방법: 계피, 금앵자를 70% 주정을 이용하여 추출 및 정제 농축·건조하여 7:3 비율로 정량한 농축액이다.
- (4) 신청원료 기능(또는 지표)물질 함량
 - 시료의 기능성분 및 지표성분을 선정하기 위해 추출 및 정제를 통해 활성물질을 확인하였고 문헌 및 논문을 참고하여 관련 화합물을 수집하였다. 화합물 목록 중 분석법 설정과 정제분리의 용이성을 고려하여 지표성분을 선정한 결과, 계피는 지표성분으로 cinnamic acid, 금앵자는 지표성분으로 chlorogenic acid로 선정하였다. 범용화된 기기 사용을 위해 HPLC를 통해 분석하였다.

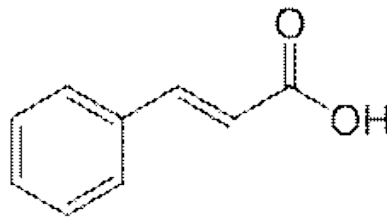
나. 분석방법

- (1) 표준원액의 제조
 - 지표성분 cinnamic acid 표준품 1mg을 정밀하게 달아 이를 4ml 용량 tube에 넣고 100% methanol로 녹인 후 이를 표준원액으로 하였다(250 µg/ml).
 - 상개 표준원액을 각 단계별 (10, 25, 50, 100, 125 µg/ml)로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.
- (2) 시험용액의 제조 / 계피·금앵자 혼합물(70% EtOH추출물)
 - 계피금앵자 추출물 80mg에 methanol 1ml을 넣어 완전히 녹인 후 0.45µm PTFE syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.
- (3) 시약 및 재료
 - HPLC용 용매는 HPLC grade용매 (J.T.Baker, USA)를 사용하였고, 초순수는 18MΩ 이상을 사용하였다. 그 외에 acetic acid (Sigma, USA)는 분석용 1급 시약을 사용하였고, 0.45µm PTFE syringe filter (ADVANTEC, Japan)로 여과한 후 사용하였다.
- (4) 기기분석
 - 표1. 사용기기 및 HPLC 조건

HPLC	YL 9111 Binary pump (Younglin) YL 9160 PDA detector (Younglin)		
Column	Aegispak C18-L (4.6 × 250mm, 5 μ m)		
Wavelength	280 nm		
Flowrate	1 ml/min / 10 μ l injection / 25 $^{\circ}$ C column temp.		
Solvent	A : Water (1% Acetic acid), B : ACN (1% Acetic acid)		
Gradient Condition	시간(min)	A%	B%
	0	95	5
	20	0	100
	25	0	100
	30	95	5
	35	95	5

다. 화합물의 정량 (계피)

(1) 표준화합물의 구조



[Cinnamic acid]

(2) 분석법 검증(밸리데이션)

(가) 특이성

- 계피 및 금앵자 시료와 표준품을 1:1(v:v)로 섞은 후 분석하여 크로마토그램을 확인하였다. 결과 peak의 모양 및 대칭성이 양호하였고 분석방해인자가 없음이 확인되었다.

(나) 직선성

- 10~250 μ g/ml 사이의 농도를 사용하여(n=3, 6) 분석한 후 상관계수(R^2)를 통하여 직선성의 여부를 확인하였다. 전체적으로 0.999이상의 양호한 직선성을 나타내었다.

- 표 2. Cinnamic acid의 농도 면적 그래프 및 직선성

Linearity						Graph
No.	Conc. (ppm)					
	10	25	50	100	125	
1day	782.795	2003.963	3870.152	7763.442	9732.670	
2day	778.192	2032.353	3919.419	7728.270	9499.469	
3day	770.403	2030.468	3936.246	7749.079	9536.570	
Mean	777.130	2022.261	3908.605	7746.930	9589.569	
RSD(%)	0.806	0.785	0.878	0.228	1.306	
Accuracy(%)	92.800	102.200	100.400	100.300	99.600	
SD	6.263	15.874	34.348	17.684	125.309	
Conc. (ppm)	9.280	25.552	50.204	100.366	124.447	

(다) 정확성 (Accuracy)

- 각 농도별 표준품을 분석한 후 검량선을 이용하여 역산된 평균농도, 이론치의 상대오차를 확인하여 정확성의 허용기준에 적합한지 확인하였다.

Recovery				Result of Intra day			
No.	Conc. (ppm)			No.	Conc. (ppm)		
	10	25	50		10	25	50
1	9.294	25.684	50.345	n=1	747.468	2001.334	3833.130
2	9.134	25.690	49.784	n=2	766.145	2005.434	3920.161
3	9.214	25.629	50.012	n=3	780.946	2034.285	3887.962
Mean	9.214	25.668	50.047	Mean	764.853	2013.684	3880.417
RSD(%)	0.865	0.1311	0.563	RSD(%)	2.193	0.891	1.133
Recovery	92.144	102.672	100.095	Accuracy(%)	91.146	101.784	99.716
SD	0.079	0.033	0.282	SD	16.776	17.958	44.003

(라) 정밀성 (Precision)

① 반복성 (Repeatability)

- peak 면적의 반복성은 각각의 standard로 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화하는 정도를 보기 위해 연속 6회 injection하여 retention time과 area의 변화를 확인하였다.

② 일내정밀성

- 농도별 표준물질을 짧은 시간차로 반복분석하여 얻은 결과값들의 상대오차를 확인하였다.

③ 일간정밀성

- 농도별 표준물질을 다른 실험일로 측정하여 분석한 결과 값들의 상대오차를 확인하였다.

Result of Intra day

LOD & LOQ

No.	Conc. (ppm)		
	10	25	50
1day	769.354	2074.177	3931.960
2day	765.985	2032.829	3876.502
3day	770.403	2050.009	3933.614
Mean	768.580	2052.338	3914.025
RSD(%)	0.300	1.012	0.830
Accuracy(%)	91.634	103.806	100.595
SD	2.308	20.772	32.506

LOD	LOQ
1.232	3.735

(마) 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

- 검량선의 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 표준용액을 6회 반복측정한 평균값으로 검량선을 작성하여 각각의 식에 따라서 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다. (검출한계 $LOD=3.3 * Y$ 절편의 표준편차 / 검량선의 기울기, 정량한계 $LOQ=10 * y$ 절편의 표준편차 / 검량선의 기울기)

(3) 계피금앵자추출물에서의 cinnamic acid의 함량

- 계피와 금앵자를 분쇄하여 70% EtOH를 이용해 24시간씩 5반복 추출을 실시
- 추출 후 evaporator를 이용한 농축 실시
- 7:3 비율(70g : 30g)로 정량, 총 100g
- 추출물의 무게는 16.72g이었으며, 수율은 약 16.72%
- 추출물로 HPLC 분석 실시, 추출물 80mg을 정량하여 용매에 녹인 후 syringe filter (0.45µm)를 이용하여 필터링 한 뒤 기기측정
- * 추출물에 0.233 mg/g extract 있는것으로 확인 됨.

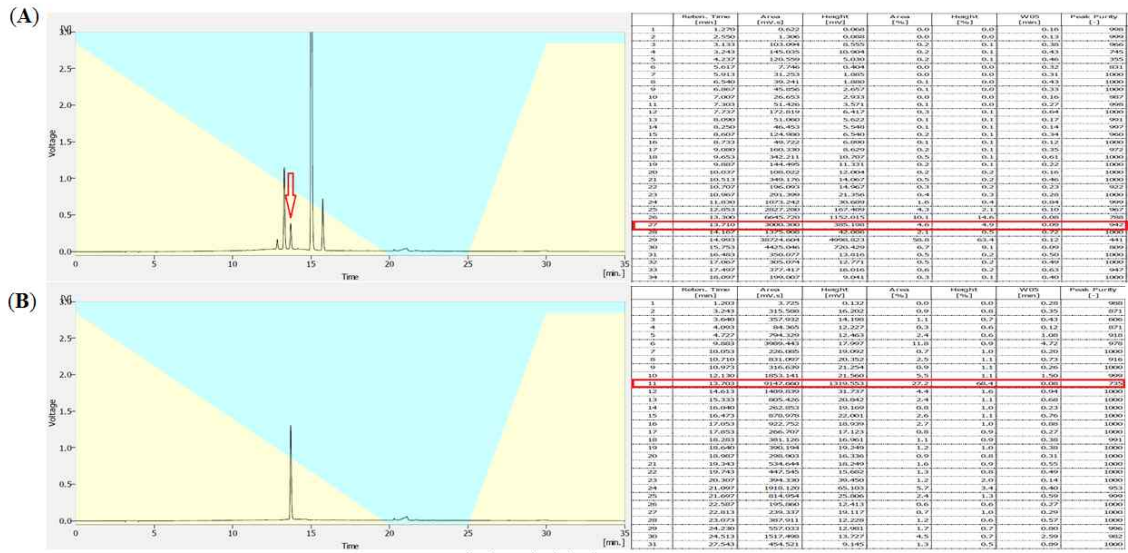
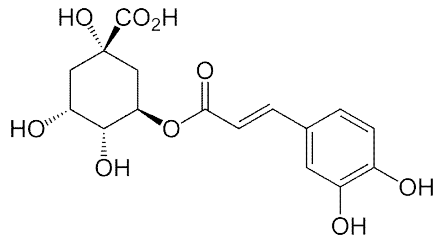


Fig. Chromatograms of 게피금앵자추출물(A) and cinnamic acid (B)

라. 화합물의 정량 (금앵자)

(1) 표준화합물의 구조



[Chlorogenic acid]

(2) 분석법 검증(밸리데이션)

(가) 특이성

- 게피 및 금앵자 시료와 표준품을 1:1(v:v)로 섞은 후 분석하여 크로마토그램을 확인하였다. 결과 peak의 모양 및 대칭성이 양호하였고 분석방해인자가 없음이 확인되었다.

(나) 직선성

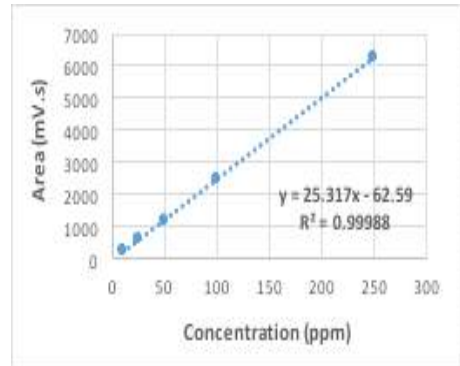
- 10~250µg/ml 사이의 농도를 사용하여(n=3, 6) 분석한 후 상관계수(R²)를 통하여 직선성의 여부를 확인하였다. 전체적으로 0.999이상의 양호한 직선성을 나타내었다.

- 표 3. chlorogenic acid의 농도 면적 그래프 및 직선성

Linearity

Graph

No.	Conc. (ppm)				
	10	25	50	100	125
1day	223.948	549.521	1176.623	2417.990	6256.419
2day	229.478	584.699	1187.987	2411.980	6349.237
3day	223.773	583.154	1178.55	2487.982	6238.657
Mean	225.733	572.458	1181.053	2439.317	6281.437
RSD(%)	1.437	3.472	0.514	1.732	0.945
Accuracy(%)	113.885	100.335	98.245	98.823	100.233
SD	3.244	19.879	6.081	42.251	59.383
Conc. (ppm)	11.388	25.083	49.122	98.823	250.583



(다) 정확성 (Accuracy)

- 각 농도별 표준품을 분석한 후 검량선을 이용하여 역산된 평균농도, 이론치의 상대오차를 확인하여 정확성의 허용기준에 적합한지 확인하였다.

Recovery

Result of Intra day

No.	Conc. (ppm)		
	10	25	50
1	11.318	24.177	48.947
2	11.536	25.567	49.396
3	11.311	25.506	49.023
Mean	11.388	25.083	49.122
RSD(%)	1.125	3.130	0.489
Recovery	113.885	100.335	98.245
SD	0.128	0.785	0.240

No.	Conc. (ppm)		
	10	25	50
n=1	182.119	485.442	965.527
n=2	184.225	480.674	965.108
n=3	186.821	464.83	968.521
Mean	184.388	476.982	966.385
RSD(%)	1.277	2.262	0.192
Accuracy(%)	97.554	85.250	81.287
SD	2.355	10.790	1.861

(라) 정밀성 (Precision)

① 반복성 (Repeatability)

- peak 면적의 반복성은 각각의 standard로 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화하는 정도를 보기 위해 연속 6회 injection하여 retention time과 area의 변화를 확인하였다.

② 일내정밀성

- 농도별 표준물질을 짧은 시간차로 반복분석하여 얻은 결과값들의 상대오차를 확인하였다.

