

발간등록번호

11-1543000-002164-01

**태극삼, 흑삼, 인삼지상부를 이용한 수출국 맞춤형
연구를 통한 고부가가치 제품개발**

(주)지에프씨

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “수출전략기술개발사업”(개발기간 : 2014. 07. 29 ~ 2017. 07. 28의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 12. 10.

주관연구기관명 : (주)지에프씨

주관연구책임자 : 강희철
세부(협동)연구책임자 : 이대영
민은실
김규일
곽정원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	314026-3	해당 단계 연구 기간	2016.07.29.~ 2017.07.28	단 계 구 분	3/3
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	태극삼, 흑삼, 인삼지상부를 이용한 수출국 맞춤형 연구를 통한 고부가가치 제품개발			
연구 책임자	해당단계 참여 연구원 수	총: 25명 내부: 25명	해당단계 연구 개발비	정부: 1,000,000 천원 민간: 333,400 천원 계: 1,333,400천원	
	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 25명 내부: 75명	총 연구개발비	정부: 3,000,000천원 민간: 1,000,200천원 계: 4,000,200천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)지에프씨			참여기업명 (주)지에프씨, 국립원예특작과학원, (주)네추럴에프앤피, 진안홍삼연구소 (재), 고려인삼제조주식회사	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

국문 요약문

	코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 최종목표 - 인삼 수출국 맞춤형 제품 개발로 인삼 수출 활성화 도모</p> <p>1. 인삼부산물을 이용한 기능성 소재 개발</p> <p>가. 인삼부산물의 기능성 소재 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 농가로부터 인삼부산물 원료 확보 ○ 인삼재배 농가 컨설팅 및 계약재배 추진 ○ 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축 <p>나. 화장품 소재로서의 인삼부산물의 활용 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼부산물로부터 화장품 활성성분 분리, 동정 및 정량 분석 시스템 확립 ○ 인삼부산물로부터 발효조건 시스템 확립 ○ 새로운 zebrafish 배아모델 시스템을 이용한 미백효능 및 안전성평가 시스템 확립 ○ 새로운 멜라닌 생합성 저해제의 기전 연구 ○ 인삼 부산물 지상부 및 발효물을 이용한 주름개선 전임상 연구 ○ 인삼 지상부를 이용한 화장품 소재 연구 ○ 수출형 기능성 화장품 개발 연구 ○ 중화권(대만 또는 중국) 제품 수출 및 국내 수요처 발굴을 위한 마케팅 전략 수립 <p>다. 기능성 식품 소재로서의 인삼부산물의 활용 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발 ○ 인삼열매 추출물의 원료화 ○ 동물모델을 이용한 기능성 평가(간기능개선) ○ 인삼열매 추출물의 인체시험 시제품 제작 및 제품화 ○ 인삼열매 추출물의 개별인정 허가 및 제품화 ○ 인삼열매추출물의 고부가가치 제품 수출 활성화 마케팅 전략 수립 <p>2. 태극삼, 흑삼을 활용한 수출형 건강기능식품 개발</p> <p>가. 태극삼 및 흑삼의 표준 제조방법 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 태극삼 및 흑삼의 제조공정 개발 ○ 태극삼 및 흑삼 추출물 제조, 제품 제조공정 확립 ○ 태극삼 및 흑삼의 지표성분 및 이화학적 특성 규명 ○ 태극삼 및 흑삼 추출물의 성분분석 및 표준화, 안정성 확보 <p>나. 태극삼 및 흑삼의 기능성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 태극삼, 흑삼의 세포수준의 기능성 평가(항스트레스, 혈행개선) ○ 동물수준의 기능성 평가(항스트레스, 혈행개선) 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대만 또는 중국 수출국가 국민 대상 인체적용시험(항스트레스, 혈행개선) ○ 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별인정형) 확보를 위한 동물시험 추진 ○ 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별인정형) 확보를 위한 인체적용시험 추진 <p>다. 태극삼 및 흑삼을 활용한 제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 흑삼, 태극삼 시제품 제조 ○ 태극삼추출물의 개별인정형 원료 · 성분관련 자료 작성 및 신청 ○ 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축 <p>3. 데이터 통합형 지식관리 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 지식기반 연구 및 제품개발을 위한 웹시스템 구축
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 태극삼, 흑삼의 이화학적 특성 조사 및 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 태극삼, 흑삼 제조 표준화 공정 확립 - 태극삼, 흑삼 제품 제조관련 특허출원 - 태극삼, 흑삼 소재 제품 개발 ○ 국제인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> - 국제(중국)인체적용시험 시험식품소재 : 태극삼, 흑삼 기능성 : 2건 (혈행개선, 인지기능개선) ○ 인삼열매 추출물 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> - 간기능 개선 인체적용시험을 통한 기능성 입증 ○ 태극삼 인체적용시험 <ul style="list-style-type: none"> - 혈행개선 관련 기능성 시험 실시 ○ 인삼열매 추출물 식품 제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인삼열매 추출물 관련 특허 출원 - 인삼 열매 소재 활용 제품 개발 ○ 인삼부산물의 발효산물 제조, 성분연구 및 전임상 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 인삼 발효산물 제조법 특허 - 신규 진세노사이드 미백용 조성물 특허 - 인삼 화합물 분리방법 내용 외 총 6건의 기술거래 - 임상 실험을 통한 화장품소재의 안전성 및 기능성 확인 - 인삼 열매 관련 화장품 소재 및 시제품 제작 ○ 인삼부산물 발효산물 및 태극삼 화장품 원료화 <ul style="list-style-type: none"> - 인삼 잎/줄기/열매 발효물의 CTFA 소재 등록/한글전성분명 등록
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 고품질 태극삼 및 흑삼 제조를 위한 최적 공정 개발 매뉴얼 수립 및 신 건 강기능식품 시장 매출 증대 효과 - 태극삼, 흑삼등의 특허분쟁시 역사성, 유래 등을 제시하여 선행기술 자료로 활용 가능 - 기능성 태극삼, 흑삼 제품의 활용범위 확대 : 기능성 평가를 통한 활성성분의 지표물질로 사용한 ginsegnoside의 임상적 효과를 입증하여 기존제품과 차별화된 고부가가치 산업을 창출할 수 있음

	<ul style="list-style-type: none"> - 인삼부산물인 열매 및 잎, 줄기로부터 천연물 유래 기능성 물질을 선별하여 functional food의 소재 개발 - 인삼 부산물인 열매 및 잎줄기의 활성 기능성분을 규명하여 활성 기작을 밝히고 과학적인 근거로 인한 제품개발 - 저명 전문 학술지에 연구결과 게재하여 기능성 성분 및 활성 공지 및 수출 주도화 - 발효기법을 이용한 보다 안전하고 강화된 진세노사이드 고품격 기능성식품 소재로 활용 ○ 경제적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 과학적으로 안전하고 효능이 있는 식품임을 증명하여 경제적 부가가치를 향상시킬 수 있는 초석이 될 수 있음 - 참여기업에 기술이전을 실시하여 산업화하고 전국의 홍삼 및 인삼제조 관련 업체에도 홍보를 통해 기술이전을 실시 - 해외에 인삼의 우수성을 알리고, 수출을 통한 매출 증대 달성 ○ 사회적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 태극삼, 흑삼 가공제품도 특정한 약리효능을 기대하는 일종의 기능식품임으로 고기능성·고품질의 태극삼, 흑삼 제품 개발은 국내 인삼산업 발전은 물론 인류건강 유지에 중요한 사업이 될 수 있음 - 원천 기술 및 특허 확보로 향후 산업적으로 다양한 분야에 적용이 가능하며, 화장품 등 다양한 분야에서 신제품의 개발이 가능 - 인삼부산물을 활용할 목적으로 개발된 제품은 기능성분 함량이 높아 고부가 식·의약, 화장품 소재로 적합하여 새로운 수요 창출이 가능함 - 개발 기술을 참여기업인 인삼생산 농협 및 생산 농민에 보급하여 부산물 유통 활성화에 기여함 - 인삼부산물 상품화율 제고로 생산 농민의 소득증대에 기여함 - 인삼부산물 제품개발 및 홍보를 통해 생산농가 및 가공제품 생산기업의 경제적 이윤확대 				
중심어 (5개 이내)	태극삼	흑삼	인삼부산물	인체적용시험	

< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>○ Final goal - Promotion of export of ginseng by development of customized products for exporting countries</p> <p>1. Development of functional materials using ginseng by-products</p> <p style="padding-left: 20px;">A. Study on functional materials of ginseng by-products</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Ginseng by-product raw material secured from farmhouse ○ Consulting and cultivation of ginseng farmers ○ Establishment of win-win cooperation plan between enterprises and farmers based on product production <p style="padding-left: 20px;">B. Use of ginseng by-products as a cosmetic material</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of separation, identification and quantitative analysis system of cosmetic active ingredients from ginseng by-products ○ Establishment of fermentation condition system from ginseng byproduct ○ Establishment of a whitening efficacy and safety evaluation system using a new zebrafish embryo model system ○ Mechanism of new melanin biosynthesis inhibitors ○ Wrinkle improvement pre-clinical study using ginseng by-product and fermented water ○ Study of cosmetic materials using ginseng root ○ Development of functional cosmetics for export ○ Establish marketing strategy to export Chinese products (Taiwan or China) and find domestic demand <p style="padding-left: 20px;">C. Use of ginseng by-products as a functional food material</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of customized active ingredient extraction technology and materialization technology of ginseng fruit ○ Raw materials of ginseng fruit extract Functional evaluation using an animal model (liver function improvement) ○ Production and commercialization of human test prototype of ginseng fruit extract ○ Individual approval and production of ginseng fruit extract ○ Establishment marketing strategy for exports of high value-added products of ginseng fruit extract 	

	<p>2. Development of export-type health functional foods utilizing Taegeuk ginseng and black ginseng</p> <p>A. A Study on Standard Preparation Method of Taegeuk ginseng and Black ginseng</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of manufacturing process of Taegeuk ginseng and black ginseng ○ Establishment of Taegeuk ginseng and black ginseng extract and product manufacturing process ○ Identification of surface components and physicochemical characteristics of Taegeuk ginseng and black ginseng ○ Analysis and standardization of ingredients of Taegeuk ginseng and black ginseng extract and secure stability <p>B. Functional studies of Taegeuk ginseng and black ginseng</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Functional evaluation of cellular level of Taeguksang and black ginseng (anti-stress, blood circulation improvement) ○ Functional evaluation at animal level (anti-stress, blood circulation improvement) ○ Tests for human body application to Taiwanese or Chinese exporting nation (anti-stress, blood circulation improvement) ○ Animal testing for securing blood circulation improving function (individual seal) of Taegeuk ginseng extract ○ Propagation test for human body to secure blood circulation improvement function (individual seal) of Taegeuk ginseng extract <p>C. Product development utilizing Taegeuk ginseng and black ginseng</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Manufacture of black ginseng and taegeum ginseng prototype ○ Preparation and application of raw materials and ingredient data of individual Taegeuk ginseng extract ○ Establishment of win-win cooperation plan between enterprises and farmers based on product production
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Physicochemical characterization and functional evaluation of Taegeuk ginseng and black ginseng <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of Taeguksam and Black gum manufacturing standardization process - Patent application related to manufacturing of Taekgam and black ginseng products - Product development of Taeguk and black gums ○ International human body test <ul style="list-style-type: none"> - International (China) human body test

	<p>Test food material: Taegeuksang, black ginseng Functionality: 2 cases (blood circulation improvement, cognitive improvement)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Ginseng fruit extract human body application test <ul style="list-style-type: none"> - Liver function improvement Functional demonstration through human body application test ○ Taegeuk ginseng human body application test <ul style="list-style-type: none"> - Conduct functional test for blood circulation improvement ○ Development of ginseng fruit extract food product <ul style="list-style-type: none"> - Applied patent for ginseng fruit extract - Developed product utilizing ginseng fruit material ○ Fermentation products of ginseng by-products, component studies and preclinical evaluation <ul style="list-style-type: none"> - Ginseng fermentation product manufacturing method patent - New patent for composition for ginsenoside whitening - Method of Separation of Ginseng Compounds Sixteen other technical transactions - Confirm safety and functionality of cosmetic materials through clinical experiment - Production of cosmetic material and prototype related to ginseng fruit ○ Fermentation product of ginseng by-product and raw materials of Taeguk ginseng cosmetics <ul style="list-style-type: none"> - Registration of CTFA material of ginseng leaf / stem / fruit fermented product
<p>Expected Contribution</p>	<p>Technical aspects</p> <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of optimal process development manual for manufacturing high quality Taegeuk ginseng and black ginseng and increase sales of new health functional food market - It can be used as prior art data by presenting history, origin, etc. in case of patent disputes such as Taegeuk ginseng and black ginseng - Expansion of application of functional Taegeuk ginseng and black ginseng product: It is possible to create high value-added industry differentiated from existing products by proving the clinical effect of ginsenoside used as an indicator of active ingredient through functional evaluation - Selection of functional materials derived from natural products from

fruits, leaves and stems of ginseng byproducts to develop functional food materials

- Identification of the active ingredients of the fruit and leaf stem of ginseng byproducts to reveal the active mechanism,
- Publishes research results in famous professional journals, and promotes functional ingredients and active notification and export
- Use of fermentation technique as safer and enhanced ginsenoside as high quality functional food material

○ Economic aspects

- It can be a cornerstone to improve economic value-added by proving that it is a scientifically safe and effective food.
- Technology transfer to participating companies to industrialize, and technology transfer through public relations to red ginseng and ginseng manufacturing companies nationwide.
- Promote excellence of ginseng in overseas and increase sales through export

○ Social aspects

- Taegeuk ginseng and black ginseng processing products are functional foods that expect specific pharmacological effects. Therefore, developing high quality and high quality Taegeuk ginseng and black ginseng products can be an important business not only for domestic ginseng industry development but also for human health maintenance.
- It can be applied to various industrial fields in future by securing source technology and patent, and it is possible to develop new type in various fields such as cosmetics.
- The products developed for the purpose of utilizing ginseng by-products are highly suitable for high value added foods, medicines and cosmetics due to high functional ingredient content, which can create new demand
- Contributing to revitalization of by-product distribution by supplying development technology to participating nonghyup and producing farmers of ginseng
- Contribution to income increase of the production farmers by enhancing the commercialization rate of ginseng
- Increase economic profit of producing farmers and processing products through the development and promotion of ginseng

Keywords	Taegeuk Ginseng	Black Ginseng	Ginseng By-product	Human Study	
----------	--------------------	---------------	-----------------------	-------------	--

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	16
3. 연구수행 내용 및 결과	25
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	383
5. 연구결과의 활용계획 등	391
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	394
7. 연구개발성과의 보안등급	394
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	395
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	395
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	395
11. 기타사항	401
12. 참고문헌	401

영문목차

1. Introduction of research and development	1
2. Domestic and Overseas Technology Development Status	16
3. Research Results and Results	25
4. Achievement of goal and contribution to related field	383
5. Use of research results	391
6. Overseas science and technology information	394
7. Security rating of R & D achievement	394
8. Research facilities	395
9. Performance of safety measure	395
10. Representiative Research Result of R&D	395
11. Other Matters	401
12. Reference	401

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

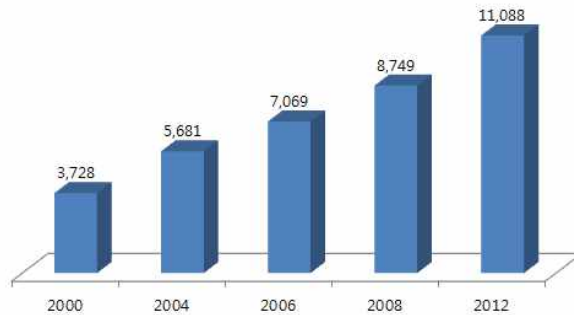
한-중 FTA, 한-미 FTA, 한-캐나다 FTA 등으로 인한 역수입 대응 및 인삼산업을 대 중국 수출 핵심산업으로 육성하기 위해서는 원료표준화, 제조공정 표준화, 첨단제형 개발, 중화권 국민을 대상으로 한 인체적용시험 등을 통한 기능성 검증, 신규 건강기능식품 등록 등 핵심 기술에 기반한 글로벌 제품 개발이 필요함.

2절. 연구개발의 필요성

가. 국내외 인삼산업 현황

○ 국내 인삼생산은 최근 건강에 대한 관심고조로 재배면적 및 생산액 등 인삼산업 규모 확대

- 재배면적 : ('95) 9,375 → ('00) 12,445 → ('05) 14,153 → ('12) 16,174ha
- 생산량 : ('95) 11,971 → ('00) 13,664 → ('05) 14,561 → ('12) 26,057톤
- 생산액 : ('95) 2,839 → ('00) 3,727 → ('05) 5,803 → ('12) 11,088억원



< 그림 1> 국내 인삼 생산액

○ 소비자 소득 증가에 따라 건강에 대한 관심이 높아지고, 인삼의 효능에 대한 학술적 검증이 확산되면서 인삼 소비가 증가하고 있으며 국내인삼 소비량 변화는 ('95) 0.23 → ('00) 0.26 → ('05) 0.28 → ('12) 0.46kg/1인 증가함

○ 세계 인삼 생산량은 8만여톤(수삼 기준) 수준이며 국가별 생산량은 중국 52천톤, 한국 27천톤, 캐나다 6천톤, 미국 2천톤이며, 국가별 수출규모는 캐나다 30%, 한국 23%, 미국 15%, 중국 15%, 홍콩 7%로 조사됨

< 표 1> 국가별 수출규모 (뿌리삼)

구분	'07	'08	'09
전체규모(US천\$)	280,679(100%)	242,740(100%)	279,350(100%)
캐나다	85,319 (30)	64,194 (26)	84,342 (30)
한국	50,821 (18)	55,083 (22)	64,101 (23)
미국	52,210 (18)	19,683 (8)	46,928 (15)
중국	46,719 (16)	52,092 (21)	44,297 (15)
홍콩	22,273 (7)	23,496 (9)	20,980 (7)

- 우리나라는 인삼종주국, 세계 2위 수준의 많은 생산량을 기록하고 있음에도 불구하고 세계적으로 인삼을 이용한 가장 큰 매출을 올리는 것은 'Ginsana'로 인삼원료에 대한 첨단분석기법을 이용한 원료 표준화 기술을 이용하여 연매출 30억불 이상을 기록하고 있으며 국내 인삼류 전체 매출액보다도 2-3배 더 큰 규모임.
- 인삼류 수출은 세계적인 웰빙 트렌드에 따라 증가 추세이나 수출국에 대한 임상시험, 글로벌 제형 개발, 가공 표준기술 개발 등의 부족으로 성장세가 둔화됨.
 - 수출액 : ('00) 79 → ('05) 82 → ('07) 92 → ('09) 109 → ('11) 189 → ('13) 174백만불
- 중화권 수출입 현황을 살펴보면 수출은 6년근 홍삼 위주로 수출되고 중국은 뿌리삼의 원형을 보아야만 신뢰하는 현황이며 중국내에서 뿌리삼은 6년근 홍삼만이 의약품으로 등록됨
 - 수출액 : ('04) 5,011 → ('06) 7,173 → ('08) 6,752 → ('10) 16,148 → ('12) 32,369천불
 - 점유율 : 21.4%(일본 24.2, 홍콩 17.6, 대만 14.7, 미국 7.7)
- 중화권 수출입 전망은 중국의 경제발전예 따른 소득증가로 약용뿐만 아니라 보건, 미용, 식품, 음료등으로 응용범위가 확산되고 있으며 선물소비 위주에서 최근 일반 소비자들의 일상 보건품으로 소비 증가로 인삼수요 증가하고 중국산 인삼류 수입도 시장접근물량(MMA)을 중심으로 늘어날 전망이며 수입 품목은 주로 백삼정과 백삼분으로 수입액은 약 3백만불임.
- 연도별 인삼제품 시장규모는 ('04) 846 → ('06) 977 → ('08) 1,129 → ('10) 1,306 → ('14) 1,749백만불로 증가추세임

지 역	시장(잠재) 수요	점유율(%)
유럽 및 중동	386	31.8
아시아	375	30.9
북미	288	23.7
남미	100	8.2
아프리카	49	4.1
오세아니아	17	1.4
합 계	1,215	100

< 표 2 > 국가별 인삼제품 시장규모

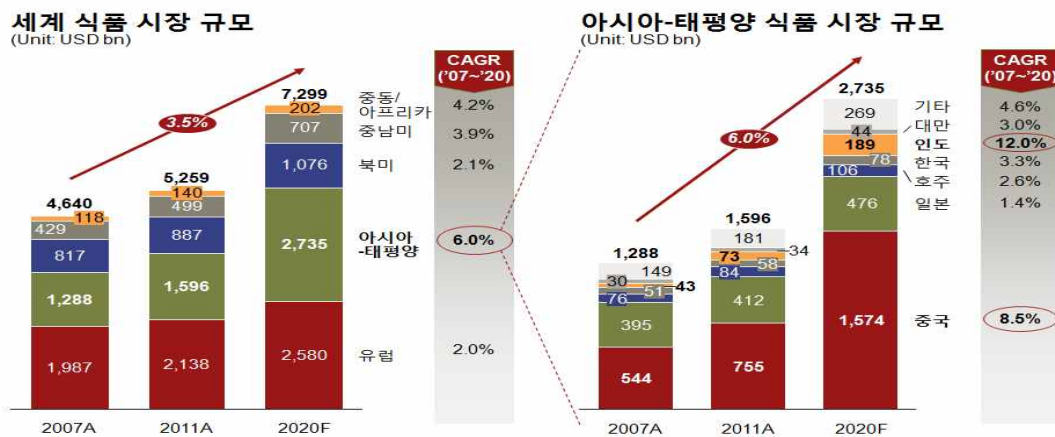
- 한-중 FTA, 한-미 FTA, 한-캐나다 FTA 등으로 인한 역수입 대응 및 인삼산업을 대 중국 수출 핵심산업으로 육성하기 위해서는 원료표준화, 제조공정 표준화, 첨단제형 개발, 중화권 국민을 대상으로 한 인체적용시험 등을 통한 기능성 검증, 신규 건강기능식품 등록 등 핵심 기술에 기반한 글로벌 제품 개발이 필요함.

나. 국내의 기능성 식품 및 화장품 시장 현황

- **기능성식품 사업의 범위**는 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함)한 식품을 의미
 - 의약품과 달리 질병상태의 치료가 목적이 아니라 생체기능의 활성화를 통해 질병발생위험을 감소시키거나 건강유지·증진을 목적으로 함
 - 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미함

- **기능성식품 산업의 특성**은 원료로부터 인체 유용한 기능성 성분을 추출 또는 정제 가공하여 동물시험 및 인체적용시험 등 과학적, 객관적 자료를 통해 개별인정을 받아 건강기능식품으로 제조, 판매·유통되는 가공식품을 포함함.
 - 개별 인정형 기능성 원료로 인정받기 위해서는 원료의 표준화, 안전성, 기능성에 대한 여러 가지 시험평가가 수반 필요

- 기능성 식품의 세계 시장 현황 및 전망은 **글로벌 기업의 세계 식품시장 영향력 점차 증대되고 있으며** 세계 식품시장의 규모는 약 4조 6천억 달러(5,500조원)로서 연평균 3.5%로 지속적인 확대 예상(Datamonitor, '12)
 - 세계 식품시장은 IT(3.5조 달러), 철강(0.5조 달러) 보다 약 1.4~10배 큰 시장
 - 인구증가 및 신흥개발국 성장으로 오는 2015년 5조 2천억 달러(6,000조원), 2020년 6조 4천억 달러(7,600조원)로 성장 전망

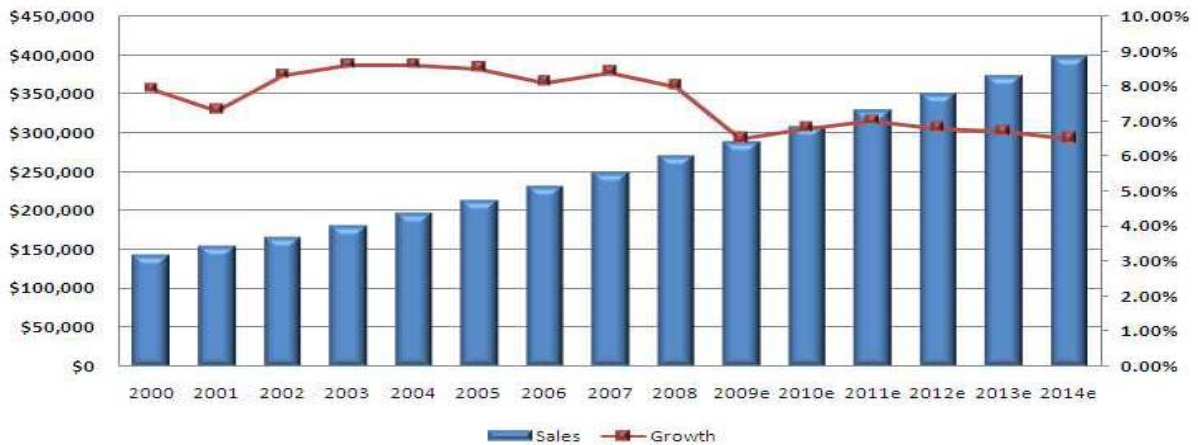


* 자료 : Datamonitor(www.datamonitor.com, 영국 리서치&컨설팅 기관), 2012.5

<그림 2. 기능성 식품산업의 시장 규모>

- 글로벌 기업들은 과감한 R&D 투자와 유통 네트워크, 브랜드 파워 등을 통해 식품시장 점유율 확대
 - 세계100대 기업 중 식품회사는 4개로 Nestle가 1천20억 달러(26위), PepsiCo가 578억 달러(86위), Coca-Cola가 351억 달러(91위), Anheuser-Busch가 368억 달러(96위)

- 식품산업의 패러다임 변화로 나노, 바이오 등을 접목한 응용기술이 빠르게 전개되고 식품의 기능과 영역 확대로 건강기능식품, 바이오 식품 등 High Tech 융복합 개발이 강조되는 등 건강 · 미용 · 화장품 · 치료용(맞춤형) 식품 등의 영역까지 확대
- 2008년 2,697억불 세계기능성식품 시장 중 1,017억불에 달하는 총 38%를 미국이 차지하는 것으로 나타났으며, 유럽은 31%(824억불)를 차지
 - Nutrition Business Journal('12)의 자료에 따르면 '10년 세계 시장규모는 약 3,014억불로 추정되며, 연평균 6.6%의 성장을 기록
- 유럽 역시 웰빙 트렌드의 꾸준한 확산에 따라 식료품 시장에 있어서도 기능성 식품소재 및 건강 식품시장이 소비트렌드를 주도할 것으로 여겨짐.



※ 자료: NBJ(Nutrition Business Journal), 2010

<그림 3. 세계 기능성식품 시장 현황>

- 세계 화장품 시장규모는 2000억 달러 이상임
 - 2012년 세계 화장품 시장규모는 2,584억 달러로 전년대비 4.1% 증가
 - 지역별 시장규모는 전년대비 2.3%성장한 유럽이 962억 달러로 가장 큼
 - 중동 및 아프리카는 69억 달러로 2.7%를 차지했으나, 연평균 6.7% 증가로 미루어 볼 때 향후 전망은 밝은 것으로 기대됨

○ 지역별 세계화장품시장 규모 ('13, KHIDI 화장품산업분석 보고서)

(단위: 백만 달러, %)

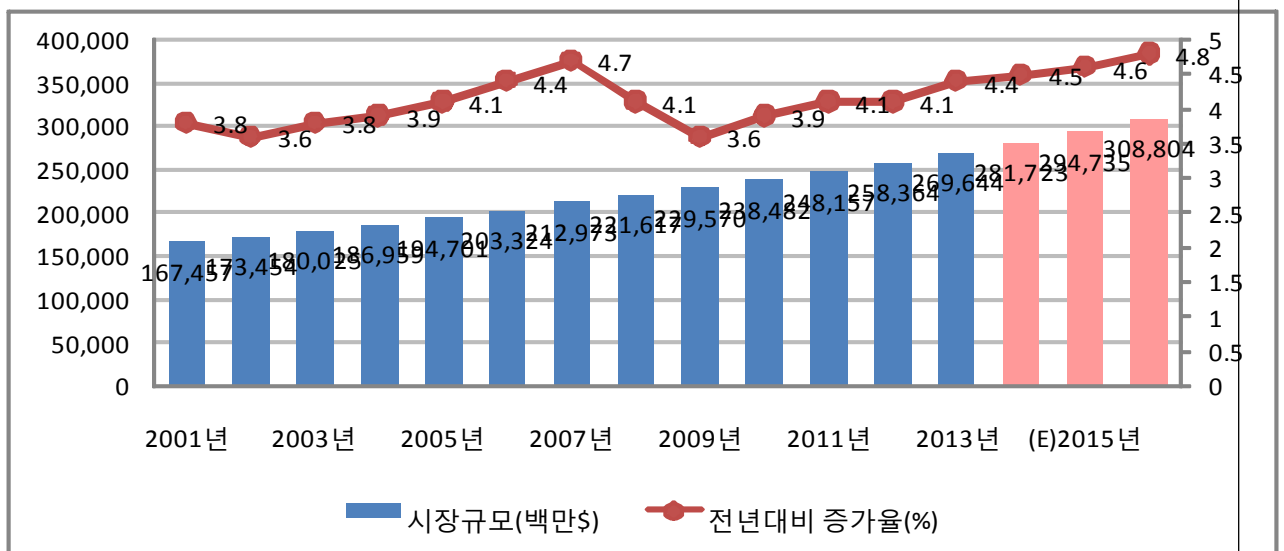
지역	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년		CAGR ('08~'12)
					시장규모	YoY	
유럽	87,293	89,535	91,708	93,965	96,170	2.3	2.5
아시아/태평양	66,794	69,731	73,249	76,765	80,589	5.0	4.8
북미/중남미	62,214	64,602	67,371	70,933	74,705	5.3	4.7
중동/아프리카	5,316	5,702	6,101	6,494	6,900	6.3	6.7
합계	221,617	229,570	238,428	248,157	258,364	4.1	3.9

주 : 1. Datamonitor의 자료를 이용하여 우리나라 화장품 유형 위주로 자료를 분석함
 2. YoY는 전년 대비 증가율이며, CAGR은 연평균 증가율(Compound annual growth rate)을 의미함

자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2013(Nov)

○ 세계 화장품산업 시장규모 및 성장률

- 2001년-2012년 동안의 화장품 시장 연평균성장률은 4.3% 수준이며, 향후 전년 대비 세계경제 성장률이 다소 높아질 것으로 전망하고 있어 화장품산업 성장률도 영향을 받을 것으로 예상

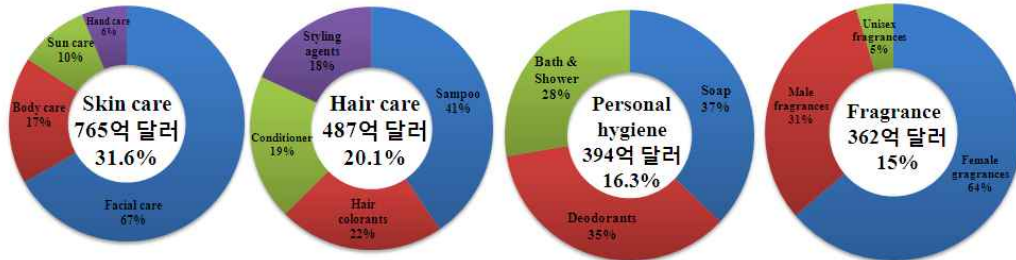


자료 : Datamonitor Personal Care Market Data

주 : 1) Datamonitor 자료를 이용하여 우리나라 화장품 유형 위주로 자료를 분석함
 2) 2012년 이후 년도의 시장규모는 Datamonitor의 추정치임

○ 세계 화장품 시장규모 및 성장률 (2011년 화장품산업 분석 보고서, 한국보건 산업 진흥원)

- 화장품 유형별 세계시장 : 화장품 유형별로는 skincare 시장이 753억 달러로 전체 시장의 33.7%를 차지함으로써 화장품 시장에서 가장 큰 점유율을 나타내고 있음.



<그림 4. 2011년 세계 화장품 시장 세부 유형별 점유율 (2011년 화장품산업 분석 보고서)>

○ 2011년 국내 식품시장규모는 40.3조원으로 국내총생산(1,237조원)의 3.26%, 제조업 총생산(347.4조원)의 11.6%를 차지하고 있으며, '10년 대비 16.7%, '07~'11년 평균 11.1% 증가 추세임

<표 4. 식품·생명소재 산업 시장 규모('07~'11)>

(단위 : 십억, 개)

		2007	2008	2009	2010	2011	CAGR ('07~'11)
건강기능식품	생산액	7,215	5,886	6,972	7,862	9,995	8.5
	성장률	46.4	-18.4	18.4	12.7	27.1	

자료 : 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2012

○ 건강지향적인 사회트렌드에 힘입어 2004년 2,506억원에서 2011년에는 1조3682억원으로 4.5배 가량 증가하였으며, 건강기능식품 수출액은 2010년 460억원에서 2011년 556억원으로 21.0% 증가 추세임

- 건강기능식품 생산액 기준 연평균 성장률은 27.4%로 국내 총생산(GDP) 5.9%, 제조업(GDP) 7.8% 보다 높은 성장률을 보이고 있음.
- 건강기능식품 산업 성장 추세는 고령화 사회로 진입하고 자기 건강관리(Self-Health Care)에 대한 관심 증가로 수요 확대가 전망됨

○ 건강기능식품연구 및 투자는 국제적으로 증가하고 있는 상태이며 최근 우리 정부 차원에 서도 건강 기능식품을 고부가가치산업으로 인지하고 국가적 차원에서의 투자가 증가하는 추세임

- 국가적 국내연구 활용도는 높이기 위하여 정부의 적극적인 지원이 필요함 국제 기능성 식품 시장이 급성장하면서 한방의 건강기능식품 소재로 각광을 받고 있는 상태이며 다양한 제품화 기술 수준이 발달하고 있음
- 국내 전통 소재를 활용한 제품 지원을 통하여 국내 대표 육성 지원 국내의 건강기능식품관련 연구 및 기술개발 육성을 위한 지원전략 및 체계적인 프로그램이 필요하며 새로운 소재에 대한 높은 해외 의존도를 감소시켜야 함
- 국내 중소기업의 건강기능식품 시장 진입을 도울 수 있는 프로그램이 필요함
- '12년 한국 화장품 시장 규모, 전 세계 화장품 시장 11위
 - 국가별로는 미국이 371억 달러로 전체 시장에서 14.3%를 차지하며 일본 281억 달러, 중국 213억 달러 순으로 집계됨
 - 우리나라의 2012년 화장품산업 시장규모는 68억 달러 세계시장 11위, 세계 시장의 2.6%를 차지함
 - 전년 대비 성장률은 브라질(9.2%), 중국(8.5%), 인도(12.4%)등 신흥국이 세계 화장품 시장 평균 성장률보다 높게 나타남

<표 5. 세계 화장품 시장 점유율>

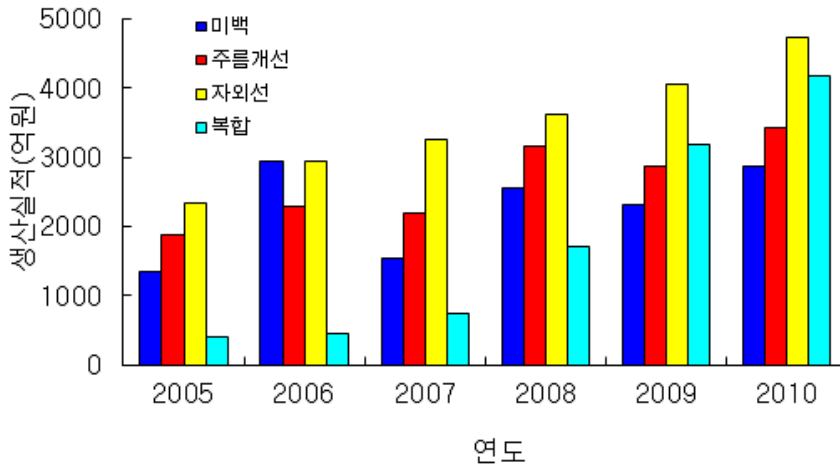
(단위: 백만 달러, %)

순위	국가	2010년		2011년		2012년		YoY
		금액	점유율	금액	점유율	금액	점유율	
1	미국	35,272	14.8	36,241	14.6	37,069	14.3	2.4
2	일본	27,354	11.5	27,704	11.2	28,058	10.9	1.3
3	중국	17,957	7.5	19,482	7.9	21,284	8.2	9.2
4	브라질	14,983	6.3	16,246	6.5	17,624	6.8	8.5
5	독일	15,052	6.3	15,389	6.2	15,559	6.0	1.1
6	프랑스	14,121	5.9	14,367	5.8	14,560	5.6	1.3
7	영국	10,849	4.6	11,175	4.5	11,562	4.5	3.5
8	이탈리아	10,205	4.3	10,418	4.2	10,541	4.1	1.2
9	러시아	7,063	3.0	7,468	3.0	7,852	3.0	5.1
10	스페인	7,088	3.0	7,043	2.8	7,082	2.7	0.6
11	한국	6,321	2.7	6,624	2.7	6,834	2.6	3.2
12	인도	5,142	2.2	5,745	2.3	6,460	2.5	12.4
13	멕시코	5,475	2.3	5,729	2.3	6,020	2.3	5.1
14	캐나다	5,366	2.3	5,525	2.2	5,682	2.2	2.8
15	호주	4,001	1.7	4,123	1.7	4,248	1.6	3.0
합계(47개국)		238,428	100.0	248,157	100.0	258,364	100.0	4.1

자료 : Datamonitor Personal Care Market Data, 2013(Nov)

- 기능성 화장품의 세부유형별로는 자외선 차단(31.1%), 복합유형(27.5%), 주름개선(22.5%), 미백(18.9%) 순으로 점유율이 큰 것으로 나타났고, 2007년 이후 복합유형의 생산액이 크게 증가하였음.

- 기능성 제품군의 생산규모는 2010년 1조 5187억 원으로 22.5% 성장함에 따라 전체 화장품 생산실적에서 차지하는 비중이 25.2%로 기초화장용 제품류 다음으로 큰 비중을 차지하고 있음.
- 최근 4년(2007년-2010년) 동안 기능성화장품은 25.2%의 높은 성장률을 기록하였으며 시장점유율에 대한 연도별 변동 폭이 다른 유형에 비해 크게 나타나고 있어 기능성 화장품에 대한 수요가 급증하고 있음을 간접적으로 보여줌.



<그림 5. 기능성화장품 세부유형별 생산실적 현황 (식품의약품안전청, 화장품 생산실적 자료)>

- 기능성 화장품 중에서도 천연소재를 이용한 제품에 대한 요구가 확대되어 가고 있음 : 국내 천연소재유래 기능성화장품 개발 현황 및 전망
- “웰빙”의 바람과 함께 건강과 외모를 중요시하는 현대인의 요구와 자연성, 식물성, 천연성을 선호하는 심리가 크게 작용하여, 화장품업계에서도 천연소재 화장품의 개발이 매년 성장을 거듭하고 있음.
- 아름다움과 건강한 삶을 추구하고자 하는 현대인의 성향으로 안전하면서도 미용효과가 우수한 천연소재 화장품의 사용이 지속적으로 확대되고 있는 추세임. 따라서 식물 추출물의 신규 효능개발과 새로운 활성성분의 분리, 천연 원료의 다양화와 함께 화장료의 제형에 대한 연구 개발도 더욱 활성화 될 전망이다.
- 본 과제를 통해 인삼수출 활성화를 위한 태극삼, 흑삼에 대한 연구와 인삼잎줄기 열매들을 활용한 고부가가치 기능성 제품을 개발하고자 함

다. 인삼 자원을 활용한 필요성

■ 인삼을 활용한 기능성 식품 소재의 개발

- 의료기술의 발달과 제약 산업의 발전 및 건강식품 개발의 도움으로 고령화 인구가 계속 증가하고 있고 2012년 사망원인 통계에 의하면 총 사망자수는 26만 7천명 정도이고 조사망율(인구 10만명당)530.8명으로 전년대비 3.3%가 증가.
- 사망의 원인은 악성신생물(암), 심장질환, 뇌혈관질환의 순으로 나타났으며, 암으로 사망한 경우가 심장질환이나 뇌혈관질환으로 사망한 경우보다 절대적으로 앞서고 있음.
- 심장질환이나 뇌혈관질환과 같이 혈행의 이상으로 발생하는 심혈관계 질환도 미국, 유럽, 아시아 등 전세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있다.
- 혈행장애가 일어나는 원인은 여러 가지가 있겠지만 그 중에서 혈소판 응집반응에 의해서 일어나는 혈행장애와 Coagulation factor 들이 cascade 식으로 활성화되어 thrombin에 의해 불용성 fibrin이 형성되어 blood clot 이 생성되는 응고기작에 의해서 혈행장애가 일어난다.
- 2012년 1월 26일부로 개정되어 시행되는 인삼산업법에서 흑삼은 증기로 찌서 말리는 과정을 3회 이상 반복한 삼으로 규정하고 있다. 아직까지 흑삼의 가공공정에 있어서 미흡한 점도 많고 소비자가 손쉽게 선택할 수 있는 제형의 개발과 복용량 등의 문제점이 있을 수 있는 상태임.
- 국내에서는 어느 정도 흑삼의 이미지가 형성되어 있으나 백삼과 홍삼에 비하면 미미한 수준이다. 따라서 흑삼에 대한 전반적인 제조방법 등이 제도권 내에서 해결되고, 성분과 효능·효과 측면에서 많은 연구가 이루어져서 소비자가 흑삼을 구매할 수 있는 계기가 되었으면 함.
- 태극삼은 홍삼 전매제 시행으로 민간 가공이 허용되지 않을 때 인삼을 가공하던 기술로 끓는 물에 살짝 데치고 건조하여 제조되었으나 끓는 물에 데치는 공정을 위한 별도의 열탕시설이 필요하고 열탕으로 인한 유효성분 손실 등으로 현재는 제조하는 곳이 매우 적으며 열탕 온도 및 방법이 잘 알려져 있지 않아 홍삼을 제조하기위해 구축된 증삼기를 이용하여 고품질 태극삼을 제조하는 방법에 대한 연구가 필요함
- 흑삼은 제조자에 의해 숙지황처럼 아홉 번 찌고 아홉 번 말리는 구증구포의 방법으로 제조되고 있으나 증숙온도 및 시간, 건조온도 및 시간 등의 차이로 인해 품질이 천차만별이며 구증 구포시 산업 생산성이 급격히 떨어지는 단점을 보완하기 위한 구체적이고 표준화된 제조방법의 개발이 필요함
- 흑삼에서 흡입시 폐암을 일으키는 1등급 발암성 물질인 벤조피렌 등이 검출되어 소비자

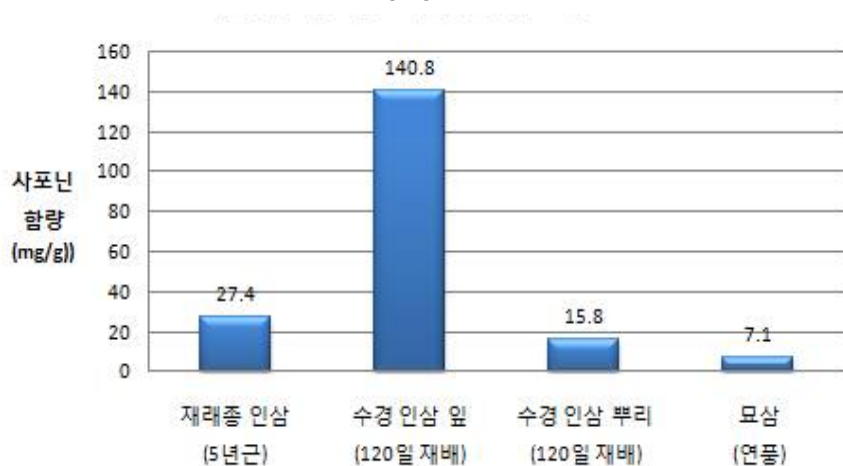
의 신뢰에 문제점을 야기하고 있어 소비자가 안심하고 복용할 수 있도록 유해물질에 대한 품질안전 관리를 위한 기준 및 검사법의 개발이 필요함

- 스위스 제약회사인 파마톤사에서 개발한 '진사나'는 인삼에서 추출한 원료내 진세노사이드 함량을 표준화한 추출물을 이용해 및 세계시장에서 3~4억불의 최고 매출을 기록하고 있으며 흑삼의 고부가가치 기능성 제품 개발을 위해서는 활성 지표물질에 대한 검사법 확립 및 성분 표준화가 필수적임.
- 태극삼에 많이 함유되어 있는 성분들과 특이성분 및 비사포닌 성분 분획 등을 이용하여 혈소판 응집억제 기능성과 thrombin 에 의해 일어나는 혈액응고 활성을 저해하는 활성등을 동물시험과 인체적용시험으로 수행하고, 그 결과를 바탕으로 개별인정형 원료 및 성분으로 식약처에 신청· 등록해서 태극삼의 기능성을 인정받고자 함.
- PubMed에서 anti-stress agents 라는 keyword 로 검색을 하면 96 개의 논문 (2013.12.22. 현재)이 검색되지만 이들 논문 중에서 인삼 및 ginsenoside 에 대한 논문은 3편에 지나지 않고 인삼의 고열 스트레스에 대한 논문은 국내외에서 발표된바 없음. 특히 고온 스트레스에 대한 인삼 논문은 전무한 실정임. 또한 anti-stress agents 특허를 검색하면 미국 및 유럽특허가 검색되고 있으나 모두 천연물 및 인공화합물에 대한 것이고 인삼에 대한 것은 전무한 실정임. 따라서 항스트레스제는 앞으로 인터넷의 발달로 인한 지능화, 자동화 사회로 진행되면서 미래에 대한 불확실성 증가, 자동화로 인한 해고 불안감, 스트레스 증가에 따라 그 수요가 증가될 것임.
- 이미 한국도 점차 온난화의 영향권 내에 들어서 경상북도 이북의 식물 작황 지도가 바뀌고 있으며 기후 변화에 따른 대응 및 남중국, 동남아 지방, 아랍권역, 남미 등의 새로운 시장 개척을 위해서는 고온 스트레스에 대한 고려인삼의 효능연구가 절실히 필요함.
- 이를 위해서는 고온 스트레스에 대한 고려인삼의 효능을 입증하기 위해서는 체계적인 국제 논문 게재와 국내 및 해외 임상시험이 요구됨. 또한 과학 논문 게재를 통해 고려인삼 구매자 및 거래처에 객관적인 근거를 제시함으로써 고려인삼의 종주국으로서 위상 및 신뢰도가 제고될 것임.
- 이와 같은 상황에서 본 연구에서는 흑삼의 제품개발에 있어서 일부제형과 관련하여 성분 분석에 의한 표준화를 수행하고, 태극삼은 동물시험과 인체적용시험을 통하여 개별인정형 원료로 등록되고, 이러한 결과가 도출되었을 때 태극삼과 흑삼을 통한 인삼의 소비를 진작시키고, 국내 소비뿐만 아니라 인삼의 주요한 소비지역인 중화권과 동남아 시장에서도 태극삼과 흑삼의 소비가 증가하고 수출의 길이 넓어져 농가수익에도 도움이 될 것임.

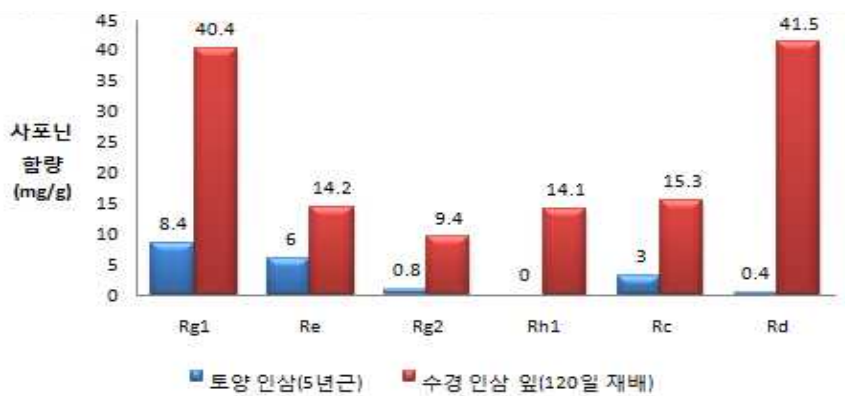
■ 인삼을 활용한 기능성 화장품 소재의 개발

- 인삼은 우리나라를 대표하는 약용작물로, 지용성성분(지질, 지방산, 정유, 유기산, 폴리아세틸렌, 페놀계화합물 등), 함질소 화합물(알칼로이드, 단백질, 아미노산, 펩티드 등), 탄수화물(다당류, 2당류, 3당류, 조섬유 펙틴 등), ginsenoside, 비타민 등 다양한 성분들이 존재한다. 인삼의 사포닌이라고 잘 알려진 ginsenoside는 당부분(glycone)과 비당부분(aglycone)으로 구성된 배당체(glycoside) 화합물의 일종으로서 인삼의 가장 중요한 약리활성성분으로 인정되고 있음.
- 과거에는 인삼의 뿌리 뿐만아니라 줄기, 잎, 꽃봉오리 등을 잘라 차로 제조해 유통했다는 기록이 있으나 현대에 와서는 인삼의 뿌리만을 식용으로 이용하여 지상부에 대한 관심이 낮았으며 대다수 그냥 버려지는 폐자원으로 전락하였다. 하지만, 최근 분석기술의 발전에 따라 인삼의 다양한 부위의 성분 연구가 진행 되었고 그 결과 인삼 잎 및 줄기, 열매에도 인삼의 뿌리와 같은 ginsenoside가 존재하는 것이 밝혀져 주목을 받고 있음.
- 연구 결과에 따르면, 인삼의 다른 부분보다도 인삼 잎과 열매에 ginsenoside의 함량이 가장 높다고 보고되었다. 인삼의 잎에는 인삼뿌리 보다 4~5배, 인삼 줄기보다 9배 이상 ginsenoside 함량이 존재하는 것으로 알려 졌으며 ginsenoside 종류 비교해 보았을 때도 인삼 뿌리에 존재하는 대다수의 ginsenoside가 잎에 존재하는 것으로 나타났다. 더불어 인삼 잎에는 인삼 뿌리의 10배에 달하는 ginsenoside Re와 5배 이상의 ginsenoside Rd가 함유되어 있는 것으로 조사 되었다. 잎뿐만 아니라 인삼 열매에는 뿌리에 비해 ginsenoside 함량이 2배 이상 많다고 알려 졌으며 특히 ginsenoside Re는 뿌리보다 30배 많다고 밝혀 졌음.
- 4~6년 동안 재배하여 이용하여야 하는 인삼 뿌리와는 달리 인삼의 지상부위는 매년 봄에 싹을 틔워 가을철 퇴화되는 부위로 연중 이용이 가능 하다는 점에서 원활한 원료공급이 가능할 수 있음.
- 노지에서 재배하는 인삼은 병충해를 막기위해 많은 양의 농약을 사용함으로써, 인삼지상부에 많은 양의 농약이 잔존할 수 있다. 따라서 잔존하는 농약으로 인하여 화장품 소재 및 식품 소재로의 활용이 제한적일 수 밖에 없다. 하지만 수경재배 인삼은 묘삼을 이용하여 4개월 재배, 무농약으로 인하여 농약으로부터 안전하다는 가장큰 장점이 있다. 수경재배기술로 인삼을 재배함으로써 무농약 청정재배와 연중생산이 가능하고 2년근 크기(8-9g)의 수삼을 4개월 만에 생산 할 수 있음.
- 인삼부산물을 활용할 목적으로 개발된 수경재배 인삼은 세계에서 최초로 개발된 고속생산 기술으로써 뿌리, 잎, 줄기를 모두 활용할 수 있고 기능성분 함량도 높아 고부가식·의약, 화장품 소재로 적합하며 새로운 수요 창출이 가능함

- 수경인삼 잎줄기에는 사포닌 함량이 140.8~180mg/g, 뿌리에는 15.8 mg/g이 들어있으며, 잎에는 Rg1, Rd, Rc, Rh1, Rg2 등 함량이 뿌리에 비하여 월등히 높아 기능성 식품이나 화장품 소재로 적합함.
- 120일 만에 생산한 수경 인삼은 사포닌 함량이 14.3~15.8mg/g으로 토양 재배한 2년생 수삼의 사포닌 함량(8~9mg/g) 보다 높음



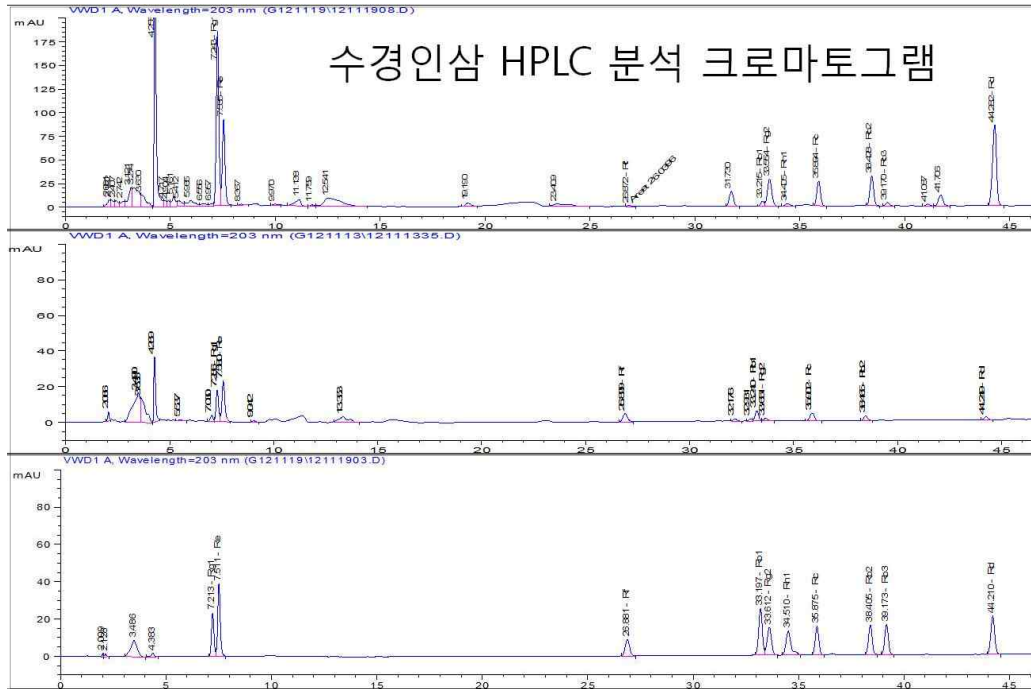
<그림 6. 인삼 종류별 사포닌 함량 비교>



<그림 7. 토양 인삼과 수경 인삼의 사포닌 성분별 함량 비교>

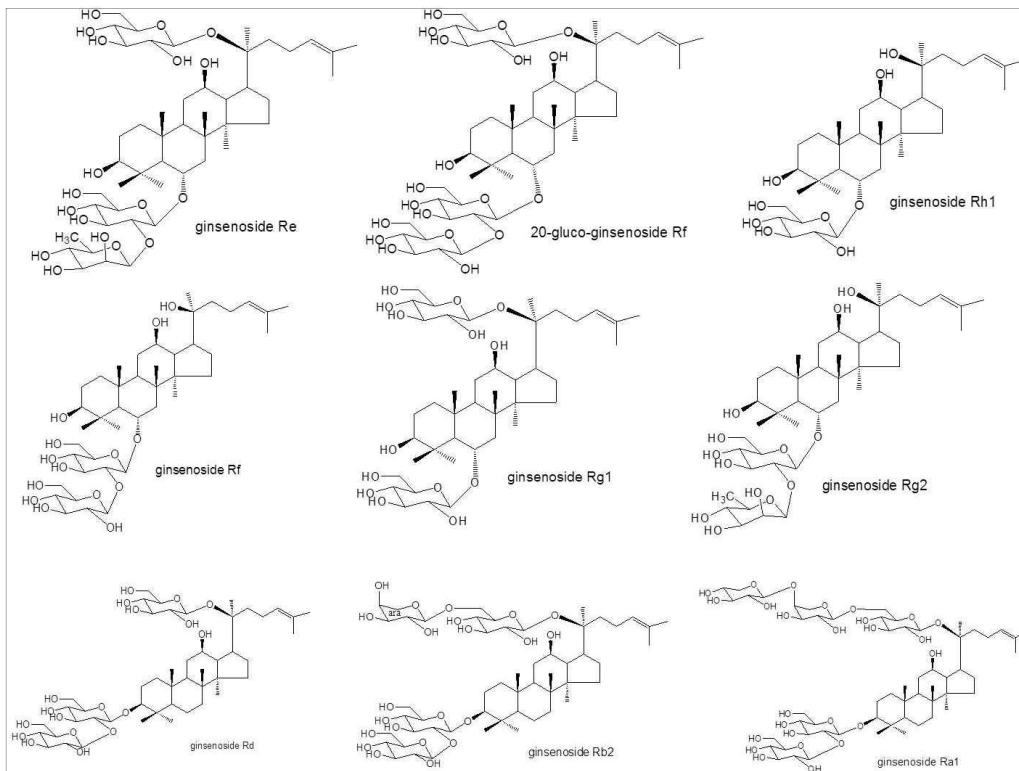
- 수경재배 방식을 통해 생산한 인삼의 잎, 줄기, 뿌리 등을 식품원료로 사용가능함을 인정[식약청 식품기준과-4482(2010.10.27.)호]
- 토지인삼으로 활성이 있는 성분 분리, 동정 및 활성에 관한 연구가 수행되어 다소의 연구결과가 보고되어 있지만, 수경재배 인삼의 잎줄기의 활성 성분의 연구를 거의 이루어지지 않고 있음.

- 하지만, 앞의 경우 토지인삼과 유사한 활성 성분 패턴을 보이고 있으며 특정 진세노사이드 경우 20~30 정도 많을 것을 확인 할수 있음



<그림 8. 노지인삼 및 수경재배 인삼잎의 분석>

- 인삼 부산물인 열매에서 다양한 진세노사이드를 분리하고 동정 하였음.



<그림 9. 인삼부산물(열매)에서 분리동정된 진세노사이드>

- 인삼열매 부산물은 과실이 매우 작고, 조직이 연약함에 따라 수확직후부터 품질의 변화가 빠르게 진행됨에 따라 생과로서는 1-2일 정도 유통이 가능하나 유통 중 품질저하가 심각하며, 유통기간을 연장하기 위해 냉동처리 및 저장 관리 기술이 필요한 실정임
- 인삼열매의 부산물인 과육은 최근에 생산량이 매년 증가하는 추세에 있어 효과적으로 이를 소비할 수 있는 방안이 필요함
- 인삼 부산물인 잎줄기는 생체중일 때 수확을 하면, 인삼뿌리에 영향을 미치므로 수확을 하지 못함. 또한 잔류 농약의 문제 때문에 식용으로 금지 되어 있음(식품의약품안전처)
- 따라서, 연중 재배 가능하고, 식약처에 식품으로 등록되어 있는 청정 인삼 잎줄기를 이용 할수 있는 수경재배 인삼 잎줄기가 기능성 식품 소재 및 화장품 소재에 효과적으로 이용될 수 있으므로 이에 대한 기능성 검증 및 제품화가 필요함

3절. 연구개발 범위

1. 제 1세부((주)지에프씨)

- 인삼부산물 및 발효산물을 이용한 피부탄력개선 전임상 연구
- 전임상 연구 결과를 통한 피부탄력개선 관련 매커니즘 연구
- 인삼부산물 및 발효산물의 피부탄력개선 및 미백 전임상 연구 데이터를 활용한 화장품 소재 개발 및 제품화
- 제품 수출을 위한 마케팅 전략 수립

2. 제 1협동(농촌진흥청)

- 농가로부터 인삼부산물 원료 확보
- 인삼부산물로부터 화장품 활성성분 분리, 동정 및 정량 분석 시스템 확립
- 인삼부산물로부터 발효조건 시스템 확립
- 인삼재배 농가 컨설팅 및 계약재배 추진
- 동물모델을 이용한 기능성 평가(항비만, 항당뇨, 간기능개선, 인지능개선 등)
- 새로운 zebrafish 배아모델 시스템을 이용한 미백효능 및 안전성평가 시스템 확립
- 새로운 멜라닌 생합성 저해제의 기전 연구

3. 제 2협동((주)네츄럴F&P)

- 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발
- 인삼열매 추출물의 원료화
- 인삼열매추출물의 인체시험 시제품 제작 및 제품화
- 지식기반 연구 및 제품개발을 위한 웹시스템 구축
- 인삼열매추출물의 개별인정 허가 및 제품화

4. 제 3협동(진안홍삼연구소)

- 태극삼 및 흑삼의 제조공정 개발
- 태극삼, 흑삼의 지표성분 및 이화학적 특성 규명
- 태극삼, 흑삼의 세포수준의 기능성 평가(항스트레스, 항치매성, 항혈압, 항산화, 혈행개선 등)
- 동물수준의 기능성 평가(1항목이상)
- 대만 또는 중국 수출국가 국민 대상 인체적용시험(1항목이상)

5. 제 4협동(고려인삼제조(주))

- 흑삼, 태극삼 추출물 제조, 제품 제조공정 확립
- 추출물의 성분분석 및 표준화, 안정성 확보
- 흑삼, 태극삼 시제품 제조
- 태극삼추출물의 혈행개선 기능성을 확보하기 위한 동물시험 추진
- 태극삼추출물의 혈행개선 기능성을 확보하기 위한 인체적용시험 추진
- 태극삼추출물의 개별인정형 원료 · 성분관련 자료 작성 및 신청
- 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축

2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

1절. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 인삼시장은 국내소비량의 증가로 생산액은 2010년도 기준 생산액이 9,883억원에 해당되는 것으로 나타났으며, 세계적인 웰빙 트렌드에 따라 향후 국내 산업규모도 확대 될 것으로 전망하고 있음 (출처: 농촌진흥청국립원예특작과학원, 인삼 인재개발 교육자료).
- 국내 홍삼시장의 경우에는 2009년도 9500억원을 기준으로 2011년까지 매년 1500억 원 가량의 성장세를 이루다가 2012년부터 2013년까지는 성장세가 하락한 것으로 나타남 (출처: 한국경제, 불황에 기운 없는 홍삼시장). 국내 홍삼 주요 업체로는 정관장을 가장 많은 매출을 올리고 있으며, NH한삼인, 천지양, 동원F&B, 롯데헬스윈이 그 뒤를 잇고 있음(출처: 한국경제, “정관장 잡아라”한삼인*천지인*뜨거운 추격전’).
- 2010년 기능성 화장품의 생산액은 1조 5,187억원으로 전년 1조 2,401억원 보다 22.5% 증가했으며 2007년에 비해 상대적으로 자외선차단의 비중은 작아지고 복합유형의 비중이 증가
- 2011년에는 복합 기능성 화장품 생산액이 전체 기능성 화장품 중 36.2% (5,935 억원)를 차지하여 가장 높았으며, 그 뒤를 이어 자외선 차단 화장품이 4,138억원으로 전체 25.2%, 주름개선 화장품이 19.7% (3,231원), 미백화장품 19% (3,113억원)을 차지한 것으로 분석
- 또한 2010년 대비 성장률도 복합기능성 화장품이 42%로 가장 높았으며, 2007년 이후 지속적 성장세를 이어감에 따라 소비자들의 다기능 상품에 대한 선호도도 상승
- 미백제품이 전체 기능성 화장품 중 차지하는 비율이 가장 낮지만 전년 대비 8.7% 증가한데다 2009년 이후 지속적 상승세를 보이고 있어 향후 기능성화장품 중 점유율이 상승할 것으로 예측 됨
- 반면, 자외선차단제품과 주름개선제의 2010년 대비 성장률은 각각 12.34%와 15.61% 감소한 것으로 나타나 그간 지속적 성장세가 한풀 꺾인 것으로 분석되었다.

<표 6. 기능성화장품 생산실적>

(단위: 억원)

구분	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년
자외선차단	3,246	3,621	4,060	4,721	4,138
복합유형	749	1,711	3,178	4,178	5,935
주름개선	2,200	3,148	2,858	3,423	3,231
미 백	1,540	2,552	2,306	2,865	3,113
기능성화장품	7,735	11,033	12,401	15,187	16,418

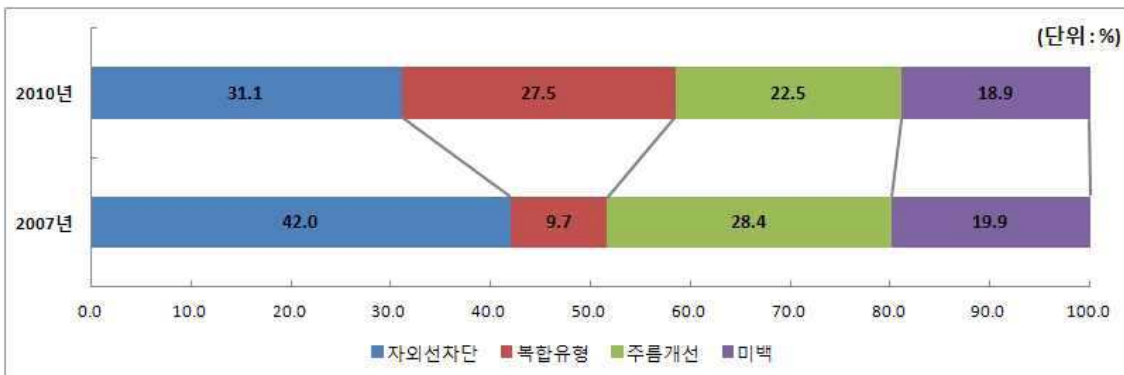
자료: 대한화장품협회, 화장품 생산실적, 각 년도

<표 7> 기능성 화장품 연도별 생산개수 추이>

(단위: 천개)

	미백	주름개선	자외선	복합	계
2005년	76,840	65,885	82,472	15,779	240,976
2006년	120,160	104,989	114,324	19,937	359,410
2007년	110,434	99,374	136,741	49,458	396,007
2008년	140,139	144,521	135,460	109,400	529,420
2009년	146,833	169,436	133,384	159,434	609,087
2010년	194,423	262,436	186,229	225,218	868,306

<표 8. 기능성화장품 세부유형별 점유율 현황 (단위: %)>



자료: 대한 화장품 협회, 화장품 생산실적 자료, 각 년도

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 인삼 시장은 크게 뿌리삼 시장과 인삼제품 시장으로 양분할 수 있음.
- 세계 교역규모를 통해 본 뿌리삼 시장규모는 '09년 40개국 수출금액 기준 약 2억 8천만 달러이며, 인삼제품(Ginseng Supplements)에 대한 시장 잠재수요는 12억 1,500만 달러 규모임.
- 뿌리삼의 주요 생산국은 캐나다, 한국, 중국, 미국 등으로 이들 4개국이 세계 뿌리삼 수출에 85.8%를 차지함.
- 주요 수입국은 홍콩, 대만, 일본, 중국, 싱가포르, 말레이시아 등 아시아 국가들임.
(이상 출처: 인삼류 해외시장동향 및 수출확대 여건, 농수산물유통공사, 2010년)

□ 수출동향 및 실적

(단위 : 톤, 천\$)

수출국	'10		'11		'12		'13. 1.1~12.17		
	물량	금액	물량	금액	물량	금액	'12.12월	'13.12월	증감(%)
일 본	538	29,809	516	33,095	683	36,644	34,893	29,192	△16.3
중 국	417	16,148	640	45,607	1,052	32,209	30,825	37,169	20.6
홍 콩	104	27,789	148	38,891	211	26,568	24,635	35,317	43.4
대 만	411	23,565	659	37,804	492	22,292	19,975	16,990	△15.0
미 국	613	9,630	510	11,143	5423	11,748	11,297	11,693	3.5
전 체	3,298	124,204	3,695	189,305	4,369	150,828	140,477	153,472	9.3

* 기타국('12) : 베트남 6,324천\$, 싱가포르 2,584 등 / 출처 : KATI 통계

- (2013년도 수출동향) 주수출시장인 중화권의 점진적 재고물량 해소에 따라 '13년 하반기부터 중화권 수출이 회복세로 전환되고, 국경절 등 명절수요 증가로 12월 17일 현재 전년대비 9.3% 증가한 153.5백만불 수출
- (주요 국가별 수출실적) 중국은 국경절 등 명절수요, 중국내 인삼가격 상승에 따른 재고확보 차원의 물량 매집 등의 영향으로 수출실적 상승(전년 동기대비 20.6% ↑)
- (주요 국가별 수출실적) 홍콩은 국내 수출업체들의 적극적인 시장개척과 중국으로 우회 수출 물량의 집중으로 수출 확대 중(전년 동기대비 43.4% ↑)
- (주요 국가별 수출실적) 경기 침체로 인한 소비위축 등으로 대만(15.0%), 일본(16.3%)은 여전히 수출회복이 더디나, 미국(3.5% ↑), 캐나다(9.3% ↑) 베트남(53.9% ↑) 등 2선 시장은 지속적인 수출성장세를 보이고 있음

(이상 출처: 2013 인삼류 수출동향, 농수산식품수출지원정보)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 인삼의 이용형태별로 비중을 보면 전체 인삼 생산량 중 수삼용과 가공용이 각각 51.0%, 49.0%로 비슷한 수준임.
- 가공 제품별 전체 인삼 생산량에서 차지하는 원료 사용 비중은 홍삼용이 44.5%로 대부분을 차지하고 있고, 그 외 백삼용과 태그삼용은 각각 4.1%, 0.4%에 불과함.

- 용도별 수삼원료 사용비중의 변동을 비교해 보면 수삼용은 전체 생산량의 약 50%내외 수준이나, 가공용의 경우 홍삼용 원료 사용량의 비중이 급증하는 추세임.
- 인삼 가공 사업의 가장 큰 특성은 가공업체의 영세성이므로 현재 인삼 가공제품의 대기업 독과점 시장 구조가 개발 기술의 산업화에 많은 한계점으로 지적되고 있음.
- 인삼산업의 급변하는 환경에 따라 기회요인 또한 나타나고 있어, 인삼의 안전성이 확보 이 확보된다면 인삼 수요는 지속적으로 증가할 것으로 전망됨.
- 또한 인삼을 원료로 이용하는 고품질 건강식품 산업화와 최첨단 제약 산업화가 활성화 추세에 있으며, 수요와 시장이 확대 될 것으로 전망됨.
- FTA 추진으로 인삼 수출 시장을 확대할 기회가 제공되고 있어, 합리적인 한 중 FTA의 협상 타결에 따른 새로운 수출 시장 개척 가능성도 있음.
- 다음은 좀 더 상세한 우리나라 인삼 산업의 SWOT분석 내용임.

<표 9. 우리나라 인삼산업의 SWOT 분석>

기회요인(O)	위협요인(T)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 소비자의 건강·웰빙에 대한 관심 고조와 인삼 소비량의 증가 전망 ▪ 안전성이 확보된 인삼의 소비증대 전망 ▪ 인삼의 고품질 식품산업화 추세 ▪ 다양한 인삼제품 개발과 수요 확대 ▪ FTA의 지속적 추진과 시장개척 및 수출 확대 기회 ▪ 국제시장에서 고려삼 인지도 증가 추세 ▪ 정부의 인삼산업 발전에 대한 중장기 지원정책 수립·운용 등 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 재배적지의 부족 등 재배환경 악화 추세 ▪ 경영비 상승 등 경영여건 악화 추세 ▪ 국내 비체계적 인삼 유통질서와 시장 구조 ▪ 한·미, 한·중 FTA 타결 및 추진으로 국내 인삼시장 개방의 가속화 ▪ 중국의 인삼산업 육성정책과 국제시장에서의 고려삼과의 경쟁 가속화 ▪ 중국, 캐나다, 미국삼의 국제시장 잠식과 고려삼의 시장점유율 하락
강점요인(S)	약점요인(W)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 국제시장에서 고려삼에 대한 전통적 약효 및 고품질 상품 인식 ▪ 국내 우수한 재배기술 및 제품 제조기술 자원 및 인력 확보 ▪ 약품과 식품으로서의 다양한 인삼제품의 우수성과 연구개발 분야의 활성화 ▪ 인삼제품을 국가 수출전략상품으로 육성 ▪ 토양 및 기후조건에서 인삼재배의 최적지 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 특정 브랜드 중심의 인삼제품 시장구조 ▪ 국제시장에서 고려삼에 대한 잘못된 인식 고착화 ▪ 국내 수많은 제품 브랜드 난립과 충돌 ▪ 인삼 재배농가 및 제조업체의 영세성 ▪ 주요 수출시장의 제도적 시장진입 규제 ▪ 국내 관련 법·제도적 사항에 대한 정부·지자체·생산자 간 첨예한 대립 지속

(이상 출처: 2013 신성장동력 발굴을 위한 원예특작산업 발전전략, 한국농촌경제연구원)

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	3,000	5,000	7,000	10,000	15,000	40,000
경제적 파급효과	1,000	1,500	2,000	5,000	7,500	17,000
부가가치 창출액		200	1,000	3,000	10,000	14,200
합 계	4,000	6,700	10,000	18,000	32,500	71,200

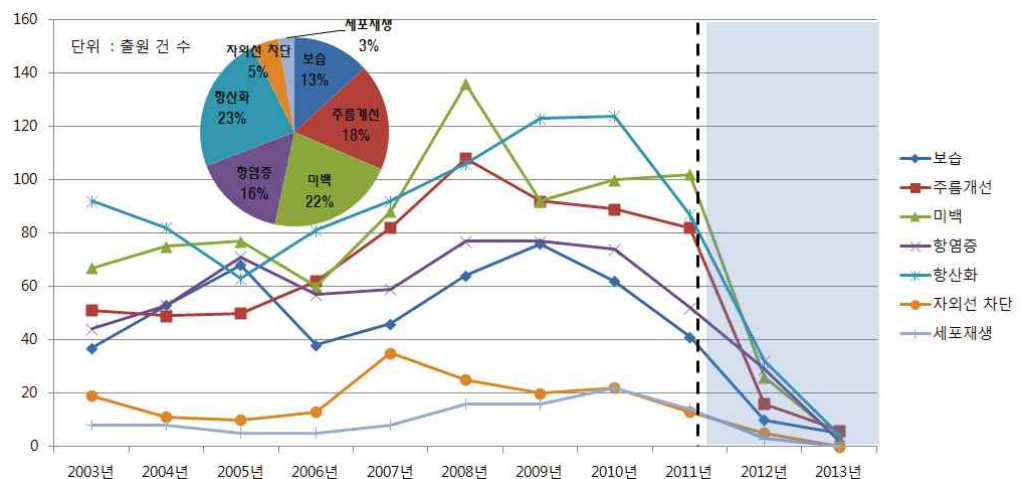
- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

2절. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

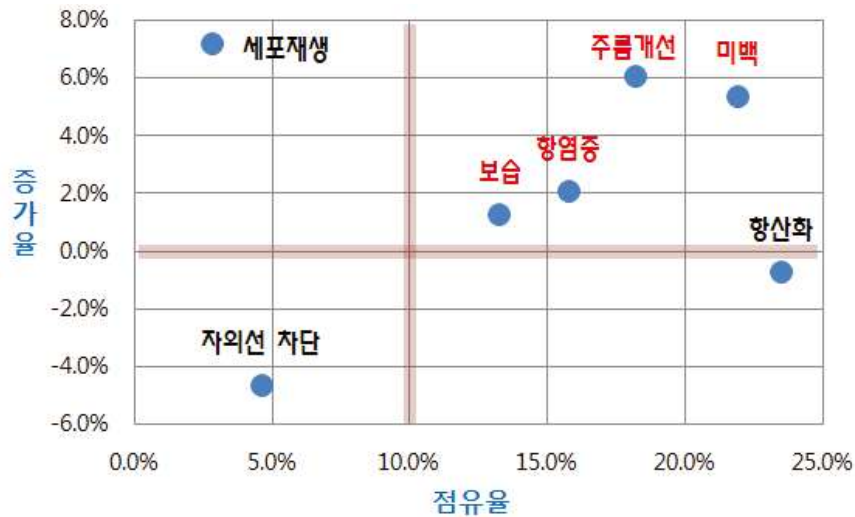
1) 특허분석 측면

- 인삼, 홍삼, 태극삼, 흑삼의 효능 및 기능 분석과 관련된 국내 특허는 최근 5년간 대략 1400여건, saponin은 대략 500여건 출원된 것으로 조사되었음. 조사된 내용들을 살펴보면, 기존 특허는 건강식품이나 화합물의 제조방법에 관한 내용들에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 효능 및 기능 분석방법에 초점을 맞춰 연구를 추진하여 태극삼, 흑삼 최적공정개발 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.
- 농축산물 유래 화장품 조성물 특허 출원 현황을 세부기능별로 살펴보면, 항산화와 관련된 특허 출원 점유율(23%)이 가장 높게 나타났으며, 미백(22%), 주름개선(18%) 등도 상대적으로 높은 점유율을 기록함.
- 전반적으로 2008년에서 2010년 사이에 가장 활발히 출원 된 후 점점 감소함.
 - 자외선 차단 기능의 농축산물 유래 화장품 조성물 특허는 2007년 가장 활발히 출원 된 후 점점 감소함.
 - 미백, 주름개선, 항염증 기능의 농축산물 유래 화장품 조성물 특허는 2008년 가장 활발히 출원 된 후 점점 감소함.
 - 보습 기능의 농축산물 유래 화장품 조성물 특허는 2009년 가장 활발히 출원 된 후 점점 감소함.
 - 항산화, 세포재생 기능의 농축산물 유래 화장품 조성물 특허는 2010년 가장 활발히 출원 된 후 점점 감소함.



<그림 10. 기능성별/연도별 특허 출원동향>

- 특허출원 증가율 및 점유율이 상대적으로 높은 2사분면에 위치한 기능으로는 보습, 항염증, 주름개선, 미백 분야로 다른 기능에 비해 상대적으로 출원이 활발히 이루어지고 있는 분야임



<그림 11. 전세계 기능별 특허 출원 점유율 및 증가율>

- 전세계적으로 미백에 대한 특허의 점유율과 증가율이 증가하고 있는 반면 우리나라의 미백 뿐만 아니라 기능성 화장품 전반에 대한 특허가 감소되고 있다. 따라서 세계의 흐름에 맞춰 미백에 대한 연구를 활발히 진행해 특허를 발표를 증가되어야 할 것으로 사료 된다.
- 인삼에 대한 미백 특허가 대부분 단순 추출물에 대한 특허가 대부분으로써 본 연구팀은 인삼에서 단일 유용물질을 분리하여 보다 과학적이고 신뢰성 있는 특허를 제출할 수 있다.
- 또한 기존의 미백에 대한 특허는 *in vitro* 에서의 활성만 미백에 대한 특허가 대부분이나 본 연구팀은 제브라피쉬를 이용하여 제브라피쉬의 멜라닌 합성이 저해 되는 것을 보는 *in vivo* 미백 활성을 이용하여 특허를 제출함으로써 보다 신뢰성 있는 미백활성 특허가 될 것이다.

2) 논문분석 측면

- 기존 논문들은 잘 알려진 특정 인삼 성분을 중심으로 약리 또는 영양학적 효능과 생물학적 활성 매커니즘을 확인하는데 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 새로운 인삼성분의 발굴 및 이의 포괄적 응용방법을 모색하는 방향으로 연구를 수행하여 기능성 평가를 통한 논문 등을 국제학술지 및 국내학술지(등재지) 등에 게재하고자 하였다.

- 기존 대부분의 논문은 인삼에서 단순 추출한 물질을 이용하여 멜라닌 합성에 저해효과에 관한 결과들로 구성된 논문이 대부분으로써 본 연구팀은 인삼 부산물로부터 단일 유효 물질을 분리하여 미백효과에 관한 메커니즘을 밝힘으로써 인삼농업에서 대부분이 폐기되는 자원에 대한 활용 가치를 높이고자 하였다.

<표 10. 피부 미백 기작과 활성물질들>

Mechanism	Example
UV Protection	Octyl methoxycinnamate, Oxybenzone, Titanium oxide, Zinc oxide
Control of signals transduction	Immelin, Chamomile ext.
Inhibition of tyrosinase synthesis	Phytoclear EL-1, Selina
Inhibition of tyrosinase activity	Arbutin, Licorice ext, Mulberry ext.
Reduction of melanin	Vitamin C, Glutathion, Coenzyme Q10
Stimulation of skin turnover	AHA, Salicylic acid, Protease

- 미백 활성에 대한 연구방법은 대부분 *in vitro* 방법으로 국한되어있고 *in vivo* 방법은 아직 논문상에서 흔하지 않다. 제브라피쉬를 이용한 전임상 연구방법을 이용하여 기존의 연구 논문과는 차별화를 두고, 전임상 미백 활성 실험을 수행하여 *in vitro*와 *in vivo* 연구방법에서 모두 효과를 갖는 신뢰성 있는 연구를 실시하고자 하였다.
- 뿐만 아니라 현재 화장품 개발에 있어서 동물실험은 사회적으로 거부감이 증가되고 있으며 특히 유럽연합의 경우 동물실험을 통해 개발된 화장품의 판매가 제한되고 있는 시점이다. 따라서 본 연구팀은 인공피부 조직을 이용한 미백 활성 방법을 통해 전임상의 연구결과를 뒷받침하고 차후 이를 통해 상품화가 되었을 때 동물실험을 대체할 수 있는 결과로 사용할 수 있다.
- 자외선에 의한 색소침착의 과정에 있어서 초기단계의 자외선에 의한 염증은 각질세포에서 멜라노사이트를 자극하는 전달물질의 방출을 유발하기 때문에 항염증 효과를 갖는 물질은 색소침착의 예방에 유효한 것으로 고려된다. 본 연구에서는 피부기능성 확대 연구를 통하여 미백과 관련된 직접적인 작용기전과 더불어 각질세포내에서 이루어지는 염증성 인자들의 조절에 관한 연구가 수반되어서 미백과 색소침착이라는 좀더 광범위한 영역에서의 미백효과에 관한 연구를 수행하고자 하였다.
- 또한 미백 활성에 대한 전임상연구도 *in vitro* 연구방법을 이용한 기존의 연구 논문과는 차별화를 둔 제브라피쉬를 이용한 방법으로 전임상 미백 활성 실험을 수행하여 보다 *In vitro*와 *in vivo* 연구방법에서 모두 효과를 갖는 신뢰성 있는 연구를 실시하였다.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 홍삼관련 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 본 연구과제에서는 태극삼, 흑삼의 최적공정개발을 통한 소재의 기능성평가, 인체적용시험을 수출국가인 대만 또는 중국에서 연구를 추진하여 수출 맞춤형 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임
- 국내 시장 분석 결과 기능성 화장품 시장은 꾸준한 성장을 이루어져 왔다. 기능성 화장품 중 미백 화장품이 차지하는 비율이 가장 낮지만 꾸준한 상승세를 보이고 있으며 생산 실적 또한 지속적으로 증가되어 왔다. 또한 복합유형의 기능성 화장품이 증가됨으로 인한 미백 물질의 수요가 증가될 것이다.
- 따라서 다양한 미백 활성 물질을 확보하고 또한 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 새로운 미백활성 물질을 개발할 필요성 더욱 증대되고 있는 상황이다.

3장. 연구 수행 내용 및 결과

1절. 인삼 부산물을 활용한 기능성 화장품 소재 개발

1. 인삼 부산물을 활용한 소재 활용성 검토

(1) 인삼 부산물의 확보

인삼재배 10여개소 농가로부터 인삼열매과육 3.75톤, 지상부 1톤을 확보함



그림12. 인삼열매(과육) 수확 및 과피액 확보 과정



그림13. 인삼지상부 수확 및 확보 과정

- 확보한 인삼과육 및 지상부를 (주)지에프씨(1세부)와 (주)네추럴에프앤피(2협동)에 제공

2. 인삼 잎/줄기를 활용한 기능성 화장품 소재 개발

(1) 인삼 잎/줄기 등의 인삼지상부의 유효성분 확인

- 본 실험에서 사용한 인삼은 노지 인삼밭에서 재배된 4년생으로 잎과 줄기, 열매, 뿌리로 나누어 분석시료를 조제하였다. 인삼은 부위별로 약 0.2-1.0 g 무게를 쟀 후 80% (v/v) 메탄올 수용액을 가하여 1시간 동안 환류 추출을 하였다. 추출액을 Whatman 여과지(No. 42 filter paper)로 걸러낸 후 동일한 방법으로 추출을 2회 수행하였다. 추출액은 감압 회전 진공 농축기로 건조시켜 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 추출물을 2차 증류수에 녹인 후 수포화 부탄올을 가하여 vortex mixer로 섞었다. 클로로필이 함유된 잎과 줄기는 2차 증류수에 녹인 추출물에 에칠아세테이트를 가하여 vortex mixer로 섞었다. 에칠아세테이트층을 제거하고 남은 물층에 수포화 부탄올을 가하였다. 그 후 과정은 위에서 기록한 부탄올 분획과정과 동일한 방법으로 수행하였다. 2회에 걸쳐 모아진 수포화 부탄올 층을 모아 감압 회전 진공 농축기로 50℃에서 용매를 제거하였다. 건조된 추출물은 다시 100% HPLC grade methanol에 녹여서 TLC 및 HPLC 분석에 사용되어졌다.

가. TLC 분석

- TLC 분석에는 silica gel 60 F254 TLC plate (Merck, Germany)를 사용하였으며, 부탄올 추출액을 TLC plate에 spotting한 후 CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10 v/v/v, lower phase)의 혼합용매를 이용하여 전개하였다. 전개한 TLC plate는 10% H₂SO₄을 분사시킨 후 열을 가해 발색시켜 사포닌 변환 양상을 관찰하였다.

나. High-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 ginsenosides 분석

- 분석시료는 HPLC grade methanol에 녹여 0.2µm membrane syringe filter를 이용하여 여과하고 HPLC를 통해 분석되어졌다. HPLC에 장착된 컬럼은 C18 (250 × 4.6mm, ID 5 µm) 으로 UV/Visible detector 203nm에서 검출되었다. 이동상 water와 acetonitrile은 유속 1.0m/min로 비율은 표와 같이 하였다. Ginsenoside 함량은 평균±표준편차값으로 표시되었다.

표 11. HPLC 분석 이동상의 water와 acetonitrile 비율 조건

Time	Percentage of water	Percentage of acetonitrile
initial	83	17
6	83	17
9	77	23
14	76.5	23.5
17	71	29
21	70.5	29.5
29	55	45
31	53	47
33	10	90
34	10	17
35	83	17

- 인삼의 뿌리와 잎, 줄기, 열매를 각각 같은 조건으로 추출 한 후 HPLC 분석 한 결과, 인삼의 모든 부위에서 모두 인삼의 ginsenoside가 존재함을 chromatogram을 통해 다시 한번 확인 하였으며는 각각의 ginsenoside 함량은 아래의 표와 같다.

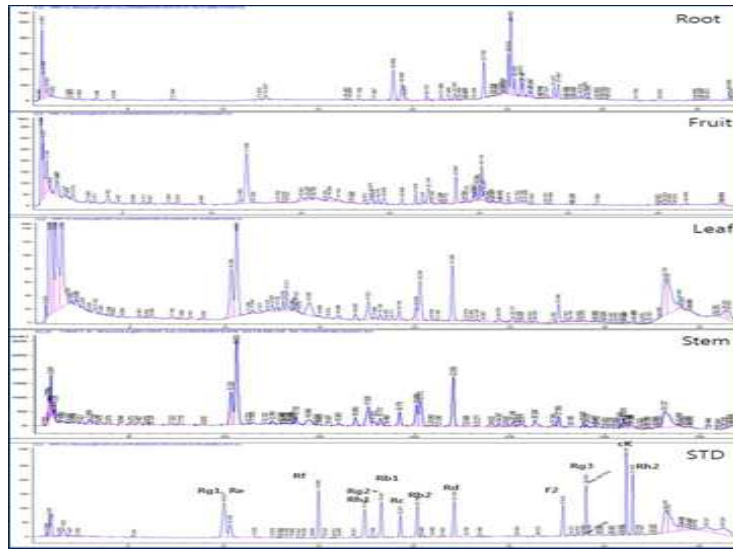


그림 14. 인삼의 부위별 ginsenoside 분석 chromatogram

표 12. 인삼 잎, 줄기, 열매와 뿌리의 ginsenoside 함량 차이 분석(mg/g)

	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg2
root	7.89	3.14	4.81	2.7	3.44	0.91	2.91	0.31
leaf	1.41	2.22	1.15	22.2	30.11	0.1>	8.08	2.01
stem	0.1>	0.1>	0.1>	0.51	7.71	0.1>	4.08	0.49
Fruit	5.4	8.51	7.7	10.55	68.7	3.05	3.71	3.24

- 함량적 차이를 비교해 보았을 때 잎과 열매에서 가장 많은 ginsenoside가 존재 함을 알 수 있었다. 뿌리의 경우 주로 ginsenoside Rb1과 같은 PPD type의 major ginsenoside이 가장 많은 비율을 차지하는 반면 잎, 줄기, 열매에서는 ginsenoside Re, Rg1과 같은 PPT ginsenoside의 비율이 높은 것으로 확인 되었다. 특히 ginsenoside Re는 뿌리에 비하여 8.75 배에 가까운 양을 가지고 있어 이를 활용할 경우 다량의 ginsenoside를 획득할 수 있을 것으로 기대되었다. 인삼의 잎과 열매에는 높은 함량의 PPT 타입 ginsenoside 뿐 아니라 많은 양의 ginsenoside Rd가 존재함을 확인 할 수 있었는데 Rd는 인삼 뿌리에도 다량 존재하는 PPD 타입의 대표적인 ginsenoside로 알려져 있다. HPLC 분석을 통해 확인한 인삼 잎, 줄기, 열매의 ginsenoside는 주로 ginsenoside Rd, Re 그리고 Rg1으로 이들은 모두 인삼 뿌리에도 존재하는 major ginsenoside 종류이지만 인삼 잎, 줄기, 열매에 훨씬 많은 함유량을 가진다. 특히, 여러 부위 중 열매 및 잎에 가장 많은 ginsenoside 함유량을 가진 것을 확인하였으며 이에 따라 본 과제에서는 이들 부위를 이용하여 사포닌을 정제하고 이로부터 화장품 소재로서의 효능을 평가하여 표준 효능물질을 발굴하고자 하였다.

(2) 인삼 잎/줄기로부터 ginsenoside의 분리 및 동정

- 인삼 지상부 건조물 5kg을 이용하여 70% 에탄올을 이용해서 상온에서 일주일간 추출한 후 이를 여과하고 남은 잔사에 70% 에탄올을 추가로 첨가하여 다시 일주일간 추출하고 이를 여과한 후 1,2차 추출물을 합하여 감압 농축하였다. 얻어진 농축물을 EtOAc (3 L × 3)/H₂O (3 L)로 분배 추출하였으며, EtOAc 층을 제하고 남은 H₂O층을 n-BuOH(2.8 L × 3)로 추출 하였다. 각층을 감압 농축하여 EtOAc, n-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다.
- 얻어진 분획물은 TLC를 확인하였으며, 유효성분을 분리하기 위하여 silica gel 및 ODS column chromatography를 반복하여 saponin을 분리, 정제하였다.

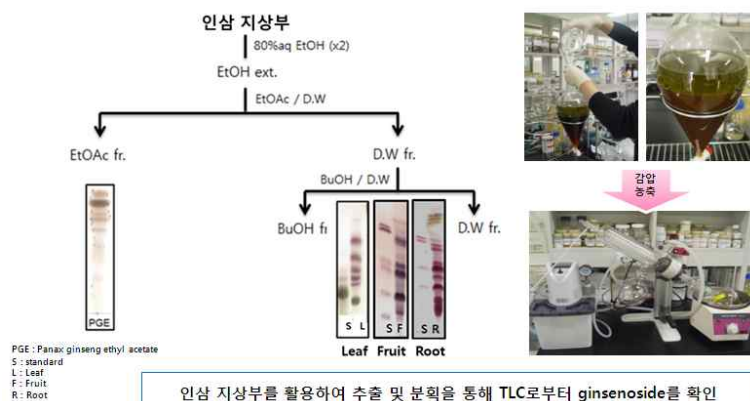


그림 15. 인삼 지상부를 활용한 추출 및 분획

- BuOH 분획물 30 g에 대하여 Silica gel column chromatography (c.c.) (CHCl₃-MeOH =8:1→7:1→4:1→CHCl₃-MeOH-H₂O=5:4:1→100% MeOH)를 실시하여, 10개의 분획물(G1~G10)을 얻었다. 이로부터 ginsenoside Re 및 다양한 major 사포닌을 분리하였으며, 일부 minor 사포닌이 인삼지상부에서 분리할 수 있었다. G3 분획물 685 mg을 가지고 ODS c.c.를 실시하여 15개의 분획물(G3-1~G3-15)을 얻었고 그 중 G3-1 분획물을 가지고 ODS c.c.을 실시하여 Ginsenoside Rh1을 G3-4 분획에서 ginsenoside F1을 분리하였다.

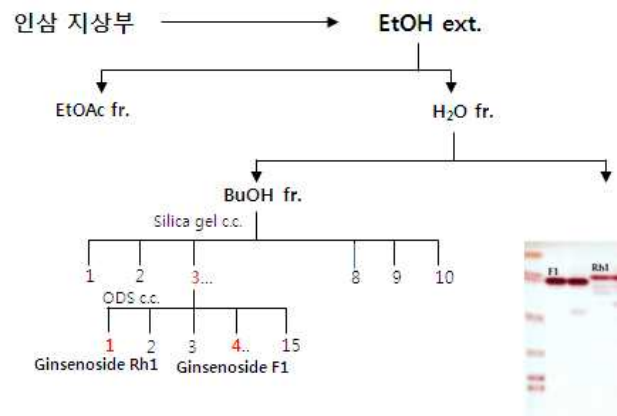


그림 16. 인삼지상부의 BuOH 분획

- 분리한 화합물에 대해서 UV detection (254, 365 nm)과 TLC plate상의 10%-H₂SO₄ 또는 anisaldehyde H₂SO₄등의 발색시약 분무 시 나타나는 양상에 따라 화합물의 골격 군을 예상하였다. ¹H-NMR spectrum상의 chemical shift로부터 수소관련 화학적 환경 해석, coupling constant로부터 인접 수소와의 입체배열 해석, integration으로부터 수소 signal의 개수를 확인하고 ¹³C-NMR spectrum으로부터 화합물을 구성하는 탄소수 및 탄소의 주위 환경을 해석하였다. DEPT NMR data로부터 탄소의 다중도를 확인 및 ¹H-¹H COSY spectrum으로부터 인접 수소의 환경을 해석하고 부분구조를 확인하였다. ¹H-¹³C COSY spectrum으로부터 수소와 탄소의 direct 연결을 확인한후 HMBC spectrum으로부터 부분 구조를 포함한 전체적인 화학구조를 확인하였다.

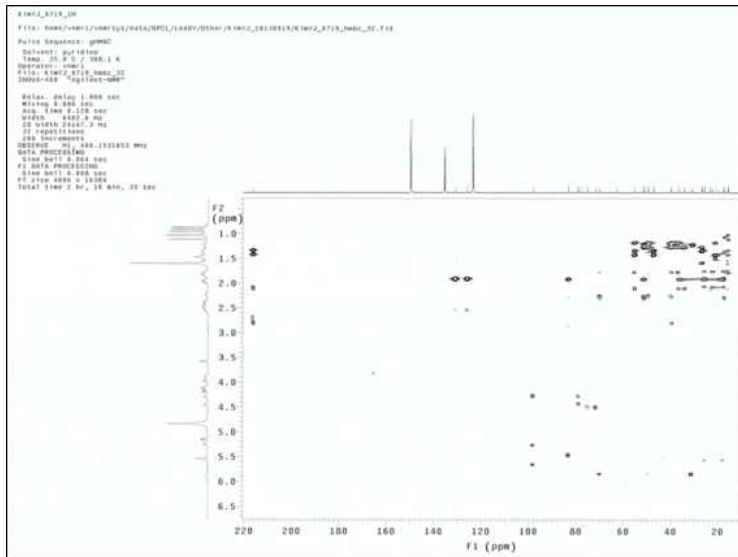
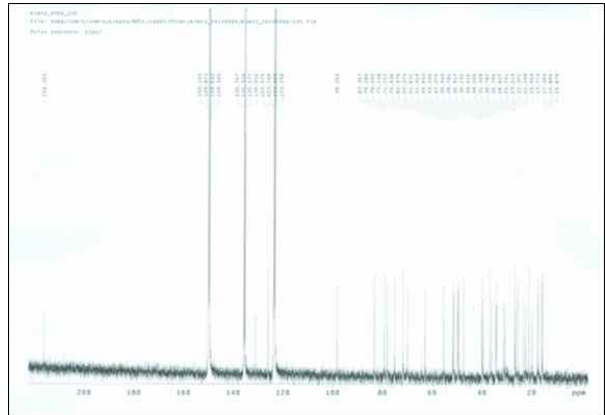
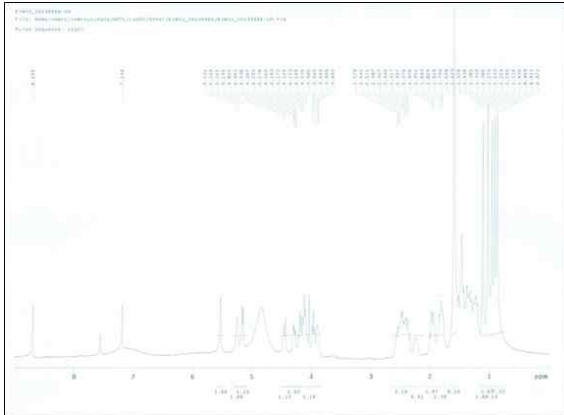


그림 18. 분리 된 ginsenoside Rh1의 NMR을 통한 동정

(3) 인삼 잎/줄기의 소재화를 위한 차별화 연구

가. 인삼 사포닌의 전환 연구

- 인삼 지상부는 인삼 뿌리 보다 더 많은 사포닌을 함유하고 있음이 알려져 있으며, 최근 그 관심도 지속적으로 증가하는 추세이지만 단순 추출 시 특별한 차별점이 없으며 더불어 일부 선행특허의 침해 가능성도 존재하기에 이를 차별화 하여 차별화된 소재로 만들 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 1차년도에는 이화학적 방법에 의한 차별화 전략, 2차년도에는 발효등을 통한 신기능성물질 발굴이라는 로드맵을 수립하여 연구를 수행하였다. 본 1차년도의 연구에서는 인삼 지상부를 이용하여 산처리 및 열처리 등의 이화학적 가공을 통하여 사포닌의 전환을 유도하고 이로부터 기능성 물질을 발굴하고자 하였다. 열처리는 Autoclave에서 105℃를 설정하여 3시간 처리하였고, 그 결과 다양한 사포닌이 생성된 것을 확인 할 수 있었다.

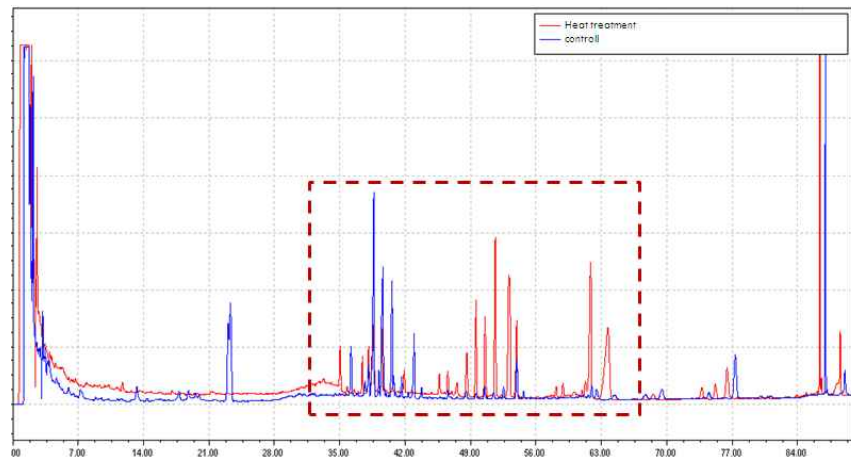


그림 19. 열처리에 의한 인삼 지상부 사포닌의 변환

- 산 처리는 기존 연구에서 pH 0.85~2.34범위 내에서 HCl에 의한 가수분해는 큰 차이가 없지만 많은 부산물이 생성되는 것으로 나타났고 1%의 초산 (acetic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 타르타르산 (tartaric acid) 및 염산으로 가수분해를 수행하였다. 이와 같은 연구를 기초로 citric acid pH 2.7로 설정하여 처리 하였으며 분석 결과 사포닌 전환이 확인 된 바 본 샘플을 이용하여 활성연구를 수행하였다.

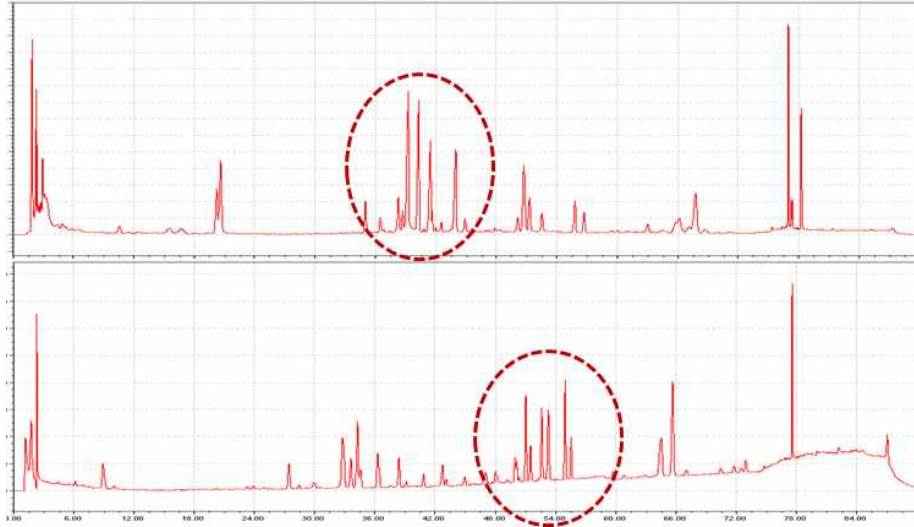


그림 20. 산처리에 의한 인삼 지상부 사포닌의 전환

- 열처리 및 산처리에 의해서 인삼 지상부의 사포닌의 전환이 이루어진 것을 확인 할 수 있으며 이를 통해 효능의 변화가 있을 수 있음을 예상할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 지상부의 이화학적 처리에 의한 사포닌 전환 산물의 활성을 비교 하였다.

나. 사포닌 전환 산물의 활성 비교

- 지상부 추출물의 변환 전 후의 주름 억제 활성을 확인하기 위하여, MMP-1에 대한 assay 실험을 진행하였다. UVA의 조사에 의하여 발현되는 MMP-1의 억제 활성을 Real-time PCR을 통하여 확인 하였으며, 변환 전 추출물과 산처리 추출물을 0, 10, 20, 50, 100ppm 농도로 조제하여 처리함으로써 MMP-1의 억제 활성에 영향을 주는지 확인 하였다.

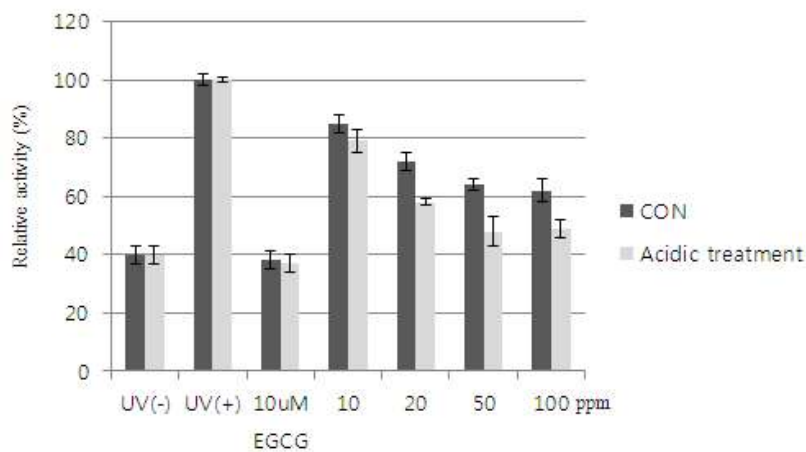


그림 21. 인삼 지상부의 산처리에 따른 MMP-1 저해 활성

- 인삼 지상부 추출물의 전환에 따른 활성 비교시 산처리를 통한 전환 샘플이 collagen 생합성에도 훨씬 높은 콜라겐 생성 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 발효 전·후의 직접 비교시 인삼 추출물의 발효 후가 발효 전보다 약 58%이상의 콜라겐 생합성 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

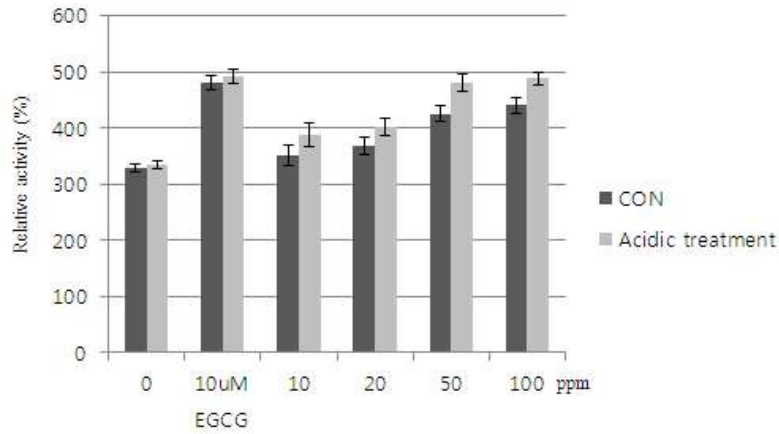


그림 22. 인삼 지상부의 산처리에 따른 Procollagen type1 생성능

- 이는 일반적으로 지상부에서 존재하는 발효 전의 major ginsenoside 보다 발효 후 생성되어지는 minor ginsenoside에서 보다 좋은 주름 억제효과가 있었다고 사료되며 이는 기존의 연구 결과와 유사한 결과로 인삼 뿌리 뿐 아니라 인삼 지상부에서도 발효를 통해 전환된 minor ginsenoside에 의하여 주름에 보다 뛰어난 효과를 가지는 것으로 보여주는 결과이다. 이를 통해 발효 인삼 지상부는 기존의 화장품 소재로 이용되는 인삼 뿌리와 더불어 높은 경쟁력을 갖출 수 있는 소재로 이용 할 수 있을 것으로 판단되어진다.

(4) 피부에 효과적인 PPT 계열 사포닌의 대량 분획 제조 기술 개발

가. 화장품 소재용 고분획물의 제조 방안 확립

- 본 연구에서는 인삼 지상부의 사포닌 중 피부 효능 효과가 뛰어난 PPT 계열의 사포닌을 화장품산업에서 활용하기 위하여 대량으로 고분획하는 방법을 확립하고자 하였다.

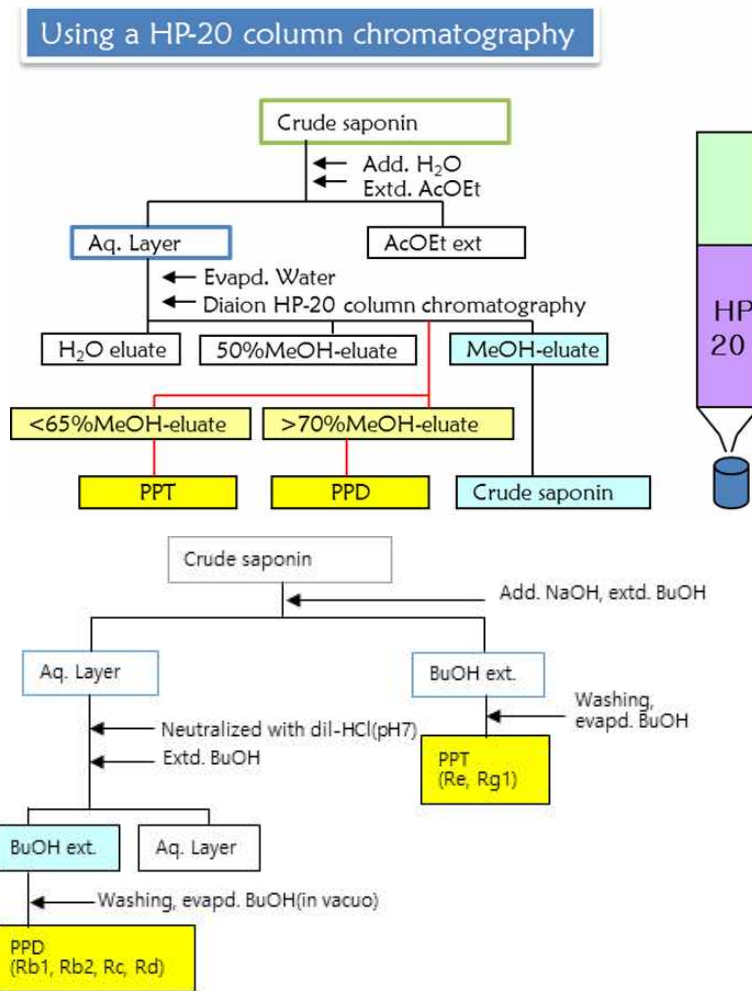


그림23. 인삼 지상부의 PPT 고분획 모식도

- 시험 방법은 HP20을 이용한 컬럼 chromatography와 액체상의 분획방법을 고려하였다. HP20의 경우 에탄올 이외의 유기용매를 사용하지 않아도 되는 장점이 있었으나, 산업적으로 대량화 하기에는 대용량의 컬럼을 구비하기 어려운점과 resin의 구입비용등의 어려움이 있는 것으로 확인 되었다. 따라서 본 연구에서는 용매 액체상에서 PPD와 PPT를 분획하는 방법을 활용하여 고분획물을 제조하고자 연구를 수행하였다.
- 액체상을 분획하면서 pH 조절을 통하여 PPD계열의 사포닌과 PPT 계열의 사포닌을 각각 분리하였으며 이를 HPLC 및 TLC를 통하여 확인한 바, 60% 이상의 PPT계열 고분획물을 얻을 수 있었다.

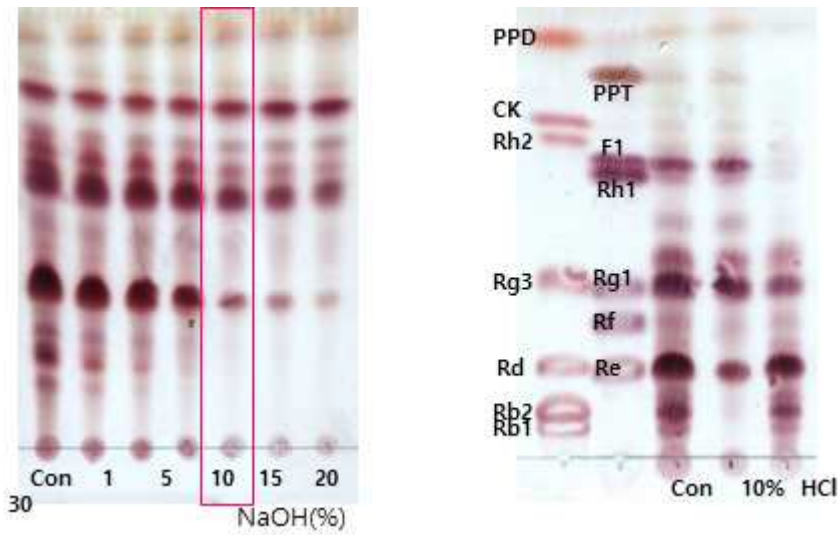
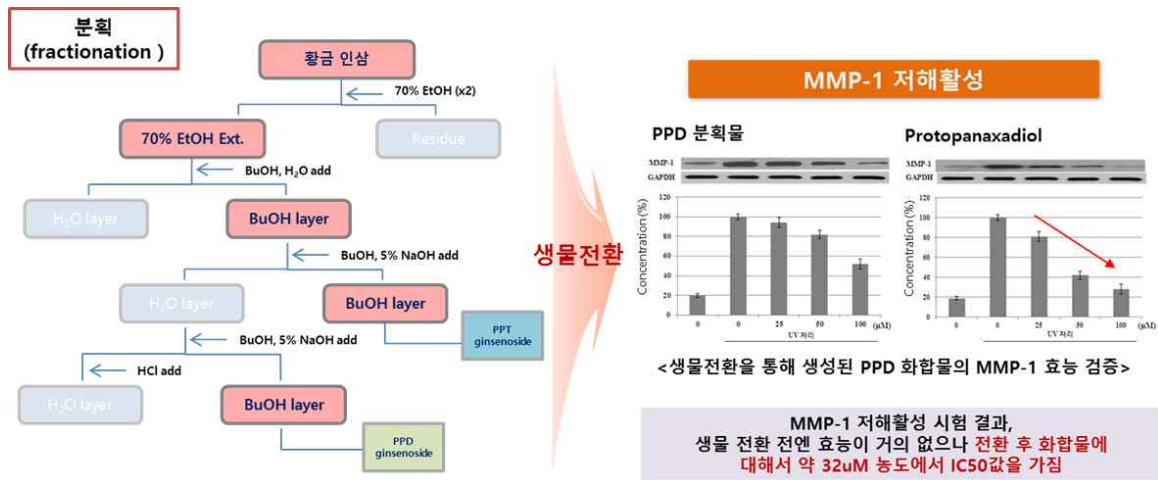


그림25. 액체상 분획을 통한 고분획물의 확인

나. 고분획물의 발효를 통한 algycone의 대량생산 및 이의 효능효과



- 화장품으로 활용가치가 높은 PPT 분획을 제외한 PPD 분획물은 효능효과를 증대시키기 위해서 앞서 확립되어진 발효기술을 이용하여 생물전환을 유도하였다. 발효 전 후를 각각 비교한 결과 다음과 같이 발효 후 뛰어난 효능 활성을 보여, PPT분획에 비하여 활성이 비교적 떨어져 활용가치가 낮을 것으로 생각되 던 PPD 분획의 활용이라는 측면에서 유용할 것으로 기대되었다.

(5) 인삼 잎/줄기, 열매를 이용한 주름개선 전임상 연구

- 분리 되어진 물질을 이용하여 피부 효능에 대한 효과를 검증하기 위한 in vitro 효능 활성화 연구를 수행하였다.
- 본 연구팀에서는 다양한 소재로부터 항염증 및 미백 등의 활성을 확인 할 수 있는 in vitro 효능 검증 system을 구축하고 있다. 이에 본 연구에서 개발되는 소재들을 효능 평가 system에 대입시켜 보다 효율적이고 객관적인 결과를 도출하고자 하였다.

가. Elastase 발현 저해 연구

- 분리 된 화합물 중 피부 또는 화장품 소재로서 활성을 가지는 소재를 선별하기 위하여 다양한 사포닌을 활용하여 Elastase 저해능력을 평가하였다.

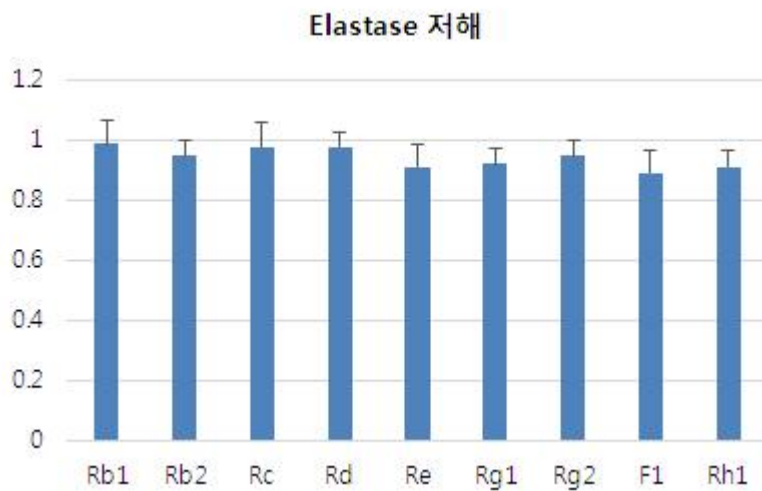


그림 26. 인삼 사포닌의 elastase 저해 활성

- 실험 결과 elastase 저해 능력의 경우 인삼 사포닌에 의한 저해 활성이 나타나지 않았으며 이를 통한 소재의 탐색이 어려울 것으로 사료 되어 다른 지표인 MMP-1 저해 활성을 탐색해 보고자 하였다.

나. MMP-1 발현 저해 연구

- 소재의 screening 단계에서 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 합성 저해 능력을 평가하였다.

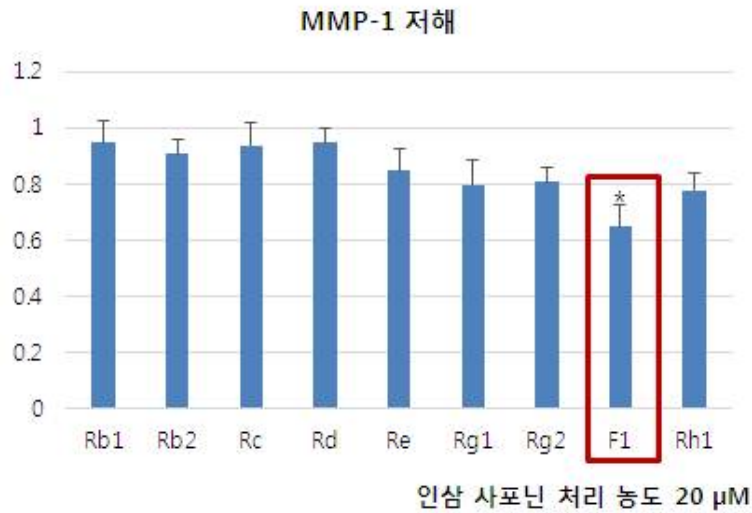


그림 27. 인삼 사포닌의 MMP-1 저해 활성

- 실험 결과 ginsenoside F1에서 유의적인 MMP-1 저해 활성이 나타났으며, 따라서 본 연구에서는 ginsenoside F1 소재에 활성 지표로서의 가능성을 평가하기 위해 심화적인 활성 검정 연구를 수행하였다.

다. 세포독성평가

- 인삼 지상부 유래 추출물 ginsenoside F1의 세포 독성을 측정하였다. 추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위하여, 인간 각질형성 세포 HaCat(ACTT, CLS 300493, USA)을 헤마사이토미터(Hemocytometer)를 이용하여 96well plate에 1.5×10^4 cell/well 씩 동일하게 계수하여 분주한 후, 37°C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 세포 배양액을 제거하였다. ginsenoside F1을 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4%로 농도로 희석하여, 각 농도별씩 40μl를 취하여 DMEM 배지와 혼합한 뒤, 각 well에 농도별로 처리하였다. 이를 다시 37°C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 CO2 incubator에 넣어 24시간 배양하였다. 그 후 well당 10% WST(high sensitive Water Soluble Tetrazolium salt)를 100μl씩 첨가하고 동일한 조건에서 2시간 동안 반응 시켜주었다. 2시간 뒤, ELISA reader(Thermo, Multiskan EX)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

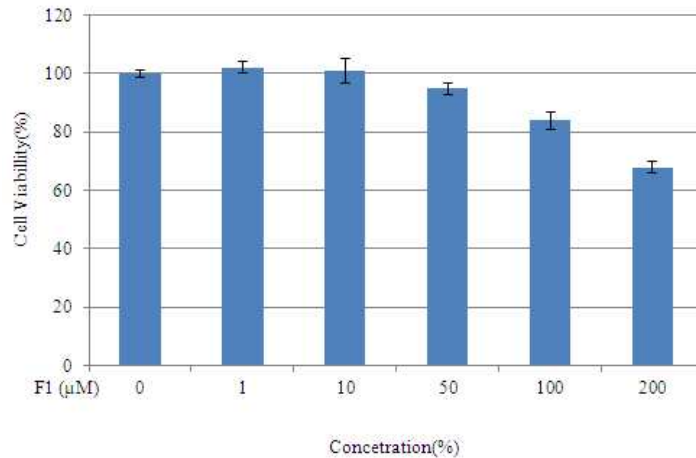


그림 28. ginsenoside F1의 세포 독성

- 인삼 지상부 유래 분리 화합물인 ginsenoside F1을 농도별로 세포독성을 측정하였으며 최고 50μM 농도에서까지 98% 이상의 세포 생존율을 보인 바 50μM이하의 농도를 최대 사용 농도로 설정하고 후속 실험을 진행하였다.

라. ginsenoside F1 콜라겐 생성 및 MMP-1 저해 효과

- Collagen 합성능력을 평가하기 위하여 ginsenoside F1을 농도별로 처리하여 실험을 콜라겐의 생성을 확인하였다.

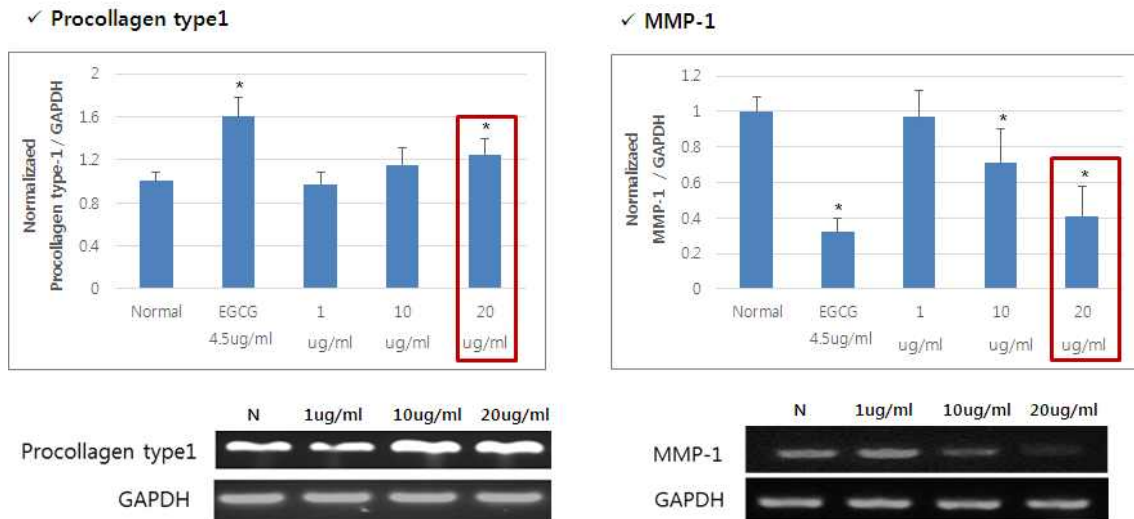


그림 29. ginsenoside F1의 콜라겐 형성능력 평가 및 MMP-1 저해 활성 평가

- 실험결과 20μM 농도에서 MMP-1 저해 및 콜라겐 생합성 증대가 관찰 되었으며, 이로 보아 본 물질은 주름개선에 효과적임을 확인 할 수 있었다.

(6) 인삼 잎/줄기, 열매의 화장품 원료화

가. 인삼 잎/줄기의 화장품 원료화

- 본 연구에서 개발된 인삼 지상부의 효능 지표 및 활성 결과를 바탕으로 지상부의 인삼 사포닌을 활용한 화장품 소재를 개발하고자 하였으며 그 공정은 다음과 같다.

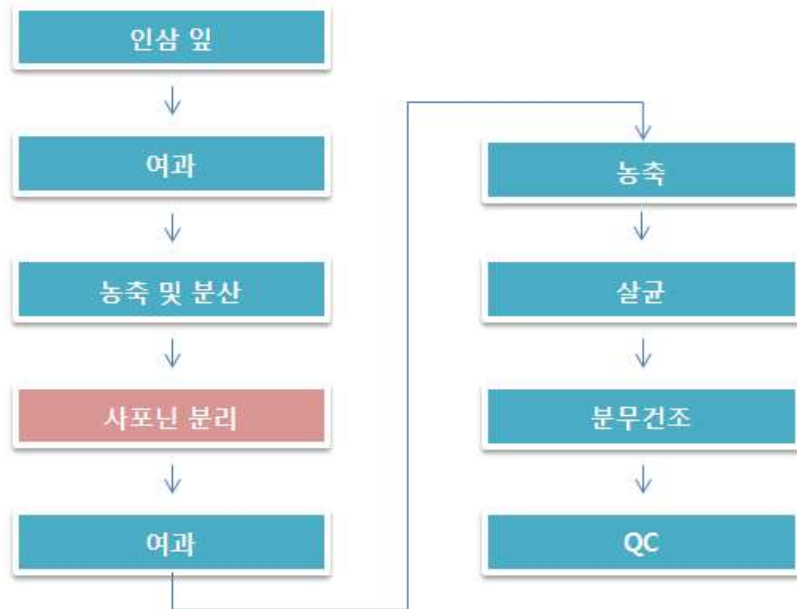


그림 30. 인삼잎/줄기를 활용한 화장품 소재 원료화 공정(1차원료 공정)

- 생산된 제품은 잔류 농약 검사 및 사포닌 검정시험을 통하여 제품 품질 평가를 수행하였다. 수립된 공정은 과제 연차 실적에 맞추어 기능성 개선 등의 개선을 할 계획이다.



그림 31. 인삼잎/줄기를 활용한 1차 원료 개발

검 사 성 적 서

발급번호 : 143288	발주번호 : 1-140513				
제 목 명 : 인삼총사료닌	제 조 일 자 : 2014. 10				
제조업체 : 영진생명	성 명 : 인삼총				
소재지 : 경기도 용인시 기흥구 양척동 1005 흥익IT밸리 2차동 302호	규 모 번 호 : -				
발주발령일 : 2014. 10. 24	검사발령일 : 2014. 10. 31				
시공일(월) : -					
검사목적 : 합고검					
시험항목 및 결과					
시험항목	기준규격	검사결과	항목명	기준규격	검사결과
DDT	-	불검출	Tolylfluent	-	불검출
BHC	-	불검출	Toxoflze-methyl	-	불검출
Azin & Dethin	-	불검출	Difencenzoate	-	불검출
Ethin	-	불검출	Pyrethrin	-	불검출
Guarantene	-	불검출	Imipicadine	-	불검출
Carbendazin	-	불검출	Fenitazolid	-	불검출
Metatyl	-	불검출	Cyazofenilid	-	불검출
Dithufenacarb	-	불검출	Cyprodinil	-	불검출
Cypermethrin	-	불검출	Kisacotr-methyl	-	불검출
Acarypsidin	-	불검출	Fludoxanil	-	불검출
Carbofuran	-	불검출	Trifluoridolil	-	불검출
Carbofufu	-	불검출	Flusilicoprostate	-	불검출
Cyfluthrin	-	불검출	Lindane	-	불검출
Flutaland	-	불검출	Teflutrin	-	불검출
Fluazinacarb	-	불검출			
합고			합고		합고
(주) 영진생명 (주) 영진생명 (주) 영진생명 (주) 영진생명 (주) 영진생명 (주) 영진생명 2014년 10월 31일 (110-470) 서울시 용인구 용정동 182동 8 (주) 한국인삼제정협회 Tel: 033872-8810-4 Fax: 033872-8809 (주) 한국인삼제정협회 11011 www.korinsam.org, ko.kr					

#309, Tower-Dong, Heungdeok IT Valley 13, Heungdeok 1-Ro, Gyeonggi-Do, Yongin-City, Gyeonggi-Do, 440-020 South Korea, www.gfco.co.kr
Phone +82-70-4192-9366 Fax +82-31-264-9366



Version : a

Certificate of Analysis

Product Name	인삼총사료닌
INCI Name (EUPCPC)	Ginseng Total Saponine
Lot No.	130108
Manufactured Date	05. Jan. 2015
Analysis Date	19. Jan. 2015
Expired Date	07. Jan. 2017

Analytical Tests	Specifications	Results
Appearance	Green powder	Pass
Odor	Slightly characteristic odor	Pass
Ginsenoside content (Content standard of Ginsenoside Rp)	≥ 8.0%	12.8
Loss on drying(10, 105°C, 4h)	≤ 8.2 %	3.88
Heavy metals	Total	4.10ppm
	Asbestos	4.10ppm
Mushrooms	Total viable aerobic count (fungi, yeasts and moulds)	≤ 1000cfu/g
	At pathogens	Advent

N.D.: Not detection
 Storage: Store the product in the original, well closed container in a cool, dry area and protected from light.
 Shelf life : 24 months from MFG.
 Note : Product might be polluted or contaminated please keep product away from light, heat and moisture.

Director Hee Cheol Kang
 R&D Center

GFCO, 인삼총사료닌

그림 32. 개발 제품의 검사성적서

나. 인삼 잎/줄기 원료화를 위한 ICID 등재

- 인삼 잎/줄기의 원료화를 위해서는 ICID 등재가 우선시 되어야하며, 이를 위해 2차년도 연구 내용을 먼저 등재하여 활용하고자 하였다.

INCI Name Application

Administrative Information:

File Number: 1-05-2015-3664
 Submitted On: 05/18/15
 Submitted By: Mr. Michael Kang (mido@gfco.co.kr)
 Company: GFC CO., Ltd.

Phone: 82 70 4192 9366 Fax: 82 31 264 9366
 E-Mail: mido@gfco.co.kr
 Contact Company: GFC CO., Ltd.
 Address:

Phone: 82 70 4192 9366 Fax: 82 31 264 9366
 Publication Company: GFC CO., Ltd.
 Address: #309, Tower-Dong, Heungdeok IT Valley, 13, Heungdeok 1-Ro, Gyeong-Gu, Yongin-City, Gyeonggi-Do, 446-908, KOREA (SOUTH)
 Phone: 82 70 4192 9366 Fax: 82 31 264 9366
 Category: Fungi

International Nomenclature Committee Information:

Anticipated Committee Review Date:
 Expiration: Fungi/Single-Celled Organism
 Trade Name: Gold Thread
 Suggested INCI Name: Metachlorella/Parasitica Ginseng Leaf/Stem Ferment Filtrate
 Reference:
 CAS Number:
 EINECS/ELINCS Number:
 Chemical Synonym:
 Genus and Species of Plant: Metachlorella koreensis, Parasitica, ginseng, Leaf/Stem
 Identity of Material Fermented: Parasitica Ginseng Leaf/Stem
 Process after Fermentation: Filtrate
 Composition Statement: 100%
 Manufacturing Method: 1) After dissolving ginsengberry powder in water, inoculate (15 minutes at 125 degrees)
 2) Inoculate 1% of Metachlorella koreensis
 3) After cultivation for 7 days, Filtrate after removing a fungus body.
 Solvent or Diluent: Water, Butylene Glycol
 Function: Skin Conditioning - Microflora
 Other Functions:
 Chemical Structure: No

Attachments (CAS Reports, Literature References, etc.):

Uploaded File Name	Secret File Name

그림 33. 인삼 지상부 추출물 관련 ICID 등재 신청 서류

(7) 인삼 지상부 원료의 임상시험

① 피험자 관리

가. 피시험자 선정기준

만 30세 이상 50세 미만의 성인 여성 중에서 다음 선정기준에 만족하며 제외기준에 해당되는 사항이 없는 사람을 피시험자로 선정한다.

- 1) 주 시험자가 설명한 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한 사람
- 2) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 사람
- 3) 주 시험자의 판단에 따라 시험부위에 주름을 가지고 있는 사람
- 4) 시험기간 동안 원활한 추적관찰이 가능한 사람

나. 피시험자 제외기준

피험자와의 면담을 통해 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외하였다.

- 1) 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
- 2) 피부질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 사람
- 3) 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 사람
- 4) 민감성, 과민성 피부를 가진 사람
- 5) 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관 확장 등의 피부 이상 소견이 있는 사람
- 6) 연구 시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 화장품 또는 의약품을 사용한 사람
- 7) 연구 시작 전 6개월 내에 시험부위에 시술을 받은 사람
- 8) 그 외 주 시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 사람

다. 피시험자 중도탈락기준

선정기준에 합당하고 제외기준에 해당하지 않는 피험자라 할지라도 아래와 같은 경우 피험자를 중도탈락 처리하였다.

- 1) 시험부위에 소양감이나 홍반 등의 이상반응이 발생하는 경우
- 2) 피시험자가 실험 진행 과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 결과의 평가에 장애가 발생한 경우
- 3) 피시험자가 실험 진행 과정 중 개인사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우
- 4) 기타 시험자의 판단으로 시험지속이 어렵다고 판단되는 경우

라. 피시험자의 숫자와 이에 대한 근거

식품의약품안전처 (MFDS)에서 발간한 [기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인-주름

개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인, 2005.7]에 근거하여 통계적 비교가 가능하기 위해 20명 이상의 유효데이터를 확보하도록 하였으며 최종 시험

자의

숫자는 20명이었다.

마. 피험자 관리

본 연구의 의뢰자 및 시험자는 헬싱키 선언의 근본정신을 준수하고, 피험자의 권익을 보호하고자 노력하였으며 연구 수행과 결과 기록 등에 있어 인체시험관리기준 (GCP) 및 관련 국내 법규를 준수하도록 노력하였다.

시험 전 모든 피험자들의 시험참여 동의를 받았으며, 식품의약품안전처가 발간한 [화장품 인체적용시험 및 효력시험 가이드라인, 2011]에 따라 피험자들의 동의를 얻는데 마땅히 제공해야 할 모든 정보들을 성실히 전달하였다.

㉔ 시험방법

가. 시험물질 적용 방법

실제 사용법과 동일하게 하기 위해 시험의뢰자가 제공한 사용방법을 피험자에게 교육하였다.

나. 사용장비 -ANTERA 3DTM (Miravex, Ireland)

Antera 3DTM 는 다과장 LED 광원을 이용하여 표피와 진피의 상태를 측정할 수 있는 장비로서

내장 프로그램을 이용하여 이미지의 2차원 및 3차원 재구성이 가능하며 과장대별 분석을 통해

다양한 목적의 분석이 가능하다

다. 시험 순서

1) 첫 번째 방문

: 방문일 12시간 전부터 기초제품의 사용을 금지하였다.

: 피험자는 시험 방법과 일정 및 위험성과 가능한 이상반응 등에 대해 설명을 듣고 기초정보를 작성하고 동의서에 서명하였다.

: 시험자가 제공하는 기준 세안제를 이용하여 세안 후 페이퍼 타올로 가볍게 두드려 물기를 제거한 후 30분간 항온항습 조건 (20~24℃, 40~60%RH)에서 안정을 취하였다.

: 양측 눈가주름 부위에서 Antera 3D를 이용한 화상측정을 실시하였다. Antera 3D 촬영 구역 설정은 안와 전체 및 양측 눈가를 포함하는 6cm X 6cm 크기의 정방형 구역으로 하였다.

: 피험자 주의사항과 제품 사용법을 교육한 후 제품을 배포하였다.

: 시험기간 동안 매일 전화 등의 방법으로 제품사용의 순응도를 체크하였다.

2) 두 번째 방문 (2주차) / 세 번째 방문 (4주차)

- : 첫 방문일과 동일한 방법으로 동일한 부위에서 기기평가를 시행하였다.
- : 피부과 전문의가 이상반응 유무를 평가하였다.
- : 마지막 방문일에는 제품을 수거하고, 피험자에게 피험비를 지급하였다.
- : Antera 3D -winkle index 분석은 측정 오차를 줄이기 위해 모든 이미지 촬영이 완료된 마지막 방문일에 실시하였다.

라. 평가 및 분석 방법

1) Antera 3D를 이용한 눈가주름 개선 효과 평가

: 제품 사용 전, 사용 2주 후, 사용 4주 후에 측정된 눈가 주름 측정치 간의 통계학적 유의성을 R (version 3.1.0, 2014 The R Foundation for Statistical Computing) 프로그램의

Wilcoxon 부호순위 검정을 이용해 분석 및 검증하였다.

: 통계적 유의성을 확보하기 위해 P-value가 0.05보다 작은 경우 유의한 차이로 인정하였다.

2) 피부과 전문의에 의한 안전성 평가

: 시험기간 중 제품사용에 의한 부작용(홍반, 부종, 인설, 가려움, 자통, 작열감, 뻣뻣함, 따끔거림 및 기타 이상증) 발생 여부를 평가하였다.

