

3cm

11-
1543000
-002194
-01

4cm

발간등록번호
11-1543000-002194-01

황정을 이용한 수면 개선 건강기능식품 개발 최종보고서

2017
농림축산식품부

고부가가치식품 기술개발 사업 R&D Report

5cm

황정을 이용한 수면 개선 건강기능식품 개발 최종보고서

(0.1cm)

2018. 4. 2.

0.15cm

주관연구기관 / (주) 농심
협동연구기관 / 서울여자대학교
이화여자대학교

5cm

2cm

농림축산식품부

3cm

발간등록번호

11-1543000-002194-01

황정을 이용한 수면 개선 건강기능식품 개발

Development of health functional food
product related with improving sleep
using *polygonatum sibiricum*

(주) 농심

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “황정을 이용한 수면 개선 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016.07.07 ~ 2017.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 04. 2.

주관연구기관명 : ㈜ 농심

(대표자) 박준



협동연구기관명 : 서울여대산학협력단 (대표자)

류기현



협동참여기관명 : 이화여대산학협력단 (대표자)

오억수



주관연구책임자 : 김훈중

제1협동연구책임자 : 최현선

제2협동기관책임자 : 김지은

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116004-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2년	단 계 구 분	(총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	황정을 이용한 수면 개선 건강기능식품 개발			
연구책임자	김훈중	해당단계 참 여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 25명 내부: 25명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:350,000천원 민간:350,000천원 계:700,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)농심, R&D 부문 연구개발실			참여기업명 (주) 농심	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약 <ul style="list-style-type: none"> • 원료 품질 관련 지표성분 및 원료 표준화 방법 확립 • 수면증진 소재의 제조조건 최적화 • 건강기능식품 시제품 제형 개발 • 설치류를 이용한 황정 추출물의 수면증진 효과 분석 • 수면활성 기능성성분의 분리정제 및 물질 규명 • 분리 정제된 소재의 신경전달물질 수용체 (GABA_A 수용체) 결합력 확인 • 황정추출물의 수면활성 작용기작 규명 • 대조군 대비 AIS (불면 관련 설문)지표 유의적 개선 확인 • 황정 추출물 포함 시제품의 인체 적용 시 안전성 확인 				보고서 면수: 110	

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> • 수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산자원인 황정의 수면개선효과 및 작용기작을 동물실험 및 인체실험을 통해 과학적으로 규명하고자 함. • 이를 바탕으로 제조 조건의 최적화 및 수면 활성물질의 분리·동정 연구를 통하여 고부가가치의 수면증진 건강기능식품을 개발하고 출시하고자 함. 				
연구개발성과	<p>1. 황정 원료 품질 규격 설정과 생산공정 표준화 및 제형 개발 및 수면개선 기능 건강기능식품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 원료 품질 관련 지표성분 및 원료 표준화 방법 확립 • 수면증진 소재의 제조조건 최적화 • 건강기능식품 시제품 제형 개발 <p>2. 수면증진 소재의 효능 평가 및 작용기작 연구 (<i>in vitro/vivo</i> study)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 설치류를 이용한 황정 추출물의 수면증진 효과 분석 • 수면활성 기능성성분의 분리정제 및 물질 규명 • 분리 정제된 소재의 신경전달물질 수용체 (GABA_A 수용체) 결합력 확인 • 황정추출물의 수면활성 작용기작 규명 <p>3. 황정 추출물 시제품의 인체효능평가</p> <ul style="list-style-type: none"> • 대조군 대비 AIS (불면 관련 설문)지표 유의적 개선 확인 • Actigraphy 측정시 총 수면시간 대조군대비 유의적 증가 확인 • 황정 추출물 포함 시제품의 인체 적용 시 안전성 확인 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> • 차년도부터 개발된 실적을 바탕으로 식약처에 수면개선 기능 개별인정 확보를 위한 준비를 진행하고 있음. 이와 더불어 소비자 기호도에 맞는 시제품을 지속적으로 개발하여 건강기능식품 상품화를 준비할 예정임. • 국내 농산물을 활용한 천연물 유래 수면증진 소재 발굴 및 수면 활성물질 규명은 수면 관련 연구 분야 확대에 기폭제가 될 수 있으며, 관련된 인체실험은 수면개선 효능평가에 중요한 기준 프로토콜이 될 수 있음 • 최근 증가하고 있는 불면증 환자 및 수면에 불편함을 느끼는 인구에 비해 부작용 없는 수면개선 소재가 거의 없는 실정임. 본 연구과제를 통하여 증가하는 시장의 니즈에 부합하는 소재 및 제품을 개발하여 국내외 건강기능식품 시장 활성화와 수면시장 개척에 이바지 할 수 있을 것으로 생각됨. 				
중심어 (5개 이내)	황정	건강기능식품	고부가가치식품	불면증	수면증진

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> • Scientific investigation of sleep improvement effects on <i>polygonatum sibiricum</i> via mouse model test and clinical research • Development of health functional food product related with sleep improvement via optimization of manufacturing process & purification and identification of active compound on sleep health improvement 					
Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. Development of final product and commercialization related with sleep improvement using standard setting of raw material, <i>polygonatum sibiricum</i> and standardization of manufacturing process <ul style="list-style-type: none"> • Establishment of quality related index components and method of standization • Otimization of manufacturing process for production of sleep improvement ingredients • Development of health functional food proto-type 2. Research of sleep improvement mechanism and efficiency test on <i>polygonatum sibiricum</i> extracts (in vitro/vivo study) <ul style="list-style-type: none"> • Analysis of sleep improvement effect using mouse model • Purification and identification of novel sleep related compound in extract of <i>polygonatum sibiricum</i> • Research of sleep related mechanism of extract of <i>polygonatum sibiricum</i> in human nervous system (GABA_A receptor pathway) 3. Clinical test of proto-type including extracts of <i>polygonatum sibiricum</i> <ul style="list-style-type: none"> • Significantly improvement of test group on AIS (Athens Insomnia Scale) index compared with placeb group • Significantly improvement of test group on total sleep time compared with placeb group via actigraphy analysis • confirmation of food safety with proto-type including extracts of <i>polygonatum sibiricum</i> applied on clinical test 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> • Plan to establish individual approval of single ingredients process from ministry of food dna drug safety using this project's results. • Plant to commercialize health functional food product via developing proto-type preferred by the major customer. • This results promoting the sleep related scientific field, due to reevaluation of domestic agricultural products to high valued food product. • Few products and ingredients already developed despite of increasing sleep related patients or sleep-inconvenience population. Therefore, in this project, the final product with extracts of <i>polygonatum sibiricum</i> promote revitalize and pioneer the sleep related food market. 					
Keywords	<i>polygonatum sibiricum</i>	health functional food product	high value product	insomnia	sleep improvement	

영문목차

1. Outline of research	9
2. Current technique development trend in internal and external	13
3. Contents and results of research	18
4. Purpose achievement and level of contribution related field	95
5. Output and applicable plan	100
6. Foreign science technique information collected in research	102
7. Security level for results of research	103
8. Current condition research facility and equipment registered in NTIS	104
9. Results of safety action of laboratory	105
10. Representative results of research	112
11. Considerations	113
12. References	114

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	13
3. 연구수행 내용 및 결과	18
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
5. 연구결과의 활용계획 등	100
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	102
7. 연구개발성과의 보안등급	103
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	104
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	105
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	112
11. 기타사항	113
12. 참고문헌	114

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

○ 연구개발의 개요 및 목적

- 수면증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 약용 작물인 황정의 수면증진효능을 동물 및 인체효능 평가를 통해 과학적으로 규명함.
- 활성물질 성분의 분리·정제 및 시너지 소재 생산공정 개발을 통해 수면증진 기능 개별인 정확보 및 부가가치가 높은 수면증진 식품을 개발하고자함.

○ 연구개발의 핵심기술

- 수면증진 기능소재의 기능성 인정 및 국내 작물유래 추출물의 산업화를 위한 핵심기술을 확립.
- 추출물의 약리활성 물질에 대한 기능성 검증을 통하여 작용 기전 규명 및 제어 기술 확립.
- 수면건강의 개선에 대한 동물효능 및 인체효능 입증을 통해 과학적 성과 및 신뢰성을 제고함.
- 기능성 소재로써 신소재 이용 및 개발 원천기술을 확립하여 고부가가치 식품 및 의약품 소재에 대한 제조 기술 확립.
- 만성질환인 수면장애의기능성 소재인 황정을 비롯한 복합소재의 건강기능식품 및 예방적 제품의 생산 및 판매를 국민 건강에 기여함.
- 국내 약용작물인 황정을 활용한 다양한 가공제품 개발뿐만 아니라 재배 농가의 수익 창출 및 고부가가치 식품산업의 발전에 기여함.

1-2. 연구개발의 필요성

- 수면장애로 병원을 찾은 환자는 2010년 28만9500명에서 지난해 45만5900명으로 5년 만에 57.5%(16만6400명) 늘었으며, 수면장애 환자는 2011년 처음 30만명을 돌파한 뒤 3년 만인 2014년에는 40만명을 넘어서는 등 연평균 8.7%의 증가율을 보이고 있음.
- 세계적으로 불면증의 유병율이 급증하고 있으며, 인구의 5%가 일시적 불면증을 겪고 이 중 25-30%가 만성적인 불면을 가짐. 불면증의 유병률은 급증하는 추세이며, 우리나라 진료환자의 건강보험 진료비 지급자료를 분석한 결과 수면장애로 인한 진료인원은 2010년 28만 9천명에서 2015년 45만 5천명으로 6년동안 16만 6천명(1.57배) 증가하였음.
- 인구 10만명당 진료인원은 최근 5년동안 246명(1.52배) 증가하였고, 총 진료비는 2012년 359억원에서 2014년 463억원으로 1.29배 증가함.
- 불면증의 50%는 주간 기능장애가 있으며 교통사고나 산업 재해를 일으키는 경우가 많

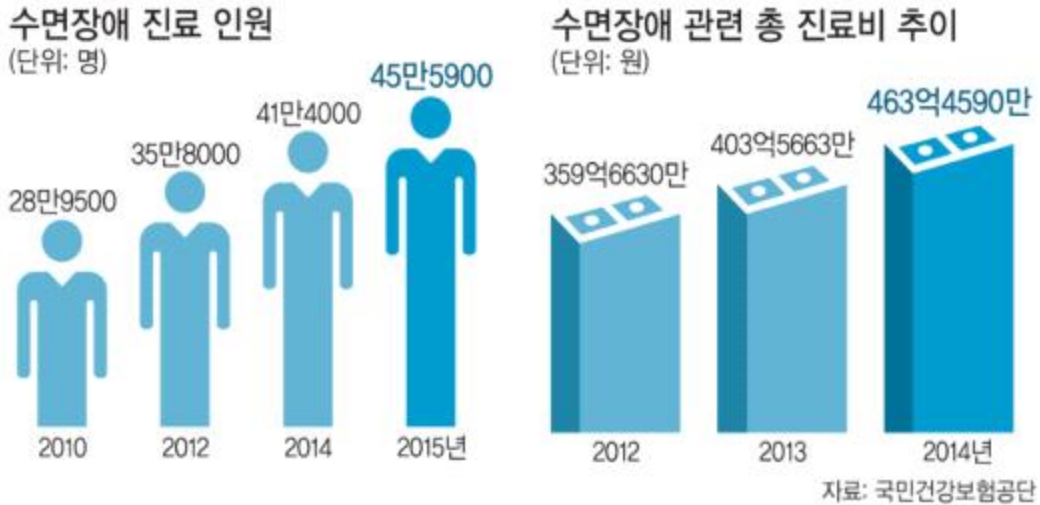


그림 1. 수면장애 진료 인원 및 총 진료비

음 또한, 불면증은 우울증의 발병의 위험 인자로 불면증을 조절하면 우울증으로의 진행을 예방할 수 있음.

- 불면증은 흔하게 발생하는 증상이나 전문가의 도움을 구하지 않는 대표적인 증상이며, 우리나라의 경우 불면증에 대해 의학적 도움을 시도한 경우는 6.8%로 매우 낮으며 불면증 치료로 수면제나 안정제와 같은 약물 처방 및 사용을 기피하는 경향이 있음.
- 약물은 내성이나 의존성이 없고 다른 질환에 영향을 끼치지 않아야 하지만, 현재 이러한 이상적인 불면증 치료 약제는 존재하지 않으며 모든 요건을 만족하는 약의 개발은 실질적으로 어려움.
- 미국의 수면 관련 시장 규모는 23조원으로 천연 수면보조제 및 수면 증진 건강기능식품 등의 수면관련 제품의 시장이 확대되고 있으며, 최근에는 선진국뿐만 아니라 개발도상국에서도 시장이 확대되고 있으며 약물이 아닌 기능성 식품 소재를 원료로 한 안전성 있는 수면 개선 제품에 대한 요구가 증가하고 있는 추세임.

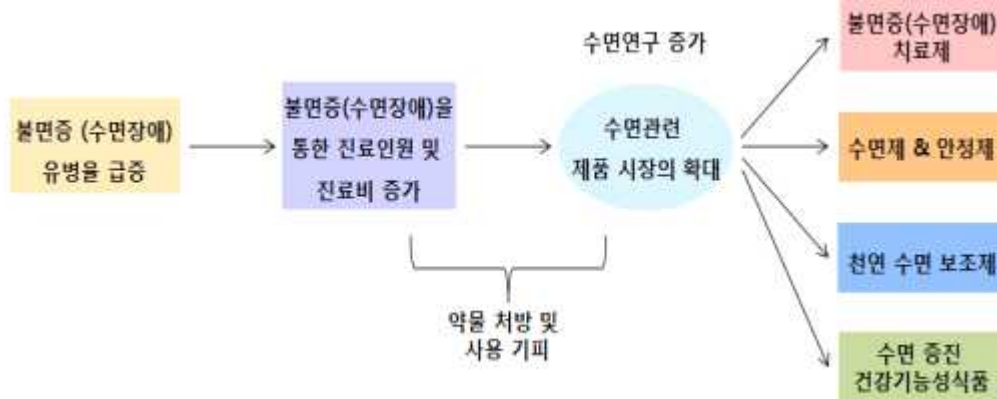


그림 2. 불면증 급증에 따른 수면관련 제품 시장 확대

1-3. 연구개발 범위

가. 황정을 이용한 수면개선 건강기능식품 개발

1) 황정의 원료 표준화

1-1) 산지별 비교분석

- 황정의 산지별 추출물 제조 및 동물효능평가 진행

1-2) 품종별 비교 분석

- 황정내 유사품종간의 수면효능 차이를 확인하고 특정 품종을 확인하기 위한 유전자 마

커 개발 및 검증

2) 황정 생산공정 최적화

2-1) 전처리 및 추출공정 최적화

- 공정별 수율 및 지표성분 및 동물 효능평가 비교분석

2-2) 분말화 공정 최적화

- 분무건조 공정별 수율 분석

3) 황정 추출물의 생산 규모 scale-up

- 랩→ 파일럿 → 플랜트 규모 생산 스케일업 진행

- 수율, 미생물, 지표성분 등 품질 지표 확보 및 재현성 분석

4) 수면개선 기능 건강기능식품 개발

- 개발한 소재를 바탕으로 시제품 (proto-type) 개발

- 제형 처방 개발 및 시생산 진행

- 인체실험용 시료 제조

5) 개별인정 신청서 작성 및 신청준비

- 개발 소재의 효능에 대한 SCI 논문 작성
- 개별인정 신청을 위한 식약처 모뎀토의 진행 및 피드백

나. 황정의 수면 개선 기작 규명

1) 황정의 동물효능 평가

1-1) 황정 동물 효능평가를 위한 pentobarbital 수면 유도 실험

2) 황정의 작용기작 규명

2-1) 작용기작 규명을 위해 flumazenil (GABAA receptor antagonist) 및 p-MPPI (5-HT1A receptor antagonist)를 이용한 설치류 수면유도 분석 및 수면구조 분석

2-2) [³H]-flumazenil을 이용한 GABAA-benzodiazepine receptor binding assay를 통해 황정의 displacement binding(%)를 분석

2-3) NMR spectrum 및 LC MS/MS를 통한 수면개선 기능성분 구조 규명

다. 황정의 수면개선 인체효능 평가 및 분석

1) 인체적용시험 프로토콜 확정

- 선행연구를 바탕으로 연구 대상자 표본수, 수면다원검사, actigraphy, sleep diary 측정 동선 등 확정 및 자료 확보

2) IRB 심의

- 이화여대 생명윤리심의위원회에서 본 연구계획과 시행 안전성에 대한 IRB 심의 진행

3) 연구대상자 모집 및 평가

- 연구 참여 기준에 부합하는 연구 대상자 모집

4) 뇌영상 수집 및 preprocessing

- 확정된 뇌영상 프로토콜을 적용하여 화학적, 구조적, 기능적 뇌영상 획득

5) 연구대상자 모집 완료 및 IRB종료 보고

- 안전성에 대한 평가 및 분석 진행

6) 임상데이터/객관적 수면 지표 분석

7) 뇌지표 분석

- 뇌영상 및 데이터 정성, 정량 분석 진행

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

3-1. 국내 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 천연물 소재를 이용한 불면증 개선에 대한 연구는 전무하여, 개발의 필요성에 대해 인식하는 초보적인 수준임.
- 국내의 소재 개발과 관련된 연구의 거의 대부분은 추출물의 단계로부터 시작하여 활성 성분을 분리, 동정하는 과정을 모두 거치고 있음. 소재의 screening에서 시작하여 유효 성분의 분자 구조를 규명하기까지의 작업은 상당한 전문성을 필요로 하며 많은 시간이 소요되기 때문에 단기적 연구 성과를 기대하는 국내 연구 상황에서는 효율성이 떨어짐.
- 수면에 대한 연구 모형과 측정의 어려움으로 인해 국내에서는 수면에 대한 원초적인 동물 실험은 거의 없으며 수면에 대한 연구는 대부분 수면 클리닉에서의 뇌파 측정을 통한 수면 장애 환자의 수면 양상 기록이 주를 이루고 있음.

○ 시장현황

- 수면경제(sleeponomics)라는 수면(sleep)과 경제(economy)의 합성어인 신조어가 생겨날 정도로 수면 관련 시장규모와 사회적 비용이 크게 증가하고 있음.
- 잠을 자도 개운하지 않거나 수면이 유지되기 어려워 자주 잠에서 깨는 증상을 통칭하여 수면장애라고 판단할 수 있는데, 인구 중 65%는 이러한 수면장애가 있다고 느낀 적이 있고, 28%는 일주일 중 며칠만 숙면을 취하는 것으로 나타남 (그림 3).

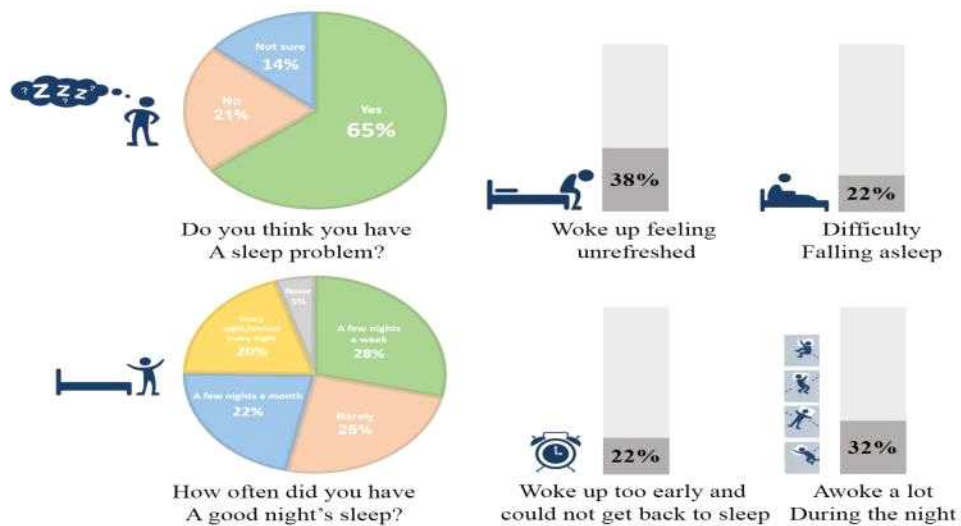


그림 3. 수면장애 발병율 및 현황

- 국민건강보험공단이 2001년부터 2008년까지 건강보험 진료비 지급 자료를 분석한 결과 우리나라 수면 장애 질환의 실진료 환자수가 2001년 5만1천명, 2005년 12만2천명, 2008

년 22만8천명으로 나타나 최근 8년간(2001-2008) 4.5배 증가(연평균 23.8% 증가)한 것으로 나타남.

- 수면 장애에 의한 건강 보험 진료비도 해마다 증가해 2001년 44억원에서 2005년 91억 원, 2008년 194억원으로 나타나 2008년 수면 장애에 의한 건강보험 진료비는 2001년보다 4.4배 이상 증가했음. 공단이 부담한 2008년 수면 장애 급여비는 모두 137억원으로 약국 68억 원, 외래 51억 원, 입원 18억 원 순으로 나타났음.
- 수면제의 경우 장기복용은 의존성 및 부작용 문제를 가져 부담이 적고 안전성이 높은 OTC(Over-The-Counter, 비처방) 수면보조제의 시장이 확대되고 있음.

○ 경쟁기관현황

- 현재 우리나라에서 불면증과 관련해 처방되는 수면제로는 졸피뎀 성분(zolpidem tartrate)의 졸피드(한미약품), 졸피람(환인제약), 스틸녹스(사노피아벤티스) 등과 Triazolam(트리아졸람) 성분의 할시온(한국화이자), 졸민(명인제약), 트리람(환인제약) 등이 있음.
- 최근 출시된 레돌민(광동제약)은 일반의약품으로 스위스 Max Zeller사의 수입의약품이며, 길초근(Valeriana officinalis L.)의 건조뿌리 추출물과 호프(Humulus lupulus L.)의 추출물을 주성분으로 하는 생약성분 수면 유도제로 지난해 매출은 약 40억 원 수준으로 확인되었음 (그림 4).



그림 4. 레돌민 (광동제약)

- ▶ 지난해 출시된 슬립큐(네추럴에프엔피)는 감태추출물을 원료로 수면 관련 기능성 인증을 받은 건강기능원료임 (그림 5).



그림 5. 슬립큐 (네추럴에프엔피)

○ 지식재산권현황

- 국내 연구들은 생약 추출물의 단일제제 효과 연구 혹은 한방을 기본으로 한 복합처방제의 추출물의 수면유도 효과에 관한 연구는 있으나 천연물 약효 물질 단일 효과 연구 논문은 극히 미미함.
- 2010년 2건의 특허로 복합처방제의 추출물을 이용하여 pentobarbital을 이용한 수면유도 실험을 통하여 동물 효능 평가를 함.

표 1. 수면 동물 효능 평가 관련 특허 현황

특 허 명	공개년도	특허내용
불면 증상의 예방 및 개선용 조성물과 그의 제조방법	2010	발아현미, 인삼 및 용안육 추출물을 혼합 사용하여 수면 유도시간을 단축하고, 수면시간을 연장시키는 효과를 나타내는 불면 증상의 예방 및 개선용 조성물과 그의 제조방법
수면장애 개선과 쾌면을 위한 건강식품 조성물	2010	산조인, 토란대, 연자육, 연근과 마그네슘으로 구성되어 수면장애 개선과 쾌면을 위한 건강식품 조성물

2-2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 지난 수년간 불면증 해소를 위한 천연물 개발을 위한 수많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고 전세계적으로 지속적인 연구가 진행되고 있는 현재의 상황은 질병 예방을 위한 거대한 수요에 비하여 아직 부작용이 없으며 만족스러운 효과를 가진 소재가 아직 부족함을 의미함.
- 새로운 작용 기전을 밝히는 상당수의 연구는 연구대상이 되는 물질들의 기능이 이미 보고되어 있어 신규성이 없는 경우가 많기 때문에 소재에 대한 기초 연구에 머무르는 한계성을 가지고 있음.

○ 시장현황

- 불면증으로 인한 직접적인 사회적 비용이 미국에서만 140억 달러이며 간접적인 비용은 약 300억 달러로 추정되고 있으나 잠재적인 수요의 85%가 남아 있는 상황으로 실제로는 불면증으로 인한 사회적 비용은 더 클 것으로 예상됨.
- 세계적으로 불면증 치료제 시장 규모는 2006년 61억달러였으며 매년 20%이상 성장하고 있어 향후 10년 안에 77억달러로 확대될 것으로 예측되고 있음.
- 불면증 시장의 주약제인 Ambien은 2006년도 전세계 주요 7개국 시장에서 23억달러의 매출을 기록함.

- 그러나 현재의 불면증 치료제들은 심각한 의존성(dependence), 내성(tolerance), 복용 시 행동 문제(충동성 증가, 기억하지 못하는 폭력적 행동 등) 등으로 충분히 수요를 만족시키지 못하고 있고 부작용 문제가 큼.

○ 경쟁기관현황

- 현재 미국에서 ZzzQuil(Proter & Gamble)이 2015년 시장점유율 23.8%로 수면보조제 시장의 선두를 차지함 (그림 6).
- 미국의 Johnson & Johnson의 주요 제품인 Tylenol PM의 시장점유율 회복과 새로운 브랜드 Simply Sleep 출시로 2012년 1200만 달러 판매 기록, 시장점유율 8%까지 증가함.



그림 6. ZzzQuil (Proter & Gamble) (왼쪽)과 Tylenol PM (Johnson & Johnson) (오른쪽)

- 일본은 최근 신기능성표시인증제도가 도입되어 글리신 성분이 포함된 구리나(아지노모토 그림 7), 테아닌 성분이 포함된 인스턴트 보리차(이토엔) 등이 수면 관련 기능을 명확하게 표시해 인기를 끌고 있음.



그림 7. 구리나(아지노모토)

○ 지식재산권현황

- 수면증진 효능을 가지는 기능성식품에 대한 특허는 미국과 유럽이 각각 364건 및 106건으로 가장 큰 비중을 차지함.
- 세계적으로 천연물 유래 물질의 기면효과에 대한 특허는 약효, 제법 및 제형에 관련된 것으로 상당히 많으나 주로 그 복합적 이용이 주를 이루고 있음.

- 불면증 완화를 목적으로 한 천연물 관련 주요 특허 내용은 다음과 같음 (표 2, 표 3).

표 2. 천연물 소재 이용 불면증 완화 관련 특허 현황

특 허 명	출원/등록번호
Plant based dietary supplement for improving the duration and quality of sleep	US 2006/0198872 A1
Method of preparing cannabidiol from plant material	EP1542952 A1
THCV and THCV extracts derived from plant material	EP 2161262 A1
Usage of the plant of genus Ampelopsis and extracts thereof for manufacture of medicament and functional food for treatment and prevention of sleep disorder is disclosed.	US 2008/0241280 A1
Hypnotic compositions and methods of use thereof	US 20120328533 A1
Tryptophan source from plants and uses therefor	EP 1283682 B1
Pharmaceutical compositions of short-acting sedative hypnotic agent	EP 1648413 B1

표 3. 활성성분 이용 불면증 완화 관련 특허 현황

	특 허 명	출원/등록번호
Phenolic compounds	Neuroactive plant extract from Hypericum Polyanthmum	EP2396016 A1
	Plants of genus ampelopsis and extracts thereof for use in the treatment of sleep disorders	EP 1767212 B1
Flavonoids	Plants of genus ampelopsis and extracts thereof for use in the treatment of sleep disorders	EP 1767212 B1
	Neuroactive plant extract from hypericum polyanthemum	EP 2396016 A1
polyacetylenic alcohols	Pharmaceutical grade St. john's wort	EP 1094825 A2
Terpenoids	Chewing gum formula for enhancing psycho-spirituality	US 20120288450 A1
	23-O-Acetylshengmanol-3-O-beta-D-xylopyranoside and its medical use	EP 2438921 A1

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

3-1. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

가. 연구개발 추진전략

- 원료 품질 규격 설정을 기반으로 수면증진 소재를 통한 건강기능식품 개발 추진
 - 농심(주관기관)은 생산공정 표준화 및 제형 개발을 통해 건강기능식품 개발 담당
 - 서울여자대학교(협동연구기관1)는 수면증진 소재의 기능성분 구조 및 작용 기작 규명을 통한동물효능 평가 담당
 - 이화여자대학교(협동연구기관2)는 수면증진 소재를 이용한 인체효능 평가 담당

나. 연구개발 추진체계

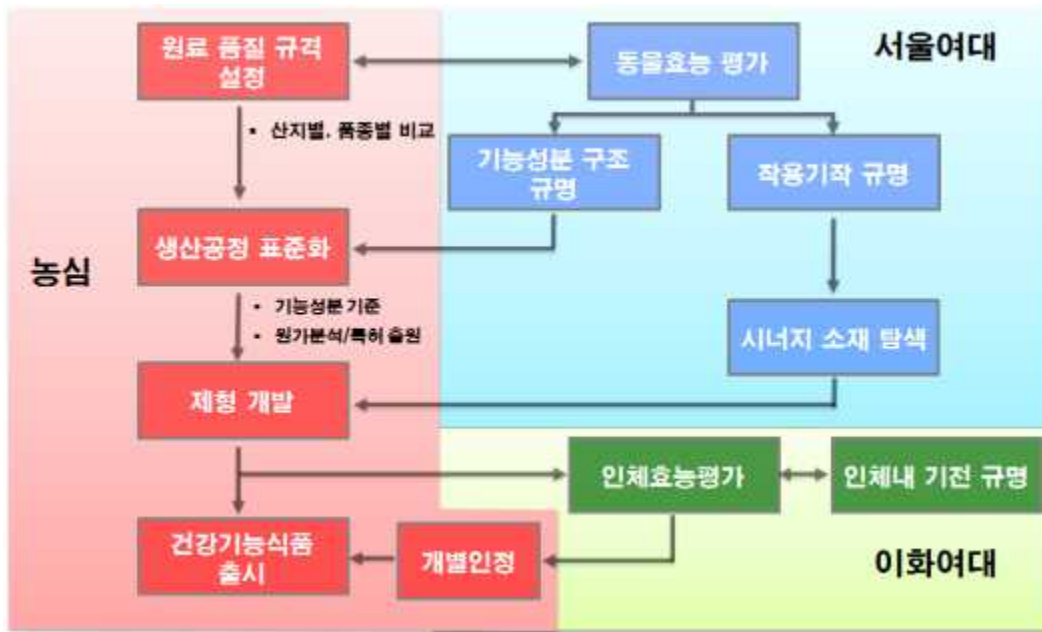


그림 8. 연구개발 협력 추진 체계도

농심(주관기관)

- 원료 품질 평가
 - 원료 품종검증
 - 산지별 품종별 황정 영양성분 분석 및 원료 표준화 방법 추진
 - 지표성분 함량 분석법 개발 및 산지별 품종별 황정 지표성분 비교분석
 - 효능 평가용 샘플 제조

- 황정 소재 생산 공정 개발
 - 원료선별, 전처리, 추출, 효소분해, 농축 등 세부 공정 최적화 및 표준화
- 생산공정 Scale up 및 표준화
 - Lab > Pilot > Plant로 생산공정 Scale up 진행
 - 지표성분, 수율, 생산성 등을 분석하여 단가 분석 및 생산 가능성 검토
- 시제품 제작 및 개별인정 확보를 통한 건강기능식품 제품 개발
 - 제품에 알맞은 제형 개발 및 시제품 제작



- 동물 및 인체효능 평가 결과를 바탕으로 식약처에 숙면 기능으로 개별인정 신청 진행

그림 9. 황정 제조공정 Scale up

서울여자대학교(협동연구기관1)

- 동물효능 평가
 - 산지별 황정 추출물에 따른 수면입면시간 (Sleep latency)와 수면시간 (Sleep duration) 측정
 - 품종별 황정 추출물에 따른 수면입면시간 (Sleep latency)와 수면시간 (Sleep duration) 측정
 - 황정 추출물에 따른 수면구조 분석 (EEG analysis)
- 작용기작 규명
 - 황정 추출물 및 수면관련 수용체 antagonist를 이용한 수면입면시간 (Sleep latency)와 수면시간 (Sleep duration) 측정
 - 황정 추출물 및 수면관련 수용체 antagonist를 이용한 수면구조 분석 (EEG analysis)
- 기능성분 구조 규명

- 황정 추출물의 분리 및 정제
- 황정 활성 획분으로부터 유효한 단일성분 분리 (NMR, MS/MS)
- 황정 활성 획분을 이용한 수면증진 관련 타겟 수용체 규명 (Receptor binding assay)

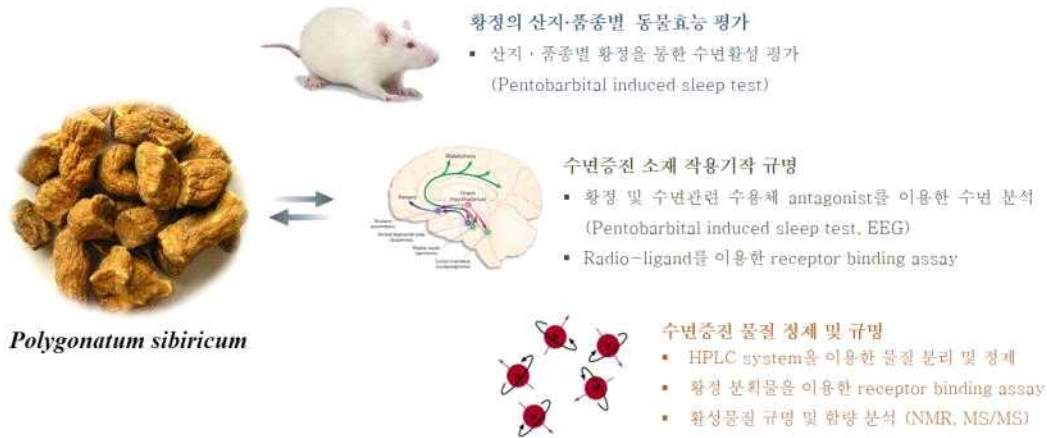


그림 10. 동물효능 평가, 작용기작 규명, 기능성분 구조 규명

- 문헌 및 자료 수집을 통한 시너지 소재 탐색

이화여자대학교(협동연구기관2)

○ 인체적용시험: 수면 개선 효과 확인

- 정신건강의학과 전문의 인력이 충분히 갖추어져 있고, 연구간호사 및 연구원 인력 등 인적 인프라가 잘 갖추어져 있어 불면에 대한 기초 평가 및 수면 개선 효과 평가에 용이할 것으로 판단됨.
- 스트레스 및 우울 등, 수면의 변이에 영향을 줄 수 있는 인자들에 대해서도 함께 평가하여 공변량화 하며, 이로 인한 측정 오류를 최소화 하고자 함.