③ 일간정밀성

- 농도별 표준물질을 다른 실험일로 측정하여 분석한 결과 값들의 상대오차를 확인하였다.

Result of Intra day

LOD & LOQ

No.	Conc. (ppm)		
	10	25	50
1day	184.805	530.675	1052.165
2day	184.321	516.480	1012.699
3day	192.216	475.796	1013.583
Mean	187.114	507.650	1026.149
RSD(%)	2.364	5.611	2.196
Accuracy(%)	98.630	90.096	86.008
SD	4.425	28.485	22.534

LOD	LOQ
0.766	2.323

(마) 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

- 검량선의 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 표준용액을 6회 반복측정한 평균값으로 검량선을 작성하여 각각의 식에 따라서 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다. (검출한계 LOD=3.3 * Y절편의 표준편차 / 검량선의 기울기, 정량한계 LOQ=10 * y절편의 표준편차 / 검량선의 기울기)

(3) 계피금앵자추출물에서의 chlorogenic acid의 함량

- 계피와 금앵자를 분쇄하여 70% EtOH를 이용해 24시간씩 5반복 추출을 실시
- 추출 후 evaporator를 이용한 농축 실시
- 7:3 비율(70g : 30g)로 정량, 총 100g
- 추출물의 무게는 16.72g이었으며, 수율은 약 16.72%
- 추출물로 HPLC 분석 실시, 추출물 80mg을 정량하여 용매에 녹인 후 syringe filter (0.45µm)를 이용하여 필터링 한 뒤 기기측정
- * 추출물에 0.0729 mg/g extract 있는것으로 확인 됨.

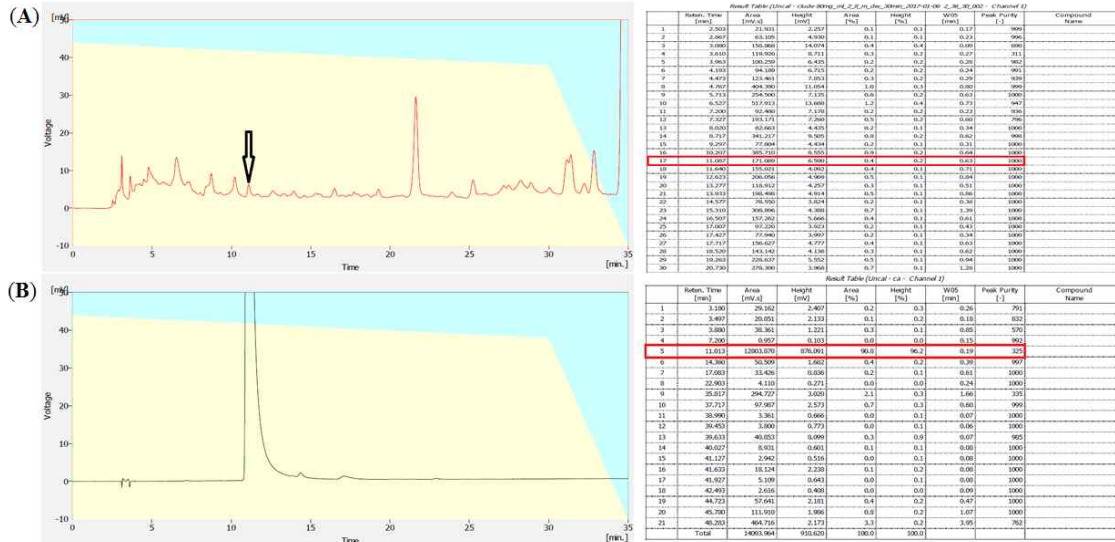


Fig. Chromatograms of 계피금영자 (7:3) 추출물(A) and chlorogenic acid (B)

[제 2협동 : 가톨릭대학교]

<1차년도>

인체적용시험 계획수립

1) 인체적용시험 임상시험 프로토콜, CRF, ICF 작성, 시험처 IRB 승인

- 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약대조 인체적용시험으로 연구의 목적과 연구방법 등에 대한 상세한 설명을 듣고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시한 후 선정/제외 기준에 적합한 자를 선정한다. 스크리닝을 통해 대상자로 선정된 자를 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하며, 인체적용시험용제품을 12주 동안 식후 1일 3회 복용하도록 한다.
- 무작위배정일(1Day) 복용 전에 유효성 평가 항목 및 안전성 평가 항목들을 실시하며, 인체적용시험용제품 복용 시작 시점을 기준으로 6주와 12주에 외래방문을 통하여 해당 방문에 대한 평가 항목들을 실시한다.
- 임상시험약 및 대조약 생산 확정이후 IRB 접수, 승인 예정임

경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금영자 추출물
복용 후 효과와 안전성을 평가하기 위한
무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험

A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate
the efficacy and safety of Cinnamon/ Rosa laevigata Michaux extract
in subjects with mild cognitive impairment

Protocol No.:

Protocol Version: 1.0

Development date: 2015.05.14

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험계획서와 관련된 모든 정보는 기밀사항으로 시험책임자, 시험담당자, 관련 행정기관, 인체적용시험기관의 IRB를 위해 계획된 것이며, 본 시험에 관련되지 않은 자에 의해 복사되거나 배포될 수 없음을 알려드립니다. 이 계획서를 제공받은 분은 문서의 기밀사항을 보장해 주시기 바랍니다.

Case Report Form

경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금영자 추출물
복용 후 효과와 안전성을 평가하기 위한
무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험

A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate
the efficacy and safety of Cinnamon/Rosa laevigata Michaux extract
in subjects with mild cognitive impairment

Protocol No.:

CRF Version: 1.0

Development date: 2015.05.14

인체시험 시행기관	
인체시험 책임자	
대상자 이니셜	<input type="text"/>
스크리닝 번호	<input type="text"/> S <input type="text"/>
무작위배정 번호	<input type="text"/> R <input type="text"/>

Confidential

Protocol No.:

Protocol Version: 1.0

인체적용시험 계획서 요약

인체적용시험 제목	경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금영자 추출물 복용 후 효과와 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험 <A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of Cinnamon/ Rosa laevigata Michaux extract in subjects with mild cognitive impairment>
인체적용시험 실시기관	가톨릭대학교 서울성모병원 가톨릭대학교 성빈센트병원
인체적용시험 책임자	가톨릭대학교 서울성모병원 가정의학과 김 경수 가톨릭대학교 성빈센트병원 가정의학과 송 상욱
시험기간	IRB 승인 후 첫 대상자 등록일로부터 마지막 대상자 종료일까지 1년
대상 질환	경증의 인지기능장애
시험디자인	다가관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 목적	일차 목적 경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금영자 추출물 또는 위약을 12주간 복용 후 인지기능개선 효과를 비교 평가한다. 이차 목적 • 계피/금영자 추출물 또는 위약을 12주간 복용 후 뇌영상학적 검사를 통한 구조적, 기능적 변화를 비교 분석한다. • 계피/금영자 추출물 복용에 대한 안전성을 평가한다.
인체적용시험용 제품	시험제품: 계피와 금영자 추출물 대조제품: 위약(Placebo)

<p>시험방법</p>	<p>본 연구의 목적과 연구방법 등에 대한 상세한 설명을 듣고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시한 후 선정/제외 기준에 적합한 자를 선정한다. 스크리닝을 통해 대상자로 선정된 자를 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하며, 인체적용시험용제품을 12주 동안 식후 1일 3회 복용하도록 한다.</p> <p>무작위배정일(1Day) 복용 전에 유효성 평가 항목 및 안전성 평가 항목들을 실시하며, 인체적용시험용제품 복용 시작 시점을 기준으로 6주와 12주에 외래방문을 통하여 해당 방문에 대한 평가 항목들을 실시한다.</p> <div style="text-align: center;"> </div>
<p>대상자 수</p>	<p>총 60명(군당 30명), 중도탈락율 15% 포함</p>
<p>선정기준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 만 50세 이상의 성인 남녀 2) 선별검사인 Korean Version of Mini Mental Status Examination in the Korean version of CERAD Assessment Packet(MMSE-KC) 기준 24점 이상 27점 이하인 자 3) 본 인체적용시험에 대하여 자세한 설명을 들은 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

2) 인체적용시험 대행기관 공고 및 선정 진행

- ‘계피와 금앵자 추출물을 이용한 인지기능 개선 건강기능성 식품 개발’ 임상시험을 수행하기 위한 업체를 나라장터 (2015.2.13.)를 통해 공고문 게시함.
- 2015년 2월 25일 12:00 마감결과, 2개 업체(메디칼엑셀런스, 네오뉴트라) 응모하여 임상시험 수행 기관에 대해 평가 후 업체 선정 완료함
- 선정 결과는 아래와 같음

내 용	일정
응모결과 보고	2015.02.26.~2015.03.02.
심사위원 위촉 및 서면심사 요청	2015.03.02.~2015.03.12.
심사결과 취합 및 보고	2015.03.12.~2015.03.18.
업체 선정 및 계약	2015.03.25

- 전문위원 선정하여 제안 업체별 비교 시행하여 메디칼엑셀런스를 임상시험대행기관으로 선정함.



Quotation No. 140012
C-000262-14019-002
Date : 2014/07/25

프로젝트 CRO 위탁 예산서

MEDICAL EXCELLENCE

Customer Information	소속 담당자 연락처	가톨릭대학교 서울성모병원 가정의학과 송상욱 교수님
Study Information	Sponsor Name Study Name	국책과제 커피와 글루타추수율을 이용한 인지기능 개선 건강기능 성 식품 개발
	No. of Sites No. of Subjects Study Period Monitoring Visit CRF Volume Scope of Services	2개 기관 100명 기준 9개월 (6개월 등록+3개월 관찰) 개시방문, 정규(기관당 4회)방문, 종료방문 약 50페이지 내외 Project Management Protocol Development IRB Submission CRA Activities Data Management by e-CRF Statistical Analysis & Clinical Study Report

Quotation Summary	ITEM	Amount (VAT excluded)
	Project Management	1,440
	Protocol Development	11,300
	Regulatory Affairs	1,920
	CRA Activities	18,860
	Data Management	29,460
	Statistical Analysis & CSR	15,800
	TOTAL	78,780
	SUGGEST SERVICE FEE	78,000

<2차년도>

1. 임상시험을 위한 임상시험대상자모집

- 첫 대상자가 2016년 03월 17일 스크리닝 되었으며 현재까지 20명 스크리닝 시행함
- 대상자 모집 현황 (2016.05.23기준)

Target No.	Screening No.	Screening Failure	Run-In	Random No.	Ongoing	drop-Out	Completion No.
40	14	1	4	4	2	0	0
20	6	0	1	5	5	0	0

2. 임상시험관리 및 모니터링

: 정기적인 연구모니터링 실시하고 연구현황에 대한 뉴스레터 공지하여 연구진행 점검함(모니터링 결과보고 및 뉴스레터 별첨함)

3. 2차년도 중간분석을 위한 뇌영상분석 플랫폼 완성함

- 구조적, 기능적 뇌신경연결망 분석 프로토콜 완성
- 구조적 MRI 분석을 통한 관련 영역의 해부학적 정량 측정: Surface based analysis를 이용한 시험군과 대조군의 회색질의 두께 차 분석을 위해 뇌영상분석 프로그램(Freesurfer 및 FSL) 설치

및 파이프라인 매뉴얼 완성함

- 확산 텐서 영상(Diffusion Tensor Imaging)을 이용한 백질구조 분석을 위해 TBSS (Tract Based Spatial Statistics) 방법론 확인함

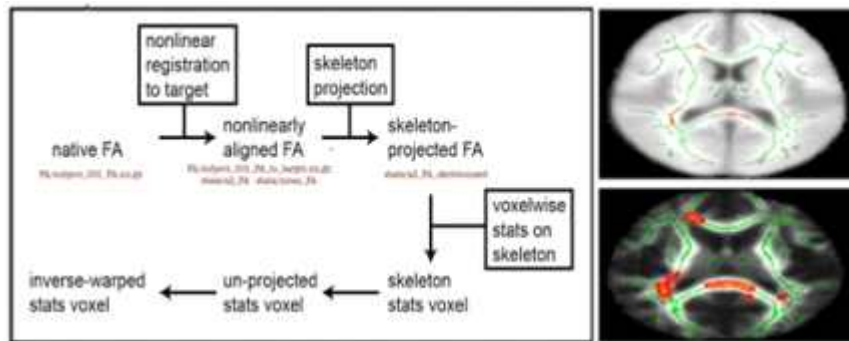


그림. TBSS 영상분석 흐름도

4. 원활한 임상연구 진행을 위해 피검자 모집 및 관리방안 추진

1) 인지기능 평가 및 기록방법에 대한 교육 실시

- 대상: 임상시험기관 소속의 임상시험 코디네이터 및 공동연구자
- 2016 년 2월 12일, 24일 2차례에 걸쳐 성빈센트병원 회의실에서 임상심리검사 검사방법 및 기록에 대한 교육 시행하여 일관성 있는 검사진행 가능하도록 함

2) 개정된 인지기능 검사도구 내용을 반영한 임상시험기록양식 완성함

CERAD-K		
○ 시행 ○ 미시행 (사유:)		
※ visit1에서 실시한 MMSE-KC(J3) 검사결과를 활용할 수 있습니다.		
항목		점수
J1	언어유창성 검사	
J2	보스톤 이름대기 검사	
J3	간이 정신상태 검사	
J4	단어목록기억 검사	
J5	구성행동 검사	
J6	단어목록회상 검사	
J7	단어목록재인 검사	
J8	구성회상 검사	
J9	길 만들기 검사	A
		B
J가	스트룹 검사	단어 페이지
		색깔 페이지
		색깔-단어 페이지
총점 I		
(합수 = J1 + J2 + J4 + J5 + J6 + J7)		
총점 II		
(합수 = J1 + J2 + J4 + J5 + J6 + J7 + J8)		

- 3) 원활한 피검자 등록을 위해 원내 홍보 및 건강검진자 대상의 스크리닝 시행함
- 4) 뇌자기공명영상 검사 및 관독으로 인한 연구진행의 지연이 예상됨에 따라 검사 당일 즉시관독 시스템 구축함



Newsletter

연구제목 : 인지능 개선에 미치는 계피/금양자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험
 Protocol No. : CRLME

계피/금양자 추출물 인체유래물 시험을 위한 관심과 노고에 감사드립니다.
 본 연구의 현재까지의 진행 현황과 주요사항을 전달 드리고자 2016년 3월 Newsletter 를 송부하여 드립니다.

