과제번호
114075-03

좁은잎천선과 추출물 활용 골관절 완화 건강기능성 식품소재 개발 및 농용자원화 최종보고서

2018

농림축산식품부 농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개( ), 비공개( ),발간등록번호(○)

발간등록번호
11-1543000-002288-01

좁은잎천선과 추출물 활용 골관절 완화 건강기능성 식품소재 개발 및 농용자원화

최종보고서

2018. 6. 11.

주관연구기관 / (재)제주테크노파크
협동연구기관 / 주식회사 휴럼
협동연구기관 / 영농조합법인허브힐

농 림 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "좁은잎천선과 추출물 활용 골관절 완화 건강기능성 식품소재 개발 및 농용자원화"(개발기간 : 2014. 09. 25. ~ 2018. 03. 24.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 06. 11.

주관연구기관명 : (재)제주테크노파크 (대표자) 허 영 호 (인)

협동연구기관명 : ㈜휴럼 (대표자) 김 진 석 (인)

협동연구기관명 : 영농조합법인허브힐 (대표자) 현 창 수 (인)

주관연구책임자 : 정 용 환

협동연구책임자 : 윤 지 현

협동연구책임자 : 현 창 수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>114075-03</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2014.09.25. ~
2018.03.24.</td><td>단 계 구 분</td><td>(해당 없음)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">농생명산업기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">좁은잎천선과 추출물 활용 골관절 완화 건강기능성 식품소재 개발 및 농용자원화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">정용환</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 명
내부: 명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 천원
민간: 천원
계: 천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 23명
내부: 23명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 690,000천원
민간: 240,000천원
계: 930,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">(재)제주테크노파크
생물종다양성연구소</td><td colspan="2">참여기업명
주식회사 휴럼
영농조합법인허브힐</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명: 경희대학교</td><td colspan="2">연구책임자: 강세찬</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약	보고서 면수
1. 연구개발 목표 - 좁은잎천선과나무의 골관절 완화 건강기능성 개별인정형 원료개발 및 농용자원화	p. 10
2. 연구개발 내용 - 골관절 완화 분야 작용기전이 확립된 원료 자원화 1식 - 식품의약품안전처 개별인정형 지표물질 및 기능성분 제출 1건 - 제주 자생 좁은잎천선과나무의 건강기능식품 원료 개별인증 자료 학보 및 신청 - 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발(과제종료 후 1년) - 제주 자생 좁은잎천선과나무의 농용자원화를 위한 대량 생산기술 확립	p. 10
3. 연구결과 - 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료자원화 및 원료표준화 확립 ☞ 지표/유효성분 분리 및 기준규격설정 확립 ☞ 최적 추출공정과 표준공정법 개발 완료 - 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 유효성 평가 및 비임상 효력시험 ☞ 항염증 유효성 평가 및 기전연구 완료 ☞ 진통 및 골관절 완화 비임상효력시험 및 안전성 평가 완료 - 좁은잎천선과나무 골관절 완화 관련 인체적용시험 완료 ☞ 골관절 완화 임상 protocol 제작 및 IRB 승인 완료 - 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료 제형조건 확립 및 사업화 추진 ☞ 좁은잎천선과나무를 이용한 다양한 제형연구 ☞ 좁은잎천선과 추출물 함유 일반제품 제작 및 사업화 추진을 위한 판매전략 수립 - 좁은잎천선과나무 고품질 생산 및 대량번식기술 개발 ☞ 좁은잎천선과나무 대량생산을 위한 대량증식 시험포 조성	pp. 60~216
4. 연구성과 활용계획 - 좁은잎천선과나무 인체적용시험 완료에 따른 기능성 입증 자료 확보 - 지적재산권 활용 기술이전 실시 및 상용화 - 좁은잎천선과나무 대량증식 시험조 조성 확대를 통한 농용자원화	pp. 223~225

<요약문>

연구의 목적 및 내용	□ **연구개발 최종목표** ● 좁은잎천선과나무의 골관절 완화 건강기능성 개별인정형 원료개발 및 농용자원화 - 원료자원화: 골관절 완화 분야 작용기전이 확립된 원료 자원화 1식 - 원료표준화: 식품의약품안전처 개별인정형 지표물질 및 기능성분 제출 1건 - 제주 자생 좁은잎천선과나무의 건강기능식품 원료 개별인증 자료 학보 및 신청 - 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발(과제 종료 후 1년) - 우량종료 생산: 제주 자생 좁은잎천선과나무의 농용자원화를 위한 대량 생산기술 확립
연구개발성과	□ **연구개발 결과** ● 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료자원화 및 원료표준화 확립 - 지표/유효성분 분리: 총 5건 ☞ Syringaresinol, 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid, Vladinol F, Rutin, Nicotiflorin - 원료표준화 기준규격 설정 ☞ Nicotiflorin 함량 범위: 1.51 ~ 2.26 mg/g - 최적 추출공정과 표준공정법 개발 완료 ☞ 최종제품(타블렛) 생산공정 확립 ● 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 유효성 평가 및 비임상 효력시험 - 유효성 평가 ☞ NO 생성 억제 효능, PGE2 생성 억제 효능, 염증성 사이토카인 생성 억제 효능, 단백질 발현 억제 효능 등 평가 및 기전 연구 완료 - 비임상효력시험 ☞ 효력시험: MIA 유도 골관절염 모델 평가 완료 ☞ 독성시험: 단회, 반복독성 시험 및 유전독성(소핵, 염색체이상, 복귀돌연변이) 평가 완료 ● 좁은잎천선과나무 골관절 완화 관련 인체적용시험 완료 - 연구대상자 60명 선정 및 시험 완료 ☞ 골관절 완화 임상 protocol 제작 및 IRB 승인 완료 ● 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료 제형조건 확립 및 사업화 추진 - 다양한 제형 연구: 소비자 선호도 조사를 통한음료, 타블렛, 정(농축액) 제형 시제품 제작 - 사업화 추진을 위한 판매전략 수립 ☞ 좁은잎천선과 추출물 함유 일반제품 제작 4건 ☞ 좁은잎천선과 추출물 함유 건기식 제품개발 및 판매전략 수립

연구개발성과	● 좁은잎천선과나무 고품질 생산 및 대량번식기술 개발 - 좁은잎천선과나무 대량생산을 위한 대량증식 시험포 조성 □ **연구개발 성과** ● 특허출원: 1건 출원, 1건 출원 예정 - 좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 관절염 개선용 조성물 (10-2018-0031634, 2018.03.19.) - 좁은잎천선과 잎 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 함염증용 조성물(2018.06. 출원 예정) ● 논문: 1건 투고 심사중, 5건 작성완료 영문교정/작성 중 - 좁은잎천선과 잎 추출물이 대식세포 RAW 264.7 세포에서 미치는 항산화 및 항염증 효과 (한국자원식물학회지, 인쇄 중) - The fraction CH_2Cl_2 extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King suppresses lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses on Raw264.7 cells (J. Food and Nutrition Research, 인쇄 중) - Anti-inflammatory activity of Vladinol F isolated from *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King leaves (Plant Foods for Human Nutrition, 2018.06. 투고예정) - The fraction EtOAc extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King inhibitions inflammatory responses on raw 264.7 macrophage and collagen-induced-arthritis mice (J. Food Sciences, 2018.06. 투고예정) - The anti-arthritis effect of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King leaves extract on collagen-induced arthritis mouse model (Food & Nutrition Research, 2018.06. 투고예정) - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating the effect and safety of extracts *Ficus erecta* var. *sieboldii* King Leaves on arthritis: a study protocol (Clinical Trials in Degenerative Disease, 2018.06. 투고예정) ● 학술발표: 5편 발표, 1편 발표예정 - 좁은잎천선과 추출물이 관절염 증상에 미치는 영향. 2015년 한국자원식물학회 춘계학술발표회(2015.04.24.) - Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ficus erecta* in murine macrophage RAW 264.7 cells. 2015년 한국식품영양과학회 정기학술대회(2015.08.24.) - Anti-inflammatory activity and action mechnism of *Ficus erecta* in murine macrophage cell line RAW 264.7 cells. 2016년도 한국식품과학회(2016.08.17.)

<table>
<tr><td>연구개발성과</td><td colspan="5">- A study of anti-oxidant, No production and cholesterol esterase inhibition activity of extracts from Ficus erecta leaf. 2016년도 한국식품과학회(2016.08.17.)
- Inhibitory effect of osteoporotic factors on leaf extract of Ficus erecta var. sieboldii in MG-63 cells. 2017년도 생화학분자생물학회
- 좁은잎천선과나무 잎 추출물의 골관절염 개선 효과. 2018년 한국산학기술학회(2018.05.26.)</td></tr>
<tr><td>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</td><td colspan="5">● 좁은잎천선과나무 인체적용시험 완료에 따른 기능성 입증 자료 확보
● 좁은잎천선과나무 추출물 활용 건강지향성 식품 판매촉진 활성화
● 골관절 개선 건강기능식품 기능성 원료 소재 활용 산업화 추진
● 지적재산권 활용 기술이전 실시
● 좁은잎천선과나무 대량증식 시험조 조성 확대를 통한 농용자원화</td></tr>
<tr><td>국문핵심어 (5개 이내)</td><td>좁은잎천선과</td><td>골관절</td><td>건강기능식품</td><td>농용자원화</td><td>항염증 효과</td></tr>
<tr><td>영문핵심어 (5개 이내)</td><td>Ficus erecta var. sieboldii</td><td>bone & Joint</td><td>health functional food</td><td>agricultural resources</td><td>anti-inflammatory activity</td></tr>
</table>

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요 ······ 10

제 1 절 연구개발의 목적 ······ 10

1. 연구개발의 최종목표 ······ 10
2. 연구개발의 세부목표 ······ 10

제 2 절 연구개발의 필요성 ······ 11

1. 연구개발 후보 소재 특성 ······ 11
2. 건강기능식품 시장 현황 ······ 12
3. 건강기능식품 원료 및 주요기능 ······ 14
4. 골관절 완화 건강기능식품 소재 개발 ······ 15

제 3 절 연구개발 범위 ······ 17

1. 연구개발 범위 ······ 17

제 2 장 연구수행 내용 및 결과 ······ 18

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용 ······ 18

1. 1차년도 연구개발 목표 및 내용 ······ 18
2. 2차년도 연구개발 목표 및 내용 ······ 19
3. 3차년도 연구개발 목표 및 내용 ······ 20

제 2 절 연구수행 방법 ······ 21

1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 준비 및 유효성 평가 ······ 21
2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 관절염 모델에서의 항염증 효과 24
3. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 골관절염 완화 비임상효력시험 ·· 25
4. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료자원화 및 기준규격설정 ······ 27
5. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재의 안전성 확보 ······ 29
6. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구-1차 제형 31
7. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구-2차 제형 33

8. 안전성 시험(GLP 독성시험) ······ 34
9. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 인체적용시험 ······ 54
10. 좁은잎천선과나무 대량증식 연구 ······ 59

제 3 절 연구수행 결과 ······ 60
1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 지표/유효물질 분리 ······ 60
2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 유효성 평가 ······ 73
3. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 관절염 모델에서의 항염증 효과 87
4. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 골관절염 완화 비임상효력시험 ·· 92
5. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료자원화 및 기준규격 설정 ··· 99
6. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재의 안정성 확보 ······ 122
7. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구-1차 제형 142
8. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구-2차 제형 149
9. 안전성 시험(GLP 독성시험) ······ 164
10. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 인체적용시험 ······ 194
11. 좁은잎천선과나무 대량증식 연구 ······ 201
12. 판매전략 수립 및 사업화 ······ 207

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ······ 217
제 1 절 연구개발 목표 달성도 ······ 217
1. 연구개발의 성과 목표 ······ 217
2. 연구개발 성과 목표 달성도 ······ 218
3. 성과목표 달성을 위한 향후계획 ······ 219

제 2 절 관련분야 기여도 ······ 221
1. 기술발전 기여도 ······ 221
2. 농용자원의 산업화 기여도 ······ 221

제 4 장 연구결과 활용 계획 ······ 223
제 1 절 연구 성과의 활용분야 및 활용방안 ······ 223
1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 활용 제품의 산업화 ······ 223

2. 타 연구에의 응용 계획 ······ 224

제 2 절 기업화 추진방안 ······ 225
1. 지식재산권 확보 ······ 225
1. 기술이전 추진 ······ 225

제 5 장 참고문헌 ······ 226

〈별첨〉 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구개발의 최종목표

가. 좁은잎천선과나무(FES)의 골관절 완화 건강기능성 개별인증형 원료개발 및 농용자원화

1) 원료자원화: 골관절 완화 분야 작용기전이 확립된 원료(좁은잎천선과나무)의 자원화 1식

2) 원료표준화: 식품의약품안전처 개별인증형 지표물질 및 기능성분(유효성분) 제출 1건

3) 제주 자생 좁은잎천선과나무의 건강기능식품 원료 개별인증 자료 확보 및 신청: 생리활성기능 2등급

4) 제품개발: 생리활성기능 2등급 이상의 글로벌 건강기능식품 개발(과제종료 후 1년) 1건 이상

5) 우량종료 생산: 제주 자생 좁은잎천선과나무의 농용자원화를 위한 대량 생산기술 확립 1식

2. 연구개발의 세부목표

가. 좁은잎천선과 추출물 활용 골관절 건강 원료자원화 연구

1) 좁은잎천선과 추출물의 골관절 건강 유효성 검색

2) 골관절 건강 분야 바이오마커 분석을 통한 효능규명 및 기전연구

3) 골관절 건강 기능성에 대한 유효 및 지표성분 연구

나. 골관절 건강 기능성소재 원료표준화 연구

1) 골관절 건강 유효 및 지표성분을 이용한 원료표준화 연구

2) 지표성분을 이용한 표준기준 및 시험분석법 확립

3) 유효물질의 최적 추출공정 및 단계별 표준공정 확립

다. 기능성소재의 친환경 대량재배 및 가공기술 개발

1) 좁은잎천선과나무의 농용자원화를 위한 고품질 생산기술 확립

2) 좁은잎천선과나무의 친환경 대량재배 시스템 구축

3) 골관절 건강 기능성 관련 제품 다양화를 위한 소재 가공기술 개발

라. 골관절 건강 고부가가치 기능성 소재 및 제품 개발

1) 선행연구기술을 바탕으로 한 골관절 건강 기능성 식·음료 소재 개발

2) 식품첨가물 대체용 골관절 건강 기능성 천연 식품소재 개발

3) 농식품자원의 영양·기능성 소재 라이브러리 확보

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 후보 소재 특성: 좁은잎천선과나무(*Ficus erecta* var. *sieboldii*)

가. 한국(제주도· 전라남도)과 일본·타이완에 분포하며, 가는잎천선과나무라고도 한다. 바닷가 근처 산기슭에서 자라며 높이 2~4m의 아교목이며, 나무껍질은 잿빛이 섞인 흰색이며 어두운 갈색 피목이 있고 털이 없다. 잎은 어긋나고 천선과나무보다 좁은 바소꼴이며 길이 10~20cm이다. 끝부분이 뾰족하고 가장자리는 밋밋하거나 거친 톱니가 난다. 곁맥은 5~6쌍이고 잎자루는 길이 1~4cm이다. 꽃은 암수딴그루로 5~6월에 잎겨드랑이에 1개씩 달려 핀다. 주머니 모양의 화낭(花囊)은 달걀을 거꾸로 세워놓은 모양인데, 3개의 포가 있고 많은 꽃이 들어 있다. 지름 약 15mm로, 자란 뒤에 열매가 되어 가을에 어두운 자줏빛으로 익는다(그림 1). 번식은 꺾꽂이로 함(식품원재료검색, 식약처, 2014).

[그림 1] 좁은잎천선과나무(上)와 천선과나무(下)의 생태 및 열매 사진

나. 좁은잎천선과나무(FES) 및 천선과나무의 과실은 우내장, 뿌리는 우내장근, 경엽은 우내시라하며 약용으로 사용되어 왔다. 특히, 어린잎과 열매는 식용이 가능하며 자양(滋養), 완하(緩下), 살충, 회충, 치질(痔疾) 분야에 효과가 있다고 알려져 있음.

다. 지금까지 문헌상으로 알려진 좁은잎천선과나무(FES) 주성분은 Bergapten, Psralen, Ficin, Taraxasterol, β-sitosterol, Citrie acid, Malic acid 등이 알려져 있음.

라. 골관절염과 같은 효능을 확인하기 위한 1차 효능평가에서 좁은잎천선과나무의 추출물은 염증반응에서 발생하는 다양한 생화학적 현상인 산화질소 합성효소(nitric oxide systhase,

NOS)와 다양한 프로스타글란딘(prostaglandins)의 생합성과 관련된 사이클로옥시제나제(cyclooxygenase, COX) 등의 염증 반응 매개체에 대한 억제효능을 보이고 있음(당 연구팀의 선행연구 -> 특허등록: 10-1353576, 2014.01.14)

마. 또한, 좁은잎천선과나무에서 기존에 알려지지 않았던 활성물질인 블라디놀 F(vladinol F)이 분리되었으며, 이 물질은 NO 생성 억제활성, PGE2의 생성억제 활성 및 염증성 사이토카인의 생성 억제 활성을 보이고 있는 바, 항염증을 수반하는 골관절 완화 부분의 천연소재로 가능성을 시사하고 있음(당 연구팀의 선행연구 -> 특허등록 10-1461440, 2014.11.07.).

2. 건강기능식품 시장 현황

가. 국내 건강기능식품 시장 현황

1) 식품산업은 식품을 생산하거나 수입된 식품의 최종 소비자에에 전달되기까지 식품원료의 생산, 수집, 가공, 저장, 판매라는 여러 유통단계를 경유하게 되고, 이와 같은 유통단계를 거치면서 소비자가 원하는 형태로 변환되고 동시에 식품산업 자체의 소득을 유발시키게 되면 고용 및 부가가치를 창출하게 됨.

2) 국내의 경우 평균 수명의 연장, 생활수준의 향상 등에 따라 삶의 질에 대한 의식이 높아지면서 웰빙(well-being) 이나 로하스(LOHAS, Lifestyles Of Health And Sustainability), 셀프 메디케이션(Self-Medication: 스스로 자신의 건강을 챙기는 일)과 같은 건강 지향적 사회 트렌드가 형성되었고 식생활의 서구화에 따른 생활습관병의 증가로 건강기능식품에 대한 관심과 그 수요가 늘어가고 있는 것이 현실이며, 이에 따라 국내 건강기능식품 시장 역시 2004년 건강기능식품법 시행 이후 꾸준한 성장을 지속해오고 있다.

3) 국내 건강기능식품 시장규모는 2015년 약 21억 달러로 전년 대비 16.2%가 증가하였으며 2011년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있음(그림 2)

국내시장규모=생산-수출+수입

(출처: 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016)

[그림 2] 국내 건강기능식품 생산실적 및 시장 규모(2011년~2015년)

4) 생산액은 2015년 약 16억 달러로 전년 대비 11.8% 증가하였는데, 최근 5년간 건강기능식품 생산액의 평균 성장률은 7.4%로 국내 제조업 국내총생산(GDP) 성장률 2.3% 보다 3.2배 높은 수준임. 이는 건강관리에 대한 관심 증가로 면역기능 개선 제품이나 비타민 등과 같은 영양 보충용 제품에 대한 수요가 증가한 것이 생산 증가의 주요 요인으로 분석됨.

나. 해외 건강기능식품 시장 현황

1) 세계 건강기능식품 시장 규모는 2015년 기준 1,179억 달러 규모로 추산되며 연평균 7.3% 성장하여 2200년에는 약 1,677억 달러(약 187조 원)에 이를 것으로 전망됨(그림 3)

(출처: NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Jounal, 2014)

[그림 3] 세계 건강기능식품 시장 규모 및 성장률(2009년~2020년)

2) 세계 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 곳은 미국으로 약 404억 달러(약 45조 원, 점유율 34.3%) 규모이며, 중국 약 163억 달러(약 18조 원, 점유율 13.8%), 일본 약 109억 달러(약 12조 원, 점유율 9.2%) 순임(2015년 단일 국가 기준)(표 1)

[표 1] 국가별 건강기능식품 시장 규모 및 전망

(단위: 억 달러 또는 %)

구 분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	188	8.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

3. 건강기능식품 원료 및 주요기능

가. 기능성원료 현황

1) 건강기능식품 기능성원료 인정은 2009년 이후 감소하는 추세임(2014년 제외)

- 기능성원료 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 개발 원료의 인정은 증가추세를 나타내고 있으며 이는 건강기능식품 개발에 대한 노하우가 축적되고 국내 연구개발 인프라가 지속 발전하고 있는 데 따른 것으로 분석됨(표 2).

[표 2] 연도별 기능성원료 인정 현황(2004년~2015년)

연도	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
건수	9	27	31	36	90	102	84	46	40	40	65	31

(출처: 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015년)

나. 노인성 질환 관련 기능성원료

1) 우리나라는 2000년에 전인구의 7% 이상이 65세 이상인 고령화사회로 진입하였으며 2018년에 65세 인구가 14%를 초과하는 고령사회, 2026년에는 20%를 초과하는 초고령 사회가 될 전망임

2) 정부에서는 2006년 12월 "고령친화산업 진흥법"을 제정하고, 범 정부차원의 전담 조직을 신설/운영하여 고령친화산업육성 계획을 수립하는 등 다양한 노력을 기울이고 있음

3) 고령화산업 활성화 전략보고서에 따르면 향후 골관절 건강 식품 등 고령친화 식품산업은 2020년까지 연평균 성장률 9.12%로 전망하고 있어 고령친화형 건강기능식품 산업의 발전 가능성은 매우 높다고 할 수 있음(표 3).

[표 3] 고령친화 실버산업 시장 규모

(단위: 억 원, %)

구 분		2002	2010	2020	연평균성장률
기능성 식품산업		36,000	68,929	149,883	8.2
고령친화 실버산업	비중(매출액 기준)	28.3	30.7	31.2	-
	매출액	10,188	21,153	46,738	8.8

(출처: 고령친화산업 활성화 전략, BT스페셜 노화 연구동향, 2010)

4) 노인성 질환과 관련된 기능성은 기억력 개선, 관절/뼈건강, 인지능력 향상이 있음

5) 관절/뼈건강 기능성원료는 2004년 이후 지속적으로 인정받고 있으며 2015년에는 본 연구팀의 소속기관이 등록한 내용 포함하여 2건이 인정되었음(표 4)

[표 4] 연도별 노인성 질환 관련 기능성원료 인정 건수(2004년~2015년)

기 능 성	인정 원료수	인정 건수												
		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	계
관절/뼈건강	21	1	2	3	3	4	4	3	2	5	4	5	2	38

(출처: 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015)

4. 골관절 완화 건강기능식품 소재 개발

가. 건강기능식품 소재 중 고시형 제품에 비해 개별인정형 제품은 소비자들이 원하는 다양한 기능성을 제공할 수 있으며 마케팅 측면에서 다양하게 활용할 수 있어 잠재력이 큰 분야임.

나. 특히, 최근에는 지역의 자원식물(제주 까마귀쪽나무 열매 주정추출물)과 연계하여 기능성을 인정받음으로서 지역 농림축산자원의 브랜드 창출과 지역산업발전에 기여하는 등 다각적으로 활용할 수 있는 점이 많아 개별인정형 건강기능식품 소재 개발이 여러 분야에 걸쳐서 다양하게 이루어지고 있음.

다. 기존의 골관절과 관련된 건강기능식품소재로는 초록입홍합추출오일(3건), 황금추출물 등 복합물(2건), Dimethylsulfone(MSM)(10건), N-아세틸글루코사민(1건), 로즈힙분말(5건), 글루코사민(2건), 차조기등 복합추출물(1건), 지방산복합물(2건), 호프추출물(1건), 비즈왁스알코올(1건), 전칠삼추출물 등 복합물(2건), 가시오갈피 등 복합추출물(2건), 강황추출물(1건), 보스웰리아 추출물(1건), CMO 함유 FAC(fatty acid complex)(1건), 닭가슴연골분말(1건), 참당귀추출분말(1건), 까마귀쪽나무 열매 주정추출물(2건)으로 총 18건의 원료명으로 39건의 개별인정을 획득하였음(건강기능식품 기능성 원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2016).

라. 단일 천연물로 획득한 것은 39건 중 7건이며, 이중 사업화중인 소재는 1~2건에 불과한 실정임. 이에 본 연구개발사업을 통하여 얻어지는 소재는 좁은잎천선과나무의 천연물 단일 추출물로서 소비자에게 어필할 수 있는 소재의 차별성이 클 것으로 판단됨.

마. 인체는 성장기뿐만 아니라 살아가면서도 골의 합성과 분해가 지속적으로 계속되는데 골의 분해 현상은 성장기 때에도 계속 진행된다. 그럼에도 지속적으로 성장을 하는 것은 골의 분해보다 합성이 더욱 활발히 일어나기 때문임.

바. 골대사 장애에는 기전적으로 크게 두가지로 구별됨. 골다공증과 같이 여러 원인으로 골밀도(bone mineral density, BMD) 감소, 골조직의 미세구조 변화로 인한 골격대사 장애와 골절임.

사. 여러 가지 환경적 영향, 신체의 정신적 또는 육체적인 변화에 의한 호르몬의 불균형이나, 골을 만드는 것보다 분해하는 것이 더욱 활발한 노년기의 경우 작은 충격으로도 골이 쉽

게 부러지는 현상이 일어나게 됨.

아. 흔히들 갱년기 이후의 여성에게 빈번하게 일어나는 골다공증(osteoporosis)은 신체 내에서의 호르몬의 불균형으로 인해 골을 만드는 일이 어려워지고, 골을 분해하는 것이 더욱 활발하여, 골 사이에 공간이 생김으로써 발행하는 병임.

자. 골다공증은 골조직의 낮은 골량(bone mass)과 미세구조의 파괴로 특정지어지는 골격질환으로 뼈가 부러지기 쉽고 골절 가능성이 높은 질환임.

차. 골다공증 외에도 골석화증(osteopetrosis)으로 골의 분해가 잘 일어나니 않을 경우 골 내의 공간이 석회화 되면서, 골의 발달이 일어나지 않거나, 팔, 다리가 짧으며 모든 면역세포의 근간인 골수의 형성이 일어나지 않는 병이 생기기도 함.

카. 이러한 골석화증 또한 골이 너무 딱딱하여 골다공증에 걸린 골처럼 쉽게 부러지기도 함. 하지만, 국내에서는 골석화증 보다는 골다공증이 더욱 빈번하게 일어나고, 전 세계적으로도 골다공증이 갱년기 이후의 문제로 대두되고 있는 추세임.

타. 특히, 관절염은 관절의 손상을 수반하는 질환으로서 55세 이상의 사람들의 거동을 불편하게 하는 주요 원인이 됨.

파. 관절염에는 여러 종류가 있으며, 종류별로 그 원인이 서로 다름. 가장 흔한 것은 골관절염(퇴행성 관절염)으로, 관절에 생기는 상처나 감염, 나이 등이 원인이 되며 다른 원인으로는, 류머티즘성 관절염과 건선성 관절염이 있음.

제 3 절 연구개발 범위

1. 연구개발 범위

가. 유효/지표성분 선정 및 기준시험법 확립

1) 유효성분 및 지표성분 선정

2) 좁은잎천선과나무 추출물 성분분석

3) 기능성분 기준시험법 확립

4) 좁은잎천선과나무 추출물 원료표준화

나. 좁은잎천선과나무 추출물의 유효성 및 안전성 평가

1) 좁은잎천선과나무 추출물의 골관절 건강 유효성 평가

2) 좁은잎천선과나무 추출물의 안전성 평가

다. 좁은잎천선과나무 비임상효력시험

1) 동물모델을 이용한 골관절 건강 효과 규명

2) 진통 억제 효력 시험

라. 골관절 건강기능성 확인을 위한 인체적용시험

1) 골관절 건강 효능 기전연구

2) 기능성 원료에 대한 인체적용시험 추진

마. 제제화 및 제형연구를 통한 다양한 제형조건 확립

1) 좁은잎천선과나무의 원료소재화

2) 원료소재의 가속시험에 따른 안전성 확보

3) 원료소재의 pH변화에 따른 지표물질의 가공적성 검토

4) 좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 다양한 제형연구 및 제형별 특성연구

바. 친환경 대량재배 및 가공기술 개발

1) 친환경 재배 관련 토양환경 조성

2) 고품질 생산 및 대량생산 체계 구축

사. 사업화 전략 수립 및 사업화 추진

1) 상품화를 위한 시제품 제작

2) 판매전략 수립 및 사업화 추진

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 1차년도 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 [2014.09. ~ 2015.09.]	[주관 및 제1세부 수행] ● 유효/지표성분 선정 및 기준 시험법 확립 ● 추출물의 유효성 및 안전성 평가 [위탁기관 수행] ● 골관절 건강 비임상 유효성 평가 ● 진통 억제 효력 시험	● 유효/지표성분 선정 - 유효/지표성분 분리 - 구조분석: NMR(1H, 13C, 2-D) 분석 - 추출조건별 추출공정 확인/확립 ● 추출물 성분분석 - 좁은잎천선과 잎 및 열매 추출물의 일반성분 분석 ● 기능성분 기준시협법 확립 - 유효/지표성분 기준규격 설정 및 분석 ● 추출물의 골관절 건강 유효성 평가 - NO, PGE_2, TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2 등 - 조골세포 염증 매개인자(IL-6, PGE_2) 억제 평가 ● 추출물의 안전성 평가 - 동물실험용 원료 및 추출물 대량 제작 - non-GLP 및 GLP 독성시험 평가: 단회투여, 유전독성시험 ● 동물모델을 이용한 골관절 건강 효과 규명 - 행동평가 - 관절 병변 변화 확인(골수, 윤활막 및 연골) - 척수(요추) 내 통증 관련 단백질 확인 ● 진통 억제 효력 시험 - 말초성 진통 억제 동물실험 - 중추성 진통 억제 동물실험
	[제1협동 수행] ● 원료소재의 안정성 확보 ● 제형 연구 및 제형별 특성 검토	● 좁은잎천선과나무의 원료소재화 - 가속시험에 따른 안정성 확보 - 산도변화에 따른 지표물질의 가공 안정성 검토 ● 추출물의 다양한 제형연구 - 음료제형, 캡슐제형, 환제형의 연구
	[제2협동 수행] ● 친환경 대량재배 및 가공 기술 개발	● 고품질 생산 및 대량생산 체계 구축 - 친환경 재배 관련 토양환경 조성 - 품종별(천선과/좁은잎천선과) 대량생산 체계(삽목방법 및 시기 등) 확립

2. 2차년도 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도 [2015.09. ~ 2016.09.]	[주관 및 제1세부 수행] • 유효/지표성분 선정 • 유효성분 효능규명 및 기전 연구 • 골관절 건강 기능성 확인을 위한 인체적용 시험 추진 [위탁기관 수행] • 골관절 건강 효능 기전 규명	• 유효물질의 최적 추출공정 확립 및 표준공정법 개발 - 기능물질 최적 함량 추출조건 확립 - LC/GC-MS를 통한 물질 분석법 정립 - 구조분석: NMR(1H, 13C, 2-D) 분석 - 최적의 지표/유효성분 각 1종 선정 • 유효성분의 효능평가 - NO, PGE_2, TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2 등 - 조골세포 염증 매개인자(IL-6, PGE_2) 억제 평가 • 골관절 건강 기전연구 - 유효성분 대상 골관절 건강 기전연구: MAPKs, NF-κB • 기능성 원료에 대한 인체적용 시험 추진 - nonGLP-DRF 임상 프로토콜 개발 - 골관절 건강 기능성 확인 인체적용 시험 추진(2차년도~3차년도) • 골관절 건강 효능 기전 규명 - 척수 내 염증 및 재생 관련 단백질 확인 - 관절 조직 내 염증, 세포사멸 관련 단백질 변화 확인 - 관절 조직 내 세포사멸 확인
	[제1협동 수행] • 원료소재의 대량생산 조건 확립 • 제형 연구 및 제형별 특성 검토	• 좁은잎천선과나무 추출물 대량 생산조건 확립 - 산업화를 위한 대량생산 조건 확립: 저비용/고효율 효과 생산시스템 확립 • 제형별 시제품 제작 및 안정성 확보 - 제형별 시제품 제작 - 제형별 선호도 조사(소비자/전문가 의뢰) - 개발제품의 품질관리 방법 확립 - 제품의 안정성 확보 방안 구축
	[제2협동 수행] • 친환경 대량재배 및 가공기술 개발	• 고품질 생산 및 대량생산 체계 구축 - 삽목방법 및 시기에 따른 생존률 모니터링 - 묘종 이식/정식에 따른 생존률 확인 - 삽목 개체의 정상 발근률 확인 - 좁은잎천선과/천선과 생존/발근률 비교분석

3. 3차년도 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도 [2016.09. ~ 2018.03.]	[주관 및 제1세부 수행] ● 기전연구 및 효능입증 자료 확보 ● 골관절 건강 인체적용 시험 ● 골관절 건강 건강기능식품 개별인정 자료 filing 및 식약처 신청	● 유효물질의 기전연구 및 효능 입증자료 확보 - 유효물질 효능 규명을 위한 기전연구 - 효능 규명에 따른 기능성 입증 자료 확보 ● 골관절 건강 인체적용 시험 완료 - 골관절 건강 기능성 확인 인체적용 시험 완료 (2차년도~3차년도) - 인체적용 시험 시험제품 지원 및 모니터링 - 인체적용 시험 완료에 따른 자료 확보 ● 건강기능식품 개별인정 자료 작성 및 신청 - 영양성분 및 기능성분 분석 자료 작성 - 기능성 평가, 안전성평가 자료 작성 - 원료표준화 및 기준규격설정 자료 작성 - 개별인정형 건강기능식품 인정 신청
	[제1협동 수행] ● 시제품 제작 ● 판매전략 수립 및 사업화 추진	● 상품화를 위한 시제품 제작 - 제형별 소비자 선호도 조사 순위에 근거한 시제품 제작 ● 판매전략 수립 및 사업화 추진 - 제품화방향 및 판매전략 수립 - 소비자 유형별 판매전략 수립 - 국내ㆍ외 판매망 확보 전략 수립 등
	[제2협동 수행] ● 친환경 대량재배 및 가공 기술 개발	● 고품질 생산 및 대량생산 체계 구축 - 묘종 이식/정식에 따른 생존률 모니터링 - 삽목 개체의 발근/생존률 모니터링 - 좁은잎천선과나무 재배단지 조성 - 10ha 조성용 종묘 생산

제 2 절 연구수행 방법

1. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 준비 및 유효성 평가

가. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 및 분획물 제작

1) 제주도 전 지역에 자생하고 있는 좁은잎천선과나무(*Ficus erecta* var. *sieboldii*, FES)의 잎을 채취하여 잘게 파쇄 후 3일 동안 냉풍건조기(40℃, 수분함량 15% 이하)에서 건조 후 분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

2) 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 및 순차적 분획물의 제조는 60% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(*n*-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다.

3) 즉 분말 건조된 시료에 60% 주정 에탄올로 2회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전히 건조시켰다.

4) 건조된 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었으며, 모든 과정은 2회 반복 실시하였다.

나. 지표성분 및 유효성분 분리 및 정제

1) 건조된 좁은잎천선과나무 잎 60% 에탄올 주정 추출물에서 지표성분과 유효성분을 규명하기 위해 단일화합물을 분리정제 실시하였다.

2) 좁은잎천선과나무 잎 60% 주정추출물을 증류수에 현탁시킨 후 *n*-hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, BuOH로 용매 분획하였으며, CH_2Cl_2 (11.2 g) 분획물에 대하여 Celite column chromatography를 실시하여 *n*-hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, MeOH으로 각각 극성별로 용매 분획물을 얻었다.

3) 이들 분획 중 활성이 확인된 CH_2Cl_2 분획을 순상 silica gel을 이용하여 총 20개의 소분획으로 나눴으며, 그 중 HPLC 분석결과 고함량 피크가 검출된 12, 16번 분획에 대해 다시 한 번 silicagel column chromatography 정제를 실시하여 단일화합물 1를 분리하였음

4) 또한 활성이 확인된 16번 분획에 대해 Revers phase column chromatography 기법을 이용하여 단일화합물 2, 3을 분리함. 분리된 단일화합물은 NMR 등의 분광학적 분석과 문헌조사를 통해 구조를 결정하였음.

다. 세포배양

1) 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)로부터 생쥐(murine) 대식세포주인 RAW 264.7세포와 인간(Human) 조골세포인 MG-63세포를 구입하여, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), 및 streptomycin (100 μg/mL)을 첨가하여 Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM; GIBCO Inc.)을 배양배지로 사용하였고, 배양조건은 37 ℃ 에서 95% air,

5% CO_2가습 공기 조건 하 포화 상태(subconfluence)에서 배양하였으며, 각각 3과 4일마다 계대배양 하였다.

2) 혈구계를 이용하여 세포의 수를 측정하였으며, trypan blue dye exclusion을 통하여 살아 있는 세포의 수를 확인하였다.

라. 질소화합물 (Nitric oxide) 생성 억제 효능 평가

1) RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 추출물 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다.

2) 생성된 NO의 양은 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-의 형태로 측정하였다.

3) 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 standard로 비교하였다.

마. 세포독성 평가 (LDH assay)

1) RAW 264.7 세포 (1.5×10^5cells/mL)를 DMEM 배지에 추출물 시료와 LPS (1 μg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다.

2) LDH (lactate dehydrogenase) assay는 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50 μL와 reconstituted substrate mix를 50 μL를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50 μL의 stop solution을 넣은 후 microplate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군 (LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

바. 염증 유발 인자 prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 억제 효능 평가

1) RAW 264.7 세포 (1.5×10^5cells/mL)와 MG-63(1.0×10^5cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2항온기에서 18시간 전 배양 하였다.

2) 이후 배지를 제거하고 RAW 264.7 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 ug/mL)로 조제된 추출물 시료 50 μL와 450 μL의 LPS (1 μg/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 MG-63 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 ug/mL)로 조제된 추출물 시료 50 μL와 450 μL의 IL-1β (10 ng/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전배양과 동일 조건에서 배양하였다.

3) 24시간 후 prostaglandin E_2 (PGE_2)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다.
4) PGE_2의 측정은 PGE_2 ELISA kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r2값은 0.99 이상이었다.

사. 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β and IL-6) 생성 억제 효능 평가
1) RAW 264.7 세포(1.5×10^5cells/mL)와 MG-63(1.0×10^5cells/mL)를 DMEM 배지를 이용하여 세포수를 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO_2항온기에서 18시간 전 배양 하였다.
2) 이후 배지를 제거하고 RAW 264.7 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 ug/mL)로 조제된 추출물 시료 50 μL와 450 μL의 LPS (1 μg/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 MG-63 세포는 10배 농도 (25, 50, 100 ug/mL)로 조제된 추출물 시료 50 μL와 450 μL의 IL-1β (10 ng/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하였고 전배양과 동일 조건에서 배양하였다.
3) 24 시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 분)하여 얻어진 상층액의 pro-inflammatory cytokines 생성 함량을 측정하였다.
4) 모든 시료는 정량 전까지 -20 ℃ 이하에 보관하였다. pro-inflammatory cytokines 정량은 mouse enzyme-linked immnunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2값은 0.99 이상이었다.

아. 단백질 발현 억제 효능 평가(western blotting)
1) 배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 한 후 세포 용해버퍼 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $NaVO_3$, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 ug/mL aprotinin, 25 ug/mL leupeptin]를 첨가하여 30분간 4℃에서 용해 시킨 후 4℃, 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다.
2) 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다. 분리된 단백질 20~30 μg를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다.
3) 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다.
4) iNOS의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-rabbit iNOS (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA), NF-κB와 MAPKs 기전연구를 검토하기 위해 anti-rabbit

NF-κB와 MAPKs (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 TTBS 용액에서 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다.

5) 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse와 rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

자. mRNA 발현 억제 효능 평가(RT-PCR)

1) 세포로부터의 Total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 이용하였으며, RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.
2) 1 μg의 Total RNA를 oligo (dT) 18 primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2U)로 70℃ 5 min, 25℃ 5 min, 37℃ 60 min, 그리고 70℃에서 10 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다.
3) Polymerase Chain Reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 유전자를 증폭시키기 위하여 2 μL cDNA, 4 μM의 5’과 3’primer, 10X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq polymerase (Promega)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μL로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다.
4) 이때 PCR cycle은 94℃/45초, 55~60℃/45초, 72℃/60초, 30회 이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

차. 통계분석

1) 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차(SD)를 구하여 신뢰수준 95%($p<0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

2. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물의 관절염 모델에서의 항염증 효과

가. 급성관절염 모델에서의 항염증 효과

1) 일반증상관찰: 투여 전 기간에 걸쳐 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류 및 정도, 발현일을 개체별로 기록하였다.
2) 체중측정: 모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여개시시에 절식 후 측정하였다.
3) 급성 관절염 유도: 랫드의 발바닥 용적을 plethysmometer로 측정한 후 시험물질을 경구투여하고 30분 후에 우측 뒷 발바닥에 기염제로 1% carrageenan/생리식염수를 0.1 mL씩 피하주사하여급성 관절염을 유발시켰다.

4) 부종 측정: 부종 유발 후 1 시간 간격으로 5회에 걸쳐 부종의 용적을 측정한 후 시험물질 투여전 용적을 기준으로 하여 그 증가율과 억제율을 계산하였다.

나. 만성관절염 모델에서의 항염증 효과

1) 조직의 광학현미경적 소견: 관절의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 10% normal buffered formalin으로 각각 관절염이 유도된 마우스의 족관절을 고정하였다. 고정 후 Calci-clear rapid로 탈회하고, 일반적인 방법에 의하여 수세, 탈수과정을 거처 파라핀으로 포매하였으며, 포매 후 3 um의 절편을 제작하여 일반적인 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

2) 사이토카인에 대한 면역조직화학염색: 파라핀 포매 조직을 면역염색용 slide에 3 um 두께로 자른 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 조직 slide를 phosphate buffered saline(PBS)으로 함수시킨 후, hydrogen peroxide를 이용하여 endogenous peroxidase를 제거하였다. 일차 항체는 anti-mouse IL-6, anti-goat TNF-α를 1 : 100으로 희석하여 4℃에서 overnight하였다. PBS로 세척한 후 anti-mouse 및 anti-goat HRP 이차항체를 반응시킨 후 DAB와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색을 시행하고 permount로 마운팅하여 광학현미경으로 판독하였다.

3) 방사선학적 검사: 쥐의 발목 관절에 대하여 시험 종료 후 X-ray 검사를 시행하였다.

4) 비장세포의 분리 및 배양: 시험 종료 후 마우스의 비장을 분리하여 histopaque을 처리한 후, 500 xg로 20분간 원심분리하여 lymphocyte층을 얻었다. 다시 RPMI-1640 배지로 세척한 후, 24 well plate에 분주하고, 5% CO_2 세포배양기에서 3일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

5) 혈청 및 비장 세포 내 IL-6, TNF-α 및 IFN-γ 측정: 시험 종료 후 마우스 안와정맥총에서 채혈한 후 원심분리를 이용하여 분리한 혈청과 비장세포 상등액에 대하여 IL-6, TNF-α 및 IFN-γ의 변화량을 ELISA kit을 이용하여 정량하였다.

3. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물의 골관절염 완화 비임상효력시험

가. MIA (monosodium iodoacetate)에 의한 골관절염 유발 동물모델

1) 약물 유도 모델은 실험동물에 특정 약물을 intra-articular injection 등의 방법으로 주입하여 chondrocyte의 metabolism을 저해하거나, ligament와 tendon의 손상을 유발함으로서 골관절염을 발생시키는 방법으로 MIA (monosodium iodoacetate)를 사용하여 골관절염을 유발시킨다.

2) 무릎주변을 깨끗이 제모한 후 골관절염 유발물질인 MIA: Monosodium iodoacetate를 1 mL 주사기를 사용하여 오른쪽 무릎 관절강 내에 50 uL (60 mg/mL)씩 투여한다. MIA 희석시에는 0.9 % saline을 사용한다. MIA 투여7 일 후에 관절염 유발유무를 확인하여 관절염이 유발된 동물만을 사용한다.

나. 식이량 측정 및 시험물질 투여

1) 1주일에 1회 또는 2회씩 식이량 (g 수) 및 음수량 (mL량)을 측정하며, 식이섭취량은 측정이 이루어지는 날의 일정한 시간에 칭량하여 1일 평균 식이섭취량을 산출하며, 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 체중 증가량을 식이섭취량으로 나누어서 계산한다.
2) 같은 방법으로 음수량을 측정한다. 시험물질은 오전 투여, 측정은 오후에 하는 것을 원칙으로 한다. 측정일은 시험물질을 경구투여한 후 4, 7, 11, 14 째 되는 날에 각각 시행한다.
3) 양성대조군으로 NSAID 약물로는 주로 염증의 중요한 매개자인 cyclooxygenase enzymes 활성을 억제하여 prostaglandin 합성을 저해함으로써 항염증 작용을 나타내는 항염증 약물인 indomethacin을 사용하였다.

다. 생물학적 지표 검사

1) 투여전 후 또는 전체 투여기간에 걸쳐일정한 간격을 두고 혈액 및 synovial fluid를, 채취한다. 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 분리한뒤, 염증성 지표로서 IL-1β, TNF-α, IL-6 등의 사이토카인은 ELISA로 측정한다.
2) 그리고 연골조직의 파괴정도를 확인하기위해 synovial fluid를 이용하여 MMP-2, 3, 7, 9, 13 및 TIMP-1, 2 등의 발현을 측정한다.
3) 투여가 완료된 후에는 실험동물의 사체로부터 synovial tissue를 채취하여 RNA를 분리하여 PCR 등의 방법을 통해 MMP-2, 3, 7, 9, 13 및 TIMP-1, 2 등의 mRNA 발현정도를 분석한다 (표 5).

[표 5] 생물학적 지표 검사를 위한 primer sequences

	Forword	Reverse
MMP2	TCCGAGATCTGCAAGCAAG	AGAATGTGGCCACCAGCAAG
MMP3	TGATGGGCCTGGAATGGTC	TTCATGAGCAGCAACCAGGAATAG
MMP7	GACATTGCAGGCATCCAGAAGTTA	AGGGCGTTTGCTCATTCCAG
MMP9	AGCCGGGAACGTATCTGGA	TGGAAACTCACACGCCAGAAG
MMP13	CCCTGGAATTGGCGACAAAG	GCATGACTCTCACAATGCGATTAC
TIMP1	CATCTCTGGCCTCTGGCATC	CATAACGCTGGTATAAGGTGGTCTC
TIMP2	GACACGCTTAGCATCACCCAGA	CTGTGACCCAGTCCATCCAGAG

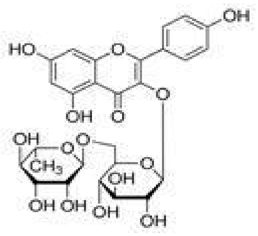
4. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물의 원료자원화 및 기준·규격설정

[좁은잎천선과나무 잎 주정 주정추출물에서 분리 정제된 단일 화합물에서 원료표준화를 위해 지표성분을 선정하여 원료표준화를 실시하였으며 지표성분 선정은 Nicotiflorin을 가지고 지표성분으로서 가능 여부를 확인하기 위해 시험법 검토를 추진하였음.]

가. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 중 Nicotiflorin 시험법 검토

- 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 건강기능식품 기능성원료로 등록하기 위하여 지표물질을 선정 하고 원료표준화 진행.
- 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 지표물질 후보인 Nicotiflorin에 대하여 시험법으로 검토한 후 지표물질 후보물질 중 분석에 용이한 물질을 선정하고, 시험법의 적절성 확인.

1) 분석물질: Nicotiflorin



	Synonym	Kaempferol 3-O-B-rutinoside
	Chemical formula	$C_{27}H_{30}O_{15}$
	Molecular weight	594.52 g/mol
	CAS No.	17650-84-9
	Product	Sigma, Cat.# 90242, Lot# BCBQ9502V, purity: 99.1%
	Storage	-20℃

2) 분석시료: 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물

3) 분석방법(제공된 시험법): 고속액체크로마토그래피법

가) 시약

(1) 증류수

(2) 메탄올(Methanol, HPLC grade)

(3) 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)

(4) 초산 (Acetic acid, HPLC grade)

나) 표준용액 조제

(1) 표준품인 Nicotiflorin 일정량을 70% 메탄올 25mL로 정용(Stock Solution)한 후 이를 70% 메탄올로 희석하여 사용(Working Solution).

다) 시험용액 조제

(1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 약 250 mg을 25 ml 용량플라스크에 넣고, 70% 메탄올을 적당량 넣어 30분 동안 초음파 추출.

(2) 추출이 끝난 후 실온으로 방치하여 식힌 후, 25 ml 용량플라스크에 70% 메탄올로 정용, Nylon syringe filter (0.45 um)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용.

라) 기기분석 조건

<table>
<tr><td>Instrument</td><td>Agilent 1260 Infinity</td></tr>
<tr><td>Detector</td><td>PDA detector</td></tr>
<tr><td>Wavelength</td><td>264 nm</td></tr>
<tr><td>Column</td><td>Cadenza Imtakt C18 (4.6mm × 150mm, 3um)</td></tr>
<tr><td>Mobile Phase</td><td>A: 0.5% 초산 in DW, B: 아세토니트릴, Gradient
<table>
<tr><th>min</th><th>이동상 A</th><th>이동상 B</th></tr>
<tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr>
<tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>36</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>50</td><td>90</td><td>10</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Flow rate</td><td>1.0 ml/min</td></tr>
<tr><td>Injection volume</td><td>5 ㎕</td></tr>
<tr><td>Oven Temperature</td><td>40℃</td></tr>
</table>

마) 계산식

$$\text{Nicotiflorin (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu g/ml) \times \text{최종량}(ml) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(mg)}$$

나. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 중 Nicotiflorin 시험법 검증

- 시험법 설정을 통해 설정된 시험법으로 검증

1) 시약 및 시액

가) 표준물질: Nicotiflorin (Sigma, Cat.# 90242, Lot# BCBQ9502V, purity : 99.1%)

나) 일반시약

(1) 증류수

(2) 메탄올(덕산, HPLC grade)

(3) 아세토니트릴(Burdic & Jackson)

(4) Trifluoroacetic acid(Sigma, HPLC grade)

2) 표준용액의 제조

가) Nicotiflorin을 일정량 취해 70% 메탄올에 넣어 용해, 용량플라스크에 정용한다.

나) Stock solution을 70% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

3) 시험용액의 제조

가) 시료 약 250 mg을 25 mL 정용플라스크에 담아 70% 메탄올에 녹인 후 sonicator에 30분 추출, 정용한다.

나) 0.45 ㎛ syringe membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

4) 기기분석조건

<table>
<tr><td>Instrument</td><td>Agilent 1260 Infinity</td></tr>
<tr><td>Detector</td><td>DAD detector</td></tr>
<tr><td>Wavelength</td><td>UV 264 nm</td></tr>
<tr><td>Column</td><td>Cadenza CD-C18 Imtakt(150 mm × 4.6 mm, 3 ㎛)</td></tr>
<tr><td>Mobile Phase</td><td>A: 0.5% Tifluoroacetic acid in DW, B: 아세토니트릴, Gradient
<table>
<tr><th>min</th><th>이동상 A</th><th>이동상 B</th></tr>
<tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr>
<tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>36</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>40</td><td>90</td><td>10</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Flow rate</td><td>1.0 ml/min</td></tr>
<tr><td>Injection volume</td><td>5 ㎕</td></tr>
<tr><td>Oven Temperature</td><td>40℃</td></tr>
</table>

5) 계산식

$$\text{Nicotiflorin (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu g/ml) \times \text{최종량}(ml) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(mg)}$$

5. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 원료소재의 안정성 확보

가. 원료소재의 안정성 확보 계획

1) 개발목표: 좁은잎천선과나무 잎을 원료소재로 활용하기 위해 용매별(주정, 물)을 이용한 소재화를 추진하고, 이에 따른 원료소재의 안정성을 확보하고자 함. 그리고 원료소재 지표물질의 안정성을 확보하기 위하여 pH 변화에 따른 안정성을 검토하였음.

2) 개발 내용: 좁은잎천선과나무 잎의 열수 및 주정추출물의 원료소재로서의 안정성을 확보

하기 위한 연구로 천연물추출물이 원료소재로 유통 및 사용되어지는 가장 일반적인 방법(추출물 및 분말화)을 선택해 진행함. 본 연구에서는 좁은잎천선과 잎 추출물을 농축한 형태로 안정성을 확보하고자 하였으며, 또한 좁은잎천선과나무 잎 추출물 분말 형태에 대한 안정성도 확보하고자 하였음.

나. 원료소재의 안정성 확보 수행 방법

1) 좁은잎천선과나무 잎의 원료소재화

가) 열수추출물: 좁은잎천선과 잎을 100℃에서 1차 및 2차 각각 5시간 추출하여 혼합한 다음 여과하여 5 Brix, 10 Brix로 각각 농축하였음.

나) 주정추출물: 좁은잎천선과 잎을 85℃에서 1차 및 2차 각각 5시간 추출하여 혼합한 다음 여과하여 5 Brix, 10 Brix로 각각 농축하였음.

다) 주정추출물분말: 좁은잎천선과 잎을 85℃에서 1차 및 2차 각각 5시간 추출하여 혼합한 다음 여과하여 10 Brix로 농축한 다음 동결건조기로 분말화하였음.

라) 안정성 평가 시료 정보: 열수추출농축액, 주정추출농축액, 주정추출농축분말 원료소재정보

소재(시료명)	제조번호	비고
좁은잎천선과나무잎 열수추출물시료 : 5 brix	HJ-150205-E5	짙은갈색 액상
좁은잎천선과나무잎 열수추출물시료 : 10 brix	HJ-150205-E10	짙은갈색 액상
좁은잎천선과나무잎 주정추출물시료 : 5 brix	HJ-150205-W5	짙은녹색 액상
좁은잎천선과나무잎 주정추출물시료 : 10 brix	HJ-150205-W10	짙은녹색 액상
좁은잎천선과 잎 70% 주정추출농축분말	HJ-150403-E.P	짙은녹색 분말

2) 원료소재의 성분분석

가) 좁은잎천선과나뭇잎의 열수추출물과 주정추출물 원료소재에 대한 성분분석을 실시하였음(원료소재 : 추출물은 각각 5 brix 샘플, 주정추출물분말)

나) 성분분석항목(9대영양성분) : 열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨

다) 시험방법 : 식품공전

3) 안정성 평가항목

가) 성상 및 pH

나) 미생물검사(식품공전) : 일반세균, 대장균군

다) 실험방법

(1) 성상: 육안관찰

(2) 색도 : 액상은 색도색차계(Model CR -410, Osaka, Japan)를 사용하고, 분말은 색도색차계(COBY, CR-A50, USA)을 사용하여 L*(lightness), a*(redness) 및 b*(yellowness) 값을 측정하였고, 그 평균값으로 나타냄.

라) 원료소재의 가속시험조건 및 시험규격

(1) 가속시험: 1차년도 원료소재 연구에 있어서는 3개월 실시

(가) 가속시험기간: 3개월간 실시 (제조 후 1개월 단위)

(나) 보존조건: 38℃, 75% RH

(다) 시험항목 및 시험방법: 성상, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목

6. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 원료소재 활용 제형연구 - 1차 제형

가. 원료소재 활용 제형연구 계획

1) 개발목표: 좁은잎천선과 잎을 소재로 한 건강식품 및 개별인정형 건강기능식품소재로 산업화 추진 목적으로 다양한 제형연구를 추진함.

2) 개발내용 : 건강기능식품 개별인정형 소재로 신청하고자 하는 것은, 좁은잎천선과 잎 주정추출분말로 이를 이용한 다양한 제형연구를 수행하고자 함. 본 제형연구는 소비자가 가장 선호하는 제품인 음료형태의 제품부터, 타블렛, 환 등 다양한 제형에 대한 연구를 수행하였음.

나. 원료소재 제형연구 수행방법

1) 제형연구 및 1차 제형제작

가) 일반적으로 제형을 포함한 제품제작연구는 (주)휴럼의 신제품개발에 따른 자체 메뉴얼에 따라 조성비를 선정하였음. ⓐ 중앙연구소 제품개발부에서 제품의 특성, 제품의 목적, 소비자 타겟, 제품의 제형 등을 고려하여 3~5종의 레시피를 개발하여 1차 레시피에 따른 각각의 제형 제품을 제작하고, ⓑ 마케팅본부에서 소비자 및 전문가의 의견을 수렴하여 다시 논의한 다음 ⓒ 다시 레시피를 조정하고 이 조정된 레시피에 따라 제품을 만들어 평가하는 과정을 3~5회 걸쳐서 1단계로 완성하여 시작품을 제작하는 것으로 매뉴얼이 구성되어 있음. 본 연구에서는 ⓐ의 단계로 1차로 선정된 제형별 레시피를 기준으로 제품을 제작하여 원료소재의 안정성 및 품질관리 등에 필요한 기본적인 시험을 수행하였음. 궁극적으로는 2차년도 과정(2차년도 수행계획에 포함되어 있음)에는 ⓑ와 ⓒ과정을 거치면서 최종적으로 산업화에 적절한 제품을 완성하게 됨.

나) 좁은잎천선과 잎 주정추출분말 소재를 이용한 제형연구는, 일반인들이 가장 선호하고 있는 음료제품을 포함하여, 휴대하기가 편한 환, 타블렛 등에 대한 다양한 제형 연구를 추진하였음.

다) 제형별 특징

(1) 공통적인 특징 : 선행연구 및 1차년도 효능평가결과를 참고하여 수행하였으며, 좁은잎천선과 잎 주정추출분말 효능평가 범위인 10~100mg/kg를 참고로 제형연구를 수행하였음. 본 연

구에서는 성인을 기준으로 일일섭취량기준 200mg을 기준으로 하여 제형연구를 수행하였음.

(2) 제형1 (음료) : 음료로서 상품화는 방법으로는 다양하게 있지만, 혼합음료서 1회 섭취하는 용량이 50~100 ml이며, 포장용기로는 병, 파우치(치어팩 포함) 등 다양하게 포장이 가능함. 본 제형연구를 추진하는데 있어서 100ml 파우치를 이용한 연구를 진행하였으며, 주원료인 좁은잎천선과 잎 주정추출분말을 1일 섭취량인 200mg이 되도록 레시피를 개발하였으며, 1차 제품을 제작하였음.

(3) 제형 2(타블렛) : 좁은입천선과 잎 추출물분말소재를 기본으로 하여 타블렛 제형에 필요한 기본적인 부형제 외 다른 성분을 최소화하는 것으로 제형연구를 추진하였으며, 이는 인체적용시험으로 추진하는 기본적인 제형으로 기타 기능성원료소재의 첨가를 제한하여 추진하였음

(4) 제형 3(환) : 좁은입천선과 잎 추출물분말소재를 기본으로 하여 일반적으로 환제품의 기본원료로 많이 알려진 결정셀룰로우스 등과 벌꿀소재를 첨가하여 제형을 개발하는 방향으로 추진하였음. 또한 기존제품과의 차별성을 확보하고자 대환제품으로 개발하였음.

라) 제형제작 : 음료 파우치 제품은 100ml / 1병(내용물기준), 타블렛은 1000mg/1정(내용물기준), 환제품의 경우 대환으로 4000mg/1정 기준으로 제작하였음.

2) 1차 제형연구로 개발된 제품의 안정성 확보

가) 가속시험: 1차 제형연구에 있어서는 2~3개월 실시(매월측정)

(1) 가속시험기간 : 2~3개월간 실시(제조 후, 1개월, 2개월, 3개월)

(2) 보존조건 : 38℃, 80% RH 이상

(3) 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목

나) 장기안정성시험: 1차 제형연구에서는 생략

(1) 장기안정성시험기간 : 24개월(또는 12개월) 이상(3개월 단위 측정)

(2) 보존조건 : 실온

(3) 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물(대장균군)등 필요항목

다) 시험방법

시험항목	시험방법	비 고
성상	-	제품별
대장균군	식품공전	
세 균	식품공전	

다. 제형연구 시료제조 : 좁은잎천선과 잎 주정 추출물의 Pilot Scale 추출

1) 제형연구를 위한 대량생산(Pilot Scale) 원료 제조 : 좁은잎천선과 잎 건조물 20 kg와 원재

료의 20배수 추출용매 60% 주정을 넣고 15시간 추출 후 1 ㎛ 카트리지로 여과 후 농축하고 3일간 동결건조하여 추출농축분말을 얻음(그림 4).

2) 추출공정

가) 추출공정도

[그림 4] 좁은잎천선과 잎 주정추출물 추출공정도

7. 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물 원료소재 활용 제형연구 - 2차 제형

가. 원료소재 활용 제형연구 계획

1) 개발 목표: 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 건강기능식품 소재로 활용하여 상품화에 적용하기 위한 제형별 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 함

2) 개발 내용: 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 건강기능식품 주원료로 하여 시작품을 제작함에 있어, 소비자가 건강기능식품으로 선호하는 제형에 대한 조사를 실시하였으며, 또한 산학연과 컨설팅 전문가가 포함된 전문가그룹의 제형에 대한 의견을 반영하여 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 함.

나. 원료소재 제형연구 연구수행 방법

1) 제형설정을 위한 소비자 및 전문가 그룹의 선호도 조사

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 소재를 건강기능식품소재로 이용하여 제품화를 추진함에 있어, 가장 적합한 제형을 설정하기 위하여 음료제형, 타블렛(알약 형태)제형, 캡슐(연질, 하드)제형, 분말 및 과립제형, 기타(환 등)제형으로 구분하여 선호도 조사를 실시하였음

나) 소비자그룹의 조사는 자사 건강대리점 중 9개점을 선정하여 진행

다) 전문가그룹은 자체 및 외부전문가(교수 및 컨설팅)들을 대상으로 실시하였음.

8. 안전성 시험(GLP 독성시험)

가. 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

1) 시험개요

가) 시험목적: 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 FER-E60을 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시한다.

나) 본 시험은 “비임상시험관리기준”의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.

다) 시험기준: 본 시험은 “의약품등의독성시험기준”에 근거하여 실시한다.

라) 동물윤리: 본 시험은 동물보호법에 근거한 ㈜바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다

2) 시험계

가) 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (Crl:CD(SD)), SPF

나) 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Korea

다) 종 및 계통의 선택이유: Sprague-Dawley 랫드는 “의약품등의안전성시험”에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택한다.

라) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위: 수컷, 12 마리, 5 주령, 113.7 ~ 131.2 g / 암컷, 12 마리, 5 주령, 105.7 ~ 117.0 g

마) 투여시 주령 및 동물수, 주령 및 체중범위: 수컷, 10 마리, 6 주령, 164.5 ~ 177.4 g / 암컷, 10 마리, 6 주령, 130.7 ~ 142.2 g

바) 검역・순화: 반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정한다. 7 일간의 순화기간 중에 매일 1 회 일반증상을 관찰한다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태를 평가한다.

사) 개체 및 사육 상자 식별: 순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육 상자에는 검역・순화기간 중 개체식별카드를 부착한다. 관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착한다.

아) 군분리: 군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일(군분리일)에 실시한다. 군분리일의 평

균체중에 가까운 암수 각 10 마리를 선발한다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2 군, 군당 5 마리로 군분리한다.

자) 잔여동물의 처리: 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시킨다.

3) 사육환경 조건

가) 동물실번호: A325

나) 사육상자의 종류, 크기: 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)

다) 사육상자당 수용동물 수: 3 마리 (검역・순화기간) / 1 마리 (관찰기간)

라) 온도: 20.6 ~ 24.4℃

마) 상대습도: 39.7 ~ 57.7%

바) 환기횟수: 10~15 회/시간

사) 명암주기(조명시간): 12시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

아) 조도: 150~300 Lux

자) 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 급이기는 약 1 회/2 주 빈도로 교환한다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균한다.

4) 사료

가) 종류: 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

나) 제조자: Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

다) 급이방법: 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취 시킨다.

라) 사료의 분석 및 확인: 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

5) 음수

가) 종류 및 급수방법: 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 자유섭취 시킨다.

