

11-154300  
0-001885-  
01

에스  
트로젠  
수용체  
베타  
타겟으로  
폐경  
이행기  
부터  
폐경  
이후  
까지  
도움을  
줄 수  
있는  
맞춤형  
건강  
기능식품  
제품  
개발  
최  
종  
보  
고  
서

2017

농림축산식품부

농식품기술개발 고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001885-01

에스트로젠 수용체 베타 타겟으로  
폐경이행기부터 폐경 이후까지  
도움을 줄 수 있는 맞춤형  
건강기능식품 제품개발  
최종보고서

2017 . 11 . 09 .

주관연구기관/(주)네추럴에프앤피  
제1협동연구기관/숙명여자대학교 산학협력단  
제2협동연구기관/순천향대학교 산학협력단

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

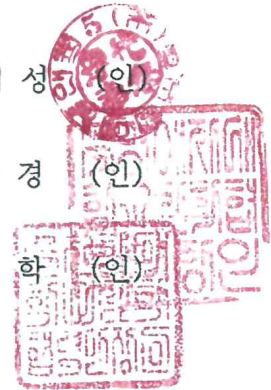
본 보고서를 “에스트로젠 수용체 베타 타겟으로 폐경이행기부터 폐경 이후까지 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 제품개발”(개발기간 : 2014. 8. ~ 2017. 7.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 11 . 8 .

주관연구기관명 : (주)네추럴에프앤피 (대표자) 문 지 성 (인)

제1협동연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 성 미 경 (인)

제2협동연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단 (대표자) 김 동 학 (인)



주관연구책임자 : 문 원 국

제1협동연구책임자 : 장 민 선

제2협동연구책임자 : 김 태 회

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	114025-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3차년도 2016.8.1.~ 2017.7.31	단 계 구 분	3차년도/3차년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	에스트로젠 수용체 베타 타겟으로 폐경이행기부터 폐경 이후까지 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 제품개발			
	세부 과제명	주관기관 : 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연물 유래 추출물의 원료화 및 건강기능식품 제품화 제1협동기관 : 갱년기 증상 완화 천연소재 후보물질 선정을 위한 효능 및 안전성 평가 제2협동기관 : 인체시험을 통한 천연소재의 갱년기 증상 완화 효능 검증 및 암 예방 활성 평가			
연구책임자	문 원 국	해당단계 참 여 연구원 수	총: 25 명 내부: 25 명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비 (천 원)	정부: 195,000 민간: 66,100 계: 261,100
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 25 명 내부: 25 명 외부: 명	총 연구개발비 (천 원)	정부: 570,000 민간: 198,300 계: 768,300
연구기관명 및 소속부서명	(주)네추럴에프앤피 중앙연구소			참여기업명 (주)네추럴에프앤피	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약	<ol style="list-style-type: none"> <li>원료의 표준화 및 대량공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>백년초, 여주, 시계꽃 추출 혼합물의 표준화 및 대량공정 표준화 완료</li> </ul> </li> <li>제형연구 및 시제품 생산을 통한 제품화 단계 진입</li> <li><i>In vitro/in vivo</i> 연구를 통한 과학적 효능 검증</li> <li>여성갱년기 건강을 위한 심도있는 인체적용시험 진행 및 완료</li> <li>개별인정형 원료 신청을 위한 식약처 모뎀토의 진행</li> </ol>			보고서 면수  104페이지	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	폐경이행기와 폐경기, 그 이후 여성층을 대상으로 심도 있는 인체적용실험 및 종합영양평가를 완료하고 갱년기 증상 완화 천연소재 식약청 원료 개별인정을 추진하여 최종적으로 우수하고 안전한 각 단계별 맞춤형 갱년기 예방 및 증상 완화 건강기능식품을 제품화하고자 함				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>갱년기 완화 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 백년초, 여주 등을 중심으로 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연소재 원료 발굴: 에스트로겐 수용체 베타를 타겟으로 스크리닝하여 에스트로겐 부작용이 현저히 적은 갱년기 완화 소재 발굴</li> <li>· 반응표면분석법(RSM)을 통한 최적추출법 확립</li> <li>· 동물실험을 활용한 원료의 탐색적 효능 평가</li> <li>· 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연소재의 원료의 표준화 및 기준 설정</li> </ul> </li> <li>▪ <b>효능 소재의 시제품 제작 및 안전성 규명, 인체적용시험 수행</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연원료를 복합물로 활용하여 건강기능식품 시제품 제작</li> <li>· 2차 동물 실험을 통한 시제품의 안전성 확인 및 효능 규명</li> <li>· 폐경이행기, 폐경기, 그 이후 연령층 대상 인체적용시험 시험을 통해 갱년기 증상 예방 및 완화 효능 평가</li> </ul> </li> <li>▪ <b>각 단계별 맞춤형 갱년기 예방 및 증상 완화 건강기능식품의 제품화</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 기준이 명확하게 검증된 원료를 중심으로 상용화를 위한 맞춤형 제품화 추진</li> <li>· 우수한 원료에 대하여 식약청 개별인정 신청</li> </ul> </li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>활용계획</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 천연소재의 안전성 평가를 위한 기술 개발 및 검증</li> <li>· 안전성이 100% 확보된 갱년기 증상 완화 제품을 개발</li> </ul> </li> <li>▪ <b>기대효과</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 원료 중심 연구를 통하여 국내 농식품의 우수성을 증명하며, 농가와 식품시장의 활성화 기대</li> <li>· 기존의 갱년기 증상 완화 제품과 차별적인 작용기전으로 안전성의 현저한 증가 기대</li> <li>· 갱년기 증상 완화 제품을 개발함으로써 골다공증, 안면홍조, 수면장애, 질 건조증과 같은 갱년기 증상 완화에 따른 삶의 질 증가 기대</li> <li>· 사각지대에 놓여 있던 폐경이행기에 있는 여성들을 위한 증상 완화 및 폐경기 예방 제품 개발</li> <li>· 폐경 이후의 여성들을 위한 폐경기 이후 관리 제품 개발을 통해 맞춤형 제품 개발로 폭넓은 연령층의 삶의 질 증가 기대</li> <li>· 본 연구결과를 통하여 맞춤형 갱년기 증상 예방 및 완화 기능성 개별인정을 획득 후 주관기관인 (주)네추럴에프앤피의 기존 거래업체에 적극적인 OEM, ODM 원료홍보를 진행하여 매출창출을 진행하며, 또한 자체 판매브랜드인 'Evergood Life'와 'NRD'社를 통하여 국내외 시장 확대와 흡쇼핑진출을 통한 시장의 진입을 진행 예정</li> </ul> </li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	폐경이행기	폐경기	건강기능식품	에스트로겐 수용체 베타	백년초



5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	Development of health functional food to help alleviate women`s menopausal symptoms using natural materials <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Standardization of natural materials</li> <li>▪ Prove scientific efficacy through <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> studies</li> <li>▪ Demonstrate safety and efficacy through clinical testing</li> </ul>				
Results	<p><b>Finding natural materials with efficacy for women's menopausal symptoms</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Screening experiment targeting estrogen receptor beta and fewer side effects</li> <li>▪ Establishment of optimal extraction method through RSM (Response Surface Methodology)</li> <li>▪ Prove scientific efficacy through <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> studies</li> <li>▪ Standardization of natural materials</li> </ul> <p><b>Identification of safety of material and progress of clinical test</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prototype production using natural materials</li> <li>▪ Demonstrate safety and efficacy through clinical testing</li> </ul> <p><b>Development of health functional food to help alleviate women`s menopausal symptoms using natural materials</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Productization               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Customized women's menopausal health functional food products</li> </ul> </li> </ul>				
Expected Contribution	Will obtain the approval of Three mixtures as the raw material of qualified health functional food by the Ministry of Food and Drug Safety and sales of that material and the health functional food products containing Three mixtures for the purpose of improving alleviate women`s menopausal symptoms				
Keywords	Menopausal transition	Menopause	Health functional food	Estrogen receptor beta	Opuntia ficus-indica (L.) Mill

## 6. 영문목차

### CONTENTS

I . Introduction of R&D projects.....	1
II . Current national and international technology trends.....	8
III . Results of R&D projects.....	10
IV . Target achievement rate of R&D projects and Contribution rate of related fields... .....	95
V . Research utilization plan.....	96
VI . Key performance of R&D projects.....	100
VII . References.....	104

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	8
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	10
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	95
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	96
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	96
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	96
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	97
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	97
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	100
11. 기타사항 .....	104
12. 참고문헌 .....	104

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
<p>1-1. 연구개발 목적</p> <p>○ 갱년기 증상 완화 지표성분이 명확하고 구체적 원료 표준화가 가능한 천연소재를 대상으로 에스트로겐 수용체 베타를 활성화시키는 천연소재를 screening한 후, chemopreventive 활성을 보이는 소재와 다양한 비율로 혼합하여, 동물실험 검증을 통해 에스트로겐 부작용을 최대한 감소시킨 갱년기 증상 완화 유력소재를 1종 이상 선정하고 맞춤형 건강기능식품 (Health Functional Food with Designed Botanical Extracts) 시제품을 복합제재로서 formulation 설정 및 개발을 완료함. 더불어 시제품을 대상으로 동물의 혈액, 조직 및 기관 실험을 실시하고, 최종 2개 이상의 복합물을 대상으로 폐경이행기와 폐경기, 그 이후 여성층을 대상으로 심도 있는 인체 임상실험 및 종합영양평가를 완료하고 갱년기 증상 완화 천연소재 식약청 원료 개별인정 신청과 함께 최종적으로 우수하고 안전한 각 단계별 맞춤형 갱년기 예방 및 증상 완화 건강기능식품을 제품화하고자 함.</p> <p>1-2. 연구개발의 필요성</p> <p>○ 폐경이행기(menopausal transition)와 폐경기(menopause)는 여성이 나이가 들면서 난소 내 난자의 수가 감소, 노화되어 에스트로겐분비가 감소되어, 월경이 더 이상 일어나지 않는 현상을 말함. 일반적인 경우 폐경기 평균 연령은 51세이며, 보통 40대 중후반에서 시작되어 점진적으로 진행되는데, 이때부터 생리가 완전히 없어지는 폐경이 나타나기 전까지를 폐경이행기(또는 갱년기)라고 하며, 그 기간은 평균 4~7년 정도임.</p> <p>○ 갱년기 장애는 에스트로겐의 현저한 감소로 냉증, 현기증, 발한, 월경통, 불면증 등을 함께 겪는 증세임. 또한, 자율신경계 이상증상으로 안면 홍조가 되며, 발작적으로 땀이 흐르는 반면 손발이나 허리가 매우 차갑게 되는데 이러한 것들이 갱년기장애의 전형적인 증상임. 정신신경 이상증상으로는 조바심, 우울증, 불안, 기억력이나 판단력의 감퇴, 두통, 이명, 불면, 손발이 저리거나 가려움 등의 지각이상도 나타남. 그 외, 월경이상, 부정성기출혈, 외음, 질, 자궁의 위축, 고지혈증이나 골다공증이 일어남. 건강보험심사평가원에서 조사한 자료에 따르면, 2011년 기준 ‘폐경기 및 기타 폐경기 전후 장애로 치료를 받은 인구는 총 446,204명으로 50세~54세 인구가 전체 진료 인구의 46%를 구성하고 있음.</p> <p>○ 전 세계적으로 갱년기 증상 치료에 사용되는 여성호르몬 대체요법 (HRT: Hormone Replacement Therapy)은 폐경으로 인해 부족해지는 호르몬을 인위적으로 보충해주는 방법으로 미국 Wyeth사(이후 Pfizer에서 인수)에서 최초로 개발되어 2002년까지 세계시장 규모 \$44억까지 성장하였음. 그러나 2002년에 미국 국립보건원(NIH)에서 호르몬대체요법의 안전성 검사를 위해 ‘Women’s Health Initiative (WHI)’ 임상 연구 도중 유방암, 심장마비, 뇌졸중, 심혈관 질환 등 심각한 부작용으로 인해 연구를 중단하고 결과를 발표한 이후 대표적인 HRT 약품인 ‘Premarin’과 ‘Prempro’의 처방이 2002년 \$20억에서 2003년 \$10억으로 급감하였으며, 그 이후로 시장의 성장이 정체되어 왔음.</p> <p>○ 신약 개발은 어려워지고, 다른 식물성 여성호르몬제인 승마(black cohosh), 이소플라본(isoflavone)도 질출혈, 간손상, 암 유발 가능성 등 부작용이 보고돼 여성 갱년기 증상 완화시장은 현재 부작용이 없는 대체재가 필요한 상황임. 현재 건강기능식품으로 판매되고 있는 갱년기 증상 완화제들은 부작용 때문에 섭취에 신중을 기하여야 함. 이러한 측면에 있어서 일상적으로 큰 제약 없이 섭취가 가능하며, 갱년기 완화에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품의 개발은 갱년기여성의 삶의 질 향상이라는 측면에 있어서 큰 도움이 될 수 있다고 판단됨.</p> <p>○ 여성은 폐경기가 되면 뼈 농도가 갑자기 낮아지게 되며, 같은 연령일 경우 여성이 남성보다 여섯</p>	

배 가량 골다공증이 많음. 특히 폐경 이후 여성은 절반가량이 골다공증 환자임. 우리나라의 여성의 평균 수명이 76세 이상에 이르러 이와 관련한 노화성 질환인 골다공증에 대한 경각심이 더해지고 있음

○ 에스트로겐 수용체는 인체의 세포로 하여금 에스트로겐이 보내는 신호에 반응하게 만드는 수용체 단백질임. 현재로는 에스트로겐 수용체 알파(Estrogen Receptor  $\alpha$ )와 에스트로겐 수용체 베타(Estrogen Receptor  $\beta$ ), 두가지 에스트로겐 수용체가 밝혀짐. 베타 수용체는 알파 수용체가 없는 뼈, 혈관 세포에 존재하는 한편, 알파 수용체가 많은 기관 세포에는 오히려 거의 존재하지 않는 것으로 나타남 (그림 1).

○ 지금까지 갱년기 증상 완화 건강기능식품에 대한 관심은 높으나, 대부분이 에스트로겐 부작용 (유방암, 자궁암 등)을 매개하는 에스트로겐 수용체 알파를 활성화시키는 단일 또는 복합추출물에 초점이 맞추어져 왔음. **에스트로겐의 순기능(심혈관질환예방, 골다공증 예방 등)과 관련하는 에스트로겐 수용체 베타를 선택적으로 활성화시키는 단일 또는 복합추출물을 개발하는 것이 더 시급한 것으로** 생각되며, 이러한 활성추출물은 기존의 제품보다 안전하며 개선된 갱년기 증상 완화 효과를 가져와 지금까지 나와 있는 갱년기 완화 제품보다 국제 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨. 미국 제약기업 바이오노보(Bionovo)는 FDA가 개발을 진행하고 있는 폐경기 여성 안면홍조 및 골다공증 치료제 ‘MF101’의 임상시험 계획을 승인했다고 2010년 11월 10일 발표함. ‘MF101’은 선택적 에스트로겐 수용체 베타 촉진제의 일종에 속하는 약물임.



< 그림 1. 에스트로겐 수용체 알파와 베타의 부위별 작용기전 차이점 >

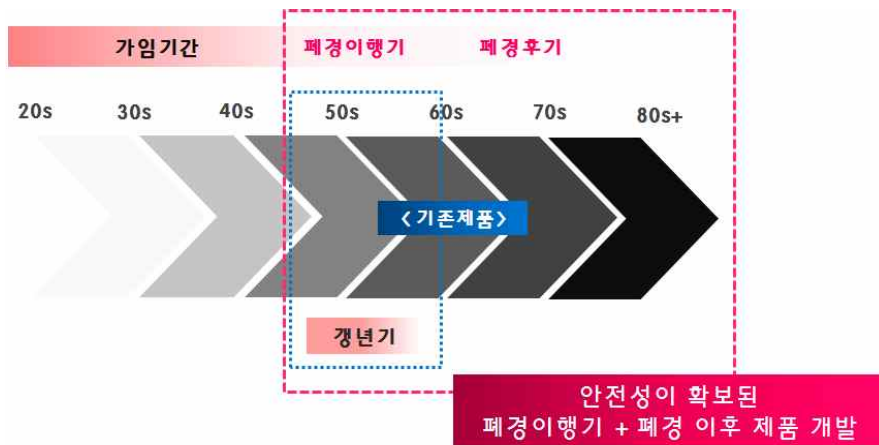
○ 에스트로겐 활성을 보이는 구성성분을 달리한 combinational botanical extract를 “디자인”하여서 가장 최적의 약효 및 benefit (갱년기 완화와 chemopreventive action)을 가져올 수 있다는 새로운 접근법을 제시함. 이와 같이, 여러 가지 품종의 혼합 제품 개발을 통해 최상의 benefit을 줄 수 있는 **새로운 “designer botanical” 개념으로 제품 개발**을 할 수 있을 것으로 사료됨.

○ 시판 중인 갱년기 완화 제품들은 폐경기 여성 대상으로만 개발되어 왔으나, 사실 연령에 따른 증상도 다른 것으로 밝혀져 맞춤형 제품 개발이 필요함 (그림 2).



< 그림 2. 연령에 따른 폐경기 증상 >

○ 앞으로, 폐경이행기, 즉 45세 이후부터 섭취하여 폐경기 예방 및 완화 차원의 제품 개발을 통해 건강한 폐경을 맞이하고, 60대 이후에도 지속적인 폐경 후의 관리 및 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 개발이 요구됨 (그림 3).



< 그림 3. 폐경이행기와 폐경기, 그리고 기존제품과 비교하여 현 연구의 맞춤형 개발 지향 >

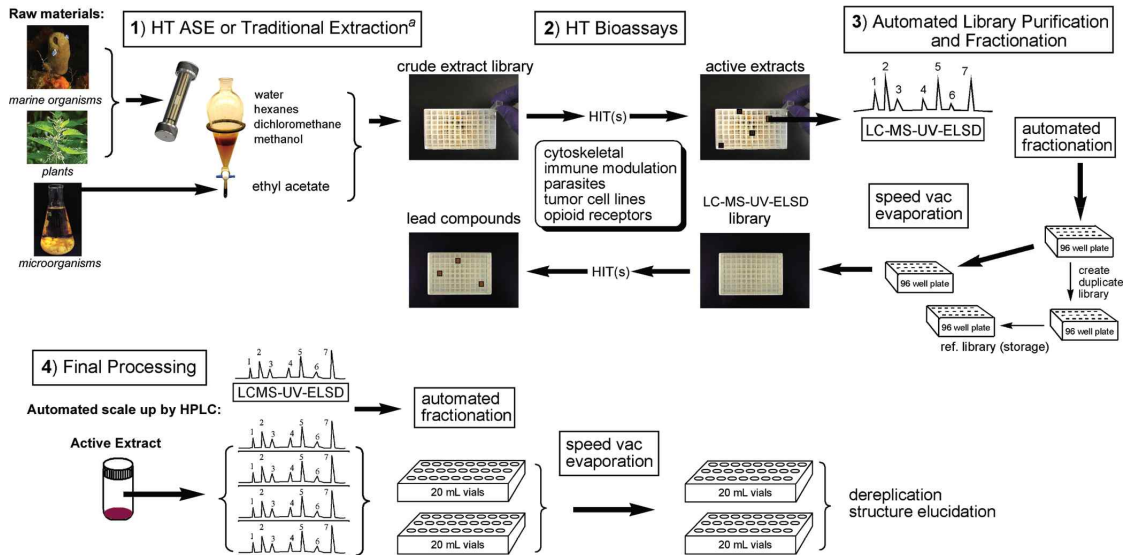
○ 국내산 소재를 이용한 맞춤형 갱년기 증상 완화 제품 개발은 현재 부재하며, 국내산 소재 스크리닝을 통해 신규 개발 제품 출시 시 농가의 소득 증대, 매출, 수출 증대 등 시장 파급 효과가 매우 클 것으로 기대됨.

○ 주관연구기관인 (주)네추럴에프앤피는 과거 의약품으로만 사용이 허가되어 왔던 은행잎 추출물을 개별인정 획득을 통하여 건강기능식품의 제품화를 성공하였으며, 평소에 일정량을 간편하게 섭취 할 수 있도록 하여 인지능력 및 혈류개선에 도움을 줄 수 있음에 대하여 인정을 받았으며, 인정받은 후 약 6 개월만에 제품이 출하되어 현재 수익 창출 중에 있음. 이러한 경험과 기술력은, 안정적이고 효과적인 갱년기 완화소재의 검증 및 맞춤형 갱년기 증상 완화 기능성 건강기능식품의 개발에 보다 효과적으로 진행 될 것으로 여겨짐.

1-3. 연구개발 범위

○ 갱년기 완화 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴

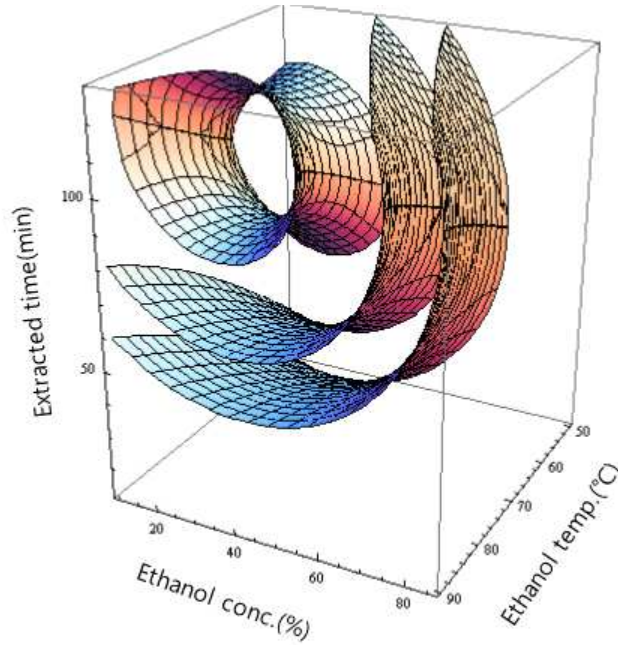
- 감초, 홉 등을 중심으로 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연소재 원료 발굴: 에스트로겐 수용체 베타를 타겟으로 스크리닝하여 에스트로겐 부작용이 현저히 적은 갱년기 완화 소재 발굴
- 에스트로겐 수용체 베타를 활성화시키는 천연물 소재 탐색을 위해 High-Throughput Screening (HTS) 기법을 도입하여 신속한 탐색이 가능 (그림 4).



< 그림 4. 일반적인 스크리닝 기법을 한단계 발전시킨 기술을 도입하여 false positives를 줄이고 천연물 라이브러리에서 활성 추출물을 신속 탐색하는데 진보를 가져옴 >

(“Natural Product libraries to Accelerate the High Throughput Discovery of Therapeutic Leads”. *J. Nat. Prod.* 2011, Dec 27;74(12):2545-55.)

- 반응표면분석법(Response Surface Methodology; RSM)을 통한 최적추출법 확립. 반응표면분석은 최근 우리나라의 식품개발 및 반응특성 연구에 많이 응용되고 있음. 새로운 식품의 개발 및 제품의 품질에 따른 요인변수의 모니터링에 적용함.
- 최적 추출조건을 설정하기 위하여 실험계획을 설계하고 반응표면 회귀분석을 위해서는 RSM program (Response Surface Methodology computer program)을 사용함. 추출조건은 추출용매의 주정농도(Ethanol concentration, %), 추출온도 (Extraction temperature, °C), 그리고 추출시간(Extraction time)의 세 가지 독립변수를 설정함. 이들 독립변수에 영향을 받는 종속변수로는 각 시료의 활성능 등을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용함. 또한 주정추출에 있어서 추출조건이 추출물의 활성능에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program을 이용하여 반응표면분석으로 해석함 (예시: 그림5).

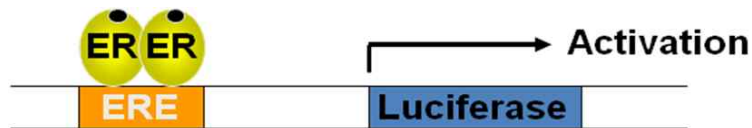


< 그림 5: RSM을 이용하여 자색 고구마 원물 최적 추출조건 데이터 >  
 (“RSM을 이용한 자미 최적 추출 방법” 관련 특허 출원 중)

· 동물실험을 활용한 원료의 탐색적 효능 평가

(1) 에스트로겐수용체 ER $\alpha$  및 ER $\beta$ 에 대한 결합력 평가

- 표적유전자로서 고효율 검색이 가능한 luciferase를 삽입하고 그의 프로모터 영역에 다수의 ERE 서열을 가지고 있는 ERE-Luciferase 플라스미드를 배양세포에 transfection 한 후 적정 농도의 해당 소재를 세포에 처리한 후 luciferase의 전사 정도를 효소활성을 측정함으로써 정량화함 (그림 6).



<그림 6. ER과 리간드의 결합과 ERE서열간의 상호작용을 통한 표적 유전자 전사활성의 원리 모식도.>

(2) 에스트로겐 반응성 유전자서열 결합을 통한 표적유전자 전사활성 평가

(3) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 조직선택성 및 ER $\alpha$  및 ER $\beta$ 선택적인 표적유전자 전사 활성 평가

(4) 세포기반 독성 및 암예방활성 평가

(5) 천연소재의 화학적 분석을 위한 fraction-guided bioassay

(6) 비임상 개발 후보 소재 선정

- *In vivo*수준에서의 효능 평가를 위한 후보 선정 기준에 관한 target product profile은 아래 표 4와 같음.
- 이 과제에서 추구하는 소재가 가지는 최선의 property는 아래 그림에서 나타난 바와 같



이 효능과 안전성을 가진 소재개발을 위해 조직선택성과 수용체 subtype 선택성 (그림 7)에 중요한 기준을 설정하고자 함.

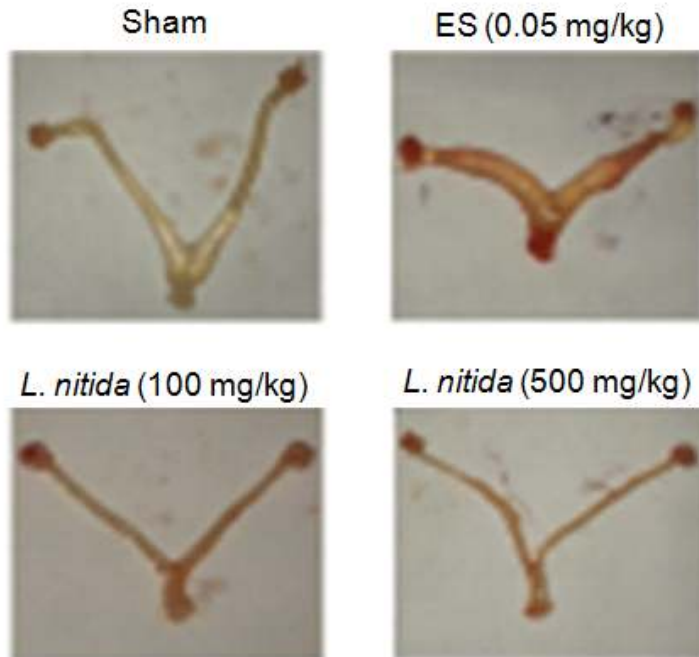
표 1. 비임상개발후보 선정의 자체 기준

기준 파라미터	기준 설정 근거
ER 수용체 선택성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER<math>\beta</math> &gt; ER<math>\alpha</math>, ERE-luciferase 전사활성에서 약 1.5 배</li> <li>• MCF-7 세포에서 전사활성 E2 효능의 &gt;40%</li> </ul>
조직선택성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER<math>\beta</math> &gt; ER<math>\alpha</math>, ERE-luciferase 전사활성에서 약 2 배</li> <li>• MCF-7 세포에서 전사활성 E2 효능의 &gt;40%</li> </ul>
세포독성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포독성 LC<sub>50</sub>농도: &gt; 20 <math>\mu</math>g/ml</li> </ul>



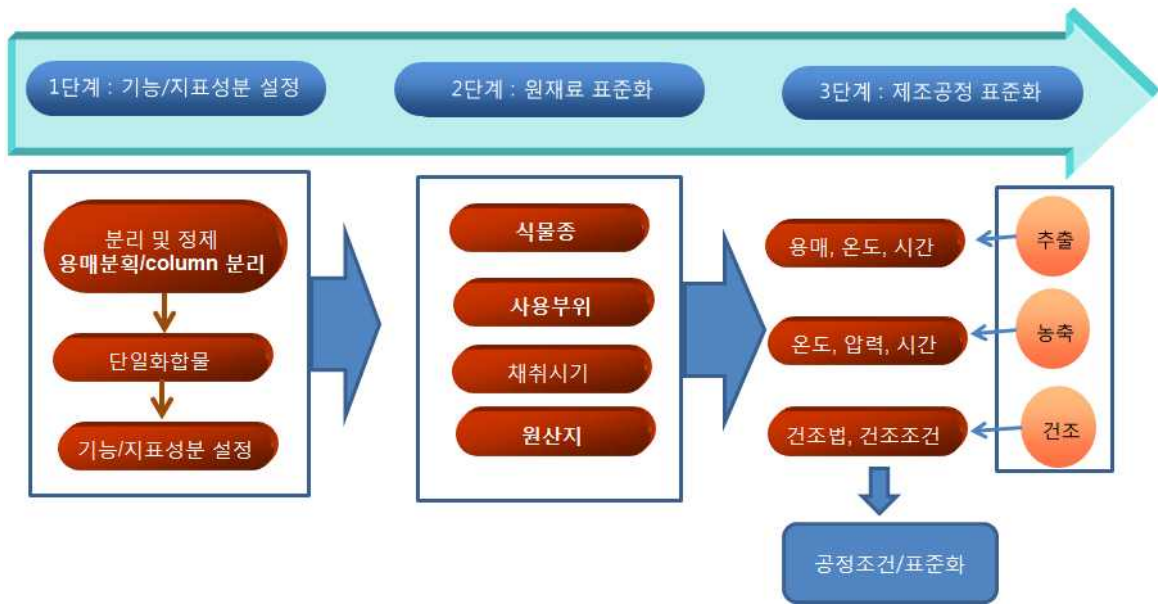
<그림 7. 비임상개발후보의 선정 기준 파라미터>

- Larrea nitida (칠레 유래 에스트로겐 활성을 나타내는 식물의 methanol 추출물) 처리에 의한 자궁증식 정도를 양성대조군인 ES와 비교하여 봄 (그림 8).



<그림 8. 랫트를 이용한 자궁증식 효능 평가 결과>

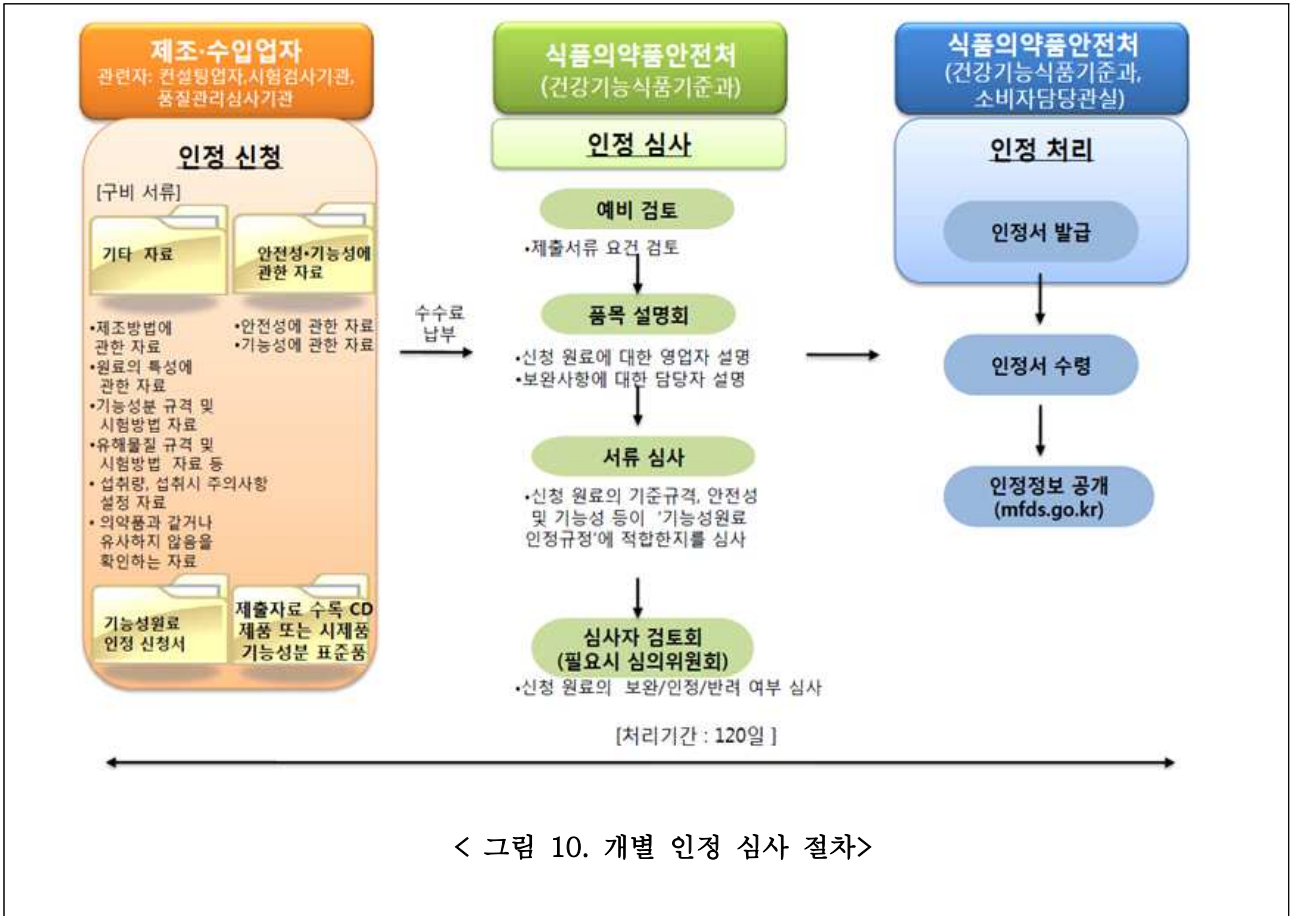
- 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연소재의 원료의 표준화 및 기준 설정 (그림 9)




<그림 9. 건강기능식품 기능성 원료 표준화 과정>

기능성분/지표성분 구조 분석 및 동정을 위해 이화여자대학교 약학대학 천연물화학연구실 서은경 교수님과 협동 연구하여 진행할 예정임.