③ 시험결과

		사용 전	사용 2주 후	사용 4주 후
좌측 눈가	측정 값	16.210	15.358***	14.651***
	개선율	0%	5.26%	9.62%
	P-value	-	<0.001	<0.001
우측 눈가	측정 값	16.004	15.175***	14.516***
	개선율	0%	5.18%	9.29%
	P-value	-	<0.001	<0.001

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

좌측과 우측 눈가에서 모두 사용 2주 후부터 통계적으로 유의한 수준에서 주름 개선 효과를 확인 할 수 있다.

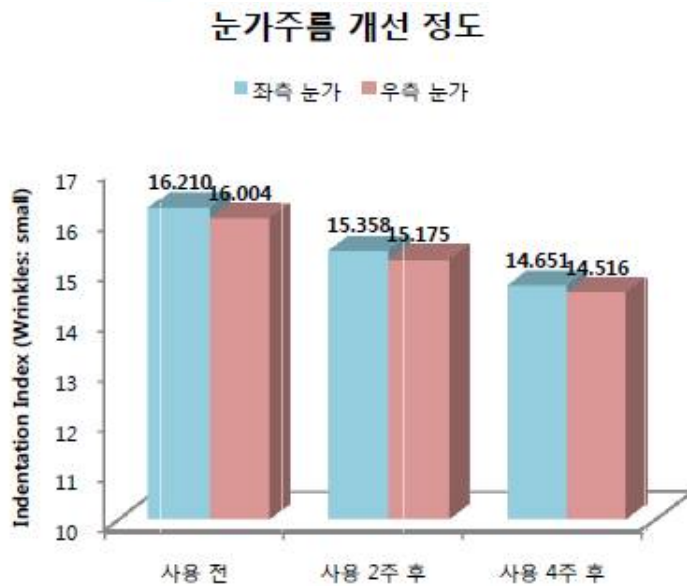
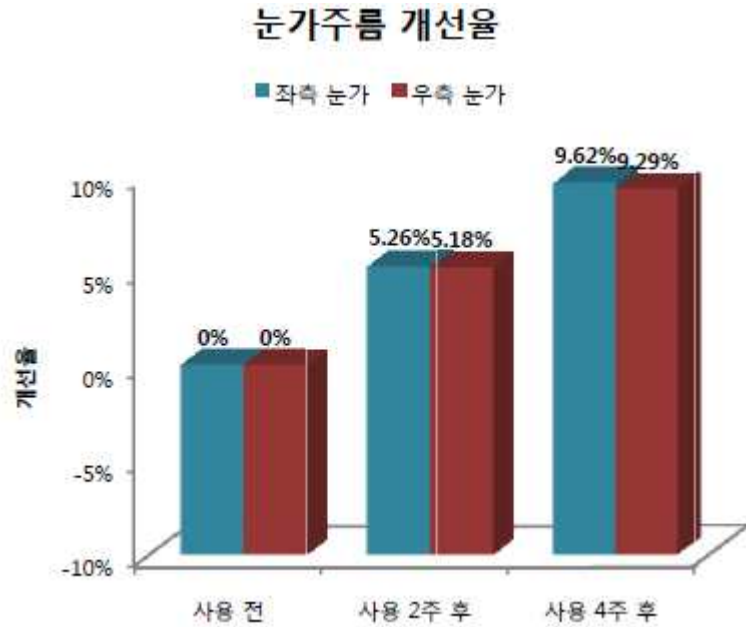


그림 34. 인삼 지상부 추출물의 주름 관련 임상 효과

총 20명의 피험자를 대상으로 총 4주 간 인삼 지상부 추출물 제품의 눈가주름 개선 효능 평가 시험을 실시하였으며, 중도탈락자 없이 20명의 피험자가 모두 시험을 완료하였다. 시험 부위의 눈가주름 개선율은 사용 2주 후에 좌측과 우측 눈가 각각 5.26%, 5.18%로 확인되었고, 사용 4주 후에는 각각 9.62%과 9.29%로 확인되었으며 제품 사용 2주 후부터 지속적으로 사용 전과 비교해서 통계적으로 유의한 수준의 눈가주름 개선율을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 4주간의 시험기간 동안 모든 피험자에서 특별한 이상반응이 관찰되지 않았다. 결론적으로 인삼 지상부 추출물제품은 사용 2주차부터 통계적으로 유의한 수준의 눈가주름 개선 효과를 보였으며, 사용 중 특별한 이상반응이 관찰되지 않아 안전한 제품으로 판단된다.

3. 인삼열매(과육) 를 활용한 기능성 화장품 소재 개발

(1) 인삼열매(과육)으로부터 유효성분의 분리 및 동정

- 인삼열매를 동결 건조한 엑기스 약 20 kg을 100% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 추출하고 2차 80%, 3차 70% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 얻어진 여액을 각각 합쳐 감압 농축하여 MeOH 추출물(550 g)을 얻었다. 추출물을 EtOAc(3 L) / H₂O(3 L)로 4회 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 n-BuOH(2.7 L)로 4회 분배 추출하였다. 각층을 감압 농축하여, EtOAc 분획과 n-BuOH 분획 및 H₂O 분획을 얻었다.

각 분획에 대한 성분을 TLC로 확인한 결과, EtOAc 분획에 비극성 사포닌으로 확인되는 물질들이 많았기 때문에 EtOAc 분획에서 화합물들을 분리하고자 하였다.

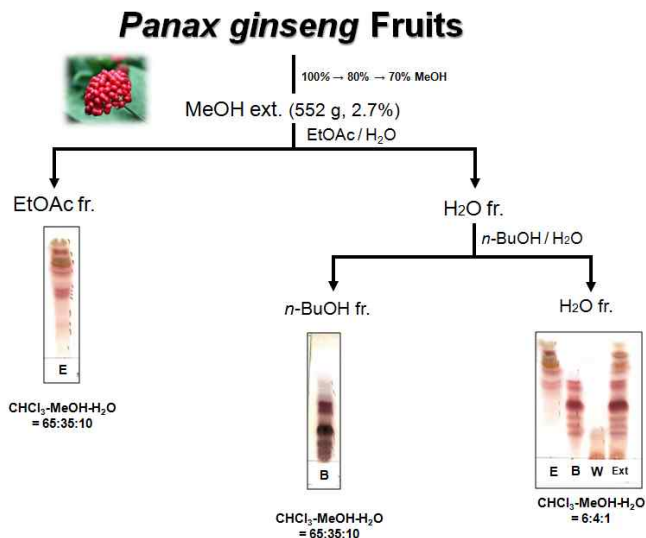


그림 35. 인삼열매로부터 추출 및 용매분획과정

(2) 인삼열매(과육)으로부터 이차대사산물의 분리

가. EtOAc 분획물로부터 활성 물질 분리

- EtOAc 분획(36 g, PGFE)에 대하여 SiO₂ column chromatography (C.C)를 실시하여 Ø 10 cm X 15 cm 조건을 사용하고 n-hexane-EtOAc = 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1 → CHCl₃-MeOH-H₂O = 25:3:1 → 23:3:1 → 17:3:1 → 14:3:1 → 12:3:1 → 10:3:1 → 7:3:1 → 65:35:10 → 6:4:1까지 순차적으로 용출하여 21개로 분획

- 소분획으로부터 SiO₂, ODS 등의 각종 matrix를 적절히 이용하고, 다양한 용출 용매로 소분획 column chromatography (c.c.)를 실시하여 활성 물질 분리함. GFE-10 (3.54 g)에 대하여 ODS C.C.를 실시하였으며 Ø 5.5 cm X 9 cm 조건을 사용하여 MeOH-H₂O = 1:1 → 3:1로 용출하여 총 41개의 분획을 얻음. 얻어진 41개의 분획 중 23번 분획에서 CHCl₃-MeOH-H₂O = 18:3:1 → 16:3:1로 용출하여 8개의 분획물을 얻음. 얻어진 8개의

분획 중 23번 분획(PGFE-10-23, 91.9 mg)에서 단일물질 ginsenoside RG2 (1)를 얻음.
- PGFE-11과 12번 분획 (PGFE-11+12, 1.18 g)에 대하여 ODS C.C를 실시하였으며 \emptyset 4 cm X 14 cm 조건을 사용하여 MeOH-H₂O = 1:1 → 3:1로 용출하여 10개의 분획 물을 얻음. 얻어진 10 개의 분획물 중 6번 분획과 7번분획(PGFE-11-6+7, 88 mg)에 대하여 SiO₂ C.C.를 실시하였으며 \emptyset 4 cm X 14 cm 조건을 사용하여 CHCl₃-MeOH-H₂O = 16:3:1로 용출하여 14개의 분획을 얻음. 그 중 10번 분획 (PGFE-11+12-6+7-10, 57.6 mg)에 대해 단일물질 ginsenoside Rf (2)를 얻음.

나 n-BuOH 분획물로부터 활성 물질 분리

- n-BuOH 분획(137 g, PGFB)에 대하여 SiO₂ column chromatography (C.C)를 실시하여 \emptyset 12 cm X 15 cm 조건을 사용하고 CHCl₃-MeOH = 3:1 → CHCl₃-MeOH-H₂O = 65:35:10 → 6:4:1까지 순차적으로 용출하여 13개로 분획
- 소분획으로부터 SiO₂, ODS 등의 각종 matrix를 적절히 이용하고, 다양한 용출 용매로 소분획 column chromatography (c.c.)를 실시하여 활성 물질 분리함.
- PGFB-3 (6.59 g)에 대하여 ODS C.C.를 실시하였으며 \emptyset 8 cm X 10 cm 조건을 사용하여 MeOH-H₂O = 3:2 → 2:1 → 5:1로 용출하여 15개의 분획을 얻음. 그 중 2번분획 (PGFB-3-2, 878 mg)에 대하여 SiO₂ C.C.를 실시하였으며 \emptyset 5.5 cm X 11 cm 조건을 사용하여 CHCl₃-MeOH-H₂O = 8:3:1로 용출하여 11개의 분획을 얻었다. 그 중 4번 분획(PGFB-3-2-4, 550 mg)에 대해 단일물질 ginsenoside Rg1 (3)를 얻음. 위의 분획 중 9번 분획과 10번 분획 (PGFB-3-2-9+10, 55 mg)에서 단일물질 ginsenoside Re (4)를 얻음.
- PGFB-3-7 (729 mg)에 대하여 SiO₂ C.C를 실시하여 \emptyset 4.5 cm X 13 cm 조건을 사용하여 CHCl₃-MeOH-H₂O = 8:3:1로 용출하여 11개의 분획을 얻음. 얻어진 11개의 분획 중 9번 분획(PGFB-3-7-9, 100 mg)에서 단일물질 ginsenoside Ia (5)를 얻음.
- PGFB-3-11 (434 mg)에 대하여 SiO₂ C.C를 실시하여 \emptyset 4 cm X 10 cm 조건을 사용하여CHCl₃-MeOH-H₂O = 11:3:1로 용출하여 11개의 분획을 얻음. 얻어진 11개의 분획 중 8번 분획(PGFB-3-11-8, 56.3 mg)에서 단일물질 notoginsenoside Fe (6)를 얻음.
- 위의 분획 중 10번 분획(PGFB-3-11-10, 81.4 mg)에서 ginsenoside Rd (7)를 얻음.
- PGFB-6 (9.4 g)에 대하여 ODS C.C.를 실시하여 \emptyset 8 cm X 9 cm 조건을 사용하여 MeOH-H₂O = 3:1로 용출하여 14개의 분획을 얻음. 얻어진 14개의 분획 중 12번 분획 (PGFB-6-12, 120 mg)에서 단일물질 ginsenoside Rd2 (8)를 얻음.

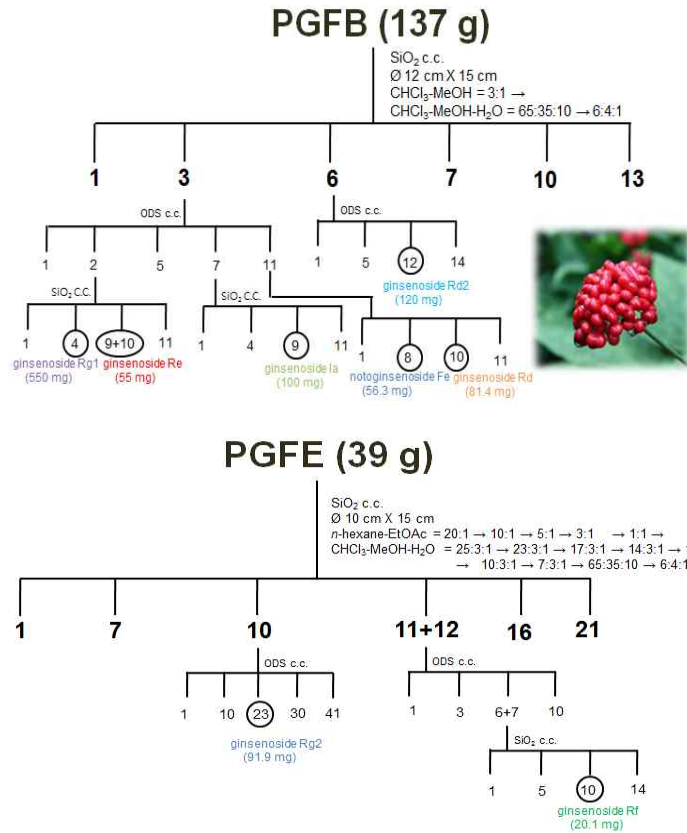


그림 36. 인삼열매로부터 진세노사이드의 분리과정

(3) 인삼 열매에서 분리한 ginsenoside 의 NMR Data 및 구조동정

- ginsenoside Rg2 : ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 5.28 (1H, dd, J=7.2, 7.2 Hz, H-24), 5.19 (1H, d, J=6.0 Hz, H-1), 4.87 (1H, br q, J=6.4 Hz, H-5''), 4.72 (1H, br s, H-3''), 4.60 (1H, dd, J=9.2, 3.2 Hz, H-2''), 4.46 (2H, dd, J=11.6, 3.2 Hz, H-6' a), 4.32 (2H, m, H-6' b), 4.31 (1H, m, H-2'), 4.3 (1H, m, H-3'), 4.25 (1H, m, H-4''), 4.14 (1H, dd, J=9.2, 8.4 Hz, H-4'), 3.92 (1H, m, H-5'), 3.43 (1H, dd, J=11.2, 4.8 Hz, H-3), 2.04 (3H, s, H-28), 1.72 (2H, d, J=6.4 Hz, H-6'), 1.64 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 1.36 (3H, s, H-21), 1.30 (3H, s, H-29), 1.16 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-30). ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 130.6 (C-25), 126.2 (C-24), 101.8 (C-1'), 101.7 (C-1''), 79.2 (C-2'), 78.5 (C-3'), 78.1 (C-5'), 74.3 (C-6), 74.0 (C-4''), 72.9 (C-20), 72.2 (C-2''), 72.1 (C-3''), 70.9 (C-12), 69.3 (C-5''), 63.0 (C-6'), 60.7 (C-5), 54.5 (C-17), 51.6 (C-14), 49.7 (C-9), 48.1 (C-13), 45.9 (C-7), 41.0 (C-8), 39.8 (C-4), 39.5 (C-10), 39.3 (C-1), 35.7 (C-22), 32.0 (C-28), 31.9 (C-11), 31.2 (C-15), 27.6 (C-2), 26.9 (C-21), 25.7 (C-26), 22.8 (C-23), 18.5 (C-6'').

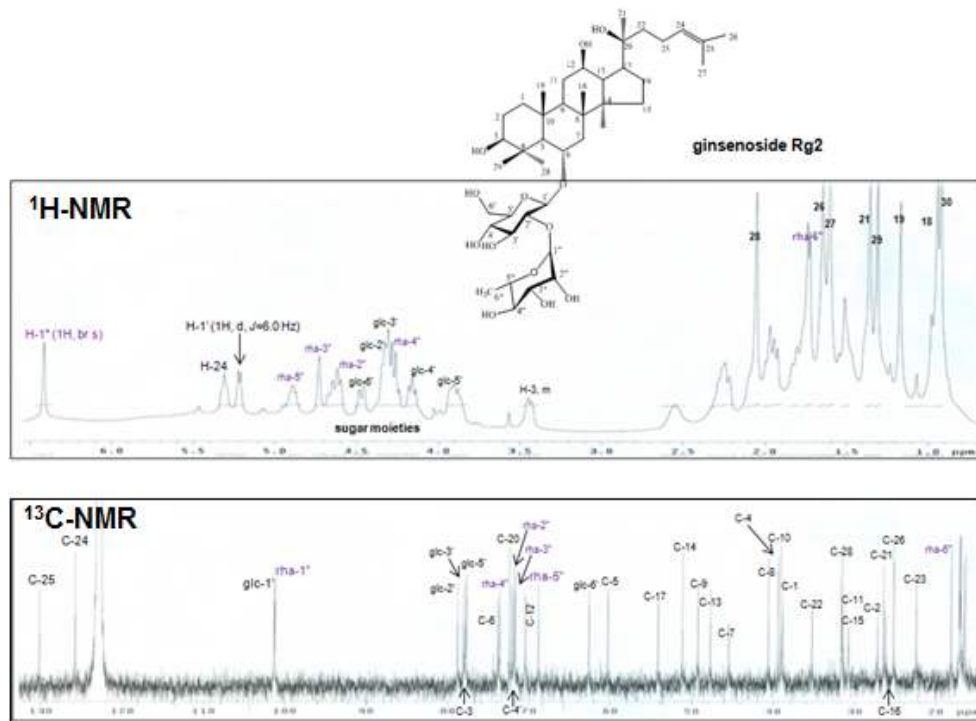


그림 37. ginsenoside Rg2의 구조동정

- ginsenoside Rf: ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 5.83 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1''), 5.30 (1H, dd, J=6.0, 5.6 Hz, H-24), 4.89 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 4.42 (1H, m, H-2'), 4.30 (1H, m, H-6), 4.28 (1H, m, H-3'), 4.18 (1H, m, H-3''), 4.17 (1H, m, H-2''), 4.14 (1H, m, H-4''), 4.10 (1H, m, H-4'), 3.88 (1H, m, H-5'), 3.87 (1H, m, H-12), 3.80 (1H, m, H-5'), 3.44 (1H, m, H-3), 2.53 (2H, m, H-23a), 2.38 (2H, m, H-7a), 2.27 (2H, m, H-23b), 2.27 (1H, m, H-17), 2.02 (3H, s, H-28), 1.92 (2H, m, H-7b), 1.64 (3H, s, H-26), 1.61 (3H, s, H-27), 1.42 (3H, s, H-29), 1.37 (3H, s, H-21), 1.14 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 0.80 (3H, s, H-30). ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 130.7 (C-25), 126.3 (C-24), 103.8 (C-1''), 103.79 (C-1'), 79.8 (C-2'), 79.77 (C-6), 79.73 (C-3'), 78.6 (C-3), 78.3 (C-3''), 77.9 (C-5''), 77.7 (C-5'), 75.9 (C-2''), 72.9 (C-20), 72.3 (C-4''), 71.7 (C-4'), 70.9 (C-12), 63.3 (C-6''), 62.9 (C-6'), 61.4 (C-5), 54.7 (C-17), 51.6 (C-14), 50.1 (C-9), 48.2 (C-13), 45.1 (C-7), 41.1 (C-8), 40.1 (C-4), 39.6 (C-10), 39.4 (C-1), 35.8 (C-22), 31.2 (C-11), 32.0 (C-28), 31.2 (C-15), 27.7 (C-2), 27.0 (C-21), 26.8 (C-16), 25.7 (C-26), 22.9 (C-23), 17.6 (C-27), 17.5 (C-19), 17.3 (C-18), 16.8 (C-30), 16.6 (C-29).

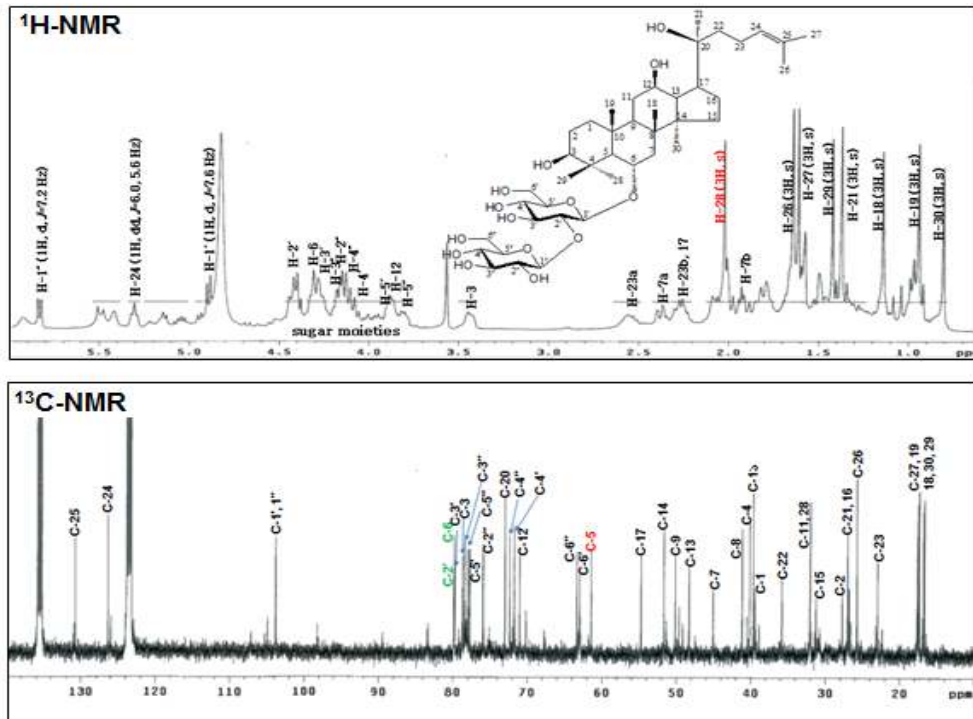


그림 38. ginsenoside Rf의 구조동정

- ginsenoside Rg1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5 , δH) 5.23 (1H, dd, $J=6.4, 6.0$ Hz, H-24), 5.12 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1''), 4.97 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1') 4.46 (2H, dd, $J=11.6, 2.8$ Hz, H-6''a), 4.42 (2H, dd, $J=12.0, 2.8$ Hz, H-6'a), 4.38 (2H, m, H-6), 4.32 (2H, dd, $J=11.6, 5.6$ Hz, H-6''b), 4.26 (2H, dd, $J=12.0, 5.2$ Hz, H-6'), 4.19 (1H, m, H-3'), 4.17 (1H, m, H-5'), 4.14 (1H, m, H-4'), 4.12 (1H, m, H-4''), 4.1 (1H, m, H-12), 3.93 (1H, dd, $J=8.8, 8.0$ Hz, H-2''), 3.89 (1H, m, H-3''), 3.85 (1H, m, H-5''), 3.47 (1H, dd, $J=11.2, 4.8$ Hz, H-3), 2.46 (1H, m, H-17), 2.44 (2H, m, H-23a), 2.43 (2H, m, H-7a), 2.38 (2H, m, H-22a), 2.21 (2H, m, H-23b), 2.05 (2H, m, H-11a), 1.98 (3H, s, H-28), 1.95 (1H, m, H-13), 1.93 (2H, m, H-2a), 1.91 (2H, m, H-2b), 1.90 (2H, m, H-7b), 1.79 (2H, m, H-22), 1.59 (3H, s, H-26), 1.58 (3H, s, H-27), 1.56 (3H, s, H-21), 1.55 (3H, s, H-29), 1.38 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-5), 1.14 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-30). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5 , δC) 130.8 (C-25), 125.9 (C-24), 105.8 (C-1'), 98.1 (C-1''), 83.2 (C-20), 80.0 (C-6), 78.6 (C-3), 70.1 (C-12), 61.3 (C-5), 51.5 (C-17), 51.3 (C-14), 49.9 (C-9), 49.1 (C-13), 45.1 (C-7), 41.1 (C-8), 40.2 (C-4), 39.6 (C-10), 39.4 (C-1), 36.0 (C-22), 31.6 (C-28), 30.9 (C-11), 30.6 (C-15), 27.8 (C-2), 26.5 (C-16), 25.6 (C-26), 23.1 (C-23), 22.2 (C-21), 17.7 (C-27), 17.5 (C-19), 17.4 (C-18), 17.1 (C-30), 16.2 (C-29).

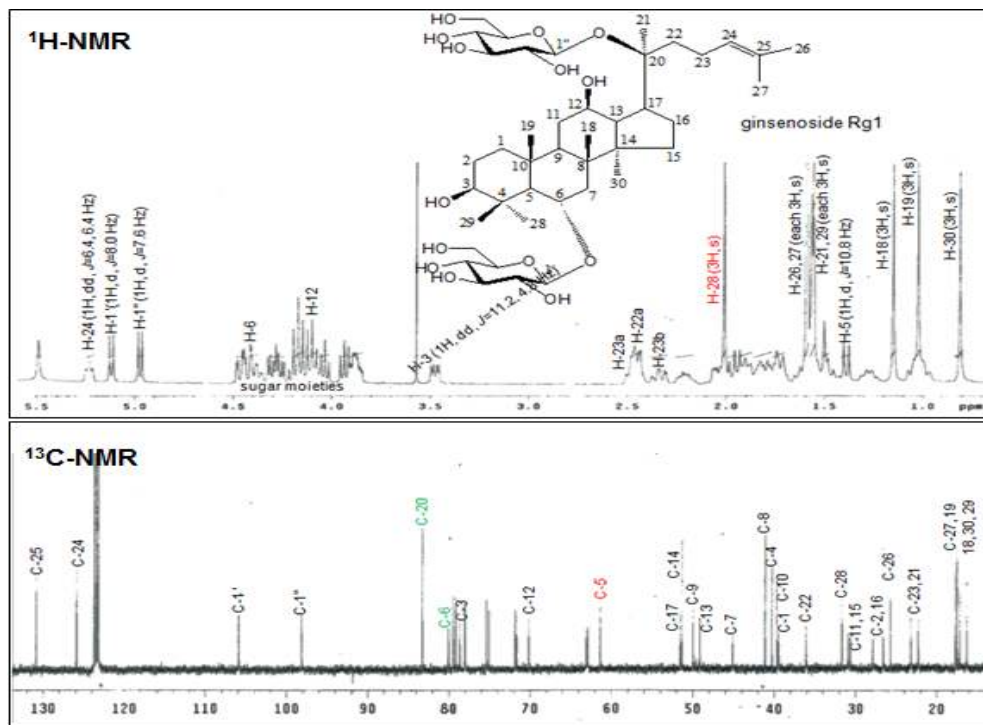


그림 39. ginsenoside Rg1의 구조동정

- ginsenoside Re: ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 5.49 (1H, br s, H-1''), 5.22 (1H, s, H-24), 5.19 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'''), 5.18 (1H, d, J=5.6 Hz, H-1'), 4.90 (1H, dt, J=6.1 Hz, H-5''), 4.75 (1H, br s, H-2''), 4.64 (1H, s, H-3''), 4.47 (1H, s, H-6'b), 4.43 (1H, s, H-6'''b), 4.35 (1H, s, H-2'), 4.32 (1H, s, H-3'), 4.31 (1H, s, H-6'a), 4.27 (1H, s, H-6'''a), 4.28 (1H, s, H-4''), 4.17 (1H, s, H-3'''), 4.16 (1H, s, H-4'), 4.12 (1H, s, H-4'''), 3.94 (1H, s, H-2'''), 3.92 (1H, s, H-5'), 3.87 (1H, s, H-5'''), 3.41 (1H, dd, J=5.3, 11.7 Hz, H-3), 2.45 (1H, s, H-17), 2.43 (1H, s, H-23b), 2.29 (1H, s, H-22b), 2.19 (1H, s, H-7b, 23a), 2.01 (2H, s, H-11b, 28), 1.90 (2H, s, H-7a, 13), 1.83 (1H, s, H-2b), 1.75 (1H, s, H-2a), 1.74 (1H, d, J=6.1 Hz, H-6''), 1.72 (2H, s, H-16b, 22a), 1.63 (1H, s, H-1b), 1.57 (2H, s, H-26, 27), 1.53 (1H, s, H-21), 1.49 (1H, s, H-15b), 1.46 (1H, s, H-9), 1.44 (1H, s, H-11a), 1.34 (1H, d, J=11.2 Hz, H-5), 1.30 (1H, s, H-29), 1.20 (1H, s, H-16a), 1.14 (1H, s, H-18), 0.94 (1H, s, H-19), 0.91 (2H, s, H-1a, 11b), 0.87 (1H, s, H-15a). ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 130.84 (C-25), 125.87 (C-24), 101.75 (C-1'), 101.7 (C-1'''), 98.16 (C-1'''), 83.23 (C-20), 79.20 (C-5'''), 79.00 (C-3'''), 78.65 (C-2'), 78.38 (C-3), 78.10 (C-3'), 78.03 (C-5'), 75.06 (C-2'''), 74.67 (C-6), 74.06 (C-4'''), 72.54 (C-4'), 72.27 (C-2''), 72.18 (C-3'''), 71.53 (C-4'''), 70.16 (C-12), 69.37 (C-5''), 63.07 (C-6'), 62.74 (C-6'''), 60.80 (C-5), 51.68 (C-17), 51.35 (C-14), 49.56 (C-9), 49.00 (C-13), 45.81 (C-7), 41.14 (C-8), 39.87 (C-4), 39.59 (C-10), 39.37 (C-1), 35.95 (C-22), 32.08 (C-28), 30.86 (C-11), 30.70

(C-15), 20.63 (C-2), 26.57 (C-16), 25.64 (C-26), 23.17 (C-23), 22.28 (C-21), 18.60 (C-6''), 17.68 (C-27), 17.454 (C-29), 17.41 (C-19), 17.21 (C-18), 17.17 (C-30).

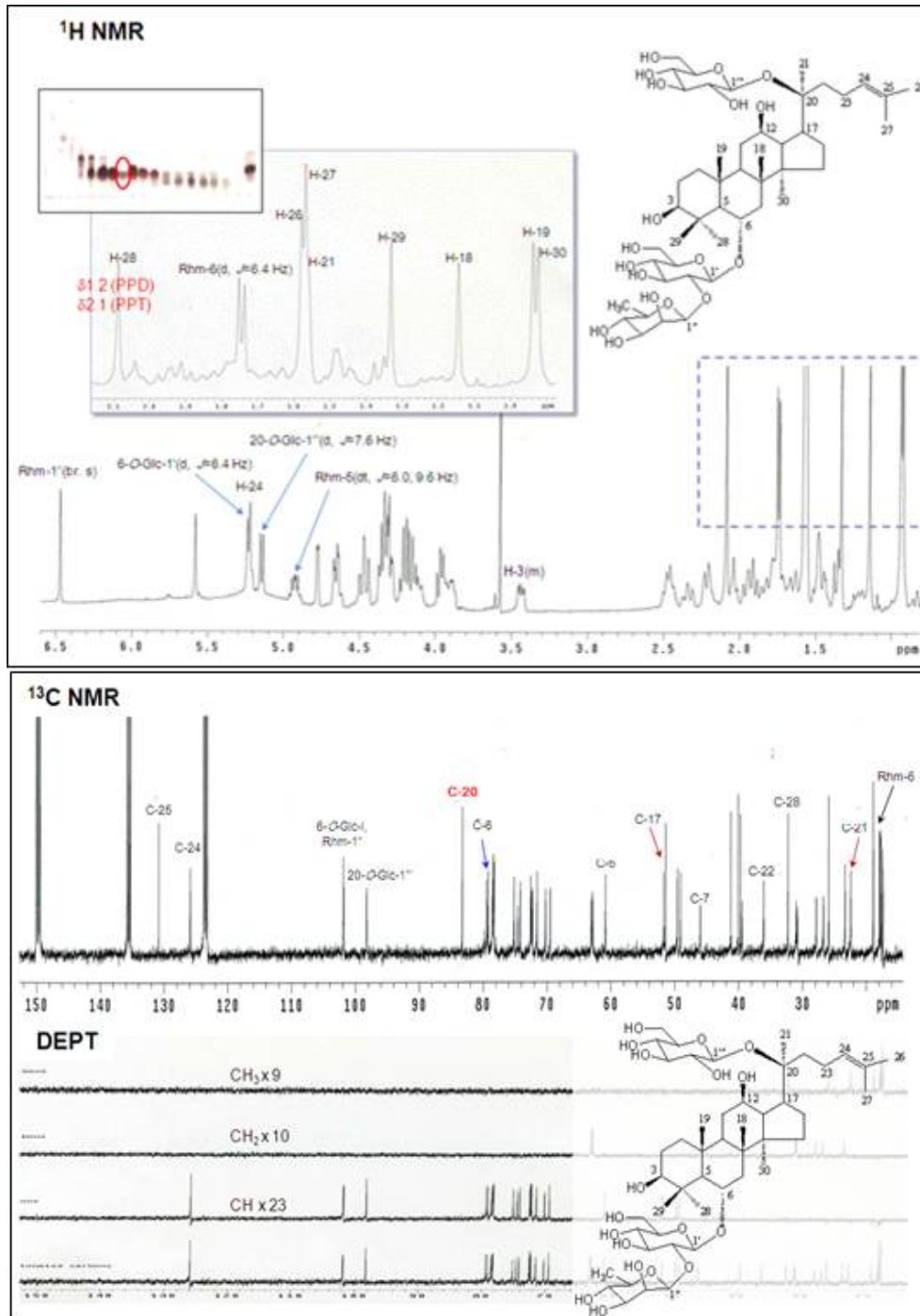


그림 40. ginsenoside Re의 구조동정

- ginsenoside Ia: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5 , δH) 5.23 (1H, dd, $J=6.4, 6.8$ Hz, H-24), 5.12 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.93 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.29 (1H, m, H-6), 4.14 (1H, m, H-12), 3.42 (1H, dd, $J=4.4, 10.8$ Hz, H-3), 2.00 (3H, s, H-28),

1.57 (3H, s, H-21), 1.57 (3H, s, H-26), 1.57 (3H, s, H-27), 1.36 (3H, s, H-29), 0.96 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-19). ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 130.8 (C-25), 125.8 (C-24), 107.1 (C-1'), 98.1 (C-1''), 89.4 (C-3), 83.2 (C-20), 79.1 (C-3''), 78.6 (C-3'), 78.18 (C-5'), 78.10 (C-5''), 75.8 (C-2'), 75.0 (C-2''), 71.9 (C-4'), 71.6 (C-4''), 70.1 (C-12), 67.5 (C-6), 63.1 (C-6'), 62.8 (C-6''), 61.7 (C-5), 51.5 (C-17), 51.3 (C-14), 49.7 (C-9), 49.1 (C-13), 47.4 (C-7), 41.1 (C-8), 40.4 (C-4), 39.1 (C-1), 38.8 (C-10), 36.0 (C-22), 31.3 (C-28), 30.8 (C-11), 30.7 (C-15), 26.5 (C-16), 26.5 (C-2), 25.6 (C-26), 23.1 (C-23), 22.3 (C-21), 17.7 (C-27), 17.5 (C-18), 17.39 (C-19), 17.32 (C-30), 16.9 (C-29)

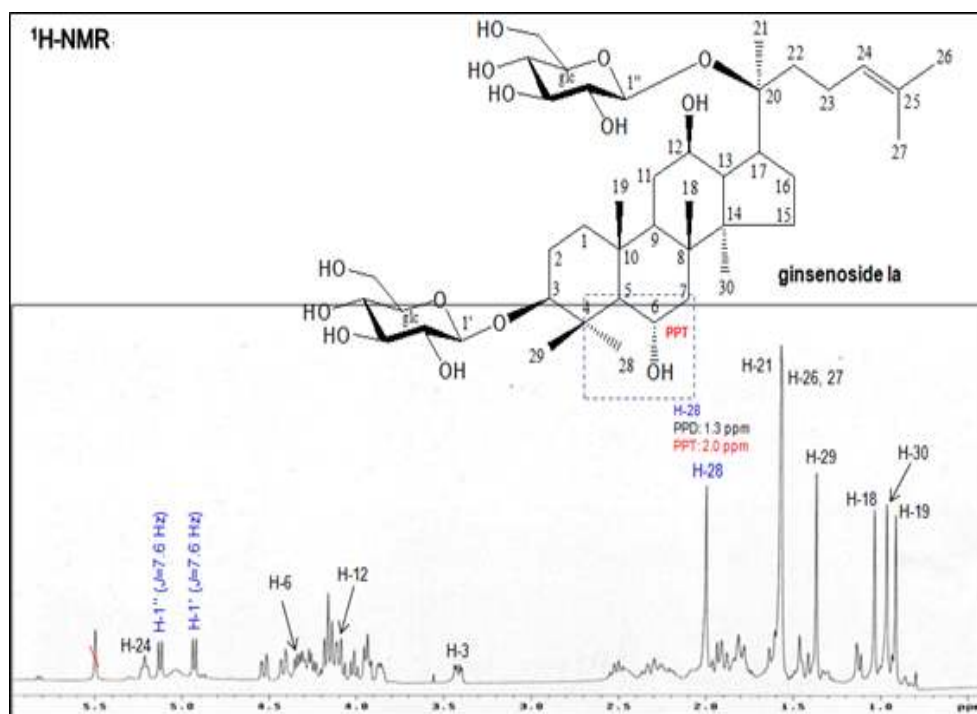


그림 41. ginsenoside Ia의 구조동정

- notoginsenoside Fe: ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 5.58 (1H, s, H-1'''), 5.06 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1''), 4.87 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 4.23 (1H, m, H-12), 3.96 (1H, m, H-12), 3.32 (1H, dd, J=11.6, 3.6 Hz, H-3), 1.63 (3H, s, H-27), 2.54 (1H, t, J=10.0 Hz, H-17), 2.46 (1H, br s, H-23), 2.17 (1H, d, J=4.8 Hz, H-26), 1.95 (1H, t, J=10.4 Hz, H-9), 1.79 (1H, m, H-2, 22), 1.59 (6H, s, H-21, 26), 1.47 (1H, d, J=13.2 Hz, H-16a), 1.37 (1H, d, J=13.2 Hz, H-16a), 1.33 (3H, s, H-28), 0.95 (3H, s, H-29), 0.93 (6H, s, H-18, 30), 0.78 (3H, s, H-19). ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 130.92 (C-25), 125.93 (C-24), 109.99 (C-ara(f)-1), 106.77 (C-3-glc-1), 97.99 (C-20-glc-1), 88.77 (C-3), 86.04 (C-ara(f)-4), 83.34 (C-ara(f)-2), 83.11 (C-20), 79.07 (C-3-glc-3), 78.81 (C-20-glc-3), 78.63 (C-ara(f)-3), 78.16 (C-3-glc-5), 76.39 (C-20-glc-5), 75.66 (C-3-glc-2), 74.93

(C-20-glc-2), 72.03 (C-3-glc-4), 71.86 (C-20-glc-4), 70.18 (C-12), 68.35 (C-20-glc-6), 63.05 (C-3-glc-6), 62.61 (C-ara(f)-5), 56.36 (C-5), 51.62 (C-17), 51.35 (C-14), 50.13 (C-9), 49.36 (C-13), 39.98 (C-8), 39.58 (C-4), 39.15 (C-1), 36.89 (C-10), 36.08 (C-22), 35.06 (C-7), 30.73 (C-15), 30.66 (C-11), 28.08 (C-28), 26.66 (C-2), 26.56 (C-16), 25.67 (C-26), 23.09 (C-23), 22.30 (C-21), 18.38 (C-6), 17.78 (C-27), 17.32 (C-30), 16.70 (C-29), 16.17 (C-18), 15.93 (C-19).

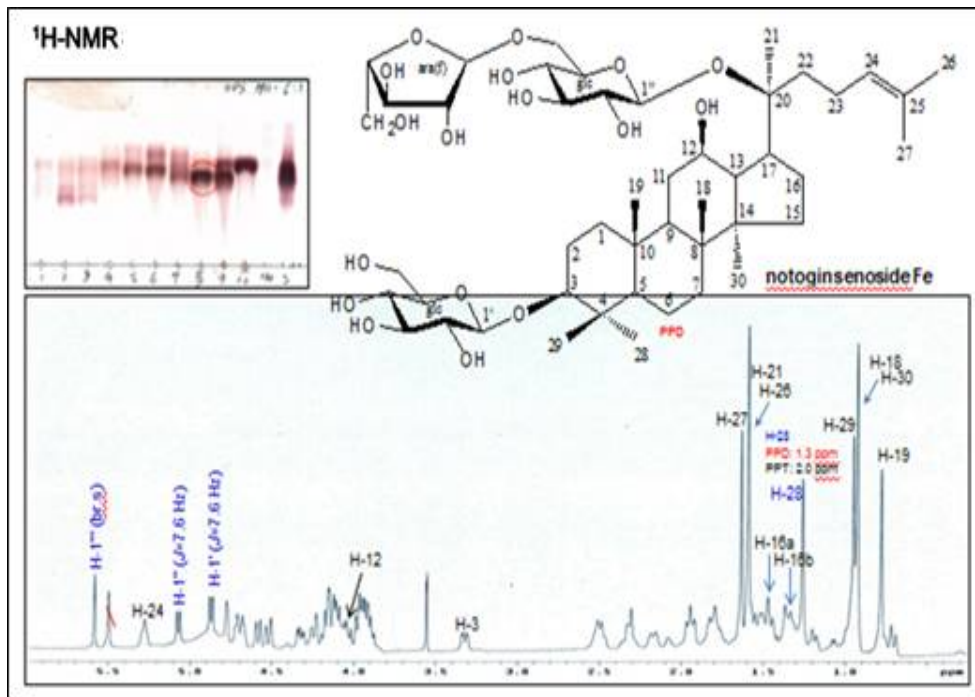


그림 42. ginsenoside Fe의 구조동정

- ginsenoside Rd: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5 , δH) 5.32 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 5.24 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-24), 5.16 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'''), 4.89 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'), 4.25 (3H, m, H-3', 3''', 5'''), 4.20 (1H, s, H-5''), 4.14 (1H, s, H-3''), 4.10 (1H, s, H-2'), 4.01 (1H, s, H-12), 3.92 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-2''), 3.85 (1H, t, $J=5.6$ Hz, H-5'''), 3.25 (1H, dd, $J=4.0, 11.6$ Hz, H-3), 2.54 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-17), 2.46 (1H, br s, H-23), 2.17 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-26), 1.95 (1H, t, $J=10.4$ Hz, H-9), 1.79 (1H, m, H-2, 22), 1.60 (9H, s, H-21, 26, 27), 1.45 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-6), 1.35 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-13), 1.27 (3H, s, H-28), 1.20 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-28), 1.09 (3H, s, H-29), 1.00 (1H, s, H-15), 0.96 (6H, s, H-18, 30), 0.82 (3H, s, H-14), 0.67 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5 , δC) 130.67 (C-25), 125.75 (C-24), 105.88 (C-1''), 104.92 (C-1'), 98.09 (C-1'''), 88.79 (C-3), 83.33 (C-2'), 83.15 (C-20), 79.13 (C-3'), 78.07 (C-3'''), 77.91 (C-3', 5'''), 77.76 (C-5'), 77.72 (C-5''), 76.97 (C-2''), 74.96 (C-2'''), 71.50 (C-4', 4'', 4'''), 70.04 (C-12), 62.76 (C-6', 6''), 62.57 (C-6'''), 56.29 (C-5),

51.50 (C-17), 51.33 (C-14), 50.11 (C-13), 49.39 (C-9), 39.96 (C-8), 39.61 (C-4), 39.13 (C-1), 36.83 (C-10), 36.07 (C-22), 35.08 (C-7), 30.70 (C-11, 15), 28.04 (C-28), 26.71 (C-2), 26.59 (C-16), 25.72 (C-26), 23.14 (C-23), 22.31 (C-21), 18.39 (C-6), 17.72 (C-27), 17.33 (C-30), 16.56 (C-29), 16.25 (C-19), 15.95 (C-18).

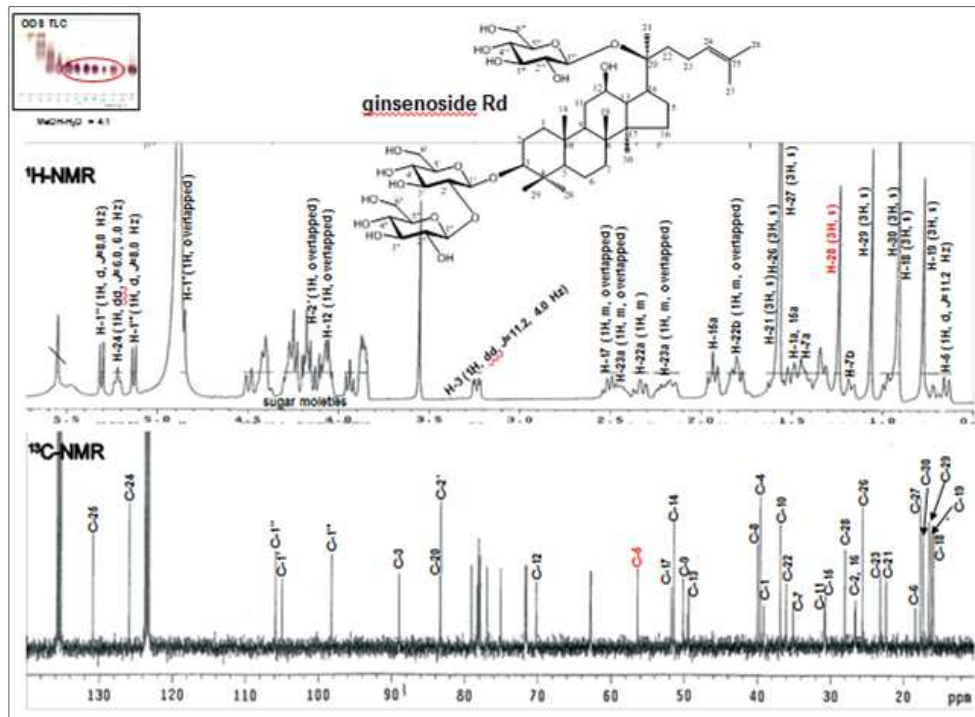


그림 43. ginsenoside Rd의 구조동정

- ginsenoside Rd2: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5 , δH) 5.30 (1H, br s, H-24), 5.90 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.95 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'''), 4.89 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.63 (1H, dd, $J=13.2, 0.8$ Hz, H-6''b), 4.53 (1H, dd, $J=13.2, 6.0$ Hz, H-6'b), 4.53 (1H, s, H-2'''), 4.40 (1H, br s, H-6'a), 4.31 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-4'''), 4.21 (1H, d, $J=24.0, 3.2$ Hz, H-5'''b), 4.20 (1H, br s, H-6'a), 4.19 (1H, s, H-3'), 4.19 (1H, s, H-4'), 4.18 (1H, s, H-2''), 4.15 (1H, s, H-12), 4.12 (1H, s, H-3''), 4.01 (1H, s, H-5''), 3.99 (2H, s, H-2', 4''), 3.97 (1H, s, H-5'), 3.96 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-3'''), 3.75 (1H, dd, $J=9.2, 3.2$ Hz, H-5'''a), 3.25 (1H, dd, $J=4.0, 11.6$ Hz, H-3), 2.54 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-17), 2.46 (1H, br s, H-23), 2.17 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-26), 1.95 (1H, t, $J=10.4$ Hz, H-9), 1.79 (1H, m, H-2, 22), 1.64 (3H, s, H-27), 1.58 (3H, s, H-21), 1.57 (3H, s, H-26), 1.49 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-6), 1.35 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-13), 1.28 (3H, s, H-28), 1.20 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-28), 1.09 (3H, s, H-29), 1.00 (1H, s, H-15), 0.96 (6H, s, H-18, 30), 0.82 (3H, s, H-14), 0.67 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5 , δC) 131.08 (C-25),

125.96 (C-24), 106.98 (C-3-Glc-1'), 104.50 (C-6'-ara-1'''), 98.13 (C-20-Glc-1''), 88.85 (C-3), 83.50 (C-20), 79.17 (C-20-Glc-3''), 78.76 (C-3-Glc-3'), 78.28 (C-3-Glc-5'), 76.68 (C-20-Glc-5''), 75.78 (C-3-Glc-2'), 75.07 (C-6'-ara-3'''), 74.93 (C-20-Glc-2''), 72.11 (C-6'-ara-2'''), 71.99 (C-3-Glc-4'), 71.91 (C-20-Glc-4''), 70.19 (C-12), 69.23 (C-20-Glc-6''), 68.45 (C-6'-ara-4'''), 65.40 (C-6'-ara-5'''), 63.18 (C-3-Glc-6'), 56.45 (C-5), 51.73 (C-17), 51.43 (C-14), 50.24 (C-9), 49.53 (C-13), 40.09 (C-8), 39.68 (C-4), 39.26 (C-1), 37.00 (C-10), 36.20 (C-22), 35.16 (C-7), 30.86 (C-11), 30.74 (C-15), 28.16 (C-28), 26.77 (C-2), 26.68 (C-16), 25.75 (C-26), 23.22 (C-23), 22.37 (C-21), 18.47 (C-6), 17.86 (C-27), 17.43 (C-30), 16.78 (C-29), 16.26 (C-18), 16.04 (C-19).

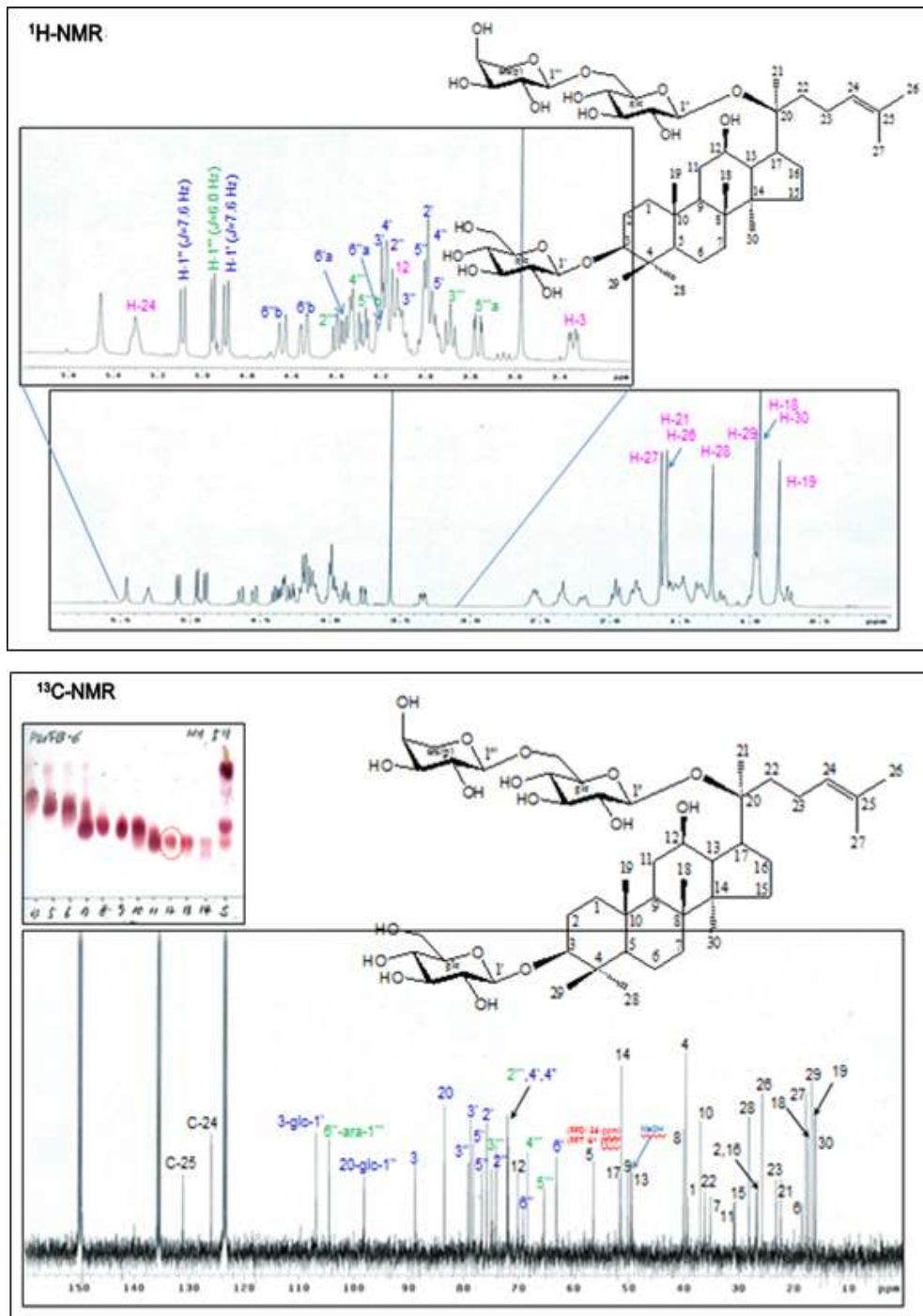


그림 44. ginsenoside Rd2의 구조동정

(4). 인삼열매(과육)으로부터 분리 및 확보한 물질 리스트

표 13. 인삼열매로부터 분리 물질 리스트

	Parts	Fraction No.	Amount (mg)	M.W.	Solvent	Purity(%)	Rf/solvent
1	Fruits		202.8	784	MeOH	>99	0.32/CMH=7.3:1 0.2/MH=5:1
2	Fruits		689.4	784	MeOH	>99	0.32/CMH=7.3:1 0.2/MH=5:1
3	Fruits		397.9	784	MeOH	>99	0.32/CMH=7.3:1 0.2/MH=5:1
4	Fruits		166.5	770	MeOH	>99	0.20/CMH=7.3:1 0.80/MH=5:1
5	Fruits		361.5	770	MeOH	>99	0.80/CMH=65.35:10 0.60/MH=3:1
6	Fruits		89.5	770	MeOH	>99	0.22/CMH=7.3:1 0.65/MH=3:1
7	Fruits		89.5	770	MeOH	>99	0.22/CMH=7.3:1 0.65/MH=3:1
8	Fruits		10.1	800	MeOH	>99	0.40/CMH=65.35:10 0.50/MH=5:2
9	Fruits		91.5	800	MeOH	>99	0.40/CMH=65.35:10 0.50/MH=5:2
10	Fruits		16.8	800	MeOH	>95	0.40/CMH=65.35:10 0.50/MH=5:2
11	Fruits		78.8	916	MeOH	>99	0.30/CMH=7.3:1 0.42/MH=5:1
12	Fruits		26.6	916	MeOH	>99	0.30/CMH=7.3:1 0.42/MH=5:1
13	Fruits		38.1	916	MeOH	>99	0.30/CMH=7.3:1 0.40/MH=5:1
14	Fruits		37.3	916	MeOH	>99	0.30/CMH=7.3:1 0.40/MH=5:1
15	Fruits		182.9	916	MeOH	>99	0.30/CMH=7.3:1 0.40/MH=5:1

(5). 인삼열매 추출물 제조 공정 확립 연구

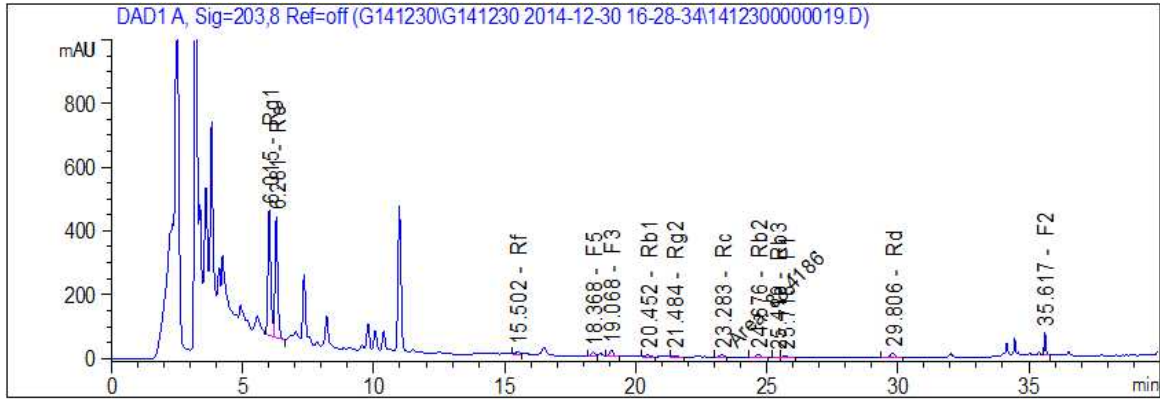
- 인삼열매를 추출 및 온도 조건에 따라 제조공정을 확립하고자 하였다. 각 샘플의 추출조건은 PGGF-1(상온 30% 주정), PGGF-2(상온 70% 주정), 2기압 압력에서 40℃ 온도 조건으로 PGGF-3(0%), PGGF-4(30% 주정), PGGF-5(50% 주정), PGGF-6(70% 주정), 2기압 압력에서 70℃ 온도 조건으로 PGGF-7(0%), PGGF-8(30% 주정), PGGF-9(50% 주정), PGGF-10(70% 주정)번으로 결정하여 추출을 진행하였다. 조건별로 발효 주정 7.3L을 넣어 잘 혼합 후 30분 후에 Ethyl alcohol 측정용(일본산) 기기를 사용하여 주정 %수치를 확인하여 실온에서 24시간 방치하여 반응 시킨 후 여과 후 대형농축기를 이용하여 진공 감압하여 설정한 온도에서 2L가 될 때까지 농축하였으며, 얻어진 농축액을 냉동 건조기(Freeze dryer)로 4일간(96시간) 동결건조 하여 샘플을 얻었다.



그림 45. 인삼열매 추출 공정

(6) 인삼열매 추출물 제조 공정별 사포닌 함량 측정

- 제조 공정별 추출된 인삼열매 추출물을 HPLC를 이용해서 진세노사이드 정량분석을 실시하였으며, 조건은 아래와 같다.



Time table

	Time	%A (D.W)	%B (MeCN)	Flow	Max.Press
1	0	73	27	0.5	200
2	6	72	28	0.5	200
3	10	-	-	0.8	200
4	30	-	-	0.8	200
5	33	-	-	0.8	200
6	38	27	73	0.8	200
7	40	73	27	0.5	200

Injection : 10 µl
 Flow : 0.5~0.8 ml/min
 Stop Time : 40min
 Post Time : 10 min
 Temperature : 50 °C
 VWD : 203 nm

그림 46. 인삼열매 추출물 정량분석 조건

표 14. 조건별 진세노사이드 함량

온도	실온		2기압 유지, 40°C				2기압 유지, 70°C			
	30	70	0	30	50	70	0	30	50	70
ginsenoside	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)	Mean(%)
Rg1	11.0890	9.3745	7.1586	7.2683	8.2230	7.7454	11.5037	12.2690	13.4160	13.0461
Re	2.4109	6.0647	4.6897	4.6051	5.3211	5.1856	1.3964	1.3647	2.9621	1.4477
Rf	0.3093	0.2672	0.3052	0.2580	0.2490	0.3402	0.2614	0.1557	0.2624	0.1375
F5	0.4346	0.3884	0.3831	0.4787	0.4056	0.3785	0.2981	0.3207	0.3819	0.3332
F3	0.8710	0.8769	0.7634	0.9462	0.7619	0.7266	0.5702	0.6752	0.8658	0.6861
Rb1	0.2619	0.2700	0.1718	0.1573	0.2742	0.4016	0.5078	0.4760	0.4863	0.5680
Rg2	0.1772	0.0880	0.0752	0.1903	0.0733	0.0892	0.3555	0.2585	0.2454	0.2695
Rh1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rc	0.3236	0.3013	0.1765	0.2551	0.2623	0.3161	0.6736	0.7474	0.6933	0.8809
Rb2	0.4037	0.3562	0.2402	0.3366	0.3176	0.3761	0.8836	0.9693	0.9029	1.1136
Rb3	0.0449	0.0428	0.0281	0.0394	0.0306	0.0496	0.1092	0.1131	0.1065	0.1248
F1	0.1066	0.1446	0.1288	0.1159	0.1213	0.1347	0.0982	0.1017	0.1463	0.1182
Rd	0.4651	0.4142	0.2726	0.4194	0.4222	0.4702	0.8954	0.9231	0.9561	1.0627
F2	0.3556	0.8054	0.6158	0.5599	0.7021	0.7358	0.3734	0.2238	0.4873	0.2616
Total	17.2536	19.3942	15.0090	16.6308	17.1642	16.9497	17.9266	18.5983	21.9124	20.0498

(7) 인삼열매 열매를 이용한 미백관련 전임상 연구

- 멜라닌의 세포내 생합성 저해활성을 알아보기 위해 C57BL/6 마우스에서 유래한 immortalized cell line인 melan-a 세포를 이용하였다. Melan-a 세포에 인삼열매 compounds와 extracts를 50 μ M의 농도로 처리한 후 멜라닌의 양을 측정하였다.

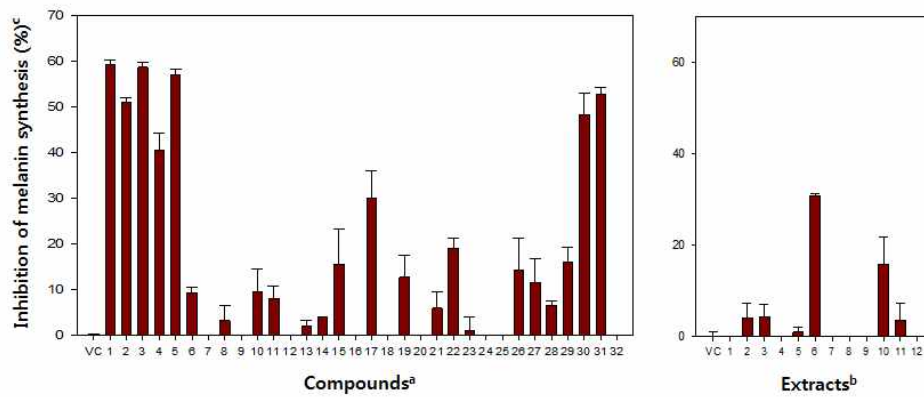
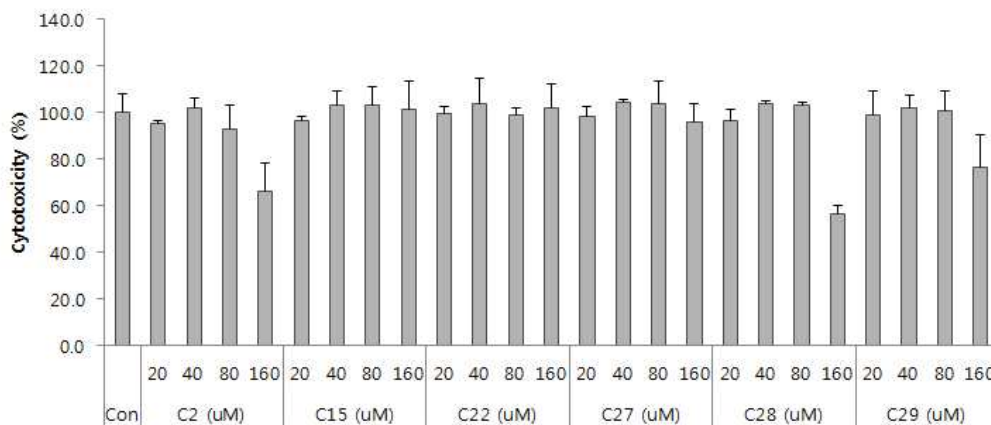


그림 47. 인삼 열매 추출물 및 분획물의 멜라닌 합성 저해 효과

가. 인삼 열매로부터 분리된 single compound들의 미백효능을 검증

- 분리된 single compounds의 미백효능을 검증하기 위하여 melan-a세포를 이용하여 in vitro 효능을 검증하였으며, in vitro상에서의 세포증식과 멜라닌 합성에 미치는 각각 single compound들의 효능은 아래와 같다.



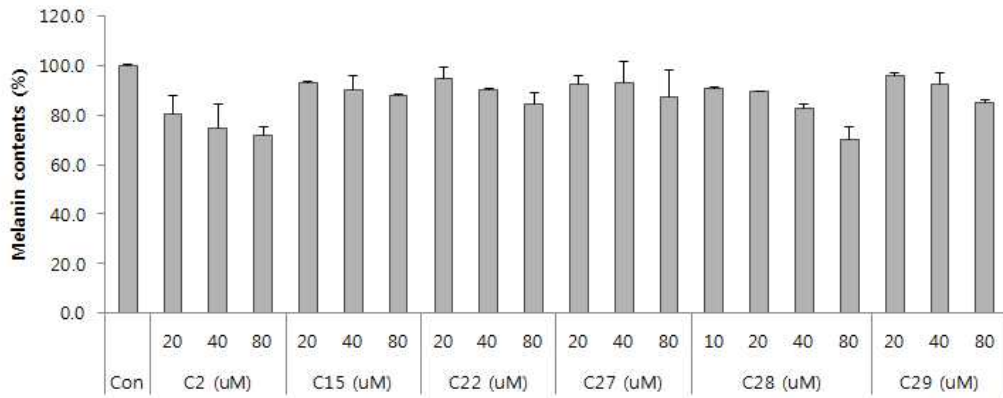


그림 48. 인삼열매로부터 분리된 compound의 세포증식 및 멜라닌 합성저해 효과

- C15, C2, C27 물질의 경우 160uM의 처리농도까지 세포독성이 나타나지 않았고, C2와 C28, C29 화합물은 80uM까지는 세포독성을 나타내지 않았지만, 160 uM의 처리농도에서는 melan-a 세포에 대한 화합물의 독성을 약하게 보였다. 그러므로 미백효능을 연구하기 위한 화합물의 처리농도는 0에서 80uM로 정하였고, 이 농도범위에서 melan-a 세포 배양 시 멜라닌합성에 미치는 영향들이 연구되었다. 그 결과 5개의 화합물 모두에서 농도 의존적으로 멜라닌의 합성이 감소됨을 보여 주었다. 이중에서 먼저 C15번과 C27번 화합물을 이용하여 멜라닌 합성저해를 연구하였다.

나. C27 (Ginsenoside Rb2)의 멜라닌 합성 저해효능 연구

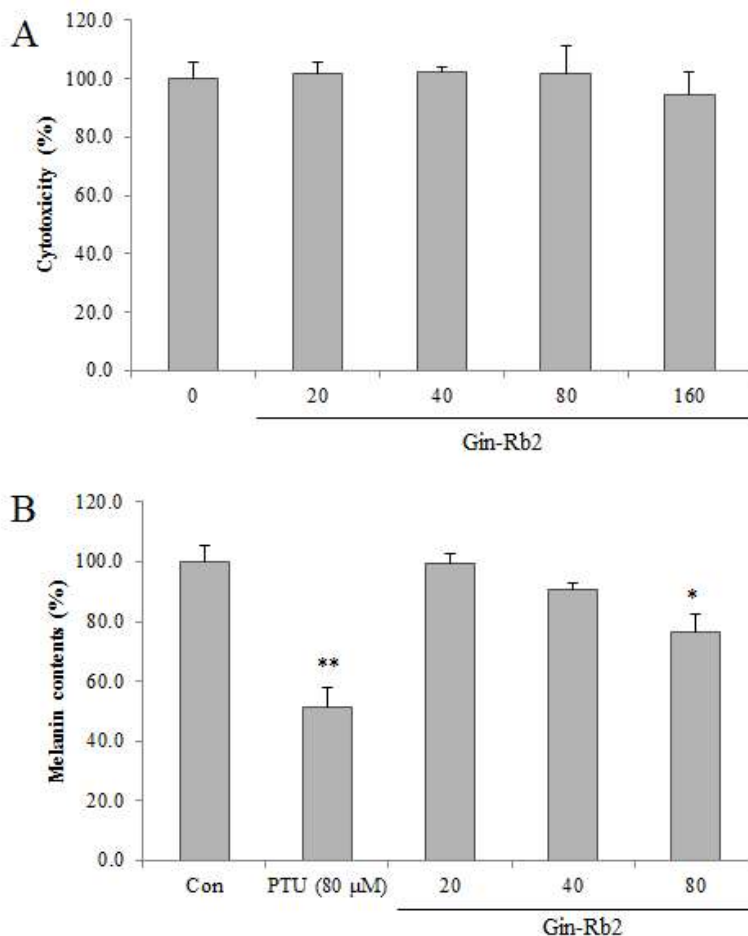


그림 49. Ginsenoside Rb2의 세포독성 및 멜라닌 합성 저해 효과

- C27번 화합물인 ginsenoside Rb2 (Gin-Rb2)의 농도별 세포독성과 멜라닌 생성 억제활성을 PTU를 양성대조군으로 사용하여 melan-a세포 배양에서 확인하였다. 160uM 처리농도까지 세포독성을 보이지 않았고, 80 uM 처리시에 무처리군에 비해서 약 20%의 멜라닌 합성이 저해됨을 확인할 수 있었다.
- 이들 결과들을 in vivo모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다.

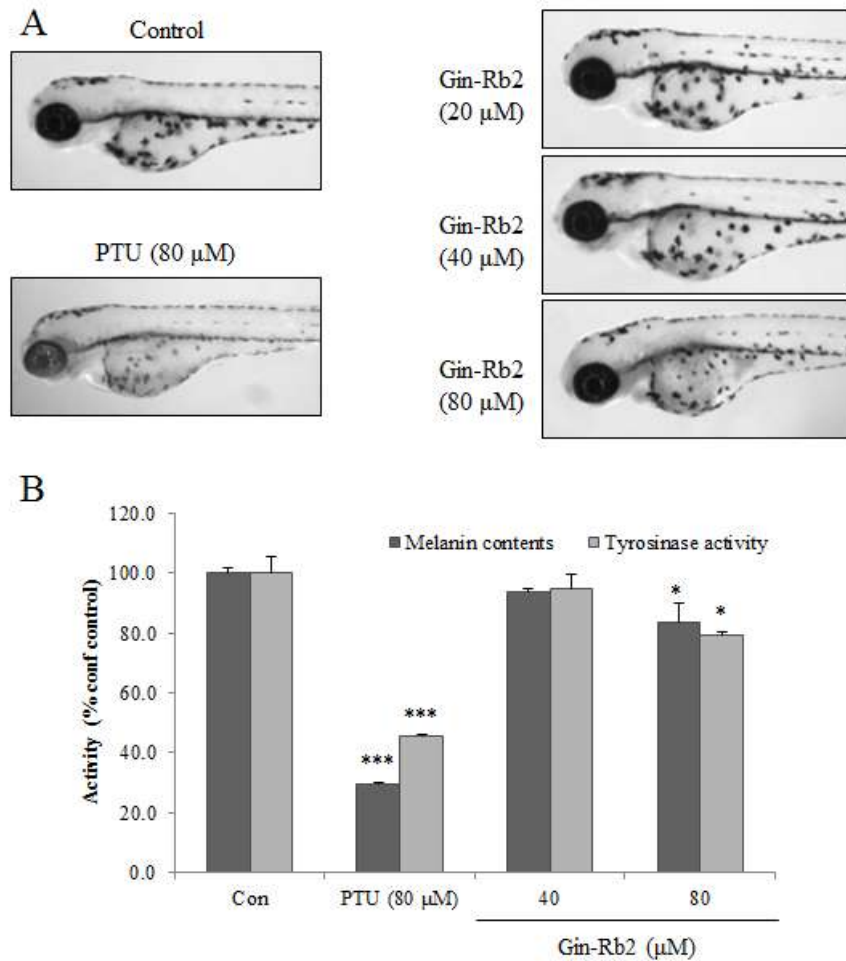


그림 50. 제브라피쉬 모델에서 ginsenoside Rb2 (Gin-Rb2)의 멜라닌 합성 저해 효과

- Gin-Rb2sms 농도 의존적으로 제브라피쉬 성체에서의 멜라닌 스팟이 줄어드는 경향을 나타내었다. 또한 실험농도범위에서는 어떤 어독성도 보이지 않았으며, 제브라피쉬의 멜라닌 생합성 저해 실험에서 사용되는 대표적인 양성대조군인 PTU에 비해서는 멜라닌 생성 저해활성이 낮았지만, 멜라닌 합성이 줄어드는 경향을 보였다. 제브라피쉬 체내에서의 tyrosinase활성 저해능을 확인하기 위하여 제브라피쉬에서 tyrosinase를 분리하였고, L-DOPA를 기질로 하여 효소의 활성을 측정하여본 결과 80 uM 처리농도에서 control 그룹과 P value 0.05이하의 유의적인 결과를 나타내었다.

다. C15(Picrinoside A)의 멜라닌 합성 저해능 연구

- Megastigmane glucosides인 picrinoside A를 인삼 잎으로부터 분리하여 멜라닌합성 저해활성을 연구하였다. 먼저 양성대조군으로 PTU와 arbutin과 함께 in vitro 멜라닌 합성조절에서 핵심 효소인 tyrosinase의 활성 저해에 미치는 영향을 확인하였다. 표에서 보는 바와같이 PTU의 IC₅₀ 값은 2.3 uM이고 arbutin의 값은 100이상으로 나타났다. 테스트 화합물인 picrinoside의 IC₅₀ 값은 9.8 uM로써 강력한 멜라닌 생성 억제제인 PTU보다는 낮지만, 화장품산업에서 미백기능성 원료로 많이 사용되는 arbutin에 비해서는 현저히 높은 저해활성을 나타냄을 보여준다.

표 15. Picrionoside A의 mushroom tyrosinase activity

Compounds	Mushroom tyrosinase IC ₅₀ (μ M)
Picrionoside A	9.8 \pm 1.4
PTU (control)	2.3 \pm 0.2
Arbutin	>100

- 그림 51의 A는 picrinoside의 구조를 나타내고 있으며, B는 농도에 따른 세포독성을 보여주고 있다. 실험결과 80 uM까지의 실험농도에서 세포독성을 나타내지 않았으며, melan-a 세포내의 tyrosinase의 활성은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여주었다. Melan-a 세포에서의 멜라닌 합성 저해활성은 농도의존적으로 감소하였으며, 80 uM 처리군에서 대조군 대비 P value 0.01이하의 유의적인 결과를 나타내었다.

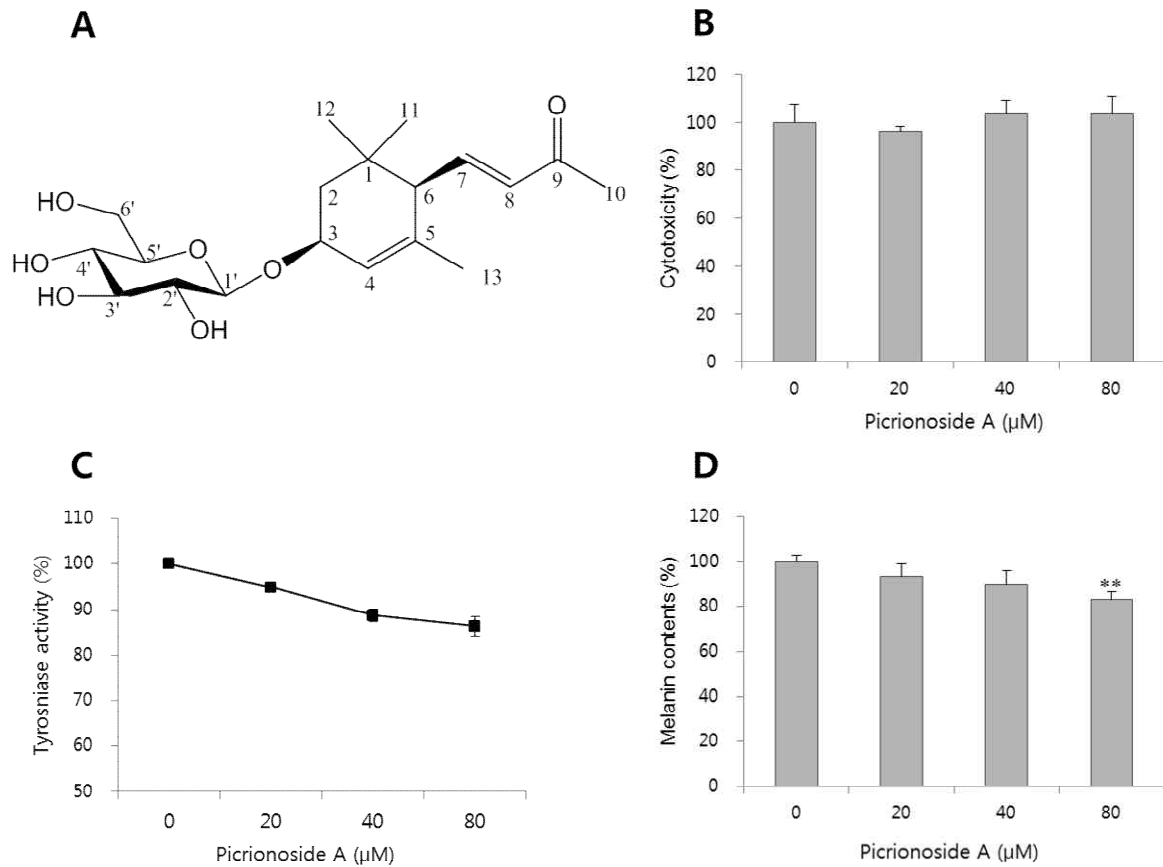


그림 51. Picrionoside A의 멜라닌 합성 저해활성

(A) Structure of picrionoside A, (B) Cytotoxicity, (C) Tyrosinase activity, (D) Melanin contents was measured in melan-a cells. The results are averages of triplicate experiments, and the data are expressed as means \pm S.D., Each values are expressed a mean \pm SD of triplicate determinations. **P<0.01versusof the control group.

- Picrinoside A의 생체내 멜라닌 합성 저해활성을 연구하기 위하여 앞선 실험과 같이 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 활성을 연구하였다. 양성대조군으로 PTU를 사용하였으며 picrinoside A는 40 과 80 μ M농도로 제브라피쉬 배아에 처리하여 제브라피쉬내에서의 멜라닌 스팟을 확인하는 방법으로 멜라닌 합성 저해활성을 측정하였다. 80 μ M을 처리한 그림 52에서는 대조군인 A와 비교하여서 머리부분(a) 배아부분(b)과 배아와 꼬리부분의 경계부분(c)에서 현저한 차이를 보여주고 있다.

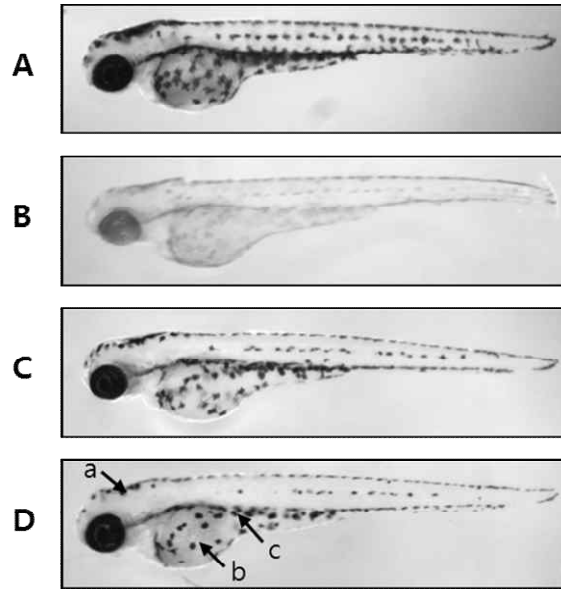
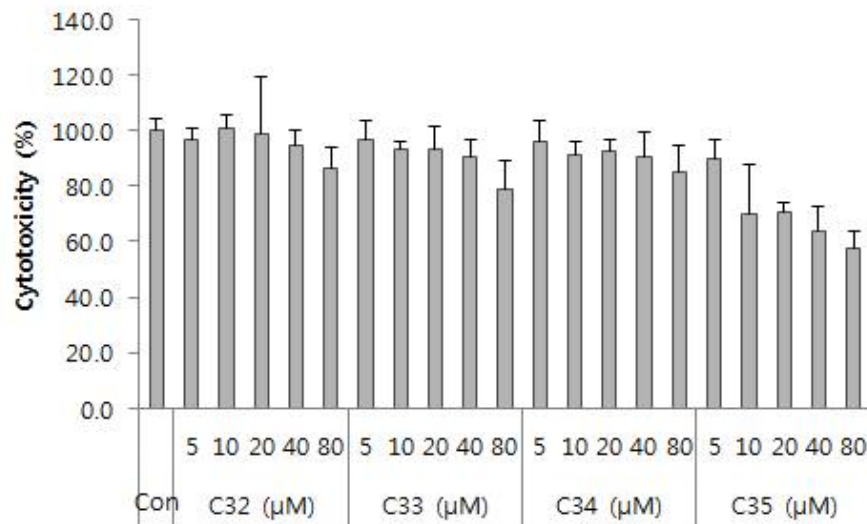


그림 52. 제브라피쉬 모델에서 Pricrinoside A의 멜라닌 합성 저해 활성

라. 기타 연구 결과

- C32번(panasenoside), C33번(ginsenoside Ia), C34번 (ginsenoside Rd2)와 C35번 (notoginsenoside Fe)의 melan-a 세포상에서의 멜라닌 생합성 저해연구들이 수행되었으며, 미백활성의 활성 기작에 대한 연구들이 수행 될 예정이다.



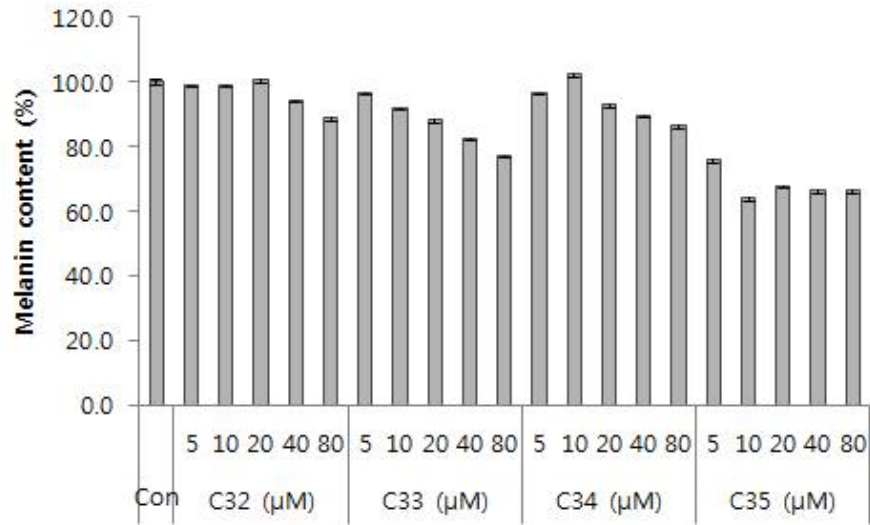


그림 53. new compounds (C32, C33, C34 and C35)의 세포독성 및 멜라닌 합성 저해 연구

4. 발효를 통한 고기능성 인삼 부산물 소재 개발

(1) 인삼 지상부 발효를 위한 사포닌 전환 균주의 선발

인삼의 뿌리와 잎, 줄기, 열매를 각각 같은 조건으로 추출 한 후 HPLC 분석 한 결과, 인삼의 지상부에는 다량의 major ginsenoside가 존재하며 특히, PPT type의 ginsenoside Re가 뿌리에 비하여 10배 이상 많은 것으로 확인되었다.

표 16. 인삼 잎, 줄기, 열매와 뿌리의 ginsenoside 함량 차이 분석(mg/g)

	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Re	Rf	Rg1	Rg2
root	7.89	3.14	4.81	2.7	3.44	0.91	2.91	0.31
leaf	1.41	2.22	1.15	22.2	30.11	0.1>	8.08	2.01
stem	0.1>	0.1>	0.1>	0.51	7.71	0.1>	4.08	0.49
Fruit	5.4	8.51	7.7	10.55	68.7	3.05	3.71	3.24

- 함량적 차이를 비교해 보았을 때, 인삼의 지상부인 잎과 열매에서 가장 많은 ginsenoside가 존재 함을 알 수 있었다. 뿌리의 경우 주로 ginsenoside Rb1과 같은 PPD type의 major ginsenoside이 가장 많은 비율을 차지하는 반면 잎, 줄기, 열매에서는 ginsenoside Re, Rg1과 같은 PPT ginsenoside의 비율이 높은 것으로 확인 되었다. 특히 ginsenoside Re는 뿌리에 비하여 8.75 배에 가까운 양을 가지고 있어 이를 활용할 경우 다량의 ginsenoside를 획득할 수 있을 것으로 기대되었다. 인삼의 잎과 열매에는 높은 함량의 PPT 타입 ginsenoside 뿐만 아니라 많은 양의 ginsenoside Rd가 존재함을 확인 할 수 있었는데 Rd는 인삼 뿌리에도 다량 존재하는 PPD 타입의 대표적인 ginsenoside로 알려져 있다.

- 하지만, 이들 major ginsenoside의 경우 대다수가 화장품 소재에 중요시 되는 미백, 주름개선, 항염 등에는 뚜렷하게 뛰어난 약리적 효과를 나타내지 못하고 있어 이를 직접적으로 활용하기에는 기존 소재 대비 경쟁력이 떨어질 것으로 판단된다. 따라서 본 2차년도 과제에서는 기존의 major ginsenoside를 피부에 효과가 있는 특정 minor ginsenoside로 전환시키고자 연구를 진행 하였다.

가. 인삼 사포닌 전환 미생물의 screening

- 김치 및 막걸리를 비롯한 국내의 발효 식품균을 지역별로 수집하여 미생물을 분리하기 위한 시료로 활용하였다. 수집한 시료를 멸균 증류수에 10⁻¹부터 10⁻³ 까지 희석하여 MRS agar plate에 100 μ l 씩 smear한 후 37 $^{\circ}$ C, 190 rpm 3-4일 배양하였다. Colony를 취하여 esculin agar 배지에 streaking하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였다. β -Glucosidase는 esculin의 β -glucose를 절단하고, 이 때 생성된 esculetin이 배지 내에

있던 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate상의 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다. 따라서 colony 주위에 black complex가 형성된 균주들을 β -glucosidase 활성을 가지는 균주라고 판단하였으며 이를 다시 37°C, MRS agar plate에 계대 배양하여 순수하게 분리하였다.

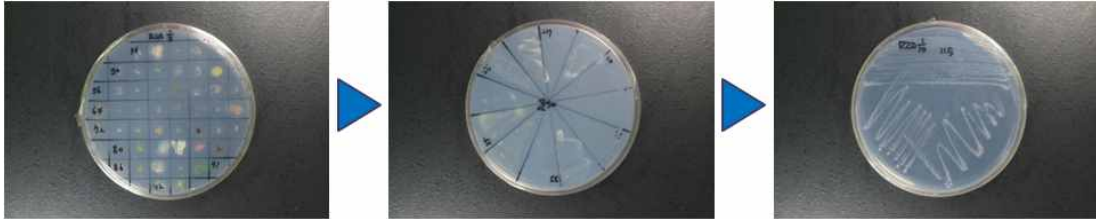


그림54. 균주의 screening 및 단일 colony로 계대

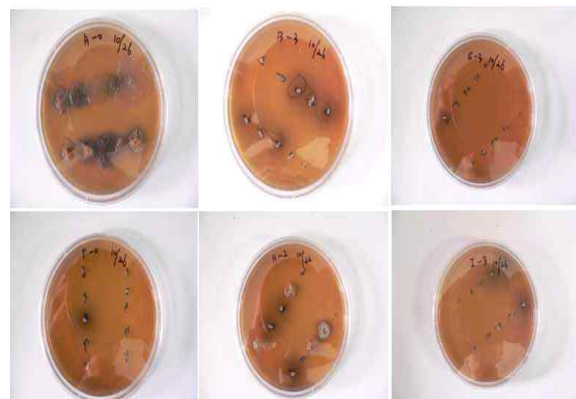
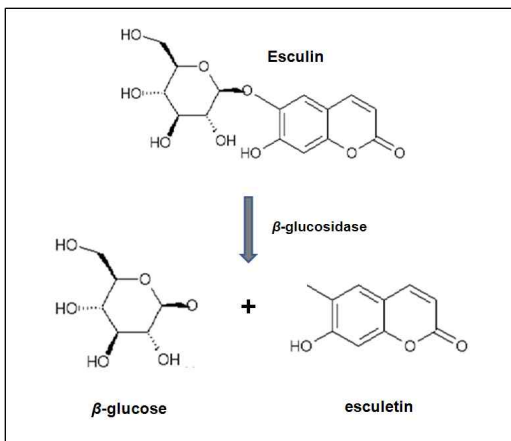


그림55. β -Glucosidase 활성 균주의 선발

나. 인삼 사포닌 전환 활성 분리 균주의 동정

- β -Glucosidase의 전환 활성이 확인 된 균주 중 실제로 인삼 사포닌과 반응하여 minor 사포닌을 생성하는 균주가 존재하는지 확인하기 위하여 major 사포닌과 반응을 시켜 사포닌 전환 활성 균주를 재선발 하였다.

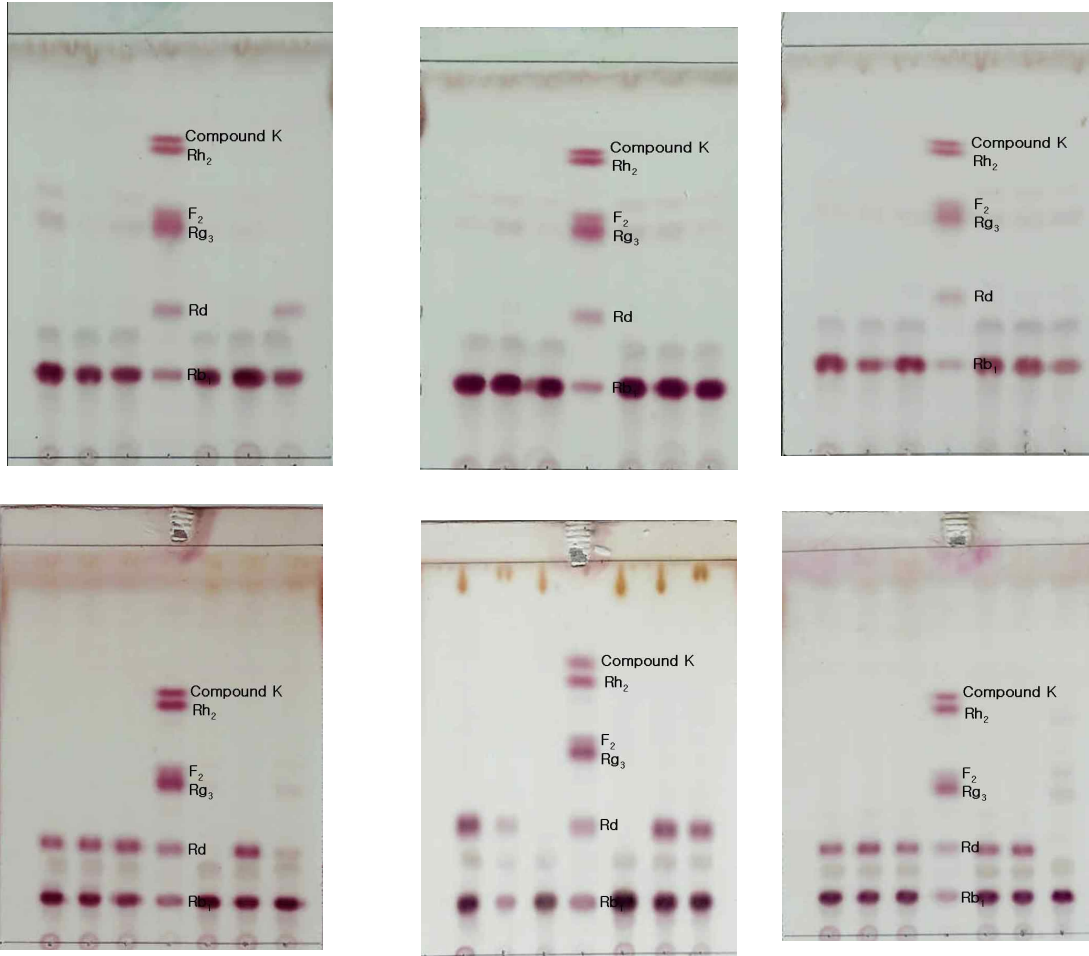


그림54. 인삼 사포닌과 균주와의 반응을 통한 사포닌 전환 활성 확인

- 균주를 각각 최적 배양 조건을 이용하여 배양한 후 이의 배양액을 이용하여 인삼 ginsenoside와 반응 하였다. 인삼 ginsenoside과의 반응 시, 37°C에서 5일간 반응 시킨 후 반응액에 부탄올을 첨가하여 ginsenoside 분획을 얻어 이를 TLC 혹은 HPLC를 활용하여 분석을 하였다. Esculin agar 법을 이용하여 glucosidase 활성이 있는 것으로 확인 되어진 각각의 250개의 균주를 각각 인삼 ginsenoside에 반응 시켜 이를 확인해 본 결과 특이적으로 ginsenoside와의 반응을 통해 minor ginsenoside으로의 전환이 확인 되었다. 이들 균주는 다른 균주에 비하여 비교적 ginsenoside 전환 활성이 강한 것으로 확인 된 바 본 연구에서는 이들 균주 중 본 과제 목적에 부합하는 minor ginsenoside를 생산하는 균주를 선발 하여 후속 연구를 진행 하였다.

다. 분리 균주를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

- 분리 균주의 16S rRNA gene sequencing은 제노텍에 의뢰하였으며, NCBI data base를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 similarity(%)를 확인하였다. 균주들의 16S rRNA 염기서열을 Clustal X program(Thompson *et al.*, 1997)을 이용하여 일정하게 정렬하고, gap는 BioEdit program으로 편집하였다.

```

      9F→
1  TTGAGTTTGA ATTCTGGCTC AGCAGCAACG CTGGCGGCAT GCCTAATAC ATGCAAGTCC
61 AACGAGCTTC CGTTGAATGA CGTGCTTSCA CTGATTTCAA CAATGAAGC GAGTCGCGAA
121 CTGGTGAGTA ACACGTGGGG AATCTGCCCA GAAGCAGGGG ATAACACTT GGAACAGGT
181 GCTAATACCG TATAACAACA AAATCCGCAT GGATTTTGT TGAAGGTCG CTTTCGGCTA
241 TCACTTCTGG ATGATCCCGC GCGGTATTAG TTAGTTGGTG AGSTAAAGG CCCACCAAGA
301 CGATGATACG TAGCCGACCT GACAGCGTAA TCGGCCACAT TGGGACTGA GACACGGCCC
361 AAACCTCCTAC GGCAGGCAGC AGTAGGGAAT CTTCCACAAT GGACGAAAG TCTGATGSAG
421 CAATGCCCGC TGAAGTGAAG ACGGTTTCCG CTCGTA AAC TCTCTTGT AAAGAGAAC
481 ACCTTTGAGA GTAAGTGTTC AAGGTTTAC GGTATTTAAC CAGAAAGCC ACGGCTAACT
541 ACGTGCCAGC AGCCCGGGA ATACGTAGCT GGCAGCGTT GTCCGGATT TATTGGCGCT
601 AAAGCGAGCC CAGCGCGTT TTTAAGTCTG ATGTGAAGC CTTCCGCTT AACCGGAGAA
661 GTGCATCGGA AACTGGGAGA CTTGAGTSCA GAAGAGGACA GTGGAAGTC CATGTGTAGC
721 GGTGGAATGC GTAGATATAT GCAAGAACAC CAGTCCCGAA GCGCGCTGT CTAGTCTGTA
781 ACTGAGGCTG AGGCTCGAAA GCATGGGTAG CGAACAGGAT TAGATACCC TGGTAGTCCA
841 TGCCGTAAAC GATGAGTGT AAGTGTTCGA GGGTTTCCC CTTCAAGTC CTGCAGCTAA
901 CGCATTAAGC ACTCCGCTC GGGACTACCA CCGCAAGGT GAAACTCAA AGGAATTGAC
961 GGGGGCCCGC ACAAGCGGTC GAGCATGTGG TTTAATTCCA AGCTAGCGC AAGAACCTTA
1021 CCAGGTCTTC ACATCTTCTC CCAATCTTAG AGATAAGAC TTCCCTTCC GGCACAGAAT
1081 GACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTACGCTCG TGTGCTGAGA TGTGGGTT AAGTCCCGCA
1141 ACCAGCGCAA CCCTTATTAT CAGTTGCCAG CATTCAAGTG GGCAGTCTC GTGAGACTGC
1201 CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATCA CGTCAAAATCA TCATGCCCC TTATGACCTG
1261 GGCTACACAC GTGCTACAA GACCGGTACA ACGAGTTTCC GAGTCGTC AGGCTAAGCT
1321 AATCTCTTAA AGCCGTTCTC AGTTCCGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTA CATGAAGTTG
1381 GAATCGCTAG TAATCGC ←1512R
  
```

그림55. 인삼 사포닌 전환 활성 균주의 16s rDNA sequence

- 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model(Kimura, 1983)을 이용하였으며, MEGA 3 Program(Kumar *et al.*, 2004)의 neighbor-joining(Saitou & Nei, 1987)방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다.

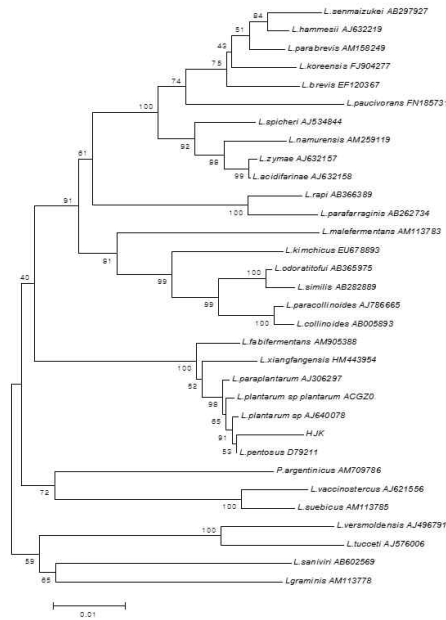


그림56. 인삼 사포닌 전환 활성 균주의 계통도

- 본 균주의 최적 전환 활성을 알아보기 위하여 성장 및 반응 조건별 β -glucosidase 활성을 확인하였다.
- 분리 균주는 *L. pentosus*와 98.9% 상동성을 지닌 균주로 확인되었으며, 본 연구팀에서는 strain GFC09로 명명하여 기존의 균주와의 분류학적 특성 비교 검정을 통한 균주의 신종으로서 가능성 여부를 검증하고 있다. 본 균주는 뛰어난 β -glucosidase 활성 및 사포닌 전환 활성을 가진 것이 확인 된 바 산업화 적용을 위한 최적화 연구를 수행 하였다. 본 균주의 배양에 따른 β -glucosidase 활성의 최적 조건을 확립하기 위하여 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(*p*-NPG)를 assay를 실시하였으며, 균주의 효소를 함유한 20 mM sodium phosphate(pH 7.0)에 *p*-NPG를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 를 첨가하여 반응을 중지시켜 유리되는 *p*-nitrophenol(*p*-NP)의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1단위(unit)는 반응시간 분당 생성되는 *p*-nitrophenol 1umol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.
- *Lactobacillus pentosus* GFC09 균주를 colony를 취하여 MRS에서 24시간 배양한 현탁액을 LB, NB, TSB, MRS에 1%(v/v) 씩 접종한 후 190 rpm, 37°C 조건에서 배양하여 4시간마다 O.D.₆₀₀ 값을 측정하여 균주의 성장을 확인하였다(Fig. 16). *L. pentosus* LH6 균주는 LB, TSB, MRS에서 배양 4시간까지는 유사하였지만 8시간 이후부터는 MRS에서 가장 잘 성장하였으며 균주의 성장 속도는 MRS>TSB>LB>NB 순으로 나타났다.

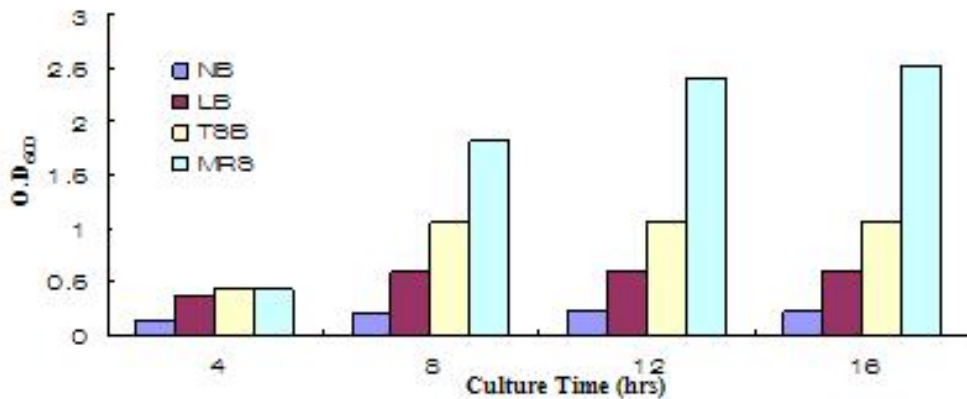


그림57. 배양 조건별 균주 성장 분석

- *L. pentosus* GFC09 균주를 MRS broth에 접종하여 배양온도를 각각 22, 25, 30 및 37°C로 24시간 배양하여 O.D₆₀₀ 값을 측정하였다. 그 결과 *L. pentosus* LH6 균주의 생장은 온도의 영향을 많이 받았다. *L. pentosus* GFC09 균주는 30°C와 37°C에서 가장 높은 성장속도를 보였고 25°C, 22°C 순으로 성장속도가 느려지는 것을 확인 할 수 있었다.

표 17. 온도 조건별 성장량

Temperature(°C)	22	25	32	37
O.D ₆₀₀	1.522	2.017	2.740	2.730

- MRS broth를 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 조절한 후 *L. pentosus* GFC09 균주를 접종하여 24시간 배양하였다. *L. pentosus* GFC09 균주는 pH 5.5에서부터 8.0 범위 내에는 큰 차이 없이 모두 잘 성장하는 것을 알 수 있었다. MRS broth 자체의 pH가 6.7이기 때문에 아래의 실험에서 pH를 조절하지 않고 직접 균 배양에 사용하였다.

표 18. pH별 성장량

pH	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
O.D ₆₀₀	2.417	2.388	2.626	2.446	2.732	2.744

- *L. pentosus* GFC09 균주를 MRS broth에서 호기성 조건하에서 37°C, 190 rpm에서 배양하면서 균의 성장 정도를 관찰하였다(Fig. 17A). *L. pentosus* GFC09 균주를 MRS broth에서 각각 O.D₆₀₀ 값 (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0)별로 배양한 후 조효소액을 조제하여 0.2 mM ginsenoside Rd와 72시간 반응시켜 TLC로 분석한 결과 ginsenoside Rd는 O.D₆₀₀ 0.5 ~ 2.0에서는 O.D₆₀₀ 값 크기에 관계없이 모두 분해가 잘 되

어 *L. pentosus* GFC09의 강한 ginsenoside Rd의 분해 능력을 나타내었다. O.D₆₀₀ 0.5, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0에서는 주로 F₂와 compound K band를 관찰 할 수 있고 O.D₆₀₀ 0.75와 1.0에서는 대부분 compound K로 전환되는 것을 관찰 할 수 있으며 그중 O.D₆₀₀ 1.0에서 가장 강한 compound K로의 전환능력을 나타냈다(Fig. 17B). 따라서 ginsenoside Rd로부터 F₂로의 전환효소는 O.D₆₀₀ 값 0.5부터 2.0사이에서 큰 차이가 없이 잘 생산이 되고 ginsenoside F₂로부터 compound K로의 전환효소는 O.D₆₀₀ 0.75-1.0사이에서 가장 많이 생산되었다.

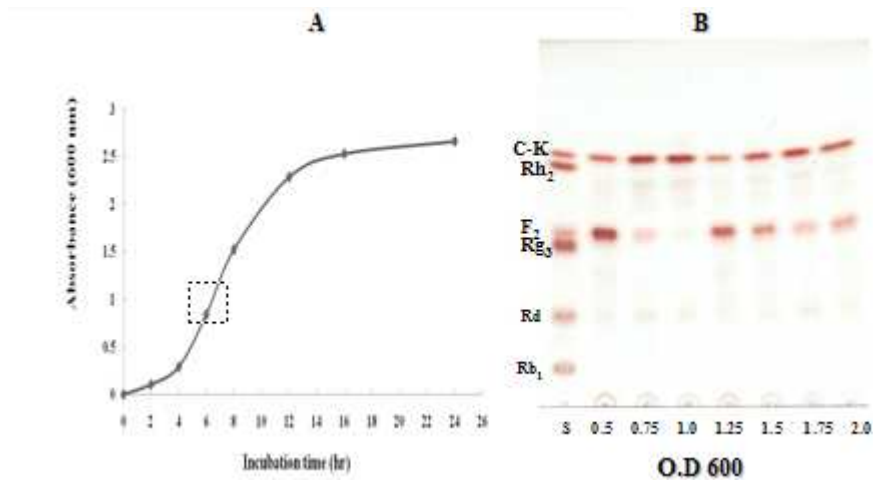


그림58. 최적 조건 탐색에 따른 사포닌 전환 확인

(2) 인삼 잎 발효 추출물로부터 활성성분의 분리 및 동정

- 본 실험에 사용한 인삼 잎 발효 추출물은 1세부에서 발효한 것을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck, Germany)을 octadecyl silica (ODS) gel은 Waters ODS 125 ÅÅ 55-105 μm를 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kieselgel 60 F254와 RP-18 F254S(Merk)를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400 (Varian, USA)으로 측정하였고, UV lamp는 Spectrolone (Model EVF-240 C/F, Spectronics Corporation, USA)을 사용하였다.

가. 인삼 잎 발효 추출물 고함유 분획물의 제조

- 건조하여 분쇄 한 후 가루 상태의 인삼 잎 발효 추출물 300 g을 제공받아 실험을 진행하였다. 건조 상태의 가루 추출물을 n-hexane (660 ml) /H₂O(660ml)로 1회 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 EtOAc : n-BuOH (20:2) (660 ml)/ H₂O(660ml)로 1회 분배 추출하였다. 각층을 감압 농축하여, n-hexane 분획과 EtOAc : n-BuOH (20:2) 분획 (FPLE, 16 g) 및 H₂O분획을 얻었다.(Fig. 1).

- 각 분획에 대한 성분을 TLC로 확인한 결과, EtOAc : n-BuOH (20:2) 분획에 비극성 사포닌으로 확인되는 물질들이 많았기 때문에 EtOAc : n-BuOH (20:2) 분획(고함유분획)에서 화합물들을 분리하고자 하였다.

Fermented *Panax ginseng* leaf MeOH ext. (300 g)

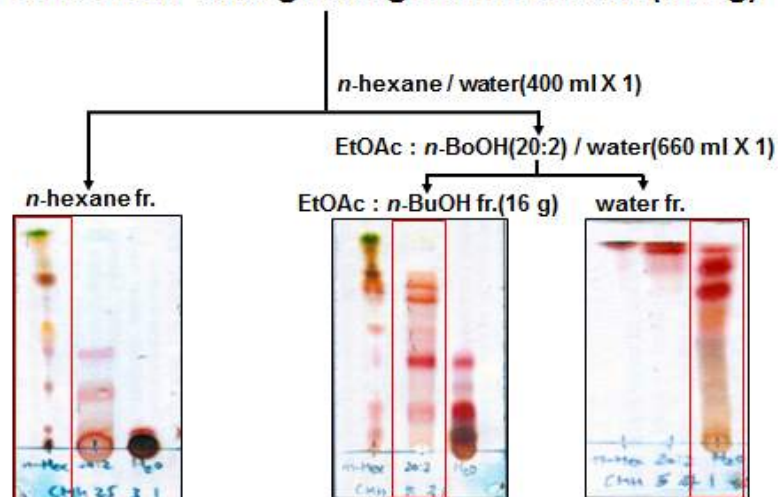


Fig. 59. Fractionation procedure of extracts from the Fermented *Panax ginseng* leaf

나. 인삼 잎 발효물 EtOAc : n-BuOH (20:2)분획물로부터 활성성분의 분리 및 정제

- 위에서 얻어진 EtOAc : n-BuOH (20:2) (이하 EB) 분획 16 g 을 SiO₂ column chromatography(이하 c.c.) (Ø 7.5 cm x 15 cm, n-Hexane-EtOAc = 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:3 → CHCl₃-MeOH=8:1→5:1)를 실시하여 180 ml씩 분취하였다. 각 분취액을 TLC(CHCl₃-MeOH=7:1,5:1)로 확인하여, 유사한 부분을 함께 모으므로, 농축하여 21개의 분획물(FPLE-1~FPLE-21)을 얻었다. FPLE-18 분획 [1.6 g, Ve/Vt 0.19-0.25] 에 대하여 SiO₂c.c.(Ø 4.5×8 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=36:3:1, 5.0L)를 실시하여 총 12개의 분획물(FPLE-18-1~FPLE-18-12)을 얻었다. FPLE-18-7 분획 [726.0 mg, Ve/Vt 0.076-0.28] 에 대하여 Waters ODS c.c.(Ø 3.5×5 cm, MeOH-H₂O=1:1, 11L)를 실시하여 FPLE-18-7-18 (Rk1, 167.4 mg) 단일물질을 얻었다. FPLE-18-7-4 분획 [67.2 mg, Ve/Vt 0.03-0.05] 에 대하여 SiO₂c.c.(Ø 2.5×15 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O=45:3:1, 8L)를 실시하여 FPLE-18-7-4-6 (Rh3,7.1mg), FPLE-18-7-4-10(oto-F1, 15.9mg) 단일물질을 얻었다.(Fig. 60.)

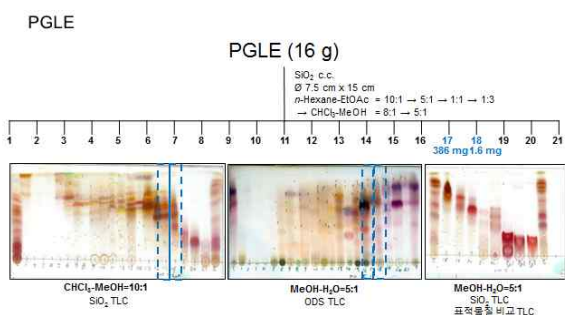


Fig. 2. Isolation procedure of EtOAc : n-BuOH fraction from the fermented *panax.ginseng* leaf

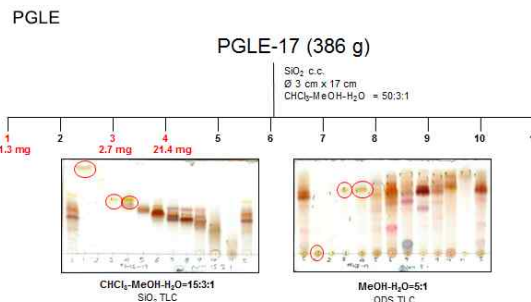


Fig. 3. Isolation procedure of EtOAc : n-BuOH fraction from the fermented *panax.ginseng* leaf

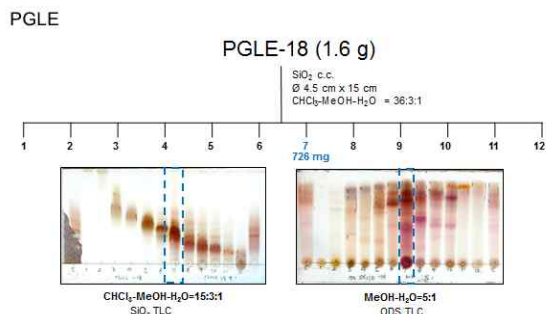


Fig. 4. Isolation procedure of EtOAc : n-BuOH fraction from the fermented *panax.ginseng* leaf

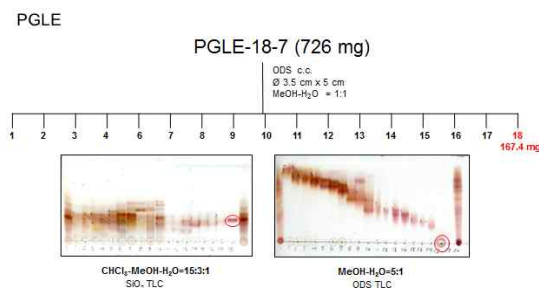


Fig. 5. Isolation procedure of EtOAc : n-BuOH fraction from the fermented *panax.ginseng* leaf

Fig. 60. Isolation procedure of EtOAc : n-BuOH fraction from the Fermented *Panax.ginseng* leaf

(3) 인삼부산물물의 진세노사이드 프로파일링

- 인삼부산물에 함유된 극미량 농도의 목적성분 및 미지성분까지도 정성적 분석을 할 수 있는 분석 장비인 UPLC/Q-TOFMS를 이용하여 분석법 확립하였다. 확립한 분석법을 사용하여 발효부산물물의 잎과 열매에서의 추출물을 분석하였다.

- 1차년도 및 2차년도에서 인삼열매 및 지상부로부터 분리 및 정제한 standard compounds를 이용하여 각각의 이온화 조건을 셋업하고 부산물 내 주요 대사체의 최적 분리조건을 설정하기 위해 chromatography 최적 분석조건 설정함.

○ LC conditions

- Instrument : Waters ACQUITY H-Class UPLC (Waters Corp.)
- Column : ACQUITY BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)
- Column Temperature : 40 °C
- Injection Volume : 2 uL
- Solvent A : 5% acetonitrile + 0.1% formic acid (v/v)
- Solvent B : 95% acetonitrile + 0.1% formic acid (v/v)
- Flow rate : 0.45 ml/min
- Solvent gradient Table

min	B%
0	10
3	20
11	23
20	95
21	10
25	10

○ MS conditions

- Ion Source: ESI negative mode
- Cone Voltage: 40 V
- Capillary: 3.0 kV
- Source Temperature: 120 °C
- Desolvation Temperature: 300 °C
- Cone Gas Flow: 30 L/h
- Desolvation Gas Flow: 600 L/h
- Mass range: 100-1200 m/z

- 그 결과, 인삼발효잎에서는 43개의 진세노사이드를 효과적으로 분리하고 동정하였고, 인삼발효 열매에서는 33종의 진세노사이드를 효과적으로 분리하고 동정하였다.

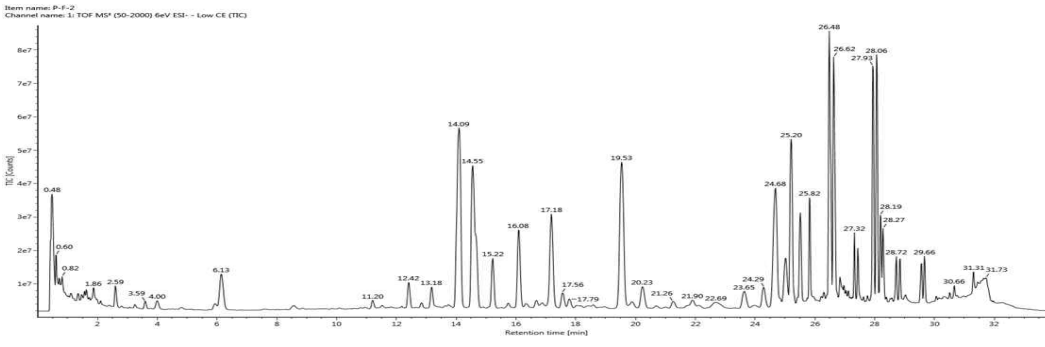
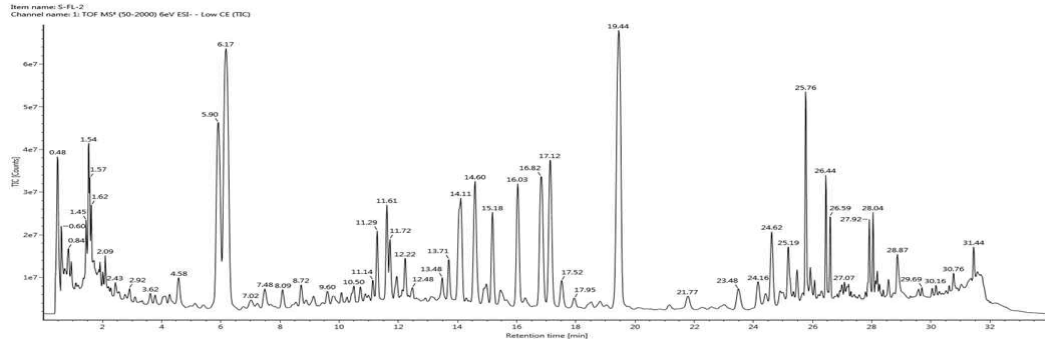


그림 61. 인삼 발효부산물물의 내 2차대사체 크로마토그램(상:발효인삼잎, 하:발효인삼열매)

(4) 발효인삼 부산물을 이용한 미백관련 전임상 연구

가. 발효인삼 부산물 crude extract 들의 미백효능 검증

- 발효인삼 부산물 crude extract의 미백효능을 검증하기 위하여 먼저 가장 간단한 in vitro 활성 측정법인 mushroom tyrosinase의 저해 활성을 아래와 같이 검증하였다.

○ 평가방법

* 멜라닌 합성 저해능 평가

- C57BL/6 마우스에서 유래한 immortalized cell line 인 melan-a 세포를 이용 하였다. Melan-a 세포의 배양은 10% fetal bovine serum, streptomycin-penicillin (100 mg/mL)과 200 nM 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate가 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂의 환경에서 세포주를 배양하여 사용하였다.
- Melanin 생합성 저해 활성을 보기 위한 구체적 실험방법은 Melan-a 세포 1×10⁵개를 24-well plate의 각 well에 분주하여 하룻밤 배양하여 실험에 사용하였다. 각 샘플을 농도별로 배지에 처리하여 4일 동안 배양했다. 이후 phosphate-buffered saline으로 세척하고 0.85N KOH를 250 μL 씩 각 well에 처리하여 용해시켰다. 용해된 세포를 96 well plate로 옮겨 microplate reader (Bio-Rad 3550)를 사용하여 optical density를 405 nm에서 측정하고 melanin 생성 억제율은 대조군과 대비해 %로 계산한다.

* Tyrosinase 저해 활성 측정

- Tyrosinase에 대한 저해활성은 96 well plate (SPL, Korea)에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 150 μL, 1.5 mM L-tyrosine solution 25 μL와 2100 unit/μL mushroom tyrosinase (Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 μL을 넣은 후, sample을 15 μL 처리하여 25 °C에서 1시간 반응시킨 후, microplate reader (Bio-Rad 3550)를 사용하여 optical density를 490 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율 (%)은 다음 식에 의하여 계산한다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{D - C} \times 100\%$$

A : 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도 C : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도

B : 저해제를 넣은 것의 반응 후 흡광도 D : 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

* 제브라피쉬(zebrafish) 멜라닌 합성저해 실험

- 형태학적 관찰

성숙한 제브라피쉬 암수를 알 채취 전날 알 채취용 수조에 넣고 다음날 광주기 시기 1-2

시간 이후에 알을 채취하였다. 채취된 알은 zebrafish embryo medium에 넣고 24시간 발생시킨 후 각 샘플을 농도별로 처리하였다.

샘플 처리 시 코리온(chorion)의 샘플 투과 정도를 알 수 없기에 각 알의 코리온에 구멍을 내어 처리하였고, 샘플 처리 후 24시간 이후 샘플의 독성이 나타난 알은 제거 하고, 나머지 알의 코리온을 완전 제거 후 2번째 샘플을 처리 하였다. 샘플 처리 48 시간 이후에 대조구 대비 샘플 처리구의 색소 발생 정도를 실체현미경으로 관찰하였다.

- 멜라닌 함량 및 tyrosinase activity 측정

각 그룹당 60mm dish에서 2일간 자란 60 마리의 zebrafish 유충(larva)의 코리온을 제거 하고 샘플을 처리한 후 48 시간 배양하였다. 배양 후 zebrafish를 수거하여 Protein extraction solution을 첨가한 다음 sonication을 이용하여 lysis 시킨다. 원심분리 후 상등액은 L-DOPA를 이용하여 tyrosinase activity 를 측정하고 남은 pallet은 NaOH를 이용하여 멜라닌 양을 측정한다.

- 그 결과, 양성대조군인 kojic acid보다는 저해활성이 높지는 않지만, NIHHS19 추출물을 제외하고 모든 샘플에서 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 감소됨을 관찰하였다.

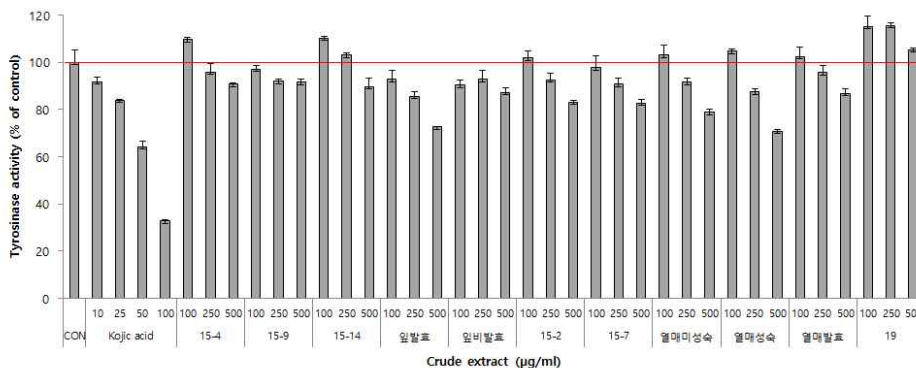


Figure 62. Inhibitory effect of crude extract from *P. ginseng* on the mushroom tyrosinase activity. Tyrosinase was preincubated with test compounds at 25°C for 10 min prior to incubation with L-tyrosin for 30 min and the absorbance was determined at 490 nm.

- crude extract의 미백효능을 검증하기 위하여 melan-a세포를 이용하여 in vitro 효능을 검증하였으며, in vitro상에서의 세포증식과 멜라닌 합성에 미치는 효능은 아래와 같다.

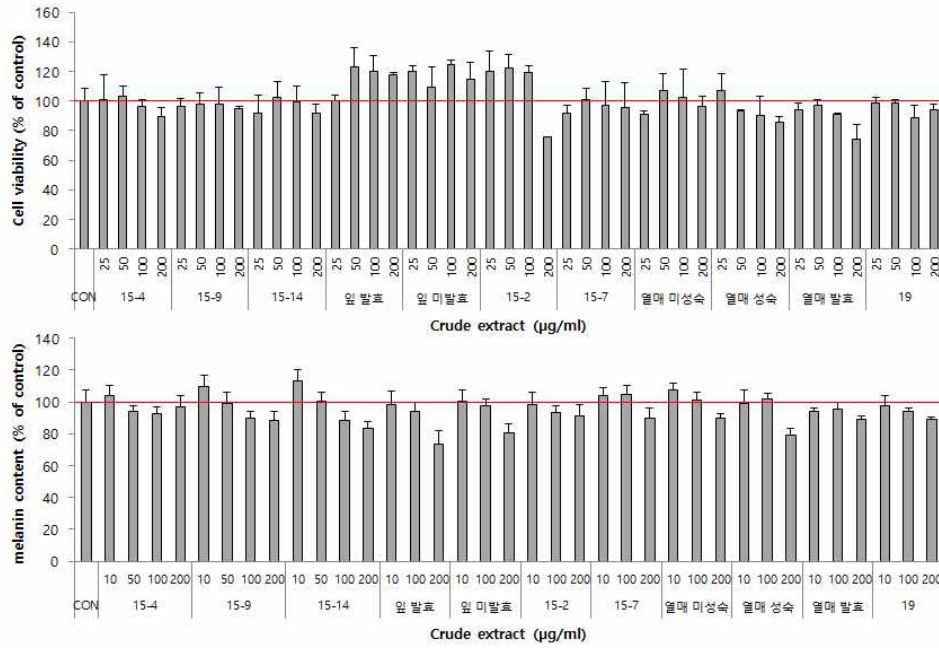


Figure 63. Effects of 11 crude extract isolated from *P. ginseng* on cytotoxicity and melanogenesis in melan-a cells.

- 대부분의 추출물은 200 µg/ml의 처리농도까지 세포독성이 나타나지 않았지만, 200 µg/ml의 15-2 추출물 처리군과, 열매성숙, 열매발효 100, 200 µg/ml의 농도에서 독성을 나타내었다. melan-a 세포를 이용한 멜라닌 합성에 미치는 영향들이 연구하였다. 잎발효, 잎미발효 추출물은 200 µg/ml의 농도에서 각각 26.2, 19.7%의 높은 멜라닌 합성 저해능이 측정되어 더 추가적인 멜라닌 합성 저해활성을 비교하였다.

나. 발효인삼 잎 추출물의 미백효능 검증

- 발효인삼잎 추출물의 미백효능을 검증하기 위하여 melan-a세포를 이용하여 in vitro 효능을 검증하였으며, in vitro상에서의 세포증식과 멜라닌 합성에 미치는 효능은 아래와 같다.

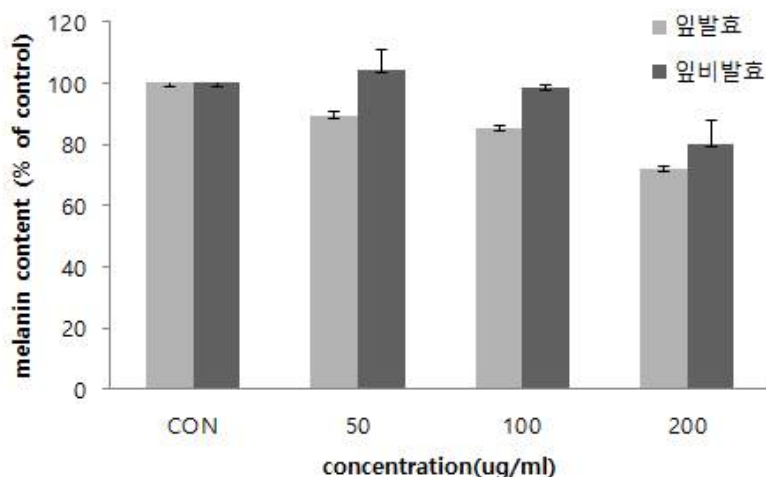


Figure 64. Effects of leaves extracts of *P. ginseng* on melanogenesis in melan-a cells. Inhibition of melanin synthesis was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 0-200 ug/ml of extracts for 3 days.

- 발효인삼잎 및 인삼잎 추출물의 농도별 멜라닌 생성 억제활성을 melan-a세포 배양에서 확인하였다. 세포독성이 보이지 않는 200 ug/ml 이하의 농도까지 처리하였을 때 발효 추출물이 200 ug/ml의 농도에서 처리농도까지 세포독성을 보이지 않았고, 200 ug/ml의 농도로 처리하였을 28%의 저해능을 보여 잎비발효물 보다 월등히 높은 멜라닌 합성 저해능을 확인 할 수 있었다.

- 이들 결과로 보아 가장 활성이 좋은 발효 추출물의 멜라닌 합성 기전을 연구하였다.

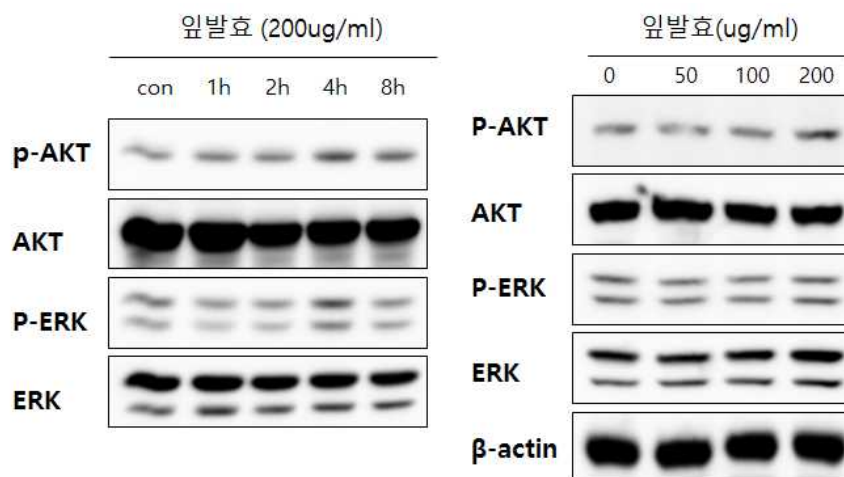


Figure 65. Effects of fermented leaves on cell protein expression in melan-a cells. The cells were cultured with 0~200 µg/ml of 15-14 for 0~8h. Whole-cell lysate

were then subjected to western blot analysis using antibodies against p-AKT, AKT, p-ERK and ERK.

- 발효 추출물의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 기전에 관련한 AKT와 ERK 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 20). 잎 발효 추출물을 melan-a 세포에 처리하였을 때 p-AKT와 p-ERK의 4시간 처리시 가장 높은 발현량을 관찰하여 잎 발효 추출물을 농도별로 4시간 처리하였다. 그 결과 농도 의존적으로 p-AKT의 농도가 증가됨을 확인하여 잎 발효추출물은 phosphorylation AKT 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료 된다.

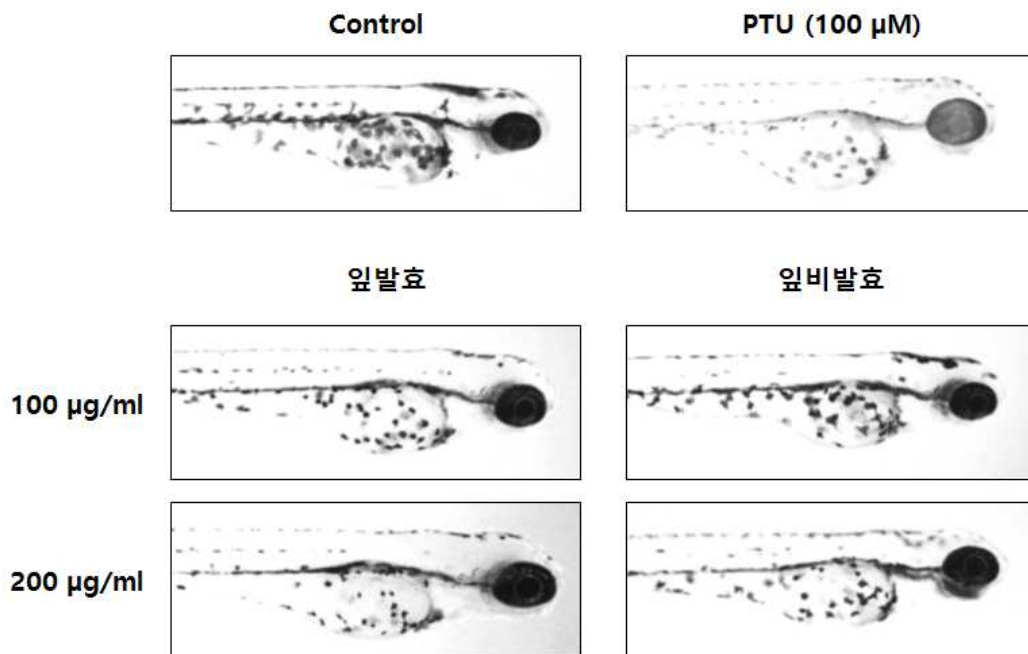


Figure 66. Effects of fermented leaves on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. 잎 발효 were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope.

- 이들 결과들을 in vivo모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다 (Figure 20). 모든 잎 추출물은 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 전체적으로 감소되는 결과를 보였으며 그중 잎 발효 추출물이 가장 좋은 멜라닌 합성 저해능을 보였다.

다. 인삼 발효부산물의 항염증 효과

- 인삼 발효 부산물들의 항염효과를 측정하기 위해 Raw 264.7 세포를 배양하고 이들로부터 생산되는 산화질소 (NO)와 염증성 사이토카인들의 발현에 미치는 영향을 측정하였다.

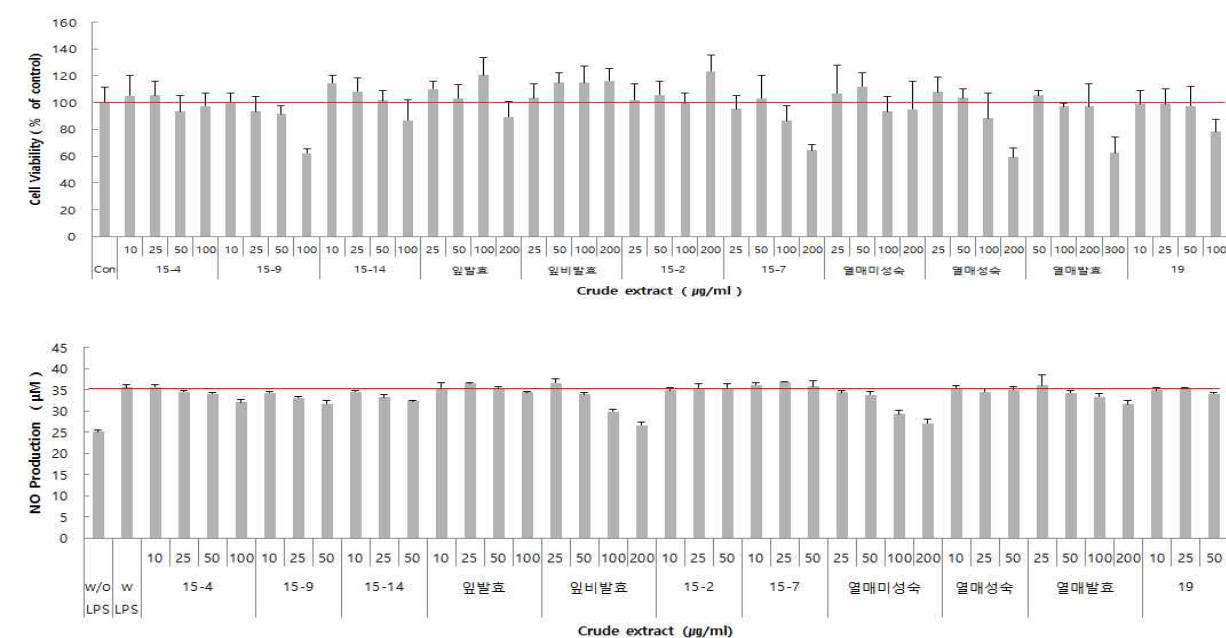


Figure 67. The effect of cell viability and nitric oxide production of crude extracts on the murine macrophage cell (Raw 264.7). Murine Raw 264.7 cells were incubated for 24 hours with the indicated concentrations of extracts.

- 인삼 부산물 추출물의 Raw264.7 세포에 대한 세포독성을 실험해 본 결과, 15-9 (100 ug/ml), 15-14 (100 ug/ml), 인발효 (200 ug/ml), 15-7 (100, 200 ug/ml), 열매성숙 (100, 200 ug/ml), 열매발효 (300 ug/ml), 19 (100 ug/ml)의 고농도에서 독성을 나타내어 독성이 없는 시료의 농도까지 NO 생성능을 측정하였다. 인삼 부산물 중 인비발효, 열매미성숙 추출물을 200 ug/ml의 농도로 처리한 군에서 각각 25.2, 24.0 %의 NO생성 저해율을 보였고 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하는 활성을 보였다.

