

# 1. 표지

(뒷면) (옆면)

(앞면)

<p>11-1543 000-002 096-01</p>	<p>Development and commercialization of natural substance for controlling atopic dermatitis aggravating factors <b>R&amp;D Report</b></p>	<p>발간등록번호 11-1543000-002096-01</p>
<p>아토피 피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화 최종보고서 2018 농림축산식품부</p>	<h2>아토피피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화 최종보고서</h2>	<p>2018.02.26.</p>
	<p>주관연구기관 / 경북대학교 산학협력단 협동연구기관 / 한국생명공학연구원 참여기관명 / 고려제약주식회사</p>	<h3>농림축산식품부</h3>

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “아토피 피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화”(개발기간 : 2014.11.28 ~ 2017.11.27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 26.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자)  
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자)  
참여기관명 : 고려제약주식회사 (대표자)



(인)

(인)

(인)



주관연구책임자 : 김상현

협동연구책임자 : 이소영

참여기관책임자 : 박지훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	314052-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.28.- 2017.11.27	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	아토피 피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화			
	세 부 과 제 명	<제1세부 경북대학교 산학협력단> 후보소재의 생리활성 및 기전연구, 면역안전성 평가 <제1협동 한국생명공학연구원> 후보소재의 표준화 및 대량생산 공정 연구기술 <제2협동 고려제약주식회사> 아토피피부염 악화인자 제어 천연 소재 제품화 기술			
연구책임자	김상현	해당단계 참 여 연구원 수	총: 33명 내부: 21명 외부: 12명	해당단계 연구 개발 비	정부:300,000천원 민간:100,000천원 계:400,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 46명 내부: 24명 외부: 22명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 산학협력단			참여기업명: 고려제약주식회사	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
- 연구기간(3년) 동안 특허 출원 8건(해외출원 2건 포함), 특허 등록 3건, 기술이전 1건(선입금 5억 원), SCI 논문 11편, 학술 발표 25건, 인력양성 11건의 연구 성과를 달성함. - 국내 농산자원을 활용하여 아토피피부염 악화인자를 제어하는 천연 소재 개발 및 제품화 개발을 위해 항아토피 검색계 4종 확립(집먼지 진드기 유도 아토피 동물 모델, 접촉피부염 동물 모델,				보고서 면수	

피부알레르기 동물 모델, *S. aureus* 도포에 의한 아토피 악화 동물 모델 확립).

- 다양한 후보생물소재의 효능 검증을 통해 최종적으로 곰보배추 추출물의 천연 소재를 선정하였으며, 아토피 질환 동물 모델을 통해 아토피 개선 효과, 피부장벽 강화 효과, 가려움 억제 및 항균효과 등을 검증하였고, 세포실험을 통해 히스타민 유리 기전, NF- $\kappa$ B 저해 역할과 Th2 억제 기전을 증명하였음.

- 선정된 후보소재인 곰보배추 추출물의 원료 품질 확인을 위해 일원화된 COA (Certificate Of Analysis)를 확립하여 건조감량, 성장, 중금속, 잔류농약 분석, 미생물 한도시험, 비중 등의 지표 항목 설정 및 신규 기시법 확립함.

- 대량생산체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립을 위해 곰보배추의 계약재배를 체결하여 지속적인 원료 공급이 가능하게 하였고, 대량생산 공정 기술 개발 및 대량 생산된 원료의 QC/QA 분석법을 확립함.

- 선정된 곰보배추 추출물을 이용한 국소 적용 제제 개발을 위해 곰보배추 추출물 함유 아토피 화장품을 개발하였고, 식약처 가이드라인 평가 방법을 통해 아토피 개선 기능 원료의 흡수 증대 및 보습력이 우수한 기능성 제품을 개발함.

- 원료 소재의 전임상 독성 시험을 위해 전임상 위탁 시험 기관을 통해 단회투여독성시험, 1차 피부자극시험, 안점막 자극시험, 피부감작성 시험, 광감작성 시험 등을 수행하였고, 개발한 시제품의 효능 평가를 위해 세명대학교 한방바이오사업 임상지원센터를 통한 인체적용시험을 진행하여 제품의 아토피 증상 완화 효과를 검증함.

- 개발한 아토피 화장품의 제품 시장 진입 및 전략 수립을 위해 국내 아토피 시장 및 타겟층 분석 보고서, 개발 제품의 시장 진입 전략 보고서, 시제품의 사업화 절차 보고서를 작성하여 제출함.

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><b>&lt;연구개발 목표&gt;</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 농산자원을 활용하여 아토피피부염 악화인자를 제어하는 천연 소재 개발 및 제품화</li> <li>○ 아토피피부염 악화인자(가려움, 세균증식, 건조증)를 억제함으로써 피부염을 개선할 수 있는 천연물 기반의 소재 발굴 및 국소 적용 (topical treatment) 제품 개발</li> <li>○ 동물모델에서의 유효성 평가, 안전성 평가 및 옴믹스/systems biology 기법을 활용한 기전연구를 통해 피부염 악화인자 억제 기반기술 확립</li> </ul> <p><b>&lt;연구개발 내용&gt;</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 아토피 시장 분석 및 제품 연구 개발 전략 수립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 아토피 시장 분석 및 타겟층 분석</li> <li>- 시장 분석 결과 및 소비자 니즈 분석 통한 연구 개발 전략 수립</li> </ul> </li> <li>○ 선행연구로 확보된 천연물 유래 소재의 생리활성 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가려움 억제, 항균, 피부 장벽강화, 아토피 염증개선, SCORAD Index 평가</li> <li>- 동물실험을 통한 효능 평가</li> <li>- S. aureus 도포에 의한 아토피 악화 증상 억제 효능 평가</li> </ul> </li> <li>○ 항아토피 천연물 소재 추가 탐색               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 library에서 아토피 원인세포 활성화억제 소재 탐색 (keratinocyte, mast cell 모델)</li> </ul> </li> <li>○ 작용기전 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 아토피 원인세포의 활성화 및 분화 억제 기전 연구</li> <li>- Omics와 systems biology를 이용한 작용기전 연구, 작용점으로 발굴된 분자와 상호작용하는 신호전달물질 규명</li> </ul> </li> <li>○ 천연물 소재의 안전성 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부감작성, 면역안전성 및 전임상 독성평가를 통한 소재 안전성 연구</li> </ul> </li> <li>○ 소재 표준화 및 규격화 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 표준화, 지표물질 선정, 생리활성 물질 분리/정제</li> <li>- 최적 배합비 연구 및 표준화</li> </ul> </li> <li>○ 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립</li> <li>○ 국소 적용 제제 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연물 함유 제제 개발</li> <li>- 천연물 미립화 등을 이용한 피부 흡수력 증대 기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 제품화 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 참여기업으로 기술을 이전을 통한 제품 상용화 환경 구축</li> </ul> </li> <li>○ 제품 시장 진입 전략 수립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 제품의 아토피 관련 시장 진입 전략 수립</li> <li>- 제품 출시 및 제품 출시에 따른 판매 홍보 전략 수립</li> </ul> </li> </ul>		

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SCI 논문 11편</li> <li>○ 국내 특허등록 3건, 출원 6건</li> <li>○ 국외 특허출원 2건</li> <li>○ 아토피 모델을 사용하여 효능을 평가하여 다수의 SCI 학술지에 게재하였고, 아토피에 효과적인 새로운 후보물질을 제시하여 다수의 국내외 특허를 출원/등록하였음</li> <li>○ 국내 아토피 시장 및 타겟층 분석 보고서, 개발 제품의 시장 진입 전략 보고서, 시제품의 사업화 절차 보고서 작성 및 제출</li> <li>○ 기술실시계약 1건 (선입금 5억 원)</li> <li>○ 천연 소재 3건 이상 (생강나무 추출물, 적소두 추출물, 곰보배추 추출물, UAA, UA, 개머루 덩굴) 개발</li> <li>○ 후보소재인 UAA, UA, 개머루덩굴의 기전연구와 면역안전성연구, 피부 장벽 강화 효과에 대하여 연구하였음</li> <li>○ 적소두 추출물, 곰보배추 추출물, UAA, UA, 개머루 덩굴의 아토피 개선효과를 평가하였음</li> <li>○ 아토피 저해활성 검색계 4종 확립 및 유효 생물소재 2종 도출함 (적소두 추출물, 곰보배추 추출물)</li> <li>○ 적소두 추출물과 곰보배추 추출물의 항염증 효과를 검증하였고 항균력을 확인하였으며 효능이 검증된 소재의 면역안전성을 평가하였음</li> <li>○ 곰보배추로부터 세스퀘테르펜계 화합물 9종, Phenolic 화합물 6종으로 총 15종의 유효화합물 분리정제</li> <li>○ 적소두로부터 Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol 총 4종의 유효화합물 분리정제</li> <li>○ 원료 품질 확인을 위한 일원화된 COA (Certificate Of Analysis) 확립 : 건조감량, 색상, 중금속, 잔류농약 분석, 미생물 한도시험, 비중 등의 지표 항목 설정 및 신규 기시법 확립</li> <li>○ 천연물 화장품 원료 최적화 연구</li> <li>○ 최적화된 신규 원료 소재의 효능을 검증하였고 화장품 제형을 개발함</li> <li>○ 원료 소재의 전임상독성시험을 완료함</li> <li>○ 화장품 시작품 제작을 위한 Baseline 제조 및 설문조사를 통한 의견을 반영하고 아토피 활성화시험을 통해 적절한 추출물 비율을 결정하여 화장품 제조회사와 시작품 제작 진행함</li> <li>○ 원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립하였고 지표성분연구를 통한 기준 및 시험방법을 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료함</li> <li>○ '세명대학교 한방바이오사업 임상지원센터'를 통해 인체적용시험을 진행하여 제품이 아토피 증상을 완화함을 확인함</li> </ul>
--------	---

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 아토피피부염에 대한 글로벌 시장은 이미 연간 백억 달러를 상회하고 있으며, 수백억 달러 규모로 성장할 잠재력이 있음. 특히 치료약이 없는 아토피피부염의 특성상 유력한 선도물질을 도출하여 식·의약품으로 개발한다면 시장을 선점할 수 있는 것으로 사료됨</li> <li>○ 또한 본 연구의 탐색계 운용을 위한 세포주, 정보 및 기본 시설을 미리 확보하고 있으며 우리 실정에 맞는 연구체계 확립을 위한 준비를 갖춘 상태이므로 작은 투자로도 선진국과의 경쟁이 충분히 가능하며 국가 경제와 의약산업 및 보건의료 산업에 기여할 수 있을 것으로 기대됨</li> <li>○ 현재까지 아토피에 적용하는 약물 대부분이 외국에서 개발되었고 외국제약회사로부터의 수입에 의존하고 있으므로, 본 연구는 전 세계적으로 아직 개발되지 않은 질환 표적기반 면역 질환 예방 및 치료를 위한 기능성 식·의약품을 개발하는 것으로 기술 개발이 성공한다면 국내 면역 질환의 예방 및 치료에 사용되고 있는 수입 의약품의 대체 효과가 기대됨</li> <li>○ 생물다양성 보존을 위한 국제협약이 강화되어감에 따라 유용성이 인정되는 유용자원을 우선적으로 확보 보존한다는 차원에서 국내 농산자원 또는 특용자원으로부터 유용자원을 탐색하여 새로운 자원으로 발굴 보존하고 그 유용물질을 밝혀 그 경제적 유용성 개발을 위한 연구가 요구되며 특히, 장기간 복용 가능하고 부작용이 적은 천연소재 산업발전에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.</li> <li>○ 아토피 치료효과 증진을 위한 건강기능식품 개발에 요구되는 효능평가기술, 독성평가기술 등의 기반 기술 및 노하우를 확보함으로써 향후 다양한 천연물 건강보조식품 개발을 위한 기반 기술 확립에 기여</li> <li>○ 특히 국내에서는 아토피에 효과를 갖는 건강기능식품의 연구개발 및 인허가 사례가 없는 상황에서, 본 연구결과를 기반으로 천연물을 이용한 아토피 치료 연구개발이 활성화 될 것으로 기대됨</li> <li>○ 본 과제의 성공적 수행으로 발굴된 추가소재를 활용한 특허 출원이 가능함 (추가소재 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 질환의 예방 및 개선용 조성물)</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>아토피피부염</p>	<p>국소 적용 제제</p>	<p>가려움</p>	<p>황색포도상구균</p>	<p>복합기능 제제</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<p>&lt;Purpose&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of natural product based anti-atopic dermatitis materials by the domestic agricultural resources</li> <li>○ Development of topical treatment anti-atopic dermatitis goods by the inhibition of itching, bacteria, and xerosis</li> <li>○ Evaluation of effectiveness, biosafety, and mechanism by the omic/systems biology</li> </ul> <p>&lt;Contents&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Market analysis and establishment of strategy</li> <li>○ Evaluation of pre-selected candidates</li> <li>○ Determination of further candidates</li> <li>○ Mechanism study</li> <li>○ Safety evaluation</li> <li>○ Standardization and normalization</li> <li>○ Optimization of manufacturing process</li> <li>○ Development of topical treatment agent</li> <li>○ Commercialization</li> <li>○ Strategy for market penetration</li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SCI publication 11</li> <li>○ Patent: domestic 9, internation 2</li> <li>○ Technical transfer contract 1</li> <li>○ Selection of natural materials 3: anti-atopic dermatitis efficacy</li> <li>○ Isolation of sesquiterpenes 9, Phenolics 6 and Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol</li> <li>○ Establishment of Certificate Of Analysis</li> <li>○ Development of anti-atopic dermatitis cosmetics</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Based on this research, anti-atopic dermatitis cosmetics was developed. Our research could be used in drug development focusing on the allergic skin diseases</li> <li>○ Further publications and patents are expected</li> </ul>				
Keywords	atopic dermatitis	topical treatment	pruritus	Staphylococcus aureus	multifunctioning



## 6. 영문목차

### < Contents >

1. Introduction .....	13
2. Background .....	19
3. Results .....	23
4. Achievements .....	122
5. Applications .....	126
6. Informations acquired during the research .....	126
7. Security level .....	126
8. Research facilities and equipments registered .....	126
9. Safety regulations .....	127
10. Representative results .....	127
11. Other .....	130
12. References .....	130

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	13
2. 국내외 기술개발 현황 .....	19
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	23
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	122
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	126
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	126
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	126
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	126
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	127
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	127
11. 기타사항 .....	130
12. 참고문헌 .....	130

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

- 국내 농산자원을 활용하여 아토피피부염 악화인자를 제어하는 천연 소재 개발 및 제품화
- 아토피피부염 악화인자 (가려움, 세균증식, 건조증)를 억제함으로써 피부염을 개선할 수 있는 천연물 기반의 소재 발굴 및 국소 적용 (topical treatment) 제품 개발
- 국내 우수한 천연물 자원과 제품화 기술을 활용하여 사회적 이슈인 아토피피부염 문제를 해결 또는 경감
- 아토피 및 접촉피부염 동물모델에서의 유효성 평가, 안전성 평가 및 오믹스/systems biology 기법을 활용한 기전연구를 통해 피부염 악화인자 억제 기반기술 확립

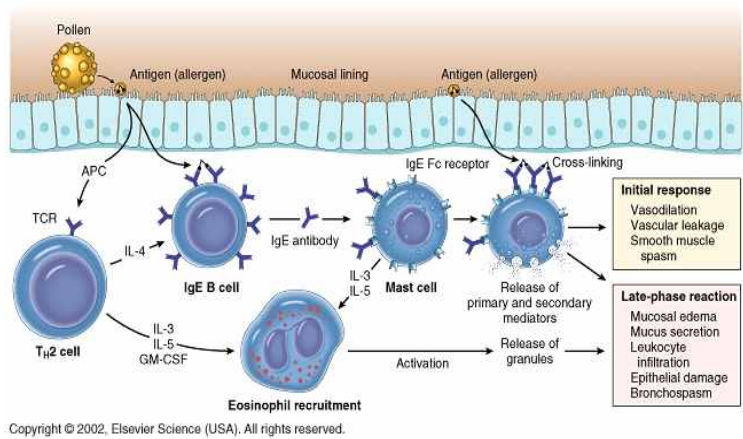
## 1-2. 연구개발의 필요성

### (1) 연구개발의 과학기술, 경제적 중요성

- 현재 사용되고 있는 아토피피부염 치료제는 스테로이드나 tacrolimus (FK-506) 같은 비특이적 면역억제제이거나 항생제, 항히스타민제 같은 증상완화제임.
- 근본적인 치료제가 없으며 항생제와 스테로이드는 장기복용 시의 부작용으로 부작용이 없는 새로운 아토피피부염 치료제의 개발이 절실함. 따라서 아토피피부질환을 유발하는 원인세포로의 분화를 억제하거나 면역기능을 강화시키는 소재의 발굴과 같은 최신 **면역학적 지식에 근거한 근원적 치료법 개발**이 절실히 요구됨.
- 아토피피부염은 가려움, 세균증식, 건조증과 같은 다양한 악화인자에 의해 유발됨으로 **다양한 인자를 복합적으로 억제**하는 기능을 갖는 소재 발굴이 필요함.

### ① 아토피피부염의 병인

- 피부면역질환은 아토피피부염 및 알레르기접촉피부염 같이 외인성 항원에 대하여 과민한 면역반응으로 유도되는 것과 건선, 백반증 같이 내인성 항원에 대한 자가면역반응으로 유도되는 것으로 크게 대별됨. 아토피는 항원에 대한 IgE 항체의 생산이 근본 원인이며, IgE 항체로의 class switch를 유도하는 IL-4 및 호산구의 증식 및 분화를 촉진시키는 IL-5가 필수적으로 관여함. IL-4와 IL-5는 Th2에 의해 생성되기 때문에 Th2 세포가 관여하는 Th2 반응이 피부질환의 유도에 핵심적 역할을 함.



- 아토피피부염은 만성적인 가려움증을 동반한 습진의 한 종류로, 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 면역계의 이상, 집먼지 진드기, 환경오염 등으로 추정됨.
- 주요 임상적 증상은 피부건조, 극심한 가려움, 염증(홍반과 피부 거칠어짐), 상흔(태선화), 진물, 색소이상 등이 있음.
- 아토피피부염은 항원에 대한 이상적 피부반응으로 세균감염에 의해 악화된다고 알려져 있으며, 피

부장벽 손상(microbiome, physical, chemical, immunological barrier), TSLP 발현, Th1/Th2 불균형, keratinocyte / mast cell / dendritic cell 과다활성 등 다양한 면역반응에 총체적으로 문제가 생기는 질환임. 따라서 아토피피부염의 치료에는 다양한 악화인자를 억제하는 복합적 치료가 필요함.



## ② 현재 아토피피부염 치료의 문제점

- 현재 사용되고 있는 아토피피부염 치료제는 스테로이드나 tacrolimus와 같은 비특이적 면역억제제 및 항히스타민제 임. 국소 스테로이드제가 가장 많이 사용되어온 약물이나, 지속적으로 사용할 경우 피부위축, 팽창선, 피부장벽기능 손상 등의 부작용이 초래됨. 따라서 항원 특이적이고, 근원적으로 치료가 가능한 새로운 치료제의 개발이 요구됨.
- 현재 아토피피부염의 치료로는 피부보습, 악화요인의 제거, 스테로이드 외용제 및 환자와 가족 교육을 기본으로 하고 증상의 정도에 따라 항히스타민제, 광치료, 면역반응 조절제, 면역억제제 등을 사용하고 있으나, 오랜 기간 비특이적 치료제로 인해 많은 부작용이 나타나, 보다 효과적이고 부작용이 적은 치료제의 개발을 필요로 함.

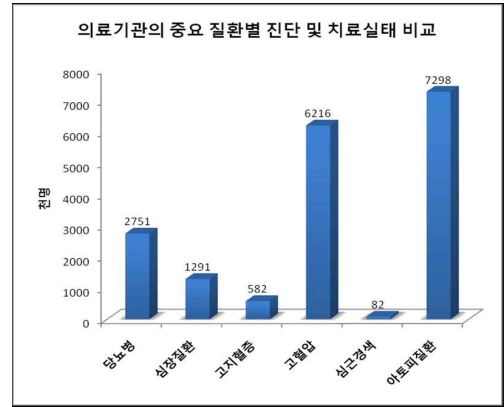
## (2) 연구개발의 경제 · 산업적 중요성

- 아토피피부염은 의료비용뿐만 아니라 생산성 저하, 간접비용 등 막대한 사회경제적 손실을 초래함으로써 효율적인 치료약물이나 국소적용제품의 개발이 절실함.
- 아토피피부염에 대한 글로벌 시장은 이미 **연간 백억 달러를 상회**하고 있으며, 수백억 달러 규모로 성장할 잠재력이 있음.
- 아토피피부염에 탁월한 효능이 있는 제품이 개발될 경우, 고부가가치 바이오산업으로 발전하여 국가 경제 발전에 기여할 것으로 기대됨

- 아토피피부염은 최근 계속 증가 추세인데 선진국의 경우 어린이의 20%가 고통 받고 있으며 성인이 되어도 아토피소질은 계속 남아있는 경우가 많음. 땀이나 정신적 스트레스로 인하여 악화를 거듭하므로 어릴 때부터 운동을 즐기기 어렵고 사회생활이 어려움. 어릴 때부터 반복되는 피부염을 치료하기 위해 환자와 가족이 겪어지는 많은 시간적, 경제적, 정신적 부담은 결국 국가적 손실로 연결됨.
- 피부면역질환은 세계적으로도 그리고 국내에서도 가장 흔한 질환 중 하나로서, **외래 진료환자 중 5위**를 차지하며, **국내 3대 만성질환**임 (보건사회연구원). 이를 치료하기 위한 경제적, 사회적 손실은 매우 크나 생명에 지장을 초래하는 경우가 드물어 다른 질환에 비해 국가적 관심이 적은 편임. 따라서 아토피피부염의 치료에 대한 국민적 관심의 해결과 이를 산업화하기 위한 국가적 지원이 필요함.
- 아토피피부염은 최근 계속 증가 추세인데 선진국의 경우 어린이의 20%가 고통 받고 있으며 성인이 되어도 아토피소질은 계속 남아있는 경우가 많음. 땀이나 정신적 스트레스로 인하여 악화를 거듭하므로 어릴 때부터 운동을 즐기기 어렵고 사회생활이 어려움. 어릴 때부터 반복되는 피부염을 치료하기 위해 환자와 가족이 겪어지는 많은 시간적, 경제적, 정신적 부담은 결국 국가적 손실로 연결됨.
- 피부면역질환은 세계적으로도 그리고 국내에서도 가장 흔한 질환 중 하나로서, **외래 진료환자 중 5위**를 차지하며, **국내 3대 만성질환**임 (보건사회연구원). 이를 치료하기 위한 경제적, 사회적 손실

은 매우 크나 생명에 지장을 초래하는 경우가 드물어 다른 질환에 비해 국가적 관심이 적은 편임. 따라서 아토피피부염의 치료에 대한 국민적 관심의 해결과 이를 산업화하기 위한 국가적 지원이 필요함.

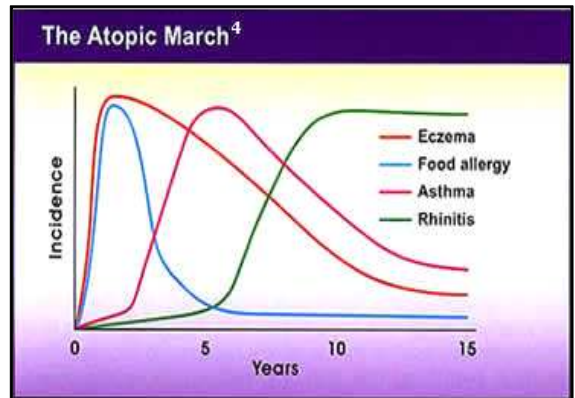
- 의료기관의 중요 질환별 진단 및 치료실태 조사에서도 **아토피질환이 고혈압, 당뇨병 보다 환자수가 많으며**, 매년 환자수가 급증하고 있음. 하지만 아토피피부염 환자의 경우 병원을 찾지 않고 아토피 화장품, 민간요법 등으로 치료하는 이들을 감안하면 최고 800 만명에 이른다는 분석이 있음 (헤럴드 경제, 2013년).



구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	연평균 증가율
계	1,090,398	1,047,564	1,053,044	1,025,315	978,965	+2.7%
입원	896	932	1,154	1,301	1,367	+11.1%
외래	1,090,156	1,047,326	1,052,722	1,024,975	978,524	+2.7%

[표] 연도별 아토피피부염 진료인원 현황 (보건복지부, 2013년) (명, %)

- 아토피피부염의 또 하나의 중요한 심각성은 **atopic march** 임. 오른쪽의 그림에 나타난 바와 같이, 아토피 환자는 아토피 증상에 머무르지 않고 시간이 지남에 따라 다양한 피부알레르기 질환으로 진행됨.
- 아토피 환자의 50% 이상이 천식, 75% 이상이 알레르기성 비염으로 진행되는 결과를 보여주는 통계로, 아토피피부염의 심각성을 나타냄.



=> 아토피피부염은 사회경제적 손실이 큰 질환으로 환자들에게 새로운 삶을 제공하면서, 막대한 의료비 지출을 줄일 수 있는 안전하고 효율적인 치료제 개발이 절실할 뿐 아니라, “수십억 달러 규모의 생물학적 제품을 가지는 시장으로 성장할 잠재력이 있다는 점”이 고려되어야 함. 아울러 아직 신약 개발 경험이 부족한 우리나라 현실을 감안할 때 전신반응보다는 **국소 피부반응을 제어할 수 있는 소재 개발의 성공 가능성이 훨씬 높음.**

### (3) 기술, 시장 및 산업 동향

- 최근 성인 아토피 환자가 20대 젊은 층부터 60세 이상의 고령층까지 크게 늘어나면서 아토피 관련 상품들이 호황을 누림. 아토피 관련 시장은 초기에 중소벤처기업으로부터 시작됐지만 현재는 대기업들이 동참하고 있으며 아토피 시장 매출도 매년 20% 이상 증가해 지난해에는 380억 원으로 성장함.
- 아토피피부염 치료를 위해 스테로이드제제, 면역억제제, 항생제 등이 경구용 또는 도포용으로 개발되어 있으나 이들은 장기간 사용 시 면역기능 이상 등의 심각한 부작용이 보고되어 단기간만 사용하고 있는 실정임. 따라서 독성이나 부작용이 없는 천연물 소재의 치료제 개발에 관심이 집중됨.

의약품명	회사	계열	성분	효능	특성 및 부작용
네리소나	한국메나리니	스테로이드	디플루코르톨론	아토피 피부염, 건선, 습진 가려움 완화	탈스테로이드 효과 (장기 사용 금지), 성장 지연, 피부막 회복 지연
더모타손	동구제약		모메타손		
더모베이트	GSK		클로베타솔		
트리코트	동광제약		트리암시놀론		
아드반탄	한국메나리니		메칠프레드리솔론		
더마톱	한독약품		프레드니카르베이트		
엘리텔	노바티스	면역억제제	피메크로리무스	중증 아토피 피부염 치료	발암 위험성 경고
프로토픽	아스텔라스제약		타크로리무스		

[표] 주요 아토피 치료제 현황 및 부작용

- 아토피피부염은 피부 장벽이 손상되어 정상인들이 전혀 느끼지 못하는 자극에 대해 민감한 반응을 나타내므로 피부장벽의 정상적인 복구를 위해 세라마이드를 함유한 천연보습제가 개발되어 수요가 증가하고 있으나 빈번한 도포를 필요로 하며 일시적인 건조화 증상 완화의 효과를 나타낼 뿐임. 따라서 근본적인 치료제 개발이 시급함.
- 일본 후지사의 FK-506 (프로토픽, tacrolimus)과 노바티스의 SDZ-ASM 981 (엘리텔, ascomycin 유도체)은 비스테로이드성 면역억제제로 다른 스테로이드 제제보다는 부작용이 적음. 이들 면역억제제들은 염증과 관련된 사이토카인 방출을 억제하여서 임상에서도 높은 효과를 나타낸 새로운 치료제이나 고가의 약품이어서 경제성에 문제가 있음.
- 중국에서는 면역계에 영향을 미치는 한약제제인 TDM (traditional chinese medicine)의 연구가 많이 진행되고 있으나 효능이 불확실하며, 국내의 경우는 기존개발 약물의 안정성 확보, 부작용 방지, 효능 보완 등의 연구를 하고 있음. 또한 슈도세라마이드, 스쿠알렌, 칼렌듈라, 정제 동백유, 알몬드 등의 천연 추출물을 활용하여 고보습, 저자극성, 가려움증 완화 및 억제, 보호 및 보습효과에 목적을 두고 도포용 치료제 개발이 이루어지고 있음.
- 질병 특이성을 높이기 위한 면역/유전자/단백질 치료제들, 약물의 독성을 조금이라도 낮춰보고자 시도되는 다양한 약제학적 방법 등, 새로운 신약을 발굴하기 위한 다양한 방법들이 시도되고 있음. 이들 중 가장 각광받고 있는 기술 중 하나는 omics 기술을 이용한 후보물질의 전사체, 단백질체, 대사체 연구와 systems biology 기술을 이용한 네트워크 분석 및 기전 연구임. 이러한 연구를 통해 우수한 효능의 후보물질을 얻을 수 있고 다수의 후보물질이 전임상/임상시험을 거치면서 요구되는 시간/비용을 획기적으로 줄일 수 있음.
- 아토피피부염은 사회경제적으로 손실이 크며 일단 발병하면 현재로서는 완치되는 질환이 아니므로 효과적이면서도 장기간 사용하여도 부작용이 적은 치료제의 개발이 절실함. 이러한 치료제의 개발은 모든 사람이 적극적인 활동을 하고, 삶의 질을 높이기 위해서도 반드시 필요함.
- 한국의 경우 아토피, 습진과 같은 면역 관련 피부 질환용 기능성 화장품의 경우에도 소비자가 의약품과 동등한 효능을 기대하며 기타 기능성 화장품 (미백, 주름 개선 등)과 이질시 하는 경향이 큼. 최근 들어 한국형 drug store (더블 유, 올리브 영 등)의 체인점이 늘어나며 이와 같은 아토피 기능성 화장품의 일반 소비자 선호도가 증가하는 추세이며 이에 따른 관련 시장 규모가 점차 확대될 것으로 예상됨.
- 앞으로 선진국에서 개발될 치료제를 모두 수입하여 사용한다면 국제 경제적 손실은 엄청날 수밖에 없음. 본 과제와 같은 연구를 통해 현재 미국 등에서 개발되고 있는 피부면역질환 치료에 사용될

제제를 대신할 수 있는 치료제나 국소적용 가능한 화장품을 개발한다면 수입대체 효과와 더불어 수출을 통해 국내 제약 및 화장품 산업의 발전에 크게 기여할 수 있음.

### 1-3. 연구개발 범위

- 천연물유래 소재 생리활성 평가
  - 아토피, 알레르기 및 접촉피부염 동물실험을 통한 효능 평가
  - S. aureus 도포에 의한 아토피 악화 억제 효능 평가
  - 가려움 억제 및 항균 효능 평가
  - 피부 장벽강화, 피부 아토피 염증개선, SCORAD Index 평가
- 작용기전 연구
  - 아토피 원인세포(keratinocytes, mast cells)의 활성화 억제 기전 연구
  - 아토피 원인세포의 분화 억제 및 타겟 단백질 도출
  - Omics와 systems biology를 이용한 소재의 작용기전 연구
  - 작용점으로 발굴된 분자와 상호작용하는 신호전달물질 규명
- 아토피피부염 원인세포를 이용한 천연물유래 소재 추가 탐색
  - 연구팀이 보유하고 있는 500여 종 이상의 국내 천연물 library에서 아토피피부염 원인세포의 활성을 억제하는 소재 추가 탐색 (keratinocyte와 mast cell 모델을 이용한 탐색)
- 국내 아토피 시장 분석 및 제품 연구 개발 전략 수립
  - 국내 아토피 시장 분석 및 타겟층 분석
  - 시장 분석 결과 및 소비자 니즈 분석 통한 연구 개발 전략 수립
- 소재 표준화 및 규격화 연구
  - 선정된 소재로부터 지표물질 및 생리활성 물질의 분리/정제, 구조 동정
  - 원료의 지표물질 3종 이상 선정
  - 원료의 표준화를 위해 지표성분의 정량 및 정성 분석법 개발
  - 도출된 소재의 생물전환에 의한 활성증진 연구
  - 추출 분획의 최적 배합비 연구 및 표준화
- 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립
  - 추출물 제조공정의 개발 및 최적화
  - 대량생산 공정 기술 개발
  - 대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립
- 화장품 제형 개발
  - 제품의 기능성 극대화를 위하여 시너지 효과를 갖는 복합 제품 개발
  - 기능성 천연 소재의 피부장벽 투과 촉진을 목적으로 나노 에멀전 등의 다양한 제형을 설계하고 평가법 개발
  - 제형의 물성 평가
  - 제조공정 확립 및 표준화

- 시제품 샘플 생산
  - 제품의 기능성 극대화를 위하여 융합 제품의 공정화
  - 제품의 공정화에 적용하기 위한 scale up
  
- 후보 소재의 전임상 독성시험
  - 단회투여독성시험
  - 1차 피부자극시험
  - 안점막 자극 또는 기타 점막 자극시험
  - 피부감작성 시험
  - 광독성 및 광감작성 시험(흡광도 측정 시 자외부(280~420nm)에서 흡수가 없을 시 면제)
  
- 제품 안정성 확립 및 분석법 연구
  - 제제 가속/가혹 안정성시험
  - 장기 안정성 시험 및 분석(성상, 함량 등)
  - 추출물 단계별 함량 분석
  - 추출물 단계별 유효물질 분석법 개량
  - 기준 및 시험방법 확립
  
- 제품 효능 평가
  - 제품의 기존 아토피개선제 대비 활성 평가
  - 제품의 흡수 측진을 통한 활성 증가도 평가
  - 피부 안전성 평가
  
- 신규 제품 허가 및 출시 준비
  - 현재 식품의약품안전처 규정상 아토피 기능성 화장품 인 증은 불가함으로 아토피 억제 효능이 있는 신규 화장품 개발을 목표로 함
  - 시제품 관능평가
  - 제품생산, 디자인



## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 2-1 국내 기술개발 및 시장 현황

#### (1) 국내 아토피 피부염 환자 분석과 주요 발병 원인

- 90년대 중후반부터 폭발적으로 증가하던 국내 아토피 환자는 2010을 전후하여 감소 추세에 있음. 그리고 아토피 환자의 대부분은 외래진료를 받지만, 최근 중증 아토피 피부염으로 인한 입원 환자가 증가추세에 있으며 이는 각종 1차 자가 치료 환자 및 40대 이상 중증 환자의 증가에 의한 것으로 사료됨.
- 2012년 기준으로 전체 환자의 성별은 남자 46만 6천명, 여자 51만 3천명으로 성별에 따른 큰 차이는 나타나지 않음. 9세 이하 (소아, 유아기) 환자는 비중이 감소한 반면 40-50세 이상의 중년층 아토피 피부염 환자 수는 꾸준히 증가세에 있으나, 4세 이하 영유아 환자는 총 환자의 35%로 여전히 큰 비중을 차지하는 것으로 나타남.
- 하지만 아토피 피부염 환자의 경우 병원을 찾지 않고 아토피 화장품, 민간요법 등으로 치료하는 이들을 감안하면 최고 800만 명에 이를 것이란 분석도 있음 (헤럴드 경제, 2013년)

[표] 연도별 아토피 피부염 진료인원 현황 (보건복지부, 2013년) (명, %)

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	연평균 증가율
계	1,090,398	1,047,564	1,053,044	1,025,315	978,965	+2.7%
입원	896	932	1,154	1,301	1,367	+11.1%
외래	1,090,156	1,047,326	1,052,722	1,024,975	978,524	+2.7%

[표] 2012년 연령대별 아토피 피부염 진료인원 현황 (보건복지부, 2013년) (천 명, %)

구분	계	9세 이하			10대	20대	30대	40대	50대	60대	70세 이상
		소계	0-4세	5-9세							
전체	979 (100)	321 (48.5)	321 (32.8)	153 (15.7)	181 (18.5)	97 (9.9)	59 (7.1)	48 (5.2)	35 (4.6)	29 (3.0)	18 (3.3)
남성	466	247	170	78	84	39	23	19	16	14	8
여성	513	227	151	75	97	58	36	29	19	14	10

- 국내 아토피 피부염 환자의 급증에는 원인이 매우 다양하여 특정 지을 수는 없으나, 유전적, 환경적, 면역학적, 피부보호막 이상 등이 주요 원인으로 지목되고 있음 (아토피 치료제 관련 국내외 특허 분석을 통한 기술개발 트렌드 및 국내 보유기술 분석 연구, 생명공학정책연구원, 2007)
  - 유전적 요인: 가족력이 존재하는 경우 70-80%의 높은 발병률을 보임.
  - 환경적 요인: 산업화로 인한 환경 공해, 식품의 다양화 및 보존을 위한 각종 화학 첨가물의 증가, 주거형태의 변화에 따른 환경 호르몬 노출 증가, 애완동물 사육, 사회적 스트레스 등이 있음.
  - 면역학적 요인: 피부 알레르기 원인물질 (항원)을 인식한 랑게르한스세포로부터 T 림프구에 항원을 전달하는 능력이 향상되어 이 과정에서 활성화되는 Th2로부터 사이토카인, IgE, 호산구가 증가됨.
  - 피부보호막의 이상: 피부 교유 기능인 보호막 기능의 이상으로 인한 각질층 내 세라마이드의 감소로 피부에 자극물질의 침투가 용이해짐.

(2) 국내 아토피 화장품 시장 현황 및 특징

- 급증하는 아토피 환자 수에 따라 2000년대 초반부터 바이오벤처 기업들이 아토피용 화장품 연구 개발에 집중하며 시장이 점차 확대되었음. 2000년 100억 원대 시장을 형성했던 국내 아토피 화장품 시장 규모는 2014년 현재 2000억 원대로 성장한 것으로 추산 (토러스 투자증권, 2014년) 되나, 유통 경로가 약국, 전문샵, 화장품샵, 인터넷, 방문판매, 유아용품전문매장, 대형 할인마트 등으로 다분화 되어있어 정확한 집계는 어려운 상황임.
- 국내에서 현재 유통되고 있는 아토피 화장품 브랜드는 약 20개로, 이 중 (주)네오팜의 아토피은 초기 원천 기술, 동화약품과의 제휴 (약국)를 통한 판매처 선점으로 전체 시장의 약 35%를 차지하고 있으며 KMAC에서 선정하는 브랜드파워 아토피케어 부문에서 8년 연속 1위에 선정됨.
- 후발 업체는 보령메디앙스, 동성제약, 아더마 (유럽 아토피 화장품 판매 1위), 김정문 알로에, 로레알, 바이오스펙트럼 등 대기업, 외국 유명 화장품 전문 기업, 국내 바이오 벤처 기업이 혼재되어 있는 시장 상황으로 분석됨.
- 현재 국내 아토피 화장품 시장에서 소비자가 가장 우선시하는 항목은 효능이며, 그 다음이 가격으로 판단됨. 이는 정상인이 아닌 환자가 사용하는 제품이므로 피부가 매우 민감한 상황으로 문제가 발생할 소지가 있으며, 일반 화장품에 비해 사용 빈도가 높아 비싼 가격의 경우 부담이 크기 때문인 것으로 판단됨.

[표] 국내 주요 아토피 화장품 및 특징

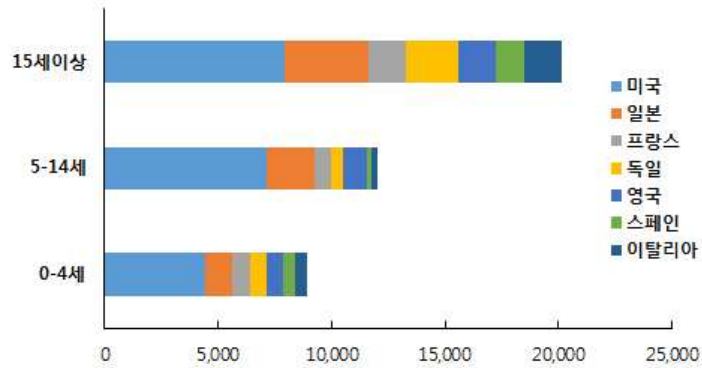
브랜드	회사	주요 성분 (특징)	비고
<b>아토피</b>	<b>네오팜</b>	<b>유사 세라미드 (MLE 특허 보유)</b>	
탈스	녹십자	10여개의 생약 혼합 제제 (항균 및 홍반 제어)	
아토피알로에	남양알로에	액티브알로에 추출물분말 (피부트러블 개선)	
동성제약	아토피클리어	부펙사막 (증상 개선)	허가 취소
아토피스	보령메디앙스	동백유, 보리추출물, 세라미드 (저자극성)	일본 원료
아토피마일드		쇠비름, 해양심층수 (보습력 강화)	
탈스	바이오스펙트럼	23종 천연식물 원료 함유 (저자극 고보습)	
아더마	유한양행	오메가 6, 귀리 추출물	프랑스 수입
아토피코	아토피코코리아	정제동백유 (보습)	일본 수입
라 로슈-포체	로레알코리아	시어버터 (피부 유연제 효능)	프랑스 수입
알로 아토피어	김정문알로에	폴리글루타믹에시드, 알로에 베라 (피부 보습)	

2-2. 국외 기술개발 및 시장 현황

(1) 국외 아토피 피부염 환자 분석

- 전 세계적으로도 아토피 피부염을 비롯한 면역 질환은 과도한 영양 상태 및 급격한 환경 변화, 고도의 산업화가 이루어진 선진국에서 집중적으로 발병하는 것으로 나타남. 특히, 세계 주요 7개국 (미국, 일본, 프랑스, 독일, 영국, 스페인, 이탈리아)의 아토피 피부염 환자는 2007년 기준으로 4,000만 명 이상으로, 2012년 통계에 따르면 중국과 인도의 아토피 환자 수를 통합하여 **1억 2천 만 명이 넘는 것으로 확인되었음** (아토피 치료제 관련 국내외 특허 분석을 통한 기술개발 트렌드 및 국내 보유기술 분석 연구, 생명공학정책연구원, 2007; Healthcare and medical, Atopic

dermatitis-Epidemiology forecast to 2022, 2013).



[표] 세계 주요 7개국 아토피 피부염 환자 현황 (Datamonitor, Atopic dermatitis, 2007)

(천 명)

인구	미국	일본	프랑스	독일	영국	스페인	이탈리아	계
0-4세	4,455	1,180	797	734	713	493	569	8,941
5-14세	7,123	2,160	687	539	1,047	186	310	12,057
15세이상	7,960	3,646	1,647	2,351	1,634	1,229	1,652	20,134
<b>계</b>	<b>19,538</b>	<b>6,986</b>	<b>3,131</b>	<b>3,624</b>	<b>3,394</b>	<b>1,908</b>	<b>2,531</b>	<b>41,112</b>
전체 인구수	303,354	128,326	60,940	82,618	60,018	43,604	58,173	737,033
<b>아토피 발병률</b>	<b>6.4%</b>	<b>5.4%</b>	<b>5.1%</b>	<b>4.3%</b>	<b>5.6%</b>	<b>4.3%</b>	<b>4.3%</b>	<b>5.5%</b>

- 주요 7개국 중 미국의 아토피 피부염 환자 발생률이 가장 큰 것으로 나타났으며, 독일과 스페인, 이탈리아가 낮은 발생 빈도를 나타냄. 비록 아토피 발생의 원인이 다양하지만 이와 같은 결과는 미국인의 정크 푸드 섭취 비중이 가장 높기 때문으로 판단되며, 미국식 식습관에 크게 영향을 받은 국내 사정을 미루어 볼 때 아토피 발생의 주요 원인으로 고려할 가치가 있음.
- 한국과 마찬가지로 세계 주요국의 아토피 환자 연령별 발생률은 공동적으로 0-4세에서 가장 높은 수치를 보이며, 5-14세 유아기의 발병률은 국가별로 큰 편차가 있음. 이는 국가별 아토피 피부염 치료에 대한 방법 및 이해, 기후, 식습관 등에 따른 것으로 판단되며 국가에 대한 아토피 관련 제품 개발 전략을 각각 수립할 필요성이 있음.

(2) 국외 아토피 피부염 치료제 및 화장품 시장 분석

- 국내에서는 바이오 벤처 회사를 중심으로 한 아토피 기능성 화장품 개발 뒤에 치료제 개발이 진행된 반면, 국외에서는 노바티스, 아스텔라스, 산도스 등을 중심으로 한 아토피 치료제 개발과 프랑스의 아벤느 (Avene), 유리아쥬 (Uriage)를 중심으로 아토피 기능성 화장품 개발이 함께 이루어짐.
- 일반적인 아토피 대처법은 기능성 화장품을 활용한 1차 관리, 증상의 정도에 따른 국소 의약품

사용 (스테로이드 및 비스테로이드 치료제), 항히스타민제 및 면역억제제의 투여, 감염에 대항하는 항생제 투여 등을 단계별로 사용하는 것임.

- 1차 아토피 치료제로 선택되는 스테로이드 기반 의약품은 사용에 따른 득과 실이 분명하며, 최근에 개발되어 각광받았던 면역억제제 기반 아토피 치료제 엘리델 (노바티스, 피메크로리무스), 프로토픽 (아스텔라스제약, 타크로리무스)는 2005년 FDA의 발암성 위험이 경고되었음. 또 다른 면역억제제 사이클로스포린 에이 (산도스, cyclosporin A)도 고혈압, 신장독성, 약물 상호작용에 따라 사용이 제한되고 있는 등 아토피 치료제의 한계가 분명함.
- 따라서 증상의 경중에 따른 의약품 선택은 필수이나, 아토피 기능성 제품을 통한 증상의 호전 및 관리가 필요하며, 최근 추세 또한 질병의 완치가 아닌 관리를 목적으로 바뀌고 있음.
- 아벤느와 유리아쥬 등은 의학적 효능을 바탕으로 한 제품 개발을 선도하였으며, 이는 프랑스 국민의 면역 관련 피부 질환의 증가, 자연 약용 온천수 보유, 선진 기술 보유, 드럭 스토어 (Drug Store)의 구비 등이 발전 이유로 분석됨.
- 한국의 경우 아토피, 습진과 같은 면역 관련 피부 질환용 기능성 화장품의 경우에도 소비자가 의약품과 동등한 효능을 기대하며 기타 기능성 화장품 (미백, 주름 개선 등)과 이질시 하는 경향이 크며, 네오팜은 이와 같은 국내 정서를 활용한 약국 마케팅으로 큰 성공을 거둠. 최근 들어 한국형 드럭 스토어 (더블 유, 올리브 영 등)의 체인점이 늘어나며 이와 같은 아토피 기능성 화장품의 일반 소비자 선호도가 증가하는 추세이며 이에 따른 관련 시장 규모가 점차 확대될 것으로 예상됨.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

<제1세부>

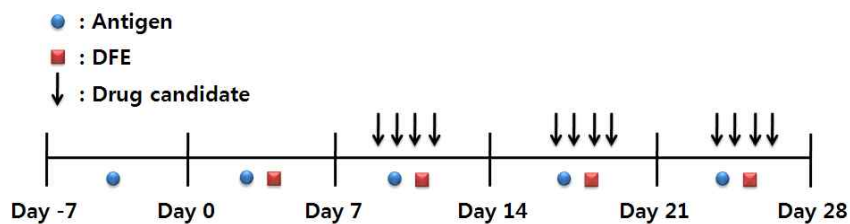
코드번호

D-05

#### 1. 검색계 확립 및 운용

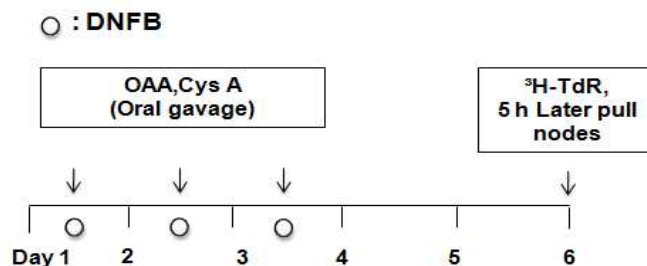
##### (1) 집먼지 진드기 유도 아토피 동물 모델

- 현재 일반적으로 사용되는 DNCB 유도 Nc/Nga 아토피 동물모델은 모델의 정확성과 항원의 적합성 때문에 논란의 대상임 (DNCB: super-antigen으로 접촉피부염도 유발, Nc/Nga: 기전이 불분명). 연구팀은 집먼지 진드기 (DFE) 항원으로 유발하는 새로운 아토피 동물모델을 확립하였음. 이 모델은 동물 귀의 비후, DEF-specific IgE, 비만세포와 호중구 침윤, 세포부착인자 (ICAM-1, selectin) 발현, Th2 사이토카인과 Th17의 활성화 등을 측정하여 아토피피부염에 효과 있는 약물을 발굴하는데 적합한 모델임이 검증됨. 이 모델을 이용한 동물실험에서 GT45, chrysin, gallangin 및 다수 천연물의 우수한 항아토피 효과를 입증하였고, 이러한 결과는 이들 물질의 아토피피부염에 대한 적용 가능성을 의미함.



##### (2) 접촉피부염 동물 모델

- 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 귀 부위에 DNFB 를 각 25  $\mu$ l씩 양쪽 귀 뒷부분에 3일동안 도포하여 피부염을 유발하였음. DNFB 도포를 2일간의 도포 중지기간을 가진 후,  $^3\text{H-TdR}$  20  $\mu$ Ci (in 250  $\mu$ l PBS) /mouse i.v injection함. 이 모델은 동물 귀의 비후, IgG2a, Th2 사이토카인의 활성화 등을 측정하여 접촉피부염에 효과 있는 약물을 발굴하는데 적합한 모델임이 검증됨. 미국 NIH에서 공인되어 사용되는 피부감작성 평가임.



##### (3) 피부알레르기 동물 모델

- Anti-DNP-specific IgE (0.5  $\mu$ g)는 각각의 ICR mice의 귀에 피하주사로 주입하였으며, 48시간 후에 4% Evans blue (1:4)와 혼합된 DNP-HSA (1  $\mu$ g)을 정맥주사 함. DNP-HSA 처리 30분 후에 ICR mice를 안락사 시키고 귀의 IgE/Ag 반응에 의한 Evans blue 염색약의 양을 육안으로 관찰함. 1 mL 1 M KOH 와 9 mL acetone과 phosphoric acid 혼합물 (5:13)에 해당 귀를 절개 하여 넣고, 하루 동안 반응시켜 microplate reader를 이용하여 620 nm의 흡광도로 염색약의 양을 측정함. 이 모델은 또한 사이토카인의 활성화 등을 측정하여 피부알레르기에 효과 있는 약물을 발굴하는데 적합한 모델임이 검증됨.