- 1) 지표성분의 확립
  - 2) 지표성분의 분석기준 확보 (HPLC사용)
    - 지표물질과 대조 분석을 통한 함량 분석 진행
- **향갱년기 활성 소재의 시제품 제작 및 안전성/효능 규명, 심도 있는 임상시험 수행**
    - 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 천연원료를 복합물로 활용하여 건강기능식품 시제품 제작
    - 2차 동물 실험을 통한 시제품의 안전성 확인 및 효능 규명
    - 폐경이행기, 폐경기, 그 이후 연령층 대상 임상 시험을 통해 갱년기 증상 예방 및 완화 효능 평가
  - **각 단계별 맞춤형 갱년기 예방 및 증상 완화 건강기능식품의 제품화**
    - 기준이 명확하게 검증된 원료를 중심으로 상용화를 위한 맞춤형 제품화 추진
    - 우수한 원료에 대하여 식약청 개별인정 신청 (그림 10)



## 2. 국내외 기술개발 현황

		코드번호	D-04	
○ 기술/시장 현황				
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 여성갱년기 건강기능식품의 경우 홍삼추출물과 백수오 추출물이 주를 이루고 있으며, 후발 주자로 석류 추출물이 있음.</li> <li>- 최근 식약처에서 백수오 추출물의 경우 안전하다는 발표가 있었지만 소비자들의 반응은 많이 감소하였음.</li> <li>- 이에 수입 원료인 감마리놀렌산, 피크노제놀 등을 사용한 제품개발이 이루어지고 있는 실정임.</li> <li>- 석류추출물과 홍삼추출물로 여성갱년기 건강기능식품이 개발되었지만, 여성갱년기 건강 시장성에 비해 점유율이 낮은 편임.</li> </ul>				
경쟁사	제품명	제품 원료	원료 기능	
케이뉴트라	여자의 봄날		석류추출물	안면홍조, 발한 개선

정원삼	황후애궁		홍삼추출물	여성갱년기건강, 면역증진, 피로개선
중근당	피크노퀸 프라임		피크노제놀 (수입원료)	여성갱년기 건강
정관장	화애락		홍삼추출물	여성갱년기건강, 면역증진, 피로개선
한삼인	백연홍		홍삼추출물 백수오추출물 오메가3	여성갱년기건강, 면역증진, 피로개선
폴무원	로젠빈수		백수오추출물 감마리놀렌산 대두추출물	여성갱년기건강, 면역증진, 혈행개선
한미약품	한미백수오		백수오 추출물 감마리놀렌산	여성갱년기건강, 면역증진
네추럴엔도텍	백수오궁		백수오 추출물	여성갱년기건강
한국야쿠르트	여성갱년기 건강솔루션		프랑스해안송 껍질 추출물	여성갱년기건강

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호                      D-05

○ 연차별 연구 개발의 목표 및 내용

#### 1. 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	<p style="text-align: center;"><b>제 1세부(주관)</b> <b>: (주)네추럴에프앤피</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 에스트로겐 수용체 베타를 활성화시키는 천연유래 추출물 확보 및 최적 추출법 확립</li> </ul>	<p><b>1. 에스트로겐 수용체 베타 활성 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 중에서 지표성분이 명확하여 차후 개별인정 진행시 유리한 품목 스크리닝</b></p> <p>1) 유력 소재 탐색</p> <p style="margin-left: 20px;">a) 국내산 천연물 원료 중심의 지속적인 스크리닝 계획</p> <p style="margin-left: 20px;">b) 백년초, 여주, 시계꽃</p> <p style="margin-left: 20px;">c) 복합 처방 원료</p> <p><b>2. 활성 소재의 RSM을 통한 최적 추출법 확립</b></p> <p><b>3. 원료 표준화 및 대량생산 확립</b></p>
		<p style="text-align: center;"><b>제 1협동</b> <b>: 숙명여자대학교</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 천연소재에 대한 에스트로겐수용체에 대한 활성 및 선택성 평가</li> </ul>	<p>1. 에스트로겐수용체 ER<math>\alpha</math> 및 ER<math>\beta</math>에 대한 결합력 평가</p> <p>2. 에스트로겐 반응성 유전자서열 결합을 통한 표적 유전자 전사활성 평가</p> <p>3. 에스트로겐수용체 활성화에 대한 조직선택성 및 ER<math>\alpha</math> 및 ER<math>\beta</math> 선택적인 표적유전자 전사 활성 평가</p> <p>4. 세포기반 독성 및 암예방활성 평가</p> <p>5. 천연소재의 화학적분석을 위한 fraction-guided bioassay 수행</p> <p>6. 비임상 개발후보 선정</p>

2. 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2016	<p><b>제 1세부(주관)</b> <b>: (주)네추럴에프앤피</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 시제품 제작</li> <li>▪ 원료의 기준 확립</li> </ul>	<p><b>1. 시제품의 제작</b> 1) 우수한 효능을 가지는 원료를 활용한 시제품 제작, 임상시험 및 동물실험에 사용</p> <p><b>2. 원료의 기준 확보로 인한 안전성, 안정성 확보</b> 1) 추출물의 2달 이상 저장성 확인 2) HPLC를 사용하여 지표성분의 함량 기준 확립 3) 성장, 향취 일반세균, 효모, 곰팡이, 대장균군, 중금속 기준 확보를 통한 원료의 안전성 기준 확립</p>
		<p><b>제 1협동</b> <b>: 숙명여자대학교</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 갱년기 증상 완화 유력 소재에 대한 <i>in vivo</i> 유효성 및 예비 독성 평가</li> </ul>	<p>1. 랫트에서 자궁증식 효과 평가 2. 마이스에서 골밀도 증가 효능 평가 3. 지질, 염증, 비만, 산화 지표 평가 4. 단회 및 1주 반복 경구투여에 의한 마이스에서의 예비독성 평가 5. 효능 지표 성분에 대한 고찰</p>
		<p><b>제 2협동</b> <b>: 순천향대학교</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 문헌 조사와 폐경 여성 설문 조사</li> <li>▪ 항갱년기 활성 선정 소재의 전임상 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>문헌 조사와 폐경 여성 설문 조사</b></li> <li>1. 폐경이행기와 폐경 후 여성 영양에 대한 기초 자료 분석 1) 폐경이행기와 폐경후 여성에서 식품군별, 섭취패턴에 따른 영양소 섭취 상태, 식사의 질, 삶의 질에 대한 연구를 통해 부족한 영양소의 기초 자료 형성 2) 기초자료를 통해서 폐경 이행기부터 여성건강의 문제점을 보완할 건강식품 개발 기반 형성 3) 병원에 내원하는 여성들의 건강식품 섭취 현황 조사</li> <li>2. 에스트로겐 분비에 영향을 주는 식생활 요인 조사</li> <li>3. 설문지 개발 및 검증</li> <li>4. 폐경이행기, 폐경기 여성의 식품빈도, 영양섭취량, 건강기능식품 이용현황 조사</li> <li>▪ <b>항갱년기 활성 선정 소재의 전임상 평가</b></li> <li>1. 질 세포주 (VK2/E6E7)의 분양과 안정적인 배양</li> <li>2. 인체에서 유래한 질세포와 난소세포, 그리고 자궁내막 세포의 일차 배양</li> </ul>

3. 3차년도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2017	<p style="text-align: center;"><b>제 1세부(주관)</b> <b>: (주)네추럴에프앤피</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 대량공정 확보</li> <li>▪ 제품의 기준 확립</li> <li>▪ 개별인정원료 신청</li> </ul>	<p><b>1. GMP시설을 활용한 대량생산공정의 문서화</b></p> <p><b>2. 제품의 기준 확보를 통하여 균일하고 안정, 안전한 제품 제조</b></p> <p>1) 봉해시험, 내용량시험, 입도시험, 성상시험, 향취시험, 일반세균시험, 호모, 곰팡이시험, 대장균시험 등을 통한 안전성 확인</p> <p>2) 제품에 대하여 g당 지표성분 함유 비율 기준 확립</p> <p><b>3. 원료의 안전성, 안정성을 입증하여 식약청의 건강기능식품 개별인정 신청</b></p> <p>1) 마케팅적 제품개발 방향 파악 2) 식용가능성 검토</p> <p>3) 해외공인성 검토 4) 문헌적 임상자료 검토</p> <p>5) 원료의 확보 경로 및 기준화와 공인성 검토</p> <p>6) 국내개발 경위 등 원료의 사용현황 검토</p> <p>7) 제조방법 및 그에 관한 자료작성</p> <p>8) 원료성분및 특성이 관한자료작성</p> <p>9) 기능성분 혹은 지표성분에 대한 기준 확보</p> <p>10) 원료의 유해물질에 대한 기준 확보</p> <p>11) 안전성에 관한 자료 확보</p> <p>12) 기능성에 관한 자료 확보</p> <p><b>4. 시제품의 제품화</b></p>
		<p style="text-align: center;"><b>제 1협동</b> <b>: 숙명여자대학교</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 시제품에 대한 항갱년기 효과의 <i>in vitro/in vivo</i> 유효성 검증</li> </ul>	<p>1. ERE-luciferase 전사 활성 효과 평가</p> <p>2. 랫트에서 자궁증식 효과 평가</p> <p>3. 랫트/마이스에서 염증, 산화, 비만, 심혈관계 바이오마커 고찰</p> <p>4. 마이스에서 골밀도 증가 효능 평가</p> <p>5. 제품화 품질관리에 필요한 효능평가 SOP 확립 및 주관기관에의 전이</p>
		<p style="text-align: center;"><b>제 2협동</b> <b>: 순천향대학교</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항갱년기 활성 선정 소재의 전임상 평가</li> <li>▪ 시제품에 대한 임상시험을 통하여 안전성 확보 및 효능 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>항갱년기 활성 선정 소재의 전임상 평가</b></li> <li>1. 주관 연구기관과 제1세부 협동기관에서 선정한 천연 물질의 분자생물학적 역할 확인 (<i>In vitro</i>)</li> <li>2. 선정된 천연 물질의 ER-β 활성 및 그로 인한 효과 확인 (<i>In vitro</i>)</li> <li>▪ <b>시제품에 대한 임상시험을 통하여 안전성 확보 및 효능 규명</b></li> <li>1. 임상시험을 통한 갱년기 증상 완화 효능검증 : 갱년기 여성 100명 선발             <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 갱년기와 관련된 혈중 parameter의 측정</li> <li>2) Kupperman지표검사 시행 3) 골밀도 측정</li> <li>4) 안면홍조 완화 측정</li> </ul> </li> <li>2. 임상시험을 통한 비만, 염증, 심혈관계 지표 호전 효능 검증 : oxidized LDL, CRP, PAI-1, TNF-α, IL-1, adiponectin, vitamin E</li> <li>3. 폐경 여성의 유전자 다양성과 개발된 건강기능식품의 효능 관계 규명 및 보완</li> </ul>

○ 연구 개발 추진전략 및 방법

1. 갱년기 완화 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴

(1) 유력소재 탐색

- 에스트로겐 수용체 베타를 활성화시키는 천연유래 추출물 확보
- 후보소재의 문헌연구 및 식약처 식품 원재료명 DB 검색을 통해 건기식 소재로 사용가능한지 확인, DB에 등록된 소재가 아닐 경우 식약처와의 회의를 통해 질의확인을 병행.
- 국내산 천연물 원료 중심이 지속적인 스크리닝 진행

표 1. 에스트로겐 수용체 베타 활성 천연물 스크리닝 품목
감초, 강황, 광곽향, 구맥, 팥금전초, 단삼, 마두령, 목적, 봉술, 사간, 강진향, 건강(토), 팔루인, 여주, 흑후추, cloeus forskohlii, Gac fruit, 마테, 파라다이스넛, 쥐오줌풀, 갈근, 구기자, 계피엑기스, 가시오가피, 둥굴레, 솔잎, 우슬, 원지, 오미자, 진피, Amla, 백년초 등

(2) 활성소재의 맞춤형 유효성분 추출 기술 및 소재화 기술 개발

- 기능성분의 용매 추출 조건 확립
- 추출 기능성분의 안정화 기술 확립
- 추출법, 추출용매, 추출온도, 추출시간, 추출횟수, 건조방법 등을 고려한 제조공정 표준화
- 성장, 기능/지표성분의 함량, 유해물질에 대한 제품의 기준 규격 설정

2. 항갱년기 활성 소재의 안전성/효능 규명

(1) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 조직선택성 및 ERβ-선택적인 표적유전자 전사 활성 평가

- ER을 발현하지 않는 CV1 또는 HeLa 세포주를  $5 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate에 seeding 함. 이때, charcoal처리한 fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 DMEM 배지 (이하, estrogen-free media)를 사용하여 배양함.
- ERα 및 ERβ를 발현하는 플라스미드(0.25 μg/well)와 ERE3-luciferase 플라스미드 (0.25 μg/well)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 co-transfection함.
- 1일 배양 후 적절한 시험물질을 세포에 처리한 후 24시간 후 Passive lysis buffer (Promega)를 이용하여 수용성세포추출물을 추출함.
- 이 추출물에 존재하는 luciferase 활성은 luciferase assay system (Promega) 시약을 이용하여 VICTOR3 luminometer (Perkin Elmer) 기기를 이용하여 그 값을 읽음.
- 농도별로 Luciferase 활성을 얻은 경우 EC<sub>50</sub> 값을 Prism 5.0 Software를 이용하여 산출하거나, 일정농도에서 보여주는 Luciferase 활성을 E2 (1 nM)이 나타내는 Luciferase 활성 (100%) 대비 상대적인 값으로 변환하여 상호 비교함.

(2) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 조직선택성 유전자 전사 활성 평가

- 사람 유방암세포주로서 ER-양성 MCF-7 세포주를 사용함. 사람의 자궁내막에서의 활성 고찰을 위해서 Ishikawa 세포주를 사용함. 각각의 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate에 seeding 함. 이때, charcoal처리한 fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 DMEM 배지 (이하, estrogen-free media)를 사용하여 배양함.



- 24시간 후 ERE3-luciferase (ERE 서열의 3개 반복 카피) 플라스미드 (0.25 µg/well)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection함.
- 1일 배양 후 적절한 약물 농도를 포함하고 있는 위의 estrogen-free media를 세포에 처리한 후 24시간 후 수용성세포추출물을 추출함.
- 이 추출물에 존재하는 luciferase 활성은 luciferase assay system (Promega) 시약을 이용하여 VICTOR3 luminometer (Perkin Elmer) 기기를 이용하여 그 값을 읽음.
- 농도별로 Luciferase 활성을 얻은 경우 EC<sub>50</sub> 값을 Prism 5.0 Software를 이용하여 산출함.

(3) 세포기반 독성 및 암예방활성 평가

- MCF-7 세포를 5x10<sup>4</sup> cells/well, 24-well plate에 seeding 한 후 적절한 농도의 시험물질 및 대조물질 (Doxorubicin, 10 mM)을 처리함.
- 24 ~ 72 시간 배양 후 배양액을 제거한 후 PBS로 세척함.
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 400 mg/ml, PBS) 100 ml를 첨가한 후 세포배양기에서 약 2시간 동안 배양시킴.
- 용액을 제거한 후 세포층에 DMSO 100 ml를 첨가하고 약 3분간 교반함.
- DMSO에 세포가 터지고 녹아져 나온 MTT의 대사체를 550 nm 흡광도를 측정하여 정량함.

(4) 천연소재의 화학적분석을 위한 fraction-guided bioassay 수행

- 열수추출물 또는 알콜 기타 용매 추출물에서 ERE-매개 전사활성이 뚜렷한 소재에 대하여 HPLC 분리를 통한 fraction 별로 생물학적 활성을 수행함.
- 이는 활성성분의 존재를 검토하고 분리, 동정하기 위한 연구단계임.
- 본 연구에서 1차 스크리닝을 통하여 선정된 소재의 경우 문헌적으로 다양한 마커 성분 그리고 그들의 생물학적 활성이 문헌에 이미 보고되었으므로 이 연구단계는 수행되지 않았음.

(5) 활성 성분 및 지표 (마커) 성분 발굴 및 추출물의 HPLC 분석 프로파일 연구

- 문헌 등에 보고된 내용을 근거로 선정된 소재에 존재하는 활성 성분을 개별 구매하였음. 구매처는 아래와 같음.

성분명	구매처	제품스펙	성분명	구매처	제품스펙
quercetin	Santa cruz	sc-206089	vitexin	Extrasyntase	1232S 10MG
kaempferol	Sigma	K0133-10MG	isovitexin	Extrasyntase	1235S 10MG
isorhamnetin	Santa Cruz	sc-202668A	orientin	Extrasyntase	1054S 10MG
narcissin	ChromaDex	ASB-0001420 1-005	isoorientin	Extrasyntase	1055S 10MG

- 각 활성성분을 DMSO에 용해하여 10, 100 mM 또는 100 ppm 스톡용액을 제조한 후 -20 °C에 보관함.
- 천연소재 추출물 분말 100 mg/ml를 70% 메탄올에 녹이고 30분 동안 초음파 분쇄를 함. 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.45 µm 시린지 필터로 여과하고, 이 여과액을 분석에 사용함.
- 여과액을 Diode Array Detector-HPLC (Agilent 1260) 로 분석함.

- (6) 활성 성분에 대한 ER 신호전달활성 발현 여부 및 정도 고찰
- 위의 (5)항에서 기술한대로 제조된 각 화합물을 이용함.
  - 각 활성성분의 1 ~ 100  $\mu\text{M}$  영역에서 MCF-7 또는 HeLa 세포에서 ERE전사활성을 위에서 기술한대로 수행함.
- (7) 선택 소재의 *in vivo* 자궁증식성 평가
- 동물시험기관승인번호: SMWU-IACUC-1410-019
  - 7주령 SD 랫트 (암컷)를 구입하고 1주간 적응기간을 둠.
  - 랫트를 isoflurane으로 마취를 하고, 마취상태에서 복부를 절개해서 난소를 적출함.
  - 난소 적출 후, 진통제인 ketoprofen 0.2 mg/kg을 투여함.
  - 난소 적출 수술이 끝나면 케이지에 3마리씩 넣어 2주 동안의 회복기 및 혈중에스트로겐 wash-out를 거치고, 실험결과에 영향을 주지 않도록 phytoestrogen이 제한된 사료 (Harlan 2020X Teklad Global Soy Protein-Free Extruded Rodent Diet)를 투여함.
  - 회복기를 거친 랫트를 Sham (no OVX), OVX control, E2 투여군, 저농도 선택소재 추출물 투여군, 고농도 선택소재 투여군, 저농도 E2 투여군, 저농도 E2+저농도 선택소재 추출물 투여군, 저농도 E2+고농도 선택소재 투여군으로 군당 6-8마리가 되도록 나눔.
  - 3일 동안 Sham group과 OVX control군에는 PBS 1 ml/kg, E2 투여군에는 corn oil에 녹인 E2 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 저농도 선택소재 추출물 투여군에는 PBS에 녹인 선택소재 추출물 250 mg/kg, 고농도 선택소재 추출물 투여군에는 PBS에 녹인 선택소재 추출물 500 mg/kg, 저농도 E2 투여군에는 Corn oil에 녹인 E2 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 저농도 E2+저농도 선택소재 추출물 투여군에는 corn oil에 녹인 E2 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 PBS에 녹인 선택소재 추출물 250 mg/kg, 저농도 E2+고농도 선택소재 투여군에는 Corn oil에 녹인 E2 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 PBS에 녹인 선택소재 추출물 500 mg/kg을 각각 피하주사함. 이때, Rat의 체중을 매일 측정하여 정량의 성분이 투여될 수 있도록 함.
  - 3일간의 피하주사가 끝나면 24시간동안 금식을 시킨 후, CO<sub>2</sub> 챔버에서 안락사를 시킴.
  - 안락사 시킨 랫트의 복부를 절개하고 자궁과 난소를 적출한 뒤, 난소와 지방을 제거하고 자궁의 무게를 측정함.
- (8) 선택 소재의 *in vivo* 혈중 대사 마커 및 체중 증가에 미치는 효과의 연구
- 8주령 SD 랫트 (암컷)를 구입하고 1주간 적응기간을 두고 난소적출수술은 위의 (7)항에 기술한바와 같이 실시함.
  - 회복기를 거친 랫트를 Sham (no OVX), OVX control, E2 투여군, 저농도 선택소재 추출물 투여군, 고농도 선택소재 투여군으로 군당 5-6마리가 되도록 나눔.
  - 5주 동안 Sham 군과 OVX control 군에는 olive oil 1 ml/kg, E2 투여군에는 olive oil에 녹인 E2 0.5 mg/kg, 저농도 선택소재 추출물 투여군에는 olive oil에 녹인 선택소재 추출물 250 mg/kg을, 고농도 선택소재 추출물 투여군에는 olive oil에 녹인 선택소재 추출물 500 mg/kg을 각각 경구투여함. 이때, 랫트의 체중을 매주 측정하여 정량의 성분이 제공될 수 있도록 하고, 랫트의 체중변화를 관찰함.
  - 5주간의 경구투여가 끝나면 24시간동안 금식을 시킨 후, isoflurane로 마취하여 심장에서 4~5 ml 정도 혈액샘플을 채취함.
  - 채취한 혈액 샘플을 3500 rpm (15분, 4°C) 로 원심분리하여 혈장 샘플을 얻은 후, 4°C에 보관하고, 1-2일 내에 분석 기관에 의뢰하여 혈액 내 lipid profile을 분석함.

(9) 비임상개발후보 선정

- 소재의 활성 측면에서 장점, 공급의 용이성, 특허출원 가능성, 마케팅 측면의 매력도를 평가하여 개발후보를 선정함.
- *In vivo*수준에서의 효능 평가를 위한 후보 선정 기준에 관한 target product profile은 아래 표와 같음.
- 이 과제에서 추구하는 소재가 가지는 최선의 property는 아래 그림에서 나타난 바와 같이 효능과 안전성을 가진 소재개발을 위해 조직선택성과 수용체 subtype 선택성에 중요한 기준을 설정하고자 함.

표1. *In vivo* 효능 평가를 진행할 소재 선정의 자체 기준

기준 파라미터	기준 설정 근거
ER 수용체 선택성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ERβ &gt; ERα, ERE-luciferase 전사활성에서 약 1.5 배</li> <li>• MCF-7 세포에서 전사활성 E2 효능의 &gt;40%</li> </ul>
조직선택성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ishikawa 세포에서의 전사활성 &lt; E2 효능의 50%</li> </ul>
세포독성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세포독성 LC<sub>50</sub>농도: &gt; 20 μg/ml</li> </ul>

○ 연구 개발 추진 체계



○ 연구 개발 추진 일정

1차년도															연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
1	에스트로겐 수용체 베타 활성 효능을 가지는 천연 추출물 품목 스크리닝	■	■	■	■										20,000	문원국 (네추럴에프앤피)
2	활성 소재의 RSM을 통한 최적 추출법 확립					■	■	■	■	■					10,000	문원국 (네추럴에프앤피)
3	원료 표준화 및 대량생산 확립									■	■	■	■	■	30,000	문원국 (네추럴에프앤피)
4	에스트로겐수용체 ERa 및 ERb에 대한 결합력 평가	■	■	■											20,000	장민선 (숙명여대)
5	에스트로겐 반응성 유전자서열 결합을 통한 표적유전자 전사 활성 평가			■	■	■									20,000	장민선 (숙명여대)
6	에스트로겐수용체 활성화에 대한 조직선택성 및 ERa 및 ERb 선택적인 표적유전자 전사 활성 평가		■	■	■										20,000	장민선 (숙명여대)
7	세포기반 독성 및 암예방활성 평가					■	■	■							20,000	장민선 (숙명여대)
8	천연소재의 화학적 분석을 위한 fraction-guided bioassay							■	■	■					10,000	장민선 (숙명여대)
9	비임상 개발 후보 소재 선정											■	■	■	10,000	장민선 (숙명여대)
2차년도															연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			

1	시제품의 제작													35,000	문원국 (네추럴에프앤피)
2	원료의 기준 확보 보로 인한 안전성, 안정성 확보													15,000	문원국 (네추럴에프앤피)
3	설치류 모델에서 자궁증식성 평가													15,000	장민선 (숙명여대)
4	RE 전사활성 및 에스트로겐성 활성 평가													15,000	장민선 (숙명여대)
5	마커성분 -지표 및 활성물질 - H P L C fingerprint 획득 을 위한 HPLC method 개발													5,000	장민선 (숙명여대)
6	항염활성 평가													5,000	장민선 (숙명여대)
7	세포기반 독성 및 암예방활성 평가													20,000	장민선 (숙명여대)
8	문헌 조사와 폐 경여성 설문 조 사													15,000	김태희 (순천향대학 병원)
9	항갱년기 활성 선정 소재의 전 임상 평가													15,000	김태희 (순천향대학 병원)
3차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
1	GMP 시설을 활 용한 대량생산공 정의 문서화													5,000	문원국 (네추럴에프 앤피)
2	제품의 기준 확보 를 통하여 안전, 안 전적인 제품제조													5,000	문원국 (네추럴에프 앤피)
3	원료의 안전성, 안 정성을 입증하 여 식약처의 건 강기능식품 개별 인정 신청													35,000	문원국 (네추럴에프 앤피)
4	시제품의 제품화													10,000	문원국 (네추럴에프 앤피)
5	ER/ERE-lucifera se 전사 활성 효과 평가													10,000	장민선 (숙명여대)

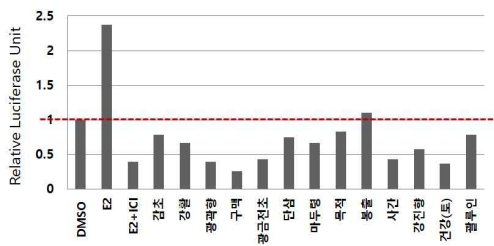
6	랫트에서 자궁 증식 효과 평가																	10,000	장민선 (숙명여대)	
7	제품화 품질관리에 필요한 효능평가 SOP 확립																		10,000	장민선 (숙명여대)
8	향년기 선정 소재의 활성 성분 평가																		20,000	김태희 (순천향대학병원)
9	시제품에 대한 안전성 평가 및 효능 규명																		55,000	김태희 (순천향대학병원)

### ○ 연구결과

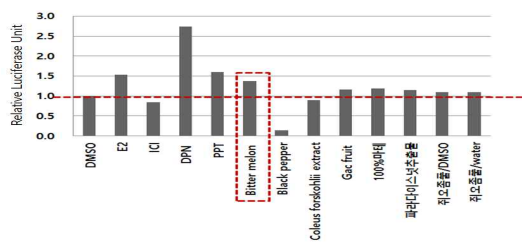
#### (1) 에스트로젠 반응성 유전자서열 결합을 통한 ERβ-선택적인 유전자 전사활성 평가: 1차 스크리닝

- 주관연구기관에서 제공한 각종 천연물 소재 약 80종 (감초, 홉 등)에 대하여 DMSO 또는 물에 적절한 농도로 용해시킨 후 10 μg/ml 농도의 샘플에 대해서 ERβ-선택적인 유전자 전사활성을 평가함.
- 1차적으로 ER-β-선택적인 유전자 활성을 예상할 수 있는 37종의 천연물을 선택하였음.
- 1차 선별된 37종의 천연물은 2차 실험으로 ERα-선택적 양성대조군으로서 PPT (1 mM), ERβ-선택적 양성대조군으로 DPN (1 mM), 일반적 ER 작용제인 E2 (1 nM)을 모두 대조군으로 사용하였음. 용매대조군은 DMSO (또는 물) 사용 함.
- DMSO대비 luciferase 활성을 상대값으로 추출하여 상대비교하였음. 각 샘플의 luciferase 활성의 상대비교 결과는 아래 그림1 A~C와 같음.

A.



B.



C.

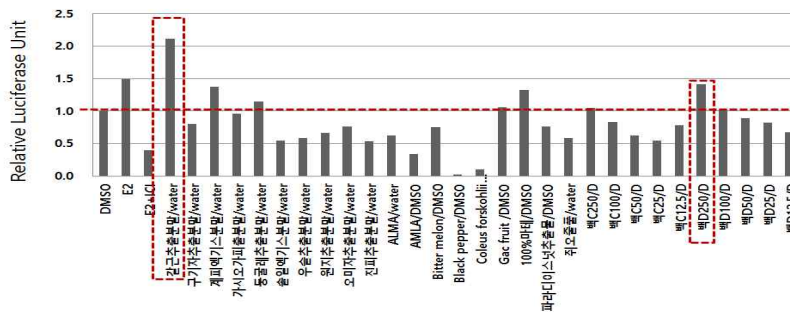


그림 1. 식물소재에 대한 ERβ-선택적인 유전자 전사활성 결과. ERβ 발현 플라스미드를 이용하여 CV1 세포에서 다양한 식물소재들의 ERβ-선택적인 유전자 활성을 검토하였음. ICI (1 μM): ER 길항제로서 음성대조군으로 사용됨. Bitter melon: 여주, 백: 백년초.

- 1차 스크리닝으로 선별된 37종의 천연물 중 갈근, 여주, 백년초 등의 활성을 확인하였음.

**(2) 선별된 원료의 선행연구 조사 시행**

- Pubmed, KIPi.or.kr 등을 검색하여 출판논문이나 선행연구 등의 조사를 시행함,
- 갈근: 골다공증 검색  
총 3건의 선행 특허 확인  
등록번호: 10-0348148, 10-0348147, 10-0733335  
출원인 3건 모두 한국한의학연구원  
- 청구항 및 상세사항 갱년기, 퇴행성 언급  
- 본 3건의 선행 특허로 갈근의 경우 갱년기 질환에 효과 보임을 예상할 수 있으므로,  
**갈근 소재를 포함한 갱년기 개선 특허 출원시 등록 가능성이 낮음.**
- 후보물질 3 종에 관한 특허/문헌 검색 및 세포에서의 유전자활성에 관한 데이터는 아래와 같음.

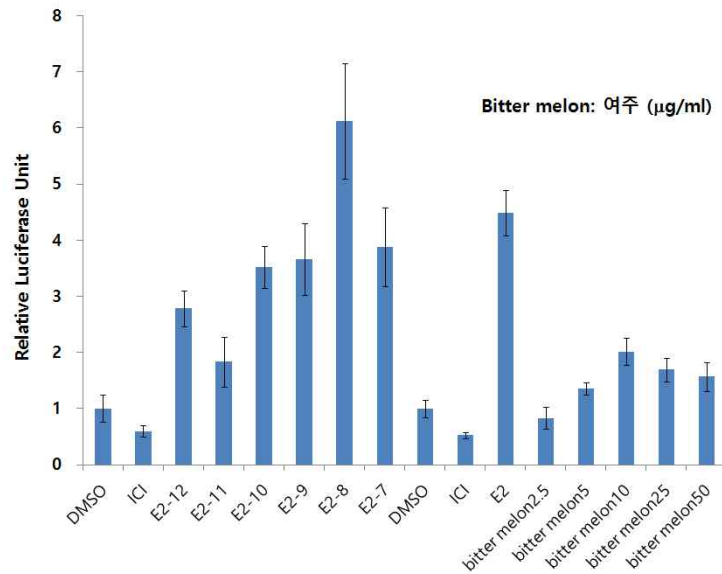
● **여주 (Bitter melon; *Momordica charantia*)**

- 국내특허 조사 결과는 아래 표와 같음.

**표 1. 여주에 관한 국내특허건 조사 결과**

<p>1) <u>항산화효과</u> [거절] 공개특허 2008년09월25일: 항산화효과를 가지는 여주 추출물 등록특허 2012년04월03일: 항노화 활성을 갖는 여주 추출물 및 이를 함유하는 건강식품 조성물</p> <p>2) <u>항당뇨효과</u> [취하] 공개특허 2008년10년15일: 여주의 효소처리 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물 등록특허 2007년04월06일: 베타-글루칸 및 여주 추출물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 조성물 등록특허 2005년10월05일: 여주에서 제조된 혈당강하용 사포닌 분획물 및 이를 포함하는 약제학적 조성물</p> <p>3) <u>항암효과</u> 등록특허 2010년10월25일: 여주 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물</p>
--

- 이미 출판된 내용에 대한 확인을 위하여 본 연구팀에 가지고 있는 여주샘플에 대하여 추가적으로 ER subtype 선택적 ERE 전사활성을 ER $\alpha$  및 ER $\beta$ 를 각각 transfection 시킨 CV1 세포에서 검토하였으며, 자궁증식적 평가를 위해 Ishikawa 세포에서의 전사활성 (그림2) 을 검토하였음. EC<sub>50</sub>결과 아래 표와 같음.



<그림 2. 여주의 Ishikawa 세포에서의 ER-매개 유전자전사활성. 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1 μM)이 사용되었음>

표 2. 여주의 ER subtype 선택적 및 자궁증식세포에서의 ER-매개 전사활성 효과

EC <sub>50</sub> (μg/ml)		Ishikawa	CV1/ERα	CV1/ERβ
		3.8	1.9	1.6
E2 (1 nM) 대비 최대 효능	%	28	45	>100
	발현 농도 (μg/ml)	10	15	10

- 본 연구팀의 결과에 의하면 여주는 ERβ full agonist 활성을 가지며, 자궁증식성은 E2의 <30%에 도달하므로, ER partial agonist로 판단할 수 있음. 이 결과는 in vivo에서 자궁증식성으로 인한 부작용이 적을 것임을 시사함.

● 백년초 (*Opuntia ficus indica*; OFI)

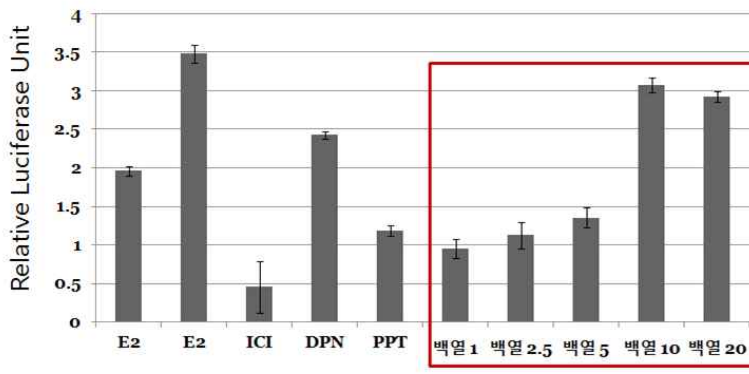
- 문헌 검색 결과 백년초 (*Opuntia ficus indica*; OFI) 의 경우 ER활성에 대한 기초연구 내용의 문헌 및 특허가 부재. 하지만, 백년초에 존재한다고 알려진 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 에 대한 에스트로겐 활성이 보고된 바 있으며 (2004, Life Sciences, Oh et al.), 이 물질을 포함하는 은행잎 추출물에 대하여 아래와 같은 특허 내용이 존재함을 KIP1.or.kr 데이터베이스를 통해 확인하였음 (표3).



표 3. 백년초의 활성성분과 관련된 은행잎 추출물에 관한 특허 검색 결과

특허명	요약	발명의 구성 및 작용 (추출 방법, 건조 여부 등 실험 재료 기술)
은행잎추출물을 유효성분으로 함유하는 발암억제 효과를 갖는 골다공증 치료제 (2004년02월16일)	본 발명은 은행잎추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증치료제에 관한 것으로 은행잎추출물은 쿠에르세틴 (quercetin)과 캄페롤(kaempferol)등의 식물 에스트로겐 (phytoestrogen)을 다량 포함하고 있으므로, 본 발명에 의한 은행잎추출물은 선택적 에스트로겐 수용체 조절 작용약으로 유방암 부작용이 없는 골다공증 치료제로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.	한국 중부지방에서 8월 내지 9월에 수확한 푸른잎의 Ginkgo biloba leaves(은행잎)를 상수로 3회 세척하고 정제수로 2회 더 세척 분리한후 자연 건조시킨다. 건조된 원재료(은행잎)100kg을 에탄올 100L와 정제수 100L(혼합용매 1:1)를 가하고 섭씨 60~70도로 가온 추출한다. 2회 반복추출하여 합하고 수회 세척된 규조토를 깔아 준비된 감압누출여과기로 여과하고 에탄올로 세척한다(이때 추출물에서 이물 및 지질을 제거) 여과액을 고형분 28~30% 선에 도달할 때 까지 감압농축한다.
	실험방법	결과
	MDG5031의 에스트로겐 작용에 의한 골다공증 치료효과	1) E-SCREEN assay; RPE (Gelative proliferative effect) 값을 이용하여 세포증식효과를 확인 2) RT-PCR을 이용하여 pS2 mRNA의 양적인 변화를 관찰함
	선택적 에스트로겐 수용체 조절기(SERMs) 작용에 의한 골다공증 치료 효과	1) Competitive binding assay; MCF-7세포의 [ <sup>3</sup> H-E <sub>2</sub> ]에 대한 특이 결합력을 비교하여 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 에 대한 친화력을 조사
조골세포(Osteoblast)의 세포증식 및 분화작용에 의한 골다공증 치료효과	1) WST-1 Assay; Saos-2 세포주를 이용 tetrazolium salt의 분해되는 정도를 측정하여 흡광도로 세포 증식률을 비교 2) Alkaline phosphatase(ALP) 활성검색 실험	
MDG5031의 유방암 억제효과	1) E-SCREEN assay; RPE(Relative proliferative effect) 값을 이용하여 세포증식효과를 확인 2) ERE-luciferase assay를 통한 유전자 발현 정도를 비교 3) 세포사멸에 의한 DNA손상이 나타난 세포수를 세어 세포사멸 정도를 확인	

- 문헌 결과 및 본 연구팀의 1차 스크리닝 결과를 바탕으로 백년초의 농도 의존성 ER $\beta$ -전사활성을 추가적으로 검토하였음, 백년초의 ER $\beta$ -luciferase 활성이 농도의존적으로 증가하며, E2 대비 약 90%의 활성을 나타내므로, **ER $\beta$  full agonist**임을 확인하였음 (그림3).

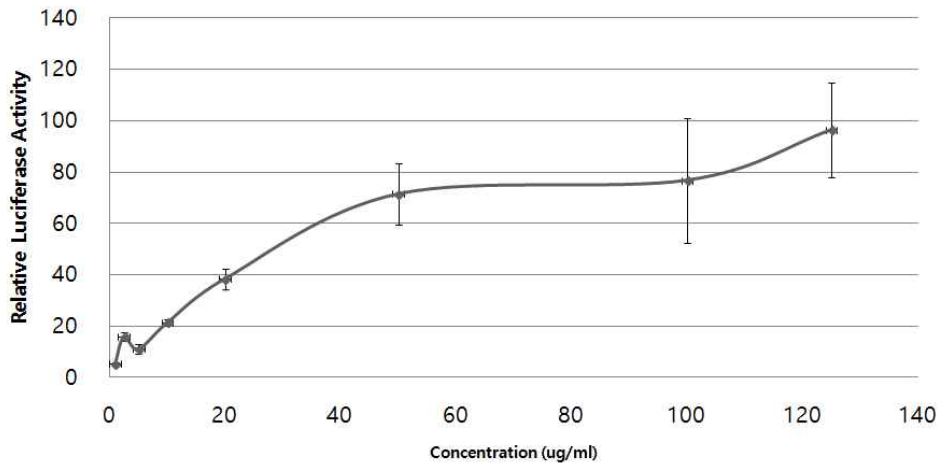


<그림 3. 백년초의 농도의존적 ER $\beta$ -전사활성. 백년초 추출물 1 ~ 20  $\mu$ g/ml 농도 범위에서 CV1 세포를 이용하여 ER $\beta$ -매개 luciferase 활성 결과. 백열: 백년초열매. 백년초의 동결건조 분쇄가루를 DMSO에 녹인 후 원심분리 및 0.45  $\mu$ m filter syringe로 여과한 후 상층액을 세포에 처리함>

● **시계꽃 (*Passiflora incarnata*)**

- 문헌 검색 결과, 시계꽃은 주로 신경성, 우울증 등 정신/신경 관련한 다양한 질환에 민간요법 및 약재로서 널리 사용됨.
- 국내 특허 검색 결과 또한 여성호르몬성과 관련된 갱년기 등의 키워드로는 검색된 바 없음.
- 우선 시계꽃 샘플의 ERE 전사활성을 MCF-7 세포에서 측정하였는데, EC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) 30 이며, 125

mg/ml에서 E2 대비 약 >90% 이상의 활성을 나타냄을 확인하였음 (그림4). 이 결과는 시계꽃이 ER full agonist임을 시사하며, 에스트로겐성 활성으로 갱년기 증상에 대하여 에스트로겐대체요법으로 사용할 수 있음을 시사함.

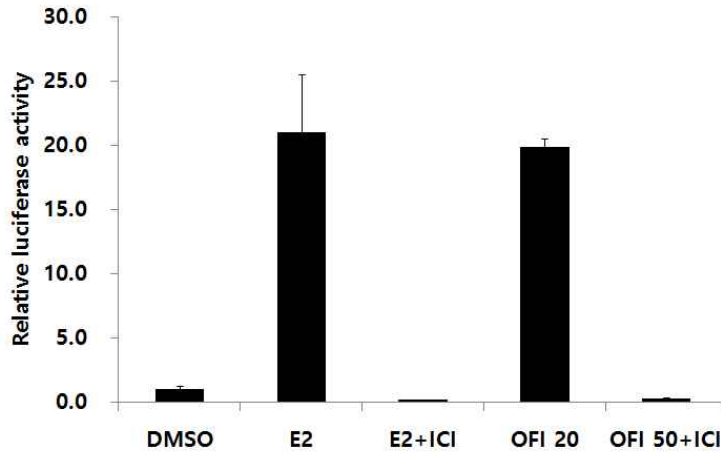


<그림 4. 시계꽃 추출물의 농도 의존성 ERE-전사활성. MCF-7세포에서 시계꽃 추출물의 건조분의 수용액을 세포에 처리하여 전사활성을 고찰함>

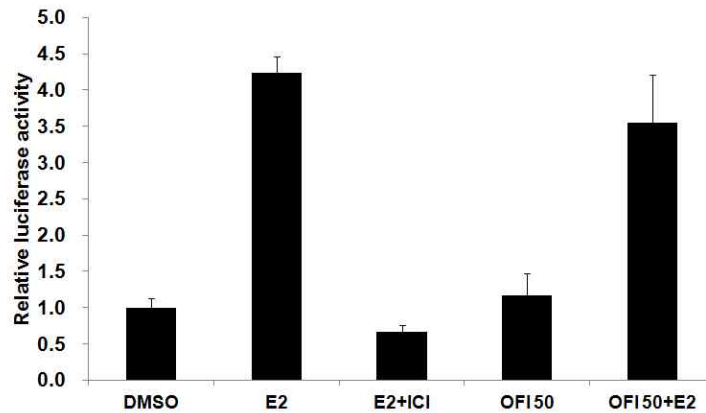
### (3) 에스트로겐수용체 활성에 대한 조직선택성 유전자 전사 활성 평가

- 사람 유방암 세포 MCF-7 및 자궁내막암 세포 Ishikawa 세포에서 1차 스크리닝에서 선정된 소재 중 백년초추출물에 대하여 ERE-luciferase 전사활성을 검토함.
- 백년초 동결건조 추출물은 세포실험을 위해 DMSO (125 µg/ml) 에 수 회의 vortexing을 한 후 microcentrifuge에서 12,000 rpm, 10 분간 원심분리 (2회 반복) 상층액을 세포에 처리함.
- MCF-7 세포에서 백년초 용해물은 농도의존적인 활성증가를 보여줌. EC<sub>50</sub> 값은 7.04 µg/ml이며 E2 (1 nM) 대비 100% 활성을 달성하였음. 이 결과는 **백년초 용해물의 ER full agonist**임을 보여줌. 또한, ICI (ER antagonist)와 동시투여시 백년초에 의한 ER매개 전사활성이 완전히 사라졌음 (그림 5A). 이 결과는 백년초 처리시 나타난 ERE-luciferase 활성이 ER에 의해 매개되었음을 보여줌.
- 한편, Ishikawa 세포에서의 ERE 전사활성은 백년초 용해물 샘플 50 mg/ml에서도 E2 1 nM 활성값의 약 25%를 나타냈음 (그림5B). 이는 백년초 샘플의 자궁증식내막에서의 ER 활성은 partial agonist임을 시사함.

A.



B.



<그림 5. 백년초 샘플에 의한 MCF-7 및 Ishikawa 세포에서의 ER-ERE 전사활성. DMSO, E2 (1 nM), ICI (1  $\mu$ M), 백년초 추출물 (OFI, 20 또는 50  $\mu$ g/ml), 백년초 추출물 + ICI 또는 백년초추출물 + E2 샘플이 배양세포에 처리되었음. A, MCF-7 세포에서의 전사활성; B, Ishikawa 세포에서의 전사활성>

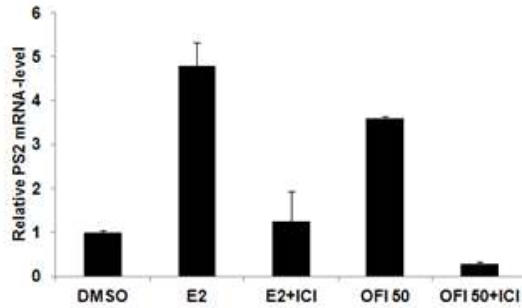
- 추가적으로 ER $\alpha$ -매개 luciferase 활성을 ER $\alpha$  발현 플라스미드를 이용하여 CV1세포에서 고찰하였으며, 백년초 추출물의 MCF-7, CV1/ER $\alpha$ , CV1/ER $\beta$  에서의 EC<sub>50</sub> 값을 정리하면 아래 표와 같음.

표 4. 백년초 동결건조 분쇄물 샘플의 ER-매개 유전자 전사활성에 대한 EC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)

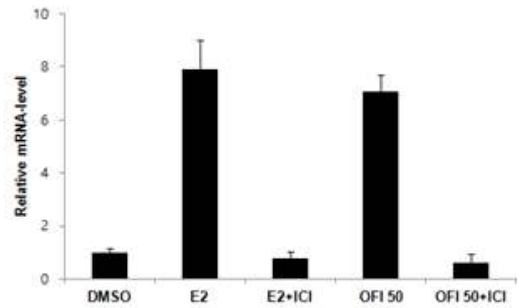
MCF-7	Ishikawa	CV1/ER $\alpha$	CV1/ER $\beta$
7.04	15.2	12.3	7.7

- 백년초 추출물은 ERE-luciferase 전사활성 뿐 아니라 Estrogen-반응성 세포내유전자인 trefoil factor 2(일명 *pS2*)와 progesterone receptor의 유전자를 mRNA 수준에서 각각 5, 8 배 증강시킴을 확인하였음 (그림6).

