

발간등록번호

11-1543000-002375-01

홀푸드형 멀티타겟 조절 장건강 증진용 식품 개발 최종보고서

2018. 10. 31.

주관연구기관 / (주)유니베라
협동연구기관 / 가천대학교

고부가가치 식품기술개발사업 R&D Report

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “홀푸드형 멀티타겟 조절 장건강 증진용 식품 개발” (개발기간 : 2014. 08. 01
- 2018. 07. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 10 . 31 .

주관연구기관명 : (주)유니베라

이 병 훈



협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단

황보택근



주관연구책임자 : 도 선 길

협동연구책임자 : 김 선 여

오 승 현

진 미 립

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의합니다.

제1세부연구기관 (주)유니베라 연구책임자 도선길
 참여연구원 신은주
 심규석
 김진완
 변인숙
 심규석
 최윤선
 성봉해
 정가영
 진유정
 송인근
 김민정
 좌혜정
 이소영
 박양희

제1협동연구기관 가천대학교 약학대학 연구책임자 김선여
 참여연구원 고영탁
 이택환
 조교희
 권오욱
 도문호
 서재욱
 박용운
 강민철
 Amna Parveen
 Lalita Subedi
 Ramu Ventakesan

제2협동연구기관 가천대학교 약학대학 연구책임자 오승현
 참여연구원 강주희
 박지윤
 우종규
 장영수
 장정은
 정현진
 최승호
 Pasupathi Sundaramoorthy

제3협동연구기관 가천대학교 의학전문대학원 연구책임자 진미림
 참여연구원 박보경
 천은호
 박선영
 Vikashi Kumarshah
 김지애
 신윤민
 안영하
 차양지
 최정준

보고서 요약서

| | | | | | |
|---------------|--|--------------------|--------------------------------|-------------------|---|
| 과제고유번호 | 114006-04 | 해 당 단 계 연 구 기 간 | 2014. 08. 01 - 2018. 07. 31 | 단 계 구 분 | (해당없음) |
| 연구사업명 | 단 위 사 업 | 농식품기술개발사업 | | | |
| | 사 업 명 | 고부가가치 식품기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 홀푸드형 멀티타겟 조절 장건강 증진용 식품 개발 Development of whole food type-functional food acting on multi targets for intestinal health | | | | |
| 연구책임자 | 도선길 | 총 연구기간 참여연구원 수 | 총: 46 명 내부: 45 명 외부: 1 명 | 총 연구개발비 | 정부: 1,200,000 천원 민간: 800,000 천원 계: 2,000,000 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | (주)유니베라 연구소 가천대학교 산학협력단 | | | 참여기업명: (주)유니베라 | |
| 국제공동연구 | 상대국명: (해당없음) | | | 상대국 연구기관명: (해당없음) | |
| 위탁연구 | 연구기관명: (해당없음) | | | 연구책임자: (해당없음) | |

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

| | |
|-------------------|--|
| 연구개발성과의 보안등급 및 사유 | |
|-------------------|--|

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구시설·장비 | 기술요약 정보 | 소프트웨어 | 화합물 | 생명자원 | | 신품종 | |
|----------|----|----|--------|---------|---------|-------|-----|-------|-------|-----|----|
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | 정보 | 실물 |
| 등록·기탁 번호 | 12 | 2 | | | | | | | | | |

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

- 백편두, 산약, 황기 각각의 소재로 장뇌축 (Gut-Brain-Axis) 컨셉을 접목시킨 장건강 증진용 건강기능식품을 개발하여 출시 후 3개월동안 864백만원의 매출을 창출함.
- 과민성 장증후군 환자 20명을 대상으로 실시한 백편두의 탐색적 연구에서 복부통증과 대변횟수가 모두 유의하게 감소하였고, 안전성을 확인하였음.
- 홉푸드형 가공기술과 염증성 장질환에 대한 고추냉이 등록특허 1건 및 항불안, 항우울 또는 항스트레스 활성을 갖는 백편두 등록특허 1건에 기재된 기술은 향후 IBD/IBS조절용 천연물의약품 개발의 기초기술로 이용될 수 있음.
- 본 과제의 연구개발성과는 12건의 논문 (SCI 11건, 비SCI 1건)으로 게재되었으며 10건의 학술대회 발표, 1건의 건강기능식품 소재 전시로 공개됨.
- 고구마유래 생리활성물질 중 flavonoid 중 특이 구조를 가진 성분 및 고추냉이의 주요 성분 중의 하나인 AITC에 의해서 MUC2가 증가되어 장염이 완화되는 것을 확인하여 선도물질로서 활용 가능성이 높을 것으로 판단됨.
- Zymosan을 이용한 IBS 동물 모델을 확립하고 IBS모델에서의 고추냉이, 백편두 및 고구마가 체중, 식이섭취량, 장 조직, 항우울/불안에 미치는 개선 효과를 확인함.
- 백편두를 처리한 IBS 동물모델로부터 뇌조직을 분리하여 각 조직에서의 신경전달물질에 대한 선택성과 감도가 높은 HPLC 분석의 확립은 향후 관련 질환 및 퇴행성뇌질환의 효능연구에도 큰 영향을 미칠 것으로 판단됨.

<국문 요약문>

| | | | | | |
|------------------------------------|--|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <p>연구의 목적 및 내용</p> | <p>염증성장질환(IBD, inflammatory bowel disease) 및 과민성장증후군(IBS, Irritable Bowel Syndrome)의 병인 연계 한의학적 약물분류 체계에 따라 멀티 타겟에 작용하는 지역 농산물 조합을 발굴하여 홀푸드 형태로 가공한 장건강 증진용 식음료 및 건강기능식품 기능성 원료를 개발함</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 염증성장질환(IBD) 및 과민성장증후군(IBS) 병인 연계 한의학적 약물분류 체계 적용으로 발굴된 지역 농산물에 대한 최적화 및 표준화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 최적화 및 표준화 연구 2. 후보 지역 농산물에 대한 장건강 증진을 위한 멀티타겟 (장운동, 배변장애, 염증/장점막손상, 스트레스/우울) 기반 기능성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - IBD 동물모델을 이용한 항염증 평가 및 기전연구 - IBS 동물모델을 이용한 장과민성 조절 기능 평가 및 기전연구 3. 제품화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 홀푸드 가공 기술 개발 - 지역 농산물 연계 식음료 제품화 연구 - 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 신청을 위한 탐색적 인체적용시험 실시 | | | | |
| <p>연구개발성과</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 장건강 증진용 식음료 개발 및 출시 1건 - 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 신청을 위한 탐색적 인체적용시험 완료 - 특허 등록 2건, 전시회 참가 1건, 논문 12건 (SCI 11건, 비SCI 1건), 학술대회 발표 11건, 인력양성 10건의 연구개발성과를 창출함 | | | | |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 장건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 매출 달성 (17억원/년) - 장 질환 관련 천연물 신약 개발 기반 마련 | | | | |
| <p>국문핵심어</p> | <p>홀푸드형</p> | <p>멀티타겟</p> | <p>장건강 증진</p> | <p>식음료</p> | <p>건강기능식품</p> |
| <p>영문핵심어</p> | <p>whole food type</p> | <p>multi-target</p> | <p>intestinal health</p> | <p>food & beverage</p> | <p>health functional food</p> |

<Summary>

| | | | | | |
|--|---|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <p>R&D Purposes</p> | <p>This study was performed to find local agricultural products that improves intestinal health with multi-targeting mechanisms. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> efficacy studies for inflammatory bowel disease (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS) were conducted on 12 natural products selected by Korean medicinal etiologic factors. The finally selected natural product was produced as health functional food for multi-targeting intestinal health and assessed in a pilot human clinical trial.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Optimization and standardization of local agricultural products selected by Korean medicinal etiologic factors 2. Examination of the local agricultural products on multi-target intestinal health functions (Impaired bowel movements, defecation disorders, inflammation/intestinal damages, anxiety/depression) <ul style="list-style-type: none"> - Efficacy studies using animal models for IBD - Efficacy studies using animal models for IBS 3. Product development <ul style="list-style-type: none"> - Research on whole food type health functional food - Product development with local agricultural products - Pilot human clinical trial | | | | |
| <p>R&D achievements</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Development and production of the health functional food that improves intestinal health with multi-targeting - Completion of the pilot human clinical trial to assess <i>Dolichos lablab</i> L. in people with IBS - Two published patents, 1 exhibition participation, 12 research papers (11 SCI, 1 non-SCI), 11 academic poster presentations, 10 doctor/master's degree graduates | | | | |
| <p>Plans to utilize R & D achievements (Benefit)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Achievement of approximately 1.7 M KRW/yr sales of the launched health functional food that improves intestinal health with multi-targeting - Establishment of foundation in the development of natural products drug on intestinal diseases | | | | |
| <p>Keywords</p> | <p>whole food type</p> | <p>multi-target</p> | <p>intestinal health</p> | <p>food & beverage</p> | <p>health functional food</p> |

< Table of Contents >

| | |
|--|-----|
| Chapter 1. Introduction | 8 |
| Chapter 2. Results | 19 |
| 1. <i>In vitro</i> screening of 12 natural products | |
| 2. Optimization and standardization of local agricultural products | |
| 3. Efficacy studies using animal models for IBD | |
| 4. Efficacy studies using animal models for IBS | |
| 5. Product development | |
| Chapter 3. Achievements and contribution to relevant field | 176 |
| Chapter 4. Reference | 181 |
| Appendix | 182 |

〈 목 차 〉

| | |
|---|----|
| 1장 연구개발과제의 개요 | 11 |
| 1절 연구개발 목적 | 11 |
| 2절 연구개발의 필요성 | 11 |
| 3절 연구개발 범위 | 18 |
| 2장 연구수행 내용 및 결과 | 22 |
| 1절 소재 선정을 위한 후보 농산물 (12종) 연구 | 22 |
| 1. 후보 농산물 (12종) 표준 추출물 제조 및 주요 성분 분석 | 22 |
| 가. 후보 농산물 수집 (12종) | 22 |
| 나. 효능평가용 후보 농산물 추출최적화 시험 및 소재공급 | 22 |
| 다. 연구대상 선정을 위한 대량시료 추출물 공급 | 23 |
| 라. 연구대상 개별 소재의 지표성분 설정 및 확보 | 23 |
| 마. 주요 후보 소재에 대한 문헌정보 수집 | 24 |
| 2. 염증성 장질환 동물모델 확립 및 후보 농산물의 IBD에 대한 효능 평가 연구 | 27 |
| 가. 급성 대장염 및 대장암 마우스 모델 확립 | 27 |
| 나. 12종 후보 농산물에 대한 가능성 평가 후 우수한 천연소재 선정 | 29 |
| 3. 과민성장증후군 동물모델 확립 및 후보 농산물의 IBS에 대한 효능 평가 연구 | 31 |
| 가. 과민성장증후군 Control model 확립 | 31 |
| 나. 장운동성 (GI transit) 실험방법 구축 | 33 |
| 다. 후보물질 스크리닝 | 33 |
| 4. 소재 선정을 위한 후보 농산물 (12종) 연구 결과 | 40 |
| 2절 [제1협동연구] 표준화 연구 | 40 |
| 1. 고추냉이 표준화 연구 | 40 |
| 가. 고추냉이 뿌리에서의 주요 지표성분 함량분석 | 40 |
| 나. 고추냉이 부위별 및 추출용매별 지표성분의 함량 분석 | 43 |
| 다. 시중 유통 중인 고추냉이 제품의 주요 성분 함량 비교 평가 | 44 |
| 라. 고추냉이의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 | 45 |
| 2. 백편두 표준화 연구 | 47 |
| 가. 백편두의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 | 47 |
| 나. 백편두 발아과정에 따른 신경보호 효과 연구 (추가 연구) | 50 |
| 다. 백편두의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 | 52 |
| 라. 백편두 Sample의 효능 평가 및 기전연구 | 56 |
| 마. Neurotransmitter Biomarker Analysis 기전연구 | 58 |
| 3. 고구마 표준화 연구 | 59 |
| 가. 고구마의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 | 59 |
| 4. 안정성 평가 | 73 |
| 가. 장기보존시험 | 73 |
| 3절 [제2협동연구] 염증성 장질환 동물모델을 이용한 효능 평가 연구 | 80 |
| 1. IBD 질환 모델 확립 및 후보소재 (일반추출, 홀푸드) 효능 연구 | 80 |
| 가. 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 | 80 |
| 나. 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석 | 80 |
| 다. 선발된 천연소재의 용량별 예방효과를 병리조직학적으로 확인 | 81 |
| 라. 마우스 모델을 이용한 8종 후보소재의 기능성 평가 | 82 |
| 마. 3차년도 출시 예정 농산물 연계 장건강 식음료 제품화를 위한 추가 평가 | 83 |

| | |
|---|-----|
| 2. IBD 동물 모델을 이용한 용량 확정 실험, 최적 조합 도출 연구 | 86 |
| 가. 1차년도에 선별된 후보 소재를 이용하여 최적조합 도출 | 86 |
| 나. 선별된 후보소재의 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 조절 분석 | 88 |
| 다. 대장염 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석 | 92 |
| 라. 대장염 억제 기전 확인을 위한 염증관련 면역세포의 분포 면역형광염색 분석 | 93 |
| 마. 대장염 매개성 대장암 모델의 확립 | 96 |
| 3. IBD 모델을 이용한 (IRB 제출을 위한) 전임상 기반 연구 | 97 |
| 가. 대장염 및 대장염 매개 대장암 모델에서 2차년도에 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인 | 97 |
| 나. 선발된 최적조합 소재의 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 | 100 |
| 다. 선발된 최적조합 대장염/암 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석 | 102 |
| 라. 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석 | 106 |
| 마. 선발된 최적조합 소재의 유효성 확인 및 독성 검증 | 106 |
| 4. IBD 모델을 이용한 경쟁제품 효능 비교 연구 | 111 |
| 가. 대장염 모델을 이용하여 선발된 최적조합소재와 경쟁제품의 효능 비교 | 111 |
| 나. 최적조합소재와 경쟁제품의 효능 비교 | 113 |
| 다. 확립된 대장염 모델에서 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인 .. | 114 |
| 라. 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 | 115 |
| 4절 [제3협동연구] 과민성장증후군 동물모델을 이용한 효능 평가 연구 | 117 |
| 1. IBS 동물모델 구축 | 117 |
| 가. 몸무게 변화 및 식이량 측정 | 117 |
| 나. Visceral pain related behaviors, 항우울작용, 대장의 조직학적 검사 | 117 |
| 다. 용량 연구 결과 | 117 |
| 2. IBS 동물모델을 이용한 효능연구 | 117 |
| 가. 백편두 (DL) | 117 |
| 나. 고추냉이 (WK) | 121 |
| 다. 코팅된 고추냉이 | 124 |
| 라. 발아백편두 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험 | 130 |
| 마. 고구마 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험 | 131 |
| 바. 고구마+발아백편두 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험 | 132 |
| 사. 고추냉이 : IBS 동물모델을 이용한 설사 개선 실험 | 133 |
| 아. 고추냉이 추출물 투여 생쥐의 장/변 변화 측정 | 133 |
| 자. 고추냉이 : IBS 동물모델을 이용한 pain-relate behaviors 실험 | 133 |
| 3. [4차년도] IBS 동물모델을 이용한 작용기전 연구 : 백편두 | 134 |
| 가. 장의 가시적 형태 변화 평가 | 134 |
| 나. 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정 | 135 |
| 다. 대장 조직에서의 염증성 사이토카인 측정 | 136 |
| 라. 대장의 조직학적 검사 | 136 |
| 마. 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석 | 137 |
| 바. 항불안 및 항우울 작용 (elevated plus maze test) | 138 |
| 사. 대뇌 전전두엽 피질 (prefrontal cortex)에서의 c-fos 단백질 발현 분석 | 139 |
| 아. 생쥐의 혈액에서 코르티코스테론 측정 | 140 |
| 자. 장에서의 신경전달 물질 측정 | 140 |
| 차. 전전두엽 피질에서의 신경전달물질 측정 | 141 |
| 카. 해마에서의 신경전달물질 측정 | 141 |
| 타. 해마에서의 BDNF 발현량 측정 | 142 |

| | |
|--|-----|
| 5절 [제1세부연구] 제품화 연구 | 143 |
| 1. 장건강 증진용 식품 출시 | 143 |
| 가. 특허 검토 | 143 |
| 나. 지역농산물 후보소재 원료 확보 및 공급 | 144 |
| 다. 식품 가공 기술 검토 | 150 |
| 라. 홀푸드 가공기술개발 (bioavailability, taste masking) | 155 |
| 마. 국내외 사례 조사 (경쟁제품) | 162 |
| 바. 제형 검토 및 관능평가 (장용성, 음료, 과립 등) | 164 |
| 사. 홀푸드 가공기술개발 (식감 및 기호도 증대), 처방개발연구 | 165 |
| 아. 관능검사 | 166 |
| 자. 제제 및 제형 연구 | 166 |
| 차. 장건강 증진용 식품 시제품 제작 | 167 |
| 카. 최적조합소재의 관능평가 및 taste masking | 168 |
| 타. 제품 출시 | 168 |
| 2. 인체적용시험 | 171 |
| 가. 인체적용시험 개요 | 171 |
| 나. 인체적용시험 방법 | 172 |
| 다. 백편두 인체적용시험 샘플 제조 | 174 |
| 라. 인체적용시험 시험물질 | 174 |
| 마. 인체적용시험 결과 | 175 |
| 3. 소재 전시회 출품 | 177 |
| 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 | 179 |
| 1. 연차별 연구개발의 목표 및 달성도 | 179 |
| 가. 1차년도 (2014.08 - 2015.07) | 179 |
| 나. 2차년도 (2015.08 - 2016.07) | 180 |
| 다. 3차년도 (2016.08 - 2017.07) | 181 |
| 라. 4차년도 (2017.08 - 2018.07) | 182 |
| 2. 목표 미달성 시 원인 (사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등) | 182 |
| 3. 연구결과의 활용 계획 등 | 183 |
| 4장 참고문헌 | 184 |

1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목적

염증성장질환 (IBD, inflammatory bowel disease) 및 과민성장증후군 (IBS, Irritable Bowel Syndrome)의 병인 연계 한의학적 약물분류 체계에 따라 멀티타겟에 작용하는 지역 농산물 조합을 발굴하여 홀푸드 형태로 가공한 장건강 증진용 식음료 및 건강기능식품 기능성 원료를 개발함.

- 장건강 증진용 식음료 개발 및 출시 1건 (3차년도)
- 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 신청 1건 (4차년도)

2절 연구개발의 필요성

- ✓ 현대인들은 스트레스, 우울, 장내 염증 등 다양한 원인에 의한 장건강 악화로 심각한 삶의 질 저하를 겪고 있음.
- ✓ 장 질환은 복잡한 병리기전으로 인하여 적절한 치료제가 부재하므로 멀티타겟을 조절하는 천연물 및 한방 소재의 활용 가능성 높음.
- ✓ 지역 농산물을 홀푸드 형태로 가공하여 장건강 기능성을 극대화할 수 있음.

1. 만성장질환은 삶의 질을 현저히 떨어뜨리는 난치성 질환임

과민성 장증후군 (IBS)과 염증성 장질환 (IBD)은 전 세계적으로 발병률이 급속히 증가하고 있음.

가. 과민성 장증후군

과민성 장증후군 (Irritable bowel syndrome, IBS)은 1차 의료기관을 방문하는 가장 흔한 이유 중 하나로 복통 혹은 복부불쾌감, 장관의 비정상적인 운동성으로 인한 설사 (diarrhea-IBS) 혹은 변비 (constipation-IBS) 또는 설사변비 반복 (mixed-IBS)의 대변형태의 변화, 배변 후 증상의 완화를 특징으로 하는 대표적인 만성 기능성 위장관 질환임. 과민성 장질환의 증상들은 기질적 또는 생화학적 원인으로 설명 될 수 없으며 아직까지 생물학적 표지자가 밝혀져 있지 않음.

과민성 장증후군의 중요한 병태생리기전으로 장관의 운동이상, 내장감각과민성 (감각 역치가 낮아 건강한 사람이 느끼지 못하는 작은 팽창에도 통증을 호소함), 중추신경계의 조절이상, 장관 감염 및 염증, 정신사회적 요인 등이 제시되고 있으나 근본적인 원인은 아직 잘 모르고 있는 실정이어서 통상적인 약물치료는 주로 증상을 개선시키는데 초점이 맞추어져 있음. 위장관의 감각과 운동 생리는 중추신경계 조절을 받으므로 환자들의 증상은 정신사회요인 (스트레스, 심리 상태, 사회지지)에 의해 영향을 받게 됨 (그림1.1).

과민성 장증후군 환자의 삶의 질은 매우 낮음. 미국 국민의 평균치 보다 삶의 질 점수가 유의적으로 낮으며 당뇨병이나 말기 신부전 환자들보다 일부 영역의 점수가 뚜렷하게 낮으며, 여행, 스포츠, 사회 모임 등에 어려움을 나타냄. 이들은 요통이나 두통, 성교통, 요로계 증상, 수면 방해 등이 건강인 보다 더 자주 나타나고 이로 인해 실업, 직업 변화, 조기 은퇴가 유발됨.

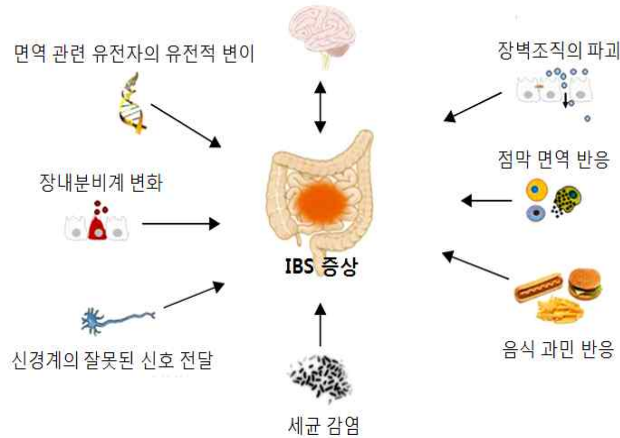


그림1.1. 과민성 장증후군의 병태생리

나. 염증성 장질환의 증가

건강보험심사평가원의 보고에 따르면 국내 크론병 및 궤양성 대장염 환자는 2009년에서 2012년 3년 사이 40,144명에서 44,897명으로 약 11.8% 증가하였으며 10대부터 70대까지 다양한 연령층에서 발병함. 특히 사회, 경제 활동의 주역인 20대~40대가 전체 환자의 절반 이상인 약 56.4%를 차지하며 환자들은 질환으로 인해 업무능력 저하, 대인관계형성 장애 등으로 인한 정신적 문제를 야기하는바 사회적인 문제로 대두되고 있음. 현재 사용되고 있는 치료제는 infliximab, adalimumab 그리고 certolizumab pegol과 같은 항TNF제제를 포함한 염증성 cytokine 억제제들이 사용되고 있으나 30%이상의 환자에서는 치료제에 대한 반응이 없고 항체 형성으로 인한 치료 반응감소, 그리고 감염 또는 악성림프종과 같은 심각한 부작용의 우려가 있는바 보다 적절한 치료제의 개발 또는 예방할 수 있는 방법이 시급한 실정임.

염증성 장질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)은 위장관의 만성 염증상태를 나타내는 용어로서 크론병 (Crohn's disease, CD)과 궤양성장염 (Ulcerative colitis, UC)으로 구분되며 이들 모두 장관의 염증과 완화가 반복 (swing)되는 것이 특징임. 환자들은 복통, 경련, 설사, 소화불량, 직장 출혈, 체중감소, 악액질 등에 시달림. CD와 UC는 염증 부위로 구별될 수 있음. CD는 transmural inflammation이 terminal ileum 에 주로 나타나지만 장관 전체에 걸쳐 나타나는 반면 UC는 colon에 국한되어 나타남. IBD의 병인에 대하여는 많은 부분이 알려져 있지 않으며 면역계 결핍에 의한 공격적 염증 반응이라기보다는 염증 반응의 실조 (dysregulation)로 이해됨. 궤양성 대장염과 크론씨병은 북유럽과 북미의 백인들에게는 비교적 흔한 질환으로 최근 들어 우리나라나 일본 등 과거 저발생 지역의 발생률이 빠른 속도로 증가 추세를 보이고 있어 점차 지역적, 인종적 차이에 따른 발생률의 간격이 좁아지고 있음. 서유럽과 미국에서 궤양성대장염의 발병률은 10만 명당 70~150명이고, CD는 10만 명당 40~100 명이고, 약 70만 명의 미국인이 염증성 장질환 환자임. 모든 연령층에서 발병하지만 15~35세가 가장 발병률이 높음.

2. 만성 장질환으로 거대한 사회적 비용이 발생함

과민성 장증후군 환자의 약 40%에서 증상이 매우 잦고 정도가 심해서 직장 결근, 사회 활동 회피, 성생활 감소, 여행을 회피하고 집안에서 많은 시간을 보내며 약제 복용 등 생활의 변화가 나타남. 미국에서는 결근의 원인으로 감기 다음으로 두 번째를 차지하며 연간 결근 일수는 대조군이 5일인데 비하여 과민성 장증후군 환자에서는 약 13일임. 과민성 장증후군 환자에서는 다른 기관의 증세로 병원을 방문하는 횟수가 잦고 개복 수술을 받는 예가 많음. 미국의 경우 1년에 약 240-350만 명이 과민성 장증후군으로 병원을 찾으며 이로 인해 220만 건의 처방전이 발행되고 매년 직접적인 의료비로 약 8조원이 소요되며 간접비용까지 포함하면 25조원 정도 임.

염증성 장질환인 크론병 (Crohn's disease)과 궤양성 대장염 (ulcerative colitis)의 2019년 주요 염증성 질환 세계 치료제 시장 규모는 현재에 비해 60% 이상 급증, 56억 달러에 이를 것으로 전망됨. 2007년 미국의 National Hospital Discharge Survey data에서 치료기술의 발전에도 불구하고 염증성 장질환의 입원과 수술비용은 1990년 이후 감소하지 않았고 오히려 대장 수술 후 안정된 크론병 환자의 입원과 궤양성 대장염 환자의 입원, 수술비용은 유의하게 증가되었다고 보고됨.

3. 면역-신경-내분비계가 관여하는 복잡한 병리기전¹⁾²⁾

IBS는 기능성 질환이고 IBD는 염증성 질환으로 여겨지나, IBD 환자는 염증의 완화시기에 IBS와 유사 증상을 나타내며 IBS환자는 감염 후에 IBD와 같은 만성 염증 상태로 진행됨. 두 질환 모두 특발성으로 면역계, 신경계, 내분비계의 실조가 관여하는 복잡한 병리기전을 나타내며 단일 약물로 치료가 어려움. 두 질환 모두 면역세포수의 증가, 면역세포와 신경세포의 활성화가 나타나며 스트레스에 의해 악화됨. 또한 IBS의 치료를 위하여 IBD의 치료제인 aminosalicylic acids를 사용 하였을 때 증상이 개선되는 결과가 보고되고 있음. 즉 두 질환의 병리 기전이 중첩될 가능성이 있다는 것을 나타냄.

4. 임상적 응용가능성 높은 소재개발 기초연구 전략

장건강 증진 작용이 있는 소재 개발을 위한 기초연구로서 ① 스트레스 및 우울에 의한 장기 기능 저하를 조절할 수 있는 (장운동성, 배변, 점막 보호) 기능성과 ② 염증에 대한 작용을 체계적으로 평가하고 연구하는 것이 임상적으로 응용가능성이 높은 효율적인 전략임.

5. 과민성 장증후군 치료제 현황

만성 장질환 연구자들은 그간에 개발된 치료제가 효과적이지 않다는 것을 인식하고 향후 치료제 연구방향에 대하여 통합적 차원에서 접근할 것을 제시하며 다음과 같이 주장함.

"New drugs targeting the entire pathophysiologic mechanism rather than only an individual part or a specific receptor" "Nonselective agents multiply targeting of whole pathophysiologic process (ex. dysmotility sensory disorder, inflammation, psychological) rather than a highly selective single mechanism"⁶⁾

과민성 장증후군의 약물요법은 아직까지 만족스럽지 못하며 위약에 비하여 치료 이득이 크지 않음. 또한 약제 효과에 대한 근거가 취약함. 약물 요법은 과민성 장증후군의 전반적인 증상을 개선시키는 약제와 단일 증상에 대한 약제로 나눌 수 있는데 단일 증상에 대한 약물 요법은 효과적이지 않음. 통증치료, 항우울제, 설사나 변비를 조절하는 약물이 사용되고 있음. IBD는 항염증 약물이 사용되고 있음.

IBD와 IBS의 병태생리가 충분히 이해되지 못하였고 현재 치료제의 한계로 인하여 환자들은 천연물을 이용한 대체치료를 이용하는 경우가 많으며 이들을 IBS 치료제로 개발하고자 하는 연구가 증가되고 있음. 1998년에 20개 한약재로 구성된 복합제가 인간에 유의적 효과가 있음이 보고 되었으며⁴⁾, Menta piperita oil, 전통의약인 Tong-xie-ning⁵⁾, STW-5⁶⁾ 연구 결과가 있음. 특히 STW-5 (Iberogast)는 9개 한약으로 구성된 전통 의약 처방으로 IBS의 통증과 설사나 변비를 조절하는데, 세로토닌 수용체와 무스카린 수용체에 결합하여 운동성이나 내장감각과민성을 개선시키는 것으로 보고됨. 임상 시험에서 유의적 결과가 인정되었고 비교적 활발히 연구되고 있음. 최근에는 STW가 DDS를 이용한 IBD 모델에서 치료 효능이 있다는 것이 보고함으로써 염증 억제 작용을 나타냈음. 즉 천연소재들이 multi mechanism에 작용함으로써 장 기능을 개선할 수 있다는 것을 나타냄.

장건강 증진작용을 지닌 대표적 기능성 식품은 유산균 제제로서 장내 유익 세균보호 및 유

해 세균 저해에 의한 장내 건강을 통하여 배변 활동에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 가장 큰 제품군을 형성하고 있으며, 식이섬유를 이용한 배변 활동 증진작용을 이용한 제품들이 사용되고 있음. 그러나 본 연구과제에서 제시하는 장건강 증진작용 (염증 및 과민성)에 대한 효과는 미미한 편임.

- ① 현대인들은 정신적 불안요소 (스트레스, 우울)와 장내 염증등의 다양한 원인에 의하여 장기능이 저하되고 결과적으로 설사, 변비, 복부 불편감, 흡수 저하, 기력 쇠진 등과 같은 증상이 나타나게 되어 심각한 삶의 질 저하를 겪고 있음. (본 과제의 연구대상은 만성 장질환으로 진단 받은 환자가 아님)

따라서, 현대인들이 주로 시달리고 있는 장과민성 증상을 복합적으로 조절할 수 있는 천연 소재를 발굴하여 장의 기능성을 증진하고 나아가 질병을 예방할 수 있는 기능성 식품을 개발하는 것은 매우 중요함.

6. 농촌 지역 기반 6차 산업 모델 제시를 통한 농업과 식품산업의 동반성장 도모

한편, 최근 창조경제의 일환으로 농촌 지역에서는 6차 미래형 산업의 활성화 필요성에 대한 인식이 확대되고 있음. 농업의 6차 산업화는 생산(1차 산업), 가공(2차 산업), 유통·판매·관광·서비스(3차 산업)까지 종합하여 부가가치를 창출하는 농업분야의 수익모델로, 임실 치즈마을과 완주 로컬푸드가 그 좋은 예임. 임실 치즈마을은 마을주민 주도로 낙농, 유가공, 체험관광을 상품화 했고, 완주 로컬푸드는 지자체와 법인 주도로 생산, 가공, 유통(직판장)을 연계해 성공적인 6차 산업을 실현하고 있음.

과민성 장증후군과 염증성 장질환과 같은 만성 장질환은 ‘삶의 질’을 현저하게 저하시키는 질환이므로, 대증적 약물 치료 또는 장건강증진용 식품의 섭취에 정신적 안정 및 스트레스 해소에 도움이 되는 휴양, 교육 등 체험형 서비스를 접목함으로써 대상자의 삶의 질 향상에 도움이 될 수 있음.

본 연구 개발 과정에서 해당 산지의 지자체 또는 관할 기관과 참여기업이 협력 과제를 수행함으로써 지역 주민 주도로 참여 기업의 유통 조직을 활용한 적극적 체험형 서비스 사업(유통 - 체험 - 치유 통합형)을 6차 미래형 산업의 한 모델로서 제시할 수 있음. 이는 생산 및 단순 가공 수준의 농가 소득에 고부가가치 서비스로 소득 및 고용 창출과 지역 경제 활성화에 기여할 수 있음.

◇ 농업·농촌의 6차 산업화 추진을 통해 2017년까지

- 매출액 100억원 이상의 6차산업화 주제 1,000개 육성
- 농가의 농외소득 연평균 증가율 7.5% 달성
- 고령농·여성 등을 위한 농촌지역 일자리 매년 5천개 창출을 목표

◇ 성장단계별 차별화된 맞춤형 지원체계 구축, 지역 네트워킹 강화, 인적·제도적 기반 구축

① 지역과 주민이 주도하는 6차 산업화 성장단계별 육성체계 구축

- (사업초기) 농산물 종합가공센터 확대, 6차 산업화 창업보육센터 지정(중기청), 은퇴전문가 기술·경영 고문제 도입, 단체급식 및 로컬푸드 매장 확대
- (성장단계) 6차산업화 사업자 인증제 도입, 자본·기술부족 및 판매애로 해소에 중점(R&D, 모태펀드, 농협 등에 전문매장, 해외 안테나숍 설치)

② 6차 산업화 촉진을 위한 지역 네트워킹 강화

- 6차 산업화 협의체 구성, 공동사업 추진시 재정지원, 공역 중간지원조직 지정

③ 6차 산업화를 위한 인적 역량 강화 및 제도적 기반 구축

- 농업인, 귀농·귀촌 희망자, 농과계 학생에 대한 교육 확대
- 농촌산업지원특별법 제정으로 시·군의 6차 산업화 계획수립 추진
- 소규모 식품·가공 시설기준 조려 제정 유도, 농가민박의 유료 조식 허용

자료 : 농림축산식품부(2013).

한국의 6차 산업화 유형구분 예시

| | |
|---|--------------------------|
| <p>■ 생산중심형 - 생산이 핵심이고 가공서비스는 부가사업. 예) 충남 홍성 문당리 친환경농업 마을</p> | - 2·3차를 통한 생산부문 활성화가 중요. |
| <p>■ 가공중심형 - 소비자니즈를 반영한 가공상품 개발이 핵심. 예) 충남 서천 달고개모시마을</p> | - 인터넷, 위탁판매 등 다양한 판로 확보. |
| <p>■ 유통중심형 - 생산유통의 공간적 연계시스템 구축. 예) 전북 완주 유통농협 로컬푸드 직매장</p> | - 로컬푸드 직판장 등 매장운영 역량. |
| <p>■ 관광·체험중심형 - 생산·가공과정에서 소비자참여가 핵심. 예) 전북 임실 지즈마을</p> | - 지역내 다양한 유·무형자원의 연계. |
| <p>■ 외식중심형 - 생산·가공·외식이 동시에 이루어짐. 예) 강원 태백 청죽 테마 영농조합</p> | - 식재료, 진정성, 맛의 스토리텔링화. |
| <p>■ 지류중심형 - 기능성 및 약용 농산물 재배 및 가치 연계. 예) 인천 강화 아르미어빌드</p> | - 원예, 심신치료 등 관련 전문성 강화. |

자료 : 농촌진흥청(2013).

7. 천연원료 소재의 품질관리 필요성

가. 천연물 및 천연물제제의 중요성

- 한국을 비롯하여, 중국, 일본은 동일한 한약재를 전통의학 (한의학)에 근거하여 고대로부터 사용하고 있으며, WHO도 1960년 말부터 현대 합성의약품의 개발에 들어가는 비용에 따른 고가의약품의 한계를 극복하기 위해 생약의 중요성을 깊이 인식하고, 한약을 1 차 건강관리를 위해서 사람들이 쉽게 사용할 수 있는 가치 있는 자원으로서 합리적으로 안전하고 효과가 있다고 입증된 것을 사용하도록 권장하고 있음.
- 한편 국내 한약시장에서 유통되고 있는 한약재의 종류는 300 여종을 상회하고 있으며 한약재는 질병치료는 물론 건강 보조식품 또는 보약의 개념으로 국민소득 증가와 더불어 수요는 격증되고 있음. 2000 년도 기준으로 국내 한약재 소비량은 88,411 톤, 수입량은 59,324 톤으로서 한약재가 국민건강에 기여하는바가 매우 큰 것을 알 수 있음.
- 인구가 고령화되고 각종 만성, 퇴행성 질환 환자가 증가하면서 특별한 치료제가 존재하지 않거나 지속적인 의약품 투여가 필요한 경우, 다양한 적응증에 대한 치료가 요구되는 경우 등에 천연물 및 천연물제제에 대한 수요가 증가하고 있으며 이러한 경향은 점차 지속될 것으로 예상됨.

나. 천연물 소재 및 천연물 제제의 품질관리의 중요성

- 국내에서 생산되는 일부분의 천연물만 국내에서 필요한 수요를 부분적으로 충당하고 대부분은 수입에 의존하고 있음. 천연물 소재는 재배 (수확) 조건, 생산 및 제조과정 등에 따라 그 품질이 매우 다양할 수 있으며 각 국가 별로 이에 대한 적절한 관리방법 (규격 및 기준)이 없거나 있다하더라도 서로 다른 경우가 많기 때문에 수입 소재에 대한 체계적 품질관리가 요구됨.
- 현재는 유통 과정에서 별도의 효능 평가나 화학적 성분분석 등이 수행되지 않고 통상적인 외부 형태에 의한 확인 및 평가가 이루어지고 있기 때문에 보다 과학적인 품질관리 체계 확립이 요구됨. 특히 외국산 천연물소재가 정품으로 수입되었다고 하더라도 기원식물, 공용부위, 성분, 오용, 오칭 등의 차이가 있는 품목도 있어 이를 평가할 수 있는 적절한 평가법 개발이 요구됨.
- 천연물의 절도, 추출 용매의 양, 추출방법, 추출 온도 및 시간 등을 전통적인 방법과 비

교 검토하여 표준 탕제 제조지침 마련을 통한 최적의 표준공정 조제법이 필요함.

- 천연물 소재의 과학화, 표준화, 규격화 작업이 국내 및 국외에서 시작되고 있고, 더 나아가서는 이러한 천연물 소재로 조제한 제제에 대해서도 꾸준히 과학적인 품질 평가 방법이 요구되어지고 있음.

다. 천연물 소재 및 천연물 제제 사용의 국제적 동향

- 국제의약허가기관대표자회의 (ICDRA)에서는 1991 년 「생약 관련의약품 평가지침」을 채택하고, 1992 년에는 「생약의 안정성 유효성 평가를 위한 연구 방향」을 제시하여 생약의 과학화연구가 활발히 진행되고 있음. 이러한 WHO의 권장책과 더불어 미국을 비롯한 서구 선진국도 점차 증가되고 있는 생약산업을 인식하고, 미국 정부가 대체보완의학 (complementary and alternative medicine, CAM)이라는 새로운 의학 영역을 1992 년부터 정책적으로 지원하기 시작하여 국립보건원 (NIH) 산하에 대체보완의학센터를 설립, 집중적으로 지원하고 있음.
- 최근 천연물 소재의 규격에 대한 통일 등의 문제가 대두됨에 따라 생약에 관해서는 WHO 서태평양지역본부 (WPRO)가 적극적으로 추진하여 생약의 국가간 조화를 위한 생약규격국제조화포럼 (FHH ; *Forum for the Harmonization of Herbal Medicines*)이 2003 년 3 월에 창립되었으며 한국, 중국, 일본, 베트남, 홍콩, 싱가포르, 호주 및 미국 8 개국이 참여하고 있음.

라. 천연물 소재 및 천연물제제 품질관리를 위한 국내외 동향

○ Fingerprint analysis

- 특정 성분만을 marker로 설정 이것의 함량 범위를 측정하는 품질관리 방법으로는 수많은 성분들로 인한 천연물 소재의 품질변화와 활성의 변화를 반영함. 천연물제제 개발을 위해서는 천연물 소재의 다양한 성분과 작용 및 상호작용을 반영할 수 있는 새로운 품질관리 방법인 fingerprint 패턴 분석 자료가 요구됨.
- 중국에서는 HPLC를 이용한 fingerprint analysis를 천연물 소재와 Qingkailing (주사제), Danshen Dropping pill, Yiqing 제제 등의 품질동등성 연구에 도입하고 있으며 chemical fingerprint를 이용한 천연물 주사제의 품질관리를 SFDA에서 규정하고 있음. 유럽에서는 HPLC, MS, NMR 등을 이용하여 식품 또는 원료생약에 대한 chemical fingerprint를 확보하는 연구가 다수 이루어지고 있으며, 최대한의 정보를 담기 위한 분석법 개발, 산지별 또는 다른 요인에 따른 classification, 여기에 기여하는 성분의 확인 등을 주목적으로 하는 metabolomics 연구가 주를 이루고 있음.
- 최근 DAD, MS 또는 NMR과 연계된 HPLC (hyphenated HPLC)를 사용하여 얻어지는 chemical fingerprint를 천연물의 품질관리 목적에 사용하고자 하는 시도는 늘고 있음
- 학술적 목적으로 연구자가 개별적으로 HPLC-UVD, LC-MS, NMR 등의 장비를 활용하여 chemical fingerprint를 얻고 이를 분석하는 경우는 있으나 실제 생산현장 또는 국가차원의 천연물 품질관리에는 이들 고가 장비가 활용되는 경우는 거의 없음.

마. 천연물 소재 성분 연구의 필요성

- 아직까지 국내에서는 천연물소재 및 천연물제제 품질관리를 위해서 한두가지 지표성분을 설정하고 이를 정량하고 이에 대해 기준을 설정하는 방식으로 진행되고 있음.
- 단일생약제제의 경우 1종, 복합제제 (n 개 생약제제 혼합)의 경우 n개의 지표성분 분석으로도 가능하였음.
- 현재 지표성분이 설정된 품목은 49종으로 대부분 1종의 지표성분이 함량분석용으로 고시되어 있고, 8종의 품목만 2종의 지표성분이 고시되어 있음.
- 천연물소재에 대한 품질관리 중요성이 점차 강조되고 있으므로 지금까지 지표성분이 설정된 품목들 외에도 점차 많은 품목들에서 지표성분이 설정되어 관리될 것으로 예상됨. 중국의 경우에도 약전에 수재되는 천연물소재 품목 자체도 증가되고 지표성분이 설정되는 품

- 목의 수도 대폭 증가할 것으로 예상됨.
- 단일 천연물소재라 하더라도 포함되어 있는 다양한 성분들의 상호작용에 의해 효능이 나타나게 되므로 천연물소재에 대한 성분연구는 지속적으로 이루어져야 함. 천연물소재의 다양한 성분들을 연구함으로써 천연물소재 효능 기전을 밝히는데 활용할 수 있으며 안전관리 및 품질관리의 수준을 높일 수 있음.

3절 연구개발 범위

| 연구 목표 | 연구 범위 |
|---|--|
| 장건강 증진용 식품 출시 | <ul style="list-style-type: none"> - 지역농산물 후보소재 원료 확보하였으며, 미확보 시 국내 재배를 위한 연구를 진행함. - 장건강 증진용 식품 시제품 제작하여 관능테스트, 제제테스트, 효능검증을 위한 필드테스트를 완료함. - 장건강 증진용 건강기능식품 ‘비움 클레즈’를 출시함. |
| 인체적용시험 실시 | <ul style="list-style-type: none"> - 인체적용시험 protocol 개발 완료함. - IRB 승인을 완료함. - Pilot 인체적용시험을 실시 완료하였으므로 아주우수로 평가함. |
| 기능성 개별인정 신청 | <ul style="list-style-type: none"> - Pilot 인체적용시험 진행으로 인해 식품의약품안전처 건강기능식품 기능성 원료 인정 미신청함. |
| <ul style="list-style-type: none"> - 후보소재 표준 추출물 제조 - 후보 소재 홉푸드형 원료 제조 - 개별 시료 분석법 개발 | <ul style="list-style-type: none"> - 효능평가용 후보소재 12종을 선별하여 지역산지별, 유통사별 유사도 분석 후 표준추출물 및 홉푸드 원료를 각각 제조한 후 그 시료를 활성팀에 제공함 - 홉푸드형 각각의 개별 소재 분석법 개발 및 지표성분 설정 즉 고추냉이를 추출용매별 및 각 부위별 시료의 추출물을 제조한 후, HPLC를 이용하여 지표성분인 sinapic acid 및 AITC의 함량을 분석. - 시중 유통 중인 고추냉이 제품의 주요성분 함량 비교 분석하였음. |
| <ul style="list-style-type: none"> - 가공 소재 표준화시료의 지표 및 유효성분 연구 - 가공조건에 따른 원료 기준 및 시험법 확립 - 최적조합소재 도출 | <ul style="list-style-type: none"> - 가공소재의 지표성분 및 유효성분 설정 후 기전연구팀에 성분 제공하였음 - 고추냉이의 지표 및 유효물질인 Sinigrin 및 AITC의 HPLC 분석법 확립 & 함량측정 - Q-TOF/LC-MS/MS와 Triple Quadrupole LC/MS 분석 및 천연물 라이브러리 매칭을 통한 백편두 대사체 L-Arginine, L-pipecolic acid. 및 이의 OPA 유도체화한 L-Arginine을 분석 및 함량측정. 백편두에 지표물질 및 유효물질을 Trigonelline으로 선정하고 LC-MS/MS 기법기반 분석조건을 확립함. 각각 추출조건에 따른 백편두 시료의 Trigonelline 함량을 측정함. - 백편두 발아과정에 따른 성분변화를 Triple Quadrupole LC/MS 기기를 이용하여 측정함 - 각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample의 Trypsin Inhibition Assay 실험법을 통한 Trypsin 억제능 효능 확인 - 고구마유래 β-Sitosterol glucoside, Crosolic acid, Scopolin, Scopoletin, Sitosterol, quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate를 확인하고 지표물질 β-Sitosterol glucoside 유효물질을 quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate 설정하고 LC-MS/MS 기법을 이용하여 분석조건 확립, HPLC 분석기기로 Total coumarin content와 Total phenol content 성분의 함량법 확립. 당성분이 제거된 고구마를 메탄올 추출물로 제조한 후 HPLC 분석법 확립(quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate, β-Sitosterol glucoside, scopolin, scopoletin 및 11개 물질 동정) |

| | |
|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> - 고추냉이와 백편두, 백편두와 고추냉이 혼합 소재를 활용한 백편두활용 최적혼합소재도출 |
| <ul style="list-style-type: none"> -최적조합소재 성분 연구 -최적조합제제 기준 및 시험법 확립 -Chemical fingerprinting를 이용한 동등성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 최적 조합소재 백편두 및 고추냉이, 백편두 및 고구마의 성분 연구를 수행하여 지표물질과 유효물질을 선정함. -TOF/UPLC-MS/MS 분석조건을 최적화하여 혼합소재 활용 제제의 chemical fingerprinting으로 동등성을 평가함 - 고추냉이의 지표 및 유효물질인 Sinigrin 및 AITC, 백편두의 Trigonelline, 고구마의 β-Sitosterol glucoside 및 quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate, Scopolin의HPLC 분석법 확립 & 함량측정함 |
| <ul style="list-style-type: none"> -개별인정형 소재 및 제제의 최적 조합 표준화 연구 -장기 안정성 시험 | <ul style="list-style-type: none"> -개별인정형 소재 및 제제 최적조합에 대한trigonelline, AITC기 반표준화연구를 수행함 - 시료 장기보관에 따른 안정성 시험 결과 장기보존 및 가혹조건에서 안정성을 확보함 |
| <ul style="list-style-type: none"> 대장염 마우스 모델을 확립하고 후보소재에 대한 기능성 평가 후 우수한 천연소재 선정 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - Dextran sulfate sodium (DSS)를 이용하여 대장염 모델을 확립하였음 - 확립된 대장염 마우스 모델에서 10종의 후보 소재에 대한 항염 효능을 병리조직학적으로 확인 하고 우수한 후보 소재를 선별하였음 (병리 소견 score, 체중 감소, 혈액분석) |
| <ul style="list-style-type: none"> 후보소재의 추출 형태 따른 항염 효능을 마우스 모델에서 비교 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 후보소재를 일반 추출 또는 홉푸드형태로 추출하여 대장염 모델에서 항염 효능을 비교 하였음 (병리 소견 score, 체중 감소, 혈액분석) |
| <ul style="list-style-type: none"> 우수 후보소재의 항염 효과 분석 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 우수한 항염 효능을 보이는 후보소재의 항염 효과 분석하였음 (염증 유전자 분석) - in vitro 염증 세포에 추출된 후보소재를 처리 후 염증 유전자 억제 효과 보이는지 확인하였음 (RNA, 단백질 분석) |
| <ul style="list-style-type: none"> IBS 동물모델 구축 | <ul style="list-style-type: none"> - Zymosan을 이용한 IBS 동물 모델을 확립. |
| <ul style="list-style-type: none"> IBS 동물모델을 이용한 효능연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 12종의 후보을 이용한 스크리닝 시험 단계에서 백편두와 고추냉이를 선정하였음. 효능 연구로는 장의 조직학적 검사, 식이 섭취량 비교, 체중 변화 비교, 항우울/불안 작용 개선 효과를 비교를 진행하였음. |
| <ul style="list-style-type: none"> IBS 동물모델을 이용한 작용기전 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 뇌에서의 Fos 단백질, 뇌신경생장인자(BDNF), 신경전달물질의 조절 기능을 확인. - 장에서의 macroscopic/microscopic 변화에 대한 효능, 염증성 사이토카인 TNF-α 조절 기능, 신경전달물질의 조절 기능 확인. - 혈액에서의 스트레스 관련 호르몬 코르티코스테론 조절 기능 확인. - BMMCs를 이용하여 각 추출물 및 추출물의 단일물질이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인. - BMMCs를 이용하여 각 추출물 및 추출물의 단일물질이 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-α)의 조절을 확인. |

- 본 연구는 1개 세부연구기관 (기업체 (주)유니베라)와 3개의 협동연구기관이 협업하여 진행함 (그림 1.2).