나) 음수의 분석 및 확인: 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」의 전 항목에 대하여 실시한다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

6) 투여

가) 투여경로: 경구투여

나) 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택한다.

다) 투여방법 및 투여횟수: 투여액량은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투

여당일)의 체중을 기준으로 산출한다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제 투여한다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4 시간에 사료를 급여한다.

7) 군구성 및 투여용량

가) 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)

나) 투여용량설정: 본시험의 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B11044P)으로 5,000 mg/10 mL/kg 을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망 사례가 관찰되지 않아, 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정한다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여한다.

8) 관찰 및 검사

가) 일반증상 관찰: 투여당일 (0 일)에 투여 후 30, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰한다. 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰한다.

나) 체중측정: 체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 일 및 14 일 (부검일)에 측정한다.

다) 부검: 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO_2 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검한다.

라) 조직병리학적 검사: 부검 시 육안소견이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다

9) 자료의 통계처리

가) 실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한다 (유의수준: 0.05). 등분산이 인정되어 Student t-test를 실시하여 유의성을 확인한다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

나. 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정 시험

1) 시험개요

가) 시험목적: 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질은 FER-E60을 4주간 반복 경구투여시 나타는 독성반응을 평가하고, 13주 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

나) Good Laboratory Practices: Non-GLP

다) 시험기준: 본 시험은 "의약품등의독성시험기준"에 근거하여 실시한다.

라) 동물윤리: 본 시험은 동물보호법에 근거한 ㈜바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다.(승인번호: 110046)

마) 수의학적 관리: 본시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어진다.

2) 시험계

가) 종 및 계통: 랫드, Sprague-Dawley(Crl-CD(SD)),SPF

나) 생산자 및 구입처: ORIENTBIO INC., Korea

다) 종 및 계통 선택이유: Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

라) 입수 시 성별, 동물 수, 월령 및 체중범위: 수컷, 24마리, 5주령, 117.1~ 37.9g/ 암컷, 24마리, 5주령, 109.7~124.6g

마) 투여개시 주령 및 동물 수, 월령 및 체중범위: 수컷, 20마리, 6주령, 181.6~204.5g/암컷, 20마리, 6주령, 149.5~170.4g

바) 검역・순화: 반입시동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울(BP410S, Satorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

사) 개체 및 사육 상자 식별: 순화기간 중에 입수시에 체중측정한 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역・순화 기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였다. 사육상자에는 색깔별로 라벨을 부착하였다.

아) 군분리: 군분리는 모든 동물 대하여 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 군분리일에 평균체중에 가까운 암수 각 20마리르 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 5마리로 군분리하였다.

사) 잔여동물의 처리: 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외 시켰다.

3) 사육환경 조건

가) 동물실번호: A326

나) 사육상자의 종류, 크기: 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H(mm)

다) 사육상자당 수용동물 수: 3마리(검역・순화기간)/1마리(관찰기간)

라) 온도: 20.5 ~ 24.0℃

마) 상대습도: 40.2~59.8%

바) 환기횟수: 10~15 회/시간

사) 명암주기(조명시간): 12시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

아) 조도: 150~300 Lux

자) 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

4) 사료

가) 종류: 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18%, Protein Rodent Diet 2918C)

나) Lot No: 2918C-110910MA, 2918C-022211MA

나) 제조자: Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

다) 급이방법: 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취시켰다.

라) 사료의 분석 및 확인: 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공받은 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

5) 음수

가) 종류 및 급수방법: 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣어 자유섭취시켰다.

나) 음수의 분석 및 확인: 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」의 전 항목에 대하여 실시한다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

6) 투여

가) 투여경로: 경구투여

나) 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예상경로를 고려하여 경구투여를 선택하였다.

다) 투여방법 및 투여횟수: 투여량은 10mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기(3 및 5mL)를 이용하여 4주간 1일 1회 위내에 강제투여하였다.

7) 군구성 및 투여용량

가) 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2 저용량군	1,000	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)
G3 중용량군	2,000	10	5(1301~1305)	5(2301~2305)
G4 고용량군	5,000	10	5(1401~1405)	5(2401~2405)

나) 투여용량설정: 단화투여 독성시험(Biotoxtech Study No: B11044)의 결과, 5,000mg/kg 용량에서 시험물질에 의한 독성이 관찰되지 않았다. 본시험에서는 5,000mg/kg 용량을 고용량으로 설정하고, 2,000 및 1,000 mg/kg을 각각 중용량 및 저용량의 투여용량으로 설정하였다. 대조군에는 고용량군과 동일한 액량의 주사용수를 투여하였다.

8) 관찰 및 검사

가) 일반증상 관찰: 모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여 1일부터 4주간 실시하였다.

나) 체중측정: 모든 동물에 대하여, 투여개시일(투여전), 투여 개시 후 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다.

다) 사료섭취량 측정: 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하고, 투여 1주째는 7일간의 섭취량을, 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

라) 혈액학적 검사: 모든 동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1mL을 EDTA함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기(ADVIA120, SIEMEINS, Germany)로 다음 항목들을 측정하였다.

항 목	단 위	측정방법
적혈구수(erythrocyte count, RBC)	×10 cells/μL	Flow cytometry
혈색소량(hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치(hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (ean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (meancorpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	Calculated
혈소판수 (platelet, PLT)	×103 cells/μL	Flow cytometry
백혈구수 (leucocyte count, WBC)	×103 cells/μL	Flow cytometry

마) 혈액생화학적 검사: 혈액생화학적 감사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기(7080, HITACHI, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

항 목	단 위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC (UV Kinetic)
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	JSCC (UV Kinetic)
알카라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	U/L	4-Nitrophenyl-phosphate 2Na
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-GLDH
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민 (albumin, Alb)	g/dLL	BCG
A/G ratio	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPSGlycerol Blanking
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH

바) 부검: 모든 동물에 대해서, 전신의 장기・조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시한다.

사) 장기중량 측정: 모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.(뇌, 간, 심장, 비장, 신장)

아) 조직병리학적 검사: 부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기・조직을 적출하여 10% 중성완충포르말린용액(neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환은 Davidson 고정액에 고정하였다.

뇌(brain)	흉선(thymus)
갑상선 및 부갑상선(thyroid and parathyroid	
폐 및 기관지(lung with bronchi)	심장(heart)
간(liver)	비장(spleen)
신장(kidney)	부신(adrenal)
위(stomach)	십이지장(duodenum)
공장(jejunum)	회방(ileum)
맹장(cecum)	결장(colon)
직장(rectum)	췌장(pancreas)
고환(testis)	부고환(epididymis)
난소(ovary)	자궁(uterus)

자) 고정된 장기・조직 중 아래의 장기・조직에 대하여 탈수・파라핀, 조직의 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 박절과정을 거쳐 검체를 제작하여 Hematcylin & Eosin(H&E)염색을 실시하였다. 검체 제작 후 잔여 장기・조직 및 고정 장기・조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

뇌(brain)	심장(heart)
간(liver)	비장(spleen)
신장(kidney)	폐(lung)

차) 조직병리학적 검사는 대조군 및 5,000mg/kg 투여군의 모든 개체의 조직절편이 제작된 장기・조직에 대하여 검경하였다.

10) 자료의 통계처리: 실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS(version 9.2, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정한다. Bartlet t test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analy sis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett’st- test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 kruskal-walli s test를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)을 확인하였다.

다. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량증가 독성시험

1) 시험개요

가) 시험목적: 암수 비글견을 이용하여 시험물질은 FER-E60을 일정한 간격으로 용량을 증가하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

나) 본 시험은 “비임상시험관리기준”의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.

다) 시험기준: 본 시험은 “의약품등의독성시험기준”에 근거하여 실시한다.

라) 동물윤리: 본 시험은 동물보호법에 근거한 ㈜바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의

해 승인되었다.(승인번호: 110122)

2) 시험계

가) 종 및 품종: Dog, Beagle

나) 생산자 및 구입처: BEIJING MARSHALL BIOTECHNOLOGY Co., Ltd., WOO JUNG BSC, Inc.

다) 종 및 품종 선택이유: 본 비글견은 동물실험용으로 생산되었고, 의약품 등의 안정성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다.

라) 입수 시 성별, 동물 수, 월령 및 체중범위: 암수 각 3마리, 5 ~ 6개 월령, 수컷: 7.02 ~ 7.07 kg, 암컷: 5.79 ~ 6.12 kg

마) 투여개시 주령 및 동물 수, 월령 및 체중범위: 암수 각 3마리, 5 ~ 7개 월령, 수컷: 7.39 ~ 7.81 kg, 암컷: 6.28 ~ 6.46 kg

바) 검역・순화: 입수 시 모든 동물에 대하여 문신번호를 확인하고, 일반증상, 체중(HW-100KGV, A&D Co., Ltd Korea) 및 체온을 측정하였다. 입수 후 15일간의 검역・순화 기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 주 1회 체중을 측정하였으며, 검역・순화기간 종료 시에 동물의 건강상태를 확인하였다.

사) 개체 및 사육 상자 식별: 사육상자에는 개체식별카드를 부착하고, 동물은 문신번호로 식별하였다.

아) 군분리: 검역・순화기간 종료 후, 체중을 기초로 하여 암수 각 대조군 1마리, 실험물질 투여군 각 2마리로 군분리 하였다.

3) 사육환경 조건

가) 동물실번호: A210

나) 사육상자의 종류, 크기: 스테인레스 개사육상자, 800W×900D×830H (mm)

다) 사육상자당 수용동물 수: 1 마리

라) 온도: 20..0 ~ 22.7℃

마) 상대습도: 35.2 ~ 63.5%

바) 환기횟수: 10~15 회/시간

사) 명암주기(조명시간): 12시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

아) 조도: 150~300 Lux

자) 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 사료통은 1~2회/2주의 빈도로 세척하였으며, 이 기간에 사료통이 분변 및 뇨등으로 오염되었을 경우, 그때마다 세척 또는 교환하였다.

4) 사료

가) 종류: 고형사료, 퓨리나 실험동물용 개사료(Lot No.: STN20110126)

나) 제조자: Agribrands Purina Korea Inc.

다) 공급량 및 방법: 사료통에 고형사료를 마리당 약 250g씩 1일 1회(11:00 ~ 13:00)에 공급하였다. 단, 투여일에는 투여 후 약 2시간 후에 공급하였다.

라) 사료의 분석 및 확인: 사료의 분석은 Agribrands Purina Korea Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

5) 음수

가) 종류 및 급수방법: 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 자동급수장치를 이용하여 자유섭취 시켰다.

나) 음수의 분석 및 확인: 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」의 전 항목에 대하여 실시한다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

6) 투여

가) 투여경로: 경구투여

나) 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택한다.

다) 투여방법 및 투여횟수: 투여액량은 5mL/kg 으로 하고, 투여당일의 체중으로 산출하였다. 투여일 오전에 경구투여용 카테터를 부착한 1회용 주사기(50ml)를 이용하여 위내에 강제투여하고, 약 2시간 후에 사료를 공급하였으며, 4일간격으로 용량을 증가하여 총 3회 투여하였다.

7) 군구성 및 투여용량

가) 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0→0→0	5	5(1101)	5(2101)
G2 시험물질 투여군	500→1,000 →2,000	15	5(1201, 1202)	5(2201, 2202)

나) 투여용량설정: 본시험의 예비시험 (BTT, Study No.: B11047P)으로 각 1마리의 비글견에 2,000mg/kg을 투여한 결과, 2례 모두 구토증산만 관찰되었다. 따라서, 본 실험에서는 500mg/kg을 1차 투여용랴으로 설정하고, 1,000 및 2,000mg/kg을 2차 및 3차 투여용량으로

설정하였다. 대조군에는 시험물질주쳐군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

8) 관찰 및 검사

가) 일반증상 관찰: 투여당일에는 투여 후 30분간 및 1, 2, 3, 4, 6 시간에 일반상태, 운동성, 자율신경계의 기능 및 배설물 등에 대한 일반증상을 관찰하였다. 그 다음날부터는 1일 2회 관찰하고, 빈사나 사망동물의 유무를 확인하여, 최종투여 후 2주간 관찰하였다.

나) 체중측정: 체중측정은 매번 투여일(투여 전). 투여 후 1일, 최종투여 후 1, 3, 7 및 13일에 측정하였으며, 동일한 시간대에 실시하였다.

다) 부검: 관찰기간 종료 후, 펜토탈소디움(Lot No.: 10015, thiopental sodium, ㈜중외제약)으로 마취하여 방혈치사 시킨 후, 체표 및 전신의 장기・조직에 대한 상세한 육안검사를 실시하였다.

라) 조직병리학적 검사: 부검 시 육안소견 및 병리변화가 의심되는 장기・조직이 관찰되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

9) 자료의 통계처리: 체중에 대한 통계처리는 실시하지 않는다.

라. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

1) 시험개요

가) 시험목적: FER-E60의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하여 검토하였다.

나) 본 시험은 "비임상시험관리기준"의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.

다) 시험기준: 본 시험은 "의약품등의독성시험기준"에 근거하여 실시한다.

2) 용량설정시험

가) 용 량: 가이드라인에서 추천하는 5,000 μg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 μg/plate의 5용량으로 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

나) 시험방법: 용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 실시하였다. 단, 용량설정시험에서는 각 용량 당 2매의 페트리디쉬를 사용하였다.

다) 본시험의 용량설정: 용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 TA100 균주의 대사활성화비존재하에서는 313 μg/plate 이상, 대사활성화존재하에서는 5,000 μg/plate의 용량에서 관찰되었다. TA98, TA1535, TA1537 및 WP2*uvrA*(pKM101) 균주는 대사활성화유무에 관계없이 생육저해는 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 최고용량은 TA100 균주의 대사활성화비존재하는 생육저해가관찰된 최저용량인 313 μg/plate, 대사활성화존

재하는 5,000 μg/plate으로 하고 이하공비 2로 5용량의 시험물질군을 설정하였다. TA98, TA1535, TA1537 및 WP2*uvrA*(pKM101) 균주는 생육저해가 관찰되지 않았기 때문에 5,000 μg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 4용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

3) 본시험

가) 시험방법: 본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다.

나) 처리방법: 대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100μL씩 마이크로피펫으로 취하여 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 0.1mol/L인산완충액(pH 7.4) 500μL 및 각 균주 현탁액 100μL를 첨가해서 37℃에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP*uvrA*(pKM101)균주에는 대장균용 top agar를 각각 2mL씩 첨가하여 vortexing하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 중층하여 실온방치 하였다. 대사활성화존재하에서는 0.1mol/L 인산완충액(pH 7.4) 500μL 대신에 S9 mix 500μL를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다. 본시험에서는 각 용량당 3매의 페트리디쉬를 사용하였다.

다) 배양법 및 배양시간: top agar가 굳은 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37℃ 배양기에서 48시간 배양하였다.

라) 오염유무 확인: 오염유무를 확인하기 위해 최고용량의 시험물질액, 0.1mol/L 인산완충액(ph7.4) 및 S9 mix를 건열멸균한 유리시험관에 넣고, 37℃에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, Top agar가 굳은 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37℃배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

마) 확인시험: 용량설정시험 및 본시험의 결과에서 재현성이 확보되었고, 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4용량 이상이 확보되었기 때문에 확인시험은 실시하지 않았다.

4) 관찰 및 계측

가) 시험물질의 침전 또는 석출의 관찰: 시험물질의 처리시 및 콜로니 계측시에 시험물질의 침전 또는 석출에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다.

나) 콜로니수의 계측: 배양종료 후, 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터(protoCOL., SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하였다.

다) Background lawn의 관찰: 계측과 동시에 background lawn으로부터 시험물질에 대한 균주의 생육저해의 유무를 관찰하였다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 엷어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

5) 시험의 성립조건

· 음성 및 양성대조군에서의 평균복귀변이콜로니수가 Historical control data의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상 일 것.
· 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않을 것.
· 오염이 없을 것.

6) 결과의 판정

· 적어도 1개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가할 것.
· 복귀변이콜로니수가 용량의존적으로 증가할 것.
· 용량설정시험과 본시험의 결과에 재현성이 있을 것.

7) 자료의 통계처리: 복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않는다.

마. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

1) 시험개요

가) 시험목적: 시험물질 FER-E60에 대해 포유류 배양세포주(Chinese Hamster Lung(CHL/IU) cell line)를 사용하여 염색체이상 유발성의 유무를 검토하였다.

나) 본 시험은 "비임상시험관리기준"의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.

다) 시험기준: 본 시험은 "의약품등의독성시험기준"에 근거하여 실시한다.

2) 세포증식억제시험

가) 용량: 가이드라인에서 추천한 5,000㎍/mL를 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5㎍/mL의 8용량을 설정하였다. 또한 음성대조군을 설정하였다.

나) 처리방법: 계대배양한 세포현탁액의 세포수를 이용하여 계수한 후 5×10^4 cells/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM으로 희석하여 96 well plate(Nunc, Denmark)에 200㎕씩 분주하고, 5%의 CO_2 가 공급되는 37℃배양기에서 24시간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법으로서의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 4well을 사용하고, 시험번호 및 각 계열을 기입해서 well plate를 구별하였다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량(mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200
	+	음성대조	0.73	0.17	0.1	200
		시험물질	0.73	0.17	0.1	200
연속처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200

처리 후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에는 6시간 배양한 후 well내를 PBS로 세정하고, 신선한 배양액 200㎕를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속 배양하였다. 시험물질의 침전 또는 석출은 시험물질액의 처리시와 배양 종료 후 각 용량별로 관찰하였다.

다) 흡광도 측정: 배양종료 후 well 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, 5 mg/mL Phosphate Buffered Saline (PBS))를 50㎕씩 첨가하여 4시간 더 배양 후에 배양액을 버리고 건조시켰다. 여기에 DMSO를 150㎕씩 첨가하여 형성된 formazan을 용해시켰다. ELISA reader(ELx8081U, BioTek, U.S.A)를 이용하여 540mm에서 흡광도를 측정하였다.

라) 본시험의 용량설정의 이유: 세포증식억제시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 50% 세포증식억제용량(Inhinition concentration 50%: IC_{90})을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화 비존재하는 145.9㎍/mL, 대사활성화존재하는 440.1㎍/mL, 연속처리법의 대사활성화비존조해는 428.0㎍/mL이었다.

3) 본시험

가) 처리방법: 계대배양한 세포현탁액의 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수한 후 5×10^4 cell/mL이 되도록 10% FBS를 포함한 EMEM로 희석하여 60mm dish(BD, U.S.A)에 5mL씩 분주하여 5% CO_2 가 공급되는 37℃배양기에서 24시간 배양하였다. 배양종료 후, 각 plate는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법으로서의 대사활성화비존재하의 합 3계열 분리하였다. 한 용량당 2개의 plate를 사용하고, 각각의 plate에 유성펜으로 코드화한 용량, 음성대조물질, 양성대조물질 및 대사활성화 존재우무를 기

입하여 식별한다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량(mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.7		0.13	5
연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

처리 후, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 6시간 배양한 후 plate내를 PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5ml로 교환하고 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 경우에는 24시간 연속배양하였다. 시험물질의 침전 또는 석출은 시험물질액의 처리시와 배양종료 후 각 용량별로 관찰하였다.

나) 검체제작: 배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액(Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2μg/mL되게 첨가하였다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 plate바닥으로부터 세포를 떼어내었다. 떨어진 세포를 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 37℃에서 보온한 0.075mol/L KCL 수용액을 5mL 첨가하여 vortex mixer로 교반한 후 37℃에서 20분간 방치하였다. 20분 후, 1mL의 냉각한 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 넣고 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 세포를 반고정 하였다. 이후, 5mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 vortex mixer로 교반하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드글래스 2군데에 1~2방울 떨어뜨려 슬라이드 표본을 제작하고 코드화하였다. 건조 후, 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하였다.

4) 관찰

가) 슬라이드 표본관찰은 단시간법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다. 염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기세포가 관찰 가능한 연속하는 3용량을 설정하였다.

나) 각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경(BX51, Olympus Japan, 600qo 배율)으로 관찰하였다. 구조이상으로 염색분체절단(chromatid break; ctb), 염색분체교환(chromatid exchange; cte), 염색체절단(chromosome break; csb), 염색체교환(chromosome exchange; cse), 갭(gap: 염색분체의 폭 보다도 좁음 비염색성 부위) 및 기타(other; o)로 분류하였다.

다) 기타로서 1개의 분열중기세포에 다수 gap 및 절단 등이 있는 경우에는 단편화 (fig)로

기록하였다. Gap에 대해서는 결과 기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합판정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가하였다. 또한 수적 이상으로서 배수체(polyploid; pool) 및 핵내배화(endoreduplication, end)를 기록하였다. 이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고, 퍼센트 값을 염색체 이상빈도로 하였다. 또한, 염색체이상의 종류를 각각 기록하였다.

5) 시험의 성립조건

① 염색체이상출현빈도가 음성대조군에서는 5%미만, 양성대조군은 10%이상일 것.
② 시험물질군에서 분열중기상 세포를 200개 관찰한 용량이 3용량 이상일 것.
③ 세포의 오염이 없을 것.

6) 결과의 판정

염색체이상을 가진 세포(gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni등의 판정기준에 따라 아래와 같이 판정하였다.

이상세포의 평균 출현율	판정
5% 미만	음성 (-)
5% 이상 ~ 10% 미만	의양성(±)
10% 이상	양성 (+)

양성으로 판정되지 않았기 때문에 D_{20} 및 TR값은 구하지 않았다.

- D_{20} : 20%의 세포에 구조이상이 출현할 수 있는 농도(mg/mL)
- TR : 단위용량 (mg/mL)당의 염색분체체형교환(cte)출현빈도의 비교치

7) 자료의 통계처리: 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS(version9.2, SAS Institute Inc., U.S.A)을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher’s exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군간 및 음성대조군과 양성대조군과의 유의차(유의수준:0.05) 검증을 실시하였다.

바. 마우스를 이용한 소핵시험

1) 시험개요

가) 시험목적: 마우스골수세포를 이용하여 시험물질 FER-E60의 소핵유발유무를 평가하였다.

나) 본 시험은 “비임상시험관리기준”의 Good Laboratory Practices 를 준수한다.

다) 시험기준: 본 시험은 “의약품등의독성시험기준”에 근거하여 실시한다.

라) 동물윤리: 본 시험은 동물보호법에 근거한 ㈜바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의

해 승인되었다.(승인번호: 110046)

2) 시험계

가) 종 및 계통: 마우스, CrljOri:CDI(ICR), SPF

나) 생산자 및 구입처: ORIENTBIO INC., Korea

다) 종 및 계통 선택이유: ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

라) 입수 시 성별, 동물 수, 월령 및 체중범위

- 용량설정실험: 수컷, 17마리, 7주령, 27.2 ~ 30.8g
- 검체제작시간 설정시험: 수컷, 10마리, 7주령, 28.4 ~ 31.5g
- 본시험: 수컷, 27마리, 7주령, 26.9 ~ 33.8g

마) 투여개시 주령 및 동물 수, 월령 및 체중범위

- 용량설정실험: 수컷, 15마리, 8주령, 33.6 ~ 36.5g
- 검체제작시간 설정시험: 수컷, 9마리, 8주령, 32.0 ~ 34.0g
- 본시험: 수컷, 25마리, 8주령, 31.7 ~ 36.3g

바) 검역・순화: 반입시동물의 외관 검사를 실시한 후, 전자저울(BP410S, Satorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일(용량설정시험, 본시험) 및 6일(검체제작설정시간시험)간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물 입수시 검역실에서 3일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동하였다. 순화기간 종료일에 전자저울로 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다.

사) 개체 및 사육 상자 식별: 순화기간 중에 입수시에 체중측정한 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역・순화 기간 중 개체식별카드를 부착하였다. 관찰기간 중에는 군분리시에 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였다. 사육상자에는 색깔별로 라벨을 부착하여 식별하였다.

아) 군분리: 군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 군분리일에 평균체중에 가까운 동물에 대해 용량설정시험용 15마리, 검체제작시간 설정시험용 9마리 및 본시험용 25마리를 선별하였다. 선별한 동물은 각군평균체중이 균등하도록 분리하였다.

자) 잔여동물의 처리: 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외 시켰다.

3) 사육환경 조건

가) 검역실번호: A316

나) 동물실번호: A324

다) 사육상자의 종류, 크기

- 순화기간중: 폴리카보네이트 케이지, 260W×420D×180H(mm)
- 시험기간중: 폴리카보네이트 케이지, 200W×260D×130H(mm)

라) 사육상자당 수용동물 수

- 검역 및 순화기간 중:	용량설정시험	8~9 마리
	검체제작시간 설정시험	10 마리
	본시험	9 마리
- 시험기간중:	용량설정시험	3 마리
	검체제작시간 설정시험	3 마리
	본시험	3 마리

마) 온도: 19.0 ~ 21.9℃(A316), 20.7 ~ 24.6℃(A324)

바) 상대습도: 46.2 ~ 56.3%(A316), 26.3 ~ 56.6%(A324)

사) 환기횟수: 10~15 회/시간

아) 명암주기(조명시간): 12시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

자) 조도: 150~300 Lux

차) 사육기재의 교환 및 세척: 사육상자 및 급이기는 1회/2주, 급수병은 2회/주 빈도로 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

4) 사료

가) 종류: 실험동물용 고형사료(Teklad Certified Irradiated Global 18%, Protein Rodent Diet 2918C)

나) Lot No: 2918C-091410MA, 2918C-110910MA

다) 제조자: Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

라) 급이방법: 급이기에 고형사료를 넣어 자유섭취시켰다.

마) 사료의 분석 및 확인: 사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공받은 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

5) 음수

가) 종류 및 급수방법: 청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수를 폴리카보네이트제 음수병에 넣어 자유섭취시켰다.

나) 음수의 분석 및 확인: 음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원에 의뢰하여「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」의 전 항목에 대하여 실시한다. 모든 항목에 대한 검사는 1 회/년, 미생물 검사는 1 회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인한다.

6) 용량설정시험

가) 투여용량의 선택이유: 가이드라인에서 정한 최고용량은 2,000mg/kg이지만, 시험물질인 식품인 것을 고려하여 5,000mg/kg을 최고용량으로 하고, 2,000, 1,000, 600 및 300mg/kg의 4용량을 설정하였다.

나) 투여방법: 1용량당 3마리로 하였다. 테프론제 존데를 장착한 주사기(1mL)를 사용하여 강제경구 투여하였다. 투여액량은 10mL/kg로 하여, 군분리시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였다.

다) 일반증상 및 사망동물 관찰: 투여직후(투여 0일), 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 각 용량별 사망동물을 관찰하였다.

라) 본시험의 용량설정: 최고용량인 5,000mg/kg에서 사망동물이 관찰되지 않았기 때문에 5,000mg/kg을 최고용량으로 설정하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

7) 검체 제작시간 설정시험

가) 투여방법: 용량설정시험에서 설정한 최고용량(5,000mg/kg)을 경구투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다. 각 시간당 동물은 3마리로 하였다. 투여액량은 10mL/kg로 하여, 군분리시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였다.

나) 일반증상 및 사망동물 관찰: 시험물질 투여직후(투여 0일), 투여 후 1, 2 및 3일에 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다.

다) 검체제작시간의 설정: 투여 후, 24, 48 및 72시간에 소핵유발을 확인한 결과, 모든 관찰시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 하였다.

8) 군구성: 각군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로설정하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투어경로	마리수 (개체번호)
G1 음성대조	0	10	경구	5(1101~1105)
G2 저용량	1,250	10	경구	5(1201~1205)
G3 중용량	2,500	10	경구	5(1301~1305)
G4 고용량	5,000	10	경구	5(1401~1405)
G5 양성대조	2	10	복강내	5(1501~1505)

9) 투여

가) 투여경로: 경구투여

나) 투여경로의 선택이유: 시험물질의 임상적용예상경로를 고려하여 경구투여를 선택하였다.

다) 투여방법 및 투여회수: 시험물질은 테프론제 존데를 장착한 주사기(1mL)를 사용하여 1회 강제경구 투여하였다. 음성대조군은 시험물질과 같은 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여하였다. 양성대조물질은 주사기(1mL, 26G)를 사용하여 일반적으로 소핵유발이 잘되는 복강에 1회 투여하였다. 투여액량은 10mL/kg로 하여, 군분리시의 체중으로부터 투여액량을 산출하였다.

10) 관찰 및 평가

가) 일반증상 및 사망동물 관찰: 일반증상 관찰은 투여직후 (투여 0일), 투여 후 2시간 및 검체제작일까지 24시간 간격으로 실시하며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였다.

나) 체중측정: 체중은 투여일(투여 0일) 및 골수채취작전에 전자저울(BP410S, Sartorius, Germany)로 측정하였다.

다) 골수세포의 채취 및 도말검체의 제작: 시험물질 투여 후 각 군의 검체제작시간에 동물을 경추탈골하였다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200μL의 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 채취하였다. 골수세포부유액은 1,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글래스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액(0.01mol/L Sorenson) 인상완충책(pH 6.8)을 사용하여 세척하고 0.004% citric acid수용액에 세정하여 건조시켰다.

라) 검체의 관찰: 코드화된 골수도말표본을 1,000배 배율의 현미경(BX51, Olympusm Japan)으로 관찰하였다. 검체 1장당 다염성적형구(PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다명성적혈구(MNPCE, Micronucleated piltchrimatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체 당 500개의 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

10) 시험의 성립조건: 음성재조군 및 양성대조군에 있어소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 범위내에 있을 것.

11) 결과의 판정: 소핵다염성적혈구의 출혈빈도는 kastenbaum and bowman의 추정학적 통계방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 것.

12) 자료의 통계처리: 소핵다염성적혈구의 출현빈도 kastenbaum & bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증하였다. 다명성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다.(유의수준: 0.05) 등분산인 경우, One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하였다(유의수준: 0.05).

9. 좁은잎천선과나무 잎 추출물의 인체적용시험

가. 인체적용시험의 목적

1) 노화로 인해 무릎관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 섭취의 관절건강 개선 기능성 및 안전성을 확인하기 위함.

나. 인체적용시험의 배경

1) 관절의 불편함은 노화로 인한 증상 중 하나로, 극심한 통증이 수반되는 퇴행성 관절염으로 발전할 경우 삶의질 저하 뿐 아니라 치료비 지출 등의 경제적 손실이 야기될 수 있음.

2) 2010~2012년동안 우리나라 65세 이상 인구 집단에서 골관절염 유병율은 28%(남성, 여성 각 9.3%, 32.5%)로 매우 높은 비율을 차지하고 있음.

3) 건강한 연골은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 합성과 분해가 역동적으로 균형을이루게 되는데, 관절의 퇴행적 변화(노화, 과도한 사용, 산화적 스트레스 등)로 이러한 균형이 깨지면서 연골의 분해가 증가되고, 연골의 손실로 관절의 통증 및 기능저하가 유발됨.

가) 퇴행적 변화로 생성된 연골의 분해 산물은 외부 물질로 인식되고, 이는 활막(synovium)으로의 대식세포 이동(macrophage recruitment)을 증가시켜 염증 반응을 유발함.

나) 염증반응의 결과로 IL-1β, TNF-α 분비가 증가하며, 이는 iNOS 생성 증진을 통한 NO 생성 증가, IL-6 분비 증가, COX-2를 경유한PGE_2생성 증가를 촉진시킴.

다) 반응으로 분비된 사이토카인은 연골세포(chondrocyte)의 조절 작용을정상적으로 수행하지 못하게 하여 기질분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 생성 및 분비를 증가시킴으로써 연골의 분해를 촉진함.

라) 연골 자체는 신경 조직이 없어 통증을 느낄 수 없으나 연골하 골(subchondral bone), 인대(ligaments), 관절낭(joint capsule)에 분포되어 있는 구심 신경에 의해 통증이 자각되며, 연골 손실로 인한 관절 구조의 변화로 통증 및 기능저하가 유발되는 것으로 보고되고 있음.

마) 또한 염증성 사이토카인은 통증을 유발시키거나 말초 조직에서 통증에 대한 예민도를 증가시키는 요인으로 알려져 있음.

4) 퇴행성 관절염 치료제는 아직 개발되어 있지 않아 증상 개선을 위한 약물이 사용되고 있으나 부작용 우려로 안전한 기능성 식품소재 개발 필요성이 대두되고 있음.

5) 진통 및 항염 작용을 가진 약물(Cox-2 억제제 또는 비스테로이드성 항염제)이 널리 사용되나 장기 복용 또는 남용은 소화기계 및 혈액응고기전의 부작용을 초래할 수 있으며, 면역력과 인체 저항력을 저하시켜 관절염을 오히려 악화시킬 우려가 있음.

6) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물은 *in vitro* 실험에서 항염증 효과가 관찰되었고, MIA (monosodium iodoacetate)로 유도된 골관절염 동물모델에서 추출물을 250, 500 mg/kg BW 수준으로 4주간 섭취 시 관절염 대조군 대비 혈중 염증성 cytokines 수준이 유의적으로 감

소되고, 연골조직 및 골수에서 MMPs 유전자 발현이 감소되어 양성대조군(indomethacin) 수준까지 유의적으로 낮아짐. 또한 연골조직의 조직학적 변화도 대조군 수준으로 회복되었고, 만성 통증 억제 실험에서도 통증반응이 대조군 대비 유의하게 억제되어 관절건강 개선 기능성이 확인됨. 따라서, 본 연구에서는 선행 연구 결과를 바탕으로, 관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 섭취의 관절건강 개선 기능성 및 안전성을 평가하고자 함.

다. 인체적용시험 연구계획서(임상 protocol) 요약

연구제목	좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 관절건강 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구
연구의뢰자 및 지원기관	제주테크노파크 농림축산식품부, 미래창조과학부
연구책임자	분당차병원 정형외과 김재화 교수
공동연구자	이화여자대학교 식품영양학과 권오란 교수(*연구 총괄 책임자) 분당차병원 정형외과 최원철 교수 서울과학기술대학교 식품공학과 김지연 교수
연구담당자	분당차병원 정형외과 김은애 연구간호사 이화여자대학교 식품영양학과 안영숙 연구원
연구기관명 /주소	분당차병원(경기도 성남시 분당구 야탑로59) 이화여자대학교 식품영양학과(서울시 서대문구 이화여대길52) * 연구대상자 모집 및 방문은 분당차병원에서 이루어지며, 일부 인체 유래물 분석은 이화여자대학교에서 수행됨.
연구기간	IRB 승인일로부터12개월
연구대상	노화로 인해 무릎관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인
연구목적	노화로 인해 무릎관절에 불편을 호소하는 중년 이상의 성인에서 좁은잎천선과나무잎 주정추출물 섭취의 골관절건강 개선 기능성 및 안전성을 확인함
연구디자인	12주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 연구
시험식품	좁은잎천선과나무 잎 주정추출물(좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 500 mg/d)
대조식품	Placebo
섭취방법	1일 1회 5정을 물과 함께 섭취

연구방법	 방문 1에 자의에 의해 인체적용연구 동의서에 서명한 지원자는 선정·제외 기준에 따라 적합성 여부를 판정 받는다. 선정된 대상자는 방문 1(0주)에 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군에 무작위 배정되어 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 기능성 바이오마커를 분석한다.
연구대상자 수	각 군당 목표 대상자수는 30명(탈락률25%고려)으로 선정기준에 적합한 대상자를 총60명 등록시키기로 한다.
연구대상자 선정기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다. 1)본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 1. 만 50세 이상 남녀 2. 골관절에 불편을 호소하는 자
연구대상자 제외기준	다음에 기술된 조건에 해당되는 사람을 제외시킨다. 1) Kellgren-Lawrence grade 3, 4에 해당하는 자 3. 첫 방문1주일 이내에NSAID계 의약품을 투여받은 자 4. 염증성 관절염이 의심되는 경우(ESR 또는CRP 상승 및 발적, 동통, 부종 등의 염증성 관절염 관련 증상을 동반한 경우) 5. 고도 비만자(BMI 30 kg/m^{2}이상) 6. 노화로 인한 무릎관절 불편감 이외에 보행에 장애를 줄 수 있는 신경계 혹은 하지 관절(고관절, 족부관절) 이상자 7. 중등도 이상의 요통 및 하지의 방사통을 호소하는 경우 8. 하지의 심한 신경학적 및 혈관성 질환자 9. 첫 방문 4주 이내에 관절건강에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품(글루코사민, MSM, 초록입홍합추출오일 등)을 지속적으로 섭취한 경우 10. 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자 11. 임산부 또는 수유부 12. 첫 방문 4주 이내에 임상시험에 참여한 자 13. 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 자

식 이 , 생활습관 지침	연구기간 동안 아래 사항을 준수하되, 이외의 사항은 평소 식이 및 생활습관을 유지 1) 해조류 및 채소로 만들어진 환, 즙 섭취 금지 14. 관절건강에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품(글루코사민, MSM, 초록입홍합추출오일 등)섭취 금지 15. 다음 의약품 복용 금지 - NSAID계 의약품(aspirin 포함) 또는 기타 항염증제 및 진통제 - 국소 항염증약(예를 들어 국소 NSAID계 겔 또는 크림제, 패취제 등) 16. 한약 섭취 금지
기능성 평가	[Subjective biomarker] • VAS [0, 4, 8, 12주] • WOMAC [0, 4, 8, 12주] [Objective biomarker] • 방사선학적 검사[0, 12주] • 관절 염증 관련 바이오마커(MMPs 등) [0, 12주]
안전성 평가	이상반응, 활력징후, 임상병리검사(일반혈액검사 및 소변 검사)

라. 연구진행 일정표

Period		Intervention			
Visit		1	2	3	4
Week		0	4	8	12
Window period			± 5d	± 5d	-3d ~ +7d
연구대상자 동의		√			
인구학적 특성(성별, 생년월일, 연령)		√			
신체계측(신장[1], 체중, BMI)		√	√	√	√
활력징후(맥박, 혈압, 체온)		√	√	√	√
병력 조사		√			
약물・건강기능식품 섭취 조사		√	√	√	√
스크리닝 검사	Kellgren-Lawrence grade[2]	√			
	ESR, CRP	√			
	임신반응검사[3]	√			

적합성 평가[4]		√			
무작위배정		√			
음주력・흡연력 조사		√			
기능성평가	VAS, WOMAC	√	√	√	√
	방사선학적 검사[5]	√			√
	관절 염증 관련 바이오마커[6]	√			√
임상병리검사(혈액, 소변 검사)[7]		√			√
활동량 조사		√			√
식습관 조사 (Recommended Food Score)		√			
식이・생활습관 교육		√	√	√	
식이조사 및 생활습관 모니터링[8]		√	√	√	√
시험・대조식품 배부		√	√	√	
반납식품 회수/순응도 확인			√	√	√
이상반응 확인		√	√	√	√

1) 신장은 방문 1(0주)에서만 측정한다.
2) 방사선학적 검사로 확인하며, 방문1(0주)로부터4주 이내에 검사 결과가 있는 대상자의 경우 검사를 생략할 수 있다.
3) 명확히 폐경(무월경 24개월 이상)인 대상자를 제외한 가임기 여성에 한해 소변으로 실시한다.
4) 선정/제외기준에 적합하지 않은 사람의 경우 이후 과정을 생략할 수 있다.
5) 스크리닝 검사 시 사용한 검사결과로 대체할 수 있다.
6) 측정 전날 12시간 공복 상태로 방문 하여 관절 염증 관련 바이오마커(MMPs 등)를 분석한다.
7) 측정 전날12시간 공복 상태로 방문하여 다음의 항목을 검사한다. 단, 방문1(0주)로부터 4주 이내에 건강검진 결과가 있는 연구대상자에 한하여 검사를 생략할 수 있다.
- 혈액학적 검사: CBC(WBC, RBC, Hb, Hct, PLT, MCV, MCH, MCHC), differential count(neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes)
- 혈액화학적 검사: ALT, AST, BUN, creatinine, eGFR
- 소변 검사: pH, protein, glucose, ketone, blood, urobilinogen, bilirubin, nitrite, leukocyte, creatinine, specific gravity, color

8) 스마트폰 앱을 이용하여 식이 섭취 내용을 조사하며(방문 전 평소식이를 대표할 수 있는 하루), 매 방문 식이・생활습관 지침 준수여부를 모니터링하고 각 방문 시 재확인하도록 한다. 단, 스마트폰 사용이 어려운 경우, 식이・생활습관 일지를 작성하도록 하고 각 방문 시 확인한다.

10. 좁은잎천선과나무 대량증식 연구

가. 좁은잎천선과나무 대량증식 기술 개발

1) 좁은잎천선과나무 대량증식을 위한 삽목을 통한 묘목 대량 생산

2) 일반삽목 및 댜양한 발근제를 활용한 삽목 기술 확립

3) 묘종 이식/정식에 따른 생존률 확인

4) 삽목 개체의 정상 발근률 확인

5) 좁은잎천선과나무/천선과나무 생존/발근률 비교 분석

6) 좁은잎천선과나무 대량생산을 위한 화분 이식

나. 좁은잎천선과나무 재배단지 조성

1) 좁은잎천선과나무 대량증식법 현장 교육

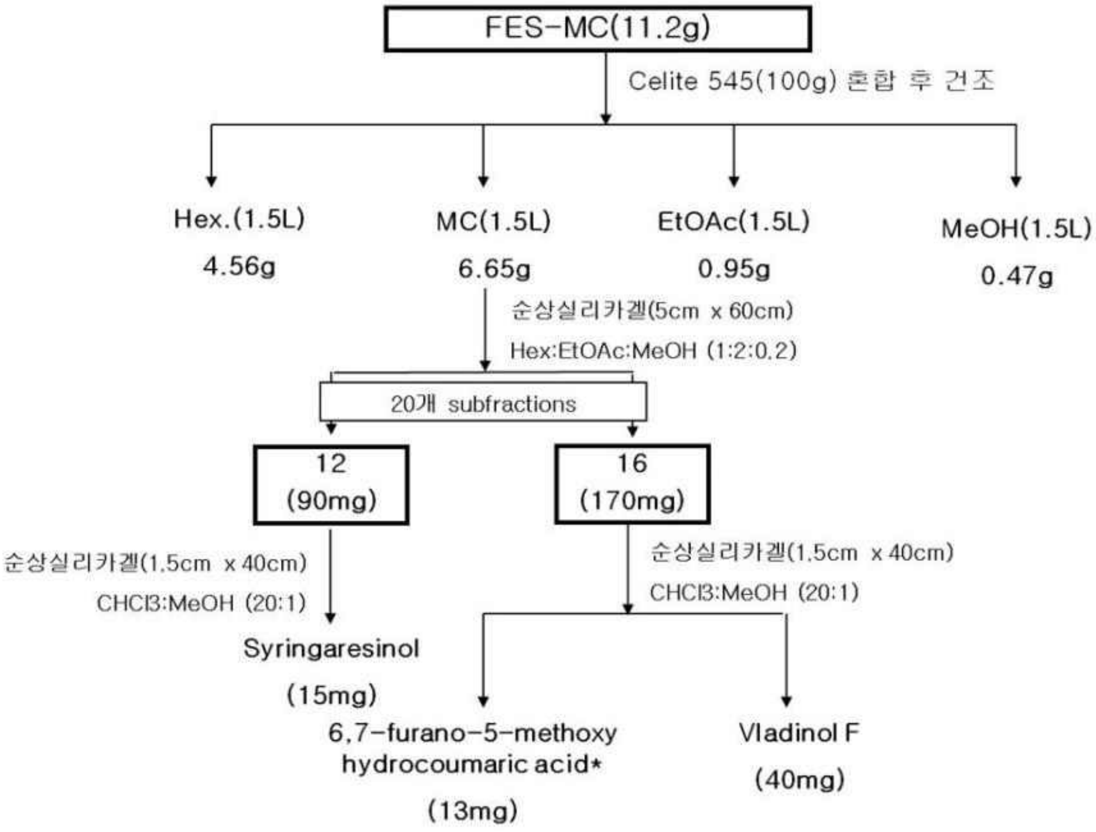
2) 좁은잎천선과나무 현장 실증재배 실험

제 3 절 연구수행 결과

1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 지표/유효물질 분리

가. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물(FES)의 유효물질 분리

1) 좁은잎천선과나무 잎 60% 주정추출물을 증류수에 현탁시킨 후 *n*-hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, BuOH로 용매 분획하였으며, CH_2Cl_2 (11.2 g) 분획물에 대하여 Celite column chromatography를 실시하여 *n*-hexane, CH_2Cl_2, EtOAc, MeOH으로 각각 극성별로 용매 분획물을 얻었다.
2) 이들 분획 중 활성이 확인된 CH_2Cl_2 분획을 순상 silica gel을 이용하여 총 20개의 소분획으로 나눴으며, 그 중 HPLC 분석결과 고함량 피크가 검출된 12, 16번 분획에 대해 다시 한 번 silicagel column chromatography 정제를 실시하여 단일화합물 1를 분리하였음
3) 또한 활성이 확인된 16번 분획에 대해 Revers phase column chromatography 기법을 이용하여 단일화합물 2, 3을 분리함. 분리된 단일화합물은 NMR 등의 분광학적 분석과 문헌조사를 통해 구조를 결정하였음(그림 5).

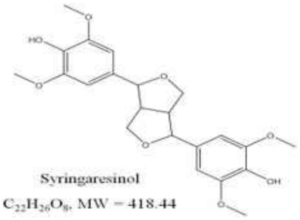


[그림 5] Isolation sheme of the isolated compounds from FES.

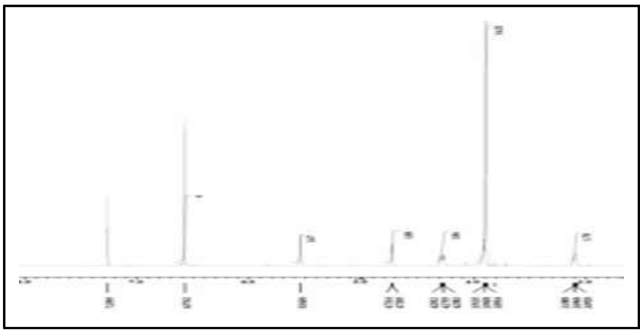
4) 유효물질 구조 규명

가) Compound 1: Syringaresinol (그림 6)

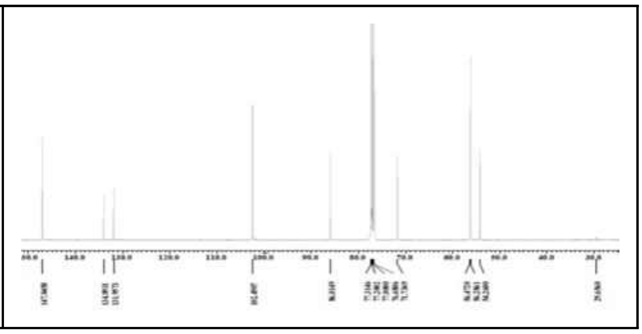
1H-NMR (CDCl3, 500 MHz) δH : 6.57 (4H, *s*, H-2,6,2′,6′), 5.53 (2H, br, OH-4,4′), 4.72 (2H, d, *J* = 5.15 Hz, H-7,7′), 4.27 (2H, m, H-9e,9′e), 3.90 (2H, m, H-9a,9′a), 3.89 (3H, s, MeO-4), 3.10 (2H, m, H-8,8′). 13C-NMR (CDCl3, 125 MHz) δC: 147.04 (C-3,5,3′,5′), 134.09 (C-4,4′), 131.95 (C-1,1′), 102.49(C-2,6,2′,6′), 86.01 (C-7,7′), 71.73 (C-9,9′), 56.47 (OMe), 54.26 (C-8,8′).



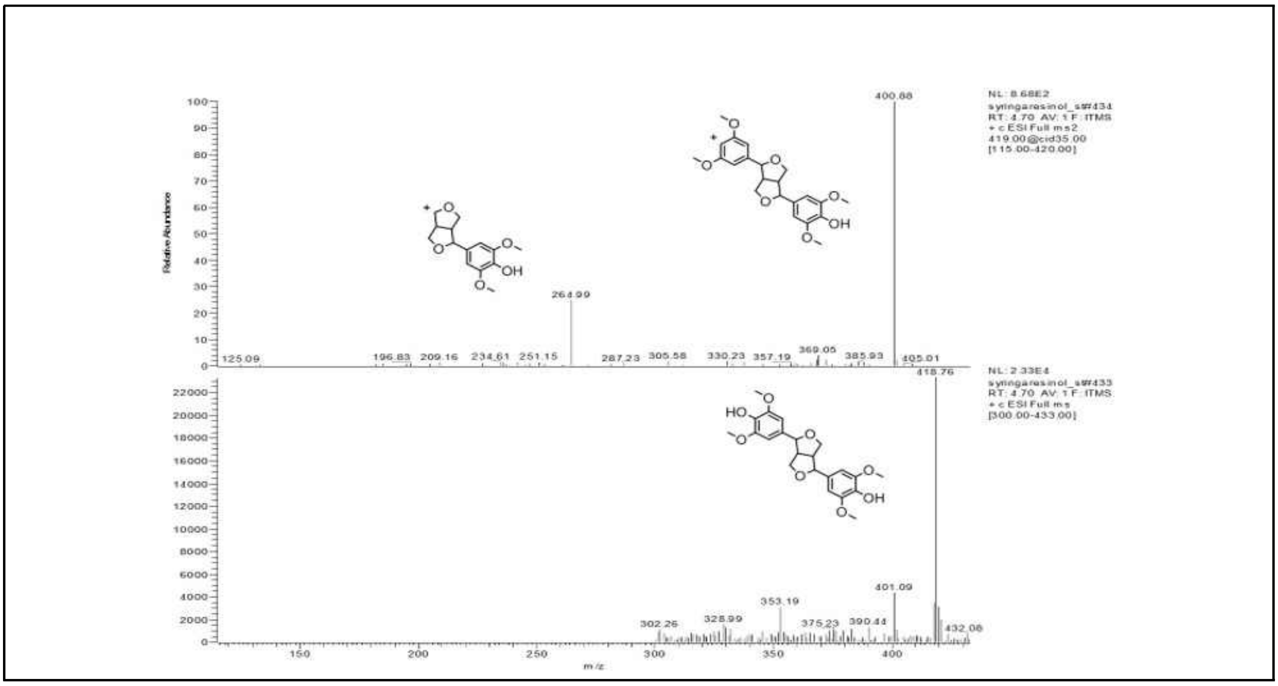
[그림 6] The chemical structure of syringaresinol.



1H NMR spectrum of syringaresinol



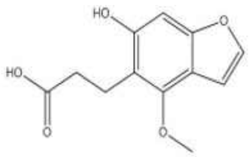
13C NMR spectrum of syringaresinol



LC-MS spectrum of syringaresinol

나) Compound 2: 6,7-Furano-5-methoxy Hydrocoumaric Acid (그림 7)

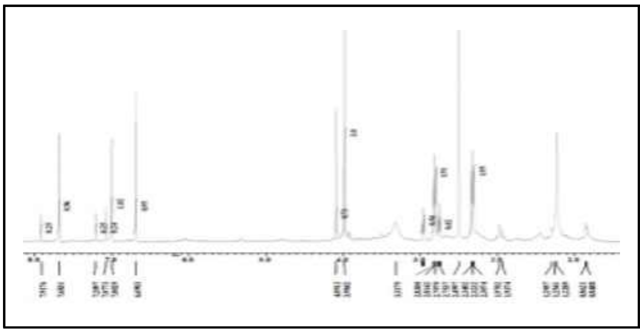
1H-NMR (DMSO, 500 MHz) δH : 7.69 (1H, s, H-9), 7.00 (1H, s, H-10), 6.69 (1H, s, H-8), 3.99 (3H, s, 5-OCH3), 2.83-2.80 (2H, m, H-4), 2.34-2.31 (2H, m, H-3) 13C-NMR (DMSO, 125 MHz) δC: 174.3 (C-2) 154.9 (C-7), 153.8 (C-8a), 151.1 (C-5), 142.5 (C-9), 112.9 (C-4a), 109.6 (C-6), 104.9 (C-10), 92.1 (C-8), 59.7(OMe), 33.9(C-3), 19.1(C-4)



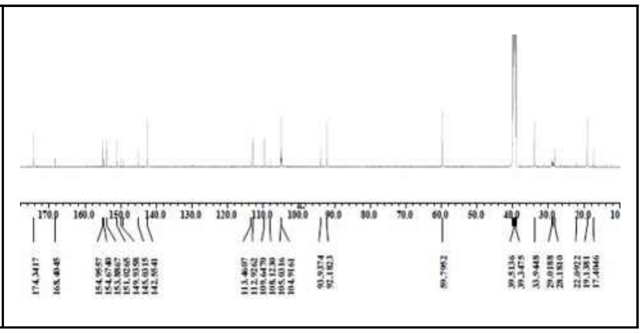
6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid

$C_{12}H_{12}O_5$, MW = 236.22

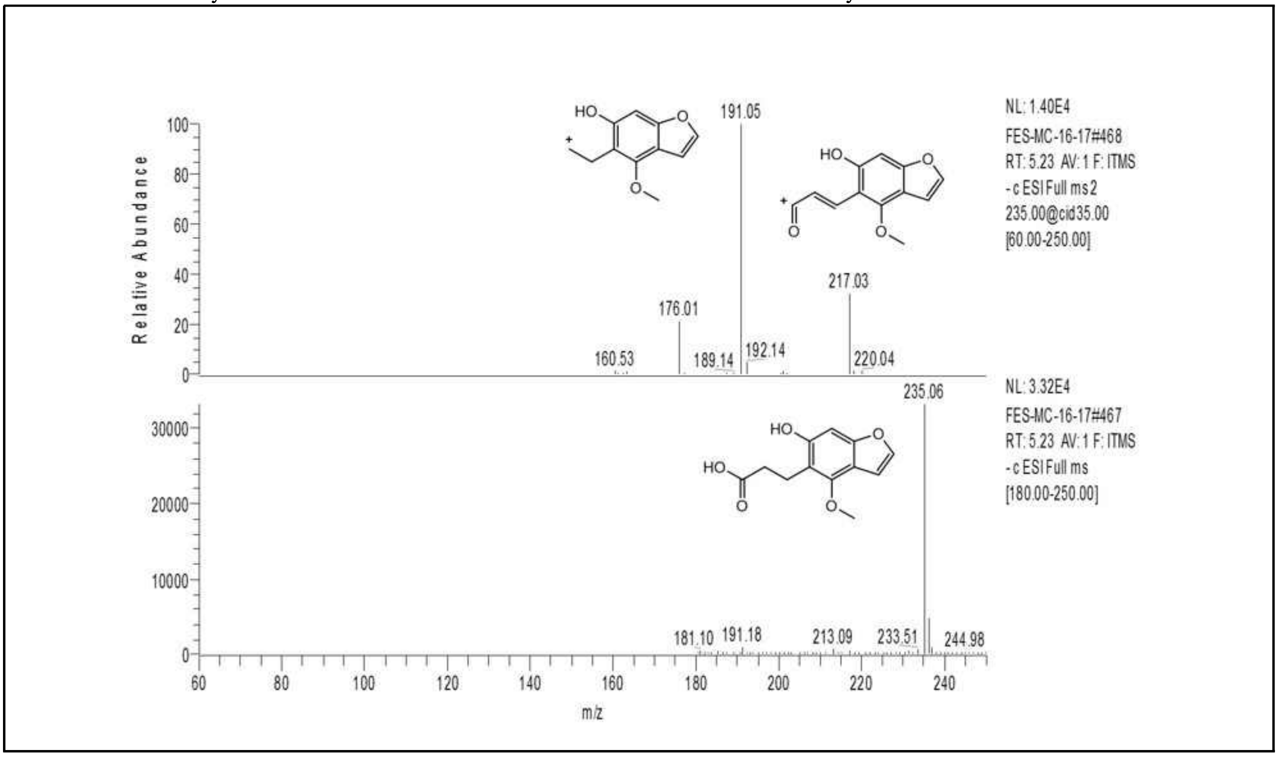
[그림 7] The chemical structure of 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid.



1H NMR spectrum of 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid



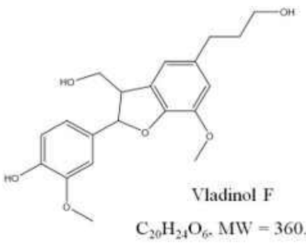
13C NMR spectrum of 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid



LC-MS spectrum of 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid

다) Compound 3: Vladinol F (그림 8)

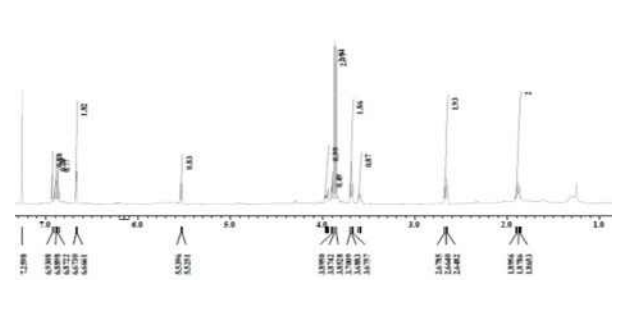
1H-NMR (CDCl3, 500 MHz) δH : 6.94 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-2), 6.89 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.5, H-6), 6.86 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.68 (1H, brs, H-2'), 6.67 (1H, brs, H-6'), 5.54 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-7), 3.94 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-9a), 3.90 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-9b), 3.88 (3H, s, 3-OMe), 3.86 (3H, s, 3'-OMe), 3.70 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-9'), 3.62 (1H, m, H-8), 2. 68 (2H, t, *J* = 7.5, H-7'), 1.85 (2H, tt, *J* = 8.0, 6.5 Hz, H-8'), 13C-NMR (CDCl3, 125 MHz) δC: 146.8 (C-3), 146.7(C-4'), 145.8(C-4), 144.4(C-3'), 135.6(C-1'), 133.3(C-1), 127.9(C-5'), 119.6(C-6), 116.1(C-2'), 114.5(C-5), 112.6(C-6'), 109.0(C-2), 87.0(C-7), 64.2(C-9), 62.5(C-9'), 56.2(3'-OMe), 56.2(3-OMe), 54.8(C-8), 34.7(C-8'), 32.2(C-7')

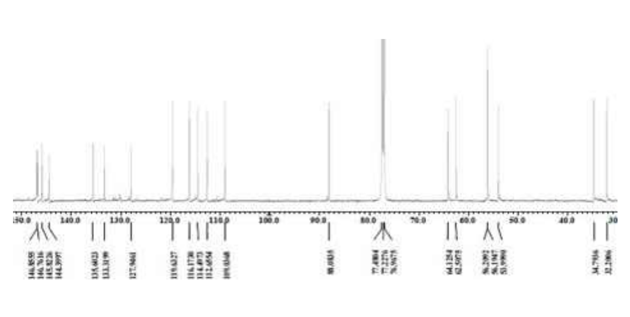


Vladinol F

$C_{20}H_{24}O_6$, MW = 360.40

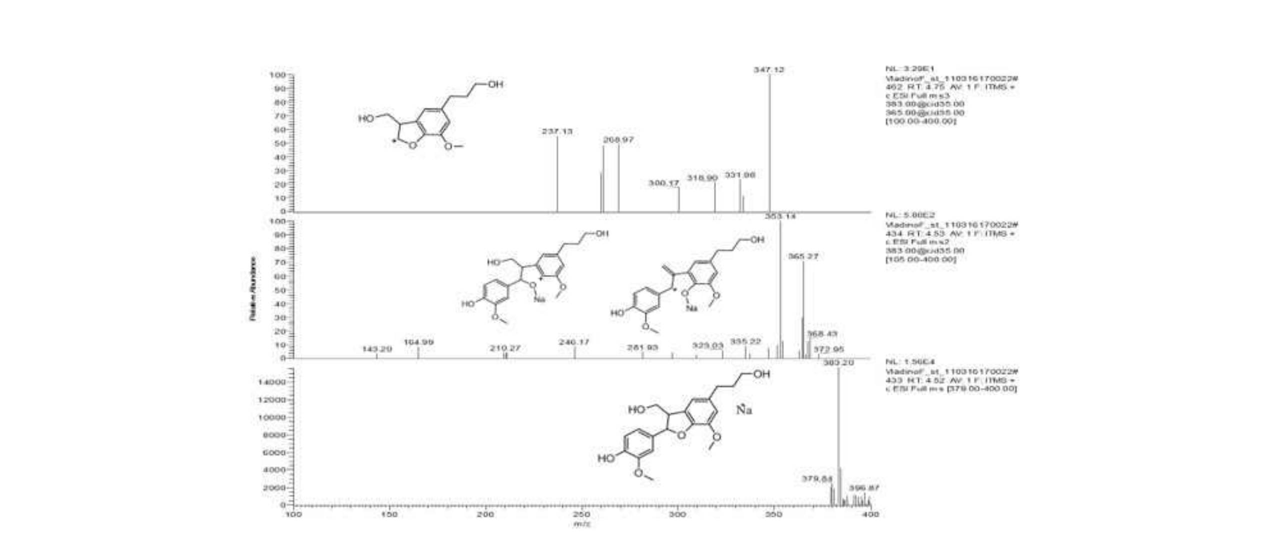
[그림 8] The chemical structure of vladinol F.