A) pS2



B) PR



<그림 6. 백년초 샘플이 estrogen 반응성 세포내유전자 발현에 미치는 효과. DMSO, E2 (1 nM), ICI (1  $\mu$ M), 백년초 추출물 (OFI, 50  $\mu$ g/ml), 백년초 추출물 + ICI 또는 백년초추출물 + E2 샘플이 MCF-7세포에 처리되었음. 24시간 배양후, 세포내 RNA를 Qiagen RNeasy mini kit 로 추출한 후 두 유전자의 발현 정도를 Real time-PCR로 정량하였음. 유전자 발현 정도는 DMSO 처리군의 유전자양을 1로 정하여 상대적인 발현량을 계산함>

- 여주추출물에 대한 조직선택성 또한 위에서 이미 기술한대로 partial agonist임. 따라서, 백년초 및 여주 소재는 자궁증식에 관한 적은 부작용이 예측되며, 이는 에스트로겐대체요법의 가장 우려되는 부작용의 하나인 자궁출혈 등이 동반되지 않을 가능성이 큼을 의미함. 이 두 가지는 제품개발에 매우 이상적 소재임.

## 1. 백년초 추출물의 활성평가 및 성분분석

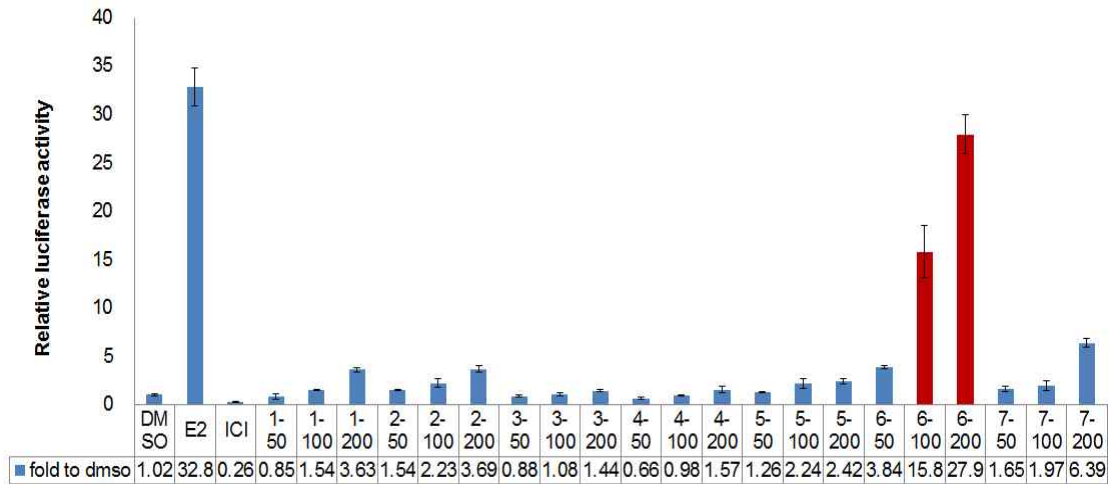
### (1) 에스트로겐수용체 활성에 대한 ER/ERE-유전자 전사활성

- 사람 유방암세포주로서 ER-양성 MCF-7 세포주를 사용함. 각각의 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate에 seeding 함. 이때, charcoal 처리한 fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 DMEM 배지 (이하, estrogen-free media)를 사용하여 배양함.
- 24시간 후 ERE3-luciferase (ERE 서열의 3개 반복 카피) 플라스미드 (0.25  $\mu$ g/well)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection함.
- 1일 배양 후 적절한 약물 농도를 포함하고 있는 위의 estrogen-free media를 세포에 처리한 후 24시간 후 수용성세포추출물을 추출함.
- 이 추출물에 존재하는 luciferase 활성은 luciferase assay system (Promega) 시약을 이용하여 VICTOR3 luminometer (Perkin Elmer) 기기를 이용하여 그 값을 읽음.
- 각각 서로 다른 추출방법으로 추출된 7개의 백년초추출물을 사용함. 1-7번 백년초추출물의 추출방법은 아래 표과 같음.

시료번호	시료특징
1	백년초 주정 추출물 1
2	백년초 주정 추출물 2
3	백년초 열수 추출물 60% 1
4	백년초 열수 추출물 60% 2

5	백년초 열수 추출물 70%
6	백년초 열수 추출물 80%
7	백년초 주정 추출물 80%

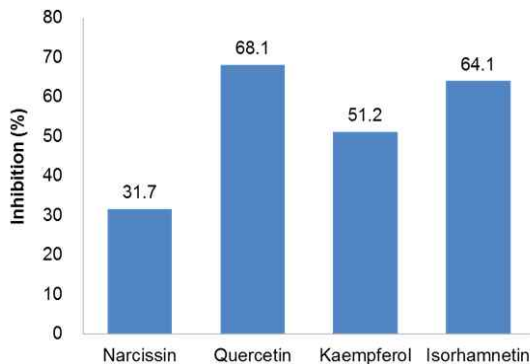
- 실험 결과, 6번 (열수추출 80%) 샘플에서 제일 우수한 ERE-Luciferase 활성이 관찰되었고, 6번 샘플 (붉은색막대)을 제외한 나머지 6개의 샘플은 ERE-Luciferase 활성이 낮은 것으로 나타남 (그림7).



<그림 7. 추출방법이 다른 7 개의 백년초추출물의 MCF-7 세포에서의 ER/ERE-유전자전사활성. 백년초추출물의 최종농도는 (50/100/200 µg/mL)이며, 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1 µM)이 사용되었음>

(2) 항염활성 평가

- 백년초추출물의 유효성분을 확인하기 위해서 백년초 성분으로 알려진 narcissin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol의 human hematopoietic prostaglandin D synthase (HPDGs) 저해효과를 측정함.
- Control (DMSO)값과 비교하여 HPDGs의 활성을 상대 비교하여 50% 이상 HPDGs의 활성을 저해하는 물질이 HPDGs 저해효과를 나타내는 물질임.
- 실험결과, narcissin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin이 control 대비 각각 31.7%, 68.1%, 51.2%, 64.1%의 HPDGs를 저해효과가 나타남. quercetin, kaempferol, isorhamnetin에서 우수한 항염활성 효과를 확인함 (그림8).



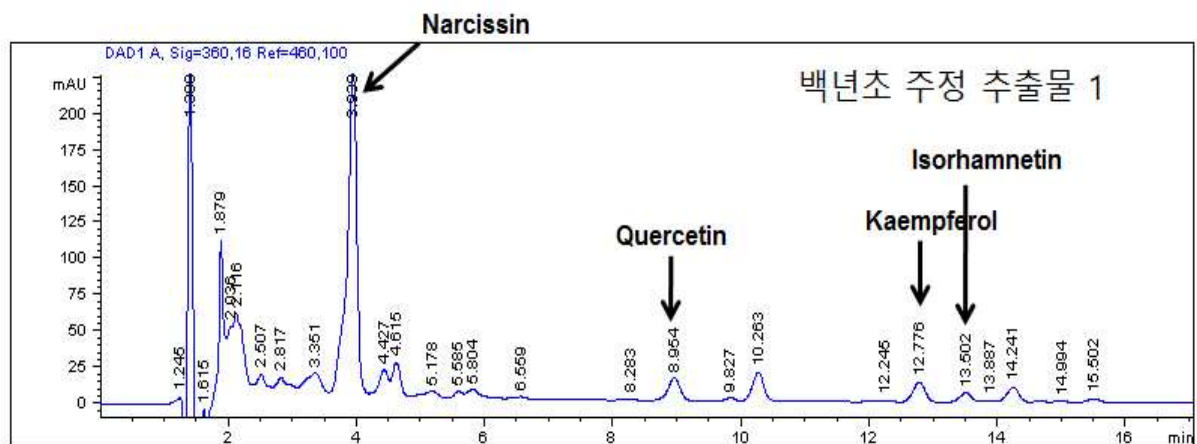
<그림 8. 백년초추출물 성분인 narcissin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol의 HPDGs 저해효과 (%)>

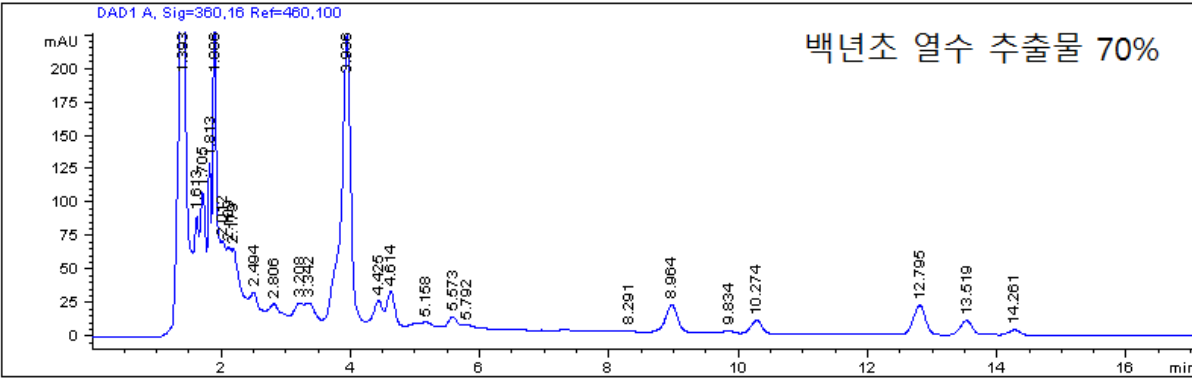
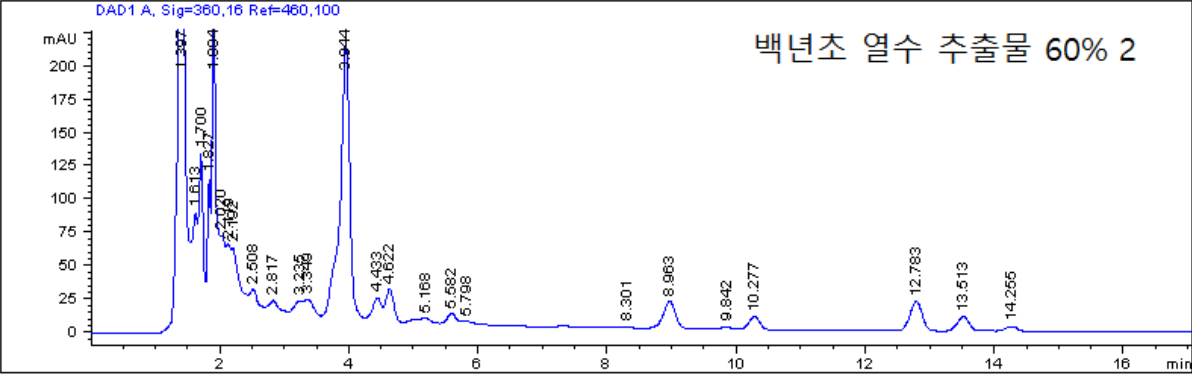
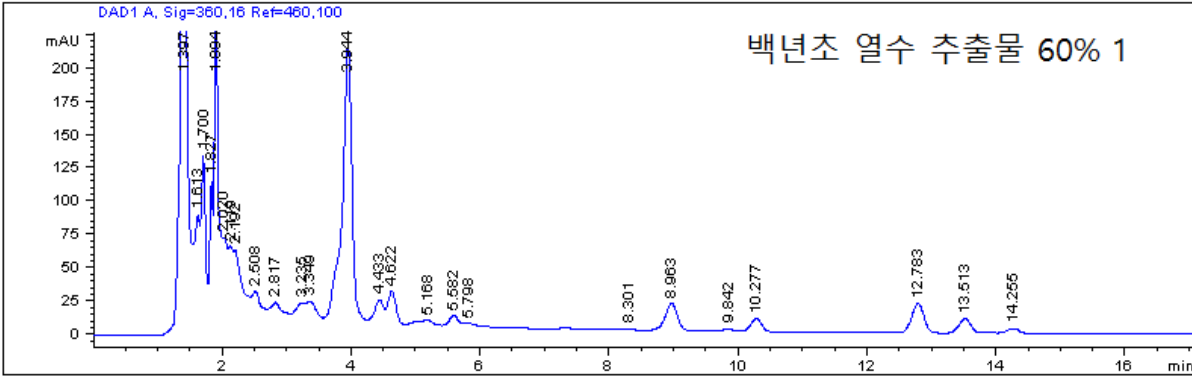
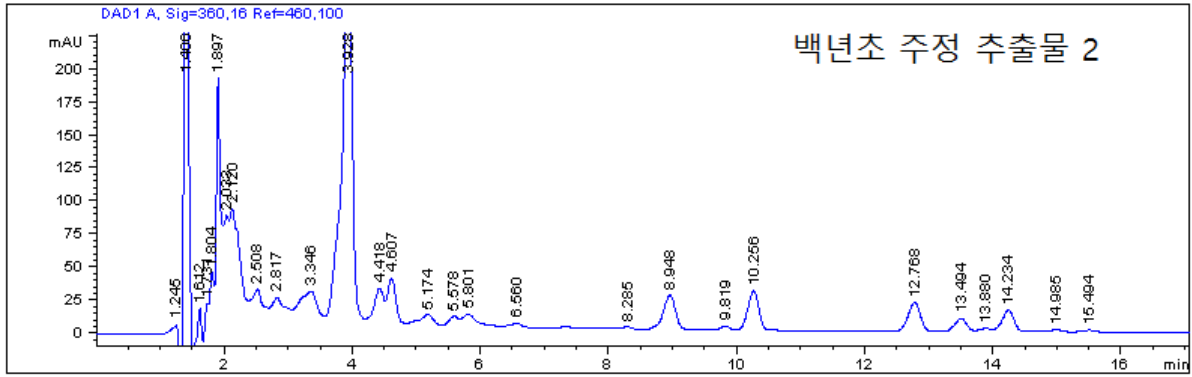
(3) 백년초 추출물 활성 성분 profile 분석

- 백년초추출물 분말 100 mg/mL를 70% 메탄올에 녹이고 30분 동안 초음파 분쇄를 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리를 함.
- 상층액을 0.45 mm PTFE-syringe filter로 필터를 한 후, Diode Array Detector-HPLC (Agilent 1260) 로 분석을 하였음.
- HPLC 분석 조건은 아래와 같음:

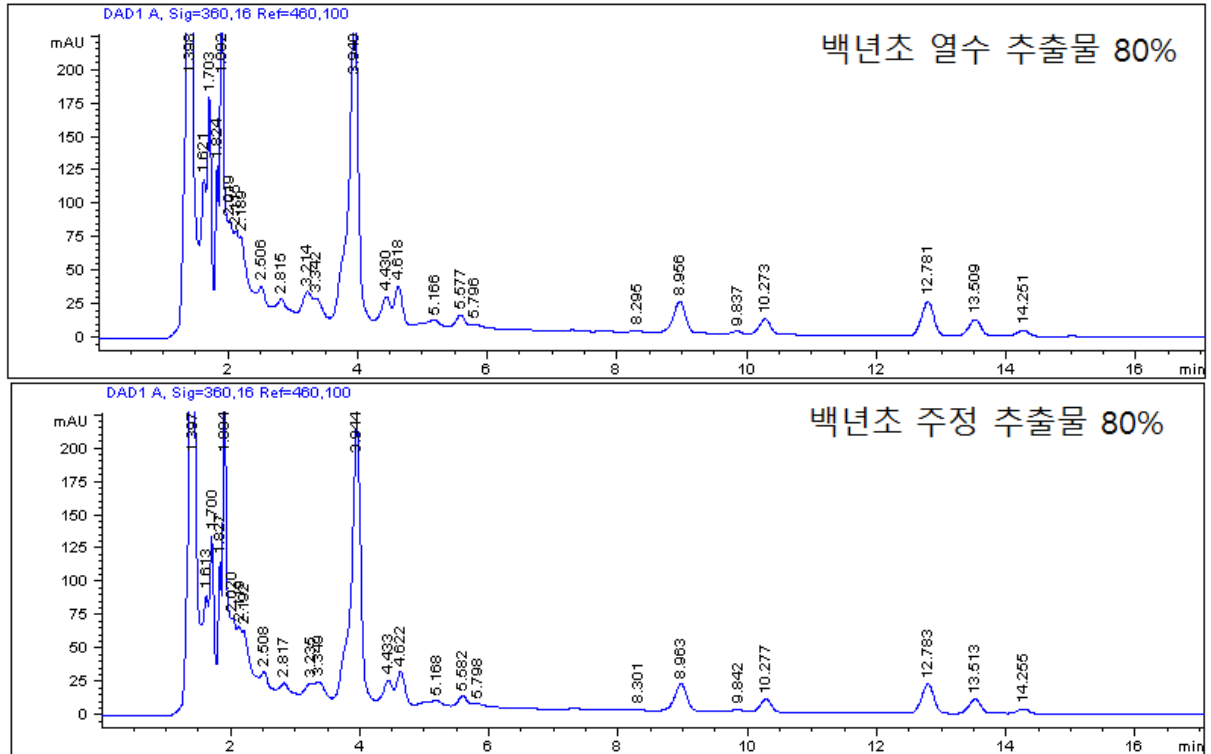
조건	내용
Column	Phenomenex Kinetex C-18 HPLC 컬럼 (4.6 x 150, 5 μm)
Column guard	Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC in-LineFilter
Column temperature	40°C
Mobile phase A	0.1% 포름산을 포함한 증류수
Mobile phase B	0.1% 포름산을 포함한 아세트나이트릴(ACN)
Mobile phase gradient	0 min: 20% B 20 min: 40% B 22 min: 20% B 25 min: 20% B
Injection volume	20 μL
Detection wavelength	360 nm
Flow rate	1 mL/min

- HPLC 분석 결과, 서로 다른 추출방법으로 추출된 7 가지 백년초추출물 내에 isorhamnetin의 배당체인 narcissin이 다량으로 존재하며 3가지의 flavonol (quercetin, kaempferol, isorhamnetin) 등 4 종의 성분이 모두 존재함을 확인함 (그림9).









<그림 9. 추출 방법이 다른 7 개의 백년초추출물의 HPLC profile. 백년초추출물 분말을 70% 메탄올에 녹인 후 위에서 기술한 HPLC method로 분석함>

(4) 백년초 추출물 성분에서의 지표물질 설정 및 정량분석

- 백년초추출물 내의 활성 및 지표성분을 개별 구매하였음. 구매처는 아래와 같음.

성분명	구매처	카탈로그 번호
quercetin	Santa cruz	sc-206089
kaempferol	Sigma	K0133-10MG
isorhamnetin	Santa Cruz	sc-202668A
narcissin	ChromaDex	ASB-00014201-005

- 내부표준물질은 genistein (Sigma, G6649)을 사용함.
- 각 활성성분과 내부표준물질을 DMSO에 용해하여 1000 mg/mL 스톡용액을 제조한 후 -20 °C에 보관함.
- 각 활성성분을 각각 농도별 0, 5, 10, 20, 50 그리고 100 mg/mL를 50% 메탄올에 희석하고 Diode Array Detector-HPLC (Agilent 1260) 로 분석함.
- 표준 용액을 각각 3번 injection (n=3)하고 HPLC로 분석하여 얻은 각 활성성분의 면적 값 (peak area)을 내부표준물질인 genistein의 peak area로 나눈 값인 area ratio로 검량선을 작성 하였으며 상관계수는 모두 0.99 이상임.
- 실험결과, 2번 sample이 narcissin 함량은 제일 높았고, 6번 sample이 flavonol 함량이 제일 높았으나, 모든 sample의 narcissin과 flavonol 양의 차이가 20 % 이내여서, 7개의 sample 모두 narcissin과 flavonol이 비슷한 양으로 높게 함유되어 있다는 것을 알 수 있음 (그림10).



		Amount (µg/g dry weight)			
	Lable	Narcissin	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin
1	백년초 주정 추출물 1	913.4	133.7	160.6	64.6
2	백년초 주정 추출물 2	1319.0	217.7	256.5	102.3
3	백년초 열수 추출물 60% 1	917.3	171.4	256.4	112.9
4	백년초 열수 추출물 60% 2	824.2	135.3	187.2	89.4
5	백년초 열수 추출물 70%	929.5	169.8	253.7	111.3
6	백년초 열수 추출물 80%	1074.9	198.3	295.0	129.9
7	백년초 주정 추출물 80%	1224.7	177.8	212.8	85.6

<그림 10. 추출 방법이 다른 7 개의 백년초추출물 내 성분의 정량분석>

- 본 연구를 통하여 여성 갱년기 건강 원료개발에 사용될 백년초는 열수추출 (80%)이며,  
 활성 성분 : isorhamnetin, quercetin, kaempferol  
 지표 성분 : narcissin  
 으로 설정하며, 정확한 지표물질의 함량은 대량공정 표준화 후 정확하게 설정.

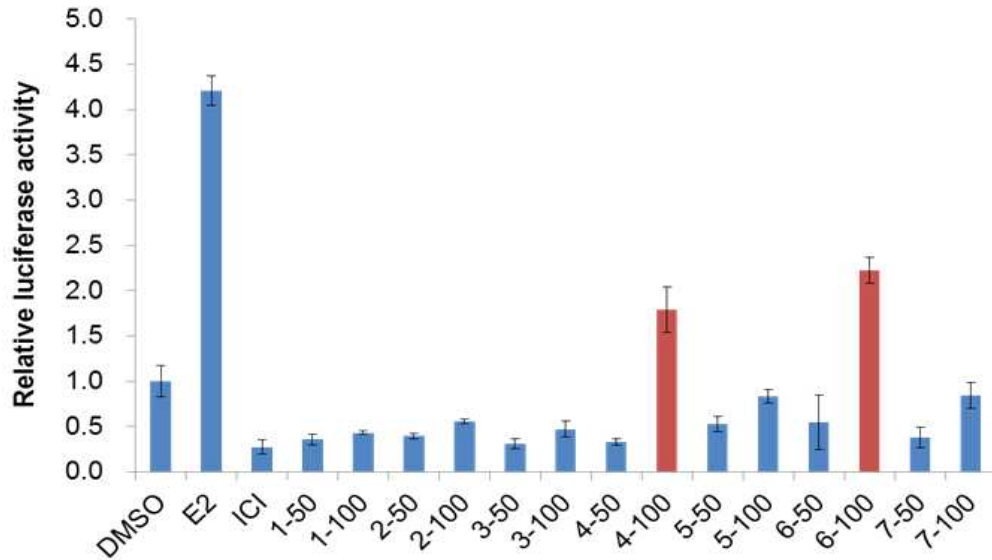
## 2. 여주추출물의 활성평가 및 성분분석

### (1) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 ER/ERE-유전자 전사활성

- 각각 서로 다른 추출방법으로 추출된 5개의 여주추출물과 중국산, 인도산 여주추출물을 사 용함. 사용된 각각의 여주추출물은 아래 표과 같음.

시료번호	시료특징
1	여주 주정 추출물 1
2	여주 열수 추출물 70% 1
3	여주 열수 추출물 70% 2
4	여주 열수 추출물 80%
5	여주 열수 추출물 90%
6	여주 중국산
7	여주 인도산

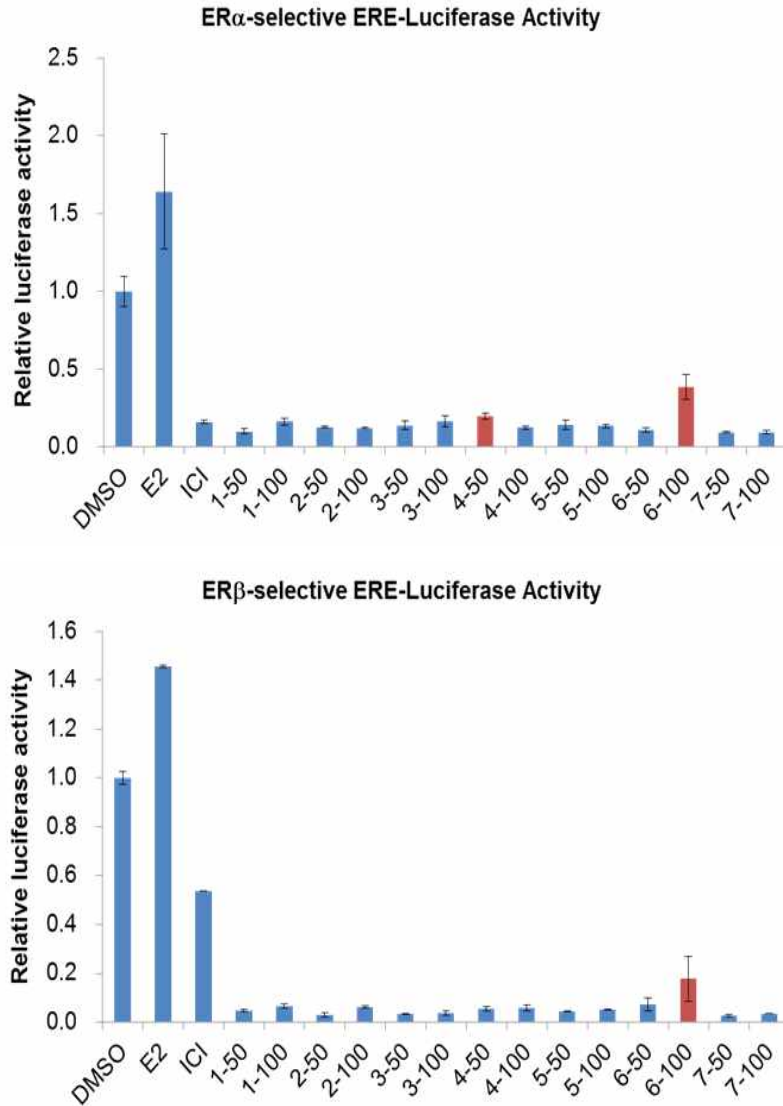
- 실험결과, 4번과 6번 여주추출물(붉은색막대)에서 매우 우수한 ERE-Luciferase 활성이 관찰됨 (그림11).



<그림 11. 7개 여주추출물의 MCF-7 세포에서의 ER/ERE-유전자전사활성. 여주추출물의 최종 농도는 (50/100 µg/ml)이며, 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1 µM)가 사용되었음>

(2) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 ERβ-선택적인 표적유전자 전사 활성 평가

- ER을 발현하지 않는 HEK293 세포주를  $5 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate에 seeding 함. 이때, charcoal 처리한 fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 DMEM 배지 (이하, estrogen-free media)를 사용하여 배양함.
- ERα 및 ERβ를 발현하는 플라스미드 (0.25 µg/well)와 ERE3-luciferase 플라스미드 (0.25 µg/well)를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 co-transfection 함.
- 1일 배양 후 적절한 시험물질을 세포에 처리한 후 24시간 후 Passive lysis buffer (Promega)를 이용하여 수용성세포추출물을 추출함.
- 이 추출물에 존재하는 luciferase 활성은 luciferase assay system (Promega) 시약을 이용하여 VICTOR3 luminometer (Perkin Elmer) 기기를 이용하여 그 값을 읽음.
- 실험결과, 다른 6개의 여주 샘플과 비교하였을 때, 6번 여주 샘플에서 높은 ERα, ERβ-선택적인 ERE-Luciferase 활성이 관찰됨 (그림12).



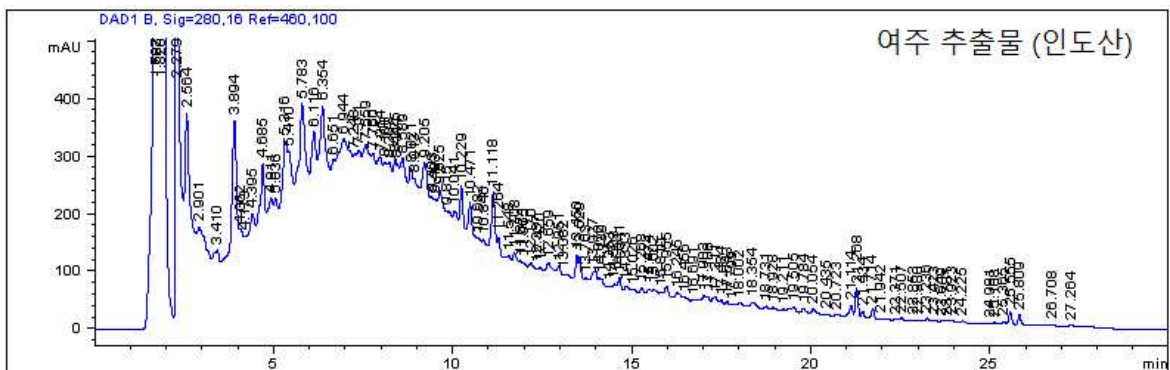
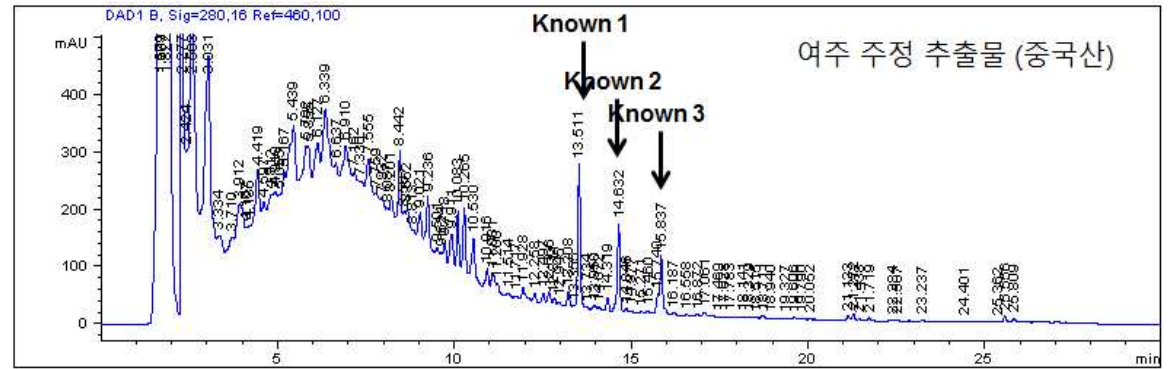
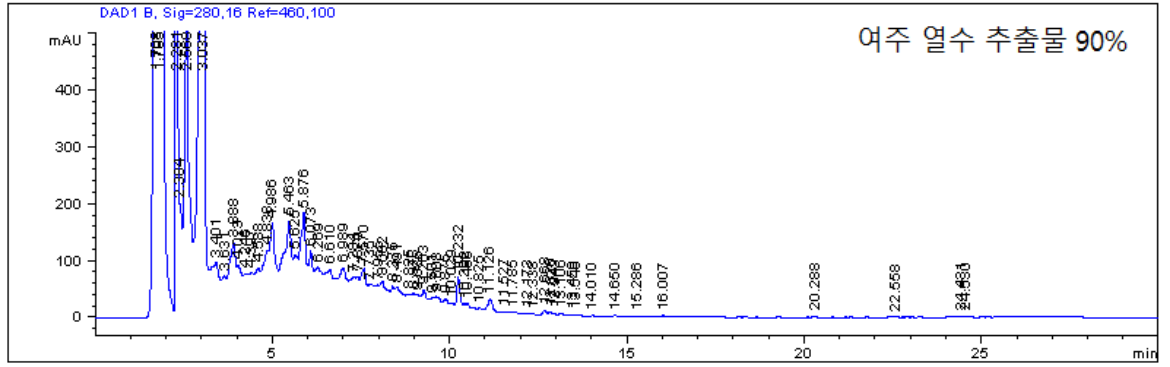
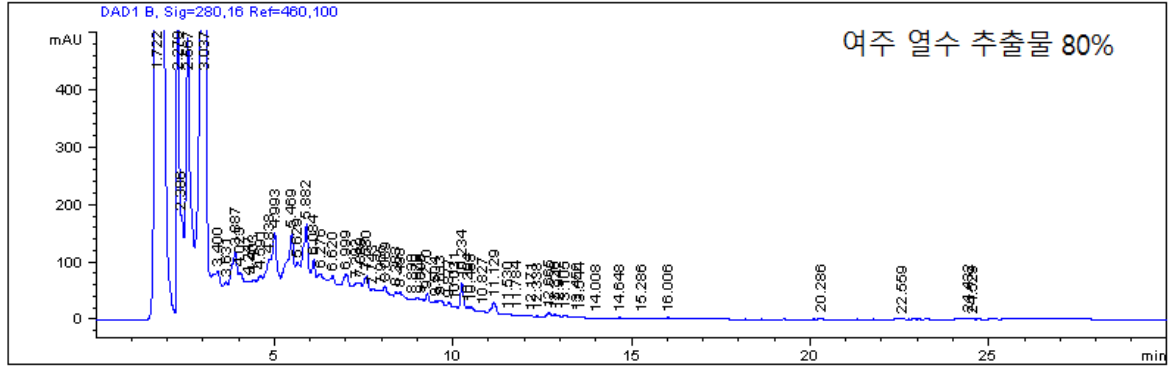
<그림 12. 7개 여주추출물의 ER $\beta$ -선택적인 유전자 전사활성. 여주추출물의 최종농도는 (50/100  $\mu\text{g/mL}$ )이며, 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1  $\mu\text{M}$ )이 사용되었음>

(3) 활성 지표 물질 profile 분석

- 여주추출물 분말 100 mg/mL를 70% 메탄올에 녹이고 30분 동안 초음파 분쇄를 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리를 함.
- 상층액을 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE-syringe filter로 필터를 한 후, Diode Array Detector-HPLC (Agilent 1260) 로 분석을 하였음.
- HPLC 분석 조건은 아래와 같음:

조건	내용
Column	Phenomenex Kinetex C-18 HPLC 컬럼 (4.6 x 150, 5 $\mu\text{m}$ )
Column guard	Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC in-LineFilter





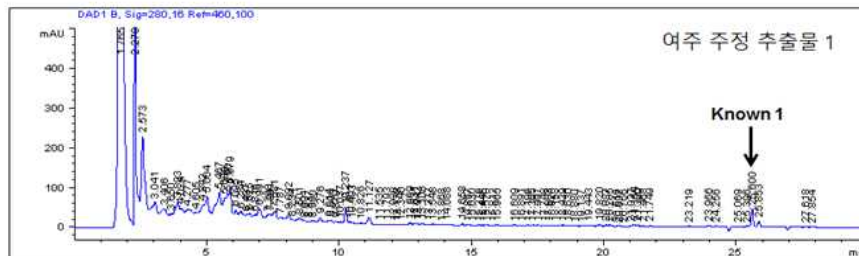
<그림13. 7개 여주추출물의 HPLC profile. 여주추출물 분말을 70% 메탄올에 녹인 후 위에서 기술한 HPLC method로 분석함>

## Charantin 분석법

조건	내용
Column	Phenomenex Kinetex C-18 HPLC 컬럼 (4.6 x 150, 5 μm)
Column guard	Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC in-LineFilter
Column temperature	35°C
Mobile phase A	0.1% 포름산을 포함한 증류수
Mobile phase B	아세트나이트릴(ACN)
Mobile phase gradient	0 min: 10% B 20 min: 90% B 25 min: 10% B 30 min: 10% B
Injection volume	20 μL
Detection wavelength	280 nm
Flow rate	1 mL/min

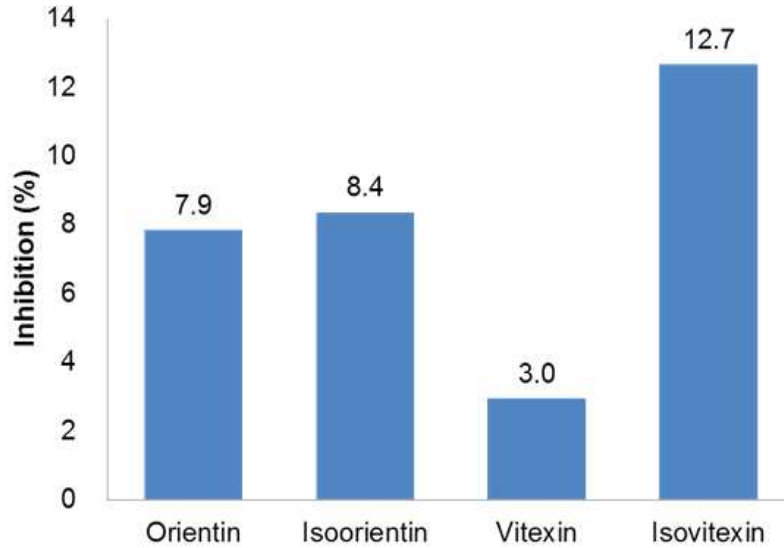
### 전처리 방법

- 여주추출물 분말 100 mg/mL를 70% 메탄올에 녹이고 30분 동안 초음파 분쇄를 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리를 함
- 상층액을 0.45 mm PTFE-syringe filter로 필터를 한 후, Diode Array Detector-HPLC (Agilent 1260) 로 분석을 하였음



### 3. 시계꽃 추출물의 항염활성 효과

- 시계꽃추출물의 항염활성 효과를 평가하기 위해 시계꽃추출물 내 단일성분인 orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin의 human hematopoietic prostaglandin D synthase (HPDGs) 저해효과를 측정함.
- 실험방법은 위에서 기술한 내용과 동일함.
- 실험결과, orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin은 control 대비 각각 7.9%, 8.4%, 3.0%, 12.7%의 HPDGs를 저해효과를 나타내었으며, 네 물질 모두 항염활성 효과가 없는 것으로 확인됨 (그림14).



<그림14. 시계꽃추출물 내 단일성분인 orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin의 HPDGs 저해효과 (%)>

#### 4. 백년초-여주-시계꽃 추출물소재 혼합비율 시험

(1) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 ER/ERE-유전자 전사활성

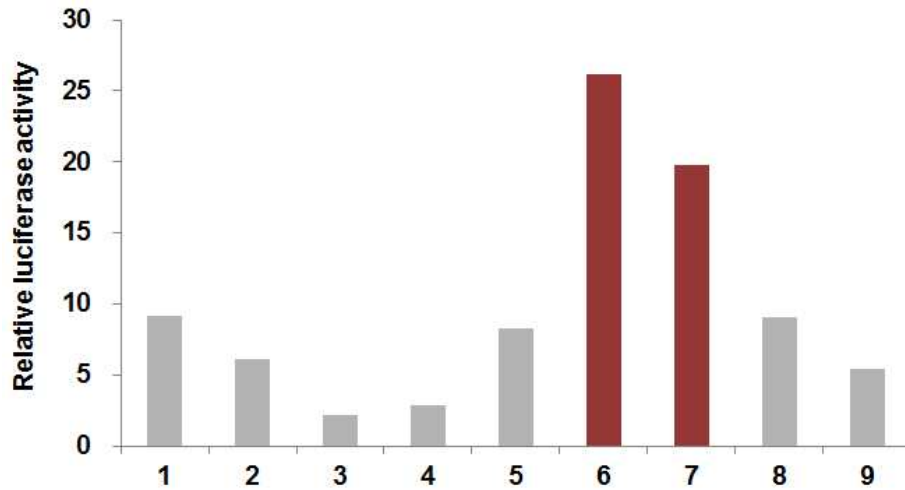
- 실험방법은 위에서 기술한 내용과 동일함.
- 앞에서 ER/ERE-유전자 전사활성을 통해 가장 활성이 우수한 소재를 선정하였으며, 선정된 소재는 아래 표와 같음.

소재명	추출법 정보
OFI (백년초)	열수추출물 80%
BM (여주)	From China, no information available
PI (시계꽃)	From Italy, no information available

- 선정된 백년초, 여주, 시계꽃 추출물을 다양한 비율로 혼합하였으며, 각각의 혼합비율은 아래 표와 같음.

