

11-1543000-002321-01

# 남성 난임 개선 기능 국제 인증을 통한 고려홍삼의 안정적 소비 저변 확대 최종보고서

2018. 08. 27.

주관연구기관 / 건국대학교글로벌산학협력단  
협동연구기관 / KGC 인삼공사  
차의과학대학교  
헬스케어크레임스앤드멘네지먼트

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원



## 2. 제출문

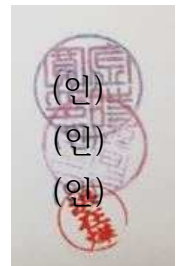
### 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “남성 난임 개선 기능 국제 인증을 통한 고려홍삼의 안정적 소비 저변 확대”  
(개발기간 : 2014. 11. 28 ~ 2018. 05. 27)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 08 . 27.

주관연구기관명 : 건국대학교글로벌산학협력단 김 시 관  
협동연구기관명 : KGC인삼공사 한 창 균  
참여기관명 : 차의과학대학교 홍 재 엽



주관연구책임자 : 김 시 관  
협동연구책임자 : 한 창 균  
참여기관책임자 : 홍 재 엽

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	314042-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.11.28.~ 2018.05.27	단 계 구 분	3년/ 3.5년
연구사업명	중 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	남성 난임 개선 기능 국제 인증을 통한 고려홍삼의 안정적 소비 저변 확대			
	세부 과제명	남성 난임 개선 기능 국제 인증을 통한 고려홍삼의 안정적 소비 저변 확대			
연구책임자	김시관	해당단계 참여 연구원 수	총: 32명 내부: 30명 외부: 2명	해당단계 연구개발비	정부:400,000천원 민간:400,000천원 계:800,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총:45 명 내부:43 명 외부: 2명	총 연구개발비	정부:1,200,000천원 민간:1,200,000천원 계:2,400,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교글로벌산학협력단 차의과대학교산학협력단			참여기업명 (※) 한국인삼공사	
위탁연구	연구기관명: 헬스케어크레임스멘네지먼트			연구책임자: 하 기 찬	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	식약처 기능등재용 서류는 대외비로 해 주실 것을 요청함
----------------------	--------------------------------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	12										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 절실한 소비자 군을 대상으로 한 적응증 발굴로 안정적 매출 증대 기반 확립</li> <li>○ 고려홍삼을 이용한 남성 난임 개선용 기능식품 개발(국내)</li> <li>○ 국제기준에 부합하는 제조공정(cGMP) 및 품질규격기준(WHO 혹은 ICH 기준) 확립</li> <li>○ 고려홍삼의 정자 생성 촉진 효능 기전 규명</li> <li>○ 정자 결핍 및 약정자증으로 인한 난임 남성용 생약재 의약품 개발(국제)</li> <li>○ 국제적으로 공인 받은 새로운 고려홍삼의 적응증 발굴</li> <li>○ 연간 1,000억 이상 매출 가능한 기능식품/생약재 의약품 launching</li> <li>○ 전임상 연구(항암제 유발 고환 세포 독성 모델 이용)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>in vitro</i>: 생쥐유래 GC-2spd (정자세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용</li> <li>- <i>in vivo</i>: doxorubicin 노출 (1 mg/wk, 8 wks), SD rats</li> <li>- 조사항목: 병리조직검사, 정자수 및 운동성, 주요 지표(항산화효소, 정자생성 관련 단백질, 성호르몬 수용체)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul> </li> <li>○ 제조공정 및 제품 개발 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제조공정 최적화, 안정성 시험(실시간 및 학대조건)</li> <li>- 품질관리 관련 분석화학 연구: 11개 지표물질의 서류 확보 및 유효 분석법 확립</li> </ul> </li> <li>○ 임상연구(이중맹검 교차시험)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 정자의 질, 자각증상 및 혈액화학지수에 미치는 효과</li> <li>- 임신 여부</li> </ul> </li> </ul>
연구개발성과			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전임상 연구               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 노령쥐의 고환 노화 방어 효과 입증 (Exp Gerontol 논문 3편 게재)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈액화학, 병리조직 검사를 통하여 노령쥐에 있어 정자생성능 저하 방어 효능 입증</li> <li>- 항산화효소, 정자생성 관련 전사인자(transcription factors) 및 성호르몬 수용체 발현 억제를 방어한다는 사실을 유전자(mRNA) 및 단백질 수준에서 규명</li> <li>- 노화의 지표인 Sirt1 및 mTORC1의 발현량 분석으로 노화 지연 효능 밝힘</li> </ul> </li> <li>2. 항암제(doxorubicin)의 고환 독성 방어 효과 규명(J, Func Food 논문 2편 게재)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- Doxorubicin-노출 GC-2spd, TM3, TM4 cells에 있어 KRG의 독성 방어 효과 규명</li> <li>- Doxorubicin-노출 웅성 rats에 있어 KRG의 정자생성 개선 효과를 병리조직검사, 정자수 및 운동성, 주요지표 (항산화효소, 정자생성 관련 단백질, 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량 비교를 통하여 입증</li> </ul> </li> <li>3. 정신적(구속) 스트레스로 인한 고환 기능 장애 방어 효능 입증(J. Ginseng Res 1편)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 간헐적 구속(2 hr/day, 6 mon)으로 야기되는 고환의 기능 장애 방어 효능 입증</li> <li>- 병리조직검사, 정자수 및 운동성, 주요지표 (항산화효소, 정자생성 관련 단백질, 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량 비교를 통하여 입증</li> </ul> </li> </ol> </li> <li>○ 제조공정 및 제품 개발 연구 (사포닌 11종의 동시다발적 유효 분석법 확립, 논문1편)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제조공정 최적화 완료, 안정성 시험(실시간 및 학대조건) 자료 확보</li> <li>- 제품별 국제 규격기준 확립, 배치 분석 자료 확보</li> <li>- 품질관리 관련 분석화학적 연구: 11개 표준품 서류 확보 및 유효 정량분석법) 확립</li> </ul> </li> <li>○ 임상연구(이중맹검 교차시험)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상자 120명 확보, 관련 항목 조사 및 분석 완료, 태아의 성별은 현재 추적 조사 중</li> <li>- KRG 투여군은 위약군에 비해 정액의 양(<math>p&lt;0.033</math>) 및 살아있는 정자 비율(<math>p&lt;0.039</math>) 이 유의하게 증가</li> <li>- 난임기간 30개월 미만자에서 위약군에 비해 임신을 유의하게 증가(<math>p&lt;0.045</math>)</li> <li>- 성호르몬 가운데 LH 함량이 유의하게 감소</li> </ul> </li> </ul>

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<b>[활용방안]</b> ○ 국제적으로 공인받을 수 있는 남성 난임 치료제로 활용 ○ 남성 성기능 개선제로도 활용 ○ 여성 난임 치료제로의 활용 범위 확대 <b>[기대성과]</b> ○ 세계 최초 남성 난임 치료제 제품 탄생 ○ 기능식품으로서 고려인삼의 신수요 창출 ○ 간절한 장복 소비자 그룹 확보→지속적 매출 증대 기대 ○ 침체된 인삼산업의 활력소 역할 ○ 년매출 1000억 이상 제품 탄생 가능 ○ 출산율 증대로 국가시책에 이바지				
	중심어 (5개 이내)	고려홍삼	표준화 제품	남성 난임	정자 생성 촉진 기전

## 5. 영문 요약문

### < SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Establishing stable sales growth by building up claim for desperate consumers</li> <li>○ Development of functional foods for improving male sexuality using Korean red ginseng</li> <li>○ Establishment of manufacturing process (cGMP) and quality specification (WHO or ICH standard) conforming to international standards</li> <li>○ Elucidation of stimulatory mechanism Korean red ginseng on spermatogenesis at molecular level</li> <li>○ Development of novel herbal medicine effective against male sub- and infertility</li> <li>○ Launching functional foods / herbal medicines with annual sales over 100 billion won</li> <li>○ Manufacturing Process and Product Development Research               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Manufacturing process optimization, stability testing (real-time and accelerate conditions)</li> <li>- Quality control related analytical chemistry: Establishment of validated analytical method for 11 ginsenosides</li> </ul> </li> <li>○ Double blind, controlled clinical trial of KRG on male sub- and infertile subjects               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Effects on sperm quality and volume, subjective symptoms and blood chemistry panel</li> <li>- Improvement of fathering capacity</li> </ul> </li> </ul>		
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pre-clinical studies               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxic effect of KRG on Doxorubicin-exposed GC-2spd, TM3, and TM4 cells</li> <li>- Doxorubicin - The effect of improving the sperm production of KRG in exposed male rats was verified by histopathological examination, sperm count and motility, and by comparison of key indicators (antioxidant enzyme, sperm production-related protein, sex hormone receptor mRNA and protein expression)</li> </ul> </li> <li>○ Manufacturing Process and Product Development Research               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Completion of manufacturing process optimization, stability test (real-time and abuse</li> </ul> </li> </ul>		

	condition) - Quality control related analytical chemistry study: 11 standard product documentation acquisition and effective quantitative analysis method establishment) ○ Clinical study (double-blind cross-over test) - Acquisition of 64 patients / subjects, administration of test drug, follow-up of related items - A total of 6 natural pregnancies (approximately 20% assuming all KRG-treated groups)				
Expected Contribution	[Application plan] ○ Propagation as a naturally occurring agent for male sexual dysfunction ○ Applied to internationally accredited traditional medicine for male sexuality booster ○ Expansion of application range for treating female sub-/infertility [Expected results] ○ Birth of the world's first botanical effective against male subfertility and infertility ○ Creation of new demand of Korean ginseng preparations as functional foods ○ Seeking long-lasting loyal consumer groups==> continuous increase in consumption ○ Role of revitalization of stagnant ginseng industry ○ Annual sales over 100 billion products ○ Contribution to national policy by increasing fertility rate				
Keywords	Korean red ginseng	Standardized ginseng product	Male subfertility	Stimulatory mechanism of spermatogenesis	Functional food



## 6. 국문 목차

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
1.1. 연구개발 목적 .....	1
1.2. 연구개발의 필요성 .....	1
1.3. 연구개발 범위 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	9
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
3.1. 실험방법 .....	11
3.1.1. 제1세부 실험방법 .....	11
3.1.2. 제1협동 실험방법 .....	16
3.1.3. 제2협동 실험방법 .....	16
3.2. 추진일정 .....	22
3.3. 연구수행결과 .....	22
3.3.1. 제1세부 연구수행결과 .....	22
3.3.2. 제1협동 연구수행결과 .....	65
3.3.3. 제2협동 연구수행결과 .....	114
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도 .....	127
4.1. 목표달성도 .....	127
4.1.1. 최종 성과목표 및 평가 방법 .....	127
4.1.2. 연차별 성과목표 .....	127
4.2. 관련분야 기여도 .....	130
5. 연구결과의 활용계획 .....	130
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	130
7. 연구개발결과의 보안등급 .....	131
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설, 장비 현황 ·	131
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ·	131
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	132
11. 기타사항 .....	133
12. 참고문헌 .....	133

## 7. 영문 목차

1. Introduction	1
1.1. Purpose of the study	1
1.2. Background of the study	1
1.3. Scope of the study	7
2. Global R&D status	9
3. Experimental contents and results	11
3.1. Materials and methods	11
3.1.1. Study I (PI)	11
3.1.2. Study II (Collaboration study 1)	16
3.1.3. Study III (Collaboration study 2)	16
3.2. Time schedule of the experiment	22
3.3. Experimental results	22
3.3.1. Study I (PI)	22
3.3.2. Study II (Collaboration study 1)	65
3.3.3. Study III (Collaboration study 2)	114
4. Achievement rate and contribution to the related industry	127
4.1. Achievement rate	127
4.1.1. Final goal achievement and evaluation method	127
4.1.2. Goal of annual achievement	127
4.2. Contribution rate to related industry	130
5. Plan of experimental results	130
6. Foreign scientific and technological information collected during the process of study	130
7. Confidential rate of the research results	131
8. Facility and equipment registered to national science & technology general information system	131
9. Safety measures applied to the laboratory	131
10. Representative research results	132
11. Others	133
12. References	133

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

- 절실한 소비자 군을 대상으로 한 적응증 발굴로 안정적 매출 증대 기반 확립
- 고려홍삼을 이용한 남성 난임 개선용 기능식품 개발(국내)
- 국제기준에 부합하는 제조공정(cGMP) 및 품질규격기준(WHO 혹은 ICH 기준) 확립
- 고려홍삼의 정자 생성 촉진 효능 기전 규명
- 정자 결핍 및 약정자증으로 인한 난임 남성용 생약재 의약품 개발(국제)
- 국제적으로 공인 받은 새로운 고려홍삼의 적응증 발굴
- 연간 1,000억 이상 매출 가능한 기능식품/생약재 의약품 launching

## 1-2. 연구개발의 필요성

○ **난임/불임의 정의:** 건강보험심사평가원의 보도자료[www.hira.or.kr, 2012. 10. 17]에 의하면 “불임(infertility)/난임(subfertility)”이란 1년간 별다른 피임을 하지 않은 부부가 정상적인 부부관계에도 불구하고 임신이 되지 않는 경우를 말한다. 정자와 난자의 수정, 수정된 배아의 발달, 배아의 자궁내 착상까지 전과정 중 한 단계에서라도 이상이 있으면 불임/난임이 될 수 있다. 발표에 의하면 대부분의 불임/난임 부부는 절대적 불임/난임 상태가 아니며 수태능력이 저하된 상태가 많다고 한다. 불임 부부의 경우 가임력이 저하된 상태이므로 자연적 임신을 기다리기보다는 수태력을 증대시켜 주는 적극적인 방법을 이용하는 것도 좋다고 본다. 그 가운데에서도 자연식품의 섭취로 아기를 가질 수 있다면 가장 이상적이라 하겠다.

○ **남성 난임/불임의 원인:** 1) 기질적 원인(정삭정맥류, 감염, 사출 이상, 불강하고환, 호르몬 불균형, 정관 결함, 염색체 이상, 성관계 불능 등), 2) 환경적 요인(고열, 독성물질 장기노출 등), 3) 생활습관(비합법적인 의약품 사용, 음주 과다, 직업적 요인, 흡연, 과도한 정신적 스트레스, 과체중, 장시간 자전거 타기 등)이 있다.

○ **의료비 증가, 생산성 저하:** 최근 5년간 건강보험심사평가원의 심사 결정 자료 [아이는 낳고 싶은데...‘불임 부부 증가’, 2011. 10. 18]를 기준으로 분석한 결과 진료인원은 2006년 148,000명에서 2010년 184,000명으로 5년간 24.4% 증가하였고 연평균으로는 5.8%씩 매우 빠르게 증가하고 있다. 이에 따른 진료비 증가 역시 2010년 203억원으로 지난 5년간 연평균 9.4%씩 가파르게 증가하고 있는 추세이다. 불임을 연령별로 구분하여 분석해 보면 2010년 기준으로 남성(73%)은 물론 여성(66.7%) 역시 30대가 가장 많다. 불임은 자식을 갖지 못하는 무자녀 가정에만 국한된 문제가 아니라 국가적으로는 출산율 저하로 이어져 당사자 개인적으로는 자신감 결여, 우울증 등으로 이어져 생산성 저하가 야기된다.

○ **불임/난임 비율:** 불임 진료인원을 성별로 분석한 결과 2010년 기준으로 남성이 34,811명, 여성이 149,765명으로 여성이 남성의 4.3배에 달하는 것으로 나타났으나 여성의 연평균 증가율은 4.8%인 반면 남성의 연평균 증가율은 11.3%로 여성 증가율의 2배를 상회한다. 남성의 경우 불임 소인을 가지고 있다고 하더라도 타인의 시선 때문에 병원을 찾지 못하는 경

우가 많다는 사실을 감안한다면 실제 난임/불임 남성의 수는 수배에 달할 것으로 본다.

○ **남성 난임/불임의 국내외 현황:** 국내에서는 결혼한 부부의 15%가 불임이며 이중 절반은 남성에게 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 남성의 15%는 난임 혹은 불임의 소인을 가지고 있다고 보아야 할 것이다. 미국의 통계[Current Reproductive Endocrinology 27(3): 487-516 (2000)]에 따르면 미국에는 600만명의 남성불임 환자가 있다고 한다. 그러나 보다 심각한 것은 남성 불임이 빠른 속도로 증가하고 있다는 점이다. 가장 큰 원인으로서는 장시간 컴퓨터 사용(고환 온도 상승), 비만(여성 호르몬 증가), 환경오염, 스트레스 등이 있다. 국내의 경우 2013년 7월 13일 SBS 20시 뉴스에 의하면 최근 5년간 국내 난임 남성 환자 비율이 75.7% 증가하였다고 한다. 이는 매년 15%씩 급속도로 증가하고 있는 셈이다.

○ **남성 갱년기 증상 심각:** 최근 데일리팜[www.dailypharm.com, 2013. 07. 12]에 보도된 기사에 의하면 우리나라 40대 이상 중년 남성 3명 가운데 1명은 평상시 각종 남성 갱년기 증상을 느끼고 있으며 10명중 1명꼴은 치료가 시급한 상태라고 한다(서울 아산병원 건강증진센터 경윤수교수팀). 이들 대부분은 혈중 남성 호르몬인 테스토스테론 함량이 3.0 ng/ml로서 호르몬 보충 요법이 필요하다고 하니 보통 심각한 상태가 아닌 것으로 사료된다.

○ **난임 남성을 대상으로 하는 기능식품/치료제:** 특허를 검색한 결과 정자의 수나 질을 개선함으로써 수정력을 높이는 특허는 2건이 검색되었다. 하나는 무청(radish leaves)을 이용하는 방법[US patent 05736144]이고 또 하나는 retinoid agonist (예: tarzarotene)이다[US patient 20070060620]. 무 잎의 경우 끓여서 차로 마시는 방법이며 retinoid agonist는 임상 증례에 대한 언급이 없는 것으로 보아 채취한 정액에 사용함으로써 정자의 운동성을 증진시키는 것으로 보인다. 이외에도 대체의약으로 추천하는 식품은 Vit. C, zinc, selenium, Vit. E, Vit. B12, L-carnithine, b-carotene 정도이다 [www.edition.cnn.com, 2012. 09. 15]. 그러나 이런 식품을 얼마나 섭취해야 정자생성이 좋아지고 나아가 불임을 치료할 수 있는지에 대해서는 보고된 바 없고 보다 중요한 사실은 이들 제품이 공인된 기능식품/치료제가 아니라는 점이다.

○ **인삼산업의 위기:** 인건비 증대에 따른 생산비 증가(경쟁국 대비 2~7배), 경기 불황으로 인한 매출 격감(2011년 대비 25% 정도 감소), 재고 누적(1조원 이상), FTA 체결로 인한 경쟁력 약화, 식재 면적 급감(2009년 대비 2011년 90%)으로 인한 인삼산업의 위기가 현재 대한민국 인삼산업 현실이다. 따라서 고려인삼의 새로운 쓰임새 발굴로 국내외 소비를 증진시키는 길만이 우리가 할 수 있는 최선의 선택일 것이다.

○ **위기 극복 경험:** 1990년도 후반 대한민국은 IMF라는 경제위기에 봉착하였다. 이런 경제 위기로 인해 인삼 매출은 극도로 위축되었으며 회사마다 엄청난 재고를 안고 있었다. 한국인삼공사 역시 1년분의 재고를 고스란히 창고에 쌓아 놓고 있는 매우 어려운 상황이었다. 이러한 악조건에서 위기를 극복하는데 결정적으로 기여한 한편의 논문은 본 주관책임자가 영국 비뇨기과학회지[KIM, SK *et al.* *Panax ginseng* protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced testicular damage in guinea pigs, BJU International, 83: 842-849 (1999).]에 발표한 “**고려인삼의 다이옥신-유발 고환독성 방어 효과**”였다.

○ **충성도 높은 소비자군 확보 절실:** 현재는 다이옥신 때문에 인삼을 복용하는 소비자는 없다. 즉, 다이옥신에 대한 고려인삼의 효과는 일과성 소비 증진에 그쳤다. 금후 인삼산업은 단타성 홍보, 막연히 건강 증진, 성기능 증진 등에 의존해서는 아니 된다고 본다. 경제 상황에 따라 매출이 급변할 수 있기 때문이다. 따라서 1) 현재 선점하고 있는 경쟁 상품이 없으며, 2) 간절히 그리고 절박하게 원하는 소비자층을 대상으로 하는 제품을, 3) 세계 최초로 launching하여 시장을 선점해야만 성공 가능성이 높다고 생각한다. 이러한 점에서 남성 난임 소비자를 대상으로 하는 “세계 최초 고려 홍삼 기능 식품” 출시는 회사 차원에서는 충성도 높은 소비자를 안정적으로 확보한다는 점이고 공익적 차원에서는 출산율을 높임으로써 국가적 시름을 경감할 수 있는 길이라 생각한다.

○ **중동시장을 겨냥한 제품 개발:** 중동의 이슬람 국가들은 일부다처제이다. 젊을 때 여러 부인을 상대하는 것은 체력적으로 큰 문제가 되지 않겠으나 중년 이후 남성의 경우 체력적으로 많이 부담되는 것이 사실이다. 따라서 이들을 겨냥한 정자생성 촉진/성기능 개선 제품 개발은 구매력이 있는 산유국에서 매우 인기 있는 상품이 될 것이다.

○ **국제 공인 효능 발굴 필요:** 현재까지 고려인삼 제품을 가지고 식약처에서 인증 받은 기능은: 1) 피로회복, 2) 면역기능 증진, 3) 혈소판 응집 억제를 통한 혈액순환 개선, 4) 기억력 개선에 도움을 줌, 5) 항산화 효과, 6) 여성 갱년기증상의 개선 등이 있으나, 이들 기능 모두 국내용으로 WHO를 비롯하여 국제적으로는 “tonic (강장효과)”이 전부이다. 본 주관연구책임자는 한국인삼공사 생산 홍삼분말 캡슐의 독일 의약품 등록 서류 작성 프로젝트를 수행한 적이 있어 생약제 의약품의 국제적 등록에 대해 잘 알고 있다. 의약품 등록 경험에 비추어 볼 때 6가지 기능 모두 국내용이지 국제적으로 공인받을 수 있을 정도로 효과가 강한 것은 아니라고 판단한다.

○ **성기능 개선 iPET 과제:** 2013년도 iPET에서 공모한 고려인삼을 이용한 성기능 개선 효과는 유교에 근간을 두고 있는 우리나라로서는 식약처의 기능식품으로 등재해 줄 수 없다고 본다. 이에 대한 협의는 본 과제 제안자가 식약처 담당관과 수차례 협의를 하여도 불가능 것으로 결론지어졌다. 그리고 성기능 개선 효과는 남성 삶의 질을 개선한다는 측면도 있겠으나 한편으로는 쾌락주의자를 위한 것으로 대한민국의 자존심인 고려인삼을 비아그라처럼 폄하되도록 할 수도 있으므로 종주국으로서 자존심이 용납할 수 없다. 그렇다하더라도 가격 면이나 효능 면에서 고려인삼과 비아그라의 경쟁이 되지 못한다.

○ **출산율 감소에 대한 대책:** 합계출산율(가임여성의 가임기간 동안의 출생아수)은 1970년에는 4.53으로 매우 높은 수준이었으나, 급격한 감소를 거듭하여 1983년에는 2.06으로 대체수준(2.10) 아래로 떨어졌다. 합계출산율은 그 이후에도 지속적으로 감소하여 2005년에는 1.08으로 역사상 가장 낮은 수준을 기록하였으며, 2013년에는 1.19로 집계되었다(통계청, world bank, 대한민국 출산율 통계). 이 상태를 유지한다면 2017년부터 대한민국은 생산가능인구가 감소하고 고령사회에 진입하는 통계보고가 있다. 이렇게 출산율이 낮은 원인으로서는 경제적 문제도 있기는 하나 만혼으로 인한 임신 불능도 상당한 비율이라고 본다. 간절히 아이를 원함에도 불구하고 임신이 되지 않는 부부에게 후손을 가질 수 있는 자연적 방법을 제공한다면 이는 부부는 물론 국가적으로도 엄청난 의미를 갖게 되는 것이다.

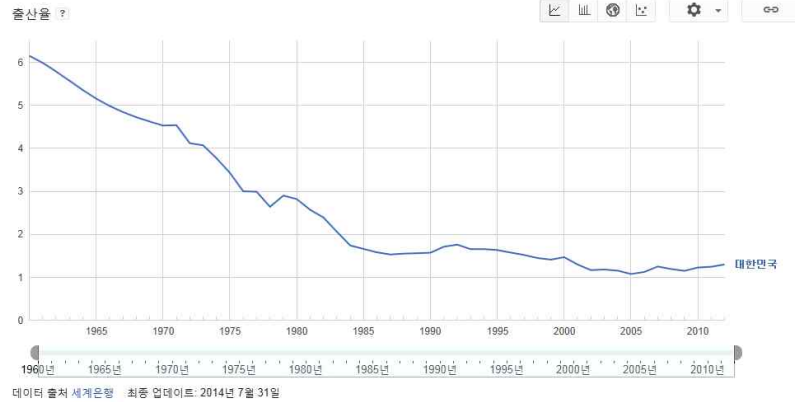


Fig 1. 대한민국 출산율 변화

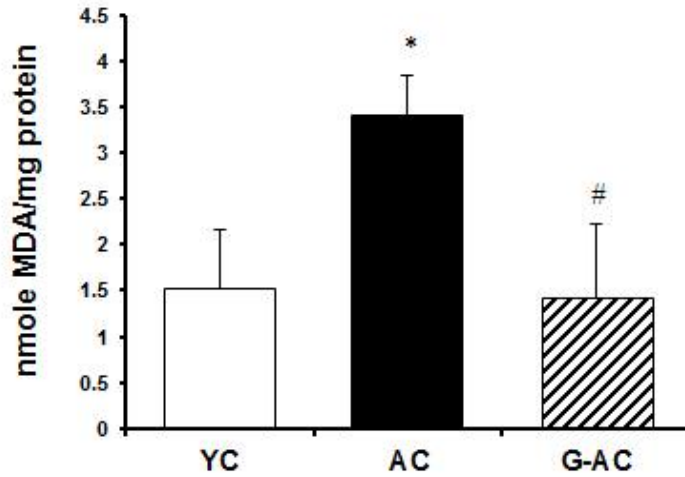
○ **승열 문제, 수세에서 공세로:** 동남아 시장에서 고려인삼은 승열작용이 있다는 오인으로 인해 관측에 큰 어려움을 겪고 있다. 지금까지의 연구 결과를 종합해 볼 때 고려인삼을 복용해도 체온 변화는 없다는 것이 잘 알려져 있다. 다만 고려인삼을 복용하면 체표면으로의 혈액순환이 활발해 지기 때문에 체온은 그대로인데 반해 피부 온도는 상승한다. 고려인삼 복용자들은 이러한 현상을 체온이 올라간다고 오인해 왔다. 그럼에도 불구하고 업체들이 해외시장에서 난관에 부딪치는 이유는 장기간 뿌리 깊게 박혀 있는 오해 때문이다. 그러나 우리가 수행한 연구결과를 가지고 그들을 아무리 설득한다 하더라도 그들의 인식은 쉽게 바뀔리가 만무하다. 오히려 그들의 오해를 더 심화시킬 수 있어 조심스럽게 접근하는 것이 현명하다고 본다. 즉, 굵어 부스럼을 만들고 심지어는 가중시키는 꼴이 된다. 이러한 상황에서 우리가 적극적으로 대처하는 방법은 수세적 자세보다는 오히려 공세적 연구 과제를 발굴해야 한다는 것이 본 과제 신청자의 생각이다.

사실 더운 지방에 거주하는 사람들일수록 고려인삼을 복용해야 하는 것이 생리학적 관점에서 볼 때 맞는 이야기이다. 즉, 더운 지방에 거주하는 사람의 피부온도가 낮으면 뇌하수체는 더욱 덥다고 감지하고 이로 인해 발한기구를 가동시켜 땀을 많이 배출하게 되는 것이다. 땀을 많이 흘리면 기력이 쇠하게 되어 궁극적으로는 건강을 해치게 된다. 임상영양학적으로 보면 더운 지방 사람들은 음식으로 섭취한 에너지의 20~30%를 체온유지를 위해 소비하는 것으로 알려져 있다(임상영양학, Diet therapy). 이런 이유로 동남아 국가 사람들의 신장이 한국인에 비해 작은 것이다. 따라서 더운 날씨에 적응하기 위해서는 체표면으로의 혈액순환을 왕성하게 함으로써 외부온도와의 차를 좁게 하여야 하며 이로 말미암아 체력손실을 방지할 수 있게 되는 셈이다. 이러한 증상을 잘 대변해 주는 동물이 중동 사막지방의 낙타이다. 낙타는 낮에는 뜨겁고 밤에는 추운 지방에서 이러한 생리적 현상을 잘 활용하여 적응한 좋은 증례이다.

본 과제에서는 실험동물을 더운 환경(35°C)에 장기간(2개월 이상) 노출시킴으로써 정자생성 기능을 감퇴시킨 실험동물에 고려인삼을 투여함으로써 고환의 정자생성능 회복 효과를 증명하고자 한다. 이러한 연구 결과는 동남아, 중동 국가와 같이 더운 나라 소비자를 대상으로 승열에 대한 공세적 관측을 할 수 있는 귀중한 과학적 자료가 될 것으로 확신한다.

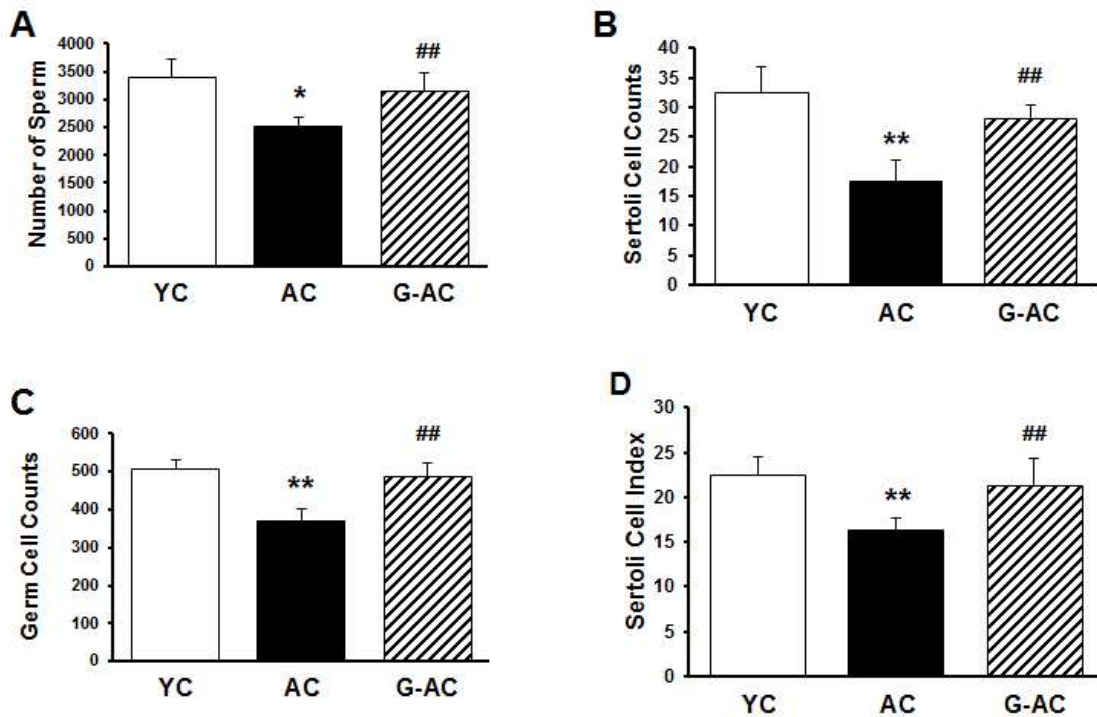
○ 선행 연구 결과: 특허 출원

- (그림 2)에서 보는 바와 같이 노화로 인한 MDA 생성 증가를 현저히 억제함.



**Fig 2.** Effect of KRG on testis lipid peroxidation (LPO) in aged rats. Values were expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). LPO was expressed as nmoles of MDA formed/min/mg protein. Statistical comparisons: YC vs. AC, \* $p < 0.01$ ; AC vs. G-AC, # $p < 0.01$ .

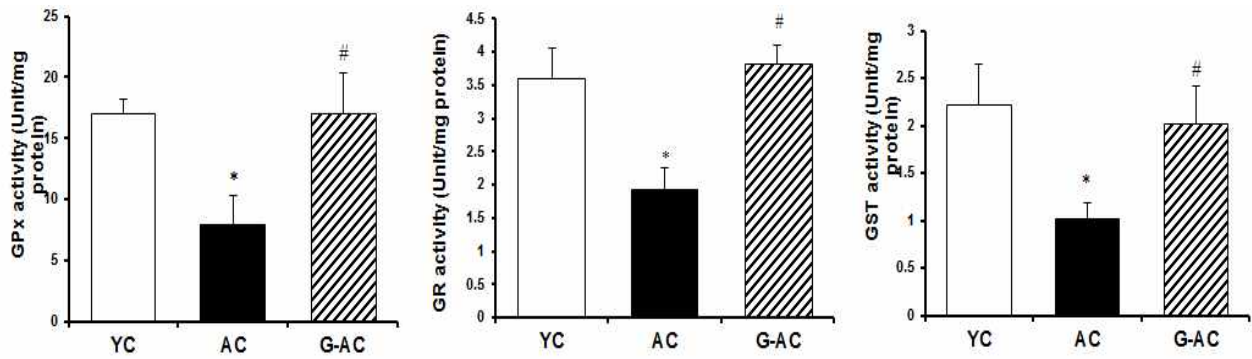
- 그림 3에서 보는 바와 같이 노화로 인해 감퇴하는 정자생성 지수를 현저히 개선함.



**Fig 3.** Effects of KRG on testis parameters related to spermatogenesis in aged rats. (A) Sperm number per tubule, (B) Sertoli cells per tubule, (C) Germ cells

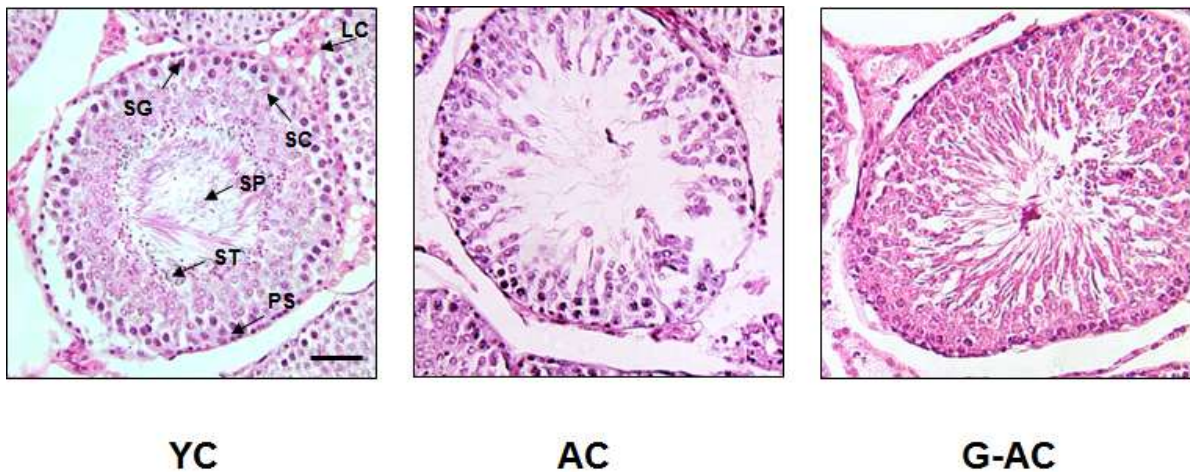
per tubule, and (D) Sertoli cell index. Statistical comparisons: YC vs AC,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; V-AR vs. G-AC,  $#p < 0.05$ ,  $##p < 0.01$ . Values are mean  $\pm$  SD (n=6).

- 노화로 인해 저하하는 고환 조직의 항산화효소활성을 현저히 개선함(그림 4)



**Fig 4.** Effect of KRG on testis glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione transferase (GST) in aged rats. Values were expressed as mean  $\pm$  SD (n=6). (A) GPx, one unit of GPx activity is expressed as the amount of enzyme that converts 1 mmole of GSH to GSSG in the presence of  $H_2O_2$  /min. (B) GR, one unit of GR activity is expressed as the quantity of enzyme which catalyses the oxidation of 1 mmole of NADPH/min. (C) GST, one unit of GST activity is expressed as mmoles of CDNB utilized/min/mg of protein. Statistical comparisons: YC vs. AC,  $*p < 0.01$ ; AC vs. G-AC,  $#p < 0.01$ .

- 노화로 인해 저하하는 정세관내 정자생성능을 현저히 개선함(그림 5)



**Fig 5.** Histological analysis of seminiferous tubules in the rat testis. Representative images of tubular cross-sections of testis from young control rats (YC, A), vehicle-treated aged rats (AC, B), and Korea red ginseng-treated aged rats (G-AC, C). Sections were stained with H&E. The images are typical of those obtained in five independent experiments. Scale bar = 45  $\mu$ m. LC, Leydig cell; PS, primary spermatocyte;



SG, spermatogonium; SP, spermatozoa; SR, Sertoli cell; ST, spermatid.

○ **선행 연구를 통한 성공 확신:** 본 과제 연구자는 지난 20년간 각종 원인(독성물질, 노화 등)에 의한 정자생성 감퇴에 미치는 고려인삼의 효과에 대하여 연구하여 왔다. 고려인삼 특히 홍삼의 정자생성 촉진 및 정자의 운동성 향상은 매우 민감하여 ppm 이하 농도에서도 발현된다. 또한, 주변의 불임 가정에 홍삼 복용을 권장한 결과 여러 가정이 아기를 출산하였기 때문에 임상효과 역시 확신을 가지고 있다. 고려홍삼은 성호르몬의 균형유지, 효소적/비효소적 항산화 기능 증진, 정자생성 관련 단백질 발현 증가, 성호르몬 수용체 발현 증대 등을 통하여 매우 재현성(repeatable) 있고, 매우 민감(sensitive)하게 정자생성을 촉진한다는 사실을 확인하였다.

더 나아가 본 연구자는 약 5년간(1999년~2004년)에 걸쳐 한국인삼공사를 대신하여 정관장 홍삼분말의 독일 의약품 판매허가권(marketing authorization holder) 신청을 해 본 경험이 있어 국제의약품 판매허가권 획득을 위해서는 어떤 연구와 서류를 작성해야 하는지에 대해 잘 알고 있다 [Drug Regulatory Affairs (DRA) 및 International Conference on Harmonization (ICH)의 guidelines에 대한 지식 필수].

따라서 본 연구자는 20년에 걸친 고려인삼의 정자생성 촉진 효능 및 기전 연구와 5년에 걸쳐 독일DRA 전문가로부터 습득한 국제의약품 등록에 관한 국제적 규격 지식과 경험을 바탕으로 1) 간절한 소비자군이 형성되어 있으며, 2) 최근 국내외적으로 시장 규모가 꾸준히 증가하고 있고, 3) 국제적으로 홍삼의 성기능 강화 효과는 경험적으로 잘 알려져 있으므로 성공가능성이 매우 높은 target일 뿐만 아니라, 4) 아직 선점하고 있는 의약품/기능성 식품이 없는 target인 “남성 난임, 불임증”에 대한 “고려홍삼의 개선, 치료효과”를 규명함과 동시에 적응증(claim)으로 국제약전에 등록함으로써 “고려홍삼의 매출을 반석위”에 올려놓고자 하는 것이 궁극적 목표로 한다.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 고환세포 독성에 대한 KRG의 방어능 조사

- (1) 과산화수소-노출 고환세포 독성에 따른 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인
- (2) 항암제-노출 고환세포 독성에 따른 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인
- (3) 고온-노출 고환세포 독성에 따른 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인

#### ○ 생식기능 저하에 대한 KRG의 방어능 조사

- (1) 노령쥐의 생식기능 저하에 대한 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰
- (2) Heat stress로 인한 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단

백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰

(3) Immobilization stress로 인한 KRG의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰

○ 품질규격 기준 부합여부 조사

(1) 지표성분 기준 규격

(2) 미생물의 기준 규격 설정

(3) 중금속의 기준 규격 설정을 공인기관의 분석과 법적 기준 등을 기본으로 설정

○ 지표물질의 validated 정량 분석법 확립

(1) ICH guideline 준수

(2) KRG의 validated 정량 분석법(선택성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 범위, 정확성, 정밀성, 강건성, 시스템 적정성) 확립

○ 제품 등록을 위한 규격기준(specification) 분석

(1) 제품 등록을 위한 3 batch QC data(물리·화학 및 미생물 검사, 위해물질 허용기준 초과여부, 국내·외 규격기준 부합여부) 확보

(2) 제품의 저장기간 확립을 위한 real time & accelerated stability 자료 확보

○ 임상연구를 통한 난임 개선 효능 입증

(1) CASA(computer aided sperm analyzer) 및 microscope를 이용한 sperm morphology 평가

(2) 정낭액의 MDA analysis와 정자의 Halo-sperm study 진행

(3) serum OT/PT (AST/ALT), serum FSH, LH, Testosterone, SHBG 검사를 통해 임상약 투여 전과 후 상태 비교 평가

(4) 생활습관, 성생활 만족도(brief sexual function inventory), 피로도(fatigue severity scale), 삶의 질(SF-36 health survey score) 평가를 통해 임상약 투여 전과 후의 상태 비교 평가

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허를 검색한 결과 미국 특허 10,306건, 유럽 2,403건, 일본 85건, 국내 89건의 특허가 검색되었고, 그 중 정자의 수나 질을 개선함으로써 수정력을 높이는 특허는 2건이 검색되었다. 하나는 무청(radish leaves)을 이용하는 방법[US patent 05736144]이고 또 하나는 retinoid agonist (예: tarzarotene)이다[US patient 20070060620]. 무 잎의 경우 끓여서 차로 마시는 방법이며 retinoid agonist는 임상 증례에 대한 언급이 없는 것으로 보아 채취한 정액에 사용함으로써 정자의 운동성을 증진시키는 것으로 보인다.</li> <li>○ 이외에도 특허는 아니지만 대체의약으로 추천하는 식품은 Vit. C, zinc, selenium, Vit. E, Vit. B12, L-carnithine, b-carotene 정도이다 [www.edition.cnn.com, 2012. 09. 15]. 그러나 이런 식품을 얼마나 섭취해야 정자생성이 좋아지고 나아가 불임을 치료할 수 있는지에 대해서는 보고된 바 없고 공인된 기능식품/치료제 의약품이 아니다.</li> <li>○ 본 과제에서는 동물실험을 통하여 KRG의 정자생성 촉진 효과와 기전을 규명하고 나아가 임상 연구를 통하여 남성 난임 개선 및 치료 효과를 증명한다. 또한, 이미 시장에 나와 있는 인삼/홍삼 제품들과는 “차별화된 제품으로 시장을 선점”하고 본 제품에 대해서는 “용도 특허”를 확보하고자 한다.</li> <li>○ 제조공정에서 품질관리에 이르기까지 전공정이 “국제기준”인 ICH (국제조화위원회)와 WHO guideline에 부합되도록 함으로써 국제 시장 진입을 목표로 모든 전임상 연구 (pharmacodynamics), 임상연구(clinical study), 제조공정(GMP), 품질관리 자료를 확보한다.</li> <li>○ 국내 불임 시장이 350억원(medisobizaneews, ‘국내 불임치료제 시장 외자사 아성 깨졌다’, 2013-04-11)으로 추정되고 있는 가운데 현재 국내에서 시판되고 있는 불임 치료제는 여성 불임에 관련된 배란유도제가 대부분임. 남성 불임에 관련된 치료제는 없고 다만 수술에 의해 치료하고 있는 상황임.</li> <li>○ 남성 불임환자에 대한 정확한 시장조사 자료는 국내외를 막론하고 보고된 것이 없음. 다만 결혼한 부부의 15%가 불임이며, 남성의 70%가 결혼을 한다고 가정하면 결혼적령기 남성의 10%는 불임일 것으로 판단됨.</li> <li>○ 현재 국외에서 시판되고 있는 불임 치료제는 여성 불임에 관련된 치료제가 대부분임. 최근 독일에서 남성 불임 관련 생식세포로 정자 배양에 성공한 사례(포커스 신문사, 2012-01-04)가 있으나, 현재 해외에서 남성 불임에 관련되어 시판되고 있는 불임 치료제는 전무한 상황임.</li> <li>○ 한국보건산업진흥원에서 발표한 자료(2013. 5. 24. vol.57)와 Dailymedi에 보도된 기사(2012. 1. 4. ‘대한민국 의료관광 효자 부상 ‘불임치료’’)에 따르면 한국의 의료 관광객의 비율이 점점 더 높아짐에 따라 현재 국내에서 시판되고 있는 남성불임 치료제로 사용될 인삼의 판매 비율이 커질 것으로 예상된다고 한다. 또한 CMH Health International의 통계에 의하면 2003부터 2007년까지의 중국 불임 치료제 시장규모는 각각 20억1500만 위안(4,000억원), 23억6500만 위안(4,700억원), 27억3800만 위안(5,476억원), 29억1300만 위안(5,829억원), 30억2100만 위안(6,042억원)으로 5년 사이에 50% 성장함으로써 중국의 불임</li> </ul>	

시장에서 큰 판매 효과를 볼 것이라 예상된다. 또한 미국의 경우 남성 불임 환자가 600만 명에 이른다고 하니 세계시장 규모는 수조원에 달할 것으로 예측한다. 또한, 남성 난임 환자의 비율은 생활습관의 변화와 더불어 급속도로 증가하고 있는 것이 특징이다. 따라서 대한민국이 중주국인 고려인삼을 이용하여 남성 난임 개선/치료제를 출시하여 세계시장을 선점한다면 경제적 측면에서는 물론 국격 제고에도 기여하리라 생각된다.

- 기존에 시장에 나와 있는 수삼, 백삼, 홍삼 가공제품이 아니라 발효인삼을 이용하여 남성 난임 치료/개선제 기능식품 개별인증을 획득함으로써 차별화된 제품, 동분야의 “세계 최초 제품”을 출시하는 것을 목표로 한다.
- 본 제품은 정자 결핍 혹은 정자의 운동성 부족으로 인하여 불임인 남성을 대상으로 하는 “건강기능식품” 혹은 “생약재 의약품”을 목표로 한다.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 가. 실험방법

[제1세부 : 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명]

##### (1) *In vitro* 실험

###### (가) 세포 배양

미국 세포주은행(ATCC) 지침에 따라 No. CRL-2196 Spermatoocyte GC-2spd, No. CRL-1714 Leydig TM3, No. CRL-1715 sertoli TM4 cell (ATCC, USA)은 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. GC-2spd는 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 units/mL penicillin (Gibco), 100 ng/mL streptomycin (Gibco)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA) 배지에서 배양한다. TM3와 TM4는 DMEM과 Ham's F12 (1:1, v/v) 배지에 5% horse serum (Gibco), 2.5% fetal bovine serum, 100-units/mL penicillin, 100 ng/mL streptomycin을 첨가하여 배양한다.

###### (나) 각종 자극에 의한 고환 세포의 홍삼 추출물 방어효과 연구

###### ① RNA추출

Total RNA는 Invitrogen사의 TRIZOL시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포를 홍삼 물 추출물 (KRG-WE) 100 µg/ml를 각각 2시간 전 처리 후 Hydrogen peroxide 600 µM로 1시간 자극을 준다. 다음으로 배양 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 TRIZOL 용액 0.4 ml 첨가, 세포를 용해시킨 후 100 µl chloroform 용액을 가하고 2~3회 잘 섞어준 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취했다. 그 후 2-propanol과 1:1로 혼합 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 침전물을 75% ethanol로 씻고 침전물을 건조시켰다. 다시 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 20 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

###### ② 중합효소(PCR) 반응

TRIZOL로 추출한 RNA는 M-MLV reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1g)에 0.1 g의 oligo-(dT), 10 mM dNTPs 을 넣고 65°C에서 10분간 변성시킴으로써 single strand를 얻었다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 200 Unit M-MLV reverse transcriptase을 첨가하고 25°C에서 10분, 37°C에서 50분, 70°C에서 15분 반응시킨 후 PCR은 각각의 tube에 250 ng cDNA, 1xPCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초, 30 cycling하였다. PCR 반응이 끝난 다음 1.5 % agarose gel에 6 µl씩을 넣고 전기영동 한 후 형광사진을 이용하여 반응을 확인하였다.

###### ③ 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

고환에서 특이적으로 발현하는 글루타티온 S-전달효소 (Glutathion S-transferase, GST) 종류의 하나인 GSTm5, 글루타티온 과산화효소 (Glutathion peroxidase, GPX) 종류의 하

나인 GPX4와 고환의 미토콘드리아에서 특이적으로 발현되는 PRX (Peroxiredoxin) 류의 하나인 PRX3의 발현을 mRNA 수준에서 조사하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

GSTm5: TCA AGC TAG ATC TGG ACT TTC CTA A (Forward)

GSTm5: ATC ATA GGT GAG AAA ATC CAC AAA G (Reverse)

GPX4: AGG CAA AAC TGA CGT AAA CTA CAC T (Forward)

GPX4: CGT TCT TAT CAA TGA GAA ACT TGG T (Reverse)

PRX3: ATG AGT TTC ATG ACG TAA AC (Forward)

PRX3: AAA GTA CTC TTT TGA AGC TG (Reverse)

④ 호르몬 pathway에서 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

정자생성 효능을 알아보기 위해 산화적 스트레스로 인해 저하되는 분자들 중 정세관세피의 접합과 정자생성에 중요한 역할을 하는 nectin-2, 여포자극호르몬 항상성을 음성적으로 유지시켜 주는 inhibin- $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

Nectin-2: AGT GAC CTG GCT CAG AGT CA (Forward)

Nectin-2: TAG GTA CCA GTT GTC ATC AT (Reverse)

Inhibin- $\alpha$ : TTG ACT CTA CAG GAT GTG GA (Forward)

Inhibin- $\alpha$ : ACA TAA GTG AAG AGA CCT TC (Reverse)

⑤ 성 호르몬 receptor 관련 mRNA 발현량 조사

산화적 스트레스로 인한 고환 세포 내의 성 호르몬 receptor의 발현량의 차이를 보기 위하여 Androgen receptor (AR), Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), Luteinizing hormone receptor (LHR) 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

AR : CTG GAC TAC CTG GAT CTC TAC CTT A (Forward)

AR : CCT GGG CTG TAG TTT TAT TGT ACT T (Reverse)

FSHR : ATG CTG CTG GCT TTT TCA CT (Forward)

FSHR : TCT TGG TGT CGC TTG ATG AG (Reverse)

LHR : GCA TTC AAT GGG ACG ACT CT (Forward)

LHR : CCT CAA AGA TGG CGG AAT AA (Reverse)

(2) *In vivo* 실험

(가) 실험 동물

랫 사육 조건은  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 명암주기 12시간으로 유지되는 항온, 항습의 SPF (Specific Pathogen Free) 조건에서 사육하였다.

① 12개월령의 노령 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 4개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 젊은 쥐 대조군(YC, Young control, 7주령), 고령쥐 대조군(OC, Old control), KRG 200mg/kg b.w. 투여군 (KRG, 200 mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 9마리씩으로 구성하였다.

② 4주령의 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 6개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하

여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 대조군(NC, Normal control), 고온 스트레스 대조군(HC, Heating control), 고온 스트레스 처리 KRG 100mg/kg b.w. 투여군 (HG100, 100mg/kg b.w.), 고온 스트레스 처리 KRG 200mg/kg b.w. 투여군(HG200, 200mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 10마리씩으로 구성하였다.

③ 4주령의 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 6개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 대조군(NC, Normal control), 구속 스트레스 대조군(IC, Immobilization control), 구속 스트레스 처리 KRG 100mg/kg b.w. 투여군 (IG100, 100mg/kg b.w.), 구속 스트레스 처리 KRG 200mg/kg b.w. 투여군(IG200, 200mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 10마리씩으로 구성하였다.

#### (나) KRG 투여

KRG는 rat용 분말사료에 첨가, 펠릿으로 제조하여 분획별 함유 비율을 감안하여 각각 ① 200mg/kg b.w. ② 100, 200mg/kg b.w. ③ 100, 200mg.kg b.w. 가 되도록 사료에 첨가하여 급여하였다. 총 6개월간의 투여 기간 동안 주당 2회 체중과 일일 사료 섭취량을 측정하여 증가한 체중을 보상하여 줌으로써 체중 대비 1일 섭취량을 계산한 다음 매 2주 간격으로 새로운 사료를 제조하였다.

#### (다) 혈액화학지수 (Blood Chemistry Panel) 조사

혈액시료를 이용, 노화로 인하여 저하되는 혈구상 변화, 당 및 지질대사 기능(Glu: glucose, T-cho: total cholesterol, LDL: LDL-cholesterol, HDL: HDL-cholesterol, TG: triacylglycerol), 성호르몬 분비량(testosterone, LH, FSH) 등을 조사하였다. 혈액화학지수는 생화학자동분석기(Hitachi Medical Co., Ltd., Model 747, Tokyo, Japan)를 이용하여 통상의 임상검사 방법에 준하여 측정하였다.

#### (라) 조직병리학적 관찰

적출한 간, 신장, 비장 및 고환 조직을 육안 관찰하고 최종적으로 1×1cm 크기로 절편 제작 후 10% buffered 중성 formalin 용액에 48시간 고정, automatic tissue processor(Citable 2000)를 이용하여 처리, Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색한 것을 현미경으로 관찰하였다. 기타 방법에 대하여는 통상적인 병리학적 실험 방법에 준하였다. Johnsen's score는 아래의 기준에 의하여 seminiferous tubule을 각 개체 당 10개를 관찰하여 계량화 하였다 (Table 1)[4].

Table 1. Parameter for testicular biopsy score counting system by Johnson's method

Score	Description of scoring system
10	Complete spermatogenesis with many spermatozoa (determined by head form) Germinal epithelium organized in regular thickness leaving an open lumen
9	Many spermatozoa present but germinal epithelium disorganized with marked sloughing or obliteration of lumen
8	Only a few spermatozoa present (<5 to 10)
7	No spermatozoa but many spermatids present
6	No spermatozoa and only a few spermatids present (<5 to 10)
5	No spermatozoa and no spermatids but several or many spermatocytes present
4	Only a few spermatocytes (<5) but no spermatids or spermatozoa present
3	Spermatogonia are the only germ cells present
2	No germ cells, but Sertoli cells are present
1	No cells in tubular section

Data from Johnsen's SC: Hormones 1:2, 1970.

(마) 고환 조직에서의 RT-PCR

① RNA추출

Total RNA는 Invitrogen사의 TRIZOL시약을 이용하여 추출하였다. 적출한 고환 조직 50 µg에 TRIZOL 용액 0.5 ml 첨가, 조직을 용해시킨 후 150 µl의 chloroform 용액을 가하고 2~3회 잘 섞어준 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 취했다. 다시 TRIZOL 0.5 ml과 chloroform 150 µl을 첨가 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 역시 상층액을 취한 후 2-propanol과 상층액을 1:1로 혼합 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물에 대해서는 75% ethanol로 씻고, 건조시켰다. 다시 침전물에 DEPC로 처리한 증류수를 60 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

② 중합효소(PCR) 반응

TRIZOL로 추출한 RNA는 M-MLV reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 g)에 0.1 g의 oligo-(dT), 10 mM dNTPs 을 넣고 65°C에서 10분간 변성시킴으로써 single strand를 얻었다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 200 Unit M-MLV reverse transcriptase을 첨가하고 25°C에서 10분, 37°C에서 50분, 70°C에서 15분 반응시킨 후 PCR은 각각의 tube에 250 ng cDNA, 1xPCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C에서 30초, 30 cycling하였다. 사용할 primer는 다음과 같으며 PCR 반응이 끝난 다음 2% agarose gel에 5 µl씩을 loading하고 전기영동한 후 형광사진을 이용하여 반응을 확인하였다.



③ 고환 조직에서의 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

고환에서 특이적으로 발현하는 글루타티온 *S*-전달효소 (Glutathion *S*-transferase, GST) 종류의 하나인 GSTm5, 글루타티온 과산화효소 (Glutathion peroxidase, GPX) 종류의 하나인 GPX4와 고환의 미토콘드리아에서 특이적으로 발현되는 PRX (Peroxi-redoxin) 류의 하나인 PRX3의 발현을 mRNA 수준에서 조사하였다.