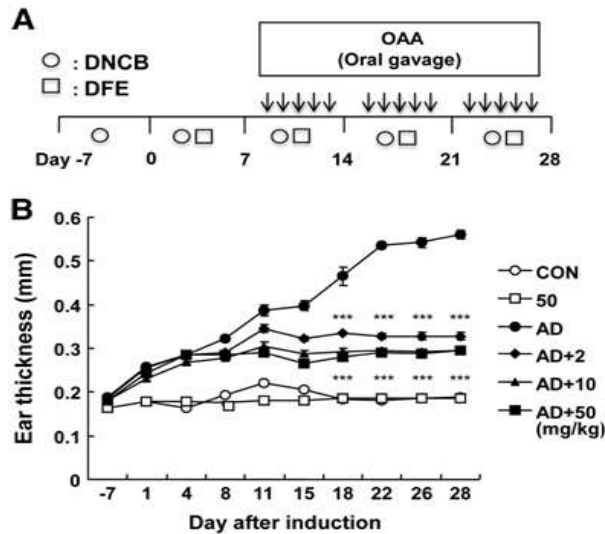
(4) *S. aureus* 도포에 의한 아토피 악화 동물 모델

- 황색포도알구균의 감염이 아토피 환자의 증상을 악화시킨다는 것은 임상적으로 널리 알려져 있음 (아토피 환자에게 항생제를 처방 하는 근거). 연구팀은 경북대학교 피부과와 함께, 연구팀에서 개발한 아토피 동물모델과 임상샘플을 대상으로 1) 아토피 증상을 악화시키는 황색포도알구균의 감염 조건을 규명하고 2) 아토피의 악화는 Staphylococcal enterotoxin A에 의해 매개된다는 것을 증명하였음. 아토피를 악화시키는 황색포도알구균의 정확한 조건 (strain, 접종 회수, 접종 균수 등)을 규명하였으며, 본 과제에 직접 적용하였음.

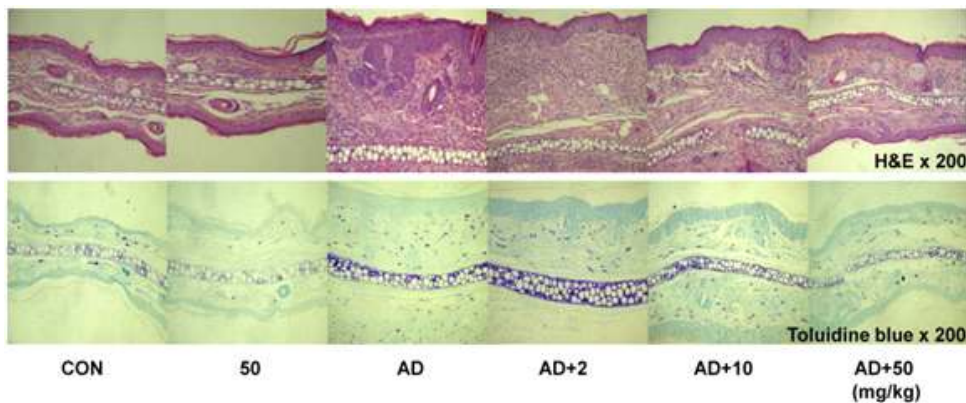
2. 활성 소재의 *in vivo* 효능 검증

(1) 적소두 추출물 (OAA)의 아토피 억제 효능

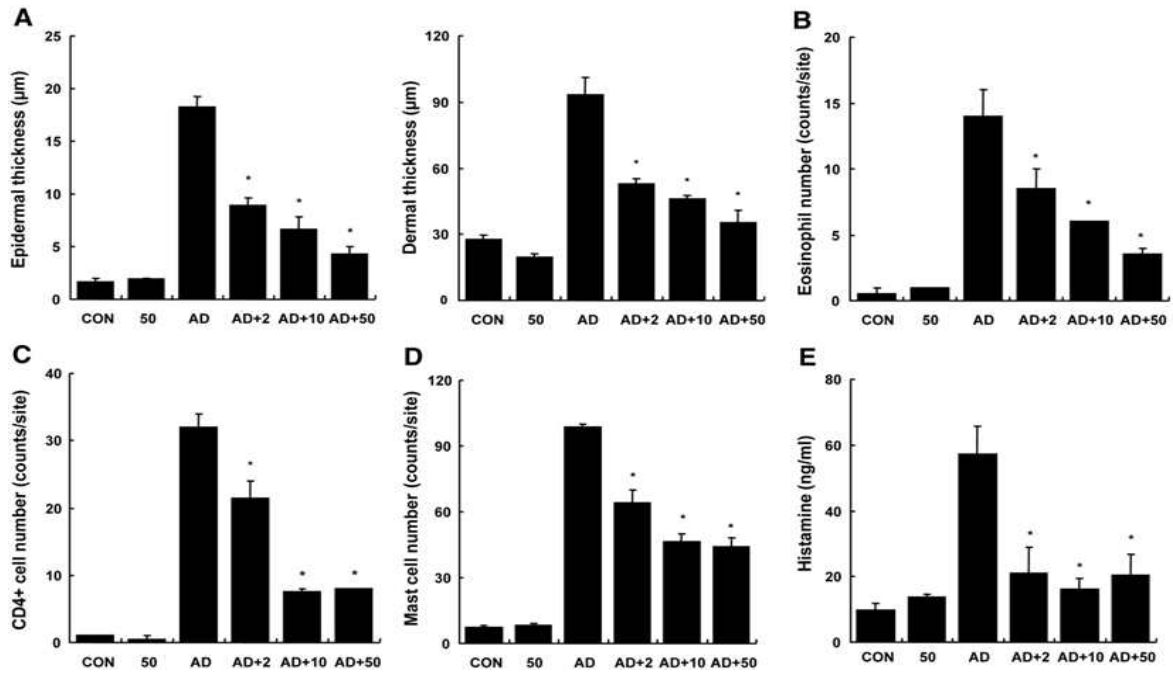
- 본 연구진이 보유한 아토피피부염 동물모델을 대상으로 적소두 추출물(OAA)의 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 적소두 추출물(OAA)는 아토피 증상을 현저히 개선시킴 (귀두께 비후, epidermis/dermis 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리, 염증세포의 침윤 등을 억제).



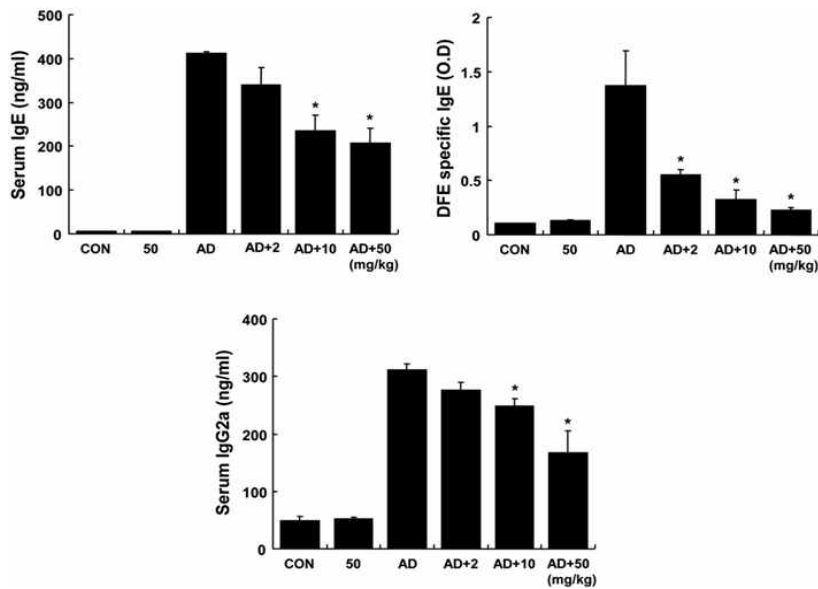
[그림 1] 귀두께 측정 결과



[그림 2] 아토피 mouse 귀조직 병리사진

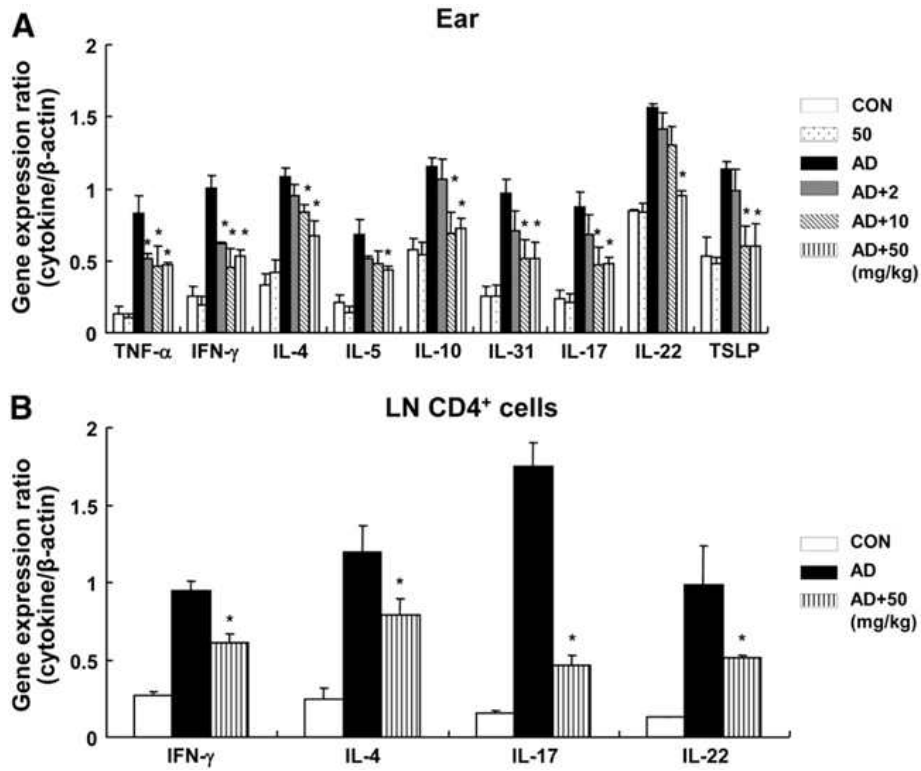


[그림 3] 아토피 mouse 귀조직 병리분석 및 염증세포의 침윤, 히스타민 유리 결과

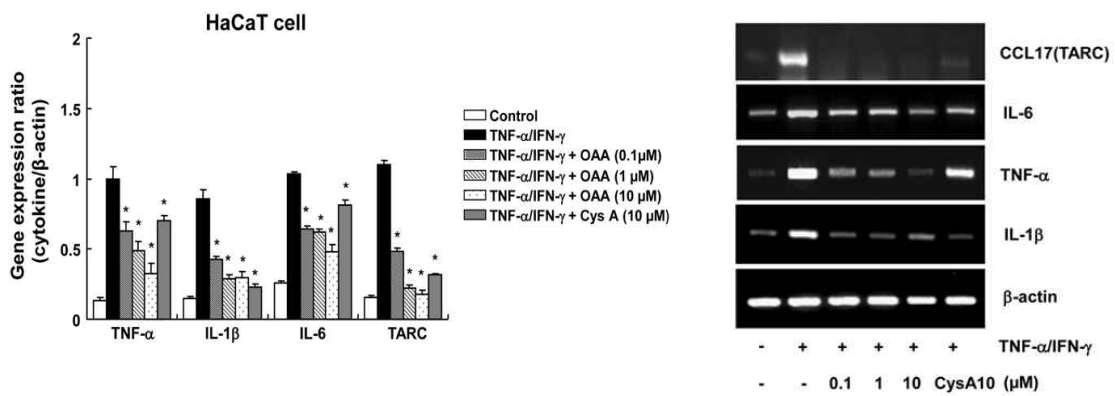


[그림 4] Serum 내 IgE, IgG2a level 측정 결과

- 아토피피부염은 Th1/Th2/Th17 반응이 모두 일어나는 복잡한 형태의 질환으로, 3가지 면역반응의 전체적인 조절이 필요함. OAA는 림프노드 Th1/Th2/Th17 세포 모두를 효과적으로 억제하는 매우 강력한 천연물 소재임. 아토피피부염의 대표적인 원인세포인 keratinocyte 모델을 대상으로 OAA의 아토피피부염 억제 기전을 연구함. OAA는 MAPK/NF-κB 신호경로를 통해 대표적인 염증유발물질인 pro-inflammatory cytokine/chemokine의 발현을 억제함.

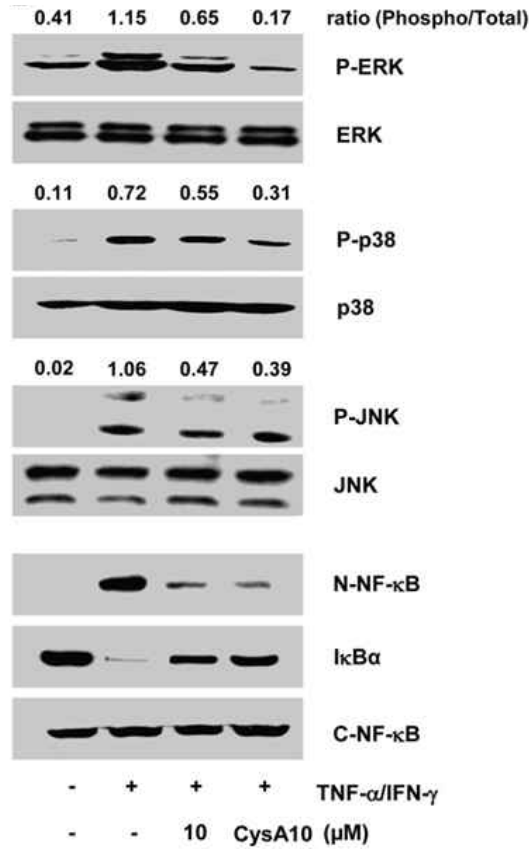


[그림 5] 아토피 mouse 귀조직 pro-inflammatory cytokine/chemokine 및 림프노드 Th1/Th2/Th17/Th22 세포 확인 결과



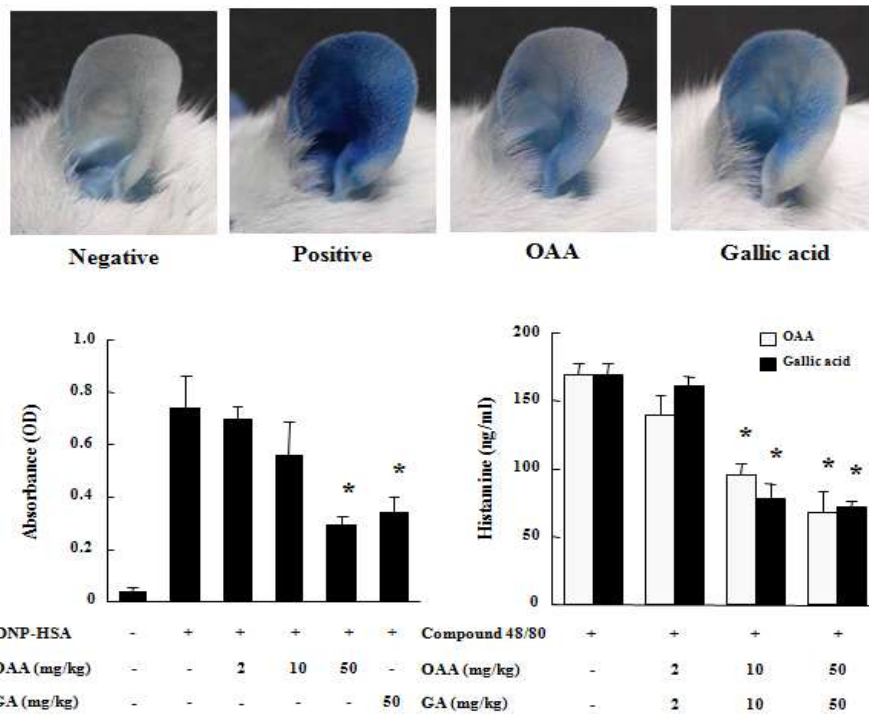
[그림 6] Keratinocyte에서의 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과





[그림 7] Keratinocyte에서의 protein level 확인 결과

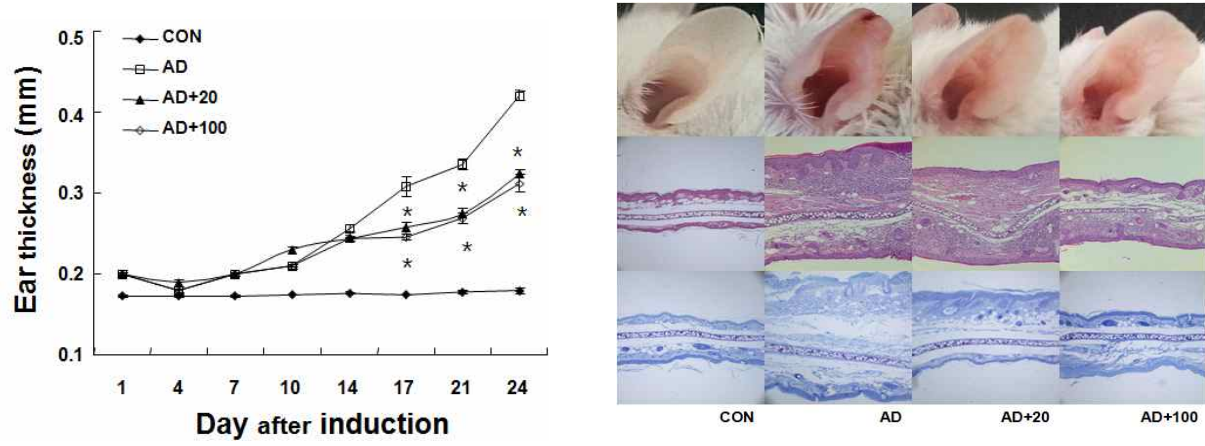
- 본 연구진이 보유한 피부알레르기 동물모델을 대상으로 적소두 추출물(OAA)의 효능을 평가함. 적소두 추출물(OAA)는 피부알레르기 증상을 현저히 개선시킴.



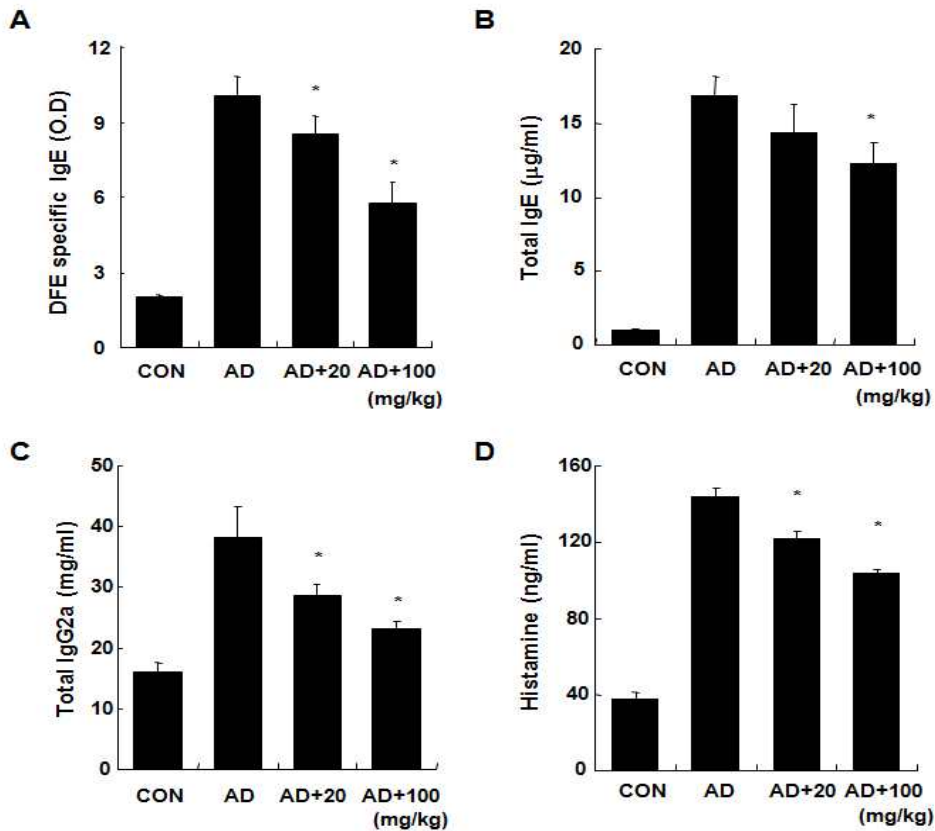
[그림 8] 피부 알레르기 mouse 귀 사진 및 histamine 유리 측정 결과

(2) 곰보배추 추출물의 아토피 억제 효능

- 본 연구진이 보유한 아토피피부염 동물모델을 대상으로 곰보배추 추출물의 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 곰보배추 추출물은 아토피 증상을 현저히 개선시킴 (귀두께 비후, epidermis/dermis 비후, 항원특이적 IgE, IgG2a 유리, 히스타민 유리, 염증세포의 침윤 등을 억제)



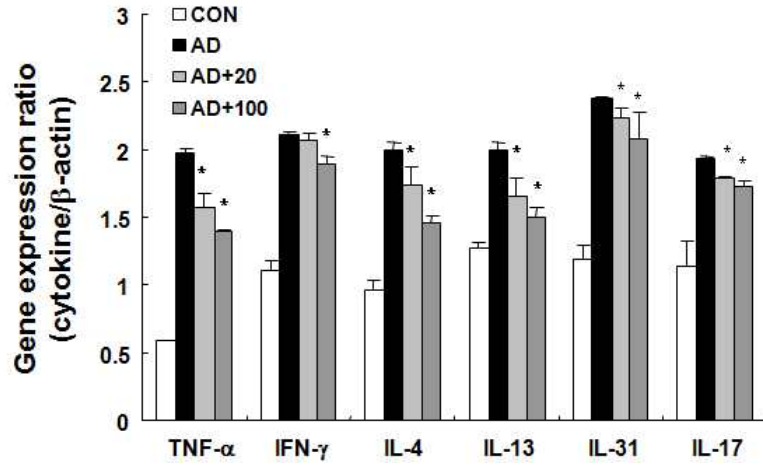
[그림 9] 아토피 mouse 귀두께 측정 및 귀조직 병리사진



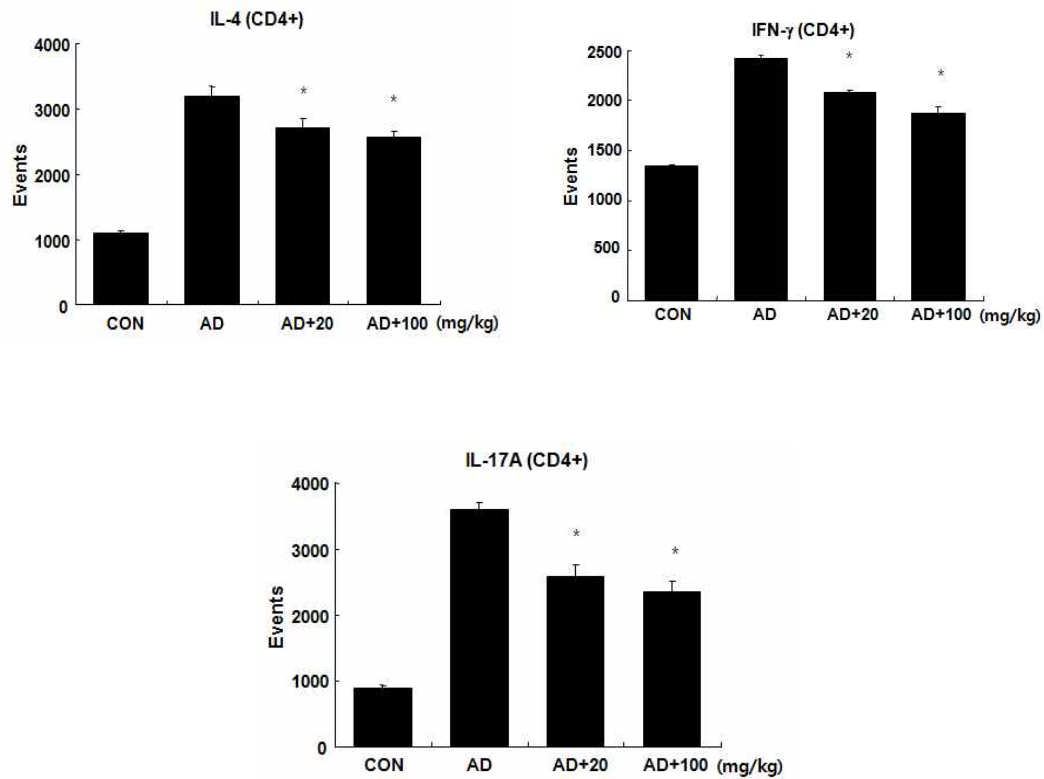
[그림 10] 아토피 mouse serum IgE, IgG2a 유리 및 히스타민 유리 결과

- 아토피피부염은 Th1/Th2/Th17 반응이 모두 일어나는 복잡한 형태의 질환으로, 3가지 면역반응의 전체적인 조절이 필요함. OAA는 림프노드 Th1/Th2/Th17 세포 모두를 효과적으로 억제하

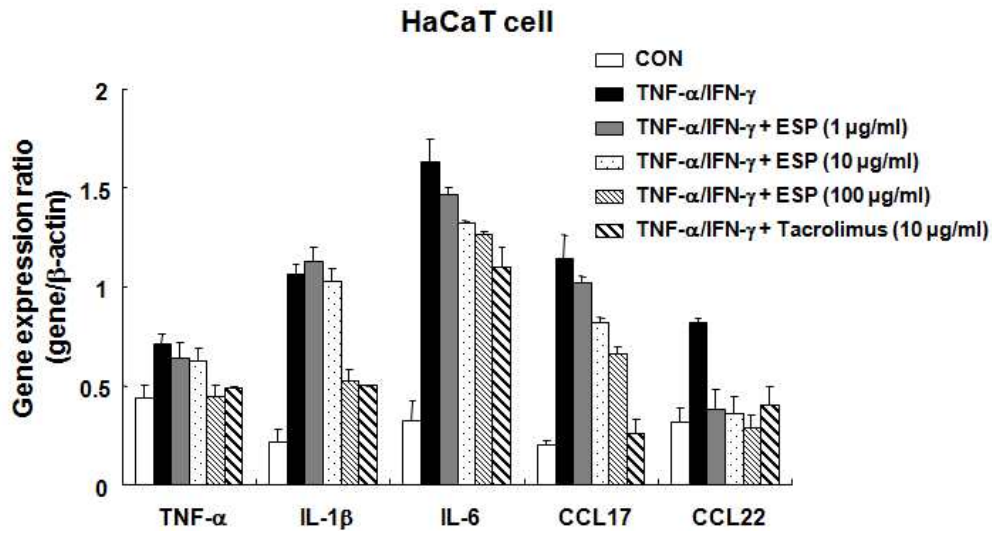
는 매우 강력한 천연물 소재임. 아토피피부염의 대표적인 원인세포인 keratinocyte 모델을 대상으로 OAA의 아토피피부염 억제 기전을 연구함. OAA는 MAPK/NF- $\kappa$ B/STAT1 신호경로를 통해 대표적인 염증유발물질인 pro-inflammatory cytokine/chemokine의 발현을 억제함.



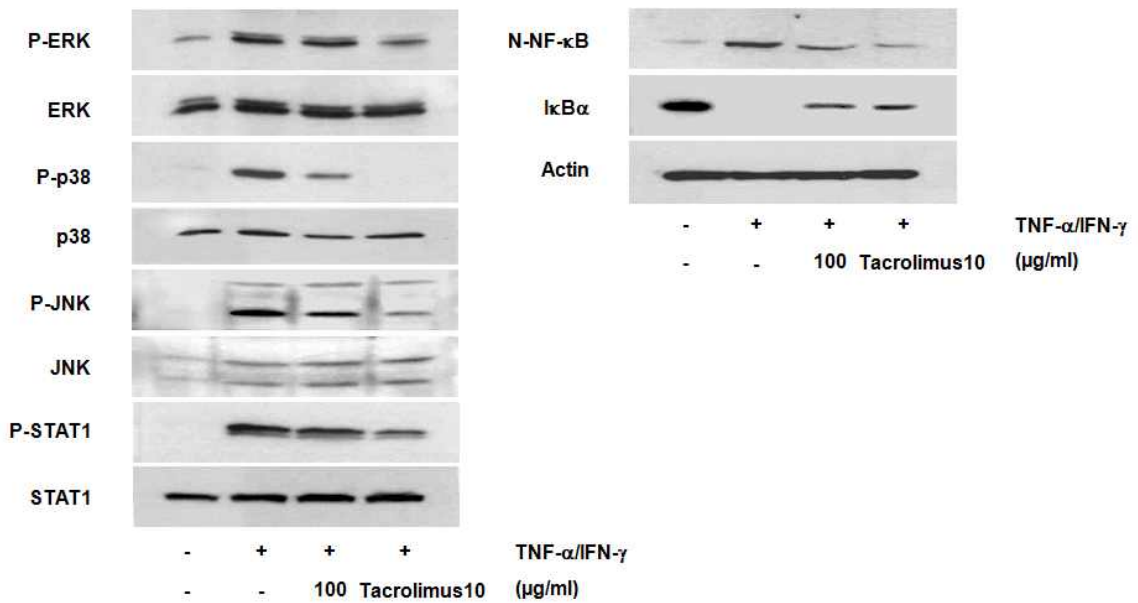
[그림 11] 아토피 mouse 귀조직 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과



[그림 12] 아토피 mouse 림프노드 Th1/Th2/Th17/Th22 세포 확인 결과



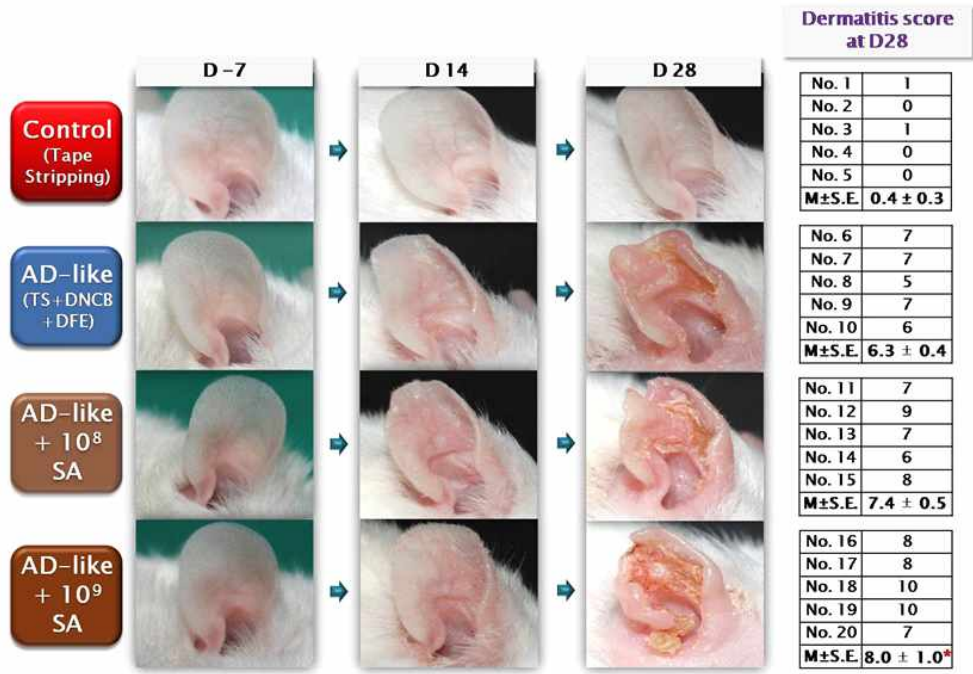
[그림 13] Keratinocyte에서의 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과



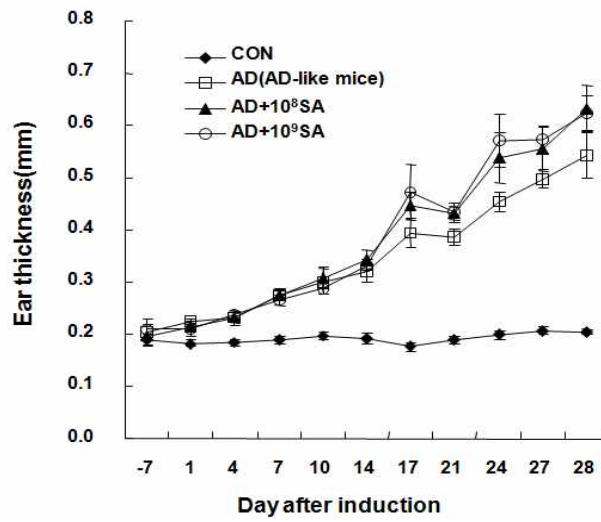
[그림 14] Keratinocyte에서의 protein level 확인 결과

### (3) S.aureus 도포에 의한 아토피 악화 증상 억제 효능 평가

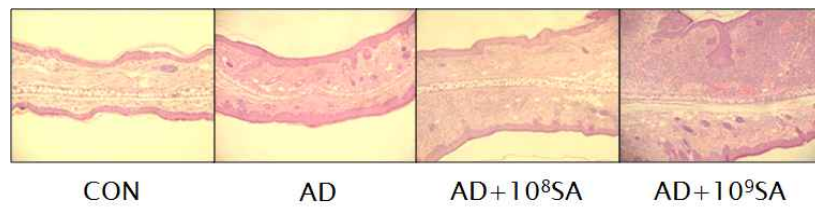
- 본 연구진이 보유한 아토피 피부염 동물모델을 대상으로 Staphylococcal enterotoxin A에 의해 아토피가 악화 된다는 것을 증명하였음. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 S. aureus는 아토피 증상을 악화시킴. (귀두께 비후, epidermis/dermis 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리, 염증세포의 침윤 등을 증가)



[그림 15] 아토피 mouse 귀 사진



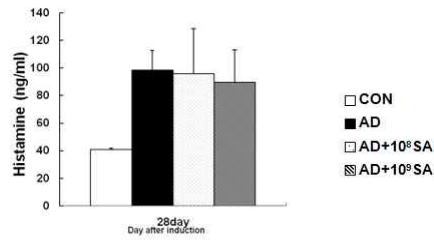
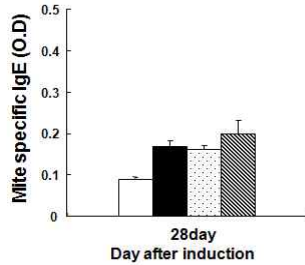
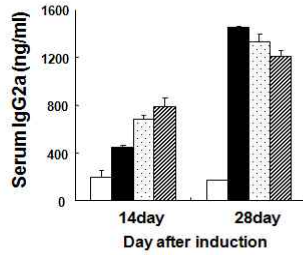
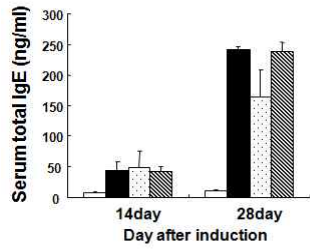
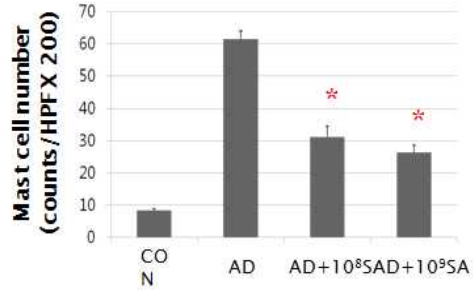
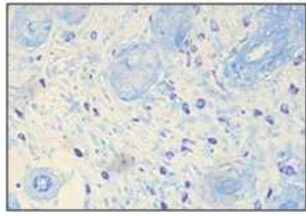
[그림 16] 귀두께 측정 결과



[그림 17] 아토피 mouse 병리분석 결과

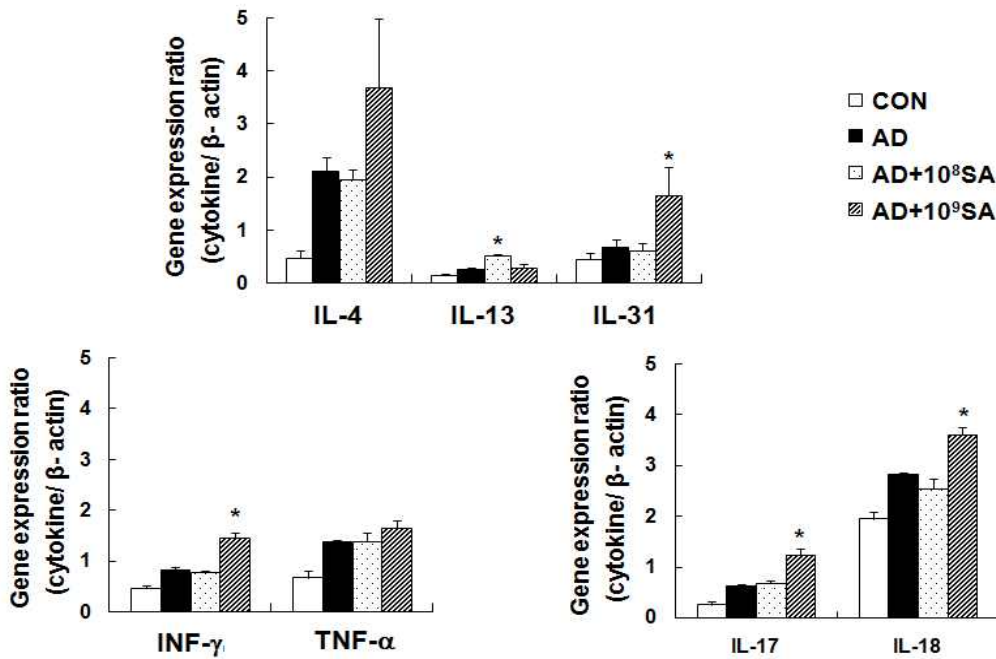


**Mast cell count (toluidine blue)**



[그림 18] 아토피 mouse serum IgE, IgG2a 유리 및 히스타민 유리 결과

- 아토피는 Th1/Th2/Th17 반응이 모두 일어나는 복잡한 형태의 질환으로, 3가지 면역반응의 전체적인 조절이 필요함. S. aureus는 아토피피부염의 대표적인 염증유발물질인 pro-inflammatory cytokine의 발현을 증가시킴.

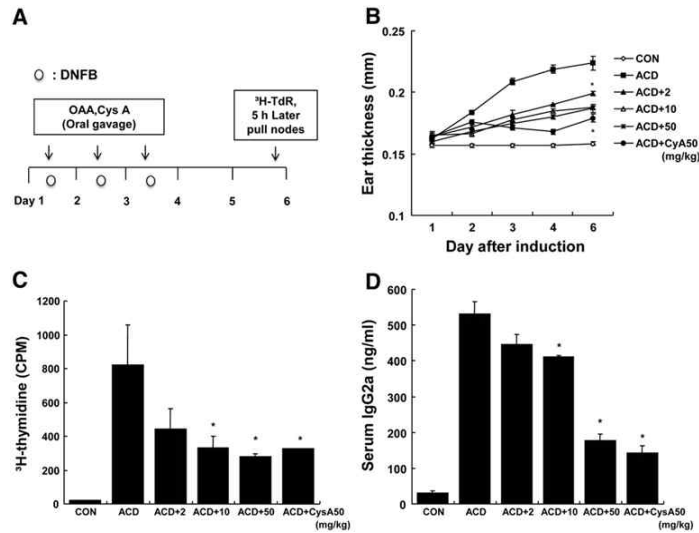


[그림 19] 아토피 mouse 귀조직 pro-inflammatory cytokine 확인 결과

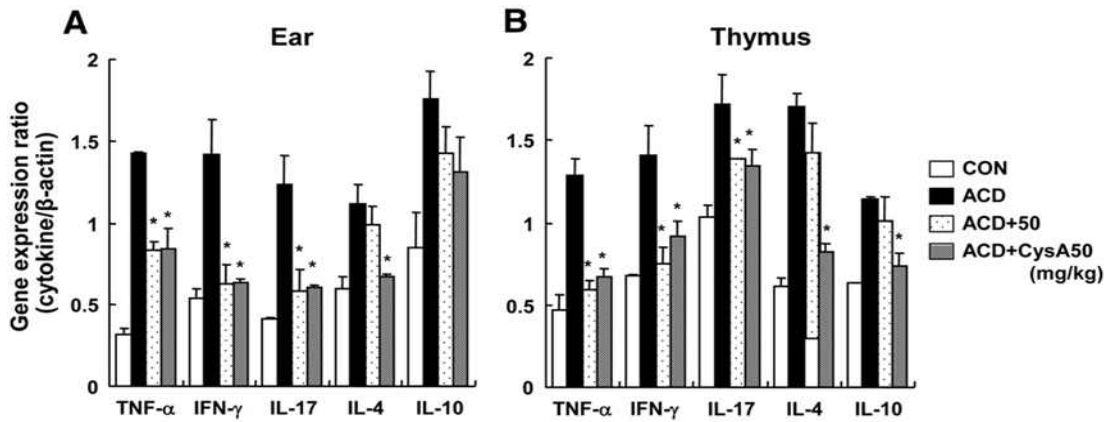
### 3. 소재의 면역안정성 연구

#### (1) 피부감작성 시험

- 본 연구진이 보유한 local lymph node assay 동물모델을 대상으로 적소두 추출물(OAA)의 효능을 평가함. 적소두 추출물(OAA)는 증상을 현저히 개선시킴.



[그림 20] Local lymph node assay 동물모델 에서의 OAA 효과 확인 결과



[그림 21] Local lymph node assay 동물모델에서의 귀조직 및 thymus의 pro-inflammatory cytokine 측정 결과

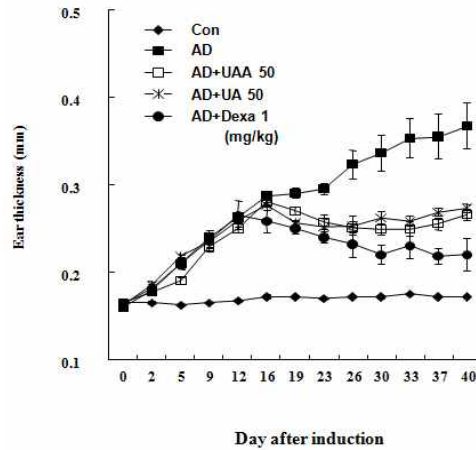
#### (2) 면역안전성 평가

- 생강나무 추출물의 생체안전성을 평가하기 위해 closed colony인 6주령 ICR 마우스(암/수, 군당 10마리)에 3가지의 농도를 정맥주사로 투여함. 일반독성 평가는 미국 National Toxicology Program 표준 프로토콜에 준하여 단회투여 후 2주간 매일 체중, 사료와 물 섭취량을 측정하고 일반증상을 관찰함. 2주 후 동물을 치사시킨 후 간, 신장, 흉선, 비장, 림프노드, 심장, 폐, 뇌의 장기무게를 측정함. 표적장기 독성을 확인하기 위해 간 및 신장에 대한 독성을 나타내는 지표인 ALT, AST, cholesterol, creatinine, BUN, total bilirubin, 적혈구, 백혈구 수치 등의 다양한 혈액 생화학적 검사를 시행함. 생강나무 추출물은 한계 허용치인 2,000 mg/kg 까지 전혀 독성이 나타나지 않음.

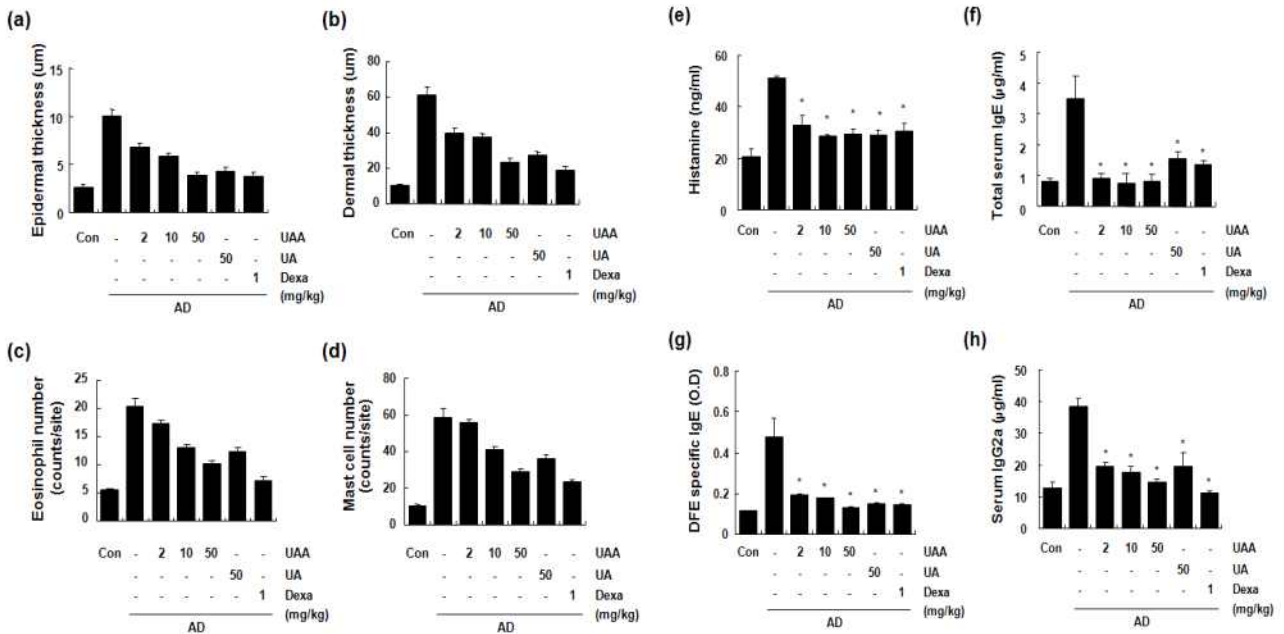
#### 4. 검증된 후보소재의 기전연구

##### (1) UAA, UA 의 아토피 억제 효능 평가

- 본 연구진이 보유한 아토피피부염 동물모델을 대상으로 UAA, UA 의 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 UAA, UA는 아토피 증상을 현저히 개선시킴 (귀두께 비후, epidermis/dermis 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리, 염증세포의 침윤 등을 억제)



[그림 22] 귀두께 측정 결과

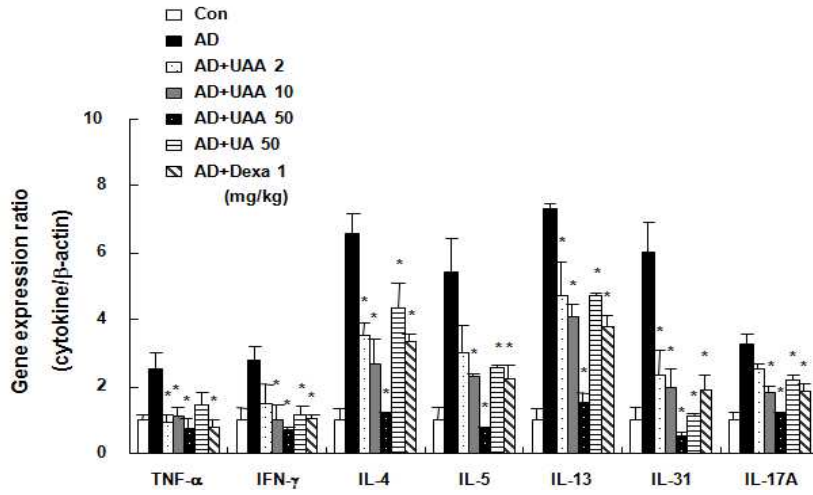


[그림 23] 아토피 mouse 귀조직 병리분석 및 염증세포의 침윤, 히스타민 유리, serum 내 IgE, IgG2a level 측정 결과

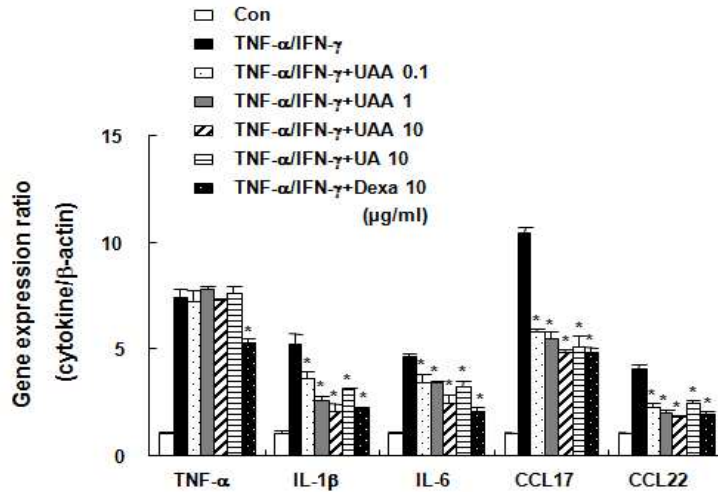
- 아토피피부염은 Th1/Th2/Th17 반응이 모두 일어나는 복잡한 형태의 질환으로, 3가지 면역반응의 전체적인 조절이 필요함. UAA, UA는 림프노드 Th1/Th2/Th17 세포 모두를 효과적으로 억제하는 매우 강력한 소재임. 아토피피부염의 대표적인 원인세포인 keratinocyte 모델을 대상으로 UAA, UA의 아토피피부염 억제 기전을 연구함. UAA, UA는 NF-κB/NFATc1 신호경로



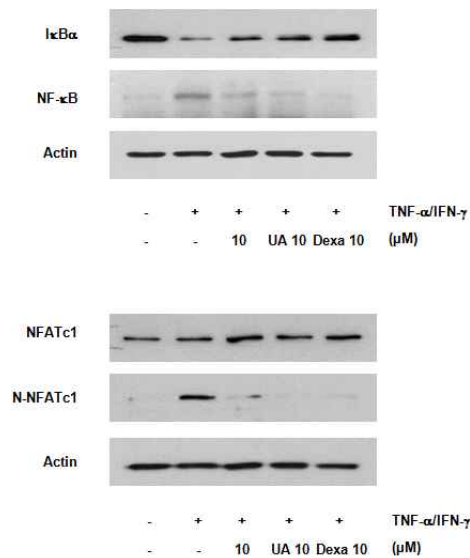
를 통해 대표적인 염증유발물질인 pro-inflammatory cytokine/chemokine의 발현을 억제함.