시료 번호	OFI	BM	PI	O:B:P 비율
	ug/ml			
1	50	100	50	1 : 2 : 1
2	25	100	75	1 : 4 : 3
3	75	100	25	3 : 4 : 1
4	100	50	50	2 : 1 : 1
5	100	25	75	4 : 1 : 3
6	100	75	25	4 : 3 : 1
7	50	50	100	1 : 1 : 2
8	75	25	100	3 : 1 : 4
9	25	75	100	1 : 3 : 4

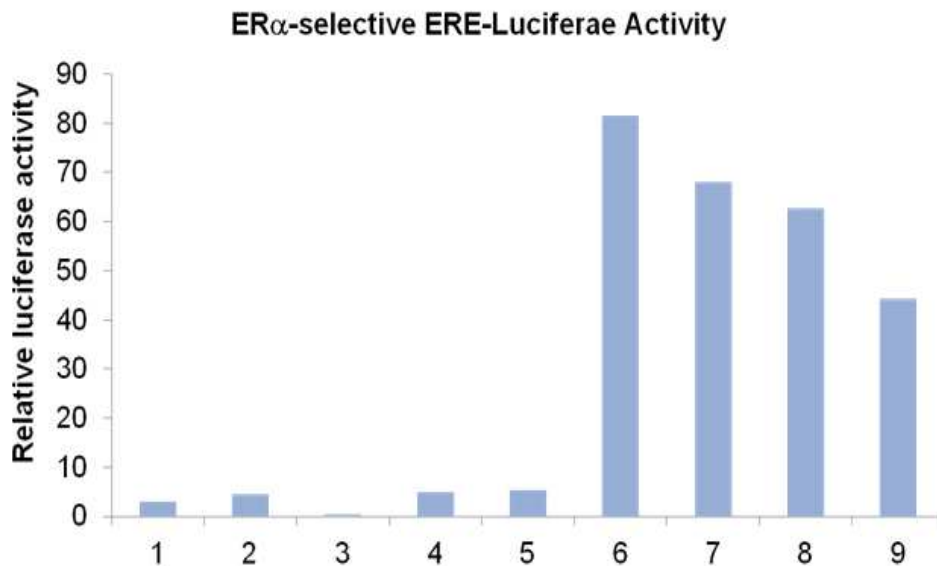
- 실험결과, 혼합 비율 6, 7에서 가장 우수한 ERE-Luciferase 활성이 관찰되었으며, 백년초 및 시계꽃의 배합량이 활성화에 영향을 미치는 것을 알 수 있음 (그림15).



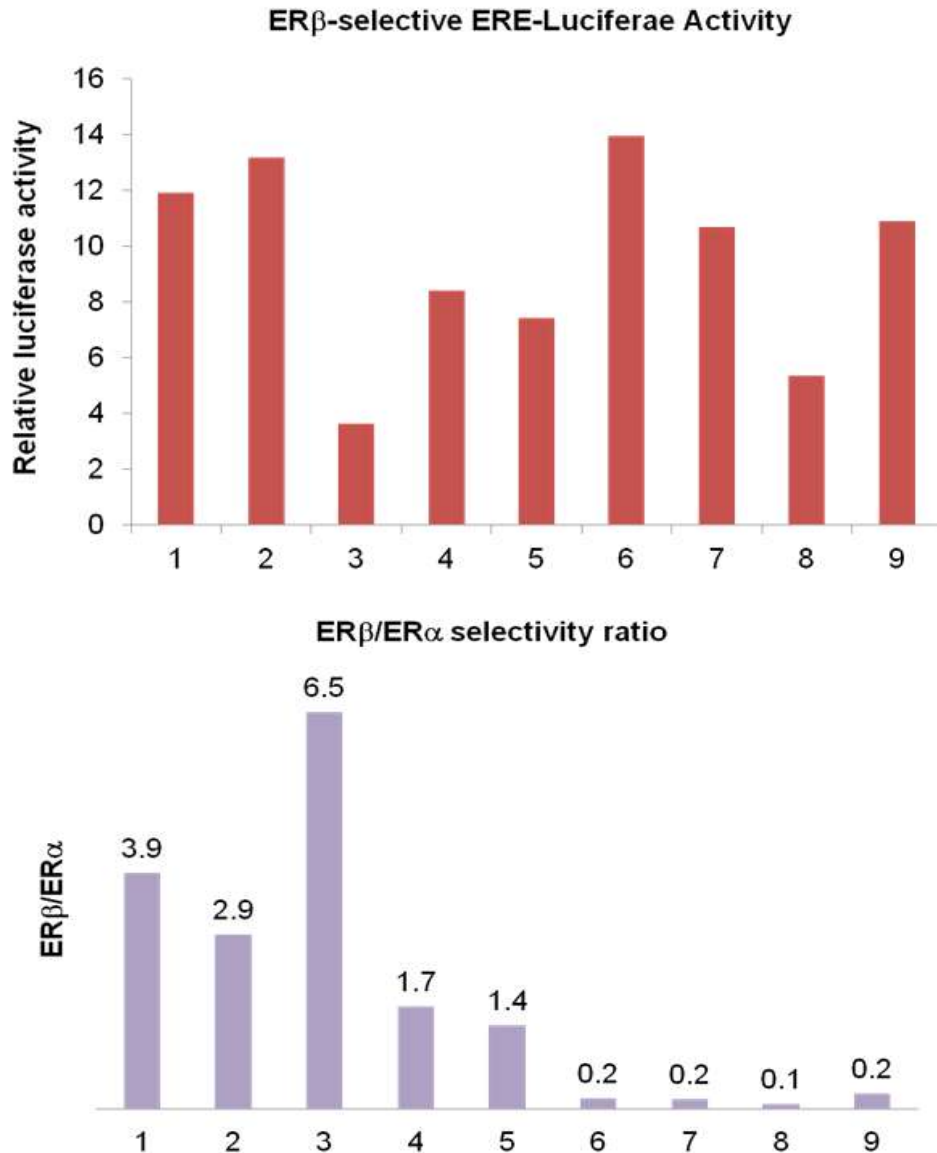
<그림15. 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물의 MCF-7 세포에서의 ER-ERE 유전자 전사활성. 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1  $\mu$ M)이 사용되었음>

(2) 에스트로겐수용체 활성화에 대한 ER $\beta$ -선택적인 표적유전자 전사 활성 평가

- 실험결과, 6-9번의 혼합비율에서 우수한 ER $\alpha$ -선택적인 Luciferase 활성이 관찰되었으며, 3, 8번을 제외한 혼합비율에서 우수한 ER $\beta$ -선택적인 ERE-Luciferase 활성이 관찰됨 (그림16). ER $\alpha$ 와 ER $\beta$  활성화에 여주 및 시계꽃의 배합량이 영향을 미치는 것을 알 수 있음.
- 1.5 이상의 ER $\beta$ /ER $\alpha$  선택적인 비율은 1-3번에서 발견됨 (그림16). 하지만 이들 샘플은 내재적으로 약한 ERE-Luciferase 활성을 보여주었음. 따라서, 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합 비율 선정 시, 절대적인 ERE-Luciferase 활성까지 고려하여 6번 (백년초:여주:시계꽃=4:3:1)의 결과가 가장 적절함.



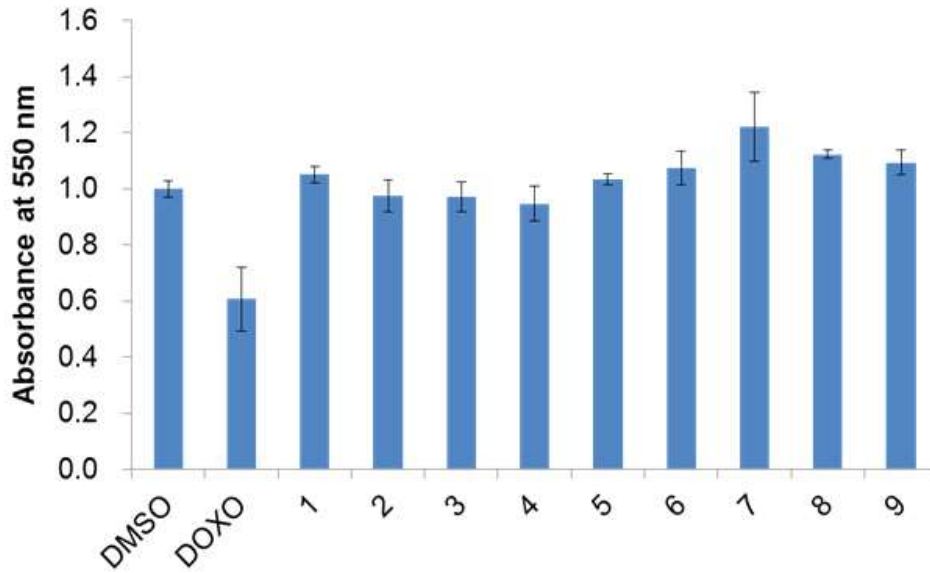




<그림 16. 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물의 ERβ-선택적인 유전자 전사활성 및 ERβ/ERα 선택적인 비율. 양성대조군으로 E2 (1 nM), 음성대조군으로 ER 길항제인 ICI (1 μM)이 사용되었음>

### 3) 세포기반 독성 및 암예방활성 평가

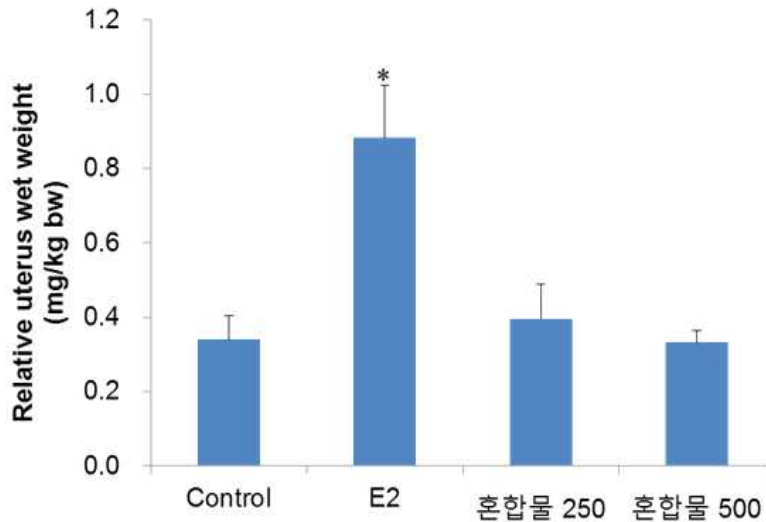
- MCF-7 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well, 24-well plate에 seeding 한 후 적절한 농도의 시험물질 및 대조물질 (Doxorubicin, 10 μM)을 처리함.
- 24 ~ 72 시간 배양 후 배양액을 제거한 후 PBS로 세척함.
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 400 μg/mL, PBS) 100 μL를 첨가한 후 세포배양기에서 약 2시간 동안 배양시킴.
- 용액을 제거한 후 세포층에 DMSO 100 μL를 첨가하고 약 3분간 교반함.
- DMSO에 세포가 터지고 녹아져 나온 MTT의 대사체를 550 nm 흡광도를 측정하여 정량함.
- 실험결과, 백년초, 여주, 시계꽃 혼합시료는 MCF-7 세포에서 독성이 보이지 않으며, ER 작용제로서의 세포증식 효과 역시 나타나지 않음 (그림17).



<그림17. 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물의 세포독성 평가. DMSO, DOXO (Doxorubicin, 10  $\mu$ M), 백년초, 여주, 시계꽃 추출물 혼합물 (# 1~9)을 MCF-7 세포에 처리한 후 48 시간 후에 MTT를 처리하였음>

#### 4. 랫트에서 자궁증식 효과

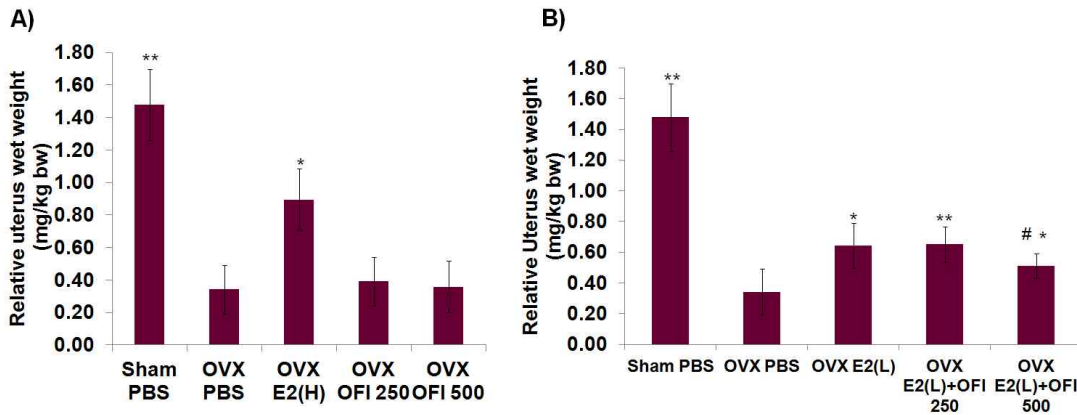
- 2주령 SD 랫트 (암컷)를 구입하고 1주간 적응기간을 둠.
- 3주령이 된 랫트를 Control, E2 투여군, 저농도 추출물 혼합물 투여군, 고농도 추출물 혼합물 투여군으로 군당 6-8마리가 되도록 나눔.
- 실험결과에 영향을 주지 않도록 실험 기간 동안에는 phytoestrogen이 제한된 사료 (Harlan 2020X Teklad Global Soy Protein-Free Extruded Rodent Diet)를 투여함.
- 3일 동안 control군에는 PBS 1 mL/kg, E2 투여군에는 corn oil에 녹인 E2 3  $\mu$ g/kg, 저농도 추출물 혼합물 투여군에는 PBS에 녹인 추출물 혼합물 추출물 250 mg/kg, 고농도 추출물 혼합물 투여군에는 PBS에 녹인 추출물 혼합물 500 mg/kg을 각각 피하주사함. 이때, 랫트의 체중을 매일 측정하여 정량의 성분이 투여될 수 있도록 함.
- 3일간의 피하주사가 끝나면 24시간동안 금식을 시킨 후, CO<sub>2</sub> 챔버에서 안락사를 시킴.
- 안락사 시킨 랫트의 복부를 절개하고 자궁과 난소를 적출한 뒤, 난소와 지방을 제거하고 자궁의 무게를 측정함.
- 자궁증식정도는 자궁무게 (mg)를 몸무게 (kg)로 나눈 값을 사용함.
- E2 (3  $\mu$ g/kg/d) 투여군은 control 군에 비하여 약 2.6배 자궁 무게가 증가하였고, 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물을 투여한 군은 control군과 자궁무게가 비슷한 수준으로 나타남 (그림18).
- 실험결과, 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물은 자궁증식성이 전혀 없다는 결과를 보여주었음.



<그림18. 백년초, 여주, 시계꽃추출물 혼합물의 미성숙 랫트에서 자궁증식 효과. 3일간 피하 투여 후 자궁중량/체중량의 상대값을 투여군마다 산출하여 대조군 (PBS treatment group)과 비교하였음. 유의적 차이: \*P<0.01, indicates significant difference.>

#### 선택 소재의 *in vivo* 자궁증식성 평가

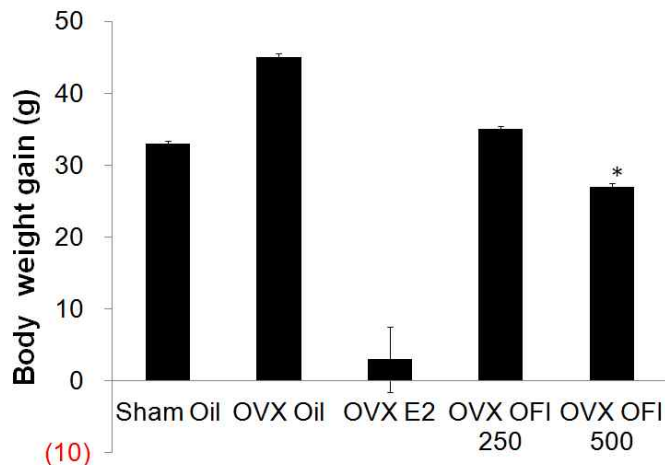
- 에스트로겐대체요법으로 각광받은 phytoestrogen은 비교적 약한 에스트로겐활성을 가지지만, 자궁증식성이 최소화된 활성을 가지는 것이 안전성 측면에서 가장 이상적인 소재임. ER $\beta$ -선택적인 ER agonist는 자궁내증식효과가 미미하며, ER $\alpha$ -매개 세포증식을 antagonize 할 수 있는 활성이 알려져 있음. 따라서, 본 과제에서는 백년초의 세포기반 assay에서 에스트로겐활성을 확인한 이후 OVX 랫트에서 자궁증식성을 평가하였음.
- 또한, 백년초 샘플 자체의 자궁증식성 뿐 아니라, 폐경기전후 (perimenopause) 즉, 폐경기전 에스트로겐대체요법으로서의 안전성을 평가하기 위하여, OVX 랫트에 저용량의 E2를 백년초샘플과 동시투여하여 E2에 의한 세포증식효과에 대한 백년초의 효능을 고찰하였음.
- OVX 처치후 군당 약 6-8마리를 분류하였고, 3일 동안 corn oil에 녹인 시험물질을 SC 투여하였음. 자궁증식정도는 자궁무게 (mg)을 몸무게 (kg)으로 나눈 값을 사용하였음.
- E2 (4  $\mu$ g/kg/d; High dose group) 투여군은 OVX control 군에 비하여 약 3배 증가하였고, E2 (0.5  $\mu$ g/kg/d; High dose group) 백년초 (500 mg/kg) 투여군의 경우, 대조군에 비하여 약 1.2배 증가하였음.
- 한편, E2 (0.5  $\mu$ g/kg/d; Low dose group) 투여군은 대조군에 비하여 상대적자궁증식지수는 2배이나 (그림19 A), E2 low dose와 백년초 공동투여군에서는 이 지수가 0.6으로 감소하였음 (그림19 B).
- 본 실험 결과 **백년초 샘플 자체는 자궁증식성이 전혀 없으며, 오히려 소량의 E2에 유발된 자궁증식을 유의성있게 억제**하는 결과를 보여주었음.



<그림 19. 백년초 추출물의 OVX 랫트에서 자궁증식 효과. 3일간 피하투여 후 자궁중량/체중량의 상대값을 투여군마다 산출하여 대조군 (OVX-PBS treatment group)과 비교하였음. 유의적 차이: P<0.01, \*\*P<0.001 indicates significant different. Significance difference against OVX E2(L): #P<0.05>

#### 5. 선택 소재의 *in vivo* 혈중 대사 마커 및 체중 증가에 미치는 효과의 연구

- 여성호르몬 에스트로젠은 혈당 및 혈중 지질의 개선 작용 등을 통해 대사성질환의 예방에 긍정적인 효과를 가지고 있을 뿐 아니라, 이에 따라 체중감소에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 따라서, 본 과제 수행을 통해 선정된 소재 중의 하나인 백년초가 당 및 지질의 혈중농도 그리고 체중에 미치는 효과를 고찰하기 위하여, OVX 랫트에 5주간 경구투여 (존대 투여) 를 수행하였음.
- 백년초 투여군 (250, 500 mg/kg)은 모두 대조군 대비 체중 증가를 방지하였으며, 특히 500 mg/kg 투여군은 통계학적으로 유의한 체중감소 효과를 보여줌.
- 또한, 혈당 및 triglyceride (혈중 지질 지표 중의 하나) 등 두 가지 지표 모두 대조군 대비 각각 0.7 및 0.5 배 감소함을 관찰하였음.
- 따라서, 백년초 추출물의 경구투여는 체내 에스트로젠 감소로 인한 체중 증가를 막아주고 lipid profile을 개선시켜줌을 시사함.



<그림 20. OVX 랫트에서 백년초 추출물의 경구투여에 의한 체중증가에 대한 효과. 백년초 추출물의 5주간의 경구투여 (500 mg/kg)가 대조군 (OVX-oil treatment group)에 비하여 유의하게 체중이 감소되었음을 확인할 수 있음. \*P<0.05>

표 5. 백년초 경구투여에 의한 혈당 및 혈중 Triglyceride 농도의 변화.

	Glucose (mg/dL)	TG (mg/dL)
Sham oil	143.6	67.4
OVX oil	171.5	93.2
OVX E2	151	47.2
OVX OFI 250 (mg/kg)	146.4	68.4
OVX OFI 500 (mg/kg)	121	50.5

#### 6. 비임상개발후보 선정

- 이상의 *in vitro* 및 *in vivo* 에서의 활성 및 안전성 평가 시험 결과를 토대로 국내 소재 소재의 활성 및 안전성 측면에서의 장점, 공급의 용이성, 특허출원 가능성, 마케팅 측면의 매력도를 평가하여 개발후보를 선정함.
- 특히 활성 및 안전성 측면에서의 후보선정 기준에 관한 target product profile은 표4에 이미 제시하였음. 추가적으로 실시한 *In vivo* 자궁증식 평가시험의 결과를 후보 선정 시 반영하였음.
- 백년초 및 여주 모두 선택 농도 (양) 의존적인 ER 전사활성을 보여주었으므로, 농도선정을 추가적으로 연구한다면 ER partial agonist 성질을 만족시킬 수 있음.
- 특히, 이 두 소재 모두 Ishikawa 세포에서 이미 ER partial agonist 성질을 보여주었으며, 백년초의 경우, 경구투여 시 *in vivo*에서 자궁증식 억제효과를 보여주었으므로, 자궁증식
- 부작용이 최소화된 가장 이상적인 소재라고 할 수 있음.
- 따라서, 이러한 *in vitro* 및 *in vivo* 결과를 바탕으로 일차년도 연구수행을 통해 국내 재배 백년초 및 여주를 여성갱년기 제품 소재로 선정하였음.

#### ○ 선택 원료의 기준 확보 및 안전성, 안정성 확보

- 백년초, 여주와 시계꽃은 각각 식품의약품안전처 식품원재료 DB 검색결과 식품 원료로 가용이 가능하다고 등재되어 있으며, 완제품에 대한 안전성, 안정성 확보에 있어 건강기능식품공전의 기준을 따름

##### (1) 백년초 열매 식품의약품 식품 원료 DB

- 원재료명 : 보검선인장
- 이명 : 선인장, 손바닥선인장, 백년초
- 식품원료 : 사용가능
- 사용 부위 : 열매, 줄기
- 일일 섭취량 : 인체시험 등의 DB검색 250g 이하

##### (2) 여주 식품의약품 식품원료 DB

- 원재료명 : 여주

- 식품코드 : 100106021800000001
- 1회제공량 : 70g 원물

(3) 시계꽃 잎 식품의약품 식품 원료 DB

- 원재료명 : 시계꽃
- 이명 : 패션꽃
- 식품원료 : 사용가능
- 사용부위 : 잎, 열매
- 일일 섭취량 : 해외 판매 제품 및 인체시험등의 DB 검색 추정 추출물 60mg



백년초 (국산)

품명	영양성분	식품	종류	재래종	수산물
식품구분 : 배양	식용여부 : 전체				
원재료명 : 전체	공천등록여부 : 전체	Opuntia ficus-indica (L.)			
원재료	식품	식품	생약명	식품원료 사용가능 여부	
				가능	제한적 불가능
백년초	백년초 선인장	Opuntia ficus-indica (L.)	선인장	가능	제한적 불가능



여주 (국산)

품명	영양성분	식품	종류	재래종	수산물
식품구분 : 배양	식용여부 : 전체				
원재료명 : 전체	공천등록여부 : 전체	Momordica charantia L.			
원재료	식품	식품	생약명	식품원료 사용가능 여부	
				가능	제한적 불가능
여주	Bitter Melon, Bitter Melon, Bitter Melon	Momordica charantia L.	고추(매운)	가능	제한적 불가능



시계꽃 (이태리)

품명	영양성분	식품	종류	재래종	수산물
식품구분 : 배양	식용여부 : 전체				
원재료명 : 전체	공천등록여부 : 전체	Passiflora incarnata L.			
원재료	식품	식품	생약명	식품원료 사용가능 여부	
				가능	제한적 불가능
시계꽃	Passiflora	Passiflora incarnata L.	시계꽃	가능	제한적 불가능

<그림 21. 백년초, 여주와 시계꽃의 식품의약품안전처 식품원재료 DB 검색결과>

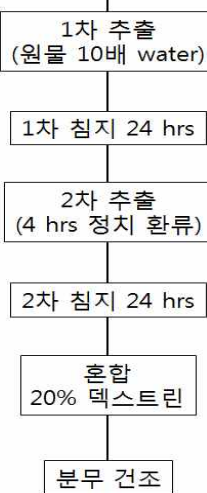
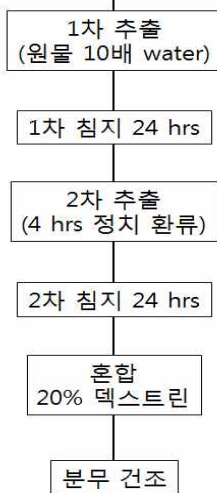
1. 각원료의 대량공정 표준화 진행

- (1) 백년초 열수 추출 (80 °C)
- (2) 여주 열수 추출 (80 °C)
- (3) 시계꽃 0.5% extract (이태리)

백년초 추출 분말 표준 제조 공정

여주 추출 분말 표준 제조 공정

시계꽃 추출 분말 표준 제조 공정



<그림 22. 추출공정 모식도>

2. 대량 생산 원료의 지표물질 함량 규격 설정

(1) 백년초 추출물

지표물질 명 : Narcissin (CAS No. 604-80-8)

설정 함량 : 107 ug/g (80 ~ 120%)

(2) 여주 추출물

지표물질 명 : Charantin (CAS No. 57126-62-2)

설정 함량 : 123 ug/g (80 ~ 120%)

(3) 시계꽃 추출물

지표물질 명 : Vitexin (CAS No. 3681-93-4)

설정 함량 : 230 ug/g (80 ~ 120%)

√ 식품의약품안전처 사전 민원 상담을 통해 원물의 특이적 성질을 가진 지표물질 설정에 대해 논의 함. 지표물질의 경우 효능과는 상관없이 그 원물에 대한 특이적 성질을 표현하는 성분임. 현재 백년초와 시계꽃의 경우 지표물질로 가능하나 여주의 경우 Charantin이외의 특이적 성분을 요청 받음. 특이적 성분의 확인 하기 어려운 경우 이에 따른 어려운 사유 및 그동안의 연구 결과에 대한 보고서를 제출하여 식품의약품안전처와 사전 협의 예정임.

- 시제품의 2달 이상의 열안정성 광안정성 보존 안전성 등 확보를 위하여 일정기간 동안 pH변화, 흡광도, 변색 및 변취를 관찰
  - : 추출물의 2달 이상 저장성 확인
  - : 성장, 향취, 일반세균, 효모, 곰팡이, 대장균군, 중금속 기준 확보를 통한 원료의 안전성 확립
- HPLC를 사용하여 지표성분의 함량 기준 확립 및 밸리데이션 진행
  - : 각 추출물의 HPLC, LC/MS 분석

[표 6. 백년초 추출물의 'Narcissin' 분석]

Sample description	Sample preparation	HPLC method	
		Column	Capcell PAK MGII(3um, 2 x 100mm)
손바닥 선인장 추출물 Narcissin 정량분석	시료 1g 사용 ↓ MeOH (100mg/ml) 녹임 ↓ Sonication (30sec) ↓ 원심분리 ↓ 상등액 MeOH:DW (50:50v/v)	Moblie phase	MeOH/DW(0.1%Formic-acid) (95:5, v/v)
		Flow rate	300 uL/min
		Injection volume	5 μl
		Mass Condition	XCALIBUR 2.0 software Spray voltage : Positive 2.0 kV Transfer capillary temperature : 301 °C Sheath gas pressure : 50, Aux gas pressure : 20 Collision energy : - 1 <sup>st</sup> : 33,2 <sup>nd</sup> 46,3 <sup>rd</sup> 46 SRM mode : Positive - 1 <sup>st</sup> ion transitions <i>m/z</i> 623.0 > <i>m/z</i> 315.1

	희석 ↓ 0.45mm syringe filter 여과	- 2 <sup>nd</sup> ion transitions $m/z$ 623.0 > $m/z$ 299.1 - 3 <sup>rd</sup> ion transitions $m/z$ 623.0 > $m/z$ 300.3
--	---	--

\*표준용액 : Sigma-aldrich 표준품으로 부터 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 ppb의 표준검량선용액을 작성하여 검량선을 작성

[표 7. 여주 추출물의 'Charantin' 분석]

Sample description	Sample preparation	HPLC method	
		column	
여주 추출물 Charantin	MeOH:Water(50:50v/v) 5ml ↓ Ultrasonication(15min) Centrifuge(15min/3,500rpm) ↓ MeOH:Water(70:30v/v) 5ml ↓ Ultrasonication Centrifuge(Hexane 3ml) ↓ Re-dissolved Chloroform:MeOH(1:1v/v) 200 $\mu$ l ↓ Nylon membrane filter 0.45 $\mu$ m	C-18 Inertsil ODS-3 column (5m particle, 4.6mm×250mm ID)	
		Moblie phase	100:2 (v/v) methanol-water
		Flow rate	1 ml/min
		Injection volume	200 $\mu$ l
		UV wavelength	204 nm

[표 8. 시계꽃 추출물의 'Vitexin' 분석]

Sample description	Sample preparation	HPLC method	
		Column	
시계꽃 추출물 Vitexin 정량분석	시료 1g 사용 ↓ MeOH (100mg/ml) 녹입 ↓ Sonication (30sec) ↓ 원심분리 ↓ 상등액 MeOH:DW (50:50v/v) 희석 ↓ 0.45mm syringe filter 여과	Capcell PAK MGII(3um, 2 x 100mm)	
		Moblie phase	Acetonitrile/DW(0.1%Formic-acid) (30:70, v/v)
		Flow rate	300 uL/min
		Injection volume	5 $\mu$ l
		Mass Condition	XCALIBUR 2.0 software Spray voltage : Positive 4.03 kV Transfer capillary temperature : 300 °C Sheath gas pressure : 50, Aux gas pressure : 20 Collision energy : - 1 <sup>st</sup> :26,2 <sup>nd</sup> 33,3 <sup>rd</sup> 18 SRM mode : Positive - 1 <sup>st</sup> ion transitions $m/z$ 433.1 > $m/z$ 313.2 - 2 <sup>nd</sup> ion transitions $m/z$ 433.1 > $m/z$ 283.2 - 3 <sup>rd</sup> ion transitions $m/z$ 433.1 > $m/z$ 415.2

\*표준용액 : Sigma-aldrich 표준품으로 부터 2000,1000, 500, 200,100, 50, 20, 10, 5, 2 ppb의 표준검량선용액을 작성하여 검량선을 작성



○ 대량 생산 원료를 활용한 과학적 효능 검증

1. 시험물질

- 네추럴에프앤피 연구소로부터 제공된 대량공정 생산 원료 백년초, 여주 및 시계꽃 추출물의 추출방법 및 성상은 아래 표 1에 요약하였음.

표 1 . 추출물 시료 정보

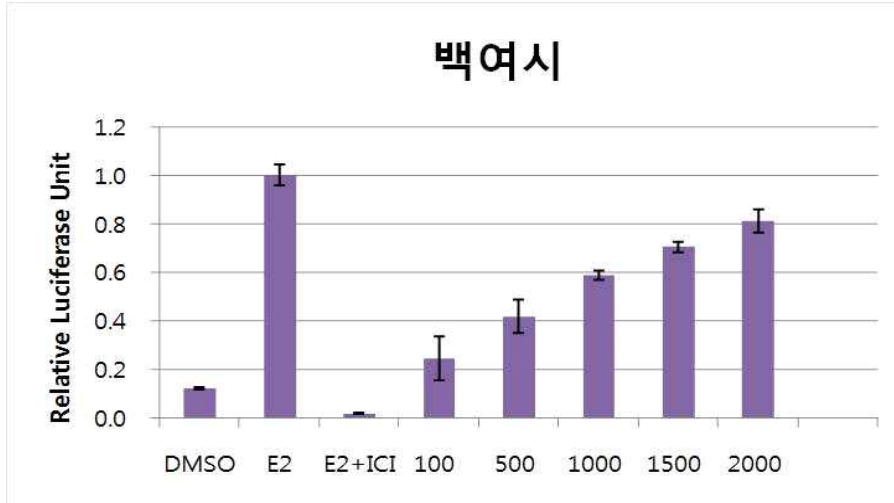
	백년초	여주	시계꽃
원산지	국산	국산	이태리
사용부위	열매	열매	잎
추출방법	열수추출 80%	열수추출 80%	주정추출
성상	갈색, powder	갈색, powder	갈색, powder

- 각 시료의 스톡용액 (Stock solution)은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후 (100 mg/ml), 13,000 rpm, 10 분간 원심분리한 후 그 상층액을 0.45 mm syringe filter를 이용하여 여과하여 불용성물질을 제거하였음. 세포 실험시 DMSO양이 0.2% v/v를 넘지 않도록 스톡용액을 배지에 희석하여 세포에 처리하였음.
- 17 $\beta$ -estradiol (E2)는 Sigma-Aldrich로부터 구매하였으며, ICI 180,782 (ICI)는 Tocris사에서 구매하였음. 이들 약물의 stock 용액 역시 DMSO를 용매로 하여 제조되었음.
- 기타 화학물질, 시약, 용매 등은 Sigma에서 구매하였음.

2. 백여시431의 개별 소재 대비 ER-ERE 경로에 의한 증강적 (Synergistic) 신호전달활성

2.1 MCF-7 세포에서의 Synergistic effect

- 표 1에 따라 개별 및 백여시431소재의 다양한 농도에서의 ERE-luciferase 활성을 검토하였음. 그 결과 개별 소재는 E2에 의한 활성 대비 최고 22%의 활성을 보여주었음. 반면, 백여시431은 2000  $\mu$ g/ml에서 80%까지의 활성을 보여주었음 (그림23).
- 백여시431의 최대활성값이 0.8 (E2 1 nM 대비)일 때, EC<sub>50</sub>값은 475  $\mu$ g/ml임.
- E2+ICI (ER 길항제)의 combination 처리는 본 실험계에서 도출된 활성 값이 ER을 매개로 하는 것임을 보여주는 지표로서 수행함.



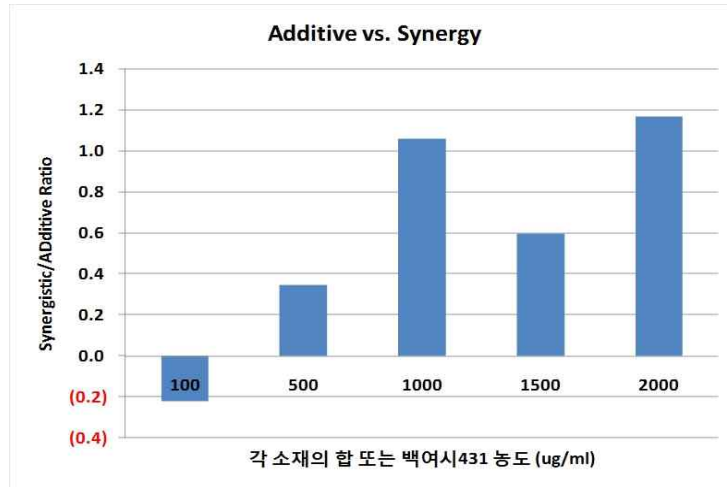
<그림 23. MCF-7 세포에서 백여시431의 ER-ERE 전사활성. 시험물질들의 luciferase 활성은 E2 1 nM이 보여주는 활성을 1로 셋팅한 후 상대적인 값을 보여주고 있음. x-축의 숫자는 농도 (µg/ml)를 의미함. ICI는 ICI-182,780의 약자임.>

- 개별 소재의 각 농도에서의 활성 (luciferase reading 값)과 농도의 합에 해당하는 백여시샘플이 보여주는 활성을 비교하면 아래 표 9와 같음. 백여시 처리가 증강효과를 보여주는 지는 표 9의 3열값 (즉, 증강값)이 양수이며 그 값이 얼마나 큰 가 (마지막 열의 비율값)로 판단가능함. 백여시 처리시 500 µg/ml 농도이상에서 모두 양수의 증강 값을 보여주었으며, 1000 및 2000 µg/ml 농도에서는 증강 값이 약 200%임 (그림24).

표 9. 개별소재 및 백여시 소재의 활성값의 합 비교

세가지 시료 농도합계 (mg/ml)	단독처리시 해당농도에서의 활성의 합 (1 열)	백여시 처리시 해당농도에서의 활성값 (2 열)	증강값 = 2 열 - 1 열 (3 열)	증강값 대비 단순합 비율 (3 열÷1 열)
100	466.49	364.37	(102.13)	(0.22)
500	460.05	619.20	159.15	0.35
1000	423.32	871.13	447.81	1.06
1500	653.35	1043.81	390.46	0.60
2000	553.48	1199.42	645.94	1.17

- 결론적으로 백여시431소재는 MCF-7 세포에서 ER-ERE 전사활성에서 분명한 증강효과를 나타냄.

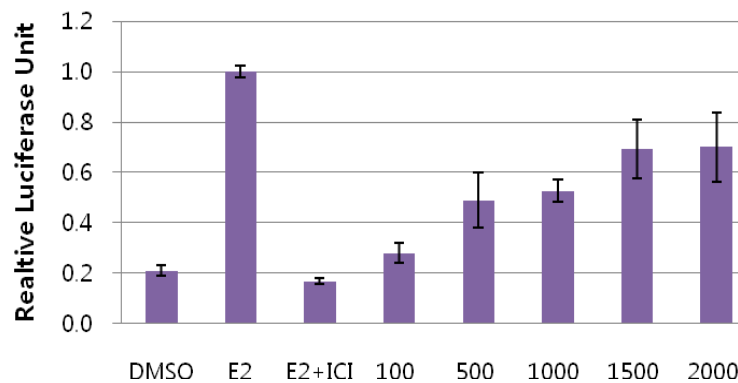


<그림 24. MCF-7세포에서 ERE-ERE 전사활성에 근거한 각 농도의 합에서 도출된 증강효과. 표의 비율값을 표현한 것임. 해당 농도에서 막대가 x-축의 0이상 즉, 양수면에 위치한 경우 증강효과가 있다고 판단함. 막대가 길수록 증강효과 우수하다고 판단함.>

## 2.2 ER $\alpha$ -선택적인 ER-ERE 활성의 Synergistic effect

- 표10에 따라 개별 및 백여시431소재의 다양한 농도에서의 ERE-luciferase 활성을 ER $\alpha$  단백질을 특이적으로 발현하는 HEK293세포에서 검토하였음. 그 결과 개별 소재는 E2에 의한 활성 대비 최고 36%의 활성 (시계꽃 250  $\mu$ g/ml)을 보여주었음. 반면, 백여시431은 1500  $\mu$ g/ml에서 70%까지의 활성을 보여주었음 (그림25).
- 백여시431의 최대활성값이 0.7 (E2 1 nM 대비)일 때, EC<sub>50</sub>값은 125  $\mu$ g/ml임.
- E2+ICI (ER 길항제)의 combination 처리는 본 실험계에서 도출된 활성 값이 ER을 매개로 하는 것임을 보여주는 지표로서 수행함.

## 백여시



<그림 25. ER $\alpha$ 를 선택적으로 발현하는 HEK293 세포에서 백여시431의 ER-ERE 전사활성. 시험물질들의 luciferase 활성은 E2 1 nM이 보여주는 활성을 1로 셋팅한 후 상대적인 값을 보여주고 있음. x-축의 숫자는 농도 ( $\mu$ g/ml)를 의미함. ICI는 ICI-182,780의 약자임.>

- ER $\alpha$ -선택적인 모델에서 백여시431의 증강효과 역시 MCF-7세포주에서의 실험에서와 유사한 방법으로 분석하였음. 아래 표 10는 개별 소재의 각 농도에서의 활성 (luciferase reading 값)과 농도의 합에 해당하는 백여시샘플에 의한 활성값의 증강효과를 계산한 결과를 보여주고 있

음. 백여시 처리시 1500 및 2000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 증강값이 약 200%임.