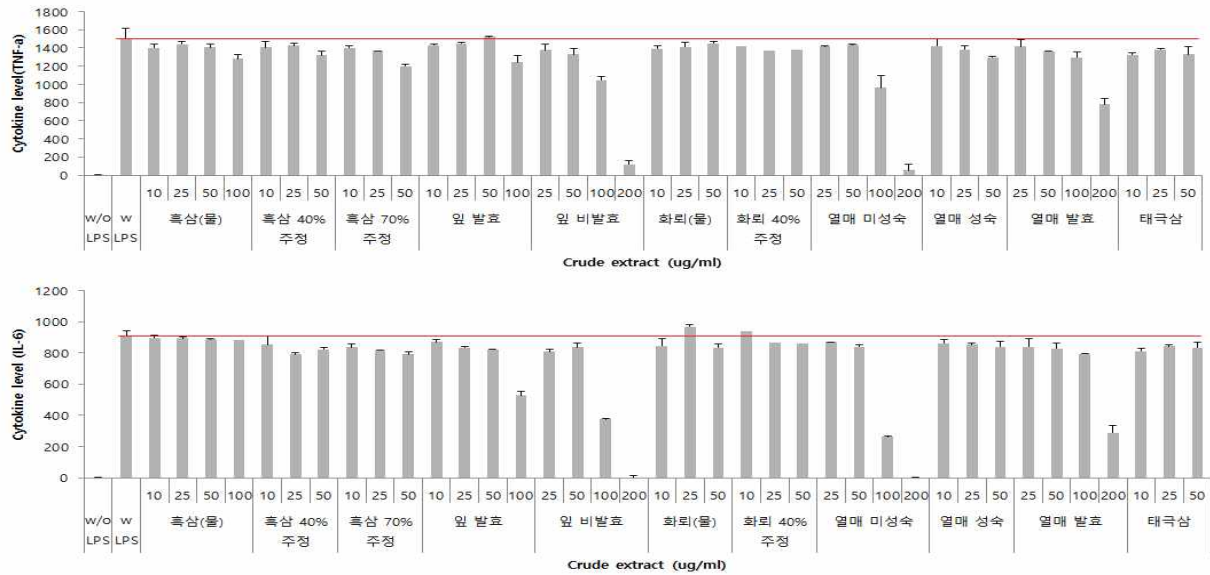


Figure 68. The effect of crude extracts on the TNF- α and IL-6 production by macrophage. Murine Raw 264.7 cells were incubated for 24 hours with the indicated concentrations of extracts. E. coli lipopolysaccharide (LPS: 0.2 μ g/ml) was used as a control.

- Cytokine은 감염, 면역반응, 염증 등을 매개하는 조절자이다. Cytokines에 따라서 질병을 악화시키거나 (proinflammatory cytokine), 혹은 염증을 약화시키고 개선시키는 (anti-inflammatory cytokine) 작용들을 수행한다. 이들 중 Major proinflammatory cytokines은 Interleukin-6와 (tumor necrosis factor) TNF- α 이다. 특히 TNF는 생체 내로 주입되면 발열, 염증과 조직에 상해를 주며 심하면 쇼크와 죽음에도 이르게 한다.
- 본 실험에서는 염증반응의 지표 인자인 proinflammatory cytokine의 생성에 미치는 시료들의 영향을 알아보기 위하여 nitric oxide 생성 저해능 실험과 동일한 농도로 처리하여 분석하였다, 그 결과 NO 생성 저해능과 같이 잎비발효와, 열매미성숙 추출물에서 proinflammatory cytokine의 분비가 거의 일어나지 않는 것으로 보아 높은 항염증 효과를 나타내었다.

라. 발효 인삼잎 추출물의 항염 효과

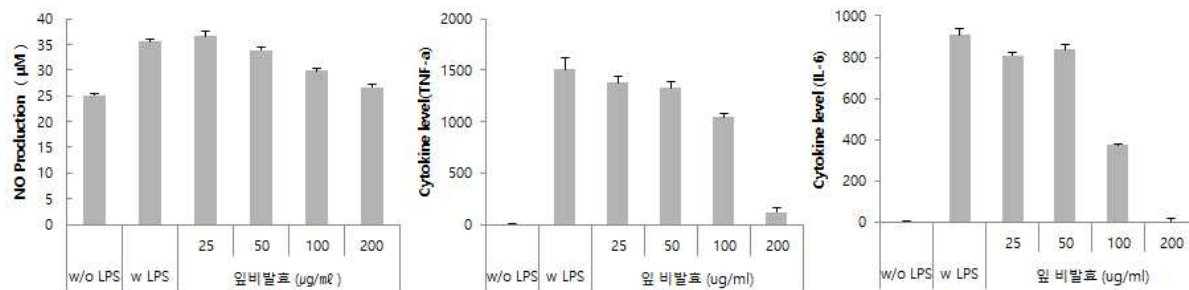


Figure 69. The effect of ginseng leaves on the nitric oxide, TNF-α and IL-6 production by macrophage. Murine Raw 264.7 cells were incubated for 24 hours with the indicated concentrations of extracts. E. coli lipopolysaccharide (LPS: 0.2μg/ml) was used as a control.

- 인삼 잎비발효 추출물에 대한 항염효과를 실험해 본 결과 농도 의존적으로 NO 생성능, TNF-α, IL-6 생성능이 현저하게 저하됨을 관찰하였다. 특히, proinflammatory cytokine 인 대조군인 LPS로 염증을 자극한 군에 비해 TNF-α는 92.1%, IL-6는 100% 생성능이 저해 되었다.

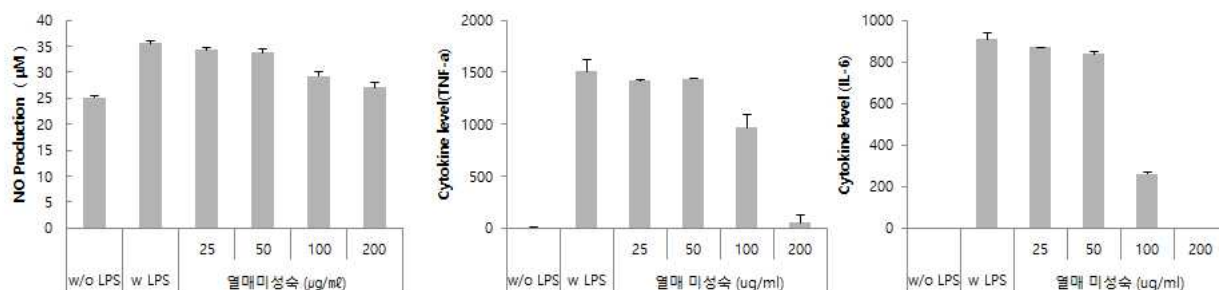


Figure 70. The effect of young berry on the nitric oxide, TNF-α and IL-6 production by macrophage. Murine Raw 264.7 cells were incubated for 24 hours with the indicated concentrations of extracts. E. coli lipopolysaccharide (LPS: 0.2μg/ml) was used as a control.

- 또한 인삼 열매미성숙 추출물에 대한 항염효과를 실험해 본 결과 농도 의존적으로 NO 생성능, TNF-α, IL-6 생성능이 현저하게 저하됨을 관찰하였다. 특히, proinflammatory cytokine인 대조군인 LPS로 염증을 자극한 군에 비해 200 ug/ml의 처리 농도에서 급격하게 TNF-α는 96.4%, IL-6는 100% 생성능이 저해 되었다. 이와 같은 결과로 보아 열매 미성숙 추출물은 200 ug/ml이상의 농도에서 항염 효과를 보이는 것으로 사료된다.

19. 발효인삼부산물로부터 분리된 Compound의 미백관련 전임상 연구

가. 발효인삼부산물로부터 분리된 single compound들의 미백효능 검증

- 분리된 single compounds의 미백효능을 검증하기 위하여 mushroom tyrosinase activity 및 melan-a세포를 이용하여 in vitro 효능을 검증하였으며, in vitro상에서의 세포증식과 멜라닌 합성에 미치는 각각 single compound들의 효능은 아래와 같다.

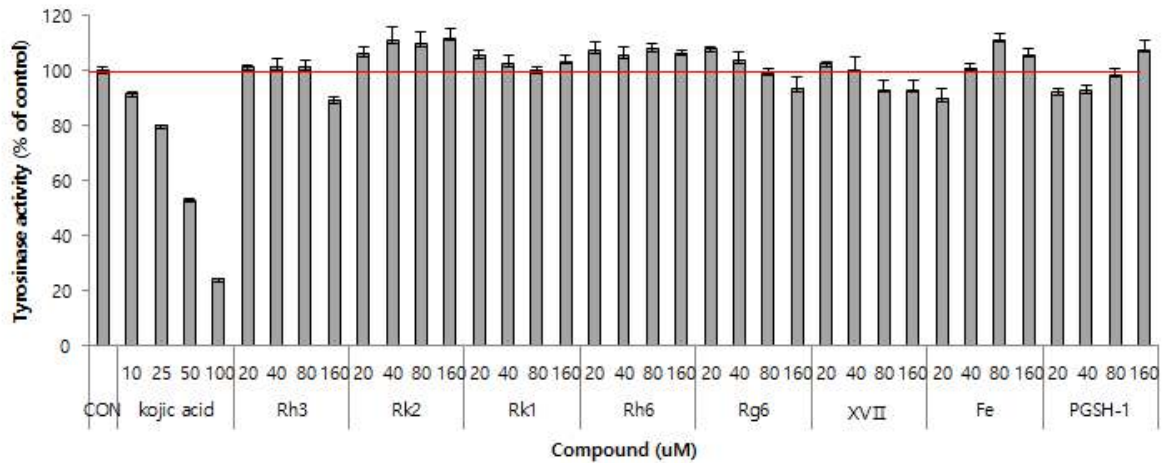
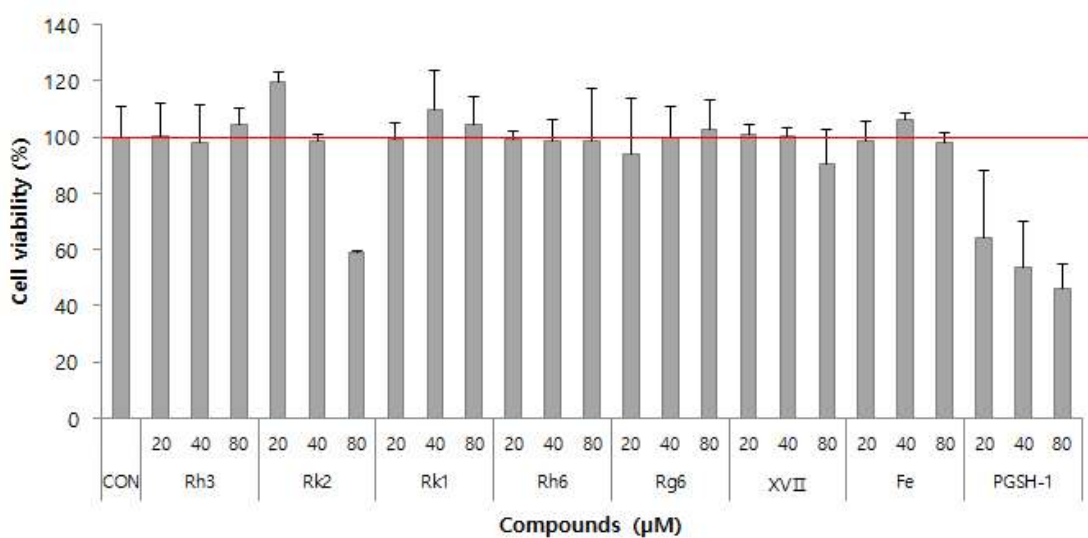


Figure 70. Inhibitory effect of single compounds from fermented *P. ginseng* on the mushroom tyrosinase activity. Tyrosinase was preincubated with test compounds at 25°C for 10 min prior to incubation with L-tyrosin for 30 min and the absorbance was determined at 490 nm.

- Single compound에 대한 mushroom tyrosinase의 저해 활성을 아래와 같이 검증한 그 결과, 양성대조군인 kojic acid는 높은 저해 활성을 보였지만 모든 single compound가 mushroom tyrosinase에 대한 저해 활성을 나타내지는 않았다.



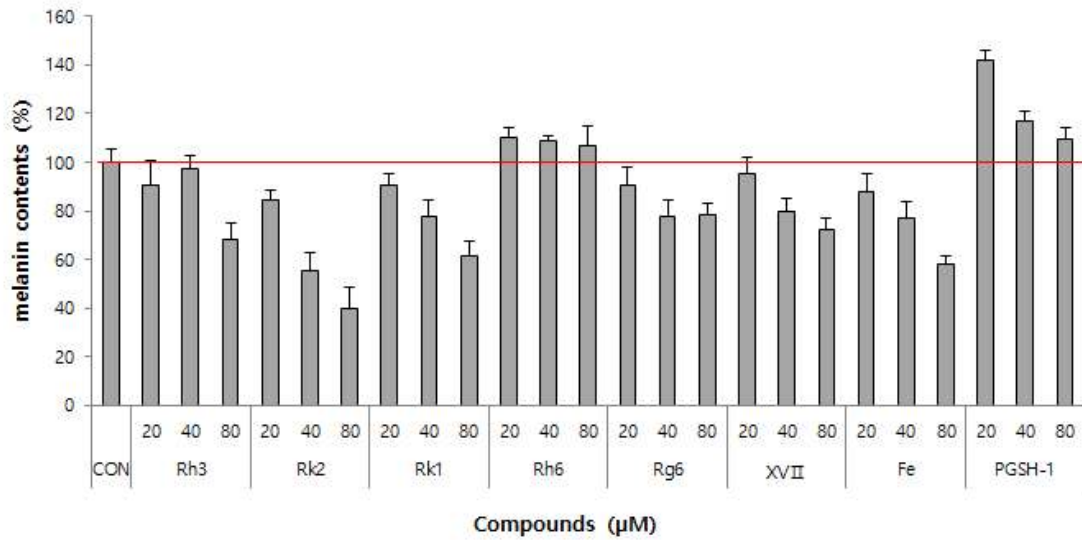


Figure 71. Effects of 8 single compounds isolated from *P. ginseng* (Rh3, Rk2, Rk1, Rh6, Rg6, XVII, F3 and PGSH-1) on cytotoxicity and melanogenesis in melan-a cells.

- 대부분의 단일물질들은 80 μM의 처리농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. 그러나 Rk2는 80 μM의 농도에서 독성을 나타내었고, PGSH-1은 모든 농도에서 Melan-a 세포에 대해 독성을 나타내었다. 이들 단일물질이 melan-a 세포를 이용한 멜라닌 합성에 미치는 영향들을 연구하였다. 그 결과 Rh6와 PGSH-1을 제외한 모든 화합물에서 농도 의존적으로 멜라닌의 합성이 감소됨을 보여 주었다. 특히 Rh3, Rk1, XVII, Fe 단일물질은 농도 80 μM의 농도에서 각각 31.8, 38.3, 27.9, 41.7 %의 멜라닌 합성 저해능을 나타내었고 Rk2 80 μM에서의 저해효과는 독성으로 인한 효과라 사료되어 독성이 없는 범위인 40 μM에서 44.6%의 뛰어난 멜라닌 합성 저해능을 관찰하였다. 따라서 효과가 좋은 Rh3, Rk2, Rk1, XVII, Fe를 이용하여 멜라닌 합성저해를 연구하였다.

나. Ginsenoside Rh3 (Rh3)의 멜라닌 합성 저해효능 연구

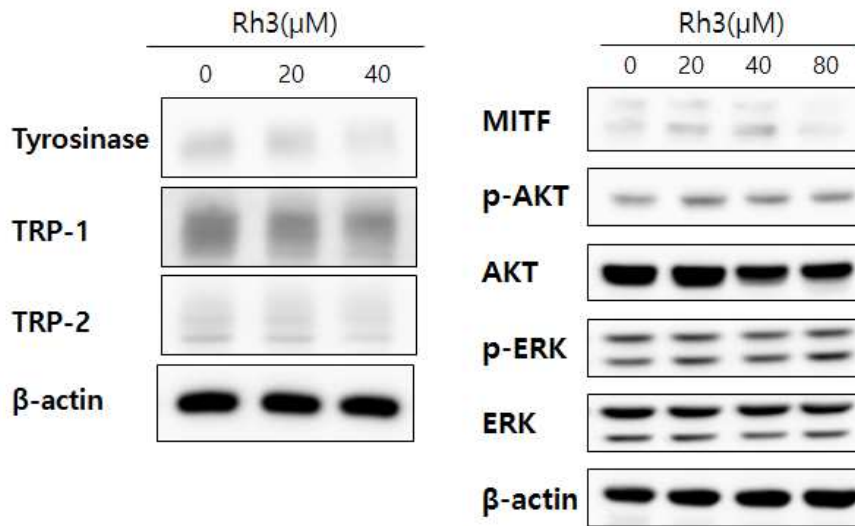


Figure 73. Effects of ginsenoside Rh3 (Rh3) on cell protein expression in melan-a cells. The cells were cultured with 0~80 μ M of Rh3 for 8 or 72h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK and MITF. Equal protein loading was confirmed using β -actin antibody.

- Rh3의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, p-AKT, p-ERK에 대한 단백질 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 3). 그 결과 Tyrosinase, TRP-1, 2의 발현이 40 μ M의 농도에서 감소됨을 확인하였다. 또한 최근 논문에 의하면 세포내 신호전달 단백질로 알려져 있는 AKT와 ERK의 신호 기전에 의해 멜라닌 생합성의 조절한다고 알려져 있다. 이에 따라 Rh3가 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. 그 결과 Rh3의 농도가 증가 할수록 phsphorlyation AKT 만 증가 되었고 ERK의 변화는 보이지 않았다. 따라서 Rh3는 phsphorlyation AKT를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료 된다.

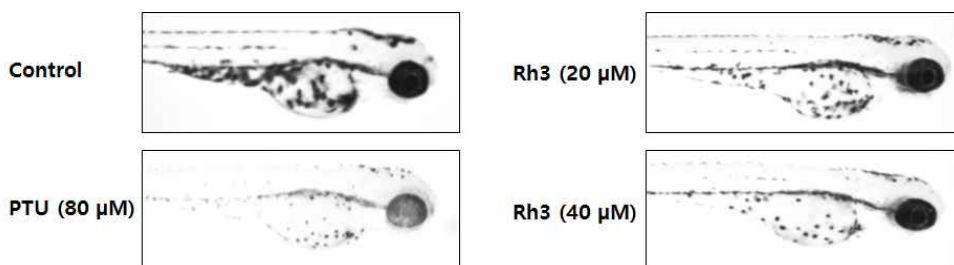


Figure 74. Effects of ginsenoside Rh3 (Rh3) on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. Rh3 were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the

stereomicroscope.

- 이들 결과들을 *in vivo* 모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다. Rh3의 멜라닌 생성 저해효과는 Figure 4와 같이 나타났다. Rh3는 농도 의존적으로 제브라피쉬 성체에서의 멜라닌 스팟이 줄어드는 경향을 나타내었다. 또한 실험농도범위에서는 어떤 어독성도 보이지 않았다

다. Ginsenoside Rk1 (Rk1)의 멜라닌 합성 저해능 연구

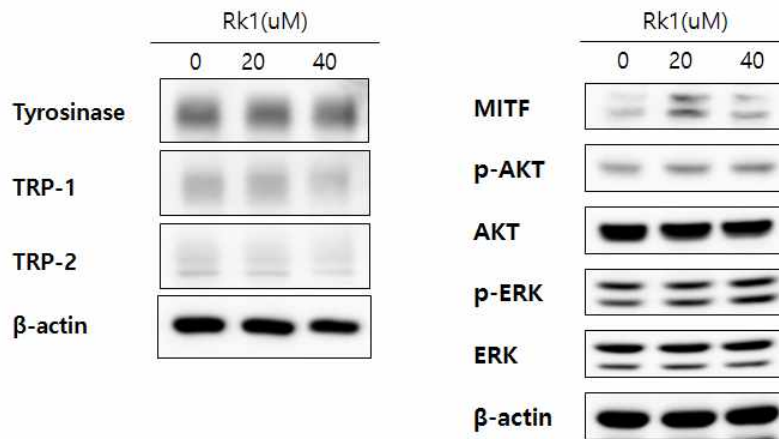


Figure 75. Effects of ginsenoside Rk1 (Rk1) on cell protein expression in melan-a cells. The cells were cultured with 0~40 μ M of Rk1 for 8 or 72h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK and MITF. Equal protein loading was confirmed using β -actin antibody.

- Rk1의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 5). 그 결과 Tyrosinase, TRP-1, 2의 발현이 40 μ M의 농도에서 약간 감소됨을 확인하였다. 멜라닌 생합성 기전을 확인하기 위해 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. 그 결과 Rk1의 농도가 증가 할수록 phsphorlyation AKT와 ERK가 증가 되었다. 따라서 Rk1은 phsphorlyation AKT와 ERK 두 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료 된다.

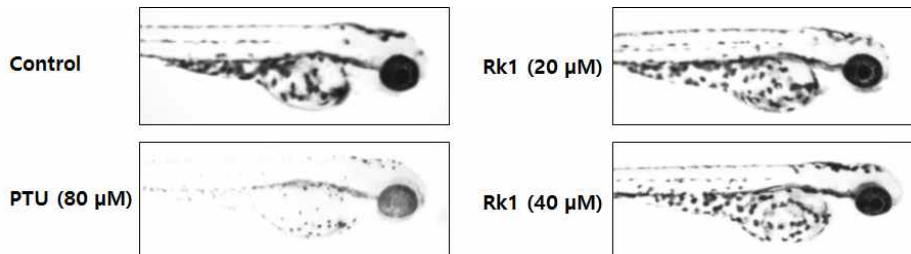


Figure 76. Effects of ginsenoside Rk1 (Rk1) on melanogenesis in zebrafish.

Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. Rk1 were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope.

- 이들 결과들을 in vivo모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다. Rk1의 멜라닌 생성 저해효과를 Figure 6와 같이 나타냈다. Rk1는 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 약간 감소 하기는 하였지만 농도의존적인 결과를 보이지 않아 in vivo에서는 큰 효과를 보이지 않았다.

라. Gypenoside XVII (XVII)의 멜라닌 합성 저해능 연구

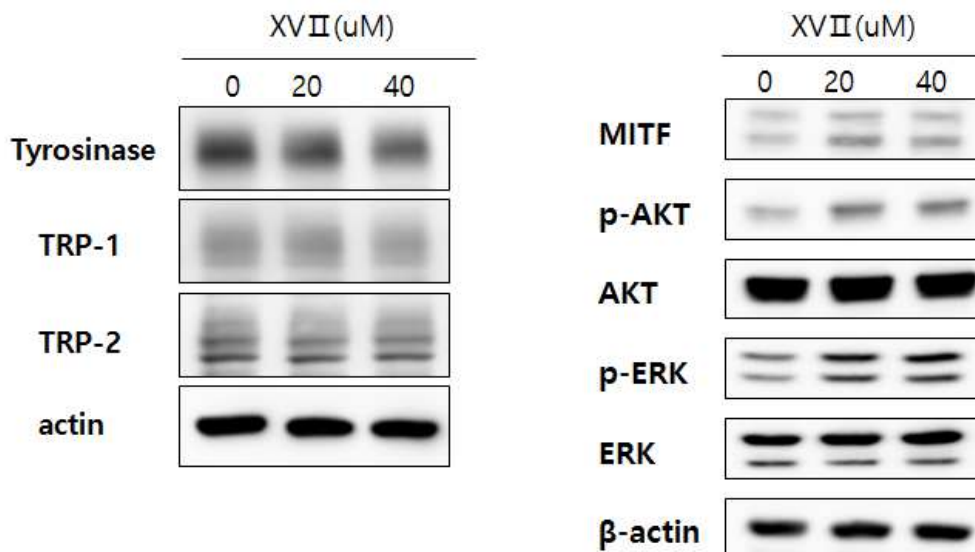


Figure 77. Effects of gypenoside XVII (XVII) on cell protein expression in melan-a cells. The cells were cultured with 0~40 μ M of XVII for 8 or 72h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK and MITF. Equal protein loading was confirmed using β -actin antibody.

- XVII의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 7). 그 결과 Tyrosinase, TRP-1의 발현이 40 μ M의 농도에서 약간 감소됨을 확인하였다. 멜라닌 생합성 기전을 확인하기 위해 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. 그 결과 XVII의 농도가 증가 할수록 pphosphorylation AKT와 ERK가 증가 되었다. 따라서 XVII는 pphosphorylation AKT와 ERK 두 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료 된다.

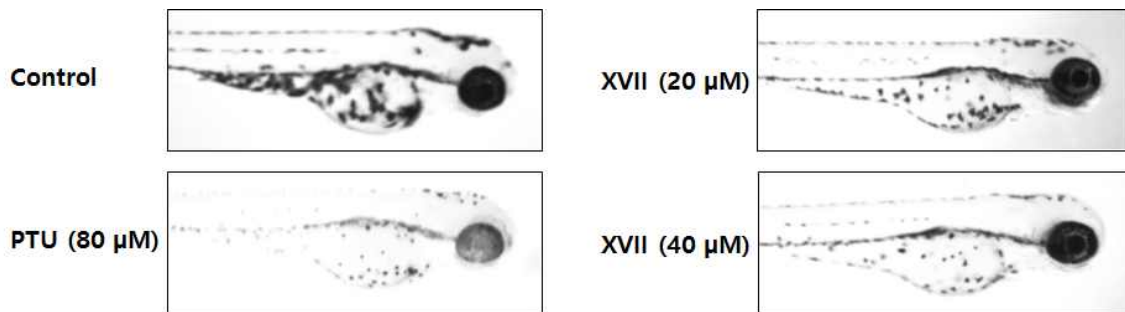


Figure 78. Effects of gypenoside XVII (XVII) on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. XVII were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope.

- XVII 단일물질에 대한 *in vivo* 모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다. XVII는 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 결과를 보였다.

마. Notoginsenoside Fe (Fe)의 멜라닌 합성 저해능 연구

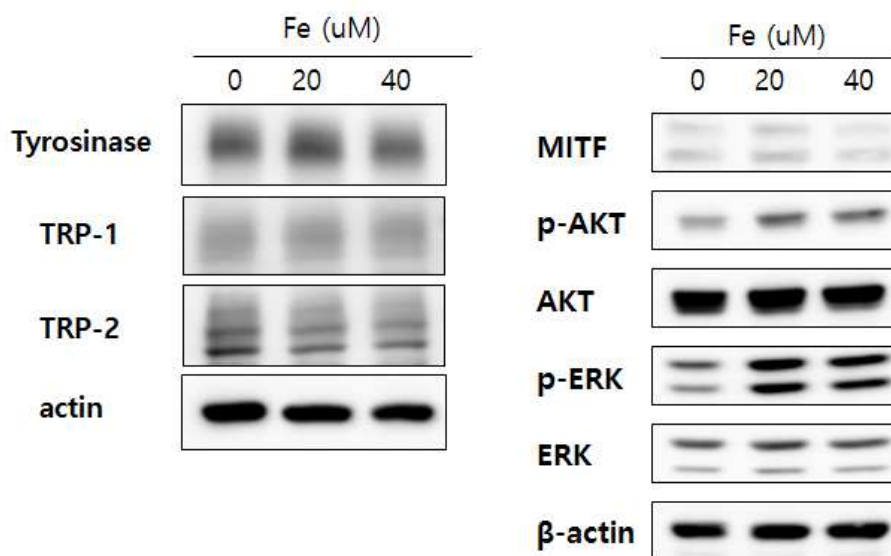


Figure79. Effects of notoginsenoside Fe (Fe) on cell protein expression in melan-a cells. The cells were cultured with 0~40 μ M of Fe for 8 or 72h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK and MITF. Equal protein loading was confirmed using β -actin antibody.

- Fe의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련된 주요 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 9). 그 결과 Tyrosinase, TRP-2의 발현이 40 μM 의 농도에서 약간 감소됨을 확인하였다. 멜라닌 생합성 기전을 확인하기 위해 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. 그 결과 Fe의 농도가 증가 할수록 phsphorlyation AKT와 ERK가 증가 되었다. 따라서 Fe는 phsphorlyation AKT와 ERK 두 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료 된다.

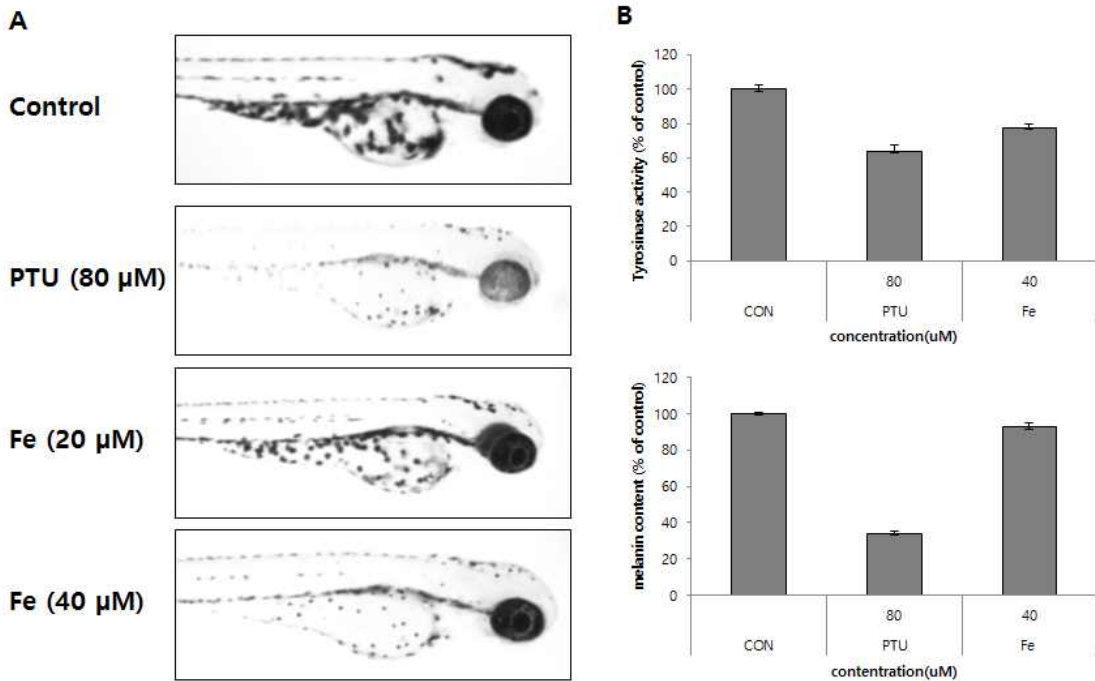


Figure 80. Effects of notoginsenoside Fe (Fe) on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. Fe were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. (A) The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope. (B) Total melanin content was quantified using a spectrometer. For measurement of tyrosinase activity, 250 μg of total protein was incubated with L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (final 0.5 mM) and then quantified using a spectrometer. Each value is expressed a mean \pm SD of triplicate determinations.

- 이들 결과들을 in vivo모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다 (Figure 10). Fe를 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 결과를 보였다. 제브라피쉬의 멜라닌 생합성 저해 실험에서 사용되는 대표적인 양성대조군인 PTU에 비해서는 멜라닌 함량이 높았으나, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해서는 멜라닌 함량이 약간 줄어들었다. 또한 제브라피쉬 체내에서의 tyrosinase 활성을 측정하기 위해 제브라피쉬에서 tyrosinase를 분리하여 L-DOPA를 기질로 효소 활성을 측정해본 결과 Fe 40 μM 처리한

그룹에서 22.7%의 tyrosinase 저해 활성을 보여 높은 멜라닌 저해 활성에 미치는 것을 사료된다.

바. Ginsenoside Rk2 (Rk2)의 멜라닌 합성 저해능 연구

- 인삼 부산물 유래의 single compound 중 가장 활성이 좋은 Rk2에 대한 멜라닌 합성 저해능을 연구하였다.

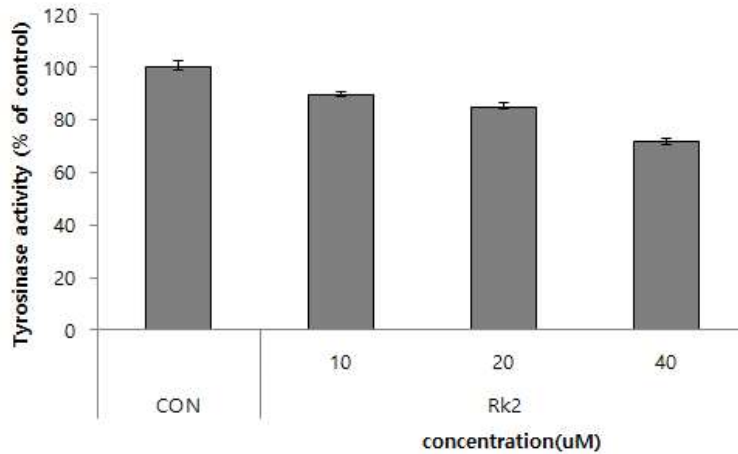


Figure 81. Effects of ginsenoside Rk2 (Rk2) on tyrosinase activity in melan-a cell. 100 µg of total protein was incubated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine and then quantified using a spectrometer. Each value is expressed a mean ± SD of triplicate determinations.

- 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성을 Rk2에 의해 세포내에서 저해하는 지를 조사하였다. 그 결과 농도 의존적으로 Rk2에 의해서 tyrosinase 활성의 저해됨을 확인하였다. 따라서 tyrosinase 활성 저해에 의해서 멜라닌 합성이 저해된다고 사료 된다.

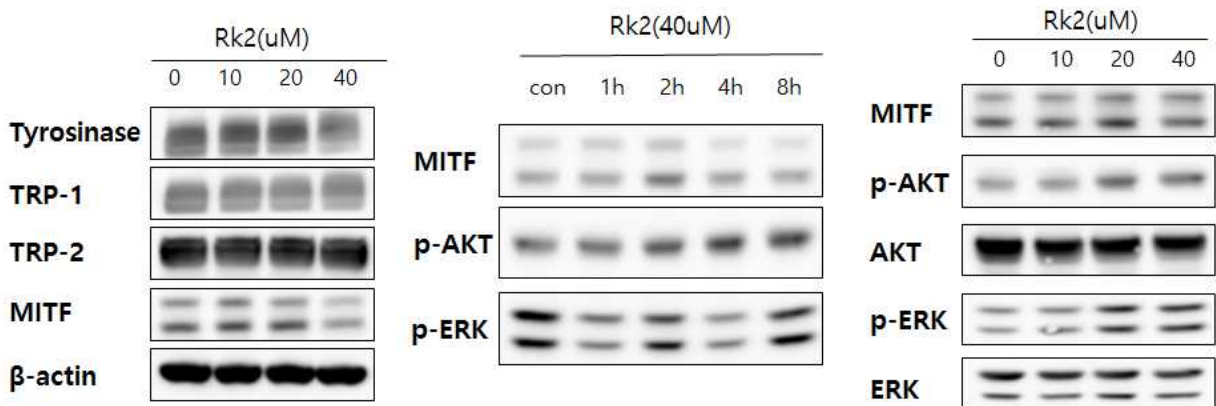


Figure 82. Effects of ginsenoside Rk2 (Rk2) on cell protein expression in melan-a

cells. The cells were cultured with 0~40 μM of Fe for 8 or 72h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-AKT, AKT, p-ERK, ERK and MITF. Equal protein loading was confirmed using β -actin antibody.

- Rk2의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 12). 먼저 melan-a 세포에 72h동안 Rk2를 처리한 후 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 조사해 본 결과, Tyrosinase와 MITF의 발현이 감소됨을 확인하였다. 멜라닌 생합성 기전을 확인하기 위해 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. Rk2를 melan-a 세포에 처리하였을 때 p-AKT와 p-ERK의 8시간 처리시 가장 높은 발현량을 관찰하여 Rk2를 농도 별 8시간 처리하였다. 그 결과 농도 의존적으로 p-AKT와 p-ERK의 농도가 증가됨을 확인하여 Rk2는 phosphorylation AKT와 ERK 두 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해 시키는 것으로 사료된다.

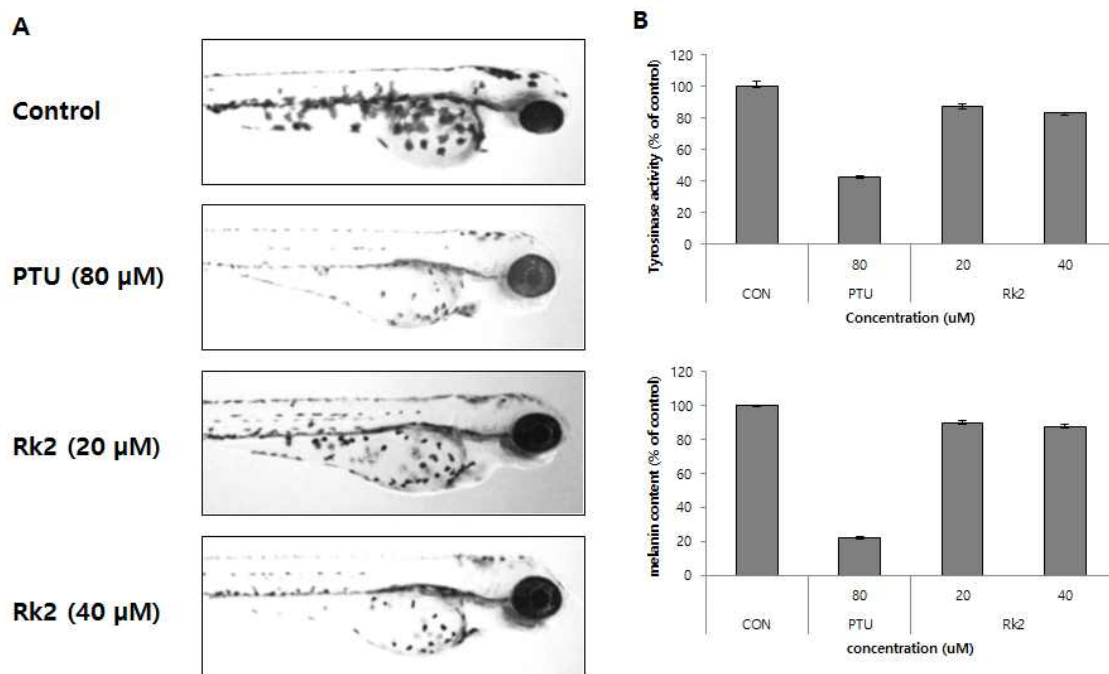


Figure 83. Effects of ginsenoside Rk2 (Rk2) on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. Rk2 were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. (A) The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope. (B) Total melanin content was quantified using a spectrometer. For measurement of tyrosinase activity, 250 μg of total protein was incubated with L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (final 0.5 mM) and then quantified using a spectrometer. Each value is expressed a mean \pm SD of triplicate determinations.

- 이들 결과들을 in vivo모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였다 (Figure 13). Rk2를 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 결과를 보였다. 또한 제브라피쉬의 멜라닌 생합성 저해 실험에서 사용되는 대표적인 양성대조군인 PTU에 비해서는 멜라닌 함량이 높았으나, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해서는 멜라닌 함량이 농도 의존적으로 감소하였으며, 제브라피쉬 체내에서의 tyrosinase 활성을 측정하기 위해 제브라피쉬에서 tyrosinase를 분리하여 L-DOPA를 기질로 효소 활성을 측정해본 결과도 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 저해 되는 결과를 보였다.

(5) 인삼 지상부 발효물의 주름관련 in vitro 효능 검증

가. 세포 생존율 시험

- 살아있는 세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소는 Tetrazolium Salt(WST)에서 formazan이라는 발색물질을 생성한다. 따라서 이를 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다. 96 well cell culture plate에 1X10⁴ cells/well 농도의 RAW264.7 세포를 seeding하고 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/ Streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24시간 배양한다. 그 후 시료가 농도별로 포함된 DMEM (1% Penicillin/Streptomycin)배지로 교체하여 24시간 배양한다. 배양이 끝난 세포에 EZ-CYTOX 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

*cell viability(%) = 시험물질 첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도×100

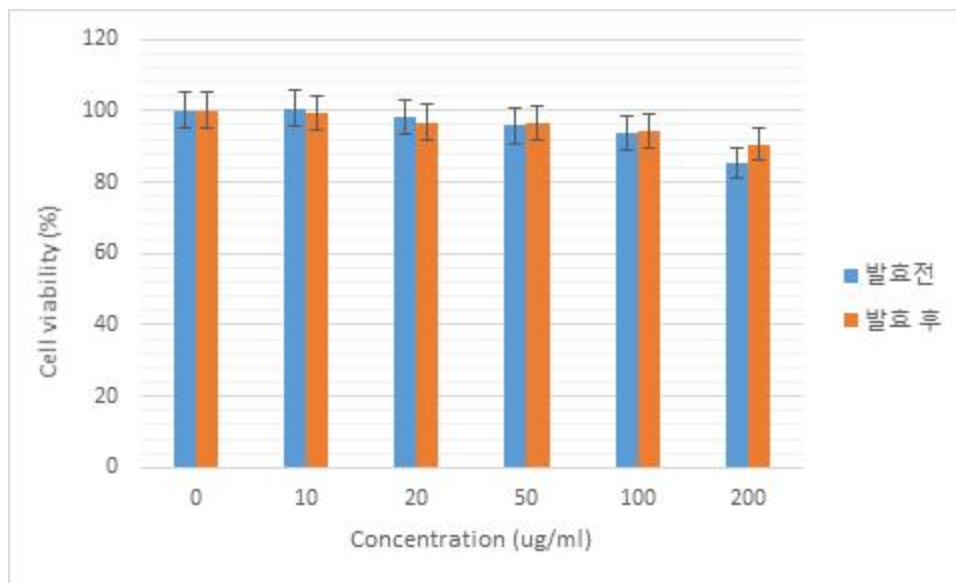


그림 85. 인삼 지상부 발효물의 세포독성

- 세포 독성농도를 분석한 결과 발효 전 후 모두 200ug/ml 까지의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않아 안전한 원료임을 확인하였다.

나. DPPH assay (항산화 분석)

- 시료의 항산화 활성 측정을 위해 DPPH 라디칼 소거활성 시험을 수행하였다. 시료를 농도별로 희석하여 준비하며, 대조군으로 Ascorbic acid를 사용한다. 각 시험 물질 50 μ l에 0.1mM DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 250 μ l, EtOH 200 μ l을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응 시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH라디칼의 농도를 확인한다.

$$\text{Free radical 소거 활성(\%)} = 100 - \frac{\text{시험물질 첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}} \times 100$$

* IC50 : DPPH라디칼 50%를 소거하는 데 필요한 시료의 농도

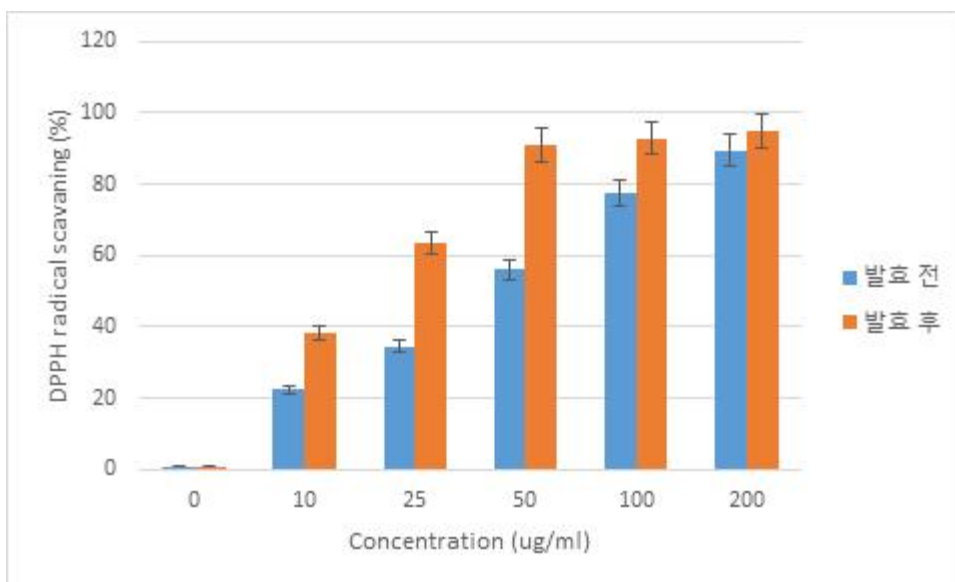


그림 86. 인삼 지상부 발효 전후의 DPPH 소거능

- DPPH 라디칼 소거활성 시험을 수행 결과 인삼 지상부의 발효 후 항산화 효과가 비약적으로 증대되는 것을 확인 할 수 있었다. 인삼 지상부 일반 추출물 또한 높은 항산화 활성을 가지는 것이 관찰 되었지만 두 처리구의 IC50값을 비교하여 볼 때 약 2배 이상의 농도 차이를 보여, 인삼 지상부를 발효 하였을때가 보다 높은 활용가치를 가지는 것으로 사료 되었다.

다. Elastase inhibition

- 엘라스타제(Elastase)는 진피 내 피부탄력을 유지시키는 데 중요한 기질인 elastin을 분해하는 효소이다. 또한 elastase는 다른 중요한 기질단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 한다고 볼 수 있다. Elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어줌으로서 주름생성의 주원인인 효소로 알려져 있다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로서 피부노화를 억제할 수 있다. 인삼 지상부 추출물 및 발효물을 농도로 희석하여 시료를 40 μ l를 E-tube에 취하고, 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 녹인 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide (S4760, Sigma) 1.6 mM 농도의 기질 200 μ l를 가한 후, 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 녹인 Elastase from porcine pancreas Type IV (E0258, Sigma) 0.4U/mL의 효소를 40 μ l 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 후 Multi-reader기를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$*Elastase\ inhibition(\%) = 100 - (\text{시험물질 첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

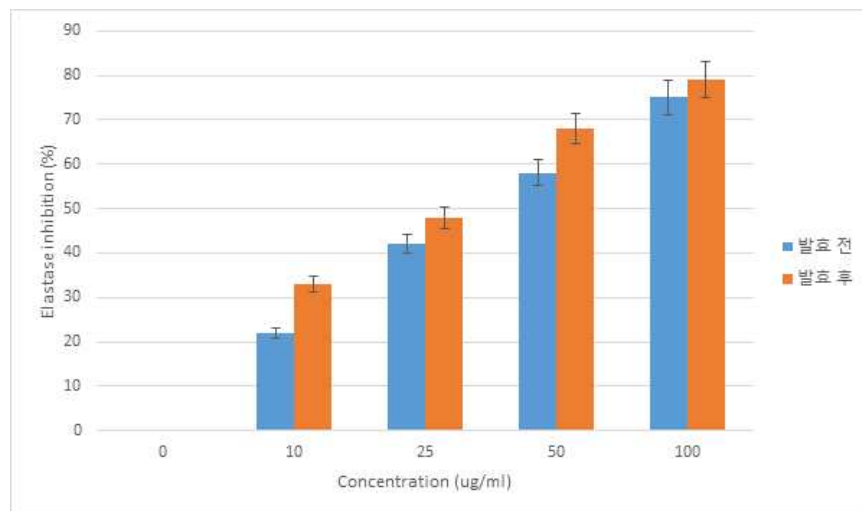


그림 87. 인삼 지상부 발효 전후의 Elastase inhibition 활성

- Elastase 억제 시험을 수행 결과 인삼 지상부 추출물 및 발효물 모두 농도 의존적으로 항주름 활성이 증대되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 10ug/ml 농도 하에서는 발효 후 샘플이 발효 전에 비하여 약 30% 이상 활성이 증대되는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 인삼 지상부 추출물의 발효 시 항주름 활성이 증대되는 것을 확인 할 수 있었다.

라. Nitric Oxide test

- RAW264.7 세포를 24well cell culture plate에 2×10^5 cells/well 농도로 seeding 한 후 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/ Streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24시간 배양한다. 그 후 lipopolysaccharide(LPS, 1ug/ml)와 시료가 농도별로 포함된 DMEM (1% Penicillin/Streptomycin) 배양액으로 교체하여 24시간 배양한다. 배양이 끝난 후 세포 배양액만 수거하여 Nitric Oxide Detection kit (intron 21021) 시약을 이용하여 NO 생성량을 산출하였다.

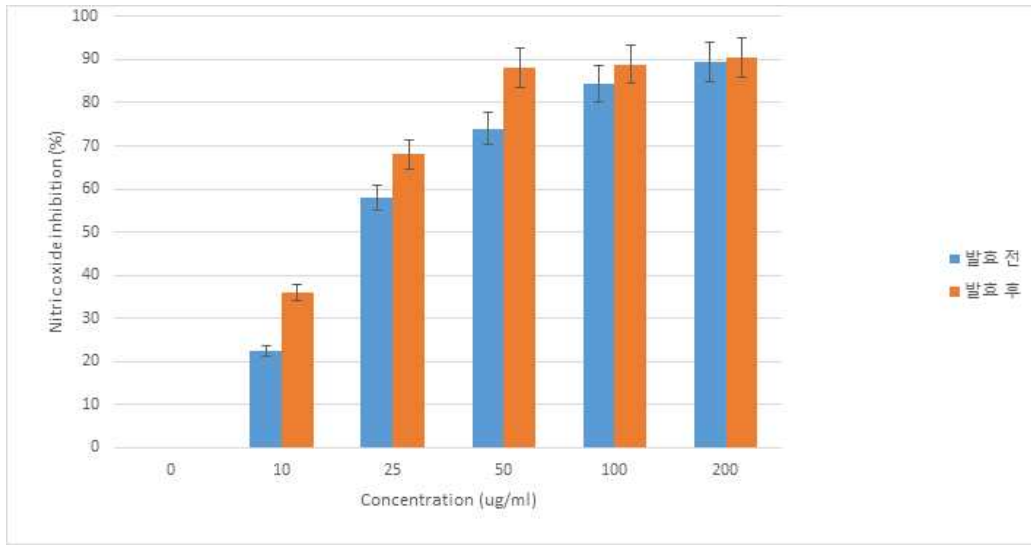


그림 88. 인삼 지상부 발효 전후의 NO inhibition 활성

- 시험 결과 10ug/ml 농도에서부터 NO 저해 효과가 관찰되었다. 특히, 발효 시에는 저 농도를 사용 하였을 때도 뛰어난 억제 효과를 보여 기존의 positive control로 사용 되는 dexamethasone 5uM의 효과와 유사한 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 이에, 발효시 효능 증대 효과로 인하여 저농도의 사용으로도 높은 활성을 기대할 수 있다.

마. MMP-1 Assay

- 인삼 지상부 추출물의 발효 전·후의 주름 억제 활성을 확인하기 위하여, MMP-1에 대한 assay 실험을 진행하였다. UVA의 조사에 의하여 발현되는 MMP-1의 억제 활성을 Real-time PCR을 통하여 확인 하였으며, 인삼 열매 발효 추출물을 농도별로 조제하여 처리함으로써 MMP-1의 억제 활성에 영향을 주는지 확인하였다.

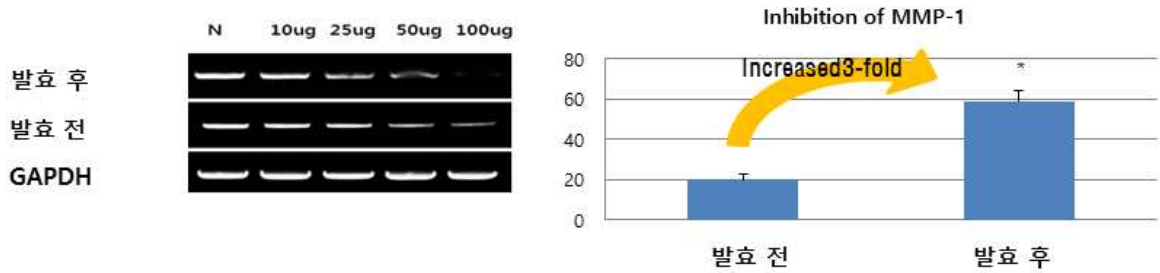


그림 90. 인삼 지상부 발효물의 MMP-1억제 활성 평가

- 그 결과, 인삼 지상부 추출물의 발효 전·후 비교시 발효를 통한 샘플이 MMP-1 억제 활성이 보다 뛰어난 것을 확인 할 수 있었다.

바. Procollagen Type I C-peptide(PIP) Assay

- Collagen들은 세포내에서 Procollagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포외로 분비되어 collagen 섬유로 중합된다. procollagen은 아미노 말단과 카르복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드염기서열을 포함하고, 프로펩티드는 endopeptidase에 의해 분리된다.
- 본 실험에서 시료가 인체 진피 섬유아세포의 procollagen 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 인삼 지상부 추출물을 hFF 세포에 각각의 농도로 처리하고 24시간 배양 후 Procollagen Type I C-peptide(PIP) kit인 96well plate에 각각 농도별로 처리한 배양액을 100 μ l씩 분주해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에 넣고 2시간동안 반응시켜주었다. 그리고 D-PBS로 세척해준 뒤, antibody-POD conjugate solution을 각각 100 μ l씩 분주해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에 넣고 1시간동안 반응시켜주었다. 다시 D-PBS로 세척해준 뒤, substrate solution (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)을 각각 100 μ l씩 분주해주고 상온에서 15분간 반응시켜주었다. 15분 뒤, multi-reader기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. procollagen 양을 조사한 결과는 그림과 같다.

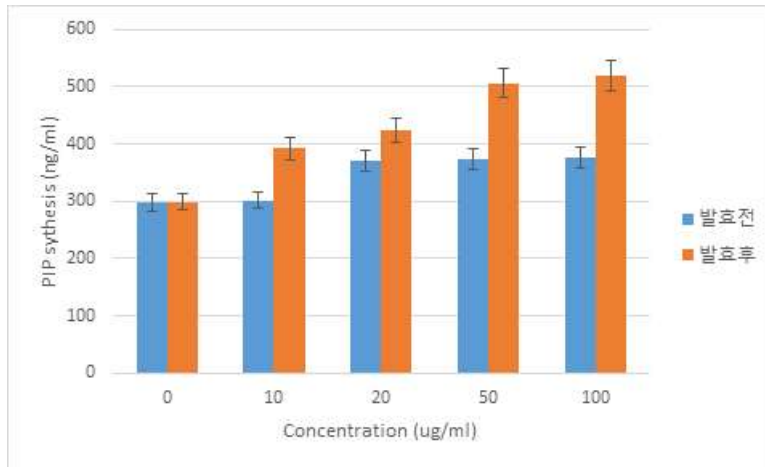


그림 91. 인삼 지상부 추출물의 발효 전,후 콜라겐 생성 활성 결과.

- 인삼 지상부 추출물의 발효 전·후 비교시 발효를 통한 샘플이 collagen 생합성에도 훨씬 높은 콜라겐 생성 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 발효 전·후의 직접 비교시 인삼 지상부 추출물의 발효 후가 발효 전보다 약 58%이상의 콜라겐 생합성 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 일반적으로 인삼 뿌리에서 존재하는 발효 전의 major ginsenoside 보다 발효 후 생성되어지는 minor ginsenoside에서 보다 좋은 주름 억제효과가 있었다는 기존의 연구 결과와 유사한 결과로 인삼 뿌리 뿐 아니라 인삼 지상부에서도 발효를 통해 전환된 minor ginsenoside에 의하여 주름에 보다 뛰어난 효과를 가지는 것으로 보여주는 결과이다. 이를 통해 발효 인삼 지상부는 기존의 화장품 소재로 이용되는 인삼 뿌리와 더불어 높은 경쟁력을 갖출 수 있는 소재로 이용 할 수 있을 것으로 판단된다.

(6) 인삼 잎/줄기/열매 발효물의 화장품 소재 등록 및 임상시험

. 인삼 지상부 발효물 원료화를 위한 ICID 등재

- 인삼 지상부 발효물의 화장품 원료화를 위해서는 ICID 등재가 우선시 되어야하며, 이를 위해 PCPC에 화장품 원료로서 인삼 지상부 발효물을 등록 완료 하였다.



그림 92. 인삼 지상부 발효물의 ICID 등재 서류

(7) 인삼지상부를 이용한 화장품 시제품 개발

가. 인삼 발효 추출물을 이용한 크림 제형 제조

- 본 연구를 통하여 확보된 인삼 지상부 발효 추출물을 이용하여 실제 크림에 적용하고 이의 안정성과 효능을 평가하고자 하였다. 실험군으로 인삼 발효 추출물이 첨가된 크림을 대조군으로 인삼 추출물을 첨가한 크림을 각각 제조하여 실험에 이용하였으며 각각에 이용된 제조 처방은 다음과 같다.

표 19. 실험에 이용된 인삼 지상부 발효 추출물 크림 제조 처방

	Trade Name	INCI	함량%
A	MYRJ52S	PEG-40 Stearate	0.60
	Rheodol AS-10	Sorbitan Strearate	0.60
	GMS 105	glyceryl Strearate	2.00
	Rheodol MS-165	Glyceryl strearate/PEG-100 stearate	2.00
	Kalcol 6870	Cetearyl alcohol	1.40
	Stearic acid	Stearic acid	2.00
	C.E.H	Cetyl Ethyl Hexanoate	6.00
	Rheodol AO-15	Sorbitan sequioleate	3.00
	Vitamin E acetate	Tocopheryl Acetate	0.05
	Soya SPL-75H	Hydrogenated soybean Lecthin	0.10
A-1	KF-96-10CS	Dimethicone	3.00
B	D.I Water	Water	46.00
	D-EDTA	EDTA	0.05
	1.3-Butylene glycol	Butylene glycol	3.00
	Glycerin	Glycerin	2.00
C	1% sodium hyaluronate	Sodium hyaluronate	5.00
	1% carbopol	Carbomer	20.00
D	D.I water	Water	2.00
	T.E.A	Trietanolamine	0.20
E	인삼 발효 추출물		1.00

표 20. 실험에 이용된 대조군 크림 제조 처방

	Trade Name	INCI	함량%
A	MYRJ52S	PEG-40 Stearate	0.60
	Rheodol AS-10	Sorbitan Strearate	0.60
	GMS 105	glyceryl Strearate	2.00
	Rheodol MS-165	Glyceryl strearate/PEG-100 stearate	2.00
	Kalcol 6870	Cetaryl alcohol	1.40
	Stearic acid	Stearic acid	2.00
	C.E.H	Cetyl Ethyl Hexanoate	6.00
	Rheodol AO-15	Sorbitan sequioleate	3.00
	Vitamin E acetate	Tocopheryl Acetate	0.05
	Soya SPL-75H	Hydrogenated soybean Lecthin	0.10
A-1	KF-96-10CS	Dimethicone	3.00
B	D.I Water	Water	46.00
	D-EDTA	EDTA	0.05
	1.3-Butylene glycol	Butylene glycol	3.00
	Glycerin	Glycerin	2.00
	1% sodium hyaluronate	Sodium hyaluronate	5.00
C	1% carbopol	Carbomer	20.00
D	D.I water	Water	2.00
	T.E.A	Trietanolamine	0.20
E	인삼 추출물		1.00

- 공정 방법은 A,B를 각각 Water bath에 증탕하여 용해하고 A의 용해가 완료된 후 A-1 계량하여 혼합 후 가온 용해한다. B를 용해 하여 Homomixer로 혼합하여 C를 첨가한다. 80℃에서 A를 첨가하여 혼합하고 55℃에서 D를 첨가한다. 마지막으로 45℃이하에서 E를 첨가하여 실험군을 제조하고 인삼 추출물을 첨가한 것을 대조군으로 하였다.

나. 인삼 지상부 발효 추출물이 첨가되어진 크림의 안정성 확인

- 제형을 1g을 정밀하게 달아 D.W 25ml을 이용하여 희석하고 이에 동량의 부탄올을 첨가하여 mixing 한 후 부탄올 증만 분획하였으며 이 과정을 2회 반복하였다. 얻어진 부탄올은 감압 농축하여 다시 HPLC grade MeOH에 용해 시킨 후 이를 filtering 하여 분석 시료로 이용하였다. 이는 제조 일로부터 약 6개월간 ginsenoside 함량 안정도를 분석했으며, HPLC 분석은 인삼 산업법에서 고시한 방법을 통해 진행하였다. 본 연구를 통하여 확보된 인삼 발효 추출물을 이용하여 실제 크림에 적용하고 이의 안정성과 효능을 평가하고자 하였다. 실험군으로 인삼 발효 추출물이 첨가된 크림을 대조군으로 인삼 추출물을 첨가한 크림을 각각 제조하여 실험에 이용하였다. 인삼 발효 추출물을 이용하여 제형에 적용되었을 때 저장 기간에 따라 인삼 ginsenoside의 분해 등의 변화가 있는지 안정성을 검사 한 결과 6개월 까지 제형이 안정한 것을 확인하였다. 제조일로부터 약 6개월이 지난 인삼 발효 추출물 함유 크림에 들어있는 ginsenoside가 일정하게 유지 되는 것을 확인할 수 있다. 이를 제조직후 대비하여 함량(%)을 계산하여 표에 나타내었다.

표 21. Ginsenoside의 HPLC 함량 분석 raw data

시간	표준품 대비 함량비 (%)		
	F1	C-K	Rg2
제조 직후	100	100	100
3개월 경과 후	99.7	99.8	100.2
6개월 경과 후	100.5	100.7	100.4

- 분석 결과 초기~6개월까지의 안정성에 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. Ginsenoside F1, C-K의 경우 99% 대의 제형 안정성을 보여 주었고 변환 Ginsenoside인 Rg2의 경우에서도 99%의 높은 안정성을 보여 본 개발 원료가 장기간의 보관에도 안정적임을 확인하였다.

다. 마스크팩 제품 개발

□ 시제품 및 인삼원료가 첨가된 액상 개발

- 본 과제기간동안 인삼을 이용한 액상 2건을 개발하여 이것을 시제품 2종에 적용하여 시제품 2종을 개발함.

1) Gold Supernova 및 Bio-Goldginseng을 이용한 액상 개발

- 마스크팩의 실제 효능을 결정하는 액상을 (주)지에프씨에서는 인삼 원료를 이용하여 두가지의 원료로 구분지어 개발함

- Gold Supernova : 항산화와 항주름 기능이 강화된 원료 기능성을 강조
- Bio-Goldginseng : 항산화와 미백효능을 강조한 원료 기능성을 강조

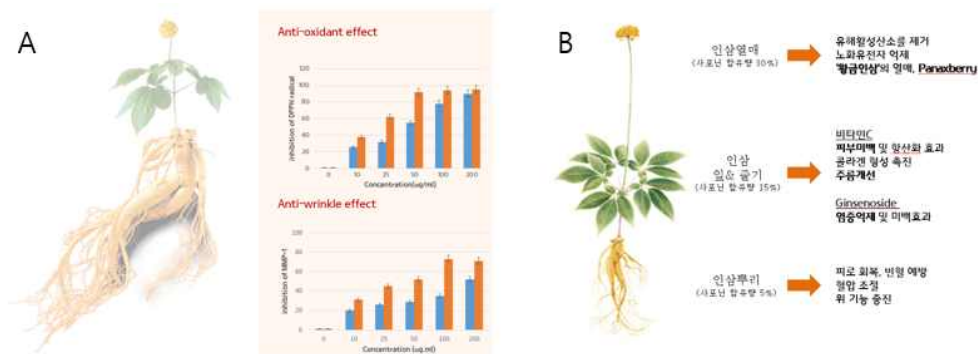


그림 93. 황금인삼을 활용한 원료 A. Gold Supernova B.Bio-Goldginseng>

2) 액상 개발

- 마스크팩의 기능성을 결정하는 액상에 다음의 처방을 기본 처방으로 하여 각각의 원료를 다양한 농도로 처리후 최적 농도인 3%로 결정하여 최적 농도로 설정하고 액상을 제조함. 그러나 차후 지속적인 품평을 통하여 사용감 개선을 위하여 수정할 예정임.

표 22. 마스크팩 액상 처방

마스크팩 액상 처방		
Ingredients	INCI Name	%w/w
Phase 1		
D.I Water	Water	65.670
D-EDTA	Disodium EDTA	0.150
Glycerin	Glycerin	5.000
D-Panthenol	Panthenol	0.100
Phase 2		
70% 1,3-BG	Butylene Glycol	2.907
원료		3.000
Phase 3		
1,3-BG	Butylene Glycol	3.000
HCO-60	PEG-60 Hydrogenated Castor Oil	0.070
Phase 4		
Sodium hyaluronate (1% aq sol.)	Water, Sodium hyaluronate	0.100
Phase 5		
Keltrol F (1% aq sol.)	Water, Xanthan gum	20.000
Total		100.00

3) 시제품 제조

- (주) 지에프씨는 개발된 액상을 바탕으로 실제 마스크팩에 적용하여 시제품을 개발을 위하여 (주)엔코스를 통하여 시제품 제작을 위탁함. 개발된 액상을 바이오셀룰로오스 마스크팩에 적용하고 다양한 마스크시트에 적용하여 샘플화를 진행함.



그림 94. 다양한 형태의 시제품 진행

4) 개발된 시제품의 사용감 품평 진행

마스크팩은 사용 시 사용감과 시트의 착용감이 매우 중요한 제품임. 따라서 개발된 액상을 적용한 마스크팩 시제품을 실제 사용 후 사용감을 자체 기준 내에서 품평함.

- 실시 예 : 바이오셀룰로오스 시트를 사용하여 피부와 시트의 밀착력이 매우 높으며 이로 인해 사용 후 액상의 잔여도가 매우 낮음.



그림 95. 마스크팩 시제품 및 액상 사용 전후.

- 마스크팩 사용 품평 : 실제 15분이상 피부와 접촉하는 마스크팩의 사용 특성상 사용자에 따른 품평이 매우 중요함. 따라서 5명의 사용자를 바탕으로 사용감을 품평함. 바이오셀룰로오스 시트는 사용 시 특유의 답답함을 느낄수 없었으며 밀착도가 높아 사용감을 모두 좋은 평가를 함. 액상 역시 사용 후 흡수도가 높아 잔존감을 많이 느낄수 없었으며 자극도가 낮았다표 품평함. 단 향의 경우 인삼원료를 사용하여 인삼향이 느껴지는데 이것은 선호도의 차이가 생길 수 있을 것 품평함.

라. 임상시험을 위한 발효 인삼 소재 함유 크림제품 제품 개발

본 연구를 통하여 확보된 인삼 발효 추출물을 이용하여 실제 크림에 적용하고 이의 안정성과 효능을 평가하고자 하였다. 인삼 발효 추출물을 이용하여 제형에 적용되었을 때 저장 기간에 따라 인삼 ginsenoside의 분해 등의 변화가 있는지 안정성을 검사 한 결과 6개월 까지 제형이 안정한 것을 확인하였다.

<표24> 임상시험용 시제품의 처방

	Trade Name	INCI	함량%
A	MYRJ52S	PEG-40 Stearate	0.60
	Rheodol AS-10	Sorbitan Strearate	0.60
	GMS 105	glyceryl Strearate	2.00
	Rheodol MS-165	Glyceryl strearate/PEG-100 stearate	2.00
	Kalcol 6870	Cetearyl alcohol	1.40
	Stearic acid	Stearic acid	2.00
	C.E.H	Cetyl Ethyl Hexanoate	6.00
	Rheodol AO-15	Sorbitan sequioleate	3.00
	Vitamin E acetate	Tocopheryl Acetate	0.05
	Soya SPL-75H	Hydrogenated soybean Lecthin	0.10
A-1	KF-96-10CS	Dimethicone	3.00
B	D.I Water	Water	46.00
	D-EDTA	EDTA	0.05
	1,3-Butylene glycol	Butylene glycol	3.00
	Glycerin	Glycerin	2.00
	1% sodium hyaluronate	Sodium hyaluronate	5.00
C	1% carbopol	Carbomer	20.00
D	D.I water	Water	2.00
	T.E.A	Trietanolamine	0.20
E	인삼 발효 추출물		1.00

위의 표에 따른 임상시험용 화장품(크림타입)의 시제품을 제조하였으며, 이때의 인삼 발효물은 3협동 기관에서 대량 생산한 발효 인삼 농축물을 활용하였다.



<그림96> 임상시험용 크림 시제품의 생산

본 연구에서는 위의 크림을 이용하여, 개발된 인삼 발효물에 대한 주름 개선에 대한 비교시 기능성을 식약처로부터 인증받을 계획이며 이를 위하여 3차년도에 주름개선 및 피부 안정성을 위한 임상시험을 실시하였다.

가. 피부 자극테스트

인삼발효물을 함유한 크림을 8시간 동안 피부에 첩포 후 각각 30분, 24시간, 48시간 경과 후 시험부위의 피부자극 여부를 판정하였으며 일차 자극 테스트 결과 피험자 모두 피부자극을 나타내지 않았으며, 이는 ‘무자극’ 물질로 판단된 것을 확인 할 수 있었다.

Table 5. 첩포시험(Patch Test) 결과

No.	Initial	제품명	다트바실러스/인삼발효과물 함유크림		
			30분 후	24시간 후	48시간 후
1	JYS	-	-	-	-
2	MIS	-	-	-	-
3	JOS	-	-	-	-
4	JSY	-	-	-	-
5	KSH	-	-	-	-
6	LGM	-	-	-	-
7	KSJ	-	-	-	-
8	LSJ	-	-	-	-
9	KJW	-	-	-	-
10	IYS	-	-	-	-
11	KSB	-	-	-	-
12	JEJ	-	-	-	-
13	JMS	-	-	-	-
14	YJO	-	-	-	-
15	YJW	-	-	-	-
16	JMR	-	-	-	-
17	HSB	-	-	-	-
18	PYO	-	-	-	-
19	KSM	-	-	-	-
20	PHJ	-	-	-	-
21	CJN	-	-	-	-
22	KRA	-	-	-	-
23	KYJ-1	-	-	-	-
24	YYT	-	-	-	-
25	HGS	-	-	-	-
26	KYJ-2	-	-	-	-
27	PSY	-	-	-	-
28	OOS	-	-	-	-
29	JSM	-	-	-	-
30	LHS	-	-	-	-
	±	0	0	0	0
	+	0	0	0	0
	++	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0
Mean score :			0.00		
판 정			무자극		

<그림97> 임상 안정성 평가

나. 피부 주름 개선 효능 테스트

준비 단계

시험 부위인 안면(눈가) 부위의 주름을 측정하기 위하여 피험자들의 측정 조건을 동일하게 하고자 시험 부위를 깨끗하고 마른 상태를 유지 하였으며 최소 30분간 항온항습($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, R.H. 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정을 취한 후 진행하였다.

측정 단계

눈가 주름 측정

주름 측정은 PRIMOS(Phaseshift Rapid In-vivo Measurement Of Skin)를 이용하여 눈가 부위를 측정하였고, 시험 부위에 대한 정확한 재현성을 위해 기존 측정부위와 새로운 측정부위가 동일할 수 있도록 overlay 기능을 사용하여 측정하였다.

PRIMOS는 미세주름을 측정하기 위한 장비로 DMD(Digital Micromirror Device)에서 만들어진 미세한 줄무늬(fringe fraction)가 피부에 투영된다. 투영된 영상은 3차원 profile 정보로 나타나며 필터과정을 통해 PRIMOS프로그램(GFM, Germany)으로 분석된다.

PRIMOS 분석 변수로는 Ra와 R3z를 선정하였다.

- Ra(Arithmetic roughness average)

PRIMOS로 측정된 주름의 거칠기 단면 peak에 대한 산술 평균값으로 Ra값이 작아질수록 피부 주름의 깊이가 낮아져 주름이 개선됨을 의미하며, 단위는 μm 이다.

- R3z(Base roughness depth)

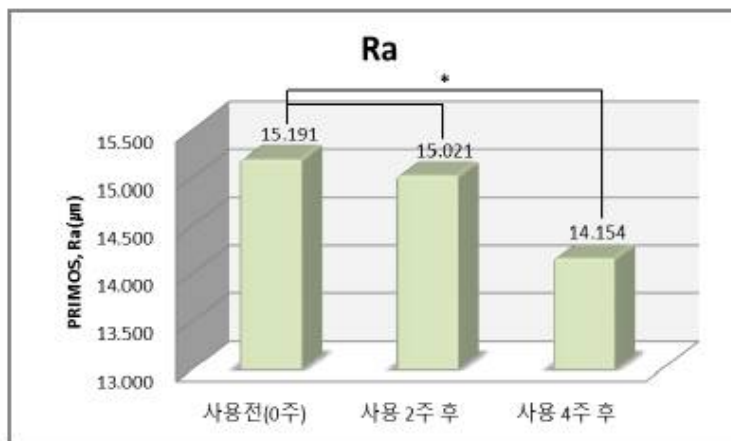
R3z는 R3z1부터 R3z5까지 5가지의 단일 거칠기 깊이에 대한 산술 평균으로 나타낸다. 단일 거칠기 깊이는 거칠기 단면의 단일 평가 거리(Ir)에서 세번째로 높은 단면 peak과 세번째로 깊은 곡선 사이의 수직거리를 의미한다. R3z의 값이 작아질수록 피부의 주름 깊이가 낮아짐을 의미하며 주름 개선이 되었음을 의미한다. 단위는 μm 이다.

Table 4. 통계학적 분석 결과

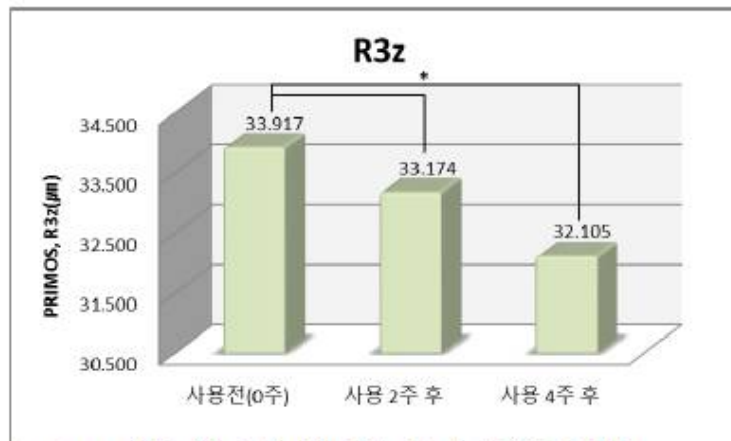
		Ra	R3z
p-value	사용 2주 후	0.448($p > 0.05$)	0.060($p > 0.05$)
	사용 4주 후	0.000($p < 0.05$)	0.008($p < 0.05$)

시험 제품 사용 후 눈가 주름 측정 결과를 정리하면 Fig. 3 과 같다.

Fig. 3 시험 제품 사용 후 눈가 주름 변화(단위: μm)



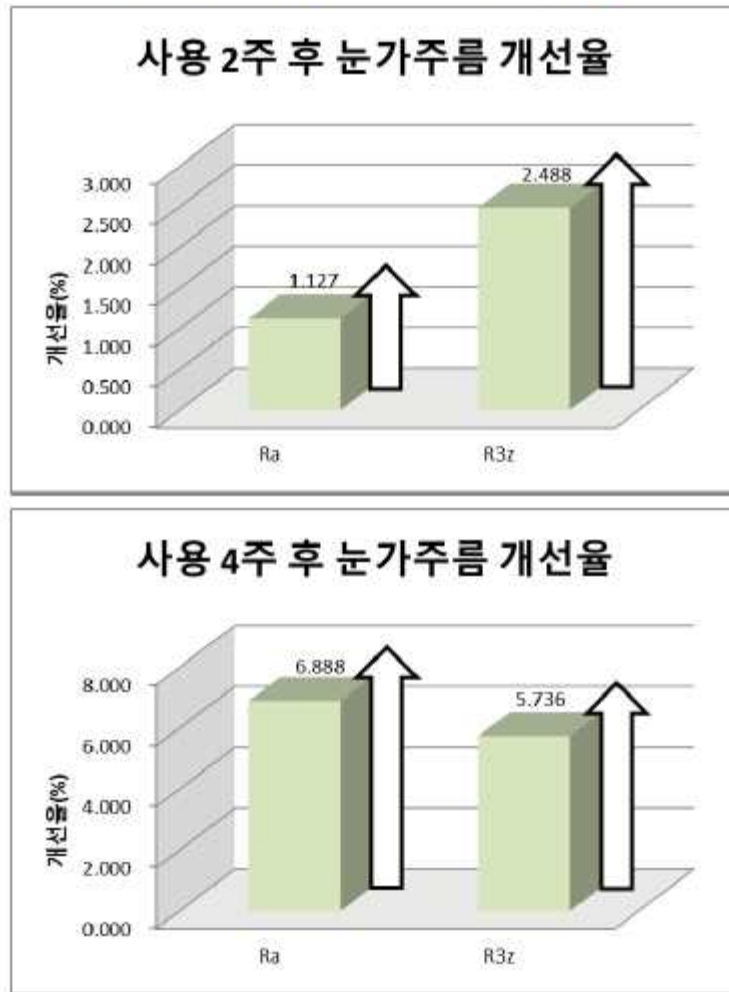
* $p < 0.05$ 제품 사용 전과 사용 후를 비교한 통계적 유의성



* $p < 0.05$ 제품 사용 전과 사용 후를 비교한 통계적 유의성

<그림98> 임상 주름 개선

Fig. 4 시험 제품 사용 후 눈가 주름 개선율(단위: %)

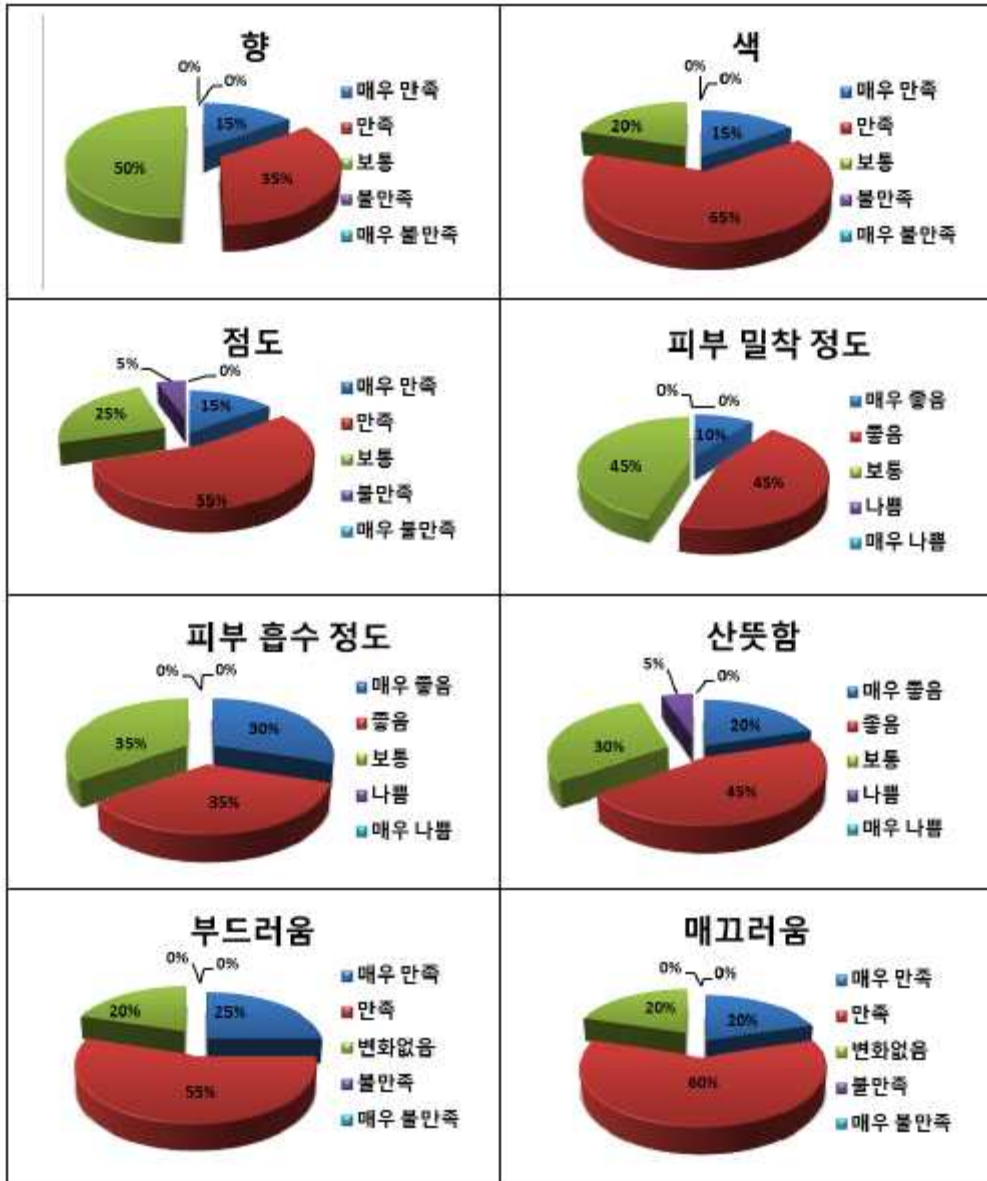


시험 제품은 제품 사용 전(0주)과 비교하여, 제품 사용 2주 후 Ra 1.127%, R3z 2.488%, 제품 사용 4주 후 Ra 6.888%, R3z 5.736%의 개선율을 확인하였다.

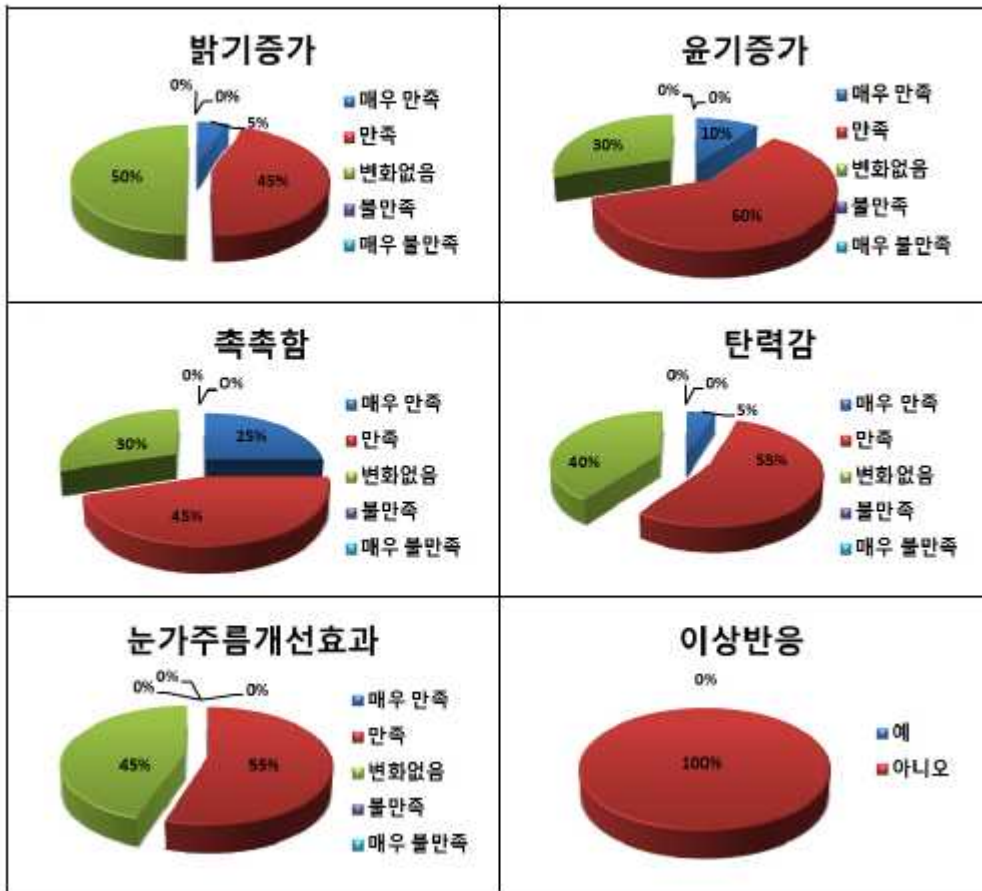
<그림99> 임상 주름 개선

같다.

Fig. 6 효과에 대한 설문 결과



<그림100> 임상 효능 설문 조사결과



<그림101> 임상 효능 설문 조사결과

그 결과, 시험 제품 사용 전후에 따라 눈가 주름에 변화가 있음을 확인할 수 있었다. 변수 Ra는 제품 사용 전(0주) 15.191 μ m에서 제품 사용 2주 후 15.021 μ m, 제품 사용 4주 후 14.154 μ m로, R3z는 제품 사용 전(0주) 33.917 μ m에서 제품 사용 2주 후 33.174 μ m, 제품 사용 4주 후 32.105 μ m로 수치 변화를 확인 할 수 있었으며, 시험 제품의 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 4주 후 Ra, R3z 모두에서 통계적으로 유의한 수준의 눈가 주름 개선 효과를 나타내었다(p<0.05). 또한 시험 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후 Ra 1.127%, R3z 2.488%, 제품 사용 4주 후 Ra 6.888%, R3z 5.736%의 눈가 주름 개선율을 나타내었다. 피부자극평가는 피험자에 의한 자가 평가 및 연구자의 육안평가를 토대로 실시하였으며, 그 결과 제품에 대한 이상반응은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 “락토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”은 눈가 주름 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다(p<0.05).

5. 흑삼 및 인삼열매의 화장품 소재 개발

(1) 가공인삼(흑삼), 인삼열매(금풍), 발효인삼열매(금풍) 추출물 및 지표성분의 미백효능 검증

미백효능을 검증하기 위하여 mushroom tyrosinase activity 및 melan-a세포를 이용하여 *in vitro* 효능을 검증하였으며, *in vitro*상에서의 세포증식과 멜라닌 합성에 미치는 각각 single compound와 extracts의 효능은 아래와 같음.

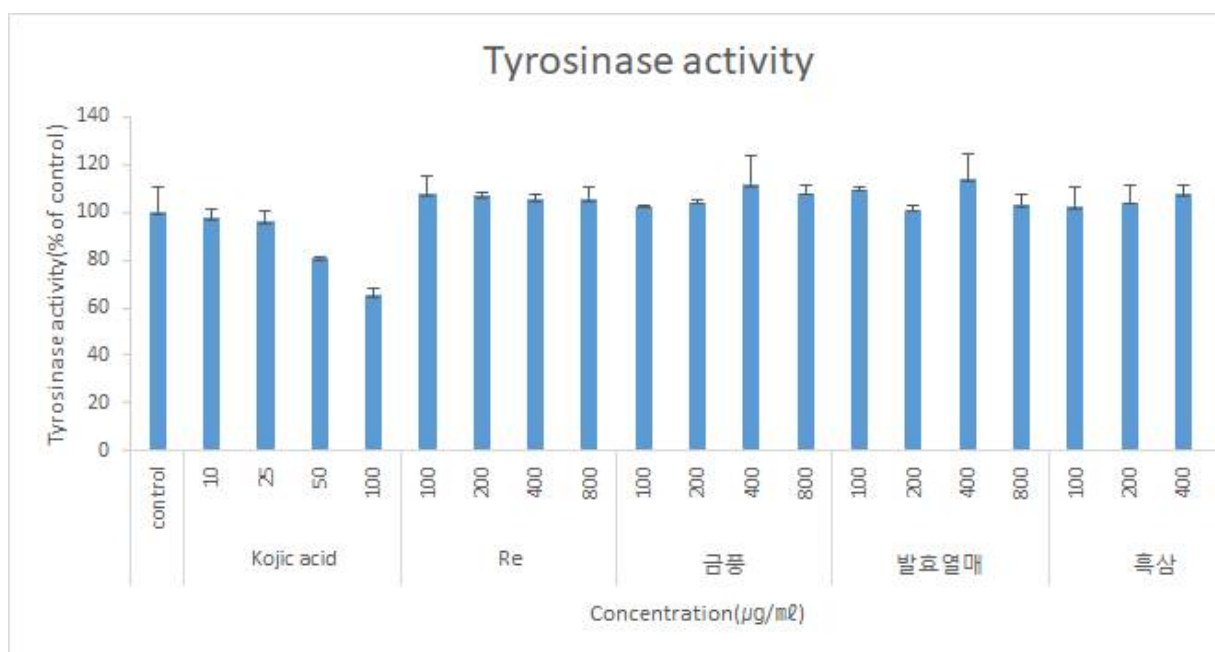


그림. 가공인삼, 인삼열매(금풍), 발효인삼열매(금풍) 추출물 및 지표성분의 티로신억제 활성

Single compound와 extract에 대한 mushroom tyrosinase의 저해 활성을 검증한 결과, 양성대조군인 kojic acid는 저해 활성을 보였지만 모든 single compound와 extract는 mushroom tyrosinase에 대한 저해 활성을 나타내지는 않았음.

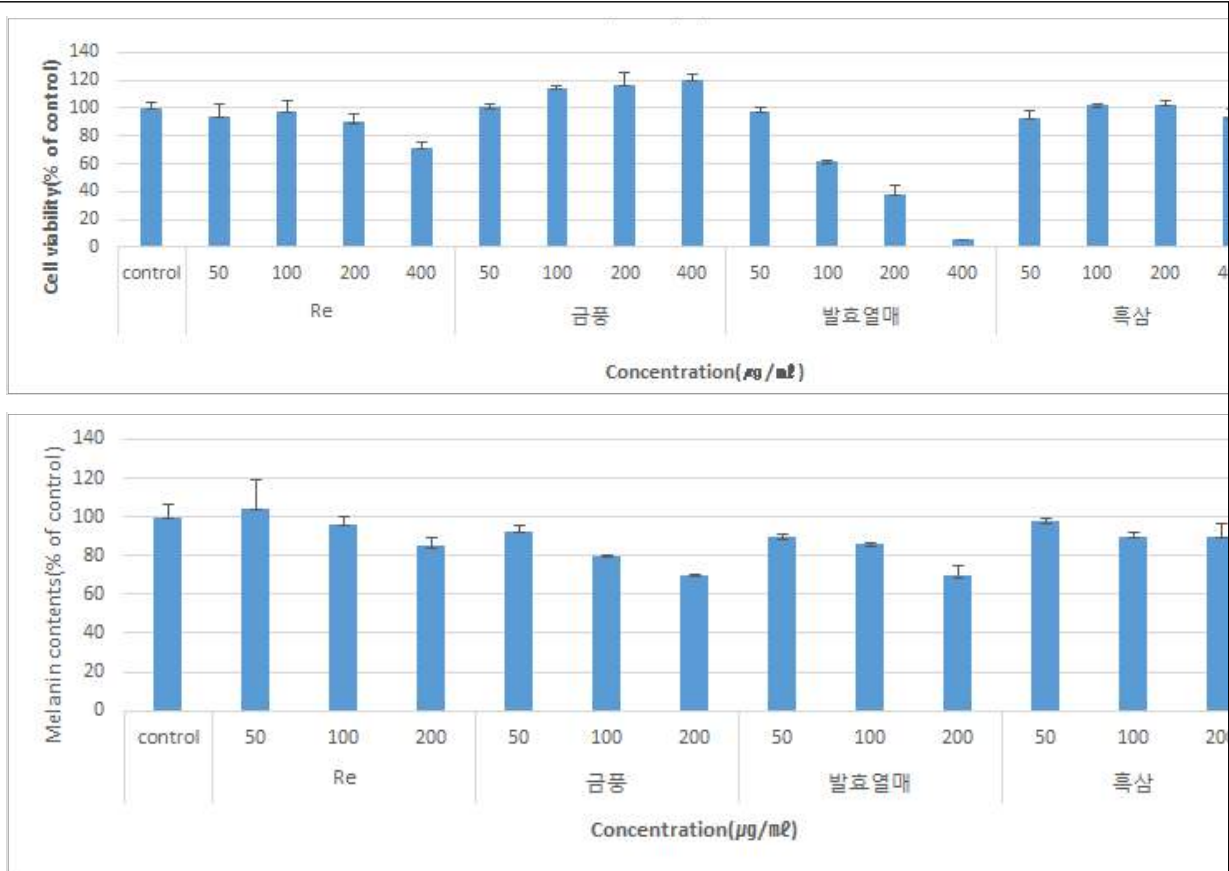


그림. 진세노사이드 Re, 금풍, 발효인삼열매, 흑삼의 멜라닌 억제활성

발효열매는 100 µg/ml의 농도에서 독성을 나타내었고, Re는 400 µg/ml의 농도에서 Melan-a 세포에 독성을 나타내었음. Melan-a 세포를 이용한 멜라닌 합성 저해 연구에서는 모든 시료에서 농도 의존적으로 멜라닌의 합성이 감소됨을 보여 주었음. 특히 금풍은 200 µg/ml의 농도에서 29.8 %의 멜라닌 합성 저해 능을 나타내었고 발효열매 200 µg/ml에서의 저해효과는 독성으로 인한 효과라 사료됨. 따라서 발효열매를 제외한 Re, 금풍, 흑삼을 이용하여 멜라닌 합성저해를 연구하였음.

(2) 흑삼의 멜라닌 합성 저해효능 연구

흑삼의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 에 대한 단백질 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인 하였음. 그 결과 TRP-2와 MITF의 발현이 조금이지만 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였음.

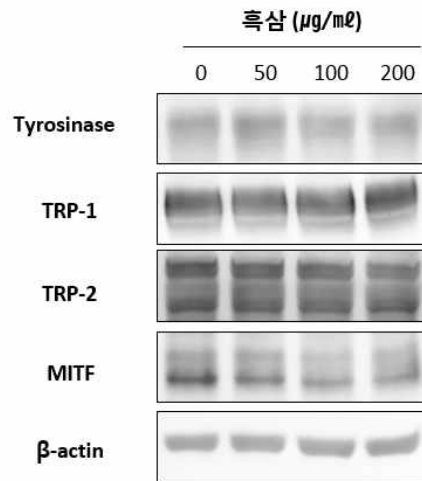


그림. 흑삼의 멜라닌 합성 단백질 저해 기전 연구

흑삼의 멜라닌 합성 저해효능을 확인하기 위해 멜라닌세포가 포함된 인공피부 모델을 사용하여 실험을 진행하였음. 흑삼을 100, 250, 500 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 멜라닌 합성 저해능이 33.8 %, 21.5 %, 21.9 %로 농도 의존적으로 감소하진 않았지만 양성대조군인 PTU를 처리한 조직보다 효능이 뛰어났으며 현미경을 통해 조직의 표면을 관찰한 결과 흑삼을 처리하였을 때 멜라닌 분포의 감소를 확인할 수 있었음.

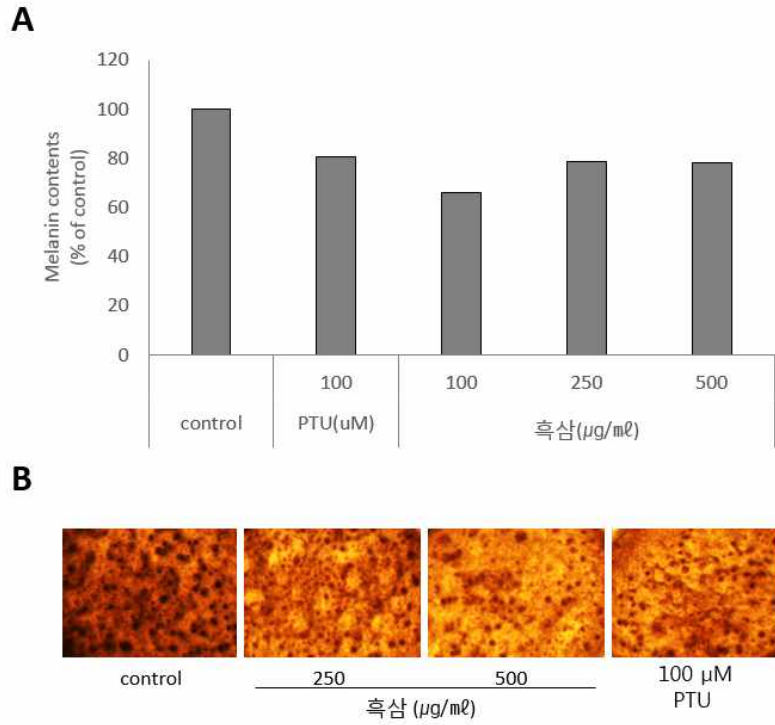


그림. 인공피부모델을 이용한 흑삼의 멜라닌 합성저해 효능

이 결과를 *in vivo* 모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아 모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였음. 흑삼의 멜라닌 생성 저해효과는 Figure 6과 같이 나타났음. 흑삼은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 감소하였지만 농도의존적인 결과는 보이지 않았음.

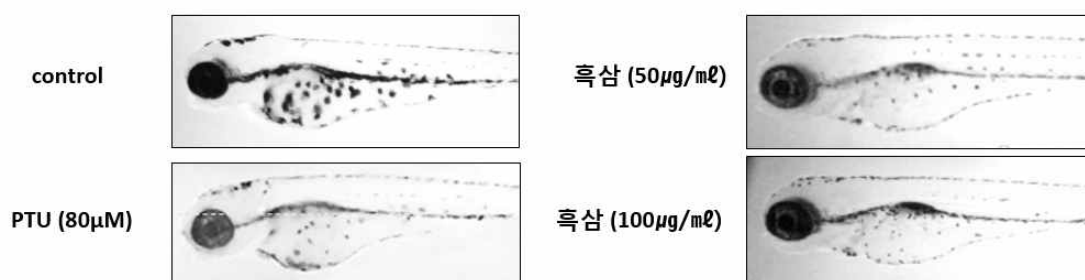


그림. 제브라피쉬 배아 모델을 이용한 흑삼의 미백효능

(4) Ginsenoside Re (Re)의 멜라닌 합성 저해효능 연구

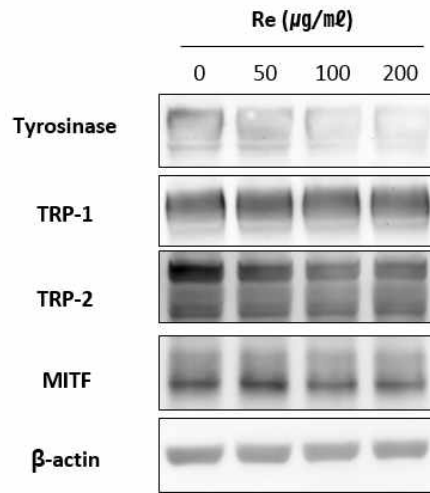


그림. 진세노사이드Re의 멜라닌 합성 단백질 저해 기전 연구

Re의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 에 대한 단백질 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인 하였음. 그 결과 Tyrosinase, TRP-2, MITF의 발현이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였음.

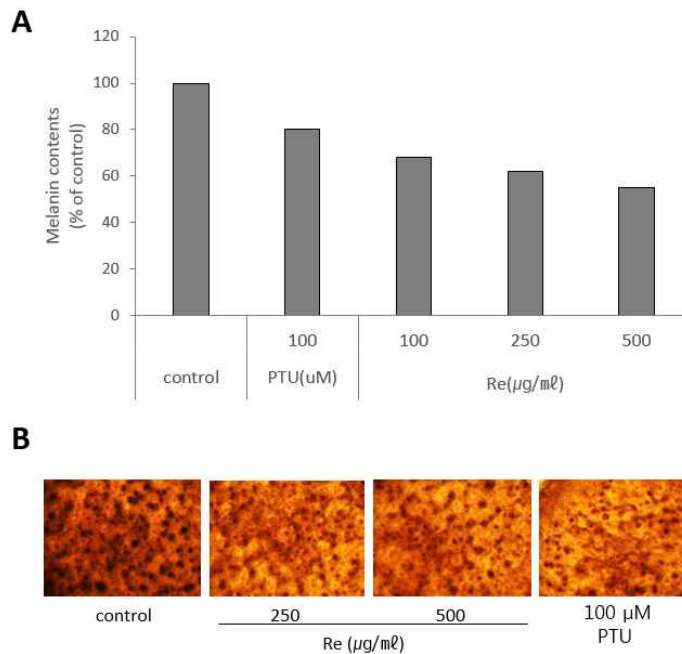


그림. 인공피부모형을 이용한 진세노사이드Re 의 멜라닌 합성저해 효능

Re의 멜라닌 합성 저해효능을 확인하기 위해 멜라닌세포가 포함된 인공피부 모델을 사용하여 실험을 진행하였음. Re를 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 멜라닌 합성 저해능이 32 %, 37.9 %, 44.7 %로 양성대조군인 PTU를 처리한 조직보다 효능이 뛰어났으며 현미경을 통해 조직의 표면을 관찰하고 Fontana-Masson으로 조직을 염색하여 멜라닌 분포를 확인한 결과 Re를 처리하였을 때 멜라닌 분포의 감소를 확인할 수 있었음. 조직학적인 변화는 H&E로 염색 된 피부 단면에서는 관찰되지 않았음.

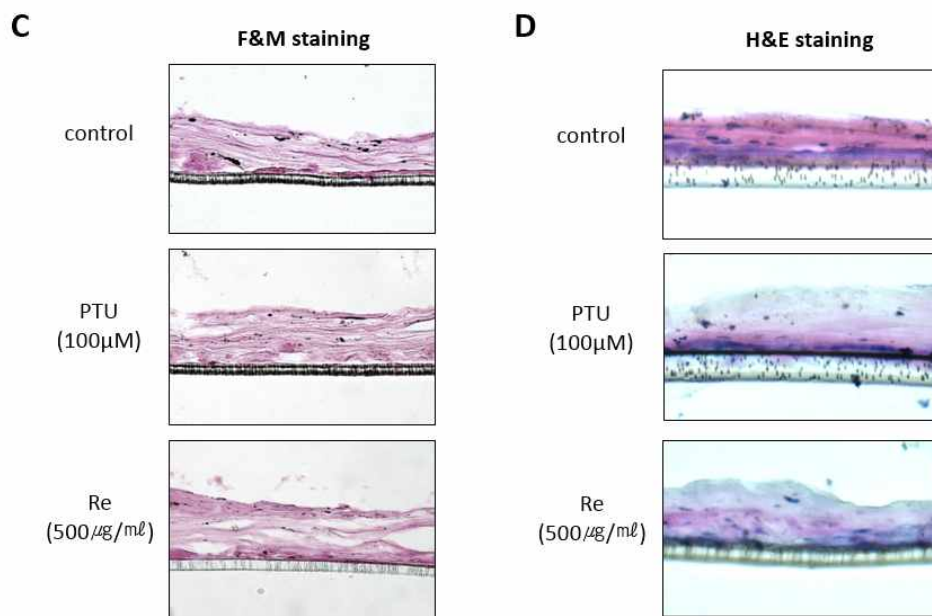


그림. Fontana-Masson으로 조직을 염색하여 멜라닌 분포 확인결과

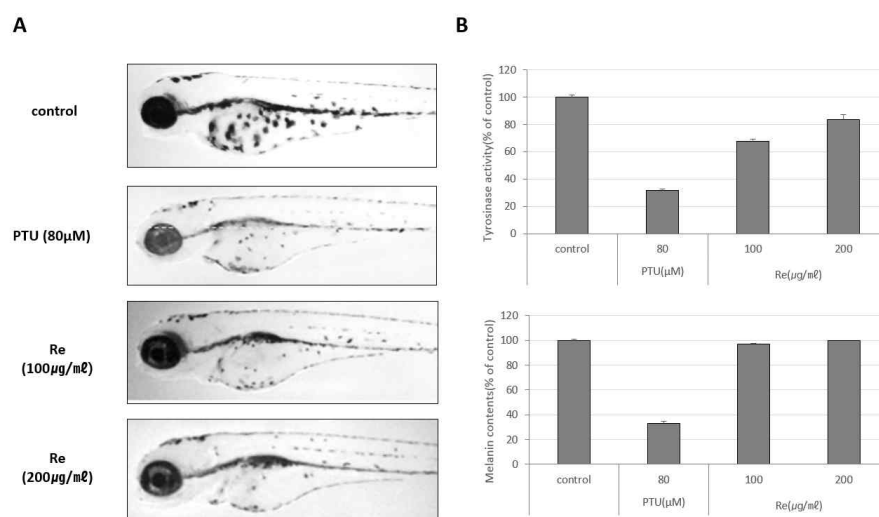


그림. 제브라피쉬 배아 모델을 이용한 진세노사이드 Re의 미백효능

이들 결과들을 *in vivo* 모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아 모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였음 (Figure 9). Re를 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 농도 의존적으로 감소되는 결과를 보였음. 제브라피쉬의 멜라닌 생합성 저해 실험에서 사용되는 대표적인 양성대조군인 PTU에 비해서는 멜라닌 함량이 높았으나 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해서는 멜라닌 함량이 약간 줄어들었음. 또한 제브라피쉬 체내에서의 Tyrosinase 활성을 측정하기 위해 제브라피쉬에서 Tyrosinase를 분리하여 L-DOPA를 기질로 효소 활성을 측정해 본 결과 Re를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 그룹에서 32.4 %의 Tyrosinase 저해 활성을 보여 높은 멜라닌 저해 활성에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

(5) 인삼열매 특이품종 금풍의 멜라닌 합성 저해능 연구

가장 활성이 우수한 금풍에 대한 멜라닌 합성 저해능을 연구하였다.

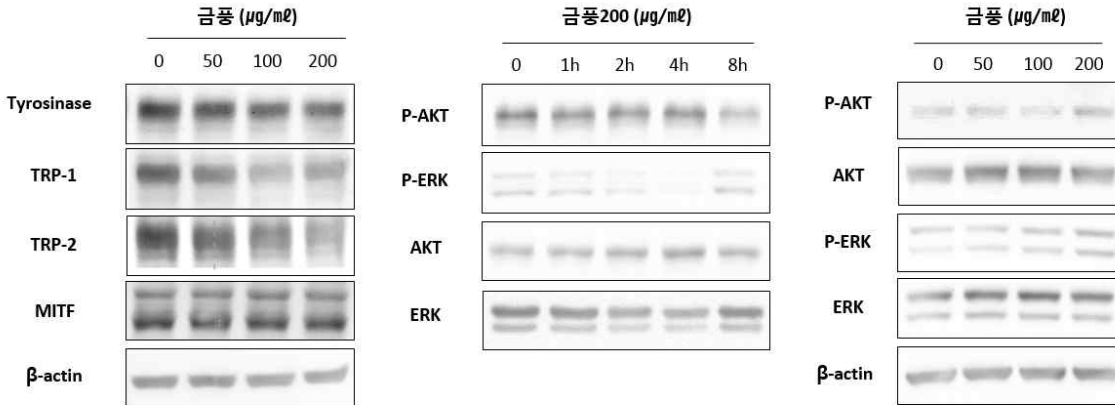


그림. 금풍의 멜라닌 합성 단백질 저해 기전 연구

금풍의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 단백질의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다 (Figure 10). 먼저 melan-a 세포에 72h동안 금풍을 처리한 후 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 조사해 본 결과, Tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 발현이 감소됨을 확인하였다. 멜라닌 생합성 기전을 확인하기 위해 melan-a 세포에서 AKT와 ERK를 발현시키는지 확인하였다. 금풍을 melan-a 세포에 처리하였을 때 p-AKT는 변화가 없었고 p-ERK는 8시간 처리 시 가장 높은 발현량을 관찰하여 금풍을 8시간 처리하였다. 그 결과 농도 의존적으로 p-ERK의 발현이 증가됨을 확인하여 금풍은 phosphorylation ERK 경로를 통해서 멜라닌 합성을 저해시키는 것으로 사료된다.

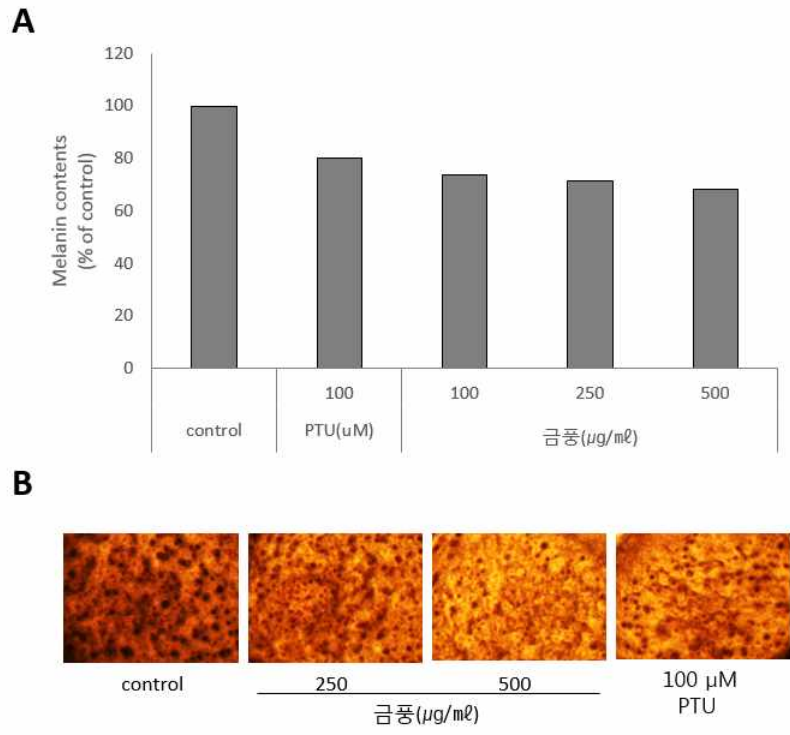


그림. 인공피부모델을 이용한 금풍추출물의 멜라닌 합성저해 효능

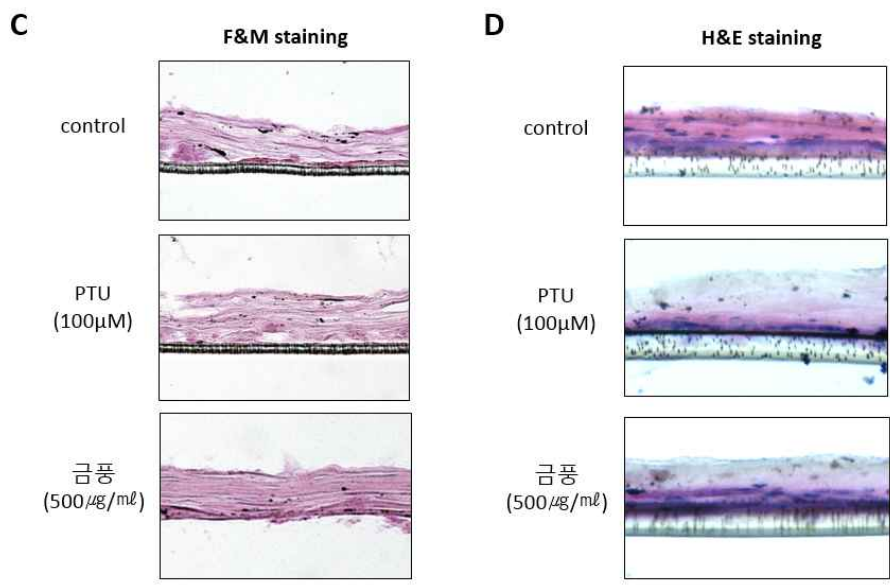


그림. Fontana-Masson으로 조직을 염색하여 멜라닌 분포 확인결과

금풍의 멜라닌 합성 저해효능을 확인하기 위해 멜라닌세포가 포함된 인공피부 모델을 사용하여 실험을 진행하였음. 금풍을 100, 250, 500 μg/ml의 농도로 처리하였을 때 멜라닌 합성 저해능이 32 %, 37.9 %, 44.7 %로 양성대조군인 PTU를 처리한 조직보다 효능이 뛰

어났으며 현미경을 통해 조직의 표면을 관찰하고 Fontana-Masson으로 조직을 염색하여 멜라닌 분포를 확인한 결과 금풍을 처리하였을 때 멜라닌 분포의 감소를 확인할 수 있었음. 조직학적인 변화는 H&E로 염색 된 피부 단면에서는 관찰되지 않았음.

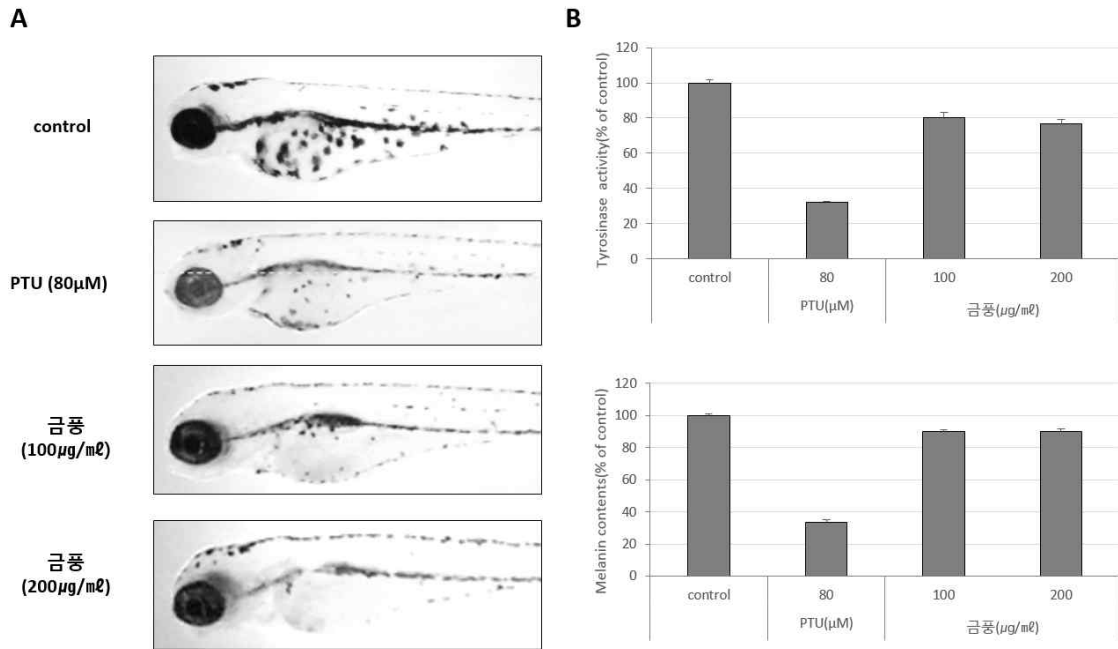


그림. 제브라피쉬 배아 모델을 이용한 금풍의 미백효능

이들 결과들을 *in vivo* 모델에서 확인하기 위하여 제브라피쉬 배아 모델을 이용하여 생체 내에서의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 연구하였음 (Figure 12). 금풍을 처리하지 않은 대조군에 비해 멜라닌 스팟이 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 결과를 보였음. 제브라피쉬의 멜라닌 생합성 저해 실험에서 사용되는 대표적인 양성대조군인 PTU에 비해서는 멜라닌 함량이 높았으나 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해서는 멜라닌 함량이 약간 줄어들었음. 또한 제브라피쉬 체내에서의 Tyrosinase 활성을 측정하기 위해 제브라피쉬에서 Tyrosinase를 분리하여 L-DOPA를 기질로 효소 활성을 측정해 본 결과 금풍을 200 μ g/ml 처리한 그룹에서 23.1 %의 Tyrosinase 저해 활성을 보여 높은 멜라닌 저해 활성에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

2절. 인삼 부산물을 활용한 기능성 식품 소재 개발

1. 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발

가. 인삼열매과육 동결건조물 일반영양성분

- 본 연구에 사용된 인삼열매(*Panax ginseng* C.A. Meyer var. *hwngsookjong*)는 횡성에서 생산하는 횡성홍삼영농조합에서 파쇄하여 씨를 제거시킨 열매과육을 -20°C 에서 냉동·저장하여 제공받아 사용하였으며, 사용된 분말은 본 인삼열매 과육을 -35°C 에서 3일 동안 동결건조하여 인삼열매과육동결건조물을 제조하여 사용하였음.



그림 102. 실험에 사용된 인삼열매

- 일반영양성분은 인삼열매 과육 동결 건조물을 식품공전 제 9. 일반시험법에 따라 수분 함량, 회분, 조단백, 조지방, 탄수화물, 칼로리, 나트륨 및 β -카로틴을 산출하여 사용하였으며, 인삼열매과육동결건조물의 일반영양성분을 분석한 결과는 아래의 표 1과 같음. 분석 결과 탄수화물이 70.21%로 가장 높은 함량을 나타냈으며, 조회분 12.82%, 조단백질 10.76%, 조지방은 1.57% 순으로 나타났음. 성상은 짙은 노란색을 가지는 분말로 황숙종 특유의 색을 보였으며, 색소성분을 분석한 결과 β -카로틴에서도 0.03 mg/g으로 나타났음.

표 25. 일반열매과육동결건조물 일반영양성분

Test items	Result	Test items	Result
Images	짙은 노란색의 분말	Carbohydrate	70.21%
Water content	4.64%	Calorie	338.01 Kcal
Crude ash	12.82%	Sodium content	35.66 mg/100g
Crude protein	10.76%	β -carotene	0.03 mg/g
Crud fat	1.57%		

나. 인삼열매과육 동결건조물 중금속 및 잔류농약

- 우리가 섭취하는 식품에는 여러 가지 금속물질이 함유되어 있는데 이들 중 철분 등 일부 무기질은 인체에 반드시 필요하나 납, 카드뮴 등 유해중금속들은 영양학적으로 무의미하며 생체 내에 축적되어 독성을 나타내기도 함. 이에 대한 대안으로 국가적으로 중금속에 대한 자료를 요청하도록 되어있으며, 본 연구에서도 중금속을 분석하여 안전성이 확립된 인삼열매추출물을 제조하고자 인삼열매 자체 중금속은 식품공전 제 10. 일반시험법 7.1 중금속 시험법에 따라 납, 카드뮴, 총비소 및 총수은에 따라 분석하였으며 그 함량은 표 2와 같음. 납은 2.51 µg/g, Hg는 0.02 µg/g 검출되었으며, 총비소 및 카드뮴에서는 검출되지 않았음. 본 인삼열매과육동결건조물을 하루 최대 섭취량을 2 g으로 선정하여 납, 카드뮴 섭취량은 FAO/WHO에서 설정한 잠정 주간 섭취 허용량(PTWI)의 2.36%, 0.07%로 매우 낮은 수준으로 나타났음.

표 26. 인삼열매과육동결건조물 중금속 함량

Test items	Result	Unit	Test method
Pb	2.51	µg/g	시험소 SOP
As	ND ¹⁾	µg/g	
Cd	ND	µg/g	
Hg	0.02	µg/g	

¹⁾ND : Not detected.

표27. 인삼열매 과육동결건 조물로부터 섭취되는 납과 카드뮴 함량을 FAO/WHO에서 설정된 잠정 주간 섭취 허용량(PTWI)과 비교

Metals (PTWI ¹⁾ , µg/kg b.w. ²⁾	Mean(mg/kg)	Total weekly intake (µg/kg b.w.)	PTWI(%)
Pb(25 µg/kg b.w.)	2.51	0.59	2.36
Cd (7 µg/kg b.w.)	0.02	0.005	0.07

¹⁾ PTWI : Provisional Tolerable Weekly Intake.

²⁾ b.w. : body weight.

- 인삼은 일반작물과는 달리 비교적 낮은 광도를 필요로 하는 반음지성 식물로서 해가림 시설 하에 생육되기 때문에 내병성에 약할 뿐만 아니라 동일한 경작지에서 보통 4년에서 6년 동안 재배되는 특성상 인삼 뿌리썩음병, 균핵병 등의 변해가 발생할 가능성이 매우 높아 효과적인 방제를 위해서는 전적으로 농약에 의존하고 있는 것으로 알려져 있음. 실제로 인삼의 안전성 조사 결과 농약잔류허용기준이 초과되어 출하 연기 등 고지한 사례가 많이 발생하고 있음. 본 연구에서도 식품공전 제 10. 일반식품 4. 식품 중 잔류농약분석법 4.1.2.2 다중농약 다성분 분석법에 따라 약 200여종에 대한 검사를 실시하였으며, 결과는 표 4와 같음. 인삼열매에서는 dimethomorph 10.8392 ppm, trifloxystrobin 0.0104 ppm, pyrachlostrobin 9.9816 ppm, pyrimethanil 0.1604 ppm

4개의 잔류농약이 검출되었음. 현재 인삼열매의 잔류농약 허용기준치는 고시되어 있지 않아 수삼의 기준을 따르고 있으며, 인삼열매를 건조하여 분말화한 경우 가공계수를 적용하여 할 수 있음.

$$\text{가공계수} = (100 - \text{건조물의 수분함량}(\%)) / (100 - \text{건조전의 수분함량}(\%))$$

본 연구물에서는 가공계수를 적용할 경우 잔류농약 허용기준 안에 포함되어 무리 없이 추출물 제조가 가능할 것으로 판단됨.

표 28. 인삼열매과육동결건조물 잔류농약 함량

Test items			
Anilofos, bromopropylate, carbophenothion, chlofenvinphos, chlorobenzilate, cyflufenamid, cyhalothrin(lambda), deltamethin, diclofol, dimethenaid 등 약 200 여종			
Items	Result(ppm)	잔류허용기준 (ppm)	가공계수 적용치 (ppm)
Dimethomorph	10.8392	3.0	60
Trifloxystrobin	0.0104	0.1	2
Pyrachostrobin	9.9816	2.0	40
Pyrimethanil	0.1604	1.0	20

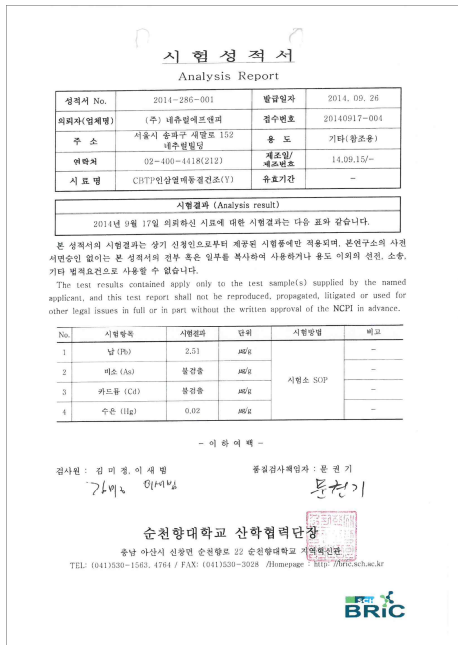


그림 103. 인삼열매과육동결건조물의 중금속 시험 성적서

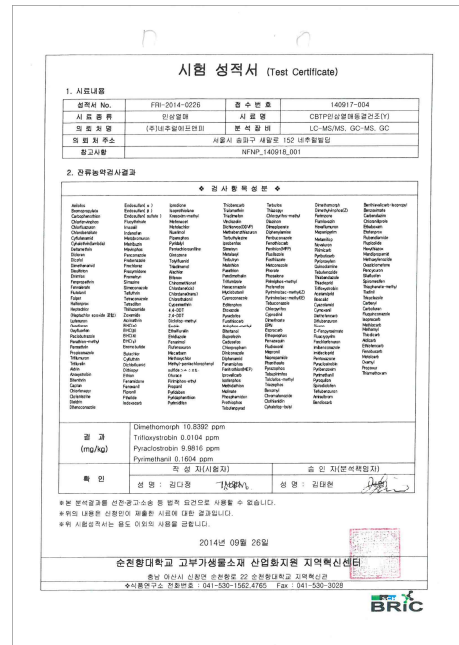


그림 104. 인삼열매과육동결건조물의 잔류농약 시험 성적서

다. 인삼열매 주정 추출 조건 선별

- 인삼열매의 알코올성 간 손상 예방 기능성 성분을 효율적으로 추출하기 위하여 주정을 이용하여 추출 조건을 다음과 같은 방법으로 설정하였음. 인삼열매 냉동 파쇄액 1 kg에 주정 95%를 100% (v/v) 첨가 후 50℃ 환류 진탕 수욕조에서 3, 5시간 동안 각각 추출하여 부직포 여과한 후 여과액을 동결건조하여 분석 시료로 사용하였음. 주정을 이용하여 추출한 인삼열매의 항산화능 특성을 조사한 결과는 표 5와 같음. 인삼열매 자체 과육의 DPPH radical 소거 IC₅₀은 449.3 ppm으로 나타났으며, 50℃로 온도를 유지하여 시간처리에 따른 변화를 확인결과 3시간에서 IC₅₀값이 가장 낮은 321.12 ppm으로 나타났으며, 이후 5시간에서는 342.91 ppm으로 약간 증가하는 경향으로 나타남. 주정 추출에서는 control과 달리 추출 시간이 오래될수록 IC₅₀값이 감소하는 경향으로 나타남.

표 29. 효소 종류, 처리 농도 및 시간에 따른 인삼열매의 추출 조건 설정

Types of enzymes	Treatment time(hr)	The DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ (ppm)
Control 0	0	449.3
Control 3	3	321.12
Control 5	5	342.91
EtOH	3	355.98
	5	328.16

라. 인삼열매 가수분해 효소제의 선별

- 인삼열매의 알코올성 간 손상 예방 기능성 성분의 효율적인 추출을 위하여 다음과 같은 방법을 이용하여 효소 추출조건을 선별하였음. 인삼열매 냉동 파쇄액 1 kg에 가온 정제수를 100% (v/v) 첨가 후 효소 종류를 달리하여 각각 0.05, 0.2% 첨가하여 50℃ 환류 진탕 수욕조에서 각각 3, 5시간 가수분해하여 부직포 여과한 후 여과액을 동결건조하여 분석 시료로 사용하였음.



그림 105. 인삼열매 가수분해 추출물 제조과정

- Pectin 및 cellulose 가수분해 효소 처리에 따른 항산화능 특성을 조사한 결과는 표 6과 같음. Enz. A는 적은 시간으로 효소 처리를 하였을 때 IC₅₀값이 낮은 경향으로 나타

났으며 이후 5시간 처리한 경우 control과 같이 증가하는 경향으로 나타남. Enz. B에서도 3시간 처리 구간에서 낮은 IC₅₀값을 보였으나 control에 비하여 높게 나타나 제외하여 진행하였음.

표 30. 효소 종류, 처리 농도 및 시간에 따른 인삼열매의 추출 조건 설정

Types of enzymes	Enzyme concentration(%)	Enzyme treatment time(hr)	The DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ (ppm)
Control 0	0	0	449.3
Control 3	0	3	321.12
Control 5	0	5	342.91
Enz. A	0.05	3	314.3
		5	381.5
	0.2	3	329.3
		5	377.6
Enz. B	0.05	3	359.3
		5	345.4
	0.2	3	386.2
		5	428.7

마. 인삼열매 효소 가수분해 및 주정 추출에 따른 진세노사이드 성분 변화

- 인삼열매에 식품으로 사용 가능한 효소 및 주정을 이용하여 추출하여 진세노사이드 함량을 살펴보면 전반적으로 Rg₁ 함량이 가장 높게 나타났으며 Re, Rd, Rb₂, F3, Rc, F2, F5, Rb₁, Rg₂, F₁, Rf, Rb₃, Rh₁ 순으로 높게 나타났음. Control군에서 3시간 추출하였을 때 총 진세노사이드 함량이 9.58%로 가장 높게 나타났으며, 주정 추출군에서는 3시간, 5시간이 10.82~10.84%로 비슷한 수치를 나타내었음. 효소처리구간에서는 Enz. A 0.2%, 3시간 구간에서 14.39%로 가장 높게 나타났으며 Enz.B 에서는 0.05%, 5시간 구간에서 11.31%로 가장 높게 나타났음. 본 연구 결과 Enz. A에서 DPPH 라디칼 소거 IC₅₀값이 가장 낮게 나타났으며, 진세노사이드 함량이 가장 높게 검출되어 Enz. A를 이용하여 인삼열매 가수분해 pilot scale 추출 및 대량 생산을 진행하고자 함.

표 31. 인삼열매 효소 가수분해 및 주정 추출에 따른 진세노사이드 성분 변화

Sample	Compound														
	Rg1	Re	Rf	F5	F3	Rb1	Rg2	Rh1	Rc	Rb2	Rb3	F1	Rd	F2	Total
Control 0	5.18	0.92	0.10	0.27	0.56	0.22	0.12	0.01	0.34	0.37	0.04	0.08	0.36	0.26	8.84
Control 3	5.39	0.99	0.08	0.27	0.56	0.27	0.13	0.02	0.45	0.49	0.05	0.09	0.49	0.29	9.58
Control 5	5.07	0.92	0.08	0.25	0.53	0.25	0.13	0.02	0.40	0.46	0.05	0.09	0.44	0.26	8.94
EtOH 3hr	6.74	0.96	0.09	0.27	0.56	0.26	0.21	ND	0.40	0.46	0.05	0.09	0.44	0.27	10.82
EtOH 5hr	6.60	0.95	0.10	0.28	0.56	0.28	0.17	0.01	0.44	0.51	0.06	0.09	0.49	0.28	10.84
Enz.A 0.05%, 3hr	5.87	1.09	0.09	0.25	0.52	0.19	0.12	0.02	0.43	0.47	0.06	0.10	0.52	0.31	10.03
Enz.A 0.2%, 3hr	6.32	1.16	0.09	0.19	0.60	0.19	0.14	0.02	1.26	1.58	0.18	0.18	2.03	0.43	14.39
Enz.A 0.05%, 5hr	5.32	0.95	0.09	0.26	0.57	0.21	0.13	0.01	0.40	0.47	0.06	0.09	0.49	0.29	9.33
Enz.A 0.2%, 3hr	4.93	1.00	0.07	0.23	0.53	0.17	0.12	0.01	0.37	0.45	0.05	0.09	0.50	0.30	8.83
Enz.B 0.05%, 3hr	5.91	1.06	0.09	0.26	0.58	0.31	0.14	0.02	0.68	0.78	0.09	0.12	0.84	0.35	11.23
Enz.B 0.2%, 3hr	5.73	1.17	0.09	0.24	0.54	0.16	0.14	0.02	0.45	0.49	0.05	0.10	0.57	0.36	10.11
Enz.B 0.05%, 5hr	5.69	1.02	0.10	0.25	0.55	0.37	0.14	0.02	0.76	0.90	0.10	0.12	0.96	0.34	11.31
Enz.B 0.2%, 3hr	5.42	0.97	0.09	0.25	0.54	0.18	0.13	0.01	0.37	0.44	0.03	0.14	0.45	0.27	9.28

바. 인삼열매 가수분해 pilot scale 추출

- 알코올성 간 손상 보호에 효능이 있는 인삼열매 추출물을 제조하고자 앞선 연구에서 선발된 효소 Enz.A의 농도를 달리하여 pilot 추출공정을 그림 5와 같이 진행하였음. 본 공정에서는 실험실에서와 달리 생산 및 제품으로 진행 시 품질관리에 필요한 공정인 효소 실활, 농축 및 살균 공정을 추가하였으며, 생산단가 절감을 위하여 분무건조를 실시하였음. 본 원료에 대해 pilot scale의 생산 결과 수율이 3.5~4.8%로 효소첨가량이 많을 수록 높게 나타났으나, 생산 효율을 고려 시 낮게 나타나 대량생산 진행 시 수율 검토가 필요할 것으로 판단됨.

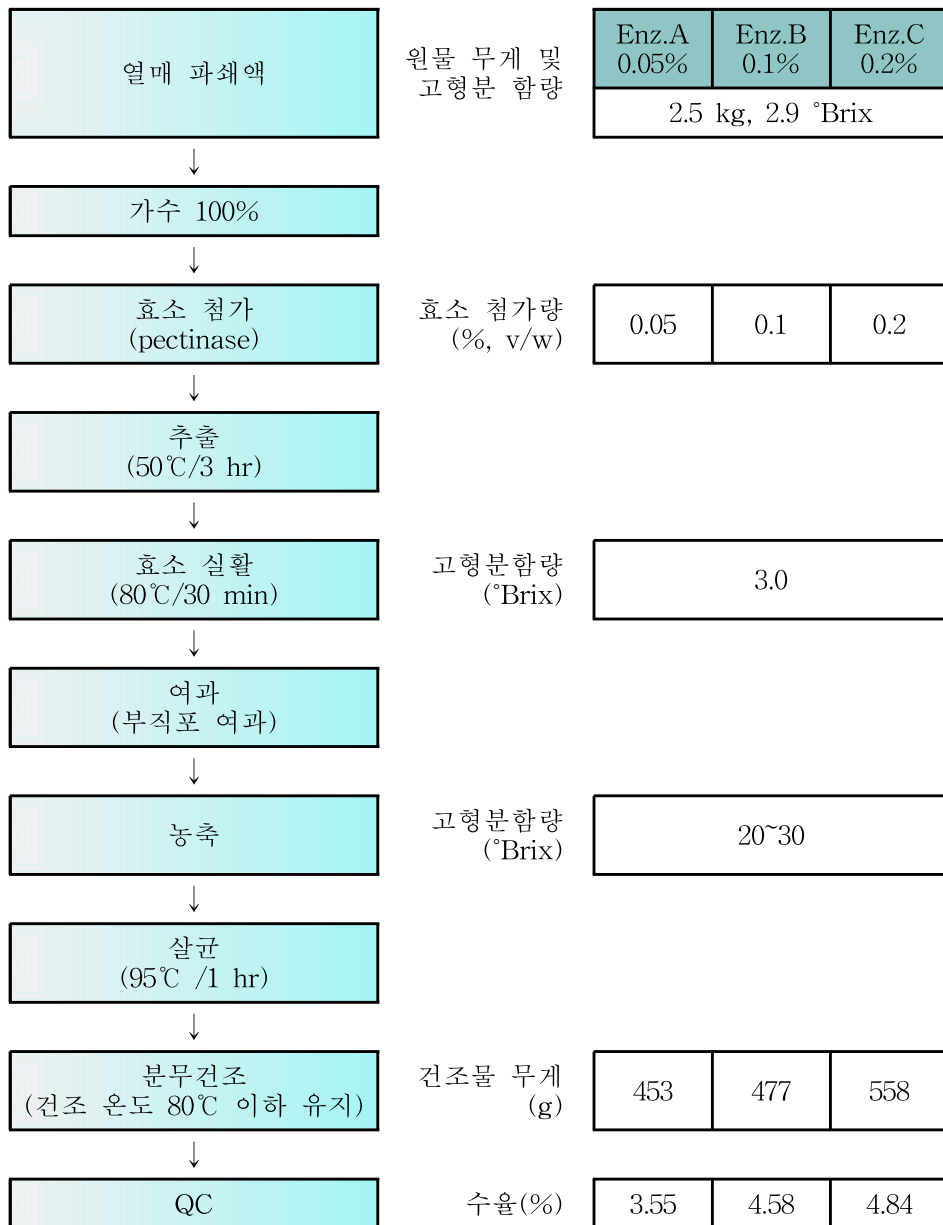


그림 106. 인삼열매 추출 pilot 생산 공정

제품시험성적서

㈜대추원푸드P 귀하

인
삼
열
매

담
양
자

연구
소장

제품명 : 인삼열매A(호포0.05%)

시험항목	관리기준	시험결과	비고
질량	고유이 체적과 항산화 가치 포함 고, 아미, 이황이 없다		
일반세균(cfu/g) 대장균군	1,000이하 음성	적합(970) 음성	
담양수량 제조연월일 Lot No. 종.상	_____	_____	_____

장기와 같이 시험재료를 시험실적서를 제출합니다.
2015년 2월 16일

주최회사 대표장병윤 김우희
장지도 최성식 책임면 우번호 494
대표전화 : 0311354-8321 팩스 : 0311354-8323

DAEHO CORPORATION

제품시험성적서

㈜대추원푸드P 귀하

인
삼
열
매

담
양
자

연구
소장

제품명 : 인삼열매B(호포0.1%)

시험항목	관리기준	시험결과	비고
질량	고유이 체적과 항산화 가치 포함 고, 아미, 이황이 없다		
일반세균(cfu/g) 대장균군	1,000이하 음성	적합(880) 음성	
담양수량 제조연월일 Lot No. 종.상	_____	_____	_____

장기와 같이 시험재료를 시험실적서를 제출합니다.
2015년 2월 16일

주최회사 대표장병윤 김우희
장지도 최성식 책임면 우번호 494
대표전화 : 0311354-8321 팩스 : 0311354-8323

DAEHO CORPORATION

제품시험성적서

㈜대추원푸드P 귀하

인
삼
열
매

담
양
자

연구
소장

제품명 : 인삼열매C(호포0.2%)

시험항목	관리기준	시험결과	비고
질량	고유이 체적과 항산화 가치 포함 고, 아미, 이황이 없다		
일반세균(cfu/g) 대장균군	1,000이하 음성	적합(103) 음성	
담양수량 제조연월일 Lot No. 종.상	_____	_____	_____

장기와 같이 시험재료를 시험실적서를 제출합니다.
2015년 2월 16일

주최회사 대표장병윤 김우희
장지도 최성식 책임면 우번호 494
대표전화 : 0311354-8321 팩스 : 0311354-8323

DAEHO CORPORATION

그림 107 인삼열매 pilot scale 생산에 대한 시험성적서(성상, 일반세균, 대장균군)

사. 인삼열매 추출물 효소 가수분해 조건에 따른 *in vitro*

- 인삼열매의 알코올성 간 손상 보호 효과에 대한 효능을 검증하고자 알코올성 간 독성으로 유도된 HepG2 세포에서, 인삼열매 처리에 따른 간의 효소(ALT, AST)의 수치 변화를 확인하였으며, 그림 10과 같음. *in vitro*에서의 간 독성 확인은 세포의 배양 배지 내에 transaminase가 방출된 양을 측정함으로써 확인할 수 있으며, HepG2와 같은 간세포에 에탄올을 24시간 처리하게 되면 세포내로 ALT(alanine transaminase)와 AST(aspartate transaminase)의 방출이 증가하게 됨. 본 실험에서는 에탄올 처리 시 ALT와 AST의 수치가 증가하였으며, 인삼열매 시료를 선 처리 한 후 에탄올을 처리한 경우, 시료의 추출 조건에 따라 정도의 차이가 나타났지만, 알코올에 대한 간 세포 보호 효과를 확인 할 수 있었음.