[그림 24] 아토피 mouse 귀조직 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과



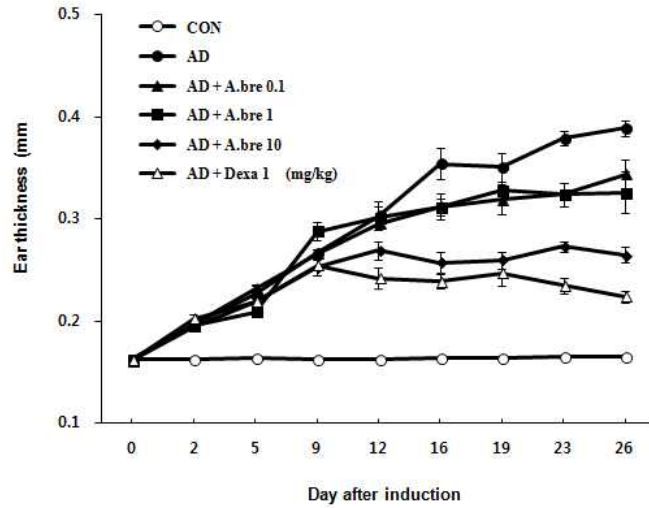
[그림 25] Keratinocyte에서의 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과



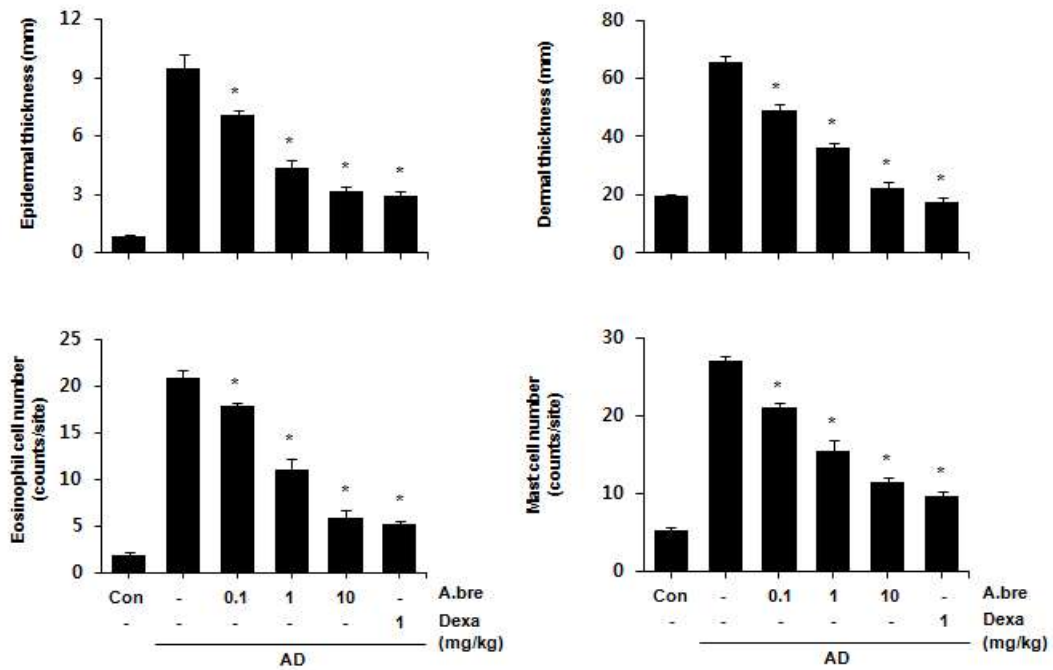
[그림 26] Keratinocyte에서의 protein level 확인 결과

(2) 개머루덩굴(A.bre) 의 아토피 억제 효능 평가

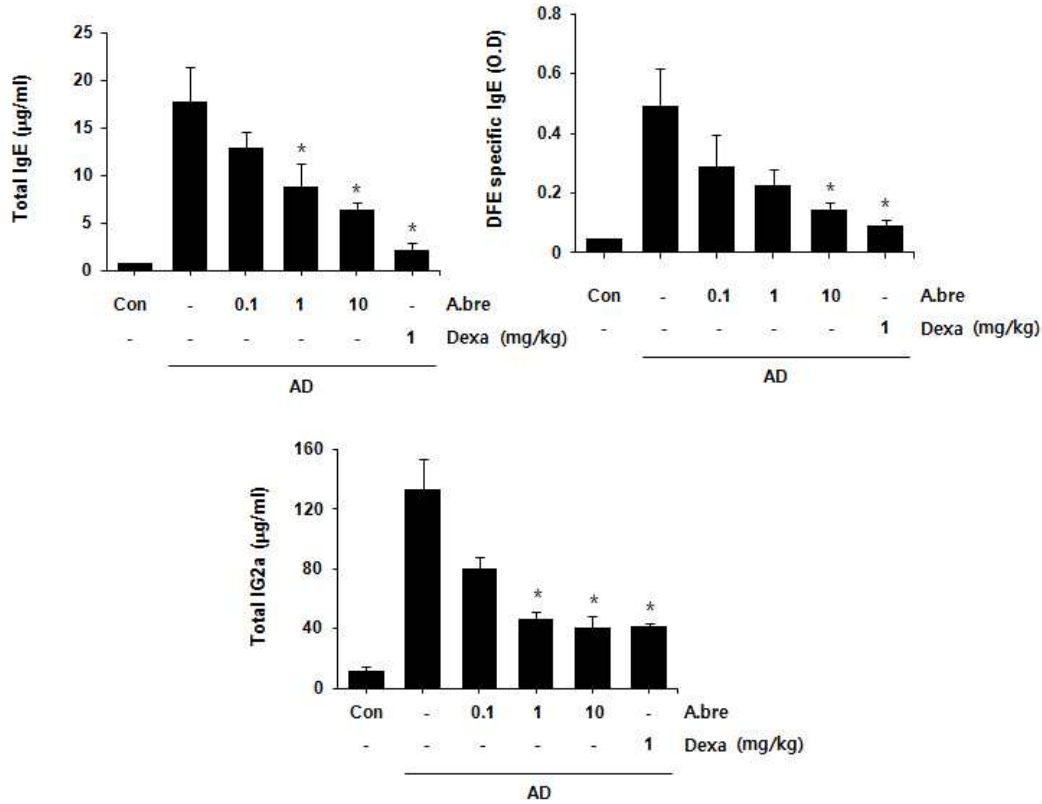
- 본 연구진이 보유한 아토피피부염 동물모델을 대상으로 개머루덩굴(A.bre) 의 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 개머루덩굴(A.bre) 은 아토피 증상을 현저히 개선시킴 (귀두께 비후, epidermis/dermis 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리, 염증세포의 침윤 등을 억제함).



[그림 27] 귀두께 측정 결과

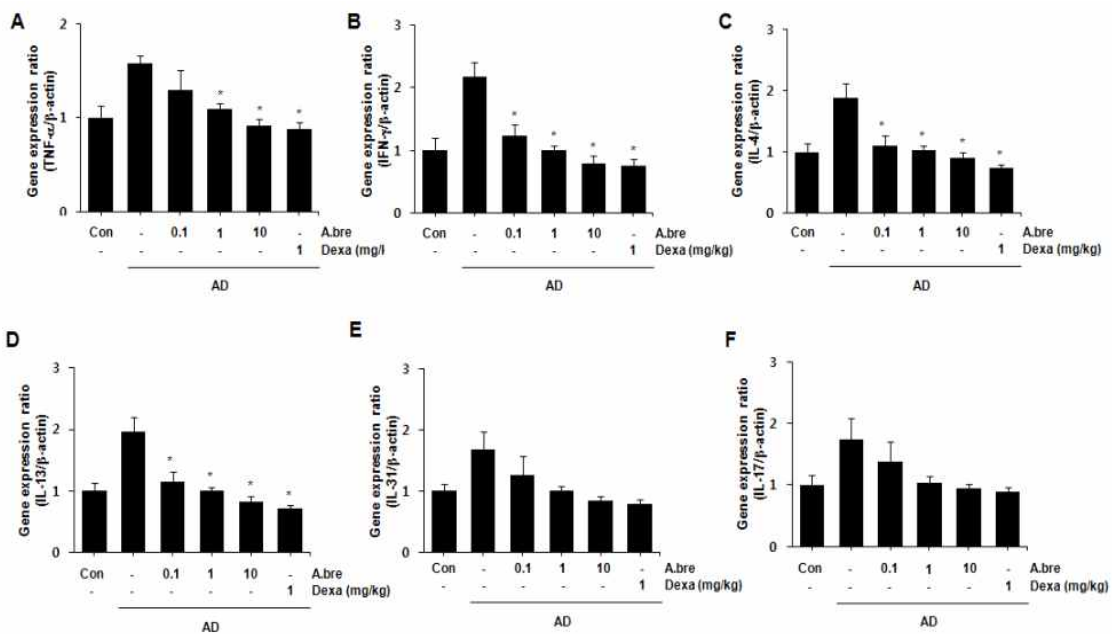


[그림 28] 아토피 mouse 귀조직 병리분석 및 염증세포의 침윤 확인 결과

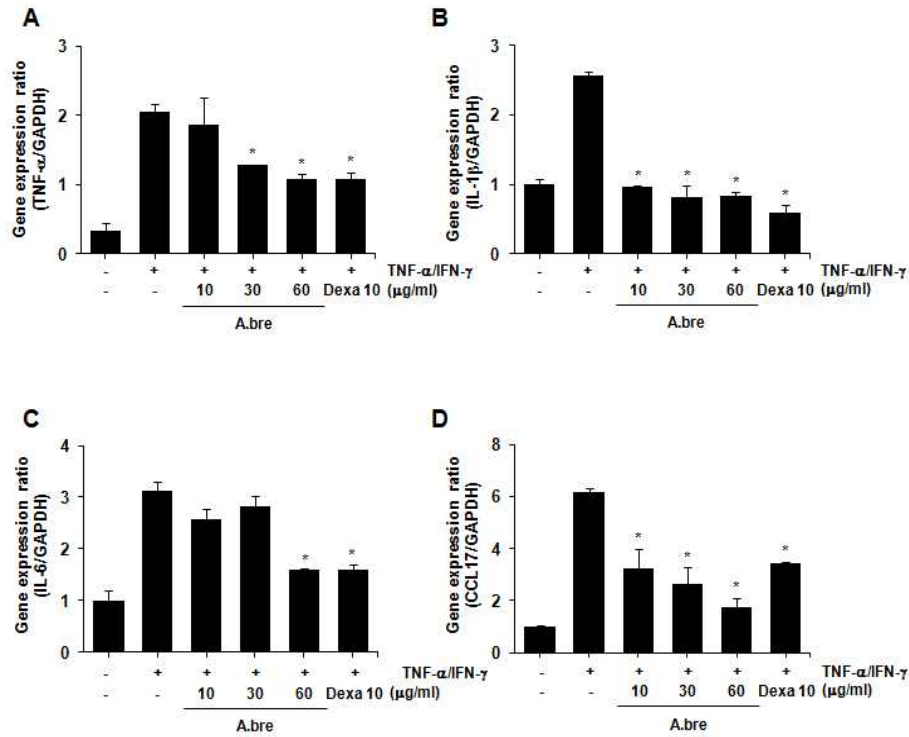


[그림 29] Serum 내 IgE, IgG2a level 측정 결과

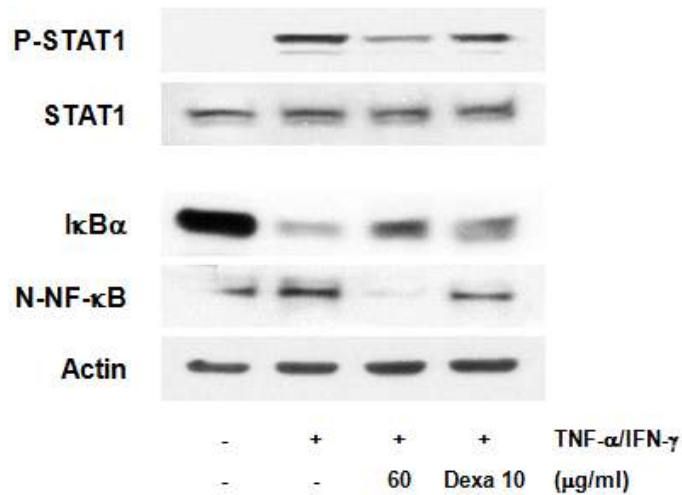
- 아토피피부염은 Th1/Th2/Th17 반응이 모두 일어나는 복잡한 형태의 질환으로, 3가지 면역반응의 전체적인 조절이 필요함. 아토피피부염의 대표적인 원인세포인 keratinocyte 모델을 대상으로 개머루덩굴(A.bre)의 아토피피부염 억제 기전을 연구함. 개머루덩굴(A.bre)은 NF- $\kappa$ B/STAT1 신호경로를 통해 대표적인 염증유발물질인 pro-inflammatory cytokine/chemokine의 발현을 억제함.



[그림 30] 아토피 mouse 귀조직 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과



[그림 31] Keratinocyte에서의 pro-inflammatory cytokine/chemokine 확인 결과

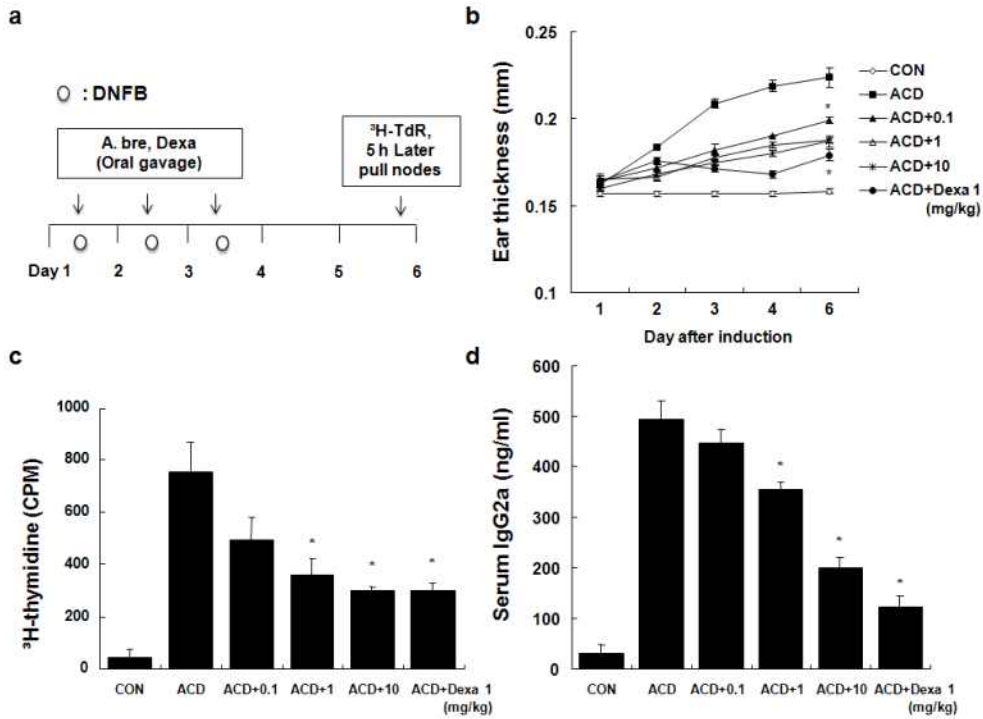


[그림 32] Keratinocyte에서의 protein level 확인 결과

## 5. 소재의 면역안정성 연구

### (1) 피부감작성 시험

- 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 귀 부위에 DNFB 를 각 25 μl씩 양쪽 귀 뒷부분에 3일동안 도포 하여 피부염을 유발하였음. DNFB 도포를 2일간의 도포 중지기간을 가진 후, <sup>3</sup>H-TdR 20 μCi (in 250 μl PBS) /mouse i.v injection함. 이 모델은 동물 귀의 비후, IgG2a, Th2 사이토카인의 활성화 등을 측정하여 피부감작성(접촉피부염)에 효과 있는 약물을 발굴하는데 적합한 모델임. 본 연구진이 보유한 local lymph node assay 동물모델을 대상으로 개머루 덩굴의 효능을 평가함. 개머루 덩굴은 증상을 현저히 개선시킴.



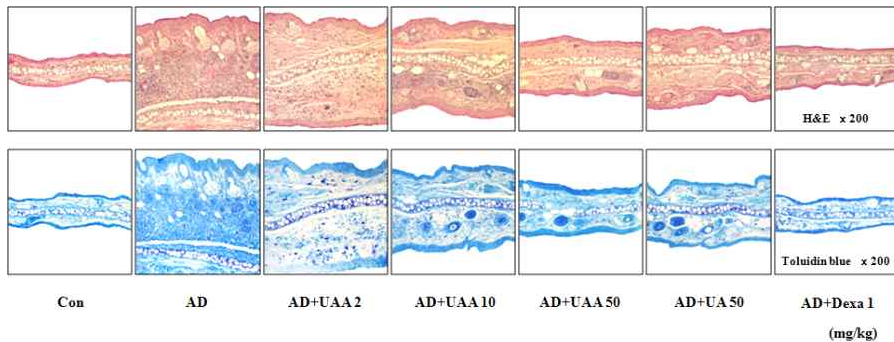
[그림 33] Local lymph node assay 동물모델 에서의 개머루 덩굴 효과 확인 결과

## (2) 면역안전성 평가

- 개머루덩굴의 면역안전성을 평가하기 위해 closed colony인 6주령 ICR 마우스(암/수, 군당 10 마리)에 3가지의 농도를 정맥주사로 투여함. 일반독성 평가는 미국 National Toxicology Program 표준 프로토콜에 준하여 단회투여 후 2주간 매일 체중, 사료와 물 섭취량을 측정하고 일반증상을 관찰함. 2주 후 동물을 치사시킨 후 간, 신장, 흉선, 비장, 림프노드, 심장, 폐, 뇌의 장기무게를 측정함. 표적장기 독성을 확인하기 위해 간 및 신장에 대한 독성을 나타내는 지표인 ALT, AST, cholesterol, creatinine, BUN, total bilirubin, 적혈구, 백혈구 수치 등의 다양한 혈액 생화학적 검사를 시행함. 생강나무 추출물은 한계 허용치인 2,000 mg/kg 까지 전혀 독성이 나타나지 않음.

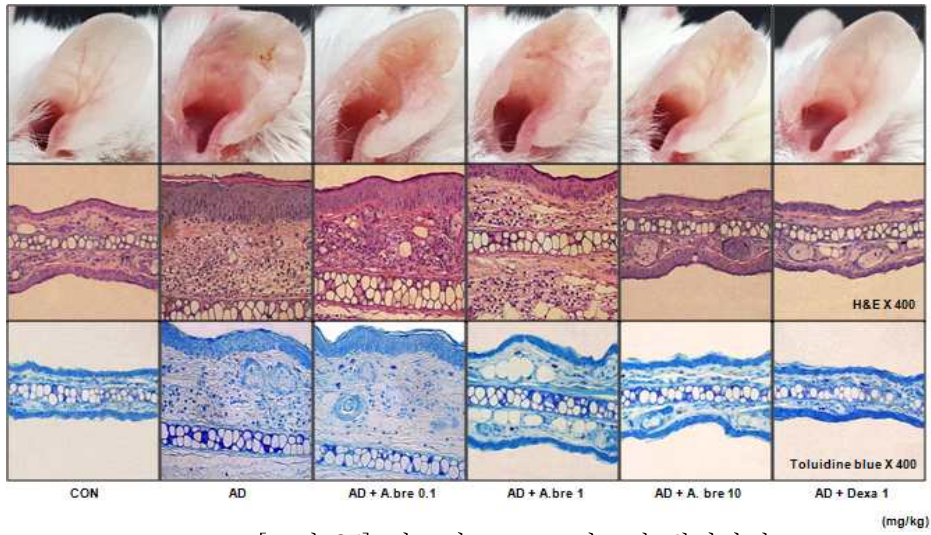
## 6. 피부 장벽강화 효과 연구

### (1) UAA, UA 의 아토피 피부염 피부 장벽강화 효과 검증



[그림 34] 아토피 mouse 귀조직 병리사진

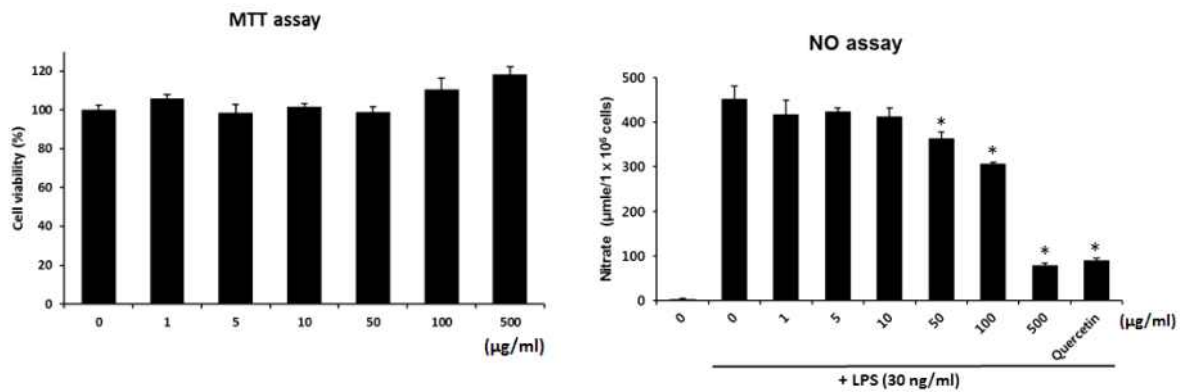
(2) 개머루덩굴의 아토피피부염 피부 장벽강화 효과 검증



[그림 35] 아토피 mouse 귀조직 병리사진

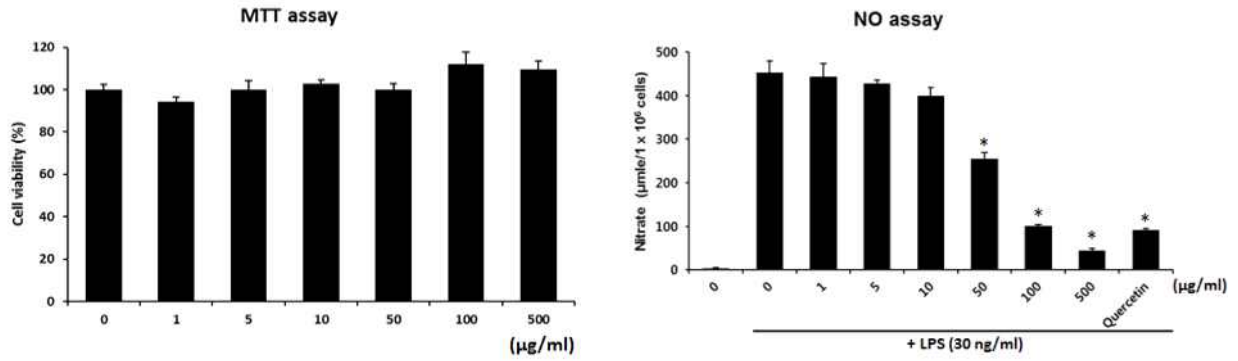
7. 피부 아토피 염증개선에 대한 효과 연구

- 염증 부위의 활성화된 대식세포는 prostaglandin (PG)과 nitric oxide (NO) 등을 대량으로 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 함. 또한, NO는 다양한 생리 및 병리학적 활성을 나타내어 조직 내의 염증반응에 일정한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 따라서 대식세포를 이용하여 항염증 효과를 알아보기 위해 후보소재인 적소두 추출물과 곰보배추 추출물이 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 저해하는지 확인하였음. 적소두 추출물과 곰보배추 추출물은 세포독성이 나타나지 않은 농도에서 모두 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 저해하였고, 특히 곰보배추 추출물의 경우 적소두 추출물보다 더 우수한 효과를 나타내었음.



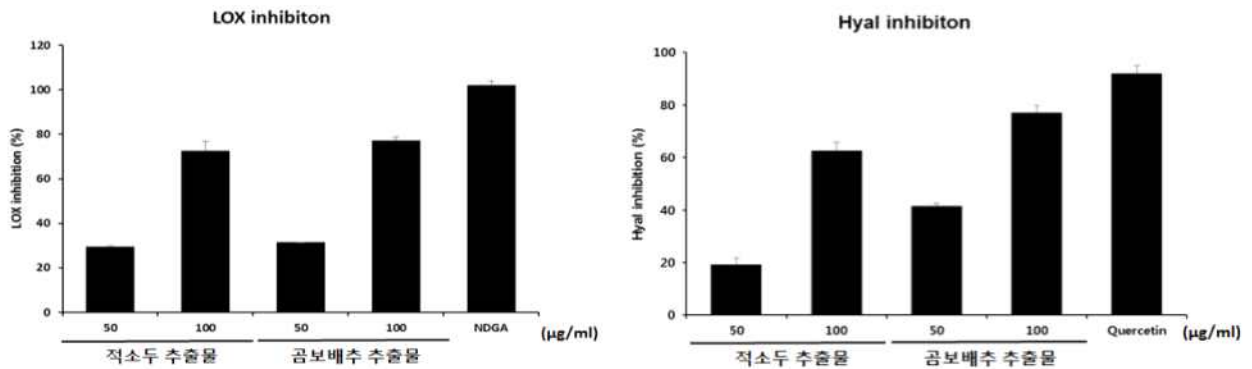
[그림 36] 적소두 추출물의 세포 독성 및세포내 NO 측정 결과





[그림 37] 곰보배추 추출물의 세포 독성 및 세포내 NO 측정 결과

- Lipoxygenase (LOX)는 arachidonic acid를 기질로 하여 류코트리엔류를 생성하는데, 류코트리엔이 과도하게 생성될 경우 아토피, 알레르기성 비염, 천식과 같은 다양한 염증 및 알레르기 질환의 원인이 됨. 또한 염증 매개 효소인 Hyaluronidase (Hyal)는 피부 보습 및 탄력 유지에 기여하는 hyaluronic acid의 분해효소로 피부면역 저해인자로도 알려져 있음. 따라서 후보소재가 lipoxygenase와 hyaluronidase의 활성을 저해한다면 염증개선 효과를 기대할 수 있음. 아토피 관련 세포인 keratinocyte를 이용하여 적소두 추출물과 곰보배추 추출물의 lipoxygenase 및 hyaluronidase 효소 활성 저해율을 측정해 본 결과, LOX의 경우 적소두 추출물과 곰보배추 추출물의 효과가 비슷하나 Hyal의 경우에는 곰보배추 추출물이 더 우수한 효과를 나타냄.

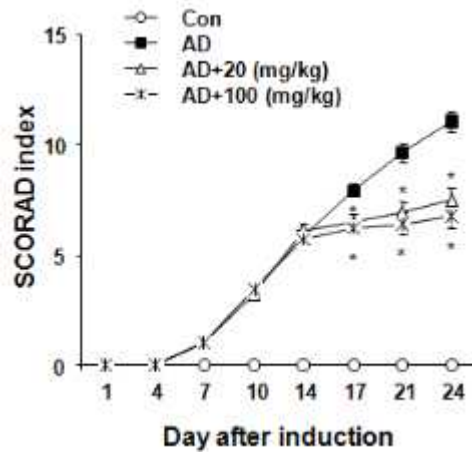


[그림 38] Lipoxygenase 와 Hyaluronidase 효소 활성 저해율 측정 결과

### 8. 아토피 개선효과 평가 (SCORAD Index)

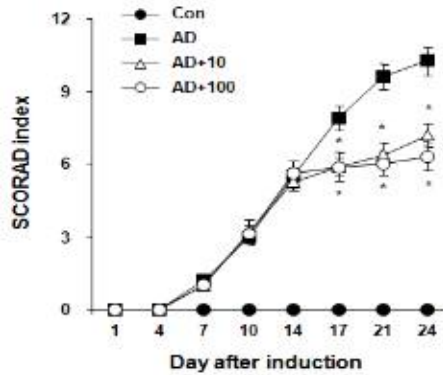
- 아토피피부염의 중증도에 대한 평가에서 가장 많이 사용되는 SCORAD index를 사용하여 병변의 범위, 병변의 심한 정도, 소양증을 평가하였음.

(1) 적소두 추출물 (KR 300)의 아토피 피부염 증증도에 대한 평가



[그림 39] 적소두 추출물 (KR 300)의 아토피 피부염 증증도에 대한 평가

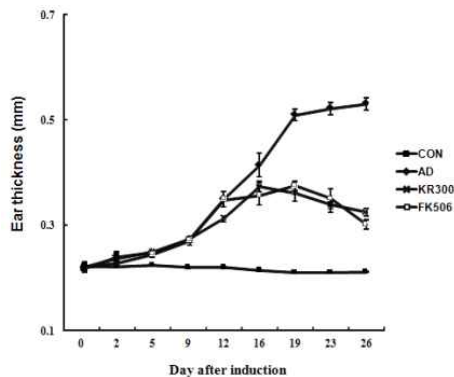
(2) 곰보배추 추출물 (KR 500)의 아토피 피부염 증증도에 대한 평가



[그림 40] 곰보배추 추출물 (KR 500)의 아토피 피부염 증증도에 대한 평가

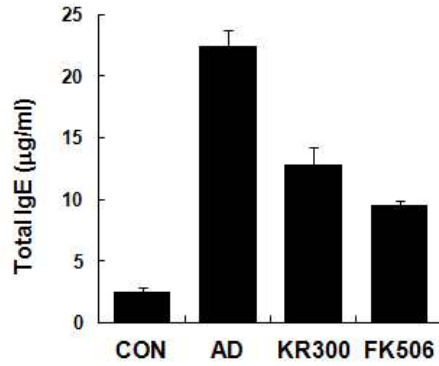
9. 검증된 소재 (적소두 추출물) 의 *in vivo* 효능 평가 (topical 처리)

- 본 연구진이 보유한 아토피피부염 동물모델을 대상으로 적소두 추출물 (KR 300) 의 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 KR 300 은 아토피 증상을 현저히 개선시킴 (귀두께 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리 등을 억제)

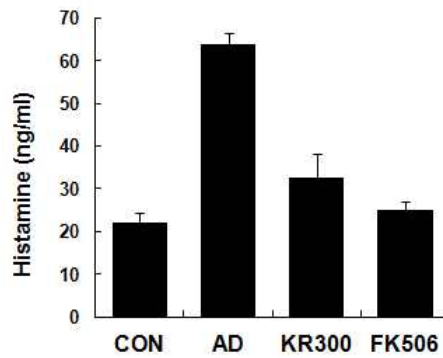


[그림 41] 귀두께 측정 결과





[그림 42] Serum 내 IgE level 측정 결과



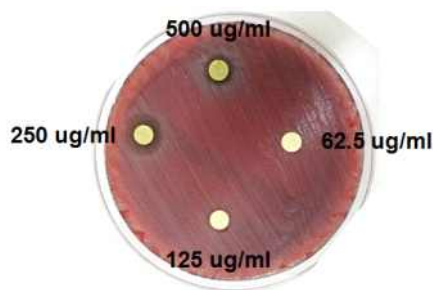
[그림 43] 아토피 mouse 히스타민 유리 확인 결과

#### 10. 선정소재에 대한 항균력 시험

- 미국 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S25, 2015에서 인용된 국제적으로 표준화된 방법으로, Broth dilution법을 이용함. MHB (Mueller-Hinton broth)에 적소두 추출물과 곰보배추 추출물을 2-fold dilution하여 각각 제조한 후, *S. aureus*을 0.5 McFarland 접종; 섭씨 35도에서 16-20시간 배양하고 세균의 생장이 억제 되는지를 확인함. 적소두 추출물과 곰보배추 추출물 모두 세균의 성장 억제효과는 없다는 것을 확인함. 따라서 적소두 추출물과 곰보배추 추출물은 항균능력이 아닌 염증개선을 통하여 아토피피부염 증상을 개선시킨다는 것을 알 수 있음.

##### (1) 적소두 추출물 (KR 300)의 항균력 시험

- 항균제 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)방법으로 적소두 추출물 (KR 300)에 대한 항균력 시험을 진행함.



[그림 44] 적소두 추출물 (KR 300)의 항균력 시험

## (2) 곰보배추 추출물 (KR 500)의 항균력 시험

- 항균제 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)방법으로 곰보배추 추출물 (KR 500)에 대한 항균력 시험을 진행함.



[그림 45] 곰보배추 추출물 (KR 500)의 항균력 시험

## 11. Omics와 systems biology를 이용한 후보물질의 작용기전 검증

- 도출된 후보소재의 기전을 omics 기법으로 분석: 곰보배추 추출물(KR 500)의 아토피 억제 기전 및 신호경로를 분석하기 위해 Label free quantification을 위한 nanoUPLC-QTOF MS analysis 후, Ingenuity pathway analysis 소프트웨어를 이용하여 네트워크 분석을 수행한 결과, KR 500에 의해 변화하는 4개의 단백질 FASN, CS, YWHAЕ, ACLY를 찾아내었고, FASN과 CS는 up-regulated 단백질, YWHAЕ와 ACLY는 down-regulated 단백질을 밝혀냄.

### (1) KR 500의 오믹스 프로파일 확보

- Label free quantification을 위한 nanoUPLC-QTOF MS analysis: keratinocyte에서 대조군과 실험군으로부터 얻어진 단백질의 변화를 알아보기 위하여 tryptic peptide와 100 fmol의 standard peptide를 혼합하여 autosampler를 이용하여 이동상 A(0.1% formic acid / Water)로 column에 loading 하고 nano-UPLC를 이용하여 300 nl/min의 속도로 분리함. Particle size 1.7  $\mu\text{m}$ , pore size 130Å column size 75 $\mu\text{m}$  × 250mm, C18 column에 loading된 시료는 최대 10,000 psi의 압력으로 이동상 B(0.1% formic acid / acetonitrile)의 농도를 점점 높여주면서 분리함.
- nano column으로부터 나오는 시료는 nano-electrospray용 Tip을 이용하여 직접 질량분석기로 분사됨. 3.5kV의 전압에 의해 분사되면서 ion화 된 tryptic peptide는 1차로 quadropole에 의해 MS 분석이 실시되고 각각 collision cell에서 fragmentation되어 time of flight(TOF)에 의해 2차 MS분석이 됨. Mass spectral data는 50-1,990 m/z 범위의 값을 얻음. 각 군으로부터 각각의 sample에서 expression에 차이가 있는 단백체들을 확인하기 위하여 accurate mass 와 재현성 높은 retention time을 기본으로 하여 분석함.
- Proteinlynx global sever program과 Protein expression software program(Waters Co.)을 이용하여 함께 넣어준 standard peptide의 RT값과 AM값들을 기본으로 하여 각각 시료를 lock mass를 이용하여 calibration 하고 단백질을 동정함. 각각의 시료들로부터 얻어진 peptide들이 동일한 RT값과 AM 값을 가지는 것들로 정렬하여 각각의 peptide intensity 비교함. 각 group에서 intensity값이 차이 나는 peptide들을 따로 분류하여 이들 peptide가 어떤 단백질에 속한 peptide들인지를 확인하므로 각 group에서 expression이 증가하는 단백체를 확인할 수 있음.

[표 1] KR 500에 의해 변화하는 단백질 (criteria cut 분석 결과)

Accession	Gene symbol	Description	Score	fenofibrate:con
IPI:IPI00679256.1	LOC100125372 Es22	Liver carboxylesterase 4	587.1	3.70
IPI:IPI00231253.5	Hsd17b10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	416.19	2.63
IPI:IPI00781636.1	Acsn2	Protein	457.37	2.56
IPI:IPI00209690.1	Ephx1	Epoxide hydrolase 1	643.31	1.89
IPI:IPI00324633.2	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	1031.41	1.75
IPI:IPI00475707.2	Ugt1a1;Ugt1a6	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6	267.15	1.52
IPI:IPI00360356.1	Actb2	actin, beta-like 2	381.09	1.47
IPI:IPI00768895.1	LOC682648 LOC690147	similar to Epoxide hydrolase 1	405	1.45
IPI:IPI00471577.1	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	622.92	1.45
IPI:IPI00191913.1	Ndufv1	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	366.22	1.43
IPI:IPI00886470.1	Hsd17b10	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	416.19	1.35
IPI:IPI00365929.1	Pdia6	protein disulfide isomerase-associated 6	438.66	1.33
IPI:IPI00212622.2	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	499.21	1.33
IPI:IPI00558154.1	LOC100125372	60 kDa protein	458.32	1.32
IPI:IPI00205157.1	Hadh	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	698.32	1.28
IPI:IPI00198887.1	P4hb	Protein disulfide-isomerase	916.34	1.28
IPI:IPI00207355.4	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	394.18	1.27
IPI:IPI00326433.11	Hspe1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	227.76	1.27
IPI:IPI00231742.5	Cat	Catalase	574.65	1.22
IPI:IPI00370387.3	RGD1560058	hypothetical protein LOC287559	594.73	1.19
IPI:IPI00188924.4	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	380.13	1.19
IPI:IPI00210920.1	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	909.43	1.19
IPI:IPI00564133.1	Kat3	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3	241.91	1.19
IPI:IPI00197770.1	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	609.05	1.18
IPI:IPI00198325.1	Cyp2d4v1	Cytochrome P450 2D4	499.97	1.16
IPI:IPI00364321.3	Etfb	Electron transfer flavoprotein subunit beta	318.15	1.16
IPI:IPI00194222.1	Cox4i1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	204.56	1.16
IPI:IPI00190557.2	Phb2	Prohibitin-2	477.55	1.15
IPI:IPI00211756.1	Phb	Prohibitin	777.53	1.14
IPI:IPI00876620.1	Aldob	Fructose-bisphosphate aldolase	348.05	1.12
IPI:IPI00778252.1	Aldh2	Protein	587.85	1.12
IPI:IPI00324443.1	Cyp2d1	Cytochrome P450 2D1	462.33	1.11
IPI:IPI00557751.2	Gstm1	18 kDa protein	335.3	1.11
IPI:IPI00195372.1	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	239.06	1.08
IPI:IPI00202584.1	Cyp2d5	Cytochrome P450 2D10	484.45	1.06
IPI:IPI00204365.2	Rpn1	Ribophorin I	384.48	1.04

**(2) KR 500 오믹스 프로파일의 통합분석**

- 질량분석기로 얻어진 Mass값을 Mascot, IDEAL-Q, PANTHER을 이용해 분석하여 평가함. Ingenuity pathway analysis 소프트웨어를 이용하여 네트워크 분석을 수행한 결과, KR 500에 의해 변화하는 4개의 단백질 FASN, CS, YWHAЕ, ACLY를 확인함.

**Help Tips**  
Steps:

- 1. Select list and list type to analyze
- 2. Select Organism
- 3. Select operation

**1.** Enter ids and or select file for batch upload. Else select file or list from workspace for comparing to a reference list.

Enter IDs: [Supported IDs](#)  separate IDs by a space or comma

Upload IDs: [File format](#) 파일 선택 선택된 파일 없음

Please [login](#) to be able to select lists from your workspace.

Select List Type:

- ID List
- Previously exported text search results
- Workspace list
- PANTHER Generic Mapping File

**2. Select organism.**

Homo sapiens ▲

Mus musculus

Rattus norvegicus

Gallus gallus

Danio rerio ▼

**3. Select Analysis.**

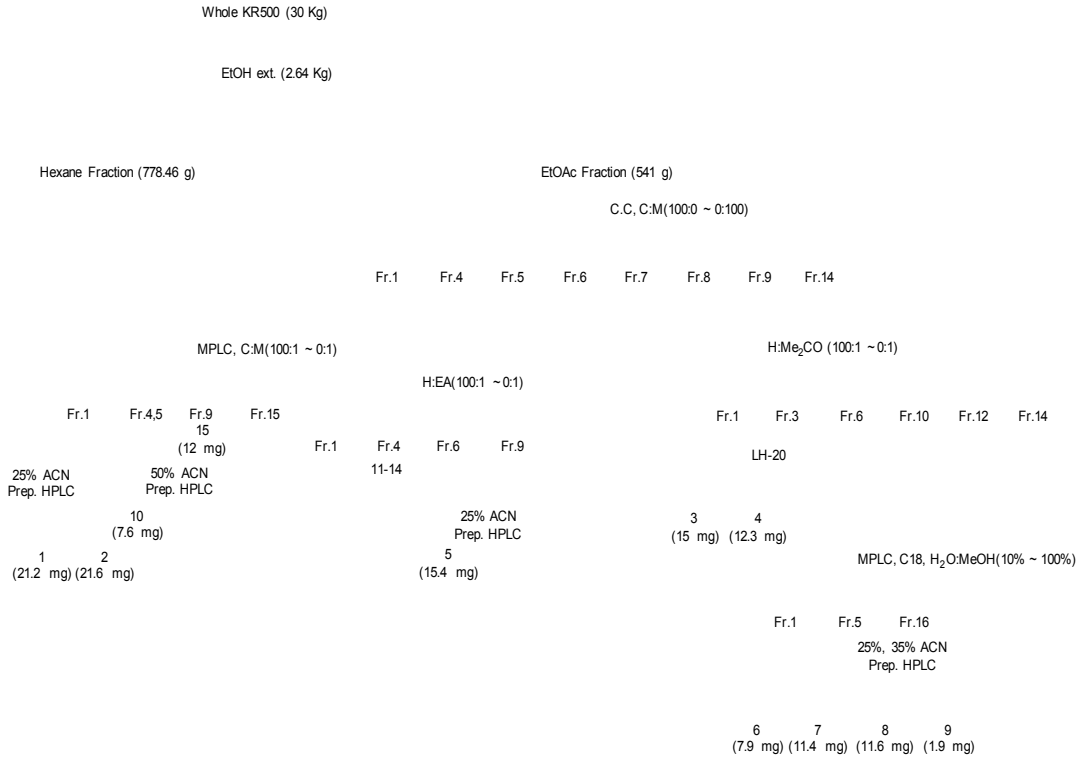
- Functional classification viewed in gene list
- Functional classification viewed in pie chart
- Statistical overrepresentation test
- Statistical enrichment test

[그림 46] PANTHER 시스템

1. 곰보배추 추출물로부터 생리활성 물질의 분리 정제 및 구조 동정

(1) 유효화합물의 분리정제

- 건조된 곰보배추 30 kg을 분쇄하여 에탄올을 추출 용매로 10시간 동안 70℃에서 추출하였음. 여지로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 실온에서 에탄올 용매를 제거한 후 추출된 잔사로서 곰보배추 에탄올 추출물 2.64 kg을 얻었음.
- 곰보배추 에탄올추출물은 물에 희석시킨 후, 헥산 및 에틸아세테이트를 이용하여 순서대로 각각 3회씩 분별 추출한 후, 감압 농축하여 헥산 가용추출물 (778.5 g), 에틸아세테이트 가용추출물 (541 g) 및 물 가용추출물 (1.3 Kg)을 얻었음.
- IL-6/STAT3 저해활성이 가장 강한 에틸아세테이트 가용추출물 541 g을 클로로포름, 메탄올 및 이들의 혼합용매 (100:0 ~ 0:100)를 이동상으로 하여 SiO<sub>2</sub> 컬럼 크로마토그래피(SiO<sub>2</sub> 3000 g, 230~400 mesh)를 수행하여 14개의 분획물(Fr.1~14)로 분리하였으며, 이중 여섯 번째 분획물 (Fr. 6, 9.5 g)을 MPLC(Teledyne Technologies, Inc.)기기를 이용하여 클로로포름 : 메탄올 (100:0 ~ 0:100 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 열다섯 개(-6-1~15)의 분획물로 나누었음. 이중 4,5번째 분획물(1.39 g)은 HPLC(Shimadzu)기기를 이용하여 50% 및 25% 아세토나이트릴 용매를 이동상으로 분당 6 mL 유속으로 하여 역상 컬럼 크로마토그래피(YMC, H-80, 250 mm × 20 mm)를 수행하여 각각 화합물 1(24.5 mg) 그리고 2(21.6 mg)을 분리하였음.
- 에틸 아세테이트 여덟 번째 분획물(Fr.8, 7 g)을 MPLC를 이용하여 헥산 : 에틸아세테이트 : 메탄올(100:0:0 ~ 0:100:0 ~ 0:0:100(v/v)) 혼합용매 조건으로 분리를 수행하여 9개의 분획물 (Fr.-8-1~9)을 분리하였음. 이 중 6번째 분획물(Fr.-8-6, 1.7 g)은 HPLC(Shimadzu)기기를 이용하여, 25% 아세토나이트릴 용매를 이동상으로 분당 3.5 mL 유속으로 하여 역상 컬럼 크로마토그래피(Phenomenex, Kinetex C18, 150 mm × 20 mm)를 수행하여 화합물 5(15.4 mg)을 분리하였음.
- 에틸 아세테이트 아홉 번째 분획물(Fr.9, 79.4 g)을 헥산 : 아세톤(10:1 ~ 0:100 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피[(800 g, 230 ~ 400 메쉬(mesh))를 수행하여 14개의 분획물(Fr. -9-1~14)로 분리하였음. 이중 3번째 분획물(Fr.9-3)을 역상 카트리지 (Agilent Technologies Inc., C18, 1GM)를 이용하여 비극성 물질들을 배제하고 이중 1번째 소분획물(Fr. 9-3-1, 40 mg)을 Shephadex LH-20(GE Healthcare Inc.) 충전물에 메탄올 단일용매를 이동상으로 하여 8개의 소분획물(Fr. 9-3-1-1~8)로 나누어 이중 5번째 소분획물(Fr. 9-3-1-5)을 화합물 3(15 mg), 6 번째 소분획물(Fr. 9-3-1-6)을 화합물 4(12.3 mg)으로 각각 분리하였음.
- 에틸 아세테이트 아홉 번째 분획물 중 여섯 번째 분획물(Fr. 9-6, 1.04 g)을 MPLC기기를 이용하여 물 : 메탄올(100:0 ~ 0:100 (v/v)) 혼합용매를 이동상으로 역상 컬럼 크로마토그래피 (C18, 130 g)를 수행하여 16개의 소분획물(Fr.-9-6-1~16)을 얻었음. 이중 다섯 번째 소분획물 (Fr.-9-6-5, 75.7 mg)을 HPLC(Shimadzu)기기를 이용하여, 25%(0 ~ 110 분), 35%(110 ~ 140 분) 아세토나이트릴 용매를 이동상으로 분당 6 mL 유속으로 하여 역상 컬럼 크로마토그래피 (YMC, H-80, 150 mm × 20 mm)를 수행하여 화합물 6(7.9 mg), 7(11.4 mg), 8(11.6 mg) 그리고 9(2.2 mg)를 분리하였음.
- silica gel, RP18, sephadex-LH20, Diaion HP-20, preparative HPLC 등의 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 6종의 화합물(10-15)의 분리정제 하였음.



[그림 1] 곰보배추로부터 유효화합물들의 분리정제 과정

(2) 유효화합물의 구조동정

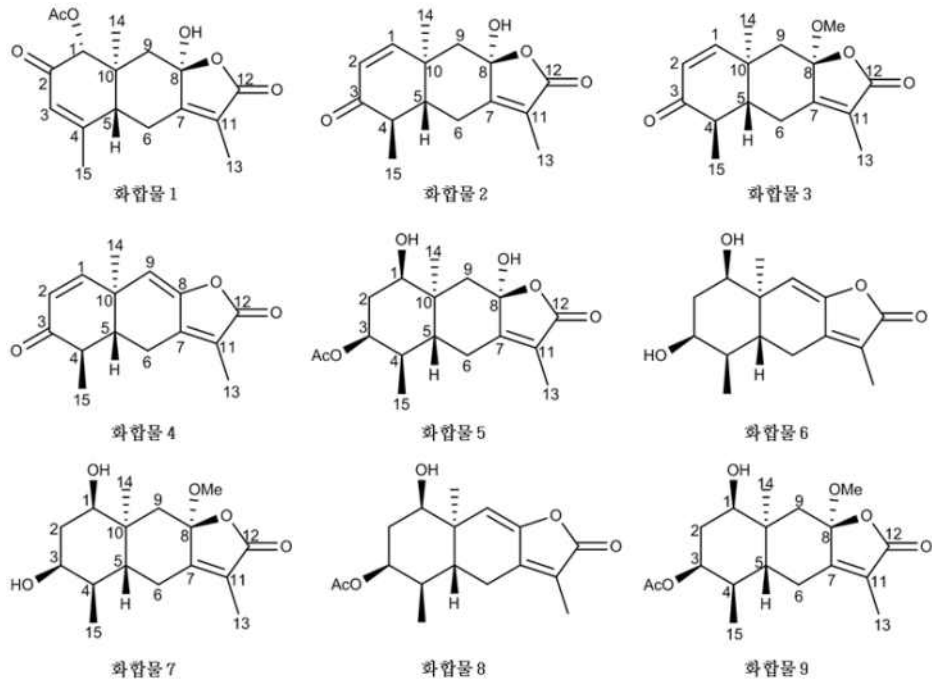
- 세스퀘테르펜계 화합물의 분자량 및 분자식 고분해능 HR/MS 분광기(JMS-700(JEOL), Fast Atom Bombardment(FAB) MS)를 사용하여 결정하였으며, 비선광도 측정은 P2000 Digital Polarimeter (Jasco Inc.)를 사용하였음. 또한 핵자기공명(NMR) 분석(JEOL Ltd., JNM-EX400, JNM-ECA600)을 통하여 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 2D NMR 분광학 자료를 이용하여 분자구조를 결정하였음. 기기분석결과를 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 화합물 **1-9** 은 유데스만계 세스퀴테르펜으로 확인하였음(Phytochemistry. 29(11), 3581-3585, 1990; Fitoterapia 94, 142-147, 2014).