1. 대상자 모집 현황

(2016.03.21 기준)

Site Name	Target No.	Screening No.	Screening Failure	Random No.	Ongoing	drop-Out	Completion No.
성빈센트병원	40	3*	0	0	0	0	0
서울성모병원	20	1*	0	0	0	0	0

* Run-in

2. 주요 사항

1) 기관별 IRB 현황

기관/IRB보고	변경사항	IRB 접수일	IRB 심의일	IRB심의 결과
성빈센트병원				
IRB 초기심의	PT1.0/CRF1.0/ICF1.0	2015.07.30	2015.08.11	보완후재심의
IRB 보완답변	PT1.1/CRF1.1	2015.10.02	2015.10.13	승인
IRB 변경계획(1차)	PT1.2/CRF1.2/ICF1.1	2015.12.03	2015.12.23	승인
IRB 변경계획(2차)	CRF1.3	2016.03.16	-	심의대기중
서울성모병원				
IRB 초기심의	PT1.0/CRF1.0/ICF1.0	2015.07.30	2015.08.11	보완후재심의
IRB 보완답변	PT1.1/CRF1.1	2015.10.02	2015.10.13	승인
IRB 변경계획(1차)	PT1.2/CRF1.2/ICF1.1	2015.12.03	2015.12.23	승인
IRB 변경계획(2차)	약제관리비	2015.12.14	2015.12.23	승인
IRB 변경계획(3차)	CRF1.3	2016.03.16	-	심의대기중

CRF 1.3버전은 오기 및 CERAD-K 결과기재란이 변경되어 IRB변경접수되어 심의 대기 중입니다.



Newsletter

연구제목 : 인지능 개선에 미치는 제피/금앵자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험
 Protocol No. : CRLME

제피/금앵자 추출물 인체적용시험을 위하여 늘 관심 주시고 대상자 등록에 힘써주시는 연구자 및 연구담당자 분들께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.
 본 연구의 현재까지의 진행 현황과 주요사항을 전달 드리고자 2016년 4월 2차 Newsletter를 송부하여 드립니다.

1. 대상자 모집 현황

(2016.04.19 기준)

기관명	Target No.	Screening No.	Screening Failure	Run-In	Random No.	Ongoing	Drop Out	Completion No.
성빈센트병원	40	7	1*	4	2	2	0	0
서울성모병원	20	6	0	1	5	5	0	0

2. 담당자 연락처

연구 진행에 문의사항이 있으시면 다음 담당자에게 연락주시기 바랍니다.

담당자	연락처	FAX	이메일
최정민 CRA			
강세나 DM (CRF 시스템관련 문의)			
IP 관련 문의			

감사합니다. 끝.

<인체적용 임상시험 진행과정>

1) 동의서 작성 및 CERAD-K 검사



2) MRI 검사



인지능 개선에 미치는 계피/금앵자 추출물의
유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검,
위약 대조 인체적용시험

A 12 week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial
for the evaluation of the efficacy and safety of Cinnamon/ Rosa laevigata Michaux
extract on improving cognitive function

Protocol No.: CRLME

Protocol Version: 1.1

Development date: 2015.09.11

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험계획서와 관련된 모든 정보는 기밀사항으로 시험책임자, 시험담당자, 관련 행정기관, 인체적용시험기관의 IRB를 위해 계획된 것이며, 본 시험에 관련되지 않은 자에 의해 복사되거나 배포될 수 없음을 알려드립니다. 이 계획서를 제공받은 분은 문서의 기밀사항을 보장해 주시기 바랍니다.

[사본]

성빈센트병원 임상연구심사위원회(VCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

무결번호 : (162 - 47) 경기도 수원시 팔달구 중부대로 93

담당자 : 정세민

문서번호	CIRB-00097_1-013	시행일	2015-12-23	
연구제목	인지능 개선에 미치는 계피/금양자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험			
과제번호	XC15HNME0077V			
시험책임자	소속	가정의학과	이름	송상욱
지원기관	성빈센트병원			
심의대상	변경계획서			
연구대상	건강식품			
심의일	2015-12-23			
심의결과	승인			
연구승인유효기간	2016-10-12	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 득하십시오. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.		
심의내역				
심의내용	<p>변경계획서</p> <p>임상시험 대상관령 : 1) 병용금기약물 중 인지기능향상의 기능을 가진 기능성 건강식품(당귀추출물)에서 (당귀추출물, 구기자추출물, 녹차추출물/태아닌복합물, 비파엽추출물, 오메가-3 지방산 함유유지, 원지추출분말, 은행잎추출물, 인삼가시오갈피 등 혼합추출물, 태아닌 등 복합추출물, 피브로인 효소가수분해물, 홍삼(홍삼농축액))로 추가</p> <p>기타 : 2) 제외기준 중 '심질환, 진전된 동맥경화 환자'와 '뇌졸중 또는 관상동맥 질환병력'이 중복되어 하나로 정리함 3) '계피와 석류'로 제품성분 오기름 '계피와 금양자'로 변경함 4) 중례기록서상 인구학적 조사내용중 교육년수 추가함 5) 중례기록서상 HADS 설문지 점수표기가 오기되어 정정함 6) 설문지 중 CERAD-K의 update가 있어 추가하며, 스크리닝시는 CERAD-K 중 MMSE-K만 실시함을 계획서/중례기록서/동의서에 명확히 명시함 7) 모약담당시 추가한 정형상 공동연구자 전산반영위한 추가</p> <p>변경사유 : 1) 식약처 인정물질 확인 후 추가함 2) 오기정정 3) 오기정정 4) 연구자의견에 따라 5) 오기정정 6) 평가점의 update 및 문구정리 7) 전산반영</p>			
심의 의견				

[사본]

성빈센트병원 임상연구심사위원회(VCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

<p>- 심의의견 : 1. 신속심사대상임 1) 연구 설계에 영향을 주지 않는 변경 2) 해당 변경 내용은 연구대상자에 대한 위험이 최소한의 위험 이내로 변경되는 경우임을 확인함.</p> <p>▶ 심의결과 : 승인 관련 규정을 근거로 제출된 변경계획서의 내용을 검토한 결과 IRB에서는 해당 연구의 변경 계획을 "승인"하기로 결정하였습니다.</p> <p>▶ 투표 결과 : 심사결과에 대한 찬성 2명, 반대 0명(반대사유:), 기권 0명(기권사유:), 이해상충으로 논의 및 투표에서 제외된 위원 0명(사유:)</p> <p>▶ 안내사항 1. 연구자는 변경된 사항을 숙지하여 연구를 진행하시기 바랍니다. 2. 심사 결과 통보서: 연구자가 반드시 보관해야 하는 서류이므로 해당 연구의 문서와 함께 보관하시기 바랍니다. 3. 연구 완료 후 임상연구 관련 문서는 관련 법률 및 기관규정에 따라 이관절차를 진행하시기 바라며, 상세 절차는 임상시험센터 문서보관 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 4. 연구대상자 동의서: 변경사항에 대해서 설명하고 최종 승인을 득한 연구대상자동의서에 승인 유효 기간이 명시된 IRB의 확인도장을 받아 재동의 취득하시기 바랍니다. 5. 본 과정은 CMC 중앙IRB에서 심사된 과제입니다. 연구 진행 중 공통으로 변경 또는 보고되어야 하는 사항은 중앙IRB로 보고하여 주시고 그 외 기관별로 변경 또는 보고되어야 하는 사항은 해당 기관의 IRB에 보고해주시기 바랍니다.</p>
--

성빈센트병원 임상연구심사위원회(VCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (162 - 47) 경기도 수원시 팔달구 중부대로 93

담당자 : 정세민

문서번호	CIRB-00103_1-032	시행일	2016-03-30	
연구제목	인지능 개선에 미치는 계피/금양자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험			
과제번호	XC15HNME0077V			
시험책임자	소속	가정의학과	이름	송삼욱
지원기관	성빈센트병원			
심의대상	변경계획서			
연구대상	건강식품			
심의일	2016-03-30			
심의결과	승인			
연구승인유효기간	2016-10-12	연구의 지속을 위해 연구승인가간 만료 전에 지속심사의 승인을 득하십시오. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.		
심의내역				
심의내용	<p>변경계획서</p> <p>기타 : CRF 변경 - 변경전 : 1.2 버전 - 변경후 : 1.3 버전</p> <p>변경사유 : 변경사유 : CERAD-K 결과기재 방법 변경 및 오기 수정</p>			
심의 의견	<p>- 심의의견 : 1. 신속심사대상임 1) 연구 설계에 영향을 주지 않는 변경 2) 해당 변경 내용은 연구대상자에 대한 위험이 최소한의 위험 이내로 변경되는 경우임을 확인함.</p> <p>▶ 심의결과 : 승인 관련 규정을 근거로 제출된 변경계획서의 내용을 검토한 결과 IRB에서는 해당 연구의 변경 계획을 "승인"하기로 결정하였습니다.</p> <p>▶ 투표 결과: 심사결과에 대한 찬성 2명, 반대 0명(반대사유:), 기권 0명(기권사유:), 이해상충으로 논의 및 투표에서 제외된 위원 0명(사유:)</p> <p>▶ 안내사항 1. 연구자는 변경된 사항을 숙지하여 연구를 진행하시기 바랍니다. 2. 심사 결과 통보서: 연구자가 반드시 보관해야 하는 서류이므로 해당 연구의 문서와 함께 보관하시기 바랍니다. 3. 연구 완료 후 임상연구 관련 문서는 관련 법률 및 기관규정에 따라 이관절차를 진행하시기 바라며, 상세 절차는 임상시험센터 문서보관 담당자에게 문의하시기 바랍니다. 4. 본 과정은 CMC 중앙IRB에서 심사된 과제입니다. 연구 진행 중 공동으로 변경 또는 보고되어야 하는 사항은 중앙IRB로 보고하여 주시고 그 외 기관별로 변경 또는 보고되어야 하는 사항은 해당 기관의 IRB에 보고해주시기 바랍니다.</p>			

<3차년도>

○ 인지능 개선에 미치는 계피/금앵자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험

1. 인체적용시험목적

가. 1차 목적

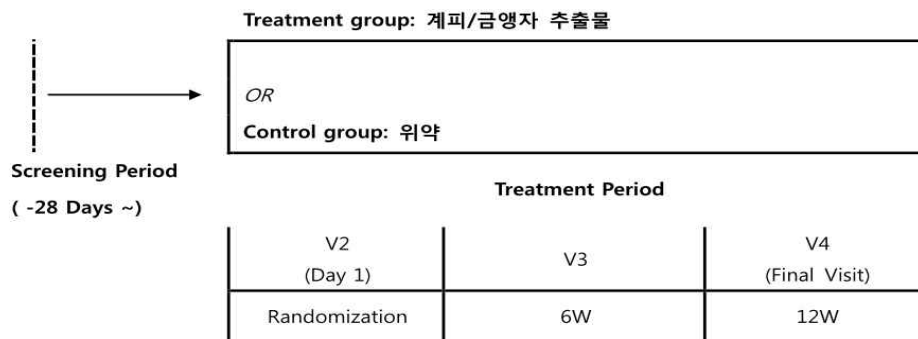
경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/ 금앵자 추출물 또는 위약을 12주간 복용 후 인지 기능개선 효과를 비교 평가.