1H NMR spectrum of vladinol F

13C NMR spectrum of vladinol F



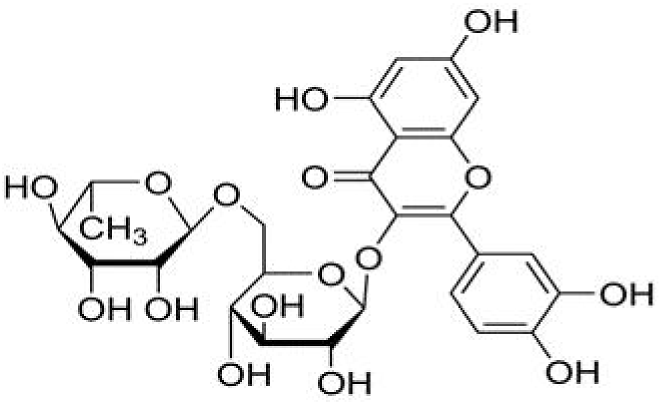
LC-MS spectrum of vladinol F

나. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물(FES)의 지표물질 분석

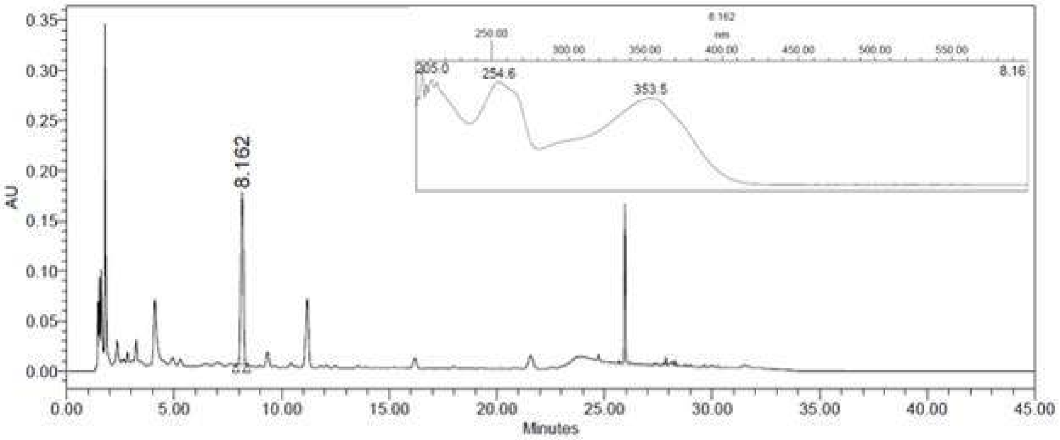
1) 지표물질-1: Rutin

가) HPLC 분석조건 (그림 9~12)

<table>
<tr><td>분석시료 제조</td><td colspan="3">- 좁은잎천선과를 70% 에탄올에 녹여 10000ppm으로 제조 후 30분 동안 초음파 추출을 실시하고 상온에서 방냉한 후 0.45㎛ 실린지필터로 여과
- Rutin 표준품(R5143, SIGMA)을 HPLC급 메탄올에 녹여 12.5, 25, 50, 100, 200ppm으로 희석 후 0.45㎛ 실린지필터로 여과</td></tr>
<tr><td>분석장비</td><td colspan="3">Waters(USA) Hihg performance liquid chromatography system e2695</td></tr>
<tr><td>검출기</td><td colspan="3">Waters(USA) Photodiode array detector 2998(235nm)</td></tr>
<tr><td>컬럼</td><td colspan="3">Cadenza CD-C18(150 x 4.6mm, 3㎛), 40℃</td></tr>
<tr><td>유속</td><td colspan="3">1ml/min</td></tr>
<tr><td rowspan="8">용매조건</td><td colspan="3">A: H_2O(in 0.5% Acetic acid)
B: ACN</td></tr>
<tr><td>Time(min)</td><td>A</td><td>B</td></tr>
<tr><td></td><td>85</td><td>15</td></tr>
<tr><td>20</td><td>75</td><td>25</td></tr>
<tr><td>25</td><td>25</td><td>75</td></tr>
<tr><td>30</td><td>25</td><td>75</td></tr>
<tr><td>31</td><td>85</td><td>15</td></tr>
<tr><td>45</td><td>85</td><td>15</td></tr>
</table>

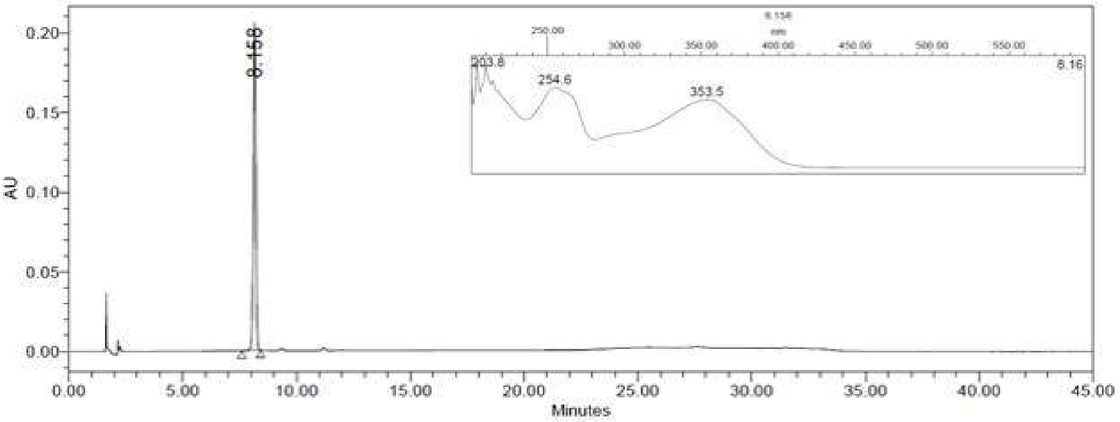


[그림 9] 지표성분 후보물질 Rutin

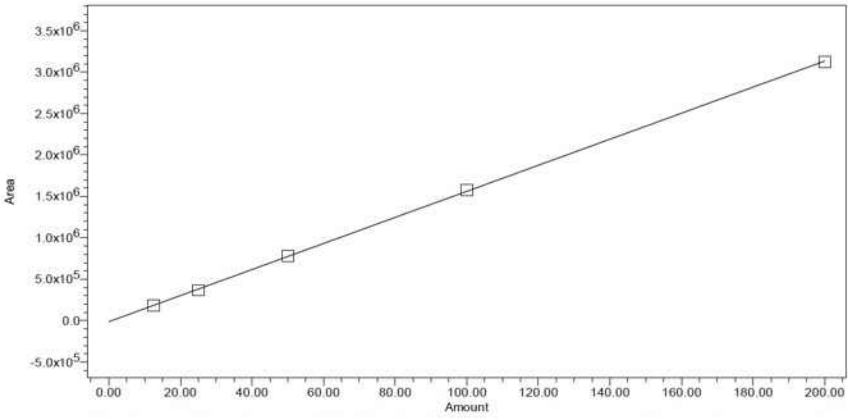


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Rutin	8.160	1444132	100.00	171781	92.567	ppm

[그림 10] 좁은잎천선과잎 추출물의 HPLC Chromatogram 및 PDA Spectrum.



[그림 11] Rutin 표준품의 HPLC Chromatogram 및 PDA Spectrum.



Peak Name: Rutin; RT: 8.165; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 1120; R: 0.999941; R^2: 0.999883; Weighting: None; Equation: Y = 1.57e+004 X - 1.23e+004; Normalized Intercept/Slope: -0.007381; RSD(E): 1.241720

[그림 12] Rutin 표준품의 HPLC 검량곡선.

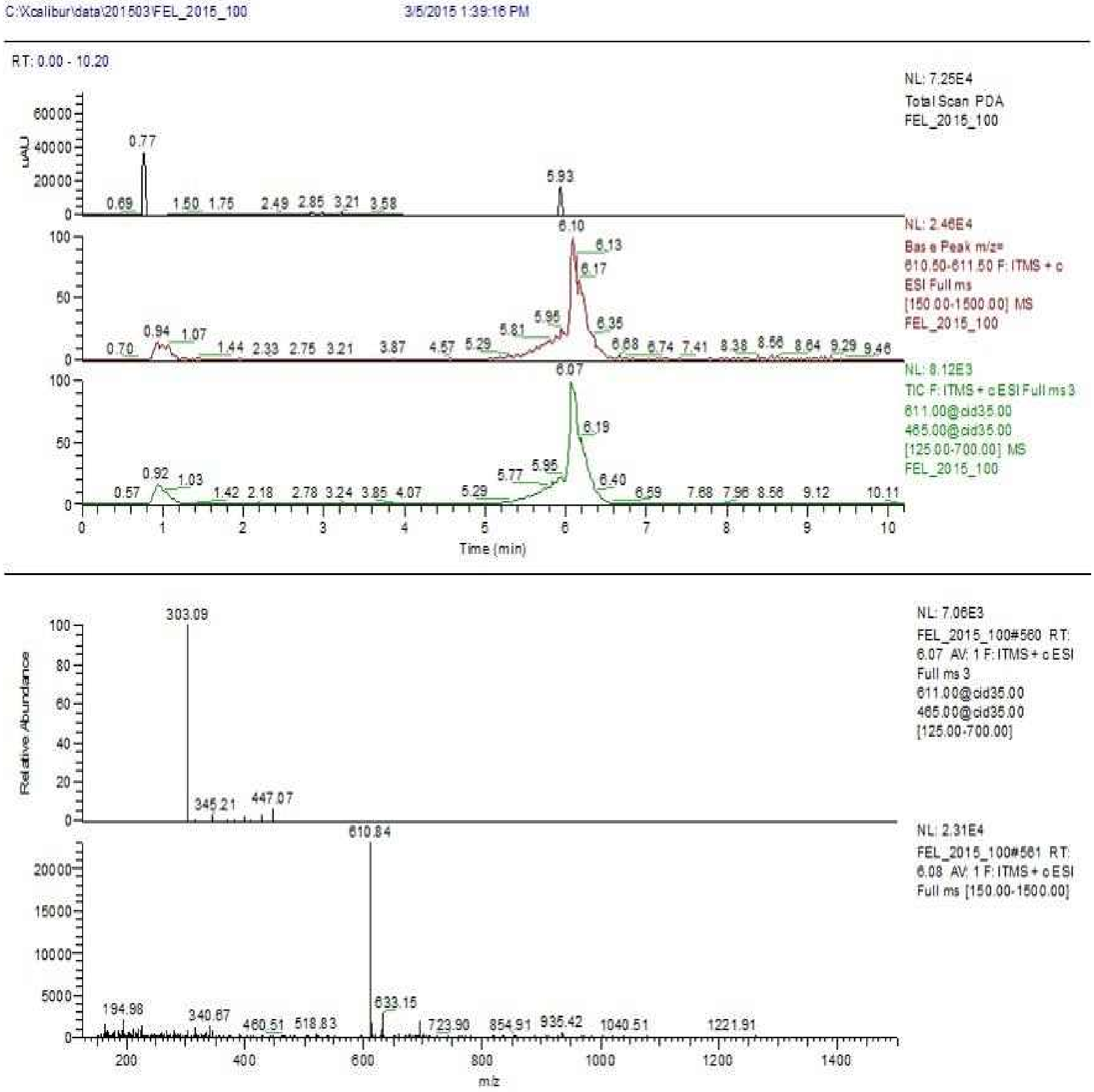
나) HPLC 분석 결과

항목	좁은잎천선과잎 추출물	Rutin
검출시간(min)	8.16	8.15
λ max(nm)	254.6, 353.5	254.6, 353.5
함량(mg/g)	9.2	-

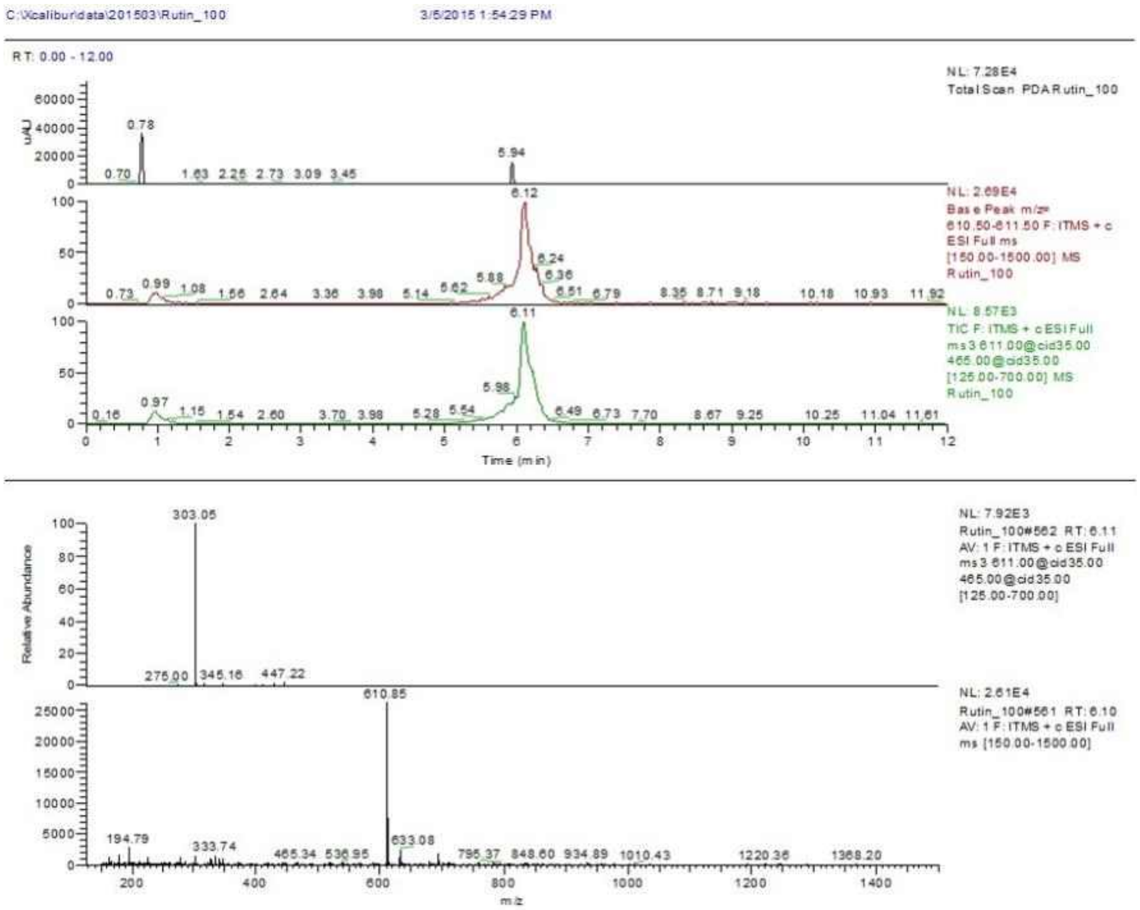
- HPLC를 이용한 분석결과 좁은잎천선과잎 추출물 중 가장 함량이 높을 것으로 예상되는 피크와 Rutin이 매우 유사한 것으로 분석되었으며 보다 정확한 결과를 얻기 위해 LC-MS분석을 실시하여 분자량 및 쪼개짐 패턴을 비교분석함.

다) LC-MS 분석 조건 (그림 13~14)

<table>
<tr><td>분석시료 제조</td><td colspan="3">- 좁은잎천선과를 70% 에탄올에 녹여 100ppm으로 제조 후 30분 동안 초음파 추출을 실시하고 상온에서 방냉한 후 0.45㎛ 실린지필터로 여과
- Rutin 표준품(R5143, SIGMA)을 HPLC급 메탄올에 녹여 10ppm으로 희석 후 0.45㎛ 실린지필터로 여과</td></tr>
<tr><td>분석장비</td><td colspan="3">Thermo Scientific LCQ-Fleet</td></tr>
<tr><td>컬럼</td><td colspan="3">Hypersil GOLD (50 x 2.1mm, 1.9㎛), 25℃</td></tr>
<tr><td>유속</td><td colspan="3">200㎕/min</td></tr>
<tr><td rowspan="9">용매조건</td><td colspan="3">A: H_2O(in 0.1% Formic acid)
B: MeOH</td></tr>
<tr><td>Time(min)</td><td>A</td><td>B</td></tr>
<tr><td></td><td>95</td><td>5</td></tr>
<tr><td>1</td><td>95</td><td>5</td></tr>
<tr><td>3</td><td>80</td><td>20</td></tr>
<tr><td>6</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>7</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>8</td><td>95</td><td>5</td></tr>
<tr><td>12</td><td>95</td><td>5</td></tr>
</table>



[그림 13] 좁은잎천선과잎 추출물의 LC-MS Chromatogram 및 Spectrum.



[그림 14] Rutin 표준품의 LC-MS Chromatogram 및 Spectrum.

라) LC-MS 분석 결과

항목	좁은잎천선과잎 추출물	Rutin
검출시간(min)	6.12	6.10
분자량(m/z)	610.84	610.85
Daughter ion(m/z)	303.09	303.05

- 좁은잎천선과나무 잎 추출물 중 Rutin을 지표성분 후보물질로 선정하였으며 함량분석 및 원료표준화에 활용될 HPLC 분석법을 개발하였음.

1) 지표물질-2: Nicotiflorin

가) 지표성분 재선정 및 함량분석

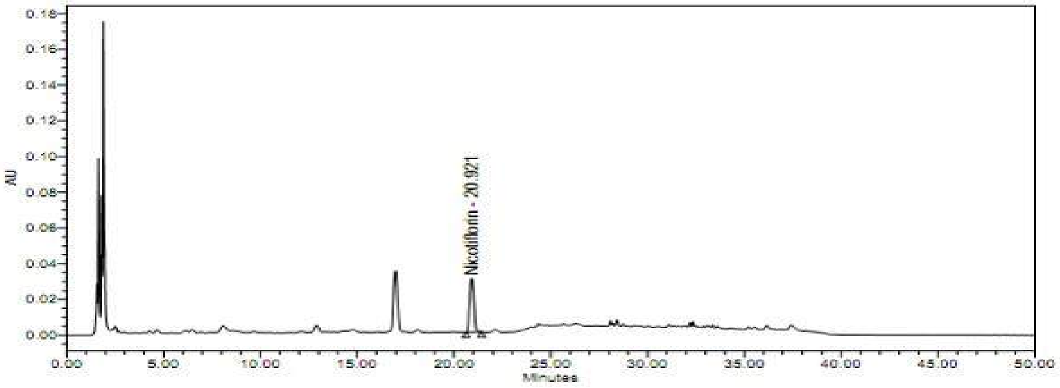
(1) 1차년도에 실험을 통해 구조가 확인된 지표성분 후보물질 Rutin은 대부분의 식물에 함유되어 있고 식품의약품안전처에서는 특이 성분을 지표성분으로 선정하길 권장하기 때문에 Rutin 다음으로 함량이 높은 성분을 탐색함.

(2) 좁은잎추출물 관련 문헌을 조사하여 후보물질을 선정한 후 추출물과 표준물질의 HPLC 동시 분석을 통해 Rutin다음으로 함량이 높은 피크의 성분을 확인함.

(3) 위 시험을 통해 구조가 확인된 지표성분 후보물질 Nicotiflorin의 추출물 중 함량분석을 실시하여 2.9mg/g 포함되어 있음을 확인함.

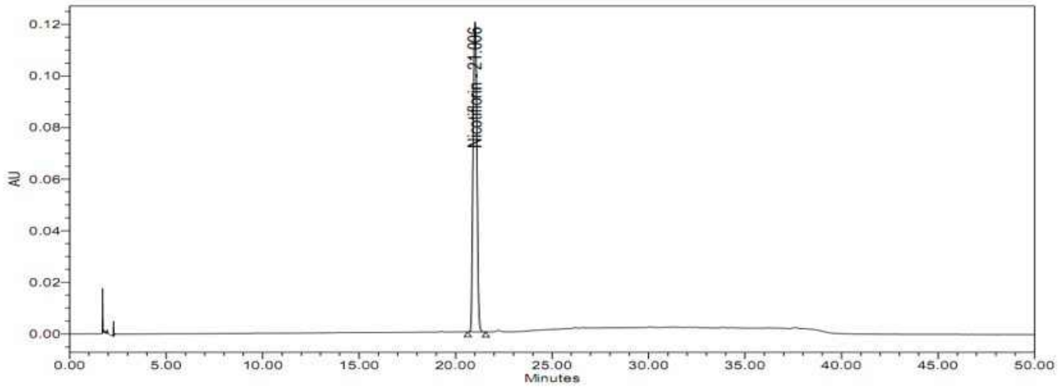
나) HPLC 분석 조건 (그림 15~19)

<table>
<tr><td>분석시료 제조</td><td colspan="3">- 좁은잎천선과나무 잎 추출물을 70% 에탄올에 녹여 10000ppm으로 희석 후 30분 동안 초음파 추출을 실시하고 상온에서 방냉한 후 0.45㎛ 실린지필터로 여과
- Nicotiflorin 표준품(Extrasynthese, NO.1053)을 HPLC급 메탄올에 소량 녹인 후 각각 메탄올 200, 100, 50, 25, 12.5ppm으로 희석하고 0.45um 실린지 필터로 여과하여 분석실시</td></tr>
<tr><td>분석장비</td><td colspan="3">Waters Alliance HPLC system</td></tr>
<tr><td>검출기</td><td colspan="3">PDA(264nm)</td></tr>
<tr><td>컬럼</td><td colspan="3">Cadenza CD-C18 3um, 4.6 x 150mm(40℃)</td></tr>
<tr><td>유속</td><td colspan="3">1ml/min</td></tr>
<tr><td rowspan="8">용매조건</td><td colspan="3">A: H_2O(in 0.5% Acetic acid)
B: ACN</td></tr>
<tr><td>Time(min)</td><td>A(%)</td><td>B(%)</td></tr>
<tr><td></td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr>
<tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>36</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>50</td><td>90</td><td>10</td></tr>
</table>



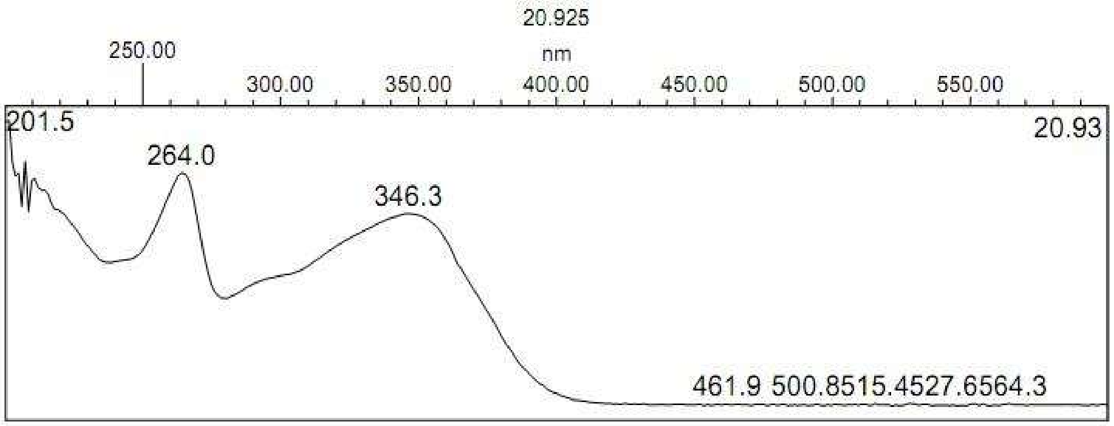
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Nicotiflorin	20.921	454100	100.00	30037	29.167	ppm

[그림 15] 좁은잎천선과나무 잎 추출물의 HPLC chromatogram.

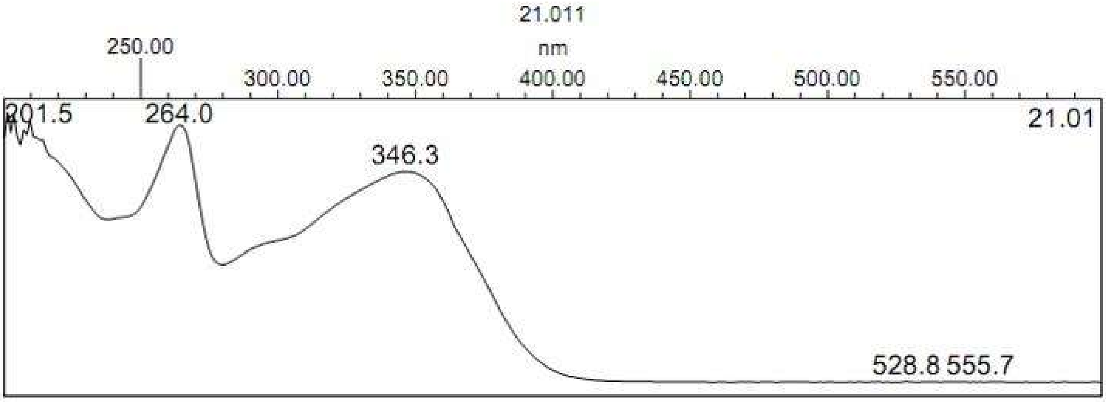


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Nicotiflorin	21.006	1646535	100.00	120145	100.000	ppm

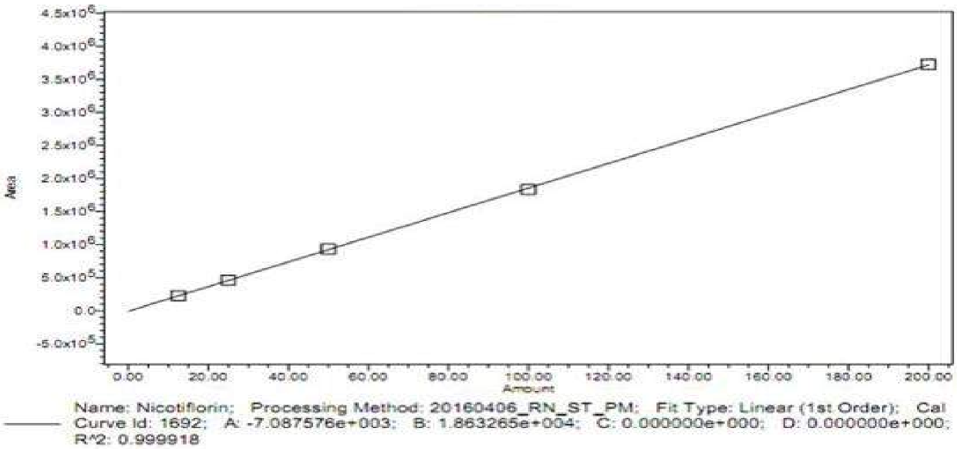
[그림 16] Nicotiflorin 표준품 HPLC chromatogram.



[그림 17] 좁은잎천선과나무 잎 추출물 중 PDA spectrum



[그림 18] Nicotiflorin 표준품 PDA spectrum.



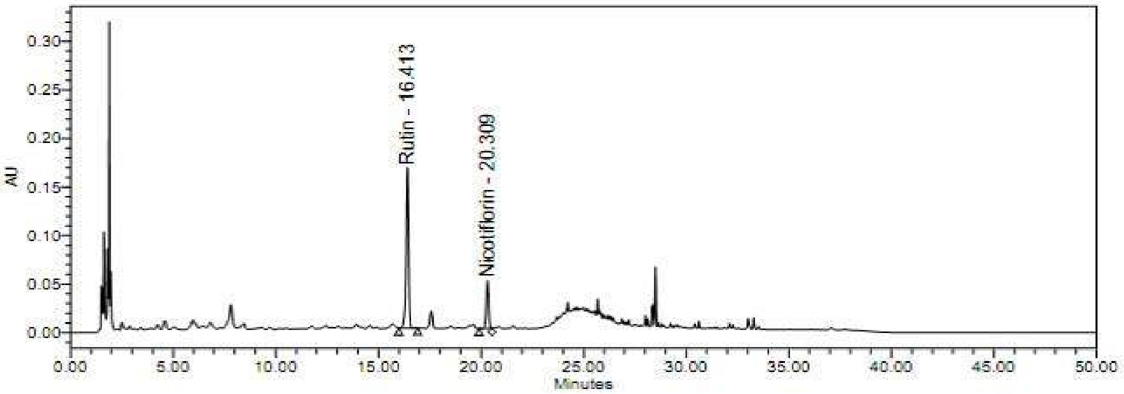
[그림 19] Nicotiflorin 표준품의 HPLC 검량곡선.

다) HPLC 분석 결과

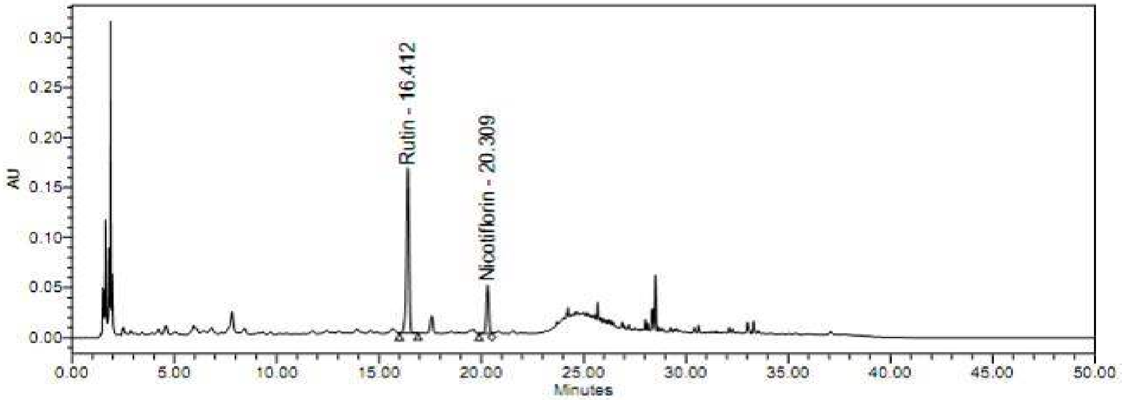
항목	좁은잎천선과잎 추출물	Nicotiflorin
검출시간(min)	20.92	21.00
λ max(nm)	264.0, 346.3	264.0, 346.3
함량(mg/g)	2.9mg/g	-

- HPLC를 이용한 분석결과 좁은잎천선과잎 추출물 중 Rutin 다음으로 함량이 높을 것으로 예상되는 피크와 Nicotiflorin이 매우 유사한 것으로 분석됨.

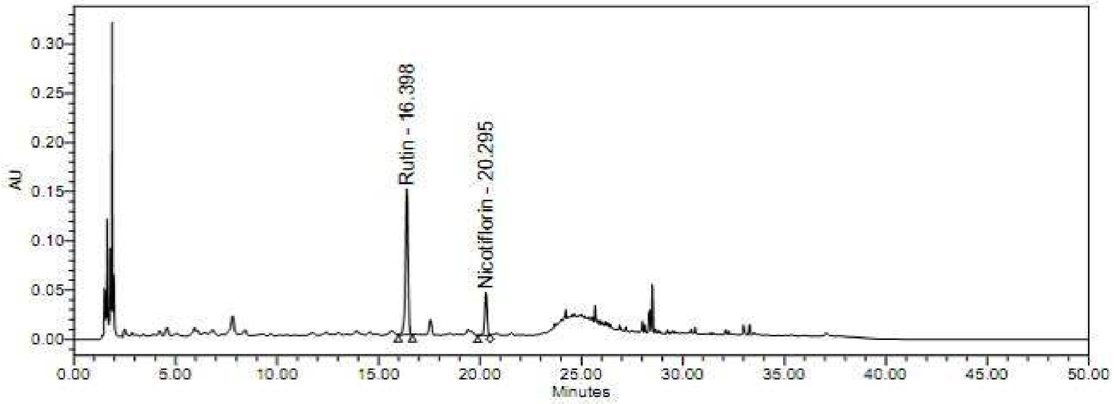
- 원료표준화를 진행하기 위하여 좁은잎천선과나무 잎을 3LOT 주정 추출하여 지표성분 후보물질인 Nicotiflorin의 함량 비교 분석(그림 20~22).



[그림 20] LOT1 HPLC 분석 chromatogram (Nicotiflorin:0.22%)



[그림 21] LOT2 HPLC 분석 Chromatogram (Nicotiflorin:0.22%)



[그림 22] LOT3 HPLC 분석 Chromatogram (Nicotiflorin:0.19%)

2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 유효성 평가

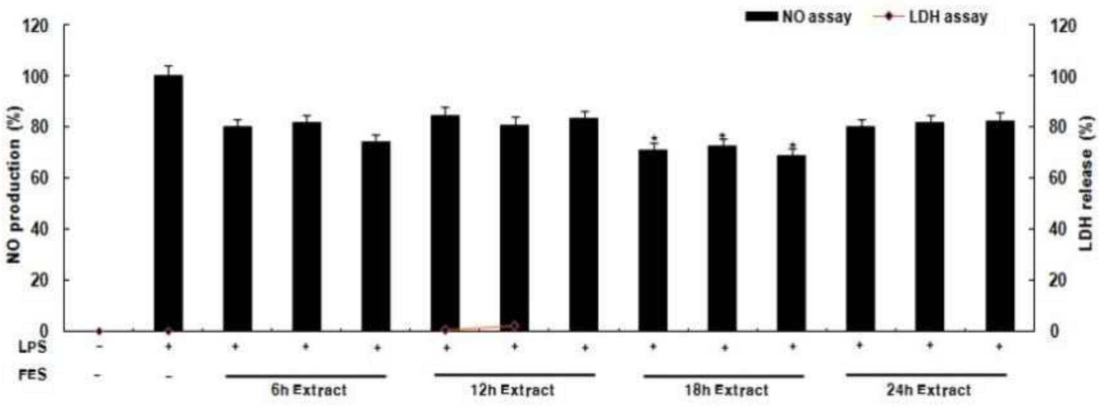
가. 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 관절염 유발 인자 억제 효능 평가

1) 원료표준화를 위한 효능 평가 결과

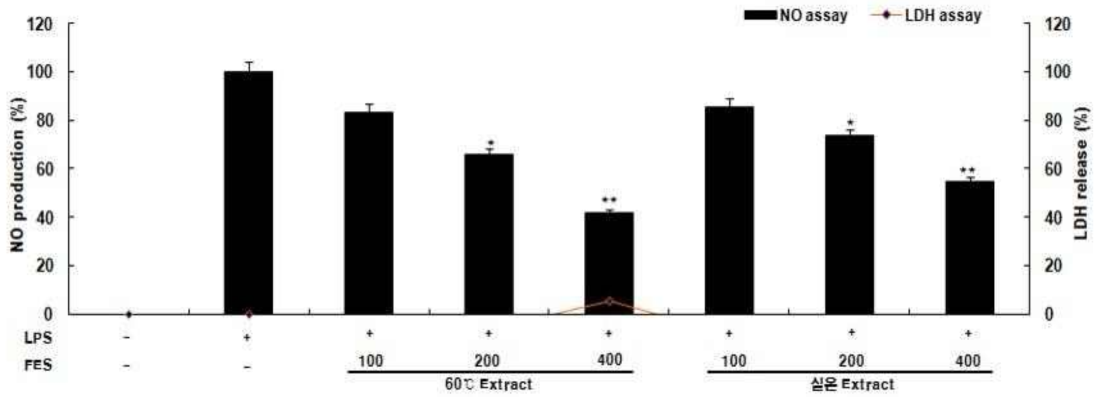
가) 좁은잎천선과 나무 시간별 주정추출물을 200ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를그림 23에 나타내었고 60% 주정추출물을 실온과 60℃에서 100, 200, 400 ug/mL 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 24에 나타내었다.

나) 그림 23~24를 참조하여 보면, 좁은잎천선과나무 잎의 18시간 추출하였을 때 효능이 좋은 것으로 나타났고 온도를 비교했을 때는 60℃ 추출물이 약간의 활성을 더 나타내기는 하지만 미비한 독성이 나타남과 동시에 Nicotiflolin의 함량이 줄어들어 실온 추출물로 실험을 진행하였다.

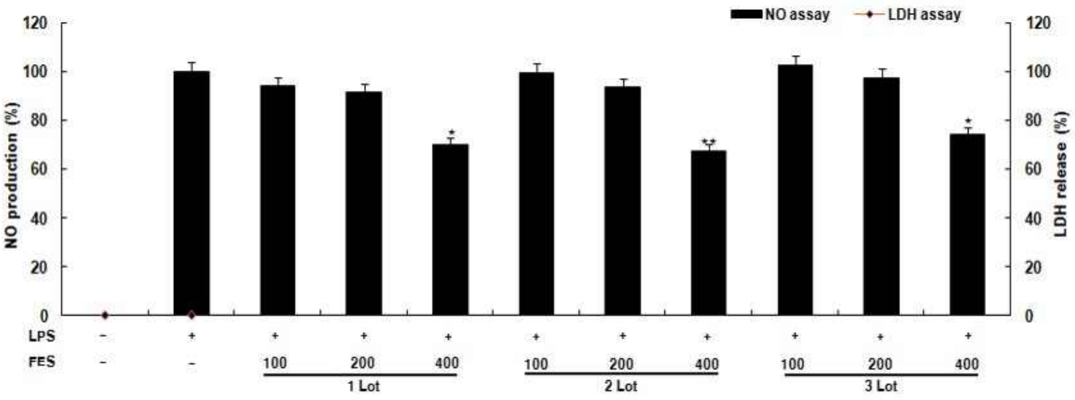
다) 그림 25에서는 좁은잎천선과나무 잎 주정 추출물을 추출조건(60%주정, 실온, 18h)에 따라 3반복 추출한 추출물을 각각 100, 200, 400 ug/mL 농도로 처리하였을 때 일정한 NO 생성 억제 활성을 나타내는 것으로 보여주는 결과이다.



[그림 23] RAW 264.7 세포에서 좁은잎천선과나무 잎을 60% 주정으로 시간별 추출한 추출물을 200 ug/mL의 농도로 처리하였을 때 억제 효과.



[그림 24] RAW 264.7 세포에서 좁은잎천선과나무 잎을 60% 주정으로 온도별 추출한 추출물을 100, 200, 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때 억제 효과.



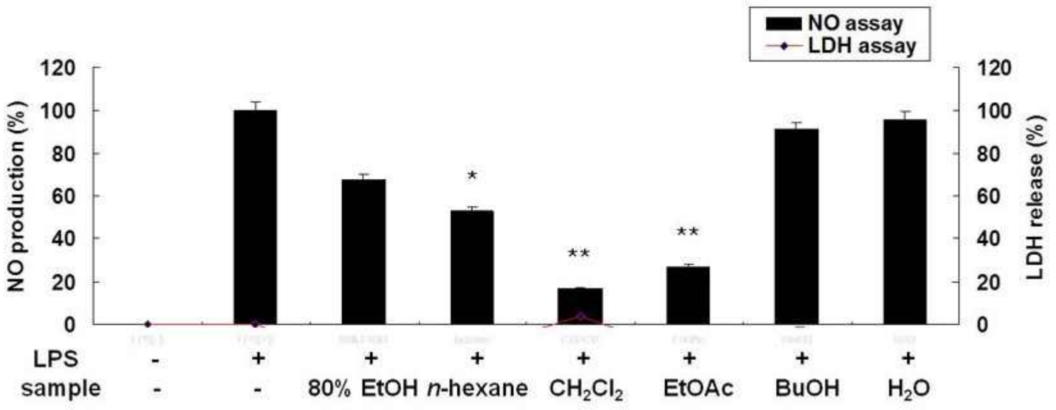
[그림 25] RAW 264.7 세포에서 좁은잎천선과나무 잎을 60% 주정으로 3Lot 추출한 추출물을 100, 200, 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때 억제 효과.

2) 세포독성 평가 (LDH assay) 결과

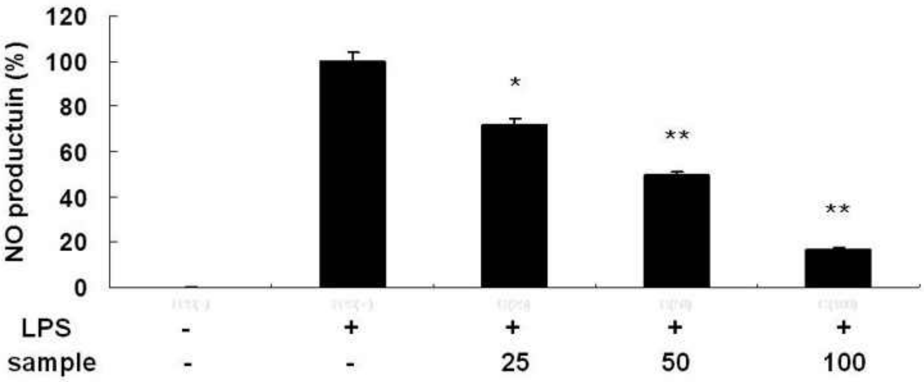
가) 좁은잎천선과 나무 시간별 주정추출물을 200ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 23에 나타내었고, 60% 주정추출물을 실온과 60℃에서 100, 200, 400 ug/mL 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 24에 나타내었다.

나) 그림 25에서는 3Lot에 걸쳐 추출한 추출물에 대한 독성을 나타내는데 모두 특별한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

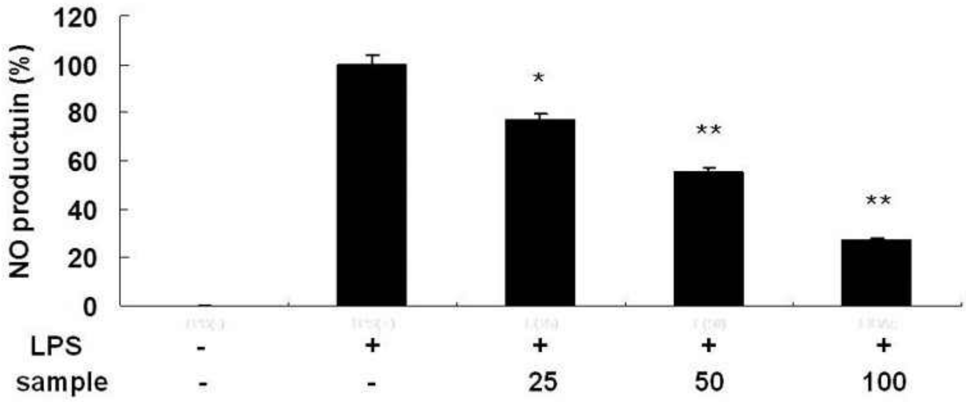
다) 추출물과 분획물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 26에 나타내었고, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물을 25, 50 및 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 27~28에 나타내었다. (Figure 1)과 (Figure 1-1 ~ 2)를 참조하여 보면, 추출물과 분획물 모두 100 ug/mL 이하의 농도에서는 특별한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.



[그림 26] The effects 80% EtOH and solvent fractions of FES on cell viability and nitric oxide production in RAW 264.7 cells.



[그림 27] Inhibitory effect of CH_2Cl_2 fraction of FES on nitric oxide production in RAW 264.7 cells.



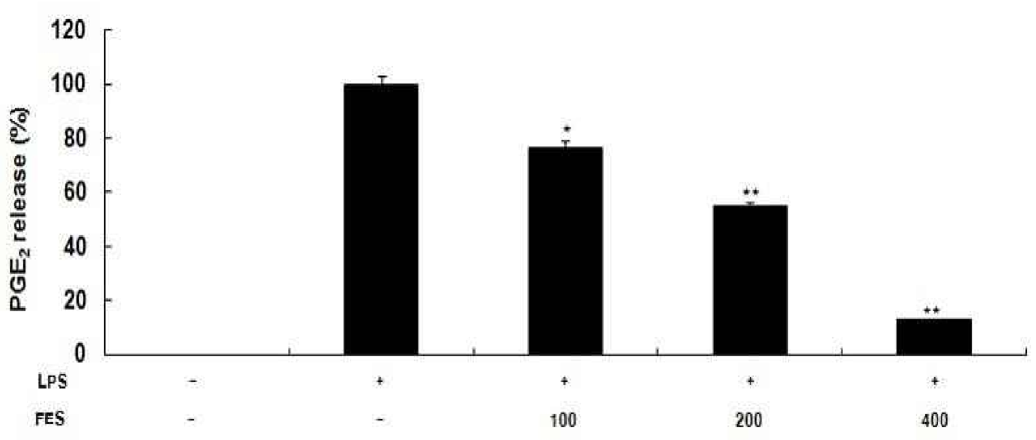
[그림 28] Inhibitory effect of EtOAc fraction of FES on nitric oxide production in RAW 264.7 cells.

3) Prostaglandin E_2 (PGE_2) 생성 억제 효능 평가 결과

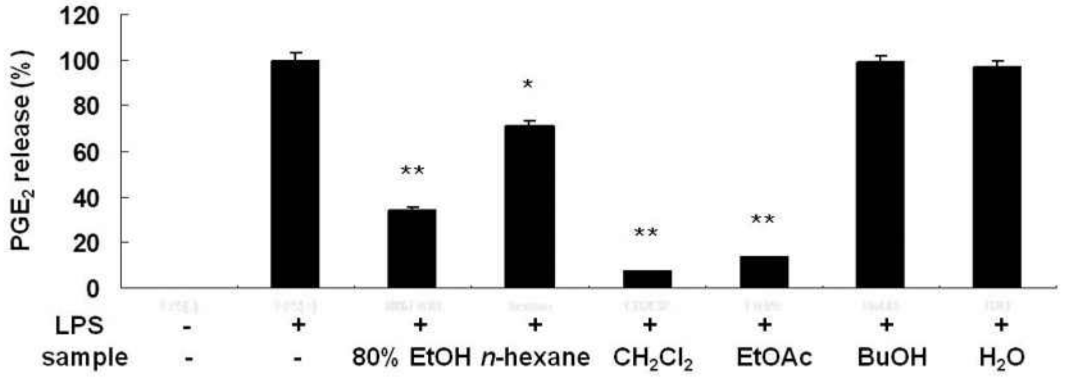
가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 100, 200 및 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 29에 나타내었다.

나) 그림 29를 참조하여 보면, 상기 NO 생성 억제 결과 보다 억제 활성이 높은 것으로 나타났으며 농도 의존적으로 PGE_2생성 억제 활성을 보임을 알 수 있다.

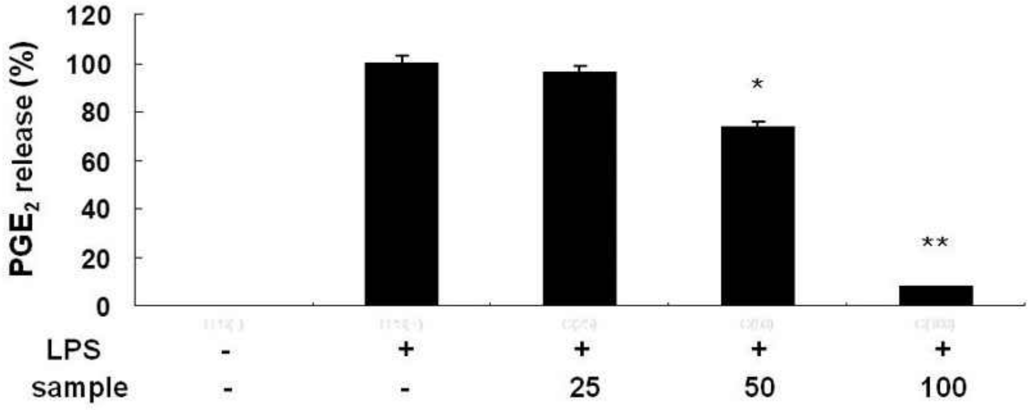
다) 추출물과 분획물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 30에, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물을 25, 50 및 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 31~32에 나타내었다. 그림 26과 그림 31~32를 참조하여 보면, 상기 NO 생성 억제 결과와 유사하게 CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물의 PGE_2생성 억제 활성이 높음을 알 수 있고, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물의 경우 농도 의존적으로 PGE_2생성 억제 활성을 보임을 알 수 있다.



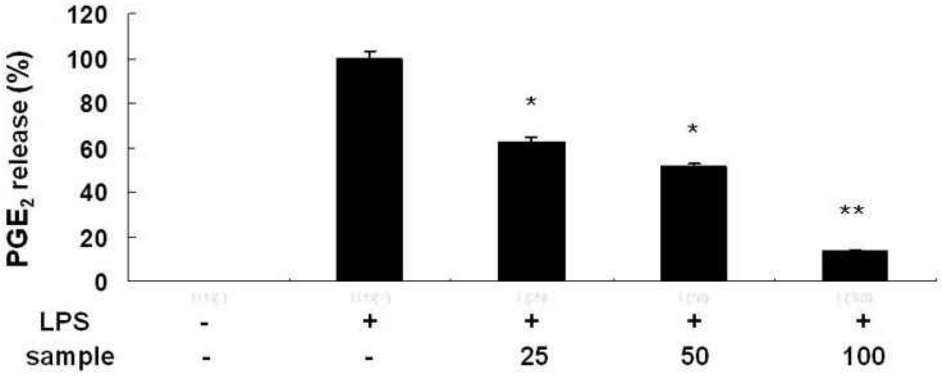
[그림 29] Inhibitory effect of 60% EtOH extract of FES on PGE_2 production in RAW 264.7 cells.



[그림 30] Inhibitory effects of the 80% EtOH extract and solvent fractions of FES on PGE_2 production in RAW 264.7 cells.



[그림 31] Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fraction of FES on PGE_2 production in RAW 264.7 cells.

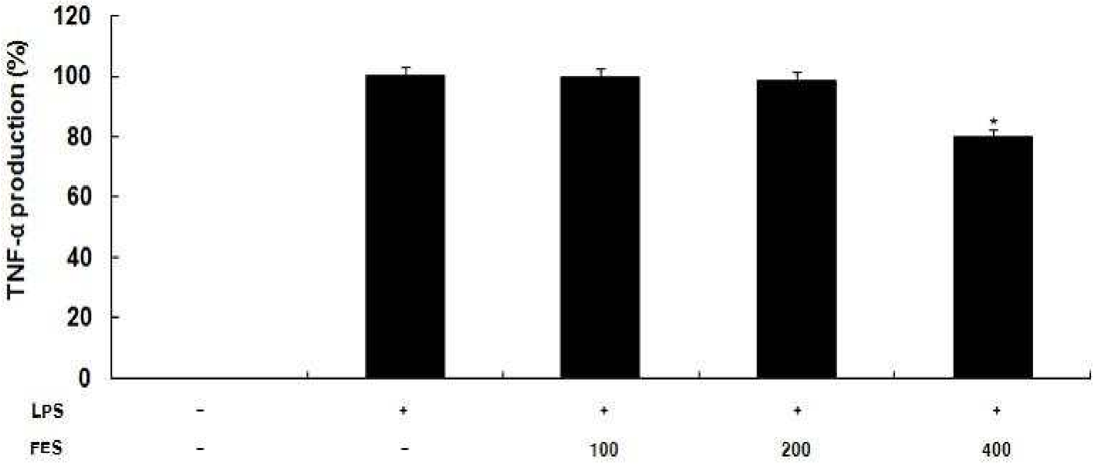


[그림 32] Inhibitory effects of EtOAc fraction of FES on PGE_2 production in RAW 264.7 cells.

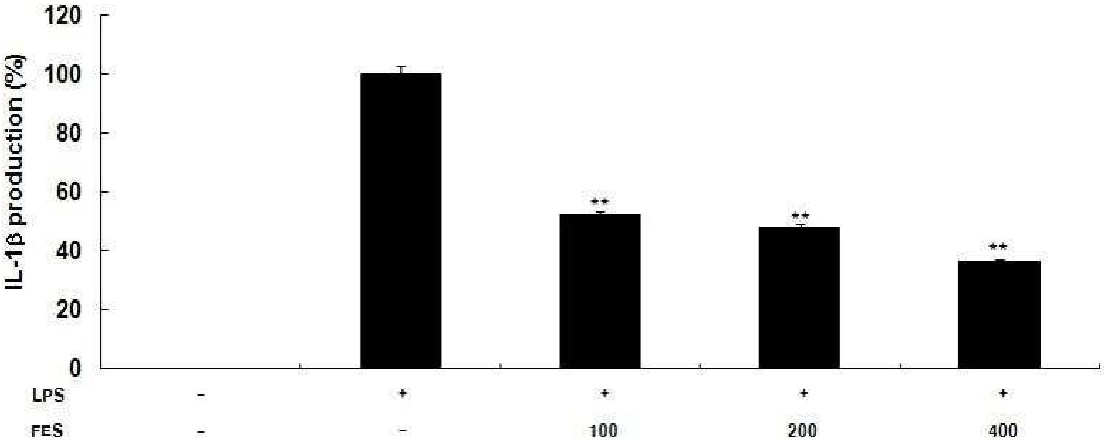
4) 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β and IL-6) 생성 억제 효능 평가 결과

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 100, 200 및 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 34~36에 나타내었다. 그림 34~36을 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 높은 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있으며, 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있다.

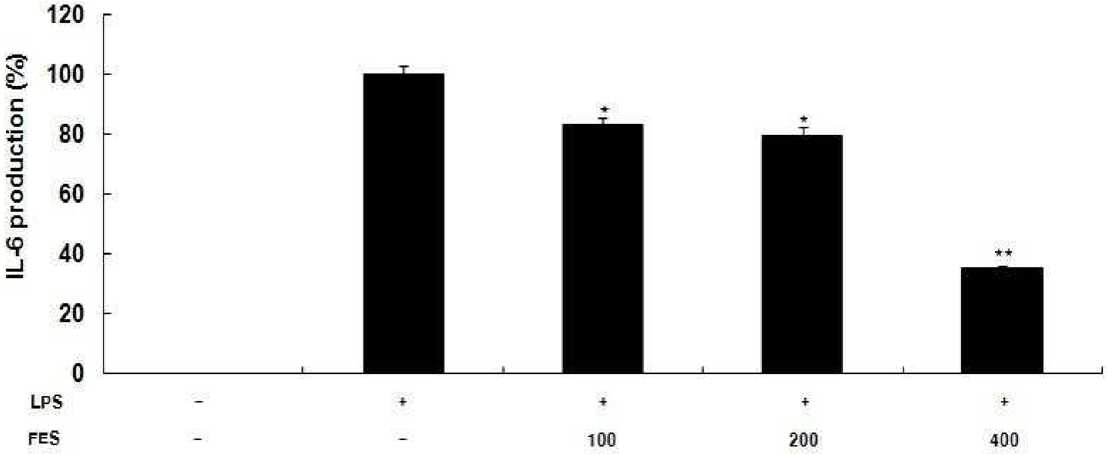
나) 추출물과 분획물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 도출하였고, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물을 25, 50 및 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 효능 평가 결과도 얻었다. 하단의 그리에서 참조하여 보면, 상기의 실험 결과들과 유사하게 CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물이 높은 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물은 농도 의존적으로 염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 보이고 있음을 확인할 수 있다(그림 34~45).



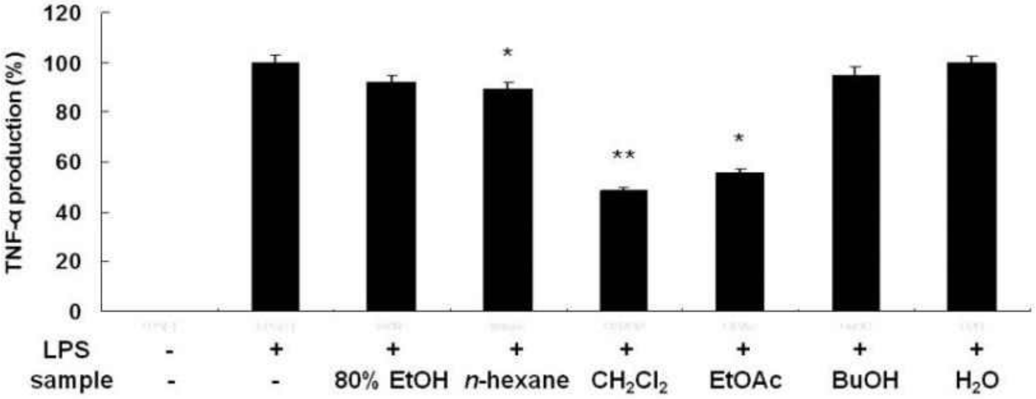
[그림 34] Inhibitory effect of 60% EtOH extract of FES on TNF-α production in RAW 264.7 cells.



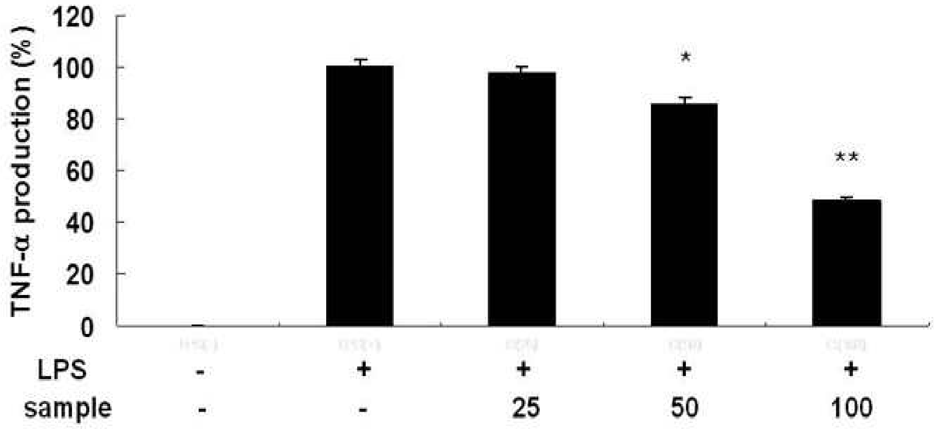
[그림 35] Inhibitory effect of 60% EtOH extract of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.



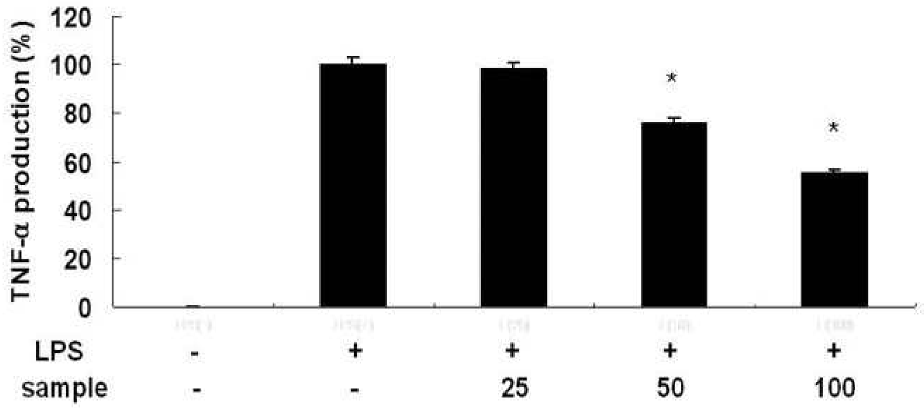
[그림 36] Inhibitory effect of 60% EtOH extract of FES on IL-6 production in RAW 264.7 cells.



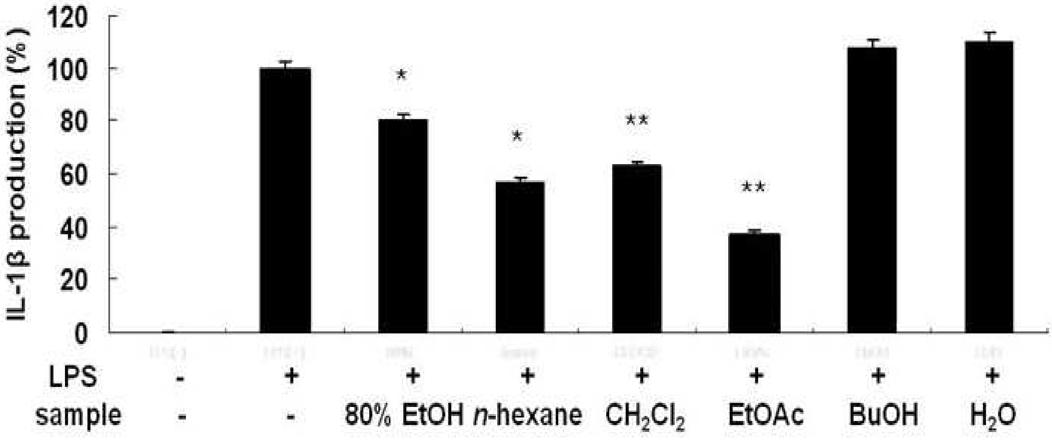
[그림 37] Inhibitory effects of the 80% EtOH extract and solvent fractions of FES on TNF-α production in RAW 264.7 cells.



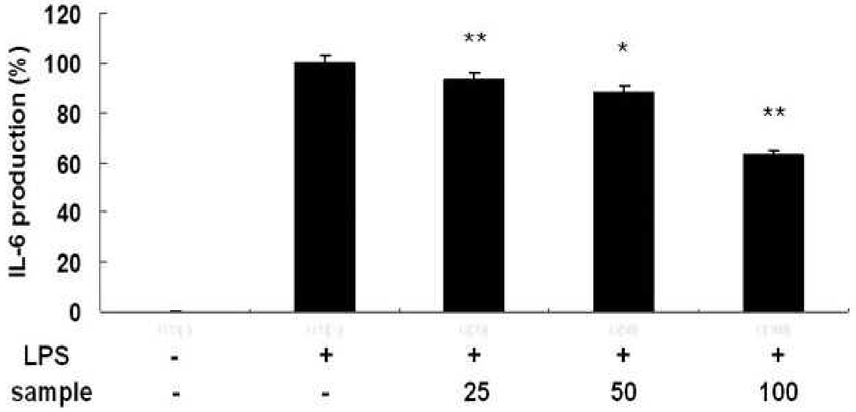
[그림 38] Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fraction of FES on TNF-α production in RAW 264.7 cells.



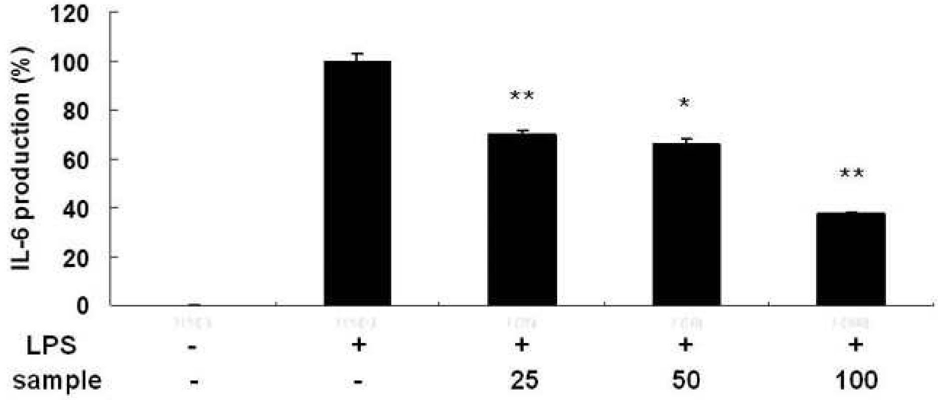
[그림 39] Inhibitory effects of EtOAc fraction of FES on TNF-α production in RAW 264.7 cells.



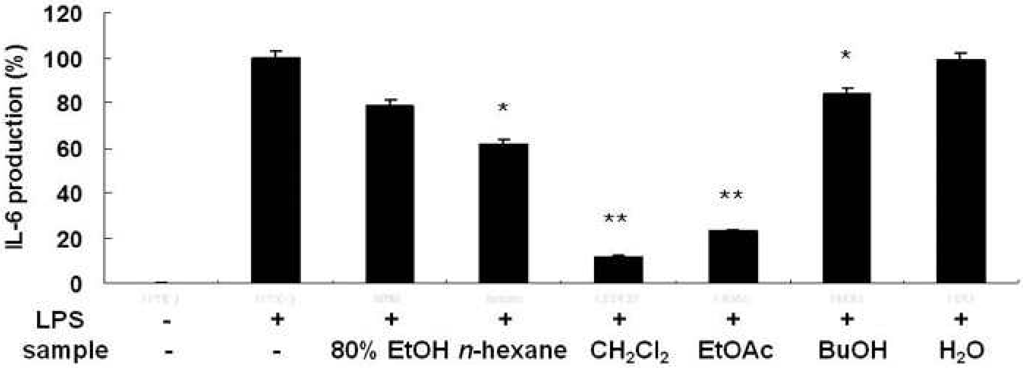
[그림 40] Inhibitory effects of the 80% EtOH extract and solvent fractions of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.



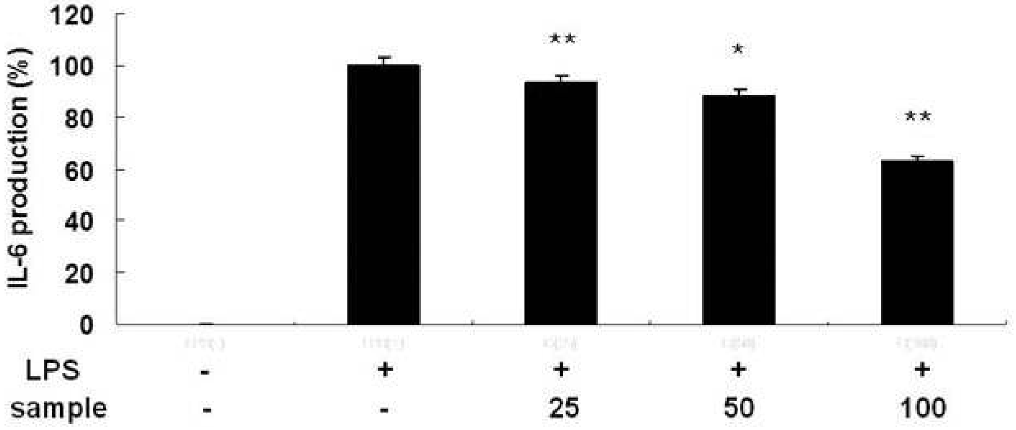
[그림 41] Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fractions of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.



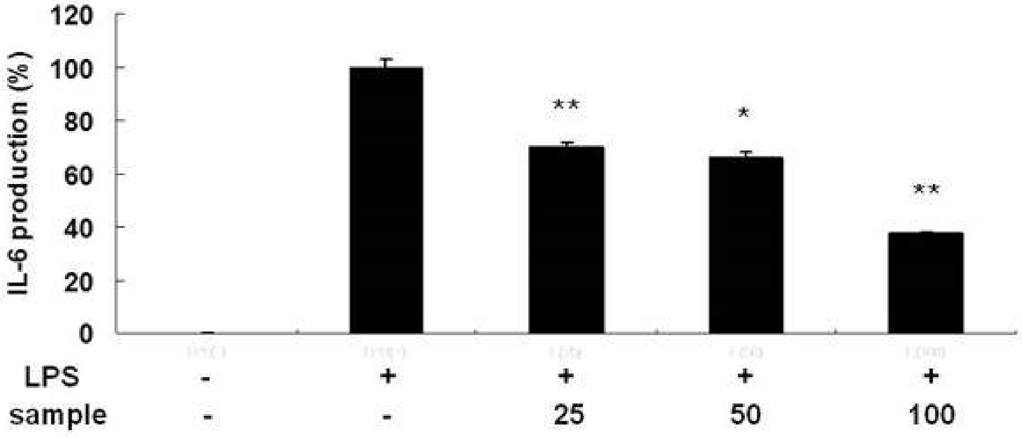
[그림 42] Inhibitory effects of EtOAc fractions of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.