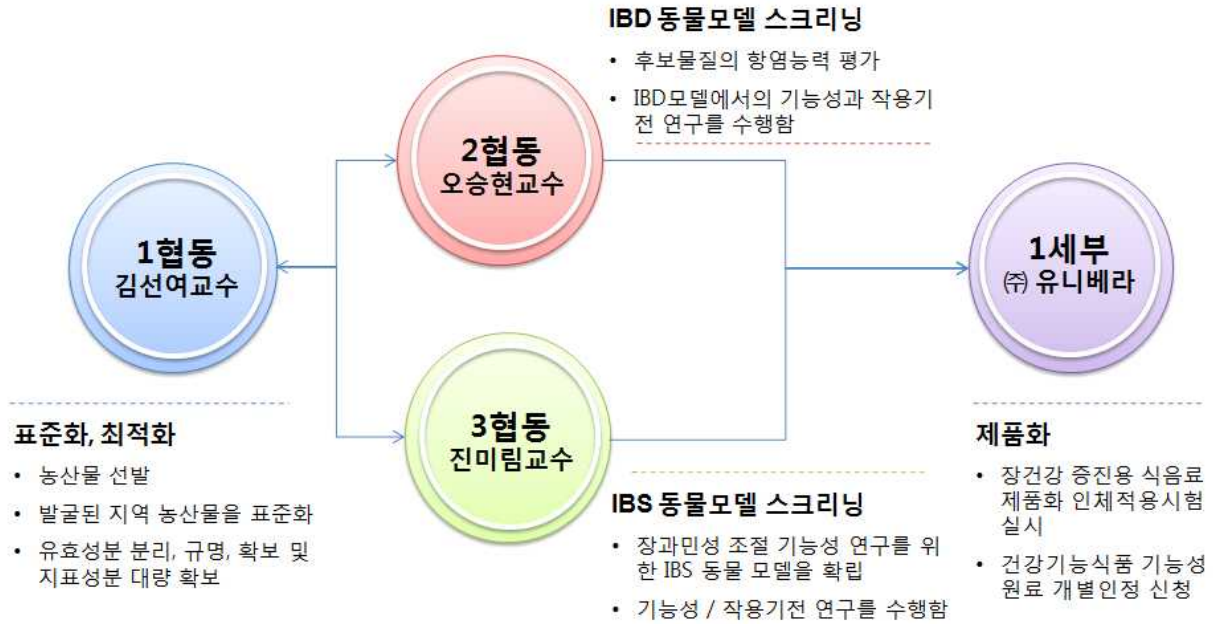


그림1.2. 협동연구 수행도

- 본 연구는 그림1.3과 같은 추진도로 진행됨.
- 연구 2차년도에 식약처 개별인정 신청 원료로 “고추냉이와 백편두 혼합물”을 선정하여 고추냉이와 백편두 표준화 및 효능 연구를 수행하였음. 고추냉이 성분 중 sinapic acid를 지표물질로 표준화를 진행하였으나, 지표물질의 휘발성으로 안정성 확보가 어려움을 확인함. 휘발성 물질 sinapic acid의 안정성을 높이기 위해 홉푸드 고추냉이를 미세분말화하여 코팅하는 가공기술을 도입하였으나, 가공 후에도 지표물질 안정성을 확보하지 못함. 따라서, 고추냉이를 개별인정 신청 원료에서 배제함.
- 연구 3차년도에 식약처 개별인정 신청 원료로 “백편두와 고구마 혼합물”을 선정하여 고구마 표준화 및 효능검증을 실행하였음. 고구마는 원물을 대표할 수 있는 특이적인 지표물질 확보가 어려워 건강기능식품 원료로서의 고부가가치가 확보되지 않아 개별인정 신청 원료에서 배제함.
- 따라서 식약처 개별인정 신청 원료로 IBD/IBS 멀티타겟 조절 효능을 확인하고 표준화가 가능한 백편두 단일원물을 선정하여 인체적용시험을 진행하고 있으며, 본 연차실적계획서에는 그간 수행한 고추냉이, 백편두, 고구마의 표준화, in vitro 및 in vivo 효능 평가 연구 실적을 모두 기재하였음.
- 건강기능식품 기능성은 질병치료가 아닌 생리기능증진만 인정해 주므로, 염증성 장질환 (IBD) 보다는 과민성 장증후군 (IBS)에 초점을 맞추어 인체적용시험을 진행함.

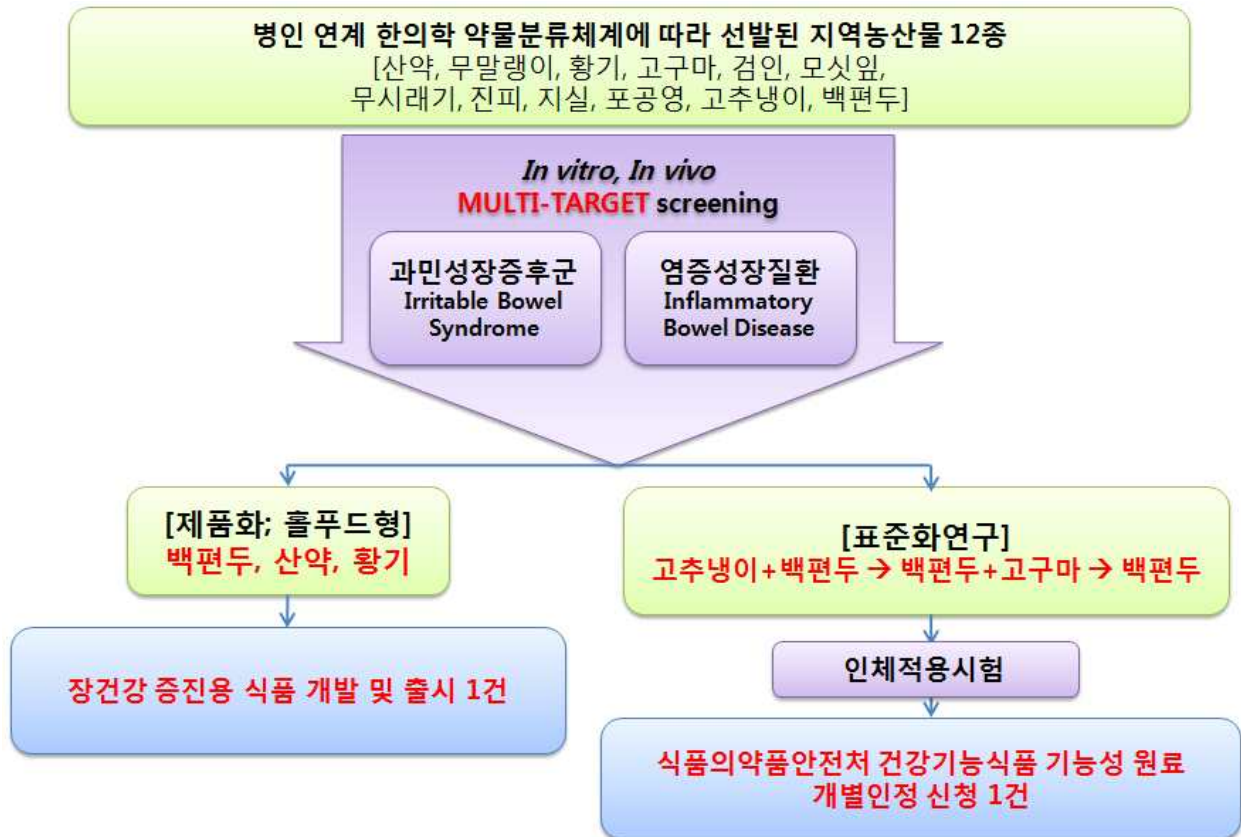


그림1.3. 연구과제 추진도

2장 연구수행 내용 및 결과

1절 소재 선정을 위한 후보 농산물 (12종) 연구

1. 후보 농산물 (12종) 표준 추출물 제조 및 주요 성분 분석

가. 후보 농산물 수집 (12종)



그림2.1.1. 홀푸드 형태의 식품개발을 위한 후보 농산물 12종

표2.1.1. 수집한 후보 농산물 정보

| 품목 | 원재료명 | 부위 | 원산지 | kg당 가격 (원) | 구입처 |
|------|----------|------|---------|------------|----------|
| 고구마 | 고구마 | 덩이뿌리 | 국산 (해남) | 3,490 | 이마트 |
| 무 | 무말랭이 | 뿌리 | 국산(고창) | 16,400 | 이마트 |
| | 시래기 | 잎 | 국산 | 29,800 | 이마트 |
| 진피 | 귤 | 열매껍질 | 국산 (제주) | 50,000 | 정도생약 |
| 산약 | 마 | 뿌리줄기 | 국산 (안동) | 19,000 | 정도생약 |
| 지실 | 탕자 | 열매 | 국산 (청양) | 10,000 | 정도생약 |
| 황기 | 황기 (1년근) | 뿌리 | 국산 (제천) | 36,000 | 정도생약 |
| 백편두 | 제비콩 | 씨 | 중국 | 7,200 | 정도생약 |
| 검인 | 가시연꽃 | 씨 | 중국 | 19,000 | 정도생약 |
| 포공영 | 민들레 | 전초 | 국산 (영천) | 19,000 | 정도생약 |
| 모시잎 | 모시풀 | 잎 | 국산 (서천) | 46,000 | 이든타운에프앤비 |
| 고추냉이 | 고추냉이 | 뿌리 | 국산 (철원) | 170,000 | 다인푸드 |

나. 효능평가용 후보 농산물 추출최적화 시험 및 소재공급

- 방법: 실험용 추출물 제조를 위해 일차적으로 50% 에탄올을 이용하여 시료를 추출하였음. 각 시료 500 g에 50% 에탄올 5리터를 넣고 초음파로 1시간 추출 후 4℃에서

12시간 더 추출하였음. 추출 후 필터지에 여과하여 여과된 추출액을 감압농축기를 이용하여 농축 후 동결, 건조함.

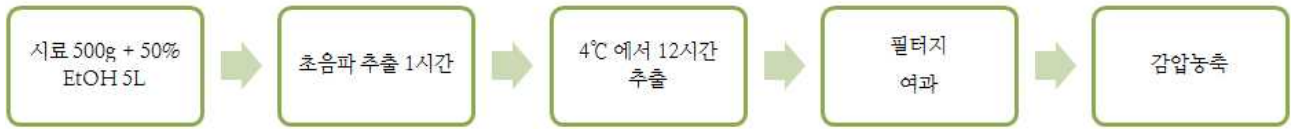


그림2.1.2. 후보 농산물 추출 과정

다. 연구대상 선정을 위한 대량시료 추출물 공급

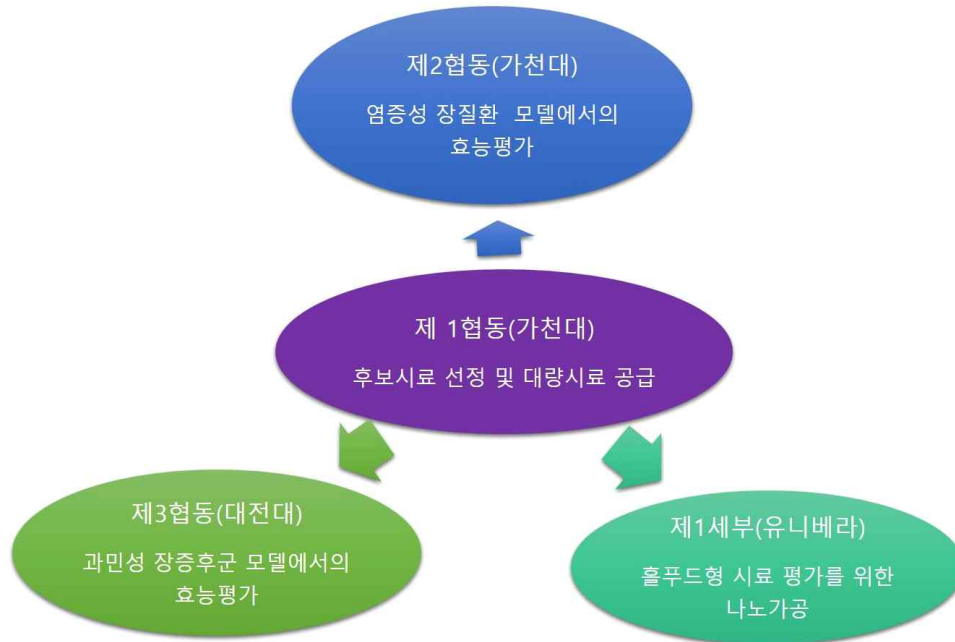


그림2.1.3. 후보 농산물 공급 전략

표2.1.2. 후보소재 추출률 및 추출물 공급

| 품목 | 추출률(%) | 현보유량(g) | 전달한량 | |
|------|--------|---------|------------|-----------|
| | | | 제 2협동 (mg) | 제 3협동 (g) |
| 고구마 | 11 | 100.9 | 200 | 30 |
| 무말랭이 | 33.2 | 234.99 | 200 | 30 |
| 무시래기 | 13.8 | 58.12 | 200 | 30 |
| 진피 | 15.8 | 63.44 | 200 | 30 |
| 산약 | 11.3 | 46.79 | 200 | 30 |
| 지실 | 11.9 | 49.41 | 200 | 30 |
| 황기 | 16 | 62.62 | 200 | 30 |
| 백편두 | 7.8 | 58.03 | 200 | 30 |
| 검인 | 0.8 | 20 | 200 | 14 |
| 포공영 | 14.8 | 62.77 | 200 | 30 |
| 모시잎 | 16.6 | 72.5 | 200 | 30 |
| 고추냉이 | 6.4 | 22.1 | 200 | 30 |

라. 연구대상 개별 소재의 지표성분 설정 및 확보

표2.1.3. 개별소재의 지표성분 설정

| 품목 | 지표성분 |
|------|---|
| 고구마 | Polyphenol 2,4-di-tert-butylphenol |
| 무말랭이 | Rasatiol, phenolics, isothiocyanates |
| 무시래기 | Rutin, quercetin, kaepferol |
| 진피 | Hesperidin |
| 산약 | Diosgenin allantoin |
| 지실 | Naringin |
| 황기 | Astragaloside, Calycosin, formononetin |
| 백편두 | Arginine Lectin dolichin |
| 검인 | Tocopherols, cerebrosides 5,7,4-trihydroxyflavanone sesquioneolignans |
| 포공영 | Taraxacin, Taraxarol, Asparagin. |
| 모싯잎 | Caffeic acid, chlogenic acid |
| 고추냉이 | Isothiocyanate유도체 |

마. 주요 후보 소재에 대한 문헌정보 수집

(1) 산약

마 *Dioscorea batatas* Decne. 또는 참마 *D. japonica* Thunb. (마과 Dioscoreaceae)의 뿌리줄기 (단근체, rhizophor)를 그대로 또는 찌서 말린 것. 중국에서는 서여(薯蕷) *D. opposita* Thunb.를 사용함.

(가) 주요 성분

- 마 (*D. batatas*) : steroidal saponin[dioscin, batatasin I~III (휴면 유발물질)], 전분, mannan, dioscorin (단백질, 그림4), amino acid, 당단백질 (높은 점액성) 등
- 참마 (*D. japonica*) : 전분, mucilage, amylase, arginine, choline, allantoin, dioscoran A~F (glycan) 등

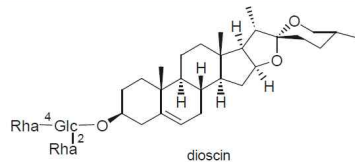


그림2.1.4. 산약의 주요성분인 dioscin의 구조

(나) 약리작용

① 자양작용

- 마 (*D. batatas*)를 포함한 복합 추출물은 forced swimming test에서 mouse의 수영시간을 증가시킨다⁷⁾.

② 소화촉진작용

- 조리하지 않은 마 (*D. japonica*)를 식이의 25% 정도 섭취하면 단백질소화효소의 활성이 증가하고 콜레스테롤 (LDL) 수치가 낮아진다. 50%로 섭취할 경우에는 단백질의 소화 흡수율이 저하된다 (*in vivo*, mouse)⁸⁾.

③ 지사작용, 거담작용

④ 항산화작용

- *D. batatas*의 mucilage에는 항산화작용이 있다 (*in vitro*)⁹⁾.
- *D. batatas*에서 분리된 32 kDa의 dioscorin은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸다 (*in vitro*)¹⁰⁾.
- Storage protein인 dioscorin의 염기서열은 α-carbonic anhydrase와 유사하며 이 효소의 활성 또한 가지고 있다. Trypsin inhibitor에 대한 항체에도 반응한다 (*in vitro*)¹¹⁾.

(다) 특허조사

- 장 기능 및 변비 개선 효과를 나타내는 유산균을 이용한 산약 발효물의 제조방법
- 마 추출물을 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 조성물 및 이를 함유하는 기능성 건강식품
- 생약으로부터 얻어진 추출농축액 및 이를 포함하는 당뇨병, 췌장염, 신장염 및 당뇨병성 신부전의 예방과 치료용 건강식품 및 약제학적 조성물
- 마 또는 산약의 유산 발효액을 함유하는 변비 및 비만의 예방 및 개선용 식품 조성물

(2) 황기

Astragalus membranaceus Bunge 또는 몽골황기 (蒙古黃芪) *A. membranaceus* Bunge var. *mongholicus* Hsiao (콩과 Leguminosae)의 뿌리로서 그대로 또는 주피를 제거한 것.

(가) 주요 성분

- Isoflavonoid: astraisoflavan, astraisoflavan-glucoside, astrapterocarpan (그림5), formononetin, 3'-hydroxyformononetin, calycosin, calycosin-7-O-β-D-glucoside, formononetin-7-O-β-D-glycoside, isoliquiritigenin
- Triterpene saponin: astragaloside I~IV, astragaloside VI, agroastragaloside I~IV, isoastragaloside I, 3-O-β-D-xylopyranosyl-cycloastragenol, soyasaponin류 등
- 기타: (-)-canavanine, phenol glycoside류, γ-aminobutyric acid 등.

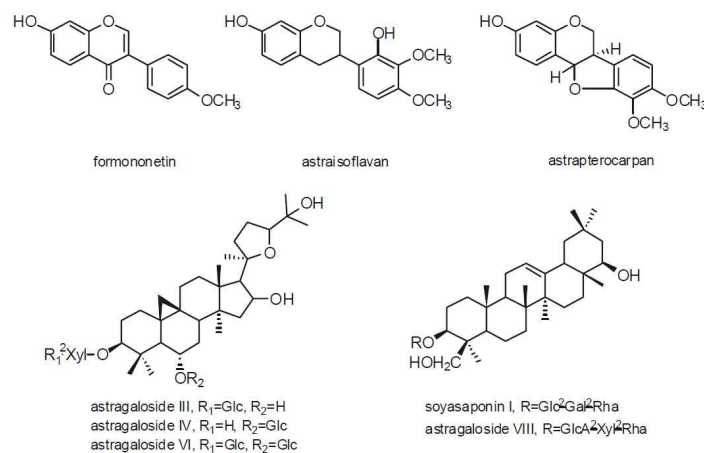


그림2.1.5. 황기의 주요성분의 구조

(나) 약리작용

① 강장작용

- 추출물에는 사람의 정자의 운동성을 증가시키고 (*in vitro*)¹²⁾, 수컷 실험동물의 발정을 일으키며 (*in vivo*, rat), 비장과 간장의 RNA의 합성을 촉진하는 등의 강정작용과 대사기능조절작용이 있다.
- ② 면역증강작용
 - 추출물은 T-dependent antigen에 대한 항체반응을 강화한다 (*in vivo*, mouse)¹³⁾.
 - 추출물에는 면역증강작용이 있다 (*in vitro*)¹⁴⁾¹⁵⁾.
 - 추출물은 Th1/Th2의 분비를 조절하여 면역증강 효능을 나타낸다 (*in vivo*, mouse, p.o.)¹⁶⁾
- ③ 이노·혈압강하작용
 - 물추출물이나, 70% EtOH 추출물, EtOH 추출물을 정맥주사하면 혈관확장에 의하여 혈압이 떨어진다 (*in vivo*, rabbit, dog, cat).
 - 물추출물에는 이노작용이 있다 (*in vivo*, human, p.o.)¹⁷⁾.
- ④ 간장보호작용
 - EtOH 추출물은 stilbenemidine으로 유도한 간독성으로부터 간세포를 보호한다 (*in vivo*, mouse, p.o.)¹⁸⁾.
- ⑤ 항염증작용
 - Astragaloside IV는 NF κ B의 활성화와 adhesion molecule의 발현을 억제한다 (*in vitro*)¹⁹⁾.
 - 추출물은 구리에 의한 지질의 과산화와 단백질의 산화적 변형을 억제한다 (*in vitro*, mouse brain homogenate)²⁰⁾.

(다) 특허조사

- 차전자피, 미강발효추출물 및 효모추출물이 함유된 배변촉진용 식품 및 이의 제조방법
- 변비 예방 및 치료용 건강식품 조성물

(3) 백편두

Dolichos lablab Linn (콩과 Leguminosae)의 씨 Thunb.를 사용함.

(가) 주요 성분

- Saponin: lablab saponin I, lablaboside A ~ F
- Steroid: dolicholide, dolichosterone, homodolichosterone (그림6)
- 종자에는 (-)-pipecolic acid, phytoagglutin A, B가 함유되어 있으며, 그 밖에 단백질 22.7%, 지방1.8%, 탄수화물 57%, 이 외에 Ca, P, Fe와 tyrosinase 등이 함유되어 있음.

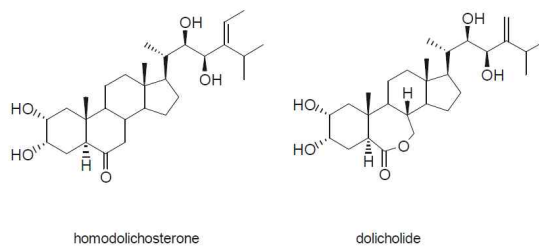


그림2.1.6. 백편두의 주요성분의 구조

(나) 약리작용

- ① 이노작용
- ② 기 타
 - Lectin인 FRIL(Flt3 receptor-interacting lectin)은 줄기세포의 한 종류인 human cord blood
 - CD34(+)/CD38(-/low)/SCID repopulating 줄기세포가 증식이나 분화를 하지 않은

채 보관되는 기간을 늘려준다 (*ex vivo*)²².

(다) 특허조사

- 발효된 한약재를 이용한 정장용 조성물

2. 염증성 장질환 동물모델 확립 및 후보 농산물의 IBD에 대한 효능 평가 연구

가. 급성 대장염 및 대장암 마우스 모델 확립

(1) 급성 대장염 모델 확립

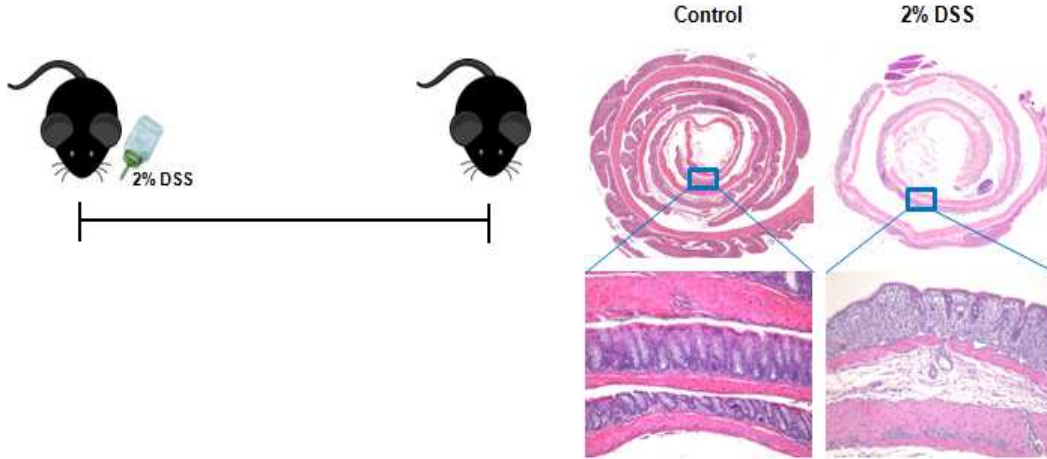
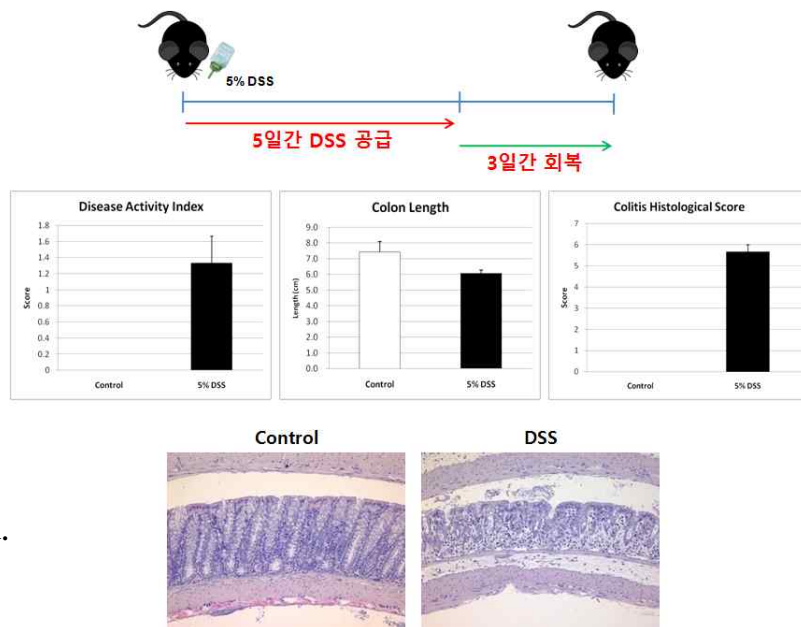


그림2.1.7. Dextran Sodium Sulfate (DSS)를 이용한 급성 대장염 확인

- C57BL/6 마우스에 일반 음수 또는 2% DSS를 포함한 음수를 7일간 처치 한 후 부검을 시행하여 대장조직에서 염증 발생을 확인함. 2% DSS를 처리한 그룹의 대장은 점막 샘 (crypt)의 구조가 붕괴되어 있으며 점막하층에 부종이 생긴 것을 확인하였음. 또한 점막과 점막하층에서 극심한 염증세포들의 침윤을 확인하였음 (그림7).

(2) 만성 대장염 모델 확립



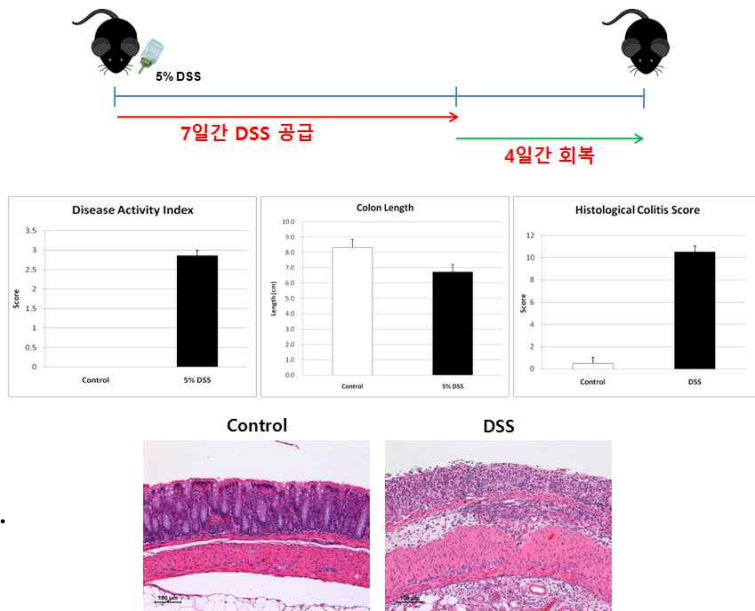


그림2.1.8. DSS를 이용한 만성 대장염 확인

- ICR 마우스에 일반 음수 또는 5% DSS를 포함한 음수를 5일 또는 7일간 처치한 후 3일 또는 4일간 일반 음수를 처치하여 대장염이 회복되는지 확인함. 두 그룹 모두 회복기간 동안 DSS에 의해 유도된 대장염이 유지 되는 것을 확인하였으며 DSS를 7일간 처치한 그룹이 5일간 처치한 그룹에 비해 대장염이 더 유도된 것을 확인하였음 (그림8A, B). 따라서 두 그룹 모두 DSS에 의해 만성 대장염이 유도되었으나 DSS 7일간 처치 및 4일 회복기간 모델이 만성 대장염모델로 더 적합한 것을 확인하였음.

(3) 대장암 모델 확립

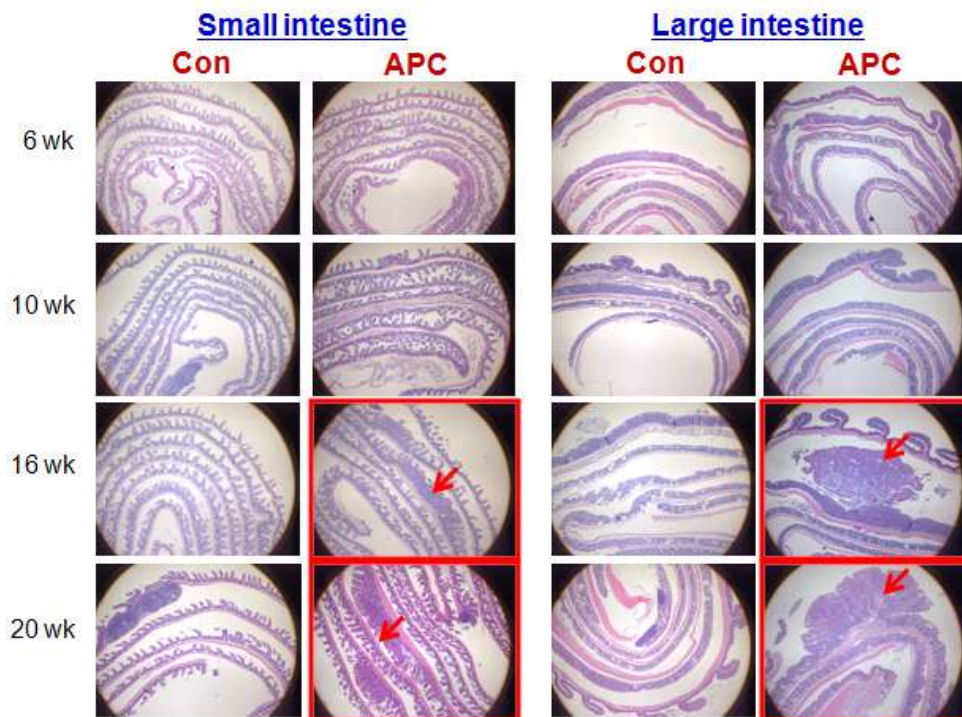


그림2.1.9. APC 변이 마우스의 대장암 발생 확인

- APC 변이 마우스를 이용하여 대장암 발생을 확인하였음. 대조군 마우스는 소장과 대장이

정상이나 APC 변이 마우스는 소장과 대장에서 생후 16주부터 용종이 형성되며 대장암으로 발전한 것을 확인하였음 (그림9).

나. 12종 후보 농산물에 대한 가능성 평가 후 우수한 천연소재 선정

- in vitro (ZO-1 염색 및 NF-kB 활성 억제 탐색)

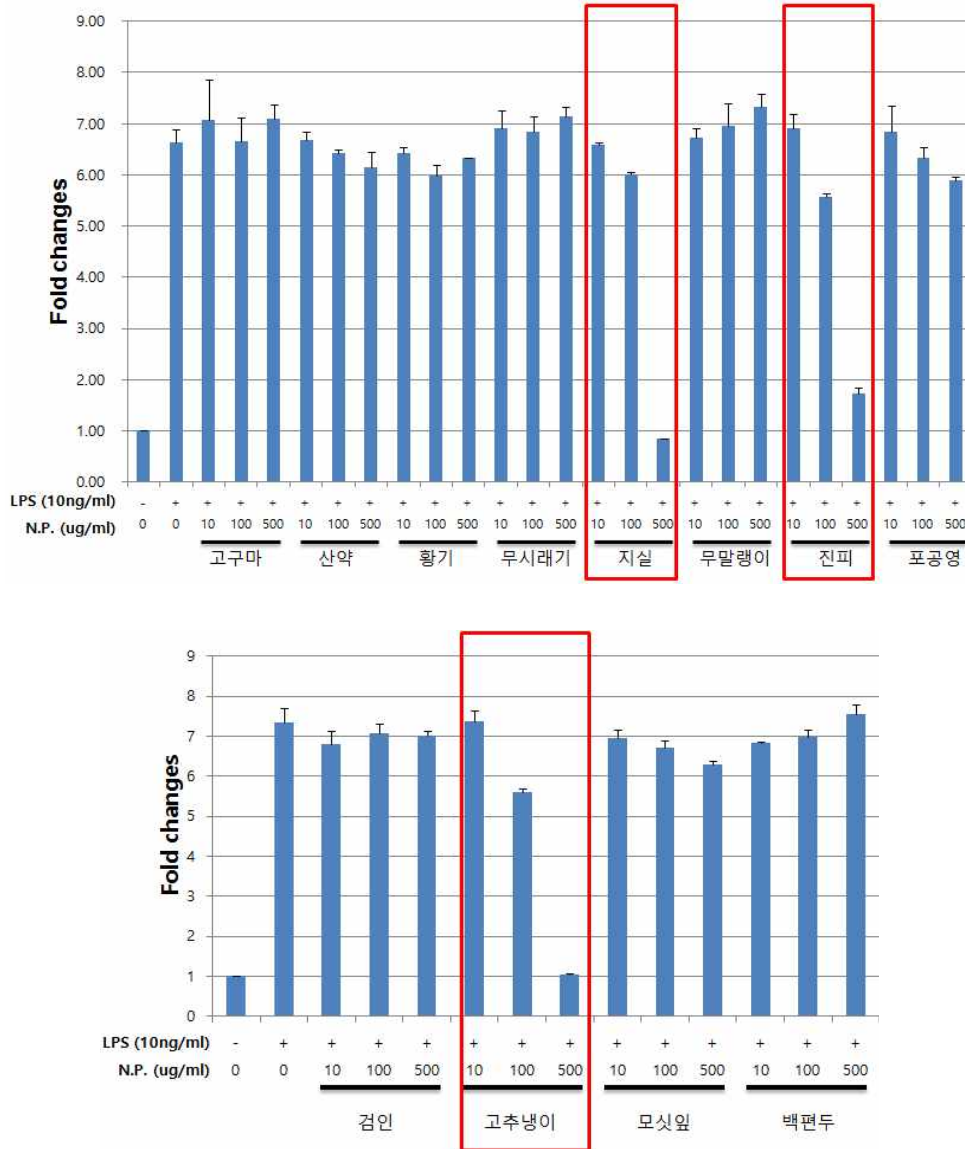


그림2.1.10. HEK293 세포주에서 형광 발현을 측정하여 NF-kB의 활성 확인

- NF-kB의 경로 활성화에 따라 형광을 발현하는 HEK293 세포주에 12 가지 후보 농산물 추출물을 처리한 후 염증의 대표 지표인 NF-kB의 활성을 형광으로 측정하여 항염 효과를 확인하였음 (그림10). 지실, 진피, 고추냉이의 추출물을 처리한 세포들에서는 농도에 따라 NF-kB의 활성이 낮아지는 것을 확인하였으며, 반면 다른 농산물은 유의한 변화가 없는 것을 확인하였음 (그림10).

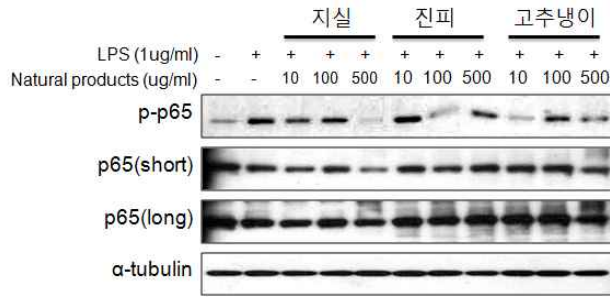


그림2.1.11. Western blot을 수행하여 Raw264.7에서 NF-κB의 활성화 확인

- 지실, 진피, 고추냉이 추출물을 이용하여 대식세포주인 Raw264.7 세포주에서 항염효과를 확인하였음 (그림11). Raw264.7 세포에 LPS 처리 시 NF-κB의 인산화가 LPS 처리 전에 비해 증가하여 NF-κB가 활성화된 것을 western blot 분석으로 확인하였음 (그림11). 반면, 지실, 진피, 고추냉이 추출물 처리 시 NF-κB의 인산화가 감소하여 활성이 억제되는 것을 확인하였음 (그림11)

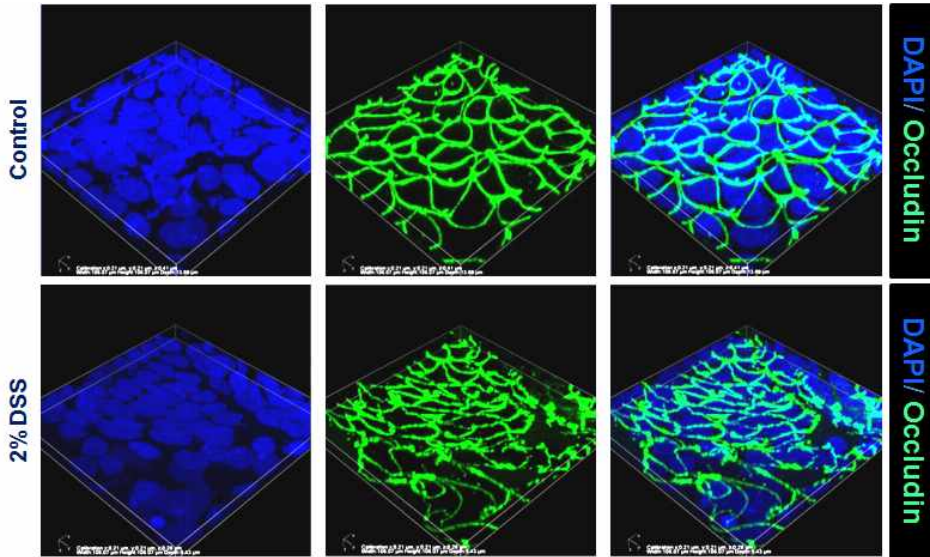


그림2.1.12. Occludin 면역형광염색을 통한 장상피 세포주의 monolayer 및 치밀결합 형성 확인

- 대장염에 의한 장상피세포의 치밀결합 붕괴에서 농산물에 의한 회복 효과를 확인하기 위해 먼저 장상피세포주인 Caco-2 세포에 2% DSS 처리를 하여 치밀결합이 붕괴되는 것을 확인하였음. 치밀결합 단백질들 중 하나인 Occludin의 발현 및 구조를 관찰하기 위해 면역형광염색을 시행하였음. Caco-2 세포의 밀도가 100% 일 때 Occludin이 세포간 junction 부위에 발현 하여 발현 패턴이 끊어짐 없이 치밀결합을 정상적으로 형성하고 있으나 2% DSS 처리 시 Occludin의 발현이 감소하고 치밀결합의 구조가 붕괴 되는 것을 확인하였음 (그림12).

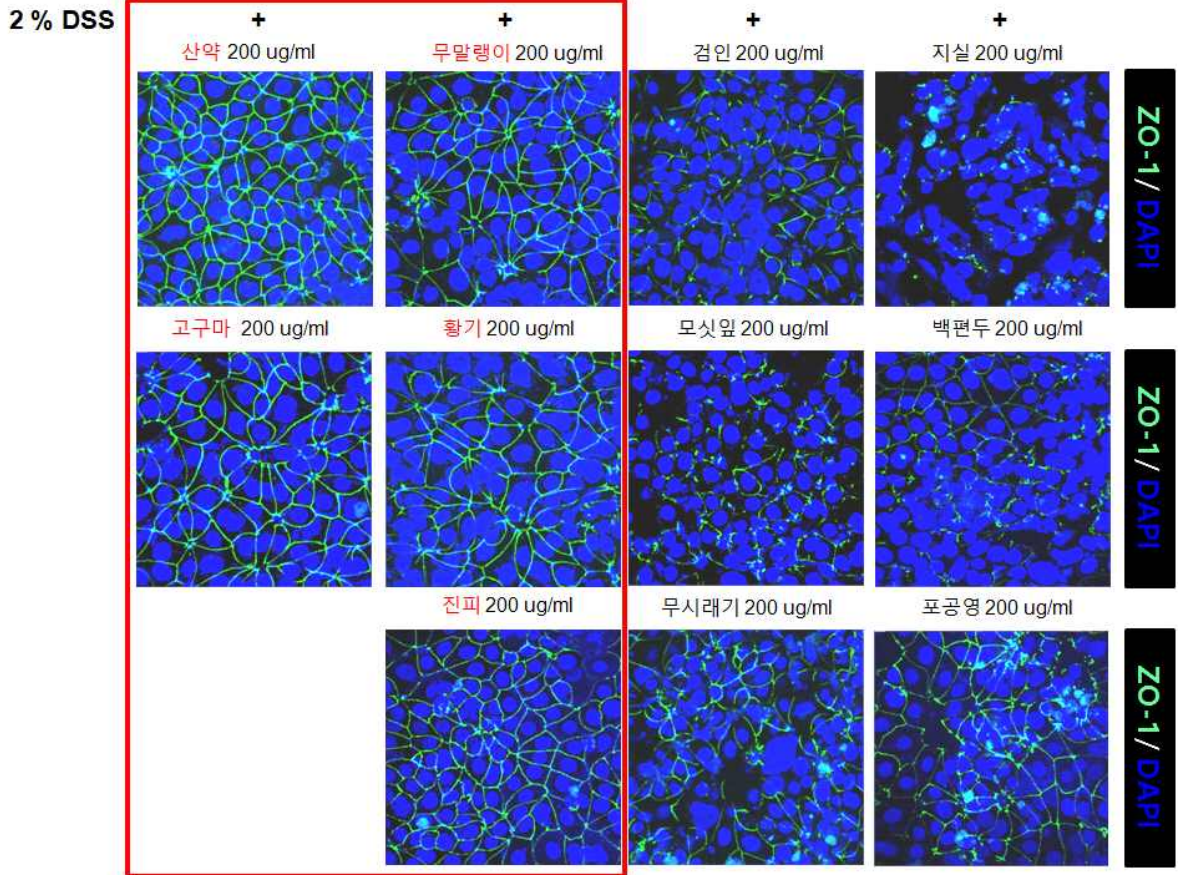


그림2.1.13. ZO-1 면역형광염색을 통한 농산물의 장상피세포 치밀결합 회복 효과 확인

- DSS를 처리하여 Caco-2 세포의 치밀결합 붕괴를 유도한 후 11 가지 농산물 추출물에 의한 붕괴 억제 효과를 치밀결합 단백질 ZO-1에 대한 면역형광염색을 통해 확인하였음. 11 가지 농산물 추출물중 5 가지, 산약, 무말랭이, 고구마, 황기, 진피를 처리한 세포는 ZO-1의 발현 패턴이 끊어짐 없이 치밀결합을 정상적으로 형성하여 DSS에 의한 치밀결합의 붕괴가 억제된 것을 확인하였음 (그림13). 반면에 나머지 6 가지 추출물을 처리한 세포는 ZO-1의 발현이 감소하고 발현 패턴이 끊어지는 것으로 보아 DSS에 의한 치밀결합의 붕괴가 회복되지 않은 것을 확인하였음 (그림13).