○ 인체적용시험: 수면 개선으로 인한 뇌재생 효과 및 수면 개선 효과의 뇌기전 확인

- 이화여자대학교 뇌융합과학연구원은 임상을 겸하지 않는 연구 전용 3T 자기공명영상 기기 2대 및 각종 연구대상자 면담 및 평가실, 휴게실 등을 갖추고 있어 편안한 환경에서 연구대상자가 연구에 참여할 수 있는 물적 인프라를 갖추고 있음. 이를 통해, 천연물 투여 전후 임상적-뇌과학적 평가를 통해 높은 수준의 논문을 다수 출판한 경험 또한 가지고 있음 (Biological Psychiatry, IF=10.255; American Journal of Psychiatry, IF=12.295; American Journal of Chinese Medicine, IF=2.755; Neuropsychopharmacology, IF=7.048). 이러한 인적/물적 인프라를 최대한 활용하여 한정된 자원으로 최고 수준의 연구를 수행하는 추진 전략을 가지고 연구를 수행하고자 함.

다. 연구개발 추진일정

(1) 1차년도

일련 번호	연구내용	1차년도						연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		월별 추진 일정							
		7	8	9	10	11	12		
1	원료 품종 검증	■	■					150,000	김훈중 (농심)
2	황정의 품종별, 산지별 식품성분 분석 및 지표성분 분석	■	■						
3	원료 및 공정에 따른 황정추출물 분석 및 최적 공정 설계	■	■	■	■				
4	황정 추출물 Pilot 규모 생산 표준화			■	■	■			
5	황정 추출물 Plant 규모 생산					■	■		
6	산지, 품종별 동물효능 평가	■	■	■				60,000	최현선 (서울여대)
7	작용기작 규명 (specific antagonist -이용 수면시간)			■	■	■			
8	작용기작 규명 (EEG analysis)				■	■	■		
9	인체적용시험 프로토콜 확정	■	■					110,000	김지은 (이화여대)
10	IRB심의		■						
11	연구대상자 모집 및 평가			■	■	■	■		
12	뇌영상 프로토콜 확정	■	■						
13	뇌영상 수집 및 preprocessing			■	■	■	■		

(2) 2차년도

2차년도														연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	추진 일정													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	황정 추출물 소재 Plant 단위 규모 생산 표준화	■	■	■										170,000	김훈중 (농심)
2	숙면 기능 시제품 개발				■	■	■	■	■						
3	개별인정 준비 및 신청									■	■	■	■		
4	기능성분 분리 및 정제	■	■	■	■									40,000	최현선 (서울여대)
5	Receptor binding assay	■	■	■	■	■									
6	기능성분 구조 규명 (NMR, MS/MS)				■	■	■	■	■	■					
7	시너지 소재 탐색									■	■	■	■		
8	보고서 작성										■	■	■		
9	연구대상자 모집 및 평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■				170,000	김지은 (이화여대)
10	연구데이터 코딩 및 프로세싱	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
11	데이터 분석				■	■	■	■	■	■	■	■	■		
12	IRB연구 종료 보고											■	■		
13	보고서 작성												■		

3-2. 1차년도 연구 내용

가. 황정을 이용한 수면개선 건강기능식품 개발 (수행기관: 농심)

- 1차년도에는 수면개선 건강기능식품 개발을 위하여 수면개선 효능이 있는 황정추출물의 공정을 개발하고, 공정을 최적화 하는 과정을 진행하였다. 나아가 랩수준에서 제조한 황정추출물을 플랜트 수준으로 scale-up을 진행하여 생산 재현성을 확인하였음.

(1) 황정의 원료별 비교 분석

- 수면개선 소재 생산을 위한 공정중 황정 원료에 따른 생산성과 수면개선 효능을 평가하였음.

(1.1) 황정의 산지별 원료 비교 분석

(가) 실험 방법

① 황정 추출분말 제조공정

- 황정 추출분말 제조공정은 (2) 황정 추출분말 생산공정 최적화 부분에서 설정한 공정을 통하여 진행하였음. 대략적인 공정은 원료투입 → 열수추출 → 여과 → 농축 → 1차살균 → 냉동 → 2차살균 → 분무건조의 과정을 거쳤음.

② 황정 추출분말의 수율 분석

- 황정 추출분말의 수율 분석 계산법은 다음과 같음.

$$\text{생산 수율 (\%)} = \frac{\text{생산된 추출분말의 양 (g)}}{\text{투입된 황정원료의 양 (g)}} \times 100$$

③ 지표성분 분석

- 황정 추출분말의 지표성분은 GABA (gamma-Aminobutyric acid)로 설정하고, GABA 분석법을 설정하였음. 분석 방법은 다음과 같음.

1. 황정 추출분말 0.1g와 1% salicylic acid에 증류수를 혼합하여 균질화 시킨뒤, 10ml까지 정용함
2. 4℃ 냉장고에서 3시간동안 보관
3. 상등액은 원심분리 (13,000rpm, 2분)후 상등액은 분리하여 0.45µm filter를 통해 여과시킨다.
4. 분석용 Tube 용기에 옮겨서 분석 진행
5. 표준분음 GABA standard (Sigma 社)를 구매하여 8, 40, 200 ppm 수준으로 증류수에 용해한 후, 상기한 방법으로 전처리후 HPLC에서 peak를 분석하여 황

정 추출분말 샘플 함량 계산

- HPLC 분석 조건은 다음과 같음

표 4. HPLC를 활용한 GABA 분석 조건

1	사용 분석기기	HPLC																																
2	Colum	ECLIPSE AAA C18(5um,250x4.6mm)																																
3	Colum temp	40℃																																
4	Solvent	A: NaH ₂ PO ₄ 40Mm-pH7.8 B: ACN:MeOH:Water = 45:45:10																																
5	Detection wavelength	EX 340nm, EM 450nm																																
6	Mobile phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>Flow(ml/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1.9</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>18.10</td> <td>43</td> <td>57</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>18.60</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>22.30</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>23.20</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>26.00</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Time(min)	% A	% B	Flow(ml/min)	0	100	0	2	1.9	100	0	2	18.10	43	57	2	18.60	0	100	2	22.30	0	100	2	23.20	100	0	2	26.00	100	0	2
Time(min)	% A	% B	Flow(ml/min)																															
0	100	0	2																															
1.9	100	0	2																															
18.10	43	57	2																															
18.60	0	100	2																															
22.30	0	100	2																															
23.20	100	0	2																															
26.00	100	0	2																															
7	Flow rate	2ml/min																																
8	Injection volume	10ul																																

④ 수면관련 동물 효능 평가

- 본 실험은 서울여대에서 진행한 바 황정의 수면 개선 기작 규명 (서울여대) 부분의 실험방법에서 제시하였음.

(나) 실험 결과

① 산지별 비교 분석

- 황정 원료 중 산지에 따른 비교를 진행 행하였음.

- 황정 원료의 재배 지역은 주로 충청남도과 경상북도, 강원도 지역에서 재배되는 것으로 알려짐. 2013년 기준으로 전체 수확면적은 38(ha) 수준이며 연간 생산량은 생물기준으로 900 톤으로 추정됨. 그중 황정의 주 생산지는 충북의 제천과 경북의 안동 등이

있음.

- 산지에 따라 황정을 구매하여 비교 분석을 진행하였음. 결과는 아래와 같음.

표 5. 산지별 원료 추출 분말의 지표성분 GABA 함량 및 수율 분석 결과

샘플명	GABA함량 (ug/g)	수율 (%)
충북 제천1	11.00	35.4
제천2	6.26	26.1
충북 1	1.00 이하	28
충북2	3.56	34
경북 영천	3.19	31.5
경북 안동	11.04	23.5
경북 봉화	7.84	28.5
경북 영주	4.19	32
강원 정선	9.4	27.5
경기 양평	1.00 이하	21.5
중국산1	1.00 이하	38.5
중국산2	7.15	16

- 산지별 분석을 위해서 국외 황정은 중국산을 사용하였음. 산지는 상기한대로 주 생산지인 경북, 충북, 강원 지역을 중심으로 선별 후 진행하였음.
- 추출 용량은 원료 건물 기준으로 200g을 기준으로 제조하였음. 기존에 효능을 확인한 원료는 충북 제천1로 표시된 원료로 GABA함량은 11.0 μ g/g이며 수율은 35.4%수준으로 분석되었음.
- 지표성분인 GABA 함량의 경우 기존 원료를 제외하고 안동산 11.04 μ g/g, 강원 정선산 9.4 μ g/g으로 상대적으로 높음 함량을 나타내었음.
- 반면 중국산1, 충북2 원료의 경우 상대적으로 높은 수율을 나타내었으나, 수급의 용이성에 문제가 있으며, GABA 함량이 낮았음.
- 결과적으로 수율과 지표성분 함량으로 볼 때 기존 제천1원료가 가장 우수하였고, 경북 안동과 강원 정선 원료가 뒤를 이었음.
- 또한 본 실험에서는 GABA 함량과 수면개선 효능의 연관성을 확인하기 위하여 동물 실험을 진행하였음. 동물실험은 시간과 비용이 상당히 소요되기 때문에 샘플을 선정하여 진행하였음. 기존 효능평가로 확인하였던 제천1과 안동, 정선을 선정하였고, 산지별로의 효능을 확인하기 위하여 제천2 원료로 제조한 추출물도 함께 선정하였음.
- 동물효능평가는 상기한 방법으로 제조한 시료를 서울여대에 제공하여 효능을 평가하였음.
- 동물효능평가에서는 Sleep latency time (수면잠복기)와 Total sleeping time (총 수면

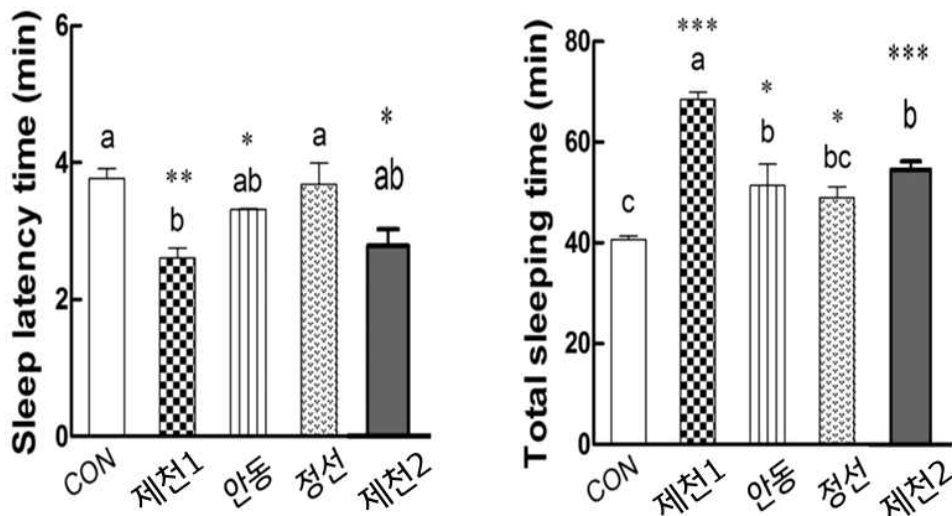


그림 11. 지별 황정 추출물의 수면개선 효능 평가 (좌: 수면잠복기, 우: 총 수면시간)

시간)을 수면과 관련된 두가지 지표로 확인하였음, 결과는 그림에 제시하였음 (그림 11).

- 수면잠복기의 경우 제천1 원료의 경우 수치가 현저하게 줄어들었으나, 안동과 정선은 Control(대조군)과 비교하여 큰 차이가 없었음. 제천산2의 경우 제천 1에 비하여 감소한 수치가 낮으나, Control과 비교하여 유의적으로 감소한 것을 알 수 있었음.

- 총 수면시간의 경우 Control에 비하여 모든 샘플군에서 유의적으로 증가하였음. 반면 기존에 사용한 제천1 원료에 비해서 효능이 떨어지는 것을 확인하였음. 안동산 원료와 정선산 원료는 Control과 비교하였을 때, 총 수면시간이 유의적으로 증가하였으나, 제천 1 데이터와 비교하였을 때도 효능에서 유의적인 차이가 존재하였음. 또한 제천2 원료의 경우에는 제천1과 같은 수준의 유의차를 나타내었음.

- 본 실험을 통하여 기존에 사용하였던 제천1 원료의 효능 재현성을 확인하였음. 타 산지의 원료인 경우 수면개선과 관련된 효능이 있으나 기존 원료 대비 떨어지는 것으로 확인되었음.

- 또한 같은 제천 산지의 원료 사용하였음에도 2가지 원료 모두 수면에 효과가 있으나, 그 수준은 서로 다른 것으로 판단됨.

- 참고로 제천1과 제천2 원료의 경우는 물성과 굳기, 색깔 등 여러 측면에서 볼 때 같은 품종이라고 보기 힘든 점이 있었음. 따라서 황정 추출물의 수면개선 효능은 산지에만 의존하지 않는다는 것을 확인할 수 있었음.

- 현재 지표성분으로 설정한 GABA의 경우, 제천1 원료와 안동산 원료에서 GABA 함

량의 차이가 거의 나지 않는 것에 비해 효능의 차이가 나타나는 것을 고려할 때, GABA가 수면개선 효능과 관련된 주요한 기능성분은 아니라고 판단됨.

(1.2) 황정의 품종별 원료 비교 분석

- 황정이 속해 있는 등굴레속은 백합과에 속하는 다년생 초본으로 북미, 유럽, 동북아시아 등 전세계적으로 40여종이 분포하며, 국내에는 16종이 분포하는 것으로 알려져 있음. 현재 본 과제에서 쓰고 있는 황정은 층층갈고리등굴레 (*Polygonatum sibiricum*)로 불리고 있으나 그 구분법이 확실하지 않고, 대부분 외관상으로 확인하기 때문에, 본 과제에서 사용하는 황정의 기원식물이나 종에 대해서 정확히 판단하기 힘든 면이 있음.
- 현재 황정이 포함된 등굴레 속에 속하는 식물의 구분은 표 6과 같음.

표 6. 등굴레속의 식물의 구분 및 특징

종류	식물성상	약제성상
황 정	잎은 끝은 점차 뾰족해진 모양인 피침형 이거나 선형으로 윗면은 녹색이고 밑면은 연한 녹색, 보통 4~5개가 돌려남, 잎 끝이 갈고리모양.	뿌리의 형상은 닭의 대가리와 비슷하고 또는 생강과 비슷한 덩어리 모양, 비대한 육질이며 약간 편평한 원기둥 모양이고 황백색, 비교적 굵으며 수염뿌리가 있고, 냄새는 없고 맛은 약간 달며 점성
진황정	줄기는 원기둥모양이며 붉은 색, 잎은 대나무 잎 같고, 피침형이고 표면은 녹색이며 뒷면은 분백색,	뿌리는 절간이 짧아 마디가 염주모양, 등굴레뿌리와 비슷한 굵기이며, 황정보다는 가늘고, 형태는 비후한 피상 혹은 관주상이며, 중부는 돌출, 단맛이 약간 있음.
등굴레	줄기에 6개의 능각이 있으며, 끝이 비스듬히 처짐, 잎은 호생하고 한쪽으로 치우쳐서 퍼지며 장타원형이고, 엽병이 없음, 표면은 녹색이고, 뒷면은 분백색	뿌리의 표면은 담황색이거나 옅은 황갈색이고 반투명하며 약간 거칠고 세로난 가는 주름 무늬가 있고, 절간이 길며, 절단면은 과립성을 띠고 황백색, 냄새가 약간 나고 맛이 약간 달며 점성
죽 대	땅위 줄기는 곧게 서고, 잎은 호생하고, 잎자루가 짧고, 긴 타원형 또는 긴 타원상 피침형, 표면은 녹색이고 뒷면은 분백색.	근경은 등굴레처럼 육질이고 굵고 옆으로 뻗지만 마디가 있으나 절간이 짧고, 잔뿌리가 많고, 단맛이 약간 있음.

- 당사에서 황정 원료를 받을 때, 건조품으로 받기 때문에, 원료에 대한 정보를 확보하기 위하여 여러 재배 농가를 방문하여, 샘플을 수집하고, 원료를 표준화를 위하여 필요한 정보를 얻었음.

(가) 재배 농가 방문 내용

- 황정의 주요 생산지인 강원 정선, 경북 안동, 충북 제천의 농가를 방문하였으며, 지자체 농촌 관련 연구소의 소개를 받아, 우수 농가를 선별하여 방문을 진행하였음.

① 황정의 품종구분

- 황정은 백합과의 여러해살이풀로써, 황정, 진황정, 층층등굴레 등의 종이 있는 것으로 알려져 있음 (표 6).

- 실제 농가에서는 종에 따른 구분을 하지 않고 있으며, 굵기에 따라 대황정, 중황정, 소황정으로 구분되는 것으로 나타났음 (그림 12).



그림 12. 황정의 품종 (좌; 중황정, 우; 대황정)

- 기존의 효능이 뛰어난 추출물의 원료를 생산하는 농가를 방문한 결과 원료는 농가 구분 기준으로 대황정 또는 중황정으로 생각되며, 경우에 따라서는 혼입이 되어 들어올 가능성도 있었음.

- 재배되는 식물을 보면 황정 종류에 따라 잎의 개수가 다른 경우가 있어 품종이 다를 수도 있음을 시사함.

② 황정 재배 현황

- 농가 방문 결과 황정은 농가별로 개별재배하며, 다른 농산물이나 한약재 작물을 같이 재배하는 농가가 많았음.

- 뿌리 종자로 재배를 시작하며, 최초 3년 이상 소요되며, 4-5년차에 일반적으로 수확을 진행함 (그림 13).

- 3년차 이상에서는 주변에 잡풀 등이 나지 않기 때문에 제초제나 농약은 사용하지 않음, 또한 일정 수준 이상으로 자라게 되면, 특별하게 관리가 필요없는 작물이기도 함.

- 뿌리는 매년 세 갈래로 자라면서 부피와 길이가 증가함. 대략적으로 평당 생산량은 6-10kg 정도 됨.



그림 13. 황정의 연차별 재배 현황 (좌; 1-2년차 육안으로 확인 불가능, 중; 3년차 새싹이 돋는 것 확인 가능, 4-5년차; 수확 가능수준)

③ 황정 가공 현황

- 생물 가격 (가공 전): kg 당 2,000원 내외 수준
건물 가격 (가공 후): kg 당 10,000원 내외 수준
- 가공 공정: 수확 → 세척 → 건조 → 볶기 → 절단 순서로 가공함 (그림 14).
건조: 78-80℃에서 5-10일 정도 건조 진행 (건조가 되면서 찌는 효과가 발생함)
볶기와 절단은 농가마다 시설이 다르고 매입자의 요구에 따라 가공 처리함.



그림 14. 황정 건물 가공 시설 (좌: 세척기, 중: 건조기, 우: 저온저장고)

④ 결론

- 방문 결과 황정 내 품종별로 효능의 차이가 나타날 수 있는 가능성 있음.
- 당사 생산시 황정 원료는 건물로 입고되기 때문에 품종이나 원료의 규격을 설정할 필요가 있다고 생각됨.
- 유전자 분석법을 활용하여 품종에 대한 검증을 진행할 예정임.

(나) 황정 품종 구별용 유전자 분석법 (DNA barcode법 개발)

- 상기한 대로 황정 품종에 대한 규격설정의 필요성이 제기되었으며, 가장 확실한 방법이 유전자 분석법이므로 유전자 분석법을 개발하고자 하였음.
- 유전자 분석법으로 사용되는 DNA barcode 법은 각각 다른 생물 종 유전체(Genome)에서 유래된 동일 유전자 (gene) 부위를 분석하여 유전자의 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 다형성 분석으로 종을 판별하는 표준화된 방법임 (ref)
- 식물의 경우 엽록체 DNA의 coding region 에서 *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* 부분과 non-coding region인 *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *psbA-trnH* spacer 부분이 이용되고 있음 (ref).
- 실험 방법은 정확하게 본 연구에 필요한 연구를 진행한 연구가 없기 때문에, 여러 연구를 참고하여 실험을 설계하였음.
- 전체적인 분석 방법은 그림에 나타내었음 (그림 15).

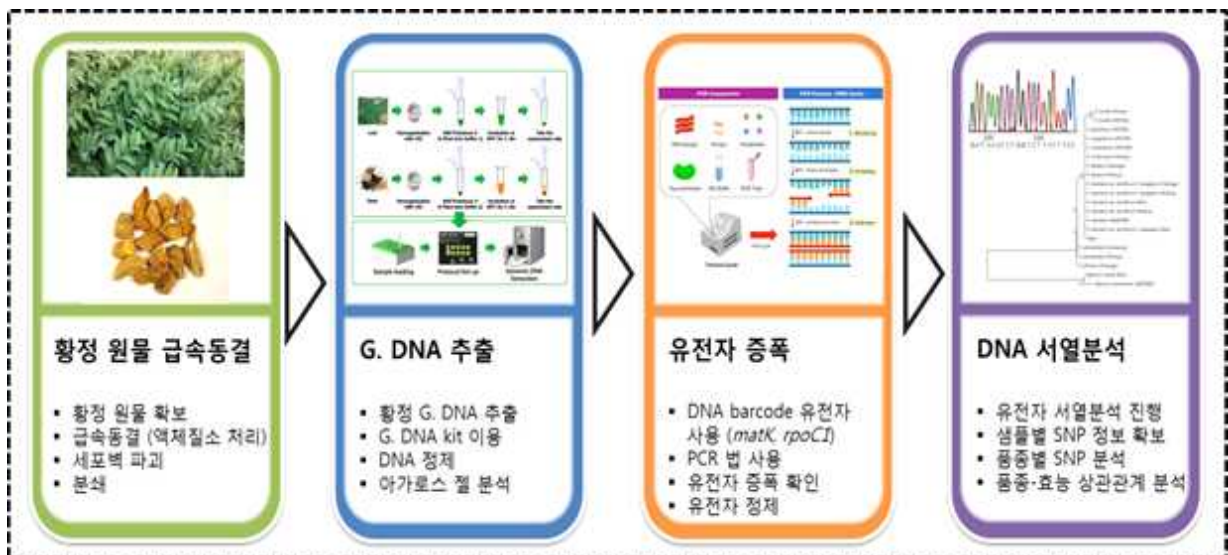


그림 15. 황정 품종 확인을 위한 DNA barcode법 개요

- 구체적인 실험 방법은 아래 표 7에 나타내었음.

표 7. 황정 품종 확인을 위한 DNA barcode법 실험 방법

1. 황정을 알맞은 수준으로 절단하여 액체질소에 잠길 정도로 담구고, 액체질소가 기화될 때까지 기다린다. (액체질소로 인하여 급속동결된 황정은 세포수준에서 파괴되어 DNA중 많은 부분이 밖으로 배출됨)
2. 급속동결된 황정은 믹서기, 분쇄기, 막대사발등을 통하여 파우더 형태로 분쇄를 진행한다.
3. 분쇄된 황정 분말을 0.1-0.2g 정도를 넣고 Genomic DNA (유전체) 추출을 진행한다.
4. G. DNA 추출 방법은 Promega 社에서 구입한 G.DNA extraction kit protocol을 따라

실험을 진행한다.

- 추출된 G.DNA는 농도와 순도를 측정하고, 아가로스 젤 상에서 확인한다.
- PCR에 필요한 primer, dNTP, polymerase 등을 준비하고, PCR 증폭기를 통하여 유전자 증폭을 진행한다.
- Barcode에 필요한 유전자는 *matK*와 *rpoC1*을 선정한다.
- 각각 유전자에 필요한 Forward와 Reverse primer는 외부에 의뢰 제작하였다.
- 일반적인 PCR 증폭방법을 이용하여 증폭한 유전자 결과물은 아가로스 젤상에서 확인하였다.

(다) 실험 결과

- DNA barcode에 이용한 primer로 분석 결과 아가로스 젤 상에서 확인이 가능하였음 (그림 16).
- matK* 유전자의 경우 대략적으로 900-950bp의 크기를 나타내며, *rpoC1*은 약 550-600bp의 크기를 나타내었음.

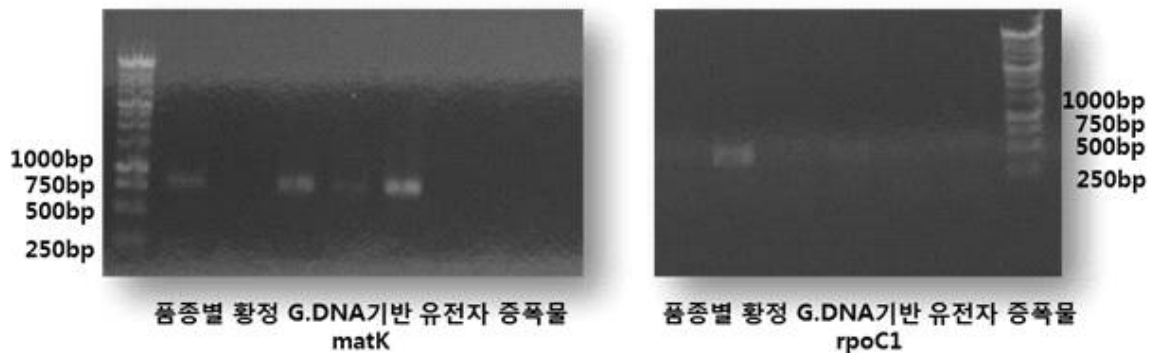


그림 16. Genomic DNA의 특정 유전자 (*matK*;좌, *rpoC1*;우)의 아가로스 젤 상의 증폭 결과

(2) 황정 추출분말 생산공정 최적화

- 황정 원료를 제외한 추출분말 생산공정의 변수를 탐색하여 최적화 과정을 진행하였음. 이에 전처리조건, 추출조건, 분무건조 조건에 대한 실험을 진행하였음. 각각의 공정에 대하여 추출물을 제조하였으며, 필요한 경우에는 서울여대에서 샘플의 효능을 동물실험을 통하여 확인하였음.
- 기준에 설정한 공정은 그림에 제시하였음 (그림 17).
- 황정 추출분말 생산공정은 다음과 같음.
- 황정 (건물)을 구매하여 투입하고 열수추출을 진행함. 가수량은 원료 기준으로 13배를 투입함. 열수추출 조건은 $92 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 3시간 진행하고 품온이 90°C 이상 시 추출을 시작함. 열수추출시 반응조 또는 추출기의 RPM은 150으로 진행함.



그림 17. 황정 추출 분말 생산 공정 (기존 설정 공정)

- 3시간의 추출이 끝나면 100 mesh를 이용하여 여과를 진행.
- 여과를 진행한 추출물은 대략 4-5 Brix 정도에 해당하며 농축기를 이용하여 30 Brix까지 농축을 진행.
- 농축액은 분무건조를 바로 진행할 수 있는 환경이면 120°C 에서 120초가량 살균을 진행한 후 분무건조를 진행하며, 파일럿이나 현장생산의 경우 추출 및 농축 후 바로 분무건조를 진행할 수 없는 상황에서는 1차 살균 (90 ±2 °C)후 5kg씩 포장하여 냉동보관을 진행. 분무건조는 농축액을 녹인 후 진행.
- 분무 건조 후 분말은 포장을 진행하며 현장생산의 경우 10, 14kg을 기준으로 하여 지대포장을 진행.

(2.1) 전처리 공정 최적화

- 황정 추출분말 제조 시 전처리 공정은 기존에 공정을 설정할 때 사용하지 않았으나, 샘플의 수율을 향상시키거나 수면개선 효능을 높일 수 있는 가능성이 있으므로 실험을 진행하였음.

(가) 실험 방법

① 전처리 공정 최적화

- 전처리 공정에 사용한 공정은 분쇄 공정과 증숙 공정임.
- 분쇄 공정은 황정 원료 건물을 믹서기나 분쇄기 등을 통하여 크기를 1cm 이하로 잘게 부순 뒤 추출공정을 처리하는 방법을 사용함.
- 증숙공정은 한약재를 달여서 쓸 때 자주 활용하는 방법으로 대표적인 방법인 구증구포 방법을 참고하여 활용하였음 (ref). 구증구포 방법은 원료를 아홉 번 찌고 아홉 번 건조하여 만든다는 데서 유래하였음. 대표적으로 홍삼을 이용할 때 많이 사용하는 방법임. 구증구포 방법을 현대적인 생산 방법에서 적용하기 위하여 autoclave를 활용하였음. 구체적인 방법은 autoclave에서 97℃에서 2.5시간동안 가열상태로 두고, 50℃에서 건조하여 추출물을 제조하였음.