GSTm5: TCA AGC TAG ATC TGG ACT TTC CTA A (Forward)

GSTm5: ATC ATA GGT GAG AAA ATC CAC AAA G (Reverse)

GPX4: AGG CAA AAC TGA CGT AAA CTA CAC T (Forward)

GPX4: CGT TCT TAT CAA TGA GAA ACT TGG T (Reverse)

PRX3: ATG AGT TTC ATG ACG TAA AC (Forward)

PRX3: AAA GTA CTC TTT TGA AGC TG (Reverse)

④ 성 호르몬 pathway에서 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

정자생성 효능을 알아보기 위해 산화적 스트레스로 인해 저하되는 분자들 중 정세관 세포의 접합과 정자생성에 중요한 역할을 하는 nectin-2, 여포자극호르몬 항상성을 음성적으로 유지시켜 주는 inhibin- $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

Nectin-2: AGT GAC CTG GCT CAG AGT CA (Forward)

Nectin-2: TAG GTA CCA GTT GTC ATC AT (Reverse)

Inhibin- $\alpha$ : TTG ACT CTA CAG GAT GTG GA (Forward)

Inhibin- $\alpha$ : ACA TAA GTG AAG AGA CCT TC (Reverse)

⑤ 성 호르몬 receptor mRNA 발현량 조사

산화적 스트레스로 인한 고환 세포 내 성 호르몬 receptor의 발현량 차이를 보기 위하여 androgen receptor (AR), follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

AR : CTG GAC TAC CTG GAT CTC TAC CTT A (Forward)

AR : CCT GGG CTG TAG TTT TAT TGT ACT T (Reverse)

FSHR : ATG CTG CTG GCT TTT TCA CT (Forward)

FSHR : TCT TGG TGT CGC TTG ATG AG (Reverse)

LHR : GCA TTC AAT GGG ACG ACT CT (Forward)

LHR : CCT CAA AGA TGG CGG AAT AA (Reverse)

(바) 항산화 및 정자생성 관련 단백질 발현량

특이적 단백질 검출을 위해 Western blot 방법을 이용하였다. 즉, 고환 조직을 추출한 다음 standard buffer (RIPA buffer 980 ml + protease inhibitor 10 ml + phosphatase inhibitor 10 ml)를 넣고 단백질을 lysis시킨 다음 원심분리 (14,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상층액을 취하여 단백질을 정량하였다. 일정량의 단백질과 loading buffer (5X)를 혼합한

다음 10% SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 5% skim milk로 1시간 blocking 후 GSTm5, PRX2, nectin-2, inhibin- $\alpha$ , actin 1차 항체와 overnight 반응시킨 후, ECL detection 용액 (Thermo) 으로 확인하였다.

(사) 통계 처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS 통계 package를 사용하여 실시하고, 분석수치는 평균과 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군 간의 차이는 one way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 검증하며,  $p < 0.05$  수준에서 유의성이 관찰된 경우 각 실험군 간의 평균값의 차이에 대한 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 평가하였다.

[제1협동 : 국제기준(ICH 혹은 WHO 기준) 부합 제조공정 확립 및 품질규격 표준화 제품 개발]

(1) 지표물질 표준품 분석

(가) 표준품 제조 : HPLC (ODS, 20 x 250 mm YMC-Pack, 203 nm, 55% CH<sub>3</sub>CN)를 이용, 각각의 ginsenoside에 해당하는 peak를 분취하였다. 분취물을 농축한 다음 최종적으로 초순수 증류수를 용매로 한 용매계에서 재결정함으로써 흰색의 무정형 결정 분말 ginsenoside reference material (RM)을 얻었다.

(나) 표준품 동정 : <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, FT-IR spectroscopy, Mass spectrometry, UV Spectrophotometry 조사한다.

(다) 표준품 순도 : Ginsenoside 표준물질은 각각 순도가 보정된 RM의 사용을 권장한다 (Choromadex(USA)에서 구입 후 사용하였음).

(라) 함량 조사 : 각각 다른 3가지의 HPLC Method로 함량 분석 실시한다.

(2) 홍삼농축액 분말 및 홍삼정 타블렛의 표준성분 분석법 확립

(가) ICH guideline에 제시된 것과 같이 해당 분석법에 대해 분석을 실시하였다.

- ① 검출한계 및 정량한계(LOD & LOQ)
- ② 특이성
- ③ 직선성
- ④ 정밀성
- ⑤ 재현성
- ⑥ 정확성

[제2협동 : 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재]

(1) 홍삼 추출물이 사람의 정액에 미치는 효과

(가) 내용: 홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하기 위해 인체적용시험을 시행하였다.

- ① 인체적용시험 제목 : 홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 24주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험.

② 목적 :홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 하였다.

③ 실시 기과 :다기관 인체적용시험, 총 4개 기관에서 참여 (차의과대학교 분당차병원, 단국대학교 제일병원, 차의과학교 강남차병원, 차여성의원 서울역 센터)

#### (나) 연구대상군

##### ① 선정기준:

○ 아래 기준의 정자결핍증, 약정자증을 가진 남성 중에서,

1. Ejaculated volume: 1.0 mL 이상이면서,
2. 다른 기준은 정상 (단, morphology 는 기준에 고려하지 않으며, pyospermia 의 경우 항생제 4주 사용 후 정상인 경우 포함 가능) 수치이며,
3. a, b, 또는 c 중 한 가지라도 해당하는 자.

a. Sperm count : 0(초과)~20 x 10<sup>6</sup>/mL,(WHO 1999년도 표준 기준의 100% 미만)

b. motility 0(초과)~50%(WHO 1999년도 표준 기준의 100% 미만)

c. Activity : 0, 1, 2

○ 시험대상자가 반드시 다음 기준을 모두 충족해야 함.

1. 만 20-60세
2. 임신을 원하는 남성 및 현재 인공수정 또는 시험관 아기를 진행 중인 남성
- 3 다음과 같이 정의되는 적절한 골수 기능: 절대 호중구 수(ANC)  $\geq 1.5 \times 10^9/L$ , 헤모글로빈 (Hb)  $\geq 8.5 \text{ g/dL}$ , 혈소판 수  $\geq 75 \times 10^9/L$
- 4 다음과 같이 정의되는 적절한 간 기능: 알부민  $\geq 2.8 \text{ g/dL}$ , 빌리루빈  $\leq 3.0 \text{ mg/dL}$ , 아스퍼테이트 아미노전이효소(AST),알라닌 아미노전이효소 (ALT), 알칼리성 인산분해효소(ALP)  $\leq 2.5 \times$  정상 상한(ULN)
- 5 국제 정상화 비율(INR)  $\leq 2.3$ 으로 정의되는 적절한 혈액 응고 기능
- 6 혈청 크레아티닌 $\leq$  정상상한(ULN)으로 정의되는 적절한 신기능
7. 단, 정자 형성에 영향을 미칠 수 있는 타 약제 (예, 엽산, L-carn, HCG, HMG, Chromifen 등) 복용 시: 2주 washout 뒤 선정 기준에 포함되면 선정 가능.
8. 서면 시험대상자 동의를 제공한 경우
9. 임상시험계획서의 모든 측면을 준수할 의향과 능력이 있는 경우

##### ② 제외기준:

○ 다음 기준에 하나라도 해당되는 시험대상자는 제외된다.

- 1) 신체검진에서 정계정맥류가 의심되는 사람. 2) 신체검진에서 obstruction이 의심되어 testis needle biopsy 를 시행 하여 병리검사 소견이 정상인 사람. 3) 기존 정관의 문합술 과거력이 있는 사람. 4) 엽산 및 불임 관련 보조제 복용중인 사람. 5) Testosterone level 이 정상이 아닌 경우. 6) 인삼에 과민반응이 있는 사람. 7) 수축기 혈압이 180mmHg 이상인 사람. 8) 변비가 심한 사람. 9) 염증 등으로 인한 고열이 있는 사람

##### ③ 목표한 연구대상자 수

본 인체적용시험에는 총 120명(홍삼군 81명, 플라세보군 39명)의 연구대상자가 무작위 배정 되어 시험을 실시하였다. 연구대상자 수 120명은 20%의 탈락률을 고려한 것이며,

96명(홍삼군 64명, 플라세보군 32명)이 인체적용시험을 중대한 위반 없이 완료하는 것을 목표로 하였다.

④ 스크리닝 (V1, V2):

- 혈액 검사
- 호르몬 검사,
- 2번의 정액 검사
- 설문조사 시행

1) 혈액 검사, 호르몬 검사, 정액검사는 V1 전 최근 4주 이내 검사 결과로 대체할 수 있다. 2) 세부적인 검사 방법은 다음 (다) 의 연구수행방법에 기술함.

(다) 연구수행방법

- ① 이중맹검, 전향적 단면연구
- ② 다기관 연구
- ③ 위와 같이 선정된 자에서 난수표를 이용하여 위약군과 치료군을 선정
- ④ 난수표에 의해 위약군과 치료군으로 선정된 자에서, 건강기능식품투여 및 검사

매 외래 방문 시 마다 문진 및 가능한 부작용 평가

○ 스크리닝 (V1, V2): 혈액 검사, 호르몬 검사, 2번의 정액 검사, 설문조사 시행

\* 혈액 검사, 호르몬 검사, 정액검사는 V1 전 최근 4주 이내 검사 결과로 대체할 수 있다.

○ 3개월 뒤 (V3): 정액 검사 1회

○ 6개월 뒤 (V4, V5): 혈액 검사, 호르몬 검사, 2번의 정액 검사, 설문조사 시행

\* 6개월 이후 모든군은 홍삼을 복용함.(6개월 이후의 자료는 경향 분석을 위한 참고 자료로 사용됨.)

○ 12개월 뒤 (V6, V7): 혈액 검사, 호르몬 검사, 2번의 정액 검사, 설문조사 시행

\* 각 방문의 window period 는 예정 방문일 전후 각 15일로 하였다. 단, 정액 검사를 반복 측정하는 일정의 경우(Visit1과 Visit2, Visit6과 Visit7), 두 방문 사이의 간격은 최소 2주 이상, 최대 3주 이하로 하였다. Visit4과 Visit5 의 경우 최소 2주 이상 최대 60일 이하로 하였다.

⑤ 치료 중 임신 시 6개월(V4, V5) 방문까지 진행하였다. 단, 시험대상자가 원할 경우 프로토콜에 따라 검사를 진행하며 시험용제품을 제공하였다.

⑥ 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

홍삼군: 1일 2회, 1회 2정, 아침/저녁 식전 30분 경구섭취(2 g/day, 홍삼농축액 3g/일; 진세노사이드 Rg1 + Rb1 + Rg3 5.5 mg/g 이상 함유)

플라세보군: 1일 2회, 1회 2정, 아침/저녁 식전 30분 경구섭취(2 g/day)

섭취기간: 홍삼 또는 플라세보 제품을 24주간 경구섭취

⑦ 검사방법

○ 연구대상자 동의서(ICD; Informed Consent Document) 취득

연구자는 인체적용시험 전반에 걸쳐 연구대상자가 가질 수 있는 질문에 대해 답변하고 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사에 중요할 수 있는 새로운 정보가 입수되는 대로 적절한 시한 내에 이를 공유하는 것을 포함하여 연구대상자가 인체적용시

험 참여로 인한 위험 및 이익을 이해하도록 확인하는 책임이 있다. ICD가 새로운 정보에 따라 갱신됨에 따라 연구자는 갱신된 ICD를 사용하여 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사를 다시 한번 확인하였다. ICD는 연구대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 쉬운 용어를 사용하여 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익을 연구대상자에게 설명하기 위해 사용하였으며, 연구대상자가 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익에 대해 만족할 만큼 이해하고 인체적용시험에 참여하고자 하는지 문서화하기 위해 사용하였다. 연구자는 각 연구대상자가 제출한 대상자 동의서를 확인하였으며, 여기에는 모든 인체적용시험계획서 상의 절차수행 및 시험제품의 처방 이전에 적절한 서명 및 날짜가 기재되어야 하는 점이 포함된다.

#### ○ 스크리닝 번호 및 연구대상자 번호 부여

인체적용시험에 참여하고자 서면 동의한 자원자에게 스크리닝 번호를 부여하였다. 스크리닝 번호는 기관약어-S숫자 세자리로(BR-S001~) 구성되며, 동의서를 받은 순서대로 부여하였다. 연구대상자 번호는 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하고, 2차 방문 시 최종 통과되면 통과된 순서대로 무작위배정하여 부여하였다. 연구대상자 번호는 기관약어-R숫자 두자리로(BR-R01~) 구성되며, 숫자는 참여한 연구대상자의 순서를 나타내며 001~120까지 나타낼 수 있다. 각 연구대상자에게 부여된 연구대상자 번호는 인체적용시험이 끝날 때까지 연구대상자를 인식하는 연구대상자 식별코드(subject identification code)로 사용하였다.

기관약어: (p. 14 인체적용시험 실시기관, 시험책임자, 공동시험책임자, 시험담당자, 관리약사 목록 참조)

#### ○ 병력 및 약물 투여력 조사

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서 10년 이내에 가지고 있는 과거 병력을 확인하고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 인체적용시험 기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 기록하였다. 또한 모든 병용약물의 약물명, 용량, 투여기간 등을 상세히 기록하였다.

#### ○ 활력징후

활력징후는 좌위 혈압, 맥박수 항목을 측정하였다. 혈압은 연구대상자의 팔이 심장의 높이에 위치하도록 하였으며, 급격한 체위 변동 없이 5분 이상 좌위 자세를 유지한 상태에서 혈압, 맥박수를 측정하였다. 단위는 mmHg 이고 정수로 표기하였다.

#### ○ 정액검사

정액검사는 매 방문 시 측정하였다. 정액검사를 반복 측정하는 일정의 경우(Visit1과 Visit2, Visit6과 Visit7), 두 방문 사이의 간격은 최소 2주 이상, 최대 3주 이하로 하였고, Visit4과 Visit5의 경우 최소 2주 이상 최대 60일 이하로 하였다. 정액검사를 1회만 측정하는 일정(Visit3)은 Visit2 기준으로 window period는 예정 방문일 전후 각 15일로 하였다. 검사항목은 다음과 같다.

정액검사: Volume, sperm count, TMSC(total motile sperm count), motility,

CASA(VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, BCF), Strict morphology, Vitality, pH

○ 호르몬검사

호르몬검사는 12시간 이상 공복상태에서 채혈하여 측정하였으며, 채취된 샘플은 분석 후 폐기하였다. 검사항목은 다음과 같다.

호르몬검사: Testosterone, E2, FSH, LH, SHBG(sex hormone binding globulin), Cortisol

○ 설문지

삶의 질 설문지, 발기능 설문지 및 피로도 측정 설문지를 조사 하였으며, 조사항목은 다음과 같다.

삶의 질 설문지(SF-36; 36-Item Short-Form Health Survey)

발기능 설문지(IIEF; International Index of Erectile Function)

피로도 측정 설문지(FSS; Fatigue Severity Scale)

○ 임신 결과

방문 시 마다 임신 여부 확인 하였다. 임신 시 24주(Visit4, Visit5) 방문까지 진행하였다. 단, 시험대상자가 원할 경우 프로토콜에 따라 검사를 진행하였으며 시험용제품을 제공하였다. 조사항목은 다음과 같다.

임신: 임신여부, 아기 성별, 정상분만 여부, 임신방법, 약물 복용 여부

○ DAZ deletion/ SpermMar IgG test

일부 대상자들의 신체 검진, 또는 성호르몬 검사 조합상에 유전적 소인이 의심되거나, 항정자 항체가 있을 가능성이 있다고 연구자가 판단하는 경우, DAZ deletion이나 SpermMar IgG test를 통해서 염색체 이상 및 정자의 상태를 검사하였다.

○ 혈액검사

혈액검사는 12 시간 이상 공복상태에서 상완정맥 등 정맥에서 채혈하여 다음 항목을 측정하였다.

Hematology: RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets, WBC, Neutrophils (Seg.), Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils

Chemistry,LFT: BUN, Creatinine, Albumin, Total bilirubin, AST(SGOT), ALT(SGPT), Alkaline phosphate

Coagulation: PT, PT(%), PT(INR)

○ 연구대상자 이상반응 모니터링

이상반응에 대한 정보는 수시로 연구대상자에게 자발적인 보고를 하도록 하였으며, 그 외에 섭취 기간 동안 전화 방문과 정기 방문 시 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용제품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용제품과의 인과관계, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함된다.

○ 선정기준/제외기준 확인(연구대상자 적합성 평가)

1차 방문 시에 수행한 연구대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약물투여력 조사, 이학적 검사소견, 기타 검사결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 합당하는 연구대상자 선정이 이루어졌는지 평가하여 기록하였다.

○ 무작위배정 및 인체적용시험용제품 처방

선정기준/제외기준에 합당한 연구대상자를 홍삼군 또는 플라세보군에 무작위배정하였다. 무작위배정은 선정기준/제외기준 평가일인 2차 방문에 이루어졌으며, 이때에 최초 섭취가 이루어졌다. 이후 섭취시작 12주, 24주에 연구대상자가 방문하여 인체적용시험용제품을 처방 및 반납하도록 하였다.

○ 반납제품 회수 및 순응도 확인

2차 방문 이후 각 방문 시마다 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험용제품의 잔량을 관리약사가 점검하여 순응도를 계산하였다.

연구대상자가 섭취하고 남은 잔량은 반드시 약국에 반납하도록 하였으며 수불장부를 기록하였다. 각 방문 별 순응도는 100%를 초과할 수 없으며, 초과할 경우 100%로 간주하였다. 각 방문 별로 순응도를 계산하였으며, 순응도는 정수로 표기하였다.

$$\text{제품 순응도 (\%)} = \frac{\text{복용한 제품 수}}{\text{복용해야 할 제품 수}} \times 100$$

⑧ 대조제품의 선정

홍삼의 유효성을 비교·평가하기 위한 대조제품은 홍삼의 유효성분이 함유되어 있지 않은 플라세보이다. 동시에 정자운동성 및 정자 질 개선에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 인체에 무해한 식품 성분으로 홍삼과 중량 및 외향이 거의 동일하게 만들어졌다.

나. 추진일정

세부과제명	세부연구내용	연차별 월 단위 추진계획											
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[제1세부] KRG를 이용한 남성 난임 개선 개별 인 정형 기능식품 개발	고려홍삼의 정자생성 효능 및 기전 연구 - 홍삼추출물 및 홍삼 사포닌( <i>in vitro</i> )	■	■	■	■	■							
	동물 사육 및 시료 투여(18개월령 노령쥐) - 시료: 홍삼 물추출물	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	정자생성 촉진 효과 규명 연구 (혈액학적, 조직생화학적, 병리조직학적, 분자생물학적 검사 및 정자운동성 조사)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
	국내외 등록 범위 자문 및 연구 총괄 관리 - 국제기준, 표준품 분리, 서류 작성 등	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
[제1협동] 국제기준 부 합 제조공정 확립 및 품질 규격 표준화 제품 개발	지표물질 표준품 분리, 국제 규격서류 작성 (순도 및 구조 관련)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	공정 최적화 및 cGMP 부합 공정 확립 (IPC 공정단계/조사항목/규격기준, alert plan, SOP 확립)		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	분석화학적 연구	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	지표물질 분리 및 정제, dossier 작성 품질규격: 미생물, 위해물질 (잔류농약, 중금속, 아플라톡신 등)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	제품의 안정성 자료 확보: real time 및 학대조건 (ICH guideline, 6개월 이상)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
[제2협동] 임상 연구를 통한 남성 난 임 개선 효능 입증	연구대상자 선정(WHO 표준 기준 미만의 정 자결핍증, 약정자증을 가진 남성)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	임상화학지수 (serum AST/ALT, serum FSH, LH, testosterone, SHBG, Inhibin $\beta$ )	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	정자의 질 및 수 조사: CASA(computer aided sperm analyzer), 현미경 하 정자 모양 평가, 정 자의 질 및 정낭액의 oxidative stress 평가.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	설문지 조사 (삶의 질 지표, 피로도 평가, 성생 활 만족도)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	임신여부 조사, 임상 연구 자료 결과 분석							■	■	■	■	■	■

다. 연구수행결과

[제1세부: 고려홍삼의 정자생성과 질 개선 효능 및 기전 규명]

1. *In vitro* 실험

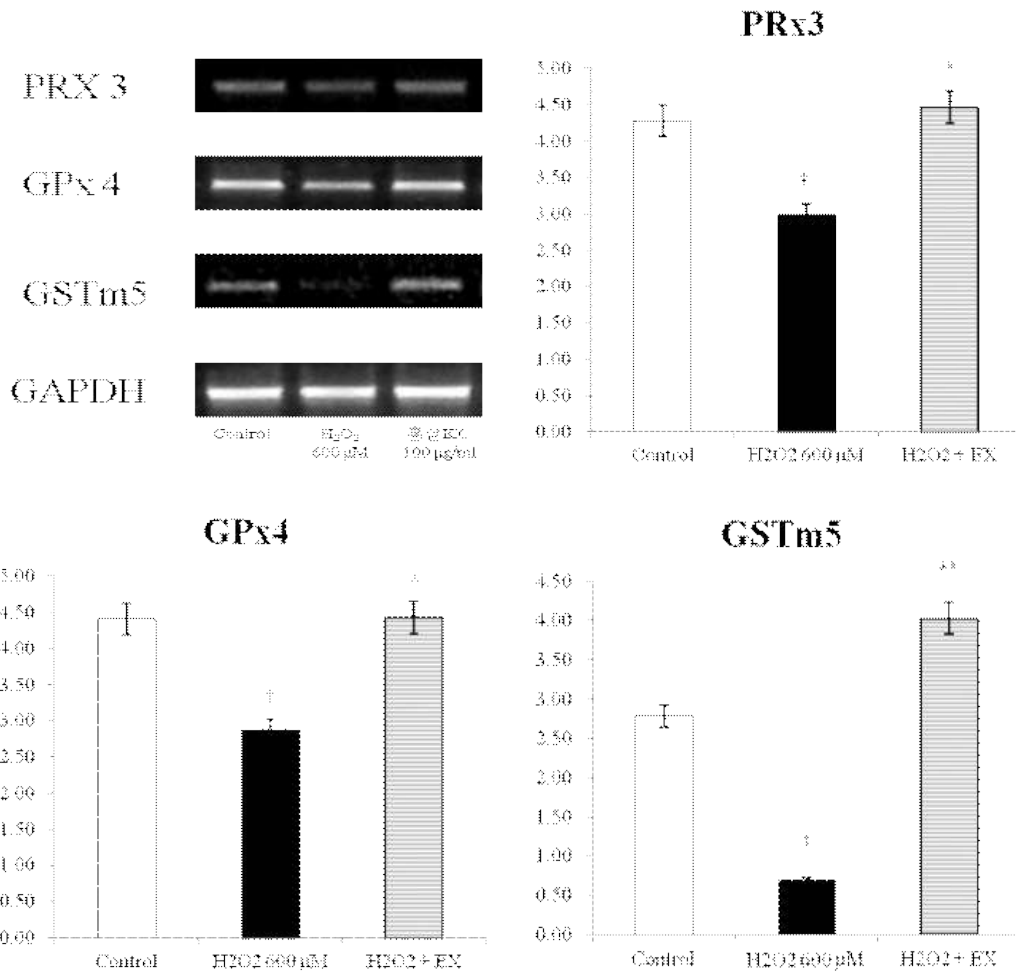
1-1 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

1-1-1과산화수소-유발 고환세포 독성에 대한 KRG

(100 mg/ml)의 방어 효과 연구를 위해 항산화 작용에 관여하는 주요 효소의 mRNA 발 현량을 조사하였다. Mouse의 정모 세포인 GC-2spd 세포주에 과산화수소 600  $\mu$ M을 1시간



처리한 결과 PRx3, PRx4, GPx4 및 GSTm5의 mRNA 발현량이 유의하게 감소하였으며 KRG 전처리군에 있어서는 과산화수소에 의한 항산화 효소의 mRNA 발현량 감소가 대조군 수준으로 유의하게 억제된다는 사실을 알았다( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1.1** 과산화수소에 노출된 GC-2spd cells에 있어 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. GC-2spd cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 600 μM). <sup>†</sup><sup>\*</sup> Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively. <sup>\*\*</sup> Significantly different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

한편, Leydig cell인 TM3 cell line의 경우 과산화수소에 대한 독성 반응은 GPx4와 GSTm5에서 매우 민감하게 나타나는 반면 KRG는 이들 항산화효소의 mRNA 발현량 감소에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

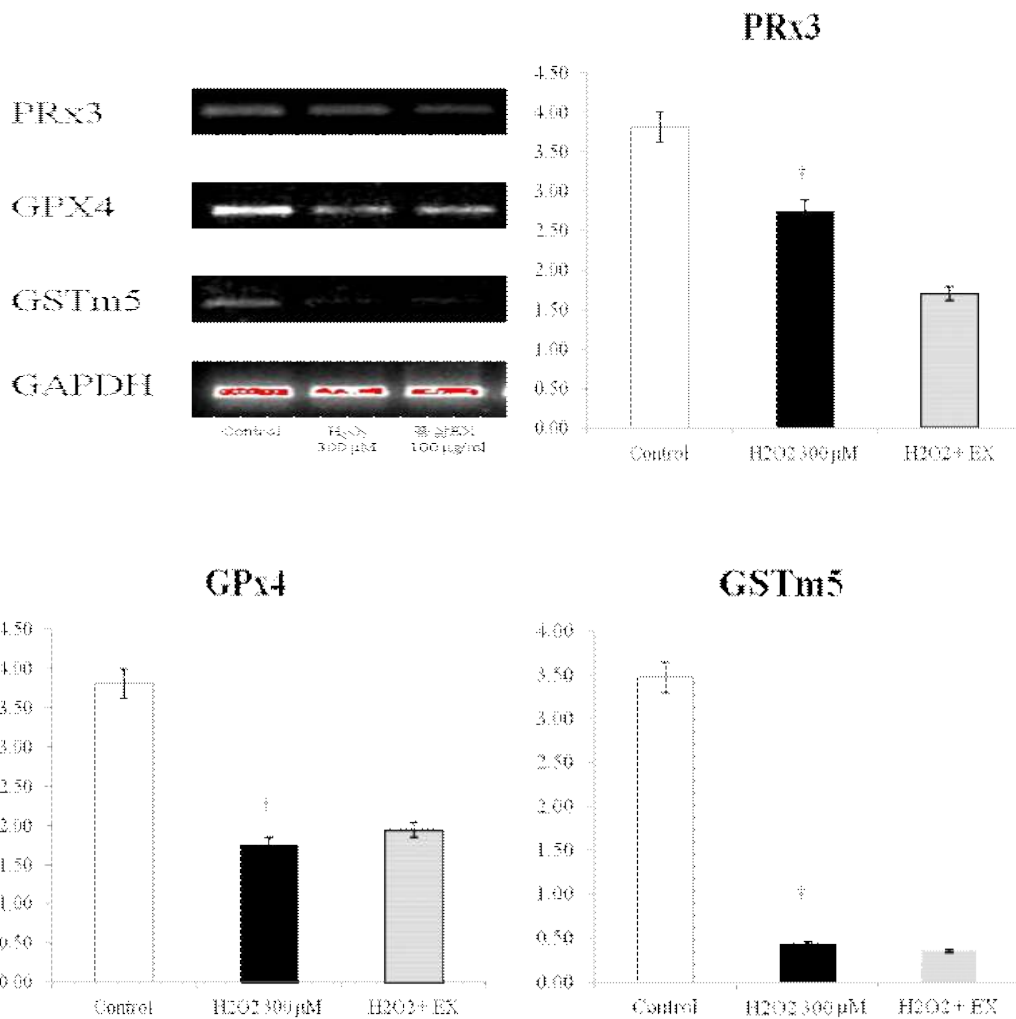
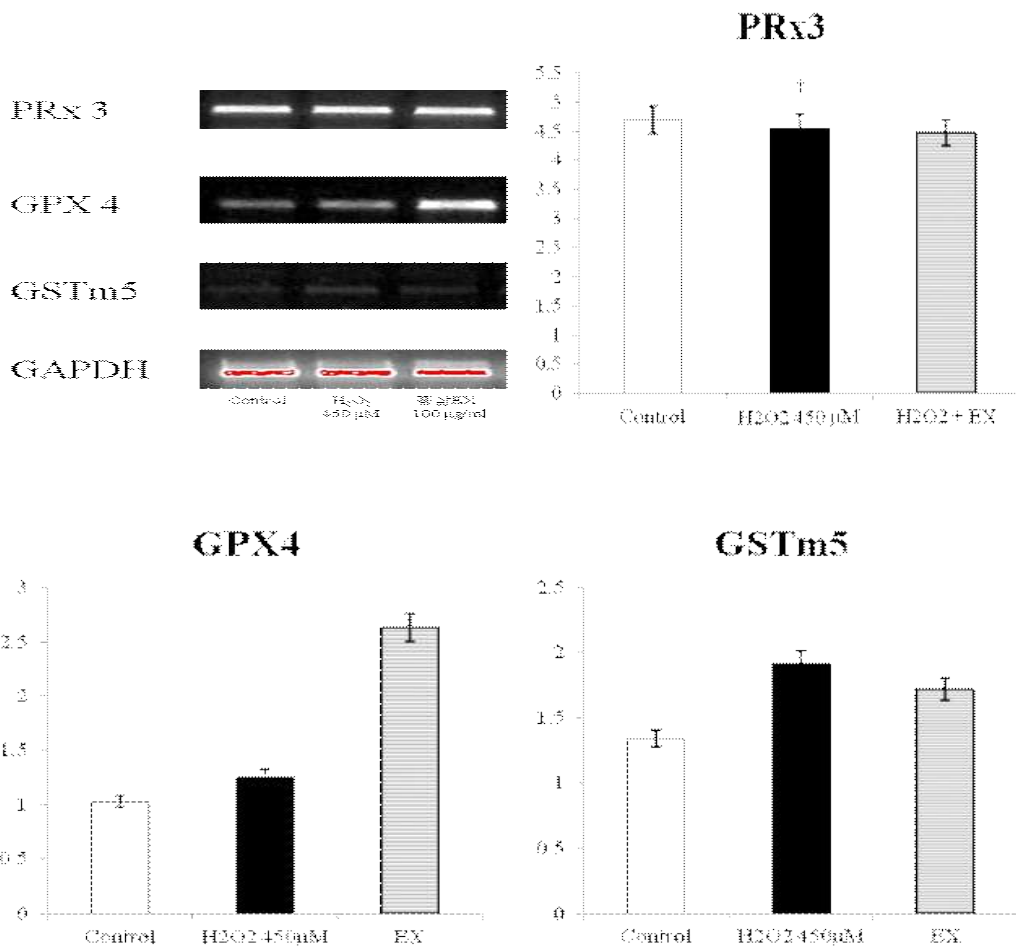


Fig. 1.2. 과산화수소에 노출된 TM3 cells에 있어 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. TM3 (Leydig) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 300 mM). <sup>†\*</sup> Significantly different from the control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

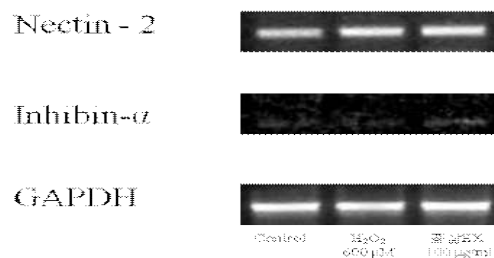
Sertoli 세포인 TM4 세포에 있어서는 과산화수소 450 mM 처리가 GPx4, GSTm5 및 PRx3의 mRNA 발현량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 KRG의 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 MTT assay를 통해 조사한 결과 과산화수소 처리 농도가 500 mM 이상으로 처리할 경우 TM4 세포 독성이 나타나 더 이상의 고농도로는 처리할 수 없었다.

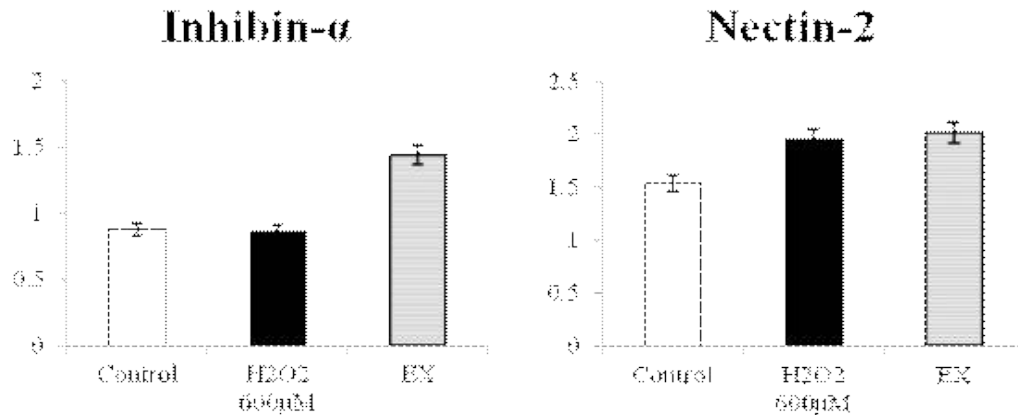


**Fig. 1.3.** 과산화수소에 노출된 TM4 cells에 있어 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. TM4 (Sertoli) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 450 mM). <sup>†</sup> Significantly different from the control at  $p < 0.05$ .

### 1-1-2 정자생성 관련 단백질의 mRNA 발현량 조사

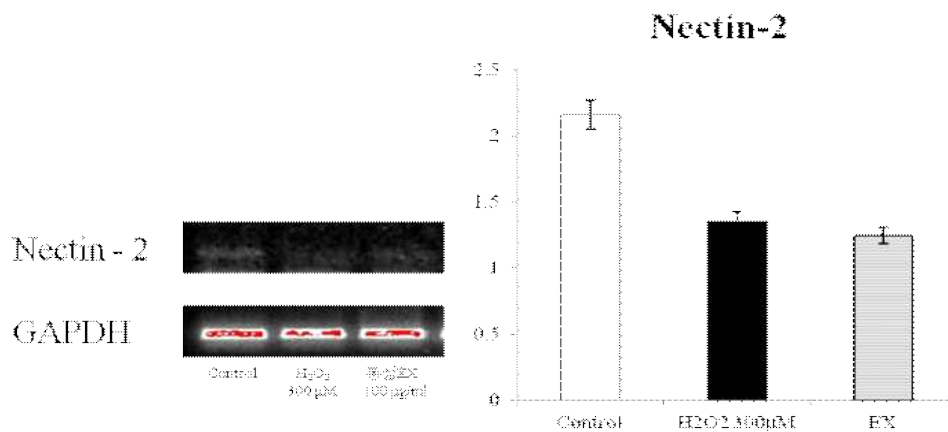
GC-2spd 세포에 있어 호르몬 pathway의 정자생성 관련 단백질 mRNA 발현량 조사에 있어서는 Fig. 1.4에서 보는 바와 같이 과산화수소 600 mM에 의해 inhibin-α와 nectin-2 모두 변화가 없는 것으로 나타나 KRG의 효과는 관찰할 수 없었다.





**Fig. 1.4.** 과산화수소에 노출된 GC-2spd cells에 있어 nectin-2 및 inhibin-α mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. GC-2spd (sperm) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 600 mM).

한편, TM3 cells에 있어서는 과산화수소 300 mM에 의해 nectin-2의 mRNA 발현량이 현저히 감소하는 반면 KRG는 100 mg/ml, 3시간 전처리에 의해 nectin-2의 mRNA 발현량 감소를 억제하지 못하는 것으로 나타났다.



**Fig. 1.5.** 과산화수소에 노출된 TM3 cells에 있어 nectin-2 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. TM3 (Leydig) cells were pre-treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 300 mM).

TM4 세포의 경우 과산화수소 450 mM 처리에 의해 nectin-2의 mRNA 발현량은 오히려 증가하였으며 KRG 전처리는 과산화수소에 의해 증가된 nectin-2 mRNA 발현량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 반면에 inhibin-α의 mRNA 발현량의 경우 과산화수소에 의해 현저히 감소한 반면 KRG 전처리는 발현량 감소를 방어하지 못하는 것으로 관찰되었다.

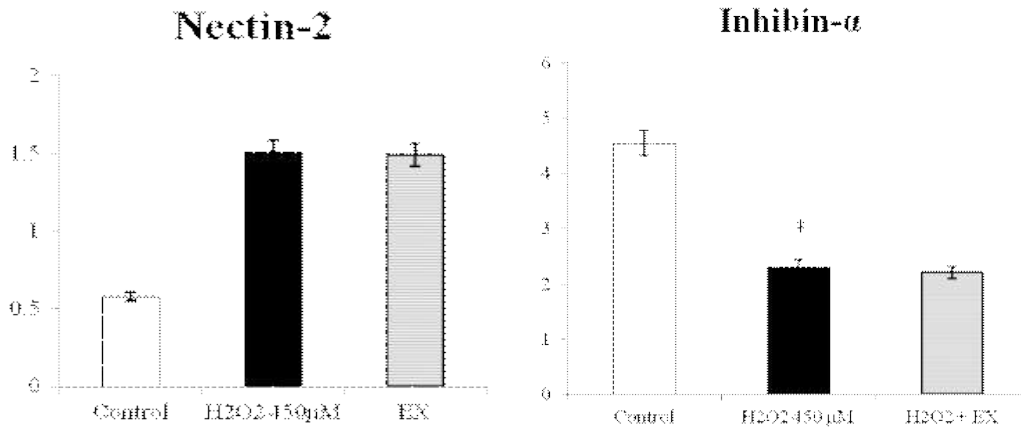
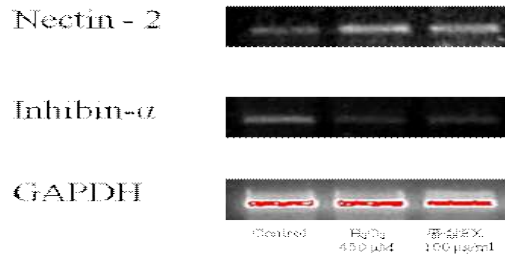
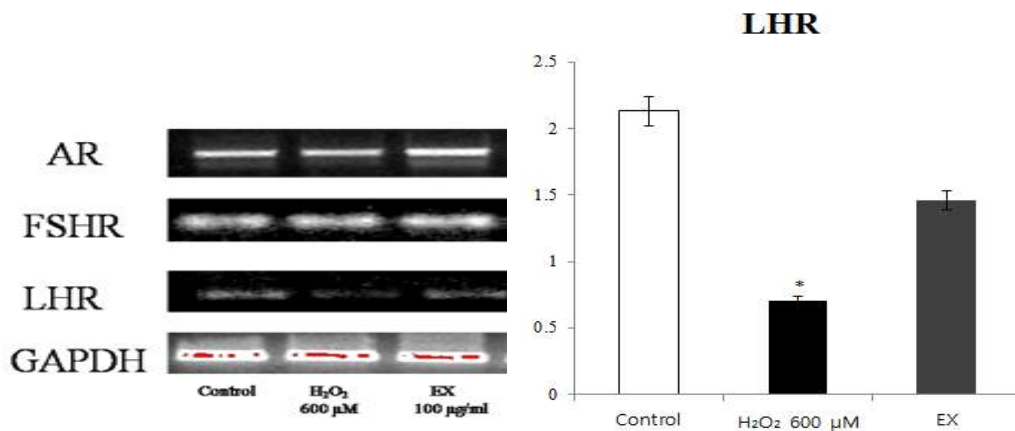
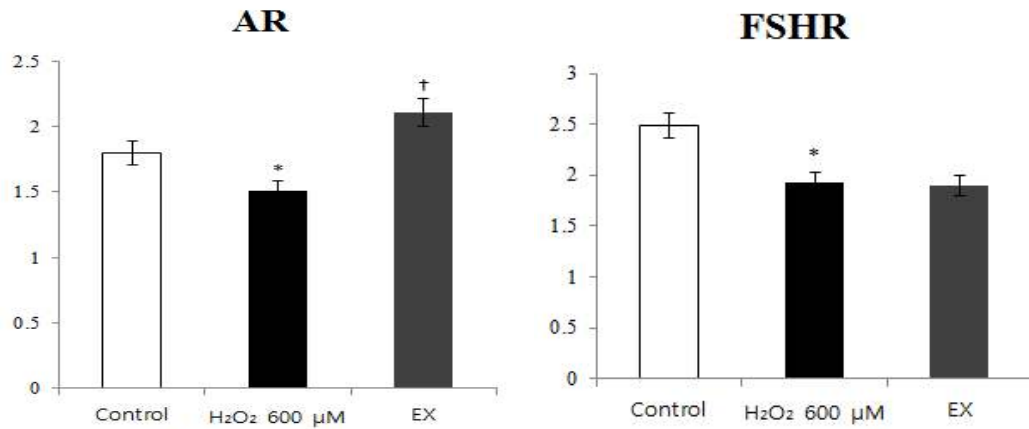


Fig. 1.6. 과산화수소에 노출된 TM4 cells에 있어 nectin-2 및 inhibin- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. TM4 (Sertoli) cells were pre-treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 450 mM). \* Significantly different from the Control at  $p < 0.01$ .

### 1-1-3 성 호르몬 receptor의 mRNA 발현량 조사

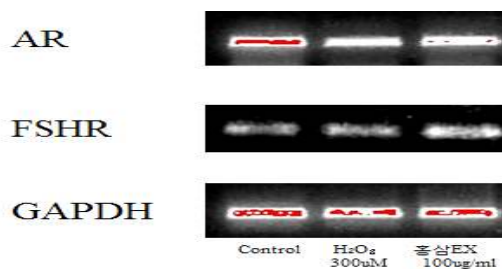
고환 세포 내 성호르몬 receptor의 mRNA 발현량을 조사하기 위하여 GC-2spd 세포와 TM3 세포를 이용하여 각각 KRG를 100 mg/ml 농도로 2시간 처리 후 과산화수소로 1시간 자극을 가하여 mRNA 발현량을 측정하였다. Fig. 1.7에서 나타난 바와 같이 GC-2spd 세포에서 과산화수소에 의해 3가지 호르몬 수용체의 발현은 감소( $p < 0.05$ )한 반면, FSHR을 제외한 AR과 LHR의 발현량 감소가 KRG 처리에 의해 유의하게 회복되는 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

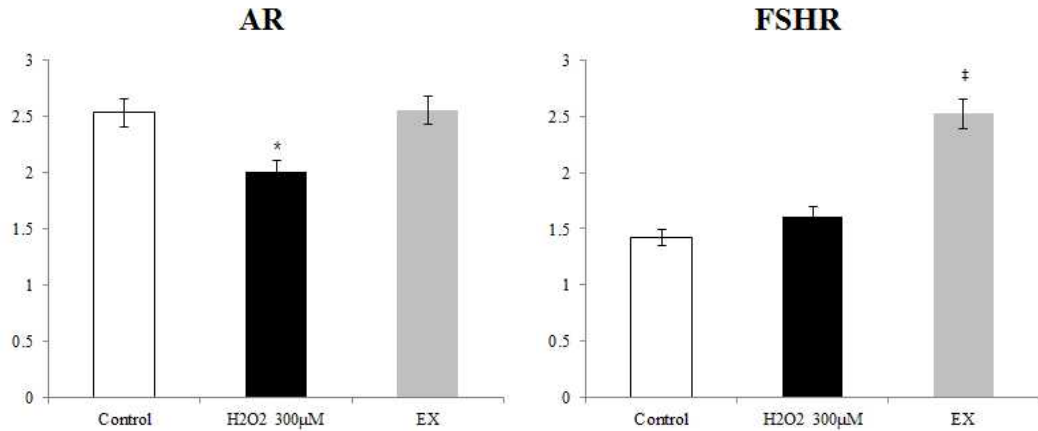




**Fig. 1.7.** 과산화수소에 노출된 GC-2spd cells에 있어 성 호르몬 receptor 발현에 미치는 KRG의 효과. GC-2spd (Sertoli) cells were pre-treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 600 mM). \*Significantly different from control ( $p<0.05$ ), †, \* Significantly different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at  $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively.

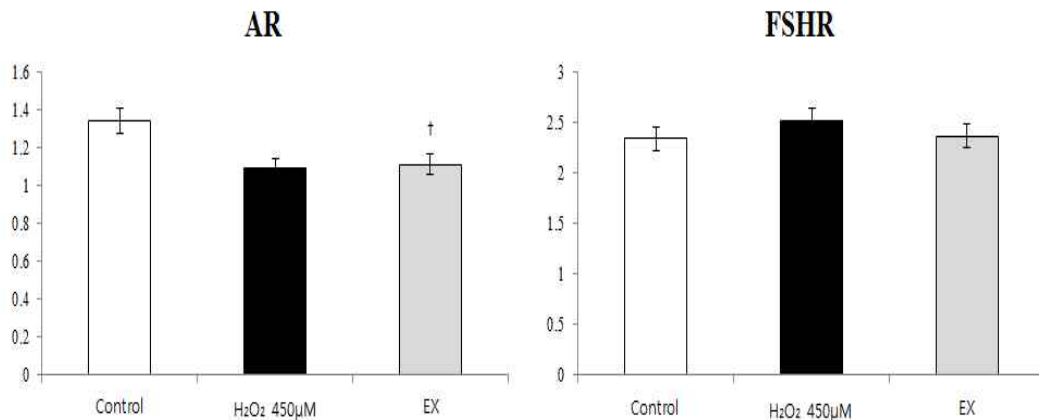
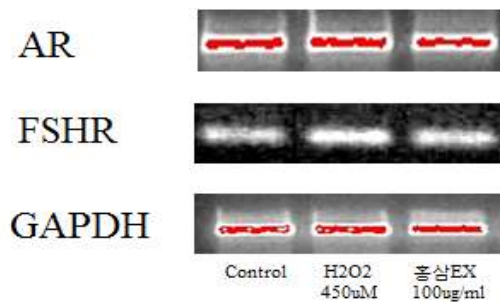
TM3 cell line의 경우 과산화수소에 대한 독성 반응은 AR에서 매우 민감하게 나타나는 반면 FSHR의 mRNA 발현량 감소에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. AR의 경우 KRG 전처리군에 의해 과산화수소로 야기되는 AR mRNA 발현량 감소가 대조군 수준으로 현저히 회복된다는 사실을 알았다 ( $p<0.01$ ). 반면 FSHR에 있어서는 비록 과산화수소에 의해 mRNA 발현량 감소가 야기되지는 않았으나 KRG는 수용체의 mRNA 발현량을 현저히 증가시키는 것으로 나타났다( $p<0.01$ ).





**Fig. 1.8. 과산화수소에 노출된 TM3 cells에 있어 성 호르몬 receptor 발현에 미치는 KRG의 효과.** TM3 (Leydig) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 300 mM). \*Significantly different from control ( $p<0.05$ ), ‡ Significantly different from hydrogen peroxide ( $p<0.01$ ).

TM4 세포의 경우 과산화수소 450 mM 처리에 의해 AR의 mRNA 발현량은 감소한 반면 KRG 전처리는 발현량 감소를 방어하지 못하는 것으로 나타났다. FSHR의 mRNA 발현량의 경우는 오히려 증가하였으며 KRG 전처리는 과산화수소에 의해 증가된 FSHR mRNA 발현량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

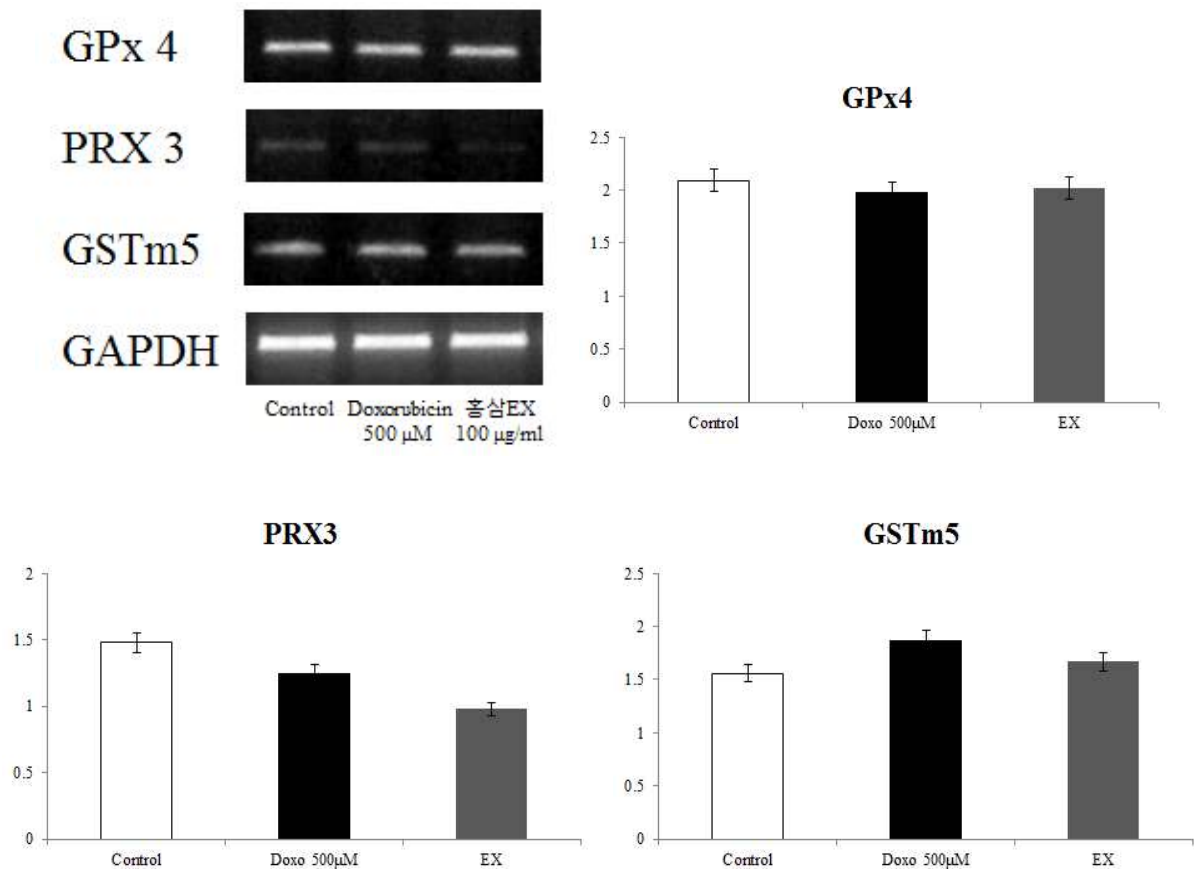


**Fig. 1.9. 과산화수소에 노출된 TM4 cells에 있어 성 호르몬 receptor 발현에 미치는 KRG의 효과.** TM4 (Sertoli) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to hydrogen peroxide (1 hr, 450 mM). \* Significantly different from hydrogen peroxide ( $p < 0.05$ ).

**1-2. 항암제 유발 rat에 있어 고환 기능에 대한 KRG의 방어 효과**

**1-2-1. 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사**

항암제-유발 고환세포(정자, Sertoli, Leydig) 독성에 대한 KRG의 방어 효과 연구를 위해 항산화에 관여하는 주요 효소의 mRNA 발현량을 조사하였다. 정모세포인 GC-2spd cell line의 경우 doxorubicin 500 mM 농도에서 유의한 감소가 관찰되지 않아 항암제 독성유발 정자 세포 독성에 대한 홍삼 추출물의 방어 효과는 조사할 수 없었다. GC-2spd cell line에 있어 항산화 효소의 mRNA 발현량을 감소시킬 수 있는 농도를 찾고자 doxorubicin의 처리 용량을 500 mM 이상으로 투여해 보았으나, 역시 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 DMSO에 용해시킨 doxorubicin을 DMEM 배지에 첨가할 경우 일정 이상의 농도로는 용해되지 않기 때문으로 생각된다. 실제로 doxorubicin을 500 mM 이상 처리할 경우 용해되지 않고 배지 표면에 doxorubicin 입자가 부유하는 것을 확인하였다.

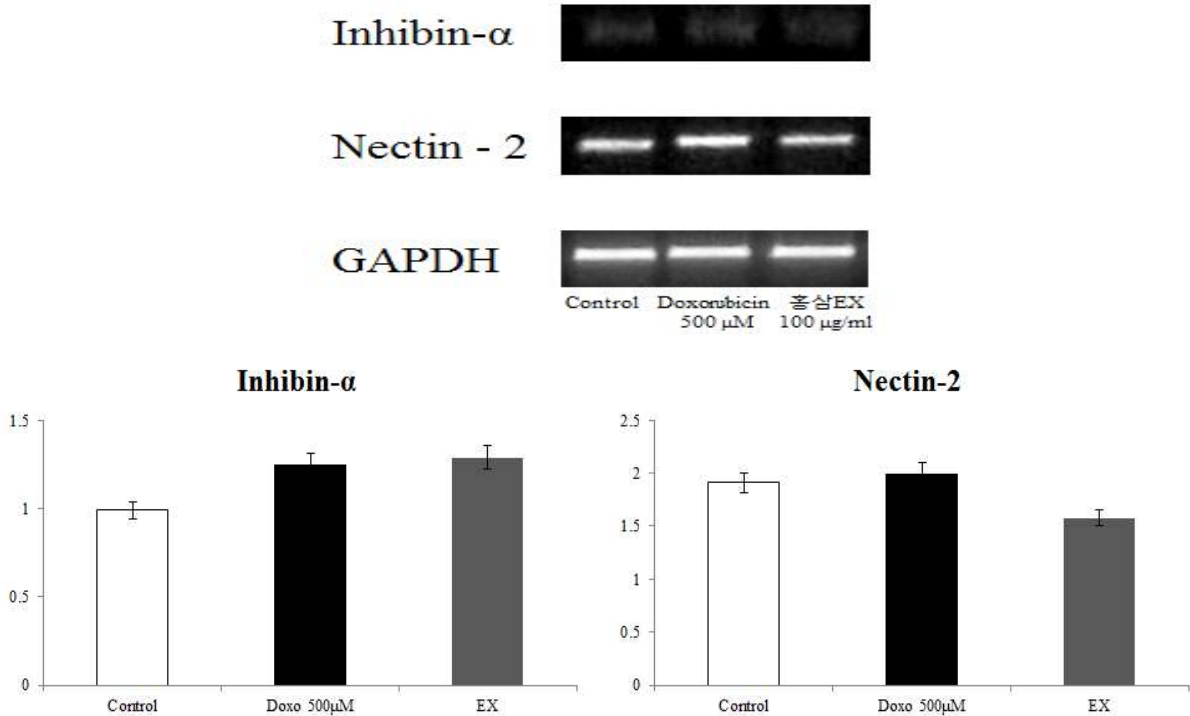


**Fig. 1.10. 항암제 노출 GC-2spd cell에서 항산화 효소 발현에 미치는 KRG의 효과.** GC-2spd (sperm) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before exposing the cells to doxorubicin (500 mM, in DMSO). The band intensities of PRx3, GPx4 and GSTm5 were analyzed by using an NIH ImageJ 1.410 package and normalized to GAPDH value.



### 1-2-2. 정자생성관련 단백질의 mRNA 발현량 조사

Doxorubicin에 노출된 정모세포(GC-2spd cells)에 있어 정자생성 pathway에서 중요한 역할을 하는 biomarker 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2)의 mRNA 발현량 역시 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과 역시 위에서 언급한 바와 같이 doxorubicin의 용해도와 관련이 있다고 사료된다.



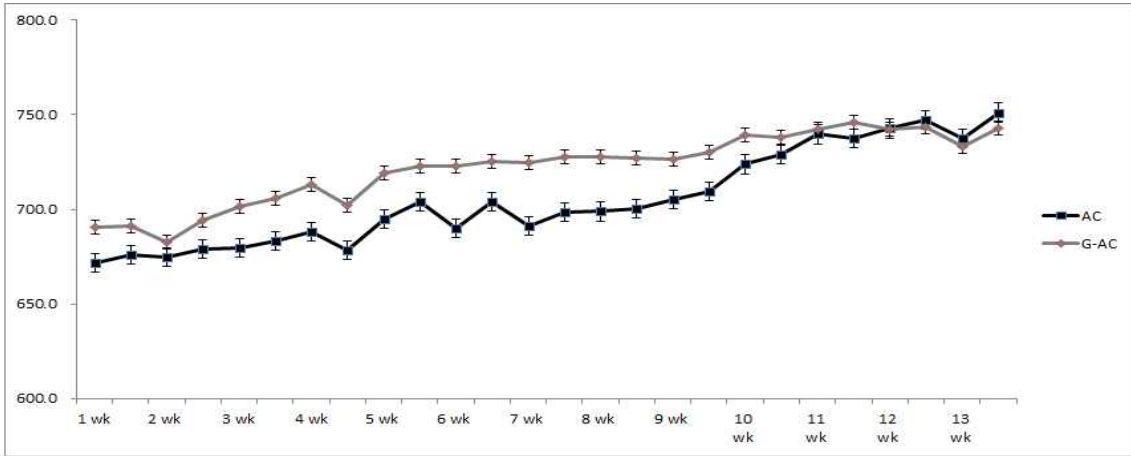
**Fig. 1.11** 항암제 노출 GC-2spd cell에서 정자생성관련 분자 발현에 미치는 KRG의 효과. GC-2spd (sperm) cells were treated with KRG (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to doxorubicin 500 mM. The band intensities of inhibin- $\alpha$  and nectin-2 were analyzed by using an NIH ImageJ 1.410 package and normalized to GAPDH value.