3. 과민성장증후군 동물모델 확립 및 후보 농산물의 IBS에 대한 효능 평가 연구
가. 과민성장증후군 Control model 확립

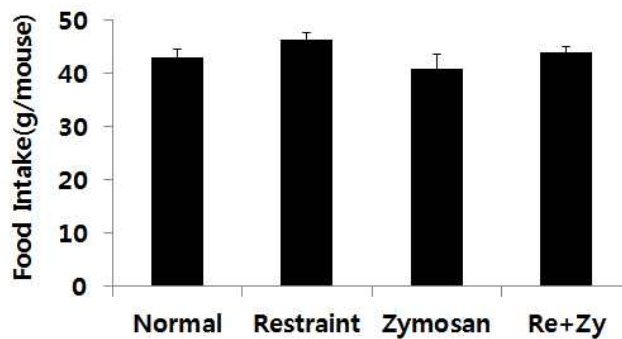


그림2.1.14. Food intake of zymosan induced IBS model.

- 결과 : 식이 섭취량은 zymosan 그룹과 구속+zymosan 그룹 모두 정상군과 비교하였을

때 큰 변화가 없었음 (그림14).

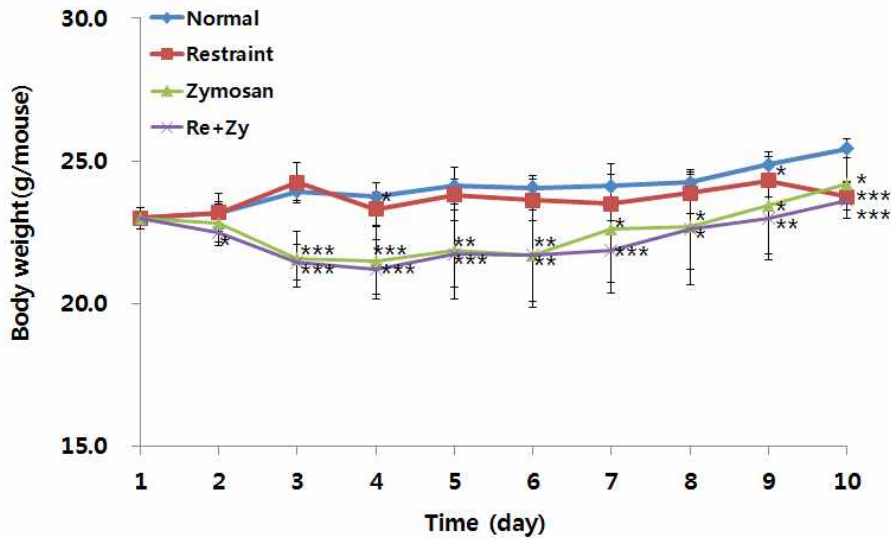


그림2.1.15. Body weight of zymosan induced IBS model.

- 결과 : 몸무게 변화는 zymosan 그룹과 구속+zymosan 그룹 모두 정상군과 비교하였을 때 몸무게가 유의적으로 감소하였음 (그림15).

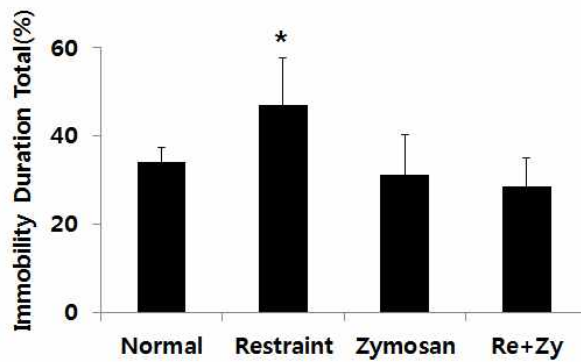


그림2.1.16. FST of zymosan induced IBS model.

- 결과 : 강제수영검사(FST)는 zymosan 그룹과 구속+zymosan 그룹 모두 정상군과 비교하였을 때 큰 변화가 없었으며, 구속 그룹에서만 차이가 있었음 (그림16).

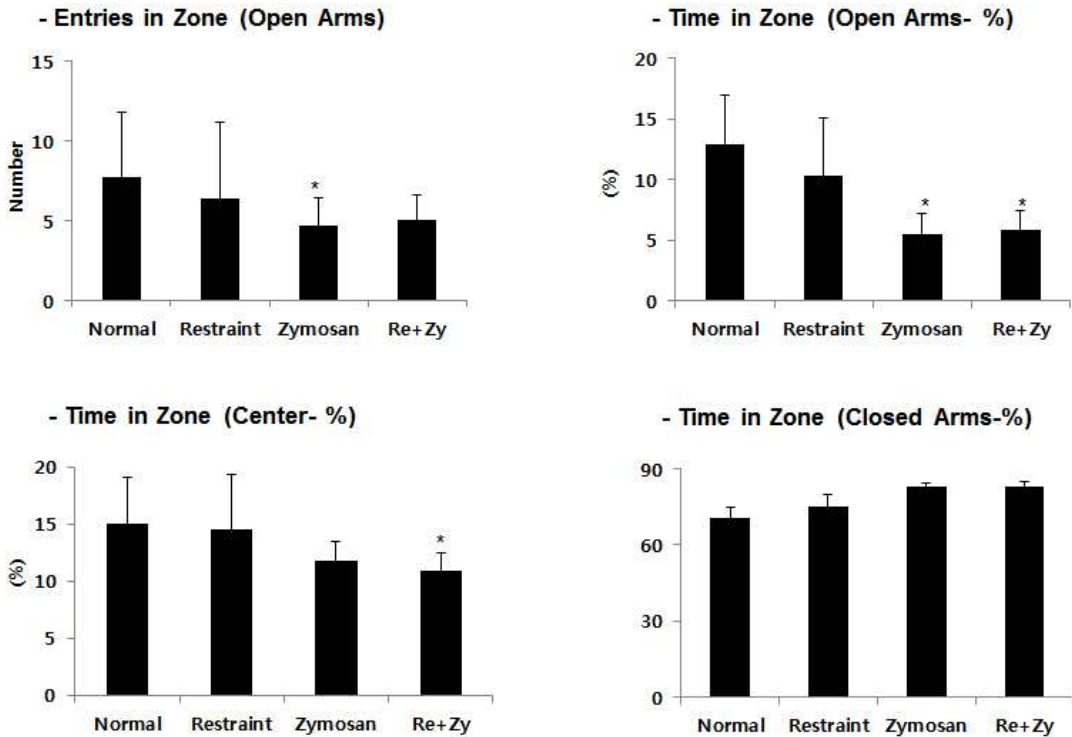


그림2.1.17. Plus maze of zymosan induced IBS model.

- 결과 : 십자미로실험 (Plus maze)은 zymosan 그룹이 정상군과 비교하였을 때 entries zone (number)과 time in zone - open arms (%)에서 차이가 있었음 (그림17).

나. 장운동성 (GI transit) 실험방법 구축

○ 위 유문동 절편을 이용한 수축 측정법

- Krebs 용액이 담긴 넓은 초자용기에서 점막을 제거한 후 2x5 mm의 크기로 절편을 만듦. 절편의 한쪽은 10 ml 용량의 organ bath 안에 있는 tissue holder에 고정시키고, 다른 쪽은 고리를 만들어 등척성 근수축변환기 (Grass, FT-03)에 연결하여 0.5g의 기본 장력을 가함. 약물투여 또는 전장자극은 1시간 동안의 안정화 기간이 지난 후 실시 하며, 안정화 기간 동안 약 15분 간격으로 Krebs 용액을 교체함. 데이터의 기록과 저장은 데이터통합장치 Powerlab 4/22 (Adinstruments)와 소프트웨어인 Chart 7.02를 이용함. 실험하는 동안 혼합가스 (95% O₂ + 5% CO₂)를 주입시키고, bath 안의 온도를 37±0.5°C로 일정하게 유지시킴. 영양액은 Krebs-bicarbonate buffer (composition in mM: 120 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 22 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, and 11.5 glucose oxygenated with 95% O₂ - 5% CO₂; pH 7.4)을 사용함.

다. 후보물질 스크리닝

- Control model 확립 실험에서 얻은 결과로 보아, IBS 평가 실험 항목으로는 몸무게 측정과 십자미로 실험이 최적인 것으로 나타났으며, 강제수영검사대신 open field test와 장조직의 면역학적 염색 (H&E and Toluidine staining)을 추가 설정 하여 12가지 후보물질을 평가함 (그림 47).

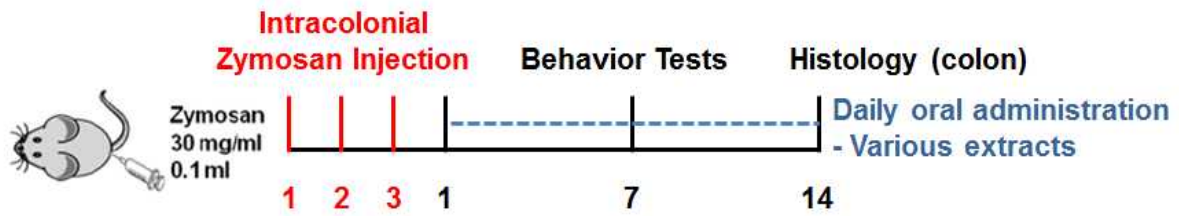


그림2.1.18. A Schematic outline of zymosan induced IBS model.

(1) IBS 1차 스크리닝 - 백편두, 고추냉이, 진피, 산약, 지실, 황기

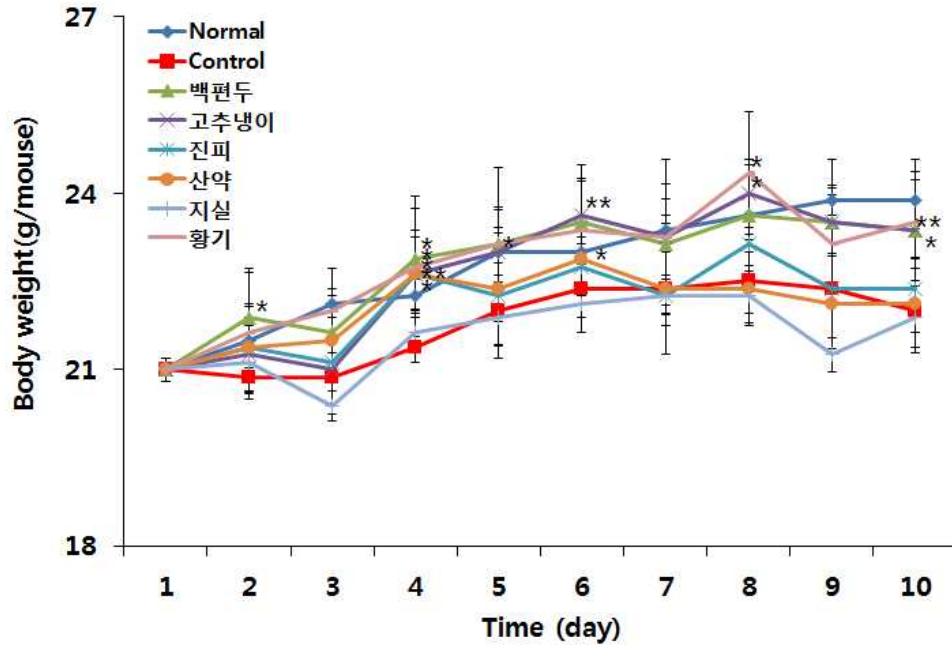
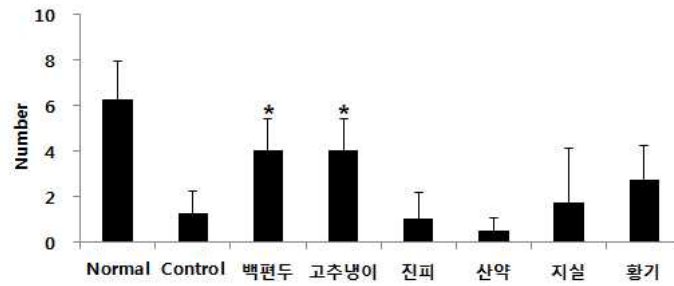


그림2.1.19. Effect of various extracts on body weight in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 몸무게 변화는 zymosan (control)군에 비하여 백편두, 고추냉이, 황기 군에서 유의적인 효과를 보였음 (그림19).

- Entries in Zone (Open Arms-number)



- Time in Zone (Open Arms- %)

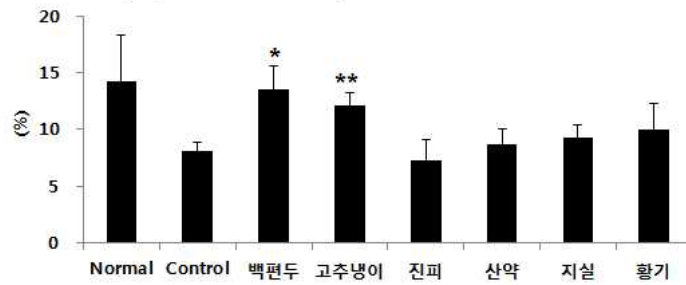


그림2.1.20. Effect of various extracts on plus maze test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 십자미로 실험에서는 zymosan군에 비하여 백편두, 고추냉이 군에서 유의적인 효과를 보였음 (그림20).

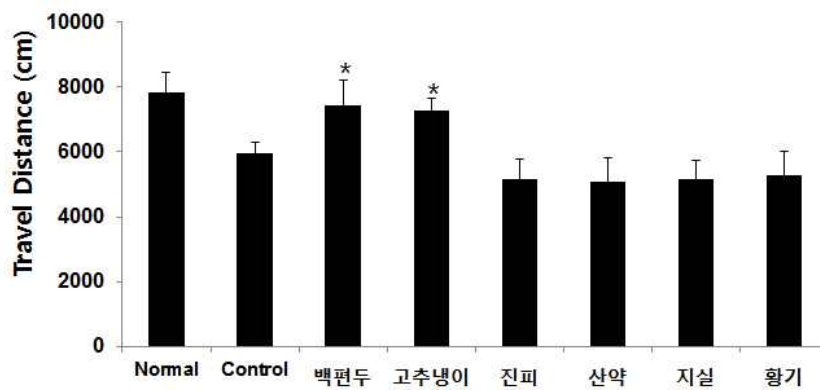


그림2.1.21. Effect of various extracts on open field test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : open field 실험에서는 zymosan군에 비하여 백편두, 고추냉이 군에서 유의적인 효과를 보였음 (그림21).

(2) IBS 2차 스크리닝 - 모식잎, 검인, 포공영

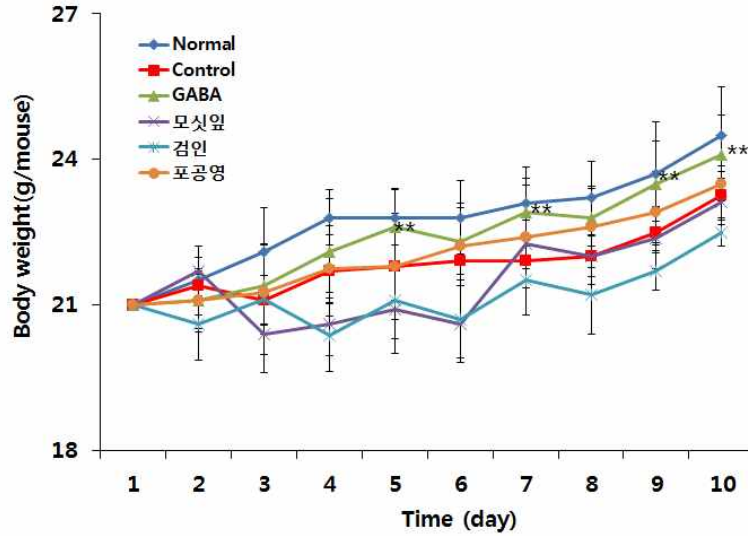
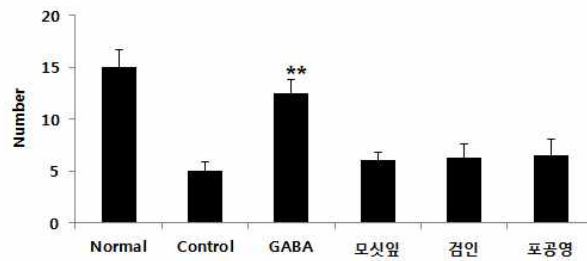


그림2.1.22. Effect of various extracts on body weight in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 몸무게 변화는 Positive control (Gabapentin)에서만 유의적인 효과를 보였고 후보 물질 군에서는 유의적인 증가를 보이지 않았음 (그림22).

- Entries in Zone (Open Arms-number)



- Time in Zone (Open Arms- %)

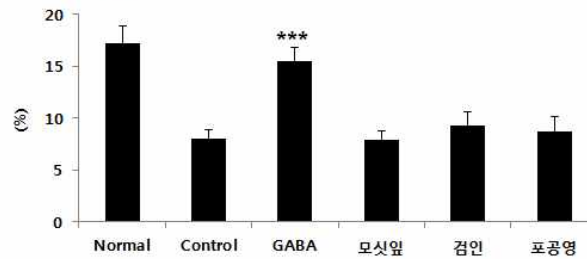


그림2.1.23. Effect of various extracts on plus maze test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 십자미로실험 역시, Positive control (Gabapentin)에서만 유의적인 효과를 보였고 후보물질 군에서는 유의적인 증가를 보이지 않았음 (그림23).

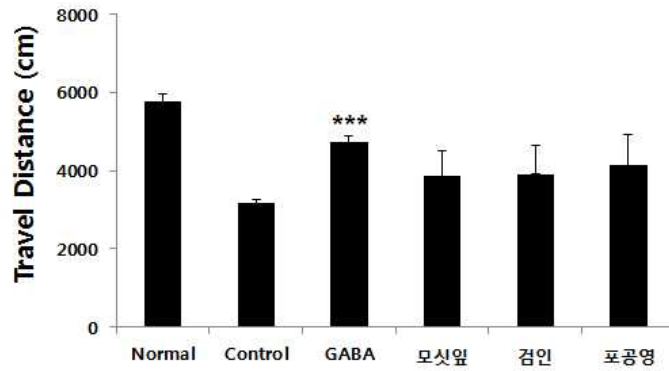


그림2.1.24. Effect of various extracts on open field test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : open field test 실험에서도 Positive control (Gabapentin)에서만 유의적인 효과를 보였고 후보물질 군에서는 유의적인 증가를 보이지 않았음 (그림24).

(3) IBS 3차 스크리닝 - 무말랭이, 무시래기, 고구마

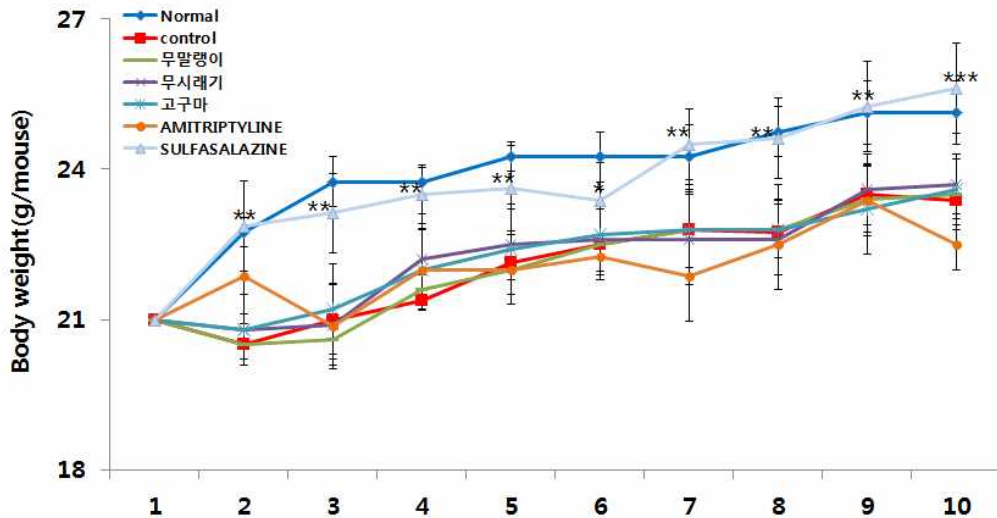
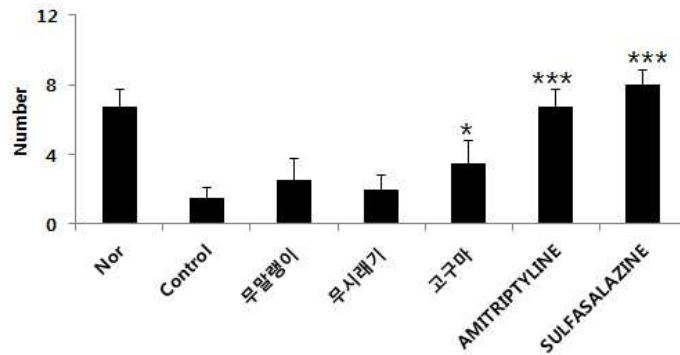


그림2.1.25. Effect of various extracts on body weight in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 몸무게 변화는 Positive control (sulfasalazine)에서만 유의적인 효과를 보였고 후보 물질 군에서는 유의적인 증가를 보이지 않았음 (그림25).

- Entries in Zone (Open Arms-number)



- Time in Zone (Open Arms- %)

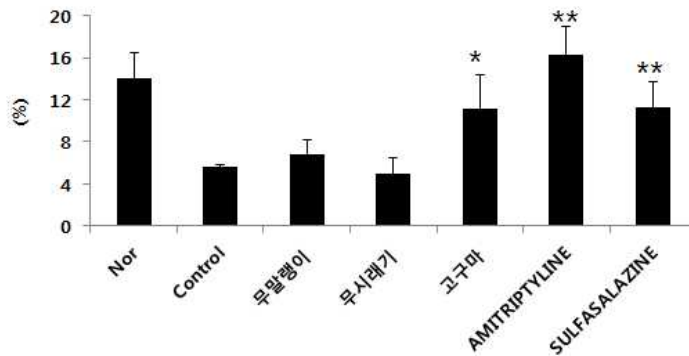


그림2.1.26. Effect of various extracts on plus maze test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : 십자미로 실험에서는 zymosan군에 비하여 고구마와 positive control (amitriptyline, sulfasalazine) 군에서 유의적인 효과를 보였음 (그림26).

■ Open field test – Travel Distance

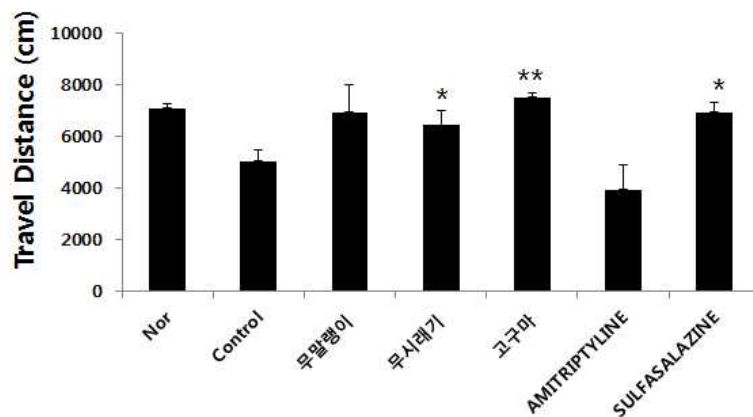
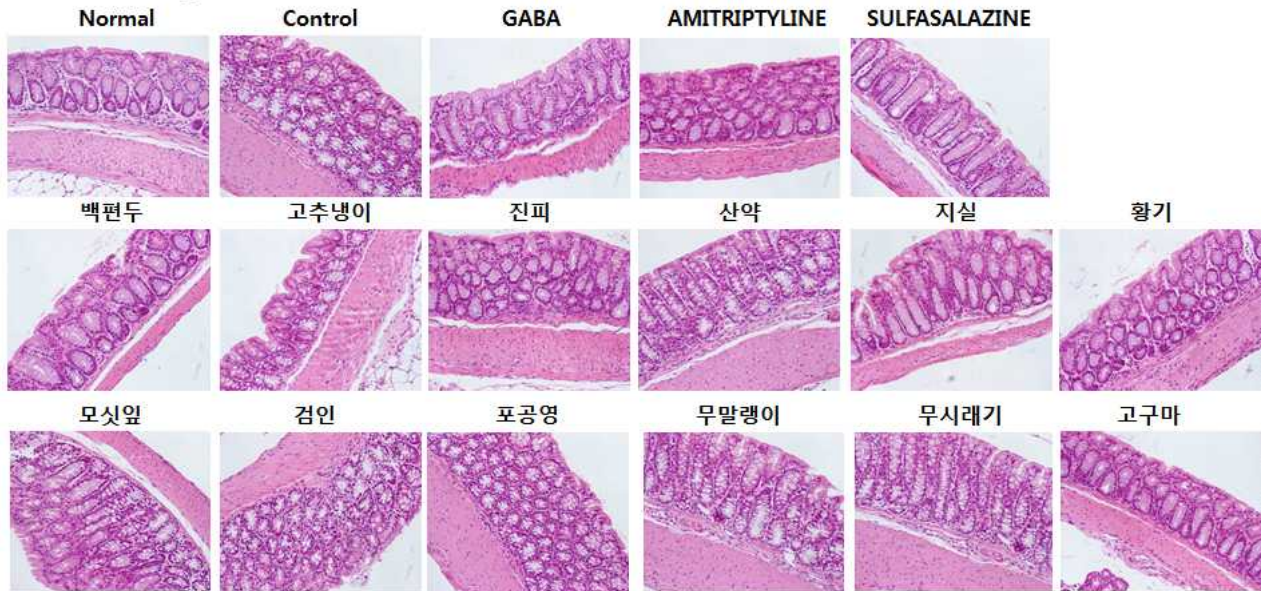


그림2.1.27. Effect of various extracts on open field test in zymosan induced IBS model.

- 결과 : open field 실험에서는 zymosan군에 비하여 무시래기, 고구마와 positive control (sulfasalazine) 군에서 유의적인 효과를 보였음 (그림27).

■ Histologic examination

- H&E staining



- Toluidine Blue staining

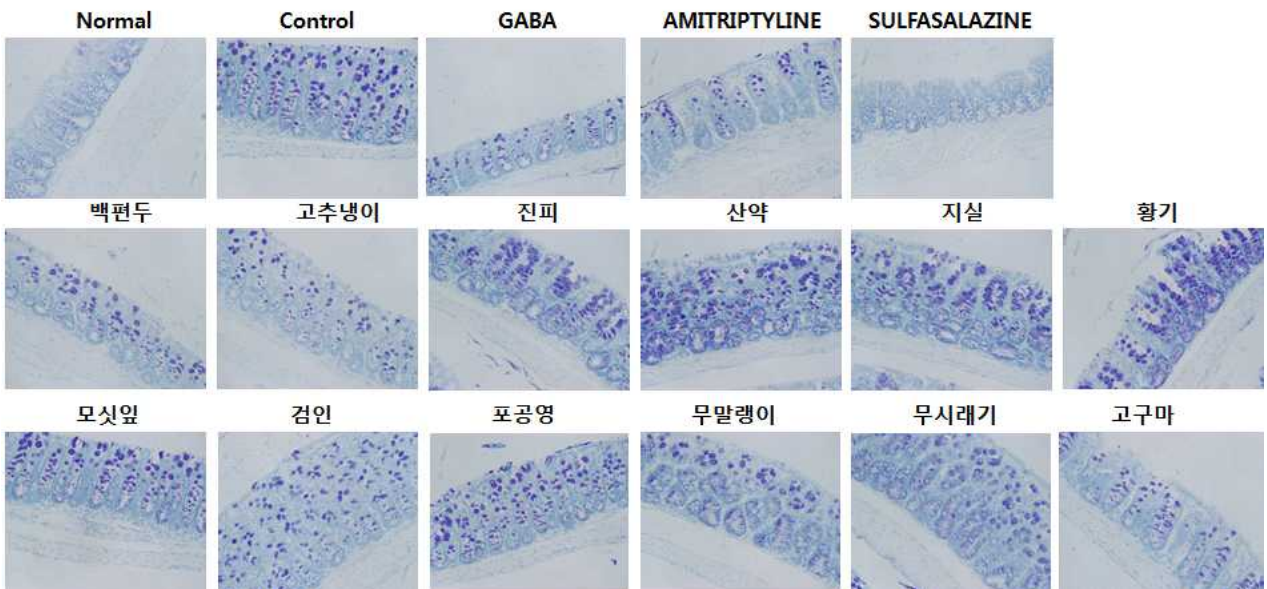


그림2.1.28. Effect of various extracts on histologic examination in zymosan induced IBS model.

- 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 면역염색을 한 결과 zymosan 군에 비하여 positive control (Gabapentin, amitriptyline and sulfasalazine) 및 백편두, 고추냉이, 고구마 군에서 염증성 세포가 감소한 것을 확인하였음 (그림28).

4. 소재 선정을 위한 후보 농산물 (12종) 연구 결과

- 제1차년도 2, 3 협동연구기관의 연구를 통해 IBD와 IBS에 모두 효능이 있는 고추냉이를 우선 연구대상으로 선정함.
- 또한 IBD에 효능이 있는 고구마, 산약, 황기와 IBS에 효능이 있는 백편두, 고구마, 황기, 무는 추후 연구를 진행함.

표2.1.4. 제2, 3협동 과제 IBD, IBS 스크리닝 연구 결과

| 원료/(기능성분) | 제2협동 IBD 효능 결과 | | 제3협동 IBS 효능 결과 | | | |
|-----------|----------------|---------|----------------|-----------|-----------------|------|
| | 항염 | 장상피 향상성 | 몸무게 | Plus Maze | Open field test | 면역염색 |
| 고구마 | - | 최상 | - | 상 | 상 | 상 |
| 무말랭이 | - | 상 | - | - | - | - |
| 무시래기 | - | - | - | - | 상 | - |
| 진피 | 상 | 상 | - | - | - | - |
| 산약 | - | 최상 | - | - | - | - |
| 지실 | 상 | - | - | - | - | - |
| 황기 | - | 상 | 상 | - | - | - |
| 백편두 | - | - | 상 | 상 | 상 | 상 |
| 검인 | - | - | - | - | - | - |
| 포공영 | - | - | - | - | - | - |
| 모싯잎 | - | - | - | - | - | - |
| 고추냉이 | 상 | 상 | 상 | 상 | 상 | 상 |

2절 [제1협동연구] 표준화 연구

1. 고추냉이 표준화 연구

가. 고추냉이 뿌리에서의 주요 지표성분 함량분석

- 방법: 고추냉이는 다인푸드를 통하여 구입하였으나 소재의 표준화연구를 수행하기 위하여 고추냉이 뿌리를 국내 수경재배하고 있는 샘통농산(강원도 철원 민통선 지역)을 통하여 고추냉이 뿌리 구입함. HPLC 기기는 Waters ACQUITY UPLC(ACQUITY Ultra Performance LC TM, Waters, USA)로 UV detector가 장착된 기기를 사용하였고, 분석 컬럼은 J'sphere ODS-H80, 250 mm × 4.6 mm; particle size, 4 μm; YMC Co. Ltd., Japan)을 사용하였으며, 시료의 주입량은 10 μL로 설정하고, 이동상으로는 H₂O(phosphoric acid 0.1%)와 acetonitrile를 초기에 80:20(v/v)부터 30:70(v/v)로 30분 동안 변경하며, 30:70(v/v)로 5분간 유지하며, 80:20(v/v)으로 1분간 변경시키다가 컬럼의 재평형을 위해 80:20(v/v)으로 9분간 유지하도록 설정하였음. 자외선 검출기 흡광파장은 320 nm로 설정하였음.



그림2.2.1. 고추냉이 재배 영농조합 법인 (샘통농산)

표2.2.1. HPLC를 이용한 지표성분의 분석법

| Time (min) | % (0.1% phosphoric acid in DW) | % (Acetonitrile) |
|------------|--------------------------------|------------------|
| 0 | 80 | 20 |
| 30 | 30 | 70 |
| 35 | 30 | 70 |
| 36 | 80 | 20 |
| 45 | 80 | 20 |

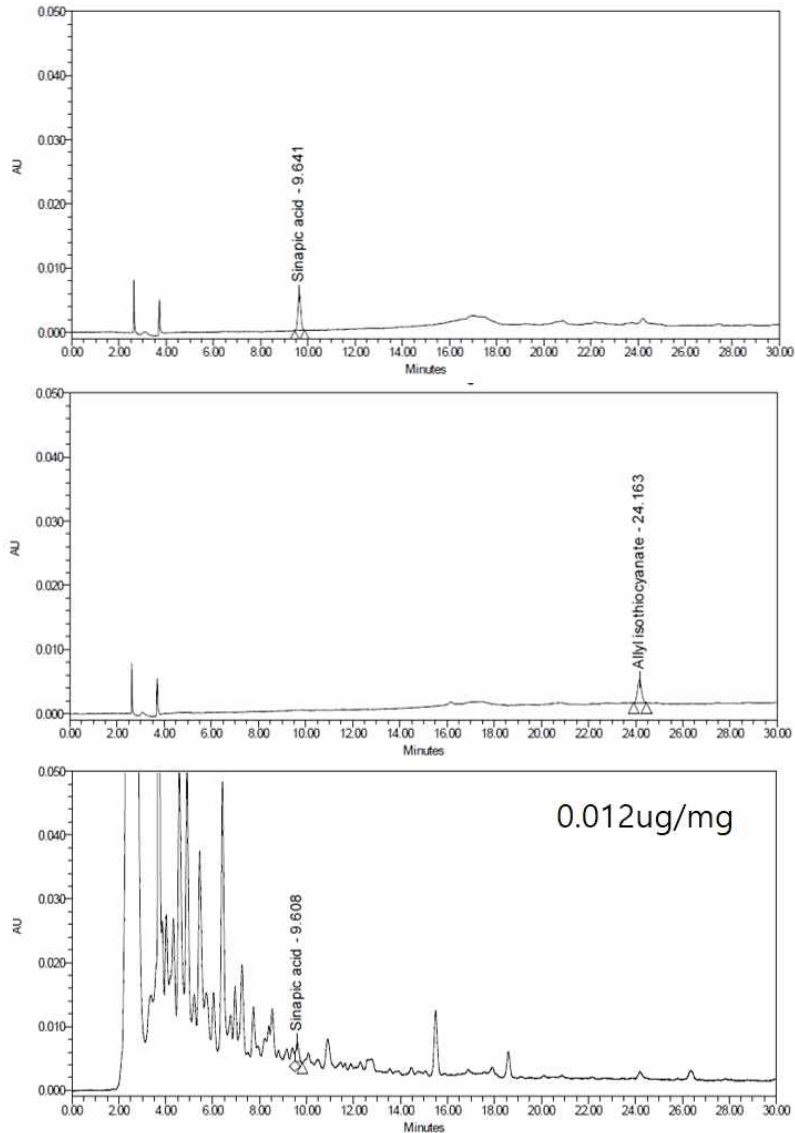


그림2.2.2. HPLC를 이용한 고추냉이의 주요 지표성분 함량 분석

- 결과: 50% 에탄올을 이용하여 고추냉이 뿌리를 추출, 농축한 소재로 HPLC를 이용하여 지표성분 함량을 분석한 결과, allyl isothiocyanate는 검출되지 않았으며, sinapic acid의 함량은 0.012 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었음.
- 방법: 50%에탄올 추출 시 myrosinase 효소 가수분해작용으로 sinigrin에서 AITC로 변형 → AITC는 농축 과정에서 휘발되어 없어짐. 그러므로 본 연구팀은 AITC함량을 높이기 위하여 기존 50%에탄올 용매를 이용하여 추출하는 방법에서 100% 메탄올 추출용매로 변경하여 추출시료를 제조함.

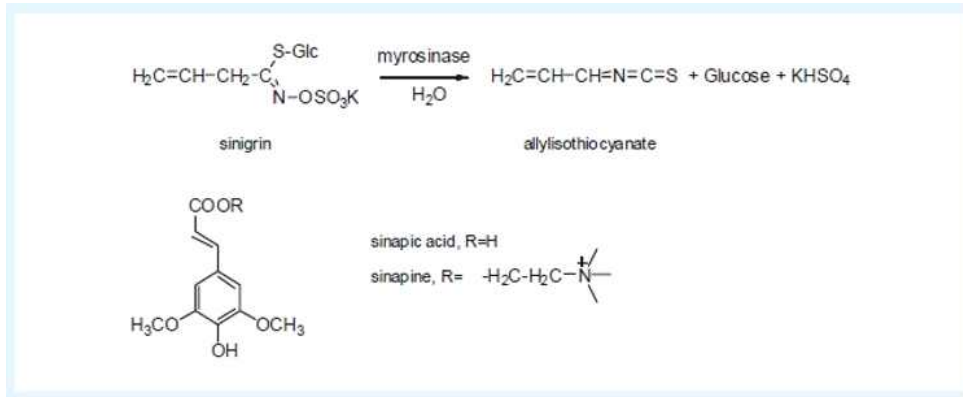


그림2.2.3. allyl isothiocyanate의 가수분해 과정

○ 결과: 100% 메탄올 추출용매로 변경하여 추출시료를 제조함.

나. 고추냉이 부위별 및 추출용매별 지표성분의 함량 분석

○ 방법: 100% 메탄올을 이용하여 선정된 시료인 고추냉이를 각 부위별로 추출하였음. 각 부위별 시료의 추출물을 제조한 후, HPLC를 이용하여 지표성분인 sinapic acid의 함량을 분석하였음.

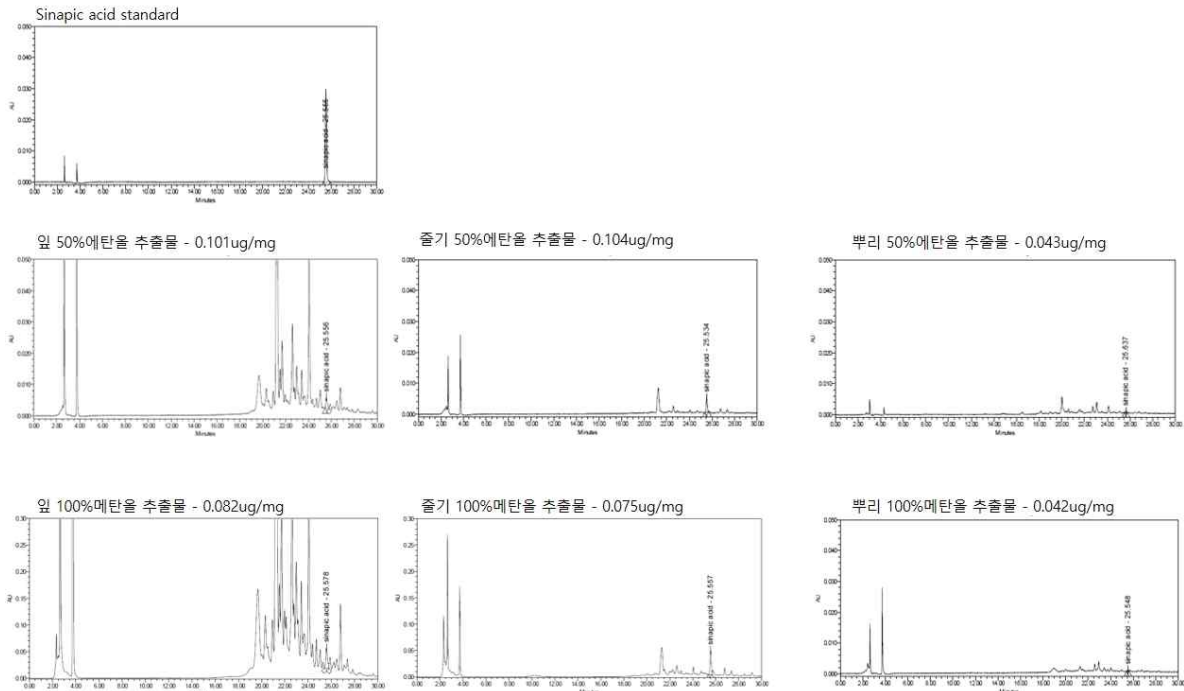


그림2.1.29. 고추냉이 부위 및 추출용매별 지표성분의 함량 분석

표2.3.1. 추출 용매에 따른 고추냉이 부위별 sinapic acid 함량 평가

단위(μg/mg)

| 추출용매 | 부위 | 잎 | 줄기 | 뿌리 |
|----------|----|-------|-------|-------|
| 50% 에탄올 | | 0.101 | 0.104 | 0.043 |
| 100% 메탄올 | | 0.082 | 0.075 | 0.042 |

- 결과: 추출용매를 50%에탄올에서 100% 메탄올로 변경하였지만 분석된 sinapic acid의 함량에는 큰 차이는 없었음. 또한 sinapic acid는 뿌리보다는 잎과 줄기에 더 많이 함유된 것을 확인함.

다. 시중 유통 중인 고추냉이 제품의 주요 성분 함량 비교 평가

- 방법: 각 시중에 판매중인 와사비 제품 1 g을 100%메탄올 10 mL에 10분간 초음파 추출 후 필터지를 이용하여 여과 후 HPLC를 이용하여 AITC를 분석하였음.



그림2.2.4. 시중 판매중인 와사비 제품

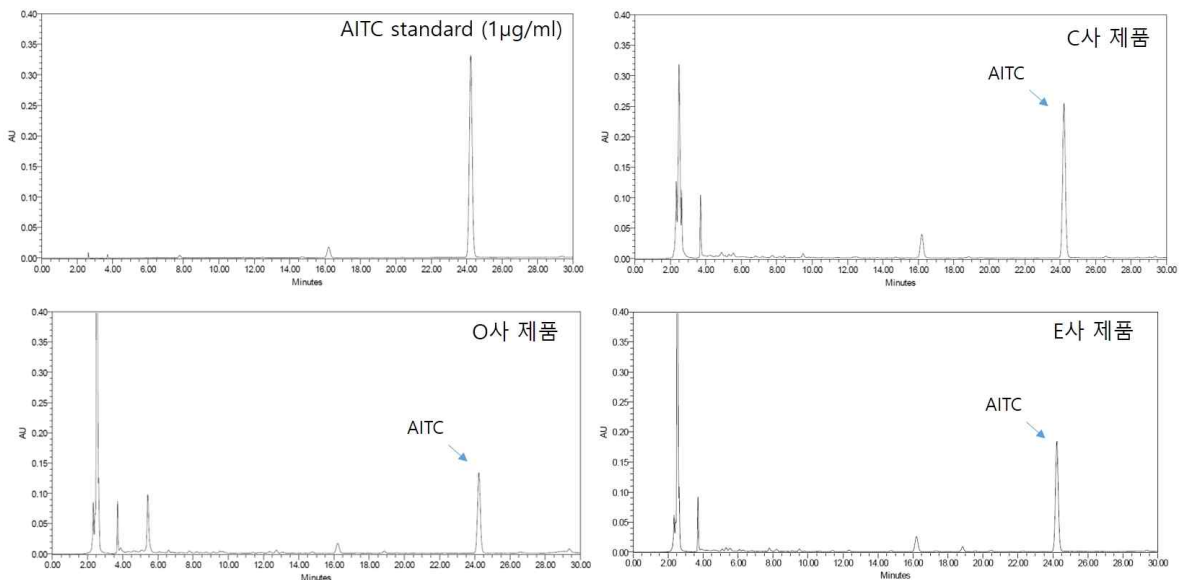


그림2.2.5. 시중 판매중인 와사비 제품에서의 AITC 함량 평가

표2.2.2. 시중 판매중인 와사비 제품에서의 와사비 함유량 및 AITC 함량 평가

| 회사 | 와사비 함유량 | 원산지 | AITC 함량 (mg/g) |
|----|-----------------------|-----|----------------|
| C사 | 와사비분 19% | 중국산 | 0.006 |
| E사 | 와사비분 15% | 중국산 | 0.004 |
| O사 | 와사비분 18%, 생와사비 10% | 중국산 | 0.002 |

○ 결과: C사 > E사 > O사 제품 순으로 AITC 함유량이 많은 것을 확인함. 시제품의 AITC 분석을 위한 HPLC 분석법을 확립하였음.

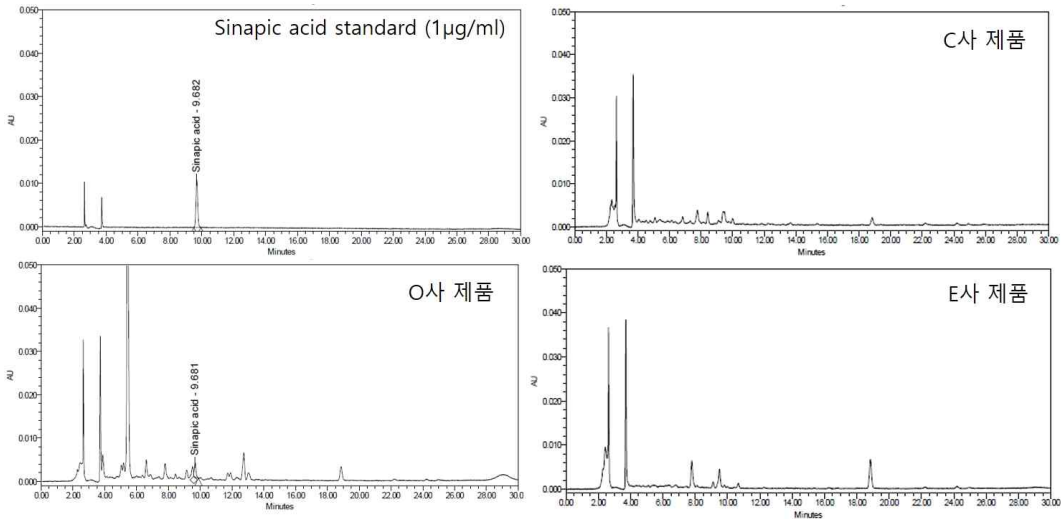


그림2.2.6. 시중 판매중인 와사비 제품에서의 sinapic acid 함량 평가

○ 방법: 제품 1 g을 100%메탄올 10 mL에 10분간 초음파 추출 후 필터지를 이용하여 여과 후 HPLC를 이용하여 sinapic acid를 분석하였음.

표2.2.3. 시중 판매중인 와사비 제품에서의 와사비 함유량 및 sinapic acid 함량 평가

| 회사 | 와사비 함유량 | 원산지 | Sinapic acid 함량 (mg/g) |
|----|-----------------------|-----|------------------------|
| C사 | 와사비분 19% | 중국산 | - |
| E사 | 와사비분 15% | 중국산 | - |
| O사 | 와사비분 18%, 생와사비 10% | 중국산 | 0.004 |

○ 결과: 그 결과 C사와 E사 제품에서는 sinapic acid가 검출되지 않았음 (표20). O사 제품에서는 0.004 mg/g의 sinapic acid 함유량을 확인함. 시제품의 sinapic acid 분석을 위한 HPLC 분석법을 확립하였음.

라. 고추냉이의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보

(1) 분석조건 확립

① 고추냉이 시료의 지표물질 분석법 확립 및 함량

○ 방법: 고추냉이에 함유된 지표물질을 분석하기위해 HPLC 분석조건을 잡았으며, 추출시간에 따른 Sinigrin 및 AITC 의 함량을 측정.