② 황정 추출분말 제조공정

- 황정 추출분말 제조공정은 (2) 황정 추출분말 생산공정 최적화 부분에서 설정한 공정을 통하여 진행하였음.

③ 황정 추출분말의 수율 분석

- 수율 분석방법은 (1.1) 황정의 산지별 원료 비교 분석 부분 실험방법에 기술하였음.

④ 지표성분 분석

- 지표성분 분석방법은 (1.1) 황정의 산지별 원료 비교 분석 부분 실험방법에 기술하였음.

⑤ 수면관련 동물 효능 평가

- 본 실험은 서울여대에서 진행한 바 황정의 수면 개선 기작 규명 (서울여대) 부분의 실험방법에서 제시하였음.

(나) 실험 결과

① 전처리 공정별 수율 및 지표성분 분석

- 전처리 공정을 적용한 지표성분 및 수율 결과는 표 8에 제시하였음.

표 8. 전처리 공정 조건별 황정 추출분말 분석 결과

샘플명	GABA함량 (ug/g)	수율 (%)
기준 (전처리 없음)	11.5	28.2
분쇄 (1cm 이하)	14.7	48.4
증숙	8.3	16.8

- 기존 조건은 전처리를 하지 않고 추출공정을 진행한 샘플을 분석한 결과로써, 원료로 사용한 황정 건물의 크기는 제각각이라고 할 수 있음.
- 기존 조건에 비해서 분쇄 조건은 지표성분인 GABA 함량이 증가하였고, 수율면에서도 크게 개선되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 분쇄 공정을 진행할 때, 추출할 수 있는 표면적이 크게 증가함으로써 추출 수율이 높아지게 되며, GABA역시 더 많이 추출된다고 생각됨,
- 분쇄 공정을 거친 추출물은 기존의 추출물에 비하여 점성이 높아 끈적이는 성질을 나타내었음.
- 반면 증숙 공정의 경우 같은 원료를 사용하였을 때도 GABA 함량과 수율이 모두 줄어드는 결과를 나타내었음. 이는 실험 당시에는 고려하지 못하였으나, 황정 재배 농가 방문시 황정 생물을 건조시키는 과정에서 수분이 날아가면서 찌는 효과가 있어, 증숙공정을 진행하게 되면 기존에 진행하였던 공정을 중복하여 진행하는 효과가 발생하여, 효과가 없을 것으로 생각되었음.
- 증숙공정을 거친 추출물의 경우 겉보기에는 거의 변함이 없으나 GABA 함량과 수율이 차이는 것을 고려할 때, 증숙 공정을 진행하면 황정내에 여러 성분이 변할 수 있다고 판단됨,
- 분쇄 공정은 GABA 함량과 수율면에서 기존 공정에 비하여 우수하다고 판단되어 동물실험을 통하여 수면개선 효능을 분석하였음.

② 전처리 공정별 동물효능평가 결과

- 동물실험은 기준에 생산한 샘플과 기존공정을 재현한 샘플, 그리고 분쇄공정을 추가한 샘플 3가지를 진행하였음 (그림 18)
- 효능평가 결과는 수면억치농도 이상인 42mg/kg로 투입하여, 수면개선에 대한 효능을 확인하였음.
- 결과 처음 스크리닝시 사용한 샘플과 기존공정으로 제조한 샘플은 동등한 수준의 효능을 확인하였음. 이는 동일한 공정을 적용하였을 때, 효능이 동등하게 나타나는 것으로 실험의 재현성을 확인하였다고 할 수 있음.
- 반면 분쇄공정은 수면잠복기의 경우 거의 Control과 같은 수준으로 늘어났으며, 총 수면시간이 Control과 비교하여 유의적으로 증가하지 않아, 수면과 관련된 효능이 없다고 할 수 있음.
- 이러한 결과는 추출물의 기능성분에 대하여 확실히 규명이 되어야 알 수 있는 부분이나, 수

42 mg/kg

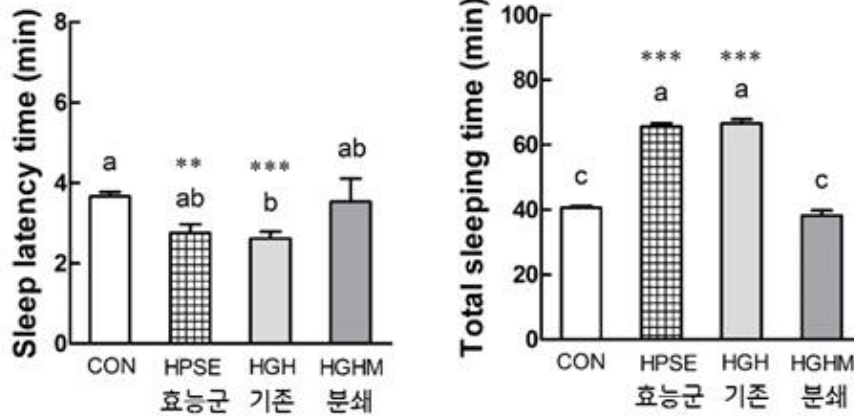


그림 18. 황정의 전처리 공정 조건에 따른 수면개선 효능분석

면효능이 있는 기능성분이 뿌리 표면에 존재하여, 원료를 분쇄하여 추출할 경우 수율이 증가하는 만큼 특정 기능성분이 희석되는 효과가 발생하면서, 동물실험시 효능에 필요한 농도를 충족하지 못하여 나타나는 결과일 수 있음. 또한 기능성분이 비극성 물질로써 원료 분쇄후 추출공정을 진행할 때, 타성분 추출이 늘어나는 만큼 추출함량이 늘어나지 않아서 생기는 현상일 수 있음.

- 또한 본 결과를 통하여 GABA함량과 수면효능의 관련성이 떨어지는 부분을 재확인할 수 있었음.

(2.2) 추출공정 최적화

- 추출공정에서는 효소분해 공정의 유효성을 검증하기 위하여 효소분해 공정을 추가하여 수율 및 수면효능을 분석하였음.

(가) 실험 방법

① 황정 추출공정 최적화

- 황정 추출분말 제조공정은 (2) 황정 추출분말 생산공정 최적화 부분에서 설정한 공정을 통하여 진행하였음.

- 효소분해공정은 열수추출공정에 이어 추출액에 효소가 작용할 수 있는 온도까지 냉각시킨 후 진행하였음. 효소분해공정에서는 황정원료 대비 0.5% 수준의 효소를 투입하였고, 1시간 효소분해를 진행하였음. 효소분해공정 설정시 메밀의 영양 성분이 황정 추출물과 유사하다고 판단하여 (탄수화물; 60-70%, 조단백질 12-15%), 메밀관련 연구결과에서 다양한 가수분해 효소 처리를 통하여 추출수율을 향상시키고 특정 유용성분 활성이 높아진다는 부분을 바탕으로 하

여 실험을 수행하였음.

- 효소는 탄수화물계열 분해효소인 viscozyme (제조사: Novozyme, 효소종류: arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase, 최적온도: 55°C), celluclast (제조사: Novozyme, 효소종류: cellulase, 최적온도: 60°C), beta glucanase (Filterase, 제조사: DSM, 효소종류: beta-glucanase, 최적온도 60°C)를 이용하여 진행하였음. 효소반응은 상기한대로 1시간 진행하였고, 온도와 pH는 효소에 맞는 최적조건에서 진행하였음.

③ 황정 추출분말의 수율 분석

- 수율 분석방법은 (1.1) 황정의 산지별 원료 비교 분석 부분 실험방법에 기술하였음.

④ 지표성분 분석

- 지표성분 분석방법은 (1.1) 황정의 산지별 원료 비교 분석 부분 실험방법에 기술하였음.

⑤ 수면관련 동물 효능 평가

- 본 실험은 서울여대에서 진행한 바 황정의 수면 개선 기작 규명 (서울여대) 부분의 실험방법에서 제시 하였음.

(나) 실험 결과

① 효소분해공정별 수율 및 지표성분 분석

- 효소분해 공정별 수율 및 지표성분 결과는 표 9에 나타내었음.

표 9. 효소분해 공정별 황정 추출분말의 수율 및 지표성분 분석 결과

샘플명	GABA함량 (ug/ml)	수율 (%)
기준	11.5	28.2
Celluclast 처리	4.63	37.5
viscozyme 처리	5.71	34.5
beta glucanase 처리	7.12	36.5

- 분석결과, 효소처리공정 도입시 GABA 함량은 기존 샘플에 비하여 줄어드는 것을 확인할 수 있었음. 이는 효소분해로 인하여 수율이 증가하면서 한정된 GABA 추출량이 희석되는 효과로 나타낸 것으로 생각됨.

- GABA 함량은 낮지만 수율 측면에서는 모든 효소처리공정에서 5% 이상 증가하는 것을 확인하였음. 만약 GABA 함량이 수면효능과 관계성이 낮고 수율이 증대된 결과를

바탕으로 동물효능평가시 기존 동등효능을 나타낸다면, 공정 개선에 도움이 될 수 있다고 판단하여 동물효능평가를 진행하였음.

② 효소분해공정별 동물효능평가 결과

- 효소분해 공정별 동물효능평가 결과는 **그림 19**에 나타내었음.
- 동물효능평가는 상기한 실험과 같이 수면잠복기와 총 수면시간을 지표로 이용하였음
- 결과적으로 모든 효소처리군에서 수면관련 효능은 유의적으로 감소한 것으로 나타났음. 수면 잠복기에서는 모든 효소 처리군에서 Control군과 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었음.
- 총 수면시간에서도 beta-glucanase 처리군과 cellulcast 처리군에서 Control과 유의적인 차이를 보였으나, 기존 샘플에 비해서도 효능이 차이남을 확인할 수 있었음.
- 따라서 효소처리시 수면개선 효능은 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 이에 대한 해석은 확실하지 않으나, 다당체로 추정되는 기능성분이 효소로 인하여 작용기가 분해되

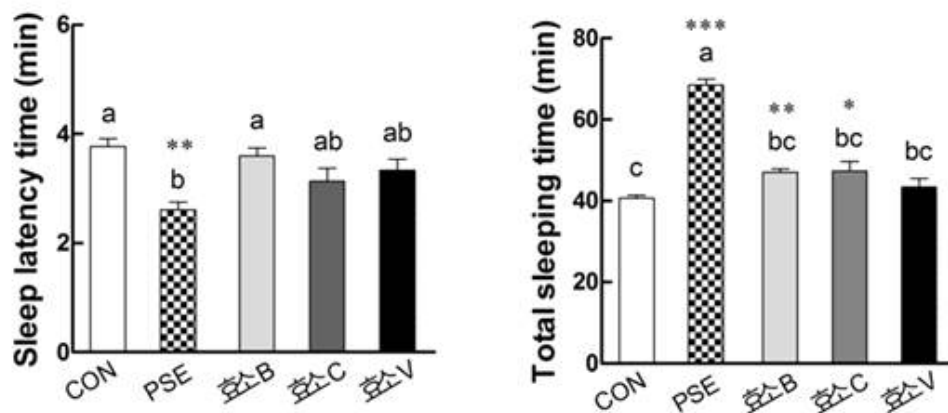


그림 19. 황정의 효소분해공정 조건에 따른 수면증진 효능분석

(PSE: 기존 샘플, 효소B: beta-glucanase, 효소C: cellulcast, 효소V: viscozyme)

거나 구조가 변하는 부분이 생길 수도 있으며, 상기에 설명한 대로 수율에 비하여 기능성분 함량이 줄어들게 되면서 효능이 감소하는 효과가 생길수도 있음, 하지만 이러한 해석은 황정 추출물의 기능성분이 확실하게 밝혀지지 않은 상태에서는 막연한 추론에 불과하며, 추후 기능성분에 대한 규명이 확실히 이루어 질 경우 확인할 수 있는 것으로 생각됨.

- 최종적으로 효소분해공정을 기존공정에 포함시키지 않기로 하였음.

(2.3) 분말화 공정 최적화

- 분무건조 공정을 수율을 높이기 위한 목적으로 진행되었으며, 따라서 측정 지표는 수율만을 측정하였음.

(가) 실험 방법

① 분말화 공정 최적화

- 분무건조 공정은 엑기스를 살균한 후 분무건조기에 일정한 속도로 투입하면서 분말화를 진행하였음. 분말화 공정에 존재하는 잠재요인은 분말화에 사용하는 추출물의 농도와 추출물에 섞는 부형제 처리 유무로 정의하였음.
- 추출물 제조시 농축된 엑기스의 농도는 30brix이며, 최소수준을 20 brix로 설정하였음. 이는 20 brix 이하로 진행되게 되면 분말건조에 들어가는 시간이 길어지게 되어 생산성이 떨어지기 때문에, 현장생산에 적용하기 힘들기 때문임.
- 부형제 처리는 황정원료가 당을 포함한 탄수화물 비율 대부분을 차지하고 있기 때문에 분말의 물성을 개선시키기에 알맞다고 생각되는 말토덱스트린 (Lo-dex5)를 사용하였고, 배합비는 전체 농축액 대비 3.226%를 사용하였음.
- 결과적으로 실험군은 3가지 (엑기스 농도:30 brix 부형제 처리 X, 엑기스 농도:30 brix 부형제 처리 O, 엑기스 농도:20 brix 부형제 처리 X)로 진행하였음

② 황정 추출분말의 수율 분석

- 분무건조 공정에서 사용하는 수율은 황정추출물 엑기스 (30 brix 기준)의 이론 수율을 계산한 후 (고형분 농도% x 엑기스의 부피ml로 계산) 실질적으로 생산된 분말량과 비교하여 확인하였음.

$$\text{생산 수율(\%)} = \frac{\text{실제 생산량 (추출분말의 량g)}}{\text{이론 생산량 (엑기스농도\% X 사용한 엑기스부피 ml)}} \times 100$$

(나) 실험 결과

- 분무건조 공정에 대한 데이터는 표 10에 정리하였음.

표 10. 분무건조 조건에 따른 수율

추출 엑기스 농도	부형제 처리 유무	수율 (%)
30 brix	X	45.6
30 brix	O	38.2
20 brix	X	62.2.

- 분무건조 조건에 따른 결과를 확인해 보면 20 brix로 희석한 경우 가장 높은 수준으로 분석되었으며, 30 brix를 분무건조에 사용하게 되면 제조 수율이 크게 감소하는 것으로 확인되었음.
- 또한 부형제 처리시 황정 추출분말의 물성이 개선되지 않고, 오히려 수율이 감소하는 것으로 확인되었음.
- 따라서 부형제를 처리하지 않는 조건으로 현장수준에서 적용가능한지 확인을 한 후 20brix 엑기스 사용을 검토하기로 하였음.

(3) 황정추출분말 현장실험 (Scale-up)

- 랩과 파일럿에서 설계한 공정을 바탕으로 황정 추출분말 현장생산 실험을 진행하였음.

(가) 실험 방법

- 생산공정은 랩에서 설정한 공정을 최대한 따르되 현장에서 구현할 수 있는 부분에 한하여서 공정을 설계하고 진행하였음.
- 현장실험은 태경농산 안성공장 (제1공장) 효소분해 1,2호기와 농축기 7호기를 사용하였으며, 분말화공정은 태경농산 제 2공장의 분무건조기를 활용하여 생산을 진행하였음. 생산에 사용한 원료 및 기기에 관한 사진은 **그림 20**에 제시하였음.
- 추출 및 농축액 제조공정은 10월 31일부터 11월 1일까지 진행하였으며, 분말화 공정은 11월 15일에 진행하였음.
- 추출액 제조 및 분말 제조공정은 **표 11, 12**에 표시하였음

표 11. 황정 추출물 현장실험 제조 공정

공정	작업 방법	내용	사용 설비	공정 소요 시간
원료 준비	1. 원료 크기 및 관능적 품질 확인	• 원료 형태 : 2cm 이하 절단 형태	-	-
원료 투입	1. 투입 순서 및 방법 (정제수 13배) - 1호기 : 정제수 1,100 kg, 황정 240kg - 2호기 : 정제수 1,100 kg, 황정 240kg *물 투입 → 교반 → 황정 투입	• 교반 속도 : 70 rpm • 원료 투입 후 온도 : 30~31°C • 원료 투입 후 품온 : 91~92°C	효소분해 1,2호기	• 정제수, 원료 투입 : 9:45~10:00 • 온도 상승 : 9:45~11:00
액수 추출	1. 추출 조건 : 92±2°C, 3시간 20분 - 품온 도달 시점부터 추출 시간 체크 2. 냉각 조건 : 70°C, 5분 셋팅 3. 추출 동안 교반 정지하지 않아야 함	• 추출 시간별 품온 및 브릭스	효소분해 1,2호기	• 추출 : 11:00~14:20 • 냉각 : 14:20~14:35
여과	1. 여과 조건 : 150 mesh 2. 교반하면서 배출 진행	• 배출 상태 : 원활하지 않아 밸브 on/off 반복하며 진행 • 여과박량 : 1,255 kg	Vibro shifter	• 여과(V/S) : 14:50~15:50
농축	1. 농축 온도 : 60°C 2. 압력 : 700 mmHg 3. 목표 브릭스 : 29~30 brix	• 농축 전 여과액 브릭스 : 6.3 brix • 농축 후 브릭스 : 28 brix	농축 7호기	• Batch식 농축 : 15:50~20:50
살균 /냉각	1. 살균 조건 : 90°C, 20분 2. 컨트롤러 온도 도달 시부터 살균 온도 체크 3. 냉각 조건 : 75°C 도달 시 배출	• 살균 후 브릭스 : 29 brix	농축 7호기	• 온도 상승 : 20:50~21:00 • 살균 : 21:00~21:20 • 냉각 : 21:20~21:30
포장	1. 포장 단위 : 15kg/캔 2. 보관 방법 : -18°C 이하 냉동보관	• 제품량 : 203.6 kg • 수율 : 8.48% (정제수 포함)	포장실	• 포장 : 21:30~21:45



원료



추출



농축



혼합



분말건조



포장

그림 20. 황정추출물 및 추출분말 생산공정에 사용된 원료 및 기기 사진

표 12. 황정 추출분말 현장실험 제조 공정

작업순서	설비	작업 방법	작업 조건
작업준비	-	<ol style="list-style-type: none"> 1. 설비 CIP 사전 실시 2. 건조상태 확인(육안), Line 내 건조상태 확인 3. 작업자 및 작업 도구 70% 알코올 소독 4. 원료 사전 준비 <ul style="list-style-type: none"> - 황정추출물 사전 해동 	<ol style="list-style-type: none"> 1. CIP : S/D CIP규정에 준하여 실시 <ul style="list-style-type: none"> - 전 라인(배관 분리) 약제 및 열수 진행 (무염, 냉동품으로 미생물 취약) 2. 황정추출물 사전 해동조건 <ul style="list-style-type: none"> - 온장고(90°C 셋팅) 2시간
원료준비 및 투입	배합탱크	<ol style="list-style-type: none"> 1. 원료 투입 순서 (처방 내역 중량 기준) <ul style="list-style-type: none"> - 황정추출물 -> 말토덱스트린 2. 황정추출물 투입 후 탱크 가운 <ul style="list-style-type: none"> - 용해 상태 확인 3. 혼합 완료 후 Brix 확인 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 배합탱크 혼합 조건 <ul style="list-style-type: none"> - 온도: 85°C (품온 도달 후 30분간 실시) - Rpm : 10 (내부 온도계 제거, 덩어리 녹은 후 교반 속도 증가) 2. 원료 용해 상태 확인
살균	액체살균기	<ol style="list-style-type: none"> 1. 혼합이 완료되면 액체살균기로 원료 이송 2. 살균 및 냉각 온도 준수 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 살균 조건 : 120°C, 120초 2. 냉각 조건 : 75°C
분무건조	분무건조기	<ol style="list-style-type: none"> 1. 혼합 완료 후 저장탱크로 원료 이송 2. 분무건조 조건 Setting 3. 열수 사전 분무 : 45~55 Hz, 30분 4. 분무 액 교체 (정제수 → 배합액) <ul style="list-style-type: none"> - 액 교체시 펌프 유량 조정 : 25~30 Hz - 배합액 분무 확인 후 분무 건조 조건이 유지 되도록 유량 Setting (20~30Hz) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 분무건조 조건 <ul style="list-style-type: none"> - 송풍온도(Inlet) : 170±1°C - 배풍온도(Outlet) : 110±1°C - 오토마이저 속도 : 8,000 rpm
포장	포장 Line	<ol style="list-style-type: none"> 1. 제품 규격 및 중량, 포장기 작동 유/무 확인 2. 하단mesh 상태 및 생산량 확인 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 하단 mesh : 10 mesh 2. 포장단위 : 14 Kg/지대

(나) 실험 결과

① 현장실험 결과

- 황정 추출물 생산의 경우 랩과 파일럿에서 설계한 공정을 바탕으로 황정 추출분말 현장생산 실험을 진행하였음.
- 황정 추출물 생산의 경우 400kg의 원료를 이용하여 2 batch를 진행하였으며, 엑기스는 740kg (30 brix 기준)을 생산하였음. 추출분말 생산공정에서는 603 kg을 투입하여 황정 추출분말을 143kg 생산하였으며, 분무건조 수율은 약 79% 수준으로 계산되었음.
- 포장은 14kg을 단위로 하여 지대포장을 진행하였으며, 4번째, 11 번째 포장물에서 분말을 샘플링하여, 분석을 진행하였음. 원료대비 분말 최종 수율은 23.8%로 계산되었음.
- 분석은 GABA 함량과 미생물을 분석하였음. GABA 함량은 추출물 생산공정과 분말 공정 각각을 샘플링하여 진행하였으며, 미생물은 분말화 공정 전공정에 걸쳐서 진행하였음.

- 미생물 수준과 GABA 함량에 대한 분석결과는 표 13, 표 14 에 제시하였음.

표 13. 황정 추출공정 GABA 함량 분석 결과

항목	Batch	추출시작	추출 1시간	추출 2시간	추출 종료	여과	농축
GABA 함량 (ug/g)	Batch1	1200.0	1008.3	936.7	993.6	982.9	471.4
	Batch 2	1251.4	1070.9	1537.8	576.7	1003.4	
고형분 함량 (%)	Batch 1	2.28	2.50	3.23	3.01	3.31	31.22
	Batch 2	1.45	2.44	1.33	3.56	2.35	

표 14. 황정 추출분말 생산공정 GABA 함량 및 미생물 분석 결과

항목	투입 후	배합 후 (85°C, 30분)	살균 전	2차 살균 후 (120°C, 2분) 초기	2차 살균 후 (120°C, 2분) 말기	S/D			비고
						초	중	말	
수분 (%)	-					4.14	3.90	3.24	
GABA 함량 (ug/g)	704.5			467.1		1094.0	1084	1082	
일반세균수 (CFU/g)	8.0x10 ³	3.0x10	8.0x10 ²	10이하	1.0x10	2.0x10	1.0x10	10이하	
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	BGLB법
<i>B. Cereus</i> (CFU/g)	1.5x10 ²	50이하	1.5x10 ²	50이하	50이하	50이하	50이하	50이하	

- 현재 설정한 규격은 지표성분인 GABA를 이용하였고 함량은 1,100±220 µg/g 수준으로 설정하였고, 미생물은 대장균군으로 음성수준으로 설정하였음.

- 현재 잔류농약은 5종 (총 디디티, 디엘드린, 총비에이치씨, 알드린, 엔드린)에 대하여

규격을 설정하였고, 중금속은 (납, 총비소, 카드뮴, 총수은)에 대한 규격을 설정하였으나, 건강기능식품 출시와 관련하여 식약처와 모듈토의를 진행한 결과 잔류농약의 규격은 더 추가가 필요할 수도 있다는 피드백을 확인하였음

- 현장생산을 진행한 각각의 공정에서 샘플링을 진행하였음. 추출공정에서는 각각의 Batch에서 샘플링을 진행하였으며, 수분정량과 GABA 함량 분석을 통하여 고휘분 대비 GABA 함량을 분석하였음.

- 여과 종료시 GABA 함량은 1000 µg/g 수준으로 측정되었으며, 고휘분 함량은 2.3-3.3% 수준으로 분석되었음.

- 분말화 공정에서는 혼합기에 투입후 GABA 함량은 704.5µg/g 수준으로 측정되었음.

- 최종 산물인 추출분말은 14kg 지대포장 기준으로 10포대정도가 생산되었고, 3,6,9 포장을 샘플링하여 1% 용액에 용해한 뒤 GABA 함량을 측정하였음. GABA 함량은 세가지 샘플에서 1080-1090 µg/g 수준으로 비교적 일정하게 나타났으며, 규격인 1100±220 µg/g 의 규격내 수준으로 확인되었음.

- 분말₁생산 공정에서는 일반 세균수는 투입 후 8.0×10^3 수준이었으나 살균을 진행한 후 10^1 수준으로 감소하였으며, 대장균은 모든 공정부분에서 음성으로 나왔으므로 원료 규격에 부합하는 것으로 나타났음.

① 생산 원가 분석

- 현장에서 생산한 수율을 바탕으로 생산 원가를 측정하였음

- 생산단가 산출을 위하여 원료비를 선정하고, 추출, 분말화 공정 수율을 전체적으로 분석하여 단가를 산출하였음

- 사전원가는 황정 추출분말 14kg 지대포장을 기준으로 산정하였고, 태경농산 안성공장에서 생산을 진행하였으므로, 태경농산 사전원가 방식에 맞추어 원가분석을 진행하였음

- 현재 황정 원료 공급가격은 업체에서 건물 kg기준 14,018원으로 매입 하였으며, 황정 이외의 부원료는 추가하지 않았음.

- 추출분말의 최종 수율은 23.9% 수준으로 계산되었으며 이를 바탕으로 사전원가를 계산하였음. 사전원가 계산결과 kg 당 68,200원 수준으로 계산되었음, 기존에 생산한 원료를 기준으로 하면 kg 당 105,000원 수준이었으나, 수율 개선등으로 인하여 100,000 원 미만으로 생산원가를 낮출 수 있었음. 향후 효능을 유지하면서 생산 수율을 높일 수 있는 방법을 고안하여 생산원가를 낮출 수 있는 개선방안을 지속적으로 찾을 필요가 있음.

나. 황정의 동물 효능 평가 및 작용기작 규명 (수행기관: 서울여대)

- 1차년도에는 황정의 산지별, 효소처리에 따른 수면개선 동물 효능을 평가하여 시료를 선정하고, *in vivo* 실험으로 GABA_A와 serotonin receptor의 specific antagonist를 이용한 황정추출물의 수면기작을 평가하였다. 나아가 *in vitro* 실험에서 receptor binding assay를 통해 황정추출물의 GABA_A receptor 결합 활성을 확인하였음.

(1) 황정의 시료별 동물 효능 비교 분석

- 동물의 수면 효능을 단기간에 평가하기 위한 방법으로 pentobarbital 유도수면 시험을 통하여 황정 산지(제천, 안동, 정선)와 효소처리(효소B: β -amylase, 효소C: cellulase, 효소V: viscozyme)에 따른 시료의 수면증진 효능을 평가하였음.

(가) 실험 방법

Pentobarbital 수면 유도 실험

- Pentobarbital 수면 유도 실험 방법은 그림 21에 나타내었음.

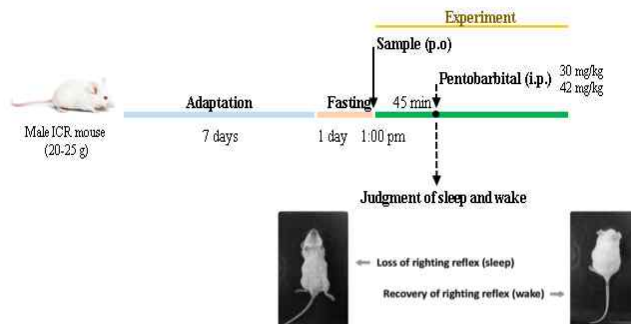


그림 21. Pentobarbital 유도 실험

- 그룹 당 10마리의 mouse를 사용하여 일주일 간 적응기간을 가진 후 실험 전 24 시간 동안 절식시킴.
- 실험은 오후 1시에서 5시 사이의 일정한 시간 내에 진행하였음.
- 대조군은 saline을 처리하고, 모든 시료(산지별, 효소별 황정)는 saline 용액을 이용하여 제조하고, pentobarbital 투여 45분 전에 160 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.)함.
- Pentobarbital은 42 mg/kg(hypnotic dosage)의 농도로 복강주사(i.p.)를 통해 사용함.
- Pentobarbital을 처리한 후 각각의 개체를 독립된 공간에 옮겨서 sleep latency(입면시간)와 sleep duration(수면시간)을 측정함.
- Sleep latency는 pentobarbital을 복강주사한 후 정반사(righting reflex)를 1분 이상 상실할 때

까지의 시간으로 설정하고, sleep duration은 정반사를 다시 회복할 때까지의 시간으로 설정하였음.

(나) 실험 결과

Pentobarbital 수면 유도 실험

- 황정 시료별 pentobarbital 수면 유도 실험 결과는 **그림 22**에 나타내었음.
- 수면잠복기(sleep latency)는 제천산 황정에서 가장 크게 감소($p < 0.01$)하였고(37.5%), 안동산 황정에서도 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였으며, 효소 처리군에서는 대조군과 비교하였을 때 수면잠복기의 유의적인 차이가 없음.
- 수면시간(sleep duration)은 대조군에 비해 황정 원산지 세 곳에서 모두 증가하였지만, 제천산 황정에서 가장 크게 증가($p < 0.001$)하였으며(43%), 효소 중 B와 C 처리 시 수면시간이 유의적으로 증가($p < 0.01$)하였으나 제천산 황정추출물에 비해 낮은 수면활성을 나타냄.

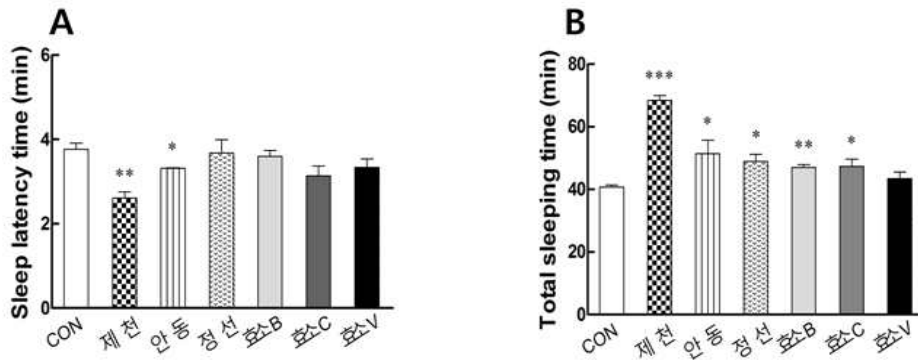


그림 22. 황정 산지, 효소처리 시료별 동물 수면 효능 평가
(A: 수면잠복기, B: 총 수면시간)

(2) 황정의 작용기작 규명(*in vivo*)

- Flumazenil(GABA_A receptor antagonist) 및 *p*-MPPI(5-HT_{1A} receptor antagonist)를 이용한 pentobarbital 수면유도 실험 및 뇌파 측정을 통한 수면 구조 분석을 통하여 황정의 수면활성에 대한 작용기작을 규명하였음.