[표 1] 분리정제 된 화합물 **1-9**의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR data

화합물	NMR data
1α-acetoxy-8α-hydroxy-2-oxo-eudesman-3,7(11)-dien-8,12-olide ( <b>1</b> )	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 MHz) δ 5.20 (1H, s, H-1), 5.98 (1H, q, <i>J</i> = 1.6 Hz, H-3), 2.86 (1H, br d, <i>J</i> = 12.8 Hz, H-5), 3.10 (1H, dd, <i>J</i> = 13.2, 3.6 Hz, H-6α), 2.50 (1H, dt, <i>J</i> = 13.2, 2 Hz, H-6β), 2.38 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz H-9β), 1.66 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz H-9α), 1.87 (3H, s, H-13), 1.19(3H, s, H-14), 2.10 (3H, s, H-15), 2.17 (3H, s, OAc). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 MHz) δ 84.3(C-1), 194.8(C-2), 126.6(C-3), 164.1(C-4), 50.4(C-5), 24.2(C-6), 160.6(C-7), 104.4(C-8), 47.1(C-9), 44.2(C-10), 124.3(C-11), 174.0(C-12), 8.3(C-13), 12.8(C-14), 22.2(C-15), 172.0(OAc), 20.6(OAc-CH <sub>3</sub> ).
Plebeiolide D ( <b>2</b> )	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 MHz) δ 6.87 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz, H-1), 5.80 (1H, d, <i>J</i> = 10.0), 2.56 (1H, m, H-4), 1.72 (1H, dt, <i>J</i> = 3.2, 12.8 Hz, H-5), 2.85 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 13.2, H-6β), 2.36 (1H, t, <i>J</i> = 13.2, H-6α), 2.38 (1H, d, <i>J</i> = 12.8, H-9β), 1.63 (1H, d, <i>J</i> = 12.8 Hz, H-9α), 1.80 (3H, s, H-13), 1.40 (3H, s, H-14), 1.21 (3H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-15). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 MHz) δ 161.0 (C-1), 126.7 (C-2), 202.8 (C-3), 43.7 (C-4), 51.8 (C-5), 25.8 (C-6),

	161.4 (C-7), 105.2 (C-8), 49.2 (C-9, CD <sub>3</sub> OD overlap), 38.5 (C-10), 123.5 (C-11), 174.2 (C-12), 8.2 (C-13), 19.1 (C-14), 12.5 (C-15).
Plebeiolide E (3)	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 Mhz) δ 6.88 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz, H-1), 5.80 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz, H-2), 2.56 (1H, m, H-4), 1.73 (1H, dt, <i>J</i> = 3.2, 13.2 Hz, H-5), 2.88 (1H, dd, <i>J</i> = 3.2, 13.6 Hz, H-6β), 2.52 (1H, m, H-6α), 2.45 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz, H-9β), 1.62 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz, H-9α), 1.86 (3H, s, H-13) 1.35 (3H, s, H-14) 1.21 (3H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-15), 3.15 (3H, s, 8-OCH <sub>3</sub> ). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 Mhz) δ 161.0 (C-1), 126.8 (C-2), 202.7 (C-3), 43.6 (C-4), 50.7 (C-5), 26.1 (C-6), 159.5 (C-7), 107.8 (C-8), 48.2 (C-9), 38.5 (C-10), 126.5 (C-11), 173.4 (C-12), 8.2 (C-13), 19.0 (C-14), 12.5 (C-15), 51.7 (8-OCH <sub>3</sub> ).
Plebeiolide F (4)	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 Mhz) δ 7.18 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz, H-1), 5.88 (1H, d, <i>J</i> = 10.0 Hz, H-2), 2.54 (1H, m, H-4, overlap with H-6α), 2.10 (1H, dt, <i>J</i> = 4.2, 13.2 Hz, H-5), 2.94 (1H, dd, <i>J</i> = 4.2, 17.4 Hz, H-6β), 2.51 (1H, m, H-6α), 6.10 (1H, s, H-9), 1.86 (3H, s, H-13), 1.23 (3H, s, H-14), 1.13 (3H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz, H-15). <sup>13</sup> C-NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 Mhz) δ 157.0 (C-1), 126.5 (C-2), 199.7 (C-3), 41.6 (C-4), 45.7 (C-5), 22.8 (C-6), 147.4 (C-7), 148.2 (C-8), 115.9 (C-9), 38.9 (C-10), 120.5 (C-11), 170.2 (C-12), 8.4 (C-13), 21.3 (C-14), 11.5 (C-15).
Plebeiolide A (5)	<sup>1</sup> H-NMR (Acetone-d <sub>6</sub> , 400 Mhz) δ 3.39 (1H, m, H-1), 2.17 (3H, m, H-2α), 1.96 (4H, m, H-2β), 5.00 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 3.6 Hz, H-3), 1.93 (4H, m, H-4), 1.88(4H, m, H-5), 2.80 (1H, dd, <i>J</i> = 3.6, 13.2, H-6β), 2.14(3H, m, H-6α), 2.17(3H, d, <i>J</i> = 12.4, H-9β), 1.63(4H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz, H-9α), 1.76 (3H, s, H-13), 1.18 (3H, s, H-14), 0.97 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-15), 1.98(3H, s, OAc). <sup>13</sup> C-NMR (Acetone-d <sub>6</sub> , 100 Mhz) δ 74.1 (C-1), 32.8 (C-2), 74.4 (C-3), 35.1 (C-4), 40.9 (C-5), 24.8 (C-6), 161.3 (C-7), 105.3 (C-8), 46.5 (C-9), 40.4 (C-10), 121.8 (C-11), 172.5 (C-12), 8.3 (C-13), 17.9 (C-14), 15.9 (C-15), 170.7 (OAc), 21.2 (OAc-CH <sub>3</sub> ).
Plebeiolide G (6)	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 Mhz) δ 3.77 (1H, t, <i>J</i> = 2.8 Hz, H-1), 2.01 (2H, dd, <i>J</i> = 6.4, 2.8 Hz, H-2α, H-2β), 3.80 (1H, dd, <i>J</i> = 4.8, 2.0 Hz, H-3), 1.75 (1H, m, H-4), 2.24 (1H, dt, <i>J</i> = 13.6, 3.6 Hz, H-5), 2.88 (1H, dd, <i>J</i> = 16.8, 3.6 Hz, H-6β), 2.34 (1H, dt, <i>J</i> = 16.8, 2.0 Hz, H-6α), 5.79 (1H, s, H-9), 1.88 (3H, d, <i>J</i> = 1.6, H-13), 1.04 (3H, s, H-14), 1.07 (3H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-15). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 Mhz) δ 76.7 (C-1), 34.8 (C-2), 73.7 (C-3), 37.2 (C-4), 37.5 (C-5), 23.6 (C-6), 150.4 (C-7), 150.1 (C-8), 120.9 (C-9), 43.5 (C-10), 121.1 (C-11), 173.5 (C-12), 8.4 (C-13), 19.4 (C-14), 16.2 (C-15).
Plebeiolide H (7)	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 Mhz) δ 3.43 (1H, br s, H-1), 2.06 (1H, m, H-2α), 1.92 (1H, m, H-2β), 3.81 (1H, br s, H-3), 1.75 (1H, m, H-4), 1.70 (1H, m, H-5), 2.80 (1H, dd, <i>J</i> = 12.8, 2.0 Hz, H-6β), 2.02 (1H, t, <i>J</i> = 12.8 Hz, H-6α), 2.06 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz, H-9β), 1.93 (1H, d, <i>J</i> = 13.6 Hz, H-9α), 1.86 (3H, d, <i>J</i> = 0.8, H-13), 1.09 (3H, s, H-14), 1.06 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-15), 3.11(3H, s, 8-OCH <sub>3</sub> ). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 Mhz) δ 76.7 (C-1), 34.5 (C-2), 76.7 (C-3), 37.3 (C-4), 41.6 (C-5), 25.5 (C-6), 161.5 (C-7), 109.1 (C-8), 46.1 (C-9), 41.1 (C-10), 125.0 (C-11), 173.9 (C-12), 8.1 (C-13), 17.5 (C-14), 16.6 (C-15), 50.7 (8-OCH <sub>3</sub> )
Plebeiolide C (8)	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 400 Mhz) δ 3.73 (1H, T, <i>J</i> = 2.8 Hz, H-1), 2.07 (1H, m, H-2α, H-2β), 4.96 (1H, dd, <i>J</i> = 5.6, 2.8 Hz, H-3) 1.93 (1H, m, H-4), 2.37 (1H, dt, <i>J</i> = 13.6, 2.8 Hz, H-5), 2.88 (1H, d, <i>J</i> = 12.8 Hz, H-6β), 2.30 (1H, dt, <i>J</i> = 13.6, 1.6 Hz, H-6α), 5.80 (1H, s, H-9), 1.87 (3H, s, H-13), 1.05 (3H, s, H-14), 0.99 (3H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-15), 2.04 (3H, s, OAc-CH <sub>3</sub> ). <sup>13</sup> C-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 100 Mhz) δ 74.4 (C-1), 33.2 (C-2), 75.0 (C-3), 35.2 (C-4), 37.4 (C-5), 23.5 (C-6), 149.9 (C-7), 150.2 (C-8), 120.3 (C-9), 42.9 (C-10), 121.1 (C-11), 173.4 (C-12), 8.4 (C-13), 19.2 (C-14), 15.5 (C-15), 173.0 (OAc), 21.3(OAc-CH <sub>3</sub> ).
Plebeiolide I (9)	<sup>1</sup> H-NMR (Methanol-d <sub>4</sub> , 600 Mhz) δ 3.41 (1H, t, <i>J</i> = 3.0 Hz, H-1), 2.15 (1H, dt, <i>J</i> = 16.2, 3.0 Hz, H-2α), 1.96 (1H, dt, <i>J</i> = 16.2, 3.0 Hz, H-2β), 4.96 (1H, q, <i>J</i> = 3.0 Hz, H-3), 1.94 (1H, m, H-4), 1.83 (1H, dt, <i>J</i> = 13.2, 3.6, H-5), 2.82 (1H, dd, <i>J</i> = 13.2, 3.6 Hz, H-6β), 2.02(1H, dt, <i>J</i> = 13.2, 1.8 Hz, H-6α), 2.10

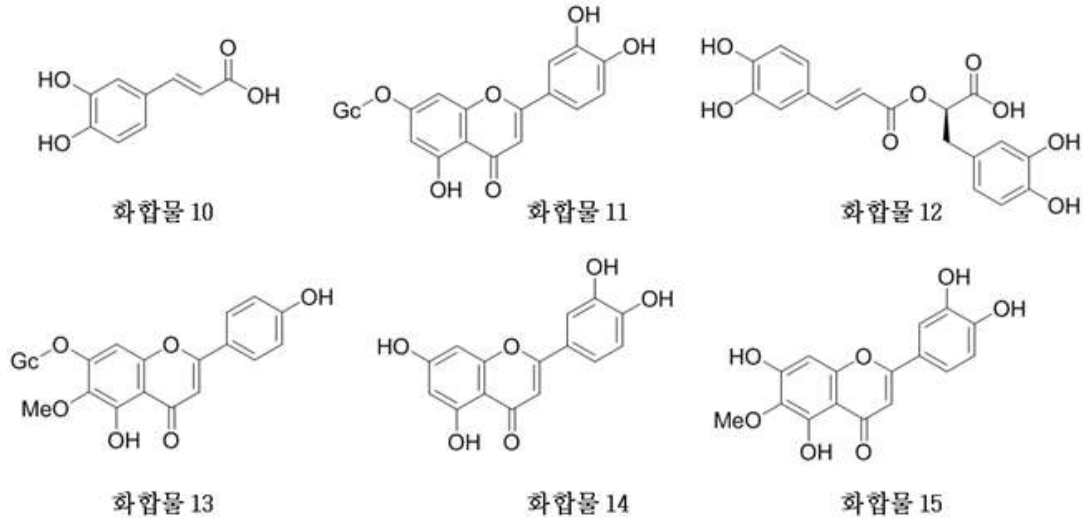
(1H, d,  $J = 13.2$  Hz, H-9 $\beta$ ), 1.97 (1H, d,  $J = 13.2$ , H-9 $\alpha$ ), 1.86 (3H, d,  $J = 0.6$ , H-13), 1.12 (3H, s, H-14), 0.99 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-15), 3.13 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 2.02 (3H, s, OAc-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 150 MHz)  $\delta$  74.3 (C-1), 33.1 (C-2), 75.2 (C-3), 35.5 (C-4), 41.5 (C-5), 25.6 (C-6), 161.1 (C-7), 109.1 (C-8), 46.2 (C-9), 40.7 (C-10), 125.2 (C-11), 173.9 (C-12), 8.2 (C-13), 18.0 (C-14), 16.0 (C-15), 50.8 (8-OCH<sub>3</sub>), 173.0 (OAc), 21.3(OAc-CH<sub>3</sub>).



[그림 2] 곰보배추로부터 분리정제 된 화합물 1-9의 구조

- 추가적으로 분리 정제된 화합물 10-15는 기기분석 (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, ESI-MS)을 통해 caffeic acid, luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, rosmarinic acid, homoplantagenin, luteolin, hispidulin으로 구조 동정하였음.

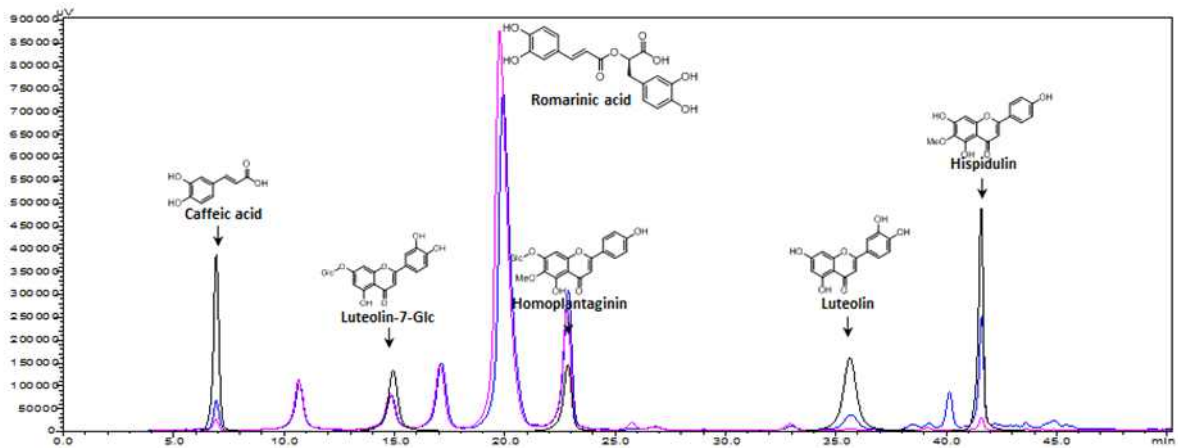




[그림 3] 곰보배추로부터 분리정제 된 phenolic 화합물 10-15의 구조

## 2. 곰보배추 추출물의 지표성분 프로파일링 및 함량평가

- 곰보배추에서는 분리 정제된 9종의 세스퀴테르펜 화합물은 6종의 폴리페놀 화합물과 비교하여 우수한 IL-6/STAT-3 억제효능을 나타냄. 그러나 세스퀴테르펜 화합물의 함량이 미량인 관계로 분리 정제된 phenolic 화합물(10-15)인 caffeic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, rosmarinic acid, homoplantagenin, luteolin, hispidulin을 지표성분으로 곰보배추 에탄올 추출물에 대한 HPLC 프로파일링 분석을 실시하였음 (그림 4).

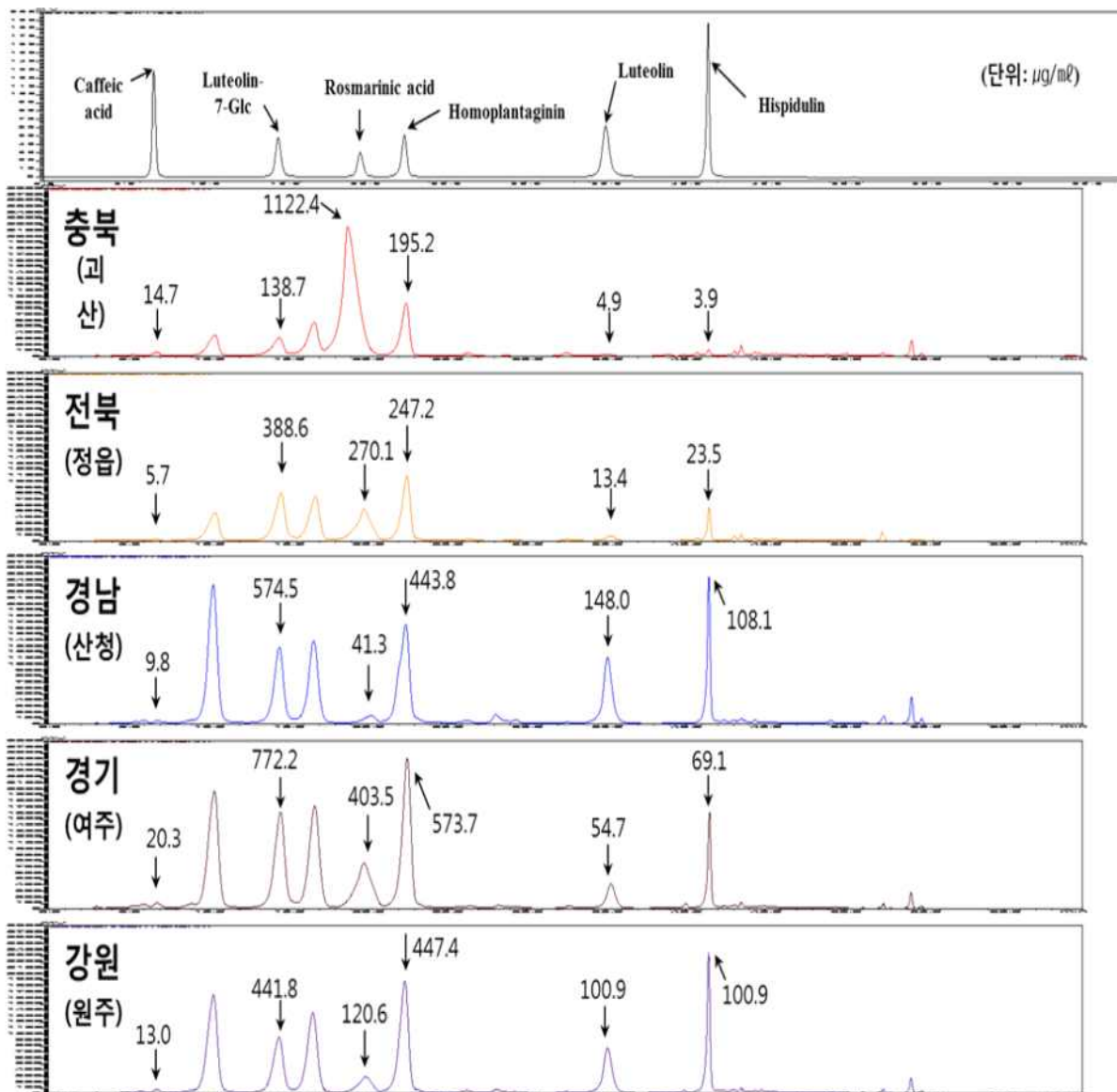


[그림 4] 곰보배추 추출물의 phenolic 화합물을 활용한 지표성분 분석

{HPLC: Shimadzu Prominence UFLC; 검출파장: 342nm; 컬럼: phenomenex gemini C<sub>18</sub>; 이동상: 62% H<sub>2</sub>O (0.5 % acetic acid), 38% MeOH → 100% MeOH, step gradient; 분석시간: 45분}

- 곰보배추 추출물의 채취 시기별 함량 변화 및 최적 시기 선정을 위하여 2주 간격으로 노지 재배 중인 곰보배추를 채취하고 이를 총 5개의 기간으로 나누어 시료를 제작하고 HPLC 프로파일링 분석을 실시하였음. 분석결과, 시료별 함량 변화의 범위가 크고 지표성분의 활성이 낮은 것으로 판단되어 새로운 지표성분을 선정할 필요가 있을 것으로 생각됨. 이와 같이 채취시기별 곰보배추 시료는 노지에서 채취한 것으로 자연 환경 조건 변화에 민감한 단점이 있어, 정확한 성장 주기별 시료의 구성 화합물 변화를 관찰하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각됨.

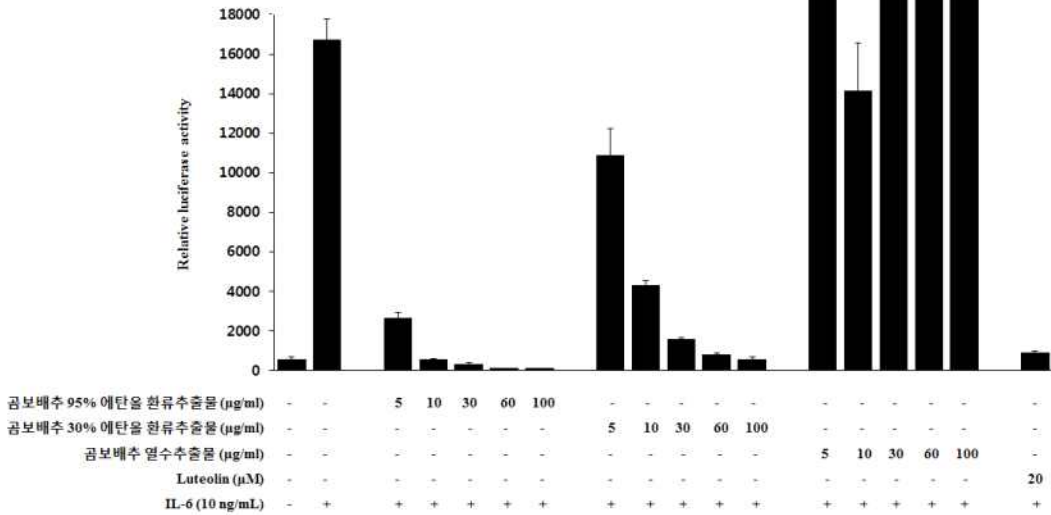
- 천연물의 자라는 환경에 따라 함유하고 있는 성분들의 차이를 보이는 것으로 알려져 있음. 이에 다양한 지역으로부터 채취된 곰보배추에 대하여 6가지 지표성분에 대한 분석을 실시하였음. 분석결과 충북(괴산) 지역에서 채취한 곰보배추에는 rosmarinic acid의 함량이 높았으며, 경남(산청) 지역 곰보배추에는 luteolin의 함량이 다른 지역과 비교하여 상대적으로 높게 측정되었음 (그림 5).
- 각 지역의 곰보배추 HPLC 분석결과 지표성분인 6가지 폴리페놀 성분의 함량변화가 있는 것으로 확인됨. 따라서 차년도에는 보다 안정적인 지표성분 선정을 위하여 추가적인 분리정제 과정을 진행하여 새로운 지표성분을 선정, 함량 분석을 실시함.



[그림 5] 지역별 곰보배추 추출물의 phenolic 화합물 함량 변화

### 3. 곰보배추 추출물 제조 공정 확립

- 곰보배추의 최적 추출물 제조 공정 확립을 위하여 1) 에탄올과 물을 배합한 용매, 2) 건조 원물 대비 용매의 양, 3) 추출 온도, 4) 추출 시간 등의 항목으로 시험하고 이를 생리활성실험결과와 연계하여 최적의 추출 공법을 확인하였음.
- 에탄올과 물을 배합한 용매 추출법은 95% 에탄올, 30% 에탄올, 열수 추출물로 구분하여 실험하였으며, 실험결과 95% 에탄올 추출물이 IL-6/STAT3 억제 활성 효과가 가장 좋은 것을 확인하였음(그림 6). 또한, 30% 에탄올 추출물에서도 활성을 확인할 수 있었음.



[그림 6] 추출물별 IL-6/STAT3 luciferase 억제 활성 평가

- IL-6/STAT3 luciferase 저해활성이 가장 높은 95% 에탄올 추출물에 대하여 추출 온도에 따른 수득량 및 수득률을 측정하였음. 에탄올 용매의 끓는점 (약 75℃)을 고려하여 80, 75, 70, 65℃로 각각 실험하였으며, 이 중 70℃ 추출 온도가 추출 용매의 회수, 수득량에서 가장 적합한 것으로 확인되었음.
- 원물 대비 용매의 양과 추출 시간은 추출 제비용 단가와 연계하여 건조 중량 대비 10배의 용매로 5시간 추출하는 것으로 결정하였음.

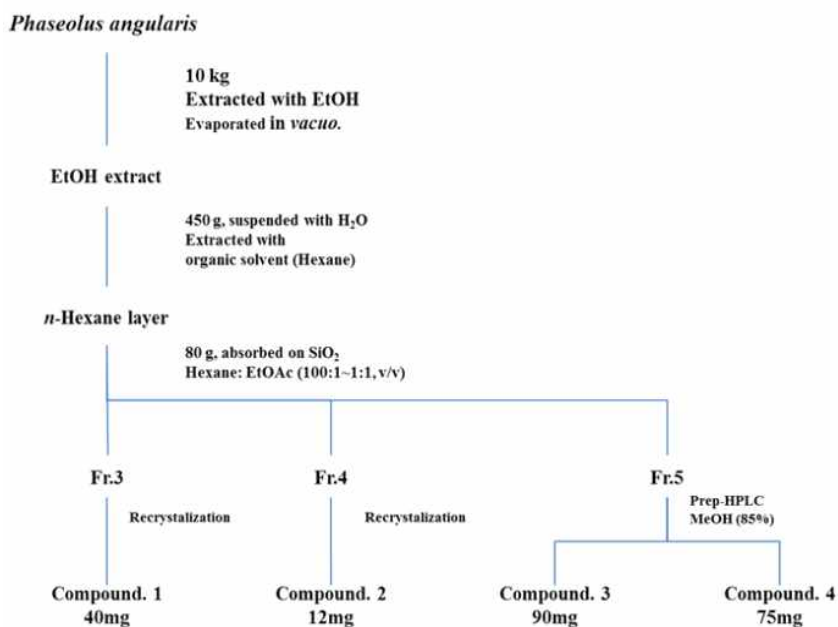
[표 2] 원물 대비 용매 양과 추출 시간 별 추출 효율

원물의 건조 중량 (g)	용매의 양	추출 시간	수득량 (g)	수득율 (%)
550	5배	5시간	36.62	6.6
	10배	5시간	51.82	9.4
	5배 (2회 반복)	5시간	59.73	10.8
	5배 (2회 반복)	10시간	67.16	12.2
	10배 (2회 반복)	5시간	81.92	14.9

#### 4. 적소두 에탄올 추출물의 정량, 정성 분석

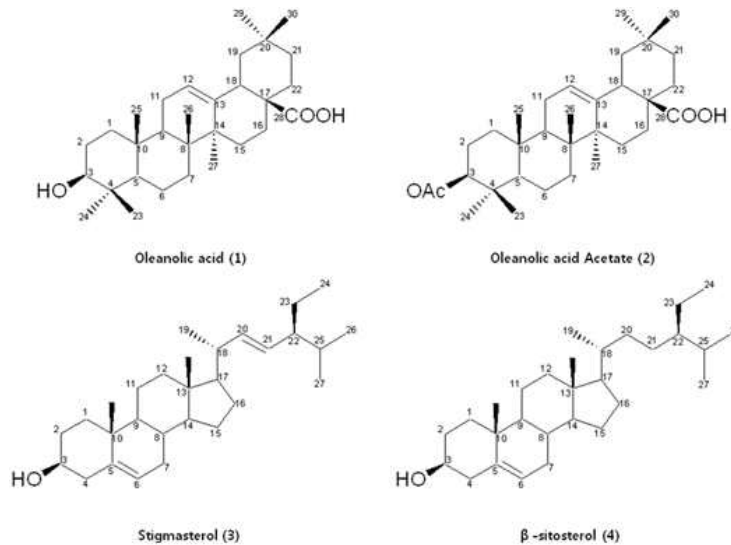
##### (1) 지표성분 분리정제 및 구조동정

- 건조된 KR-300 (10 kg)은 powder 형태로 만든 후, 60 L 의 주정을 추출용매로 사용하여, 70℃에서 2시간 동안 1차 추출을 하였으며, 2차 추출은 300 L 의 주정을 추출용매로 사용하여, 70℃에서 2시간 동안 추출하였음. 이 추출물은 여과하여 1차적으로 불순물을 제거한 후, 40℃에서 감압농축하여, 450 g 의 주정 추출물을 얻었다. 주정 추출물 450 g 은 물에 녹여 유기용매인 Hexane과 분배하여, Hexane Layer를 , 40℃에서 감압농축하여 80 g 의 분획물을 얻었음. 이 후 Hexane 분획물 80 g 을 Silica gel 에 흡착시켜 Silica gel column 에 loading하고 Hexane : EtOAc (100:1 ~ 1:1 v/v)으로 용출하여 9개의 Fraction을 얻었음. 그 중 Fr.3 과 Fr.4 을 Recrystallization 하여 각각 Compound 1 (40 mg)과 Compound 2 (12mg)을 얻었으며, Fr.5 을 Prep-HPLC (MeOH 85%)로 분리하여, Compound 3 (90 mg)과 Compound 4 (75 mg)을 얻었음.



[그림 7] 적소두로부터 유효화합물들의 분리정제 과정

- 분리된 각각의 Compounds 는  $^1\text{H-NMR}$  과  $^{13}\text{C-NMR}$ , LC/MS-ESI 와 GC/MS-EI를 통해 그림 8 과 같이 구조 동정을 하였음.



[그림 8] 적소두로부터 분리정제된 유효화합물들의 구조

### (2) 적소두 추출 및 전처리

- 적소두(5 g)을 blander로 갈아 powder형태로 만든 후, 35 mL의 95% 에탄올을 추출용매로 사용하여 70°C에서시간동안 1차 추출을 하였으며, 2차 추출은 25 mL의 95% 에탄올을 추출용매로 사용하여 70°C에서시간 추출하였음. 이 추출물은 여과하여 1차적으로 불순물을 제거한 후, 40°C에서 감압농축하고 1 mL 정도 남겨 이를 질소로 건조 시켜 140 mg의 추출물을 얻었음. 추출물은 클로르포름 2 mL에 녹인 후 0.22 µm PTFE 필터로 여과 한 후, 분석 시료로 사용하였음. 적소두 추출물은 C8 (Agilents, 4.6 x 150 mm, 5 µm) HPLC용 컬럼, 40°C 온도, 1 mL/min 유속, MeOH 및 D.W(0.1%인산) 조성의 이동상, 그리고 210nm에서 Simadzu HPLC systems을 이용하여 분석하였음.

### (3) 표준정량곡선과 LOD, LOQ

- 지표성분의 농도별 분석결과를 토대로 표준정량곡선을 측정한 결과 oleanolic acid ( $R^2=0.9998$ ), oleanolic acid acetate ( $R^2=0.9998$ ), stigmasterol ( $R^2=0.9997$ ) 과  $\beta$ -sitosterol ( $R^2=0.9993$ )으로 측정되었음. 4가지 화합물의 검출중의 불순물 또는 분석물질을 정확한 값으로 정량화 할 필요가 없는 최소의 양을 알기 위해 검출한도(LOD)와 적절한 정확도와 정밀도로 검체 중의 불순물 또는 분석물질을 정량적으로 분석할 수 있는 최소의 양을 알기 위한 정량한도 (LOQ)를 구하기 위하여, blank 용액의 chromatogram에서 계산 된 noise signal의 3배(검출한계)과 10배(정량한계)되는 signal에 해당되는 product 농도를 계산하여, 위에서 계산된 농도를 포함 하는 범위에 포함되는 6개의 농도로부터 회귀 직선식을 구하고, 이를 바탕으로 정량한계에 해당하는 용액의 시료를 7번 분석하여 LOD와 LOQ를 구한 결과, LOD는 oleanolic acid (0.0002 mg/mL), oleanolic acid acetate (0.0003 mg/mL), stigmasterol ( $R^2=0.0014$  mg/mL) 과  $\beta$ -sitosterol (0.0008 mg/mL)으로 계산 하였고, LOQ 의 경우 oleanolic acid (0.0006 mg/mL), oleanolic acid acetate (0.0008 mg/mL), stigmasterol (0.0043 mg/mL) 과  $\beta$ -sitosterol (0.0024 mg/mL)로 구하였음(표 3).

[표 3] 지표화합물에 대한 표준정량곡선, LOD, LOQ

Standard compounds	t <sub>R</sub> (min)	Calibration equation (linear model) <sup>a</sup>	Linear range (mg/mL)	Correlation coefficients (R <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	LOD <sup>c</sup> (mg/mL)	LOQ <sup>d</sup> (mg/mL)
Oleanolic acid 1	5.92	Y = 2508180X - 19064	0.005 - 3	0.9998	0.0002	0.0006
Oleanolic acid acetate 2	10.76	Y = 2452244X - 20594	0.005 - 3	0.9998	0.0003	0.0008
Stigmasterol 3	39.28	Y = 1636781X - 13263	0.005 - 3	0.9997	0.0014	0.0043
β-sitosterol 4	46.42	Y = 1276482X - 17349	0.005 - 3	0.9993	0.0008	0.0024

<sup>a</sup> y, peak area at 210 nm; x, concentration of the standard (mg/mL).  
<sup>b</sup> R<sup>2</sup>, correlation coefficient for 12 data points in the calibration curves.  
<sup>c</sup> LOD, limit of detection S/N = 3 (n=6).  
<sup>d</sup> LOQ, limit of quantification S/N = 10 (n=6).

(4) 적소두 추출물에 대한 정성 분석 및 정량분석

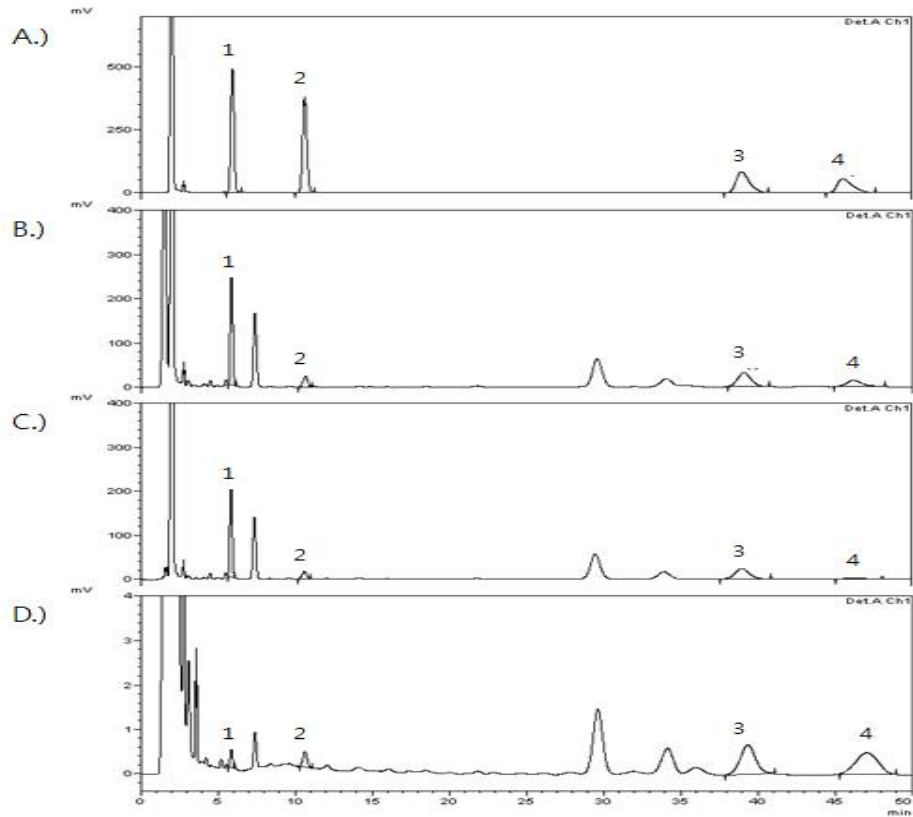
- 적소두에 포함되어 있는 oleanolic acid, oleanolic acid acetate, stigmasterol 그리고 β-sitosterol의 함량을 알아보기 위하여, H<sub>2</sub>O, EtOAc 및 EtOH 추출물을 대상으로 HPLC를 이용하여 정량 및 정성분석을 실시하였음. 분석결과 H<sub>2</sub>O층에는 1 g당 oleanolic acid (0.03 mg), oleanolic acid acetate (0.04 mg), stigmasterol (0.11 mg) 과 β-sitosterol (0.16 mg) 함유되어 있음. EtOAc층에는 1 g당 oleanolic acid (2.99 mg), oleanolic acid acetate (0.47 mg), stigmasterol (2.99 mg) 과 β-sitosterol (0.67 mg) 이 포함되어 있으며, EtOH층에는 oleanolic acid (3.63 mg), oleanolic acid acetate (0.68 mg), stigmasterol (3.67 mg) 과 β-sitosterol (2.57 mg)가 함유되어 있음(표 4, 그림 9).

[표 4] 적소두 추출물 및 분획물에 대한 정량분석

Analyte	Extract (n=3)		
	Water (mg/g) <sup>a</sup>	Ethyl acetate (mg/g)	EtOH (mg/g)
Oleanolic acid 1	0.03 ± 0.02	2.99 ± 0.05	3.63 ± 0.02
Oleanolic acid acetate 2	0.04 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.68 ± 0.02
Stigmasterol 3	0.11 ± 0.02	2.99 ± 0.04	3.67 ± 0.02
β-sitosterol 4	0.16 ± 0.02	0.67 ± 0.03	2.57 ± 0.02

<sup>a</sup>Extraction yield (mg/g).





[그림 9] 적소두 추출물 및 분획물에 대한 HPLC chromatogram

A.) Standrads, B.) EtOH extract, C.) Etyl Acetate extract, D.) Water extract

1. Oleanolic acid, 2.Oleanolic acid acetate, 3.Stigmasterol, 4. β -sitosterol

(5) 적소두 추출물별 함량분석

- 적소두에 포함되어 있는 oleanolic acid, oleanolic acid acetate, stigmasterol 그리고 β-sitosterol 의 농도별 정확성을 검증하기 위하여, 수율이 가장 좋은 EtOH층을 대상으로 임의의 3가지 농도를 첨가 한 후, HPLC를 이용하여 회수율 실험을 실시하였음. 회수율 분석결과 회수율은 96.1에서 104.1% 안으로 분석되었고, Intra, Inter-day의 RSD(%) 모두 0.03에서 2.46 사이로 분석되었음.

[표 5] 적소두 EtOH 추출물의 정확도 및 회수율

Analyte	Concentration added (mg/mL)	Concentration after addition		Recovery test <sup>a</sup> (n=3) (%)	Precision test (n=3)	
		Expected (mg/mL)	Measured (mg/mL)		Intra-day RSD <sup>b</sup> (%)	Inter-day RSD (%)
Oleanolic acid 1	0.05	0.6259	0.6475	103.5	0.22	0.52
	0.1	0.6759	0.6916	102.3	0.04	0.41
	0.2	0.7759	0.7850	101.2	0.18	0.3
Oleanolic acid acetate 2	0.05	0.1578	0.1538	97.5	0.42	0.55
	0.1	0.2078	0.2076	99.9	0.03	0.68
	0.2	0.3078	0.3123	101.5	0.01	1.65
Stigmasterol 3	0.1	0.6813	0.6700	98.4	0.54	0.51
	0.2	0.7813	0.7511	96.1	0.40	2.46
	0.4	0.9813	1.0243	104.4	0.11	0.89
β-sitosterol 4	0.1	0.5079	0.5084	100.1	0.08	0.15
	0.2	0.6079	0.6007	98.8	1.05	1.08
	0.4	0.8079	0.8018	99.2	0.06	0.86

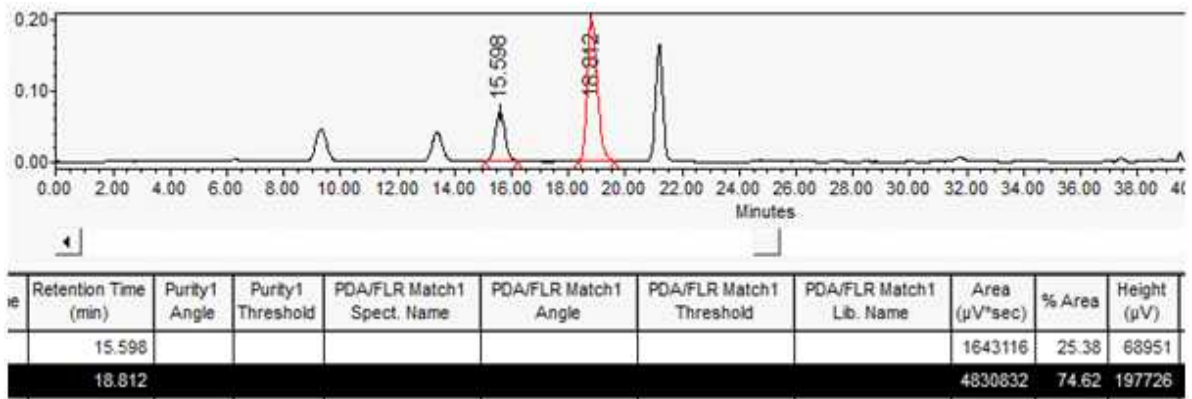
<sup>a</sup>Recovery tests were performed in the EtOH extract spiked with each standard compound.

<sup>b</sup>RSD, Relative standard deviation.

## 5. 대량생산 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립

### (1) 새로운 지표성분 선정 위한 분리정제 및 함량분석

- 곱보배추 농축액에 대한 함량 분석시, 비교적 안정적인 Luteolin-7-Glc 및 Rosmarinic acid를 지표물질로 선정하였음. 농축액 20 mg을 메탄올 10 ml 용액에 녹임(10분 동안 초음파 수행). 이 액의 일부를 0.45 μm PTFE 필터로 필터링 후 검액으로 함.
- Chromatographic system 세팅 조건
  - Detector: 342 nm UV Detector
  - Column: Phenomenex Gemini C18 (250 × 4.6 mm)
  - Column temperature: 25°C ± 10°C
  - Flow rate: 1.0 ml/min, 60 min



[그림 10] 곱보배추 농축액 함량 분석

### (2) 대량생산 공정 기술 개발

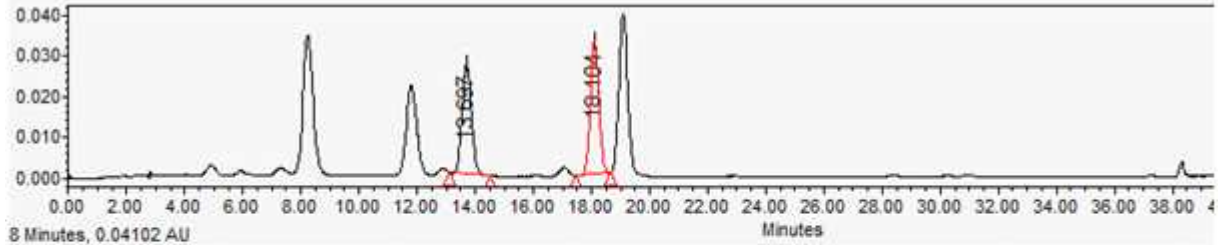
- 곱보배추의 최적 추출물 제조 공정을 추출 용매의 종류, 용매의 양, 추출 온도, 추출 시간 등의 조건으로 실험, 최적 조건을 확립하였음.
- 95% 에탄올 추출물의 추출 온도는 용매의 끓는점 (약 75°C)을 고려하여 65~80°C로 실험하였으며, 이 중 75~80°C 추출 온도가 추출 용매의 회수 및 수득량에서 가장 적합한 것으로 확인되었음. 원물 대비 용매의 양과 추출 시간은 추출 제비용 단가와 연계하여 건조 중량 대비 10배의 용매로 5시간 환류 추출하는 것으로 결정하였음.

원물의 건조 중량 (g)	용매의 양	추출 시간	수득량 (g)	수득율 (%)
550	5배	5시간	36.62	6.6
	10배	5시간	51.82	9.4

[표 6] 곱보배추 원물 대비 용매 양 및 추출 효율



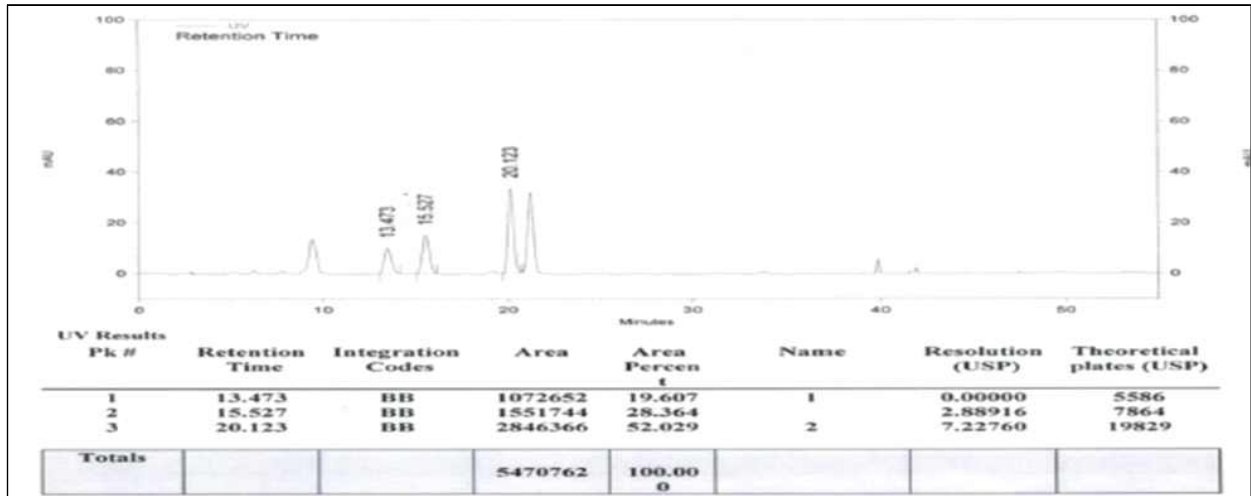




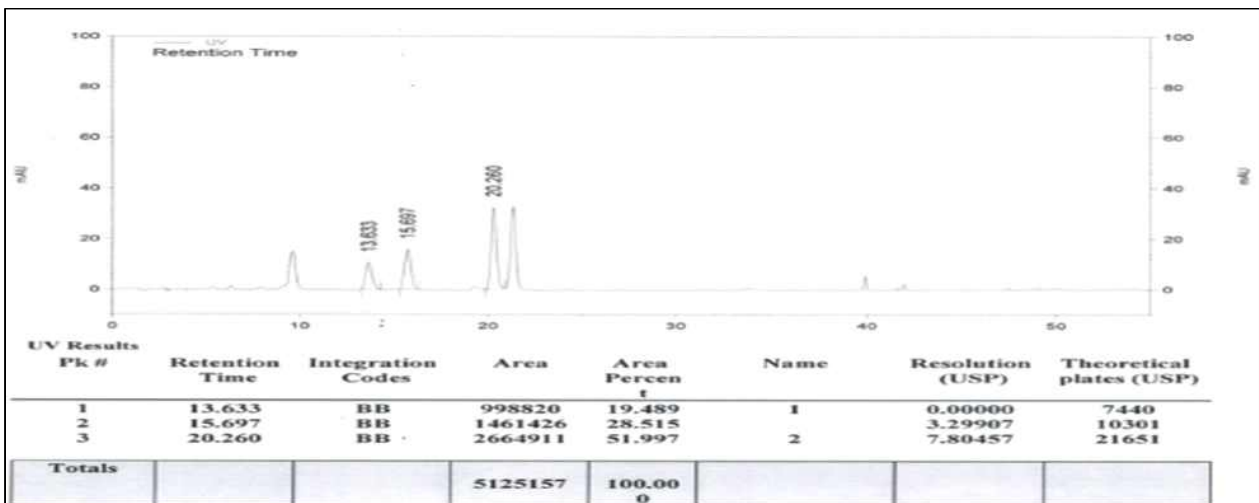
Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	PDA/FLR Match1 Spect. Name	PDA/FLR Match1 Angle	PDA/FLR Match1 Threshold	PDA/FLR Match1 Lib. Name	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)
13.697							617118	48.22	27013
18.104							662586	51.78	32571

[그림 14] 곰보배추 농축액 : 1,3-BG = 25 : 75 혼합물 함량 분석

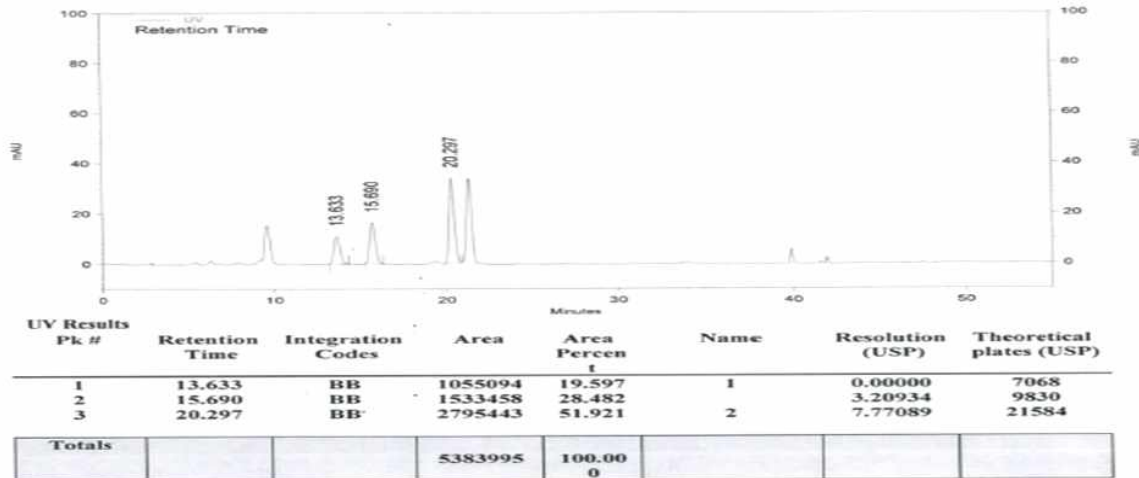
- 지표성분의 함량이 가장 높은 곰보배추 농축액:1,3-BG = 50:50의 상, 중, 하층에 대한 함량분석결과 원료의 균질성 확인되었으며, 최종 원료 formulation으로 곰보배추 농축액:1,3-BG = 50:50으로 설정하였음.



[그림 15] 곰보배추 농축액 : 1,3-BG = 50 : 50 혼합물의 상층 함량 분석



[그림 16] 곰보배추 농축액 : 1,3-BG = 50 : 50 혼합물의 중층 함량 분석



[그림 17] 곰보배추 농축액 : 1,3-BG = 50 : 50 혼합물의 하층 함량 분석

(3) 대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립

- 화장품 원료로 사용되는 곰보배추 농축액 (KDC14-4)을 이용한 원료 생산을 위해 경기도 군포시에 위치한 “(주)두래”과 용역 계약을 체결, 전임상 및 시작품 제작 위한 원료 생산 완료.

### 원료 제조 위탁 계약서

본 계약서는 서울특별시 강남구 논현로 28길 34번지 에 소재한 '고려제약주식회사' (이하 '甲'이라 한다) 와 경기도 군포시 당정로 56번지 에 소재한 '(주)두래' (이하 '乙'이라 한다) 는 '甲'이 '乙'에게 제공하는 '원료 제조 위탁' (이하 '본 업무'라 한다) 에 관한 계약이다.