나. 2차 목적

- 계피/금앵자 추출물 또는 위약을 12주간 복용 후 뇌영상학적 검사를 통한 구조적, 기능적 변화를 비교 분석.
- 계피/금앵자 추출물 복용에 대한 안전성을 평가.

2. 인체적용시험방법

- 본 연구는 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약대조 인체적용시험으로 연구의 목적과 연구방법 등에 대한 상세한 설명을 듣고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시한 후 선정/제외 기준에 적합한 자를 선정하였다.
- 스크리닝을 통해 대상자로 선정된 자를 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하였으며, 인체적용시험용제품을 12주 동안 식후 1일 3회 2정씩 복용하도록 하였다.
- 무작위배정일(1Day) 복용 전에 유효성 평가 항목 및 안전성 평가 항목들을 실시하였으며, 인체적용시험용제품 복용 시작 시점을 기준으로 6주와 12주에 외래방문을 통하여 해당 방문에 대한 평가 항목들을 실시하였다.



가. 대상자

(1) 대상자수

	시험군	대조군	총 대상자 수
유효성 평가례수	33명	33명	66명
중도탈락(20%) 포함	42명	42명	84명

나. 선정기준

- (1) 만 50세 이상의 성인 남녀
- (2) 선별검사인 Korean Version of Mini Mental Status Examination(MMSE-KC) 기준 24점 이상 27점 이하인 자
- (3) 본 인체적용시험에 대하여 자세한 설명을 들은 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

다. 제외기준

- (1) DSM-IV 치매 선정 기준에 포함된 자
- (2) HADS의 불안 또는 우울 점수가 하나라도 11점 이상인 자
- (3) CDR의 Global Score이 0.5점 이상인 자
- (4) 신경 또는 정신의학적으로 중요한 병이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 자(우울증, 정신분열병, 간질, 알코올 중독, 약물남용 혹은 중독)
- (5) 중증 심혈관질환(심부전, 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 진전된 동맥 경화증) 병력이 있는 자
- (6) 악성종양 또는 폐질환이 있는자
- (7) 심한 신 기능 장애가 있는 자(serum creatinin 이 2.0mg/dl 이상)
- (8) 심한 간 기능 장애가 있는 자(AST, ALT Bilirubin 중 하나라도 정상 상한치의 2.5배 이상)
- (9) 계피와 금앵자 혼합추출물에 과민증이 있는자
- (10) 최근 1개월 이내에 본 인체시험에 영향을 미칠 수 있는 치매와 기억력 향상에 도움이 되는 대표적인 의약품이나 건강 기능식품 등을 복용한 경험이 있는 자
- (11) 현재 다른 임상시험 또는 인체시험에 참여하고 있거나 최근 1개월 이내에 임상시험 또는 인체적용시험에 참여하고 있는 자
- (12) 임부 또는 수유부
- (13) 시험담당자의 소견으로 볼 때 시험의 준수 사항을 따를 수 없다고 판단 되는 자

라. 시험방법

- 12주 동안 시험제품인 계피/금앵자 추출물 또는 대조제품을 1일 3회 2정씩 경구로 식후 복용하도록 하였다.

마. 관찰 항목

- (1) 대상자 동의 및 인구학적 조사, 신체계측
 - 인체적용시험에 들어가기 전, 시험자는 본 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 상세히 설명하였고, 서면 동의를 받았다. 서면동의 후 증례기록서에 인구학적 정보를 조사하여, 서면동의 날짜와 대상자 이니셜, 성별, 생년월일 등을 기록하고, 신체계측(신장, 체중)도

측정하여 기록하였다.

(2) 병력 조사

- 스크리닝 방문을 기준하여 1년 이내의 알리지력 또는 질병 또는 질병 기왕력에 대해 상세히 조사하여 기재 하였다.

(3) 선행 및 병용 약물 조사

- 스크리닝 방문을 기준하여 30일 이전부터 복용한 모든 약물에 대해서 조사. 기록하였고, 이후 매 방문마다 스크리닝 검사 시 조사되었던 선행 약물과 병용 약물 투여 상황에 변화가 있는지 여부 및 새로운 병용약물이 있는지에 대하여 조사한 후, 약제명(성분명 또는 제품명), 1회 투여량, 용량단위, 투여빈도, 경로, 투여 이유 등을 증례기록서에 기재하였다.

(4) 임신검사

- 스크리닝 방문(Visit 1)에 시행하였으며, 폐경(무월경이 12개월 이상)이 확인된 대상자를 제외한 가임기 여성 대상자의 경우, urine β -HCG 검사 결과가 음성이어야 하고, 전체 인체적용시험 기간 및 추적관찰 기간 동안 의학적으로 받아들일 수 있는 피임법을 지속적으로 사용할 것을 동의 받고 피임을 유지할 것에 대하여 교육하였다.

(5) HADS(Hospital Anxiety and Depression Scale)

- 불안-우울 정도를 측정하기 위해 14문항으로 구성된 척도이다. 7개의 홀수 문항은 불안을 7개의 짝수 문항은 우울을 측정할 수 있도록 구성되어 있으며, 각 문항은 0-3점으로 총점은 불안, 우울 각각 21점으로 계산되었다.

(6) 대상자 적합성 평가 (선정/제외기준 확인)

- 대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약물 투여력 조사, 이학적 검사 소견, 실험실 검사 등을 바탕으로 선정/제외기준을 확인하여 적합한 대상자가 선정되었는지 평가하여 기록하였다. 본 인체적용시험에서 대상자가 DSM-IV 치매 기준에 포함이 된다면 본 인체적용시험에서 제외되었다.

(7) 유효성 평가 항목

① CERAD-K(Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease-Korean version)

치매 진단에 필요한 임상정보를 표준화된 방식으로 인지기능 상태를 평가할 수 있는 신경심리 검사의 시행을 목적으로 한다. 언어유창성 검사, 보스톤 이름대기 검사(15점), MMSE-KC(30점), 단어목록기억 검사(30점), 구성행동 검사(11점), 단어목록회상 검사(10점), 단어목록재인 검사(10점), 구성회상 검사(11점), 길만들기 검사(A: 360점, B: 300점), 스트룹 검사(단어, 색깔)의 10가지 검사로 구성되어 있다.

② CDR(Clinical Dementia Rating Scale): 임상적 치매 척도

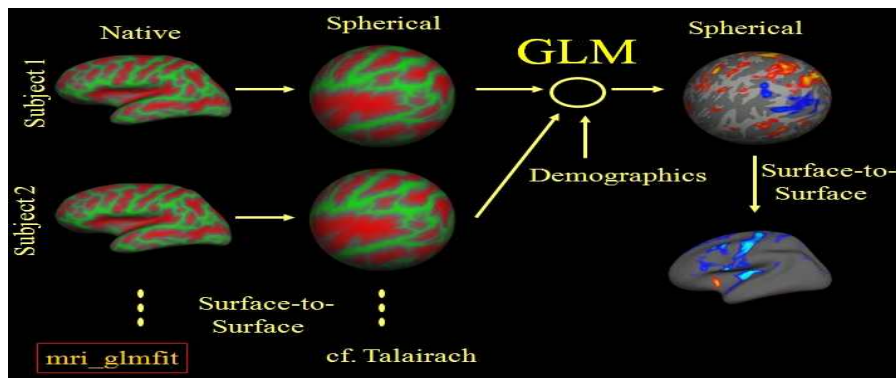
CDR은 세부적으로 6가지 항목인 기억력, 지남력, 판단력과 문제해결 능력, 사회활동, 집안 생활과 취미, 위생 및 몸치장을 평가한다. 각 영역에서 0부터 5점까지(0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5) 점수를 되어있으며, 여섯 영역을 합산한 “°Sum of boxes(CDR-SB)”±와 기억력 점수를 기준으로 하는 “Global Score”±로 제시한다.

③ Brain MRI

뇌영상검사는 가톨릭대학교 성빈센트병원에 등록된 대상자(40명)만으로 3D MPRAGE, DTI, resting state fMRI를 시행하였다. 기저 시점(V2)와 12주(V4)에 측정시 동일한 측정자가 시행하는 것을 원칙으로 하며, 시험담당자가 직접 판독을 하였다.

resting state fMRI는 Slices 31, TR = 2000ms, thickness = 3.6mm, flip angle = 90, scans = 240이며, 3D T1은 orientation sagittal, slice thickness = 1mm, TR = 1780ms, TE = 2.22ms, DTI는 slices 70, orientation transversal, slice thickness = 2mm, TR = 1,340ms, TE = 107ms으로 진행된다.

관찰 방법은 일반선형모델(General linear model)을 이용하여 통계적 분석을 실시하였으며, 그 고유한 통계 프로그램은 각각의 프로그램(SPM, Freesurfer, FSL)에 내재되어 있으며, 이를 이용하여 효과를 평가하였다. 회백질 농도(VBM), 회백질의 두께 (Cortical Thickness), 백질의 여러 확산 계수 (Fractional anisotropy, Mean diffusivity 등)의 각 군의 차를 결정하기 위해서 집단 비교를 시행하여 그 통계적 결과를 MRI 평균 자기공명 표준판에 표시하여 분석하고 Talairach 좌표 값으로 바꾼 다음 정위적 공간을 갖는 해부학적 좌표로 구성한다. 이 과정에서 여러가지 인구학적 지표, 임상적 지표, 유전자 자료를 공변수 (covariates)로 포함하여 그 차이를 분석하였고 인구학적 지표, 임상적 지표, 유전자 자료 상호간의 관계 또한 관찰하였다.



(8) 안전성 평가 항목

① 이학적 검사

매 방문 시에 실시하였다. 이학적 검사는 알러지, 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관계/간 및 담도계, 대사계/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관 검진을 포함하였다. 임상적으로 유의한 사항은 증례기록서의 의견란에 해당 내용을 기록하고, 인체적용시험용제품 섭취개시 후 이상반응의 정의에 부합되는 이학적 소견상의 유의할 만한 사항이 발견된 경우에는 증례기록서의 이상반응 항목에 기록하였다.

② 활력징후

매 방문 시에 실시하였으며, 활력징후(앉은 자세에서 5분 후에 측정된 혈압, 맥박, 체온)를 측정하여 기록하였다.

③ 실험실적 검사

실험실적 검사 시 공복상태(방문 전 8시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하였다. 또한, 시험 중 실험실적 검사 측정치의 이상 또는 악화가 나타난 경우에는 실험실 검사치 이상의 임상적 유의성 여부를 판정하여 유의한 이상변동으로 판정될 경우 그 후의 처치, 경과에 대해 증례기록서에 기록하였다.

- 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, differential count
- 혈액화학적 검사: Fasting Glucose, ALT, AST, ALP, total bilirubin, albumin, BUN, γ -GTP, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-Cholesterol, Na, K, Cl
- Fasting Insulin, TSH
- 소변검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, occultBlood, Urobilinogen, nitrate, WBC, RBC

④ 이상반응

시험자 또는 시험담당자는 대상자가 자발적인 보고를 하도록 수시로 교육했으며, 정기 또는 추가 방문에 면담 및 문진 등 진료를 통하여 이상반응을 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 시험제품과 관련하여 취해진 조치 및 시험제품과의 인과관계 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함하였다.

바. 통계분석

(1) 통계분석의 일반적 원칙

- 본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 ITT(Intention To Treat) 분석대상군과 PP(Per Protocol) 분석대상군의 두 가지 형태로 분석하였다.

① ITT 분석대상군

ITT 분석대상군은 무작위 배정되어 최소한 한 번이라도 시험제품을 섭취한 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함하였다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 인체적용시험이 종료되기 전에 대상자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료 분석을 실시하였다(Last observation Carried Forward Analysis).

② PP 분석대상군

PP 분석대상군은 ITT 분석에 포함되는 대상자 중 인체적용시험 계획서대로 완료한 대상자로부터 얻어진 자료를 분석에 포함시켰다.

③ 유효성 평가 분석대상군

유효성 평가는 원칙적으로 ITT와 PP 분석을 모두 실시하였으며, 분석 결과가 다른 경우에는 ITT 분석대상군을 주 분석대상군으로 하였고, PP 분석대상군은 보조 분석대상군으로 분석하여 그 결과를 ITT 분석 결과와 비교하였다.

④ 안전성 평가 분석대상군

안전성 평가 분석의 경우 ITT 분석대상군을 주분석군으로 하였다.