(2.1) Pentobarbital 수면 유도 실험을 통한 황정의 작용기작 규명

(가) 실험 방법

- ① Specific antagonist를 이용한 pentobarbital 수면 유도 실험

- 그룹 당 10마리의 mouse를 사용하여 pentobarbital 수면 유도 실험과 동일한 조건에서 진행하였음.
- 대조군은 saline을 처리하고, 황정은 saline 용액을 이용하여 80, 160 mg/kg(PSE 80, PSE 160) 농도로 제조하였으며, positive control은 benzodiazepine 계열의 alprazolam을 2.5 mg/kg(BDZ)의 농도로 투여함.
- 시료 경구 투여 30분 전에 flumazenil(GABA_A receptor antagonist) 및 *p*-MPPI(5-HT_{1A} receptor antagonist)를 각각 3.5 mg/kg과 1 mg/kg을 좌 복강주사(i.p.)를 통해 사용함.
- 시료 경구 투여 30분 후에 pentobarbital을 42 mg/kg의 농도로 우 복강주사(i.p.)를 한 후, sleep latency와 sleep duration을 분석함.

(나) 실험 결과

① GABA_A receptor antagonist(flumazenil)를 이용한 pentobarbital 수면 유도 실험

- GABA_A receptor antagonist(flumazenil)를 이용한 pentobarbital 수면 유도 실험 결과는 그림 23에 나타내었음.

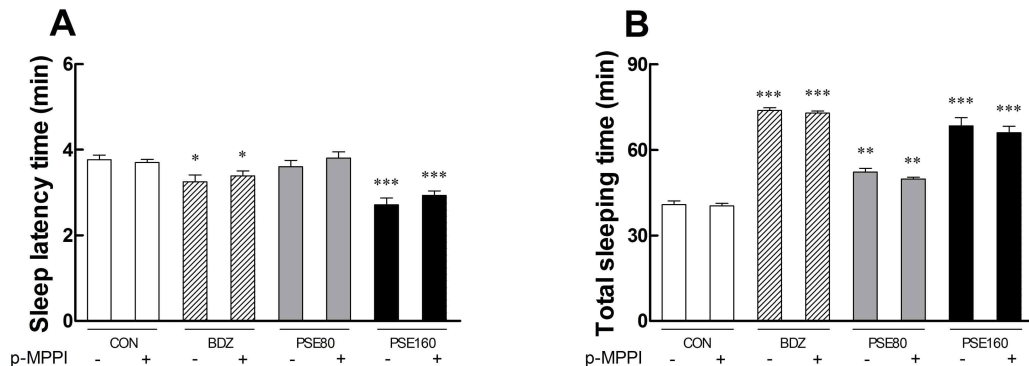


그림 23. Serotonin receptor antagonist(*p*-MPPI)을 이용한 수면기작 규명
(A: 수면잠복기, B: 총 수면시간)

- 수면잠복기(sleep latency)는 benzodiazepine을 처리한 양성대조군에서 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였으며, BDZ와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 수면잠복기는 대조군과 유사하게 증가($p < 0.01$)하여 수면 증진을 억제함.
- 고농도의 황정 추출물(PSE) 160 mg/kg 처리하였을 때 수면잠복기가 유의적으로 감소($p < 0.001$)하였으며, PSE와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 수면잠복기는 대조군과 유사하게 증가($p < 0.01$)하였음.
- 수면시간(sleep duration)은 benzodiazepine(BDZ)을 처리한 양성대조군에서 유의적으로 증가

($p < 0.001$)하였으며, BDZ와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 수면시간은 대조군과 유사한 수준으로 감소($p < 0.01$)하여 수면증진을 억제함.

- 저농도의 황정 추출물(PSE)을 80 mg/kg을 처리하였을 때 flumazenil에 의해 수면증진 효과가 억제되었으며, PSE를 고농도 160 mg/kg 처리하였을 때 수면시간은 유의적으로 증가($p < 0.001$)하였으며, PSE와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 수면시간은 대조군과 유사한 수준으로 감소($p < 0.001$)하였음.

- 따라서, PSE와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 수면잠복기 및 수면시간은 양성대조군인 BDZ와 flumazenil을 함께 처리한 군과 동일한 경향을 보임으로써 PSE는 GABA_A receptor에 작용하는 것으로 사료됨.

② 5-HT_{1A} receptor receptor antagonist(*p*-MPPI)를 이용한 pentobarbital 수면 유도 실험

- 5-HT_{1A} receptor antagonist(*p*-MPPI)를 이용한 pentobarbital 수면 유도 실험 결과는 **그림24**에 나타내었음.

- 수면잠복기(sleep latency)는 benzodiazepine(BDZ)을 처리한 양성대조군에서 유의적으로 감소($p < 0.05$)하였으나, BDZ와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군에서도 수면잠복기가 BDZ만 처리한 군과 비슷한 수준으로 감소($p < 0.05$)하여 수면증진 억제 효과를 보이지 않음.

- 고농도의 황정 추출물(PSE) 160 mg/kg 처리한 군과 황정추출물/*p*-MPP를 함께 처리한 군에서도 감소되는 수면잠복기의 수준이 비슷하게 관찰되어 황정의 수면잠복기에 대한 감소효과가 serotonin receptor와는 상관이 없는 것으로 사료됨.

- 수면시간(sleep duration)은 benzodiazepine(BDZ)을 처리한 양성대조군에서 유의적으로 증가($p < 0.001$)하였으나, BDZ와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군에서 수면시간의 감소가 관찰되지 않았음.

- 저농도의 황정 추출물(PSE)을 80 mg/kg을 처리하였을 때 *p*-MPPI에 의한 수면증진 억제 효과는 없었으며, PSE를 고농도 160 mg/kg 처리하였을 때 대조군과 비교하여 수면시간이 크게 증가하였으며 PSE와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군에서 *p*-MPPI에 의한 수면시간의 유의적인 감소가 관찰되지 않아 PSE의 수면시간 증진효과가 serotonin과는 무관하게 작용하는 것으로 사료됨.

- 따라서, PSE와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군에서 수면잠복기 및 수면시간은 양성대조군인 BDZ와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군과 동일한 경향의 결과를 얻어 serotonin(5-HT_{1A}) receptor antagonist인 *p*-MPPI에 의한 수면증진 억제 효과는 확인되지 않음.

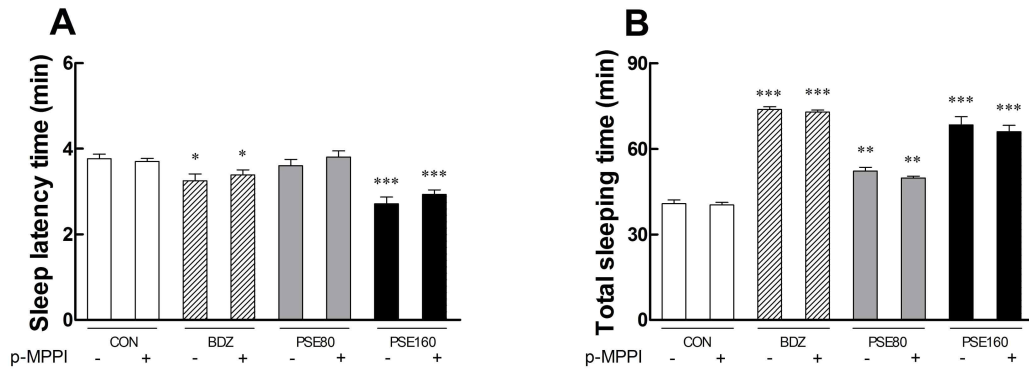


그림 24. Serotonin receptor antagonist(*p*-MPPI)을 이용한 수면기작 규명
(A: 수면잠복기, B: 총 수면시간)

(2.2) 뇌파 분석을 통한 황정의 작용기작 규명

(가) 실험 방법

① Specific antagonist를 이용한 뇌파(electroencephalogram, EEG) 분석

- 동물 뇌파 분석 방법은 그림 25에 나타내었음.
- SD rat(200-250 g)을 일주일 간 적응시킨 후 뇌파 측정을 위해 전극 삽입 수술을 실시하였음.
- Rat을 isoflurane을 이용하여 호흡 마취시키고, 뇌정위기(stereotaxic instrument)에 두부를 고정시킴.
- 두부 피하 결합조직을 절개한 후 EEG 측정을 위하여 stainless-steel screw 와 silver electrode line을 삽입하고, 이후 dental cement로 고정시키고 봉합함.
- 수술부위의 소독 및 항생제 투여를 3일간 실시하여 수술로 인한 염증을 예방하고, 일주일 간 회복기간을 가짐.
- 이후 3일간 시료를 일정한 시간에 경구투여(p.o.)한 후 마지막 투여하는 날 시료 투여 20분 전에 flumazenil(GABA_A receptor antagonist) 및 *p*-MPPI(5-HT_{1A} receptor antagonist)를 각각 3.5 mg/kg과 1 mg/kg을 복강주사(i.p.)를 통해 사용하였음.
- 10:00부터 17:00까지 7시간동안 EEG 측정하였으며, EEG의 sampling rate는 200 Hz로 설정하고, 0.1-25 Hz의 필터 영역을 설정하여 데이터를 기록하였음.
- 수면구조 분석은 fast fourier transform (FFT) 알고리즘에 의해 수행되며, 프로그램 eeg AUTO 3.3.0.20을 이용하였음.
- 분석결과는 wake, REM sleep(rapid eye movement, theta band: 6-10 Hz), NREM sleep(non-rapid eye movement, delta band: 0.65-4 Hz)으로 구분하여 수면 구조를 분석하였음.

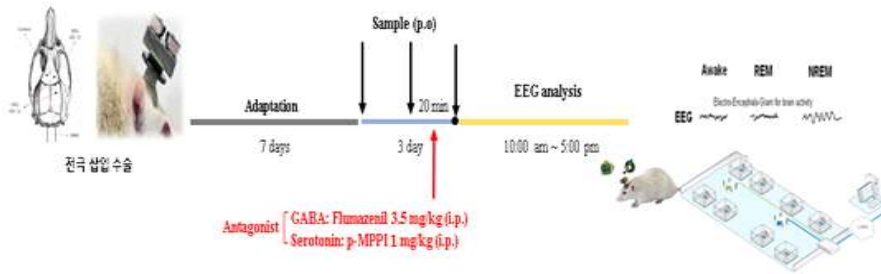


그림 25. Specific antagonist를 이용한 수면구조 분석

(나) 실험 결과

① GABA_A receptor antagonist(flumazenil)를 이용한 수면 구조 분석

- GABA_A receptor antagonist(flumazenil)를 이용한 뇌파 수면 구조 분석 결과는 그림 26에 나타내었음.
- 양성대조군으로 BDZ(2.5 mg/kg)을 투여하였을 때 각성시간이 유의적으로 감소($p < 0.01$)하였으며, BDZ와 flumazenil(3.5 mg/kg)을 함께 처리하였을 때 각성시간이 유의적으로 증가($p < 0.001$)하여 수면 증진 효과를 억제함.
- 고농도의 황정 추출물(PSE)을 160 mg/kg 처리하였을 때 각성시간이 유의적으로 감소($p < 0.001$)하였으며, PSE와 flumazenil을 함께 처리한 군에서 각성시간은 대조군과 유사하게 증가($p < 0.001$)하였음.
- 수면의 질을 측정하는 NREM 수면과 REM 수면에서는 160 mg/kg의 PSE를 투여하였을 때 NREM 수면이 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되었으며($p < 0.001$), REM 수면은 유의적으로 감소하여($p < 0.0001$) 수면시간과 질이 증가되었음을 확인하였음.
- PSE의 수면시간과 질의 증가는 flumazenil에 의해 억제되어 대조군과 유사한 수면 구조를 보임.
- 따라서, pentobarbital 유도 수면 실험 결과와 동일하게 PSE와 flumazenil을 함께 처리한 군의 수면시간과 수면의 질은 양성대조군인 BDZ와 flumazenil을 함께 처리한 군과 동일한 경향의 결과를 얻어 GABA_A receptor antagonist인 flumazenil에 의해 수면증진 효과가 억제되는 것을 확인함.

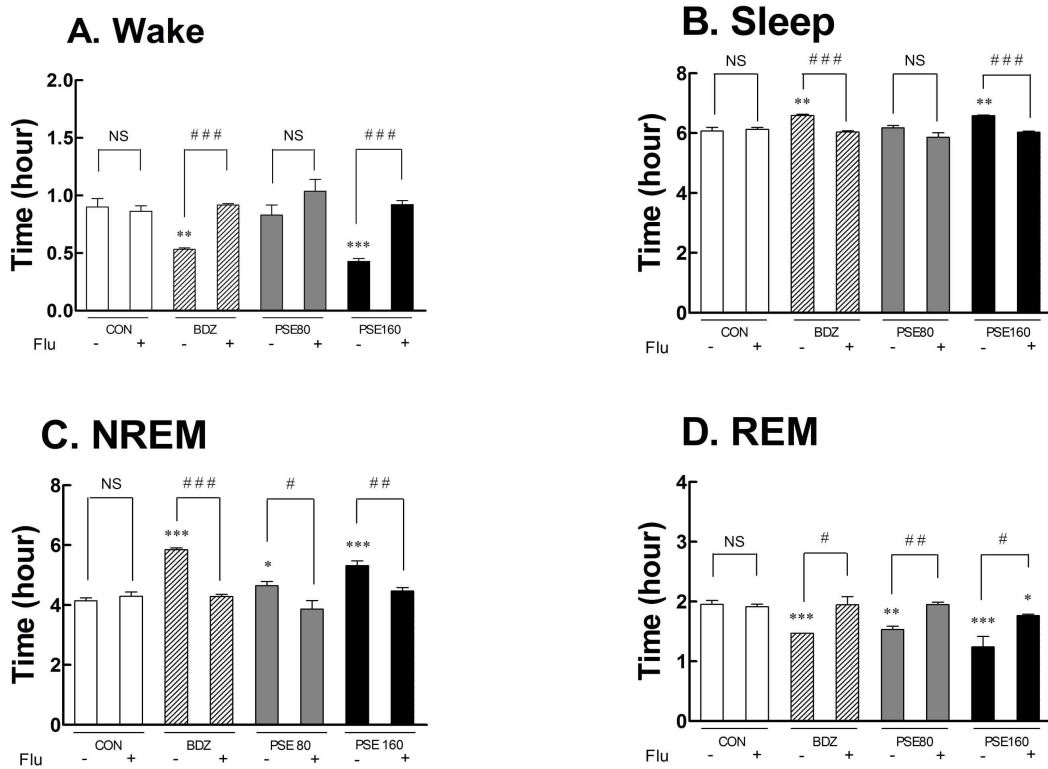


그림 26. GABA_A-benzodiazepine receptor antagonist(flumazenil)을 이용한 SD rat의 수면구조 분석

② 5-HT_{1A} receptor antagonist(*p*-MPPI)를 이용한 수면 구조 분석

- 5-HT_{1A} receptor antagonist(*p*-MPPI)를 이용한 뇌파 수면 구조 분석 결과는 그림 27에 나타내었음.
- 양성대조군으로 BDZ을 투여하였을 때 각성시간이 유의적으로 감소($p < 0.01$)하였으나, BDZ와 *p*-MPPI(1 mg/kg)를 함께 처리하였을 때도 BDZ만 처리하였을 때와 비슷한 수준으로 각성시간에 변화가 관찰되지 않음.
- 고농도의 황정 추출물(PSE) 160 mg/kg 처리하였을 때 각성시간이 유의적으로 감소($p < 0.001$)하였으나, PSE와 *p*-MPPI을 함께 처리한 군에서도 각성시간의 변화는 관찰되지 않음.
- 따라서, pentobarbital 유도 수면 실험 결과와 동일하게 PSE와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군의 수면시간과 수면의 질은 양성대조군인 BDZ와 *p*-MPPI를 함께 처리한 군과 동일한 경향의 결과를 얻어 serotonin(5-HT_{1A}) receptor antagonist인 *p*-MPPI에 의한 수면증진 억제 효과는 일어나지 않는 것을 확인함.

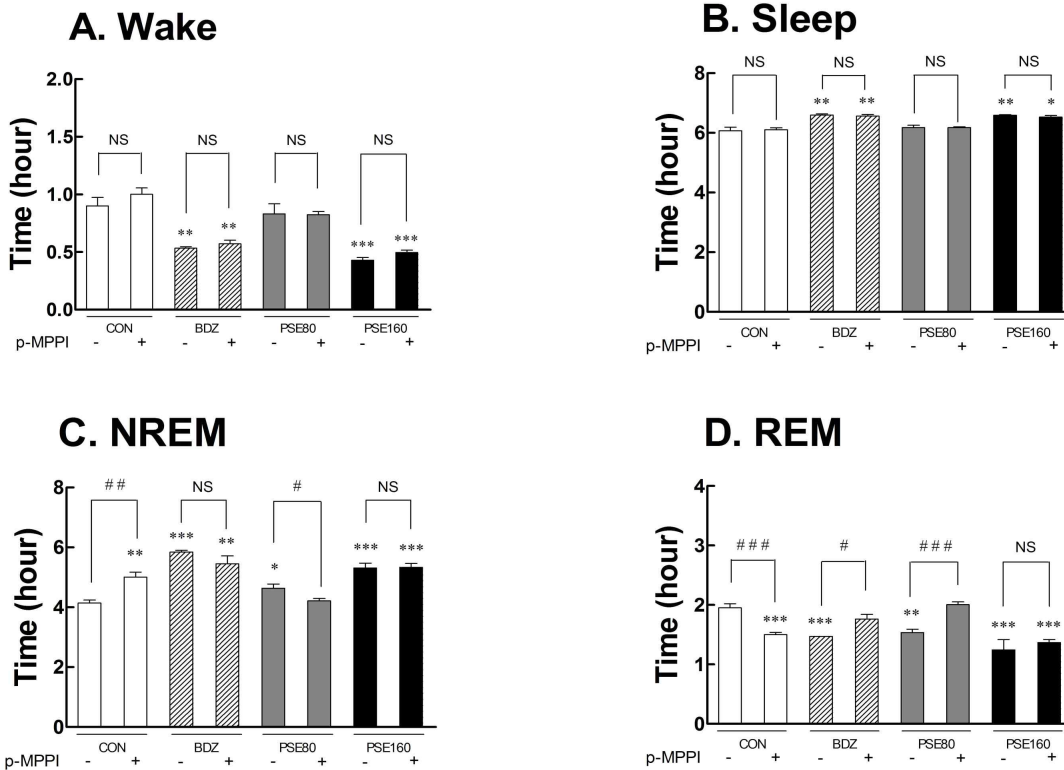


그림 27. Serotonin receptor antagonist(p-MPPI)을 이용한 SD rat의 수면구조 분석

(3) 황정의 작용기작 규명(*in vitro*)

- [³H]-flumazenil을 이용한 GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 통해 황정의 displacement binding(%)를 분석하였음.

(가) 실험 방법

GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 통한 황정의 작용기작 규명

- Receptor binding assay 방법은 그림 28에 나타내었음.

- Benzodiazepine 수용체 표본제작을 위하여 SD-rat(250~300g)을 단두 후 희생시켜, 즉시 대뇌피질 조직을 분리하고, 대뇌 피질 조직은 무게를 잰 후 50배 부피의 50 mM triscitrate 완충용액(pH=7.4)에서 균질화(homogenization)함.

- 균질화한 조직은 원심분리기(20,000×g, 4°C, Beckman, USA)를 사용하여 20분간 원심분리시킨 후 그 결과 생겨나는 침전물은 다시 50배 부피의 tris-citrate 완충 용액에 재분배(resuspension)함.

- Benzodiazepine 수용체 결합반응(receptor binding assay)을 위한

[³H]-flumazenil(Ro15-1788) 결합반응에서는 각 시험관 당 100 μL의 대뇌피질 조직 (약 0.32 mg 단백질에 해당), 21 μL의 방사성 동위원소와 50 μL의 각종 약물을 사용하며, 50 mM triscitrate 완충용액을 총 부피 500 μL가 되게 첨가함.

- 실험에 사용한 황정의 농도는 0.01 mg/mL에서 100 mg/mL까지 5 구간으로 설정하였으며, [³H]-flumazenil의 binding 억제활성을 분석함.

- [³H]-flumazenil 결합반응을 위해서 0~4°C에서 1 시간동안 incubation시킨 후 GF/B 여과지(Whatman)상에서 Brandel M-24R(Brandel Instruments, Gaithersberg, MD, USA)을 사용하여 0~4°C의 50 mM triscitrate 완충용액으로 결합분획과 비결합분획을 신속히 분리함.

- 여과지상의 결합분획이 내는 방사성 활성도는 liquid scintillation counter를 사용하여 측정 하고 제작한 대뇌피질 조직의 단백질 함량은 BCA법을 사용하여 측정함.

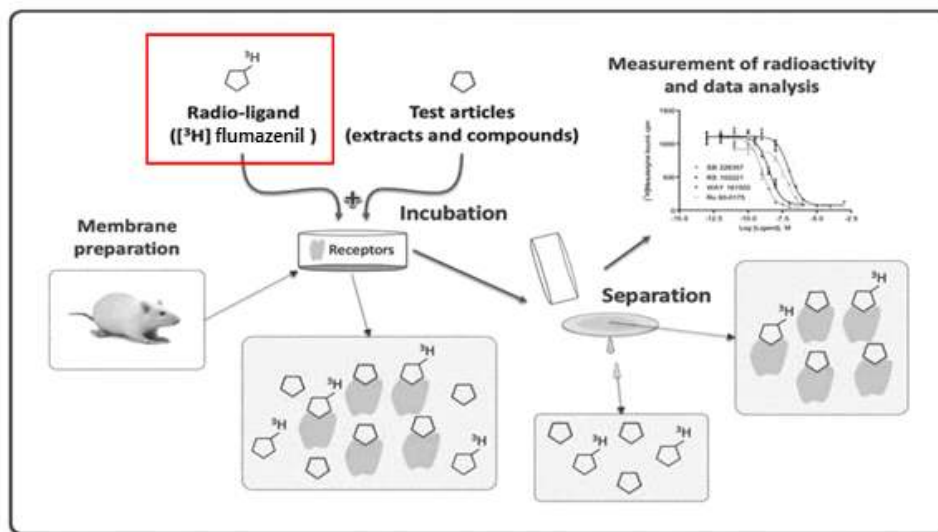


그림 28. Radio-ligand binding assay

(나) 실험 결과

GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 통한 황정의 작용기작 규명

- Receptor binding assay를 통한 황정의 displacement binding(%)는 그림 29에 나타내었음.

-황정 추출물(PSE)은 중추성 benzodiazepine 수용체의 antagonist인 [³H]-flumazenil의 수용체 결합을 5구간의 농도에서 농도의존적으로 6.25~60.30%의 억제 활성도를 나타내었으며, EC₅₀ 값은 0.8152 mg/mL이었음.

- 따라서, 황정 추출물은 수면 유도 및 수면시간 증가, 수면 질의 향상에 효과가 있

으며 specific antagonist를 이용한 pentobarbital 유도 수면 시험, EEG를 통한 수면 구조 분석, GABA_A-benzodiazepine receptor binding assay를 통해 GABA_A-receptor antagonist인 flumazenil에 의해 수면 증진이 억제 되고, serotonin(5-HT_{1A}) receptor antagonist인 *p*-MPPI에 의해서는 수면 증진이 억제되지 않는 것을 확인하여 결과적으로 황정 추출물은 GABAergic 메커니즘을 통해 수면 증진 효과를 갖는 것으로 확인됨.

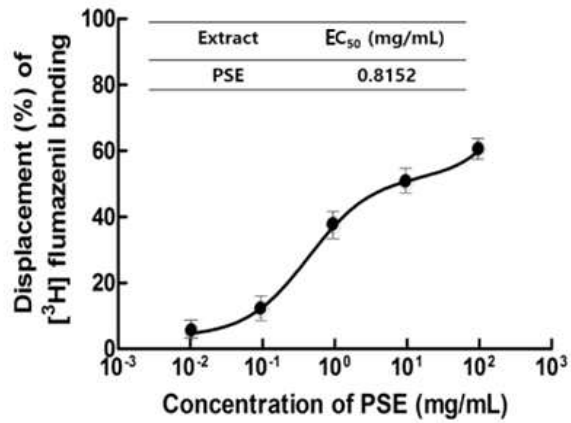


그림 29. 황정의 농도별 receptor binding activity

다 황정의 수면개선 인체효능 평가 및 분석 (수행기관: 이화여대)

- 주관기관인 농심에서 개발한 황정 추출물을 포함한 시제품을 활용하여 수면개선 인체 효능평가를 진행함

(가) 인체적용시험 진행 방법

- 1차년도에는 인체적용실험을 위한 실험법을 설계하고, 실험자 모집을 시작하였음.

① 인체대상연구의 안전성 심의 완료

- 이화여자대학교 생명윤리위원회를 통해 본 연구과제의 연구 디자인, 진행의 안전성 심의를 완료함. 심의 결과 본 연구과제의 IRB 심의가 승인되었음.

② 연구대상자 선전

- 선정기준

- 만 20세에서 65세 이하의 성인 남녀
- 수면 개시 또는 수면 유지에 어려움이 있거나, 새벽에 깨고 다시 잠이 들지 않는 증상, 자도 잔 것 같지않고 개운하지 않은 증상을 일주일에 1회 이상, 최소 2개월 이상 겪어 온 경우

- 제외기준: 다음 중 한 가지 이상의 항목에 해당하는 모든 대상자

- 구조화된 면담과 수면 척도로 평가하였을 때 불면증(질환 이환 상태)에 해당하는 경우
- 수면장애를 흔히 유발하는 것으로 알려진 약물(예: 코르티코스테로이드, 스타틴계 등)을 복용 중인 경우
- 수면제(예시: zolpidem, 벤조디아제핀 계열 등)를 최근 2개월 동안 복용한 경우
- 병력청취, 신체검진 및 실험실적 검사에서 발견된 중대한 주요 내과적 또는 신경학적 질환이 있는 경우
- 구조화된 도구로 평가하였을 때에, 1축 정신장애(우울장애, 양극성 장애, 알코올 의존, 조현병 등)의 증거가 있는 경우
- 의식 소실 혹은 경련을 동반한 두부 외상의 병력
- 뇌자기공명영상 검사나 수면다원검사를 시행할 수 없는 경우(예: 폐소공포증, 체내에 삽입된 자기성을 띤 전자기기 등)
- 항정신성 약물을 참여 시점부터 3개월 이전 동안 어느 때라도 복용한 적이 있는 경우
- 황정(둥굴레) 혹은 황정추출물을 포함한 식품에 부작용 혹은 알레르기 반응이 있었던 경우
- 본 인체적용시험에 영향을 줄 수 있는 기간 내에 다른 약물을 복용하거나 다른 임상시

험에 참여하였던 경험이 있는 경우

- 피임약을 복용중인 경우
- 연구 참여 기간 중 임신을 계획하고 있거나, 현재 임신 중 혹은 수유 중인 경우

③ 인체적용시험 디자인

- 본 연구는 황정(동굴레)의 수면 증진 효과 및 인체 투여 안전성을 검증할 수 있는 전향적 이중 맹검 무작위 배정 인체적용시험 및 무작위 부표본을 대상으로 수면다원 검사를 통한 심층평가를 하였음.
- 연구참여자들은 총 4번을 방문하였고, Visit 1(선별검사)에서 연구참여자 선정/제외 기준에 따라 선별한 후 Visit 3에서 각 군(황정추출물 섭취군, 위약대조군)으로 무작위 배정됨.
- Visit 2 이후 각성활동량검사(Actigraphy)와 수면일기를 통해 실험적 세팅이 아닌 일반 자연적 세팅에서의 수면을 기본적으로 평가함.
- 방문 시마다 수면의 질 측정을 위한 검사, 우울, 불안, 스트레스 정도 등에 대한 조사를 시행하며, 황정 섭취 전후에는 안전성 평가를 위한 혈액 및 소변 검사를 실시함.
- Visit 3, Visit 4에는 대뇌 화학적 물질대사 등을 평가할 수 있는 자기공명분광영상 등의 뇌 MRI 검사를 시행함.
- 또한 각 군에서 무작위 추출된 부표본을 대상으로 수면다원검사를 통한 심층적 평가를 Visit 3, Visit 4에 실시함 (그림30).

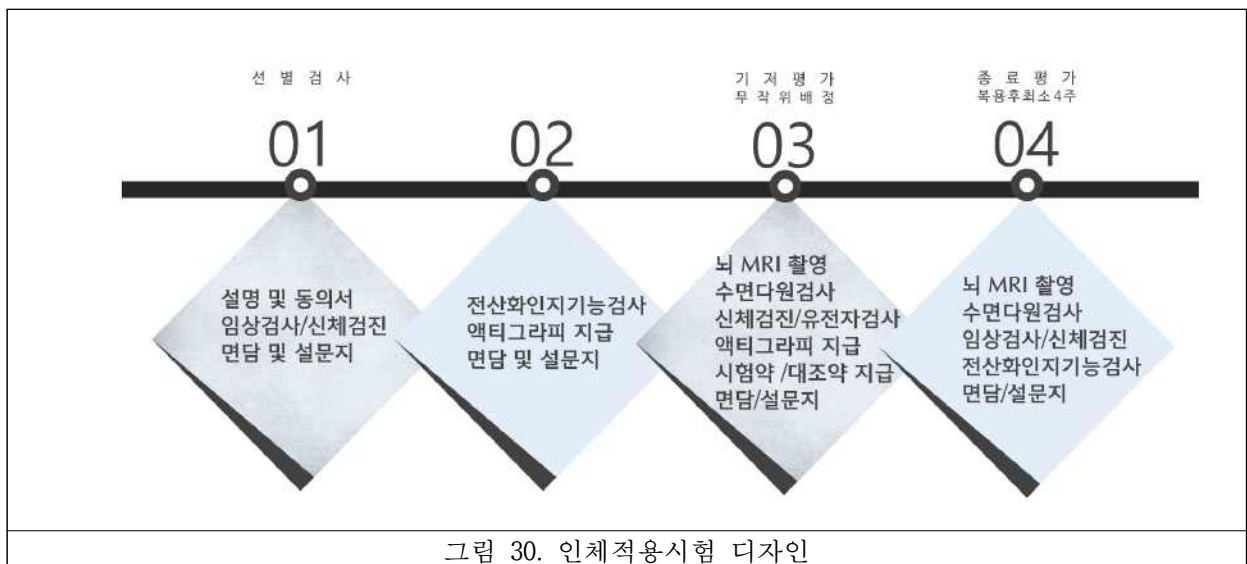


그림 30. 인체적용시험 디자인

④ 검사항목 및 방법

1) 기초검사

- 본 연구에서는 기본적인 사회인구학적 정보, 병력 및 약물투여력, 이학적 검사, 활력징후 검사, 신체검사 및 심전도 검사 등의 기초검사를 진행함.

2) 수면관련 검사

- 본 연구에서는 수면 관련 자가보고 설문지를 이용한 주관적 지표를 매 방문시 수집하였고, 각성활동량 검사를 이용하여 객관적 지표를 약물 복용 전과 후에 수집함.

- 부표본에 한해 수면 다원검사를 이용한 객관적 지표를 약물 복용 전후로 2차례 수집하여 포괄적으로 수면 관련 내용을 측정함.

2-1) 수면 관련 자가보고 설문지 조사

- 다음 설문지를 사용하여 수면 문제를 측정함.

수면 문제 측정 설문지
피츠버그 수면의 질 평가 설문 (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI)
아테네 불면 척도 (Athens Insomnia Scale, AIS)
불면증 심각성 척도 (Insomnia Severity Index, ISI)

2-2) 각성활동량 검사(Actigraphy)

- 자연적 세팅에서의 수면 및 활동량을 평가할 수 있는 각성활동량검사를 약물 복용 전후로 수면 및 활동량 변화를 측정함 (그림 31).