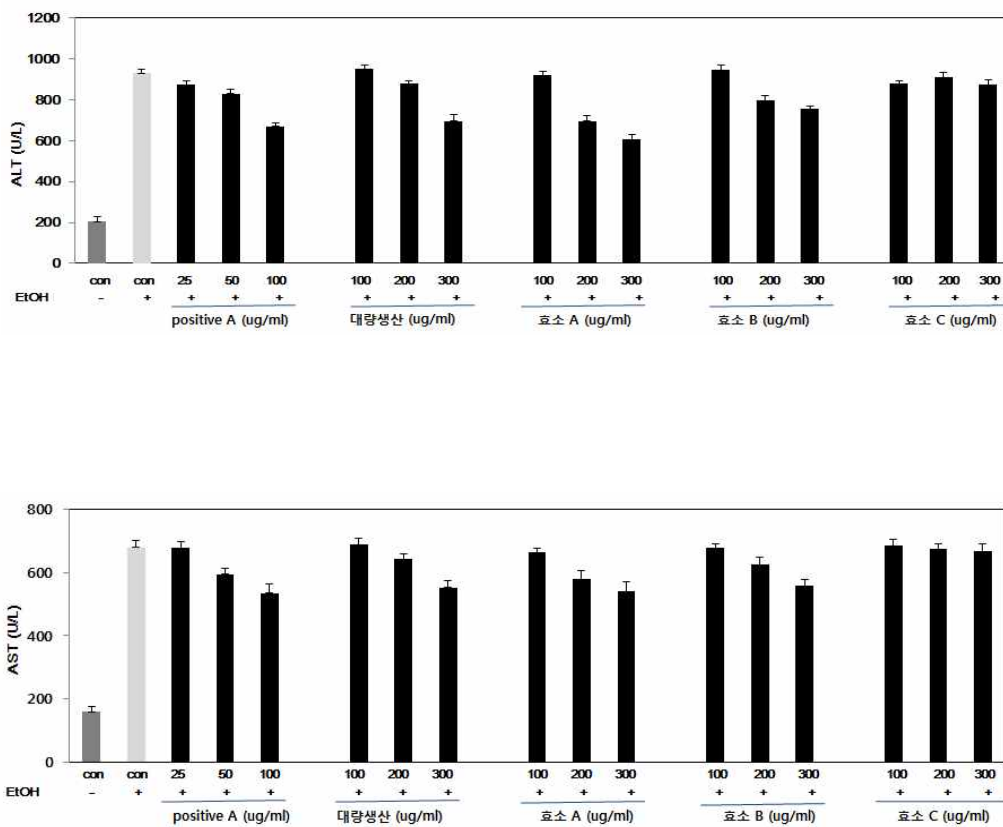


그림 108. 알코올성 간 독성으로 유도된 HepG2 세포에서 인삼열매 처리에 따른 간 효소(ALT, AST)의 수치 변화 확인

2. 인삼열매 추출물의 원료화

가. 대량생산 제조과정 확립 및 표준화

- 대량생산으로는 인삼열매 500 kg을 기준으로 진행하여 pilot scale과 같은 방법으로 추출, 효소 실험, 여과 및 농축을 진행하였으며 건조에서는 진세노사이드 특성상 보통 사용되는 분무건조 온도보다 낮게 설정하여 성분이 파괴되는 정도를 낮추고자 함. 이와 같은 방법으로 대량생산을 진행한 결과, 원물 500 kg당 추출물 18.3 kg으로 수율 4.4%로 나타났으며, 분무건조 시 건조 부형제 (말토덱스트린, 텍스트린 등)를 첨가하지 않고 건조가 가능하여, 기능성 평가 시 낮은 농도에서 기능성 활성이 보일 수 있을 것으로 판단됨.

제조지시 및 제조기록서 MANUFACTURING INSTRUCTION & MANUFACTURING RECORD						
제품명	제조일	제조일자	종료일	제조장	제조원	제조일자
인삼열매 건조분말	kg	2015.04.14	2015.04.17	17.3kg	2015.04.17	호 병 배
제조시사항	원료 500kg	이용량사항	-	최종용량사항	17.0kg	
용량	가라기물(분말)	유출가량	이용량	보상	비합계 분량	
원료 투입 실적 (Raw material input control)						
원료명	혼합비율	지시량(kg)	출고량(kg)	확인	비고(Lot No)	
물트 시(인삼열매)	50%	500	500	조명규	-	
90 Water	50%	500	500	조명규	-	
계	100%	1,000	1,000			

공정명 CODE	표준작업절차	조건	시작	CODE/확인	IPC(Industrial process control) history	비고
1. 1차 추출	1. 원물 500kg (PC=500, 말고 50분에서 3시간 동안 추출) (40°C에서, 분기 불필요)	50도	9pm	양식/사정확인	1. 추출조건: 50도/10시간 2. 사정확인 3. 수율: 500kg당 18.3kg	원물 500kg당 표준 18.3kg
2. 2차 추출	1. 80도에서 5시간 동안 추출 후 50도에서 3시간 동안 추출	80도	0.5pm	양식/사정확인	1. 추출조건: 80도/5시간 2. 사정확인 3. 수율: 500kg당 17.3kg	수율 17.3kg
3. 여과	1. 80도 살균 후 200-400미크론 여과망을 이용하여 여과 (사정 확인)		5pm	여과 확인		수율 17.3kg
4. 농축	1. 여과한 추출물 90%를 10~200미크론 농축한다	온도: 55도 진공: -720mmHg	8pm	가중, 80% 확인	-로제 첨가	100kg당 농축 17.3kg
5. 냉각	1. 55도 이하 냉각(중과기에서 냉각 실시)	55도	1pm	냉각 온도 확인	>55도	
6. 분무건조	1. 분말의 최종 수율을 달성할 때까지 100도에서 분무건조 (사정 확인)	Inlet Temp.: 100도 Outlet Temp.: 100도 Pressure: 1.0-2.0kg/cm ² Flow rate: 60%	100도/1pm	성상 확인		
일	시간	비고	확인	확인	비고	비고
2015.04.17	17.0kg	/	조명규	조명규	제조원/비고	수출/비고

그림 109. 인삼열매 대량생산 제조지시 및 제조 기록서

나. 인삼열매 추출물 원료의 품목신고

- 대량생산 공정을 표준화한 인삼열매 추출물의 품목보고신고를 아래와 같이 완료함.

식품(식품첨가물) 품목제조보고서		제조방법 설명서	
<p>1. 품목명: 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>2. 제조방법: 분무건조</p> <p>3. 원료: 인삼열매, 물, 말토덱스트린, 텍스트린</p> <p>4. 제조장: 서울특별시 강남구 테헤란로 123길 12 (인삼열매추출물 제조공장)</p> <p>5. 제조일자: 2015.04.17</p> <p>6. 제조원: 인삼열매추출물 제조공장</p> <p>7. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>8. 제조량: 1,000kg</p> <p>9. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>10. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>11. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>12. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>13. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>14. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>15. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>16. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>17. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>18. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>19. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p> <p>20. 제조비율: 인삼열매 50%, 물 50%</p>	<p>1. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>2. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>3. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>4. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>5. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>6. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>7. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>8. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>9. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>10. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>11. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>12. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>13. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>14. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>15. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>16. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>17. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>18. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>19. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p> <p>20. 인삼열매추출물(고형분 10%)</p>	<p>1. 제조방법: 분무건조</p> <p>2. 제조방법: 분무건조</p> <p>3. 제조방법: 분무건조</p> <p>4. 제조방법: 분무건조</p> <p>5. 제조방법: 분무건조</p> <p>6. 제조방법: 분무건조</p> <p>7. 제조방법: 분무건조</p> <p>8. 제조방법: 분무건조</p> <p>9. 제조방법: 분무건조</p> <p>10. 제조방법: 분무건조</p> <p>11. 제조방법: 분무건조</p> <p>12. 제조방법: 분무건조</p> <p>13. 제조방법: 분무건조</p> <p>14. 제조방법: 분무건조</p> <p>15. 제조방법: 분무건조</p> <p>16. 제조방법: 분무건조</p> <p>17. 제조방법: 분무건조</p> <p>18. 제조방법: 분무건조</p> <p>19. 제조방법: 분무건조</p> <p>20. 제조방법: 분무건조</p>	

그림 110. 인삼열매 추출물 품목제조보고서



원재료



가수 및 효소 첨가



효소 혼합



추출



농축



농축

그림 111. 인삼열매 가수분해 추출물 대량생산 공정

3. 지식기반 연구 및 제품개발을 위한 웹시스템 구축

○ 차별화되고 경쟁력 있는 제품개발 및 연구추진을 위해 지식기반 시스템 구축

가. 위키기반 데이터 통합형 지식관리 시스템 구축

- 아래와 같은 내용의 데이터 통합형 지식관리 시스템 구축을 완료하였음

- 세부과제별 연구 진도 관리 및 결과와 데이터의 업로드 및 관리
- 인삼, 흑삼, 태극삼 및 인삼 부산물(잎, 줄기, 열매)에 대한 문헌 정보의 수집 및 통합
- Web2.0 시대에 부합되는 새로운 방식의 통합형 지식관리시스템 구축
- 매크로, 파서 등 기본 플러그인의 구축 및 수정



그림 112. 위키기반의 통합형 지식관리 시스템의 장점

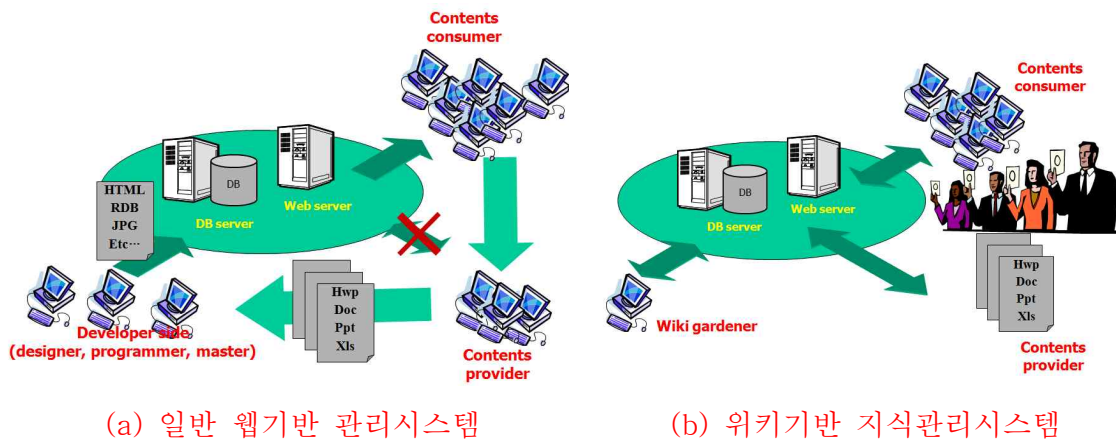


그림 113. 일반 웹기반 관리시스템과 위키기반의 지식관리시스템의 비교

1) 구성 요소

- 계정관리, 즐겨찾기, 최근변경, 도움말에 쉽게 접근할 수 있도록 구성된 유틸메뉴
- 빠른 지식검색을 도와주는 검색창
- 시스템의 주요 콘텐츠를 나타내는 주메뉴
- 주메뉴에 따른 부메뉴 (보다 세부적이고 다양한 콘텐츠를 나타낼 수 있음)
- 페이지의 제목 및 내용
- 인쇄용 화면, 히스토리, 수정, 편집, 즐겨찾기, 태그, 댓글 등의 유용한 기능이 모여있는 에디트바
- 새 글쓰기, 첨부파일 관리, 권한설정이 가능한 옵션바



그림 114. 웹사이트 기본 화면 구성

2) 과제 소개

- 과제 소개 메뉴는 ‘인삼수출 활성화를 위한 기능성 및 제품 개발’ 사업을 위한 연구개발과제에 대한 전반적인 내용을 다루고 있음

- 연구 개요
- 연구 필요성
- 연구 목표
- 연구 개발 추진 체계
- 참여 기관




그림 115. 과제 소개 메뉴

3) 진행 사항 및 연구 성과

- 각 세부과제별 진행 사항 또는 연구 산출물을 연구자들 사이에 서로 공유 가능

- 제 1 세부과제
- 제 1 협동과제
- 제 2 협동과제
- 제 3 협동과제
- 제 4 협동과제



지식기반의 인삼 기능 연구 시스템
Knowledge based Ginseng Functional Research System

system • LOGOUT • RECENT • ADMIN • HELP

과제 소개

진행 사항 및 연구 성과

참고 자료

관 웹사이트

제1년부과제

제1입동과제

제2입동과제

제3입동과제

제4입동과제

- 제1년부과제
- 제1입동과제
- 제2입동과제
- 제3입동과제
- 제4입동과제

제3입동과제 [REVIEW]

가. 연구개발의 목표 및 내용

(1) 연구개발의 목표

- 태극삼, 옥삼의 수송전달체 품 개발을 위한 제조공정 최적화 및 기능성 평가(in vitro, in vivo, 인체적용시험)

(2) 연구개발의 주요내용

- 태극삼 및 옥삼의 제조공정 개발
 - 기존 옥삼 제조업소 방문 제조시설현황, 제조방법 및 장단점 조사
 - 전문가 기술자문회의를 통한 고품질 원료삼 제조안 마련
 - 옥삼 제조 system 구축 및 가공 조건에 따른 단계별 테스트 시료 제조
 - 테스트 제품 지표품질 향상에 근거한 제조방법 최적화 및 pilot 수준의 생산공정 확립
- 태극삼, 옥삼의 지표성분 및 이화학적 특성 규명
 - 제조 단계별 Ginsenoside 등 지표물질 동시 다성분 분석
 - 제조 단계별 총폴리페놀 등 기능성원 분석
 - 제조 단계별 아미노산 등 기능성원 분석
 - 제조 단계별 지방산 등 기능성원 분석
 - 제조 단계별 변조피린 등 유해물질 분석
 - 제조 단계별 수분축적 및 건조감량 변화 측정
 - 제조 단계별 칼변도 측정
 - 제조 단계별 무기질, 중금속 등 동시 다성분 분석
- 세포수준의 기능성 평가
 - 항스트레스 평가를 위한 PC12 세포를 이용한 in vitro 검체 시험
 - 알지미성 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase 저해활성, β-secretase저해활성
 - 항알집 기능성 평가(삼혈관질환 활성으로 Angiotensin 전환 효소 저해활성)
- 항산화 기능성 평가
 - 말초혈액순환 기능성 평가
- 동물수준의 기능성 평가 (항스트레스, 말초혈액순환 등)
- 국제 인체적용시험(항스트레스, 혈행개선 등)

나. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

(1)2014 (1차년도)

가. 연구개발목표

- 수송전달체 품 소재 태극삼, 옥삼 제조공정 개발
- in vitro 기능성 평가 연구를 통한 수송전달체 품 기능성 항목 선정
- in vivo 기능성 평가 및 수송전달체 품 기능성 임상 프로토콜 작성
- 태극삼, 옥삼 채 2할 당도 필만 신장능 저하 및 EPC 역할 규명(위탁 2)

나. 연구개발의 내용

- 태극삼, 옥삼 뿌리성분 제조공정 및 원료 표준화 연구
- 태극삼, 옥삼 이화학적 특성 규명
- in vitro 기능성 평가 연구

©2014. Inokogin, Inc. LABKIM

PRINT | HISTORY | EDIT | DELETE | FAVORITE | (5)

그림 116. 진행 사항 및 연구 성과 화면

4) 참고 자료

- 참고 자료 메뉴에는 게시판 형태로 개발하여 각 부메뉴별 관련 자료를 게시판 자료로 공유 가능
 - 연구 동향 및 소식
 - 문헌 분석
 - 특허 분석
 - 생물 정보 분석

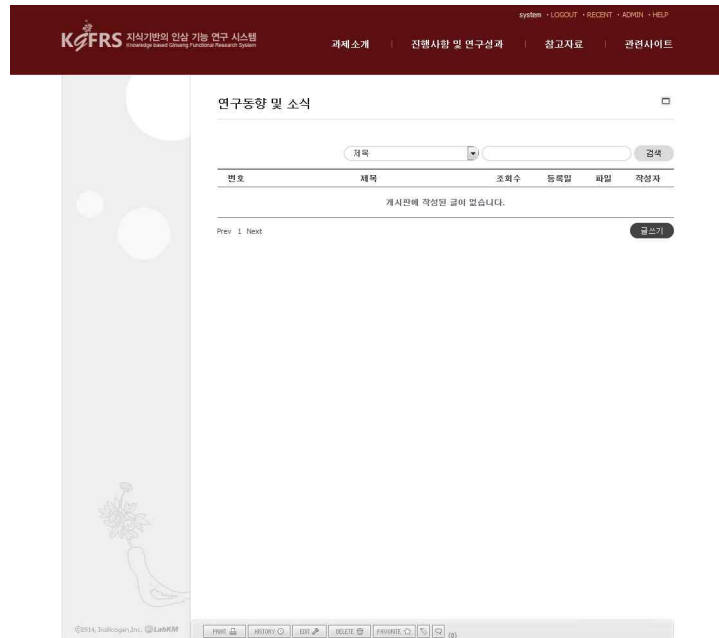


그림 117. 참고 자료 메뉴

5) 관련 사이트

- 관련 사이트 메뉴에서는 해당 연구 개발 과제에 참여하는 기관에 대한 정보 확인 가능

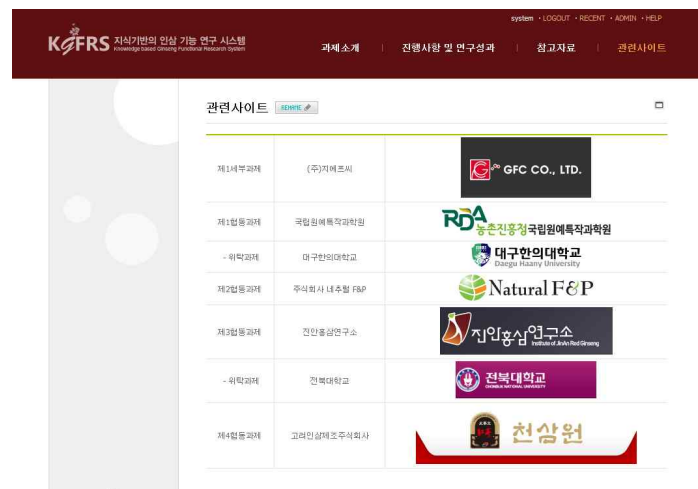


그림 118. 관련 사이트 메뉴

6) 관리자 기능

- 시스템 기본 관리: 사이트명, 로고 이미지, 고유 이름, 사이트 설명 관리
- 메뉴 구조 관리: 메인 메뉴 및 부 메뉴 관리
- 사용자 관리: 가입된 사용자 목록 관리
- 그룹 관리: 그룹 생성 및 관리
- 기본 허가 관리: 사용자나 그룹, 또는 모든 사용자의 기본 권한 설정

4. 인삼부산물(인삼열매) 추출물의 세포 및 동물 모델을 이용한 간 기능 개선 평가

가. 재료 및 연구방법

- 효소처리된 인삼열매(A) 및 주정추출물 인삼열매(B), 양성대조군: 헛개나무 과병 추출물

1) 세포독성 시험

RAW 264.7세포에 각 시료를 여러 농도로 희석하여 48시간 배양 후, MTT법에 의해 세포독성을 측정함.

2) 마우스 알콜성 간질환 모델

5주령의 수컷 Balb/c 마우스에 25% ethanol을 5 g/kg의 투여량으로 1일 1회 총 7일간 경구 투여하여 알콜성 간질환을 유발시킴.

3) 시료의 투여

양성대조군을 비롯하여 두 종류의 공시시료는, 에탄올 투여 개시 3일전부터 각각 0.5 mg/mouse 혹은 1 mg/mouse의 양으로 1일 1회 총 10회 경구 투여함.

4) 생화학적 분석

에탄올 투여 종료 후 1일째의 혈청 시료를 이용하여 혈중 GTP (ALT), GOT (AST) 및 LDH를 정량하고, 에탄올 투여 종료 후 1일째의 간 조직을 lysis하여 간 조직 중의 SOD 및 catalase를 정량함.

5) 시료의 안전성 (*in vivo* 테스트)

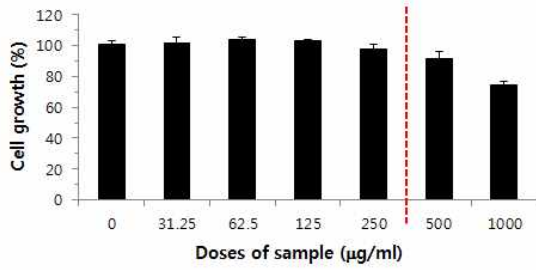
마우스의 체중 측정과 혈청학적 분석을 통한 간독성 테스트를 통해 시료에 의한 독성유무도 유무를 판정하였음.

6) 통계학적 유의성은 에탄올만을 처리한 그룹에 대해 Student's two tailed t-test를 통해 검토함.

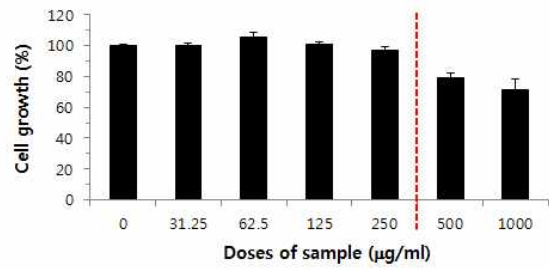
나. 인삼열매의 세포독성 평가

- 공시 시료의 세포독성을 RAW 264.7세포를 이용하여 측정한 결과, 헛개나무, 인삼열매-A 및 인삼열매-B 추출물은 모두 약 250 mg/ml의 농도까지는 안전한 것으로 확인됨 (그림 1). *In vitro* 실험에서의 세포독성 시험 데이터를 기초로 *in vivo* 실험에서 사용할 투여량을 결정하는 것은 어려우나, 대략 2-3 mg/mouse의 투여량까지는 안전할 것으로 추정됨. 향후 *in vivo* 실험에서는 0.5 및 1 mg/mouse의 양으로 시료를 투여함.

A) 헛개나무



B) 인삼열매-A



C) 인삼열매-B

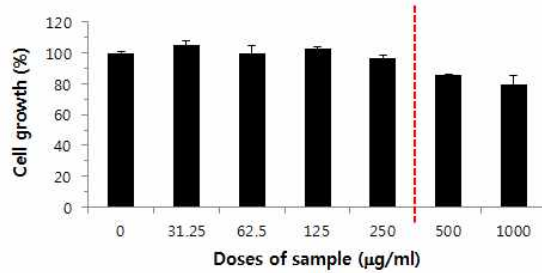
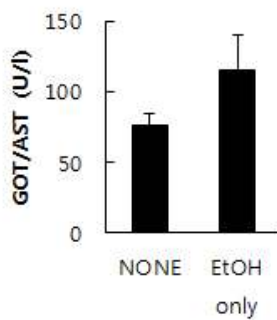


그림 119. 공시시료의 세포독성 시험

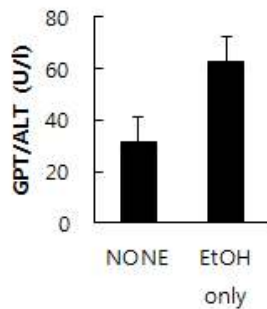
다. 에탄올 투여에 의한 간 독성 유도시험

- 에탄올 투여에 의한 간 독성 유도시험은 25% ethanol을 5 g/kg의 양으로 1일 1회 총 7일간 투여하는 방식으로 실시하였음. 그 결과 간 독성의 지표인 GOT/AST, GPT/ALT 및 LDH의 혈중 농도가 증가하여, 에탄올 투여에 의해 간세포가 손상되어 독성이 발현된 것으로 나타남 (그림 2).

A) GOT



B) GPT



C) LDH

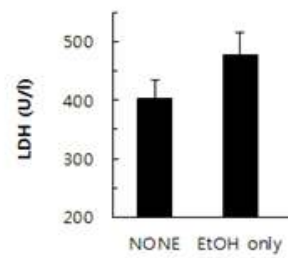


그림 120. 에탄올 투여에 의한 간독성 유도

라. 동물 모델에서 공시 시료의 간 독성 억제효과

- 공시 시료를 에탄올 투여 3일 전부터 경구 투여한 마우스에서, 혈청 중의 AST 및 ALT를 정량하여 시료의 간질환 억제활성을 판정한 결과, 에탄올 투여에 의해 상승한 혈중 AST/ALT의 수치가 인삼A 추출물 및 인삼B 추출물 투여에 의해 감소함. 특히 인삼A 추출물은 비교군인 헛개나무 추출물의 동등 혹은 그 이상의 억제효과를 나타내었음 (그림 3).

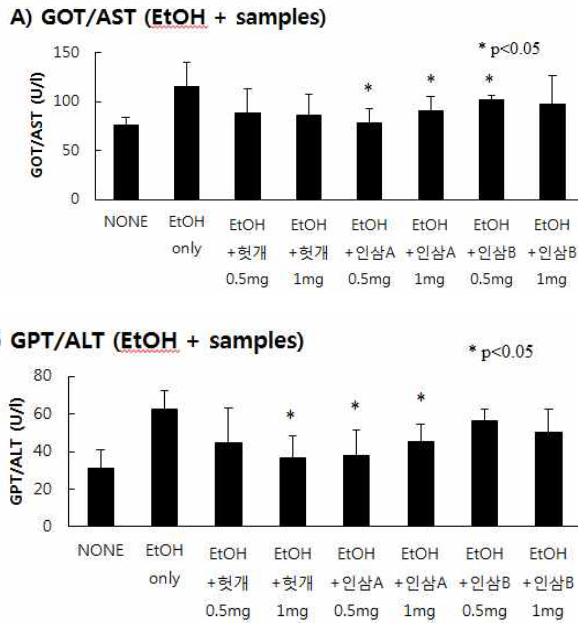


그림 121. 공시시료 투여에 의한 혈중 AST/ALT 농도의 억제효과

- 또한 간 질환 발생 시 간세포의 손상에 의해 간세포 내에 있던 LDH 효소의 혈중 농도가 높아지는 것으로 알려져 있음. 알코올 투여에 의해 유도된 간질환에서 혈중 LDH 농도 상승에 대한 공시 시료의 억제 효과를 관찰한 결과, 에탄올 투여에 의한 LDH 혈중 농도 상승의 억제 효과는 인삼A 및 인삼B 추출물 모두 우수한 것으로 나타남 (그림 4).

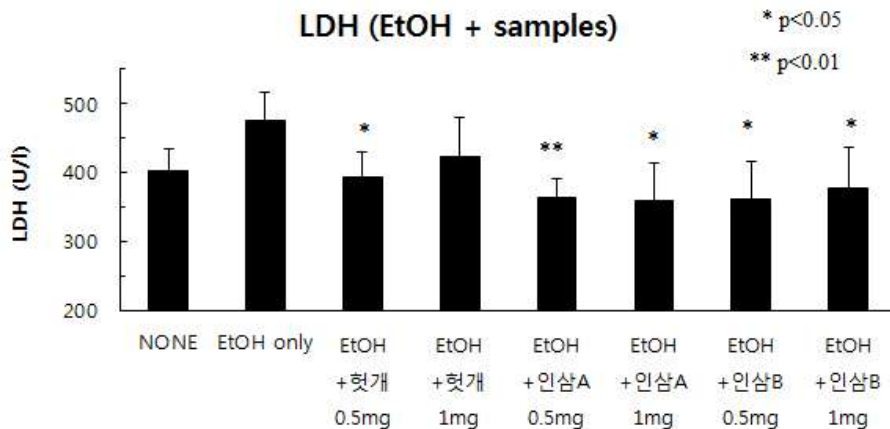
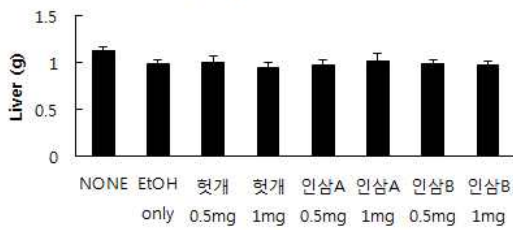


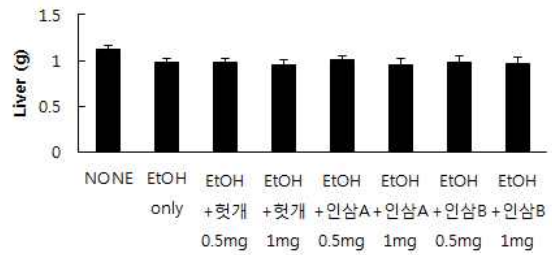
그림 122. 알코올성 간질환에서 공시 시료에 의한 LDH 혈중 농도 억제 효과

- 한편 공시 시료 투여 및 공시 시료 전처리 후 에탄올 투여에 의해 장기에 대한 독성이 발현되는 지의 여부를 측정하기 위하여, 공시 시료 투여군과 공시 시료 전처리 후 에탄올 투여군에 있어서 간과 비장의 중량을 측정함. 그 결과, 본 실험 조건에서는 공시 시료 투여에 의한 장기 중량 감소는 물론, 에탄올 처리에 있어서도 장기의 중량에는 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타남 (그림5). 또한 시험 기간 중 체중 증가율에 있어서도 별다른 변화는 관찰되지 않음 (그림 6).

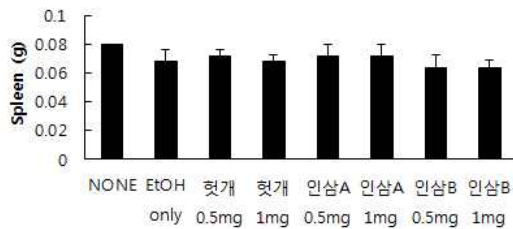
A) Liver (sample only)



B) Liver (EtOH + samples)



C) Spleen (sample only)



D) Spleen (EtOH + samples)

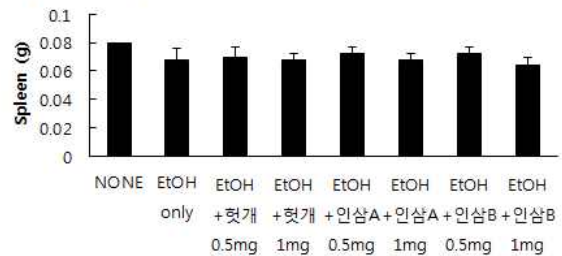


그림 5. 각 시험군에 있어서 간 및 비장 중량의 비교

Body weight (증가율)

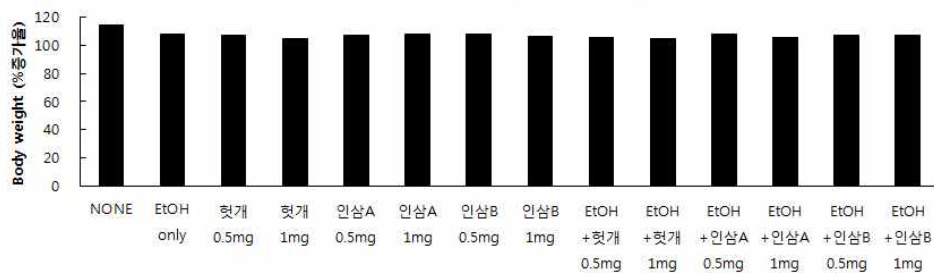


그림 123. 각 시험군의 체중변화

마. 간 조직 내 항산화 활성 분석

- 간 조직 중의 항산화 활성관련 효소인 SOD와 catalase의 발현량을 정량해 본 결과 공시 시료 투여에 의해 catalase의 발현량은 약간 상승하는 경향을 나타내었으나, SOD의 발현량은 그다지 영향 받지 않는 것으로 나타남 (그림 7).

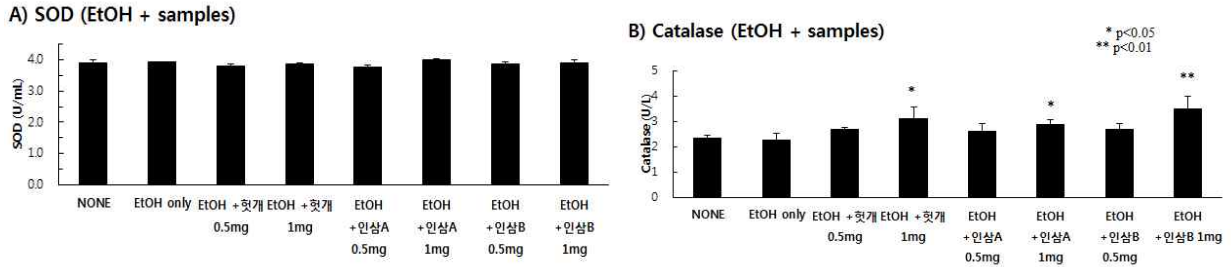


그림 124. 공시 시료 투여에 의한 간 조직 내 항산화 효소 발현량 변화

바. 간 조직의 염증인자 분석

- 간 조직을 이용하여 간세포 중의 COX-2, iNOS, HO-1, TGF-β1 등 염증관련인자의 발현을 Western bot에 의해 측정함. 그 결과, COX-2, iNOS 및 TGF-β1의 발현량에는 별다른 변화가 관찰되지 않았으나, 염증억제 작용을 하는 HO-1분자의 발현이 공시시료 처리에 의해 증가하는 것으로 나타남 (그림 8). 간 조직 내의 염증매개인자 분석에 대해서는 추후 보다 구체적인 분석이 필요한 것으로 사료됨.

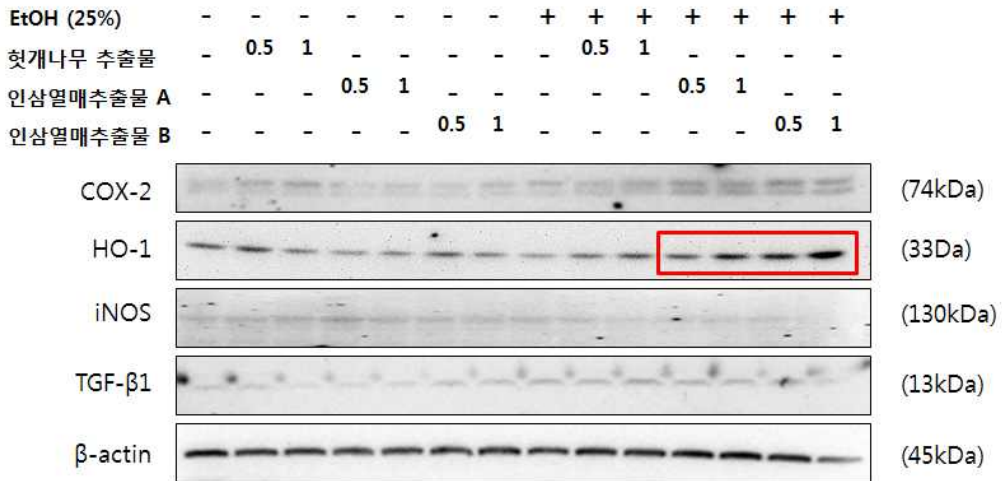
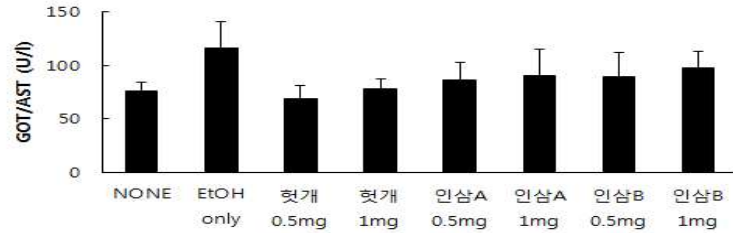


그림 125. 간 조직 중의 염증관련 분자 발현 비교

사. 조직해부학적 검사

- 공시 시료의 안전성을 테스트하기 위하여, 공시 시료 투여에 따른 혈중 간수치의 변화를 측정 한 결과 공시 시료는 특이한 독성이 없는 것으로 나타남 (그림 9).

A) GOT/AST (sample only)



B) GPT/ALT (sample only)

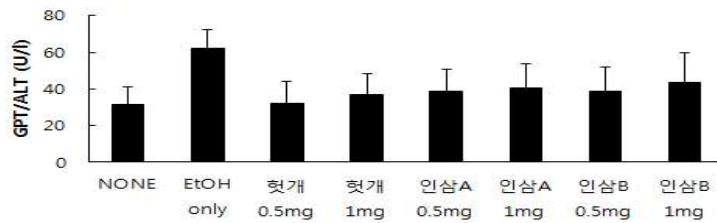
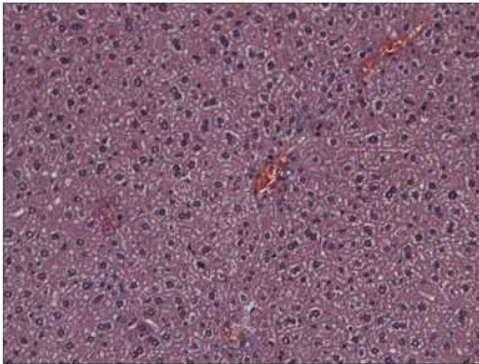


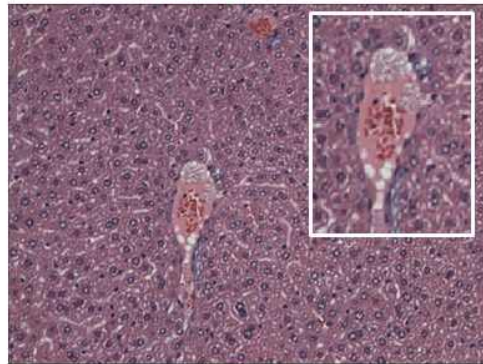
그림 126. 공시시료 투여가 간독성에 미치는 영향

- 한편 간 조직의 해부학적 소견을 측정한 결과, 에탄올 투여 군에서 혈관 주위 조직에서 약간의 세포 손상이 관찰되었으나, 이 조건에서는 현저한 조직 상해는 관찰되지 않음 (그림 10). 각 공시 시료를 단독으로 투여한 군에서도 조직학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않음.

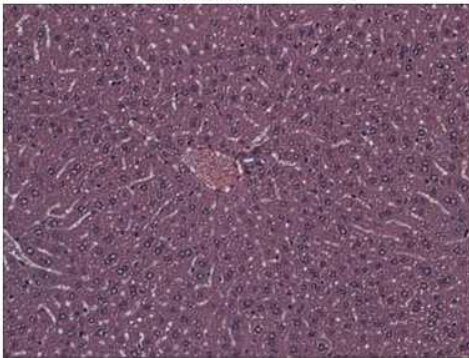
Normal



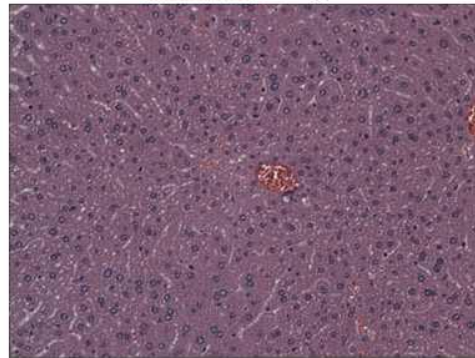
EtOH-treated



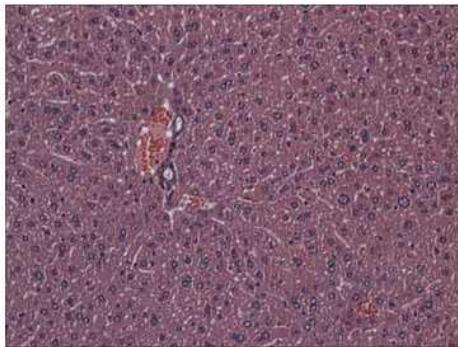
헛개나무-0.5 mg



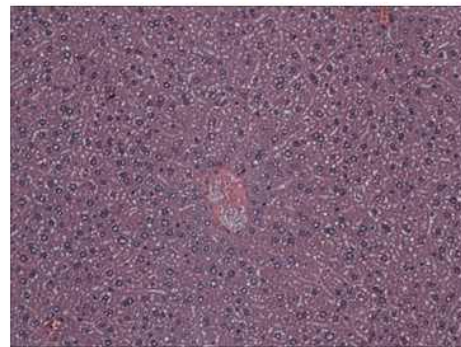
헛개나무-1 mg



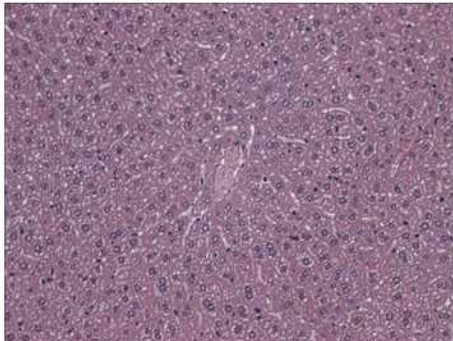
인삼열매-A-0.5 mg



인삼열매-A-1 mg



인삼열매-B-0.5 mg



인삼열매-B-1 mg

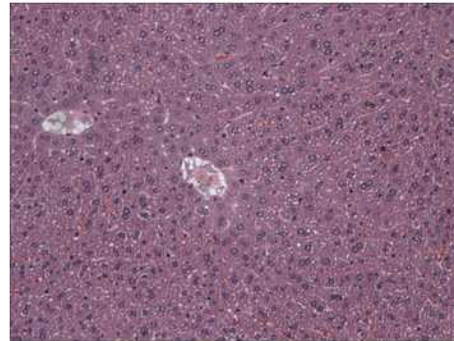


그림 127. 에탄올 투여 및 각 시료의 단독투여 마우스의 간 조직

- 한편 각 공시 시료를 전처리한 후 에탄올을 투여한 마우스의 간 조직을 조사한 결과, 에탄올 투여군에서 현저한 간 손상이 관찰되지 않아 판독에 난해함이 있었으나, 적어도 공시시료를 전처리한 마우스에서의 간조직 손상은 관찰되지 않음 (그림 11).

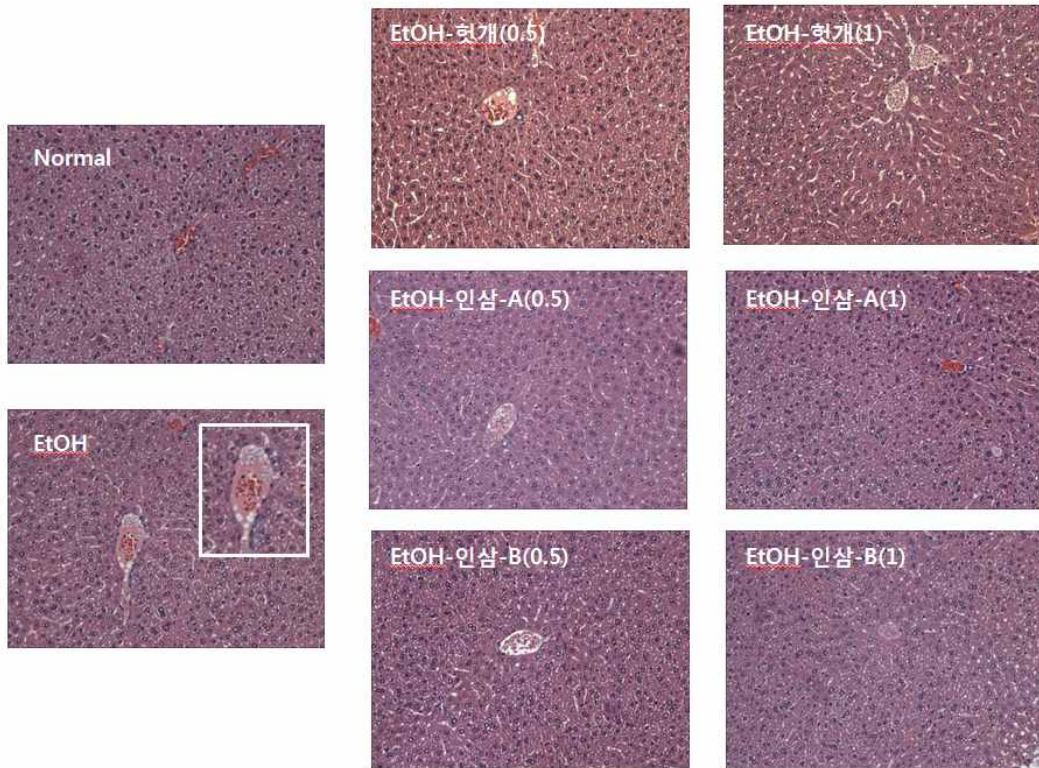



그림 128. 공시시료 전처리 후 에탄올 투여군의 간 조직

* 종합 분석

- 효소처리군 인삼열매(A) 및 주정 추출물 인삼열매(B)는 알코올성 간 질환에 의한 AST 및 ALT 상승을 억제하는 효과를 나타냄.
- 공시 시료에 의한 알코올성 간 질환 억제효과는 간 조직 중의 catalase 효소 발현의 상승과 관련이 있는 것으로 보임.
- 각 조직 내의 염증관련인자의 분석 결과, HO-1 분자의 발현 증가가 공시 시료에 의한 간 독성 억제와 관련 있는 것으로 관찰됨.
- 공시 시료에서는 간 독성은 물론 체중 감소나 간 및 비장의 중량 감소 등이 관찰되지 않아, 안전한 것으로 사료됨.

⇒ 본 실험 결과를 기반으로 ‘알코올성 간 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 인삼열매 추출물 및 그 제조 방법’이라는 제목으로 농진청과 공동 특허 출원 완료 (출원 번호: 10-2016-0093761)

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)		(11) 공개번호 10-2017-0018170 (42) 공개일자 2017년06월08일
(81) 국제특허분류(Int. Cl.) A62J 2/39 (2006.01) A62J 29/00 (2018.01) CPC특허분류 A62J 23/20F (2018.08) A62J 29/00 (2018.08)	(71) 출원인 대한민국의농촌진흥청장 경기도 용인시 처인구 동정면로 300 (공농) (농)농촌진흥청(보령캠퍼) 충청북도 영주시 청원구 오창읍 당정출판길 28	(72) 발명자 이계열 경기도 수원시 영통구 삼성로329번길 38 413호 프 크 124동 802호 김광숙 충청북도 영주시 청원구 출판로 101, 408동 802 호(수정동, 김원천대학1관건110호) (공민영 발수) (74) 대리인 특허법인 아베

국제 청구항 수 : 총 8 항
 (84) 발명의 명칭 발효용질 및 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 인삼열매 추출물 및 그 제조 방법

(87) 요약
 본 발명은 인삼열매로부터 발효용질 및 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 인삼열매 과육 농밀구조를 이용하여 제조한 인삼열매 냉동 과육에 페리나시제, 셀룰라아제 및 펙티나제용액이첨가된 인삼액에 침지하는 단계와 인삼액은 별도로 하는 이상의 가온처리 후 소용액 추출을 실시하고, 45-65℃의 온도를 유지하여 국물 추출된 후, 인삼액(1)의 후 침출이 증가하고, 동시에 발효용에 대한 간 세포 보호효과를 가지는 고품질의 인삼열매 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

주요도 - 표 1

인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)
인삼액(1)	인삼액(2)	인삼액(3)	인삼액(4)	인삼액(5)	인삼액(6)	인삼액(7)	인삼액(8)	인삼액(9)	인삼액(10)

(81) CPC특허분류 A27J 2000/00 (2013.01) A27J 2200/20 (2013.01) A27J 2200/22W (2013.01) A27J 2200/44 (2013.01) A27J 2200/28 (2013.01)	(72) 발명자 송정호 송정호 송정호 송정호 22, 128동 408호(현정안구+파르) 이계열 송정호 송정호 송정호 송정호 44-16, 103동 1608호(남부포천경+파르) 이계열 서울특별시 송파구 백제로701, 영도역로27 1108호 (영+동) 임영철 충청북도 음성군 소서면 피산로 22 문필학 서울특별시 강남구 도산대로87길 83, 201호(명동동, 명암대우빌딩스카운티11차)	송정호 서울특별시 강남구 도산대로87길 84, 301호(명동동, 명암대우빌딩스카운티10차) 오지영 경기도 용인시 수지구 전신로889길 10, 629동 1608호(용인천동, 전신로중앙광대지연가+파르) 임영철 경기도 평택시 안면로 34, 212동 1103호(화산동, 화산3단지고층주유기+파르) 송정호 경기도 고양시 일산동구 평리로 19, 현정빌딩의 1차 2동 718호(백석동) 이계열 서울특별시 송파구 송정대로 426, 304동 1201호(신천동, 죽곡리호)
---	--	---

이 발명을 포함한 국가연구개발사업
 과제고유번호 214000-01-0-00000
 과제명 농림축산식품부
 연구관리지원기관 농림수산식품 기술기획평가원
 연구수당명 농림축산식품연구개발사업 중추연구기술개발
 연구과제명 폐기물, 축산, 인삼기생충의 효율 관리를 위한 수송과 방출형 그루파가제 개발 및 전장 식물 개발(세무+제정) : 인삼 부산물을 이용한 화상병 및 건강기능성 식물 소재개발
 과제 총 171
 과제기간 2014.07.09 ~ 2017.07.28

그림 129. 인삼열매 추출물 관련 특허 출원

(5) 인삼열매 추출물의 원료화

○ 1차년도 목표였던 인삼열매 추출물의 원료화와 관련하여 기능성분의 기준규격 설정을 위한 지표물질 진세노사이드 Re의 밸리데이션 실험을 수행함.

가. 지표물질 밸리데이션

- 인삼열매의 지표물질 Re를 대상으로 한양대학교 약학대학에서 자사시험법으로 밸리데이션을 진행하였음. 진세노사이드 Re와 추출물을 각각 50% MeOH에 녹여 HPLC (Waters alliance system, PDA detector)를 이용하여 분석하였고, C18 5 μ m 4.6 X 250mm (Shiseido capcell pak UG-120) 컬럼을 이용하여 203 nm에서 측정하였음.

1. 장비와 재료

1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(100 mL)
- 1.1.2 HPLC용 유리병
- 1.1.3 용매용 일회용 실린지
- 1.1.4 여과용 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μ m)
- 1.1.5 초음파진탕기
- 1.1.6 Column : Shiseido C18 5 μ m 4.6 X 250 mm

1.2 분석장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래프
- 1.2.2 자외부흡광광도검출기(UV Detector)
- 1.2.3 HPLC: Waters Alliance system with a PDA detector

2. 표준물질 및 일반시약

2.1 표준물질

- 2.1.1 진세노사이드 Re
분자식 : C₄₈H₈₂O₁₈, 분자량 : 947.15, CAS No. : 52286-59-6

2.2 일반시약

- 2.2.1 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.2.2 증류수(Distilled water)
- 2.2.3 메탄올

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

- 3.1.1 표준물질을 50%메탄올로 녹여 1mg/ml의 농도로 만듦
- 3.1.2 상기 용액을 serial dilution 하여 0.5, 0.25, 0.125, 0.065 mg/ml의 5가지 농도로 만듦
- 3.1.3 을 필터링하여 HPLC에 10ul 주입

3.2 추출물 제조

- 3.1.1 추출물을 10mg/ml의 농도로 메탄올에 녹임
- 3.1.2 필터링하여 10ul 주입

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

- 1) 특이성: 불순물, 분해물, 배합 성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 표준물질 1 mg/ml과 추출물 10 mg/ml을 HPLC를 이용하여 분석하였을 때, 첨가제 및 주변 화합물들이 지표물질의 retention time에 영향을 주지 않았으며, 높은 분리도를 보임.

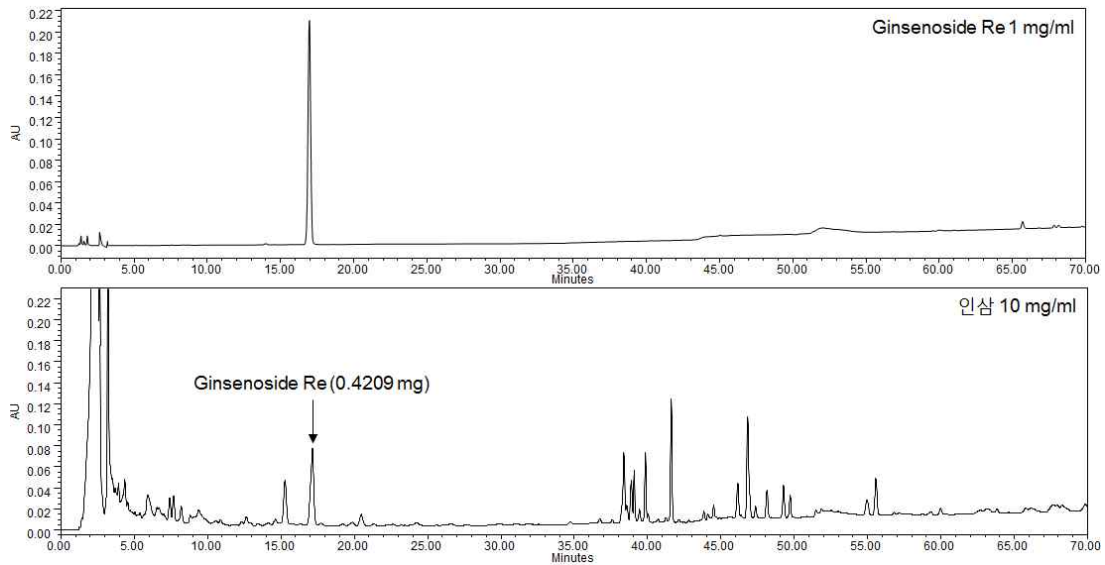


그림 130. 진세노사이드 Re 및 인삼열매 추출물의 HPLC 분석 결과 자료

- 2) 정확성: 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며, 인삼열매에서 근접정도 95.6 ~ 100.6%를 나타내어 규격범위인 80~120% 내에 있어 적합한 것으로 나타남.

표 32. 진세노사이드 Re 측정값의 정확성

Analyte	Nominal concentration (mg/ml)	Intra-day (n = 5)			Inter-day (n = 3)		
		Observed concentration (n = 5) Mean ± SD	Accuracy (%)	Precision (%)	Observed concentration (n = 3) Mean ± SD	Accuracy (%)	Precision (%)
Ginsenoside Re	0.0625	0.0598 ± 0.0013	95.6382	2.1192	0.0598 ± 0.0002	95.6302	0.4141
	0.25	0.2511 ± 0.0008	100.4530	0.3005	0.2515 ± 0.0024	100.6133	0.9637
	1	0.9884 ± 0.0031	98.8414	0.3174	0.9953 ± 0.0067	99.5311	0.6711

- 3) 정량한계와 검출 한계: 정확성, 정밀성이 확보된 기기분석방법을 통하여 정량값으로 표현할 수 있는 시료 중 분석대상물질의 최소량인지 확인하는 것으로, 검량선은 검출한계에 근접한 분석 대상물질을 함유하는 검체를 가지고 작성되어야 함. 회귀직선에서 잔차

의 표준편차 또는 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 이용할 수 있음.

표 33. 진세노사이드 Re 분석값의 회귀 분석 자료

The regression data, LODs and LOQs for ginsenoside Re analyzed by HPLC.

	Regression equation ($Y = aX + b$)	R^2	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ginsenoside Re	$Y=2,627,279 + 11,165.04$	0.9999	62.5 $\mu\text{g} - 1,000 \mu\text{g}$	2.49 μg	7.55 μg

^aLOD refers to the limits of detection, S/N = 3.3.

^bLOQ refers to the limits of quantity, S/N = 10.

- 4) 직선성: 실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석 대상 물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하는 것으로, 표준품을 5개 농도별로 회석하여 검량선을 확인하였을 때, 0.0625 mg/ml ~ 1 mg/ml 내에서 유효한 직선성이 나타남.

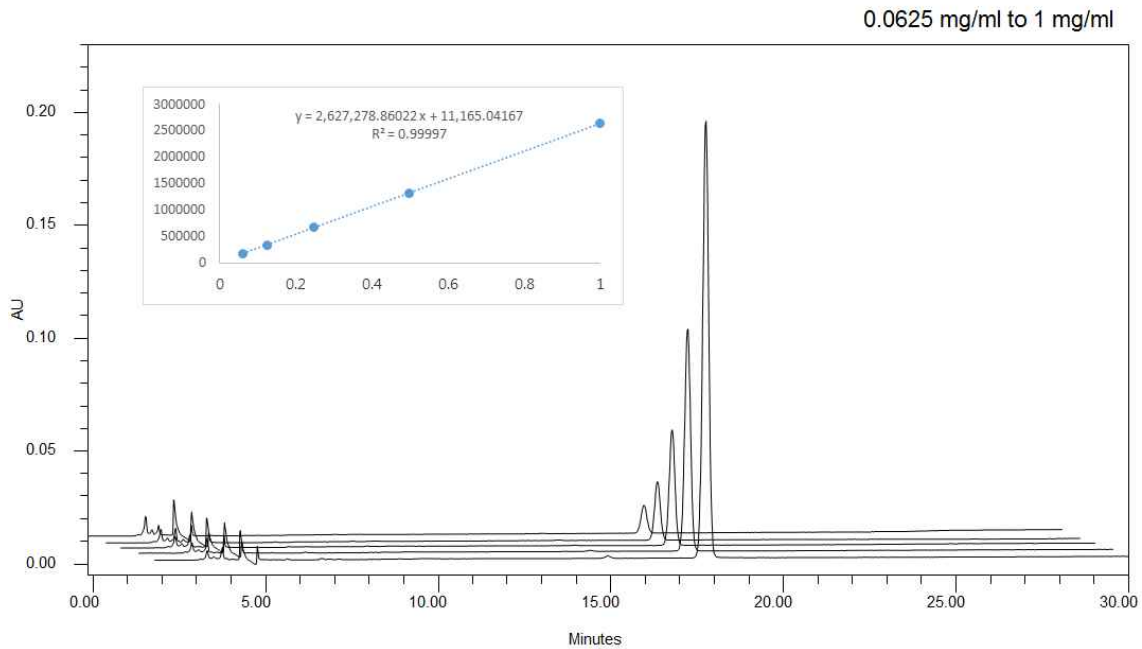


그림 131. 진세노사이드 Re 표준품의 검량선

- 5) 정밀성: 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 나타내는 것으로, 인삼열매 Re 함량(%)이 아래와 같이 나타나, 측정값들 사이의 높은 근접성을 보임.

표 34. 인삼열매 추출물의 진세노사이드 Re 반복 측정값

Con.(mg/ml)	Retention time	Area(UV sec)	Height((UV)
0.0625	16.754	171663	13663
0.0625	16.871	171123	13471
0.0625	17.066	163460	12736
0.0625	17.072	167339	13078
0.0625	17.386	167453	13489
0.25	17.279	667938	53625
0.25	17.28	670422	52497
0.25	17.349	671362	55013
0.25	17.245	671780	50478
0.25	17.166	673298	53414
1	17.247	2598557	205153
1	17.194	2599578	203151
1	17.35	2613300	207039
1	17.421	2612934	211116
1	17.291	2615691	203315

6) 범위: 정밀성, 정확성 및 직선성을 포함할 수 있는 범위(상한값, 하한값)로 설정 범위는 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양 또는 농도의 하한 값 및 상한값 사이의 영역 0.0625 mg/ml ~ 1 mg/ml 농도를 측정하여 본 결과 0.0625mg/ml ~ 1 mg/ml 범위에서 직선성이 나타나며, 정확성, 정밀성이 유지됨.

5. 인삼부산물(인삼잎) 추출물의 항염증 효과

가. UPLC-QqQ/MS를 이용한 염증유발 대식세포 내 지질대사체 프로파일링 분석

- 대식세포 RAW264.7에 Lipopolysaccharide (LPS)을 0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL 등의 농도별로 처리한 후, 광학현미경을 사용한 형태학 (Morphological study)을 수행
- 또한, 다섯 개의 세포시료 내 nitric oxide (NO), TNF- α , IL-6를 분석하므로 LPS 처리농도에 따른 염증도 증가를 확인
- 다섯 개의 RAW264.7 세포시료 내 지질대사체 분석을 위해 우선 Chloroform 및 Methanol을 사용하는 Bligh & Dyer법을 사용하여 리피드추출을 수행
- 최적화된 UPLC-QqQ/MS를 사용하여 각각의 시료 내 리피드 프로파일링을 수행
- Mass Hunter 프로그램을 사용한 데이터 전처리 후 Metaboanalyst 데이터 통계프로그램을 사용하여 다변량분석 (Multivariate analysis)을 수행
- 주성분분석 (Principal component analysis)을 사용하여 각각의 시료 내 지질대사체 데이터가 차이가 남을 확인하고, Heatmap을 통해 어떤 리피드가 염증의 정도와 상관성있게 변하는지를 관찰함.

나. 인삼잎 추출물을 투여한 당뇨 유도쥐의 혈액시료 내 지질대사체 분석

- ICR mouse에 5일 동안 control (구아바 잎 추출물) 또는 인삼잎 70%주정 추출물을 구강 투여한 후, Alloxan을 투여하여 당뇨를 유발시켜 샘플을 준비
- 네 종류의 ICR mouse (None (아무것도 투여하지 않음, 정상쥐), Alloxan only (Alloxan만 투여, 당뇨쥐), Control (당뇨쥐에 구아바 잎 추출물 투여), Ginseng (당뇨쥐에 인삼잎 70%주정 추출물 투여))로부터 채취한 혈액시료를 채취 후 지질대사체 프로파일링에 사용
- 네 종류의 ICR mouse 혈액시료 내 지질대사체 분석을 위해 Chloroform 및 Methanol을 사용하는 Bligh & Dyer법을 사용하여 리피드추출을 수행
- 기존에 확립한 UPLC-QqQ/MS를 사용하여 각각의 시료 내 지질대사체 프로파일링을 수행
- Mass Hunter 프로그램을 사용하여 데이터 전처리를 수행한 후, Metaboanalyst 데이터 통계프로그램을 사용하여 다변량분석 (Multivariate analysis) 수행
- 주성분분석 (Principal component analysis, PCA)을 통해 각각의 시료 내 지질대사체 데이터가 차이가 남을 확인하고, Heatmap을 통해 수경인삼 70%주정 추출물의 투여에 따른 당뇨 유도쥐의 혈액 내 지질대사체 변화를 관찰

다. 염증유발 대식세포 내 지질대사체 분석결과

- 대식세포 RAW264.7에 Lipopolysaccharide (LPS)을 0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL의 다섯 가지 농도로 각각 처리한 후, 광학현미경을 사용하여 형태학 (Morphological study)을 수행한 결과, LPS의 농도가 높을수록 RAW264.7 세포의 수지상 형태가 더욱 심해지는 것을 확인했다.

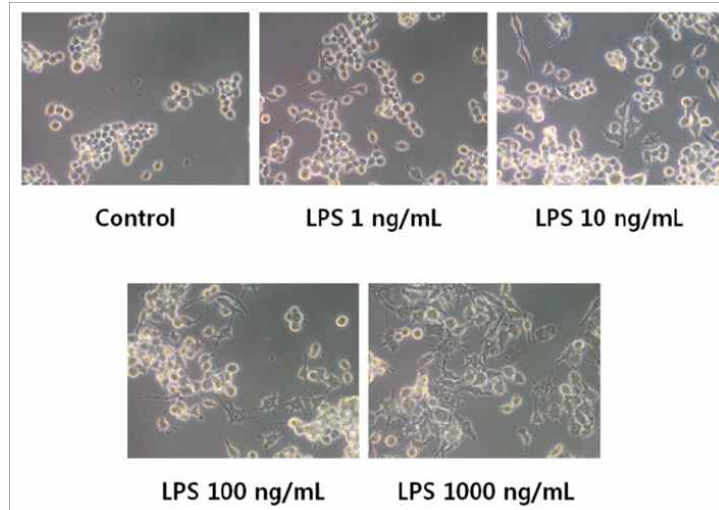


그림 00. LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 RAW264.7 세포의 형태 변화

- 대식세포 RAW264.7에 LPS를 0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL의 다섯 가지 농도로 처리한 후, 각각의 세포시료 내 nitric oxide (NO), TNF- α , IL-6를 분석했을 때, LPS 처리농도가 높을수록 NO, TNF- α , IL-6의 양도 증가하는 것으로 나타났다. 이는 LPS 처리농도가 높을수록 RAW264.7 세포의 염증 정도도 증가하는 것을 의미한다.

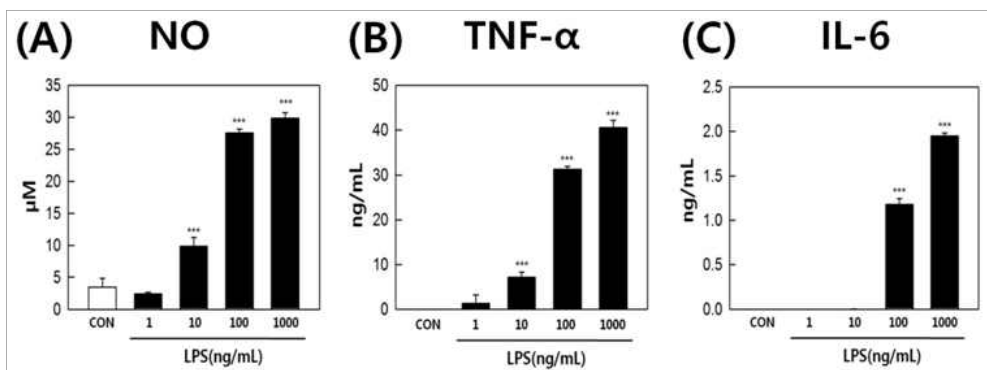


그림 00. LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 RAW264.7 세포 내 (A) NO, (B) TNF- α , (C) IL-6의 정량변화

- LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 다섯 개의 RAW264.7 세포시료 내 지질대사체 분석을 위해 우선 Chloroform 및 Methanol을 사용하는 Bligh & Dyer법을 사용하여 리

피드추출을 수행하고, 최적화된 UPLC-QqQ/MS를 사용하여 각각의 시료 내 리피드 프로파일링을 수행. 이어서 Mass Hunter 프로그램을 사용한 데이터 전처리 후 Metaboanalyst 데이터 통계프로그램을 사용하여 다변량분석 (Multivariate analysis)을 수행

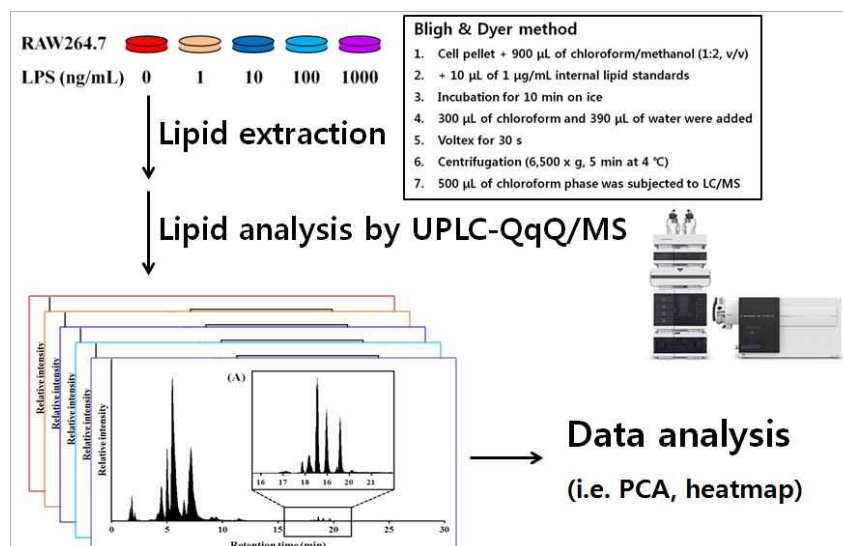


그림 . 염증유발 RAW264.7 세포 내 리피도믹스 분석 스킴 (Scheme)

- 주성분분석 (PCA)을 사용하여 LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 다섯 개의 RAW264.7 세포시료 내 지질대사체 데이터가 차이가 남을 확인함. Heatmap을 통해 LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 RAW264.7 세포 다섯 개의 그룹에서 유의적으로 차이가 나는 리피드들을 확인함. 붉은색일수록 상대적 정량 값이 높고 파란색일수록 정량 값이 낮게 나타난 것임. 다양한 리피드 클래스들을 분석하였는데 특별히 대표적인 중성지방인 Triacylglycerol (TG)은 LPS 처리농도에 따른 염증 정도가 높을수록 증가했고, 반대로 세포막을 구성하는 대표적 인지질인 Phosphatidylcholine (PC)은 감소하는 경향을 나타냄. 이는 염증과 대식세포의 대사적 상관성을 연구하는데 매우 의미있는 결과로 해석됨.

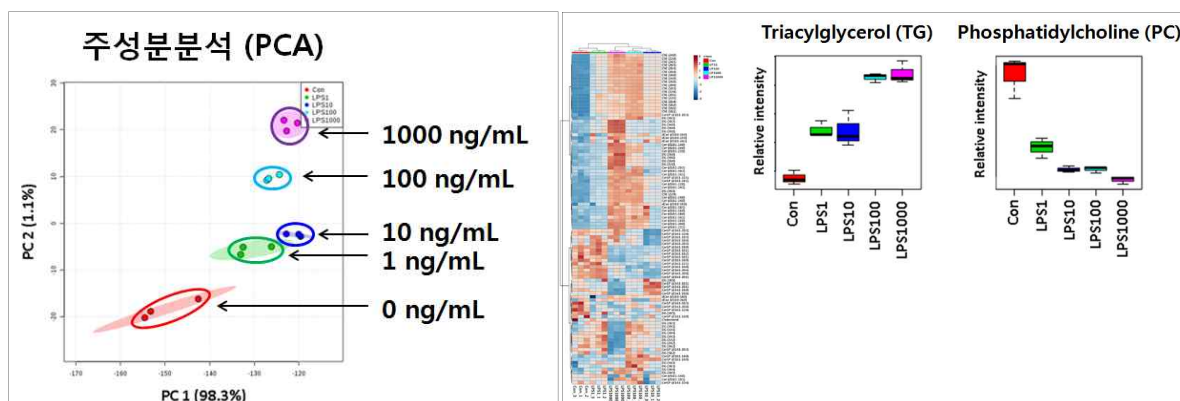


그림 . LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 RAW264.7 세포 내 지질대사체 프로파일링 데이터의 주성분분석 (PCA) score plot 및 LPS (0, 1, 10, 100, 1000 ng/mL) 처리에 따른 RAW264.7 세포 내 지질대사체 데이터의 Heatmap 및 TG와 PC의 Bar plot

라. 인삼잎 추출물을 투여한 당뇨 유도쥐 혈액시료 내 지질대사체 분석

- ICR mouse에 5일 동안 구아바 잎 추출물 또는 인삼잎 70%주정 추출물을 각각 구강 투여한 후, Alloxan을 투여하여 당뇨를 유도하는 일정으로 동물실험 샘플을 준비함

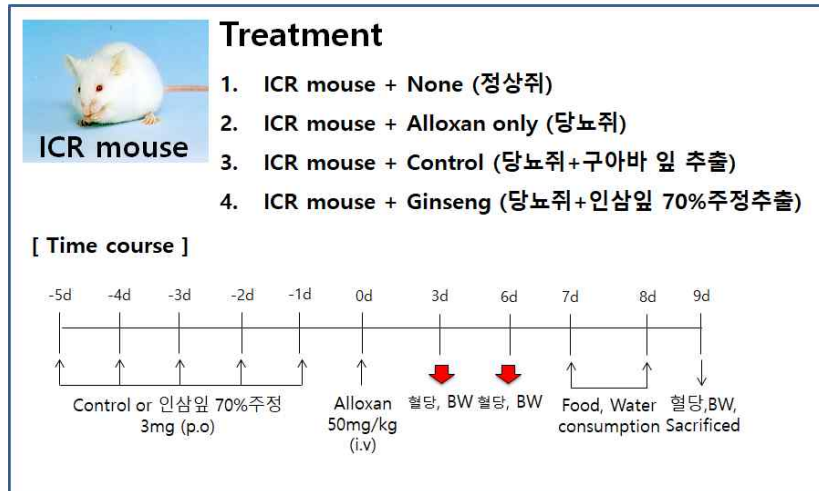


그림. ICR mouse 당뇨모델 동물실험 스킴(Scheme)

- 네 종류의 ICR mouse (None (아무것도 투여하지 않음, 정상쥐), Alloxan만 투여, 당뇨쥐), Control (당뇨쥐에 구아바 잎 추출물 투여), Ginseng (당뇨쥐에 인삼잎 70%주정 추출물 투여))로부터 채취한 혈액시료를 채취 후, Chloroform 및 Methanol을 이용한 Bligh & Dyer법을 사용하여 지질대사체를 추출하고, UPLC-QqQ/MS를 사용하여 각각의 시료 내 지질대사체 프로파일링을 수행. 이어서 Mass Hunter 프로그램을 사용하여 데이터 전처리를 수행한 후, Metaboanalyst 데이터 통계프로그램을 사용하여 다변량분석 (Multivariate analysis) 수행하여 정상쥐와 당뇨쥐, 그리고 의 네 가지 실험에 따른 혈액시료 내 지질대사체 변화 관찰

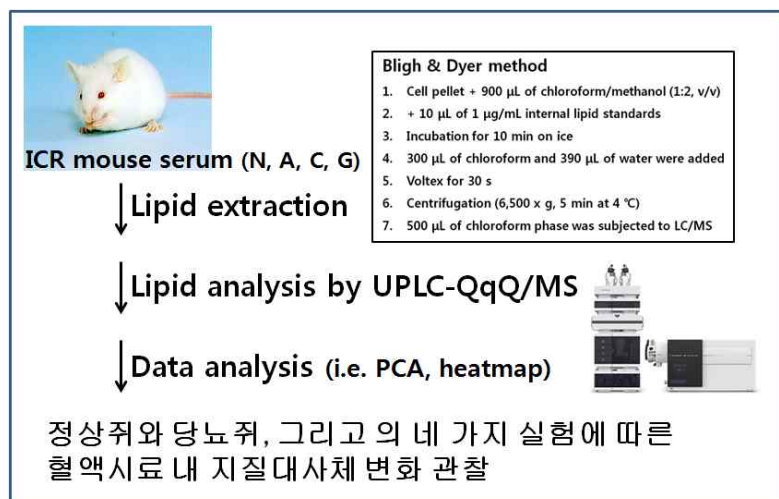


그림. ICR mouse 당뇨모델의 혈액시료 내 리피도믹스 분석 스킴 (Scheme)

- 주성분분석 (Principal component analysis, PCA)을 통해 네 종류의 ICR mouse (정상쥐, 당뇨쥐, 당뇨쥐에 구아바 잎 추출물 투여, 당뇨쥐에 인삼잎 70%주정 추출물 투여)로부터 채취한 혈액시료 내 지질대사체 데이터 사이의 차이를 확인함. 정상쥐와 당뇨쥐, 그리고 당뇨쥐에 구아바 잎 또는 인삼잎 추출물을 투여한 그룹, 이렇게 세 그룹의 지질대사체 프로파일링이 구분되는 것을 확인. 구아바 잎 또는 인삼잎 추출물 투여의 두 그룹 간에는 지질대사체 프로파일이 크게 차이가 나지 않음을 확인.

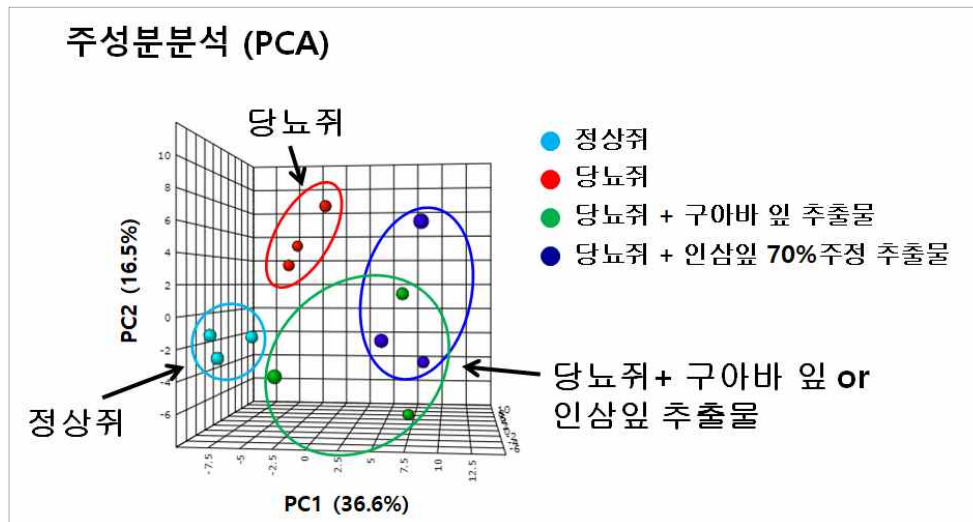


그림. 네 그룹의 ICR mouse 혈액시료 내 지질대사체 분석 데이터의 주성분분석 (PCA)

- 또한, 네 그룹의 ICR mouse 혈액시료 내 지질대사체의 Heatmap 및 Hierarchical clustering 분석을 통해 정상쥐와 당뇨쥐, 그리고 당뇨쥐에 구아바 잎 또는 인삼잎 추출물을 투여한 그룹, 이 세 그룹의 지질대사체가 유의적으로 차이가 남을 확인

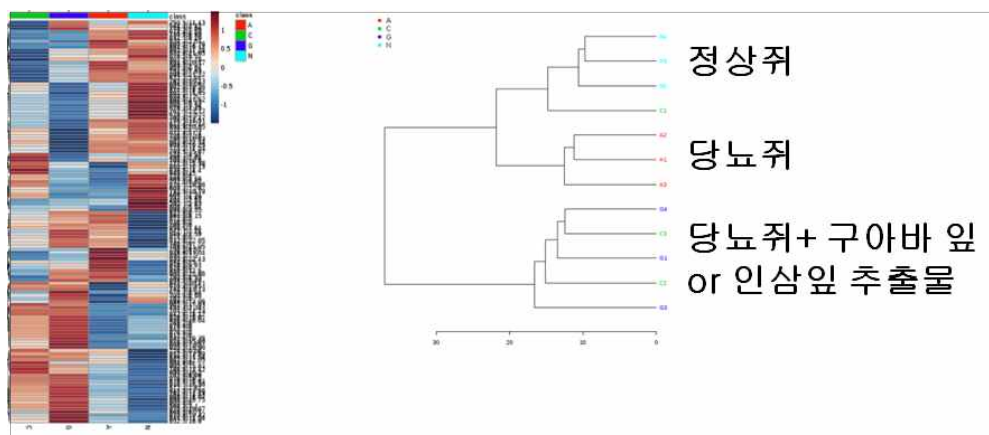


그림. 네 그룹의 ICR mouse 혈액시료 내 지질대사체 분석 데이터의 Heatmap 및 Hierarchical clustering 분석

3절. 인삼열매추출물의 인체시험 시제품 제작 및 수출용 인삼열매 추출물 건강지향식품 개발

1. 인체시험 시제품의 개발

가. 인삼열매 추출물의 인체시험 시제품 제작

1) 인체적용시험용 시제품의 배합비 설정

- 인체적용시험에 사용될 시제품의 배합비를 아래와 같이 설정함.

표 35. 인체적용시험용 시제품 배합비

주약 1 (125 mg)			주약 2 (250 mg)		
성분명	배합비 (%)	함량 (mg)	성분명	배합비 (%)	함량 (mg)
인삼열매추출농축분말	25.00	125.00	인삼열매추출농축분말	50.00	250.00
위약 분말	**.**	**.**	위약 분말	**.**	**.**
HPMC	**.**	**.**	HPMC	**.**	**.**
자당지방산에스테르	**.**	**.**	자당지방산에스테르	**.**	**.**
합계	100.00	500.00	합계	100.00	500.00

위약		
성분명	배합비 (%)	함량 (mg)
결정셀룰로오스101	**.**	**.**
말토덱스트린	**.**	**.**
유당혼합분말	**.**	**.**
이산화규소	**.**	**.**
스테아리산마그네슘	**.**	**.**
식용색소 황색 4호	**.**	**.**
식용색소 적색 40호	**.**	**.**
히드록시프로필메틸셀룰로오스	**.**	**.**
자당지방산에스테르	**.**	**.**
합계	100.00	500.00

2) 인체적용시험용 시제품 제작

- 네추럴에프앤피는 건강기능식품 전문제조기업으로 그간 의약품 제조에서만 적용하고 있던 엄격한 생산기준인 GMP를 건강기능식품제조에 도입하여 국내에서는 최초로 식품의약품안전처에서 GMP 국내 1호 지정업소로 허가를 획득한 중소기업임.
- 위의 설정된 배합비대로 인삼열매 추출물을 이용한 인체적용시험용 시제품을 총 120 병 (진약 80병, 위약 40병) 제작하였음.

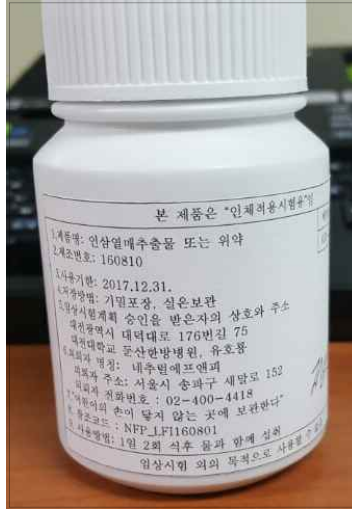


그림 132. 인체적용시험용 시제품 사진

시험번호	제품회사 연구 번호 2018-2241	시생산제조기록서		PAGE: 1-1		
제품번호	6001	제품명	인삼수출귀계 인체적용시험용 시제품(주약1)			
제품	시험기서 불기록서					
인체용량	500 mg	Lot번호	26,000 g	제조기서자	이진우	
제품번호	6001	제품기서번호				
제조년월일		제품제조일				
품질보증일	입력 요청 사항과 한도외 호칭정적					
1. 내용물중량 표시 불기름						
성분명	비율(%)	3250mg	Lot(%)	사출량(%)	고조번호	특이사항
인삼열매추출물(주약1)	98.900	2729.828	1.978240		11733	양호
말록티스톡	9.000	25.000	0.000200		02271	양호
말록티스톡	9.000	180.000	0.000200		13119	양호
이산화규소	1.000	9.000	0.000200		01611	
스파라세(이산화규소)	1.000	9.000	0.000200		00081	
옥탄올 4중 4중	0.076	0.650	17.500		03051	양호
옥탄올 4중 4중	0.020	0.100	0.000		02825	양호
옥탄올 4중 1중	0.038	0.038	1.250		03326	양호
폴리비닐피롤리돈	0.900	4.500	0.000		00055	양호
카실라그(아세트산)	0.100	0.500	0.000		00037	양호
합 계	100.000	900.000	26,000.000			
2. 시험/호칭						
2.1	비의 각 항목을 25.0%씩 사용하여 시험한다.					
2.2	인간 비로품을 혼합한다.					
2.3	인간용료 목적에 20%(w/w)의 주약과 결합한다. 계비(인간용료)에서 60%로 건조하여, 최종 수분이 3% 이하가 되도록 건조한다.					
2.4	비의 분말과 인체적용료 25.0%씩 함께 시험한다.					

(주)네추럴F&P

그림 133. 위약, 주약1, 주약2 시제품 시생산제조기록서

나. 인삼열매 추출물의 건강지향식품으로의 제품화

1) 인삼열매의 제품화: 개발사례 1



그림 134. 인삼열매 추출물을 함유한 ‘청춘팔팔’ 제품

- 제품명: 닥터문 청춘팔팔 (2016년 10월 출시)
- 연간 판매량 및 매출액: 2184 set, 약 5,500만원
- 식품유형: 건강기능식품
- 내용량: 500 mg × 180정 (90 g)
- 원료 및 함량: 인삼열매추출물분말, 산화아연, 옥타코사놀분말, 비수리추출분말, 결정셀룰로오스, 마카추출농축액분말, 자라분말, 하이드록시메틸렌셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 과라나추출물분말, 오미자농축액분말, 구기자추출물농축액분말, 산수유추출물분말, 복분자딸기과즙분말, L-아르기닌, 실크웬타이드, 이산화규소, 스테아린산마그네슘, 이산화티타늄, 자당지방산에스테르, 치자청색소
- 섭취량 및 섭취방법: 1일 1회, 1회 3정씩 물과 함께 섭취
- 영양 및 기능정보

1일 섭취량 당	함량	%영양소기준치
열량	0kcal	1%
탄수화물	2g	0%
단백질	0g	0%
지방	0g	0%
나트륨	0mg	0%

기능성분 또는 지표성분 : 아연12 mg, 옥타코사놀 7 mg

- 네추럴에프앤피는 인삼열매 추출물에 아연과 옥타코사놀 등을 넣어 면역증진 및 간 기능 개선 등에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품인 청춘팔팔을 제작하여 현재 갤러리아 면세점에서 판매중임. 소비자들의 반응이 좋아 현재 청춘팔팔2를 기획 중에 있음.

2) 인삼열매의 제품화: 개발사례 2



그림 135. 인삼열매 추출물을 함유한 ‘천기열매’ 제품

- 제품명: 천기열매 (2016년 12월 출시)
- 연간 판매량 및 매출액: 700 set, 약 1,400만원
- 식품유형: 액상차 (일반식품)
- 내용량: 60 ml × 30포 (1 box)
- 원료 및 함량: 인삼열매추출물, 헛개나무열매 추출 농축액, 타우린, 시클로텍스트린시럽, 황금 혼합추출 농축액, 무수구연산, 구연산삼나트륨, 정제수
- 섭취량 및 섭취방법: 하루 1~2회, 1회 1포
- 네추럴에프엔피는 인삼열매 추출물과 강장성분을 함유한 건강 음료를 개발하여 출시함. 타우린과 헛개 나무 추출물도 포함하는 파우치 형태의 음료로서 여름부터 소구되는 건강음료 시장에 성공적으로 진입하여, 면세점 및 온라인 및 오프라인을 통한 판로를 확보함.

다. 인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스 구축

1) 인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스 구축

- 기능별, 효능별 정보의 수집, 통합을 위한 데이터베이스 설계
- 사포닌의 타입별 문헌정보 수집 및 데이터베이스화
- 사포닌과 인간 질병 및 화학성분 (compound) 간의 네트워크 정보 수집 및 추출
- 인삼의 기능, 효능 관련 문헌 정보 수집 및 텍스트마이닝에 의한 유용 정보 추출
- 각 compound의 효능 및 부작용에 대한 메커니즘 확보

2) 수출 대상국 선호도 DB 구축

- 수출국 맞춤형 제품 생산을 위한 현지 소비자 니즈 및 동향분석을 통한 소비자 선호도 조사

- 해외 협력 네트워크 구축을 통한 해외 수출 마케팅 전략 수립

- ✓ 현재 (주)네추럴에프앤피는 중국, 대만, 러시아 등 세계적인 유통망을 갖고 있는 NHT Global과 네트워크를 구축하여 해외 협력사를 이용해 중국, 대만, 베트남, 홍콩 등으로 제품을 제안하여 “TwinSlim Diet Jelly, TwinSlim magic light, Herbalance, Essential probiotics” 등 다양한 수출용 제품을 제안하여 2014년 약 100만\$의 제조이익을 창출하였음.



그림 136. (주)네추럴에프앤피의 해외 협력 네트워크

- ✓ 인삼열매의 간 건강 기능성 소재 개발에 대한 해외 협력사와의 사전 미팅에서는 매우 호의적인 관심을 보였으며, 본 연구 과제를 통해 중국, 대만, 러시아 등 수출국 맞춤형 간기능 개선 기능성 제품을 판매할 예정임.

◆ 인삼열매의 간 건강 기능성 소재 개발 및 해외 시장에 대한 반응 검토 (베트남)

----- Original Message -----
 From: Trung (Trung) <trung@nht.com.vn>
 To: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Date: 2024년 06월 04일 10:58:01
 Subject: [Natural F&T] Proposal for health liver by ginseng berry.

Hi Jin,
 Thank you very much for your kind email.
 I am getting better and in our office now.
 We will pay attention to this new product & let you know the possibility in Vietnam soon.
 We appreciate your proposal & would expect your company is getting started & prosperity.
 Looking forward to see you & your family in Vietnam soon.
 Thanks & best regards,
 Trung

From: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Sent: Wednesday, June 04, 2024 12:29 PM
 To: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Subject: [Natural F&T] Proposal for health liver by ginseng berry.
 Dear Jin,
 How was your checking for operation last Saturday?
 I wish there is no problem in your work and hope you get better.
 Our R&D team is under new project and the main ingredient is ginseng berry extract for liver health.
 Hope you could be interested in this project. If you have any question, please let me know.
 Take good care of you.

A. We will pay attention to this new product & let you know the possibility in Vietnam soon.

Q. Our R&D team is under new project and the main ingredient is ginseng berry extract for liver health

• Ginseng berry extract for Liver Health



✓ Scientific name : *Panax ginseng* C.A. Meyer
 ✓ Family name : Araliaceae

◆ 인삼열매의 간 건강 기능성 소재 개발 및 해외 시장에 대한 반응 검토

—중국, 대만, 홍콩, 러시아의 판매처를 보유한 NHT Global에 관심도 문의

----- Original Message -----
 From: Trung (Trung) <trung@nht.com.vn>
 To: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Date: 2024년 06월 04일 10:58:01
 Subject: [Natural F&T] Proposal for health liver by ginseng berry.

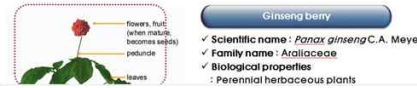
Hi Jin,
 Thank you very much for your kind email.
 I am getting better and in our office now.
 We will pay attention to this new product & let you know the possibility in Vietnam soon.
 We appreciate your proposal & would expect your company is getting started & prosperity.
 Looking forward to see you & your family in Vietnam soon.
 Thanks & best regards,
 Trung

From: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Sent: Wednesday, June 04, 2024 12:29 PM
 To: '진지인' <jinjimin@nht.com.vn>
 Subject: [Natural F&T] Proposal for health liver by ginseng berry.
 Dear Jin,
 How was your checking for operation last Saturday?
 I wish there is no problem in your work and hope you get better.
 Our R&D team is under new project and the main ingredient is ginseng berry extract for liver health.
 Hope you could be interested in this project. If you have any question, please let me know.
 Take good care of you.

A. Although we already have Chinese herbal product for liver health, I still want to know more about this Ginseng berry.

Q. I would like to introduce our new project; ginseng berry extract for liver health.

• Ginseng berry extract for Liver Health



✓ Scientific name : *Panax ginseng* C.A. Meyer
 ✓ Family name : Araliaceae
 ✓ Biological properties : Perennial herbaceous plants

그림 137. 해외 바이어 제품화 사전 미팅 자료

라. 수출 활성화 마케팅 전략 수립

1) 해외 수출을 위한 마케팅 기본 전략의 수립

- 현재 관련 제품의 일반 현황 조사 : 제품화, 시장 내 컨셉, 주요 소비자, 주요 수출 국가 등
- 수출 시장 세부 조사 : 수출 국가의 관련 제품의 제품화 현황 및 소비자 접근 Process 조사
- 우선 진입 및 접근해야 할 전략 국가의 선정
- 전략 국가의 문화, 지역 및 시장 특성에 대한 조사
- 고객 세분화 및 Targeting
- 국가별 수출 가능 유통 채널 진입 전략 수립 : 직납, 간납 등 전 경로에 대한 검토를 통한 수출 현실화 (해외 직납 검토 및 Contact 가능한 신뢰성 있는 국내 Vendor 접촉 등)
- 각 년차별 단계별 진입 및 확장 전략
- 전략 국가별 차별화 컨셉의 도출 및 접근 방향

2) 연구 결과의 소비자 커뮤니케이션 방안 및 전략 제품 카테고리의 선정

- 예상되는 연구 결과의 전략 국가별 소비자 커뮤니케이션 방안 수립
- 개발 가능한 카테고리의 예상 선호도 및 소비 패턴 분석
- 전략 국가의 요구도를 반영한 최우선 경쟁 카테고리의 선정
- 제품 확장 방향성 설정 및 로드맵 구축

3) 마케팅 세부 실행 전략의 수립

- 선정 경쟁 카테고리 및 제품의 세부 소비자 Needs & Un-met Needs 조사
- 기존 제품 및 유사 카테고리의 Key Un-met Needs 및 제품의 한계성 조사
- Main, Sub Target의 선정 및 소비자 Turning 전략 수립
- 소비자 관점에서의 제품이 갖추어야 할 필수 요소 도출
- 주요 카테고리의 가격 범위, Type, 주력 유통 채널 도출
- 제품 사용 문구 검토 : 전체 관련 문구 - 전략 국가의 법적 범위 내 위반 사항
- 카테고리별 패키지 타입 및 Main Selling Point 도출
- 생산 효율화 검토 : 보유 공장 및 구색 보유를 위한 OEM 등 전 범위 검토
- 진입 가능한 전 유통 채널별 접근 전략 및 프로모션 방안 도출

다. 수출국 맞춤형 건강지향식품 및 건강기능식품 개발을 통한 단계적 수출 전략 구축

- 인삼열매 추출물을 이용한 수출국 맞춤형 건강지향 제품을 개발하여 중화권 시장을 선점하고, 국내 간건강 기능성 개별인정 허가 진행을 통해 기능성과 안전성이 입증된 과학적이고 신뢰성 높은 건강기능식품 생산을 통해 수출 체계를 마련함.
- 일반식품의 중국 수출을 위해 “해외 생산기업 등록”, “수출입 포장식품 라벨 검사감독 관리규정”, “포장식품 영양표기제”에 따라 제품생산 및 수출을 진행할 예정.
- 건강기능식품은 국가식품약품감독관리국에 ‘수입산 건강기능식품비준증서’를 발급 받아 진행할 예정이며, 이러한 절차는 대행업체를 통해 진행할 예정임 또한 중국보건협회의 정보 및 전문가를 활용하여 수출 맞춤형 건강기능식품 개발 예정임.

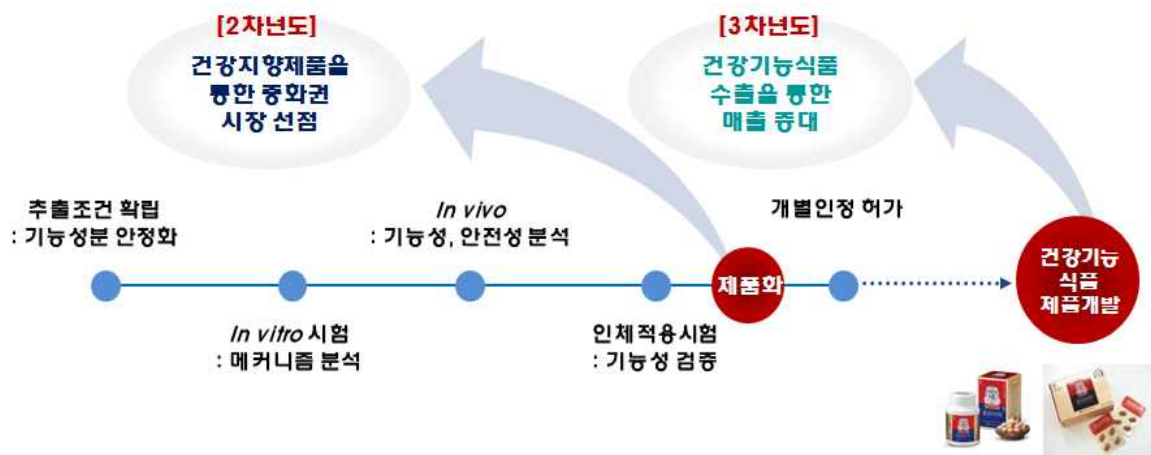


그림 138. 인삼열매 추출물을 이용한 수출용 건강기능식품 제품 개발 계획

2. 인삼열매 추출물의 간기능 개선 인체적용시험 모델 개발

- 인삼열매추출물의 간 기능 개선 기능성 및 안전성을 검증하기 위한 인체적용시험 모델 개발

- 연구대상자: 만 20세 이상, 만 70세 미만 성인남녀

1) 선정 기준

- ① γ -GTP 65 이상 350 이하의 소견을 가지고 있는 자
- ② 특별한 과거 질환이 없고, 평소 다른 약물을 복용하지 않은 자
- ③ 건강보조식품을 섭취하고 있지 않은 자
- ④ 이 연구의 목적을 충분히 이해하고 참여에 동의하는 자

2) 제외 기준

- ① 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 피험자
- ② 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용중이거나 간염보균자, 신급성간염 환자 등 심한 간 기능 장애가 있는 환자
- ③ 심질환, 신질환, 담도계 질환, 위장관계 질환, 암 등으로 약물을 복용 중인 자
- ④ 항결핵제나 비스테로이드성 소염진통제, 항생제 및 CYP450에 영향을 줄 수 있는 항전 간제를 복용하는 자
- ⑤ 정신적 무능력자, 본 연구에 사용되는 시험약 이외에 현재 연구개발 중인 다른 시험약을 복용하고 있는 자
- ⑥ 이전에 약물 과민이력이 있는 자
- ⑦ 다음의 기저질환이 확인된 자: 조절되지 않는 고혈압(고혈압 약물 복용 후에도 수축기혈압 > 140mmHg 및 이완기혈압 > 90mmHg), 제 1형 당뇨병 및 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자, 악성종양, 결핵, 천식, 녹내장, 다발성경화증, 정신병의 소견을 보이는 우울증, 양극성 정서장애, 정신분열증, 치매, 지방간, 약물성/알코올성 간염, 간경화증, 만성신부전증, 거식증, 이상식욕항진, 간질
- ⑧ 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- ⑨ 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- ⑩ 갑상선기능저하증, 쿠싱증후군 등 체중에 영향을 미칠 수 있는 내분비질환 병력이 있는 자
- ⑪ 3개월 이내에 식욕억제제, 식욕완화제, 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬, 암페타민, 싸이프로헵타딘, 페노다디아진 등의 약물을 복용한 경험이 있는 자
- ⑫ 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자
- ⑬ 법적으로 임상시험에 참가가 불가능한 자
- ⑭ 본 임상시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

3) 시험 디자인

구분	내용											
실험대상자 선정	만 20세 이상 만 70세 미만의 성인 남녀 100명											
집단분류	1) 위약 섭취 (PC; placebo group, n=33) 2) 저농도 인삼열매추출물 섭취 (LPG; low dose panax ginsen ingestion group, n=34) 3) 고농도 인삼열매추출물 섭취 (HPG; high dose panax ginsen ingestion group, n=33)											
임상시험 설계	무작위배정, 이중맹검, 평행, 위약대조											
투여방법 및 기간	1) 대조식품군: 위약 캡슐을 1일 2회 (아침, 저녁), 1회 1캡슐, 12주간 복용 (250 mg * 2캡슐 = 1일 총 500mg 복용) 2) 시험식품군: ① 저용량 시험식품을 1일 2회 (아침, 저녁), 1회 1캡슐, 12주간 복용 (125 mg * 2캡슐 = 1일 총 250mg 복용) ② 고용량 시험식품을 1일 2회 (아침, 저녁), 1회 1캡슐, 12주간 복용 (250 mg * 2캡슐 = 1일 총 500mg 복용)											
임상시험 방법	<p>피험자를 총 100명[고용량 시험식품군 33명, 저용량 시험식품군 34명, 대조식품군 33명]으로 세 군으로 나누어 임상 연구를 진행하였음. 본 연구에 참여할 것을 서면으로 동의한 자로 피험자를 선정하고 필요한 임상검사 및 설문지를 받음. Visit 1에 피험자를 검사하여 Visit 2에 선정 및 제외기준에 적합한 피험자에 한하여 시험 책임자가 무작위로 대상자들을 시험식품군과 대조식품군으로 배정하여 총 8주간의 treatment period를 진행함.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Visit 1 -7d (-1wk)</th> <th colspan="3">Double-blind treatment period</th> </tr> <tr> <th>Visit 2 1d (0wk+7)</th> <th>Visit 3 42d (6wk±7)</th> <th>Visit 4 84d (12wk±7)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Screening</td> <td>무작위배정, 건강기능식품 배포</td> <td>건강기능식품 반납 및 재배포</td> <td>건강기능식품 복용 종료</td> </tr> </tbody> </table>	Visit 1 -7d (-1wk)	Double-blind treatment period			Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 42d (6wk±7)	Visit 4 84d (12wk±7)	Screening	무작위배정, 건강기능식품 배포	건강기능식품 반납 및 재배포	건강기능식품 복용 종료
Visit 1 -7d (-1wk)	Double-blind treatment period											
	Visit 2 1d (0wk+7)	Visit 3 42d (6wk±7)	Visit 4 84d (12wk±7)									
Screening	무작위배정, 건강기능식품 배포	건강기능식품 반납 및 재배포	건강기능식품 복용 종료									
자료분석	모든 검사결과를 토대로 자료 분석 실시											
결과보고서 작성	자료분석을 실시한 결과를 토대로 결과보고서 작성											

4) 바이오마커

1. 유효성 평가 지표

- ① γ -GTP
- ② ALT, AST, 설문지

2. 안전성 평가 지표

- ① 일반혈액검사: Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet Count, Differential Count

(Neutrophil, Eosinophil, Basophil, Lymphocyte, Monocyte), MCV, MCH, MCHC, Uric acid

② 혈청생화학검사: Fasting plasma glucose, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, TG, HDL, LDL, Total cholesterol, LDH, SOD, GPx, Catalase

③ 뇨검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Blood, Leukocyte

④ 혈청검사 : HBsAg test (Visit 1에서만 실시)

3. 활력징후, 신체검사 및 계측

① 활력징후: 혈압, 맥박, 체온

② 신체검사: 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내부비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 증양

③ 신체 계측: 키, 체중, 체질량지수

5) 임상연구윤리심의위원회 (IRB) 심사

- 상기의 인체적용시험 디자인으로 IRB로부터의 승인을 받아, 인체적용시험 수행을 위한 요건을 갖춘.

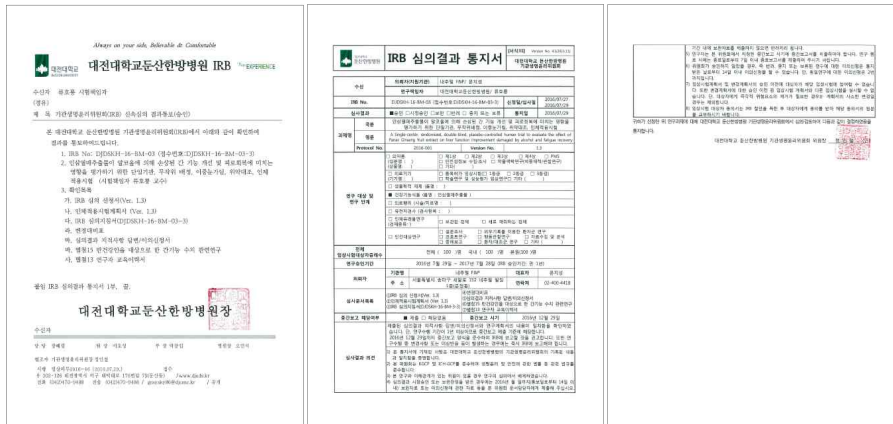


그림 139. 인삼열매 추출물을 이용한 인체적용시험 IRB 심의결과 통지서

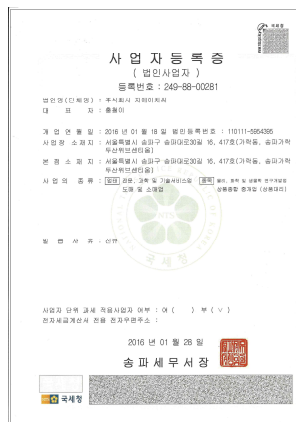


그림 140. CRO 기관의 사업자 등록증

3. 인체적용시험을 통한 안정성 확보 및 효능 규명

가. 인체적용시험의 배경

1) 천연물 기반의 건강기능식품시장의 성장

개발회사	화합물	기원(학명)	적응증	개발단계
Abbott Lab	ABT-594	Ecuadorian frog	진통제	전임상
AMRAD	Conocurvone alogue(AM1401)	Western Australian smokebush	항 HIV	전임상
Bristol-Myers Squibb	Eleutherobin	Rare Australian soft coral	유방암, 난소암	전임상
	Paclitaxel(Taxol)	<i>Taxus brevifolia</i>	불응성유방암, 난소암	시판
Eli-Lilly&Co	Cryptophycins	Blue-green algae	항암	전임상
Calbiomarine Tech.	Product aquaculture	<i>Bugula neritina</i>	전이성 악성 melanoma	임상
Intrabiotics	IB-367	Protegrin	구강점막염	임상
Marine habor branch	Discodermolide	Sponge	항암	전임상
NCI	Dolostatin 10	Mollusc (<i>Dolabella auricularia</i>)	항암	임상
NCI / Eisai US	Halichondrin B	Marine sponge	항종양, 난소암	전임상
Pharmaprint	Standardized ext	Saw palmetto berries	전립선 과형성증	임상
Phytera	Cyclomarin	Caribbean sea whip	항염증	전임상

그림 141. 천연물의 다양한 활용 사례

- 천연물로부터 생리활성물질을 찾아 이를 인체에 긍정적으로 적용하는 연구는 이미 오래 전부터 많은 연구자들에 의해 이루어져 옴. 특히 특정 질환 및 질병에 대한 예방제제 또는 치료제로서, 그리고 건강보조제의 형태로 식물자원이 널리 이용되고 있는 실정임 (김미경 등, 2005; 이건순, 2005). 특히, 우리나라의 경우, 경제성장 및 국민소득의 증대와 더불어 각종 성인병이 증가 추세에 있기 때문에 특정 타겟 질환 및 질병의 치료 및 예방을 목적으로 하는 기능성식품 및 건강식품에 대한 관심도가 급증함. 여기에, 근거중심의 과학과 의학의 기술이 발전하고 여러 약용 식물의 다양한 형태를 바탕으로 발전시킨 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 이들을 추출·정제 하여 기능성 식품 및 의약품으로 개발함으로써 많은 관심이 고조되고 있음 (최혜미 등, 2002; 김미경 등, 2005; 강대일, 2011).
- 국내의 건강기능성 식품시장은 이미 2015년도에 그 순수 규모가 2조3천억에 육박하였으며, 이는 전 세계 건강기능성 식품 시장의 10% 수준임. 세계 기능성 식품 시장은 미국이 99년 445억불로 세계시장의 35%를, 유럽이 422억불로 33%, 일본이 232억불로 18%를 점유하고 있으며 미국, 유럽, 일본이 세계 시장의 86%를 차지하고 있음 (통계청, 2008). 또한, 현재 유통판매 되고 있는 건강기능식품들 중 식물추출물이 21.0%로서 가장 높은 비율을 차지하고 있음 (손숙미와 박진경 2004; 이건순, 2005; 윤선 등, 2006).

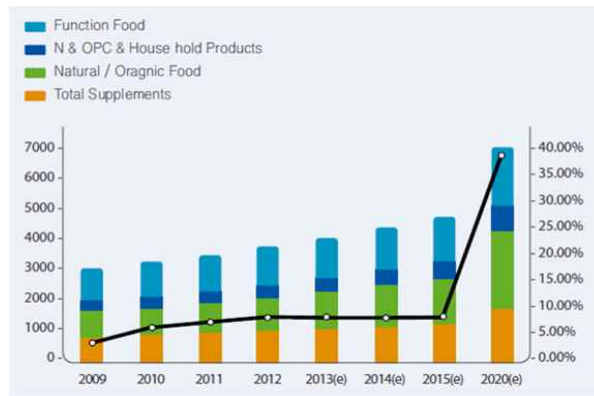
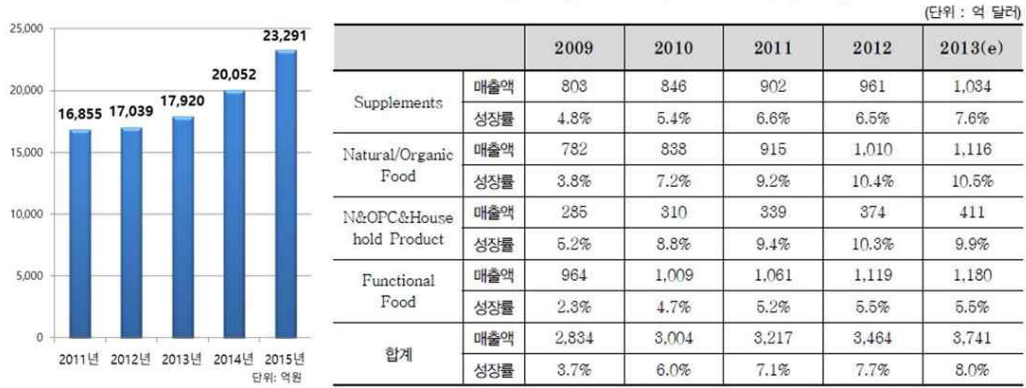


그림 142. 국내 및 세계의 건강기능식품 시장 현황

2) 인삼열매추출물의 특성



그림 143. 건강기능식품들 중 인삼/홍삼제품이 차지하는 비율

- 2015년까지 조사된 발표에 따르면 다양한 건강기능성 제품들이 시판되고 있으며 그중에 인삼의 형태의 가공식품들이 약 40%를 차지하는 등 현재까지도 인삼자원을 활용한 다양한 기능성 식품들이 개발되고 있음.

인삼뿌리와 인삼열매의 성분 효능 비교

가공 인삼열매와 6년근 인삼뿌리
진세노사이드 | Ginsenoside
종류별 효능 및 함유량 비교 분석

시료 : 인삼열매 가공 분말, 6년근 인삼 분말
분석 : HPLC 분석장치
단위 : mg/g 일시 : 2015.02.10
담당 : 김홍수 연구기관 : 농약대학교

진세노사이드 종류	효능	가공인삼열매	인삼뿌리	비교
Rg1	학습능력 및 기억력 개선 항 피로 작용	5,454	3,71	1.47 배
Re	당뇨병 개선 및 혈당 저하 골수세포 합성 촉진 및 건보호	45,033	9,92	4.54 배
Rf	뇌신경세포 운동작용 저질과 산화억제 비만억제 혈당 감소	0,737	1,09	인삼의 67 %
Rg2	혈소판 응집 억제 기억력 강화 개선	5,054	0,18	28.00 배
Rh1	알레르기 증식억제 피부연령 효과 항 알레르기 항 암작용	1,097	0,08	13.71 배
Rb1	중추신경 억제 해당 진동 기억력 개선 간기능 보호 멜라닌 합성 촉진	5,061	5,16	거의 동등
Rc	진통 작용 단백질 및 저질합성 촉진	9,072	1,87	4.85 배
Rb2	항 당뇨 항 중독작용 간세포 증식 항산화 작용 노화억제 프라세로 증식	10,065	1,64	6.14 배
Rh3	혈당 강하	5,592	0,47	5.51 배
Rd	부신피질 호르몬 분비 촉진	23,046	0,54	42.88 배
Rg3	알레르기 억제 혈당 강하 항당뇨 내장억제 항사마제 기억력 향상	5,064	0,03	168.00 배
총사포닌		268,900	90,00	2.98 배



인삼열매의 알려진 효능



인삼열매에 많은 진세노사이드 Re

인삼열매에 주로 존재하는 진세노사이드로 뿌리근보다 함량이 특이적으로 높아 인삼과 다른 약리작용을 지니게 만드는 성분이다. 진세노사이드 Re는 항당뇨와 제증감소, 간기능 개선, 혈관손상을 억제하여 동맥경화를 낮추고, 에스트로겐과 유사한 구조를 지녀 갱년기 증상을 완화시키는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

그림 144. 인삼열매의 효능 관련 자료

- 인삼은 우리나라를 대표하는 약용작물로, 지용성 성분(지질, 지방산, 정유, 유기산, 폴리 아세틸렌, 페놀계화합물 등), 합질소 화합물(알칼로이드, 단백질, 아미노산, 펩티드 등), 탄 수화물(다당류, 2당류, 3당류, 조섬유 펙틴 등), ginsenoside, 비타민 등 다양한 성분들을 함유함. 인삼의 사포닌이라고 잘 알려진 ginsenoside는 당부분(glycone)과 비당부분 (aglycone)으로 구성된 배당체(glycoside) 화합물의 일종으로서 인삼의 가장 중요한 약리 활성성분으로 인정되고 있음.
- 과거에는 인삼의 뿌리 뿐만 아니라 줄기, 잎, 꽃봉오리 등 지상부를 차로 활용했다는 기록이 있으나 현대에 와서는 인삼의 뿌리만을 주로 이용하고 있음. 현재 인삼 지상부의 활용은 미미하며, 그냥 버려지는 폐자원으로 전락하였음. 하지만, 최근 분석기술의 발전에 따라 인삼의 다양한 부위의 성분 연구가 진행되었고 그 결과 인삼 잎 및 줄기, 열매에도 인삼의 뿌리와 같은 ginsenoside가 존재하는 것이 밝혀져 주목을 받고 있음.

- 01 면역기능
- 02 여성갱년기 증상 완화
- 03 혈액 순환을 원활하게 함 (혈행 개선)
- 04 체중조절
- 05 성기능 향상
- 06 인슐린 민감성을 높여서 혈당을 조절
- 07 항산화 작용



- 항암 효과 08
- 심혈관계 건강유지 09
- 콜레스테롤 수치 저하작용 10
- 간 보호작용 11
- 칼슘, 마그네슘, 아연 등 미네랄이 풍부함 12
- 풍부한 비타민과 무기질로 신체의 신진대사 활성화 생리활성 조절 13

그림 145. 인삼열매의 다양한 효능

- 연구 결과에 따르면, 인삼의 다른 부분보다도 인삼 잎과 열매에 ginsenoside의 함량이 가장 높다고 보고됨. 인삼의 잎에는 인삼뿌리 보다 4~5배, 인삼 줄기보다 9배 이상 ginsenoside 함량이 존재하는 것으로 알려졌으며 ginsenoside 종류 비교해 보았을 때에도 인삼 뿌리에 존재하는 대다수의 ginsenoside가 잎에 존재하는 것으로 나타남. 더불어 인삼 잎에는 인삼 뿌리의 10배에 달하는 ginsenoside Re와 5배 이상의 ginsenoside Rd가 함유되어 있는 것으로 조사됨. 잎 뿐만 아니라 인삼열매에는 뿌리에 비해 ginsenoside 함량이 2배 이상 많다고 알려졌으며 특히 ginsenoside Re는 뿌리보다 30배 많다고 알려져 있음. 4~6년 동안 재배하여 이용하여야 하는 인삼 뿌리와는 달리 인삼의 지상부위는 매년 봄에 싹을 틔워 가을철 퇴화되는 부위로 연중 이용이 가능하다는 점에서 뿌리에 비해 원활한 원료공급이 가능함.
- 노지에서 재배하는 인삼은 병충해를 막기 위해 많은 양의 농약을 사용함으로써, 인삼지상부에 비해 많은 양의 농약이 잔존할 수 있으므로, 이로 인해 화장품 소재 및 식품 소재로의 활용이 제한적임. 이에 비해 수경재배 인삼은 묘삼을 이용하여 4개월 재배하므로 농약으로부터 안전하다는 장점이 있음. 수경재배기술로 인삼을 재배함으로써 무농약 청정재배와 연중생산이 가능하고 2년근 크기(8-9g)의 수삼을 4개월 만에 생산할 수 있음. 또한 인삼부산물을 활용할 목적으로 개발된 수경재배 인삼은 세계에서 최초로 개발된 고속생산 기술로서 뿌리, 잎, 줄기를 모두 활용할 수 있고 기능성분 함량도 높아 고부가 식품, 의약, 화장품 소재로 적합하며 새로운 수요 창출이 가능함.

3) 알코올성 간손상의 증가

- 전 세계적으로 알코올의 소비량은 점증하고 있으며, 2013년도의 발표에 따르면 우리나라는 평균 12-21g의 알코올을 매일 섭취하는 것으로 알려져 있음. 알코올 간질환은 바이러스 간질환에 이은 두 번째 흔한 간질환의 이유이며, 알코올 관련 사망자 수도 연간 10만 명당 9.6명으로 위험군에 속하는 편임.
- 입원 환자를 대상으로 한 연구에 의하면 우리나라에서 알코올에 의한 간경변증은 약 25-30%였으며(Kim YS et al, 2003), 알코올 간질환 환자 727명을 평균 480일 추적 검사한 결과 사망률은 14.6%였고, 주 사망원인은 정맥류출혈(31.0%), 간부전(24.5%), 간신증후군과 패혈증(11.3%) 순으로 나타남. 특히, 만성 알코올성 간질환의 경우 비알코올성 지방간의 표현형과 상당히 비슷한 손상이 야기되며, 지방간 형태의 손상이 일어남. 또한, 산화적 손상과 염증성 손상이 동시에 일어나 다발적으로 간조직에 영향을 주어 괴사 및 재생을 더디게 하는 효과를 가져옴. 이러한 병리학적인 상태가 지속되면, 간성상세포가 활성화되어 섬유소 및 콜라겐과 같은 세포외 기질 등의 물질을 분비시켜서 섬유화를 초래하기도 함.
- 중증 알코올성 간손상에 대해 스테로이드, 영양요법, 펜톡시필린(pentoxifylline)을 처방하는 것이 권장되나 초기 또는 경도의 알코올 간손상에 대해서는 단주와 절주 외에 보조적으로 활용할 수 있는 건강기능식품이나 약물은 뚜렷하게 없는 실정임 (대한간학회, 2013).

알코올성 간질환의 병리학적 기전

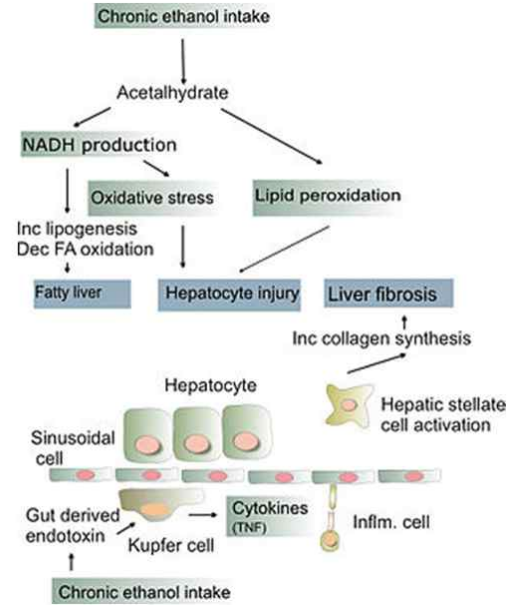
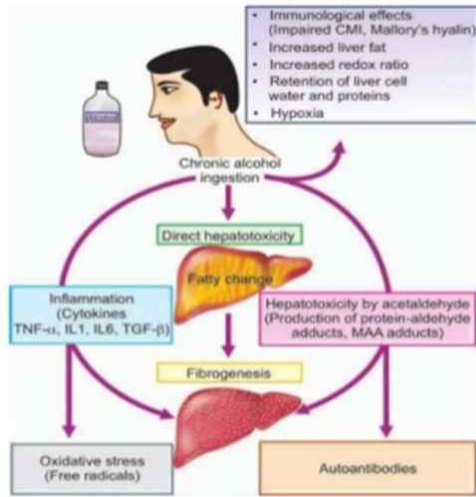


그림 146. 알코올성 간 질환의 병리학적 기전

나. 연구 목표

1) 인체적용시험의 목적

- 인삼열매추출물이 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선 및 피로회복에 미치는 영향 평가.
- 시험군 투여의 안전성을 확인.

2) 대상 질환

- 만 20세 이상 만 70세 미만 성인 남녀로서 장기간 알코올을 습관적으로 섭취 하는 인원 중 특히 간장 질환에 이상 소견이 있는 자들을 선정.

3) 인체적용시험 디자인

- 단일기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조, 인체적용시험
- 시험군: 고농도와 저농도 인삼열매 추출물 투여로, 총 2군
- 대조군: 위약 투여
- 본 인체적용시험은 만 20세 이상 만 70세 미만 성인남녀를 대상으로 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선 및 피로회복에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험임.
- 인체적용시험을 자발적으로 동의한 시험대상자는 스크리닝 이후 시험대상자 선정/제외 기준에 적합 여부를 확인 후, 적합한 경우에는 무작위 배정을 통해 시험군은 인삼열매 추출물을 12주간 1일 2회 복용하고, 대조군은 위약을 복용하게 됨.
- 시험대상자는 무작위 배정 후 12주간 시험물질을 복용한 후 외래 방문하여 인체적용 시험계획서에 따라 안전성 및 유효성 평가를 위한 의사의 검진 및 실험실적 검사를 받게 됨.

4) 대상자 선정 및 제외 기준

- 대상자 선정 기준

- 만 20세 이상 만 70세 미만 성인남녀
- 아래의 기준 중 1개 이상 해당하는 경우
 - ① γ -GTP 60 이상 192 이하의 소견을 가지고 있는 자
 - ② AST(GOT)가 40 이상 105 이하의 소견을 가지고 있는 자
 - ③ ALT(GPT)가 40 이상 135 이하의 소견을 가지고 있는 자
- 건강보조식품을 섭취하고 있지 않은 자
- 이 연구의 목적을 충분히 이해하고 참여에 동의하는 자

- 대상자의 제외 기준

- 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 피험자
- 3개월 이내 간기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용중이거나 간염 보균자, 신급성간염환자 등 심한 간 기능 장애가 있는 환자
- 심질환, 신질환, 담도계 질환, 위장관계 질환, 암 등으로 약물을 복용 중인 자
- 항결핵제나 비스테로이드성 소염진통제, 항생제 및 CYP450에 영향을 줄 수 있는 항진균제를 복용하는 자
- 정신적 무능력자, 본 연구에 사용되는 시험약 이외에 현재 연구개발 중인 다른 시험약을 복용하고 있는 자
- 이전에 약물 과민이 있는 자
- 다음의 기저질환이 확인된 자: 조절되지 않는 고혈압(고혈압 약물 복용 후에도 수축기혈압 > 140mmHg 및 이완기혈압 > 90mmHg), 제 1형 당뇨병 및 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자, 악성종양, 결핵, 천식, 녹내장, 다발성경화증, 정신병의 소견을 보이는 우울증, 양극성 정서장애, 정신분열증, 치매, 바이러스성 간염, 간경화증, 만성신부전증, 거식증, 이상식욕항진, 간질
- 시험제품에 대한 과민 반응력이 있는 자
- 병용약물로 인해 심각한 약물 상호작용의 위험성이 있는 자
- 갑상선기능저하증, 쿠싱증후군 등 체중에 영향을 미칠 수 있는 내분비질환 병력이 있는 자
- 3개월 이내에 식욕억제제, 식욕완화제, 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬, 암페타민, 싸이프로헵타딘, 페노다디아진 등의 약물을 복용한 경험이 있는 자
- 의학적, 정신적으로 연구약물 복용의 금기 사항을 가지는 자
- 법적으로 임상시험에 참가가 불가능한 자
- 본 임상시험에 비협조적인 태도의 가능성이 있는 자 또는 연구자가 판단하여 시험을 진행할 수 없다고 판단되는 자

5) 목표한 대상자의 수 및 그 근거

- 본 임상시험에서는 시험식품 투여군이 대조식품 투여군에 비해 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선 효과가 우월함을 증명하는 것으로, 인체를 대상으로 인삼열매추출물의 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선에 대해 평가한 자료가 검색되지 않아, 헛개나무

추출물과 칩뿌리 추출물을 이용한 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선에 대한 γ -GTP 변화량을 참고함 (박상욱 등, 대한본초학회지 28(6):31-38, 2013).

- 참고문헌에 따라 γ -GTP 변화량의 평균값이 대조군은 -9.3, 저용량시험군(칩뿌리추출물)은 0.2이고, 고용량시험군(헛개나무추출물)은 -28.1, $\sigma=27.0$ 이라 가정함. 이때 $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$ ($1-\beta=0.8$)를 기준으로, 일원배치분산분석(ANOVA)을 위한 피험자 수는 군당 17명이며, 탈락률(25%)을 고려하여 군당 등록할 피험자 수는 22명이나 안정적인 통계분석을 위해 군당 30이상으로 선별하여 총 등록 피험자 수는 총 102명으로 함.

- 목표유효성 평가 대상자 수:

- 대조군: 22명
- 시험군1(저용량 시험군): 22명
- 시험군2(고용량 시험군): 22명

- 무작위 배정 대상자 수

- 대조군 : 34명
- 시험군1(저용량 시험군): 34명
- 시험군2(고용량 시험군): 34명

6) 건강기능식품 복용 방법

(1) 시험군

- 시험 횟수는 1일당 2회, 12주간 총 168회를 투여함.
- 무작위로 배정되어 시험 순서 눈가림된 상태에서 수령 및 투여 방법을 지시받음.
- 복용하지 않은 추출물은 회수하여 기록함.
- 시험기간 동안 일체의 다른 처치는 시행하지 않음.

(2) 대조군(위약)

- 시험 횟수는 1일당 2회, 12주간 총 168회를 투여함.
- 무작위로 배정되어 시험 순서 눈가림된 상태에서 수령 및 투여 방법을 지시받음.
- 복용하지 않은 추출물은 회수하여 기록함.
- 시험기간 동안 일체의 다른 처치는 시행하지 않음.

7) 관찰 항목, 임상 검사 항목 및 관찰 검사 방법

- 방문별 관찰 항목 및 임상검사 항목

- 방문 시마다 임상실험실 검사와 유효성 평가변수 측정 (Kit 사용 포함)을 위해 최소 11ml (Visit 1)에서 최대 13ml (Visit 2 ~ Visit 4)의 채혈을 실시하고, 10ml (Visit 1 ~ Visit 4)의 소변검사를 진행함.

(1) Visit 1 : -7d (-1wk)

- 피험자 방문 및 서면 동의서 취득
- Baseline Number (이하 BN) 부여
- 인구학적, 병력 및 치료력 조사
- 활력징후, 신체검사 및 계측

- ① 활력징후: 혈압, 맥박, 체온, 호흡수
- ② 신체검사: 영양상태, 소화기계, 피부/점막, 근골격계, 이비인후계, 갑상선, 호흡기, 심혈관계, 대사/내분비계, 비뇨생식기계, 신경/정신계, 척추/사지 종양
- ③ 신체 계측: 키, 체중, 체질량지수

- 임상실험실 검사

- ① 일반혈액검사: Hematocrit, Hemoglobin, RBC, WBC, Platelet count, Differential Count (Neutrophil, Eosinophil, Basophil, Lymphocyte, Monocyte), MCV, MCH, MCHC, Uric acid, ESR
- ② 혈청생화학검사: Fasting plasma glucose, γ -GTP, AST, ALT, Total Bilirubin, Creatinine, BUN, Alkaline Phosphatase, Albumin, Total protein, TG, HDL, LDL, Total cholesterol, LDH, SOD, Catalase, NK Cell activity, CRP
- ③ 뇨검사: pH, Specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Nitrite, Blood, Leukocyte, hCG(가임기여성)
- ④ 혈청검사: HBsAg test (Visit 1에서만 실시)

- 심전도(ECG) 검사 (Visit 1에서만 실시)
- 만성 피로(Chalder's fatigue scale), 음주문제선별검사(AUDIT-K), 우울증 (Beck Depression Inventory), 건강과 관련된 삶의 질(EQ-5D) 설문
- 병력과 약물 투여력 조사
- 선정 및 제외 기준 판정
- 식사 및 복용방법 교육

(2) Visit 2 : 1d (0wk+7, Visit 1 기준)

- Visit 2 시점에 검사한 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 임상시험용 건강기능식품 투여 후 검사에 대한 기저치(Baseline)로 이용됨.
- 활력징후(혈압, 맥박, 체온, 호흡수)
- Randomization Number (이하 RN) 부여
- 임상시험용 건강기능식품 처방
- 병용약물 변화
- 식사 및 복용확인 및 방법 교육

(3) Visit 3 : 42d (6wk \pm 7, Visit 2 기준)

- 활력징후(혈압, 맥박, 체온, 호흡수), 신체검사 및 계측
- 임상실험실 검사
- 유효성 평가변수 측정
- 임상시험용 건강기능식품 처방
- 반납약 회수 및 순응도 평가
- 병용약물 변화

- 이상반응 평가
- 식사 및 복용확인 및 방법 교육
- 보조 평가변수 측정: 만성 피로 (Chalder's fatigue scale), 우울증 (Beck Depression Inventory), 건강과 관련된 삶의 질(EQ-5D) 설문

(4) Visit 4 : 84d (12wk±7, Visit 2 기준)

- Visit 4 시점에 검사한 활력징후, 신체검사, 임상실험실 검사, 유효성 평가변수 측정 결과 등은 임상시험용 건강기능식품 투여 후 검사에 대한 최종 평가시점(endpoint)로 이용됨.
 - 활력징후(혈압, 맥박, 체온, 호흡수), 신체검사 및 계측
 - 임상실험실 검사
 - 반납약 회수 및 순응도 평가
 - 유효성 평가변수 측정
 - 병용약물 확인
 - 이상반응 평가
 - 보조 평가변수 측정: 만성 피로(Chalder's fatigue scale), 우울증 (Beck Depression Inventory), 건강과 관련된 삶의 질(EQ-5D) 설문
 - 인체적응시험의 종료/중지

(5) Unscheduled Visit

- 임상시험 진행 중 시험 책임자가 이상약물반응이나 중대한 이상반응이라고 판단할 증상을 피험자가 호소하는 경우 또는 그밖에 필요한 경우에는 정규 방문 이외에 unscheduled visit을 할 수 있음.
- 시험 책임자는 피험자에 대하여 활력징후, 신체검사 및 계측, 임상실험실 검사, 심전도(ECG) 검사, γ -GTP, ALT, AST, Lipid parameters 평가, 병용약물 확인, 이상반응 평가 등 필요하다고 판단되는 검사를 시행할 수 있고, 해당 내용을 증례 기록서에 기록함.

8) 평가 계획표

표 36. 인체적용시험 평가 계획표

항목	검사일정			
	방문1 (선정방문)	방문2 (투여 전 1차 약물지급)	방문3 (투여 6주후 2차 약물지급)	방문4 (투여12주후 약물투약종료)
대상자동의서	○			
선정기준/제외기준	○			
Baseline Number 부여	○			
인구학적 조사, 병력 및 치료적 조사	○			
활력징후, 신체검사 및 계측	○		○	○
입상실험실 검사	○		○	○
알코올성 간 손상 검사 (γ -GTP, ALT, AST)	○		○	○
Total cholesterol 평가 및 약물복용 여부	○		○	○
심전도 검사	○			
만성피로, 음주문제선별검사, 우울증, 건강과 관련된 삶의 질 설문	○		○	○
이상반응, 병용약물 확인		○	○	○
선정 및 제외 기준 판정		○		
식사 및 복용방법 교육	○	○	○	
총괄적 유효성 평가				○
총괄적 안전성 평가				○
무작위 배정		○		
순응도 검사			○	○
이상반응 조사		○	○	○
제품 지급		○	○	
투여 횟수		1일 2회 × 12주		

* 1차 screening 이후 2차 방문은 10일 이내로 시행하며, 3차 방문까지의 시기는 2차 방문일로부터 6주±3일을, 4차 방문까지의 시기는 3차 방문일로부터 6주±3일을 허용함.

9) 유효성 평가 기준 및 평가 방법

(1) 평가기준

- 일차 유효성 평가: 기초상태(baseline)에서 12주(endpoint)까지의 γ -GTP 변화량 비교를 통해 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 알코올성 간 손상에 대한 간보호 효과가 우월함을 증명하고, 알코올에 의해 손상된 간 기능에 대한 개선에 효과적인 적합한 용량을 찾아냄.
- 이차 유효성 평가: 기초상태(baseline)에서 12주(endpoint)까지의 ALT, AST의 변화를 통해 시험식품을 투여한 군이 대조식품 투여군에 비해 알코올성 간 손상에 대한 간보호 효과가 우월함을 증명하고, 알코올성 간 손상에 대한 간보호에 효과적인지를 평가하며, 만성 피로 (Chalder's fatigue scale), 음주문제선별검사 (AUDIT-K), 우울증 (Beck Depression Inventory), 건강과 관련된 삶의 질 (EQ-5D)을 평가함.

(2) 통계분석방법

- 인구학적 정보 및 기타 치료 전 특성
 - 인구학적 정보(연령, 신장, 체중 등) 및 기타 임상시험용 건강기능식품 투여 이전에 실시한 검사치에 대하여 연속형 변수에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 실시함. 범주형 변수에 대해서는 카이제곱 검정(chi-squared test) 및 피셔의 정확 검정 (Fisher's Exact Test)을 실시하여 비교함.
- 일차 및 이차 유효성 자료의 분석
 - 시험식품 투여군이 대조식품 투여군에 비해 개선효과의 우월함과 용량결정을 위해 기초상태(baseline)에서 12주(endpoint)까지의 γ -GTP 변화량을 측정하여 Shapiro-Wilk 방법으로 정규성을 검정하고 정규성을 가정할 수 있으면 분산분석 (ANOVA), 가정할 수 없으면 Kruskal-Wallis test 기법을 적용하여 세 군의 평균 변화량의 차이를 검정함. 또한, 분산분석에서 유의한 차이가 있는 경우 Bonferroni 방법으로 보정하여 다중검정을 실시함.
 - 투여 전과 투여 후 관측된 세 군의 만성 피로(Chalder's fatigue scale), 음주문제 선별검사(AUDIT-K), 우울증 (Beck Depression Inventory), 건강과 관련된 삶의 질(EQ-5D) 설문 점수 변화량 및 ALT, AST의 변화량 각각에 대하여 Shapiro-Wilk 방법으로 정규성을 검정하고 정규성을 가정할 수 있으면 분산분석 (ANOVA), 가정할 수 없으면 Kruskal-Wallis test 기법을 적용하여 세 군의 평균 변화량의 차이를 검정함. 모든 검정은 양측 검정으로 유의수준은 0.05에서 수행됨.
- 안전성 자료의 분석
 - 활력징후 및 신체계측, 임상실험실 결과는 각 방문 시점별 평균 및 표준편차 등의 기술통계량과 임상시험용 건강기능식품 복용 전후 변화량으로 기술하고, 각 치료군 간의 비교는 분산분석(ANOVA)을 실시하며, 치료 전후 비교는 짝지은 표본 t-검정 (paired sample t-test) 또는 반복측정 분산분석(Repeated measure ANOVA)으

로 분석함.

- 신체검사 결과는 각 방문별로 증례 수를 계산하여 카이제곱검정(chi-squared test) 및 피셔의 정확 검정(Fisher's Exact Test)을 이용하여 비교 분석함.
- 임상시험 전반에 걸쳐 발생한 이상반응에 대하여는 신체기관별로 구분해서 증례 수를 계산하여 카이제곱검정(chi-squared test)을 이용하여 비교 분석함. 또한 발생한 이상반응을 중증도, 투약과의 관련여부별로 증례수를 산출하고 카이제곱검정(chi-squared test) 및 피셔의 정확 검정(Fisher's Exact Test)을 이용하여 비교 분석함.
- 약물 복용력은 임상시험 기간 동안 임상시험용 건강기능식품 이외에 피험자가 복용한 모든 약물을 기록하고, 기록된 약물은 계열별로 분류하여 평가함.

10) 이상 반응을 포함한 안전성의 평가 기준 및 평가 방법

(1) 평가 대상

- 시험에 참여한 전례(ITT군)에 대하여 평가함.

(2) 평가 기준

- 간 기능 및 신장 기능 등의 악화와 소화기 장애 발생 여부
- 본 시험에서 이상반응은 인체적용시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 발생하는 모든 바람직하지 않은 의학적 소견을 이상반응으로 분류함.

(3) 평가 방법 (통계분석 방법)

- 치료와 연관성이 있는 이상반응 발현건수를 시험군 별로 기술하고 1회 이상의 이상반응을 경험한 시험대상자 비율의 군 별 비교는 유의수준 0.05에서 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 수행함.

다. 연구 계획

- 본 인체적용시험 계획을 도식화하면 아래의 그림과 같음.