(2) 평가 기준

① 1차 유효성 평가변수

기저 시점 대비 12주 후의 CERAD-K 변화량

② 2차 유효성 평가변수

기저 시점 대비 12주 후의 CDR 변화량 및 뇌 영상의 변화 (뇌실질 부피, 회색질 두께)

③ 안전성 평가변수

이상반응, 실험실적 검사, 활력징후, 이학적 검사

(3) 유효성 평가 방법

① 1차 유효성 평가

기저 시점 대비 12주 후의 CERAD-K의 변화량을 산출한 후 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 정리하였고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정하였다. 또한 군 내 차이를 분석하기 위해서 paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 비교 검정하였다.

② 2차 유효성 평가

기저 시점 대비 12주 후의 CDR, MRI 결과의 변화량을 산출한 후 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 정리하였고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정하였다. 또한 군 내 차이를 분석하기 위해서 paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 비교 검정하였다.

(4) 안전성 평가 방법

① 이상반응

시험기간 중 발생한 모든 이상반응에 대하여 시행하였다. 이상반응의 발현율, 중도탈락의 원인이 된 이상반응의 발현율, 중대한 이상반응의 발현율을 처리군별로 요약하였으며, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 검정하였다. 이상반응의 발현율은 모든 이상반응에 대한 발현율 및 시험제품과 관련이 있는 이상반응의 발현율을 제시하였다.

② 활력징후, 이학적 검사 및 실험실적 검사

연속형 자료의 경우 기저 시점 대비 각 방문 시점 별 변화량에 대하여 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 제시하였고, 자료의 정규분포의 여부에 따라 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정하였다. 또한 군 내 비교를 위해서는 Paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석하였다. 범주형 자료의 경우 기술통계량(빈도, 백분율)을 제시하였고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 두 군간 비교 검정하였다.

인체적용시험 일정표

항목		Visit			
		Screening*	Baseline	Treatment Period	
		Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
		-28D ~	1D	6W±7D	12W±7D
서면동의서		●			
인구학적 조사		●			
음주력/흡연력 조사		●			
신체계측		●	●		●
병력 조사		●			
대상자 적합성 평가		●	●		
임신검사		●			●
HADS		●			
유효성 평가	CERAD-K ¹⁾	●	● [†]		●
	CDR	●	● [†]		●
	Brain MRI ²⁾		●		●
안전성 평가	이학적 검사	●	●	●	●
	활력징후	●	●	●	●
	실험실적 검사 ³⁾	●	● [†]	●	●
	이상반응 확인		●	●	●
무작위배정			●		
선행 및 병용 약물 조사		●	●	●	●
인체적용시험용 제품 제공			●	●	
순응도 평가				●	●

*: 스크리닝 기간은 최대 28일까지 허용된다.

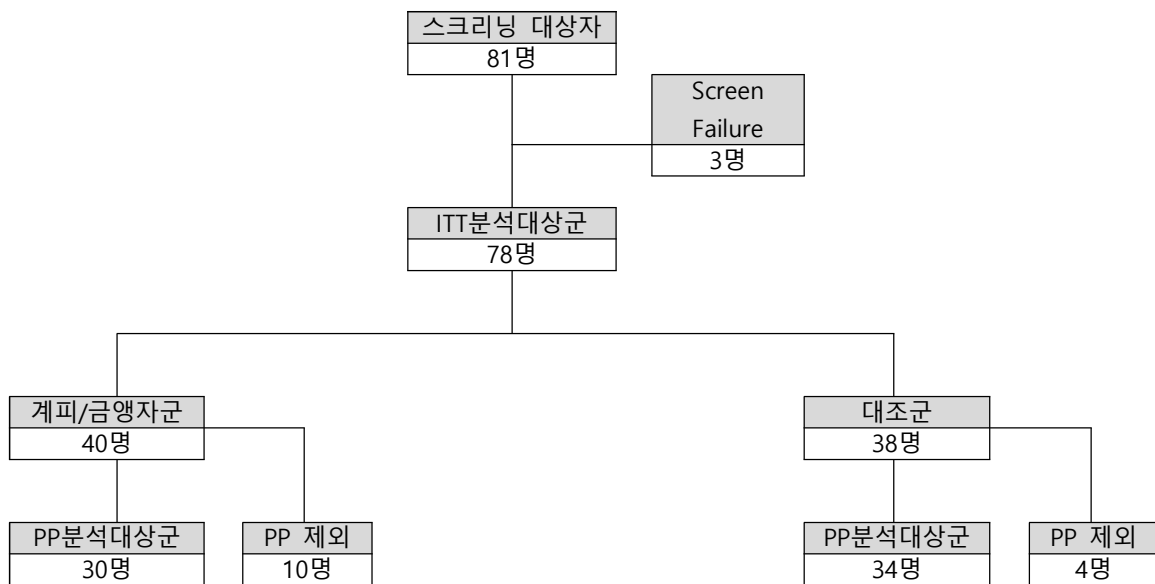
† visit1에서 실시하였을 경우 visit2에서는 생략 가능하다.

- 1) 스크리닝방문시 CERAD-K 중 MMSE-KC 만 시행하여 선정/제외기준 평가 후, 대상자 등록가능할 시 Baseline 에서 나머지 검사를 시행한다. 이때, Baseline 에서는 스크리닝시 실시한 MMSE-KC 결과를 활용할 수 있다.
- 2) **가톨릭대학교 성빈센트병원에 등록된 대상자(40 명에 한함)만으로 시행한다.**
- 3) 실험실적 검사의 항목은 다음과 같다.
 - ① 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT count, WBC differential count
 - ② 혈액화학적 검사: Fasting Glucose, ALT, AST, ALP, total bilirubin, albumin, BUN, γ-GTP, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-Cholesterol, Na, K, Cl,
 - ③ Fasting Insulin, TSH
 - ④ 소변검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, occult Blood, Urobilinogen, nitrate, WBC, RBC

3. 결과

가. 대상자

총 2개의 시험기관에서 81명의 인체적용시험대상자가 본 인체적용시험에 참여하여 스크리닝 검사를 받았고, baseline 방문에서 최종 적합성 평가를 통해 3명이 스크리닝 탈락되어 총 78명(계피/금앵자 추출물 복용군 40명, 대조군 38명)의 대상자가 무작위배정을 받았다. 무작위 배정된 78명 중 14명이 중도 탈락하여 총 64명(계피/금앵자 추출물 복용군 30명, 대조군 34명)의 시험대상자가 인체적용시험을 완료하였다.



[Table 1] 인체적용시험 참여 및 탈락 대상자 분포

	시험군	대조군	Total
스크리닝 모집된 대상자			81 (100.00%)
스크리닝 탈락			3 (3.70%)
ITT 분석 대상군	40 (49.38%)	38 (46.91%)	78 (96.30%)
PP 분석 대상군	30 (37.04%)	34 (41.98%)	64 (79.01%)
시험을 완료하지 못한 대상자	10 (12.35%)	4 (4.94%)	14 (17.28%)
탈락/위반 사유			
인체시험계획서 위반	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
추적실패	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
병용금지 약물 복용	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
이상반응/ 중대한 이상반응	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
동의철회	5 (6.17%)	3 (3.70%)	8 (9.88%)
복용순응도 80% 미만	5 (6.17%)	1 (1.23%)	6 (7.41%)
기타	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)

나. 인구학적 조사 및 신체계측

인체적용시험대상자의 평균연령(±SD)은 계피/금앵자 복용군에서 65.10세(±6.85)였고, 대조군은 64.92세(±6.31)였다. 남자는 계피/금앵자 복용군, 대조군에서 각각 8명(20.00%), 12명(31.58%)이었으며, 평균 교육년수는 시험군에서 12.95년(±3.84), 대조군에서 12.00년(±3.30)이었다. 음주여부, 알코올 섭취량 및 섭취빈도, 흡연량 등 조사된 모든 인구학적 요인에서 복용군간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 수축기/이완기 혈압, 맥박, 호흡수, 체온, 키 및 체중 변수에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

[Table 2] 인구학적 정보: Baseline characteristics

		시험군	대조군	p-value
ITT		40	38	
연령	Mean	65.10	64.92	0.9049 ¹⁾
	SD	6.85	6.31	
	Median	64.50	64.50	
	Min	51.00	54.00	
	Max	78.00	79.00	
성별	남자	8 (20.00%)	12 (31.58%)	0.2418 ²⁾
	여자	32 (80.00%)	26 (68.42%)	
교육년수	Mean	12.95	12.00	0.3256 ³⁾
	SD	3.84	3.30	
	Median	12.00	12.00	
	Min	6.00	6.00	
	Max	20.00	18.00	

1) Independent t-test
 2) Chi-square test
 3) Wilcoxon's rank sum test

다. 1차 유효성 평가

(1) 기저 시점 대비 12주 후의 CERAD-K 변화량

ITT 분석 대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CERAD-K 총점 I의 변화량은 계피/금앵자 복용군의 경우 5.43 ± 6.01 점 증가 (p < 0.001), 대조군의 경우 5.37 ± 5.42 점이 증가 (p < 0.001)하였지만 복용군간 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. CERAD-K 총점 II의 변화량은 계피/금앵자복용군의 경우 6.10 ± 6.54 점 증가 (p < 0.001), 대조군의 경우 5.37 ± 5.55 점이 증가 (p < 0.001)하였지만 두군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. CERAD-K 항목별 점수 변화량을 보면, 언어유창성, 보스톤 이름대기, 간이정신상태(MMSE-KC), 단어목록기억, 구성행동, 단어목록회상, 단어목록재인, 구성회상, 길만들기 검사, 스트룹검사(단어, 색깔) 등 모든 세부검사 항목에서 복용군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

ITT		시험군	대조군	p-value ^(a)	ANCOVA	
		40	38			
CERAD-K 총점 I (점수 = J1 + J2 + J4 + J5 + J6 + J7)						
Baseline	Mean	77.93	75.58	0.1842		
	SD	7.06	8.38			
	Median	77.50	76.00			
	Min	56.00	57.00			
	Max	92.00	93.00			
12W	Mean	83.35	80.95	0.2341		
	SD	8.29	9.39			
	Median	83.00	81.00			
	Min	62.00	58.00			
	Max	104.00	102.00			
	Difference vs. Baseline	5.43 ± 6.01	5.37 ± 5.42	0.8332 ³⁾	0.8432	
	p-value ^(b)	<.0001 ²⁾ *	<.0001 ²⁾ *			
총점 II (점수 = J1 + J2 + J4 + J5 + J6 + J7 + J8)						
Baseline	Mean	86.83	84.53	0.2657		
	SD	8.52	9.58			
	Median	87.50	84.50			
	Min	61.00	63.00			
	Max	102.00	104.00			
12W	Mean	92.93	89.89	0.1757		
	SD	9.31	10.27			
	Median	93.00	90.00			
	Min	72.00	63.00			
	Max	115.00	110.00			
	Difference vs. Baseline	6.10 ± 6.54	5.37 ± 5.55	0.7070 ³⁾	0.4791	
	p-value ^(b)	<.0001 ²⁾ *	<.0001 ²⁾ *			

		시험군	대조군	p-value ^(a)	ANCOVA ¹⁾	ANCOVA ²⁾	
언어유창성	Baseline	Mean	16.20	14.32	0.0188 ¹⁾		
		SD	3.53	3.39			
	12W	Mean	17.20	16.61	0.3032 ³⁾		
		SD	4.24	4.82			
		Difference vs. Baseline	1.00 ± 3.56	2.29 ± 3.87			
보스톤이름대기	Baseline	Mean	12.33	12.13	0.9267 ³⁾		
		SD	1.38	2.00			
	12W	Mean	12.88	12.34	0.2786 ³⁾		
		SD	1.60	2.03			
		Difference vs. Baseline	0.55 ± 1.11	0.21 ± 1.02			
간이 정신상태	Baseline	Mean	26.10	26.42	0.0855 ³⁾		
		SD	0.98	0.95			
	12W	Mean	27.58	28.08	0.1790 ³⁾		
		SD	1.68	1.44			
		Difference vs. Baseline	1.48 ± 1.72	1.66 ± 1.38			
단어목록기억	Baseline	Mean	21.38	21.61	0.9001 ³⁾		
		SD	3.36	3.86			
	12W	Mean	24.23	23.66	0.4397		
		SD	2.96	3.48			
		Difference vs. Baseline	2.85 ± 3.11	2.05 ± 3.08			
구성행동	Baseline	Mean	10.73	10.71	0.7539 ³⁾		
		SD	0.51	0.65			
	12W	Mean	10.88	10.74	0.2860 ³⁾		
		SD	0.40	0.64			
		Difference vs. Baseline	0.15 ± 0.53	0.03 ± 0.59			