**제 1 조 (계약의 목적)**

1. '甲'은 추출하고자 하는 배암차즈기 건조 (이하 '생약'이라 한다)를 '乙'에게 제공하여 '乙'에게 추출을 의뢰하고 '乙'은 '甲'으로부터 제공 받은 '생약'을 관련법령의 제반 규정을 준수하여 추출 제조하여 양사가 협의한 기준에 적합한 생약 추출물과 1,3-Butylene Glycol 1 : 1 비율의 혼합물 (이하 '원료'라 한다) 을 '甲'에게 제공함을 목적으로 한다. 단, '생약' 1Lot는 배암차즈기 100kg을 의미하고 생약 추출물 1Lot는 배암차즈기 추출물 10kg 이상을 의미한다.
2. '甲'이 제공한 '기준 및 시험방법'을 가지고 '乙'은 화장품 원료 허가 규정에 적합한 원료를 생산한다.

**제 2 조 (역할)**

1. '甲'의 역할
  - 1) '甲'은 '생약'을 Lot단위로 '乙'에게 제공한다.
  - 2) '甲'은 제조방법 및 품질시험에 필요한 제조공정도 및 기준 및 시험방법, 지표성분 등을 '乙'에게 제공한다.
  - 3) '甲'은 '乙'로부터 제공된 원료의 제조 방법 및 기준 및 시험방법의 승인 및 시험성적을 판정한다.
2. '乙'의 역할
  - 1) '甲'로부터 제공 받은 '생약'의 보관.
  - 2) '생약'의 추출 제조를 통해 Lot단위로 갑에게 제공한다.
  - 3) '원료' 관련 공정 및 '원료' 시험 성적서 제공.
  - 4) '생약'에 대한 '원료'의 수율은 10% 이상, 90 brix.
  - 5) '甲'가 지정한 장소로 '원료'의 운송 및 납품.

**제 3 조 (의무사항 및 비밀유지)**

1. '乙'는 '甲'와 체결한 '비밀유지 계약서'에 따라 '원료' 제조에 관련된 공정, 기준 및 시험 방법, 자문에 의한 모든 사항에 대해 비밀을 유지해야 한다.
2. '乙'는 공급받은 '생약'을 제3자에게 담보로 제공하거나 처분할 수 없으며, 정해진 관리 기준에 맞추어 관리자의 주의 의무로 관리하여야 한다.
3. '乙'는 '甲'의 서면으로 동의하지 않는 경우를 제외하고는 '원료'를 '甲'에게만 독점적으로 공급하여야 하며, 본 '생약'을 이용하여 '乙'가 자체적으로 추출물 또는 '원료'를 제조하거나 제품화 및 OEM 생산을 하지 않는다.

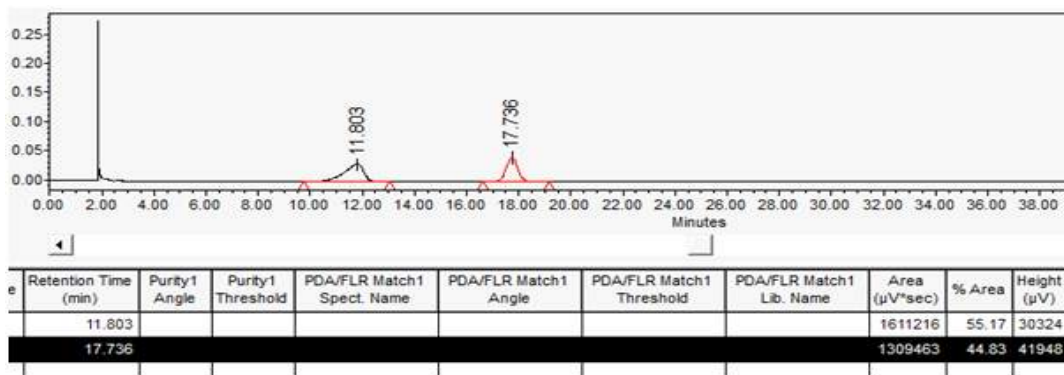
[그림 18] 원료 생산업체와의 업무 계약

\* '배암차즈기'는 흔히 곰보배추라고 부르는 꿀풀과의 2년생 초본 식물임.

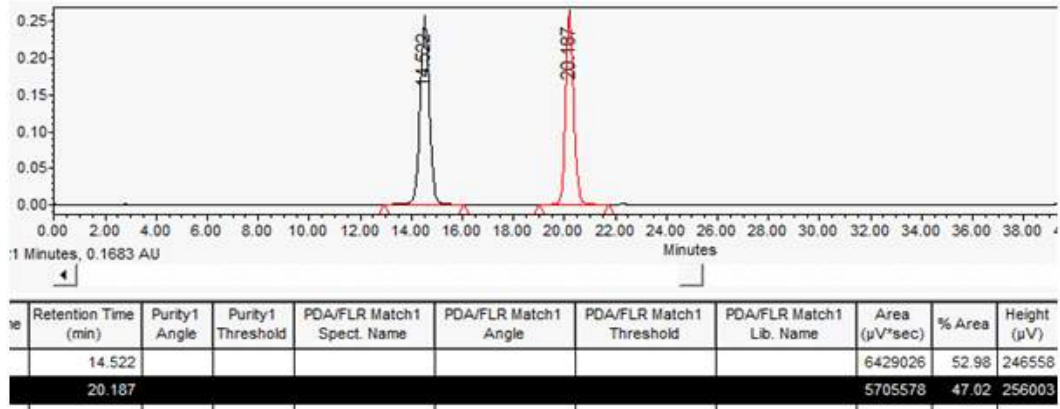
• 원료 QC/QA 분석법 및 분석 결과

- Mobile phase (이동상)
- Solvent A : 0.5% Acetic Acid in water/ Solvent B : Methanol
- 0.45 µm 필터 후 가스 제거
- Standard preparation (표준품 준비)
- 1000 ppm 표준액 : Luteolin-7-Glc 5 mg 및 Rosmarinic acid 5 mg 을 정밀히 달아 Conical tube (15 ml) 에 넣고, 메탄올 5 ml (pipette 1 ml) 용액으로 채운 액 일부를 0.45 µm 필터를 사용하여 거른액을 검액으로 함.
- 500 ppm 표준액 : 1000 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
- 250 ppm 표준액 : 500 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
- 125 ppm 표준액 : 250 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
- 62.5 ppm 표준액 : 125 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
- Sample preparation(시료)
- 농축액 20 mg을 정밀히 달고, 메탄올 10 ml 용액에 녹임 (초음파를 10분 동안 함). 이 액의 일부를 0.45 µm PTFE 필터를 사용하여 거른액을 검액으로 함.
- Sample 1 (농축액:BG = 50:50) 20 mg을 정밀히 달고, 메탄올 10 ml 용액에 녹임 (초음파를 10분 동안 함). 이 액의 일부를 0.45 µm PTFE필터를 사용하여 거른액을 검액으로 함.
- Sample 2 (농축액:BG = 75:25) 20 mg을 정밀히 달고, 메탄올 10 ml 용액에 녹임 (초음파를 10분 동안 함). 이 액의 일부를 0.45 µm PTFE필터를 사용하여 거른액을 검액으로 함.
- Sample 3 (농축액:BG = 25:75) 20 mg을 정밀히 달고, 메탄올 10 ml 용액에 녹임 (초음파를 10분 동안 함). 이 액의 일부를 0.45 µm PTFE필터를 사용하여 거른액을 검액으로 함.
- Chromatographic system
- Detector: 342 nm UV Detector
- Column: Phenomenex Gemini C18 (250 × 4.6 mm)
- Column temperature: 25°C ± 10°C
- Flow rate: 1.0 ml/min, 60 min

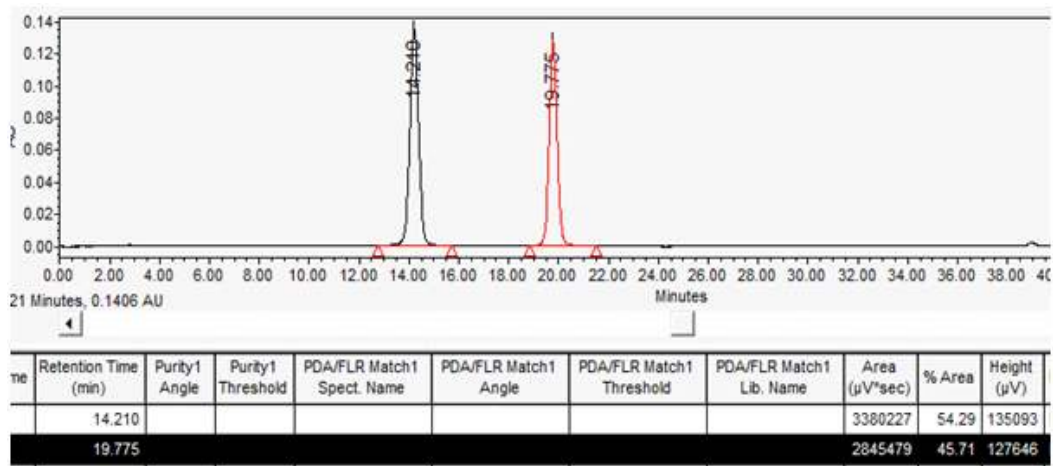
Mobile Phase (1 ml/min)/time	0 min	14 min	17 min	18 min	32 min	40 min	45 min
A: H <sub>2</sub> O with 0.5% acetic acid	62%	58%	55%	52%	50%	15%	0%
B: MeOH	38%	42%	45%	48%	50%	85%	100%



[그림 19] 표준액 62.5 ppm 함량 분석



[그림 20] 표준액 125 ppm 함량 분석



[그림 21] 표준액 250 ppm 함량 분석

- 원료의 품질 일원화를 위한 기준 및 시험방법을 개발하였음. 대량생산 원료를 ‘곰보배추 건조엑스(10→1)·1,3-butylene Glycol 혼합물(1:1)’로 명명하였으며, 기준 및 시험방법은 다음과 같음.
  - 곰보배추 [*Salvia plebeia* R. Br. (꿀풀과 Labiatae)]의 뿌리를 제외한 지상부를 물로 깨끗이 씻은 후 건조한 건조약 100 kg을 세절하고 질량대비 10배의 에탄올을 가하여 교반하면서 5시간 이상 환류 추출하고(75~80℃), 10 μm 여과지로 여과한 후 여액을 합하고 에탄올을 감압 농축(60℃)함. 그리고 1, 3-BG를 농축 무게 대비 1:1로 혼합하여 약 20 kg의 원료를 얻음. 이 원료는 정량할 때 Luteolin-7-glucoside (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>: 448.37) 1.23%와 Rosmarinic acid (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>: 360.32) 3.82% 이상을 함유함.
  - 성상 : 이 원료는 황갈색~갈색의 가루로서 특이한 냄새가 있고 맛은 씹.
  - 확인시험 : 액체크로마토그래프법. 이 원료를 가지고 다음의 정량법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 피크 유지시간을 나타냄.
  - 순도시험 : 중금속 30 ppm 이하. 이 원료를 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 순도시험 중 중금속 항에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
  - 건조감량 : 실측치로 기준 설정. 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 건조감량 항에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
  - 회분 : 실측치로 기준 설정. 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 회분 항에 따라 시험할 때 적합하여야 함.

- 산불용성 회분 : 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 산불용성회분 항에 따라 시험할 때 적합하여야 함. (실측치가 1% 미만일 경우 생략 가능)
- 정량법 : Luteolin-7-glucoside (1.23% 이상)와 Rosmarinic acid (3.82% 이상).
- 검액 : 농축액 20 mg을 정밀하게 달아 10 ml 용량플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹여 표준하고 초음파를 10분동안 하여, 이 액을 0.45 µm PTFE 필터로 여과하여 검액으로 함.
- 표준액
  - 1000ppm 표준액 : Luteolin-7-glucoside 표준품 5 mg 및 Rosmarinic acid 표준품 5 mg을 정밀하게 달아 메탄올 5 ml에 녹이고 0.45 µm PTFE 필터로 여과하여 표준액으로 함.
  - 500 ppm 표준액 : 1000 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
  - 250 ppm 표준액 : 500 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
  - 125 ppm 표준액 : 250 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
  - 62.5 ppm 표준액 : 125 ppm 1 ml을 정밀히 달고, 메탄올 1 ml 용액에 녹임.
- 시스템적합성 : 표준액을 6회 반복 주입할 때 피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하, Luteolin-7-glucoside 와 Rosmarinic acid의 분리도는 1.5 이상이어야 함.
- 기기조건
  - 칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 25 cm의 스테인레스강관에 5 µm의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴실리카겔을 충전한 칼럼
  - 이동상 : A: H<sub>2</sub>O with 0.5% acetic acid, B: MeOH
  - 주입량 : 10 µl
  - 유 속 : 1.0 ml/min
  - 검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장: 342 nm)
  - 온도 : 30℃
  - Gradient 조건

min	H <sub>2</sub> O with 0.5% acetic acid	MeOH
0.0	62.0	38.0
14.0	58.0	42.0
17.0	55.0	45.0
18.0	52.0	48.0
32.0	50.0	50.0
40.0	15.0	85.0
45.0	0.0	100.0

- 계산 : 표준액 5개(1000, 500, 250, 125, 62.5 ppm)를 주입하여 얻은 피크면적으로 검량선을 작성하고 검액의 피크면적을 가지고 농도를 구하여 함량을 계산함.
- 잔류용매시험 : 에탄올 5000 ppm 이하. 이 원료를 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 잔류용매시험법에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
- 잔류농약시험
  - DDT : 0.1 ppm 이하
  - BHC : 0.2 ppm 이하
  - Aldrin Dieldrin Endrin : 0.01 ppm 이하.
- 이 원료를 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 생약시험법의 잔류농약시험법에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
- 미생물한도시험
  - 총 호기성미생물수 : 100000/g 이하
  - 총 진균수 : 100/g 이하



- 특정미생물 : 불검출.
- 원료를 가지고 대한민국약전 일반시험법 중 미생물한도시험법에 따라 시험할 때 적합하여야 함.
- 보관조건 : 실온(1 ~ 30°C)보관, 차광 기밀용기

DuraeCorpration  
 Dangeong-ro 56, Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-832, South Korea  
 Tel : +82-31-397-6066 Fax : +82-31-397-5322

DATE: September.09. 2016

## Certificate of Analysis

Product Name : 곰보배추농축액  
 Lot No.: GB1600100Y  
 Manufacturing date: 2016.08.26  
 Expiry data: 2019.08.25  
 Net weight: 5kg×2ea, 500g×1ea

시험항목	기준	시험결과
성상	Brownish black viscous liquid Special odor	적합
확인시험	1) TLC에 의한 확인 2) HPLC에 의한 확인	적합 적합
비중	-	-
건조감량	7.30% 이하	7.05%(2g, 105℃, 5시간)
회분	4.50% 이하	4.28%(2g, 550℃, 4시간)
정량법	Luteolin-7-glucoside Rosmarinic acid	2.92% 8.62%
미생물 한도시험	(1)세균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (2)진균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (3)대장균: 불검출 (4)녹농균: 불검출 (5)황색포도상구균: 불검출 (6)살모넬라균: 불검출	시험 중

- \* Shelf life : 36 months
- \* Storage : Tightly sealed , Keep in cool place(refrigerator) and Avoid direct Sunlight

Certified by  
 Name: Yeom Myeong Hun  
 Signature:   
 Position: Director

[그림 22] 곰보배추 농축액에 대한 COA

DuraeCorpration  
 Dangeong-ro 56, Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-832, South Korea  
 Tel : +82-31-397-6066 Fax : +82-31-397-5322

DATE: September.09. 2016

## Certificate of Analysis

Product Name : 곰보배추농축액:1,3-BG(1:1)

Lot No.: GB1600100Y

Manufacturing date: 2016.08.26

Expiry data: 2019.08.25

Net weight: 5kg×2ea, 500g×1ea

시험항목	기준	시험결과
성상	Brownish black viscous liquid Special odor	적합
확인시험	1) TLC에 의한 확인	적합
	2)HPLC에 의한 확인	적합
비중		1.150
건조감량	53.0% 이하	51.21%(2g, 105℃, 5시간)
회분	2.20% 이하	2.06%(2g, 550℃, 4시간)
정량법	Luteolin-7-glucoside	1.35%
	Rosmarinic acid	4.35%
미생물 한도시험	(1)세균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하	시험 중
	(2)진균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하	
	(3)대장균: 불검출	
	(4)녹농균: 불검출	
	(5)황색포도상구균: 불검출	
	(6)살모넬라균: 불검출	

\* Shelf life : 36 months

\* Storage : Tightly sealed , Keep in cool place(refrigerator) and Avoid direct Sunlight

Certified by

Name: Yeom Myeong Hun

Signature: 

Position: Director

[그림 23] 곰보배추 농축액1,3-BG(1:1)에 대한 COA



DuraeCorpration  
 Dangeong-ro 56, Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-832, South Korea  
 Tel : +82-31-397-6066 Fax : +82-31-397-5322

DATE: September.09. 2016

## Certificate of Analysis

Product Name : 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)

Lot No.: GB1600100Y

Manufacturing date: 2016.08.26

Expiry data: 2017.08.25

Net weight: 5kg×2ea, 500g×1ea

시험항목	기준	시험결과
성상	Brownish black viscous liquid Special odor	적합
확인시험	1) TLC에 의한 확인 2)HPLC에 의한 확인	적합 적합
비중	1.000~1.300	1.150
건조감량	60.86% 이하	51.21%(2g, 105℃, 5시간)
회분	2.45% 이하	2.06%(2g, 550℃, 4시간)
정량법	Luteolin-7-glucoside 1.23%이상 Rosmarinic acid 3.82이상	1.35% 4.35%
미생물 한도시험	(1)세균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (2)진균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (3)대장균: 불검출 (4)녹농균: 불검출 (5)황색포도상구균: 불검출 (6)살모넬라균: 불검출	적합

- ※ Shelf life : 12 months
- ※ Storage : Tightly sealed , Keep in cool place(refrigerator) and Avoid direct Sunlight

Certified by

Name: Yeom Myeong Hun

Signature:

Position: Director



[그림 24] 1 batch 원료에 대한 COA

DuraeCorpration  
 Dangeong-ro 56, Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-832, South Korea  
 Tel : +82-31-397-6066 Fax : +82-31-397-5322

DATE: September.13. 2016

## Certificate of Analysis

Product Name : 배암차즈기95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)

Lot No.: GB1600200Y

Manufacturing date: 2016.09.13

Expiry data: 2017.09.12

Net weight: 5kg×5ea

시험항목	기준	시험결과
성상	Brownish black viscous liquid Special odor	적합
확인시험	1) TLC에 의한 확인 2)HPLC에 의한 확인	적합 적합
비중	1.000~1.300	1.190
건조감량	60.86% 이하	49.93%(2g, 105℃, 5시간)
회분	2.45% 이하	2.01%(2g, 550℃, 4시간)
정량법	Luteolin-7-glucoside 1.23%이상 Rosmarinic acid 3.82이상	1.40% 4.25%
미생물 한도시험	(1)세균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (2)진균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (3)대장균: 불검출 (4)녹농균: 불검출 (5)황색포도상구균: 불검출 (6)살모넬라균: 불검출	적합

※ Shelf life : 12 months

※ Storage : Tightly sealed , Keep in cool place(refrigerator) and Avoid direct Sunlight

Certified by

Name: Yeom Myeong Hun

Signature:

Position: Director

[그림 25] 2 batch 원료에 대한 COA

DuraeCorpration  
 Dangeong-ro 56, Gunpo-si, Gyeonggi-do 435-832, South Korea  
 Tel : +82-31-397-6066 Fax : +82-31-397-5322

DATE: September.19. 2016

## Certificate of Analysis

Product Name : 배암차즈기95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)

Lot No.: GB1600300Y

Manufacturing date: 2016.09.19

Expiry data: 2017.09.18

Net weight: 5kg×4ea, 2kg×1ea

시험항목	기준	시험결과
성상	Brownish black viscous liquid Special odor	적합
확인시험	1) TLC에 의한 확인 2)HPLC에 의한 확인	적합 적합
비중	1.000~1.300	1.158
건조감량	60.86% 이하	51.02%(2g, 105℃, 5시간)
회분	2.45% 이하	2.06%(2g, 550℃, 4시간)
정량법	Luteolin-7-glucoside 1.23%이상 Rosmarinic acid 3.82이상	1.35% 4.12%
미생물 한도시험	(1)세균: 1×10 <sup>6</sup> 개/g 이하 (2)진균: 1×10 <sup>5</sup> 개/g 이하 (3)대장균: 불검출 (4)녹농균: 불검출 (5)황색포도상구균: 불검출 (6)살모넬라균: 불검출	적합

\* Shelf life : 12 months

\* Storage : Tightly sealed , Keep in cool place(refrigerator) and Avoid direct Sunlight

Certified by

Name: Yeom Myeong Hun

Signature:

Position: Director



[그림 26] 3 batch 원료에 대한 COA

## 6. 대량생산된 원료의 안정성 시험

- 화장품 안정성 시험은 화장품의 저장방법 및 사용기한을 설정하기 위하여 경시변화에 따른 품질의 안정성을 평가하는 시험으로,化妆품을 제조된 날부터 적절한 보관조건에서 성상·품질의 변화 없이 최적의 품질로 이를 사용할 수 있는 최소한의 기한과 저장방법을 설정하기 위한 기준을 정하는데 있음.
- 이미 곰보배추 추출물을 이용한 화장품원료의 대량생산은 완료 되었음. 화장품원료의 경우 통상적으로 운반 및 보관과정에서 극한적인 온도 및 압력조건에 제품이 노출 되는 것을 생각하여 품질관리상 중요한 항목 및 분해산물의 생성유무를 확인 하는 실험으로 85~90℃에서 변질 여부를 확인하는 방법으로 안정성 시험을 진행함. 이는 보통 화장품 원료(추출물 등)는 45℃에서 3개월, 빛 광조 1개월 동안 실험으로 안정성을 확인하지만 과제 일정상 이를 대체하여 85~90℃에서 중탕하여 3시간 후 확인하는 방법으로 대체하여 진행 완료함.
- 3 batch 안정성 시험
  - 가 속 : 알루미늄봉투/화이바드럼과 PE 비닐봉투/ 알루미늄봉투/화이바드럼으로 포장한 경우에는 가속조건에서 6개월간 안정하였으며 원료 포장용기로 사용하기에 적합함.
  - 가 혹 : 가혹 조건에서 성상 변화나 분해산물 등이 검출 되지 않고 모두 안정한 것으로 나타남.
  - 장기보존 : 알루미늄봉투/화이바드럼과 PE 비닐봉투/ 알루미늄봉투/화이바드럼으로 포장한 경우에는 장기보존 조건에서 24개월간 안정 하였으며 이중비닐봉투/화이바드럼은 설정된 기준을 벗어남. 3가지 포장형태 모두 36개월 안정성 시험 결과, 안정한 것으로 나타남.



[그림 27] 1-3 원료에 대한 안정성 테스트

**7. 원료추출물의 대량 생산 및 공급**

- 임상 및 시작품 제작을 위한 원료의 지속적인 대량 생산 및 공급을 위해 지속적으로 (주)두래와 용역 계약 체결을 유지하여 재배된 곱보배추 원물을 이용한 3 batch 원료를 생산함.

**8. 대량생산된 원료의 지속적인 QC/QA**

- Luteolin-7-glucoside와 Rosmarinic acid를 지표성분으로 지속적인 함량평가 및 건조감량, 중금속, 잔류 농약 분석 등을 통한 원료 품질 일원화함.
- 3 batch 원료에 대한 함량분석 결과 Luteolin-7-glucoside와 Rosmarinic acid의 함량이 1.23% 이상과 3.82% 이상으로 확인되었음. 또한 3 batch 원료에 대한 건조감량, 중금속, 미생물 한도시험 결과 기준치 이하로 확인되었음.

Sample(농축액:1,3-BG)	표준품	함량(%)
75:25	Luteolin-7-Glc	3.38
	Rosmarinic acid	4.58
50:50	Luteolin-7-Glc	2.19
	Rosmarinic acid	3.43
25:75	Luteolin-7-Glc	1.09
	Rosmarinic acid	1.75

[표 7] 곱보배추 농축액 함량분석 결과

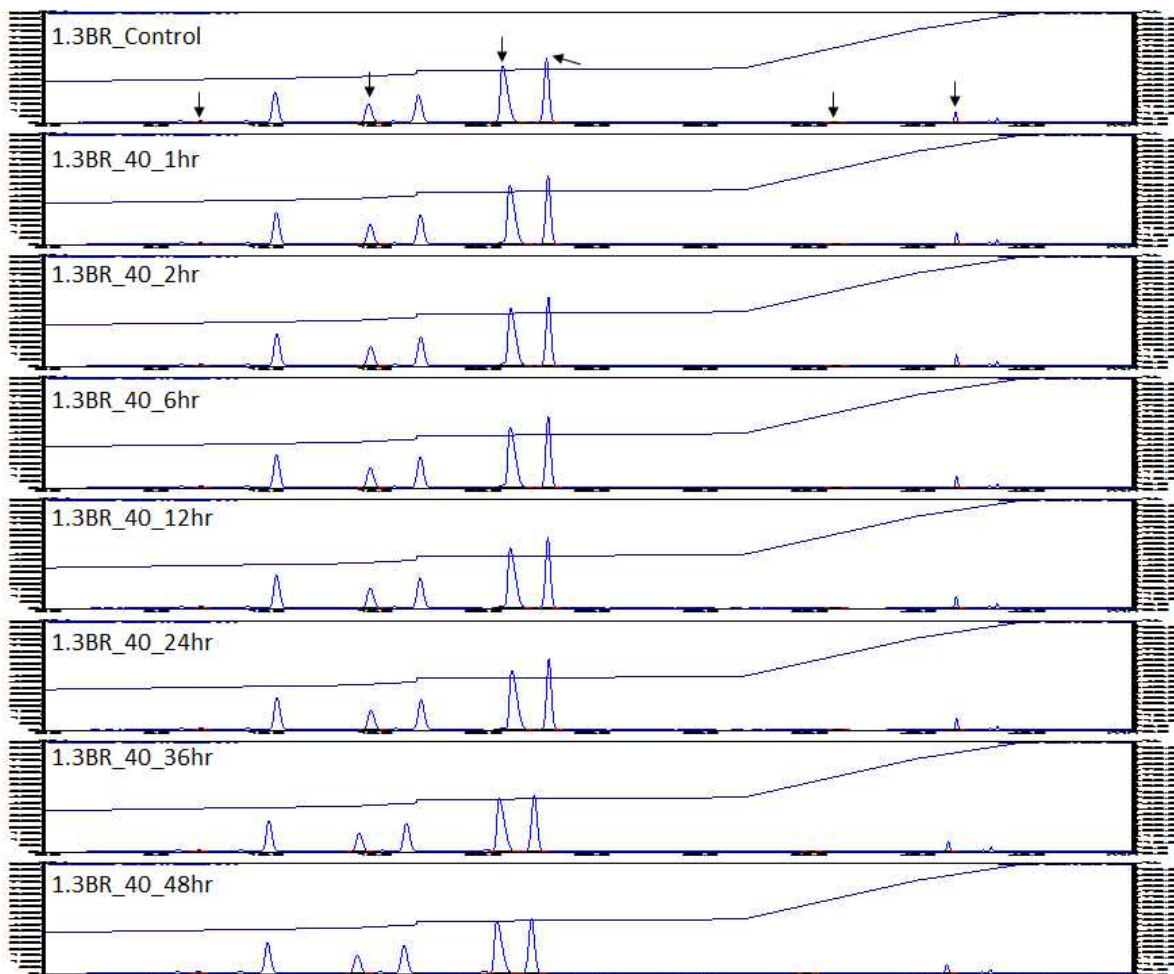
**9. 대량생산된 원료의 지속적인 장기 안정성 시험**

- 사용기한 설정을 위한 보관, 운반, 사용 조건에 따른 물리적, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성 평가함.
- 알루미늄봉투/화이바드럼과 PE비닐봉투/알루미늄봉투/화이바드럼으로 포장한 경우에는 가속조건에서 6개월간 안정하였으며, 가혹 조건에서 성장변화나 분해산물이 검출되지 않음. 또한 장기보존 조건에서 24개월간 안정하였음.

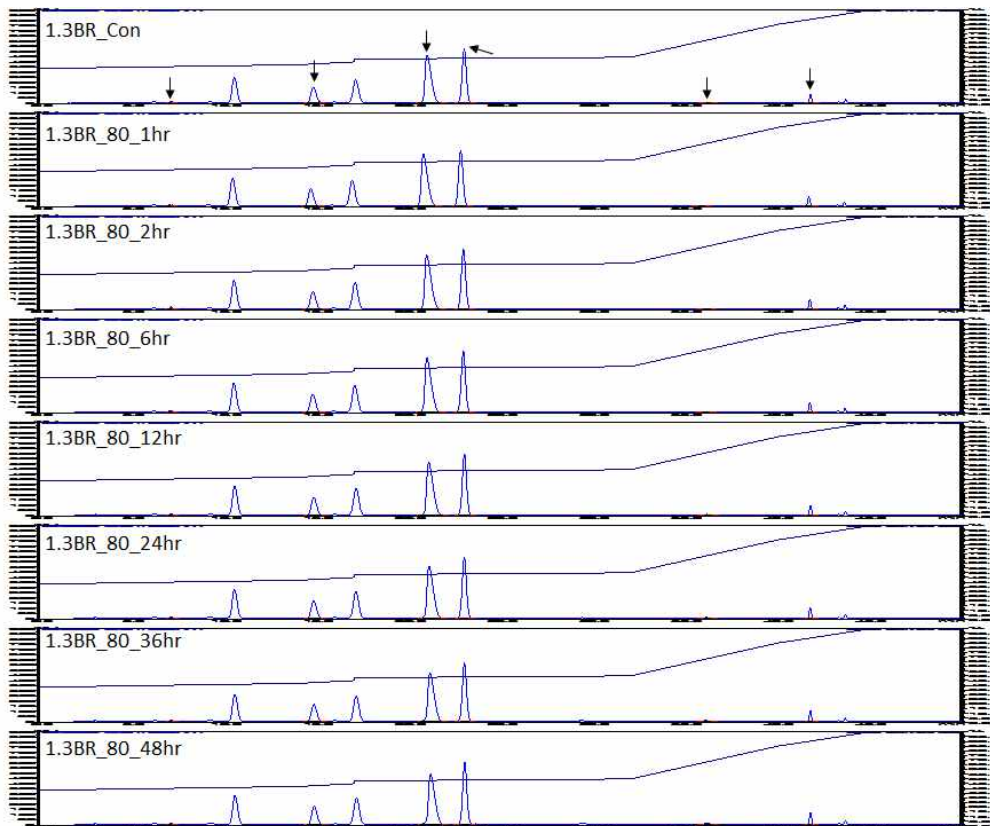
**(1) 대표적인 1 batch 원료에 대한 안정성 시험**

- 1 batch 원료 (곱보배추 농축액 : 1,3-BG = 50 : 50 혼합물)에 대한 안정성 실험을 진행하였음.
- 기존 선행 연구에 따르면 지표화합물인 rosmarinic acid 화합물은 원산지 및 재배 조건뿐만 아니라 건조 환경과 보관 방법 등의 유통 과정에 따라 함량의 차이가 나타나는 것으로 보고되어 있음. 따라서 1 batch 원료가 온도와 자연광선에 의해 함량의 변화가 나타나는지 여부를 조사하고자 본 실험을 수행하였음.
- 먼저 온도에 따른 안정성 실험은 1 batch 원료 1 g을 정밀하게 취하여 밀폐유리용기에 담고 오븐 내에서 (40 및 80℃) 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48시간까지 보관이후에 설정된 지표화합물이 어떻게 변화하는지 분석하였음.
- 자연광선에 의한 안정성 실험은 상기 내용과 동일한 방법으로 원료를 취한 후 일출시간과 일몰시간을 고려하여 하루 8시간 동안 태양 광선을 조사하였으며 마찬가지로 1, 2, 6, 12, 24, 36, 48시간까지 자연광선을 조사한 이후 지표화합물의 변화를 분석하였음. 분석은 상기 설정한 분석조건과 방법을 이용하여 화합물 변화를 추적하였음.

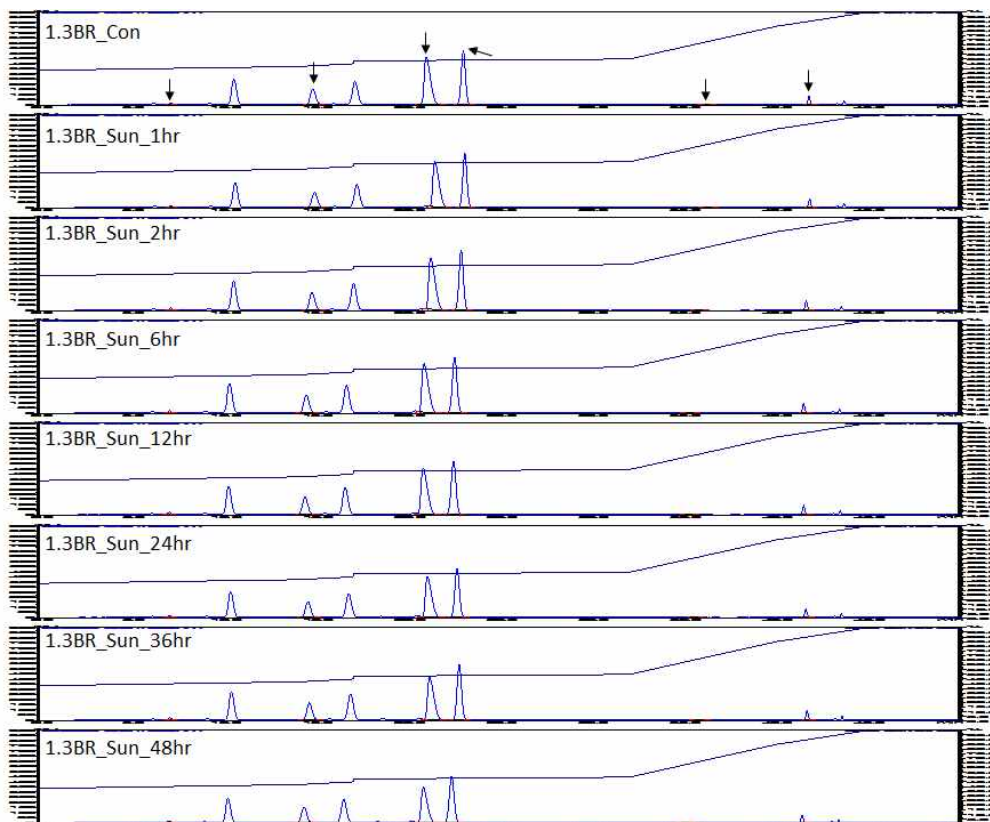




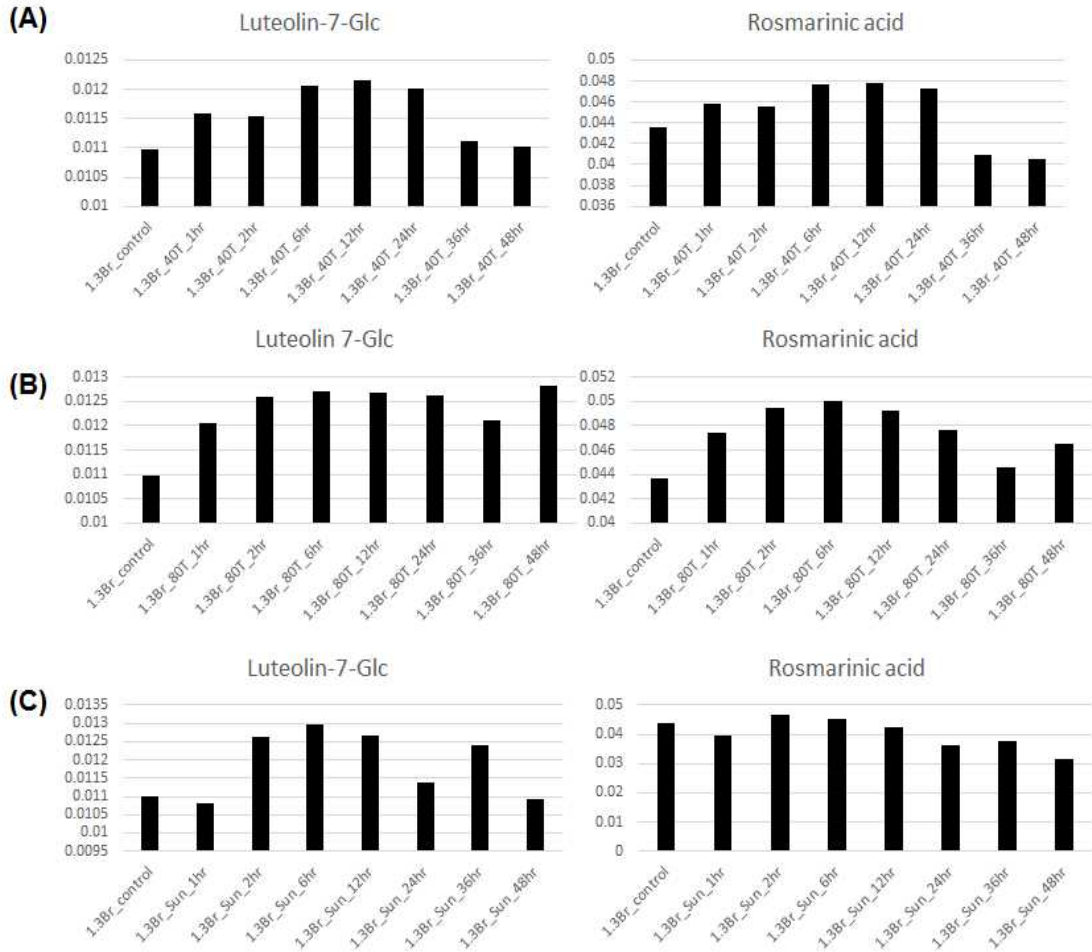
[그림 28] 온도(40°C)에 따른 1 batch 원료의 크로마토그램



[그림 29] 온도(80℃)에 따른 1 batch 원료의 크로마토그램



[그림 30] 자연광선에 따른 1 batch 원료의 크로마토그램



[그림 31] 온도 및 자연광선에 따른 1 batch 원료의 지표화합물 변화

- 1 batch 원료의 온도 및 자연광선에 따른 안정성 실험 결과 온도를 가한 조건에서는 (40, 80°C) 40시간 지난 이후에 luteolin 및 rosmarinic acid 화합물의 함량이 약간 감소하는 경향을 보였으나 자연광선을 조사한 실험 군에서는 48시간 조사한 이후에도 큰 변화량을 보이지 않은 것을 확인하였음.



1. 천연물 화장품 원료 최적화 연구

(1) 원료 수준의 화학적 특성 변화 분석

(가) 곰보배추 (KR-600)의 부위별 지표 화합물 6종의 함량 평가

- 실험방법 : 곰보배추를 분쇄기를 사용하여 파우더 상태로 분쇄 → 건조 무게에 대한 5배의 에탄올을 추출 용매로 설정 → 추출기로 70℃, 5시간 동안 추출 → 추출액 온도가 30℃ 아래로 내려가도록 실온에서 방치.
- 실험결과 : 곰보배추 뿌리가 포함된 전초보다 지상부의 추출 수율이 우수함.

[표 1] 곰보배추 부위별 지표 화합물 함량 분석

	추출 수율	Caffeic acid	Lute.-7-Glc	Rosmarinic acid	Homoplan-tagin	Luteolin	Hispidulin
곰보배추 전초 (3kg)	10.50%	12.3	394.4	1895.7	537.7	10.6	15.3
곰보배추 지상부 (2.1kg)	12.35%	10.9	574.8	1634.5	634.6	13.2	16.9

(나) 곰보배추 (KR-600)의 부위별 IL-6/STAT3 활성 평가

- 곰보배추 전초와 지상부의 IL-6/STAT3 활성 평가 결과, 차이를 판단하기 어려움. 곰보배추 뿌리와 열수추출물은 IL-6/STAT3 활성 없음.

(다) 곰보배추 채취시기 (곰보배추의 크기)별 함량 평가

- 곰보배추의 뿌리 및 줄기가 길게 성장하면서 잎의 크기는 점차 작아지고, 줄기 색이 보라색으로 나타나는 특징을 나타냄.

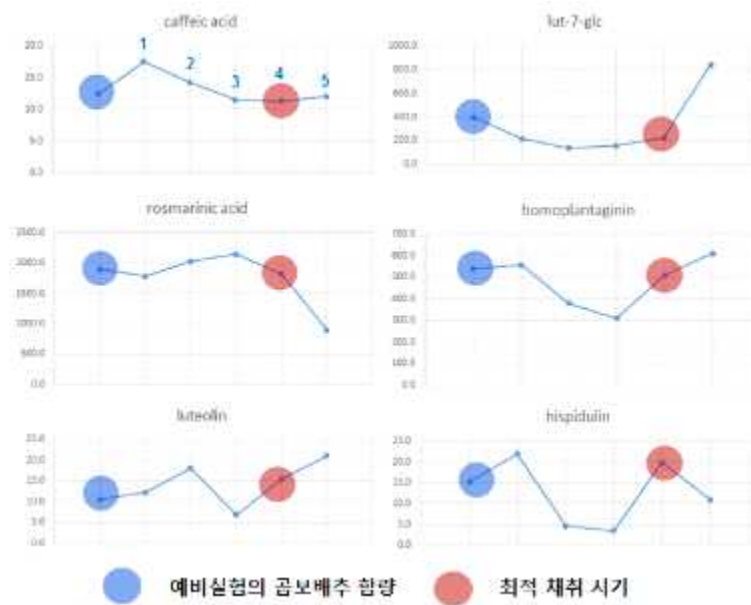


[그림 1] 채취시기에 따른 곰보배추의 크기

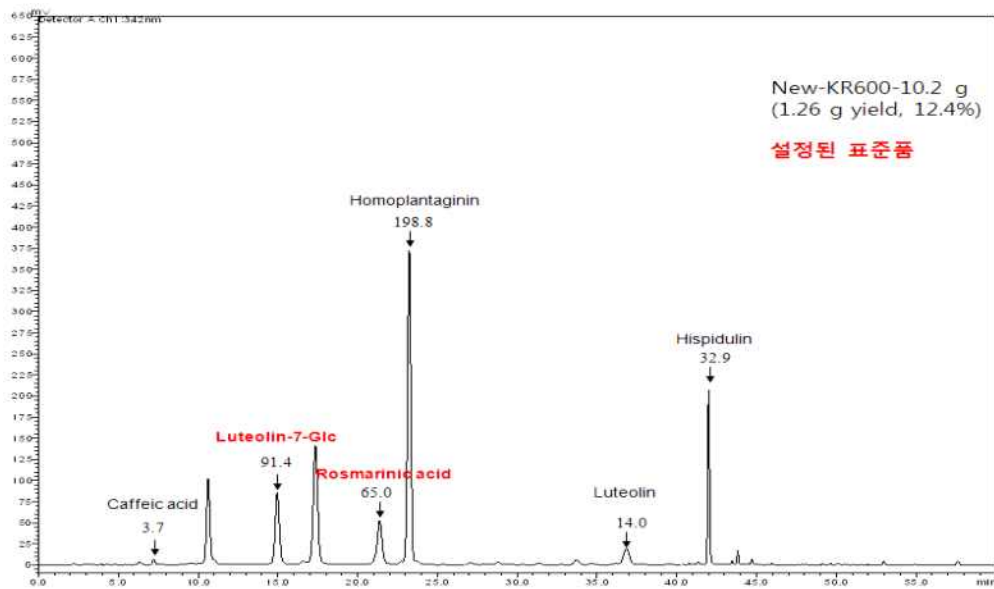
[표 2] 곰보배추 채취시기별 함량 평가

	Caffeic acid	Lute.-7-Glc	Rosmarinic acid	Homoplan-tagin	Luteolin	Hispidulin
곰보배추 전초 (3kg, 추출기)	12.3	394.4	1895.7	537.7	10.6	15.3
1	17.5	217.9	1784.0	556.3	12.2	21.8
2	14.2	139.8	2030.6	379.0	18.1	4.7
3	11.5	155.3	2144.6	311.0	6.8	3.5
3 (X15 volume)	11.0	152.0	2106.2	277.8	6.7	3.3
4	11.2	225.1	1819.6	508.4	15.4	19.8
5	12.0	839.3	893.8	610.5	21.1	11.0

- 각 채취시기에 따른 1차 지표물질의 함량을 그림으로 나타냄. 4번 시기의 곰보배추가 예비 실험과 가장 유사한 함량 분포를 나타내었으므로 최적 채취 기준 시기로 선정함.



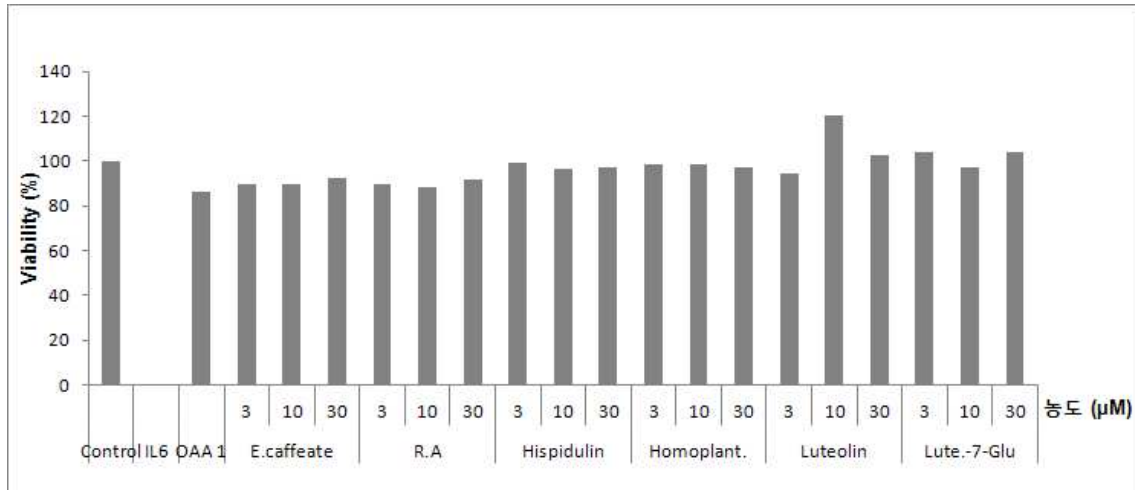
[그림 2] 곰보배추 1차 지표물질 함량



[그림 3] 곰보배추 1차 지표물질 프로파일링

(라) KR-600의 지표 화합물 6종의 IL-6/STAT3 활성 평가

- Hispidulin과 Luteolin에 대한 IL-6/STAT3 억제 활성은 기 보고 되어 있음. 가장 큰 함량을 갖는 rosmarinic acid, luteolin-7-glucoside, homoplantaginin은 IL-6/STAT3 억제 활성이 미약한 것으로 나타남.



[그림 4] 곰보배추 1차 지표물질 IL-6/STAT3 활성 평가

## (2) 원료 수준에서의 유효성분 함량 변화 분석

(가) 실험별 함량 평가

- 추출기와 heating mantel 회의 추출조건은 동일함. 함량 평가 결과의 차이가 존재하나, 동일 반복의 경우에는 기준에 부합하는 것으로 나타남.

[표 3] 실험별 곰보배추 1차 지표물질 함량 평가

추출법	시료	Caffeic acid	Lute.-7-Glc	Rosmarinic acid	Homoplan-tagin	Luteolin	Hispidulin
추출기 사용	전초 (3Kg)	12.3	394.4	1895.7	537.7	10.6	15.3
	전초 기준 80%	9.8	315.5	1516.5	430.2	8.5	12.2
	전초 기준 120%	14.8	473.3	2274.8	645.3	12.7	18.3
	지상부 (2.1Kg)	10.9	574.8	1634.5	634.6	13.2	16.9
	지상부 기준 80%	8.7	459.8	1307.5	507.7	10.5	13.6
	지상부 기준 120%	13.1	689.7	1961.3	761.5	15.8	20.3
heating mantel 사용	전초 (10 g)-1	15.4	317.8	1912.1	524.3	12.3	17.0
	지상부 (10 g)-1	14.8	229.6	1930.4	396.8	12.4	22.1
	전초 (10 g)-2	13.5	450.1	1715.1	539.5	10.1	14.6
	지상부 (10 g)-2	13.8	290.7	1826.5	523.4	10.8	16.7
	전초 (50 g)	12.0	485.8	1661.5	557.6	11.6	16.9
	지상부 (50 g)	11.5	400.9	1716.0	570.0	10.7	14.8
추출기 사용	전초 (250 g)	12.3	319.8	1835.0	474.9	11.0	16.4
	전초 (500 g)	12.4	316.9	1847.0	479.6	11.1	16.6

(나) 추출 조건별 결과

- 질마재 1차 곰보배추와 2차 곰보배추의 함량 자체 차이가 있음. 한국생명공학연구원에서는 luteolin-7-glucoside 약 4배, rosmarinic acid 약 3배의 차이가 확인되었으며 동방FTL에서는

luteolin-7-glucoside 약 6배, rosmarinic acid는 약 2배의 차이가 확인됨.

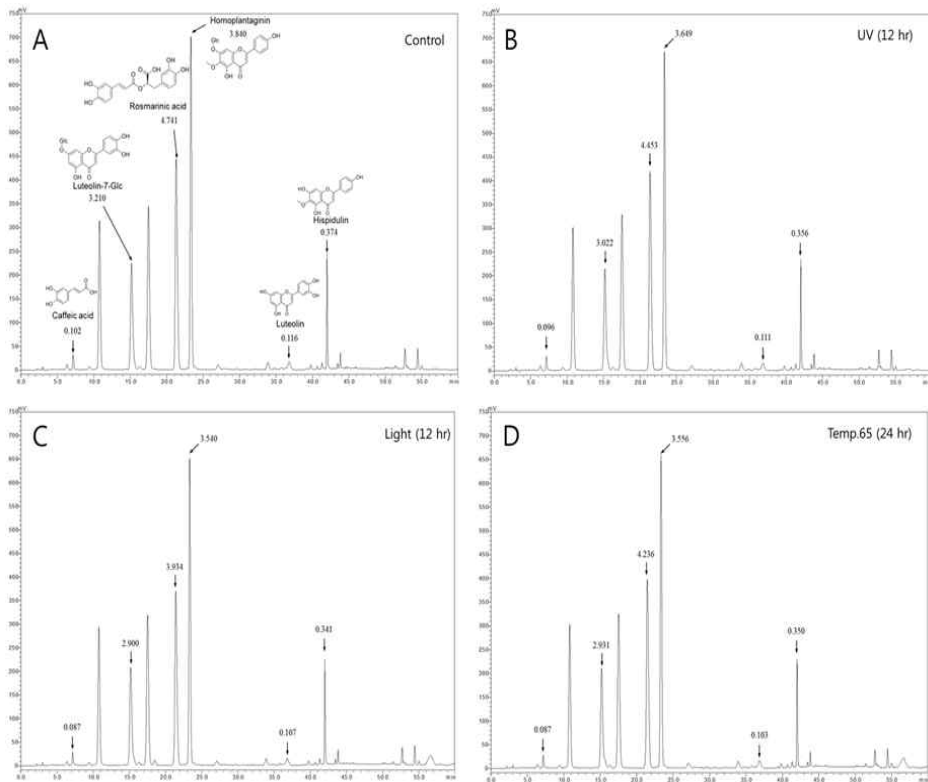
- 추출 조건별로 수율은 높아지나, 표준품의 함량 증가는 없는 것으로 판단됨.
- 전초와 지상부의 두 표준품 lut와 ros의 비율은 전초가 지상부에 비해 더 큰 것으로 확인됨.