[그림 43] Inhibitory effects of the 80% EtOH extract and solvent fractions of FES on IL-6 production in RAW 264.7 cells.



[그림 44] Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fractions of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.

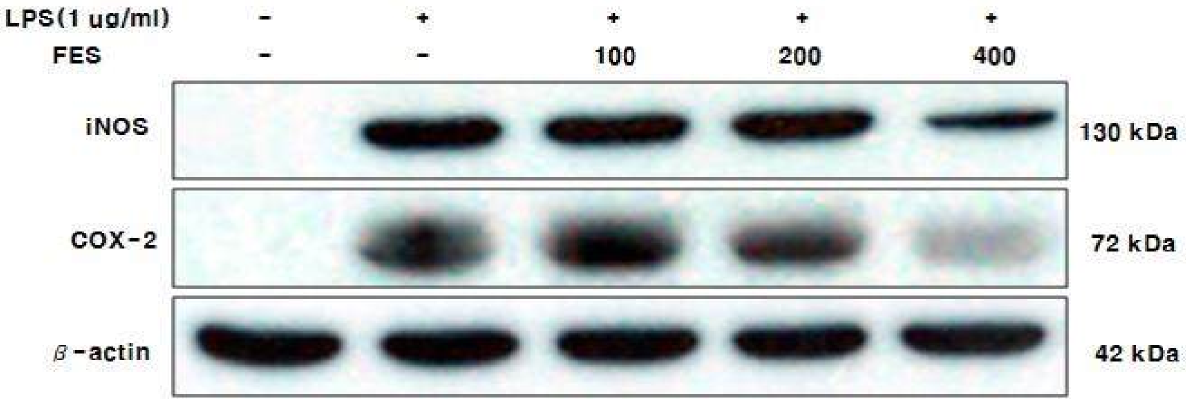


[그림 45] Inhibitory effects of EtOAc fractions of FES on IL-1β production in RAW 264.7 cells.

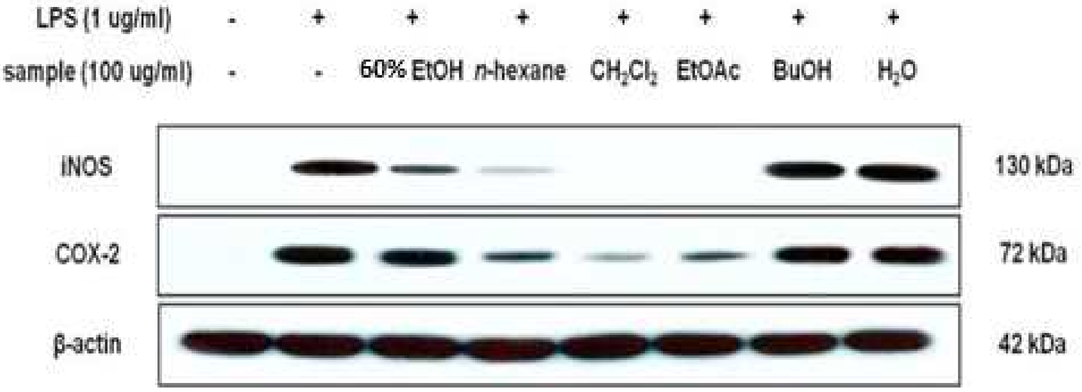
5) 관절염 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 평가(western blotting) 결과

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 100, 200 및 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 46에 나타내었고, 그림 46을 참조하여 보면, 상기의 결과들과 유사한 경향을 보이면서, iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있다.

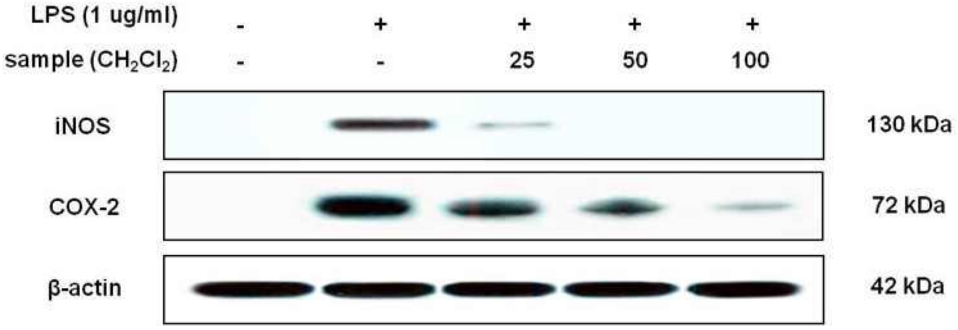
나) 추출물과 분획물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 47에 나타내었고, CH_2Cl_2 분획물을 25, 50 및 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 48~49에 나타내었다. 그림 48~49를 참조하여 보면, 상기의 결과들과 유사한 경향을 보이면서, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물이 높은 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있으며, 또한 그림 26과 그림 30에서 확인되듯이, CH_2Cl_2 및 EtOAc 분획물의 경우 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 발현 억제 활성을 보이고 있다.



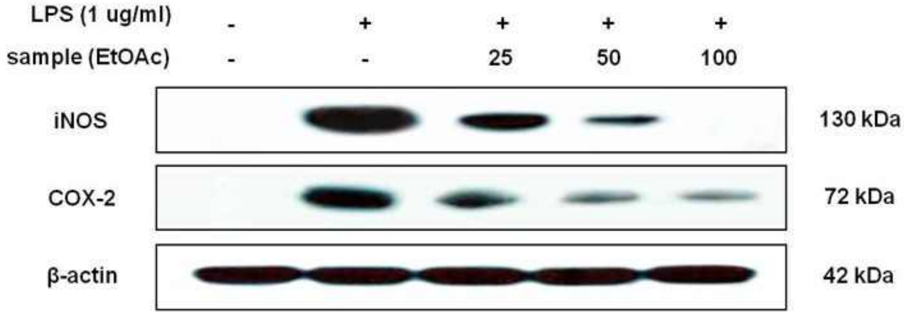
[그림 46] Inhibitory effect of 60% EtOH extract of FES on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells.



[그림 47] Inhibitory effects of the 60% EtOH extract and solvent fractions of FES on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells.



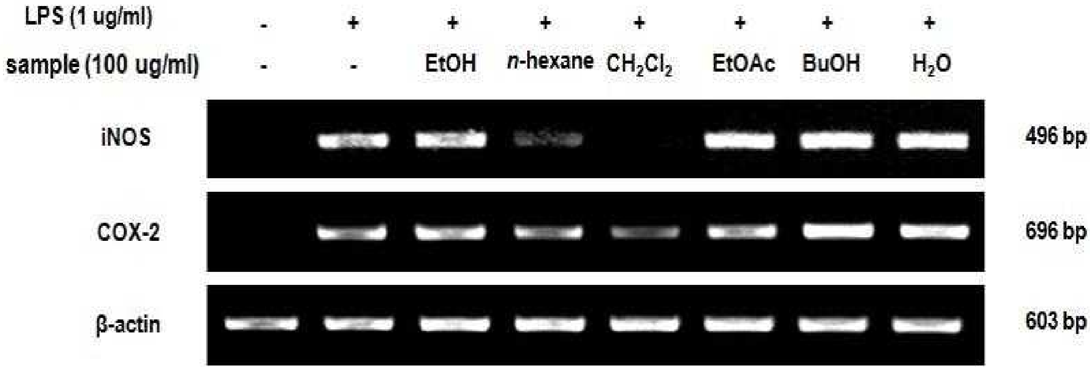
[그림 48] Inhibitory effects of CH_2Cl_2 fractions of FES on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells.



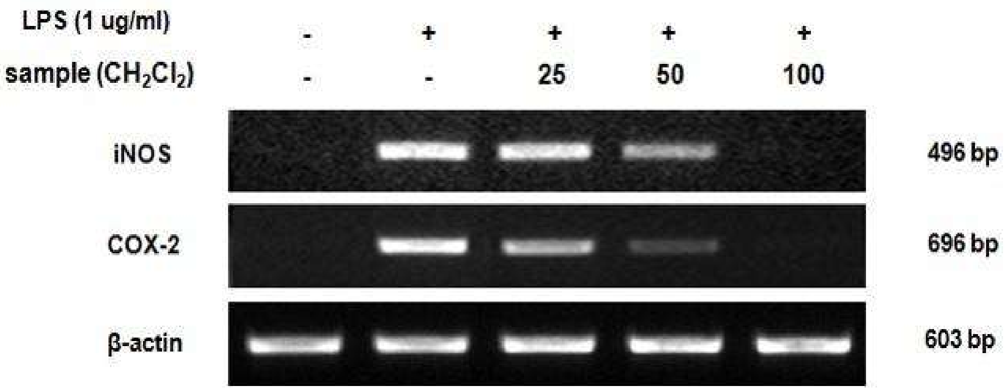
[그림 49] Inhibitory effects of EtOAc fractions of FES on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells.

6) 관절염 유발 인자 mRNA 발현 억제 효능 평가(RT-PCR) 결과

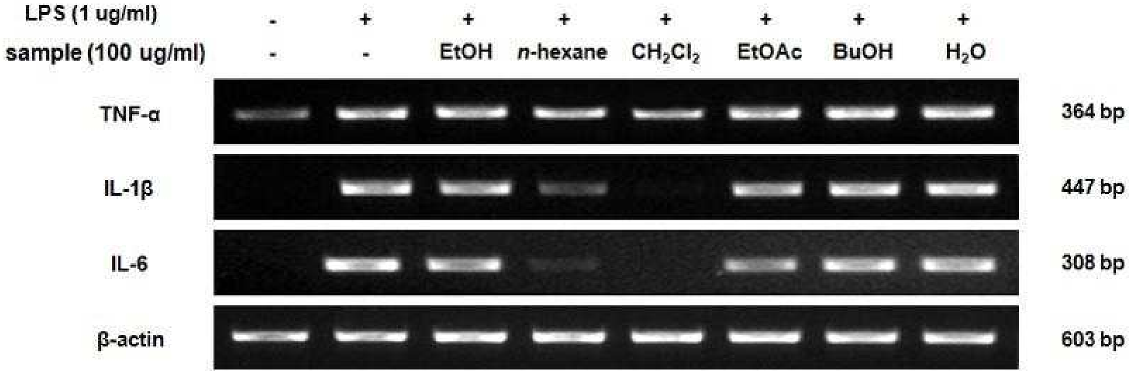
가) 추출물과 분획물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 50~53에 나타내었고, CH_2Cl_2 분획물을 25, 50 및 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 50~53에 나타내었다. 그림 50과 52를 를 참조하여 보면, 상기의 결과들과 유사한 경향을 보이면서, CH_2Cl_2 분획물이 농도 의존적으로 높은 iNOS, COX-2 및 cytokines 발현 억제 활성을 보이고 있다.



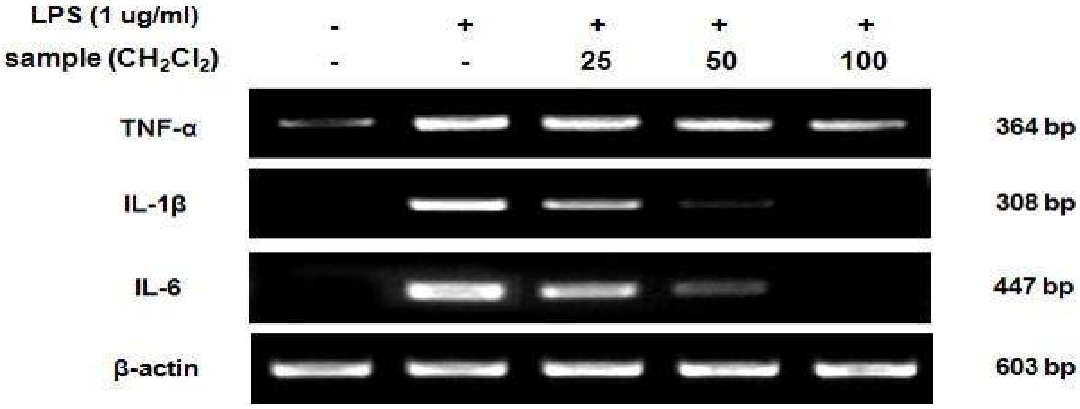
[그림 50] Inhibitory effects of the 60% EtOH extract and solvent fractions of FES on the mRNA expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells.



[그림 51] Inhibitory effects of the CH_2Cl_2 fractions of FES on the mRNA expression of iNOS and COX-2 in RAW 264.7 cells.



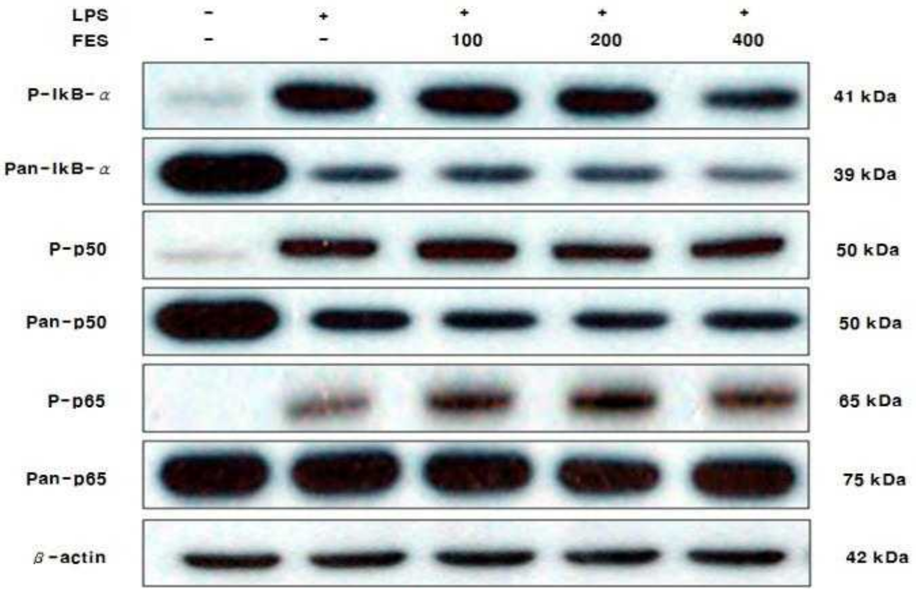
[그림 52] Inhibitory effects of the 60% EtOH extract and solvent fractions of FES on the mRNA expression of cytokines in RAW 264.7 cells.



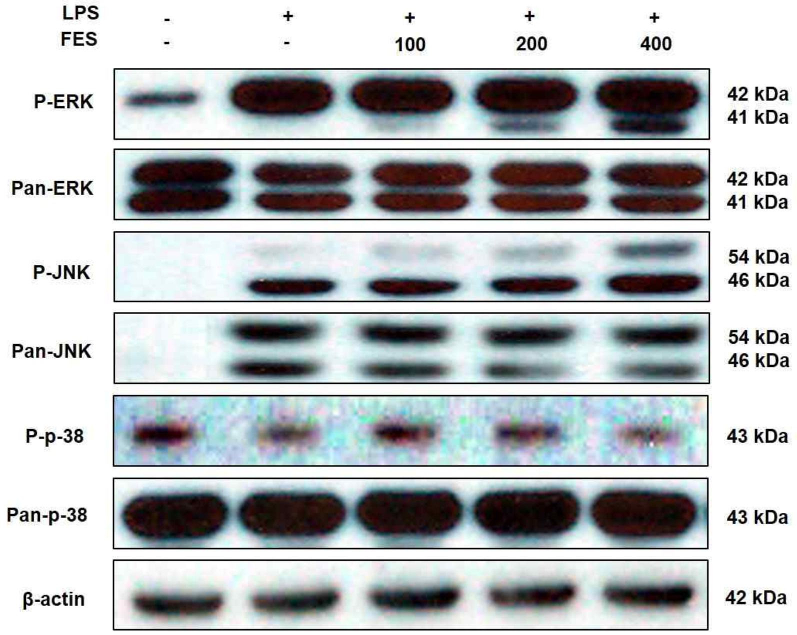
[그림 53] Inhibitory effects of the CH_2Cl_2 fractions of FES on the mRNA expression of cytokines in RAW 264.7 cells.

7) 염증 유발 인자 단백질 발현 억제 효능 규명을 위한 기전연구 결과

가) 염증 유발 인자 단백질 발현 억제 효능을 규명하기 위해 NF-κB와 MAPKs 기전연구를 수행하였고, 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 100, 200 및 400 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 54~55에 나타내었다. 그림 54와 55에서 확인되듯이, 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물이 NF-κB(IκB-α 와 p50)와 MAPKs(p38)의 인산화를 억제 시키는 활성을 보이고 있어 NF-κB와 MAPKs에서 일부 기전이 염증 유발 인자의 발현을 조절한다는 것을 확인하였다.



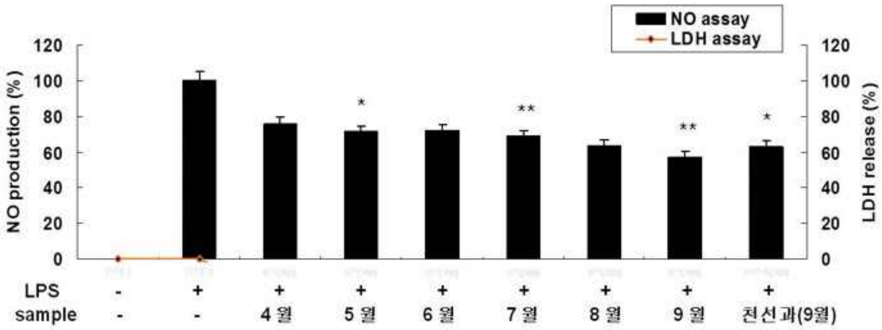
[그림 54] Inhibitory effect of 60% EtOH from FES on the IκB-α and NF-κB protein levels in RAW 264.7 cells.



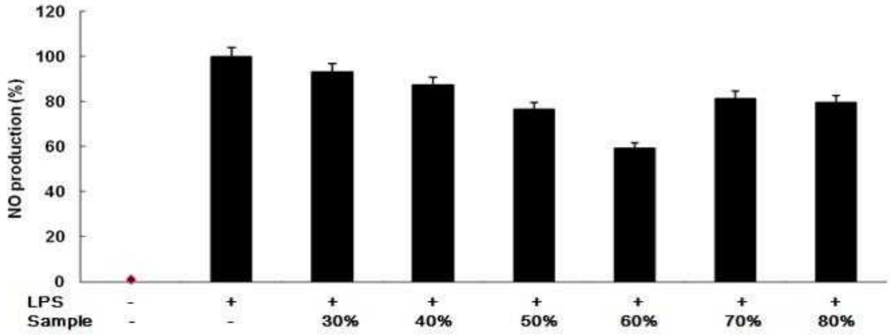
[그림 55] Inhibitory effect of 60% EtOH from FES on the protein level of MAPKs in RAW 264.7 cells.

8) 원료표준화를 위한 효능 평가 결과

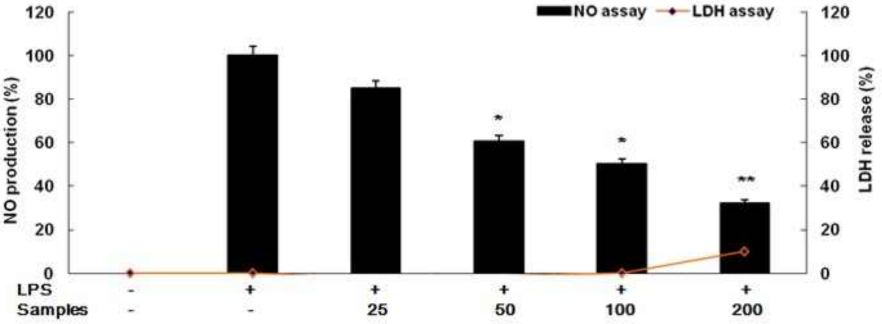
가) 좁은잎천선과나무 월별 및 농도별 주정추출물을 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 56~57에 나타내었고 60% 주정추출물을 25, 50, 100 ug/mL 농도로 처리하였을 때의 결과를 그림 58에 나타내었다. 그림 56~58를 참조하여 보면, 좁은잎천선과나무 9월 주정추출물이 효능이 좋은 것으로 나타났고 농도별로는 60% 주정추출물이 효능이 좋은 것으로 나타났으며 60% 주정추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 보이고 있다.



[그림 56] Monthly test of FES on cell viability and nitric oxid production in RAW 264.7 cells.



[그림 57] Dose test of FES on cell viability and nitric oxid production in RAW 264.7 cells.



[그림 58] Inhibitory effects of 60% EtOH extract of FES on on cell viability and nitric oxid production in RAW 264.7 cells.

3. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 관절염 모델에서의 항염증 효과

가. 급성관절염 모델에서의 항염증 효과

1) 부종증가율

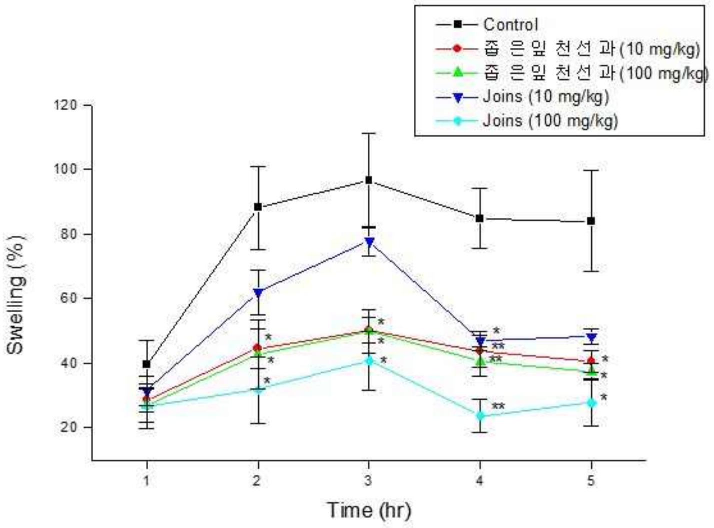
가) 대조군의 경우 부종 유발 후 3시간 경과시에 96.6%의 최대 부종증가율을 나타냈으며, 4시간 경과시부터 부종증가율이 떨어졌다. 좁은잎천선과나무 투여군은 10과 100 mg/kg 투여군 모두 전 측정기간에 걸쳐 대조군에 비하여 유의성 있는 수준으로 부종 증가율이 감소하였다.

나) 양성대조군인 조인스 투여군에서는 10 mg/kg의 경우 4시간, 100 mg/kg의 경우에는 2시간 경과 후부터 각각 대조군에 비하여 유의성 있는 수준으로 부종 증가율이 감소하였다.

[표 6] Effects of 60% EtOH extract from FES on rat’s hind-paw inflammation.

Group	Swelling (%)				
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
G1	39.6 ± 7.37	88.2 ± 12.87	96.6 ± 14.84	84.8 ± 9.29	84.0 ± 15.69
G2	28.6 ± 3.62	44.5 ± 6.26*	50.3 ± 3.96*	43.6 ± 4.96**	40.5 ± 3.33*
G3	27.0 ± 5.17	42.7 ± 10.59*	49.8 ± 6.63*	40.6 ± 4.42**	37.4 ± 2.66*
G4	31.4 ± 4.54	62.0 ± 6.91	77.8 ± 4.65	46.9 ± 2.99**	48.3 ± 2.41
G5	26.7 ± 6.96	31.7 ± 10.37*	40.7 ± 9.23*	23.6 ± 5.17**	27.8 ± 7.31*

G1, Vehicle control; G2, FES (10 mg/kg); G3, FES (100 mg/kg); G4, positive control (Joins, 10 mg/kg); G5, positive control (Joins, 100 mg/kg). Data represented Mean ± SE, *: significantly different from control ($p < 0.05$), **; significantly different from control ($p < 0.01$).



[그림 59] Effects of 60% EtOH extract from FES on rat’s hind-paw inflammation. Data represented Mean ± SE, *; significantly different from control ($p < 0.05$), **; significantly different from control ($p < 0.01$).

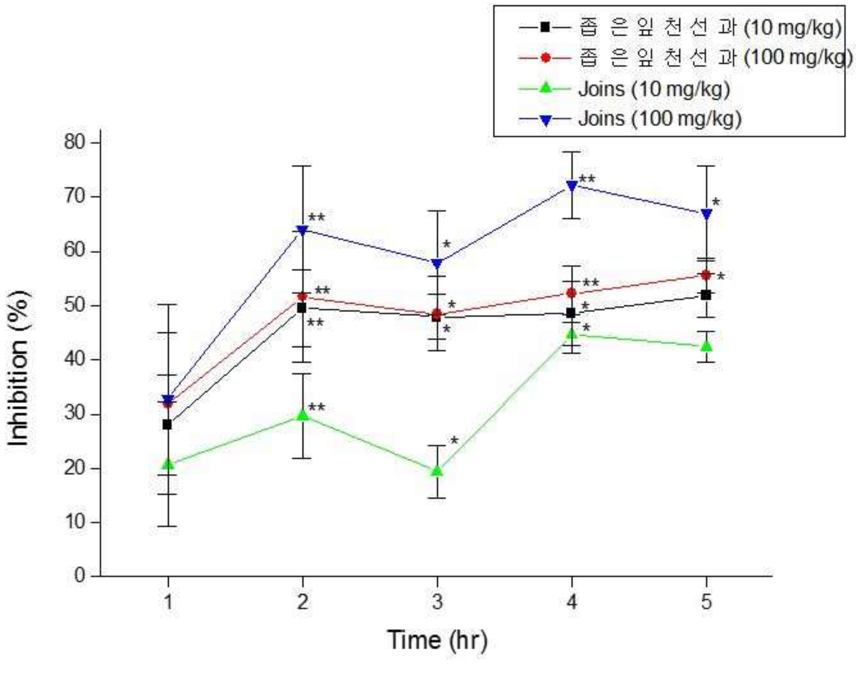
2) 부종억제율

가) 100 mg/kg 투여시 5시간 경과시에 양성대조군인 조인스 투여군의 경우 50.7%, 시험물질 투여 후 부종 유발 후 2시간과 3시간 경과시에는 전 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 수준으로 증가되었고, 4시간 경과시에는 전 투여군에서, 5시간 경과시에는 좁은잎천선과(100 mg/kg) 및 양성대조군 (100 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 수준으로 부종 억제율이 증가되었다.

[표 7] Effects of 60% EtOH extract from FES on rat' s hind-paw inflammation

Group	Inhibition (%)				
	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
G1	28.0 ± 9.13	49.5 ± 7.10**	47.9 ± 4.10*	48.6 ± 5.85*	51.8 ± 3.97
G2	31.9 ± 13.05	51.6 ± 12.01**	48.5 ± 6.86*	52.2 ± 5.22**	55.5 ± 3.16*
G3	20.7 ± 11.45	29.7 ± 7.84**	19.4 ± 4.82*	44.7 ± 3.52*	42.5 ± 2.87
G4	32.7 ± 17.56	64.0 ± 11.76	57.9 ± 9.55*	72.1 ± 6.10**	67.0 ± 8.70*

G1, Vehicle control; G2, FES (10 mg/kg); G3, FES (100 mg/kg); G4, positive control (Joins, 10 mg/kg); G5, positive control (Joins, 100 mg/kg). Data represented Mean ± SE, *: significantly different from control ($p < 0.05$), **; significantly different from control ($p < 0.01$).

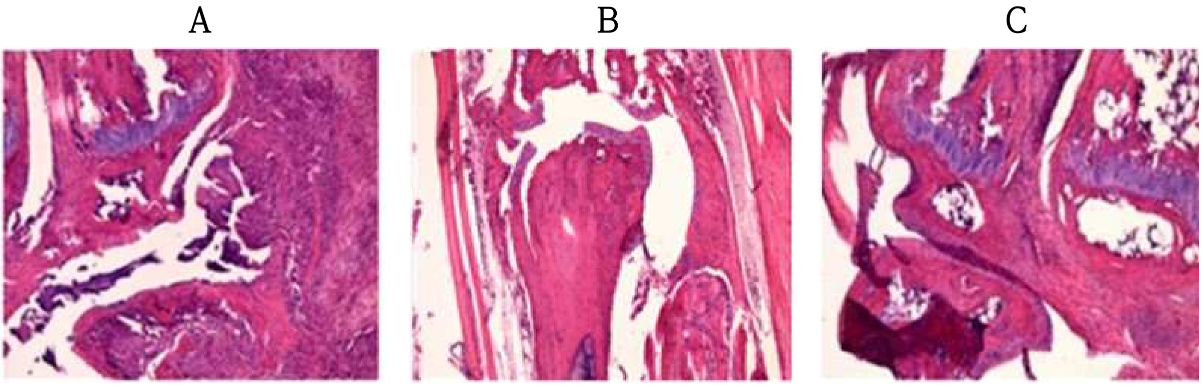


[그림 60] Effects of 60% EtOH extract from FES on rat' s hind-paw inflammation. Data represented Mean ± SE, *; significantly different from control ($p < 0.05$), **; significantly different from control ($p < 0.01$).

나. 만성관절염 모델에서의 항염증 효과

1) 조직소견

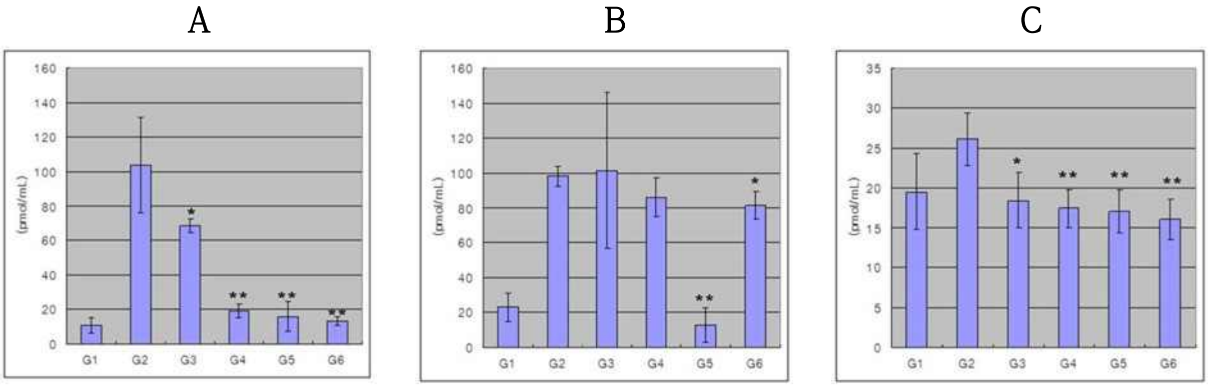
가) 용매대조군의 경우, 관절면 침식과 주변에 fibroblast의 침착이 관찰되었다. 조인스 투여군의 경우에는 관절면은 smooth하였으나 주변에 collagen의 증식이 관찰된 반면 좁은잎천선과나무 주정추출물 투여군의 경우 관절의 파괴나 변형이 거의 관찰되지 않았다(그림 61).



[그림 61] Histologic analysis of knee joint. A, vehicle control(CIA only); B, FES; C, Joins. x 100.

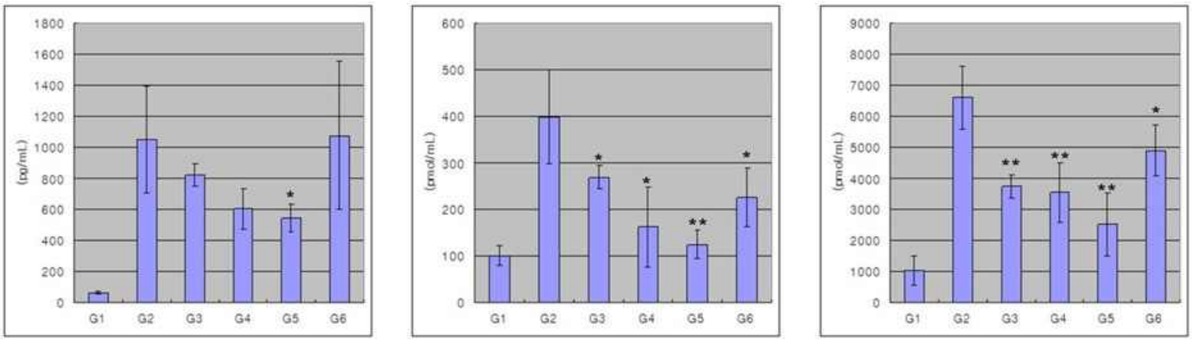
2) 혈청 및 비장세포내 cytokine 변화

가) 혈청에서의 cytokine 생성 변화는 다음과 같다. IL-6 수치는 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 62-A). TNF-α 수치는 좁은잎천선과나무(25, 50 mg/kg) 투여군을 제외한 투여군과 조인스 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 억제되었다(그림 62-B). IFN-γ 수치 또한 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 62-C). 비장 세포의 경우, IL-6 수치는 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 63-A), TNF-α수치는 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 63-B). IFN-γ 수치는 전 투여군에서 용매대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였다(그림 63-C).



[그림 62] Effects of the extract from FES on cytokines production of serum. A, IL-6; B, TNF-α; C, IFN-γ. G1, normal control; G2, vehicle control (CIA only); G3, 25 mg/kg; G4, 50 mg/kg; G5, 100 mg/kg; G6, positive control (Joins, 10 mg/kg).

A B C



[그림 63] Effects of the extract from FES on cytokines production of lymphocytes. A, IL-6; B, TNF-α; C, IFN-γ. G1, normal control; G2, vehicle control (CIA only); G3, 25 mg/kg; G4, 50 mg/kg; G5, 100 mg/kg; G6, positive control (Joins, 10 mg/kg).

3) 방사선학적 검사

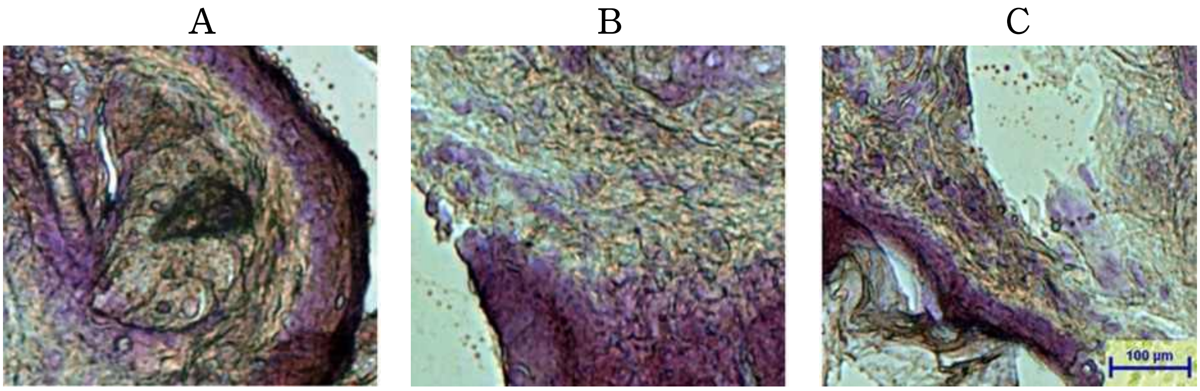
가) 시험 종료 후 마우스를 경추탈골로 희생시킨 후 발목관절을 X-ray로 촬영한 결과 용매대조군에서는 심한 관절의 파괴와 변형을 관찰할 수 있었으나 시험물질 투여군에서는 관절의 병변이 거의 관찰되지 않았다(그림 64).

A B C

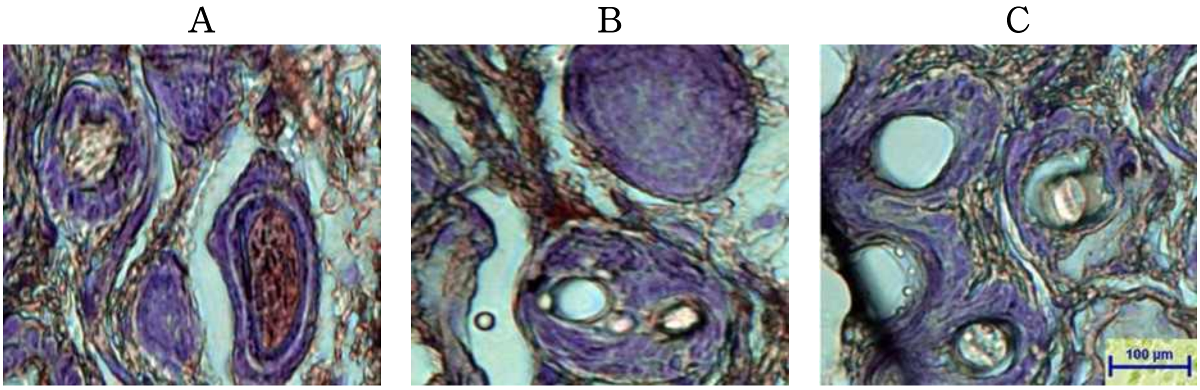
[그림 64] Radiographs of the hind paws of collagen-induced arthritis model mice. A, vehicle control (CIA only); B, FES; C, Joins.

4) 사이토카인에 대한 면역조직화학 염색

가) 시험 종료 후 마우스의 족관절을 파라민 포매한 후 IL-6와 TNF-α에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 관절염을 유발한 후 용매만을 투여한 용매대조군에서는 IL-6와 TNF-α가 족관절 조직 전체에서 많이 발현되었으나, 시험물질 투여군에서는 발현량이 감소되었다(그림 65~66).



[그림 65] Immunohistochemical analysis of IL-6 from the CIA model. A, vehicle control (CIA only); B, FES; C, Joins.



[그림 66] Immunohistochemical analysis of TNF-α from the CIA model. A, vehicle control (CIA only); B, FES; C, Joins.

4. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 골관절염 완화 비임상효력시험

가. MIA-induced osteoarthritis model을 활용한 비임상효력시험

1) 체중변화: 시험기간 동안 체중 측정한 결과 모든 군에서 체중의 증가가 관찰되었으며, 체중 변화의 차이는 관찰되지 않았음.

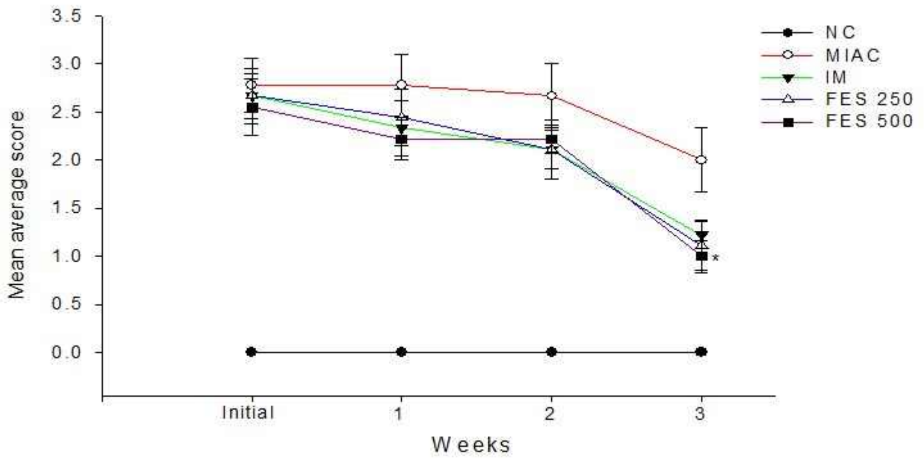
[표 8] 좁은잎천선과나무 추출물이 MIA로 유도된 rat에서의 체중 변화

Groups	Body weight (g)		Weight gain (g)
	Initial	Final	
NC	226.0 ± 2.62	341.7 ± 6.28	115.7 ± 4.86
MIAC	217.3 ± 5.44	332.5 ± 6.35	115.2 ± 7.18
IM	213.3 ± 4.95	323.8 ± 4.37	110.5 ± 4.91
FES 250	218.5 ± 4.30	326.5 ± 5.51	108.0 ± 7.99
FES 500	212.5 ± 4.38	328.6 ± 3.11	116.1 ± 3.58

2) 주차별 행동 score: 좁은잎천선과 잎 주정추출물(FES) 투여군에서 1주차부터 감소하기 시작하였으며, 3주차에는 양성대조군인 IM (indomethacin) 보다 더 낮은 수준으로 감소하는 것을 확인하였다.

[표 9] 행동 score

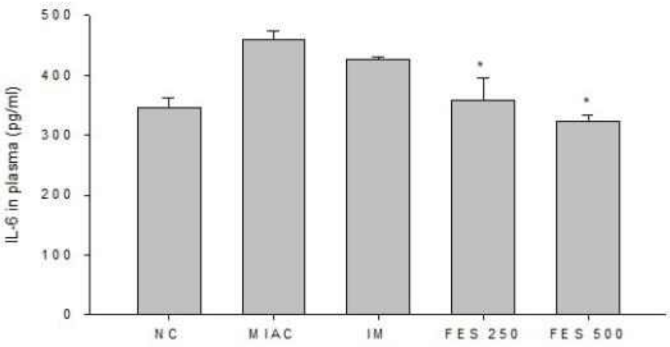
0	정상
1	증상은 경미하나 착지 시 한쪽발로 착지
2	한쪽 발을 경미하게 절뚝거림
3	한쪽 발을 심하게 절뚝거림
4	한쪽 발을 1초 이상 내딛지 못함
5	한쪽 발을 내딛지 못함



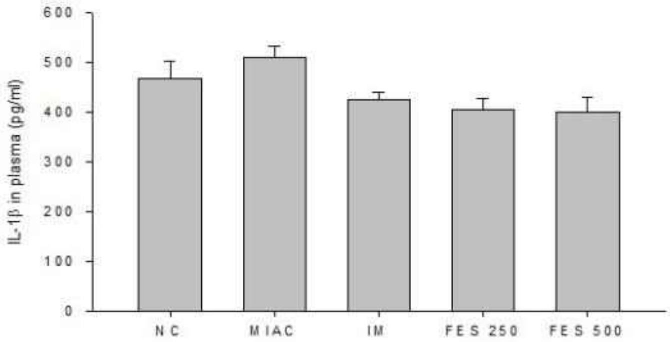
[그림 67] MIA 유도 골관절염 모델에서 좁은잎천선과 추출물의 주차별 행동 score.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

3) 생물학적 지표 검사

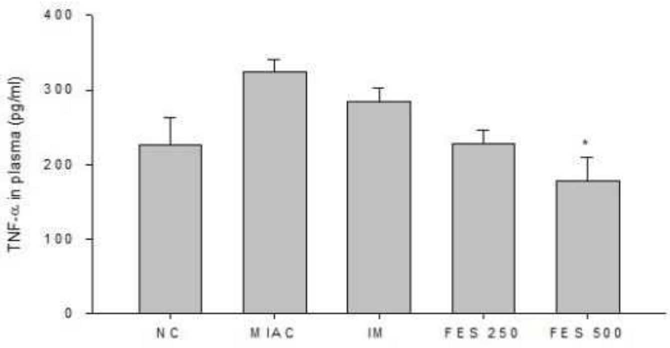
가) TNF-α와 IL-1β는 파골세포, 연골세포 등을 자극하여 IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 촉진, 골관절염에서 연골파괴의 주요 인자로 알려져 있다. 시험 종료 후 얻은 혈청으로부터 염증성 지표로서 IL-6, IL-1β, TNF-α 등의 사이토카인을 ELISA로 측정한 결과, 그림 68~70과 같이 좁은잎천선과 추출물 투여군 (FES 250, 500)에서 염증성 지표인 IL-6, IL-1β, TNF-α가 정상 수준까지 낮아지는 것을 확인하였다.



[그림 68] MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 IL-6 level 측정. Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

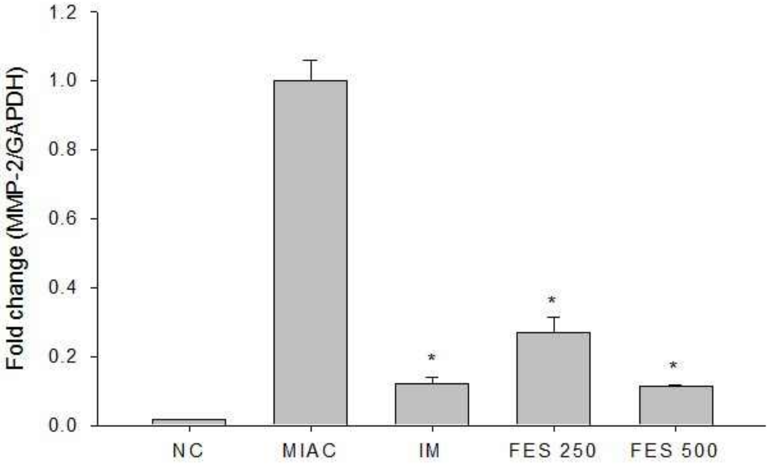


[그림 69] 27. MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 IL-1β level 측정. Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

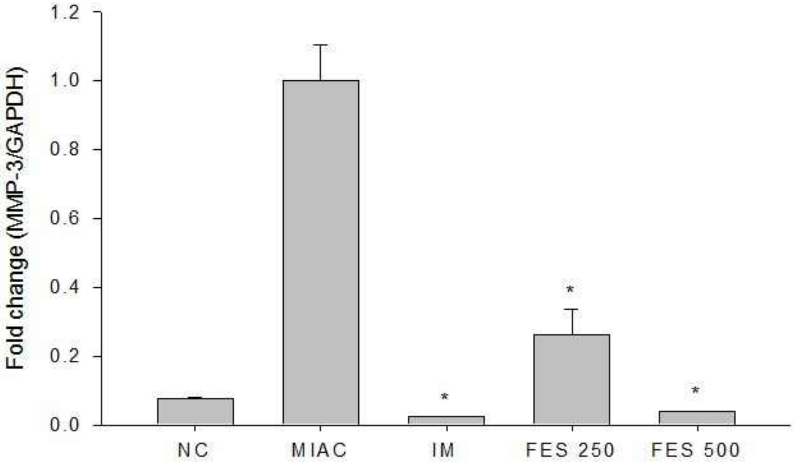


[그림 70] MIA 유도 골관절염 모델에서의 혈청 αTNF- level 측정. Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

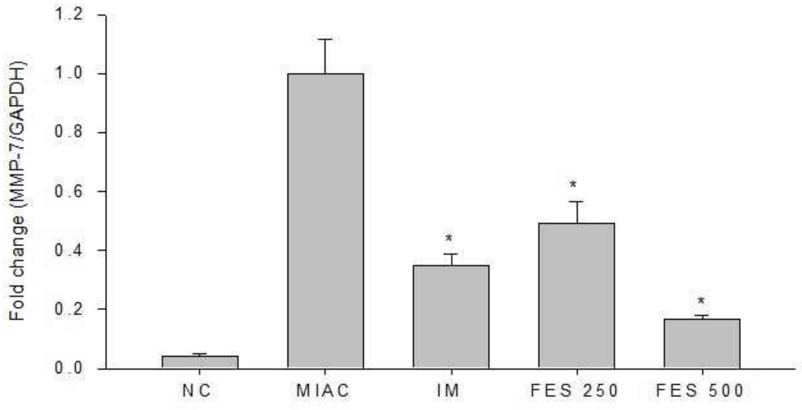
나) IL-1β와, TNF-α은 연골세포로부터 MMPs의 생성과 분비를 촉진시켜 연골의 고분자의 파괴를 증가시키며 PGE_2의 생성을 촉진시킨다. MMPs는 연골조직이 파괴되면 활성화되어 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 골 및 연골의 기질 구성요소를 파괴하는 단백질 분해효소로 알려져 있다. 연골조직의 파괴정도를 확인하기 위해 synovial fluid를 채취하여 RNA를 분리하여 PCR 방법을 통해 MMP-2, 3, 7, 9, 13 및 TIMP-1, 2 등의 발현을 측정하였다. 그 결과, 좁은잎천선과 추출물 및 양성대조군 (IM, indomethacin)에서의 MMP-2, 3, 7, 9, 13 발현의 MIAC에 비해 크게 감소가 나타났으며, TIMP-1, 2의 발현을 크게 감소하였다(그림 70~77).



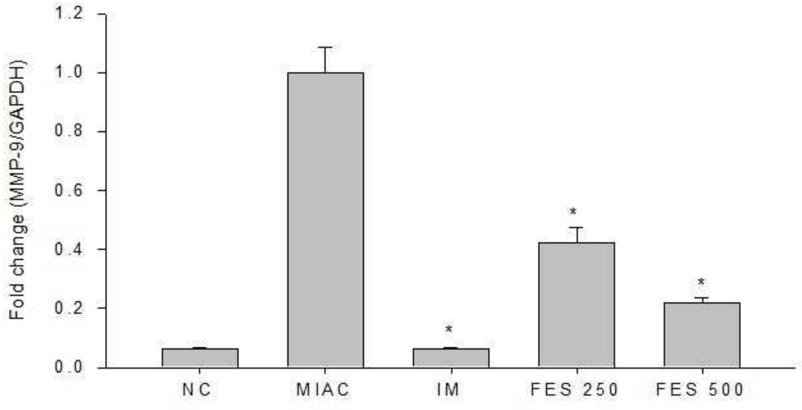
[그림 71] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-2 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)



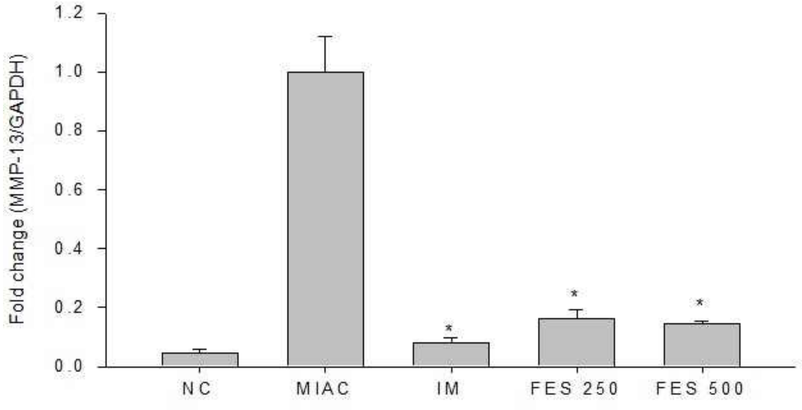
[그림 72] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-3 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)



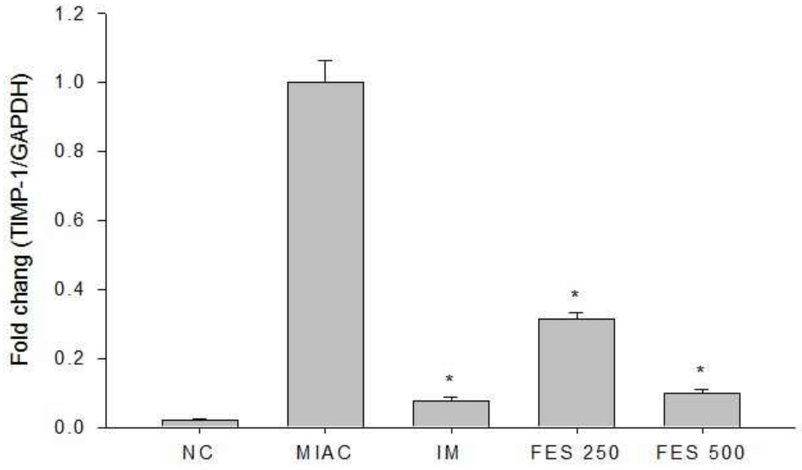
[그림 73] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-7 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)



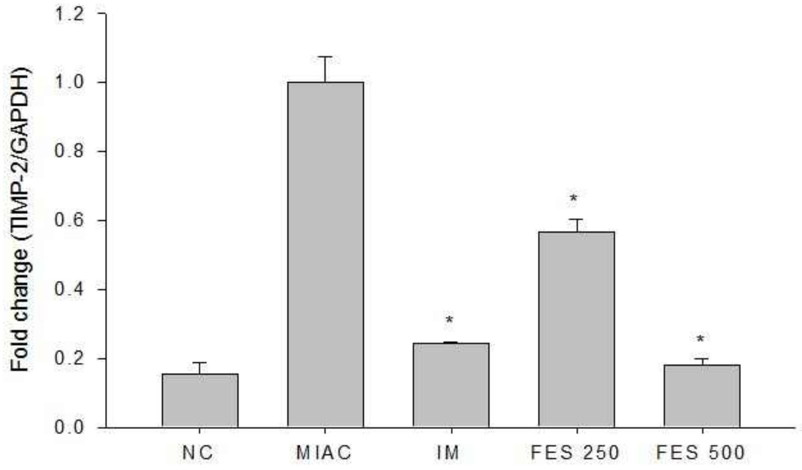
[그림74] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-9 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)



[그림 75] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 MMP-13 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

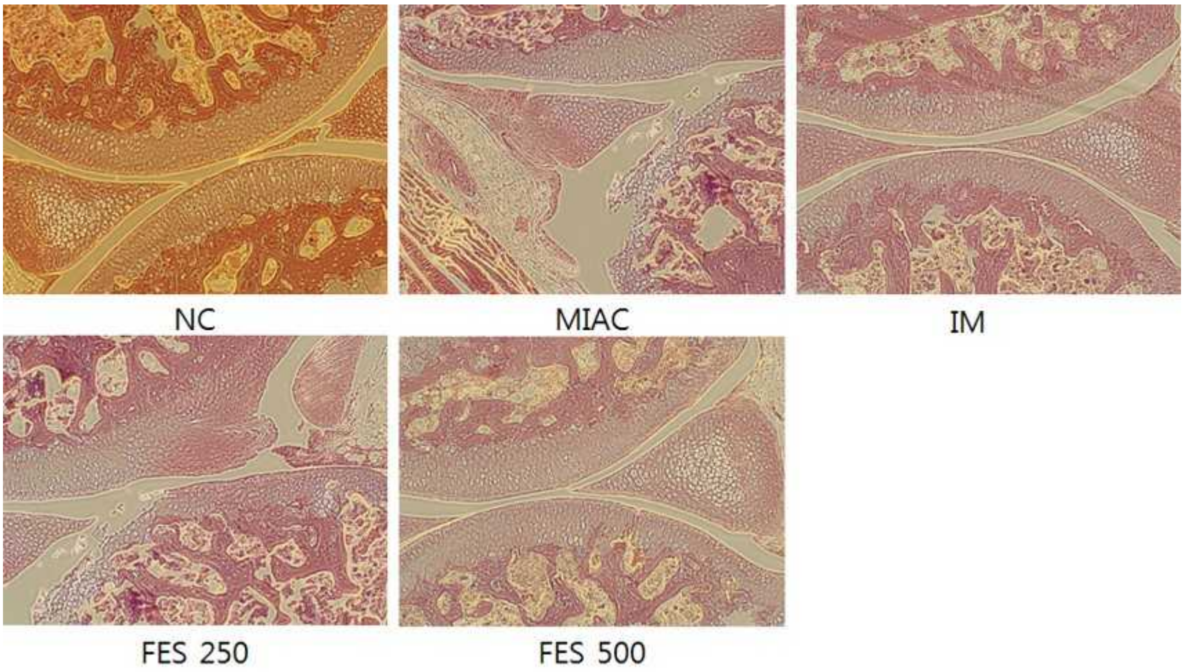


[그림 76] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIMP-1 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)



[그림 77] MIA로 유도된 rat 연골조직에서의 TIPM-2 mRNA level 측정.
Data represented Mean ± SE, *: significantly different from MIAC ($p < 0.05$)

다) 좁은잎천선과 추출물이 무릎 관절 및 연골 조직에 미치는 영향을 확인하기 위하여 H&E stain을 실시하였다. 대조군은 골관절염이 유발되어 정상군보다 연골과 활막 및 섬유조직의 변형이 현저하게 나타난 반면, 좁은잎천선과 추출물 투여군은 정상군과 비슷하게 회복되는 것을 확인하였다(그림 78).

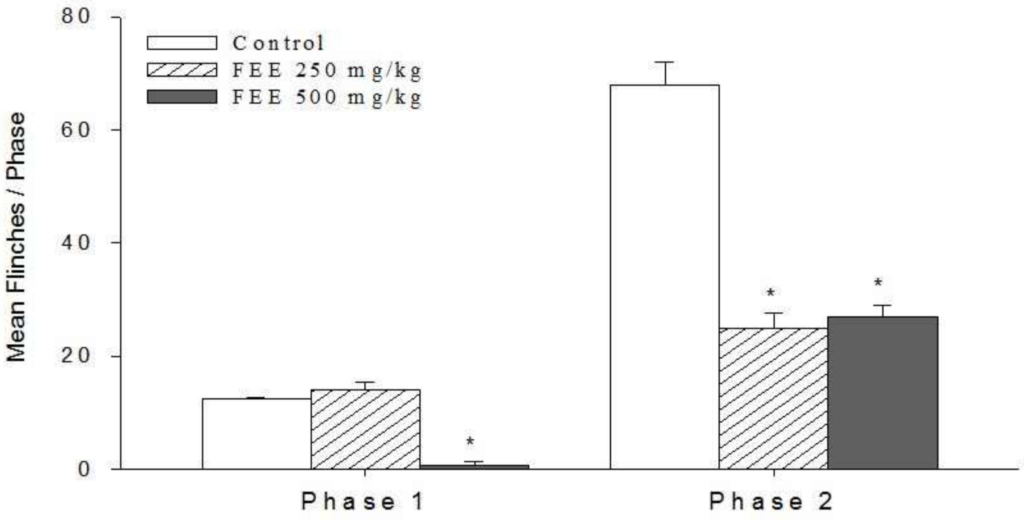


[그림 78] MIA로 유도된 rat 연골조직 H&E stain.

4) 진통 억제 효력 시험

가) 만성 통증 억제 동물시험 (Formalin test)

1) Formalin test는 유해 자극에 대한 조직손상이 일어나는 지속적인 통증에 대한 효력 시험방법으로 통증 자극이 지속적인 만성 통증 모델이다. rat의 뒷발에 10% Formalin을 피하 주사한 뒤 3분 단위로 투여한 발의 Flinching 행동 수를 측정하였다. Flinching 행동은 Phase 1 (0-12 분)과 Phase 2 (24-39 분)으로 나누며, Phase 1 시기에는 침해 자극에 의한 구심성 C 섬유의 흥분에 따른 급성 통증 행동으로 formalin 투여 후 5-10분간 지속되었다가 사라진다. Phase 2는 염증관련물질 즉 프로스타글라딘 등에 의하여 야기되어지는 말초신경계 관련 통증 및 중추신경 감작에 의한 복합성 통증을 측정하는데, 통증반응은 20-60분에 걸쳐 보인다. formalin 주사 후 나타나는 초기의 통증반응은 통각수용체에 대한 직접적인 자극 때문이고 후기에 보이는 통증반응은 중추성 감작 때문이다. 좁은잎천선과 추출물을 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg로 실험 시작 60분 전에 경구 투여하였다. 그림 79를 참조하여 보면, Phase 1에서는 500 mg/kg에서 대조군에 비해 크게 억제되는 것을 확인하였으며, Phase 2에서는 좁은잎천선과 추출물 투여군 모두에서 대조군에 비해 크게 억제된 것을 알 수 있다.



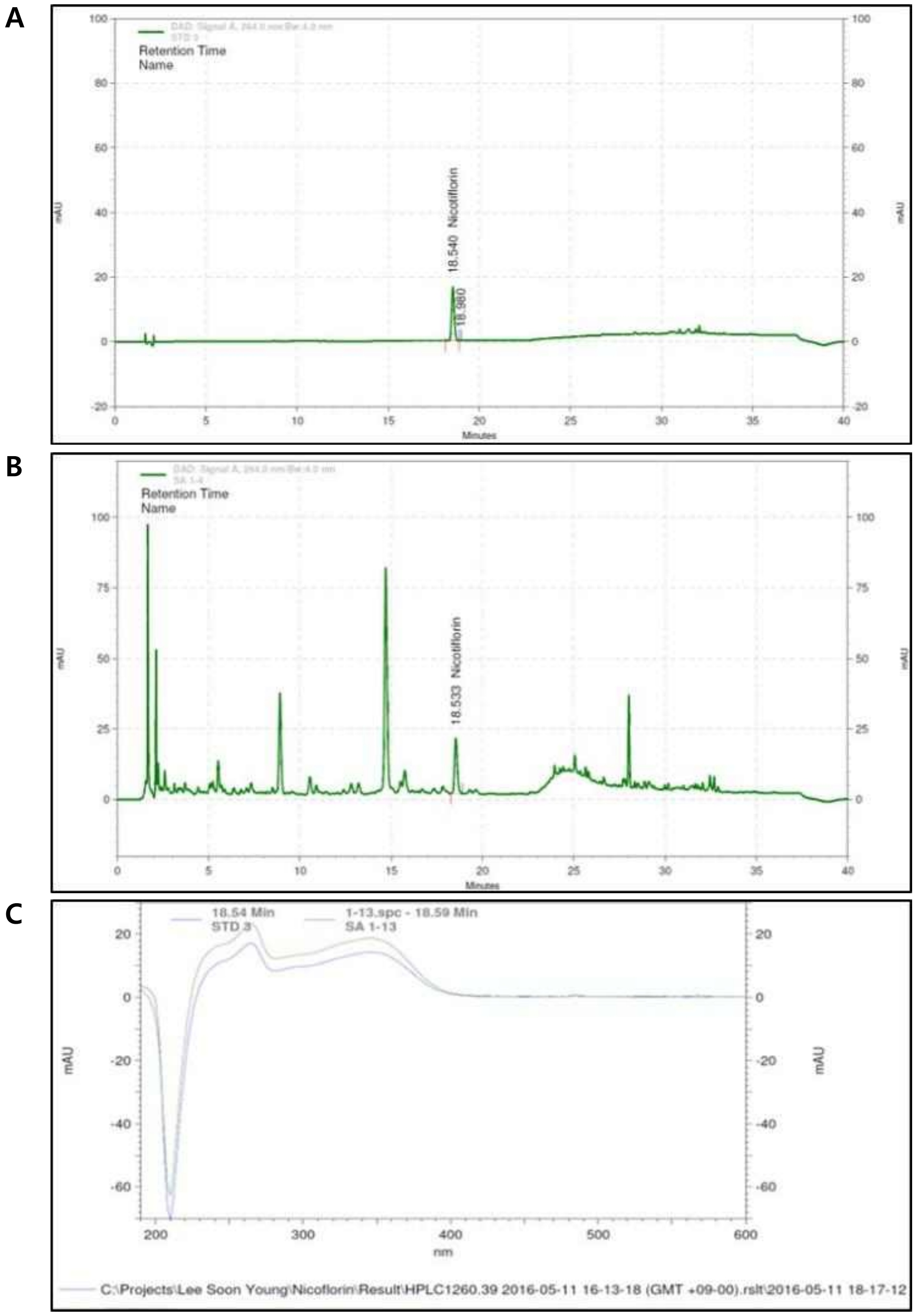
[그림 79] 좁은잎천선과 추출물의 만성 통증 억제 효과.

Data represented Mean ± SE, *: significantly different from control ($p < 0.05$)

5. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원료자원화 및 기준·규격 설정

가. 지표물질(Nicotiflorin)의 확인

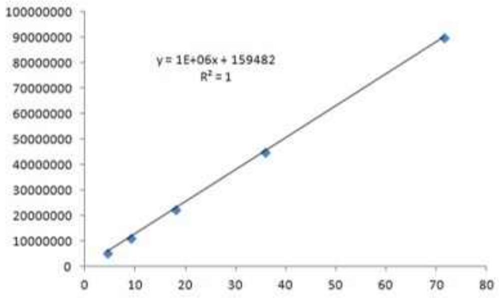
1) 표준용액 분석 결과 Nicotiflorin peak가 약 18분대에 나타났으며, 시험용액에서도 동일한 시간대에 peak가 나타났다. 스펙트럼 확인 결과, 시험용액과 표준용액의 spectrum 패턴도 동일한 것으로 확인 되었다. 시험용액과 표준용액의 크로마토그램은 아래와 같다(그림 80).