단어목록회상	Baseline	Mean	7.70	7.45	0.4997 ³⁾		
		SD	1.42	1.55			
	12W	Mean	8.25	8.18	0.9510 ³⁾		
		SD	1.48	1.61			
		Difference vs. Baseline	0.55 ± 1.38	0.74 ± 1.55	0.4448 ³⁾	0.8052	0.7237
단어목록재인	Baseline	Mean	9.60	9.37	0.2991 ³⁾		
		SD	0.63	0.91			
	12W	Mean	9.93	9.66	0.0808 ³⁾		
		SD	0.27	0.85			
		Difference vs. Baseline	0.33 ± 0.66	0.29 ± 0.77	0.7070 ³⁾	0.1628	0.1929
구성회상	Baseline	Mean	8.90	8.95	0.9668 ³⁾		
		SD	2.34	2.12			
	12W	Mean	9.58	8.95	0.1176 ³⁾		
		SD	2.09	2.16			
		Difference vs. Baseline	0.68 ± 2.20	0.00 ± 2.00	0.1395 ³⁾	0.1152	0.1471
길만들기검사_A	Baseline	Mean	62.23	59.76	0.7301 ³⁾		
		SD	32.52	22.15			
	12W	Mean	50.78	49.53	0.7638		
		SD	18.33	18.23			
		Difference vs. Baseline	-11.45 ± 25.21	-10.24 ± 16.84	0.6379 ³⁾	0.9451	0.6081
길만들기검사_B	Baseline	N	35	32			
		Mean	168.49	147.97	0.4551 ³⁾		
		SD	79.08	53.21			
		Median	144.00	142.50			
		Min	49.00	60.00			
	12W	N	38	34			
		Mean	136.84	143.00	0.7521 ³⁾		
		SD	55.55	66.27			
		Difference vs. Baseline	-35.94 ± 64.33	-10.53 ± 45.03	0.0641	0.1747	0.3876
스트룹검사 단어	Baseline	Mean	71.75	72.84	0.7642		
		SD	16.73	15.23			
	12W	Mean	75.98	74.24	0.6431		
		SD	16.62	16.35			
		Difference vs. Baseline	4.23 ± 12.86	1.39 ± 8.59	0.2402 ³⁾	0.2794	0.4183
스트룹검사 색깔	Baseline	Mean	60.55	58.53	0.6927 ³⁾		
		SD	12.25	14.47			
	12W	Mean	62.78	60.47	0.6311 ³⁾		
		SD	12.81	15.07			
		Difference vs. Baseline	2.23 ± 7.61	1.95 ± 7.51	0.8609 ³⁾	0.7632	0.9283
스트룹검사 색깔단어	Baseline	Mean	35.43	34.63	0.7612		
		SD	12.23	10.65			
	12W	Mean	39.10	36.68	0.3201		
		SD	10.59	10.72			
		Difference vs. Baseline	3.68 ± 9.19	2.05 ± 5.99	0.5610 ³⁾	0.2473	0.2752
		p-value ^(b)	0.0052 ²⁾ *	0.0413*			

라. 2차 유효성 평가

(1) 기저 시점 대비 12주 후의 CDR 변화량

ITT 분석대상군 78명을 대상으로 기저시점 대비 12주 후의 CDR 결과의 변화량은 0점으로 통계적 산출은 적용되지 않았으며, 모든 대상자가 기저 시점에서 0점이었으며, 12주후 측정에서도 0점으로 악화된 대상자는 관찰되지 않았다.

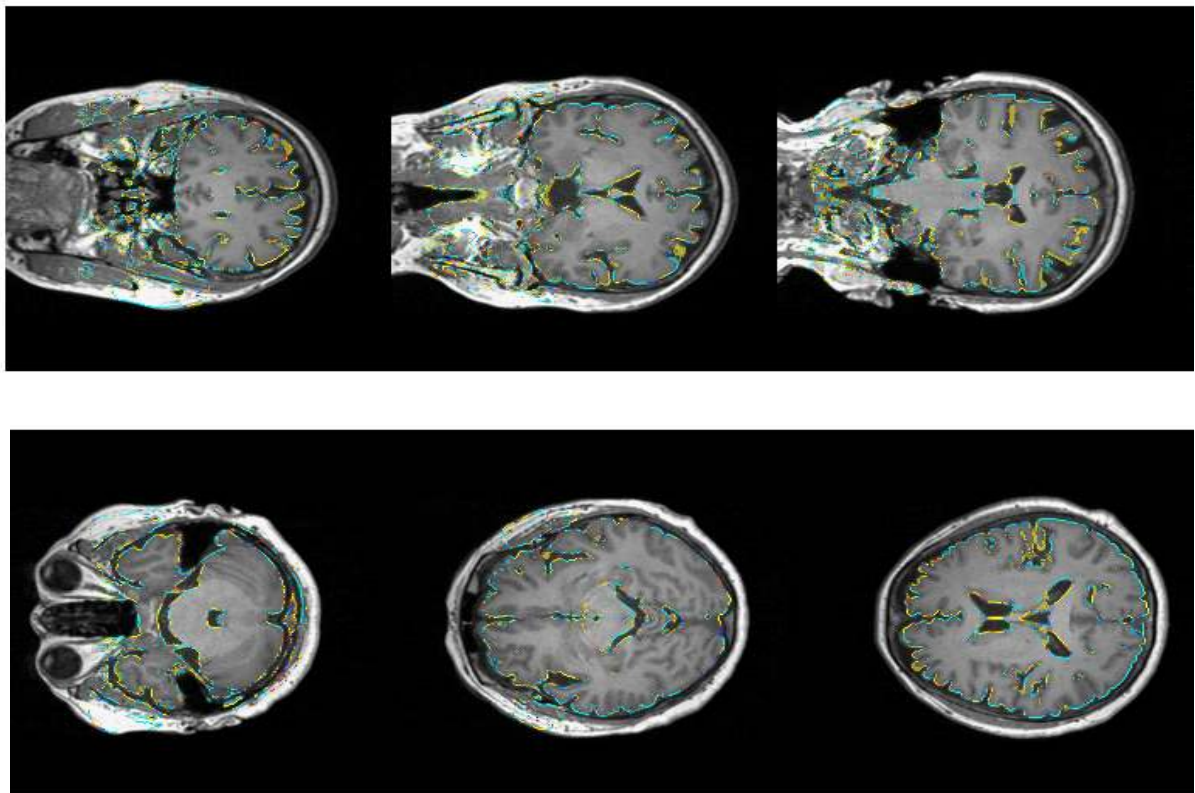
(2) 기저 시점 대비 12주 후의 뇌 영상 변화

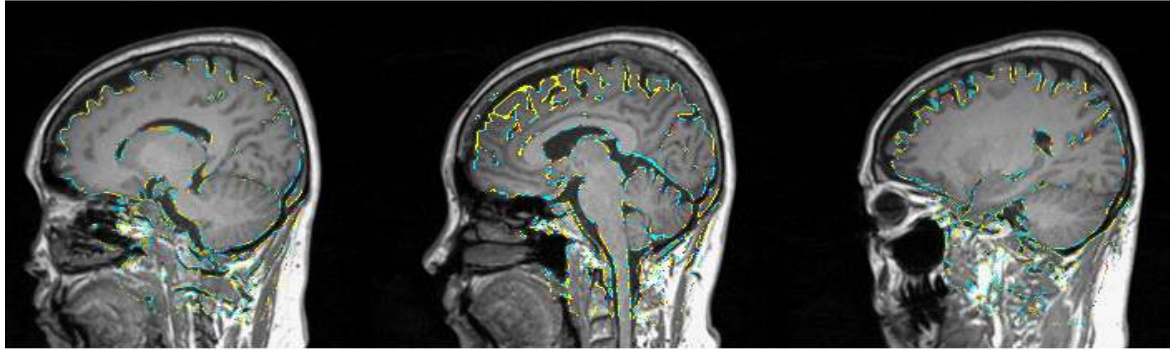
구조적 MRI 분석을 통해 관련 영역의 해부학적 정량을 측정한 결과 대조군에서 계피/금영자 복용군 보다 뇌용적이 더 크게 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다(PBVC - 0.48±0.715 vs -0.64±1.656, p=0.739).

	시험군 (n=14)		대조군 (n=19)		p	95% 신뢰구간	
	평균	표준편차	평균	표준편차			
AREA	269951.86	44622.078	286875.11	61094.963	.387	-56284.597	22438.101
VOLC	-1654.06	3686.681	-4318.77	8640.472	.288	-2366.342	7695.778
RATIO	-.01	.016	-.01	.029	.585	-.013	.022
PBVC	-.38	.817	-.79	1.738	.422	-.616	1.433
AREA1	271420.21	45150.235	283370.58	39104.602	.423	-41939.490	18038.760
VOLC1	-5231.94	3548.243	6044.65	71679.874	.562	-50548.262	27995.067
RATIO1	-.02	.011	-.03	.041	.183	-.008	.039
PBVC1	-1.34	.863	-2.06	2.447	.297	-.671	2.125
final PBVC	-.48	.715	-.64	1.656	.739	-.806	1.125

Final brain edge movement image

atrophy  0  "growth"





마. 안전성 평가

ITT 분석 대상군 78명 중 17명(21.79%)에서 총 28 건의 이상약물반응이 발생하였으며 복용 군별로는 계피/금앵자 복용군 10명(25.00%), 대조군 7명(18.42%)이었고, 이상약물반응이 발생한 시험 대상자의 비율에 대한 복용군 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p = 0.4818$). 이상약물반응의 중증도로 구분하였을 때 경증이 25건, 중등증은 3건, 중증은 발생하지 않았으며, 사망을 포함한 중대한 이상약물반응은 보고되지 않았다. 인체적용시험용 식품의 영구중단을 초래한 이상약물반응은 시험군에서 위장장애를 호소한 1건으로 중증은 아니었으며 복용 중단 후 완전 회복되었다.

바. 고찰

본 임상시험은 경증의 인지기능장애를 가진 대상자에서 계피/금앵자 추출물을 복용했을 때 인지기능 개선에 있어 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 실시되었다. 기저시점 대비 12주 후의 인지기능의 평균변화량은 계피/금앵자 추출물 복용군, 대조군 모두에서 증가하였으나 복용군간의 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 치매척도(CDR) 및 뇌영상으로 분석한 뇌용적의 변화량도 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상반응으로 살펴 본 시험제품의 안전성은 대조군과 비교하여 안전한 것으로 판단된다. 임상시험 기간동안 중대한 이상반응은 관찰되지 않았으며, 이상반응의 대부분이 경증으로 대조군과 비교하여 통계적 차이를 보이지 않았다.

[사본]

성빈센트병원 임상연구심사위원회(VCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (162 - 47) 경기도 수원시 팔달구 중부대로 93

담당자 : 정세민

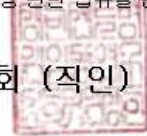
문서번호	CIRB-00093-014	시행일	2015-10-13
연구제목	인지능 개선에 미치는 계피/금앵자 추출물의 유효성 및 안전성 평가를 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중 맹검, 위약 대조 인체적용시험		
과제번호	XC15HNME0077V		
시험책임자	소속	가정의학과	이름 송상욱
지원기관	(주)메디칼엑셀런스		
심의대상	보완답변서		
연구대상	건강식품		
심의일	2015-10-13		
심의결과	승인	심사결과가 "승인" 일 경우, 연구의 개시가 가능합니다. 심사결과가 "시정후승인" 일 경우, 1개월 이내에 보완답변서를 제출하여 주십시오. 보완답변서는 신속심사에서 심사됩니다. 심사결과가 "보완" 일 경우, 3개월 이내에 보완답변서를 제출하여 주십시오. 보완답변서는 정규심사에서 심사됩니다.	
연구승인유효기간	2017-10-12	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 득 하십시오. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.	
심의내역			
심의내용	보완답변서 진행례수 : 0		
심의 의견	- 기타 : 1. 임상연구 심의 보완 답변서 성빈센트 2. 농림부-인지기능개선과제_Protocol_Ver1.1_20150911_Clean 3. 농림부-인지기능개선과제_CRF_Ver1.1_20150902_Clean 4. 이해상충신고서_정원삼_교수님 5- 1. 농림부-인지기능개선과제_보완답변서_20150911 5- 2. 농림부-인지기능개선과제_변경 대비표_20150911		

[사본]

성빈센트병원 임상연구심사위원회(VCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

- * 귀하가 신청하신 심의안건에 대하여 본 임상연구심사위원회의 심의결과를 위와 같이 알려드립니다.
- * 시험 책임자는 IRB 심의 결과에 미의가 있는 경우 IRB 통보일로부터 2주 이내에 서면으로 미의 사유를 기록하여 미의를 제기할 수 있습니다. 단, 동일 사항에 대하여 2회 연속으로 미의신청을 할 수 없습니다.
- * 본 임상연구심의위원회는 KGCP 및 ICH-GCP 규정을 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련 법규를 준수합니다.