(다) 원료 수준의 물리 화학적 안정성 조사

- 곰보배추 에탄올 추출물에 함유돼 있는 polyphenol 성분들이 빛, 온도 변화에 따라 변화하는지 원료 수준에서 안정성 실험을 실시하였음. 곰보배추 에탄올 추출물은 UV(12시간), 햇빛(12시간) 및 65도에서 노출(24시간)시킨 후 1차 지표성분인 6가지 polyphenol 성분들의 함량 변화를 HPLC로 분석한 결과, 각각의 조건에서 곰보배추 에탄올 추출물에 함유된 6가지 polyphenol 성분들의 함량변화가 관찰되었음. 특히 12시간 일광노출 시 caffeic acid 및 rosmarinic acid의 함량은 각각 control과 비교하여 15%, 17% 감소하였으며, 65도 오븐에서 24시간 보관시 caffeic acid, rosmarinic acid, luteolin의 함량이 각각 15%, 11%, 11% 감소하는 경향을 보였음. 이상의 실험결과를 참고로 다음 년도에는 정확한 안정성 시험을 실시할 계획임.

[표 4] 곰보배추 에탄올 추출물에 대한 6가지 polyphenol 성분들의 함량변화

	함량(µg/mg)					
	Caffeic acid	Luteolin-7-Glc	Rosmarinic acid	Homoplantagin	Luteolin	Hispidulin
Control	0.102	3.210	4.741	3.840	0.116	0.374
UV	0.096	3.022	4.453	3.649	0.111	0.356
Light	0.087	2.900	3.934	3.540	0.107	0.341
Temp.65	0.087	2.931	4.236	3.556	0.103	0.350

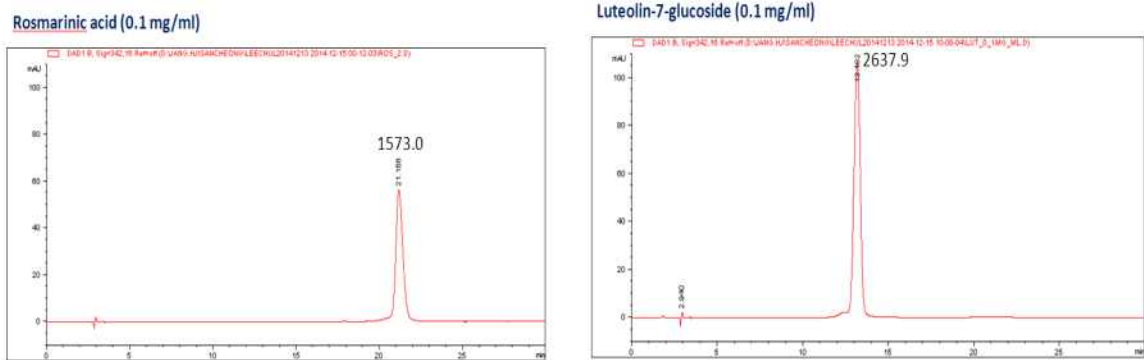


[그림 5] 곰보배추 에탄올 추출물에 대한 HPLC 크로마토그램

A: control; B: UV 12시간 조사; C: 햇빛 12시간 일광노출; D: 65도 오븐에서 24시간 보관

### (3) 유효물질 분석법을 통한 최적의 원료 수준의 추출법 확립

#### (가) 유효물질 분리분석

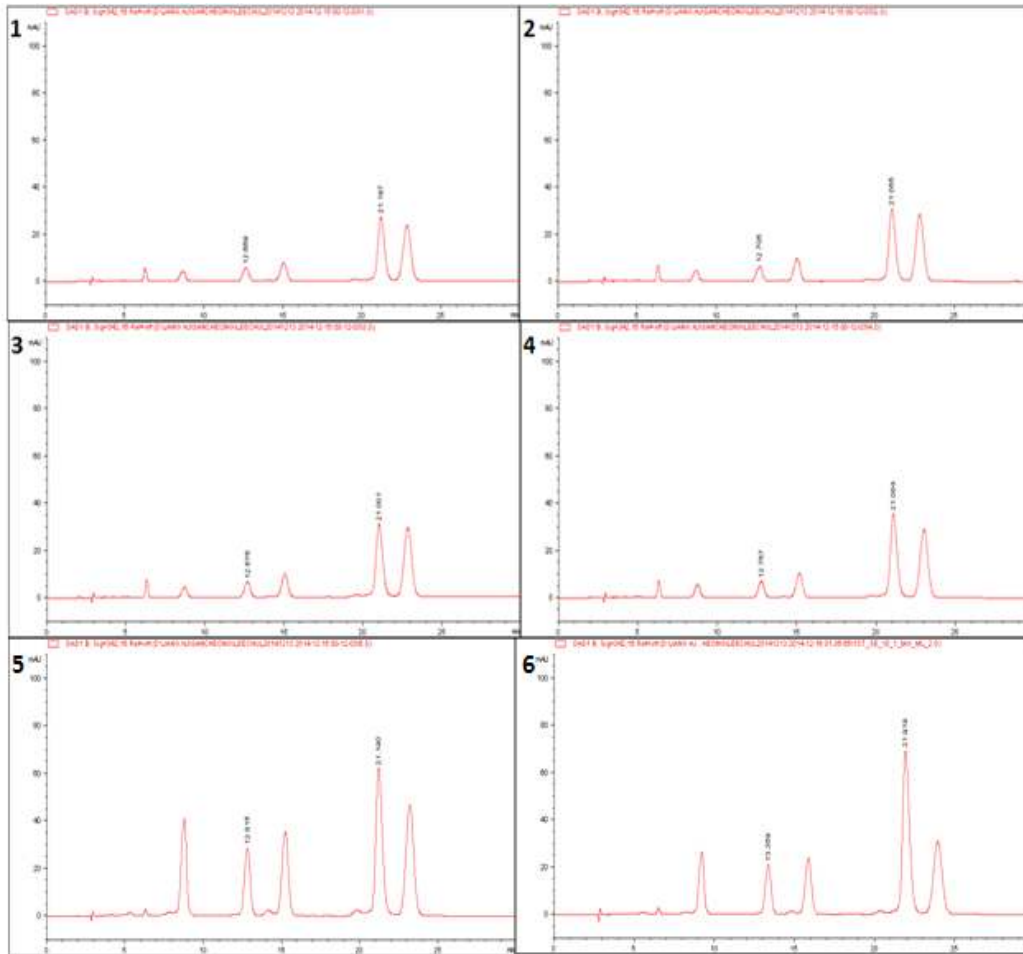


[그림 6] 유효물질 2종의 분리분석법

- 6종의 1차 지표물질 중, rosmarinic acid와 luteolin-7-glucoside의 2종을 유효물질로 선정함. 각 추출 조건별로 rosmarinic acid, luteolin-7-glucoside 분리분석법을 통해 최적의 추출법을 확립함.

#### (나) 추출 조건별 결과

- 질마재 1차 곱보배추와 2차 곱보배추의 함량 자체 차이가 있음. 한국생명공학연구원에서 luteolin-7-glucoside 약 4배, rosmarinic acid 약 3배의 차이가 확인되었으며 동방FTL에서는 luteolin-7-glucoside 약 6배, rosmarinic acid는 약 2배의 차이가 확인됨.
- 추출 조건별로 수율은 높아지나, 표준품의 함량 증가는 없는 것으로 판단됨.
- 전초와 지상부의 두 표준품 lut와 ros의 비율은 전초가 지상부에 비해 더 큰 것으로 확인됨.

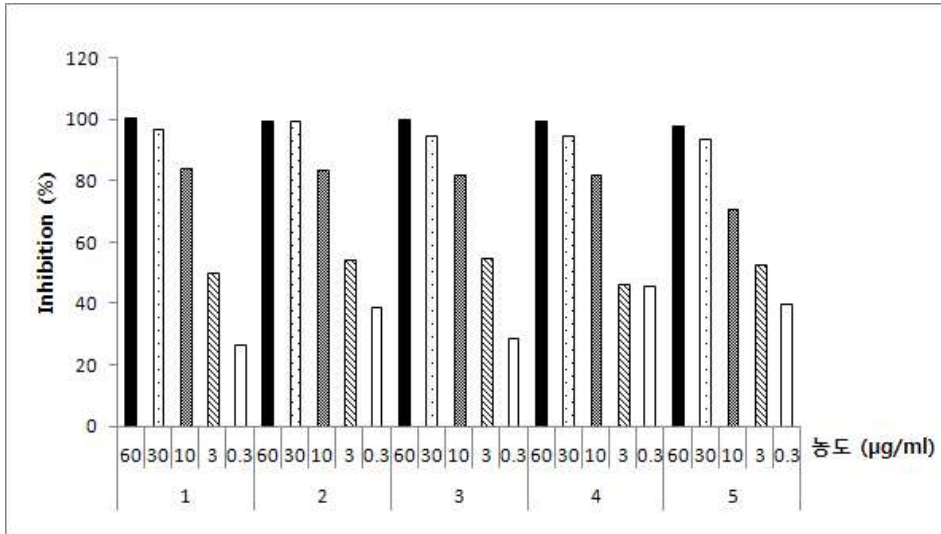


[그림 7] 최적 원료 수준의 추출법 확립

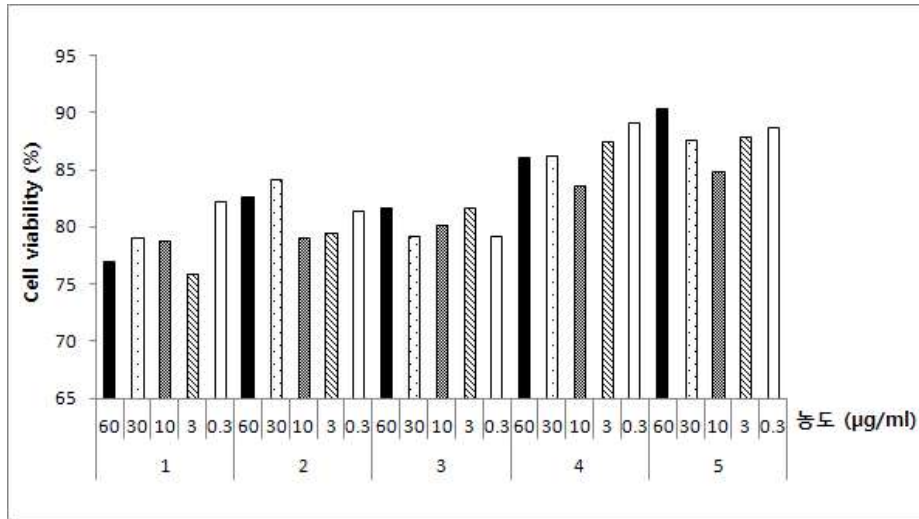
[표5] 원료 추출 조건별 유효물질 분석

샘플	원료 (550g)	상태	용매량	시간	반복 추출 횟수	수율	Luteolin-7-glucoside	Rosmarinic acid	area 구성비 (lut/ros)
참고용	원료 2차	세절	5배	5시간	1회	6.67%	-	-	
1	원료 2차	세절	10배	5시간	1회	9.42%	0.0053	0.0479	약 16.0/84.0
2	원료 2차	세절	5배	5시간	2회	10.86%	0.0060	0.0539	
3	원료 2차	세절	5배	10시간	2회	12.21%	0.0060	0.0541	
4	원료 2차	세절	10배	5시간	2회	14.89%	0.0064	0.0626	
5	원료 1차 (지상부, 2.1 kg)	파우더	5배	5시간	1회	12.35%	0.0271	0.1119	28.0/72.0
6	원료 1차 (전초, 550g)	세절 (rough)	10배	5시간	1회		0.0192	0.1257	20.3/79.7

- 원료 2차, 세절, 1회의 반복 추출의 샘플 1을 추출 조건으로 최종 선정함.
- 추출 조건별 IL-6/STAT3-dependent luciferase assay 및 cell viability 결과, 함량 차이와는 별도로 IL-6/STAT3 및 세포 독성의 차이는 없는 것으로 판단됨.



[그림 8] 추출 조건별 IL6/STAT3-dependent luciferase assay 결과



[그림 9] 추출 조건별 Cell viability 결과

- 따라서, 건조 조건에 따라 원물 시료의 total pheolic compound degradation 된 것으로 판단되나 IL-6/STAT3 활성의 변화는 없는 것으로 미루어 phenolic compound를 제외한 활성 화합물의 함량은 큰 변화가 없을 것으로 예상됨.
- 질마재 2차 곰보배추의 경우 전초에 가까워 기존의 함량 기준에 비교하여 luteolin-7-glucoside는 미달, rosmarinic acid는 초과됨.

[표 6] 유효물질 2종의 구성비

기시범 구축시 사용된 1차 질마재 원물 시료	Lute.-7-Glc	Rosmarinic acid	구성비 (lut/ros)
곰보배추 전초 (3Kg)	394.4	1895.7	17.2/82.8
곰보배추 지상부 (2.1Kg)	574.8	1634.5	26.0/74.0

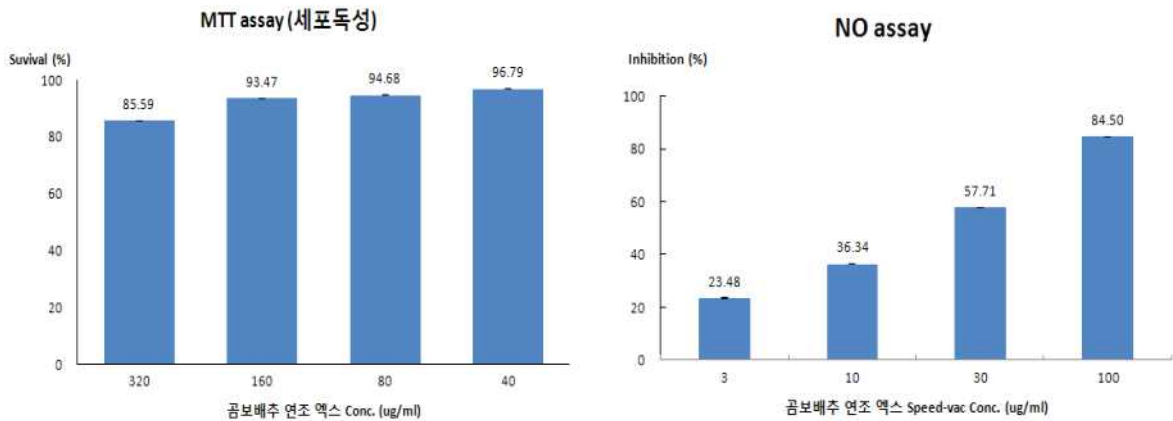


## 2. 최적화된 신규 원료 소재의 효능 검증 평가

(1) In vitro 효능 검증을 통해 최종 화장품용 천연물 원료를 개발하고 이로부터 비고시 기능성 화장품 원료로 개발하여 적용 가능성 검토

### (가) 곰보배추

- 곰보배추 연조 엑스를 이용하여 세포독성시험 (MTT assay)과 NO assay를 수행하였음.



[그림 10] 곰보배추 연조 엑스를 이용한 MTT 및 NO assay 결과

곰보배추 연조 엑스를 이용하여 40, 80, 160, 320ug/ml 각 농도별로 MTT assay를 수행한 결과, dose-dependent한 결과를 나타냈으며 특히 160ug/ml 이하의 농도에서는 곰보배추 연조 엑스가 세포에 독성을 거의 나타나지 않았음을 확인함.

NO assay 역시 dose-dependent한 염증 억제 효능을 보였으며, 100ug/ml에서는 84.5%의 억제능을 보였음.

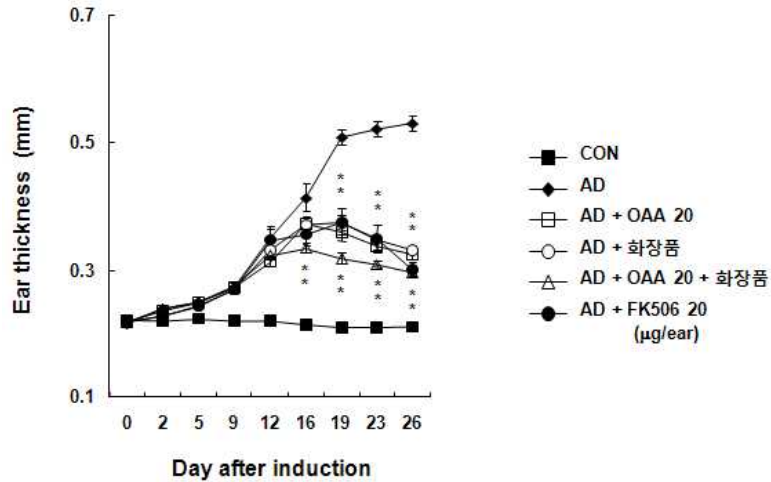
### (2) 소재 후보의 기존 제품 대비 아토피 개선 평가

- 적소두로부터 아토피 증상 완화용 소재를 개발하기 위하여 연구진이 보유한 아토피피부염과 국소피부과민반응 동물모델을 대상으로 효능을 평가함. 집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 적소두 추출물(OAA)은 **아토피 증상을 현저히 개선**시킴. 개선 정도를 귀 두께 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리 실험으로 확인하였음.

#### (가) 귀 두께 비후 개선

- 아토피 동물모델 (Atopic Dermatitis, AD)을 이용하여 적소두 추출물 (OAA) 단독, 아사의 기존 아토피화장품 (AtoMD 20 $\mu$ l/ear), OAA+화장품, 면역억제제군 (일본 후지사의 FK-506) 간의 귀 두께 비후 정도를 비교. 그 결과, OAA+화장품 군이 가장 효과가 좋았으며 시너지 효과가 나타났음을 확인함.

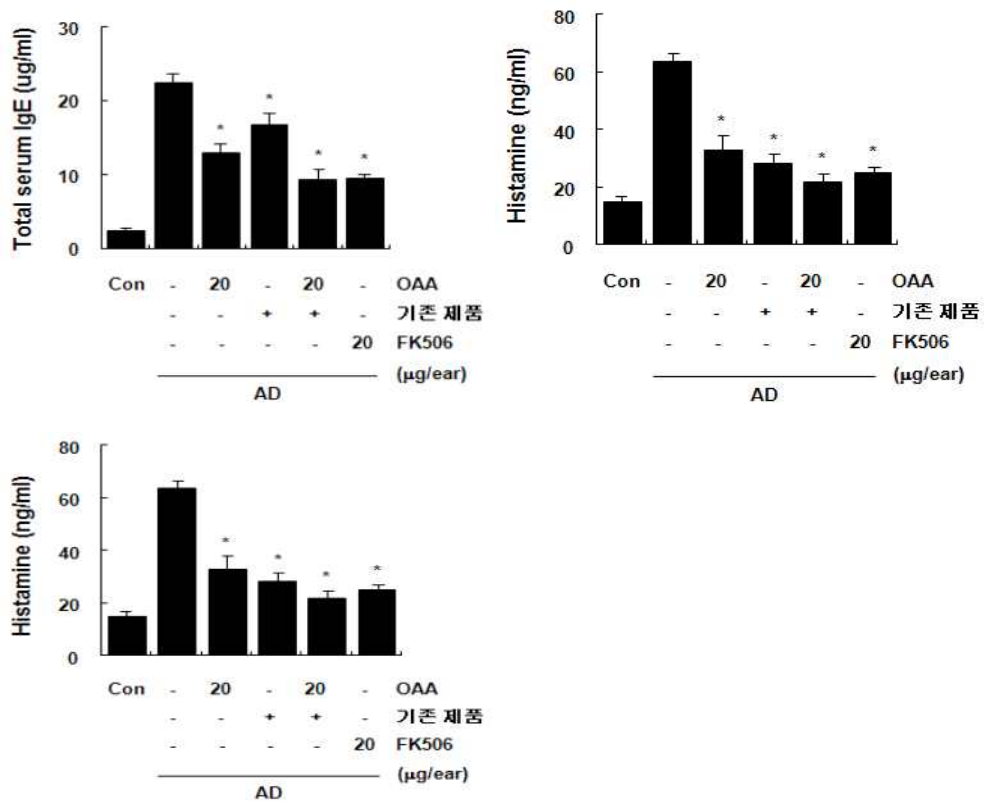




[그림 11] 적소두 추출물과 화장품의 아토피 개선 시너지 효과

(나) 항원특이적 IgE와 히스타민 유리 억제

- 아토피 동물 모델을 이용하여 혈액 내의 total IgE를 측정 한 결과, 적소두 추출물 (OAA)이 IgE 생성을 효과적으로 억제. 아사의 기존 아토피화장품과 아토피 개선에 시너지 효과를 보였으며 면역억제제군 (일본 후지사의 FK-506)과 비슷한 효과를 보임. 뿐만 아니라, OAA가 아토피 및 피부알레르기 유발 물질인 히스타민 유리 억제시킴. 아사의 화장품과 함께 처리했을 때의 히스타민 유리 억제 효과가 가장 좋았음.



[그림 12] 적소두 추출물과 기존 화장품의 아토피 개선 효능 평가

(다) 아토피 개발제품에 대한 시험항목으로 보습력 측정시험 가이드라인 확인  
(화장품 표시·광고 실증을 위한 시험방법 가이드라인 2012.05. -식약처-)

1. 시험장소

평가하는 장소는 공기의 이동이 없고 직사광선이 없으며 항온항습조건(22±2℃, 40-60%)이어야 한다. 피시험자는 시험 장소에서 최소 30분간 피부안정을 취하며 측정할 부위를 노출해 둔 후 측정한다.

2. 측정

피부수분함유도 변화를 Corneometer로 측정하여 시험물질이 피부수분함유도에 미치는 영향을 평가하는 시험이다.

1) 시험일정

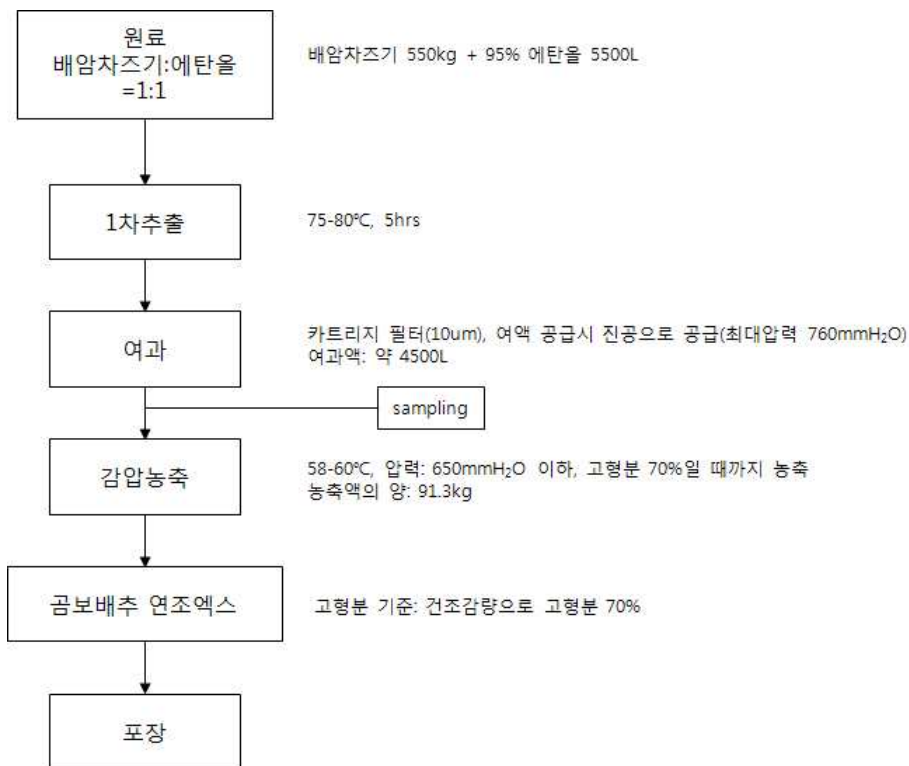
신체 부위 중 일정한 부위를 선택하여 시험물질을 도포하고, 도포 전·후의 피부수분 함유도의 변화를 측정한다. 측정을 시행하는 시점은 시험물질의 용법, 효능 및 유해사례를 고려하여 적절히 결정할 수 있다.

2) 피부수분함유도 평가

피부수분함유도는 Corneometer를 이용하여 측정한 측정치로 평가한다. 동일한 부위에서 3회 이상 측정하여 그 평균값을 채택하여 분석에 사용한다.

(3) 신규 소재의 기준 및 시험법 연구

- 곰보배추의 최적 추출물 제조 공정 확립을 위하여 원료를 에탄올과 배합, 추출 온도 및 시간 등의 항목으로 시험하여 최적의 추출 공법을 확인하였음.
- 곰보배추 원료는 25℃에 에탄올과 1:10의 비율로 투입하며 75~80℃, 5시간 동안 추출함. 32℃, 10μm 카트리지 필터로 여과 후 58~60℃, 고형분 70%일 때까지 농축하며 농축액의 양은 91.3kg임을 확인함.



[그림 13] 곰보배추 추출 및 작업 모식도

### 3. 다양한 제형 설계 및 평가 가능 방법 개발

- 기능성화장품 평가를 위한 식약처 가이드라인 중, 「생체의 피부흡수시험 가이드라인」, 「피부 보습 시험 가이드라인」을 평가 방법을 응용하여 보조적으로 본과제의 아토피 기능성 화장품 제품의 기능성을 확인하는데 적용 계획임.

#### (1) 생체의 피부흡수시험

##### ① 시험원리

- 방사성 동위원소로 표지된 시험물질을 피부 표면에 처리한다. 시험물질을 특정 조건하에서 특정 시간동안 피부에 노출시킨 후 적절한 세척과정을 통해 세척. 수용액(receptor fluid)을 정해진 시간 간격으로 채취하여 시험물질이나 대사물질을 분석.
- 대사활성이 있는 피부를 사용할 때에는 시험물질의 대사산물을 적절한 방법으로 분석. 시험이 끝난 후 시험물질과 그 대사산물의 분포를 정량화.
- 시험 완료 후, 수용액과 시험물질이 처리된 피부를 분석하여 물질의 피부 흡수도를 평가. 수용액의 측정수치만으로 흡수도를 산정할 수 없다면, 피부에 잔류한 시험물질을 피부에 흡수된 것으로 간주. 세척액 내의 시험물질이나 피부층에 남아있는 물질을 분석하여 시험물질의 분포 성향과 회수율과 같은 항목을 추가로 분석할 수 있음.

##### ② 시험방법

- 피부적용
  - 일반적인 시험에서는 시험물질의 농도를 한정적으로 적용. 고체물질의 경우 피부 cm<sup>2</sup>당 1-5 mg, 액체의 경우 cm<sup>2</sup>당 10  $\mu$ l 또는 10 mg까지 도포. 도포량은 시험물질의 예상되는 사용 조건이나 연구 목적, 시험물질의 물리적 성질을 고려. 점도가 낮은 물질의 경우 그 양을 줄일 수 있음.
  - 피부 내 최대흡수율을 유지하기 위해 적용하는 물질의 양을 제한하지 않음. 적용량을 제한하지 않는 시험인 경우, (일반적으로 100  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>이상의 양을 적용) 일정한 유속, 흡수율, Kp 값을 통해 일정한 피부흡수상태를 유지.
  - 균일한 도포를 위해 기구를 사용할 수 있으나, 기구에 남아 있는 시험물질의 양은 시험 완료 후 결과 산출에 반영.
  - 방사선 표지 시험물질은 피부 cm<sup>2</sup>당 14C를 37 kBq (1  $\mu$ Ci)로 적용하는 것이 적용 용량의 흡수율을 측정하는데 적절.
- 피부투과장치의 개폐
  - 정상적인 노출방법을 고려하여, 장치를 개방하거나 폐쇄. 개방형 장치는 시험물질 중 휘발성분이 증발할 수 있음. 또한, 정상적인 건조과정이 있으므로, 피부의 수화에 의한 피부구조 손상을 피할 수 있음.
- 노출 및 시료채취 기간
  - 피부 표면을 세척하면 물질 적용은 종료됨. 피부 노출 시간은 정상적으로 인체에 노출되는 시간과 방법을 고려하여 결정. 피부노출 후 수성비누와 같은 세척제로 세척하여 남아있는 여분의 시험물질을 제거하고, 세척용액은 분석을 위해 회수. 시험물질 제거 과정은 물질의 특성에 따라 달라질 수 있음.
  - 피부흡수시험에서 일반적으로 시료 추출을 24시간동안 하여 검사하고자 하는 시험물질의 피부흡수도를 파악할 수 있는데, 피부는 24시간을 경과되면서 상태가 나빠지므로 시료 추출기간은 24시간을 넘기지 않음. 시료의 채취는 24시간 동안 6-12회로 하나, 시험물질의 피부 흡수도 그래프를 그릴 수 있도록 시료채취빈도를 조절할 수 있음.
- 피부 분리

- 피부층을 신털레이션액 내에서 용해하여 피부내 시험물질의 분포를 정량화하여 시험물질과 대사체를 분석. 피부내 시험물질의 분포를 평가하는 다른 방법을 피부를 세로로 절단하거나 방사능 사진촬영(autoradiography) 또는 confocal microscopy와 같은 시각적 분석 기술을 이용 가능.
- 분석
  - 시험계의 모든 구성 요소가 분석되어야 하며, 회수율이 평가되어야함 (방사능표지물질의 경우  $100 \pm 10\%$  회수를 목표로 하며, 이를 벗어났을 경우 그 이유를 보고서에 명시).
  - 여기에는 시험물질 도포 기구, 공여칸, 피부 세척액, 피부, 수용액 및 수용칸 등이 포함.
  - 경우에 따라 피부를 시험물질 노출부와 비노출 테두리로 구분하기도 하며, 표피, 각질층, 진피로 구분하여 분석 가능.

## (2) 피부 보습 시험

### ① 피험자의 선정

- 만 20세 이상의 성인 남녀 중에서 선정기준에 만족하며 선정제외기준에 해당사항이 없는 사람 20명 이상을 피험자로 선정.
- 선정기준
  - 시험책임자 또는 시험책임자의 위임을 받은 사람이 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 동의서를 작성하고 서명한 자
  - 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자
  - 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자
- 선정제외기준
  - 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성
  - 피부질환 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용하는 사람
  - 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 사람
  - 민감성, 과민성 피부를 가진 사람
  - 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 사람
  - 연구 시작 전 3개월 내에 시험부위에 동일 또는 유사한 효능 화장품 및 의약품 등을 사용한 사람
  - 연구 시작 전 6개월 내에 시험부위에 시술을 받은 사람
  - 그 외 시험책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 사람

### ② 시험부위

- 보습에 관한 피부 측정을 시행할 시험부위는 정확한 측정을 위하여 땀이 적게 나고 외부의 영향을 덜 받는 부위를 선정.

### ③ 시험물질 도포

- 시험물질은 시험담당자 또는 피험자가 시험부위에 도포. 도포횟수는 시험물질의 용법·용량을 원칙으로 하되, 용법·용량이 명확하지 않은 경우 아침과 저녁 2회 도포. 시험물질의 효능 및 유해사례를 고려하여 도포횟수 및 도포총량을 결정할 수 있음.

### ④ 평가




- 피부수분함유도 변화를 Corneometer<sup>®</sup>로 측정하여 시험물질이 피부수분함유도에 미치는 영향을 평가.
- 신체 부위 중 일정한 부위를 선택하여 시험물질을 도포하고, 도포 전·후의 피부수분 함유도의 변화를 측정. 측정을 시행하는 시점은 시험물질의 용법, 효능 및 유해사례를 고려하여 적절히 결정할 수 있음.



- 피부수분함유도는 Corneometer®를 이용하여 측정한 측정치로 평가. 동일한 부위에서 3회 이상 측정하여 그 평균값을 채택하여 분석에 사용.

- 위 식약처 가이드라인을 평가 방법으로 설정하여 아토피 개선 기능 원료의 흡수 증대 및 보습력 평가를 확인하고, 기능성 제품 개발에 적용계획 수립함.

#### 4. 제형의 물성 평가

- 시제품 제작을 위해 총 5회에 걸쳐 한국콜마로부터 Baseline 제작 및 각 회차별 설문조사를 통한 Baseline 제형 설정 진행하였으며, 가격 경쟁력을 위해 콜마, 다쏘엔컴퍼니 등과 화장품 제조회사와 함께 시제품 생산연구 진행 중임.

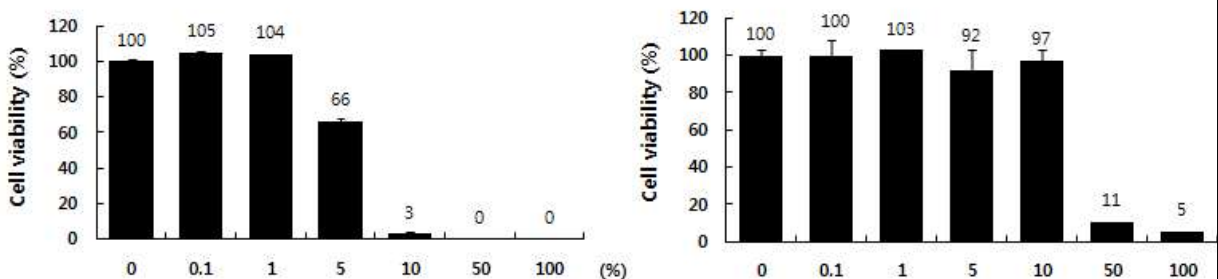
회차	Baseline 사진	특성	설문조사 결과
1차		-고영양감 주는 오일에 폴리올 성분과 고보습 폴리올이 고함량 적용된 제형 -상쾌하고 프레쉬한 은은한 향	-제형의 매트함에 비해 흡수력 및 보습감 부족, 끈적임 남음 -은은한 향이 자극적이지 않아 부담 없음.
2차		-1차 baseline과 동일한 향 적용된 아토피크림 제형	-2차 baseline이 1차 baseline보다 제형이 더 농축된 느낌, 유분감 많음 -1차 baseline의 경우 발림성이 가볍고 바로 흡수되어 끈적임 없이 산뜻한 마무리 -반면, 2차 baseline은 수분감 및 유분감 있는 리치한 제형, 촉촉함이 오래 갈 것 같으나 다소 끈적임 -1차 baseline은 색상이 밝은 화이트 계열이나, 2차 baseline은 어두운 옐로우 계열
3차		-1차 Baseline에서 실리콘 엘라스토머 첨가로 실키한 막감을 부여하여 끈적임을 개선	-촉촉하고 부드러우며 발림성이 뛰어난 -향이 좋음

4차		-2차 Baseline에서 영양감 있는 막감과 고보습감 주는 리포솜 성분을 추가하여 마무리감을 끈적임 적고 보습감 있게 개선	-변질된 듯한 색상 및 향의 거부감 -피부에 도포 시, 유분감 많음
5차		수분감이 느껴지는 유헤타입 보습크림 제형	-색상과 향이 좋으며 크림보다 가벼운 제형으로 산뜻한 마무리감

[표 7] 시작품 제작위한 Baseline 특성 조사

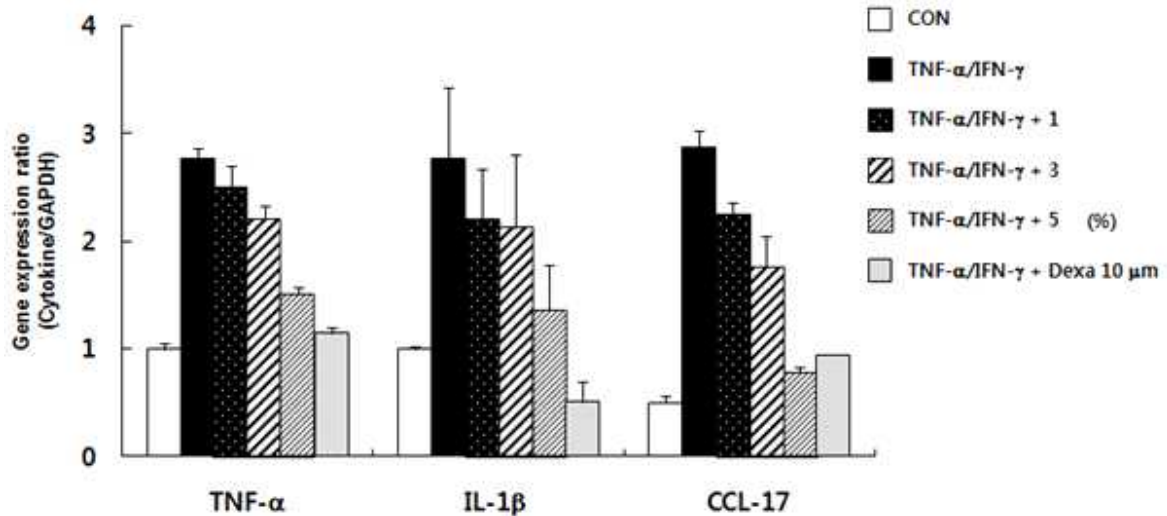
### 5. 제조공정 확립 및 표준화

- 생산된 곰보배추 원료로 제작할 제품의 표준화를 위해, 곰보배추 원료의 효능을 *in vitro* 실험을 통해 평가하였음. 아토피피부염의 대표적인 원인세포 keratinocyte인 HaCaT cell에 곰보배추 원료를 처리하여 cell viability를 확인한 결과, 곰보배추 원료의 10% 이상에서 세포독성을 확인하였으므로 효능 평가 실험은 원료의 5%까지 처리하여 수행하였음.



[그림 14] 곰보배추 원료 효능 평가 위한 cell viability 측정 (L: XTT assay, R: Cell counting)

- 제품 표준화 위한 곰보배추 원료의 효능을 HaCaT cell에 처리하여 확인하였음. 곰보배추 원료의 농도가 높아질수록 아토피 개선 효과가 높아지는 것을 확인할 수 있었으며, 가장 높은 농도로 처리한 곰보배추 원료 5%의 경우는 양성대조군과 비슷한 효능을 나타내었음.



[그림 15] 제품 표준화 위한 원료 효능 평가 in vitro 시험

- 화장품 시작품 제작을 위한 Baseline 제조 및 설문조사를 통한 의견을 반영하고 아토피 활성시험을 통해 적절한 추출물 비율을 결정하여 다쏘엔컴퍼니 등의 화장품 제조회사에서 시작품 제작

#### 6. 원료 소재의 전임상 독성시험

화장품 원료로 사용되는 곰보배추 농축액 (KDC14-2)의 전임상시험을 위해 충청북도 청주시 청원구에 위치한 전문 전임상 위탁 시험 기관 “(주)바이오톡스텍”과 용역 계약을 체결, 항목별 전임상 시험 완료함

### 위탁 시험 용역 계약서

서울시 강남구 논현로 28길 34번지 소재 고려제약㈜ (대표이사 박상훈, 이하 “갑”이라 한다) 와 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 53 오창과학산업단지 내 ㈜바이오톡스텍(대표이사 광종구, 이하 “을”이라 한다)은 위탁시험 용역 계약을 다음과 같이 체결한다.

- 위탁과제명 : “KDC 14-2”에 대한 안전성시험
  - 1) 단회투여독성시험 (랫드-경피)
  - 2) 1차피부자극시험 (토끼-경피)
  - 3) 안정막자극시험 (토끼-점안)
  - 4) 피부감작성시험 (ELISA법을 이용한 국소림프절시험)
  - 5) in vitro 3T3 NRU 광독성시험
  - 6) 광감작성시험 (기니픽-경피)

[그림 16] 전임상 CRO 기관과의 업무 계약



(1) 단회투여독성시험

요약

본 시험은 시험물질인 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)을 Sprague-Dawley 계 암수 6 주령 랫드에 단회 경피투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 2,000 mg/kg 의 용량 및 대조군의 2 군으로 하고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경피투여 하였다. 투여 후 14 일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

암수 2,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 또한, 일반증상, 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)을 랫드에 단회 경피투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

[그림 17] 단회투여독성시험 최종보고서 요약

## (2) 1차 피부자극시험

### 요약

시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)의 피부자극시험을 11주령의 수컷 NZW계 토끼 3마리를 사용해서 검토하였다.

토끼의 경배부위에 좌·우 각 2부위, 할 4부위의 투여부위를 설정하고, 그 중 2부위를 비찰과부위, 그 외 2부위를 찰과부위로 하였다. 시험물질원액 0.5 mL를 각각의 비찰과 및 찰과부위의 시험물질투여부위에 적용하고 24시간 폐색접포하였다. 투여 후 24, 48 및 72시간에 ‘Draize의 피부반응 평가표<sup>1)</sup>’에 따라서 피부반응을 평가하고, 투여 후 24 및 72시간에 대한 1차피부자극지수 (Primary Skin Irritation Index, P.I.I.)를 구하여 피부자극성을 판정하였다.

투여 후 24 및 48시간에 시험물질투여부위의 비찰과 및 찰과부위 모두에서 홍반 (평점 2)이, 투여 후 72시간에는 홍반 (평점 1)이 모든 동물에서 관찰되었다. 시험물질의 1차피부자극지수 (P.I.I.)는 ‘1.5’로, 자극정도는 ‘약한 자극성 (Slightly irritant)’으로 분류되었다.

무처치대조부위의 비찰과 및 찰과부위에서는 모든 관찰시간에 홍반 및 부종등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

관찰기간 중, 모든 동물에서 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)은 토끼의 피부에 대해서 ‘약한 자극성’이 있는 물질로 판단된다.

[그림 18] 1차 피부 자극시험 최종보고서 요약

### (3) 안점막자극시험

#### 요약

시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)의 안자극시험을 11주령의 수컷 NZW계 토끼 6마리를 사용해서 검토하였다.

비세안군은 토끼 3마리의 우안 결막낭 내에 시험물질원액 0.1 mL를 투여하고, 투여 후 1, 24, 48 및 72시간에 각막, 홍채 및 결막등의 안구병변을 관찰하였다. 세안군은 별도의 3마리의 토끼를 사용해서 비세안군과 동일하게 투여하고, 투여 30초 후에 세안한 후, 세안효과를 확인하였다. ‘Draize의 안구병변의 등급<sup>1)</sup>’에 따라서 시험물질의 안점막자극을 평가하고, Guillot의 ‘안점막자극 평가표<sup>2)</sup>’를 참조해서 안점막자극의 정도를 분류하였다.

비세안군에서 시험물질투여 후 1시간 이후에 홍채충혈 (평점 1), 결막발적 (평점 1), 결막부종 (평점 1 또는 평점 3) 및 배출물 (평점 1)이 관찰되었다. 이러한 자극반응 중 홍채충혈 및 배출물은 투여 후 48시간에, 결막발적 및 결막부종은 투여후 72시간에 모두 소실되었다. 비세안군의 I.A.O.I. (Index of Acute Ocular Irritation)는 ‘15.0’으로, 안점막 자극성의 정도는 ‘경도자극물’로 분류되었다.

세안군에서는 투여 후 1시간에 홍채충혈 (평점 1), 결막발적 (평점 1), 결막부종 (평점 2) 및 배출물 (평점 1)이, 투여 후 24 및 48시간에는 결막발적 (평점 1) 및 결막부종 (평점 1)이 관찰되었으나, 투여후 72시간에 모두 소실되었다. 세안군의 I.A.O.I는 ‘13.0’으로, 비세안군과 비교하여 I.A.O.I가 작으므로, 안자극성에 대한 세안효과가 확인되었다.

관찰기간 중, 각 군의 모든 동물에서 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)은 토끼의 눈에 대해서 ‘경도자극물’로 판단된다. 또한, 안자극성에 대한 세안효과가 확인되었다.

[그림 19] 안점막 자극시험 최종보고서 요약



#### (4) 피부감작성시험

##### 요약

본 시험은 CBA/N 마우스를 이용하여 시험물질인 배암차즈기 95% 에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)을 경피투여하였고, 시험물질의 피부감작성 유무를 평가하고자 실시하였다.

용량설정시험은 최고용량을 50%로 설정하고 이하의 용량은 25, 10, 5 및 2.5%의 총 5 용량으로 실시하였다. 또한 음성대조군을 설정하였다. 용량설정시험의 결과, 최고농도인 50%에서 시험물질의 착색으로 육안적 평가가 불가하여 본시험에서 25%를 최고농도로 설정하였고 그 이하는 공비 2 로 10 및 5%로 설정하였다. 그리고 음성대조군을 설정하였고, 양성대조군은 25%의  $\alpha$ -hexylcinnamaldehyde 를 사용하였다.

음성대조군은 부형제 1 인 *N,N*-dimethylformamide 를, 시험물질투여군은 배암차즈기 95% 에탄올연조엑스(10 → 1) · 1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)을, 양성대조군은  $\alpha$ -hexylcinnamaldehyde 를 1 회/일, 3 일간 총 3 회 동물의 좌·우측 이개부 외측 피부에 각각 경피 투여하였으며, 오전 중 일정한 시간에 실시하였다.

관찰기간 동안 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고, 체중은 투여개시일 (Day1) 및 조직적출일 (Day6)에 측정하였다. 육안적 피부자극 (홍반)은 투여개시일부터 1 회/일, 6 일간 총 6 회 관찰하였고, 귀두께는 투여개시일 (투여 전), 투여 후 3 및 6 일째 (조직적출일)에 측정하였다. 조직적출일에 귀 조직 및 이개림프절을 적출하였고, 귀 조직의 중량을 측정하였다. 적출한 이개림프절은 BrdU labeling cell 을 정량하였고, 자극지수를 산출하여 시험물질의 피부감작성을 평가하였다.

본 시험의 결과, 관찰기간 동안 모든 투여군에서 이상증상 및 사망례는 관찰되지 않았다.

5, 10 및 25% 농도의 시험물질투여군은 체중을 제외한 육안적 피부자극, 귀 두께, 귀조직 중량 및 자극지수 모두 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타났고, 피부감작성 지표인 자극지수 (SI)는 1.6 이상으로 산출되었다.

25% 농도의 양성대조군은 육안적 피부자극, 귀 두께, 귀조직 중량 및 자극지수 모두 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가되었으며 피부감작성 지표인 자극지수 (SI)는 2.78 로 1.6 이상으로 산출되었다.

추가시험의 결과, 관찰기간 동안 모든 투여군에서 이상증상 및 사망례는 관찰되지 않았다.

0.5% 농도의 시험물질투여군은 체중, 육안적 피부자극, 귀 두께, 귀조직의 중량 및 자극지수 모두 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았고, 피부감작성 지표인 자극지수 (SI)는 1.6 이하로 산출되었다.

결론적으로, CBA/N 마우스를 이용한 피부감작성 시험 (Local lymph node assay: BrdU-ELISA 법)에서 시험물질인 배암차즈기 95% 에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)은 5, 10 및 25%에서는 양성으로 판단되지만, 0.5%에서는 음성으로 판단된다.

[그림 20] 피부감작성 시험 최종보고서 요약

## (5) 광독성시험

### 요약

본시험은 BALB/c 3T3 clone A31 세포에 시험물질인 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)을 처리한 후 UVA 조사 유무에 따라 시험물질에 노출된 세포 생존율의 변화로 광독성을 평가하였다.

용량설정시험은 1,000 µg/mL 를 최고용량으로 설정하였고, 이하 공비 2로 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 및 7.81 µg/mL의 8용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다. 그 결과, UV 비조사 및 UV 조사에서는 세포독성이 관찰되어, 50 % 세포증식억제농도를 산출한 결과, 40.2 및 30.5 µg/mL으로 나타났다. 시험물질의 석출은 모든 농도에서 관찰되지 않았다.

용량설정시험의 결과에 따라서 본시험의 최고용량은 UV 비조사 및 UV 조사에서 세포독성이 관찰되었기 때문에 IC<sub>50</sub>을 산출이 가능한 용량인 125 µg/mL 농도를 최고용량으로 설정하였고 그 이하의 용량은 공비 2로 8농도 (125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.90, 1.95 및 0.97 µg/mL)로 설정하였다. 또한 음성대조군을 설정하였다.

양성대조군 (Chlorpromazine)은 UVA 비조사시에는 100 µg/mL를 최고용량으로 설정하였고 이하, 75, 50, 37.5, 25, 12.5, 6.25 및 3.13 µg/mL의 총 8 용량으로 하였다. UVA 조사시에는 4 µg/mL 를 최고용량으로 설정하였고 이하, 2, 1.6, 1, 0.75, 0.6, 0.25 및 0.125 µg/mL의 총 8 용량으로 설정하였다. 또한, 음성대조군 (Ethanol)을 설정하고 2회 실시하였다.

본시험의 결과, 시험물질의 UVA 비조사 및 UVA 조사시에 세포독성이 관찰되어 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과, UVA 비조사시에는 1차 및 2차 시험에서 각각 32.4 및 44.8 µg/mL, UVA 조사시에는 각각 20.1 및 24.1 µg/mL으로 나타났다. PIF (Photo irritation factor)값은 1.6 및 1.9로 2 이하로 나타났고 MPE (Mean photo effect)값은 0.059 및 0.042로 0.1 이하로 나타났다. 시험물질 처리종료시에 시험물질의 석출은 UVA 비조사 및 조사시의 모든 농도에서 관찰되지 않았으며 세포의 오염도 관찰되지 않았다.

양성대조군 (Chlorpromazine)의 UVA 비조사시의 IC<sub>50</sub>은 1차, 2차 시험에서 모두 7.0 ~ 90.0 µg/mL의 범위에 있었고, UVA 조사시의 IC<sub>50</sub>도 0.1 ~ 2.0 µg/mL의 범위에 있었다. 산출된 PIF값은 6 이상으로 나타났다.

이상의 결과로부터 BALB/c 3T3 clone A31 세포를 이용한 광독성시험에서 시험물질인 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)의 광독성은 음성으로 판단된다.

[그림 21] 광독성시험 최종보고서 요약



## (6) 광감작성시험

### 요약

시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)의 광감작성을 Hartley계 기니픽을 이용해서 Adjuvant & Strip법<sup>1)</sup>으로 검토하였다. 군구성은 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 합 3군 (각 5마리)으로 하였다.