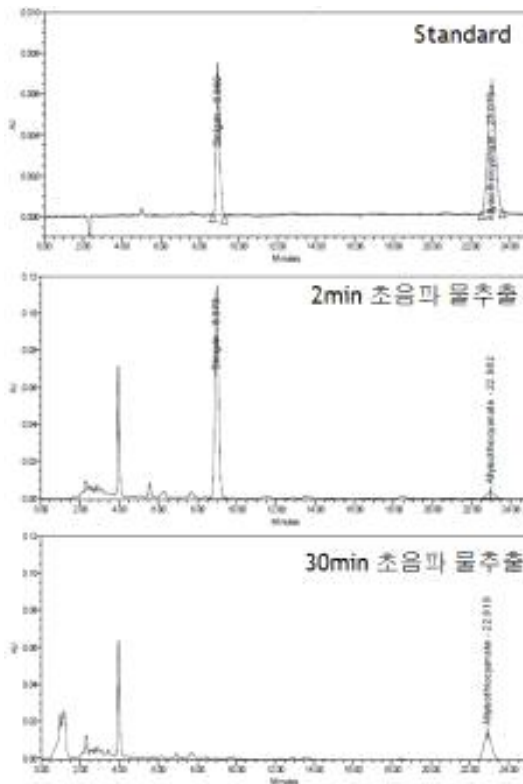


그림2.2.7. 추출 시간에 따른 지표물질 변화 HPLC 크로마토그램

| | R ² | 2min (ug/mg) | 30min (ug/mg) |
|------------------|----------------|--------------|---------------|
| Sinigrin | 0.9999 | 59.179 | - |
| Allylthiocyanate | 0.9992 | 3.9068 | 11.688 |
| Total sinigrin* | - | 74.8452 | 48.8689 |

*Total sinigrin = sinigrin + (AITC × 4.01)

표2.2.4. 고추냉이의 지표성분 함량 평가

HPLC 분석 조건

Mobile phase (Isocratic): 5mM tetraheptylammonium bromide in acetonitrile/20mM

phosphate buffer(pH 6.5) 40/60(v/v)

Column : Triatt-C18, 250×4.6 mm; particle size, 5 um; YMC Co. Ltd., Japan

Column temp. : 30°C

Time : 25min

Detection : 242nm

- 결과: 추출시간이 길어지면서 sinigrin이 모두 AITC로 변환된 것을 확인. AITC는 휘발성이 강해 추출과정에서도 손실이 생기게 되고 따라서 분석하는 조건과 실험자마다 분석 값이 다를 가능성이 큼. 따라서 이를 보완하고자 Total sinigrin 함량으로 계산하는데 이는 한번에 sinigrin과 AITC를 동시 정량하여 합한 값을 의미함. Total sinigrin은 sinigrin 함량과 AITC에 4.01[sinigrin hydrate(M.W:397.46)/AITC(M.W : 99.15)]을 곱한 값을 합한 값으로 계산함. Total sinigrin 함량을 비교해보면 2분 추출보다 30분 추출일 경우 양이 줄어든 것을 확인할 수 있으며 이러한 결과는 추출 과정이 길어지면서 sinigrin이 AITC로 전환되고 휘발되어 손실이 발생한 것으로 추측할 수 있음. 따라서 정확한 함량측정을 위해 추출 시간은 최소화해야 함.

2. 백편두 표준화 연구

가. 백편두의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보

(1) 분석조건 확립

(가) Q-TOF-LC-MS 기기를 이용한 백편두 시료의 지표물질 분석법 확립 및 함량

○ 방법: Q-TOF-LC-MS 분석 및 천연물 라이브러리 매칭을 통한 백편두 물질 분석

표2.2.5. 백편두의 성분 정성 분석

| Name | Fomular | Score | Mass | Area |
|--|---------------|-------|----------|---------|
| Adenine | C5 H5 N5 | 97.75 | 135.0545 | 5399809 |
| alpha-Hydroxymethylserine | C4 H9 N O4 | 86.89 | 135.0544 | 5326788 |
| 3-Hydroxy-25-norfriedel-3,1(10)-dien-2-one-30-oic acid | C29 H42 O4 | 78.56 | 454.3103 | 4463792 |
| Costaclavine | C16 H20 N2 | 79.56 | 240.1626 | 3878742 |
| CTHD0233085 A | C46 H80 O3 | 80.38 | 680.609 | 2590042 |
| (-)-pipecolic acid | C8 H11 N O2 | 99.52 | 129.0792 | 2440464 |
| Harmalol | C12 H12 N2 O | 76.36 | 200.095 | 2083343 |
| Tecostanine | C11 H21 N O | 78.3 | 183.1617 | 1934056 |
| Deoxymorellin | C33 H38 O6 | 98.82 | 530.2676 | 1888577 |
| gamma-Guanidinobutyric acid | C5 H11 N3 O2 | 92.07 | 145.0845 | 1503833 |
| Nauclequinine | C20 H14 N2 O3 | 90.62 | 330.1012 | 1005797 |
| Eerectquione B | C29 H40 O6 | 97.62 | 484.283 | 893818 |
| Benzaldehyde | C7 H6 O | 84.31 | 106.0421 | 848068 |
| Neohancoside B | C21 H36 O11 | 85 | 464.224 | 816907 |
| Delphicrispuline | C30 H42 N2 O6 | 76.27 | 526.3012 | 812308 |
| Celastrol | C29 H38 O4 | 93.81 | 450.2755 | 702436 |
| Usambarine | C30 H34 N4 | 82.37 | 450.2756 | 701993 |
| L-Arginine | C6 H14 N4 O2 | 99.12 | 174.1116 | 625236 |
| Guanine | C5 H5 N5 O | 75.55 | 151.0482 | 618185 |
| Podocdysone B | C27 H42 O6 | 81.72 | 462.3006 | 609997 |
| Nicotinamide | C6 H6 N2 O | 75.54 | 122.048 | 593788 |
| Ugonin B | C26 H28 O6 | 86.11 | 436.1863 | 531848 |
| Tetrahydrobungeanol | C18 H33 N O2 | 89.41 | 295.25 | 515407 |
| Monoricinolein | C21 H40 O5 | 97.56 | 372.2876 | 496426 |
| 5,6,7,8-Tetrahydro-2,4-dimethylquinoline | C11 H15 N | 84.09 | 161.1202 | 441787 |
| Methyl allyl tetrasulfide | C4 H8 O4 | 85.94 | 120.0434 | 431183 |
| Sarcovaging B | C30 H50 N2 O4 | 77.16 | 502.3793 | 429421 |
| Actinolide B | C16 H28 O4 | 76.25 | 284.1969 | 357288 |
| 2-(1-Ethoxy-2-hydroxy)propyl-4-methoxyphenol-2-methyl-butyrate | C17 H26 O5 | 98.31 | 310.178 | 324902 |
| 5-Ene-methyl-cholate-3-O-beta-D-glucopyranoside | C31 H50 O8 | 79.88 | 550.3486 | 305860 |

| | | | | |
|--|---------------|-------|----------|--------|
| Thioacetic anhydride | C4 H6 O2 S | 75.57 | 118.0096 | 253177 |
| Gerronemin E | C26 H34 O4 | 75.11 | 410.2441 | 221154 |
| PR toxin | C17 H20 O6 | 75.28 | 320.1249 | 212527 |
| Notharman | C11 H8 N2 | 83.32 | 168.0684 | 172861 |
| Alloisoleucine | C8 H13 N O2 | 78.76 | 131.0941 | 156931 |
| Lycodine | C16 H22 N2 | 81.4 | 242.179 | 155384 |
| Caprylic acid | C8 H16 O2 | 77.63 | 144.1156 | 146440 |
| Siraitic acid B | C29 H42 O5 | 94.34 | 470.3029 | 145028 |
| DELTA6-Dehydroferuginol | C20 H28 O | 77.66 | 284.2162 | 142530 |
| Chelirubine | C21 H16 N O5 | 75.64 | 362.1045 | 128127 |
| Mioporosidegenin | C12 H22 O5 | 80.5 | 246.1472 | 124523 |
| Campesteryl-D-glucoside-6'-palmitate | C50 H88 O7 | 92.47 | 800.653 | 117733 |
| Debilic acid | C18 H13 N O7 | 78.32 | 355.0693 | 114282 |
| Serratidinine | C18 H28 N2 O2 | 78.68 | 304.2127 | 106899 |
| Exaltolide | C15 H28 O2 | 81.84 | 240.2086 | 106409 |
| Tropinone | C8 H13 N O | 76.37 | 139.1009 | 104416 |
| Icariside H1 | C18 H26 O9 | 75.53 | 386.1567 | 103305 |
| Lupinine | C10 H19 N O | 75.96 | 169.1473 | 100140 |
| Resibufagin | C24 H30 O5 | 78.84 | 398.2088 | 92315 |
| Methyl isopelletierine | C9 H17 N O | 85.34 | 155.1315 | 86938 |
| Pyroglutamic acid | C5 H7 N O3 | 85.48 | 129.0424 | 80025 |
| (+)-gamma-Hydroxy-L-homoarginine | C7 H16 N4 O3 | 81.71 | 204.1218 | 77812 |
| sym-Homospermidine | C8 H21 N3 | 82.24 | 159.1738 | 75605 |
| Herculin | C16 H29 N O | 76.8 | 251.2253 | 73172 |
| 5-Cinnamoylphototoxicin II | C29 H36 O6 | 85.68 | 480.2521 | 66528 |
| Polygalaxanthone V | C26 H30 O15 | 83.42 | 582.1573 | 51643 |
| 1-Methyl naphthalene | C11 H10 | 76.33 | 142.0779 | 50423 |
| Azetidine-2-carboxylic acid | C4 H7 N O2 | 81.71 | 101.047 | 49874 |
| Muscoprydine | C16 H25 N | 81.45 | 231.1976 | 48411 |
| 3-(2'-Hydroxyphenyl)-4-(3H)-quinazolinone | C14 H10 N2 O2 | 76.74 | 238.0738 | 44496 |
| 8-Acetylcolaconine | C26 H39 N O6 | 76.6 | 461.2752 | 44453 |
| (+)-1-Hydroxypinoresinol-4',4"-di-O-beta-D-glucopyranoside | C32 H42 O17 | 93.25 | 698.2429 | 42382 |
| Dendroside F | C21 H34 O9 | 80.98 | 430.2206 | 41028 |
| Parasorbic acid | C6 H8 O2 | 77.01 | 112.0524 | 40669 |
| N-3-methyl-2-butenyl urea | C6 H12 N2 O | 76.96 | 128.0947 | 40128 |
| 1-O-Caffeoylglycerol | C12 H14 O6 | 85.22 | 254.0789 | 39252 |
| Acifoline | C16 H23 N O2 | 75.14 | 261.1754 | 38387 |
| Trufflesphingolipid D | C34 H69 N O5 | 76.66 | 571.514 | 36886 |
| Miserotoxin | C9 H17 N O8 | 77.98 | 267.0953 | 33717 |
| Adenosine | C10 H13 N5 O4 | 82.34 | 267.0954 | 33717 |

| | | | | |
|--|------------------|-------|-----------|-------|
| 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-diacetoxyoctane | C19 H28 O6 | 90.05 | 352.1878 | 33386 |
| Isovaleroxy-hydroxy dihydrovaltrate | C27 H40 O11 | 80.32 | 540.2547 | 31914 |
| Phalloidin | C35 H48 N8 O11 S | 84.47 | 788.3181 | 31789 |
| 4-Quinazolone | C8 H6 N2 O | 78.01 | 146.0483 | 30833 |
| 2-Hexenyl benzoate | C13 H16 O2 | 76.45 | 204.115 | 30223 |
| Purine | C5 H4 N4 | 99.61 | 120.0436 | 25809 |
| Muscone | C16 H30 O | 82.76 | 238.229 | 21734 |
| L-Asparagine | C4 H8 N2 O3 | 77.49 | 132.0529 | 20597 |
| lablab saponin I | C54 H82 O22 | 89.98 | 1082.5291 | 20308 |
| 16-Methoxycarbonyl naufoline | C21 H19 N3 O3 | 84.96 | 361.1433 | 19594 |
| Galegine | C6 H13 N3 | 80.39 | 127.1105 | 18553 |
| 2,3,4-Trimethyl-5-phenyloxazolidine | C12 H17 N O | 76.94 | 191.1319 | 18315 |
| Dianoside G | C48 H76 O20 | 87.47 | 972.4913 | 17945 |
| L-Homoarginine | C7 H16 N4 O2 | 83.83 | 188.1275 | 14141 |
| Panaxynol | C17 H24 O | 75.56 | 244.1827 | 12907 |
| 10-Deacetyltaxol | C45 H49 N O13 | 80.79 | 811.3192 | 11987 |
| 10beta-Hydroxy-6beta-isobutyryl furanoeremophilane | C19 H28 O4 | 75.04 | 320.2007 | 10537 |
| Dimethyl azelate | C11 H20 O4 | 79.35 | 216.1364 | 10342 |

(나) 백편두에서 OPA 유도체화 L-Arginine

○ 방법: 백편두에서 OPA 유도체화한 L-Arginine을 측정 및 함량 평가함.

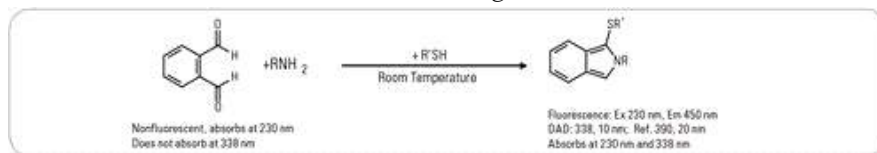
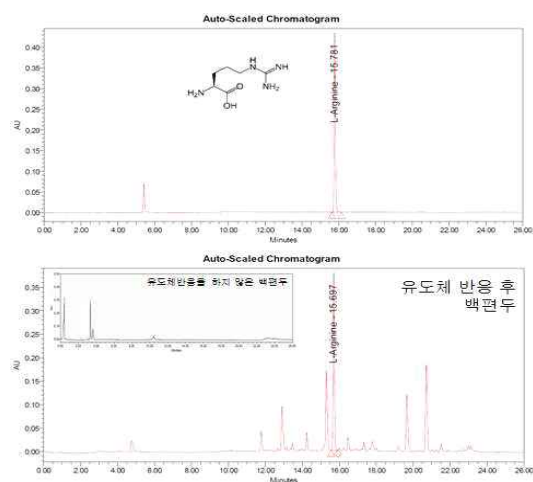


그림2.2.8. 아미노산의 OPA 유도체 과정



| | R ² | 백편두 (ug/mg) | % 함량 |
|------------|----------------|-------------|-------|
| L-Arginine | 0.9993 | 4.368 | 0.43% |

그림2.2.9. 백편두에서 OPA 유도체화한 L-Arginine 측정 및 함량 평가

- 결과: 백편두의 지표물질은 L-Arginine과 L-pipecolic acid로 설정함. L-Arginine 분석을 위해 아미노산 분석에 쓰이는 ortho-phthalaldehyde (OPA) 유도체화 과정을 거친 분석법을 이용함. 백편두의 L-Arginine의 함량은 0.43% 로 분석됨.

(다) Triple Quadrupole LC/MS 기기를 이용한 백편두의 지표물질분석

- 방법: Triple Quadrupole LC/MS를 이용하여 분석조건을 설정하고, 백편두에 L-pipecolic acid 물질 분석

표2.2.6. Triple Quadrupole LC/MS를 이용한 백편두 표준시료 분석

| | M/Z ion pair | CE (Volt) | 비고 |
|------------------|--------------|--------------------|----|
| L-pipecolic acid | 130.1/84.0 | 15 | |
| 0.1% formic acid | ACN | Flow rate (µl/min) | |
| 50 | 50 | 20 | |

(라) LC/MS 기기를 이용한 백편두의 지표물질분석

- 방법: 백편두 지표물질인 L-pipecolic acid을 LC/MS 기기를 이용하여 크로마토그램 및 함량 평가

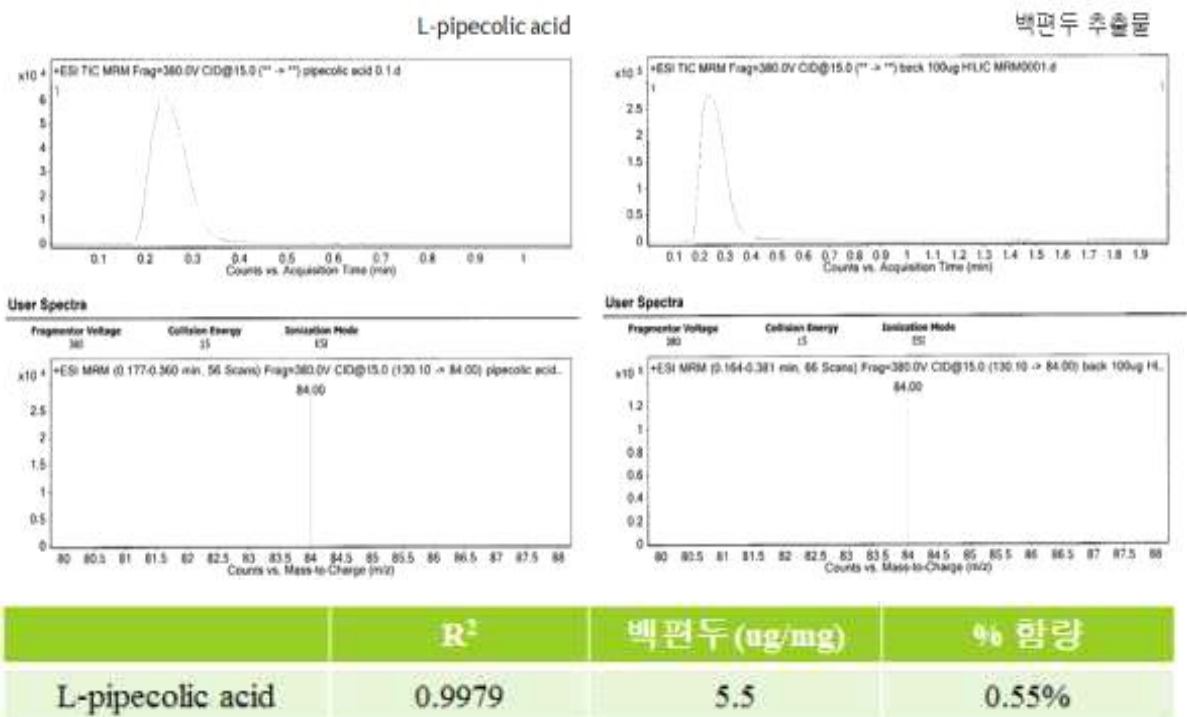


그림2.2.10. 백편두 지표물질인 L-pipecolic acid의 LC/MS 크로마토그램 및 함량 평가

나. 백편두 발아과정에 따른 신경보호 효과 연구 (추가 연구)

- 방법: 발아과정에 따른 성분변화 측정을 위해 Triple Quadrupole LC/MS 기기를 이용하

여 발아 시간에 따른 성분변화를 측정하였으며, 발아 시간에 따른 6-OHDA로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 보호 효능을 평가함.

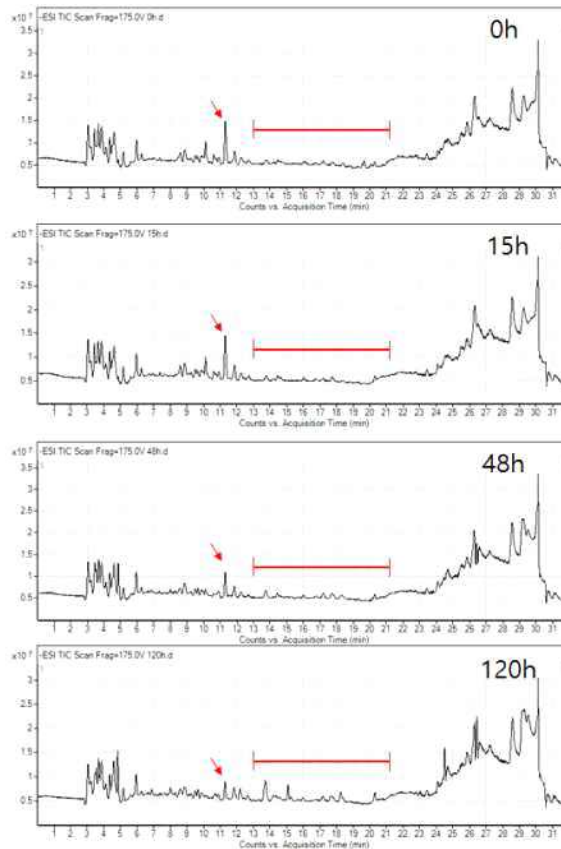


그림2.2.11. 발아과정에 따른 성분변화 측정 Triple Quadrupole LC/MS 크로마토그램 결과

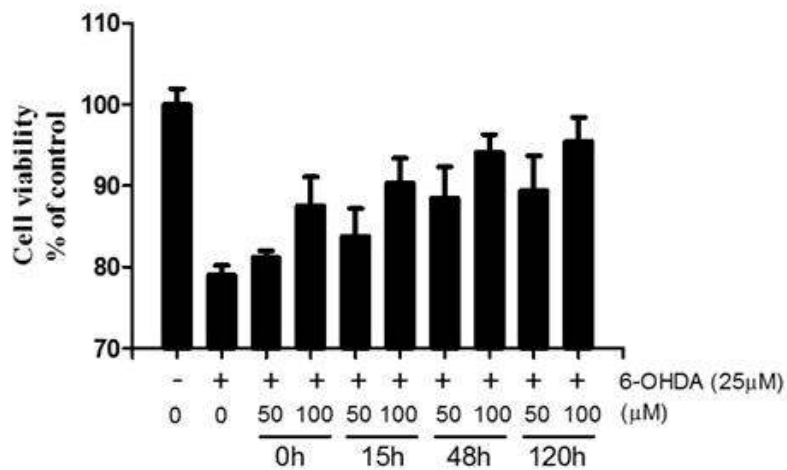


그림2.2.12. 6-OHDA로 유도한 human neuroblastoma SH-SY5Y 세포주 모델에서 발아 과정에 따른 백편두의 효능 평가

○ 결과: 백편두를 발아함에 따라 그림24의 화살표로 표시한 피크가 줄어들며 retention time 13~21분경 검출되는 피크의 함량이 많아짐을 확인함. 또한 이러한 변화로 인해 6-OHDA로 유도한 SH-SY5Y세포주에서 발아에 따라 증가된 세포보호 효능을 보임.

다. 백편두의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보

(1) 분석조건 확립

백편두의 활성성분인 Trigonelline을 지표물질로 설정.

○ 방법: 백편두에 함유된 Trigonelline의 정량을 위하여 LC-MS/MS 기법을 이용하여 분석조건 확립.

| Cpd | Label | Mass | Avg Mass | Std Dev | Base Peak | m/z | Polarity | Max Z | Min Z | RT | Height | Width | Vol | Vol % | Quality Score |
|-----|---------------|----------|----------|---------|-----------|----------|----------|-------|-------|-------|---------|-------|----------|-------|---------------|
| 1 | Cpd 1: 0.840 | 158.9843 | 159.063 | | 159.9916 | 159.9916 | Positive | 1 | 1 | 0.84 | 91953 | 0.308 | 1427674 | 0.28 | 80.5 |
| 2 | Cpd 2: 1.179 | 265.149 | 265.271 | | 266.1563 | 266.1563 | Positive | 1 | 1 | 1.179 | 55718 | 0.121 | 567995 | 0.11 | 100 |
| 3 | Cpd 3: 1.446 | 303.1444 | 303.2936 | | 304.1517 | 304.1517 | Positive | 1 | 1 | 1.446 | 1096016 | 0.12 | 8966648 | 1.74 | 93.2 |
| 4 | Cpd 4: 1.539 | 813.2737 | 813.68 | | 814.2809 | 814.2809 | Positive | 1 | 1 | 1.539 | 54561 | 0.047 | 494226 | 0.1 | 80 |
| 5 | Cpd 5: 1.544 | 129.0796 | 129.2008 | | 130.0869 | 130.0869 | Positive | 1 | 1 | 1.544 | 1695291 | 0.129 | 16817472 | 3.26 | 100 |
| 6 | Cpd 6: 1.549 | 137.0465 | 137.2649 | | 138.0538 | 138.0538 | Positive | 1 | 1 | 1.549 | 1724877 | 0.14 | 19870290 | 3.86 | 100 |
| 7 | Cpd 7: 1.603 | 257.1034 | 257.184 | | 258.1106 | 258.1106 | Positive | 1 | 1 | 1.603 | 134726 | 0.15 | 1513197 | 0.29 | 100 |
| 8 | Cpd 8: 1.632 | 118.0073 | 118.0546 | | 119.0146 | 119.0146 | Positive | 1 | 1 | 1.632 | 424453 | 0.055 | 2875948 | 0.56 | 80 |
| 9 | Cpd 9: 1.632 | 364.0965 | 364.25 | | 365.1037 | 365.1037 | Positive | 1 | 1 | 1.632 | 304164 | 0.112 | 2654752 | 0.52 | 98.9 |
| 10 | Cpd 10: 1.636 | 526.1521 | 526.4387 | | 527.1594 | 527.1594 | Positive | 1 | 1 | 1.636 | 44402 | 0.168 | 522084 | 0.1 | 100 |
| 11 | Cpd 11: 1.718 | 646.2491 | 646.896 | | 324.1318 | 324.1318 | Positive | 2 | 2 | 1.718 | 97380 | 0.206 | 1326873 | 0.26 | 80 |
| 12 | Cpd 12: 1.725 | 232.1025 | 232.1885 | | 233.1098 | 233.1098 | Positive | 1 | 1 | 1.725 | 201152 | 0.102 | 1460237 | 0.28 | 87.8 |
| 13 | Cpd 13: 1.824 | 292.0463 | 292.1441 | | 293.0536 | 293.0536 | Positive | 1 | 1 | 1.824 | 58497 | 0.194 | 651776 | 0.13 | 100 |
| 14 | Cpd 14: 2.005 | 569.1429 | 569.524 | | 570.1502 | 570.1502 | Positive | 1 | 1 | 2.005 | 50612 | 0.105 | 519786 | 0.1 | 80 |
| 15 | Cpd 15: 2.006 | 245.052 | 245.0531 | 0.0022 | 246.0592 | 246.0592 | Positive | 1 | 1 | 2.006 | 695787 | 0.03 | 4246616 | 0.82 | 80 |
| 16 | Cpd 16: 2.007 | 227.0419 | 227.0419 | 0.0013 | 228.0492 | 228.0492 | Positive | 1 | 1 | 2.007 | 200241 | 0.054 | 1391990 | 0.27 | 80 |
| 17 | Cpd 17: 2.012 | 285.0448 | 285.1774 | | 286.0521 | 286.0521 | Positive | 1 | 1 | 2.012 | 334115 | 0.137 | 2896660 | 0.56 | 80 |
| 18 | Cpd 18: 2.091 | 717.1979 | 717.4319 | 0.0038 | 359.6061 | 359.6061 | Positive | 2 | 1 | 2.091 | 51622 | 0.337 | 554925 | 0.11 | 86.3 |
| 19 | Cpd 19: 2.137 | 760.118 | 760.1577 | | 381.0663 | 381.0663 | Positive | 2 | 2 | 2.137 | 79445 | 0.164 | 984811 | 0.19 | 99.6 |
| 20 | Cpd 20: 2.147 | 588.1545 | 588.4828 | | 589.1618 | 589.1618 | Positive | 1 | 1 | 2.147 | 59664 | 0.204 | 928905 | 0.18 | 94 |



| Tentative identification | tR | Mesured mass(m/z) | Error(ppm) | Molecular formular | MS/MS |
|--------------------------|-------|-------------------|------------|--------------------|------------|
| Trigonelline | 1.549 | 137.0465 | 8.61 | C7H7NO2 | 92, 94, 78 |

그림2.2.13. 백편두에 함유된 Trigonelline의 LC-MS/MS 분석

○ 결과: LC-MS/MS 기법을 이용하여 Trigonelline 성분을 지표물질로 선정함.

(2) 백편두의 기전연구를 위한 유효성분 제공

○ 방법: 백편두의 활성성분인 Trigonelline을 분석하기 위하여 TLC분석법 및 HPLC 기기를 이용하여 Trigonelline이 존재하는 것을 확인, 각각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample의 Trigonelline 함량을 정량하였음.

발아백편두 지표성분 분석(HPLC)

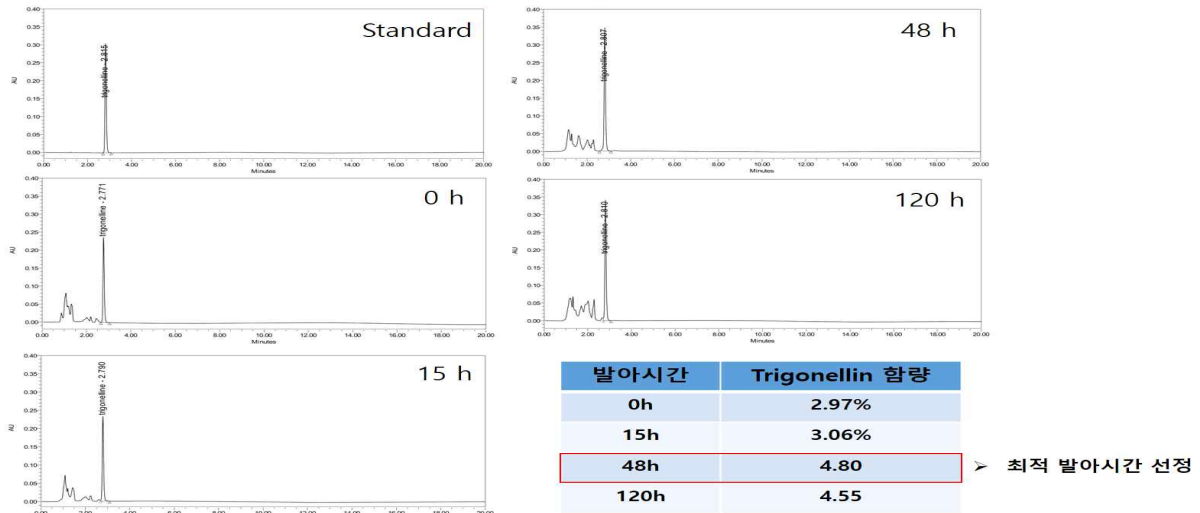


그림2.2.14. HPLC 기기를 이용한 발아 백편두의 지표성분 분석

인도백편두 Trigonelline 지표성분 분석(HPLC)

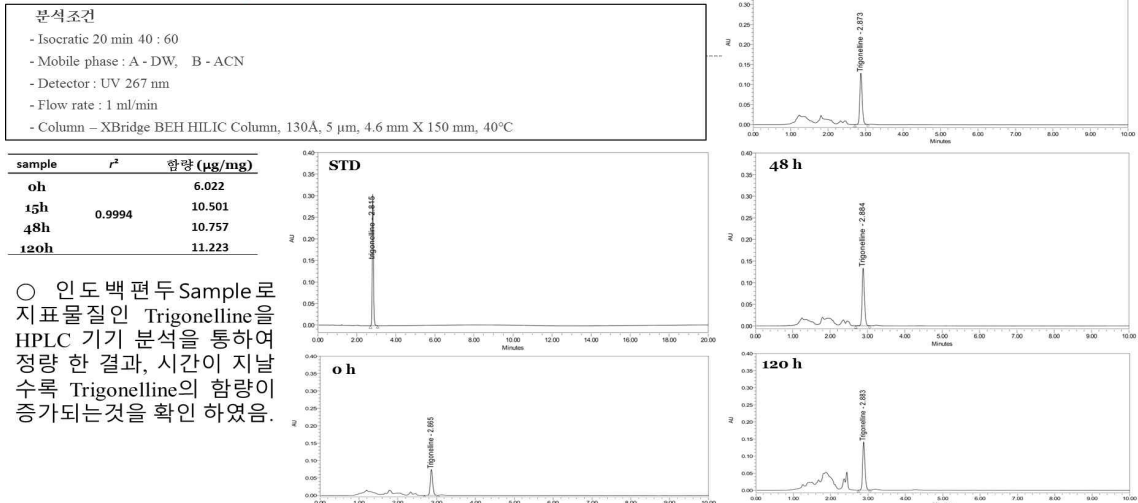
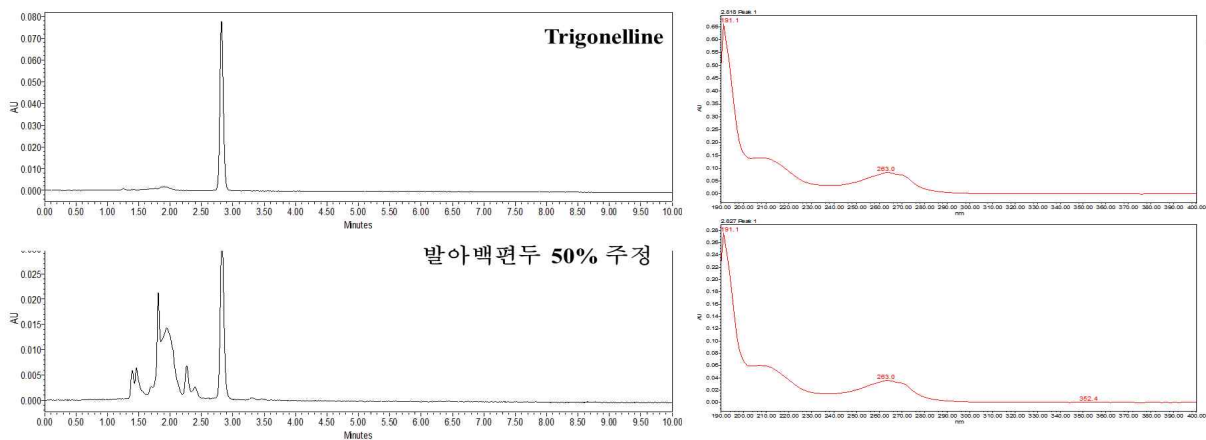
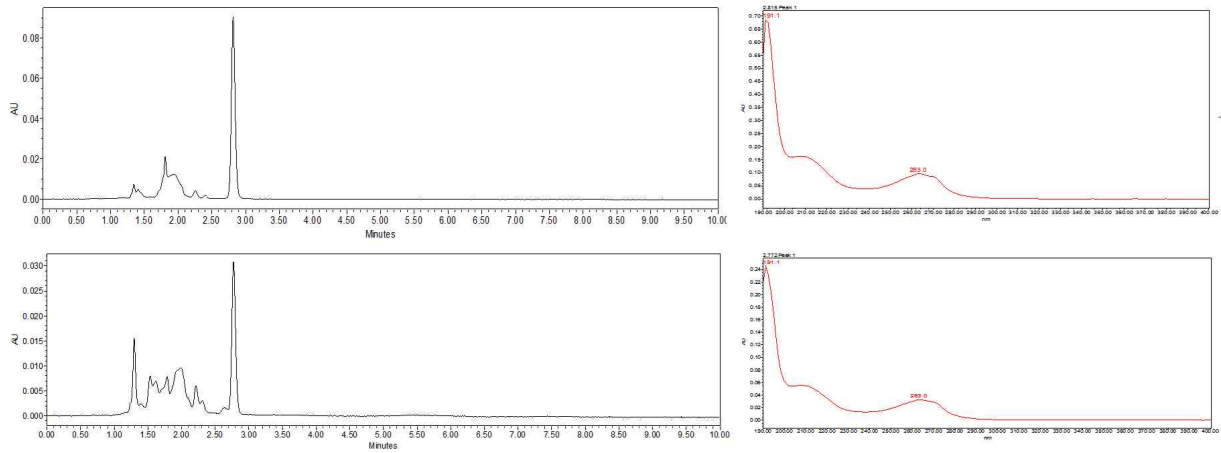


그림2.2.15. HPLC 기기를 이용한 인도 백편두의 발아에 따른 Trigonelline 함량 분석

유니베라 백편두 Trigonelline 지표성분 분석(HPLC)

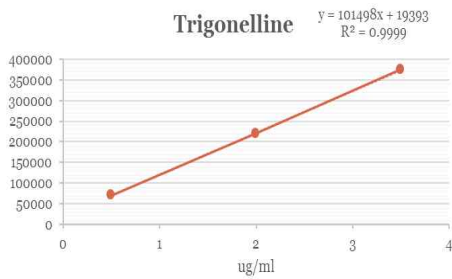




| Sample | Area | Contents (µg/100µg) |
|----------------|---------|---------------------|
| 발아백편두-50% EtOH | 124,493 | 1.155097 |
| 백편두-70% EtOH | 333,957 | 3.107231 |
| 인도 발아백편두 | 121,540 | 1.127576 |

그림2.2.16. HPLC 기기를 이용한 산지별, 추출용매별 Trigonelline 함량 분석

백편두 Trigonelline 정량



| µg/ml | 0.5 | 2 | 3.5 |
|-------|--------|---------|---------|
| area | 71,095 | 220,481 | 375,588 |

| Sample | (µg/100µg) |
|----------------------|------------|
| 백편두-RE-70% EtOH | 1.52592 |
| 백편두-80°C-70% EtOH | 2.1327 |
| 백편두-발아-80°C-70% EtOH | 1.63199 |

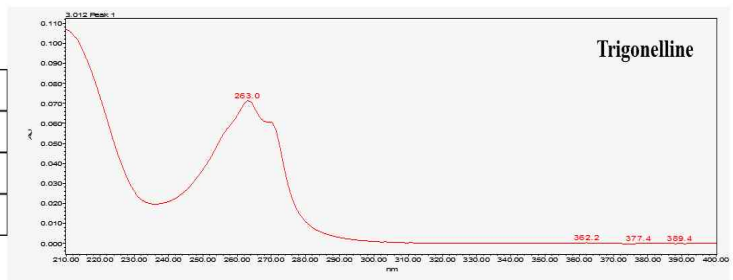
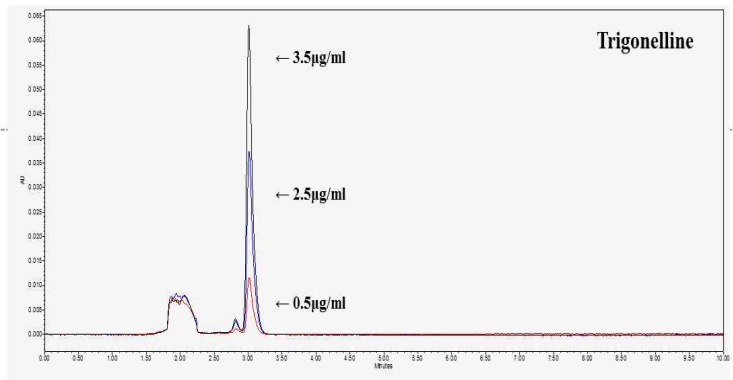


그림2.2.17. HPLC 기기를 이용한 발아유무 및 추출법에 따른 Trigonelline 함량 분석

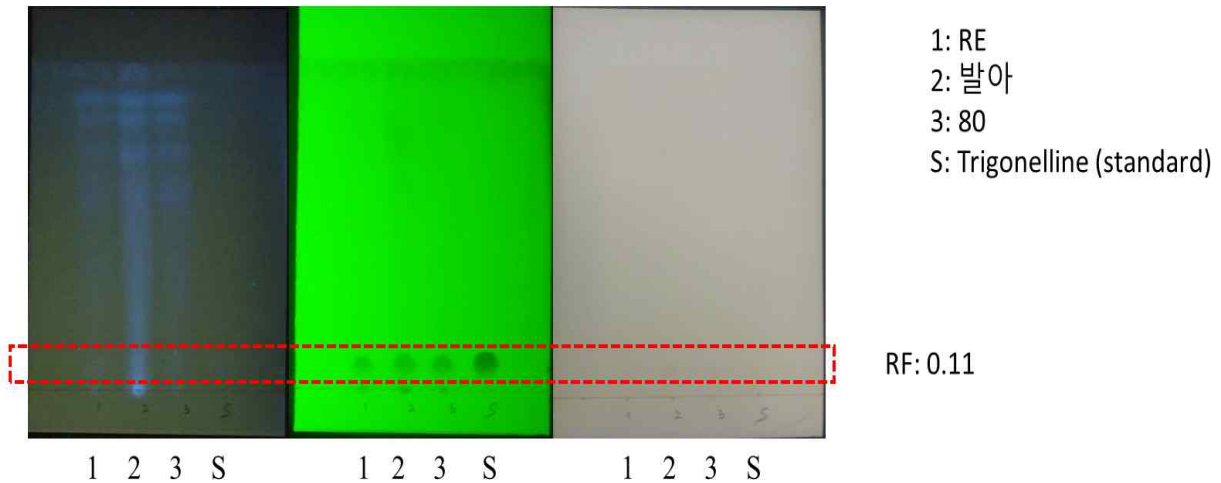


그림2.2.18. TLC 기법을 이용한 Trigonelline 함량 분석

- 결과: HPLC 기기를 이용하여 백편두의 발아 시간에 따른 Trigonelline의 함량 변화를 분석한 결과, 발아가 진행될수록 많은 Trigonelline 함량이 높게 측정되었음. 또한, 각각의 백편두 Sample (발아백편두-50% EtOH, 백편두-70% EtOH, 인도발아백편두)로 지표물질인 Trigonelline을 HPLC기기분석을 통하여 정량한 결과, 70% EtOH 백편두의 Trigonelline 함량이 가장 높은 것으로 확인 되었음. 각각의 백편두 Sample (RE-70% EtOH, 80° C-70% EtOH, 발아-80° C-70% EtOH)로 지표물질인 Trigonelline을 HPLC기기분석을 통하여 정량한 결과, 80° C-70% EtOH 100 μg당 2.1 μg로, 가장 많은 Trigonelline을 함유하고 있었음.

(1) 최적 조합 시료의 분석법 개발

(가) 분석법 validation과 기준 및 시험법 확립

① LC-MS/MS를 이용한 fingerprint analysis

- 방법: UPLC-MS/MS 분석조건을 최적화하여 주요 peak 들의 retention time 및 peak area에 대해 validation을 수행함. TIC에 대해 Molecular Feature Extraction을 수행하여 전체 물질에 대한 retention time, m/z, abundance 정보를 저장하고 retention time과 m/z에 peak alignment를 수행함.

표2.2.7. 백편두 LC Conditions

| | |
|------------------------------|---|
| mobile phase | B- 0.1% formic acid in ACN C- 0.1% formic acid in Water |
| Column (mm) | Thermo C18 Hypersil GOLD 50 X 2.1 |
| detector | Q-Orbitrap-MS |
| Gradient | 0 min : B-0, C-100 20 min : B-100, C-0 20.5 min : B-0, C-100 23 min : B-100, C-0 |
| Flow (mL/min) | 0.3 |
| Injection volume (μL) | 10 |

표2.2.8. 백편두의 70% EtOH 추출물 LC-MS/MS 분석

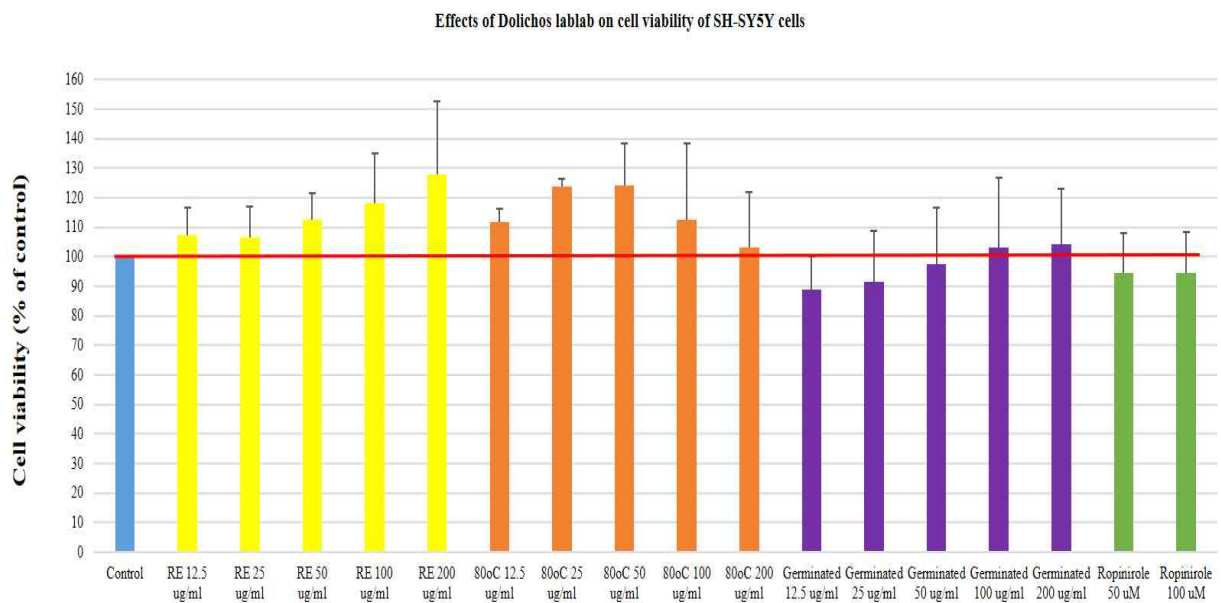
| Peak No | Retention time | Peak mass (M-H+) | Molecular weight | Molecular formula | Compound name |
|---------|----------------|--|------------------|--|---------------|
| 1 | 0.55 | 341.10 | | | Unknown |
| 2 | 3.50 | 130.14 | 131.17 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | Leucine |
| 3 | 0.49 | 134.02 | | | Unknown |
| 4 | 4.59 | 145.02 | 146.19 | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ | Lysine |
| 5 | 7.53 | 116.92, 152.99, 174.95, 809.434, 839.40, 877.42 | | | Unknown |
| 6 | 9.03 | 152.99, 809, 823 | | | Unknown |
| 7 | 9.17 | 152, 193.03, 823.41, 845.21 | | | Unknown |
| 8 | 9.98 | 793.43, 819.89 | | | Unknown |
| 9 | 9.44 | 477.32 | 478.66 | | Dolicholide |
| 10 | 8.70 | 116 | 117.15 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | Valine |
| 11 | 4.15 | 134.03, 149.119, 136.03, 191.055, 193.04, 525, 507.2005, | | | Unknown |
| 12 | 5.06 | 136.039 | 137.14 | C ₇ H ₇ NO ₂ | Trigonelline |

○ 결과: 백편두 샘플을 Q-Orbitrap-UPLC-MS/MS 분석기기를 이용하여 분석한 결과, 백편두 샘플에서 총 12개의 main peak 중 4개의 물질을 identify 하였음.

라. 백편두 Sample의 효능 평가 및 기전연구

(1) 백편두 Sample의 SH-SY5Y 세포주 모델에서 독성 및 효능 평가

○ 방법: 각각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample의 6-OHDA로 유도한 human neuroblastoma SH-SY5Y 세포주 모델에서 효능 평가.