## 2. *In vivo* (동물) 실험

### 2-1 노령쥐의 교환기능에 미치는 효과

#### 2-1-1. 체중 및 장기 무게 증가에 미치는 영향

Fig 2.1.은 노령쥐와 KRG 투여군 간의 체중변화 결과로서, 모든 처리군에서 시험기간 중 체중은 꾸준히 증가하였으며, 시험군 간 유의한 증가 차이는 관찰되지 않았다.



**Fig 2.1 Effect of Korean red ginseng (KRG) in body weight increment of aging rats.** The overall body weight of AC and G-AC groups from week 1-13 were shown. Each point represents the mean (n=20). AC: vehicle-treated aged rats; G-AC: KRG 200 mg/kg b.w. treatment AC group.

### 2-1-2. 노령쥐의 혈액화학지수에 미치는 효과

Table 1.은 혈액상 변화를 측정한 값으로서 YC 그룹에 비해 AC 그룹에서 백혈구와 혈소판, 림파구 값이 근소하게 감소한 것으로 나타났으며, 이는 노화로 인한 골수기능 저하로 혈구 생성이 감소된 것으로 추측된다.

**Table 1. Effect of KRG on blood chemistry panel of aging rats.**

Group	WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HCT (%)	HGB (g/dl)	PLT (10 <sup>3</sup> /μl)	LYM (%)
YC	9.31 ± 3.12	6.76 ± 0.32	39.50 ± 1.85	13.86 ± 0.69	1023.33 ± 202.44	83.63 ± 4.13
AC	6.94 ± 1.86	7.97 ± 0.38**	38.78 ± 1.43	13.84 ± 0.53	868.00 ± 133.80	63.84 ± 5.01**
G-AC	6.59 ± 2.41	7.59 ± 0.56	37.36 ± 1.90	13.51 ± 0.69	903.22 ± 336.08	61.49 ± 9.54

WBC : white blood cell, RBC : red blood cell, HCT : hematocrit, HGB : hemoglobin, PLT : platelet, LYM : lymphocyte. \*\*Significantly different from YC ( $p < 0.01$ ).

Table 2.은 시험군별 포도당 및 지질대사 지표변화로서 노화에 의해 고혈당이 유도되었다는 사실을 알 수 있었다 ( $p < 0.01$ ). 이에 비해 홍삼추출물 투여군에서는 거의 모든 항목에서 다소 개선되는 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of KRG in glucose and lipid metabolism analysis of aging rats.

Group	GLU (mg/dl)	T. CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL - C (mg/dl)	LDL- C (mg/dl)
YC	100.9 ± 30.5	50.5 ± 18.2	51.2 ± 15.8	44.2 ± 14.4	6.4 ± 2.8
AC	149.7 ± 28.06**	166.5 ± 33.8**	154.7 ± 68.3	87.7 ± 17.0**	44.5 ± 14.7*
G-AC	138.9 ± 63.3	191.3 ± 63.3	207.4 ± 59.5†	84.0 ± 20.0	48.7 ± 24.5

GLU: glucose, T.CHO: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol. \*\*, \*\*Significantly different from YC at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively. † Significantly different from AC at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

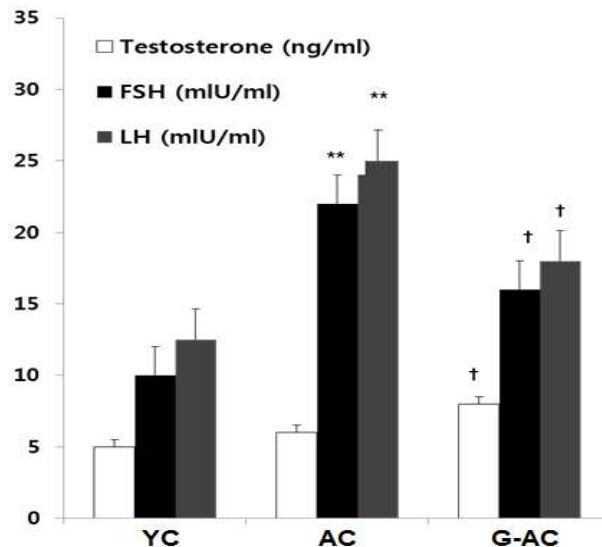
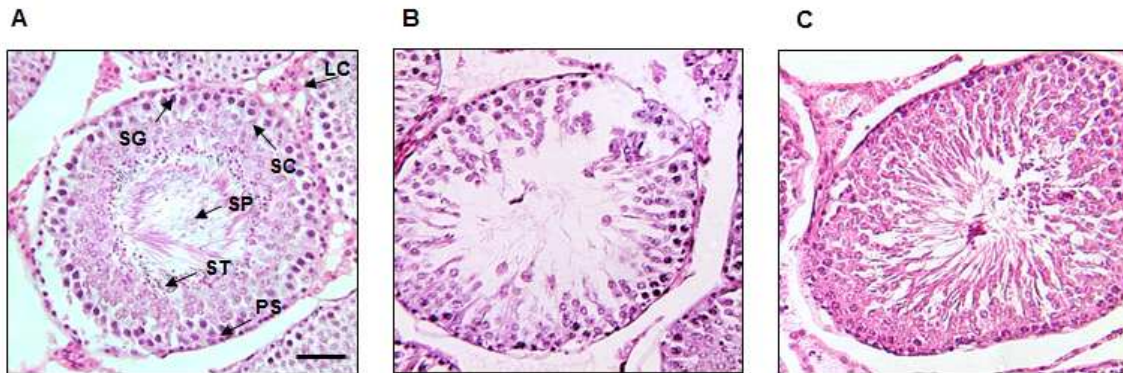


Fig 2.2 Effect of KRG on sex hormone levels in aging rats. AC: vehicle-treated aged rats; G-AC: KRG 200 mg/kg b.w. treatment AC group. \*\*, \*\*Significantly different from YC ( $p < 0.01$ ), † Significantly different from AC ( $p < 0.05$ ).

Fig 2.2은 혈중 성호르몬 함량을 나타낸 것으로서 AC의 testosterone 함량은 YC와 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이에 반하여 G-AC의 testosterone 함량은 AC군에 비해 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 한편, FSH와 LH의 함량은 YC군에 비해 AC군에서 현저히 증가하였으나( $p < 0.01$ ), 이는 노화로 인해 정자 생성 관련 기능이 감퇴됨으로 인해 남성 호르몬 분비를 촉진시키기 위한 내분비계의 보상적 결과라 판단된다. 이에 반해 G-AC는 FSH와 LH의 함량 감소가 관찰되었으며( $p < 0.05$ ) 이는 홍삼 추출물이 고환의 정자 생성 기능을 개선하기 때문에 성선자극호르몬의 과잉 분비가 요구되지 않기 때문이라 사료된다. 그러나 이러한 사실을 증명하기 위해서는 성 호르몬 수용체 발현량을 조사할 필요가 있다고 판단된다.

### 2-1-3. 노령쥐 고환의 조직병리학적 관찰

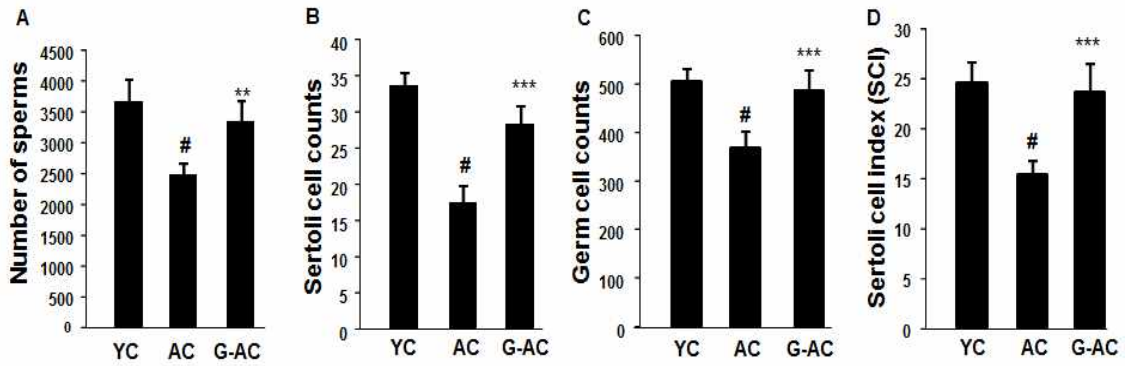
YC, AC, G-AC에서 고환조직의 형태학적 특성은 Fig 2.3에서 나타냈다. YC 그룹의 고환 단면에서 Leyding cell, spermatocytes, spermatids, spermatozoa의 치밀하게 분포되어있는 것을 관찰되었다(Fig 2.3 A). 반면 AC 그룹에서는 정세관 상피세포의 치밀도가 유의하게 감소되어 있으며, 정세관 상피세포사이의 연결성 또한 상실되어 버팀세포와 종자세포의 간격이 넓어져 다소 떨어져 있는 모양이 관찰되기도 하였다. 성숙 중인 정자세포 (spermatid)의 증식이 많은 정세관에서 확인되고 있으나, 정조세포 및 정자세포의 수는 유의하게 감소되어 있었고 지지세포 (Sertoli's cell)가 주된 정세관 상피세포로 관찰되었다. 또한 일부 부위에서 정세관의 상피세포가 괴사되고 탈락되어 정세관 내강에 저류되어 있는 소견도 관찰되었으며, 공포 또한 관찰되었다(Fig 2.3 B). 반면, KRG가 AC 그룹의 고환 내 세포 수와 정자 생성을 포함하여 조직학적 상태의 큰 개선효과를 보이는 것을 관찰되었다(Fig 2.3 C). 게다가 Leyding cell이 조직 내 전체적으로 G-AC 그룹에서 회복되는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig 2.3 Histological analysis of seminiferous tubules in aged rats.**

Representative images of tubular cross-sections of testis were shown. A: young control rats (YC), B: vehicle-treated aged rats (AC), and C: KRG-treated aged rats (G-AC). Sections were stained with H&E. The images are typical of those obtained in five independent experiments. Scale bar = 45 mm. LC: Leydig cell; PS: primary spermatocyte; SG: spermatogonia; SP: spermatozoa; SR: Sertoli cell; ST: spermatid.

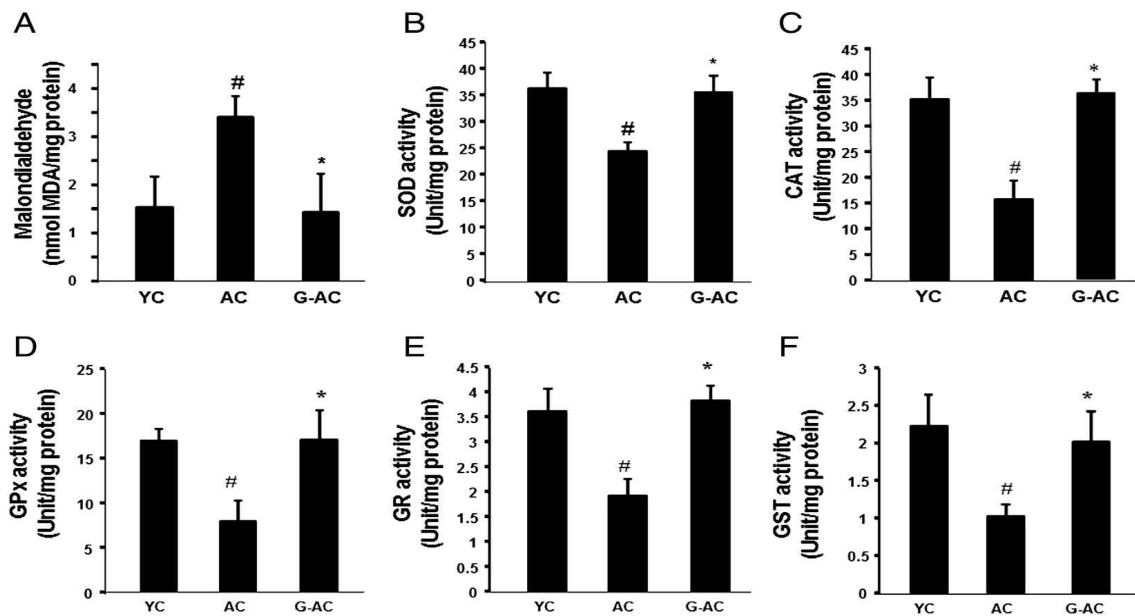
더욱이, 정자 수, Sertoli cell, germ cell, Sertoli cell index와 같은 정자생성관련 parameters 들은 YC 그룹과 비교하여 AC 그룹에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 KRG는 AC 그룹과 비교했을 때, 정자 수 (Fig 2.4 A), Sertoli cell (Fig 2.4 B), germ cell (Fig 2.4 C), Sertoli cell index (Fig 2.4 D)의 감소를 회복하는 것으로 관찰되었다.



**Fig 2.4 Histological analysis of spermatogenesis related parameters in aged rats.** The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6), where # $p$ <0.05 compared with YC group, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001 compared with AC group. A: sperm number per tubule, B: Sertoli cells per tubule, C: germ cells per tubule, and D: Sertoli cell index. YC: young control rats, AC: vehicle-treated aged rats, and G-AC: KRG-treated aged rats.

#### 2-1-4. 노령쥐의 고환 과산화지질(LPO)과 효소활성에 대한 KRG의 효능

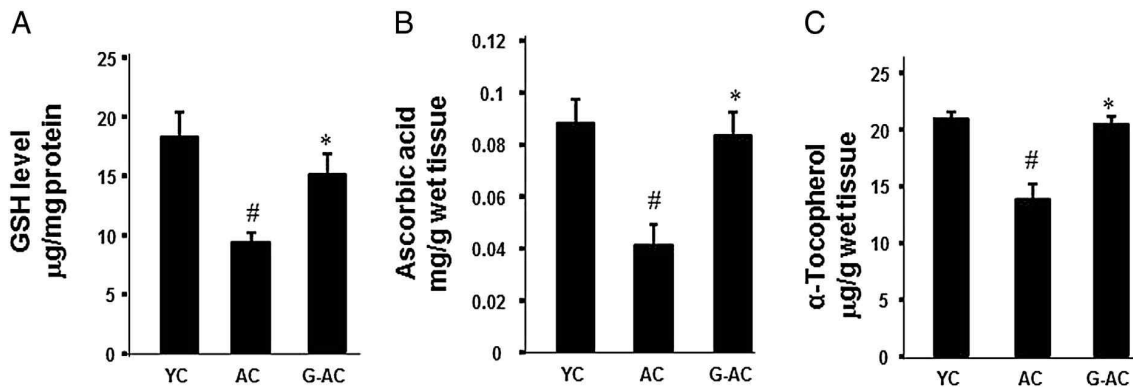
YC, AC 및 G-AC 그룹에서의 고환 산화에 대한 KRG의 효과를 확인하기 위해, 노령쥐에서의 지질과산화 marker인 MDA (Malondialdehyde), SOD, CAT, GPx, GR, GST (Glutathione transferase)의 수치를 측정하였다 (Fig 2.5). Fig 2.5 A에서 보는 것과 같이, YC 그룹에 비해, AC의 MDA 수준은 노화에 의한 지질 과산화가 증가한 것으로 나타났다. AC 그룹에서 KRG를 투여한 그룹에서는 YC 그룹과 비슷한 수치로 회복하는 경향을 보였다 ( $p$ <0.05). SOD (Fig 2.5 B), CAT (Fig 2.5 C), GPx (Fig 2.5 D), GR (Fig 2.5 E) 그리고 GST (Fig 2.5 F)와 같은 효소 항산화의 경우도 AC 그룹에 비해 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었다 ( $p$ <0.05).



**Fig 2.5 Effect of KRG on testis lipid peroxidation (LPO) and enzymatic levels in aged rats.** LPO was expressed as nmol of MDA formed/mg protein (A). One unit of SOD activity is expressed as 50% inhibition of auto-oxidation of pyrogallol/min by the enzyme (B). One unit of CAT activity is expressed as  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilized/min/mg protein (C). One unit of GPx activity is expressed as the amount of enzyme that converts 1 mmol of GSH to GSSG in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min (D). One unit of GR activity is expressed as the quantity of enzyme which catalyzes the oxidation of 1 mmol of NADPH/min (E). One unit of GST activity is expressed as mmol of CDNB utilized/mg of protein (F). The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6), where # $p$ <0.05 compared with YC group, \* $p$ <0.05 compared with AC group. AC: young rats; AC: aged rats; G-AC: KRG treated aged rats. MDA: malondialdehyde, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase and GST: glutathione-S-transferase.

#### 2-1-5. 노령쥐 고환 내의 비효소적 항산화수치에 대한 KRG의 효능

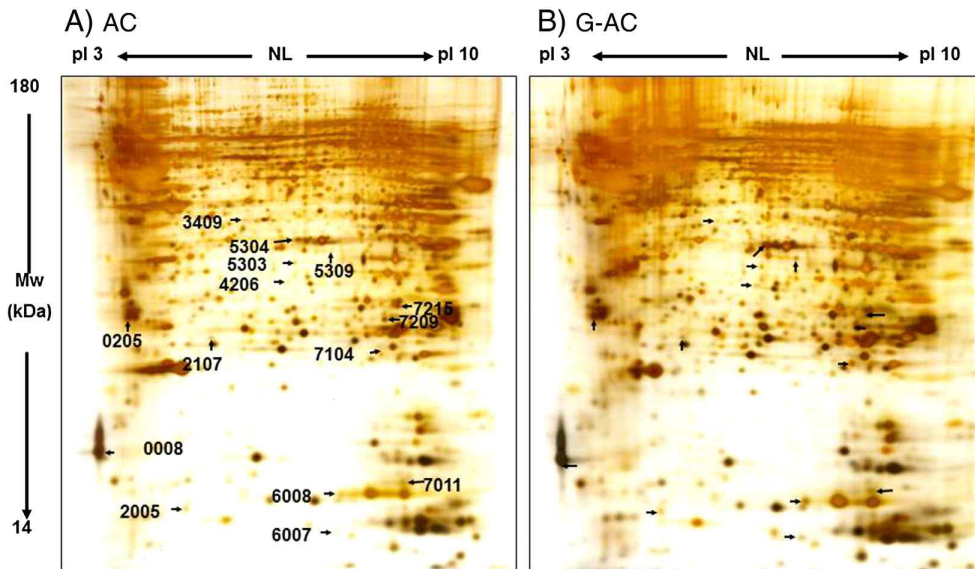
GSH, ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol를 포함하는 비효소적 항산화수치는 YC 그룹에 비해, AC 그룹에서 감소하는 경향을 보였다 (Fig 2.6.). 그러나 G-AC 그룹에서 볼 수 있듯이, KRG가 산화적 수치의 회복에 도움을 주고 있다는 것을 확인할 수 있었다 ( $p$ <0.05).



**Fig 2.6 Effect of KRG on non-enzymatic antioxidant levels in testis of aged rats.** (A) The amount of GSH is expressed as  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein. The amount of ascorbic acid is expressed as  $\text{mg}/\text{g}$  wet tissue (B). The amount of  $\alpha$ -tocopherol is expressed as  $\text{mg}/\text{g}$  wet tissue. The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6), where # $p$ <0.05 compared with YC group, \* $p$ <0.05 compared with AC group. YC: young rats; AC: aged rats; G-AC: KRG treated aged rats.

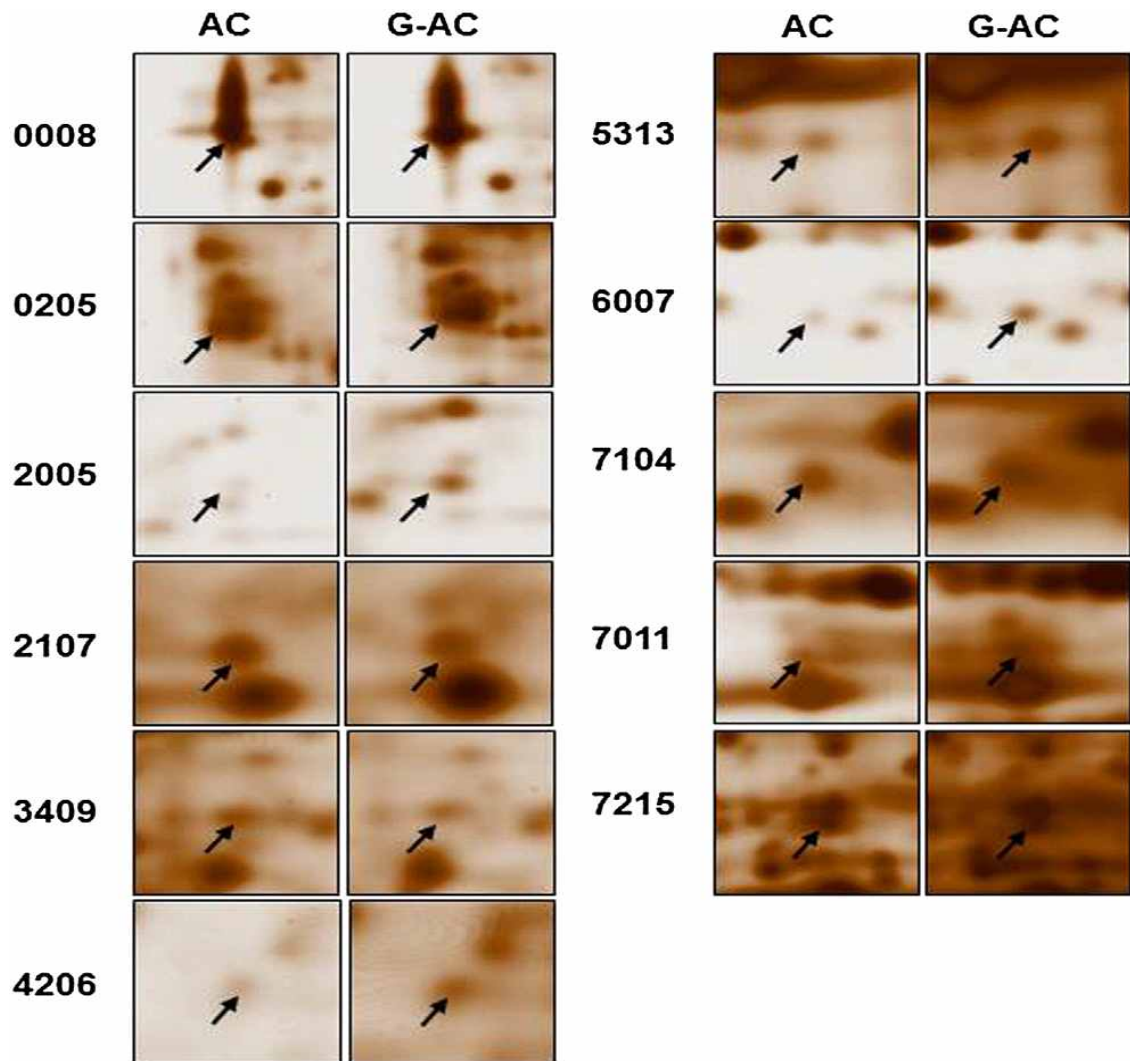
### 2-1-6. 노령쥐의 고환 proteome의 분리 및 특성

단백질은 AC, G-AC 그룹의 고환에서 추출하였고, silver-stained 2-DE로 확인하였다. 각 그룹별 평균 일치율은 AC 그룹의 경우 82.5 %, G-AC의 경우 76.6 % 로 나타났다 (Fig. 2.7). 900개가 넘는 단백질에서 3-10의 pH와 14-180kDa의 질량을 가진 단백질들이 각각 확인되었다.



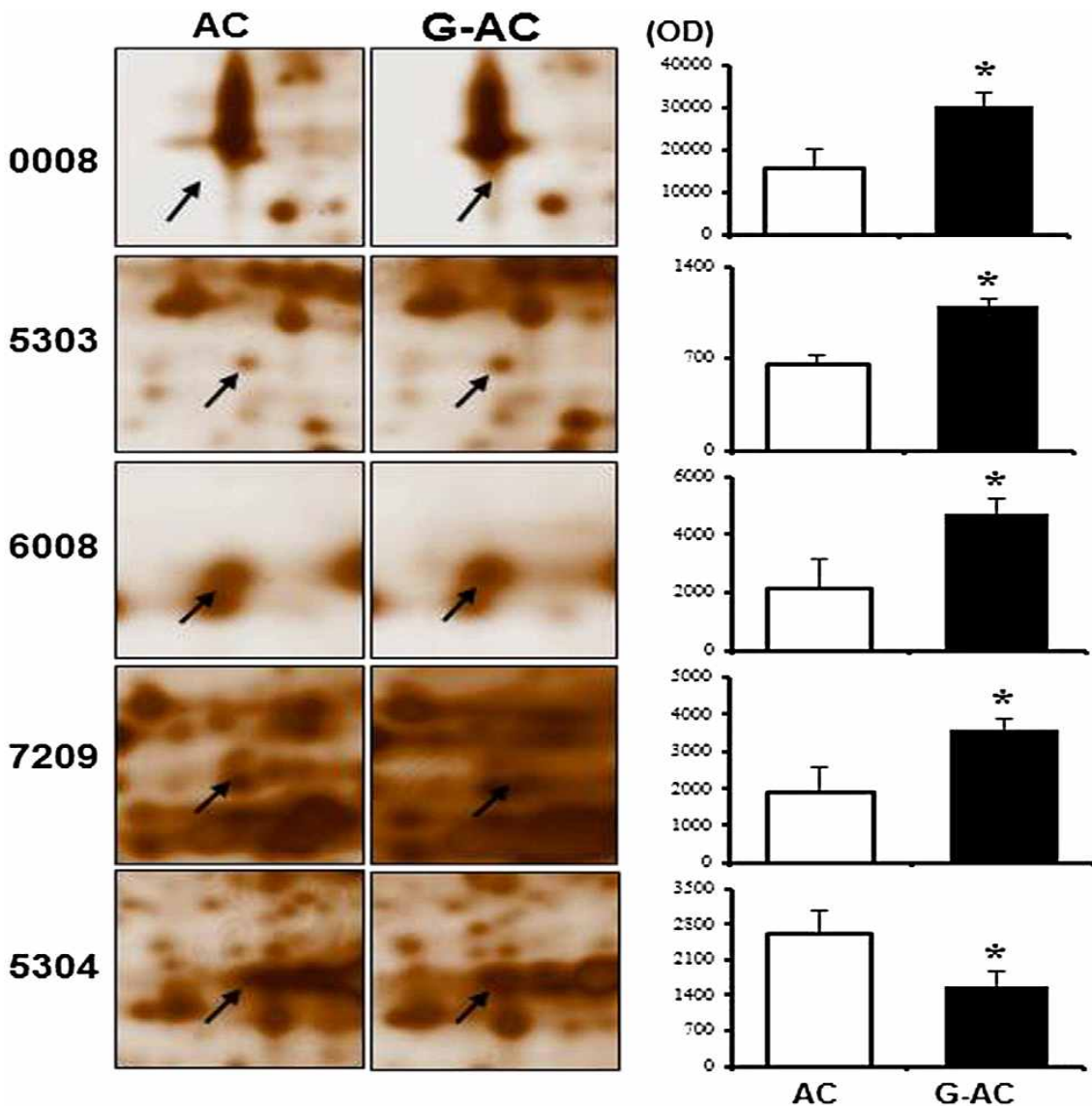
**Fig 2.7 Representative images of silver-stained 2-DE gels showing the rat testis proteome.** Aged rats were treated with vehicle (A) or administered 200 mg/kg body weight KRG (B) daily for 6 months. Proteins were subjected to IEF on IPG pH 3-10 NL strips and then separated by 12% SDS-PAGE. Arrows show protein spots in which expression is altered in G-AC groups relative to AC groups. The images are typical of those obtained in four independent experiments.

이들 중, AC 그룹과 비교하여, G-AC 그룹의 11개 단백질 발현 (Fig 2.8) 에 대해 살펴보면, calmodulin, PITP (Phosphatidylinositol transfer protein), FABP9 (Fatty acid binding protein-9) 그리고 TPI1 (Triosephosphate isomerase-1)은 상향되는 모습을 보였고, GSH는 하향되는 모습을 보였다 (Fig 2.9).



**Fig 2.8 Silver-stained 2-DE images showing total altered proteins in AC versus G-AC testis of rats.** The arrows indicate differentially expressed proteins. Aged rats (AC group) were treated with vehicle (A) or administered 200 mg/kg body weight KRG (G-AC group) daily for 6 months (B). Proteins were subjected to IEF on IPG pH 3-10 NL strips and then separated by 12% SDS-PAGE. Arrows show protein spots in which expression is altered in G-AC groups relative to AC groups. The images are typical of those obtained from four independent experiments.





**Fig 2.9** Silver-stained 2-DE images showing up- and down-regulated proteins in AC versus G-AC testis. The arrows indicate differentially expressed proteins. The numbers indicated in the gels correspond to those in Table 1. Statistical analysis was performed on gels using PD Quest and the results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=4), where  $*p < 0.05$  compared with AC group. AC: aged rats; G-AC: KRG treated aged rats. White bars, AC group and black bars. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

대표적인 peptide 서열, 서열 범위, 이론적 및 실험적 pI와 MW 값을 포함하는 단백질 특성과 Swiss-Prot과 NCBI database 에서 제공하는 번호를 Table 3. 에 작성하였다. PITP, FABP9, TPI1 과 같은 단백질들은 AC 그룹과 비교해 G-AC 그룹의 고환에서 증가하였고,

ADR1에서는 감소하는 경향을 보였다.

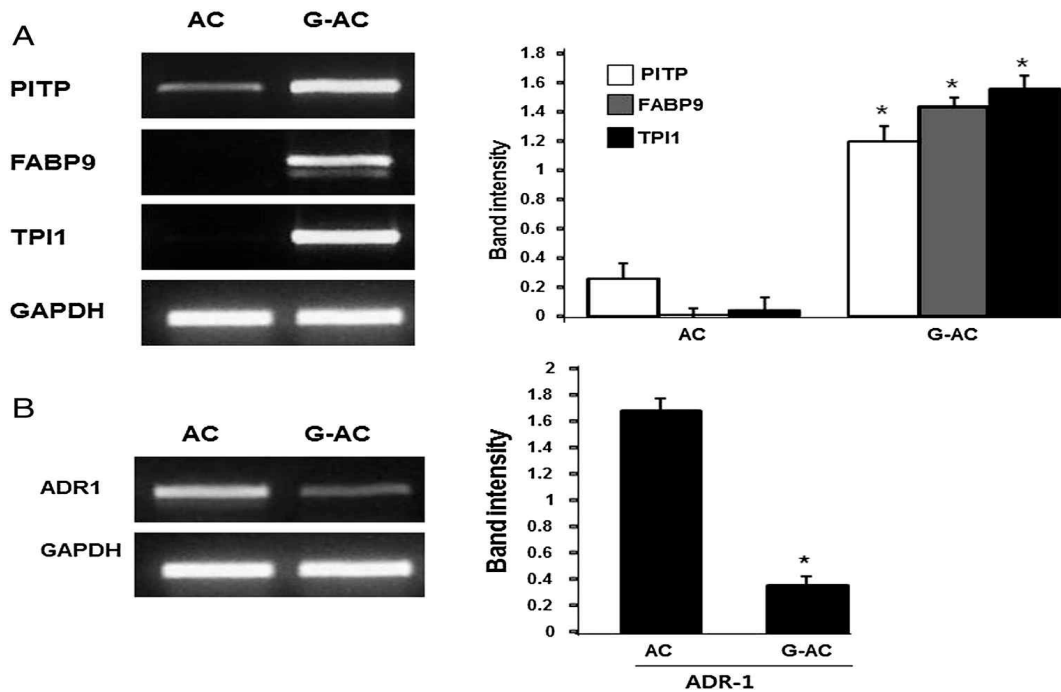
**Table 3. The Altered proteins in rat testis tissue identified by MALDI-TOF/TOF.**

No	Protein Name	Peptide Sequences	SC (%) /Score	Protein pI/Mr (kDa) Theoretical (Experimental)	Accession No /Data Base
0008	Chain M, Crystal Structure Of Apocam Bound To The Gating Domain Of Small Conductance Ca <sup>2+</sup> -Activated	VFDKDGNGYISAAELR	10/79	4.09/16.5 (/)	gi52695360/NCP62161/SP
5303	phosphatidylinositol transfer protein	AWNAYPYCRHVEAIYI DIADRLFTNFHR	10/112	5.97/31.8 (/)	gi8393962/NCP16446/SP
5304	aldehyde reductase 1	AIGVSNFNPLQIER	4/41	6.26/35.7 (5.54/34.0)	gi6978491/NCP07943/SP
6008	fatty acid binding protein 9, testis	LVSENFENYVR	9/31	7.63/15.0 (/)	gi12408304/NCP55054/SP
7209	triosephosphate isomerase 1	LPADTEVVCAPPTAYI DFAR	8/48	6.45/26.9 (/)	gi12621074/NCP48500/SP

Protein spots were quantified in testis from AC treated with vehicle or KRG. Increases or decreases of at least 1.5-fold in three independent experiments were considered significant ( $p < 0.05$ ).

#### 2-1-7. 노령쥐에서 선택된 mRNA의 발현에 대한 KRG의 효능

앞서 P1TP, FABP9, TPI1 그리고 ADR1이 노화과정에 관여한다는 사실을 바탕으로, 고환 내의 이러한 유전자의 mRNA 발현량을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시하였다 (Fig 2.10). Proteome의 결과와 마찬가지로 P1TP, FABP9, TPI1과 같은 유전자는 고환의 산화적 스트레스를 증가시키는 AC 그룹에서 억제되는 현상을 확인하였다. 정량적인 분석 또한 유의적인 감소를 보였다 (Fig 2.10 A). 대조적으로, ADR1은 노화가 될수록 증가하는데, G-AC 그룹의 경우 감소하는 경향을 보였다 (Fig 2.10 B).



**Fig 2.10 Effect of KRG on confirmation of changes in mRNA expression in AC and G-AC.** (A) Total RNA was extracted from 50 mg testis tissues in aged rat and reverse-transcribed for 50min at 37°C. The aliquots (200 ng) of the RT products were amplified and were separated on 2.0% agarose gel containing Et-Br by electrophoresis. The intensities of bands were analyzed using an NIH Image J 1.45s package and normalized to GAPDH value. A: mRNA expressional levels of up-regulated genes, PITP, FABP9 and TPI1 and their corresponding quantification data (upper right panel). B: mRNA expressional levels of down-regulated gene ADR1 and its corresponding quantification data (lower right panel). The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6), where  $*p < 0.05$  compared with their corresponding genes, respectively. AC: young rats; AC: aged rats; G-AC: KRG treated aged rats.

## 2-2. 항암제(doxorubicin) 노출 rat의 고환 독성에 미치는 효능

### 2-2-1. 고환 선택적 독성 유발 doxorubicin 적정 투여량 조사

본 실험에 앞서 rat의 고환 선택적 독성을 야기하는 doxorubicin의 적정 투여량을 조사하기 위해 수행한 실험으로 군당 5마리씩 할당하여 마리당 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml/kg b.w.의 doxorubicin을 주 1회, 총 8회 복강주사 하였다. Fig. 2.11의 체중 그래프는 군당 5마리 전체의 평균 체중으로 나타낸 것으로서 Control군은 체중 증가에 기복이 없이 8주 연속 꾸준히 증가하는 양상을 나타냈으나 doxorubicin을 투여군의 경우 전반적으로 대조군에 비해 체중 증가가 투여량-의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 특히 2 mg/kg b.w. 투여군의 경우 6주부터 체중이 전혀 증가하지 못하였으며 털이 거칠어지는 것과 같은 외적인 독성 반응이 나타나는 것으로 보아 투여량이 과다한 것으로 판단하였다. 한편, 1 mg/kg b.w. 투여군에서는 대조군 대비 현저한 체중 증가 억제가 관찰되었으나 조사기간 동안 외적으로 심한 독성 반응은 나타나지 않았으므로 본 실험에서는 독소루비신의 투여량을 1 mg/ml/kg b.w.로 하였다.

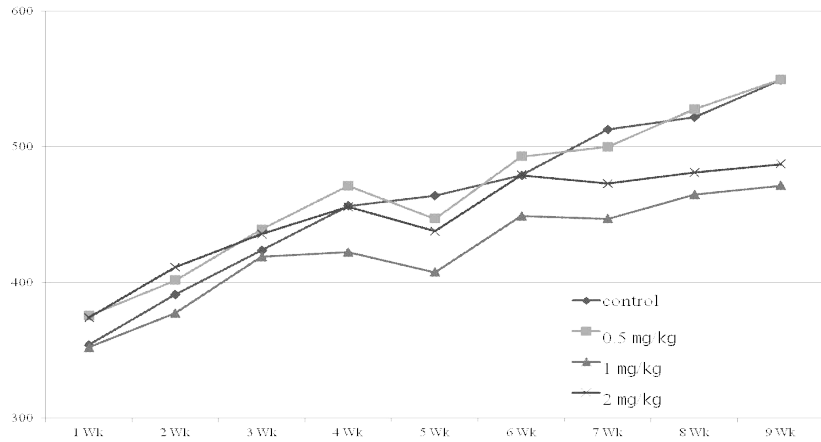


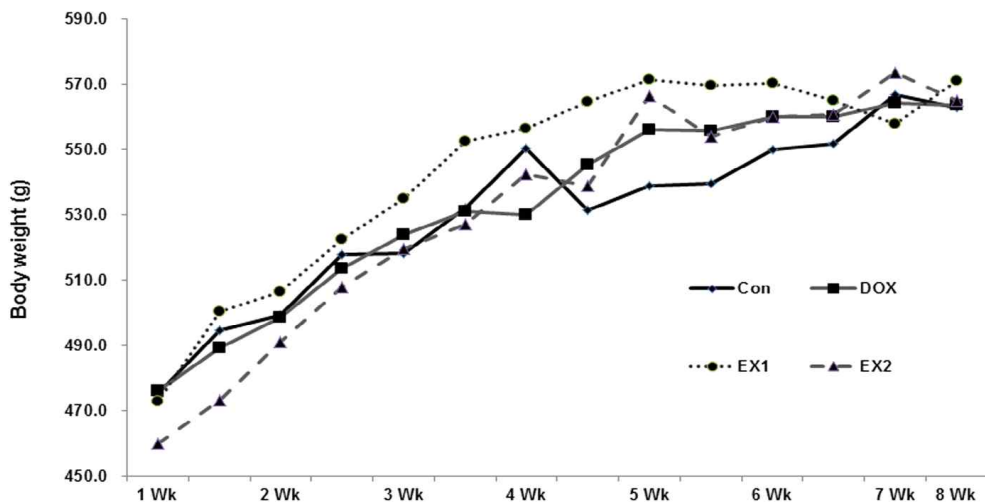
Fig. 2.11 Doxorubicin 투여량에 따른 rat 체중 변화

## 2-2-2. Doxorubicin 노출 rat의 고환 독성에 대한 KRG의 방어 효과

### ① 체중 증가율에 미치는 효과

Doxorubicin 유도 고환 독성에 대한 홍삼의 방어 효과를 보기 위해 진행한 실험으로 홍삼 추출물 투여군은 100 mg/kg b.w.과 200 mg/kg b.w. 두 그룹으로 하여 독소루비신 노출 1주일 전부터 사료에 첨가하여 급여하였다. 독성이 심하게 나타나는 동물모델에서는 고용량의 홍삼을 투여하는 것이 오히려 장기에 부담을 줄 수 있다는 우려 때문에 그간 본 연구자가 고환 기능에 미치는 KRG의 효과 조사를 위해 동물실험을 수행할 때 사용하는 적정 투여량인 200 mg/kg b.w. 외에 용량을 반으로 줄인 그룹 하나를 더 설정하였다. 그 이유는 다이옥신 노출후 홍삼을 투여하는 실험 모델에서는 예방효과의 경우 200 mg/kg b.w.이 유리한 반면 치료효과는 100 mg/kg b.w. 투여군이 탁월하였기 때문이다.

대조군이 다른 군에 비해 체중 증가율이 다소 떨어졌으나 통계적으로 유의성이 있을 정도는 아니었다. 또한 독소루비신 단독 투여군과 독소루비신과 KRG 병용 투여군에 있어서도 유의한 체중 증가율 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 “1 mg/kg b.w., 주 1회, 총 7-8주”의 독소루비신 투여가 고환 독성만 야기한다면 고환 선택적 독성 유도 용량으로 적합할 것으로 판단되었다.



**Fig. 2.12 Effects of Korean red ginseng aqueous extract (KRG-WE) on body weight increments in doxorubicin (DOX)-treated rats.** The overall body weight of CON, DXR, EX1, and EX2 groups from week 1 to 8. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 7). CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

### 2-2-3 Doxorubicin 노출 rat의 혈중 성호르몬 함량에 미치는 KRG의 효과

Table 5에서 보는 바와 같이 독소루비신에 노출된 rat의 경우 testosterone, follicle stimulating hormone (FSH), luteonizing hormone (LH)의 혈중 함량이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 이에 반하여 KRG 투여군, 특히 200 mg/kg b.w. 투여군에서는 독소루비신에 의한 성호르몬의 감소가 유의하게 회복되었다 ( $p < 0.05$ ). Estradiol의 경우 독소루비신 투여에 의해 현저하게 감소하기는 하나 개체차가 심하여 통계적 유의성은 도출할 수 없었다. 이에 반하여 KRG 투여군은 독소루비신 투여에 의해 감소하는 estradiol 함량을 회복시키는 것으로 나타났으나 독소루비신 단독투여군의 심한 오차 범위로 인해 통계적 유의성을 관찰되지 않았다. 그러나 동물실험을 통하여 분명히 확인할 수 있는 현상은 독소루비신에 의해 혈중 성호르몬 함량에 심한 불균형이 야기되며 홍삼 추출물, 특히 200 mg/kg b.w. 투여는 혈중 성호르몬 불균형을 회복시킨다는 사실이다.

**Table 5. Effect of Korean red ginseng aqueous extract (KRG) on sex hormone levels in doxorubicin (DOX)-exposed rats.**

Group	Testosterone (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Estradiol (pg/mL)
CON	4.63 $\pm$ 0.74	17.24 $\pm$ 3.26	21.56 $\pm$ 3.67	4.26 $\pm$ 0.85
DOX	3.25 $\pm$ 0.98 <sup>‡</sup>	12.25 $\pm$ 1.41 <sup>‡</sup>	14.69 $\pm$ 2.56 <sup>‡</sup>	3.48 $\pm$ 0.76
EX1	3.82 $\pm$ 0.87	14.21 $\pm$ 1.62	18.54 $\pm$ 3.62	3.85 $\pm$ 0.66
EX2	4.16 $\pm$ 0.74 <sup>*</sup>	16.64 $\pm$ 2.32 <sup>*</sup>	19.26 $\pm$ 2.49 <sup>*</sup>	3.92 $\pm$ 0.82

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). <sup>‡</sup> $p < 0.05$  compared with CON group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  compared with DXR alone group by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0.

### 2-2-4. Doxorubicin 노출 rat의 병리조직학적 소견에 미치는 KRG의 효과

Fig. 2.13에 나타난 바와 같이 독소루비신 단독 투여군(DOX)은 대조군인 CON에 비해 유의성은 없으나 고환 무게가 감소한 것으로 나타났으며, KRG 투여군(EX1, EX2)에서는 독소루비신에 의해 야기되는 고환과 부고환 무게 감소를 유의하게 억제하지는 않는 것으로 관찰되었다.

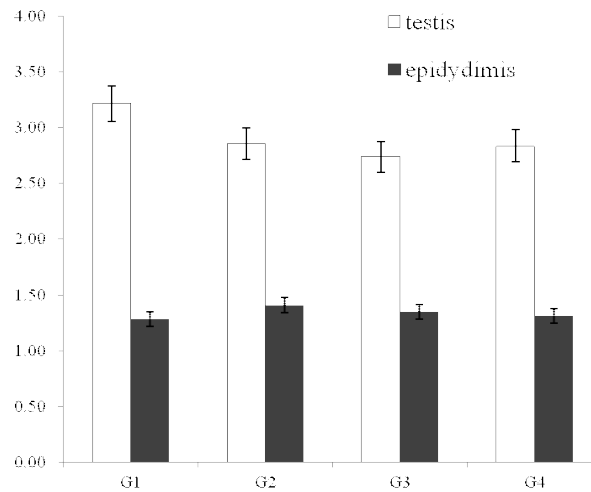


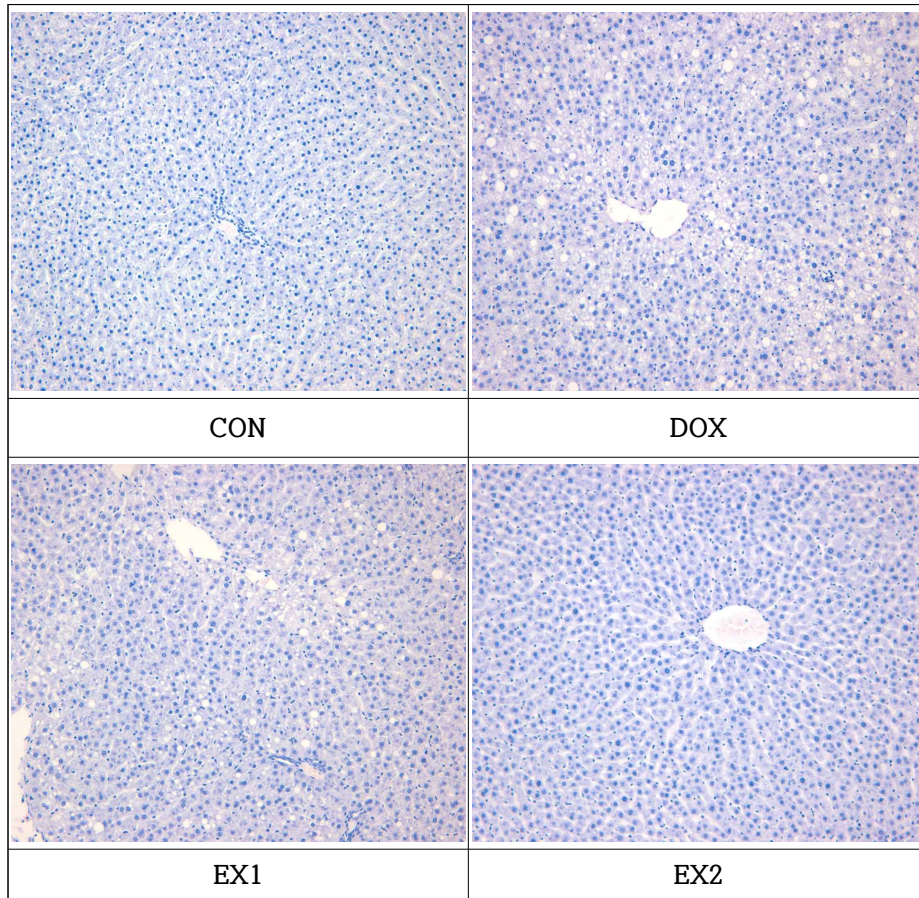
Fig. 2.13 Doxorubicin 노출 rat의 고환 및 부고환의 무게에 미치는 KRG의 효과

간 손상의 정량적인 평가를 위해 cell necrosis, destruction of lobular structure, fatty change, hydrophic change, 간 손상 및 간 섬유화/간경화의 정도를 점수화하였다. 즉, 0점 (no lesions & fibrosis), 1점, minimal (<10%), 2점, mild (10-25%), 3점, moderate (25-45%), 4점, severe (46-60%), 5점, extreme (>60%)으로 계수화 하였다. 이러한 결과는 간 조직의 단면 병리 사진을 육안으로 관찰하여도 계량화가 가능하다. Table 6에 나타난 바와 같이 간의 병리조직 소견에 있어 doxorubicin 투여군(DOX)에서는 세포의 괴사(cell necrosis)는 0.9, 간소엽구조의 파괴(destruction of lobular structure) 0.8, 지방공포의 변성(fatty change) 2.3, 수포변성(hydrophic change) 1.2로 나타났으며( $p<0.01$ ), 이를 종합한 간의 손상과 섬유화 정도는 5.2로 관찰되었다( $p<0.01$ ). CON군의 간 조직은 세포 밀도가 조밀하였으며, 문정맥을 중심으로 간세포가 방사성으로 배열(radial arrangement)하고 있었다(Fig. 2.14). 반면, DOX군은 현저한 변성을 보였을 뿐만 아니라 문정맥을 중심으로 하는 세포의 방사성 배열이 현저하게 소실된 것을 알 수 있었다. 이에 반하여 KRG 투여군(EX1, EX2)에서는 독소루비신 단독투여군(DOX)에서 보였던 세포핵의 과염색상, 세포질의 호산성 변화 및 공포형성, 수포변성과 지방변성 등을 포함하여 여러 가지 소견들이 거의 모든 개체에서 유의하게 개선되는 경향을 보였으며( $p<0.05-0.01$ ) 이러한 증상은 저용량 투여군인 EX1군 보다는 EX2군에서 보다 유의하게 개선되는 경향을 나타내는 것으로 나타났다.

Table 6. 독소루비신 노출 rat의 간 병리조직 소견에 미치는 KRG의 효과

Groups	Cell necrosis	Destruction of lobular structure	Fatty change	Hydrophic change	Lesions
CON	0	0	1.1	0.2	1.4
DOX	0.9 <sup>‡</sup>	0.8 <sup>‡</sup>	2.3 <sup>‡</sup>	1.2 <sup>‡</sup>	5.2 <sup>‡</sup>
EX1	0.6 <sup>*</sup>	0.3 <sup>*</sup>	1.7 <sup>*</sup>	0.9	3.5 <sup>*</sup>
EX2	0.3 <sup>**</sup>	0.2 <sup>**</sup>	1.2 <sup>**</sup>	0.6 <sup>*</sup>	2.3 <sup>**</sup>

CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin. <sup>‡</sup> Significantly different from CON at  $p<0.01$ . <sup>\*</sup>,<sup>\*\*</sup> Significantly different from DOX at  $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively.



**Fig. 2.14 Doxorubicin 노출 rat의 간 조직 단면도.** CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

Johnsen's scoring system에 의거 정세관에서의 정자 생성 활성도에 미치는 KRG의 효과를 조사한 결과(Table 7) 정상대조군의 경우 Johnsen's score는  $8.06 \pm 1.21$ 인 반면 doxorubicin 단독 투여군은  $6.26 \pm 0.87$ 로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 한편, KRG 투여군 특히 200 mg/kg b.w. 투여군의 Johnsen's score는 7.72로 DOX군에 비해 유의하게 개선되었다( $p < 0.01$ ).

**Table 7. Doxorubicin 노출 rat의 정자생성 지수(Johnsen's score)에 미치는 효과**

Group	Mean score
CON	$8.06 \pm 1.21$
DOX	$6.26 \pm 0.87^{\dagger}$
EX1	$7.24 \pm 1.42$
EX2	$7.72 \pm 0.96^{**}$

CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract

(200 mg/kg) plus doxorubicin. † Significantly different from CON at  $p<0.05$  and \*\*significantly different from DOX at  $p<0.01$ .

군당 총 66개(11개/마리)를 관찰한 결과 독소루비신에 노출된 rat의 정세관 크기에 있어서는 DOX군에서 현저한 위축이 나타났으나 개체별 차이가 심하여 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 이에 반하여 KRG 투여군의 정세관 크기는 정상대조군과 차이가 없는 것으로 보아 독소루비신에 의해 야기되는 정세관 위축을 방어하는 것으로 생각되나 독소루비신 단독 투여군의 개체차로 인하여 DOX군과의 통계적 유의성은 도출할 수 없었다.

**Table 8. Doxorubicin 노출 rat의 정세관 크기에 미치는 효과**

Group	No of tubules	Tubular size ( $\mu\text{m}$ )
CON	66	215.6 $\pm$ 49.5
DOX	66	195 $\pm$ 56.2
EX1	66	226.5 $\pm$ 46.7
EX2	66	211.9 $\pm$ 50.4

CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

한편, 독소루비신에 노출된 rat 정세관이 정자를 함유하고 있는 비율은 59.2%로 대조군 75.5%에 비해 약 20% 감소한 것을 알 수 있다( $p<0.05$ ). 또한 DOX군의 정자수/정세관은  $1.75 \times 10^3$ 으로서 정상대조군( $2.12 \times 10^3$ )의 82.5%에 불과하였다( $p<0.05$ ). 이에 반하여 KRG 투여는 2개 투여 용량 모두에서 정자 함유 정세관 비율, 정자수/정세관 모두에서 유의하게 개선되었음을 알 수 있었다( $p<0.01$ ). 특히, 200 mg/kg b.w. 투여군의 정자생성 지수는 독소루비신에 노출되었음에도 불구하고 정상대조군과 유사한 소견을 나타냈다.

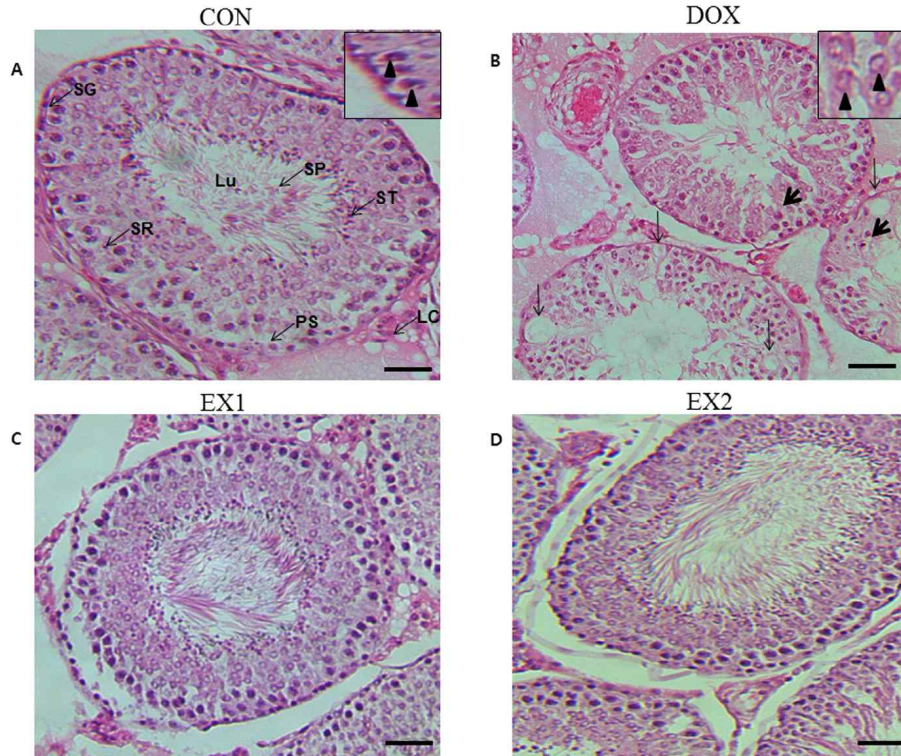
고환 조직의 병리조직학적 관찰 결과, Fig. 2.15에서 보는 바와 같이 CON군은 조밀한 고환 세포 배열을 하고 있는 반면 DOX군에서는 조직이 손상되어 세포의 배열이 loose하고 무질서해졌다는 사실을 알 수 있었다. 반면 KRG 투여는 독소루비신으로 야기되는 고환 조직 손상을 현저히 억제하였다. 특히 정세관내 Sertoli 세포는 물론 정자세포의 maturation 단계별로 정모세포, 정자세포 및 정자(정충)가 compact하게 배열된 모습을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 KRG가 독소루비신에 의해 야기되는 고환세포 독성을 유의하게 방어함으로써 정상적 정자생성 기능을 유지시켜 준다는 사실을 시사한다.

**Table 9. Doxorubicin 노출 rat 고환조직 정자생성 지수에 미치는 효과**

Group	No of tubules	% of tubules with sperm	Sperm No ( $\times 10^3$ )
CON	66	74.5 $\pm$ 13.7	2.12 $\pm$ 524
DOX	66	59.2 $\pm$ 10.5 <sup>†</sup>	1.75 $\pm$ 384 <sup>†</sup>
EX1	66	66.2 $\pm$ 11.4 <sup>**</sup>	1.86 $\pm$ 391 <sup>**</sup>
EX2	66	71.5 $\pm$ 12.5 <sup>**</sup>	1.98 $\pm$ 421 <sup>**</sup>



CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin. † Significantly different from CON at  $p < 0.05$ , \*\*Significantly different from DOX at  $p < 0.01$ .