[그림 80] 반복성 실험의 chromatogram과 spectrum (A: STD, B: Sample, C: Spectrum)

2) 표준용액은 조제 후 이를 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 4.469~71.5 ppm에서 직선성이 나타남이 확인되었다. 표준용액의 검량선 결과는 표 9와 같다.

[표 9] 반복성, 직선성 실험에서의 표준용액 분석결과 및 검량선 결과

STD level	농도(ug/ml)	Area	검량선 결과
1	4.46875	5734669	
2	8.9375	11377137	
3	17.875	22659684	
4	35.75	45156320	
5	71.5	90000022	

3) 시료의 전처리는 위의 변경된 방법에 준하여 진행하였으며, 같은 시료량에 따른 함량 편차 여부를 확인하기 위해 시료채취량을 약 250 mg으로 하여 3반복 실험을 진행하였다. 그 결과, 같은 시료량에 따른 유의적인 편차는 나타나지 않았으며, 시료 중 Nicotiflorin의 함량은 2.155±0.0012 mg/g 임을 확인할 수 있었다. 다음은 반복성 실험 결과값이다(표 10).

[표 10] 반복성 실험 결과

	시험용액 농도 (ug/ml)	채취량 (mg)	용액량 (ml)	희석 배수	표준품 순도	Nicotiflorin 함량 (mg/g)
1	24.018	274.6	25	1	0.991	2.167
2	23.152	266.0	25	1	0.991	2.156
3	22.531	260.5	25	1	0.991	2.143
					mean±S.D (mg/g)	2.155±0.0012

4) 또한 시료량에 따른 직선성을 확인하기 위하여 250 mg을 100%로 보았을 때 250 mg의 25~200%에 해당하는 시료량(약 62.5~500 mg)에 대해 실험을 진행하였다. 분석한 결과, 결과값의 평균은 2.141±0.0038 mg/g으로 시료량에 대한 편차는 없었다. 또한 반복성 실험 결과와 비교하여도 비슷한 수준이었다. 다음은 직선성 실험 결과값이다(표 11).

[표 11] 직선성 실험 결과

		시험용액 농도 (ug/ml)	채취량 (mg)	용액량 (ml)	희석 배수	표준품 순도	Nicotiflorin 함량 (mg/g)
1	25%	7.381	87.0	25	1	0.991	2.102
2	100%	22.531	260.5	25	1	0.991	2.143
3	200%	45.881	522.0	25	1	0.991	2.178
						mean±S.D (mg/g)	2.141±0.0038

5) 위의 모든 실험결과를 종합하여 볼 때 retention time이 약 18분대에 동일하게 분석이 되었으며, 분석값의 평균과 표준편차가 2.149±0.0029 mg/g으로 일자간의 차이도 거의 없는 것으로 확인되어 실험의 정밀성이 확인되었다.

6) 따라서 본 시험법으로 분말 상태인 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 정량에는 무리가 없을 것으로 사료된다.

나. 시험범 검증(Method Validation) 결과

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 함량을 확인하기 위하여 설정된 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

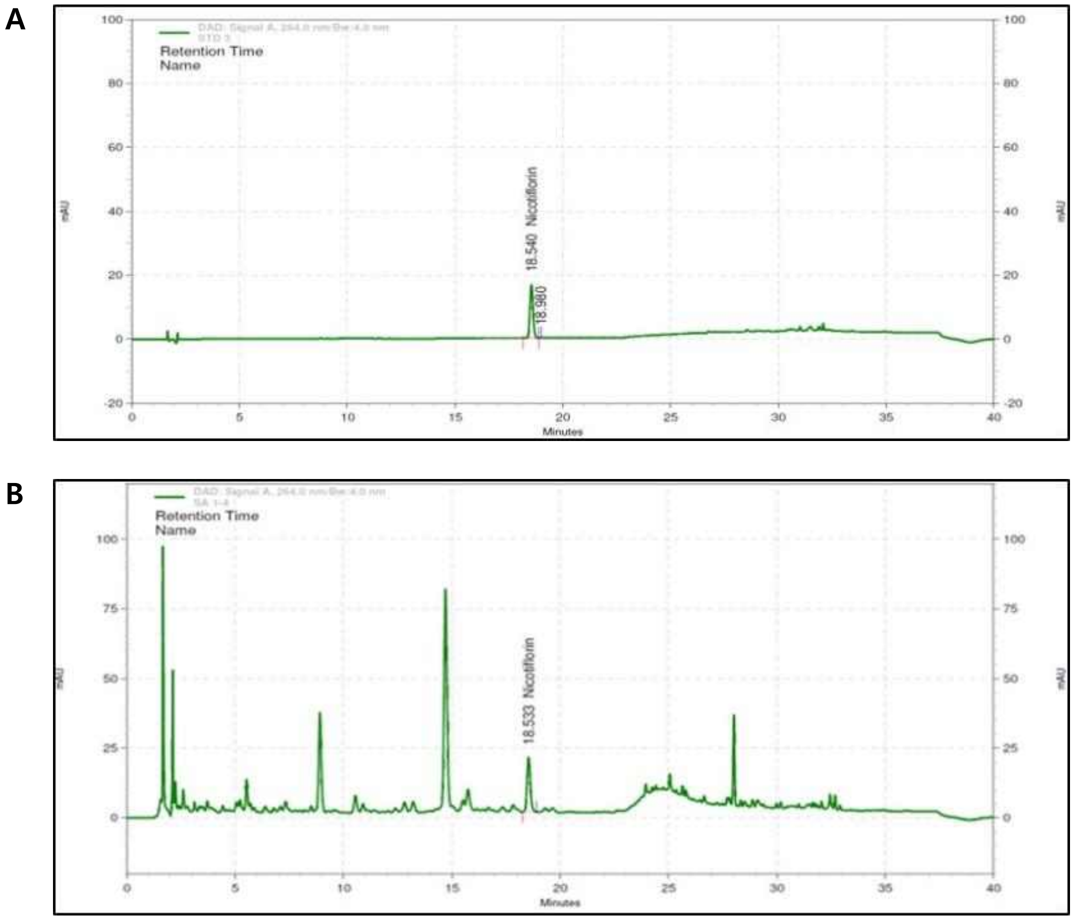
[표 12] 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토	o 검출시간 : 약 18분 o spectrum : 약 264 nm 표준용액과 시험용액 일치 o peak purity : 시험용액 중 Nicotiflorin peak 5 points가 일치, 단일물질로 확인됨
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 25~400%에서 확인 3.95~93.3 mg/L o R^2: 1
	시료에 대한 8개 농도에서 직선성 확인	o 목적농도의 25~200%에서 확인 o R^2: 0.9974~0.9999
정확성 (Accuracy)	시료 중 3개 농도로 표준물질 첨가하여 회수율 검토	o 첨가한 농도 - 7.464~29.856 mg/L 회수율 – 98.13~98.37%, RSD(%) - 0.26~1.15%
정밀성 (Precision)	3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일자간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	o 실험실내 정밀성 함량 – 1.958~2.142 mg/g, RSD(%) - 4.908% o 반복정밀성 함량 – 1.947~2.151 mg/g, RSD(%) - 0.523~0.967%
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	o 3.95~93.3 mg/L

2) 특이성(Speccificity)

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflofin의 retention time과 peak 분리도 확인

1) 표준물질인 Nicotiflorin과 시료를 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 표준용액과 시험용액이 동일한 시간대(약 18분)에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인 하였다(그림 81). 시험용액에서도 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다.



[그림 81] 특이성 실험의 chromatogram (A: 표준용액, B: 시험용액)

나) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 spectrum과 peak purity 확인

(1) 시험용액 중 검출된 Nicotiflorin이 표준용액의 Nicotiflorin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 겹쳐 확인하였다. 약 18분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 시험용액의 Nicotiflorin peak의 purity를 확인하기 위해서 peak의 5 points spectrum을 확인하였다(그림 82).

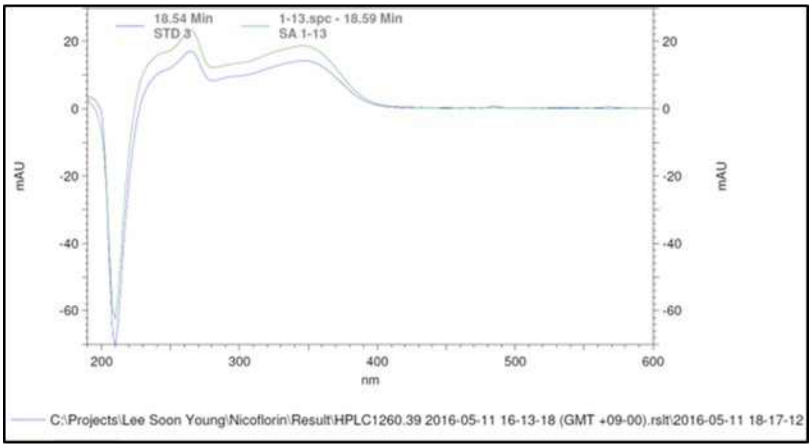
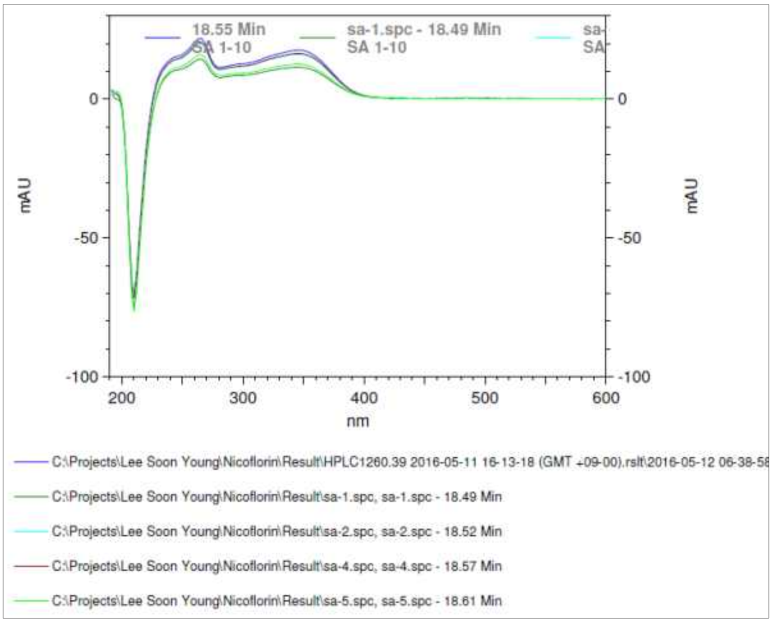


Fig. 4. Nicotiflorin Spectrum (표준용액과 시험용액의 spectrum을 겹쳐 놓음).



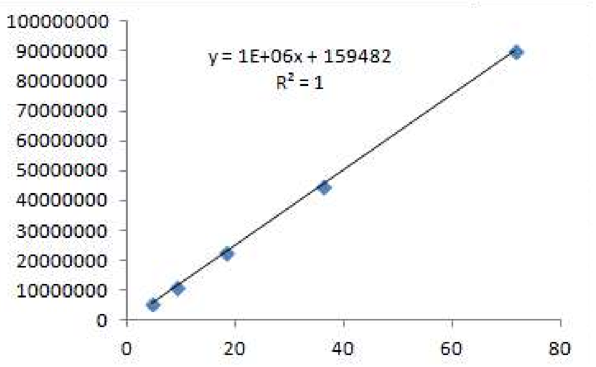
[그림 82] Nicotiflorin의 5 Points Spectrum

3) 직선성(Linearity)

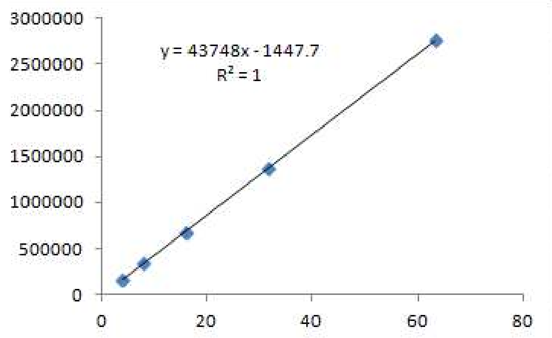
가) 표준물질에 대한 직선성(Linearity)

(1) 표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. Nicotiflorin의 검출 농도 약 17 ug/ml를 목적농도 100%로 설정하여 25~400% 범위에서 3반복 평가하였다. 분석 결과, 농도별로 직선성이 확인되었으며, 기울기 값은 161356~10000000, R^2는 세 번 모두 1로 나타났다(표 13~15).

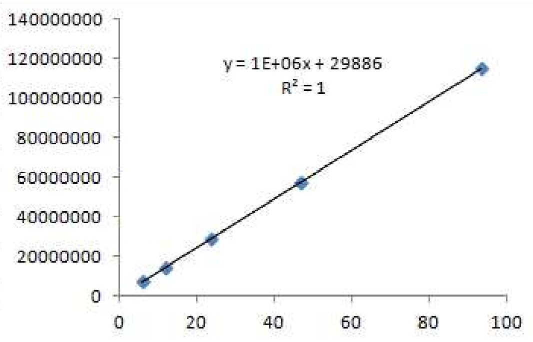
[표 13] Nicotiflorin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	검량선
25%	4.46875	5734669	
50%	8.9375	11377137	
100%	17.875	22659684	
200%	35.75	45156320	
400%	71.5	90000022	
기울기	1000000		
y 절편	159482		
R^2	1		

[표 14] Nicotiflorin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	검량선
25%	3.95	173560	
50%	7.9	344271	
100%	15.8	691654	
200%	31.6	1373811	
400%	63.2	2766359	
기울기	43748		
y 절편	-1447.7		
R^2	1		

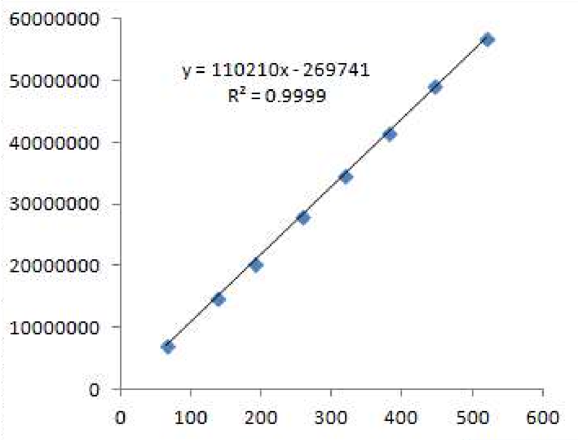
[표 15] Nicotiflorin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도(%)	검출농도 (ug/ml)	면적 (area)	검량선
25%	5.83125	7261251	
50%	11.6625	14312209	
100%	23.325	28895005	
200%	46.65	57428299	
400%	93.3	115051013	
기울기	1000000		
y 절편	29886		
R^2	1		

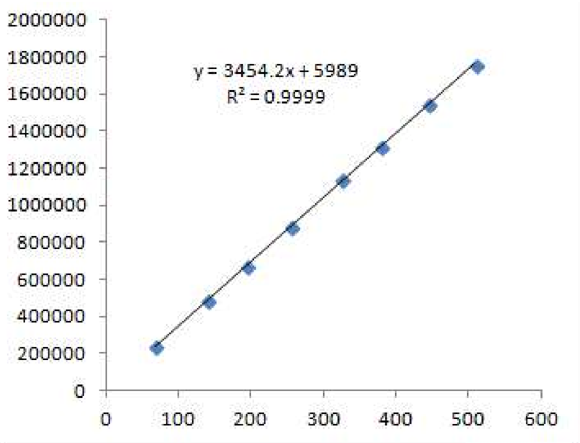
나) 시료에 대한 직선성(Linearity)

(1) 시료를 중량별로 측정하여 전처리한 후 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시료 약 250 mg을 25 ml 용량플라스크에 취해 70% 메탄올을 넣어 용해한 후 검출된 농도 약 20 ug/ml를 목적농도 100%로 설정하여 25~200% 범위에서 3반복 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인할 수 있었다. 기울기 값은 3454.2~110210, R^2는 1회, 2회, 3회 실험 각각 0.9999, 0.9999, 0.9974 순으로 나타났다(표 16~18).

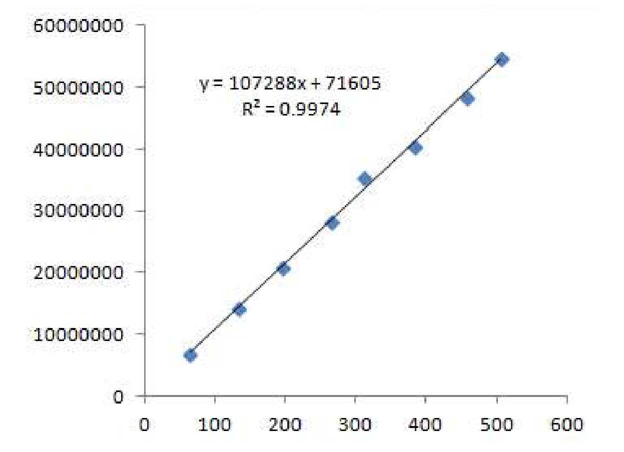
[표 16] 시료를 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

농도(%)	시료채취량 (mg)	면적(area)	검량선
25%	66.4	7144129	
50%	137.6	15002008	
75%	190.3	20579599	
100%	258.0	28021965	
125%	318.7	34676970	
150%	380.0	41639730	
175%	445.7	49191290	
200%	519.3	56832550	
기울기	110210		
y 절편	-269741		
R^2	0.9999		

[표 17] 시료를 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

농도(%)	시료채취량 (mg)	면적(area)	검량선
25%	68.6	240568	
50%	139.4	485306	
75%	194.0	676583	
100%	254.6	883618	
125%	325.6	1138614	
150%	379.7	1318982	
175%	443.5	1546043	
200%	509.1	1752970	
기울기	3454.2		
y 절편	5989		
R^2	0.9999		

[표 18] 시료를 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도(%)	시료채취량 (mg)	면적(area)	검량선
25%	65.2	6898531	
50%	133.4	14381799	
75%	196.8	20854100	
100%	266.3	28232840	
125%	312.5	35554171	
150%	382.6	40578066	
175%	456.8	48356014	
200%	506.9	54678391	
기울기	107288		
y 절편	71605		
R^2	0.9974		

4) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin 분석의 정확성을 측정하기 위해 시료에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하였다. 검출농도를 고려하여 시료 약 250 mg을 취한 후 검출 농도 7.464~29.856 mg/L인 표준용액을 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 분석하였다. 농도별로 3반복씩 진행한 결과, 회수율 평균 98.13~98.37%, 표준편차(SD) 0.26~1.14%, 상대표준편차(RSD)는 0.26~1.15%로 나타났다. 회수율은 전체적으로 100% 가까이의 회수율을 보이므로 분석방법에 문제가 없다고 사료된다 (표 19).

[표 19] 시료 중 표준용액 농도별 회수율 확인

표준물질 (mg/L)	원료+표준물질 (mg/L)	시료 채취량 (mg)	검출농도 (mg/L)	채취량대비 보정농도 (mg/L)	평균농도 (100mg당)
0	-	260.0	22.504	8.66	8.67
		253.4	22.024	8.69	
		266.2	23.081	8.67	

표준물질 (mg/L)	원료+표준물질 (mg/L)	채취량대비 계산농도 (mg/L)	이론농도 (mg/L)	시료 채취량 (mg)	검출농도 (mg/L)	회수율 (%)	회수율 평균 (%)	SD (%)	RSD (%)
7.464	SA+7.464	22.73	30.19	262.1	30.074	99.60	98.37	1.14	1.15
		23.97	31.43	276.4	30.846	98.13			
		24.36	31.82	280.9	30.987	97.37			
14.928	SA+14.928	21.98	36.90	253.4	36.307	98.38	98.13	0.52	0.53
		23.80	38.73	274.4	37.769	97.53			
		24.49	39.42	282.4	38.816	98.47			
29.856	SA+29.856	22.14	52.00	255.3	51.066	98.21	98.16	0.26	0.26
		22.50	52.36	259.5	51.520	98.39			
		24.72	54.57	285.0	53.419	97.89			

5) 정밀도(Precision)

가) 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

(1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin 함량의 분석 재현성 시험을 위해 분석 장비, 분석자와 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였다. 결과는 시료를 5회 반복 전처리 한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 실험 장비는 두 가지(Agilent HPLC 1260 infinity①(KHSI-A-022)과 다른 Agilent HPLC 1260 infinity②(KHSI-A-018))로, 3일간, 두 명의 시험자가 분석하였다. 분석 결과 Nicotiflorin의 평균 함량 2.075 mg/g, 표준편차(SD) 0.102 mg/g, 상대표준편차(RSD)는 4.908%로 나타났다(표 20).

[표 20] 분석일자, 분석자, 분석기기간 Nicotiflorin 함량

	일자	분석자	기기	Nicotiflorin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	2016-05-11	A	Agilent 1260 infinity① (KHSI-A-022)	2.125	2.075	0.102	4.908
2	2016-05-12	A	Agilent 1260 infinity② (KHSI-A-018)	1.958			
3	2016-05-25	B	Agilent 1260 infinity① (KHSI-A-022)	2.142			

나) 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

(1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한번 진행시 각각 6번의 전처리를 진행하여 Nicotiflorin 함량을 측정하였다. 일자를 달리하여 측정한 결과 1.958~2.125 mg/g으로 검출되었고, 최소 1.947~최대 2.151 mg/g, 표준편차(SD) 0.010~0.102 mg/g, 상대표준편차(RSD) 0.523~0.967%로 분석되었다(표 21~23).

[표 21] 분석일 2016년 05월 11일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity①(KHSI-A-022)

	Area	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	Nicotiflorin 함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	28021965	22.166	258.0	2.129	2.125	0.021	0.967
2	29853993	23.624	272.1	2.151			
3	27868098	22.044	261.3	2.090			
4	28298646	22.386	259.4	2.138			
5	27660814	21.879	255.0	2.126			
6	30156079	23.864	279.0	2.119			

[표 22] 분석일 2016년 05월 12일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260 Infinity②(KHSI-A-018)

	Area	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	Nicotiflorin 함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	883618	20.231	254.6	1.969	1.958	0.010	0.523
2	924121	21.157	266.1	1.970			
3	923842	21.151	268.8	1.949			
4	974272	22.303	283.8	1.947			
5	893669	20.461	259.9	1.950			
6	967824	22.156	279.7	1.963			

[표 23] 분석일 2016년 05월 25일, 분석자 B, Agilent HPLC 1260 Infinity①(KHSI-A-022)

	Area	시험용액농도 (ug/ml)	시료채취량 (mg)	Nicotiflorin 함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	28232840	22.883	266.3	1.999	2.011	0.016	0.807
2	27966988	22.667	261.0	2.020			
3	28898397	23.423	269.2	2.024			
4	28309713	22.945	263.0	2.030			
5	28698528	23.261	272.3	1.987			
6	28770400	23.319	270.1	2.008			

6) 범위(Range)

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직선성과 정확도, 정밀도를 고려할 때, 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 분석 농도를 3.95~93.3 mg/L의 범위로 설정하였다.

다. 표준화 확인

1) 원료의 균일성 확인

가) 원재료의 경우 원산지, 채취시기, 채취년도, 제조공정에 따라 원재료의 추출물이 달라질 수 있다. 원료의 기능성을 확보할 수 있도록 생산기반을 마련할 필요가 있다. 원료의 표준화를 위해 원재료뿐만 아니라 제조공정을 표준화해야만이 항상 동질의 원료를 생산할 수 있다(표 24). 본 연구에서는 제조일자를 달리하여 추출한 여러 Lot의 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물에서 기능/지표성분인 Nicotiflorin의 함량을 측정함으로써 원료의 균일성을 확인하고 최종 원료의 표준화 확인을 하였다. 분석 결과, 추출일자가 다름에도 불구하고 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 함량이 일정하게 검출됨을 확인할 수 있었다(표 25). 그러나 원료 특성상 채취시기(년생)가 정해져 있기 때문에 제조일자가 다르다고 하더라도 원재료가 표준화 되었다라고 판단하기는 무리인 것으로 보인다. 따라서 추후 년도, 원산지를 달리하여 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 생산하여 Nicotiflorin의 함량을 측정함으로써 원재료의 표준화 확인을 할 필요가 있으며, 이를 고려하여 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중 Nicotiflorin의 함량 기준 규격을 설정할 필요가 있다고 사료된다.

[표 24] 원재료, 제조공정 표준화시 고려사항

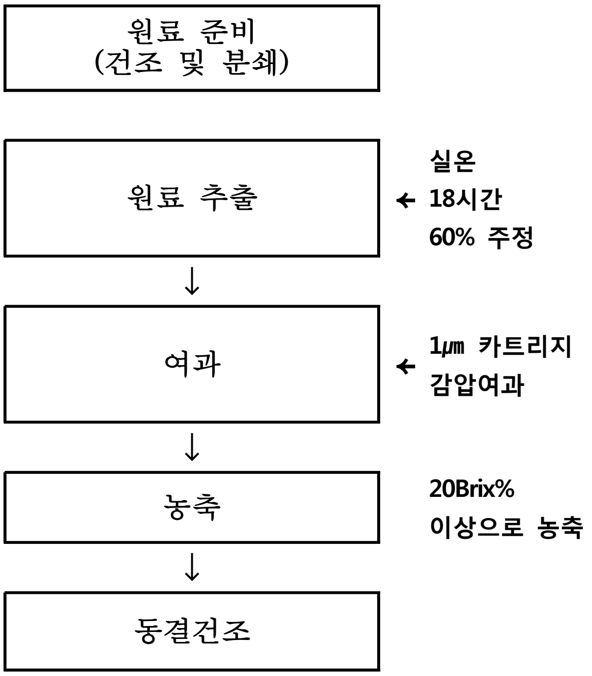
항목	고려해야할 항목	대상 식물
원재료 표준화시 고려사항	원재료 유사종(정확한 종 확인)	선정된 후보식물
	원재료의 부위	
	원산지	
	채취시기(계절)	
	채취시기(년생)	
제조공정 표준화시 고려사항	추출용매	
	추출온도	
	용매비율	
	추출시간	
	추출횟수	
	건조방법	
	원재료 monitoring	

[표 25] 생산 Lot별 Nicotiflorin 함량 분석결과

No.	Lot	Nicotiflorin (mg/g) 함량
1	FERE 2016-4	1.71
2	FERE 2016-5	2.13
3	FERE 2016-6	2.07

2) 제조공정별 기능/지표물질 함량 검토

가) 제조공정 중 기능/지표물질의 함량 변화를 확인하기 위하여 좁은잎천선과나무 잎 원물을 포함한 각각의 제조공정에 따른 추출액 및 농축액을 제공받아 Nicotiflorin의 함량을 측정하였다. 원재료인 원물, 60% 에탄올추출액, 농축액, 동결건조분말에서의 Nicotiflorin의 함량은 각각 0.12 mg/g, 0.02 mg/g, 0.30 mg/g, 1.75 mg/g으로 검출되었다.



[그림 83] 제조공정도

라. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물에 대한 제안 기준・규격

1) 제조방법

가) 원재료 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물

나) 제조공정 : 원재료를 슬라이스하여 주정으로 추출한 후 여과, 농축하여 분말화

2) 기준규격

가) 성상 : 이미・이취가 없고 고유의 향미가 있는 검은갈색의 분말

나) Nicotiflorin 함량 (mg/g) : 1.88mg/g의 80~120% (1.51~2.26)

다) 납(mg/kg) : 1.0 이하

라) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하

마) 총비소(mg/kg) : 1.0 이하

바) 총수은(mg/kg) : 1.0 이하

사) 대장균군 : 음성

3) 시험법

가) 성상

(1) 식품공전 제 9. 일반시험법 9.1 성상시험법(관능시험법)

(2) 한국표준색이름(산업자원부 기술표준원) 참조

나) Nicotiflorin 함량(고속액체크로마토그래피법)

(1) 장비

(가) HPLC System : Agilent 1260 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC, G1315D 1260 DADVL
Quat Pump G1311A, Autosampler G1329, DAD G1315D,
Column Oven G1316A, Degasser G1322A

(나) Analytical Column : Cadenza-CD Imtakt C18(4.6mm × 150mm, 3um)

(2) 시약

(가) Nicotiflorin 표준품: Extrasynthese, Cat.# 1053 S, Lot# 17650-84-9, purity : 93.0512%

(나) 증류수

(다) 메탄올 : Duksan, HPLC급

(라) 아세토니트릴(Burdic & Jackson)

(마) Trifluoroacetic acid(Sigma)

(3) 표준용액 조제

(가) 표준품인 Nicotiflorin 일정량을 70% 메탄올 25 mL로 정용(Stock Solution)한 후 이를 70% 메탄올로 희석하여 사용하였다(Working Solution).

(4) 시험용액 조제

(가) 시료 약 250 mg을 25 mL 정용플라스크에 칭량하여 70% 메탄올에 녹인 후 sonicator에 30분 추출, 정용한다.

(나) 0.45㎛ syringe membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

(5) 분석조건

<table>
<tr><td>Instrument</td><td>Agilent 1260 Infinity</td></tr>
<tr><td>Detector</td><td>DAD detector</td></tr>
<tr><td>Wavelength</td><td>UV 264 nm</td></tr>
<tr><td>Column</td><td>Cadenza CD-C18 Imtakt (150 mm × 4.6 mm, 3 μm)</td></tr>
<tr><td>Mobile Phase</td><td>A: 0.5% Trifluoroacetic acid in DW,
B: 아세토니트릴, Gradient
<table>
<tr><th>min</th><th>이동상 A</th><th>이동상 B</th></tr>
<tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr>
<tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>36</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>40</td><td>90</td><td>10</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Flow rate</td><td>1.0 ml/min</td></tr>
<tr><td>Injection volume</td><td>5 μl</td></tr>
<tr><td>Oven Temperature</td><td>40℃</td></tr>
</table>

(6) 계산

$$\text{Nicotiflorin (mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu g/ml) \times \text{최종량}(ml) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(mg)}$$

다) 납

(1) 식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납(Pb) 1) 시험용액의 조제 가)습식분해법 (2) 마이크로웨이브법

라) 카드뮴

(1) 식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.2 카드뮴(Cd)

마) 총비소

(1) 식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.3 비소(As)

바) 총수은

(1) 식품공전 제9. 일반시험법 7. 식품중 유해물질시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.4 수은(Hg)

사) 대장균군

(1) 식품공전 제9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군 3.7.1. 정성시험 가. 유당배지법

아) 잔류농약

(1) 식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1 식품일반 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법

(2) 식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1 식품일반 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법-제2법

4) 기준·규격 설정 근거

가) 기능/지표물질 규격 설정에 관한 자료

(1) 기능/지표물질의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 주정추출물의 경우는 표시량의 80~120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표물질의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 15.0) One-way ANOVA를 이용하여 각 Lot 간의 평균값(mean), 표준편차(SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한치(Upper Bound)와 하한치(Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다.

나) Nicotiflorin 함량

(1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 기준 규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과(표 26)를 토대로 Nicotiflorin의 함량 범위(표 27, 28)를 구하였다. 전체 평균 ±SD, 평균의 80~120%, 각 Lot별 하한치~상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 1.88mg/g의 80%~120%인 1.51~2.26mg/g으로 설정하였다. 제주테크노파크에서 제공한 3 Lot의 원료 간 Nicotiflorin의 함량은 편차가 거의 없게 나타났으나, 천연물의 경우 원재료 채취 시기, 재배지 등에 따라 편차가 있을 수 있으므로 Lot를 추가적으로 생산하여 추가 검토할 필요가 있다고 사료된다.

[표 26] Lot 별 Nicotiflorin의 함량 분석결과

	Lot No. / 반복수	Lot. FERE 2016-1	Lot. FERE 2016-2	Lot. FERE 2016-3	평균
Nicotiflorin 함량(mg/g)	1	1.93	1.91	1.76	1.88
	2	1.98	1.92	1.77	
	3	1.98	1.91	1.79	
	평균	1.96	1.91	1.77	

[표 27] Lot 별 Nicotiflorin의 함량 범위 결과

Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
FERE 2016-1	0.02887	0.01667	1.93	1.98	1.8916	2.0350
FERE 2016-2	0.00577	0.00333	1.91	1.92	1.8990	1.9277
FERE 2016-3	0.01528	0.00882	1.76	1.79	1.7354	1.8113
전체	0.08689	0.02896	1.76	1.98	1.8165	1.9501

[표 28] Nicotiflorin 함량 범위(요약)

	Nicotiflorin (mg/g) 함량 범위
전체 평균±SD	1.88±0.09(1.77~1.96)
평균의 80~120%	1.51~2.26
최소값~최대값	1.76~1.98

3) 유해물질 규격 설정에 관한 자료

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 식품의약품안전처 고시 제2014-26호 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 [별표 2] 유해물질규격설정항목(제14조제6호 가목 관련)에 준하여 설정하였다. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 경우 좁은잎천선과나무의 잎을 주정으로 추출하여 농축하였으므로 중금속 4종(납, 총비소, 카드뮴, 총수은)과 미생물 중 대장균군을 유해물질규격으로 설정하였다(표 29).

[표 29] 유해물질규격설정항목(식품의약품안전처 고시 제2014-26호 제14조제6호 가목 관련)

원료	항목		규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8㎍/일	
		총비소	< 150㎍/일	
		카드뮴	< 3.0㎍/일	
		총수은	< 2.1㎍/일	
	미생물	대장균군	음성	
		세균수	≤ 100/g	액상제품에 한함
용매를 사용한 원료	잔류용매	헥산	< 0.005g/kg	
		이소프로필알콜	≤ 0.05g/kg	
		초산에틸		
		메틸알콜		
		아세톤	≤ 0.03g/kg	
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	동물용 의약품		「식품의 기준 및 규격」에 따름	
	곰팡이 독소	총아플라톡신 (B_1, B_2, G_1 및 G_2의 합)		
		파튤린		
		오크라톡신		
		기타곰팡이독소		
	방사능 오염	^{131}I		
		$^{134}Cs+^{137}Cs$		

나) 중금속

(1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 중금속 실험을 진행한 결과, 납은 최대 0.0878 mg/kg, 카드뮴은 최대 0.0627 mg/kg, 총비소는 최대 0.1611 mg/kg로 검출되었고 총수은은 최대 0.01 mg/kg로 검출되었다. 원료간 오차, 원료의 1일 최대섭취량, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에서 제안하고 있는 중금속 기준(상한값)을 고려하여 안전성에 문제가 없도록 설정하고자 하였으며, 그 결과 납, 카드뮴, 총비소, 총수은 모두 1.0 mg/kg 이하로 설정하였다.

[표 30] 중금속 분석결과

시 험 항 목		Lot. FERE 2016-1	Lot. FERE 2016-2	Lot. FERE 2016-3
중금속	납(mg/kg)	0.0867	0.0736	0.0878
	카드뮴(mg/kg)	0.0535	0.0578	0.0627
	총비소(mg/kg)	0.1514	0.1611	0.1448
	총수은(mg/kg)	0.006	0.014	0.012

* 최대값을 굵은 글씨로 표시.

[표 31] 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 중금속 규격 상한값

시 험 항 목		규격	상한값(이하)*
중금속	납(mg/kg)	< 10.8㎍/일	10.8㎍/1g
	카드뮴(mg/kg)	< 3.0㎍/일	3.0㎍/1g
	총비소(mg/kg)	< 150㎍/일	150㎍/1g
	총수은(mg/kg)	< 2.1㎍/일	2.1㎍/1g

* 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 섭취량 미정으로 최대섭취량을 1g/일로 계산 단, 섭취량 변경시 검토 필요.

[표 32] 중금속 제안규격

시 험 항 목		제안규격(mg/kg)
중금속	납(mg/kg)	1.0[a)]
	카드뮴(mg/kg)	1.0[b)]
	총비소(mg/kg)	1.0[c)]
	총수은(mg/kg)	1.0[d)]

[a)] 납 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 납을 섭취할 수 있음. 이는 식약처의 가이드라인 범위인 10.8㎍/일 보

다 낮은 섭취 기준임.

[b] 카드뮴 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 카드뮴을 섭취할 수 있음. 이는 식약처의 가이드라인 범위인 3.0㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

[c] 총비소 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 총비소를 섭취할 수 있음. 이는 식약처의 가이드라인 범위인 150㎍/일 보다 낮은 섭취 기준임.

[d] 총수은 : 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0㎍/일의 총수은을 섭취할 수 있음. 이는 식약처의 가이드라인 범위인 2.1㎍/일 보다 낮은 섭취 기준

다) 대장균군

(1) 대장균군은 실험결과 모든 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였다.

[표 33] 대장균군 분석결과

시 험 항 목		Lot. FERE 2016-1	Lot. FERE 2016-2	Lot. FERE 2016-3
미생물	대장균군	음성	음성	음성

[표 34] 대장균군 제안규격

시 험 항 목		제안규격
미생물	대장균군	**음성**

4) 유해물질 규격 미설정에 관한 자료

가) 잔류농약

(1) 잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로 「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등 검사에 관한 규정」 식품의약품안전처고시 제2015-39호 [별표 3] 1. 동시다분석 검사대상: 58종에 대하여 분석하여야 한다. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 원재료인 좁은잎천선과나무 잎의 경우 원재료에 대한 기준이 없지만, 어린잎과 열매는 식용하고 있어 정밀검사 항목 58종에 대하여 분석하였다. 분석결과 정밀검사항목(58종) 중 Chlorpyrifos가 0.0530 mg/kg, Flubendiamide 0.0001 mg/kg, Pyraclostrobin 0.0005 mg/kg으로 검출되었다. Flubendiamide와 Pyraclostrobin은 미량으로 검출된 반면에, Chlorpyrifos는 해당 원재료

에 대한 기준은 없지만 국내 농약잔류허용최저기준(0.01 mg/kg)에 비해 다량 검출되어 다른 Lot를 추가적으로 생산하여 사용하였음(Table 25).

[표 35] 잔류농약 시험항목 및 시험방법

시 험 항 목	시 험 방 법
Atrazine, BHC, Bifenthrin, Captan, Chlorfenapyr, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Cyhalothrin, Cypermethrin, Cyprodinil, DDT, Diazinon, Dichlorvos, Dicofol, Endosulfan, Ethion, Fenarimol, Fenitrothion, Fenpropathrin, Fenvalerate, Fludioxonil, Imazalil, Iprodione, Isoprothiolane, Malathion, Methidathion, Paclobutrazol, Parathion, Parathion-methyl, Permethrin, Phenthoate, Phosmet, Pirimicarb, Pirimiphos-methyl, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Quintozene, Tolclofos-methyl, Triadimefon, Triazophos, Triflumizole, Triflumuron	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1 식품일반 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약 다성분 시험법
Acetamipid, Azoxystrobin, Boscalid, Carbaryl, Carbofuran, Fenhexamid, Flufenoxuron, Methomyl, Methoxyfenozide, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Thiamethoxam, Flubendiamide	식품공전 제9.일반시험법 4.식품 중 잔류농약 분석법 4.1.2 다종농약다성분 분석법 4.1.2.2 다종농약다성분 분석법-제2법

[표 36] 잔류농약(58종) 분석 결과

시 험 항 목	Lot. FERE 2016 분석결과
다이아지논(Diazinon)	불검출
디디티(DDT)	불검출
디코폴(Dicofol)	불검출
디크로보스(Dichlorvos)	불검출
말라치온(Malathion)	불검출
메소밀(Methomyl)	불검출
메톡시페노자이드(Methoxyfenozide)	불검출
메티다치온(Methidathion)	불검출
보스칼리드(Boscalid)	불검출
비에치씨(BHC)	불검출

비펜스린(Bifenthrin)	불검출
싸이퍼메쓰린(Cypermethrin)	불검출
싸이프로디닐(Cyprodinil)	불검출
싸이할로쓰린(Cyhalothrin)	불검출
아세타미프리드(Acetamiprid)	불검출
아족시스트로빈(Azoxystrobin)	불검출
아트라진(Atrazine)	불검출
에치온(Ethion)	불검출
엔도설판(Endosulfan)	불검출
이마자릴(Imazalil)	불검출
이소프로치오란(Isoprothiolane)	불검출
이프로디온(Iprodione)	불검출
카바릴(Carbaryl)	불검출
카보후란(Carbofuran)	불검출
캡탄(Captan)	불검출
퀸토젠(Quintozene)	불검출
클로로타로닐(Chlorothalonil)	불검출
클로르피리포스(Chlorpyrifos)	0.0530 mg/kg
클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl)	불검출
클로르훼나피르(Chlorfenapyr)	불검출
톨크로포스-메칠(Tolclofos-methyl)	불검출
트리아디메폰(Triadimefon)	불검출
트리아조포스(Triazophos)	불검출
트리프루미졸(Triflumizole)	불검출
트리플루무론(Triflumuron)	불검출
티아메톡삼(Thiamethoxam)	불검출

파라치온(Parathion)	불검출
파라티온-메틸(Parathion-Methyl)	불검출
파클로부트라졸(Paclobutrazol)	불검출
퍼메쓰린(Permethrin)	불검출
페나리몰(Fenarimol)	불검출
페니트로치온(Fenitrothion)	불검출
펜발러레이트(Fenvalerate)	불검출
펜토에이트(Phenthoate)	불검출
펜프로파스린(Fenpropathrin)	불검출
펜헥사미드(Fenhexamid)	불검출
포스메트(Phosmet)	불검출
프로시미돈(Procymidone)	불검출
프로클로라즈(Prochloraz)	불검출
프로페노포스(Profenofos)	불검출
플루벤디아마이드(Flubendiamide)	0.0001mg/kg
플루페녹수론(Flufenoxuron)	불검출
피라크로스트로빈(Pyraclostrobin)	0.0005mg/kg
피리메타닐(Pyrimethanil)	불검출
피리미카브(Pirimicarb)	불검출
피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl)	불검출
후루디옥소닐(Fludioxonil)	불검출
디메토에이트(Dimethoate)	불검출

마. 영양성분 분석

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물에 대한 영양성분분석은 표 37과 같다.

[표 37] 영양성분 시험방법 및 결과

시험항목	시 험 방 법	결 과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 제9.일반시험법 1.식품성분시험법 1.1.6 열량의 계산	324.81
탄수화물 (%)	식품공전 제9.일반시험법 1.1 일반성분시험법	57.74
조단백질 (%)	식품공전 제9.일반시험법 1.식품성분시험법 1.1.3.1 총질소 및 조단백질	10.21
조지방 (%)	식품공전 제9.일반시험법 1.식품성분시험법 1.1.5.1 조지방	5.89
수분 (%)	식품공전 제9.일반시험법 1.식품성분시험법 1.1.1 수분	6.94
회분 (%)	식품공전 제9.일반시험법 1.식품성분시험법 1.1.2 회분	19.22
나트륨 (mg/100g)	식품공전 제9.일반시험법 1.2미량영양성분시험법 1.2.1.6 무기성분	750.58

6. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재의 안정성 확보

가. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 제조 및 시제품 생산

1) 좁은잎천선과나무 잎 대량생산 조건에 따른 주정추출물제조 : 2차년도에 확립된 대량생산 조건에 따라 건조된 좁은잎천선과나무 잎 50 kg와 60% 주정 1000 L을 추출기에 넣고 18 시간 동안 추출하고 여과 후 여액을 감압농축시킴. 농축액을 동결 후 동결건조기로 건조 시켜 분말화하여 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물(4.7 kg)을 확보하였음.

[그림 84] 대량생산 공정도

2) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 성분분석 결과

분석항목	분석결과 분석	비 고(%영양소기준치)
열량	329.3 kcal / 100g	
탄수화물	52.2 g / 100g	
당류	46.5 g / 100g	
단백질	7.0 g / 100g	
지방	10.2 g / 100g	
포화지방	5.6 g / 100g	
트랜스지방	0.0 g / 100g	
콜레스테롤	0.0 mg / 100g	
나트륨	894.3 mg / 100g	

3) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 기준규격확인 : 대량생산공정에 따라 생산된 추출물이 규격에 적합한지 성상과 시험법 검토에 따라 확립된 시험법으로 지표성분인(Nicotiflorin) 함량를 확인한 결과, 성상은 짙은갈색 분말, 대장균군은 음성, 지표성분함량은 1.74 mg/g 으로 기준규격에 “적합”하였고, 이 추출물을 타블렛 시제품 제조에 사용하였음.

시험항목	시험방법	규 격 좁은잎천선과나무 잎 주정추출분말
성 상	-	짙은갈색 분말
대장균군	식품공전	음성
지표성분함량	(주)1	1.74 mg/g
지표성분함량범위 (80% ~ 120%)	-	1.88 mg/g(1.51 mg/g ~ 2.26 mg/g)
사 진		

(주)1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 지표성분 고속액체크로마토그래프 측정 예

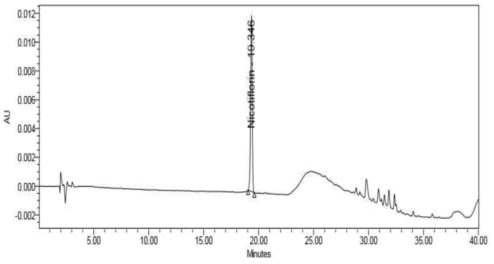
[(주)1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 지표성분 고속액체크로마토그래프 측정예]

○ 고속액체크로마토그래프 분석조건

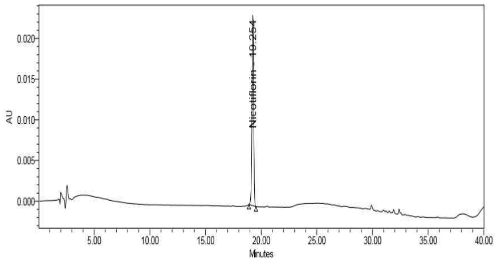
분석조건	
시험용액 및 표준용액	• 시험용액 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 70% 메탄올에 녹여 1만 ppm(250 mg/25 mL)으로 제조하고 30분간 초음파추출 후 실온에서 방냉 후 0.45 ㎛ syringe filter(PTFE)로 여과 후 시험용액으로 사용함. • 표준용액(Nicotiflorin) : Nicotiflorin(Extrasynthese, 1053s)을 HPLC급 70% 메탄올에 녹여 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 ppm으로 희석하여 표준용액을 제조하여 사용함.
분석기기	Waters Alliance HPLC 2695/996
검출파장	264 nm
컬럼 및 온도	Imtakt Cadenza C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 ㎛, 40 ℃
이동상조건	A : 0.5 % Trifluoroacetic acid in D.W B : Acetonitrile
유속	1.0 mL/min
주입 용량	5 ㎕

Time(min)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
20.0	80	20
30.0	20	80
35.0	20	80
36.0	90	10
40.0	90	10

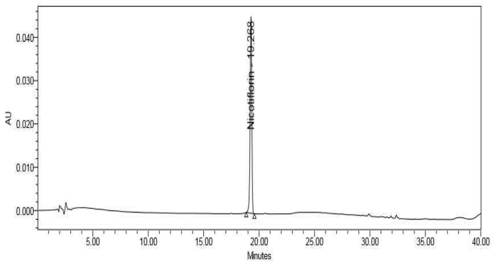
○ Standard chromatograph 및 Calibration Curve



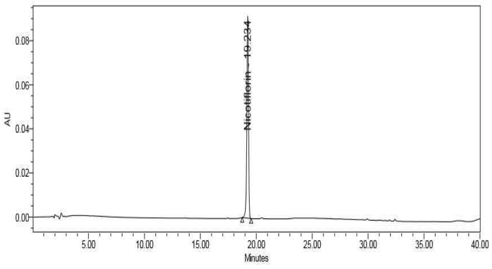
12.5 ppm



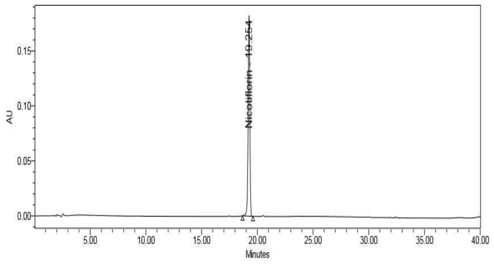
25 ppm



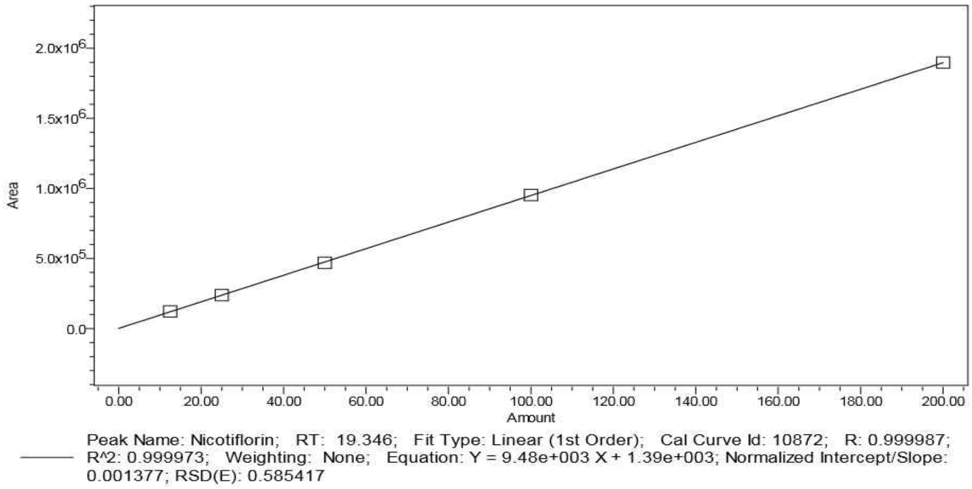
50 ppm



100 ppm



200 ppm

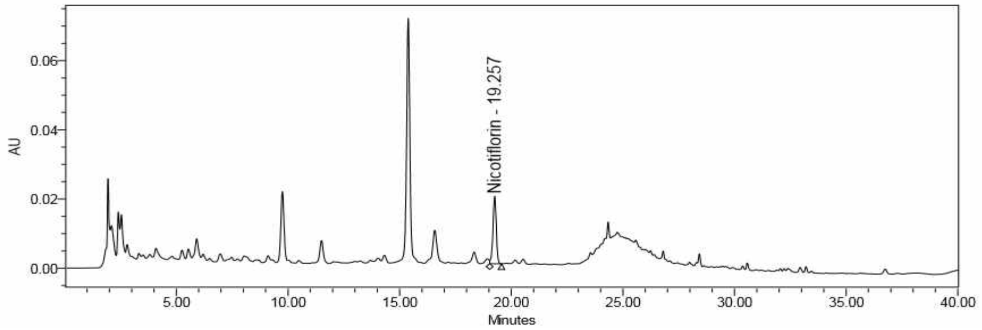


Calibration Curve

$$\text{Nicotiflorin(mg/g)} = \frac{\text{검량선결과}(\mu g/mL) \times \text{최종량}(mL) \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량}(mg)}$$

계산식

○ Sample chromatograph



좁은잎천선과나무 잎 주정추출물

4) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 생산 : 대량생산공정에 따라 생산된 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출물을 사용하여 2차년도 유형별 제품 및 소비자선호도 평가결과를 바탕으로 타블렛 제품을 선정하여 생산하였음. 또한, 시작품(1차)에 적용된 레시피 중 일부 원료의 배합비율과 함량을 변경·적용하여 시제품(2차)을 생산하였고, 이 시제품을 안정성 연구에 사용하였음.

가) 시제품 레시피 및 시제품사진

500 T / 100 mg

원료명	배합비 (%)	함량 (mg)	사용목적
좁은잎천선과나무잎 주정추출분말	20.0	100.0	기능성확인목적
결정셀루로오스	29.5	147.5	부형제
덱스트린	39.1	195.7	부형제
유당	5.5	27.5	부형제
스테아린산마그네슘	1.5	7.5	부형제
이산화규소	1.5	7.5	부형제
청색소(코팅제포함)	2.9	14.3	인체적용시험제품제작시 첨가 (시험/플라시보 같은 형태/색상)
합계	100	500	

타블렛 시작품 제작사진(1차)

타블렛 시제품 제작사진(2차)

나. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 안정성 연구

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 : 대량생산조건으로 생산된 Lot별 주정추출물

2) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 안정성평가방법

가) 성상 : 육안관찰

나) 미생물검사(식품공전) : 일반세균, 대장균군

다) 지표성분(Nicotiflorin) : 고속액체크로마토그래프(HPLC)을 이용하여 원료소재에 함유하고 있는 지표성분 함량을 측정함.

3) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 안정성연구평가 세부사항

가) 가속시험▶ 성상, 미생물(대장균 및 세균), 지표성분 등 필요항목 6개월간 실시

(1) 시험기간 : 6개월간 실시(6개월간 6회 측정)

(2) 보존조건 : 40 ℃, 80 % RH이상

나) 안정성 평가기준

시험항목	시험방법	규 격		
		주정추출분말 Lot.1	주정추출분말 Lot.2	주정추출분말 Lot.3
		HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성 상	-	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	식품공전	음성	음성	음성
지표성분함량	(주)1	1.94 mg/g	1.92 mg/g	1.76 mg/g
지표성분함량범위 (80% ~ 120%)	-	1.88 mg/g(1.51 mg/g ~ 2.26 mg/g)		
사 진	-			

4) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 가속시험을 통한 안정성 실험결과

가) 1차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.03.09.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성 상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.94	1.92	1.76
비고			

나) 2차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.04.11.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성 상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.89	1.89	1.69
비고			

다) 3차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.05.09.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성 상	길은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.88	1.86	1.70
비고			

라) 4차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.06.08.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성 상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.83	1.80	1.63
비고			

마) 5차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.07.11.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성　　상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.79	1.77	1.60
비고			

바) 6차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.08.11.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성　　상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.80	1.78	1.57
비고			

사) 7차 가속시험

(1) 제 조 일: 2016.03.09.

(2) 보존조건: 40℃, 80% RH 이상

(3) 시 험 일: 2016.09.07.

제조번호 / 시험항목	HJ-160309-60%E-L1	HJ-160309-60%E-L2	HJ-160309-60%E-L3
성　　상	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말	짙은갈색 분말
대장균군	적합	적합	적합
지표성분함량(mg/g)	1.77	1.76	1.56
비고			

◎ 안전성시험결과(6개월 측정 결과)

- 1개월 단위로 6개월간 가속조건으로 좁은잎천선과 잎 주정추출물에 대하여 안정성시험을 진행한 결과
  - 성상의 경우 초기성상인 짙은갈색분말과 큰 차이가 없었음.
  - 대장균군 검사결과 식품공전상에 의거하여 결과 값이 “0” 으로 “적합”하였음.
  - 지표성분함량측정결과 지표성분함량범위인 1.51 mg/g ~ 2.26 mg/g 함량내에 함유하고 있어 “적합”하였음.

다. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 산도변화에 따른 지표성분 가공 안정성 연구

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 가공조건

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 액상시료제조 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 20 g을 2000 mL 용량플라스크에 넣어 증류수 2/3가량 넣고 30분간 초음파추출 후 실온에서 방냉 후 정용하여 시료을 제조하여 비가열 및 가열조건 산도별 가공안정성시료제조용으로 사용함.

나) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 비가열조건 산도별 시료제조 : 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출물 1000 mL을 식품첨가물인 구연산(30 % Citric acid)과 가성소다(10 % NaOH)을 사용하여 각 산도별로 pH 2, 4, 6, 8, 10으로 제조하여 가공안정성시료로 사용함.

다) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 가열조건 산도별 시료제조 : 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출물 1000 mL을 식품첨가물인 구연산(30 % Citric acid)과 가성소다(10 % NaOH)을 사용하여 각 산도별로 pH 2, 4, 6, 8, 10으로 제조하고 항온수조에서 90 ℃, 30 분간 가열처리 후 실온에서 방냉 후 가공안정성시료로 사용함.

2) 비가열처리조건

가) 산도조건(pH) : 2, 4, 6, 8, 10

나) 보존조건(실온) : 1시간, 4시간, 24시간

[mg/g]

산도(pH) / 보존시간(실온)	2	4	6	8	10
초기	1.65(1.32 ~ 1.98)				
1 시간	1.64	1.65	1.65	1.62	1.54
4 시간	1.63	1.63	1.62	1.52	1.43
24 시간	1.64	1.64	1.56	1.29	1.26
비 고	초기성분측정값의 평균의 80~120%				

3) 가열처리조건

가) 산도조건(pH) : 2, 4, 6, 8, 10

나) 보존조건(실온) : 1시간, 4시간, 24시간

보존시간(실온) \ 산도(pH)	2	4	6	8	10
초기	1.65(1.32 ~ 1.98)				
1 시간	1.61	1.65	1.54	1.42	1.39
4 시간	1.62	1.63	1.53	1.40	1.37
24 시간	1.56	1.63	1.53	1.24	1.16
비 고	초기성분측정값의 평균의 80~120%				

4) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 가공시 산도변화에 따른 지표성분 가공안정성연구

- 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 가공안정성 검토를 위해 산도별(pH), 가열 및 비가열처리를 하여 안정성 시험을 진행한 결과
  - 비가열처리한 조건에서 pH 2, 4, 6 / 24시간까지 보존한 조건의 경우 지표성분의 함량이 측정범위 안에 존재하였지만, pH 8, 10 조건에서 보존한 조건의 경우 지표성분함량은 시간이 지남에 따라 지표성분함량의 범위를 벗어(감소)나는 경향을 보임.
  - 90 ℃, 30분간 가열처리한 조건에서 비가열처리한 조건과 유사한 경향으로 pH 2, 4, 6 / 24시간까지 보존한 조건의 경우 지표성분의 함량이 측정범위 안에 존재하였지만, pH 8, 10 조건에서 보존한 조건의 경우 지표성분함량은 시간이 지남에 따라 지표성분의 범위를 벗어(감소)나는 경향을 보임.
  - 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 지표성분의 경우 산성에서 안정한 결과를 보이는 반면, 알칼리(pH 8, 10)에서 불안정한 결과 보이고 있으며, 90 ℃, 30분간 가열처리 했을 시 큰 영향은 없는 결과를 보임.

라. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 안정성 연구

1) 좁은잎천선과나무 잎 타블렛 시제품 안정성 연구 : 대량생산공정으로 생산된 좁잎천선과나무 잎 주정추출물을 사용하여 생산된 타블렛 시제품(2차)을 안정성 연구에 사용하였고, 안정성 시험세부항목과 평가기준은 다음과 설정하였음.

가) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 안정성연구 시험항목

(1) 성상 : 육안관찰

(2) 미생물검사(식품공전) : 일반세균, 대장균군

(3) 지표성분(Nicotiflorin) : 고속액체크로마토그래프(HPLC)을 이용하여 원료소재에 함유하고 있는 지표성분 함량을 측정함.

(4) 붕해도검사(대한약전) : 60분 이내

(5) 시험기간 : 12개월간 실시(12개월간 7회 측정)

(6) 보존조건 : 25 ℃, 40 ℃(80 % RH이상)

나) 안정성 평가기준

시험항목	시험방법	규 격
		좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛
성 상	-	청색의 타원형코팅정제
대장균군	식품공전	음성
지표성분함량	(주)2	0.350 mg/g
지표성분함량범위 (80% ~ 120%)	-	0.376 mg/g(0.301 mg/g ~ 0.451 mg/g)
붕해도	대한약전	60분 이내
사 진	-	

(주)2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 지표성분 고속액체크로마토그래프 측정 예

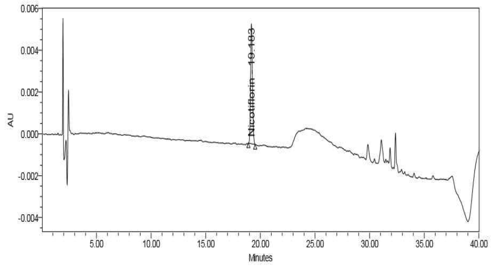
[(주)2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 지표성분 고속액체크로마토그래프 측정예]

○ 고속액체크로마토그래프 분석조건

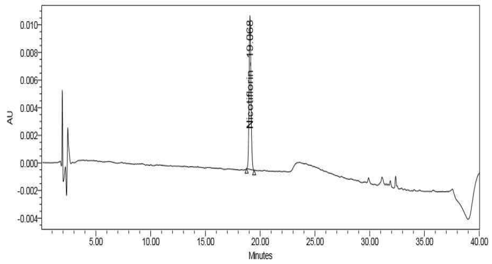
분석조건	
시험용액 및 표준용액	• 시험용액 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 20알을 분쇄하여 약 500 ~ 600 mg을 무게칭량 후 70% 메탄올 15 mL을 넣어 30분간 초음파추출함. 추출완료 후 실온에서 방랭하고 25 mL로 정용하여 0.45 ㎛ syringe filter(PTFE)로 여과 후 시험용액으로 사용함. • 표준용액(Nicotiflorin) : Nicotiflorin(Extrasynthese, 1053s)을 HPLC급 70% 메탄올에 녹여 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 ppm으로 희석하여 표준용액을 제조하여 사용함.
분석기기	Waters Alliance HPLC 2695/996
검출파장	264 nm
컬럼 및 온도	Imtakt Cadenza C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 ㎛, 40 ℃
이동상조건	A : 0.5 % Trifluoroacetic acid in D.W B : Acetonitrile (see gradient table below)
유속	1.0 mL/min
주입 용량	5 ㎕

Time(min)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
20.0	80	20
30.0	20	80
35.0	20	80
36.0	90	10
40.0	90	10

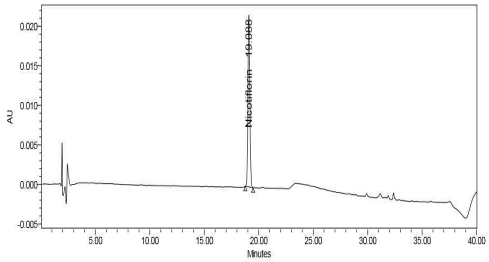
○ Standard chromatograph 및 Calibration Curve



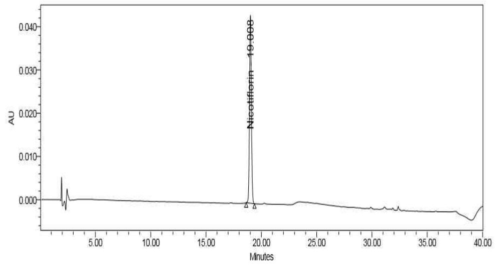
6.25 ppm



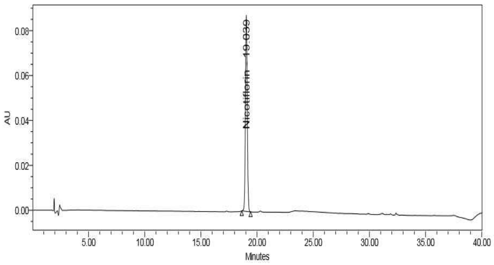
12.5 ppm



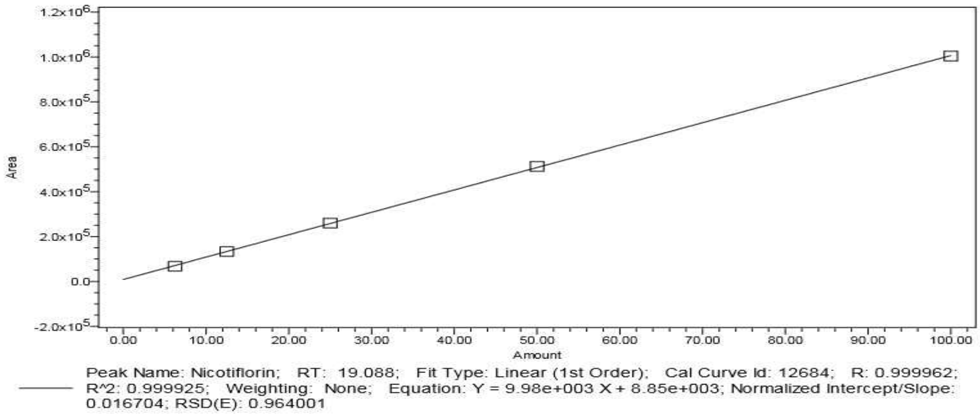
25 ppm



50 ppm



100 ppm

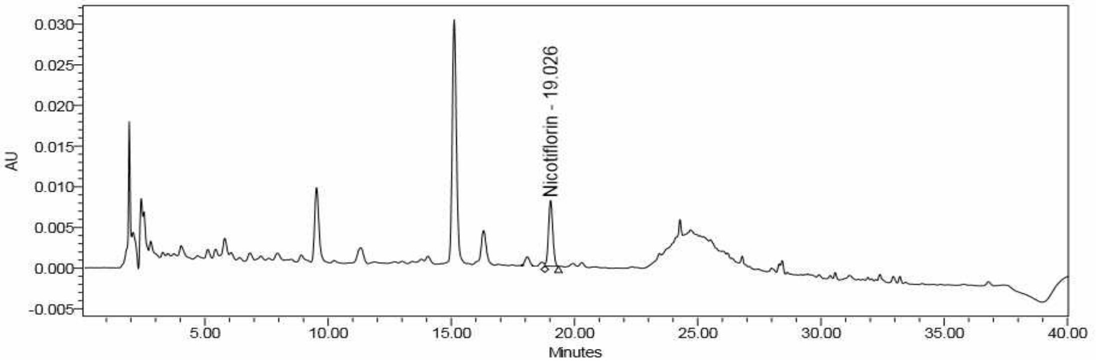


Calibration Curve

$$\text{Nicotiflorin(mg/g)} = \frac{\text{검량선결과(μg/mL)} \times \text{최종량(mL)} \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

계산식

○ Sample chromatograph



좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛

마. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 안정성 시험결과

1) 1차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2016.12.14.