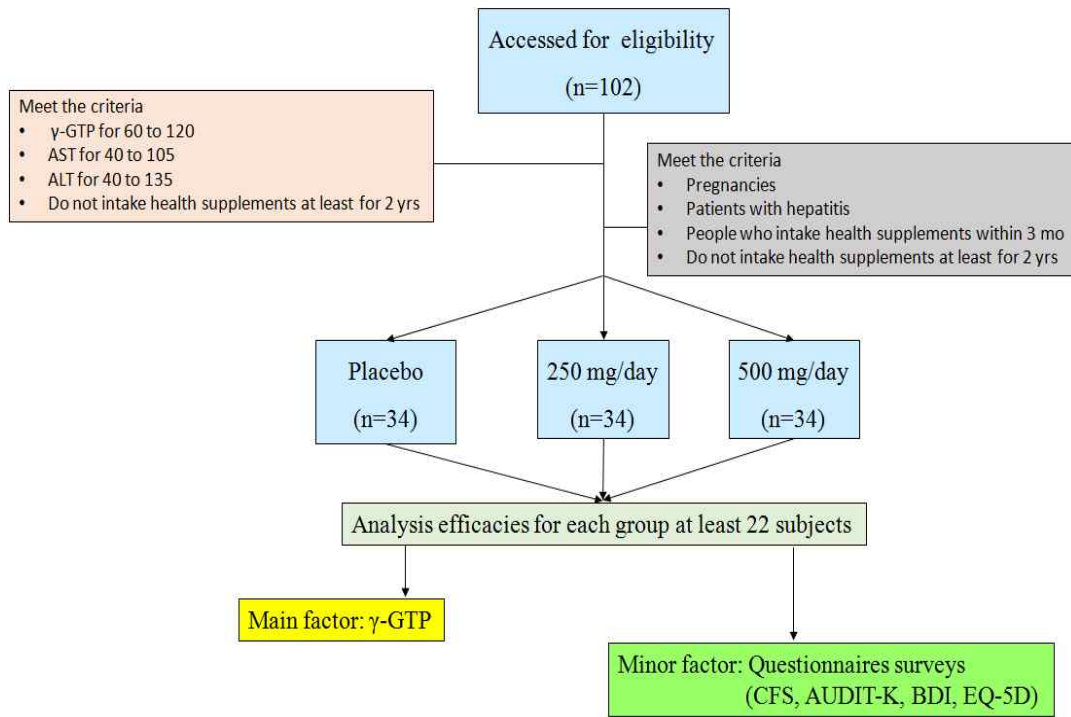


그림 147. 인체적용시험 연구 절차

라. 연구 결과

- 연구대상자는 모두 102명이 등록하여 이중 91명이 완료하였으며, 중도탈락은 11명이었으나 인삼열매 추출물의 부작용과 관련된 건은 없어서, 인삼열매 추출물의 안전성을 검증하였음.

1) 인삼열매 추출물의 항 알코올성 간 질환 효능 연구

(1) 주 평가 인자인 γ -GTP의 혈청 내 변화 관찰

- 연구 기간 동안 혈청 내 γ -GTP의 변화를 측정된 결과, 시험식품군의 경우 시간이 지날수록 γ -GTP의 양이 감소하는 경향을 나타내어 12주 후 측정 결과 baseline 측정값보다 유의하게 감소하였으며 이는 농도 의존적으로 나타남. 특히 고용량 섭취군의 경우 12주 후 측정 결과에서 대조식품군과 비하여 유의하게 감소하였음을 볼 수 있음.

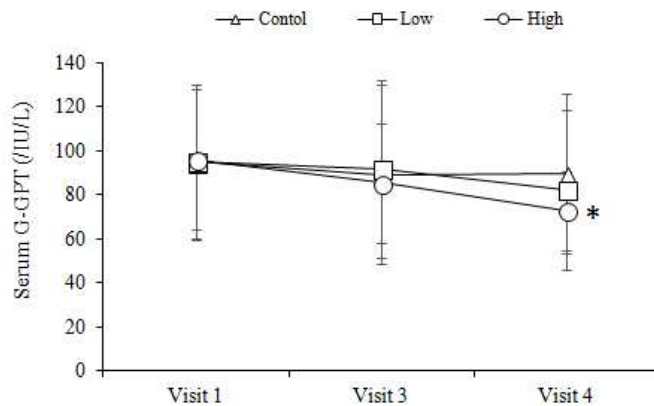


그림 148. 시간에 따른 혈청 내 γ -GTP의 변화량 비교

(2) 부 평가 인자인 간장 전이 효소의 혈청 내 변화 관찰 (AST, ALT, ALP)

- 간장 전이 효소인 AST, ALT, ALP의 변화를 측정한 결과 AST와 ALT 모두 시험식품 고용량 섭취군에서만 baseline과 비교하여 유의적으로 감소하였으며, 특히 AST의 경우 대조식품군과 비교하였을 때에도 유의차를 나타냄. ALP의 경우에는 군간에 유의한 변화가 나타나지 않음.

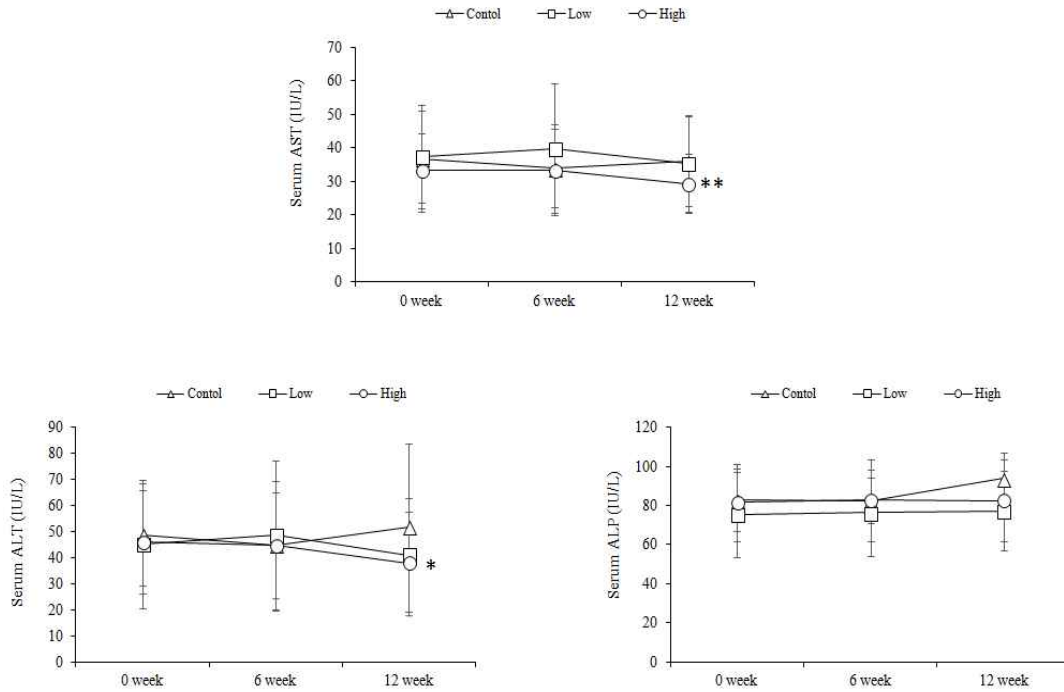


그림 149. 시간에 따른 혈청 내 AST, ALT, ALP의 변화량 비교

(3) 부 평가 지수인 설문지 조사 결과 현황 (한국형 피로도 조사: CFS, 한국형 음주관련 선별검사: AUDIT-K, 우울증: BDI, 건강관련 삶의 질 조사: ED-50)

- 알코올 섭취와 관련하여 피로도 및 우울증 정도를 알아보기 위하여 설문조사를 실시한 결과, 한국형 피로도 (CFS-36) 설문조사에서는 대조식품군에 비하여 시험식품 저용량 및 고용량 섭취군 모두 baseline에 비하여 피로도가 유의하게 감소한 것으로 나타났으며, 이는 대조식품군과 비교하여서도 유의하게 감소함. 한국형 음주관련선별검사 (AUDIT-K) 설문 조사 및 한국형 우울증 관련 (BDI) 설문 조사, 그리고 건강관련 삶의 질 (ED-50) 설문 조사에서는 대조식품군 및 시험식품군 모두 baseline에 비하여 유의하게 감소하거나 증가함을 나타내어 긍정적인 결과를 보였으며, 대조식품군도 같은 경향을 나타내어 플라시보 효과가 크게 관찰됨.

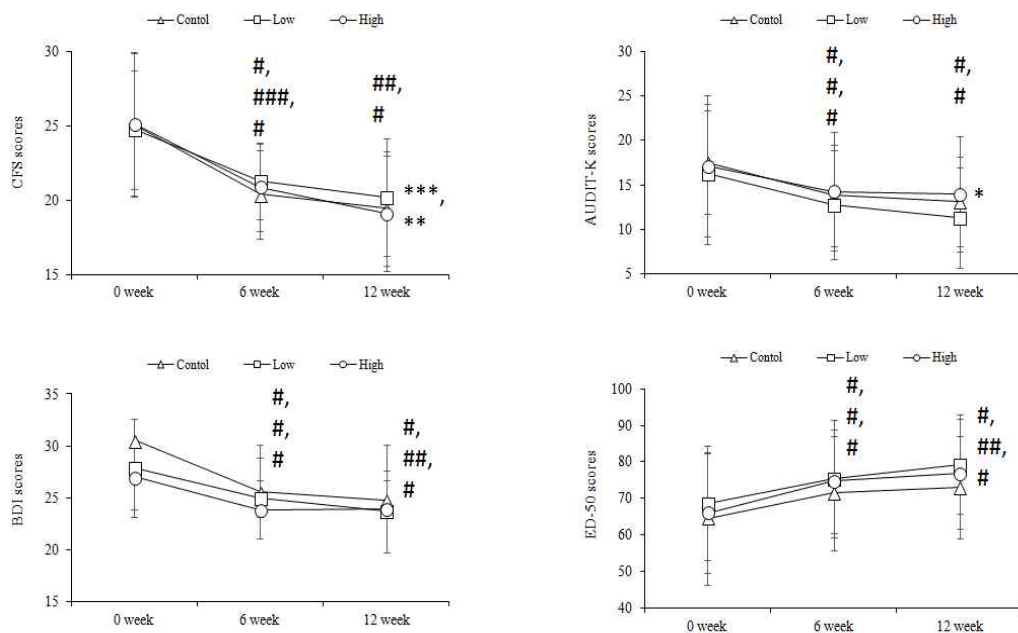


그림 150. 설문지 조사 결과 현황 (CFS, AUDIT-K, BDI, ED-50)

(4) 기타 평가 요소인 혈청 내 지질 및 지질 대사체의 변화량 관찰 (Total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL)

- 혈청 내의 지질 및 지질 대사체의 변화량을 측정한 결과에서는, HDL cholesterol의 경우 시험식품 고용량 섭취군에서 대조식품군과 비교하여 유의하게 증가하였으나, total cholesterol의 경우 대조식품군보다 유의하게 많은 것으로 나타나 상반된 결과를 보임. Triglyceride 및 LDL cholesterol의 경우 군들 간에 유의한 변화가 보이지 않음.

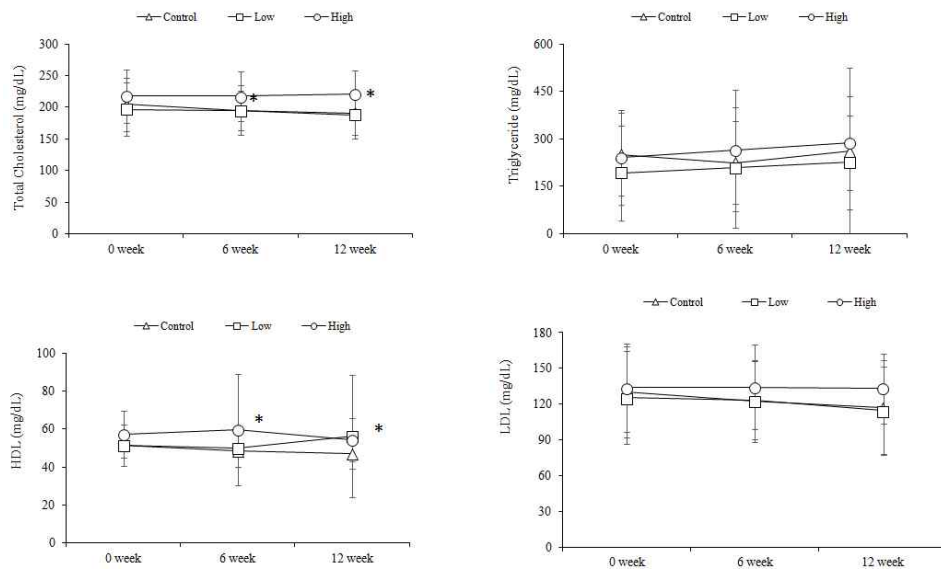


그림 151, 시간에 따른 혈청 내 total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL의 변화량 비교

(5) 기타 평가 요소인 간장 내 지질 및 지질 대사체의 변화량 관찰 (Total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL)

- 간장 내에서의 지질 및 지질 대사체 변화량을 측정한 결과, 군들 간에 유의한 차이가 나타나지 않음.

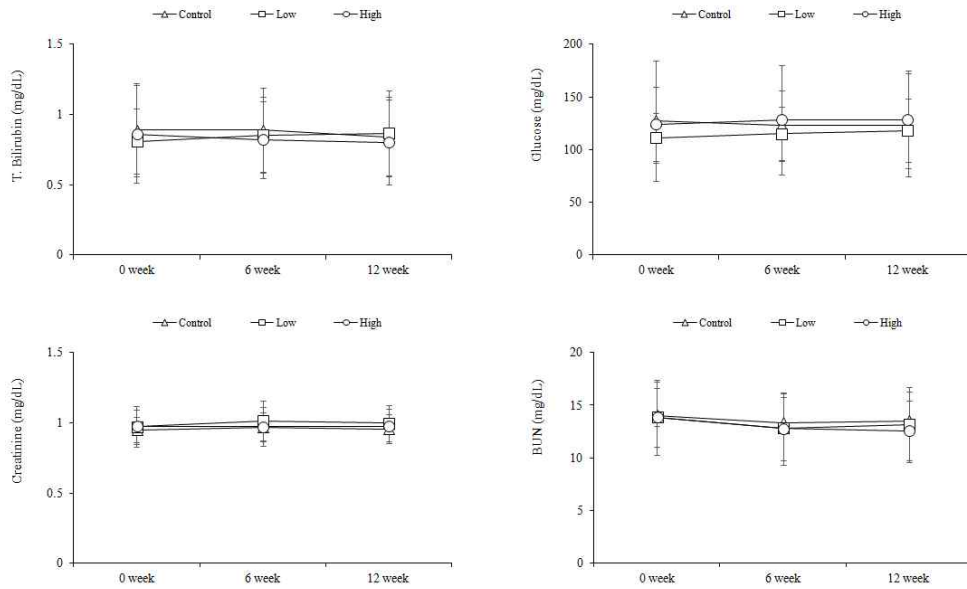


그림 153. 시간에 따른 간장 내 total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL 변화량 비교

(6) 기타 측정 요소인 대상자 혈액 구성 세포의 분포 변화 결과

- 대상자들의 면역력 변화 여부를 알아보기 위하여 혈액 세포 내 구성 성분인 백혈구의 수치 및 적혈구, 헤모글로빈, 면역 세포들의 수치의 변화를 측정한 결과, 군간에 유의적인 차이는 나타나지 않음.

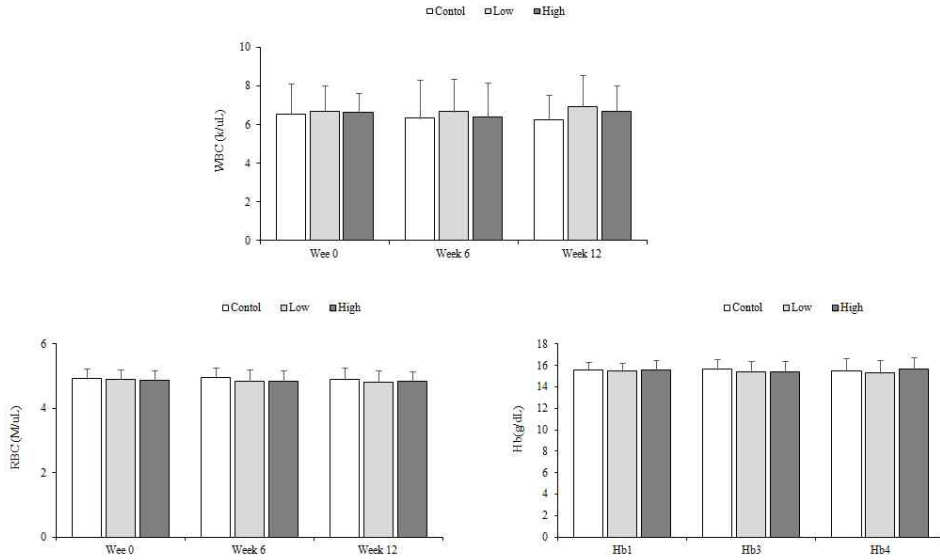


그림 154. 혈액 구성세포인 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈 수치의 변화

표 37. 혈구세포의 하위 분류인 중성구, 단핵구, 임파구, 호산구 및 호염기구의 분포 변화

	Control			Low (250 mg/day)			High (500 mg/day)		
	Week 0	Week 6	Week 12	Week 0	Week 6	Week 12	Week 0	Week 6	Week 12
NE (%)	54.53 ± 8.71	53.76 ± 9.13	54.70 ± 8.63	53.32 ± 9.25	53.16 ± 8.49	53.71 ± 11.85	56.84 ± 8.52	55.01 ± 7.10	55.64 ± 8.92
MO (%)	6.90 ± 1.76	6.99 ± 1.21	7.30 ± 1.38	7.87 ± 2.31	7.86 ± 2.38	7.83 ± 1.87	6.92 ± 1.79	7.24 ± 1.54	6.91 ± 1.69
LY (%)	35.45 ± 7.87	36.09 ± 8.07	34.81 ± 6.95	34.77 ± 7.33	35.36 ± 6.62	33.98 ± 6.51	33.51 ± 7.47	34.63 ± 6.84	34.37 ± 8.04
EO (%)	2.61 ± 1.82	2.63 ± 1.73	2.68 ± 2.19	3.05 ± 1.76	3.10 ± 2.44	2.34 ± 1.36	2.20 ± 1.21	2.55 ± 1.14	2.62 ± 1.45

* 종합 분석

- 혈청 내 γ -GTP의 경우 시험식품 섭취군에서 시간이 농도의존적으로 γ -GTP의 양이 감소하는 경향을 나타내어 12주 후 측정 결과 baseline 측정값보다 유의하게 감소하였으며. 특히 고용량 섭취군의 경우 대조식품 섭취군 보다 유의하게 감소함. 또한 시험식품 고용량 섭취군에서 간장 전이 효소인 AST와 ALT의 수치가 baseline과 비교하여 유의적으로 감소하였으며, 특히 AST의 경우 대조식품군과도 유의적인 감소를 나타냄. 이러한 결과로 인삼열매 추출물의 알코올성 간에 대한 보호 효과를 알 수 있음.
 - 설문조사의 경우 한국형 피로도 설문조사에서 시험식품 섭취군이 대조식품 섭취군에 비하여 baseline 보다 피로도가 유의하게 감소한 것으로 나타나, 인삼열매 추출물의 섭취 기간이 늘어남에 따라 피로도가 감소함을 관찰할 수 있음.
 - 지질 및 지질 대사체의 경우 혈청의 HDL 및 total cholesterol을 제외하고는 군들 간에 아무런 경향이나 유의한 변화가 보이지 않음. 대조식품 고용량 섭취군에서 혈청 HDL cholesterol 수준이 유의하게 증가하였으나 total cholesterol 또한 증가하여 상이한 결과를 나타냄.
 - 혈구 및 면역세포에서는 군들 간에 유의적인 차이를 보이지 않음
- ⇒ 본 실험 결과를 종합하여 볼 때, 인삼열매 추출물의 섭취가 알코올에 의해 손상된 간 기능 개선 및 피로회복에 도움을 준다는 사실이 확인되었으며, 12주 간의 실험 기간 동안 시험식품과 관련된 부작용 사례가 나타나지 않아 안전성 또한 확인됨. 본 인체적용시험 결과는 개별인정원료 신청의 기능성 자료로 사용됨.

가. 건강개별인정 신청 서류 작성 및 신청

- 기능성 식품 원료로 사용하기 위한 식약처의 개별인정원료 심사 및 허가 절차는 아래와 같음.

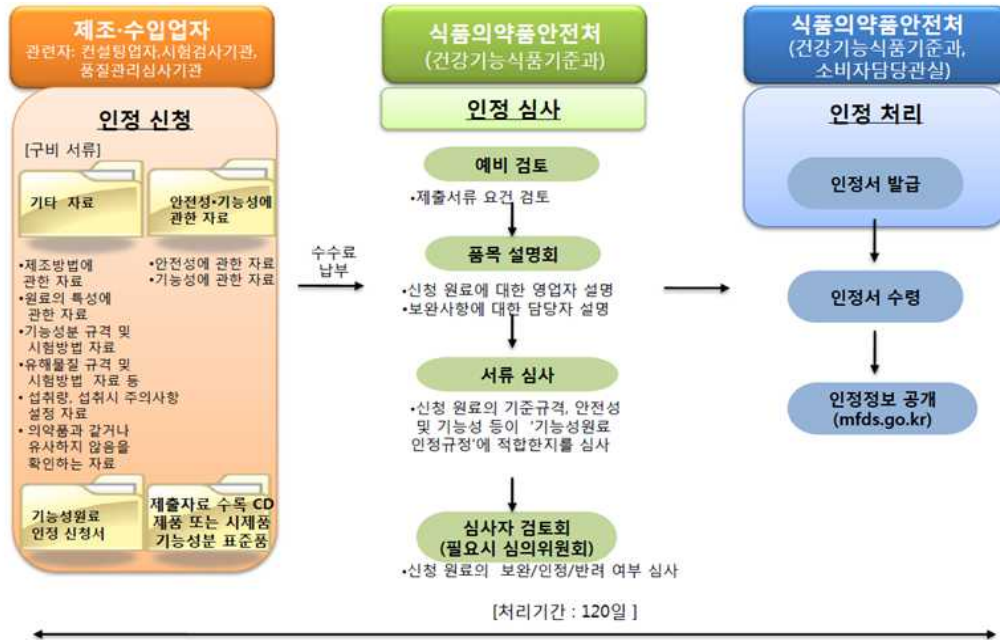


그림 155. 식약처 개별인정원료 심사 및 허가 절차

- 본 과제를 통하여 수행된 인삼열매 추출물의 표준화, 안전성, 기능성 평가 결과 자료와 수집 분석된 자료를 종합하여 식품의약품안전처의 건강기능식품 기능성 원료 가이드라인에 따라 인정 신청을 위한 제출 자료를 아래와 같이 작성하였음. 세포 및 동물 실험의 논문이 게재 완료 되는데로 (Nutrients 학회지에 현재 심사 중) 신청 완료할 예정임.

The figure shows three sample application forms for functional food ingredients:

- 제출자료의 종합 요약본 (Summary of Submitted Data):** A table summarizing key information such as product name, manufacturer, and application details.
- 제출자료 체크리스트 (Submission Checklist):** A checklist of 25 items to verify, including document completeness, ingredient specifications, and safety/efficacy data.
- 안전성·기능성 평가 결과 (Safety and Efficacy Evaluation Results):** A table detailing the results of various tests, including acute toxicity, subacute toxicity, and efficacy studies.

그림 156. 개별인정원료 신청을 위한 작성 서류의 일부

3) 제품명 ‘진생리버베리’: 간을 보호해주는 인삼열매라는 의미의 제품명으로, 인삼열매의 그림과 함께 열매의 붉은색 배경을 바탕으로 한 패키지 상자 도안으로 디자인함.



그림 158. 인삼열매를 이용한 시제품 ‘진생리버베리’ 패키지 상자 도안 - 국문, 중문



그림 159. ‘진생리버베리’ 시제품 패키지 상자 및 제품 사진

4) 시제품 '진생리버베리'의 제품 배합비 설정

표 38. '진생리버베리' 시제품 배합비

성분명	배합비 (%)	합량 (g)
인삼열매추출물분말	5.00	0.50
시클로덱스트린 시럽	**.**	**.**
대추농축액	**.**	**.**
겔정과당	**.**	**.**
아가베 시럽	**.**	**.**
배농축액	**.**	**.**
검베이스혼합제제	**.**	**.**
감마시클로덱스트린분말	**.**	**.**
허브향	**.**	**.**
무수구연산	**.**	**.**
황금혼합추출농축액	**.**	**.**
효소처리스테비아	**.**	**.**
자옴종자추출물	**.**	**.**
식물혼합분말	**.**	**.**
스피루리나 추출물 분말	**.**	**.**
빌베리추출물 분말	**.**	**.**
정제수	**.**	**.**
합계	100	10.00

나. 시제품의 안정성 평가: 유통기한 설정

1) 본 제품은,

① 공정 중 살균 공정이 있는 제품으로 자체의 미생물 생육이 억제될 수 있고, 내면 PE 포장으로 포장 완료 상태에서의 외부로부터의 공기 유입이나 수분 흡수가 방지되고 자외선이 차단된다는 점

② 본 제품과 유사한 자사의 기존유통제품의 유통기한이 18개월인 점
 상기의 두 가지 사항을 감안하여 ‘식품 등의 유통기한 설정기준 III. 식품 등의 유통기한 설정 실험을 생략할 수 있는 경우’를 적용, 유통기한 설정 실험을 생략하고 본 제품의 유통기한을 18개월로 설정하였음.

< 그림 160. 품목제조보고 신청 시 제출한 유통기한 설정 사유서 >

2) ‘진생리버베리’ 제품 품목제조 보고 완료

No.	원재료명 또는 첨가물 명	중량비율(%)
1	진생리	58.00%
2	사탕수수(청)시럽	12%
3	당아교	10%
4	천연향료	5%
5	사탕수수(청) (고형분 10%)	20%
6	사탕수수	10%
7	설탕	4%
8	향미증진제 (염화나트륨)	4%
9	설탕	1%
10	산화제 (아스코르브산)	1.7%
11	수분보습제	10%
12	사탕수수	10%
13	사탕수수(청) (불수분농도 40%)	10%
14	사탕수수	10%
15	사탕수수	10%
16	수분보습제	0.5%
17	설탕	0.5%
18	수분보습제	2%
19	수분보습제	10%
20	사탕수수	2%
21	설탕	4%
22	수분보습제	0.5%

< 그림 161. 인삼열매 제품 ‘진생리버베리’ 품목제조보고서 >

⇒ 인삼열매 추출물을 포함하는 ‘진생리버베리’ 제품을 개발 완료하여 품목보고를 완료하였으며, 중국 등의 해외시장 수출을 겨냥하고 있음

6. 태극삼, 흑삼 및 인삼 부산물의 통합 데이터베이스 및 웹사이트 구축

가. 1, 2차년도에 수집된 데이터의 효율적인 검색 및 서비스를 위한 시스템 설계

- 1) 사용자 편의성을 기반으로 한 웹 디자인 설계 (1차년도에 구축된 웹사이트의 업데이트)
 - 계정관리, 즐겨찾기, 최근변경, 도움말에 쉽게 접근할 수 있도록 구성된 유틸 메뉴
 - 빠른 지식검색을 도와주는 검색창
 - 시스템의 주요 콘텐츠를 나타내는 주 메뉴
 - 주 메뉴에 따른 부 메뉴 (보다 세부적이고 다양한 콘텐츠를 나타낼 수 있음)
 - 페이지의 제목 및 내용
 - 인쇄용 화면, 히스토리, 수정, 편집, 즐겨찾기, 태그, 댓글 등의 유용한 기능이 모여있는 에디트 바
 - 새 글쓰기, 첨부파일 관리, 권한설정이 가능한 옵션 바



그림 162. 웹사이트 기본 화면 구성

2) 각 진세노사이드의 상세정보 및 질병과 유전자 간의 연결정보 시각화 구현

- 현재까지 크로마토그래피 분석에 따라 30가지가 넘는 진세노사이드가 확인 및 분류되어 있음. 인삼 내 함유된 진세노사이드의 종류 및 구성 성분은 인삼의 종 및 조직, 재배 기간, 재배 방법, 수확 시기 및 보존 방법에 따라서도 달라짐.
 - 국내 학술발표 및 국가 연구보고서 1,906건 → 질병 관련 29건
 - 진세노사이드 관련 특허 출원/공개
 - ✓ 국내 특허실용 검색 총 2,522건 → 질병 관련 1,492건
 - ✓ 일본 특허 검색 총 393건 → 질병 관련 224건
 - Pubmed/Scopus 등의 학술지 검색 총 3,936건, 이중 질병 관련 1,124건
- 2차년도에 구축된 인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스에 진세노사이드 관련 정보 추가 업데이트를 완료함.

3) 인삼의 콘텐츠 및 생산이력정보 등을 포함한 빅데이터 설계.

- 현재까지 품목제조신고된 국내 인삼제품 8,190건 → 현재 유통 중 3,276건
- 제품 정보 및 생산이력 정보를 포함하여 데이터베이스에 업데이트 완료.

4절. 태극삼, 흑삼을 활용한 기능성 소재화

1. 태극삼, 흑삼 제조공정 개발 연구

가. 시중 유통 태극삼과 흑삼의 진세노사이드 및 벤조피렌 분석

1) 진세노사이드 함량 분석

- 시중에서 판매되는 태극삼 3종과 흑삼 5종을 구입하여 진세노사이드 성분을 비교하였다. 시중에서 판매되는 흑삼에는 진세노사이드 Rb1, Rg1 성분이 거의 존재하지 않는 것으로 나타났으며 Rg3 성분은 0.6~1.7mg/g이 함유되어 있었으며 평균적으로 1.0mg/g을 함유하고 있었다. 시중에서 판매되는 태극삼에는 Rg1, Rb1 성분이 5.1~10.4mg/g 함유되어 있었으며 평균 7.0 mg/g 함유하고 있었으며 Rg3는 극미량 함유되어 있는 것으로 나타났다.

표 38. 시중 유통 태극삼(TG) 및 흑삼(BG) 진세노사이드 함량

	진세노사이드 함량 (mg/g)									
	TG 1	TG 2	TG 3	TG 평균	BG 1	BG 2	BG 3	BG 4	BG 5	BG 평균
Rg1	2.46	3.24	2.33	2.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Re	1.22	2.43	1.30	1.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rf	0.33	0.72	0.66	0.57	0.18	0.08	0.13	0.25	0.66	0.26
Rh1(s)+Rg2(s)	0.14	0.14	0.25	0.18	0.53	0.33	0.40	0.89	1.63	0.76
Rb1	2.71	7.21	2.92	4.28	0.00	0.00	0.06	0.00	0.11	0.03
Rc	1.23	2.22	0.75	1.40	0.00	0.00	0.02	0.00	0.06	0.02
Ra1	1.15	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rb2	0.90	2.41	0.80	1.37	0.04	0.04	0.04	0.05	0.09	0.05
Rb3	0.15	0.33	0.14	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
Rd	0.41	0.40	0.23	0.35	0.02	0.03	0.09	0.02	0.12	0.06
Rg3(s)	0.02	0.00	0.05	0.02	0.73	0.72	0.63	1.40	1.70	1.04

시험방법

▶ 시험용액의 조제

분말 약 1 g에 50% methanol 25 mL를 첨가한 후 30분 동안 초음파 추출한 것을 0.45 µm syringe filter(advantec, PTFE)하여 HPLC 분석에 이용하였다.

▶ 표준용액의 조제

진세노사이드 14종 표준품 각각을 메탄올에 녹여 여과(0.45 µm)하여 각각 표준원액을(1 mg/mL)만들고, 표준원액을 메탄올로 적당히 희석하여 표준용액으로 이용하였다.

▶ 고속액체크로마토그래피 분석 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼 (ODS 칼럼, 4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정과장)	자외부흡광광도검출기(203 nm)		
주입량	10 μL		
이동상	시간 (min)	증류수	Acetonitrile
	0	82%	18%
	10	80%	20%
	30	73%	27%
	40	70%	30%
	55	49%	51%
	66	10%	70%
	70	10%	90%
	71	82%	18%
75	82%	18%	
유량	1.6 mL/min		

- ▶ 정량시험 : 표준용액과 시험용액을 각각 10 μL씩 주입하여 앞의 조건에서 실험하였다.
표준용액의 피크의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 진세노사이드의 농도(μg/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 시료 중 진세노사이드의 함량(mg/g)을 구하였다.

$$\text{개별 진세노사이드 함량(mg/g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

S : 시험용액 중 개별 진세노사이드 농도(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 회석배수

2) 벤조피렌 함량 분석

- 시중에서 유통되는 흑삼 5종을 수거하여 벤조피렌 함량 조사하였다. 시중에서 판매되는 흑삼에는 벤조피렌 함량이 0.6~0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 함유하는 것으로 나타났으며 평균 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 함유하고 있어서 식약처에서 정한 기준(2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)은 만족하였으나 안정적인 품질유지를 위해 꾸준한 관리가 필요할 것으로 판단되었다.

표 39. 시중유통 흑삼의 벤조피렌 함량

	Benzopyrene($\mu\text{g}/\text{kg}$)
BG 1	0.89
BG 2	0.94
BG 3	0.93
BG 4	0.73
BG 5	0.68
BG 평균	0.83

시험방법

▶ 시험용액의 조제

분말 약 2.5 g을 정밀하게 달아 물 50 mL를 넣어 30 분간 초음파 추출하였다. 여기에 헥산 약 50 mL 및 내부표준액 1 mL을 넣어 1 분간 균질하게 섞은 다음 30 분간 초음파 추출하였다. 헥산층을 분액갈 때기에 옮기고 다시 물층에 헥산 약 50 mL씩을 넣고 2회 반복 추출하여 헥산층을 취하여 분액갈 때기에 합하였다. 합한 헥산층에 물 약 50 mL를 넣어 세척하고, 이 헥산층을 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 사용하여 탈수 여과한 다음 45 °C의 수욕상에서 감압하여 헥산 약 2 mL가 될 때까지 농축하였다. 플로리실카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 순서대로 초당 2~3 방울의 속도로 유출시켜 활성화시킨 후 사용하였다. 활성화된 카트리지에 위의 추출용액을 넣어 헥산·디클로로메탄혼합액(3 : 1) 20 mL를 초당 2~3 방울의 속도로 용출시켰다. 이 용출된 액을 35°C이하의 수욕상에서 질소가스에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴 1 mL에 녹인 다음 0.45 μm syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 이용하였다.

▶ 표준용액의 조제

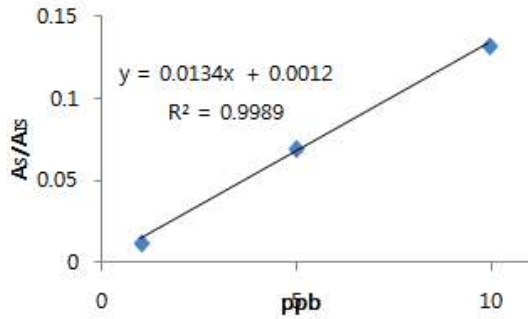
벤조피렌 표준품 및 3-메틸콜란트렌표준품 적당량을 정밀하게 달아 각각 아세토니트릴에 녹여 mL당 1 μg 을 함유하는 표준원액 및 내부표준원액을 만들었다. 이 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 mL 당 약 1~50 ng의 벤조피렌과 각각 50 ng의 내부표준물질이 함유되도록 희석하여 표준액으로 하였다.

▶ 고속액체크로마토그래피 분석 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼 (ODS 칼럼, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정과장)	형광검출기 (여기과장 : 294 nm, 형광과장 : 404 nm)		
주입량	10 μL		
이동상	시간 (min)	증류수	Acetonitrile
	0	20%	80%
	30	20%	80%
컬럼온도	30°C		
유량	1.0 mL/min		

▶ 정량시험 : 표준용액과 시험용액을 각각 10 μL씩 주입하여 앞의 조건에서 실험하다..

- 각 표준액에서 얻은 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 벤조피렌의 농도를 X축으로 하여 만든 검량곡선을 작성하고, 검액의 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 구하였다.



AS : 검량곡선표준용액의 표준물질 피크면적
AIS : 검량곡선표준용액의 내부표준물질 피크면적
ASAM : 시험용액의 벤조피렌 피크면적
ASAMIS : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

<calibration curve for Benzopyrene>

나. 태극삼, 홍삼, 흑삼 제조 공정 확립 연구

- 기존의 홍삼, 태극삼 및 백삼과는 다른 새로운 형태의 제품인 흑삼이 출현함에 따라 이에 대한 체계적 관리를 하기 위하여 「인삼산업법」이 개정, 공포(법률제10948호, 2011. 7. 25)됨에 따라 제조방법에 따른 분류 규정을 색상에 따라 구별하도록 법 개정이 되었다(시행규칙 개정 2012. 1. 26).
- 진안지역에서 재배된 4년근 인삼을 10월에 채굴하여 크기와 모양이 비슷하게 선별하고 직삼 50~70g에 해당하는 인삼을 채취하여 흙이나 비닐 등 이물질을 완전히 제거한 뒤 진안홍삼연구소에 구축된 증삼장치와 건조장치를 이용하여 조건별 태극삼, 홍삼과 흑삼을 제조하여 산업적으로 우수한 경쟁력을 갖을 수 있도록 제조공정을 확립하고자 하였다.
- 따라서 본 실험에서도 태극삼 제조에는 물을 사용하지 않고 수증기를 이용하여 익히고 건조하였으며 다음의 제조 조건에 따라 태극삼과 흑삼을 제조하였다.



그림 163. 증삼장치 및 건조장치

1) 태극삼 표준 제조공정



그림 164. 태극삼 제조공정

① 세척

인삼을 원통형세척기에 넣고 흙, 비닐 등 이물질이 완전히 제거되도록 깨끗하게 세척한다. 이때 세척기로 인해 최대한 인삼에 상처가 나지 않도록 주의한다.

② 예비건조

세척한 인삼을 채반에 배열하고 열풍건조기에서 30~40℃로 3~10시간 건조하거나 또는 햇볕에서 1~2일 정도 건조한다.

③ 증삼

건조한 인삼을 채반에 배열하여 증삼기에 넣고 실온에서 60~70℃까지 빠르게 승온하여 10~20분간 유지하고 목적온도(90~98℃)까지 빠르게 승온하여 20분~1시간 증삼한다. 증삼 후 원하는 성분함량과 색택에 따라 30분~1시간 정도 후숙한다.

④ 건조

증삼한 인삼을 증삼기에서 꺼내서 50~60℃ 건조실에서 건조하여 표면의 수분을 제거하고 건조기 또는 양건장에서 최종 수분이 15%이하가 되도록 건조한다.

2) 흑삼 표준 제조공정

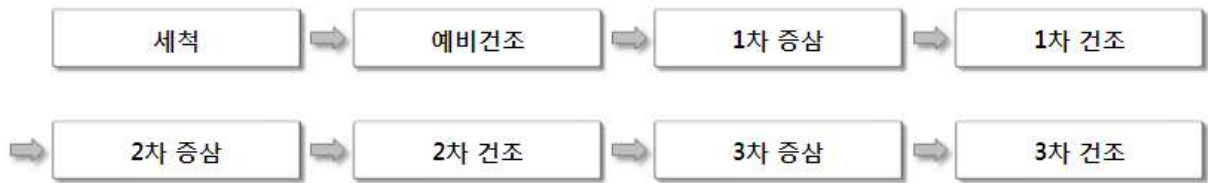


그림 165. 흑삼 제조공정

① 세척

인삼을 원통형세척기에 넣고 흙, 비닐 등 이물질을 완전히 제거한다. 이때 최대한 인삼에 상처가 나지 않도록 한다.

② 예비건조

세척한 인삼을 열풍건조기에서 30~40℃로 3~10시간 또는 햇볕에서 1~2일 정도 건조한다.

③ 1차 증삼

건조한 인삼을 증삼기에 넣고 실온에서 60~70℃까지 빠르게 승온하여 10~20분간 유지하고 목적온도(90~98℃)까지 승온하여 2~5시간 증삼한다.

④ 1차 건조

증삼한 인삼을 증삼기에서 꺼내서 20~40℃에서 1일간 건조하여 표면의 수분이 제거되도록 건조한다.

⑤ 2차 증삼

건조한 인삼을 증삼기에 넣고 실온에서 목적온도(90~98℃)까지 승온하여 2시간~5시간 증삼한다. 증삼 후 원하는 성분별 함량, 선택에 따라 1~3시간 정도 더 증삼한다.

⑥ 2차 건조

증삼한 인삼을 증삼기에서 꺼내서 20~40℃에서 1일간 건조하여 표면의 수분을 제거한다.

⑦ 3차 증삼

건조한 인삼을 증삼기에 넣고 실온에서 목적온도(90~98℃)까지 승온하여 2시간~5시간 증삼한다. 증삼 후 원하는 성분별 함량, 선택에 따라 1시간~3시간 정도 더 증삼한다.

⑧ 3차 건조

증삼한 인삼을 증삼기에서 꺼내서 50~60℃ 건조실에서 1일간 건조하여 표면의 수분을 제거하고 건조기 또는 양건장에서 최종 수분이 15%이하가 되도록 건조한다.

3) 제조된 태극삼과 흑삼



백삼



태극삼(1증)



홍삼(1증)



흑삼(3증)

그림 167. 상기 제조방법에 따라 제조된 태극삼과 흑삼

4) 제조된 태극삼과 흑삼의 절단면



태극삼(단면)



흑삼(단면)

그림 168. 제조된 태극삼과 흑삼의 절단면

5) 태극삼과 흑삼의 대표적인 주요 결점요인



태극삼(내백)



흑삼(내공)

그림 169. 태극삼과 흑삼의 주요 결점요인

6) 태극삼 및 흑삼의 물 추출 농축액 제조

- 태극삼 및 흑삼의 물추출물 농축액의 제조는 홍삼 물추출물 농축액의 제조과정과 유사하게 제조하여 최종 고형성분이 72Bx가 되도록 농축하여 4℃ 저온창고에서 보관하면서 성분분석, 생리활성, 동물시험 및 인체적용시험용 시료로 사용하고자 하였다.

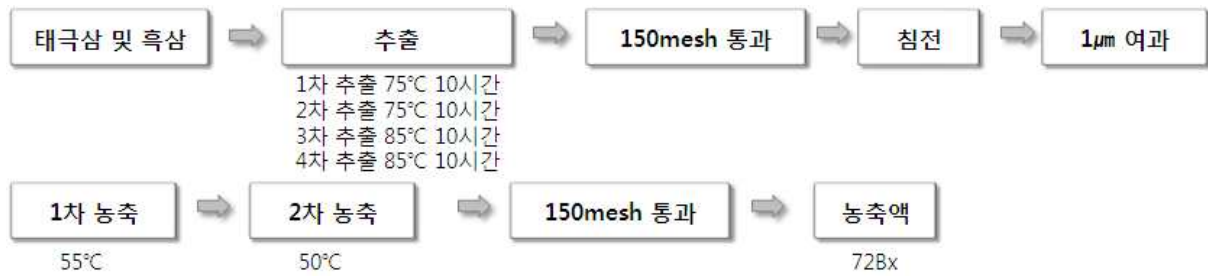


그림 170. 태극삼 및 흑삼 농축액 제조방법

다. 흑삼 가공 조건별 진세노사이드 함량 분석 결과

- 흑삼 제조공정 개발을 위해 증삼/건조 횟수별 진세노사이드 함량을 분석하였다. 각 단계별 증삼은 90~95℃ 온도범위에서 2~5시간 가공시간으로 제조하였다.
- 진세노사이드 Rg1, Rb1은 2회 증삼/건조까지는 함량이 큰폭으로 증가하였으며 4회 이상부터는 현저히 감소하여 8회 이상에서는 Rg1이 거의 다 사라지는 것으로 나타났다. 이 결과는 시중에서 유통되는 흑삼의 검사 결과와 유사한 결과를 보여주는 것으로 9중9포 흑삼에서는 인삼의 지표물질인 Rg1이 전혀 검출되지 않아 인삼이라고 말하기조차 어려운 상황이었다. 그러나 Rg3(s), F4, Rg5의 경우에는 7중까지 지속적으로 증가하다 8중 이후부터는 별로 증가하지 않는 결과를 보였다.

(Unit: mg/g)

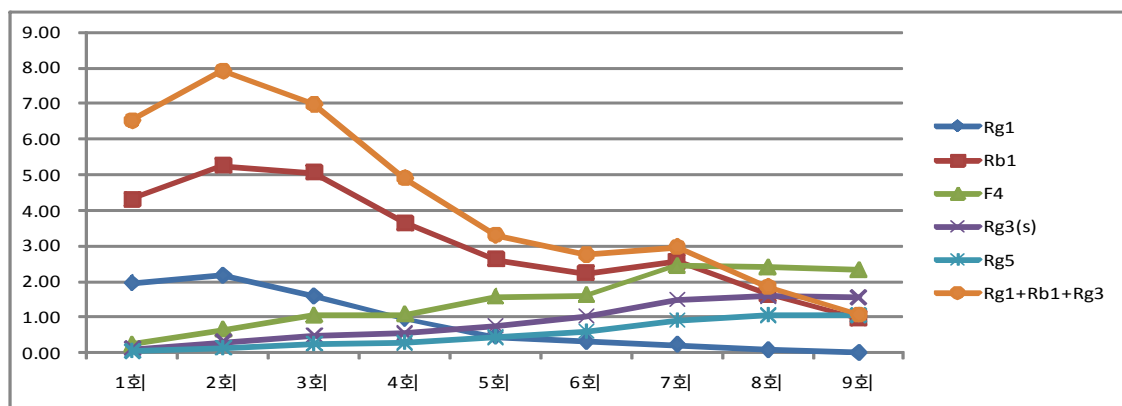


그림 171. 흑삼 가공조건별 진세노사이드 함량

라. 흑삼 가공 조건별 벤조피렌 함량 분석 결과

- 벤조피렌은 고온의 열가공에 의해서 흑삼을 제조할 때 증가하는 발암성 물질로 매우 유해한 성분이다. 그래서 우리는 흑삼의 진세노사이드 성분의 변화관찰과 함께 벤조피렌 함량변화를 관찰하였다.
- 흑삼의 가공 온도(90~95℃)와 횟수(1~9회)에 따른 벤조피렌 함량 변화를 분석하였다. 증숙횟수에 따라 벤조피렌 함량이 증가한다는 상념과는 다르게 벤조피렌 함량은 우리가 가공한 90~95℃ 조건에서는 가온에 의한 벤조피렌 증가가 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다. 가공 차수별로 차이는 있었으나 0.4~0.5μg/g을 값으로 시판되는 흑삼의 벤조피렌 보다는 50%이상 낮은 값을 보였다.

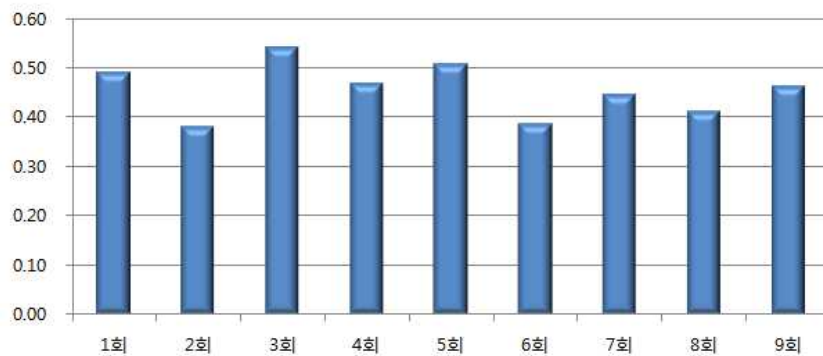


그림 172. 흑삼 가공조건별 벤조피렌 함량

마. 태극삼 및 흑삼 농축액의 ginsenoside 함량 분석 및 패턴 조사

- 건강기능식품 공전에는 인산류의 기능성분(또는 지표성분) 함량 기준은 ginsenoside Rb1과 Rg1의 합이 0.8~34mg/g으로 규정되어 있기 때문에 소량 및 대규모 시설을 이용한 태극삼과 흑삼 물추출 농축액을 제조하여 ginsenoside 함량분석을 공식 검사기관에 의뢰하여 분석하였다. 태극삼 농축액의 경우 5.09, 5.91, 6.63 mg/g으로 나타나 그 기준에 적합하였다. 그리고 흑삼 농축액의 경우(표 4, Fig. 3) 태극삼 농축액에 비해서 ginsenoside-Rg1은 감소하였으나 Rb1은 약 1.5배 이상, Rg3(s) 함량은 3-6정도 증가하였고 diol 그룹의 분해산물인 ginsenoside-Rk1은 0.24mg/g, Rg5는 0.34mg/g의 농도로 검출되었다.
- 흑삼의 특징적인 사포닌이라고 할 수 있는 Rk1과 Rg5 함량은 증삼 횟수에 따라 그 양이 증가하는 경향이거나 Jo 등(31)의 결과에 의하면 9회 증삼했을 경우에 Rk1 함량은 6.8mg/g, Nam 등(30)은 약 4.07mg/g이며 3회 증삼했을 경우에는 1.28mg/g 정도라고 보고하였다. 한편 Rg5의 경우 Jo 등(31)은 흑삼의 경우에 28.1mg/g으로 보고하였으나, 본 실험에서는 흑삼 농축액의 경우에 0.34mg/g과 비교하면 많은 차이가 난다. 이것은 분석방법에 의한 차이가 있을 수도 있으나 ginsenoside-Rk1과 Rg5 자체가 매우 불안정하여 액체 상태로 존재할 경우에 분해속도가 빠르게 진행될 수 있다고 판단된다.
- 그리고 본 연구에서는 태극삼 물추출 농축액의 경우에는 동물시험과 인체적용시험을 추진하여 기능성 추가 또는 개별인정 원료의 등록이라는 측면에서 보면 태극삼 농축액의 원료성분 표준화가 잘 이루어 졌으며, 이를 동물시험과 인체적용시험의 시료로 사용하여도

별 문제가 없다고 판단된다. 소규모 및 대규모 시설을 이용하여 제조한 태극삼 물추출 농축액의 ginsenoside의 HPLC 패턴은 거의 같은 retention time에 거의 같은 높이의 peak로 나타났다. 그러나 ginsenoside-Rg3(s)의 경우 육안으로도 확인하기 어려운 정도의 peak가 검출되어 홍삼이나 흑삼의 농축액과 다른 형상으로 나타났다.

표 39. 예비 소규모 실험에 의한 태극삼 농축액의 ginsenosides 함량

태극삼 농축액	Ginsenosides 함량(mg/g)			
	Rb1	Rg1	Rg3(s)	Rb1 + Rg1
A	2.54	2.55	0.04	5.09
B	3.11	2.80	0.06	5.91
C	3.69	2.94	0.08	6.63

표 40. 본 실험에 의한 태극삼 농축액의 ginsenosides 함량

태극삼 농축액	Ginsenosides 함량(mg/g)			
	Rb1	Rg1	Rg3(s)	Rb1 + Rg1
A	4.95	1.93	0.28	6.88
B	4.80	1.93	0.28	6.73
C	4.76	1.94	0.27	6.70

표 41. 흑삼 농축액의 ginsenosides 함량

항목	Ginsenosides(mg/g)				
	Rg1	Rb1	Rg3(s)	Rk1	Rg5
흑삼 농축액	1.06	4.82	1.01	0.24	0.34

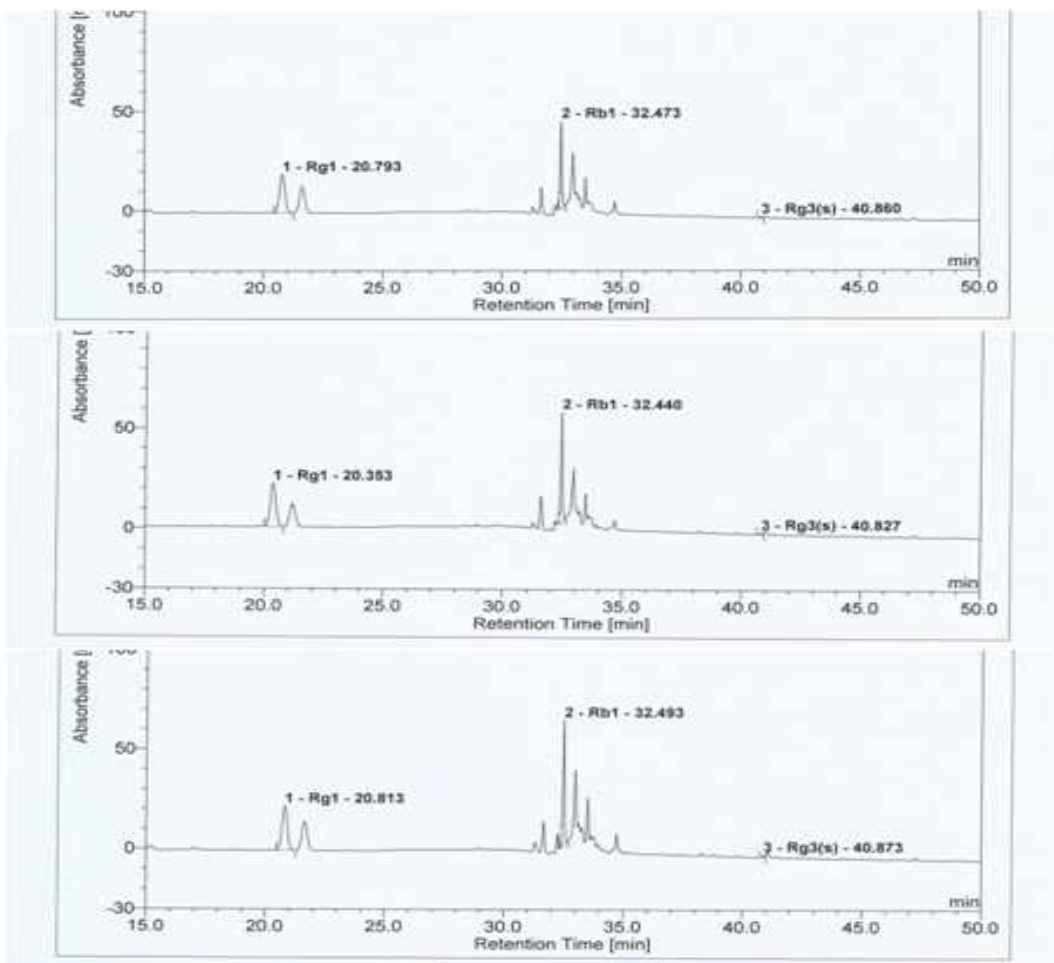


그림 112. 태극삼농축액의 ginsenoside-Rb1, Rg1 and Rg3(s) HPLC chromatogram (Lab scale)

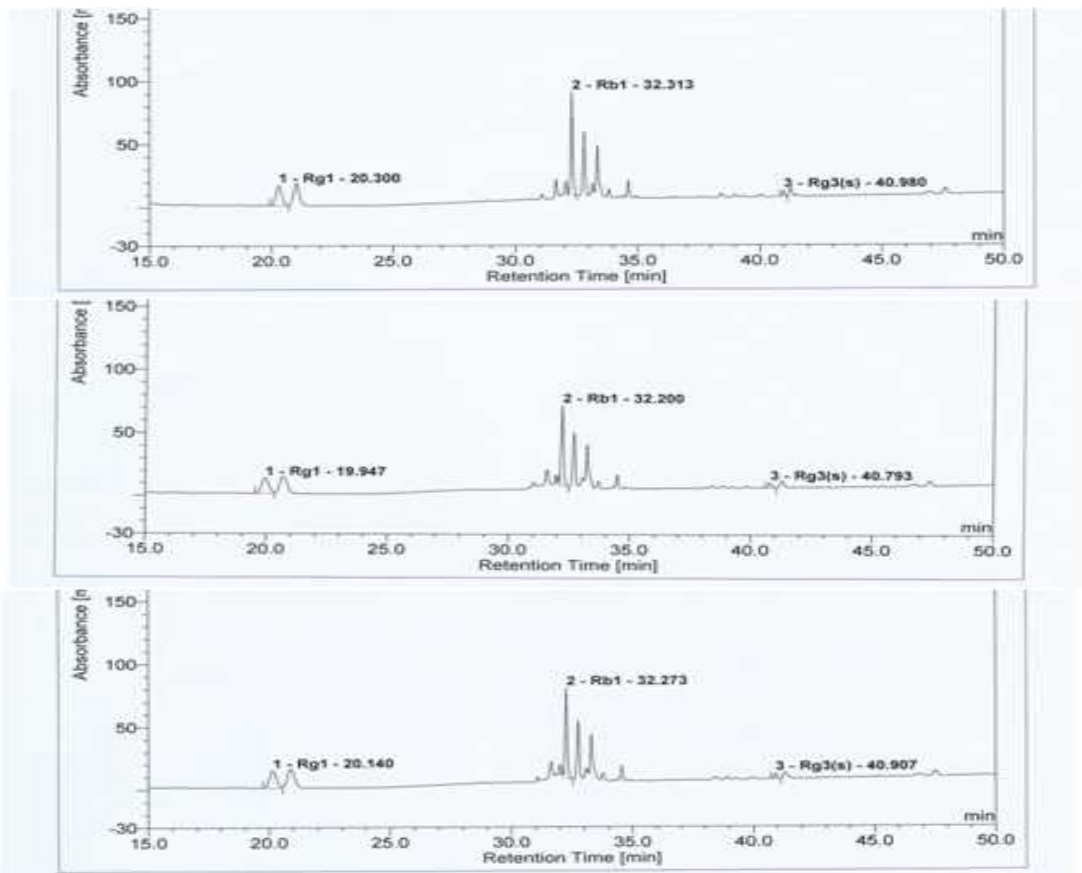


그림 173. 태극삼농축액의 ginsenoside-Rb1, Rg1 and Rg3(s) HPLC chromatogram (large scale)

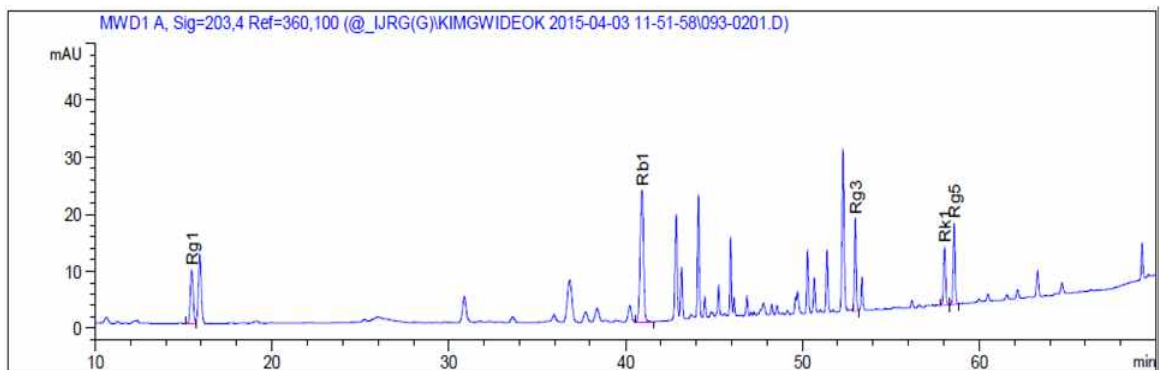
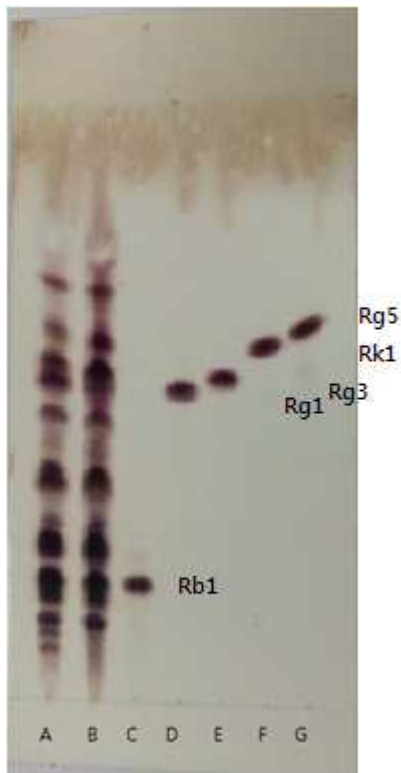


그림 174. 흑삼추출물의 ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3(s), Rk1, and Rg5 HPLC chromatogram

바. 태극삼 및 흑삼 농축액의 TLC에 의한 ginsenoside 패턴 분석

- 태극삼과 흑삼의 물추출물 농축액의 ginsenoside의 TLC 패턴을 조사한 결과, 태극삼 농축액에서는 ginsenoside-Rb1과 Rg1은 분명히 나타났으나 Rg3(s)는 불명확하게 나타났으며, 흑삼 농축액에서는 ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3(s) 및 Rk1은 분명하게 나타났으나 Rg5는 불투명하게 나타나 다른 전개용매를 사용하여 확인할 필요성이 있다고 판단된다.



A : Taegeuk ginseng extract,

B : Black ginseng extract

C : Rb1, D : Rg1, E : Rg3(s), F : Rk1, G : Rg5

그림 175. 태극삼과 흑삼추출물의 인삼사포닌 TLC chromatogram

2. 태극삼, 흑삼 이화학적 특성 분석

가. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 수분, 회분 함량 측정

1) 수분함량(상압가열건조법)

- 미리 가열하여 항량으로 한 칭량 접시에 시료 약 3 g을 정밀히 취하여 105℃ 오븐에 넣고 8시간 건조 후 데시케이터에서 30분간 식히고 무게를 측정하였다. 다시 칭량접시를 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복하였다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a : 칭량접시의 무게(g)

b : 칭량접시와 검체의 무게(g)

c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

- 수분함량은 태극삼이 7.49%, 홍삼이 5.76%, 흑삼이 7.10% 이었다.

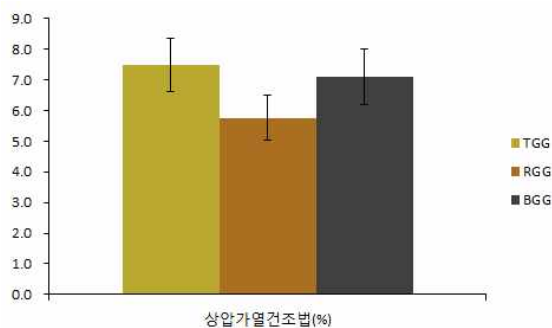


그림 177. 수분함량

2) 회분 함량 측정

- 회분의 측정은 식품공전시험법 9.1.1.2. 직접회화법에 따라 시행하였다. 미리 회화 후 가열 건조하여 항량으로 한 도가니에 시료 약 1 g을 정밀히 취하여 550℃에서 8시간 가열하고 그대로 식혀 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 식힌 후 칭량하고 시료의 회분량(%)을 다음식에 따라 산출하였다.

$$\text{회분}(\%) = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W0 : 항량이 된 도가니에 무게(g)

W1 : 회화 후의 도가니와 회분의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

- 회분함량은 태극삼이 4.16%, 홍삼이 4.18%, 흑삼이 4.12%로 비슷하였다.

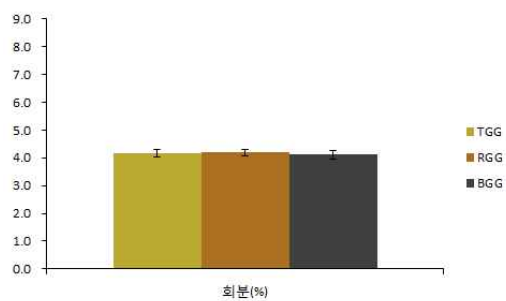


그림 178. 회분함량

나. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 아미노산 함량 측정

1) 표준용액의 조제

아미노산 표준품 21종을 각각을 섞어 50 mL 부피플라스크에 메탄올로 녹여 200 ppm으로 하여 표준원액으로 하였다. 이 원액을 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 2 ppm으로 계열 희석하여 표준용액으로 하였다.

2) 시험용액의 조제

시료 1 g을 falcon 튜브에 넣고 50mL의 물을 가하고, 30분간 sonication한 후 여과하여 물층을 취했다. 다시 falcon 튜브에 50mL의 물을 가하고, 30분간 sonication한 후 여과하여 물층을 모아 60°C에서 감압농축하였다. 농축액을 0.02 N 염산에 용해하여 최종부피가 10 mL가 되도록 하였다. 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 0.45 µm syringe filter(dvantec, PTFE)로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

3) 이동상의 조제

이동상의 조제는 아세트니트릴 : 메탄올 : 물 = 45:45:10으로 하였고, Na₂HPO₄ (Sigma, Germany) 5.47 g을 물 1 L에 녹이고, 5 mg Sodium azide(Sigma, Germany)를 녹인 후, pH 7.8이 되도록 하였다.

4) 아미노산 21종 함량 측정

a) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼(ODS 칼럼, 4.6mm × 150mm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정과장)	자외부흡광광도검출기(Ex=230 nm, Em=450 nm)		
주입량	10 µL		
이동상	시간(min)	ACN/MeOH/DW	pH 7.8 buffer
	Int	10	90
	6.50	13	87
	9.00	18	82
	15.00	34	66
	17.00	35	65
	18.00	36	64
	22.00	60	40
	24.00	80	20
	27.00	80	20
	29.00	10	90
31.00	10	90	
유량	1.5 mL/min		

b) 정량시험 : 표준용액과 시험용액을 각각 10 µL씩 주입하여 앞의 조건에서 시험한다. 표준용액의 피크의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 아미노산 21종의 농도(µg/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 시료 중 아미노산의 함량(mg/kg)을 구하였다.

$$\text{아미노산 함량(mg/kg)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}}$$

S : 시험용액 중 개별 아미노산 농도(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

- 생체에서 합성되지 않는 필수아미노산인 valine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, lysine, phenylalanine, tryptophan은 태극삼, 홍삼, 흑삼 모두에서 검출되었다.

Tryptophan은 태극삼이 홍삼에 비해 5%정도 적었고, valine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, lysine, phenylalanine은 15~44% 정도 더 많았다. 성장기의 유아에게 필요한 arginine, histidine의 경우에는 태극삼이 홍삼에 비해 19%와 39% 더 많이 함유하고 있었다. 흑삼의 경우 필수아미노산의 함량은 태극삼이 116~716% 정도 더 많이 검출되었고, arginine, histidine의 경우에는 태극삼이 흑삼에 비해 288%와 181% 더 많이 검출되었다. 아미노산 함량은 아미노산이 열변성에 약하기 때문에 증삼온도가 낮고 증삼시간 짧은 태극삼에서 가장 많이 검출되었고, 홍삼, 흑삼의 순으로 많이 검출되었다.

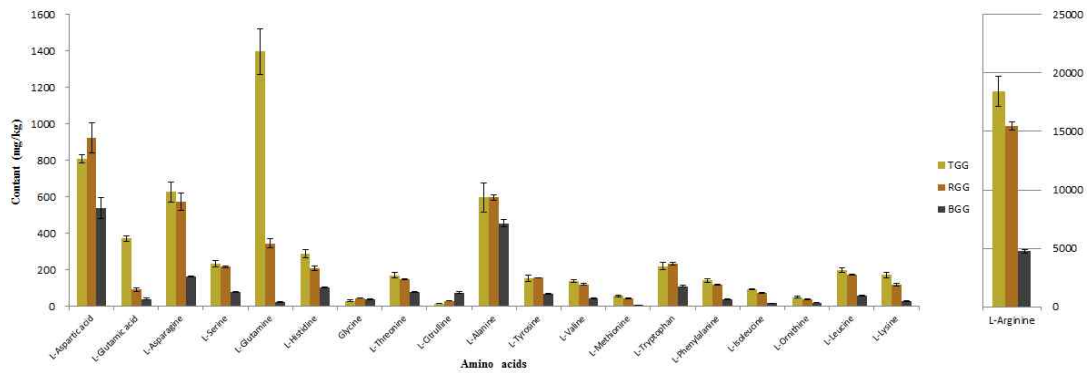


그림 179 아미노산 함량(mg/kg)

다. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 무기질 함량 측정

1) 표준용액의 조제

표준품을 3% 질산으로 묽혀 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm 하여 표준용액으로 하였다.

2) 시험용액의 조제

균질화된 시료 약 0.5 g을 마이크로웨이브용 베셀에 정밀히 취한 후 질산 8 mL를 넣고 마이크로웨이브에서 190℃에서 50분간 전처리 하였다. 이때 반응 공시료로 마이크로웨이브용 베셀에 질산 8 mL를 넣어 같이 전처리 하였다. 마이크로웨이브에서 꺼내어 3차 증류수로 20 mL 부피플라스크에 희석한 것을 시험용액으로 하였다.

3) 기기분석 조건

항 목	조 건
RF Power	1500 Watts
Gas Flow	Plasma (16 L/min), Auxiliary (0.2 L/min), Nebulizer (0.45 L/min)
Sample Flow Rat	1.5 mL/min

- 무기질 함량은 Ca, K, Cu, Zn은 오차범위 이내로 검출되었고, Fe는 49.97~61.77 ppm, Mn은 34.91~43.02 ppm, Mg는 1,367~1,497 ppm, S는 1,235~1,475 ppm, P는 2,796~3,324 ppm, Na는 182.0~271.4 ppm 이었다.

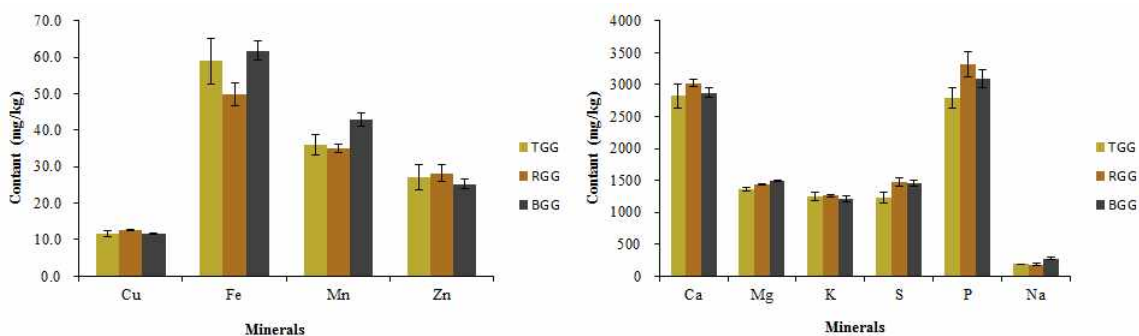


그림 180. 무기질 함량 (mg/kg)

라. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 지방산 함량 측정

1) 표준용액의 조제

37종 지방산 표준품(F.A.M.E. Mix C4-C24, Supelco, Germany) 앰플을 4 mL 헥산에 녹여 조제 하였다.

2) 시험용액의 조제

지방산 측정은 식품공전 9.1.1.5.4. 지방산 제2법에 의하여 실시하였다. 균질화된 검체를 약 시료 약 1.5 g을 정확히 칭량하여 마조니어관에 넣고 약 100 mg의 피로갈콜을 첨가한 후, 2 mL의 내부표준용액을 첨가하였다. 마조니어관에 끓임쪽을 넣고 2 mL 에탄올을 첨가하여 전체 검체가 잘 섞일 때까지 혼합하고 8.3 M 염산용액 10 mL을 넣고 잘 섞었다. 마조니어관의 마개를 밀봉한 후, 80°C의 수조에서 40분간 분해하였다. 분해 후, 실온으로 냉각하고 에테르 추출 시 분액이 용이하도록 마조니어관의 아래 부분을 에탄올을 첨가하여 채운 후 부드럽게 섞어주었다. 마조니어관의 분해물에 25 mL 디에틸에테르를 첨가하고 마개를 한 후 5분간 진탕하여 추출하였다. 에테르 혼합 추출용매로 마개를 씻고 25 mL의 무수 석유에테르를 추가하여 5분간 다시 진탕 추출하고 상층이 깨끗해질 때까지 방치하여 분리하였다. 에테르 층을 분액한 후 증발시키기 위해 40°C 수조에서 에테르를 천천히 증발시켰다. 2~3 mL 클로로포름과 2~3 mL 디에틸에테르로 추출한 지방을 녹여 15 mL 시험관으로 옮긴 후, 40°C 수조에서 질소 농축하고 2.0 mL 7% 트리플루오로보란메탄올 용액과 1.0 mL의 톨루엔을 첨가하였다. 마개로 잘 밀봉하여 100°C 오븐에서 45분간 가열한 후 실온으로 냉각하였다. 5.0 mL 증류수, 1.0 mL 헥산 및 약 1.0 g 무수 황산나트륨을 첨가한 후 진탕하여 정치하고 분리된 상층액을 취하여 약 1.0 g의 무수 황산나트륨을 담은 다른 바이알에 넣고 탈수한 후 시험용액으로 하였다.

3) 가스크로마토그래피 불꽃이온화검출기 분석 조건

항 목	조 건
컬럼	SP-2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 μ m)
주입부 온도	225°C
컬럼온도	80°C에서 4분간 유지한 후 4°C/min의 비율로 240°C까지 온도를 상승시키고 이후 20분간 유지
이동상가스 유량	헬륨 0.75 mL/min
검출기 온도	285°C
Split ratio	100 : 1

- 지방산 함량은 리놀레산, 팔미트산, 올레산, 리놀렌산(linolenic acid, palmitic acid, oleic acid, linolenic acid) 순으로 높게 나타났으며, 불포화지방산으로 체내에서는 합성되지 않는 필수지방산으로 식품으로 섭취하여야하는 리놀레산, 리놀렌산 및 아라키돈산의 경우 태극삼이 6.52 mg/g, 홍삼이 6.61 mg/g, 흑삼이 7.77 mg/g으로 흑삼에서 가장 많이 검출되었다. 개별 지방산의 함량은 태극삼, 홍삼, 흑삼의 순으로 많이 검출되었다

(unit: mg/g)

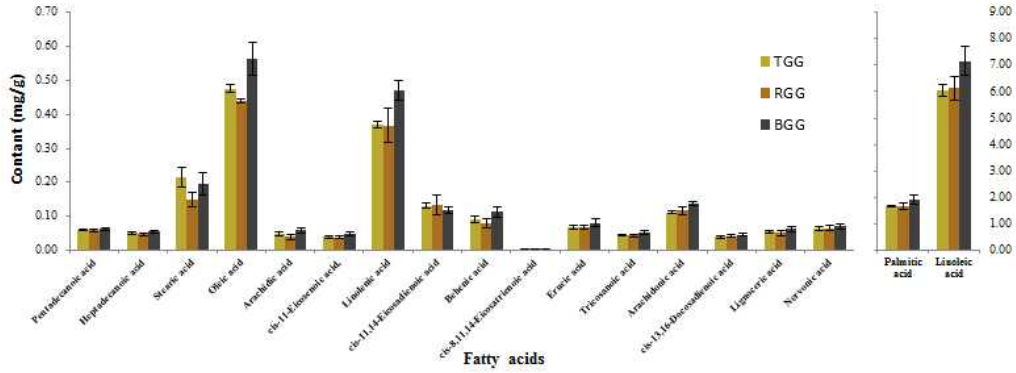


그림 181. 지방산 함량

마. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 색차 측정

1) 주근 색차 측정

- 색차계(코니카미놀타, CM-700d)를 사용하여 태극삼, 홍삼, 흑삼 시료를 Figure 182과 같이 주근의 2부위(A, B)에서 색차를 측정하였다.

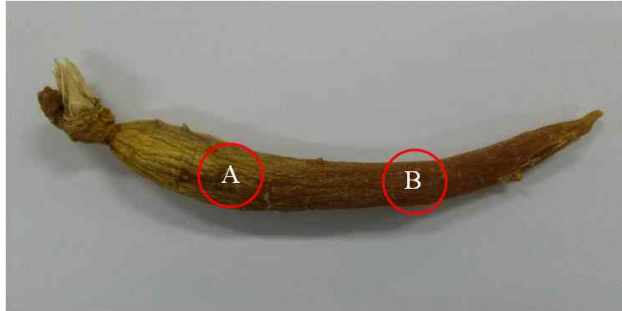


그림 182. 주근의 색차 측정위치

- 주근의 색차값 L(명도)값은 A와 B부분 모두에서 태극삼, 홍삼, 흑삼의 순으로 감소하였다. a(적색도)값은 A와 B부분 모두에서 홍삼, 태극삼, 흑삼의 순으로 감소하였다. b(황색도)값은 A부분에서는 홍삼, 태극삼, 흑삼의 순으로 감소하였고, B부분에서는 태극삼, 홍삼, 흑삼의 순으로 감소하였다. dE값은 A와 B부분 모두에서 태극삼, 홍삼, 흑삼의 순으로 감소하였다.

홍삼에 비해 흑삼이 1 mg/g 정도 더 함유하고 있었다. 전체적인 지방산 함량에서는 홍삼이 1.00 g/100 g 이었고 흑삼이 1.17 g/100 g 이었다.

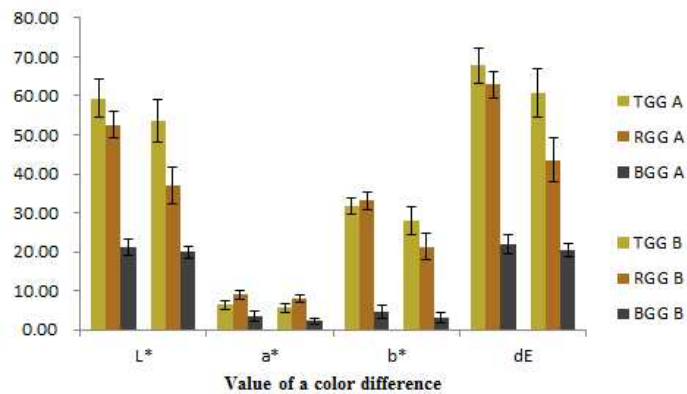


그림 183. 주근의 색차 비교

2) 분말 색차 측정

- 색차계(코니카미놀타, CM-700d)를 사용하여 각 조건별 균질화된 시료를 cell에 넣고 일정한 밀도로 분말시료를 충전하여 색차를 측정하였다.
- 분말 색차값 L, a, b에서 L(명도)값은 태극삼이 86.16, 홍삼이 84.93으로 비슷하였고, 흑삼이 66.86으로 감소하는 경향을 보였다. a(적색도)값은 태극삼이 1.71, 홍삼이 2.37, 흑삼이 6.45로 증가하였고, b(황색도)값은 태극삼이 14.23, 홍삼이 16.18, 흑삼이 18.96으로 증가하였다. dE값은 태극삼이 87.34, 홍삼이 86.49로 비슷하였고, 흑삼이 69.80이었다.

표 42. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 색차 비교

	TGG		RGG		BGG	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
L*	86.16	0.27	84.93	0.55	66.86	1.41
a*	1.71	0.10	2.37	0.07	6.45	0.43
b*	14.23	0.16	16.18	0.18	18.96	0.93
dE	87.34	0.27	86.49	0.53	69.80	1.21

바. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 ginsenoside 함량 분석

1) 시험용액의 조제

- 분말 약 1 g에 50% methanol 25 mL를 첨가한 후 30분 동안 초음파 추출한 것을 0.45 μm syringe filter(advantec, PTFE)하여 HPLC 분석에 이용하였다.

2) 표준용액의 조제

- 진세노사이드 14종 표준품 각각을 메탄올에 녹여 여과(0.45 μm)하여 각각 표준원액을 (1 mg/mL)만들고, 표준원액을 메탄올로 적당히 희석하여 표준용액으로 이용하였다.

3) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

항목	조건		
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼 (ODS 칼럼, 4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) 또는 이와 동등 이상의 것		
검출기(측정파장)	자외부흡광광도검출기(203 nm)		
주입량	10 μL		
이동상	시간 (min)	증류수	Acetonitrile
	0	82%	18%
	10	80%	20%
	30	73%	27%
	40	70%	30%
	55	49%	51%
	66	10%	70%
	70	10%	90%
	71	82%	18%
75	82%	18%	
유량	1.6 mL/min		

4) 정량시험 : 표준용액과 시험용액을 각각 10 μL씩 주입하여 앞의 조건에서 실험하였다. 표준용액의 피크의 면적에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 진세노사이드의 농도(μg/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 시료 중 진세노사이드의 함량(mg/g)을 구하였다.

$$\text{개별 진세노사이드 함량(mg/g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{1}{1,000}$$

S : 시험용액 중 개별 진세노사이드 농도(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

5) 태극삼, 홍삼, 흑삼의 진세노사이드 함량 분석 결과

- 표준화된 제조공정으로 제조된 태극삼과 흑삼에 함유된 진세노사이드를 홍삼의 진세노사이드 함량과 비교하여 분석하였다.
- 진세노사이드 Rg1, Rc, Rb2는 태극삼에서 홍삼으로 가공시에 함량이 증가하는 것으로 나타났으며 이는 이들의 전구체인 말로닐진세노사이드 Rg1, Rc, Rb2가 열처리에 의해 말로닐 그룹이 떨어져나가면서 증가한 것으로 보인다. 태극삼에는 말로닐 진세노사이드가 존재하였으나 홍삼에는 말로닐 진세노사이드가 존재하지 않았다.
- 진세노사이드 Rg3, F4, Rh1+Rg2는 홍삼에서 흑삼으로 가공시에 급격하게 증가하는 것으로 나타났고 진세노사이드 Rd, Rg5, Rk1은 홍삼에서 흑삼으로 가공시에 서서히 증가하는 것으로 나타났다.
- 진세노사이드 Rg1, Ra1은 홍삼에서 흑삼으로 가공시에 서서히 감소하는 것으로 나타났고 진세노사이드 Re, Rb1은 홍삼에서 흑삼으로 가공시에 급격하게 감소하는 것으로 나타났다.

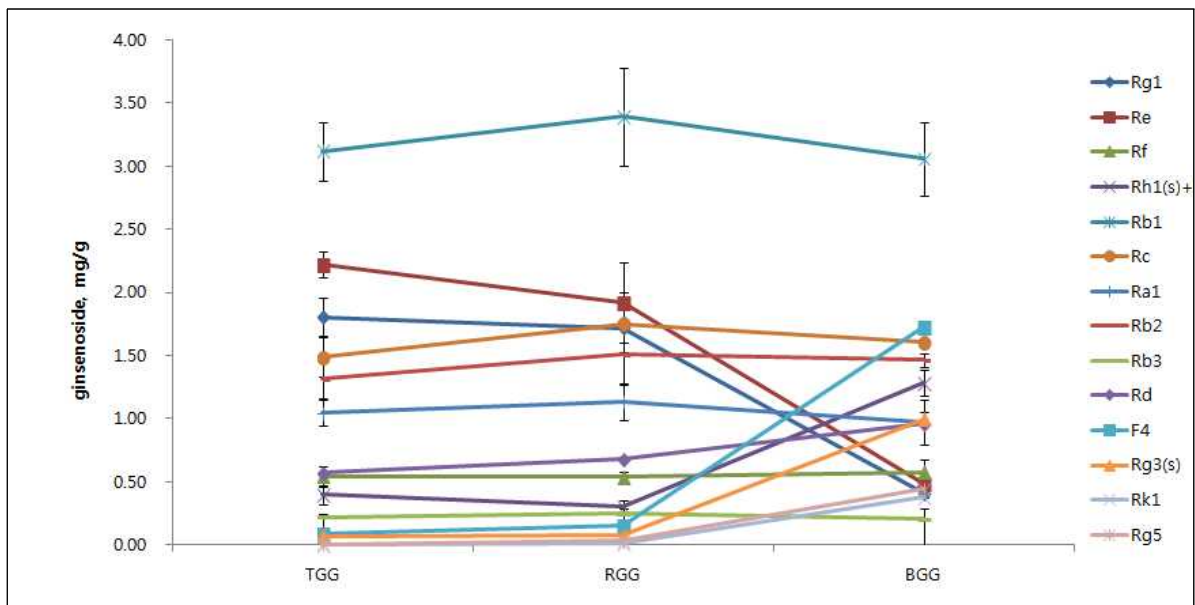


그림 184. 태극삼, 홍삼과 흑삼의 진세노사이드 함량

사. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 벤조피렌 함량 분석

1) 시험용액의 조제

- 분말 약 2.5 g을 정밀하게 달아 물 50 mL를 넣어 30 분간 초음파 추출하였다. 여기에 헥산 약 50 mL 및 내부표준액 1 mL을 넣어 1 분간 균질하게 섞은 다음 30 분간 초음파 추출하였다. 헥산층을 분액깔때기에 옮기고 다시 물층에 헥산 약 50 mL씩을 넣고 2회 반복 추출하여 헥산층을 취하여 분액깔때기에 합하였다. 합한 헥산층에 물 약 50 mL를 넣어 세척하고, 이 헥산층을 무수황산나트륨을 넣은 여과지를 사용하여 탈수 여과한 다음 45 °C의 수욕상에서 감압하여 헥산 약 2 mL가 될 때까지 농축하였다. 플로리실카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 순서대로 초당 2~3 방울의 속도로 유출시켜 활성화시킨 후 사용하였다. 활성화된 카트리지에 위의 추출용액을 넣어 헥산-디클로로메탄 혼합액(3 : 1) 20 mL를 초당 2~3 방울의 속도로 용출시켰다. 이 용출된 액을 35°C이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴 1 mL에 녹인 다음 0.45 µm syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 이용하였다.

2) 표준용액의 조제

- 벤조피렌 표준품 및 3-메틸콜란트렌표준품 적당량을 정밀하게 달아 각각 아세토니트릴에 녹여 mL당 1 µg을 함유하는 표준원액 및 내부표준원액을 만들었다. 이 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 mL 당 약 1~50 ng의 벤조피렌과 각각 50 ng의 내부표준물질이 함유되도록 희석하여 표준액으로 하였다.

3) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

항목	조건									
칼럼	옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한 칼럼 (ODS 칼럼, 4.6 mm × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등 이상의 것									
검출기(측정파장)	형광검출기 (여기파장 : 294 nm, 형광파장 : 404 nm)									
주입량	10 µL									
이동상	<table border="1"><thead><tr><th>시간 (min)</th><th>증류수</th><th>Acetonitrile</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>20%</td><td>80%</td></tr><tr><td>30</td><td>20%</td><td>80%</td></tr></tbody></table>	시간 (min)	증류수	Acetonitrile	0	20%	80%	30	20%	80%
시간 (min)	증류수	Acetonitrile								
0	20%	80%								
30	20%	80%								
컬럼온도	30°C									
유량	1.0 mL/min									

4) 정량시험 : 표준용액과 시험용액을 각각 10 µL씩 주입하여 앞의 조건에서 실험하다. 각 표준액에서 얻은 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[AS/AIS]를 Y축으로 하고 벤조피렌의 농도를 X축으로 하여 만든 검량곡선을 작성하고, 검액의 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[ASAM/ASAMIS]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 구하였다.

5) 태극삼, 홍삼, 흑삼의 벤조피렌 함량 분석 결과

흔히 흑삼을 제조할 때 가공횟수 증가에 따라 벤조피렌이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으나 실제로는 90~98℃가공조건에서는 벤조피렌이 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다. 태극삼, 홍삼, 흑삼중의 벤조피렌 함량은 거의 유사한 경향을 보였다.

(단위 : µg/kg)

Sample	벤조피렌 함량평균	편차
TGG	0.43	0.07
RGG	0.57	0.14
BGG	0.49	0.10

아. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 총 폴리페놀 함량 분석

1) 시험용액의 조제

- 분말 약 1 g을 정밀하게 달아 50% ethanol, 50 mL를 넣어 환류추출(85°C, 2 hr)한 후 원심분리하여 (3000 rpm, 10분) 상층액만 취하였다. 잔사에 50% ethanol, 40 mL 넣어 반복 추출하고 원심분리 후 상등액만 모아 100 mL로 정용한 액을 시험용액으로 이용하였다.

2) 시약

- 탄닌산 10 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채운다. 위의 표준원액을 증류수로 적정농도 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

3) 총 폴리페놀 함량 측정

- 증류수 7.5 mL를 시험관에 취한 후 표준용액 및 시험용액을 각각 1 mL씩 첨가하였다. Folin-denis 시약 0.5 mL, 35% 탄산나트륨 1 mL를 반드시 순서대로 가하여 혼합하여 암소에서 1시간 방치 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 총 폴리페놀 함량 측정 결과

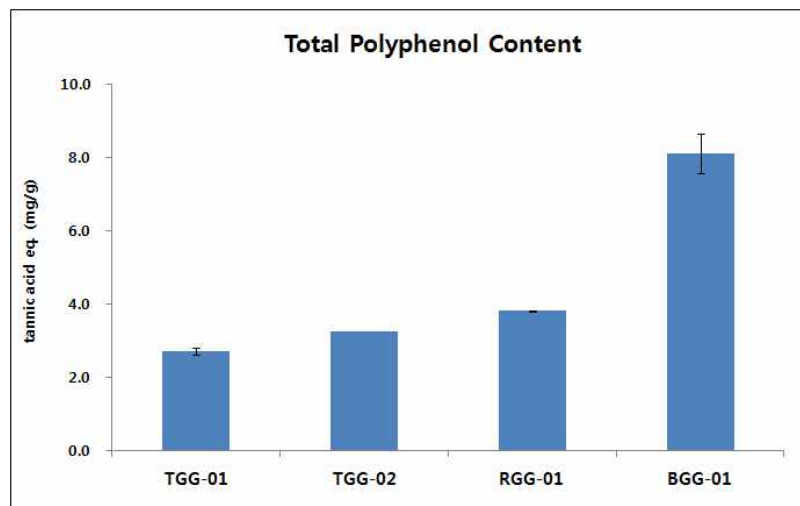


그림 185 . 태극삼, 홍삼, 흑삼의 총 폴리페놀 함량

자. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 항산화 활성 분석

1) 시험용액의 조제

- 분말 약 1 g을 정밀하게 달아 50% ethanol, 50 mL를 넣어 환류추출(85°C, 2 hr)한 후 원심분리하여 (3000 rpm, 10분) 상층액만 취하였다. 잔사에 50% ethanol, 40 mL 넣어 반복 추출하고 원심분리 후 상층액만 모아 100 mL로 정용한 액을 시험용액으로 이용하였다.

2) 시약 조제

- 1 mM DPPH 용액 제조 : ethanol에 녹여 갈색병에 보관하여 사용하였다.

- ABTS·⁺ 용액 제조

7 mM ABTS 및 2.5 mM potassium persulfate 용액을 증류수에 녹여 제조한 후 두 용액을 동량 혼합하여 12시간 동안 방치(4°C, 암소)하여 radical을 형성시켰다. ABTS radical 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 0.800 ± 0.020 되도록 EtOH로 희석하여 사용하였다.

3) DPPH, ABTS 항산화 활성 측정

- 시험용액 2mL(분말 10mg 상당량/mL)를 시험관에 넣고 ethanol 1.0mL 및 1mM DPPH 용액 1.0 mL를 순차적으로 가하였다. 위 시험액을 암소에서 30분간 정치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 추출물 대신 ethanol을 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

- 시험용액 100 μ L(분말 0.5 mg 상당량/mL)를 시험관에 넣고 증류수 1.9 mL 및 1 ABTS radical 용액 2.0 mL를 순차적으로 가하였다. 위 시험액을 암소에서 30분간 정치시킨 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 추출물 대신 증류수를 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

$$\frac{\text{DPPH, ABTS}}{\text{radical-scavenging activity (\%)}} = (\text{Control}-\text{샘플})/\text{Control} \times 100/\text{분말 무게}$$

4) DPPH 항산화 활성 평가 결과

- DPPH 항산화 활성은 태극삼, 홍삼, 흑삼으로 증속도가 증가함에 따라 증가함을 확인하였다. 태극삼에서 홍삼으로의 변화에서는 소폭 증가하였으나 홍삼에서 흑삼으로의 변화에서는 두배 이상 큰 폭으로 증가하였다.

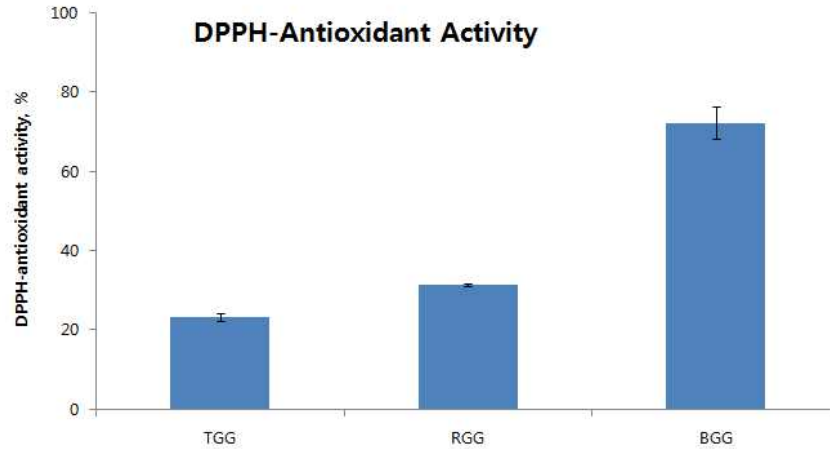


그림 186. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 DPPH 항산화 활성

5) ABTS 항산화 활성 평가 결과

- ABTS 항산화 활성은 태극삼, 홍삼, 흑삼으로 증속도가 증가함에 따라 증가함을 확인하였다. 태극삼에서 홍삼으로의 변화에서는 소폭 증가하였으나 홍삼에서 흑삼으로의 변화에서는 두배 이상 큰 폭으로 증가하였다. ABTS 항산화 활성은 DPPH 항산화 활성과 거의 동일한 경향을 보였다.

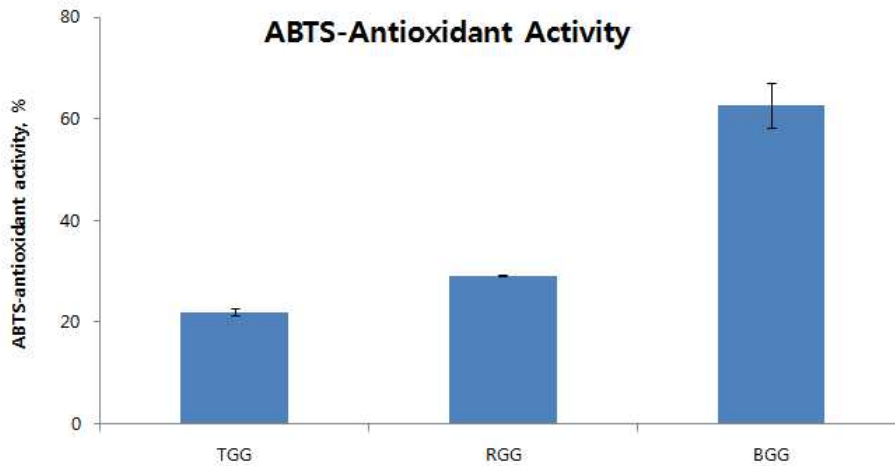


그림 187. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 ABTS 항산화 활성

차. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 산성다당체 함량 분석

1) 시험용액의 조제

- 분말 2 g을 정밀하게 달아 증류수, 50 mL를 넣어 환류추출(80°C, 3 hr)한 후 100 mL로 정용한다. 이 액을 원심분리하여 (4000 rpm, 20분) 상층액만 취하였다. 상층액 2 mL에 ethanol, 8 mL 넣어 1시간 방치한 후 원심분리(4000 rpm, 20분)하여 잔사를 침전시킨다. 상층액은 버리고 잔사에 증류수 20 mL를 첨가하여 희석시킨다. 이 희석액을 증류수를 이용하여 5배 추가 희석한 것을 시험용액으로 이용하였다.

2) 시약 조제

- 0.1% Carbazole 시액 : Ethanol에 녹여 냉암소에 보관.
- 표준용액 제조 : Glucuronic acid를 물에 희석하여 10~100 ppm으로 한 것을 이용

3) 산성다당체 함량 측정

- 시험용액 0.5 mL에 0.1% carbazole 시액 0.25 mL를 첨가한 후 황산 3 mL를 첨가하였다. 85°C에서 5분간 가열하고 상온에서 15분간 방치하여 냉각시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도별로 희석한 표준용액도 동일하게 시험하여 표준곡선을 작성하였다.

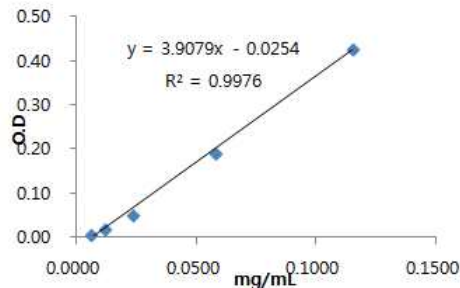


그림 188. ginseng acidic saccharides의 Calibration curve

4) 산성다당체 함량 측정 결과

- 태극삼과 홍삼에는 산성다당체가 거의 동일하게 함유되어 있었으며 흑삼에는 더 많은 산성다당체가 함유되어 있는 것으로 나타났다.

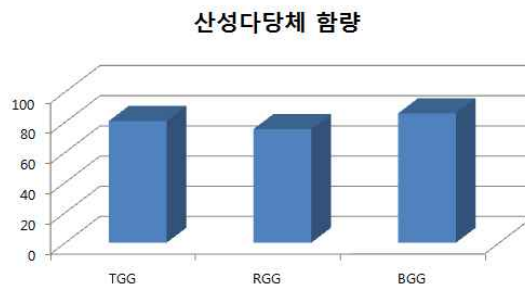


그림 189. 태극삼, 홍삼, 흑삼의 산성다당체 함량

카. 태극삼과 흑삼 농축액의 일반성분 함량

- 태극삼과 흑삼의 물추출물 농축액의 일반성분 및 조사포닌과 산성다당체 함량을 분석한 결과 총당에 있어서 태극삼 농축액이 흑삼 농축액보다 약 10% 정도 높게 나타났으며 조회분 함량에 있어서는 흑삼 농축액이 태극삼 농축액보다 약 2.4% 정도 높게 나타났다. 그리고 조지방, 조단백질, 조사포닌 및 산성다당체 함량은 태극삼과 흑삼 농축액이 비슷하게 나타났다. 흑삼 농축액의 회분 함량이 높게 나타난 원인에 대해서는 높은 온도로 계속하여 열처리를 받는 제조과정에서 태극삼 농축액과 달리 회화가 되지 않는 미지의 물질들이 생성된 결과에 의한 것이 아닌지 좀 의외의 결과라고 사료된다. 이를 좀더 명확하게 구명하기 위하여 태극삼 및 흑삼 농축액을 공식 검사기관에 의뢰해서 회분함량과 각 무기성분의 함량을 조사하고자 한다.

표 43. 태극삼 및 흑삼 농축액의 일반성분 함량 (Unit : % dry basis)

농축액	총당	조지방	조단백질	조회분	조사포닌	산성다당체
태극삼	84.30	0.64	12.30	0.79	6.73	5.60
흑삼	73.80	0.39	14.10	8.86	5.24	6.64

타. 태극삼과 흑삼 농축액의 색상 비교

- 태극삼 및 흑삼 농축액의 색상을 적색 관련 파장인 490 및 550nm에서 흡광도를 조사한

결과 표 6과 같이 흑삼 농축액이 태극삼 농축액에 비해서 약 5.8배 정도로 나타나 흑삼 제조과정 중에 열에 의한 비효소적 갈변반응에 의한 결과라고 판단된다.

표 44. 태극삼 및 흑삼 농축액의 색도 비교

물추출 농축액*	Wavelength(nm)	
	490	550
태극삼	0.076(100)	0.034(100)
흑삼	0.442(582)	0.199(585)

* 건조물 1% 수용액

파. 태극삼과 흑삼 농축액의 총 페놀화합물 및 총 플라보노이드 함량

- 총 페놀화합물의 함량은 흑삼 농축액이 1.64%로 태극삼의 약 2배 정도 높게 나타났으며 총 플라보노이드 함량에서도 흑삼 농축액이 약 2배 이상 높게 나타나 이들 물질에 의한 항산화활성도 흑삼 농축액이 높게 나타날 가능성이 있다고 판단된다.

표 45. 태극삼 및 흑삼 농축액의 총 페놀화합물 및 총 플라보노이드 함량

(Unit : % dry basis)

물추출 농축액	총 페놀화합물	총 플라보노이드 화합물
태극삼	0.82	319*
흑삼	1.64	678*

* ($\mu\text{g}/100\text{g}$)

하. DPPH free radical에 의한 scavenging activities

- DPPH 용액 2mL와 2% 수용액의 태극삼 및 흑삼 물추출 농축액 0.5mL를 혼합하여 DPPH free radical에 의한 scavenging activities를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 반응 1분 후의 활성은 태극삼 농축액이 34.5%, 흑삼 농축액은 61.1%로 나타나 흑삼 농축액이 태극삼 농축액의 1.7배 이상의 활성을 나타내었다. 한편 $3.125 \times 10^{-3}\%$ 의 농도의 vitamine C는 1분 후 48.1%의 활성을 보였다. 이러한 결과는 5분 후에 73.7%의 DPPH 소거활성을 보인 본 실험 결과와 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 30분 경과시 약 75%의 항산화 활성을 나타낸 경우(27)와 매우 유사한 결과였다.

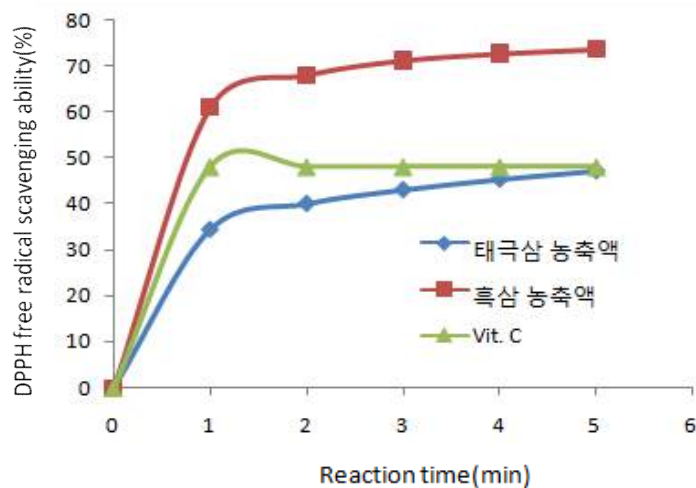


그림 190. 태극삼, 흑삼 추출물의 DPPH free radical scavenging abilities

표 46. 반응시간에 따른 태극삼 및 흑삼 농축액의 DPPH radical scavenging activities

Ginseng extracts	Reaction time(min)					
	0	1	2	3	4	5
Taegeuk	0	34.5*	40.1	43.1	45.4	47.2
Black		61.1	68.1	71.3	72.8	73.7
Vitamine C**		48.1	48.0	47.8	47.8	47.8

* Scavenging activity(%) = (Absorbance of DPPH solution-absorbance of sample treatment / Absorbance of DPPH solution) x 100

** Concentration of vitamin C was $3.125 \times 10^{-3}\%$.

3. 태극삼 흑삼 혈행개선 기능성 평가(세포수준)

가. 혈전용해활성 연구방법

1) 혈전용해 활성시험

- Haverkate-trass의 fibrin 법을 일부 변형하여 측정하였다. PBS로 fibrinogen의 최종농도가 0.6%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 10mL를 Petri dish에 옮기고 PBS에 녹인 thrombin용액 1unit/mL를 30분 이상 상온에 방치하여 고화시켰다. 시료를 직경 6 mm filter paper disc에 각 농도별로 fibrin plate 상에 점적하여 사용하였으며, positive control로 plasmin from human plasma 1unit/mL 사용하였다. 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 fibrin plate가 용해되어 형성된 투명환의 넓이를 측정하여 활성도를 측정하였다.

혈전용해활성(%) = (시료에 의한 영역/plasmin 용해영역) X 100

2) 세포배양

- HUVEC은 Lonza (Walkers ville, MD)에서 구입하여, EBM-2 Bullet kit growth medium에서 37°C humidified 5% CO₂조건으로 배양했다. 실험하는 동안, HUVEC은 4~9회 계대배양한 것을 사용했다. 배양접시에 HUVEC이 90~95% 정도 채워졌을 때, 각 시료 (인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물)를 농도별로 처리한 후 1시간동안 전처리 한 뒤 LPS (1 µg/mL), TNF-α (10 ng/mL), palmitate, high glucose (50 mM)를 시간별로 처리하였다.

3) 세포독성

- 각종 시료추출물에 대한 세포독성은 MTT assay로 시험하였다. 24 well plate에 well당 세포 (1×10⁵ cells)를 접종하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 각 시료추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 후 MTT 용액 500 uL씩을 각 well에 가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 4시간 동안 정치하였다. MTT 용액을 완전히 제거한 후 1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO)로 세포 내에 형성된 formazan 결정체를 용해하여 ELISA plate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) ELISA

- 24 well plate에 cell (5×10⁵ cells/well)을 배양한 후 각각의 처리조건에 맞춰 각 추출물(인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물)과 LPS (1 µg/mL), TNF-α (10 ng/mL), palmitate, high glucose (50 mM)를 처리한 후 상층액을 항체가 코팅되어진 96 well plate (ICAM-1, VACM-1, Seletin kit)에 100 µL 넣은 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다.

Washing buffer (0.05% Tween 20 in d-PBS)로 4회 세척하고 biotin-conjugated anti-human antibody (ICAM-1), VCAM-1 그리고 Seletin)를 blocking buffer에 1:500으로 희석하여 100 μ l씩 첨가하여 상온에서 1-2시간동안 방치 하였다. 그 후 washing buffer로 4회 세척하고 streptavidin-HRP를 첨가한 후 30분간 반응시킨 후 4회 세척하였다. 그 후 substrate를 100 μ l 첨가하여 차광시키고 30분 동안 상온 반응 시킨 후 stop buffer를 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Total RNA 분리 및 정량

- HUVEC세포를 100mm culture dish에 plate당 2×10^6 cell을 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포로부터 상등액을 제거한 후 d-PBS를 이용하여 세척하고 1ml의 Trizol reagent를 가하여 culture dish 바닥에 점도가 사라질 때 까지 pipetting하고 microcentrifuge에 옮겼다. 세포가 완전히 용해될 때 까지, 대략 5분간 inversion한 후에 chloroformdmf200 μ l를 가하고 15초 동안 교반하였다. 상온에서 10분 정도 방치한 후 원심분리 (12,000xg, 4 $^{\circ}$ C, 15분)하였다. 상등액을 새로운 tube에 옮긴 후 isopropanol을 상등액과 동량으로 가하고 inversion한 후 원심분리 (12,000 xg, 4 $^{\circ}$ C, 15분)하였다. 상등액을 버리고 pellet을 75% DEPC-treated cold ethanol로 세척한 후, RNA pellet이 건조된 상태에서 DEPC-treated dH₂O에 용해시켰다. 이 때 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 정량하고 1 mg/mL 농도가 되도록 보정하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관 하였다.

6) RT-PCR

- RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하여 VCAM-1과 ICAM-1의 mRNA 발현량을 측정하였다. 추출된 total RNA는 cDNA synthesis kit (TaKaRa, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. VCAM-1과 ICAM-1을 확인하기 위한 PCR을 위하여 생성된 cDNA mixture 1 μ l와 PCR mixture (dNTP Mixture, 10 \times taq buffer, taq polymerase, PCR primer, DW)를 혼합하여 총 25 μ l의 반응액을 25~30회 반복하는 PCR cycle로 반응하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 housekeeping gene인 GAPDH를 사용하여 함께 PCR을 진행하였다.

- The following primers were used : ICAM-1 forward primer was 5-CAC AAG CCA CGC CTC CCT GAACCT A-3, reverse primer was 5-TGT GGG CCT TTG TGT TTT GAT GCT A-3, VCAM-1 forward primer was 5-TGA GCG GGA AGG TGA GGA GTGAGG-3, reverse primer was 5-CAG GAT GGA GGA AGG GCT GAC CAA-3, GAPDH forward primer was 5-TAT GAC AAC AGC CTC AAG AT-3, reverse primer was 5-AGG TCC ACC ACT GAC ACG TT-3.

7) 총단백질의 분리 및 정량

- 세포를 100mm culture dish에 plate당 2×10^6 세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 회수하여 d-PBS를 이용하여 세척하고 세포침전물에 lysis buffer (20mM Hepes pH 7.0, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton X-100,

10% glycerol, 150mM NaCl, 20mM β -glycerophosphate, 5 ng/ml leupeptin, 0.1 unit/ml aprotinin) 200-500 μ L 넣고 침전물을 녹인 후에 ice에 30~60분간 방치해 놓은 후에 원심분리 (4°C, 13000rpm, 10분)하여 상등액을 취해 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

8) Western blot analysis

- 실험에 이용할 20-50 μ g의 단백질을 적당한 농도의 SDS-PAGE gel에 전기 영동한 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 5% skim milk in TBST (Tris Buffered Saline with Tween; 25 mM Tris, 140mM NaCl, 3mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0)를 blocking buffer로 만들어 처리한 후 1차 항체를 넣고 4°C에서 overnight 처리하였다. 0.25% TBST로 3회 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody in blocking buffer를 3시간 동안 상온에서 처리하였다. 0.25% TBST로 3회 세척 후에 detection reagent (ECL)를 가한 후 Kodak scientific imaging film에 노출시켜 각각의 단백질 발현을 확인하였다.

9) ROS 측정

- HUVEC을 100mm culture dish에 2×10^6 cells을 배양한 후 각각의 처리조건에 맞춰 각 추출물(인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물)과 LPS (1 μ g/mL), TNF- α (10 ng/mL), palmitate, high glucose (50 mM)를 처리한 후 상층액을 제거한 후 1 \times PBS로 세척하였다. 세포에 cell lysis buffer (RIPA buffer)를 처리한 후 세포를 녹인 후 원심분리하여 상층액 (단백질)을 분리하였다. Total ROS 측정을 위한 항체가 코팅되어진 96 well plate (ROS ELISA KIT, Cell Signaling)에 단백질을 100 μ L 넣은 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. Washing buffer (0.05% Tween 20 in d-PBS)로 4회 세척하고 biotin-conjugated anti-human antibody를 blocking buffer에 1:500으로 희석하여 100 μ L씩 첨가하여 상온에서 1-2시간동안 방치 하였다. 그 후 washing buffer로 4회 세척하고 streptavidin-HRP를 첨가한 후 30분간 반응시킨 후 4회 세척하였다. 그 후 substrate를 100 μ L 첨가하여 차광시키고 30분 동안 상온 반응 시킨 후 stop buffer를 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 혈전용해활성 연구결과

1) 혈전용해 활성 연구 결과

- PBS로 fibrinogen의 최종농도가 0.6%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 10mL를 Petri dish에 옮기고 PBS 에 녹인 thrombin용액 1unit/mL 를 30분 이상 상온에 방치하여 고화시켰다. 시료를 직경 6 mm filter paper disc 에 각 농도별로 fibrin plate 상에 점적하여 사용하였으며, positive control 로 plasmin from human plasma 1unit/mL 사용하였다. 37°C 에서 4시간 동안 반응 시킨 후 fibrin plate 가 용해되어 형성된 투명한환의 넓이를 측정하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 인삼과 태극삼물추출물에서는 10 mg/mL농도에서도 용해도를 나타내지 않았다. 홍삼물추출물은 농도의존적으로 용해도가 증가하였으며, 특히 흑삼물추출물에서 용해도가 가장 높게 나타났다.

- 인삼물 추출물 Fibrinolytic Area

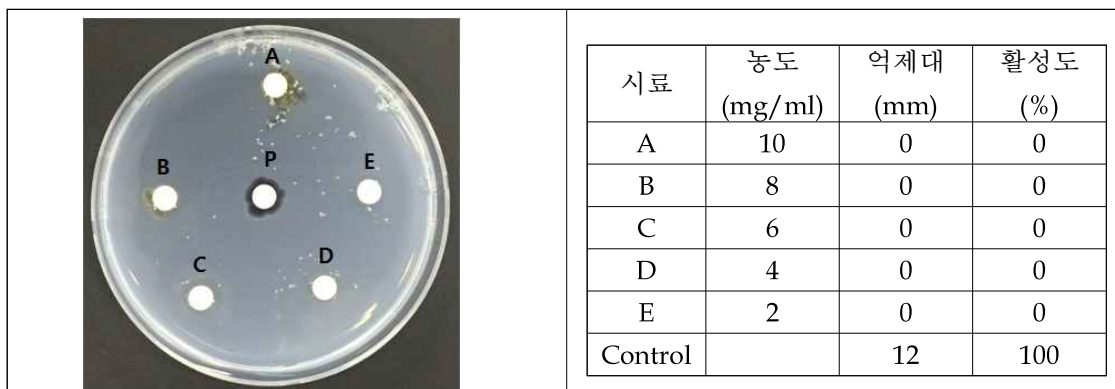


그림 191. 인삼물추출물의 혈전용해 활성

- 태극삼물추출물 Fibrinolytic Area

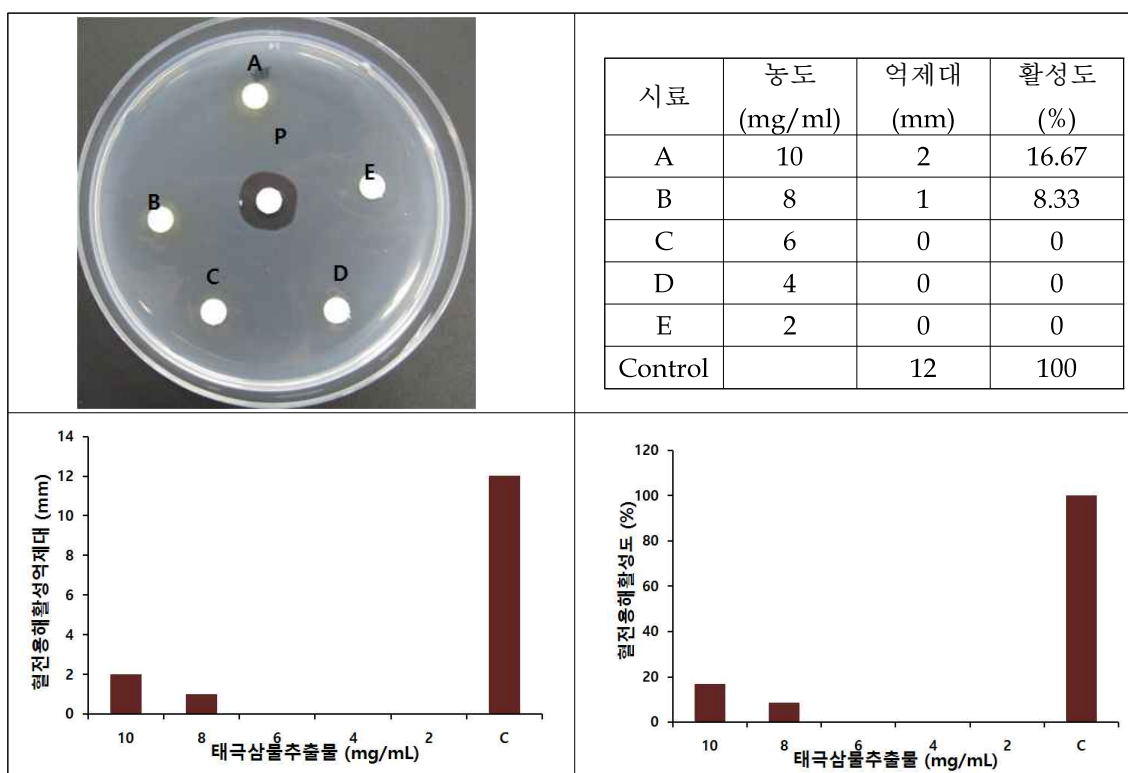


그림 192. 태극삼물추출물의 혈전용해 활성

- 홍삼물추출물 Fibrinolytic Area

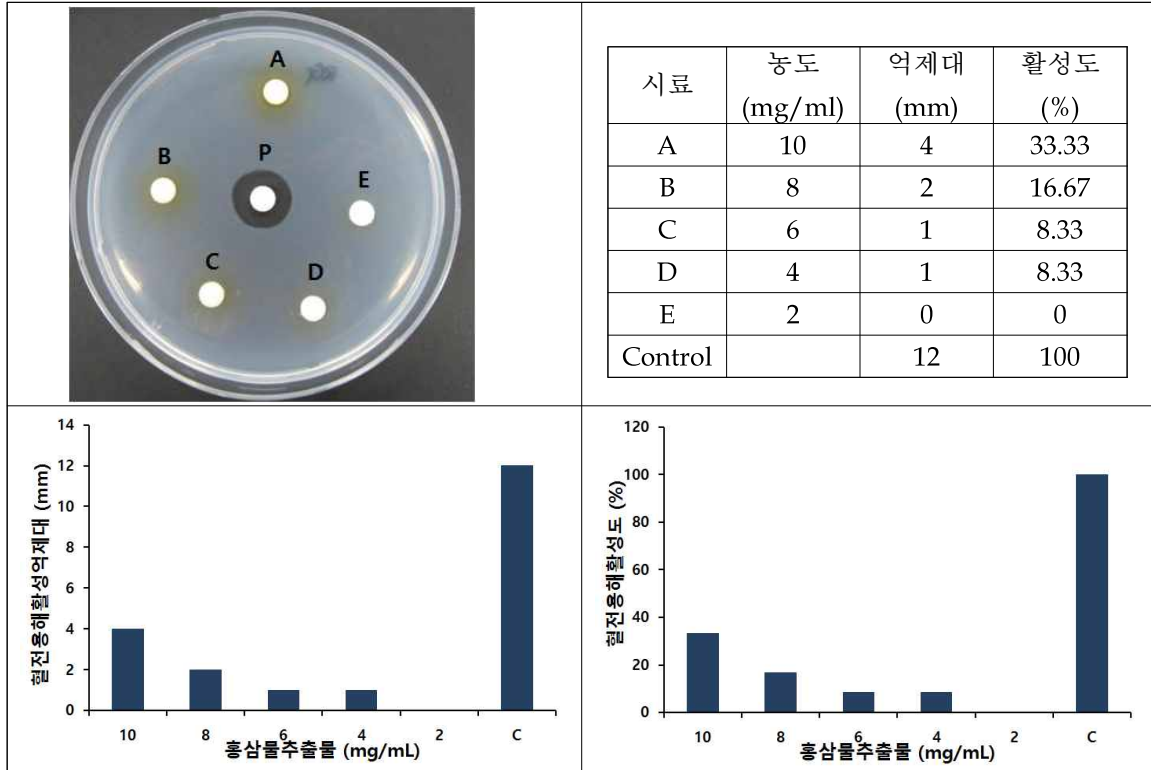


그림 193. 홍삼물추출물의 혈전용해 활성

- 흑삼물추출물 Fibrinolytic Area

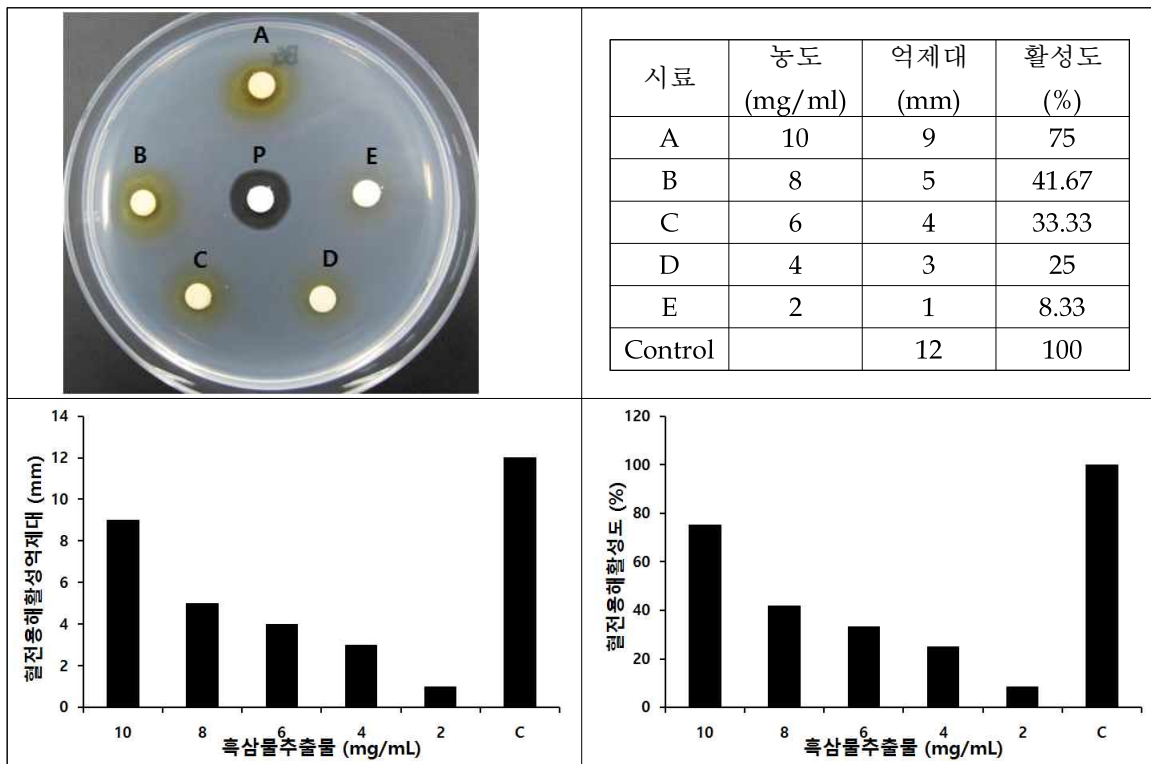


그림 194. 흑삼물추출물의 혈전용해 활성

2) 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 세포독성

- HUVEC에 각 시료 (인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물)를 농도별로 처리한 후 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 2 mg/mL 농도까지는 세포독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

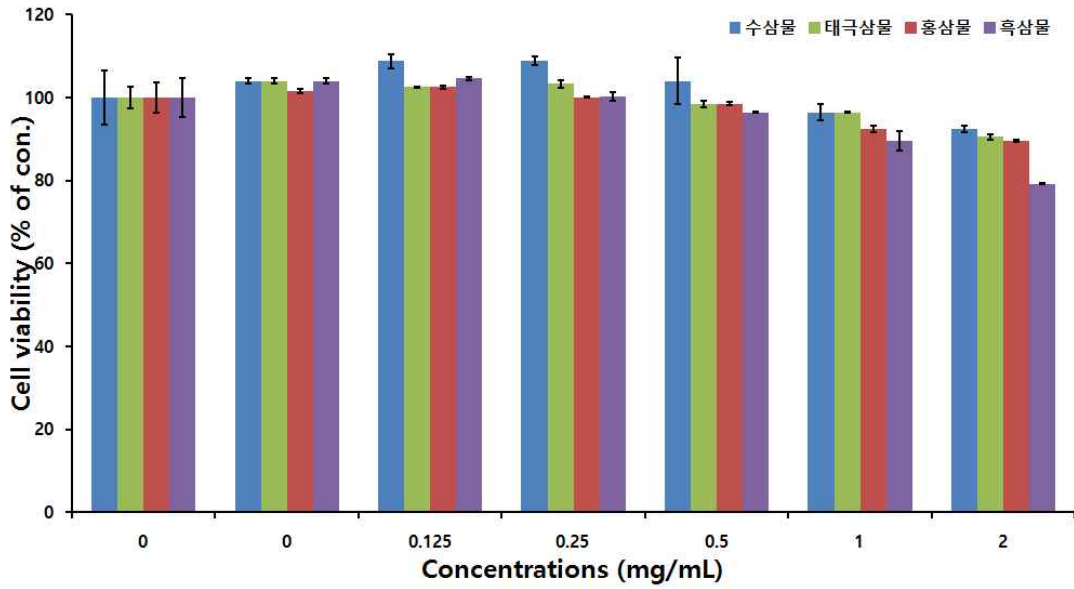


그림 195. 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 HUVEC에 대한 세포독성

3) HUVEC에서 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 VCAM-1 발현 효과

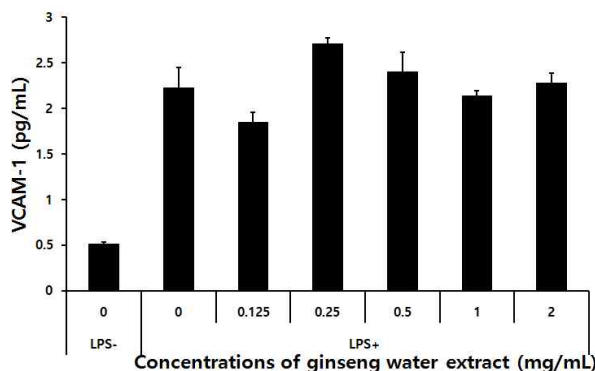


그림 196. 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼추출물의 VCAM-1 발현효과

- HUVEC에 LPS를 처리한 후 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 VCAM-1 발현을 확인한 결과, 인삼물추출물은 농도의존적으로 억제효과를 보이지 않았으나 홍삼물추출물은 농도의존적으로 강한 억제를 보였다.

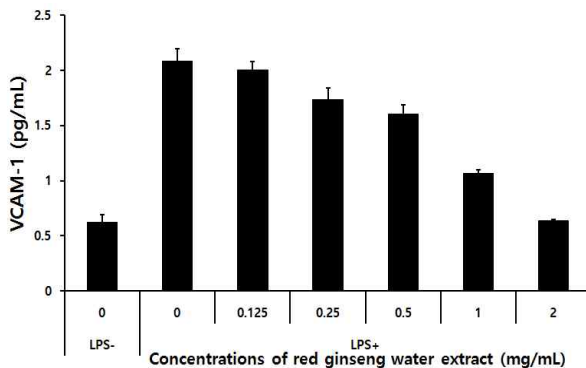


그림 197. LPS가 처리된 HUVEC에 인삼과 홍삼물추출물을 처리한 후 VCAM-1의 발현 변화

- 태극삼과 흑삼물추출물도 농도의존적으로 VCAM-1 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 특히 흑삼물추출물은 0.25 mg/mL 농도에서부터 35%이상 감소되었다.

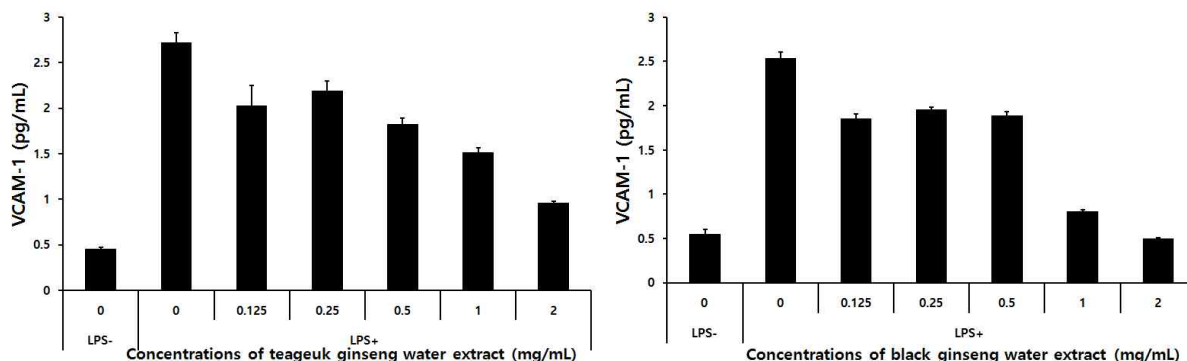


그림 198. LPS가 처리된 HUVEC에 태극삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 VCAM-1의 발현 변화

4) HUVEC에서 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 ICAM-1 발현 효과

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 ICAM-1 발현을 확인한 결과, 인삼물추출물은 농도의존적으로 억제효과를 보이지 않았으나, 홍삼물추출물은 농도의존적으로 강한 억제를 보였으며, 0.125 mg/mL 농도부터 38% 정도 감소하였다. 태극삼과 흑삼물추출물도 농도의존적으로 ICAM-1 발현이 억제되는 것을 확인하였다.

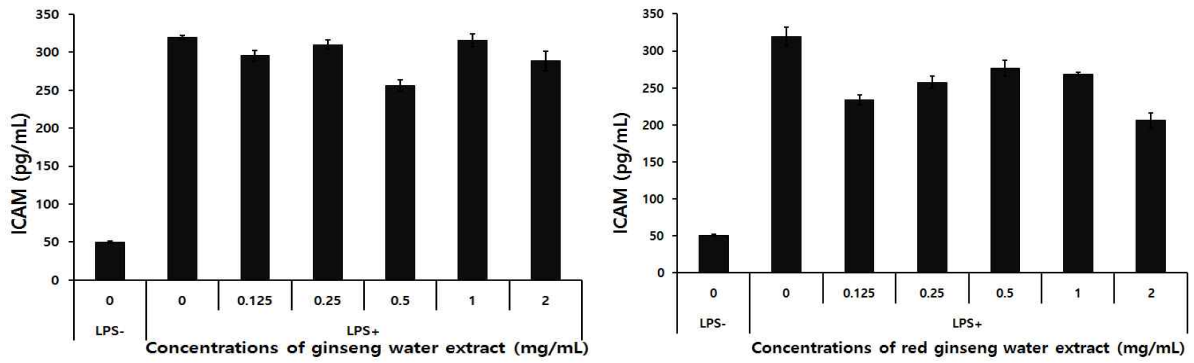


그림199. LPS가 처리된 HUVEC에 수삼과 홍삼물추출물을 처리한 후 ICAM-1의 발현 변화

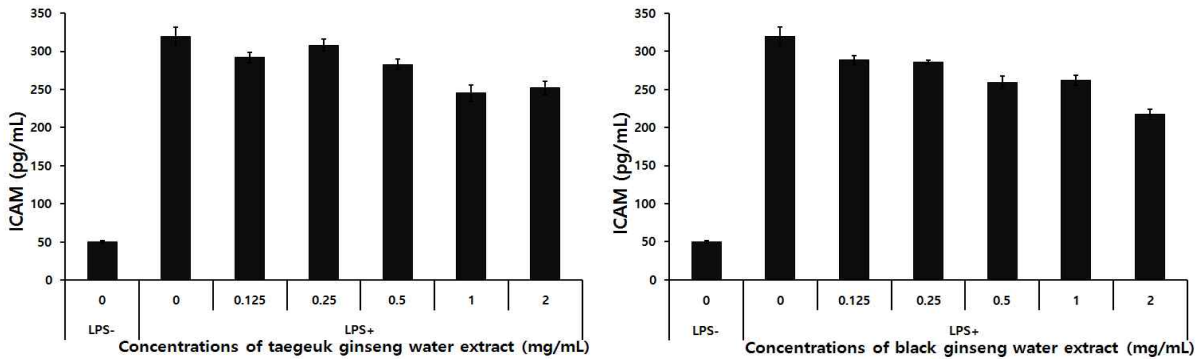


그림 200. LPS가 처리된 HUVEC에 태극삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 ICAM-1의 발현 변화

5) HUVEC에서 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 IL-6 발현 효과

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 IL-6 발현을 확인한 결과, 인삼과 홍삼물추출물은 농도의존적으로 강한 억제효과를 보였다. 태극삼과 흑삼물추출물도 농도의존적으로 IL-6 발현이 강하게 억제되는 것을 확인하였다.

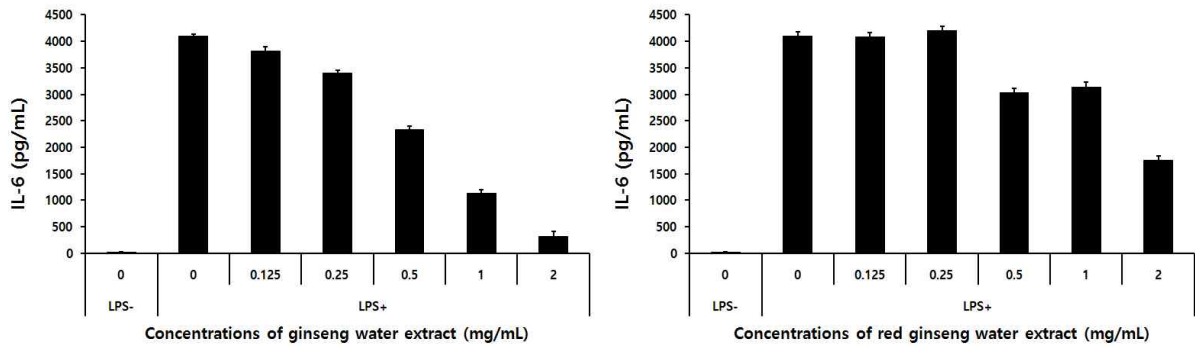


그림 201. LPS가 처리된 HUVEC에 수삼과 홍삼물추출물을 처리한 후 IL-6의 발현 변화

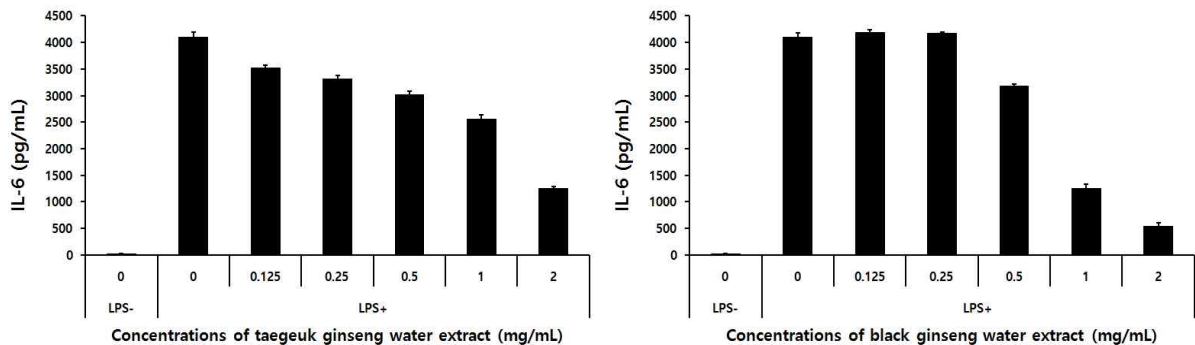


그림 202. LPS가 처리된 HUVEC에 태극삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 IL-6의 발현 변화

6) HUVEC에서 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 TNF- α 발현 효과

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 TNF- α 발현을 확인한 결과, 인삼과 홍삼물추출물은 농도의존적으로 강한 억제효과를 보였다. 태극삼과 흑삼물추출물 역시 농도의존적으로 TNF- α 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 흑삼에서 강한 억제를 확인하였다.