가톨릭대학교 성빈센트병원 임상연구심사위원회 (직인)



가톨릭대학교 성빈센트병원장



연구자의 임상시험/연구 수행시 지켜야 할 사항

1. 위원회의 승인을 받은 계획서에 따라 연구를 수행하십시오.
2. 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전승인을 받고 수행하십시오. 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 응급사항에 서의 변경도 즉각 위원회에 보고 해야합니다.
3. 위원회의 승인을 받은 연구대상자 동의서를 사용하십시오.
4. 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회 승인을 받아야 합니다.
5. 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거한 동의 과정을 수행할 것이며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에의 참여여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공해야 합니다.
6. 연구대상자 모집광고는 사용 전에 위원회로부터 승인을 득한 후 사용해야 합니다.
7. 위원회에서 승인된 계획서에 따라 등록된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 부작용에 대하여는 위원회에 서면으로 보고해야 합니다.
8. 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출해 주시기 바랍니다.
9. 임상시험 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고해야 합니다.
10. 초기심의회서 승인된 연구의 지속을 위해서는 연구승인유효기간 이내에 지속심의를 신청하여 승인을 득해야 합니다.
11. 임상시험이 종료(조기종료를 포함한다)된 경우, 연구종료 요약자료와 함께 임상시험 종료 사설을 서식 FI-10-02 임상연구종료보고서에 따라 위원회에 보고하여야 합니다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	코드번호	D-06
4-1. 목표달성도 <input type="radio"/>		
4-2. 관련분야 기여도 <input type="radio"/>		

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
--	------	------

○ 사업화계획

1. 생산 계획

구분		(2018년) 개발 종료 후 1년	(2019년) 개발 종료 후 2년	(2020년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	5%	12%	20%
	판매량(단위:개)	판매량(단위: 8,000개)	판매량(단위: 16,000개)	판매량(단위: 24,000개)
	판매단가(원)	120,000원/20,000원	120,000원/20,000원	120,000원/20,000원
	국내매출액(백만원)	500	1,000	1,500
해 외	시장점유율(%)	0.5%	1.2%	2%
	판매량(단위:개)	판매량(단위: 12,000개)	판매량(단위: 24,000개)	판매량(단위: 36,000개)
	판매단가(\$)	107.70/17.95	107.70/17.95	107.70/17.95
	해외매출액(백만\$)	0.67	1.34	2.01
당사 생산능력1)		100,000	190,000	400,000

2. 투자 계획

(단위 : 백만원)

항목		(2018년) 개발 종료 후 1년	(2019년) 개발 종료 후 2년	(2020년) 개발 종료 후 3년
매출원가1)		1,100	3,300	6,600
판매관리비2)		825	2475	4950
자본적 지출	토지			
	건물/구축물			
	기계장치등	500	1000	2000
자본적지출 합계		500	1000	2000

3. 사업화 전략

: 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략

가. 주관((주)네추럴웨이)

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : PTP 정제 및 일반식품 ○ 수요처 : 홈쇼핑, 주요 백화점 및 대형마트 ○ 예상 단가 : 120,000원/20,000원 ○ 개발 투입인력 및 기간 : 개발 투입인력 4명, 기간 6개월
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자체 공장을 통한 제품생산 및 품질관리 ○ 분말의 수용성, 유동성, 균질도 등을 최적화 시키는 과립제조와 미세분말 및 펠렛(Seed)의 분말표면코팅 기술력 확보 ○ 중량, 체적 등 기준규격을 세밀하게 생산 ○ 롤러커팅식 자동 제환기를 이용하여 경질소환, 대환 등이 생산 가능 ○ 이중캡충진기, 스틱포장기, PTP포장기, 사면포장기, 삼면포장기, 이열포장기, 로타리파우치포장기 확보
상용화 계획 및 일정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이론값, 보정값, 실칭량값 넣은 후 원료 성적 및 각 원료의 대장균 및 일반세균 측정: 2017년 3/4분기 ○ 시제품 제작: 2017년 4/4분기 ○ 제품 판매 개시: 2018년도 1/4분기

나. 계피금앵자 사업화 전략

1. 계피금앵자 MKTG 전략

	Phase I		Phase II		Phase III		Phase IV
	Diagnosis	Research	Hit Idea & Concept Creation	Concept Evolution	STP Strategy	Launching Strategy	Coaching & Advisory
초기 목표	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출		"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출		"STP 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 포괄적이고 효과적인 런칭전략		내부 실행력 강화 공감대 형성
리더쉽/파트너쉽	<ul style="list-style-type: none"> • Triangle Work Shop™ • Pest Analysis • SMC.C Model™ • Chance Recheck™ 		<ul style="list-style-type: none"> • Seri-Coig™ • E2 balance™ • Value Transfer™ • USP Logic Trip™ • Concept Evaluation Process™ 		<ul style="list-style-type: none"> • 2 way Segmentation • Target Pincette™ • Positioning Cascading™ • UPP 13way™ • MISF™, S-Big Picture • IMC™, TTL Communication 		<ul style="list-style-type: none"> • Coaching & Advisory • Education
조사	<ul style="list-style-type: none"> • U&A 조사 (On-line) • 전문가 Depth Interview (Delphi) 		<ul style="list-style-type: none"> • 1차 Test : 형성조사 FGD • 2차 Test : Concept & Product Test (HUT) 		<ul style="list-style-type: none"> • Survey Data Analysis 		-
비즈니스 모델 수립	<ul style="list-style-type: none"> • Internal Interview - Project Needs 청취 • Data Research - 2차 자료 조사 - 시장사입구조 분석 • 사업 전략 리부 - 내부 전략의 주안점 - 기존 전략에 대한 평가 • Quick & Core FGD • Triangle Work Shop 		<ul style="list-style-type: none"> • Hit Idea 개발 - Seri Profiling - Key Hit Point 도출 및 적용 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening • Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발 • Concept 검증 및 정교화 - 조사설계 및 조사 진행 - 조사분석 		<ul style="list-style-type: none"> • STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출 - 기존 속면 수면, 기능성 제품들과의 차별화가 가능한 positioning 수립 - 컨셉 시장 수요 예측 • 4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정 • 런칭 전략 및 실행 프로그램 설계 • BTL Communication 전략 설계 		

2. 계피금앵자 상품화 전략

2-1. 내용물 개발

- 사용원료의 인허가
- 제형 및 음용방법 결정 및 처방확정

2-2. 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test (HUT 조사 : Home Using Test)

3. 계피금앵자 런칭 전략

- 가격 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 관측물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

4. 계피금앵자 유통 전략

4-1. 국내 유통

- 친환경 식품 전문점 (초록마을, 올가홀 푸드 등과 같은 친환경 식품전문 판매점 입점)
- 대형마트 입점 (하나로 마트, 홈플러스, 이마트 등의 대형마트 입점)
- 자가 방문판매 조직을 통한 판매 (자사 방문판매 법인인 엘파인을 통해 신제품 및 기존 제품에 부원료로 활용하는 방안을 통한 건강기능식품 개발 및 판매)
- 소셜커머스 및 온라인 (온라인 쇼핑몰 입점 및 소셜커머스를 통한 판매)
- 타사 프로모션 (타사 제품의 프로모션용 제품으로 OEM, ODM 형식의 납품)



4-2. 해외 유통

- 베트남 현지 유통회사를 통한 해외 유통시장 진출 (현재 계피가 들어간 음료 브랜드 개발을 진행 중에 있으며 계피가 함유된 음료판매는 현지에서 월 1만병 판매되고 있음)
- 정부산하기관의 중소기업 수출 프로그램 등을 적극 활용하여 주기적인 바이어 발굴을 통한 유통



5. 제품 디자인 예시

5-1. 일반 음료 식품



가칭 “한방에우린”은 일상의 스트레스 해소와 건강한 정신을 위한 생활비법 차를 지향한다. 향료나 색소를 전혀 섞지 않고 전통원료 그대로 깔끔하게 우려낼 예정이며 ‘한방에다린 계피차’는 편안한 마음의 휴식을 위한 차로 계피, 당귀 등을 원료로 사용할 예정이며, ‘한방에우린 금앵자 차’는 기운찬 하루를 위한 제품으로 금앵자, 계피, 대추, 인삼 등을 우려냈다. ‘한방에우린 차’는 스마트한 하루를 위한 차로 계피, 금앵자, 황금, 구기자, 대추 등을 원료로 사용할 예정. 패키지는 각 제품의 특징과 효능을 재미있는 일러스트와 대화체로 풀어내 친근감을 높일 수 있는 제품개발 예정.

5-2. 건강기능식품



관절건강에 도움을 줄 수 있는 MSM + 계피+금앵자 (실버건식)관절건강에 효과적인 MSM에 동의보감유래의 **계피**(간이나 폐의 기를 고르게 하며 온갖 약기운을 고루 잘 퍼지게 한다.)와 **금앵자**(모든 새는것(방설,防泄)을 단속하는 작용이 강하다고 하여 야노증과 유정, 빈뇨 환자들에게 처방되었다)를 처방한 어르신들을 위한 실버제품 개발



인지능력개선에 도움을줄수 있는 참당귀 + 계피+ 금앵자 (실버건식)인지능력 개선에 효과적인 **참당귀**에 동의보감유래의 **계피**(간이나 폐의 기를 고르게 하며 온갖 약기운을 고루 잘 퍼지게 한다.)와 **금앵자**(모든 새는것(방설,防泄)을 단속하는 작용이 강하다고 하여 야노증과 유정, 빈뇨 환자들에게 처방되었다)를 처방한 어르신들을 위한 실버제품 개발

4. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 수립 배경

건강기능식품의 경우 치매 예방이나 치료보다는 뇌기능의 개선 및 강화와 관련된 제품이 다수이고 약 500억 원 규모의 시장이 형성되어 있다. 이에, 치매 관련 치료 의약품 및 뇌기능 개선관련 건강기능식품의 국내시장 총규모는 약 2,000억 원 규모로 추정할 수 있으나, 향후 시장의 수요는 급속히 증가할 것으로 예상된다. 그 이유는 노인 장기요양보험의 실시로 치매환자에 대한 적극적인 치료가 확대되고 있고, 이는 시장의 수요로 연결될 것으로 판단된다. 이와 같은 예상은 한국치매가족협회가 국민건강보험공단이 전국의료 기관에서 진료를 받은 치매환자 609명의 보호자 등을 대상으로 설문 조사를 통해 발간한 '치매환자의 사회·경제적 비용 보고서(2007)'를 분석한 결과 보고서(2008)에서 근거를 찾을 수 있다. 치매환자 1인당 연평균 의료비는 507만3000여원, 교통비·식비·간병비·보조용품 구입비·대체 의료 사용비 등은 191만7000여원, 치매 환자 본인이나 부양자의 임금 손실액이 88만1000여원으로 집계되었다. 연평균 치매환자 비용은 치매에 걸린 지 1년 이내 714만7000여원, 1~2년 693만7000여원에서 2년 이상 915만3000여원으로 급속히 증가했다. 또 의료 기관에 입원하지 않는 치매환자의 경우 연평균 비용이 414만6000여원에 그쳤지만, 2~3개월 입원하면 1,303만1,000여원, 4~6개월 입원하면 1,927만여 원, 7개월 이상 장기 입원자는 3,060만여 원이 드는 것으로 조사됐다. 보고서는 2008년도 기준 치매환자수가 전체노인의 8.3%인 약36만 명이며 비 노인층 환자까지 포함하면 최대 56만 명에 달하는 것으로 추산했다. 이에 따라 치매로 인한 총비용은 연간 3조4000억~4조4000억 원 정도가 소요된다고 분석했다. 이러한 치매 치료 비용이 부담되어 그동안 치료에 적극적으로 참여하지 않았으나, 노인 장기요양보험의 실시로 환자가 가족의 부담이 경감됨에 따라 향후에는 치료뿐만 아니라 예방에도 많은 관심을 갖게 될 것이며, 이는 뇌기능 보호 건강기능식품 또는 예방 의약품의 수요로 연결될 것이다.

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

식용자원인 천연자원으로부터 탐색하고 이를 의약, 식품의약 및 건강기능식품의 원료로 소재화함에 있어 최종물질의 안전성을 확보, 의약품 및 건강기능식품 소재로 실용화될 확률을 높이고자 하며, 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안으로 식용식물자원을 대상으로 신 물질을 탐색 후 개발하고자 하며, 소재의 출처 상 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 화학적인 합성에 의한 물질들보다 안전성의 확보가 용이할 것으로 예상하고 있으며 그만큼 제품화 하는데 부담이 감소될 수 있도록 개발을 추진할 계획임.