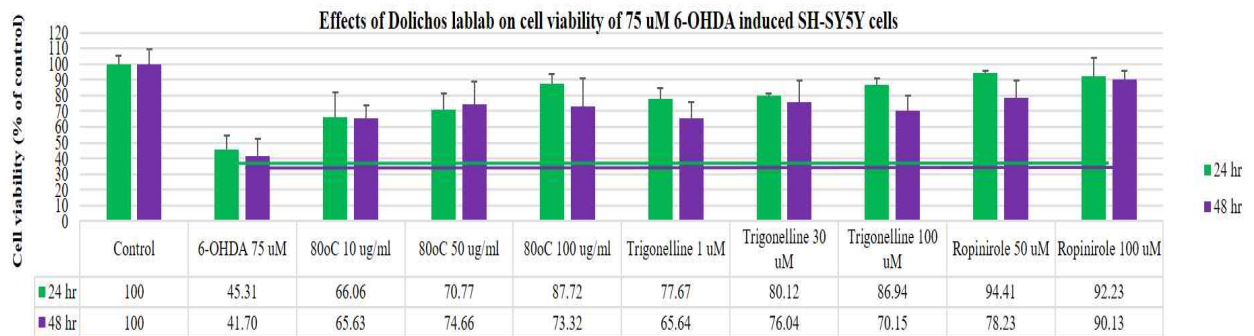
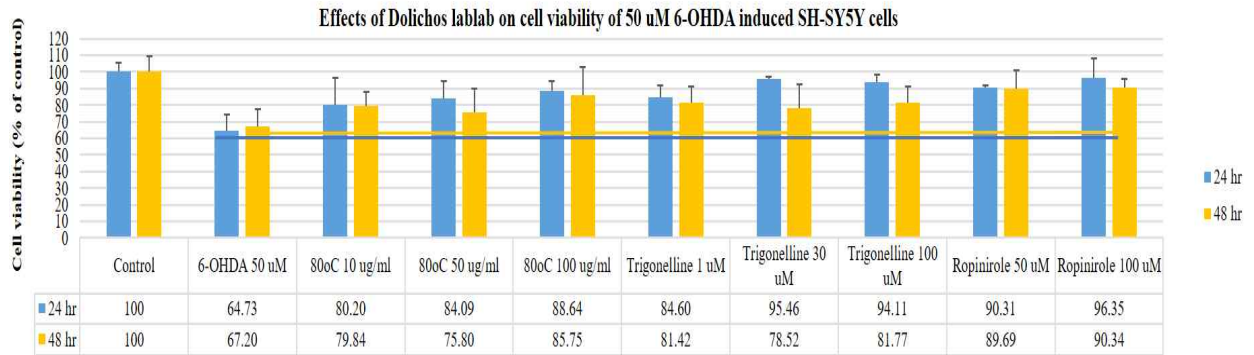


그림2.2.19. 6-OHDA로 유도한 human neuroblastoma SH-SY5Y 세포주 모델에서 효능 평가

- 결과: 각각의 3가지 백편두 sample로 SH-SY5Y 세포주에서 독성을 평가한 결과, Sample 모두에서 200 μ g/mL 농도까지 독성이 없었으며, 6-OHDA로 유도한 human neuroblastoma SH-SY5Y 세포주 모델에서 효능을 평가한 결과, Trigonelline 1 μ M에서부터 양성대조군인 Ropinirole 50 μ M 농도의 효능에서와 비슷한 효능을 보였음. 백편두 80° C 70% EtOH 추출물에서도 세포보호 효능을 나타내었음.

(2) 백편두 Sample의 SH-SY5Y 세포주에서 기전연구

- 방법: 각각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample을 SH-SY5Y 세포주에 처리 후, Western Blot 단백질 분석법을 이용한 MAPKs 기전 확인.

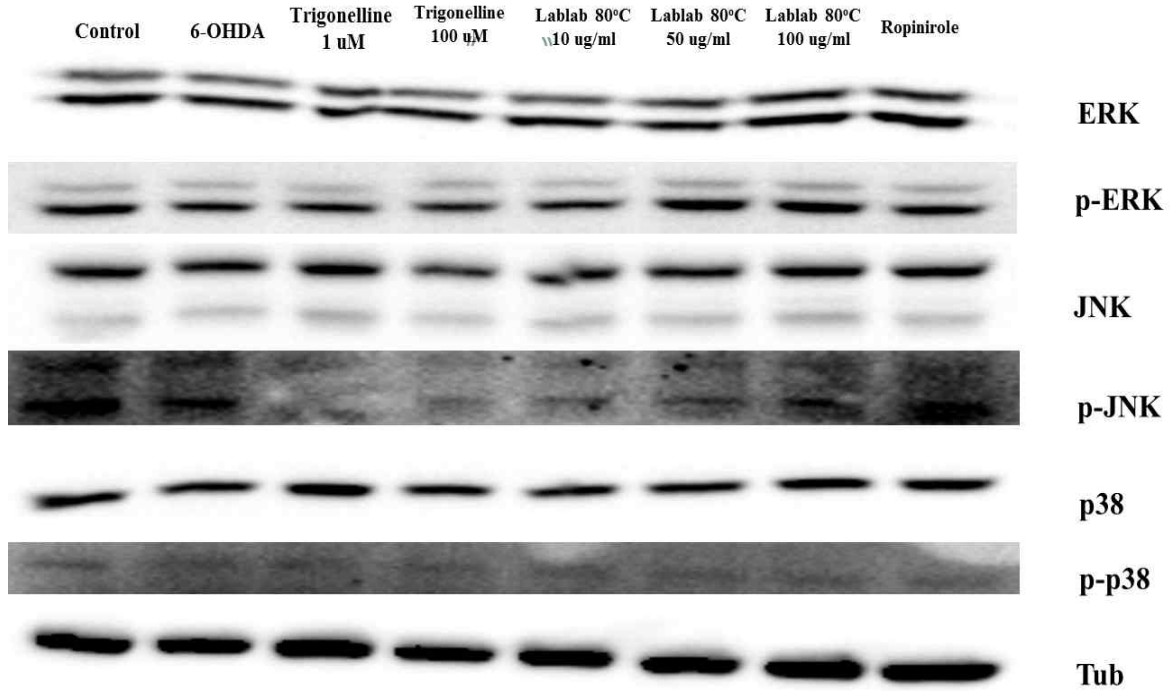
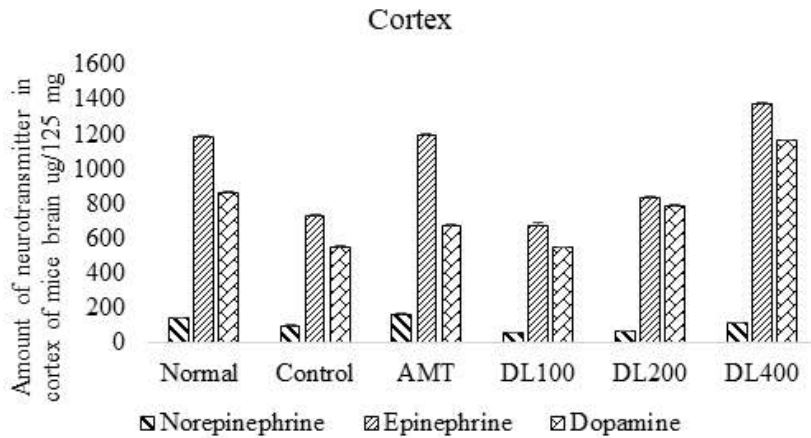


그림2.2.20. SH-SY5Y 세포주에서 Western Blot 단백질 분석법을 이용한 기전연구

- 결과: 각각 조건이 다르게 추출된 백편두시로 처리에 따른 Western Blot 단백질 분석법을 이용하여 MAPKs 기전을 확인해본 결과, MAPKs 기전을 경유하지 않는 것으로 보임.

마. Neurotransmitter Biomarker Analysis 기전연구

- 방법: 백편두의 효능에 대한 작용기전을 추가적으로 연구하기 위하여 14일간 백편두를 처리한 동물모델에서 뇌조직을 분리하여 각 부위마다 즉 cortex, hippocampus, intestine에서의 신경전달 물질을 HPLC 정량분석하고 이후 변화된 신경전달물질과 관련된 신호전달 관련 기전연구를 수행함.



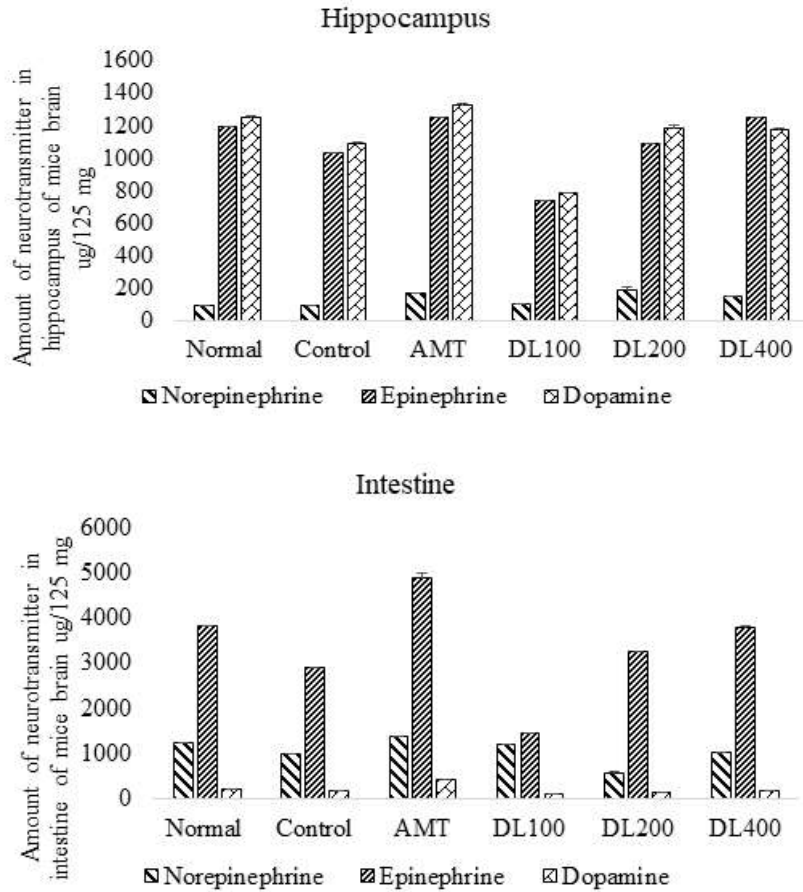


그림2.2.21. Neurotransmitter Biomarker Analysis 기전연구

- 결과: 14일간 백편두 시료가 처리된 마우스의 뇌조직에서 cortex, Hippocampus 부위를 분리하여 노르에피네프린, 에피네프린 및 도파민을 정량한 결과, 노르에피네프린, 에피네프린 및 도파민 모두 Control군에서 가장 적게 측정되었으며, 백편두 처리 농도가 클수록 정상군과 AMT군에 가깝게 혹은 그 이상으로 증가되었다. 또한, Intestine 조직에서 노르에피네프린, 에피네프린 및 도파민을 정량한 결과, DL 100 처리군에서 3가지 신경전달물질이 모두 가장 낮게 측정되었으며, AMT, normal, DL 400 순으로 3가지 신경전달 물질이 높게 측정되었다.

3. 고구마 표준화 연구

가. 고구마의 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보

(2) 분석조건 확립

(가) Q-TOF-LC-MS 기기를 이용한 고구마 시료의 지표물질 분석법 확립 및 함량

- 방법: Q-TOF-LC-MS 분석 및 천연물 라이브러리 매칭을 통한 고구마 성분분석

표2.2.9. 고구마 총추출물의 성분 정성 분석

| Name | Formula | Mass | Mass (DB) | Polarity | Height |
|----------------------------|--------------|----------|-----------|----------|---------|
| Betaine | C5 H11 N O2 | 117.0794 | 117.079 | Positive | 1708064 |
| 2,4-Dimethoxybenzaldehyde | C9 H10 O3 | 166.0632 | 166.063 | Positive | 1291740 |
| Gynunol | C11 H14 O3 | 194.0946 | 194.0943 | Positive | 1127596 |
| Adenine | C5 H5 N5 | 135.0546 | 135.0545 | Positive | 481735 |
| cis-4-Hydroxymethylproline | C6 H11 N O3 | 145.0739 | 145.0739 | Positive | 380538 |
| Tetrahydrobugeanol | C18 H33 N O2 | 295.2517 | 295.2511 | Positive | 342070 |
| Gentiatibetine | C9 H11 N O2 | 165.0792 | 165.079 | Positive | 306119 |
| L-Aspartic acid | C4 H7 N O4 | 133.0375 | 133.0375 | Positive | 259769 |
| Eugenol methyl ether | C11 H14 O2 | 178.0995 | 178.0994 | Positive | 208871 |
| L-Asparagine | C4 H8 N2 O3 | 132.0536 | 132.0535 | Positive | 195660 |
| Maltol | C6 H6 O3 | 126.0318 | 126.0317 | Positive | 186278 |
| Tetrahydrobugeanol | C18 H33 N O2 | 295.2515 | 295.2511 | Positive | 178512 |
| p-Aminobenzoic acid | C7 H7 N O2 | 137.0477 | 137.0477 | Positive | 164366 |
| Methyl isopelletierine | C9 H17 N O | 155.131 | 155.131 | Positive | 149475 |
| Capillanol | C12 H14 O | 174.1049 | 174.1045 | Positive | 140293 |
| Protostemonine | C23 H31 N O6 | 417.2147 | 417.2151 | Positive | 123304 |
| Cinnamic acid | C9 H8 O2 | 148.0527 | 148.0524 | Positive | 118861 |
| Cordycepic acid | C7 H12 O6 | 192.0635 | 192.0634 | Positive | 113152 |
| 3,6-Anhydrogalactose | C6 H10 O5 | 162.0529 | 162.0528 | Positive | 100223 |
| (-)-Gomisin L2 | C22 H26 O6 | 386.173 | 386.1729 | Positive | 94300 |
| Quinic acid | C7 H12 O6 | 192.063 | 192.0634 | Negative | 3035675 |
| Cellobiose | C12 H22 O11 | 342.1162 | 342.1162 | Negative | 2488833 |
| Malic acid | C4 H6 O5 | 134.0215 | 134.0215 | Negative | 449376 |
| Isocitric acid d | C6 H8 O7 | 192.027 | 192.027 | Negative | 354841 |
| L-Aspartic acid | C4 H7 N O4 | 133.0376 | 133.0375 | Negative | 216380 |
| Fumaric acid | C4 H4 O4 | 116.011 | 116.011 | Negative | 171980 |
| 2-Furancarboxylic acid | C5 H4 O3 | 112.0159 | 112.016 | Negative | 96483 |

(나) MPLC를 이용한 고구마 물질 분리

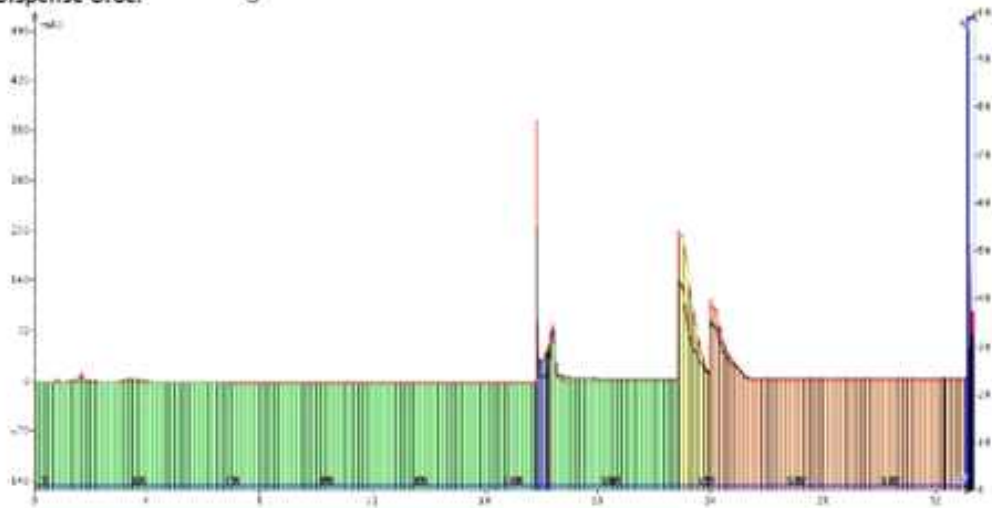
- 방법: MPLC 기기를 이용하여 고구마의 EA층 물질을 분리하여 TLC 분석법을 이용하여 분리된 물질을 확인.

Biotage Isolera Archive Report

1.

User: ljh
 Sample Name: goguma
 Date: 2016-Apr-07 16:51
 Method:
 Project:
 Comment:
 Cartridge: SNAP 100g
 Flowrate: 20 ml/min
 Solvent A: Chloroform
 Solvent B: Methanol
 Rack Type: 16x150 mm
 Max Fraction Volume: 22 ml
 Dispense Order: S

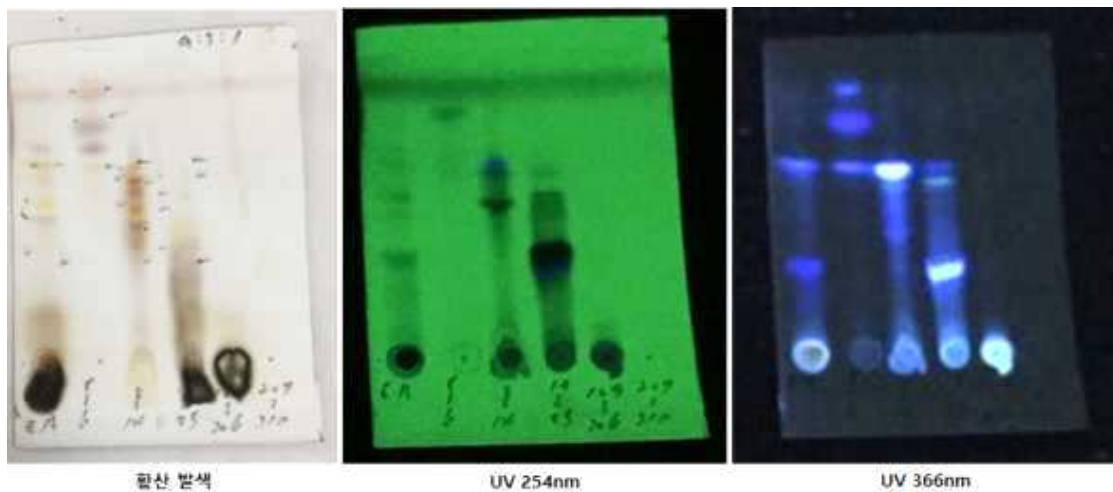
Detection Mode: UV1+UV2
 UV1 (Collection): 254 nm
 UV2 (Collection): 366 nm
 Collect All: On



| Gradient | | | |
|----------|----------|-----|-------------|
| | Solvents | Mix | Length (CV) |
| Equil | A/B | 0% | 3.0 |
| 1 | A/B | 0% | 1.0 |
| 2 | A/B | 0% | 30.0 |
| 3 | A/B | 0% | 2.0 |

flowrate 20 ml/min

그림2.2.22. MPLC를 이용한 고구마 EA층 성분분석



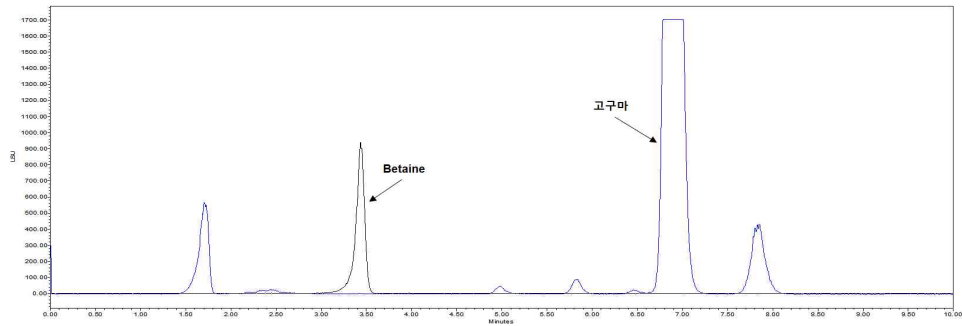
광선 발색

UV 254nm

UV 366nm

그림2.2.23. TLC를 이용한 분획별 발색 결과

고구마 & Betaine



➤ 고구마 추출물에 Betaine 함유 되어있지 않음.

그림2.2.24. LC-MS/MS 기기를 이용한 고구마의 지표물질 분석

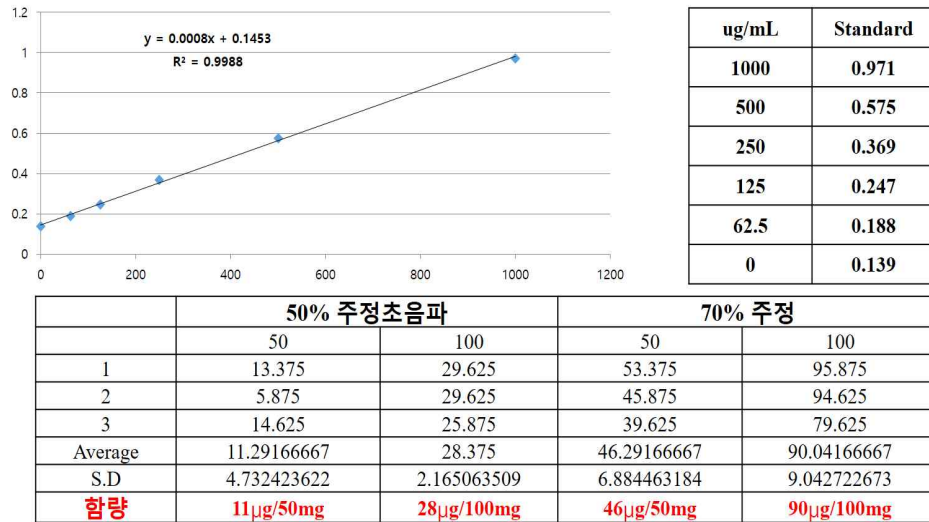


그림2.2.25. 총 쿠마린 함량 분석법을 통한 쿠마린 함량 확인

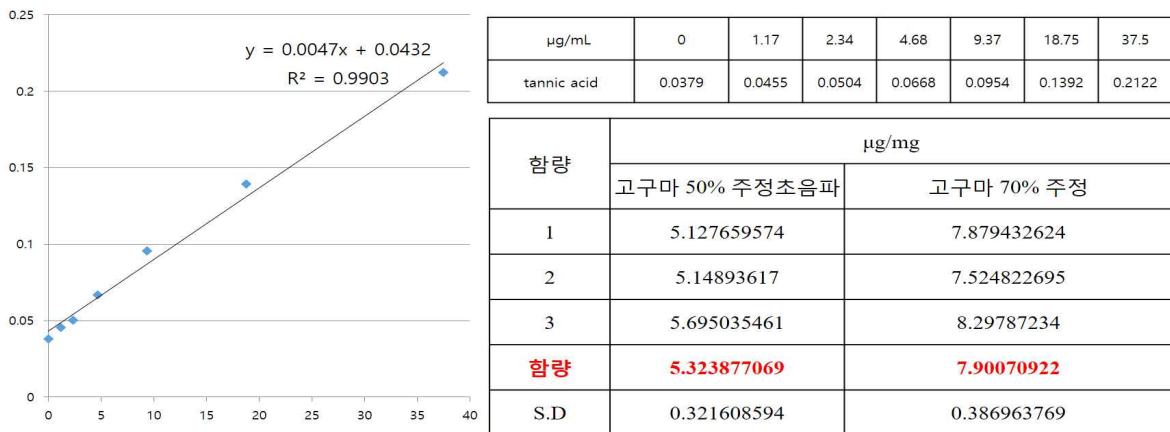


그림2.2.26. 총 페놀 함량 분석법을 통한 페놀 함량 확인

○ 결과: LC-MS/MS 기법을 이용하여 Scopoletin 성분을 지표물질로 선정하였으나, 본 시료에 Scopoletin 함량이 너무 적어 다른 물질로 선정하기로 함. 그 외

Cellobiose, Gentiobiose, Betaine 등을 정량해본 결과, 함유 되어있지 않음. 유니젠 고구마 Sample의 쿠마린 함량을 Total coumarin content assay를 통하여 정량 한 결과, 50% 주정 초음파 추출물에서는 추출물 100mg당 28 μ g의 쿠마린이 함유되어 있었으며, 70% 주정 추출물에서는 추출물 100mg당 90 μ g의 쿠마린이 함유되어 있었음.

유니젠 고구마 Sample의 총 폴리페놀 함량을 Total phenol content assay를 통하여 정량 한 결과, 50% 주정 초음파 추출물에서는 추출물 1mg당 5.3 μ g의 폴리페놀이 함유되어 있었으며, 70% 주정 추출물에서는 추출물 1mg당 7.9 μ g의 폴리페놀이 함유되어 있었음.

(4) 고구마추출물의 지표성분/유효성분 동정

- 방법: 고구마추출물의 지표성분/유효성분 동정을 위하여 EtoAc 및 물분획물을 확보한 후, EtoAc분획물을 대상으로 silica gel open column을 수행하여 9가지 소분획물을 확보함. 효능을 나타낸 소분획물 3종을 대상으로 다시 Sephadex open column으로 3가지 미세소분획물을 얻고, 최종 총 두개의 물질로 분리하여 NMR 분석법을 통하여 물질 구조를 확인함.



Figure 1: Dried slices of sweet potato roots

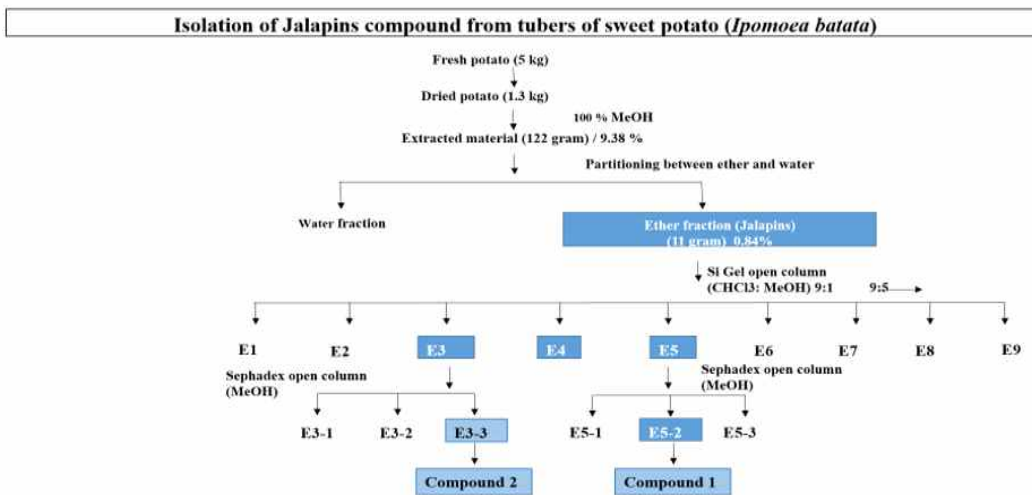
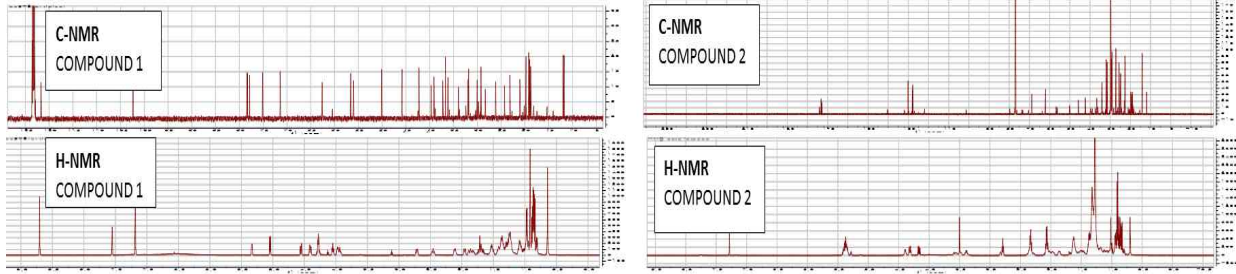


Figure 2: Extraction and isolation scheme of Compound

그림 2.2.27. 고구마 총메탄올 추출물유래 에틸아세테이트 분획물에서 물질 분리



Next: Identification of compound 2 by NMR and mass spectroscopy.

Compound 1: β -Sitosterol glucoside: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz pyridine- d_5); δ 0.64 (3H, s, H₃-18), 0.84 (3H, d, J=8, H₃-29), 0.87 (3H, d, J=8, H₃-27), 0.88 (3H, d, J=7.2, H₃-26), 0.92 (3H, s, H₃-19), 0.97 (3H, d, J=8, H₃-21) and 5.33 (1H, s, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ δ 37.25 (C-1), 29.23 (C-2), 78.93 (C-3), 42.25 (C-4), 56.10 (C-5), 121.69 (C-6), 39.11 (C-7), 31.95 (C-8), 50.11 (C-9), 33.98 (C-10), 20.16 (C-11), 39.72 (C-12), 45.8 (C-13), 56.03 (C-14), 24.29 (C-15), 26.14 (C-16), 56.59 (C-17), 11.94 (C-18), 18.99 (C-19), 36.17 (C-20), 19.20 (C-21), 37.25 (C-22), 29.23 (C-23), 50.11 (C-24), 23.16 (C-25), 18.79 (C-26), 19.76 (C-27), 21.06 (C-28), 11.75 (C-29), 102.64, 78.39, 77.84, 75.12, 71.5, 62.6 ppm (for six carbons of glucose unit) FAB mass (negative mood) m/z 576 (M-H)⁻.

Next: compound 2 will be identified by NMR spectroscopy and FAB mass spectroscopy.

그림2.2.28. 고구마에서 분리한 Compound 1 (β -Sitosterol glucoside)의 NMR data

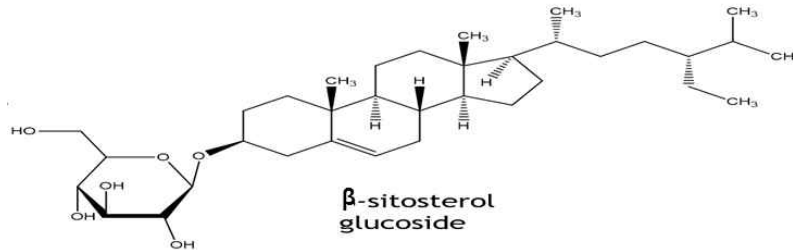


그림2.2.29. 고구마에서 분리한 Compound 1 (β -Sitosterol glucoside)의 구조

○ 결과: 분리한 두 개의 물질 중 먼저 하나의 물질을 H-NMR과 C-NMR로 구조 분석을 해 본 결과, β -Sitosterol glucoside인 것으로 판명 됨.

(5) 분석법 validation과 기준 및 시험법 확립

(가) 분석법 validation과 기준 확립

○ 방법: HPLC 기기를 사용하여 기준에 구입 가능한 Trigoneline 지표물질과 백편두의 함유된 성분을 대조 분석하여 같은 조건에서 같은 Rt 값에 유사한 패턴의 peak가 있는지를 확인함.

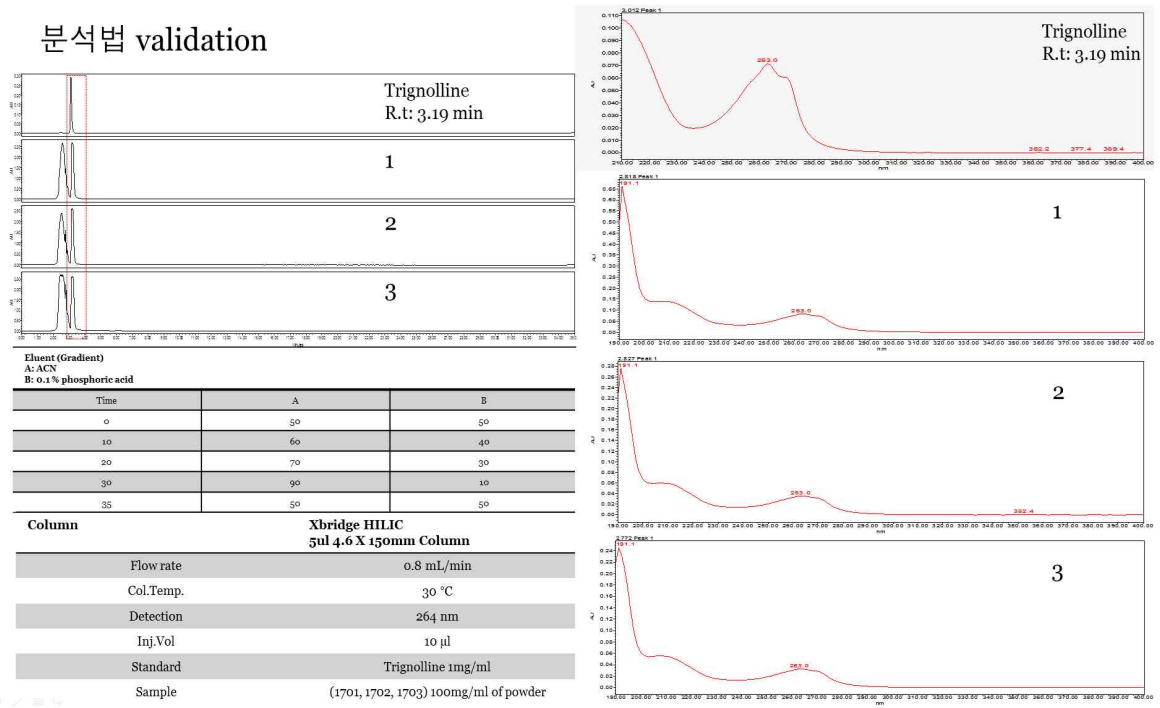


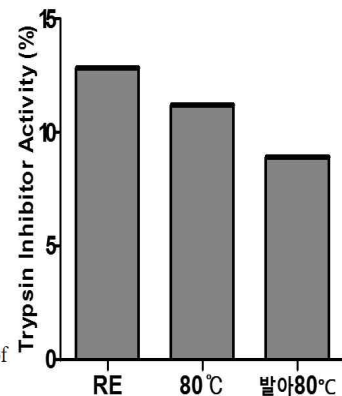
그림2.2.30. HPLC 기기를 이용한 Trigonelline 지표물질 분석조건 확립

○ 결과: 위와 같은 조건에서 HPLC 기기를 사용하여 백편두에서 Trigonelline을 반복적으로 분석하여 분석법 validation과 기준을 확립하였음. 반복실험 결과 Rt값 3.19 min에서 지표물질 peak가 나옴. 또한 264 nm에서 흡광도를 분석 시, 위와 같은 패턴을 보임.

(나) 시험법 확립 (Trypsin Inhibition Assay, cell viability assay)

○ 방법: 각각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample의 Trypsin Inhibition Assay 실험법을 통한 Trypsin 억제능 효능 확인.

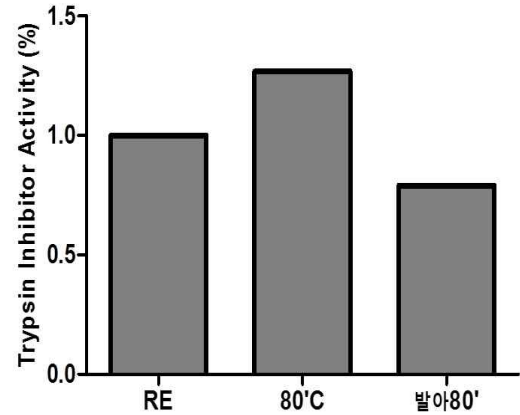
| Sample | Volume (mg/ml) | Protein Concentration (mg/ml) | Total Inhibitor Activity (U) | Specific Inhibitor activity (U/mg) | Total Inhibitor Activity % |
|------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Blank | | | 0 | | 0 |
| Trypsin Inh. | | 0.1 | 11.677 | | 100 |
| RE-70% EtOH | 50 | 0.632 | 1.501 | 2.375 | 12.86 |
| 80°C-70% EtOH | 50 | 0.709 | 1.312 | 1.850 | 11.23 |
| 발아-80°C-70% EtOH | 50 | 0.765 | 1.044 | 1.365 | 8.94 |



(U) : Inhibitor activity toward bovine trypsin. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 per 30 min at 37 °C

(U/mg) : Specific activity was calculated by the ratio of total activity (U) and total protein content (in milligram)

| Sample | Volume (mg/ml) | Protein Concentration (mg/mg) | Total Inhibitor Activity (U) | Specific Inhibitor activity (U/mg) | Purification (fold) |
|---------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| RE-70% EtOH | 10 | 0.027 | 0.0492 | 0.1826 | 1.0 |
| 80°C-70% EtOH | 10 | 0.019 | 0.0447 | 0.2319 | 1.27 |
| 발아 80°C | 10 | 0.012 | 0.0177 | 0.1445 | 0.79 |



(U) : Inhibitor activity toward bovine trypsin. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 per 30 min at 37 °C

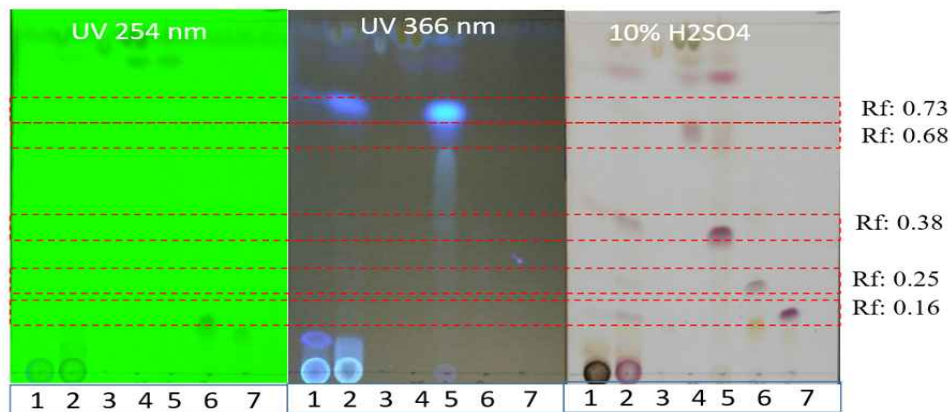
(U/mg) : Specific activity was calculated by the ratio of total activity (U) and total protein content (in milligram)

그림2.2.31. Trypsin 억제활성 및 세포독성 확인

- 결과: 처음 각각의 3가지 백편두 sample로 Trypsin Inhibition Assay를 통하여 Trypsin Inhibition Activity를 확인 한 결과, 발아80° C-70% EtOH sample의 경우 그 활성이 가장 많이 감소됨을 확인하였음. 두 번째 실험결과 역시 발아 80° C-70% EtOH sample 이 가장 많이 감소되어지는 것을 확인하였음.

(3) 품질관리를 위한 지표성분 대량 확보

- 방법: 고구마를 5 kg을 구입하여 얇게 절편으로 건조 후, 곱게 파쇄하여 100% MeOH 에 24h 침출한 후, 동결건조 하여 총 122 g의 파우더를 얻고 이로부터 관련화합 물을 분리하고 확인함. 특히 β -Sitosterol glucoside을 많이 함유함.



1: MeOH extract
 2: Ether Fraction (E)
 3: E1
 4: E2 (Umbelliferon)
 5: E3 (Resin glycoside)
 6: E4 (Resin glycoside)
 7: E5 (Resin glycoside)

Mobile phase: CHCl₃: MeOH (9:1)
 Spray agents: 10 % H₂SO₄

그림2.2.32. TLC 분석법을 이용한 분리된 물질 확인

(4) NMR, MS, HPLC-DAD, LC-MASS를 이용한 동등성 평가법 개발

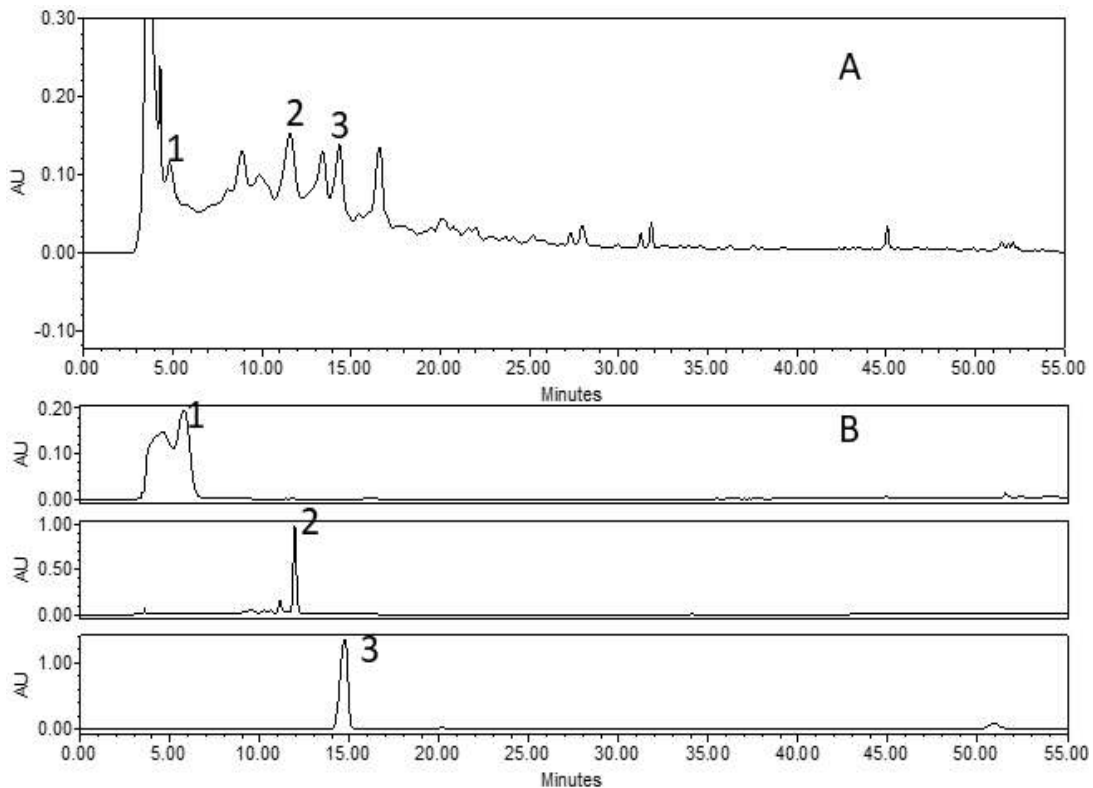
- 방법: LC-Q-TOF-MS/MS 기기를 이용하여 백편두에서 Trigonelline의 존재 여부를 확인한 후, HPLC 분석법을 통하여 백편두의 Trigonelline을 Trigonelline 표준물질과 비교 분석하여 각각 조건이 다르게 추출된 백편두 Sample에 Trigonelline의 함량을 정량함.
- 결과: 고구마를 분획하여 얻은 두 개의 물질 중, 한 개의 물질을 C-NMR, H-NMR로 분석한 결과, 구조적으로 β -Sitosterol glucoside인 것으로 판명 됨.

(5) 최적 조합 시료의 분석법 개발

(가) 분석법 validation과 기준 및 시험법 확립

① HPLC-DAD를 이용한 fingerprint analysis

- 방법: HPLC-DAD 분석조건을 최적화하고 주요 peak들의 retention time 및 peak area에 대해 validation을 수행함. 품질동등성 평가 대상 시료들의 chromatogram을 확보한 후 retention time shift를 보정하기 위해 correlation optimized warping (COW)를 수행하고 baseline correction을 수행함. 보정된 chromatogram을 이용하여 주성분분석 (Principal Component Analysis, PCA)에서 outlier 존재 여부를 확인하고 평균 chromatogram을 확보한 후 이에 대한 각 시료의 상관계수 (correlation coefficient)를 구함.



: A-Sweet potato extract chromatogram; B-Standard compound chromatogram

1) Scopolin, 2) PW9-3, 3) Scopoletin.

그림2.2.33. 고구마의 당을 제거한 메탄올 추출물 HPLC 분석

- 결과: 당을 제거한 고구마 메탄올 추출물을 HPLC 기기를 이용하여 분석한 결과, scopolin 과 scopoletin 및 unknown compound를 확인하였음.

② LC-MS/MS를 이용한 fingerprint analysis

- 방법: UPLC-MS/MS 분석조건을 최적화하여 주요 peak 들의 retention time 및 peak area에 대해 validation을 수행함. TIC에 대해 Molecular Feature Extraction을 수행하여 전체 물질에 대한 retention time, m/z, abundance 정보를 저장하고 retention time과 m/z에 peak alignment를 수행함.

표2.2.10. 고구마 LC Conditions

| | |
|------------------------------|---|
| mobile phase | B- 0.1% formic acid in ACN C- 0.1% formic acid in Water |
| Column (mm) | Thermo C18 Hypersil GOLD 50 X 2.1 |
| detector | Q-Orbitrap-MS |
| Gradient | 0 min : B-0, C-100 20 min : B-100, C-0 20.5 min : B-0, C-100 23 min : B-100, C-0 |
| Flow (mL/min) | 0.3 |
| Injection volume (μL) | 10 |

표2.2.11. 고구마의 당을 제거한 메탄올 추출물 LC-MS/MS 분석

| Peak No | Retention time | Peak mass (M-H ⁺) | Molecular weight | Molecular formula | Compound Name |
|---------|----------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1 | 0.52 | 190.92 | | | Unknown |
| 2 | 0.70 | 191.055 | 192.04 | C10H8O4 | Scopoletin |
| 3 | 3.82 | 353.08 | 354.09 | 3-O-Caffeoylquinic acid | 3-O-Caffeoyl quinic acid |
| 4 | 4.27 | 353.8 | 354.31 | C16H18O9 | Scopolin |
| 5 | 6.24 | 515.119 | 516.12 | C25H24O12 | 3,5-Dicaffeoyl quinic acid |
| 6 | 8.64 | 329.23 | 330.14 | C19H22O5 | Gibberilin A5 |
| 7 | 9.56 | 411.23 | 412.69 | C ₂₉ H ₄₈ O | Stigmasterol |
| 8 | 10.98 | 515.11 | 516.18 | C29H28N2O7 | Ipobscurine C |
| 9 | 11.50 | 347.19 | 348.19 | C20H28O5 | Gibberlin A53 |
| 10 | 12.94 | 699.38 | 700.43 | C44H60O7 | Ipomoeassin D |
| 11 | 15.64 | 415.22 | 416.32 | C27H44O3 | Octadecyle coumarate |
| 12 | 17.95 | 265.14 | 266.15 | C15H22O4 | Hydroxymyoporene |
| 13 | 12.37 | 161.01 | | | Unknown |

- 결과: 고구마 샘플을 Q-Orbitrap-UPLC-MS/MS 분석기기를 이용하여 분석한 결과, 고구마 샘플에서 총 13개의 main peak 중 11개의 물질을 identify 하였음.