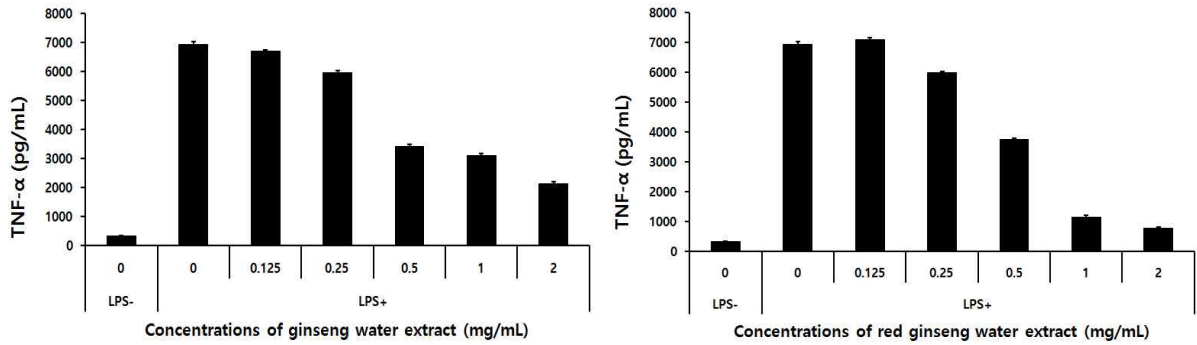


그림 203. LPS가 처리된 HUVEC에 수삼과 홍삼물추출물을 처리한 후 TNF- α 의 발현 변화

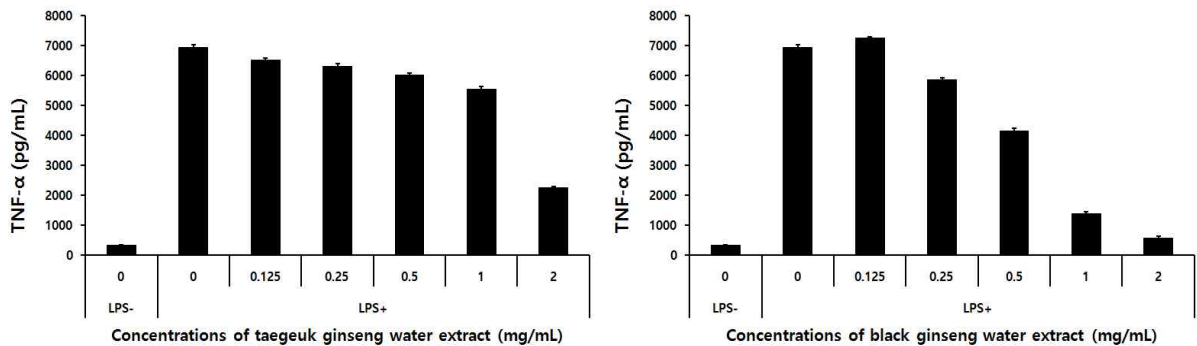


그림 204. LPS가 처리된 HUVEC에 태극삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 TNF- α 의 발현 변화

7) HUVEC에서 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물의 E-Selectin 발현 효과

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 E-Selectin 발현을 확인한 결과, 인삼과 홍삼물추출물은 농도의존적으로 강한 억제효과를 보였다. 태극삼과 흑삼물추출물 역시 농도의존적으로 E-Selectin 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 홍삼과 흑삼물추출물에서 강한 억제를 확인하였다.

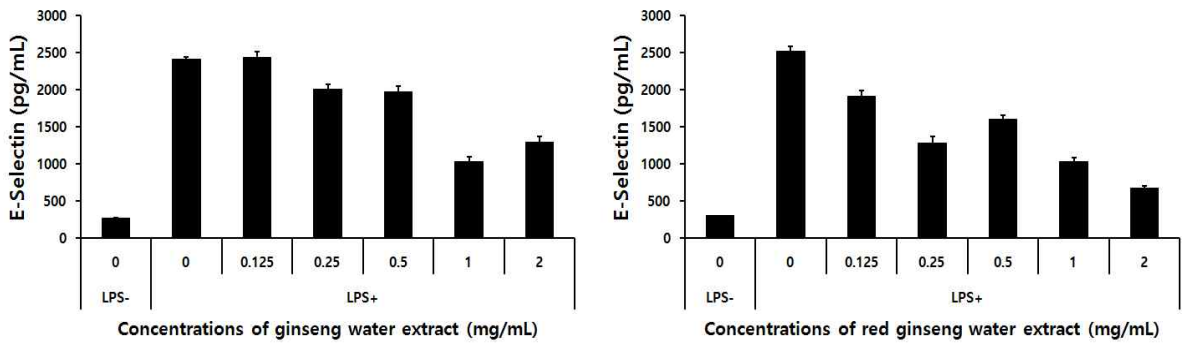


그림 205. LPS가 처리된 HUVEC에 수삼과 홍삼물추출물을 처리한 후 E-Selectin의 발현 변화

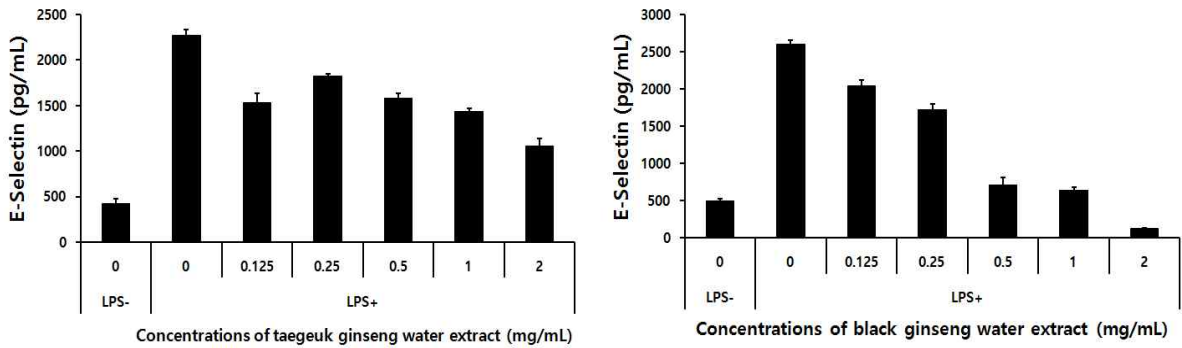


그림 206. LPS가 처리된 HUVEC에 태극삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 E-Selectin의 발현 변화

8) HUVEC에서 홍삼과 흑삼물추출물의 단백질발현

- HUVEC에 LPS를 처리한 후 홍삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 웨스턴블랏 방법을 이용하여 VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin 단백질발현을 확인한 결과, 홍삼과 흑삼물추출물 처리 농도의존적으로 단백질 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

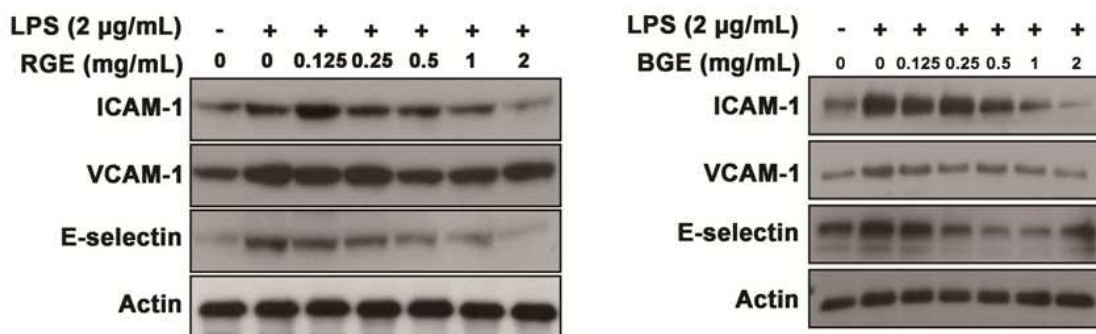


그림 207. LPS가 처리된 HUVEC에 홍삼과 흑삼물추출물을 처리한 후 단백질 발현

9) 혈전용해연구 결론

- 다양한 혈관질환은 순환 지질단백질, 혈액학 요소 및 동맥 혈관 벽과 면역 시스템간의 병리적인 상호작용에 의해 발생하는 만성염증질환으로 이로 인해 혈관 탄성과 섬유화가 진행되어지며, 혈중 지질농도가 증가되면 혈전유발에 원인이 된다. 혈 중 cholesterol수치가 높아지면 동맥 내피세포와 반응하여 내피-백혈구 부착인자를 발현시키며, 이로 인해 단핵 백혈구가 내피에 부착함으로써 동맥경화 및 지질대사 장애 등 대사성질환이 유발되어진다. 이러한 질환의 초기 단계에서 순환하는 면역세포들이 증가되어지며, 이로 인해 다양한 단백질 발현 (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin)이 증가되어진다. 이러한 세포부착인자는 염증성 cytokine류에 의해 활성화된 다음, 혈관의 내피에서 분비되는 분자로서, 혈관 내 불안정반을 표지하는 대표적인 인자로 알려져 있으며, 이러한 분자들은 혈관 내피의 활성화 및 혈관의 염증을 평가하는 표지인자로 사용 할 수 있다.

- 본 연구에서는 수삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물추출물을 이용하여 각종 혈관염증관련 인자의 발현 억제효과를 관찰한 결과, 홍삼과 흑삼물추출물이 혈전억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 다양한 염증관련 단백질 발현도 홍삼과 흑삼물추출물에서 더 효과가 좋은 것으로 확인되었다. 특히 염증매개물인 LPS를 처리했을 때 TNF-α가 높게 증가되는 것으로 보아 세포부착인자의 발현에 관여하는 것으로 사료되어진다.

	ICAM-1	VCAM-1	E-selectin	TNF-α	IL-6
인삼	↓	↓	↓	↓	↓↓↓
홍삼	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓
태극삼	↓	↓	↓	↓	↓
흑삼	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓

그림 208. 다양한 혈전용해 연구 결과

다. 진세노사이드 Rg3의 혈관염증억제 연구

1) 세포독성

- HUVEC에 진세노사이드 Rg3를 농도별로 처리한 후 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 160 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지는 세포독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

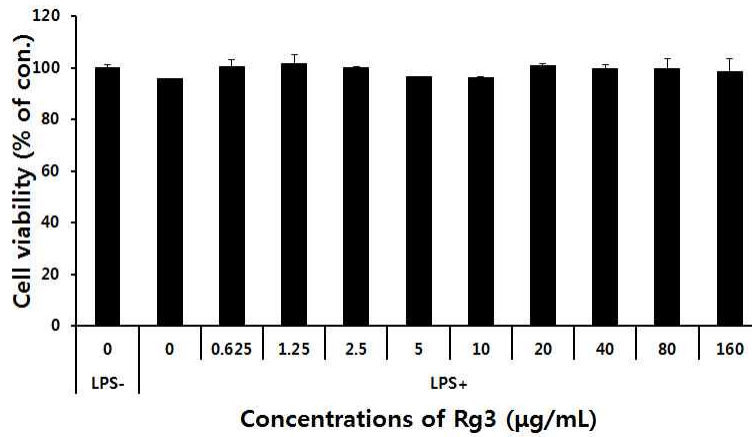


Fig. 209. Effect of ginsenoside Rg3 on cell viability of HUVECs

2) 세포부착분자 발현 효과

- HUVEC에 LPS를 처리한 후 진세노사이드 Rg3를 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 VCAM-1, ICAM-1, E-seletin 발현을 확인한 결과, VCAM-1과 E-seletin 발현이 농도의존적으로 강하게 억제되는 것을 확인하였다. ICAM-1 발현 역시 농도의존적으로 강하게 억제되는 것을 확인하였으며, 24시간내에서 더욱 억제효과가 높았다.

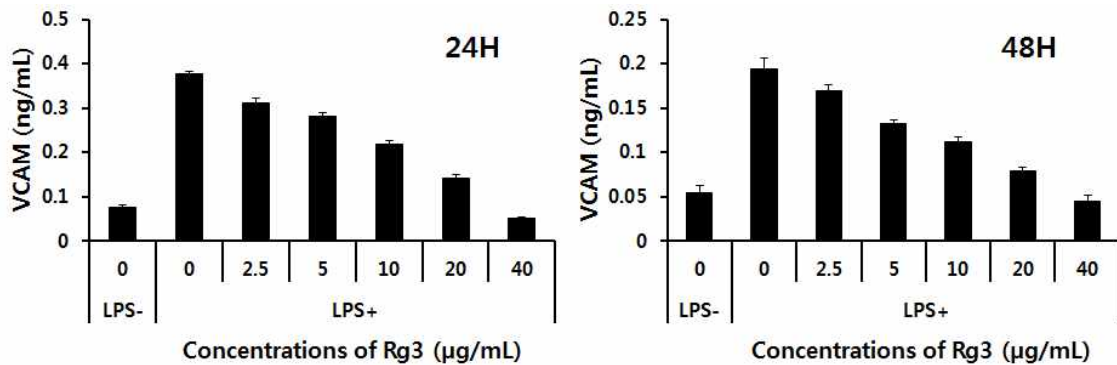


Fig. 210. Effect of ginsenoside Rg3 on VCAM-1 secretion by LPS-stimulated HUVECs.

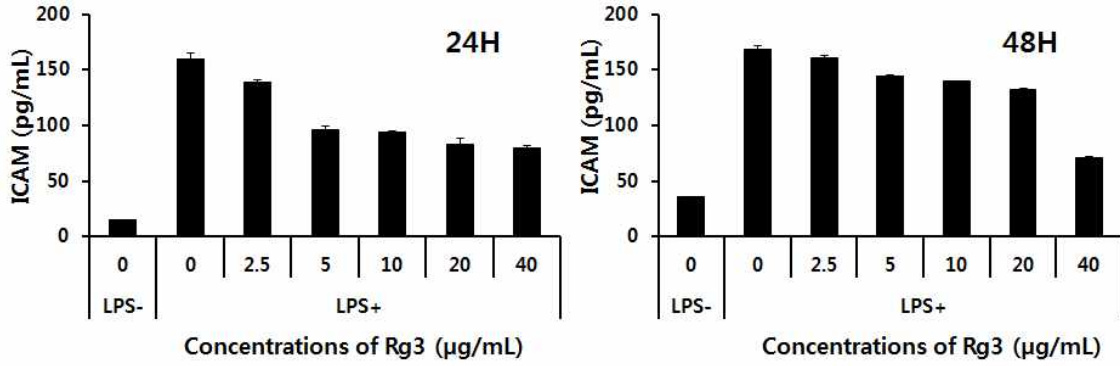


Fig. 211. Effect of ginsenoside Rg3 on ICAM-1 secretion by LPS-stimulated HUVECs.

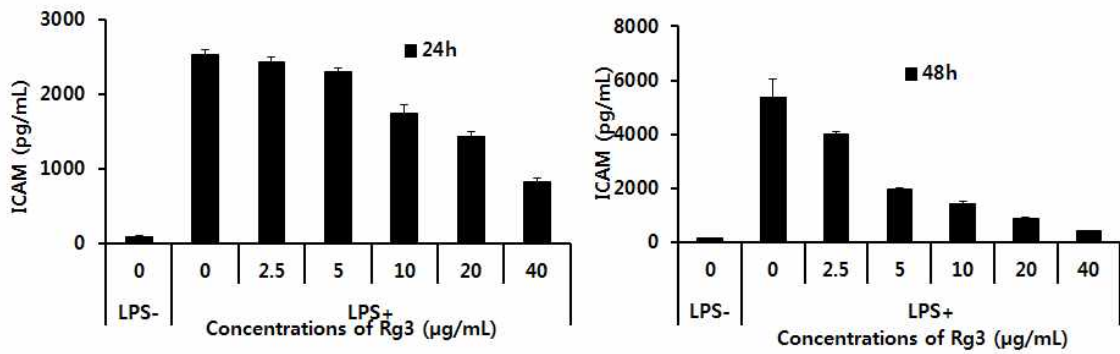


Fig. 212 Effect of ginsenoside Rg3 on E-selectin secretion by LPS-stimulated HUVECs.

3) HUVEC에서 진세노사이드 Rg3의 사이토카인 발현 효과

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 진세노사이드 Rg3를 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 사이토카인 생성변화를 확인한 결과, TNF- α 은 48시간에서 더 높은 억제효과를 보였으며, IL-6와 IL-8 발현 역시 농도의존적으로 강한 억제효과를 보였다.

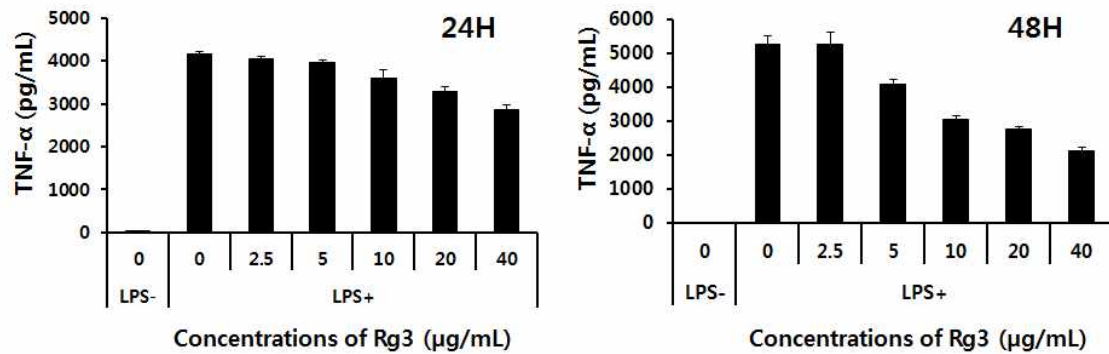


Fig. 213. Effect of ginsenoside Rg3 on TNF- α secretion by LPS-stimulated HUVECs.

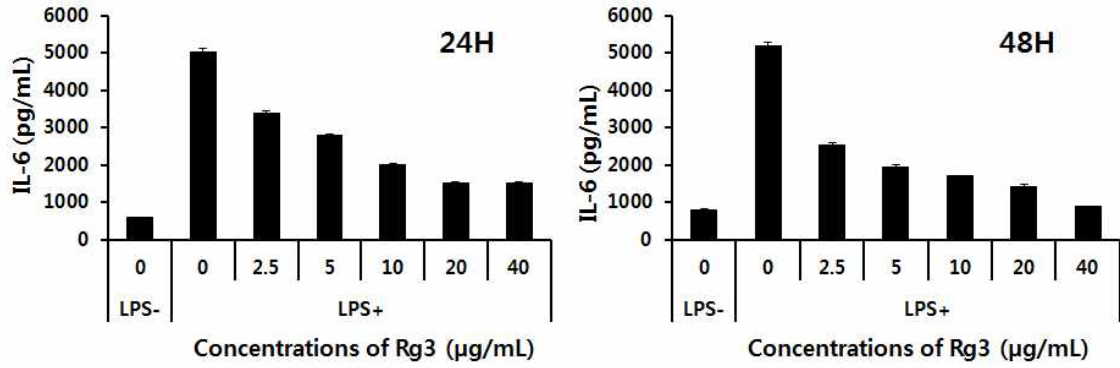


Fig. 214. Effect of ginsenoside Rg3 on IL-6 secretion by LPS-stimulated HUVECs.

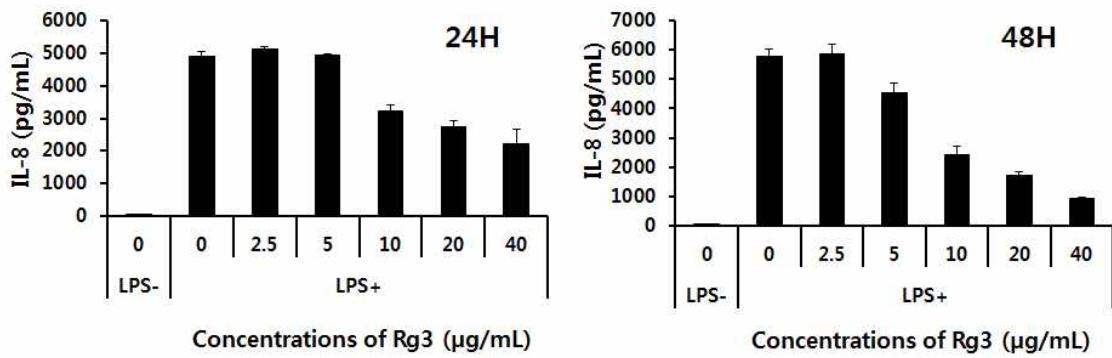


Fig. 215. Effect of ginsenoside Rg3 on IL-8 secretion by LPS-stimulated HUVECs.

- HUVEC에 고글루코스를 처리한 후 진세노사이드 Rg3를 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 사이토카인 생성변화를 확인한 결과, MCP-1, G-CSF, GM-CSF 발현은 농도의존적으로 높은 억제효과를 보였으며, 대체적으로 48시간에서 더 높은 억제효과를 보였다

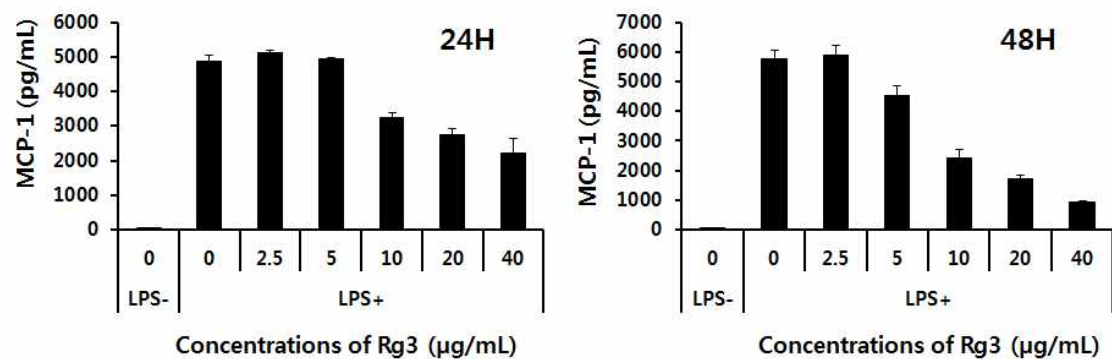


Fig. 216. Effect of ginsenoside Rg3 on MCP-1 secretion by LPS-stimulated HUVECs.

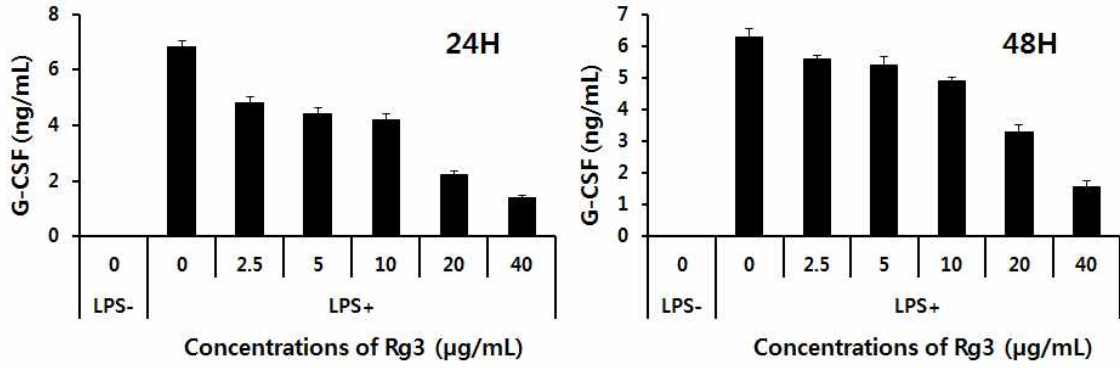


Fig. 217. Effect of ginsenoside Rg3 on G-CSF secretion by LPS-stimulated HUVECs.

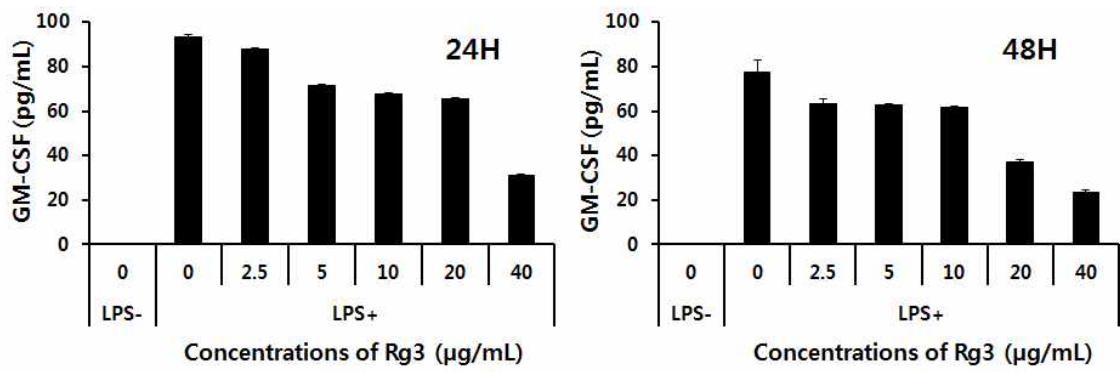


Fig. 218. Effect of ginsenoside Rg3 on GM-CSF secretion by LPS-stimulated HUVECs.

4) HUVEC에서 진세노사이드 Rg3에 의한 세포부착분자 단백질발현 변화

- HUVEC에 LPS를 처리한 후 진세노사이드 Rg3를 처리한 후 웨스턴블랏 방법을 이용하여 VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin 단백질발현을 확인한 결과, 농도의존적으로 단백질 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

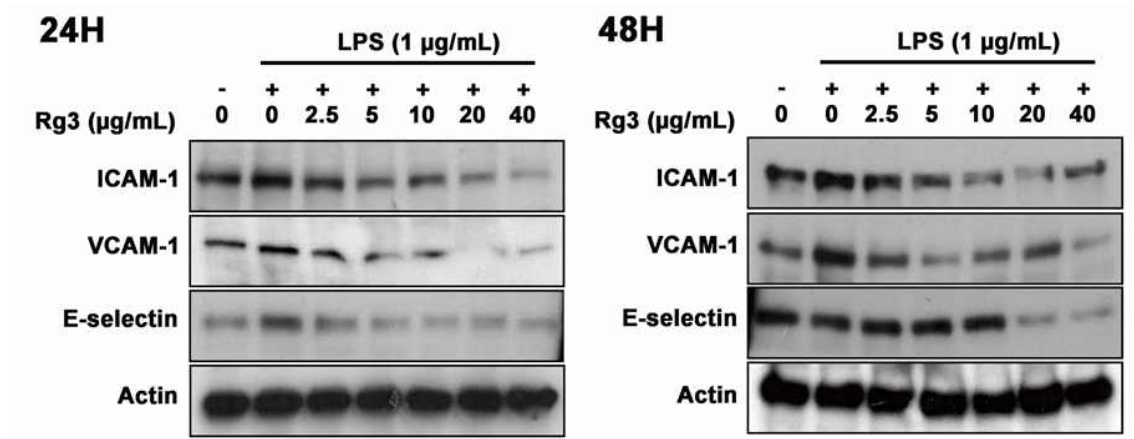


Fig. 219. Effects of Rg3 on ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression in LPS-stimulated HUVECs for 24 or 48h.

- HUVEC에 LPS를 처리한 후 진세노사이드 Rg3를 처리한 후 웨스턴블랏 방법을 이용하여 MAPKs의 인산화를 확인한 결과, 진세노사이드 Rg3를 처리시 p38단백질의 인산화가 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

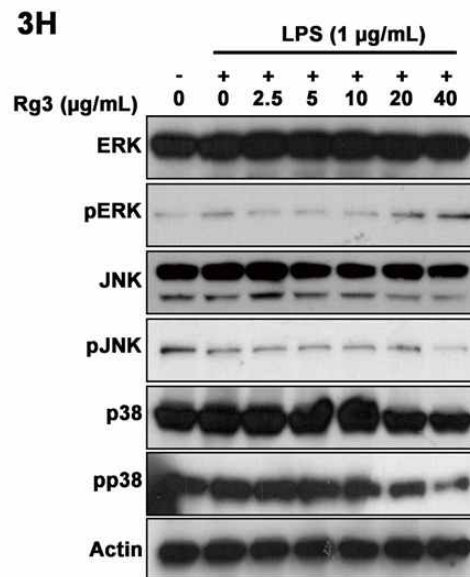


Fig. 220. Effects of Rg3 on MAPKs expression in LPS-stimulated HUVECs for 3h.

5) HUVEC에서 진세노사이드 Rg3에 의한 THP-1 단핵세포 부착억제

- HUVEC에서 LPS 처리시 THP-1 단핵세포의 부착이 증가하였으나, 진세노사이드 Rg3를 농도별로 처리시 농도의존적으로 THP-1 단핵세포의 부착감소 결과를 보였다.

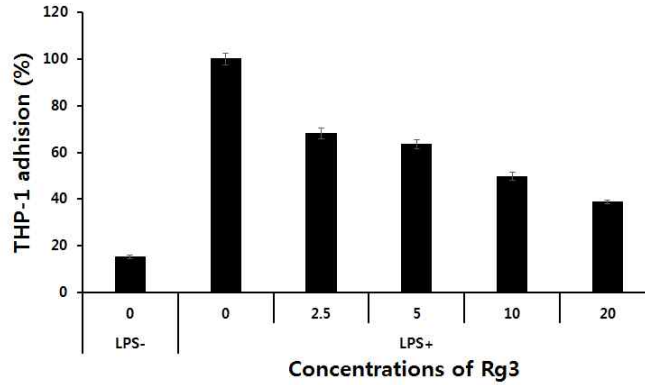
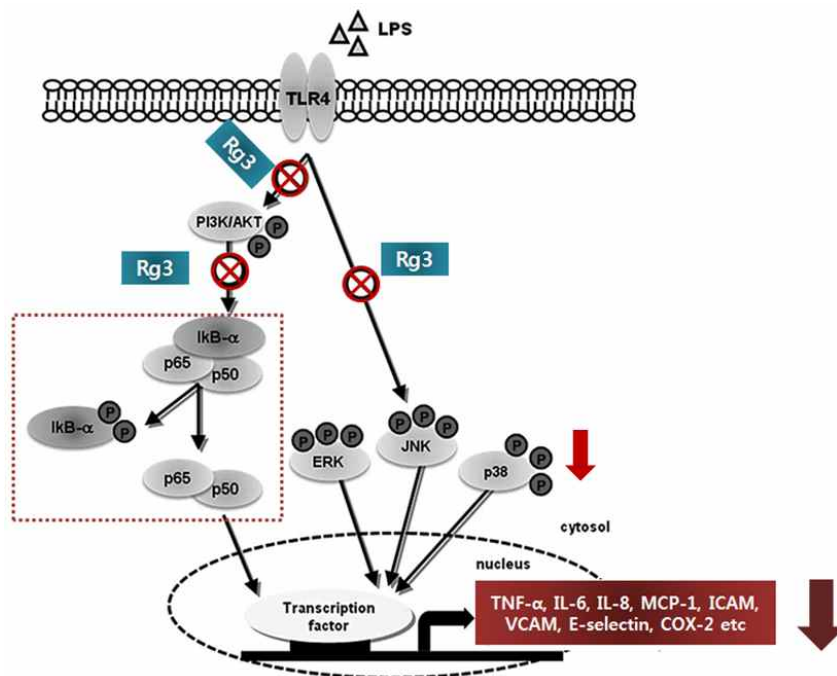


Fig. 221. Inhibitory effects of ginsenoside Rg3 on adhesion of THP-1 monocytes to LPS-activated HUVECs.

6) 진세노사이드 Rg3의 혈관염증억제 연구 결론

- 본 연구에서는 진세노사이드 Rg3를 이용하여 각종 혈관염증관련 인자의 발현 억제효과를 보였으며, 세포부착분자들의 발현과 THP-1 단핵세포의 부착 역시 억제효과를 보였다. 흑삼물추출물의 사이토카인 발현의 조절은 NF- κ B와 관련하여 조절되는 되는 것으로 생각되어진다.



4. 태극삼, 흑삼 인지기능 개선 기능성 평가 (세포수준)

가. 연구 방법

1) SH-SY5Y neuroblastoma 세포배양

- SH-SY5Y neuroblastoma 세포는 한국 세포주은행에서 구입하여, 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 MEM배지 (Hyclone, Logan, UT, USA)에서 37°C humidified 5% CO₂ 조건으로 배양했다.

실험 하는 동안 세포는 4~9회 계대 배양 한 것을 사용했다. 배양접시에 SH-SY5Y neuroblastoma 세포가 90~95% 정도 채워졌을 때, 각 시료 (인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물)를 농도별로 3시간 처리한 후 H₂O₂ (100 µM/mL)를 함께 24시간 처리하였다.

2) 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물의 세포독성

- 각종 시료 추출물에 대한 세포 독성은 MTT assay로 시험하였다. 24 well plate에 well당 세포 (2×10⁵ cells)를 접종하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포 단층을 얻은 후, 각 시료 추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다.

그 후 상층액을 제거 한 후 MTT 용액 500 µL씩을 각 well에 가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 3시간 동안 정치하였다.

MTT 용액을 완전히 제거한 후 1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO)로 세포 내에 형성된 formazan 결정체를 용해하여 multi plate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Acetylcholinesterase (AChE)저해 활성

- Acetylcholinesterase (AChE)저해 활성 측정은 acetylcholine iodide 를 기질로 사용하여 측정하였다. 효소는 SH-SY5Y 세포 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 균질화를 위한 buffer (1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM Tris-HCl (pH 7.2) 2 mL를 첨가하여 균질화 한 후 세포배양액을 12000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다 모든 추출 공정은 4°C에서 수행하였으며 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정한 뒤 실험을 진행하였다.

- 효소 10 µL에 추출물 10 µL를 넣어 37°C에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 에 용해시킨 Ellman's reaction mixture (0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 70 µL를 첨가한 후 10분 동안 반응 후, 410 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 효소 활성은 mol unit/mg protein 으로 표현하였다.

나. 연구결과

1) 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼물 추출물의 세포독성

- SH-SY5Y 뇌세포에 각 시료(인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물)를 농도별로 처리한 후 MTT 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 2 mg/mL 농도까지는 세포독성이 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

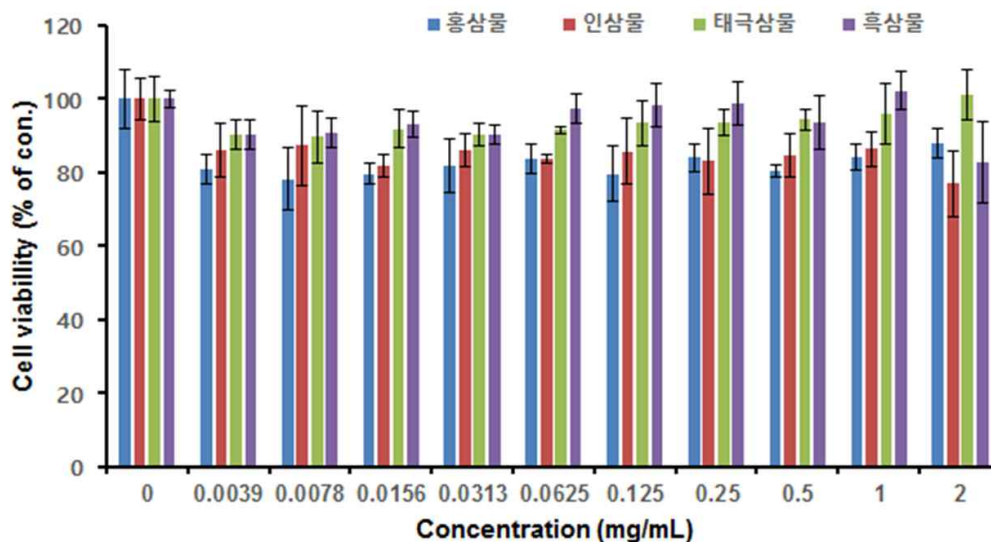


그림. 222. 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물의 SH-SY5Y 뇌세포에 대한 세포독성

2) H₂O₂ 100 μM로 SH-SY5Y 뇌세포에 산화적 스트레스를 준 후 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물의 뇌세포 보호 효과

- SH-SY5Y 뇌세포에 각 시료(인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물)를 농도별로 3시간 전 처리 후 H₂O₂ 100 μM 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 MTT 방법을 이용한 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, H₂O₂ 100 μM 처리한 군에 비해 인삼과 태극삼 물추출물은 농도 의존적으로 억제효과를 보이지 않았으며, 홍삼과 흑삼 물추출물을 처리한 군간의 비교 시 농도 의존적으로 손상되었던 세포들이 시료물의 최고농도 0.25 mg/mL에서 18% 정도 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

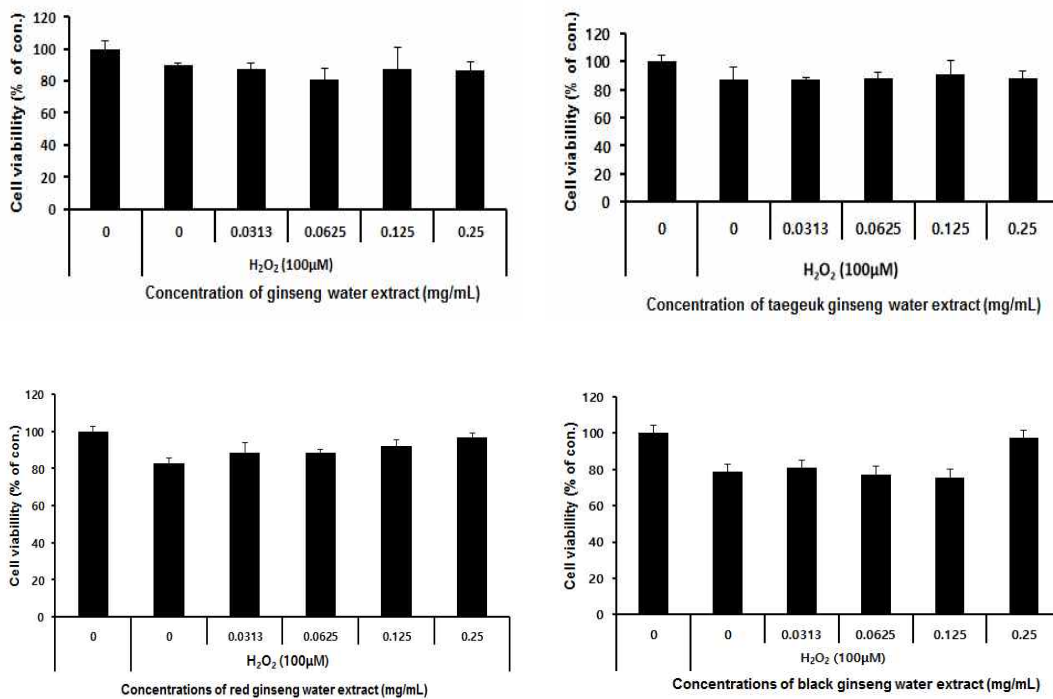


그림 223. 인삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물 뇌세포 보호 효과

3) Acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성 효과

- SH-SY5Y 뇌세포에 홍삼, 흑삼 물추출물을 3시간 먼저 처리한 후 H₂O₂ 100 μM 함께 24시간 처리하여 acetylcholinesterase 저해 활성 효과를 확인한 결과, 대조군에 (180±20 mU/mg protein) 비해 홍삼과 흑삼 물추출물 (0.313-0.25 mg/mL)에서 비슷한 양상으로 억제되는 것을 확인하였고 특히 홍삼 물추출물이 흑삼 물추출물 보다 0.25 mg/mL에서 억제 효과가 뛰어난 것을 확인하였다 (그림 74.)

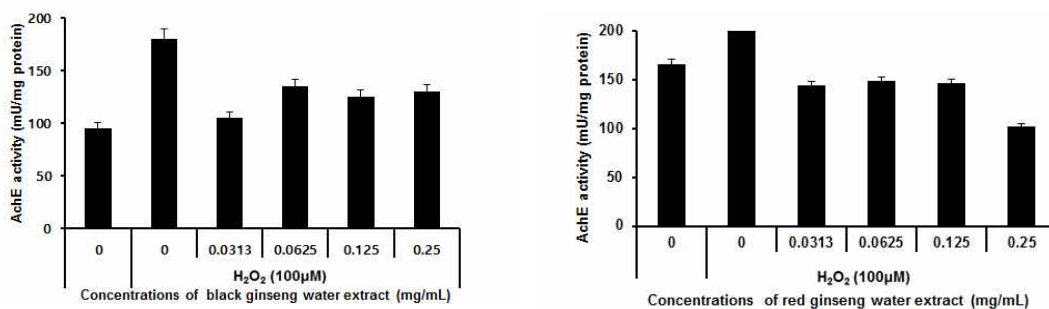


그림 224. 홍삼, 흑삼 물추출물의 Acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성 효과

다. 결론

- AChE의 발현을 억제하는 것은 치매 치료에 있어서 현재 가장 큰 비중으로 실험에 사용되고 있으며, 아세틸콜린의 농도를 유지하는 것은 치매의 일차적 증상인 기억력 감퇴 현상이 진행되는 것을 막아주어 병의 진행을 지연시키고 인지 기능을 증진시킨다는 점에서 큰 의미를 가지고 있다. AChE를 농도 의존적으로 억제하였는데 이는 실제로 혈관 뇌장벽을 통과한 후 뇌내 AChE 활성 억제를 통해 뇌내 아세틸콜린의 농도를 적절하게 유지함으로써 뇌의 시냅스에서 콜린성 신경계의 기능을 높여주어 학습과 기억력 감퇴를 억제하여 주었다는 것을 의미한다.

- 본 연구에서는 홍삼, 흑삼 물추출물을 이용하여 뇌세포에 H₂O₂ 100 μM 손상을 유도한 후, 세포 생존율로 회복 효과를 확인한 후 AChE 억제 효과를 관찰한 결과 홍삼, 흑삼 물추출물이 억제 효과에 뛰어난 것으로 확인 되었다.

5. 태극삼, 흑삼 항스트레스 기능성 평가 (세포수준)

가. 연구 방법

1. 뇌세포 배양

세포 배양 : 한국세포주 은행에서 분주 받은 SH-5YSY cell은 culture dish에 고착하여 증식한다. 배양액은 10% FBS가 포함 된 α -MEM (alpha-Minimum Essential Media) media에 100U/ml penicillin G, 100ug/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 세포는 2일 간격으로 계대배양을 수행하였다.

2. 세포 생존율 : 시료 단독으로 세포의 사멸에 미치는 영향과 과산화 수소를 이용하여 산화적 스트레스를 야기시킨 후 세포의 사멸에 시료가 미치는 영향을 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay를 이용하여 확인하였다. SH-5YSY 세포를 24well에 7×10^4 cells/well로 분주 하여, 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 각 각 배양액을 제거하고, 신선한 배양액에 농도별(0, 30, 100, 300, 1000, 3000ug/ml)로 시료를 첨가 한 후 48시간 배양하였다. 그 후 100ug/ml의 농도가 되도록 MTT 용액을 처리 한 후 2시간 동안 반응 시켰다. MTT 용액 제거 후 DMSO에 생존한 세포 미토콘드리아에서 생성된 formazan을 녹여 microplate reader로 590nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험결과는 3회 이상 반복하여 얻은 결과를 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

3. 산화적 스트레스로 인해 야기된 세포사멸에 시료가 미치는 영향 : 과산화 수소를 이용하여 세포에 산화적 스트레스를 야기 시킨 후 시료가 세포 보호에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 먼저 SH-5YSY 세포를 24well에 7×10^4 cells/well로 분주 하여, 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 각 각 배양액을 제거하고, 신선한 배양액에 농도별(0, 30, 100, 300, 1000, 3000ug/ml)로 시료를 첨가 한 후 24시간 배양하였다. 그 후 400uM의 과산화 수소를 첨가 하여 24시간 배양하였다. 배양 후, MTT 용액을 이용하여 세포 생존율을 확인하였다.

나. 실험 결과

1. 세포독성

흑삼, 태극삼, 홍삼 시료가 가지는 뇌세포 보호 효과를 확인하기 위해 앞서 시료 자체가 가지고 있는 세포독성을 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 태극삼, 흑삼, 홍삼 시료는 3000ug/ml까지 세포독성이 나타나지 않았다.

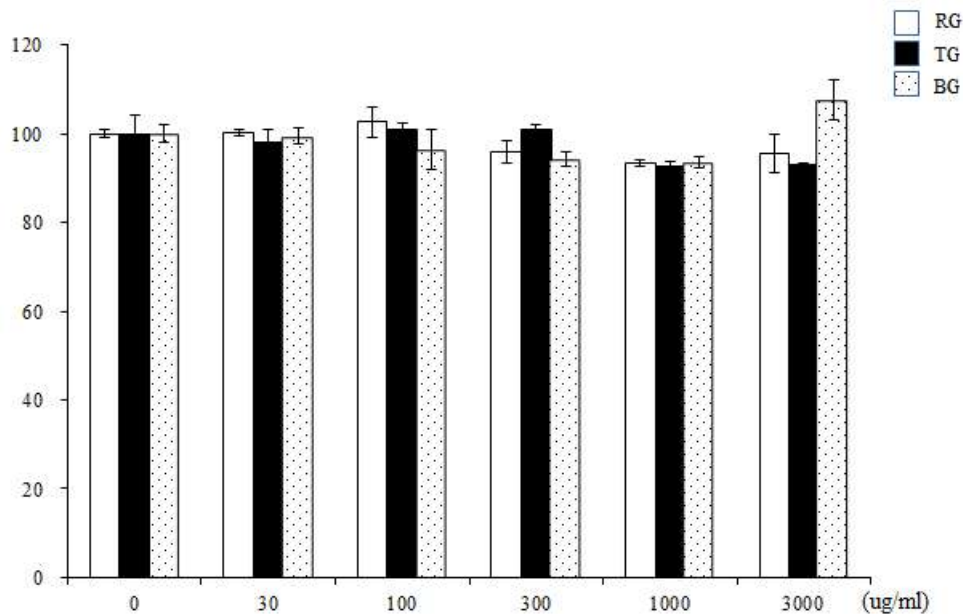


그림225. 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물의 세포독성 평가

뇌세포에 과산화 수소로 산화적 스트레스를 야기 시켜 세포 사멸을 유도한 후 시료가 세포 가지는 세포보호 효과를 확인한 결과 400uM의 hydrogen peroxidase에 의해 세포 생존율은 30% 까지 감소 하였다.

홍삼 30, 100, 300, 1000, 3000ug/ml을 함께 처리하였을 때 세포생존율은 각각, 31.3 ± 1.3 , 45.7 ± 3.2 , 48.4 ± 0.8 , 82.5 ± 3.2 , $68.8 \pm 1.4\%$ 로 홍삼 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가함을 확인하였다.

태극삼 30, 100, 300, 1000, 3000ug/ml에서 세포생존율은 31.5 ± 0.8 , 34.8 ± 2.1 , 75.7 ± 2.3 , $23.0 \pm 0.8\%$ 로 1000ug/ml까지는 세포생존율이 태극삼 농도 의존적으로 증가하였으나, 3000ug/ml에서는 오히려 감소하는 경향이 나타났다.

흑삼에서는 30, 100, 300, 1000ug/ml에서 세포 생존율은 30.7 ± 1.1 , 31.8 ± 2.0 , 40.1 ± 1.6 , $69.6 \pm 2.3\%$ 로 1000ug/ml까지는 세포생존율이 농도 의존적으로 증가하였으나 태극삼에서와 비슷한 경향으로 3000ug/ml에서는 $42.9 \pm 1.9\%$ 의 세포생존율을 보여 오히려 감소하는 경향을 확인하였다.

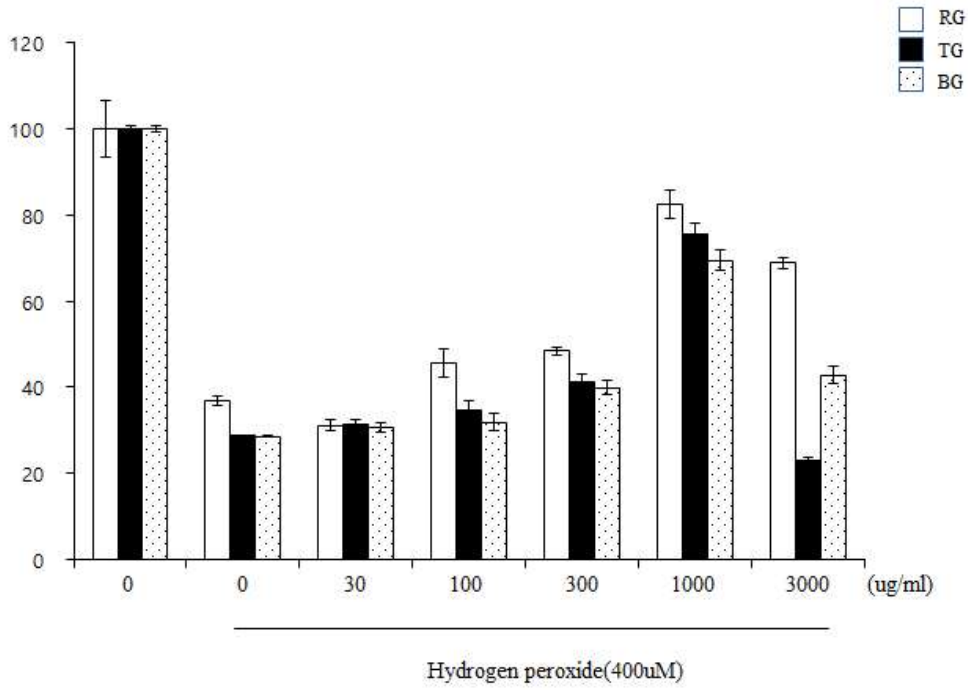


그림226. 태극삼, 홍삼, 흑삼 물추출물의 산화적 스트레스에 대한 세포보호 효과

6. 태극삼, 흑삼, 홍삼 혈류개선 기능성 평가(동물수준)

※ 홍삼, 흑삼 및 태극삼 투여농도 결정을 위한 실험

가. 홍삼, 흑삼 및 태극삼의 C57BL/6 마우스에서의 식후혈당억제능

- C57BL/6 마우스에 홍삼, 흑삼 및 태극삼을 각각 저농도 (200 mg/kg) 와 고농도 (400 mg/kg) 농도로 투여 후 sucrose를 투여하여 식후 혈당억제능시험을 수행한 결과 홍삼, 흑삼 및 태극삼을 저용량 및 고용량으로 투여한 실험군이 대조군에 비해 낮은 혈당치를 보였다. 대조군에서는 sucrose를 투여한 후 120분의 혈당이 초기에 비해 139.5% 증가하였다. 반면 저용량 투여군은 유의적으로 혈당치가 감소하지 않았다. 반면 홍삼, 흑삼 및 태극삼을 고용량 투여시는 대조군에 비하여 유의적으로 혈당치 감소효능을 보였다 (Table 1). 또한 식후혈당억제능시험 수행동안 대조군에서 최고 혈당은 203 mg/dl이었으며, 저용량 BTD-1을 투여한 군에서는 182.5 mg/dl, 고용량 BTD-1을 투여한 군에서는 168.5 mg/dl로 홍삼, 흑삼 및 태극삼의 용량 의존적으로 최고 혈당 수치가 낮은 경향을 보였다 (다만 저용량에서는 통계학적 유의성은 없었음). 따라서 본 실험에서 400 mg/kg 농도의 홍삼, 흑삼 및 태극삼을 투여하여 당뇨병시 나타나는 혈행장애 개선에 대해 효능을 평가할 계획이다.

표 47. C57BL/6 마우스에서의 식후혈당 억제능시험

Group	Blood glucose(mg/dl)			
	0 min	30 min	60 min	120 min
Control	113.4±6.6	188.2±10.3	176.4±8.5	153.7±5.4
Low (200 mg/kg)	107.7±7.8	171.5±13.6	163.5±9.3	142.2±9.2
High (400 mg/kg)	119.2±4.7	154.3±8.4	142.9±5.6	123.6±7.3

- LETO rats을 대조군으로하고 OLETF rats은 무작위(random)하게 5군으로 분류하며 각 군당 동물의 수는 OLETF 대조군 (n=5)을 제외하고 군당 7마리로 구성됨.

◦ **그룹 1** (LETO 대조군; N/C): 표준 실험용 사료 와 식수를 자유롭게 공급받는 그룹으로 고지방 식이 및 평가하고자하는 홍삼, 흑삼 및 태극삼시료를 투여하지 않음.

◦ **그룹 2** (OLETF 대조군): OLETF rats은 당뇨병 유발 대조군으로 사용되며, 고지방 식이는 투여하되 홍삼, 흑삼 및 태극삼시료를 투여하지 않음. 그 외 표준 실험용 사료 와 식수는 자유롭게 공급 받음.

◦ **그룹 3** (WGG 투여군): 400 mg/kg WGG(백삼)을 사료에 섞어 120일 동안 투여함.

◦ **그룹 4** (RGG 투여군): 400 mg/kg RGG(홍삼)을 사료에 섞어 120일 동안 투여함.

◦ **그룹 5** (BGG 투여군): 400 mg/kg BGG(흑삼)을 사료에 섞어 120일 동안 투여함.

◦ **그룹 6** (TGG 투여군): 400 mg/kg TGG(태극삼)을 사료에 섞어 120일 동안 투여함.

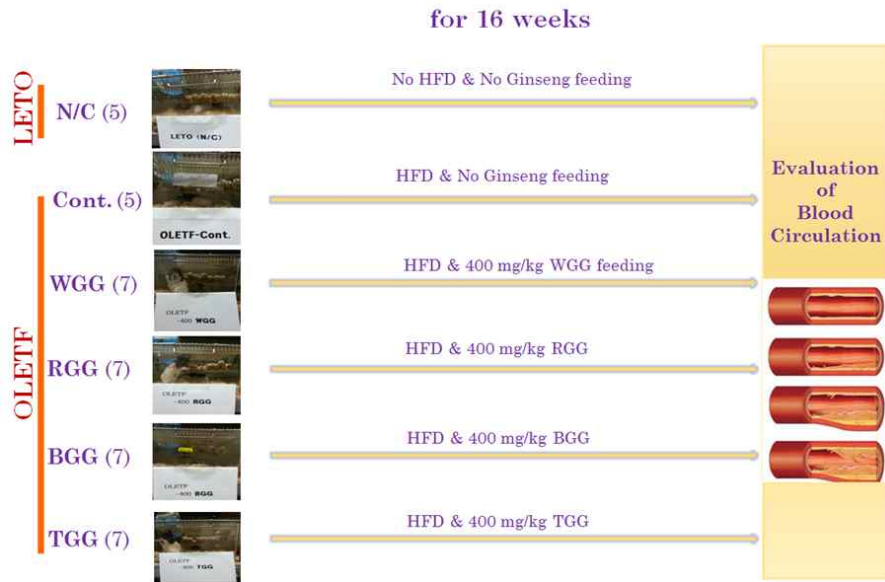


그림 227. 식후혈당억제능 시험

4종 (WGG, RGG, BGG, TGG)의 시료가 포함된 사료제조 (제분소)



- Body weight 변화량

총 6개 그룹에 대해 Body weight 변화량을 비교하였다. 홍삼과 흑삼을 식이한 그룹에서 60일 이후 유의한 결과를 보였다

Body weight (g)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	72.4±2.3	186.5±5.68	239.7±7.32	304.3±6.49	355.6±7.34	
OLETF	75.6±2.1	214.6±9.4	353.3±12.7	466.5±13.4	587.4±17.6	
400WGG +OLETF	72.9±2.5	202.6±13.7	337.7±16.4	449.1±15.4*	564.6±15.3*	*0.05
400RGG +OLETF	74.8±2.6	196.5±14.4	324.8±13.7**	432.7±17.5**	552.6±14.7**	**0.01
400BGG +OLETF	75.1±2.2	198.3±13.9	329.5±14.7*	442.5±12.9*	559.3±17.3*	*0.05
400TGG +OLETF	71.2±2.4	203.6±11.4	335.8±13.2*	445.6±14.1*	553.7±14.6*	*0.05

- Glucose 함량 비교

총 6개 그룹에 대해 Glucose 함량을 비교하였다. 홍삼과 흑삼을 식이한 그룹에서 60일 이후 유의한 결과를 보였다.

Glucose (mg/dl)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	97.5± 2.06	99.6±2.96	95.2±2.75	98.4±3.69	103.6±4.64	
OLETF	99.6±2.51	162.4±16.96	223.7±22.43	258.4±15.94	259.6±16.81	
400WGG +OLETF	97.5±2.85	149.7±17.21	184.3±19.48 *	207.6±14.93*	214.8±19.28*	*0.05, **0.01
400RGG +OLETF	99.8±2.16	146.7±11.6	167.9±14.3**	188.4±17.6**	217.4±17.69* *	**0.01
400BGG +OLETF	95.2±2.74	142.5±16.1	185.4±25.5*	222.7±15.3*	225.8±23.46*	*0.05
400TGG +OLETF	98.6±2.29	148.7±13.7	212.5±15.2	237.9±19.6	222.7±17.15*	*0.05

- Total cholesterol 함량 비교

총 6개 그룹에 대해 Total cholesterol 함량을 비교하였다. 홍삼과 흑삼을 식이한 그룹에서 60일 이후 유의한 결과를 보였다.

Total cholesterol (mg/dL)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	125.4±9.85	121.7±12.5	132.6±10.7	127.4±9.67	132.7±13.4	
OLETF	133.7±13.5	143.5±14.1	214.7±14.6	269.4±15.3	276.5±11.3	
400WGG +OLETF	129.7±9.62	132.7±13.8	206.5±15.9	253.7±17.6	260.6±12.7*	*0.05
400RGG +OLETF	138.3±12.6	137.4±10.7	183.5±12.5**	225.9±16.5**	237.7±19.4**	**0.01
400BGG +OLETF	125.6±11.4	129.5±10.7	193.5±12.6*	242.6±17.9*	241.6±18.3**	*0.05
400TGG +OLETF	134.2±	137.6±11.5	202.3±10.7	245.8±13.6*	251.4±15.8*	*0.05

- Free fatty acid 함량 비교

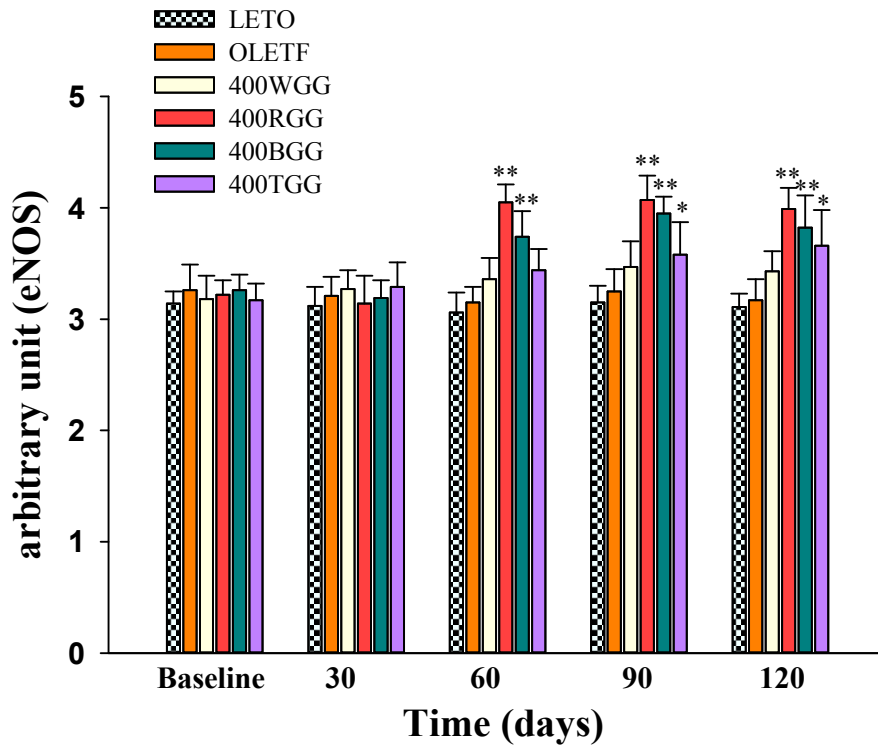
총 6개 그룹에 대해 Free fatty acid 함량을 비교하였다. 홍삼은 30일, 흑삼은 60일 태극삼은 90일 섭취한 그룹에서 유의한 결과를 보였다.

Free fatty acid (μEq/l)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	518.5±14.6	523.7±18.5	527.5±12.3	521.6±15.9	529.3±14.6	
OLETF	573.7±17.3	653.2±23.6	695.3±26.3	747.2±25.5	759.6±23.6	
400WGG +OLETF	556.4±15.6	642.5±21.3	673.4±19.6	720.6±23.4	734.2±18.5*	*0.05
400RGG +OLETF	569.7±19.6	627.2±22.4*	662.3±23.9*	707.3±19.6**	712.3±22.3**	*0.05, **0.01
400BGG +OLETF	571.8±14.8	648.2±19.6	654.7±27.2*	711.4±23.6*	725.3±24.2*	*0.05
400TGG +OLETF	582.5±17.6	637.2±25.3	682.3±22.1	711.2±18.7*	732.5±25.6*	*0.05

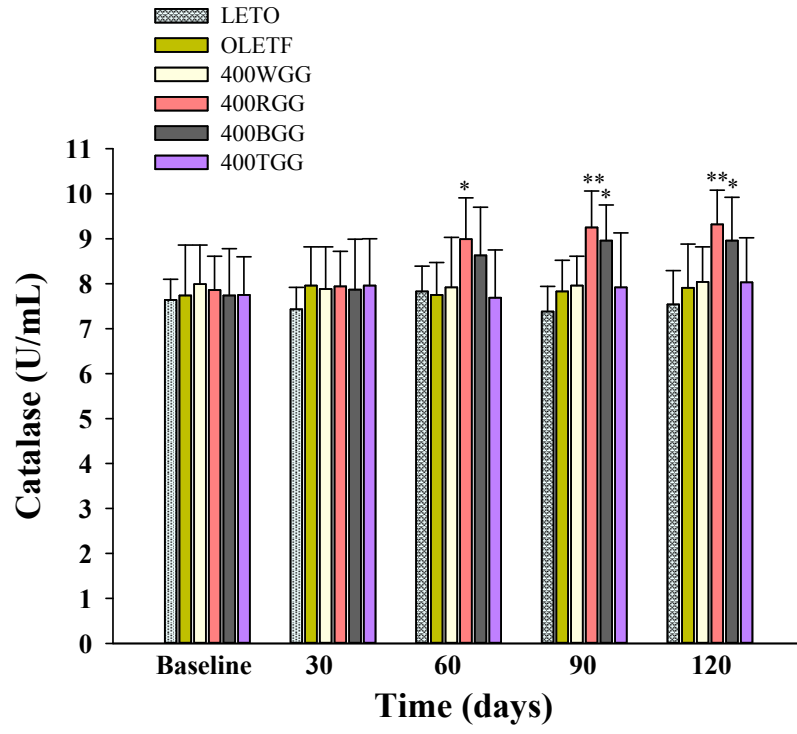
- eNOS, catalase 증가 효과

Endothelial NOS (eNOS)는 NOS3라고 알려져 있고 혈관에서 NO를 생성하여 혈관 기능에 관여한다.

NO(Nitrogen oxide) 합성 효소(eNOS)의 증가는 혈관을 이완하여 혈류순환에 도움이 되는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 해당시료의 사용이 eNOS의 분비를 증가하는지에 대한 작용 기전을 규명하였다. 그 결과는 아래와 같다.



RGG 및 BGG(400 mg/kg) 투여 2달 이후부터 투여는 혈장의 Catalase (CAT)를 유의적으로 증가시킴 (Effect on plasma CAT levels)

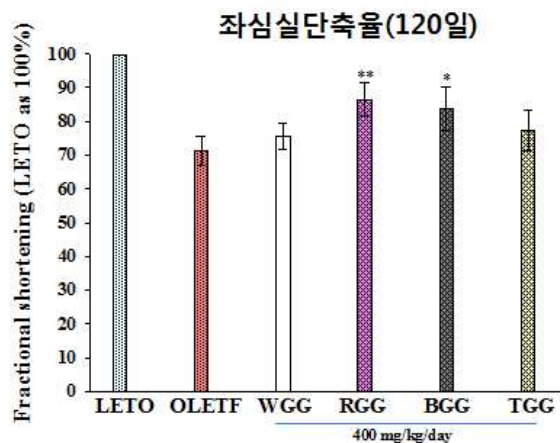
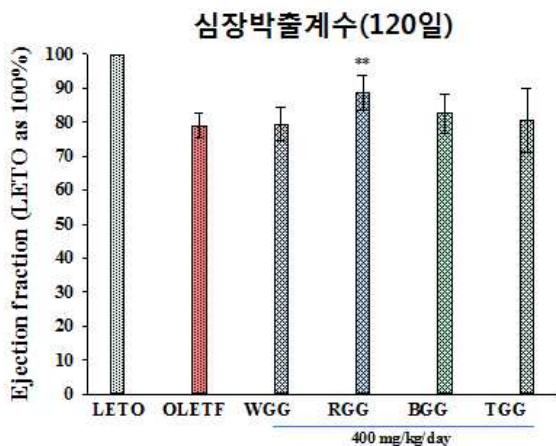
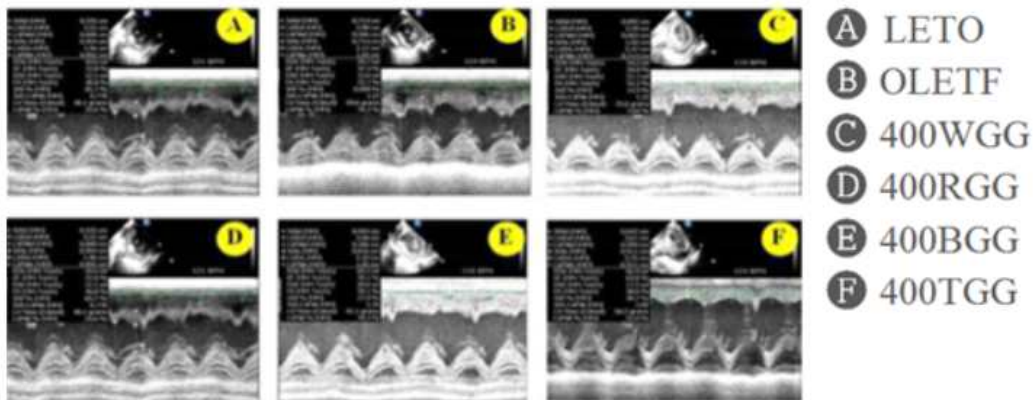


나. 심초음파를 이용한 혈행기능 개선 효능 연구

- 질환모델동물인 LETO/ OLETF rats에 400 mg/kg용량으로 4종 시료를 4달 동안투여 후 초음파 측정에 의한 심장 박출계수(ejection fraction) 및 좌심실 단축율 (fractional shortening)을 계산함.

- 실험종료 후 (120일 후) WGG, RGG, BGG, TGG의 투여군에서 심장박출계수 (ejection fraction) 및 좌심실 단축율 (fractional shortening)을 확인함.

: 결과를 보면 LETO 대조군 (LETO), OLETF 군, 400 mg/kg WGG, RGG, BGG, TGG투여군에서 심장 박출계수 × 좌심실 단축율 (fractional shortening)은 각각 다음과 같았다. 즉 4달 후 400 mg/kg RGG 투여군에서 심장 박출계수가 통계학적으로 유의하게 억제되었다 (**p<0.01). 그리고 400 mg/kg RGG 및 BGG 투여군에서 좌심실 단축율 (fractional shortening)값의 감소가 통계학적 유의적으로 억제되었다. (*p<0.05, **p<0.01) 이 결과로 보아 400 mg/kg RGG 및 BGG 투여군에서 혈행개선에 효능이 있는 것으로 평가된다.



- 120일 후 동맥을 적출 하여 각군에서 norepinephrine에 의해 유도되는 수축반응에서 억제 정도를 측정하였다. 수축반응은 baseline을 기준으로 KCl에 대한 수축을 100%로 하여, norepinephrine에 대한 각 농도에서의 수축반응을 기록하였음. 각군에 대한 수축억제 반응은 아래와 같이 나타남.

- 혈관수축능에 있어서 노르에피네프린을 대동맥에 $10^{-10} \sim 10^{-5}$ M 농도까지 처리했을 때, OLETF 군에서 정상군에 비해 혈관의 수축력이 10^{-9} M 부터 농도 의존적으로 증가하였음. 그러나, 4 종시료 투여군 중 RGG 및 BGG군에서 혈관의 수축력이 농도 의존적으로 유의성 있게 수축억제효능이 있었음 (그림 및 표, ** $P < 0.01$). 이와 같은 작용으로 보아 400 mg/kg용량의 RGG 및 BGG의 장기간 투여는 동물에서 혈행장해개선에 효능이 있을 것으로 판단됨. 다만 사람에게 적용시에는 임상연구가 먼저 선행되어야 할 것으로 사료됨

- 120일 후 동맥을 적출 하여 각군에서 Carbachol에 의해 유도되는 이완반응에서 이완능을 측정하였다. 이완반응은 baseline을 기준으로 KCl에 대한 수축을 100%로 하여, Carbachol에 대한 각 농도에서의 이완반응을 기록하였음. 각군에 대한 이완반응은 아래와 같이 나타남.

- 혈관이완능에 있어서 Carbachol을 농도 의존적으로 처리했을 때, OLETF 군에서 LETO 군에 비해 혈관의 이완력이 10^{-8} M 부터 농도 의존적으로 억제되었음. 그러나, 4종시료 투여군 중 RGG 및 BGG군에서 혈관의 이완력이 OLETF 군에 비해 농도 의존적으로 유의성 있게 증가되었음 (그림 및 표, ** $P < 0.01$). 이와 같은 작용으로 보아 400 mg/kg용량의 RGG 및 BGG의 장기간 투여는 동물에서 혈행장해개선에 효능이 있을 것으로 판단됨. 다만 수축능과 마찬가지로 사람에게 적용시에는 임상연구가 먼저 선행되어야 할 것으로 사료됨.

*** 결론**

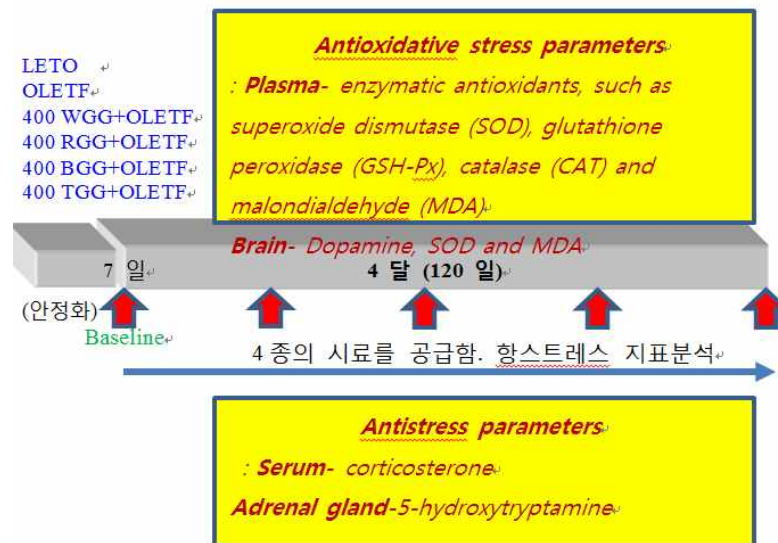
- 이상의 실험에서 400 mg/kg RGG 및 BGG 투여군에서 혈행개선에 효능이 있는 것으로 평가되며 우리가 제조한 흑삼은 홍삼과 동등 이상의 혈행개선 기능을 가짐을 동물수준에서 확인 하였으며 태극삼과 백삼은 이보다는 조금 낮은 기능성을 보였다.

7. 태극삼, 흑삼 항스트레스 기능성 평가(동물수준)

- 본 실험의 목적은 당뇨모델동물에서 백삼, 홍삼, 흑삼, 태극삼의 항스트레스 및 산화스트레스억제 효능을 평가하는 것임.
- 항스트레스효능 평가를 위하여 혈액 및 뇌에서 스트레스지표분석, 혈청의corticosterone 분석 및 부신에서 hydroxytryptamine*분석하여 백삼, 홍삼, 흑삼, 태극삼의 항스트레스 및 산화스트레스 억제 효능을 평가하였음.

* Chronic stress was found to increase adrenal gland weight and serum corticosterone and 5-HT levels (Gamaro GC et al., 2003)

* 실험 디자인 (Experimental design)



* 실험 그룹

: 6개 군 (각군당 n=7)

LETO 대조군 (LETO), OLETF 군

400 mg/kg WGG, RGG, BGG, TGG투여군

- 당뇨유도 실험동물을 이용하여 4종의 시료(400mg/kg WGG, RGG, BGG, TGG)투여 120일 동안 혈액, 뇌조직 및 부신을 분리하여 스트레스억제효능에 대한 평가를 수행하였다.

- LETO 대조군 (LETO), OLETF 군, 400 mg/kg WGG, RGG, BGG, TGG투여군에서 스트레스지표인 혈중 SOD, CAT, GSH-Px 및 MDA level에서 장기간 시료 투여시 유의적인 스트레스 억제효능을 보였다 (*P<0.05, **P<0.01)

Plasma Levels

Oxidative stress: superoxide dismutase (U/mL)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	27.65±2.14	28.32±1.98	29.93±1.43	28.48±2.02	27.63±2.25	
OLETF	26.43±1.97	27.47±1.32	26.37±1.98	23.65±2.13	23.92±2.54	
400WGG +OLETF	28.56±2.03	28.42±2.07	27.43±1.48	27.19±1.98**	28.46±2.71**	**P<0.01
400RGG +OLETF	25.39±1.75	26.53±1.76	28.56±1.91	27.65±1.54**	29.82±3.01**	**P<0.01
400BGG +OLETF	27.94±2.13	24.76±1.90	29.32±2.02*	28.97±2.05**	27.97±2.79**	*P<0.05, **P<0.01
400TGG +OLETF	25.82±2.04	25.98±2.13	25.49±1.99	24.52±1.90	26.32±2.10*	*P<0.05

Plasma Levels

Oxidative stress: Catalase (U/mL)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	13.45±2.26	14.83±3.02	14.56± 2.94	14.84±2.42	14.91±3.01	
OLETF	14.83±2.95	14.96±3.15	13.86±2.83	14.69±2.69	13.48±2.72	
400WGG +OLETF	13.79±2.37	13.99±2.98	14.68±2.76	16.54±2.75*	16.97±2.58*	*P<0.05
400RGG +OLETF	14.81±2.75	14.52±3.43	15.99±2.77	18.65±2.95*	18.48±3.19*	*P<0.01
400BGG +OLETF	14.19±2.68	15.82±3.69	17.48±2.52*	17.48±3.42*	19.69±3.04**	*P<0.05, **P<0.01
400TGG +OLETF	14.93±2.84	15.42±3.01	15.93±3.24	15.58±2.69	16.43±3.45*	*P<0.05

- 혈중 CAT지표를 보면 400 mg/kg WGG 투여군 및 400 mg/kg RGG 투여군에서 투여 90일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었으며 (*P<0.05), 400 mg/kg BGG 투여군에서는 투여 60일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01). 다만 TGG투여군에서는 투여 120일 이후에 CAT의 증가효능을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 4종의 시료는 당뇨유발동물에서 장기간 투여시 혈중 CAT 활성을 증가시켜 산화스트레스에 효능을 보이는 것으로 평가된다.

Plasma Levels

Oxidative stress: Glutathione peroxidase (U/mL)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P</i> values (Compared to OLETF)
LETO	1325.26 ±116.24	1426.27 ±132.76	1362.26 ±143.48	1329.46 ±122.28	1359.36 ±143.81	
OLETF	1375.26 ±126.37	1359.39 ±128.47	1398.38 ±154.87	1298.57 ±141.90	1365.16 ±153.09	
400WGG +OLETF	1384.27 ±119.38	1439.36 ±132.49	1548.38 ±137.27	1558.38 ±130.76*	1698.38 ±135.87**	*0.05, **0.01
400RGG +OLETF	1296.29 ±142.85	1384.28 ±153.13	1438.37 ±148.45	1769.57 ±154.98**	1743.83 ±129.58**	**0.01
400BGG +OLETF	1345.60 ±138.27	1478.24 ±138.37	1587.39 ±153.76*	1846.38 ±176.47**	1984.37 ±142.47**	*0.05
400TGG +OLETF	1285.29 ±125.25	1427.29 ±149.35	1587.59 ±127.39	1658.49 ±165.09*	1636.92 ±164.38*	*0.05

- GSH-Px지표를 보면 400 mg/kg WGG, 400 mg/kg RGG 및 400 mg/kg TGG투여군에서 투여 90일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었으며 (*P<0.05, **P<0.01), 400 mg/kg BGG 투여군에서는 투여 60일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01). 이와 같은 결과로 보아 4종의 시료는 당뇨유발동물에서 장기간 투여시 혈중 GSH-Px 활성을 증가시켜 산화스트레스에 효능을 보이는 것으로 평가된다.

Plasma Levels

Oxidative stress: Malondialdehyde (nmol/mL)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P</i> values (Compared to OLETF)
LETO	7.38±1.26	7.03±1.43	7.39±1.79	7.92±2.23	8.41±1.58	
OLETF	7.62±1.03	7.19±1.74	9.93±1.97	10.42±2.41	13.85±2.04	
400WGG +OLETF	8.31±1.15	7.65±1.39	7.02±2.10	8.37±1.90	11.43±1.96	*0.05, **0.01
400RGG +OLETF	7.97±1.03	7.43±2.04	7.14±1.85	7.16±1.76*	7.42±1.87**	**0.01
400BGG +OLETF	7.16±0.09	7.10±1.96	7.77±1.77	7.96±1.94*	8.43±2.13*	*0.05
400TGG +OLETF	7.41±1.21	7.65±2.14	8.38±2.20	9.54±1.85	11.76±2.53	*0.05

- MDA지표를 보면 400 mg/kg WGG 및 400 mg/kg TGG투여군에서는 120일 동안 유의적인 차이를 보이지 않았다 (P>0.05). 400 mg/kg RGG 및 400 mg/kg BGG 투여군에서는 투여 90일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01). 이와 같은 결과로 보아 2종 시료 (RGG 및 BGG)는 당뇨유발동물에서 장기간 투여시 혈중 MDA 활

성을 증가시켜 산화스트레스에 효능을 보이는 것으로 평가된다.

Brain Levels

Dopamine ($\mu\text{g/g}$)		
	실험종료일 (120 days)	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	0.68±0.08	
OLETF	0.50±0.07	
400WGG +OLETF	0.56±0.06*	*P<0.01
400RGG +OLETF	0.69±0.07**	**P<0.01
400BGG +OLETF	0.65±0.08**	**P<0.01
400TGG +OLETF	0.60±0.09**	**P<0.01

- 뇌조직에서의 스트레스와 관련이 있는 Dopamine levels, SOD 및 MDA지표를 보면 우선 Dopamine levels에서 400 mg/kg WGG 및 TGG투여군의 경우 투여 120일 이후에 유의적인 증가효능을 나타내었다. 반면 400 mg/kg RGG 및 400 mg/kg BGG 투여군에서는 투여 60일 이후부터 유의적인 증가효능을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01). 이와 같은 결과로 보아 4종 시료 (RGG 및 BGG)는 당뇨유발동물에서 장기간 투여시 혈중 Dopamine 농도를 증가시켜 스트레스억제효능을 나타내는 것으로 평가된다.

Brain Levels

Oxidative stress: superoxide dismutase (U/mg protein)		
	실험종료일 (120 days)	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	18.53±1.53	
OLETF	11.42±1.48	
400WGG +OLETF	9.69±1.26*	*P<0.01
400RGG +OLETF	8.47±0.09**	**P<0.01
400BGG +OLETF	9.47±1.07*	*P<0.05
400TGG +OLETF	10.85±2.14	

- 뇌조직내 SOD levels에서 보면 4종의 시료에서 모두 120일 이후 대조군과 유의적인 차이를 나타내었으며, MDA levels에서는 400 mg/kg RGG 및 400 mg/kg BGG 투여군에서만 유의적인 증가효능을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01).

Brain Levels

Oxidative stress: Malondialdehyde (nmol/g protein)		
	실험종료일 (120 days)	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	4.38±0.89	
OLETF	8.76±0.91	
400WGG	8.03±1.02	
+OLETF		
400RGG	6.32±0.95**	*0.05
+OLETF		**0.01
400BGG	7.28±1.03*	*0.05
+OLETF		
400TGG	8.04±0.99	
+OLETF		

- 이와 같은 결과로 보아 2종 시료 (RGG 및 BGG)는 당뇨유발동물에서 장기간 투여시 뇌 조직내 SOD농도 증가 및 MDA 농도가 감소되어 스트레스억제효능을 나타내는 것으로 평가된다.

Blood Levels

Corticosterone (µg/100 ml)						
	Baseline	30 days	60 days	90 days	120 days	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	6.57±0.06	6.64±1.10	6.73±1.06	6.52±0.07	6.83±0.08	
OLETF	6.89±0.09	6.89±1.04	7.93±0.07	11.75±0.09	10.63±0.09	
400WGG	6.43±1.03	6.37±1.08	6.95±0.09*	10.89±0.09*	11.42±0.07*	*0.05
+OLETF						
400RGG	6.74±0.09	6.75±0.09	6.84±0.06*	9.68±1.02**	8.75±1.02*	*0.05
+OLETF						
400BGG	6.92±0.08	6.49±1.09	7.03±1.01	9.42±1.04*	9.96±0.09*	*0.05
+OLETF						
400TGG	6.85±1.02	6.38±1.05	6.72±0.09	9.37±0.09*	8.69±1.01*	*0.05
+OLETF						

Adrenal gland

5-hydroxytryptamine (5-HT) (µg/g)		
	실험종료일 (120 days)	<i>P values</i> (Compared to OLETF)
LETO	0.93±0.03	
OLETF	1.65±0.25	
400WGG +OLETF	1.59±0.09	
400RGG +OLETF	1.37±0.22*	*0.05
400BGG +OLETF	1.34±0.17*	*0.05
400TGG +OLETF	1.56±0.15	

- 혈중 스트레스 호르몬인 Corticosterone 및 5-HT levels에서도 4종시료의 장기간 투여 시 해당 호르몬의 억제작용을 나타내었다.

8. 태극삼, 흑삼 인지기능 개선 기능성 평가(동물수준)

실험동물은 7 주령의 수컷 랫트(male Sprague-Dawley rat) 30 마리를 샘타코(오산)에서 구입하여 사용하였다. 도입 후 7 일간 사육실에서 실험실 환경에 대한 적응기간을 두었다. 사육실의 사육환경은 실내온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$ 유지하였으며, 12 시간씩 명암이 조절되고(12 h light/dark cycle), 물(필터를 이용한 정수처리)과 사료(rodent chow, 샘타코, 오산)는 충분하게 공급하였다.

CTR: 대조군으로서 약물 처지가 없으며 다른 실험군과 동일하게 vehicle 만 경구 투여

SCP: scopolamine 0.4 mg/kg 를 복강투여

Substrate H: 홍삼 100 mg/kg 를 경구투여

Substrate T: 태극삼 100 mg/kg 를 경구투여

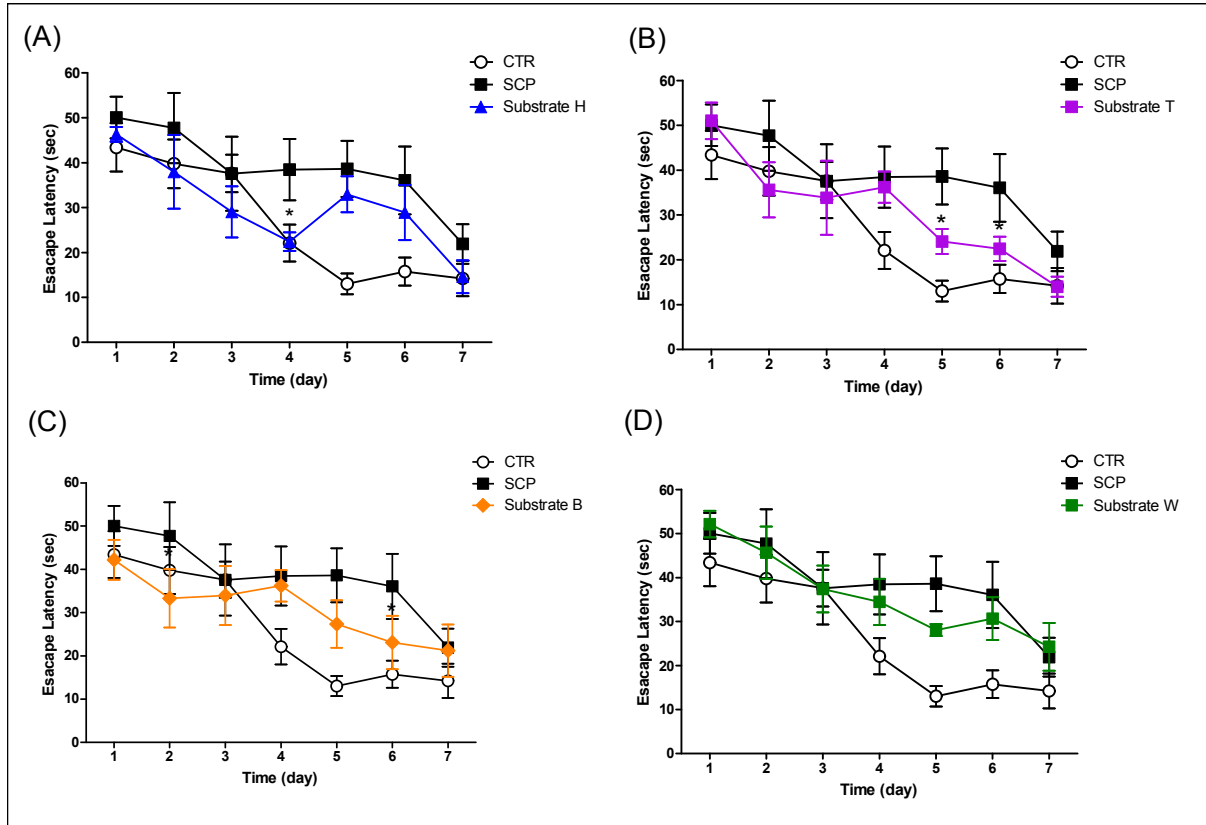
Substrate W: 백삼 100 mg/kg 를 경구투여

Substrate B: 흑삼 100 mg/kg 를 경구투여

실험군을 나누어 개체들의 체중을 측정하고, 체중 증가에 따른 약물 투약량을 환산하여 존대(round tip feeding needle)를 이용하여 경구로 투여하였다. 본 실험에서 사용한 약물은 인삼추출물로서 시험약물들은 증류수(DW)에 희석하여 이용하였으며, scopolamine hydrobromide(SigmaCo., USA)는 주사용 생리식염수에 희석하여 복강내 투여하였다.

II. 실험결과 분석 및 고찰

기억력 감퇴 모델에서 장기간 시험 약물의 경구투여가 학습과 기억에 미치는 영향



* $p < 0.05$ vs the scopolamine by ANOVA (post hoc with Fisher's PLSD)

그림. 228 Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 모델에서 장기간 시험 약물 투여가 학습과 기억에 미치는 영향-perform trial

약물이 학습과 기억에 미치는 영향을 알아보기 위해 약물을 3 주동안 투여 후 8 일동안 Morris water maze test 를 실행하였다. 7 일간의 perform trial 과정에 공간지각 학습(spatial acquisition, 그림 1)의 초기 시작점은 모든 실험군에서 CTR(43.4 ± 5.1), SCP(50.0 ± 3.4), Substrate H(46.3 ± 4.2), Substrate T(51.0 ± 3.5), Substrate B(42.2 ± 4.2), Substrate W(52.1 ± 4.01)로 평균 47.4 초 가량으로 비슷하게 출발하였으나, Substrate W 그룹을 제외한 나머지 약물그룹은 학습과정의 중간인 4 일 이후부터 SCP 그룹과 유의한 학습차이가 확인되었다. (Substrate H, Substrate T, substrate B vs SCP) 학습능력 저해를 위한 scopolamine 을 주사하였음에도 불구하고 장기간 시험 약물 투여가 선행된 실험군의 학습능력은 SCP 그룹에 비해 크게 향상됨을 확인하였다.

* $p < 0.05$ vs the scopolamine by ANOVA (post hoc with Fisher's PLSD)

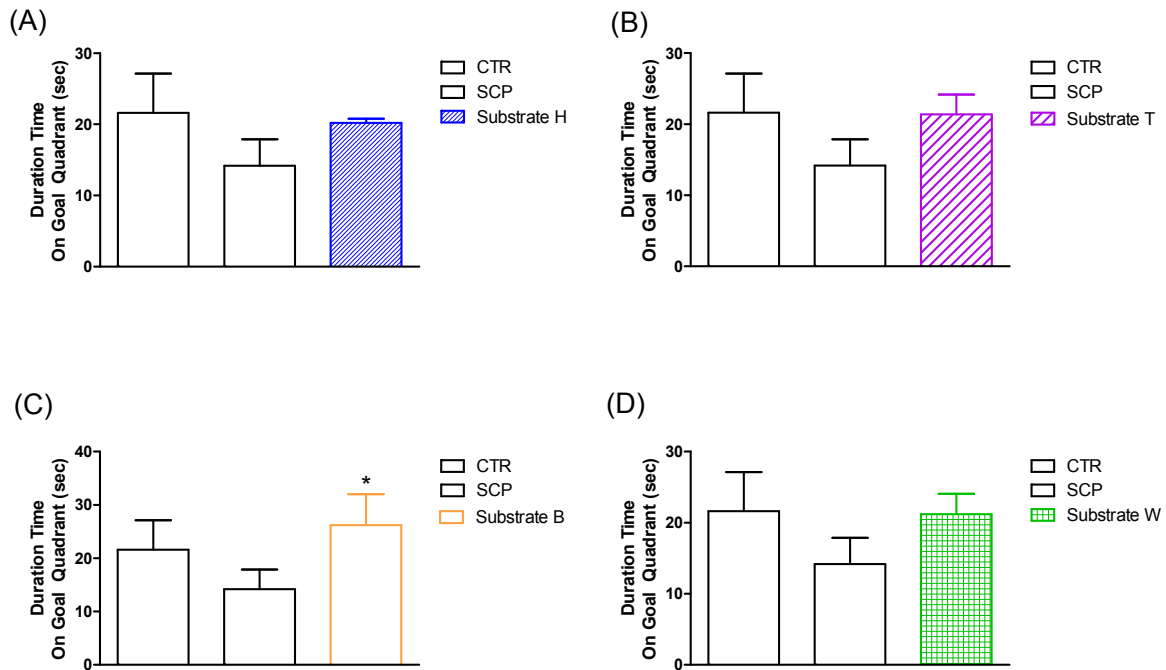
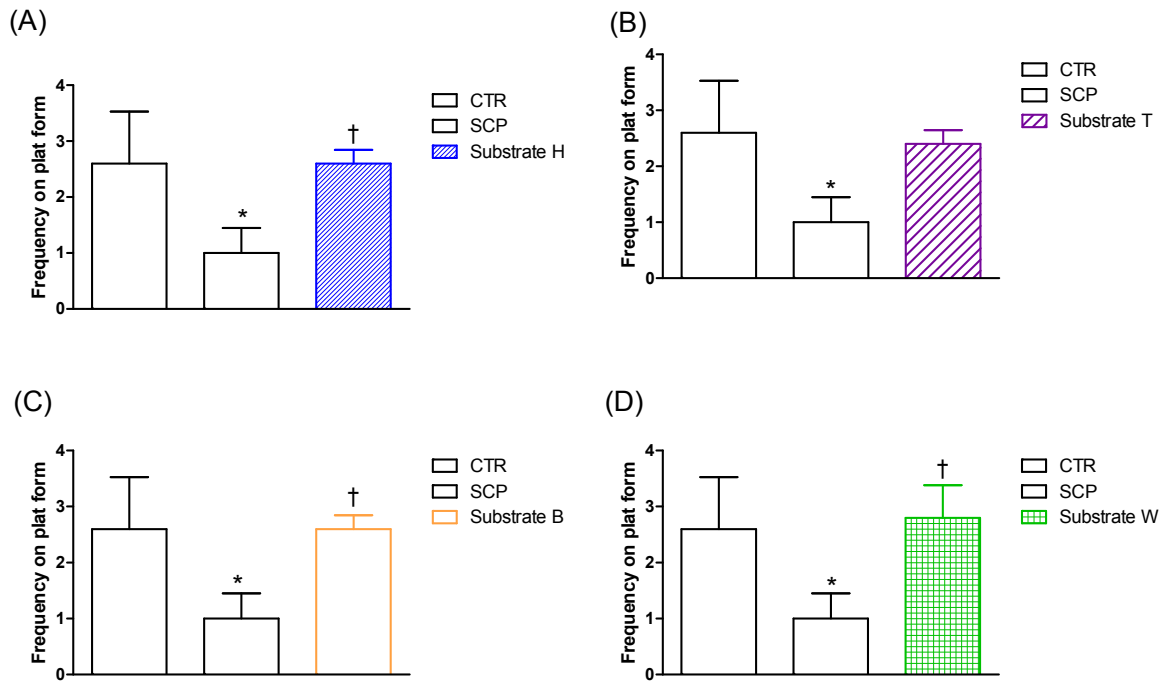


그림 229. Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 모델에서 장기간 약물 투여가 학습과 기억에 미치는 영향-probe trial(goal quadrant duration time)

Acquisition phase가 종료된 후 시행한 probe trial를 시행하여 학습의 강도 및 장소에 대한 기억이 유지되는 강도(memory retention and consolidation)를 살펴보았다. probe trial 결과에서 goal quadrant에서 머무른 시간을 비교하였을 때, 시험약물그룹들이 SCP 그룹에 비해 CTR 그룹과 비슷한 경향을 확인하였으며, 그 중 Substrate B 그룹은 유의성 있는 차이를 보여주었다(CTR(21.6±5.5), SCP(14.2±3.6), Substrate H(20.2±0.5), Substrate T(21.4±2.7), Substrate W(21.2±2.8), Substrate B(26.2±2.8))(그림 2).



* $p < 0.05$ vs the control, † $p < 0.05$ the scopolamine by ANOVA (post hoc with Fisher's PLSD)

그림 3. Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 모델에서 장기간 약물 투여가 학습과 기억에 미치는 영향-probe trial(frequency on plat form)

Plat form 을 제거한 후 Plat form 이 위치하고 있던 자리에 정확하게 찾아가는 횟수를 측정 한 결과에서는 Substrate T 그룹을 제외한 모든 약물그룹들이 SCP 그룹에 비해 CTR 그룹과 통계적 유의성을 확인하였다(CTR(2.6 ± 0.9), SCP(1.1 ± 0.4), Substrate H(2.6 ± 0.2), Substrate T(2.4 ± 0.2), Substrate W(2.8 ± 0.5), Substrate B(2.6 ± 0.2))(그림 3). 이로써 장기간 약물 투여가 기억의 강화 및 장기유지에 효과가 있는 것을 관찰하였다.

2. 기억력 감퇴 실험동물 모델에서 장기간 약물 투여가 탐색활동에 미치는 영향

공간과 연계된 상황학습 및 불안을 측정하기 위해 실험동물을 개방된 공간에 노출시켜 탐색활동도를 5분동안 노출하여 보행활동도(ambulation)을 측정하였다.

CTR(4621.4 ± 173.4), SCP(5299.2 ± 104.5), Substrate H(5102.2 ± 324.5), Substrate T(4987.8 ± 369.8), Substrate B(5530.2 ± 431.7), Substrate W(4534.0 ± 567.8)로 그룹 간의 유의한 차이는 없었다.

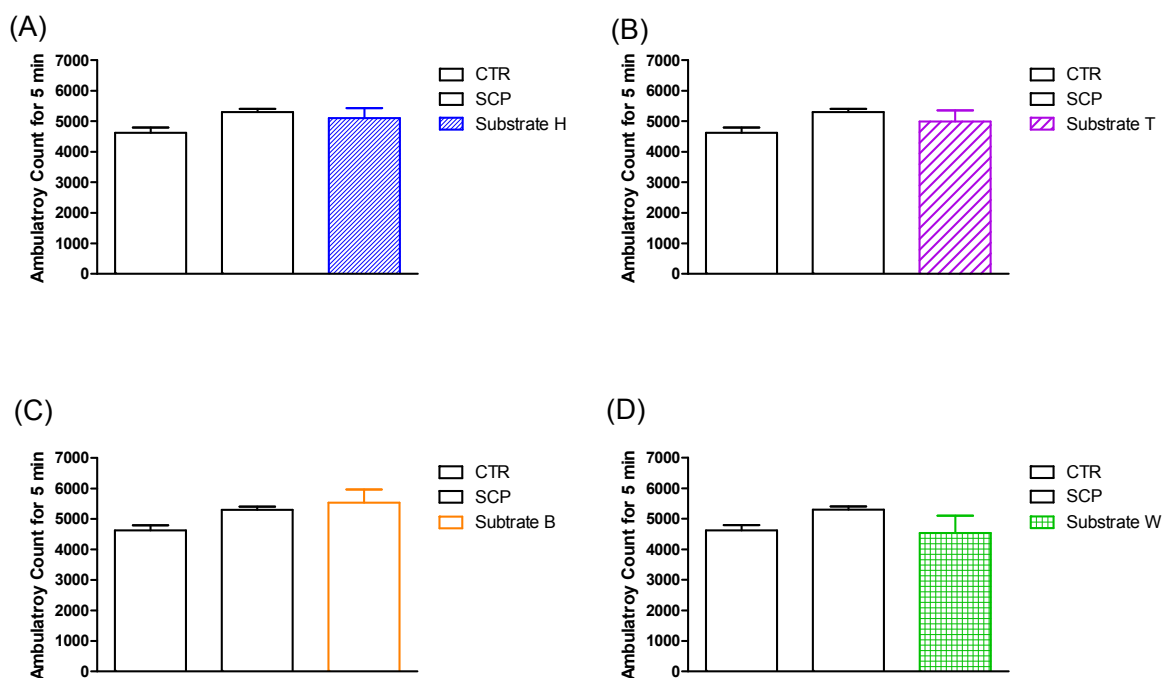
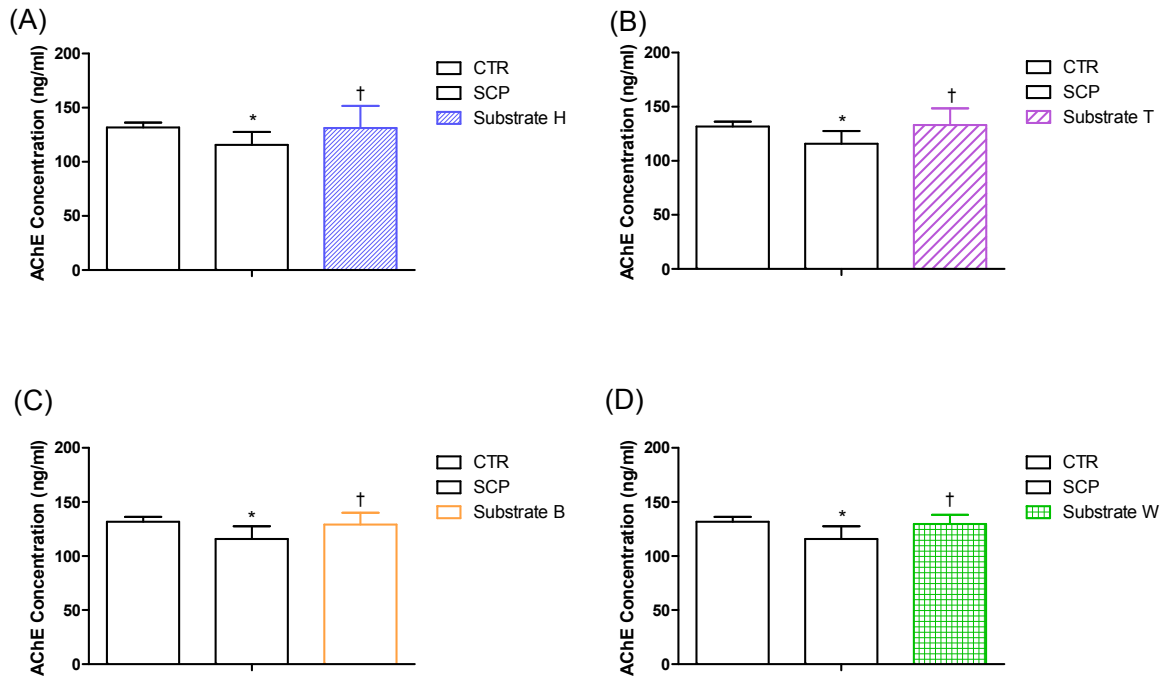


그림 230. Scopolamine 투여에 의한 기억력 감퇴 모델에서 장기간 약물 투여가 탐색활동에 미치는 영향

3. 기억력 감퇴 실험동물 모델에서 뇌의 콜린성 회로에 미치는 영향

시험약물이 기억력 감퇴실험동물에서 뇌의 콜린성 회로에 미치는 영향을 알아보기 위해 AChE 효소활성도를 측정하였다. 기억의 중추적 역할을 하는 뇌의 해마부위를 균질화 하여 AChE 효소 활성도를 측정하였다. CTR(131.8 ± 4.4), SCP(110.3 ± 5.8), Substrate H(139.6 ± 14.2), Substrate T(133.0 ± 15.5), Substrate B(129.0 ± 11.0), Substrate W(129.5 ± 8.5)로 CTR 그룹에 비해 SCP 그룹은 AChE 효소의 활성이 유의하게 감소하였으며, 모든 시험약물그룹에서는 AChE 효소의 활성이 회복됨을 확인하였다(그림 5).



* $p < 0.05$ vs the control, † $p < 0.05$ the scopolamine by ANOVA (post hoc with Fisher's PLSD)

그림 231. 시험물질 경구 투여 후 해마에서 acetylcholinesterase 효소활성 측정

5. 기억력 감퇴 실험동물 모델에서 학습 및 기억에 관련된 신경화학적 변화

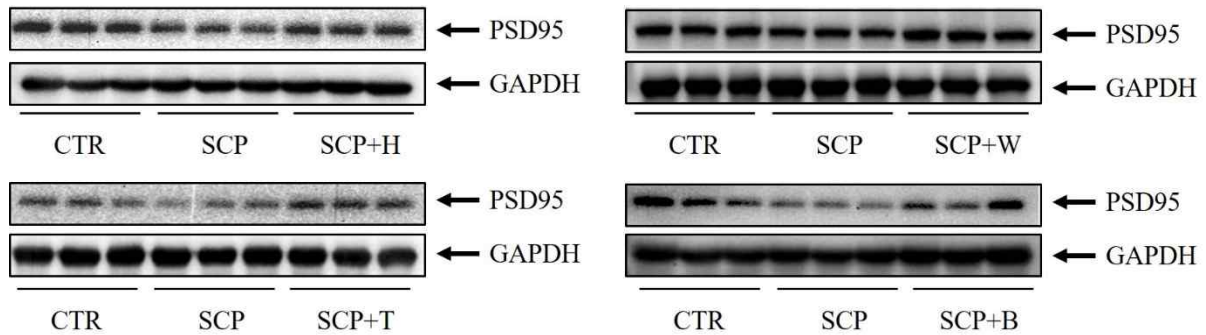


그림 232. 시험물질 경구 투여 후 해마에서 시냅스 지표 Psd95 발현 측정

기억력 감퇴 실험동물에서 학습 및 기억에 관련된 신경화학적 변화를 살펴보기 위해 해마조직에서 신경 가소성 및 신경 연결(synapse; 시냅스)의 세기를 확인하는 지표인 Psd95(post-synaptic density protein 95)의 발현을 전기영동(Western blot)으로 확인하였다. CTR 에 비해 SCP 는 발현이 감소하였으며, 모든 시험약물그룹에서 Psd95 의 발현이 SCP 보다 증가하는 것을 확인하였다.

* 결론

1. 기억력감소 모델에서 시험약물의 장기간 경구투여 효과는 scopolamine 에 의해 유도된 기억력 감소모델에서 학습효과 개선을 나타냈다.
2. 기억력감소 모델에서 시험약물의 장기간 경구투여 효과는 공간과 연계된 상황 학습 및 불안울 측정하는 탐색활동에는 영향을 미치지 않았다.
3. 기억력감소 모델에서 시험약물의 장기간 경구투여 효과는 뇌의 해마조직에서 수행한 acetylcholinesterase 효소활성도 검사에서 통계적으로 유의성 있는 효소활성 증가로 관찰되었다.
4. 기억력감소 모델에서 시험약물은 학습과 기억의 증추적 역할을 하는 해마 영역에서 신경망의 강화 관련된 PSD95 단백 발현이 증가되는 신경화학적 변동을 초래하였다.

5절. 태극삼, 흑삼 국제 임상 연구(국제임상시험)

가. 시료제조 및 임상 준비

- 태극삼과 흑삼의 혈류개선과 인지기능 개선에 대해 중국 현지인을 대상으로 인체적용시험을 실시하고자 하였다. 중국 심양에 위치한 Shenyang Dasan Pharmaceutical에서 임상관리를 하고 대련에 위치한 Military 215 Hospital 에서 임상시험을 실시하였다.
- 임상용 시료는 진안에서 생산된 4년근 인삼을 구입하여 진안홍삼연구소에서 직접 제조한 태극삼과 흑삼으로 분말을 제조하고 제 4협동기관인 고려인삼제조(주)에서 과립제형을 제조, 포장하여 임상에 사용하였다.
- 임상시험은 35~60세 사이의 피험자를 모집하여 그룹당 30명씩 배정하여 시험을 실시하였으며, 현재 혈행개선과 인지기능개선에 대한 연구를 실시하였다.

나. 혈행개선 임상시험 결과 Summary

Request Agency	진안홍삼연구소	
Study Title : 중국인의 혈행개선에 대한 고려 홍삼, 고려 흑삼 및 고려 태극삼의 효과 - 무작위, 이중맹검법에 의한 인체적용시험		
Responsible medical officer and investigator : 중국 인민해방군 제215병원		
Test period : Apr. 25, 2016~Mar. 31, 2017	Phase of development : 인체적용시험	
목적: 본 연구의 목적은 중국인 대상 무작위 이중맹검법을 통해 한국산 고려 홍삼, 흑삼 및 태극삼의 혈행개선에 대한 영향을 검증하고 3종간의 혈행개선에 대한 차이를 비교하였다.		
시험방법: 무작위, 이중맹검법으로 시행하였다. 시험은 모두 두단계로 나뉘어 진행하고 제1단계는 첫번째 복용 시작전 1주이고 주요내용은 지원자를 선별하는 것이고 제2단계는 복용단계이며 모두 8주 복용하였다. 그중 제4주와 제8주 각각 관련 지표에 대한 검사와 평가를 진행하였다.		



연구대상자 수:

총 120명(홍삼군, 흑삼군, 태극삼군, 대조제품군 각 30명씩 총 120명)

선정기준

- 건강성인, 간기능이 정상이고 혈압, 혈액 지질 검사에서 실험실 정상수치의 120%를 초과하지 않는 자
- 연령은 35~60세, 성별 제한 없음.
- 중학교이상 교육수준
- 자발적으로 참가하고 피험자 동의서를 작성함.

제외기준

- 신체질병, 뇌질환과 약물을 남용한 자
- 심리 혹은 정신 질병이 있는 자
- 임신 및 수유기 여성

시험물 정보:

고려 홍삼, 흑삼, 태극삼, 분말 과립(모두 2.5g/포, 2포/일, 배치 번호: JRG1601-1, 2, 3), 대조제품 분말 과립(2.5g/포, 2포/일, 배치 번호: JRG1601-4)

사용법과 복용주기:

1일 2회, 1회 1포, 온수와 함께 복용.
복용기간 : 8주

평가기준과 방법

안전성 평가

- 이상반응
- 임상실험실검사와 혈액학검사, 심전도, 소변검사 등
- 자각증상
- 신체검진

유효성 평가

혈류에 대한 영향: 주로 혈액점도(전혈점도, 혈장점도, 카슨점도), 혈액응고(PT, TT, APTT, FGR), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB) 등 지표에 대한 평가를 포함하였다.

- 1차 유효성 평가
 - 혈액점도(전혈점도)
- 2차 유효성 평가
 - 혈액점도(혈장점도, 카슨점도), 혈액응고(PT, TT, APTT, FGR), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB)

통계방법:

1. 본 연구는 SPSS 2.0통계 소프트웨어 패키지를 사용하여 통계분석을 진행하였다.
1. 평균, 표준편차, 최대치, 최소치, 백분위수 등 지표로 분석하였다.
2. 같은 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 비교할 때 대응표본 T-검정을 사용하였다. 예를 들면 홍삼 제0주와 제8주간의 비교
3. 다른 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 두군씩 비교할 때 독립표본 T-검정을 사용하였다. 예를 들면 홍삼과 대조식품 제8주 간의 비교
4. 다른 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 네군을 동시에 비교할 때 one-way analysis of variance(ANOVA), 즉 F검증이다. 예를 들면 홍삼, 흑삼, 태극삼, 대조제품 네군 간의 동시 비교
5. 통계결과 차이가 현저한데 관한 해석:
통상적으로 시험결과 유의성이 0.05수준 혹은 0.01수준에 도달해야 데이터간에 차이가 현저

혹은 매우 현저하다고 설명할 수 있다. 결론을 지을 때 방향성을 확실하게 서술해야 하였다 (예를 들면 현저하게 크거나 현저하게 작다). 유의성은 통상적으로 $P > 0.05$ 는 차이성이 현저하지 않다고 표시하였다(통계적으로 유의하지 않다). $0.01 < P < 0.05$ 는 차이성이 현저하다는 것을 표시하였다(통계적으로 유의하다). $P < 0.01$ 는 차이성이 매우 현저하다는 것을 표시하였다(통계적으로 유의하다).

결론:

고려 홍삼, 흑삼, 태극삼 연구제품과 대조제품을 각각 복용한 후 혈행개선 관련 지표를 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

본 연구는 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼 섭취가 혈행개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검법, 위약-대조 연구이다.

본 연구의 목표 연구대상자 수는 108명이며, 총 136명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 120명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중맹검법 방법을 통해 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군, 대조제품군에 1:1:1:1 무작위 배정되어 본 연구에 참여하였다. 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군, 대조제품군 각각 30명에서 중도 탈락자 없이 총 120명의 연구대상자가 연구계획서(프로토콜)에 명시한 바에 따라 연구를 정상적으로 완료하였다.

연구자는 모든 연구대상자를 대상으로 연구계획서에 정해진 바에 따라, 혈액점도(전혈점도), 혈액점도(혈장점도, 카슨점도), 혈액응고(PT, TT, APTT, FGR), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB) 등 유효성 평가와 임상병리 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다.

□ 계획서 순응 연구대상자군 (Per Protocol Set) 120명을 대상으로 1차 유효성 평가 항목인 혈액점도(전혈점도)를 비교한 결과 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군과 대조제품군 네 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$). 전혈점도는 흑삼에서 가장 큰 감소 경향을 보였고 홍삼, 태극삼 순으로 감소하였으나 대조제품군과 함께 비교하면 전반적으로 유의성있는 변화는 없었으며 대조제품의 효과가 대단히 큰 것으로 나타났다. 2차 유효성 평가항목인 혈액점도(혈장점도, 카슨점도), 혈액응고(PT, TT, APTT, FGR), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB) 변화에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$). 혈행과 밀접한 관계가 있는 혈장점도 측면을 고려하여 흑삼군의 결과에 관심을 가질 필요가 있을 것이다.

□ 안전성 평가를 위해 연구에 참여하여 최소 1회 이상 연구용 제품을 섭취한 연구대상자 120명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 임상병리 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 120명의 연구대상자는 모두 본 제품과 관련한 직접적인 이상반응은 발생하지 않았다.

□ 네 섭취군 간 이상반응 발생에 차이가 없었으며, 연구용 제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단하였다. 임상병리 검사 항목 중 몇몇 항목에서 섭취군 내 의미 있는 차이가 있었으나($P < 0.05$), 이는 참고치 범위 내에서 일어난 변화로 임상적 의미가 없다고 판단하였다. 활력징후 등에서도 네 섭취군 간에 의미 있는 차이가 없었다($P > 0.05$).

□ 요약하면, 본 연구를 통해 중국인 연구대상자에서 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 8주 섭취에 따른 혈행 개선 효과를 증명할 수 있었으며, 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군 중에서 홍삼군이 가장 큰 개선 효과를 보여주었다. 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

Date of the report :

2017.05.31

-임상실험실검사와 혈액학검사, 심전도, 소변검사 등

-자각증상

-신체검진

유효성 평가

주로 WCST(위스콘신 카드 분류 검사), ADAS-Cog(알츠하이머병-인지평가척도)중의 단어회상능력과 단어식별테스트, 바이오마커(AB, ACT), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB)등 지표에 대한 평가를 포함하였다.

-1차 유효성 평가

· WCST(위스콘신 카드 분류 검사)

-2차 유효성 평가

· ADAS-Cog(알츠하이머병-인지평가척도)중의 단어회상능력과 단어식별테스트, 바이오마커(AB, ACT), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB)

통계방법:

1. 본 연구는 SPSS 2.0통계 소프트웨어 패키지를 사용하여 통계분석을 진행하였다.

6. 평균, 표준편차, 최대치, 최소치, 백분위수 등 지표로 분석하였다.

7. 같은 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 비교할 때 대응표본 T-검정을 사용하였다. 예를 들면 홍삼 제0주와 제8주간의 비교

8. 다른 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 두군씩 비교할 때 독립표본 T-검정을 사용하였다. 예를 들면 홍삼과 대조제품 제8주 간의 비교

9. 다른 군 시험물을 복용전(0주), 복용후(8주)간에 대하여 네군을 동시에 비교할 때 one-way analysis of variance(ANOVA), 즉 F검증이다. 예를 들면 홍삼, 흑삼, 태극삼, 대조제품 네군 간의 동시 비교

10. 통계결과 차이가 현저한데 관한 해석:

통상적으로 시험결과 유의성이 0.05수준 혹은 0.01수준에 도달해야 데이터간에 차이가 현저 혹은 매우 현저하다고 설명할수 있다. 결론을 지을 때 방향성을 확실하게 서술해야 하였다(예를 들면 현저하게 크거나 현저하게 작다). 유의성은 통상적으로 $P > 0.05$ 는 차이성이 현저하지 않다고 표시하였다(통계적으로 유의하지 않다). $0.01 < P < 0.05$ 는 차이성이 현저하다는 것을 표시하였다(통계적으로 유의하다). $P < 0.01$ 는 차이성이 매우 현저하다는 것을 표시하였다(통계적으로 유의하다).

결론:

고려 홍삼, 흑삼, 태극삼 연구제품과 대조제품을 각각 복용한 후 인지기능개선 관련 지표를 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

본 연구는 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼 섭취가 인지기능개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 8주, 무작위배정, 이중맹검법, 위약-대조 연구이다.

본 연구의 목표 연구대상자 수는 108명이며, 총 136명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 120명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중맹검법 방법을 통해 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군, 대조제품군에 1:1:1:1 무작위 배정되어 본 연구에 참여하였다. 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군, 대조제품군 각각 30명에서 중도 탈락자 없이 총 120명의 연구대상자가 연구계획서(프로토콜)에 명시한 바에 따라 연구를 정상적으로 완료하였다.

연구자는 모든 연구대상자를 대상으로 연구계획서에 정해진 바에 따라, WCST(위스콘신 카드 분류 검사), ADAS-Cog(알츠하이머병-인지평가척도)중의 단어회상능력과 단어식별테스트, 바이오마커(AB, ACT), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB)등 유효성 평가와 임상병리 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다.

□ 계획서 순응 연구대상자군 (Per Protocol Set) 120명을 대상으로 1차 유효성 평가 항목인 WCST(위스콘신 카드 분류 검사)를 비교한 결과 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군과 대조제품군의 복용전과 복용후 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$). WCST(위스콘신 카드 분류 검사)는 홍삼에서 가장 큰 감소 경향을 보였고 태극삼, 흑삼, 순으로 감소하였으나 대조제품군과 함께 비교하면 전반적으로 유의성있는 변화는 없었으며 대조제품의 효과가 대단히 큰 것으로 나타났다. 2차 유효성 평가항목인

ADAS-Cog(알츠하이머병-인지평가척도)중의 단어회상능력과 단어식별테스트, 바이오마커(Aβ, ACT), 혈중지질(CHO, TG, HDL, LDL, APO, POB)변화에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P < 0.05$). 이상 지표의 군간비교에서 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군은 대조제품군과 비교하여 복용전에 비해 복용후 모두 유의성있는 변화는 없었다($P > 0.05$).

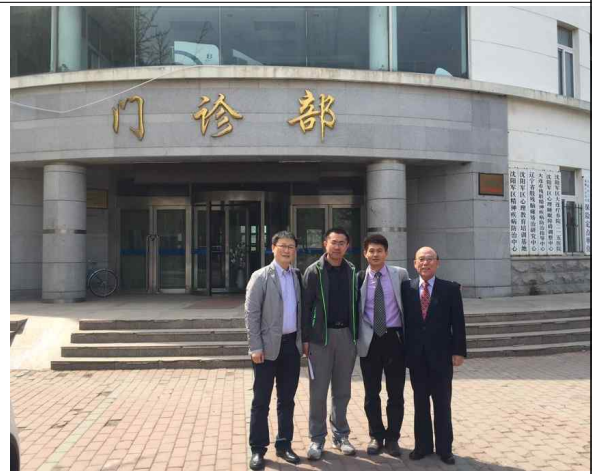
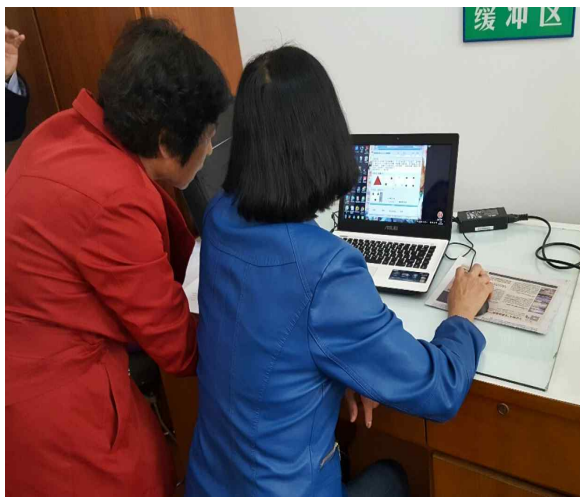
- 안전성 평가를 위해 연구에 참여하여 최소 1회 이상 연구용제품을 섭취한 연구대상자 120명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 임상병리 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 120명의 연구대상자는 모두 본 제품과 관련한 직접적인 이상반응은 발생하지 않았다.
- 네 섭취군 간 이상반응 발생에 차이가 없었으며, 연구용 제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단하였다. 임상병리 검사 항목 중 몇몇 항목에서 섭취군 내 의미 있는 차이가 있었으나($p < 0.05$), 이는 참고치 범위 내에서 일어난 변화로 임상적 의미가 없다고 판단하였다. 활력징후 등에서도 네 섭취군 간에 의미 있는 차이가 없었다($p > 0.05$).
- 요약하면, 본 연구를 통해 중국인 연구대상자에서 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 8주 섭취에 따른 인지기능개선 효과를 증명할 수 있었으며, 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군 중에서 흑삼군이 가장 큰 개선 효과를 보여주었다. 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

□

Date of the report :

2017.05.31

라 임상시험 진행 확인



가공기술 지도교육 실시

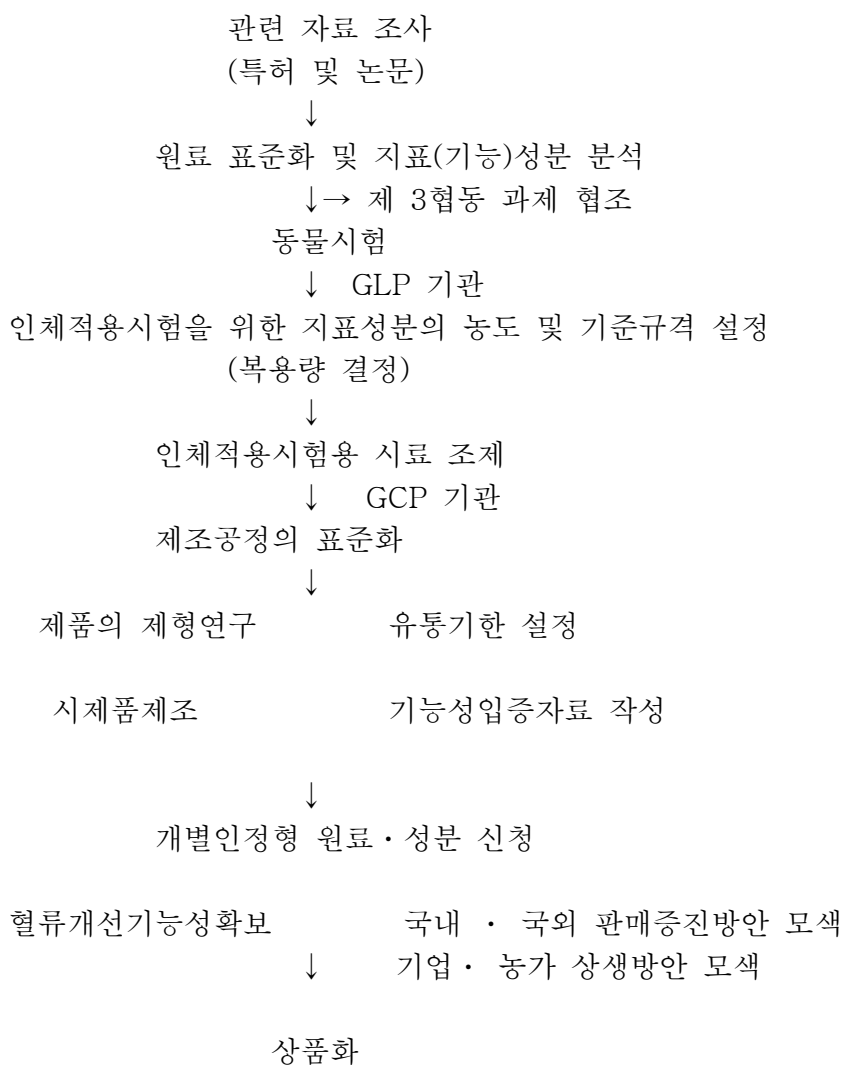
가. 가공기술 지도

- 기업체 애로 및 기존 제조공정 청취(시간, 온도 조건이 서로 상이함)
- 흑삼 선택 등 제조업체 기준 청취(5증~9증 사이의 목표 선택이 다름)
- 온도, 차수에 따른 흑삼 제조공정 지도
- 기존 방법의 성분, 효능의 우수성 증명은 못하고 주장만 하는 수준으로 이들 제조공정에 대한 추가적인 기능성 검증이 필요할 것으로 생각됨



6절. 태극삼의 기능성 소재화 연구

본 연구를 수행함에 있어서 태극삼의 기능성 표방은 면역력증진과 피로회복으로 제한 되어 있기 때문에 또 다른 기능성을 인정받아 내수 촉진은 물론 국외수출증대를 피하고자 한다. 따라서 이와 같은 목표에 도달하기 위해서는 동물시험과 인체적용시험을 원활하게 수행하기 위해 GLP 기관과 GCP 기관에서 수행하여야 하며, CRO 기관과 식의약처, 학계 및 업계의 전문가와 협의·협조를 받아서 연구를 추진하고자 한다.



현시대를 살아가고 있는 사람들은 최신 의료기술의 발달과 제약 산업의 발전 및 건강 식품 개발의 도움으로 고령화 인구가 계속 증가하고 있다. 통계청 발표에 의한 2012년 사망 원인 통계에 의하면 총 사망자수는 26만 7천 명 정도이고 조사망율(인구 10만명 당) 530.8 명으로 전년대비 3.3%가 증가하였다. 사망의 원인은 악성신생물(암), 심장질환, 뇌혈관질환의 순으로 나타났으며, 암으로 사망한 경우가 심장질환이나 뇌혈관질환으로 사망한 경우보다 절대적으로 앞서고 있다. 심장질환이나 뇌혈관질환과 같이 혈행의 이상으로 발생하는 심혈관계 질환도 미국, 유럽, 아시아 등 전 세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있다. 혈행장애가 일어나는 원인은 여러 가지가 있겠지만 그 중에서 혈소판 응집반응에 의해서 일어나는 혈행장애와 coagulation factor 들이 cascade 식으로 활성화되어 thrombin에 의해 불용성 fibrin이 형성되어 blood clot이 생성되는 응고기작에 의해서 혈행장애가 일어난다. 현재 식품의약품안전처로부터 인정받고 있는 홍삼의 기능성은 혈행개선, 면역력 증진, 피로개선, 항산화작용, 기억력 증진 등 5가지이지만 백삼, 태극삼과 같은 인삼류는 면역력 증진과 피로개선 기능성 2가지를 인정해주고 있으며, 흑삼은 단 한가지의 기능성도 인정받지 못하고 있다. 많은 과학자들이 지금까지 홍삼의 대한 효능, 효과에 대해서는 여러 가지 분야에 걸쳐서 연구가 수행되어 왔으나 백삼이나 태극삼의 효능에 대해서는 매우 미미한 수준이다. 태극삼과 관련된 연구는 인삼의 가공 유형별 주요기능 구명(1), 백삼, 태극삼 및 홍삼 추출물이 세포 수준에서 glucose uptake에 관한보고(2), 인삼의 가공방법에 따른 성분함량 변화(3), 인삼의 가공별 phenolic 화합물과 ginsenoside의 함량 변이(4), 원적외선 건조기를 이용한 태극삼의 건조특성(5), 백삼과 태극삼의 크기 및 연근별 인삼사포닌 함량(6), 건조인삼제품의 품질 특성(7), 태극삼 제조공정의 효율화를 통한 백삼의 경쟁력 제고방안(8), 가공방법에 따른 백삼 제품의 성분 변화(9) 등의 보고에 불과하다. 한편, 최근에 많은 연구가 수행되어온 흑삼은 2012년 1월 26일부로 개정되어 시행되는 인삼산업법에서 흑삼은 증기로 찌서 말리는 과정을 3회 이상 반복한 삼으로 규정하고 있다. 아직까지 흑삼의 가공공정에 있어서 미흡한 점도 많고 소비자가 손쉽게 선택할 수 있는 제형의 개발과 복용량 등의 문제점이 있을 수 있는 상태이다. 그러나 흑삼에 대한 연구는 태극삼과 달리 상당히 많은 연구가 수행되었다. 흑삼의 효능과 관련된 연구로는 아토피 억제활성(10), 항암활성(11, 12), 기억력 개선(13-17), 항비만 효과(18-20), 항당뇨 및 합병증(21-23), 증포 횡수에 따른 흑삼의 항산화 활성(24, 25), 신생혈관 형성 억제활성(26), 흑삼 추출물의 면역, 암전이 억제, 혈당조절, 항산화 활성 등의 생리활성(27), 흑삼 성분이 함유된 한방화장품의 주름 개선 효과(28, 29) 등이 보고되었다. 또 한편으로는 흑삼제조와 관련되어 성분변화(3, 23, 25, 30-34)와 흑삼성분이 함유된 식품의 품질 특성(35-41), 그리고 흑삼의 안전성 문제로 대두되고 있는 benzo(a)pyrene과 관련된 연구(42, 43) 등 다방면에 걸쳐서 보고되고 있다. 국내에서는 어느 정도 흑삼의 이미지가 형성되어 있으나 백삼과 홍삼에 비하면 미미한 수준이다. 따라서 흑삼에 대한 전반적인 제조방법 등이 제도권 내에서 해결되고, 성분과 효능·효과 측면에서 많은 연구가 이루어져서 소비자가 흑삼 또는 흑삼제품을 구매할 수 있는 계기가 되었으면 한다. 2013년 농림축산식품부의 인삼통계자료집에 의하면 태극삼의 연도별 검사실적을 살펴보면 표 1과 같이 전체 74톤을 검사하였고 그 중에서 37톤이 수출용이었다. 검사 실적은 약간씩 증가하는 경향이었으나 2013년 기준 홍삼의 461톤과 백삼 282톤과 비교하면 상당히

적은 양이었다. 그리고 흑삼의 경우는 통계자료에 잡히지도 않는 수준이었다.

표 1. 태극삼의 연도별 검사 및 수출 실적(단위 : 톤)

연도 용도	2009	2010	2011	2012	2013
국내용	20	35	32	29	37
수출용	26	33	33	51	37
계	46	68	65	80	74

또 본 연구에서는 태극삼에 많이 함유되어 있는 성분들과 특이성분 및 비사포닌 성분 분획 등을 이용하여 혈소판 응집억제 기능성과 thrombin에 의해 일어나는 혈액응고 활성을 저해하는 활성 등을 동물시험과 인체적용시험으로 수행하고, 그 결과를 바탕으로 태극삼의 기능성 추가 또는 개별인정형 원료·성분으로 식품의약품안전처에 신청·등록해서 태극삼의 기능성을 인정받고자 한다. 이와 같은 상황에서 본 연구에서는 흑삼의 제품개발에 있어서 제형 개발과 관련하여 성분분석에 의한 표준화를 수행하고, 태극삼은 동물시험과 인체적용시험을 통하여 혈액의 흐름에 도움을 주는 기능성 추가 또는 개별인정형 원료로 등록하고자 한다.

이러한 결과가 도출되었을 때 태극삼과 흑삼의 소비를 진작시키고, 국내 소비뿐만 아니라 인삼의 주요한 소비지역인 중국 및 동남아 시장에서도 태극삼과 흑삼의 소비가 증가하고 수출의 길이 넓어져 인삼류 제조업체 및 인삼 재배농가 수익에도 도움이 되고자 한다.

다. 재료 및 방법

1) 인삼류

본 연구에 사용된 수삼은 경상북도 풍기군 지역에서 재배된 6년근 중소편급 수삼을 구입하여 저온창고에 보관하면서 태극삼 및 흑삼 제조용 수삼으로 사용하였다. 제조된 태극삼, 흑삼은 다시 적정 조건으로 태극삼, 흑삼 물추출 농축액으로 제조하고 필요에 따라 시료로 사용하였다.

2) 시약

총당 분석에 사용된 glucose 및 phenol, 환원당 분석에 사용된 dinitrosalicylic acid(DNS), 산성다당체 분석에 사용된 galacturonic acid 및 carbazole, 항산화 활성 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 총 phenol 화물과 총 flavonoid 화합물 측정에 사용된 gallic acid 및 rutin 등은 Sigma사 시약을 사용하였다. Ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3, Rg5 및 Rk1은 Ambo Institute(Daejeon, Korea)사의 제품을 인삼성분 확인용 TLC plate는 Merck사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외 실험에 사용된 시약은 1급 시약을 사용하였다.

3) 일반성분 분석 및 색상 비교

태극삼 및 흑삼 물추출 농축액에 함유되어 있는 총당 분석은 phenol-sulfuric acid 방법 (44), 환원당 분석은 DNS 방법(45), 산성다당체 함량 분석은 carbazole-sulfuric acid 방법 (46)을 이용하였고 수분 함량은 105°C 건조법, 지방 함량은 diethylether 추출법, 회분 함량은 550°C에서 3 시간 이상 가온하여 조사하였다(47). 그리고 태극삼과 흑삼 농축액의 색상을 비교하기 위하여 건조물량 기준으로 1% 용액을 조제하여 1,610 x g에서 15 분간 원심 분리하여 490 및 550 nm에서 흡광도를 조사하였다.

4) 조사포닌, ginsenoside 함량 및 TLC 패턴 조사

조사포닌 함량 및 TLC에 의한 ginsenoside pattern 조사는 수포화 n-butanol 추출방법 (48-50)에 의해 조사포닌 분획을 얻어서 5% methanol 용액으로 제조하여 약 10 µl씩 silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate에 점적한 후 전개용매로서는 chloroform/methanol/water(65:35:10) 하층으로 전개시킨 후 30% 황산 용액을 분무하고 110°C에서 10분간 발색시켜 그 패턴을 조사하였다. 그리고 HPLC에 의한 ginsenoside 함량 분석은 아래 내용과 같은 조건으로 수행하였다.

- 검출기 : 자외부 흡광검출기(DAD), 203 nm
- 칼럼 : Eclipse Plus C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 µm)
- 이동상 : 물/아세토니트릴 82/18 %, - 유량 : 1.6 mL/min- 주입량 : 10 µL

시간(분)	물(%)	아세토니트릴(%)
0	82	18
10	80	20
30	73	27
40	70	30
55	49	51
56	10	90
61	10	90
62	82	18
65	82	18

5) 총 페놀화합물 및 총 플라보노이드 함량 조사

총 페놀화합물은 Folin-Denis 방법(51)에 의해 측정하였다. 시료 0.5 mL에 Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 가하여 혼합하고 3분간 정치한 후 2% sodium carbonate 용액을 10 mL를 가하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 gallic

acid를 사용하여 총 페놀화합물 함량을 구하였다. 총 플라보이드 함량은 Moreno 등(52)의 방법에 따라 시료 1 mL에 10% aluminium nitrate 0.1 mL, 1M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 가하여 암실에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 rutin을 사용하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

6) DPPH free radical을 이용한 scavenging activity 조사

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical을 이용한 scavenging activity는 Blois의 방법(53)에 의해서 조사하였다. DPPH 용액(DPPH 12 mg을 100 mL ethanol에 완전히 용해시킨 후 증류수 100 mL를 가한 액) 2 mL에 시료 용액 0.5 mL를 가하여 반응시간에 따른 흡광도의 차이를 조사하여 상대활성으로 나타내었다.

Scavenging activity(%) = (무첨가구의 흡광도 - 시료 첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) x 100

7) 태극삼 및 흑삼 농축액의 품질 안전성 조사

태극삼과 흑삼 농축액의 식품학적 품질 안전성을 조사하기 위하여 잔류농약, 중금속, 일반세균, 대장균군 및 benzopyrene 함량 분석 등의 시험은 공식 검사기관에 의뢰하여 조사하였다. Benzopyrene 함량 분석조건은 다음과 같다.

- 칼럼 : Eclipse Plus C18, Agilent, (4.6 × 250 mm, 5 μm)
- 칼럼온도 : 30℃
- 이동상 : 아세트니트릴과 물의 혼합액 (8:2)
- 이동상 유량 : 1.0 mL/min
- 검출기 : 형광검출기, 여기파장 294 nm, 형광파장 404 nm
- 주입량 : 10 μL

8) 유동층 과립기를 이용한 과립(pellet), 장용성 과립제품 제조 및 품질안정성 조사

유동층 과립제조기를 이용하여 태극삼, 흑삼 물추출 농축액을 직경 1.2 mm 내외의 구형의 과립제품을 제조하였다. 이 과립제품을 저장조건을 달리하여 보관하면서 저장기간에 따라 과립제품의 응고 유무를 육안으로 관찰하였다. 이때 과립 제조조건 및 저장조건은 다음과 같다.

가) 과립 제조조건

- (1) 기기 : Fluid bed granulator batch model
- (2) 제조조건 : 농축액 농도 45Bx, 흡입공기 온도 90℃, 분무공기 압력 2.0 bar, 투입관 온도 60℃, 투입속도 300 g/min
- (3) 코팅제 : 1% Hydroxy propyl methyl cellulose(HPMC)
- (4) Pellet 크기 : φ1.2 mm 내외
- (5) 과립의 수분함량 : 5% 이하

나) 과립 저장조건

- (1) 밀폐 유무

- (2) 25℃, RH 75%, 10시간 노출
- (3) 35℃, RH 80%, 10시간 노출
- (4) 40℃, RH 75%, 10시간 노출
- (5) 3℃ 냉장 보관
- (6) 실온 보관(RH 40 ± 5%)

9) 봉해도 측정

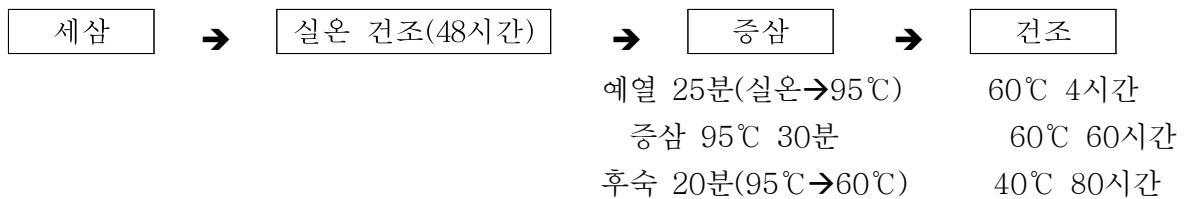
태극삼 및 흑삼 물추출 농축액을 과립 제형으로 제조한 후 흡습 방지제인 HPMC를 코팅하여 식품공전 방법에 따라 Disintegration testor(KUKJE Engineering CO.)로 봉해도를 측정하였다.

2. 태극삼, 흑삼의 제조 및 성분분석, 생리활성, 제품제조

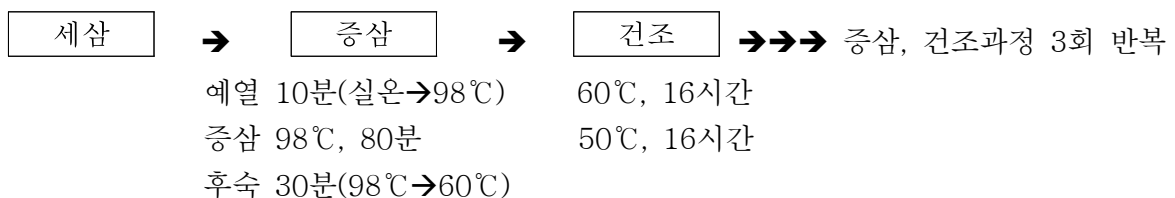
가) 태극삼 및 흑삼 제조

기존의 홍삼, 태극삼 및 백삼과는 다른 새로운 형태의 제품인 흑삼이 출현함에 따라 이에 대한 체계적 관리를 하기 위하여 「인삼산업법」이 개정, 공포(법률제10948호, 2011. 7. 25)됨에 따라 제조방법에 따른 분류 규정을 색상에 따라 구별하도록 법 개정이 되었다(시행규칙 개정 2012. 1. 26). 따라서 본 실험에서도 태극삼 제조에는 물을 사용하지 않고 수증기를 이용하여 익히고 건조하였으며 다음의 제조 조건에 따라 태극삼과 흑삼을 제조하였다.