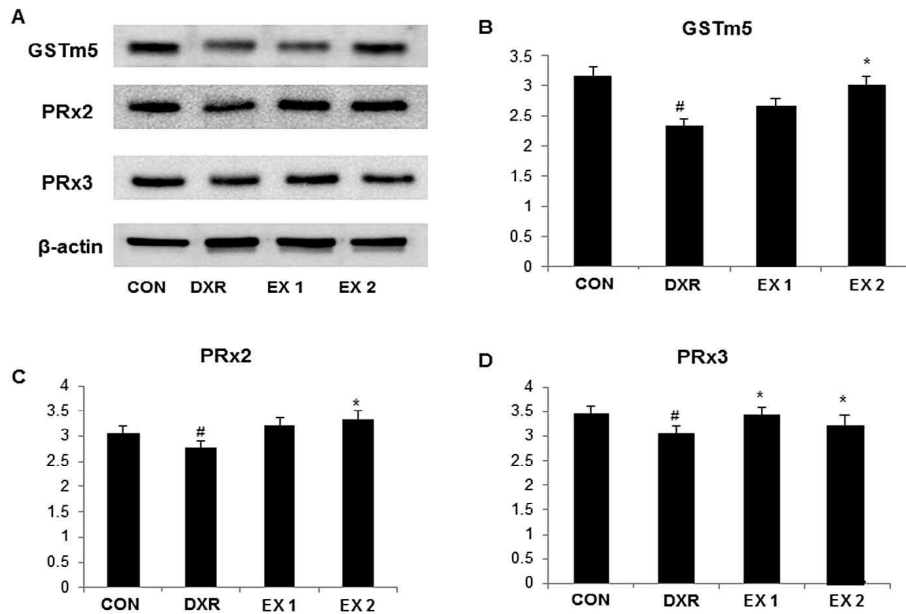


**Fig. 2.15 Doxorubicin 노출 rat의 고환 조직 단면도.** Sections were stained using H&E (n = 6). (A) Control group showing seminiferous tubules with normal morphology. The Sertoli cells show normal nuclei (inset; arrows). (B) DOX-treated group showing severe germ cell depletion and intraepithelial vacuoles (thin arrows). Displaced Sertoli cells from the basement membrane (thick arrows) and abnormal profile (inset; arrow head). (C - D) Seminiferous tubules exhibiting organized epithelium containing spermatocyte, spermatids, and sperms. Moreover, degraded Leydig cells were rejuvenated by EX1 and EX2 treatment and were uniformly scattered through the interstitial tissue and the basement membrane. Scale bar = 45 M. Lu, lumen; LC, Leydig cell; PS, primary spermatocyte; SG, spermatogonium; SP, spermatozoa; SR, Sertoli cell; ST, spermatid; H&E, haematoxylin and eosin.

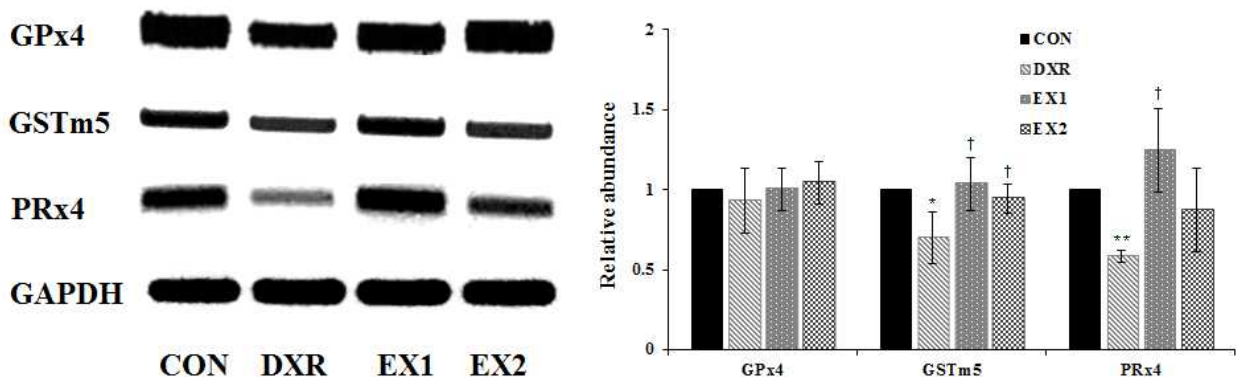
#### 2-2-5 Doxorubicin 노출 rat에 있어 고환 항산화 효소 발현에 미치는 KRG의 효과

항산화 관련 효소 중 고환 조직 내 글루타치온 S-전이효소 (glutathion S-transferase, GST) 류의 하나인 GSTm5와 고환의 미토콘드리아에서 발현되는 PRx (Peroxioredoxin) 류의 하나인 PRX2의 단백질 발현을 Western blot을 통해 확인한 결과, PRx3의 경우 doxorubicin 투여군과 비투여군 사이에 발현량의 차이는 보이지 않았으나, GSTm5, PRx2에 있어서는 독소루비신 투여에 의해 유의( $p < 0.05$ )하게 감소하였으며 홍삼 추출물 투여군에서는 용량-의존적으로 발현량을 회복시키는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 또한 RT-PCR로 RNA 발현량에 대해 확인한 결과, GSTm5, PRx4에 있어 독소루비신 투여에 의해 유의( $p < 0.05 \sim 0.01$ )하게 감소

하였으며, 홍삼 추출물 투여군에서는 감소된 발현량을 회복시키는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이는 KRG가 독소루비신 투여로 야기되는 항산화효소 발현 감소를 억제하고 나아가 고환조직의 산화적 스트레스 방어함으로 인해 궁극적으로는 독소루비신에 의해 야기되는 고환에서의 정자생성 기능 감퇴를 회복시킬 것으로 사료된다.



**Fig. 2.16 Doxorubicin 노출 rat 고환 항산화효소 단백질 발현에 미치는 KRG의 효과.** Protein expression of GSTmu5, PRx-2, and 3 in testicular tissue was analysed using western blot analysis. (A) Tissue lysates from CON, DXR, EX1, and EX2 groups were immunoblotted with specific anti-GSTmu5, anti-PRx-2, and -3 antibodies. The internal control used was  $\beta$ -actin. (B - D) Quantification of GSTmu5, PRx-2, and PRx-3, respectively from three independent experiments. Data are mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ ,  $\#p < 0.05$  compared with CON group,  $*p < 0.05$  compared with DXR alone group by Student's t-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

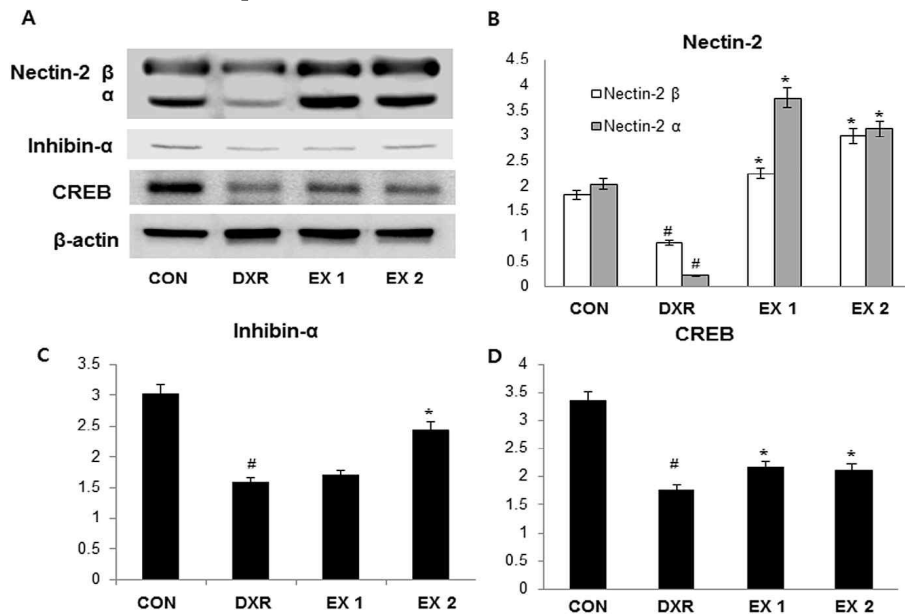


**Fig. 2.17 Doxorubicin 노출 rat 고환 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과.** Quantification of each band was carried out with three independent experiments. Quantification of each band was carried out with three independent

experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. CON: normal control; DXR: DOX-treated control; EX1: DOX plus KRG-WE (100 mg/kg b.w./day); EX2: DOX plus KRG-WE (200 mg/kg b.w./day). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 when compared with CON group; †*p*<0.05, ‡*p*<0.01 when compared with DXR group.

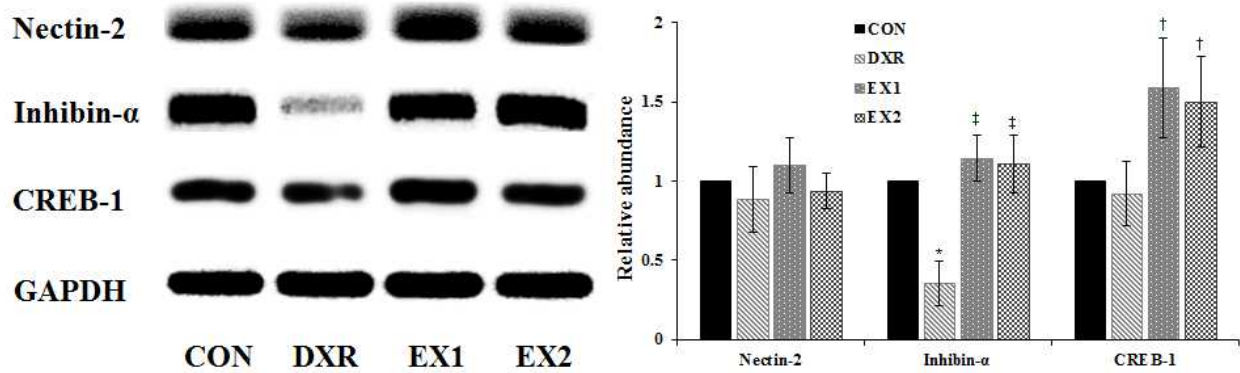
### 2-2-6. Doxorubicin 노출 rat에 있어 정자생성 관련 단백질 발현에 미치는 KRG의 효과

Doxorubicin에 노출된 rat에 있어 성호르몬 pathway에서 정자생성에 관여하는 nectin-2와 inhibin- $\alpha$ 를 단백질 수준에서 발현량을 조사한 결과 nectin-2와 inhibin- $\alpha$  모두 유의하게 감소하였다(*p*<0.01). 한편, KRG 투여군에 있어서는 독소루비신 투여로 야기되는 nectin-2와 inhibin- $\alpha$ 의 발현량 감소를 현저히 억제(*p*<0.05-0.01)하였으며 이러한 효과는 nectin-2와 2b에서 더욱 현저하게 나타났다(*p*<0.01).



**Fig. 2.18 Doxorubicin 노출 rat 정자생성관련 단백질 발현에 미치는 KRG의 효과.** Protein expressions of nectin-2 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), inhibin- $\alpha$ , and CREB in rat testicular tissue was analysed using western blot analysis. (A) Tissue lysates from CON, DXR, EX1, and EX2 were immunoblotted with specific antibodies of nectin-2 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), inhibin- $\alpha$ , and CREB. The internal control used was  $\beta$ -actin. (B - D) Quantification of nectin-2, inhibin- $\alpha$ , and CREB, respectively from three independent experiments. Data are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6), #*p* < 0.05 compared with CON group, \**p* < 0.05 compared with DXR alone group by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

Doxorubicin에 노출된 rat의 정자생성관련 mRNA의 발현량을 조사한 결과, inhibin- $\alpha$ 의 발현량이 현저하게 감소하였다(*p*<0.05). 한편 KRG 투여군에 있어서는 발현량의 감소를 억제(*p*<0.01)하였으며, 조사한 모든 biomarkers에서 정상수준 혹은 그 이상 회복되거나 향상되는 모습을 보였다(Fig. 2.19).



**Fig. 2.19 Doxorubicin 노출 rat 정자생성관련 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과.** mRNA expression level was analyzed using RT-PCR. Quantification of each band was carried out with three independent experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. CON: normal control; DXR: DOX-treated control; EX1: DOX plus KRG-WE (100 mg/kg b.w./day); EX2: DOX plus KRG-WE (200 mg/kg b.w./day). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 when compared with CON group; † $p$ <0.05, ‡ $p$ <0.01 when compared with DXR group.

### 2-2-7 Doxorubicin 노출 rat에 있어 성호르몬 수용체 발현에 미치는 KRG의 효과

Fig. 2.20, 2.21에서 보는 바와 같이 독소루비신은 황체호르몬 수용체(luteonizing hormone receptor, LHR), 여포자극호르몬 수용체(follicle stimulating hormone receptor, FSHR) 및 남성호르몬 수용체(androgen receptor, AR) 발현을 현저히 억제하는 것으로 나타났다 ( $p$ <0.05-0.01). 이에 반해 KRG는 독소루비신 투여로 야기되는 성호르몬 수용체 발현 감소를 현저히 방어하는 것으로 나타났다. 흥미로운 사실은 독소루비신 투여로 남성호르몬 수용체의 발현이 거의 사라지며 KRG는 2개 실험군 모두에서 정상대조군의 수준으로 회복시킨다는 사실을 알 수 있었다. 이는 독소루비신 투여로 야기되는 혈중 남성 호르몬 함량 감소 방어와 더불어 홍삼이 웅성 rat에 있어 남성 호르몬 수용체의 감소를 억제하므로 고환세포가 호르몬에 민감하게 반응하도록 도와준다는 과학적 증거를 제시한다 하겠다.

게다가 최근 선진국을 중심으로 “androgen insensitivity syndrome” (AIS, 남성호르몬 불감증 증상)으로 인한 문제가 심각하게 대두되고 있다. 즉, 남성으로 태어났음에도 불구하고 성징이 여성화 되는 증상을 말한다. NCBI의 gene review에 의하면 부분적 및 완전 AIS 환자는 4-10명/100,000명으로 존재하며 이는 전 인구의 0.04-0.1%에 상당하는 수치이다. AIS는 아직 예방 혹은 치료할 수 있는 방법이 없다는 점에서 홍삼은 AIS를 예방 및 치료할 수 있는 매우 중요한 천연물 의약품이라 사료된다.

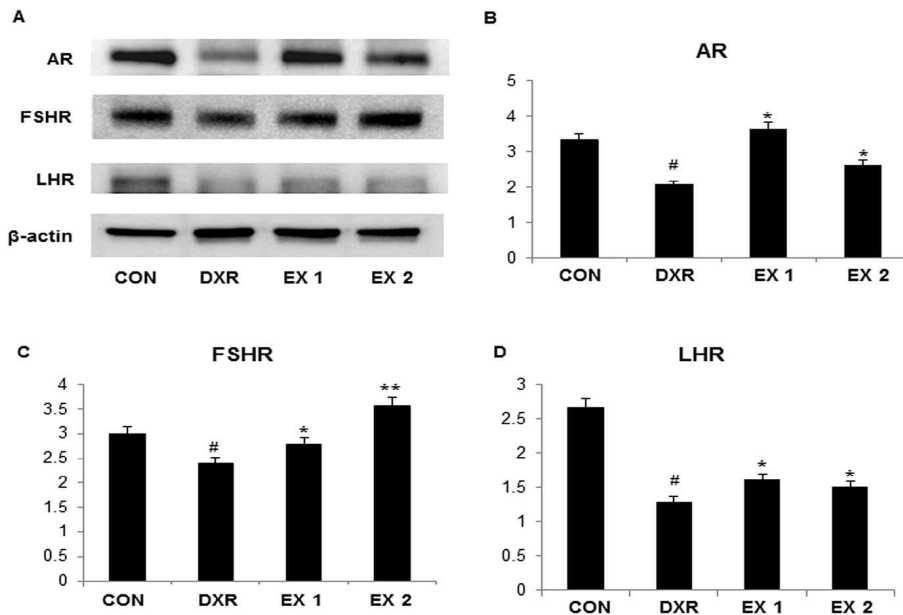


Fig. 2.20 Doxorubicin 노출 rat에 있어 성호르몬 수용체 단백질 발현에 미치는 KRG의 효과. Expression levels of receptor proteins including androgen receptor (AR), follicle stimulating hormone receptor (FSHR), and luteinizing hormone receptor (LHR) in rat testicular tissues were analysed using western blotting. (A) Tissue lysates from CON, DXR, EX1, and EX2 were immunoblotted with specific antibodies against AR, FSHR, and LHR. The internal control used was  $\beta$ -actin. (B - D) Quantification of AR, FSHR, and LHR, respectively from three independent experiments. (B - D) Data are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6, \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01, compared with control group, <sup>†</sup> $p$  < 0.05 compared with DXR alone group, Student's  $t$ -test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0). CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

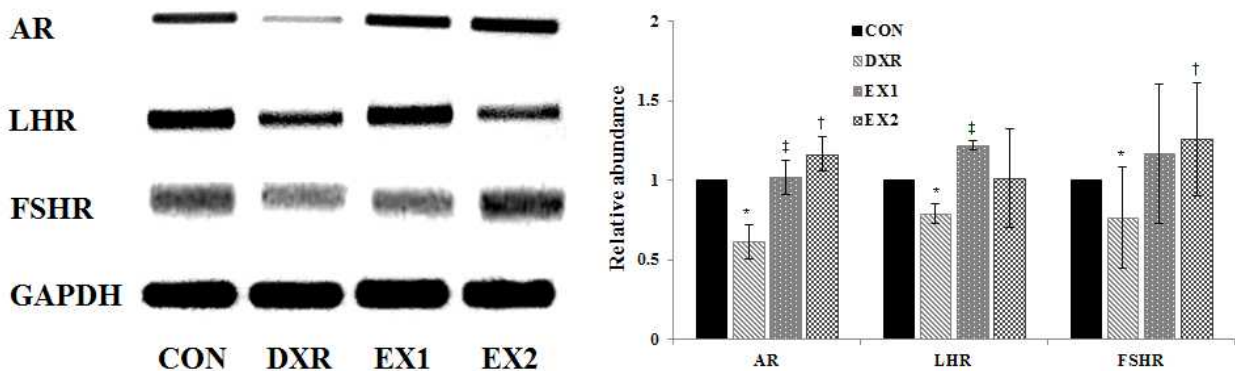


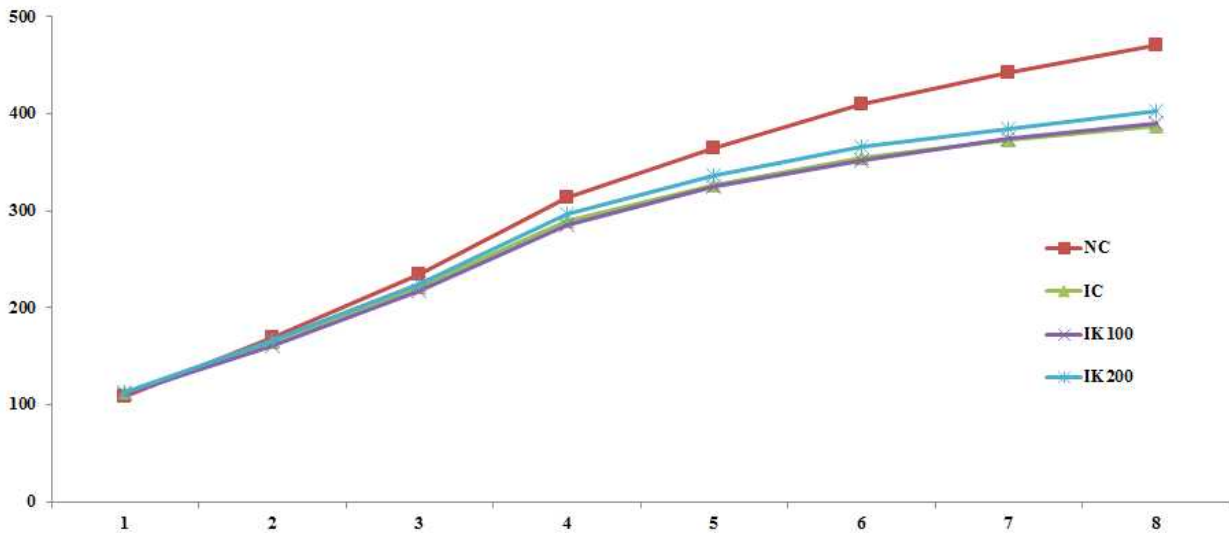
Fig. 2.21 Doxorubicin 노출 rat에 있어 성호르몬 수용체 mRNA 발현에 미치는 KRG의 효과. mRNA expression level was analyzed using RT-PCR. Quantification of each band was carried out with three independent experiments. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's  $t$ -test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0). CON, control; DXR, doxorubicin alone; EX1, Korean red ginseng aqueous extract (100 mg/kg) plus doxorubicin; EX2, Korean red ginseng aqueous extract (200 mg/kg) plus doxorubicin.

ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. CON: normal control; DXR: DOX-treated control; EX1: DOX plus KRG-WE (100 mg/kg b.w./day); EX2: DOX plus KRG-WE (200 mg/kg b.w./day). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  when compared with CON group; †  $p < 0.05$ , ‡  $p < 0.01$  when compared with DXR group.

### 2-3. 구속스트레스에 노출된 rat의 고환 독성에 미치는 KRG의 효능

#### 2-3-1 체중 증가율에 미치는 효과

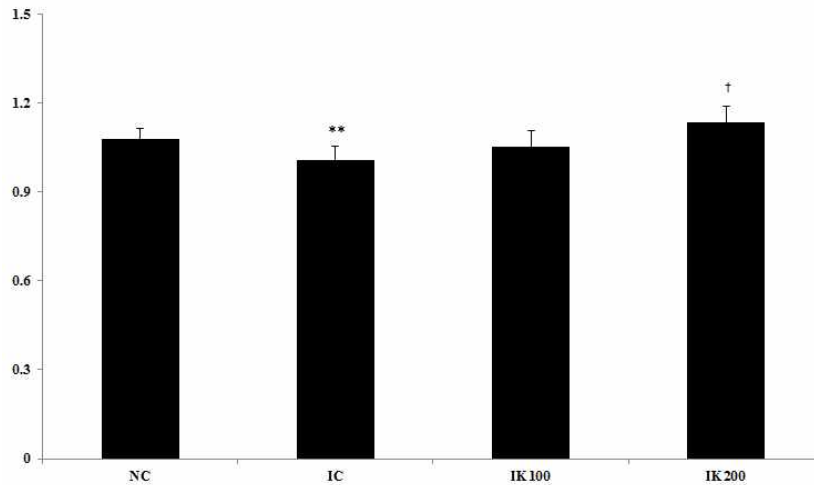
그림에서 보는 바와 같이 구속스트레스를 가한 rat은 정상군에 비해 체중 증가율이 유의하게 낮게 나타났다. 그러나 구속을 한 그룹에서는 홍삼 투여 유무와 관계없이 체중 증가율은 정상군에 비해 낮았다.



**Fig. 2.22 Effect of KRG in body weight increment of immobilization - induced stress in rats.** The overall body weight of NC, IC, IK groups from week 5-12 were shown. Each point represents the mean (n=8). NC: Normal control; IC: Immobilization control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w

#### 2-3-2. 구속스트레스를 부하한 rat의 고환무게에 미치는 효과

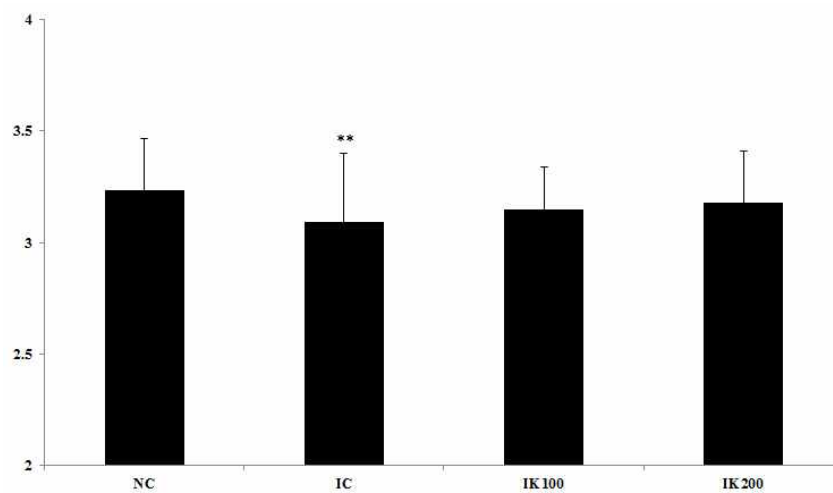
구속을 한 그룹의 고환 무게는 정상군에 비해 유의하게 낮았으나 200 mg/kg b.w. 홍삼 투여군에서는 구속으로 인한 고환 무게 감소를 유의하게 억제하는 것으로 나타났다.



**Fig. 2.23. Effect of KRG in rat testis weight of immobilization-induced stress.**

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.

**2-3-3. 구속스트레스를 부하한 rat의 부고환무게에 미치는 효과**  
 구속을 한 그룹의 부고환 무게는 정상군에 비해 유의하게 낮았으나 홍삼 투여군에서는 구속으로 인한 부고환 무게 감소를 유의하게 억제하지 못하는 것으로 나타났다.



**Fig. 2.24 Effect of KRG in rat epididymis weight of immobilization-induced stress.**

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.

**2-3-4. 구속스트레스를 부하한 rat의 정자운동성에 미치는 효과**  
 구속을 한 rat의 정자는 운동성을 가진 정자의 수가 현저히 감소하는 반면 홍삼 투여는 구속으로 인한 정자의 운동성 감소를 억제하는 것으로 나타났다.

**Table 10. Effect of KRG on sperm kinematic values of immobilization-induced stress.**

Average	Motile	Progressive	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	Elongation
NC	<b>82.67 ± 14.83</b>	25.00 ± 12.34	30.59 ± 5.74	21.77 ± 4.86	73.86 ± 9.53	70.43 ± 2.51	38.00 ± 2.52	96.43 ± 2.15
IC	<b>51.00 ± 8.00<sup>+</sup></b>	17.71 ± 4.79	33.21 ± 8.49	25.80 ± 8.92	81.31 ± 20.09	76.86 ± 12.82	44.86 ± 14.84	99.00 ± 2.65 <sup>**</sup>
IK100	<b>84.43 ± 13.45<sup>†</sup></b>	31.00 ± 9.11 <sup>†</sup>	33.67 ± 3.13	23.74 ± 3.18	81.37 ± 8.99	67.29 ± 5.71	35.57 ± 5.26	98.00 ± 1.91
IK200	<b>93.14 ± 5.27<sup>†</sup></b>	36.00 ± 6.73 <sup>†</sup>	33.90 ± 3.66	23.99 ± 2.49	75.24 ± 6.93	69.00 ± 2.65	38.29 ± 3.25	94.71 ± 1.60 <sup>†</sup>

Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \**p*<0.01 compared with NC group. \*\**p*<0.05 compared with NC group. <sup>†</sup>*p*<0.01 compared with IC group. <sup>‡</sup>*p*<0.05 compared with IC group. VAP; average path velocity, VSL; straight line velocity, VCL; curvilinear velocity, LIN; linearity = VSL/VCL×100, STR; straightness = VSL/VAP×100

**2-3-5. 구속스트레스를 부하한 rat의 혈중 지질대사에 미치는 효과**  
 구속을 한 rat의 혈중 지질대사산물 가운데 중성지질(triglyceride)는 구속으로 인하여 유의하게 감소하였으며 홍삼 투여(200 mg/kg b.w.)는 구속으로 인한 감소를 억제하는 것으로 나타났다. 기타 대사산물에 있어서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.



**Table 11. Effect of KRG on lipid metabolism-related serum parameters of immobilization-induced stress.**

Group	AST	ALT	ALP	TG	GLU	T-PRO	ALB	BUN	HDL	LDL	ALB
NC	95.20 ± 17.25	29.40 ± 6.15	403.80 ± 35.65	66.80 ± 15.80	165.40 ± 9.66	6.44 ± 0.13	2.74 ± 0.05	19.56 ± 0.96	21.00 ± 1.58	11.00 ± 0.71	2.74 ± 0.05
IC	75.80 ± 8.67	24.20 ± 3.19	423.40 ± 54.62	45.00 ± 15.98 <sup>†</sup>	163.80 ± 18.50	6.28 ± 0.18 <sup>**</sup>	2.72 ± 0.08	21.36 ± 2.00	19.00 ± 1.41	8.60 ± 2.07 <sup>**</sup>	2.72 ± 0.08
IK100	67.80 ± 7.50 <sup>‡</sup>	27.40 ± 3.78	495.80 ± 95.66 <sup>†</sup>	46.00 ± 10.37	163.40 ± 10.24	6.34 ± 0.21	2.72 ± 0.08	21.74 ± 2.91	19.40 ± 2.19	8.80 ± 1.10	2.72 ± 0.08
IK200	100.40 ± 44.69	36.60 ± 19.35	408.00 ± 12.30	57.60 ± 21.76 <sup>‡</sup>	174.20 ± 15.22	6.40 ± 0.07	2.68 ± 0.08	22.68 ± 3.92	17.80 ± 2.68	9.60 ± 2.88	2.68 ± 0.08

Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \**p*<0.01 compared with NC group. \*\**p*<0.05 compared with NC group. <sup>†</sup>*p*<0.01 compared with IC group. <sup>‡</sup>*p*<0.05 compared with IC group

**2-3-6. 구속스트레스를 부하한 rat의 혈구수에 미치는 효과**

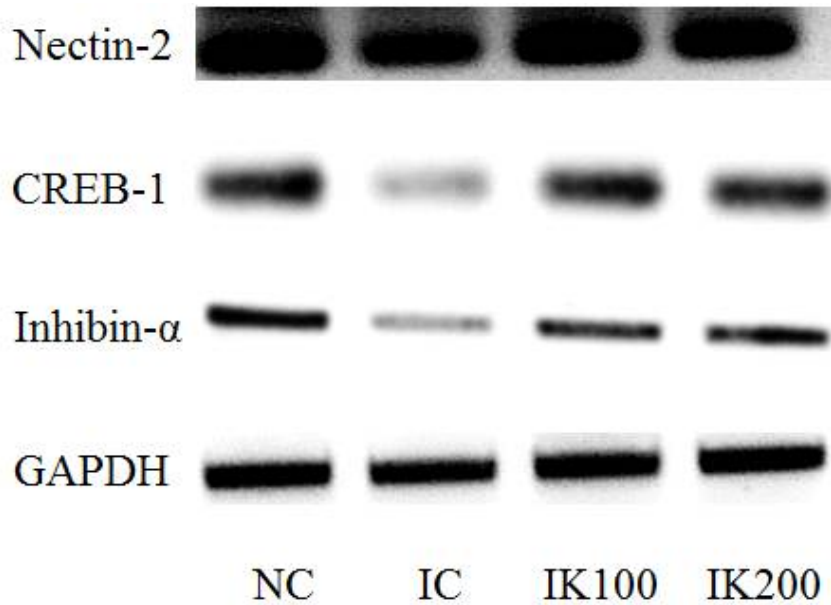
구속 스트레스를 부하한 rat의 혈구수 가운데 백혈구 수가 현저히 감소하는 것으로 나타났으며 홍삼 투여는 이를 억제하는 것으로 나타났다.

**Table 3. Effect of KRG on blood chemistry panels of immobilization-induced stress.**

Average	WBC (X10 <sup>3</sup> /μl)	LYM (%)	RBC (X10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (X10 <sup>3</sup> /μl)
NC	9.21 ± 2.60	77.67 ± 5.35	8.29 ± 0.31	17.51 ± 0.20	45.24 ± 1.15	944.33 ± 170.61
IC	6.15 ± 1.27 <sup>**</sup>	81.04 ± 3.16	7.99 ± 0.48	17.01 ± 1.34	44.16 ± 4.17	852.17 ± 164.22
IK100	6.59 ± 1.66 <sup>‡</sup>	81.44 ± 7.17	8.22 ± 0.34	16.97 ± 0.60	45.09 ± 1.28	939.67 ± 304.66
IK200	8.74 ± 2.59	80.59 ± 3.29	8.55 ± 0.38 <sup>‡</sup>	17.86 ± 0.86	46.00 ± 2.18	881.40 ± 74.60

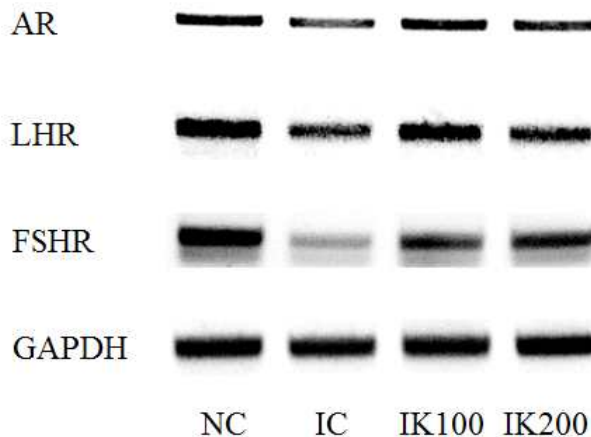
Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \**p*<0.01 compared with NC group. \*\**p*<0.05 compared with NC group. <sup>†</sup>*p*<0.01 compared with IC group. <sup>‡</sup>*p*<0.05 compared with IC group. WBC white blood cell, Lym lymphocyte, RBC; red blood cell, HGB; hemoglobin, HCT; hematocrit, PLT; platelet.

2-3-7. 구속스트레스를 부하한 rat의 정자생성 관련 분자의 mRNA발현에 미치는 효과  
 정자생성에 관여하는 전사인자 가운데 CREB와 inhibin은 구속으로 인해 유의하게 억제되는  
 반면 홍삼 투여는 이를 유의하게 방어하는 것으로 나타났다.



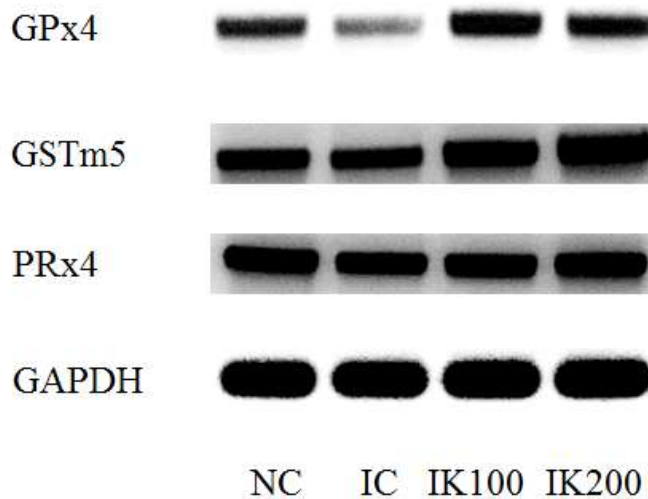
**Fig. 2.25 Effect of KRG on mRNA expression levels of spermatogenesis-related molecules in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p < 0.01$  compared with NC group. \*\* $p < 0.05$  compared with NC group. † $p < 0.01$  compared with IC group. ‡ $p < 0.05$  compared with IC group.

2-3-8. 구속스트레스를 부하한 rat의 성호르몬 수용체 mRNA발현에 미치는 효과  
 성호르몬 수용체 발현에 있어서는 구속으로 인해 AR, LHR 및 FSHR 모두 유의하게  
 감소하였으며 홍삼 투여는 이를 현저하게 방어하는 것으로 나타났다.



**Fig. 2.26 Effect of KRG on mRNA expression of sex hormone receptors in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.

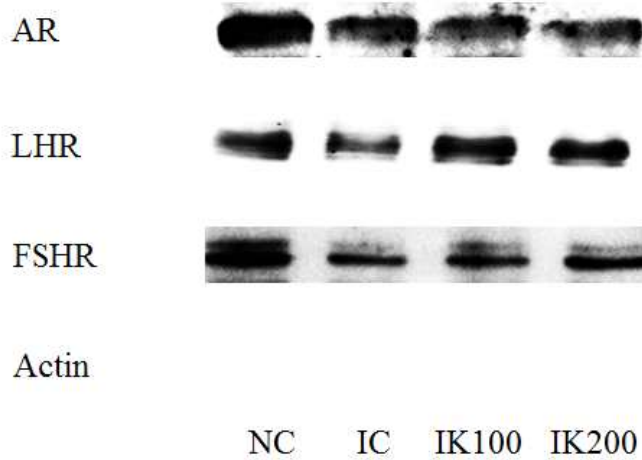
2-3-9. 구속스트레스를 부하한 rat의 고환조직내 항산화 효소 mRNA발현에 미치는 효과  
 고환에 존재하는 항산화 효소 가운데 GPx4는 구속으로 인해 발현량이 유의하게 소하였으  
 며 GSTm5와 PRx4는 구속으로 인해 변화가 없는 것으로 나타났다.



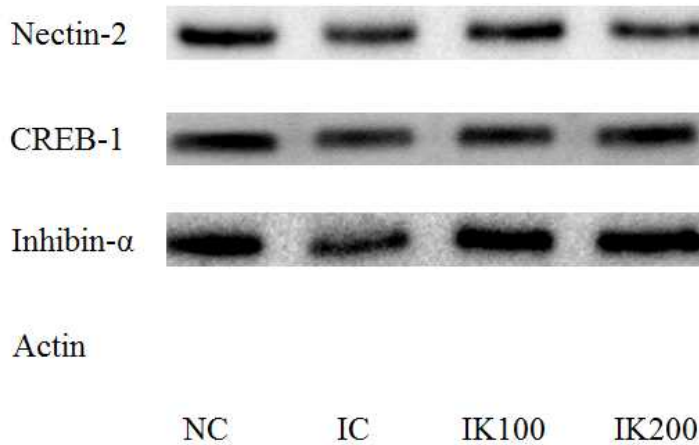
**Fig. 2.27 Effect of KRG on mRNA expression of antioxidant enzymes in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.

2-3-10. 구속스트레스를 부하한 rat의 고환조직내 성호르몬 수용체 단백질 발현에 미치는 효과

구속 스트레스를 가한 rat의 고환조직에 있어서는 성호르몬 수용체 가운데 FSHR만 유의하게 감소하였으나 AR과 LHR은 구속으로 인하여 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이에 반하여 홍삼의 투여는 구속으로 인하여 발현이 감소하는 FSHR을 회복시켜 주는 것으로 나타났다.



**Fig. 2.28 Effect of KRG on protein expression levels of spermatogenesis-related molecules in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.



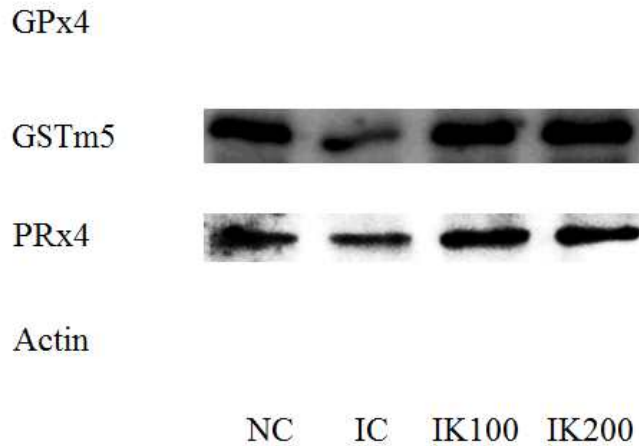
**Fig. 2.29 Effect of KRG on protein expression of sex hormone receptors in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. † $p$ <0.01 compared with IC group. ‡ $p$ <0.05 compared with IC group.

2-3-12. 구속스트레스를 부하한 rat의 고환조직내 정자생성 관련 전사인자 발현에 미치는 효과

고환에 존재하는 항산화 효소 가운데 GPx4는 구속으로 인해 발현량이 유의하게 감소하였으며 GSTm5와 PRx4는 구속으로 인해 변화가 없는 것으로 나타났다.

2-3-13. 구속스트레스를 부하한 rat의 고환조직내 항산화 효소 발현에 미치는 효과

고환에 존재하는 항산화 효소 가운데 GSTm5와 PRx4는 구속으로 인해 발현량이 유의하게 감소하였으며 GPx4는 구속으로 인해 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 홍삼의 투여는 구속으로 인한 항산화효소 발현량 감소를 유의하게 억제하였다.



**Fig. 2.30 Effect of KRG on protein expression of antioxidant enzymes in rat testis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IK100: immobilization-stressed and received KRG 100 mg/kg b.w.; IK200: immobilization-stressed and received KRG 200 mg/kg b.w. \* $p$ <0.01 compared with NC group. \*\* $p$ <0.05 compared with NC group. \* $p$ <0.01 compared with IC group. \* $p$ <0.05 compared with IC group.

라.[위탁 : 기능 등재를 위한 연구: 식약처 기능식품 등재를 위한 서류 작성]

(1) 건강기능식품 개발 기술컨설팅

- 기능성 소재에 대한 연구결과 활용도를 높이고, 개발품목에 대한 성공 가능성을 높이기 위해 기술컨설팅 진행함, 컨설팅 결과 반영하여 연구 계획 수립함
- 연구자 협의 등을 통해 진행 현황 파악 및 진행시 문제점 파악, 대책 방안 논의
- 개별인정 업무를 효율적으로 진행하기 위한 전반적인 내용에 대한 식약처 사전 검토 (민원상담)
- 담당주무관: 오재명 주무관 (영양기능연구팀)
- 식약처 기능성 원료 및 기준 규격 인정에 관한 규정 안내

회의록		기 록	비 정 일
회의명	식품의약품안전처 원자운동성(정자운동성/남성)		
일시	2016. 01. 19 (수) PM 2:00 - 3:00		
장소	식품의약품안전처 교육지원센터 (충북 오송)		
참석자	- 원자운동성 연구팀: 오정영, 최병진, 최소희(이희영), 최기영, 박희남		
회의 내용			
1) 기동성 관련			
주제	내용	관련법령	비고
원자운동성	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	식품의약품안전처 원자운동성 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정
원자운동성 관련 연구 동향	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정
원자운동성 관련 연구 동향	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정
원자운동성 관련 연구 동향	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정	원자운동성 관련 연구 동향 및 식품의약품안전처 관련 규정

Fig. 1. 민원상담 회의록

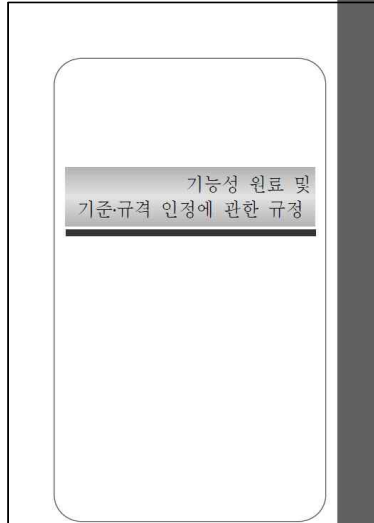


Fig. 2 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정

건강기능식품(건강기능식품/원료)평가/개발/관리	
<b>개별인정원료</b>	
<b>마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프, 제2011-7호)</b>	
2016년 1월	건강기능식품평가과
○ 품목명	마카 젤라틴화 분말
○ 인정번호	제20117호 (2011.1.7)
○ 업체	(주)라이스타비엔이프
○ 기능성 성분	- 음용수용성 마카에 도유를 첨가한 마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프 3등급) - 장기능성 개선에 도유를 첨가한 마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프 3등급) - 장기능성 개선에 도유를 첨가한 마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프 3등급)
○ 섭취추천사항	-
○ 유효성분량	- 음용수용성 마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프 3등급) 1.5~3.0g/일 - 장기능성 개선에 도유를 첨가한 마카 젤라틴화 분말(라이스타비엔이프 3등급) 5.0g/일
해당 정보를 무단으로 복제/사용 시 이용되는 경우 저작권법 등에 따라 법적행동을 할 수 있습니다.	

Fig. 3. 유사원료 개별인정 현황

(2) 기능성소재(홍삼) 관련 자료 수집/정리

- 선행연구 조사를 통한 기능성 및 안전성자료 검토
- 홍삼 소재의 관련 논문자료 및 섭취근거 자료 검토
- 홍삼 지표성분의 기능성 및 안전성 자료 검토
- 원재료 기원에 관한 정보

원재료명	인삼	비고(참고)
학명	<i>Panax ginseng</i> C.A Meyer <i>Panaxschinseng</i> Nees(이명)	http://www.foodsafetykorea.go.kr/
이명	Ginseng, 백삼, 홍삼, 야산삼, 별직삼, 귀개, 토정, 신초, 혈삼, 장뇌삼, 산양삼 등	
생약명	인삼(人參, Ginseng Radix Alba)	
원재료분류	식물	
식품원료 사용가능부위	잎/뿌리/조식배양삼/열매/씨	

- 홍삼의 정자운동성 개선 관련 논문 현황

<국내 연구 현황>

자료출처: KISS, DBpia

주요 검색어: 홍삼, 진세노사이드, 정자운동성&성기능

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	인체적용시험	총설 / 메타분석	Total
홍삼		1	1		2
ginsenoside					
Total	0	1	1	0	2

<국외 연구 현황>

자료출처: Pubmed

주요 검색어: red ginseng, ginsenoside, sperm motility&sexual function

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	인체적용시험	총설 / 메타분석	Total
홍삼		3	5		8
ginsenoside	1	3	1		5
Total	1	6	6	0	13





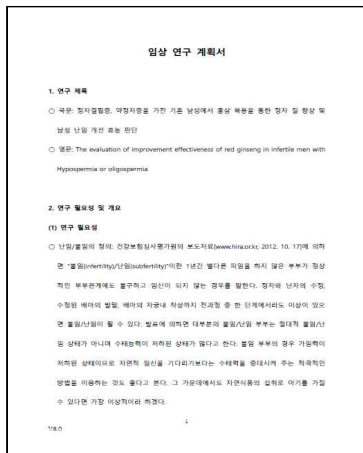
[그림] 포장 및 라벨링방법 안내



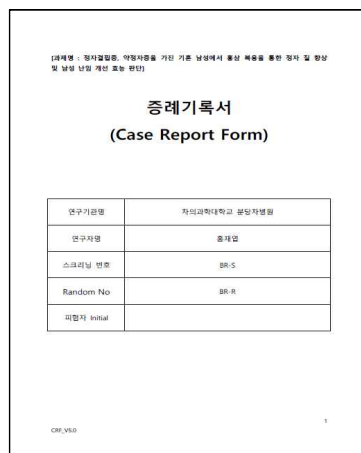
[그림] 맹검봉투 준비 안내

(5) 프로토콜, 증례기록서 통합 및 관리

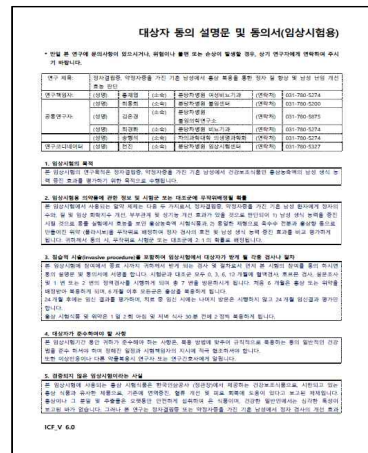
- 실시기관별 프로토콜 및 증례기록서 취합하여 통합 및 관리함
- IRB 심의자료 준비하여 각 실시기관 발송



[그림] 프로토콜



[그림]증례기록서



[그림]대상자동의설명서 및동의서

(6) 임상시험 모니터링

- 연구의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 연구 수탁기관(CRO; Contact Research Organization)에서 연구 전반 과정에 대해 모니터링을 실시
- 모니터링 계획
  - 모니터 요원은 계획서 및 증례기록서, 연구대상자 동의서, 연구자에게 제공되는 서면 정보, 사용되는 시험용제품, 연구 관리기준 및 관련 규정 및 본 연구를 위하여 수립된 모니터링 계획에 따라 모니터링 실시 중
  - 모니터링 항목
    - ▶ 시험자 및 관련 연구 인력들에 대한 교육



- ▶ 근거 문서 확인(Source Data Verification: SDV)
- ▶ 자료 처리에 관한 절차
- ▶ 시험제품 관리에 대한 절차
- ▶ 임상병리 자료 및 샘플 처리 절차
- ▶ 기타: 임상시험에서 사용될 여러 문서 template이나 임상시험팀 연락처 주소 등을 확인함.

- 모니터링 방문 및 follow-up

- 사전에 수립된 모니터링 계획서에 따라 담당 수행기관에 대한 개별 monitoring visit 계획을 세우고, 현장 방문 시 확인해야 할 내용 및 만나야 할 대상을 정하여 미리 일정을 짜고 연구자와 방문 약속을 조정함. 현장 모니터링 시에 연구 관리요원이 확인해야 하는 항목들을 현장 방문 때 빠짐없이 check되어 자세히 기록되도록 확인함.

- Source Data Verification (SDV)

- 모니터 요원의 routine monitoring 시에 자료의 질적인 측면을 보장하기 위한 활동으로서 가장 중요한 것이 증례기록서에 적힌 정보의 source data를 source document를 통하여 대조 확인하는 작업임.



**Fig. 7. 모니터링 방문 사진**

- 모니터링 보고서

- 모니터링 방문 활동 또는 다른 연구와 관련된 교신은 모니터링 보고서로 작성함. 개별 모니터링 방문에 대한 보고서는 방문 요약 및 서술적 기술, issues, checklist results 등의 부분으로 구성되며 연구대상자 등재 현황 및 방문의 진행, data monitoring과 SDV 등 활동 영역이 포함됨.

○ 모니터링 방문: 진행 중이며, 그동안 진행한 일정은 아래와 같음.

회차		분당차병원		제일병원	강남차병원	서울역센터
개시방문		2015-04-01	-	2015-4-8	2015-4-22	2016-10-27
1	37	2015-07-17	2017-06-13	2015-8-26	2015-7-15	2017-3-8
2	38	2015-09-04	2017-06-16	2015-10-12	2015-10-21	2017-4-26
3	39	2015-10-27	2017-06-26	2015-12-14	2015-12-9	2017-6-14
4	40	2015-12-18	2017-06-27	2016-2-29	2016-2-17	2017-7-27
5	41	2016-01-21	2017-06-29	2016-3-28	2016-5-11	2017-8-12
6	42	2016-04-12	2017-06-30	2016-6-20	2016-7-13	2017-10-24
7	43	2016-06-14	2017-07-03	2016-8-22	2016-10-19	2017-12-20
8	44	2016-07-07	2017-07-04	2016-10-10	2016-12-14	2018-2-1
9	45	2016-07-08	2017-07-05	2016-10-11	2017-2-15	-
10	46	2016-08-26	2017-07-06	2016-12-5	2017-2-16	
11	47	2016-10-13	2017-07-07	2017-2-20	2017-3-22	
12	48	2016-10-14	2017-08-08	2017-2-21	2017-3-23	
13	49	2016-12-21	2017-08-22	2017-3-27	2017-5-10	
14	50	2016-12-22	2017-08-23	2017-3-28	2017-5-31	
15	51	2017-01-03	2017-09-19	2017-5-22	2017-6-7	
16	52	2017-01-04	2017-09-20	2017-5-23	2017-6-15	
17	53	2017-01-10	2017-10-25	2017-5-26	2017-8-9	
18	54	2017-01-11	2017-10-26	2017-6-5	2017-10-12	
19	55	2017-02-01	2017-10-27	2017-6-19	2017-12-13	
20	56	2017-02-02	2017-11-22	2017-6-20	2018-2-9	
21	57	2017-02-22	2017-11-23	2017-6-21	2018-4-25	
22	58	2017-02-23	2017-12-05	2017-7-25	-	
23	59	2017-03-14	2017-12-11	2017-7-26		
24	60	2017-03-15	2017-12-22	2017-8-30		
25	61	2017-04-06	2017-12-26	2017-10-18		
26	62	2017-04-07	2017-12-27	2017-12-18		
27	63	2017-05-16	2017-12-28	2017-12-19		
28	64	2017-05-17	2018-01-10	2018-1-8		
29	65	2017-05-25	2018-01-11	2018-1-9		
30	66	2017-05-29	2018-01-12	2018-1-22		
31	67	2017-05-30	2018-01-29	2018-5-23		
32	68	2017-06-01	2018-01-30			
33	69	2017-06-02	2018-01-31			
34	70	2017-06-08	2018-02-07			
35	71	2017-06-09	2018-02-12			
36	72	2017-06-12	2018-05-16			



**(5) 기능성원료 개별인정 신청**

- 선행 연구 자료와 인체적용시험 결과를 바탕으로 건강기능식품 원료 개별인정을 받을 수 있도록 신청 제출자료 준비
- 건강기능식품에 관한 법률에 따라 건강기능식품 기능성 원료 및 기준 규격의 인정에 필요한 제출자료 준비
- 새로운 건강기능식품 원료 또는 성분을 사용하고자 할 때 원료에 대한 안전성, 기능성 평가를 받아야 하며, 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위해 제출자료 및 구비서류를 준비함
- 신청 시 같이 제출해야 하는 서류(구비서류)
  - ① 제출자료 1부
  - ② 제출자료 수록 CD 1개
  - ③ 제품 또는 시제품
  - ④ 기능성분(또는 지표성분) 표준품
  - ⑤ 국내외 검사기관이 발행한 시험성적서

- 제출 자료의 범위

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료	
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
3. 제조방법 및 그에 관한 자료	
3.1	제조공정표
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화
3.5	주요공정별 수율 변화
4. 원료의 특성에 관한 자료	
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거
4.3	영양성분정보자료
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료	
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료		
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : )		
7.1	섭취근거 정보	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	
7.3	섭취량 평가 정보	
7.4	영양평가, 생물학적유용성, 인체적용시험 정보	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험
		3개월 반복투여독성시험
		유전독성시험
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성 )
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료		
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.2	동물시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 :
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.3	인체적용시험	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) *인체적용시험기관 :
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료		
9.1	섭취량 및 근거	
9.2	섭취방법 및 근거	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료		
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	

[제1협동: 국제기준(ICH 혹은 WHO 기준) 부합 제조공정 확립 및 품질규격 표준화 제품 개발]

### 1. 원료제조 공정

홍삼정타블렛 생산에 필요한 홍삼농축액 추출분말 및 홍삼정 타블렛 제조공정을 Figure 1 ~ 6에 도식화하였다.