(6) 최적소재의 지표성분 성분연구

(가) 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보

① Ether fraction (Jalapins) - 주요지표물질로 확보

- 방법: 고구마추출물의 지표성분/유효성분 동정을 위하여 해남향토농장에서 고구마 5 kg을 구입하여 건조 (1.3 kg)한 후 100% 메탄올에 24h 3반복 침출하여 여과, 농축 및 동결건조하여 최종적으로 122 g을 수득하였다. 고구마 추출물 122 g로부터 활성지향적 기법으로 생리활성 물질을 추적함.

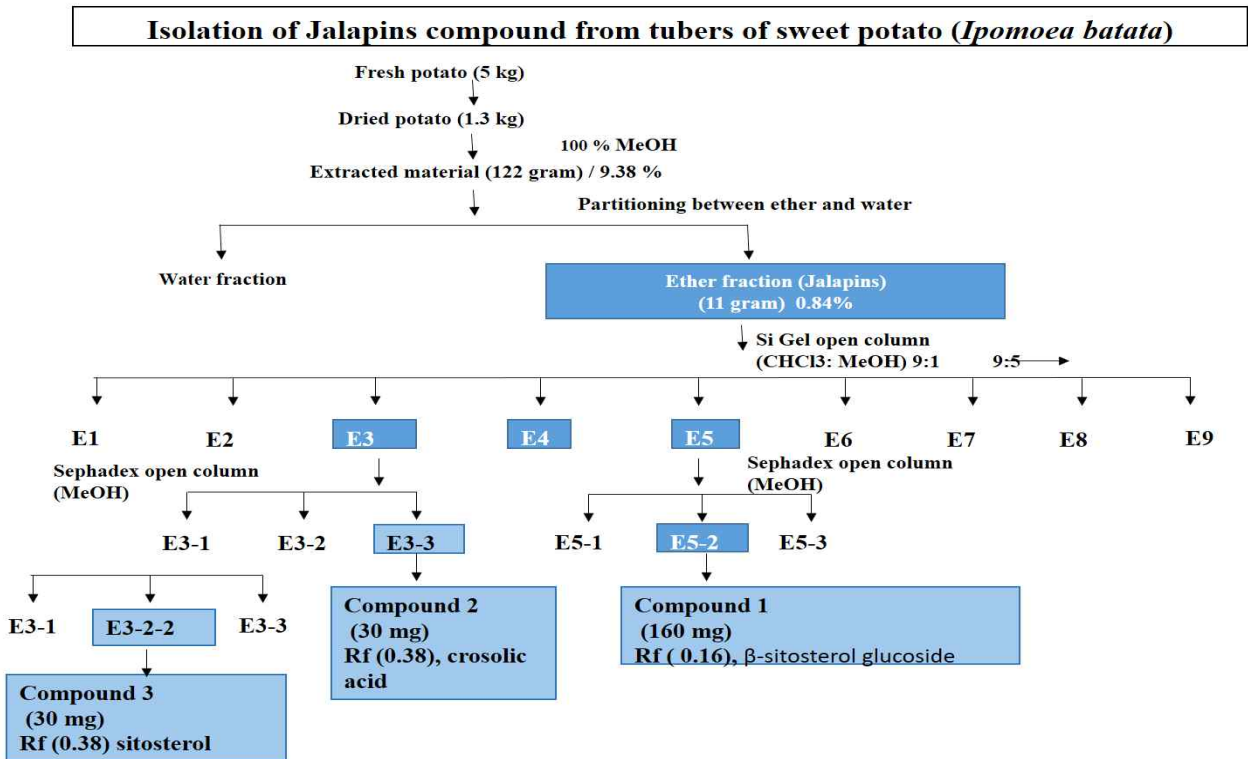


그림2.2.34. 고구마 메탄올 추출물유래 에틸아세테이트 분획물에서 화합물 분리

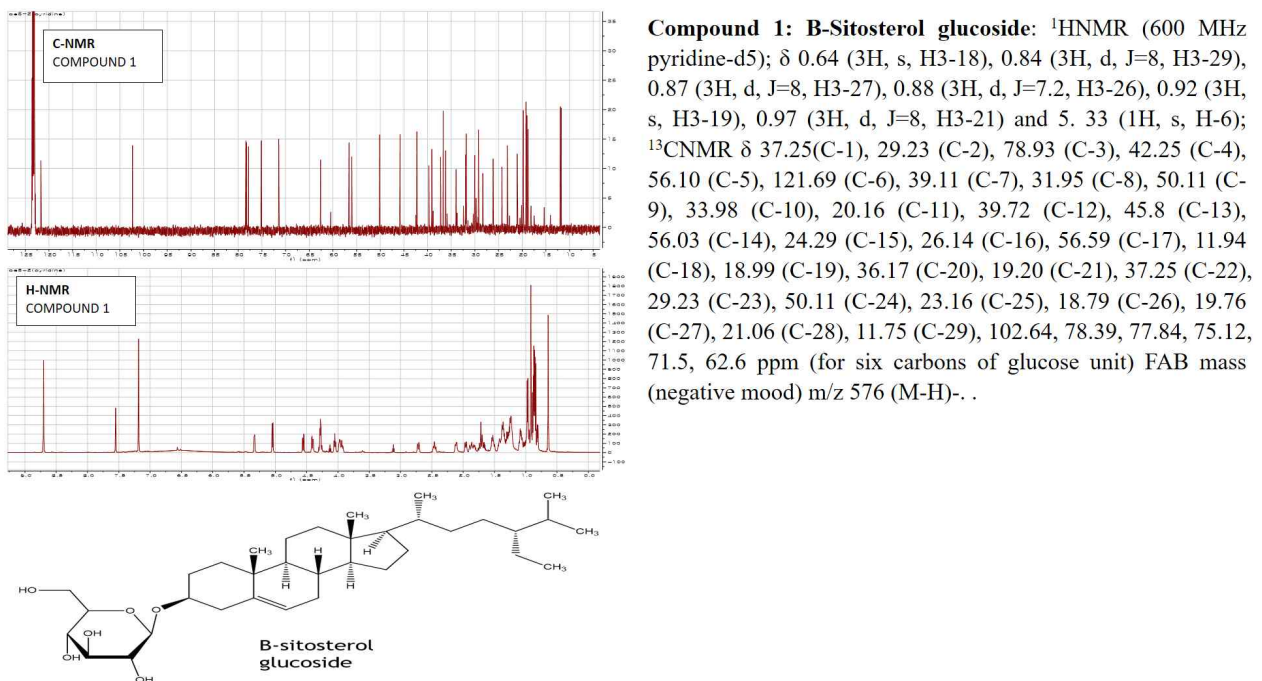
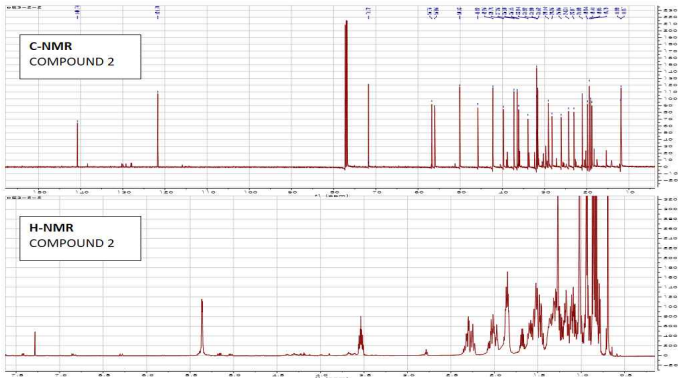


그림2.2.35. 고구마 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 Compound 1 (β-Sitosterol glucoside)의 NMR data



Crosolic Acid: ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃); 0.97(3H,d,J=6.5Hz), 1.01(3H, d, J=6.5Hz), 0.94, 1.03, 1.06, 1.20,1.25 (3H×5, s,), 2.61(1H, d, J=11.0Hz, H-18), 3.38(1H, d, J=9.5Hz, H-3β), 4.08 (1H, td, J=11.0, 4.5Hz, H-β) ,5.46 (1H, t-like, J=3.5Hz, H-12); ¹³C-NMRδ: 50.1 (C-1), 71.72 (C-2), 83.9 (C-3), 39.78 (C-4), 56.06 (C-5), 18.79 (C-6), 33.94(C-7), 42.26(C-8), 45.82(C-9), 37.26 (C-10), 24.31(C-11), 121.70(C-12), 140.74(C-13), 42.26(C-14), 29.14(C-15), 26.06 (C-16), 50.13(C-17), 56.06 (C18), 71.72(C-19), 42.26 (C-20), 26.06(C-21), 39.78 (C-22), 31.62 (C-23), 21.09 (C-24), 11.87 (C-25), 18.79(C-26), 24.31 (C-27), 180.7(C-28), 26.06(C-29), 19.05 (C-30).

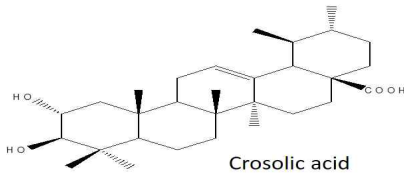
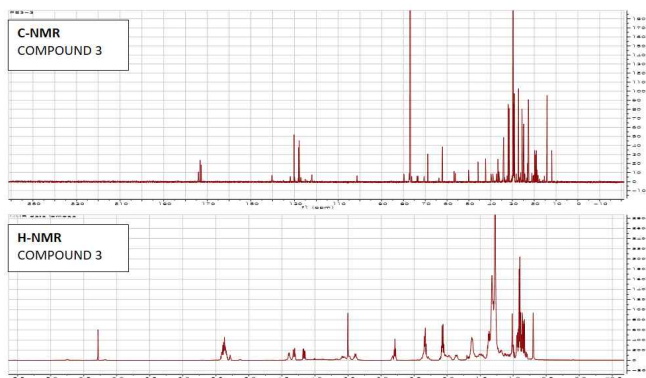


그림2.2.36. 고구마 에틸아세테이트 층에서 분리한 Compound 2 (Crosolic acid)의 NMR data



B-Sitosterol: ¹H-NMR (600 MHz CDCl₃); δ 0.69 (3H, s, H3-18), 0.81 (3H, d, J=8, H3-29), 0.83 (3H, d, J=8, H3-27), 0.86 (3H, d, J=7.2, H3-26), 0.93 (3H, s, H3-19), 1.02 (3H, d, J=8, H3-21), 3.53 (tdd, 1H, J= 4.5, 4.2, 3.8, H-3) and 5. 35 (1H, s, H-6); ¹³CNMR δ 37.26 (C-1), 31.62 (C-2), 71.72 (C-3), 42.26 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 31.26 (C-7), 31.92 (C-8), 50.13 (C-9), 36.50 (C-10), 21.09 (C-11), 39.78 (C-12), 42.26 (C-13), 56.76 (C-14), 26.06 (C-15), 28.26 (C-16), 56.06 (C-17), 36.15 (C-18), 19.22 (C-19), 33.94 (C-20), 24.31 (C-21), 45.82 (C-22), 23.07 (C-23), 11.19 (C-24), 29.14 (C-25), 19.84 (C-26), 19.6 (C-27), 18.79 (C-28), 11.87 (C-29).

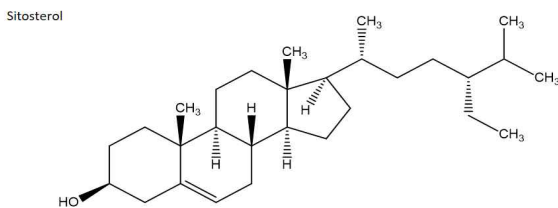


그림2.2.37. 고구마 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 Compound 3 (Sitosterol)의 NMR data

- 결과: 최종적으로 ethylacetate 분획물에서 분리한 물질은 β-Sitosterol glucoside (160mg), Crosolic acid (30 mg), Sitosterol (30mg)로 판명됨.
- ② Water fraction - 유효물질 확보 (High activity)
- 방법: 고구마추출물의 지표성분/유효성분 동정을 위하여 해남향토농장에서 고구마 5 kg을 구입하여 건조 (1.3 kg)한 후 100% 메탄올에 24h 3반복 침출하여 여과, 농축 및 동결건조하여 최종적으로 122 g을 수득하였다. 고구마 추출물 122 g을 대상으로 EtoAc 및 물분획물을 확보함. 이 후, 물층 분획물을 대상으로 Sephadex open column을 이용하여 8가지 소분획물을 제조함. 이 중 효능이 가장 뛰어난 PW2, PW3 및 PW4 소분획물을 혼합하여 dianion 컬럼층진제를 이용하여 다시 2개의 분획물로 제조함. 당이 제거된 PW-9 분획물을 ODS

open column으로 14가지 소분획물을 얻음. 이 14개의 소분획물에 대한 효능 평가에서 가장 우수한 효능을 보이는 분획물을 선정하여 최종 생리활성 물질인 Scopolin과 Quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate를 분리함.

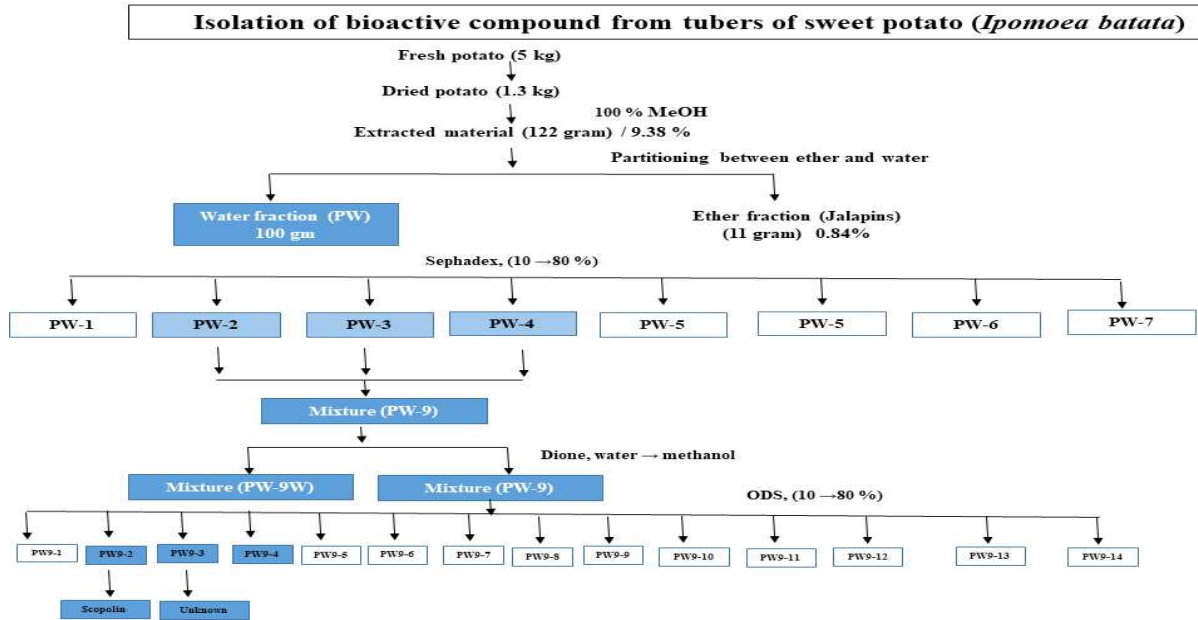


그림2.2.38. 고구마 메탄올 추출물의 유래 물 분획물에서 효능물질 분리

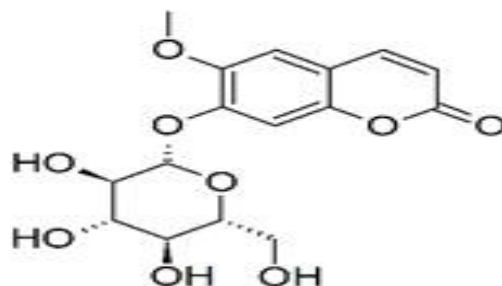
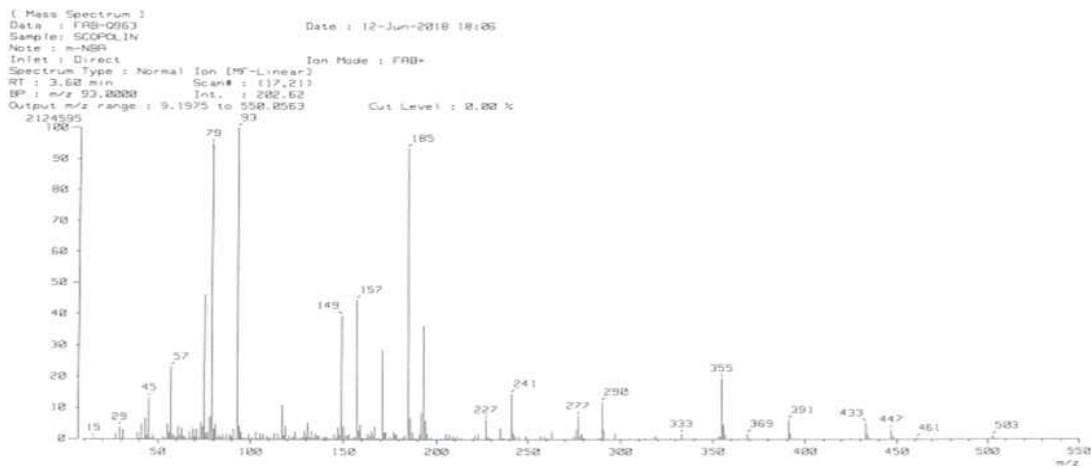


그림2.2.39. 고구마 물 분획물에서 분리한 Compound 1 (Scopolin)의 NMR data

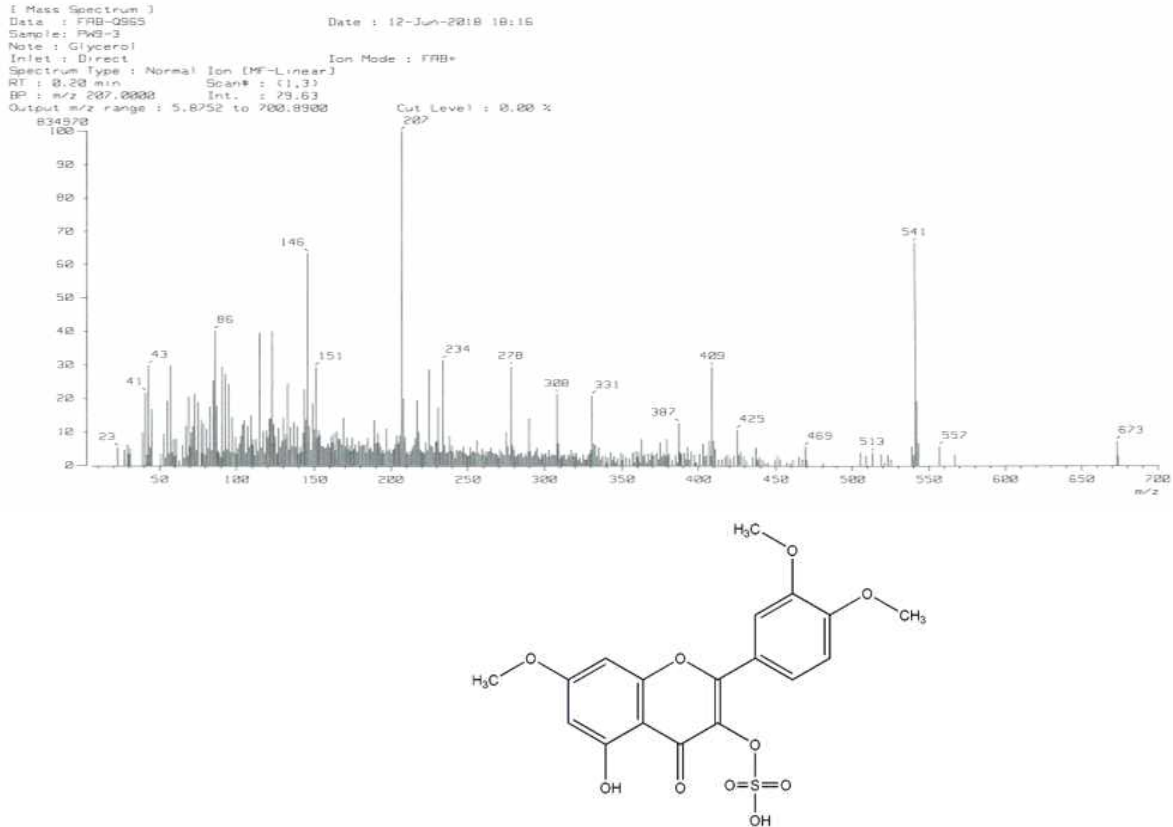


그림2.2.40. 고구마 물 분획물에서 분리한 Compound 2 (Quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate)의 NMR data

- 결과: 최종적으로 Water 분획물에서 분리한 물질은 Scopolin과 Quercetin 7,3',4'-trimethyl ether 3-sulfate로 판명됨.

4. 안정성 평가

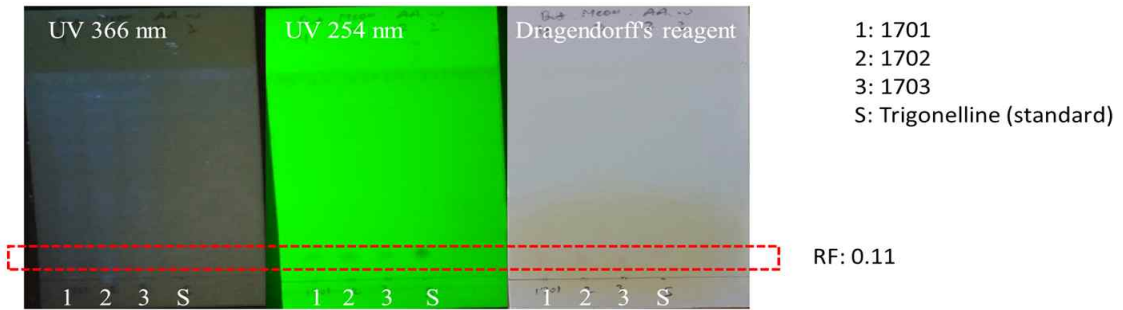
가. 장기보존시험

- 방법: 보존조건 $25 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $60 \pm 5\%$ 에서 18개월 동안 주기적으로 측정하여 시간이 지남에 따른 Sample (1701, 1702, 1703)의 지표성분 함량 변화를 HPLC 성분 함량 측정 분석법을 이용하여 측정, 수분함량 변화를 수분측정기를 이용하여 측정, 성상 변화 추적 관찰.

Sample: 백편두 3개로트 (1701, 1702, 1703)

1. 장기보존시험 4/18 start

| | |
|------|---|
| 검체수 | 3개 로트 |
| 실험항목 | ① 지표물질: trigonelline ② 성상 (색: 노란색 분말, 향: 무취) ③ 수분함량 |
| 보존조건 | $25 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $60 \pm 5\%$ |
| 시험기간 | 18개월 |
| 측정시기 | 0~1개월은 0주, 1주, 2주, 4주 측정, 2~6개월은 1개월마다 측정; 7~18개월은 3개월마다 측정 |
| 시험값 | 각 시험항목별로 로트당 3회 이상 실시하여 그 평균치를 사용함. |



- 10 mg of extract were dissolved in 1 mL of methanol.
- The mobile phase consist of Buatnol: methanol: acetic acid: water (8: 3: 2: 2). The mobile phase was saturated for 20 min
- UV visibility: visible in 254 nm with dark spot
- Spray reagent: Dragendorff's reagent
- S: Trigonelline 1 mg/MI
- All three samples contain trigonelline. Trigonelline appeared orange color with dragendorff's reagent having Rf value 0.11.

그림2.2.41. TLC 기법을 이용한 Sample의 Trigonelline 성분 확인

장기보존시험

17.04.18 (0주 측정)

1. 지표물질

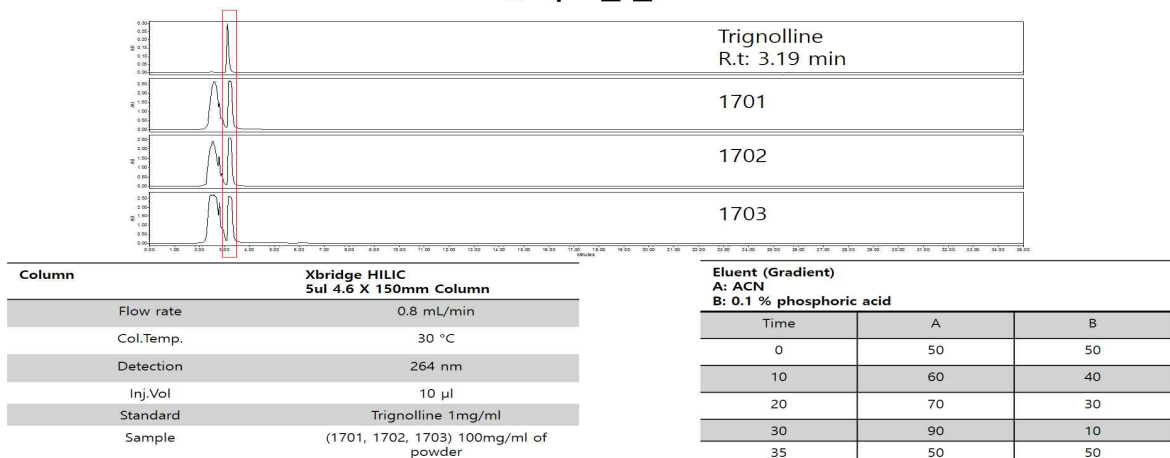


그림2.2.42. HPLC 분석기기를 이용한 Sample의 Trigonelline 성분 함량 측정

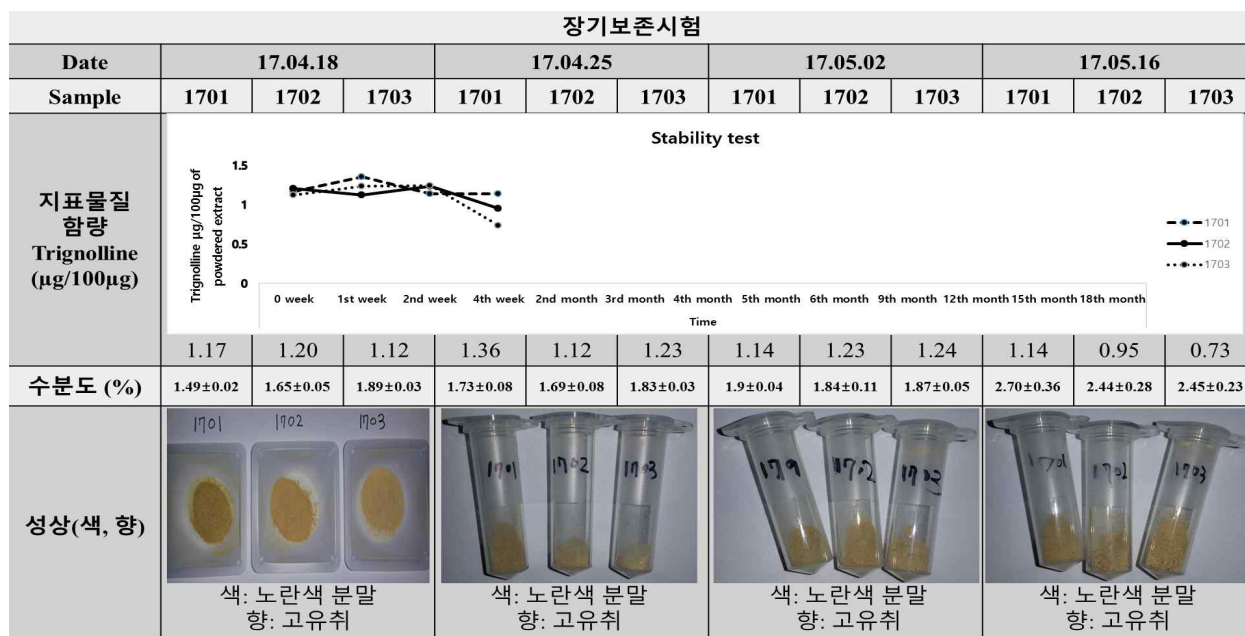


그림2.2.43. 장기보존시험 요약 표

- 결과: 보존조건 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ / 상대습도 $60\pm 5\%$ 에서 18개월 동안 주기적으로 지표물질 함량, 수분도, 성상(색, 향)을 측정해본 결과, 수분도는 조금씩 증가하였으며, 지표물질 함량은 6월15일 측정 시, 약간 감소하였음.

(1) 시료 장기보관에 따른 안정성 시험

(가) 장기보존시험

- 방법: 보존조건 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ / 상대습도 $60\pm 5\%$ 에서 18개월 동안 주기적으로 측정하여 시간이 지남에 따른 Sample (1701, 1702, 1703)의 지표성분 함량 변화를 HPLC 성분 함량 측정 분석법을 이용하여 측정, 나아가 수분함량 변화를 수분측정기를 이용하여 측정하고 성상 변화 추적 관찰.

| Time | 1701 | 1702 | 1703 |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 week | 1.173 \pm 0.07 | 1.208 \pm 0.05 | 1.129 \pm 0.02 |
| 1 st week | 1.361 \pm 0.01 | 1.126 \pm 0.00 | 1.237 \pm 0.01 |
| 2 nd week | 1.145 \pm 0.01 | 1.238 \pm 0.01 | 1.246 \pm 0.01 |
| 4 th week | 1.142 \pm 0.05 | 1.150 \pm 0.00 | 1.179 \pm 0.00 |
| 3 rd month | 1.160 \pm 0.07 | 1.257 \pm 0.05 | 1.211 \pm 0.02 |
| 4 th month | 1.207 \pm 0.01 | 1.200 \pm 0.00 | 1.202 \pm 0.01 |
| 5 th month | 1.263 \pm 0.01 | 1.195 \pm 0.01 | 1.173 \pm 0.01 |
| 6 th month | 1.262 \pm 0.05 | 1.165 \pm 0.01 | 1.165 \pm 0.01 |
| 9 th month | 1.265 \pm 0.03 | 1.182 \pm 0.01 | 1.219 \pm 0.02 |
| 12 th month | 1.288 \pm 0.01 | 1.12 \pm 0.01 | 1.19 \pm 0.02 |

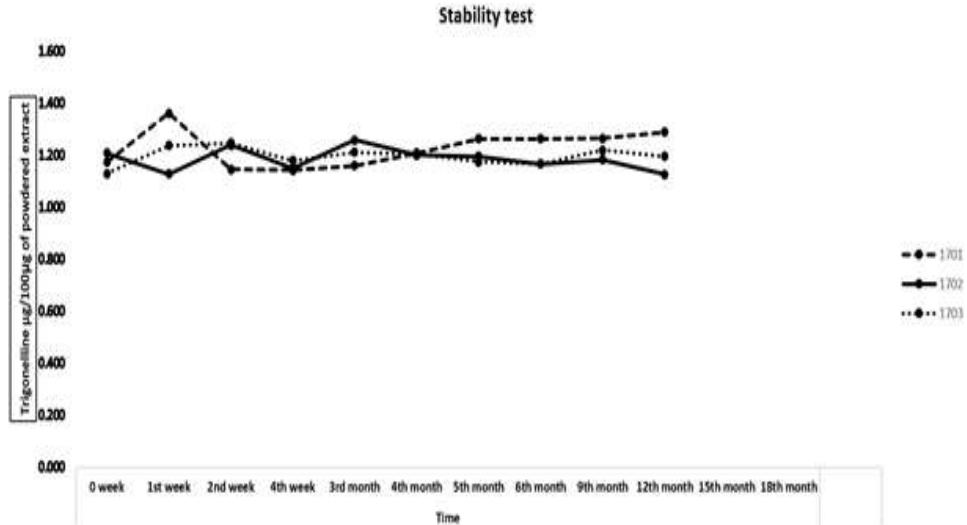


그림2.2.44. 장기보관에 따른 Sample에서 지표성분 (Trigonelline) 함량 변화 (ug/100 ug)

표2.2.12. 장기보관에 따른 Sample에서 수분 함량 변화 (%)

| Time | 1701 | 1702 | 1703 |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0 week | 1.49±0.02 | 1.65±0.05 | 1.89±0.03 |
| 1 st week | 1.73±0.08 | 1.69±0.08 | 1.83±0.03 |
| 2 nd week | 1.9±0.04 | 1.84±0.11 | 1.87±0.05 |
| 4 th week | 2.70±0.36 | 2.44±0.28 | 2.45±0.23 |
| 3 rd month | 2.88±0.06 | 2.59±0.04 | 2.66±0.16 |
| 4 th month | 2.9±0.07 | 2.73±0.05 | 2.52±0.08 |
| 5 th month | 3.02±0.1 | 2.79±0.17 | 3.16±0.55 |
| 6 th month | 3.93±0.29 | 4.68±1.12 | 4.83±0.57 |
| 9 th month | 4.25±0.94 | 6.57±0.02 | 5.97±0.32 |
| 12 th month | 3.66±0.01 | 5.6±1.40 | 4.08±0.98 |



0 week



12th month

그림2.2.45. 장기보관 Sample의 0 week 와 12th month 색상 비교

- 결과: 1703, 1702, 1703 sample을 보존조건 $25 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $60 \pm 5\%$ 조건에서 약 12달 동안 지표성분, 수분함량 및 성상을 측정 및 관찰한 결과, 지표성분과 성상의 변화는 없었으며, 수분함량은 2~3배가량 증가하였음.

(나) 가속조건시험

① HD101

- 방법: 보존조건 $40 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5\%$ 에서 6개월 동안 주기적으로 측정하여 시간이 지남에 따른 Sample (1701, 1702, 1703)의 지표성분 함량 변화를 HPLC 성분 함량 측정 분석법을 이용하여 측정, 수분함량 변화를 수분측정기를 이용하여 측정, 성상 변화 추적 관찰.

| Time | 1701 | 1702 | 1703 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0 week | 1.21 ± 0.00 | 1.27 ± 0.01 | 1.26 ± 0.01 |
| 1 st week | 1.21 ± 0.00 | 1.29 ± 0.00 | 1.26 ± 0.01 |
| 2 nd week | 1.23 ± 0.00 | 1.27 ± 0.01 | 1.28 ± 0.01 |
| 4 th week | 1.26 ± 0.02 | 1.32 ± 0.03 | 1.23 ± 0.00 |
| 2 nd month | 1.27 ± 0.02 | 1.33 ± 0.01 | 1.25 ± 0.02 |

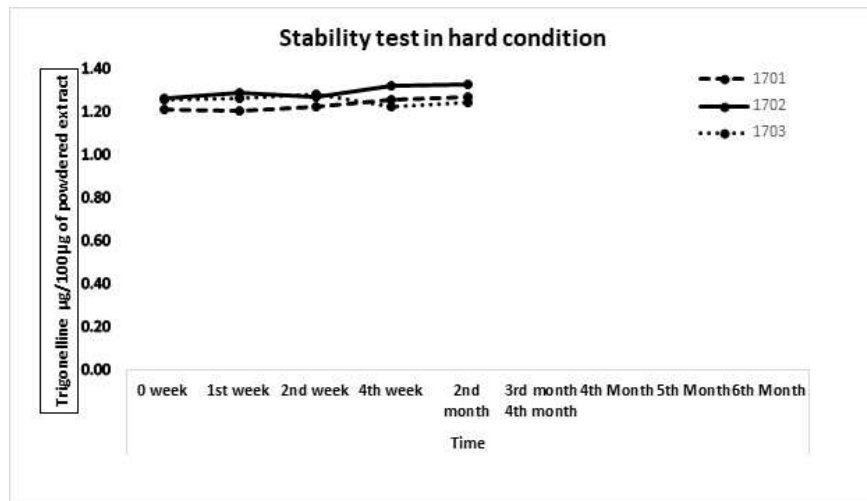


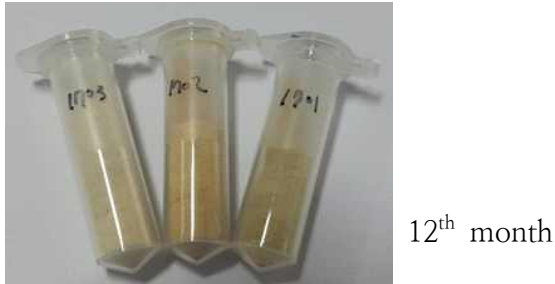
그림2.2.46. 가속조건에 따른 HD101Sample에서 지표성분 (Trigonelline) 함량 변화 (ug/100 ug)

표2.2.13. 가속조건에 따른 HD101 Sample에서 수분 함량 변화 (%)

| Time | 1701 | 1702 | 1703 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0 week | 0.81 ± 0.05 | 0.91 ± 0.01 | 1.04 ± 0.01 |
| 1 st week | 1.07 ± 0.19 | 1.31 ± 0.18 | 1.30 ± 0.13 |
| 2 nd week | 2.32 ± 0.01 | 2.01 ± 0.03 | 2.69 ± 0.15 |
| 4 th week | 2.56 ± 0.41 | 2.78 ± 0.36 | 2.91 ± 0.34 |
| 2 nd month | 2.59 ± 0.25 | 2.65 ± 0.76 | 2.72 ± 0.42 |



0 week



12th month

그림2.2.47. 가혹조건 Sample(HD101)의 week 와 12th month 정상 비교

○ 결과: 1703, 1702, 1703 sample을 $40 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5\%$ 조건에서 약 2달 동안 지표성분, 수분함량 및 성상을 측정 및 관찰한 결과, 지표물질, 수분함량 및 성상의 변화는 없었음.

② HD201

○ 방법: 보존조건 $40 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5\%$ 에서 6개월 동안 주기적으로 측정하여 시간이 지남에 따른 Sample (1701, 1702, 1703)의 지표성분 함량 변화를 HPLC 성분 함량 측정 분석법을 이용하여 측정, 수분함량 변화를 수분측정기를 이용하여 측정, 성상 변화 추적 관찰.

| Time | HD201 |
|-----------------------|------------------|
| 0 week | 21.45 ± 0.09 |
| 1 st week | 21.87 ± 0.14 |
| 2 nd week | 27.22 ± 0.24 |
| 4 th week | 25.41 ± 0.09 |
| 8 th week | 26.83 ± 0.11 |
| 12 th week | 27.34 ± 0.42 |

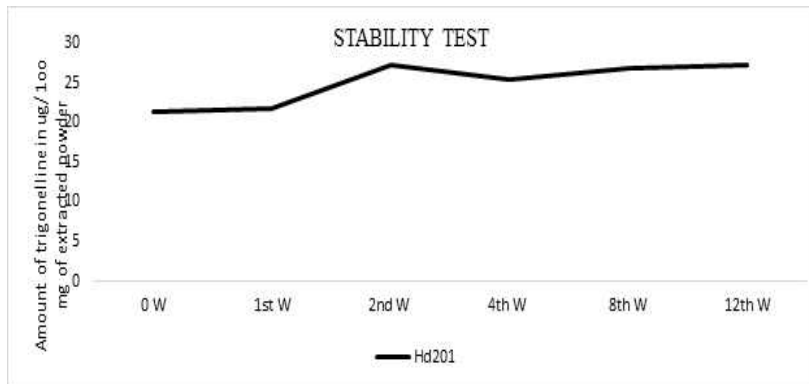


그림2.2.48. 가혹조건에 따른 HD101Sample에서 지표성분 (Trigonelline) 함량 변화 (ug/100 ug)

표2.2.14. 가혹조건에 따른 HD201 Sample에서 수분 함량 변화 (%)

| Time | HD201 |
|-----------------------|-------------|
| 0 week | 2.36 ± 0.29 |
| 1 st week | 2.53 ± 0.25 |
| 2 nd week | 2.45 ± 0.14 |
| 4 th week | 2.67 ± 0.27 |
| 8 th week | 2.58 ± 0.40 |
| 12 th week | 2.60 ± 0.14 |

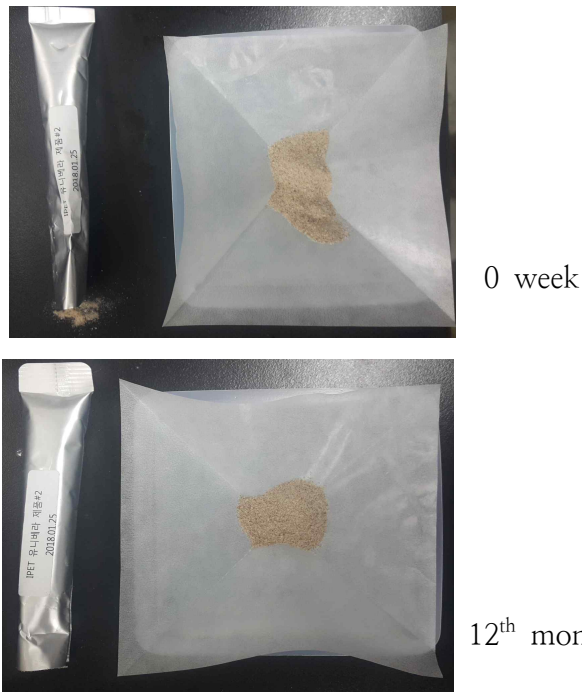


그림2.2.49. 가혹조건 Sample(HD201)의 week 와 12th month 성상 비교

- 결과: HD201 sample을 $40 \pm 2^\circ \text{C}$ / 상대습도 $75 \pm 5\%$ 조건에서 약 12주간 지표성분, 수분함량 및 성상을 측정 및 관찰한 결과, 지표물질, 수분함량 및 성상의 변화는 없었음.

3절 [제2협동연구] 염증성 장질환 동물모델을 이용한 효능 평가 연구

Development of whole food type-functional food using IBD mouse model

1. IBD 질환 모델 확립 및 후보소재 (일반추출, 홀푸드) 효능 연구 가. 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석

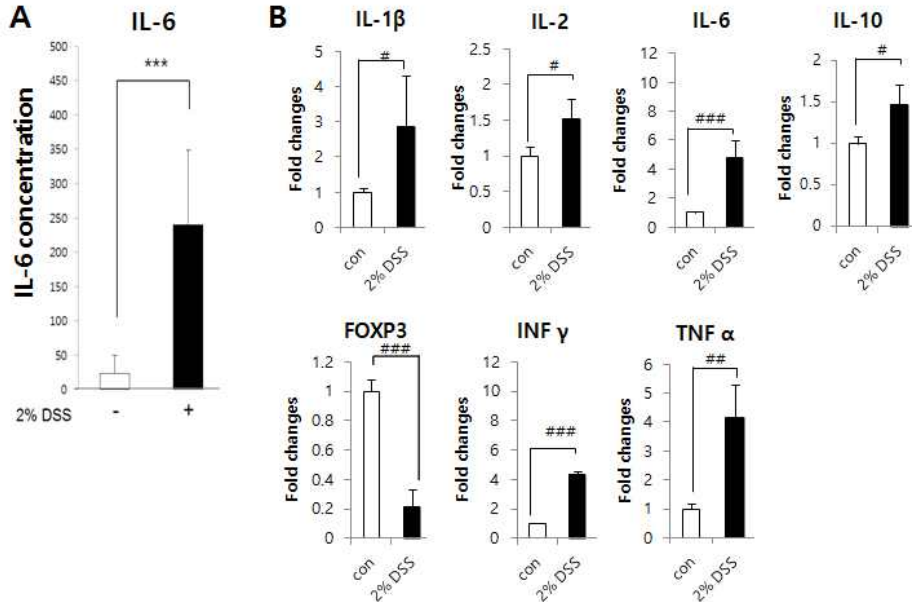


그림2.3.1. 대장염 조직에서 염증관련 단백질 및 RNA 발현 확인

- 마우스에서 DSS에 의한 대장염을 유도하여 혈액 채취 및 혈청 분리 후 ELISA를 이용하여 염증관련 단백질의 발현을 확인하였으며 대장 조직에서 염증관련 RNA 발현을 qRT-PCR을 시행하여 확인하였음. 정상 그룹에 비해 대장염 그룹의 혈청에서 염증관련 단백질인 IL-6가 현저히 증가한 것을 확인하였음 (그림1A). 또한 FOXP3을 제외한 염증관련 유전자들인 IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, INFγ, TNFα의 mRNA 레벨이 정상 그룹에 비해 대장염 그룹에서 모두 증가한 것을 확인하였음 (그림1B).

나. 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석

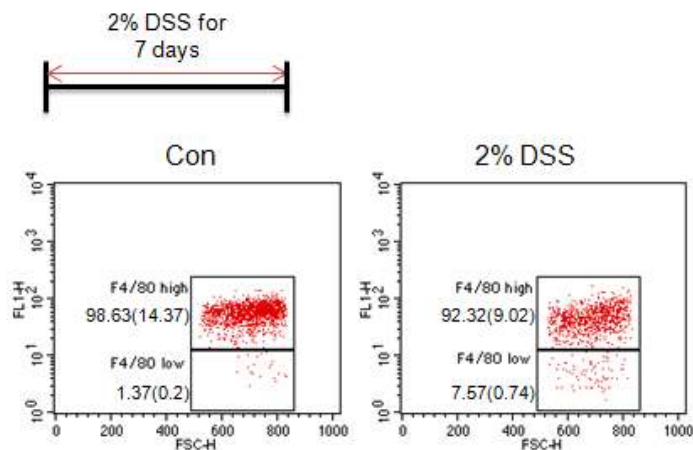


그림2.3.2. 대장염 조직에서 유세포분석을 통한 F4/80+ 대식세포 분포 확인

- Mouse에서 DSS를 이용한 대장염 유도 후 대장조직을 채취하여 효소처리 후 F4/80 항체를 이용해 유세포분석을 시행하였다. F4/80+ 대식세포는 F4/80^{high} 와 F4/80^{low} 로 나뉘며

대조군에 비해 DSS에 의한 대장염에서 F4/80^{high} 대식세포는 감소하고 염증반응 유도에서 중요한 역할을 하는 F4/80^{low} 대식세포가 증가하는 것을 확인하였음 (그림2).