표 10. 개별소재 및 백여시 소재의 ER $\alpha$ -선택적인 활성값의 합 비교

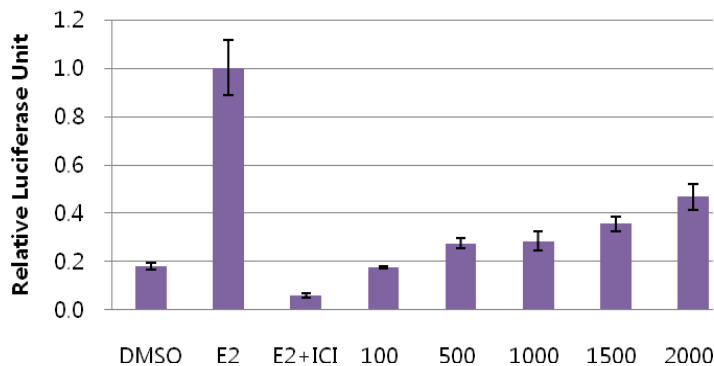
세가지 시료 농도합계 (mg/ml)	단독처리시 해당농도에서의 활성의 합 (1 열)	백여시 처리시 해당농도에서의 활성값 (2 열)	증강값 = 2 열 - 1 열 (3 열)	증강값 대비 단순합 비율 (3 열÷1 열)
100	8282.3	5899.26	(2383.0)	(0.29)
500	11035.7	10339.17	(696.5)	(0.06)
1000	11760.8	11124.18	(636.6)	(0.05)
1500	11941.7	14652.15	2710.4	0.23
2000	12770.3	14812.28	2041.9	0.16

- 결론적으로 백여시431소재는 ER $\alpha$ -선택적인 ER-ERE 전사활성에서 고농도 처리 시 증강효과를 나타냄.

### 2.3 ER $\beta$ -선택적인 ER-ERE 활성의 Synergistic effect

- 표 11 에 따라 개별 및 백여시431소재의 다양한 농도에서의 ERE-luciferase 활성을 ER $\beta$  단백질을 특이적으로 발현하는 HEK293세포에서 검토하였음. 그 결과 개별 소재는 E2에 의한 활성 대비 DMSO 처리시보다 유의미하게 우수한 활성을 보이는 경우가 보이지 않았음. 반면, 백여시431은 2000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50%까지의 활성을 보여주었음 (그림26).
- 백여시431의 최대활성값이 0.5 (E2 1 nM 대비)일 때, EC<sub>50</sub>값은 474  $\mu\text{g/ml}$ 임.
- E2+ICI (ER 길항제)의 combination 처리는 본 실험계에서 도출된 활성 값이 ER을 매개로 하는 것임을 보여주는 지표로서 수행함.

### 백여시



<그림 26. ER $\beta$ 를 선택적으로 발현하는 HEK293 세포에서 백여시431의 ER-ERE 전사활성. 시험물질들의 luciferase 활성은 E2 1 nM이 보여주는 활성을 1로 셋팅한 후 상대적인 값을 보여주고 있음. x-축의 숫자는 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )를 의미함. ICI는 ICI-182,780의 약자임.>

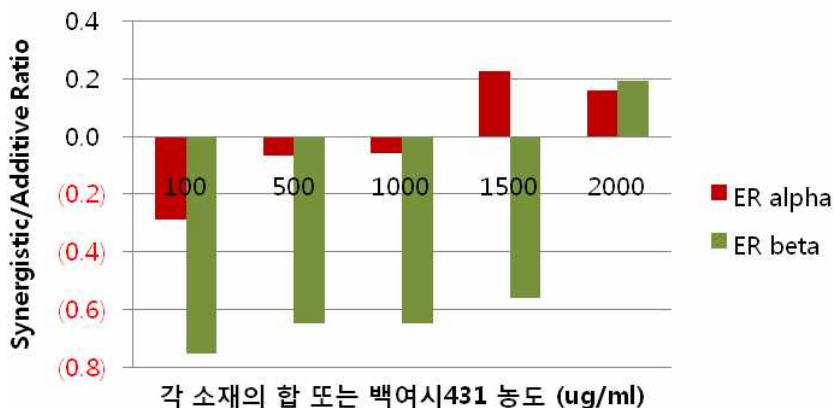
- ERβ-선택적인 모델에서 백여시431의 증강효과 역시 MCF-7세포주에서의 실험에서와 유사한 방법으로 분석하였음. 아래 표 는 개별 소재의 각 농도에서의 활성 (luciferase reading 값)과 농도의 합에 해당하는 백여시 샘플에 의한 활성값의 증강효과를 계산한 결과를 보여주고 있음. 백여시 처리시 2000 µg/ml 농도에서는 증강값이 약 20%임 (그림27).

표 11. 개별소재 및 백여시 소재의 ERβ-선택적인 활성 값의 합 비교

세가지 시료 농도합계 (mg/ml)	단독처리시 해당농도에서 활성의 합 (1 열)	백여시 처리시 해당농도에서의 활성값 (2 열)	증강값 = 2 열 - 1 열 (3 열)	증강값 대비 단순합 비율 (3 열÷1 열)
100	203288.63	51086.12	(152202.5)	(0.75)
500	223268.36	79405.76	(143862.6)	(0.64)
1000	232314.13	82503.16	(149811.0)	(0.64)
1500	234153.82	103264.12	(130889.7)	(0.56)
2000	113728.17	135723.24	21995.1	0.19

- 결론적으로 백여시431소재는 ERβ-선택적인 ER-ERE 전사활성에서 고농도 처리시 증강효과를 나타냄

### Additive VS. Synergistic in HEK-ERα & β



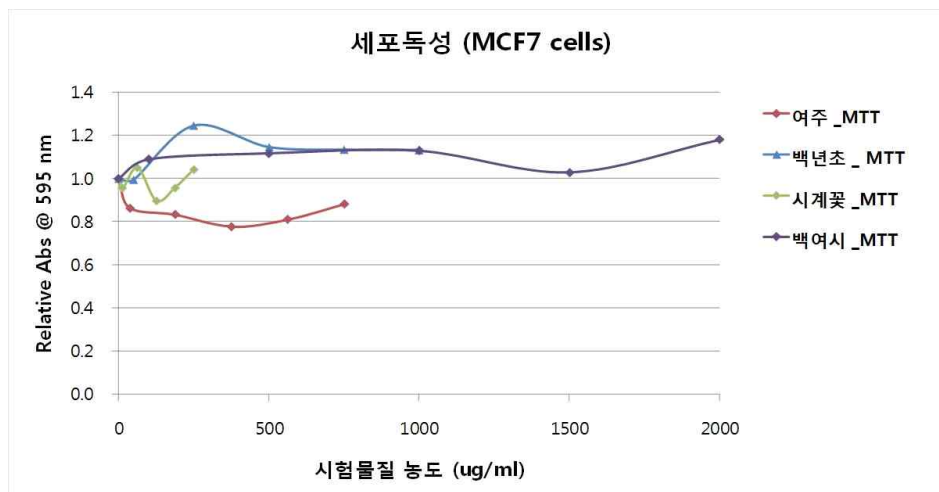
<그림 27. HEK293세포에서 ERα 또는 ERβ-선택적인 ERE-ERE 전사활성에 근거한 각 농도의 합에서 도출된 증강효과. 표 10과 11의 비율값을 표현한 것임. 해당 농도에서 막대가 x-축의 0이상 즉, 양수면에 위치한 경우 증강효과가 있다고 판단함. 막대가 길수록 증강효과 우수하다고 판단함.>

### 3. 백여시 혼합물의 개별 소재 대비 세포독성 고찰

- 표 1에 근거하여 적절한 농도의 단독 및 혼합소재를 활성을 검토했던 세포주모델에서 세포독성을 검토하였음.

### 3.1 MCF-7 세포주에 대한 소재의 세포독성 고찰

- 실험에 사용했던 모든 농도군에서 DMSO (용매대조군) 처리군 대비 유의미한 독성이 관찰되지 않았음 (그림28). 단, 여주의 경우 200 µg/ml 이상에서 약 ~20%에 해당하는 세포독성이 관찰되었음.
- 고농도의 백여시 처리군의 경우 DMSO 대비 1.2배의 세포증식도를 보여주었는데, 만약 유의미한 증식이라면 ER을 경유한 분자적기작의 결과일 수도 있음. 백여시431처리군이 랫드에서의 자궁증식평가실험에서 전혀 활성을 보이지 않은 점 (농기평 3차년도 과제 수행 결과 참조)을 감안하면 백여시의 투여로 인하여 우려될 만한 조직증식을 초래하지 않을 것으로 기대됨.
- MCF-7 세포에 대한 독성은 다양한 기작으로 발현되며, ER를 경유하여 세포증식을 억제할 수도 있으므로, 여주가 나타낸 독성은 물질 자체의 독성일 수도 있으나, ER 조절체로서 암세포의 증식을 억제하는 유익한 효과일 수도 있음. 여주의 세포독성의 분자적 기작은 추후에 검토해야 함.

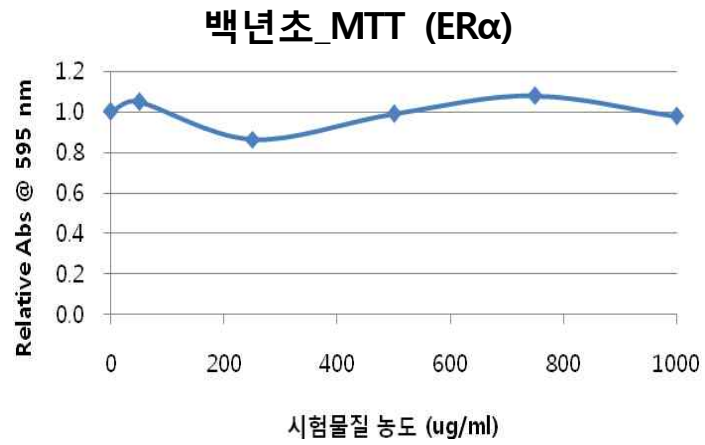


<그림 28. 단독 및 혼합 소재의 MCF-7세포에 대한 독성. MCF-7 세포에 시험물질을 처리하고 24시간 후 세포의 살아있는 정도를 MTT dye를 이용하여 측정하였음.>

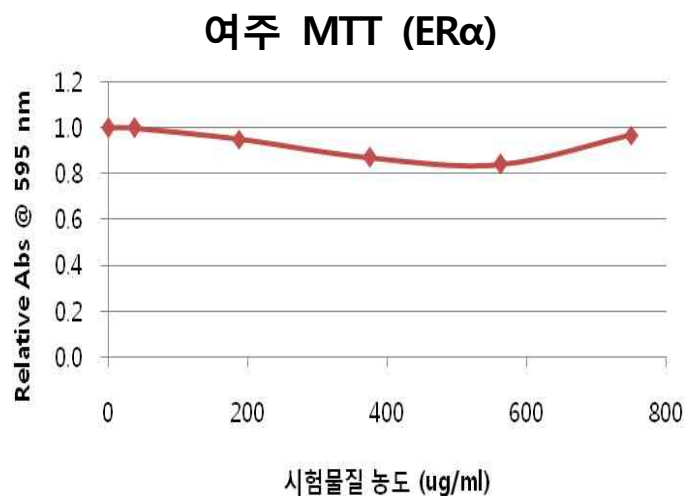
### 2.2 ER $\alpha$ -선택적인 HEK293 세포주에 대한 소재의 세포독성 고찰

- 고농도의 여주 처리군 및 백여시의 모든 농도 처리군에서 약 20~30%에 해당하는 세포독성을 보여주었음. 백년초 및 시계꽃의 경우 유의미한 독성을 보여주지 않음 (그림 29A~D).

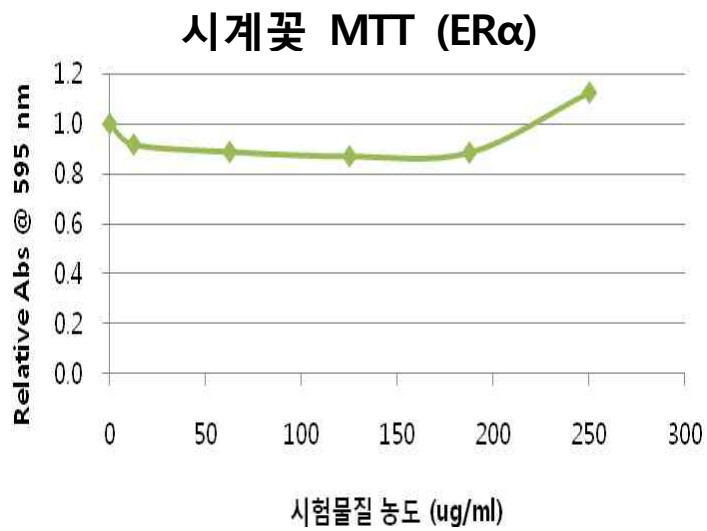
A



B

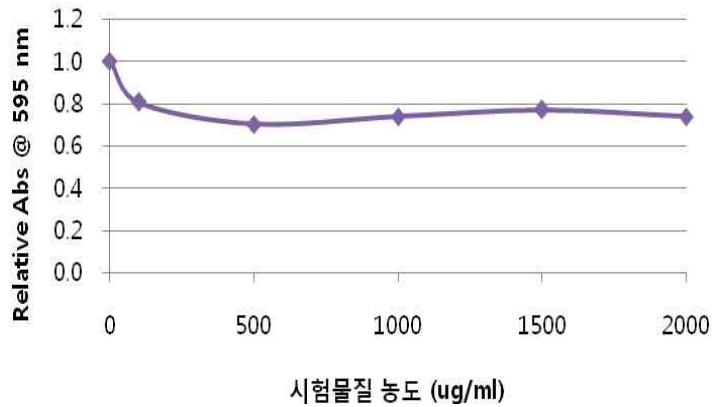


C



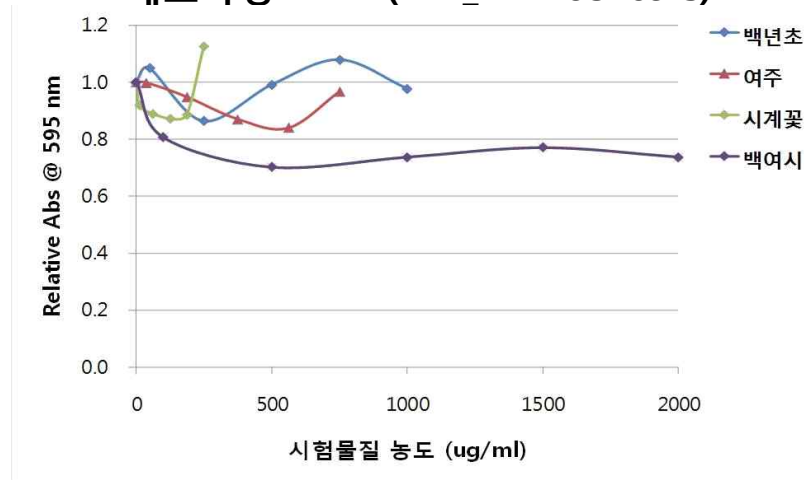
D

### 백여시 MTT (ER $\alpha$ )



E

### 세포독성 MTT (ER $\alpha$ \_HEK293 cells)



<그림29. 단독 및 혼합 소재의 ER $\alpha$ -선택적인 HEK293세포에 대한 독성. HEK293 세포에 시험물질을 처리하고 24시간 후 세포의 살아있는 정도를 MTT dye를 이용하여 측정하였음>

- 본 실험 결과로부터 여주의 세포증식방지 활성이 유의한 점이 있는지는 추가 연구를 통해서 밝혀내야 할 것임.
- 백여시의 세포독성이 ER $\alpha$ 를 경유한 것인지에 대한 고찰이 추가적으로 필요하나, HEK 세포주가 암세포가 아닌 것을 감안할 때, 백여시의 세포독성이 ER $\alpha$ 를 경유하며 세포 증식효과를 보이지는 않음을 예측할 수 있음.

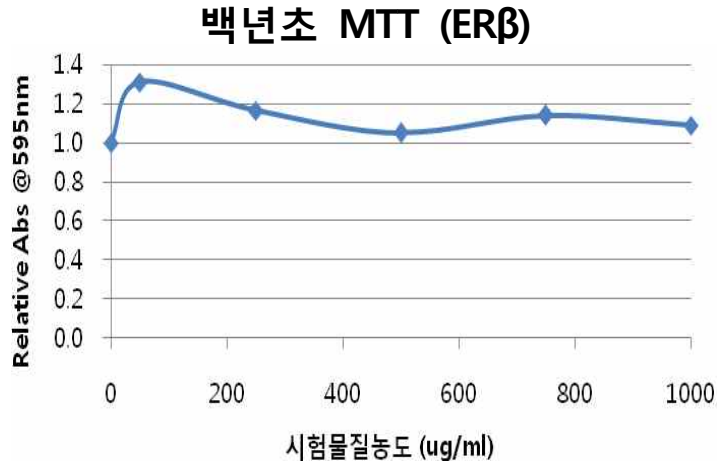
### 2.3 ER $\beta$ -선택적인 HEK293 세포주에 대한 소재의 세포독성 고찰

- 여주 처리군의 경우 농도-반응 관계의 경향 없이 약 30%의 세포독성이 관찰되었음 (그림30B). 이는 MCF-7 세포 및 ER $\alpha$ -HEK293 세포에서 일관되게 나타난 세포증식 억제 활성을 시사하고 있음.
- 백년초 및 백여시 처리군의 경우 20% 이상의 세포증식 또는 독성을 보여주지 않았음 (그림30A, D). 반면, 시계꽃의 경우 저농도에서 세포독성이 약 30% 이상 관찰되었음 (그림30C). 시계꽃이 다른 세포모델에서는 세포독성을 보여주지 않았음을 감안하면 시

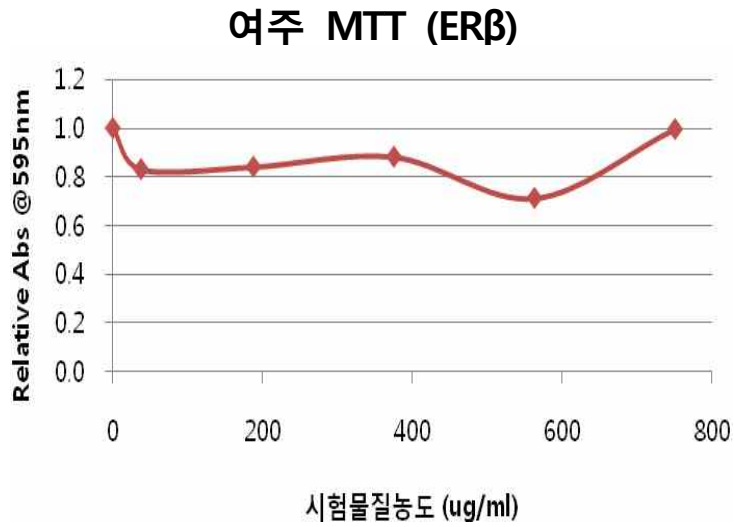


계꽃 추출물의 ER $\beta$ 와 연관된 세포독성의 분자적 기전은 추가로 살펴볼 가치가 있음.

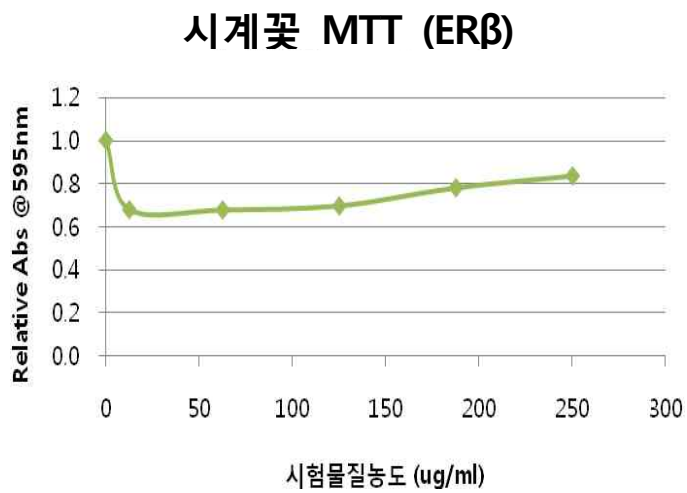
A



B

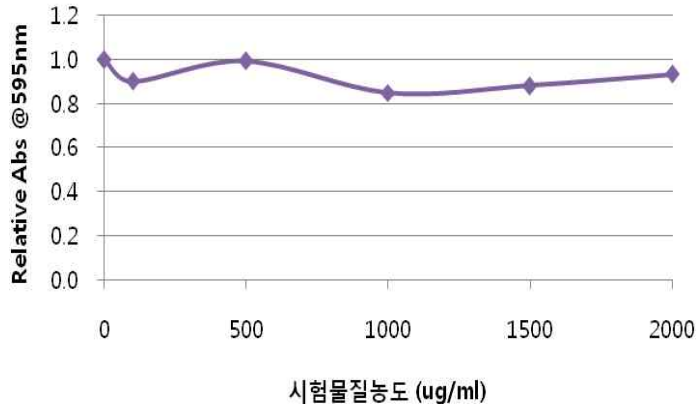


C

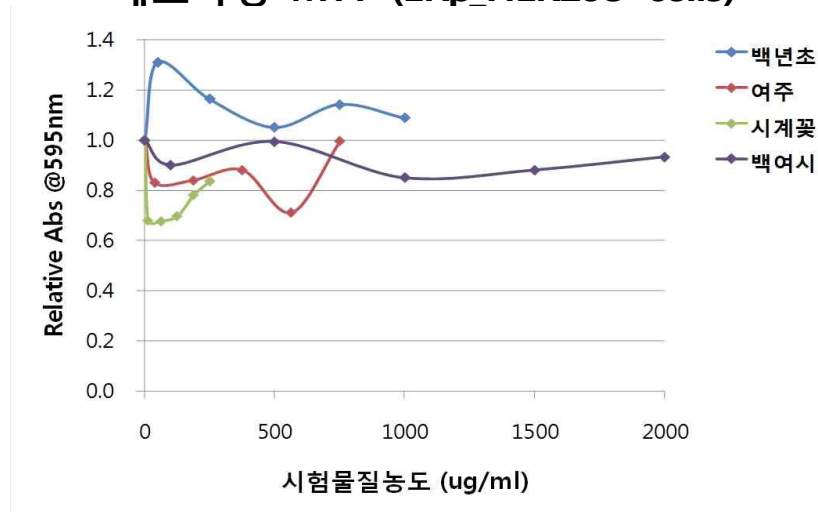


D

### 백여시 MTT (ERβ)



### 세포독성 MTT (ERβ\_HEK293 cells)



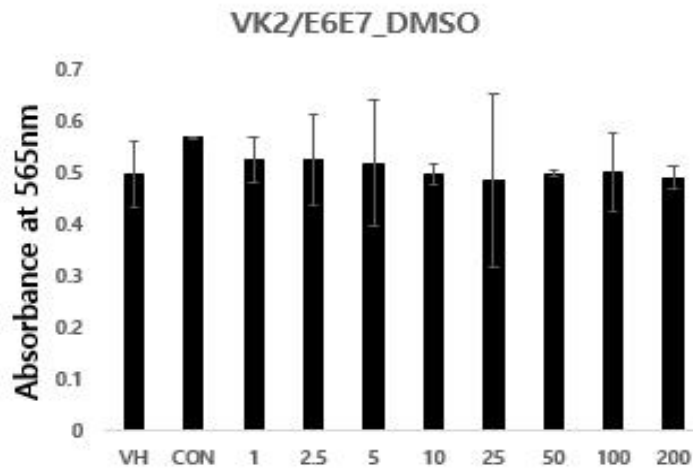
<그림 30. 단독 및 혼합 소재의 ERβ-선택적인 HEK293세포에 대한 독성. HEK293 세포에 시험물질을 처리하고 24시간 후 세포의 살아있는 정도를 MTT dye를 이용하여 측정하였음>

- 본 실험 결과로부터 여주의 세포증식방지 활성이 유의한 점이 있는지는 추가 연구를 통해서 밝혀내야 할 것임.

#### ◦ 정상 질 세포주 (VK2/E6E7)의 안정적인 배양

- : 사람 질세포주로서 VK2/E6E7 세포주를 사용함. 질 세포를  $8.5 \times 10^5$  cells/well,  $\phi$  100 dish에 seeding함. 이때, charcoal처리한 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 DMEM 배지 (이하, estrogen-free media)를 사용하여 배양함. DMEM 배지에는 keratinocyte serum-free medium (KSFM), bovine pituitary extract (BPE), epidermal growth factor (EGF), calcium chloride, gentamycine과 같은 supplement가 포함되어 있음. 세포주는 5% CO<sub>2</sub>가 포함되어있는 세포배양기에서 배양되어 짐.
- : 24 ~ 72 시간 배양 후 배양액을 제거한 후 DPBS로 세척한 후 배지를 교체해 줌.
- : 배지를 교체해 준 후 24~72시간 배양 후 세포 증식을 위해 새로운  $\phi$  100 dish에 세포의 대를 이어 배양함.
- : 위와 같은 방법으로 계속 계대 배양을 해 주며 안정적인 배양법을 확보함.

- 폐경 후 위험도가 높아지는 방광암세포주(T24)과 난소암세포주(SKOV3) 안정적인 배양
  - : 한국세포주은행에서 분양받은 인체에서 유래한 방광암 세포주 T24 세포주를 사용함. 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하며 phenol-red 미첨가 RPMI-1640배지를 사용하여 배양함. 세포주는 5% CO<sub>2</sub>가 포함되어있는 세포배양기에서 배양되어 짐.
  - : 24 ~ 72 시간 배양 후 배양액을 제거하고 DPBS로 세척한 후 배지를 교체해 줌.
  - : 배지를 교체해 준 뒤에 24~72시간 배양 후 세포 증식을 위해 새로운 ϕ100 dish에 세포의 대를 이어 배양함.
  - : 위와 같은 방법으로 계속 계대 배양을 해 주며 안정적인 배양법을 확보함.
- 세포기반 독성 및 암예방활성 평가
  - : 세포를 약 5,0000/well의 농도로 96-well plate에 seeding 한 뒤 24시간 후 DMSO (<0.5%), sorafenib (100 nM), DMSO에 녹인 후보물질/시제품 (복합추출물, 넓은 농도 범위)을 배양액에 첨가함.
  - : 24 시간 배양한 뒤 배양액을 제거한 후 MTT (0.4 g/ml, PBS) 40 ml를 첨가한 후 세포배양기에서 약 4시간 동안 배양시킴.
  - : 용액을 제거한 후 세포층에 DMSO 100 ml를 첨가하고 약 30분간 교반함.
  - : DMSO에 세포가 터지고 녹아져 나온 MTT의 대사체를 565 nm 흡광도를 측정하여 정량함
  - : 정상 질 세포주 VK2/E6E7에서 MTT dye를 이용한 assay로 24시간 처리에 대한 세포증식효과와 폐경 후 위험도가 높아지는 방광암 세포주 T24에서 세포독성을 검토하였음.



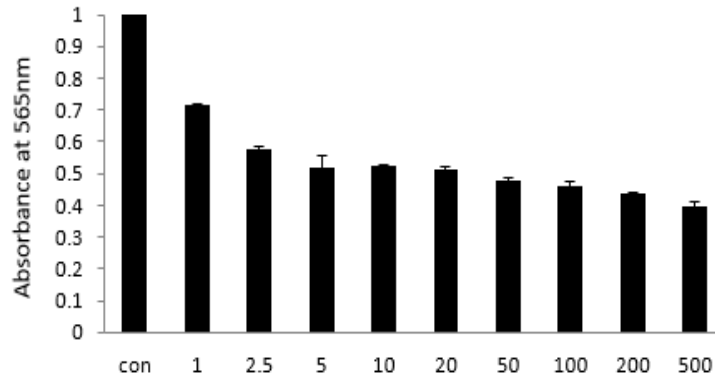
<그림 31. 복합추출물의 세포증식효과 >

\*DMSO, Control, 복합 추출물 (1~200 mg/ml), VK2/E6E7 세포에 처리한 후 24 시간 후에 처리되었음

#### 4. 백년초, 여주, 시계꽃 각 추출물 3종 및 백여시431의 농도의존적 ER-ERE 전사활성 고찰

- 각 소재의 농도 의존적 ER-ERE 전사활성을 고찰하기 위하여 MCF-7 및 HEK (ER $\alpha$  및 ER $\beta$  단백질 과발현 시스템)세포주에서 시험물질을 처리하였음.
- 시험물질의 농도는 10 ~ 1000  $\mu$ g/ml를 사용함.
- 세포내 전사활성은 DMSO 처리군을 1.0으로 셋팅하였을때의 fold로서 상대값을 표현하였음.

## T24\_DMSO

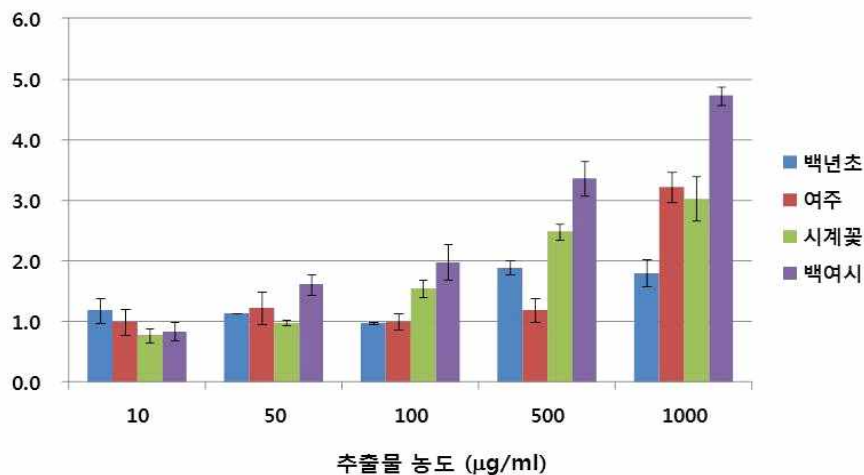


<그림 32. 복합추출물의 세포독성효과 >

\*DMSO, Control, 복합 추출물 (1~200 mg/ml), T24 세포에 처리한 후 24 시간 후에 처리되었음

### 4.1 MCF-7 세포에서의 농도의존적 ER-ERE 전사활성 고찰

- 백년초 및 여주 단독 처리시 전체 농도군에서 유의할 만한 전사활성을 보이지 않았음. 반면 시계꽃의 경우 100  $\mu\text{g/ml}$ 이 넘는 농도에서 약 1.5 배가 넘는 활성을 보이고 또한 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 3배의 활성을 보여줌 (그림33).
- 백여시431의 경우 역시 100  $\mu\text{g/ml}$ 이 넘는 농도에서부터 전사활성을 보여주었으며, 고농도인 1000  $\mu\text{g/ml}$  에서 4배의 활성을 보여주었음. 이는 모든 시료를 통틀어 고찰할 때, 가장 높은 활성을 보여준 것임.
- 농도 500 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 백여시431의 상승효과가 뚜렷이 관찰됨.



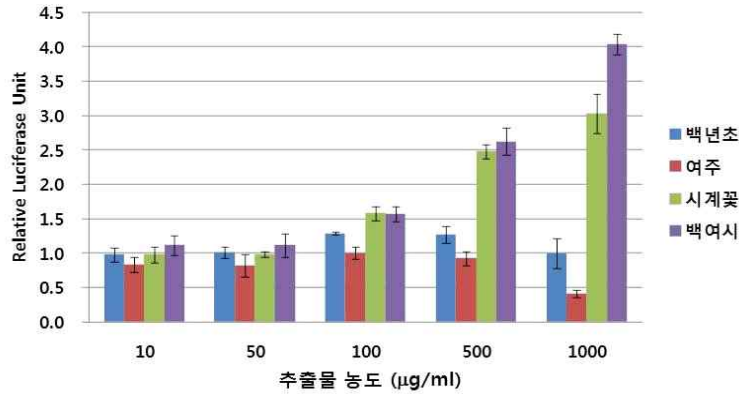
<그림 33. 단독 및 혼합 소재의 MCF-7 세포에서의 농도의존적인 전사활성. 실험 방법은 위에 기술한 바와 같으며, 본 실험은 네 가지 소재 모두 동일 농도를 사용한 것임.>

### 3.2 개별 소재의 ER $\alpha$ -선택적인 농도의존적인 전사활성

- ER $\alpha$  발현 플라스미드를 transfection시킨 HEK 세포주에서 각 소재의 ER $\alpha$ -선택적인 전사활

성을 관찰하였음.

- MCF-7 세포주에서의 결과와 유사하게 백년초 및 여주 단독 처리시 유의할 만한 전사활성을 보이지 않음 (그림34). 주목할 만한 것은 고농도의 여주 (1000  $\mu\text{g/ml}$ )에서 전사활성이 거의 ER antagonist 처리와 비슷한 수준으로 떨어짐. 이것이 여주의 ER antagonist 성질 때문인지 2.2에서 보여진 세포독성 때문인지 추가 고찰이 필요함.
- 시계꽃 및 백여시431의 경우 500  $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 2.5배 이상의 전사활성을 보이며, 역시 MCF-7 세포주에서의 결과와 유사하게 백여시431의 활성이 시계꽃의 활성보다 우월함을 보여줌. 특히 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 백여시431은 4배와 시계꽃은 3배의 활성을 보여줌.

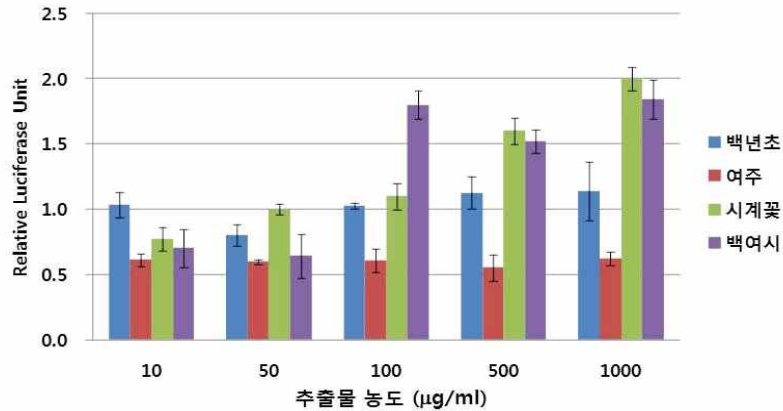


<그림 34. 단독 및 혼합 소재의 ER $\alpha$ -선택적인 농도의존적 전사활성. 실험 방법은 위에 기술한 바와 같으며, 본 실험은 네 가지 소재 모두 동일 농도를 사용한 것임.>

농도 500 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 백여시431의 상승효과가 뚜렷이 관찰됨.

### 3.3 개별 소재의 ER $\beta$ -선택적인 농도의존적인 전사활성

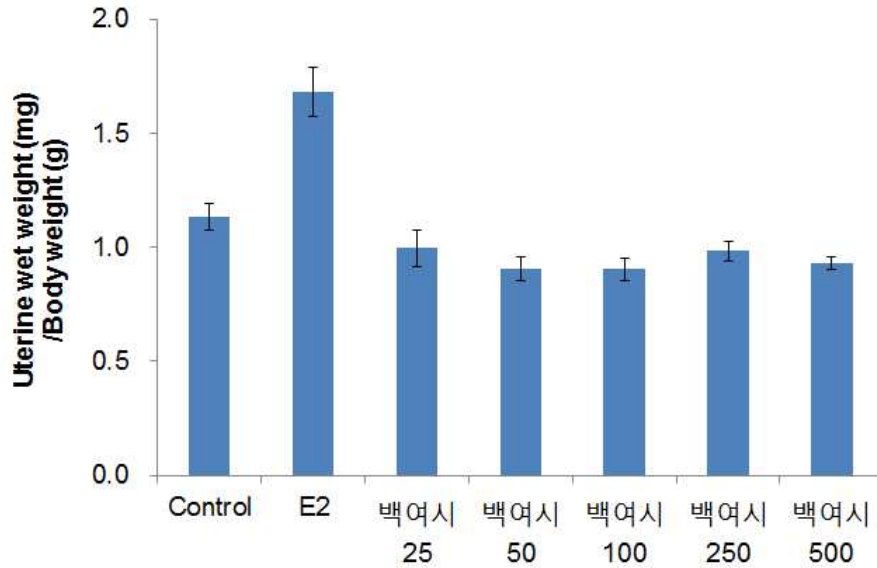
- ER $\beta$  발현 플라스미드를 transfection시킨 HEK 세포주에서 각 소재의 ER $\beta$ -선택적인 전사활성을 관찰하였음.
- 시계꽃의 경우 500  $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 1.5 배 이상의 전사활성을 보임. 다른 단독 소재는 유의할 만한 활성을 보이지 않으며, 여주의 경우 MCF-7이나 ER $\alpha$ -HEK 세포에서처럼 감소활성을 보여주지는 않았음 (그림35).
- 백여시431의 경우 100  $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유의할만한 전사활성을 보여주었으며, 그 이상의 고농도에서도 더 높은 활성을 보이지 않은 것으로 보아 maximum efficacy 값을 보여주는 농도는 100  $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 사료됨.
- 농도 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 백여시431의 상승효과가 뚜렷이 관찰됨.



<그림 35. 단독 및 혼합 소재의 ERβ-선택적인 농도의존적 전사활성. 실험 방법은 위에 기술한 바와 같으며, 본 실험은 네 가지 소재 모두 동일 농도를 사용한 것임.>

#### 5. 백여시431의 랫트에서 자궁증식 효과

- 동물시험기관승인번호: SMWU-IACUC-1612-040
- 14일령 미성숙SD 랫트 (암컷)를 구입하고 케이지에 어미랫트 1마리에 미성숙 랫트 10마리씩 넣어 1주간 적응기간을 둠.
- 21일령 미성숙랫트를 Control (PBS투여군), E2 투여군, 백여시431추출물 투여군 (각각 25, 50, 100, 250, 500 mg/kg 투여) 으로 군당 5-7마리가 되도록 나눔.
- 실험결과에 영향을 주지 않도록 phytoestrogen이 제한된 사료 (Harlan 2020X Teklad Global Soy Protein-Free Extruded Rodent Diet)를 투여함.
- 3일 동안 Control군에는 PBS 1 ml/kg, E2 투여군에는 corn oil에 녹인 E2 3 µg/kg, 백여시431추출물 투여군에는 PBS에 녹인 백여시 추출물 25, 50, 100, 250, 500 mg/kg을 각각 피하주사 (S.C. injection)한다. 이때, 랫트의 체중을 매일 측정하여 정량의 성분이 투여될 수 있도록 함.
- 3일간의 피하주사가 끝나면 24시간 동안 금식을 시킨 후, CO<sub>2</sub> 챔버에서 안락사를 시킨다.
- 안락사 시킨 랫트의 복부를 절개하고 자궁과 난소를 적출한뒤, 난소와 지방을 제거하고 자궁의 무게를 측정함.
- 자궁증식정도는 자궁무게 (mg)을 몸무게 (kg)으로 나눈 값을 사용함.
- 3일간 피하투여 후 자궁중량/체중량의 상대값을 투여군마다 산출하여 대조군 (Control; PBS투여군)과 비교함.
- E2 (3 µg/kg/d) 투여군은 Control군에 비하여 자궁 무게가 약 1.48배 증가함. 백여시추출물 (25, 50, 100, 250, 500 mg/kg/d) 투여군은 Control군 대비 자궁무게가 0.8배로 Control군과 비슷한 수준으로 측정됨. 따라서, 백여시 추출물은 모든 투여 용량군에서 자궁증식을 나타내지 않음을 보여줌.



<그림 36. 백여시추출물의 미성숙 랫트에서 자궁증식효과. 미성숙 랫트에 시험물질을 3일간 피하투여한 후, 5일째에 자궁을 적출하여 그 무게를 측정함. Control: PBS 투여군, E2: E2 투여군, 백여시431추출물 투여군. 백여시 옆의 숫자는 mg/kg 단위의 투여용량을 의미함.>

#### ○ OVX 동물 모델을 활용한 폐경이행기 개선 효능

<주관기관 : KCL 기관에서 수행>

✓ 본 시험은 시험물질 백년초, 여주 및 시계꽃 혼합물을 난소적출 랫트 동물모델에 4주 반복 경구 투여하였을 때 나타나는 초기 갱년기 (폐경이행기) 증상 완화를 조사하기 위하여 본 시험을 실시함. 8주령의 랫트에 난소를 적출 후 약 9일간의 회복기간을 두고 시험물질을 50, 150 및 450mg/kg 용량으로 시험군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였음. 4 주 반복투여에 의한 사망률, 임상증상, 체중변화, 골밀도, 혈액생화학적 검사, 뇌신경 전달 물질 측정, 혈중 NO, eNOS 및 호르몬 측정 자궁 조직내 p-Akt, p-ERK 활성 측정 및 장기중량 측정을 실시함.