그림 31. Actigraphy 및 측정 데이터

2-3) 수면다원검사

- 본 연구의 수면다원검사는 임상시험용 식품 섭취 전/후 2회에 걸쳐 동일한 시간에 실시되었으며, 평균 밤 10 시부터 새벽 6 시까지 진행됨. 검사는 적절한 습도와 온도가 조절된 어둡고 조용한 방에서 시행하였으며 전/후 동일한 방에서 진행함.

3) 기타 설문 및 인지기능 검사

- 수면관련 문제 이외의 기타 설문으로는 우울, 불안, 신체건강 및 삶의 질, 그리고 식품의 효과를 평가할 수 있는 다양한 척도를 실시함.
- 인지기능 검사로는 주의집중력 및 감각운동, 기억력, 실행능력 및 전두엽 기능, 그리고 사회정서적 인지능력을 측정함.

4) 뇌영상 검사

- 뇌영상 검사로는 신경전달물질의 농도를 측정할 수 있는 자기공명분광영상을 획득함.

5) 혈액 및 소변 검사

- Visit 1과 Visit 4에서 8시간 공복 상태의 혈액, 소변을 채취하여 (주)녹십자에 의뢰하여 분석함. 혈액 및 소변검사에 대한 결과 중 주목할만한 임상병리학적 비정상 결과에 대해서는 책임연구자가 모두 확인하였고, 치료가 필요한 경우 증례 기록서의 '이상반응' 페이지에 진단 또는 의학적 상태를 입력함.

3-3. 2차년도 연구 내용

가. 황정을 이용한 수면개선 건강기능식품 개발 (수행기관: 농심)

- 2차년도에는 1차년도에 이어 수면개선 건강기능식품 개발에 관련된 연구를 추진하였음.
- 개략적인 연구내용은 개별인정 신청을 위한 신규 지표성분 개발 및 유전자 분석법 개발, 또한 품질 지표 설정을 위한 기능성분 함량 분석, 현장실험 (2회)를 통한 품질 표준화 확인, 그리고 시제품 개발 부분이 있음.

(1) 신규 지표성분 설정

- 지표성분은 건강기능식품에 사용되는 주요 원료의 표준화를 확인하기 위해서 필요한 것으로 원재료의 생산, 원료의 제조, 가공 공정과 안정성 등 원료의 특성을 고려하여 여러 번의 시험 결과를 근거로 함량 단위를 설정함
- 식약처와의 모듬토의 결과 (결론 부분 상세 제시) GABA가 황정을 대표하는 지표성분으로 적합하지 않다는 의견을 들었기 때문에 황정 원료에 적합한 지표성분을 찾는 일을 진행하였음.
- 이에 황정을 포함한 등굴레속에 비교적 특이적으로 함유된 물질을 찾기 위하여 노력하였음. 황정 추출물을 기준으로 분리 정제를 진행하였고 최종적으로 NMR 분석을 통하여 β -sitosterol과 stigmasterol 두가지를 분리 정제하는데 성공하였음.
- 신규 지표성분의 GC peak를 그림 32에 게시하였음.

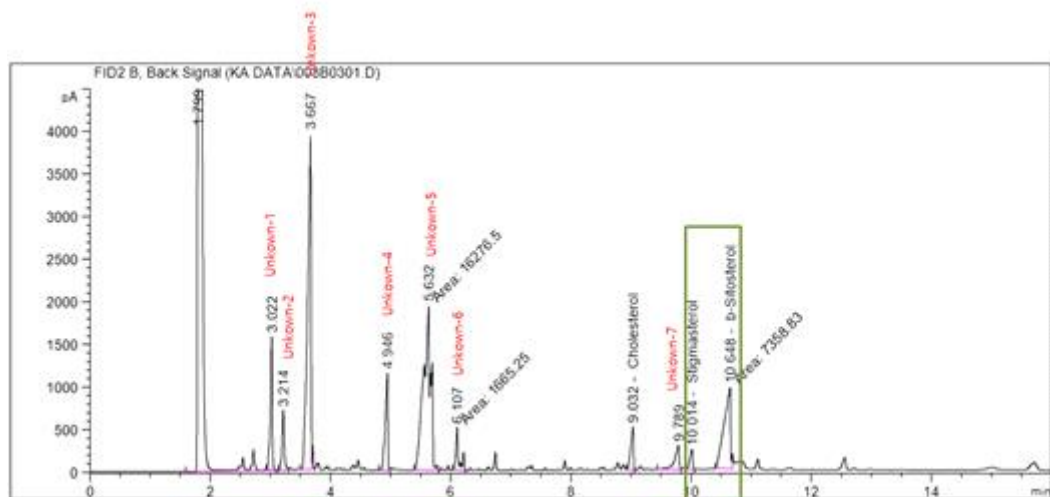


그림 32. 황정 추출분말의 GC 분석 Peak (지표성분 함량 분석용)

- 분석 결과는 서울여대에서 진행한 결과임. Data에서 Cholesterol은 Internal standard

로써 활용하였음. 분석결과를 보면 지표성분 분석의 앞쪽 부분에 여러 가지 Unknown peak가 발견되었고, 이 peak 들은 신규로 발견한 β -sitosterol과 stigmasterol과 비교하여 함량이 비슷하거나 높은 경우도 존재하였음. 또한 Cholesterol 뒤쪽에 stigmasterol과 β -sitosterol을 확인할 수 있었음. 각각의 함량은 stigmasterol: 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (분해 전), 2.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (분해 후), β -sitosterol: 83.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (분해 전), 225.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (분해 후)로 분석되었음 (서울여대 분석결과).

- 서울여대로부터 분석 방법을 확보하여 현장생산품 함량을 분석하였음.

(가) 실험 방법

- 황정 추출분말 지표성분은 β -sitosterol 로써 GC를 통한 분석 방법을 개발하였음.
- β -sitosterol 분석을 위한 전처리 과정은 전처리: Acid hydrolysis > Alkali saponification > Sample clean up > TMS 유도체화 후 GC분석을 진행하였음.
- 분석방법은 표 15에 게시하였음

표 15. 지표성분 분석을 위한 전처리 및 분석 방법

Acid Hydrolysis	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기능성 소재 sample 50또는 100mg을 15ml tube에 정량 2. GC 분석시 Internal standard로 사용되는 Betulin 희석액을 10ug을 계산하여 투입 3. N2 gas를 이용하여 건조 4. 2N HCl/MeOH (1ml) 추가 5. Vortex 및 incubation (150 rpm, 70-80°C, 1시간) 6. 상온에서 방냉 (10분 이상) 7. N2 gas를 이용하여 건조
Alkali Saponification	<ol style="list-style-type: none"> 1. 4N KOH/MeOH (1ml) 추가 2. Vortex 및 incubation (150 rpm, 70-80°C, 1시간) 3. 상온에서 방냉 (10분 이상) 4. 50% KOH/MeOH (1ml) 추가 5. Vortex 및 incubation (150 rpm, 70-80°C, 1시간) 6. 상온에서 방냉 (10분 이상)
Sample Cleanup	<ol style="list-style-type: none"> 1. H2O(2ml) 및 CHCl3 (3ml) 추가 2. Inverting 뒤 centrifugation 진행 (2,500rpm, 3분) 3. 상층부 (물층) 제거 (Pipet 이용) 4. H2O (3ml) 추가 및 같은 분리과정 3반복 진행 5. 하층부 분리 (CHCl3층) 6. N2 gas를 이용하여 건조
TMS-유도체화	<ol style="list-style-type: none"> 1. 유도체 (BSTFA : TMCS (99:1)) 100ul 추가 2. Vortex 및 incubation (150 rpm, 60°C, 1시간)

	3. N2 gas를 이용하여 건조 4. CHCl3 200ul에 용해
GC 분석	- Flow rate : 8.7316 mL/min (split, 10: 1) → 0.87316 ml/min - Injuector Temp. : 310℃ - Detector Temp. : 310℃ - Oven Temp. 250 (1 min) → 10 ℃/min → 320℃ (6 min) - Injection volumn : 1μL - RT값, 6.3-6.4부근에서 분석

(나) 실험 결과

- 서울여대에서의 선행결과를 바탕으로 GC 결과 분석을 진행하였음.
- 분석 전 분해과정이 필요한데, 분해과정을 거치지 않으면 지표성분 함량이 낮으며, 함량이 일정하지 않은 문제가 있기 때문에 분해 후 분석을 진행하였음.
- 전처리 과정은 매우 길고 복잡한 과정을 포함하기 때문에 분석 시 오차가 날 수 있는 부분이 많고, 표준품의 경우 일부는 순도가 낮아서 오차의 원인이 되기도 하며, 순도가 높더라도 표준품 peak에서 잡 peak가 발견되기도 하기 때문에 전처리와 분석 시 주의를 요하게 됨.
- β-sitosterol 표준품에 대한 데이터 (3가지 농도 포함)는 **그림 33**에 표시하였음. 황정 표준품에 대한 그래프는 **그림 34,35**에 표시하였음.

농도	Area
1 mg/ml	193756
100 μg /ml	19016
10 μg /ml	2186

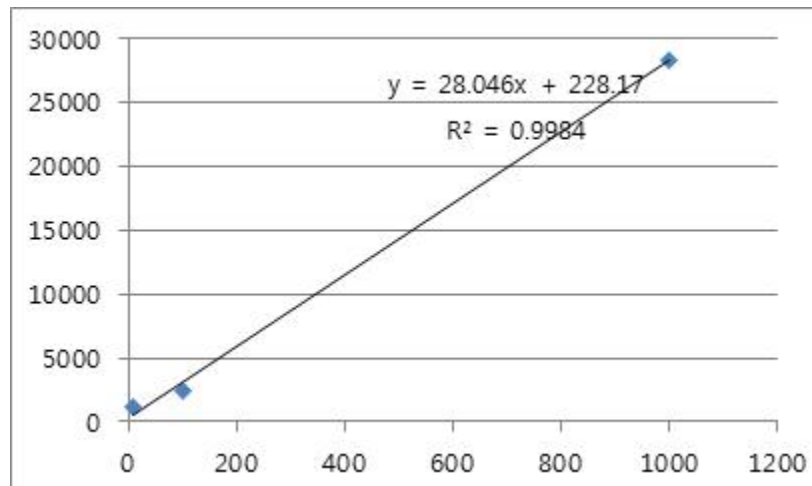


그림 33. β-sitosterol의 농도별 분석 및 calibration 그래프

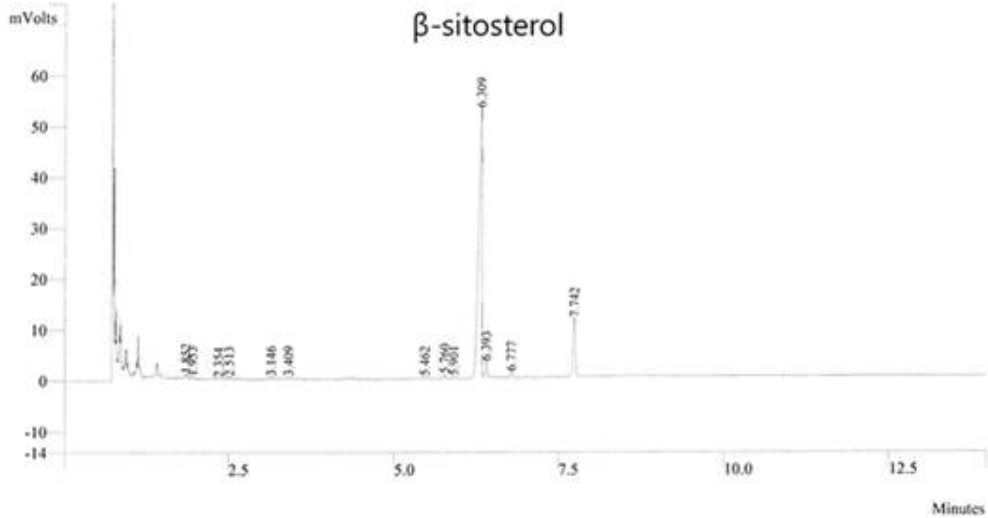


그림 34. 1mg/ml의 β -sitosterol 표준품 용액의 GC 그래프

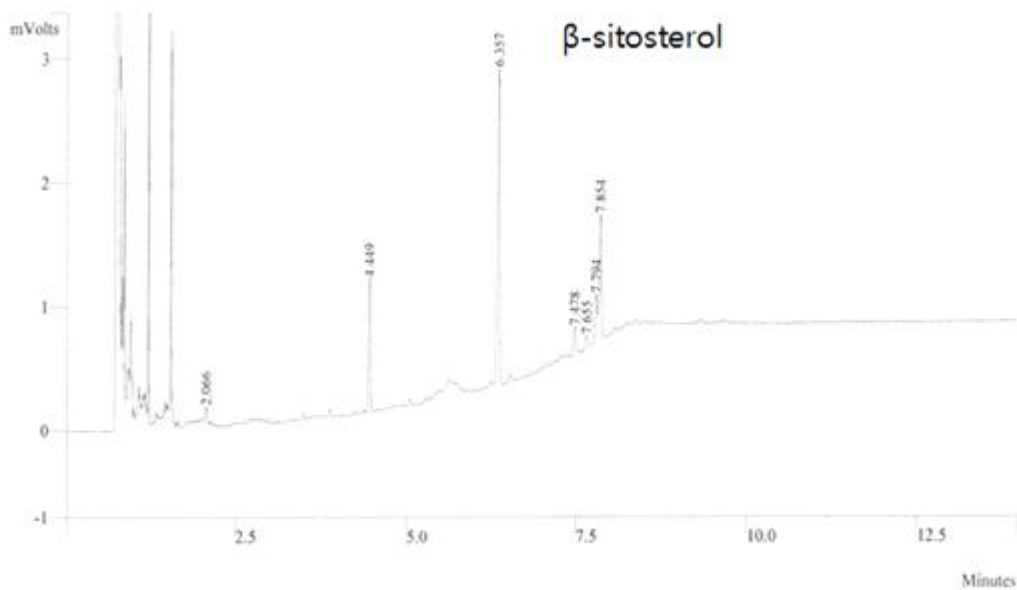


그림 35. 황정 추출분말 표준품 (100mg) GC 분석결과

- Sitosterol은 동일한 방법으로 측정이 가능하나 황정 추출물 내 농도가 매우 낮은 편이기 때문에 농도가 높은 β -sitosterol을 이용하는 것이 유리하다고 판단되어 β -sitosterol을 이용하여 분석을 진행하였음.
- 지표성분으로써 활용 가능성을 확인하기 위하여 공정능력분석을 진행하였음. 분석 결과는 표 16과 그림 36에 표시하였음.

표 16. β -sitosterol 분석결과 data

회차	1 회			2 회			3 회		
반복 수	1	2	3	1	2	3	1	2	3
결과 값 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	2.19	2.29	2.40	2.41	2.25	2.45	2.10	1.96	2.02
회차	4 회			5 회			6 회		
반복 수	1	2	3	1	2	3	1	2	3
결과 값($\mu\text{g}/\text{mg}$)	2.32	2.24	2.31	2.30	2.43	2.21	2.01	2.03	2.10

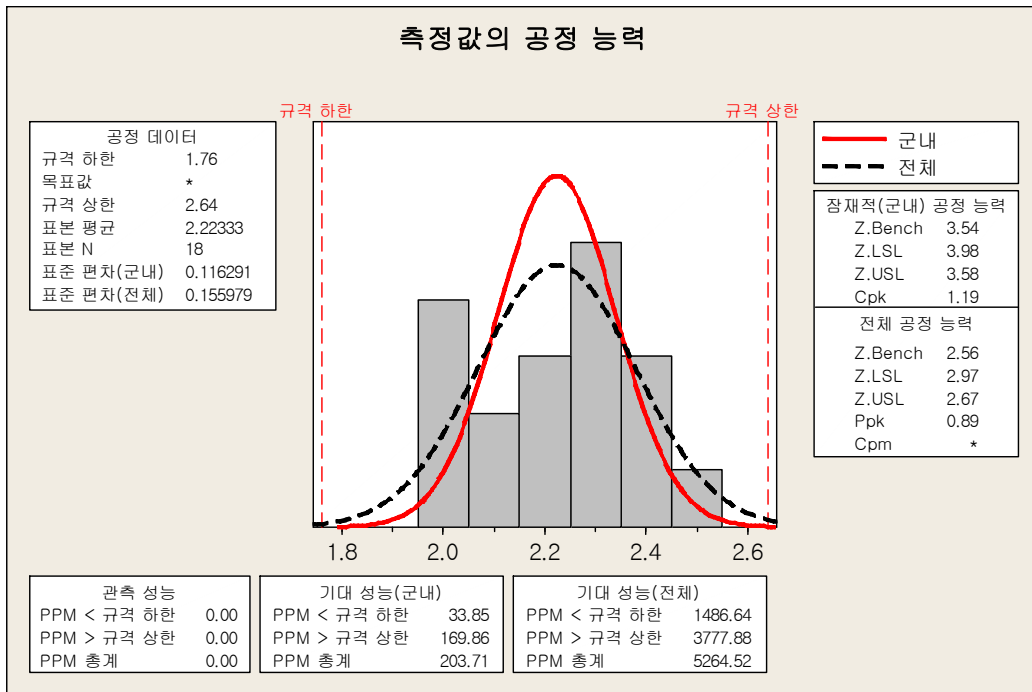


그림 36. β -sitosterol 분석결과에 대한 공정능력 분석 결과

- β -sitosterol에 대한 측정값은 평균 2.22 표준편차는 0.156 수준으로 분석되었음
- 규격을 2.20으로 설정하고 건강기능식품 설정에 맞게 80-120%로 설정하여, 규격하한을 1.76, 규격 상한을 2.64로 설정하였을 때, 현장생산품 분석값은 5시그마 수준에 도달하여 건강기능식품에 필요한 지표성분으로 사용하기에 적합하다고 판단하였음. 다만 추가로 현장생산을 진행하여 생산시 함량이 일정하게 분석되는지 확인할 필요가 있음.

(2) 기능성분 함량 분석

- 서울여대 연구결과에 따라 수면개선에 효능이 있는 2가지 물질(Glyceryl monolinoleate 또는 monolinolein 과 Oleamide)을 규명하였음.
- 본 연구결과에서는 정량분석이 끝난 Oleamide 부분에 대해서 기술하고자 함.
- Oleamide는 이미 수면증진에 효능이 알려진 물질로 GABA_A receptor에 작용하여 수면증진에 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있음.

(가) 실험 방법

- Oleamide의 정확한 분석을 위해서 β -sitosterol에서 진행한 동일한 전처리 조건 (Acid hydrolysis > Alkali saponification > Sample clean up)을 활용하였음.
- Sample clean up 과정 후 N₂에 건조를 진행하고, LC 분석에 사용하는 용매 (acetonitrile: H₂O=80:20)100ul에 용해시키고 표의 조건을 통하여 분석을 진행하였음.

표 17. Oleamide LC 분석 조건

<ul style="list-style-type: none">• Column : C18 Plus (5um, 250 x 4.6 mm)• Flow rate : 0.87 mL/min (Split 1 : 10)• Injector Temp. : 280°C• Oven Temp. : 250°C(1 min) → 10°C/min → 320°C(6 min)• Detector Temp. : 310°C• Injection Vol. : 1 μL

- 표준품은 Oleamide (Sigma, O2136)를 구입하여 사용하였음.
- Oleamide의 경우 전처리를 하지 않으면 표준품과 추출분말간에 peak의 RT값이 미세하게 차이가 날 수 있기 때문에, 반드시 전처리를 진행하고 분석을 해야 정확한 값을 구할 수 있음.

(나) 실험 결과

① Oleamide 분석 결과

- 현장생산품 황정 추출분말을 3번 3반복으로 분석한 결과는 표 18에 기술하였음. 또한 Oleamide 의 그래프와 공정능력 분석 결과는 그림 37,38에 표시하였음.

표 18. 황정 추출분말의 Oleamide 함량 분석 결과

회차	1 회			2 회			3 회		
반복수	1	2	3	1	2	3	1	2	3
결과값 ($\mu\text{g}/\text{m g}$)	0.085	0.091	0.090	0.112	0.113	0.114	0.104	0.094	0.092

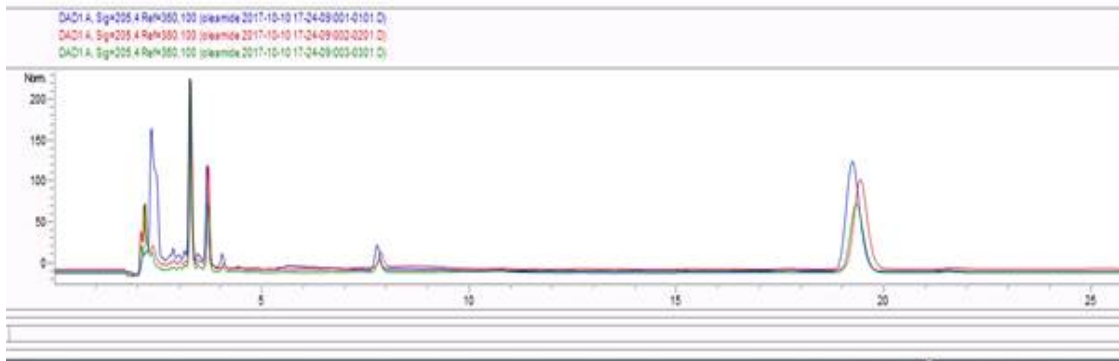


그림 37. Oleamide 표준품 LC 그래프

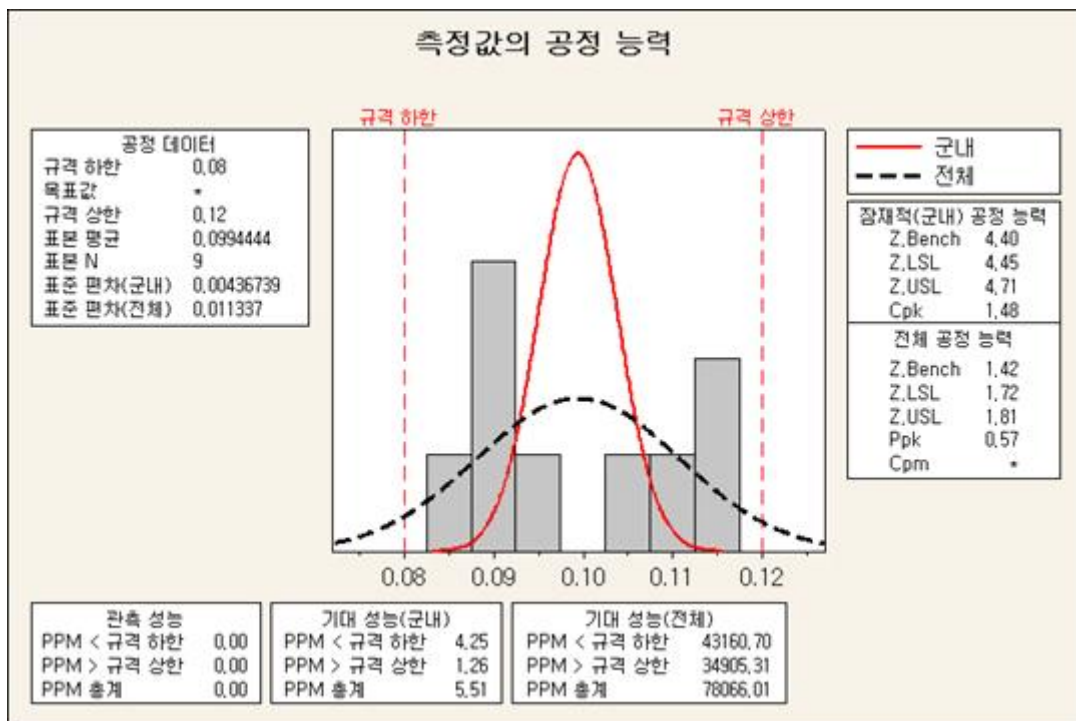


그림 38. 황정 추출분말의 Oleamide 함량 공정 능력 분석

- 데이터의 평균은 $0.1\mu\text{g}/\text{m g}$ 수준으로 분석되었으며 표준편차는 $0.011\mu\text{g}/\text{m g}$ 수준으로 확인되었음.
- 또한 3번의 반복실험을 통하여 얻은 데이터를 공정능력 분석을 진행한 결과 5.9 시그

마 수준으로 분석되었음. 상한값과 하한값은 β -sitosterol과 마찬가지로 80-120%로 정하고 분석을 진행하였음.

- 지표성분의 후보군인 β -sitosterol과 같은 전처리 조건을 사용하지만 상대적으로 Oleamide는 분석값이 거의 흔들리지 않고 일정하게 분석됨, 따라서 standard peak만 오차없이 분석된다면 분석에 있어서 어려움이 적은 편임.

② 원료별 추출분말의 Oleamide 분석 결과

- 1차년도에 진행한 연구결과를 확인해보면 본 연구기관에서 선정된 황정을 원료로 추출분말을 제조할 경우 타 원료에 비해서 수면개선 효능이 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었음.

- 따라서 이러한 효능의 차이는 Oleamide와 같은 기능성분 함량의 차이에 기인한 것으로 생각되기 때문에, 1차년도에 제조한 여러 원료의 추출분말을 같은 방법으로 함량을 분석하였음.

- 결과는 그림 39에 표시하였음.

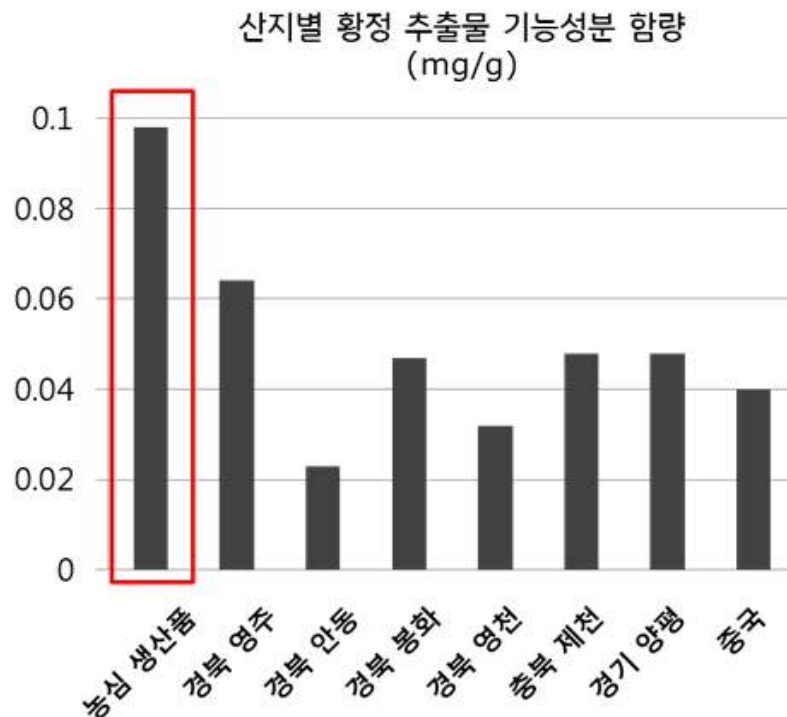


그림 39. 황정 원료별 Oleamide 함량 분석

- 황정 원료는 현재 품종별로 구별이 어렵기 때문에 구입시 확인할 수 있는 산지로 기술하였음.

- 결과를 확인해 보면 당사에서 생산한 추출분말은 0.1 μ g/mg수준이지만 타 원료로 제

조한 추출분말의 경우 당사 생산품 대비 30-60% 수준의 기능성분만을 함유하고 있음. 이와 같이 기능성분의 함량은 수면효능의 정성적 측면에서 영향을 줄 것으로 생각됨.

- 따라서 본 생산 시 기능성분의 함량이 일정 이하로 떨어지지 않도록 규격을 설정할 필요가 있음. 현재 2번의 현장생산을 추가로 진행한 부분을 분석해 필요가 있으나 현수준에서는 0.1 µg/mg 수준으로 규격을 설정하고, 이의 80% 수준인 0,08 이상의 함량을 유지하도록 품질 규격을 설정하는 것이 적절한 것으로 판단됨.

- β-sitosterol과 Oleamide와 관련된 결과는 자체 validation에 끝나면, 공인인증기관 의뢰를 통하여 분석방법에 대한 인증을 받을 예정임. 이러한 내용은 식약처 개별인정신청 시 근거자료로 제출할 예정임

- 이를 바탕으로 수면개선과 관련있는 주요 건강기능식품과 의약품들의 수면활성 기능성분과 제품내 함량을 확인하였음 (표 19). 하기한 대부분의 제품은 벤조디아제핀 수용체와 관련된 기작을 활용하였음.

표 19. 주요 수면 관련 제품과의 수면 활성성분 및 함량 비교

제품명	농심 시제품	레돌민	슬립큐	졸피뎀
제품 유형	건강기능식품	일반의약품	건강기능식품	전문의약품
수면기능성분	올레아마이드, 모노리놀레인	valernic acid	플로포탄닌(플로로글루시놀, 엑콜, 엑스톨로놀, 트리플로레톨-A 및 디엑콜)	졸피뎀
함량	50mg	200mg	30mg	10mg

(3) 원료 관리용 DNA barcode 법 개발

- 황정이 속해 있는 등글레속은 백합과에 속하는 다년생 초본으로 북미, 유럽, 동북아시아 등 전세계적으로 40여종이 분포하며, 국내에는 16종이 분포하는 것으로 알려져 있음 (ref)

- 수면개선 연구에서 사용하고 있는 황정은 층층갈고리등굴레 (*Polygonatum sibiricum*)이나 기원식물이나 종에 대해서 정확히 판단하기 힘든 부분이 있음. 또한 1차년도 실험결과 황정 내에서도 품종에 따라 효능의 차이가 존재하기 때문에 종내 아종을 판별하는 기술도 필요할 것으로 판단됨.

- DNA barcode 법은 각각 다른 생물 종 유전체에서 유래된 동일 유전자 부위를 분석하여 유전자의 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) 다형성 분석으로 종을 판별하

는 표준화된 방법임.

- 작년 농가 방문 후 황정 품종에 대한 명확한 구분이 없다는 것을 확인하였기에, 원료의 표준화 및 원료외 타 종 혼입을 방지하기 위한 DNA barcode 법을 이용하였음.

(가) 실험 방법

- DNA barcode법은 황정 원료의 품종을 구별하는 방법으로 개발하였음. DNA barcode 법은 원료 전처리 → DNA 추출 → 특정 유전자 PCR 증폭 → 유전자 Sequencing 진행 → SNP 분석 단계로 이루어짐.

① 원료 전처리

- 액체질소에 적당한 수준으로 절단한 원료가 완전히 잠길 수 있도록 하고, 액체질소가 증발할 수 있도록 함.

- 원료가 분쇄를 할 수 있는지 확인 후 분쇄기를 통하여 분쇄를 진행. 분쇄 크기는 크게 중요하지 않으나 2mm mesh를 사용하여 분쇄를 진행함. 분쇄기가 없을 경우 막자사발을 이용하여 진행할 수 있으나, 효율이 좋지 않음.

② DNA 추출

- DNA 추출부분은 생물의 경우 Wizard® Gemonic DNA purification kit (Promega, A1120)에서 제공하는 프로토콜을 사용하여 진행하였음.

- DNA 추출방법은 표 20에 기술하였음.