### 1-1. 홍삼 제조 방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액의 제조를 위한 홍삼의 제조 방법은 Figure 2와 같다.

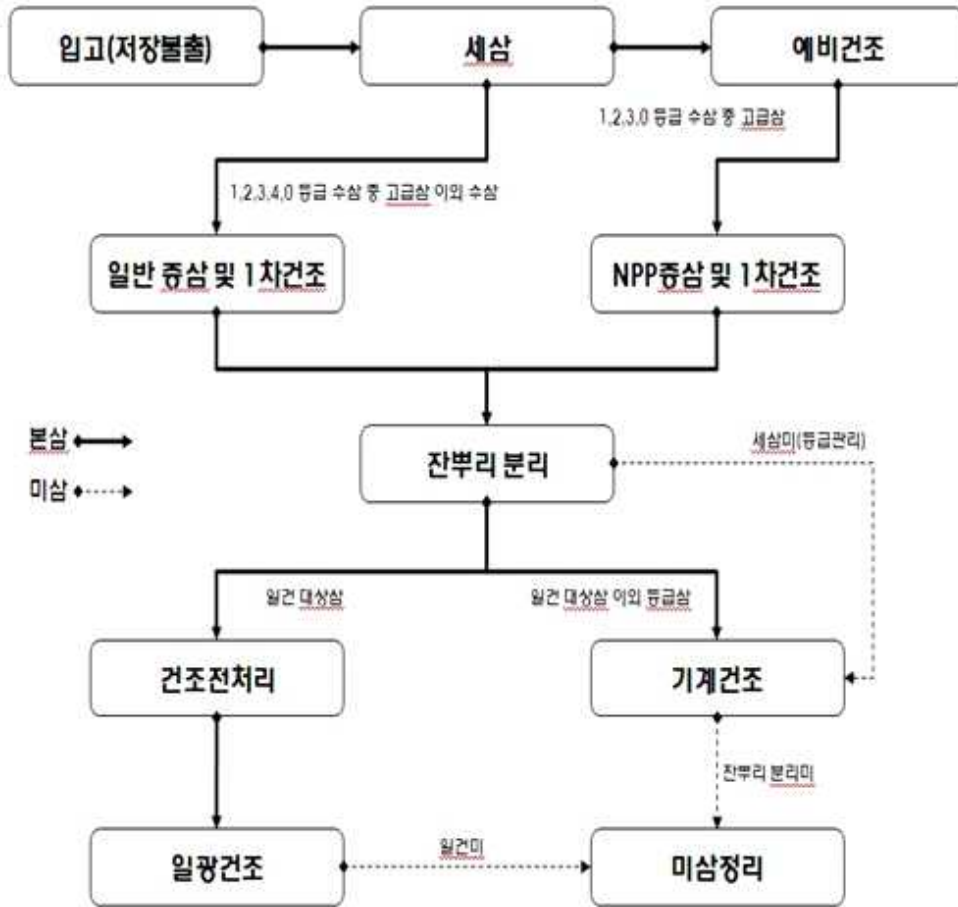


Figure 1. 홍삼 제조공정도

## 1-2. 홍삼농축액 제조방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액 분말의 제조를 위한 홍삼 농축액 제조 방법은 Figure 3과 같다.

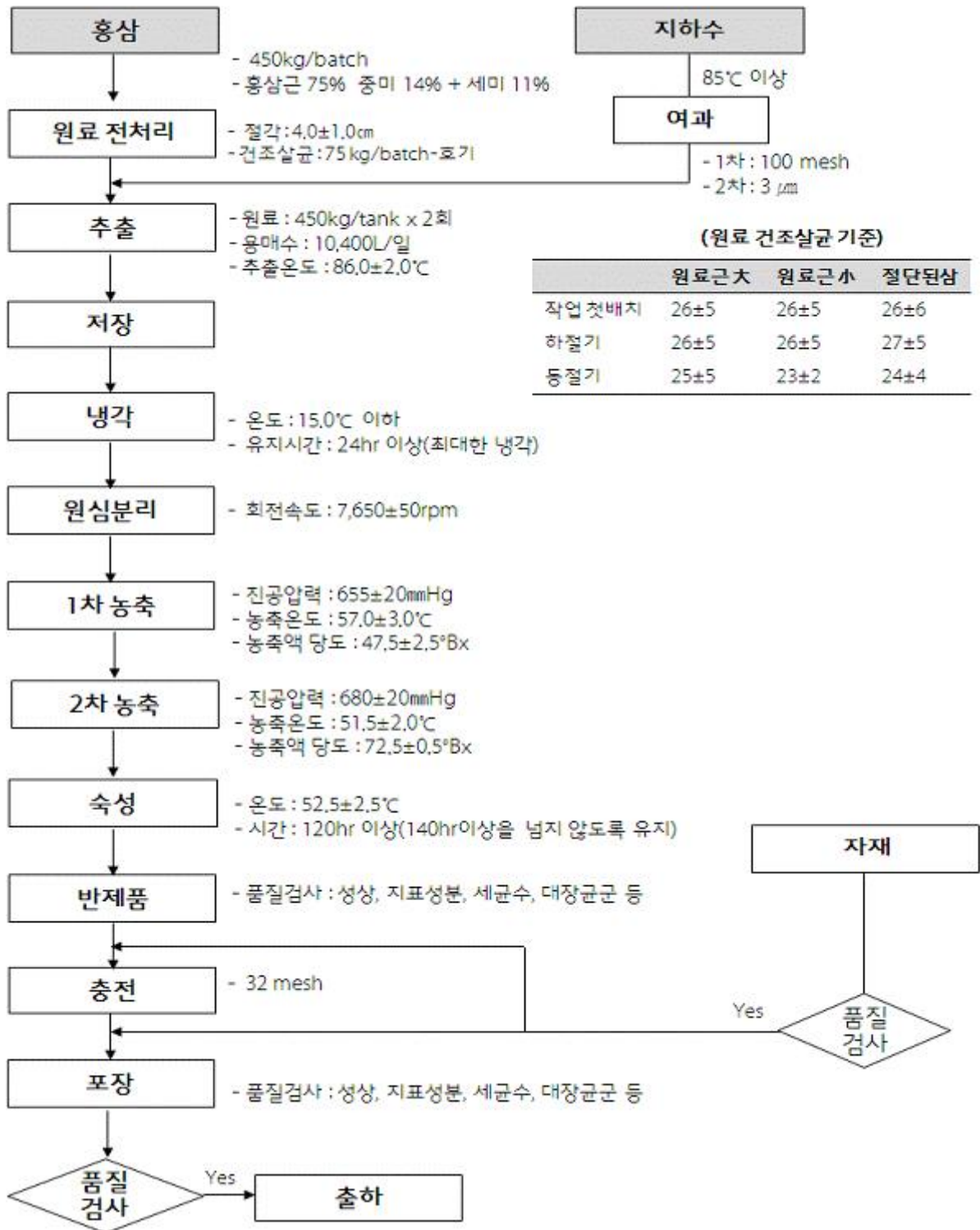


Figure 2. 홍삼농축액 제조공정도

### 1-3. 홍삼농축액분말 제조방법

규격에 적합한 원료 홍삼농축액 분말의 제조 방법은 Figure 4와 같다.

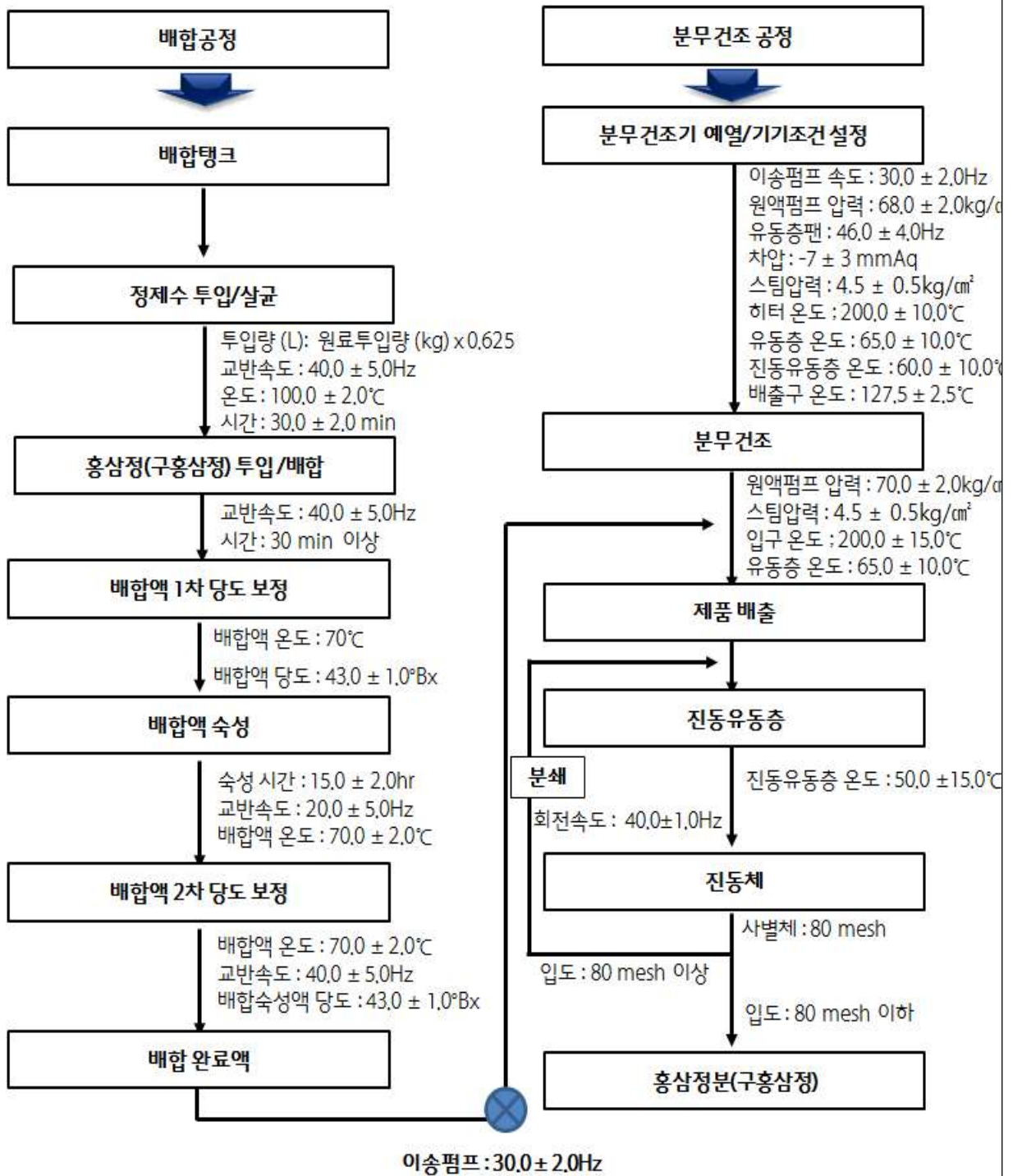


Figure 3. 홍삼농축액분말 제조공정도



## 2. 인체적용시험 홍삼정 타블렛 제조 공정

### 2-1. 홍삼 타블렛 제조방법

홍삼 및 부원료의 무게를 칭량하고 무게대비 15%의 주정을 혼합하여 스피드 믹서에서 10분간 1,500rpm으로 혼합하였다. 혼합 후 캐비닛 건조기에서 건조 온도 50°C 로 수분 5% 이하가 될 때까지 건조하였고, 건조가 완료되면 30호체로 정립하였다. 혼합된 원료는 타정기(KTM-36)를 이용하여 타정하였으며, 타정속도는 25rpm을 유지하였다. 타정된 제품은 하이드록시프로필셀룰로오스를 정제수와 발효주정에 녹인 후 60°C의 온도에서 코팅 후 40°C에서 20분간 건조 하였다. 코팅이 완료된 정제에 대하여 코팅불량 정제 및 깨진 정제를 선별하여 함습을 방지한 조건에서 알루미늄 및 PVDC로 이중 포장을 실시하였다. 제조공정은 Figure 4에 도식화하였다.

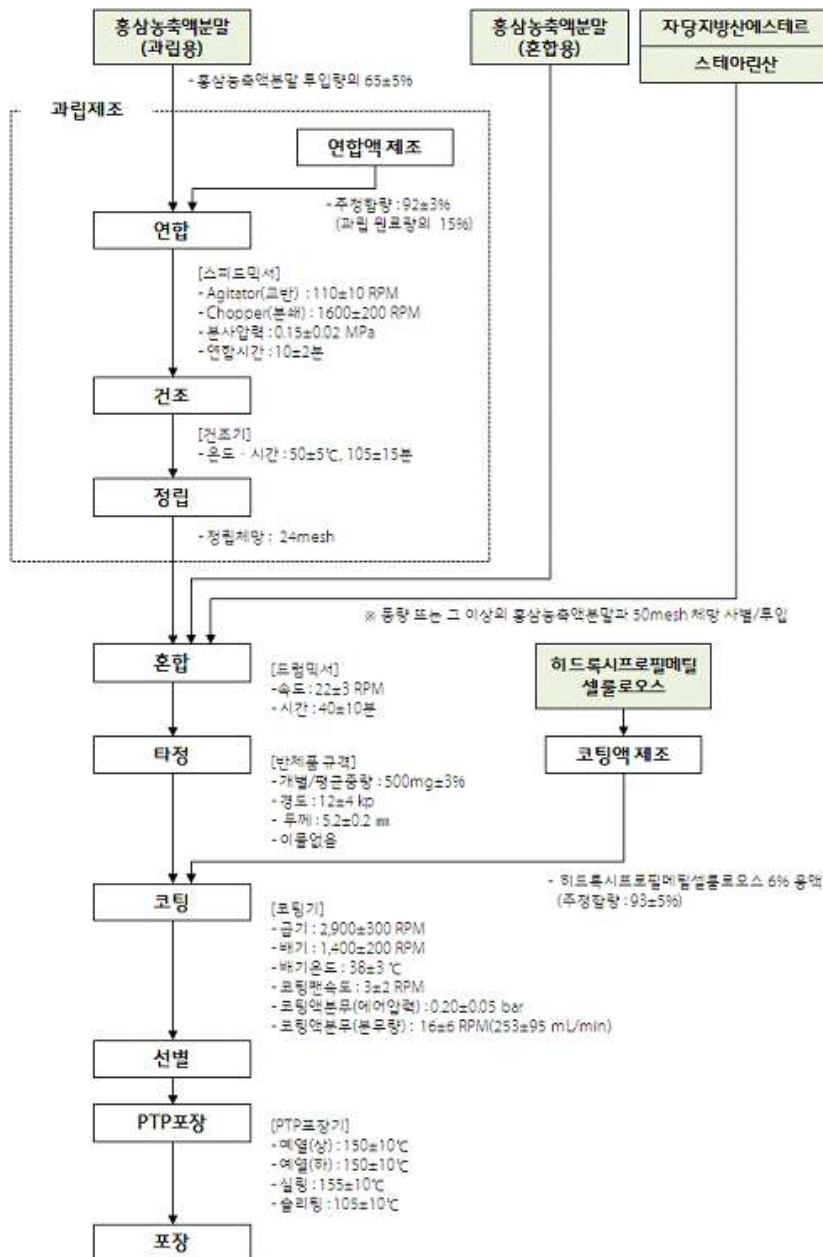


Figure 4. 홍삼정 타블렛 제조공정도

## 2. 원료 및 제품의 기준규격

### 1. 수삼 원료 기준

#### 1-1. 원료 명칭

원료명	규격	비고
수삼(6년근)	별첨	학명:Panax Ginseng C.A. Meyer

#### 1-2. 외관 및 성상

구분	1 등	2 등	3 등	등외	
① 체형	머리	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	몸통과 균형을 이룬 머리가 있는 것	제한없음
	몸통 및 다리	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	몸통이 부분적으로 비대하거나 굴곡이 심하지 아니한 것	제한없음
② 내용 조직	몸통의 길이가 6cm 이상이고 5cm 이상의 다리가 2개 이상인 것이나 몸통의 길이가 10cm 이상이고 직립형인 것. 다만 몸통 지름이 몸통길이의 2/5 이하이어야 한다.	몸통의 길이가 4cm 이상이고 3cm 이상의 다리가 2개 이상인 것이나 몸통의 길이가 8cm 이상이고 직립형인 것. 다만 몸통 지름이 몸통길이의 1/2 이하이어야 한다.	몸통의 길이가 3cm 이상이고 몸통과 균형을 이룬 다리가 있는 것이나 몸통의 길이가 5cm 이상이고 직립형인 것. 다만 무게가 50g 이상인 체형 불량삼을 포함한다.	제한없음	
③ 색택 및 표피	치밀하고 탄력성 있는 것	치밀하고 탄력성 있는 것	치밀하고 탄력성 있는 것	제한없음	
	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	부패부위가 없는 것	
	미황색, 미황백색인 것	미황색, 미황백색인 것	미황색, 미황백색인 것		
윤향하고 균열이 없는 것	윤향하고 균열이 없는 것	윤향하고 균열이 약간 있는 것			
④ 개체당중량	75g 이상	40g 이상	30g 이상	제한없음	
⑤ 피해삼 허용 범위	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	썩은삼, 은피삼 및 주름삼이 아닌 것	좌동	
	· 얽은 적변이나 치유된 흔적이 몸통면적의 20% 이하인 것 · 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 · 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것	· 얽은 적변이나 치유된 흔적이 몸통면적의 20% 이하인 것 · 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 · 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것	· 얽은 적변이나 치유된 흔적이 몸통면적의 20% 이하인 것 · 머리 및 다리부분의 손상이 각각 10% 및 30% 이하인 것 · 부패성이 아닌 병반점이 전체 표면적의 5% 이하인 것 · 적변삼 중 표피가 콜크화된 것 외에 무게가 50g 이상인 것은 포함된다.		
⑥ 혼품 허용 정도(포장단위 기준)	2 등 해당품위 개체가 5% 이내 일 것	3 등 해당품위 개체가 5% 이내 일 것	등외 해당품위 개체가 5% 이내 일 것		

[근기] : 수삼 품질검사 기준(2014년도, 원료사업실)

### 1-3. 그 외의 외관 기준

	항목	기준·규격	비고
1	토사 함유율	0.95% 미만	자체규격
2	줄기 자름(절경)	1cm 미만	자체규격
3	등급 착오율	1 개 등급 착오 10% 미만	자체규격

[근기] : 수삼 품질검사 기준(2014년도, 원료사업실)

### 1-4. 농약 잔류 허용기준

(단위 : ppm)

	성분명	기준		성분명	기준
1	DDT(p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE 의 합)	0.01	36	Buprofezin	0.07
2	Metalaxyl	0.5	37	Cyhalothrin(이성질체의 합)	0.05
3	BHC(α, β 및 δ-BHC 의 합)	0.01	38	Flusilazole	0.07
4	Aldrin & Dieldrin(Aldrin 과 Dieldrin 의 합)	0.01	39	Prochloraz(Prochloraz 와 2,4,6-trichlorphenol 기를 포함하고 있는 대사산물의 합)	0.3
5	Endrin(Endrin 과 δ-keto-endrin 의 합)	0.01	40	Dithianon	0.2
6	Carbendazim(Benomyl, carbendazim 및 thiophanate-methyl)	0.2	41	Cymoxanil*	0.2
7	Quintozene(quintozene, pentachloroaniline and methyl pentachlorophenyl sulfate 의 합계)	0.1	42	Clothianidin	0.2
8	Diethofencarb	0.3	43	Thiamethoxam	0.1
9	Difenoconazole	0.5	44	Ethaboxam	0.2
10	Cypermethrin(이성질체의 합)	0.1	45	Cyfluthrin(이성질체의 합)	0.1
11	Azoxystrobin	0.1	46	Fluazinam	0.7
12	Tolyfluanid	0.20	47	Tebuconazole	0.5
13	Tolclofos-Methyl	1.0	48	Mandipropamid	0.1
14	Iminoctadine	0.1	49	Methoxyfenozide	0.2
15	Pyrimethanil	1.0	50	Metconazole	1.0
16	Fenhexamid	0.3	51	Bifenthrin	0.5
17	Cyazofamid	0.3	52	Sethoxydim	0.05
18	Cyprodinil	2.0	53	Emamectin benzoate(Emamectin benzoate B1a 와 emamectin benzoate B1b 의 합)	0.05
19	Kresoxim-methyl	0.2	54	Etridiazole	3.0
20	(Ethylenebis(dithiocarbamate)s)* Dithiocarbamate 계 농약들의 합	0.3	55	Thiacloprid	0.1
21	Cadusafos*	0.05	56	Propamocarb	0.5
22	Pencycuron*	0.7	57	Hexaconazole	0.5
23	Fludioxonil	0.5	58	Fluopicolide	0.1
24	Carbosulfan(Carbofuran,3-hydroxycarbofuran 의 합)	0.1	59	Triflumizole	0.1
25	Thifluzamide*	1.0	60	Fosetyl-aluminium	2.0
26	Flutolanil*	1.0	61	Simeconazole	0.7
27	Tebupirimfos*	0.01	62	Amisulbrom	0.3
28	Trifloxystrobin	0.1	63	Acetamiprid	0.1
29	Boscalid	0.3	64	Chlorfenapyr	0.1

30	Dimethomorph*(Dimethomorph ((E), (Z)형태의 합)	3.0	65	Dinotefuran	0.05
31	Chlorothalonil*	0.1	66	Carbofuran(Carbofuran 과 3-hydroxycarbofuran 의 합)	0.03
32	Tefluthrin*	0.1	67	Clethodim*(Clethodim, 5-(2-ethylthiopropyl)cyclohexene-3-one 기를 포함하고 있는 대사산물, 5-(2-ethylthiopropyl)-5-hydroxycyclohexene-3-one 기를 포함하고 있는 대사산물 및 각각의 sulfoxide, sulfone 형태의 합)	0.05
33	Fluquinconazole*	0.2	68	Iprovalicarb	0.1
34	Pyraclostrobin	2.0	69	Lindane( $\gamma$ -BHC)	0.01
35	Amitraz(아미트라즈와 (2,4-Dimethylphenyl)-N'-methylformamidine 의 합)	0.05	기타	Procymidone	0.2

[근기] : 식품위생법(인삼의 농약 잔류 허용 기준)

## 2. 홍삼의 원료 기준

### 2-1. 품질 규격

항목		규격	비고								
1	수분(%)	14.0 이하	인삼산업법 기준 : 15.0 이하								
2	회분(%)	5.0이하(미삼의 경우에는 6.0이하일 것)									
3	농약잔류 허용기준 <sup>1)</sup>	농산물품질관리법」 및 「식품위생법」에 따른 인삼의 농약잔류 허용기준에 의할 것	(별지 규격)								
4	중금속(ppm) <sup>2)</sup>	<table border="1"> <tr> <td>Pb</td> <td>As</td> <td>Hg</td> <td>Cd</td> </tr> <tr> <td>2.0이하</td> <td>3.0이하</td> <td>0.2이하</td> <td>0.2이하</td> </tr> </table>	Pb	As	Hg	Cd	2.0이하	3.0이하	0.2이하	0.2이하	「식품위생법」과 「약사법」에 따른 인삼의 중금속 기준 中 중한 기준에 의할 것
Pb	As	Hg	Cd								
2.0이하	3.0이하	0.2이하	0.2이하								
5	이물	인삼류는 원료의 처리과정에서 세척 등으로 제거 가능한 이물과 제조과정에서 오염된 비위생적인 이물을 함유하지 아니할 것									
6	보존료, 인공색소및표백제	검출되지 아니할 것									
7	세균수(cfu/g)	50,000이하	진공포장 한 제품은 3,000이하								
8	대장균군	음성일 것									
9	내용량	표시량 이상일 것									
10	인삼 성분	n-부탄올 추출물 (조사포닌)의 함량(%)	본삼류 2.0이상 대미,중미류, 분쇄인삼 3.0이상 세미류 5.0이상								
		뮌에탄올 추출물의 함량(%)	18.0이상								
11	진세노사이드 함량(mg/g)	Rg1: 0.10이상, Rb1: 0.20이상									

2-2. 농약잔류 허용기준(mg/kg)

	성분명	기준		성분명	기준
1	DDI(pp'-DDI, $\alpha$ p'-DDI, pp'-DDD, pp'-DDE의 합)	0.05	36	Buprofezin	0.56
2	Metalaxyl	0.5	37	Cyhalothrin(이성질체의 합)	0.4
3	BHC( $\alpha$ , $\beta$ 및 $\delta$ -BHC의 합)	0.05	38	Flusilazole	0.56
4	Aldrin & Dieldrin(Aldrin과 Dieldrin의 합)	0.05	39	Prochloraz(Prochloraz와 2,4,6-trichlorophenol 기를 포함하고 있는 대사산물의 합)	2.4
5	Endrin(Endrin과 $\delta$ -keto-endrin의 합)	0.05	40	Dithianon	1.6
6	Carbendazim(Benomyl, carbendazim 및 thiophanate-methyl)	0.5	41	Cymoxanil*	0.2
7	Quintozene(quintozene, pentachloroaniline and methyl pentachlorophenyl sulfate의 합계)	0.5	42	Clothianidin	1.6
8	Diethofencarb	0.3	43	Thiamethoxam	0.8
9	Difenoconazole	0.5	44	Ethaboxam	1.6
10	Cypermethrin(이성질체의 합)	0.1	45	Cyfluthrin(이성질체의 합)	0.3
11	Azoxystrobin	0.5	46	Fluazinam	5.6
12	Tolyfluanid	0.01	47	Tebuconazole	4.0
13	Tolclofos-Methyl	2.0	48	Mandipropamid	0.8
14	Iminoctadine	0.2	49	Methoxyfenozide	1.6
15	Pyrimethanil	0.3	50	Metconazole	8.0
16	Fenhexamid	0.3	51	Bifenthrin	4.0
17	Cyazofamid	0.3	52	Sethoxydim	0.4
18	Cyprodinil	5.0	53	Emanectin benzoate(Emanectin benzoate BIa와 emanectin benzoate BIb의 합)	0.4
19	Kresoxim-methyl	1.0	54	Etridiazole	24.0
20	(Ethylenebis(dithiocarbamate)s) * Dithiocarbamate계 농약들의 합	0.3	55	Thiacloprid	0.8
21	Cadusafos*	0.1	56	Propamocarb	4.0
22	Pencycuron*	0.7	57	Hexaconazole	4.0
23	Fludioxonil	3.0	58	Fluopicolide	0.8
24	Carbosulfan (Carbofuran,3-hydroxycarbofuran의 합)	0.3	59	Triflumizole	0.8
25	Thifluzamide*	2.0	60	Fosetyl-aluminium	16.0
26	Flutolanil*	1.0	61	Simeconazole	5.6
27	Tebupirimfos*	0.01	62	Amisulbrom	2.4
28	Trifloxystrobin	0.2	63	Acetamiprid	0.8
29	Boscalid	2.4	64	Chlorfenapyr	0.8
30	Dimethomorph*(Dimethomorph ((E), (Z)형태의 합)	3.0	65	Dinotefuran	0.4
31	Chlorothalonil*	0.1	66	Carbofuran(Carbofuran과 3-hydroxycarbofuran의 합)	0.24
32	Tefluthrin*	0.1	67	Clethodim*(Clethodim, 5-(2-ethylthiopropyl)cyclohexene-3-one기를 포함하고 있는 대사산물, 5-(2-ethylthiopropyl)-5-hydroxycyclohexene-3-one기를 포함하고 있는 대사산물 및 각각의 sulfoxide, sulfone 형태의 합)	0.05
33	Fluquinconazole*	0.2	68	Iprovalicarb	0.8
34	Pyraclostrobin	16.0	69	Lindane( $\gamma$ -BHC)	0.1
35	Amitraz(아미트라즈와 (2,4-Dimethylphenyl)-N'-methylformamidine의 합)	0.4	기타	Procymidone	1.6

### 2-3. 중금속 기준 비교(식품위생법 vs. 대한민국약전)

	Pb	As	Hg	Cd
식품위생법	2.0이하	-	-	0.2이하
대한민국 약전	5.0이하	3.0이하	0.2이하	0.3이하

### 3. 홍삼농축액 원료 기준규격

기준규격	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정상 : 암갈색의 농축액으로서 이미, 이취가 없어야 한다.</li> <li>- 고형분 : 64%</li> <li>- 진세노사이드 Rg1과 Rb1 및 Rg3(s)의 합(원료성제품) : 표시량(5.5mg/g) 이상</li> <li>- 세균수 : 1g 당 300 cfu 이하</li> <li>- 대장균군 : 음성</li> </ul>
------	---

※ 본 품질기준에 정하지 않은 사항은 식품공전 등 해당 법령의 기준에 따른다.

### 4. 홍삼 농축액 분말 원료 기준규격

기준규격	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 정상 : 암갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 함.</li> <li>- 수분 : 4.3 ± 1.5%</li> <li>- 입도 : #100 mesh 92% 이상 통과</li> <li>- 진세노사이드 Rg1과 Rb1 및 Rg3(s)의 합(원료성제품) : 표시량(7 mg/g) 이상</li> <li>- 세균수 : 1g 당 300 cfu 이하</li> <li>- 대장균군 : 음성</li> </ul>
------	--

※ 본 품질기준에 정하지 않은 사항은 식품공전 등 해당 법령의 기준에 따른다.

### 5. 첨가제 기준 규격

타블렛 제조 시 들어가는 첨가제는 다음과 같다.

첨가 원료	함량	첨가제 용도
자당지방산에스테르 (Sucrose Esters of Fatty Acids)	1.1%	<b>유화제</b> : 물과 기름처럼 혼합되지 않는 두 액체를 안정하게 혼합시켜 장시간 유화상태를 유지할 수 있도록 한다.
스테아린산 (Stearic acid)	1%	<b>유화제</b> : 물과 기름처럼 혼합되지 않는 두 액체를 안정하게 혼합시켜 장시간 유화상태를 유지할 수 있도록 한다.
히드록시프로필메틸셀룰로오스 (Hydroxypropylmethyl Cellulose)	0.9%	<b>안정제(코팅제)</b> : 식품에 대한 점착성을 증가시키고, 유화안정성을 증가시킨다. 가열이나 보존 중의 변화에 관여해 신선도를 유지하고 형태를 보존하는데 도움을 주며 식품의 식감이나 촉감을 좋게 한다.



품질관리기준서(Quality Control Manual)

	환경모니터링 (Environmental Monitoring)	문서번호	KQM-008
		개정번호	1
		시행일자	■■■■
		페이지	3 / 6

**1 목적 (PURPOSE)**  
이 규정은 ㈜한국인삼공사의 제조 작업장 청정도를 구분에 따른 환경모니터링을 실시함으로써 작업장 위생환경을 유지하여 위생적이며 안전한 제품을 생산하는데 그 목적이 있다.

**2 적용범위 (SCOPE)**  
본 규정은 ㈜한국인삼공사에서 청정도를 구분하여 관리되는 모든 작업장에 해당한다.

**3 관련문서 (RELATED DOCUMENTS)**  
없음

**4 참고문헌 (REFERENCES)**  
4.1 건강기능식품 GMP매뉴얼 (2008)

**5 용어정의 (DEFINITIONS)**  
5.1 환경모니터링  
작업장 환경의 상태와 그 변화를 기록하기 위한 과학적으로 계획된 연속적 측정과 관측을 말한다.

**6 책임 (RESPONSIBILITY)**  
6.1 제조관리책임자  
청정도관리를 위해 각 공정담당자를 책임장별로 청정도관리 담당자로 지정하여 위생 전반에 관하여 점검 확인하여야 한다.  
6.2 품질관리책임자

㈜한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

품질관리기준서(Quality Control Manual)

	환경모니터링 (Environmental Monitoring)	문서번호	KQM-008
		개정번호	1
		시행일자	■■■■
		페이지	4 / 6

환경평가 담당자에게 작업장 청정도별로 환경평가(낙하균, 표면균, 부유입자)측정을 주기별로 수행하게 하여 그 결과에 따라 청반칙인 조치를 해당 공정담당자에게 지시하여 개선토록 해야 한다.

**7 절차 (PROCEDURE)**  
7.1 청정도 구분  
7.1.1 작업장별 청정도 구분 및 기준은 위생관리기준서 청정도 기준(KHM-001-SOP-001)을 따른다.  
7.1.2 청정도별 환경 모니터링 항목 및 주기

정 도	측정항목		측정주기	비 고	
	GMP	HACCP			
1A 급 2 급	정결 구역	낙하균 표면균 부유입자	분기별 1 회	* 표면균은 제품의 내용물과 직접 닿는 기계에 대해서만 필요시 측정 * GMP 와 HACCP 청정도가 일치하지 않는 작업장은 상위 수준의 측정 항목, 주기 적용	
	3 급	일반 구역			낙하균 표면균
					필요시

7.2 낙하균 측정방법  
7.2.1 낙하균 측정방법(KQM-008-SOP-003)에 따라 측정을 실시한다.  
7.2.2 측정결과를 해당양식에 기록한다.

7.3 표면균 측정방법  
7.3.1 표면균 측정방법(KQM-008-SOP-004)에 따라 측정을 실시한다.  
7.3.2 측정결과를 해당양식에 기록한다.

7.4 부유입자 측정  
7.4.1 부유입자 측정방법(KQM-008-SOP-001)에 따라 측정을 실시한다.  
7.4.2 측정결과를 해당양식에 기록한다.

7.5 부유균 측정

㈜한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

품질관리기준서(Quality Control Manual)

	환경모니터링 (Environmental Monitoring)	문서번호	KQM-008
		개정번호	1
		시행일자	■■■■
		페이지	5 / 6

7.5.1 부유균 측정방법(KQM-008-SOP-002)에 따라 측정을 실시한다.  
7.5.2 측정결과를 해당양식에 기록한다.

**7.6 조치계통도**

```

    graph TD
      A[시험계획 수립 및 시행 : 품질관리부서 환경평가 담당자] --> B[↓]
      B --> C[시험기록서 작성(낙하균, 표면균, 부유입자) : 품질관리부 환경평가 담당자]
      C --> D[↓]
      D --> E[시험결과 승인 및 조치 통보 : 품질관리책임자]
      E --> F[↓]
      F --> G[조치계획 수립 : 제조관리책임자]
      G --> H[↓]
      H --> I[조치실시 : 각 공정관리담당자 및 작업실 담당자]
      I --> J[↓]
      J --> K[조치확인 및 결과 통보 : 제조관리책임자]
    
```

7.6.1 이상시 조치사항  
7.6.1.1 낙하균  
낙하균이 자체적인 기준보다 오염되었다고 품질관리 책임자가 인정한 경우 낙하균 측정방법에 따라 조치한다.  
7.6.1.2 표면균  
표면균이 자체적인 기준보다 오염되었다고 품질관리 책임자가 인정한 경우 표면균 측정방법에 따라 조치한다.  
7.6.1.3 부유입자  
부유입자가 자체적인 기준보다 오염되었다고 품질관리 책임자가 인정한 경우 부유입자 측정방법에 따라 조치한다.  
7.6.1.4 부유균  
부유균이 자체적인 기준보다 오염되었다고 품질관리 책임자가 인정한 경우 부유입자 측정방법에 따라 조치한다.

㈜한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

품질관리기준서(Quality Control Manual)

	환경모니터링 (Environmental Monitoring)	문서번호	KQM-008
		개정번호	1
		시행일자	■■■■
		페이지	6 / 6

**8 첨부문서 (APPENDIX)**  
8.1 첨부 I : 환경평가 (낙하균, 부유입자) 측정위시도 (KQM-008-A01)  
8.2 첨부 II : 환경모니터링 관리일지(낙하균, 표면균, 부유입자) (KQM-008-F01)

㈜한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

※ 보안상의 사유로 관리자 등 블랭크 처리 함



## 1-2. 낙하균 측정

- 낙하균 : 공기 중에서 낙하되는 세균으로 공기 중에 부유, 낙하하고 있는 상태에서 먼지나 수증기 등에 미생물들이 부착되어 생존하고 있으며, 주로 제조과정 중 제품 표면에 부착되어 영향을 주고 세균수가 먼지의 농도에 정비례된다는 사실로 미루어보아 공기 청정도와 밀접한 관계가 있는 것으로 조사되고 있다.

- 측정방법

### ① 배지 및 배양 조건

구 분	배 지	배 양 조 건
세균용	Triptic Soy Agar (TSA)	30~35℃, 2일간
진균용	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	20~25℃, 5일간
대장균(균)용	3M Film (Coliform Count Plates)	30~35℃, 2일간

② 사용기구 : 페트리접시(직경 9cm), 3M Film(Coliform Count Plates), Incubator, Colony counter

③ 측정위치 : 작업실의 오염상태를 파악할 수 있는 최적 장소를 선택하여 벽에서 30cm 정도 떨어지게 한다.

④ 한번 선정된 위치는 변동시키지 않는 것을 원칙으로 하며 각 작업실별 측정위치는 측정위치도에(Fig. XX) 따른다.

⑤ 측정주기 : 규정된 측정 주기에 따른다.(환경모니터링 규정7.1.3 청정도별 환경모니터링 측정 항목 및 주기)

⑥ 노출 시간 및 방법 : 해당 작업장의 미생물오염 정도를 충분히 측정할 수 있는 시간으로 설정하며 오염원 정도에 따라 측정시간을 조정한다.

⑦ 청정도에 따른 노출시간 : 청정도가 높은 100,000class인 작업장은 1시간으로 설정하며 청정도가 낮고, 오염도가 높은 작업실은 환경조건에 맞추어 노출시간을 조정한다.

청 정 도	1A급, 2급		
노출시간	1시간(대장균(균)용은 15분)		
측정시점	작업 전	작업개시 30분 전	
	작업 후	타정/분쇄/제환실	종료 후 1시간 이후
		기타 작업장	종료 후 30분 이후

⑧ 배양접시 뚜껑에 측정위치 번호를 기록하고 뚜껑의 속 부분이 밑으로 향하게 한다.

⑨ 노출 위치별로 세균용 배지 1개, 진균용 배지 1개, 대장균(균)용 배지 1개씩 놓는다.

⑩ 측정결과와 계산 및 조치

- 측정결과와 계산

배양종료 후 측정위치별로 배양접시당 세균 및 진균의 집락수를 Colony Counter를 사용하여 측정하며 단위시간당 균 집락수를 산출하여 청정도 등급별로 구분하여 낙하균수를 계산하여 판정한다.

- 결과의 조치 및 기록유지

측정결과가 미생물 오염으로 인하여 해당 작업에 부적당하다고 판정된 경우 조치 계통도에 따라 개선될 수 있도록 조치를 취한다. 시험결과 및 조치결과는 청정도 관리일지에 작성하여 2년간 보관한다.

**1-3. 부유입자 측정**

- 부유입자 : 대기 중에부유하는 입경이 0.5 $\mu$ m 이상의 고체 또는 액체의입자상 물질

- 측정방법

① 일반 기기 사용기구 : 부유입자 측정기기(Particle counter)

② 측정입자의 크기 :0.5 $\mu$ m 이상의 미립자

③ 측정주기 : 규정된 측정 주기에 따른다. (KQM-008환경모니터링 7.1.3 청정도 별 환경 모니터링 항목 및 주기)

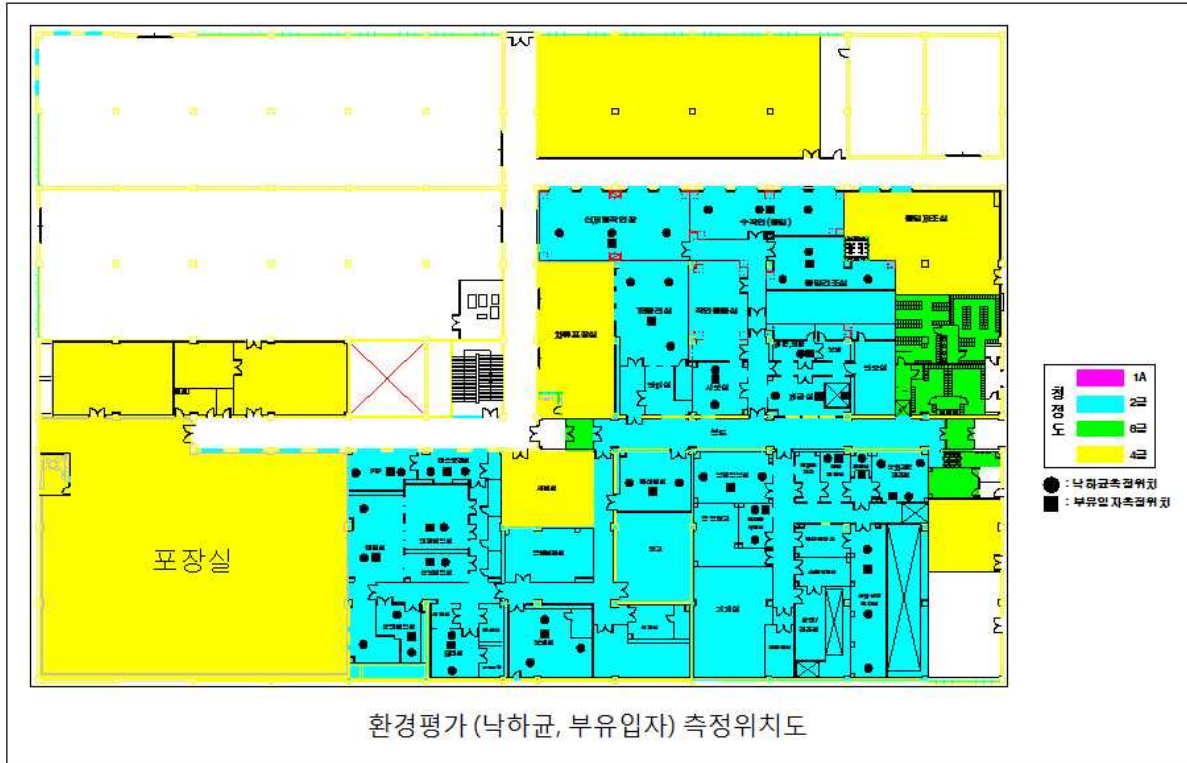
④ 측정위치는 주로 작업이 수행되는 장소를 감안하며 전체에 걸쳐 균등하게 분포 되도록 한다.

⑤ 측정 높이는 정상작업 시 작업이 이루어지는 위치를 기준으로 한다.

⑥ 한 작업실에서 1분씩 5회 측정하며 각각 다른 위치에서 0.1cubic-foot양을 흡입 측정한다.

⑦ 측정결과와 계산 및 조치 : 작업실의 측정위치 별 측정값을 출력하여 평균을 구한다.

⑧ 결과의 조치 및 기록유지 : 측정결과가 부유입자 오염에 인하여 해당 작업에 부적당하다고 판정된 경우 조치 계통도에 따라 개선될 수 있도록 조치를 취한다. 시험결과 및 조치결과는 청정도 관리일지에 작성하여 2년간 보관한다.



#### 1-4. 부유균 측정

##### - 측정 방법

- ① 미생물 배양 조건 : 적절한 배지를 선택한 후 배양 시간과 온도를 결정한다.
- ② 배지 성장 촉진 시험(media growth promotion test) : 사용 배지는 배양하고자 하는 미생물이 100 CFU (colony-forming units) 미만으로 접종 되어도 성장이 가능하여야 함.
- ③ 검체채취 장소(sampling sites) : 제품과의 근접도, 제품과의 접촉 및 마개-용기 시스템의 오염가능성이 높은 지역을 검체채취 장소로 결정함.
- ④ Class 100 지역의 부유균 측정은 해당 장치(biosafety cabinet, laminar flow booth, laminar flow hood 등)의 정기적인 revalidation 시에 시행함.
- ⑤ 검체채취 빈도수 : KQM-008 환경모니터링 7.1.3 청정도별 환경모니터링 항목 및 주기 참조
- ⑥ 미생물 관리 기준

Class	공기 1 입방 미터 당 CFU
100	< 1
10,000	< 20
100,000	< 200

- ⑦ 소독용 알코올로 공기 채취 장치를 닦고, 밸리데이션된 방법으로 멸균된 후 배지 성장 촉진 시험(media growth promotion test)을 통과한 배지가 담긴 페트리 디쉬와 함께 부유균 측정 지역으로 반입함.

- ⑧ 공기채취장치 내에 배지가 담긴 페트리 디쉬를 설치함.
- ⑨ 공기채취장치를 작동하여 1,000L 의 공기를 흡입하여 부유균 검체를 채취함.  
이때 Class 100,000 이상의 경우(청정도가 낮은 지역), 시험의 효율성을 고려하여 1,000L 의 공기 흡입대신 공기 흡입 량과 미생물 허용기준을 함께 조정하여 밸리데이션 후 시행할 수 있음.
- ⑩ 페트리 디쉬를 공기채취장치에서 꺼내어 정해진 방법에 따라 배양함.
- ⑪ 배양 후 부유균의 CFU 수를 확인함.
- ⑫ 시험 결과가 관리 수준을 벗어난 경우
  - 경계 수준을 벗어난 경우 : 품질관리실에서는 원인에 대하여 조사를 하여 필요 시 시정 조치를 취함.
  - 조치 수준을 벗어난 경우 : 품질관리실에서는 일탈보고서를 작성하고 원인에 대하여 조사를 하고 시정 조치를 취함.

### 1-5. 표면균 측정

#### - 측정 방법

- ① 배지 및 배양 조건 : 낙하균 측정법에 준한다.
- ② 사용기구 : 표면균 측정용 KIT(Komed, easy swab), ATP측정기, 핀셋, 알콜 램프
- ③ 측정주기 : 규정된 측정 주기에 따른다.(환경모니터링7.1.3 청정도별 환경 모니터링 항목 및 주기)
- ④ 표면균 측정용 KIT를 10× 10cm<sup>2</sup>의 목적표면에 약 4~5회 문지른 후 KIT에 다시 넣어 침출한다.
- ⑤ 침출한 액 1ml씩을 평판 배양법에 따라 시험한다.
- ⑥ 침출액이 너무 혼탁되어 있을 경우 10배 또는 100배 희석한 후 침출액으로 한다.
- ⑦ 측정결과의 계산 및 조치
  - 측정결과의 계산 : 배양종료 후 측정위치별로 배양접시당 세균 및 진균의 집락수를 Colony Counter를 사용하여 측정 후 산출한다.
  - 결과의 조치 및 기록유지 : 측정결과가 미생물 오염으로 인하여 해당 작업에 부적당하다고 판정된 경우 조치 계통도에 따라 개선될 수 있도록 조치를 취한다. 시험결과 및 조치결과는 청정도 관리일지에 작성하여 2년간 보관한다.

### 2. 환경 모니터링 관리

- 환경 모니터링은 관리일지와 표면균 측정일지를 통하여 관리되고 있으며, 1년에 4회 실시하여 환경 모니터링 분석결과를 통계분석, 보관하고 있고 그 예시는 아래와 같다.



## 2-3. 환경모니터링 경향 분석

 환경모니터링 경향분석 (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
	작성일자	████████
	페이지	1 / 7

### 환경모니터링 경향분석 (주)한국인삼공사 고려인삼창

구분	부서	성명	서명	일자
작성	품질2팀	████████		████████
검토	품질2팀	████████		
	품질1팀	████████		
승인	품질보증책임자	████████		

주)한국인삼공사

Korea Ginseng Corporation

 환경모니터링 경향분석 (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
	작성일자	████████
	페이지	2 / 7

목 차

1 목적 (PURPOSE)	3
2 적용범위 (SCOPE)	3
3 측정항목 및 기준 (MONITORING ITEM AND SPECIFICATION)	3
4 결과 (RESULT)	3
5 개선방안 (IMPROVEMENT PLAN)	6

주)한국인삼공사

Korea Ginseng Corporation

 환경모니터링 경향분석 (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
	작성일자	████████
	페이지	3 / 7

#### 1 목적 (PURPOSE)

- 1.1 본 환경모니터링 경향분석은 주)한국인삼공사 고려인삼창의 작업실중 계몽이 직접 노동하는 정장지역에 대해 실시한 환경모니터링 결과를 리뷰하여 적정한 환경이 늘 유지되는지 확인하고자 함이며 문제가 있는 작업실에 대해서는 조치를 취하기 위해 작성되었다.

#### 2 적용범위 (SCOPE)

- 2.1 2010년에 실시한 환경모니터링 결과

#### 3 측정항목 및 기준 (Monitoring Item and Specification)

##### 3.1 측정항목 및 기준

측정항목	정정도	1A			2			3		
		면적	2곳	2곳	96곳	96곳	10곳	10곳	10곳	
부유입자(작업시)	0.5~5um/ft <sup>3</sup>	≤100	≤100	≤100,000	N/A					
부유입자(비작업시)	0.5~5um/ft <sup>3</sup>	≤100	≤100	≤1,000,000	N/A					
낙하균(일반세균)	cfu/9cm <sup>2</sup> /hr	≤0	≤0	≤20	≤50					
낙하균(진균)	cfu/9cm <sup>2</sup> /hr	≤1	≤1	≤20	≤50					
표면균	cfu/10X10cm <sup>2</sup>	-	-	-	-					

##### 3.2 측정주기

- 3.2.1 부유입자, 낙하균 : 1회/3개월  
3.2.2 표면균 : 필요시

#### 4 결과 (RESULT)

- 4.1 2010년 환경모니터링은 4회 실시되었다. (2월, 4월, 8월, 12월)
- 4.2 부유입자는 해당 작업실의 부유입자 측정시 작업유무에 따라 비작업시, 작업시로 측정되어 4회 실시한 자료로 비교분석이 불가능 하고 낙하균은 비교분석이 가능하다.
- 4.3 부유입자  
4.3.1 Worst한 결과를 보이는 측정위치

주)한국인삼공사

Korea Ginseng Corporation

 환경모니터링 경향분석 (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
	작성일자	████████
	페이지	4 / 7

월	비작업시		작업시	
	측정위치	부유입자수	측정위치	부유입자수
2월	없음		없음	
4월	갑상중현실	████████	PTP중현실	████████
8월	갑상중현실	████████	PTP중현실	████████
12월	없음		물류청고콜린부스	████████

#### 4.3.2 원인분석

##### 4.3.2.1 갑상중현실

- 4.3.2.1.1 갑상중현실유류 청소대기 상태에서 측정하여 수진시 발생하면 분진이 공조 가동에 따라 비산 하여 부유입자측정 값에 영향을 끼침
- 4.3.2.1.2 향후 측정시 청소유류된 상태에서 측정할 것

##### 4.3.2.2 PTP중현실

- 4.3.2.2.1 PTP중현실과 포장실 사이의 틈이 커져 자압이 적절히 걸리지 않아 포장실에서 PTP중현실로 공기가 역유하여 발생한 것으로 판단됨
- 4.3.2.2.2 PTP가 현에이어벨트를 타고 포장실로 넘어가는 틈을 최소화 함

##### 4.3.2.3 물류청고콜린부스

- 4.3.2.3.1 분말 샘플링을 하고 있던 중으로 원로 분말이 비산하여 부유입자 측정값에 영향을 끼침
- 4.3.2.3.2 Class 100,000 지역에서 분진이 날리는 작업시에 측정된 결과는 유의성이 없는 결과이므로 향후 측정시에는 가급적 비작업시에 측정할 것

#### 4.4 낙하균

##### 4.4.1 Worst한 결과를 보이는 측정위치

월	1A급 지역		2급 지역		3급 지역	
	세균	진균	세균	진균	세균	진균
2월						
4월						
8월						
12월						

주)한국인삼공사

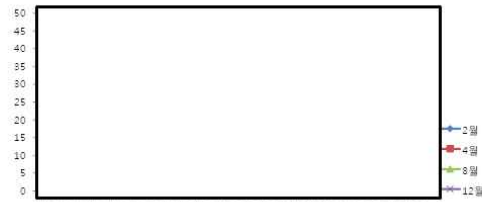
Korea Ginseng Corporation

	<b>환경모니터링 경향분석</b> (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
		작성일자	██████
		페이지	5 / 7

4.4.2 경향  
4.4.2.1 계측



4.4.2.2 진동



대한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

	<b>환경모니터링 경향분석</b> (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
		작성일자	██████
		페이지	6 / 7

4.4.3 원인분석

- 4.4.3.1 2급 지역  
상정화개관식과 파우더배합실은 물을 사용하는 작업실로 습도가 높아 낙하균이 많이 검출될 것으로 판단된다. 파우더배합실은 항상 습도가 높고 온도가 높기 때문에 깨끗한 청소를 통해 균을 관리할 필요가 있다.
- 4.4.3.2 3급 지역  
농축액 라인에 그 특성상 물을 항상 사용하고 습도 온도가 높다 또한 원료인 종살이 상온된 원료가 아니기에 세균 번식이 발육하기 좋은 조건을 제공한다. 하지만 이곳은 일폐된 탱크에서 농축이 이뤄지기 때문에 위험이 되지는 않는다.

5 개선방안 (IMPROVEMENT PLAN)

- 5.1 개선방안
- 5.1.1 청정실(1A, 2급지역)은 정해진 청소방법대로 청소하고 청결한 상태를 늘 유지하도록 한다.
- 5.1.2 2급지역도 필요한 경우 24시간 공조를 가동하여 청정도를 유지할 필요가 있다.
- 5.1.3 물을 사용하는 작업실은 물 사용후 물기를 제거하여 세균의 번식을 억제한다.
- 5.1.4 청정도가 바뀌는 지역은 자갈을 1.5mmH<sub>2</sub>O 이상 걸리게 하여 공기의 역류를 방지한다.
- 5.1.5 일상적인 청소로 세균을 제어할수 없을경우 해당 작업실에 대한 소독을 검토한다.
- 5.1.6 농축액제조실은 물, 원료로 인한 세균을 관리하기 어려운 지역이나 일폐된 탱크에서 제조되며 그온으로 유지되기에 세균으로 인한 위험가능성이 극히 희박하므로 별도의 Alert limit, Action limit을 적용시키지 않는다.

5.2 Alert limit, Action limit의 설정

5.2.1 복수일차

	1A	2	비고
Alert limit	25	50,000	1A급 지역은 작업실, 2급 지역은 비작업실
Action limit	50	80,000	기준으로 한다.

5.2.2 낙하균(세균, 진균)

	1A	2	3	비고
Alert limit	-	10	25	농축액제조실과 같이 일폐된 탱크등에서 제조하는 경우 예외로한다.
Action limit	1(진균)	15	40	

5.3 기준조각시 조치방법

- 5.3.1 측정원에 작업실의 상태(작업중, 청소중, 비작업중)를 확인하여 청정등급 및

대한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

	<b>환경모니터링 경향분석</b> (Environmental Monitoring Trend Analysis)	문서번호	KEMT-20111
		작성일자	██████
		페이지	7 / 7

- 측정항목에 맞게 작업상태에 따라 측정한다.
- 5.3.2 Alert limit
- 5.3.2.1 Alert limit 초과시 별도의 조치는 필요치 않다.
- 5.3.2.2 2회 연속 초과시 Action을 취한다.
- 5.3.3 Action limit
- 5.3.3.1 Action limit을 초과할 경우 조치를 취해야 한다.
- 5.3.3.2 원인을 조사하고 대책을 수립, 실시한다.
- 5.3.3.3 조치완료후 재측정을 실시하여 기준내에 들어오는지 확인하고 그 결과를 문서화 한다.

대한국인삼공사 Korea Ginseng Corporation

※ 한국인삼공사 고려인삼창 전체적인 환경모니터링 결과로 회사 보안상 블랭크 처리 함

### 3. 국제기준 부합 지표물질 표준품 분리정제 및 분석법 확립

#### 1. 지표물질 표준품 11종 분리, 정제

##### 1-1. Ginsenoside Rg3(S), Rb3(R)의 분리를 위한 사포닌 분획 제조

시료인 홍삼 농축액 2 kg을 증류수 5 L를 이용하여 3시간 동안 교반하며 녹여 시료를 준비하여 HP20을 이용한 column chromatography를 실시하였다. HP20 25L를 컬럼에 패킹한 후 아세톤 20 L를 넣고 30분간 활성화 시킨 후 증류수를 이용하여 아세톤 냄새가 나지 않을 때까지 닦아 주었다. (약 100L 사용) 준비된 시료를 컬럼에 흡착시키기 위해 30분간 정치하였다. 50 L 증류수를 가하여 용해되어 나오는 분획을 모아 두고, 30% 에탄올 20L를 가하여 용해되어 나오는 분획을 모아두었다. 마지막으로 100% 에탄올 각 20 L를 가하여 용해되어 나오는 분획을 감압 농축하여 사포닌 분획을 제조하였다 (약 110 g, 수율 5.5%). 이와 같은 방법으로 6회 반복하여 다량의 사포닌 분획을 확보하였다.

확보된 사포닌 분획을 이용하여 대량 컬럼을 이용한 1차 HPLC를 수행하였다. 1회 분리에 사용되는 전체 용출 시간은 90분이며, 조건은 아래와 같다.

#### - 기기 조건

HPLC	YMC LC-Forte/R
Detector	UV (203nm)
Column	YMC Actus Triart-C18 (250 X 30 mm)
Run Time	90 min
Flow Rate	30.0 ml/min
inj. vol.	10 ml

#### - 용매 조건

Time (min)	A % (H2O)	B % (Acetonitrile)
0	80	20
10	80	20
12	68	32
32	68	32
33	72	28
65	72	28
66	10	90
80	10	90
81	80	20
90	80	20



HPLC는 반자동 시스템으로 운영되었으며, 반복적으로 수행하여 진세노사이드 Rg1과 Rg를 함유한 분획 1(8.3 g), Rf와 Rg2s를 함유한 분획 2(6.1 g), Rb1과 Rc를 함유한 분획 3(7.9 g), Rh2, Rb2, Rd를 함유한 분획 4(15.3 g), Rg3s와 Rg3r을 함유한 분획 5(10.8 g)을 확보하였다.

확보된 복합물 분획을 각각 이용하여 순수 진세노사이드를 얻기 위하여 아래와 같은 방법을 수행하였다.

### 1. Ginsenoside Rg1, Re의 순수 분리 정제

1차 HPLC를 이용하여 확보된 사포닌 Rg1, Re가 다량 함유되어 있는 것으로 판단되는 분획물을 이용하여 C18 column (YMC C-18, 250 x 10 mm)을 이용하여 HPLC를 실시하여(용매 시스템 : 75% AcCN in DW) 사포닌 Rg1과 Re를 분리 하였으며, 각각의 물질들의 순수하게 정제하기 위하여 2차 HPLC (용매시스템 : 50% MeOH in DW)를 실시하여 순수한 Rg1 (2.2g)과 Re (2.1 g)을 얻을 수 있었다.

물질의  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HR-TOF MS 등을 측정하였으며, 의 분광학적 자료들을 (Fig 7, 8) 바탕으로 문헌들의 참고자료들과 비교한 결과 ginsenoside Rg1, Re 임을 확인 할 수 있었다.