##### 1) 일반증상 및 사망률

- 실험기간 동안 모든 투여군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음

##### 2) 체중변화

- 체중측정결과, 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않았음

##### 3) 혈액생화학적 검사

- 혈액생화학적 검사결과, 시험물질 투여군에서 ALP (alkaline phosphatase) 수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가함 ( $P < 0.01$ ). ALP 수치는 골형성 과정에서 조골세포의 활성도를 반영하는 대표적인 지표 중 하나로 조골세포는 골 기질의 형성과 무기질화 (mineralization)에 주된 역할을 함. 또한, 시험물질 투여군에서 HDL-cholesterol이 증가하는 경향을 보임. 이는 갱년기 여성의 경우 여성 호르몬의 변화로 중성지방, LDL-cholesterol을 증가시키고 HDL-cholesterol을 감소시킴으로써 심혈관질환을 증가시키는 것으로 보고됨.

$\beta$ -estradiol 투여 그룹의 중성지방의 경우 급격하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었음. 추출 혼합물을 섭취시킨 그룹에서 오히려 감소하는 경향을 확인 할 수 있었음.

검사 항목	Negative	OVX	OVX + Low	OVX + Mid	OVX + Hight	OVX + 17 β-estradiol
ALP (IU/L)	208 ± 58	197 ± 43	245** ± 41	265** ± 43	301** ± 30	144 ± 52
IP (mg/dl)	6.9 ± 0.8	6.9 ± 0.3	6.9 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.3 ± 0.4	6.4 ± 0.8
TG (mg/dl)	36 ± 18	37 ± 13	30 ± 12	28 ± 5	28 ± 7	64 ± 22
HDL	24 ± 3	22 ± 4	25 ± 3	24 ± 2	24 ± 3	29 ± 3
LDL	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1

4) 뇌신경전달물질의 정량분석

- 뇌신경전달물질인 Serotonin과 Norepinephrine 측정결과, 150 mg/kg/day 투여군에서 Norepinephrine가 증가하는 경향을 보임.

검사 항목	Negative	OVX	OVX + Low	OVX + Mid	OVX + Hight	OVX + 17 β-estradiol
Serotonin (ng/mL)	305.55 ± 86.47	352.16 ± 65.04	325.18 ± 106.24	331.59 ± 98.77	367.82 ± 56.31	307.71 ± 42.73
Norepinephrine (pg/mL)	457.15 ± 90.53	458.08 ± 57.20	1425.37 ± 179.13	461.76 ± 42.73	517.47 ± 99.26	594.38 ± 91.32

5) 혈중 NO 및 eNOS 측정

- 혈중 NO 및 eNOS 측정 결과, 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않음.

6) 혈중 호르몬 측정

- 혈중 E2 (estradiol), FSH (follicle stimulating hormone), LH (luteinizing hormone) 측정 결과, 시험물질 투여군에서 통계학적으로 유의한 결과는 관찰되지 않음

7) 자궁 조직내 p-Akt, p-ERK 활성 측정

- 자궁 조직내 p-Akt, p-ERK 활성 측정 결과, 시험물질 투여군에서 p-Akt, p-ERK 활성도가 증가하는 경향을 보임.

8) 장기중량 측정

- 장기중량 측정 결과, 50 및 150 mg/kg/day 투여군에서 자궁의 상대장기 중량수치가 부형제 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가함 (P<0.05).

※ 본 결과를 바탕으로 본 시험 조건에서 난소적출 랫트 동물모델에 시험물질인 백년초, 여주 및 시계꽃 혼물을 4주 반복 경구투여하였을 때 조골세포의 활성도를 높이는 ALP 수치 및 자궁의 상대장기 중량이 통계학적으로 증가하였고, 심혈관질환의 감소에 관여하는 HDL-cholesterol 수치, Norepinephrine 수치 및 자궁세포의 Akt, ERK 인산화 활성이 증가하는 경향이 관찰되었음. 따라서, 백년초, 여주 및 시계꽃 혼합물은 초기 갱년기 (폐경이행기) 증상완화에 미약하게 도움이 되는 것으로 판단됨.

○ 에스트로겐 수용체 베타 활성 효능을 가지는 추출물의 시제품 제작

- 캡슐제제



- 원료 청량, 젤라틴 피막 제조, 내용 제조, 연질 캡슐 성형, 1차 건조, 2차 건조 및 선별
- 규격

[표 12. 임상시험용 주약 배합비]

성분명	배합비(%)	함량(mg)	기능성분 함량
백년초 추출물 분말	49.4510	180.00	360
여주 추출물 분말	37.0880	135.0003	270
시계꽃 추출물 분말	12.3630	45.0013	90
스테아린산마그네슘	1.0980	3.9967	
합 계	100	364.	720

- 섭취량 : 1일 1회, 1회 2캡슐
- 섭취방법 : 2캡슐을 물과 함께 섭취

[그림 37. 건강기능식품 제형 및 제품]



분말/과립



액상



유동층 과립



경질캡슐



연질캡슐



정제

[그림 38. 생산시스템의 자동화]



PTP포장



스틱설비



액상충전기



정제선별기



연질캡슐성형기



자동병충전기

○ 원료의 유해물질 검사진행

- 식품 유해물질 공인 검사 성적서 발행.
- 잔류농약, 중금속 및 미생물 등을 포함한 유해물질을 식품의약품안전처의 공식 공인 기관인 한국기능식품연구원에서 확인 함.
- 총 65가지의 잔류농약, 중금속 및 미생물의 불검출 및 음성을 판정 받음.

**검사 성적서**

제 D2016070375 호

검체명	백년초/여주/시계꽃혼합추출물	분석일자 (유효기간)	2016-07-18
의뢰인	(주)내추얼에프엔피 서울 송파구 새암로 152 내추얼빌딩		
제주번호	본지점	접수년월일	2016-07-06
원시분석목적	잔류농약	검체접수번호	D2016070375

귀하가 우리 연구원에 감사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
Diniconazole(mg/kg)	불검출	김용수
DDT(mg/kg)	불검출	김용수
Dicofol(mg/kg)	불검출	김용수
Dichlorvos(mg/kg)	불검출	김용수
Malathion(mg/kg)	불검출	김용수
Methomyl(mg/kg)	불검출	장태석
Methoxyfenozide(mg/kg)	불검출	장태석
Methidathion(mg/kg)	불검출	김용수
Boscalid(mg/kg)	불검출	장태석
BHC(mg/kg)	불검출	김용수
Bifenthrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cypermethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Cyproconinil(mg/kg)	불검출	김용수
Cyhalothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Acetamiprid(mg/kg)	불검출	장태석
Azoxystrobin(mg/kg)	불검출	장태석
Atrazine(mg/kg)	불검출	김용수
Ethion(mg/kg)	불검출	김용수
Endosulfan(mg/kg)	불검출	김용수
Imazalil(mg/kg)	불검출	김용수
Isoptrethionone(mg/kg)	불검출	김용수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	장태석
Carbofuran(mg/kg)	불검출	장태석
Captan(mg/kg)	불검출	김용수

**검사 성적서**

귀하가 우리 연구원에 감사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Toctifos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizol(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamectox(mg/kg)	불검출	장태석
Parathion(mg/kg)	불검출	김용수
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Petahmel(mg/kg)	불검출	김용수
Penitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Phenothate(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Procymsid(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenfos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	장태석
Flufenoxuron(mg/kg)	불검출	장태석
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	장태석
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	김용수
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수
배관수(g)	230/g	이경미
대장균	음성	이경미

**검사 성적서**

귀하가 우리 연구원에 감사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사관련 총 책임자 김 원 희

시험항목	결과	검사담당자
납(mg/kg)	0.0296mg/kg	유미진
카드뮴(mg/kg)	0.0146mg/kg	유미진
중수소(mg/kg)	불검출	조용
중비소(mg/kg)	0.0205mg/kg	유미진

2016년 7월 12일  
한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsl.re.kr> 전화: 02-6400-0400-1

○ 원료의 영양성분 검사 성적서

일반 검사 시험 성적서			
발급번호	영양2016-000015-2	접수번호	영양2016-000015
검체명	백년초추출건조분말(3차)	검사목적	내부참고용
업체명	(주)안동축마	대표자명	김숙희
소재지	경북 안동시 풍산읍 매곡리 1139, 경북바이오벤처프리지202호		
접수일자	2016년02월02일	검사완료일	2016년02월18일
참고사항	1. 본 성적서는 시용항목에 한하며, 검사목적 이외의 법적소용, 청정성전 및 상업적 불도 등 기타 목적으로 사용될 수 없습니다. 2. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며, 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.		
분석항목 및 분석결과			
분석항목	분석결과	표준오차율(WRSO)	비고
1) 열량	389.55 kcal	-	
2) 탄수화물	94.42 g/100g	-	
3) 당류	7.05 g/100g	-	
4) 단백질	0.47 g/100g	-	
5) 지방	1.11 g/100g	-	
6) 포화지방	0.00 g/100g	-	
7) 트랜스지방	0.00 g/100g	-	
8) 콜레스테롤	0.00 mg/100g	-	
9) 나트륨	91.59 mg/100g	-	
10) 수분	2.88 %	-	
11) 회분	1.12 %	-	
2016년 02월 18일 <b>재단법인 경북바이오산업연구원</b> www.oib.co.kr (주) 760-390 경북 안동시 승정동 영동로 1486-18 (1315) 5A Tel) 054-850-6915-16 Fax 054-850-6999			

○ 원료 품목제조신고

발급번호 : 12VC-PHOT-M2ER-3060-7X28		
식품(식품첨가물) 품목제조보고서		
보고인	성명(법인명) 문지성	생년월일(법인번호) 1982년 05월 07일
	주소 충청북도 청주시 청원구 양청송대길 39	전화번호 휴대전화
영업소	명칭(상호) (주)네추럴에프앤피	
	소재지 충청북도 청주시 청원구 양청송대길 39	
제품정보	식품의 유형	기타가공품
	제품명	백여시혼합분말
	유통기한	제조일로부터 24개월
	품질유지기한	
	원재료 또는 성분명, 배합비율	맛장애 기재
	용도 용법	맛장애 기재
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기재
표장방법 및 포장단위	표장방법: 내면 PE 포에 일봉 포장한 추 포장 단위별은 박스 포장한다. / 포장단위: 500g, 1kg, 2kg, 3kg, 5kg, 10kg, 20kg, 30kg, 40kg 등	
성상	분홍색 분말	
고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ] O [ ] 아니요 [ ] 해당 없음	
기타		
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.		
2016년 12월 12일 보고인 문지성		
충청북도 청주시장 귀하		
품목보고번호	20040415081-311	
처리부서	복지교육국 위생정책과	처리자성명
	박종하	처리일자
		2016년 12월 12일

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	기타가공품 [ 백년초추출 건조분말 ]	50%
2	기타가공품 [ 여주추출 건조분말 ]	37.5%
3	시계꽃추출물 [ 분말 ]	12.5%
용도용법	일반식품 또는 건강기능식품의 원료로 적당량 사용한다.	
보관방법 및 포장재질	직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오. AL 또는 지디(내면PE)분투	

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.



○ **시제품 임상시험을 통한 안전성 확보 및 효능 규명**

◦ **안전성 확보 및 효능 규명을 위한 임상시험설계**

: 연구 대상군 선정

- 총 64명 (총 78명의 대상자가 참여하여 스크리닝 검사에서 10명이 탈락, 68명의 대상자만이 2차 방문에 진행되었고 4차 f/u 시 중간 탈락자 4명이 발생하여 최종 64명의 대상자만이 연구를 진행하였음.)

: 스크리닝 검사 탈락자

- 총 10명 (사유 - 간수치 이상 :5명 , 호르몬 수치상 폐경수치 아님 :5명)

: 3차방문후 탈락자

- 총 4명 (사유 - 몸이 붓는 증상:2명, 눈 가려움 및 충혈: 1명, f/u loss: 1명)

**선정기준**은 다음과 같음.

(1) 만 45세 이상의 여성

(2) 혈청estradiol농도가30 pg/mL 미만이면서 FSH농도가 30 mIU/mL 이상인 자,

(3) 12개월간 자발적인 무월경 혹은 자궁절제술을 받았거나 받지 않은 양측 난소절제술 후6주가 경과한 여성,

(4) Kupperman지표점수가 20점 이상인 피험자,

(5) 본 임상시험에 서면으로 동의한 자

◦ **실험 디자인**

선정된 시험약(임상약 혹은 위약)을 연구 대상자에게 12 주간 투약하였음.

◦ 섭취량: 1 일 1 회, 1 회 3 캡슐

◦ **임상 실험Flow**

각 대상자에서 치료약물의 복용은 추적 방문마다 조사하였음.

(1) 1 차 방문

- 첫 방문은 임상시험 시작 1주일전 이내에 시행되었으며, 피험자 서면동의서 취득, 기초정보, 신체검사, 과거병력, 생체징후, 임상실험검사, Kupperman 지표검사, 질 성숙지수(vaginal maturation index, VMI) 검사를 시행함.

(2) 2 차 방문

- 두번째 방문은 첫 번째 방문 시 시행한 검사들이 본 연구의 선정기준에 합당한 환자만을 대상으로 시행됨.

- 병용약물을 확인하고 임상 시험 제품을 처방함.

(3) 3 차 방문 또는 전화 확인

- 세번째 방문은 실험 시작 6 주후 시행되었으며 생체징후, 신체검사, 이상반응 확인, 순응도 확인을 시행함.

(4) 4 차 방문

- 마지막 방문은 실험 시작 12 주후 진행되어 생체징후, 신체검사, 임상실험 검사, kupperman 지표검사, 질 성숙지수(vaginal maturation index, VMI) 검사, 이상반응 확인, 순응도 확인이 진행됨.

◦ **관찰 항목/임상 검사항목 및 관찰검사방법**

(1) Kupperman Index

- Kupperman 지표는 안면홍조, 진땀, 불면증, 신경과민, 우울증, 현기증, 집중력저하, 관절통, 두통,

가슴 두근거림, 질 건조감에 대하여 각각 증상 없음(0 점), 미약(1 점), 보통(2 점), 심함(3 점)으로 나누어 안면홍조는 4 점의 가중치, 진땀, 불면증, 신경과민은 2 점의 가중치, 나머지는 1 점의 가중치를 두어 총 51 점으로 이루어짐.

- Kupperman index 평가자를 2명 배치하고 2명 연구자에게 시험약 실험군과 위약군이 누구인지 알지 못하게 관찰자 Blinding 하여 측정함.

\* 2명의 관찰자의 일치도를 CCC (corcondance correlation coefficient)로 확인하였음.

#### (2) 질성숙지수(Vaginal maturation index)

- 질 성숙지수 검사(VMI)는 환자에게서 채취된 질 상피 세포들 중 parabasal cell, intermediate cell, superficial cell들이 차지하는 비율을 점수화 하는 방법으로 질 세포를 채취함. 질 성숙 지수는 폐경 후에 감소하는 것으로 알려져 있으며, 질 성숙 지수를 통해 폐경으로 인해 발생 할 수 있는 생식기계 변화를 객관화 할 수 있음. (VMI = 0.2x percent parabasal cells 0.6x percent intermediate cells 1.0 percent superficial cells, Fertil Steril2007;88:530-2)

#### (3) 기초 검사 및 신체 계측

- 대상자의 나이와 함께 신체검사는 체중(kg), 신장(cm), 생체징후는 혈압(mmHg), 체온(°C), 맥박수(beat/min)를 검사함.

#### (4) 실험실 검사(Laboratory test)

- 실험실 검사는 혈액학검사로 백혈구 (WBC,per mm<sup>3</sup>), 적혈구(RBC,per mm<sup>3</sup>), 헤모글로빈(Hemoglobin,g/dL), 생화학검사는 혈당 (Glucose,mg/dL),아스파르트산/에스테르 아미노기 전이효소 aspartate transaminase (AST,U/L), 알라닌 아미노기 전이효소 alanine transaminase (ALT,U/L), 중성지방 (Triglyceride,mg/dL), 총콜레스테롤 (Total Cholesterolmg/dL), 고밀도지단백 콜레스테롤 (HDLmg/dL), 저밀도지단백콜레스테롤 (LDLmg/dL), 크레아티닌 (Creatinine,mg/dL)을 검사함.

- 염증 상태 검사로 C-반응성단백 (CRP)과 적혈구 침강속도 (ESR)검사를 시행함.

- 호르몬 검사로 에스트라디올(E2,pg/mL)이 검사함.

- 요검사로 단백질과 포도당을 측정함.

#### \*효과 측정 부분

##### 1) 인구통계 및 베이스라인 특성

- 연령, 병력, 과거 약물 등을 비롯한 시험대상자의 인구통계 및 베이스라인 특성을 기술통계를 사용하여 요약함. 연속형 변수의 경우 대상자수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값, 최대값을 제시하며 범주형 변수의 경우 대상자수와 백분율을 제시. 필요한 경우, 결측자료의 범주를 제시 함.

##### 2) Kupperman Index 및 질성숙지수

- 12 주 복용 전후 대상자의 Kupperman Index 와 질성숙지수에 대하여 각 시점별 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값, 최대값을 요약하여 제시하고, 시점별 유의한 변화가 있는지 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test 그리고 Fisher's exact test 로 도출.

##### 3) 약의 순응도

- 제공된 임상 시험약의 복용량을 확인함. 복용 순응도는 투여해야 하는 예정량에 대해 실제 복용한 의약품의 양의 비율로 다음 식에 따라 계산됨.

**실제복용량(No.of actual drug administered) #**  
**투여해야 하는 용량(No.of expected drug taken) \***

<그림 39. 복약 순응도(Drug Compliance(%))의 산출 방법>

\* 투여해야 하는 용량= 1일 의무 복용 임상시험용의약품 개수 x 투여기간  
 # 실제복용량= 처방량- 회수량

제목 (Title)
임상시험용 제품 인수인계증 (Investigational Product Receipt)

**임상시험용 제품 인수/인계증**

IRB 번호	시험기관	관리약사	시험책임자
SCHBC 2016-12-022-002	순천향대학교 부천병원	고화라	산부인과 김태희

제품명	백년초, 여주, 시계꽃 혼합 추출물 또는 위약		
포장단위	270 CAP/BOTTLE		
보관조건	실온보관		
총수량	68 BOTTLE		
LOT NO.	유효기간	수량	
170329	2019.04.11	68 BOTTLE	

임상시험용 제품을 상기와 같이 인수/인계함.

2017년    월    일

인계자		인수자	
소속	㈜네추럴에프앤피	소속	순천향대학교 부천병원

◦ **임상시험 연구 결과**

.. **일반사항 및 기본 특성 (표13)**

- : 전체 분석 대상자는 68명으로 실험군(34명)과 위약군(34명)이며 전체 대상자의 평균연령은 57.7 ± 4.8세이며 실험군의 평균연령은 57.4 ± 4.9세이며 위약군은 57.9 ± 4.7세로 비슷하게 나타남. 키의 경우 실험군의 경우 평균 152.9 ± 5.9cm이고 위약군의 경우 155.8 ± 4.9cm으로 두 군간의 유의한 차이가 나타남 (p<0.033).
- : 비만도(BMI)는 두 군간의 평균 24.2 ± 2.7 로 실험군과 위약군 모두 과체중(23~24.9)으로 유의한 차이는 없었음.
- : 폐경기간을 살펴보면 실험군 82.2 ± 57.1(월)이고 위약군 82.6 ± 61.6(월)로 두군 모두 약 7년 정도의 비슷한 폐경 기간을 가지고 있었음.
- : 출산력은 실험군과 위약군 모두 2.1명 정도로 비슷하였으며 유의한 차이는 없음.

**Table 13. 군별 기본특성 비교**

변수	전체 (N=68)	실험군 (N=34)	위약군 (N=34)	P-value
연령 (세)	57.7 ± 4.8	57.4 ± 4.9	57.9 ± 4.7	0.67
키 (cm)	154.3 ± 5.6	152.9 ± 5.9	155.8 ± 4.9	0.033
몸무게 (kg)	57.8 ± 7.8	56.9 ± 8.2	58.7 ± 7.4	0.343
비만도 BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.2 ± 2.7	24.3 ± 2.9	24.2 ± 2.5	0.842
폐경기간 (월)	82.4 ± 59.0	82.2 ± 57.1	82.6 ± 61.6	0.995
TPAL				
Term birth	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.5	0.806
Preterm birth	0.0 ± NA	0.0 ± NA	0.0 ± NA	NA
Abortion	1.1 ± 1.1	1.0 ± 0.8	1.3 ± 1.2	0.382
No. of living child	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.5	0.806

NA, not available.

데이터는 평균과 표준편차로 제시되었음.

P-value는 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로 도출되었음.

**- 기저질환 및 복용약물 비교 (표14)**

- : 본 연구 대상자의 기저질환을 질문한 결과, 과거 병력을 보면 전체 68명중 11명인 16.4%가 과거 병력이 있었고, 실험군에서 과거 병력을 가지고 있는 경우는 14.5%이며 위약군은 17.5%로 위약군이 약간 높으나 유의한 차이는 없음.
- : 실험군의 과거 병력의 질환으로는 강박증 (2.9%), 결핵 (2.9%), 고지혈증 (2.9%), 어지러움 (2.9%), 지주막하 출혈 (2.9%) 이었고, 위약군의 질환은 갑상선암 (5.9%), 관절염 (2.9%), 뇌하수체 종양 (2.9%), 빈혈 (2.9%), 직장암 (2.9%)이었으며 유의한 차이는 보이지 않음.
- : 현재 병력은 전체 대상자의 76.6%가 현재 질환을 가지고 있었으며 고혈압이 (30.9%)로 가장 많이 나타났으며 고지혈증 (22.1%), 당뇨 (5.9%), 갑상선 기능저하증 (4.4%), 디스크 (4.4%)등의 순으로 나타났으나 두 군간의 유의한 차이는 보이지 않음. (중복 답변임)
- : 복용약물은 전체 대상자의 75.1%가 약물을 복용하고 있었으며 약물의 종류로는 고혈압약이 (30.9%)로 가장 많았고 고지혈증약 (20.6%), 기타 (비타민제 등) (11.8%), 갑상선 호르몬약 (7.4%)등의 순이었으며 이 역시 두 군간의 유의한 차이는 보이지 않았음.

**Table 14. 군별 기저질환 및 복용약물 비교**

변수	전체 (N=68)	실험군 (N=34)	위약군 (N=34)	P-value
<b>과거 병력</b>				
갑상선암	2 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	2 ( 5.9%)	0.473
강박증	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
결핵	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
고지혈증	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
관절염	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
뇌하수체 종양	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
빈혈	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
어지럼증	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
지주막하 출혈	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
직장암	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
<b>현재 병력</b>				
갑상선기능저하증	3 ( 4.4%)	0 ( 0.0%)	3 ( 8.8%)	0.238
갑상선기능항진증	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
고지혈증	15 (22.1%)	5 (14.7%)	10 (29.4%)	0.242
고혈압	21 (30.9%)	8 (23.5%)	13 (38.2%)	0.294
골관절염	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
골다공증	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
당뇨	4 ( 5.9%)	2 ( 5.9%)	2 ( 5.9%)	1
수전증	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
디스크	3 ( 4.4%)	1 ( 2.9%)	2 ( 5.9%)	1
협심증	2 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	2 ( 5.9%)	0.473
<b>복용 약물</b>				
갑상선호르몬약	5 ( 7.4%)	1 ( 2.9%)	4 (11.8%)	0.353
고지혈증약	14 (20.6%)	5 (14.7%)	9 (26.5%)	0.368
고혈압약	21 (30.9%)	8 (23.5%)	13 (38.2%)	0.294
골다공증약	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
협심증약	2 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	2 ( 5.9%)	0.473
기타	8 (11.8%)	2 ( 5.9%)	6 (17.6%)	0.259

데이터는 빈도(백분율)로 표기되었음

P-value는 Fisher's exact test로 도출되었음.

**.. 투약전 신체계측 및 혈액검사 특성 비교 (표15)**

: 두 군의 혈압측정 결과 실험군의 평균 수축기 혈압은 정상 (120mmHg미만)이며 위약군은 165mmHg로 높았으나 두 군 간의 유의한 차이는 없음.

: 두 군의 혈액검사 결과는 정상 범위내에 있었으나 모든 항목에서 두 군간 유의한 차이는 없음.



**Table 15. 군별 투약 전 실험실적 특성 비교**

변수	전체 (N=68)	실험군 (N=34)	위약군 (N=34)	P-value
SBP (mmHg)	142.9 ± 167.7	119.9 ± 15.2	165.8 ± 236.2	0.131
DBP (mmHg)	75.4 ± 11.0	73.3 ± 11.4	77.6 ± 10.4	0.107
맥박 (beat/min)	77.0 ± 9.9	76.7 ± 9.0	77.3 ± 10.9	0.531
체온 (°C)	41.3 ± 40.0	36.5 ± 0.2	46.2 ± 56.6	0.939
E2 ≥ 10pg/mL	9 (13.2%)	5 (14.7%)	4 (11.8%)	1
FSH	57.8 ± 21.0	57.6 ± 21.1	58.0 ± 21.2	0.943
WBC (/mm <sup>3</sup> )	7022.1 ± 8479.4	8061.8 ± 11887.5	5982.4 ± 1562.2	0.893
Hb (g/dL)	14.6 ± 12.1	13.0 ± 1.0	16.2 ± 17.1	0.297
RBC	4.3 ± 0.6	4.3 ± 0.7	4.4 ± 0.6	0.256
Glucose	99.2 ± 14.7	99.2 ± 16.8	99.1 ± 12.5	0.946
AST	23.0 ± 5.2	22.8 ± 4.5	23.2 ± 5.9	0.675
ALT	19.3 ± 8.2	18.9 ± 6.1	19.8 ± 10.0	0.936
Cholesterol	199.5 ± 40.7	195.7 ± 41.0	203.4 ± 40.7	0.438
HDL-C	65.6 ± 77.4	75.7 ± 108.6	55.5 ± 12.2	0.425
LDL-C	131.0 ± 104.7	116.5 ± 28.9	145.6 ± 144.8	0.458
BUN	14.3 ± 3.2	14.3 ± 3.2	14.3 ± 3.3	0.951
Cr	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.964
ESR	18.8 ± 12.0	19.6 ± 13.3	17.9 ± 10.8	0.602
CRP	0.7 ± 4.1	1.3 ± 5.8	0.1 ± 0.1	0.233
RUA Protein - positive	2 ( 2.9%)	2 ( 5.9%)	0 ( 0.0%)	0.473
RUA Glucose - positive	3 ( 4.4%)	3 ( 8.8%)	0 ( 0.0%)	0.238

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's-t test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

**· 이상반응 및 연구 중지 비교 (표16)**

: 두 군간의 이상반응으로 중도 탈락된 경우는 실험군 2명, 위약군 2명으로 각 군별로 5.9%의 탈락률을 보였으나 유의한 차이는 없었음. 이상반응의 정도는 눈주변 가려움, 부종, 두통, 불면증, 소화불량 등으로 경미한 증상이었으며 따로 치료를 받거나 하지는 않았음.

**Table 16. 군별 이상반응 및 연구중지 비교**

변수	전체 (N=68)	실험군 (N=34)	위약군 (N=34)	P-value
----	--------------	---------------	---------------	---------

이상반응

눈주위 가려움 / 충혈	2 ( 2.9%)	2 ( 5.9%)	0 ( 0.0%)	0.473
두통 / 뒷골 당김	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
부종	2 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	2 ( 5.9%)	0.473
얼굴 두드러기	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
변비	1 ( 1.5%)	1 ( 2.9%)	0 ( 0.0%)	1
불면증	2 ( 2.9%)	1 ( 2.9%)	1 ( 2.9%)	1
소화불량	1 ( 1.5%)	0 ( 0.0%)	1 ( 2.9%)	1
이상반응				1
없음	60 (88.2%)	30 (88.2%)	30 (88.2%)	
있음	8 (11.8%)	4 (11.8%)	4 (11.8%)	
중도탈락				1
아니오	64 (94.1%)	32 (94.1%)	32 (94.1%)	
예	4 ( 5.9%)	2 ( 5.9%)	2 ( 5.9%)	

데이터는 빈도(백분율)로 표기되었음

P-value는 Fisher's exact test로 도출되었음.

.. 투약 12주후 신체계측 및 혈액검사 특성 비교 (표17)

: 투약 12주후 두 군의 혈압측정 결과 투약전과 특별히 달라진 것은 없었으며 실험군의 평균 수축기 혈압은 120.9mmHg, 위약군은 168mmHg로 47.4mmHg의 차이가 있었으나 두 군간의 유의한 차이는 없음.

: 투약 12주후 두 군의 혈액검사 결과 정상범위내에 있었으며 모든 항목에서 두 군간 유의한 차이는 없음.

Table 17. 군별 투약 12주째 실험실적 특성 비교

변수	전체 (N=64)	실험군 (N=32)	위약군 (N=32)	P-value
SBP (mmHg)	144.6 ± 172.7	120.9 ± 15.1	168.3 ± 243.4	0.235
DBP (mmHg)	75.6 ± 11.0	73.8 ± 11.5	77.4 ± 10.4	0.187
맥박 (beat/min)	77.3 ± 10.1	76.8 ± 9.2	77.8 ± 11.0	0.346
체온 (°C)	41.6 ± 41.3	36.5 ± 0.2	46.8 ± 58.3	0.944
E2 ≥ 10pg/mL	9 (14.1%)	5 (15.6%)	4 (12.5%)	1
FSH	58.4 ± 21.1	58.4 ± 21.2	58.3 ± 21.3	0.98
WBC (/mm <sup>3</sup> )	7084.2 ± 8733.3	8231.6 ± 12237.3	5936.9 ± 1591.2	0.737
Hb (g/dL)	14.7 ± 12.5	13.0 ± 1.0	16.4 ± 17.6	0.224
RBC	4.3 ± 0.6	4.3 ± 0.7	4.4 ± 0.6	0.167
Glucose	99.4 ± 14.8	99.8 ± 17.0	99.0 ± 12.4	0.752
AST	22.9 ± 5.3	22.7 ± 4.4	23.2 ± 6.1	0.637
ALT	19.1 ± 8.4	18.7 ± 6.1	19.5 ± 10.3	0.909

Cholesterol	199.9 ± 41.0	194.7 ± 40.6	205.0 ± 41.3	0.318
HDL-C	66.4 ± 79.7	77.2 ± 111.9	55.6 ± 12.6	0.428
LDL-C	132.2 ± 107.5	115.4 ± 28.5	149.1 ± 148.7	0.251
BUN	14.3 ± 3.1	14.0 ± 3.1	14.6 ± 3.2	0.495
Cr	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.966
ESR	19.2 ± 12.3	19.9 ± 13.5	18.4 ± 11.0	0.687
CRP	0.8 ± 4.2	1.4 ± 5.9	0.1 ± 0.1	0.272
RUA Protein - positive	2 ( 3.1%)	2 ( 6.2%)	0 ( 0.0%)	0.472
RUA Glucose - positive	3 ( 4.7%)	3 ( 9.4%)	0 ( 0.0%)	0.237

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

.. 투약 12주후 치료 효과비교 (표18)

: 실험군과 위약군의 투약 12주후에 치료 효과에 대해 살펴보았음. 실험군에서 질 분비물의 증가 (28.1%), 수면의 질 호전 (21.9%), 화끈거림/열감 호전 (15.6%) 등의 치료효과를 보였으나 위약군 에서도 질 분비물의 증가 및 수면질의 호전 등의 치료 효과가 나타났으며 유의한 차이를 보이지 않음.

Table 18. 군별 투약 12주째 치료효과 비교

변수	전체 (N=64)	실험군 (N=32)	위약군 (N=32)	P-value
치료효과				
질 분비물 증가	17 (26.6%)	9 (28.1%)	8 (25.0%)	1
두근거림 호전	3 ( 4.7%)	2 ( 6.2%)	1 ( 3.1%)	1
수면의 질 호전	10 (15.6%)	7 (21.9%)	3 ( 9.4%)	0.302
소변감 호전	2 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1
화끈거림/열감 호전	7 (10.9%)	5 (15.6%)	2 ( 6.2%)	0.423
관절통증 완화	2 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1
식욕 증가	1 ( 1.6%)	0 ( 0.0%)	1 ( 3.1%)	1
스트레스 감소	2 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1 ( 3.1%)	1
질 통증 완화	3 ( 4.7%)	2 ( 6.2%)	1 ( 3.1%)	1
몸이 가벼움 / 변비해소	3 ( 4.7%)	1 ( 3.1%)	2 ( 6.2%)	1

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

.. 갱년기 지수(Kupperman's index) 및 복용순응도 비교 (표19)

: 두 군간의 갱년기 지수를 측정한 결과 실험군에서는 투약 전 42.1 ± 24.9에서 투약 12주째에는 21.0 ± 10.6으로 투약 후 Kupperman 지표가 좋아졌음을 볼 수 있으나 위약 군에서도 투약 전

36.9 ± 21.9에서 12주 투약 후 22.5 ± 12.4로 Kupperman 지표가 낮아져 두 군간의 유의한 차이는 보았음.

: 갱년기 지수중 '비뇨기 증상'항목(p=0.015)과, 세부항목인 '소변을 자주보며 남아있는 느낌이 있다'지표가 위약군에 비해 실험군에서 유의하게 감소하였음을 확인함(p=0.004).

: 복약순응도는 두 군 모두 89.6%로 높은 편으로 볼 수 있으며 두 군간의 유의한 차이는 없음.

Table 19. 군별 Kupperman 지표 및 복약순응도 비교

변수	전체 (N=64)	실험군 (N=32)	위약군 (N=32)	P-value
<b>Δ 혈관운동장애</b>	-2.4 ± 5.5	-3.5 ± 5.4	-1.4 ± 5.3	0.136
Δ 얼굴이 화끈거리며 열감이 있다.	-0.8 ± 3.4	-1.1 ± 3.1	-0.4 ± 3.7	0.560
Δ 몸이 차고 냉감이 있다.	-1.7 ± 3.2	-2.4 ± 3.5	-1.0 ± 2.7	0.101
<b>Δ 비뇨기 증상</b>	-2.2 ± 3.8	-3.4 ± 4.4	-0.9 ± 2.7	<b>0.015</b>
Δ 소변을 자주 보며 남아있는 느낌이 있다.	-0.8 ± 2.1	-1.6 ± 2.3	-0.1 ± 1.6	<b>0.004</b>
Δ 소변을 참기 힘들고 지리는 때가 있다.	-1.3 ± 2.3	-1.8 ± 2.6	-0.8 ± 1.9	0.146
<b>Δ 전신신경 증상</b>	-4.9 ± 7.4	-5.6 ± 7.4	-4.2 ± 7.4	0.370
Δ 머리가 무겁거나 아프다.	-0.9 ± 2.7	-1.3 ± 3.0	-0.5 ± 2.4	0.198
Δ 귀에서 소리가 난다.	-0.2 ± 1.9	0.0 ± 1.8	-0.4 ± 2.1	0.547
Δ 마음이 불안하다.	-1.8 ± 2.9	-2.1 ± 3.2	-1.4 ± 2.6	0.326
Δ 신경질 짜증이 잘 난다.	-1.1 ± 1.8	-1.3 ± 2.0	-0.9 ± 1.6	0.647
Δ 우울한 기분이 든다.	-0.7 ± 1.6	-0.7 ± 1.5	-0.6 ± 1.6	0.925
Δ 가슴이 두근거린다.	-0.4 ± 0.7	-0.3 ± 0.7	-0.4 ± 0.6	0.463
<b>Δ 운동기 증상</b>	-1.4 ± 2.8	-1.7 ± 2.5	-1.2 ± 3.1	0.375
Δ 등과 허리가 아프다.	-0.3 ± 0.7	-0.4 ± 0.7	-0.2 ± 0.7	0.151
Δ 어깨나 뒷머리가 아프다.	-1.1 ± 2.6	-1.2 ± 2.3	-1.0 ± 3.0	0.600
<b>Δ 소화기증상</b>	-6.9 ± 9.3	-6.9 ± 9.5	-6.8 ± 9.2	0.968
Δ 속이 메스껍거나 구토증이 난다.	-0.5 ± 1.7	-0.5 ± 1.7	-0.5 ± 1.7	1.000
Δ 변비가 있거나 설사를 자주한다.	-0.8 ± 1.9	-1.2 ± 2.3	-0.5 ± 1.3	0.208
Δ 배가 더부룩하니 입맛이 없다.	-0.8 ± 2.3	-0.9 ± 2.2	-0.8 ± 2.4	0.721
Δ 어지럽다.	-0.3 ± 0.6	-0.4 ± 0.7	-0.2 ± 0.5	0.194
Δ 피로를 쉽게 느낀다.	-0.4 ± 0.7	-0.4 ± 0.7	-0.4 ± 0.8	0.846
Δ 관절이 아프다.	-0.6 ± 0.8	-0.6 ± 0.8	-0.6 ± 0.8	0.953
Δ 근육이 아프다.	-0.4 ± 0.8	-0.3 ± 0.7	-0.6 ± .09	0.101
Δ 땀이 많이 난다.	0.9 ± 2.6	1.1 ± 2.7	0.7 ± 2.5	0.526
Δ 몸이 잘 붓는다.	-0.8 ± 2.3	-0.7 ± 2.0	-0.9 ± 2.6	0.651
Δ 입이 마른다.	-1.4 ± 2.9	-1.8 ± 2.6	-0.9 ± 3.1	0.319
Δ 피부가 스멀거려서 벌레가 기어다니는 느낌이다.	0.0 ± 0.6	-0.1 ± 0.5	0.0 ± 0.7	0.384
Δ 감각이 예민해지거나 둔해졌다.	-0.7 ± 1.5	-0.3 ± 1.5	-1.1 ± 1.4	0.019
Δ 몸이 저린다.	-1.0 ± 1.4	-0.9 ± 1.5	-1.0 ± 1.4	0.853
투약 전 Kupperman index	39.5 ± 23.4	42.1 ± 24.9	37.0 ± 22.0	0.375
투약 12주째 Kupperman's index	21.7 ± 11.5	21.0 ± 10.6	22.5 ± 12.4	0.732
Δ Kupperman index	-17.8 ± 21.5	-21.1 ± 21.7	-14.5 ± 21.2	0.078

복약순응도 (%)	89.6 ± 10.0	89.6 ± 10.2	89.6 ± 9.9	0.968
-----------	-------------	-------------	------------	-------

데이터는 평균과 표준편차로 제시되었음.  
P-value는 Mann-Whitney U test로 도출되었음.  
Δ 는 투약 12주후 지표의 값에서 투약전 지표의 값을 뺀 값을 의미함

- 질성숙지수 (VMI) 평가 (표 20)

Table 20. 군별 질성숙지수(VMI) 비교

변수	전체 (N=62)	실험군 (N=31)	위약군 (N=31)	P-value
투약 전 VMI	60.4 ± 8.9	59.3 ± 8.7	61.5 ± 9.2	0.254
투약 12주째 VMI	63.5 ± 10.4	63.7 ± 10.6	63.3 ± 10.3	0.746
Δ VMI	3.1 ± 10.0	4.4 ± 11.4	1.8 ± 8.2	0.439

데이터는 평균과 표준편차로 제시되었음.  
P-value는 Mann-Whitney U test로 도출되었음.  
Δ 는 투약 12주후 지표의 값에서 투약전 지표의 값을 뺀 값을 의미함

- : 중도탈락자를 제외한 질성숙지수 평가 인원은 실험군 31명, 위약군 31명으로 총 62명이었으며 투약 12주후 질성숙지수가 5이상 증가한 대상자는 이중 눈가림 해제 결과 실제로 실험군에서 13명, 위약군에서 8명이었음. 투약 12주후의 질성숙지수의 차이가 15이상인 대상자는 실험군에서 4명인 것으로 나타났음.
- : 질성숙지수 검사(Vaginal maturation index, VMI)는 연구대상자에게서 채취된 질 상피 세포들 중 기저결 세포(parabasal cell), 중간 세포(intermediate cell), 표층 세포(superficial cell)가 차지하는 비율을 점수화 하는 방법임. 질성숙지수는 폐경 후에 감소하는 것으로 알려져 있으며, 질성숙지수를 통해 폐경으로 인해 발생 할 수 있는 생식기계 변화를 객관화 할 수 있음. 각 시기별 질 성숙지수 평균 ± 표준편차 (그림 40)
- : 질성숙지수 평가 결과 (Mann-Whitney test) 위약군과 실험군의 평균값 차이는 유의하지 않았음 (P-value = 0.439).