(1) 태극삼 제조 공정

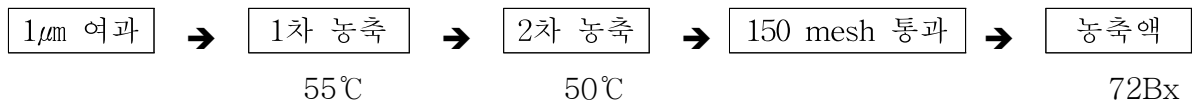
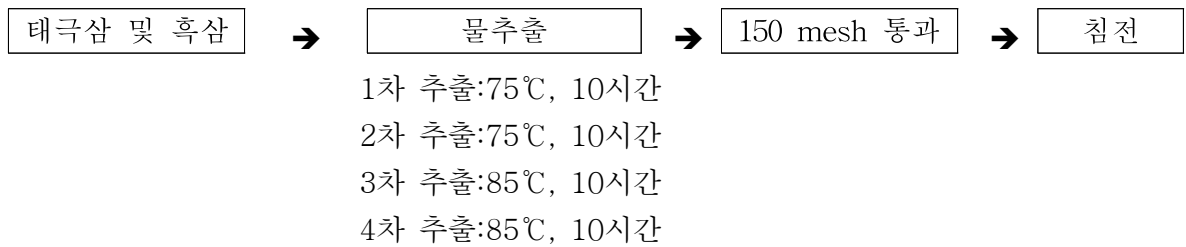


(2) 흑삼 제조 공정



나) 태극삼 및 흑삼의 물추출 농축액 제조

태극삼 및 흑삼의 물추출물 농축액의 제조는 홍삼 물추출물 농축액의 제조과정과 유사하게 제조하여 최종 고형성분이 72Bx가 되도록 농축하여 4℃ 저온창고에서 보관하면서 성분분석, 생리활성, 동물시험 및 인체적용시험용 시료로 사용하고자 하였다.



다) 태극삼 및 흑삼 농축액의 ginsenoside 함량 분석 및 패턴 조사

건강기능식품 공전에는 인산류의 기능성분(또는 지표성분) 함량 기준은 ginsenoside Rb1과 Rg1의 합이 0.8~34 mg/g으로 규정되어 있기 때문에 소량 및 대규모 시설을 이용한 태극삼과 흑삼 물추출 농축액을 제조하여 ginsenoside 함량분석을 공식 검사기관에 의뢰하여 분석한 결과는 표 2, 3과 같다. 태극삼 농축액의 경우 5.09, 5.91, 6.63 mg/g으로 나타나 그 기준에 적합하였다. 그리고 흑삼 농축액의 경우(표 4, Fig. 3) 태극삼 농축액에 비해서 ginsenoside-Rg1은 감소하였으나 Rb1은 약 1.5배 이상, Rg3(s) 함량은 3-6정도 증가하였고 diol 그룹의 분해산물인 ginsenoside-Rk1은 0.24 mg/g, Rg5는 0.34 mg/g의 농도로 검출되었다.

흑삼의 특징적인 사포닌이라고 할 수 있는 Rk1과 Rg5 함량은 증삼 횟수에 따라 그 양이 증가하는 경향이나 Jo 등(31)의 결과에 의하면 9회 증삼했을 경우에 Rk1 함량은 6.8 mg/g, Nam 등(30)은 약 4.07 mg/g이며 3회 증삼했을 경우에는 1.28 mg/g 정도라고 보고하였다. 한편 Rg5의 경우 Jo 등(31)은 흑삼의 경우에 28.1 mg/g으로 보고하였으나, 본 실험에서는 흑삼 농축액의 경우에 0.34 mg/g과 비교하면 많은 차이가 난다. 이것은 분석 방법에 의한 차이가 있을 수도 있으나 ginsenoside-Rk1과 Rg5 자체가 매우 불안정하여 액체 상태로 존재할 경우에 분해속도가 빠르게 진행될 수 있다고 판단된다.

그리고 본 연구에서는 태극삼 물추출 농축액의 경우에는 동물시험과 인체적용시험을 추

진하여 기능성 추가 또는 개별인정 원료의 등록이라는 측면에서 보면 태극삼 농축액의 원료성분 표준화가 잘 이루어 졌으며, 이를 동물시험과 인체적용시험의 시료로 사용하여도 별 문제가 없다고 판단된다. 소규모 및 대규모 시설을 이용하여 제조한 태극삼 물추출 농축액의 ginsenoside의 HPLC 패턴은 그림 1, 2와 같이 거의 같은 retention time에 거의 같은 높이의 peak로 나타났다. 그러나 ginsenoside-Rg3(s)의 경우 육안으로도 확인하기 어려운 정도의 peak가 검출되어 홍삼이나 흑삼의 농축액과 다른 형상으로 나타났다.

표 48. 예비 소규모 실험에 의한 태극삼 농축액의 ginsenosides 함량

태극삼 농축액	Ginsenosides 함량(mg/g)			
	Rb1	Rg1	Rg3(s)	Rb1 + Rg1
A	2.54	2.55	0.04	5.09
B	3.11	2.80	0.06	5.91
C	3.69	2.94	0.08	6.63

표 49. 본 실험에 의한 태극삼 농축액의 ginsenosides 함량

태극삼 농축액	Ginsenosides 함량(mg/g)			
	Rb1	Rg1	Rg3(s)	Rb1 + Rg1
A	4.95	1.93	0.28	6.88
B	4.80	1.93	0.28	6.73
C	4.76	1.94	0.27	6.70

표 50. 흑삼 농축액의 ginsenosides 함량

항목	Ginsenosides(mg/g)				
	Rg1	Rb1	Rg3(s)	Rk1	Rg5
흑삼 농축액	1.06	4.82	1.01	0.24	0.34

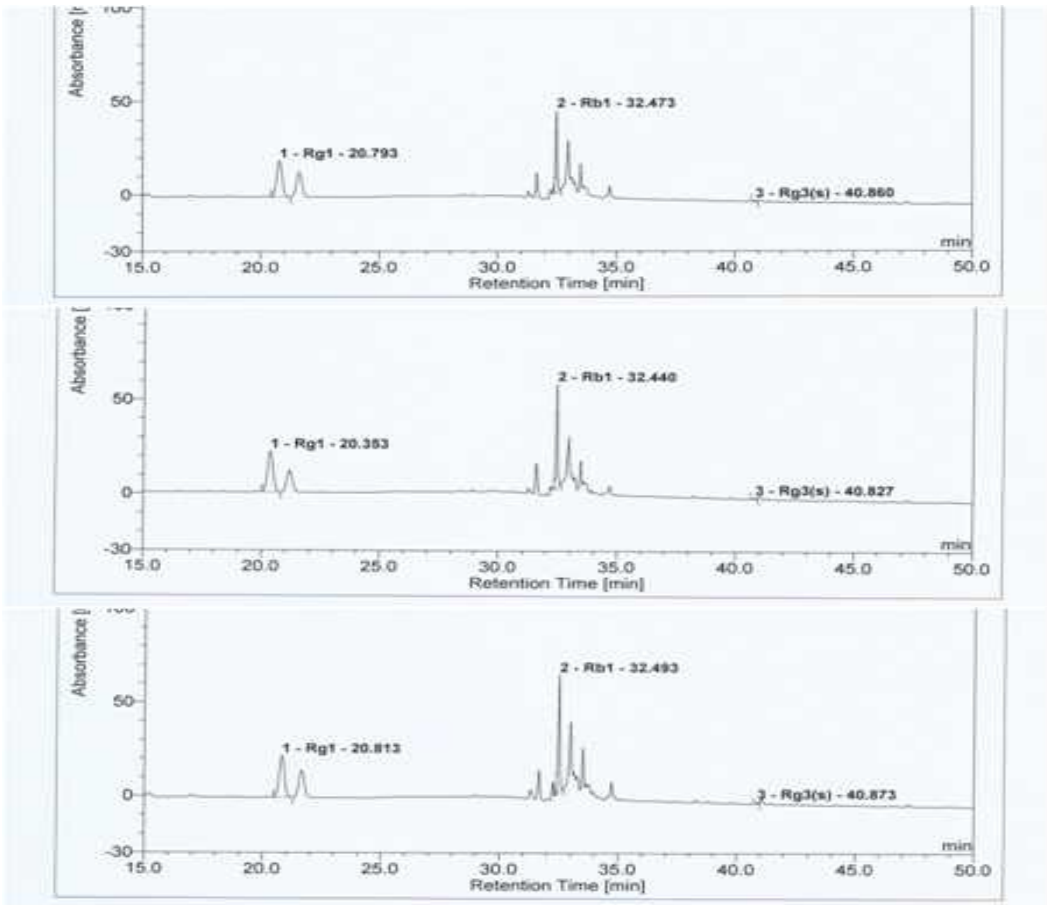


그림 233. HPLC chromatogram of ginsenoside-Rb1, Rg1 and Rg3(s) from 3 Taegeuk ginseng water extracts prepared by laboratory scale.

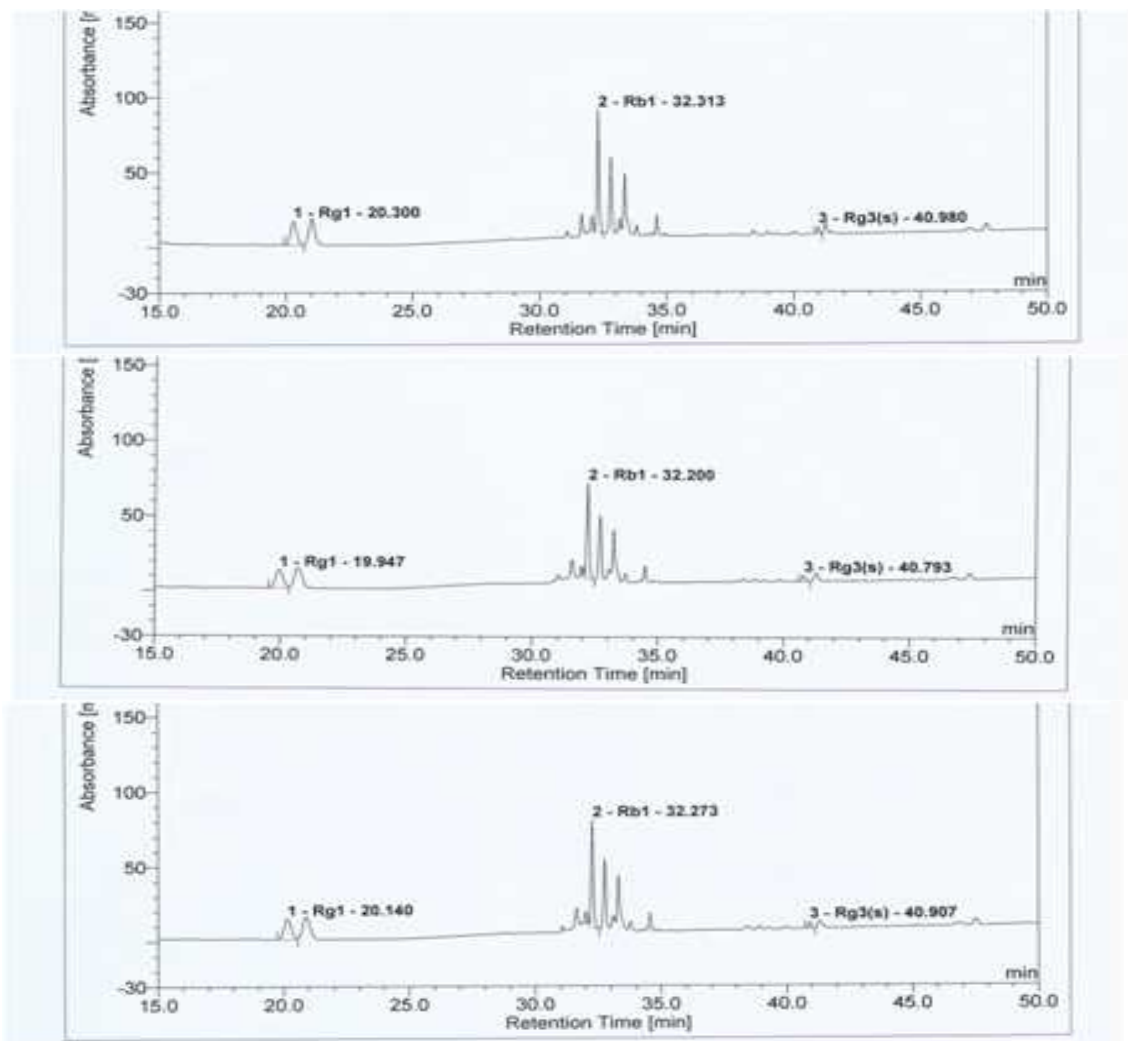


그림 234. HPLC chromatogram of ginsenoside-Rb1, Rg1 and Rg3(s) from 3 Taeguik ginseng water extracts prepared by large scale.

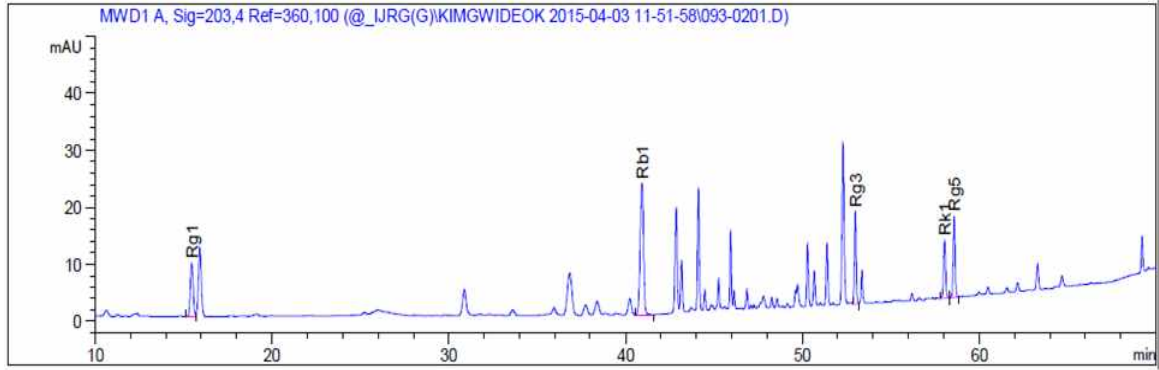


Fig. 235. HPLC chromatogram of ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3(s), Rk1, and Rg5 from Black ginseng water extracts

라) 태극삼 및 흑삼 농축액의 TLC에 의한 ginsenoside 패턴 분석

태극삼과 흑삼의 물추출물 농축액의 ginsenoside의 TLC 패턴을 조사한 결과는 그림 4와 같이 태극삼 농축액에서는 ginsenoside-Rb1과 Rg1은 분명히 나타났으나 Rg3(s)는 불명확하게 나타났으며, 흑삼 농축액에서는 ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3(s) 및 Rk1은 분명하게 나타났으나 Rg5는 불투명하게 나타나 다른 전개용매를 사용하여 확인할 필요성이 있다고 판단된다.



그림 236. TLC chromatogram of ginseng saponin from Taegeuk and Black ginseng extracts

A : Taegeuk ginseng extract, B : Black ginseng extract
 C : Rb1, D : Rg1, E : Rg3(s), F : Rk1, G : Rg

마) 일반성분 함량

태극삼과 흑삼의 물추출물 농축액의 일반성분 및 조사포닌과 산성다당체 함량을 분석한 결과 표 5와 같다. 총당에 있어서 태극삼 농축액이 흑삼 농축액보다 약 10% 정도 높게 나타났다. 그리고 조지방, 조단백질, 조사포닌 및 산성다당체 함량은 태극삼과 흑삼 농축액이 비슷하게 나타났다. 흑삼 농축액의 회분 함량이 높게 나타난 원인에 대해서는 높은 온도로 계속하여 열처리를 받는 제조과정에서 태극삼 농축액과 달리 회화가 되지 않는 미지의 물질들이 생성된 결과에 의한 것이 아닌지 좀 의외의 결과라고 사료된다.

표 51. 태극삼 및 흑삼 농축액의 일반성분 함량

(Unit : % dry basis)

농축액	총당	조지방	조단백질	조회분	조사포닌	산성다당체
태극삼	84.30	0.64	12.30	6.40	6.73	5.60
흑삼	73.80	0.39	14.10	8.83	5.24	6.64

바) 색상 비교

태극삼 및 흑삼 농축액의 색상을 적색 관련 파장인 490 및 550 nm에서 흡광도를 조사한 결과 표 6과 같이 흑삼 농축액이 태극삼 농축액에 비해서 약 5.8배 정도로 나타나 흑삼 제조과정 중에 열에 의한 비효소적 갈변반응에 의한 결과라고 판단된다.

표 52. 태극삼 및 흑삼 농축액의 색도 비교

물추출 농축액 (건조물 1% 수용액)	Wavelength(nm)	
	490	550
태극삼	0.076(100)	0.034(100)
흑삼	0.442(582)	0.199(585)

사) 총 페놀화합물 및 총 플라보노이드 함량

총 페놀화합물의 함량은 흑삼 농축액이 1.64%로 태극삼의 약 2배 정도 높게 나타났으며 총 플라보노이드 함량에서도 흑삼 농축액이 약 2배 이상 높게 나타나 이들 물질에 의한 항산화활성도 흑삼 농축액이 높게 나타날 가능성이 있다고 판단된다(표 7).

표 53. 태극삼 및 흑삼 농축액의 총 페놀화합물 및 총 플라보노이드 함량

(Unit : % dry basis, $\mu\text{g}/100\text{g}$)

물추출 농축액	총 페놀화합물	총 플라보노이드 화합물
태극삼	0.82	319*
흑삼	1.64	678*

아) DPPH free radical에 의한 scavenging activities 조사

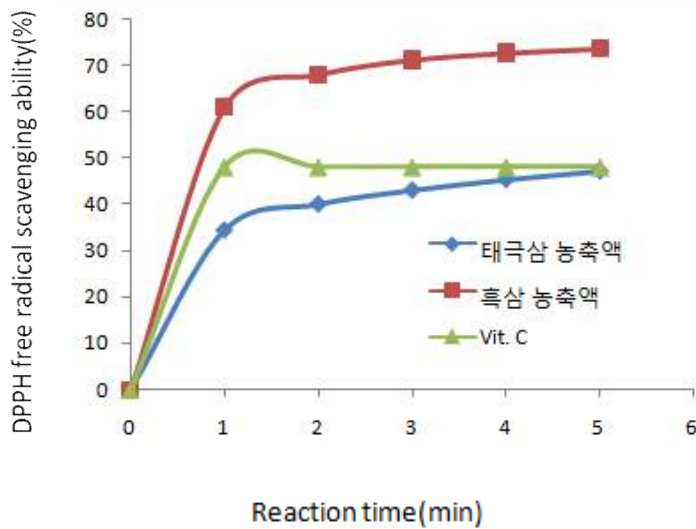


그림 237. DPPH free radical scavenging abilities of water extract of Taegeuk and Black ginseng.

DPPH 용액 2 mL와 2% 수용액의 태극삼 및 흑삼 물추출 농축액 0.5 mL를 혼합하여 DPPH free radical에 의한 scavenging activities를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 반응 1분 후의 활성은 태극삼 농축액이 34.5%, 흑삼 농축액은 61.1%로 나타나 흑삼 농축액이 태극삼 농축액의 1.7배 이상의 활성을 나타내었다. 한편 $3.125 \times 10^{-3}\%$ 의 농도의 vitamine C는 1분 후 48.1%의 활성을 보였다. 이러한 결과는 5분 후에 73.7%의 DPPH 소거활성을 보인 본 실험 결과와 $1,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 30분 경과시 약 75%의 항산화활성을 나타낸 경우(27)와 매우 유사한 결과였다.

표 54. 반응시간에 따른 태극삼 및 흑삼 농축액의 DPPH radical scavenging activities

Ginseng extracts	Reaction time(min)					
	0	1	2	3	4	5
Taegeuk	0	34.5*	40.1	43.1	45.4	47.2
Black		61.1	68.1	71.3	72.8	73.7
Vitamine C**		48.1	48.0	47.8	47.8	47.8

자) 품질 안전성

태극삼 및 흑삼 농축액의 식품으로서의 안전성을 조사한 결과 잔류농약, 중금속, 세균수, 대장균군에 있어서 또 흑삼의 경우 benzo(α)pyrene 함량 등은 기준치내로 모두 적합 판정을 받았다(표 9, Fig. 6). PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons, 2개 이상의 벤젠고리를 가지고 있는 다환 방향족 탄화수소) 그룹에 속하는 benzo(α)pyrene은 300~600℃의 온도에서 불완전 연수 시 생성되어 유전독성과 발암성이 강한 것으로 알려져 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)는 그룹 1(발암물질)로 분류하였다. 본 실험에서 3중 3포 흑삼을 제조하여 농축액으로 제조했을 때 benzopyrene의 함량이 0.31 μg/kg으로 나타났다. Cho 등(42)이 보고한 내용에 의하면 뿌리의 경우 120℃에서 60분간 열처리 하면 benzopyrene량이 0.47 μg/kg에서 300분까지 열처리를 했을 때는 2.29 μg/kg로 증가하였고, 1회부터 9회까지 증삼·건조과정을 반복하여 흑삼을 제조했을 때 1회는 0.92, 3회는 1.20, 5회는 1.49, 7회는 1.97, 9회는 2.06 μg/kg로 나타났다고 보고하였으며 시판 흑삼의 경우도 2 μg/kg 이상이라고 보고하였다. 그러나 Cho 등(43)의 보고에 의하면 1~7회까지 증삼·건조하여 제조한 흑삼의 경우 약 0.08 μg/kg, 9회까지 증삼·건조하여 제조한 흑삼은 약 0.15 μg/kg로 매우 낮은 수준이라고 보고하였다. 또 4번 증삼·건조를 반복하여 제조한 흑삼의 동체와 미삼에 함유되어 있는 benzopyrene량은 동체가 0.1, 미삼이 약 0.4 μg/kg 정도였다고 보고하였다.

표 55. 태극삼 및 흑삼 농축액의 식품학적 위해요소 분석

항목	잔류농약 (ppm)	중금속(mg/kg)		세균수 (CFU/mL)	대장균군	Benzopyrene (μg/kg)
		납	카드뮴			
태극삼 농축액	불검출	0.1	0.0	170	음성	-
흑삼 농축액	불검출	0.0	0.0	70	음성	0.31

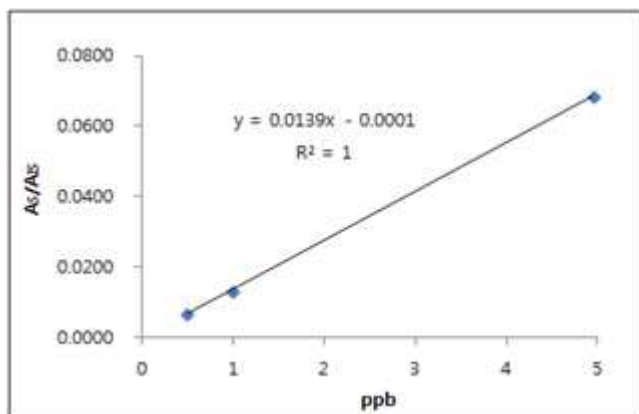


그림 238. Standard curve of benzopyrene.

차) 봉해도

태극삼 및 흑삼 농축액의 과립제품을 식품공전의 방법대로 봉해도를 조사한 결과 5분 이내 모두 봉해되어 기준치인 30분 이내 기준을 통과하여 적합한 것으로 나타났다.

타) 과립제조 및 과립의 품질분석 및 저장안정성

태극삼 및 흑삼 농축액 과립을 유동층 과립제조기를 이용하여 과립을 제조하고 HPMC를 1% 정도 코팅하여 그림 7과 같은 제품을 완성하였다. 태극삼 및 흑삼 농축액 과립의 자체 기준안을 만들고 이에 따른 품질을 분석한 결과는 표 10과 같이 일반식품의 품질 검사기준에 적합하게 나타났다. 그리고 가속시험을 포함한 품질안정성 조사를 실시한 결과 표 11과 같이 45일이 경과한 현재 온, 습도를 달리 하여도 밀폐된 용기에서는 응고현상(과립과 과립이 흡습 등에 의하여 엉겨 붙는 현상)이 나타나지 않았다. 그러나 온, 습도를 높이고, 개방된 병에 보관된 과립은 모두 10시간 이내에 응고현상이 나타났으나 냉장 보관이나 실온에서 개방한 상태로 보관하였을 경우 45일 경과 후에도 응고현상이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 대기의 습도가 높지 않는 조건이나 냉장상태의 습도가 매우 낮은 수준과 과립의 입자 크기가 작으면 작을수록 표면적이 크기에 따라 수분의 흡수량이 결정되기 때문이라고 사료된다.



흑삼 농축액 과립 태극삼 농축액 과립

그림 239. 흑삼 및 태극삼 농축액 과립의 외부 형상

표 56. 태극삼 및 흑삼 농축액 과립의 품질 분석 결과

항목	결 과		판정	기준안
	태극삼 농축액 과립	흑삼 농축액 과립		
성상	적합	적합	적합	
수분(%)	5.2	4.7	적합	7% 이하
일반세균(CFU/g)	-	-	적합	3,000 이하
대장균군	음성	음성	적합	음성
붕해도(분)	5	5	적합	30분 이내
입도(ϕ , mm)	1.2	1.2	적합	#16 표준체 통과량이 30% 이하일 것

표 57. 품질안정성 조사 결과(가속시험)

포장방법	가속시험 조건	밀폐유무	응고유무**	실온 경과 일수
갈색 유리병 20, 80, 100g 병입	1. 25℃, RH 75%, 10시간	밀폐	-	45
	2. 35℃, RH 80%, 10시간	밀폐	-	45
	3. 40℃, RH 75%, 10시간	밀폐	-	45
	4. 3℃, 냉장	밀폐	-	45
	5. 실온 보관(RH 40±5%)	밀폐	-	45
갈색 유리병 20, 80, 100g 병입	1. 25℃, RH 75%, 10시간	개방	+	45
	2. 35℃, RH 80%, 10시간	개방	+	45
	3. 40℃, RH 75%, 10시간	개방	+	45
	4. 3℃, 냉장	개방	-	45
	5. 실온 보관(RH 40±5%)	개방	-	45

* 각 1, 2, 3 조건의 시료는 10시간 처리 후 실온에서 보관

** - ; 비응고, + ; 응고

카) 장용성 태극삼 및 흑삼 농축액 과립 제조

장용성 제제는 제약학 분야에서는 약효성분이 위산에 의해서 분해되어 그 효력이 저하되거나 위점막을 강하게 자극하는 약품의 경우에 많이 이용되고 있다. 그러나 식품분야에서는 식품의 쓴맛이나 향미를 싫어하는 소비자나 제품의 색상이나 광택을 조정하여 상품성을 높인다든지 복용했을 때 위에 부담감을 준다든지 또는 거북함을 느끼는 소비자를 위해서는 장용성 제제로 제조하여 판매하고 있다. 장용성 제제는 pH 1.2 정도에서 2시간 이상 분해되지 않고 pH 5.6 이상에서 분해되어 장에서 소화, 흡수되어야 한다. 본 실험에서는 태극삼 및 흑삼 농축액을 과립제품으로 제조한 후 식품가공용 장용성 제품 제조에 필요한 첨가물인 Hydroxypropylmethyl cellulose Phthalate(HPMCP)를 0, 5, 10, 15 및 20%를 첨가하여 장용성 제품을 제조하였다. 이 장용성 제품의 품질 시험은 공식 품질검사 기관에 의뢰하여 분해도 등을 분석하고자 한다.

이 때 실제 코팅제인 HPMCP의 양은 표 12와 같다. 이 장용성 제품의 분해도 조사 결과는 표 13과 같이 HPMCP를 10% 까지 코팅하였을 때에도 약 30% 정도 분해가 일어났으나 15% 이상 코팅하였을 때에는 분해가 거의 일어나지 않아 태극삼, 흑삼 장용성 과립을 제조할 때에는 HPMCP를 15% 이상 코팅해야 된다는 것을 알 수 있었다(표 13, 14).

표 58. 장용성 제품의 HPMCP 실제 코팅량

장용성 제품	Enteric coating pellets test sheet(%)			
	HPMCP 5%	HPMCP 10%	HPMCP 15%	HPMCP 20%
흑삼	4.76*	9.29	13.90	18.46
태극삼	4.76	9.41	13.92	18.33

* The ratio of HPMCP of Enteric coating pellets product 100g

표 59 육안에 의한 장용성 제품의 분해도 시험 결과

장용성 제품	HPMCP 5%		HPMCP 10%		HPMCP 15%		HPMCP 20%	
	1액*	2액**	1액	2액	1액	2액	1액	2액
흑삼 물추출 농축액	+	+	+	+	-	+	-	+
태극삼 물추출 농축액	+	+	+	+	-	+	-	+

HPMCP : Hydroxy propyl methyl cellulose Phthalate

+ : 분해됨, - : 분해되지 않음

* NaCl 2.0 g에 묽은 염산 24 mL 및 물을 가하여 1 L로 한다. 이 액은 무색 투명하고 pH는 약 1.2이다 - 120분 동안 분해되지 않아야 함

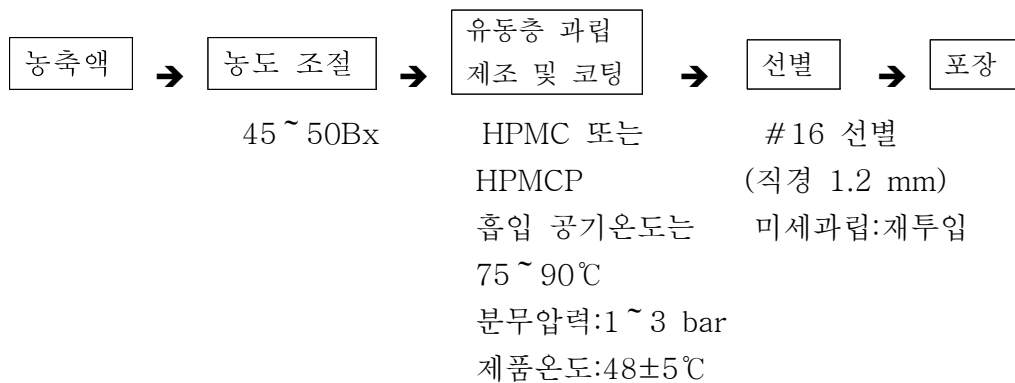
** 0.2N-KH₂PO₄ 용액 250 mL에 0.2N-NaOH 용액 118 mL 및 물을 가하여 1 L로 한다. 이 액은 무색 투명하고 그 pH는 약 6.8이다. - 60분 이내에 분해되어야 함

표 60. 태극삼 농축액 장용성 과립제품의 분해도

Coating amount of HPMCP(%)	Amount of pellet (mg/850 mL of disintegration solution I, pH 1.2)	Absorbance (500 nm) after disintegration for 120 min	Disintegrative ratio(%)
	0	0.000	0.0
	120	0.004	20.0
	240	0.008	40.0
	360	0.012	60.0
	480	0.016	80.0
	600	0.021	100.0
5		0.009	43.8
10		0.006	29.5
15		0.001	5.7
20		0.001	5.7

과) 과립 및 장용성 과립 제조 공정

과립(pellet) 제조 공정은 다음과 같다. 농축액의 농도는 정제수로 약 45~50Bx로 조정하고 유동층 과립기로 과립을 제조하고 흡습을 방지하기 위해서는 HPMC를 0.5~1.0% 정도 코팅을 한다. 장용성 제품은 HPMCP를 약 15% 이상 코팅하고 크기를 선별하여 포장한다. 이 때 실제로 HPMCP가 코팅되는 양은 다음 표 와 같다.



하) Thrombin time에 미치는 태극삼, 흑삼 물추출 농축액의 영향

혈액 응고의 공통인자인 thrombin 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해서 태극삼, 흑삼 물추출 농축액의 여러 가지 유기용매 분획물은 다음과 같이 제조하였다(그림 8). 그리고 80% EtOH 상정액 분획을 농축하고 다시 EtOH를 가하여 90% EtOH 불용성 분획, 99% EtOH 불용성 분획 및 99% EtOH 가용성 분획을 조제하여 Fig. 8과 같이 분획하고 각 분획의 thrombin time에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 15와 같다. 예비실험으로서 조사하였지만 Ethyl acetate 분획에서는 태극삼 농축액과 흑삼 농축액이 혈액응고 저해능이 거의 없었으며, 조사포닌 분획에서는 약간의 저해능이 있었으나 태극삼과 흑삼 농축액간에는 별 차이가 없었다. 또 조사포닌의 물세척 분획에서도 약간의 저해능이 있었으며 80% EtOH 침전분획에서는 희석을 하였지만 thrombin time에는 별 영향을 주지 못했으며, 90% EtOH insoluble 분획에서는 태극삼 농축액이 흑삼 농축액보다 혈액응고를 지연시켰다. 99% EtOH insoluble 분획과 99% EtOH soluble 분획에서는 흑삼 농축액이 태극삼 농축액보다 혈액응고 저해활성이 높게 나타났다. 향후에는 prothrombin time(PT)이나 activated partial thromboplastin time(APTT)을 조사하여 외인성 또는 내인성 혈액응고 인자에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

5 grams of Taegeuk and black ginseng water extract

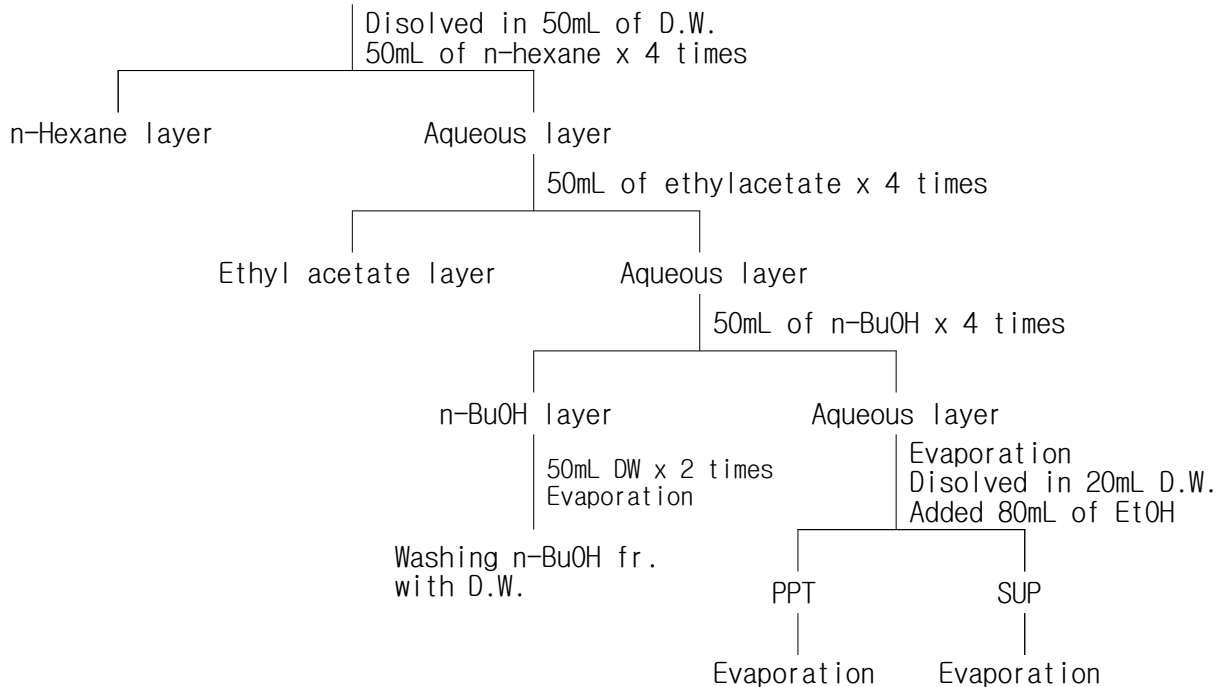


그림 240. Preparation of fractionations from Taegeuk and Black ginseng water extract by various organic solvents

표 61. 태극삼 및 흑삼 물추출물의 유기용매 분획물이 thrombin time에 미치는 영향

Fractions ¹⁾		Concentrations(Dilution fold)				
		1	2	3	5	10
Ethyl acetate	T	19.0± 0.2 ²⁾	- ³⁾	-	-	-
	B	21.1± 0.2	-	-	-	-
n- BuOH	T	73.0± 0.5	-	-	-	-
	B	76.2± 4.4	-	-	-	-
Water washing of n-BuOH fr.	T	35.3± 1.3	-	-	-	-
	B	41.8± 0.4	-	-	-	-
80% EtOH ppt	T	-	-	-	23.1± 0.4	-
	B	-	-	-	25.8± 0.7	-
90% EtOH insoluble	T	-	101.6± 4.3	62.9± 0.4	37.4± 0.9	-
	B	-	82.6± 2.5	36.8± 0.6	35.5± 1.1	-
99% EtOH insoluble	T	120.1± 1.6	-	-	28.0± 0.5	-
	B	258.4± 29.0	-	-	35.7± 0.4	-
99% EtOH soluble	T	59.1± 2.0	-	-	-	21.7± 0.7
	B	104.7± 10.8	-	-	-	21.9± 0.5

* Thrombin time of control : 19.3±0.1 sec.

¹⁾ Dissolved in 0.1M-phosphate buffer solution(pH 7.0).

²⁾ Each value is the means± SD of three times determinations.

T : Taegeuk ginseng water extract, B : Black ginseng water extract

Reaction mixture of 50 μ l of thrombin(0.5 NIH unit/mL), 50 μ l of 25 mM CaCl₂, and 50 μ l of sample solution was preincubated for 3 min at 37°C, and then 100 μ l of human plasma was added and detected clotting time.

³⁾ Not determined.

3. 태극삼, 흑삼의 제품의 개발

가) 제품개발

태극삼 및 흑삼 물추출 농축을 사용하여 다음과 같이 제품개발을 완료하였고 포장방법은 다양하게 하고자 한다.

- 태극삼, 흑삼 물추출 농축액 장용성 pellet 각 1개 제품
- 태극삼, 흑삼 물추출 농축액 pellet 각 1개 제품
- 태극삼, 흑삼 물추출 농축액 각 1개 제품
- 태극삼 물추출 농축액 분말 1개 제품
- 태극삼 함유 다기능 제품(5高 제품), 숙취해소 제품 각 1개 제품

인삼제품류	제품의 제형		계	포장방법
	과립제품(Pellet)	장용성 과립제품(Pellet)		
태극삼	1	1	2	병입포장, 스틱포장
흑삼	1	1	2	병입포장, 스틱포장
태극삼	물추출 농축액		1	병입포장
흑삼	물추출 농축액		1	병입포장
태극삼	물추출 농축액 분말		1	병입포장, 캡슐, 스틱 등
태극삼	다기능 제품(5高 제품)		1	과립, 타브렛
태극삼	숙취해소 제품		1	음료, 분말, 캡슐, 타브렛 등

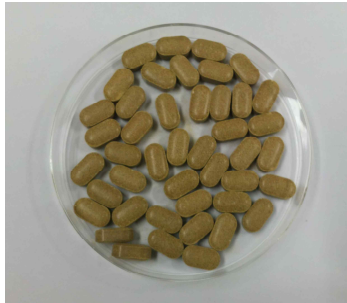
나) 태극삼 성분이 혼합된 복합제품 개발

태극삼이나 흑삼 단독으로 제품의 제형을 달리한 제품 개발과 더불어 태극삼 또는 흑삼 성분에 천연물이나 다른 성분을 혼합한 복합제품을 개발, 제품화하여 태극삼, 흑삼의 국내 매출과 국외 수출을 촉진하고자 한다.

(1) 태극삼 물추출 농축액이 함유된 다기능(五高) 제품 개발

- 혈압, 혈당, 혈행, 기억력, 항산화기능 - 과립 또는 타브렛 제조 방법(특허출원 예정)
- 배합성분
 - 태극삼 물추출물 분무건조 분말
 - 코엔자임 Q10 : 혈압조절, 항산화작용
 - 바나바잎추출물 : 혈당조절
 - 은행잎추출물 : 기억력 개선, 혈행개선
- 일일섭취량 : 1,000 mg(500 mg x 2정), 2회/일, 1정/회

상기와 같이 태극삼 물추출물 분무건조 분말을 기본 성분으로 하고 혈압조절과 항산화 작용의 기능이 인정된 코엔자임 Q10, 혈당조절 기능이 있는 바나바잎추출물, 그리고 기억력 개선, 혈행개선 기능이 인정된 은행잎추출물을 혼합한 다기능 제품을 개발하여 상품화를 시도하고자 하며 이와 관련된 내용은 특허출원을 하고자 한다(그림 9).



다기능(五高) 제품



태극삼 물추출 농축액 분말 캡셀 제품

그림 241. 다기능(五高) 제품과 태극삼 물추출 농축액 분말 캡셀 제품의 외관 모습

(2) 육계(계피) 및 태극삼(인삼류) 물 추출물이 함유된 숙취해소 제품 개발

2013년 사망원인통계(요약)에 의하면 사망자 수는 266,257명이며 간질환에 의한 사망원인 순위는 8위로 나타났다. 알코올 관련 사망자 수는 4,476명으로(1일 평균 12.3명) 전체 사망자의 1.68%로 나타났다. 남자가 여자보다 7.59배 높으며, 30세부터 급증하여 50대를 정점으로 감소하고 있다.

체내에 섭취된 알코올은 위(胃)에서 20%, 소장(小腸)에서 80% 체내로 흡수된다. 흡수되는 속도는 술의 종류에 따라 다르나 일반적으로 알코올 농도가 높을수록 빠르며, 특히 장이 비어 있는 공복 시에 빠르다. 위와 장에서 흡수된 알코올은 혈액을 따라 몸 전체로 퍼지게 되는데 도중에 간장을 통과하면서 분해된다. 간에 이르러 알코올은 먼저 아세트알데히드(acetaldehyde, CH_3CHO)로 바뀌고, 아세트알데히드는 아세트산(acetic acid, CH_3COOH)으로 분해돼 간 밖으로 배출되며, 체내를 돌며 이는 다시 물(H_2O)과 이산화탄소(CO_2)로 분해된다. 알코올은 소화과정 없이 흡수된 후 바로 대사된다. 체내에 흡수된 알코올은 90% 이상 98%까지 완전 산화되는데, 1 g당 7 kcal의 열량이 생성된다. 이 과정은 매우 빠르다. 산화되지 않은 2%, 대량 섭취한 경우라도 10% 미만의 알코올만이 호흡, 땀, 소화선 분비 및 소변 등을 통해 그대로 배설된다.

위와 소장을 통해 흡수된 알코올은 간에서 아세트알데히드(acetaldehyde)로 바뀌게 된다. 아세트알데히드는 독성물질이다. 이 분해과정에 관여하는 효소의 이름은 알코올탈수소효소(ADH:Alcohol dehydrogenase)와 미크로솜에타놀산화계효소(MEOS)다. 알코올탈수소효소(ADH)는 전체 알코올 처리의 약 80~90%를 담당하는 주력부대 격이며, 미크로솜에타놀산화계효소(MEOS)는 나머지 10~20%를 처리하는 보조부대 격이다. 여기에서 흥미

있는 사실은 ADH가 술에 강하고 약함에 관계없이 일정한 활성을 지닌데 비해 MEOS는 음주량이나 음주빈도에 따라 활성이 강화된다는 사실이다. 술에 약한 사람이 자주 술을 마심에 따라 점차 술에 강해지는 것은 바로 이 MEOS계통의 효소활성이 강해지기 때문이다. 최근 밝혀진 바에 따르면 MEOS가 생산되지 않거나 또는 그 양이 적은 사람이 있다고 하는데, 술을 전혀 마시지 못하는 것은 이와 관련이 있다.

ADH는 간장 이외에 위 점막에도 존재한다고 밝혀졌다. 위 점막 ADH의 활성은 간장 ADH에 비하여는 매우 낮다. 그러나 위 점막 ADH는 혈액으로 흡수되는 알코올의 양 즉 알코올의 생체 내 유용도를 저하시킨다. 이 위 점막 ADH 활성은 여자가 남자에 비해 낮으며 만성 알코올 중독자는 정상인의 반밖에 되지 않는다. 따라서 같은 양의 알코올을 섭취하더라도 여성과 알코올 중독자에서 혈중 알코올 농도는 높아 빨리 취할 수 있다. 또 위 절제술을 받은 사람은 위장에서의 대사과정이 없고 소장에서 빨리 흡수되므로 정상인보다 빨리 취한다. ADH와 MEOS에 의해 생성된 아세트알데히드는 인체에 해를 미치지 않는 초산으로 바뀌어 간장 밖으로 배출되는데 이 역할을 하는 효소가 아세트알데히드탈수소효소(ALDH)다.

간에서 분해과정을 거친 알코올(아세트알데히드)은 심장에서 대동맥을 거쳐 몸 구석구석으로 보내진다. 거미줄처럼 촘촘하게 짜여진 혈관을 거쳐 우리 몸 곳곳에 있는 근육이나 지방조직으로 스며들게 된다. 이 과정에서 알코올(아세트알데히드)은 혈관에 충격을 준다. 적당히 술을 마셨을 경우에는 이런 충격이 혈관을 확장시켜 피의 흐름을 도와주지만, 흡수한 알코올 양이 간의 능력을 초과해 미처 분해되지 못한 알코올과 아세트알데히드가 혈액을 타고 전신을 돌게 되면 인체의 여러 장기에 치명적인 해를 끼치게 되는 것이다.

아세트알데히드는 독성이 매우 강한 물질이다. 때문에 간은 ALDH(아세트알데히드탈수소효소)를 만들어 이것을 파괴한다. 그런데 아세트알데히드가 분해되지 않고 우리 몸에 독성을 내뿜게 되면 심각한 부작용이 생기게 된다. 분해되지 못한 아세트알데히드는 혈관을 타고 온 몸으로 퍼져나간다. 아세트알데히드에 의해 혈관이 확장되는데, 얼굴이 붉어지는 것도 그런 이유 때문이다. 아세트알데히드는 계속해서 미주신경, 교감신경 내의 구심성 신경 섬유를 자극해 구토, 어지럼증, 동공확대, 심장박동 및 가쁜 호흡 등 알코올 영향(숙취)을 유발하게 된다. 연구 결과에 따르면 아세트알데히드는 매우 독성이 강해 동물 실험의 경우 암을 일으키는 것으로 나타났다.

또 알코올은 간에서 분해되어 알데히드의 형태로 되며 이 알데히드는 뇌 속에서 신경전달 물질인 생체 아민의 작용을 변화시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 알데히드는 혈중 또는 뇌 조직 중의 알코올보다 훨씬 유독하며 이러한 알데히드의 제거는 일차적으로 숙취의 제거 효과가 있다. 이것은 알데히드가 뇌 속에서 신경전달 물질의 대사산화물과 반응하여 물핀 유사물질을 형성하며 현재까지 알려진 물핀 유사물질로는 tetrahydroisoquinoline, salsolinol, tetrahydroxypapaveroline 등이 있다. 이러한 물질들은 음로 인한 숙취나 알코올 중독을 유발하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 이들 물질을 형성하는 과정은 효소적 반응이 아닌 비효소적 반응으로서 알데히드와 생체아민의 대사물

이 축합반응을 하는 것으로 알려져 있다(55).

따라서 태극삼, 흑삼 등 인삼류와 alcohol dehydrogenase의 활성을 저해하여 aldehyde의 생성을 최소화할 수 있고 생성된 aldehyde는 빠른 시간에 대사시켜서 생체 내에 무해한 물질로 전환시킬 수 있는 천연물 소재를 선별하여 숙취해소에 도움이 되는 제품을 개발하고자 한다. 이와 관련하여 다음과 같이 특허 출원과 관련 전문 학술지에 논문을 투고하고자 한다. Alcohol dehydrogenase 저해활성과 acetaldehyde dehydrogenase 활성은 표와 같이 측정하였다.

표 62. Assay of alcohol dehydrogenase activity

Reagent	T(mL)	TC(mL)	C(mL)	CC(mL)
Distilled water	0.50	0.50	0.50	0.60
Buffer solution(0.1M-phosphate buffer, pH 7.0)	0.50	0.50	0.50	0.60
NAD ⁺ (6.25 mg/mL in buffer soln.)	0.15	0.15	0.15	0.15
Sample(extract)	0.10	0.10	-	-
Alcohol dehydrogenase(3 mg/mL buffer soln.)	0.10	-	0.10	-

Preincubation 30°C, 5 min ↓

Ethanol(99.9%)	0.15	0.15	0.15	0.15
----------------	------	------	------	------

Reaction 30°C, 5 min ↓

Cooling(반응정지, Ice water, 1~2°C)

↓

Absorbance at 340 nm

$$\text{Activity(\%)} = \{[(T-CC) - (T-TC)/C-CC]\} \times 100$$

T : 시료구의 흡광도, TC : 시료 대조구의 흡광도

C : 효소 반응구의 흡광도, CC : 시료 및 효소 반응 대도구의 흡광도

$$\text{Inhibitory activity(\%)} = \{1 - [(T-CC) - (T-TC)/C-CC]\} \times 100$$

T : 시료구의 흡광도, TC : 시료 대조구의 흡광도

C : 효소 반응구의 흡광도, CC : 시료 및 효소 반응 대도구의 흡광도

표 62. Assay of acetaldehyde dehydrogenase activity

Reagent	T(mL)	TC(mL)	C(mL)	CC(mL)
Distilled water	0.50	0.50	0.50	0.55
Buffer solution(1M-Tris-HCl, pH 8.0)	0.50	0.55	0.55	0.55
3M-KCl	0.10	0.10	0.10	0.10
0.33M-2-Mercaptoethanol	0.10	0.10	0.10	0.10
NAD ⁺ (20 mM, 6.75 mg/ml in buffer soln.)	0.10	0.10	0.10	0.10
Sample(extract)	0.05	0.05	-	-
Aldehyde dehydrogenase(2.5 mg/ml in buffer)	0.05	-	0.05	-

Preincubation 25°C, 5min ↓

Acetaldehyde(1.0M)	0.10	0.10	0.10	0.10
--------------------	------	------	------	------

Reaction 25°C, 5 min ↓

Ice water(반응정지, Ice water, 1~2°C)

↓

Absorbance at 340 nm

$$\text{Activity(\%)} = \{[(T-CC) - (T-TC)/C-CC]\} \times 100$$

T : 시료구의 흡광도, TC : 시료 대조구의 흡광도

C : 효소 반응구의 흡광도, CC : 시료 및 효소 반응 대도구의 흡광도

(3) 인삼류의 알코올 분해효소에 미치는 영향

인삼류(백삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼)를 5 g 취하여 100 mL의 정제수를 가하고 80°C에서 8시간 추출하여 여과한 뒤 alcohol dehydrogenase와 acetaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 백삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물 추출물은 alcohol dehydrogenase 활성에는 큰 영향을 미치지 않았다(표 63). 그러나 백삼, 태극삼, 홍삼, 흑삼 물 추출물은 acetaldehyde dehydrogenase 활성을 약 10% 정도 촉진시켰다(표 64).

표 63. 인삼류 물추출물이 alcohol dehydrogenase(ADH) 활성에 미치는 영향

천연물명	학 명	Activity on alcohol dehydrogenase(%)
백삼(White ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	103.8±2.3
태극삼(Taegeuksam, Semi red ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	98.5±1.8
홍삼(Red ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	103.8±2.2
흑삼(Black ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	98.1±2.0

표 64. 인삼류 물추출물이 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성에 미치는 영향

천연물명	학 명	Activity on aldehyde dehydrogenase(%)
백삼(White ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	111.3±2.2
태극삼(Taegeuksam, Semi red ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	110.7±1.9
홍삼(Red ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	107.2±2.2
흑삼(Black ginseng)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	109.6±1.7

육계(계피)를 5 g 취하여 100 mL의 정제수를 가하고 80°C에서 8시간 추출하여 여과한 뒤 추출액 양에 따른 alcohol dehydrogenase와 acetaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 계피 물추출물의 alcohol dehydrogenase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 계피 물추출액의 건조물량으로서 약 100 µg/1.5 mL의 반응 시스템에서 약 80% 정도 저해하였고 150 µg/1.5 mL의 농도에서 거의 100% 정도 저해하였다. 그러나 계피 물추출액 85 µg/1.5 mL의 반응시스템에서도 85% 정도의 활성을 나타내었다(그림 10, 11).

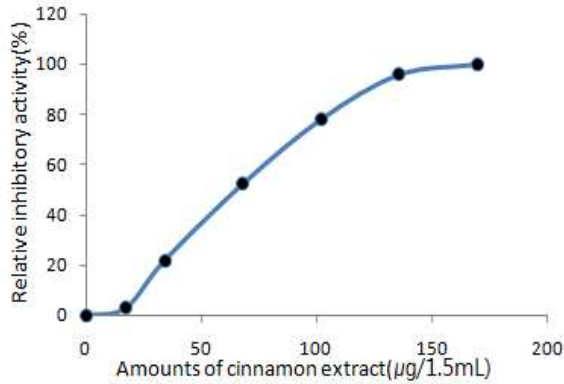


Fig. . Inhibitory effect of the amounts of cinnamon extract on alcohol dehydrogenase

그림 241. 육계(계피) 물추출물의 건조물량이 alcohol dehydrogenase 저해활성에 미치는 영향

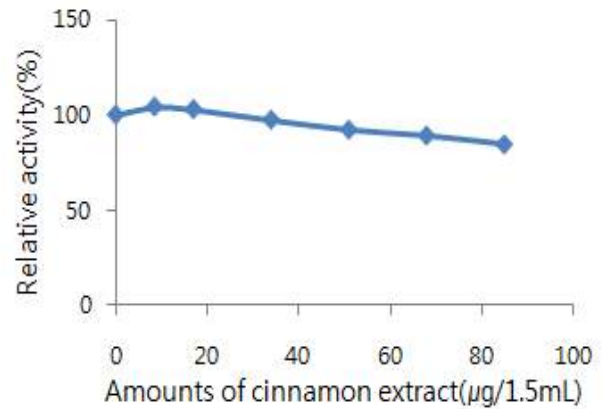


그림 242. 육계(계피) 물 추출물의 건조물량이 aldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 영향

계피 물추출물이 alcohol dehydrogenase의 활성을 매우 강하게 저해하기 때문에 계피 성분이 정제되지 않은 상태에서 저해 형태(inhibition type)를 조사한 결과는 12와 같다. 계피 물추출물 무첨가구와 건조물량으로서 51 μg/1.5 mL 정도가 첨가된 상태에서 alcohol dehydrogenase에 미치는 영향을 조사하여 Lineweaver-Burk plot 한 결과 비경쟁적 저해, 그 중에서 혼합형(mixed type)으로 나타났다. 여기에서 계피 물추출물 무첨가구의 K_m 치는 약 0.13%로 나타났고, 계피 물추출물 첨가구(51 μg/1.5 mL)에서의 K_m 치는 0.46%로 나타나 기질(alcohol) 친화력 측면에서 계피 성분은 전형적인 alcohol dehydrogenase의 저해물질로 확인이 되었다.

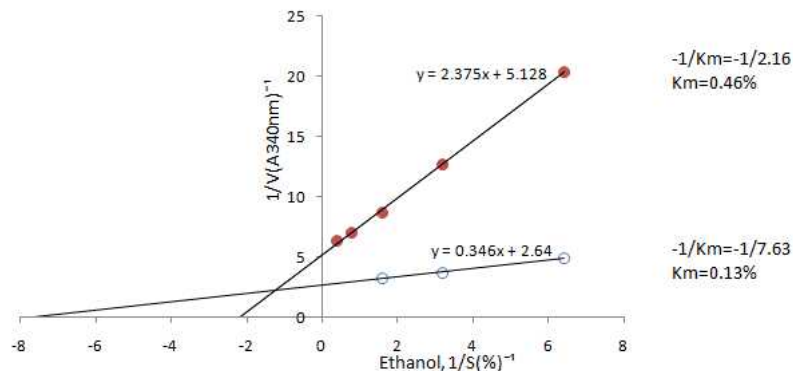


Fig. . Type of inhibition against alcohol dehydrogenase by Cinnamon water extract
 Lineweaver-Burk plots of ethanol concentration against activity of alcohol dehydrogenase in the presence and absence of cinnamon water extract
 ● : Presence of cinnamon extract(51μg/1.5mL)
 ○ : absence of cinnamon extract

그림 243. 육계 물추출물의 alcohol dehydrogenase에 대한

(4) 육계 부위별 alcohol dehydrogenase 활성에 미치는 영향

국내에 수입되는 육계(계피)는 거의 베트남에서 생산되는 것으로서 재배기간이나 육질(油細胞層의 두께가 45% 정도 이상은 YB1 등급, 베트남 YenBai 지방에서 생산된 계피에 대해서 등급을 정함-YB1~YB4의 등급으로 구분)의 두께 및 계피의 향에 따라 그 등급이 결정된다. 계피의 YB1~YB4 등급, 계지의 직경과 계피나무의 엽병의 물추출물이 alcohol dehydrogenase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. 계피의 등급이 우수할 수록 alcohol dehydrogenase 활성을 저해하는 정도가 큰 경향이었고 계지는 계피의 저해 활성에 비해서 3/1~1/2 정도에 불과하였다. 한편 엽병의 alcohol dehydrogenase 저해능은 계피의 1.2~1.6배, 계지의 3~3.7배 정도로 높았다(표65).

표 65. Effect of grades and parts of cinnamon on the activity of alcohol dehydrogenase, and the comparison of contents of cinnamaldehyde from various cinnamon parts

Grades and parts	Relative activity of alcohol dehydrogenase(%) (Inhibitory activity)	Contents of cinnamaldehyde(%)
Control	100.0±1.5(0.0)	
Cinnamon bark(cortex) YB1(1등급)	20.3±2.1(79.7)	
Cinnamon bark(cortex) YB2(2등급)	22.0±2.4(78.0)	
Cinnamon bark(cortex) YB3(3등급)	40.3±1.9(59.7)	
Cinnamon bark(cortex) YB4(4등급)	35.0±2.2(65.0)	2.42
Cinnamomi ramulus φ0.4~0.6cm(계지)	67.7±2.5(32.3)	
Cinnamomi ramulus φ0.2~0.4cm(계지)	73.7±1.7(26.3)	1.31
Cinnamomi petiole(엽병)	3.7±1.8(96.3)	2.85

각 시료(크기 : 0.5 cm 내외) 5 g에 100 mL의 정제수를 가하여 80℃에서 8시간 추출한 후 좀 더 정확한 저해율을 조사하기 위하여 2배 희석하여 0.1 mL를 반응액에 첨가하였음 (다른 실험에서는 희석하지 않고 첨가)

한편 계피와 계지 및 엽병에 함유되어 있는 cinnamaldehyde의 양을 HPLC를 사용하여 분석한 결과 alcohol dehydrogenase 저해활성과 아주 밀접한 연관관계가 있는 것을 알 수 있었다. 계피에는 약 2.4%, 계지에는 1.3%, 엽병에는 2.8%의 cinnamaldehyde가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 즉 cinnamaldehyde 함량이 높을수록 alcohol dehydrogenase 활성을 강하게 저해하는 경향이였다. 그리고 계피내에 함유되어 있는 cinnamaldehyde의 양의 분석방법과 조건 및 HPLC 패턴은 그림 244과 같다.

㉞ Cinnamaldehyde 분석방법 및 분석 결과

① 전처리 방법

육계를 균질하게 분쇄(50~100 mesh)하고 분말 약 1.0 g을 정밀하게 취하여 플라스크에 넣고 여기에 메탄올 50 mL를 넣어 1시간 동안 실온에서 초음파 추출한 다음 침전물을 여과하여 제거하고 여액에 메탄올을 넣어 정확하게 50 mL로 정용한 뒤 적절히 희석하여 Agilent 1200 series HPLC를 사용하여 분석하였다. 이 때 표준물질로 사용된 cinnamaldehyde(Sigma Co.)는 methanol에 0.005, 0.025, 0.05% 단위로 용해하여 사용하였다. 그 결과 cinnamaldehyde는 3분 30초 이후에 단일 peak로 나타났다. 그리고 계피나 계지에서는 나타나지 않지만 엽병에는 4분 30초 부근에서 미지의 물질이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

② 분석 조건

- 기기명 : Agilent 1200 series HPLC(UV 280 nm)

```

Injection
Injection Mode:                Standard injection
Injection Volume:              10.00 µL

Low Pressure Limit:            0.00 bar
High Pressure Limit:          400.00 bar
Flow:                          1.600 ml/min
Maximum Flow Gradient:        100.000 ml/min²
Primary Channel:               Automatic

Compress
Compressibility Mode:          Compressibility Value Set
Compressibility:               100 10e-6/bar

Stroke
Automatic Stroke Calculation:   Yes

Stop Time
Stoptime Mode:                 Time set
Stoptime:                      35.00 min

Post Time
Posttime Mode:                 Off

Timetable
Time Function      Parameter
-----
0.00 Change Solvent Com. Solvent composition A: 60.0 % B:40.0 %
                        C: 0.0 % D: 0.0 %
30.00Change Solvent Com. Solvent composition A: 20.0 % B:80.0 %
                        C: 0.0 % D: 0.0 %
35.00Change Solvent Com. Solvent composition A: 60.0 % B:40.0 %
                        C: 0.0 % D: 0.0 %

```

- 전개용매 A: Distilled water, B: Acetonitrile

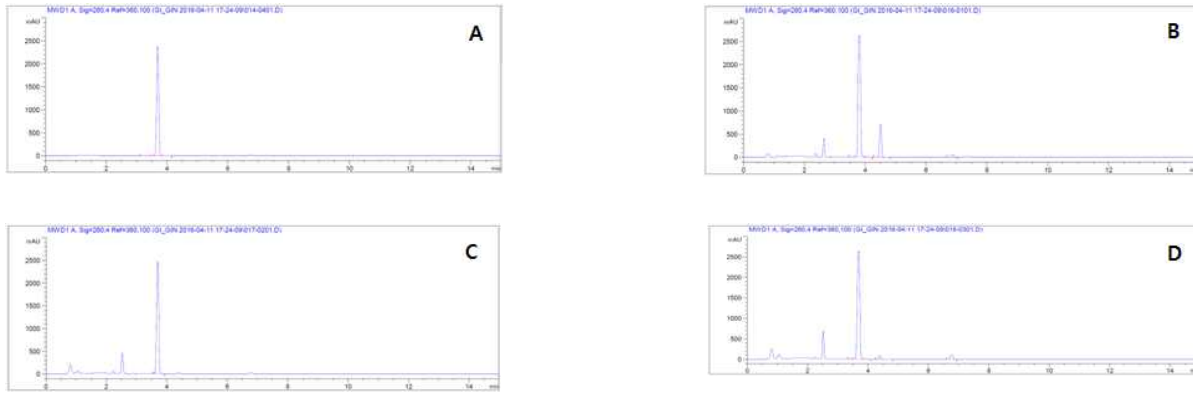


그림 244 . HPLC patterns of cinnamaldehyde standard, extracts from cinnamomi petiole,

cinnamomi ramulus and cinnamon bark

A; Cinnamaldehyde(0.025% in methanol), B; Cinnamomi petiole,

C; Cinnamomi ramulus ϕ 0.2~0.4 cm D; Cinnamon bark(cortex) YB4

(5) 태극삼과 복합시 알코올 분해효소의 활성화에 상승효과를 나타내는 천연물 검색

태극삼(백삼, 홍삼, 흑삼 등 포함) 추출물을 기본으로 하고 alcohol dehydrogenase 활성을 강하게 저해하는 계피 및 당귀 추출물과 acetaldehyde dehydrogenase 활성을 증가시키는 마늘, 바지락, 파래 물추출물의 양을 달리하여 10가지의 조성물을 제조한 뒤 alcohol dehydrogenase 저해활성과 acetaldehyde dehydrogenase 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 21과 같다. 1번 조성물은 약 83%, 10번 조성물은 94% 정도의 alcohol dehydrogenase 활성을 저해하였으나 그 외 조성물은 거의 100% 정도의 alcohol dehydrogenase 활성을 저해하였다. 그리고 이들 조성물이 acetaldehyde dehydrogenase 활성화에 미치는 영향은 파래 추출물이 함유된 혼합물에서 121% 정도의 활성을 나타내었고, 그 다음이 2번 조성물에서 약 119% 정도로 증가시키는 것으로 나타났다.

표 66. 천연물 물추출물의 혼합물들이 alcohol dehydrogenase 활성화에 미치는 영향

천연물 물 추출물	혼합 비율(mL)									
	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6	실시예 7	실시예 8	실시예 9	실시예 10
태극삼	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
육계	0.05	0.10	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.05	0.10	-
당귀	0.05	0.05	0.05	0.05	-	-	0.05	0.15	0.10	0.15
마늘	0.05	0.05	0.05	0.05	-	0.05	-	0.05	0.05	0.05
바지락	0.05	0.05	0.05	-	0.05	-	-	0.05	0.05	0.05
파래	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-
정제수	0.35	0.30	0.25	0.25	0.35	0.35	0.35	0.25	0.25	0.30
계	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
ADH(%)	16.7 ±1.8	0	0	0	0	0	0	0	0	5.8 ±1.2

* 육계성분이 함유된 예에서는 alcohol dehydrogenase활성이 거의 100% 저해되었음
당귀성분이 함유된 예에서도 약 94% 정도가 저해받았음

표 67. 천연물 물추출물의 혼합물들이 acetaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 영향

천연물 물 추출물	혼합 비율									
	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6	실시예 7	실시예 8	실시예 9	실시예 10
태극삼	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
육계	0.025	0.050	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.025	0.050	-
당귀	0.025	0.025	0.025	0.025	-	-	0.025	0.075	0.050	0.075
마늘	0.025	0.025	0.025	0.025	-	0.025	-	0.025	0.025	0.025
바지락	0.025	0.025	0.025	-	0.025	-	-	0.025	0.025	0.025
과래	-	-	-	0.025	-	-	-	-	-	-
정제수	0.375	0.350	0.325	0.325	0.375	0.375	0.375	0.325	0.325	0.350
계	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
ALDH(%)	111.1 ±1.8	118.8 ±1.5	115.4 ±2.1	121.1 ±1.4	113.8 ±1.1	101.3 ±0.8	89.1 ±2.1	72.4 ±2.8	96.6 ±1.7	75.1 ±2.4

* 과래성분이 함유된 예4에서 aldehyde dehydrogenase 활성이 높게 나타났음

- 관능(맛, 향취미) 측면에서 홍삼에 비해 우수하다는 것을 관능검사에 의해서 확인, 증명하고자 하며, 홍삼 농축액과 항산화 활성, 혈액응고 저해활성, 알콜 분해 및 저해 활성 등을 비교 조사하고자 함

* 매출 증대에 대한 추진예정 사항

견본 시제품을 제조하여 국내, 국외 거래처에 송부 및 평가 요청 예정

< 국외 거래처 >

1. 上海欧美药妆保健用品有限公司(중국)
2. 錦御兰(株)(중국)
3. J-E International(중국)
4. 화창토산
5. 上海文君食品有限公司(중국)
6. 富一金箔健品有限公司(홍콩)
7. SUNRISE HEALTH PRODUCTS INC(미국)
8. ROOT9 GINSENG INC(미국)

2) 시험제품의 *In vitro* 혈소판응집 억제능 조사

태극삼 물추출 농축분말을 0~20 mg의 농도로 첨가하여 collagen 및 ADP로 유도된 혈소판 응집 억제능을 조사한 결과는 그림 14와 같다. Collagen 및 ADP로 유도된 혈소판 응집을 모두 농도 의존적으로 억제했으며, Collagen 보다 ADP가 유도된 혈소판 응집 억제작용을 약간 더 강하게 나타내었다.

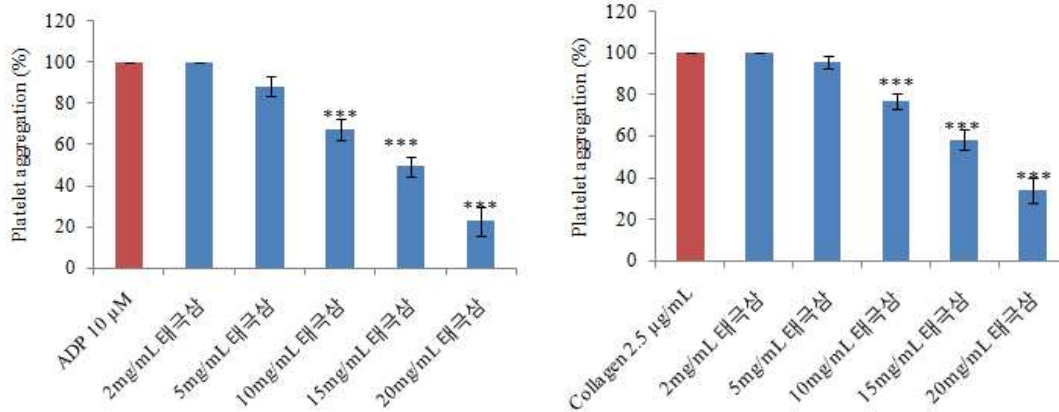


그림 245. 태극삼 농축액 분말의 농도가 ADP alc collagen으로 유도된 혈소판 응집에 미치는 영향

- Blood was collected from male SD rats and washed platelets were prepared.
- Platelet concentration was adjusted at 3×10^8 cells/mL using Tyrode's buffer and platelet aggregation test was performed using light transmission aggregometry.
- Briefly, platelets were pre-treated with different concentrations of taegeug ginseng water extract powder along with 1mM CaCl₂ following stimulation with Collagen (2.5 μg/ml) or ADP (10 μM).
- Taegeug ginseng water extract powder significantly inhibited platelet aggregation in a dose dependent manner(***) $p < 0.001$ versus control).

7절. 태극삼 농축액의 혈행개선 개별인정형 인정을 위한 동물시험 연구

태극삼 농축액은 현 건강기능식품법상 그 기능성이 면역력 증진과 피로개선으로 한정되어 있어서 혈행개선 기능성을 추가 또는 개별인정형 원료·성분 인정을 받고자 동물시험을 추진하고자 한다(표 68).

표 68. 동물시험 추진방법

시험기관	(주) 이비오
1. 시험동물 및 수	SD rat(male), 6-8마리
2. 시료(태극삼 농축액) 투여량 및 투여방법	10 mg/kg, 50 mg/kg, 500 mg/kg, 경구투여
3. 시료 투여 기간	4주
4. 시험방법	1. 혈소판 응집 억제효능 - 수컷 rat에서 혈액 채취 - 혈소판 부유액 제조 후 혈소판 응집 시료를 사용하여 8분간 응집속도 측정
	2. 혈액응고 억제효능 (<i>In vitro</i> 시험) - Rat에서 혈액 채취 - 시험물질 투여 - PT 및 APTT 측정 (<i>In vivo</i> 시험) - Rat에 용량별 시험물질 투여 - 30분 후 채혈 - PT 및 APTT 측정
	3. 경동맥 폐쇄 억제효능 - Rat에 용량별 시험물질 투여 - Rat 경동맥에 혈류측정기 장착 - 30분 후 FeCl3 적신 여과지를 동맥표면에 10분간 부착 - 60분간 혈류 기록 - 혈행정지 지연효과 보이는 용량 제시

동물시험 결과는 다음과 같이 전반적으로는 혈류개선 가능성이 인정되었다.(별첨)

가) 시험동물의 경동맥에 70% FeCl₃를 처리하여 폐색(혈전)이 일어나는 시간 측정에 의한 혈류개선 효과가 확인되었으며

나) ADP 및 Collagen이 유도된 혈소판 응집반응에서 농도 의존적으로 그 억제능이 확인되었으나

다) PT, APTT 측정에 의한 혈액응고 저해능에는 영향을 미치지 않았다.



시 험 명 : 태극삼추출물의 혈행개선 효능 평가

상기 시험의 보고서를 제출합니다.

2015년 9월 2일

시험 책임자	연구소장	서윤희
참여 연구원	책임연구원	송혜진
참여 연구원	연구원	장선형
참여 연구원	연구원	강아름
시험 감수인	이학박사	최수영

(주) 이 비 오 대표 오진근

요 약

태극삼추출물이 혈행개선에 도움이 되는지 확인하기 위하여 항혈전 시험, 혈소판 및 혈액응고 억제 시험을 수행하였다.

항혈전 시험은 시험동물의 경동맥에 70% FeCl₃를 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 혈전이 형성되는 시간은 혈류를 측정하여 평가하였다. 용매대조군(태극삼추출물 0mg/kg)에서 혈전 생성으로 혈관 폐색이 일어나는 시간은 9.2±5.7min이었고, 태극삼추출물 10mg/kg, 50mg/kg, 500mg/kg 투여군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간은 각각 37.5±6.2, 32.1±9.8, 35.4±7.1min으로 투여 농도와 상관없이 용매대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 지연되었다. 혈소판응고 억제 시험에서 ADP에 의한 혈소판의 응집률은 용매대조군에서 55.5±3.7%이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군투여군의 응집률은 53.9±3.6, 51.1±2.7, 51.6±2.4 %로 50mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 collagen에 의한 응집률은 용매대조군에서 61.3±6.0%이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군의 응집률은 각각 52.8±6.9, 49.9±7.1, 50.5±4.5%로 모든 시험물질 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다.

혈액응고 억제 시험에서 PT 및 aPTT는 시험물질 투여군과 용매대조군이 차이가 없었다.

위 결과로 보아 FeCl₃로 혈전을 유도하였을 때 태극삼추출물을 투여한 군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간이 지연되는 것은 시험물질이 항응고 보다는 항혈소판 응집에 더 효과가 있기 때문으로 생각되며, 농도 의존성 없이 태극삼추출물을 투여한 모든 시험군에서 유사한 혈관 폐색 지연과 혈소판 응집률을 보이는 것은 특정 임계값(threshold)를 넘어서면 혈행개선에 효과가 있기 때문으로 판단된다.

가. 시험방법

1) 항혈전 활성시험

시험물질 마지막 경구투여 45분 후에 Isoflurane(Piramal, PA, USA)로 흡입마취하고 목을 절개하여 경동맥을 노출시킨다. 시험물질 투여 60분후에 70% FeCl₃를 적신 2mm²의 Whatman No.1 filter paper를 경동맥에 올려놓고 혈류측정기(Omegawave, Tokyo, Japan)를 이용하여 혈류를 측정하였다. 10분후 Whatman filter paper를 제거하고 30분 동안(총 40분) 혈류량을 기록하였다. 처음 혈류량의 10%가 되었을 때를 경동맥 폐색이 일어난 것으로 판단하였다.

2) 혈소판 응집 억제 및 혈액 응고 억제 시험

가) *in vitro* 혈액 응고 억제 시험

시험관에서 시험물질의 혈액 응고 억제 효능을 평가하기 위하여 prothrombin time(PT)과 plasma-activated partial thromboplastin time(aPTT)을 자동혈액응고분석기 ACL100(Instrumentation Laboratory, Milano, Italy)로 측정하였다.

시험에 사용된 시료는 액상형태의 추출물로 고형분의 함량을 알 수 없어 시험에 사용할 수 있는 최대 부피를 최고 농도로 하여 용량을 설정 하였다.

시험동물의 복대정맥에서 혈액 9ml 채취하고 항응고제 3.8% Sodium citrate 1ml을 처리하고 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장과 시료를 섞어 37℃에서 7분간 incubation하여 혈장 50 μ l에 PT reagent(RecombiPlasTin 2G, Instrumentation Laboratory) 100 μ l을 섞어 응고까지의 시간을 측정하였다. aPTT 또한 혈장과 시료를 섞어 37℃에서 7분간 incubation하여 혈장 50 μ l에 aPTT reagent(SynthASil, Instrumentation Laboratory) 53 μ l를 첨가한 후 CaCl₂ 50 μ l를 넣어 응고까지의 시간을 측정하였다.

나) *ex vivo*

(1) PRP 및 PPP 준비

시험물질 경구투여 1시간 후에 시험동물의 복대정맥에서 혈액 9ml을 채취하고 항응고제 3.8% Sodium citrate 1ml을 처리하였다. 950rpm으로 10분간 원심분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 분리하고, 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP는 혈구계수기(MELET SCHLOESING Laboratories, Osny, France)를 이용하여 혈소판의 수를 계수하고 PPP로 3.8×10^8 /ml가 되도록 희석하였다.

(2) 혈소판 응집률 측정

혈소판 응집은 Chrono-Log aggregometer(Chrono-Log, Havertown, USA)를 사용하여 측정하였다. 정량된 혈소판을 cuvette에 넣고 37°C에서 10분간 incubation한 후 1200rpm으로 교반하면서 baseline이 안정화 되면 혈소판 응집촉진물질인 adenosine diphosphate(AP)와 Collagen을 넣고 반응하여 10분간 응집률을 측정하였다.

(3) 혈액 응고 측정

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

나. 자료의 통계처리

모든 자료들은 SPSS program (SPSS INC,ver.21.0)을 이용하여 통계해석을 실시하였다. One-way analysis of variation(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 용매대조군 (vehicle)과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test를 실시하였다(유의 수준 양측 5%).

2. 결과

가. 항혈전 활성시험

1) 시험기간 중 체중

시험기간 중 용매대조군(0)과 시험물질을 투여한 시험동물의 체중은 차이를 보이지 않았다.

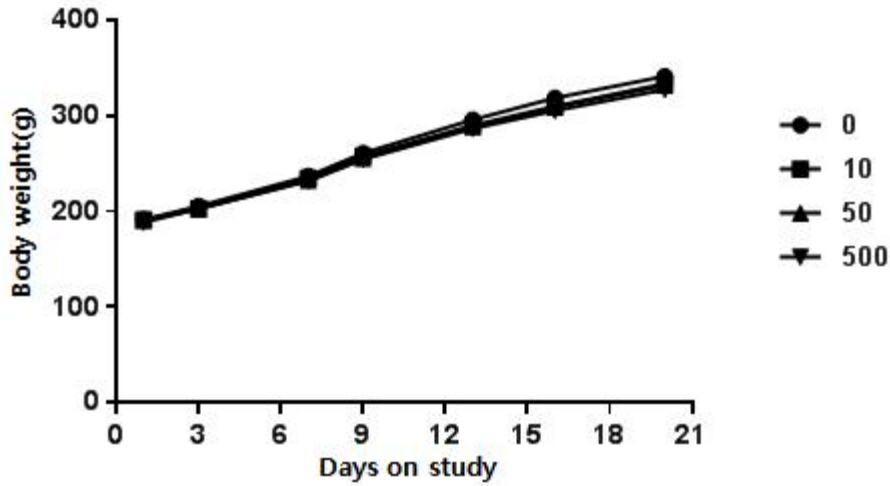


Figure 246. Body weight of SD Rat on FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model.

n=6

Table 69. Body weight of SD Rats on FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model.

(g)

Dose (mg/kg)	Taegeuk ginseng concentrate			
	0	10	50	500
Day 1	191.5 ± 9.4	191.0 ± 5.9	190.3 ± 7.5	190.3 ± 7.5
3	205.5 ± 9.2	202.9 ± 7.0	202.8 ± 9.6	202.8 ± 9.6
7	236.9 ± 9.3	234.9 ± 7.5	232.5 ± 12.2	232.5 ± 12.2
9	260.8 ± 11.8	258.0 ± 7.5	255.3 ± 12.7	255.3 ± 12.7
13	295.8 ± 13.6	289.8 ± 9.3	288.4 ± 14.6	288.4 ± 14.6
16	318.5 ± 17.5	310.0 ± 10.0	308.9 ± 18.0	308.9 ± 18.0
20	341.0 ± 19.5	333.6 ± 12.3	331.4 ± 21.3	331.4 ± 21.3

The values are mean±SE, n=6

2) 항혈전 활성 시험

태극삼추출물을 시험동물에 21일간 경구투여 후 경동맥에 70% FeCl₃를 10분간 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 시험물질이 혈류의 흐름에 미치는 영향을 40분 동안 평가하였다. 혈관 폐색이 일어나는 기준은 FeCl₃를 처리하기 전 혈류량을 기준으로 10%이하가 되는 시간을 기준으로 하였다. 용매대조군(0)의 혈관 폐색이 일어나는 시간은 9.2±5.7 min이었고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군에서는 각각 37.5±6.2, 32.1±9.8, 35.4±7.1 min으로 혈관 폐색 시간이 지연되었으며 통계적인 유의성을 보였다 (Figure 2, 3, Table 2).

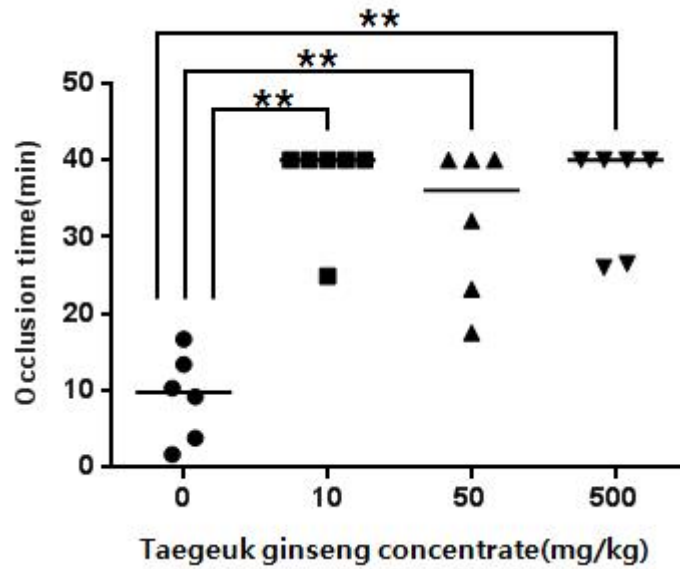


Figure 247. *in vivo* antithrombotic effect of Taegeuk ginseng concentrate

The time to vessel occlusion are reported and the median times calculated. n=6, Significant difference from Vehicle(0) by Dunnet's t-test : ** $p < 0.01$.

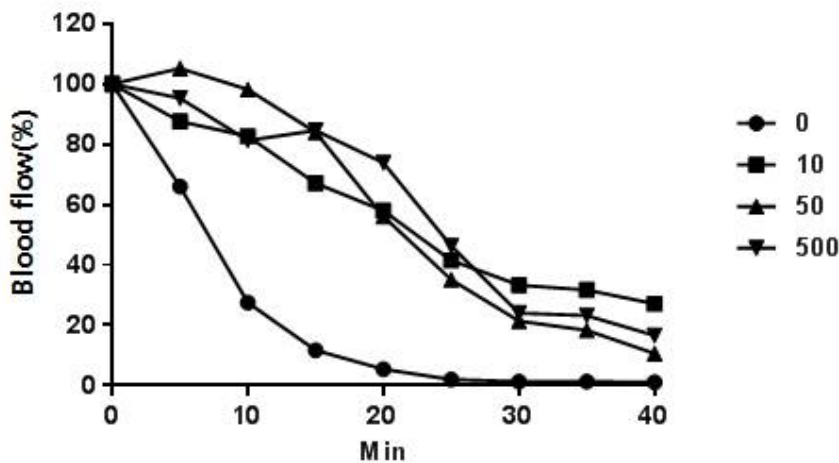


Figure 248. Time-course of carotid arterial blood flow.

Table 70. *in vivo* antithrombotic effect of Taegeuk ginseng concentrate. (min)

Dose (mg/kg)	Taegeuk ginseng concentrate			
	0	10	50	500
Occlusion time(min)	9.2±5.7	37.5±6.2**	32.1±9.8**	35.4±7.1**

The values are mean±SE

n=6, Significant difference from Vehicle(0) by Dunnet's t-test : ** $p < 0.01$.

나. 혈소판 응집 억제 및 혈액 응고 억제 시험

다.

1) 시험기간 중 체중

시험기간 중 용매대조군(0)과 시험물질을 투여한 시험동물의 체중은 차이를 보이지 않았다.

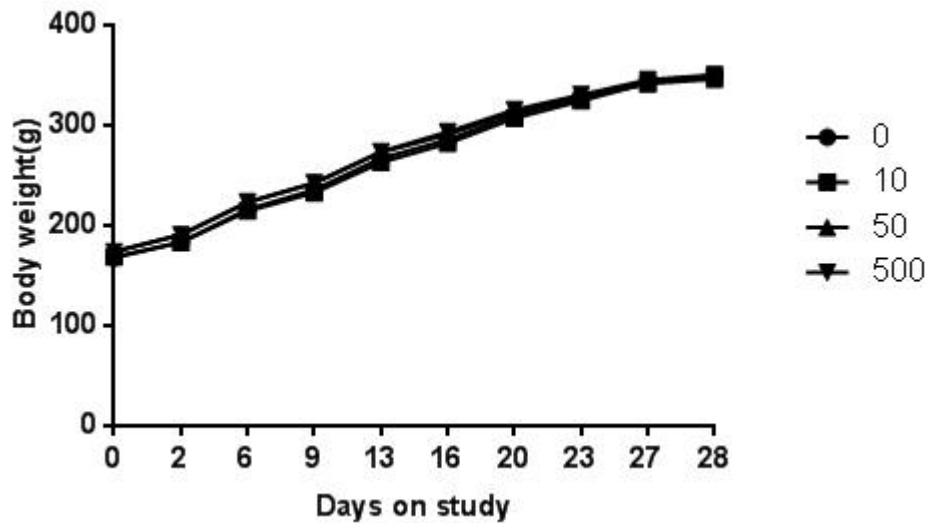


Figure 249. Body weight of SD Rats on platelet aggregation and blood coagulation.

n=8

Table 71. Body weight of SD Rats on platelet aggregation and blood coagulation.

(g)

Dose (mg/kg)	Taegeuk ginseng concentrate				
	0	10	50	500	
Day	0	167.8 ± 6.6	168.8 ± 8.3	174.1 ± 8.6	174.0 ± 8.5
	2	183.4 ± 7.8	183.2 ± 8.5	190.8 ± 9.5	190.9 ± 9.9
	6	216.1 ± 7.0	214.4 ± 11.4	223.1 ± 10.3	223.4 ± 11.2
	9	235.7 ± 7.7	232.8 ± 11.8	242.5 ± 12.2	242.6 ± 11.8
	13	267.1 ± 10.2	263.1 ± 14.2	273.1 ± 14.3	274.0 ± 13.4
	16	285.4 ± 11.7	282.3 ± 14.8	290.8 ± 14.4	293.7 ± 14.5
	20	310.7 ± 11.3	307.3 ± 18.4	313.2 ± 15.8	315.6 ± 15.8
	23	327.4 ± 12.4	324.6 ± 20.5	327.2 ± 18.8	330.5 ± 19.3
	27	344.6 ± 12.6	342.6 ± 22.1	341.8 ± 20.7	345.6 ± 21.5
	28	349.6 ± 13.3	348.9 ± 22.0	346.1 ± 21.3	350.6 ± 22.1

The values are mean±SE, n=8

2) 혈소판 응집 억제 시험

태극삼추출물을 시험동물에 28일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈소판을 분리하여 agonist인 ADP와 Collagen으로 반응하여 혈소판 응집률을 aggregometer로 측정하였다. 용매대조군의 ADP에 대한 응집률은 $55.5 \pm 3.7\%$ 이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군 투여군의 응집률은 53.9 ± 3.6 , 51.1 ± 2.7 , 51.6 ± 2.4 %로 50mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 용매대조군의 Collagen에 대한 응집률은 $61.3 \pm 6.0\%$ 이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군의 응집률은 각각 52.8 ± 6.9 , 49.9 ± 7.1 , $50.5 \pm 4.5\%$ 로 모든 시험물질 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다.

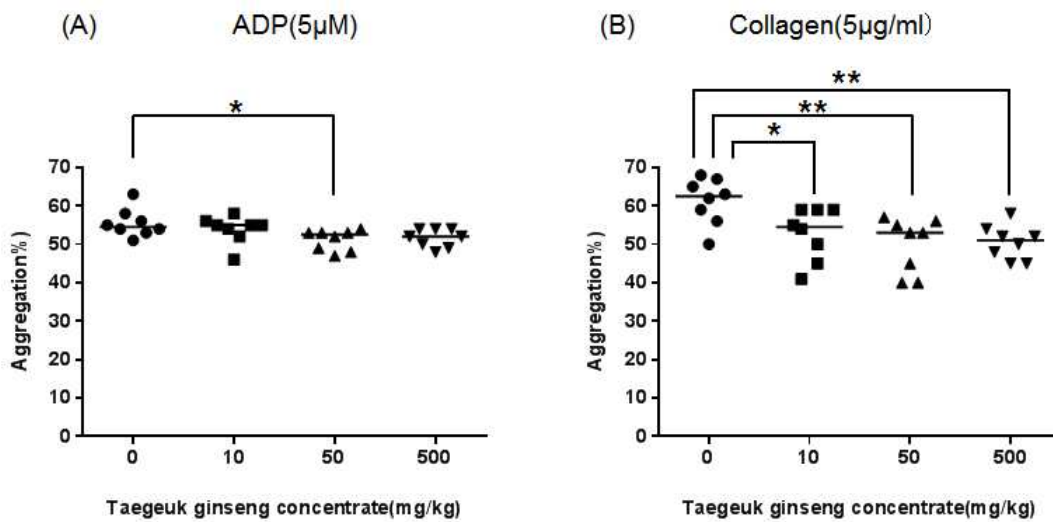


Figure 250. *ex vivo* antiplatelet effect of Taegeuk ginseng concentrate. Platelet aggregation was induced by ADP(5µM) (A) and Collagen(5µg/ml) (B).

The aggregation rates of platelet are reported and the median calculated.

Table 72. *ex vivo* antiplatelet effect of Taegeuk ginseng concentrate. (%)

Dose (mg/kg)	Taegeuk ginseng concentrate			
	0	10	50	500
ADP	55.5 ± 3.7	53.9 ± 3.6	$51.1 \pm 2.7^*$	51.6 ± 2.4
Collagen	61.3 ± 6.0	$52.8 \pm 6.9^*$	$49.9 \pm 7.1^{**}$	$50.5 \pm 4.5^{**}$

3) 혈액응고 억제 시험

시험동물에서 PPP를 분리하여 태극삼추출물과 반응시켜 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)를 측정하였다. 모든 농도군에서 용매대조군(0)과 차이를 보이지 않았다(Table 5).

태극삼추출물을 시험동물에 28일간 경구투여 후 채취한 혈액에서 혈장을 분리하여 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)를 측정하여 시험물질이 혈액응고에 미치는 영향을 평가하였다. 용매대조군의 PT는 9.7 ± 0.7 sec이고 모든 시험물질 투여군에서 유의성이 없었다. aPTT 또한 용대조군과 차이가 없었다(Figure, Table).

Table 73. *in vitro* anticoagulation effect of Taegeuk ginseng concentrate. (sec)

Dose (%)	Taegeuk ginseng concentrate			
	0	0.1	0.5	1.0
PT	9.5 ± 0.1	9.7 ± 0.1	9.3 ± 0.0	9.2 ± 0.1
aPTT	42.6 ± 1.3	44.4 ± 3.4	43.0 ± 3.7	46.2 ± 5.9

n=2

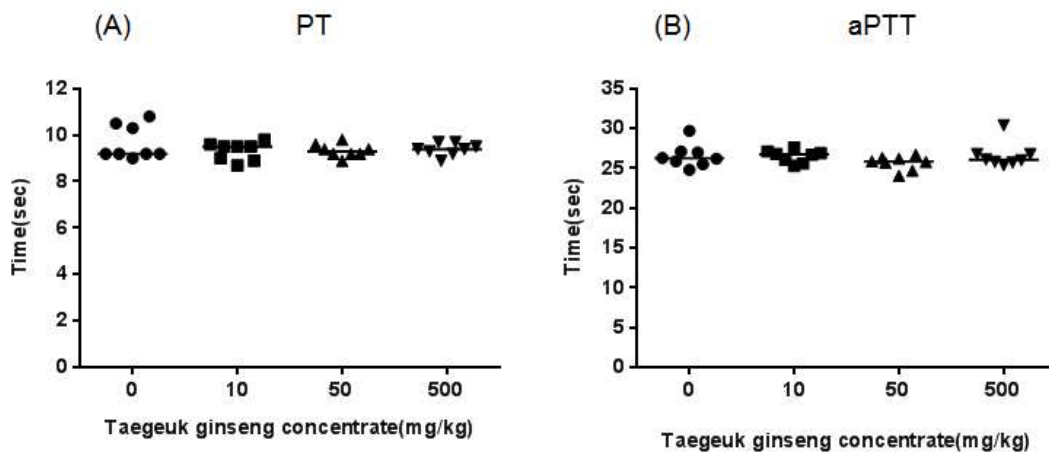


Figure 251. *ex vivo* anticoagulation effect of Taegeuk ginseng concentrate.

The coagulation times are reported and the median calculated. n=8.

Table 74. *ex vivo* anticoagulation effect of Taegeuk ginseng concentrate. (sec)

Dose (mg/kg)	Taegeuk ginseng concentrate			
	0	10	50	500
PT	9.7 ± 0.7	9.3 ± 0.4	9.3 ± 0.3	9.4 ± 0.3
aPTT	26.6 ± 1.5	26.5 ± 0.8	25.7 ± 0.9	26.6 ± 1.6

The values are mean±SE, n=8

3. 결론

태극삼추출물이 혈행개선에 도움이 되는지 확인하기 위하여 항혈전 시험, 혈소판 및 혈액응고 억제 시험을 수행하였다. 항혈전 시험은 시험동물의 경동맥에 70% FeCl₃를 처리하여 인위적으로 혈전을 유발하고 혈전이 형성되는 시간은 혈류를 측정하여 평가하였다. 용매대조군(태극삼추출물 0mg/kg)에서 혈전 생성으로 혈관 폐색이 일어나는 시간은 9.2 ± 5.7 min이었고, 태극삼추출물 10mg/kg, 50mg/kg, 500mg/kg 투여군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간은 각각 37.5 ± 6.2 , 32.1 ± 9.8 , 35.4 ± 7.1 min으로 투여 농도와 상관없이 용매대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 지연되었다. 혈소판응고 억제 시험에서 ADP에 의한 혈소판의 응집률은 용매대조군에서 $55.5 \pm 3.7\%$ 이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군투여군의 응집률은 53.9 ± 3.6 , 51.1 ± 2.7 , 51.6 ± 2.4 %로 50mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 collagen에 의한 응집률은 용매대조군에서 $61.3 \pm 6.0\%$ 이고 시험물질 10, 50, 500mg/kg 투여군의 응집률은 각각 52.8 ± 6.9 , 49.9 ± 7.1 , $50.5 \pm 4.5\%$ 로 모든 시험물질 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다. 혈액응고 억제 시험에서 PT 및 aPTT는 시험물질 투여군과 용매대조군이 차이가 없었다. 위 결과로 보아 FeCl₃로 혈전을 유도하였을 때 태극삼추출물을 투여한 군에서 혈관 폐색이 일어나는 시간이 지연되는 것은 시험물질이 항응고 보다는 항혈소판 응집에 더 효과가 있기 때문으로 생각되며, 농도 의존성 없이 태극삼추출물을 투여한 모든 시험군에서 유사한 혈관 폐색 지연과 혈소판 응집률을 보이는 것은 특정 임계값(threshold)를 넘어서면 혈행개선에 효과가 있기 때문으로 판단된다.

8절. 태극삼 농축액의 혈행개선 개별인정형 인정을 위한 인체적용시험

혈행개선 기능성을 확보하기 위한 태극삼 농축액의 인체적용시험은 동물시험 결과가 도출되면 CRO기관과 협의하여 추진하고자 한다.

가) 태극삼 농축액의 혈행개선 개별인정형 인정(기능성 추가)을 위한 인체적용시험

- 연구용역 계약 : 2015. 07. 01

경희대학교 동서의대학원 의학영양학과 임현정 교수

시험기관 : 경희대학교 한방병원 한의학임상시험센터

- 제목 : 건강한 성인의 태극삼 추출물 섭취가 혈행 개선에 미치는 유효성을 평가하기 위한 인체적용 시험

- 시험 방법 : 혈소판 응집 억제효능, 혈액응고 억제효능

- 분석

1차 유효성평가

- 혈행관련검사 : 혈소판응집능, 프로트롬빈시간(PT), 활성화부분트롬보플라스틴시간(aPTT), 트롬복산 B₂(TxB₂), 트롬복산 A₂ (TxA₂), 세로토닌 (Serotonine), 혈액응고검사, 혈장피브리노겐, 혈소판수(PLT)

2차 유효성평가

- 지질관련검사 : 총콜레스테롤(TC), 저밀도콜레스테롤(LDL), 고밀도콜레스테롤(HDL), 중성지방(TG)
- 고농도군, 저농도군, 위약군 각 30명씩, 8주 복용

나) 태극삼 물추출 농축액의 분무 건조 및 캡셀 충전

인체적용시험에 사용될 시제품의 제조와 관련하여 태극삼 물추출 농축액의 분무건조는 다음과 같이 제조하였다.

(1) 고농도 군

- 태극삼 농축액 100%(73Bx) 9 kg

(2) 저농도 군

- 태극삼 농축액 100%(73Bx) 4.5 kg
- 말토 텍스트린(씨제이제일제당, DEX150, DE16.7) 3.0 kg
- Caramel 색소{(보락, Bolak)텍스트린 73.3%, 카라멜색소 26.7%} 28 g
- 홍삼향(식용, 한불화농, 허브향 LE1-0062) 20 mL
- Bitter flavour(식용, 81B015 Food grade, France) 54 mL

(3) 위약군

- 말토 텍스트린(씨제이제일제당, DEX150, DE16.7) 6.0 kg

- Caramel 색소{(보락, Bolak)텍스트린 73.3%, 카라멜색소 26.7%} 56 g
- 홍삼향(식용, 한불화농, 허브향 LE1-0062) 40 mL
- Bitter flavour(식용, 81B015 Food grade, France) 108 mL

위의 3군을 각각 정제수를 끓인 후 80℃ 정도로 식혀서 각 성분을 용해하고 50℃ 정도를 유지하면서 분무건조 한다. 이때 분무건조기내의 온도는 약 120℃ 정도이다. 각 군의 분무건조 수율은 고형분 기준으로 고농도군은 97.4%, 저농도군은 94.5%, 위약군은 약 100%이다. 이렇게 제조된 시제품 분말을 400 mg 불투명 적색 캡셀에 충전하였다(표 24).

표 75. 인체적용시험관련 시제품의 성분함량 (성분함량/1캡셀 400 mg 기준)

구분	고농도군		저농도군		위약군	
	mg	%	mg	%	mg	%
태극삼 물추출 분말	400.00	100.00	200.00	50.00		
Ginsenoside-R-b1	(2.79)	(0.70)	(1.58)	(0.40)		
Ginsenoside-R-g1	(0.96)	(0.24)	(0.54)	(0.14)		
말토 Dextrin			198.2	49.55	396.30	99.08
Caramel 색소			1.80	0.45	3.70	0.92
홍삼향			0.00134	0.0003	0.00267	0.00067
Bitter flavour			0.00360	0.0009	0.00720	0.0018
합계	400.00	100.00	400.00	100.00	400.00	100.00

* 봉해도 시험 : 적합(20분 이내 봉해되었음)

- 포장방법 : 플라스틱 병포장, 150 capsules/병, 204 병(34 명 x 2 개월 x 3 시험구)
- 복용방법

인체적용시험 피험자는 하루에 5 캡셀 복용(1일 분무건조 분말 2 g 복용 기준, 400 mg x 5 캡셀 = 2 g): 아침에 2 캡셀, 저녁에 3 캡셀

* 시험제품 제조 완료 : 2015. 12. 29

- IRB 심의 : 2015. 12. 28
- IRB 승인 : 2016. 01. 26
- 피험자가 복용할 시험제품 전달 : 2016. 03. 15
(경희대학교 한방병원 한의학임상시험센터 박소연)

* 피험자가 복용할 시험제품의 병 라벨과 피험자 모집 홍보물은 다음과 같다.

인체적용시험용

코드명 : KG_TG R006 제품명 : 태극삼 추출물 또는 위약
 제조번호 : 시-1 제조업자 : 고려인삼제조(주)
 유효기간 : 2년
 저장방법 : 습기가 적고, 직사광선을 받지 않는 실온 보관
 섭취방법 : 1일 2회 (2캡슐, 3캡슐) 총 5캡슐,
 식후 30분, 물과 함께 섭취

인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음

Product No. : R2020_KG
 Version No. : 1.1

시험 대상자 모집

건강한 성인의 태극삼 추출물의 섭취가 열형 개선에 미치는 유효성을 평가하기 위한 인체적용 시험

신청 요건

- ① 연령 : 만 20세 이상 ~ 69세 이하의 건강한 성인
- ② 본 인체적용시험에 참여할 것을 동의하고 서면동의서에 자의로 서명한 자

제외 대상

- ① 약물을 복용하고 있는 고혈압 환자 또는 당뇨진단을 받고 약을 복용하고 있는 당뇨병자
- ② 이상지질혈증 진단 및 약물 치료를 받고 복용하고 있는 경우
- ③ 심장, 신장, 간, 갑상선, 뇌혈관 질환이 있는 자
- ④ 임신, 수유기, 임신중, 임신예정인 등 혈소판 응집에 영향을 주는 건강기능식품 또는 마스틱인과 같은 약물을 복용하는 경우

시험 일정

- * 태극삼, 태극삼 고품질 또는 저품질 성분으로 무작위 배정, 8주간 시험제품 섭취
- * 모든 대상자에게 제공되는 식사, 혈압계산 관련 혈액검사, 식습관조사, 식서양 조사 제공
- * 8주간 고려인삼연구소(충청남도당진시)에서 진행예정
- (66-9) 본 소로 방문, 연구실에서 조정의 시행비가 지급됩니다.

연구책임자

책임 연구자 : 고려대학교 한방병리 상재제일과 이 위주 교수
 공동 연구자 : 고려대학교 의생명과학과 교수 / 임상영양연구소 소장 임 현정 교수

참여 문의 및 담당자 : 고려대학교 임상영양연구소 정민정 (02-33597171, 02-33598276)

당첨자에게 알려주는 국립자료서, 윤리위원 윤락나 국하의 윤리에 대한 설명장이 있으면 다음의 연락처로 바로 문의하실 수 있습니다. 임상시험심사위원회 연구윤리담당자 윤락나 (02-6200-8899)



다) 국제임상시험(진안홍삼연구소)을 위한 시료의 종류와 배합비율은 표 25와 같다.

- 1) 진안홍삼연구소 : 수삼 구입 및 홍삼, 태극삼, 흑삼 제조 후 분쇄
- 2) 고려인삼제조(주) : 홍삼, 태극삼, 흑삼 분말 및 위약군 각 20 kg 과립 제조 후 스틱 포장(2.5 g/스틱), 60스틱 포장용 지함 포장 후 진안홍삼연구소 송부

홍삼 과립 : 2.5 g 스틱 제품 8,640개, 60개 스틱 지함 144 box

태극삼 과립 : 2.5 g 스틱 제품 7,080개, 60개 스틱 지함 118 box

흑삼 과립 : 2.5 g 스틱 제품 8,520개, 60개 스틱 지함 142 box

위약 과립 : 2.5 g 스틱 제품 6,000개, 60개 스틱 지함 100 box

표 25. 위약 제조 원료배합 비율

원재료명	규격	배합비율(%)	테스트(kg)	비고
전분		69.88	20	
남영브라운칼라C-3285	4% 용액			용액
비트프레바				
인삼향 분말(남영F&C)				
합계		100.00		

· 혼합 및 용해 ➡ 과립화 ➡ 건조 ➡ 사별(20~30 mesh), 수분함량 10% 이하

* 흑삼 및 흑삼제품 관련 참고사항[국내제품]

- 식약처에서 고려인삼연구(주)에서 제조한 흑삼 제품인 흑삼농축액과 고려흑삼분말골드에 대해서 홍삼제품과 같은 기준 규격 및 기능성(①면역력 증진에 도움을 줄 수 있음 ②피로개선에 도움을 줄 수 있음 ③혈소판 응집 억제를 통한 혈액흐름에 도움을 줄 수 있음 ④기억력 개선에 도움을 줄 수 있음 ⑤항산화에 도움을 줄 수 있음)을 동일하게 적용한다고 하였고(2016-04-07), 이와 관련한 공문이 건강기능식품업체에 발송하였고 당 업체에서도 관련 공문을 접수하였다(표 76).

표 76. 흑삼 제품의 품목제조 신고 관련 기준 규격

항목	제품	
	흑삼농축액	고려흑삼분말골드
업소명	고려인삼연구(주)	고려인삼연구(주)
신고번호	2004001703865	2004001703866
등록일자	2016-04-07	2016-04-07
유통기한	제조일로부터 24개월까지	제조일로부터 24개월까지
성상	점성을 가진 흑갈색의 액상제품	흑삼 고유의 향미를 가지며 이미, 이취가 없는 흑갈색의 분말
섭취량/섭취방법	건강기능식품 원료로 사용	1일 3회, 1회 2g을 냉수 또는 온수에 타서 잘 저어서 드십시오
포장재질(방법)	유리병, PE	유리병, PE
보존 및 유통기준		
섭취시 주의사항		
기능성 내용	①면역력 증진에 도움을 줄 수 있음 ②피로개선에 도움을 줄 수 있음 ③혈소판 응집 억제를 통한 혈액흐름에 도움을 줄 수 있음 ④기억력 개선에 도움을 줄 수 있음 ⑤항산화에 도움을 줄 수 있음	①면역력 증진에 도움을 줄 수 있음 ②피로개선에 도움을 줄 수 있음 ③혈소판 응집 억제를 통한 혈액흐름에 도움을 줄 수 있음 ④기억력 개선에 도움을 줄 수 있음 ⑤항산화에 도움을 줄 수 있음
기준 및 규격	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합 : 표시량 5mg/g 이상	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합 홍삼제품 : 표시량(24 mg/6g)의 80% 이상 홍삼(원료성) : 표시량(4 mg/g) 이상

경인지방식품의약품안전청 식품안전관리과(2016. 4. 8, 식품안전관리과-3319)

수신 : 관내 건강기능식품업체 대표 귀하

제목 : 품목제조신고 관련 참고사항 알림

1. 귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 건강기능식품의 기준 및 규격 적용(흑삼사용)과 관련하여 「인삼산업법」에서 ‘흑삼’도 넓은 범위에서 ‘홍삼’으로 포함시킬 수 있다는 관련 부처의 의견을 반영하여 ‘흑삼’을 주원료로 하여 제조하는 제품에 대하여 건강기능식품(홍삼제품)으로 품목제조 신고가 가능함을 알려드리니 관련 업무에 참고하여 주시기 바랍니다. 끝

인삼산업법에서는 가공방법에 따라 인삼류의 종류는 밭에서 수확한 후 가공하지 않은 수삼, 수삼을 햇볕·열풍 또는 기타 방법으로 익히지 아니하고 건조한 백삼, 수삼을 물로 익히거나 그 밖의 방법으로 익혀서 건조한 태극삼, 수삼을 증기나 그 밖의 방법으로 찌서 익혀 건조한 홍삼, 수삼을 증기나 그 밖의 방법으로 찌서 익혀 건조한 것으로서 이 과정을 3회 이상 반복하여 제조한 것을 흑삼이라고 분류하고 있다.

건강기능식품법에서는 백삼이나 태극삼의 기능성은 면역력 증진과 피로개선만 인정하는 반면 홍삼은 면역력 증진, 피로개선, 항산화효과, 기억력 개선, 혈소판응집 억제효과에 의한 혈액의 흐름에 도움을 준다는 기능성과 여성 갱년기 장애 개선을 인정하고 있다.

한편, 흑삼은 건강기능식품법 테두리에 없었으나 최근 흑삼을 주원료로 하여 제조하는 제품에 대하여 건강기능식품(홍삼제품)으로 품목제조신고가 가능하다고 하였다(식약처 공지사항 2016. 4. 25).

따라서 국내 매출은 물론 국외에 태극삼의 홍보나 판매를 위해서는 보다 많은 기능성을 확보하는 것이 최선이라고 판단되어 혈액의 흐름에 도움을 줄 수 있다는 기능성을 확보하기 위해서 동물시험을 거쳐 인체적용시험을 실시하여 기능성을 추가하고자 하였다.

피험자의 인구학적 정보는 다음 표 77과 같다.

표 77. 인구학적 정보

Characteristics	Placebo(n=28)	L-TG(n=29)	H-TG(n=28)	p ²⁾
Gender (male/female)	10/18	12/17	9/19	0.765
Age (year)	32.0±10.6 ¹⁾	35.8±13.1	35.7±11.3	0.364
Height (cm)	165.98±7.9	167.48±9.8	166.7±7.3	0.844
Weight (kg)	63.4±10.7	64.5±14.2	61.1±9.0	0.567
Body mass index (kg/m ²)	22.9±2.7	22.7±3.3	21.9±2.3	0.314
Body fat (%)	27.2±7.2	24.8±7.8	24.9±6.0	0.370
Waist circumference (cm)	79.2±8.1	81.2±8.7	79.1±7.1	0.527
Systolic blood pressure (mmHg)	116.86±12.5	115.20±13.2	109.8±9.7	0.140
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.6±9.6	69.2±8.1	69.43±9.2	0.502
Pulse rate (beats/min)	75.7±9.5	75.5±9.6	76.9±8.80	0.256

¹⁾ Values are expressed as means ± SD.

²⁾ No significant difference between among groups at P<0.05 by obtained from χ^2 tests for categorical variables or One-way ANOVA for continuous variables.

사) 피험자의 건강관련 음주, 흡연 및 운동여부에 관한 정보는 표 78과 같다.

표 78. 피험자의 건강관련 음주, 흡연 및 운동여부

Variables	Placebo	L-TG	H-TG	²⁾ p
Drinking status (n, %)				0.013*
Yes	21(75.0) ¹⁾	12(41.4)	13(46.4)	
No	6(22.2)	17(58.6)	15(53.6)	
Smoking status (n, %)				0.663
Yes	4(14.3)	2(6.9)	3(10.7)	
No	24(85.7)	27(93.1)	25(89.3)	
Regular exercise (n, %)				0.020*
Yes	16(57.1)	21(72.4)	10(35.7)	
No	12(42.9)	8(27.6)	18(64.3)	

¹⁾ Values are n (%)

²⁾ Significantly different among the groups by χ^2 tests for categorical variables
*p<0.05.

아) 태극삼 섭취가 피험자의 혈행개선 유효성 지표들의 변화

시제품(저농도, 고농도)과 위약을 8주간 복용한 지원자들의 혈액을 채취하여 혈액의 흐름에 도움을 줄 수 있다는 지표로서 ADP 및 collagen으로 유도한 혈소판응집 억제능과 PT, aPTT와 같은 혈액응고에 미치는 영향을 비교한 결과는 위의 표 29와 같다. ADP 및 collagen으로 유도한 혈소판응집 억제능에 있어서는 위약군과 시험군(저, 고농도 투약군) 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 혈소판 응집을 촉진하는 serotonin 함량은 크게 차이는 없었으나 고농도 투약군에서는 오히려 약간 증가하는 경향이었고, thromboxane A2 함량은 고농도 군에서 약간 감소하는 경향이였다. 혈소판 응집을 억제하는 PGI2 함량은 위약군과 시험군(저, 고농도 투약군) 모두 증가하는 경향이였으며 저농도군에서 가장 많이 증가하였다.

또 혈액응고와 관련된 fibrinogen과 plasminogen 함량은 군간에 큰 변화는 보이지 않았으며, PT나 aPTT에서도 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 종합하면 태극삼 물추출물은 혈소판응집과 혈액응고 기작에는 별 영향을 미치지 않는다고 판단된다.

실제로 태극삼에도 여러 가지 ginsenosides, ethylacetate 추출물, 석유에테르 추출물, 산성다당체 등이 상당량 존재하기 때문에 태극삼도 혈소판응집 억제력이 홍삼보다는 조금 약하지만 그 활성을 나타낼 것으로 기대하고 시험을 실시하였다. 이 시험이 전반적으로 잘못 기획되었는지, 액상제품이 아닌 태극삼 물추출 농축분말제품에 문제가 있었는지, 복

용량 문제 아니면 인체적용시험 시행기관에서의 시험과정에서 어떤 문제가 있었는지 알 수가 없지만 안타까운 결과가 아닐 수 없다.

인삼에 함유되어 있는 많은 ginsenosides들이 혈액의 흐름에 도움을 줄 수 있는 기능이 있다고 보고하였다(55). 혈소판응집 억제 작용은 ginsenoside-Ro, Rb1, Rg1, Rg2, Rg3, Rh1 등이, 항트롬빈 작용은 ginsenoside-Ro, Rg1, Rg2 등, 선용활성화 작용은 ginsenoside-Ro, Rg1, Rg2, Rh1, 혈관 확장(이완)은 ginsenoside-Ro, Rb1, Re, Rg1, Rg3, 항혈전작용은 ginsenoside-Rg3은 thromboxane A_2 (TXA₂) 합성효소 억제 작용은 ginsenoside-Rb2, prostacyclin(prostaglandin I₂, PGI₂) 생성촉진 작용은 ginsenoside-Rc가 그 기능을 나타낸다고 하였다. 그리고 인삼 성분은 혈관확장 작용에 의한 혈류 순환 개선, 동맥경화증 발생 억제, 혈관내피세포 손상 억제, 심근세포 보호작용, 심기능 강화작용, 적혈구 변형능의 개선에 의한 말초순환 개선, 혈관 평활근세포의 증식 억제 등의 효능을 나타낸다고 하였다.

그리고 건강한 성인 남녀에게 홍삼분말을 급성경구투여(3 g)한 후 6시간 동안 혈소판 응집 억제능을 조사한 바에 의하면 ADP, epinephrine, collagen에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였다. 그리고 Ginsenoside-Ro, b1, b2, c, d, e, g1, g2를 건강인 혈소판 풍부혈장을 사용하여 혈소판 응집 억제능을 조사한 결과 Ginsenoside-Ro는 collagen, Rg1 은 ADP 및 collagen, Rg2는 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였다. 또 Rg1은 arachidonic acid에 의한 혈소판 응집을 저해하였으며 Ca ionophore 응집을 억제 해서 ATP 방출을 강하게 억제하였다고 하였다. 홍삼 분획물이 혈전에 미치는 영향을 조사한 결과 항혈액응고작용과 혈전용해촉진 작용을 동시에 나타낸다고 하였다(56).

또 ginsenoside-Rg1은 arachidonic acid, collagen, ADP, epinephrine 등에 의해 유도된 혈소판 응집을 강하게 억제하였으며 이는 thromboxane A₂ 합성 저해에 의한 결과라고 보고하였다(57).

한편, 동맥경화와 혈전증에 미치는 인삼의 영향에 있어서 arachidonic acid를 전구체로 해서 TXA₂ synthase에 의해서 강력한 혈소판응집작용과 혈관 수축작용을 나타내는 TXA₂와 PGI₂ synthase에 의해서 혈소판응집억제작용과 혈관확장작용을 나타내는 PGI₂의 서로 상반된 두가지 물질이 만들어 진다. 인삼 중에 함유되어 있는 protppanaxatriol계 사포닌인 ginsenoside-Rg1은 강력한 혈소판 응집억제능을 나타내며, 또 protppanaxadiol계 사포닌인 ginsenoside-Rb1, Rb2, Rc, Rd는 혈소판 응집억제 작용이 없지만 위액내에서 ginsenoside-Rg3로 전환되면 Rg1과 거의 같은 혈소판응집 억제 작용이 있다고 알려져 있다. 그 중에서 ginsenoside-Rc는 혈관벽에 존재하는 PGI₂의 생산을 촉진하고, 배양혈관평활근 세포의 PGI₂ 생산과 배양혈관평활근 세포의 cyclooxygenase 활성 및 cyclooxygenase의 mRNA 수준을 높인다고 알려져 있다(58,59).

Shin 등은 ginsenoside-Ro는 thrombin으로 유도된 혈소판응집을 농도 의존적으로 저해하고 그리고 또 c-AMP 의존적으로 vasodilator-stimulated phosphoprotein을 인산화

해서 $\alpha IIb/\beta 3$ 에 fibrinogen의 결합을 약화시킨다고 보고하였다(60). 또 홍삼으로부터 얻은 total saponin은 vasodilator-stimulated phosphoprotein을 인산화해서 thrombin으로 유도된 혈소판 응집을 저해한다고 하였다(61).

Rhee 등은 인삼으로부터 얻은 lipophilic fraction은 thrombin으로 유도된 혈소판응집을 강하게 저해하였으며, 또 농도 의존적으로 serotonin의 방출을 억제시켰다고 하였고, 홍삼에서 얻은 비사포닌 분획(지용성 분획)이 thrombin으로 유도된 혈소판 응집을 강하게 저해하였으며, protopanaxadiol 및 triol 분획은 adrenaline으로 유도된 혈소판응집에서 Thromboxa A₂의 생성을 억제하고 혈소판응집을 억제하였다고 하였다(62~64).

또 Chang 등은 돼지관상동맥에서 protopanaxatriol과 protopanaxadiol의 혈관이완 효과를 조사한 결과 acetylcholine에 의한 수축은 농도 의존적으로 억제하였다고 하였다(65). 그리고 이 등은 홍삼의 소수성 단백질 분획이 cGMP 생성에 석유에테르 추출물과 상승작용을 하고 석유에테르 추출물과 단백질 분획이 항혈소판 응집 작용을 나타낸다고 하였다(66).

이 등은 linoleic acid가 다량 함유된 corn oil과 포화지방산이 다량 함유된 beeftallow를 3주간 쥐에게 먹이한 후 홍삼 petroleum ether 분획을 3주간 먹이시켜 thrombin 및 collagen으로 유도된 혈소판응집 작용을 조사한 결과 혈소판응집을 강하게 억제하였으며, 혈액응고의 지표인 thrombin time도 유의성 있게 연장되었다고 하였다(67). 김 등은 인삼 성분이 혈관내피세포에 영향을 미쳐 혈관 이완효과, 혈관 수축 억제 및 고콜레스테롤 개선 등의 효과를 나타낸다(68).

이 등은 ginsenoside Rg₃의 혈소판 응집 억제 효과 및 그 작용기전에 대해서 조사한 결과 ginsenoside Rg₃는 collagen과 thrombin으로 유도된 혈소판응집을 강하게 억제하였으며 Rg₁이나 ginsenosides nonpolar fraction, ginsenosides polar fraction보다 훨씬 강하다고 하였다. 그리고 ginsenoside Rg₃의 혈소판응집 억제기전은 세포내 저장소로부터의 Ca²⁺의 유리 및 외부 Ca²⁺ 유입을 억제함으로써 TXA₂ 생성을 억제하고 과립분비를 억제함에 기인한다고 하였다(69).

Serotonin 방출과 관련해서는 홍삼 6년근에서 얻은 petroleum ether extract (X-compound)는 platelet activating factor에 의한 serotonin 방출을 강하게 억제하였으며 collagen과 thrombin에 의해 혈소판으로부터의 serotonin 방출도 억제하였다. 이 기능은 4년근의 물추출물이나 petroleum ether extract보다 강하다고 보고하였다(70). 홍삼제품류를 4~5년 정도 복용했을 때에는 혈전과 동맥경화증을 예방할 수 있다는 증거로서 collagen에 의한 혈소판응집을 억제하고 그리고 aPTT 도 연장시키고 triglyceride에 대한 HDH cholesterol ratio도 유의성 있게 낮았다고 보고하였다(71).

또 홍삼을 염기성 수용액으로 추출하여 40.2%의 우론산을 함유하는 분자량 약 177 kDa의 산성다당체를 분리하였으며, 이 다당체는 thrombin에 의한 fibrinogen의 응고를

농도 의존적으로 저해하였고 혈장을 사용한 실험에서 내인성 경로의 혈액응고를 저해하였다고 하였다(72). 그리고 건강한 성인 31명(홍삼 투여군 19명, 위약군 12명)을 대상으로 홍삼 3 g을 1회 투여한 후 지질대사와 혈소판 응집능에 미치는 영향을 조사한 결과, 홍삼 투여군은 ADP, epinephrine, collagen으로 유도된 혈소판 응집을 유의하게 억제하였다고 하였다(73).

한편, 건강한 지원자에게 홍삼농축액(위약군, 저농도, 고농도군)을 8주간 복용시킨 뒤 ADP, collagen에 의한 혈소판 응집 억제능을 조사한 결과 홍삼 복용군 모두 통계적으로 유의하게 개선되었다고 하였다(74). 홍삼 산성다당체와 관련된 연구로서 홍삼 산성다당체는 thrombin과 collagen으로 유도된 혈소판 응집을 억제하였으며 비사포닌 성분인 산성다당체가 thrombosis나 atherosclerosis와 같은 심혈관 질환의 예방효과에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다고 하였다(75).

NO 유리와 관련해서는 홍삼의 총사포닌과 ginsenoside-Rg3 혈관 내피세포 유래 nitric oxide(NO)를 혈관 내피세포로부터 유리하여 혈액의 흐름을 원활하게하고 또 혈소판응집을 억제하여 혈액순환 개선에 기여한다고 하였다(76). Panaxtriol은 Ca의 수준과 phosphoinositide breakdown을 감소시켜 thrombin에 의한 혈소판 응집을 저해함으로써 혈소판응집이 매개한 혈전증 질환에 유익한 효과를 나타낼 수 있다고 하였다(77). 또 홍삼으로부터 얻은 panaxadiol은 thrombin에 의해서 유도된 혈소판 응집 반응을 강하게 촉진하는 thromboxane A₂의 생성을 저해하여 항혈소판 작용을 나타낸다고 하였다(78).

한편 Wee 등은 홍삼으로부터 얻은 ethylacetate 분획은 thrombin time을 연장시켜서 anticoagulant로서의 역할을 하며 이는 심장질환에 효과적일 수 있다고 하였다(79). 또 조식배양한 산삼근에서 얻은 ethylacetate 추출물이 시험관 실험에서 전혈에서 혈소판응집을 억제하고 쥐의 말초혈액의 흐름을 증가가 혈관에서 혈소판응집과 혈전혈성을 저해할 수도 있다고 하였다(80). 그리고 홍삼으로부터 얻은 total saponin은 cyclooxygenase(COX-1)와 thromboxane A₂ synthase를 억제하여 thromboxane A₂의 생성을 저해함으로써 혈소판이 매개된 혈전증 질환에 유용한 전통 생약재라고 하였다(81).

또 홍삼 물추출물이 arginase를 저해하여 NO signaling을 증가시킴으로서 죽상동맥경화증과 같은 내피기능장애로 생기는 혈관질환에 유용할 것이라고 하였다(82). 그리고 홍삼에서 얻은 crude saponin 분획은 collagen으로 유도된 혈소판에서 Ca의 동원을 현저하게 억제하여 혈소판응집과 ATP 유리를 강하게 저해하기 때문에 비정상적인 혈소판의 기능을 포함한 심혈관 기능장애의 치료에 유용할 수 있다고 하였다(83). 한편, 홍삼의 비사포닌 분획이 thrombin으로 유도된 혈소판 응집을 강하게 저해하였으며 혈소판 내 cAMP 생성 증가에도 크게 영향을 미치지 않았고 thromboxane A₂의 생성과 serotonin의 방출도 억제시켰다. 또 비사포닌 분획은 혈소판 막 인지질로부터 arachidonic acid의 방출을 억제하지 않았으며 arachidonic acid를 thromboxane A₂로 전환시키는 경로를 저해하여 혈전증의 치료 및 예방에 중요한 역할을 할 것이라고 하였다(84).

한편, Matsuda 등은 홍삼과 백삼의 70% 메탄올 추출물이 순환기계 미치는 영향을 조사한 결과 정상 쥐와 serotonin이나 endotoxin 처리 쥐에서 저하된 장기조직의 혈류를 증가시키며 혈액응고를 억제하고 선용계의 활성화 작용을 나타내었으며 홍삼이 백삼보다 강하다고 하였다(86~88). 그리고 또 홍삼에 존재하는 ginsenoside-Rg3는 혈관의 평활근 확장작용(혈압저하), 혈관 이완작용을 하는 cGMP의 분해 억제 작용, 혈액순환 촉진 작용(혈류장애 개선 및 혈액 유동성 향상), 혈소판 응집억제 작용 등이 있다고 보고하였다.

표 79. 혈행개선 유효성 지표 (보정전)

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Aggregation							
ADP (U)	63.7±17.8	68.1±13.5 ¹⁾	56.3±8.2	60.9±9.5 [†]	59.2±14.1	63.2±16.5	0.12
Collagen(U)	51.4±14.0	54.2±11.6	45.6±8.6	49.0±8.4	48.4±12.8	50.3±11.7	0.16
Serotonin (ng/dl)	144.0±73.9	139.5±65.8	135.3±65.8	137.6±88.7	144.0±124.7	161.6±133.4	0.60
Platelet (10 ³ /ul)	259.8±65.0	260.1±74.4	261.5±56.0	261.3±60.1	265.6±65.4	260.1±65.6	0.99
TXA ₂ (pg/ml)	424.5±368.9	379.6±323.1	364.9±337.0	406.9±327.8	504.2±345.1	454.6±326.4	0.70
TXB ₂ (ng/ml)	5.0±5.8	3.3±4.4 [†]	3.5±2.5	3.5±4.1	4.1±2.8	3.6±3.2	0.96
PGI-2 (pg/ml)	196.9±73.2	220.7±76.6	176.7±61.8	245.6±94.3 [†]	181.1±77.2	230.8±89.8 [†]	0.55
Fibrinogen (mg/dl)	260.9±50.1	266.3±52.4	253.4±93.4	279.1±77.9	255.7±59.9	258.8±50.7	0.45
Plasminogen (%)	98.9±24.4	102.0±14.2	104.8±47.2	99.7±17.6	99.9±12.1	100.1±10.1	0.82
Coagulation							
PT (sec)	12.9±0.5	13.1±0.5	13.0±0.6	13.2±0.7 [†]	13.0±0.5	13.2±0.4	0.54
PTT (sec)	38.3±4.2	38.4±4.1	37.8±3.5	38.2±2.8	39.0±3.4	38.2±3.1 [†]	0.96

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I2; TXA2, Thromboxane A2; PTT, Partial thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex, dietary vitamin K intake (Baseline).

²⁾ No significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

[†] Significantly different from the baseline by paired t-test at [†] p < 0.05.

자) 혈중 지질 지표들의 변화

시험제품 섭취 전과 후에 혈중지질 및 콜레스테롤 농도 변화를 비교한 결과는 위 표 80과 같다. 시험제품 섭취 전과 후, 혈중 triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL cholesterol의 군간 또는 군내에 차이는 보이지 않았다($P>0.05$). 또한, 나이와 성별을 보정한 결과에서도 식품 섭취군간 또는 군내 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$).

표 80. 혈중지질 지표들의 변화 (보정전)

	Placebo		L-TG		H-TG		P ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Triglyceride (mg/dl)	90.2±15.3	93.4±41.61 ^{1,3)}	92.4±47.8	106.0±60.0	100.1±43.9	95.0±42.1	0.569
Total-cholesterol mg/dl)	186.8±26.1	197.9±31.4	182.9±34.1	186.0±29.3	186.2±28.8	186.8±26.1	0.233
LDL-cholesterol (mg/dl)	118.0±25.2	124.0±27.4	115.6±31.2	117.6±31.3	114.4±25.9	114.6±27.7	0.460
HDL-cholesterol (mg/dl)	65.4±15.3	66.3±16.2	59.2±15.1	58.1±14.2	63.4±14.6	65.0±17.5	0.122

HDL, High density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex.

²⁾ No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA.

³⁾ No significantly different from the baseline by paired t-test at $p < 0.05$.

사) 혈액학적 및 혈액화학적 검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사 결과는 표 90과 같다. 식품 섭취 전과 후, 세군간의 유의한 변화를 보인 지표는 없었다($P>0.05$).

각 지표의 군내 비교에서, 대조군의 RBC가 유의적인 증가를 보였으나, 모두 정상범위내에서의 변화였다.

표 90. 혈액학적 및 혈액화학적 검사

Variables	Placebo		L-TG		H-TGF		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
White blood cell(10^3 /ul)	5.7±1.4	6.1±1.7 ¹⁾	5.3±1.5	5.6±1.9	5.8±1.4	5.7±1.4	0.440
Red blood cell (10^6 /ul)	4.7±0.5	4.8±0.5 [†]	4.7±0.5	4.8±0.5	4.6±0.4	4.7±0.4	0.642
Hemoglobin (g/dL)	14.2±1.5	14.4±1.5	14.0±1.6	14.1±1.5	14.1±1.4	14.2±1.3	0.711
Hematocrit (%)	42.9±3.9	43.4±4.2	42.4±3.8	42.5±3.8	42.1±3.5	42.7±3.4	0.638
AST (U/L)	20.9±5.8	18.6±4.6	20.6±6.7	22.6±9.0	19.2±4.4	19.8±6.7	0.101
ALT (U/L)	17.0±9.4	16.8±8.8	16.1±7.9	18.3±7.4	16.6±8.1	17.6±10.1	0.817
BUN (mg/dL)	12.7±2.7	13.3±3.3	12.9±2.8	13.2±3.2	12.8±3.5	12.4±2.9	0.527
Total protein (g/dL)	7.4±0.3	7.5±0.4	7.3±0.4	7.4±0.4	7.4±0.5	7.4±0.4	0.625
Albumin (g/dL)	4.6±0.2	4.7±0.2 [†]	4.6±0.2	4.6±0.2	4.6±0.3	4.7±0.2	0.646
Glucose (mg/dL)	85.1±9.2	83.9±8.6	87.1±10.5	86.7±8.9	86.4±7.6	88.1±7.8	0.174
CRP (mg/L)	0.9±1.2	0.7±0.7	1.3±3.4	1.0±2.5	0.5±0.5	0.4±0.5	0.377

AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, Blood urea nitrogen;

CRP, C - reactive protein.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex.

²⁾ No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA.

[†] Significantly different from the baseline by paired t-test at [†] p < 0.05.

- 인체적용시험에서 지원자들이 복용한 시제품은 식품학적 안전성 측면에서 아무런 이상증후를 발견하지 못했다.

6) 식의약처 건강기능식품 개별인정형 신청 시제품의 원료·성분 분석 결과

(붙임자료 참조, 분석기관 : 한국건강기능식품협회)

식의약처 건강기능식품 개별인정형 신청 시제품의 원료·성분 분석 결과는 그림 15와 표 32와 같다. 대장균은 음성이며, 열량은 350.53 Kcal/100g, 중금속과 ginsenosides 함량은 3lot 3반복 실험에 의한 평균값으로 표시하였다. 중금속 4종은 미량 수준으로 기준 규격에 적합하였으며 ginsenosides 함량은 10 mg/g 이상으로 나타났다. 그리고 30종의 잔류농약 함량을 조사한 결과 불검출 또는 0.02 ppm 이하 수준으로 모두 기준치 이하로 나타났다.

가. 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 영한 황갈색의 내용물을 함유한 진한 빨간색의 경질 캡슐

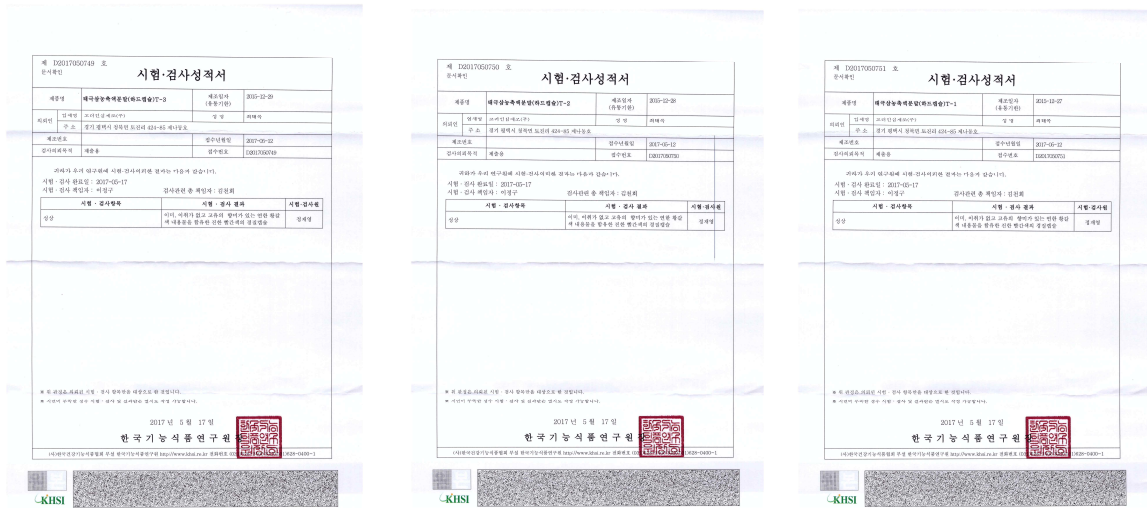


그림 252. Lot별 시제품의 성상, 성분 분석 검사 성적서

표 91. 성분 함량 조사 결과

시험·검사항목	시험·검사 결과(Lot 별)		
	T1	T2	T3
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 영한 황갈색의 내용물을 함유한 진한 빨간색의 경질 캡슐	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 영한 황갈색의 내용물을 함유한 진한 빨간색의 경질 캡슐	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 영한 황갈색의 내용물을 함유한 진한 빨간색의 경질 캡슐
대장균군	음성		
열량(Kcal/100g)	350.53		

탄수화물(%)	71.81		
조단백질(%)	12.2		
조지방(%)	1.61		
수분(%)	8.31		
회분(%)	6.07		
나트륨(mg/100g)	145.98		
당류(과당, 포도당, 자당, 맥아당, 유당)(mg/g)	552.31		
포화지방산(g/100g)	0.04		
트랜스지방산(g/100g)	불검출		
콜레스테롤(mg/100g)	불검출		
중금속			
납(mg/kg)	0.0562	0.0450	0.0577
카드뮴	0.0162	0.0154	0.0168
비소	0.0373	0.0397	0.0301
수은	불검출	0.001	0.002
진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합(mg/g)	10.76	11.02	10.57
잔류농약(mg/kg)			
DDT	불검출		
Metalaxy	불검출		
BHC	불검출		
Aldrin&Dieldrin	불검출		
Endrin	불검출		
Carbendazim	불검출		
Quintogene	불검출		
Diethofencarb	불검출		
Difenonazole	불검출		
Cypermethrin	불검출		
Azoxtstrobin	0.0167		
Tolyfluanid	불검출		
Tolclofos-methyl	불검출		

시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과		
	T1	T2	T3
Iminoctadine	불검출		
Pyrimethanil	0.0026		
Fenhexamid	불검출		
Cyazofamid	불검출		
Cyprodinil	불검출		
Kresoxim-methyl	불검출		
Cadusafos	불검출		
Fludioxonil	불검출		
Thifluzamide	불검출		
Flutolanil	불검출		
Trifloxystrobin	0.0189		
Tefluthrin	불검출		
Fluquinconazole	0.0002		
Cyfluthrin	불검출		
Carbofuran	불검출		
Carbosulfan	불검출		
Lindane:γ-BHC	불검출		

7) 농가-기업체의 상생 방안

농가-기업체의 상생방안의 일환으로 태극삼, 흑삼 제품제조에 사용되는 원료수삼의 확보를 지속적으로 유지하기 위하여 강화인삼조합의 황우덕씨의 포지(인천광역시 강화군 강화읍 갑곶리 844-1, 277,900 m²)를 사용할 수 있도록 약정서를 작성하였다(그림 16).