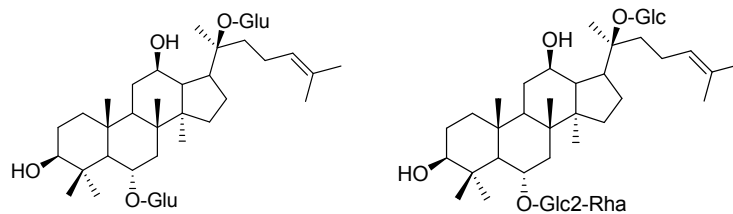


Fig 5.1. Structure of Ginsenoside Rg1 & Ginsenoside Re

### 2. Ginsenoside Rf와 Rg2s의 순수 분리 정제

1차 HPLC를 이용하여 확보된 사포닌 Rf, Rg2s가 다량 함유되어 있는 것으로 판단되는 분획물을 이용하여 C18 column (YMC C-18, 250 x 10 mm)을 이용하여 HPLC를 실시하여(용매 시스템 : 75% AcCN in DW) 사포닌 Rf과 Rg2s를 분리 하였으며, 각각의 물질들의 순수하게 정제하기 위하여 2차 HPLC (용매시스템 : 50% MeOH in DW)를 실시하여 순수한 Rgf (2.0g)과 Rg2s (2.0 g)을 얻을 수 있었다.

물질의  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HR-TOF MS 등을 측정하였으며, 의 분광학적 자료들을 (Fig 9, 15) 바탕으로 문헌들의 참고자료들과 비교한 결과 ginsenoside Rf, Rg2s 임을 확인 할 수 있었다.

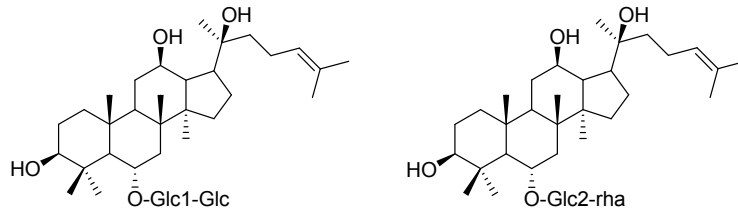


Fig 5.2. Structure of Ginsenoside Rf & Ginsenoside Rg2(20S)

### 3. Ginsenoside Rb1, Rc의 순수 분리 정제

1차 HPLC를 이용하여 확보된 사포닌 Rb1, Rc가 다량 함유되어 있는 것으로 판단되는 분획물을 이용하여 C18 column (YMC C-18, 250 x 10 mm)을 이용하여 HPLC를 실시하여(용매 시스템 : 50% AcCN in DW) 사포닌 Rb1과 Rc를 분리 하였으며, 각각의 물질들의 순수하게 정제하기 위하여 2차 HPLC (용매시스템 : 45% MeOH in DW)를 실시하여 순수한 Rg1 (2.0g)과 Re (2.1 g)을 얻을 수 있었다.

물질의  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HR-TOF MS 등을 측정하였으며, 의 분광학적 자료들을 (Fig 10, 11) 바탕으로 문헌들의 참고자료들과 비교한 결과 ginsenosede Rb1, Rc 임을 확인 할 수 있었다.

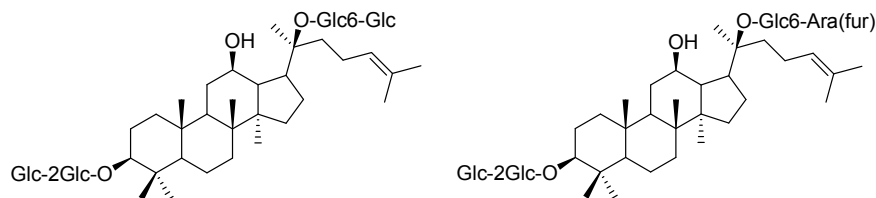


Fig 5.3. Structure of Ginsenoside Rb1 & Ginsenoside Rc

### 4. Ginsenoside Rh2, Rb2, Rd의 순수 분리 정제

1차 HPLC를 이용하여 확보된 사포닌 Rh2, Rb2, Rd가 다량 함유되어 있는 것으로 판단되는 분획물을 이용하여 C18 column (YMC C-18, 250 x 10 mm)을 이용하여 HPLC를 실시하여(용매 시스템 : 50% AcCN in DW) 사포닌 Rg1과 Re를 분리 하였으며, 각각의 물질들의 순수하게 정제하기 위하여 2차 HPLC (용매시스템 : 40% MeOH in DW)를 실시하여 순수한 Rh2, Rb2, Rd를 각각 1.0 g 얻을 수 있었다.

물질의  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HR-TOF MS 등을 측정하였으며, 의 분광학적 자료들을 (Fig 12-14) 바탕으로 문헌들의 참고자료들과 비교한 결과 ginsenosede Rh2, Rb2, Rd 임을 확인 할 수 있었다.

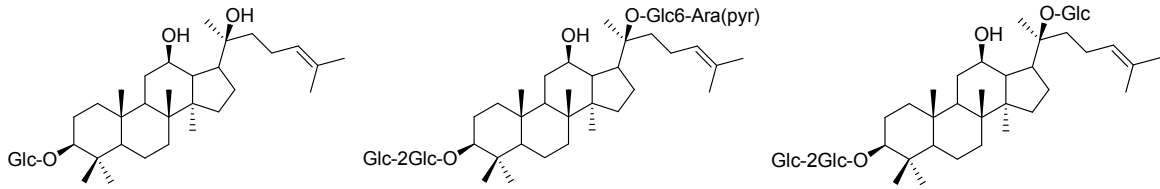


Fig 5.4. Structure of Ginsenoside Rh2, Rb2 Rd

5. Ginsenoside Rg3s, Rg3r의 순수 분리 정제

Ginsenoside Rg3이 다량 함유되어 있는 것으로 판단되는 PD fraction을 이용하여 2회에 걸친 silica column chromatography를 실시하였다 (1차; Chloroform : Methanol : Distilled Water = 70 : 30 : 5, 2차; Chloroform : Methanol : Ethyl Acetate : Distilled Water = 2 : 2 : 4 : 1). 1, 2차 silica column chromatography를 통해 분리 되어진 분획을 TLC를 이용하여 ginsenoside Rg3의 존재 유무를 확인 한 후, C18 column chromatography (45% AcCN in DW) 를 실시하여 ginsenoside Rg3 (20S)과 (20R)가 포함된 물질을 (4 g)을 정제하였다 (Fig 6). ginsenoside (20S)과 (20R)를 정제하기 위해서는 물질의 물리화학적 특성을 이용하여 분리할수 있었다. ginsenoside(20S)의 경우 차가운 물에 잘 녹으나 (20R)는 잘 녹지 않는 성질을 이용하여 분리하였다.

먼저, 믹스처 상태의 ginsenoside(20S)과 (20R)를 잘 건조하여 수분이 포함되어 있지 않도록 한 후 차가운 물을 넣어 녹인 후 빠르게 필터하여 녹아진 ginsenoside(20S)과 녹지 않은 ginsenoside(20R)를 분리해 내었다. 이 방법으로 3회 반복 실험하여 순수한 ginsenoside(20S) 2g과 (20R) 1g을 얻을 수 있었다.

물질의 1H NMR, 13C NMR, HR-TOF MS 등의 분광학적 자료들을 (Fig 16, 17) 바탕으로 문헌들의 참고자료들의 비교한 결과 ginsenosede Rg3(20S), (20R) 임을 확인 할 수 있었다.

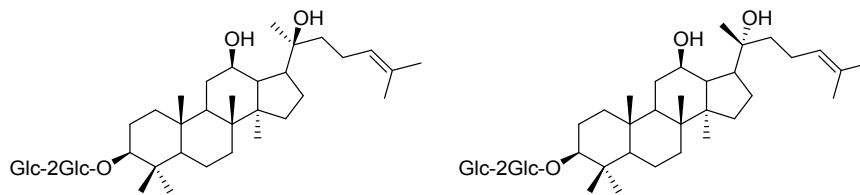


Fig 5.5. Structure of Ginsenoside Rg3(20S) & Ginsenoside Rg3(20R)

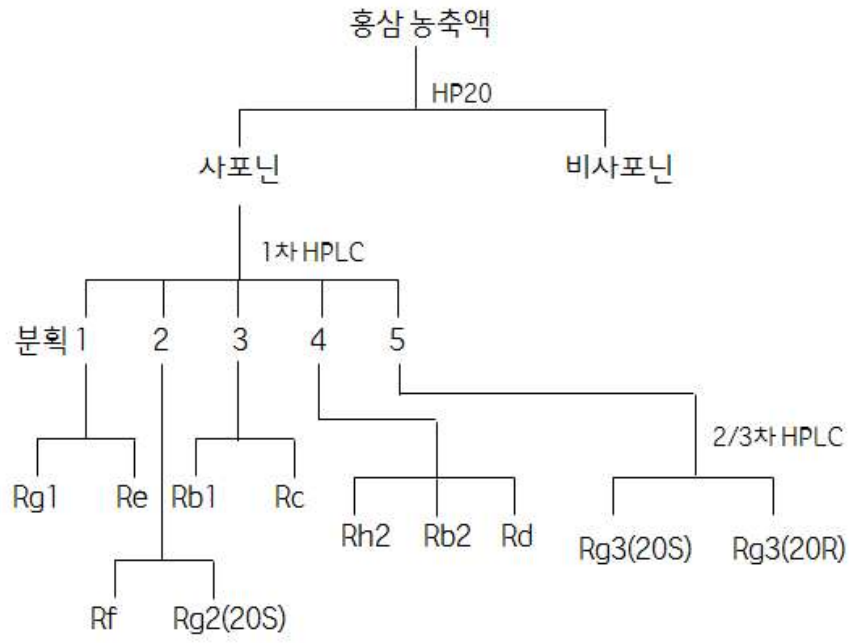


Fig 6. Ginsenoside 11종 분리 scheme

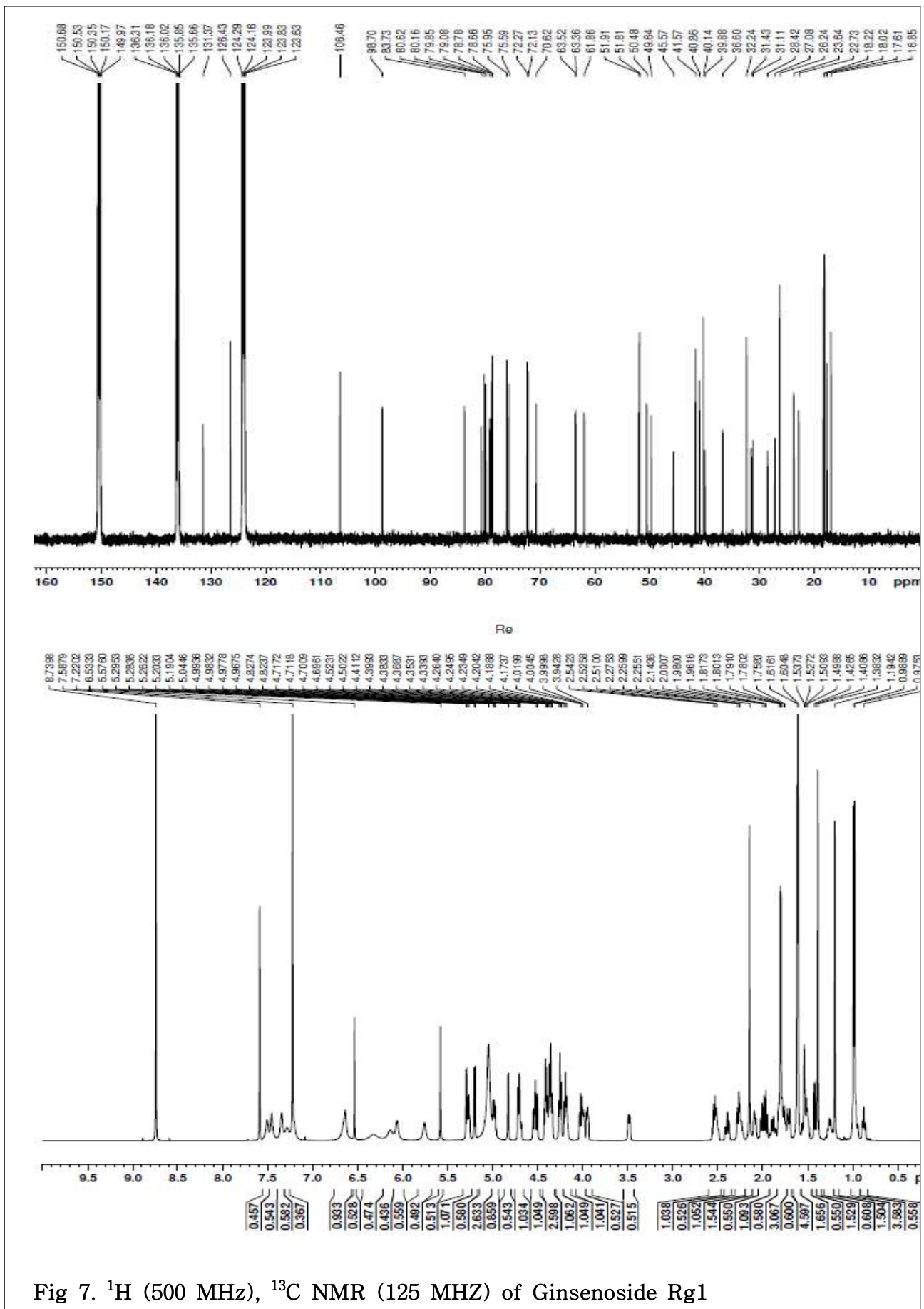


Fig 7. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rg1

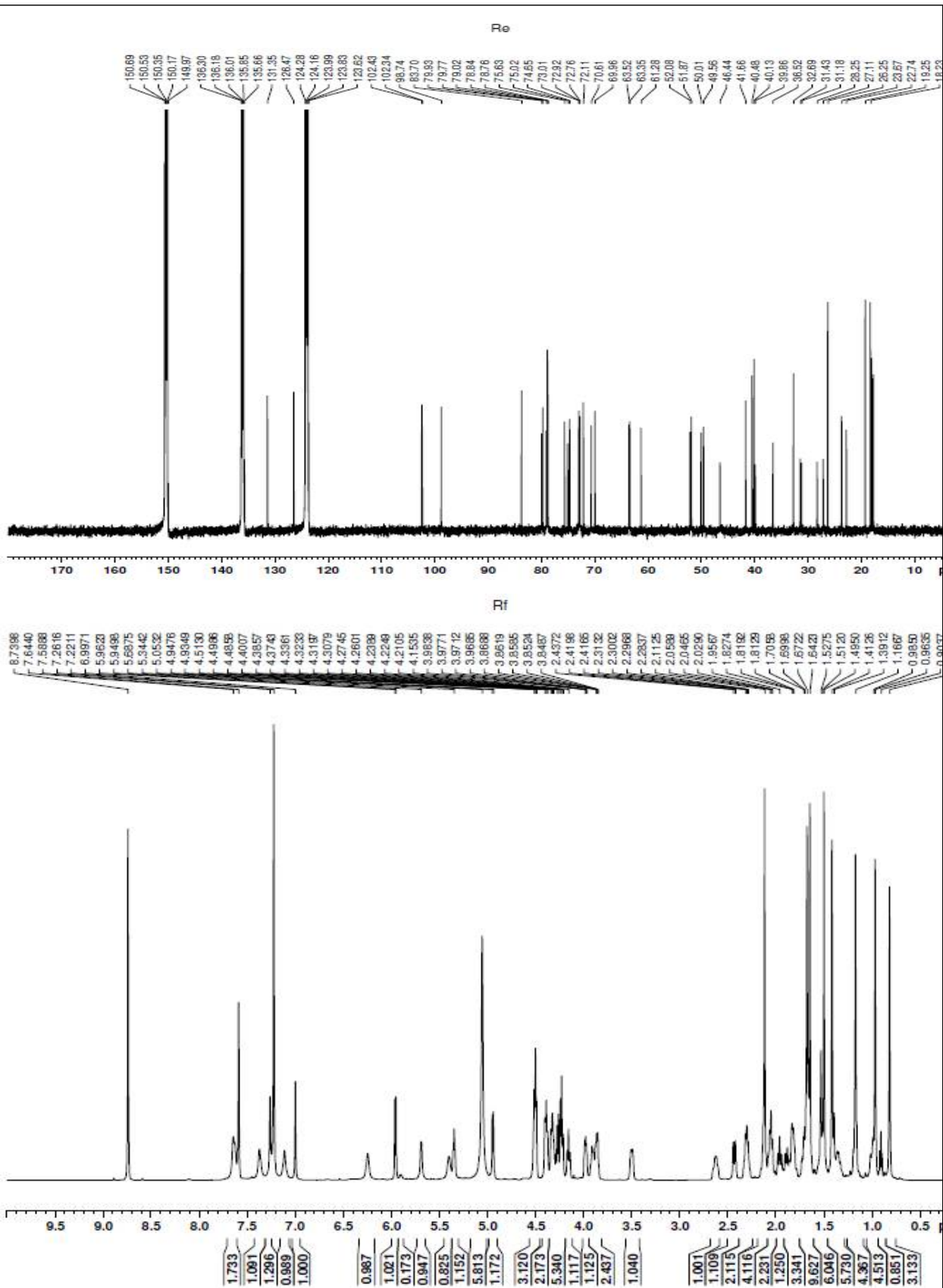


Fig 8. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Re

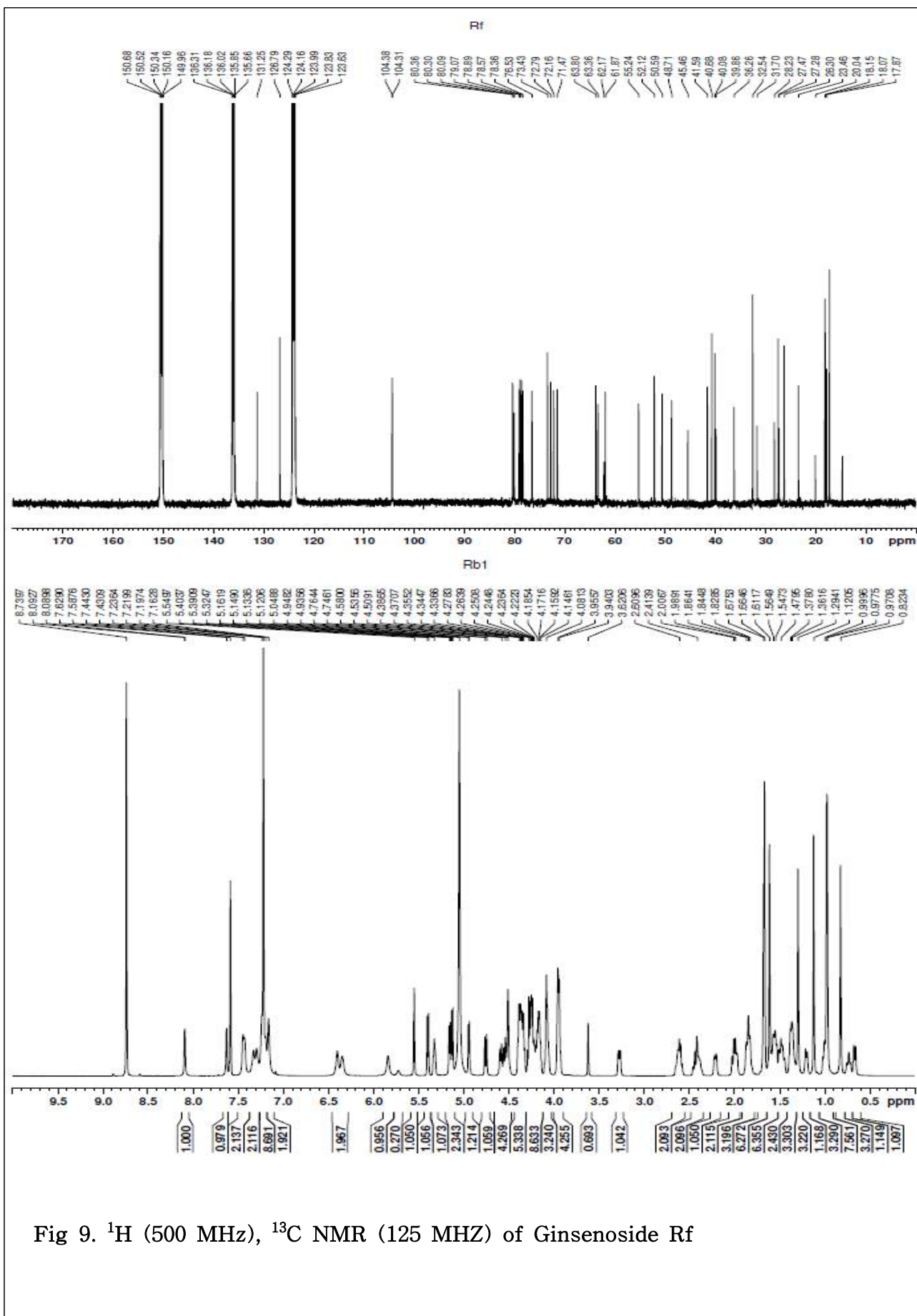


Fig 9. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rf

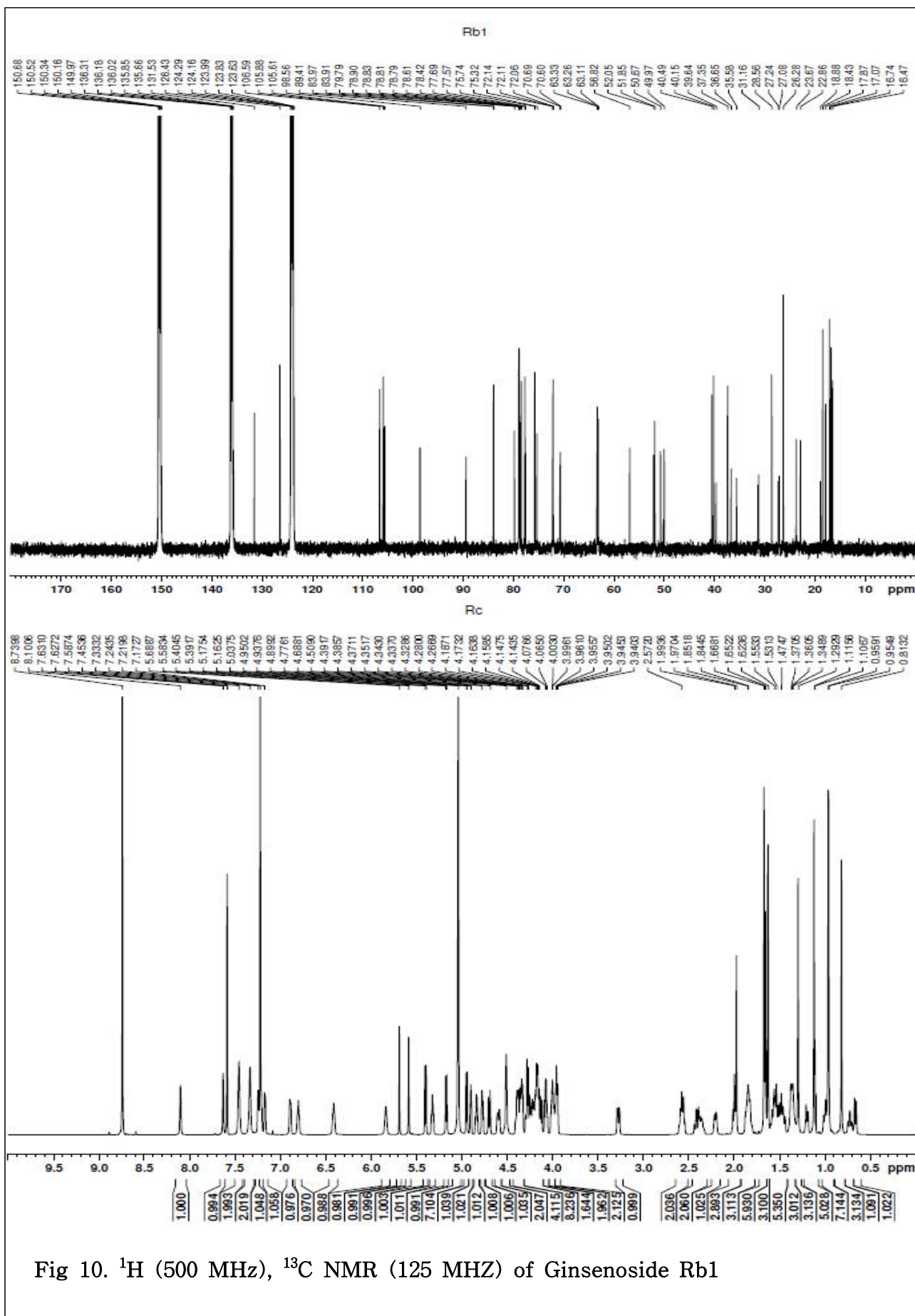


Fig 10. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rb1



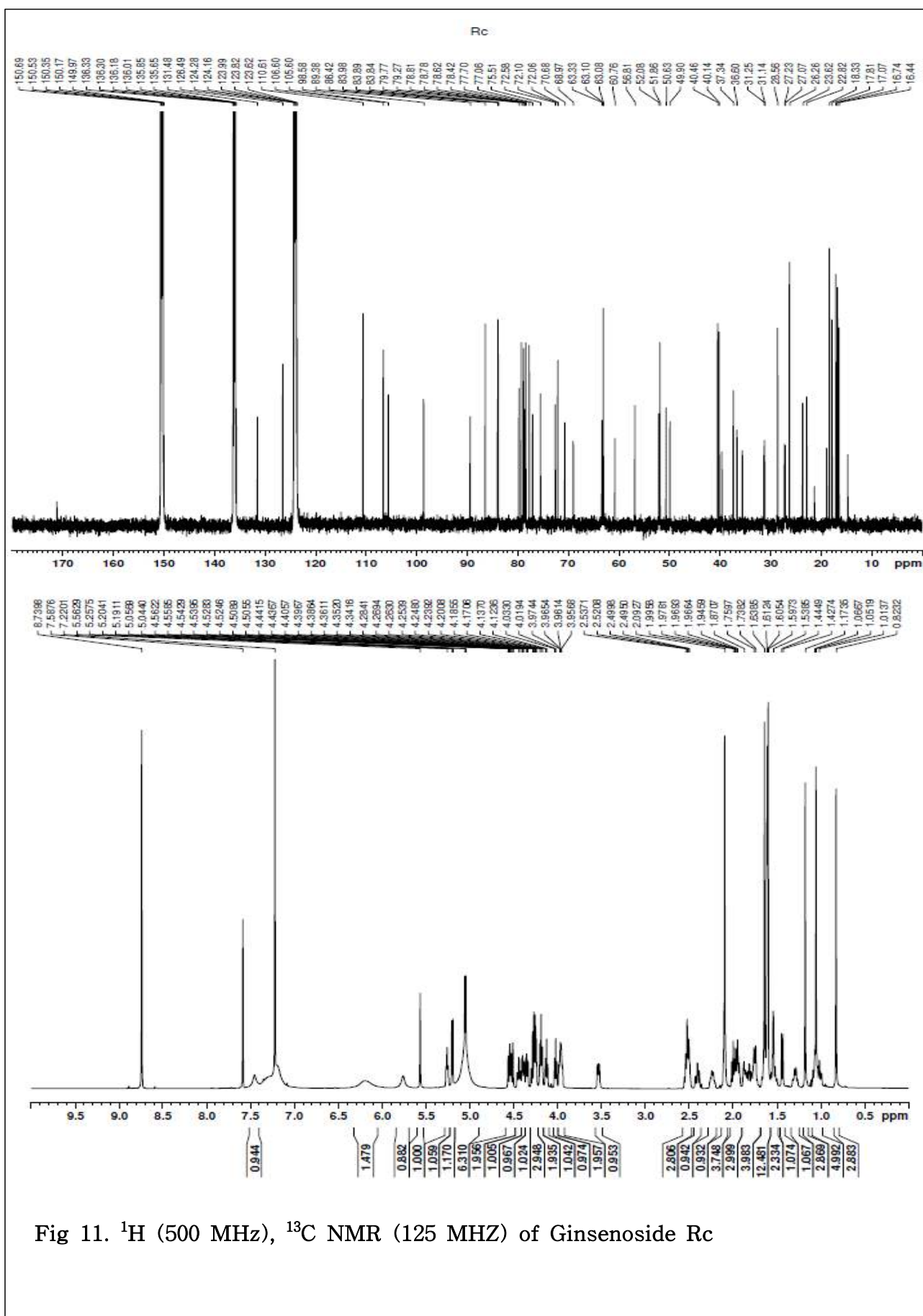


Fig 11. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rc

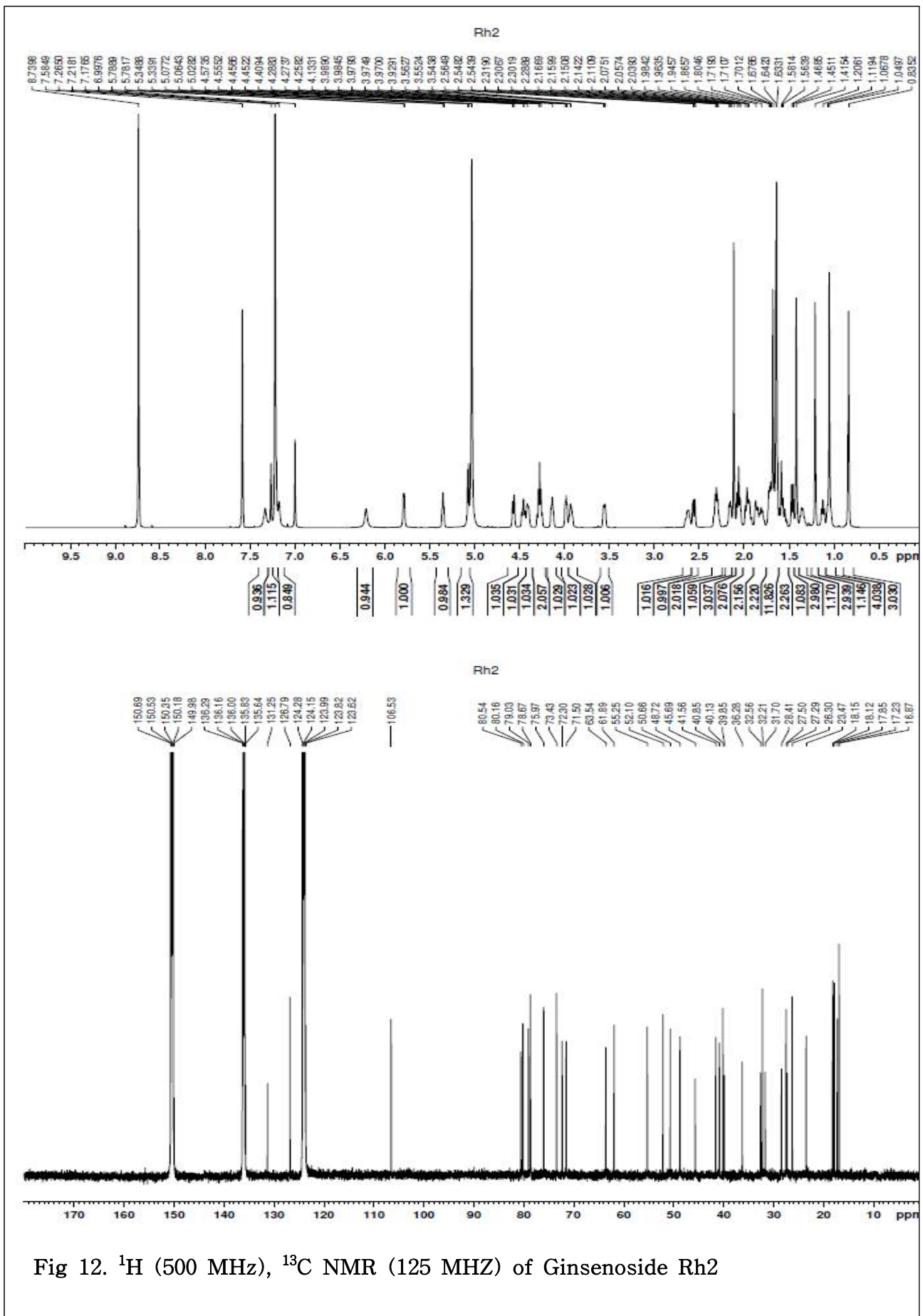


Fig 12. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rh2

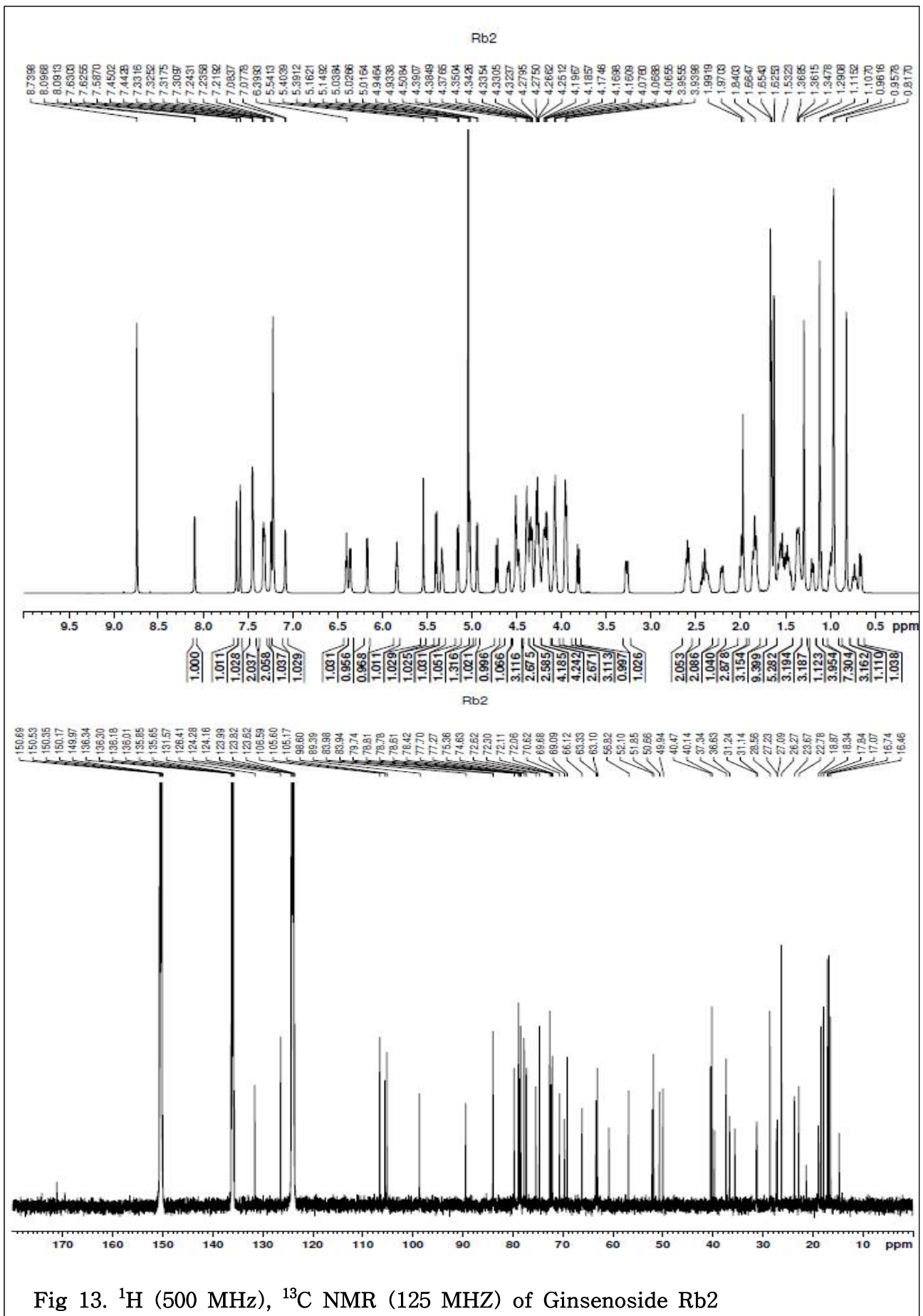


Fig 13. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rb2

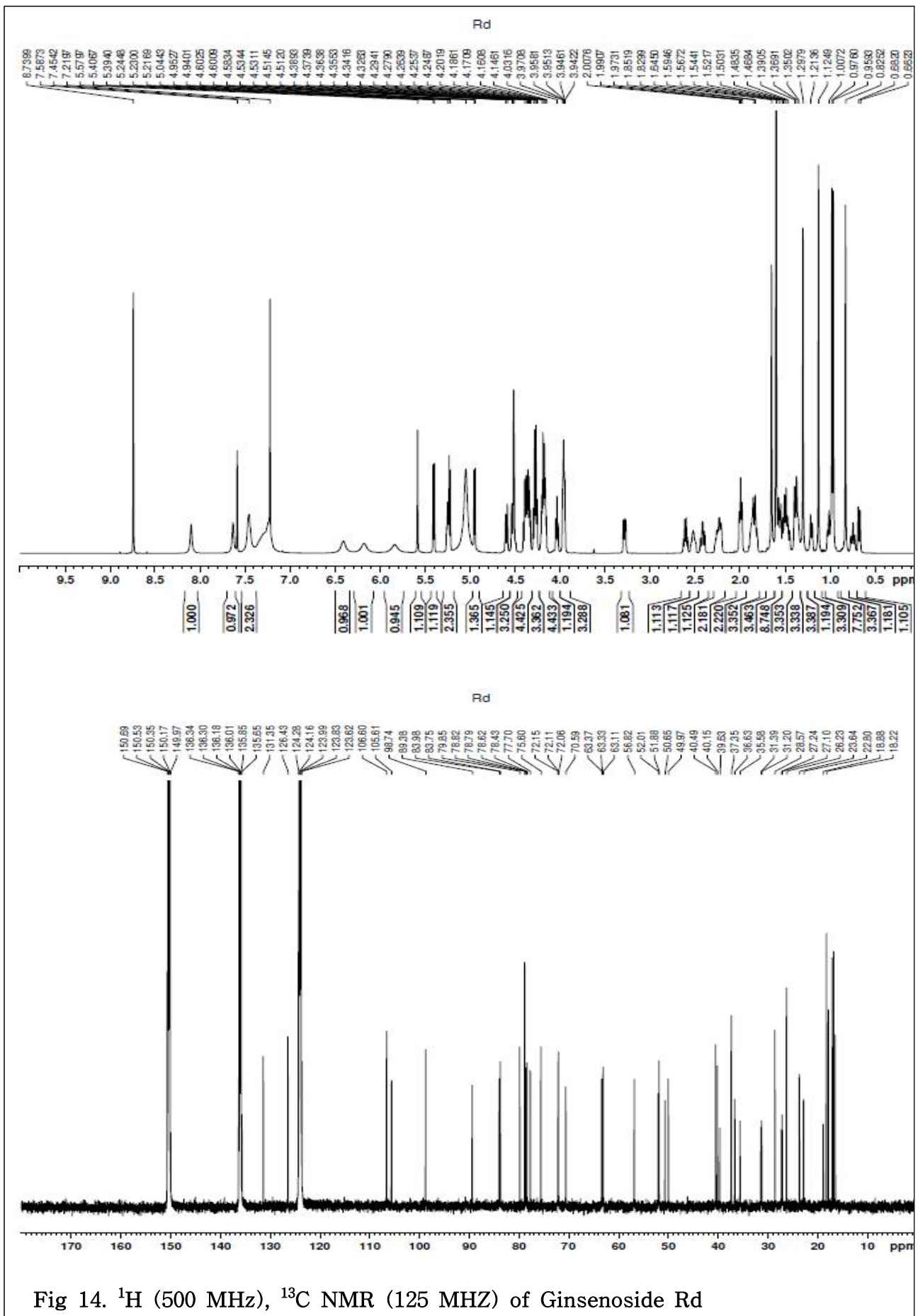


Fig 14. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rd

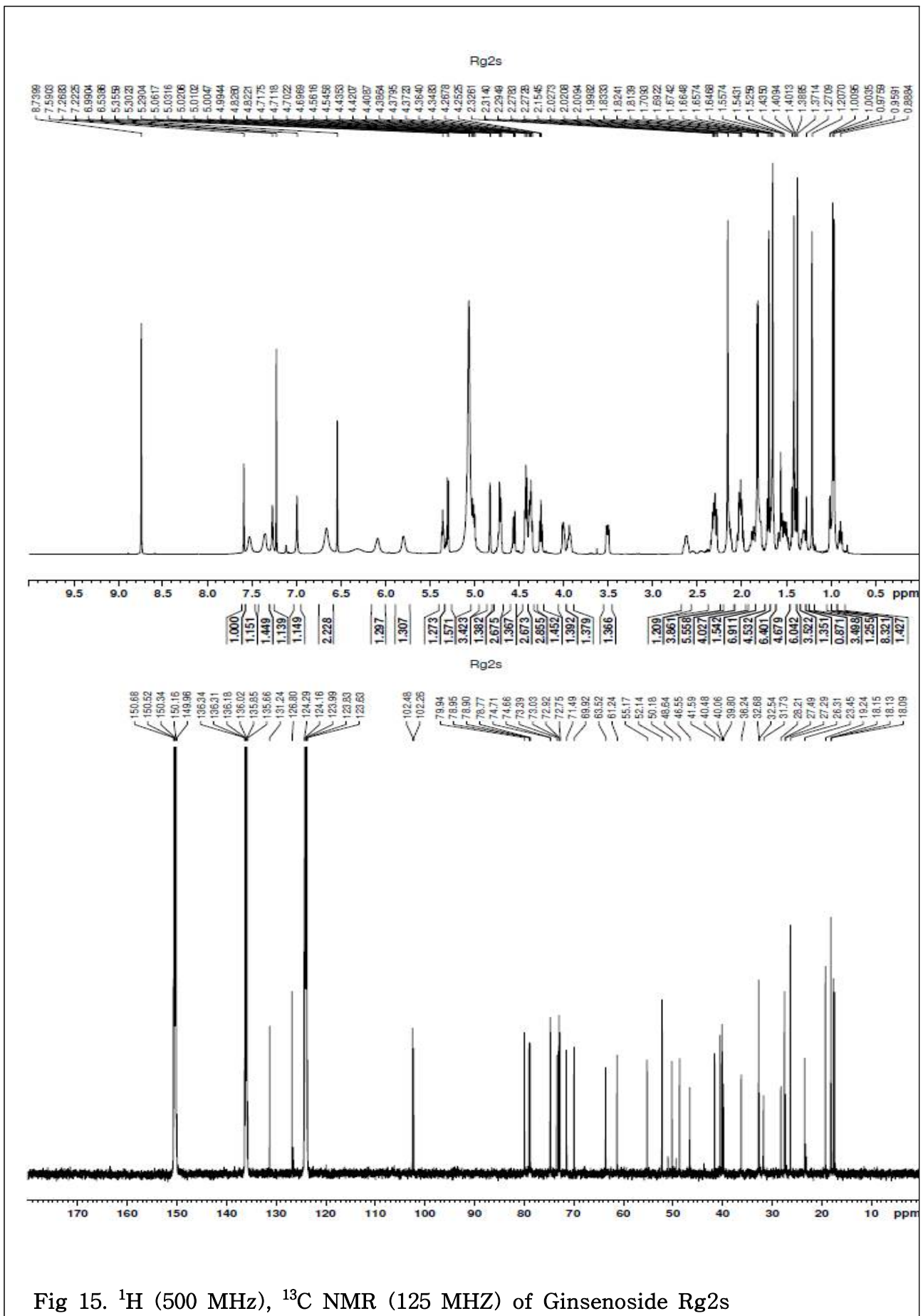


Fig 15. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rg2s

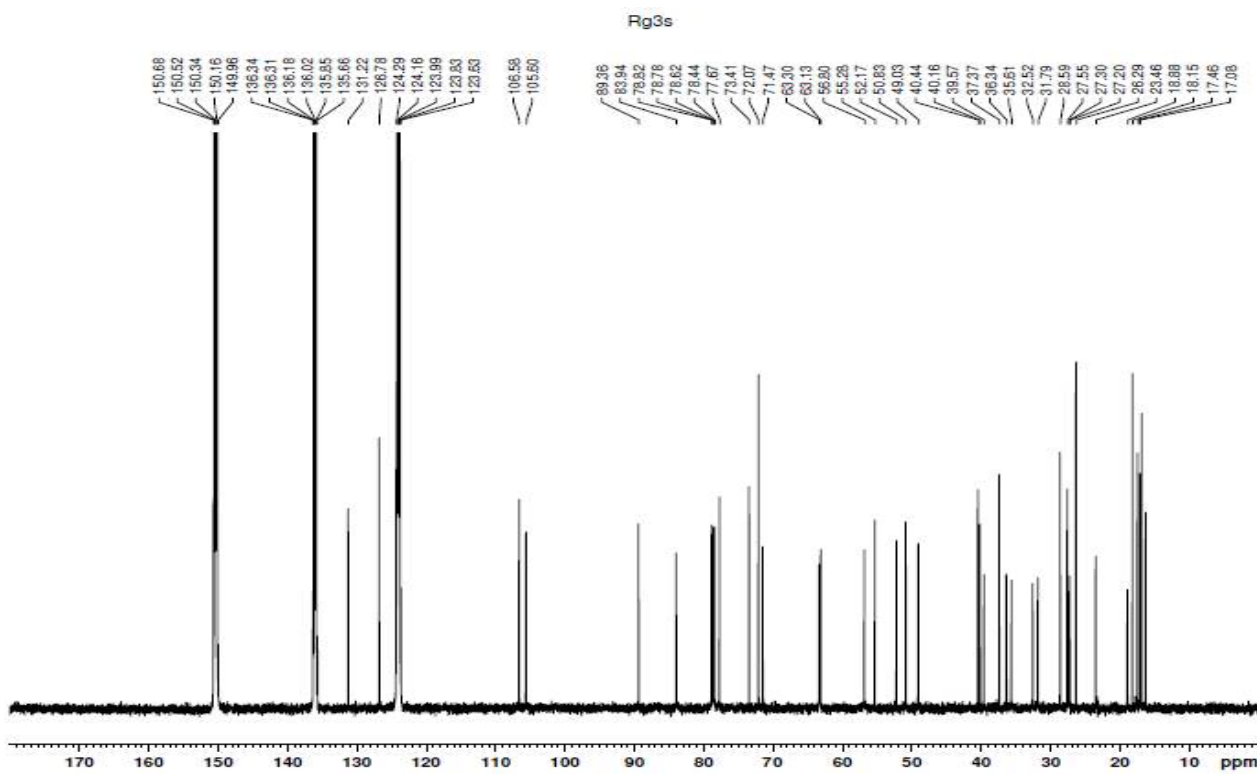
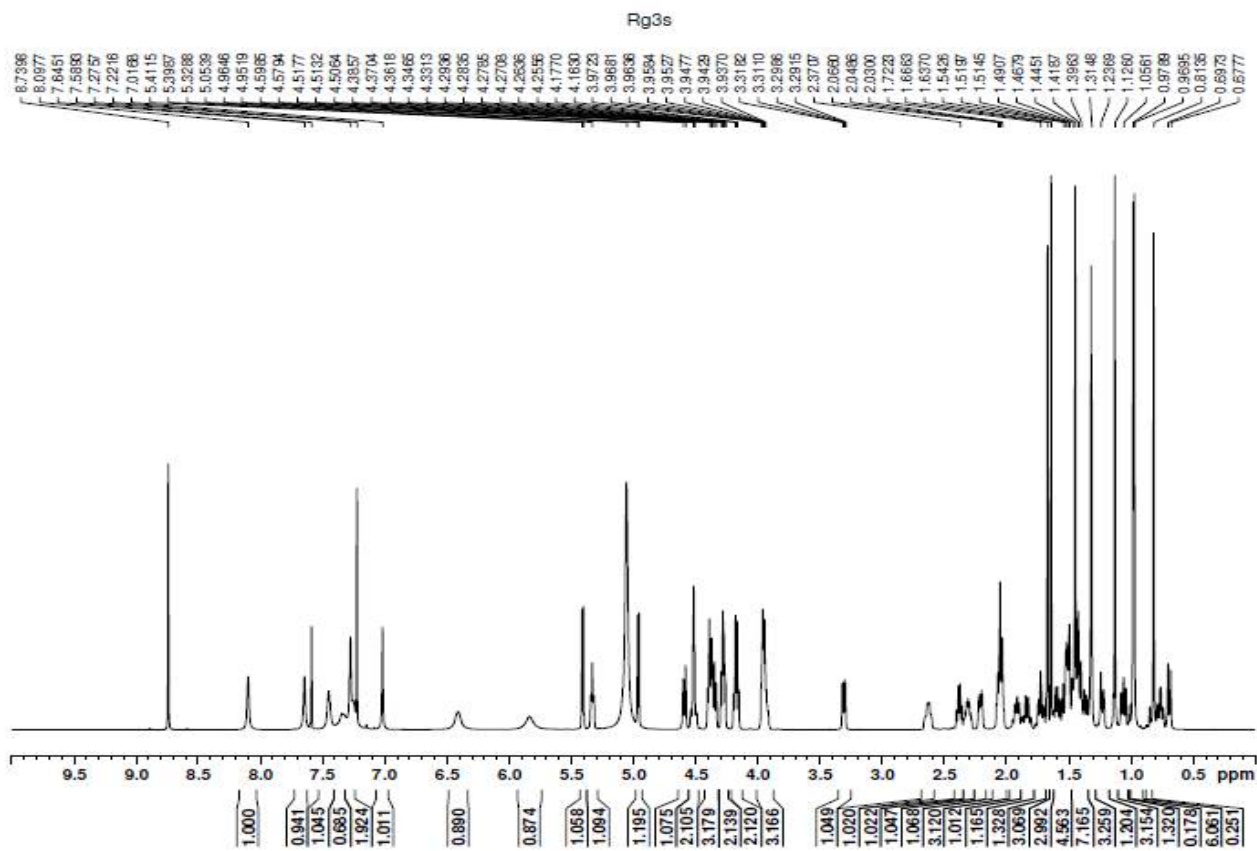


Fig 16.  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rg3(20S)

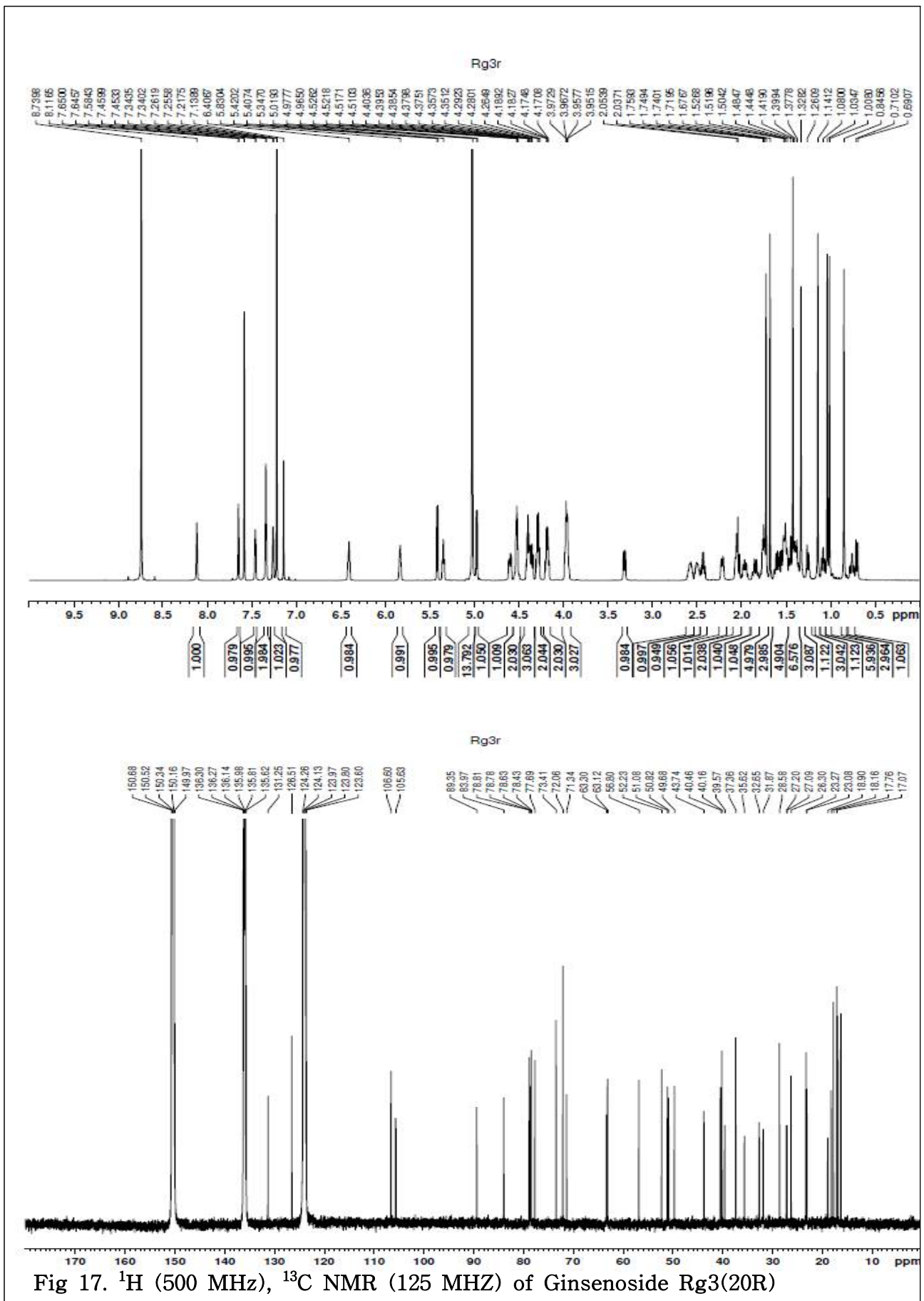


Fig 17. <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) of Ginsenoside Rg3(20R)

## 2. 지표물질 확보

분리된 진세노사이드 11종 (Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rh2, Rb2, Rd, Rg2s, Rg3s, Rg3r) 의 품질기준규격은 아래의 Table과 같다. 분리된 진세노사이드들은 모두 95% 이상의 순도를 보였으며 성상은 백색 분말로 확인시험결과 UV 203nm에서 96 % 이상이었고 TLC 확인 결과 주어진 시료 외에 반점은 확인되지 않았다.

**Table 1. Ginsenoside Rg1의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 801.01
순도	98.31 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 2. Ginsenoside Re의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 947.15
순도	99.9%
건조감량	1.0% 이하
Normalization	UV 203nm에서 96% 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 3. Ginsenoside Rf의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 801.01
순도	95.33 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.



**Table 4. Ginsenoside Rb1의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 1109.29
순도	99.8 %
건조감량	1.0% 이하
Normalization	UV 203nm에서 96% 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 5. Ginsenoside Rc의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 1079.27
순도	99.27 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 6. Ginsenoside Rh2의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 622.87
순도	97.81 %
건조감량	1.0% 이하
Normalization	UV 203nm에서 96% 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 7. Ginsenoside Rb2의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 1079.27
순도	98.5 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 8. Ginsenoside Rd의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 963.17
순도	95.9 %
건조감량	1.0% 이하
Normalization	UV 203nm에서 96% 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 9. Ginsenoside Rg2(20S)의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 785.02
순도	95.6 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 10. Ginsenoside Rg3(20S)의 품질 규격**

성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 785.01
순도	98.8%
건조감량	1.0% 이하
Normalization	UV 203nm에서 96% 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.

**Table 11. Ginsenoside Rg3(20R)의 품질 규격**

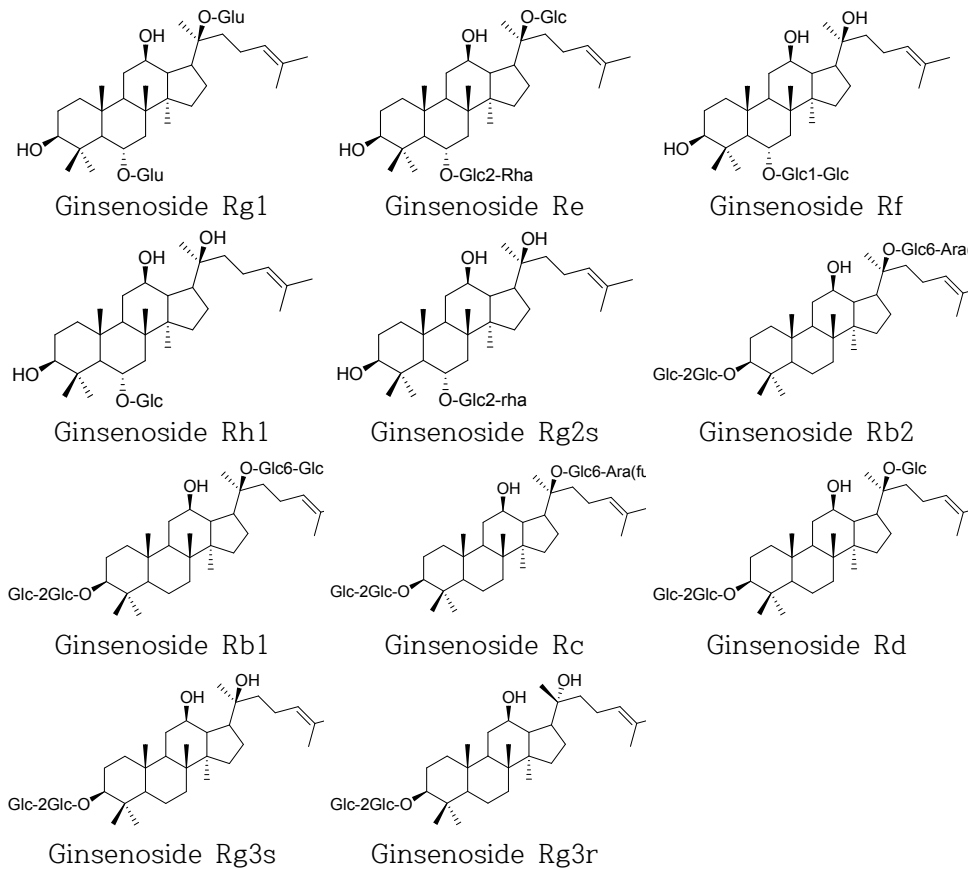
성상	백색분말
분자량	[M-H] <sup>+</sup> m/z 785.01
순도	96.1 %
건조감량	1.0 % 이하
Normalization	UV 203nm에서 96 % 이상
확인시험	TLC에서 주어진 시료외의 반점이 확인되어서는 안된다.