제조번호 / 시험항목	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.349	0.352	0.349
함량평균(mg/g)	0.350		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
제조번호 / 시험항목	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.349	0.352	0.349
함량평균(mg/g)	0.350		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

2) 2차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.02.14.

시험항목 \ 제조번호	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.354	0.350	0.349
함량평균(mg/g)	0.351		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
시험항목 \ 제조번호	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.350	0.350	0.349
함량평균(mg/g)	0.350		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

3) 3차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.04.14.

시험항목 \ 제조번호	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.348	0.349	0.345
함량평균(mg/g)	0.347		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
시험항목 \ 제조번호	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.344	0.345	0.345
함량평균(mg/g)	0.345		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

4) 4차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.06.14.

시험항목 \ 제조번호	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.350	0.349	0.353
함량평균(mg/g)	0.351		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
시험항목 \ 제조번호	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.343	0.341	0.344
함량평균(mg/g)	0.343		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

5) 5차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.08.14.

시험항목 \ 제조번호	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.337	0.338	0.337
함량평균(mg/g)	0.337		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
시험항목 \ 제조번호	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.331	0.331	0.329
함량평균(mg/g)	0.330		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

6) 6차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.10.12.

제조번호 / 시험항목	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.329	0.328	0.329
함량평균(mg/g)	0.329		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
제조번호 / 시험항목	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.323	0.322	0.325
함량평균(mg/g)	0.323		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

7) 7차 안정성시험

가) 제조일자: 2016.12.14.

나) 보존조건: 25℃, 40℃ (80% RH 이상)

다) 시험일자: 2017.12.14.

제조번호 / 시험항목	25 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.323	0.325	0.327
함량평균(mg/g)	0.325		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내
제조번호 / 시험항목	40 ℃ 보존조건		
	HJ-161214-60%E-S1	HJ-161214-60%E-S2	HJ-161214-60%E-S3
성 상	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제	청색의 타원형코팅정제
대장균군	음성	음성	음성
지표성분함량(mg/g)	0.323	0.324	0.325
함량평균(mg/g)	0.324		
붕해도	60분 이내	60분 이내	60분 이내

◎ 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품(2차) 안정성시험결과

- 2개월 단위로 총 12개월간 실온조건과 가속조건으로 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품(2차)에 대하여 안정성시험을 진행한 결과,
  - 성상의 경우 초기성상인 청색의 타원형코팅정제로 큰 차이가 없었음.
  - 대장균군 검사결과가 식품공전상에 의거하여 결과 값이 "음성"으로 "적합"하였음.
  - 지표성분함량측정결과가 타블렛 시제품 지표성분함량범위인 0.301 mg/g ~ 0.451 mg/g 함량내에 함유하고 있어 "적합"하였음.
  - 붕해도 검사결과가 대한약전상에 의거하여 시험결과가 60분 이내에 모두 충족하여 "적합"하였음.

바. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 품질평가

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 생산 : 개발제품인 타블렛 제품를 동일한 공정으로 생산 후 품질규격에 맞는지 확인하기 위한 목적으로 2차년도에 설정된 제안규격인 성상, 대장균군(일반세균), 지표성분함량(Nicotiflorin), 중금속(납, 카드뮴, 비소, 수은) 시험항목 대하여 품질평가를 진행하였음.

2) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 제조 : 좁은잎천선과 잎 주정추출물을 확립된 대량생산 공정을 통하여 추출물을 제조하고, 성상, 대장균군 및 지표성분함량(Nicotiflorin)를 확인한 결과, 기준규격에 "적합"하였으며, 추출물에 대한 결과는 아래 표와 같음.

시험항목	시험방법	규 격 좁은잎천선과나무 잎 주정추출분말
성 상	-	짙은갈색 분말
대장균군	식품공전	음성
지표성분함량	(주)1	2.10 mg/g
지표성분함량범위 (80% ~ 120%)	-	1.88 mg/g(1.51 mg/g ~ 2.26 mg/g)
사 진		

3) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 생산 : 대량생산공정을 통하여 확보한 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 사용하여 타블렛 시제품(3차) 생산하였음. 성상 및 미생물(대장균군, 일반세균), 지표성분함량(Nicotiflorin), 중금속(납, 카드뮴, 비소, 수은) 시험항목에 대하여 품질평가 진행하였으며, 중금속규격의 함량결과는 공인시험분석기관을 통하여 성적서를 확보하였음. 타블렛 시제품에 대한 결과는 아래 표와 같음.

<table>
<tr><th rowspan="2">시험항목</th><th rowspan="2">시험방법</th><th colspan="2">규 격</th></tr>
<tr><th colspan="2">좁은잎천선과 잎 주정추출물 타블렛</th></tr>
<tr><td>성 상</td><td>-</td><td colspan="2">청색의 타원형코팅정제</td></tr>
<tr><td>대장균군</td><td>식품공전</td><td colspan="2">음성</td></tr>
<tr><td>지표성분함량</td><td>(주)2</td><td colspan="2">0.393 mg/g</td></tr>
<tr><td>지표성분함량범위
(80% ~ 120%)</td><td>-</td><td colspan="2">0.376 mg/g(0.301 mg/g ~ 0.451 mg/g)</td></tr>
<tr><td>붕해도</td><td>대한약전</td><td colspan="2">60분 이내</td></tr>
<tr><td rowspan="4">중금속
(mg/kg)</td><td rowspan="4">식품공전</td><td>납</td><td>1.0 이하</td></tr>
<tr><td>카드뮴</td><td>1.0 이하</td></tr>
<tr><td>비소</td><td>1.0 이하</td></tr>
<tr><td>수은</td><td>1.0 이하</td></tr>
<tr><td>사 진</td><td>-</td><td colspan="2"> </td></tr>
</table>

(주)2. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품 지표성분 고속액체크로마토그래프 측정 예와 같음.

4) 공인시험기관 분석 : 식품의약품안전처의 공인시험분석기관 성적서 확보

○ 대장균군 및 중금속 공인성적서

시험 · 검사성적서

atc

발행번호	R20171031-0066	접수번호	170304822-002
검사완료일	2017-10-30	접수연월일	2017-10-18
제품명	[illegible]		
유형 · 재질 · 품목명	기타		
시험 · 검사목적	식품 (기타(자체확인용))		

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
대장균군	기준없음	음성	상기실험확인함	
납(mg/kg)	기준없음	0.05	상기실험확인함	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.03	상기실험확인함	
수은(mg/kg)	기준없음	0.00	상기실험확인함	
비소(mg/kg)	기준없음	0.01	상기실험확인함	

종합판정 : 상기실험확인함

비고 :

2017년10월31일

(주)오에이티씨

[그림 85] 대장균군 및 중금속 공인시험성적서

4) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품(3차) 품질평가결과

- 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 타블렛 시제품(3차)에 대한 품질평가결과,
  - 대장균군 검사결과가 식품공전상에 의거하여 결과 값이 “음성”으로 “적합”하였음.
  - 지표성분함량측정결과가 지표성분함량범위인 0.301 mg/g ~ 0.451 mg/g 함량내에 함유하고 있어 “적합”하였음.
  - 붕해도 검사결과가 대한약전상에 의거하여 시험결과가 60분 이내에 모두 충족하여 “적합”하였음.
  - 중금속 시험결과가 공인시험분석에 의거하여 납, 카드뮴, 수은, 비소의 결과가 1.0 mg/kg 이하에 모두 충족하여 “적합”하였음.

7. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구 - 1차 제형

가. 음료제형

1) 음료제품의 제형특성 및 제형 1차 제작

가) 궁극적으로 소비자들이 가장 선호하는 타입인 혼합음료 제형으로 병, 파우치 등 다양한 형태로 제작할수 있으며, 본 제형연구 및 제품제작에 있어서는 100ml 파우치 제품을 기준으로 하여 추진하였음. 혼합음료 제품의 경우 주원료인 좁은잎천선과 잎 주정추출분말 1일 복용기군인 200mg을 기준으로 하여 아래와 같이 레시피를 1차로 완성하였음.

나) (혼합)음료제형의 1차 레시피

성 분 명	배합비(%)	비고
좁은잎천선과나무잎 주정추출분말	0.2	1일복용=200mg
사과농축액	5.0	
기타(6종)	10.3	
정제수	84.5	
계	100.0	

다) (혼합) 음료 제형 1차 제작사진

[그림 86] 음료제형제작사진

라) 음료제품의 특징

(1) 음료제형으로 파우치 용기 100ml 용을 이용한 연구진행 및 제품을 1차 제작하였음.

(2) 주원료인 좁은잎천선과 잎 주정추출분말 1일 섭취량인 200mg이 되도록 제형연구 및 레시피를 개발하여 1차 제품을 제작하였음.

(3) 제작음료 : 11.2 brix, pH 3.62 임. 색도 및 점도는 아래의 표와 같음

항목	5 brix	비고
L*	20.14	
a*	-0.77	
b*	2.44	

☞ 측정방법 : 시료 15mL를 액상측정용 cell에 넣은 후, 색도색차계(ModelCR-410, Minolta, Japan)를 이용하여 L*(lightness),a*(redness)및 b*(yellowness) 값을 측정하였고, 9회 반복 시험하여 색도의 변화정도를 측정하고, 그 평균값으로 나타내었다. /HunterL*a*bvalue L명도/a적색도/b황색도, L:0~100 0~ 검정 ~100 백색 / a:+적색,-녹색 / b:+노랑,-파랑

Spindle NO.	RPM	%(토크)	CP	샘플온도
ULA-35(E)Y	60	47.30%	4.73	24.8

☞ 측정방법 : 시료의 점도는 회전점도계(DV-ii viscometer LV, brookfield, USA)를 이용하여, Spindle ULA-35(E)Y, 60 rpm, 25℃로 setting하여 측정하였다. 측정 방법으로는 시료 16mL를 Ultra Low Adaptor를 이용하여 sample chamber에 담아 측정하였다.

2) 음료제품의 가속시험을 통한 안정성평가

가) 식품의 유형 : 혼합음료

나) 제품의 특징 : 100ml 파우치 제품

다) 제조 년・월・일 : 2015. 06. 15.

라) 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

마) 가속시험 : 2~3개월(1개월단위)

바) 평가항목 및 내용

시험항목	평가방법	제조번호			평가기준
		sample 1	sample 2	sample 3	
성상	육안	*	*	*	짙은갈색
대장균군	식품공전	*	*	*	불검출
세 균	식품공전	*	*	*	불검출

3) 1차 음료제품의 안정성 검사(가속시험을 통한 안정성 평가)

가) 1차 가속시험: 2015. 06. 17.

제조번호 시험항목	HR-20150615-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합

나) 2차 가속시험: 2015. 07. 16.

제조번호 시험항목	HR-20150615-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합

다) 3차 가속시험: 2015. 08. 17.

제조번호 시험항목	HR-20150615-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합

라) 4차 가속시험: 2015. 09. 16.(예정)

제조번호 시험항목	HR-20150615-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합

나. 타블렛 제형

1) 타블렛 제품의 제형특성 및 제형 1차 제작

가) 휴대하기가 편리하고 소비자가 선호하는 제형중의 하나인 타블렛 제형연구를 추진하였음.

나) 타블렛 제형의 1차 레시피

원료명	함량(mg)	함량비율(%)	사용목적
좁은잎천선과나무잎 주정추출분말	200.0	20.0	기능성확인목적
결정셀룰로오스	395.0	39.5	부형제
텍스트린	*	*	부형제
기타(유당 외)	*	*	부형제
합 계	1,000	100.0	

다) 타블렛 제형 1차 제작사진(개/병)

[그림 87] 타블렛 제형 제작사진

2) 타블렛 제품의 1차 안정성 검사

가) 1차 가속시험

(1) 제조일자: 2015. 06. 16.

(2) 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

(3) 가속시험 1차 시험일 : 2015. 06. 17.

제조번호 / 시험항목	HR-20150616-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

나) 2차 가속시험: 2015. 07. 17.

제조번호 시험항목	HR-20150616-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

다) 3차 가속시험(예정일 : 2015. 08. 18.)

제조번호 시험항목	HR-20150616-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

라) 3차 가속시험(예정일 : 2015. 09. 17.)

제조번호 시험항목	HR-20150616-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

나. 환 제형

1) (대)환 제품의 제형특성 및 1차 제형 연구

2) 환제품의 경우, 좁은잎천선과 잎 주정추출분말 외에도 기존에 환 제품 원료소재로 많이 이용되고 있는 기본 원료 소재를 이용하여 제형연구를 추진하였음. 일반적인 환 제품이 아닌 대환제품의 제형연구를 추진하였음.

3) 환 제형의 1차 레시피

원 재 료 명	배합비(%)	함량(mg)
좁은잎천선과나무잎 주정추출분말	5	200
벌꿀	45	1,800
결정셀룰로오스분말	20	800
기타	30	1,200
계	100.0	4,000

4) 환 제조방법

가) 기준 및 규격에 적합한 원료 구입 및 선별

나) 상기의 배합비율에 따라 칭량

다) 원료를 스쿠류반죽기에 넣고 반죽한 다음, 장 환기에 넣어서 환주를 형성한 후 제환기에 넣어 규격에 맞는 환을 제작

라) 당의팬에 넣어 둥근 환 모양으로 성형 및 코팅

마) 성형이 완료된 제품을 건조기에 넣고 건조

바) 건조된 환은 (반)제품으로 용도에 따라 포장

사) (대)환 제형 1차 제작사진

[그림 88] 환 제형 제작사진

4) 환 제형 제품의 안정성검사

가) 검사항목 : 성상, 이물, 수분함량(참고사항)

나) 검사방법 : 식품공전

다) 검사기간 : 1차 제형연구로 가속조건하에서 3개월

라) 규격

시험항목	시험방법	규 격	비 고
성 상	-	갈색	
이 물	-	불검출	
참 고			

5) 환 제형 1차 안정성 검사

가) 1차 가속시험

(1) 제조 년・월・일 : 2015. 06. 17.

(2) 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상

(3) 가속시험 1차 시험일 : 2015. 06. 18.

제조번호 / 시험항목	HR-20150617-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
이 물	적합	적합	적합
참 고	-	-	-

나) 2차 가속시험(실험일 : 2015.07.17.)

제조번호 / 시험항목	HR-20150617-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
이 물	적합	적합	적합
참 고	-	-	-

다) 3차 가속시험(실험예정일 : 2015.08.17.)

제조번호 / 시험항목	HR-20150617-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
이 물	적합	적합	적합
참 고	-	-	-

라) 4차 가속시험(실험예정일 : 2015.09.17.)

제조번호 / 시험항목	HR-20150617-R1		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
이 물	적합	적합	적합
참 고	-	-	-

8. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 원료소재 활용 제형연구 - 2차 제형

가. 수행계획

1) 개발 목표 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 건강기능식품 소재로 활용하여 상품화에 적용하기 위한 제형별 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 함,

2) 개발 내용 : 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물을 건강기능식품 주원료로 하여 시작품을 제작함에 있어, 소비자가 건강기능식품으로 선호하는 제형에 대한 조사를 실시하였으며, 또한 산학연과 컨설팅 전문가가 포함된 전문가그룹의 제형에 대한 의견을 반영하여 시작품을 제작하고 안정성을 확보하고자 함.

나. 수행결과

1) 제형설정을 위한 소비자 및 전문가 그룹의 선호도 조사

가) 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출물 소재를 건강기능식품소재로 이용하여 제품화를 추진함에 있어, 가장 적합한 제형을 설정하기 위하여 음료제형, 타블렛(알약 형태)제형, 캡슐(연질, 하드)제형, 분말 및 과립제형, 기타(환 등)제형으로 구분하여 선호도 조사를 실시하였으며, 소비자그룹의 조사는 자사 건강대리점 중 9개점을 선정하여 진행하였으며, 전문가그룹은 자체 및 외부전문가(교수 및 컨설팅)들을 대상으로 실시하였음.

나) 소비자그룹의 선호도 조사 결과 : 소비자 90명을 대상으로 실시하였으며, 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과, 총 270점 중 타블렛 (알약 포함) 형태의 제형이 127점으로 47.0%로 나타났으며, 그 다음으로는 음료 (액상)형태의 제형이 63점으로 23.3%로 나타났음. 그리고 캡슐 (연질 및 하드) 제형이 62점으로 23.0 %를 차지하였으며, 분말 및 과립 제형과 기타 (환 등)제형이 각각 5.6 %와 1.1 %로 나타났음.

다) 전문가그룹의 선호도 조사 결과 : 전문가 10명을 대상으로 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과, 총 30점 중 타블렛 (알약)제형과 캡슐제형이 각각 12점 (40.0 %)을 얻었으며, 그리고 음료(액상)제형이 5점(16.7 %)를 얻었으며, 분말 및 과립 제형이 1점 (3.3 %)을 얻었으며, 기타제형은 없었음.

2) 시제품 제작 및 안정성 확보

가) 타블렛 제형 시작품 제작 : 소비자 선호도를 반영하여 제작하였으며, 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출분말이 정당 100 mg이 함유되어 있는 500 mg을 제작하였고, 가속시험을 통한 안정성을 확보하였음.

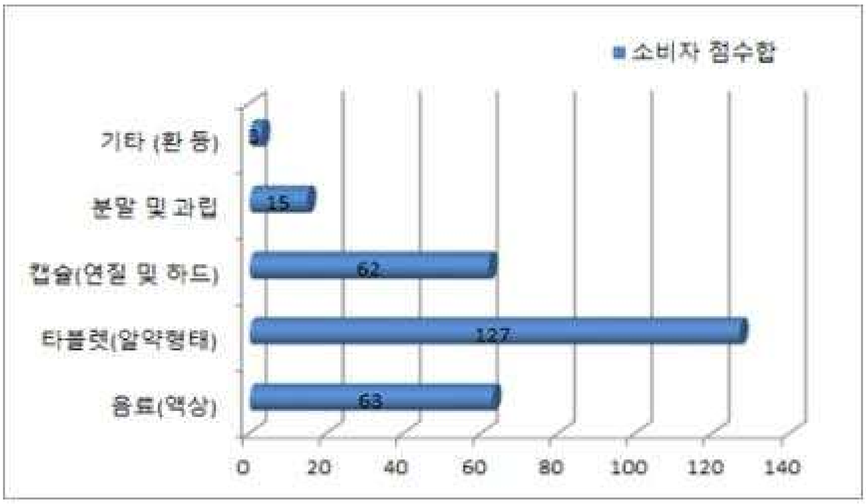
나) 음료 제형 시작품 제작 : 100 mL병에 좁은잎천선과잎 주정추출농축액(1 brix) 85 %(850 mg)을 함유하도록 제작하였고, 가속시험을 통한 안정성을 확보하였음.

다) 정(농축액) 제형 시작품 제작 : 소비자 및 전문가 선호도조사 외에 홍삼농축액과 같이 제품의 제형을 다양화하기 위하여 제작하였으며, 좁은잎천선과잎 주정추출농축액을 50 % 이상 함유하도록 제작하였고, 가속시험을 통한 안정성을 확보하였음.

나. 수행결과 세부내용

1) 건강기능식품 제형별 선호도 조사

가) 소비자 그룹의 제형별 선호도 조사



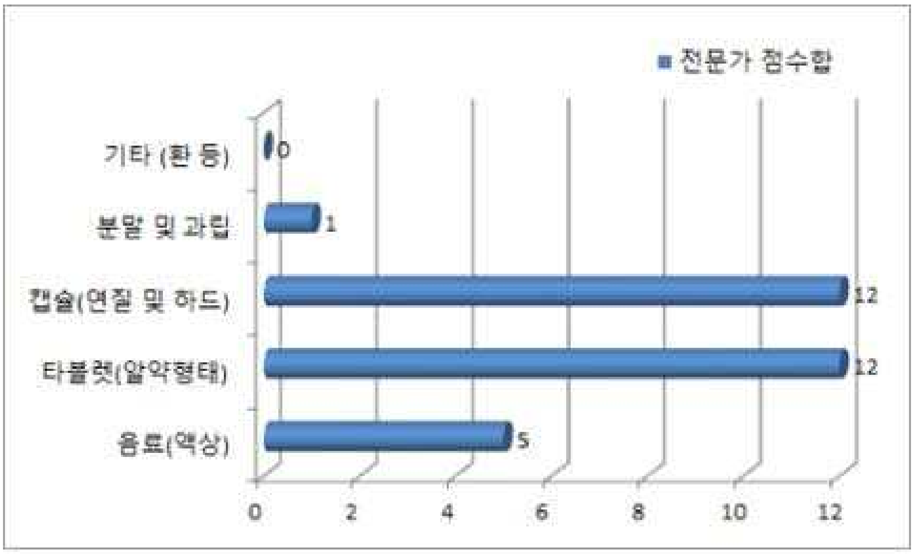
[그림 89] 소비자 제형별 선호도 점수

[그림 90] 소비자 제형별 선호도 백분율

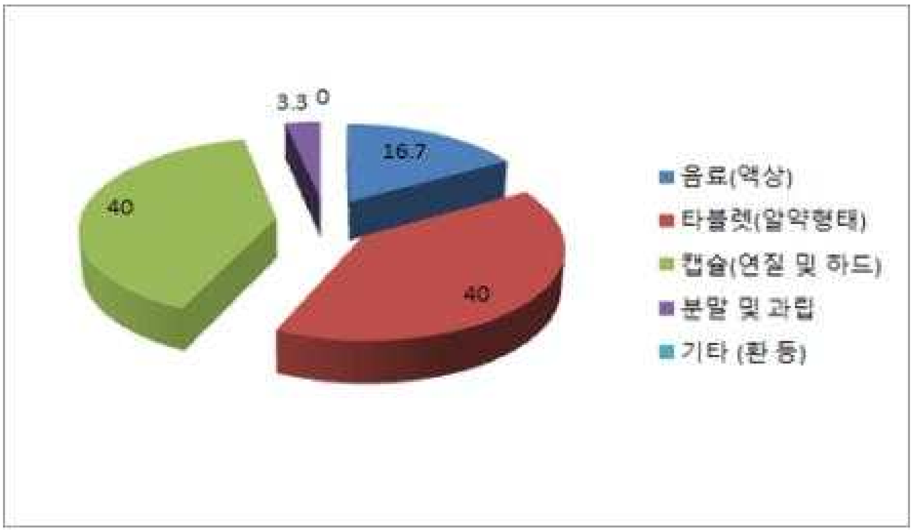
(1) 소비자 90명을 대상으로 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 위의 그림과 같은 결과를 얻었음.

(2) 총 270점 중 타블렛 (알약포함) 형태의 제형이 127점으로 47.0 %로 나타났으며, 그 다음으로는 음료 (액상)형태의 제형이 63점으로 23.3 %로 나타났음. 그리고 캡슐 (연질 및 하드) 제형이 62점으로 23.0 %를 차지하였으며, 분말 및 과립 제형과 기타 (환 등)제형이 각각 5.6 %와 1.1 %로 나타났음.

나) 전문가 그룹의 제형별 선호도 조사



[그림 91] 소비자 제형별 선호도 점수



[그림 92] 소비자 제형별 선호도 백분율

(1) 전문가 10명을 대상으로 1순위 (*2점) 및 2순위 (*1점)로 선정된 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 위의 그림과 같은 결과를 얻었음.

(2) 총 30점 중 타블렛 (알약)제형과 캡슐제형이 각각 12점 (40.0 %)을 얻었으며, 그리고 음료(액상)제형이 5점(16.7 %)를 얻었으며, 분말 및 과립 제형이 1점 (3.3 %)을 얻었으며, 기타제형은 없었음.

다) 소비자 및 전문가 그룹의 제형별 선호도 분석을 통한 제형 선택

(1) 소비자 및 전문가 그룹의 건강기능식품의 제형에 대한 선호도를 분석한 결과 타블렛 형태의 제형이 두 그룹 모두 40 % 이상으로 조사되었음.

(2) 그러나 두 번째 제형의 경우, 소비자 그룹의 경우 음료제형과 캡슐제형이 비슷하게 선호하는 것으로 조사되었으나, 전문가 그룹의 경우 캡슐제형이 40 %으로 타블렛과 같은 선호도를 나타내었음. 이러한 선호도분석조사 결과는 현재 휴럼이 다양한 음료(건강즙, 홍삼음료 등)를 주력으로 하는 회사이며, 이를 판매하는 휴럼 건강전문대리점에서 선호도 조사를 실시한 것이 일부 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.

(3) **시작품제형선택** : 가장 우선적으로 **타블렛 제형**을 이용한 시작품제작을 추진하고자 하며 이는 추후 인체적용시험용 제형으로 사용하고자 함. 또한 2차적으로는 소비자의 선호도를 반영하여 **음료제형**의 연구를 통한 시작품을 제작하고자 하며, 제품의 고급화적인 측면을 고려하여 **농축액(65 brix) 제형**의 시작품을 제작하고자 함.

참고 : 2013년도와 2016년도 소비자 및 전문가 그룹의 제형별 선호도 분석

① 소비자 그룹의 선호도분석

㉮ 2013년(122명 대상) : 총 366점 중 타블렛(알약포함) 형태의 제형이 189점으로 51.6 %로 나타났으며, 그 다음으로는 음료 (액상)형태의 제형이 73점으로 20 %로 나타났음. 그리고 캡슐 (연질 및 하드) 제형이 60점으로 16.4 %를 차지하였으며, 분말 및 과립 제형과 기타 (환 등)제형이 각각 6.8 %와 5.2 %로 나타났음.

㉯ 2016년(90명 대상) : 총 270점 중 타블렛 (알약포함) 형태의 제형이 127점으로 47.0 %로 나타났으며, 그 다음으로는 음료 (액상)형태의 제형이 63점으로 23.3 %로 나타났음. 그리고 캡슐 (연질 및 하드) 제형이 62점으로 23.0 %를 차지하였으며, 분말 및 과립 제형과 기타 (환 등)제형이 각각 5.6 %와 1.1 %로 나타났음.

㉰ 가장 선호하는 제형이 타블렛인 것은 같은 것으로 분석되었으나, 비율이 조금감소 한 반면에 액상과 캡슐제형의 선호도가 조금 증가한 선호도를 나타내었음.

② 전문가 그룹의 선호도분석

㉮ 2013년(9명 대상) : 총27점 중 타블렛 (알약)제형이 15점 (55.6 %), 캡슐 (연질 및 하드)제형이 10점 (37 %), 음료 (액상)제형과 분말 및 과립 제형이 각 1점 (3.7 %)을 얻었으며, 기타제형은 없었음.

㉯ 2016년(10명 대상) : 총 30점 중 타블렛 (알약)제형과 캡슐제형이 각각 12점(40.0 %), 음료(액상)제형이 5점(16.7 %), 분말 및 과립 제형이 1점 (3.3 %)을 얻었으며, 기타제형은 없었음.

㉰ 가장 선호하는 제형이 2012년도와 달리 타블렛과 캡슐의 선호도가 같았으며, 음료의 선호도도 일부 증가하였음.

2) 시제품 제작 및 안정성 확보

가) 타블렛 제형의 레시피개발 및 시제품 제작

(1) 개발개요

(가) 소비자 선호도조사를 반영하여 가장 우선적으로 레시피를 개발하였으며, 시작품을 제작하였음.

(나) 본 제형은 인체적용시험용의 제품에 적용하고자 함.

(다) 시작품을 제작하는 타블렛 제품은 좁은잎천선과나무 잎 주정추출분말이 100 mg이 함유되어 있는 500 mg용으로 제작하였음.

(2) 레시피 개발 및 시제품 제작 사진

500 T / 100 mg

원료명	배합비 (%)	함량 (mg)	사용목적
좁은잎천선과나무잎주정추출분말	20.0	100.0	기능성확인목적
결정셀루로오스	29.5	147.5	부형제
덱스트린	42.0	210.0	부형제
유당	5.5	27.5	부형제
스테아린산마그네슘	1.5	7.5	부형제
이산화규소	1.5	7.5	부형제
색소	0	0	인체적용시험제품제작시 첨가 (시험/플라시보 같은 형태/색상)
합계	100	500	

[그림 93] 타블렛 제형 시제품 제작 사진

나) 타블렛 제형의 품질관리 기준 확보를 통한 안정성 확보

(1) 가속시험 및 안정성검사 기준

(가) 제조년월일 : 2016. 05. 10

(나) 보존조건 : 38 ℃, 80 % RH 이상

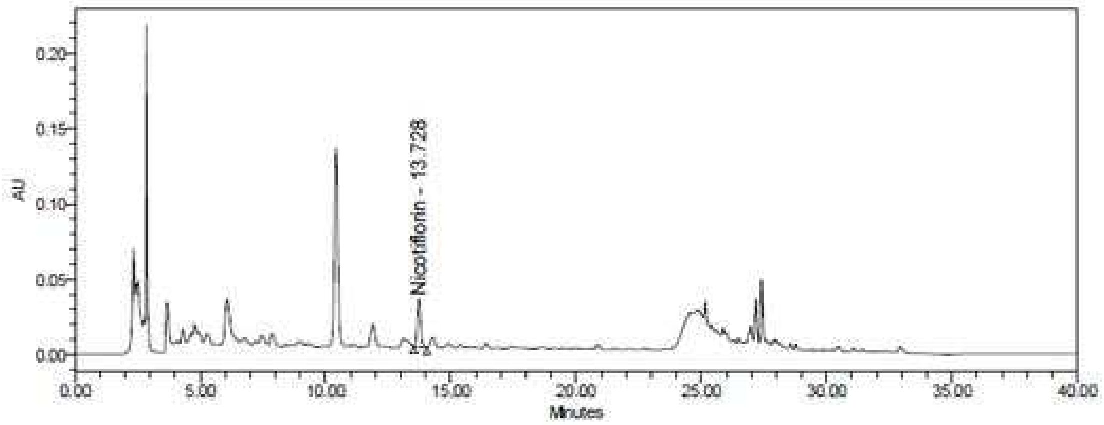
(다) 안정성평가 기준

제조번호 / 시험항목	시 료
성상	회색의 정방형 정제
지표성분* (Nicotiflorin)	타블렛 1정에 지표성분 함량 : 0.151 ~ 0.226 mg/g
대장균군	음성
붕해도	식품공전 기준(60분 이내)

*함량범위 : Nicotiflorin 지표성분함량범위인 1.51 mg/g ~ 2.26 mg/g의 1/10에 해당되는 100 mg당 Nicotiflorin의 함량범위

(2) 1차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.05.10)

제조번호 / 시험항목	HR-20160510		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합



[그림 94] 1차 가속시험 시제품의 지표성분 크로마토그램

(3) 2차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.06.13)

제조번호 시험항목	HR-20160510		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

(4) 3차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.07.11)

제조번호 시험항목	HR-20160510		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

(5) 4차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.08.10)

제조번호 시험항목	HR-20160510		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
지표성분	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합
붕해도	적합	적합	적합

다) 음료 제형의 레시피개발 및 시제품 제작

(1) 개발개요

(가) 소비자 선호도조사를 반영하여 타블렛 제형 외에 음료제형으로 레시피를 개발하였으며, 시작품을 제작하였음.(식품제형 : 액상차)

(나) 본 제형의 시작품은 1병에 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출농축액(1 brix) 84 %, 즉 840 mg을 함유하도록 제작하였음.

(2) 레시피 개발

(가) 소비자들이 가장 선호하는 타입 인 혼합음료 제형으로 병, 파우치 등 다양한 형태로 제작할 수 있으며, 본 제형연구 및 제품제작에 있어서는 100 mL병 제품을 기준으로 하여 추진하였음. 혼합음료 제품의 경우 주원료인 좁은잎천선과 나무 잎 주정추출농축액을 1일 복용기준인 840 mg을 기준으로 하여 아래와 같이 레시피를 완성하였음.

(나) 레시피개발시 자체내부규정 3단계(개발자단계, 마케팅 및 생산자단계, 전문가단계)를 거쳐서 완성하였음.

(3) 음료제형의 레시피 및 시작품 사진

원료명	함량(%)	비 고
좁은잎천선과 주정추출물(40 birx)	2.10	1일섭취 : 840mg
대추농축액(66 brix)	3.45	
배농축액	x.xx	
구연산	x.xx	
당류	x.xx	
정제수	x.xx	
계	100	

[그림 95] 병음료 제형 시제품 제작 사진

(4) 개발음료의 특성

(가) 색도 : 시료 20 mL를 액상측정용 석영셀에 넣고 색도색차계(ModelCR-410, Minolta, Japan)를 이용하여 L*(lightness), a*(redness)및 b*(yellowness) 값을 측정하였고, 시료당 15회 반복 시험하여 색도의 변화정도를 측정하고, 그 평균값으로 나타내었음.

(나) 점도 : 시료의 점도는 회전점도계(DV-ii viscometer LV, brookfield, USA)를 이용하여, Spindle 304S/S (ULA-35(E)Y), 60 rpm으로 setting하였고, 측정 방법으로는 시료 12 mL를 Ultra Low Adapter를 이용하여 sample chamber에 담아 측정하였음.

(다) 측정결과

○ 색도

L^*	21.89	a^*	0.03	b^*	3.68
	21.90		0.05		3.65
	21.91		0.05		3.65
평균	21.90	평균	0.04	평균	3.66

* 9회 반복측정 평균값

○ 점도 외

Spindle NO.	RPM	%(토크)	CP	샘플온도	pH	Brix
ULA-35(E)Y	60	14.10 %	1.41	26	5.35	12.3

라) 음료 제형의 품질관리 기준 확보를 통한 안정성 확보

(1) 가속시험 및 안정성검사 기준

(가) 제조년월일 : 2016. 05. 16

(나) 보존조건 : 38 ℃, 80 % RH 이상

(다) 안정성평가 기준

제조번호 시험항목	시료
성 상	짙은 갈색으로 이미 이취가 없음
대장균군	음성
세 균	100 이하/1 g

(2) 1차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.05.16)

제조번호 시험항목	HR-20160516		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(3) 2차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.06.16.)

제조번호 시험항목	HR-20160516		
	sample 1	sample 2	sample 3
성　　상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세　　균	0	0	0

(4) 3차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.07.14.)

제조번호 시험항목	HR-20160516		
	sample 1	sample 2	sample 3
성　　상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세　　균	0	0	0

(5) 4차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.08.16.)

제조번호 시험항목	HR-20160516		
	sample 1	sample 2	sample 3
성　　상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세　　균	0	0	0

(6) 5차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.09.09.)

제조번호 시험항목	HR-20160516		
	sample 1	sample 2	sample 3
성　　상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세　　균	0	0	0

(7) 공인시험기관 분석 : 식품의약품안전처의 공인시험분석기관의 영양성분 성적서 확보

(가) 3차 가속시험완료 후 공인시험기관에 의뢰하여 영양성분을 분석하였음.

WFR-1607-0174

(주)우솔환경연구원
Research Institute of Environment

www.우솔환경연구원.com

국가공인 먹는물 검사기관 금강유역환경청 제12호 국가공인 식품 자가품질 검사기관 대전지방식약청 제079호

문서번호 WFR-1607-0174
시행일자 2016년 07월 22일
발 신 (주)우솔환경연구원
발송담당 관리팀 황태욱

제 목 식품검사성적서 교부
받 음 제주특별자치도 서귀포시 남원읍 신례동로 121-17 (신례리 1575)
(주)휴럼
백순옥 귀하

검 사 성 적 서

63608

의뢰업체명	(주)휴럼	대 표 자	백순옥
업 체 주 소	제주특별자치도 서귀포시 남원읍 신례동로 121-17 (신례리 1575)		
검 사 목 적	참고용	접 수 일	2016-07-07
결과완료일	2016-07-22		
제 품 명	좋은일친신과싱(가칭)	제품의 유형	Sample
제 조 일 자		유 통 기 한	

검 사 항 목 및 결 과

검 사 항 목	기 준	결 과
열량(kcal/100g)	-	251.00
탄수화물(g/100g)	-	54.64
당류(g/100g)	-	34.32
단백질(g/100g)	-	4.52
지방(g/100g)		1.64
포화지방(g/100g)		0.76
트랜스지방(g/100g)		0.00
콜레스테롤(mg/100g)		불검출
나트륨(mg/100g)		209.37
	= 이 하 여 백 =	
판 정	확인	

비 고 1. 위 결과는 의뢰인이 제시한 견체에 대한 결과이며, 검사목적이외의 다른 용도(광고,홍보용)로는 사용할 수 없습니다.
*

우솔환경연구원장

2016년 07월 22일
검사자 : 최태연
책임자 : 김관용

수질연구원 : 충남 공주시 차령로 2037 (송선동 637-4) TEL 041-855-0061, 0063 FAX 041-855-0062

식품연구원 : 충북 영동군 영동읍 대학로 310 (영동대학교 고등직업산업기업지원센터 3층) TEL 043-742-0751, 0761 FAX 043-742-0752

22/07 2016 2:01 PM FAX 0437420752 W00S01 0002/0002

[그림 96] 영양성분 공인시험성적서

마) 정(농축액) 제형 개발 및 시제품 제작

(1) 개발개요

(가) 소비자 및 전문가 선호도조사 외에 홍삼농축액과 같이 제품의 제형을 다양화하기 위하여 농축액제품을 개발하고자 함.

(나) 본 제형은 좁은잎천선과나무 잎 주정추출농축액을 50 % 이상함유하면서, 대추농축액 등의 천연물 추출물농축액과 당류를 첨가하여 소량씩 직접섭취 및 물에 희석하여 섭취 할 수 있도록 제품의 제형을 개발하였음.

(2) 레시피 개발

(가) 소비자들이 가장 선호하는 타입 외 다양한 상품화의 전략군으로서 정(농축액)제품으로 개발하고자 하였으며, 아래와 같이 레시피를 완성하였음.

(나) 레시피개발시 자체내부규정 3단계(개발자단계, 마케팅 및 생산자단계, 전문가단계)를 거쳐서 완성하였음.

(다) (혼합)음료제형의 레시피 및 시작품 사진

원료명	함량(%)	비 고
좁은잎천선과 주정추출농축액(75 birx)	51.00	
대추농축액(66 brix)	x.xx	
식물혼합추출농축액	x.xx	
허브향	x.xx	
당류	x.xx	
계	100	

[그림 97] 정(농축액) 제형 시제품 제작 사진

(3) 개발 정제품의 특징

(가) 색도: 시료 20 mL를 액상측정용 석영셀에 넣고 색도색차계(ModelCR-410, Minolta, Japan)를 이용하여 L*(lightness), a*(redness) 및 b*(yellowness) 값을 측정하였고, 시료당 15회 반복 시험하여 색도의 변화정도를 측정하고, 그 평균값으로 나타내었음.

(나) 점도: 시료의 점도는 회전점도계(DV-ii viscometer LV, brookfield, USA)를 이용하여, Spindle SC4-16 (SC4-8R(P)), 30 rpm으로 setting하였고, 측정 방법으로는 시료 10 mL를 Small Sample Adapter를 이용하여 sample chamber에 담아 측정하였음.

(다) 측정결과

○ 색도

L^*	17.99	a^*	0.36	b^*	0.82
	18.04		0.29		0.87
	18.03		0.31		0.85
평균	18.02	평균	0.32	평균	0.85

*** 9회 반복측정 평균값**

○ 점도 외

Spindle NO.	RPM	%(토크)	CP	샘플온도	pH	Brix
SSA-34	30	81.1	1622	26.1	6.7	72

바) 음료 제형의 품질관리 기준 확보를 통한 안정성 확보

(1) 가속시험 및 안정성검사 기준

(가) 제조년월일 : 2016. 05. 18

(나) 보존조건 : 38 ℃, 80% RH 이상

(다) 안정성평가 기준

제조번호 / 시험항목	시료
성 상	갈색으로 이미 이취가 없음
대장균군	음성
세 균	100 이하/1 g

(2) 1차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.05.18.)

제조번호 / 시험항목	HR-20160518		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(3) 2차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.06.20.)

제조번호 시험항목	HR-20160518		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(4) 3차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.07.18.)

제조번호 시험항목	HR-20160518		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(5) 4차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.08.22.)

제조번호 시험항목	HR-20160518		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(6) 5차 가속시험의 안정성검사(시험일: 2016.09.20.)

제조번호 시험항목	HR-20160518		
	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합
대장균군	0	0	0
세 균	0	0	0

(7) 공인시험기관 분석: 식품의약품안전처의 공인시험분석기관의 영양성분 성적서 확보

(가) 3차 가속시험 완료 후 공인시험기관에 의뢰하여 영양성분을 분석하였음.

(주)우솔환경연구원
Research Institute of Environment

WFR-1607-0173

www.우솔환경연구원.com

국가공인 먹는물 검사기관 고강유역환경청장 제12호 　 국가공인 식품 자가품질검사기관 대전식품의약품안전청 제070호

문서번호 　 WFR-1607-0173
시행일자 　 2016년 07월 22일
발 　 신 　 (주)우솔환경연구원
발송담당 　 관리팀 황태옥

제 　 목 　 식품검사성적서 교부
받 　 음 　 제주특별자치도 서귀포시 남원읍 신례동로 121-17 (신례리 1575)
(주)휴림
백순옥 귀하

검 사 성 적 서

63608

의뢰업체명	(주)휴림		대 표 자	백순옥	
업 체 주 소	제주특별자치도 서귀포시 남원읍 신례동로 121-17 (신례리 1575)				
검 사 목 적	참고용	접 수 일	2016-07-07	결과완료일	2016-07-22
제 품 명	풋귤은일천석과메이드(가칭)		제품의 유형	Sample	
제 조 일 자			유 통 기 한		

검 사 항 목 및 결 과

검 사 항 목	기 준	결 과
열량(kcal/100mL)		55.45
탄수화물(g/100mL)		12.90
당류(g/100mL)		11.65
단백질(g/100mL)	-	0.49
지방(g/100mL)	-	0.21
포화지방(g/100mL)	-	0.13
트랜스지방(g/100mL)	-	0.00
콜레스테롤(mg/100mL)	-	불검출
나트륨(mg/100mL)		10.07
	= 이 하 여 백 =	

판 　 정	확인

비 고 　 1. 위 결과는 의뢰인이 제시한 검체에 대한 결과이며, 검사목적이외의 다른 용도(광고,홍보용)로는 사용할 수 없습니다.
*

우솔환경연구원장 (인)

2016년 07월 22일
검사자 : 최대연
책임자 : 김관용

수질연구원 : 충남 공주시 차령로 2037 (송선동 637-4) TEL 041-855-0061, 0063 FAX 041-855-0062
식품연구원 : 충북 영동군 영동읍 대학로 310 (영동대학교 교통전자산업기업지원센터 3층) TEL 043-742-0751, 0761 FAX 043-742-0752

22/07 2016 2:01 PM FAX 0437420752 WOOSOL 0001/0002

[그림 98] 영양성분 공인시험성적서

9. 안전성 시험(GLP 독성시험)

가. 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

1) 결과 및 고찰

가) 사망유무: 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다.

[표 38] Summary of mortality

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing															Mortality (dead/total)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0% (0/5)

나) 일반증상: 5,000mg/kg 투여군에서 투여 후 1일 약물혼입변(compound-colored stool)이 암수 전례에서 관찰되었고, 연변(soft stool)이 수컷 1례 및 암컷 2례에서 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질투여에 기인한 일시적인 변화로 사료된다.

[표 39] Summary of clinical signs

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hours (Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													
			Soft stool	1													
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
			Compound-colored stool	5													
			Soft stool	2													

NOA: No Observable Abnormality

[표 40] Individual of clinical signs

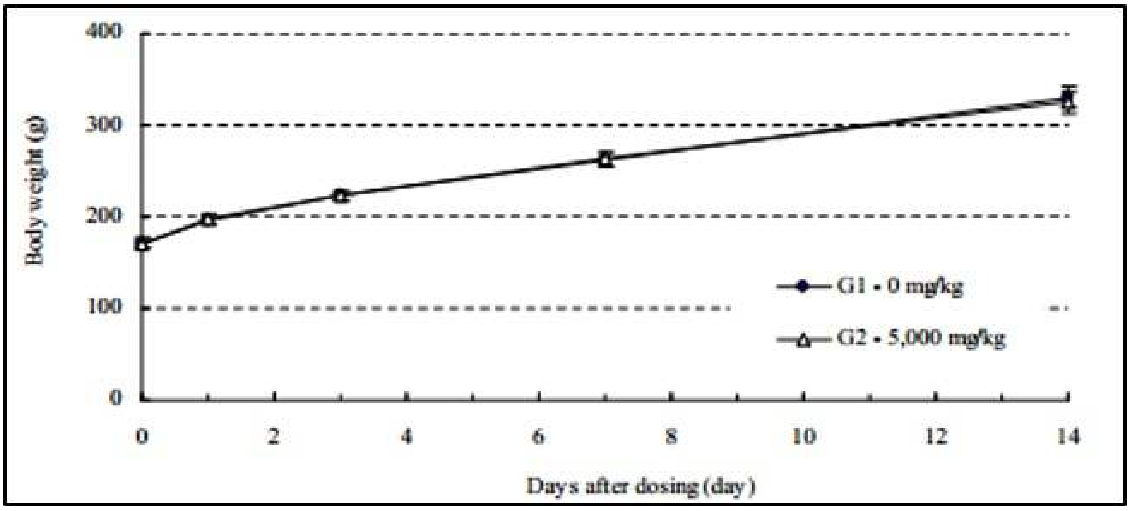
Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1	1101		-	-	-	-	-
0	1102		-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-
G2	1201		-	-	-	-	-
5,000	1202		-	-	-	-	-
	1203		-	-	-	-	-
	1204		-	-	-	-	-
	1205		-	-	-	-	-

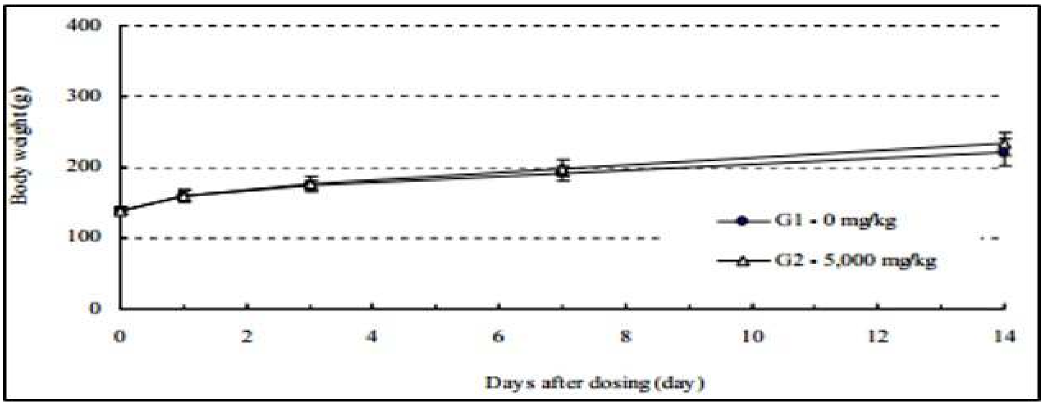
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	1201	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,000	1202	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1203	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1204	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1205	Compound-colored stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Soft stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No observable abnormality　　+: Observable abnormality

다) 체중변화: 관찰기간 동안, 암수 5,000mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.



[그림 99] Body Weights in Male SD Rats



[그림 100] Body Weights in Female SD Rats

라) 육안적 부검소견: 부검시, 암수 대조군 및 5,000mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지않았다.

[표 41] Summary of necropsy findings

Sex	Male		Female	
Group	G1	G2	G1	G2
Dose (mg/kg)	0	5,000	0	5,000
No. of animals	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5
No. of examined	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

2) 결론: 본 시험의 조건하에서 FER-E60을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

나. 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험

1) 결과 및 고찰

가) 일반증상: 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 시험물질투여군에 사망례는 관찰되지 않았다. 암수 1,000, 2,000 및 5,000mg/kg 투여군의 전례에서 약물혼입변이 투여 2일부터 투여기간 동안 관찰되었고, 암수 5,000mg/kg 투여군의 전례에서 투여 10일부터 투여전 또는 투여직후 유연이 투여기간 동안 관찰되었다. 이는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다.

[표 42] Summary of clinical signs

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Day 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	5	NOA	5													
1,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	5	NOA	5													
2,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	5	NOA	5													
5,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Salivation*										4	4	4	5	5

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Day 15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	5	NOA														
1,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	5	NOA														
2,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	5	NOA														
5,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Salivation*	5	5	4	4	4	3	3	3	4	4	4	5	5	5
		Salivation#						1	1	1	1	1	1			

NOA: No Observable Abnormality

*: Immediately after dosing, #: Prior to dosing

Sex: Female

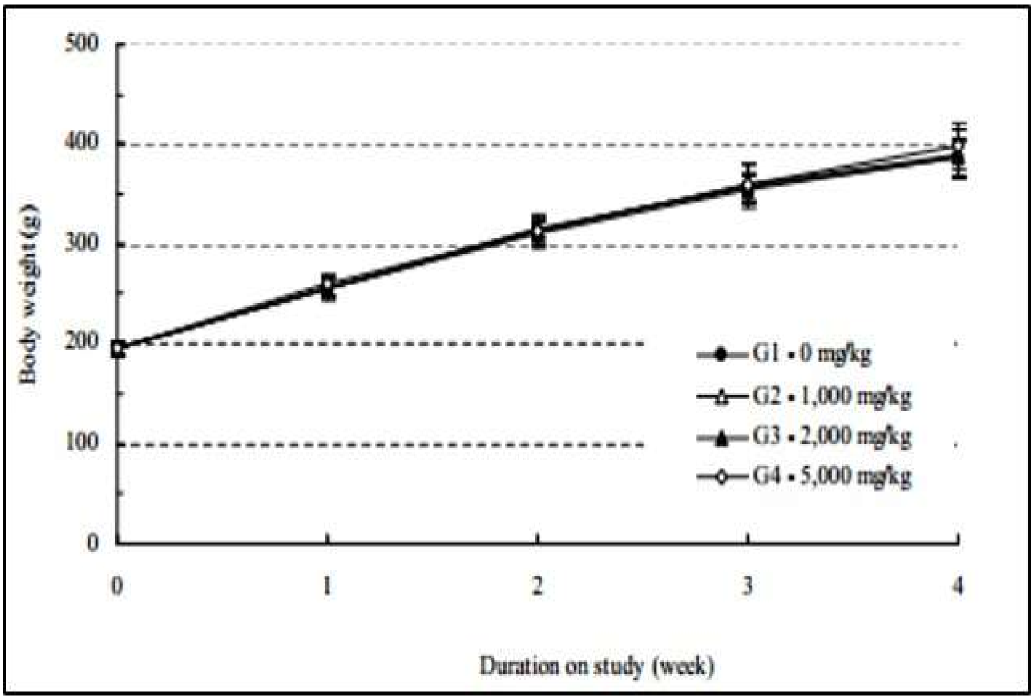
Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Day 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	5	NOA	5													
1,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	5	NOA	5													
2,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	5	NOA	5													
5,000		Compound-colored stool		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Salivation*										2	2	5	5	5

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Day 15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	5	NOA														
1,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	5	NOA														
2,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	5	NOA														
5,000		Compound-colored stool	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Salivation*	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

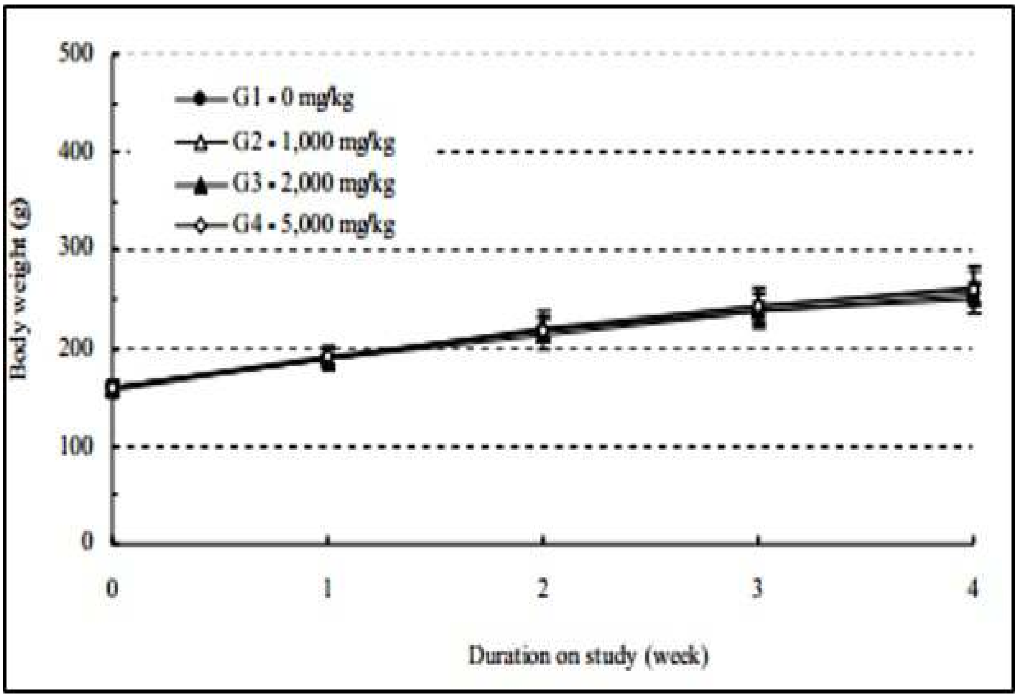
NOA: No Observable Abnormality

*: Immediately after dosing

나) 체중변화: 투여기간 동안 암수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.



[그림 101] Body weights in male SD rats.



[그림 102] Body weights in female SD rats.

다) 사료섭취량: 투여기간 동안 암수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료 섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

[표 43] Mean food consumption

Sex: Male						(g/day)
Group / Dose (mg/kg)		Week				
		0	1	2	3	4
G1	Mean	24.4	27.9	31.1	31.3	31.0
0	S.D.	1.5	1.3	0.9	1.9	2.1
	N	5	5	5	5	5
G2	Mean	24.5	27.9	29.3	31.7	31.5
1,000	S.D.	2.4	2.6	2.0	3.3	2.8
	N	5	5	5	5	5
G3	Mean	23.6	26.5	28.9	29.8	30.0
2,000	S.D.	1.2	1.7	1.9	1.9	2.1
	N	5	5	5	5	5
G4	Mean	25.7	26.7	29.3	30.7	31.7
5,000	S.D.	2.7	2.0	1.1	1.1	1.2
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female						(g/day)
Group / Dose (mg/kg)		Week				
		0	1	2	3	4
G1	Mean	22.1	22.5	24.9	24.9	25.7
0	S.D.	3.9	2.2	2.9	2.4	2.3
	N	5	5	5	5	5
G2	Mean	21.9	22.6	24.5	26.6	26.6
1,000	S.D.	1.6	1.7	2.1	2.6	2.6
	N	5	5	5	5	5
G3	Mean	20.8	21.8	23.4	24.6	24.6
2,000	S.D.	2.4	1.1	1.2	1.8	1.6
	N	5	5	5	5	5
G4	Mean	20.7	22.3	23.8	24.3	25.1
5,000	S.D.	2.5	1.0	1.8	2.6	3.2
	N	5	5	5	5	5

라) 혈액학적 검사: 암수 시험물질투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 수컷 5,000mg/kg 투여군에서 혈색소량 (HGB)의 감소가 인정되었으나, 경미한 변도으로 절혈구수(RBC) 및 헤마토크리트치(HCT)D의 변동도 동반되지 않았으며, 수컷 1,000mg/kg투여군에서 관찰된 혈소판수(PLT)의 감소는 용량의존성이 없어 독성학적인 의미는 없다고 판단된다.

[표 44] Mean hematological parameters

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)		RBC (×10⁶ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (×10³ cells/μL)	WBC (×10³ cells/μL)
G1	Mean	7.66	15.3	43.5	56.9	20.0	35.2	1168	9.03
0	S.D.	0.14	0.2	0.3	1.2	0.5	0.2	111	1.95
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	7.44	15.1	43.1	57.9	20.3	35.1	977 **	10.03
1,000	S.D.	0.11	0.4	1.2	1.2	0.3	0.3	53	3.98
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	7.48	15.4	44.1	59.0	20.5	34.9	1074	8.82
2,000	S.D.	0.38	0.7	2.5	1.1	0.4	0.3	52	2.29
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	7.30	14.5 *	41.7	57.2	19.9	34.9	1158	11.33
5,000	S.D.	0.20	0.3	1.1	1.7	0.6	1.0	89	2.84
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)		RBC (×10⁶ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (×10³ cells/μL)	WBC (×10³ cells/μL)
G1	Mean	7.19	14.9	41.5	57.8	20.7	35.9	1190	5.20
0	S.D.	0.31	0.4	0.7	2.2	0.9	0.4	245	0.97
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	7.38	14.7	41.6	56.4	20.0	35.4	1281	4.64
1,000	S.D.	0.32	0.4	1.7	1.3	0.5	0.6	85	1.18
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	7.44	15.0	42.1	56.7	20.1	35.5	1158	5.06
2,000	S.D.	0.34	0.5	1.5	1.6	0.7	0.2	155	1.40
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	6.88	14.2	40.2	58.5	20.7	35.4	1229	4.16
5,000	S.D.	0.28	0.4	1.1	1.1	0.5	0.7	76	0.75
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

마) 혈액생화학적 검사: 암수 시험물질투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 수컷 2,000mg/kg 투여군에서 알칼라인 포스파타제(ALP)의 감소가 인정되었으나, 용량의존성이 없는 변화로 독성학적 의미는 없었다.

[표 45] Mean clinical chemistry

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1	Mean	32.6	112.7	620.2	13.7	0.41
0	S.D.	5.0	24.2	60.8	0.9	0.03
	N	5	5	5	5	5
G2	Mean	31.6	94.0	601.6	13.6	0.42
1,000	S.D.	4.8	17.6	91.6	2.3	0.04
	N	5	5	5	5	5
G3	Mean	29.1	105.7	441.1 *	13.4	0.43
2,000	S.D.	3.6	20.6	123.6	1.9	0.04
	N	5	5	5	5	5
G4	Mean	33.7	116.0	604.8	13.6	0.41
5,000	S.D.	4.2	21.5	91.3	1.3	0.06
	N	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1	Mean	5.5	2.3	0.71	76	33	154
0	S.D.	0.2	0.1	0.04	14	20	13
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	5.5	2.3	0.72	67	50	171
1,000	S.D.	0.2	0.1	0.07	6	12	19
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	5.4	2.3	0.76	70	42	154
2,000	S.D.	0.1	0.1	0.06	13	24	17
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	5.4	2.4	0.77	70	54	142
5,000	S.D.	0.1	0.1	0.07	9	11	9
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * $p<0.05$.

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1	Mean	27.7	102.1	356.2	14.0	0.45
0	S.D.	2.5	25.0	84.0	1.3	0.04
	N	5	5	5	5	5
G2	Mean	28.4	81.7	355.7	14.2	0.44
1,000	S.D.	5.6	14.3	139.1	3.0	0.09
	N	5	5	5	5	5
G3	Mean	25.9	94.4	310.0	16.8	0.42
2,000	S.D.	3.0	21.1	74.8	1.4	0.05
	N	5	5	5	5	5
G4	Mean	27.7	96.2	308.5	16.1	0.46
5,000	S.D.	4.5	26.6	60.7	3.5	0.03
	N	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1	Mean	6.0	2.6	0.78	82	13	138
0	S.D.	0.2	0.1	0.03	12	5	26
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	6.0	2.7	0.79	84	14	140
1,000	S.D.	0.2	0.2	0.02	7	7	7
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	6.0	2.8	0.85	93	20	142
2,000	S.D.	0.3	0.2	0.07	16	6	12
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	6.0	2.6	0.79	79	11	137
5,000	S.D.	0.3	0.2	0.04	15	5	19
	N	5	5	5	5	5	5

바) 장기중량: 암수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 장기중량 변화는 관찰되지 않았다.

[표 46] Mean absolute organ weights

Sex: Male (g)

Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1	Mean	358.5	1.93	1.13	10.65	0.67	2.61
0	S.D.	18.9	0.11	0.04	0.91	0.13	0.20
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	360.5	2.00	1.16	11.37	0.72	2.73
1,000	S.D.	22.1	0.03	0.07	0.78	0.10	0.23
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	355.1	1.88	1.18	11.02	0.60	2.52
2,000	S.D.	13.0	0.05	0.08	0.76	0.09	0.19
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	365.6	1.95	1.20	11.79	0.72	2.70
5,000	S.D.	21.0	0.09	0.09	1.33	0.17	0.14
	N	5	5	5	5	5	5

Sex: Female (g)

Group / Dose (mg/kg)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1	Mean	232.3	1.90	0.90	7.14	0.54	1.83
0	S.D.	15.6	0.08	0.06	0.55	0.08	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	240.2	1.88	0.87	7.23	0.50	1.83
1,000	S.D.	16.7	0.06	0.09	0.84	0.08	0.22
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	233.9	1.83	0.86	7.15	0.67	1.82
2,000	S.D.	10.3	0.07	0.03	0.32	0.34	0.18
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	239.4	1.80	0.90	7.71	0.55	1.91
5,000	S.D.	21.8	0.09	0.06	0.84	0.05	0.15
	N	5	5	5	5	5	5

[표 47] Mean relative organ weights>

Sex: Male (g/100g body weight)

Group / Dose (mg/kg)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1	Mean	358.5	0.54	0.32	2.97	0.19	0.73
0	S.D.	18.9	0.05	0.02	0.15	0.03	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	360.5	0.55	0.32	3.15	0.20	0.76
1,000	S.D.	22.1	0.03	0.02	0.14	0.02	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	355.1	0.53	0.33	3.10	0.17	0.71
2,000	S.D.	13.0	0.02	0.01	0.15	0.03	0.06
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	365.6	0.54	0.33	3.22	0.19	0.74
5,000	S.D.	21.0	0.04	0.01	0.26	0.03	0.04
	N	5	5	5	5	5	5

Sex: Female (g/100g body weight)

Group / Dose (mg/kg)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1	Mean	232.3	0.82	0.39	3.07	0.23	0.79
0	S.D.	15.6	0.07	0.01	0.10	0.03	0.02
	N	5	5	5	5	5	5
G2	Mean	240.2	0.79	0.36	3.00	0.21	0.76
1,000	S.D.	16.7	0.05	0.02	0.18	0.02	0.04
	N	5	5	5	5	5	5
G3	Mean	233.9	0.78	0.37	3.06	0.29	0.78
2,000	S.D.	10.3	0.03	0.02	0.13	0.16	0.06
	N	5	5	5	5	5	5
G4	Mean	239.4	0.76	0.38	3.22	0.23	0.80
5,000	S.D.	21.8	0.06	0.02	0.15	0.01	0.06
	N	5	5	5	5	5	5

사) 부검: 암수 시험물질투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

[표 48] Summary of necropsy findings

Sex	Male				Female			
Group	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg)	0	1,000	2,000	5,000	0	1,000	2,000	5,000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5	5	5	5	5
No. of examined	5	5	5	5	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

아) 조직병리학정검사: 암수 시험물질투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다. 그 외, 암수 대조군 및 5,000mg/kg 투여군에서 관찰된 소견은 자연발생성으로 해당 주령의 Sprague-Dawley랫드에서 흔이 관찰되는 병변이며, 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 독성학적인 의미는 없었다.