시기	성숙지수	성숙값	편차(±)
신생아	0/90/10	55	10
유아기	80/20/0	10	20
배란전기	0/40/60	80	10
배란후기	0/70/30	65	15
폐경기	0/80/20	60	20
폐경후기	50/50/0	25	40
에스트로겐 치료	0/10/90	95	10
프로게스테론 치료	0/90/10	55	10
안드로겐 치료	20/80/0	40	10

그림 40. 각 시기별 질성숙지수의 세포 수 및 성숙값 (Basic Diagnostic Cytology, 2<sup>nd</sup> Edition, 155p)

: 질 성숙 지수의 점수화 방법. PAP staining 염색 시행 후 각 슬라이드에서 5가지 다른 부위를 무작위로 100개씩 세포 종류에 따라 셈. 각 세포수에 다음과 같이 점수를 부여한 후 100%를 기준으로 총 점수를 객관화함. (그림 41. 기저결 세포 수 \*0.5, 작은 중간 세포 수 \*0.6, 큰 중간 세포 수 \*0.7, 녹색 표층 세포 \*0.8, 적색 표층 세포 \*1.0)

세포 종류	X 점수
에오신호성 표층세포	1.0
녹색 표층세포	0.8
큰 중간세포	0.7
작은 중간세포	0.6
기저결세포	0.5

그림 41 각 세포의 객관화 점수

: 평가의 객관화를 위해 3명의 연구자가 독립적으로 평가하였음. PAP staining 세포 수 평가의 기준을 삼기 위해 폐경 전 건강한 상태의 샘플에서 기준을 정함 (그림 42).

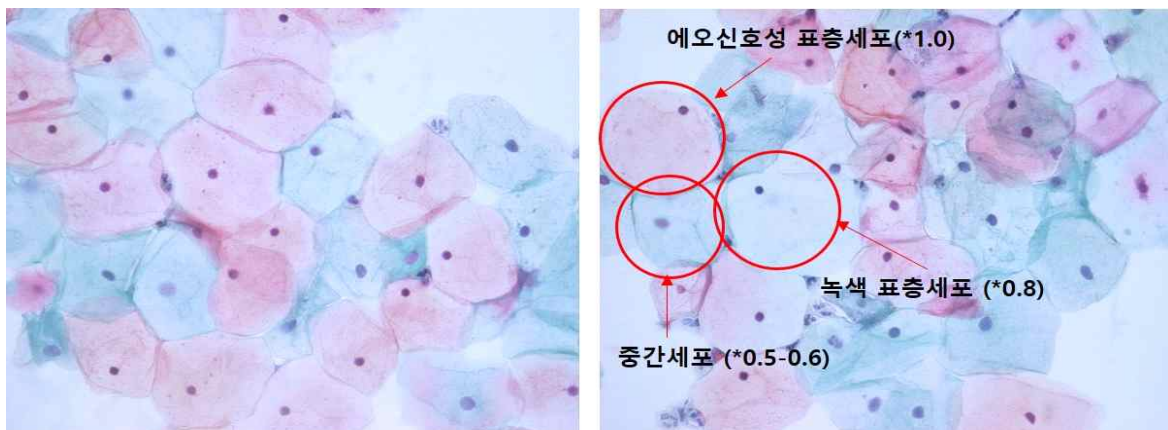


그림42. 질성숙지수 평가를 위한 폐경 전 여성의 PAP staining 결과

: 위약군과 실험군에서 투약 전 후 점수 차이가 크게 난 대상자에서는 실제 중간세포, 표층세포의 증가함을 보임 (그림43,44).

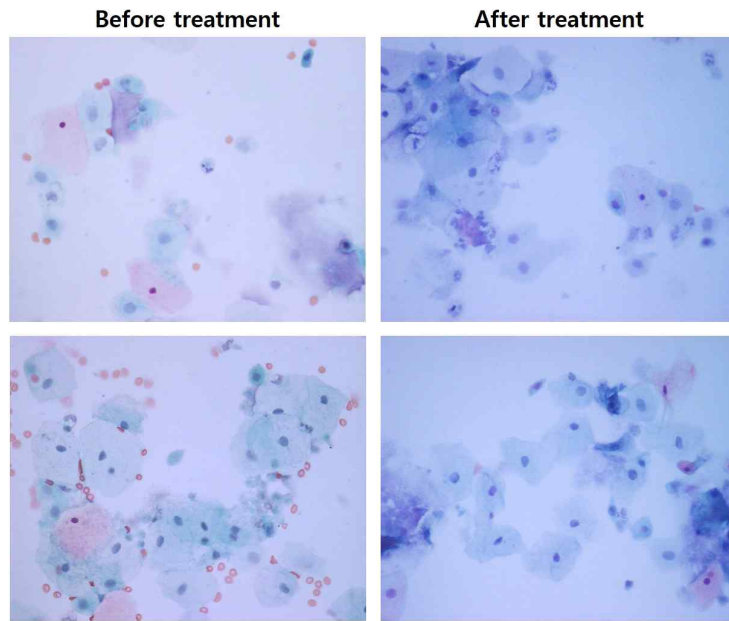


그림 43. 복용 12주 전후의 PAP staining 결과 사진  
(위약군)

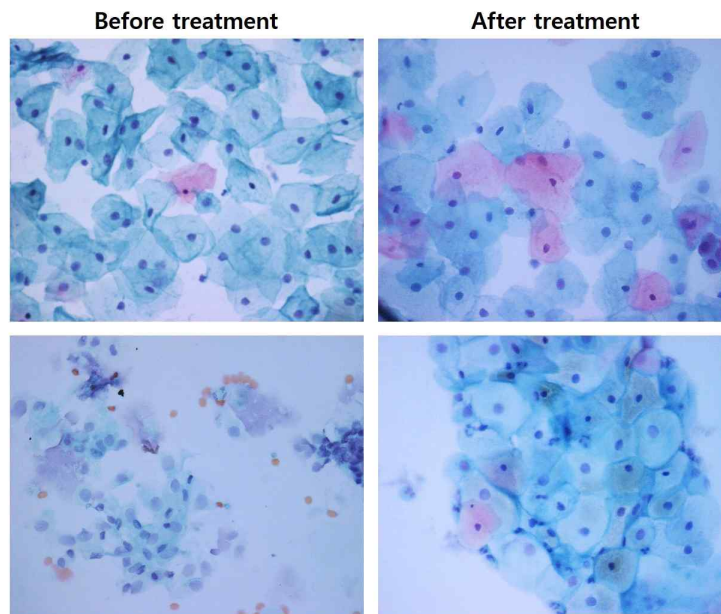


그림 44. 복용 12주 전후의 PAP staining 결과 사진  
(실험군)

◦ 임상시험 결과 고찰

: 시제품을 이용한 임상시험의 결과 실험군과 위약군에서 일반사항과 기본특성, 기저질환 및 복용 약물, 신체 계측 및 혈액검사를 분석한 결과 유의한 차이가 없었음. Kupperman 지표의 경우 실험군에서 시제품 복용전과 복용 후 현저한 차이가 있었지만 이는 위약군에도 차이가 나타나 두 군과

의 유의한 결과를 나타내지는 못함. 이상 반응의 경우 실험군에서 2명의 탈락자가 있었지만 그 증상(부종, 불편증 등)이 경미한 수준으로 투약을 중단 후 증상은 바로 호전되어 특별한 치료를 요하지는 않았으므로 시제품에 대한 안전성은 뒷받침 되었다고 볼 수 있음. 질성속지수(VMI)는 복용전에 비해 복용 후 질성속지수가 5이상 증가한 대상자는 실험군에서 13명, 위약군에서 8명이었음. 복용 전후의 질성속지수의 차가 15이상인 대상자는 실험군에서 4명인 것으로 나타났으며, 모두 복용 순응도가 좋았음. 전반적인 결과 시제품을 복용한 실험군의 경우 Kupperman 지표의 변화와 질성속 지수의 변화 치료효과에 대한 주관적인 개선 등으로 볼 때 시제품이 갱년기 증후군 예방에 충분히 영향을 미친다고 생각되나 연구 대상자수(n수) 부족하여 연구 결과에 유의한 결과를 미치지 못한 것으로 사료됨.

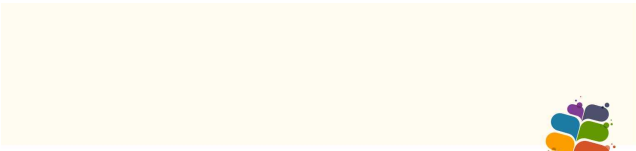
○ 개별인정 원료 신청을 위한 식약처 모듈토의 진행

**건강기능식품 『모듈토의』 신청서**

일반사항	회사(기관)명	㈜네추럴 F&P	주소	서울시 송파구 세갈로 149 2F 중앙연구소
	신청인		FAX	02-400-0217
	검색자	오지영, 장민선, 김태희	문의처 (Tel : 02-400-4418 / 010-5892-0827)	
	기능성 원료명	백년초, 여주, 시계꽃 추출물		
신청 기능성 내용				
여성 갱년기 완화				

연구단계	원료의 표준화 (기본규격)	<input type="checkbox"/> 제조과정 <input type="checkbox"/> 기능(지표)성분 <input type="checkbox"/> 유해물질	<input type="checkbox"/> 단위공정 표준화 <input type="checkbox"/> 설정 <input type="checkbox"/> 기준규격 설정 완료	<input type="checkbox"/> 수율 분석 <input type="checkbox"/> 분석법 확보 <input type="checkbox"/> 분석 완료
	안전성	<input type="checkbox"/> 기초 자료 <input type="checkbox"/> 독성시험	<input type="checkbox"/> 섭취근거자료 <input type="checkbox"/> DB 검색 등을 통한 안전성 정보 자료(부작용 등) <input type="checkbox"/> 영양평가자료 <input type="checkbox"/> 생물학적 유용성자료	<input type="checkbox"/> 섭취량평가자료 <input type="checkbox"/> 자료(부작용 등) <input type="checkbox"/> 인체시험자료
	가능성	<input type="checkbox"/> 시험관 시험 <input type="checkbox"/> 동물시험 <input type="checkbox"/> 인체적용시험	<input type="checkbox"/> 자료 확보 <input type="checkbox"/> 설계 중 <input type="checkbox"/> 실시 중	<input type="checkbox"/> 시험 완료 <input type="checkbox"/> 실시 중 <input type="checkbox"/> 시험 완료
	가능성	<input type="checkbox"/> 동물시험 <input type="checkbox"/> 인체적용시험	<input type="checkbox"/> 자료 확보 <input type="checkbox"/> 설계 중 <input type="checkbox"/> 실시 중	<input type="checkbox"/> 시험 완료 <input type="checkbox"/> 실시 중 <input type="checkbox"/> 시험 완료

필요사항	원료의 표준화 (기본규격)	- 지표물질 확인
	안전성	- 건강기능식품 개별인정 허가 진행을 위한 안전성 자료 확인
	가능성	- 인체적용시험 설계의 타당성



에스트로겐수용체 베타 타겟으로 폐경 이행기부터 이후까지 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 제품개발

원료명 : 백년초, 여주, 시계꽃추출물  
 신청회사 : ㈜네추럴에프앤피  
 동물시험연구자 : 숙명여자대학교 장민선교수님  
 인체시험연구자 : 순천향대학교 김태희교수님



- 모듈토의 진행시 여주 추출물의 지표물질 설정에 관한 보완사항을 확인.
- 여주 추출물의 지표물질 추가 설정 진행 중.
- 인체적용시험의 지표 설정에 대한 타당성 확인.
- 지표의 Kupperman 지표의 경우 피험자수 최소 각 그룹 당 30명이상이며, 유의성을 보인다면 가 능함.

○ 개별인정 원료 신청을 위한 신청 자료 작성 진행

- 개별인정형 신청을 위한 자료 작성 및 체크리스트 작성.
- 여주 추출물의 추가 지표물질 설정 및 인체적용시험 결과보고서 완료 후 식품의약품안전처에 개별인정형 신청 진행 예정.



# 기능성원료 인정 신청을 위한 제출 자료

## □ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	비고
1	제출자료 전체의 송달 요약본	■ 예 □ 아니요		
2	기원, 개발경위, 국내의 인정 및 사용현황 등에 관한 자료			
2.1	기원	■ 국내 □ 국외		
2.2	개발경위	■ 국내 □ 국외		
2.3	국내 외 인정허가 현황	■ 국내 ■ 국외		
2.4	국내 외 사용 현황	■ 국내 ■ 국외		
3	제조방법 및 그에 관한 자료			
3.1	제조공정표 ※ 승인전간기능성분인 경우 제조절차가 발명한 자료	■ 예 □ 아니요		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■ 예 □ 아니요		
3.3	사용된 원료첨가물이 식품 및 첨가물규정에 적합한지 여부	■ 예 □ 아니요		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■ 예 □ 아니요		
3.5	주요공정별 수율 변화	■ 예 □ 아니요		
4	원료의 특성에 관한 자료			
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상 출성 등	■ 예 □ 아니요		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■ 예 □ 아니요 □ 기능성분 ■ 지표성분		
4.3	절함성분정보자료	■ 예 □ 아니요		
5	기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료			
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■ 예 □ 아니요		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(LOT)의 시험성적서	■ 예 □ 아니요		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 수득, 규조, 측정 유효기간 등 정보 추가)	■ 예 □ 아니요 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■ 예 □ 아니요		

회사명	(주)Natural F&P (대표이사 : 문지성)		
영업허가(신고번호)	제조업 ■	수입업 □	
주소 및 연락처	* 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양정송대길 39 * (연락처) 02-400-4418 (팩스) 02-400-0217		
	담당자	(이름) 오현아 (연락처) 02-400-4418(419), 010-6422-6094	
신청 원료명	백년초, 여주, 시계꽃 추출 복합물		
심사 대상 분류	개발 인정 원료	새로운 원료 ■	신청 기능성 : 갱년기 여성건강에 도움을 줄 수 있음 신청 섭취량 : 백년초, 여주, 시계꽃 추출 복합물로서
		기능성 추가 섭취량 변경 □ 제조방법 변경 □ 기준규격 변경 □ 시험방법 변경 □	(변경 전)   (변경 후)
국내제조 수입	고시된 원료	기능성 추가 □ 섭취량 변경 □ 제조방법 변경 □ 기준규격 변경 □ 시험방법 변경 □	(변경 전) (변경 후)
		수리번호 제조회사 소재지	수출국
모품로서의 품목설명회	실시 날짜 : 최말 날짜 :		

### <여성 갱년기 건강 제품 개발 경위>

#### ○ 폐경이행기와 폐경후 여성의 영양소 섭취상태, 식사의 질, 삶의 질 연구

##### ◦ 분석설계

- 국민건강영양조사 2009~2012년도 자료 분석
- 연구대상 선별
  - : 국민건강영양조사 여성건강 조사항목 분야에서 40세 이상의 여성 중 폐경이행기(n=2,298)와 폐경군(n=2,101)으로 분류함
  - : 제외대상 - 남성, 40세 미만여성, 월경여부 무응답, 영양소 섭취 및 삶의 질 무 응답자

##### · 연구내용

- : 영양소 섭취상태 분석
- : 식사의 질 (ND, NAR, MAR, INQ)
- : 삶의 질 (EQ-5D)

##### · 분석방법

- : 복합표본 설계
- : SPSS 18.0K 프로그램, Independent t-test 및 pearson correlation analysis 시행

##### ◦ 연구결과

##### · 조사대상자들의 영양소 섭취상태 (표21)

- : 전체 대상자의 평균연령은 폐경이행기군 47.7세, 폐경군 54.2세로 나타남.
- : 영양소섭취량 분석 결과 폐경이행기군은 지방, 나트륨의 섭취가 폐경군에 비해 유의하게 높음. 반면, 폐경군은 당질, 섬유소, 철분, 칼륨, 비타민 B1, 비타민C의 섭취가 유의하게 높은 것으로 나타남.

**Table 21. Comparison of nutrient intake status**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Age (yrs)	47.7 ± 2.81)	54.2 ± 3.3	<0.001
Energy (kcal)	1705.1 ± 613.7	1721.1 ± 650.0	0.401
Protein (g)	61.6 ± 30.2	61.1 ± 31.3	0.544
Fat (g)	33.6 ± 22.4	30.9 ± 22.8	<0.001
Carbohydrate (g)	288.4 ± 109.0	301.7 ± 120.4	0.003
Fiber (g)	7.8 ± 6.0	8.4 ± 6.6	0.004
Calcium (mg)	487.7 ± 301.0	491.8 ± 322.9	0.658
Phosphorous (mg)	1056.2 ± 435.5	1064.9 ± 463.5	0.635
Iron (mg)	14.7 ± 9.7	15.9 ± 11.3	<0.001
Sodium (mg)	4306.2 ± 2642.5	4080.8 ± 2834.1	0.007
Potassium (mg)	2992.9 ± 1511.6	3104.5 ± 1660.4	0.020
Vitamin A (µgRE)	854.5 ± 1114.0	866.5 ± 1044.3	0.162
Retinol (µg)	93.4 ± 267.7	85.1 ± 240.9	0.363
β Carotene (µg)	4446.8 ± 6198.6	4639.8 ± 6021.0	0.296
Vitamin B1 (mg)	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.8	0.004
Vitamin B2 (mg)	1.2 ± 0.6	1.2 ± 0.7	0.726
Niacin (mgNE)	14.7 ± 7.1	14.8 ± 7.5	0.579

\*1) mean ± standard deviation

• 조사대상자들의 식사의 질 - 영양밀도 (표 22)

: 영양밀도(nutrient density, ND) = 개인별 섭취량을 토대로 열량섭취 1000kcal당 영양소 섭취량을 환산.

: 1000kcal당 영양소 섭취 밀도를 분석한 결과 두 군 모두 에너지, 인, 나트륨, 칼륨의 섭취밀도는 높고 단백질, 섬유소, 칼슘, 인, 철분, 비타민 A, 나이아신, 비타민 C의 밀도는 낮음.

: 폐경이행군은 나트륨의 섭취밀도가 유의하게 높고, 폐경군은 철분, 칼륨, 비타민 C의 섭취밀도가 높음.

**Table 22. Quality of diet (nutrient density, ND)**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Energy	1.72 ± 0.621)	1.72 ± 0.65	0.987
Protein	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.711
Fiber	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.976
Calcium	0.49 ± 0.29	0.49 ± 0.32	0.497
Phosphorous	1.06 ± 0.63	1.07 ± 0.46	0.643
Iron	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	<0.001
Sodium	4.26 ± 2.63	4.08 ± 2.83	0.007
Potassium	2.99 ± 1.52	3.11 ± 1.66	0.018
Vitamin A	0.86 ± 1.7	0.87 ± 1.04	0.744
Niacin	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.957
Vitamin C	0.11 ± 0.11	0.13 ± 0.12	0.012

\*1) mean ± standard deviation

### 조사대상자들의 식사의 질 - 영양소 적정비 (표23)

- : 영양소 적정비 (nutrient adequacy ratio, NAR) = 개인별 섭취량을 토대로 한국인 영양섭취기준 영양소 섭취량을 환산.
- : 평균 영양소 적정비 (mean adequacy ratio, MAR) = 영양소 적정비의 총 평균값 산출.
- : 2015년 한국인영양섭취기준 (보건복지부, 한국영양학회 공동발행)의 각 군별 평균연령의 권장섭취량과 비교하였을 때 두 군 모두 에너지, 섬유소, 칼슘, 칼륨의 섭취는 부족하고 단백질, 인, 철분, 나트륨, 비타민 A, 비타민 B1의 섭취는 충족하고 있는 상태임. 특히 철분, 칼륨, 비타민 C는 폐경군에서 유의하게 높았음.
- : 평균 영양소 적정비는 폐경이행군 1.20, 폐경군 1.28로 폐경군이 유의하게 높은 것으로 나타났고 한국인 영양권장량 대비 폐경군의 전반적인 영양소의 섭취가 더 양호한 것으로 나타남.
- : 두 군 모두 부족한 영양소 섭취들의 충족을 위한 중재가 필요하며, 여성의 필수 영양소에 해당하는 칼륨, 비타민 C 섭취증가에 대한 적극적인 관리가 요구됨.

**Table 23. Quality of diet (nutrient adequacy ratio, NAR., mean adequacy ratio, MAR)**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Protein	1.38 ± 0.691)	1.36 ± 0.70	0.196
Calcium	0.73 ± 0.44	0.71 ± 0.46	0.140
Phosphorous	1.51 ± 0.63	1.52 ± 0.66	0.635
Iron	1.36 ± 1.00	1.95 ± 1.41	<0.001
Sodium	2.91 ± 1.79	2.91 ± 2.01	0.879
Potassium	0.85 ± 0.43	0.89 ± 0.47	0.019
Vitamin A	1.36 ± 1.91	1.44 ± 1.74	0.162
Vitamin B1	1.22 ± 0.70	1.26 ± 0.78	0.078
Niacin	1.06 ± 0.51	1.06 ± 0.53	0.966
Vitamin C	0.11 ± 0.11	0.13 ± 0.12	0.012
MAR	1.20 ± 0.60	1.28 ± 0.65	<0.001

\*1) mean ± standard deviation

### · 조사대상자들의 식사의 질 - 영양 질적지수 (표24)

- : 영양 질적지수 (index of nutritional quality, INQ) = 한국인 영양섭취기준에서 평균필요량이 설정된 영양소와 비교하여 산출.
- : 2015년 한국인영양섭취기준 (보건복지부, 한국영양학회 공동발행)의 각 군별 평균연령의 평균 필요량과 비교하였을 때 칼슘, 칼륨의 섭취는 부족하고, 단백질, 인, 철분, 나트륨, 비타민 A, 비타민 B2, 나이아신, 칼슘의 섭취는 충족하고 잇는 상태임. 폐경이행군은 폐경군에 비해 철분의 섭취가 유의하게 낮음.

**Table 24. Quality of diet (index of nutritional quality, INQ)**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Protein	1.49 ± 0.431)	1.42 ± 0.41	<0.001
Calcium	0.80 ± 0.46	0.75 ± 0.44	<0.001
Phosphorous	1.65 ± 0.42	1.61 ± 0.41	0.001
Iron	1.47 ± 0.91	2.03 ± 1.20	<0.001
Sodium	3.19 ± 1.69	3.07 ± 1.79	0.027
Potassium	0.94 ± 0.39	0.93 ± 0.37	0.833
Vitamin A	1.49 ± 2.53	1.49 ± 1.73	0.971
Vitamin B1	1.34 ± 0.78	1.33 ± 0.68	0.613
Niacin	1.15 ± 0.38	1.11 ± 0.36	0.001
Vitamin C	1.29 ± 1.23	1.31 ± 1.09	0.609

\*1) mean ± standard deviation

• **조사대상자들의 삶의 질 - EQ-5D (표25)**

- : 삶의 질 (Euro Quality of life-5 Dimensions, EQ-5D) = 운동능력, 자기관리, 일상활동, 통증/불편, 불안/우울의 5가지 질문에 3단계 척도(1-문제없음, 2-다소 문제있음, 3-매우 문제있음)로 응답하여 산출.
- : 폐경이행군은 폐경군에 비해 운동능력에서만 삶의 질이 유의하게 높고 자기관리, 일상활동, 통증/불편, 불안/우울 4가지 항목에서는 삶의 질이 유의하게 낮은 것으로 분석됨. 또한, 평균 삶의 질 역시 폐경이행군은 0.93, 폐경군은 0.96으로 전반적인 삶의 질이 낮은 것으로 평가됨.

**Table 25. Quality of life**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Mobility	1.08 ± 0.321)	1.16 ± 0.38	<0.001
Self care	1.02 ± 0.21	1.04 ± 0.20	0.004
Usual activities	1.06 ± 0.29	1.10 ± 0.31	<0.001
Discomfort	1.25 ± 0.49	1.33 ± 0.52	<0.001
Anxiety/depression	1.13 ± 0.38	1.16 ± 0.40	0.007
Mean EQ-5D	0.93 ± 0.11	0.96 ± 0.08	<0.001

\*1) mean ± standard deviation

• **종합분석**

- : 영양소 섭취와 식사의 질적 측면에서 폐경이행군은 만성질환의 위험을 높이는 영양소 섭취가 높고 폐경군의 영양섭취상태가 더 양호한 것으로 분석됨. 특히 여성에게 필수적인 칼슘, 철분, 비타민 A 섭취의 질이 폐경군에서 더 우수한 것으로 나타남. 삶의 질에서도 운동능력을 제외한 나머지 항목에서 폐경군의 삶의 질이 높은 것으로 평가됨. 따라서 본 data의 분석 결과, 우리나라 여성은 폐경기 이후 균형된 영양상태 유지를 위해 폐경이행기부터 사전 영양섭취 관리와 식사 가이드가 필요하며, 삶의 질 증가를 위해 다양한 방안모색이 필요한 것으로 사료됨.

○ **병원에 내원하는 여성들의 건강기능식품 섭취 현황 조사**

- 분석설계

- 직접설문 실시, 여성의 건강기능식품에 대한 인식 및 이용실태 조사
  - 연구대상 선별
    - : 병원에 내원하고 조사에 응한 여성 133명중 폐경전군 (n=76)과 폐경군 (n=57)으로 분류함
- 조사내용
  - : 일반사항 8문항 (연령, 폐경연령, 학력, 월평균 수입, 직업, 거주형태, 건강상태 자가 평가, 질병력), 건강기능식품에 대한 인식 5문항 (건강기능식품에 대한인지도, 관심도, 신뢰도, 정보 취득처), 이용실태 17문항 (이용경험유무, 품목, 구매처, 비구매 사유, 선택기준, 구매기준, 구매사유, 가장 중요시하는 요건, 선호 포장형태, 구매 분량, 지출비용, 구매만족도, 부작용, 재 구매의향, 여성전용 제품 개발 필요성, 여성전용 제품 개발 분야)
- 분석방법
  - : SPSS 18.0K 프로그램, Independent t-test 및  $\chi^2$  test 시행

◦ 연구결과

• 조사대상자들의 일반사항 (표26)

: 전체 분석대상자는 만 19세부터 67세 사이의 여성 133명이며 그 중 폐경인 대상은 57명으로 42.9%를 차지함. 폐경군의 평균 연령은 55.4 ± 6.2세이며 폐경연령은 49.6 ± 4.3세였고, 폐경전군의 평균 연령은 38.7 ± 9.0세로 나타남. 학력의 경우 폐경전군의 대졸 및 대학원졸의 비율이 59.2%로 폐경군의 36.8%에 비해 유의하게 높았고 (P<0.05), 월평균 수입에서는 두 군 모두 '200~300만원'이라고 응답한 비율이 가장 높았으나 유의한 차이는 없었음. 직업종류를 살펴보면 폐경군은 가정주부 (52.6%), 전문직 (2.8%), 자영업 (19.3%), 일반사무직 (5.3%)순으로 나타났으나 폐경전군에서는 가정주부 (38.2%), 전문직 (17.0%), 일반사무직 (15.8%), 판매서비스직 (15.8%), 자영업 (13.2%) 순으로 나타나 그룹간 유의한 차이를 보임 (P<0.01). 거주 형태는 두 군 모두 '자녀와 함께 산다', '부부만 산다'는 응답이 많았고, 건강상태 역시 '건강한 편이다', '보통이다'로 응답 순을 나타냄. 질병력을 살펴보면 폐경군은 질병이 있는 인원수는 총 32명으로 폐경군의 56.1%를 차지하였고 주로 심혈관질환 (31.2%), 암(31.2%), 생식계 질환 (21.9%) 순으로 나타났으며 폐경전군에서 질병이 있는 인원수는 총 25명으로 32.9%를 차지하였고 생식계질환 (64.0%)이 가장 많은 것으로 나타나 두 군간 유의한 차이를 보임 (P<0.01).

Table 26. General characteristics

	Postmenopause group (n=57)	Premenopause group (n=76)	P-value
Age	55.4 ± 6.2 <sup>1)</sup>	38.7 ± 9.0	0.002
menopausal age	49.6 ± 4.3	-	
Educational attainment			0.028
A junior high school degree or below	5 (8.8) <sup>2)</sup>	2 (2.6)	
A high school degree	31 (54.4)	29 (38.2)	
A college degree	19 (33.3)	44 (57.9)	
A graduate school degree	2 (3.5)	1 (1.3)	
Average monthly income (KRW)			0.955
2 million or below	13 (22.8)	18 (23.7)	

2-3 million	13	(22.8)	20	(26.3)	
3-4 million	12	(21.1)	14	(18.4)	
4-5 million	11	(19.3)	16	(21.1)	
5 million or over	8	(14.0)	8	(10.5)	
Occupation					0.003
Housewife	30	(52.6)	29	(38.2)	
Professionals	13	(22.8)	13	(17.0)	
Self-employed worker	11	(19.3)	10	(13.2)	
Office worker	3	(5.3)	12	(15.8)	
Sales and service	0	(0.0)	12	(15.8)	
living arrangement					0.074
Live along	2	(3.5)	9	(11.8)	
Couple-only	18	(31.6)	20	(26.3)	
Living with children	34	(59.6)	34	(44.7)	
Living with siblings	1	(1.8)	6	(7.9)	
Living with parents	2	(3.5)	7	(9.3)	
Health status					0.490
Very healthy	2	(3.5)	8	(10.5)	
Healthy	26	(45.6)	31	(40.8)	
Somewhat healthy	18	(31.6)	26	(34.2)	
Not healthy	10	(17.5)	8	(10.6)	
Very unhealthy	1	(1.8)	3	(3.9)	
Medical History					0.004
Diabetes mellitus	2	(6.3)	0	(0.0)	
Hypertension, hyperlipidemia, cardiovascular disease	10	(31.2)	3	(12.0)	
Cerebrovascular disease	0	(0.0)	1	(4.0)	
Cancer	10	(31.2)	1	(4.0)	
Gynecological/ genital disorder	7	(21.9)	16	(64.0)	
Others	3	(9.4)	4	(16.0)	

\*1) mean  $\pm$  standard deviation  
2) number (%)

• 건강기능식품에 대한 인식조사 (표27)

: 건강기능식품에 대한 인지도에 관한 질문에서 두 군 모두 '종류 정도만 알고 있다'는 응답이 가장 많았으며, 관심도에서는 폐경군은 관심 정도가 '보통이다' 49.1%, '관심이 많다' 29.8%였으나 폐경전군은 '보통이다' 51.3%, '관심이 없다' 25.0%로 군간 응답순에 차이를 보여줌. 신뢰도에서는 두 군 모두 '보통이다'는 응답이 과반을 넘게 차지했고 그 다음으로 '신뢰한다'고 응답하였으며, 정보취득처는 두 군 모두 'TV나 라디오', '주변 가족이나 지인'으로 응답한 비율이 높았으나 폐경전군은 '인터넷 및 스마트기기'를 통한 정보취득율이 25.0%나 차지하여 폐경군과의 차이점을 살펴볼 수 있음.

Table 27. Recognition on health functional foods

	Postmenopause group (n=57)	Premenopause group (n=76)	P-value
Recognition			0.294
I exactly know the type and efficacy of the food.	13 (22.8) <sup>1)</sup>	13 (17.1)	
I just know the type of the food.	25 (43.9)	39 (51.3)	

I just know the efficacy of the food.	17	(29.8)	16	(21.1)
I do not know at all.	2	(3.5)	8	(10.5)
Interest				0.053
Very much	5	(8.8)	6	(7.9)
Moderately	17	(29.8)	10	(13.2)
Somewhat	28	(49.1)	39	(51.3)
Very little	5	(8.8)	19	(25.0)
Not at all	2	(3.5)	2	(2.6)
Scientific reliability				0.323
Very reliable	1	(1.8)	1	(1.3)
Moderately Reliable	15	(26.3)	13	(17.1)
Somewhat reliable	35	(61.4)	54	(71.1)
Not very reliable	6	(10.5)	5	(6.6)
Not at all	0	(0.0)	3	(3.9)
Information source				0.161
TV, Radio	17	(34.0)	20	(31.2)
Internet, smart devices	2	(4.0)	16	(25.0)
Brochure	3	(6.0)	2	(3.1)
Door-to-door sales	3	(6.0)	3	(4.7)
Family members of acquaintances	19	(38.0)	19	(29.6)
Sales store	2	(4.0)	1	(1.6)
Related book	0	(0.0)	1	(1.6)
Home shopping ad	2	(4.0)	1	(1.6)
Professionals (physician, pharmacist, etc.)	2	(4.0)	1	(1.6)

\*1) number (%)

• **건강기능식품에 대한 이용실태 조사 (표28, 29)**

: 건강기능식품 섭취 경험에 대한 질문에서 폐경군은 '현재 섭취 중이다' 54.4%, '과거 섭취했었다' 22.8%, '섭취 경험이 없다' 22.8%로 응답하였으나 폐경전군은 '과거 섭취했었다' 41.3%, '현재 섭취 중이다' 32.0%, '섭취 경험이 없다' 26.7%로 두 군간 유의한 차이를 나타냄 ( $P < 0.05$ ). 현재 섭취 중이나 섭취 경험이 있는 경우 두 군 모두 대다수의 섭취품목은 영양보충용 제품으로 나타났고 구매처는 폐경군은 전문판매업소 38.5%, 약국 17.9%, TV 및 홈쇼핑 15.4%, 인터넷 15.4% 순으로 나타났으나 폐경전군은 약국 35.4%, 전문판매업소 31.3%, 인터넷 14.6%로 응답순위가 달랐음 ( $P < 0.05$ ). 과거 또는 현재 섭취를 하지 않는 대상자들에게 구매경험이나 계획이 없는 사유를 질문하였을 때 폐경군은 '효과가 없을 것 같아서'가 28.5%, '현재 건강하기 때문에 불필요하다' 17.9%, '식사섭취만으로는 불충분해서' 17.9% 순으로 나타났으며 폐경전군은 '현재 건강하기 때문에 불필요하다' 31.9%, '효과가 없을 것 같아서' 23.4%, '가격이 비싸서' 14.9%라고 응답함. 건강기능식품의 선택기준은 폐경군의 경우 '전문가의 권유'가 42.0%로 가장 높았으나 폐경전군은 '주변 경험을 통한 권유'가 45.6%로 가장 높았음. 구매기준은 두 군 모두 나의 '건강을 챙기기 위해서', 구매사유 역시 '건강유지'를 위한 응답이 가장 높았음.

**Table 28. Usage patterns of health functional foods I**

	Postmenopause group (n=57)	Premenopause group (n=76)	P-value
Experience of consumption			0.024
Former user	13 (22.8)	31 (41.3)	
Current user	31 (54.4)	24 (32.0)	
No experience	13 (22.8)	20 (26.7)	
Product items			0.311
Nutritional supplement	6 (66.7)	9 (75.0)	
Red ginseng	1 (11.1)	2 (16.7)	
Aloe	2 (22.2)	0 (0.0)	
Omega-3 fatty acids	0 (0.0)	1 (8.3)	
Place of purchase			0.025
Sales store	15 (38.5)	15 (31.3)	
TV shopping	7 (17.9)	0 (0.0)	
Internet	6 (15.4)	7 (14.6)	
Pharmacy	6 (15.4)	17 (35.4)	
Door-to-door sales	5 (12.8)	6 (12.5)	
Others	0 (0.0)	3 (6.2)	
Reasons for non-purchase			0.572
Unnecessary	5 (17.9)	15 (31.9)	
Taking other medications	3 (10.7)	3 (6.4)	
Expensive price	4 (14.3)	7 (14.9)	
Foods seem to be ineffective	8 (28.5)	11 (23.4)	
Concerned about negative effects	3 (10.7)	3 (6.4)	
Meals provide sufficient nutrients	5 (17.9)	5 (10.6)	
Others	0 (0.0)	3 (6.4)	
Selection criteria			0.265
Price	0 (0.0)	3 (4.4)	
Manufacturer	11 (22.0)	9 (13.2)	
Recommendation of experts	21 (42.0)	24 (35.3)	
Recommendation of acquaintances	18 (36.0)	31 (45.6)	
Others	0 (0.0)	1 (1.5)	
Buying criteria			0.594
For the health of family members	24 (44.6)	29 (41.4)	
For personal health	26 (48.0)	31 (44.3)	
Gift	2 (3.7)	7 (10.0)	
Others	2 (3.7)	3 (4.3)	
Reasons for purchase			0.779
Disease treatment	1 (1.9)	1 (1.4)	
Disease prevention	9 (17.3)	15 (21.1)	
Health maintenance	42 (80.8)	54 (76.1)	
Others	0 (0.0)	1 (1.4)	

\*1) number (%)



: 건강기능식품 선택시 가장 중요하게 생각하는 사항을 분석한 결과 두 군 공통으로 중요하다는 응답률이 가장 높았던 항목은 복용효과, 성분, 체질 관련성, 유통기한 및 제조일이었음. 특히 건강기능식품의 성분은 폐경전군에서 ‘중요하다’는 응답이 76.3%로 폐경군의 49.1%보다 유의하게 높았고 (P<0.01) 가격의 경우 폐경전군에서 ‘중요하다’는 응답이 56.6%로 가장 높았으나 폐경군에서는 ‘보통이다’는 응답이 57.9%로 두 군간 유의한 차이를 나타냄 (P<0.05). 상대적으로 맛과 향, 브랜드 및 제조회사, 복용 편리성, 휴대의 간편성, 구매 후 A/S, 광고여부, 포장디자인은 중요도에서 큰 차이를 보이지 않았음. 구매 시 포장 형태는 두 군 모두 정제나 캡슐형태를 원하고 있었고 1회 구매 시 3~6개월치에 대한 요구가 가장 많았음. 한달 평균 건강기능식품 지출 적정비용은 폐경군은 5~10만원이 38.6%, 10~15만원이 33.3%순이었으나 폐경전군은 5~10만원 43.4%, 5만 원 이하 30.3%로 군간 유의한 차이를 나타내었음 (P<0.01).

**Table 29. Usage patterns of health functional foods II**

		Postmenopause group (n=57)	Premenopause group (n=76)	P-value
<b>Most importantly considered factors</b>				
Efficacy	Important	34 (59.6)	59 (77.6)	0.080
	Moderately important	22 (38.6)	16 (21.1)	
	Not important	1 (1.8)	1 (1.3)	
Components	Important	28 (49.1)	58 (76.3)	0.003
	Moderately important	27 (47.4)	15 (19.8)	
	Not important	2 (3.5)	3 (3.9)	
Price	Important	20 (35.1)	43 (56.6)	0.024
	Moderately important	33 (57.9)	26 (34.2)	
	Not important	4 (7.0)	7 (9.2)	
Taste and flavor	Important	5 (8.8)	17 (22.4)	0.054
	Moderately important	39 (68.4)	38 (50.0)	
	Not important	13 (22.8)	21 (27.6)	
Manufacturer	Important	21 (36.8)	27 (35.5)	0.308
	Moderately important	33 (57.9)	39 (51.3)	
	Not important	3 (5.3)	10 (13.2)	
Usage convenience	Important	19 (33.3)	33 (43.4)	0.219
	Moderately important	34 (59.7)	34 (44.8)	
	Not important	4 (7.0)	9 (11.8)	
Portability	Important	18 (31.6)	29 (38.2)	0.545
	Moderately important	31 (54.4)	34 (44.7)	
	Not important	8 (14.0)	13 (17.1)	
After-sales service	Important	18 (31.6)	31 (40.8)	0.522
	Moderately important	29 (50.9)	32 (42.1)	
	Not important	10 (17.5)	13 (17.1)	
Advertisement, recognition	Important	14 (24.6)	12 (15.8)	0.214
	Moderately important	33 (57.9)	42 (55.3)	
	Not important	10 (17.5)	22 (28.9)	
Packaging design	Important	10 (17.5)	7 (9.2)	0.010
	Moderately important	33 (57.9)	31 (40.8)	
	Not important	14 (24.6)	38 (50.0)	
Personal body constitution features	Important	30 (52.6)	62 (81.6)	0.002
	Moderately important	22 (38.6)	12 (15.8)	
	Not important	5 (8.8)	2 (2.6)	
Expiration date, manufacture date	Important	30 (52.6)	55 (72.4)	0.043
	Moderately important	22 (38.6)	19 (25.0)	

	Not important	5 (8.8)	2 (2.6)	
Packaging type				0.229
Tablets (pills)	19 (35.8)	40 (56.4)		
Capsules	20 (37.7)	17 (23.9)		
Powders (granular materials, pouch)	3 (5.7)	2 (2.8)		
Liquids (syrup, water)	9 (17.0)	9 (12.7)		
Pills (herbal medicine)	2 (3.8)	3 (4.2)		
Purchase quantity				0.292
Less than 1-2 months	13 (22.8)	29 (38.2)		
3-6 months	36 (63.2)	40 (52.6)		
1 year	6 (10.5)	6 (7.9)		
1 year or over	2 (3.5)	1 (1.3)		
Reasonable monthly expense (KRW)				0.006
50,000 or less	11 (19.3)	23 (30.3)		
50,000-100,000	22 (38.6)	33 (43.4)		
100,000-150,000	19 (33.3)	7 (9.2)		
150,000-200,000	5 (8.8)	13 (17.1)		
200,000 or over	0 (0.0)	0 (0.0)		

\*1) number (%)

• 건강기능식품에 대한 만족도 및 요구도 조사 (표30)

: 구매 시 만족도에 대해 살펴본 결과 두 군 모두 복용효과에 대해서는 ‘보통이다’는 응답율이 80%를 상회하였고, A/S 처리나 가격, 품질에 대해서는 ‘보통이다’는 응답이 가장 높았음. 건강기능식품 섭취 후 다빈도로 경험했던 부작용으로는 두 군 모두 위장장애와 구토, 피부질환을 꼽음. 재 구매 의향으로는 폐경군은 ‘의향이 있다’ 47.8%, ‘그저 그렇다’ 39.1% 폐경전군은 ‘의향이 있다’ 55.6%, ‘그저 그렇다’ 38.9%로 재 구매 의향은 폐경전군에서 근소하게 많았음. 여성만을 위한 건강기능식품 개발의 필요성에 대해 질문한 결과 ‘잘 모르겠다’는 응답이 두 군 모두 높았고 ‘필요하다’는 응답은 폐경군 22.8%, 폐경전군 32.9%로 나타났다으며 개발되기를 희망하는 제품분야로는 두 군 모두 갱년기 증후군 및 삶의 질 개선과 여성 다빈도 질병 예방 및 지연, 여성 전반에 대한 영양제품 순으로 답하였음.