다. 선발된 천연소재의 용량별 예방효과를 병리조직학적으로 확인

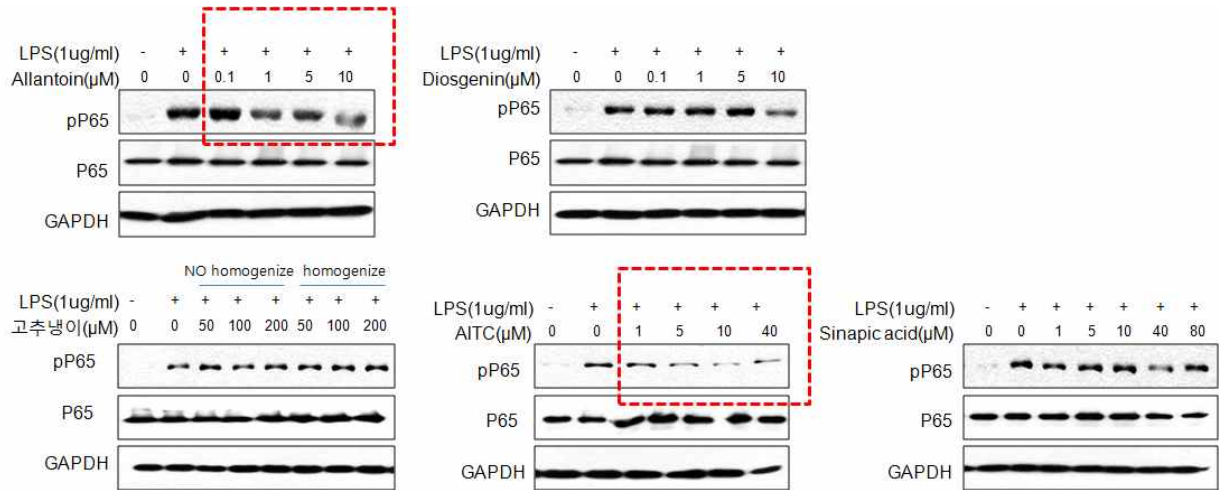


그림2.3.3. Raw264.7 세포주에서 western blot을 통한 산약 및 고추냉이 추출물의 항염 효과 확인

- LPS에 의해 활성화된 Raw264.7 세포에 산약의 단일성분인 Allantoin 및 Diosgenin과 고추냉이 추출물 및 단일 성분인 AITC 와 Sinapic acid 처리 후 단백질 정제 및 western blot을 시행하여 각 성분의 항염 효과를 확인하였음. Raw264.7 세포에 LPS 처리 시 NF-κB (p65)의 인산화가 증가하였으며 Allantoin 또는 AITC와 함께 처리 시 농도에 따라 NF-κB의 인산화가 억제되는 것을 확인하였음 (그림3). 반면, Diosgenin, 고추냉이 추출물, Sinapic acid는 NF-κB의 인산화 억제 효과가 미미하였음 (그림3). 따라서 Allantoin 와 AITC는 NF-κB의 활성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과를 보였음 (그림3).

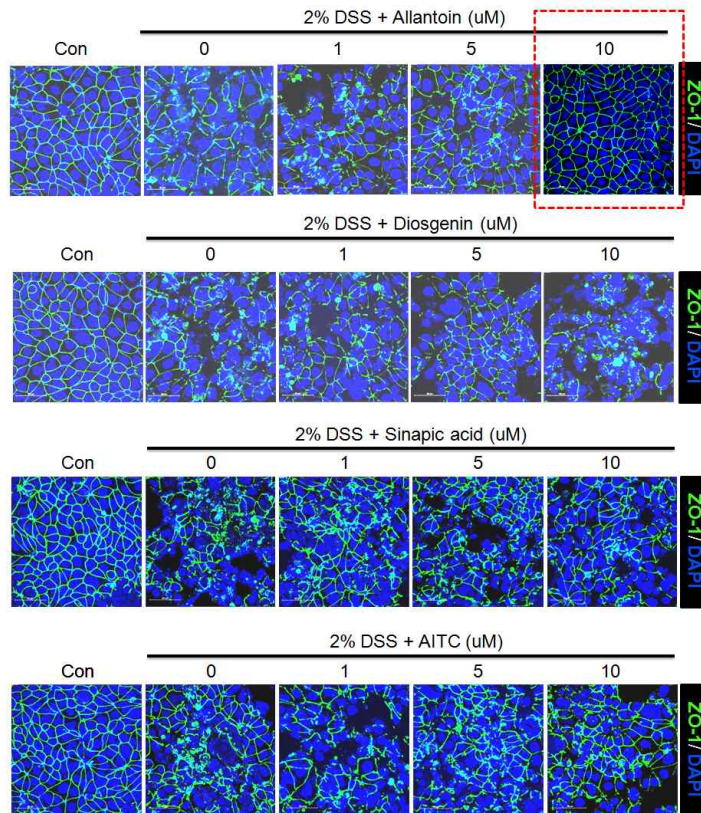


그림2.3.4. 산약 및 고추냉이 추출물의 치밀결합 회복 효과 확인

- Caco-2 세포에 DSS 또는 DSS 와 산약 및 고추냉이 단일 성분을 함께 처리 후 ZO-1 면역형광염색을 시행하여 산약 및 고추냉이 단일 성분의 치밀결합 붕괴 억제 효과를 확인하였음. DSS 처리 시 ZO-1의 발현이 감소하고 구조가 붕괴되나 Allantoin과 함께 처리 시 ZO-1의 발현 감소와 구조의 붕괴가 억제되는 것을 확인하였음 (그림4). 반면, Diosgenin, Sinapic acid, AITC는 DSS만 처리한 샘플과 비교해 유의한 차이를 보이지 않았음 (그림 4). 따라서 Allantoin을 처리한 세포에서 치밀결합의 붕괴를 억제하는 효과를 보였음 (그림 4).

라. 마우스 모델을 이용한 8종 후보소재의 기능성 평가

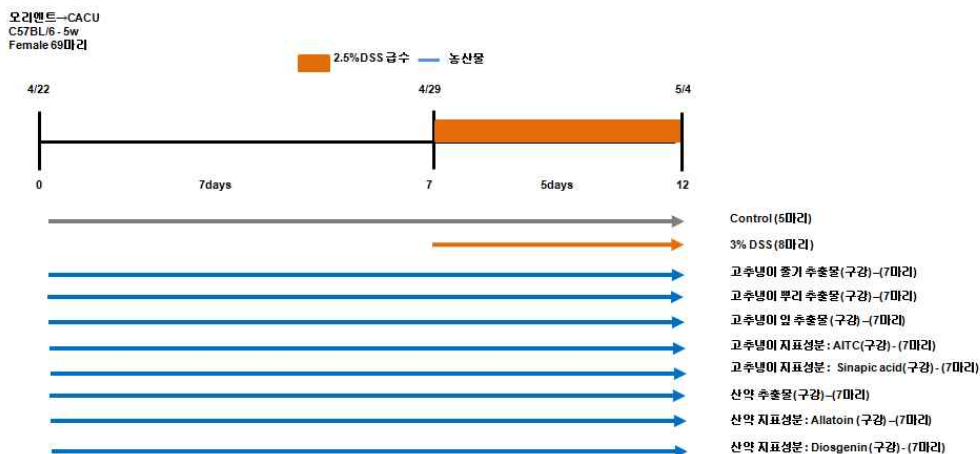
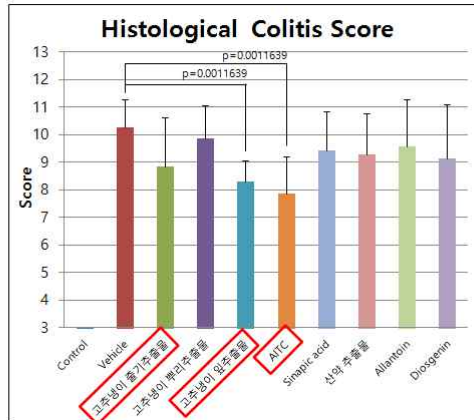


그림2.3.5. DSS에 의한 염증 유도 및 농산물 처리 방법

- 마우스에서 DSS에 의한 대장염 유도 후 각 농산물들의 항염효과를 조직학적으로 확인하였음. 각 각 추출물 및 농산물 단일 성분을 12일간 구강 투여하였으며 투여 7일째부터 5일간 DSS를 음수를 통해 처리한 후 부검을 수행하였음 (그림5).

A

| | Histological Colitis Score |
|--------------|----------------------------|
| Control | 0 |
| Vehicle | 10.3 |
| 고추냉이 줄기추출물 | 8.9 |
| 고추냉이 뿌리추출물 | 9.9 |
| 고추냉이 잎추출물 | 8.3 |
| AITC | 7.9 |
| Sinapic acid | 9.4 |
| 산약 추출물 | 9.3 |
| Allantoin | 9.6 |
| Diosgenin | 9.1 |



B

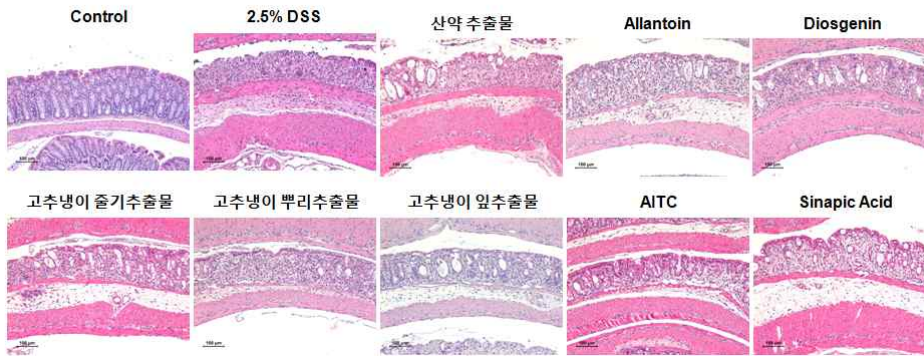


그림2.3.6. DSS 와 농산물 추출물 및 단일 성분 처리에 따른 대장염의 조직학적 분석

- DSS와 vehicle을 함께 처리한 그룹은 극심한 대장염이 유도되었으며 회복이 되지 않은 것을 확인하였음 (그림6). 농산물 추출물 및 단일 성분을 처리한 그룹들 중 AITC 처리 그룹이 가장 유의한 회복효과를 보였으며 고추냉이 잎추출물을 처리한 그룹 또한 통계적으로 유의한 회복효과를 보였음 (그림6). 고추냉이 줄기추출물을 처리한 그룹은 회복효과를 보였으나 통계적으로 유의하지 않았음 (그림6). 고추냉이 뿌리추출물, Sinapic acid, 산약 추출물, allantoin, diosgenin은 대장염에 대한 회복효과를 보이지 않았음 (그림6).

마. 3차년도 출시 예정 농산물 연계 장건강 식음료 제품화를 위한 추가 평가

- (1) ZO-1 염색 및 NF-kB 활성억제 탐색

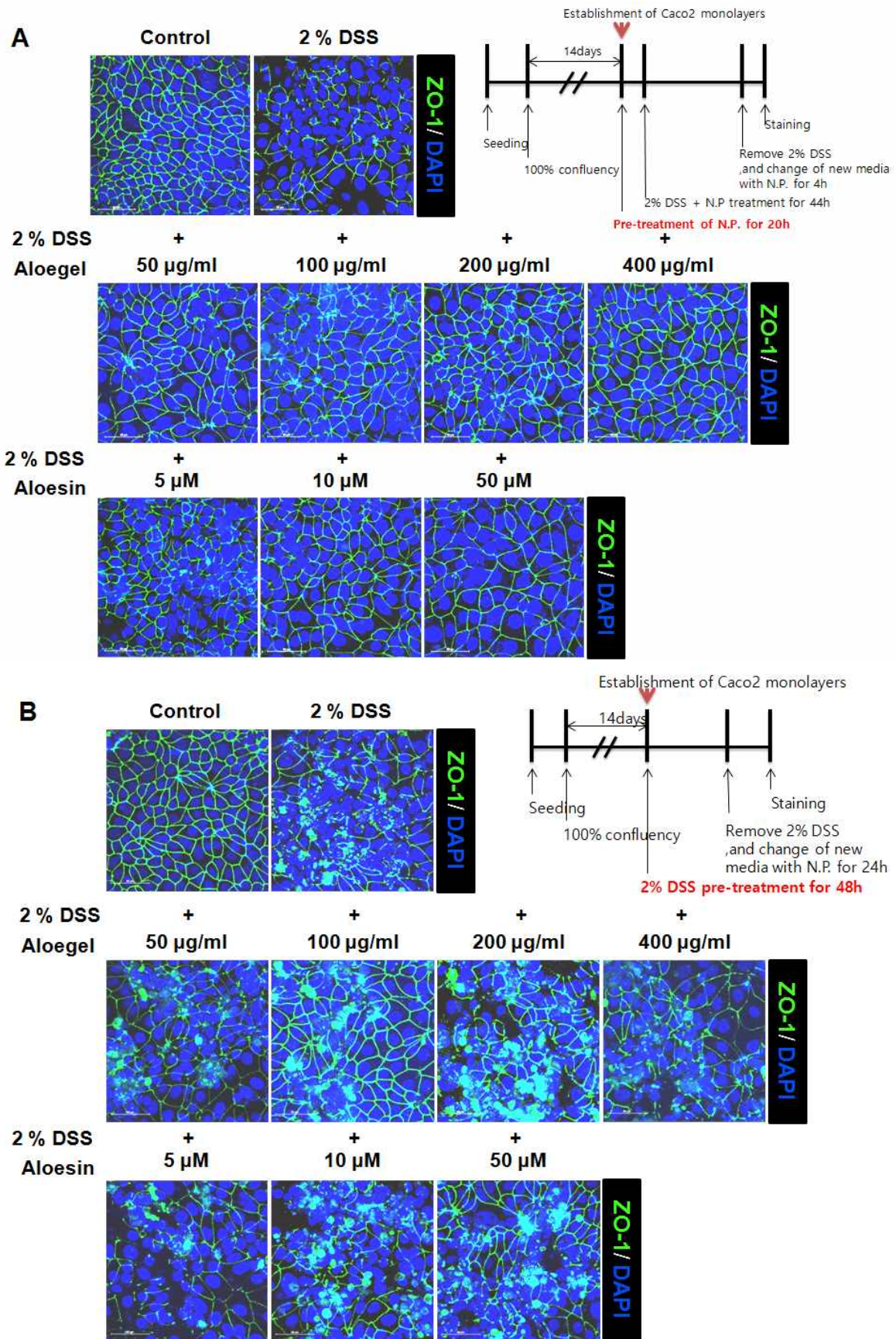


그림2.3.7. ZO-1 면역형광염색을 통한 Aloegel 및 Aloesin의 치밀결합 회복 효과 확인

- 대장염에 의한 장상피세포의 치밀결합 붕괴에서 Aloegel과 Aloesin의 붕괴 억제 효능을

ZO-1 면역형광염색을 통해 확인하였음. Aloegel과 Aloesin을 전 처리한 후 DSS를 이용한 치밀결합 붕괴 유도 시 Aloegel과 Aloesin 처리 농도에 따라 치밀결합의 붕괴가 억제되는 것을 확인하였음 (그림7A). 반면, DSS 전 처리 후 Aloegel과 Aloesin 처리 시 DSS에 의한 치밀결합 붕괴가 회복되나 Aloegel과 Aloesin 전처리 보다 효능이 낮은 것을 확인하였음 (그림7B).

(2) 마우스, 랫트 변비모델 확립

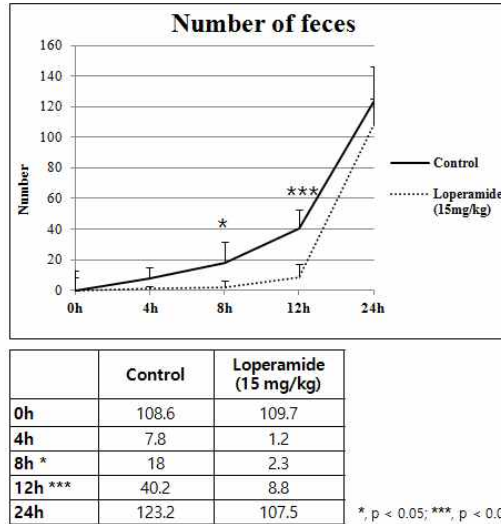


그림2.3.8. 마우스에서 loperamide를 이용한 변비 유도 확인

- C57BL/6 마우스에서 loperamide를 이용한 변비 유도 실험을 수행하였음. 마우스에 loperamide 처리 전 배설한 변의 개수를 확인하였으며 loperamide 처리 후 4시간, 8시간, 12시간, 24시간에서 변의 개수를 확인하였음. Loperamide 처리 후 12 시간동안 변의 개수가 대조군에 비해 감소한 것으로 보아 loperamide에 의해 변비가 유도된 것을 확인하였음. 하지만 유도된 변비가 12시간 까지 지속되나 이 후 24시간에서 변비가 회복되는 것을 확인하였음 (그림8).

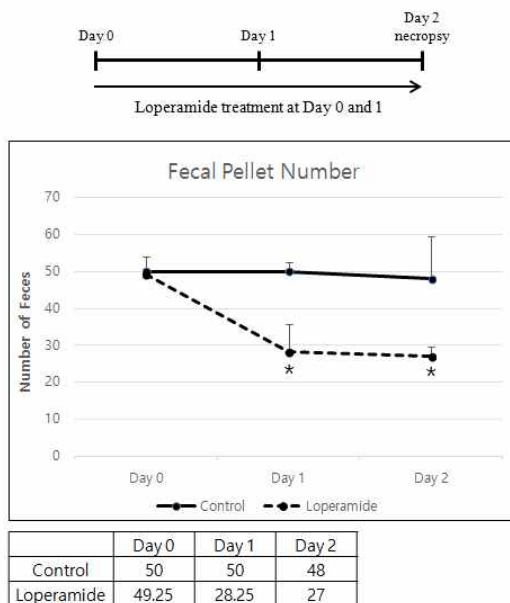


그림2.3.9. Sprague Dawley (SD) 랫트에서 loperamide를 이용한 변비 유도 확인

- SD 랫트에서 loperamide를 이용한 변비 유도 실험을 수행하였음. Loperamide 처리 시

변의 개수가 대조군에 비해 감소하여 변비가 유도된 것을 확인하였고 Day 2 까지 변비가 지속되는 것을 확인하였음 (그림9).

(3) 락추로스 파우더와 알로에 전잎의 변비완화 확인

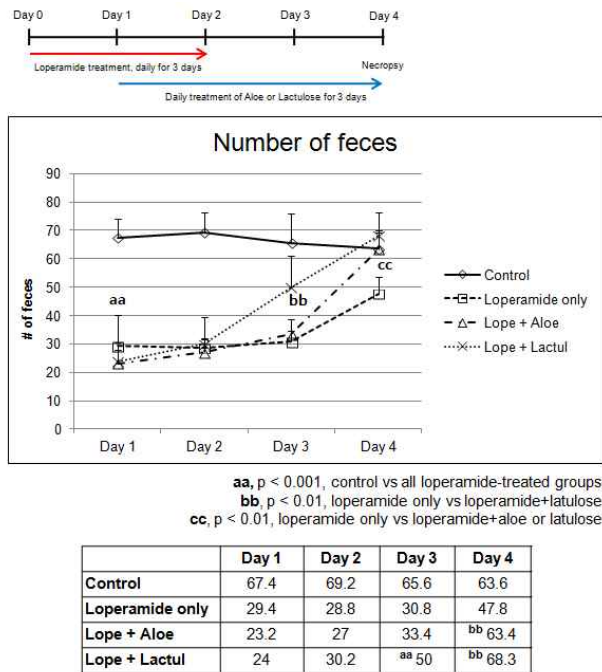


그림2.3.10. SD 랫트에서 알로에 전잎과 lactulose의 변비 완화 효과 확인

- Loperamide에 의해 변비가 유도된 SD 랫트에서 알로에 전잎과 lactulose의 변비 완화 효과를 확인하였음. loperamide만 처리한 그룹은 변비 유도 후 변의 개수가 Day 4 까지 대조군에 비해 감소한 것을 확인하였음 (그림10). 반면, lactulose를 loperamide와 함께 처리한 그룹은 Day 2 이후부터 변의 개수가 증가하고 Day 4에서 대조군과 유사하게 회복된 것을 확인하였으며 알로에 전잎을 처리한 그룹에서는 Day 3이후부터 증가하여 Day4에서 control과 유사하게 회복된 것을 확인하였음 (그림10). 따라서 알로에 전잎과 lactulose의 변비 완화 효과를 확인하였으며 lactulose의 변비완화 효과가 알로에 전잎에 비해 앞선 시간대에서 나타나는 것을 확인하였음 (그림10).

2. IBD 동물 모델을 이용한 용량 확정 실험, 최적 조합 도출 연구

가. 1차년도에 선별된 후보 소재를 이용하여 최적조합 도출

(1) 선별된 후보 농산물의 NF-kB 활성 억제 탐색

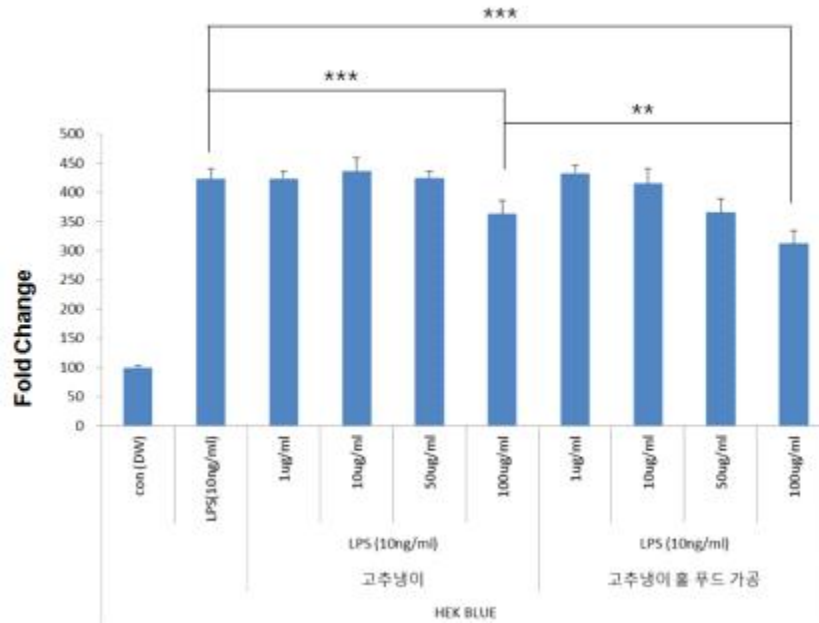


그림2.3.11. HEK293 세포주에서 형광 발현을 측정하여 NF-kB의 활성 확인

- NF-kB의 경로 활성화에 따라 형광을 발현하는 HEK293 세포주에 고추냉이와 고추냉이 홀푸드 (Eudragit) 가공을 처리한 후 염증의 대표 지표인 NF-kB의 활성을 형광으로 측정하여 항염 효과를 확인하였음. 고추냉이와 고추냉이 홀푸드 가공을 처리한 세포들에서는 농도에 따라 NF-kB의 활성이 조금 낮아지는 것을 확인하였음.

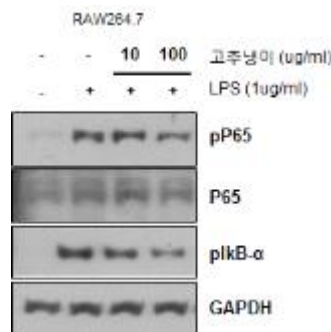


그림2.3.12. Raw264.7 세포주에서 western blot을 통한 고추냉이 추출물의 항염 효과 확인

- LPS에 의해 활성화된 Raw264.7 세포에 고추냉이 처리 후 단백질 정제 및 western blot을 시행하여 각 성분의 항염 효과를 확인하였음. Raw264.7 세포에 LPS 처리 시 NF-kB (p65)의 인산화가 증가하였으며 NF-kB의 인산화가 억제되는 것을 확인하였음 (그림12). 따라서 고추냉이는 NF-kB의 활성을 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과를 보였음 (그림12).

(2) ZO-1 면역형광염색을 통한 선별된 후보 농산물의 치결합 손상 회복효과 확인

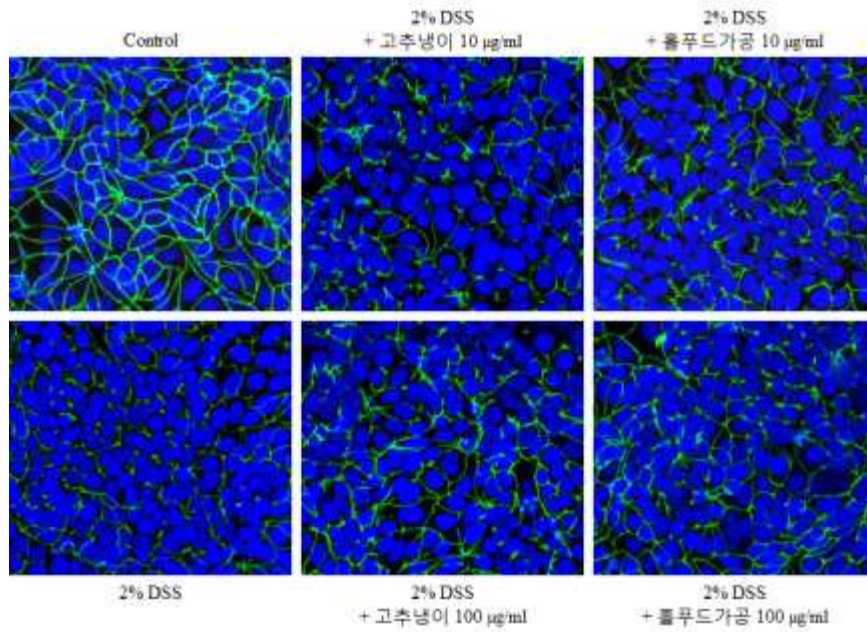


그림2.3.13. Caco-2를 이용한 밀집결합 단백질의 발현 및 구조 확인 결과

- Caco-2 세포주에 2% DSS 처리 시 밀집결합 단백질인 ZO-1의 발현이 감소하고 구조가 파괴되는 것을 확인하였으나 고추냉이 또는 홀푸드가공 처리 시 유의한 차이를 보이지 않았음. 따라서 밀집결합 단백질의 회복에서 고추냉이와 홀푸드가공에 의한 직접적 효과는 없는 것으로 보임.

나. 선별된 후보소재의 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 조절 분석

- (1) 후보소재들을 이용한 대장염 예방 소재 확보

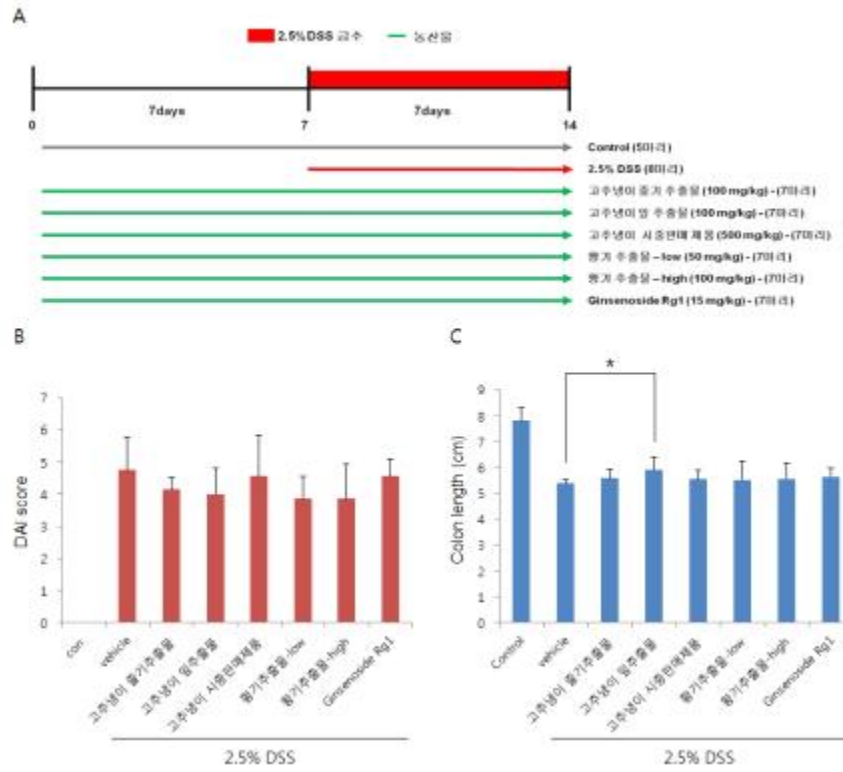


그림2.3.14. 대장염 유도 모델에서 후보소재들의 항염효과 확인

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 후보소재들을 각각 투여하여 disease activity index (DAI) 및 대장의 길이를 측정하였음
- Disease Activity Index (DAI) score는 DSS와 후보소재들을 처리한 그룹들 간 차이는 보이지 않았음
- 대장 길이 측정 결과 DSS 처리에 의해 대장의 길이가 짧아 지는 것을 확인하였으며 고추냉이 잎추출물을 처리한 그룹에서만 장의 길이가 회복되는 것을 확인하였음

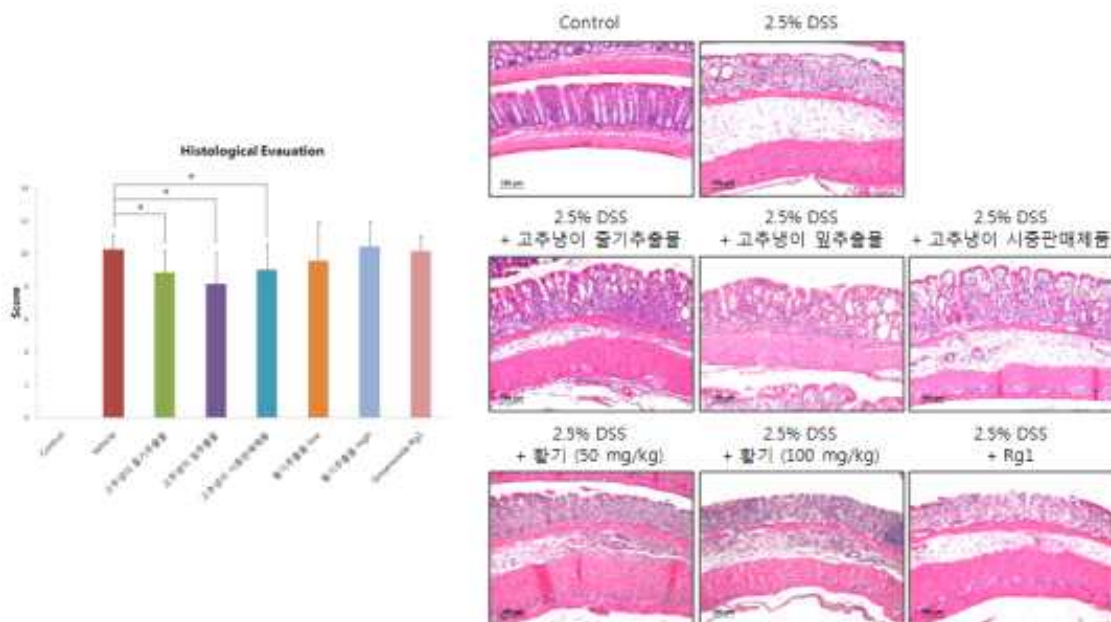


그림2.3.15. 대장염 유도 모델에서 후보소재들의 항염효과 조직학적 분석

- 대장염 유도모델에서 각 그룹 마우스들의 대장 조직 표본을 제작하여 H&E 염색 후 조직학적 분석을 수행하였음
- 2.5% DSS만 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조가 파괴되고 염증세포들의 침윤 및 그에 따른 부종이 관찰됨
- 후보소재들을 선 처리한 마우스들 중 고추냉이 추출물 및 시중판매제품을 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조의 파괴가 덜 일어나고 염증세포 침윤 및 부종이 완화된 것을 확인하였음
- 반면 황기 및 Rg1을 선 처리한 그룹의 마우스 대장 조직은 대장염이 완화되지 않은 것을 확인하였음
- 따라서 대장염 예방 효과에 대한 후속 실험을 위해 고추냉이를 선정하였음

(2) 고추냉이 추출물 가공에 의한 대장염 예방 향상 효과 - 1차 실험 (고용량)

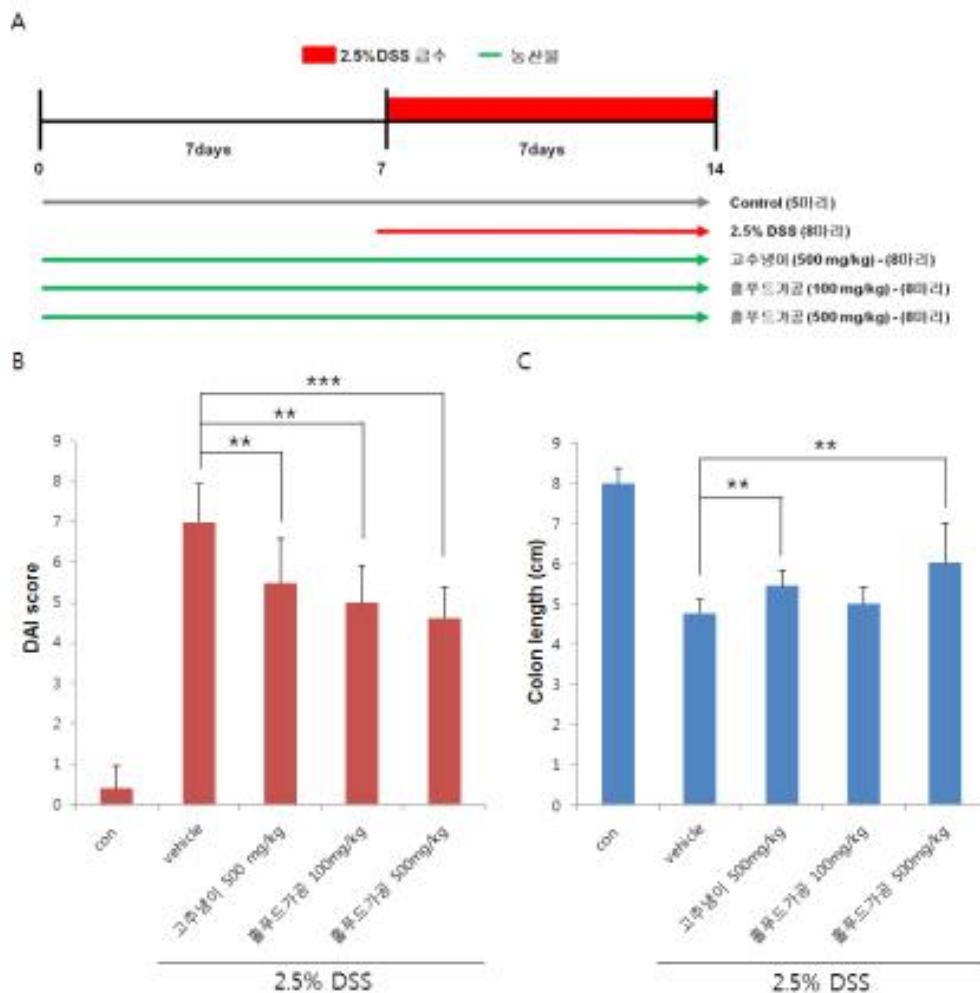


그림2.3.16. 대장염 유도 모델에서 고추냉이 및 홀푸드가공에 의한 항염효과 확인

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 고추냉이 또는 홀푸드가공 고추냉이 (5% Eudragit를 이용해 가공한 고추냉이)를 각각 투여하여 disease activity index (DAI) 및 대장의 길이를 측정하였음
- 2.5% DSS만 처리한 마우스 그룹에 비해 고추냉이를 처리한 그룹의 DAI가 현저히 낮은 것으로 보아 대장염에 의한 증세가 완화된 것으로 보이나 고추냉이를 처리한 그룹들간 유의한 차이는 없었음
- 또한 2.5% DSS에 짧아진 대장의 길이가 고추냉이와 홀푸드가공 고추냉이 처리 그룹들에

서 회복된 것을 확인하였으며 두 그룹들 간 유의한 차이는 없었음

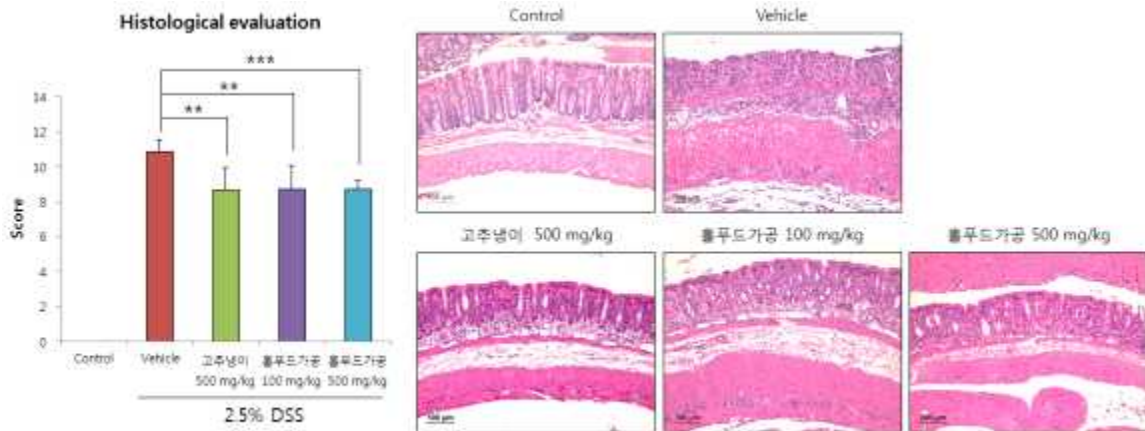


그림2.3.17. 대장염 유도 모델에서 고추냉이 및 가공에 의한 항염효과 조직학적 분석

- 대장염 유도모델에서 각 그룹 마우스들의 대장 조직 표본을 제작하여 H&E 염색 후 조직학적 분석을 수행하였음
- 2.5% DSS만 처리한 그룹에 비해 고추냉이 또는 홀푸드가공 고추냉이를 처리한 그룹에서 대장 조직의 구조가 회복된 것을 확인하였으며 염증세포의 침윤이 감소한 것을 확인하였음
- 고추냉이와 홀푸드가공 고추냉이 처리 그룹들 간 유의한 차이는 없었음

(4) 고추냉이의 홀푸드가공에 의한 대장염 예방 향상 효과 - 2차 실험 (저용량을 홀푸드가공 고추냉이 비교)

(가) 동물 실험을 통한 분변 및 조직학적 분석

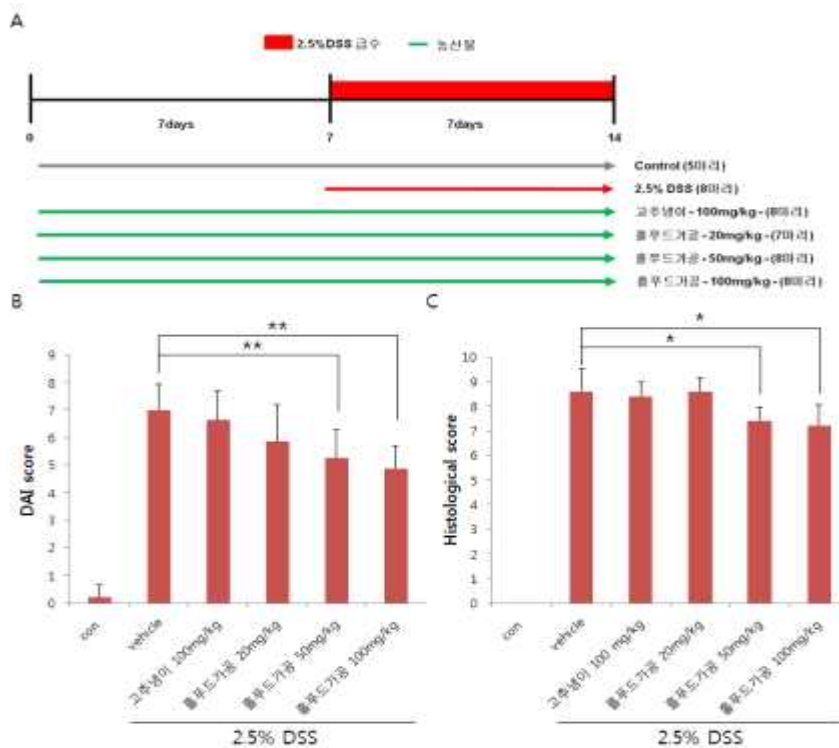


그림2.3.18. 대장염 유도 모델에서 고추냉이 및 홉푸드가공 고추냉이의 항염효과 차이 확인

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 저용량의 고추냉이 또는 홉푸드가공 고추냉이를 각각 투여하여 DAI 및 대장의 길이를 측정하였음
- DAI 분석 결과 100 mg/kg의 고추냉이는 대장염증세가 완화되지 않았으나 홉푸드가공 고추냉이 50 mg/kg 와 100 mg/kg 처리 시 대장염 증세가 완화된 것을 확인하였음
- 또한 DAI 분석 결과와 마찬가지로 고추냉이 100 mg/kg 처리 그룹은 조직학적으로 대장염이 완화되지 않았으나 홉푸드가공 고추냉이 50 mg/kg 와 100 mg/kg 처리 시 대장 조직의 구조가 회복되고 염증세포의 침윤이 감소하여 대장염이 완화된 것을 확인하였음

(나) 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 발현 조절 분석

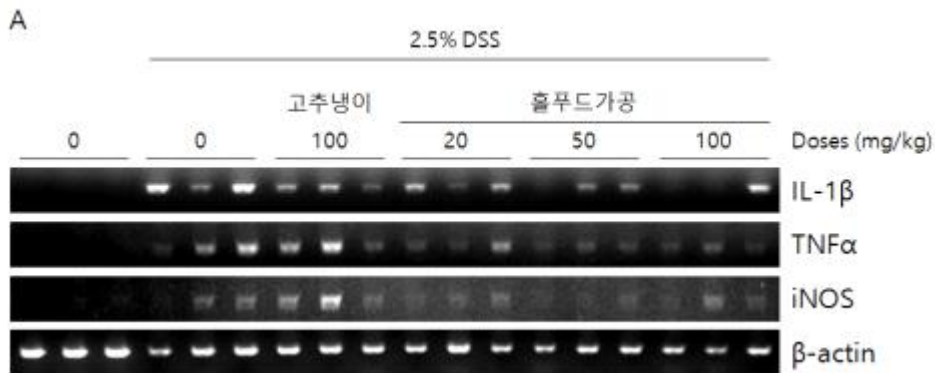


그림2.3.19. 대장염조직에서 염증 cytokine RNA 발현 변화 분석

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 저용량의 고추냉이 또는 홉푸드가공 고추냉이를 각각 투여 후 rectum의 약 1 cm 조직을 적출하여 RNA를 추출하였으며 염증 cytokine의 RNA 발현 차이를 RT-PCR을 통해 분석하였음
- DSS에 의해 대장염 유도 시 대표적인 염증 유발 cytokine들인 IL-1 β , TNF α , iNOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였음
- 가공 전 고추냉이 뿌리가루 처리 시 cytokine들의 발현이 감소하지 않으나 가공 후 고추냉이 처리 시 모든 용량에서 cytokine들의 발현이 감소하는 것을 확인하였음

다. 대장염 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석

(1) 홉푸드가공에 따른 고추냉이의 염증 cytokine RNA 발현 억제 효과 분석

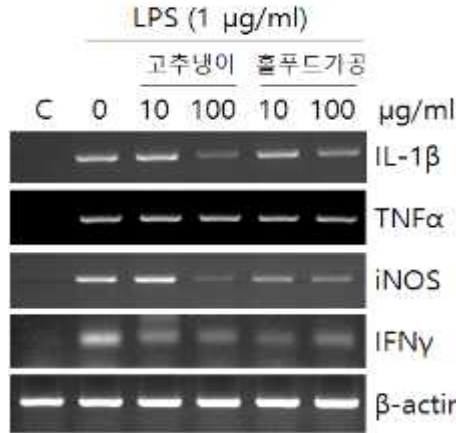


그림2.3.20. 대식세포주 Raw264.7에서 염증 cytokine의 mRNA 발현 분석

- 대식세포주 Raw264.7에서 염증 cytokine의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였음
- Raw264.7에 LPS (1 ug/ml) 처리 시 염증 cytokine들의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며 TNFα를 제외한 염증 cytokine들의 발현이 고추냉이 또는 홀푸드가공 고추냉이를 처리함에 따라 감소하는 것을 확인하였으며 고추냉이와 홀푸드가공 고추냉이간에 유의한 차이는 보이지 않았음

(2) 고추냉이 및 홀푸드고추냉이의 염증 cytokine 단백질 발현 억제 효과 분석

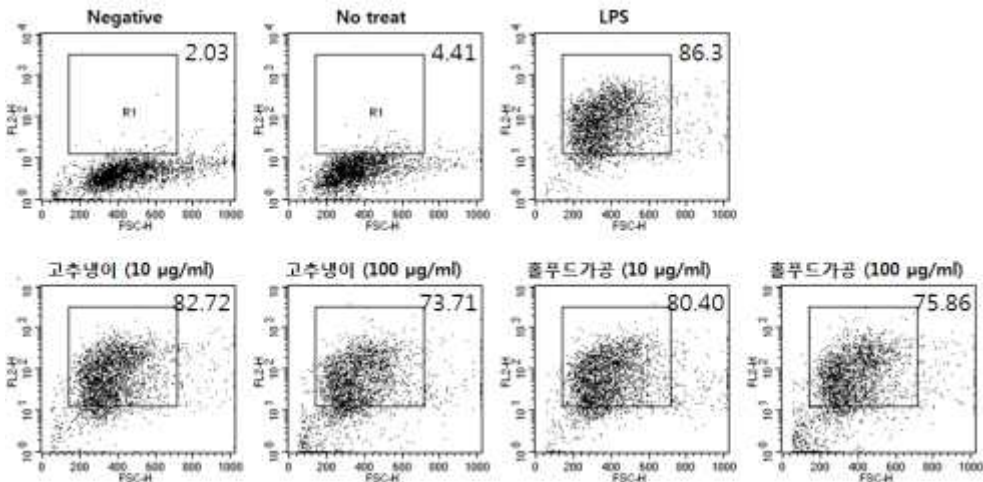


그림2.3.21. 유세포분석을 통한 염증 cytokine 단백질 발현 분석

- 대식세포주 Raw264.7에서 염증 cytokine의 단백질 발현을 유세포분석을 통해 확인하였음
- Raw264.7에 LPS (1 ug/ml) 처리 시 염증 cytokine인 TNFα의 발현이 증가하며 홀푸드가공 전, 후 고추냉이 (100 ug/ml) 처리 시 TNFα의 발현이 감소하는 것을 확인하였음
- 홀푸드가공 전, 후 고추냉이 간의 유의한 차이는 없었음