표 20. DNA 추출법

1. 200 mg의 분쇄한 원료를 E-tube에 옮겨 담는다.
2. 1ml에 CTAB 버퍼(Promega, MC1411)를 E-tube에 처리한다. .
3. kit에서 제공하는 RNase A를 20 ul 추가하고, Proteinase K를 40 ul 추가한다.
4. Inverting과 Vortexing을 통하여 샘플이 잘 섞이게 한다.
5. 65℃로 미리 온도를 맞춰둔 Water bath에서 30분간 Incubation을 진행한다.
6. kit에서 제공하는 카트리지를 준비한다.
7. Incubation이 끝나면 Inverting과 Vortexing을 통하여 샘플이 잘 섞어준다.
8. 13,000-16,000 x g에서 10분 이상 원심분리를 진행한다.
9. 카트리지에 300ul의 Lysis 버퍼를 Well 1번에 추가한다.
10. 원심분리가 끝난 샘플의 상층액의 300 ul를 분리하여 카트리지 1번에 첨가한다. 상층액 분리시 고형물이 포함되지 않도록 한다.
11. 제공된 Maxwell RSC 기기를 이용하여 DNA purification을 진행한다.

③ 유전자 증폭

- 유전자 증폭과정은 상기한 DNA추출과정으로부터 생성된 Genomic DNA를 Template로 하여 특정 유전자를 증폭하여 원료 내에 존재하는 특정 유전자를 분석 가능한 수준의 농도로 증폭시키는 과정임.
- 황정과 관련된 유전자 마커에 관한 기존 연구결과가 존재하지 않기 때문에, 특정 유전자 탐색 및 유전자 증폭 조건 설정을 진행하였음.
- 후보군 유전자는 matK, rbcL, rpoB, rpoC1 4가지 유전자를 사용하였음.
- PCR을 진행하기 위해서 PCR 반응에 필요한 반응액을 제조하였음. 반응액 조성은 표에 제시하였음. 표 21에 표시한 대로 PCR tube (200μl)에 분주하고 PCR 기기를 이용하여 반응을 준비하였음, Polymerase가 포함된 용액은 Ice bag 등을 통하여 낮은 온도에서 보관하면서 실험을 진행하였음.

표 21. PCR 반응액 조성

Contents	Volume (μl)
PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TAKARA,R045A) dNTP, buffer, Polymerase 포함 2x 용액	25
Template DNA	2
Primer_sense	1
Primer_Antisense	1
DW (up to 50 μl)	21
Total	50

- 각 유전자를 증폭하기 위하여 설정한 PCR 최적 조건은 표 22에 표시하였음. 각 조건은 PCR 기계에 입력하여 반응을 진행하였음.

표 22. 유전자별 PCR 증폭 최적 조건 (온도, 시간)

유전자	증폭 과정	MatK	rbcL	rpoB	rpoC
Step 1	Pre-denaturation	98℃ 5min	98℃ 5min	98℃ 5min	98℃ 5min
Step 2	Denaturation	98℃	98℃	98℃	98℃
		15sec	15sec	15sec	15sec
	Annealing	45℃	42℃	53℃	51℃
		30sec	30sec	30sec	30sec
Elongation	72℃	72℃	72℃	72℃	
	2min	1min 30sec	2min	1min 30sec	
	Cycle	35	40	35	35

Step 3	Final elongation	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min
---------------	------------------	---------------	---------------	---------------	---------------

- PCR을 종료한 반응액은 Agarose gel을 통하여 적절한 사이즈에 band를 확인함. Agarose gel은 TBA buffer(40mM Tris-Acetate, 1mM EDTA)에 0.8%로 용해한 후 전자레인지 등의 열기구를 통하여 끓을 때까지 가열한 후 10분 이상 냉각한 후, 굳기 전에 Gel lane 틀에 넣고 굳혀서 제조함.
- PCR 반응액은 DNA에 특이적인 loading dye (6x Dyne Loding STAR, A753)를 이용하여 확인함.
- Gel loading 기기를 이용하여 120 V에서 20분정도 loading을 진행한 후, Dye가 충분히 loading이 되었는지 확인한 후 gel을 꺼내어 확인함. Chemi-doc (Bio-rad)와 사용프로그램을 이용하여 UV를 비춰주면 증폭된 DNA를 확인할 수 있음.

④ 유전자 sequencing (염기서열 분석)

- PCR 반응이 확인되면 염기서열 확인을 위하여 PCR 결과물의 정제를 진행함.
- PCR 결과물 정제는 PCR 정제 kit를 통하여 진행하였고, kit 제품은 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit (TAKARA, 9761)을 사용하였음.
- PCR 정제부분은 kit에 포함되어있는 프로토콜에 따라 진행하였고, 비교적 간단하기 때문에 보고서에 기술하지 않았음.
- 정제된 PCR 결과물은 30 µl 수준으로, PCR에 사용한 프라이머를 이용하여 DNA Sequencing을 담당하는 업체에 의뢰하여 진행하였음.

⑤ SNP 분석

- 의뢰한 유전자 Sequencing은 대략 2일 정도면 결과를 확인할 수 있음. 결과 파일을 다운 받은 후 적절한 프로그램을 이용하여 서로 다른 샘플로부터 얻은 PCR 결과물의 염기서열을 비교 분석함.
- 각각의 염기서열 중 일치하지 않는 부분을 확인하고 DNA sequence 결과에서 그래프를 확인하여 염기서열 분석이 정확히 되었는지 확인함. 같은 과정을 2회 이상 반복하여 유전자에 대한 sequencing에 대한 정확도를 높일 수 있음.

(나) 실험 결과

- 유전자 탐색 방법은 식물에서 가장 보편적인 엽록체 부분의 유전자를 탐색하였고,

PCR을 증폭하기 위하여 Primer 선택을 하였음. NCBI에 등록된 Polygonatum속에 포함된 여러종으로부터 비롯된 유전자의 sequence를 비교 분석하였으며, 그 결과 유전자 중간 부분 중 거의 차이가 없어, Primer로 사용하기 용이한 부분을 찾아 Primer를 제조하고 PCR을 진행하였음.

- 연구 초기에는 matK, rbcL, rpoB, rpoC1 trnH 5가지 유전자를 target으로 진행하였으나 trnH의 경우에는 Polygonatum속에서 보편적으로 일치하는 sequence를 찾기 어려웠기 때문에 중단하였고, rbcL은 유전자 증폭시 일부 품종에서 증폭이 잘 되지 않는 경우를 발견하여 최종적으로 matK, rpoB, rpoC1 최종 3건으로 분석을 진행하였음. 품종 구별시 3종의 마커가 있으면 충분하다고 판단하였음.

- 현장생산을 진행한 추출물 원료를 포함한 4종의 원료로 품종 구별에 대한 결과를 확인하였음.

- matK는 약 800 bp부분을 증폭하며 현재 4종에서는 5개 수준의 SNP를 확인할 수 있었음. 대부분의 유전자 서열의 차이가 없었으나 일부분에서 원료별로 유전자 서열의 차이를 확인할 수 있었음

- rpoB 마커는 600 bp 정도를 증폭하였으며 10개 이상의 SNP를 확인할 수 있었음. 반면 SNP가 몰려있는 부분이 있었기 때문에 추후에 다양한 원료에서 분석해 볼 필요가 있음

- rpoC는 500 bp 정도를 증폭하였으며, 사용 원료품종과 1가지의 원료에서 같은 SNP로 표현되었으며, 이는 품종마다 유전자별로 패턴이 다르게 형성되어 품종 구별 시 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각됨.

(4) 현장실험 진행

- 지표성분 및 미생물등 여러 지표의 안정성을 확인하기 위하여 현장생산을 진행하였음.

- 현장생산에는 황정 원료 600kg을 사용하였으며, 추출물은 30 brix 기준으로 892 kg을 생산하여 44.6%의 생산수율을 나타내었고, 분무건조 결과 192 kg을 생산하여 분무건조 수율은 72%를 확인하였음.

- 추출물 생산수율은 기존 30.1%와 대비하여 크게 증가하였고, 분말화 수율은 기존 79%에 비하여 소폭 하락하였으나, 전체수율은 기존 23.8% 대비 32.0% 수준으로 크게 상승하였음. 이에따라 추출분말 단가도 kg당 5만원 이하로 계산되었음.

- 추출 수율이 증가한 이유로 황정 원료의 사전 가공 공정에서 건조가 더 오래 되면서 수분함량이 감소하고 건조 중량이 증가했기 때문으로 생각됨. 이는 지표성분이나 기타

지표들을 확인함으로써 규격 설정시 참고할 필요가 있음.

- 미생물 수준은 추출분말 기준 일반 미생물은 50 이하로 분석되었으며, 바실러스는 음성, 대장균은 음성수준으로 기존 규격을 만족하였음.
- 현장생산은 11월말 12월 초에 진행되었으므로 지표성분 및 기능성분 분석은 현재 진행중에 있음.

(5) 시제품 개발

- 수면개선 건강기능식품을 상품화 하기 위하여 시제품을 개발하였음. 현재 개발이 완료된 부분은 타정(알약) 형태이며, 음료, 앰플 등 여러 제형도 개발 단계에 있음. 타정 시제품 개발 부분은 임상실험에 적용하였으며, 현재 유통기한 설정실험을 진행하고 있음.

(가) 시제품 (타정) 처방 개발

- 황정 추출분말을 이용한 시제품 개발은 (주) 콜마 비엔에이치로부터 진행을 하였음. 개발한 타정 제형은 인체실험시 실험군으로 사용하였고, 실험에 맞추어 위약군 처방도 개발하였음.
- 개발한 처방은 표 23에 기술하였음. GHNS는 황정 추출분말을 의미함.
- 현재는 과제 개발기간이 짧아 타정제형만 개발하였으나, 상품화를 위하여서 소비자 기호도에 맞는 제형을 지속적으로 개발할 예정임.

표 23. 황정 추출분말 타정 제형 처방의 예 (상: 임상군, 하: 위약군)

성분 및 배합비율			
No	원료명(규격)	배합비율	투입량 (g)
1	황정추출분말	62.5000%	62.5000
2	결정셀룰로오스(M102)	13.0000%	13.0000
3	말토 덱스트린	4.5000%	4.5000
4	유당혼합분말(락토원)	15.1000%	15.1000
5	스테이란산마그네슘	1.2400%	1.2400
6	히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC)	2.1000%	2.1000
7	글리세린지방산에스테르혼합제제	0.1600%	0.1600
8	이산화티타늄	1.0000%	1.0000
9	치차황색소	0.4000%	0.4000
원재료 계		100.0000%	100.0000

성분 및 배합비율					
No	원료명(규격)	배합비율	제조/원산지	투입량(g)	ERP코드
1	말토덱스트린	30.0000%		30.0000	
2	유당혼합분말(락토원)	40.0000%		40.0000	
3	결정셀룰로오즈(M102)	24.7000%		24.7000	
4	스테아린산마그네슘(싱가폴)	1.14000%		1.1400	
5				-	
6	히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC)	2.6000%		2.6000	
7	글리세린지방산에스테르혼합제	0.2600%		0.2600	
8	이산화티타늄	1.0000%		1.0000	
9	색소	0.3000%		0.3000	
원재료 계		100.0000%		100.0000g	

(나) 유통기한 설정실험

- 개발한 타정 제형을 통하여 개별인정신청을 위하여 미리 유통기한 설정실험을 진행하였음.
- 유통기한 설정실험은 항온항습기를 이용하여 20, 25, 40 °C에서 진행하였다.
- 시작 날짜는 9월 29일로써 현재는 0개월, 2개월 만을 분석하였고, 앞으로 4개월 6개월 샘플을 샘플링 한 후 분석할 예정이다. 현재 GABA와 β -sitosterol 두가지 모두 분석을 진행하려는 계획이 있음. 0개월, 2개월에서 3반복으로 측정 결과 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (GABA), 2.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (β -sitosterol)로 분석되어 설정된 규격에 일치하는 것으로 확인되었음.

나. 황정의 활성물질 분리·정제 및 구조 규명 (수행기관: 서울여대)

- 2차년도에는 수면활성 기작을 규명한 황정의 solvent fractionation 및 column chromatography를 통한 분리·정제를 진행함과 동시에 분획의 GABA_A receptor 결합 활성을 평가하여 최종 활성 분획을 선정하였다. 나아가 활성 분획을 NMR을 통해 구조 규명을 하고, GC-MS를 통해 최종 활성물질을 확인하였음.

(1) 황정의 활성물질 분리 및 정제

- 황정 추출물을 solvent fractionation 및 column chromatography를 통해 분리 및 정제한 분획으로 부터 receptor binding assay를 이용한 활성추적분획법에 의해 수면활성을 평가하였음.

(가) 실험 방법

① Solvent fractionation에 의한 수면 활성물질 분리

- 황정 활성물질 분리 및 정제 방법은 그림 39에 나타내었음.
- 황정 추출물로부터 용매의 polarity 차이를 이용한 계통분획법에 의해 순차적으로 ethyl acetate, n-butanol, distilled water 분획을 얻어 receptor binding assay를 이용한 활성추적분획법에 의해 수면활성 평가를 확인하였음.

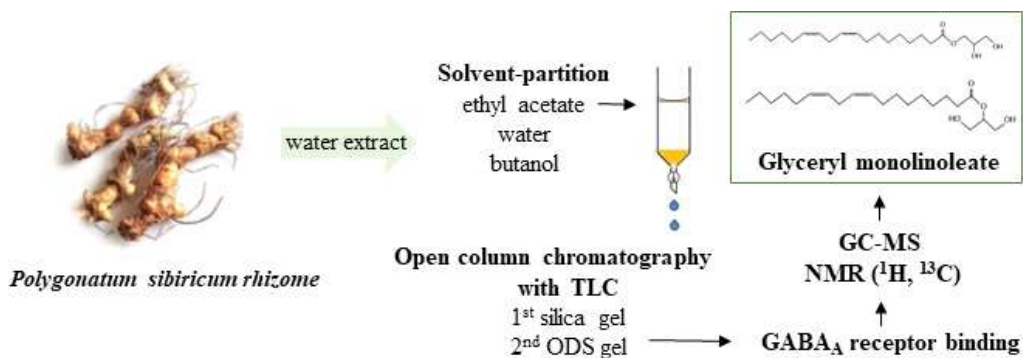


그림 39. 활성성분 분리 및 정제

② Column chromatography에 의한 수면 활성물질 분리

- Column chromatography에 의한 수면 활성물질 분리 방법은 그림에 나타내었음.
- 용매분획으로 얻은 활성분획으로부터 normal phase(silica gel)을 이용한 column

chromatography(400 × 50 mm, I.d.)를 실시하였음.

- hexane:ethyl acetate 혼합물을 용매로 ethyl acetate의 농도를 순차적으로 높여서 진행하여 (20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0:1, v/v, 500 ml) 총 77개의 분획을 모았음.
- TLC(Merck Co., Darmstadt, Germany) 분석을 실시하여 전개 pattern 및 10% H₂SO₄에 의한 발색양상에 따라 소분획을 총 12개를 얻음.
- 12개의 분획을 대상으로 receptor binding activity를 측정함.

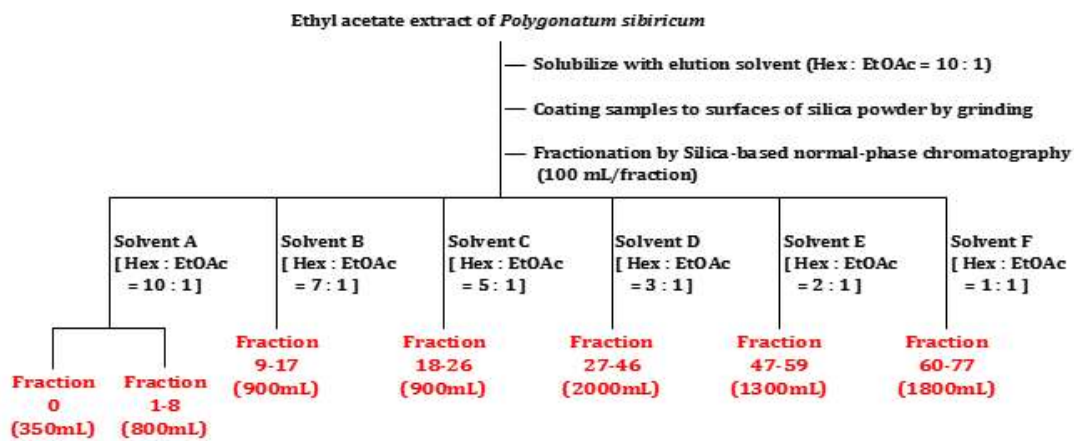


그림 40. Silica gel column chromatography

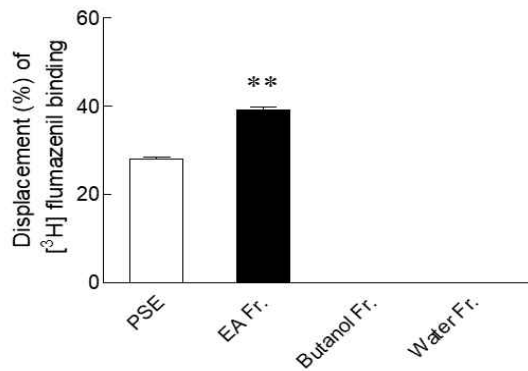
- 활성분획의 2차 정제를 위해 reverse phase(C18)을 이용한 column chromatography(500 × 30 mm, I.d.)에 H₂O:acetonitrile(ACN) 혼합물을 용매로 ACN의 농도를 높여서 진행하여 (10:1, 5:1, 2:1, 1:1, v/v, 500 ml) 총 100개의 분획을 모아서 TLC pattern 및 10% H₂SO₄에 의한 발색양상에 따라 소분획 및 활성물질을 총 10개로 나누고, 각 분획물 및 활성물질의 receptor binding activity를 확인함.

(나) 실험 결과

① Solvent fractionation에 의한 수면 활성물질 분리

- Solvent fractionation으로 얻은 시료의 receptor binding assay결과는 그림 41에 나타내었음.
- 분획들 중 Ethyl acetate 분획만이 GABA_A-benzodiazepine receptor에 대한 결합능이 확인되었고 ethyl acetate 분획에 활성물질이 존재할 것으로 사료되어 이후 column chromatography를 진행함.

② Column chromatography에 의한 수면 활성물질 분리



- Column chromatography로 부터 얻은 시료의 receptor binding assay 결과는 그림 42, 그림 41. Solvent fraction의 receptor binding activity

43에 나타내었음.

- 총 12개의 silica fraction 중 7, 8번의 분획에서 GABA_A-benzodiazepine receptor에 대해 약 36~38%의 결합능이 확인되어 7, 8번 분획에 활성물질이 존재할 것으로 사료되어 이후 2차 column chromatography를 진행함.

- 총 10개의 ODS fraction 중 7번의 분획에서 GABA_A-benzodiazepine receptor에 대해 약 60%의 결합능이 높게 확인되어 7번 분획에 활성물질이 존재하며, 단일물질인 것으로 사료되어 이후 NMR GC-MS를 통해 분석함.

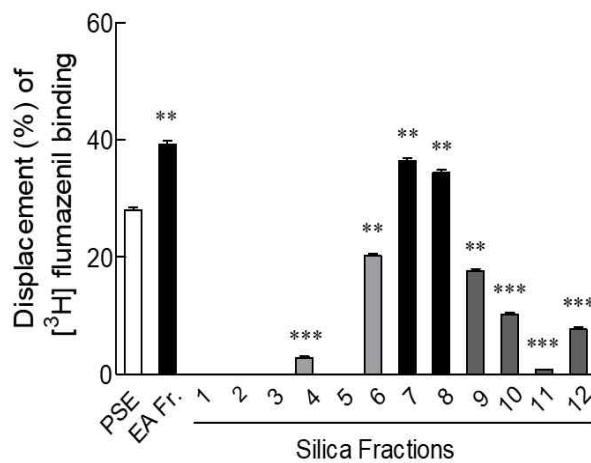


그림 42. Silica fraction의 receptor binding activity

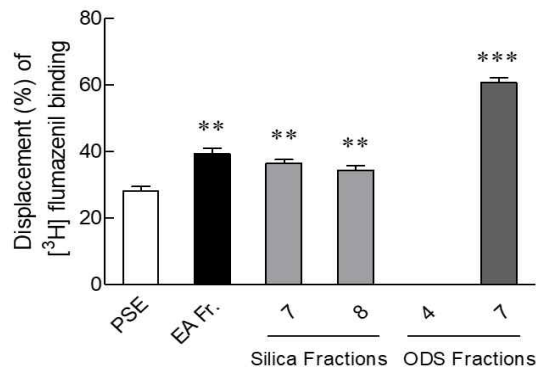


그림 43. ODS fraction의 receptor binding activity

(2) 황정의 활성물질 구조 규명 및 표준물질과 기능비교

- 황정의 활성물질을 NMR을 통해 구조 규명 및 GC-MS 분석으로부터 활성물질을 확인하였으며, 이를 표준물질과 기능비교 하였음.

(2.1) 황정의 활성물질 구조규명

(가) 실험 방법

① NMR 분석을 통한 활성물질 구조규명

- NMR(Bruker AVANCE II 400, 1H NMR at 400 MHz, 13C NMR at 100 MHz, Bruker, Germany)는 유기, 무기, 신소재 합성연구와 천연물 분석에 필수적이며, 이를 통해 ¹H, ¹³C spectrum을 분석하였음.

② GC-MS 분석을 통한 활성물질 확인

- 최종적으로 분리한 유효 단일물질의 분자량을 분석 및 확인하고자 TMS(tetramethylsilane)를 이용하여 시료를 silylation 유도체화 시킨 후 GC-14B(Shimadzu, Tokyo, Japan)로 분석하여 전체 이온크로마토그램(TIC)를 얻음.

- GC-FID의 분석관은 DB-5(0.25 μm film thickness × 0.53 mm diameter × 30 m length)를 사용하였고, 오븐온도는 80°C(2 min)-2°C/min-100°C-20°C/min-200°C(3 min)로 승온 시킴.

- 주입부 온도와 검출기 온도를 250°C로 하였으며, split ratio는 3:1, 헬륨의 흐름속도는 12.4 mL/min, 시료는 3 μL를 주입하여 분석하였음.

(나) 실험 결과

① NMR 분석을 통한 활성물질 구조규명

- NMR 분석 spectrum은 **그림 44**에 나타내었음.
- SCIFinder를 이용해 기존에 밝혀져 있는 구조에 대한 spectrum의 library를 비교분석함으로써 활성분획의 spectrum에 대한 구조를 유추하여 glyceryl에 monolinoleate가 결합되어있는 구조임을 확인함.
- 정확한 구조의 규명을 위해 시판되는 glyceryl monolinoleate를 구입하여 NMR 분석을 함께 진행하고 spectrum을 비교하여 활성물질의 구조를 명확히 규명함.

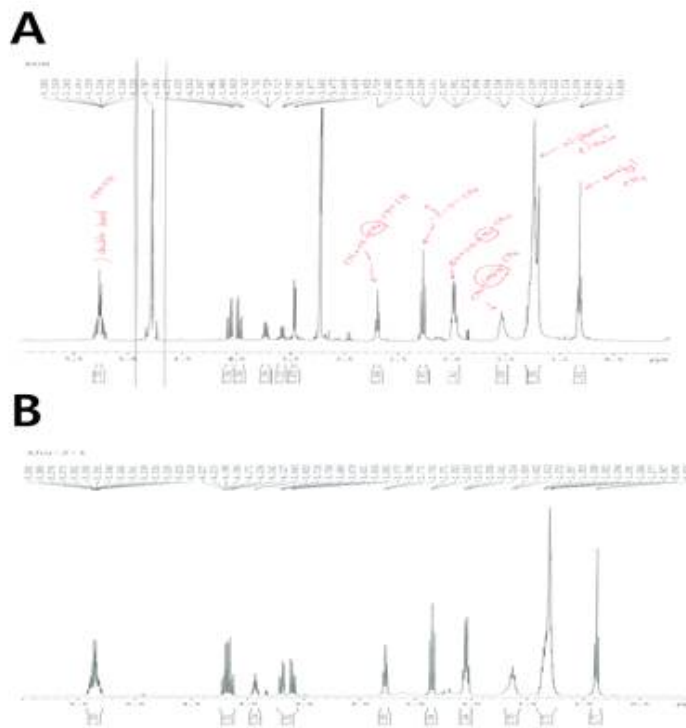


그림 44. 황정(A) 및 활성 추정물질(B)의 ^1H NMR spectrum

② GC-MS 분석을 통한 활성물질 확인

- GC-MS 분석을 통해 얻은 spectrum은 **그림 45, 46**에 나타냈음.
- 분석을 통해 얻은 전체 이온크로마토그램(TIC)을 MS library에서 search하여 단일물질인 glyceryl monolinoleate의 분자량을 확인함 (**그림 47**).

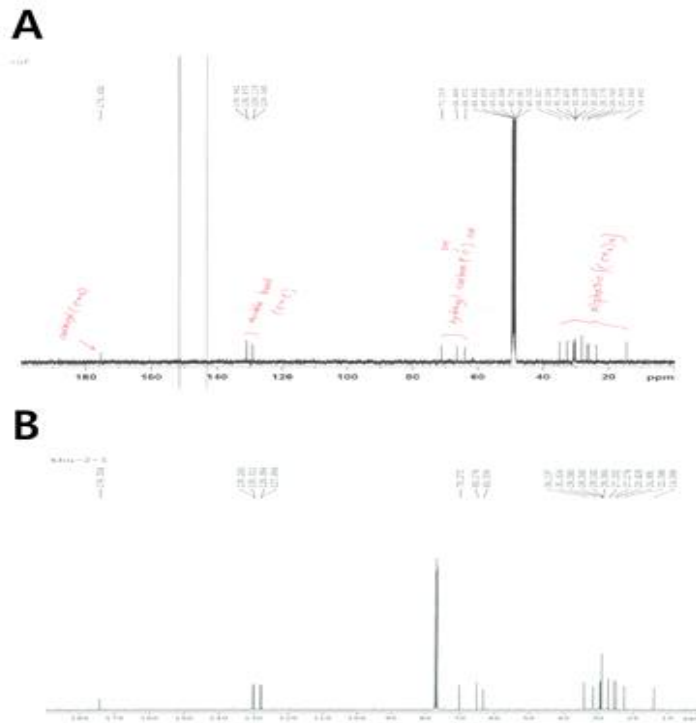


그림 45. 황정(A) 및 활성 추정물질(B)의 ^{13}C NMR spectrum

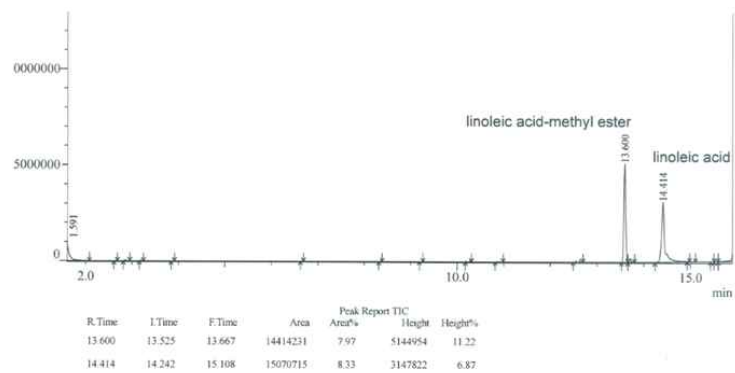


그림 46. 황정 활성분획의 GC-MS spectrum

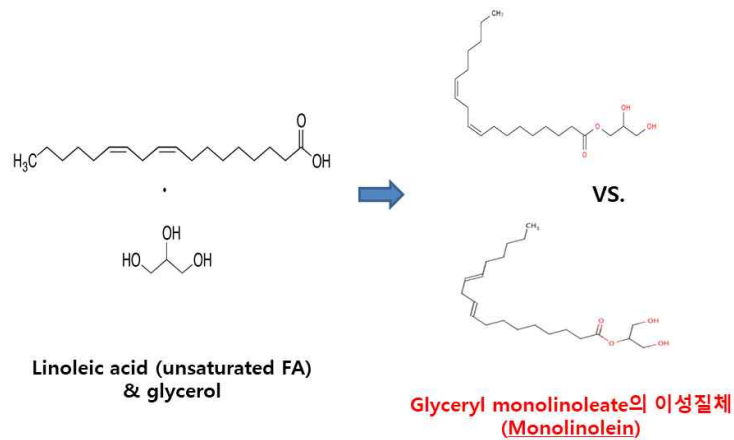


그림 47. 활성물질 구조 규명

(2.2) 황정의 활성물질과 표준물질의 기능 비교

(가) 실험 방법

① 표준물질과 활성물질의 receptor binding assay를 통한 수면활성 비교 (그림 47)

- 시판되는 표준물질인 glyceryl monolinoleate의 이성체를 각각 Sigma사 (1-monolinolein)와 Santa cruz사(2-monolinolein)에서 구입하였음.
- 분리·정제한 황정의 활성물질과 수면활성 평가를 receptor binding assay를 실시하여 수면활성을 평가하고 본 연구에서 분리·정제한 황정의 활성물질과 비교를 진행하였음.

② GC-MS 분석을 통한 황정에 함유된 이외의 수면활성물질 분석 및 수면활성 비교

- 기존의 알려진 수면활성물질인 oleamide를 glyceryl monolinoleate를 분석한 동일한 조건에서 GC-MS를 통해 확인하였음.

(나) 실험 결과

① 표준물질과 활성물질의 receptor binding assay를 통한 수면활성 비교

- Receptor binding assay 결과는 그림 48에 나타내었음.
- 황정 추출물(PSE), ethyl acetate 분획물(EA Fr.), 2차 정제를 거친 최종 분획(ODS Fr. 7)의 GABA_A-benzodiazepine receptor 결합능은 각각 27%, 39%, 60%로 정제가 진행될수록 증가하는 경향을 보이며 27~60%로 점차 유의적으로 증가하는 경향을 보였음.
- 활성물질로 사료되는 표준물질 이성체의 결합능을 확인하였을 때, 분리·정제된 최종 분획보다는 낮지만 1-monolinolein과 2-monolinolein 두 이성체 모두 GABA_A-benzodiazepine receptor에 결합하는 것을 확인함 (53%, 40%).

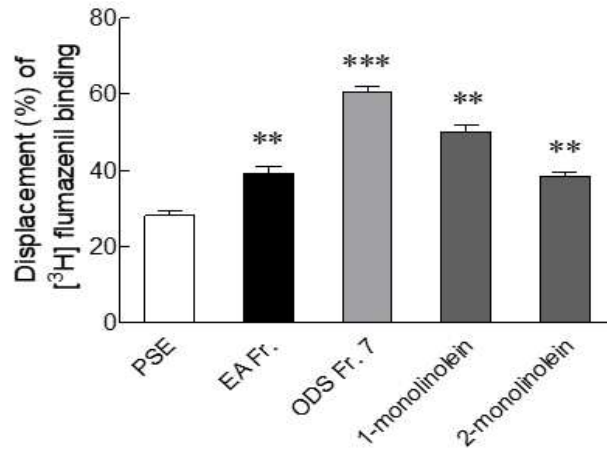


그림 48. 표준, 활성물질의 receptor binding activity

② GC-MS 분석을 통한 황정에 추출물에 함유된 수면활성물질 분석 및 수면활성 비교

- GC-MS 분석을 통해 얻은 spectrum 및 receptor binding activity는 그림 49에 나타냈음.
- 본 연구의 2차 정제를 거쳐 얻은 최종 분획(ODS Fr. 7)과 유사한 정도의 GABA_A-benzodiazepine receptor 결합능(56%)을 가지고 있음을 확인함. 선행연구에 따르면 oleamide는 진정, 항불안 등의 효과가 보고 되어있음.
- GABA_A-benzodiazepine receptor 결합능(56%)이 본 연구의 2차 정제를 거쳐 얻은 최종 분획인 ODS Fr. 7과 유사함을 확인함 (그림 50).