(2) 핵심경쟁요인

계속되는 노인성 질환, 치매에 대한 연구에도 불구하고, 아직까지 완전하게 치매를 치료할 방법이나 제약은 개발되어 있지 않다. 다만 병이 더 이상 진행되지 않도록 정신 기능을 담당하고 있는 뇌세포에 혈액 순환을 원활하게 하고 기억력을 향상시킬 수 있는 약물 또는 영양소를 공급하여 자신이 누구인지 자신의 힘으로 최소한의 생활을 영위할 수 있게 하는 것이 지금으로선 최선의 치료 방법이라 할 수 있겠다. 최근 연구동향은 Aβ에 의한 뇌신경세포 보호물질을 찾거나 ChAT의 활성화 또는 AChE의 억제제를 통한 신호전달성분의 수준을 높이는 방향으로 많이 연구되어지고 있다. 국내에서는 천연물 및 한약재가 치료제로 개발되고 있으며, 이러한 개발물질은 국내뿐 아니라 유

럽 및 미국에서도 사용되고 있다. 실질적인 예로 은행잎 추출물은 유럽에서 뇌일혈 환자의 회복 및 치매병 치료에 효과가 있다고 여러 연구 기관에서 보고하고 있고, 현재 사용 중에 있다. 이러한 시점에서 원광대학교 연구팀이 개발한 치매단은 생약 성분으로 간독성이 나타나지 않았으며 그 밖에 어지럼증, 떨림증, 구토증 등과 같은 부작용이 전혀 나타나지 않기 때문에 조기 치료 및 예방 약품으로 매우 가치 있는 것으로 판단된다. 또한 국내 건강기능식품 및 의약품에 사용될 신소재 개발 산업은 전반적으로 기술수준이 주요 선진국에 비해 절반정도의 수준에 머물러 있고, 치매관련 의약품은 전량 수입에 의존하거나, 비싼 기술 로열티를 지불하고 국내에 공급하는 실정이다. 그러나 정부의 뇌 과학 육성을 위한 적극적인 지원과 우수한 인력자원을 보유하고 있는 점은 향후 발전 가능성을 높이는 장점으로 인정된다. 앞으로 이러한 약품이나 건강기능 식품의 일반적 보급이 시급하며 더욱더 개발하여, 수출할 수 있는 정도의 수준이 되면 국가 경제적으로도 많은 도움이 될 것이다.

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황 및 경쟁구조

현재 판매되고 있는 ChEIs는 알츠하이머병에서 인식된 신경전달물질인 아세틸콜린(ACh)의 분해를 방지하여 뇌 내의 ACh량을 증가시키는 것으로 FDA에서 허가된 약품은 Cognex 와 Aricept 두 종류이다. Cognex(성분명은 tarcrine)의 경우 치매 병이 초기 및 중간 단계의 환자들에게 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 그 부작용이 너무 심해 떨림증, 현기증, 구토증, 간독성 등은 우려할 만한 부작용으로 알려져 있다. 효능과 부작용에서 개선된 새로운 제품으로 1996년에 일본의 Eisai사가 개발한 Aricept(성분명은 donepezil) 제품이 시판되었으며 이 제품은 Cognex 보다 훨씬 선택성이 우수하여 부작용이 적어졌으나 이 제품 역시 현기증, 구토증, 설사 등의 부작용이 있다고 보고되고 있고 미국을 비롯한 55개국 이상에서 판매되는 대표적인 치매 치료제로서 연간 10조원 이상의 매출을 기록하고 있다. 이 계통의 새로운 제약들이 개발, 최종 단계에 들어 있는 것으로 베이어제약에서 Metrifonate라는 제품과 Sandon에서 END-713, Forest사의 physostigmine SR, Astra Arcus사의 NXX-066, Janssen사의 galanthamine 등이 있다. 그밖에 뇌신경전달물질인 아세틸콜린 양을 증가시키는 제약으로 개발중인 약품으로는 Eli Lilly사의 Xanomeline, Parke-Davis 사 제품인 milameline, Smithkline Beecham 사의 SB-202026, Suow Brand producto사의 AF-102B와 Abbott사의 ABT-418등이 개발되고 있는 실정이다. 또한 최근 피부에 붙이는 패취형 치매 치료제가 나왔는데, 노바티스의 엑셀론 패취이다. 엑셀론 패취는 콜린분해효소억제제 계열의 약물로 뇌의 신경전달물질인 아세틸콜린의 활성을 증가시키는 작용을 한다. 전문의약품으로 의사 처방을 받아 사용할 수 있으며 1일 1회 1매씩 허리, 등이나 팔뚝 등에 부착하도록 되어 있다. 하지만 아직까지 ChAT를 활성화 시켜주는 연구는 genetic approach에 한해서 국내 연구진에서도 비교적 활발히 이루어지고 있는 반면, 개발된 신소재나 drug은 현재 전무한 실정이다.

(2) 시장진입 장벽

뇌기능 개선을 위한 제품으로서 대표적으로 대두 포스파티딜세린과 누에고치 추출물인 피브로인 추출물, 그리고 DHA 제품이 판매되고 있다. DHA는 뇌의 중요 구성성분이라는 점에서 두뇌에 영양공급을 한다는 기능성 표시가 허용되어 있다. 따라서, 평가신청 기술인 계피와 금앵자를 이용한 퇴행성 뇌질환, 특히 알츠하이머에 대한 예방 및 치료개선 건강기능식품 분야는 개발완료 후 사업

화 시 강력한 시장지배자가 존재하지 않으며 본과제를 포함한 소수의 경쟁자가 적절하게 시장을 분할할 것으로 예상된다.

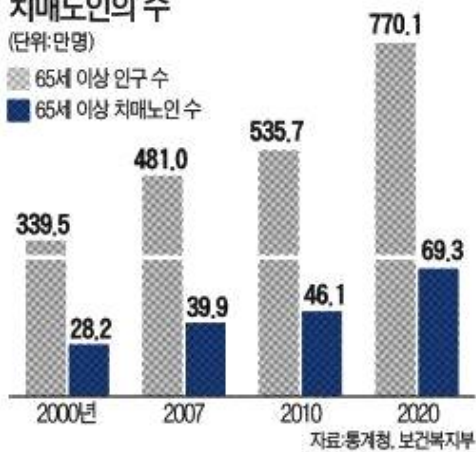
라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

치매노인의 수

(단위:만명)

65세 이상 인구수
65세 이상 치매노인수



보건복지부 자료에 따르면 지난해 65세 이상 노인 치매 환자는 47만여명으로 유병률이 8.8%에 이른다. 2005년 35만2200명(8.07%)이었던 치매 환자는 점차 증가해 2050년엔 200만명(13.17%)이 될 것으로 추정된다.

과제 종료 이후 제품화 시 노인성치매가 걸리는 주 대상 연령층을 고려해 부담 없이 마실 수 있는 차형태의 제품이나 섭취하기 편한 형태인 드링크, 캡슐 형 제품 개발을 검토하고 있음.

(2) BM의 수익창출 방안



--

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

○

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

○

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

<p>○ 실험실 정밀안전진단 실시</p> <p>1. 대상</p> <p>: 연구개발 활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실</p> <p>2. 실시</p> <p>가. 일상점검</p> <p>- 연구개발 활동에 사용되는 기계·기구·전기·약품·병원체 등의 보관상태 및 보호 장비 관리상태 등을 육안으로 실시하는 점검으로서 연구개발 활동을 시작하기 전에 매일 1회 실시</p> <p>나. 정기점검</p> <p>- 연구개발 활동에 사용되는 기계·기구·전기·약품·병원체 등의 보관상태 및 보호 장비 관리상태 등을 안전점검기기를 이용하여 실시하는 세부적인 점검으로서 매년 1회 이상 실시</p> <p>다. 특별안전점검</p> <p>- 폭발사고·화재사고 등 연구활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 실시하는 점검으로서 필요할 시에 실시</p> <p>○ 참여연구원의 안전교육 및 관리</p> <p>1. 개요</p> <p>: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구 활동에 기여하고, 또한 연구실 안전,환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계</p>
--

열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

2. 교육대상

: 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

3. 교육구분

가. 정기교육

- (1) 매년 2회 연구실 법정 안전교육 실시
- (2) 매월 1회 안전교육 수강 (고려대학교 안전관리팀 홈페이지 동영상 교육)

나. 비정기 임시교육:

- (1) 대상: 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
- (2) 방법: 고려대학교 안전관리팀 홈페이지 동영상 교육, 자료/유인물, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등

다. 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

○ 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
상해보험	사망, 후유장해 : 1억 원 이상 부상 : 1천만 원 이상 후유장해, 상해 등급별 정액 및 실손 보상	연구 활동종사자	안전관리팀

○ 추가 이행 실적

① 실험종사자 건강검진 및 보험 추가가입	1. 정기적인 건강검진 실시 2. 상해보험추가가입검토
② 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
③ 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행
④ 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화설비를 설치하여 사고 확산을 예방
⑤ 유기용매 보관시설 설치 및 액체질소 통합관리	1. 유기용매 보관창고에서 통합관리 2. 액체질소를 시약센터에서 통합관리
⑥ 실험실 환경안전지침 작성	매일 점검(화학물질, 고압가스) 매월 점검(매월 안전점검표 작성)
⑦ 고압가스 안전관리	안전시설 설치
⑧ 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치

10. 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/인 용횟수 등)
1	특허	계피 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물	고려대학교 산학협력단	출원인	대한민국		2015.10.15		
2	특허	계피추출물 및 금앵자 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물	고려대학교 세종산학협력단	출원인	대한민국		2016.12.26.		
3	논문	Characterization of Nutritional Composition Anti-oxidative Capacity, and Sensory Attributes of <i>Seomae</i> mugwort, a Native Korean Variety of <i>Artemisia argyi</i> H. Lev. & Vaniot	고려대학교	교신저자	<i>Journal of Analytical Methods in Chemistry</i>	0.948	2015.05.25	단독사사	SCI
4	논문	<i>Cinnamomum loureirii</i> Extract Inhibits Acetylcholinesterase Activity and Ameliorates Trimethyltin-Induced Cognitive Dysfunction in Mice	고려대학교	교신저자	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>	1.547	2016.03.31	단독사사	SCI
5	논문	2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol from <i>Cinnamomum loureirii</i> Improves Cognitive Deficit, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Damage in TMT-Treated Mice	고려대학교	교신저자	<i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>	1.828	2017.03.17	단독사사	SCI

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"> 1) 65세 이상 치매환자 및 치매 관리 비용 (보건복지부, 2012) 2) 30~50대 치매환자 연도별 증가 현황 (국민건강보험공단, 2012년) 3) 주요 사망원인 질병의 퍼센트 변화 (미국, 2000~2008년) 4) 알츠하이머병과 그 밖의 질병의 노인의료보험금 지급 평균액 비교 (미국, Medicare Current Beneficiary Survey, 2009) 5) 알츠하이머를 포함한 기타 뇌질환과 그 밖의 질병의 의료비용 비교 (미국, Medicare Current Beneficiary Survey, 2009) 6) 2007년도 치매 치료약(아리셉트) 생산액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 7) 2007년도 뇌졸중 치료약 (플라빅스) 매출액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 8) 2007년도 중추신경계용 의약품 생산액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 9) 주요 제약회사의 치료 범위별 R&D 프로젝트 포트폴리오 (출처: "Strategic Perspectives 2005 : CNS Market and Pipeline Overview", Datamonitor, 2007) 10) 뇌 연구 관련 국내기업 현황 (출처: "BT 기술동향보고서, 국가생명공학정책연구센터, 2008) 11) 건강기능식품 주요 원료별 시장규모 동향 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 12) 기억력 및 인지능력 관련 개별인정형 기능성원료 현황 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 13) 2007년도 건강기능식품 매출액 (출처: 2008년도 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2008) 14) 뇌기능 개선 건강기능식품 매출액 추이 (출처: 식품의약품통계연보, 식품의약품안전청, 2006~2008년도) 15) 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년) (출처: "CNS Disorders - Current market landscape & dynamics", Business Insights, 2007) 16) 뇌·신경질환별 세계시장현황(2004~2005년) (출처: "CAGR - Compound Annual Growth Rate", Business Insights, 2007) 17) 뇌·신경질환별 세계시장 전망 (출처: "The CNS Market Outlook to 2010 - Health Care", Business Insights, 2007) 18) 뇌·신경질환별 세계시장 전망 (출처: "CAGR - Compound Annual Growth Rate of Market outlook to 2010", Business Insights, 2007) 19) 뇌·신경질환 관련 상위 10개사의 판매액(2004~2005년) (출처: "Top CNS Portfolios in 2005 - The Industry Gold Standards", Datamonitor, 2007) 		

8. 뒷면지

주 의

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