[표 49] Summary of histopathological findings

Organ / Findings	Sex		Male		Female	
	Group		G1	G4	G1	G4
	Dose (mg/kg)		0	5,000	0	5,000
	No. of animals		5	5	5	5
Kidney	-Basophilic tubules	±	2	0	0	1
	-Mineralization, outer medulla	±	0	0	0	1
	-Tubular dilatation, focal, outer medulla	±	0	0	0	1
	No. of examined		5	5	5	5
Liver	-Extramedullary hematopoiesis	±	0	0	1	0
	-Microgranuloma	±	1	2	3	2
		+	0	0	0	1
	-Vacuolation, hepatocyte, periportal	±	0	1	1	1
	No. of examined		5	5	5	5
Spleen	-Extramedullary hematopoiesis	±	2	0	1	2
		+	1	2	0	0
	No. of examined		5	5	5	5

There were unremarkable changes in the brain, heart and lung of Groups 1 and 4.

Grade - ±: minimal, +: mild

2) 결론: 본 시험 조건하에서, FER-E60을 4주 반복 경구 투여한 결과, 암수 5,000mg/kg 투여군에서 시험물질에 기인한 독성변화는 인정되지 않았다. 따라서, 13주 반복투어 독성시험의 고용량은 5,000mg/kg, 저용량은 1,000mg/kg으로 설정해도 될 것으로 판단된다.

다. 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량결정 독성시험

1) 결과 및 고찰

가) 일반증상: 실험기간 중 암수 모두에서 사망동물은 발생하지 않았으며, 500 및 1,000mg/kg투여 후에는 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 그러나 2,000mg/kg투여 후 수컷의 2례와 암컷의 1례(2201)에서 약 10분 이내에 구토(vomiting)가 발생하고, 다른 암컷의 1례(2202)에서는 약 1시간에 구토가 나타났다. 또 수컷의 1례(1202)에서는 약 4시간에 추가로 구토가 관찰되었다. 이는 시험물질의 투여에 의한 영향으로 사료되나 구토증상만 관찰되어 심각한 독성영향은 아닌 것으로 사료된다.

[표 50] Summary of clinical signs

Sex : male

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day 0* 0.5 hr	0* 1 hr	0* 2 hr	0* 4 hr	0* 6 hr	1	2	3	4* 0.5 hr	4* 1 hr	4* 2 hr	4* 4 hr	4* 6 hr	5	6	7
G1 0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
G2 500→1,000 →2,000	1201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	1202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-

Sex : female

Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day 0* 0.5 hr	0* 1 hr	0* 2 hr	0* 4 hr	0* 6 hr	1	2	3	4* 0.5 hr	4* 1 hr	4* 2 hr	4* 4 hr	4* 6 hr	5	6	7
G1 0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
G2 500→1,000 →2,000	2201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
	2202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-

*: dosing day. -: no abnormal findings.

Sex : male

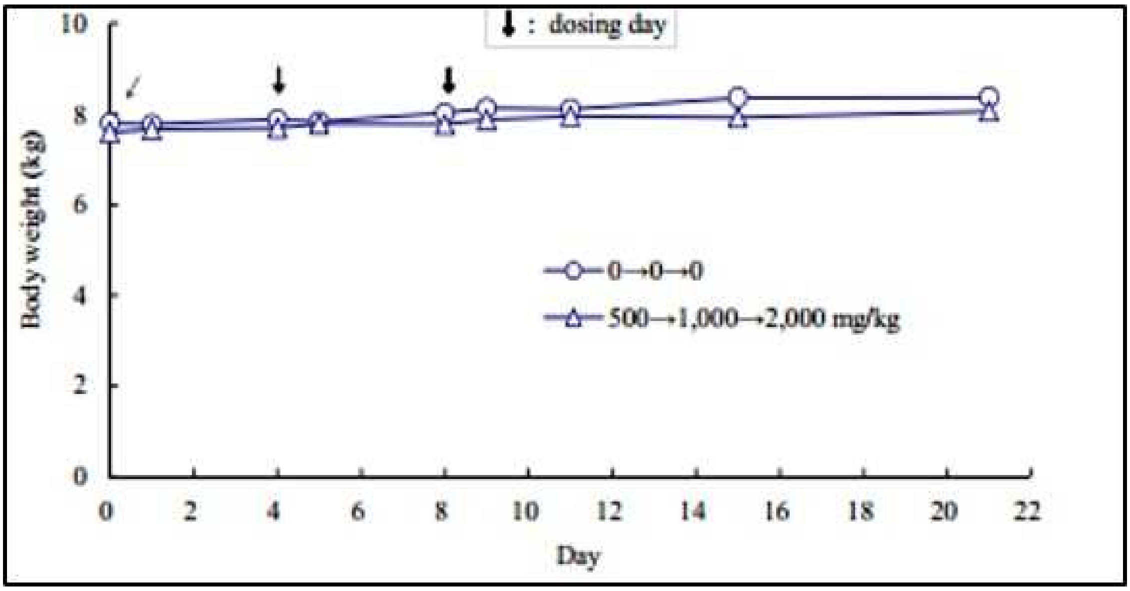
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day 8* 0.5 hr	8* 1 hr	8* 2 hr	8* 4 hr	8* 6 hr	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G1 0→0→0	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 500→1,000 →2,000	1201	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1202	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sex : female

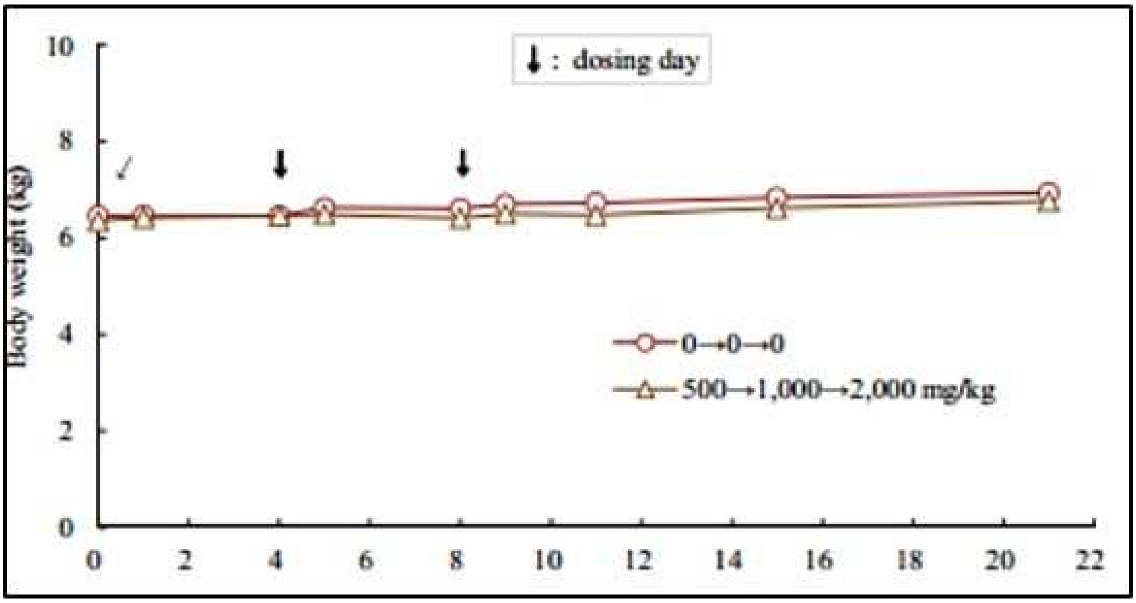
Group /Dose (mg/kg)	Animal ID	Day 8* 0.5 hr	8* 1 hr	8* 2 hr	8* 4 hr	8* 6 hr	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
G1 0→0→0	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 500→1,000 →2,000	2201	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: dosing day. -: no abnormal findings, V: vomiting.

나) 체중: 체중에서는 암수 모두 시험물질의 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다.



[그림 103] Body weights of male Beagle dogs



[그림 104] Body weights of female Beagle dogs

다) 부검: 부검에서는 대조군을 포함한 암수 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

[표 51] Necropsy findings

Sex	Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Findings	Day of sacrifice
Male	G1 0→0→0	1101	All	Unremarkable findings	22
	G2 500→1,000→2,000	1201	All	Unremarkable findings	22
		1202	All	Unremarkable findings	22
Feamle	G1 0→0→0	2101	All	Unremarkable findings	22
	G2 500→1,000→2,000	2201	All	Unremarkable findings	22
		2202	All	Unremarkable findings	22

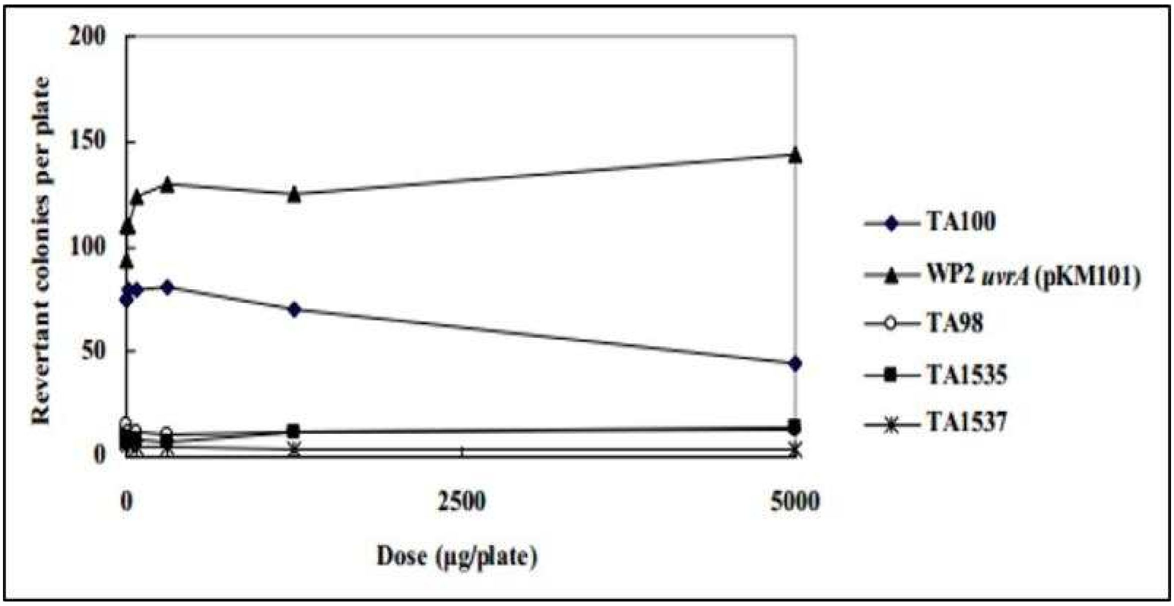
2) 결론: 본 시험은 암수 비글견을 이용하여 시험물질인 FER-E60의 500→1,000→2,000mg/kg의 용량을 4일 간격으로 증가하여 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하기 위하여 실시한 결과, 암수 모두에서 사망례는 발생하지 않았으며, 500 및 1,000mg/kg의 용량에서는 어떠한 증상도 관찰되지 않았으나, 2,000mg/kg의 용량에서 암수 모두에서 구토증상이 관찰되었다. 그 외, 체중 및 부검에서는 이상변화가 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건 하에 암수 비글견에 대한 최대내성용량(MTD)은 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

라. 복귀돌연변이시험

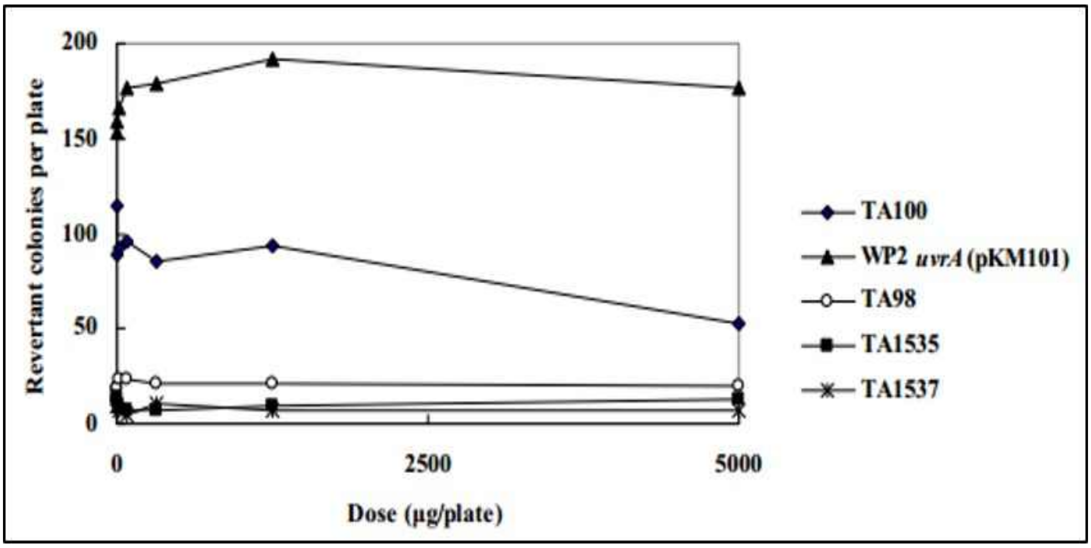
1) 결과 및 고찰

가) 용량설정시험: 5,000㎍/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88㎍/plate의 용량으로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 TA100 균주의 대사활성화비존재하에서는 313㎍/plate이상, 대사활성화존재하에서는 5,000㎍/plate의 용량에서 관찰되었다. TA98, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA(pKM101)균주는 대사활성화 유무에 관계없이 생육저해가 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전 또는 석출은 대사활성화 유무에 관계없이 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 용량은 아래의 표와 같이 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (μg/plate)
TA98	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100	-	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
TA1535	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA1537	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
WP2*uvrA*(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313



[그림 105] Dose-respone curve in the absence of metabolic activation (dose range finding study)



[그림 106] Dose-respone curve in the presence of metabolic activation

[표 52] The number of revertant colonies per platae in the absence of metabolic activation

Strain	Test item	Dose level (μg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean
TA98	Water for injection	0	15 , 11	13
	FER-E60	4.88	21 , 10	16
		19.5	14 , 9	12
		78.1	10 , 14	12
		313	12 , 8	10
		1,250	12 , 11	12
		5,000	12 , 14	13
	2-Nitrofluorene(2-NF)	5.0	542 , 593	568
TA100	Water for injection	0	77 , 72	75
	FER-E60	4.88	69 , 80	75
		19.5	77 , 82	80
		78.1	80 , 80	80
		313	96* , 65*	81
		1,250	65* , 75*	70
		5,000	42* , 46*	44
	Sodium azide(SA)	1.5	419 , 415	417
TA1535	Water for injection	0	12 , 7	10
	FER-E60	4.88	7 , 7	7
		19.5	7 , 7	7
		78.1	13 , 4	9
		313	7 , 8	8
		1,250	15 , 9	12
		5,000	14 , 14	14
	Sodium azide(SA)	1.5	397 , 385	391
TA1537	Water for injection	0	8 , 6	7
	FER-E60	4.88	8 , 7	8
		19.5	6 , 5	6
		78.1	7 , 2	5
		313	8 , 2	5
		1,250	3 , 5	4
		5,000	4 , 4	4
	9-Aminoacridine(9-AA)	80.0	297 , 249	273
WP2*uvrA* (pKM101)	Water for injection	0	85 , 102	94
	FER-E60	4.88	116 , 104	110
		19.5	124 , 95	110
		78.1	129 , 119	124
		313	142 , 118	130
		1,250	127 , 123	125
		5,000	152 , 135	144
	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF2)	0.005	947 , 788	868

*: Indicated growth inhibition

[표 53] The number of revertant colonies per platae in the presence of metabolic activation

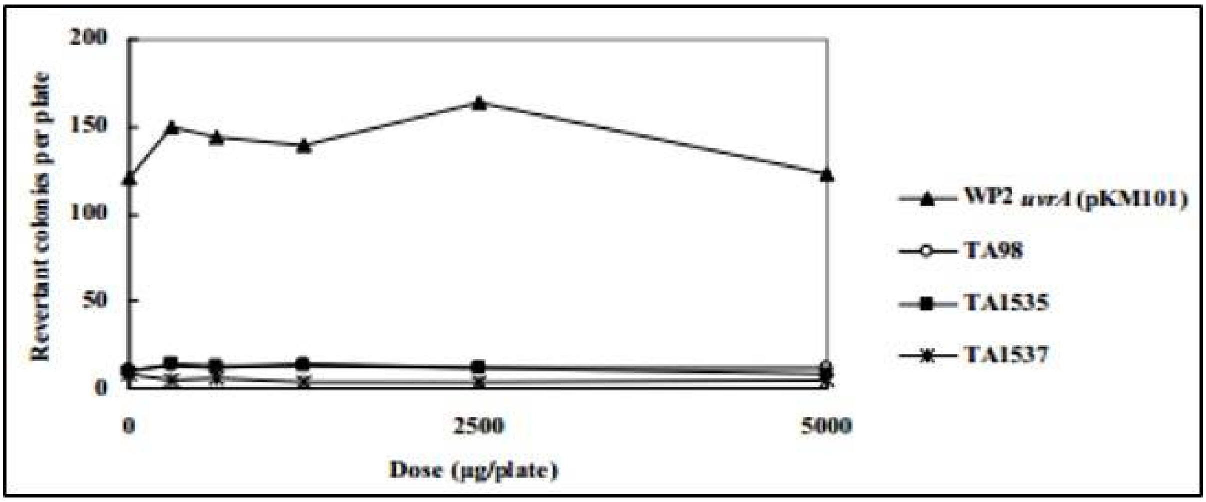
Strain	Test item	Dose level (㎍/plate)	Individual revertant colony counts	Mean
TA98	Water for injection	0	21 , 16	19
	FER-E60	4.88	17 , 20	19
		19.5	20 , 27	24
		78.1	23 , 23	23
		313	21 , 22	22
		1,250	20 , 23	22
		5,000	20 , 20	20
	2-Aminoanthracene(2-AA)	1.0	153 , 162	158
TA100	Water for injection	0	115 , 115	115
	FER-E60	4.88	107 , 70	89
		19.5	93 , 91	92
		78.1	98 , 94	96
		313	94 , 76	85
		1,250	91 , 95	93
		5,000	59* , 46*	53
	2-Aminoanthracene(2-AA)	2.0	638 , 441	540
TA1535	Water for injection	0	13 , 14	14
	FER-E60	4.88	14 , 9	12
		19.5	9 , 7	8
		78.1	10 , 5	8
		313	9 , 5	7
		1,250	7 , 12	10
		5,000	14 , 12	13
	2-Aminoanthracene(2-AA)	3.0	132 , 156	144
TA1537	Water for injection	0	10 , 8	9
	FER-E60	4.88	10 , 8	9
		19.5	3 , 10	7
		78.1	4 , 6	5
		313	9 , 11	10
		1,250	9 , 4	7
		5,000	5 , 8	7
	2-Aminoanthracene(2-AA)	3.0	243 , 242	243
WP2*uvrA* (pKM101)	Water for injection	0	180 , 139	160
	FER-E60	4.88	136 , 171	154
		19.5	169 , 164	167
		78.1	178 , 176	177
		313	188 , 171	180
		1,250	192 , 191	192
		5,000	191 , 163	177
	2-Aminoanthracene(2-AA)	2.0	440 , 441	441

*: Indicated growth inhibition

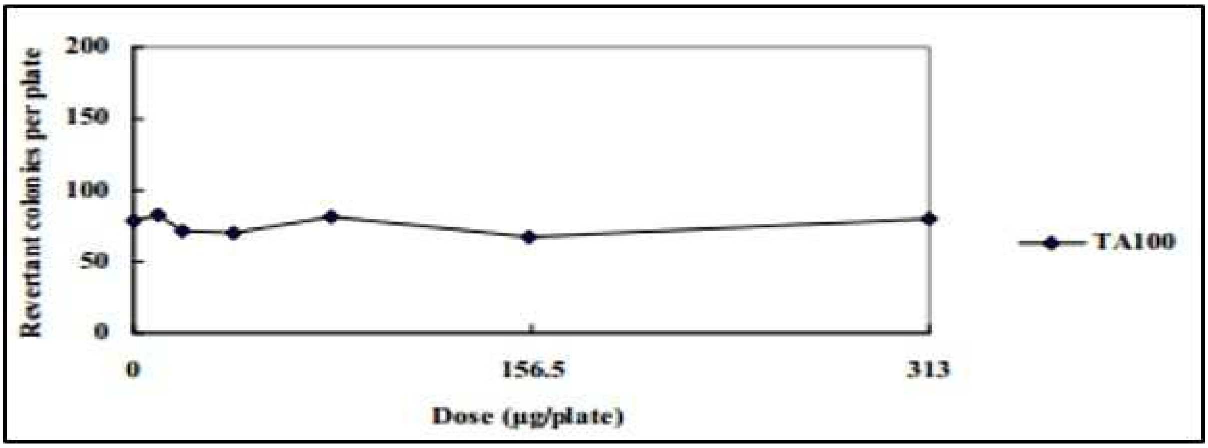
나) 본시험

(1) 복귀 변이 콜로니수의 계측: 시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 시험물질에 의한 생육저해제는 TA100 균주의 대사활성화 비존재하에서는 313㎍/plate의 용량에서 관찰되었다. 양성대조군에서는 각 균주의 복귀변이 콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

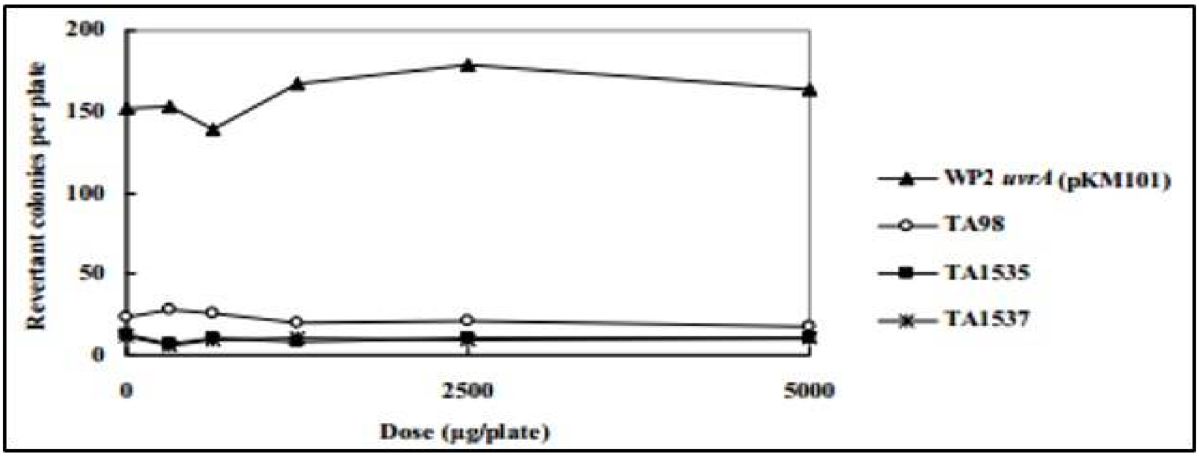
(2) 시험물질의 침전 또는 석출: 대사활성화 우무에 관계없이 모든 용량에서 관찰되지 않았다.



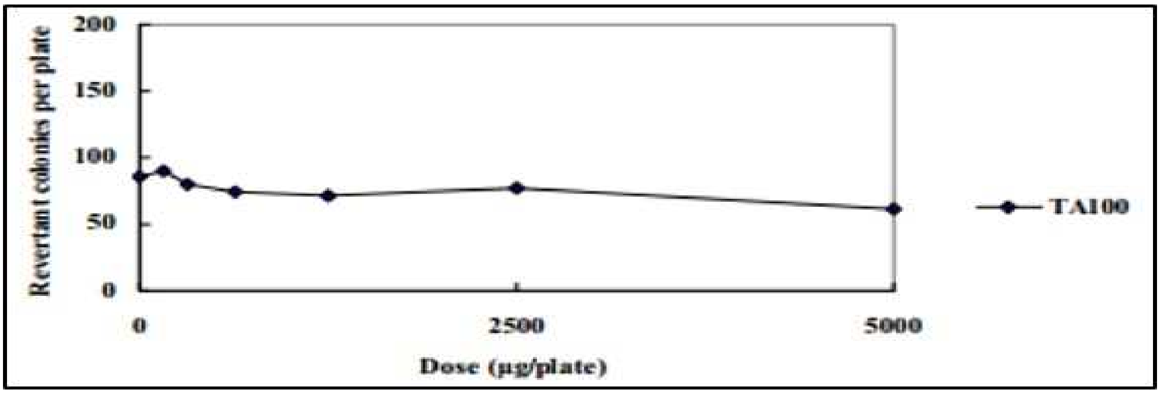
[그림 107] Dose-response curve in the absence of metabolic activation (TA98, TA1535, TA1537 and WP2*uvrA*(pKM101), Main Study)



[그림 108] Dose-response curve in the absence of metabolic activation (TA100, Main Study)



[그림 109] Dose-response curve in the presence of metabolic activation (TA98, TA1535, TA1537 and WP2*uvrA*(pKM101), Main Study)



[그림 110] Dose-response curve in the presence of metabolic activation (TA100, Main Study)

[표 54] The number of revertant colonies per plate in the absence of metabolic activation (Main Study)

Strain	Test item	Dose level (μg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	12 , 13 , 8	11	3
	FER-E60	313	17 , 13 , 10	13	4
		625	13 , 10 , 13	12	2
		1,250	15 , 12 , 16	14	2
		2,500	10 , 14 , 12	12	2
		5,000	5 , 18 , 13	12	7
	2-Nitrofluorene(2-NF)	5.0	445 , 474 , 487	469	22
TA100	Water for injection	0	84 , 79 , 71	78	7
	FER-E60	9.78	75 , 85 , 90	83	8
		19.6	77 , 61 , 76	71	9
		39.1	77 , 69 , 66	71	6
		78.3	88 , 85 , 71	81	9
		157	76 , 70 , 55	67	11
		313	74* , 100* , 65*	80	18
	Sodium azide(SA)	1.5	497 , 481 , 458	479	20
TA1535	Water for injection	0	9 , 9 , 9	9	0
	FER-E60	313	19 , 12 , 10	14	5
		625	15 , 8 , 14	12	4
		1,250	11 , 13 , 13	12	1
		2,500	16 , 6 , 13	12	5
		5,000	8 , 9 , 7	8	1
	Sodium azide(SA)	1.5	382 , 458 , 428	423	38
TA1537	Water for injection	0	7 , 7 , 9	8	1
	FER-E60	313	8 , 4 , 3	5	3
		625	6 , 5 , 5	5	1
		1,250	7 , 2 , 3	4	3
		2,500	6 , 2 , 4	4	2
		5,000	5 , 5 , 5	5	0
	9-Aminoacridine(9-AA)	80.0	353 , 338 , 333	341	10
WP2*uvrA* (pKM101)	Water for injection	0	119 , 128 , 113	120	8
	FER-E60	313	158 , 149 , 143	150	8
		625	140 , 162 , 129	144	17
		1,250	131 , 137 , 149	139	9
		2,500	154 , 175 , 163	164	11
		5,000	113 , 115 , 142	123	16
	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF2)	0.005	1059 , 886 , 762	902	149

S.D.: Standard Deviation
*: Indicated growth inhibition

[표 55] The number of revertant colonies per plate in the presence of metabolic activation (Main Study)

Strain	Test item	Dose level (㎍/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	32 , 22 , 16	23	8
	FER-E60	313	24 , 34 , 25	28	6
		625	29 , 25 , 23	26	3
		1,250	16 , 26 , 18	20	5
		2,500	25 , 23 , 16	21	5
		5,000	11 , 17 , 23	17	6
	2-Aminoanthracene(2-AA)	1.0	142 , 142 , 177	154	20
TA100	Water for injection	0	76 , 93 , 90	86	9
	FER-E60	156	92 , 82 , 98	91	8
		313	74 , 83 , 83	80	5
		625	76 , 76 , 73	75	2
		1,250	75 , 64 , 77	72	7
		2,500	72 , 74 , 86	77	8
		5,000	50* , 74* , 59*	61	12
	2-Aminoanthracene(2-AA)	2.0	716 , 727 , 748	730	16
TA1535	Water for injection	0	10 , 10 , 19	13	5
	FER-E60	313	6 , 9 , 7	7	2
		625	12 , 10 , 11	11	1
		1,250	8 , 7 , 10	8	2
		2,500	12 , 10 , 10	11	1
		5,000	10 , 11 , 10	10	1
	2-Aminoanthracene(2-AA)	3.0	148 , 143 , 146	146	3
TA1537	Water for injection	0	12 , 16 , 8	12	4
	FER-E60	313	4 , 9 , 6	6	3
		625	16 , 6 , 5	9	6
		1,250	9 , 14 , 10	11	3
		2,500	9 , 6 , 13	9	4
		5,000	8 , 14 , 8	10	3
	2-Aminoanthracene(2-AA)	3.0	194 , 193 , 194	194	1
WP2*uvrA* (pKM101)	Water for injection	0	163 , 151 , 143	152	10
	FER-E60	313	153 , 152 , 153	153	1
		625	130 , 130 , 156	139	15
		1,250	168 , 162 , 173	168	6
		2,500	192 , 172 , 174	179	11
		5,000	146 , 183 , 162	164	19
	2-Aminoanthracene(2-AA)	2.0	453 , 456 , 528	479	42

S.D.: Standard Deviation
*: Indicated growth inhibition

다) Historical Control Data: 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의 복귀편이 콜로니수의 평균치는 Historical Control Data의 범위내에 속하였다.

[표 56] Historical control data

Historical negative control values of revertant colonies

Strain	S9 mix	N	Mean ± S.D.	Range Lower	Range Upper
TA100	-	100	102.9 ± 14.6	69.0	136.9
	+	100	113.0 ± 16.7	74.4	151.7
TA1535	-	100	11.6 ± 2.5	4.2	18.9
	+	100	10.7 ± 2.5	5.1	16.3
WP2*uvrA* (pKM101)	-	94	124.8 ± 19.4	73.5	176.1
	+	96	144.3 ± 17.5	107.5	181.2
TA98	-	100	16.9 ± 4.1	5.6	28.2
	+	100	24.2 ± 4.5	9.9	38.5
TA1537	-	100	6.7 ± 2.4	1.2	12.1
	+	100	10.7 ± 2.9	3.0	18.4

Historical positive control values of revertant colonies

Strain	S9 mix	Positive control	Dose (μg/plate)	N	Mean ± S.D.	Range Lower	Range Upper
TA100	-	SA	1.5	110	520.7 ± 106.2	256.5	784.9
	+	2-AA	2.0	59	533.8 ± 155.7	136.8	930.9
TA1535	-	SA	1.5	110	441.1 ± 85.0	262.6	619.6
	+	2-AA	3.0	66	127.8 ± 37.5	41.6	214.1
WP2*uvrA* (pKM101)	-	AF2	0.005	85	865.3 ± 203.6	319.9	1410.7
	+	2-AA	2.0	106	408.2 ± 91.8	232.5	583.9
TA98	-	2-NF	5.0	110	573.7 ± 115.4	272.9	874.4
	+	2-AA	1.0	103	345.1 ± 95.6	134.6	555.7
TA1537	-	9-AA	80.0	110	417.8 ± 119.8	135.7	699.8
	+	2-AA	3.0	59	151.1 ± 38.4	48.0	254.2

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% Carboxymethyl cellulose

SA : Sodium azide.

2-AA : 2-Aminoanthracene

AF2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2-NF : 2-Nitrofluorene

9-AA : 9-Aminoacridine

The above historical control values were obtained from the data pooled from February 22, 2008 to July 15, 2010.

The range was calculated by the control limit of $\bar{X}$ derived from $\bar{X}$-$\bar{R}$-$\bar{Rs}$ value.

라) 시험의 성립: 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치 Historical Control Data범위 내에 속하였고, 각 균주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실한 증가가 확인되었다. 또한, 생육저해가 인정되지 않는 용량이 4용량 이상이었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

2) 결론: 이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 FER-E60의 유전자 돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

마. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

1) 결과 및 고찰

가) 세포증식억제 시험: 5,000㎍/mL을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50㎍/mL의 용량으로 세포증식억제시험을 실시한 결과, 단시간처리법 및 연속처리법의 모든 처리계열에서 세포독성이 관찰되었다. 50% 세포증식억제용량 (Inhibition concentration 50%: IC_{50})을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 145.9㎍/mL, 대사활성화존재하는 440.1㎍/mL, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 428.0㎍/mL이었다. 시험물질의 침전은 단시간처리법은 2,500㎍/mL이상, 연속처리법은 1,000㎍/mL이상에서 관찰되었다. 따라서 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한 각각의 처리계열에 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	150, 75.0, 37.5, 18.8
	+	440, 220, 110, 55
연속처리법	-	430, 215, 108, 53.8

[표 57] Summary of growth inhibition study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	Growth of cells (OD) (Mean±S.D.)			Growth rate (%)
Water for injection	0	-	6-18	0.919	±	0.050	100
FER-E60	5	-	6-18	0.951	±	0.041	104
	10	-	6-18	0.981	±	0.100	107
	50	-	6-18	0.811	±	0.053	88.3
	100	-	6-18	0.636	±	0.032	69.2
	250	-	6-18	0.083	±	0.001	9.01
	500	-	6-18	0.085	±	0.006	9.20
	1,000	-	6-18	0.101	±	0.024	10.9
	2,500†	-	6-18	0.092	±	0.008	10.0
	5,000†	-	6-18	0.112	±	0.006	12.2
Water for injection	0	+	6-18	0.753	±	0.030	100
FER-E60	5	+	6-18	0.757	±	0.071	100
	10	+	6-18	0.794	±	0.035	105
	50	+	6-18	0.733	±	0.072	97.3
	100	+	6-18	0.709	±	0.047	94.1
	250	+	6-18	0.615	±	0.035	81.7
	500	+	6-18	0.287	±	0.049	38.1
	1,000	+	6-18	0.088	±	0.005	11.6
	2,500†	+	6-18	0.086	±	0.004	11.4
	5,000†	+	6-18	0.106	±	0.001	14.0
Water for injection	0	-	24-0	1.117	±	0.051	100
FER-E60	5	-	24-0	1.141	±	0.064	102
	10	-	24-0	1.146	±	0.099	103
	50	-	24-0	1.085	±	0.115	97.1
	100	-	24-0	1.067	±	0.016	95.5
	250	-	24-0	0.802	±	0.012	71.8
	500	-	24-0	0.450	±	0.006	40.3
	1,000†	-	24-0	0.289	±	0.030	25.9
	2,500†	-	24-0	0.092	±	0.006	8.19
	5,000†	-	24-0	0.109	±	0.011	9.72

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times
S.D.:Standard deviation
† : Precipitation

나) 본시험

(1) 염색체이상 관찰 대상용량: 검체제작과정에서 단시간 대사활성화비존재하 및 존재하는 최고용량에서 분열중기상 세포 200개를 확보 할 수 있었기 때문에 최고용량을 포함한 3용량을, 연속처리법의 대사활성화비존재하는 최고용량에서 분열중기상 세포 200개를 확보할 수 없었기 때문에 최고용량을 제외한 이하 3용량을 선정하였다.

(2) 염색체이상 출현빈도: 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하에서 염색체 이상을 가진 세포의 출현빈도는 5%미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되 지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다.(Fishet’s exact test, $p \geq 0.05$) 연속처리법의 대사활성화비존재하의 관찰 가능한 최고용량인 215㎍/mL의 용량에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 4.5%로 음성대조군(0.5%)과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었지만 (Fishet’s exact test, $p<0.05$), 염색체이상 출현빈도는 5%미만으로, 음성으로 판정되었다. 양성대조군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 10%이상이며, 음성대조군과 비교시 통계학저으로 유의하게 증가하였다.(Fishet’s exact test, $p<0.05$).

[표 58] Summary of main study

Test substance	Dose (μg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations						gap (%)	Number of cells with numerical aberrations		
					ctb	csb	cte	cse	frg	total (%)		end	pol	total (%)
Water for injection	0	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
FER-E60	18.8	-	6-18	not observed										
	37.5	-	6-18	100	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	75	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	150	-	6-18	100	1	0	0	1	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
MMC	0.05	-	6-18	100	7	0	8	0	0	26* (13.0)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)
				100	4	0	9	0	0			0	0	
Water for injection	0	+	6-18	100	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	1	0			0	0	
FER-E60	55	+	6-18	not observed										
	110	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	220	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	440	+	6-18	100	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	1	0	0			0	0	
B[a]P	20	+	6-18	100	6	0	21	0	0	43* (21.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	6	0	13	1	0			0	0	
Water for injection	0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	1	0	0			0	0	
FER-E60	53.8	-	24-0	100	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	1	0	0	0	0			0	0	
	108	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)
				100	0	0	0	0	0			0	0	
	215	-	24-0	100	1	0	2	0	0	9* (4.5)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)
				100	1	0	0	5	0			0	0	
	430	-	24-0	toxic										
MMC	0.05	-	24-0	100	7	0	8	0	0	31* (15.5)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)
				100	4	0	11	1	0			0	0	

Aberration; gap: chromatid and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol:polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

Significant differece fromnegative control by fisher's exact test : * $p<0.05$

다) Historical Control Data: 음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 Historical Control Data의 범위내에 있었다.

[표 59] Historical control data

Historical control values of structural aberrations

Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range(%) MIN	Range(%) MAX
Negative control	-	6-18	99	0.2	±	0.3	0	<5
	+	6-18	99	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	99	0.2	±	0.3	0	<5
Positive control	-	6-18[a)]	99	17.3	±	3.8	6*	29*
	+	6-18[b)]	99	22.2	±	6.6	3*	42*
	-	24-0[a)]	99	19.6	±	4.5	6*	33*

Historical control values of numerical aberrations

Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range(%) MIN	Range(%) MAX
Negative control	-	6-18	68	0.2	±	0.5	0	<5
	+	6-18	68	0.1	±	0.2	0	<5
	-	24-0	68	0.2	±	0.5	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% methyl cellulose 1500cP, *etc.*

a : Mitomycin C (0.05 μg/mL)

b : Benzo[a]pyrene (20 μg/mL)

N : The total number of chromosome aberration test

The above historical control values were obtained from the data pooled from October 16, 2008 to June 14, 2010.

*: The range was calculated by the control limit from Mean ± 3 S.D.

라) 시험의 립: 양성대조군에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10%이상으로 음성대조군과 비교해서 유의한 증가가 확인되었고, 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열중기상 세포가 관찰 가능하였다. 또한, 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다.

2) 결론: 이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 FER-E60의 염색체이상 유발성은 음성으로 판정되었다.

바. 마우스를 이용한 소핵시험

1) 결과 및 고찰

가) 용량설정시험 및 검체제작시간 설정시험: 본시험은 최고용량을 설정하기 위해 5,000, 2,000, 1,000, 600 및 300mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 투여 후 2시간에 1,000, 2,000, 및 5,000mg/kg의 용량에서 약물혼입변이 관찰되었고, 투여 후 1일째에는 모든 용량에서 관찰되었다. 사망동물은 관찰기간 동안 모든 용량에서 관찰되지않았다. 따라서 본시험은 사망동물이 관찰되지 않은 5,000mg/kg을 최고용량을 하고, 이하 공비 2로 2,500 및 1,250mg/kg의 시험물질군을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다. 본시험의 골수세포 채취시간을 설정하기 위해 용량설정시험에서 설정된 최고용량인 5,000mg/kg을 투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수세포를 채취하여 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발빈도는 증가되지 않았다. 따라서 일반적으로 사용하는 투여 후 24시간을 본시험의 골수세포 채취사간으로 설정하였다.

[표 60] Clinical signs of dose range finding study in male ICR mice

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment				
					0	2	24	48	72
FER-E60	300	P.O.	3	NAD	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0
	600	P.O.	3	NAD	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0
	1,000	P.O.	3	NAD	3	0	0	3	3
				Compound-colored stool	0	3	3	0	0
	2,000	P.O.	3	NAD	3	0	0	3	3
				Compound-colored stool	0	3	3	0	0
	5,000	P.O.	3	NAD	3	0	0	3	3
				Compound-colored stool	0	3	3	0	0

NAD : No Abnormalities Detected
P.O. : Per Os

[표 61] Clinical signs bone marrow collection time determining study in male ICR mice

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment				
					0	2	24	48	72
FER-E60	5,000	P.O.	3	NAD	3	3	0	-	-
				Compound-colored stool	0	0	3	-	-
	5,000	P.O.	3	NAD	3	3	0	3	-
				Compound-colored stool	0	0	3	0	-
	5,000	P.O.	3	NAD	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0

NAD : No Abnormalities Detected
P.O.: Per Os
- : No data

[표 62] Results of bone marrow collection time determining study in male ICR mice

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Counted PCE : NCE	PCE/ (PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
FER-E60	5,000	P.O.	24	B1101	169 : 331	0.338	1 / 2000
				B1102	184 : 316	0.368	0 / 2000
				B1103	163 : 337	0.326	1 / 2000
				Total	- : -	-	2 / 6000
				Mean±S.D.	- : -	0.344 ± 0.022	0.7 ± 0.6
		P.O.	48	B1201	154 : 346	0.308	0 / 2000
				B1202	173 : 327	0.346	1 / 2000
				B1203	176 : 324	0.352	0 / 2000
				Total	- : -	-	1 / 6000
				Mean±S.D.	- : -	0.335 ± 0.024	0.3 ± 0.6
		P.O.	72	B1301	171 : 329	0.342	1 / 2000
				B1302	167 : 333	0.334	0 / 2000
				B1303	186 : 314	0.372	0 / 2000
				Total	- : -	-	1 / 6000
				Mean±S.D.	- : -	0.349 ± 0.020	0.3 ± 0.6

P.O.: Per Os
S.D.: Standard Deviation
MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte
PCE: Polychromatic erythrocyte
NCE: Normochromatic erythrocyte

나) 본시험

(1) 일반증상 및 사망동물의 관찰: 시험물질군의 모든 용량에서 투여 후 1일 약물혼입변이 관찰되었지만, 사망동물은 관찰되지 않았다.

[표 63] Clinical sings of main study in male ICR mice

Group		Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Hours after treatment		
						0	2	24
Negative control	Water for injection	0	P.O.	5	NAD	5	5	5
Test substance	FER-E60	1,250	P.O.	5	NAD	5	5	0
					Compound-colored stool	0	0	5
		2,500	P.O.	5	NAD	5	5	0
					Compound-colored stool	0	0	5
		5,000	P.O.	5	NAD	5	5	0
					Compound-colored stool	0	0	5
Positive control	MMC	2	I.P.	5	NAD	5	5	5

P.O.: Per Os
I.P.: Intraperitoneal
MMC : Mitomycin C
NAD : No Abnormalities Detected

(2) 체중변화: 각군 모든 동물에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(p≥0.5, ANOVA)

[표 64] <Body weights of main study in male ICR mice>

Group		Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Body weight (g) at the time of Administration	Body weight (g) at the time of Sacrifice
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	36.3	35.8
					1102	34.1	33.4
					1103	34.1	33.7
					1104	32.7	32.3
					1105	32.7	31.9
					Mean±S.D.	34.0 ± 1.5	33.4 ± 1.5
Test substance	FER-E60	1,250	P.O.	24	1201	36.0	35.3
					1202	34.6	34.5
					1203	33.7	34.1
					1204	32.8	31.6
					1205	32.2	31.4
					Mean±S.D.	33.8 ± 1.5	33.4 ± 1.8
		2,500	P.O.	24	1301	35.6	35.3
					1302	34.6	33.6
					1303	33.7	32.2
					1304	33.0	32.5
					1305	32.1	32.4
					Mean±S.D.	33.8 ± 1.4	33.2 ± 1.3
		5,000	P.O.	24	1401	35.0	35.2
					1402	34.6	33.7
					1403	33.6	33.0
					1404	33.4	34.2
					1405	31.8	31.4
					Mean±S.D.	33.7 ± 1.2	33.5 ± 1.4
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	35.0	33.6
					1502	34.8	33.7
					1503	33.6	33.6
					1504	33.5	33.0
					1505	31.7	30.4
					Mean±S.D.	33.7 ± 1.3	32.8 ± 1.4

P.O.:Per Os
I.P. : Intraperitoneal
MMC : Mitomycin C
S.D. : Standard Deviation

(3) 소핵유발 출현빈도: 시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가는 관찰되지않았다.(p≥0.5, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다.(p≥0.5, ANOVA). 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다.(p≥0.5, Kastenbaum & Bowman). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관칠되지 않았다.(p≥0.5, ANOVA)

[표 65] Results of main study in male ICR mice

Groups		Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Counted PCE : NCE	PCE/ (PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	149 : 351	0.298	0 / 2000
					1102	148 : 352	0.296	0 / 2000
					1103	162 : 338	0.324	0 / 2000
					1104	165 : 335	0.330	0 / 2000
					1105	157 : 343	0.314	0 / 2000
					Total	- : -	-	0 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.312 ± 0.015	0.0 ± 0.0
Test Substance	FER-E60	1,250	P.O.	24	1201	228 : 272	0.456	0 / 2000
					1202	169 : 331	0.338	0 / 2000
					1203	157 : 343	0.314	0 / 2000
					1204	153 : 347	0.306	0 / 2000
					1205	139 : 361	0.278	0 / 2000
					Total	- : -	-	0 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.338 ± 0.069	0.0 ± 0.0
		2,500	P.O.	24	1301	174 : 326	0.348	0 / 2000
					1302	134 : 366	0.268	0 / 2000
					1303	133 : 367	0.266	0 / 2000
					1304	169 : 331	0.338	0 / 2000
					1305	130 : 370	0.260	0 / 2000
					Total	- : -	-	0 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.296 ± 0.043	0.0 ± 0.0
		5,000	P.O.	24	1401	149 : 351	0.298	0 / 2000
					1402	141 : 359	0.282	0 / 2000
					1403	123 : 377	0.246	0 / 2000
					1404	135 : 365	0.270	0 / 2000
					1405	155 : 345	0.310	0 / 2000
					Total	- : -	-	0 / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.281 ± 0.025	0.0 ± 0.0
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	190 : 310	0.380	113 / 2000
					1502	165 : 335	0.330	85 / 2000
					1503	156 : 344	0.312	93 / 2000
					1504	157 : 343	0.314	83 / 2000
					1505	187 : 313	0.374	104 / 2000
					Total	- : -	-	478† / 10000
					Mean±S.D.	- : -	0.342 ± 0.033	95.6 ± 12.8

P.O.: Per Os
I.P. : Intraperitoneal
MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte
PCE : Polychromatic erythrocyte
NCE : Normochromatic erythrocyte
MMC : Mitomycin C
S.D. : Standard Deviation
Significant difference from negative control by Kastendaum & Bowman : † $p < 0.05$

다) 시험의 성립: 음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 범위내에 있었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다.

[표 66] Historical control data>

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)

Group	Dose (mg/kg)	n	MNPCE/2000PCE Mean±S.D.			Range(MNPCE/2000PCE) MIN	MAX
Negative control	0	100	0.9	±	0.59	0	2.3
Positive control	2	100	155.1	±	29.00	85.9	224.4

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes

Group	Dose (mg/kg)	n	PCE/NCE+PCE Mean±S.D.			Range(PCE/NCE+PCE) MIN	MAX
Negative control	0	100	0.425	±	0.053	0.304	0.546
Positive control	2	100	0.390	±	0.078	0.189	0.591

Negative control : Including water for injection, olive oil, corn oil, 0.5% methyl cellulose 1500cP, 0.5% CMC-Na, DMSO, Saline *etc.*

Positive control : Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single administration)

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 6, 2006 to Aug. 4, 2010.

The range was calculated by the control limit from Mean ± 2.5 S.D.

2) 결론: 이상의 결과로부터, 본시험 조건하에서 시험물질 FER-E60의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 음성으로 판정하였다.

사. 추가 독성시험

1) 본 연구에서 급성 독성시험과 유전독성시험(소핵, 염색체이상, 복귀돌연변이)을 수행한 결과 모두 음성으로 판정되었다.

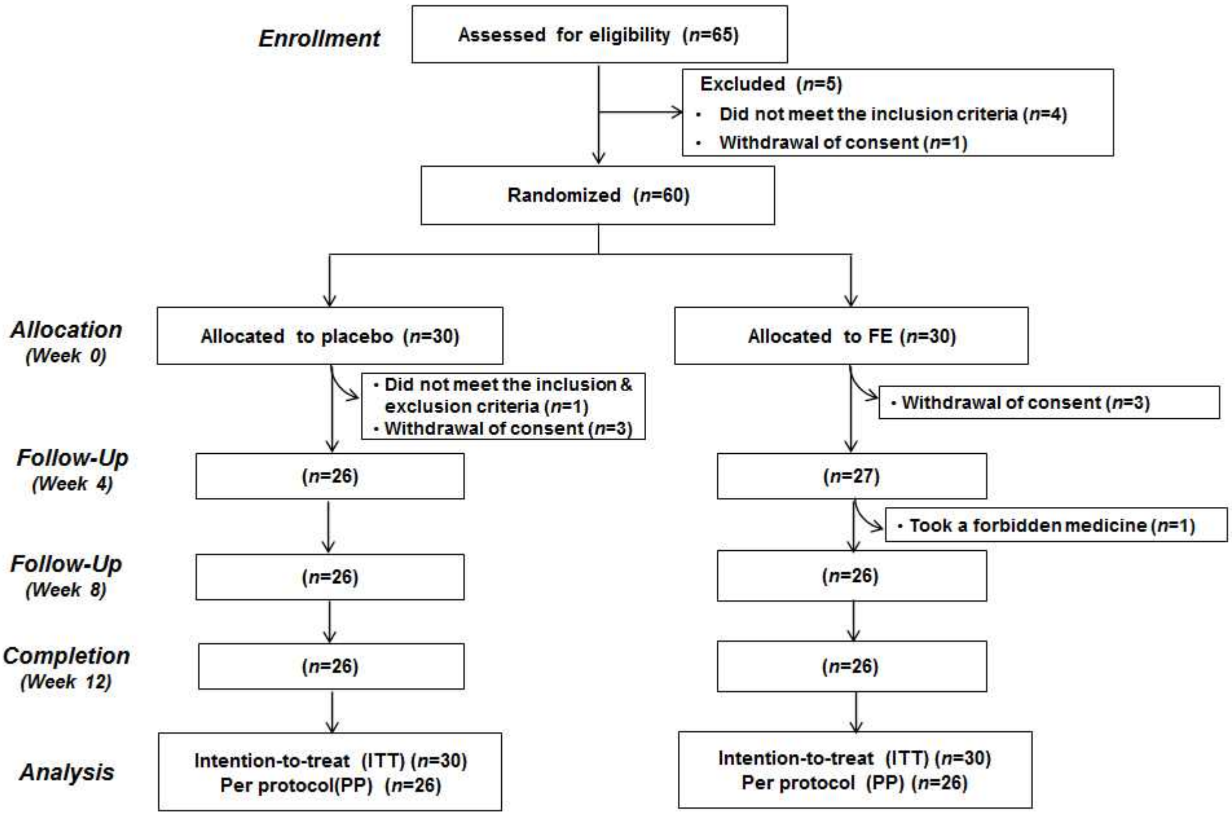
2) 본 연구시료인 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물에 대한 인체적용시험의 결과 해석이 완료되면 식품의약품안전처 관계자와 협의 후 건강기능식품 개별인정을 위한 13주 반복 독성시험 추진하겠음.

10. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 인체적용시험

가. 연구대상자 등록 및 진행

1) 본 연구의 진행은 그림 111과 같았다. 총 65명을 스크리닝하여 60명의 연구대상자가 선정되었다. 스크리닝에서 탈락한 5명 중 4명은 선정/제외기준에 부합하지 않는 자였고, 1명은 무작위배정 전에 동의 철회하였다.

2) 등록된 60명의 연구대상자는 대조군 또는 시험군으로 무작위 배정되었다. 시험기간에 대조군에서 4명(동의철회 3명, 선정제외기준부적합 1명)과 시험군에서 4명(동의철회 3명, 병용금기약물복용 1명)이 중도 탈락하여 최종적으로 52명이 시험을 완료하였다.



[그림 111] CONSORT diagram for flow of subjects through the study

나. 연구결과

연구대상자 방문 완료(2018.01.31.) 되었으나 효능과 관련된 바이오마커 분석 등이 완료되지 않았기에 기능성평가(VAS, WOMAC, 관절염증 관련 바이오마커) 항목의 raw data를 아래에 제시함

--> 연구결과 및 해석이 완료되면 보고서 내용을 R&D 연구마당 연구성과 항목에 추가 탑재하겠음.

1) 기능성평가 - VAS, WOMAC

Screening No.	VAS (mm)				WOMAC (total score)			
	0주	4주	8주	12주	0주	4주	8주	12주
S-001	10	10	20	30	7	8	10	13
S-002	20	20	0	0	27	13	0	0
S-003	20	50	20	20	5	6	9	4
S-004	25	25	5	10	8	23	14	6
S-005	50	15	15	10	34	12	7	5
S-006	40	70	30	50	23	24	33	34
S-007	30	35	.	.	15	22	.	.
S-008	30	15	10	10	32	31	27	24
S-009	30	45	50	45	22	24	45	32
S-010	30	.	.	.	23	.	.	.
S-011	50	.	.	.	51	.	.	.
S-012	15	30	15	20	6	11	8	11
S-013	30	10	20	20	17	10	27	17
S-014	.	.	.	.	.	.	.	.
S-015	35	20	35	10	33	7	13	6
S-016	40	.	.	.	12	.	.	.
S-017	10	30	10	30	6	15	8	30
S-018	30	20	20	20	19	30	27	9
S-019	20	0	10	0	3	0	2	2
S-020	50	.	.	.	26	.	.	.
S-021	10	.	.	.	31	.	.	.
S-022	30	40	10	20	30	13	7	24
S-023	30	.	.	.	22	.	.	.
S-024	30	20	40	15	22	25	18	18
S-025	80	70	50	50	46	50	19	30
S-026	20	15	20	10	8	4	7	8
S-027	20	25	60	10	5	21	10	4
S-028	35	30	25	0	30	27	32	15
S-029	10	0	0	0	13	37	12	6
S-030	20	30	30	20	25	18	23	25
S-031	15	20	10	5	7	5	3	3
S-032	35	.	.	.	16	.	.	.

Screening No.	VAS (mm)				WOMAC (total score)			
	0주	4주	8주	12주	0주	4주	8주	12주
S-033	40	35	30	20	34	31	25	7
S-034	.	.	.	.	.	.	.	.
S-035	40	30	30	15	22	33	21	18
S-036	50	40	20	15	39	52	25	20
S-037	70	.	.	.	41	.	.	.
S-038	10	15	30	10	6	22	17	27
S-039	25	20	20	15	11	20	19	24
S-040	70	30	30	40	30	15	14	18
S-041	30	20	0	0	20	7	5	7
S-042	50	30	50	30	32	30	22	35
S-043	30	35	30	20	15	15	21	7
S-044	.	.	.	.	.	.	.	.
S-045	30	30	40	30	29	10	21	16
S-046	60	30	60	70	47	59	53	53
S-047	30	20	60	40	42	40	58	43
S-048	50	30	50	20	15	21	24	26
S-049	25	20	30	10	24	25	24	13
S-050	40	20	17	25	35	27	22	20
S-051	50	25	50	55	45	27	32	14
S-052	40	30	50	35	17	44	33	30
S-053	20	25	10	10	17	17	12	9
S-054	20	40	20	10	14	37	4	18
S-055	30	50	40	50	15	18	16	23
S-056	20	10	10	10	6	7	8	7
S-057	20	20	10	10	3	3	2	4
S-058	40	15	10	15	28	11	7	30
S-059	20	20	20	20	10	14	7	5
S-060	.	.	.	.	.	.	.	.
S-061	80	60	70	70	42	53	56	57
S-062	30	30	30	22	23	10	17	3
S-063	20	10	10	30	4	6	13	18
S-064	15	10	0	5	4	2	6	7
S-065	30	30	30	40	8	33	41	37

2) 관절 염증 관련 바이오마커 - MMP-3, MMP-9, COMP, IL-6

Screening No.	MMP-3 (serum, ng/mL)		MMP-9 (serum, ng/mL)		COMP (serum, ng/mL)		IL-6 (serum, pg/mL)	
	0주	12주	0주	12주	0주	12주	0주	12주
S-001	29.4	18.7	402.9	374.5	456.7	448.1	6.5	4.5
S-002	22.7	20.9	178.7	186.9	287.7	373.8	7.6	4.4
S-003	14.2	15.9	184.9	195.2	268.3	240.8	9.0	5.0
S-004	9.5	7.7	190.2	150.6	148.9	133.7	2.6	4.0
S-005	7.1	5.2	251.8	445.3	156.9	94.9	1.6	7.4
S-006	2.7	3.5	129.4	144.3	163.2	174.5	4.2	2.7
S-007	17.0	.	379.8	.	284.6	.	7.2	.
S-008	13.0	11.6	277.8	202.5	208.2	199.3	6.1	3.9
S-009	12.2	13.2	197.5	218.4	176.2	170.3	1.8	4.2
S-010	20.7	.	186.6	.	146.9	.	4.2	.
S-011	.	.	.	.	.	.	.	.
S-012	9.4	13.8	188.4	195.3	214.2	230.7	4.4	5.5
S-013	14.6	13.8	300.8	214.5	122.4	120.4	16.0	3.9
S-014	.	.	.	.	.	.	.	.
S-015	8.5	8.9	224.2	221.6	252.1	294.3	2.8	4.2
S-016	21.5	.	417.6	.	374.9	.	8.1	.
S-017	13.6	8.7	224.2	209.1	205.4	141.5	5.1	6.2
S-018	5.9	6.1	280.6	202.5	174.9	154.1	1.8	3.6
S-019	10.8	5.9	216.5	171.5	137.6	92.2	3.9	3.2
S-020	4.0	.	297.9	.	147.4	.	1.3	.
S-021	8.4	.	206.2	.	263.4	.	2.3	.
S-022	10.5	8.0	87.7	180.2	302.3	207.4	4.6	7.0
S-023	23.4	.	343.3	.	568.1	.	9.1	.
S-024	7.7	12.4	181.6	106.5	210.5	169.6	2.7	3.0
S-025	11.4	9.6	325.6	143.1	222.9	197.1	3.0	3.2
S-026	9.6	9.1	201.9	80.5	242.9	234.8	2.1	4.3
S-027	6.9	6.9	204.2	114.2	180.4	237.8	4.8	6.0
S-028	18.6	35.0	272.6	220.9	162.2	134.5	3.1	5.2
S-029	7.4	8.3	188.9	120.3	221.9	269.2	0.9	3.5
S-030	6.3	4.2	321.6	304.0	184.9	209.1	1.2	4.5
S-031	24.8	14.2	575.6	441.8	318.3	365.1	3.9	3.5
S-032	14.5	.	167.6	.	150.4	.	2.7	.

Screening No.	MMP-3 (serum, ng/mL)		MMP-9 (serum, ng/mL)		COMP (serum, ng/mL)		IL-6 (serum, pg/mL)	
	0주	12주	0주	12주	0주	12주	0주	12주
S-033	8.8	21.9	159.7	123.7	152.8	159.4	2.2	2.6
S-034	.	.	.	.	.	.	.	.
S-035	15.5	14.9	264.6	99.4	233.0	315.0	1.8	3.6
S-036	7.2	5.8	187.0	255.5	186.7	209.0	1.1	7.4
S-037	87.5	.	330.5	.	177.7	.	1.5	.
S-038	10.6	13.8	98.6	170.4	227.4	290.5	0.7	4.3
S-039	9.1	7.7	138.5	211.9	227.9	262.3	2.0	2.1
S-040	10.4	8.9	325.7	437.3	168.7	324.5	0.9	3.0
S-041	16.3	12.1	163.0	168.1	195.7	238.7	1.2	2.5
S-042	24.7	16.9	693.5	####	311.9	226.9	5.9	10.6
S-043	22.7	17.3	294.5	865.2	201.7	232.6	0.9	3.7
S-044	.	.	.	.	.	.	.	.
S-045	19.8	16.4	220.0	234.4	349.9	364.8	4.9	3.2
S-046	24.6	18.0	362.2	494.5	166.5	203.0	5.3	4.0
S-047	3.9	6.4	178.7	190.5	245.1	162.6	2.3	3.8
S-048	6.0	7.4	63.3	84.0	140.0	185.3	0.5	5.9
S-049	3.3	3.1	368.6	167.4	170.8	246.9	4.7	3.1
S-050	7.0	5.0	139.5	62.2	182.0	193.9	4.2	4.8
S-051	10.2	51.0	212.5	249.0	235.1	154.1	1.3	4.1
S-052	8.4	8.9	240.5	184.7	207.7	230.1	1.7	3.5
S-053	18.4	24.9	115.8	242.6	254.7	208.9	3.5	3.1
S-054	6.3	6.4	160.3	145.1	216.8	275.9	1.9	2.8
S-055	13.3	10.9	173.8	178.5	150.2	129.7	10.1	13.2
S-056	7.4	6.6	71.3	65.6	233.8	268.3	1.2	3.3
S-057	15.5	14.8	180.6	163.8	150.5	146.0	3.5	4.1
S-058	8.5	41.5	234.4	174.8	136.4	177.2	2.5	4.1
S-059	6.8	6.5	203.0	193.1	221.5	199.0	4.6	3.1
S-060	.	.	.	.	.	.	.	.
S-061	6.0	3.5	334.2	432.5	203.9	300.0	3.2	2.3
S-062	16.0	24.9	289.4	210.7	151.3	109.6	2.9	3.5
S-063	3.9	2.8	172.6	204.3	124.4	149.4	2.5	2.2
S-064	15.4	17.2	292.0	323.1	244.2	236.8	4.4	5.9
S-065	5.9	9.0	274.5	122.6	172.5	185.5	14.3	2.4

3) 관절 염증 관련 바이오마커 - TIMP-1, Fructosamine, CTX-II

Screening No.	TIMP-1 (serum, ng/mL)		Fructosamine (serum, ng/mL)		CTX-II (urine, ng/mL creatinine)	
	0주	12주	0주	12주	0주	12주
S-001	201.4	175.4	212.8	204.4	15.2	133.1
S-002	182.2	144.2	149.9	163.2	14.7	182.8
S-003	188.6	158.1	306.4	184.8	166.4	28.7
S-004	149.0	137.0	275.6	257.6	366.2	156.4
S-005	157.0	160.1	136.9	308.7	154.1	65.6
S-006	164.2	119.8	90.9	140.3	119.4	377.7
S-007	214.2	.	232.2	.	284.5	.
S-008	163.4	138.8	123.0	155.4	78.2	28.4
S-009	149.7	130.8	110.0	130.0	155.8	121.7
S-010	143.8	.	98.7	.	228.5	.
S-011	.	.	.	.	.	.
S-012	150.7	156.8	141.6	162.7	30.7	15.5
S-013	202.6	141.3	80.1	127.6	71.9	191.8
S-014	.	.	.	.	.	.
S-015	159.1	131.6	73.2	150.2	112.1	87.7
S-016	160.9	.	179.5	.	72.2	.
S-017	190.1	135.2	96.6	202.2	155.5	45.2
S-018	163.2	126.6	100.3	127.0	324.9	135.4
S-019	147.2	144.9	90.8	135.3	209.0	404.8
S-020	121.6	.	97.6	.	105.3	.
S-021	140.6	.	93.0	.	281.9	.
S-022	158.4	160.9	125.1	116.7	126.8	24.4
S-023	219.1	.	153.8	.	62.6	.
S-024	117.7	100.1	110.9	141.9	100.9	92.0
S-025	147.3	148.3	230.5	175.8	163.4	78.5
S-026	101.8	121.7	102.4	127.1	192.6	94.5
S-027	167.7	137.5	193.2	242.2	154.5	28.7
S-028	131.1	90.3	92.7	86.3	158.0	49.7
S-029	135.9	122.3	149.0	151.0	116.2	164.3
S-030	167.0	159.7	120.1	249.2	115.8	36.8
S-031	174.4	155.6	176.7	105.4	60.7	27.3
S-032	187.5	.	191.8	.	102.0	.