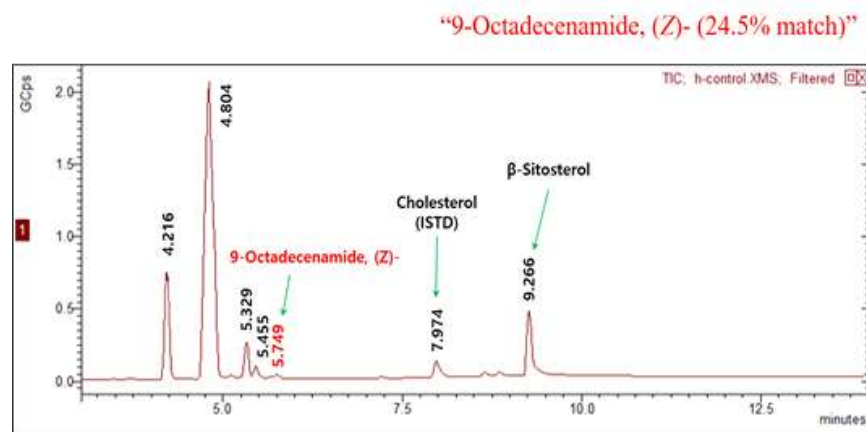


그림 49. Oleamide의 GC-MS spectrum

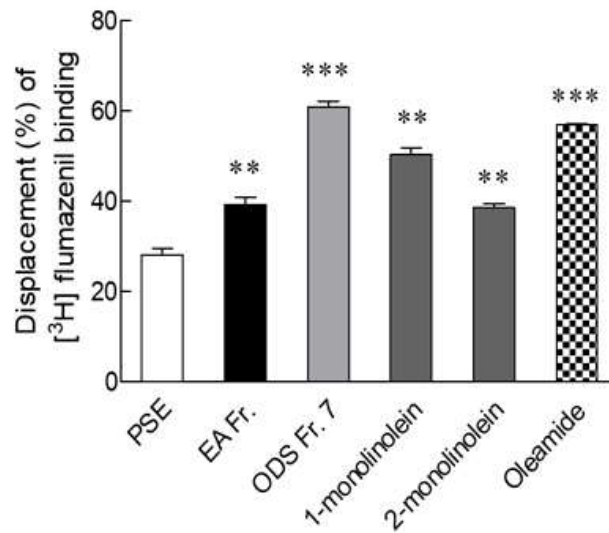


그림 50. Oleamide의 receptor binding activity

(3) 황정의 지표성분 규명 및 함량 분석

- 황정의 지표성분을 NMR을 통해 구조를 규명하고, GC를 통해 정량 분석함.

(가) 실험 방법

① NMR 및 GC 분석을 통한 지표성분 규명 및 함량 분석

- 1차 정제를 거친 silica fraction 중 2번의 분획을 TLC를 통해 단일물질로 분리된 것을 확인하였음.
- NMR 구조 규명 및 분석용 GC를 통해 정확한 함량을 분석하였음.

(나) 실험 결과

① NMR 및 GC 분석을 통한 지표성분 규명 및 함량 분석

- NMR 분석 spectrum은 그림 51에 나타내었음.
- NMR 구조분석으로부터 silica fraction 2번 분획이 식물체에 함유되어있는 phytosterol류인 β -sitosterol임을 확인하였음.
- GC 분석 결과 황정 가수분해물 1 g 당 2.2 mg의 β -sitosterol이 존재하는 것으로 확인됨.
- 따라서, 본 연구를 통해 황정은 동물모델에서 수면의 양 뿐만 아니라 질도 함께 향상시키

는 것을 확인하였으며, 이러한 효과를 가지는 황정유래 활성물질로써 glyceryl monolinoleate와 oleamide를 확인하였고, 이들은 GABAergic mechanism을 통해 작용하는 것임을 밝혔다. 또한, 지표물질로써 β -sitosterol이 적합함을 확인하였음.

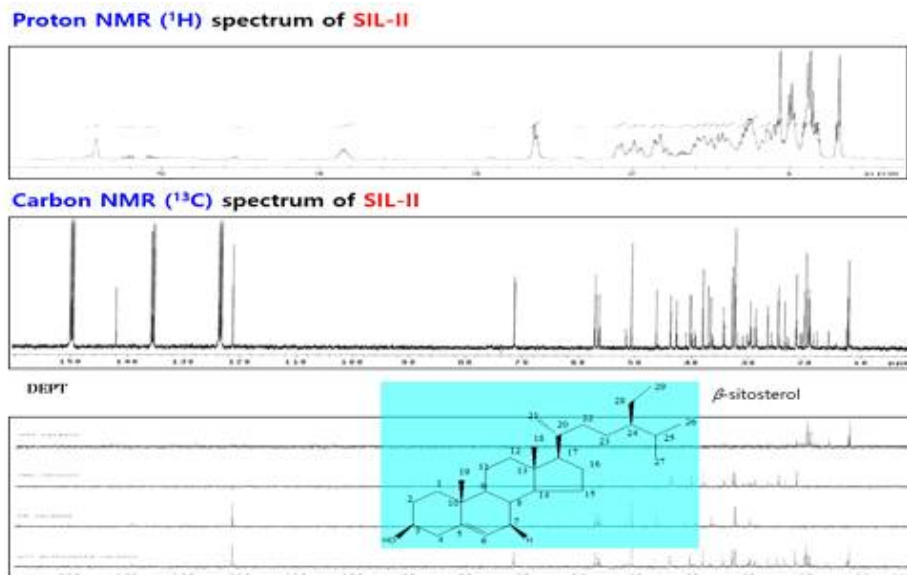


그림 51. β -sitosterol의 NMR spectrum

다 황정의 수면개선 인체효능 평가 및 분석 (수행기관: 이화여대)

- 2차년도에서는 1차년도부터 시작한 인체적용시험 실험자를 모집하고, 실험자의 수면개선 효과를 분석하였음.

(가) 인체적용시험 결과

(1) 대상자 선정 및 현황 (그림 52)

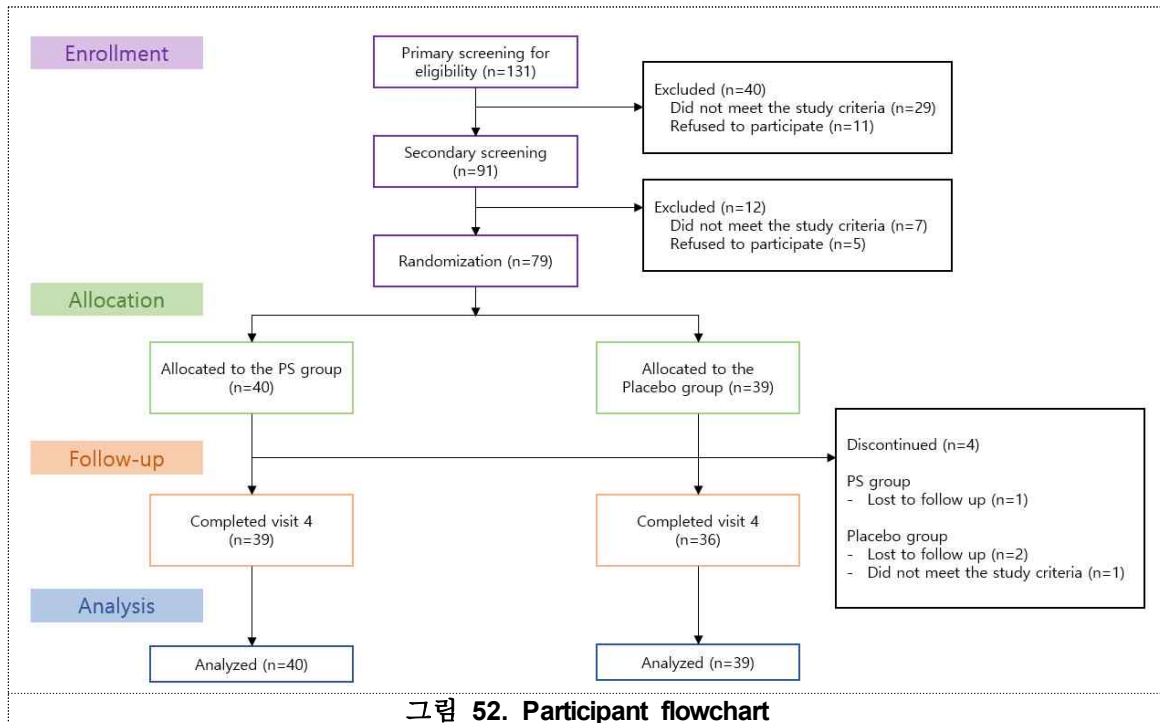


그림 52. Participant flowchart

- 본 연구는 만 20세에서 65세 사이의 수면 개시 또는 수면 유지에 어려움이 있거나, 새벽에 깨고 다시 잠이 들지 않는 증상, 자도 잔 것 같지 않고 개운하지 않은 증상을 일주일에 1회 이상, 최소 2개월 이상 겪어온 성인 남녀를 대상으로 진행되었음.

- 스크리닝 평가는 이화여자대학교에서 모집된 131명을 대상으로 실시되었으며, 정신과적 평가와 혈액검사, 심전도 검사 등을 통해 선정/제외기준에 적합한 79명의 대상자가 본 연구에 recruit 되었음. 선정된 후에는 황정추출물 섭취군(n=40)과 위약대조군(n=39)으로 무작위 배정되어 4주간 시험제품을 복용하도록 하였음(그림 52).

- 연구 기간 동안 동의철회로 2명의 대상자가 중도 탈락 하였고, 2명이 연구계획서상의 제외기준에 해당하게 되어 중도 탈락하였음.

Group	N
Screening	131
Screen out	52

Randomization	79
Drop out	4
ITT analysis	79

(2) 인구통계학적 및 임상적 자료 분석

- 본 연구에 참여한 연구대상자의 나이, 성별, 교육연한 사회경제적 지위, 결혼상태 등을 포함하여 두 군간의 차이는 없었음(표 24).

표 24. Baseline demographic and clinical characteristics

Characteristics	Treatment groups		p-value*
	Placebo (n=39)	PS group (n=40)	
Age, mean (SD), y	39.8 (13.0)	39.0 (12.5)	0.79
Women, No. (%)	18 (46.2)	21 (52.5)	0.58
Education, mean (SD), y	15.2 (1.9)	15.4 (2.6)	0.74
Socioeconomic status, No. (%)			
Upper	7 (17.9)	8 (20)	
Upper Middle	13 (33.3)	16 (40)	
Middle	17 (43.6)	15 (37.5)	
Lower Middle	2 (5.1)	1 (2.5)	
Marriage, No. (%)			
Married	18 (46.2)	16 (40)	
Never married	17 (43.6)	22 (55)	
Divorced, widowed, or separated	4 (10.3)	2 (5)	

* Between groups comparison, independent t-test and chi-square test p < 0.05

Abbreviation: PS, Polygonatum sibiricum; SD, standard deviation

(3) 영양소 섭취 상태

- 표 25에서 대상자들의 한 달간 영양소 섭취 상태를 살펴보면, 곡류 및 감자류, 당류, 두류, 견과류 및 종실류, 버섯류, 채소류 및 과일류, 육류, 난류, 어패류, 해조류, 우유류, 유지류, 음료 및 주류, 조미료류, 조리가공식품류 등 대부분의 영양소 섭취에서 두 군간의 차이는 없었음. 조미료류의 경우 연구기간 동안 섭취량이 감소하였지만, 섭취군과 대조군과의 섭취량 변화에는 유의한 차이는 없었음.

표 25. Dietary intakes status of the subjects

	Placebo(n=39)		Treatment(n=40)		P-value (group-visit interaction)
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
곡류 및 감자류	-0.027±0.39	0.033±0.37	-0.009±0.31	0.005±0.40	0.79
당류	0.070±0.86	0.110±0.79	-0.081±0.55	-0.084±0.60	0.76
두류	-0.053±0.65	-0.157±0.46	0.049±0.55	0.158±0.71	0.13
견과류 및 종실류	0.073±0.96	0.058±1.14	-0.107±0.48	-0.016±0.63	0.24

버섯류	0.194±1.55	-0.021±0.94	-0.080±0.69	-0.131±0.49	0.63
채소류 및 과일류	-0.005±0.45	0.006±0.49	-0.023±0.34	0.073±0.42	0.52
육류	-0.054±0.51	-0.019±0.47	0.075±0.58	-0.005±0.54	0.20
난류	0.016±0.71	-0.108±0.76	0.131±0.89	-0.050±0.48	0.64
어패류	0.105±0.76	-0.068±0.46	-0.038±0.40	-0.004±0.54	0.17
해조류	0.049±0.87	-0.078±0.66	0.014±0.71	0.009±0.73	0.50
우유류	-0.087±0.44	-0.105±0.43	0.030±0.50	0.160±0.65	0.20
유지류	0.108±0.87	-0.053±0.49	-0.079±0.52	-0.025±0.70	0.12
음료 및 주류	0.029±0.43	-0.041±0.32	-0.033±0.39	0.039±0.45	0.14
조미료류	0.020±0.74	-0.189±0.46	0.165±1.13	-0.015±0.85	0.75
조리가공식품류	0.046±0.59	0.001±0.44	-0.015±0.60	-0.045±0.36	0.84

(4) 수면 개선 유효성 평가 결과

① 수면 관련 자가 보고 설문 결과 요약

- 연구참여자들은 위약식품 혹은 시험식품 복용 전후 수면 문제 관련 다음의 자가 보고 설문을 수행하였음(표 X).
 - 피츠버그 수면의 질 평가 설문 (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI)
 - 아테네 불면 척도 (Athens Insomnia Scale, AIS)
 - 불면증 심각성 척도 (Insomnia Severity Index, ISI)
- AIS로 시험식품과 위약식품의 수면 개선 효과를 측정하였을 시, 시험식품 복용 이후 AIS 총점은 유의하게 감소하였고($z = -5.78, P < 0.001$)고 시험식품의 수면 개선효과는 위약식품에 비해 유의하게 높았음($z = -2.11, P = 0.035$)(그림 53).
- 시험식품 복용 전에 비하여 시험식품 복용 이후 PSQI 총점은 유의하게 감소하였으나($z = -5.48, P < 0.001$) 수면 개선 효과가 위약식품군과 유의한 차이는 없었음($z = -0.41, P = 0.68$)(그림 X).
- 시험식품 복용 후, 기저 시점에 비하여 ISI 총점이 유의하게 감소하는 수면 개선 효과를 보였으나($z = -4.14, P < 0.001$) 그 정도는 위약식품군과 유의한 차이가 없었음($z = -1.06, P = 0.29$) (표 26).

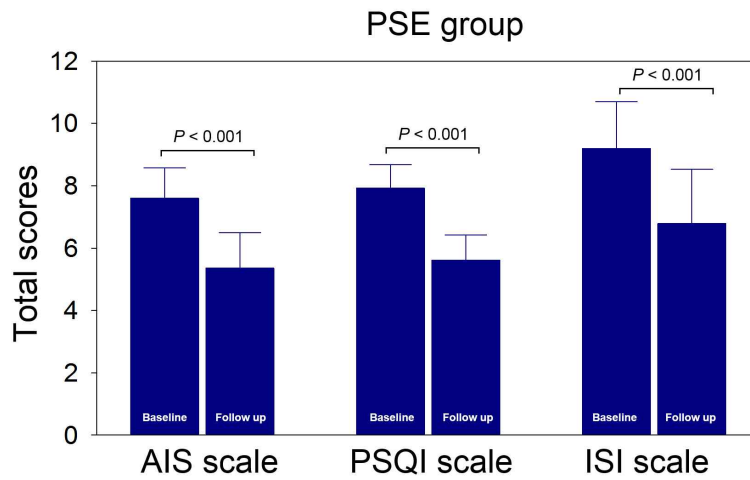


그림 53. Mean values of scale scores at pre- and post-treatment in the PSE group

Abbreviations: PSQI, Pittsburgh Sleep Quality Index; AIS, Athens Insomnia Scale;

표 26. Self-reported sleep quality at pre- and post-treatment

	Placebo (mean±SD)		Treatment (mean±SD)		b (SE)	P for interaction
	Baseline (n=39)	Follow-up (n=36)	Baseline (n=40)	Follow-up (n=39)		
ASI (total score)	6.28±2.41	5.14±2.11	7.60±3.05	5.34±3.51	-1.00 (0.47)	0.035
PSQI (total score)	7.69±2.19	5.61±1.99	7.93±2.35	5.62±2.59	-0.22 (0.54)	0.68
ISI (total score)	7.62±3.65	6.11±3.63	9.20±4.67	6.79±5.35	-0.77 (0.73)	0.29

ISI, Insomnia Severity Index

② 수면 관련 actigraphy 결과 요약

- 연구참여자들은 위약식품 혹은 시험식품 복용 전 1주일간 actigraphy를 착용하여 수면의 질 및 활동량을 측정하였으며, 위약식품 혹은 시험식품 복용 3주 후부터 시험 종료 시까지 약 1주일에서 10일 정도 actigraphy를 착용하여 수면의 질 및 활동량을 측정하였음(표 26).
- Actigraphy로 측정한 총 수면시간(total sleep time)은 위약식품 복용 시에 비하여 시험식품 복용 시에 대조군 대비 유의적으로 증가하였음.
- Actigraphy로 측정한 수면 효율성(sleep efficiency)과 수면 유도후 각성(wake after sleep onset, WASO)은 시험식품군과 위약식품군 사이에 변화의 유의한 차이가 없었음.

③ 신경전달물질 농도 변화 결과 요약

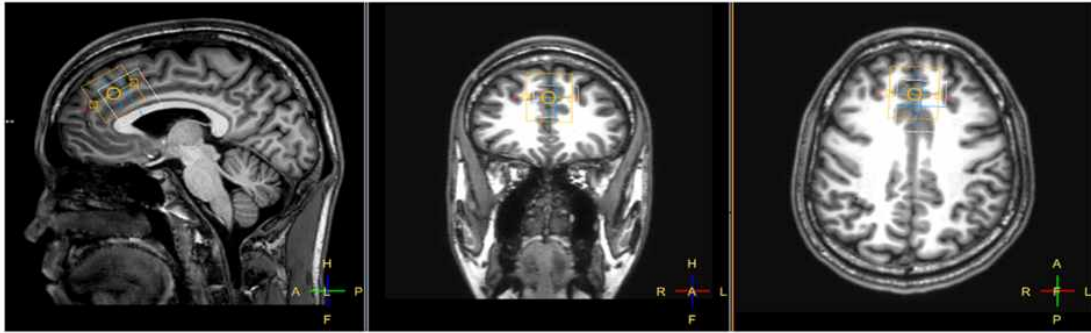


그림 54. Voxel placement for the measurement of neurometabolite levels

-연구참여자들은 위약식품 혹은 시험식품 복용 전과 후에 자기공명분광영상법을 이용하여 그림X의 전전두엽 영역에서 γ -aminobutyric acid (GABA)와 glutamate/glutamine (Glx)와 같은 신경전달물질의 농도를 측정하였음(표 X). 자기공명분광영상법으로 측정한 시험식품군과 위약식품군 투여 전후의 전전두엽의 GABA($z = -0.78, P = 0.43$)와 Glx($z = 0.04, P = 0.97$) 농도는 군간 유의한 차이가 없었음 (그림 54, 표 26).

표 26. Sleep quality assessment using actigraphy at pre- and post-treatment

	Placebo (mean±SD)		Treatment (mean±SD)		b (SE)	P for interaction
	Baseline (n=39)	Follow-up (n=36)	Baseline (n=40)	Follow-up (mean±SD)		
GABA levels	1.35±0.18	1.39±0.17	1.37±0.18	1.36±3.51	-0.04 (0.06)	0.43
Glx levels	0.93±0.16	0.90±0.14	0.90±0.10	0.90±0.10	0.001 (0.03)	0.97

Abbreviations: GABA, γ -aminobutyric acid; Glx, glutamate/glutamine

④ 수면 관련 polysomnography 결과 요약 (부표본 결과)

- 위약식품군 10명과 시험식품군 10명의 부표본 연구참여자에서 위약식품 혹은 시험식품 복용 전과 후에 수면다원검사(polysomnography)를 시행하여 수면의 질을 특정하였음(표 27).

- 총 20명의 부표본에서 시행한 수면다원검사를 통하여 측정한 시험식품군과 위약식품군 간의 수면잠복시간(sleep latency, $z = -0.43, P = 0.67$), 수면효율성(sleep efficiency, $z = -0.59, P = 0.56$), 총수면시간(total sleep time, $z = -1.00, P = 0.32$), 수면 유도후 각성(wake after sleep onset, WASO, $z = 0.45, P = 0.66$)에 대한 효과의 차이는 유의하지 않았음.

표 27. Sleep quality assessment using actigraphy at pre- and post-treatment*

	Placebo (mean±SD)		Treatment (mean±SD)		b (SE)	P for interaction
	Baseline (n=10)	Follow-up (n=10)	Baseline (n=10)	Follow-up (n=10)		
Sleep latency (min)	6.75±4.80	7.95±7.01	12.1±14.3	11.2±13.6	-2.15 (5.03)	0.67
Sleep efficiency	87.8±14.9	87.8±10.6	89.0±8.9	86.7±9.9	-2.29 (3.90)	0.56
Total sleep time (min)	373.6±68.2	386.2±54.8	400.2±49.6	390.8±53.6	-21.9 (21.9)	0.32
WASO (min)	47.7±73.4	46.9±51.4	36.4±31.6	42.2±38.7	6,7 (15.0)	0.66

Abbreviations: WASO, wake after sleep onset.

(5) 안전성 평가

- 안전성 평가는 임상병리검사 (혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변 검사), 활력징후 (혈압, 맥박), 심전도 검사를 통해 분석하였음. 안전성 평가는 무작위 배정되어 임상시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취하고 안전성 평가 항목에 대한 정보가 수집된 연구대상자를 포함하여 분석을 시행하였음.

①혈액 및 소변 검사 결과

- 위약식품군과 시험식품군 간 위약식품 혹은 시험식품 복용 전후의 혈액 및 소변

표 28. Safety measures

Laboratory profiles	Placebo (n=39)	PS group (n=40)	All (n=79)
	mean(SD)	mean(SD)	mean(SD)
Absolute neutrophil count (μL)			
Baseline	3290 (1154)	3035 (1366)	3161 (1264)
Follow-up	3318 (1242)	3196 (1250)	3254 (1239)
Hemoglobin (d/dL)			
Baseline	14.1 (1.2)	14.1 (1.3)	14.1 (1.2)
Follow-up	14.0 (1.4)	13.9 (1.3)	13.9 (1.3)
Hematocrit (%)			
Baseline	42.4 (3.9)	42.3 (3.6)	42.3 (3.7)
Follow-up	41.9 (3.6)	41.8 (3.9)	41.9 (3.7)
Platelet (μL)			
Baseline	253.6 (54.5)	250.9 (69.8)	252.2 (62.3)
Follow-up	258.4 (57.4)	251.7 (76.4)	254.9 (67.6)
Serum creatinine (mg/dL)			
Baseline	0.82 (0.2)	0.83 (0.2)	0.82 (0.2)
Follow-up	0.80 (0.2)	0.81 (0.2)	0.80 (0.2)
Serum BUN (mg/dL)			
Baseline	13.1 (3.8)	13.3 (3.8)	13.2 (3.8)
Follow-up	12.6 (3.3)	13.2 (4.1)	12.9 (3.7)
AST (units/L)			

Baseline	18.3 (3.8)	19.4 (5.2)	18.9 (4.5)
Follow-up	18.4 (5.3)	19.6 (5.7)	19.1 (5.5)
ALT (units/L)			
Baseline	17.0 (6.8)	16.8 (8.0)	17.0 (7.3)
Follow-up	17.2 (9.0)	17.3 (9.4)	17.3 (9.1)
Glucose (mg/dL)			
Baseline	92.4 (7.9)	93.4 (8.7)	92.9 (8.3)
Follow-up	90.0 (10.1)	92.3 (12.4)	91.2 (11.3)
Cholesterol (mg/dL)			
Baseline	191.3 (34.8)	177.0 (31.2)	184.1 (33.6)
Follow-up	189.4 (32.6)	185.5 (54.2)	187.3 (44.9)
BMI (kg/m ²)			
Baseline	24.0 (3.2)	23.8 (3.3)	23.9 (3.2)
Follow-up	23.7 (3.1)	23.7 (3.4)	23.7 (3.2)

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index

검사 결과의 유의한 차이는 없었음(표 28).

② 부작용 측정 검사 결과

- 이학적 검사는 연구자의 의학적 판단 하에 정상/비정상으로 구분한 후 통계적인 분석을 하였음. 표 29를 보면, 시험군/대조군 모두 시험 식품 섭취 후 이학적 검사에서 이상을 보인 경우는 없었던 것으로 보고되었음.

표 29. Safety measures- number of abnormal subjects in physical examination

	Placebo (n=39)		PS group (n=40)	
	Before	After	Before	After
Cardiovascular system	0	0	0	0
Respiratory system	0	0	0	0
Digestive system	0	0	0	0
Endocrine system	0	0	0	0
Urinary system	0	0	0	0
Reproductive system	0	0	0	0
Skeletal/Muscular system	0	0	0	0
Integumentary system	0	0	0	0
Nervous system	0	0	0	0
Psychological system	0	0	0	0

(6) 식품 섭취 순응도

- 시험식품 및 위약식품을 4주 이상 매일 복용할 수 있도록 안내했고, 복용기간은 평균 31.5일 섭취하였음. 위약식품군의 식품 섭취율은 평균 90.8%, 시험식품군의 식품 섭취율은 평균 91.5%였음.

3-4. 결론 및 연구성과

가. 연구 결론

- 전통적으로 사용하는 천연 한방소재인 황정을 이용하여 수면개선 소재 및 건강기능식품을 개발하였음. 선행연구를 통하여 황정 추출물에서 기타 다른 한방원료 추출물보다 높은 수면 활성을 나타냈으며, 수면잠복기 및 수면의질 지표에서 수면제와 동등한 효능을 갖는 것을 알 수 있었음. 동물 효능평가를 통하여 황정 추출물에서 GABAA receptor에 결합하므로써 수면개선에 도움을 줄 수 있는 결과를 확인하였으며, 이에 작용하는 기능성분인 Monolinolein과 Oleamide를 확인하였음. 원료 및 공정 최적화를 통하여 수율 및 단가, 품질 측면에서 최적화 표준화를 진행하였으며, 인체실험을 통하여 수면개선에 도움을 줄 수 있는 결과를 확인할 수 있었음. 상품화를 위하여 타정 제형을 개발하였으며 지속적으로 다른 제형에 적용하여 개별인정 확보 후 상품화를 위한 준비작업을 진행하고 있음.
- 한편으로 2016년과 2017년에 각각 한번씩 식약처와 모뎀토의를 진행함으로써 개별인정신청을 위한 보완 검토작업을 진행하였음.
- 2016년에는 전체적인 공정과 안전성에 대한 검토를 받았음. 주요 이슈사항은 유사 원재료에 대한 확인방법과 안전성 평가에 대한 의사결정도, 그리고 지표성분 (GABA)에 대한 재검토 부분이 제기되었음. 유사 원재료 부분은 DNA 분석법 개발과 맞물려 진행하고 있으며, 안전성 부분은 근거자료를 마련중에 있음. 지표성분 (GABA)에 대한 부분은 부정적인 피드백을 확인하여 2017년에는 신규 지표성분을 탐색하였음.
- 2017년 모뎀토의에서는 지표성분 설정과 안전성 평가에 대한 부분에 대한 검토와 피드백을 진행하였음. 지표성분 후보군은 분석법을 검증하였던 β -sitosterol과 oleamide를 후보군으로 삼고 기존 지표성분 후보군인 GABA를 추가하였음. 그 결과 유사 원재료를 확인할 수 있는 DNA 분석법에 대한 검증이 포함되면 β -sitosterol과 oleamide를 품질 지표로써 적합하다는 판단을 확인하였음. 안전성 부분은 황정 내 포함된 아제티딘이라는 물질에 대한 것으로 관련 근거자료로 1일 섭취량, 추출물 수율등을 고려하여 근거자료를 확인하였고, 개별인정 신청을 위하여 수정보완에 대한 필요성을 확인하였음.