Fig 18. Ginsenoside 표준품 11종

### 3. 홍삼 농축액분말 및 홍삼정 타블렛의 표준성분 분석법 확립

#### 3-1. 지표 성분



### 3-2. 분석방법

균질화된 Rg3강화 타블렛 약 1 g을 정확히 취하여 50 mL 용량플라스크에 넣고 DW로 45 mL 채운 후 30 분간 초음파 추출 한다. 실온에서 냉각 후 DW로 정용하고 syringe filter(0.2 µm)로 여과 후 UPLC/PDA 분석을 수행한다.

#### 3-2-1. 시험 장비

- ① 전자저울 : XP205V, Mettler Toledo, Switzerland 또는 저울의 최소 측정단위가 0.1 mg 이하인 것
- ② 원심분리기 : Legand Mach 1.6R, Thermo, Germany 또는 15 mL 용량 Tube를 사용하여 3000 r/min 이상의 속도로 원심분리가 가능한 것
- ③ 초음파 세척기 : SD-200H, 성동초음파, Korea 또는 수정진동자의 주파수가 40 KHz 이상인 것
- ④ UPLC : Acquity UPLC system, Waters, USA

#### 3-2-2. 기구 및 시약

- 표준용액

- ① Ginsenoside 표준물질 : Ginsenoside 표준물질은 각각 순도가 보정된 RM의 사용을 권장한다.  
(Chromadex(USA)에서 구입 후 사용하였음)
- ② 정량시험용 표준용액 : 위 표준물질을 적당량취하여 10 mL 용량플라스크에 취한 후 메탄올로 정용하여 사용하였다.
- ③ 표준물질 종류 : Ginsenoside Rg1, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rf, Ginsenoside Rh1, Ginsenoside Rg2s, Ginsenoside Rb1, Ginsenoside Rc, Ginsenoside Rb2, Ginsenoside Rd, Ginsenoside Rg3(s), Ginsenoside Rg3(r)
  - ㉠ 기준규격의 적합사항을 판정하는 경우 : 해당제품의 기준규격의 115 %의 농도에 해당하는 표준용액을 조제한다.
  - ㉡ 필요에 따라 Multi point calibration을 해야 하는 경우 적당한 농도로 표준용액을 조제하여 사용한다.

- 시약

- ① 메탄올 : HPLC grade, Merck, Germany
- ② 아세트니트릴 : HPLC grade, Merck, Germany
- ③ 3차 증류수 : 초순수 제조장치를 사용하여 저항 값이 18.0 MΩ 이상이 되는 물을 사용하고 항상 저항 값을 확인 한 후 조제한다.

- 기구

- ① 500 mL 용량 플라스크 : Class A, Duran, Germany
- ② 1 000 mL 용량 플라스크 : Class A, Duran, Germany
- ③ 50 mL 용량 플라스크 : Class A, Duran, Germany
- ④ 10 mL 용량 피펫 : Class A, Witeg, Germany
- ⑤ Syringe filter : GHP Acrodisc (13 mm), 0.2  $\mu$ m pore size, Waters, USA
- ⑥ 3 mL 일회용 주사기 : PP-single use, Norm-Jet, Germany
- ⑦ 2 mL sample vial : HPLC 용, Waters, USA
- ⑧ UPLC column : Acquity BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm)

### 3-2-3. 시험방법

- 시험용액의 준비

- ① 분석 시료: 분쇄된 Rg3강화 타블렛
- ② 무게측정
  - ① 전자저울에 유산지를 올려놓고 영점을 맞춘 후, 시료 약 1 g을 0.1 mg 의 범위까지 정확히 칭량한 후 50 mL 용량 플라스크에 옮겨 담는다.
- ③ 추 출
  - ① 시료가 담겨있는 용량 플라스크에 용량피펫을 사용하여 DW 45 mL를 첨가한다
  - ② 용량 플라스크의 마개를 단단히 잠그고 균질하게 섞이도록 잘 흔들어 준다.
  - ③ 용량 플라스크를 초음파 세척기에 넣고 30 분간 초음파 추출을 실시한다. (초음파 추출 중 분말의 색상이 균일해 지도록 잘 흔들어 준다.)
  - ④ 초음파 추출이 완료되면 냉각 후 DW로 용량 플라스크의 눈금선까지 정용한다.
  - ⑤ 정용 후 잘 섞이도록 흔들어 상징액을 취하여, 3 mL 일회용 주사기와 0.2  $\mu$ m 주사기용 필터를 사용하여 여과한 용액을 2 mL sample vial에 담아 이를 시험용액으로 사용한다.

### 3-2-4. 기기분석 방법

사용하는 분석장비의 작동조건은 다음의 표와 같다.

장비	UPLC - PDA		
Column	Acquity BEH C18 (1.7 μm, 2.1 × 50 mm)		
Mobile Phase	시간 (분)	A (%) 증류수	B (%) 아세토니트릴
	initial	85	15
	0.5	85	15
	14.5	70	30
	15.5	68	32
	16.5	60	40
	17.0	45	55
	21.0	10	90
	25.0	85	15
	27.0	85	15
Flow rate	0.6 mL/min		
주입량	2 μL		
검출기	UV 203 nm		
컬럼 온도	40 °C		

### 3-2-5. 시험용액 중 Ginsenoside 함량 분석

- ① 시험용액을 분석 장비에 주입하여 6. 3의 조건으로 분석하고 각 성분의 피크 면적을 얻는다.
- ② 따로 정량시험용 표준용액을 동일 방법으로 주입하여 분석하고 각 성분의 피크 면적을 얻는다.

### 3-2-6. 시료 중 Ginsenoside 함량 계산

검량선을 이용하여 시료에 함유되어 있는 Ginsenoside를 다음 식에 준하여 계산하며 시료의 Ginsenoside 함량을 mg/g으로 표시한다.

$$U_{\text{UPLC}} \times \frac{S_{\text{Solvent}}}{W_{\text{Weight}}} \times \frac{1}{1000} \text{-----[Ginsenoside의 함량계산식]}$$

$U_{\text{UPLC}}$  : 시료 중 Ginsenoside의 기기 검출양 (μg/mL)

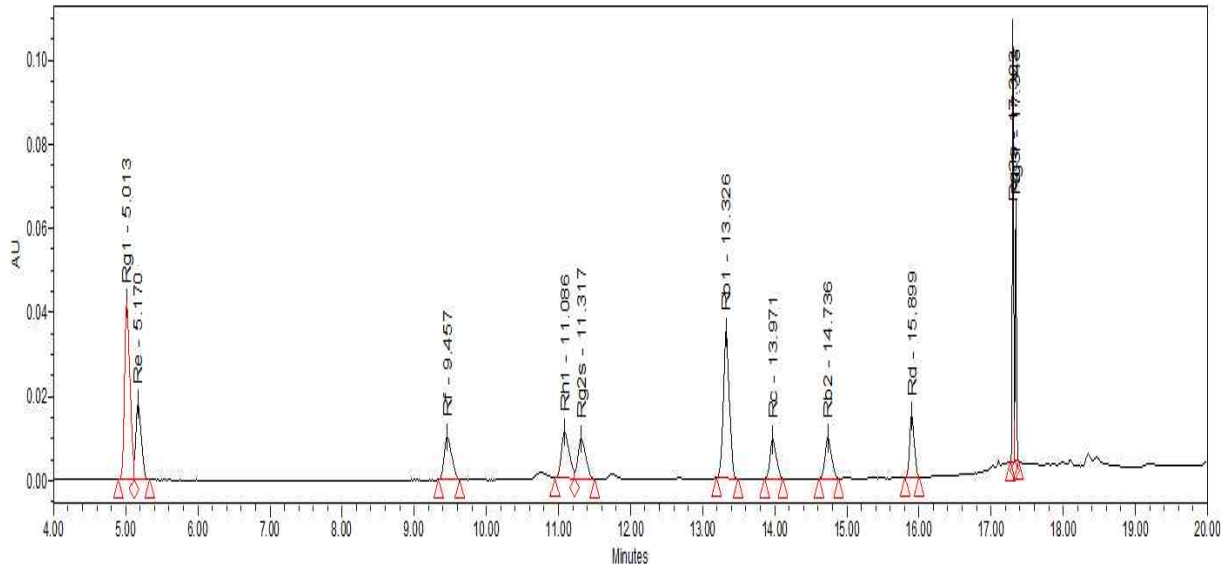
$S_{\text{Solvent}}$  : 추출량 (mL)

$W_{\text{Weight}}$  : 정량시험에 사용한 시료의 양(g)

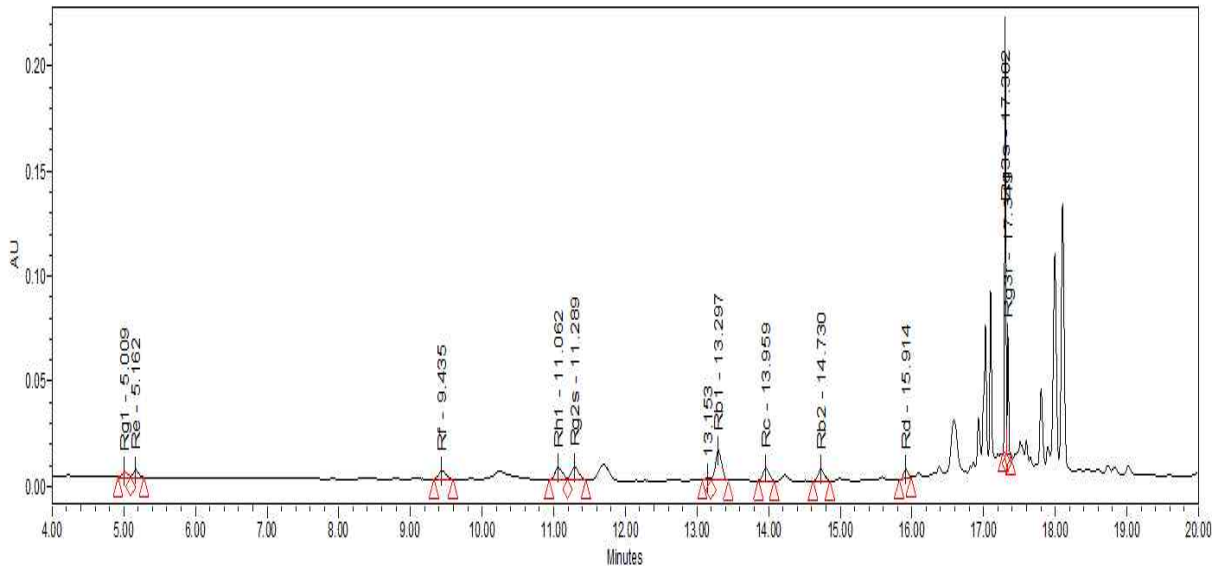
### 3-3. 분석법에 의한 홍삼정 타블렛의 Ginsenoside 크로마토그램

본 SOP에 따라 분석한 표준용액 및 시료의 HPLC 크로마토그램은 다음의 그림과 같다.

#### ① Ginsenoside 표준용액의 크로마토그램



#### ② 홍삼정 타블렛 크로마토그램



### 3-4. Method Validation

#### 3-4-1. 정밀성 (Precision)

사용하는 시료의 양을 각각 0.5 g, 1 g, 1.5 g으로 조정하여 본 SOP에 기술한 방법에 의해 3반복 시험한 결과 및 통계 값은 다음과 같다.

① Ginsenoside Rg1

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	0.64	0.64	0.64
Standard deviation	0.01	0.00	0.01
Within-level precision (expressed as %RSD)	1.86	0.73	1.65
Between-level mean	0.63		
Between-level standard deviation	0.01		
Between-level precision (expressed as %RSD)	1.65		

② Ginsenoside Re

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	0.90	0.92	0.93
Standard deviation	0.02	0.02	0.01
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.65	2.27	0.90
Between-level mean	0.91		
Between-level standard deviation	0.02		
Between-level precision (expressed as %RSD)	2.00		

③ Ginsenoside Rf

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	1.21	1.25	1.28
Standard deviation	0.02	0.02	0.03
Within-level precision (expressed as %RSD)	1.40	1.75	1.95
Between-level mean	1.25		
Between-level standard deviation	0.04		
Between-level precision (expressed as %RSD)	2.99		

④ Ginsenoside Rh1

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	1.86	1.94	1.96
Standard deviation	0.03	0.02	0.02
Within-level precision (expressed as %RSD)	1.72	1.05	0.95
Between-level mean	1.93		
Between-level standard deviation	0.04		
Between-level precision (expressed as %RSD)	2.29		



⑤ Ginsenoside Rg2s

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	1.77	1.79	1.80
Standard deviation	0.03	0.02	0.01
Within-level precision (expressed as %RSD)	1.87	1.29	0.78
Between-level mean	1.79		
Between-level standard deviation	0.02		
Between-level precision (expressed as %RSD)	1.04		

⑥ Ginsenoside Rb1

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	5.31	5.32	5.31
Standard deviation	0.11	0.02	0.06
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.11	0.38	1.09
Between-level mean	5.33		
Between-level standard deviation	0.04		
Between-level precision (expressed as %RSD)	0.76		

⑦ Ginsenoside Rc

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	2.30	2.35	2.38
Standard deviation	0.05	0.05	0.03
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.30	2.12	1.07
Between-level mean	2.34		
Between-level standard deviation	0.05		
Between-level precision (expressed as %RSD)	2.02		

⑧ Ginsenoside Rb2

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	2.00	2.06	2.06
Standard deviation	0.05	0.02	0.02
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.64	0.72	1.15
Between-level mean	2.05		
Between-level standard deviation	0.03		
Between-level precision (expressed as %RSD)	1.36		

⑨ Ginsenoside Rd

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	0.99	0.97	0.99
Standard deviation	0.03	0.01	0.01
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.68	1.23	0.95
Between-level mean	0.98		
Between-level standard deviation	0.02		
Between-level precision (expressed as %RSD)	1.78		

⑩ Ginsenoside Rg3s

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	10.103	10.01	9.89
Standard deviation	0.30	0.05	0.12
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.99	0.48	1.25
Between-level mean	10.00		
Between-level standard deviation	0.19		
Between-level precision (expressed as %RSD)	1.90		

⑪ Ginsenoside Rg3r

Level of preparation	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (3 Replicate)	2.95	2.62	2.57
Standard deviation	0.06	0.04	0.08
Within-level precision (expressed as %RSD)	2.12	1.51	3.05
Between-level mean	2.71		
Between-level standard deviation	0.19		
Between-level precision (expressed as %RSD)	6.87		

**3-4-2. 정확성 (Accuracy)**

Rg3강화 타블렛에 사포닌 분획물(엑기스에서 추출한 BuOH 추출물)의 함량을 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL 추출용매에 첨가한 후, 본 SOP에 기술한 방법에 의해 3반복 시험한 결과, 통계 값 및 회수율은 다음과 같다.

① Ginsenoside Rg1

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	102.43	98.72	98.74
Trial 2	103.83	100.13	97.81
Trial 3	102.07	99.49	96.60
Mean	102.78	99.45	97.72
STDEV.	0.93	0.70	1.07
Precision (RSD)	0.91	0.71	1.10

② Ginsenoside Re

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	100.41	96.34	96.99
Trial 2	99.53	97.76	96.18
Trial 3	96.99	98.04	95.88
Mean	98.98	97.38	96.35
STDEV.	1.77	0.91	0.57
Precision (RSD)	1.79	0.94	0.59

③ Ginsenoside Rf

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	99.58	98.17	98.79
Trial 2	97.17	97.07	96.24
Trial 3	97.44	98.47	97.71
Mean	98.06	97.90	97.58
STDEV.	1.32	0.74	1.28
Precision (RSD)	1.35	0.75	1.31

④ Ginsenoside Rh1

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	97.22	96.28	96.87
Trial 2	96.77	97.12	96.08
Trial 3	96.55	97.67	95.67
Mean	96.85	97.02	96.21
STDEV.	0.34	0.70	0.61
Precision (RSD)	0.35	0.72	0.64

⑤ Ginsenoside Rg2s

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	95.72	95.86	95.98
Trial 2	98.10	96.86	94.76
Trial 3	96.38	96.93	94.69
Mean	96.74	96.55	95.14
STDEV.	1.23	0.60	0.72
Precision (RSD)	1.27	0.62	0.76

⑥ Ginsenoside Rb1

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	97.21	97.52	98.82
Trial 2	97.82	96.60	97.72
Trial 3	96.92	101.18	98.42
Mean	97.32	98.43	98.32
STDEV.	0.46	2.43	0.56
Precision (RSD)	0.47	2.46	0.57

⑦ Ginsenoside Rc

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	97.58	96.01	96.83
Trial 2	96.92	96.95	96.35
Trial 3	95.17	97.51	95.64
Mean	96.56	96.82	96.27
STDEV.	1.25	0.76	0.60
Precision (RSD)	1.29	0.79	0.62

⑧ Ginsenoside Rb2

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	98.15	96.51	96.16
Trial 2	96.31	96.28	94.75
Trial 3	96.13	96.56	95.13
Mean	96.86	96.45	95.35
STDEV.	1.12	0.15	0.73
Precision (RSD)	1.16	0.15	0.76

⑨ Ginsenoside Rd

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	106.94	98.55	101.02
Trial 2	104.73	99.91	100.46
Trial 3	100.34	101.92	97.86
Mean	104.00	100.13	99.78
STDEV.	3.36	1.70	1.69
Precision (RSD)	3.23	1.69	1.69

⑩ Ginsenoside Rg3(s)

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	99.69	98.63	97.18
Trial 2	99.03	98.41	98.17
Trial 3	98.46	98.77	97.61
Mean	99.06	98.61	97.66
STDEV.	0.61	0.18	0.50
Precision (RSD)	0.62	0.18	0.51

⑪ Ginsenoside Rg3(r)

Parameters	Level 1	Level 2	Level 3
Trial 1	100.44	100.28	97.88
Trial 2	101.00	99.45	99.91
Trial 3	99.23	101.94	101.99
Mean	100.22	100.55	99.93
STDEV.	0.91	1.27	2.06
Precision (RSD)	0.90	1.26	2.06

4. 안정성 연구

4-1. 실험계획

4-1-1. 원료 및 제형의 안정성 실험

원료 및 제품에 대한 제형화 연구를 실시하였고 안정성 실험은 ICH 가이드라인에 준하여 장기보관조건 및 가속조건에서 시료를 보관하고 정해진 시험주기에 따라 실험을 진행하고 있다(Table 8).

Table 8. 안정성시험 보관 조건 및 시험 주기

	보관조건	시험주기
장기보존실험	25±2°C, 60RH±5%	0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 개월
가속실험	40±2°C, 75RH±5%	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 개월

4-2. 연구 결과

4-2-1. 홍삼농축액분말

홍삼농축액을 분말화하여 제조된 3 배치의 홍삼농축액분말의 시험분석 결과는 Table 9와 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성실험의 시료로 사용하였다.

Table 9. 홍삼농축액분말 시험분석 결과(3배치)

시험 항목	시험 기준	Batch Analysis		
		배치 1	배치 2	배치 3
외관 및 색상	암갈색의 분말로 이미, 이취가 없어야 한다.	적합	적합	적합
이물	불검출	없음	없음	없음
건조감량	10 % 이하	5.49	5.43	4.57
입도	#100통과 : 92.0 이상	93.4	94.8	94.5
세균수	300 cfu/g 이하	10	50	70
대장균군	음성	음성	음성	음성
Ginsenoside (지표 성분 합량)	Rg1+Rb1+Rg3(S)의 합 : 5.5 mg/g 이상	8.88	9.70	10.10

Batch No.	진세노사이드 함량 (mg/g)											
	Rg1	Re	Rf	Rh1	Rg2(S)	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3(S)	Rg3(R)	Rg1+Rb1+Rg3(S)
1	0.37	0.49	1.23	2.35	3.06	4.43	2.01	1.71	0.86	3.27	1.02	8.07
2	0.33	0.64	1.25	1.17	3.23	5.35	2.30	1.73	1.06	3.59	1.65	9.27
3	0.71	1.19	1.28	1.25	2.84	5.94	2.55	2.20	1.00	2.72	1.05	9.37

Batch No.	영양성분 (%)									(kcal/100g)	
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	칼로리	
1	5.80	8.73	ND	ND	ND	ND	ND	16.66	68.81	341.88	
2	5.31	7.46	ND	ND	ND	ND	ND	15.76	71.47	348.92	
3	5.43	7.16	ND	ND	ND	ND	ND	16.35	71.06	349.64	

Batch No.	아플라톡신(µg/kg)				중금속(mg/kg)							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.85	23.71
2	ND	ND	ND	ND	ND	0.09	ND	ND	ND	ND	6.92	25.85
3	ND	ND	ND	ND	ND	0.09	ND	ND	ND	ND	4.94	23.57

Batch No.	작물보호제 (동시분석 292종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cyprodinil	Fludioxonil	Flutolanil	Methoxyfenozide	Tebuconazole	Metalaxyl	Thifluzamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	음성
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.03	0	음성
3	0.01	0.01	0.06	0.01	0.01	0.01	ND	ND	0	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

#### 4-2-2. 홍삼정타블렛

홍삼농축액분말로 생산한 홍삼정타블렛의 시험분석 결과는 아래 Table 10과 같이 시험기준에 적합하게 제조되었음을 확인하였고 안정성시험의 시료로 사용하였다.

Table 10. 홍삼정타블렛 시험분석 결과(3배치)

시험 항목	시험 기준	Batch Analysis			
		배치 1	배치 2	배치 3	
외관 및 성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없는 연갈색 정제	적합	적합	적합	
Ginsenoside (지표 성분 함량)	Rg1+Rb1+Rg3의 합 : 11.00mg/2g의 80% 이상	28.00	29.16	28.80	
수분	10% 이하	4.89	6.34	6.10	
붕해도	60분 이내	적합	적합	적합	
경도	8.0 kgf/cm <sup>2</sup> 이상	14.39	11.28	11.37	
세균수	1,000 cfu/g 이하	0	7	7	
대장균군	음성	음성	음성	음성	
중량	평균중량	508.4	503.5	501.2	
	중량 편차	5 ~ 10 % (±T1) : 2개 이하	1	X	X
		10 % 초과 (±T2) : 없을 것	X	X	X
정제의 크기	높이	5.35	5.46	5.45	
	단폭	-	-	-	
	장폭	13.62	13.54	13.57	
알루미늄 필로우 포장 기밀성	기밀일 것	적합	적합	적합	

Batch No.	진세노사이드 함량 (mg/g)											
	Rg1	Re	Rf	Rh1	Rg2(S)	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3(S)	Rg3(R)	Rg1+Rb1+Rg3(S)
1	0.25	0.39	0.98	1.37	2.57	3.75	1.63	1.48	0.89	10.00	2.49	14.00
2	0.61	0.97	1.20	1.57	2.95	5.18	2.15	1.92	1.00	8.79	2.47	14.58
3	0.57	0.97	1.20	1.53	2.97	5.16	2.15	1.93	1.00	8.67	2.49	14.40

Batch No.	영양성분 (%)										(kcal/100g)
	수분	조회분	조지방	포화지방	불포화지방	트랜스지방	콜레스테롤	조단백질	탄수화물	칼로리	
1	4.89	6.28	3.82	0.78	0.51	ND	ND	15.26	69.75	374.42	
2	6.34	6.92	2.06	ND	ND	ND	ND	15.32	69.37	357.26	
3	6.10	6.96	2.89	ND	ND	ND	ND	15.18	68.87	362.21	

Batch No.	아플라톡신(µg/kg)				중금속(mg/kg)							
	B1	B2	G1	G2	As	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Sn	Zn
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.11	ND	ND	ND	4.00	27.96
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.89	ND	ND	ND	3.92	32.09
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16.87	ND	ND	ND	4.17	30.11



Batch No.	작물보호제 (동시분석 292종, µg/kg)*								미생물	
	Boscalid	Cyprodinil	Fludioxonil	Flutolanil	Methoxyfenozide	Tebuconazole	Metalaxyl	Thifluzamide	일반세균수 (CFU/g)	대장균군
1	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	0.07	0	음성
2	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	0.05	7	음성
3	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	0.05	7	음성

\* 그 외 성분 : ND(Not Detected)

#### 4-3. 안정성 실험 결과

##### 4-3-1. 홍삼농축액분말(KGC04P)

표준화된 홍삼농축액분말을 장기보존조건 및 가속조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다(Table 11-12).

##### 4-3-1-1. 가속조건

Table 11. 홍삼농축액분말 가속조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	1	2	3	4	5	6	
1 배치	외관 및 성상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.80	7.36	7.58	7.42	7.50	7.71	7.47	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	8.07	8.37	8.03	7.92	8.41	8.14	8.04	
2 배치	외관 및 성상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.31	5.94	5.82	6.11	6.13	6.44	6.56	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	13	<10	17	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	9.27	8.02	8.36	8.12	7.92	8.15	6.78	
3 배치	외관 및 성상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	수분	10 % 이하	5.43	5.71	5.51	6.03	5.71	6.35	6.56	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	27	<10	17	37	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	9.37	8.95	8.69	7.83	8.59	8.09	7.41	

4-3-1-2. 장기보존조건

Table 12. 홍삼농축액분말 장기보존조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수								
			0	1	3	6	9	12	18	24	36
1 배치	외관 및 색상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
	수분	10 % 이하	5.80	6.16	6.20	6.65	6.72	7.56	6.79	7.11	
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	8.07	8.39	8.23	7.89	8.75	7.18	7.65	7.50	
2 배치	외관 및 색상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		
	수분	10 % 이하	5.31	5.31	4.02	5.94	5.23	6.42	5.71		
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	17	<10		
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성		
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	9.27	9.20	7.84	7.77	8.49	8.35	9.40		
3 배치	외관 및 색상	암갈색의 분말로 무미, 무취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		
	수분	10 % 이하	5.43	5.10	4.00	5.69	5.81	6.15	5.45		
	세균수	300 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	37		
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성		
	지표 성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 5.5 mg/g 이상	9.37	9.63	8.66	8.81	9.49	9.20	10.08		

4-3-2. 홍삼정타블렛

표준화된 홍삼농축액분말로 생산한 3배치의 타블렛을 장기보존조건 및 가속조건에서 안정성실험을 실시한 결과 설정된 규격에 적합함을 확인하였다(Table 13-14).

4-3-2-1. 가속조건

Table 13. 홍삼정타블렛 가속조건 안정성 실험 결과

	시험 항목	시험 기준	경과월수							
			0	1	2	3	4	5	6	
1 배치	외관 및 색상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상	28.00	32.5	31.34	31.16	31.02	28.72	31.88	
	수분	10 % 이하	4.89	4.27	4.26	5.81	4.74	4.31	5.35	
	붕해도	60분 이내	18	25	30	30	23	25	28	
	경도	8.0 kg*f/cm2 이상	14.39	15.71	15.83	16.65	16.72	18.49	17.12	
	세균수	1,000 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
	중량	평균	500 mg 이상	508.4	510.3	511.2	510.4	507.5	507.8	507.6
		편차	5~10%(±T1) : 2 이하	1	1	1	X	X	X	X

		10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X	
정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.35	5.36	5.38	5.37	5.38	5.37	5.35	
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-	
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.62	13.57	13.58	13.57	13.57	13.55	13.54	
알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
2 배치	시험 항목	시험 기준	경과일수							
			0	1	2	3	4	5	6	
	외관 및 성상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상		29.16	32.3	30.26	27.92	30.78	31.08	27.42
	수분	10 % 이하		6.34	5.74	6.22	6.14	6.39	6.67	7.29
	붕해도	60분 이내		20	22	27	23	26	26	24
	경도	8.0 kg*f/cm2 이상		11.28	24.3	23.3	23.8	24.3	24.0	24.1
	세균수	1,000 cfu/g 이하		<10	13	<10	<10	<10	<10	<10
	대장균군	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
	중량	평균	500 mg 이상	503.5	507.3	502.9	503.3	502.7	510.3	509.5
		편차	5~10%(±T1) : 2 이하	X	X	X	X	X	X	X
			10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X
	정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.46	5.46	5.46	5.44	5.44	5.44	5.45
		단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-
장폭		13.5 ~ 13.7 mm	13.54	13.54	13.48	13.58	13.56	13.48	13.58	
알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
3 배치	시험 항목	시험 기준	경과일수							
			0	1	2	3	4	5	6	
	외관 및 성상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상		28.80	29.9	30.66	28.4	30.46	31.86	26.62
	수분	10 % 이하		6.10	5.45	6.17	6.15	5.65	6.38	6.71
	붕해도	60분 이내		20	23	26	26	30	25	24
	경도	8.0 kg*f/cm2 이상		11.37	24.4	24.1	23.2	23.8	24.3	23.3
	세균수	1,000 cfu/g 이하		<10	<10	<10	<10	<10	<10	20
	대장균군	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
	중량	평균	500 mg 이상	501.2	505.4	508.4	507.1	506.2	502.6	501.6
		편차	5~10%(±T1) : 2 이하	X	X	X	X	X	X	X
			10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X
	정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.45	5.46	5.44	5.44	5.46	5.46	5.46
		단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-
장폭		13.5 ~ 13.7 mm	13.57	13.58	13.56	13.58	13.58	13.58	13.58	
알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	

4-3-2-2. 장기보존조건

Table 14. 홍삼정타블렛 장기보존조건 안정성 실험 결과

시행 항목	시행 기준	경과월수										
		0	1	3	6	9	12	18	24	36		
1 배치	외관 및 성상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상	28.00	31.3	31.82	29.12	31.98	30.34	31.38	35.3		
	수분	10 % 이하	4.89	4.86	5.53	4.69	5.02	5.07	5.25	5.23		
	붕해도	60분 이내	18	18	30	22	25	30	26	26		
	경도	8.0 kg*f/cm2 이상	14.39	14.02	13.90	14.94	15.16	14.70				
	세균수	1,000 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10		
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성		
중량	평균	500 mg 이상	508.4	508.6	507.3	508.1	505.4	508.1	507.1	506.2		
	편차	5~10%(±T1) : 2 이하	1	1	X	X	X	X	X	X		
		10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X	X		
정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.35	5.36	5.36	5.34	5.36	5.36	5.36	5.34		
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-	-		
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.62	13.59	13.58	13.56	13.55	13.55	13.59	13.58		
	알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		
2 배치	외관 및 성상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합			
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상	29.16	32.1	31.65	30.74	30.56	28.82	29.25			
	수분	10 % 이하	6.34	6.28	6.40	6.23	6.01	6.52	6.08			
	붕해도	60분 이내	20	22	30	26	20	22	20			
	경도	8.0 kg*f/cm2 이상	11.28	11.92	12.48	14.00	13.90	13.94	12.40			
	세균수	1,000 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	<10	15	<10			
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성			
중량	평균	500 mg 이상	503.5	501.2	504.4	502.6	511.6	501.6	503.3			
	편차	5~10%(±T1) : 2 이하	X	1	X	X	X	X	X	X		
		10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X	X		
정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.46	5.46	5.44	5.44	5.44	5.45	5.44			
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-			
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.54	13.48	13.58	13.58	13.58	13.57	13.58			
	알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합			
3 배치	외관 및 성상	고유의 색택과 향미 / 무미, 무취의 연갈색 정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합			
	지표성분 함량	Rg1+Rb1+Rg3(s)의 합 : 11.00 mg/2g의 80% 이상	28.80	32.00	31.56	29.74	29.56	27.66	28.25			
	수분	10 % 이하	6.10	5.98	6.14	5.73	5.65	5.66	5.73			

붕해도	60분 이내	20	25	30	25	20	21	21		
경도	8.0 kg*f/cm2 이상	11.37	11.21	11.99	12.92	11.48	13.00	12.01		
세균수	1,000 cfu/g 이하	<10	<10	<10	<10	20	43	<10		
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성		
중량	평균	500 mg 이상	501.2	502.2	501.3	504.2	502.9	506.5	502.4	
	편차	5~10%(±T1) : 2 이하	X	X	1	X	X	X	X	
		10 % 초과(±T2) : 없을 것	X	X	X	X	X	X	X	
정제 크기	높이	5.2 ~ 5.7 mm	5.45	5.44	5.44	5.45	5.44	5.44	5.43	
	단폭	7.5 ~ 7.7 mm	-	-	-	-	-	-	-	
	장폭	13.5 ~ 13.7 mm	13.57	13.58	13.58	13.57	13.58	13.58	13.57	
알루미늄 필로우 포장기밀성	기밀일 것	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		

## 5. 기타 연구

### 5-1. 인체적용시험 제품 제조

시험대상자에게 제공되는 총 4회의 제공분 중 1차년도에 제조한 1-2회분에 이어 2차년도에는 3-4회 제공분에 대한 제품을 제조 공급하였다.

#### 5-1-1. 인체적용시험 제품 제조기관

홍삼정타블렛은 홍삼농축액분말을 (주)한국인삼공사에서 공급받아 (주)네추럴에프엔피에서 제조하였으며, 위약은 네추럴에프엔피에서 원료사로부터 원료를 공급받아 제조하였다. (주)네추럴에프엔피는 건강기능식품 제조 전문회사(제2005-대전청-0001호)로 GMP(우수 의약품 제조 관리 기준)를 갖추고 있으며, 모든 인체적용시험 식품 생산은 GMP 하에서 제조하였다.

#### 5-1-2. 임상시험 Investigations Product(IP)

인체적용시험 식품은 연한 흑갈색 분말의 정제이고, 대조식품은 시험식품과 동일한 성상의 옥수수전분과 셀룰로오스 홍삼향이 첨가된 정제이다. 섭취방법은 1일 2회, 1회 1,000 mg(500 mg x 2정)으로 아침과 저녁 식사 30분전 공복상태에서 복용한다. 섭취기간은 24주(6개월)이다(Table 15).

Table 15. 인체적용시험식품 및 대조식품 특성

제품명	시험식품	대조식품
지표(유효) 성분	홍삼농축액 (진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3>5.5mg/g 함유)	시험식품과 동일한 성상의 옥수수전분과 셀룰로오스에 홍삼향이 첨가된 정제
제형 및 성상	연한 흑갈색 분말의 정제	
저장방법	고온 다습한 곳에 두면 흡습 되어 변질의 우려가 있으므로 습기와 직사광선을 피하여 <b>서늘한 장소에 보관</b>	
1일 섭취량 및 섭취방법	<b>1일 2회, 1회 1000mg(500mg X 2정)</b> <b>아침과 저녁 식사 30분 전 공복상태에서 복용</b>	
섭취기간	<b>24주간</b>	

5-1-3. 인체적용시험 포장 및 라벨

5-1-3-1. 인체적용시험 제품포장

인체적용시험 IP는 기본적으로 90일씩 제공하고 방문일을 고려하여 15일간의 여유분을 합하여 총 420정을 1회 방문당 시험대상자에게 제공하였다. 포장은 15일분을 소포장하고, 소포장한 7 box를 1 box로 중포장하였다.

5-1-3-2. 인체적용시험 포장라벨

인체적용시험 라벨은 Fig. 34와 같이 소포장 박스에는 박스번호를 라벨 하였고, 중포장 상단 정중앙에는 제품코드, 제조번호, 사용기간, 저장방법, 제조업자 및 주의사항을 인쇄하였으며, 측면에는 제품코드를 라벨링 하였다. PTP포장 규격은 시험대상자의 편의성을 고려하여 안정성에 문제가 없는 재질로 변경하였다.



Fig. 34. 인체적용시험식품 포장라벨 상태 및 변경된 PTP 재질



5-2-1-2. 대조식품

원료명	규격	1차		2차	
		배합비율(%)	중량/정(mg)	배합비율(%)	중량/정(mg)
결정셀룰로오스(101)		63.000	315.000	67.000	335.000
유당혼합분말		26.960	130.480	-	-
옥수수전분		-	-	25.000	125.000
식용색소 황색 4호		0.420	2.100	0.400	2.000
식용색소 적색 40호		0.100	0.500	0.200	1.000
식용색소 청색 1호		0.020	0.100	0.050	0.250
홍삼향혼합제제		5.000	25.000	3.350	16.750
이산화규소		2.000	10.000	2.000	10.000
카르복시메틸셀룰로오스칼슘		1.000	5.000	-	-
스테아린산마그네슘		0.500	2.500	0.500	2.500
히드록시프로필메틸셀룰로오스	식첨	0.900	4.500	1.400	7.000
자당지방산에스테르	식첨	0.100	0.500	0.100	0.500
합 계		100.000	500.000	100.000	500.000

5-2-2. 포장규격 : 500 mg/정\*4정/PTP\*15PTP/단위

구분	항목	내 용	인쇄	비고	
PTP	상	크기(mm)	47*65 (1매 사이즈, 가로*세로)	무인쇄	
		재질 (μm)	PVDC 335		
	하	크기(mm)	47*65 (1매 사이즈, 가로*세로)	무인쇄	
		재질 (μm)	1차 생산 : AL20/ PVC15 2~4차 생산 : AL30/PVDC		
파우치	크기(mm)	98*170*52 (가로*세로*폭)	무인쇄	M자 봉합지, End Sealing 10mm Side Sealing 8mm	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	PET12/ AL7/ PE23/ LLDPE30			
파우치 내부케이스	크기(mm)	97*48*66 (장*폭*고)	무인쇄	무광코팅, 3면 접착	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	VM PET12(금) / IV350			
내부케이스 칸막이	크기(mm)	348*46 (가로*세로)		무광코팅, 단위지함당 1개씩 삽입 PTP 5개를 3등분하여 포장	
	재질(g/m <sup>2</sup> )	VMPET12(금)/ SC300G			
실리카겔	크기(mm)	50*60 (가로*세로)		단위지함 내 파우치 1매당 1개 투입(내부 케이스에 넣지 말 것)	
	중량(g)	3g			

남성난임 기능성 건기식 개발계획

(1) 시장현황 및 개발 전략


- 국민건강보험의 통계에 따르면, 난임으로 치료받는 환자의 숫자가 매년 증가하는 추세이며, 여성보다 남성들의 수가 더 빠르게 늘어나고 있는 것으로 나타남.
- 남성난임 환자의 증가추세에도 불구하고 뚜렷한 건기식 시장은 형성되지 않았으며, 건강기능 식품 국내 1위 기업인 한국인삼공사는 제형화 및 제품화 연구를 위한 기술력과 생산 시설 등의 인프라 구축이 완료 되어 있고 사업화에 대한 풍부한 노하우가 있음.



- 본 연구과제를 통한 남성 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효한 연구결과를 바탕으로 홍삼농축액분말을 활용한 남성난임 전용 기능성 홍삼정 타블렛 개발을 통한 사업화 준비 중임.

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	20억원
		관련제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	20억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		0위

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		남성난임 기능성 홍삼정 타블렛 (2년)		
	소요예산(백만원)		2,000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			-	20 억원	40 억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	5 %	10 %
국외		-	-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		남성난임 전용 기능성 홍삼정 타블렛    ○ 상용화 형태 : 타블렛 약제 / 박스			

		○ 수요처 : 난임 혹은 약정자증 남성 대상 ○ 예상 단가 : 200,000원(총 240정, 2달분)		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)	-	-	-
	수출	-	-	-

**[제2협동: 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재]**

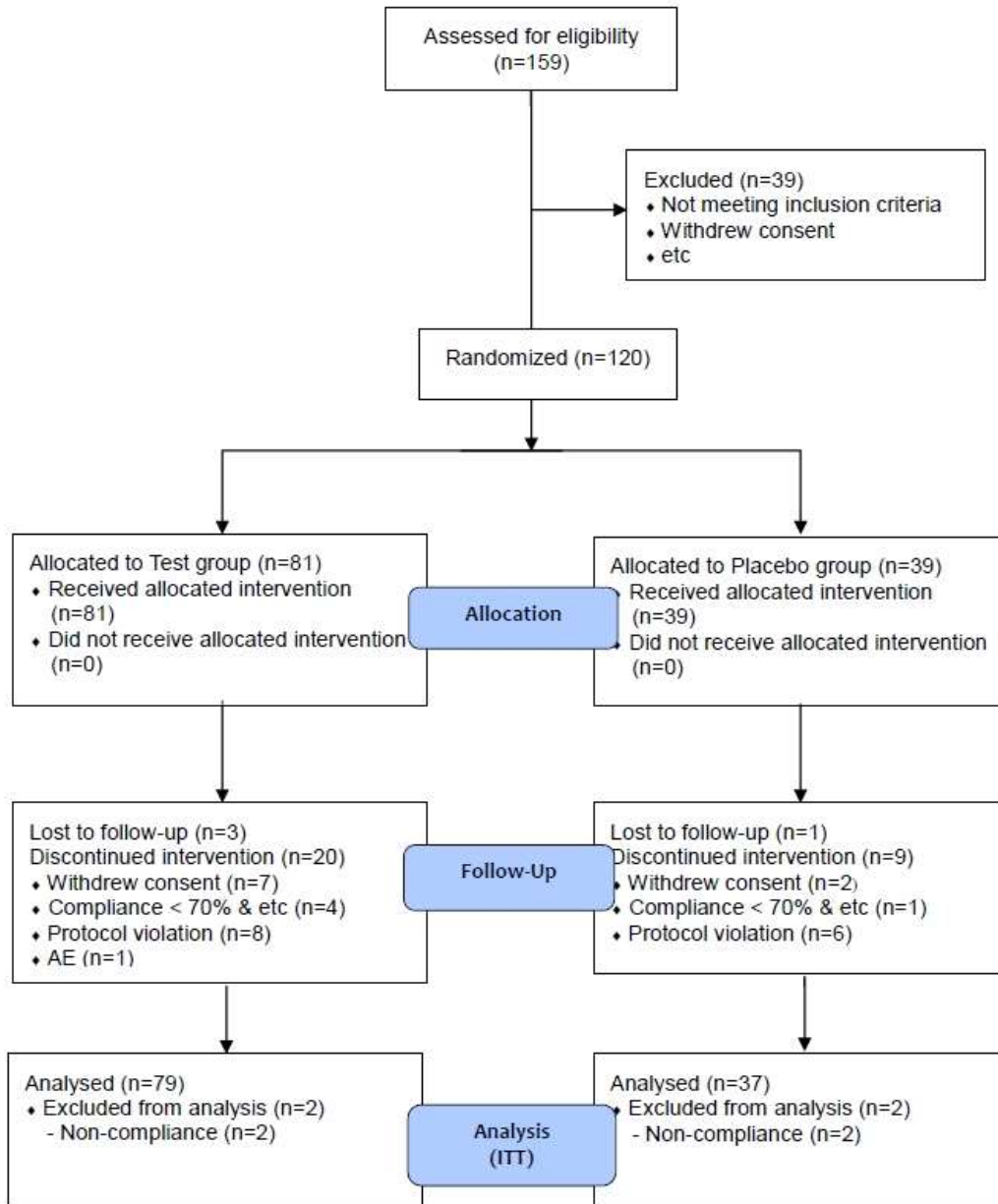
**1. 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재 신청 완료**

제 2협동에서는 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재를 위하여, 2015. 03.10.부터 2018.01.13.까지 ‘홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안정성을 평가하기 위한 24주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험’을 시행하였다. 현재 IRB 에 종료보고 및 결과보고를 마쳤고, 기능식품 등재 신청을 위한 인체적용 시험 결과보고서를 제출하여 제2협동 연구를 성공적으로 수행하였다.

**2. 연구 대상자 참여 실태**

본 인체적용시험의 등록 목표 연구대상자 수는 120명, 중도탈락 20%를 고려한 종료 목표 연구대상자 수는 96명으로, 연구 참여를 위한 서면 동의서를 작성한 자원자 159명에 대하여 스크리닝 검사를 실시하여 선정기준에 부합하는 연구대상자 120명을 선정하였다. 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 등록(홍삼군 81명, 플라세보군 39명)되어 하루 두 번씩 매일 시험용 제품을 섭취하면서 24주 동안 인체적용시험에 참여하였다.

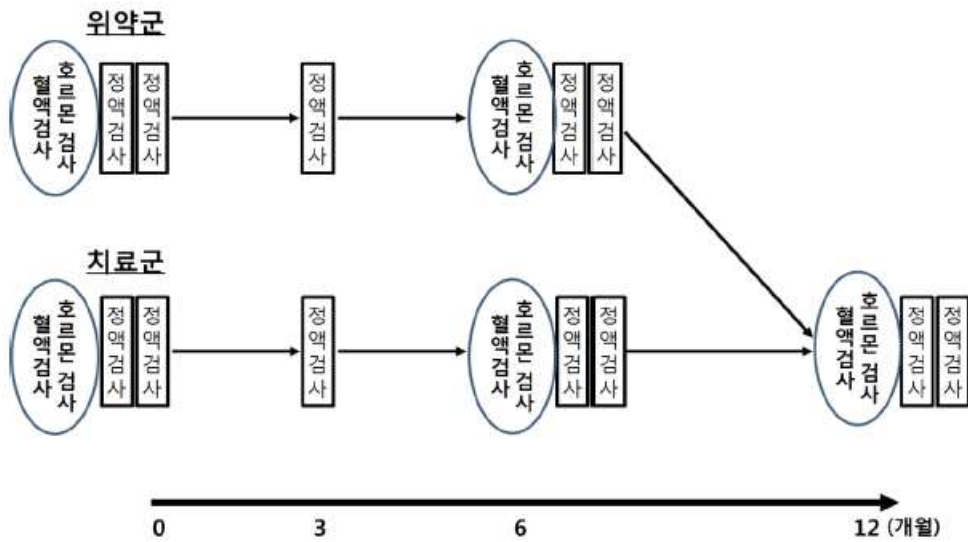
인체적용시험 진행 도중 중도탈락이 33명(홍삼군 23명, 플라세보군 10명), 미준수(외국인 동의취득 절차)로 인한 탈락이 4명(홍삼군 2명, 플라세보군 2명- 홍삼군 1명:계획서 위반 & 미준수 중복)이 발생함에 따라 총 84명(홍삼군 57명, 플라세보군 27명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였다.



연구 대상자 참여 실태

### 3. 연구 계획 개요

인체 적용시험 기간 동안 유효성 평가를 위해 시험용 제품 섭취 전과 섭취 24주 후에 정액검사 (Volume, sperm count, TMSC(total motile sperm count), motility, CASA (VCL, VSL, VAP, ALH, LIN, BCF), Strict morphology, Vitality, pH), 호르몬검사 (Testosterone, E2, FSH, LH, SHBG(sex hormone binding globulin), Cortisol), 삶의 질 설문지 (SF-36), 발기능 설문지(IIEF), 피로도 측정 설문지(FSS), 임신 결과 (임신 여부, 아기 성별, 정상분만 여부, 임신 방법, 약물 복용 여부) 등을 시행하였고, 안전성 평가를 위해 이상반응 조사, 혈액 검사, 활력징후 등을 시행하였다. 6개월 이후 모든 군은 홍삼을 복용하게 되며, 12개월 (V6, V7)의 자료는 경향 분석을 위한 참고 자료 사용되었다.



연구 계획 개요

#### 4. 연구 대상자의 인구학적 정보

인구학적 정보 분석에 포함되는 연구대상자는 총 120명 중에서 미준수 (외국인 동의취득 절차)로 인한 탈락자 4명을 제외한 총 116명으로 홍삼군 (79명), 플라세보군 (37명)으로 나뉘었으며 연구대상자의 자세한 인구학적 정보는 아래 표와 같다.

스크리닝 당시 연구대상자의 평균 연령은  $37.38 \pm 5.93$ 세 (홍삼군  $36.43 \pm 5.42$ 세, 플라세보군  $39.41 \pm 6.51$ 세)로 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다. ( $P=0.011$ )

연구대상자의 평균 난임기간은  $30.61 \pm 31.42$ 개월 (홍삼군  $29.6 \pm 33.81$  개월, 플라세보군  $32.73 \pm 25.95$  개월)이었으며, 평균 난임기간, 신장, 혈압, 맥박수에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 연령에서 두 섭취군 간 차이가 있었지만, 홍삼군과 플라세보군 무작위배정이 비교적 잘 이루어졌다고 판단하였으며, 이후 분석에서는 연령 차이를 보정한 통계분석을 시행하였다.

	Test group (n=79)	Placebo group (n=37)	Total (n=116)	P-value <sup>1)</sup>
연령 (세)	$36.43 \pm 5.42$	$39.41 \pm 6.51$	$37.38 \pm 5.93$	<b>0.011*</b>
난임기간 (개월)	$29.60 \pm 33.81$	$32.73 \pm 25.95$	$30.61 \pm 31.42$	0.620
신장 (cm)	$174.03 \pm 6.33$	$173.95 \pm 5.84$	$174.00 \pm 6.15$	0.949
SBP (mmHg)	$124.99 \pm 9.06$	$123.65 \pm 11.88$	$124.56 \pm 10.01$	0.546
DBP (mmHg)	$78.77 \pm 8.58$	$78.51 \pm 10.95$	$78.69 \pm 9.35$	0.890
Pulse (BPM)	$73.54 \pm 9.48$	$75.92 \pm 11.04$	$74.30 \pm 10.02$	0.236

Values are presented as mean  $\pm$  SD

<sup>1)</sup> Analyzed by independent t-test

\*  $P < 0.05$

#### 인구학적 정보

## 5. 유효성 평가

### 5.1. 유효성 평가 항목 기저치

유효성 평가항목인 정액 검사의 기저치를 분석한 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

	Test group (n=79)	Placebo group (n=37)	Total (n=116)	P-value <sup>1)</sup>
Volume (ml)	3.00 ± 1.27	2.74 ± 1.21	2.91 ± 1.25	0.293
Sperm count (x10 <sup>6</sup> (M)/ml)	46.45 ± 45.61	46.24 ± 34.18	46.38 ± 42.15	0.981
TMSC (x10 <sup>6</sup> (M))	50.88 ± 63.49	44.22 ± 48.43	48.76 ± 58.97	0.573
Motility (%)	35.79 ± 13.36	32.85 ± 12.73	34.85 ± 13.18	0.265
Strict Morphology (%)	6.82 ± 4.43	6.69 ± 4.62	6.78 ± 4.47	0.884
Vitality (%)	52.11 ± 15.72	51.57 ± 16.86	51.94 ± 16.02	0.865
pH	7.60 ± 0.26	7.63 ± 0.30	7.61 ± 0.27	0.669
Total Sperm Count (x10 <sup>6</sup> (M)/ejaculate)	142.10 ± 169.25	131.79 ± 142.00	138.81 ± 160.51	0.749
Sperm Count of Vitality	2441.39 ± 2416.77	2436.85 ± 2053.60	2439.94 ± 2298.21	0.992

	Test group (n=79)	Placebo group (n=37)	Total (n=116)	P-value <sup>1)</sup>
VCL (µm/s)	54.20 ± 16.71	47.94 ± 14.38	52.25 ± 16.20	0.090
VSL (µm/s)	24.34 ± 8.05	21.33 ± 7.31	23.41 ± 7.91	0.094
VAP (µm/s)	33.03 ± 9.96	28.87 ± 9.04	31.74 ± 9.82	0.062
ALH (µm/s)	3.11 ± 2.66	2.49 ± 0.90	2.92 ± 2.28	0.104
LIN (%)	45.46 ± 8.16	45.07 ± 7.62	45.34 ± 7.96	0.834
BCF (Hz)	17.12 ± 8.28	17.55 ± 9.59	17.25 ± 8.66	0.828

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by independent t-test

### 정액검사의 기저치

### 5.2. 유효성 평가 결과

유효성 평가는 주 분석군 120명 중에서 미준수(외국인 동의취득 절차)로 인한 탈락자 4명을 제외한 총 116명 (홍삼군 79명, 플라세보군 37명)을 대상으로 분석하였다.

#### 5.2.1. 정액 검사

방문별 정액검사를 비교한 결과, 홍삼군 내에서 정액의 부피(volume)가 방문별 유의적으로 변화하여(P=0.033), 섭취군 간 비교 시 플라세보군 대비 변화하는 경향이 있었다(P=0.056). 플라세보군 내에서 VAP (정자 두부의 이동속도)가 방문별 유의적으로 변화하였으나, (P=0.027) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

섭취 전, 섭취 6개월 후 정액검사를 비교한 결과, 살아있는 정자 비율 (Vitality)이 홍삼군에서 증가, 플라세보군에서 감소하여, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.039). 본 연구 결과에서 확인한 살아있는 정자 비율의 증가는 1)고환 내에서 정자 생성 질 향상, 2) 부고환 내에서 정자 성숙 및 저장 시 생존 증가, 3) 정낭액, 전립선액과 질 향상으로 인한 정자 보존성의 증가를 의미한다. 이로 토대로 정자수, 정자의 활동성, 정자의 모양, 생존정자의 수로 평가되는 정자의 기능에 있어 유의하게 정자의 기능이 호전되었음을 의미한다.