**Table 30. Usage satisfaction and needs for development of health functional foods**

		Postmenopause group (n=57)	Premenopause group (n=76)	P-value
Purchase satisfaction				
Efficacy	Satisfied	3 (6.8)	2 (3.7)	0.671
	Moderately satisfied	35 (79.6)	44 (81.5)	
	Not satisfied	6 (13.6)	8 (14.8)	
Customer service	Satisfied	7 (15.9)	8 (14.8)	0.714
	Moderately satisfied	31 (70.5)	42 (77.8)	
	Not satisfied	6 (13.6)	4 (7.4)	
Price	Satisfied	12 (27.3)	8 (14.8)	0.255
	Moderately satisfied	30 (68.2)	40 (74.1)	
	Not satisfied	2 (4.5)	6 (11.1)	
Quality	Satisfied	1 (2.3)	3 (5.6)	0.214
	Moderately satisfied	39 (88.6)	41 (75.9)	
	Not satisfied	6 (9.1)	10 (18.5)	
Negative effect				0.142
None		28 (66.7)	41 (87.3)	
Gastrointestinal disorder		8 (19.0)	5 (10.6)	
Skin disorder		5 (11.9)	0 (0.0)	

Headache	1	(2.4)	1	(2.1)	
Repurchase intention					0.064
Not at all	3	(7.0)	3	(5.6)	
Very little	18	(41.9)	21	(38.8)	
Very much	22	(51.2)	30	(55.6)	
Need of food products development for women					0.370
Necessary	13	(22.8)	25	(32.9)	
Unnecessary	4	(7.0)	3	(3.9)	
Not sure	40	(70.2)	48	(63.2)	
Segment of product development					0.881
Improvement of climacteric syndrome and quality of life	15	(50.0)	19	(45.2)	
Overall nutritional status of women	5	(16.7)	9	(21.4)	
Prevention and delay of frequent diseases in women	9	(30.0)	11	(26.2)	
Weight management	1	(3.3)	3	(7.2)	

\*1) number (%)

#### • 종합분석

: 폐경전군과 폐경군의 건강기능식품 이용실태 및 요구도 조사를 실시한 결과, 폐경전군은 학력과 전문직 비율이 높았음. 건강기능식품에 대한 관심도도 폐경전군이 높았고 폐경군에 비해 인터넷 및 스마트기기 정보취득율이 높음. 또한 현재 건강기능식품의 섭취율은 폐경군에 비해 낮았는데 이는 현재 건강이 양호하여 불필요하다는 응답이 주를 이루었으나 재구매의향율은 폐경전군이 약간 더 높았음. 두 군 모두 제품에서 중요한 요소를 복용효과, 성분, 체질 관련성, 유통기한, 제조일순으로 꼽았고 여성만을 위한 건강기능식품 개발의 필요성에 대해 폐경전군의 요구가 높았음. 제품의 종류로는 두 군 모두 갱년기 증후군 및 삶의 질 개선과 여성 다빈도 질병 예방 및 지연, 여성 전반에 대한 영양제품 순으로 응답하였음. 상기 결과를 통해 여성건강개선 및 갱년기 증후군 예방을 위한 제품의 개발은 필수적이고, 잠재적으로 구매력과 관심도가 높은 폐경전군을 대상으로 한 판매전략과 홍보마케팅 준비는 매우 효과적인 결과를 보여줄 것으로 사료됨.

#### ○ 에스트로겐 분비에 영향을 주는 식생활 요인 조사

##### ◦ 분석설계

• 직접설문 실시, 에스트로겐 분비에 영향을 주는 식생활 요인 조사

• 연구대상 선별

: 병원에 내원하고 조사에 응한 여성 226명중 에스트로겐(E2 기준) 분비 정상군 (n=88)과 저하군 (n=138)으로 분류함 (항목별 응답빈도는 다름)

• 조사내용

: 일반사항, 여성건강요인, 식생활요인, 갱년기지수, 삶의 질, 영양섭취상태

: 에스트로겐 농도 (E2, FSH)

• 분석방법

: SPSS 18.0K 프로그램, Independent t-test 및  $\chi^2$  test 시행

##### ◦ 연구결과

• 일반사항 및 건강요인 (표31)

: 에스트로겐 분비상태에 따른 두 군간의 건강요인을 살펴본 결과 폐경은 정상군 31.4%, 저하군 83.3%로 저하군에서 많았음. 경제소득의 경우 두 군 모두 중상, 중하였고 학력수준도 비슷함

였음.

: 비만도는 정상범위가 가장 많았으나 과체중이상의 비율은 저하군에서 더 높았음. 임신과 출산의 비율은 두 군 모두 비슷하였음.

: 경구피임약 사용경험 및 현재 사용률은 정상군 16.7%, 저하군 16.7%로 응답하였고 호르몬 치료경험 및 현재 치료율은 정상군은 22.7%, 저하군은 54.3%로 나타났음. 이는 병원에 내원하는 여성을 대상으로 하였기에 저하군의 치료율이 상대적으로 높은 것으로 사료됨.

**Table 31. General characteristics and health status**

	Normal Group (n=88)	Low Group (n=138)	P-value
Age	48.4 ± 4.11)	52.9 ± 5.0	<0.001
Menopause status			
Pre	59 (68.6)2)	23 (16.7)	<0.001
Post	27 (31.4)	115 (83.3)	
Income			
Low	8 (9.1)	10 (7.4)	0.193
Middle-low	38 (43.2)	54 (39.7)	
Middle-high	38 (43.2)	71 (52.2)	
High	4 (4.5)	1 (0.7)	
Educational level			
≤ Middle school	7 (8.0)	16 (11.8)	0.464
High school	50 (56.8)	77 (56.6)	
≥ Undergraduate school	31 (35.2)	43 (31.6)	
Marital status			
Unmarried	4 (4.6)	3 (2.2)	0.435
Married	83 (95.4)	134 (97.8)	
BMI			
Underweight	3 (3.5)	3 (2.2)	0.311
Normal	44 (51.8)	61 (44.9)	
Overweight	13 (15.3)	35 (25.7)	
Obesity	25 (29.4)	37 (27.2)	
Ever pregnancies			
Yes	85 (96.6)	128 (95.5)	0.693
No	3 (3.4)	6 (4.5)	
Ever delivery			
Yes	81 (94.2)	132 (96.4)	0.447
No	5 (5.8)	5 (3.6)	
Ever OC use			
Yes	14 (16.9)	22 (16.7)	0.969
No	69 (83.1)	110 (83.3)	
Ever hormone treatment			
Yes	20 (22.7)	75 (54.3)	0.070
No	68 (77.3)	63 (45.7)	

\*1) mean ± standard deviation

2) number (%)

• **식생활습관 및 삶의 질 (표32)**

: 생활습관 및 식습관을 비교한 결과 흡연의 경우 정상군의 현재 흡연율은 정상군 4.7%, 저하군 3.3%였으며 현재 음주율은 정상군 44.7%, 저하군 31.3%로 유의하지는 않았지만 정상군에서 다소 높았음. 규칙적인 운동 시행이나 일일 평균 수면시간은 두 군 모두 비슷하였음. 스트레스 정도는 평균 33.8%가 많은 편이라고 응답하였음.

: 식사의 규칙성은 항상 규칙적이거나 가끔 규칙적이다라는 응답율은 정상군이 더 높았으나 유의한 차이는 없었음. 갱년기 지수 평균 평점은 정상군 81.89점, 저하군 82.29점으로 차이가 없었음. 에스트로겐 농도에 따른 삶의 질 비교시에도 총 평균 평점은 정상군 1.18점, 저하군 1.17점으로 두 군간 유의한 차이가 나타나지 않았음.

Table 32. Life style and diet habit status

	Normal Group (n=88)	Low Group (n=138)	P-value
<b>Smoking</b>			
Nonsmoker	78 (91.8) <sup>1)</sup>	116 (94.3)	0.772
Smoker at past	3 (3.5)	3 (2.4)	
Current smoker	4 (4.7)	4 (3.3)	
<b>Drinking</b>			
Nondrinker	43 (50.6)	81 (61.8)	0.131
Drinker at past	4 (4.7)	9 (6.9)	
Current drinker	38 (44.7)	41 (31.3)	
<b>Regular Exercise</b>			
Yes	38 (43.7)	64 (47.8)	0.552
No	49 (56.3)	70 (52.2)	
<b>Sleeping hours per day</b>			
	6.6 ± 1.1 <sup>2)</sup>	6.3 ± 1.4	0.456
<b>Stress level</b>			
Too much	2 (2.3)	5 (3.8)	0.843
Much	28 (32.6)	38 (28.8)	
A little	51 (59.3)	79 (59.8)	
Almost never	5 (5.8)	10 (7.6)	
<b>Meal regularity</b>			
Ever regular	32 (36.8)	35 (25.9)	0.368
Sometime regular	24 (27.6)	43 (31.9)	
Ever irregular	14 (16.1)	24 (17.8)	
Sometime irregular	17 (19.5)	33 (24.4)	
<b>Kupperman's index</b>			
	81.89 ± 29.44	82.29 ± 35.12	0.932
<b>Mobility</b>			
	1.05 ± 0.21	1.08 ± 0.28	0.323
<b>Self care</b>			
	1.05 ± 0.26	1.02 ± 0.15	0.376
<b>Usual activities</b>			
	1.05 ± 0.21	1.04 ± 0.21	0.938
<b>Discomfort</b>			
	1.48 ± 0.57	1.41 ± 0.54	0.305
<b>Anxiety/depression</b>			
	1.32 ± 0.49	1.34 ± 0.49	0.777
<b>Mean EQ-5D</b>			
	1.18 ± 0.20	1.17 ± 0.24	0.722

\*1) number (%)

2) mean ± standard deviation

· 영양소 섭취 평가 (표33)

: 영양소 섭취상태를 비교한 결과 인과 엽산을 제외한 나머지 영양소에서 섭취량에 차이가 없었음. 인과 엽산 모두 저하군의 섭취가 유의하게 많은 것으로 분석됨.

Table 33. Comparison of nutrient intake

	Normal Group (n=88)	Low Group (n=138)	P-value
Energy (kcal)	1580.1 ± 622.7 <sup>1)</sup>	1747.9 ± 67.4.0	0.565
Protein (g)	58.9 ± 32.3	68.5 ± 32.4	0.446
Fat (g)	38.5 ± 21.6	44.3 ± 36.8	0.329
Carbohydrate (g)	249.6 ± 91.8	271.4 ± 109.7	0.371
Fiber (g)	15.6 ± 8.0	18.1 ± 9.4	0.222
Calcium (mg)	400.4 ± 242.8	440.6 ± 235.7	0.887
Phosphorous (mg)	650.9 ± 403.1	803.0 ± 371.3	0.016
Iron (mg)	11.4 ± 8.5	10.9 ± 5.7	0.653
Sodium (mg)	3166.5 ± 1900.4	3618.7 ± 2032.0	0.164
Potassium (mg)	1766.0 ± 1030.8	2054.5 ± 1141.3	0.110
Zinc (mg)	7.1 ± 6.4	7.3 ± 4.5	0.891
Vitamin A (µgRE)	536.8 ± 578.9	516.7 ± 431.3	0.804
Retinol (µg)	110.4 ± 235.6	85.1 ± 127.5	0.385
β Carotene (µg)	2579.9 ± 3116.8	2530.4 ± 2240.1	0.908
Vitamin B1 (mg)	0.84 ± 0.47	0.86 ± 0.38	0.814
Vitamin B2 (mg)	0.79 ± 0.46	0.81 ± 0.39	0.841
Vitamin B6 (mg)	1.46 ± 0.87	1.64 ± 0.87	0.212
Niacin (mgNE)	11.2 ± 6.7	12.9 ± 7.0	0.122
Vitamin C (mg)	88.1 ± 79.5	95.2 ± 72.6	0.566
Folic acid (mg)	169.9 ± 88.8	216.4 ± 127.3	0.014
Vitamin E (mg)	9.2 ± 6.8	10.9 ± 7.7	0.145
Cholesterol (mg)	217.7 ± 190.7	225.2 ± 169.6	0.796

\*1) mean ± standard deviation

· 식품 섭취량 평가 (표34)

: 평소 식품 섭취량에 대한 조사 분석을 시행한 결과, 과일류, 난류, 음료류를 제외한 나머지 식품군에 대한 섭취는 차이가 없었음.

: 과일과 난류의 경우 정상군의 섭취가 유의하게 많았고, 음료류는 저하군의 섭취가 유의하게 많음.

Table 34. Comparison of food intake (g)

	Normal Group (n=88)	Low Group (n=138)	P-value
Grains & cereals	234.9 ± 123.3 <sup>1)</sup>	242.9 ± 125.4	0.691
Potatos & starches	43.6 ± 83.7	63.4 ± 102.6	0.205
Sugar & sweetners	5.6 ± 6.6	6.7 ± 8.1	0.396
Beans	45.8 ± 130.3	44.6 ± 60.8	0.934

Nuts & seeds	3.8 ± 13.5	2.4 ± 8.9	0.340
Vegetables	200.4 ± 128.1	232.6 ± 143.2	0.152
Mushrooms	5.9 ± 17.2	5.3 ± 18.4	0.826
Fruits	137.8 ± 143.3	90.1 ± 119.5	0.048
Meats	40.2 ± 40.3	51.2 ± 64.5	0.233
Eggs	69.1 ± 304.8	18.9 ± 28.3	0.019
Fishes & shellfishes	51.6 ± 92.5	55.5 ± 74.4	0.787
Seaweeds	3.7 ± 13.0	3.5 ± 10.6	0.907
Milks	66.3 ± 101.8	56.7 ± 107.9	0.578
Oils	7.1 ± 17.1	7.0 ± 6.8	0.955
Beverages	95.0 ± 85.4	214.3 ± 97.1	0.001
Seasonings	20.2 ± 16.6	26.5 ± 20.5	0.413

\*1) mean ± standard deviation

#### · 종합분석

: 에스트로겐 (E2) 농도를 기준으로 정상군과 저하군의 식생활과 영양섭취 상태를 비교하였을 때 학력, 경제수준, 여성건강요인, 음주, 흡연, 운동, 갱년기지수, 삶의 질은 유의한 차이가 없었음. 그러나 저하군의 비만도가 정상군에 비해 다소 높고 인과 엽산, 음료류의 섭취가 유의하게 많고 정상군은 과일과 난류의 섭취가 많은 것으로 분석됨. 전반적인 결과 사회 환경적 요인이 나 생활습관보다 에스트로겐은 비만상태, 영양소 및 식품 섭취에 영양을 받을 것으로 예측되거나 체내 식이섭취에 따른 호르몬 분비상태에 대해서는 더 많은 연구와 논의가 필요한 것으로 사료 됨.

#### ○ 폐경이행기와 폐경 후 여성의 식품섭취빈도, 건강기능식품 이용 빈도 조사

##### · 분석설계

- 국민건강영양조사 2009~2012년도 자료 분석
- 연구대상 선별

: 국민건강영양조사 여성건강 조사항목 분야에서 40세 이상의 여성 중 폐경이행기(n=2,298)와 폐경군(n=2,101)으로 분류함

: 제외대상 - 남성, 40세 미만여성, 월경여부 무응답, 영양소 섭취 및 삶의 질 무 응답자

##### · 연구내용

- : 건강기능식품 이용현황 조사
- : 식품섭취 빈도

##### · 분석방법

: SPSS 18.0K 프로그램,  $\chi^2$  test 시행

##### · 연구결과

- 건강기능식품 이용현황 조사 (표35)

**Table 35. Usage patterns of health functional foods**

	Menopause transition group (n=2,298)	Menopause group (n=2,101)	P value
Product items			
Nutritional supplement	364 (15.8) <sup>1)</sup>	528 (25.1)	0.213
Red ginseng	196 (8.5)	225 (10.7)	
Aloe	86 (3.7)	115 (5.5)	
Omega-3 fatty acids	190 (8.3)	259 (12.3)	

\*1) number (%)

폐경이행기군의 경우 전체 대상자중 건강기능식품을 이용하는 비율이 36.3%, 폐경군은 53.6%에 달했으며 폐경군은 두 군 모두 균형영양제품을 선호하는 것으로 나타남. 또한 폐경군은 혈액 개선에 효능이 있는 Omega-3 fatty acids 및 홍삼의 빈도도 폐경이행군보다 높았으나 두 군 사이에 유의한 차이는 없었음.

· 식품섭취빈도 조사 (표36)

**Table 36. Food intake frequency status**

**36-1. Menopause transition group**

	Total (n=1242)							
	None	6-11times /year	1time /month	2-3times /month	1time /week	2-3times /week	4-6time s/week	1time /day
Beer	679(54.7) <sup>1)</sup>	106(8.5)	165(13.3)	92(7.4)	113(9.1)	62(5.0)	17(1.4)	8(0.6)
Hamburger	1014(81.6)	119(9.6)	75(6.0)	26(2.1)	7(0.6)	1(0.6)	0(0.0)	0(0.0)
Pizza	663(53.4)	270(21.7)	218(17.6)	71(5.7)	18(1.4)	1(0.1)	1(0.1)	0(0.0)
Fried food	310(25.0)	273(22.0)	346(27.9)	188(15.1)	95(7.6)	27(2.2)	2(0.2)	1(0.1)
Coffee	103(8.3)	22(1.8)	26(2.1)	27(2.2)	50(4.0)	72(5.8)	41(3.3)	353(28.4)
Green tea	423(34.1)	77(6.2)	105(8.5)	95(7.6)	156(12.6)	160(12.9)	36(2.9)	140(11.3)
Soda drink	604(48.6)	192(15.5)	173(13.9)	107(8.6)	89(7.2)	58(4.7)	12(1.0)	7(0.6)

\*1) number (%)

**36-2. Menopause group**

	Total (n=574)							
	None	6-11times /year	1time /month	2-3times /month	1time /week	2-3times /week	4-6times/ week	1time /day
Beer	358(62.4) <sup>1)</sup>	58(10.1)	54(9.4)	42(7.3)	32(5.6)	23(4.0)	6(1.0)	1(0.2)
Hamburger	500(87.1)	43(7.5)	7(1.2)	2(0.3)	1(0.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Pizza	410(71.4)	93(16.2)	54(9.4)	14(2.4)	2(0.3)	1(0.2)	0(0.0)	0(0.0)
Fried food	186(32.4)	153(26.7)	73(12.7)	29(5.1)	5(0.9)	1(0.2)	0(0.0)	0(0.0)
Coffee	65(11.3)	12(2.1)	17(3.0)	16(2.8)	26(4.5)	44(7.7)	22(3.8)	180(31.4)
Green tea	216(37.6)	56(9.8)	58(10.1)	42(7.3)	53(9.2)	75(13.1)	15(2.6)	40(7.0)
Soda drink	318(55.4)	89(15.5)	62(10.8)	57(9.9)	33(5.7)	12(2.1)	3(0.5)	0(0.0)

\*1) number (%)

: 폐경이행군과 폐경군의 술, 음료, 패스트푸드 등 건강과 관련된 식품섭취빈도를 살펴본 결과 두군은 비슷한 양상을 나타냄. 맥주, 햄버거, 피자, 튀김음식, 탄산음료에 대한 섭취빈도는 상대



적으로 적고 커피의 섭취빈도는 두 군 모두 높은 경향을 나타냄.

○ 연구과제 성과 목표 달성을 위한 향후 추진 방안

- 1단계 : 인체적용시험의 추가 진행
  - 현재 진행 된 64명의 대상자를 통한 Kupperman 지표의 유의차는 0.78임. 이에 약 40명 인체적용시험을 추가로 진행 계획.
  - (1) 식약처 민원상담 10월 27일 진행 - 추가 인체적용시험에 대한 논의.
  - (2) 식약처 민원상담 11월 13일 예정 - DM 통계 진행 자료 확인.
- 2단계 : 추출혼합물 에서의 지표물질 함량 설정
  - 각 개별 추출물에서 설정된 지표물질 함량을 추출혼합물에서 확인 및 이에 따른 공인 성적서 발행.
  - 시기별, 지역별 원료의 지표물질 함량 확인 및 설정 진행.

그림45. 향후 추진 타임라인

원료이름	항목	세부항목	담당자	담당기관	2017		2018									
					11	12	1	2	3	4	5	6	7	8		
백여시	기능성	세포시험	장민선	숙명여대												
		동물시험	류현열	KCL												
		인체적용시험 (보안 시험진행)	김태희	순천향대학교												
		논문 작성 및 게재 (세포/동물/인체)														
	규격화 및 안전성	지표물질 선정	오현아	Natural F&P												
		공인성적서 (지표물질, 성분, 유해물질 등)	오현아	Natural F&P												
	서류작성	서류작성	오현아	Natural F&P												
	식약처 방문상담	자료 제출전 최종 방문 상담	오현아	Natural F&P												
	서류 제출 및 심사	서류제출	오현아	Natural F&P												
		1차 심사 (120일)	오현아	Natural F&P												
		보안 및 제출 (해당되는 경우)	오현아	Natural F&P												
	재심사 (해당되는 경우)	오현아	Natural F&P													
	개별인정 승인	개별인정 승인	오현아	Natural F&P												

- 3단계 : 건강기능식품 제품 개발
  - 타블렛, 캡슐 등의 제형을 통하여 전문적인 여성건강의 시장 점유율 확인 및 마케팅 전략 확인.

※ 각 단계별 연구 진행 하여 “연구과제 종료 후 보고”를 통해 연구 진행에 대한 추가 보고를 진행 할 것임.

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

##### 4-1. 목표달성도

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보진시	
												SCI	비SCI						
최종목표	3					1					1	2	5	6		7		1	
1차년도	목표	2												1		1			
	실적	2							1					3					
2차년도	목표	1										1	2	2		4			
	실적					1						2	2	3		1			
3차년도	목표					1					1	1	3	3		2		1	
	실적	1							2			1	3	4		2			
소계	목표	3				1					1	2	5	6		7			
	실적	3				1			3			3	5	10		3			
종료 1차년도		1										1	1						
종료 2차년도		1										1	1						
종료 3차년도																			
소계		2										2	2			4			
합계		3	2			1			3		1	4	7	6		3		1	

##### 4-2. 관련분야 기여도

-(주)네추럴에프앤피

- 원료의 최적 추출방법을 통한 대량생산 표준화 확립
- 본 연구과제를 위한 3명의 중앙연구소 고용창출 사업화 추가 성과
- 시제품 제작을 통한 제품화 연구로 시장 진입 준비
- 전문인력으로 구성된 개별인정형 승인을 위한 식약처와의 모뎀토의 및 승인을 이끌어 내기 위한 추가적인 지표물질 설정 및 그에 따른 증명 자료 작성

- 본 연구사업의 성과를 바탕으로 개별인정형 승인 후 건강기능식품으로서의 상품화까지 개발 진행 -협동기관 (숙명여자대학교, 순천향대학교 부천병원)
- 숙명여자대학교와 순천향대학교의 과학적 증명에 따른 논문 게재 (SCI 150% 달성, 비SCI 100%달성) 및 학술 발표 (166% 달성)의 추가적 성과

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>1. 연구수행 결과로 이루어진 상품화된 여성갱년기 건강을 위한 건강기능식품 제품화</p> <p>가. 제품 및 출시</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구를 통하여 개별인정형 원료로서의 건강기능식품을 제조하여 2018년부터 판매할 수 있도록 제품화 단계를 밟을 것임.</li> <li>○ 백년초, 여주, 시계꽃 추출복합물의 개별인정형원료를 함유한 여러 제품을 개발하여 홈쇼핑, (주)네추럴에프앤피의 자체 온라인 몰에서도 판매를 진행 할 예정임.</li> <li>○ 여성 갱년기 건강을 위한 건강기능식품의 경우 백수오 추출물이 대부분의 시장을 점유하고 있으며, 최근 여러 원료에 대한 이슈 사항으로 소비자의 불신이 이어짐에도 백수오 추출물의 매출은 꾸준히 일어나고 있음. 이에, 안전하고 새로운 원료로서 소비자의 신임을 얻는다면 여성갱년기 건강의 큰 시장에 많은 매출이 예상됨.</li> <li>○ 기능을 인정받은 본 원료의 본 사업에서 진행된 암 예방 등의 면역증진 효능을 활용하여 추가적인 기능성 인정을 받기위해 노력할 것임.</li> </ul> <p>나. 세부 생산 및 판매 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2018년 상반기 개별인정형 원료로서 승인 및 건강기능식품 품목제조신고</li> <li>○ 2018년 중반부터 건강기능 식품으로서 생산</li> <li>○ 홈쇼핑 런칭을 통해 매출을 계획하고 있으며, 지속적인 유통채널 확보를 통해 매출 증대가 기대됨.</li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 일반		

### 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11																																										
<p>○ 기술적 위험요소 분석</p> <p><b>임상시험은 인간을 대상으로 함으로 연구 윤리 사항에 위배될 가능성이 존재</b></p> <p>- 생명윤리 및 안전에 관한 법률」에 의거하여 연구수행기관 자체의 기관생명윤리심의 위원회를 통해 심의를 받고 질병관리본부에 그 결과(심의결과서)를 제출하려고 함.</p> <p>○ 안전관리대책</p> <p><b>&lt;제1세부(주관)&gt; (주)네추럴에프앤피</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 15%;">구분</th> <th style="width: 40%;">내용</th> <th style="width: 15%;">주체</th> <th style="width: 20%;">관련근거</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>안전 점검</td> <td>일상점검</td> <td>실험 시작 전 매일 실시</td> <td>각 실험실</td> <td>안전·보건 관리규정 제 2장</td> </tr> <tr> <td>안전 교육</td> <td>안전교육</td> <td>실험실 책임자가 신입사원 대상 실험실별 안전교육 실시(월 1시간 이상)</td> <td>각 실험실</td> <td>안전·보건 관리규정 제 3장</td> </tr> <tr> <td>보험</td> <td>보험가입</td> <td>직원의 경우 관리본부에서 일괄 가입</td> <td>각 실험실/ 시설자재실</td> <td>내부규정</td> </tr> <tr> <td>건강 검진</td> <td>일반건강검진</td> <td>유해인자 취급 연구실 1년 1회 이상 실시</td> <td>각 실험실</td> <td>안전·보건 관리규정 제 2장</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>&lt;제1협동&gt; 숙명여자대학교</b></p> <p><input type="checkbox"/> 2017년 연구실 안전환경 중점 개선사항</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2016년 실험실 정기점검 결과 미비점을 중점적으로 개선 예정</li> <li>○ 안전비품추가 확충 및 안전시설 개선, 개인안전보호구와 안전물품 확충</li> <li>○ 연구실 안전인식 확산을 위한 연구실내 안전활동 및 안전교육강화</li> <li>○ 실험실 고압가스 사용 및 취급관련 사항 개선</li> <li>○ 실험실 고압가스 사용 및 취급관련 사항 개선</li> </ul> <p><input type="checkbox"/> 안전점검 및 정밀안전진단</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 20%;">일상점검</th> <th style="width: 20%;">상시점검</th> <th style="width: 20%;">정기점검</th> <th style="width: 30%;">정밀안전진단</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>횟수</td> <td>매일 1회</td> <td>월 1회 이상</td> <td>연간 1회</td> <td>2년 1회</td> </tr> <tr> <td>대상</td> <td>중점관리연구실</td> <td>중점관리연구실,</td> <td>중점관리연구실,</td> <td>중점관리연구실중</td> </tr> </tbody> </table>				구분	내용	주체	관련근거	안전 점검	일상점검	실험 시작 전 매일 실시	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 2장	안전 교육	안전교육	실험실 책임자가 신입사원 대상 실험실별 안전교육 실시(월 1시간 이상)	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 3장	보험	보험가입	직원의 경우 관리본부에서 일괄 가입	각 실험실/ 시설자재실	내부규정	건강 검진	일반건강검진	유해인자 취급 연구실 1년 1회 이상 실시	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 2장		일상점검	상시점검	정기점검	정밀안전진단	횟수	매일 1회	월 1회 이상	연간 1회	2년 1회	대상	중점관리연구실	중점관리연구실,	중점관리연구실,	중점관리연구실중		
	구분	내용	주체	관련근거																																								
안전 점검	일상점검	실험 시작 전 매일 실시	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 2장																																								
안전 교육	안전교육	실험실 책임자가 신입사원 대상 실험실별 안전교육 실시(월 1시간 이상)	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 3장																																								
보험	보험가입	직원의 경우 관리본부에서 일괄 가입	각 실험실/ 시설자재실	내부규정																																								
건강 검진	일반건강검진	유해인자 취급 연구실 1년 1회 이상 실시	각 실험실	안전·보건 관리규정 제 2장																																								
	일상점검	상시점검	정기점검	정밀안전진단																																								
횟수	매일 1회	월 1회 이상	연간 1회	2년 1회																																								
대상	중점관리연구실	중점관리연구실,	중점관리연구실,	중점관리연구실중																																								

		일반관리연구실	일반관리연구실	해당연구실
점검자	해당실험실사용자	부서담당자	외부점검의뢰 또는 부서담당자	외부점검의뢰

○ 안전점검 및 안전진단체계

※ 안전관리 구분을 위한 분류

- 중점관리 연구실 (A형, B형, C형 실험실), 일반관리 연구실(D형, E형 실험실)

※ 연구 형태에 따른 관리형태 분류

- A형 실험실(미생물 및 동물을 사용), B형 실험실 (화학약품 등을 사용), C형 실험실(기계 전기설비 등을 사용), D형 실험실 (컴퓨터 사용), E형 실험실(작업 테이블 등으로만 되어 있는 설계/제도/제단 실습실).

○ 2017년 정기점검 및 정밀안전진단 실시 계획

가. 정기점검 : 2017년 6월 예정 (연안법 또는 교내규정으로 정한 연구실)

나. 정밀안전진단 : 2017년 10월 예정 (연안법에서 정한 정밀안전진단 대상 실험실)

다. 진단결과 보고 : 매년 4월 30일 교과부 보고

□ 연구실 안전교육

○ 교육개요

- 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강.

○ 교육구분

가. 정기교육

- 1) 교육방법 : 오프라인 교육 및 온라인교육
- 2) 교육시기 : 오프라인 교육 (2월, 8월), 온라인 (4월, 10월).
- 3) 교육강사 : 본교 교수, 직원 및 외부 전문가 활용.
- 4) 교육내용 : 연안법, 전기/소방, 화학/생물, 기계/가스 및 기타 실험실 안전관련 사항.

※ 온라인교육 : 연구개발인력원 “연구실 안전” 온라인과정 매학기별로 수강

나. 신규종사자 교육

- 1) 교육방법 : 오프라인 교육 개별교육
- 2) 교육시기 : 신입생 입학전 1회
- 3) 교육강사 : 지도교수
- 4) 교육내용 : 연구실별 연구와 관련된 안전사항에 관련된 내용.

다. 수시교육

- 해당연구실의 연구과제 및 특별히 안전조치가 필요할 때 실험실책임자(담당교수)가 시행.

라. 특별교육

- 안전사고 발생시 및 우리대학의 실험실 안전사항 변경 등 특별한 사유 발생시.

○ 기타

가. 정기교육 미참석자는 대한 보충교육 및 추가 실시.

나. 실험/실습별로 필요시 수시로 안전교육 실시하도록 권장.

다. 실험실습 교과목에 대해서 안전교육을 강의계획에 포함하도록 시행 중.

□ 건강검진

○ 건강검진 실시계획

가. 시 기 : 2017년 10월 예정(년 1회)

나. 인 원 : 약 300명 (대학원생/연구원 등 상시연구활동 종사자)

다. 검진사항 : 일반건강검진 및 특수건강검진.

□ 보험가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주 관부서
교육시설공제	<ul style="list-style-type: none"> <li>재산 및 시설물 보험가입 : 약관에 따른 보상금액</li> <li>교육시설재난공제회에 가입</li> </ul>	피보험자	관계팀
캠퍼스보험	<ul style="list-style-type: none"> <li>상해사망 후유장해 : 1억원/인</li> <li>치료비 : 2백만원/인</li> </ul>	대학원생	총무·인사팀
연구실안전공제	<ul style="list-style-type: none"> <li>상해사망 및 후유장해 : 1억원/인</li> <li>상해, 후유정도에 따른 보상 : 1천만/인</li> <li>연구활동종사자 : 학부생, 대학원생, 연구원 등</li> </ul>	연구활동종사자	실험자원 관리팀
교직원 상해보험	<ul style="list-style-type: none"> <li>상해사망 및 후유장해 : 5천만/인</li> <li>입원의료비지원 : 200만원/인</li> <li>통원비 : 15만원, 조제비 : 5만원</li> </ul>	교직원	총무·인사팀

<제2협동> 순천향대학교

1) 연구실 안전점검 실시

- 일상점검 : 실험 시작 전 매일 각 실험실에서 실시  
[안전·보건 관리규정 제2장에 의거함]

2) 참여연구원의 안전교육 실시

- 신입사원 안전교육 : 실험실 책임자가 신입사원 대상으로 실험실별 안전교육 월 1시간 이상 실시  
[안전·보건 관리규정 3장에 의거함]

3) 연구활동종사자의 건강검진 및 보험가입

- 실험실습실 연구활동종사자 건강검진 실시
- 직원의 경우 관리본부에서 건강보험 일괄가입  
[내부규정에 의거함]
- 일반건강검진 : 협실습실 연구활동종사자 중 유해인자 취급 연구실 1년 1회 이상 실시  
[안전·보건 관리규정 제 2장에 의거함]

4) 실험실습실 안전수칙 제작 부착

- 실험실습실 안전수칙 게시판을 제작하여 실험실 제작 부착

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

### 가. 연구논문실적

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	Evaluation of The Biological Activity of <i>Opuntia ficus indica</i> as A Tissue- and Estrogen Receptor Subtype-Selective Modulator	숙명여자 대학교	교신	Phytotherapy Research	3.092	2016.06.02	중복사사	SCI
2	논문	Characterization of Phase I and Phase II Hepatic Metabolism and Reactive Intermediates of <i>Larrea nitida</i> Cav. and Its Lignan Compounds	숙명여자 대학교	교신	Phytotherapy Research	3.092	2017.01.06	중복사사	SCI
3	논문	Comments on the relationship between green tea consumption and the risk of endometrial cancer.	순천향대 학교	교신	Archives of Gynecology and Obstetrics	2.09	2015.11.24	단독사사	SCI
4	논문	A study on perception and usage status on health functional foods in women according to according to menopause status.	순천향대 학교	교신	Journal of Menopausal Medicine		2016.04.26	단독사사	KCI
5	논문	Alternative Therapy Trends among Korean Postmenopausal Women	순천향대 학교	교신	Journal of Menopausal Medicine		2016.04.25	단독사사	KCI
6	논문	Relationship between Heavy Metal Exposure and Bone Mineral Density in Korean Adult	순천향대 학교	교신	Journal of bone metabolism		2016.11.30	단독사사	KCI
7	논문	Cell Therapy Products in Menopausal Medicine	순천향대 학교	교신	Journal of Menopausal Medicine		2016.8.30	단독사사	KCI
8	논문	Management of Menopausal Symptoms in Mongoli	순천향대 학교	교신	Journal of Menopausal Medicine		2016.8.30	단독사사	KCI

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	코드번호		국명
			발표일시	C-06-02 장소	
1	2015 대한약학회 춘계 학술대회	정혜수	2015.04.24	오송 C&V센터	대한민국
2	2015 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	정혜수	2015.06.06	부산 벅스코	대한민국
3	2015 아시아독성학회	주문매	2015.06.26	제주 국제 컨벤션 센터	대한민국
4	The 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium	Hyesoo Jeong, Wenmei Zhou, Soolin Kim, Jimin Lee, Xiyuan Liu, So Dam Kim, Yun Seon Song, Minsun Chang	2015.10.19	제주 국제컨벤션 센터	대한민국
5	43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress (Poster presentation, p95, DOI:10.1530/boneabs.5.P95)	김태희	2016.05.14	로마	이탈리아
6	2016 한국질량분석학회 정기어름 학술대회	정혜수	2016.06.15	경주 화백 컨벤션 센터	대한민국
7	2016 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회	김수린	2016.11.01	제주 국제컨벤션센터	대한민국
8	12th International Conference on "Medical, Medicine and Health Sciences" (MMHS-2017 Osaka)	정혜수	2017.01.24	Osaka International Convention Center	일본
9	2016년 대한산부인과학회 102차 추계 학술대회	이대근, 김미진, 신예빈, 김지혜, 김태희	2016.9.23.~24.	그랜드 힐튼 서울 호텔 컨벤션센터	대한민국
10	11th European Menopause and Andropause Society (EMAS) Congress	최승도, 류애리, 김태희, 염승래, 박유진	2017.5.22.~24.	Amsterdam	네덜란드



다. 생명자원(생물자원)/화합물

		코드번호		C-06-03
No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

		코드번호		C-06-04					
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	특허	대한민국	(주)네추럴 에프앤피, 숙명여자대 학교산학협 력단	2015.02.03	10-2015-0 016550				100
2	특허	대한민국	(주)네추럴 에프앤피 숙명여자대 학교산학협 력단	2015.02.03	10-2015-0 016552				100
3	특허	대한민국	(주)네추럴 에프앤피	2017.07.13	10-2017-0 088968				100

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

					코드번호		C-06-05
No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

바. 전문연구 인력양성

			코드번호		C-06-06									
No 1	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	제2협동 (석사과정)	2016		2			1	1		2				
2	제1협동 (석사과정)	2016		1				1	1					

사. 산업기술 인력양성

					코드번호	C-06-07
No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1						
2						

아. 기술거래(이전) 등

					코드번호	C-06-08
8	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황

자. 사업화 투자실적

					코드번호	C-06-09
No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격	
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타	

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

							코드번호	C-06-10		
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	고용창출	고용창출	서울	1명	중앙연구소	(주)네추럴에프앤피			2015	
2	고용창출	고용창출	서울	2명	중앙연구소 개발팀	(주)네추럴에프앤피			2017	

카. 표준화

					코드번호	C-06-11	
No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(채택)일	국가
						yyyy.mm.dd	

타. 기술요약정보

			코드번호	C-06-12
연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호

파. 보고서 원문

		코드번호	C-06-13
연도	보고서 구분	발간일	등록번호

하. 기타

11. 기타사항

		코드번호	D-13
○			

12. 참고문헌

		코드번호	D-14
1.	Oh, S.M. and Chung, K.H. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. Life Sciences, 2004. <b>74</b> (11): p. 1325-35.		
2.	Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.M., Corbo, L.. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. Endocrine reviews, 2011. <b>32</b> (5): p. 597-622.		
3.	Ilieva, I., et al., The effects of Ginkgo biloba extract on lipopolysaccharide-induced inflammation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . Exp Eye Res, 2004. <b>79</b> (2): p. 181-7.		
4.	An, B.H., et al., Evaluation of the biological activity of Opuntia ficus indica as a tissue- and estrogen receptor subtype-selective modulator. Phytotherapy Research, 2016. <b>30</b> (6):971-80.		

주 의

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