나. 연구 개발 성과

(1) 논문 게재 성과

- 논문 5건 게재

번호	게재연 도	논문명	저자명	학술지명	Vol (No)	국내외 논문	SCI 여부	등록 번호
1	2016	A review on the fermented foods with beneficial effects on brain and cognitive function	김빈나 (제1저자) 김지은 (교신저자)	The Korean Society of Food Science and Nutrition (한국식품영양과학회)	21(4) 1-00	국내	비SCI	Print ISSN: 2287-1098
2	2017	Changes in <i>Drosophila melanogaster</i> sleep-wake behavior due to lotus (<i>Nelumbo nucifera</i>) seed and Hwang Jeong (<i>Polygonatum sibiricum</i>) extracts	Kyungae Jo, SangDuck Jeon, Chang-Won Ahn, Sung Hee Han, and Hyung Joo Suh	Preventive Nutrition and Food Science	22(4): 293-299	국외	비SCI	Print ISSN: 2287-1098
3	2017	Effect of Valerian/Hop Mixture on Sleep-Related Behaviors in <i>Drosophila melanogaster</i>	Hyeon-Son Choi, Bong Soo Ko, Hae Dun Kim, Ki-Bae Hong, and Hyung Joo Suh	Biological Pharmaceutical Bulletin	40(7) 1101-1110	국외	SCI	Print ISSN: 0918-6158
4	2018	<i>Nelumbo nucifera</i> seed extract promotes sleep in <i>Drosophila melanogaster</i>	Kyungae Jo, Hyeon-Son Choi, SangDuk Jeon, Chang-Won Ahn, and Hyung Joo Suh	Biological Pharmaceutical Bulletin	41(3)	국외	SCI	Print ISSN: 0918-6158
5	2018	Natural products from single plants as sleep aids: A systematic review	Jungyoon Kim; Suji L. Lee; Jieun E. Kim	Journal of Medicinal Food	in press (게재 예정)	국외	SCI	1096-620X

(2) 특허 성과

- 특허 1건 등록, 1건 출원

번호	출원 연도	출원/등록 구분	기술명	출원인	출원국	출원/등록 번호
1	2017	등록	등골레 추출물을 함유하는 수면 장애 치료 및 수면 시간 증진을 위한 조성물	김훈중, 박수현, 손병옥, 안동규, 안창원, 오기백, 전상덕	대한 민국	10-17795 36
2	2017	출원	모노 글리세라이드를 유효 성분으로 함유하는 약학 또는 식품 조성물	김훈중, 박수현, 손병옥, 안동규, 안창원, 오기백, 전상덕	대한 민국	10-2017- 0108484

다. 연구 결과

(1) 경제적 성과 (사업화 계획)

- 사업화 계획

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년 (개별인정 확보 및 상품화 진행)			
	소요예산(백만원)	500 만원 (개별인정 신청 및 보완, 상품화 마케팅 및 제품 생산 최소 비용)			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	25	50	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	20	40
국외		-	5	7	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	타정 제품을 기준으로 음료, 애플, 분말 등 소비자 기호도에 맞는 제품 개발 각 제품별 맞춤형 마케팅 전략 수립			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	2	3	
	수 출	-	10	15	

■ 개발일정/ 상품화일정

The First The Only The Best

❖ 상품화 일정



- 사업화 계획 및 매출 실적

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-억원
			향후 3년간 매출	12억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	13억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 40 % 국외 : 5 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 5 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10위권

- 사업화 예시

상품화_타정 제형

TRACK 1

잠재적 경쟁제품	일반의약품 수면제 (레돌민 정)
우위효과	홈쇼핑 및 기타 판로를 통한 제품 홍보 가능
홍보방안	<ol style="list-style-type: none"> 음료 제품을 통한 인지도 확대 소방관 대상 제품 테스트 : 효능 인지도 확보 이미지 구축



타정 제형

판매가격 (원) 21,000-25,000원/30정

제조원가

원료 (황정추출분말)	1,000원/15g
원재료	800원
부재료비	2,500원
노무비	
제조경비	
일반경비	1,000원
합계	5,300원

제조원가는 판매가의 20% 기준

차별화 제품
가격 유통
Price Price

용량: 800mg/정 x 30정

컨셉: 수면증진 건강기능식품

제형 선택근거:

- 주 소비층에서 선호하는 제형
- 가격 부분 충족 (30,000원 이하)

Home plus e mart

LOTTE Mart

대형마트

LOTTE GS SHOP
롯데홈쇼핑 홈&쇼핑

현대 홈쇼핑
HYUNDA HOME SHOPPING

CJ O SHOPPING

NS 홈쇼핑

홈쇼핑



약국

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

가. 목표 평가의 착안점 및 기준

년도	연구개발의 목표	가중치 (%)	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	황정 원료별 추출불 효능 분석	10	- 황정 원료별 수면효능 분석 및 최종 원료 선정
	황정 추출분말 제조공정 설정	20	- 황정 추출분말 제조공정 최종 설정
	황정 추출분말 제조공정 Scale-up	20	- 미생물, 지표성분, 제조수율 규격 내 생산 확인
	수면 관련 동물효능평가	20	- 척추동물 유래 총 수면시간, 수면잠복기 측정 확인
	황정 추출물의 작용기작 규명	20	- 황정 추출물의 수면개선 작용기작 규명 1건 이상 - 관련 결과 논문 게재 및 학술대회 참가
	윤리적인 연구 수행을 위한 IRB 승인 확보	10	- IRB 신청 및 승인 확인
2차 년도	황정의 신규 지표성분 규명 및 분석법 개발	10	- 신규 지표성분 1종 이상 개발 및 분석법 표준화 확인
	황정 추출물 Plant 규모 생산 표준화	15	- 제조수율 개선, 미생물, 지표성분 규격내 확인
	건강기능식품 시제품 개발	25	- 시제품 1종 이상 개발
	황정 원료 분석법 확보	10	- 유전자 분석법 프로토콜 개발
	황정 추출물의 수면활성 기능성분 규명 및 분석법 개발	15	- 수면활성 기능성분 규명 1종 이상 분석법 표준화 확인
	연구대상자 모집 완료	5	- IRB 종료보고 및 임상실험 완료
	객관적 주관적 수면 지표 분석 황정 추출물의 인체효능 확인	20	- 설문 지표에서 1종 이상 대조군 대비 수면의질 또는 불면개선 유의적 효과 확인 - 객관적 지표를 통한 대조군 대비 수면개선 유의적 효과 확인 (1종 이상)

년도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1 차 년 도	주관기관 (농심) 황정의 원료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황정 원료 산지별 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 제조한 추출물의 동물효능평가 분석 결과 제천산 원료가 가장 높은 효능을 나타냄 ○ 황정 원료 품종별 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 황정과 유사품종간의 차이를 구분하고 효능이 확보된 황정 원료 품종을 관리하기 위하여 유전자 분석법을 개발함 	100
	황정 추출물 생산공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전처리 및 추출공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 전처리 공정에서는 분쇄 및 증숙공정을 비교하였으며, 추출공정에서 열수 추출공정과 효소분해 공정을 비교하여 최종 공정을 설정하였음 ○ 분말화 공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 분말화 공정 제조수율 향상을 위하여 투입 추출물 농도 및 부형제 함량에 따른 분석을 진행하였음 	100
	황정 추출물 제조 Scale-up	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현장 수준 생산실험 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 황정 추출물말 현장생산을 진행함 - 최종 수율은 23.8% 수준, 미생물 및 지표성분 GABA 함량 만족함 - 자선원가는 68,200원 수준 	100
	제1협동기관 (서울여대) 황정의 수면 활성 및 작용 기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황정의 산지, 품종별 수면 활성 및 수면특성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - ICR mice model에서의 황정의 수면 활성 평가: 수면 잠복기 및 총 수면 시간 평가 ○ 황정의 작용기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> - Specific antagonist(flumazenil, p-MPPI)를 이용한 황정의 수면활성 	100

		<p>평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - SD rat model에서의 뇌파측정을 통한 황정의 작용기작 규명: antagonist 처리 시 총 수면시간 평가 및 수면의 질(랩 및 비랩수면 등)의 변화 평가 - Radio ligand binding assay를 통한 황정의 작용기작 규명 	
	<p>제 2 협동기관 (이화여대) 인체실험 프로토콜 확정</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체실험 프로토콜 확정 <ul style="list-style-type: none"> - 선행연구를 바탕으로 연구대상자 최소 표본수 산출 - 대상자의 수면다원검사 Actigraphy, sleep diary 측정 동선 확정 및 식약처에서 프로토콜 점검 진행 	100
	<p>IRB 확보 및 연구대상자 모집</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ IRB 심의 및 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 이화여대 생명윤리심의위원회에서 본 연구 계획과 시행의 안전성에 대한 IRB 심사 진행 및 승인 ○ 연구대상자 모집 및 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 연구 참여 기준에 부합하는 연구대상자 모집 및 screening 진행 	100
	<p>뇌영상 프로토콜 확정 및 Preprocessing 진행</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 뇌영상 프로토콜 확보 <ul style="list-style-type: none"> - MRS, MRI scan 획득을 위한 프로토콜 확정 ○ 뇌영상 수집 및 Preprocessing 진행 <ul style="list-style-type: none"> - 확정된 뇌영상 프로토콜을 적용하여 뇌영상을 획득함 (preprocessing) 	100
2 차 년 도	<p>주관기관 (농심) 신규 기능성 및 지표성분 분석법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 지표성분 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 식약처와의 모듬토의 후 등굴레속 특유의 지표성분 개발 필요 - beta-sitosterol 분석법 개발 (현장 생산품 기준 2.2mg/g 수준) ○ 신규 수면활성 기능성분 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 협동기관인 서울여대에서 수면개선 작용기작 및 기능성분인 Monolinolein, Oleamide 2종을 규명함 	100

		- Oleamide 분석법 개발 (현장 생산품 기준 0.1mg.g 수준 확인) -	
	원료 관리 DNA barcode 법 개발	○ 품질 관리를 위한 원료 구별 유전자 분석법 개발 - 황정 품종 확인을 위한 DNA 마커 3 종 (MatK, rpoB1, rpoC)를 개발하였 으며, 각 마커의 SNP를 확인하였음	100
	현장수준 품질 표준화	○ 현장생산 및 품질 표준화 확보 - 현장 생산을 3회 진행 - 미생물 및 지표성분 규격내 확인함 - 생산수율을 추출분말 기준 32% 수준 으로 증대함	100
	시제품 개발	○ 건강기능식품 제형 시제품 개발 - 타정 처방 개발 - 타정 시생산 진행, 유통기한 설정실험 진행	100
	제 1협동기관 (서울여대) 황정의 기능성분 분리, 정 제 및 구조 규명	○ 황정의 기능성분 분리 및 정제 - Solvent fractionation과 column chromatography를 통한 수면 활성성 분 분리 및 정제 - Receptor binding assay를 통한 활성 성분 추적 평가	100
		○ NMR 및 GC-MS를 통한 기능성분 구 조 규명 - ¹ H, ¹³ C NMR 분석 및 GC-MS 분석 을 통한 활성성분 구조 규명 - 표준물질과 활성물질의 receptor binding assay를 통한 수면활성 비교 ○ NMR을 통한 지표성분 규명 및 GC를 통한 함량분석	100
	제 2 협동기관 (이화여대) 연구대상자 이상 분석	○ 연구 대상자 영양소 섭취 상태 분석 ○ 안전성 평가 ○ 식품 섭취 순응도	100
	수면 관련 설문 결과 분석	○ 수면 관련 자가 보고 설문 결과 확인 - 피츠버그 수면의 질 평가 설문	100

		(Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI), 아테네 불면 척도 (Athens Insomnia Scale, AIS), 불면증 심각성 척도 (Insomnia Severity Index, ISI) 분석을 진행 - 모든 분석 결과에서 대조군 대비 수면의 질 및 불면증 개선이 확인되었으며, AIS 검사에서는 유의성을 확인함	
	수면 관련 Actigraphy 결과 분석	○ 수면 관련 Actigraphy 결과 확인 - 연구 대상자의 수면과 관련된 객관적 지표로써 Actigraphy 분석 결과를 활용함 - 대조군대비 총 수면시간, 수면 효율성, WASO (잠든 후 깨어있는 시간) 측정 시 모든 지표가 개선되었으며, 총 수면시간은 대조군 대비 유의적 증가를 확인함	100

4-2. 관련분야 기여도

- 현재 수면관련 환자 및 수면과 관련된 불편함을 느끼는 인구는 지속적으로 증가하고 있음에도 불구하고 만족할만한 수면개선 소재는 많지 않은 실정임. 현재 많은 환자들이 복용하는 수면제 및 수면 보조제는 우울증이나 발암, 자살충동 증가 등 여러 가지 부작용들이 발견되어 궁극적인 대안이 될 수 없다고 판단됨
- 특히 국내 수면환자 및 진료비가 급격히 증가함에도 불구하고 수면개선과 관련된 소재는 거의 없음. 최근 한국식품연구소에서 감태 추출물을 이용한 수면개선 건강기능식품을 출시하였으나, 원료 수급의 어려움으로 인한 단가가 매우 높아 제품의 단가의 한계를 가지고 있어 시장에서 크게 성공하지 못하였음.
- 본 연구는 국내 농산물을 타겟으로 한 수면개선 소재를 확보함으로써 국내 농가 소득에도 기여할 수 있으며, 수면과 관련된 증가하는 시장에 접근할 수 있는 제품을 확보할 수 있음
- 또한 개발 과정에서 황정 추출물의 수면관련 메커니즘과 기능성분에 대한 규명이 이루어졌으며, 인체적용시험에서도 수면과 관련된 객관적 주관적 지표가 유의적으로 개선되는 점을 확인할 수 있어, 관련 업계에서 연구를 진행할 때 가이드라인이 될 수 있음.

- 최종적으로 수면개선 건강기능식품 및 식품에 개발 소재를 적용함으로써 국내 농산물의 부가가치를 높이며, 기업과 국가 입장에서 과학기술을 활용한 신성장동력을 확보할 수 있음

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 천연식물자원을 활용한 고부가 신기능성 소재로써의 활용 범위를 확장하고, 천연식물에서 추출 여과된 공정을 통하여 인체에 부작용이 없으며 질환에 효과적인 치료 및 개선제의 대량 생산 상품화가 가능. - 국내 작물유래 추출물의 기능성 소재를 확보함으로써 추출물의 수면건강에 대한 개선 효능 입증 및 임상시험으로 과학적 성과 및 신뢰성을 제고함. 약리활성 물질에 대한 기능성 검증을 통하여 그 작용 기전 규명 및 제어 기술 확립. - 수면질환에 대한 치료제 처방과 함께 치료의 효율을 높일 수 있는 건강기능식품 소재로써 활용이 가능하며, 유효 기능성 성분 대량 함유된 추출기술, 생산기술 및 원료제형화, 제품 포물레이션, 제형제재(과립, 분말 등) 및 포장 기술을 확보. - 만성질환인 수면장애에 대한 황정 및 복합소재의 기능성 인증 및 작물의 산업화를 위한 핵심기술 확립하고 추출액의 안정성과 기능성향상 기술 확보. - 소재 및 그 유래 유효성분의 과학적인 기능성 자료와 고효율 대량 생산 체계 기술 개발은 우리나라 농업식품분야의 위상을 높여줌. - 최종적으로 우수한 연구 논문 발표를 통하여 우수 연구인력의 배출에 기여함. <p>○ 산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최근 불면증 환자가 증가하는 경향을 보이고 있으며, 이로 인한 직접적인 사회적 비용이 미국에서만 140억 달러이며 간접적인 비용은 약 300억 달러로 추정되고 있음. 그러나 잠재적인 수요의 85%가 남아 있는 상황으로 실제로는 불면증으로 인한 사회적 비용은 더 클 것으로 예상됨. 또한 평균 수명이 증가함에 따라 건강한 생활패턴을 유지하기 위해 불면증 치료는 향후 필수적으로 관리되어야 하는 요소임. - 미국의 수면 관련 시장 규모는 23조원으로 천연 수면보조제 및 수면 증진 건강기능식품 등의 수면 관련 제품의 시장이 확대되고 있으며, 최근에는 선진국뿐만 아니라 개발도상국에서도 시장이 확대되고 있으며 약물이 아닌 기능성 식품 소재를 원료로 한 안전하고 부담감이 적은 수면 개선 제품에 대한 요구가 증가하고 있는 상황이다. 국내에서도 천연물 소재를 이용한 불면증 개선에 대한 연구는 전무하며, 개발의 필요 	

성에 대해 인식하는 초보적인 수준이다. 따라서 본 연구를 통하여 우수한 효능을 가진 소재가 발굴되고 그 작용기전에 대한 규명이 이루어질 경우, 산업화를 위한 다음 단계 연구로 진행될 수 있음.

- 현재까지 개발되었던 수면제는 주로 Benzodiazepine과 이의 부작용을 완화시킨 Zolpidem 이다. 수면제를 처방하면 단기적인 효과를 볼 수 있다. 그러나 장기간 수면제를 처방하는 경우 약물에 대한 내성, 의존성, 오남용 가능성, 각종 부작용, 반동성 불면증, 낮 시간의 인지기능 저하 등이 초래될 가능성이 있다. 따라서 불면증, 특히 정신생리성 불면증에서는 비약물 치료가 우선적으로 권고되고 있음

- 본 연구에서는 수면 활성을 갖는 황정을 선정하여 천연물 기원의 기능성 물질 생산에 토대를 마련하고자 하였으며, 더 나아가서는 수면 활성물질의 규명을 통해 자원의 고부가가치 활용이라는 측면에서 새로운 가능성이 제시될 것으로 판단됨.

- 1차년도에서 검증한 황정의 수면 증진 효능을 통해 기능성 소재의 개발을 타겟으로 하였으며, 2차년도에서 본 연구의 성공적 수행으로 밝혀진 황정의 작용기작 및 활성 물질 규명에 향후 천연물 신약과 같은 제약 산업으로도 확장될 수 있음.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<input type="checkbox"/>	
작성요령(제출 시 삭제할 것)	
<input type="checkbox"/> 기 추진한 연구 관련 해외과학기술정보 기술	

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

작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 당해과제 연구개발 시작부터 최종 연구종료시점까지 현금으로 구입한 1개(건)당 3,000만원(부가세 포함) 이상의 연구시설·장비 및 3,000만원 미만이라도 공동활용이 가능한 연구시설·장비라도 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 시설·장비를 기재

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>[농심]</p> <p>1. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 일상점검: 매일 1회 이상/ 연구 활동 종사자 점검 ○ 정기점검: 연 1회 이상/ 기계안전, 전기안전, 화공안전, 소방안전, 가스안전, 사업위생 등 부문별 안전 관리자 점검 ○ 특별안전점검: “연구실 안전환경 조성법 제 9조”에 의거 연구실 정밀안전진단을 2년에 1회 실시하였음 <p>2. 연구실 내 위험물 관리</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 모든 연구실 및 실험실의 출입허가제를 운영하며, 안전관리 규칙을 어길 시 출입권한을 박탈함 ○ 화학약품을 취급하는 연구실 및 실험실에 안전설비로써 긴급 샤워기와 세안기 등을 설치하고 관리함 ○ 주요 위험관리 기자재는 소모성 부품교환 주기에 맞추어 순회 안전점검 실시 <p>나. 연구자 안전관리 체계</p> <p>1. 참여연구원 교육훈련 및 건강검진 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 9조”에 따라 반년에 6시간 이상의 정기 교육을 실시함 ○ 온라인교육을 실시할 경우 반드시 평가과정을 거쳐 교육 이수시간을 인정하여야 함 ○ “연구실 안전환경 조성에 관한 시행규칙 제 10조”에 따라 “국민건강보험법”에 따른 건강검진 기관에서 1년에 1회 이상 일반건강검진을 실시함 <p>2. 상해보험가입</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ “연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제 14조”에 따라 보험가입을 의무화하고 “시행령 제 14조 제 1항 제 1호”와 같이 연구주체의 장은 연구활동 종사자의 보험 가입에 필요한 비용을 매년 예산에 계상하여 실시함 ○ 그 외 과제 참여 기업체 연구원들은 “산업재해보상보험”에 가입되어 있음 ○ 실험실 내 보호장비 보관함 및 구급함을 구비함 	
<p>[서울여자대학교]</p> <p>가. 안전점검 및 정밀안전진단</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 점검대상 : 자연계, 이공계열 모든 대학원 연구실 및 연구소(센터) <ul style="list-style-type: none"> - 점검목적 : 안전사고 예방 및 안전의식 고취 - 점검안내 : ①포털 공지 ②그룹 메일 ③SMS 문자 전송 ○ 안전점검 <ul style="list-style-type: none"> - 일상안전점검 : 연구활동 종사자 매일 점검 → 매월 4일 안전점검의 날 - 정기안전점검 : 년 1회, 4~5월 실시(유자격자 또는 업체 위탁점검) - 특별안전점검 : 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우 실시 ○ 정기안전점검 범위 <ul style="list-style-type: none"> - 연구실 일반관리, 소방, 기계, 산업위생, 화학약품, 생물, 전기, 가스 	

- 정밀안전진단
 - 진단시기 : 2년 1회, 4~5월 실시
 - 진단분야 : 일반안전관리, 소방안전, 기계안전, 산업위생, 화공안전, 생물안전, 전기안전, 가스안전

나. 안전교육

- 교육대상자 : 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구원)
- 온라인 안전교육 : 전반기 6시간, 후반기 6시간
- 자체교육 : 실험·실습 수업 전 5분 자체 안전교육실시(지도교수 또는 조교의 지도하에 당해 실험 주의사항)
- 온라인교육 이수 홈페이지 : <http://kusafe.korea.ac.kr> (365일 교육수강 접속可)

◇ 교육영상 분류(풀에서 원하는 동영상 취사선택 / 지속 업데이트)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 기계분야(9개) ▪ 전기분야(11개) ▪ 화공분야(36개) ▪ 소방분야(8개) ▪ 가스분야(2개) ▪ 보건(위생)분야(5개) ▪ 생물분야(5개) ▪ 생활안전(43개) ▪ 기타분야(5개)

다. 상해보험 가입

- 대상: 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 보상기준 및 내용

구 분		내 용
보상 기준		-연구실에서 발생한 사고로 연구활동 종사자가 부상, 질병, 신체장애, 사망 등 생명 및 신체상의 손해발생시 보상
보상 내용	사망	1인당 1억원
	후유장애	1억원을 한도로 후유장애등급별 정액 보상
	상해의료비	1천만원 한도로 1인당 상해등급별 정액 및 실손 보상

라. 건강검진

- 대상 : 자연계 연구활동 종사자(학부생, 대학원생, 연구(보조)원)
- 시행 : 매년 3~4월, 교내에서 지정한 장소(2곳)

마. 추가 연구실 안전시설 안전성 확보

- 위험물 저장소 설치
 - 설치 : 자연과학대학(1)
 - 효과 : 실험실내 안전성 향상
- 비상샤워기 및 세안기 설치
 - 설치 : 유해 위험한 시약을 취급하는 모든 실험실 또는 실험실 복도
 - 효과 : 유해 화학물질 접촉 시 긴급한 세척으로 피해예방
- 가스누설경보기 설치
 - 대상 : 가연성, 독성가스를 사용하는 모든 실험실 → 75개소
 - 효과 : 가스 누설 시 자동차단으로 인명과 재산피해 예방 및 감소
- 가스용기 전도방지 고정장치 설치
 - 대상 : 가스용기를 사용하는 모든 실험실(스탠드식 → 78개소 등)
 - 효과 : 가스용기 전도예방 및 안전성 확보 등
- 안전보호구함 제작
 - 목적 : 안전보호구의 위생적 보관 및 관리
 - 효과 : 안전보호구 착용 및 안전의식 고취

- 안전관리팀 전담부서 설치
 - 목적 : 교내 안전관리 체계화 도모 및 전담부서 신설 추세.
 - 분장 : 연구실, 환경

[이화여자대학교]

가. 연구대상자에 대한 안전성 배려

- 잠재적 위험성 최소화 및 연구대상자를 위한 안전성 배려
 - 본 연구는 잠재적 위험성에 대하여 세심한 면담과 검증된 확인 절차를 거친 연구대상자에 한하여 시행되며, 잠정적 불편감이나 위험성 등을 충분히 설명하고 이해하여 자발적으로 동의한 연구대상자에 한하여 연구에 임하게 됨.
 - 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI) 및 자기공명분광영상 촬영으로 인한 위험은 극히 제한적이며, 만약 촬영 중 심한 불편감을 호소할 경우 언제라도 즉시 마이크를 통하여 연구원에게 직접 의사를 전달하고 촬영을 중단할 수 있음. 촬영이 진행되는 과정에서 연구대상자의 신체적인 상태는 연구자에 의해 면밀히 관찰되고 기록되어 절차에 반영될 것이며, 연구대상자로 하여금 임상면담에서 어떤 가능한 부작용도 보고되도록 장려될 것임.

- 자기공명영상 및 자기공명분광영상 반복촬영의 안전성
 - 1996년 미 FDA에서 4 Tesla(T) 이하의 MRI 촬영은 안전성을 허가 받았으며, 임상진료 및 연구에서 4 T 이하의 MRI촬영이 활발히 이루어지고 있음. 본 연구에서는 3 T MRI만을 사용하고 있으며, 이는 안전성이 널리 알려져 연구 목적에서뿐만 아니라, 임상에서도 널리 사용되고 있으므로 위험성이 최소한인 것으로 판단됨. 본 연구진은 연구대상자의 최선의 안전을 확보하기 위하여 다음을 충분히 고려하여 시행할 예정임. 이에 본 연구는 뇌영상 연구자체로 연구대상자의 신체적 또는 정신적 위험성이 최소한일 것으로 판단됨.
 - **Strong static magnetic fields(B0):** 뇌영상 촬영 시 strong static magnetic fields로 인하여 연구대상자의 심장박동 및 혈압 변화와 같은 신체 내부의 변화가 유도될 수 있음. 그러나 2006년 World Health Organization(WHO)에서 발간한 자료(Environmental Health Criteria 232)에서는 8 Tesla 강도의 magnetic field 환경에 노출되었을 때도 신체 내부의 변화는 정상 범주를 벗어나지 않는다고 함. 따라서 3 Tesla 강도에서 시행되는 본 연구에서는 B0 effect로 인한 위험성은 미미할 것으로 판단됨.
 - **Projectile effect:** 이는 연구대상자 혹은 관리자의 부주의 및 실수로 인하여 자기장에 의하여 영향 받을 수 있는 금속 물질을 차폐방 안으로 가지고 들어감으로써 발생할 수 있는 문제임. 이를 방지하기 위해, 본 연구진은 사전에 촬영을 위한 교육을 전 연구원을 대상으로 1년에 4회 이상 시행하고 있음. 또한, 본 연구진은 촬영 전후 checklist를 매번 작성하여 혹시라도 발생할 수 있는 부주의 사고를 미연에 방지하고 있음.
 - **Interaction with implantable medical devices:** 강한 자기장으로 인해 medical device에 attraction/ torque가 발생하며, 이것으로 인하여 세포에 상해가 있을 수 있음. 하지만 이러한 위험성을 미연에 방지하고자, 전문 연구원의 screening을 통해 medical device를 이식 및 착용하고 있는 연구대상자는 본 연구에서 제외시킬 것임(자기성을 띄지 않는 medical device 제외).
 - **Heat rise from radio frequency(RF) magnetic field:** RF 흡수로 인한 체온 상승은 강한 자기장에서 일어날 수 있지만, 체온 1도의 상승은 건강한 정상인에게서는 문제가 되지 않는 것으로 알려짐. 뇌영상 촬영 시 기기를 통해 SAR(Specific-energy Absorption Rate)를 monitoring함.

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	논문	Changes in <i>Drosophila melanogaster</i> sleep-wake behavior due to lotus (<i>Nelumbo nucifera</i>) seed and Hwang Jeong (<i>Polygonatum sibiricum</i>) extracts	서울여대. 고려대	제1저자	Preventive Nutrition and Food Science	0.47	2017.12.31	단독	비SCI
2	논문	<i>Nelumbo nucifera</i> seed extract promotes sleep in <i>Drosophila melanogaster</i>	서울여대. 고려대	제1저자	Biological and Pharmaceutical Bulletin	1.683	2018.01	단독	SCI
3	특허	동굴레 추출물을 함유하는 수면 장애 치료 및 수면 시간 증진을 위한 조성물	농심	발명자	대한민국		2017.05.11	단독	
4	특허	모노 글리세라이드를 유효 성분으로 함유하는 약학 또는 식품 조성물	농심	발명자	대한민국		2017.08.28	단독	
5	논문	Natural products from single plants as sleep aids: A systematic review	이화여대	제1저자	Journal of Medicinal Food	1.955	계제예정	단독	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
1. Siegel JM. 2005. Clues to the functions of mammalian sleep. <i>Nature</i> 437: 1264-1271.	
2. Mahowald MW, Schenck CH. 2005. Insights from studying human sleep disorders. <i>Nature</i> 437: 1279-1285.	
3. Cuesta M, Boudreau P, Boivin DB. 2017. Basic circadian timing and sleep-wake regulation. In <i>Sleep Disorders Medicine</i> . Springer, New York, NY, USA. p. 79-102.	
4. Emert SE, Tutek J, Lichstein KL. 2017. Associations between sleep disturbances, personality, and trait emotional intelligence. <i>Personality and Individual Differences</i> 107: 195-200.	
5. Sateia MJ, Buysse DJ, Krystal AD, Neubauer DN. 2017. Adverse effects of hypnotic medications. <i>J Clin Sleep Med</i> 13: 839.	
6. Glass J, Lanctôt KL, Herrmann N, Sproule BA, Busto UE. 2005. Sedative hypnotics in older people with insomnia: meta-analysis of risks and benefits. <i>BMJ</i> 331: 1169.	
7. Pearson NJ, Johnson LL, Nahin RL. 2006. Insomnia, trouble sleeping, and complementary and alternative medicine: analysis of the 2002 National Health Interview Survey. <i>Arch Intern Med</i> 166: 1775-1782.	
8. Dubowy C, Sehgal A. 2017. Circadian rhythms and sleep in <i>Drosophila melanogaster</i> . <i>Genetics</i> 205: 1373-1397.	
9. Chung BY, Kilman VL, Keath JR, Pitman JL, Allada R. 2009. The GABAA receptor RDL acts in peptidergic PDF neurons to promote sleep in <i>Drosophila</i> . <i>Curr Biol</i> 19: 386-390.	
10. van Swinderen B, Nitz DA, Greenspan RJ. 2004. Uncoupling of brain activity from movement defines arousal states in <i>Drosophila</i> . <i>Curr Biol</i> 14: 81-87.	
11. Choi HS, Ko BS, Kim HD, Hong KB, Suh HJ. 2017. Effect of Valerian/Hop mixture on sleep-related behaviors in <i>Drosophila melanogaster</i> . <i>Biol Pharm Bull</i> 40: 1101-1110.	
12. Ko CH, Koon CM, Yu SL, Lee KY, Lau CB, Chan EH, Wing YK, Fung KP, Leung PC. 2016. Hypnotic effects of a novel anti-insomnia formula on <i>Drosophila</i> insomnia model. <i>Chin J Integr Med</i> 22: 335-343.	
13. Singh A, Zhao K. 2017. Treatment of insomnia with traditional Chinese herbal medicine. <i>Int Rev Neurobiol</i> 135: 97-115.	
14. Ernst E. 2006. When natural is not harmless. <i>Int J Clin Pract</i> 60: 380-380.	
15. Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, Stough C, Scholey A. 2011. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. <i>Eur Neuropsychopharmacol</i> 21: 841-860.	
16. Zhao J, Li SP, Yang FQ, Li P, Wang YT. 2006. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in <i>Ziziphus jujuba</i> (Suanzaoren) by high performance liquid chromatographyevaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. <i>J Chromatogr A</i> 1108: 188-194.	
17. Fornaro M, Solmi M, Veronese N, De Berardis D, Buonaguro EF, Tomasetti C, Perna G, Preti A, Carta MG. 2017. The burden of mood-disorder/cerebrovascular disease comorbidity: essential neurobiology, psychopharmacology, and physical activity interventions. <i>Int Rev Psychiatry</i> 29: 425-435.	
18. Hsieh MT, Chen HC, Kao HC, Shibuya T. 1986. Suanzaorentang, and anxiolytic Chinese medicine, affects the central adrenergic and serotonergic systems in rats. <i>Proc Natl Sci Counc Repub China B</i> 10: 263-268.	
19. Yuan CS, Mehendale S, Xiao Y, Aung HH, Xie JT, Ang-Lee MK. 2004. The gamma-aminobutyric	

- acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. *Anesth Analg* 98: 353-358.
20. Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR. 2005. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* 138: 191-197.
21. Jo K, Kim HD, Kim S, Han SH, Choi HS, Suh HJ. 2017. Effect of the sleep-promoting by *Polygonatum sibiricum* rhizome extracts in vertebrate models. *FASEB J* 31: 1b369.
22. Rajput MA, Khan RA. 2017. Phytochemical screening, acute toxicity, anxiolytic and antidepressant activities of the *Nelumbo nucifera* fruit. *Metab Brain Dis* 32: 743-749.
23. Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Araujo Escalona AG, Ledesma Velázquez I, Martínez-Mota L, Moreno J, Heinze G. 2012. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 139: 164-170.
24. Mukherjee PK, Saha K, Balasubramanian R, Pal M, Saha BP. 1996. Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn. rhizome extract. *J Ethnopharmacol* 54: 63-67.
25. Liu L, Dong Q, Dong XT, Fang JN, Ding K. 2007. Structural investigation of two neutral polysaccharides isolated from rhizome of *Polygonatum sibiricum*. *Carbohydr Polym* 70: 304-309.
26. Wang J, Lu CS, Liu DY, Xu YT, Zhu Y, Wu HH. 2016. Constituents from *Polygonatum sibiricum* and their inhibitions on the formation of advanced glycosylation end products. *J Asian Nat Prod Res* 18: 697-704.
27. Zhao X, Li J. 2015. Chemical constituents of the genus *Polygonatum* and their role in medicinal treatment. *Nat Prod Commun* 10: 683-688.
28. Sugimoto Y, Furutani S, Itoh A, Tanahashi T, Nakajima H, Oshiro H, Sun S, Yamada J. 2008. Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 15, 1117-1124.

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.