정자 운동성을 포함한 항목에서는 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

	Test group (n=79)				Placebo group (n=37)				P-value <sup>1)</sup>	P-value <sup>2)</sup>
	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>		
Volume (ml)	3.00 ± 1.27	3.26 ± 1.46	3.02 ± 1.21	0.033*	2.74 ± 1.21	2.50 ± 1.09	2.66 ± 1.17	0.549	0.056	0.054
Sperm count (x10 <sup>6</sup> (M)/ml)	46.45 ± 45.61	51.04 ± 57.35	57.35 ± 69.32	0.276	46.24 ± 34.18	45.19 ± 33.29	56.26 ± 46.92	0.077	0.822	0.830
TMSC (x10 <sup>6</sup> (M))	50.88 ± 63.49	64.69 ± 78.19	71.29 ± 96.88	0.137	44.22 ± 48.43	48.20 ± 51.47	58.44 ± 68.19	0.208	0.859	0.859
Motility (%)	35.79 ± 13.36	35.79 ± 16.78	37.84 ± 16.72	0.299	32.85 ± 12.73	37.88 ± 16.43	35.44 ± 14.04	0.175	0.208	0.217
Strict Morphology (%)	6.82 ± 4.43	6.88 ± 4.5	7.18 ± 4.56	0.766	6.69 ± 4.62	7.51 ± 4.07	7.32 ± 4.86	0.369	0.558	0.553
Vitality (%)	52.11 ± 15.72	52.50 ± 19.12	54.97 ± 18.39	0.265	51.57 ± 16.86	54.35 ± 16.79	49.49 ± 16.94	0.168	0.052	0.052
pH	7.60 ± 0.26	7.62 ± 0.24	7.59 ± 0.21	0.856	7.63 ± 0.30	7.62 ± 0.32	7.59 ± 0.27	0.800	0.948	0.951
Total Sperm Count (x10 <sup>6</sup> (M)/ejaculate)	142.10 ± 169.25	168.40 ± 204.85	175.43 ± 205.05	0.400	131.79 ± 142.00	116.74 ± 106.70	146.43 ± 154.08	0.321	0.648	0.654
Sperm Count of Vitality	2441.39 ± 2416.77	8 ± 3661.5	1 ± 2851.2	0.170	2436.85 ± 2053.60	1 ± 1883.8	8 ± 2647.8	0.108	0.566	0.573

	Test group (n=62)				Placebo group (n=28)				P-value <sup>1)</sup>	P-value <sup>1)</sup>	P-value <sup>2)</sup>
	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>			
VCL (µm/s)	54.20 ± 16.71	53.32 ± 17.68	53.04 ± 16.78	0.854	47.94 ± 14.38	52.79 ± 17.47	49.43 ± 16.08	0.056	0.064	0.063	
VSL (µm/s)	24.34 ± 8.05	24.48 ± 8.98	23.90 ± 8.28	0.835	21.33 ± 7.31	23.17 ± 7.93	22.03 ± 7.27	0.050	0.369	0.364	
VAP (µm/s)	33.03 ± 9.96	32.87 ± 11.01	32.35 ± 10.12	0.963	28.87 ± 9.04	31.79 ± 10.17	29.72 ± 9.40	0.027*	0.101	0.100	
ALH (µm/s)	3.11 ± 2.66	2.75 ± 0.98	2.83 ± 0.92	0.477	2.49 ± 0.90	2.61 ± 1.04	2.61 ± 0.89	0.903	0.577	0.579	
LIN (%)	45.46 ± 8.16	45.14 ± 9.7	44.33 ± 6.91	0.663	45.07 ± 7.62	44.45 ± 9.52	44.89 ± 6.60	0.944	0.770	0.771	
BCF (Hz)	17.12 ± 8.28	16.02 ± 8.88	15.8 ± 8.56	0.351	17.55 ± 9.59	16.53 ± 9.24	16.73 ± 10.02	0.944	0.731	0.723	

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data, which were adjusted for age in baseline

\* P<0.05

### 방문별 정액 검사

	Test group (n=79)			Placebo group (n=37)			P-value <sup>2)</sup>	P-value <sup>3)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>		
Volume (ml)	3.00 ± 1.27	3.02 ± 1.21	0.631	2.74 ± 1.21	2.66 ± 1.17	0.887	0.677	0.692
Sperm count (x10 <sup>6</sup> (M)/ml)	46.45 ± 45.61	57.35 ± 69.32	0.134	46.24 ± 34.18	56.26 ± 46.92	0.064	0.919	0.908
TMSC (x10 <sup>6</sup> (M))	50.88 ± 63.49	71.29 ± 96.88	0.087	44.22 ± 48.43	58.44 ± 68.19	0.106	0.780	0.781
Motility (%)	35.79 ± 13.36	37.84 ± 16.72	0.113	32.85 ± 12.73	35.44 ± 14.04	0.372	0.869	0.862
Strict Morphology (%)	6.82 ± 4.43	7.18 ± 4.56	0.591	6.69 ± 4.62	7.32 ± 4.86	0.385	0.648	0.645
Vitality (%)	52.11 ± 15.72	54.97 ± 18.39	0.095	51.57 ± 16.86	49.49 ± 16.94	0.237	0.040*	0.039*
pH	7.60 ± 0.26	7.59 ± 0.21	0.811	7.63 ± 0.30	7.59 ± 0.27	0.662	0.767	0.773
Total Sperm Count (x10 <sup>6</sup> (M)/ejaculate)	142.10 ± 169.25	175.43 ± 205.05	0.241	131.79 ± 142.00	146.43 ± 154.08	0.190	0.828	0.834
Sperm Count of Vitality	2441.39 ± 2416.77	2986.41 ± 2851.25	0.080	2436.85 ± 2053.60	3028.08 ± 2647.84	0.063	0.879	0.873

	Test group (n=62)			Placebo group (n=28)			P-value <sup>2)</sup>	P-value <sup>3)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>		
VCL (µm/s)	54.20 ± 16.71	53.04 ± 16.78	0.993	47.94 ± 14.38	49.43 ± 16.08	0.387	0.525	0.524
VSL (µm/s)	24.34 ± 8.05	23.90 ± 8.28	0.953	21.33 ± 7.31	22.03 ± 7.27	0.308	0.486	0.485
VAP (µm/s)	33.03 ± 9.96	32.35 ± 10.12	0.965	28.87 ± 9.04	29.72 ± 9.40	0.448	0.532	0.532
ALH (µm/s)	3.11 ± 2.66	2.83 ± 0.92	0.459	2.49 ± 0.90	2.61 ± 0.89	0.686	0.484	0.485
LIN (%)	45.46 ± 8.16	44.33 ± 6.91	0.354	45.07 ± 7.62	44.89 ± 6.60	0.811	0.505	0.503
BCF (Hz)	17.12 ± 8.28	15.8 ± 8.56	0.230	17.55 ± 9.59	16.73 ± 10.02	0.950	0.482	0.480

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by Paired t-test

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

<sup>3)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data, which were adjusted for age in baseline

섭취 전, 섭취 6개월 후 정액검사

### 5.2.2. 호르몬 검사

호르몬 검사 항목으로 Testosterone (남성 호르몬), E2 (난포호르몬, 여성호르몬, FSH (난포자극호르몬, LH (황체형성호르몬), SHBG (성호르몬결합글로부린) 및 Cortisol (스트레스 호르몬)을 측정하였으며, 섭취 전, 섭취 6개월 후 성호르몬 및 스트레스 호르몬 검사를 비교한 결과는 아래 표와 같다. 홍삼군 내에서 LH (황체형성 호르몬)가 유의하게 감소하였으나, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이외의 항목은 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 홍삼군 내에서 황체형성호르몬 감소의 소견을 보인 것은 생체 이용 가능한 남성호르몬 (bioavailable form)이 증가되었음을 나타내는 것이며, 황체형성 호르몬또한 증가된 것을 추정해 볼 수 있다. 또

한 3개월 째 방문별 정액 검사에서 확인한 정액 양의 증가도 상기 기전으로 추정이 가능하다. 이외의 항목은 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

	Test group (n=79)			Placebo group (n=37)			P-value <sup>2)</sup>	P-value <sup>3)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>		
Testosterone (ng/ml)	4.83 ± 1.77	5.03 ± 1.77	0.212	4.62 ± 1.73	4.87 ± 1.86	0.153	0.649	0.641
E2 (Pg/ml)	31.32 ± 12.46	32.81 ± 10.69	0.426	29.45 ± 12.80	30.87 ± 11.77	0.282	0.867	0.870
FSH (mIU/ml)	6.95 ± 3.66	6.83 ± 4.10	0.851	6.54 ± 3.82	6.86 ± 4.08	0.208	0.495	0.490
LH (mIU/ml)	5.14 ± 2.27	4.50 ± 1.77	0.008**	4.71 ± 1.64	4.56 ± 1.49	0.345	0.252	0.250
SHBG (nmol/l)	39.61 ± 18.96	40.13 ± 19.23	0.372	36.35 ± 16.89	37.21 ± 16.52	0.261	0.136	0.135
Cortisol (ug/dl)	10.84 ± 4.50	11.84 ± 4.43	0.057	9.97 ± 4.31	10.52 ± 4.21	0.412	0.581	0.587
Free Androgen Index	45.47 ± 14.03	47.49 ± 16.10	0.076	48.97 ± 21.86	52.22 ± 32.92	0.193	0.875	0.885
E2/Testosterone	7.35 ± 4.40	7.14 ± 3.17	0.632	6.72 ± 3.20	7.04 ± 3.56	0.580	0.485	0.501

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by Paired t-test

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

<sup>3)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data, which were adjusted for age in baseline

\*\* P < 0.01

### 섭취 전, 섭취 6개월 후 호르몬 검사

#### 5.2.3. 설문지

삶의 질 설문지 (SF-36), 발기능 설문지 (IIEF), 피로도 측정 설문지 (FSS)를 조사하였으며, 시험용제품 섭취 전 (Baseline), 섭취 6개월 후에 측정하였다. 설문지 분석 결과, 아래의 표와 같이 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.



	Test group (n=79)			Placebo group (n=37)			P-value <sup>2)</sup>	P-value <sup>3)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>		
PH	94.05 ± 11.71	94.15 ± 11.54	0.682	92.03 ± 11.39	93.24 ± 10.65	0.503	0.395	0.400
RPP	92.09 ± 23.53	92.69 ± 29.55	0.923	88.51 ± 22.51	91.91 ± 14.72	0.388	0.625	0.635
RE	88.61 ± 30.14	90.26 ± 32.66	0.694	87.39 ± 24.03	87.26 ± 29.60	0.923	0.755	0.755
VT	56.46 ± 13.47	56.54 ± 15.31	0.917	55.00 ± 17.48	55.74 ± 13.21	0.815	0.793	0.796
SF-36 (삶의 질 설문지)	MH 68.05 ± 15.22	67.38 ± 14.11	0.551	67.57 ± 14.14	67.76 ± 11.48	0.924	0.829	0.836
SF	76.11 ± 18.47	78.08 ± 18.09	0.542	77.03 ± 19.21	78.88 ± 13.52	0.537	0.913	0.916
BP	82.37 ± 19.30	81.50 ± 18.52	0.769	87.03 ± 14.49	88.38 ± 13.48	0.632	0.598	0.606
GH	60.95 ± 15.17	62.00 ± 14.97	0.663	60.68 ± 19.90	64.26 ± 17.24	0.079	0.270	0.276
HC	51.90 ± 15.90	54.23 ± 17.99	0.321	47.97 ± 16.01	53.68 ± 15.24	0.081	0.414	0.421
IIEF (발기능설문지)	52.28 ± 17.12	47.89 ± 19.78	0.118	53.22 ± 13.62	50.00 ± 18.39	0.261	0.817	0.821
FSS (피로도측정설문지)	30.34 ± 10.69	29.40 ± 10.34	0.681	28.89 ± 11.51	29.35 ± 10.71	0.866	0.711	0.710

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by Paired t-test

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

<sup>3)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data, which were adjusted for age in baseline

### 섭취 전, 섭취 6개월 후 설문지

#### 5.2.4. 임신 결과

임신 결과를 매 방문마다 확인하여 분석한 결과, 홍삼군에서 임신한 자는 21명 (26.58%), 플라세보군에서 임신한 자는 4명 (10.81%) 으로, 섭취군 간 비교 유의적인 경향을 나타냈다. (p=0.054). 임신 정보에 관해서는 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이로 미루어 볼 때 인체적용 시험 대상자 수가 증가할 시 통계적으로 유의한 결과가 나올 것을 기대해 볼 수 있다.

추가 분석으로 난임 기간이 30개월 미만인 자 (총 77명: 홍삼군 56명, 플라세보군 21명) 를 대상으로 임신 결과에 대하여 추가 분석하였을 때, 홍삼군에서 임신한 자는 18명 (32.14%), 플라세보군에서 임신한 자는 2명 (9.52%)으로, 섭취군 간 유의한 차이를 나타냈다. (P=0.044). 남성 난임의 궁극적인 치료 목적은 임신을 증가로 난임 기간 30개월 미만인 자에서 홍삼은 난임 치료에 효과적인 기능성 식품임을 확인하였다. 임신 방법 (자연 임신, 인공수정, 시험관 아기) 에 따른 각 군별 차이는 없었다.

	Test group (n=79)	Placebo group (n=37)	Total (n=116)	P-value <sup>1)</sup>
임신여부				
예	21 (26.58%)	4 (10.81%)	25 (21.55%)	0.054
아니오	58 (73.42%)	33 (89.19%)	91 (78.45%)	

Values are presented as number (%)

<sup>1)</sup> Analyzed by Chi-square test or Fisher's exact test

### 전체 대상자를 대상으로 한 임신 결과

		Test group (n=56)	Placebo group (n=21)	Total (n=77)	P-value <sup>1)</sup>
임신여부	예	18 (32.14%)	2 (9.52%)	20 (25.97%)	0.044*
	아니오	38 (67.86%)	19 (90.48%)	57 (74.03%)	

Values are presented as number (%)

<sup>1)</sup> Analyzed by Chi-square test or Fisher's exact test

\* P<0.05

## 난임 기간 30개월 미만인 자를 대상으로 한 임신 결과

### 6. 안전성 평가

안전성 평가는 시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자 120명 (Safety 분석군)을 대상으로 분석하였다.

#### 6.1. 자, 타각 증상 등 이상반응

인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자 중 시험기간 동안 27명 (22.50%)의 연구대상자에서 총 41건의 경도 또는 중등도의 이상반응과 1건의 중대한 이상반응이 발생하였다.

발생한 이상 반응은 홍삼군 19건 (23.46%: 감기 4, 위염 1, 전립선비대증 1, 왼쪽 아래 사랑니 발치 1, 왼쪽 아래 어금니 신경치료 1, 불면 1, 좌측 발목 통증 1, 항문주위 염증 1, 기침 2, 지방간 1, 만성 0위염 2, 위미란 1, 식도염 2, 고환이 딱딱해짐 1, 가슴답답 1, 우측 손가락 골절 1, 설사 1, 여드름 1, 소화불량 1, 두통 1, 고혈압 1, 호흡 불편 1, 위식도 불편감 1, 갑상선암 1, 비임균성 요도염 1, 정액내 백혈구 검출 1, 요도가려운 감각 1건으로 총 33건), 플라세보군 8명 (20.51% : 치아감염 1, 음부 헤르페스 1, 상복부 통증 1, 감기 1, 비임균성 요도염 3, 속쓰림 1건으로 총 8건), 중대한 이상반응은 플라세보군 1명 (쓸개염 1건) 이었다. 분석 결과, 두 섭취군 간 이상 반응 발생에 유의한 차이가 없었으며, 발생한 이상 반응과 인체적용시험제품의 섭취 하이에 인과관계가 없다고 판단하였다

	Test group (n=81)	Placebo group (n=39)	Total (n=120)	P-value <sup>1)</sup>
이상반응 발생 N (%)	19 (23.46%)	8 (20.51%)	27 (22.50%)	0.818

Values are presented as number (%)

<sup>1)</sup> Analyzed by Chi-square test or Fisher's exact test

### 이상반응

#### 6.2. 혈액 검사

시험제품 섭취 전과 섭취 6개월 후 적혈구, 헤모글로빈, 백혈구, 혈소판, 임파구 및 신장수치 (BUN, Creatinine), 알부민, 빌리루빈, 간수치 (AST, ALT), 혈액 응고수치 (PT, PTT) 를 측정하였다. 측정한 혈액검사 결과 상, 모든 항목에서 두 섭취군 간 통계적, 임상적으로 유의한 차이 또는 변화가 없었다.

	Test group (n=81)			Placebo group (n=39)			P-value <sup>2)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	
RBC (10**6/ $\mu$ l)	5.03 $\pm$ 0.33	5.02 $\pm$ 0.31	0.519	4.95 $\pm$ 0.36	4.96 $\pm$ 0.35	0.847	0.823
Hemoglobin (g/dL)	15.36 $\pm$ 0.86	15.40 $\pm$ 0.84	0.713	15.21 $\pm$ 0.98	15.27 $\pm$ 0.99	0.972	0.880
Hematocrit (%)	44.98 $\pm$ 2.60	44.94 $\pm$ 2.35	0.940	44.36 $\pm$ 3.01	44.31 $\pm$ 2.91	0.642	0.745
Platelet (10**3/ $\mu$ l)	240.37 $\pm$ 42.32	239.55 $\pm$ 42.31	0.045*	235.21 $\pm$ 48.69	236.57 $\pm$ 51.90	0.613	0.119
WBC(10**3/ $\mu$ l)	6.11 $\pm$ 1.44	6.00 $\pm$ 1.54	0.650	6.31 $\pm$ 1.39	6.26 $\pm$ 1.77	0.664	0.914
Neutrophils (%)	54.64 $\pm$ 7.35	53.80 $\pm$ 6.74	0.309	54.32 $\pm$ 8.41	53.29 $\pm$ 9.01	0.500	0.838
Lymphocytes (%)	33.94 $\pm$ 6.99	34.69 $\pm$ 6.52	0.344	34.27 $\pm$ 7.87	35.25 $\pm$ 8.64	0.453	0.783
Monocytes (%)	5.90 $\pm$ 1.91	6.03 $\pm$ 1.50	0.769	6.08 $\pm$ 1.55	5.70 $\pm$ 1.52	0.182	0.224
Eosinophils (%)	3.35 $\pm$ 2.04	3.35 $\pm$ 1.83	0.458	3.31 $\pm$ 1.71	3.65 $\pm$ 1.64	0.034*	0.305
Basophils (%)	0.54 $\pm$ 0.24	0.52 $\pm$ 0.26	0.536	0.50 $\pm$ 0.23	0.54 $\pm$ 0.24	0.536	0.401
BUN (mg/dL)	13.17 $\pm$ 2.58	12.55 $\pm$ 2.58	0.095	13.00 $\pm$ 2.67	12.80 $\pm$ 3.30	0.861	0.440
Creatinine (mg/dL)	0.91 $\pm$ 0.13	0.88 $\pm$ 0.12	0.126	0.91 $\pm$ 0.13	0.93 $\pm$ 0.15	0.158	0.050
Albumin (g/dL)	4.67 $\pm$ 0.25	4.60 $\pm$ 0.26	0.020*	4.57 $\pm$ 0.27	4.57 $\pm$ 0.23	0.966	0.192
Total bilirubin (mg/dL)	0.74 $\pm$ 0.38	0.80 $\pm$ 0.38	0.188	0.74 $\pm$ 0.27	0.82 $\pm$ 0.40	0.101	0.617
AST (IU/L)	24.65 $\pm$ 8.00	23.76 $\pm$ 10.50	0.580	23.59 $\pm$ 8.67	23.51 $\pm$ 5.28	0.889	0.666
ALT (IU/L)	30.57 $\pm$ 19.06	28.54 $\pm$ 21.11	0.699	29.67 $\pm$ 19.94	29.83 $\pm$ 13.61	0.599	0.476
Alkaline Phosphate (IU/L)	96.56 $\pm$ 57.19	87.72 $\pm$ 61.77	0.057	88.62 $\pm$ 47.93	85.09 $\pm$ 54.79	0.361	0.647
PT (sec)	11.59 $\pm$ 0.99	11.68 $\pm$ 1.04	0.202	11.38 $\pm$ 0.86	11.42 $\pm$ 0.92	0.945	0.480
PT (%)	96.65 $\pm$ 10.84	95.96 $\pm$ 11.05	0.363	99.91 $\pm$ 11.79	99.89 $\pm$ 8.63	0.982	0.622
PT (INR)	1.03 $\pm$ 0.07	1.03 $\pm$ 0.07	0.915	1.01 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.04	0.193	0.328

Values are presented as mean  $\pm$  SD

<sup>1)</sup> Analyzed by Paired t-test

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

\* P<0.05

### 섭취 전, 섭취 후 혈액 검사

#### 6.3. 활력 징후

활력징후 (수축기 혈압, 이완기 혈압 및 맥박수) 를 시험용제품 섭취 전, 섭취 3개월 6개월 후에 측정하였으며, 모든 항목에서 두 섭취군 간 통계적, 임상적으로 유의한 차이 또는 변화가 없었다.

	Test group (n=81)				Placebo group (n=39)				P-value <sup>1)</sup>
	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	3 month	6 month	P-value <sup>1)</sup>	
SBP (mmHg)	125.21 $\pm$ 9.07	126.38 $\pm$ 10.06	123.82 $\pm$ 11.13	0.137	123.59 $\pm$ 11.64	123.28 $\pm$ 9.79	124.17 $\pm$ 12.30	0.839	0.262
DBP (mmHg)	79.14 $\pm$ 8.81	79.51 $\pm$ 9.88	78.09 $\pm$ 9.27	0.581	78.10 $\pm$ 10.94	77.22 $\pm$ 7.85	78.08 $\pm$ 12.17	0.802	0.575
Pulse (BPM)	73.48 $\pm$ 9.48	77.25 $\pm$ 11.64	75.07 $\pm$ 11.27	0.004	76.23 $\pm$ 10.89	77.25 $\pm$ 11.47	75.47 $\pm$ 9.67	0.711	0.316

Values are presented as mean  $\pm$  SD

<sup>1)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

\*\* P<0.01

#### 방문별 활력 징후

	Test group (n=81)			Placebo group (n=39)			P-value <sup>2)</sup>
	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	Baseline	6 month	P-value <sup>1)</sup>	
SBP (mmHg)	125.21 ± 9.07	123.82 ± 11.13	0.284	123.59 ± 11.64	124.17 ± 12.3	0.898	0.474
DBP (mmHg)	79.14 ± 8.81	78.09 ± 9.27	0.309	78.1 ± 10.94	78.08 ± 12.17	0.958	0.638
Pulse (BPM)	73.48 ± 9.48	75.07 ± 11.27	0.120	76.23 ± 10.89	75.47 ± 9.67	0.708	0.237

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by Paired t-test

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

## 섭취 전, 섭취 6개월 후 활력징후

### 7. 결론

인체적용시험 기간 동안 유효성 평가를 위해 시험용제품 섭취 전과 섭취 24주 후에 정액검사, 호르몬 검사, 삶의 질 설문지, 발기능 설문지, 피로도 측정 설문지, 임신 결과 등을 시행하였고, 안전성 평가를 위해 이상반응 조사, 혈액 검사, 활력징후 등을 시행하였다.

인체적용시험 진행 도중 중도탈락이 33명 (홍삼군 23명, 플라세보군 10명), 미준수 (외국인 동위 취득 절차)로 인한 탈락이 4명 (홍삼군 2명, 플라세보군 2명- 홍삼군 1명 : 계획서 위반 & 미준수 중복)이 발생함에 따라 총 84명 (홍삼군 57명, 플라세보군 27명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였다.

유효성 평가는 주 분석군인 총 120명 중에서 동의 취득 미준수로 인한 탈락자 4명을 제외한 총 116명 (홍삼군 79명, 플라세보군 37명)을 대상으로 분석하였다.

방문 별 정액 검사를 비교한 결과, 홍삼군 내에서 Volume이 방문별 유의적으로 변화하여 (P=0.033), 섭취 군간 비교 시 플라세보군 대비 변화하는 경향이 있었다 (P=0.056). 플라세보군 내에서 정자 두부의 이동성(VAP)이 방문별 유의적으로 변화하였으나 (P=0.027), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 섭취 전, 섭취 6개월 후 정액 검사를 비교한 결과, 살아있는 정자 비율 (Vitality)이 홍삼군에서 증가, 플라세보군에서 감소하여, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다. (P=0.040). 이러한 살아있는 정자 비율의 증가는 1)고환 내에서 정자 생성 질 향상, 2) 부고환 내에서 정자 성숙 및 저장 시 생존 증가, 3) 정낭액, 전립선액과 질 향상으로 인한 정자 보존성의 증가를 의미한다. 이로 토대로 정자수, 정자의 활동성, 정자의 모양, 생존정자의 수 로 평가되는 정자의 기능에 있어 유의하게 정자의 기능이 호전되었음을 의미한다. 정자운동성을 포함한 항목에서는 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

섭취 전, 섭취 6개월 후 호르몬 검사를 비교한 결과, 홍삼군 내에서 황체형성호르몬 (LH)이 유의하게 감소 (P=0.008) 하였으나, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 홍삼군 내에서 황체형성호르몬 감소의 소견을 보인 것은 생체 이용 가능한 남성호르몬 (bioavailable form)또한 남성호르몬 수용체의 증가 가능성을 나타낸다.

임신여부를 분석한 결과, 홍삼군에서 임신한 자는 21명 (26.58%), 플라세보군에서 임신한 자는 4명 (10.81%) 으로, 섭취군 간 비교 유의적인 경향을 나타냈다. (P=0.054).

난임기간이 30개월 미만인 자 (총:77명: 홍삼군 56명, 플라세보군 21명)을 대상으로 임신 결과에 대해 추가 분석하였다. 임신 여부를 분석한 결과, 홍삼군에서 임신한 자는 18명 (32.14%), 플라세보군에서 임신한 자는 2명 (9.52%)으로, 섭취군 간 비교 유의적

인 차이를 나타냈다 (P=0.044).

안전성 평가는 시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자 120명 (Safety 분석군)을 대상으로 분석하였다. 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자 중 시험기간 동안 27명의 연구대상자에서 총 41건의 경도, 또는 중등도의 이상반응과 1건의 중대한 이상반응이 발생하였으나, 두 섭취군 간 이상반응 발생에 통계적으로 유의가 없었고, 이상반응과 인체적용시험용제품의 섭취 사이에 인과관계가 없다고 판단하였다. 혈액 검사 및 활력징후 검사 결과에서도 통계적, 임상적으로 의미 있는 차이와 변화가 없었다.

즉, 본 제2협동에서 시행한 홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가 인체적용시험에서는 홍삼 섭취 시 플라세보군과 비교하여 정액의 양을 증가시키고 생존 정자의 비율이 증가함을 확인하였고, 난임 기간이 30개월 미만의 대상자에서 플라세보군에 비해 임신율을 증가 시킴을 확인할 수 있어 이러한 대상자에게는 홍삼이 난임 치료에 효과적인 기능성 식품임을 확인할 수 있었다.

또한 인체적용시험이 진행되는 동안 플라세보군과 비교하여 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않았음을 확인할 수 있었다. 따라서 홍삼 6개월 섭취가 인체에 안전하고 일부 정자의 수치 개선에 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

정액 검사 결과와 임신 결과의 p-value 값으로 미루어 볼 때 향후 보다 많은 수의 인체적용시험 총 대상자를 확보할 시 보다 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

본 인체적용시험의 연구기간은 2015. 03.10.부터 2018.01.13.였으며, IRB 종료보고 완료 (2018. 6. 21.) 및 결과보고 완료 (2018.7.3.) 하였으며, 기능 등재를 위한 인체적용 결과보고서를 작성하여 제출하였다.인체적용시험 원료인 KGC04P의 정자운동성 기능성 신청을 위하여 식약처 제출서류 작성을 완료 하였으나, 인체적용시험 결과에서 정자운동성에 대한 유효성을 확인 할 수 없었다. 구비된 서류와 인체적용시험 보고서를 가지고 식약처 상담 및 외부 전문가 상담 결과 기능성 인정에 대한 유효성 확보가 미비하다는 결론을 얻어 기능성 신청서를 접수 하지 못하였다.

홍삼농축액분말(KGC04P)의 정자운동성 기능성 확보 시 기능성 제품화 3종의 개발과 그에 관련한 국제 특허 출원 및 등록, 그를 통한 국제 인증서 확보를 계획하였으나 기능성 확보가 불가 하여 계획에 대한 수행이 어려울 것으로 판단된다.

종료보고서

연구용 기재(IRB에서 기재하는 항목입니다.)					
IRB File No.	CHAMC 2014-12-191-049	연구용 확인	김다운	접수일	2019.06.15
e-IRB 사용의향 (이항의 내용은 e-IRB에서 조회, 신청이 가능한 권한을 부여합니다.)					
연구책임자	최경철	차의과학대학교 분당 차병원	비뇨기과	신청일	2019.06.14
연구담당자	박소영	차의과학대학교 분당 차병원	임상시험센터	최종일	2019.06.12
담당요원번호				최종일	
연구과정명	국문	홍삼의 정자분쇄성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 24주, 무작위배정, 이중눈가림, 블라인드 대조 임체적용시험			
영문	A 24-week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled human trial to evaluate the efficacy and safety of red ginseng on improvement of sperm motility and sperm quality.				
임상시험코드		Study/Trial Name			
○ 연구관련자 정보					
구분	성명	소속	부서	연락번호	고유번호일
연구책임자	최경철	차의과학대학교 분당차병원	비뇨기과	091-780-5380	2019.09.14
연구담당자	박소영	차의과학대학교 분당차병원	임상시험센터	091-780-4979	2019.03.28
관리약사	최지현	차의과학대학교 분당차병원	약정부	091-780-3447	2019.06.09
관리약사	강윤영	차의과학대학교 분당차병원	약정부	091-780-5756	2019.11.13
Phase	<input type="checkbox"/> I ( <input type="checkbox"/> First-in-human <input type="checkbox"/> First-non-human )				
	<input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PM6 <input checked="" type="checkbox"/> 기타				
연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품				
	<input type="checkbox"/> 의료기기 ( <input type="checkbox"/> 1등급 <input type="checkbox"/> 2등급 <input type="checkbox"/> 3등급 <input type="checkbox"/> 4등급 )				
	<input type="checkbox"/> 의료기기 이외				

연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 임간대상연구 <input type="checkbox"/> 임체적용시험(임체)연구 <input type="checkbox"/> 후유기특연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 형세포배양연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포연구 <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구 <input type="checkbox"/> 후향적 연구 <input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구 <input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구		
연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 관찰연구 ( <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 횡단조사연구 <input type="checkbox"/> 코호트연구 ) <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
연구분류5	<input type="checkbox"/> 임상용 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)		
일련번호		상용명	
최초시험대상인수	전향	120 명	국내
연구승인기간	2019.01.19 ~ 2019.01.19		
지원의료기관	기관명	병원/연구소/분부	대표(직책)
내용	본 연구는 홍삼추출물 제 2형종교제 연구로 (총 연구기간: 2014.11.29 ~ 2017.11.27: 9년)으로 3차 병행에서 연구신청하였으며 IRB승인일(2016년 9월 23일)부터 총 10명까지 대상자를 187명으로 시행하였습니다. 4주차 연구시작 후 본원에 발령하는 남양주에서 6개월 이상의 연구종료까지 본 임상연구 약제 불충분하여 지연일상을 기다리는 것보다 시판약시술 등과 같은 보조적수술을 조기에 진행하는 경우 유익이 많아 연구대상자를 충분한 email 확인 여과와 계획된 기간내 대상자 모집이 어려웠습니다. 이에 당 기관과의 주가조정(총 6개 2017년 8월 변경계획서)의 목표 연구대상자를 120명으로 변경 신청하여 조원원 목표까지 enroll하였으나 연구기간 내 환자연구결과 도출을 위해서 부득이하게 조기종료를 결정하게 되었습니다. 대상자에게 무작위적 기간에 임체적용 시험과 임체 연구결과가 불충 분기하였고, 이로인해 남은 2명(정형임상실험대상자) 또한 없이 종료하고, 현재까지 아직까지 대상자 공개되었고, 이루어졌 습니다. 따라서 종료발적으로 처리하고 마무리하였습니다.		
첨부파일	R016.대상자(인정)소통(V2.2) _20180605[2].doc	R019.임상연구-종료보고서 (v4.1)_20190605[2].doc	위판사항 자료.doc
연구책임자정보			
관리자정보			
제출서류목록	(제부) 대상자知情 List [V2.2] [09 / JUN / 19] (제부) 종료보고서 [V4.1] [05 / JUN / 19] (제부) 위판사항자료 [V3.0] [12 / JUN / 19]		
연구자유문사항	1.2 위판사항을 확인하였습니다 3.5 수정하였습니다 4. 계획서 위판 / 이발사제 자료 첨부하였습니다		
비고			

인체적용시험 IRB 종료보고서

통지서

IRB Form: CHAMC 2014-12-191-050. Study Nick Name: ...

연구목적: 홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 24주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

연구승인번호: (홍부) 임상연구비지급신청서보고서 [V2.1] [18 / JUN / 18]

- 1) 본 위원회는 HGGP 및 ICH-GCP를 준수하며 생명안전 및 윤리에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.
2) 위원의 GOP 75% 5.9에 최저기준이 시정 승인 또는 보완된 임상시험 계획서는 보완자료 또는 이의에 관한 자료 등을 제출함으로써 심사위원회의 재심의를 받을 수 있습니다.

차의과학대학교 분당차병원 의학연구윤리심의위원회



인체적용시험 IRB 결과 보고 통지서

Ginseng CONFIDENTIAL June 2018

인체적용시험결과보고서

홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 24 주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

Table with 2 columns: 인체적용시험제출, 홍삼, 플라세보. Rows include: 의뢰자, 계획서번호, 인체적용시험 시작일, 인체적용시험 종료일.

2018.06

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험은 Good Clinical Practice(GCP)를 준수하여 수행되었습니다. 이 결과보고서는 기밀사항이며, 의뢰자의 승인 없이 다시 작성되거나 공개될 수 없습니다.

Ginseng CONFIDENTIAL June 2018

10. 결론

본 인체적용시험은 홍삼의 정자운동성 및 정자 질 개선에 대한 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하는 연구이다.

본 인체적용시험의 동등 비교 연구대상자 수는 120명, 동등률 20%를 고려한 동등 비교 연구대상자 수는 96명으로, 연구 장여를 위한 서면동의서를 작성한 자총 159명(대하여 스크리닝 검사를 실시하여 선정기준에 부합하는 연구대상자 120명)을 선정하였다.

인체적용시험 기간 동안 유효성 평가를 위해 시정용제출 섭취 전과 섭취 24주 후에 정역과사(Volume, sperm count, TMSC(total motile sperm count), motility, CASA(VOL, VSL, VAP, ALH, LIN, BCF), Strict morphology, Vitality, pH), 호르몬검사 (Testosterone, E2, FSH, LH, SHBG(sex hormone binding globulin), Cortisol), 남유 및 살부지(SF-36), 발기는 살부지(IEF), 피로도 측정 살부지(FSS), 임신 결과(임신 여부, 아기 성별, 정상분만 여부, 임신한박, 약물 복용 여부) 등을 시행하였고, 안전성 평가를 위해 이상반응 조사, 혈액 검사, 흉터검출 등을 시행하였다.

인체적용시험 진행 도중 동등률이 33%(홍삼군 23명, 플라세보군 10명), 미준수(외국인 동의서 불충족)로 인한 탈락이 4명(홍삼군 2명, 플라세보군 2명) - 홍삼군 1명, 계획서 위반 5 미준수 등복이 발생하여 따라 총 84명(홍삼군 67명, 플라세보군 27명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였다.

유효성 평가는 두 분조군의 ITT군 총 120명 중에서 미준수(외국인 동의서 불충족)로 인한 탈락자 4명을 제외한 총 116명(홍삼군 79명, 플라세보군 37명)을 대상으로 분석하였다.

반복 및 정역과사를 비교한 결과, 홍삼군 내에서 Volume이 반복별 유의적으로 변화하여(A=0.033), 섭취군 간 비교 시 플라세보군 대비 변화하는 경향이 있다(A=0.056). 플라세보군 내에서 VAP가 반복별 유의적으로 변화하였으나(A=0.027), 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 섭취 전 - 섭취 6개월 후 정역과사를 비교한 결과, Vitality가 홍삼군에서 증가, 플라세보군에서 감소하여, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.040). 정자운동성을 포함한 항복에서는 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

기능식품 등재 용 인체적용시험 결과보고서

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표달성도

###### 가. 최종 성과목표 및 평가 방법

- (1) 개발 제품의 국제기준 부합 여부(30%): cGMP 준수 여부(제조공정의 flow chart, routine QC, in-process control, red alertness 대비 방법 등), 국제수준(WHO 혹은 ICH)의 품질규격 확립, 지표물질 표준품 서류 구비 여부, 지표물질의 정성/정량 분석법 유효화 여부, ICH-conformed real time & accelerated 조건하 안정성 자료 확보 여부, 잔류농약 불검출 제품 생산 여부, 표준화 제품 생산 여부
  - (2) 정자 수 증가 및 질 개선에 미치는 효능 및 기전 규명(30%): 노화, 고온 스트레스 노출, 만성 구속 스트레스 노출에 따른 고환 기능 감퇴에 대한 방어 효과 및 기전 규명, 병리조직 검사, 정자운동성 조사, 항산화 관련 효소의 mRNA 및 단백질 발현량, 정자생성 관련 단백질 발현량, 성호르몬 수용체 mRNA 및 단백질 발현량
  - (3) 임상 효능 입증 여부(30%): 간, 신장 기능 관련 임상화학 지수, 혈중 성호르몬 함량, 정자 수 및 운동성, 부부관계 및 삶의 질, 임신여부
  - (4) 제품의 식약처 개별 인증 신청/획득 여부(10%): 개별인증 서류 작성 및 신청서 제출
- 나. 연차별 성과목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정모세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -독성 유도: 과산화수소 노출	100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
			100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
			100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량
		100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
		100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- $\alpha$ , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
		100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량	
		100	▪ 간/신장 기능 관련 혈액화학지수(동물실험)	
		100	▪ 혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량	
	100	▪ 정세관의 현미경 관찰(정자생성능)		
	[제1협동] 국제기준(ICH 혹은 WHO 기 준) 부합 제조 공정 확립 및 품질규격 표준 화 제품 개발	○ 제조공정 최적화연구  ○ 품질분석 및 임상시험용 시료 제공	100	▪ 홍삼원료 및 제품의 공정흐름도 확립 ▪ 공정단계/규격기준 확립
100			▪ 위해물질(잔류농약, 중금속), 미생물 분석 ▪ in vitro 및 vivo 동물시험 물질	



				제공
		○ 임상시험용 제품의 clinical formula 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>임상시험용 IP(Investigational Products)의 formula 구축 및 생산</li> <li>임상시료 생산완료, 라벨링 및 공급</li> <li>임상시료의 품질분석 및 품질 규격 확립</li> </ul>
		○ 분석화학적 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>표성분 Ginsenoside Rb1 &amp; Rg1 각 2g 이상 확보</li> <li>표준품의 구조 동정 및 순도 확인</li> </ul>
	[제2협동] 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 증 및 기능식품 등재	○ 연구대상자 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>기관 내 연구윤리심의위원회에서 연구계획서 심의를 완료함.</li> </ul>
2차 년도 (2014)	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정자세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -독성유도: 항암제 (doxorubicin) 노출	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>정자생성관련 단백질 (inhibin-<math>\alpha</math>, nectin-2 등)의 mRNA 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>성호르몬 수용체의 mRNA 발현량</li> </ul>
		○ 고온 스트레스(Heat stress) 노출 모델	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>정자생성관련 단백질 (inhibin-<math>\alpha</math>, nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			80	<ul style="list-style-type: none"> <li>간/신장 기능 관련 혈액화학지수 (동물실험)</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량</li> </ul>
		80	<ul style="list-style-type: none"> <li>정세관의 현미경 관찰 (정자생성능)</li> </ul>	
		[제1협동] 국제기준 제조공정 및 품질 표준화 개발	부합 규격제품	○ 국제기준 부합 제조 공정 최적화
100	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료홍삼에 대한 제조공정을 확립하였고 지표성분의 기준규격을 설정하였음</li> <li>식약처의 기준에 따라 KOLAS 시스템에서 잔류농약의 분석 및 중금속 분석을 실시하였으며 원료에 대한 안전성을 확인하였음.</li> </ul>			
○ 분석화학적 연구	100			<ul style="list-style-type: none"> <li>지표성분을 확보하기 위하여 크로마토그래피를 이용하여 ginsenoside Rb1 과 진세노사이드 Rg1을 각각 2g 이상씩 확보하였음.</li> </ul>
	100			

				<ul style="list-style-type: none"> <li>지표성분의 구조는 NMR과 LC-TOF/Mass를 이용하여 확인하였음.</li> </ul>
	[제2협동] 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재	○ 연구대상자 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>WHO 표준 기준 미만의 정자결핍증, 약정자증을 가진 기혼 남성</li> </ul>
		○ 임상화학지수 관련 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 간, 신장 기능/성호르몬, 스트레스 호르몬 함량 중심</li> </ul>
		○ 정자의 질 및 수 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>CASA(computer aided sperm analyzer), 정자 운동성 자동분석기 활용</li> </ul>
		○ 문진을 통한 연구대상자 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>삶의 질(피로감, 의욕 등), 부부관계의 질, 부작용 유무</li> <li>임신 여부, 임신한 자녀의 성별 등</li> </ul>
3차 년도 (2015)	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정모세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -특성 유도: 고온 노출	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>정자생성관련 단백질(inhibin-<math>\alpha</math>, nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
		○ 만성 구속 스트레스(Immobilization stress) 노출 모델	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>정자생성관련 단백질(inhibin-<math>\alpha</math>, nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량</li> </ul>
			80	<ul style="list-style-type: none"> <li>간/신장 기능 관련 혈액화학지수(동물실험)</li> </ul>
			80	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량</li> </ul>
			80	<ul style="list-style-type: none"> <li>정세관의 현미경 관찰(정자생성능)</li> </ul>
		[제1협동] 국제기준 제조공정 및 품질 표준화 개발	○ 제조공정 최적화 연구	80
100	<ul style="list-style-type: none"> <li>지표물질인 11종의 진세노사이드(Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rh1, Rg2s, Rg3s, Rg3r) 각 1-2g 이상 확보하였음</li> <li>분리 정제하여 분광학적 자료를 바탕으로 구조 동정 후, dossier 작성하였음.</li> </ul>			
100	<ul style="list-style-type: none"> <li>원료 2종 및 제품 1종에 대해 각 3 배치 확보하여 분석 완료하였음.</li> <li>원료 및 제품 3 batch에 대한 가속 6개월 및 실온 24개월 분석자료 확보하였으며 추가 진행중임</li> </ul>			
		○ 제품의 안정성 자료 확보 (Batch analysis data 확보 : 3 batches, Real time stability 자료 확보)	100	

		○ 임상시험용 제품의 clinical formulae 확립 및 임상 시험용 제품 생산, 공급	80	<ul style="list-style-type: none"> <li>임상시험에 사용된 시험제품 및 대조제품의 clinical formulae 작성</li> <li>4차 시험식품을 생산하였고, 포장 및 라벨링 후 무작위 배정을 통해 공급하고 있으며, 생산된 2 batches는 안정성 시험 및 품질규격을 작성하는 시료로 사용함.</li> </ul>
[제2협동] 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 기능식품 등재		○ 연구대상자 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>WHO 표준 기준 미만의 정자결핍증, 약정자증을 가진 기혼 남성</li> </ul>
		○ 임상화학지수 관련 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>혈중 간, 신장 기능/성호르몬, 스트레스 호르몬 함량 중심</li> </ul>
		○ 정자의 질 및 수 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>CASA(computer aided sperm analyzer), 정자 운동성 자동분석기 활용</li> </ul>
		○ 문진을 통한 연구대상자 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>삶의 질(피로감, 의욕 등), 부부관계의 질, 부작용 유무</li> <li>임신 여부, 임신한 자녀의 성별 등</li> </ul>
		○ 기능 등재를 위한 연구 결과 및 기본 자료 작성	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>등록을 위한 임상 연구 기초자료 확보 및 기본 서류 작성</li> </ul>

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 화합물/생약재를 다양한 동물 모델을 이용하여 정자생성능과 기전을 규명한 논문은 극히 드물다. 게다가 임상연구를 거쳐 기능 식품 혹은 치료제로 등록된 제품은 하나도 없다. 즉, 모두 논문에서 그치고 산업화로까지 이어지지 못했다는 이야기이다. 그러므로 본 연구 과제가 성공하면 우리가 개발한 제품은 “남성 난임 개선/치료제 1호”가 되는 것이다.
- 남성 난임 치료/개선제 기능식품 개별인증을 획득함으로써 차별화된 제품, 동분야의 “세계 최초 제품”을 출시

### 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 자사의 보유 바이어와 글로벌 천연물 유통업체 협의회인 NHFS를 활용하여 제품이 우수성을 홍보하고 신제품을 출시할 계획</li> <li>○ 자사의 해외법인이 있는 일본, 대만, 미국을 중심으로 전략을 수립하여 관리하고 있는 바이어들에게 원료 및 제품을 우선 공급하는 전략을 수립하여 실행할 계획</li> <li>○ 국내외 박람회 참가 및 일본 판매 조직의 마케팅 교육을 강화할 예정</li> </ul>		

### 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지표물질 표준품 분석, validation 정량분석법, 잔류농약 관련 정보 수집 <ul style="list-style-type: none"> <li>- ICH guideline, Ph.Eur.(유럽약전), J.Ph(일본약전) 참고</li> </ul> </li> <li>○ 관련 자료 예시</li> </ul>		

<b>VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: (METHODOLOGY *)</b>	<b>STABILITY TESTING OF NEW ACTIVE SUBSTANCES AND MEDICINAL PRODUCTS *)</b>	<b>C. CONTROL OF STARTING MATERIALS</b> <b>C.1 ACTIVE SUBSTANCES)</b>																																							
<p>Guideline Title Validation of Analytical Procedures: Methodology  Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended  Date of first adoption December 1986  Date of entry into force For studies commencing after June 1997  Status Last revised 1996  Previous titles/other references ICH Q2(R)CPMP11CH281/95  Additional Notes This note for guidance concerns test procedures used in documentation submitted in accordance with Part 2, sections A-F of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product.  This guideline is complementary to, and should be read in conjunction with, the guideline on Validation of Analytical procedures: Definitions and Terminology.</p>	<p>Guideline Title Stability Testing of New Active Substances and Medicinal Products *)  Legislative basis Directive 75/318/EEC as amended  Date of first adoption October 1985  Date of entry into force Compulsory for applications submitted after 1/1/1998  Status Last revised 1993  Previous titles/other references ICH Q1A: Stability Testing of New Drug Substances and Products, I11232/92, CPMP/ICH/288/91  Additional Notes This note for guidance covers the application of Part 2, sections C and F of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a new medicinal product.  This guideline replaces those sections of the CPMP guideline entitled Stability tests on Active Ingredients and Finished Products which refer to new active substances and medicinal products containing new active substances.</p>	<p>Table 1. Specification and routine tests for starting material of Korean red ginseng powder capsule.</p>																																							
<b>CONTENTS</b>	<b>CONTENTS</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Test parameters</th> <th>Test method</th> <th>Specification/limit</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Identification</td> <td>Ph. Eur. 01/002:1523 (Group) - Identification C</td> <td>As described in Ph. Eur. 01/002:1523 - Identification C</td> </tr> <tr> <td>Loss on drying</td> <td>Ph. Eur. 2.2.32</td> <td>≤ 8.0%</td> </tr> <tr> <td>Total ash</td> <td>Ph. Eur. 2.4.16</td> <td>≤ 5.0%</td> </tr> <tr> <td>HC1-insoluble ash</td> <td>Ph. Eur. 2.8.1</td> <td>≤ 1.0%</td> </tr> <tr> <td>Foreign matter</td> <td>Ph. Eur. 2.8.2</td> <td>≤ 2.0%, 100 g sample used</td> </tr> <tr> <td>Content of S06: EPH extractable material</td> <td>2 Ph. Eur. C.11.2.7</td> <td>≥ 18.0%</td> </tr> <tr> <td>Assay</td> <td>Ph. Eur. 01/002:1533</td> <td>≥ 94%, combined ginsenosides (S) and Rg, calculated with reference to the dried drug</td> </tr> <tr> <td>Microbiological quality</td> <td>Ph. Eur. 2.6.12 &amp; 13 Ph. Eur. 5.1.4</td> <td>Category 3B</td> </tr> <tr> <td>Aflatoxin*</td> <td>HPLC/reference device C.11.2.5</td> <td>MI: 0.05 µg/kg BI: 2.0 µg/kg Total of aflatoxins: 4.0 µg/kg</td> </tr> <tr> <td>Pesticides</td> <td>Test method according to 535 LMB/1000-34 &amp; L000-903 C.11.2.4</td> <td>Ph. Eur. 2.8.13</td> </tr> <tr> <td>Heavy metals</td> <td>Ph. Eur. 4.2.4.27 (modified) C.11.2.5</td> <td>Ph. Eur. 5 µg/kg Cd: 0.2 µg/kg Hg: 0.1 µg/kg Calculated on the dried powder</td> </tr> <tr> <td>Radioactivity*</td> <td>Determination of the activity concentration of gamma emitting radionuclides. IAEA: 509 (G-01)-R(1997) C.11.2.6</td> <td>≤ 800 Bq/kg</td> </tr> </tbody> </table>	Test parameters	Test method	Specification/limit	Identification	Ph. Eur. 01/002:1523 (Group) - Identification C	As described in Ph. Eur. 01/002:1523 - Identification C	Loss on drying	Ph. Eur. 2.2.32	≤ 8.0%	Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤ 5.0%	HC1-insoluble ash	Ph. Eur. 2.8.1	≤ 1.0%	Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤ 2.0%, 100 g sample used	Content of S06: EPH extractable material	2 Ph. Eur. C.11.2.7	≥ 18.0%	Assay	Ph. Eur. 01/002:1533	≥ 94%, combined ginsenosides (S) and Rg, calculated with reference to the dried drug	Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 5.1.4	Category 3B	Aflatoxin*	HPLC/reference device C.11.2.5	MI: 0.05 µg/kg BI: 2.0 µg/kg Total of aflatoxins: 4.0 µg/kg	Pesticides	Test method according to 535 LMB/1000-34 & L000-903 C.11.2.4	Ph. Eur. 2.8.13	Heavy metals	Ph. Eur. 4.2.4.27 (modified) C.11.2.5	Ph. Eur. 5 µg/kg Cd: 0.2 µg/kg Hg: 0.1 µg/kg Calculated on the dried powder	Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma emitting radionuclides. IAEA: 509 (G-01)-R(1997) C.11.2.6	≤ 800 Bq/kg
Test parameters	Test method	Specification/limit																																							
Identification	Ph. Eur. 01/002:1523 (Group) - Identification C	As described in Ph. Eur. 01/002:1523 - Identification C																																							
Loss on drying	Ph. Eur. 2.2.32	≤ 8.0%																																							
Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤ 5.0%																																							
HC1-insoluble ash	Ph. Eur. 2.8.1	≤ 1.0%																																							
Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤ 2.0%, 100 g sample used																																							
Content of S06: EPH extractable material	2 Ph. Eur. C.11.2.7	≥ 18.0%																																							
Assay	Ph. Eur. 01/002:1533	≥ 94%, combined ginsenosides (S) and Rg, calculated with reference to the dried drug																																							
Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 5.1.4	Category 3B																																							
Aflatoxin*	HPLC/reference device C.11.2.5	MI: 0.05 µg/kg BI: 2.0 µg/kg Total of aflatoxins: 4.0 µg/kg																																							
Pesticides	Test method according to 535 LMB/1000-34 & L000-903 C.11.2.4	Ph. Eur. 2.8.13																																							
Heavy metals	Ph. Eur. 4.2.4.27 (modified) C.11.2.5	Ph. Eur. 5 µg/kg Cd: 0.2 µg/kg Hg: 0.1 µg/kg Calculated on the dried powder																																							
Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma emitting radionuclides. IAEA: 509 (G-01)-R(1997) C.11.2.6	≤ 800 Bq/kg																																							
<b>INTRODUCTION</b> 1. SPECIFICITY 2. LINEARITY 3. RANGE 4. ACCURACY 5. PRECISION 6. DETECTION LIMIT 7. QUANTIFICATION LIMIT 8. ROBUSTNESS 9. SYSTEM SUITABILITY TESTING	<b>PREAMBLE</b> <b>OBJECTIVE</b> <b>SCOPE</b> <b>ACTIVE SUBSTANCE</b> <b>PRODUCT</b> <b>ANNEX 1</b>	<p>J.P.: Jap. Pharmacopoeia; Ph. Eur.: Eur. Pharmacopoeia. *Analyzed every ten batches.</p>																																							
107	127	1 7 Version Aug. 2004																																							

### 7. 연구개발결과의 보안등급

	<b>코드번호</b>	<b>D-09</b>
○ 일반 등급 - 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음.		

### 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	<b>코드번호</b>	<b>D-11</b>
<b>가. 실험실 안전 점검</b>		
		<b>분류 기준</b>
<b>A등급</b>	<b>분기 1회</b>	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
<b>B등급</b>	<b>반기 1회</b>	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
<b>C등급</b>	<b>연 1회</b>	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실
<b>(1) 실험실 정밀안전진단 실시</b> 실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보		

보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

나. 교육 훈련

- (1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행 규칙 제 9조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)
- (2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속 연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등)
- (3) 안전교육 시간 및 수료인정기간
  - 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
  - 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)
- (4) 안전교육 과정
  - 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
  - A코스 : 생물·방사선 취급
  - B코스 : 화학·가스 취급
  - C코스 : 전기·기계 취급

다. 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

라. 안전 교육, 훈련 이행 실적

- 월 1회 연구책임자 안전 교육
- 분기별 전체 실험실 이용자 교육

소속기관		의료생명대학	안전관리책임자	소속기관장
		의생명대학과	김재	
		융합생화학전공		
교육·훈련 일시	2019년 3월 15일 / 5: 00 ~ 19: 00 (2시간)			
교육·훈련 인원	11 명	교육·훈련 실시자	김시경	(인)
교육·훈련 장소	실험실 600			
교육·훈련 구분	B* 장기 교육·훈련 □ 신규자를 위해 마련 교육·훈련 □ 특별 안전 교육·훈련			
교육·훈련 실시자 자격 조건	B* 조교수 이상으로 안전에 관한 경험과 학력이 충분한 자 □ 연구실 안전관리책임자 □ 적법한 자격을 만족하는 자 ( )			
교육·훈련 실시 내용	○ 교육·훈련 실시 내용 - 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 - 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 - 안전인 연구개발활동에 관한 사항 - 물질안전보건자료(MSDS)에 관한 사항 - 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 - 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 - 안전표지에 관한 사항 - 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항			

\* 매월 1일 지남일의 기록부 복사본을 서명함의 '연구실 안전관리책임자'에게 제출하세요. (4월 1일, 03120) ( 1 )

소속기관		의료생명대학	안전관리책임자	소속기관장
		의생명대학과	김재	
		융합생화학전공		
교육·훈련 일시	2019년 3월 15일 / 5: 00 ~ 19: 00 (2시간)			
교육·훈련 인원	8 명	교육·훈련 실시자	김시경	(인)
교육·훈련 장소	실험실 600			
교육·훈련 구분	B* 장기 교육·훈련 □ 신규자를 위해 마련 교육·훈련 □ 특별 안전 교육·훈련			
교육·훈련 실시자 자격 조건	B* 조교수 이상으로 안전에 관한 경험과 학력이 충분한 자 □ 연구실 안전관리책임자 □ 적법한 자격을 만족하는 자 ( )			
교육·훈련 실시 내용	○ 교육·훈련 실시 내용 - 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 - 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 - 안전인 연구개발활동에 관한 사항 - 물질안전보건자료(MSDS)에 관한 사항 - 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 - 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 - 안전표지에 관한 사항 - 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항			

\* 매월 1일 지남일의 기록부 복사본을 서명함의 '연구실 안전관리책임자'에게 제출하세요. (4월 1일, 03120) ( 1 )

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
1	논문	Korean red ginseng protects against doxorubicin-induced testicular damage:An experimental study in rats	건국대	교신 저자	Journal of Functional Foods	4.48	2015.10.15	단독사사	
2	논문	Korean red ginseng extract rejuvenates testicular ineffectiveness and sperm maturation process in aged rats by regulating redox proteins	건국대	교신 저자	Experimental Gerontology	3.529	2015.03.11	단독사사	
3	논문	Korean red ginseng attenuates doxorubicin-induced testicular dysfunction in rats by modulating inflammatory, oxidative and autophagy responses	건국대	교신 저자	Journal of Functional Foods	4.48	2018	단독사사	
4	논문	Korean red ginseng improves testicular ineffectiveness in aging rats by modulating spermatogenesis-related molecules	건국대	교신 저자	Exp Gerontol	3.529	2017.1.20	단독사사	
5	논문	Protective effects of Korean red ginseng against sub-acute immobilization stress-induced testicular damage in experimental rats	건국대	교신 저자	J Ginseng Res	4.053	2017.9.2	단독사사	

## 11. 기타사항

코드번호		D-13
○ 해당사항 없음		

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ ‘아이는 낳고 싶은데 ‘불임부부’증가’, 2010. 10. 17 건강보험심사평가 보도자료</li> <li>○ Current Reproductive Endocrinology 27(3): 487-516 (2000)</li> <li>○ ‘40대 이상 남성 3명 중 1명 ‘남성 갱년기’, 2013. 7. 2 데일리팜 뉴스기사</li> <li>○ ‘대한민국 의료관광 효자 부상 ’불임치료“, 데일리메디, 2012년 1월 4일 게재</li> <li>○ Aaron S, Kim ED, and Lipshultz LI. Contemporary approach to the male infertility evaluation. Current Reproductive Endocrinology 27: 487-516 (2000).</li> <li>○ Kobayashi H, Urashima M, Hoshi Y, Uchiyama H, Fujisawa K, Akatsuka J, Maekawa K and Hurusato M, Testicular morphological changes in children with acute lymphoblastic leukemia following chemotherapy. Acta Paediatrica Japonica 38: 640-643 (1996).</li> <li>○ Kim W, Hwang S, Lee H, Song H and Kim S. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular damage in guinea pigs, <i>BJU Int'l</i>, 83, 842-849 (1999).</li> <li>○ Hwang SY, Kim WJ, Wee JJ, Choi CS and Kim SK. Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. <i>BJU Int'l</i>, 94: 663 - 668 (2004).</li> <li>○ Hwang SY, Sohn SH, Wee JJ, Yang JB, Kyung JS, Kwak YS, Kim SW and Kim SK. <i>Panax ginseng</i> improves senile testicular function in rats. <i>J Ginseng Research</i> 34: 327-335 (2010).</li> <li>○ Gene Review: Androgen Insensitivity Syndrome (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1429/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1429/</a>)</li> <li>○ Ishigami, J. Department Urology, School of Medicine, Kobe University, Japan. <i>Japanese Journal of infertility</i> 16: 45-49 (1971).</li> <li>○ Kim EH, Park JD, Pyo SN, Rhee DK, Effects of non-saponin red ginseng components on multi-drug resistance, <i>J. Ginseng Research</i>. v.31: 74-78 (2007).</li> <li>○ Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. <i>Hormones</i>. 1:2-25 (1970).</li> </ul>	