Screening No.	TIMP-1 (serum, ng/mL)		Fructosamine (serum, ng/mL)		CTX-II (urine, ng/mL creatinine)	
	0주	12주	0주	12주	0주	12주
S-033	143.0	140.7	114.1	121.8	141.2	41.6
S-034	.	.	.	.	.	.
S-035	151.6	123.8	202.4	188.2	192.5	130.8
S-036	137.8	143.1	78.9	95.6	186.3	54.7
S-037	184.0	.	140.5	.	431.6	.
S-038	118.7	104.4	88.3	136.5	164.6	202.9
S-039	127.6	124.9	100.9	170.9	109.3	130.9
S-040	162.4	146.8	105.2	159.9	370.3	46.9
S-041	186.5	160.0	103.1	156.5	291.3	111.5
S-042	164.1	167.7	134.9	155.2	83.2	246.1
S-043	189.0	192.5	254.5	174.7	142.4	48.0
S-044	.	.	.	.	.	.
S-045	146.4	150.4	123.4	153.0	138.4	74.9
S-046	175.3	177.4	185.6	165.4	39.7	137.3
S-047	211.2	154.7	119.6	137.0	270.4	96.3
S-048	179.6	134.2	128.3	165.2	255.5	86.5
S-049	120.0	105.5	155.3	178.9	110.1	233.5
S-050	218.2	153.0	72.5	155.7	140.8	28.1
S-051	148.3	145.3	88.9	136.5	303.2	56.6
S-052	150.3	110.8	58.2	143.2	456.7	200.4
S-053	132.9	140.0	208.5	143.8	98.1	46.6
S-054	162.8	133.0	160.6	176.2	573.7	88.6
S-055	188.9	148.0	84.0	146.9	139.6	76.1
S-056	202.0	116.8	197.4	246.0	449.9	36.7
S-057	168.5	117.2	99.8	173.6	131.6	33.9
S-058	145.0	116.8	66.9	140.6	75.0	27.9
S-059	156.4	167.2	225.2	183.4	55.5	20.2
S-060	.	.	.	.	.	.
S-061	115.0	109.7	165.1	163.2	53.5	58.9
S-062	156.1	148.0	165.6	140.7	51.3	254.9
S-063	126.7	148.9	157.2	143.2	37.6	672.4
S-064	168.3	202.6	159.7	114.0	55.5	19.1
S-065	144.5	138.7	267.6	147.8	49.5	118.0

11. 좁은잎천선과나무 대량증식 연구

가. 좁은잎천선과나무 대량증식을 위한 시설 구축

[그림 112] 좁은잎천선과나무 대량증식을 위한 육묘장(서귀포시 남원읍 소재) 구축

나. 좁은잎천선과나무 대량증식 방법 확립

1) 삽목을 통한 묘록 대량 생산

가) 삽목방법 및 시기에 따른 생존률 모니터링

(1) 비닐하우스 내 육묘장에서 삽목을 실시한 바 삽목시기에 따른 생존률은 유의차가 없음.

(2) 삽목자지에 잎이 나오기 전(3월), 후(5월) 비교

[그림 113] 좁은잎천선과나무 삽목을 통한 묘목 생상

[그림 114] 다양한 발근제를 활용한 삽목 조건 확립 실험

2) 묘종 이식/정식에 따른 생존율 확인

가) 발근제 무처리 및 처리 삽목 각 30개체씩 화분 이식 : 생존률 각각 99.33%(298/300)

발근제 무처리 삽목 상태(2016.04.11.)	발근제 처리 삽목 상태(2016.04.11.)
발근제 무처리 화분 이식 상태(2016.07.14.)	발근제 처리 화분 이식 상태(2016.07.14.)

3) 삽목 개체의 정상 발근률 확인

가) 발근제 유도시 빠른 뿌리내림은 확인되었으나 대조군과의 생존률 차이는 유의차 없음.

발근제 미처리(삽목 10일째, 2015.08.11)	발근제 처리(삽목 10일째,2015.08.11.)

발근제 미처리(삽목 70일째, 2015.10.12)	발근제 처리(삽목 70일째,2015.10.12.)

발근제 미처리(삽목 100일째, 2015.12.09)	발근제 처리(삽목 100일째, 2015.12.09)

3) 삽목 개체의 정상 발근률 확인발근제 미처리(삽목 130일째, 2016.02.11)	발근제 처리(삽목 130일째, 2016.02.11.)

4) 좁은잎천선과나무/천선과나무간 삽목/발근률

(1) 두 분류군 간 생존/발근률은 유의차가 없음.

좁은잎천선과나무 삽목 상태(2016.06.10.)	좁은잎천선과나무 발근 상태(2016.06.10.)

5) 좁은잎천선과나무 대량생산을 위한 화분 이식

좁은잎천선과나무 및 천선과나무의 재배포장 구축용 위한 화분 이식 현황

6) 좁은잎천선과나무 대량생산을 현장적응 시험

	◆ 좁은잎천선과나무 육묘 - 온실에서 삽목에 의한 육묘
	◆ 개별 화분으로 이식 - 발근 후 3개월 지난 개체 - 개별 화분으로 이식
	◆ 야외 현장포장으로 정식 - 개별 화분에서 6개월 모니터링 - 야회 현장으로 정식을 위한 이식 - 최종 정식거리: 2m x 2m

다. 좁은잎천선과나무 대량증식법 현장 교육

1) 1차 현장교육

가) 일시: 2016.07.05.

나) 장소: 영농조합법인허브힐 시험포장

[그림 115] 좁은잎천선과 대량증식법 현장교육(1차)

2) 2차 현장교육

가) 일시: 2017.03.06.

나) 장소: 영농조합법인허브힐 시험포장

[그림 116] 좁은잎천선과 대량증식법 현장교육(2차)

12. 판매전략 수립 및 사업화

가. 판매전략 수립

1) 계획

가) 개발목표: 「좁은잎천선과나무 추출물 원료 소재의 골관절염 제품화」에 따라 환경을 분석하고 targeting과 positioning을 설정하고 마케팅 전략을 수립하여 제품 판매 전략의 방향을 잡고자 함.

나) 개발 내용: 건강기능식품 시장 및 관절염 시장 등의 환경을 분석하였고, 타겟팅 및 포지셔닝을 설정하였으며, 브랜드 및 디자인 개발 등을 통한 마케팅 전략을 수립하였음.

2) 수행결과

가) 국·내외 건강기능식품 시장, 기능성식품의 국가별 키워드 분석, 유통 채널의 구성 변동 등을 동향을 파악하였고, 보다 세부적으로 관절염 시장의 국내외 규모와 현재 판매되고 있는 경쟁제품의 동향을 파악하였음. SWOT 분석을 통하여 전략수행 방향을 설정하였고, 관절 고객의 특성 및 Needs를 분석하였음.

나) 관절염 시장 분석 등의 환경분석 결과를 토대로 [40대 이상 여성 및 중장년 세대]를 기본으로 타겟팅하여, 노년층 이전부터 관절 건강에 대한 예비적 관리요소를 부각시킴. 또한 포지셔닝을 위한 프로필 챠트 분석을 통해 제품의 기본 포지셔닝 전략과 방향을 설정하였음.

다) 개발제품의 사업화 추진 로드맵을 수립하였고, 브랜드 및 디자인을 개발하였으며, Price 등 다양한 요인들을 고려하여 마케팅 전략을 수립하였음.

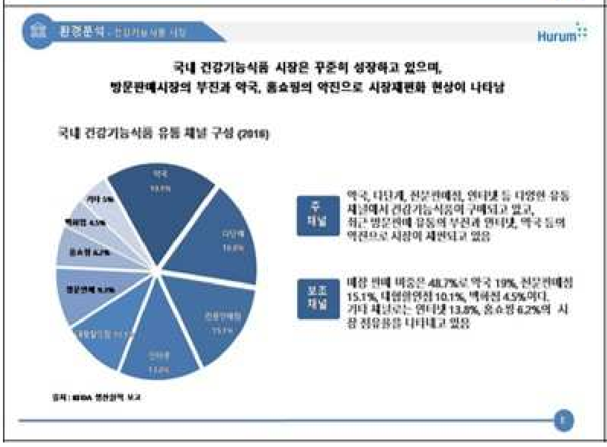
2) 수행결과 세부 내용

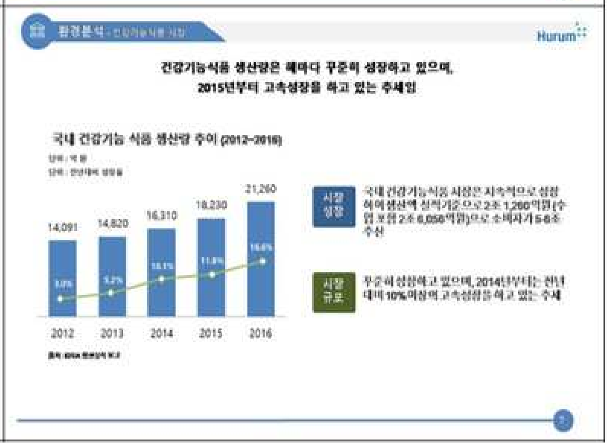
INDEX
Hurum
목 차
INDEX
I. 환경분석
1.1 건강기능식품 시장
1.2 관절염 시장
1.3 경쟁 분석
1.4 관절 고객 특성 분석
II. Targeting & Positioning
2.1 Targeting
2.2 Positioning
III. 좁은잎 추출물 소개
IV. 마케팅 전략
1.1 Product & Branding
1.2 Price
1.3 Place
1.4 Communication
2

환경분석
Hurum
1 건강기능식품 시장
2 관절염 시장
3 경쟁 분석
4 관절 고객 특성 분석
3

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
선진국을 중심으로 건강기능식품 소비의 점진적 증가 및
국내에서도 건강관리에 대한 관심 증대에 따라 건기식 수요 증가
세계 건강기능식품 시장
국내 건강기능식품 시장
2011 2013 2015 2017 2020
• 세계 건강기능식품 시장은 미국(34.3%), 중국(13.8%), 일본(9.2%) 순서로 점유 중임(2016년 기준)
• 한국은 21억 달러 규모의 시장을 형성 중이며, 2011년 이후 지속적인 성장세임

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
건강기능식품 해외 시장 동향
(국가별 기능성식품 키워드)
미국
일본
중국


환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
국내 건강기능식품 시장은 꾸준히 성장하고 있으며,
방문판매시장의 부진과 약국, 홈쇼핑의 약진으로 시장재편화 현상이 나타남
국내 건강기능식품 유통 채널 구성 (2016)
주 채널
약국, 다단계, 전문판매점, 인터넷 등 다양한 유통 채널에서 건강기능식품이 구매되고 있고, 최근 방문판매 유통의 부진과 인터넷, 약국 등의 약진으로 시장이 재편되고 있음
보조 채널
매장 판매 비중은 48.7%로 약국 19%, 전문판매점 15.1%, 대형할인점 10.1%, 백화점 4.5%이다. 기타 채널로는 인터넷 13.8%, 홈쇼핑 6.2%의 시장 점유율을 나타내고 있음

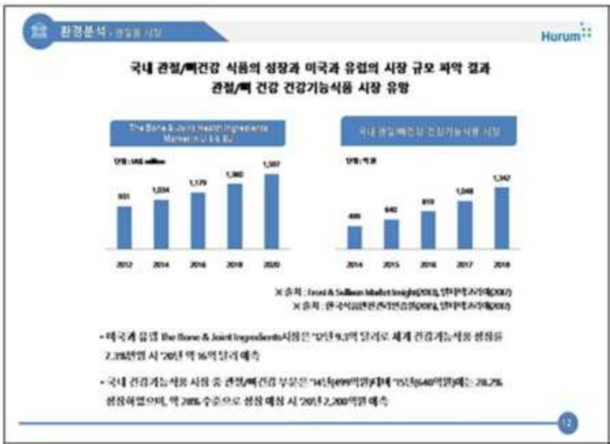

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
건강기능식품 생산량은 해마다 꾸준히 성장하고 있으며,
2015년부터 고속성장을 하고 있는 추세임
국내 건강기능 식품 생산량 추이 (2012~2016)
14,091
14,820
16,310
18,230
21,260
2012 2013 2014 2015 2016
시장 성장
시장 규모
꾸준히 성장하고 있으며, 2014년부터는 전년 대비 10%이상의 고속성장을 하고 있는 추세

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
국내 건강기능식품 소비자 기준 시장규모(구매자 구성비)
시장 분석

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
국내 건강기능식품 소비자 기준 시장규모(기능성원료별)
원료별 시장분석

환경분석 - 건강기능식품 시장
Hurum
주요 시장참여자(천연물 기반 건강기능식품 제조/판매 업체 15개)

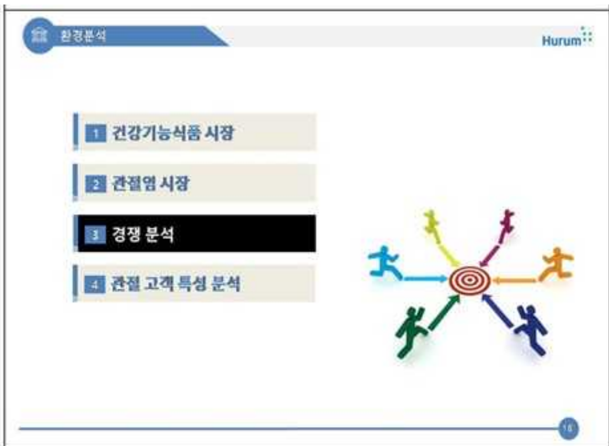
환경분석
Hurum
1 건강기능식품 시장
2 관절염 시장
3 경쟁 분석
4 관절 고객 특성 분석

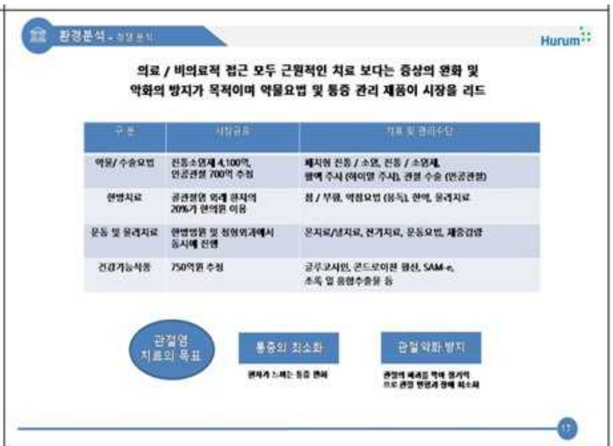

환경분석
Hurum
국내 관절/뼈건강 식품의 성장과 미국과 유럽의 시장 규모 파악 결과
관절/뼈 건강 건강기능식품 시장 유망
1,034
1,179
1,507
2012
2014
2016
2018
2020
1,342
2014
2015
2016
2017
2018
12

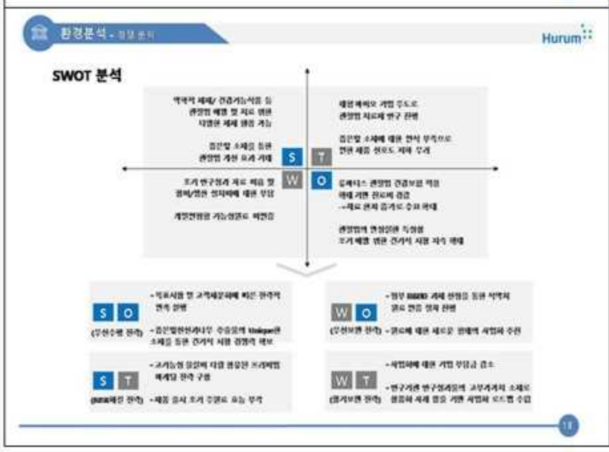
환경분석
Hurum
골관절염은 연령이 높아질 수록, 남성 보다 여성에게 많이 발생하며
한국 내 환자 수는 230만 명 추산되는 만성 퇴행성 질환
연령별 골 관절염 유병률(분전)
36.1%
26.1%
20.9%
14.0%
10.4%
7.2%
4.7%
2.1%
13

환경분석
Hurum
관절 연골의 손상으로 통증 등이 발생하는 관절염 중
퇴행성 관절염(골관절염)이 가장 대표적이며 향후 주요 타겟 고객임
14

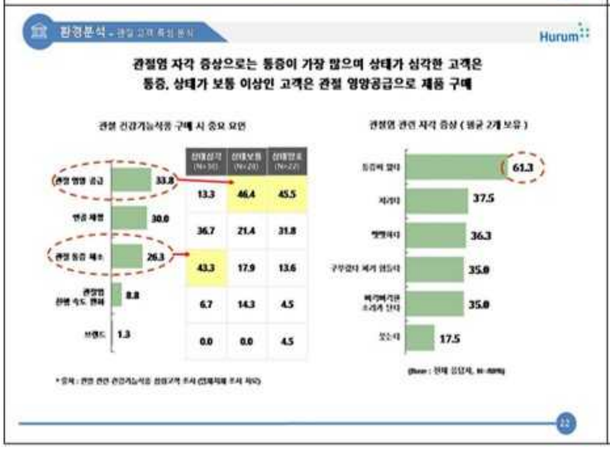
환경분석
Hurum
경쟁제품 동향(건강기능식품)
국내 주요 관절염 개선 건강기능식품
제조사
D사
C사
F사
B사
주원료
특징
용량 및 가격
15

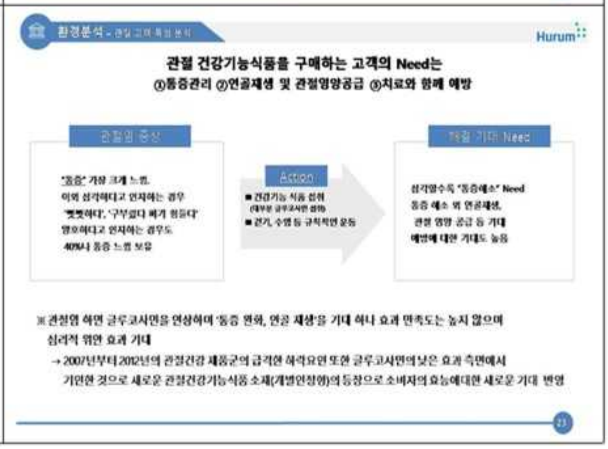

환경분석
Hurum
1 건강기능식품 시장
2 관절염 시장
3 경쟁 분석
4 관절 고객 특성 분석
16


환경분석
Hurum
의료 / 비의료적 접근 모두 근원적인 치료 보다는 증상의 완화 및
악화의 방지가 목적이며 약물요법 및 통증 관리 제품이 시장을 리드
약물/ 수술요법
한방치료
운동 및 물리치료
건강기능식품
750억원 추정
관절염
치료의 목표
통증의 최소화
관절 악화 방지
17

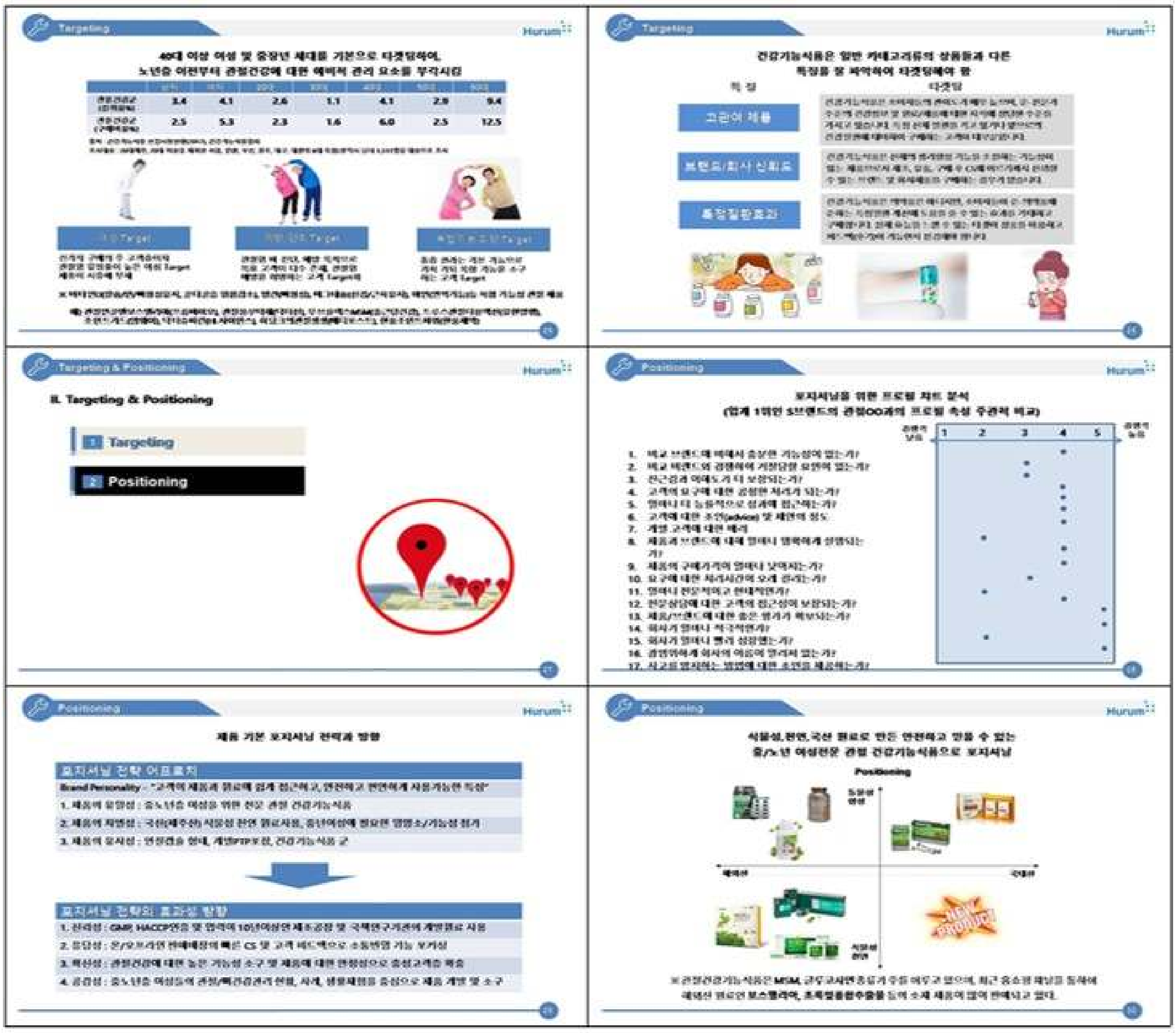

환경분석
Hurum
SWOT 분석
S
W
O
T
18

환경분석
Hurum
주요 경쟁 상대는 직접적인 경쟁 상대인 건강기능식품과 함께
통증.척추/관절 전문병원,성형외과 및 한의원과의 경쟁 상황임
우리들병원
바른세상병원
19



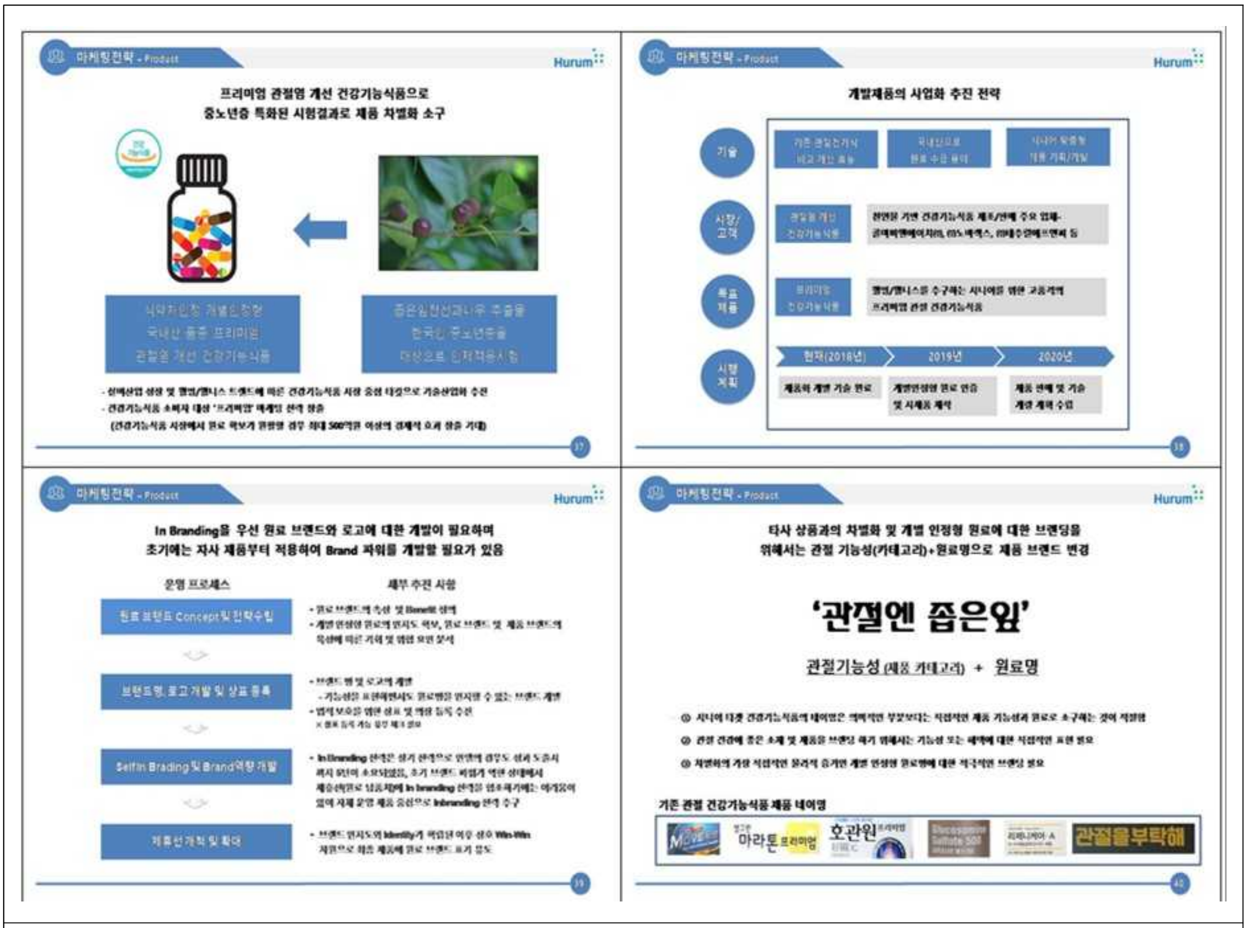


(3) Targeting & Positioning


Targeting
Hurum
Targeting & Positioning
Targeting
Positioning
Positioning

(4) 마케팅 전략

마케팅전략
Hurum
1 Product
2 Price
3 Place
4 Communication
36

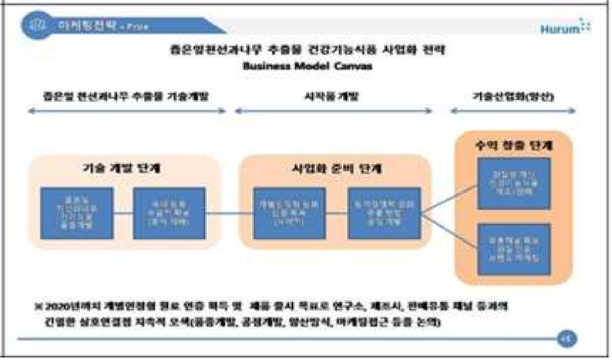

마케팅전략 - Product
Hurum
프리미엄 관절염 개선 건강기능식품으로
중노년층 특화된 시험결과로 제품 차별화 소구
마케팅전략 - Product
Hurum
개발제품의 사업화 추진 전략
기술
시장/고객
목표제품
시행계획
현재(2018년)
2019년
2020년
마케팅전략 - Product
Hurum
In Branding을 우선 원료 브랜드와 로고에 대한 개발이 필요하며
초기에는 자사 제품부터 적용하여 Brand 파워를 개발할 필요가 있음
운영 프로세스
세부 추진 사항
마케팅전략 - Product
Hurum
타사 상품과의 차별화 및 개별 인정형 원료에 대한 브랜딩을
위해서는 관절 기능성(카테고리)+원료명으로 제품 브랜드 변경
'관절엔 좁은잎'
관절기능성 (제품 카테고리) + 원료명
기존 관절 건강기능식품 제품 네이밍
마라톤 프리미엄
호관원 프리미엄
관절을부탁해

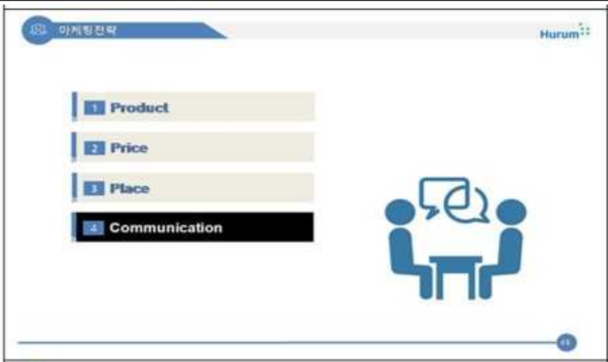
마케팅전략 - Product
Hurum
'관절엔 좁은잎' 개별인정형 건강기능식품 패키지 디자인 시뮬
① ㈜휴럼 건강기능식품 Package Identity 적용
② 복용에 용이한 캡슐형태 및 개별 PTP포장으로
위생감, 사용의 편의성 제공
③ 패키지 상단에 기능성 내용을 표현하는 삽화 삽입
관절엔 좁은잎
마케팅전략 - Product
Hurum
'관절엔 좁은잎' 개별인정형 건강기능식품 패키지 디자인 시뮬
① ㈜휴럼 건강기능식품 Package Identity 적용
② 복용에 용이한 캡슐형태 및 개별 PTP포장으로
위생감, 사용의 편의성 제공
③ 패키지 상단에 기능성 내용을 표현하는 삽화 삽입
관절엔 좁은잎
마케팅전략
Hurum
1 Product
2 Price
3 Place
4 Communication
마케팅전략 - Price
Hurum
가격결정 전략 수립
외부요인
내부요인
Best Price

마케팅전략 - Price
Hurum
제품의 소비자 가격은 향후 다채널 운영을 가정 고가채널인 방판,
다단계의 가격체계에 부합하여 고객, 경쟁, 원가 고려 월 8만원 책정

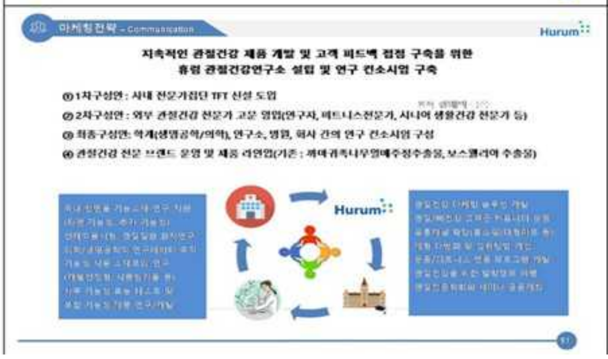
마케팅전략
Hurum
1 Product
2 Price
3 Place
4 Communication

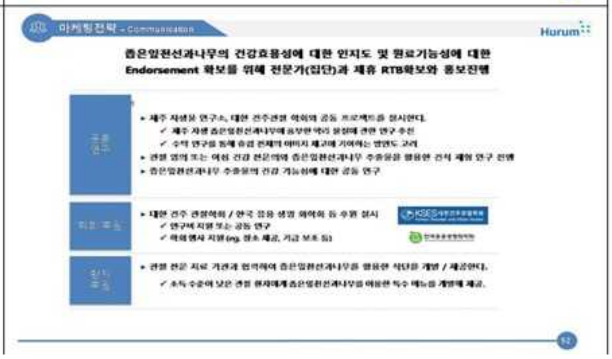
마케팅전략 - Place
Hurum
매출확보,설명판매에 유리한 홈쇼핑과 직판채널을 중심으로
개발 상품(BtoC)과 원료 판매(BtoB) 전략을 동시 진행


마케팅전략 - Price
Hurum
좁은잎천선과나무 추출물 건강기능식품 사업화 전략
Business Model Canvas
좁은잎 천선과나무 추출물 기술개발
시작품 개발
기술산업화(양산)
기술 개발 단계
사업화 준비 단계
수익 창출 단계
※2020년까지 개별인정형 원료 인증 획득 및 제품 출시 목표로 연구소, 제조사, 판매유통 채널 등과의
긴밀한 상호연결점 지속적 모색(품종개발, 공정개발, 양산방식, 마케팅접근 등을 논의)


마케팅전략
Hurum
1 Product
2 Price
3 Place
4 Communication

마케팅전략 - Communication
Hurum
관절관련 전문가 집단과의 제휴로
초기 제품의 인지도 상승 커뮤니케이션 전략
관절 초기 제품에 대한 효능,전문성,신뢰를
고객에게 전달하는 방법으로 관절 관련 전문가의
신뢰도와 전문성을 활용하여 제품의 신뢰도를
높일 수 있다.
- 후보군 : 관절전문병원 의사/한의사
카이로프락틱/추나요법 전문가
피트니스/필라테스 전문가
- 방식 : 제품 연구개발 참여
패키지 모델 참여
홈쇼핑 게스트 참여


마케팅전략 - Communication
Hurum
지속적인 관절건강 제품 개발 및 고객 피드백 접점 구축을 위한
휴럼 관절건강연구소 설립 및 연구 컨소시엄 구축
①1차구성안 : 사내 전문가집단 TFT 신설 도입
②2차구성안 : 외부 관절건강 전문가 고문 영입(연구자, 피트니스전문가, 시니어 생활건강 전문가 등)
③최종구성안: 학계(생명공학/의학), 연구소, 병원, 회사 간의 연구 컨소시엄 구성


마케팅전략 - Communication
Hurum
좁은잎천선과나무의 건강효용성에 대한 인지도 및 원료기능성에 대한
Endorsement 확보를 위해 전문가(집단)과 제휴 RTB확보와 홍보진행

마케팅전략 - Communication
Hurum
종합편성 채널 건강전문프로그램 및 시니어 대상 TV프로그램에
후원 및 PPL 진행으로 제품인지기능 강화
MBN
jtbc

마케팅전략 - Communication
Hurum
시니어, 여성 층이 이용하는 병원, 미용실, 마사지샵 등지에
건강전문 및 여성전문 잡지에 제품 및 원료에 대한 광고
헬스조선
WomanSense

나. 사업화 내용

1) 계획

가) 개발 목표: 제주 자생 좁은잎천선과나무 추출물의 건강기능식품 개별인증 전까지 원료 소재의 활용도를 높이고자 건강지향식품의 컨셉으로 관련 원료 소재를 이용한 제품을 제작하였음.

나) 개발 내용: 제형 연구를 통해 원료 소재로서의 활용 편이성이 좋은 추출분말을 사용하여 우선 기존 제품에 원료로써 적용함.

2) 수행계획

가) 원료명: 원료명 : “좁은잎천선과나무잎주정추출물”

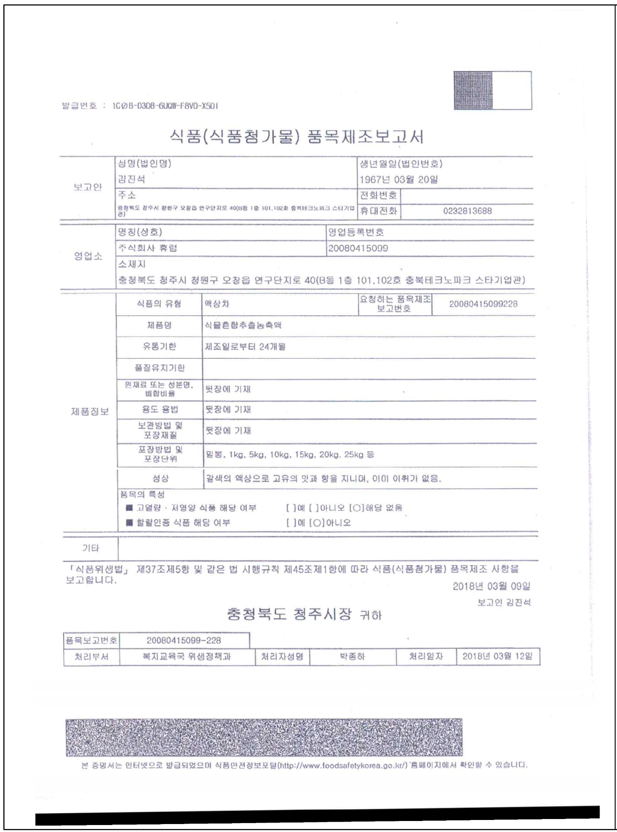
나) 적용내용: 식물혼합추출농축액 복합원재료의 “좁은잎천선과나무잎주정추출물“ 원료 추가

다) 현재 유통제품 및 표시사항 : 식물혼합추출농축액 적용 제품(총 4종)

제품명	휴럼데이스틱홍삼정	휴럼원데이홍삼정스틱	휴럼데이스틱홍삼	천년홍삼
함량(%)	2.00%	0.01%	2.00%	1.60%
현재 표시사항	대추(국산), 구기자(국산)	대추(국산),구기자(국산),오미자,황기,생강		

※ 복합원재료가 당해 제품의 원재료에서 차지하는 중량 비율이 5%미만에 해당하는 경우 또는 복합원재료를 구성하고 있는 복합원재료의 경우에는 그 복합원재료를 나타내는 명칭(제품명을 포함한다) 또는 식품의 유형만을 표시할 수 있다.

2) 수행결과 세부 내용: 품목보고


발급번호 : 1CØB-D3D8-6UQW-F8VD-X5DI

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 김진석	생년월일(법인번호) 1967년 03월 20일	
	주소 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40(B동 1층 101,102호 충북테크노파크 스타기업관)	전화번호	
		휴대전화	0232813688
영업소	명칭(상호) 주식회사 휴럼	영업등록번호 20080415099	
	소재지 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지로 40(B동 1층 101,102호 충북테크노파크 스타기업관)		

제품정보	식품의 유형	액상차	요청하는 품목제조 보고번호	20080415099228
	제품명	식물혼합추출농축액		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	밀봉, 1kg, 5kg, 10kg, 15kg, 20kg, 25kg 등		
	성상	갈색의 액상으로 고유의 맛과 향을 지니며, 이미 이취가 없음.		
	품목의 특성 ■ 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [O]해당 없음 ■ 할랄인증 식품 해당 여부 [ ]예 [O]아니오			
기타				

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

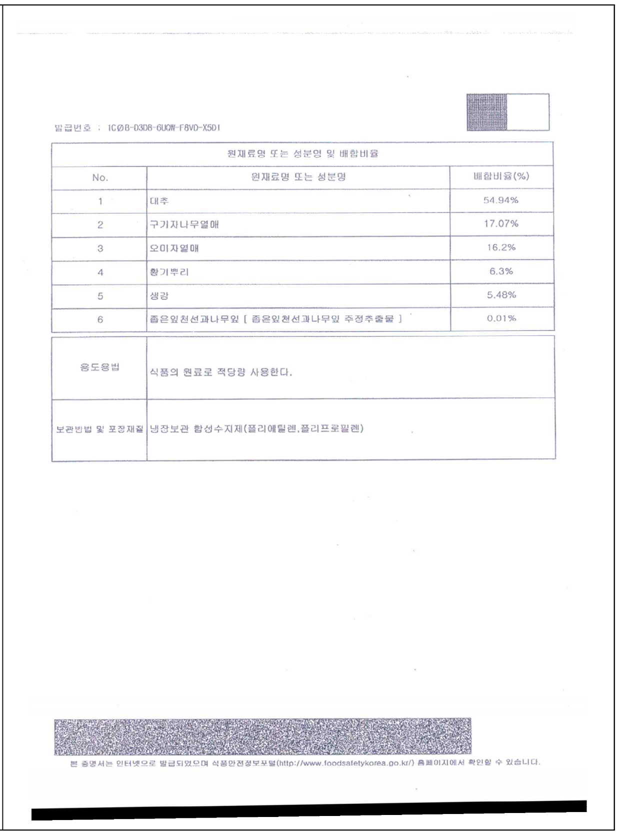
2018년 03월 09일

보고인 김진석

충청북도 청주시장 귀하

품목보고번호	20080415099-228				
처리부서	복지교육국 위생정책과	처리자성명	박종하	처리일자	2018년 03월 12일

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


발급번호 : 1CØB-D3D8-6UQW-F8VD-X5DI

원재료명 또는 성분명 및 배합비율

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	대추	54.94%
2	구기자나무열매	17.07%
3	오미자열매	16.2%
4	황기뿌리	6.3%
5	생강	5.48%
6	좁은잎천선과나무잎 [좁은잎천선과나무잎 주정추출물]	0.01%

용도용법	식품의 원료로 적당량 사용한다.
보관방법 및 포장재질	냉장보관 합성수지제(폴리에틸렌,폴리프로필렌)

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

3) 좁은잎천선과나무 추출물 사용 제품 사진

구분	제품 사진	제품설명	비고
휴럼 데이스틱 홍삼정		- 식품유형: 홍삼음료 - 소비자가: 105,000원 - 내용량: 120g(12g×10포) - 기타: 이마트편의점(이마트24) 판매용 스틱건강식품	
휴럼 원데이 홍삼정스 틱		- 식품유형: 건강기능식품 - 소비자가: 105,000원 - 내용량: 600g(10g×60포)	
휴럼 데이스틱 홍삼		- 식품유형: 건강기능식품 - 소비자가: 17,900원 - 내용량: 180g(12g×15포)	
천년홍삼		- 식품유형: 홍삼음료 - 소비자가: 55,000원 - 내용량: 천년홍삼골드 50ml×12병(600ml) +천년홍삼 50ml×20포(1,000ml)	

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발의 성과 목표

가. 연구개발 평가착안점

1) 연구개발계획서(신청 시) 평가 착안점

평가 착안점 및 기준				
평가항목	개발목표치	세계최고수준	연구개발 전 국내수준	수행기관
1. 골관절 건강 유효성분 규명	1건 이상	Pfizer	동등수준	주관
2. 추출물의 지표성분 규명	3건 이상	Pfizer	동등수준	주관
3. 기능성물질 원료표준화	완료	-	동등수준	주관
4. 가공기술 생산공정 확립	공정 확립	쎌바이오텍	동등수준	제1협동
5. 비임상 효력시험	완료	미국	동등수준	주관/위탁
6. 시제품생산	생산 완료	-	-	제1협동
7. 인체적용 시험	완료	미국	동등수준	주관
8. 효능입증자료 확보	논문 3편	-	-	주관
9. 지적재산권 확보	등록 1건	-	-	주관
10. 자원식물 대량생산	10ha 이식분	(영) 허브힐	비교우위	제2협동
11. 건기식 개별인증 자료	작성/신청	-	-	주관

나. 연구개발 성과목표

구분	특허		기술실시(이전)	사업화		학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활동 등)
	출원	등록		제품화	고용창출	논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
						SCI	비SCI						
1차년도								1	1	1			
2차년도	1				1		1	2	1			5	6
3차년도	1	1	1	1		1	1	2	1	1	1	5	6
계	2	1	1	1	1	1	2	5	3	2	1	10	12

2. 연구개발 성과 목표 달성도

가. 연구개발 평가착안점 대비 목표 달성도

평가 착안점 및 기준			
평가항목	개발목표치	달성도 (%)	비고
1. 골관절 건강 유효성분 규명	1건 이상	100	총 5건 [Syringaresinol, 6,7-furano-5-methoxy hydrocoumaric acid, Vladinol F, Rutin, Nicotiflorin]
2. 추출물의 지표성분 규명	3건 이상	100	
3. 기능성물질 원료표준화	완료	100	기준・규격설정: 1.51~2.26
4. 가공기술 생산공정 확립	공정 확립	100	최종제품(타블렛) 생산공정 확립
5. 비임상 효력시험	완료	100	효력시험: MIA 유도 골관절염 모델 독성시험: 단회, 반복시험 및 유전독성(소핵, 염색체이상, 복귀돌연변이)
6. 시제품생산	생산 완료	100	시제품생산 및 일반제품 생산 완료
7. 인체적용 시험	완료	100	연구대상자 60명 선정 및 시험 완료
8. 효능입증자료 확보	논문 3편	-	작성/투고 중 6편 (in vitro, in vivo, 임상자료)
9. 지적재산권 확보	등록 1건	(50)	출원완료 등록심사 중
10. 자원식물 대량생산	10ha 이식분	100	시험포 완료
11. 건기식 개별인증 자료	작성/신청	-	임상시험 결과 분석 중

나. 연구개발 성과목표 대비 달성도

구분	특허		기술 실시 (이전)	사업화		학술성과			교육 지도	인력 양성	정책활용 ・홍보		기타 (타연구 활동 등)
	출원	등록		제품화	고용 창출	논문 SCI	논문 비SCI	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
1차년도								2		1			
2차년도					1			2	2			10	12
3차년도	1			4	2			1	1			5	
계	1			4	3			5	3	1		15	12

3. 성과 목표 달성을 위한 향후계획

가. 지식재산권(특허) 확보

발명의 명칭	출원일	출원번호	차후대책
좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 관절염 개선용 조성물	2018.03.19.	10-2018-0031634	발명등록 모니터링 지속
좁은잎천선과 잎 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 함염증용 조성물			Syringaresinol 등 분리화합물의 함염증 효능 자료를 바탕으로 한 특허출원 추진

나. 논문 확보

제 목	저 널 명	차 후 대 책
좁은잎천선과 잎 추출물이 대식세포 RAW 264.7 세포에서 미치는 항산화 및 항염증 효과	한국자원식물학회지	게재확정 (2018.06.11.)
The fraction CH_2Cl_2 extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King suppresses lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses on Raw 264.7 cells	Journal of Food and Nutrition Research	in press (2018.06.08.)
Anti-inflammatory activity of Vladinol F isolated from *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King leaves	Plant Foods for Human Nutrition	작성완료, 영문교정 중 (2018.06. 투고 예정)
The fraction EtOAc extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King inhibitions inflammatory responses on raw 264.7 macrophage and collagen-induced-arthritis mice	Journal of Food Sciences	작성 중 (2018.06. 투고 예정)
The anti-arthritis effect of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King leaves extract on collagen-induced arthritis mouse model	Food & Nutrition Research	작성 중 (2018.06. 투고 예정)
A randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating the effect and safety of extracts *Ficus erecta* var. *sieboldii* King Leaves on arthritis: a study protocol	Clinical Trials in Degenerative Disease	작성 중 (2018.06. 투고 예정)

다. 기술이전 실시

1) 임상시험자료 분석이 완료되어 식품의약품안전처로 효능 입증 자료를 신청한 후 본 연구 결과의 기술가치평가를 추진하여 그 결과에 따라 참여기업을 우선으로 한 기술이전을 실시할 예정임.

2) 기술이전 대상은 본 연구과제 신청 시 제시한 선행연구로 기 확보된 기술특허도 포함하여 추진할 계획임.

3) 선행 특허

발명의 명칭	등록일	등록번호
좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 항염증제 조성물	2014.01.14.	10-1353576
블라디놀 F를 이용한 함염증성 조성물	2014.11.07.	10-1461440

라. 정책활용

1) 좁은잎천선과나무의 잎과 열매는 식품원료 사용이 가능한 “식품의약품안전처”의 식품원료 목록에 해당됨.

2) 본 연구에서 확인된 항염증 효과 및 진통억제 효과를 바탕으로 한 좁은잎천선과나무의 신규 가치를 담은 자료를 발간

3) 발간된 자료는 제주특별자치도농업기술원 및 제주특별자치도 관련 부서에 제공

4) 좁은잎천선과나무의 재배가 농용자원화가 될 수 있도록 상품개발 기업과 좁은잎천선과나무 재배 농가와의 계약재배가 이뤄질 수 있도록 지속적인 모니터링 및 적극적 지원 추진

마. 건기식 개별인증 자료 확보

1) 임상시험 결과의 통계분석

2) 선행 특허 및 본 연구 결과의 기술특허를 중심으로 기술단계분석 컨설팅

3) 식품의약품안전처에 건기식 개별인증 자료 신청 및 모니터링

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술발전 기여도

가. 기술적 측면

1) 생리활성 물질의 일차적 탐색에 머물러 있는 국내 천연물 연구는 선진국 대비 기술적인 격차가 현저한 바, 본 연구가 목표대비 성공적 성과를 얻을 경우 국내의 기술수준을 한 단계 나아갈 것으로 판단됨.
2) 핵심기술 수준 한 단계 상승: 천연물 분리정제, 유효소재 탐색, 기능(유효)물질 구조 분석, 자원 천연물의 대량생산 시스템 확립 등의 단위기술
3) 본 연구결과는 건기식 소재 개발 뿐만 아니라, 천연물 신약소재 개발 등 전·후방 산업에 큰 파급효과를 가져올 것으로 예상됨

나. 경제적ㆍ산업적 측면

1) 지역경제 활성화에 기여 : 제주의 풍부한 생물자원의 소재개발 및 제품개발은 제주 생물산업의 기반 구축과 지역자원관리의 효율성을 확보할 수 있는 방안으로 활용
2) 6차 산업 견인 : 대량증식 등의 재배를 통한 소득 작물로 다양화를 유도한 1차 산업 뿐 아니라 가공/제조 등의 2차 산업 및 3차 산업과 연계한 융복합 산업 원동력 마련
3) 제주산 생물자원 가치창출: 제주의 청정 환경 이미지와 어울리는 다양한 웰빙 상품의 개발을 촉진.
4) 자원의 국산화를 통한 외국으로부터의 소재 수입제한에 따른 외화 절약 등의 효과에 기여하고 제주 특화 건강ㆍ뷰티 생물산업 발전에 기여

2. 농용자원의 산업화 기여도

가. 매출증대 및 비용 절감 효과

1) 건강기능식품시장에서 뼈 및 관절분야는 지속적으로 성장하고 있는 한 분야로, 제주 자생식물인 좁은잎천선과나무의 잎 주정추출물이 건강기능식품으로 상품화가 이루어질 경우, 기업의 매출 증대는 물론이고 관련 기능성식품 및 소재의 수입대체효과가 클 것으로 판단됨.
2) 신규개발한 소재의 경우 소재의 가격측면에서 경쟁력을 가지고 있을 것으로 판단되며, 특히 제품 및 생산공정의 표준화 및 최적화를 통하여 생산비용, 관리비용이 절감될 것으로 판단됨.
3) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물이 건기식 개별인증을 득할 경우 상업화 가능성 : 100%
4) 해당 기술이 기업 매출 증가에 기여할 것으로 보이는 정도 : 50%

나. 수출 증대 및 수입 대체 효과

1) 본 연구과제와 직접적으로 연관되는 참여기업 자체의 천연물 소재 생산뿐만 아니라, 참여기업의 기존 사업품목의 생산기술 개선 등을 통한 매출액 증대 등 직접적인 경제적 효과를 기대할 수 있음.

2) 또한, 사업화 추진에 따른 매출액 증대, 기능성식품의 제제화 공정 개발에 따른 간접적인 소득창출 효과도 기대할 수 있으며, 나아가서 건강 기능식품 분야 및 보건의료산업 전반에 걸쳐 시장 확대가 가능할 것임.

다. 연관 산업에 미치는 효과

1) 자생식물의 안정적인 수급이 필요하므로 계약재배를 통한 농가의 안정적이고 부가가치를 높이는 1차 산업 구조를 만드는 효과가 있음.

2) *in vivo* 질환모델동물을 이용한 화합물의 고속 효능평가 선별기술 축적은 향후 천연물을 활용한 생물제제 산업의 성장에 많은 파급효과가 있을 것으로 기대됨.

3) 천연물신약의 개발에도 활용될 수 있어, 기술 및 경제적인 면에서 보건의료산업 전반에 미치는 파급효과가 매우 크다고 할 수 있음.

제 4 장 연구결과 활용 계획

제 1 절 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

1. 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물 활용 제품의 산업화

가. 경쟁분석을 통한 제품의 산업화

1) 목표시장별 고객세분화에 따른 전략적 판촉 실행

2) 좁은잎천선과나무 추출물의 unique한 소재를 통한 건기식 시장 경쟁력 확보

3) 고기능성 물질이 다량 함유된 프리미엄 마케팅 전략 구상

4) 제품의 출시 초기 주원료의 효능 부각

나. 마케팅전략 강화를 통한 제품의 산업화

1) 실버산업 성장 및 웰빙/웰니스 트랜드에 따른 건강기능식품 시장 중점 타깃으로 산업화 추진

2) 건강기능식품 소비자 대상 “프리미엄” 마케팅 전략 창출

3) 타사 상품과의 차별화 및 개별인정형 원료에 대한 브랜딩 강화

--> 관절 기능성(카테고리) + 원료명으로 제품 브랜드 변경

--> 추가 기능성 검토를 통한 제품의 차별화 제시

다. 유통 및 판매망 확충

1) 기존 참여기업의 유통 및 판매처 활용

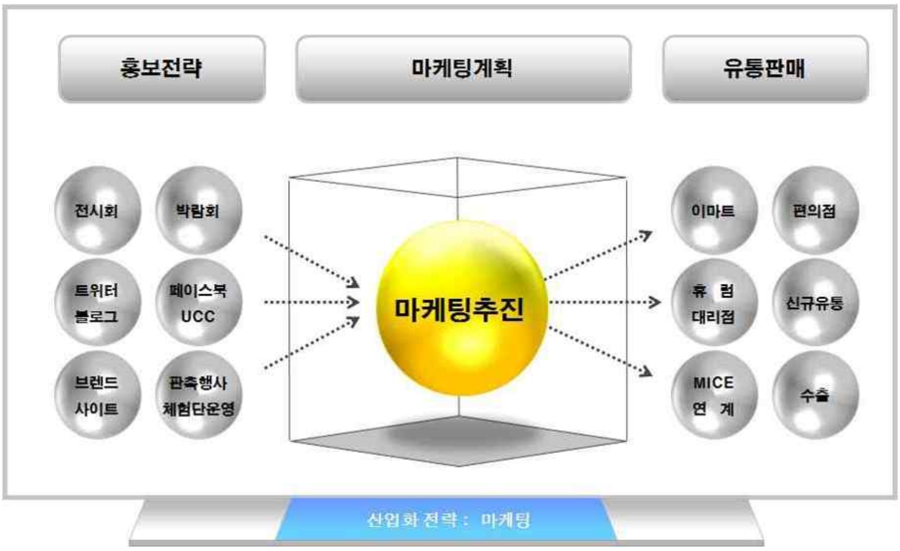
가) 할인마트 유통 및 판매: 이마트 120여 점 등 할인마트를 통한 유통

나) 휴럼건강전문대리점을 통한 유통 및 판매: 60여개의 휴럼 전문대리점을 통한 유통

2) 신규 유통 및 판매망 확충

가) 홈쇼핑 등 신규유통 및 판매망 확충

나) 국내외 박람회 참가 등을 통한 국외 바이어 확보를 통한 해외 수출



2. 타 연구에의 응용 계획

가. 본 연구에서 확보된 원천기술을 바탕으로 한 기능성 향장품 및 의약품 소재개발 등 전후방사업 발굴/육성

나. 1차산업 부흥을 위한 자원식물의 계약재배 및 신소득 작물 추가 발굴

다. 지역 기업의 가공기술을 바탕으로 한 전략식품산업 클러스터 조성

라. 농림부 향토산업육성사업과의 연계를 통한 지역단위 부가가치 창출 및 참여농가 활력 창출

제 2 절 기업화 추진방안

1. 지식재산권 확보

가. 특허확보 방안

1) 세포수준(*in vitro*) 및 비임상수준(*in vivo*)에서의 항염증 효과에 대한 특허출원 완료에 따른 특허 등록 확보

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2018.03.19
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(18099)
출 원 번 호	10-2018-0031634 (접수번호 1-1-2018-0273701-47)
출원인 명칭	재단법인 제주테크노파크(2-2005-039314-6)
대리인 성명	특허법인태웅(9-2012-100102-8)
발명자 성명	정용환 윤원종 함영민 윤선아 오대주 김창숙 이윤지
발명의 명칭	좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 관절염 개선용 조성물

특 허 청 장

2) 임상 protocol 및 시험결과에 따른 결과를 토대로 한 특허출원 추진

가) 특허명: 좁은잎천선과 잎 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용한 함염증용 조성물

나) 주요내용: Syringaresinol 등 분리화합물의 함염증 효능 자료를 바탕으로 한 특허출원

2. 기술이전 추진

가. 골관절 완화 건기식 개별인정 원료 소재 신청 및 등록

1) 좁은잎천선과나무 잎 주정추출물의 건기식 기능성원료 인정 신청 및 등록 추진

2) 기능성원료 등록 후 제품화를 통해 산업화 추진 예정

나. 기술이전

1) 본 연구과제 결과 신청 기술특허 + 선행연구로 기 확보된 기술특허

--> 본 연구과제 결과의 특허 등록 시점에서 참여기업으로의 기술이전 실시

2) 선행연구 기 확보 기술특허인 경우 본 연구과제 결과의 기술이전과 병행하여 상용화 추진

가) 좁은잎천선과 잎 추출물을 이용한 항염증제 조성물(10-1353576, 2014.01.14. 등록)

나) 블라디놀 F를 이용한 항염증성 조성물(10-1461440, 2014.11.07. 등록)

제 5 장 참고문헌

삼일회계법인, 2011. 건강기능식품 주요 국가별 시장동향 분석.

생명공학정책연구센터, 2010. 고령친화산업 활성화 전략. BT스페셜 노화 연구동향.

식품의약품안전처, 2014. 식품원재료검색.

식품의약품안전처, 2015. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황.

식품의약품안전처, 2015. 식품의약품 통계연보.

식품의약품안전처, 2016. 건강기능식품 기능성 원료 인정 현황.

식품의약품안전처, 2016. 건강기능식품 생산실적 보도자료.

식품의약품안전처, 2016. 건강기능식품 생산실적 보도자료.

안덕균, 1988. 한국약용식물도감. 교학사, p.855.

한국건강기능식품협회, 2014. 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태 조사.

한국건강기능식품협회, 2016. 건식투데이.

한국성과실용화진흥원, 2016. 건강기능식품 시장 동향. S&T Market Report 41.

Bae, S.J. 2002. The effects of anticarcinogenic activity of *Solanum thberosum* peel fractions. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31:905-909.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1198-1200.

Branen, A.L. 1975. Toxicological and biochemistry by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1202.

Chang, Z.J., S.C. Kuo, S.C. Chan, F.N. KO and C.M. Teng. 1998. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. Biochem. Biophys. Acta 1392:291-299.

Coleman, M.D., S. Fernandes and L.A. Khanderia. 2003. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamin E, C and α-lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. Environ. Toxicol. Pharmacol. 14:69-75.

Corl, M.M. 1974. Antioxidant activity of tocopherol and ascorbylpalmitate and their mode of action. J. Am. Oil Chem. Soc. 51:321-325.

Fridovich, I. 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk

xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245:4053-4057.
Goldring, M.B. and S.R. Goldring, 2007. Osteoarthritis. J Cell Physiol. 213:626-34.
Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1993. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Glarendon Press, Oxford (UK).
Heo, S.J., W.J. Yoon, K.N. Kim, G.N. Ahn, S.M. Song, D.H. Kang, A. Affan, C. Oh, W.K. Jung and Y.J. Jeon. 2010. Evaluation of anti- inflammatory effect of fucoxanthin isolation from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Food Chem. Toxicol. 48:2045-2051.
Hyun, E.A., H.J. Lee, W.J. Yoon, S.Y. Park, H.K. Kang, S.J. Kim and E.S. Yoo. 2004. Inhibitory Effect of *Salcia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW 264.7. YAKHAK HOEJI 48:159-164.
Ismaki, P. and J. Punnonen. 1997. Pro-and anti-inflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. Ann. Med. 29:449-507.
Kim, E.Y. and K.D. Moudgil. 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. Immunol. Left. 120:1-5.
Kim, J.H., R.A. Bachmann, and J. Chen. 2009. Interleukin-6 and insulin resistance. Vitam. Horm. 80:613-633.
Korycka-Dahl, M., T. Richardson and C. Hicks. 1979. Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. J. Food Protection 42:867-871.
LEE, H.S., 2010~2012. Prevalence of Osteoarthritis and Related Risk Factors in the Elderly: Data from the Fifth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V). J Korean Diet Assoc. 20:99-109.
Lee, T.B. 1980. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Publishing Co., Seoul, Korea. p. 990 (in Korea).
Malfait, A,M. and T.J. Schnitzer, 2013. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. Nat. Rev. Rheumatol. 9):654-64.
Masferrer, J., B.S. Zweifel, P.T. Manning, S.D. Hauser, K.M. Leahy, W.G. Smith, P.C. Isakson and K. Seibert. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3228-3232.
McCartney-Francis, N., J.B. Allen, D.E Mizel, J.E. Albina, Q.W. Xie, C.F. Nathan and S.M. Wahl. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J. Exp. Med. 178:749-754.
Moncada, S., R.M. Palmer and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43:109-14.
Moon, S.J., Y.J. Woo, J.H. Jeong, M.K. Park, H.J. Oh, J.S. Park, E.K. Kim, M.L. Cho, S.H. Park,

H.Y. Kim and J.K. Min, 2012. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by down-regulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 20:1426-38

Murphy, G. and H. Nagase, 2008. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 4:128-3508

Nathan, C. 1992. Nitric ocide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 6:3051-3064.

NBJ' s global supplement & nutrition industry report, 2014. Nutrition Business Journal Report.

Nishikimi, M., N.A. Roa and K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine metho-sulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:849-854.

Pryored, W.A. 1984. Free radicals in biology. Academic Press. New York (USA).

Ren, K. and R. Torres. 2009. Role of interleukin-1 beta during pain and inflammation. Brain. Res. Rev. 60:57-64.

Santos-Gomes, P.C., R.M. Seabra, P.B. Andrade and M. Fernandes-Ferreira. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis L.*). J. Plant Physiol. 160:1025-1032.

Sokolove, J. and C.M. Lepus, 2013. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. Ther Adv Musculoskelet Dis. 5:77-94.

Storck, M., M. Scgilling, K. Burkhardt, R. Prestel, D. Abendroth and C. Hammer. 1994. Production of proinflammatory cytokines and adgesion molecules in *ex-vivo* xenogeneic kidney perfusion. Transpl. Int. 7:S647-S649.

Stuehr, D.J., H.J. Cho, N.S. Kwon, M.F. Weise and C.F. Nathan. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD-and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7773-7777.

Talalay, P. and A.M. Benson. 1982. Elvation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. Advances in Enzyme Regulation 20:287-300.

Tesuka, Y., S. Irikawa, T. Kaneko, A.H. Banskota, T. Nagaoka, Q. Xionh, K. Hase and S. Kadota. 2001. Screening of chinese herval drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bugeanum*. J. Ethnopharmacol. 77:209-217.

Wefers, H., T. Komai, P. Talalay and H. Sies. 1984. Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). Federation of European Biochemical Societies 169:63-66.

Weisz, A., L. Cicatiello and H. Esumi. 1996. Regulation of the mouse inducible -type nitric

oxid synthase gene promoter by interferon-γ, bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. Biochem. J. 316:209-215.

Williams G.M., C.X. Wang and M.J. Iatropoulos. 1990. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. I. chronic feeding studies. Food Chem. Toxicol. 28:799-806.

Yun, H.Y., V.L. Dawson and T.M. Dawson. 1996. Neurobiology of nitric oxide. Crit. Rev. Neurobiol. 10:291-316.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.