투여 0일에 감작부위 네 모서리에 주사용수-FCA 유화액을 피내주사한 후, 감작부위를 stripping하였다. 시험물질군, 음성대조군 및 양성대조군의 감작부위에 각각 0.5% 시험물질, 1,3-Butanediol (1,3-BG) 및 1% chlorpromazine (CP)을 개방도포한 후, UV-A로 최종에너지가 약 10 J/cm<sup>2</sup>이 되도록 조사하였다. Stripping, 개방도포 및 UV-A 조사는 1일 1회, 투여 1일부터 투여 4일까지 연속해서 실시하였다. 투여 21일에 시험물질군 및 음성대조군에는 0.5% 시험물질 및 1,3-BG를, 양성대조군에는 0.1% CP 및 ethanol을 야기부위에 개방도포한 후, UV-A를 조사하여 야기하였다. 야기 광조사 후 24 및 48시간에 피부반응을 평가하였다.

시험물질군 및 음성대조군은 야기 광조사 후 24 및 48시간에, 0.5% 시험물질 및 1,3-BG의 야기부위에서는 광조사 유·무에 관계없이 홍반, 부종 등의 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

양성대조군은 모든 관찰시간에, 0.1% CP의 광조사부위에서 홍반 (평점 3) 및 부종 (평점 3)이 모든 동물에서 관찰되었으나, 비광조사부위에서는 피부반응이 모든 동물에서 관찰되지 않았다. Ethanol의 야기부위에서는 광조사 유·무에 관계없이 피부반응은 모든 동물에서 관찰되지 않았다.

관찰기간 중, 각 군의 일반증상 및 체중에 이상은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험 조건하에서 시험물질 배암차즈기 95%에탄올연조엑스(10→1)·1,3-Butylene Glycol 혼합물(1:1)은 0.5%까지는 광감작성이 없는 물질로 판단된다.

[그림 22] 광감작성시험 최종보고서 요약

## 7. 제품 효능 평가

- 곰보배추 농축액을 0.2%함유한 제품(KDC14-2)의 임상시험을 위해 충청북도 제천시 신월동 세명로에 위치한 임상 시험 기관 “세명대학교 산학협력단”과 용역 계약을 체결, 임상 시험이 종료됨

### 연구용역계약서(研究用役契約書)

○과 제 명 : ‘KDC14-2’의 아토피 피부 보습 개선하는 데 도움 및 안전성평가 인체적용시험 평가 용역

○계약당사자 : (갑) 고려제약주식회사  
(을) 세명대학교 산학협력단

○총괄책임자 : 세명대학교 교수 김용민

서울시 강남구 논현로 28길 34번지 소재 고려제약주식회사(이하 (갑)이라 한다)과 충청북도 제천시 신월동 세명로 65 소재 세명대학교 산학협력단(이하 (을)이라 한다)는 ‘KDC14-2’의 아토피 피부 보습 개선하는 데 도움 및 안전성평가 인체적용시험 평가 용역에 관한 연구에 대하여 다음과 같이 연구계약을 체결한다.

[그림 23] 임상기관과의 업무 계약



## (1) 피부 첩포 안전성 평가에 대한 인체적용시험

### 1. 연구 개요

본 연구는 의뢰자로부터 시료를 수령한 후 만 20~55세의 성인 남녀를 대상으로 수행함.

고려 제약 주식회사의 “KDC14-2”을 25 $\mu$ l씩 Finn Chamber에 적하 시킨 후 피험자의 등 부위에 얹어 고정시킴. 24시간 후 첩포를 제거하고, Marking Pen으로 시험부위를 표시하여 30분, 24시간, 48시간 경과 후에 시험부위를 관찰하고 피부반응을 평가함.

평가는 센터 내부 지침서(SOP)에 준하여 수행하였으며, 식품의약품안전처 고시에 규정하지 않은 사항은 참고 문헌을 참조하여 수행함.

### 2. 피험자

#### 1) 피험자 선정

만 20세에서 55세의 성인 남·여 중에서 선정기준에 만족하며 제외기준에 해당되는 사항이 없는 사람을 대상으로 선정함. 시험 제품의 평가 항목을 측정하기 위해 문서화된 정보를 피험자에게 제공하고, 연구자가 구두와 문서로 자세하게 설명한 후 피험자의 자유로운 의사에 의해 대상자가 되기를 서면으로 동의한 후 시험에 참여함.

#### 2) 선정 기준

가. 시험자가 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명을 하고, 자발적으로 임상 시험 참가 동의서를 작성하고 서명한 자

나. 피부 질환을 포함하여 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자

다. 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

#### 3) 제외 기준 : 피험자의 문진을 통하여 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외함.

가. 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성

나. 피부 질환의 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 자

다. 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과하지 않은 자

라. 민감성, 과민성 피부를 가진 자

마. 시험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자

바. 연구 시작 전 6개월 내에 피부박피시술, 주름제거시술 등을 받은 자

사. 그 외 주 시험자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 자

#### 4) 피험자 주의사항

가. 검사일정 및 시간을 꼭 지키도록 함.

나. 연구 대상자는 시험하는 동안 시험 부위에 심한 마찰을 주는 행위를 자제하도록 함.

다. 인체적용시험 중 과음과 지나친 흡연을 삼가도록 함.

라. 시험 부위를 햇빛에 노출시키지 않도록 함.

마. 시험 기간 중 과도한 스트레스 등 일상생활을 크게 벗어난 활동을 하지 않도록 함.

#### 5) 시험 기간 중도 탈락 기준

선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않더라도 다음의 상황이 발생한 경우 연구 책임자와 연구원의 판단 하에 제외시켰으며, 이는 시험 결과 산정에서 제외하고 이를 보고서에 작성함.

가. 피험자에게 중대한 이상반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 모든 제품 사용 부위에 소양감이나 홍반 등의 이상 반응이 발생하여 피험자가 시험 중단을 요구한 경우

나. 인체적용시험에서 발견치 못한 전신 질환이 발견된 피험자

- 다. 시험 진행과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 한 자
- 라. 시험 진행과정 중 지나친 음주, 흡연 등으로 결과, 평가에 장애가 발생한 경우
- 마. 인체적용시험 기간 중 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구한 경우
- 바. 연구자나 피험자에 의해 시험계획을 위반한 경우
- 사. 피험자에게 시험 제품을 사용하는데 문제가 있는 경우
- 아. 경과 관찰 기간 동안 전문의의 지시 없이 연구결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우
- 자. 기타 담당자의 판단에 의해 연구 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

6) 시험 기간 중 자진 철회

시험 기간 중 연구 대상자는 언제든지 자유의사에 따라 자진철회를 할 수 있도록 함.

7) 이상 반응 시 보상 대책

본 연구센터는 모든 시험 수행 시 연구 대상자의 안전을 위해 최선의 노력을 다하였으며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생 시 신속하고 적절한 조치를 위하여 그 이상반응을 최소화 함. 이에 대하여 연구기관장 및 연구책임자는 조사 및 관리를 수행함. 본 연구와 관련된 시험 중 시험에 연계된(사용한 시료)이상 반응이 발생한 경우에는 즉시 시험을 중단하고, 증상이 호전되지 않을 경우와 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 피부과 전문의에게 문진하여 치료를 받도록 함. 연구책임자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록해 둔.

8) 시험에 대한 일반적인 주지사항

연구자는 피험자들에게 본 시험의 목적과 방법, 기대 이득 효과와 시험으로부터 야기될 수 있는 소양증, 홍반, 자극 등의 이상반응, 시험기간 종료와 동시에 즉시 적인 시험군에서의 탈퇴, 본인의 임상시험 거부 또는 탈퇴로 다른 불이익을 받지 않게 됨을 확인하고 시험시료로 인한 모든 이상반응의 발생 가능성과 만일 이상반응 발생 시 중도탈락 및 치료 등의 다른 조치가 고려될 수 있음에 대하여 충분히 설명함.

9) 피험자 정보의 비밀 유지와 성실 의무

본 시험에 참여한 피험자의 비밀은 보장되었으며, 의학적인 목적에 의해서 피험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료를 이용하도록 함. 본 실험을 통해 얻은 피험자의 정보는 시험이 종료될 때까지 비밀을 유지하도록 하였고, 성실하고 정직하게 자료를 작성하도록 함.

10) 피험자 수

피험자는 선정 기준에 적합하며, 제외기준이 적용되지 않는 자로 30명을 선정하여 시험함.

3. 시험 부위

시험 부위는 피험자의 등 부위에 실시함

4. 시험 방법

- 1) 준비 단계 : 피험자들의 측정 조건을 동일하게 하고자 시험 부위를 깨끗하고 마른 상태로 유지하였으며 최소 30분간 항온항습(22±2℃, R.H. 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정을 취한 후 진행함
- 2) 측정 단계 : 시험부위를 70% 에탄올로 닦아낸 뒤 건조시킨 다음 고려제약 주식회사의 “KDC14-2”을 25 $\mu$ l씩 Finn Chamber에 적하 시킨 후 피험자의 등 부위에 얹어 고정시켰다. 첩포는 24시간 후 제거하였으며, 첩포를 제거한 후에는 Marking Pen으로 시험부위를 표시하여 30분, 24시간, 48시간 경과 후에 시험부위를 관찰함.

5. 시험 일정 및 절차

1) 방문1 (0일, 시험 시작일)

피험자 선정, 제외 기준에 따라 연구에 적합한 피험자를 선정하고, 피험자의 피부상태를 확인한 후, 시험 방법에 따라 시험을 시행함.

2) 방문2 (1일, 패치 제거 후 30분)

시험방법에 따라 피부반응을 판정하기 위한 육안평가와 사진 촬영을 진행함.

3) 방문3 (2일, 패치 제거 후 24시간)

시험방법에 따라 피부반응을 판정하기 위한 육안평가와 사진 촬영을 진행함.

4) 방문4 (3일, 패치 제거 후 48시간)

시험방법에 따라 피부반응을 판정하기 위한 육안평가와 사진 촬영을 진행함

6. 결과분석

판정은 첩포 제거 후 30분, 24시간, 48시간에 행하며 피부반응은 [그림 24]의 국제접촉피부염연구회 (International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 판정기준에 따라 자극정도를 분류함. 평균 피부반응도 (Mean score)는 계산공식에 따라 산정하였으며 피부 첩포시험 (Patch Test) 결과 판정표에 따라 자극유무를 판정함.

기호	판 정 기 준				
-	Negative				
±	Doubtful or slight reaction and erythema				
+	Erythema + Induration				
++	Erythema + Induration + Vesicle				
+++	Erythema + Induration + Bullae				
	-	±	+	++	+++
Score	0	0.5	1	2	3

[그림 24] 국제접촉피부염연구회의 판정 기준

※ 피부반응 판정기준

1) Negative (-) : 무자극

2) Doubtful or slight reaction and erythema (±) : 미자극, 희미한 또는 가까스로 감지할 수 있는 가벼운 홍반

3) Erythema + Induration (+) : 경자극, 경계가 뚜렷하나 약한 홍반, 부종 및 구진

4) Erythema + Induration + Vesicle (++) : 중자극, 뚜렷한 홍반, 구진 및 소수포

5) Erythema + Induration + Bullae (+++) : 강자극, 심한 홍반 및 대수포, 가피형성

$$\text{Mean score} = \frac{(A + B + C) \times 100}{3(\text{maximum score}) \times \text{No. of total subjects} \times \text{No. of evaluation}}$$

$$A = \sum_{i=1}^n \text{Score}_i$$

$$B = \sum_{j=1}^n \text{Score}_j$$

$$C = \sum_{k=1}^n \text{Score}_k$$

$i$  = 패치 제거 후 30분 경과 후 피험자 번호

$j$  = 패치 제거 후 24시간 경과 후 피험자 번호

$k$  = 패치 제거 후 48시간 경과 후 피험자 번호

Score  $i, j, k$  = 첩포제거 후 30분, 24시간, 48시간에 각각의 평가결과를 ICDRG 판정기준에 따라 score로 표기된 점수, erythema 와 edema 두 가지 반응에 대하여 모두 적용

[그림 25] 평균 피부반응도 (Mean score) 계산공식

판정(Grade)	Mean Score
무자극(1)	0.00 ~ 0.75
미자극(2)	0.76 ~ 1.50
경자극(3)	1.51 ~ 2.50
중자극(4)	2.51 ~ 4.00
강자극(5)	4.01 ~

[그림 26] 피부 첩포시험(Patch Test) 결과 판정표

7. 시험 결과

1) 피험자 기본정보

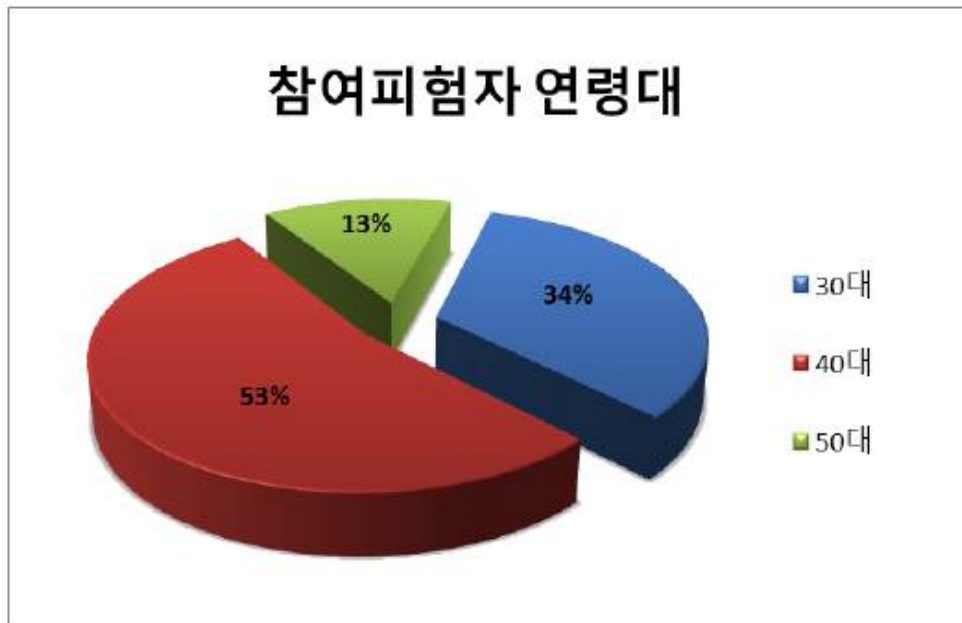
본 인체적용시험에 참가한 피험자의 정보는 [그림 27]에 정리함

No.	Initial	Age	Sex
1	JJN	48	F
2	KHY	44	F
3	HSN	42	F
4	TEJ	51	F
5	PGH	54	F
6	KHS	43	F
7	JHJ	49	F
8	JYS	43	F
9	LSJ	36	F
10	KGN	36	F
11	JYH	38	F
12	KMH	40	F
13	AIG	42	F
14	KEJ	41	F
15	ISJ	42	F
16	LYH	46	F
17	KSO	38	F
18	KYJ	35	F
19	KER	46	F
20	SJE	32	F
21	CSE	53	F
22	LEH	39	F
23	HMJ	48	F
24	JDH	52	F
25	JGJ	43	F
26	GYM	42	F
27	IMR	38	F
28	LGS	48	F
29	SSR	34	F
30	YHC	35	F
평 균		42.6	여성: 30명
표준편차		6.0	남성: 0명

[그림 27] 피험자 기본 정보

인원	구분	참여 피험자	탈락 및 중도 포기	시험을 종료한 총 피험자(%)
30명	30대	10	0	10 (33%)
	40대	16	0	16 (54%)
	50대	4	0	4 (13%)

[그림 28] 피험자의 참여 연령대

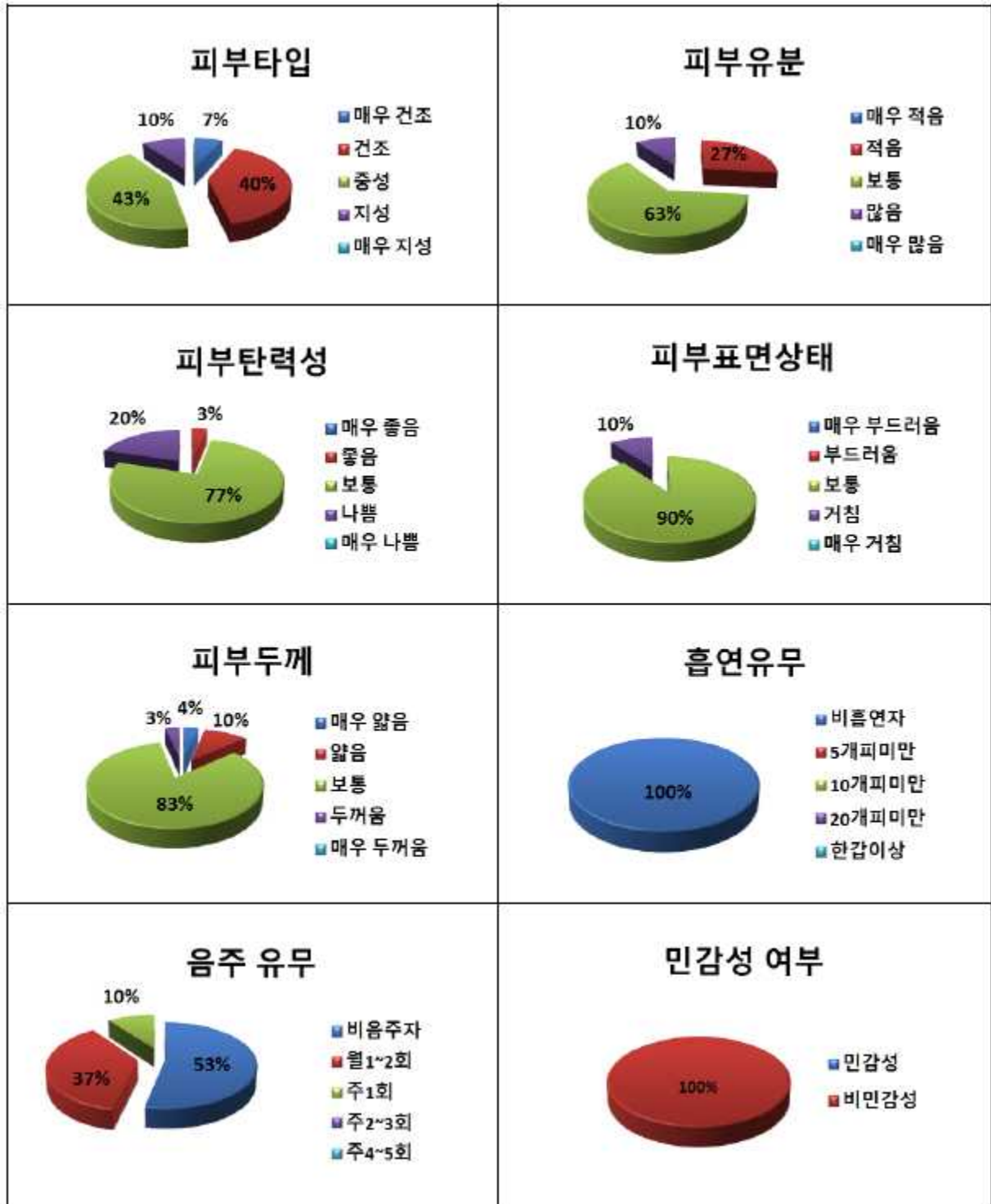


[그림 29] 참여피험자 연령대

시험에 참여하는 피험자들은 평균 42.6세로 연령대별로 30대가 34%, 40대가 53%, 50대가 13%로 참여함. 시험 도중 이상반응으로 중도 포기한 피험자는 없으므로 시험에 참여한 피험자는 총 30명임.

2) 피험자 피부 유형 및 상태

피험자는 시험 전 피부유형 및 피부 상태를 설문을 통해 자가 작성 함



[그림 30] 피부 상태에 대한 자가 설문 평가(단위: %)



3) 측정 결과

No.	Initial	제품명 KDC14-2		
		30분 후	24시간 후	48시간 후
1	JJN	-	-	-
2	KHY	-	-	-
3	HSN	-	-	-
4	TEJ	-	-	-
5	PGH	-	-	-
6	KHS	-	-	-
7	JHJ	-	-	-
8	JYS	-	-	-
9	LSJ	-	-	-
10	KGN	-	-	-
11	JYH	-	-	-
12	KMH	-	-	-
13	AIG	-	-	-
14	KEJ	-	-	-
16	ISJ	-	-	-
16	LYH	-	-	-
17	KSO	-	-	-
18	KYJ	-	-	-
19	KER	-	-	-
20	SJE	-	-	-
21	CSE	-	-	-
22	LEH	-	-	-
23	HMJ	-	-	-
24	JDH	-	-	-
25	JGJ	-	-	-
26	GYM	-	-	-
27	IMR	-	-	-
28	LGS	-	-	-
29	SSR	-	-	-
30	YHC	-	-	-
반응도	±	0	0	0
	+	0	0	0
	++	0	0	0
	+++	0	0	0
Mean score :		0.00		
판 정		무자극		

[그림 31] 첩포시험(Patch Test) 결과

## 8. 고찰 및 결론

본 시험은 고려제약 주식회사에서 의뢰한 “KDC14-2”에 대한 피부 첩포 안전성 평가에 대한 인체적용시험으로 “KDC14-2”을 24시간 동안 피부에 첩포하였으며, 첩포를 제거하고 30분, 24시간, 48시간이 경과된 후에 시험부위에서 나타난 피부반응을 국제접촉피부염 연구회(International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 판정기준에 따라 자극정도를 분류하고, 피부 첩포시험(Patch Test) 결과 판정표에 따라 평균 피부반응도(Mean score)를 구함 피험자는 만 20세에서 55세의 성인 남녀 30명을 대상으로 시험을 수행하였으며 중도 탈락자는 없었음. 시험은 2017년 05월 15일부터 2017년 05월 18일 동안 진행되었으며, 피험자들은 총 4회(시험 시작일, 패치제거일, 패치제거 후 24시간, 48시간) 방문함 시험 결과, “KDC14-2”은 패치 제거 후 30분, 24시간, 48시간 모두에서 자극이 관찰되지 않았음. 평균 피부반응도는 0.00으로 피부 첩포시험(Patch Test)의 판정기준에 따라 “DC14-2”은 무자극으로 판정함.

## 9. 시험 기관 실태 조사서

### 1. 연구기관

연구기관명: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주 소: 충북 제천시 신월동 세명로 65 한방바이오산업 임상지원센터

### 2. 연구기관의 설립목적

본 연구기관(연구센터)는 기업체들의 센터의 지원을 통하여 안전성실험, 효능효과실험 등을 거쳐 안전하고 신뢰받는 바이오 제품을 생산함으로써 고부가가치의 한방바이오산업을 육성하고자 설립된 산업자원부 지정 지역혁신센터(RIC)로서, 특히 화장품 및 한방 화장품의 기능성 화장품 인증에 관련된 인체적용시험(자외선차단지수, 자외선A 차단지수, 주름, 미백개선)을 수행하고, 이와 관련된 인력양성 및 기술 개발을 위해 설립된 기관이다.

## (2) 아토피 개선 효능 평가를 위한 인체적용시험

### 1. 연구 개요

본 연구는 의뢰자로부터 시료를 수령한 후 만 5~40세의 성인을 대상으로 아토피 증상이 있는 병변 부위에 4주간 시험 제품을 사용하고 SCORAD INDEX 측정, 기기 측정, 사진촬영 및 설문 평가를 통해 효능을 평가함. 평가는 센터 내부 지침서 (SOP)에 준하여 수행하였으며, 식품의약품안전처 고시에 규정하지 않은 사항은 참고 문헌을 참조하여 수행함.

### 2. 피험자

#### 1) 피험자 선정

아토피 피부염 증상이 있는 남·녀로서 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터에 방문하여 피부과 전문의 및 한방피부과 전문의의 진료 후 “대한아토피피부염학회(2005) 한국인 아토피 피부염 진단기준”에 의해 아토피 피부염으로 진단된 환자 중 피험자 선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 환자를 대상으로 인체적용시험을 진행함.

모든 피험자들은 어린이부터 성인까지 스크리닝을 통해서 피험자를 선별하였으며, 주 시험자는 피험자 또는 보호자가 알아야 할 시험에 관한 모든 내용들을 충분히 설명하고 피험자 또는 보호자가 완전하게 이해를 한 다음 ‘인체적용시험 참여 동의서’ 를 작성하도록 하였고 어린이 및 미성년자의 경우에는 보호자의 동의 하에 피험자 참여 동의서를 작성함.

#### 2) 선정기준

- 가. 대한아토피피부염학회(2005) 한국인의 아토피 피부염 진단기준에 따라 주 소견 중 2개 이상, 부 소견 중 2개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자
- 나. 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자
- 다. 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 자
- 라. 미성년자의 경우 보호자의 동의하에 참여를 결정하고
- 마. SCORAD INDEX 40 이하인 자

#### 3) 제외기준

피험자의 문진을 통하여 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외하였다.

- 가. 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자
- 나. 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자
- 다. 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자
- 라. 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성
- 마. 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 시험의 진행이 곤란하다고 판단되는 환자

#### 4) 피험자 주의사항

- 가. 검사일정 및 시간을 지키도록 하였다.
- 나. 제품의 사용을 중단하지 않도록 하였다.
- 다. 시험부위가 과도한 자외선에 노출되지 않도록 하였다.
- 라. 인체적용시험 중 과음과 지나친 흡연을 삼가도록 하였다.

#### 5) 시험기간 중도 탈락 기준

선정기준에 합당하고 제외기준에 해당되지 않더라도 다음의 상황이 발생한 경우 연구 책임자와 연구원의 판단 하에 제외시켰으며, 이는 시험 결과 산정에서 제외하고 이를 보고서에 작성하였다.

- 가. 피험자에게 중대한 이상반응(Serious Adverse Events)이 발생한 경우 혹은 모든 제품

사용 부위에 소양감이나 홍반 등의 이상반응이 발생하여 피험자가 시험 중단을 요구한 경우  
 나. 인체적용시험에서 발견치 못한 전신 질환이 발견된 피험자  
 다. 시험 진행과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 한 자  
 라. 시험 진행과정 중 지나친 음주, 흡연 등으로 결과, 평가에 장애가 발생한 경우  
 마. 인체적용시험기간 중 피험자 또는 피험자의 법정 대리인이 시험 중단을 요구한 경우  
 바. 연구자나 피험자에 의해 시험계획을 위반한 경우  
 사. 피험자의 추적관찰이 되지 않는 경우  
 아. 피험자에게 시험 화장품을 도포하는데 문제가 있는 경우  
 자. 경과 관찰 기간 동안 전문의의 지시 없이 연구결과 판정에 영향을 미칠 수 있는 약물 등을 복용한 경우  
 차. 기타 담당자의 판단에 의해 연구 진행이 적합하지 못하다고 판단되는 경우

6) 시험기간 중 자진 철회

시험기간 중 연구 대상자는 언제든지 자유의사에 따라 자진철회를 할 수 있도록 함.

7) 이상반응 시 보상 대책

본 연구센터는 모든 시험 수행 시 연구 대상자의 안전을 위해 최선의 노력을 다하였으며, 예측 가능한 이상반응 이외의 이상반응 발생시 신속하고 적절한 조치를 위하여 그 이상반응을 최소화 함. 이에 대하여 연구기관장 및 연구책임자는 조사 및 관리를 수행함. 본 연구와 관련된 시험 중 시험에 연계된(도포한 시료) 이상반응이 발생한 경우에는 즉시 시험을 중단하고, 증상이 호전되지 않을 경우와 기타 비정상적인 피부 반응이 발생할 경우 피부과 전문의에게 문진하여 치료를 받도록 함. 연구책임자와 연구원은 피부과적 평가와 함께 적절한 조치를 취하며 증례 및 상황에 대하여 상세히 기록해 둠.

8) 시험에 대한 일반적인 주의사항

연구자는 피험자들에게 본 시험의 목적과 방법, 기대 이득 효과와 시험으로부터 야기될 수 있는 소양증, 홍반, 자극 등의 이상반응, 시험기간 종료와 동시에 즉시적인 시험군에서의 탈퇴, 본인의 임상시험 거부 또는 탈퇴로 다른 불이익을 받지 않게 됨을 확인하고 시험시료로 인한 모든 이상반응의 발생 가능성과 만일 이상반응 발생시 중도탈락 및 치료 등의 다른 조치가 고려될 수 있음에 대하여 충분히 설명함.

9) 피험자의 비밀 유지 및 성실 의무

본 시험에 참여한 피험자의 비밀은 보장되었으며, 의학적인 목적에 의해서 피험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료를 이용하도록 함.

피험자는 본 실험을 통해 얻은 정보는 실험이 종료될 때까지 비밀을 유지하도록 하였고, 성실하고 정직하게 자료를 작성하도록 함.

10) 피험자 수

피험자는 선정기준에 적합하며, 제외기준이 적용되지 않는 자로 20명을 선정하여 시험함.

3. 시험 부위

시험 부위는 아토피 증상이 있는 병변 부위로 시험 제품을 도포함

4. 시험방법

1) 준비단계 : 피험자들은 시험부위를 깨끗하고 마른 상태로 유지하며 최소 30분간 항온항습 (22±2℃, R.H. 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정을 취한 후 진행

2) 측정단계

· 육안 평가

매 방문 시마다 SCORAD INDEX(severity scoring of atopic dermatitis index)지표를 기준으로 extent criteria, intensity criteria, subjective symptoms에 대한 total score를 계산하여 제품 사용 전과 사용 후 아토피의 증상 정도를 평가하였으며, 피험자의 병변 부위를 사진 촬영함.

· 경피수분손실량(transdermal water loss, TEWL) 측정

Tewameter TM300(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용해 병변 부위의 경피수분손실량(TEWL)을 측정함. 평가는 약 20초간, 수치가 안정화 될 때까지 측정을 하며, 안정화된 3개의 값에 대한 평균을 사용함. 건조한 증상이 악화될수록 측정값이 높아지며, 측정계수는 g/m<sup>2</sup>/h 임.

· 수분 측정

Corneometer CM825(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)를 이용해 병변 부위의 피부수분 정도를 측정함. 평가는 3회 실시하였으며 평균을 사용함. 수분이 높을수록 측정수치가 높아지며, 측정계수는 arbitrary unit(A.U.) 임.

· 피부 pH 측정

Skin pH meter PH905(Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)을 이용해 아토피 병변 부위의 수소이온농도를 측정함. Probe에 약간의 물기가 있는 상태에서 측정을 하며, 평가는 3회 실시하였으며, 평균을 사용함. 건강한 피부는 약산성으로 피부장벽이 손상될수록 높은 pH를 나타냄.

5. 시험 일정 및 절차

평가 : 총 3 회 방문	Screening & Treatment Period		
	0 주(screening)	2 주	4 주
Visit	1st	2nd	3rd
피험자 동의서 취득	○		
기초 조사 <sup>1)</sup>	○		
아토피 피부염 진단기준	○		
선정 / 제외기준 판정 <sup>2)</sup>	○		
SCORAD 측정	○	○	○
병변 부위 이미지 촬영	○	○	○
피부수분 정도 측정	○	○	○
경피수분 손실량 측정	○	○	○
피부 pH 측정	○	○	○
이상반응 조사		○	○
총괄적 유효성 평가			○

1) 기초 조사: 생년월일, 성별, 주소 등을 조사한다.

2) 선정/제외기준 판정: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 실시한다.

[그림 32] 인체적용시험 일정 및 절차

## 6. 피부자극 평가

시험 제품에 대해 이상반응인 홍반(Erythema), 부종(Edema), 인설(Scaling), 가려움(Itching), 자통(Stinging), 작열감(Burning), 뻣뻣함(Tightness), 따끔거림(Prickling)이나 다른 이상반응이 발생하는지의 존재 여부를 면밀히 관찰하고 피부 이상반응이 나타날 시 본 센터로 보고하도록 하였으며, 방문 시마다 이상반응 여부를 보고하도록 함.

■ 피부자극평가 (이상반응)

\*Adverse grading

0:none(이상반응 없음), 1:mild, 2:severe, 3:very severe(심각한 이상반응)

Erythema 홍반	Edema 부종	Scaling 인설	Itching 가려움	Stinging 자통	Burning 작열감	Tightness 뻣뻣함	Prickling 따끔거림

[그림 33] 피부자극평가

## 7. 결과 분석

### 1) 유효성 평가

유효성 평가 결과는 제품 사용 전후의 차이를 비교하여 살펴보았으며 분석방법은 '8.3의 통계분석 방법'을 사용하였다.

### 2) 기기 측정 분석

경피수분손실량(TEWL), 수분, skin-pH의 측정 결과는 제품 사용 전후 차이를 비교하여 '8.3의 통계분석 방법'을 사용하였다.

### 3) 통계분석 방법

통계분석은 제품 사용 전후 차이 비교를 위해 쌍체 검정(Paired t-test)법으로 하였다. 모든 통계 결과는 생물학적 통계분석에서 가장 많이 사용하는 유의차 5%( $p < 0.05$ )일 때 통계적 유의성이 있다고 간주하였으며, 통계분석은 SPSS 10.0 software를 사용하였다.

8. 시험결과

1) 피험자 기본 정보 : 피험자 기본정보는 [그림 34] 와 [그림 35]에 나타냄

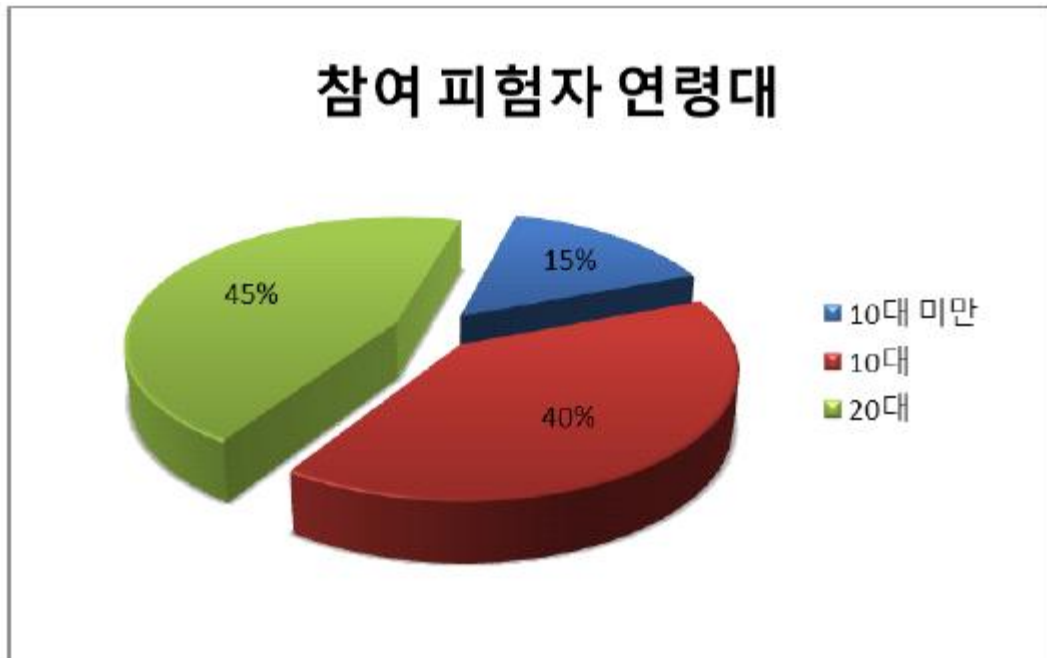
No.	Subject Initial	Age	Sex
1	MJH	20	F
2	PJK	18	F
3	LYJ	20	F
4	JAR	19	F
5	PMJ	20	M
6	CHW	20	M
7	KMS	8	M
8	RHJ	12	M
9	KKO	13	M
10	LSR	19	M
11	PHJ	21	F
12	LSH	8	M
13	GBH	9	M
14	JDO	11	F
15	YTY	19	M
16	LJY	22	F
17	LJK	21	M
18	GDH	23	F
19	PYS	16	M
20	YHS	20	F
평 균		17.0	여성 9명
표준 편차		4.9	남성 11명

[그림 34] 피험자 기본 정보



최종인원	구분	참여피험자	탈락 및 중도포기	시험을 종료한 총 피험자
20명	10대 미만	3	0	3(10%)
	10대	8	0	8(35%)
	20대	9	0	9(55%)

[그림 35] 피험자 참여 연령대



[그림 36] 참여 피험자 연령대

시험에 참여하는 피험자들은 평균 17.0세로 연령대별로 10대 미만이 15%, 10대가 45%, 20대가 40%로 참여함. 시험 도중 탈락 및 중도 포기한 피험자는 없으므로 시험에 참여한 피험자는 총 20명.

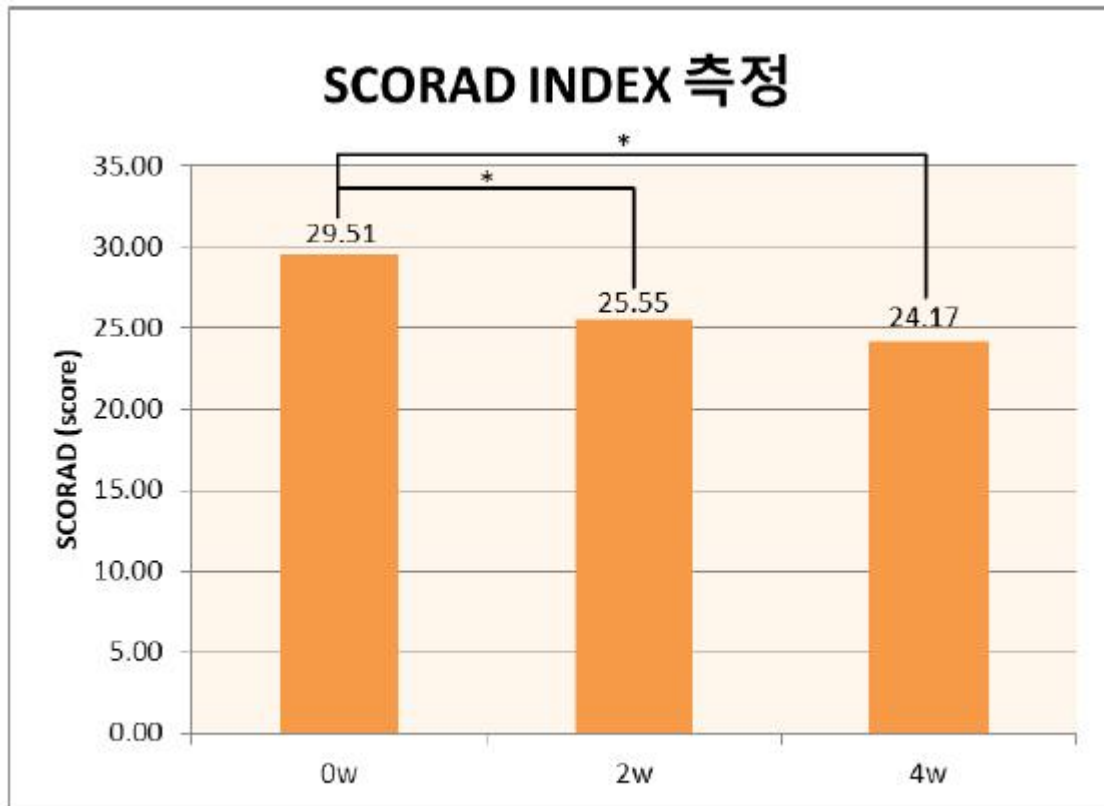
2) SCORAD INDEX 평가 결과

	0 주	2 주	4 주
평균	29.51	25.55	24.17
표준편차	8.40	8.62	7.87

[그림 37] SCORAD INDEX 측정 결과

	2 주	4 주
p-value	0.006	0.000

[그림 38] 통계학적 분석 결과



\* $p < 0.05$  (제품 사용 전, 후의 통계적인 유의성)

[그림 39] SCORAD INDEX 평가 결과

SCORAD INDEX 분석 결과, 제품 사용 전(0주) 29.51에서 제품 사용 2주 후 25.55, 제품 사용 4주 후 24.17으로 감소함. 통계분석 결과, 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후 모두에서 통계적으로 유의한 수준의 차이로 감소함( $p < 0.05$ ).

SCORAD INDEX는 값이 작아질수록 아토피 증상이 있는 병변 부위가 호전됨을 의미함.

### 1. SCORAD INDEX

No.	Initial	0 주	2 주	4 주
1	MJH	35.8	28.1	22.3
2	PJK	24.2	23.8	23.4
3	LYJ	39.8	38.5	35.0
4	JAR	26.8	21.2	20.2
5	PMJ	28.8	32.1	28.7
6	CHW	33.5	25.5	24.3
7	KMS	10.2	9.1	9.0
8	RHJ	35.8	31.1	26.6
9	KKO	18.4	20.9	16.4
10	LSR	40.2	33.2	27.5
11	PHJ	31.3	11.7	20.7
12	LSH	26.8	23.1	22.1
13	GBH	26.2	11.3	9.3
14	JDO	27.0	29.5	28.5
15	YTY	38.7	35.2	35.1
16	LJY	15.8	19.3	17.2
17	LJK	22.9	19.4	19.4
18	GDH	33.4	28.7	28.4
19	PYS	34.6	31.1	31.1
20	YHS	39.9	38.3	38.3
<b>평균</b>		<b>29.51</b>	<b>25.55</b>	<b>24.17</b>
<b>표준편차</b>		<b>8.40</b>	<b>8.62</b>	<b>7.87</b>

[그림 40] SCORAD INDEX 평가 결과표

3) 기기평가

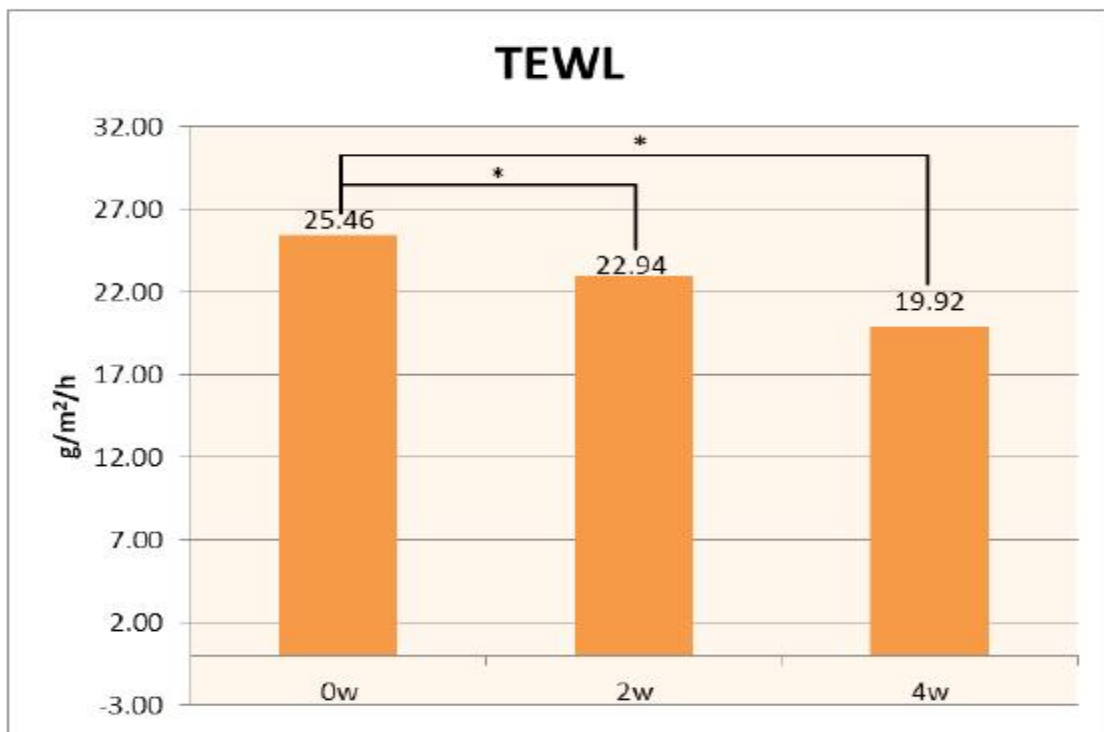
(1) 경피수분손실량(TEWL) 측정

	0 주	2 주	4 주
평균	25.46	22.94	19.92
표준편차	8.26	6.69	5.73

[그림 41] 경피수분손실량(TEWL) 측정 결과

	2 주	4 주
p-value	0.004	0.001

[그림 42] 통계학적 분석결과



\* $p < 0.05$  (제품 사용 전, 후의 통계적인 유의성)

[그림 43] 경피수분손실량(TEWL)의 변화 측정

경피수분손실량(TEWL)은 제품 사용 전(0주) 25.46 g/m<sup>2</sup>/h에서 제품 사용 2주 후 22.94 g/m<sup>2</sup>/h, 제품 사용 4주 후 19.92 g/m<sup>2</sup>/h로 감소함. 통계분석 결과, 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후 모두에서 통계적으로 유의한 수준의 차이로 감소함( $p < 0.05$ ). 경피수분손실량(TEWL)은 수분 손실량이 작을수록 측정값이 작으며, 아토피 피부염이 개선될수록 낮은 수치의 경피수분손실량(TEWL)을 보임.

## 2. 경피수분손실량(Tewameter) 측정

No.	Initial	0 주	2 주	4 주
1	MJH	24.0	24.2	15.7
2	PJK	36.6	29.6	20.7
3	LYJ	34.5	28.3	21.5
4	JAR	34.5	30.4	30.2
5	PMJ	26.2	18.3	17.8
6	CHW	18.7	17.8	20.8
7	KMS	16.1	16.3	15.0
8	RHJ	21.6	21.7	19.7
9	KKO	19.1	16.8	15.4
10	LSR	22.2	20.5	15.2
11	PHJ	13.5	13.5	12.5
12	LSH	17.5	17.0	17.3
13	GBH	21.7	21.1	20.6
14	JDO	28.7	31.4	20.6
15	YTY	24.6	17.0	15.7
16	LJY	21.2	23.4	28.7
17	LJK	31.9	30.7	28.9
18	GDH	31.0	25.9	14.7
19	PYS	19.1	16.5	15.8
20	YHS	46.6	38.3	31.8
<b>평균</b>		<b>25.46</b>	<b>22.94</b>	<b>19.92</b>
<b>표준편차</b>		<b>8.26</b>	<b>6.69</b>	<b>5.73</b>

[그림 44] 경피수분손실량(TEWL)의 결과표

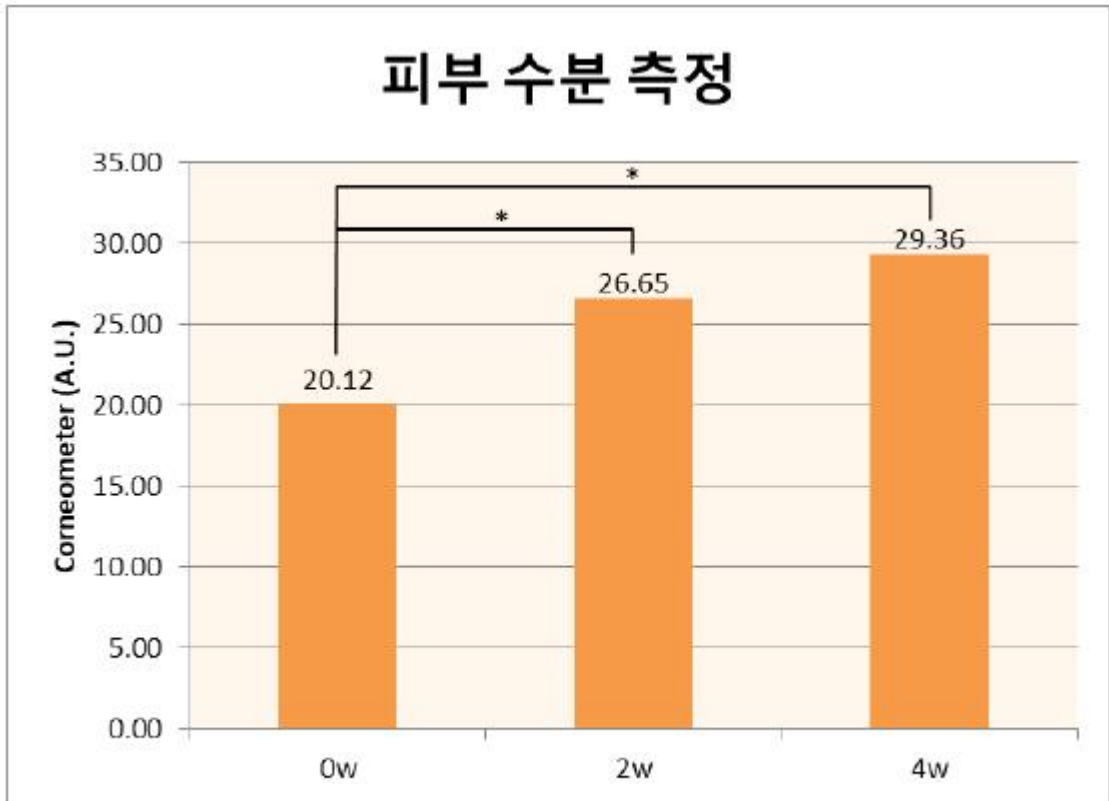
(2)수분 측정

	0 주	2 주	4 주
평균	20.12	26.65	29.36
표준편차	11.10	12.15	10.23

[그림 45] 수분 측정 결과

	2 주	4 주
p-value	0.000	0.000

[그림 46] 통계학적 분석결과



\* $p < 0.05$  (제품 사용 전, 후의 통계적인 유의성)

[그림 47] 수분 측정 결과

수분 측정은 제품 사용 전(0주) 20.12 A.U.에서 제품 사용 2주 후 26.65 A.U., 제품 사용 4주 후 29.36 A.U.로 증가함. 통계분석 결과, 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후 모두에서 통계적으로 유의한 수준의 차이로 증가함( $p < 0.05$ ).

피부의 수분이 높을수록 측정값이 높아지며, 아토피 피부염이 개선될수록 높은 수치의 수분량을 보임.