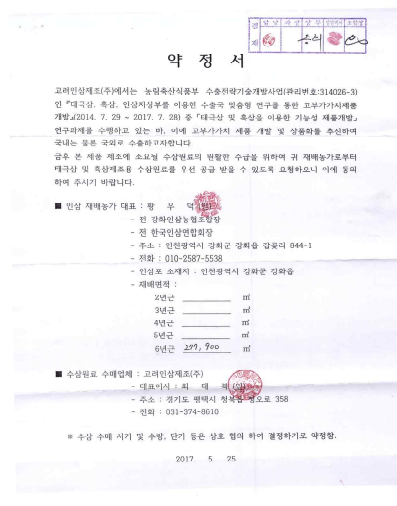


그림 253. 황우덕씨의 포지 사용 약정서

최종 연구 결과 보고서

과제명	건강한 성인의 태극삼 추출물 섭취가 혈행 개선에 미치는 유효성을 평가하기 위한 인체적용시험		
	A clinical trial for the evaluation of the efficacy of blood circulation with Taegeuk ginseng extraction among healthy adults		
연구기간	2015. 7 ~ 2017. 6		연구비 220,000 천원
	성명	임현정	전화번호
	이메일주소		핸드폰
주관연구기관 책임연구원 (총괄책임자)	기관주소	(02447) 서울특별시 동대문구 경희대로 26	
	소속/부서	경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과 교수 경희대학교 임상영양연구소 소장	
	직위	부교수	전공 임상영양학
연구참여자	이의주 (경희대학교 한의과대학 한의학과 교수, 경희대학교 한방병원 사상체질과 교수) 김미아 (경희대학교 한방병원 동서협진실 임상전문교원) 정연형 (경희대학교 동서의학대학원 석사과정) 임효정 (경희대학교 임상영양연구소 연구원) 김기윤 (경희대학교 임상영양연구소 연구원) 유혜진 (경희대학교 임상영양연구소 연구원) 원윤선 (경희대학교 한방병원 사상체질과 연구코디네이터) 김원숙 (경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 과제연구원) 권형준 (경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 임상관리약사)		
본 연구기관은 붙임과 같이 최종보고서를 제출합니다. <div style="text-align: right; margin-right: 100px;"> 2017 년 6 월 28 일 경희대학교 산학협력단장 (직인) </div>			
붙임 1. 최종결과보고서			

목 차

◎ 인체적용시험 계획서 요약	3
1. 인체적용시험의 명칭	5
2. 연구자 및 연구지원조직	5
3. 인체적용시험 의뢰자 및 지원기관	6
4. 인체적용시험의 배경 및 목적	6
5. 인체적용시험용 식품	7
6. 시험 기간	9
7. 대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 대상자 수	9
8. 시험방법	12
9. 검사 항목 및 방법	15
10. 시험중지 및 탈락기준, 분석 제외기준	20
11. 통계분석 방법	21
12. 통계분석 결과	22
13. 요약 및 결론	39
14. Reference	40

인체적용시험 결과보고서 요약

제목	건강한 성인의 태극삼 추출물 섭취가 혈행 개선에 미치는 유효성을 평가하기 위한 인체적용시험 A clinical trial for the evaluation of the efficacy of blood circulation with Taegeuk ginseng extraction among healthy adults
인체적용 시험책임자	이의주 (경희대학교 한의과대학 한의학과 교수, 경희대학교 한방병원 사상체질과 교수)

공동연구자	임현정 (경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과 교수, 경희대학교 임상영양연구소 소장) 김미아 (경희대학교 한방병원 교수, 동서협진실 임상전문교원)
실시기관	경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 (서울특별시 동대문구 경희대로 23)
지원기관	최초 지원기관: 농림수산물기술기획평가원 (경기도 안양시 동안구 부림로 166) 의뢰기관: (주) 고려인삼 제조 (경기도 평택시 청북면 청오로 358)
기간	2016. 05. 17 (첫 연구대상자 동의일) ~ 2017. 01. 10 (마지막 연구 대상자 방문일)
대상자	1) 만 20세 이상 60세 이하 건강한 성인 2) 본 인체적용시험에 참여할 것을 동의하고 서면동의서에 자의로 서명한 자
디자인	8주간, 무작위배정, 이중맹검, 위약 대조 인체적용시험
목적	건강한 성인을 대상으로 8주간 태극삼 추출물 섭취가 혈행개선에 미치는 영향에 대해 유효성을 평가하고자 함.
방법	방문 1 에 자의에 의해 연구 대상자 동의서에 서명한 지원자는 대상자 선정 기준에 적합여부를 판정 받음. 선정된 대상자는 방문 2 (0 주)에 순서에 따라 랜덤번호와 함께 대조군, 태극삼 저함량섭취군, 태극삼 고함량섭취군 중 한 군으로 무작위 배정 되어, 8 주간 시험식품을 섭취함. 방문 2 (0 주), 방문 3 (4 주) 및 방문 4 (8 주)에 혈행 관련 유효성지표 및 안전성을 평가하기위한 지표를 측정을 실시하였음.
대상자수	각 군당 27명씩 총81명이 목표이고, 탈락률(20%)를 고려하여 선정기준에 적합한 연구대상자는 군당 34명씩 총 102명을 등록함.
분석항목	<ul style="list-style-type: none"> ■혈행관련 유효성지표: ADP 또는 collegen을 이용한 혈소판 응집능 검사, Serotonin, 프로트롬빈시간 (PT), 부분트롬보플라스틴시간 (PTT), Plasminogen, Fibrinogen, Thromboxane B₂, TormboxaneA₂, Plateletcount ■지질관련 유효성지표: 중성지방 (TG), 총콜레스테롤 (TC), 저밀도 콜레스테롤 (LDL), 고밀도 콜레스테롤 (HDL) ■생화학 지표: WBC, RBC, Hb, Hematocrit, BUN, Albumin, Glucose, CRP protein (hs) ■안전성 지표: ALT, AST
통계분석 방법	<ul style="list-style-type: none"> ■인체적용시험계획서에 따라 일정수준 이상으로 순응하고, 시험을 완료한 대상자를 대상으로 분석을 시행하였음. ■범주형 변수는 Chi-square test 분석함. ■연속형 변수에 대해서는 군 간 비교를 위해서 one-way ANOVA로 유효성 검증을 실시하였고, P-value가 0.05 미만일 경우, Duncan multiple test로 사후검정을 실시함. ■모든 지표는 전후 비교를 위해 Paired t-test를 실시하였음.

	<p>■공변량에 의한 보정이 필요할 경우, 공분산분석 (ANCOVA)을 실시하여 유의성을 검정한 후, Bonferroni로 사후검정을 실시함.</p>
<p>결론</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■만 20세 이상 60세 이하 건강한 성인 모집 (각 그룹당 34명 이상의 대상자 확보, 최종 평가 예수 이상의 대상자 (27명 이상)로 분석함.) ■세 군간의 인구학적 특징 (성별비, 연령)과 신체계측 지표 (키, 체중, BMI), 혈압에는 차이가 없었음 (Baseline). ■건강관련 습관에서 음주, 운동여부에서 유의적인 차이가 있으나 성별을 구분하여 분석 시 차이가 없었음. ■혈행개선 유효성 지표 분석 결과, 시험 전 군간의 차이가 없으나 연령, 성별, vit K섭취량 보정 후, 태극삼 섭취군의 PGI-2 (pg/ml) 가 유의적으로 증가함. (저함량섭취군:176.7±61.82 (pg/ml) → 243.2±16.22 (pg/ml); 고함량섭취군181.1±77.22 (pg/ml) →234.3±16.52 (pg/ml)) 또한 태극삼 저함량섭취군에서 PT가 13.0초에서 13.2초로 유의적으로 증가함. 하지만 8주후 군간의 차이가 없어 의미가 있다고 할 수 없음. ■혈행개선 유효성 지표의 군간의 변화량, 변화율에 유의적인 차이는 없었음. ■성별로 층화분석 한 결과, 남성에서 8주후 ADP(U)에서 대조군이 가장 높았고, 태극삼군에서의 차이는 없었음. 여성의 경우, 태극삼 두 군에서 PGI-2 (pg/ml) 가 유의적으로 증가함. ■혈중지질농도, 혈액화학적검사, 식이섭취에는 연구 전 후, 군간의 유의적인 차이가 없었음.

1. 인체적용시험의 명칭

건강한 성인의 태극삼 추출물 섭취가 혈행 개선에 미치는 유효성을 평가하기 위한 인체적용시험

A clinical trial for the evaluation of the efficacy of blood circulation with Taegeuk ginseng extraction among healthy adults.

2. 연구자 및 연구지원조직

2.1. 인체적용시험 실시기관

경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 (서울특별시 동대문구 경희대로 23)

2.2. 인체적용시험 책임자

이의주 (경희대학교 한의과대학 한의학과 교수, 경희대학교 한방병원 사상체질과 교수)

2.3 인체적용시험 공동연구자

임현정 (경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과 교수, 경희대학교 임상영양연구소 소장)

김미아 (경희대학교 한방병원 동서협진실 임상전문교원)

2.4 인체적용시험 연구담당자

정연형 (경희대학교 동서의학대학원 석사)

임효정 (경희대학교 임상영양연구소 연구원)

김기윤 (경희대학교 임상영양연구소 연구원)

유혜진 (경희대학교 임상영양연구소 연구원)

원윤선 (경희대학교 한방병원 사상체질과 연구코디네이터)

2.5 모니터링 담당자

김원숙 (경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 과제연구원)

2.6. 시험제품 관리 담당자

권형준 (경희대학교 한방병원 한의약임상시험센터 임상관리약사)

3. 인체적용시험 의뢰자 및 지원기관

3.1 최초 지원기관

농림수산물기술기획평가원 (경기도 안양시 동안구 부림로 166)

3.2 의뢰기관 및 의뢰자

최태복 (주) 고려인삼 제조 (경기도 평택시 청북면 청오로 358)

4. 인체적용시험의 목적 및 배경

4.1 목적

본 연구에서는 건강한 성인을 대상으로 태극삼 추출물의 섭취가 혈행개선의 기능성 여부를 평가하기 위함이었다

4.2 배경

- 2012년 사망원인 10위 안에 혈액 및 혈관 건강으로 인한 질병 (심장질환, 뇌혈관질환, 당뇨병, 고혈압성 질환)이 절반을 차지하고 있다 (통계청 2013).



-현재 고혈압, 이상지질혈증, 당뇨 등은 완치법이 확립되어 있지 않은 질환으로 혈압, 혈중 지질, 혈당을 조절하는 것을 가장 중요한 치료 목표로 하고 있다.

-해당 질환의 치료를 위해 약물복용법을 사용하고 있지만, 증상개선에 어려움이 있어 식품소재에 대한 요구가 증가하고 있다.

-인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae) 인삼속(Panax)에 속하는 다년생 초본류로서, 건강기능식품공전에 따라 말리지 아니한 수삼, 수삼을 햇볕·열풍 또는 기타 방법으로 익히지 아니하고 말린 백삼, 수삼을 물로 익혀 말린 태극삼을 포함하고 있다.

-태극삼은 홍삼전매법 시행으로 인하여 민간제조가 허용되지 않을 때 인삼을 가공하던 기술로 85℃ 물에 30분간 (수삼 내부조직의 부분 호화)침지하고 건조 과정을 통해 제조하였다.

-태극삼 추출물의 혈행개선의 기능성에 대한 in vivo 연구를 통하여 본 소재의 혈당조절 기능성을 확인한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 태극삼 추출물의 혈행개선 기능성을 인체적용연구를 통해 확인하고자 하였다.

5. 인체적용시험용 식품

5.1 시험식품

5.1.1 태극삼 추출물 고품량

- 주 성분명: Ginsenoside -Rb1+ Rg1
- 성상 및 제형: 캡셀
- 함량 (주성분): 400mg (3.75mg)
- 복용량: 1일 5캡셀 (아침 2, 저녁 3)복용

구분	성분	배합비 (%)	함량 (mg)
주원료	태극삼 추출물 분말	100.00	400.00
	Ginsenoside R-b1	(0.70)	(2.79)
	Ginsenoside R-g1	(0.24)	(0.96)
부원료	말토덱스트린	0	0
	Caramel 색소	0	0
	홍삼향	0	0
	Bitter flavor	0	0
합계		100.0	400.0

5.1.2 태극삼 추출물 저함량

- 주 성분명: Ginsenoside -Rb1+ Rg1
- 성상 및 제형: 캡셀
- 함량(주성분): 400mg (2.12mg)
- 복용량: 1일 5캡셀(아침 2, 저녁 3)복용

구분	성분	배합비 (%)	함량 (mg)
주원료	태극삼 추출물 분말	50.00	200.00
	Ginsenoside R-b1	(0.40)	(1.58)
	Ginsenoside R-g1	(0.14)	(0.54)
부원료	말토덱스트린	49.55	198.2
	Caramel 색소	0.45	1.80
	홍삼향	0.0003	0.00134
	Bitter flavor	0.0009	0.00360
합계		100.0	400.0

5.1.3 대조식품 (Placebo)

- 성분명 : 말토덱스트린
- 성상 및 제형 : 시험식품과 같은 맛과 향이 있는 캡셀
- 함량: 400mg (시험 식품과 동일한 중량)
- 복용량: 1일 5캡셀 (아침 2, 저녁 3)복용

구분	성분	배합비 (%)	함량 (mg)
부원료	말토덱스트린	99.08	396.30
	Caramel 색소	0.92	3.70
	홍삼향	0.00067	0.00267
	Bitter flavor	0.0018	0.00720
합계		100.0	400.0

5.2 시험식품 코드

KG_TG R001

5.3. 시험식품에 대한 라벨은 다음과 같은 내용을 포함하였다.

- ① 인체적용 시험용이라는 표시
- ② 시험 식품의 코드명 또는 주성분의 일반명
- ③ 고유코드: 무작위 배정표에 따라 기록
- ④ 저장방법: 직사광선을 피해 냉장보관
- ⑤ 유효 기간 또는 사용기한
- ⑥ 제조 번호 및 섭취 방법
- ⑦ 제조업자 또는 수입자의 상호
- ⑧ “인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음” 이라는 표시

5.4 포장 및 고유코드기록

모든 대상자는 0 주, 4 주 방문 시 시험제품을 제공받았다. 시험제품은 총 300 캡셀 (8 주, 56 일 5 캡셀 + 여유분 4일 20 캡셀)의 태극삼 추출물 고함량, 태극삼 추출물 저함량 또는 대조 식품이 들어 있으며, 용기 외부에는 라벨과 고유 식별 코드가 함께 붙어 있다. 고유 식별 코드는 연구자와 대상자가 시험제품에 대한 이중 맹검을 유지하기 위함으로, 연구 종료 후 연구자에게 공개되었으며, 연구자는 제품 배정시 배정된 무작위 번호와 식별 코드를 이용

하여 식품을 배분하였다. 시험용 식품의 관리는 시험 책임자가 위임한 권형준 관리약사가 하였다.

6. 시험 기간

2016.05.17 (첫 연구대상자 동의일) ~ 2017.01.10 (마지막 연구대상자 방문일)

7. 대상자의 선정기준, 제외기준 및 목표 대상자의 수

7.1 대상자

대상자 선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 건강한 성인을 연구 대상으로 하였다.

7.1.1. 선정기준

다음 기술된 조건에 부합되는 자를 대상으로 선정하였다.

- 1) 만 20세 이상 60세 이하 건강한 성인
- 2) 본 인체적용시험에 참여할 것을 동의하고 서면동의서에 자의로 서명한 자

7.1.2. 제외기준

다음 기술된 조건에 해당되는 자는 대상자 선정에서 제외시켰다.

- 1) 혈압이 160/100 mmHg 이상 이거나 고혈압 진단을 받고 관련 약물을 복용하고 있는 고혈압 환자 또는 당뇨진단을 받고 약을 복용하고 있는 당뇨 환자
- 2) 이상지질혈증 진단을 받아 관련 약을 처방 받아 복용하고 있는 경우
- 3) 혈소판 응집능에 영향을 미치는 약품(예: 아스피린)과 건강기능식품(예: 홍삼농축액, 오메가3 정제유, 은행잎 추출물, 감마리놀렌산, 영지버섯 자실체 추출물 등)을 복용하는 경우
- 4) 심장, 신장, 간, 갑상선, 뇌혈관 질환이 있는 경우
- 5) 우울증, 정신분열증, 알코올중독증, 약물중독 등의 정신질환자
- 6) 최근 6개월 이내 수술 병력이 있는 경우
- 7) 약물 또는 알코올 중독의 과거력이 있는 자
- 8) 임신중인 여성의 경우
- 9) 시험 개시 3 개월 전 다른 임상시험(인체적용시험)에 참여했던 자
- 10) 글자를 읽지 못하거나 그러한 능력이 제한된 자

- 11) 연구책임자/공동연구자의 소속 진료과의 피고용인, 연구원, 동일 단과대학 학생 및 직원, 수업을 수강하는 학생. (단, 이를 제외한 경우, 소속 기관의 구성원 또한 연구대상이 될 수 있음)
- 12) 기타 : 연구책임자의 소견에 따라 임상적 의미가 있다고 판단되는 자 등

7.2. 목표한 대상자 수

	대조군	고함량 섭취군	저함량 섭취군	총 대상자수
최종 평가 예수 (PP)	27	27	27	81
Drop - out (20%) 고려예수	34	34	34	102

대상자 선정, 제외 기준에 적합한 81 명 이상을 확보하여 복용하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 평가 예수로 102 명 이상(그룹당 34명 이상)을 확보하여 평가하기로 계획하였다.

7.3. 대상자 수 설정근거

태극삼 추출물을 이용한 전임상연구에서 항혈전에 의한 효과가 좋게 나타났으며 그 중 ADP에 의한 혈소판 응집력에 대한 유의적인 감소를 보였기 때문에 1차 유효성 평가 지표로 설정하였다. 그리고 기능성 성분인 오메가 3 시험제품 복용 후 ADP에 의한 혈소판 응집능력을 측정할 임상연구 결과를 활용하였다 (Victor L. Serebruany, et al. Early Impact of Prescription Omega-3 Fatty Acids on Platelet Biomarkers in Patients with Coronary Artery Disease and Hypertriglyceridemia. *Cardiology* 2011;118:187-194).

선행연구(Serebruany et al., 2011)에서 시험군과 대조군의 전후 ADP 평균과 표준편차는 시험군 59.4 ± 8.2 , 50.3 ± 7.0 그리고 대조군 50.6 ± 6.0 , 50.4 ± 7.8 이었으며, 이에 따라 변화량의 평균은 시험군 -9.1, 대조군 -0.2로 계산되었다. 참고 논문에서 사용한 시험제품은 의약품이지만 비타민과 오메가3와 같은 기능성 성분은 함량이 같다면 의약품과 건강기능식품의 효과가 같다고 사료되어 시험군의 효과를 그대로 적용하였다. 변화량의 표준편차는 각 군의 섭취 전, 후에 대한 표준 편차값들로부터 전, 후 간 상관관계수 0.1을 적용하여 시험군 10.24, 대조군 9.35로 산출하였으며, 이는 변화량의 표준편차에 대한 참고 자료가 거의 없

어 보수적인 관점으로 낮은 상관계수를 적용한 결과이다.

(1) 귀무가설 [$H_0: \mu_{dt} = \mu_{dp}$]

: 8 주 후, 고함량, 저함량 섭취군에서의 ADP 검사결과 대조군과 비교했을 때, 10% 유의수준에서 차이가 없다.

(2) 대립가설 [$H_1: \mu_{dt} \neq \mu_{dp}$]

: 8 주 후, 고함량, 저함량 섭취군에서의 ADP 검사결과 대조군과 비교했을 때, 10% 유의수준에서 차이가 있다.

- $\alpha = 10\%$
- $\beta = 5\%$ (power = 95%)
- N_t : 시험군에서의 대상자수
- N_p : 대조군에서의 대상자수
- $N_t = N_p$
- μ_{dt} : 시험군에서 ADP의 변화량의 모평균
- μ_{dp} : 대조군에서 ADP의 변화량의 모평균
- σ_{dt} : 시험군에서 ADP의 변화량에 대한 모표준편차
- σ_{dp} : 대조군에서 ADP의 변화량에 대한 모표준편차
- 연구대상자수 산출 공식

$$N_t = \frac{(z_{\alpha/2} + Z_B) \times (a^{2_{dt}} + a^{2_{dp}})}{(M_{dt} - M_{dp})} = \frac{(1.645 + 1.645)^2 \times (10.24^2 + 9.35^2)}{(-9.1 - (-0.2))^2} \approx 27 \text{명}$$

따라서 각 군별 27명이 필요하며, 탈락률 20%를 고려하여 34명씩 총 102명을 대상자수로 하였다.

8. 시험방법

8.1. 시험의 설계

11.분 인체적용시험은 8 주간 진행되는 무작위배정, 위약대조 인체적용시험으로 디자인하였다. 자의에 의해 인체적용시험의 동의서에 서명을 하고, 인체적용시험에 참가하면 인구학

적 조사, 병력 및 약물 투여력 조사, 신체계측 조사, 활력징후 검사, 안전성 검사를 실시하여 선정기준에 적합하면 무작위 배정을 통한 대상자 등록이 이루어졌다. 대조군, 태극삼 추출물 고함량 섭취군, 또는 태극삼 추출물 저함량 섭취군 배정된 대상자는 총 8주간 대조식품 또는 시험식품을 복용하였으며, 각 군의 배정비율은 대조군: 태극삼 고함량 섭취군: 태극삼 저함량 섭취군 = 1:1:1로 하였다.

12.

8.2. 1 일 섭취량 및 섭취방법

- 대조군 (Placebo): 1일 5캡셀 (아침2, 저녁3)복용
- 태극삼 고함량 섭취군: 1일 5캡셀 (아침2, 저녁3)복용
- 태극삼 저함량 섭취군: 1일 5캡셀 (아침2, 저녁3)복용

8.3. 섭취기간

시험식품 (태극삼 추출물) 또는 대조식품 (Placebo)을 8주간 섭취하였다. 혈행 개선 연구에서 약물 또는 기능성 물질을 이용한 임상연구는 2주로 진행되었지만 건강기능식품 소재의 혈행 개선 연구의 경우 4주 또는 8주로 진행되었다. 태극삼 추출물의 지속적인 섭취에 따른 혈소판 응집능 및 혈행 개선의 효과를 확인하고자 하였다.

8.4. 섭취량 설정 사유

본 기능성원료의 섭취량은 추출 수율 50% 기준으로 본삼의 분말형태로 환산시 6g을 섭취하는 것에 해당되며, 우리나라 국민이 일상적으로 식이로 섭취하는 양은 조사된 바가 없으므로 비교가 불가능하였다.

1) 기존의 인체적용 시험 결과

- 혈청 지질의 변화를 조사하기 위해 사용한 홍삼섭취량은 2.7g/day이었으며 혈압조절의 효능을 평가하기 위한 임상시험의 섭취량은 4.5g/day이었다.

2) 국내에서 판매되고 있는 제품에 포함된 양은 다음과 같았다.

- (태극삼코리아) 고려 태극삼 분말: Rg1+Rb1의 합 2mg/g
- (동일) 고려태극삼 농축액: Rg1+Rb1의 합 4mg/g

8.5 시험용 식품의 사용상 주의사항

시험 식품으로 사용되는 태극삼은 식품의약품안전처에서 허가된 식용 가능한 원료 구성 되어 현재까지 알려진 부작용은 없었다. 경우에 따라 태극삼 물추출 섭취 시 경미한 피부발진, 가벼운 발열, 나른함 등과 같은 증상이 발생할 수 있을 것으로 예상되어 이를 연구담당 의사가 연구 시작 전에 충분히 설명하고, 이러한 증상이 발생하면, 연구 도중 즉각적으로 보고하기로 계획하였다.

1) 섭취 시 주의사항

아래와 같이 섭취시 주의 사항을 사전에 안내하였다.

- ① 특정 식품이나 식품 성분에 알레르기가 있는 분들은 섭취 전 전문의와 충분히 상담하도록 계획한다.
- ② 섭취량 준수 (이 식품의 투여로 건강한 지원자의 정신 및 운동기능에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되나 과량으로 복용하지 않도록 주의토록 한다.)
- ③ 이 식품의 투여로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압상승 나타날 경우 즉시 연구자와 상의하여야 한다.
- ④ 이 식품의 투여 후 배변이 불편하거나 열이 나거나 염증으로 인한 고열이 있는 경우에는 연구자와 상의 후 식품의 복용을 중지하는 것이 좋다.
- ⑤ 남용과 신체적, 정신적 의존성
이 식품의 투약중단 시 금단증상이나 정서변화의 징후는 없을 것으로 판단되나, 연구자는 약물남용의 경력이 있는 대상자에 대하여 오남용의 증후가 있는지 조심 하여 관찰해야 한다.

2) 보관 및 취급상의 주의사항

다음과 같은 취급 주의사항을 안내하였다.

- ① 유아의 손에 닿지 않는 곳에 보관할 것
- ② 직사광선을 피하고 가능한 습기가 적고 서늘한 곳에 밀봉하여 보관할 것
- ③ 오용 및 남용을 피하고 품질을 유지하기 위해 다른 용기에 넣지 말 것

3) 병용 금지 약물 등(병용, 병용금지, 기타)

다음과 같은 약물의 병용은 원칙적으로 금지하도록 하며, 시험기간 중에 병용하는 모든 약물은 약물명, 용량, 투여기간 등을 증례기록서에 기재하였다.

- ① 혈전 용해제

- ② 항 응고제
- ③ 항혈전제
- ④ 순환개선제
- ⑤ 기타 간독성을 유발할 수 있는 약

8.6 무작위배정

선정된 대상자는 대조군, 태극삼 저함량 섭취군, 태극삼 고함량 섭취군에 1:1:1의 비율로 무작위 배정하였다.

- ① 연구대상으로 선정한 대상자를 SAS V9.4를 이용하여 확률에 의거한 무작위배정 방법으로 각 군에 배정하였다.
- ② 대상자의 방문일 (Visit 2)을 기준으로 세 군 중의 한 군에 인체적용시험에 참여하는 순서대로 무작위 배정표에 따라 배정번호 (Randomization Number: RN)를 부여하여 시험군 혹은 대조군에 배정되도록 하였다.
- ③ 무작위배정 계획에 따라, 대상자에게 부여한 코드대로 시험식품을 제공하였다.

8.7 이중눈가림

본 인체적용시험은 이중눈가림 시험으로 연구자와 대상자 모두 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하였다. 캡슐화된 시험 제품은 외형상으로 구분이 불가능하도록 포장하고, 무작위 배정표에 따라 고유 식별 코드를 라벨링하여 공급하였다. 각 군별로 고유 식별 코드의 할당 내역은 독립된 자가 봉인된 상태로 관리하였으며, 연구가 모두 종료된 후 눈가림 해제를 진행하였다.

9. 검사 항목 및 방법

9.1. 인체적용시험 진행일정표

Periods	Screening		Active Treatment	
	1	2	3	4
Visit				
Week	-2	0	4	8
Window period	-	±5	±5	±5
대상자 적합성 평가	✓			
서면 동의서	✓			
인구학적 조사	✓			
병력 /약물복용력 조사	✓			
신체계측 (체중, 신장)		✓	✓	✓
활력징후 (혈압, 맥박) 측정		✓	✓	✓
임상병리검사		✓		✓
식습관 조사		✓	✓	✓
식이섭취량 조사		✓	✓	✓
무작위배정		✓		
시험식품 및 대조식품 처방		✓	✓	
복약일지/ 식사일기 배부	✓	✓	✓	
이상반응확인			✓	✓
순응도 확인			✓	✓
약물투여력 및 병용요법 변화 확인		✓	✓	✓

9.2 검사 항목

9.2.1. 대상자 동의 및 인구학적 조사

인체적용시험에 들어가기 전, 본 시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 상세히 설명하고, 서면 동의를 받았으며 서면 동의는 대상자가 자의로 서명하였다. 인구학적 조사는 서면 동의 여부 및 동의 일자와 대상자 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 질환의 가족력 및 운동과 흡연 여부의 일반사항 등을 조사하였다.

9.2.2. 병력 및 약물 투여력 조사

병력 및 약물 투여력은 문진과 면담을 통하여 조사하였다. 병력은 스크리닝 시점을 기준으로 6 개월 이내 병력을 상세히 조사하여 기록하였다. 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기 (발생년도 또는 발생년월), 치료기간, 지속여부, 연구자의 의견 등을 기재하였다. 약물 투여력은

스크리닝 시점을 기준으로 3 개월 이내에 복용한 약물을 모두 확인하였다.

9.2.3. 신체계측 조사

신체계측은 0주 (시험시작), 4주, 8주 (시험종료)로 총 3회 실시하였다. 동일한 장비를 이용하여 신장 (height), 체중 (weight), 체지방 (body fat), 체지방 (lean body mass), BMI (body mass index), 허리 둘레를 측정하였다. 가벼운 옷차림 상태에서 공복 상태를 기준으로 신장은 0.1 cm, 체중은 0.1 kg 단위까지 반올림하여 측정하였다. 동일한 시간대 (\pm 1 시간)에 동일한 시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 하였다.

9.2.4. 활력징후(혈압, 맥박) 측정

각 방문 시 혈압과 맥박을 측정하여 기록하였다. 각 방문에서 동일한 장비를 이용하여 동일한 시간대에 동일한 대상자의 혈압을 동일한 시험기관 담당자가 측정할 수 있도록 하였다.

9.2.5. 임상병리검사

시험제품의 안전성 및 기능성을 평가하기 위한 목적으로 실시되었다. 연구자는 대상자로 하여금 방문 당일 12 시간 이상 공복 상태로 내원하도록 지시하였다. 방문 1 에는 혈액 5 ml 을, 방문 2 와 방문 4 에 20 ml의 정맥혈을 채취한 후, 분석기관 (녹십자, 고려대학교)에 의뢰하여 유효성 및 기능성을 위해 아래와 같은 항목을 검사를 실시하였다.

Table. 방문 별 임상병리검사 지표 항목

		Visit 1	Visit 2	Visit 4
혈행개선	ADP, Collagen에 의한 혈소판 응집능 검사		○	○
	Serotonin		○	○
	PT, prothrombin time		○	○
	PTT, partial thromboplastin time		○	○
	Plasminogen		○	○
	Fibrinogen		○	○
	Thromboxane B ₂		○	○
	Thromboxane A ₂		○	○
	PGI-2		○	○
	Platelet count		○	○
혈중지질	Triglyceride		○	○
	Total cholesterol		○	○
	HDL-cholesterol		○	○
	LDL-cholesterol		○	○
생화학 검사	WBC, White blood cell		○	○
	RBC, Red blood cell		○	○
	Hemoglobin		○	○
	Hematocrit		○	○
	BUN, Blood urea nitrogen		○	○
	Albumin		○	○
	CRP protein, C-reactive protein		○	○
	Glucose	○	○	○
간기능	AST, Aspartate aminotransferase	○	○	○
	ALT, Alanine aminotransferase	○	○	○

혈액 이송은 검체가 있을 때마다 검체 운반 담당자가 아이스 박스에 보관하여 분석센터로 이송하였다. 모든 혈액 검체는 검사 완료 후 폐기하여 연구목적 이외에는 사용되지 않았다. 혈액학적 정상치 기준을 벗어나는 혈액검사 결과는 대상자의 증례기록서 (e-CRF)에 연구자 의견 (Comments)을 기재하였다.

9.2.6. 식습관 및 영양 섭취량 조사

1) 식습관 조사

식사 횟수, 아침식사의 여부, 식사시간 규칙성, 과식 횟수, 외식 횟수와 식사를 준비하는 사람이 누구인지 등의 질문을 설문지에 포함시켜 실시하였다.

2) 식이섭취량 조사

식사를 통한 영양소 섭취량을 조사하기 위해, 매 방문 시 ‘식사일기’를 배부하여, 대상자에게 일대일 면접으로 식품 모델 (Food model), 계량 컵, 계량스푼 등을 사용하여 정확한 눈대중 분량과 음식의 재료와 조리방법 기록을 설명하였으며 시험 진행자는 대상자가 평일 2 일과 주말 1 일을 포함하여 섭취한 음식명과 그에 포함된 식품 재료 명 및 섭취량을 모두 기록할 수 있도록 충분히 숙지시켰다. 조사한 자료를 기초로 영양평가 프로그램 (Computer Aided Nutritional Analysis for Professionals. Ver 4.0, 한국영양학회)과 식품성분표의 자료를 이용하여 개인별 1 일 영양소 섭취량을 분석하였다.

9.2.7. 반납식품 회수 및 순응도 확인

1) 섭취순응도: 시험식품의 섭취 순응도는 각 방문 시마다 남은 약물의 용량을 측정하는 것으로 만일 복약순응도가 2 회 연속 80% 미만인 경우 순응도가 낮은 (non-compliant) 것으로 간주하였다.

$$\text{순응도} = \frac{\text{실제 섭취한 시험식품(또는 대조식품)의 개수}}{\text{실제 섭취할 시험식품(또는 대조식품)의 개수}} \times 100\%$$

2) 용기 반납: 대상자들에게 식품을 복용하는 방법과 횟수 등을 알려주고 방문 3, 방문 4 (시험 종료 시)에는 복용하고 남은 식품과 포장용기를 반납하도록 하였다.

3) 미사용 식품의 처리

미사용 식품과 재고는 모두 의뢰자 ((주)고려인삼제조)에게 돌려주었다.

9.3 관찰 검사 방법

참여기간은 8 주이며, 방문 횟수는 4 회로 시행되었다. 매 방문시 소요되는 시간은 40~60 분 정도 소요되었다. 각 방문 별로 진행되는 절차는 아래와 같았다.

9.3.1 방문 1 (Screening visit, week -2)

스크리닝 검사를 다음과 같이 실시하였다.

- ① 시험에 참가하기 전에 시험과정에 대한 설명을 실시하였고 서면 동의를 받는다.
- ② 순서대로 Screening No를 지정 배부한다.
- ③ 인구학적 정보, 병력, 의약품 및 건강기능식품 복용력을 조사를 실시하였다. 음주력 및 흡연력에 대한 조사를 실시하였다.
- ④ 식이 섭취기록지를 배부 받고 작성 방법에 대한 교육을 실시하였다.

9.3.2 방문 2 (Baseline visit, week 0)

방문 1 (스크리닝)로부터 2주 (± 5 일째)에 이루어졌으며 아래와 같은 절차로 수행되었다.

- ① 무작위배정번호를 부여를 배부한다.
- ② 의약품 복용력 변화를 확인 하였다.
- ③ 공복상태에서 정맥혈 20 ml를 취하여 적혈구, 백혈구 및 염증수치를 보고, 빈혈, 간 기능 등을 검사를 실시하였다. 혈액응고 및 항혈전 수치를 확인하기 위해 검사를 실시하였다.
- ④ 체중, 신장, 체질량지수(BMI), 허리둘레를 측정을 실시하였다.
- ⑤ 활력징후(맥박, 혈압)을 측정을 실시하였다.
- ⑥ 식이섭취기록지를 확인을 실시하였다.
- ⑦ 식이섭취 빈도, 식습관조사를 실시하였다.
- ⑧ 4주 분량의 시험식품(고함량, 저함량) 또는 대조식품을 배부하였다.
- ⑨ 식사일지 및 복약일지를 배부하였다.

9.3.3 방문 3 (Interim visit week 4)

방문 2 (0주) 이후 4주 (± 5 일째)에 이루어졌으며 아래와 같은 절차로 수행되었다.

- ① 의약품 복용력 변화를 확인 하였다.
- ② 이상반응을 확인 하였다.
- ③ 체중, 신장, 체질량지수(BMI), 허리둘레를 측정을 실시하였다.
- ④ 활력징후(맥박, 혈압)을 실시하였다.
- ⑤ 식이섭취 및 복약일지를 확인 하였다.
- ⑥ 식습관조사를 실시하였다.
- ⑦ 식이섭취 및 복약일지를 배부 하였다.
- ⑧ 복용한 시험식품을 반납하고, 4주 분량의 시험식품(고함량, 저함량) 또는 대조식품을

배부 하였다.

9.3.4 방문 4 (Final visit, week 8)

방문 2(0주) 이후 8주 (±5일째)에 이루어졌으며 아래와 같은 절차로 수행되었다.

- ① 의약품 복용력 변화를 확인하였다.
- ② 이상반응을 확인하였다.
- ③ 공복상태에서 정맥혈 20 ml를 취하여 적혈구, 백혈구 및 염증수치를 보고, 빈혈, 간 기능 등을 검사를 실시하였다. 혈액응고 및 항혈전 수치를 확인하기 위해 검사를 실시하였다.
- ④ 체중, 신장, 체질량지수 (BMI)를 측정하였다.
- ⑤ 활력징후 (맥박, 혈압)을 측정하였다.
- ⑥ 식이섭취 및 복용일지를 확인하였다.
- ⑦ 식습관조사를 실시하였다.
- ⑧ 남은 시험식품을 반납하도록 하였다.

10. 시험중지 및 탈락기준, 분석 제외 기준

10.1. 시험 중지 및 탈락기준

본 시험의 시험책임자, 연구자는 대상자가 태극삼 추출물을 섭취할 수 있도록 교육하고, 시험계획서의 위반이 발생하지 않도록 계획서에 대해 충분히 숙지시켰다. 중대한 시험 위반의 경우, 예컨대, 대상자 중지/탈락 기준에 해당하거나, 대상자 선정/제외기준 위반, 동의서 미 취득, 섭취하지 않은 경우 등 대상자의 안전과 시험결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 위반의 경우 해당 대상자를 연구에서 탈락처리 (Drop-out)함을 원칙으로 하였다.

모든 대상자의 시험 완료 여부를 기록하고, 시험식품 섭취나 관찰이 중단된 경우에 시험 담당자는 시험 중지의 이유, 처치 및 임상증상에 대한 소견을 증례기록서에 기록하였다.

시험이 진행중인 대상자에 대하여 시험을 중단한 경우는 다음과 같다.

- 1) 대상자 (또는 보호자)가 인체적용시험의 동의를 철회한 경우
- 2) 담당자의 판단에 의해 연구의 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우
- 3) 시험제품 복용 등의 계획에 따른 순응도가 2 회 모두 80% 미만으로 유효성 평가를 하

지 못하는 경우

10.2. 분석 제외 기준

8 주까지 효능 평가에 대한 추적조사가 이루어지지 않은 경우에는 인체적용시험의 결과 처리 시 분석군 (계획서대로 진행된 완료례)에서 제외하였다.

11. 통계분석 방법

인체적용시험 계획서를 일정수준 이상으로 순응하고 시험을 완료한 대상자를 대상으로 분석을 실시하였다 (per-protocol (PP) set analysis).

시험 시작 전, 시험군과 대조군 간에 나이, 신체 계측, 혈압, 영양 섭취 상태 등 유효성 평가 변수에 영향을 주는 대상자의 속성에 통계적 차이가 있는지를 검정하기 위해 연속형 변수는 One-way ANOVA 로 유의성을 검정하였으며, Duncan multiple test로 사후 검정을 실시하였다. 또한, 성비 및 건강관련 습관 (음주, 흡연, 운동의 유무)와 같은 범주형 변수는 Chi-square test로 분석을 실시하였다.

혈행개선의 유효성평가 변수는 군 간의 비교 분석을 위해, 대상자의 속성 (Age, sex, Vitamin K 섭취량)을 통제한 공분산분석 (ANCOVA)로 유의성을 검정한 후, Bonferroni로 사후 검정을 실시하였다.

유효성평가 변수의 변화량 및 변화율에 군 간의 차이가 있는지 비교하기 위해, 다음과 같이 구하였다.

변화량= After 8 week-Baseline

변화율= (After 8 week-Baseline)/ Baseline*100

모든 유효성평가 변수는 각 군의 전후 비교를 위해 Paired t-test를 실시하였다.

결과 값은 연속형 변수 (continuous variable)는 mean±SD (standard deviation)로 나타내고, 범주형 변수 (discrete variable)는 n (%)로 나타냈다.

13.12. 통계분석 결과

12.1. 연구대상자의 시험 참여 현황

총 119 명의 대상자를 스크리닝하였다. 스크리닝에서 탈락한 17 명을 제외한 102 명이 대조군 (placebo), 저함량섭취군 (L-TG), 또는 고품량섭취군 (H-TG)에 34 명씩 무작위로 배정되었다 (Figure 1). 스크리닝에서 탈락한 대상자 사유는 선정기준에 적합하지 않은 자 (7 명), 무작위 배정되기 전에 동의 철회 (10 명)이다.

8 주간의 Follow-up 기간 중, 대조군 6 명, 저함량섭취군 5 명, 고품량 섭취군 6 명으로, 총 17 명이 중도 탈락하였다. 탈락사유는 9 명은 동의를 철회하였고, 8 명은 낮은 순응률 (80% 미만)로 인하여 탈락되었다.

따라서, 통계학적 분석 기준에 부합되는 자 (PP 분석)는 대조군 28 명, 저함량섭취군 29 명, 고품량섭취군 28 명으로, 총 85 명으로, 분석을 시행하였다. 이는 최종 평가 예수인 각군의 27 명 이상을 만족하는 인원이다.

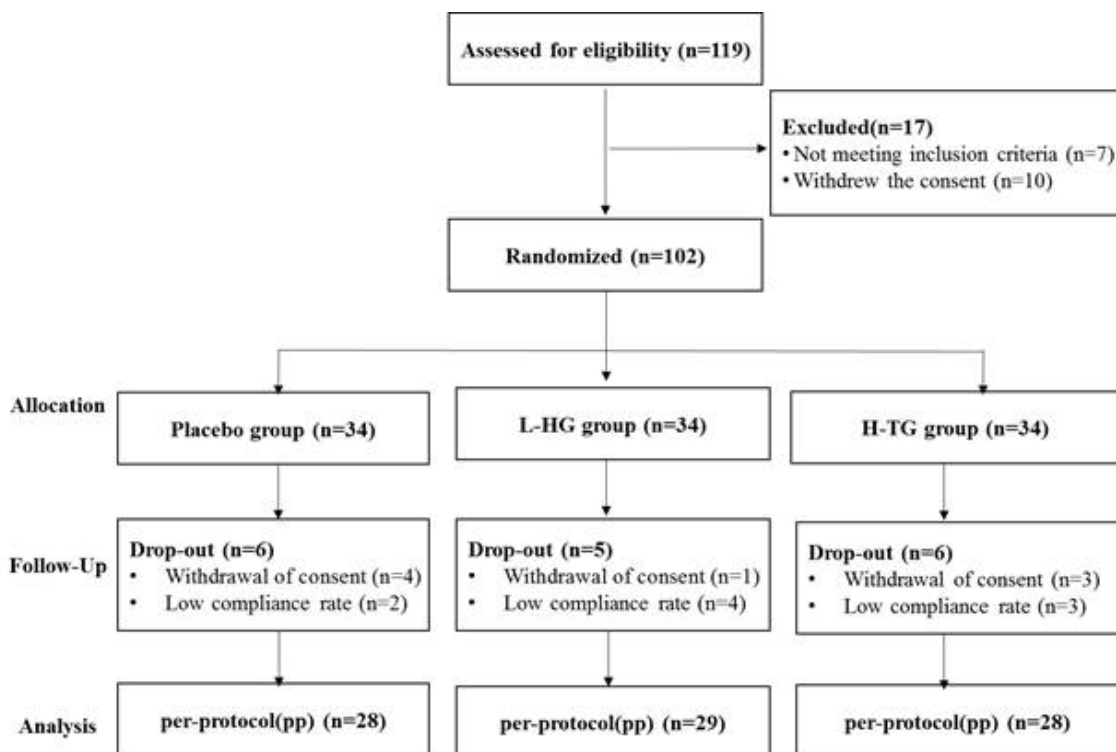


Figure 1. Flow diagram

12.2 인구통계학적 정보 및 건강관련 습관

대상자의 인구학적 정보 및 신체계측 결과를 Table 1 에, 건강관련 음주, 흡연 및 운동 여

부는 Table 2 에 제시하였다. 대상자의 인구학적 정보 및 특성을 군별로 비교하여 차이가 있는 요인을 확인하고자 하였다.

본 연구에 참여한 대상자는 남성이 31 명 (36.5%), 여성이 54 명 (63.5%)이었다. 군별로는 대조군, 저함량섭취군 (L-TG)과 고함량섭취군 (H-TG)의 남성은 각각 10 명 (35.7%), 12 명 (41.4%), 9 명 (32.1%) 이었으며, 여성은 18 명 (64.3%), 19 명 (67.9%), 17 명 (58.6%) 으로 군 간의 유의한 차이는 없었다 (P=0.765).

연령은 대조군, 저함량섭취군 (L-TG)과 고함량섭취군 (H-TG)이 각각 32.0±10.6세, 35.8±13.1세, 35.7±11.3세로 군 간의 유의한 차이는 없었다 (P=0.364).

체중 (P=0.567), 체질량지수 (P =0. 0.314) 및 체지방율 (P=0.370)에서 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 수축기 혈압 (P =0.140)및 이완기 혈압 (P=0.502)에서도 군간의 유의적인 차이가 없었다.

건강관련 습관에서, 흡연 여부에서는 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (P =0.663). 음주를 하는 사람은 대조군, 저함량섭취군과 고함량섭취군, 에서 각각 21 명 (75.0%), 12 명 (41.4%), 13 명 (46.4%)으로 유의적인 차이를 보였다 (P =0.013). 운동여부에서는 대조군, 저함량섭취군과 고함량섭취군에서 각각 16명 (57.1%), 10명 (35.7%), 21명 (72.4%)으로 군 간의 유의적인 차이를 보였다 (P=0.020).

Table 1. 인구학적 정보

Variables	Placebo	L-TG	H-TG	p ²⁾
Drinking status (n, %)				0.013*
Yes	21(75.0) ¹⁾	12(41.4)	13(46.4)	
No	6(22.2)	17(58.6)	15(53.6)	
Smoking status (n, %)				0.663
Yes	4(14.3)	2(6.9)	3(10.7)	
No	24(85.7)	27(93.1)	25(89.3)	
Regular exercise (n, %)				0.020*
Yes	16(57.1)	21(72.4)	10(35.7)	
No	12(42.9)	8(27.6)	18(64.3)	

¹⁾ Values are expressed as means ± SD.

²⁾ No significant difference between among groups at P<0.05 by obtained from χ^2

tests for

categorical variables or One-wayANOVAfor continuous variables.

Table 2. 건강관련 음주, 흡연 및 운동 여부

Characteristics	Placebo(n=28)	L-TG(n=29)	H-TG(n=28)	p2)
Gender (male/female)	10/18	12/17	9/19	0.765
Age (year)	32.0±10.6 ¹⁾	35.8±13.1	35.7±11.3	0.364
Height (cm)	165.98±7.9	167.48±9.8	166.7±7.3	0.844
Weight (kg)	63.4±10.7	64.5±14.2	61.1±9.0	0.567
Body mass index (kg/m ²)	22.9±2.7	22.7±3.3	21.9±2.3	0.314
Body fat (%)	27.2±7.2	24.8±7.8	24.9±6.0	0.370
Waist circumference (cm)	79.2±8.1	81.2±8.7	79.1±7.1	0.527
Systolic blood pressure (mmHg)	116.86±12.5	115.20±13.2	109.8±9.7	0.140
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.6±9.6	69.2±8.1	69.43±9.2	0.502
Pulse rate (beats/min)	75.7±9.5	75.5±9.6	76.9±8.80	0.256

¹⁾ Values are n (%)

²⁾ Significantly different among the groups by χ^2 tests for categorical variables *p<0.05.

12.3 유효성 평가 결과

혈소판은 agonist 에 의해 응집되는데, 혈소판 응집이 과도하게 일어나면 혈행 장애가 일어나게 되므로 혈행 개선의 바이오마커로 사용될 수 있다. 혈소판 응집을 일으키는 agonist 로는 thrombin, ADP, collagen, thrombin, 혈소판활성인자, serotonin 등이 있다.

본 연구에서는 1 차 유효성 지표로 ADP 에 의한 혈소판 응집 반응을 2 차 유효성 지표에서 collagen 에 의한 혈소판 응집 반응 및 응고에 관여하는 기타 지표를 살펴보았다.

결과로서 보정 전 결과 (Table 3), 응집에 영향을 줄 수 있는 인자인 나이, 성별, 비타민 K 섭취량을 보정하여 분석한 결과 (Table 3-1), 변화량 (Table 3-2), 변화율 (Table 3-3) 및 성별에 따른 층화분석 결과 (Table 3-4, Table 3-5)를 제시하였다.

12.3.1. ADP 에 의한 혈소판 응집 반응

ADP 에 의한 혈소판 응집검사에서 시험 식품 섭취 전과 후, 세 군간의 유의적인 차이는

보이지 않았다 (Table 3, Table 3-1).

시험식품 섭취 전과 8 주 후, 대조군과 저함량섭취군이 각각 유의적인 증가를 보였다 (대조군: 63.7 ± 17.8 (U) \rightarrow 68.1 ± 13.5 (U), $P=0.025$, 저함량섭취군: 56.3 ± 8.2 (U) \rightarrow 60.9 ± 9.5 (U), $P=0.028$) (Table 3).

성별에 따른 증화분석 결과, 남성에서 8 주 후, ADP 에 의한 혈소판 응집검사에서 군 간의 유의적인 차이를 보였다 ($p=0.031$) (Table 3-4). 이는 대조군 (67.9 ± 3.4 (U))이 유의적으로 가장 높았고, 저함량섭취군 (58.4 ± 3.1 (U))과 고함량섭취군 (54.1 ± 3.7 (U)) 은 대조군보다 낮았으나, 두 군 사이에 유의적인 차이는 없었다.

ADP 에 의한 혈소판 응집검사의 변화량 (Table 3-2)과 변화율 (Table 3-3)을 살펴본 결과, 군 간의 유의적인 차이는 없었다.

12.3.2. Collagen 에 의한 혈소판 응집 반응

Collagen 에 의한 혈소판 응집 반응에서, 섭취 전 과 후 세 군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다 (Table 3, Table 3-1). 군 내 비교, 변화량 및 변화율, 성별에 따른 증화 분석 결과, 유의적인 변화를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

12.3.3. 그 외 혈소판 응집관련 지표

혈소판이 활성화되면서 serotonin, Platelet, thromboxane A_2 등을 유리되어 주위의 주위의 다른 혈소판의 응집을 증폭시키고, 혈장에 존재하는 coagulation factor와 반응하여 혈괴 (clot)를 형성하게 되는데, serotonin, thromboxane A_2 의 분비를 억제하는 소재는 혈행 개선에 효능이 있을 것으로 판단한다. 또한, PGI-2는 TXA_2 와 길항작용을 함으로써 혈소판의 활성화 및 플라그 형성을 방해한다. 이는 혈관 이완에도 관여하는 것으로 알려져 있으며, 혈소판 응집을 저해하므로, PGI-2의 분비를 촉진하는 소재는 혈행 개선 효능이 있을 것으로 판단한다.

본 연구에서는 혈소판 응집에 관여하는 serotonin, Platelet, TXA_2 , TXB_2 를 시험식품 섭취

전과 후, 세 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). 그러나, 8 주 후, 대조군에서 TXB₂가 유의적으로 감소하였다 (5.0 ± 5.8 (ng/ml) → 3.3 ± 4.4 (ng/ml), $P=0.043$) (Table 3). 이는 성별로 층화분석을 하였을 때, 남성에서는 유의적인 변화가 없었던 반면, 여성에서 유의적인 감소가 있었던 것으로 나타났다 (여자: 5.3 ± 6.7 (ng/ml) → 3.7 ± 1.0 (ng/ml), $P=0.033$) (Table 3-5).

한편, PGI-2는 섭취 전과 8 주 후, 군 간의 유의적인 차이는 없었다 ($P=0.602$). 군 내 비교 결과, 저함량섭취군 및 고함량섭취군에서 각각 유의적인 증가를 보였다 (저함량섭취군: 176.7 ± 61.8 (pg/ml) → 245.6 ± 94.3 (pg/ml), $P=0.001$, 고함량섭취군: 181.1 ± 77.2 (pg/ml) → 230.8 ± 89.8 (pg/ml), $P=0.014$).

성별로 층화분석 한 결과, 여성에서 8 주 후, PGI-2 에서 저함량섭취군과 고함량섭취군에서의 유의적인 증가 (저함량섭취군: 152.6 ± 46.7 → 245.6 ± 94.3 ($P=0.003$), 고함량섭취군: 162.1 ± 53.6 → 208.6 ± 89.8 ($P=0.026$))를 보였으나, 군 간의 유의적인 차이는 없었다 ($P=0.712$) (Table 3-5).

12.3.4. 혈액응고 관련 지표

혈액응고는 여러가지 응고 인자들이 연속적으로 반응하여 피브리노겐 (fibrinogen)을 피브린 (fibrin)으로 활성화시킴으로써 이루어진다. fibrinogen을 감소시키는 물질은 혈행 개선 가능성이 있는 것으로 판단한다. 본 연구 결과, Fibrinogen 및 Plasminogen은 섭취 전과 후, 세 군간 또는 군 내에서 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$) (Table 3, Table 3-1).

12.3.5. 혈액응고시간 관련 지표

외인성 경로 (extrinsic pathway)는 손상을 입은 혈관의 혈액 중에 조직액이 혼입되어 작동하는 응고 구조이며 혈관벽이나 주위 조직의 손상으로 시작된다. 한편, 내인성 경로 (intrinsic pathway)는 Thromboplastin은 프로트롬빈이 트롬빈으로 전환되는 것을 돕는 단백질로 응고과정을 촉진하는데, 트롬빈은 피브린 고정인자를 활성화하여 안정화된 혈병을 만들게 된다.

본 연구에서는 혈액응고 인자의 활성화의 내인성경로-공통경로에 관여하는 시간 (PT) 및 외인성경로의 시간 (PTT)을 측정하였다. 시간이 길수록 혈전이 늦게 생기는 것이므로 혈행이 개선되는 것으로 판단한다. 본 연구 결과에서는, PT 와 PTT 모두 시험식품 섭취 전과 후, 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$) (Table 3, Table 3-1). 군 내 비교에서, PT는 저함량섭취군에서 유의적인 증가 (13.0 ± 0.6 (sec) \rightarrow 13.2 ± 0.7 (sec), $P=0.016$)를 보인 반면, PTT는 고함량섭취군에서 유의적인 감소를 보였다 (39.0 ± 3.4 (sec) \rightarrow 38.2 ± 3.1 (sec), $P=0.041$).

Table 3. 혈행개선 유효성지표 (보정 전)

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Aggregation							
ADP (U)	63.7 \pm 17.8	68.1 \pm 13.5 ¹⁾ †	56.3 \pm 8.2	60.9 \pm 9.5 [†]	59.2 \pm 14.1	63.2 \pm 16.5	0.125
Collagen (U)	51.4 \pm 14.0	54.2 \pm 11.6	45.6 \pm 8.6	49.0 \pm 8.4	48.4 \pm 12.8	50.3 \pm 11.7	0.164
Serotonin (ng/dl)	144.0 \pm 73.9	139.5 \pm 65.8	135.3 \pm 65.8	137.6 \pm 88.7	144.0 \pm 124.7	161.6 \pm 133.4	0.605
Platelet (10 ³ /ul)	259.8 \pm 65.0	260.1 \pm 74.4	261.5 \pm 56.0	261.3 \pm 60.1	265.6 \pm 65.4	260.1 \pm 65.6	0.997
TXA ₂ (pg/ml)	424.5 \pm 368.9	379.6 \pm 323.1	364.9 \pm 337.0	406.9 \pm 327.8	504.2 \pm 345.1	454.6 \pm 326.4	0.709
TXB ₂ (ng/ml)	5.0 \pm 5.8	3.3 \pm 4.4 [†]	3.5 \pm 2.5	3.5 \pm 4.1	4.1 \pm 2.8	3.6 \pm 3.2	0.963
PGI-2 (pg/ml)	196.9 \pm 73.2	220.7 \pm 76.6	176.7 \pm 61.8	245.6 \pm 94.3 [†]	181.1 \pm 77.2	230.8 \pm 89.8 [†]	0.559
Fibrinogen (mg/dl)	260.9 \pm 50.1	266.3 \pm 52.4	253.4 \pm 93.4	279.1 \pm 77.9	255.7 \pm 59.9	258.8 \pm 50.7	0.456
Plasminogen (%)	98.9 \pm 24.4	102.0 \pm 14.2	104.8 \pm 47.2	99.7 \pm 17.6	99.9 \pm 12.1	100.1 \pm 10.1	0.821
Coagulation							
PT (sec)	12.9 \pm 0.5	13.1 \pm 0.5	13.0 \pm 0.6	13.2 \pm 0.7 [†]	13.0 \pm 0.5	13.2 \pm 0.4	0.540
PTT (sec)	38.3 \pm 4.2	38.4 \pm 4.1	37.8 \pm 3.5	38.2 \pm 2.8	39.0 \pm 3.4	38.2 \pm 3.1 [†]	0.960

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I2; TXA2, Thromboxane A2; PTT, Partial thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean \pm SD for age, sex, dietary vitamin K intake (Baseline).

²⁾ No significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple

comparison of ANCOVA.

† Significantly different from the baseline by paired t-test at $^{\dagger}p < 0.05$.

Table 3-1. 혈행개선 유효성지표 (보정 후)

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Aggregation							
ADP (U)	63.7±17.8	66.0±1.9 ^{1),†}	56.3±8.2	63.2±1.8 [†]	59.2±14.1	62.9±1.8	0.441
Collagen (U)	51.4±14.0	53.0±1.7	45.6±8.6	50.5±1.7	48.4±12.8	49.9±1.7	0.410
Serotonin (ng/dl)	144.0±73.9	140.1±10.0	135.3±65.8	143.8±9.9	144.0±124.7	154.6±10.0	0.574
Platelet (10 ³ /ul)	259.8±65.0	261.6±7.2	261.5±56.0	262.9±7.1	265.6±65.4	257.1±7.2	0.840
TXA ₂ (pg/ml)	424.5±368.9	396.2±43.3	364.9±337.0	454.4±42.6	504.2±345.1	388.9±43.6	0.505
TXB ₂ (ng/ml)	5.0±5.8	3.0±0.7 [†]	3.5±2.5	3.9±0.6	4.1±2.8	3.6±0.6	0.619
PGI-2 (pg/ml)	196.9±73.2	219.8±16.5	176.7±61.8	243.2±16.2 [†]	181.1±77.2	234.3±16.5 [†]	0.602
Fibrinogen (mg/dl)	260.9±50.1	265.1±10.4	253.4±93.4	280.9±10.2	255.7±59.9	258.1±10.4	0.286
Plasminogen (%)	98.9±24.4	103.0±2.6	104.8±47.2	98.7±2.5	99.9±12.1	100.1±2.6	0.491
Coagulation							
PT (sec)	12.9±0.5	13.1±0.1	13.0±0.6	13.2±0.1 [†]	13.0±0.5	13.1±0.1	0.643
PTT (sec)	38.3±4.2	38.5±0.4	37.8±3.5	38.6±0.4	39.0±3.4	37.7±0.4 [†]	0.249

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I₂; TXA₂, Thromboxane A₂; PTT, Partial thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex, dietary vitamin K intake (Baseline).

²⁾ No significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

† Significantly different from the baseline by paired t-test at $^{\dagger}p < 0.05$.

Table 3-2. 혈행개선 유효성지표 변화량

	Placebo	L-TG	H-TG	p ²⁾
Aggregation				
ADP (U)	5.2±2.0 ¹⁾	4.3±2.0	3.3±2.0	0.800
Collagen (U)	3.2±1.7	3.5±1.7	1.4±1.7	0.730
Serotonin (ng/dl)	-0.5±10.0	2.1±9.8	13.8±10.0	0.565
Platelet (10 ³ /ul)	0.4±7.4	-0.4±7.2	-5.3±7.4	0.842
TXA ₂ (pg/ml)	-29.8±43.3	36.9±44.1	-59.3±45.0	0.300
TXB ₂ (ng/ml)	-1.7±0.7	0.1±0.7	-0.5±0.7	0.212
PGI-2 (pg/ml)	27.3±19.1	67.4±182	47.8±19.1	0.332
Fibrinogen (mg/dl)	8.5±10.4	24.3±10.2	1.5±10.4	0.286
Plasminogen (%)	3.7±2.6	-5.7±2.5	0.3±6.0	0.522
Coagulation				
PT (sec)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.648
PTT (sec)	0.2±0.5	0.4±0.5	-0.9±0.4	0.121

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I₂; TXA₂, Thromboxane A₂;

PTT, Partial

thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean±SD.

²⁾ No significantly different among the groups using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

Table 3-3. 혈행개선 유효성지표 변화율

	Placebo	L-TG	H-TG	p ²⁾
Aggregation				
ADP (U)	152.3±30.8 ¹⁾	70.4±30.2	60.8±30.5	0.329
Collagen (U)	140.9±36.3	71.3±35.7	60.5±36.1	0.247
Serotonin (ng/dl)	54.3±63.0	15.6±61.9	200.4±63.1	0.099
Platelet (10 ³ /ul)	-2.9±27.4	9.2±26.9	-8.2±27.4	0.898
TXA ₂ (pg/ml)	222.9±297.6	546.2±293.0	286.4±299.9	0.717
TXB ₂ (ng/ml)	326.7±253.4	98.1±248.2	150.9±250.6	0.803
PGI-2 (pg/ml)	307.1±123.6	462.9±121.5	290.9±123.3	0.602
Fibrinogen (mg/dl)	48.0±47.1	140.0±47.1	29.2±47.2	0.215
Plasminogen (%)	-1.6±20.9	19.9±20.1	-0.9±20.5	0.700
Coagulation				
PT (sec)	13.9±6.9	19.8±6.7	11.5±6.9	0.674
PTT (sec)	6.2±11.2	10.6±11.1	-15.8±11.3	0.218

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I₂; TXA₂, Thromboxane A₂; PTT, Partial thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean±SD.

²⁾ No significantly different among the groups using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

Table 3-4. 혈행개선 유효성지표 (보정 후) -남자

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Aggregation							
ADP (U)	63.1±16.7	67.9±3.4 ^{1,3)a}	56.7±9.3	58.4±3.1 ^b	50.8±10.8	54.1±3.7 ^b	0.031
Collagen (U)	53.5±14.5	53.0±2.8	45.1±9.9	48.3±2.6	44.1±9.9	48.2±3.0	0.422
Serotonin (ng/dl)	114.9±51.1	108.4±18.3	134.7±51.5	130.1±16.6	119.2±44.6	148.1±19.6	0.356
Platelet (10 ³ /ul)	250.6±48.1	258.5±18.7	287.8±61.6	274.8±16.9	260.8±57.5	251.2±20.0	0.649
TXA ₂ (pg/ml)	495.8±392.0	342.5±104.1	524.8±391.4	475.0±94.5	480.0±432.3	513.4±111.5	0.502
TXB ₂ (ng/ml)	4.4±4.0	3.4±1.2	2.8±2.8	3.3±1.1	4.5±3.9	2.2±1.3	0.774
PGI-2 (pg/ml)	211.9±93.4	243.3±28.6	210.7±66.2	260.1±26.0	221.3±104.8	259.4±30.7	0.895
Fibrinogen (mg/dl)	235.4±59.9	237.2±16.6	241.0±97.4	249.7±15.1	239.7±50.7	223.7±17.8	0.549
Plasminogen (%)	103.0±11.5	102.7±4.7	109.6±73.0	93.7±4.2	99.1±10.7	101.6±5.0	0.311
Coagulation							
PT (sec)	13.0±0.6	13.1±0.2	13.0±0.6	13.4±0.2	13.0±0.5	13.3±0.2	0.665
PTT (sec)	39.0±3.2	37.6±1.0	37.8±3.5	38.6±0.9	39.0±3.4	37.5±1.1	0.427

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I2; TXA2, Thromboxane A2; PTT, Partial

thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex, dietary vitamin K intake (Baseline).

²⁾ Significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

³⁾ No significantly different from the baseline by paired t-test at p < 0.05.

^{a,b} Different superscripts indicate significant differences among the groups at 8 week.

Table 3-5. 혈행개선 유효성지표 (보정 후) -여자

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Aggregation							
ADP (U)	64.0±18.9	68.6±3.6 ¹⁾	56.1±7.6	62.4±3.6	63.2±13.9	67.4±3.5	0.448
Collagen (U)	50.3±14.0	54.8±3.0	45.9±7.9	49.2±3.0	50.4±13.7	51.4±2.9	0.422
Serotonin (ng/dl)	160.2±80.7	158.0±29.5	135.7±75.8	147.6±29.6	155.8±148.3	162.6±28.4	0.933
Platelet (10 ³ /ul)	264.9±73.6	259.1±17.5	242.9±44.6	251.3±17.6	267.9±70.2	266.7±16.9	0.822
TXA ₂ (pg/ml)	384.8±360.8	395.9±82.2	252.0±246.3	368.0±82.5	515.6±308.5	422.7±79.1	0.893
TXB ₂ (ng/ml)	5.3±6.7	3.7±1.0 [†]	4.0±2.3	3.5±1.0	3.9±2.3	4.1±1.0	0.916
PGI-2 (pg/ml)	188.5±60.7	220.7±76.6	152.6±46.7	245.6±94.3 [†]	162.1±53.6	208.6±89.8 [†]	0.712
Fibrinogen (mg/dl)	275.0±39.0	280.3±14.4	262.2±92.4	299.0±15.0	263.3±63.6	278.1±14.4	0.555
Plasminogen (%)	96.6±29.3	102.0±3.3	101.4±14.2	102.5±3.3	100.3±12.9	100.3±3.2	0.892
Coagulation							
PT (sec)	12.8±0.5	13.1±0.1	12.8±0.5	13.1±0.1	13.0±0.6	13.1±0.1	0.702
PTT (sec)	37.9±4.7	38.4±0.9	37.5±3.9	38.2±0.9	39.6±3.3	38.7±0.8 [†]	0.915

ADP, Adenosine diphosphate; PGI-2, Prostaglandin I₂; TXA₂, Thromboxane A₂; PTT, Partial thromboplastin time; PT, Prothrombin time.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex, dietary vitamin K intake (Baseline).

²⁾ No significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

[†] Significantly different from the baseline by paired t-test at [†]p < 0.05.

12.3. 혈중 지질 지표

시험식품 섭취 전과 후에 혈중 지질 및 콜레스테롤 농도 변화를 비교 결과를 Table 4, Table 4-1 에 나타냈다.

시험제품 섭취 전과 후, 혈중 Triglyceride, Total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL cholesterol의 군 간 또는 군 내에 차이는 보이지 않았다 ($P>0.05$). 또한, 나이와 성별을 보정한 결과에서도 식품섭취 군 간 또는 군 내 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$).

Table 4. 혈중지질 지표 (보정 전)

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Triglyceride (mg/dl)	90.2±15.3	93.4±41.6 ^{1,3)}	92.4±47.8	106.0±60.0	100.1±43.9	95.0±42.1	0.569
Total-cholesterol mg/dl)	186.8±26.1	197.9±31.4	182.9±34.1	186.0±29.3	186.2±28.8	186.8±26.1	0.233
LDL-cholesterol (mg/dl)	118.0±25.2	124.0±27.4	115.6±31.2	117.6±31.3	114.4±25.9	114.6±27.7	0.460
HDL-cholesterol (mg/dl)	65.4±15.3	66.3±16.2	59.2±15.1	58.1±14.2	63.4±14.6	65.0±17.5	0.122

HDL, High density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein.

¹⁾ Values are adjusted mean ± SD for age, sex.

²⁾ No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA.

³⁾ No significantly different from the baseline by paired t-test at $p < 0.05$.

Table 4-1. 혈중지질 지표 (보정 후)

	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Triglyceride (mg/dl)	90.2±15.3	97.2±6.9 ^{1,3)}	92.4±47.8	107.1±6.7	100.1±43.9	90.1±6.8	0.213
Total-cholesterol mg/dl)	186.8±26.1	194.3±3.5	182.9±34.1	188.8±3.4	186.2±28.8	187.5±3.5	0.353
LDL-cholesterol (mg/dl)	118.0±25.2	123.1±2.9	115.6±31.2	117.2±2.9	114.4±25.9	115.9±2.9	0.200
HDL-cholesterol (mg/dl)	65.4±15.3	63.7±1.9	59.2±15.1	61.2±1.8	63.4±14.6	64.5±1.8	0.413

HDL, High density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein.

1) Values are adjusted mean \pm SD for age, sex.

2) No significantly different among the groups by obtained using Bonferroni multiple comparison of ANCOVA.

3) No significantly different from the baseline by paired t-test at $p < 0.05$.

12.5.3 혈액학적 및 혈액 화학적 검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사 결과는 Table 5 와 같다. 식품 섭취 전과 후, 세 군간의 유의한 변화를 보인 지표는 없었다 ($P > 0.05$).

각 지표의 군 내 비교에서, 대조군의 RBC가 유의적인 증가를 보였으나, 모두 정상 범위 내에서의 변화였다.

Table 5. 혈액학적 및 혈액화학적 검사

Variables	Placebo		L-TG		H-TGF		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
White blood cell (10^3 /ul)	5.7 \pm 1.4	6.1 \pm 1.7 ¹⁾	5.3 \pm 1.5	5.6 \pm 1.9	5.8 \pm 1.4	5.7 \pm 1.4	0.440
Red blood cell (10^6 /ul)	4.7 \pm 0.5	4.8 \pm 0.5 [†]	4.7 \pm 0.5	4.8 \pm 0.5	4.6 \pm 0.4	4.7 \pm 0.4	0.642
Hemoglobin (g/dL)	14.2 \pm 1.5	14.4 \pm 1.5	14.0 \pm 1.6	14.1 \pm 1.5	14.1 \pm 1.4	14.2 \pm 1.3	0.711
Hematocrit (%)	42.9 \pm 3.9	43.4 \pm 4.2	42.4 \pm 3.8	42.5 \pm 3.8	42.1 \pm 3.5	42.7 \pm 3.4	0.638
AST (U/L)	20.9 \pm 5.8	18.6 \pm 4.6	20.6 \pm 6.7	22.6 \pm 9.0	19.2 \pm 4.4	19.8 \pm 6.7	0.101
ALT (U/L)	17.0 \pm 9.4	16.8 \pm 8.8	16.1 \pm 7.9	18.3 \pm 7.4	16.6 \pm 8.1	17.6 \pm 10.1	0.817
BUN (mg/dL)	12.7 \pm 2.7	13.3 \pm 3.3	12.9 \pm 2.8	13.2 \pm 3.2	12.8 \pm 3.5	12.4 \pm 2.9	0.527
Total protein (g/dL)	7.4 \pm 0.3	7.5 \pm 0.4	7.3 \pm 0.4	7.4 \pm 0.4	7.4 \pm 0.5	7.4 \pm 0.4	0.625
Albumin (g/dL)	4.6 \pm 0.2	4.7 \pm 0.2 [†]	4.6 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2	4.6 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2	0.646
Glucose (mg/dL)	85.1 \pm 9.2	83.9 \pm 8.6	87.1 \pm 10.5	86.7 \pm 8.9	86.4 \pm 7.6	88.1 \pm 7.8	0.174
CRP (mg/L)	0.9 \pm 1.2	0.7 \pm 0.7	1.3 \pm 3.4	1.0 \pm 2.5	0.5 \pm 0.5	0.4 \pm 0.5	0.377

AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; BUN, Blood urea nitrogen;

CRP, C - reactive protein.

1) Values are adjusted mean \pm SD for age, sex.

2) No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA.

† Significantly different from the baseline by paired t-test at $\dagger p < 0.05$.

12.4 대상자의 시험식품 순응도

대상자의 8 주간 순응도를 4 주씩 나누어 2 번씩 실시하였고, 순응률이 80% 미만으로 중도탈락된 대상자를 제외한 결과이며 그 값은 Table 6 과 같다.

대조군, 저함량섭취군, 고함량섭취군의 8 주간 순응도는 각각 $90.0 \pm 7.7\%$, $90.2 \pm 7.1\%$, $91.7 \pm 8.5\%$ 이었으며, 섭취 중 불편함을 호소한 사람은 없었다. 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다 ($P=0.661$).

Table 6. 순응도¹⁾

	Placebo	H-TG	L-TG	p ³⁾
0-4 week	87.9 \pm 10.1 ²⁾	90.8 \pm 8.5	90.9 \pm 12.3	0.469
4-8 week	92.1 \pm 8.3	89.2 \pm 10.0	92.5 \pm 11.4	0.477
0-8 week	90.0 \pm 7.7	90.2 \pm 7.1	91.7 \pm 8.5	0.661

1) 순응도 = $\frac{\text{실제 섭취한 시험식품(또는 대조식품)의 개수}}{\text{실제 섭취할 시험식품(또는 대조식품)의 개수}} \times 100\%$

2) Values are mean \pm SD.

3) No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA at $p < 0.05$.

12.5 식이섭취조사

시험 식품 섭취 전, 8 주 후, 에너지, 탄수화물, 단백질, 지질, 콜레스테롤, 식이섬유, 칼슘 및 비타민 K에 대한 섭취량을 비교한 결과, 군 간 및 군 내에 유의적인 차이는 보이지 않았다 ($P > 0.05$).

Table 7. 식이섭취조사 결과

Variables	Placebo		L-TG		H-TG		p ²⁾
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8	
Energy (kcal)	1477.2±474.7 ¹⁾	1547.6±436.4 ³⁾	1552.9±386.0	1596.0±425.2	1540.0±375.3	1575.6±413.5	0.871
Carbohydrate (g)	204.0±66.2	209.5±63.3	213.4±52.7	219.3±60.4	202.9±60.0	225.6±64.8	0.662
Protein (g)	59.6±20.2	56.7±18.1	60.9±17.5	64.6±19.0	63.0±18.3	61.3±14.9	0.235
Fat (g)	44.5±16.0	47.8±16.0	46.8±17.5	48.1±17.9	58.4±55.3	48.1±14.9	0.989
Cholesterol (mg)	314.5±137.8	284.9±126.5	330.1±131.3	329.6±133.6	315.8±142.2	409.7±447.6	0.244
Fiber (g)	14.2±5.2	15.4±5.2	15.3±4.4	15.7±5.4	15.7±5.5	16.4±5.4	0.789
Calcium (mg)	402.0±178.9	447.5±169.3	401.6±195.2	380.9±148.8	399.3±149.8	441.8±190.5	0.265
Vitamin K (mg)	2011.6±762.3	2129.7±721.8	2130.0±531.8	2125.3±637.8	2283.2±782.0	2310.6±817.7	0.554

1) Values are mean ± SD.

2) No significantly different among the groups by Duncan multiple comparison of ANOVA at p<0.05.

3) No significantly different from the baseline by paired t-test at p < 0.05.

13. 요약 및 결론

- 총 119 명을 스크리닝하였으며, 선정기준에 적합하지 않은 대상자 7 명과 무작위배정 전 동의철회한 대상자 10 명을 포함하여 17 명을 제외한, 102 명이 대조군, 저함량섭취군, 고함량섭취군에 각각 34 명씩 무작위 배정되었다.
- 8 주간의 Follow-up 기간 중 대조군에서 6 명, 저함량섭취군에서 5 명, 고함량섭취군에서 6 명이 중도 탈락 (동의 철회 및 80% 미만의 순응률) 되어, 총 85 명의 대상자를 분석하였다.
- 세 군간의 대상자의 인구학적 특성 (연령, 성별비), 신체계측 (체중, 체질량지수, 체지방량) 및 혈압에는 군간의 유의적인 차이가 없었다.
- 건강관련습관에서 흡연을 제외한, 음주 및 운동 여부에서 세 군간의 유의적인 차이를 보였으나, 이는 성별로 층화분석을 하였을 때 유의성이 없었다.
- 혈행개선 유효성 지표 분석 결과, 시험 전 군 간의 차이가 없으나 연령, 성별, vit K 섭취량 보정 후, 태극삼 섭취군의 PGI-2 (pg/ml) 가 유의적으로 증가하였다 (저함량섭취군: 176.7 ± 61.8 → 243.2 ± 16.2 ; 고함량섭취군 181.1 ± 77.2 → 234.3 ± 16.5). 또한 태극삼 저함량섭취군에서 PT가 13.0초에서 13.2초로 유의적으로 증가하였으나, 8주 후 군간의 차이가 없어 의미가 있다고 할 수 없음.
- 성별로 층화분석 한 결과, 남성에서 8주 후, ADP (U)에서 대조군이 유의적으로 가장 높았고, 저함량섭취군과 고함량섭취군에서의 유의적인 차이는 없었다. 여성의 경우, 저함량섭취군과 고함량섭취군에서 PGI-2 (pg/ml)가 유의적으로 증가하였다.
- 혈중지질농도, 혈액화학적검사, 식이섭취에는 시험제품 섭취 전 후, 군간의 유의적인 차이가 없었다.

4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
<p>가. 최종목표</p> <p>: 태극삼, 흑삼의 제조 공정 개발 및 이화학적 특성 구명과 인삼지상부의 효능 검증을 통한 수출국 맞춤형 제품 개발</p> <p>나. 연도별 연구 개발내용 및 달성도</p> <p>○ 1차년도</p>			
당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
인삼 잎/줄기의 주름개선 전임상 연구		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼 잎/줄기의 주름개선 전임상 연구 - Elastase 활성 저해 연구 - Collagenase 활성저해 연구 - Collagen 합성 저해능 연구 - MMP-1 합성 저해능 연구 	100
인삼 지상부를 활용한 화장품 소재 개발 : 1품목		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼지상부를 이용한 화장품 소재 개발 - 인삼 잎/줄기를 이용한 화장품 원료화 - 인삼 열매를 이용한 화장품 원료화 - 제조 공정 검토 및 표준화 	100
농가로부터 인삼부산물 원료 확보		○ 인삼 농가(10여농가)로부터 부산물(과육, 지상부) 확보를 하고 건조하여 1세부, 2협동에게 제공	100
인삼부산물로부터 기능성 물질 추출물, 사포닌(진세노사이드) 고함유 추출물 조제		○ 인삼지상부로부터 용매 추출물 제조 및 용매 극성 이용하여 분획물 제조 및 활성 검정	100
세포 및 동물모델을 이용한 간기능개선 검증		○ 건강기능식품 개별인정 원료 허가를 위한 세포 및 동물모델에서 인삼열매 추출물의 간기능 전임상 평가 및 바이오마커 검증	100
인삼 잎/줄기, 열매를 이용한 미백관련 전임상 연구		<ul style="list-style-type: none"> ○ 미백에 관련된 핵심 효소인 tyrosinase의 in vitro 활성을 검증 ○ melan-a 세포를 활용한 세포내의 멜라닌 생합성 저해능 및 체브라피쉬를 활용한 in vivo활성 검증 	100
인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발 - 기능성분의 용매 추출조건 확립 - 기능성분의 저온고압 추출조건 확립 ○ 추출 기능성분의 안정화 기술 확립 - in vitro 실험조건에서 인삼열매 추출물의 간기능 개선 바이오마커 측정 - 간기능 개선 기능성분 원료개발 기술 확립 	100
인삼열매 추출물의 원료화		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼열매 추출물의 원료화 - 대량생산 제조공정 확립 및 표준화 - 기능성분의 기준규격 설정 및 품목신고 	100
지식기반 연구 및 제품개발을 위한 웹시스템 구축		<ul style="list-style-type: none"> ○ 위키 기반 데이터 통합형 지식관리 시스템 구축 - 세부과제별 연구 진도 관리 및 결과와 데이터의 업로드 및 관리 - 인삼, 흑삼, 태극삼 및 인삼 부산물(잎, 줄기, 열매)에 대한 문헌 정보의 수집 및 통합 - Web 2.0 시대에 부합되는 새로운 방식의 통합형 지식관리 시스템 구축 - 단순한 데이터의 수집이 아닌 데이터 속에서 새로운 지식을 	100

		찾아낼 수 있는 지식 관리 시스템이 요구됨 - 통합관리시스템에 적용될 이미지 및 템플릿 디자인 - 매크로, 파서 등 기본 플러그인의 구축 및 수정	
태극삼, 흑삼 제조공정 개발		○ 태극삼, 흑삼 뿌리삼류 제조공정 개발 및 표준화 연구 - 태극삼, 흑삼 지표성분 선정 및 분석조건 확립 - 온도, 시간 조건에 따른 제조 공정 최적화 - 태극삼, 흑삼 제조 공정 매뉴얼 작성	100
in vitro 기능성 평가 연구		○ in vitro 기능성 평가 연구 - 혈행개선 기능성 연구 (태극삼, 흑삼, 홍삼, 백삼 비교)	100
in vivo 기능성 평가 연구		○ in vivo 기능성 평가 연구 - 제 2형 당뇨 마우스에서 분리된 EPC의 부착능, 이동능, 혈관 신생능 저하 확인 - 태극삼, 흑삼 EPC 기능 개선의 세포 분자적 기전 확인 - 태극삼, 흑삼의 혈행개선 효과 분석	100
국제임상시험 프로토콜 작성		○ 국제임상(인체적용시험) 연구 - 인체적용시험 프로토콜 작성	100
태극삼, 흑삼 제품개발을 위한 제형화 연구		○ 태극삼, 흑삼 제조 및 태극삼, 흑삼 농축액 제조 ○ 제형선정 및 최적제조조건 확립 ○ 장용성 코팅기술을 이용한 제품 개발 ○ 흑삼제품 개발 : 1 품목 이상	100
동물시험에 의한 기능성 확보		○ 혈소판응집 억제효능 ○ 혈액응고 억제효능 ○ 경동맥 폐쇄 억제효능	100
인체적용시험에 의한 혈행 개선 기능성 확보(태극삼)		○ 인구학적 배경조사 - 피험자의 성별, 연령, 몸무게 등 조사	100

○ 2차년도

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
인삼 잎/줄기/열매 발효물의 주름개선 전임상 연구		<발효 최적조건 탐색> - 발효 균주의 탐색 - 인삼 지상부 발효 조건 확립 - 발효에 따른 사포닌전환 분석 시험 <In vitro 효능 평가> - Elastase 활성 저해능, Collagenase 활성 저해능, Collagen 합성 저해능, MMP-1 합성 저해능, 항산화 in vitro 효능 검증 - 1협동기관에서 전달 받은 사포닌과 비사포닌 계열의 주름 개선 효능 평가 수행 중 (차년도 계속 수행) <In vivo 효능 평가> - 주름 임상시험 준비	
PPT type 사포닌 대량화 기술 개발		○ 피부에 효과적인 PPT 계열 사포닌의 대량 분획 제조 기술 개발 - 분획 및 HP20 column을 이용한 PT 계열 사포닌 및 PD 계열 사포닌 분리 - PPT 계열 사포닌을 이용한 in vitro 효능 검증 - PPT 계열 분획의 발효를 통한 aglycone화 연구	
인삼 잎/줄기/열매 발효물의 화장품 소재 등록		○ 인삼 잎/줄기/열매 발효물의 화장품 소재 등록 - 발효물의 CTFA 소재 등록 - 한글전성분명 등록	
인삼 지상부를 활용한 제품		○ 인삼지상부를 이용한 화장품 개발	

개발 : 2품목		<ul style="list-style-type: none"> - 소비자 니즈 및 동향분석을 통한 소비자 선호도 조사 - 시제품 생산 : 인삼 지상부를 활용한 마스크팩 제작 (주름개선 및 미백) 	
발효를 이용한 진세노사이드 함량 극대화 기술 확립		<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효산물제조 - 균주선발 및 최적발효 조건 확립 - 발효부산물에서 다양한 진세노사이드의 변화를 확인하였고 지표성분의 함량을 증가시킴 	
발효 인삼부산물로부터 진세노사이드 화합물의 분리 정제 및 동정		<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 성분의 분리 정제 - SiO₂, ODS 컬럼을 반복하여 기능 성분 분리 - NMR, IR 및 MS 스펙트럼 data 를 해석하여 구조결정 -UPLCQTOF/MS를 이용한 진세노사이드의 프로파일링 - 3종의 minor 진세노사이드 확보 및 발효 시 대량으로 증가함 - 발효일에서 총 43종의 진세노사이드를 프로파일링 - 발효열매에서 총 33종의 진세노사이드를 프로파일링 	
활성 진세노사이드 화합물 고함유분획 제조 시스템 구축		<ul style="list-style-type: none"> - 활성사포닌이 다량 함유되어있는 분획물 제조 및 활성시료 제공 	
인삼부산물 추출물 및 지표 성분에 대한 간기능개선 전임상 연구		<ul style="list-style-type: none"> ○ 에탄올 투여 3일 전부터 경구투여한 마우스에서, 혈청 중의 AST 및 ALT를 정량하여 시료의 간질환 억제활성을 판정 - 에탄올 투여에 의해 상승한 혈중 AST/ALT의 수치가 인삼A(2협등) 추출물 및 인삼B(일반주정추출) 추출물 투여에 의해 감소하였음. - 특히 인삼A 추출물은 비교군인 헛개나무 추출물의 동등 혹은 그 이상의 억제효과를 나타내었음 	
발효부산물 추출물 및 지표 성분에 대한 미백 전임상 연구		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼 부산물로부터 분리한 single compound와 발효추출물의 미백활성을 측정한 결과, 5종류의 single compound와 3종류의 추출물이 좋은 미백활성을 나타냄, 그중 가장 좋은 활성을 가진 Ginsenoside Rk2를 선별하여 melan-a 세포 및 제브라피쉬를 이용한 미백활성을 실험을 통해 활성을 검증함. 	
인삼열매추출물의 간기능 개선 인체적용시험 모델 개발	15	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼열매추출물의 간기능개선 인체적용시험 모델 개발 - 인체시험 시제품 개발 - 항비만 인체적용시험 계획 수립: 연구대상자, 선정기준/제외기준, 시험디자인, 섭취기간, 바이오마커, 통계방법 등 - 인체적용시험을 위한 임상연구윤리심의위원회(IRB) 심사 - IRB 승인 후, 인체적용시험 실시: 피험자 모집 및 스크리닝 	100
수출용 인삼열매추출물 건강 지향식품 개발	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수출용 인삼열매추출물 건강지향식품 개발 - 인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스 구축 - 수출용 인삼열매추출물 건강지향식품 개발 	100
인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스 구축		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인삼의 기능별, 효능별 데이터베이스 구축 - 기능별, 효능별 정보의 수집, 통합을 위한 데이터베이스 설계 - 사포닌의 타입별 문헌정보 수집 및 데이터베이스화 - 사포닌과 인간 질병 및 화학성분 (compound) 간의 네트워크 정보 수집 및 추출 - 인삼의 기능, 효능 관련 문헌 정보 수집 및 텍스트마이닝에 	100

		<p>의한 유용정보 추출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각 compound의 효능 및 부작용에 대한 메커니즘 확보 <p>○ 수출 대상국 선호도 DB 구축</p>	
수출전략 제품 소재 in vitro/ in vivo 혈행개선 및 인지기능 개선 기능성 평가 연구		<p>○ in vitro/ in vivo 혈행개선 및 인지기능 개선 기능성 평가 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시제품 최종원료(태극삼, 흑삼)에 대한 기능성 평가 - 혈행개선 및 인지기능 작용기전 연구 <p>○ 태극삼, 흑삼의 인지기능 효능평가(위탁2)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 태극삼, 흑삼 투여전후 Uncontrollable 혈행개선 및 인지기능 개선 동물 모델에서 행동검사 	
수출전략 제품 소재 태극삼, 흑삼, 홍삼, 백삼 이화학적 특성 구명		<p>○ 태극삼, 백삼 이화학적 특성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특이 진세노사이드 등 기능성분 분석 - 태극삼, 흑삼 뿌리삼류 대량 제조공정 개발 분석 지원 	
수출전략 제품화를 위한 타겟 기능성 국제임상		<p>○ 국제임상 추진 (2건 추진)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대상국 : 중국 - 시험식품소재 : 태극삼, 흑삼 - 기능성 : 2건 (혈행개선, 인지기능개선) 	
태극삼, 흑삼 제조		<ul style="list-style-type: none"> - 증삼 및 건조온도, 시간 및 추출 조건 확립 - Ginsenoside-Rb1, Rg1 함량 적정 	
태극삼, 흑삼 시제품 개발		<ul style="list-style-type: none"> - 태극삼, 흑삼 물추출물의 과립 및 장용성 과립 - Ex 제품, 캡셀제품 	

○ 3차년도

당초 목표	가중치 (%)	개발 내용	달성도 (%)
인삼 지상부를 활용한 사업화 추진		<p>○ 인삼지상부소재의 발효를 통한 임상시험 시제품 제조</p> <p>○ 안전성 및 기능성 임상실시</p> <ul style="list-style-type: none"> - 주름개선 효과 입증 - 자극 시험을 통한 무자극 확인 <p>○ 수출형 인삼 지상부 소재의 개발 및 홍보전략 수립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미국, 중국 화장품 브랜드와 소재 수출 협의 진행 중 	100
지표성분 정성 정량 분석 및 활성분획, 제품 표준화 방법 확립		<p>○ 안전성 및 기능성 임상실시</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활성 지표 성분에 대하여 HPLC 및 LCMS를 이용하여 분석조건 확립 - 분석 조건을 이용한 지표성분의 회귀 곡선 작성 - 위의 방법을 적용하여 활성소재, 제품의 표준화 규격확립 	
인체적용시험을 통하여 안전성 확보 및 효능 규명		<p>○ 인체적용시험을 통한 기능성 및 안전성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - 효능 검증을 위한 연구대상자 선정 - 바이오마커 측정 <ul style="list-style-type: none"> · 혈중 바이오마커 측정 · 기전과 관련된 바이오마커 측정 - 인체적용시험 결과 통계분석 및 보고서 작성 	100
개별인정 원료 신청	15	<p>○ 개별인정원료 신청</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개별인정 신청서류 작성 및 신청 	100
인삼수출용 제품 개발	10	<p>○ 수출용 개별인정형 건강식품 시제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제형별 시제품 제조 - 시제품의 안정성 평가 	100

태극삼, 흑삼의 기능성 원료 표준화 연구		- 지표성분 대량 분리 정제, 구조 동정 - 태극삼, 흑삼, 홍삼, 백삼 이화학적 특성 규명	100
국제임상연구 - 혈행개선		- 국제임상 기능성 검증 통계분석 등 : 태극삼, 흑삼, 홍삼 군간의 혈행개선 능력 관련 임상 완료 : 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 8주 섭취에 따른 혈행 개선 효과를 증명	100
국제임상연구 - 인지능력		-국제임상 기능성 검증 통계분석 등 : 중국인 연구대상자에서 고려 홍삼, 흑삼, 태극삼의 8주 섭취에 따른 인지기능개선 효과를 증명할 수 있었으며, 고려 홍삼군, 흑삼군, 태극삼군 중에서 흑삼군이 가장 큰 개선 효과 보임	100
수출전략 제품 소재 태극삼, 흑삼 제조기술 보급		-태극삼, 흑삼 제조공정 및 표준화 기술 보급 방안 제시	100
태극삼 인체 적용시험		- 시험물질 제조(저, 고농도 제품, 위약 포함) 및 포장 - 혈소판 응집 억제능 조사 (ADP, collagen 유도) - 혈행관련 지표 분석 - 혈액, 혈액생화학적 지표 분석 - 지질관련 지표 분석 - 통계처리	100

다. 성과목표에 대한 세부 진행 내용

성과목표	진행 내용
○농가로부터 인삼부산물 원료 확보	- 인삼농가 단체(영농조합)로부터 1년차 및 2년차에 걸쳐 인삼부산물을 확보하였으며 인삼 잎과 열매는 농가로부터 가공비를 제외하고 2각 2,000원에 수매를 하였음 - 현재 농가로부터 인삼부산물(인삼열매)의 과육을 착즙하는 과정까지 표준화 완료
○인삼재배 농가 컨설팅 및 계약재배 추진	- 1협동이 주관하에 인삼농가(영농조합)에 인삼부산물의 쓰임과 기능성에 대하여 농가지도 컨설팅을 추진하였으며 1세부와 2협동은 인삼부산물 확보를 위하여 계약재배를 협의하였음. 1년단위로 필요한 원물을 종자를 따기전에 통보하고자 함. - 현재 인삼재배 농가 컨설팅까지 이루어짐 → 과제를 위한 계약재배를 하고 있으나 제품화 후 과제 종료 후 에도 지속적인 원료제공을 위한 협약을 완성할 예정
○제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축	- 1세부, 2협동에서는 인삼영농조합(농가대표)와 협의를 하고 농가의 부산물 가격뿐 만아니라(농민으로 환수)중간가공(세척 및 과육확보) 작업을 요청함 -> 농가의 새로운 소득이 생김 \ - 현재 상생협력을 위하여 농가와 긴밀히 협약 논의까지 이루어짐 → 제품화 후 꾸준한 원료제공을 위한 협약을 완성할 예정
○ 인삼부산물로부터 화장품 활성성분 분리, 동정 및 정량 분석 시스템 확립	- 발효 부산물로부터 3종의 minor 진세노사이드 확보 및 발효 시 대량으로 증가한다는 것을 확인하였으며, 관련으로 미백효과 실험 및 1세부에 활성시료 제공. - 세계 최초로 발효인삼 잎을 이용해서 총 43종의 진세노사이드를 프로파일링을 진행 하였으며, 발효열매에서는 총 33종의 진세노사이드를 프로파일링하였음.
○ 인삼부산물로부터 발효조건 시스템	- 그동안 버려지던 인삼 부산물의 고기능성화를 통한 상업적

확립	가치 상승을 목적으로 인삼 부산물에 함유된 인삼 사포닌을 활용하고자 하였음. 인삼 사포닌을 화장품 소재로 효과가 있는 minor사포닌으로 전환시키기 위하여 인삼사포닌 전환 활성 균주를 screening하였고 이들 균주의 최적 발효조건을 확립하였음. 이를 통하여 인삼 부산물로부터 ginsenoside f1 및 ck 대량 생산 방법을 확립하였고 차년도 연구를 통해 표준화 하고자 함.
○새로운 zebrafish 배아모델 시스템을 이용한 미백효능 및 안전성평가 시스템 확립	- 인삼부산물의 추출물 및 화합물을 이용해서 zebrafish 배아모델 시스템을 이용한 미백효능 검증은 원료를 하였으며 발효부산물성분의 미백효능 효과 검증 완료
○새로운 멜라닌 생합성 저해제의 기전 연구	- 발효 인삼부산물로부터 분리한 화합물 및 추출물을 이용하여 미백 활성을 분리한 결과, Ginsenoside Rk2 가 높은 활성을 나타내었다. 또한 발효를 통한 Bioconversion한 잎발효 추출물이 발효를 하지 않은 잎추출물 보다 높은 미백활성을 보여 보다 자세한 미백활성 연구가 필요하다고 사료되고 향후 국내 및 국제 특허를 출원
○인삼 부산물 지상부 및 발효물을 이용한 주름개선 전임상 연구	- 인삼 지상부를 이용하여 주름개선 소재에 대한 전임상연구를 원활하게 수행하였으며, 일반 추출물물에 비해 발효물의 주름개선 효과가 증대되는 것을 확인 - 더불어, 본 소재를 바탕으로 임상시험 진행 결과 주름개선 효과 확인 완료
○인삼 지상부를 이용한 화장품 소재 연구	- 인삼 지상부 발효물을 국제적인 화장품 소재로 활용할 수 있도록 PCPC에 화장품 소재로 등록을 추진하였으며 현재 등록 완료 되어, 향후 인삼 지상부 발효물을 국제적인 화장품 소재로 활용할 수 있게하는 기틀을 마련. - 인삼 지상부를 이용하여 크림 및 마스크 제형에 적용시켜 화장품 시제품을 제작 완료
○ 수출형 기능성 화장품 개발 연구	- 현지소비자 설득 : 제품의 효능 우위성 홍보 인체적용시험결과 이용 - 전문우수 학술지 게재 외국 Buyer 초청, 견학, 전문성교육 - 태극삼, 흑삼제품의 고도화 - 건강기능식품 생산 제형, 디자인 작업 완료, 홍보전략 수립(현지 출장하여 제품의 우수성 홍보), 소비층의 니즈에 부응하는 제품 개발
○ 중화권(대만 또는 중국) 제품 수출 및 국내 수요처 발굴을 위한 마케팅 전략 수립	- 현재 국내 및 중화권에 제품 판매 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립 → 국내에는 제품화 후 판매와 중화권에는 제품 등록 후 수출을 완성 / 직간접 수출 매출 18억 원
○ 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발	- 인삼열매의 새로운 기능성을 등록시키기 위하여 효소이용 추출을 진행 하였으며, 관련 연구로 공동출원을 완료하였음 - 현재 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출 기술 및 소재화를 위한 원료 생산 공정도 및 품목신고까지 이루어짐
○ 인삼열매 추출물의 원료화	- 인삼 지상부를 효율적으로 발효시키기 위한 발효균주의 개발 및 이의 대량화를 위한 최적 조건확립을 수행하였고 최적의 추출물을 제조 공정 확립 완료 - 인삼 지상부를 효율적으로 발효시키기 위한 발효균주의 개발 및 이의 대량화를 위한 최적 조건확립까지 이루어짐
○ 동물모델을 이용한 기능성 평가 (간기능개선)	- 마우스 실험을 통한 항산화 기전 연구를 위한 효능데이터 확보까지 이루어짐 - 인삼부산물(인삼열매)의 효소 처리 및 주정추출물을 에탄올 투여 3일 전부터 경구투여한 마우스에서, 혈청 중의 AST 및 ALT를 정량하여 시료의 간질환 억제활성을 판정한 결과, 인삼추출물은 비교군인 헛기

	<p>나무 추출물의 동등 혹은 그 이상의 억제효과를 나타내었으며, 관련으로 학술발표 공동특허 출원까지 이루어짐 → 기술이전</p>
○ 인삼열매 추출물의 인체시험 시제품 제작 및 제품화	<p>- CRO 선정 및 인체적용위탁연구 계약 완료, IRB심사 준비, 시제품 개발 개시까지 이루어짐 → 임상시험 완료</p> <p>- 인삼열매추출물을 주성분으로 하는 파우치 음료개발 개시까지 이루어짐 → 제품화를 완성</p>
○ 인삼열매 추출물의 개별인정 허가 및 제품화	<p>- 인삼열매추출물을 주성분으로 하는 파우치 음료개발 개시→ 개별인정 진행 중</p>
○ 태극삼 및 흑삼의 제조공정 개발	<p>- 기존 흑삼에서 인삼의 고유성분인 Rg1, Rb1이 거의 검출되지 않는 문제점을 해결하는 가공조건을 개발하여 특허 1건을 출원 완료하였음</p>
○ 태극삼 및 흑삼 추출물 제조, 제품 제조공정 확립	<p>- 증삼 및 건조온도, 시간 및 추출조건 확립 완료</p> <p>- Ginsenoside-Rb1, Rg1 함량 적정성 완료</p>
○ 태극삼 및 흑삼의 지표성분 및 이화학적 특성 규명	<p>- 최적 태극삼, 흑삼 제조공정으로 제조된 진세노사이드, 벤조피렌, 아미노산, 무기질 등 이화학적 특성 조사</p>
○ 태극삼 및 흑삼 추출물의 성분분석 및 표준화, 안정성 확보	<p>- 현재 태극삼 및 흑삼 추출물의 성분분석 및 표준화까지 이루어짐 → 원료의 안정성 확보</p> <p>- 사포닌 성분으로서 태극삼 추출물은 ginsenoside-Rb1, Rg1의 건강기능식품공전상의 기준에 적합 확인</p> <p>- 사포닌 성분으로서 흑삼 추출물은 ginsenoside-Rb1, Rg1, Rg3의 건강기능식품공전상의 기준에 적합 확인</p> <p>- 태극삼 및 흑삼 추출물의 잔류농약, 미생물 기준, 중금속 기준, Benzopyrene기준에 적합 확인</p>
○ 태극삼, 흑삼의 세포수준의 기능성 평가 (항스트레스, 혈행개선)	<p>- 태극삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 이용한 세포수준의 혈류개선 기능성 및 기전연구 결과 흑삼은 혈류개선에 홍삼과 동등 이상의 효능을 가지는 것으로 확인</p> <p>- 태극삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 이용한 세포수준의 인지기능 기전 및 기능성 연구를 진행하였으며, 태극삼보다 흑삼에서 높은 가능성이 확인 됨</p>
○ 동물수준의 기능성 평가(항스트레스, 혈행개선)	<p>- 래트를 이용한 태극삼, 흑삼의 당뇨병성 혈행장애 개선에 대한 기능성을 평가하였으며 흑삼에서 홍삼과 유사한 수준의 기능성을 확인</p> <p>- 래트를 이용한 산화적 스트레스에 대한 태극삼과 흑삼의 기능성 평가를 확인하였음</p>
○ 대만 또는 중국 수출국가 국민 대상 인체적용시험(항스트레스, 혈행개선)	<p>- 혈행개선, 인지기능 개선에 대한 국제임상연구 완료</p>
○ 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별 인정형) 확보를 위한 동물시험 추진	<p>- FeCl3에 의한 혈전 생성 유도시 혈관 폐색 지연 효과 확인</p> <p>- ADP 및 collagen에 의한 혈소판응집 억제효과 확인</p>
○ 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별 인정형) 확보를 위한 인체적용시험 추진	<p>용역연구기관 계약 완료</p> <p>- 피험자 복용 시제품 제조 및 시험기관 송부 완료</p> <p>- IRB 승인 완료</p> <p>- 피험자 복용 및 혈행개선 관련 지표 조사 완료</p>
○ 흑삼, 태극삼 시제품 제조	<p>- 태극삼, 흑삼 물추출물 과립 및 장용성 과립제품 개발 완료</p> <p>- 태극삼, 흑삼 Ex 제품, 캡셀제품 개발 완료</p> <p>- 천연물 함유 복합제품 개발 완료</p>
○ 태극삼추출물의 개별인정형 원료 성분 관련 자료 작성 및 신청	<p>- 인체적용시험 완료 후 작성 예정</p> <p>- 현재 인체적용시험을 위한 자료 확보까지 이루어짐 인체적용시험 완료 후 작성을 완성할 예정</p>
○ 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생 협력 방안구축	<p>- 예정지 관리시기부터 또는 재배 2년차 우수포지 선발 및 공급계약 체결(개별)</p>

4-2. 관련분야 기여도

가. 국내·외 기술개발 현황

1) 중국에서는 한국의 6년근 홍삼 등은 의약품 수준으로 관리하고 있기 때문에 신청해서 등록되기가 매우 어렵고 비용도 많이 들기 때문에 쉽게 접근하기가 어렵다. 대신에 4년근이나 5년근은 덜 어렵게 신청을 받아준다고 한다. 중국에서 백삼이나 태극삼 제품시장이 형성될려면 6년근이 아닌 저년근 제품을 우선 생각할 필요가 있다고 판단된다.

2) 국가별 건강기능식품 시장규모는 미국, 서유럽, 중국, 일본 등의 순으로 시장이 형성되고 있으며 미국은 그 규모가 서유럽, 중국, 일본과 같은 나라들의 약 4배 정도가 큰 시장을 형성하고 있다. 그리고 최근의 추세는 중국이 매우 활발한 상승세를 타고 있다. 건강식품의 기호도 측면에서는 일반 건강식품보다는 기능성이 강화된 제품이나 음료를 선호하고 있기 때문에 기능성 강화제품 분야로 연구가 많이 수행되어야 할 것으로 판단된다. 인삼분야에서는 우리나라가 중주국으로서의 위치를 지키고 있지만 아사를 포함한 중화권, 특히 중국 사람들의 기호를 충족시킬 수 있는 기능성 강화제품들이 개발되어야 할 것으로 보인다.

나. 우월성

세계에서 인삼을 대상으로 수 많은 기능성을 연구하고 그 결과를 이용하여 기능강화제품을 개발하고 품질을 개선하는 국가는 많지 않다. 현재 우리나라에서 인정하는 태극삼의 기능은 면역력 증대, 피로해소 기능에 불과하다. 본 연구에서는 태극삼의 기능성을 확대하기 위하여 혈행개선에 도움이 된다는 기능성을 확보하기 위하여 수행되었다. 혈행개선 분야는 식품이 아닌 약의 개념이 크기 때문에 이 점을 이용하여 국민 건강에 이바지할 수 있는 고기능성 제품을 개발한다는 점에 그 의의를 찾아볼 수 있다.

다. 기여한 점

- 1) In vitro 및 in vivo 시험에 의한 연구 결과를 국외 전문학회지에 투고하여 태극삼의 기능성을 널리 알리고, 인식시켜서 한국인삼의 우수성을 널리 알리고자 한다.
- 2) 본 연구를 수행하면서 연구 2년차부터 직접 수출이 아닌 간접 수출에 의해서 관련 제품을 판매한 매출액을 산출한 결과를 표로서 나타내었다. 3차년도 현재까지 18억 8천 2백 만원을 간접 수출하였다.

구분	2차년도 매출액(백만원)	3차년도 매출액(백만원)	합계	비고
흑삼제품(6종)	310	186	496	
숙취해소 제품	26		26	수출
태극삼 제품	1,127	233	1,360	
합계	1,463	419	1,882	

5장. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>1절. 활용계획</p> <p>1. 상품화 방법</p> <p>1) 상품화 1 단계(개발 기간 내)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구 자료 축적 및 논문게제, 특허 출원 <p>2) 상품화 2 단계(개발종료 후 1년 이내)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제형별, 제품별 품목 제조신고를 추진한다. - 타블렛, 캡셀, 과립형, 음료등으로 제품 품목을 다양화 한다. <p>2. 양산화 방법</p> <p>1) 제 1 단계</p> <ul style="list-style-type: none"> - 당사는 GMP시설이 완벽하고 추출, 여과, 농축등 일련의 제조장치가 운영되고 있으므로 식약처로부터 인증 받은 기능성원료를 대량 생산 한다. (GMP 인정. 식약처 제 0005호. 2012.10.26) ▶보유설비 : 추출기(8,000L), 여과(1,200L/HR), 농축(1,000L/HR), 파우치제조설비, 과립제조설비, 분말제조설비, 스틱포장, 자동포장설비 등 <p>2) 제 2 단계</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제형에 따른 원료 제조를 위하여 캡셀(연질, 하드)제조시설, 음료제조 시설을 증설하고 인력을 확보한다. <p>3) 판매전략</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 고려인삼제조사의 국내 판매 네트워크 활용(E-Mart, GS25, 한국야쿠르트, CJ등) - 마케팅 홍보를 바탕으로 온라인 / 오프라인 병행 판매 진행. - 홈쇼핑 (GS, CJ등) 입점하여 방송 판매 및 쇼핑몰 입점. - 외국인들의 컨셉에 맞추어서 제품을 제작하여 당사의 기존 거래처인 ‘화창토산’, ‘인천 공항 면세점’ 등 판매. - 자사의 해외수출 네트워크를 활용하여 해외 시장 출시로 의화획득 미국(SUN RISE), 일본(ASAHI GODO), 캐나다(Uncle Bill Trading), 중국(WENJUN), 프랑스(BLUE LOTUS), 오스트레일리아(Champ Firm), 홍콩(Hysan Pharmaceutical), 베트남(SONG HAN VIET TRADING CO.,LTD) - 중국 국가식품약품감독관리국(CFDA)의 보건식품 등록요건을 참조하여 건강식품, 신자원식품, 일반식품에 적합하게 등록하여 해외 수출 진행 -점진적으로 매출 신장이 되면 별도의 오프라인 전시장 및 판매처를 개척하여 다양하게 확보할 예정. <p>4) 마케팅 계획</p>	

① 제품의 전문성

객관적, 과학적 연구결과를 바탕으로 신뢰할 수 있는 건강기능식품 및 일반식품 출시

② 디자인의 차별성

- 소비층의 트렌드는 심플하되 고급스러움을 지향
- 다방면의 시장조사를 통해 독창적인 디자인 창출
- 제형의 다변화를 도입하여 특성을 살린 제품 제작

3. 판로확보계획

1) 제품 다양화

- 개발된 기능성 원료를 제품 소비층 군별, 권역별로 세분화하여 제품의 전문성, 독창성을 강조한 소비층 집중 공략 제품 개발 및 생산

2) 홍보전략

① 국내외 전시회 참가

② 방송 미디어를 활용한 홍보

- TV, 라디오에 광고를 게재하되 제품을 공격적으로 PR 하기 보다는 점진적인 계획을 잘 세워서 전략적인 홍보를 계획
- ‘천호식품’을 벤치마킹, 현실적 홍보와 호기심/재미를 동시 유발 하는 형태를 지향

③ 옥외광고를 통한 마케팅

- 지하철 내부 광고 (스크린도어), 버스광고, 집행 예정.

2절. 활용방안

- 본 연구에서 확보된 태극삼의 혈행개선 기능성, 안전성, 안정성 및 원료 표준화에 대한 과학적 근거자료를 활용하여 건강기능식품 원료·성분 신청 및 등록
- 면역력증진, 피로회복이외에 태극삼의 기능성에 혈행개선이 추가되어 국내외 제품의 판매 증진 및 수출시장 확대
- 공정별 표준화를 통한 대량 생산 체계 확립
- 제품의 형태를 타블렛, 캡슐, 과립, 액상제품등으로 다양화하여 소비자 Needs 충족
- 참여기업에 기술이전을 실시하여 산업화하고 전국의 홍삼 및 인삼제조 관련 업체에도 홍보를 통해 기술이전을 실시
- 인삼 부산물인 열매 및 잎줄기의 활성 기능성분을 규명하여 활성 기작을 밝히고 과학적인 근거로 인한 제품개발
- 발효기법을 이용한 보다 안전하고 강화된 진세노사이드 고품격 기능성식품 소재로 활용
- 연구 결과는 국내외 학술지, 심포지움, 관련 교육 등을 통해 홍보하고, 단위농협 등 유통 관련자들에 대한 교육 및 현장 지도 등을 통하여 관련 기술을 보급하고자 함
- 개발된 다양한 제품을 참여기업에 이전하여 실용화가 되도록 함
- 인삼부산물 관련 연구 결과를 언론 등에 홍보하여 부산물의 우수성을 알리고 관심을 유도

- 연구 결과를 논문에 발표하여 학술적으로 인정받고 특허를 통해 개발된 기술이 보호 받도록 함
- 인삼부산물의 활성성분의 대량 조제로 in vitro 및 in vivo 활성 연구를 이용한 생리활성 규명
- 국가기관이 참여한 국내 인삼부산물 연구의 독보적 우수성 확보
 - 수경재배 인삼 지상부 및 발효물을 이용하여 주름개선 효과의 매커니즘을 확보
 - 자사의 화장품 개발 know-how를 이용하여 기능성 화장품 소재 개발 공정을 확립하고, 미백 및 주름개선 화장품 소재를 확보
 - 타겟 시장 공략을 위한 선호도, 기능성, 디자인, 제품 용기 등 트렌드 분석을 통한 제품화 전략 수립
 - 수경재배를 통한 친환경 이미지 확립 및 마케팅 활용
 - 고부가가치 제품의 마케팅 전략 수립 및 홍보 체계 구축
 - 태극삼, 흑삼의 제조공정을 확립하여 표준화함으로써 인삼의 새로운 기능성 지표물질의 대량 생산이 가능케 됨
 - 태극삼, 흑삼을 약리학적으로 규명함으로써 건강기능식품 소재뿐만아니라 의약품개발을 위한 소재의 가능성도 제시할 수 있음
 - 태극삼, 흑삼의 기능성 평가를 통한 지표성분을 강화한 소재는 다양한 건강기능식품 분야에서 고부가 가치 제품 개발에 응용할 수 있음

○ 기대성과

▪ 기술적 측면

- 현재까지 태극삼은 건강기능식품상으로 그 기능성이 면역력증진, 피로회복에 국한되어 있다. 본 연구가 원활히 수행될 경우 혈소판응집억제기능이나 Thrombin에 의한 혈액응고 저해활성이 동물시험이나 인체적용시험에 의해서 확인되면 태극삼은 개별인정형 원료·성분이 혈행개선에 도움이 된다는 기능성이 추가될 수 있다.
- 원천 기술 및 특허 확보로 향후 산업적으로 다양한 분야에 적용이 가능하며, 화장품 등 다양한 분야에서 신제품의 개발이 가능
- 제조 공정 시스템의 표준화로 생산성, 안전성, 기술성 향상을 이룰 수 있음.
- IT 기술 접목을 통해 한국 인삼의 과학적 우수성을 홍보하고 정보 분석시스템 접목을 통해 모바일로 쉽게 접근할 수 있도록 개발 확장이 가능
- 인삼전문가와 연구결과를 연계한 정보제공으로 2차 연구 활성화 가능
- 인삼종자 수확시 버려지고있는 인삼열매 부산물로부터 활성 진세노사이드 성분을 이용기술 확립 및 안정화된 소재 개발

▪ 경제 산업적 측면

- 태극삼, 흑삼의 시제품개발에 의한 상품화로 국내 매출 증대 및 국외 수출증대가 기대됨
- 인삼과 관련이 있는 기업과 재배농가간의 수익이 보장될 수 있는 상생의 길이 열릴 것으로 기대됨.
- 기능성 식품, 화장품 등의 다양한 분야의 제품에 적용하여 제품 다양화를 통한 국내외

시장 형성이 가능함.

- 기존에 잘 사용하지 않는 인삼 지상부를 사용하므로 인삼농가에 새로운 수입원으로 성장할 수 있을 것으로 기대됨
- 해외에 인삼의 우수성을 알리고, 수출을 통한 매출 증대 달성
- 화장품 산업은 인력의 고용창출 효과가 크고 생산 및 부가가치 유발계수가 높아지는 등의 경제적 파급효과가 있음.
- 기능성 태극삼, 흑삼 제품의 활용범위 확대 : 기능성 평가를 통한 활성성분의 지표물질로 사용한 ginsenoside의 임상적 효과를 입증하여 기존제품과 차별화된 고부가가치 산업을 창출할 수 있음
- 점차적인 시장개방에 따른 외국 인삼가공제품의 대만, 중국 시장 잠식에 대한 경쟁력 있는 우위를 확보하여 대처할 수 있음
- 태극삼, 흑삼 가공제품도 특정한 약리효능을 기대하는 일종의 기능식품임으로 고기능성·고품질의 태극삼, 흑삼 제품 개발은 국내 인삼산업 발전은 물론 인류건강 유지에 중요한 사업이 될 수 있음
- 과학적으로 안전하고 효능이 있는 식품임을 증명하여 경제적 부가가치를 향상시킬 수 있는 초석이 될 수 있음
- 태극삼, 흑삼등의 특허분쟁시 역사성, 유래 등을 제시하여 선행기술 자료로 활용 가능
- 인삼부산물을 활용할 목적으로 개발된 제품은 기능성분 함량이 높아 고부가 식·의약, 화장품 소재로 적합하여 새로운 수요 창출이 가능함
- 개발 기술을 참여기업인 인삼생산 농협 및 생산 농민에 보급하여 부산물 유통 활성화에 기여함
- 인삼부산물 상품화를 제고로 생산 농민의 소득증대에 기여함
- 인삼부산물 제품개발 및 홍보를 통해 생산농가 및 가공제품 생산기업의 경제적 이윤확대
- 최근 수입이 확대되고 있는 베리류 등을 대체할 수 있어 국가경제에도 도움이 될 것으로 판단됨

6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○		

7장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

8장. 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

9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호		D-11
○		

10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

No	논문명	학술지명	주저 자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	사포닌 전환 활성 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> Strain GFC09 균주의 분리 동정 및 전환 사포닌의 주름 개선 효과	대한 화장품학회지	민진우	41	한국	대한화장 품학회	비SCI	2015.12	375-382
2	Antimelanogenic Effects of Picrionoside A Isolated from the Leaves of Korean Ginseng	Biological & Pharmaceutical Bulletin	이대영	10	일본	일본생약 학회	SCI	2015.10	0918-615 8
3	The potential of minor ginsenoside isolated from the leaves of Panax ginseng as inhibitors of melanogenesis	International Journal of Molecular Sciences	Dae Young Lee	16	Switzer land	MDPI	SCI		
4	Molecular mechanism of protopanaxadiol saponin	Journal of Ginseng Research	김종훈 등	39(2015)	대한민 국	고려인삼 학회	SCIE		

	fraction-mediated anti-inflammatory actions								
5	Ginseng total saponin attenuates myocardial injury by antioxidative and anti-inflammatory properties	Journal of Ginseng Research	김종훈 등		대한민국	고려인삼학회	SCIE		
6	약용식물 추출물의 에탄올대사 효소활성에 미치는 영향	산업식품공학,	도재호, 광정원, 이선정, 노정진, 이광승, 김동철		대한민국				
7	Aqueous Extract of Taegeug Ginseng Inhibits Platelet Aggregation and Thrombus Formation	Journal of Do, Medicinal Food Jaeho				미국	SCI (1.995)	심사중	
8	UPLC-QqQ/MS-Based Lipidomics Approach To Characterize Lipid Alterations in Inflammatory Macrophages	Journal of Proteome Research	이재원	16(4)	미국	Journal of Proteome Research	SCI (4.173)	2017.04.07	
9	Melanogenesis inhibition activity of floralginsenoside A from Panax ginseng berry	Journal of Ginseng Research	이대영	41(1)	한국	고려인삼학회	SCIE 3.898	2017.10.02	

나. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국응용생명화학학회 국제학술대회	Jaeho Do1, Jungwon Gwak1, Sunjeong Lee1, Kwangseung Lee1, Dong Chung Kim2,*	2016. 6. 16(목) - 18(토)	제주	대한민국
2	Detail characterization of lipid alterations in the autophagic cell death of cancer cells	이재원, 이대영	2015.08.17	평창	대한민국
3	2015 대한화장품학회 추계학술발표대회-인삼 잎으로부터 분리된 picrionoside A의 멜라닌 합성 저해 효과	이대영, 정용태, 김진희	2015. 11. 13	서울과학기술대학교	대한민국

4	2015 대한화장품학회 추계학술발표대회-인삼 잎으로부터 분리된 단일물질의 미백활성 효과	정용태, 이대영, 김진희	2015. 11. 13	서울과학기술 대학교	대한민국
5	2015 한국피부기능식품연구회 창립10주년 기념 SYMPOSIUM - Anti-melanogenesis Activity of Single Compound Isolated from The Panax ginseng	정용태, 강민주, 이대영, 김진희	2015. 11. 20	건국대학교	대한민국
6	2016 고려인삼학회 국제학술대회 - Relationship between the sample number in the group and relative standard deviation(RSD)	김규일, 장상민, 김귀덕, 이재인, 오효빈	2016.03	제주	대한민국
7	2016 고려인삼학회 국제학술대회 -Black ginseng attenuates LPS-induced endothelial cell inflammation by suppression of AMPK and NF- κ B signaling in human umbilical vein endothelial cells	황승미, 고선미, 고은실, 차정단	2016.03	제주	대한민국
8	2014 한국약용작물학회 인삼잎으로부터 분리한 진세노사이드의 in vitro 및 in vivo 모델에서의 미백효과	이대영, 차병주, 김진희 이경희, 백남인, 노형준, 이승은, 김승유, 김금숙	2014.10.16	하이원호텔	대한민국
9	2014 한국응용생명화학학회 Polyacetylenes from the aerial parts of Panax ginseng C.A.Meyer	차병주, 박지혜, 백남인, 김진희, 강희철, 김금숙, 이대영	2014.10.24	목포대학교	대한민국
10	2014 대한화장품학회 추계학술발표대회-인삼 잎으로부터 분리된 ginsenosides의 멜라닌 생합성 저해 효과 규명	이대영, 정상철, 정용태, 백남인, 김진희	2014.11.14	서울과학기술 대학교	대한민국
11	2014 대한화장품학회 인동초로부터 분리한 Sweroside의 멜라닌 합성 조절	정상철, 정용태, 김진희	2014.11.14	서울과학기술 대학교	대한민국
12	2015 약용작물학회 인삼 열매로부터 분리한 Ginsenoside Rb2의 멜라닌 합성 저해 효과	이대영, 정용태, 정상철, 이예주, 김도연, 김금숙, 이승은, 백남인, 강희철, 김진희	2015.5.8	건국대학교	대한민국
13	2015 고려인삼학회 인삼 잎으로부터 분리한 파낙세롤 A-D의 미백 및 항염증 활성 탐색	이대영, 백남인, 김진희, 이경희, 이예주, 이재원, 김금숙, 이승은, 안영섭	2015.5.13	한국인삼공 사	대한민국
14	한국약용작물학회(국내학술대회)	김규일 등	2015.5.7. ~5.8	건국대학교	대한민국
15	한국약용작물학회(국내학술대회)	김규일 등	2015.5.7. ~5.8	건국대학교	대한민국
16	2015 Spring Ginseng Conference(국제학술대회)	김규일 등	2015.5.13	한국인삼공 사	대한민국
17	2015 Spring Ginseng Conference(국제학술대회)	김규일 등	2015.5.13	한국인삼공 사	대한민국
18	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국
19	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국

20	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제 학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국
21	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제 학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국
22	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제 학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국
23	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제 학술대회)	김종훈 등	2015.4.23. ~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국
24	2015 Proceedings of the Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (국제 학술대회)	김종훈 등	2015.4.23.~4.24	OSONG Medical Innovation Foundatio n C&V Center, Chungcheo ngbuk-do, KOREA	대한민국

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
			코드번호 C-06-04						
1	신규한 락토바실러스 카제이 GFC 1 균주, 상기 균주를 이용한 인삼 발효 추출물 및 이의 제조방법	대한민국	지에프씨	16.01	10-2016-0002796	지에프씨	17.03.15	10-1718465	
2	알코올성 간 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 인삼열매 추출물 및 그 제조방법	대한민국	(주)네추럴에프앤피	15.07.27	10-2015-0105726				
3	연속식 유동층 공정기에 의한 순수 농축액을 농축액환 제조장치 및 제조방법	한국	이지1	16.03.30	10-2016-0038158				
4	신규한 진세노사이드를 유효성분으로 포함하는 미백용 조성물	국유	농촌진흥청	16.02.26	10-2016-0023497				
5	유효 진세노사이드 손실이 없는 흑삼의 제조방법 및 그 방법으로 제조된 흑삼	대한민국	(재)진안홍삼연구소	16.05.27	10-1216-				
6	미백용 조성물	대한민국	농촌진흥청장	2015.04.21	10-2015-0055825	-	-	-	미공개
7	인삼유래 화합물 분리방법 및 이를 이용한 항염증 조성물	대한민국	농촌진흥청장	2015.04.21	10-2015-0055828	농촌진흥청장	2017.09.18	10-1780939-0000	미공개
8	비타민C를 시드로한 인삼류 순수 농축액을 이용한 과립코팅 제조방법	대한민국	(주)이지1고려인삼제조(주)	2016.07.29	10-2016-0097575				
9	다기능 천연농축물을 시드로한 인삼류를 이용한 과립코팅 제조방법	대한민국	(주)이지1고려인삼제조(주)	2016.07.29	10-2016-0097577				
10	인삼이 함유된 한약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 숙취해소용 조성물	대한민국	고려인삼제조(주)	2016.06.29	10-2016-0081260				
11	육계 및 육계나무의 엽병을 유효성분으로 함유하는 숙취해소용 조성물	대한민국	고려인삼제조(주)	2016.06.29	10-2016-0081259				
12	당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 숙취해소용 조성물	대한민국	고려인삼제조(주)	2016.06.29	10-2016-0081256				
13	알코올성 간 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 흑삼 추출물 및 그 제조방법	대한민국	농촌진흥청장	2017.07.27	10-2017-0095251				
14	피부 미백용 흑삼 추출물 및 이의 제조방법	대한민국	농촌진흥청장	2017.11.03	10-2017-0146205				
15	항산화, 항염 및 주름개선 활성을 갖는 황숙종 유래의 화합물을 함유하는 화장품	대한민국	지에프씨	2017.09.01	10-2017-0111756				

	조성물								
16	락토바실러스 배양용 배지 조성물, 이를 포함하는 인삼열매 발효 추출물 및 피부상태 개선용 화장료 조성물	대한민국	지에프시 외 1	2014.11.28	10.2014-0168072	지에프시 외 1	2016.12.07	10-1686112	

라. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개회회수	코드번호	
					C-06-07	총 교육인원
1	흑삼 제조 기술 교육	흑삼 제조 기술과 교육	진안홍삼연구소	1	4	12
2	홍삼해설사 양성교육	흑삼, 태극삼, 홍삼 제조 및 품질관리	진안홍삼연구소	1	4	28

마. 기술거래(이전) 등

No.	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	코드번호	C-06-08
					기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	통상실시	미백용 조성물	(주)신오덕	2015.12.02	3,360,000원 (사후정산)	
2	통상실시	미백용 조성물	(주)자연드림	2015.06.03	21,600,000원 (사후정산)	
3	통상실시	인삼 유래 화합물 분리방법 및 이를 이용한 항염증 조성물	(주)아모레퍼시픽	2015.12.02	47,100,000	47,100,000
4	통상실시	미백용 조성물	(주)자연드림	2016.04.21	21,600,000원 (사후정산)	
5	통상실시	신규한 진세노사이드를 유효성분으로 포함하는 미백용 조성물	(주)지에프씨	2016.08.16	10,125,000원 (사후정산)	
6	전용실시	알코올성 간 손상 예방 기능성 성분을 포함하는 인삼열매 추출물 및 그 제조 방법	네추럴에프앤비	2016.09.27	50,019,370원	50,019,370

11장. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12장. 참고문헌

코드번호	D-14
-Food, K., & Administration, D. 2007. The Korean Pharmacopoeia. pp988-989	
-Kim HC. 2001. Herbal Pharmacology(한약약리학). Jipmundang. pp422-427	
-Montvale, N. J., & Fleming, T. 2000. PDR for Herbal Medicines. pp346-350	
-Cha JY, Park EY, Kim HJ, Park SU, Nam KY, Choi JE, Jum HS. Effect of white, taegeuk, and red ginseng root extracts on insulin-stimulated glucose uptake in muscle cells and proliferation of β -cells. J. Ginseng Res.2010;34(3):192-197	
-Choi JE, Nam KY, Kim BY, Cho HS, Hwang KB. Changes of Chemical Compositions and Ginsenoside Contents of Different Root Parts of Ginsengs with Processing Method. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2010;18(2):118-125	
-Davidson, M. H., Stein, E. A., Bays, H. E., Maki, K. C., Doyle, R. T., Shalwitz, R. A., ... & COMBination of prescription Omega-3 with Simvastatin (COMBOS) Investigators. Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study.Clinical therapeutics. 2007;29(7):1354-1367.	

- Fei H, Rong G, Wu SL, Ming S, Ming L. Protective effects of ginsenoside Rb1 on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.*2007;50(3):314-320
- Ghahremanfard, F., Semnani, V., Ghorbani, R., Malek, F., Behzadfar, A., & Zahmatkesh, M. Effects of cigarette smoking on morphological features of platelets in healthy men. *Saudi medical journal.* 2015;36(7): 847-850
- Hwang JB, Ha JH, Hawer WD, Nahmgung B, Lee BY. Ginsenoside Contents of Korean White Ginseng and Taegeuk Ginseng with Various Sizes and Cultivation Years. *Korean J. Food SCI Technology.* 2005;37(3):508-512
- Jeong Y. H., Cho J. H., Kang M. K., Koh J. S., Kim I. S., Park Y., Hwang J. Y. Smoking at least 10 cigarettes per day increases platelet inhibition by clopidogrel in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Thrombosis research.*2010;126(4):e334-e338.
- Lee BY. Develop new functional foods of Ginseng(새로운 인삼기능성식품 개발). *Bulletin of food technology.* 2002;15(4):17-28
- Nam KY. Clinical Applicationa and Efficacy of Korean Ginseng. *J. Ginnseng Res.* 2002;26(3):111-131
- Park CK, Jeon BS, Yang JW. The chemical Components of Korean Ginseng. *Food Industry and Nutri.* 2003;8(2):10-23
- Shin KS, Lee JJ, Jin YR, Yu JY, Park ES, Im JH, You SH, Oh KW, Lee MK, Wee JJ, Kim YS, Yun YP. Effect of Korean red ginseng extract on blood circulation in healthy volunteers: A randomized, double blind, placebo controlled trial. *J. Ginseng Res.*2007;31(2):109-116
- Victor L. Serebruany, et al. Early Impact of Prescription Omega-3 Fatty Acids on Platelet Biomarkers in Patients with Coronary Artery Disease and Hypertriglyceridemia. *Cardiology* 2011;118:187-194.
- Zhou Q, Jiang L, Xu C, Luo D, Zeng C, Liu P, Yue M, Liu Y, Hu X, Hu H. Ginsenoside Rg1 inhibits platelet activation and arterial thrombosis. *Thrombosis Research.*2014;133:57-65
- ChemFaces (<http://www.chemfaces.com>)

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 태극삼, 흑삼, 인삼지상부를 이용한 수출국 맞춤형 연구를 통한 고부가가치 제품 개발				
	(영문) Delvelopment of products for global market through evaluation of efficacy of Taeguek Ginseng, Black ginseng, aerial parts of Ginseng				
주 관 연구 기관	(주)지에프씨		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)지에프씨	
참 여 기 업	(주)지에프씨, 국립원예특작과학원, (주)네추럴에프앤피, 진안홍삼연구소(재), 고려인삼제조주식회사			(성명) 강희철	
총 연구개발비 (4,000,200천원)	계	4,000,200	총 연구 기간	2014. 7. 29 ~ 2017. 7. 28 (3년)	
	정부출연 연구개발비	3,000,000	총 참 여 수	총 인원	75
	기업부담금	1,000,200		내부인원	75
	연구기관부담금			외부인원	

1. 연구개발 목표 및 성과

최종목표

- 인삼 수출국 맞춤형 제품 개발로 인삼 수출 활성화 도모

(1) 인삼부산물을 이용한 기능성 소재 개발

가. 인삼부산물의 기능성 소재 연구

- 농가로부터 인삼부산물 원료 확보
- 인삼재배 농가 컨설팅 및 계약재배 추진
- 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축

나. 화장품 소재로서의 인삼부산물의 활용 연구

- 인삼부산물로부터 화장품 활성성분 분리, 동정 및 정량 분석 시스템 확립
- 인삼부산물로부터 발효조건 시스템 확립
- 새로운 zebrafish 배아모델 시스템을 이용한 미백효능 및 안전성평가 시스템 확립
- 새로운 펩타이드 생합성 저해제의 기전 연구
- 인삼 부산물 지상부 및 발효물을 이용한 주름개선 전임상 연구
- 인삼 지상부를 이용한 화장품 소재 연구
- 수출형 기능성 화장품 개발 연구
- 중화권(대만 또는 중국) 제품 수출 및 국내 수요처 발굴을 위한 마케팅 전략 수립

다. 기능성 식품 소재로서의 인삼부산물물의 활용 연구

- 인삼열매의 맞춤형 유효성분 추출기술 및 소재화 기술 개발
- 인삼열매 추출물의 원료화
- 동물모델을 이용한 기능성 평가(간기능개선)
- 인삼열매 추출물의 인체시험 시제품 제작 및 제품화
- 인삼열매 추출물의 개별인정 허가 및 제품화
- 인삼열매추출물의 고부가가치 제품 수출 활성화 마케팅 전략 수립

(2) 태극삼, 흑삼을 활용한 수출형 건강기능식품 개발

가. 태극삼 및 흑삼의 표준 제조방법 연구

- 태극삼 및 흑삼의 제조공정 개발
- 태극삼 및 흑삼 추출물 제조, 제품 제조공정 확립
- 태극삼 및 흑삼의 지표성분 및 이화학적 특성 규명
- 태극삼 및 흑삼 추출물의 성분분석 및 표준화, 안정성 확보

나. 태극삼 및 흑삼의 기능성 연구

- 태극삼, 흑삼의 세포수준의 기능성 평가(항스트레스, 혈행개선)
- 동물수준의 기능성 평가(항스트레스, 혈행개선)
- 대만 또는 중국 수출국가 국민 대상 인체적용시험(항스트레스, 혈행개선)
- 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별인정형) 확보를 위한 동물시험 추진
- 태극삼추출물의 혈행개선 기능성(개별인정형) 확보를 위한 인체적용시험 추진

다. 태극삼 및 흑삼을 활용한 제품 개발

- 흑삼, 태극삼 시제품 제조
- 태극삼추출물의 개별인정형 원료 · 성분관련 자료 작성 및 신청
- 제품 생산에 따른 기업, 농가 간 상생협력 방안구축

2. 연구내용 및 결과

- 태극삼, 흑삼의 이화학적 특성 조사 및 기능성 평가
 - 태극삼, 흑삼 제조 표준화 공정 확립
 - 태극삼, 흑삼 제품 제조관련 특허출원
 - 태극삼, 흑삼 소재 제품 개발
- 국제인체적용시험
 - 국제(중국)인체적용시험
 - 시험식품소재 : 태극삼, 흑삼
 - 기능성 : 2건 (혈행개선, 인지기능개선)
- 인삼열매 추출물 인체적용시험
 - 간기능 개선 인체적용시험을 통한 기능성 입증

- 태극삼 인체적용시험
 - 혈행개선 관련 기능성 시험 실시
- 인삼열매 추출물 식품 제품 개발
 - 인삼열매 추출물 관련 특허 출원
 - 인삼 열매 소재 활용 제품 개발
- 인삼부산물의 발효산물 제조, 성분연구 및 전임상 평가
 - 인삼 발효산물 제조법 특허
 - 신규 진세노사이드 미백용 조성물 특허
 - 인삼 화합물 분리방법 내용 외 총 6건의 기술거래
 - 임상 실험을 통한 화장품소재의 안전성 및 기능성 확인
 - 인삼 열매 관련 화장품 소재 및 시제품 제작
- 인삼부산물 발효산물 및 태극삼 화장품 원료화
 - 인삼 잎/줄기/열매 발효물의 CTFA 소재 등록/한글전성분명 등록

3. 연구성과 활용실적 및 계획

- 기술적 측면
 - 고품질 태극삼 및 흑삼 제조를 위한 최적 공정 개발 매뉴얼 수립 및 신 건강기능식품 시장 매출 증대 효과
 - 태극삼, 흑삼등의 특허분쟁시 역사성, 유래 등을 제시하여 선행기술 자료로 활용 가능
 - 기능성 태극삼, 흑삼 제품의 활용범위 확대 : 기능성 평가를 통한 활성성분의 지표물질로 사용한 ginsenoside의 임상적 효과를 입증하여 기존제품과 차별화된 고부가가치 산업을 창출할 수 있음
 - 인삼부산물인 열매 및 잎, 줄기로부터 천연물 유래 기능성 물질을 선별하여 functional food의 소재 개발
 - 인삼 부산물인 열매 및 잎줄기의 활성 기능성분을 규명하여 활성 기작을 밝히고 과학적인 근거로 인한 제품개발
 - 저명 전문 학술지에 연구결과 게재하여 기능성 성분 및 활성 공지 및 수출 주도화
 - 발효기법을 이용한 보다 안전하고 강화된 진세노사이드 고품격 기능성식품 소재로 활용
- 경제적 측면
 - 과학적으로 안전하고 효능이 있는 식품임을 증명하여 경제적 부가가치를 향상시킬 수 있는 초석이 될 수 있음
 - 참여기업에 기술이전을 실시하여 산업화하고 전국의 홍삼 및 인삼제조 관련 업체에도 홍보를 통해 기술이전을 실시
 - 해외에 인삼의 우수성을 알리고, 수출을 통한 매출 증대 달성
- 사회적 측면
 - 태극삼, 흑삼 가공제품도 특정한 약리효능을 기대하는 일종의 기능식품임으로 고품질·고기능성의 태극삼, 흑삼 제품 개발은 국내 인삼산업 발전은 물론 인류건강 유지에 중요한 사업이 될 수 있음
 - 원천 기술 및 특허 확보로 향후 산업적으로 다양한 분야에 적용이 가능하며, 화장품 등 다양한 분야에서 신제품의 개발이 가능

- 인삼부산물을 활용할 목적으로 개발된 제품은 기능성분 함량이 높아 고부가 식·의약, 화장품 소재로 적합하여 새로운 수요 창출이 가능함
- 개발 기술을 참여기업인 인삼생산 농협 및 생산 농민에 보급하여 부산물 유통 활성화에 기여함
- 인삼부산물 상품화율 제고로 생산 농민의 소득증대에 기여함
- 인삼부산물 제품개발 및 홍보를 통해 생산농가 및 가공제품 생산기업의 경제적 이윤확대

주 의

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