### 3. 수분(Corneometer) 측정

No.	Initial	0 주	2 주	4 주
1	MJH	12,6	17,0	24,6
2	PJK	12,7	15,6	24,1
3	LYJ	7,9	15,1	27,5
4	JAR	17,2	19,0	23,9
5	PMJ	46,6	52,6	50,5
6	CHW	37,0	46,8	42,7
7	KMS	25,5	31,7	35,5
8	RHJ	10,3	16,6	21,6
9	KKO	18,9	27,2	38,2
10	LSR	33,7	35,8	36,0
11	PHJ	7,5	32,4	30,2
12	LSH	24,6	36,4	33,1
13	GBH	26,4	33,5	38,5
14	JDO	16,0	16,4	16,5
15	YTY	9,1	16,5	19,7
16	LJY	36,0	39,1	38,4
17	LJK	16,3	22,8	20,6
18	GDH	19,3	35,6	36,6
19	PYS	16,3	13,3	19,3
20	YHS	8,6	9,5	9,6
<b>평균</b>		<b>20.12</b>	<b>26.65</b>	<b>29.36</b>
<b>표준편차</b>		<b>11.10</b>	<b>12.15</b>	<b>10.23</b>

[그림 47] 수분 측정 결과표



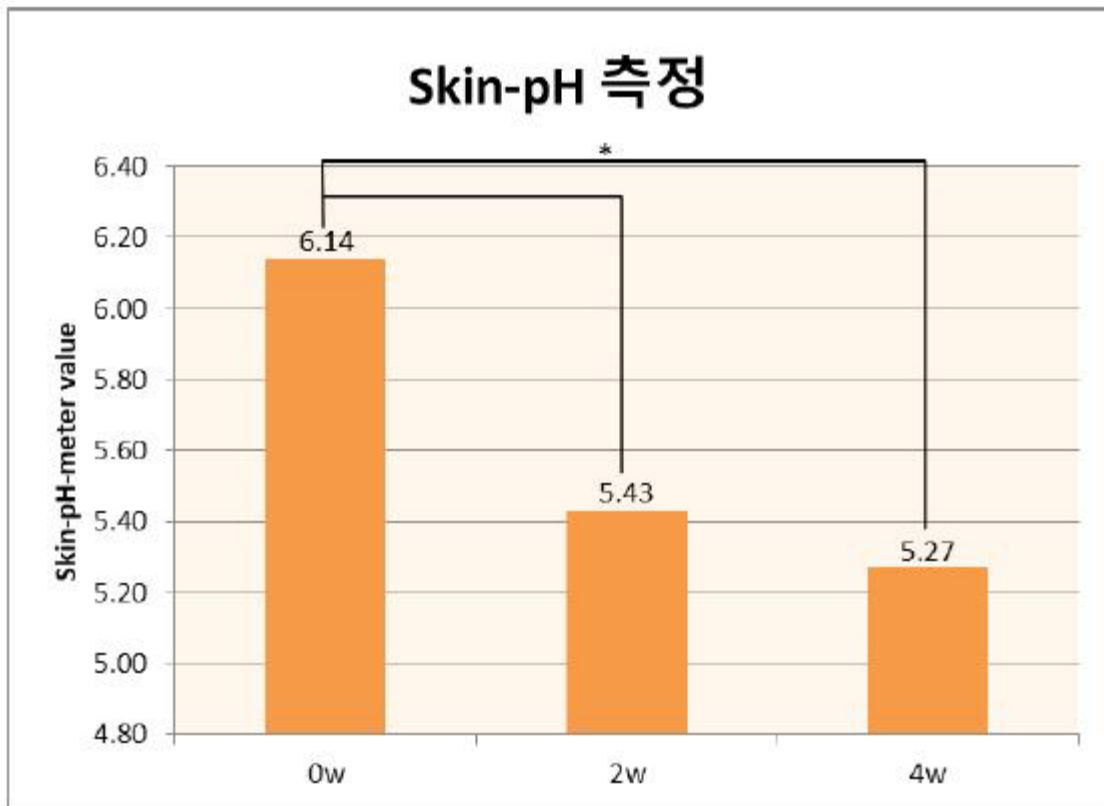
(3) Skin-pH 측정 결과

	0 주	2 주	4 주
평균	6.14	5.43	5.27
표준편차	1.55	0.69	0.62

[그림 48] Skin-pH 변화 측정 결과

	2 주	4 주
p-value	0.062	0.037

[그림 49] 통계학적 분석결과



\* $p < 0.05$  (제품 사용 전, 후의 통계적인 유의성)

[그림 50] Skin-pH 측정 결과

시험 부위의 skin-pH는 제품 사용 전(0주) 6.14에서 제품 사용 2주 후 5.43, 제품 사용 4주 후 5.27로 감소함. 통계분석 결과, 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 4주 후에서 통계적으로 유의한 수준의 차이로 감소함( $p < 0.05$ ).

아토피 피부염의 증상이 심할수록 높은 pH를 나타내며, 개선됨에 따라 pH값이 점점 낮아지게 됨.

#### 4. Skin-pH 측정

No.	Initial	0 주	2 주	4 주
1	MJH	4.97	6.15	5.88
2	PJK	4.57	6.26	6.19
3	LYJ	6.68	6.31	6.59
4	JAR	4.54	4.79	5.48
5	PMJ	4.64	4.43	4.69
6	CHW	6.79	5.56	4.98
7	KMS	6.62	4.28	4.24
8	RHJ	5.77	4.43	5.28
9	KKO	4.87	5.86	4.95
10	LSR	8.52	5.14	4.95
11	PHJ	6.32	5.76	6.42
12	LSH	4.29	4.69	4.76
13	GBH	9.64	6.46	4.85
14	JDO	8.77	5.26	5.12
15	YTY	7.63	4.86	4.87
16	LJY	4.47	5.86	4.85
17	LJK	5.81	5.69	5.15
18	GDH	6.68	6.08	5.90
19	PYS	5.35	5.01	4.84
20	YHS	5.84	5.69	5.40
<b>평균</b>		<b>6.38</b>	<b>5.80</b>	<b>5.47</b>
<b>표준편차</b>		<b>1.24</b>	<b>1.04</b>	<b>0.68</b>

[그림 51] Skin-pH 측정 결과표

## 9. 고찰 및 결론

본 시험은 고려제약 주식회사에서 의뢰한 “KDC14-2”에 대한 아토피 개선 효능을 평가하기 위한 인체적용시험임.

- 1) 시험에 참여한 최종 피험자는 20명으로 평균 17.0세이며, 여성 9명, 남성 11명으로 구성
- 2) **SCORAD INDEX 측정 결과**, 제품 사용 전(0주) 29.51, 제품 사용 2주 후 25.55, 제품 사용 4주 후 24.17으로 감소함. 제품 사용 전(0주)와 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 확인함( $p<0.05$ ).
- 3) **경피수분손실량(TEWL) 측정 결과**, 제품 사용 전(0주) 25.46 g/m<sup>2</sup>/h에서 제품 사용 2주 후 22.94 g/m<sup>2</sup>/h, 제품 사용 4주 후 19.92 g/m<sup>2</sup>/h로 감소함. 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 확인함( $p<0.05$ ).
- 4) **수분 측정 결과**, 제품 사용 전(0주) 20.12A.U.에서 제품 사용 2주 후 26.65A.U., 제품 사용 4주 후 29.36A.U.로 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후와 4주 후에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 확인함( $p<0.05$ ).
- 5) **Skin-pH 측정 결과**, 제품 사용 전(0주) 6.14에서 제품 사용 2주 후 5.43, 제품 사용 4주 후 5.27로 감소함. 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 4주 후에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 확인함( $p<0.05$ ).

본 시험이 진행되는 동안 피부 이상반응은 관찰되지 않음.

**이상의 결과로 고려제약 주식회사에서 의뢰한 “KDC14-2”은 아토피성 피부에 도움을 주는 효과가 있다고 사료됨( $p<0.05$ ).**

## 10. 시험 기관 실태 조사서

### 1. 연구기관

연구기관명: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

주 소: 충북 제천시 신월동 세명로 65 한방바이오산업 임상지원센터

### 2. 연구기관의 설립목적

본 연구기관(연구센터)는 기업체들의 센터의 지원을 통하여 안전성실험, 효능효과실험 등을 거쳐 안전하고 신뢰받는 바이오 제품을 생산함으로써 고부가가치의 한방바이오산업을 육성하고자 설립된 산업자원부 지정 지역혁신센터(RIC)로서, 특히 화장품 및 한방 화장품의 기능성 화장품 인증에 관련된 인체적용시험(자외선차단지수, 자외선A 차단지수, 주름, 미백개선)을 수행하고, 이와 관련된 인력양성 및 기술 개발을 위해 설립된 기관이다.

## 8. 제품 생산 계약

### 화장품 위·수탁 생산 계약서

본 계약서는 경기도 이천시 신둔면 원적로 69-10 에 소재한 '고려제약주식회사'(이하 위탁자 "갑"이라 한다)와 인천시 남동구 논현고잔로 97 에 소재한 '주식회사 포아렌' (이하 수탁자 "을"이라 한다)는 살비아토 로션(가칭) 생산에 대하여 아래와 같이 위·수탁 계약을 체결한다.

- 아 래 -

#### 제 1 조 (목적)

"갑"은 "을"에게 살비아토 로션의 생산을 위탁하고, "을"은 수탁 받은 '제품'의 생산공정에 따른 관리, 품질관리 및 '제품'의 발주 및 납품 등 전반적인 규정하여 위·수탁 생산에 따른 관리 및 책임을 원활히 하고자 함을 목적으로 한다.

#### 제 2 조 (계약제품)

"갑"은 "을"에게 살비아토 로션 생산을 위탁한다.

[그림 49] 화장품 위·수탁 생산 계약서

### 화장품 품질위탁시험 계약서

본 계약서는 경기도 이천시 신둔면 원적로 69-10에 소재한 '고려제약주식회사' (이하 "갑"이라 한다) 와 인천시 남동구 논현고잔로 97에 소재한 '주식회사 포아렌' (이하 "을"이라 한다) 은 살비아토 로션(가칭) 품질위탁시험에 대하여 아래와 같이 위·수탁 계약을 체결한다.

#### 제 1 조 (목적)

화장품법 제5조(제조판매업자 등의 의무 등), 동법 시행규칙 제11조(제조판매업자의 준수사항 등) 제6호에 따른 품질검사의 위·수탁 계약을 체결한다.

#### 제 2 조 (위탁시험의 종류)

1. 법규에 의한 시험은 생산 공정 중 혹은 완료된 "제품"에 대해 법적 의무사항인 시험(안정성시험 포함)을 말한다.
2. "갑"이 요청하는 시험은 법규에 의한 시험을 제외한 "제품"에 대한 추가적인

[그림 50] 화장품 품질위탁시험 계약서

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
○ 목표 달성도			
구분	연구개발의 목표	달성내용	달성도(%)
1차년도	<p>&lt;주관: 경북대학교&gt; 아토피피부염 저해활성 검색계 확립 및 운용 및 활성소재의 <i>in vivo</i> 효능 검증</p>	<p>-검색계 4종 확립: 집먼지 진드기 유도 아토피 동 물 모델, 접촉피부염 동물 모델, 피부알레르기 동 물 모델, <i>S. aureus</i> 도포에 의한 아토피 악화 동 물 모델 확립</p> <p>-유효 생물소재 2종 도출: 적소두 추출물, 곰보배추 추출물 도출</p>	100
	<p>&lt;주관&gt; 검증된 소재(생강나무)의 면역안전성 연구</p>	<p>-피부감작성 시험 1건: 생강나무 추출물</p> <p>-면역안전성 평가 1건: 생강나무 추출물</p>	
	<p>&lt;1협동: 한국생명공학연구원&gt; 소재의 표준화 및 규격화 연구</p>	<p>-곰보배추로부터 세스퀘테르펜계 화합물 9종, Phenolic 화합물 6종으로 총 15종의 유효화합물 분리정제</p> <p>-적소두로부터 Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol 총 4종의 유효 화합물 분리정제</p> <p>-곰보배추의 지표물질로 caffeic acid, luteolin-7-O-<math>\beta</math>-D-glucoside, rosmarinic acid, homoplantagenin, luteolin, hispidulin 4종을 선정</p> <p>-적소두의 지표물질로 Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol 4종을 선정</p>	
	<p>&lt;1협동&gt; 실험실에서 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립</p>	<p>-곰보배추와 적소두에서 에탄올 추출공정법을 개 발함</p>	
	<p>&lt;제2협동: 고려제약주식회사&gt; 천연물 화장품 원료 최적화 연구</p>	<p>-유효성분 rosmarinic acid, lute-7-Glc에 대한 안 정성 분석을 진행함</p> <p>-적소두 추출물로 아토피 개선 평가를 진행함</p>	
	<p>&lt;제2협동&gt; 최적화된 신규 원료 소재의 효능 검증 평가</p>	<p>-In vitro 효능 검증을 통해 최종 화장품용 천연물 원료를 개발하고 이로부터 기능성 화장품 원료로 개발하여 적용 가능성 검토함</p>	
	<p>&lt;주관&gt; 효능이 검증된 후보소재의 기전연구</p>	<p>-효능이 검증된 후보소재인 UAA, UA, 개머루 덩 굴의 히스타민 유리 기전, NF-kB 저해 역할과 Th2 억제 기전을 증명하였음</p>	
2차년도	<p>&lt;주관&gt; 후보소재의 면역안전성 연구</p>	<p>-개머루 덩굴이 피부감작성 시험과 면역안전성 평 가에서 문제없음을 확인함</p>	100

<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 피부 장벽강화 효과 연구</p>	<p>-병리검사를 통해 아토피 질환 동물모델에서 발굴된 유효물질인 UAA, UA, 개머루덩굴의 피부 장벽강화 효과를 확인하였음</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 피부 아토피 염증개선에 대한 효과 연구</p>	<p>-후보소재인 적소두 추출물과 곰보배추 추출물의 항염증 효과를 검증함</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 아토피 개선효과 평가 (SCORAD Index)</p>	<p>-SCORAD index 평가 결과 적소두, 곰보배추, UAA, UA, 개머루 덩굴의 아토피 개선효과를 평가하였음</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 아토피 유발세포(keratinocytes, mast cells)에서 활성 검증 및 추가 소재 도출</p>	<p>-UAA, UA, 개머루 덩굴이 Th1/Th2/Th17 cytokines 분비를 줄이고 NF-kB, NFATc1를 억제하여 히스타민 및 Th1 cytokines 분비 억제를 확인하였음</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 검증된 소재(적소두 추출물)의 <i>in vivo</i> 효능 평가 (topical 처리)</p>	<p>-집먼지 진드기를 귀에 도포시켜 유발한 아토피 모델에서 적소두 추출물 (KR 300) 을 topical 처리하여 효과 확인 함. (귀두께 비후, 항원특이적 IgE 유리, 히스타민 유리등)</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;주관&gt;</b> 선정소재에 대한 항균력시험</p>	<p>-미국 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S25, 2015에서 인용된 국제적으로 표준화된 방법으로, Broth dilution법을 이용하여 적소두 추출물 (KR 300), 곰보배추 추출물 (KR 500)의 항균력을 확인 함</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;1협동&gt;</b> 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립</p>	<p>-새로운 지표성분 선정을 위한 분리정제 및 함량 분석: Luteolin-7-glucoside (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>: 448.37) 와 Rosmarinic acid (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>: 360.32)에 대한 HPLC 분석결과, 각각 1.23%와 3.82% 함유되어 있는 것을 확인하였으며, 곰보배추 농축액 분석을 위한 지표성분으로 선정하였음</p> <p>-대량생산 공정 기술 개발: 100kg 기준 곰보배추 에탄올 환류추출 방법, 여과 후 감압농축 방법 및 농축액과 1, 3-Butylene Glycol (1,3-BG)의 혼합비율 설정을 통하여 대량생산 공정 기술을 개발하였음</p> <p>-대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립: 액체크로마토그래피법을 이용한 step gradient 용매 조건을 이용하여 컬럼, 이동상 및 분석 시간을 설정하여 원료의 분석법을 확립하였음</p>
<p style="text-align: center;"><b>&lt;1협동&gt;</b> 대량생산된 원료의 안정성 시험</p>	<p>-대량생산된 원료의 가속, 가혹, 장기 안정성 시험: 85~90℃에서 중탕하여 3시간 후 확인하는 방법으로 대체하여 진행 완료함</p>

	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 화장품 제형 개발</p>	-식약처 가이드라인을 평가 방법으로 설정하여 아토피 개선 기능 원료의 흡수 증대 및 보습력 평가를 통하여 기능성 제품 개발에 적용함	
	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 원료 소재의 전임상 독성시험</p>	-전임상 위탁 시험 기관 “(주)바이오톡스텍”과 용역 계약을 체결하여 항목별 전임상 시험 진행함	
3차년도	<p><b>&lt;주관&gt;</b> Omics와 systems biology를 이용한 후보물질의 작용기전 연구</p>	-Label free quantification을 위한 nanoUPLC-QTOF MS analysis 후, Ingenuity pathway analysis 소프트웨어를 이용하여 네트워크 분석을 수행한 결과, KR 500에 의해 변화하는 4개의 단백질 FASN, CS, YWHAЕ, ACLY 확인	100
	<p><b>&lt;1협동&gt;</b> 원료추출물의 대량생산 및 공급</p>	-임상 및 시작품 제작을 위한 원료의 지속적인 대량생산 및 공급을 진행함 ((주)두레와 용역 계약 체결)	
	<p><b>&lt;1협동&gt;</b> 대량생산된 원료의 지속적인 QC/QA</p>	-Luteolin-7-glucoside (1.23% 이상)와 Rosmarinic acid (3.82% 이상)를 지표성분으로 지속적인 함량평가 및 건조감량, 중금속, 잔류 농약 분석 등을 통한 원료 품질 일원화함	
	<p><b>&lt;1협동&gt;</b> 대량생산된 원료의 지속적인 장기 안정성 시험</p>	-사용기한 설정을 위한 보관, 운반, 사용 조건에 따른 물리적, 화학적, 미생물학적 안정성 및 내용물과 용기의 적합성 평가를 진행함	
	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 시작품 생산</p>	-화장품 시작품 제작을 위한 Baseline 제조 및 설문조사를 통한 의견을 반영하고 아토피 활성시험을 통해 적절한 추출물 비율을 결정하여 화장품 제조회사와 시작품 제작 진행함	
	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 제조공정 확립 및 표준화</p>	-원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립함 -지표성분연구를 통한 기준 및 시험방법을 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료함	
	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 제품 안정성 확립 및 분석법 연구</p>	-시작품에 대한 온도 변화에 따른 변화 측정 시험 통하여 완제 안정성 확인함 -첨가된 원료에 따른 제품에서의 함량분석 확인함 -확립된 제품의 공정 및 함량 분석방법을 이용하여 제품에 대한 기준 및 시험 방법을 확립함	
	<p><b>&lt;제2협동&gt;</b> 제품 효능평가</p>	-‘세명대학교 한방바이오사업 임상지원센터’를 통해 인체적용시험을 진행하여 제품이 아토피 증상을 완화함을 확인함	



#### 4-2. 관련분야 기여도

- 국내 농산물로부터 부작용 없이 안전한 아토피피부염 악화인자 제어 천연소재를 개발함으로써 기존 약물 중 부작용이 알려져 있는 스테로이드, 면역억제제, 항생제 및 항히스타민제 시장을 잠식할 수 있을 것으로 기대함
- 아토피 치료효과 증진을 위한 건강기능식품 개발에 요구되는 효능평가기술, 독성평가기술 등의 기반 기술 및 노하우를 확보함으로써 향후 다양한 천연물 건강보조식품 개발을 위한 기반 기술 확립에 기여
- 국내 농산물 자원의 신소재화
  - 국내 농산물자원인 곰보배추(배암차즈기)를 이용하여 아토피 치료제 및 화장품에 적용 가능한 고부가가치 신소재로 개발
  - 향후 농산물 신소재를 이용한 천연물 기능성소재 개발 분야에 원천기술 확보를 위한 적절한 모델을 제시하였다고 판단됨
- 원료 표준화 공정 및 안정성
  - 원료 품질 확인을 위한 일원화된 COA (Certificate Of Analysis) 확립 : 건조감량, 색상, 중금속, 잔류농약 분석, 미생물 한도시험, 비중 등의 지표 항목 설정 및 신규 기시험 확립
  - 기숙, 가혹, 장기보존 연구 결과 확보를 통한 신소재에 대한 안정성 시험 기술 확립
  - 향후 농산물 신소재 개발을 위한 표준화 원천기술에 적용 가능할 것으로 기대됨
- 제조 공정 확립 및 공정화
  - 원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립함
  - 지표성분 연구를 통한 기준 및 시험방법을 확립하고 그 시험법을 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료함
- 제품 안정성 확립 및 분석법 연구
  - 시제품에 대한 온도 변화에 따른 변화 측정 시험 통하여 완제 안정성 시험 확립함
  - 첨가된 원료에 따른 제품에서의 함량분석 방법을 확립함
  - 확립된 제품의 공정 및 함량 분석방법을 이용하여 제품에 대한 기준 및 시험방법을 확립함
  - 시제품에 대한 안정성 확립 및 분석법 연구를 확립함으로써 제품의 안정성, 분석법 적용 가능할 것으로 기대됨

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 아토피피부염에 효능이 있는 화장품 개발</li> <li>○ 아토피피부염에 대한 생리활성물질을 함유하는 국내 농산물 자원(미생물 및 식물)을 화장품 또는 식·의약 원료로 공급</li> <li>○ 신기능 생물소재의 최적화 기술 확보에 따른 연구개발의 모델화</li> <li>○ 기능성 소재의 도출 및 작용기전 연구결과는 유명학회 및 학술지에 발표를 통한 검정</li> <li>○ 생리활성 신기능 생물 소재의 수입대체 및 수출 효과</li> <li>○ 관련 질환 치료제의 목표 지향적 target으로 질병의 병태생리와 발생기작 등의 연구에 크게 기여</li> <li>○ 화장품 제품 개발 후 사업화 및 시장진입 전략               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고려제약의 국내영업망 및 마케팅 전략으로 국내 시장 점유가 용이할 뿐만 아니라 고려제약이 현재 의약품을 수출하고 있는 해외수출국가(중국, 베트남, 캄보디아, 싱가포르, 필리핀, 예멘, 에콰도르)에도 수출이 가능</li> <li>- 어린이 보습 및 아토피 개선을 위한 제품개발팀 뿐만 아니라 이들 제품의 효능 및 매출을 꾸준히 모니터링할 수 있는 전담팀을 만들어 고객의 needs를 지속적으로 파악하고 제품을 개선함</li> <li>- 종합병원뿐만 아니라 의원과 약국에도 진출할 계획임</li> </ul> </li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해당사항 없음</li> </ul>		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 일반</li> </ul>		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11
<p>가. 연구실 안전 점검 및 진단</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 소속기관의 연구실 안전관리 규정을 바탕으로 연구실 안전관리 담당자를 지정하여 매일 일반안전, 소방안전, 전기안전, 화공안전, 생물안전, 가스안전, 사업위생에 관하여 점검함.</li> <li>▷ 매년 교육시설 재난 공제회에서 실시되는 연구실 점검 및 정밀 안전진단을 평가하여 주기적으로 문제점을 파악하고 개선하여 연구실 안전성을 확보 및 유지함.</li> <li>▷ 각 연구실마다 소화기를 비치하고, 안전보호구함을 설치하여 개인 보호구인 방독 마스크, 보안경, 후레쉬 등을 비치하였으며, 연구실 앞 복도에 비상용 세척설비(세안기)를 설치하여 비상사태를 대비함.</li> </ul> <p>나. 연구실 안전 교육</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▷ 연구실에 소속되어 있는 모든 참여원은 각 소속기관에서 실시하는 연구실 안전 정기 교육과정을 매년 8시간 이상씩 이수하여 연구실 안전수칙에 대해 자각하고 준수함.</li> <li>▷ 연구실 내부에 연구실 안전 수칙과 비상연락망, 비상시 행동 요령 등을 눈에 잘 띄는 곳에 비치하여 안전사고에 대비함.</li> </ul>			

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호	D-12		
번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기 사항 (SCI 여부/ 인용 횟수 등)
1	논문	Oleanolic acid acetate inhibits rheumatoid arthritis by modulating T cell immune responses and matrix-degrading enzymes.	경북대학교	교신 저자	Toxicology and Applied Pharmacology	3.847	2016.01.01	중복사사	SCI
2	논문	Anti-allergic and anti-inflammatory effects of aqueous extract of Pogostemon cablin	경북대학교	교신 저자	International Journal of Molecular Medicine	2.348	2016.01.01	중복사사	SCI
3	논문	1,2,4,5-Tetramethoxybenzene suppresses house dust mite-induced allergic inflammation in BALB/c mice	경북대학교	교신 저자	International Archives of Allergy and Immunology	2.677	2016.07.01	중복사사	SCI

4	논문	Association between perfluorooctanoic acid exposure and degranulation of mast cells in allergic inflammation.	경북대학교	교신저자	Journal of Applied Toxicology	2.722	2016.09.29	중복사사	SCI
5	논문	2-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid attenuates mast cell-mediated allergic reaction in mice via modulation of the FcεRI signaling pathway.	경북대학교	교신저자	Acta Pharmacologica Sinica	3.166	2017.01.02	중복사사	SCI
6	논문	Suppressive effect of aqueous extract of Diospyros kaki calyx on dust mite extract/2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesion	경북대학교	교신저자	International Journal of Molecular Medicine	2.348	2017.08.01	중복사사	SCI
7	논문	House dust mite increases pro-Th2 cytokines, IL-25 and IL-33 via the activation of TLR1/6 signaling	경북대학교	교신저자	Journal of investigative dermatology	6.287	2017.11		SCI
8	논문	Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier	경북대학교	교신저자	Food and chemical toxicology	3.778	2017.11		SCI
9	논문	Chrysin attenuates atopic dermatitis by suppressing inflammation of keratinocytes.	경북대학교	교신저자	Food and Chemical Toxicology	3.778	2017.12	중복사사	SCI
10	논문	Diospyros kaki calyx inhibits immediate-type hypersensitivity via the reduction of mast cell activation	경북대학교	교신저자	Pharmaceutical biology	1.916	2017.12		SCI
11	논문	Anti inflammatory effect of Amomum xanthioides in a mouse atopic dermatitis model.	경북대학교	교신저자	Molecular Medicine Reports	1.692	2017.12	중복사사	SCIE

12	특허	2-(4-hydroxyphenyl) ethanol을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	경북대학교	발명인	대한민국		2015.02.17	중복사사	출원
13	특허	2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물	경북대학교	발명인	대한민국		2016.02.01	중복사사	출원
14	특허	1,2,4,5-tetramethoxybenzene을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물	경북대학교	발명인	대한민국		2016.02.02	중복사사	특허등록
15	특허	해당화 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	한국생명공학연구원	발명인	대한민국		2016.07.15	중복사사	출원
16	특허	해당화 꽃 추출물을 유효성분으로 포함하는 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	한국생명공학연구원	발명인	국외		2016.07.15	중복사사	해외특허
17	특허	올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 약제에 의해 유발되는 신장독성의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	한국생명공학연구원	발명인	국외		2016.10.03	중복사사	해외특허
18	특허	올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 약제에 의해 유발되는 신장독성의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	한국생명공학연구원	발명인	대한민국		2016.10.04	중복사사	출원
19	특허	2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물	경북대학교	발명인	대한민국		2017.04.24	중복사사	특허등록
20	특허	올레아놀린산 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 약제에 의해 유발되는 신장독성의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	한국생명공학연구원	발명인	대한민국		2017.05.11	중복사사	특허등록

21	특허	섬유화증 예방, 개선 또는 치료용 조성물	한국생명공학연구원	발명인	대한민국		2017.06.30	중복사사	출원
22	특허	살비아토	고려제약주식회사	발명인	대한민국		2017.12.05	단독사사	출원

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14		
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 헤럴드 경제, 2013년</li> <li>○ 보건복지부, 2013년</li> <li>○ 토러스 투자증권, 2014년</li> <li>○ 아토피 치료제 관련 국내외 특허 분석을 통한 기술개발 트렌드 및 국내 보유기술 분석 연구, 생명공학정책연구원, 2007</li> <li>○ Datamonitor, Atopic dermatitis, 2007</li> <li>○ Healthcare and medical, Atopic dermatitis-Epidemiology forecast to 2022, 2013</li> <li>○ Antonio G. G.; Teresa A. G.; Javier G. L.; Jesús T. V.; Rodríguez M. L.; Ravelo J. L.; Jairo C.; Augusto R. Sesquiterpene lactones from <i>Salvia palaefolia</i>. <i>Phytochemistry</i>. 1990, 29(11), 3581-3585.</li> <li>○ Gao, C.; Han, L.; Zheng, D.; Jin, H.; Gai, C.; Wang, J.; Zhang, H.; Zhang, L.; Fu, H. Dimeric Abietane Diterpenoids and Sesquiterpenoid Lactones from <i>Teucrium viscidum</i>. <i>J. Nat. Prod.</i> 2015, 78, 630 - 638.</li> <li>○ Jang, H. J.; Oh, H. M.; Hwang, J. T.; Kim, M. H.; Lee, S.; Jung, K.; Kim, Y. H.; Lee, S. W.; Rho, M. C. Eudesmane-type sesquiterpenoids from <i>Salvia plebeia</i> inhibit IL-6-induced STAT3 activation. <i>Phytochemistry</i> 2016, 130, 335 - 342.</li> <li>○ Liu, Y.; Ma, J.; Wang, Y.; Donkor, P. O.; Li, Q.; Gao, S.; Hou, Y.; Xu, Y.; Cui, J.; Ding, L.; Zhao, F.; Kang, N.; Chen, L.; Qiu, F. Eudesmane-Type Sesquiterpenes from <i>Curcuma phaeocaulis</i> and Their Inhibitory Activities on Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Cells. <i>Eur. J. Org. Chem.</i> 2014, 2014, 5540 - 5548.</li> <li>○ Li, W.; Deng, Y.; Dai, R.; Yu, Y.; Saeed, M. K.; Li, L.; Meng, W.; Zhang, X. Chromatographic fingerprint analysis of <i>Cephalotaxus sinensis</i> from various sources by high-performance liquid chromatography - diodearray detection - electrospray ionization-tandem mass spectrometry. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i>, 2007, 45, 38-46.</li> <li>○ Zhao, Y.; Li, Z.; Zhou, X.; Cai, Z.; Gong, X.; Zhou, C. Quality evaluation of <i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i>, 2008, 48, 1230-1236.</li> <li>○ Jin, X. F.; Lu, Y. H.; Wei, D. Z.; Wang, Z. T. Chemical fingerprint and quantitative analysis</li> </ul>				

of *Salvia plebeia* R. Br. by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm Biomed. Anal.*, 2008, 48, 100-104.

- Chen, L.; Kang, Y. H. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of plebeian Herba (*Salvia plebeia* R. Br.) under different cultivation conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62, 2190-2197.
- 2014 아토피 피부염 시장현황 및 전망 보고서
- 2012 국민건강통계, 통계청
- 2014 화장품 제조·유통 조사
- 2016 화장품산업분석보고서
- 2012 네오팜 사업보고서
- 2017 한국경제산업 분석보고서
- 중소·중견기업 기술 로드맵 2017-2019
- 서울대학교병원 의학정보, 서울대학교병원
- 바이오인더스트리, 아토피피부염 시장현황 및 전망, 생명공학정책연구센터, 2014
- Atopic Dermatitis-Global, Drug Forecast and Market Anlysis to 2022, 2013 생명공학정책센터 재가공
- 대한화장품협회 화장품 생산실적 자료(2015년)
- 2012 화장품산업분석보고
- 보건복지부 질병관리 본부 자료
- 기능성화장품 소비실태 및 인지도 조사 (식품의약품안전처)
- 국내 소비자의 기능성화장품 구매행태 및 선복화 활용 기능성화장품 상품화를 위한 연구(한국산 학기술학회논문지. 2016)
- Choi JK, Oh HM, Lee S, Kwon TK, Shin TY, Rho MC, Kim SH. *Salvia plebeia* suppresses atopic dermatitis-like skin lesions. *Am J Chin Med.* 2014, 42, 967-985.
- 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터
- 대한화장품협회 (화장품 성분 표준 정보)



<별첨작성 양식>

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 아토피피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화				
	(영문) Development and commercialization of natural substance for controlling atopic dermatitis aggravating factors				
주관연구기관	경북대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 경북대학교 산학협력단	
참 여 기 업	고려제약주식회사			(성명) 김상현	
총연구개발비  (1,200,000 천원)	계	1,200,000	총 연구 기간	2014.11.28.~2017.11.27 (3년)	
	정부출연 연구개발비	900,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	46 명
	기업부담금	300,000		내부인원	24 명
	연구기관부 담금			외부인원	22 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 농산자원을 활용하여 아토피피부염 악화인자를 제어하는 천연 소재 개발 및 제품화</li> <li>- 아토피피부염 악화인자(가려움, 세균증식, 건조증)를 억제함으로써 피부염을 개선할 수 있는 천연물 기반의 소재 발굴 및 국소 적용 (topical treatment) 제품 개발</li> <li>- 국내 우수한 천연물 자원과 제품화 기술을 활용하여 사회적 이슈인 아토피피부염 문제를 해결 또는 경감</li> <li>- 아토피 및 접촉피부염 동물모델에서의 유효성 평가, 안전성 평가 및 오믹스/systems biology 기법을 활용한 기전연구를 통해 피부염 악화인자 억제 기반기술 확립</li> <li>- 아토피피부염 악화인자를 제어하는 소재의 표준화 및 규격화 연구</li> <li>- 후보 소재의 대량생산 공정 개발 및 최적화</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 아토피 시장 분석 및 제품 연구 개발 전략 수립             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 아토피 시장 분석 및 타겟층 분석</li> <li>• 시장 분석 결과 및 소비자 니즈 분석 통한 연구 개발 전략 수립</li> </ul> </li> <li>- 선행연구결과로 확보된 천연물 유래 소재의 생리활성 평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 가려움 억제, 항균, 피부 장벽강화, 피부 아토피 염증개선, SCORAD Index 평가</li> <li>• 아토피 및 접촉피부염 동물실험을 통한 효능 평가</li> <li>• S. aureus 도포에 의한 아토피 악화 증상 억제 효능 평가</li> </ul> </li> <li>- 항아토피 천연물 소재 추가 탐색             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 천연물 library에서 아토피피부염 원인세포 활성억제 소재 탐색 (keratinocyte, mast cell 모델)</li> <li>- 작용기전 연구</li> </ul> </li> </ul>					

- 아토피 원인세포의 활성화 및 분화 억제 기전 연구
- Omics와 systems biology를 이용한 작용기전 연구, 작용점으로 발굴된 분자와 상호작용하는 신호전달물질 규명
  - 천연물 소재의 안전성 평가
- 피부감작성, 면역안전성 및 전임상 독성평가를 통한 소재 안전성 연구
  - 소재 표준화 및 규격화 연구
- 원료 표준화, 지표물질 선정, 생리활성 물질 분리/정제
- 최적 배합비 연구 및 표준화
  - 실험실 및 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립
  - 국소 적용 제제 연구
- 천연물 함유 제제 개발
- 천연물 미립화 등을 이용한 피부 흡수력 증대 기술 개발
  - 제품화 연구
- 참여기업으로 기술을 이전을 통한 제품 상용화 환경 구축
  - 제품 시장 진입 전략 수립
- 개발된 제품의 아토피 관련 시장 진입 전략 수립
- 제품 출시 및 제품 출시에 따른 판매 홍보 전략 수립

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 아토피피부염에 대한 글로벌 시장은 이미 연간 백억 달러를 상회하고 있으며, 수백억 달러 규모로 성장할 잠재력이 있음. 특히 치료약이 없는 아토피피부염의 특성상 유력한 선도물질을 도출하여 식·의약품으로 개발한다면 시장을 선점할 수 있는 것으로 사료됨
- 또한 본 연구의 탐색계 운용을 위한 세포주, 정보 및 기본 시설을 미리 확보하고 있으며 우리 실정에 맞는 연구체계 확립을 위한 준비를 갖춘 상태이므로 작은 투자로도 선진국과의 경쟁이 충분히 가능하며 국가 경제와 의약산업 및 보건의료 산업에 기여할 수 있을 것으로 기대됨
- 현재까지 아토피에 적용하는 약물 대부분이 외국에서 개발되었고 외국제약회사로부터의 수입에 의존하고 있으므로, 본 연구는 전 세계적으로 아직 개발되지 않은 질환 표적기반 면역 질환 예방 및 치료를 위한 기능성 식·의약품을 개발하는 것으로 기술 개발이 성공한다면 국내 면역 질환의 예방 및 치료에 사용되고 있는 수입 의약품의 대체 효과가 기대됨
- 생물다양성 보존을 위한 국제협약이 강화되어감에 따라 유용성이 인정되는 유용자원을 우선적으로 확보 보존한다는 차원에서 국내 농산자원 또는 특용자원으로부터 유용자원을 탐색하여 새로운 자원으로 발굴 보존하고 그 유용물질을 밝혀 그 경제적 유용성 개발을 위한 연구가 요구되며 특히, 장기간 복용 가능하고 부작용이 적은 천연소재 산업발전에 기여할 수 있을 것으로 기대됨
- 아토피 치료효과 증진을 위한 건강기능식품 개발에 요구되는 효능평가기술, 독성평가기술 등의 기반 기술 및 노하우를 확보함으로써 향후 다양한 천연물 건강보조식품 개발을 위한 기반 기술 확립에 기여
- 특히 국내에서는 아토피에 효과를 갖는 건강기능식품의 연구개발 및 인허가 사례가 없는 상황에서, 본 연구결과를 기반으로 천연물을 이용한 아토피 치료 연구개발이 활성화 될 것으로 기대됨
- 본 과제의 성공적 수행으로 발굴된 추가소재를 활용한 특허 출원이 가능함 (추가소재 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 질환의 예방 및 개선용 조성물)
- 아토피피부염에 대한 글로벌 시장은 이미 연간 백억 달러를 상회하고 있으며, 수백억 달러 규모로 성장할 잠재력이 있음. 특히 치료약이 없는 아토피피부염의 특성상 유력한 선도물질을 도출하

여 식·의약품으로 개발한다면 시장을 선점할 수 있는 것으로 사료됨

- 또한 본 연구의 탐색계 운용을 위한 세포주, 정보 및 기본 시설을 미리 확보하고 있으며 우리 실정에 맞는 연구체계 확립을 위한 준비를 갖춘 상태이므로 작은 투자로도 선진국과의 경쟁이 충분히 가능하며 국가 경제와 의약산업 및 보건의료 산업에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

- 현재까지 아토피에 적용하는 약물 대부분이 외국에서 개발되었고 외국제약회사로부터의 수입에 의존하고 있으므로, 본 연구는 전 세계적으로 아직 개발되지 않은 질환 표적기반 면역 질환 예방 및 치료를 위한 기능성 식·의약품 개발하는 것으로 기술 개발이 성공한다면 국내 면역 질환의 예방 및 치료에 사용되고 있는 수입 의약품의 대체 효과가 기대됨

- 생물다양성 보존을 위한 국제협약이 강화되어감에 따라 유용성이 인정되는 유용자원을 우선적으로 확보 보존한다는 차원에서 국내 농산자원 또는 특용자원으로부터 유용자원을 탐색하여 새로운 자원으로 발굴 보존하고 그 유용물질을 밝혀 그 경제적 유용성 개발을 위한 연구가 요구되며 특히, 장기간 복용 가능하고 부작용이 적은 천연소재 산업발전에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	314052-3	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제			총괄책임자		
과제명	아토피피부염 악화인자 제어 천연 소재개발 및 제품화		과제유형	개발	
연구기관	경북대학교 산학협력단, 한국생명공학연구원, 고려제약주식회사		연구책임자	김상현	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.11.28.~ 2015.11.27.	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2015.11.28.~ 2016.11.27.	300,000	100,000	400,000
	3차년도	2016.11.28.~ 2017.11.27.	300,000	100,000	400,000
	계		900,000	300,000	1,200,000
참여기업	고려제약주식회사				
상대국		상대국연구기관			

### 2. 평가일 :

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교 산학협력단	교수	김상현

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

다양한 아토피 악화인자를 동시에 억제하는 천연 소재를 개발하고 이를 제품화  
발병 원인이 복잡한 아토피 질환을 동시에 억제하는 소재 개발로 해당 질환치료에 대한 새로운 전략  
을 제시

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

국내농산물을 활용한 천연물 유래의 아토피 제어 화장품 제품화를 통해 국내농가의 소득증대 및 의  
약품 개발로 갈 수 있는 기반 마련

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

개발한 아토피 화장품의 제품 시장 진입 및 전략 수립을 위해 국내 아토피 시장 및 타겟층 분석 보고  
서, 개발 제품의 시장 진입 전략 보고서, 시제품의 사업화 절차 보고서를 작성  
이미 제약회사에 기술이전을 통해 선입금 5억 원의 실적을 달성  
개발한 제품의 우수한 효능과 시장 전략을 통해 매출액 3억 달성이 무난할 것으로 예상

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

과제 선정당시 제시한 연구목표를 100% 수행

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구기간(3년) 동안 특허 출원 8건, 등록 3건 (해외특허 출원 2건), 기술이전 1건(선입금 5억원),  
SCI 논문 11건, 학술 발표 25건

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가	
<주관> 아토피피부염 저해활성 검색계 확립 및 운용 및 활성소재의 <i>in vivo</i> 효능 검증	5	100	목표로 제시한 내용이 모두 성공적으로 수행됨	
<주관> 소재의 면역안전성 연구	5	100		
<주관> 효능이 검증된 후보소재의 기전연구	5	100		
<주관> 후보소재의 면역안전성 연구	5	100		
<주관> 피부 장벽강화 효과 연구	3	100		
<주관> 피부 아토피 염증개선에 대한 효과 연구	3	100		
<주관> 아토피 개선효과 평가 (SCORAD Index)	4	100		
<주관> 아토피 유발세포에서 활성 검증 및 추가 소재 도출	5	100		
<주관> 후보물질의 작용기전 검증	5	100		
<제1협동> 소재의 표준화 및 규격화	2	100		
<제1협동> 추출물 제조 공정의 최적화	3	100		
<제1협동> 대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립	5	100		
<제1협동> 대량생산된 원료의 안정성 시험	5	100		
<제1협동> 원료추출물의 대량생산 및 공급	5	100		
<제1협동> 대량생산된 원료의 지속적인 QC/QA	5	100		
<제1협동> 대량생산된 원료의 지속적인 장기 안정성 시험	5	100		
<제2협동> 천연물 화장품 원료 최적화 연구	3	100		
<제2협동> 최적화된 신규 원료 소재의 효능 검증 평가	3	100		
<제2협동> 화장품 제형 개발	4	100		
<제2협동> 원료 소재의 전임상 독성시험	3	100		
<제2협동> 시작품 생산	3	100		
<제2협동> 제조공정 확립 및 표준화	4	100		
<제2협동> 제품 안정성 확립 및 분석법 연구	5	100		
<제2협동> 제품 효능평가	5	100		
합계	100			

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

과제 선정시에 제시하였던 모든 연구목표와 연구내용이 이행되었으며 성공적으로 수행되었음  
추가적인 SCI 논문이 도출될 것으로 기대되며, 사업화를 통해 매출액 달성이 무난할 것으로 예상됨

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

특이사항 없음

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

특이사항 없음

### IV. 보안성 검토

#### 1. 연구책임자의 의견

특이사항 없음

#### 2. 연구기관 자체의 검토결과

특이사항 없음





	억제하여 히스타민 및 Th1 cytokines 분비 억제를 확인
⑨검증된 소재(적소두 추출물)의 <i>in vivo</i> 효능 평가 (topical 처리)	✓ 아토피피부염 동물모델을 이용하여 적소두 추출물 (KR 300)의 topical 처리시 효능을 검증
⑩선정소재에 대한 항균력시험	✓ 적소두 추출물 (KR 300)과 곰보배추 추출물 (KR500)의 항균력을 확인
⑪후보물질의 전사체, 단백질 프로파일 확보	✓ Label free quantification을 위한 nanoUPLC-QTOF MS analysis
⑫프로파일의 통합분석 및 작용점으로 발굴된 분자와 상호작용하는 신호전달물질 규명	✓ Ingenuity pathway analysis 소프트웨어를 이용하여 네트워크 분석을 수행한 결과, KR 500에 의해 변화하는 4개의 단백질 FASN, CS, YWHAЕ, ACLY 규명
⑬소재의 표준화 및 규격화	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 곰보배추로부터 세스퀘테르펜계 화합물 9종, Phenolic 화합물 6종으로 총 15종의 유효화합물 분리정제</li> <li>✓ 적소두로부터 Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol 총 4종의 유효화합물 분리정제</li> <li>✓ 곰보배추의 지표물질로 caffeic acid, luteolin-7-O-<math>\beta</math>-D-glucoside, rosmarinic acid, homoplantagenin, luetolin, hispidulin 4종을 선정</li> <li>✓ 적소두의 지표물질로 Oleanolic acid, Oleanolic acid acetate, Stigmasterol, <math>\beta</math>-sitosterol 4종을 선정</li> </ul>
⑭추출물 제조 공정의 최적화	✓ 곰보배추와 적소두에서 에탄올 추출공정법을 개발
⑮대량 생산 체제에서의 추출물 제조 공정의 최적화 및 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 새로운 지표성분 선정을 위한 분리정제 및 함량분석: Luteolin-7-glucoside (<math>C_{21}H_{20}O_{11}</math>: 448.37) 와 Rosmarinic acid (<math>C_{18}H_{16}O_8</math>: 360.32)에 대한 HPLC 분석결과, 각각 1.23%와 3.82% 함유돼 있는 것을 확인하였으며, 곰보배추 농축액 분석을 위한 지표성분으로 선정</li> <li>✓ 대량생산 공정 기술 개발: 100kg 기준 곰보배추 에탄올 환류추출 방법, 여과 후 감압농축 방법 및 농축액과 1, 3-Butylene Glycol (1,3-BG)의 혼합비율 설정을 통하여 대량생산 공정 기술을 개발</li> <li>✓ 대량생산된 원료의 QC/QA 분석법 확립: 액체크로마토그래피법을 이용한 step gradient 용매 조건을 이용하여 컬럼,</li> </ul>

	이동상 및 분석 시간을 설정하여 원료의 분석법을 확립
⑩대량생산된 원료의 안정성 시험	✓ 대량생산된 원료의 가속, 가혹, 장기 안정성 시험: 85~90℃에서 중탕하여 3시간 후 확인하는 방법으로 대체하여 진행
⑪원료추출물의 대량생산 및 공급	✓ 임상 및 시작품 제작을 위한 원료의 지속적인 대량생산 및 공급 ((주)두래와 용역 계약 체결) : 3 batch 원료 생산
⑫대량생산된 원료의 지속적인 QC/QA	✓ 3 batch 원료에 대한 함량분석 결과 Luteolin-7-glucoside와 Rosmarinic acid의 함량이 1.23% 이상과 3.82% 이상으로 확인되었음. 또한 3 batch 원료에 대한 건조감량, 중금속, 미생물 한도시험 결과 기준치 이하로 확인
⑬대량생산된 원료의 지속적인 장기 안정성 시험	✓ 알루미늄봉투/화이바드럼과 PE비닐봉투/알루미늄봉투/화이바드럼으로 포장한 경우에는 가속조건에서 6개월간 안정하였으며, 가혹 조건에서 성장변화나 분해산물이 검출되지 않음. 또한 장기보존 조건에서 24개월간 안정함
⑭천연물 화장품 원료 최적화 연구	✓ 유효성분 rosmarinic acid, lute,-7-Glc에 대한 안정성 분석을 진행 ✓ 적소두 추출물로 아토피 개선 평가를 진행
⑮최적화된 신규 원료 소재의 효능 검증 평가	✓ In vitro 효능 검증을 통해 최종 화장품용 천연물 원료를 개발하고 이로부터 기능성 화장품 원료로 개발하여 적용 가능성 검토
⑯화장품 제형 개발	✓ 식약처 가이드라인을 평가 방법으로 설정하여 아토피 개선 기능 원료의 흡수 증대 및 보습력 평가를 통하여 기능성 제품 개발에 적용
⑰원료 소재의 전임상 독성시험	✓ 전임상 위탁 시험 기관 “(주)바이오톡스텍”과 용역 계약을 체결하여 항목별 전임상 시험 진행 ✓ 단회투여독성시험, 1차 피부부자극시험, 안점막자극시험, 피부감작성시험, 광독성시험, 광감작성 시험 등의 시험을 통해 무독성임을 확인
⑱제형의 물성 평가 및 시작품 생산	✓ 화장품 시작품 제작을 위한 Baseline 제조 및 설문조사를 통한 의견을 반영하고 아토피 활성 시험을 통해 적절한 추출물 비율을 결정하여 화장품 제조회사와 시작품 제작 진행
⑳제조공정 확립 및 표준화	✓ 원료가 적용된 시작품의 기능성 극대화를 위한 제품 공정 확립 ✓ 지표성분연구를 통한 기준 및 시험방법을 바탕으로 대량추출 원료 생산 제조공정 및 표준화 완료
㉑제품 안정성 확립 및 분석법 연구	✓ 시작품에 대한 온도 변화에 따른 변화 측정 시험 통하여 완제 안정성 확인

	✓ 참가된 원료에 따른 제품에서의 함량분석 확인 ✓ 확립된 제품의 공정 및 함량 분석방법을 이용하여 제품에 대한 기준 및 시험 방법을 확립
㉗제품 효능평가	✓ ‘세명대학교 한방바이오사업 임상지원센터’를 통해 인체적용시험을 진행하여 제품이 아토피 증상을 완화함을 확인

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표										
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시			
												SCI	비 SCI						논문 평균 IF		
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건		
가중치																					
최종목표	4	1		1		2						6			6		6				
연구기간 내 달성실적	8	3		1	300	2						11			25		11				
달성율(%)	200	300		100		100						180			415		180				

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	아토피피부염 저해활성 검색계 및 효능 검증 기술
②	지표화합물 및 유용화합물 분리정제 및 구조동정 기술
③	지표화합물을 활용한 표준 분석법 개발 기술
④	곰보배추 추출물을 함유한 시제품의 아토피 관련 임상시험 결과 효과 입증

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	정책 자료	기타
①의 기술						○	○				
②의 기술						○		○	○		
③의 기술						○		○	○		
④의 기술						○		○			

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 아토피피부염 저해 효능 소재 개발 및 개발된 제품 효능 검증에 활용 가능
②의 기술	- 소재 표준화 작업을 위한 성분 프로파일링 연구에 활용 가능 - 선도화합물 도출에 활용 가능 - 농산물 자원 분리분석을 위한 기반 자료로 활용 가능
③의 기술	- 원료 및 시제품의 지속적인 QC/QA에 활용 - 농산물 자원을 활용한 기능성 소재 개발 연구에 활용 가능
④의 기술	- 곱보배추 추출물을 함유한 개발 제품의 아토피 완화 효능을 입증한 임상시험 결과를 강조하여 개발제품 판매 및 홍보에 활용할 계획

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SCI	비 SCI	논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용	
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	4	3		1		2	300					8		8		7			
연구기간 내 달성실적	8	3		1	300	2						11		25		11			
연구종료 후 성과창출 계획		2			200		300					2		2		1			