라. 대장염 억제 기전 확인을 위한 염증관련 면역세포의 분포 면역형광염색 분석

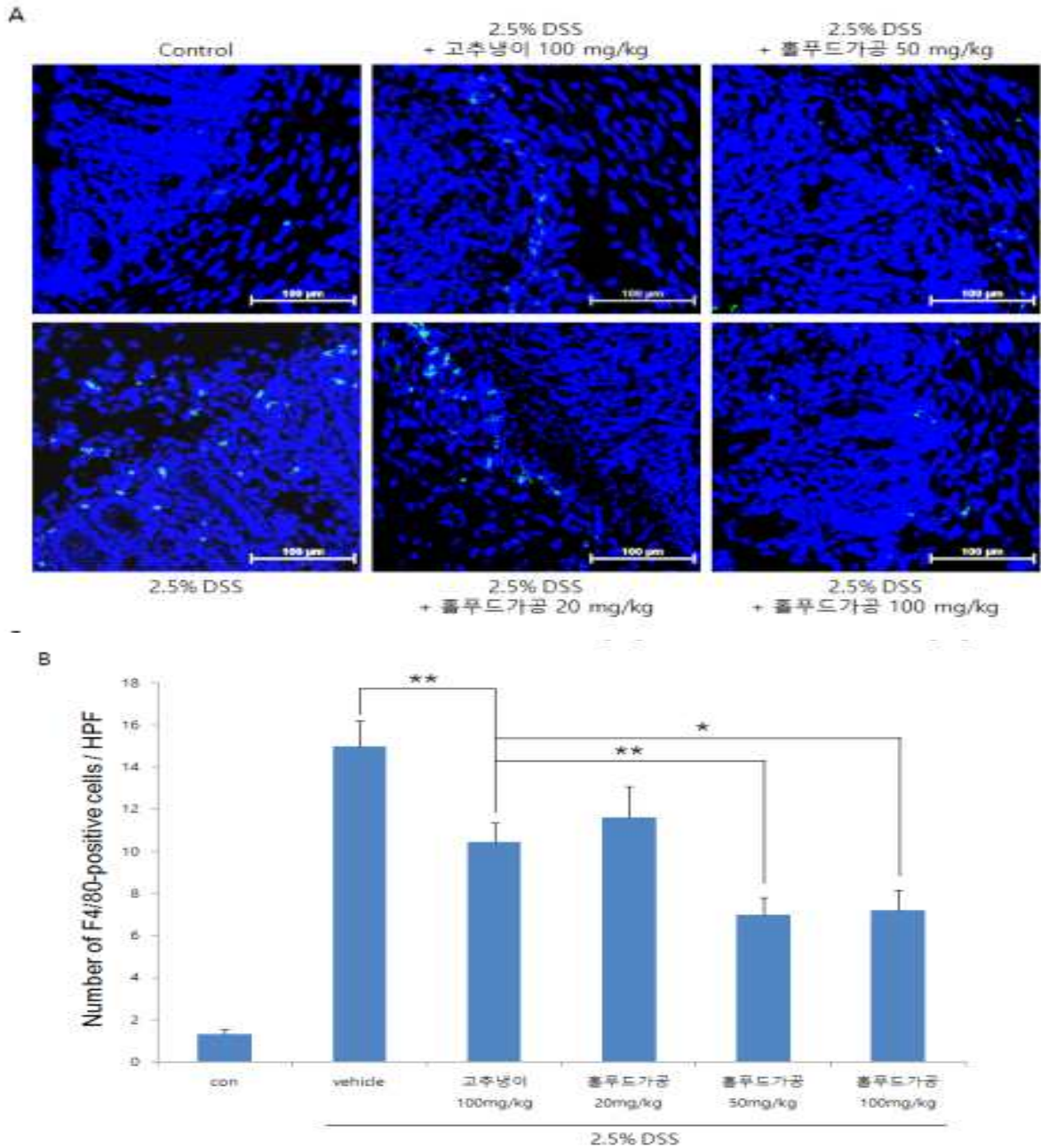


그림2.3.22. 대장염 조직에서 면역형광염색을 통한 염증세포 분포 분석

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 저용량의 고추냉이 또는 홀푸드가공 고추냉이를 각각 투여 후 rectum의 약 1 cm 조직을 적출하여 액체 질소에 얼린 후 동결절편을 제작하였음
- 제작한 동결절편에 대식세포 표지자인 F4/80에 대한 면역형광염색을 시행하여 염증세포의 분포를 확인하였음
- 마우스에 2.5% DSS 처리 시 대장 조직내 염증세포의 침윤이 증가하고 홀푸드가공 전, 후 고추냉이 처리 시 염증세포의 침윤이 감소한 것을 확인하였음
- 또한 홀푸드가공 전 고추냉이 처리 비해 가공 후 고추냉이 처리 시 염증세포 침윤 감소 효과가 현저히 감소하는 것을 확인하였음

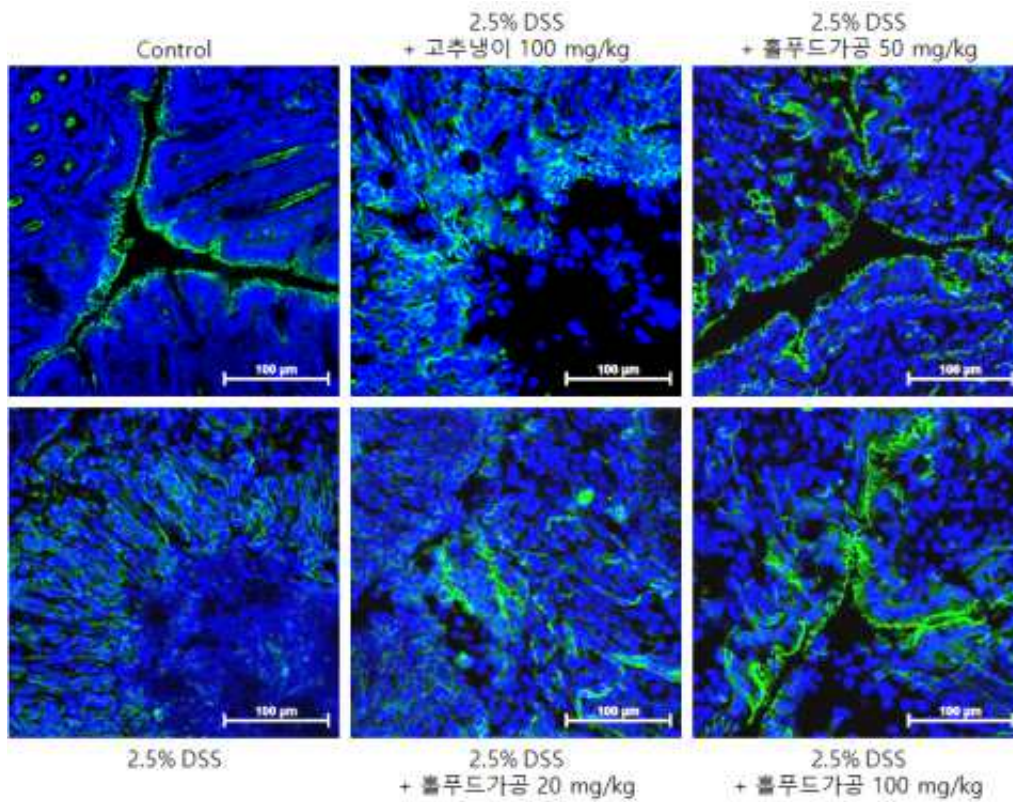


그림2.3.23. 대장염 동결조직절편에서 면역형광염색분석을 통한 밀집결합 발현 및 구조 확인

- 2.5% DSS에 의해 유도된 대장염 조직에서 밀집결합 단백질인 ZO-1의 발현이 감소하고 구조가 파괴되는 것을 확인하였으며 고추냉이 100 mg/kg 및 홉푸드가공 고추냉이 20 mg/kg 투여에 의한 회복 효과는 보이지 않았음
- 반면, 홉푸드가공 고추냉이 50 mg/kg 및 100 mg/kg 투여 시 현저히 회복되는 것을 확인 하였음
- 따라서 홉푸드가공 고추냉이에 의해 대장염이 완화됨에 따라 밀집결합이 회복되는 것으로 볼 수 있음

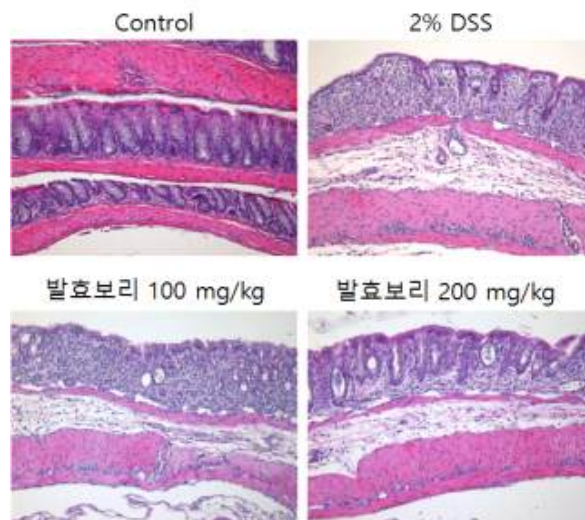


그림2.3.24. 마우스 대장염모델을 이용한 발효보리의 항염효과

- 2% DSS를 이용한 마우스 대장염 모델에서 발효보리 100 mg/kg 와 200 mg/kg로 투여하였으며 부검 후 조직 표본을 제작하여 H&E 염색을 수행하였음
- 2% DSS만 처리한 마우스 그룹의 대장 조직은 그 구조가 파괴되고 염증세포의 침윤이 관찰되며 그에 따른 부종이 관찰됨
- 반면 발효보리 선 처리 시 투여량에 따라 대장의 조직학적 구조가 회복되는 것을 확인하였음

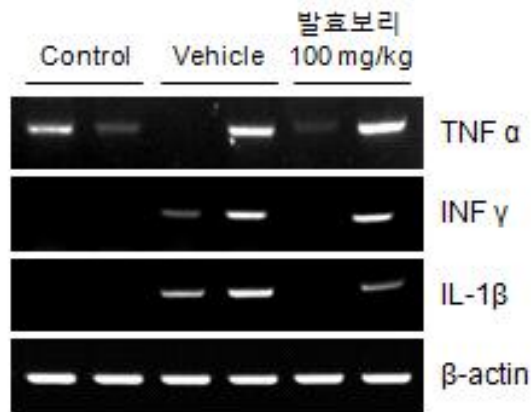


그림2.3.25. 대장염 조직에서 염증 cytokine RNA 발현 변화 분석

- 2% DSS를 이용한 마우스 대장염 모델에서 rectum을 약 1 cm 적출하여 RNA 추출 후 RT-PCR을 통해 염증 cytokine의 발현을 확인하였음
- DSS에 의해 염증이 유도된 대장 조직에서 염증 cytokine들 $TNF\alpha$, $INF\gamma$, $IL-1\beta$ 의 발현이 증가하고 발효보리에 의해 $TNF\alpha$ 를 제외한 $INF\gamma$ 와 $IL-1\beta$ 의 발현이 감소하는 것을 확인하였음

마. 대장염 매개성 대장암 모델의 확립



그림2.3.26. 대장암 모델의 확립

- C57BL/6 마우스를 도입하여 AOM (5mg/kg) 복강 투여 후 DSS를 1주일 음용수로 급여하였음.

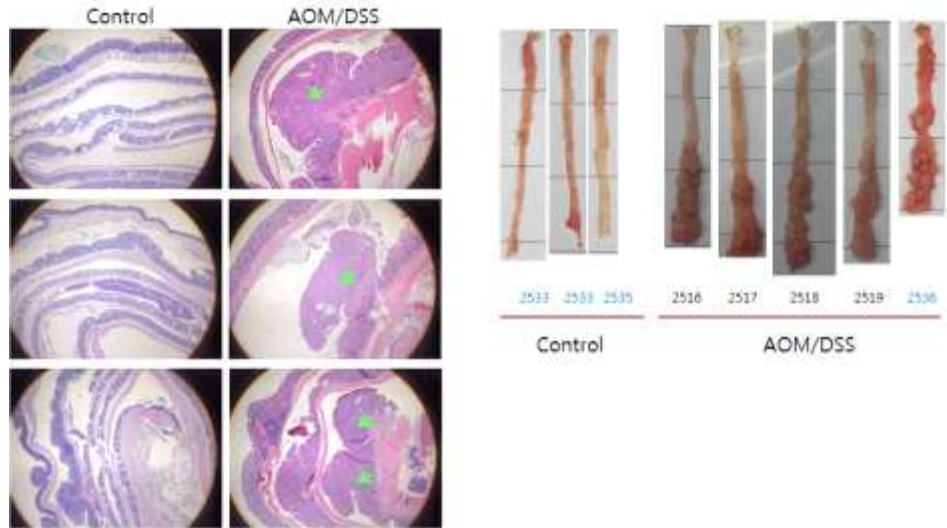


그림2.3.27. 대장암 모델의 확립 후 조직학적 분석 및 대장 사진

- 14주 후에 각각 부검하여 대장을 적출하여 고정 후 swiss roll 형태의 조직표본을 제작하였음. 현미경하에서 관찰하여 대장암의 발생 빈도, 종양의 형태 등을 확인함. 14주 경과 시 마우스의 대장에서 대장암 발생이 육안적, 조직학적으로 관찰되었음.

3. IBD 모델을 이용한 (IRB 제출을 위한) 전임상 기반 연구

가. 대장염 및 대장염 매개 대장암 모델에서 2차년도에 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인

(1) 대장염 모델에서 최적조합 소재의 항염 확인

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 선발된 최적조합 소재 (고추냉이)를 가공하여 홀푸드가공 고추냉이 (5% Eudragit를 이용해 가공한 고추냉이, WKE)의 항염 효과를 재확인하였음
- 대장염 유도모델에서 각 그룹 마우스들의 대장 조직 표본을 제작하여 H&E 염색 후 조직학적 분석을 수행하였음
- 2.5% DSS만 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조가 파괴되고 염증세포들의 침윤 및 그에 따른 부종이 관찰됨
- 홀푸드가공 고추냉이 (WKE) 는 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조의 파괴가 덜 일어나고 염증세포 침윤 및 부종이 완화된 것을 확인하였음
- 각각의 그룹에서 disease activity index (DAI)를 측정된 결과 2.5% DSS만 처리한 마우스 그룹에 비해 홀푸드가공 고추냉이 (WKE) 를 처리한 그룹의 DAI가 현저히 낮은 것으로 보아 대장염에 의한 증세가 완화된 것으로 보이나 용량에 따른 유의한 차이는 없었음

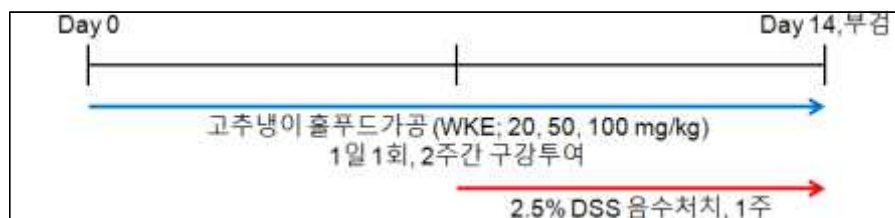


그림2.3.28. 대장염 완화효과 확인을 위한 마우스 실험 일정

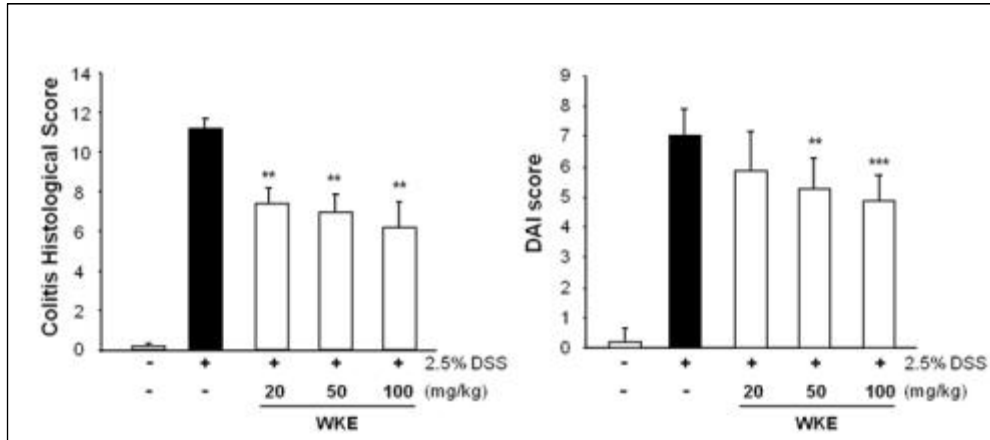


그림2.3.29. 실험 종료 후 대장염 조직에 대한 병리학적 지표결과 (왼쪽) 과 증상에 대한 평가지표결과 (오른쪽)

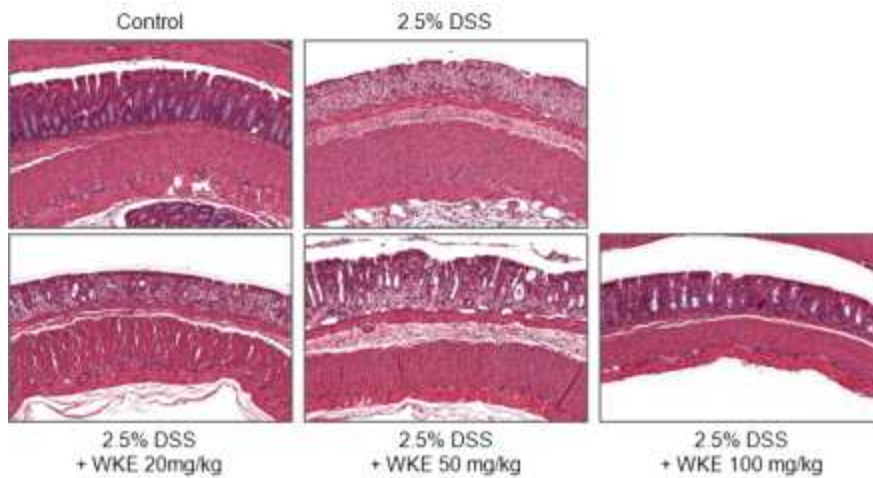


그림2.3.30. 대장조직 사진

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 추가 선발된 소재인 알로에신 및 알로에겔의 항염 효과를 확인하였음
- 대장염 유도모델에서 각 그룹 마우스들의 대장 조직 표본을 제작하여 H&E 염색 후 조직학적 분석을 수행하였음
- 2.5% DSS만 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조가 파괴되고 염증세포들의 침윤 및 그에 따른 부종이 관찰됨
- 알로에겔 및 알로에신을 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조의 파괴가 덜 일어나고 염증세포 침윤 및 부종이 완화된 것을 확인하였음

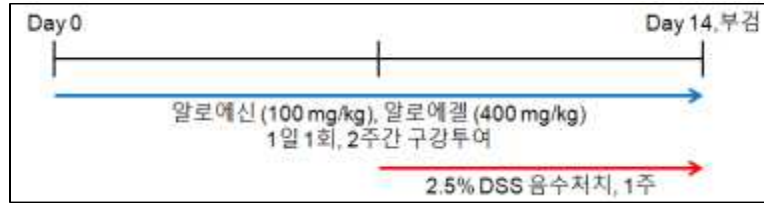


그림2.3.31. 대장염 완화효과 확인을 위한 마우스 실험 일정

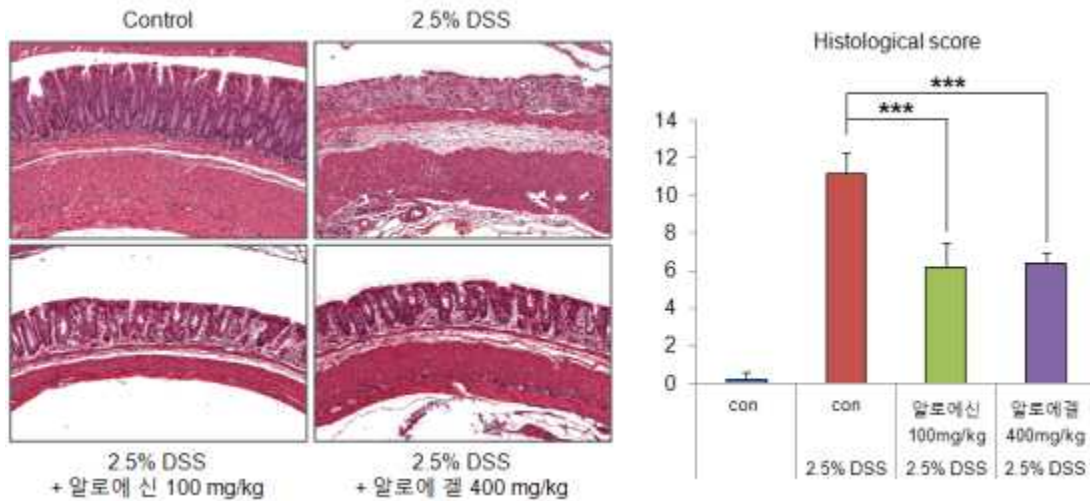


그림2.3.32. 대장조직 사진 (왼쪽)과 대장염 조직에 대한 병리학적 지표결과 (오른쪽)

(2) 대장염 매개 대장암 모델에서 최적조합 소재의 항암효과 확인

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 AOM (5mg/kg) 복강 투여하였음
- 2주 간격 3회 2~3% DSS를 1주일씩 음용수로 급여하여 대장암을 유도하였음
- 주 1회 마우스 체중을 측정하여 이상 여부를 확인하였고 선발된 최적조합 소재 및 다른 농산물 소재를 투여하여 암 예방효과를 관찰하였음
- 5월 29일 마우스 부검을 수행하여 대장을 적출하여 사진촬영하고 rectum의 약 1 cm 조직을 액체질소에 얼리고 나머지는 고정 후 swiss roll 형태의 조직표본을 제작
- 슬라이드 제작 후 H&E 염색하여 현미경하에서 관찰하여 대장암 형태 및 숫자 확인예정

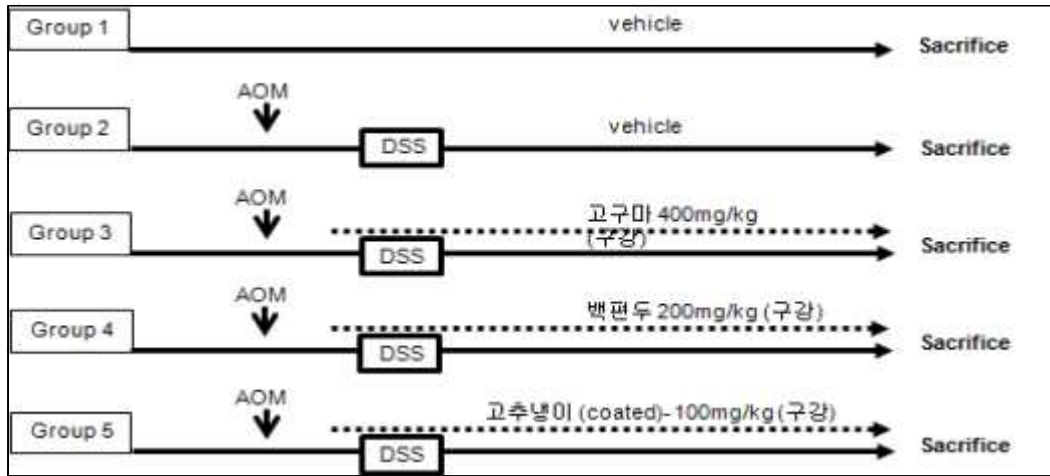


그림2.3.33. 대장염 억제효과 확인을 위한 마우스 실험 일정

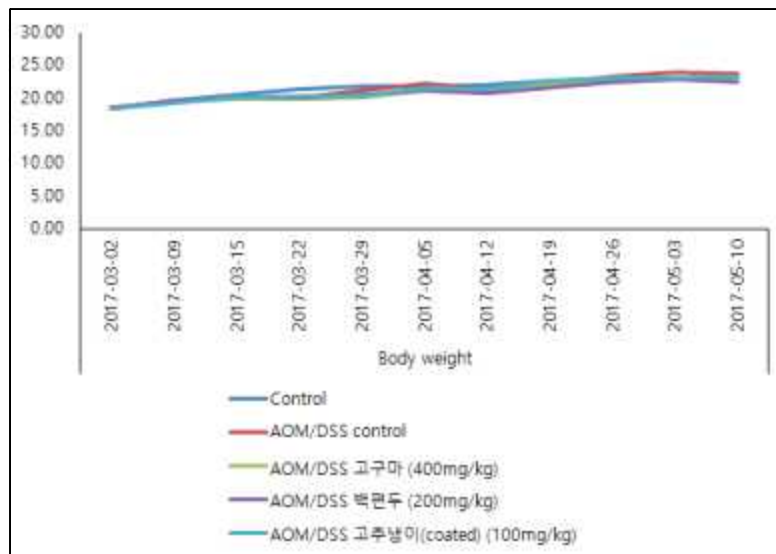


그림2.3.34. 대장염 억제효과 확인을 위한 마우스 실험과 정 중 체중 변화

나. 선발된 최적조합 소재의 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석

- 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 고용량의 고추냉이 (WK) 또는 홀푸드가공 고추냉이 (WKE) 를 각각 투여 후 rectum의 약 1 cm 조직을 적출하여 RNA를 추출하였으며 염증 cytokine의 RNA 발현 차이를 RT-PCR을 통해 분석하였음
- DSS에 의해 대장염 유도 시 대표적인 염증 유발 cytokine들인 IL-1 β , TNF α , iNOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였음
- 가공 전 고추냉이는 cytokine들의 발현을 현저하게 감소하지 않으나 가공 후 고추냉이는 모든 용량에서 cytokine들의 발현을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였음

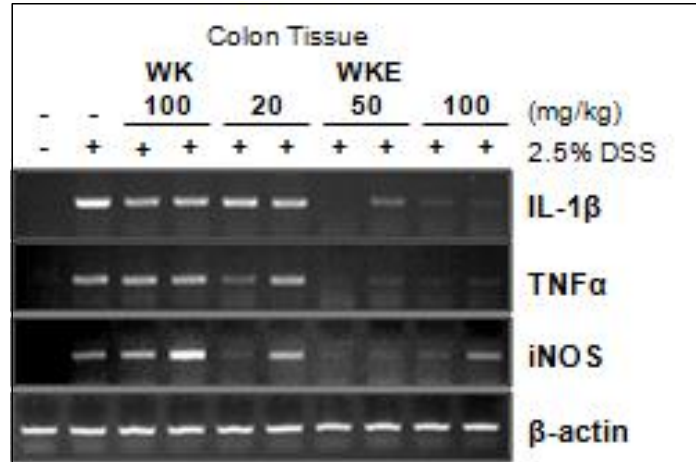


그림2.3.35. 동물실험 후 대장조직에서 RNA 추출 후 RT-PCR 결과

- 장상피세포주를 이용하여 고추냉이 추출물의 치밀결합 유지에 대한 효과를 관찰하였음.
- 2주간 여러층으로 중첩되어 배양된 Caco-2 세포주에 2.5% DSS를 투여하여 치밀결합이 손상되게 유도한 후 고추냉이 추출물을 처리하여 치밀결합 유지에 대한 효과를 단백질 분석을 통하여 관찰하였음
- 세포막 부분의 단백질을 분리하여 Western blotting을 수행한 결과 치밀결합 유지에 필요한 ZO-1, Occludin, Claudin-1 등이 DSS 투여에 의해 감소하였으나 고추냉이 투여 시 다시 회복되는 것을 확인하였음

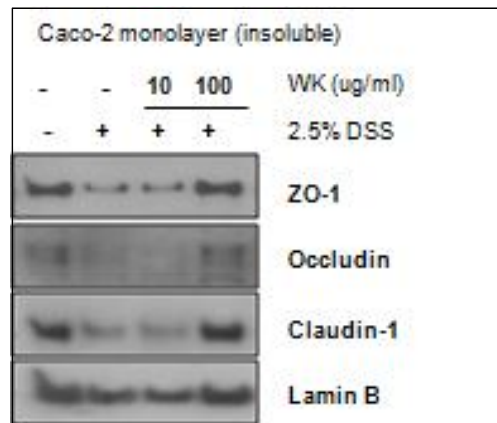


그림2.3.36. 장상피 세포의 치밀결합 관련 단백질에 대한 고추냉이 추출물의 효능 확인 (Western blotting)

- 적출한 대장 조직을 이용하여 밀결합 유지에 필요한 Occludin, Claudin-1 등의 발현에 대한 고추냉이 추출물의 효과를 비교하였음
- 2.5% DSS만 처리한 그룹의 마우스 대장은 상피세포의 조직학적 구조의 파괴가 일어나 Occludin, Claudin-1 등의 발현이 감소하였음
- 홀푸드가공 고추냉이 (WKE) 처리한 그룹의 마우스 대장은 장상피세포의 조직학적 구조가 보존되어 Occludin와 Claudin-1 이 장상피세포에서 뚜렷하게 관찰되었음
- 고추냉이 추출물에서는 장상피세포의 보존이 뚜렷하지 않아 마우스가 고추냉이를 섭취한 후 홀푸드 가공에 의해 대장까지의 전달이 향상되어 우수한 효과가 관찰된 것으로 판단되었음

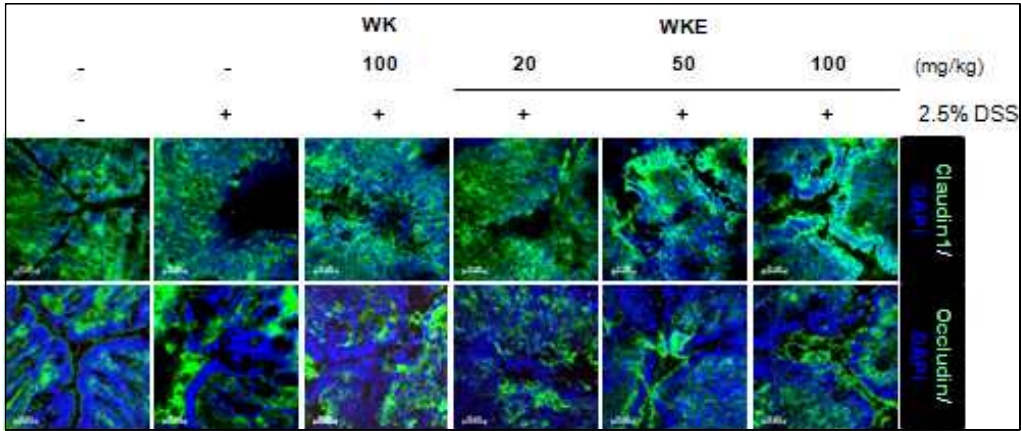


그림2.3.37. 동물실험 후 마우스 대장에서 치밀결합 관련 유전자 (Occludin 와 Claudin-1)의 면역 염색 결과

- 추가된 소재인 알로에신과 알로에겔의 장상피세포의 치밀결합에 대한 효과를 관찰하였음
- Caco-2 세포주에 2% DSS 처리 시 밀집결합 단백질인 ZO-1의 발현이 감소하고 구조가 파괴되는 것을 확인하였으나 알로에겔 또는 알로에신 처리 시 다시 회복되는 것을 확인하였음.
- 이러한 효과는 농도 의존적으로 향상되었음

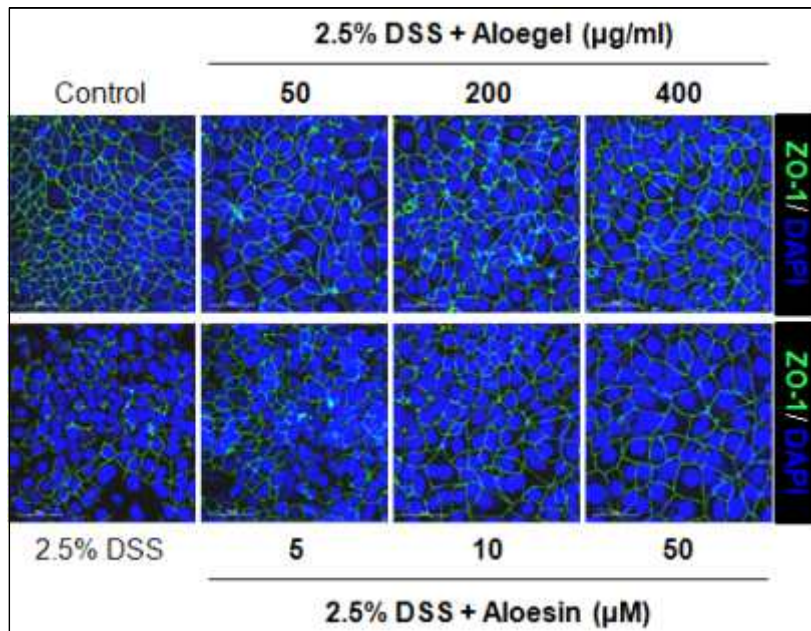


그림2.3.38. 장상피세포 다중 배양 후 치밀결합 관련 단백질 (ZO-1)에 대한 알로에 소재의 효과

- 추가된 소재인 고구마 물추출물, 메탄올추출물, 에테르추출물의 장상피세포의 치밀결합에 대한 효과를 관찰하였음
- Caco-2 세포주에 2% DSS 처리 시 밀집결합 단백질인 ZO-1의 발현이 감소하고 구조가 파괴되는 것을 확인하였으나 고구마 추출물 처리시 다시 회복되는 것을 확인하였음.

다. 선발된 최적조합 대장염/암 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 AOM (5mg/kg) 복강 투여
- 2주 간격 3회 2~3% DSS를 1주일씩 음용수로 급여
- 선발된 최적조합 소재를 AOM 투여시부터 12-16주간 매일 (주5회) 마우스에 처리
- 마우스 부검을 수행하여 대장을 적출하여 사진촬영하고 rectum의 약 1 cm 조직을 액체질소에 얼리고 나머지는 고정 후 swiss roll 형태의 조직표본을 제작
- 대장 조직은 분쇄하여 RNA 분리 및 정제함
- RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하여 각 염증조절을 할 수 있는 상위 유전자의 발현양이 조절되는 것을 확인
- 현재 추가된 후보소재를 포함하기 위해 실험이 지연되어 6월달에 수행 예정
- 이를 보완하기 위해 대장암 세포주를 이용한 항암 효능 확인 실험하였음
- 대장암세포주 (HCT116, DLD1, HT29, SW620, CT-26)에 대한 정상세포로서 CCD-18Co 세포주를 사용하여 MTT실험을 수행하였음. 각 well 에 3000개의 세포를 이식 한 후 각 추출물을 농도별로 처리하고 2틀 후 OD 값을 측정하였음
- 대부분의 세포주에서 사용한 추출물은 세포성장의 억제효과가 뚜렷하지 않아 세포성장의 주기 억제 또는 세포사멸에 의한 암성장 억제가 아닌 다른 기전을 예상해야한다고 판단하였음

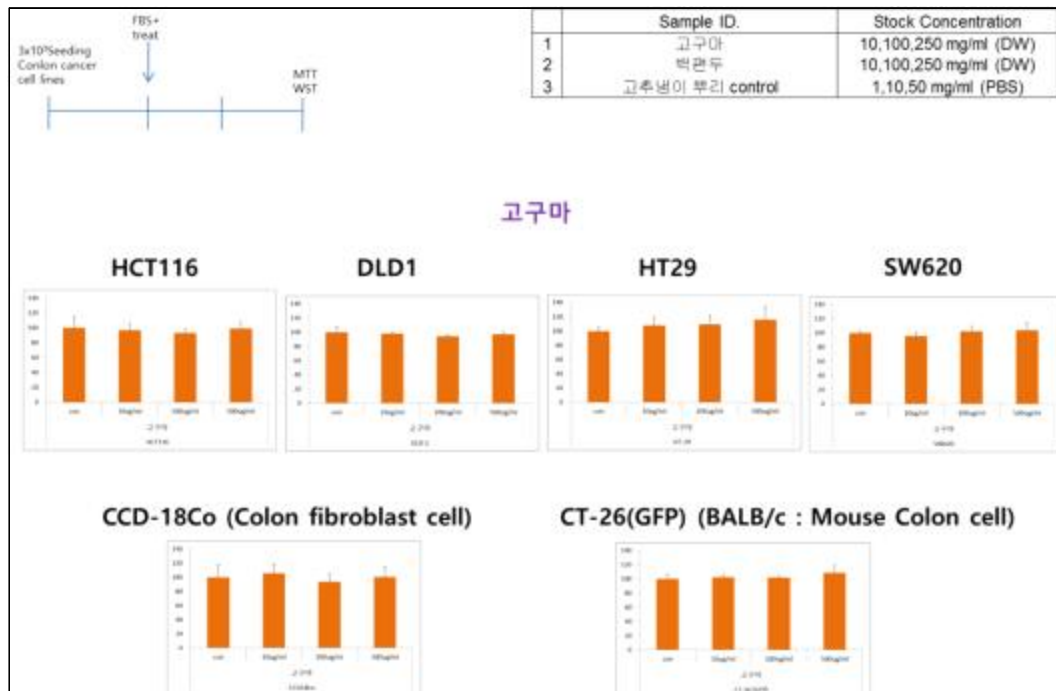


그림2.3.39. 대장암세포주에서 고구마 추출물을 처리한 후 세포성장률 비교 (MTT assay)

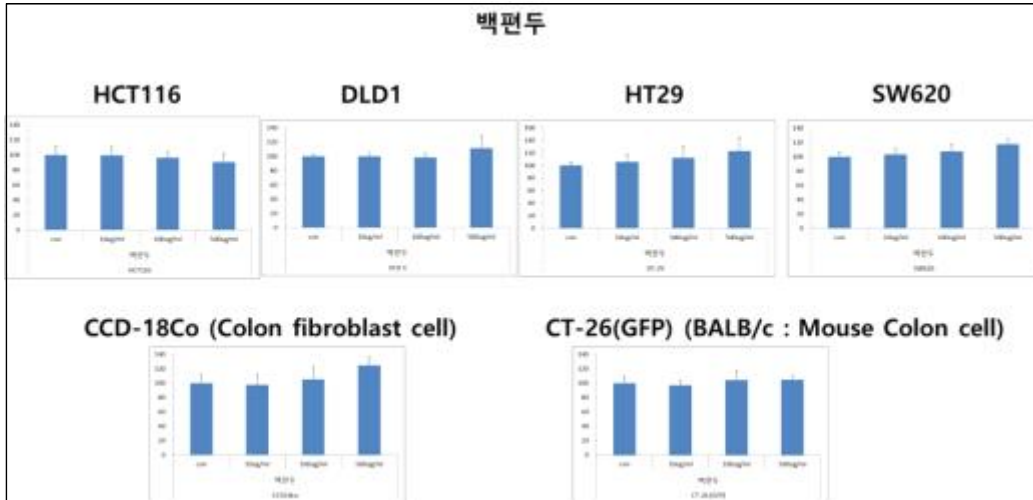


그림2.3.40. 대장암세포주에서 백편두 추출물을 처리한 후 세포성장률 비교 (MTT assay)

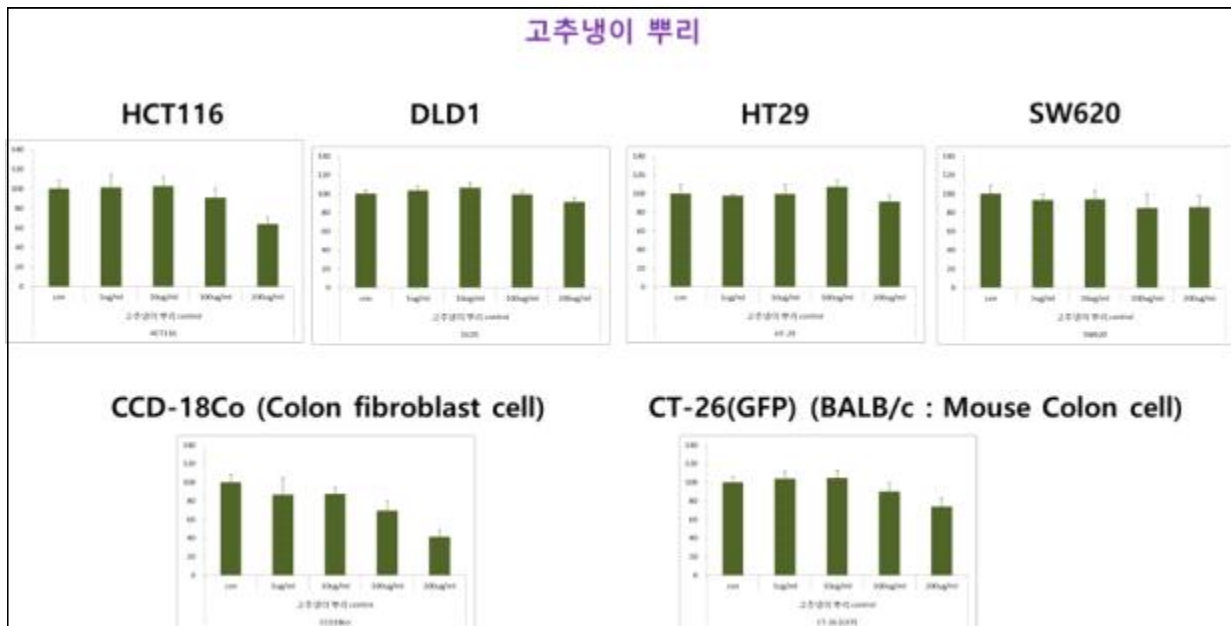


그림2.3.41. 대장세포주에서 고추냉이추출물을 처리한 후 세포성장률 비교 (MTT assay)

- 암세포의 colony 형성 후 추출물을 처리하여 생존률 억제를 확인하는 Colony forming assay를 수행한 결과 고추냉이 추출물에서만 생존률 억제효과가 관찰되었음.

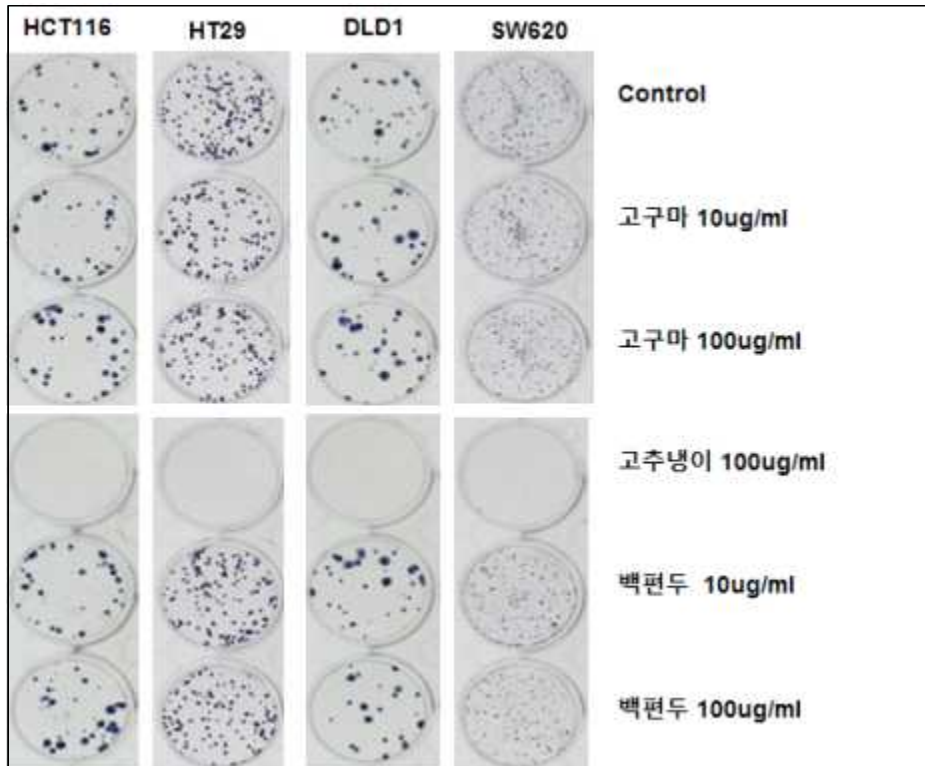


그림2.3.42. 대장세포주에서 고추냉이추출물을 처리한 후 세포생존률 비교 (Colony forming assay)

- 염증 및 암세포 성장과 관련된 신호전달체계에 대한 백편두와 고구마추출물의 영향을 확인하였음 (고추냉이의 효과는 논문 투고하여 revision 수행중임). LPS를 처리하여 염증 신호를 활성화한 후 추출물을 처리한 결과 이에 대한 억제효과는 관찰되지 않았음.
- 염증완화 효과가 관찰되지 않아 장상피세포의 항상성 유지에 대한 효과를 관찰하였음. 오랜기간 Caco-2 장상피세포를 배양하여 다중배양을 수립한 후 DSS를 처리하여 치밀결합을 손상시켰음. 그리고 고구마추출물을 처리하였을 경우 추출물에 따라 조금 차이는 있었지만 장상피세포의 치밀결합을 유지하도록 하는 것을 ZO-1 (Tight junction 필수 단백질) 형광 염색으로 확인하였음

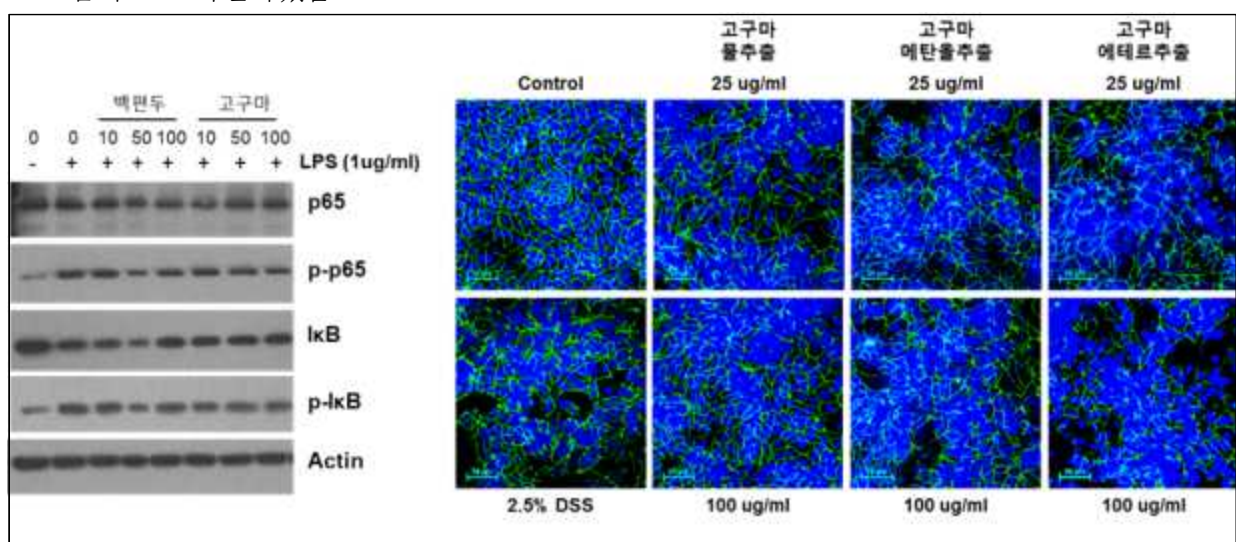


그림2.3.43. 염증관련 신호전달 유전자에 대한 추출물의 효과 (왼쪽)와 장상피세포 다중 배양 후 치밀결합 관련 단백질 (ZO-1)에 대한 효과

라. 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석

- 마우스 대식세포주 Raw264.7에서 염증 cytokine의 단백질 발현을 유세포분석을 통해 확인하였음
- Raw264.7에 LPS (1 ug/ml) 처리 시 염증 cytokine인 IL-1 β 의 발현이 증가하며 고추냉이 추출물 (100 ug/ml) 처리 시 IL-1 β 의 발현이 감소하는 것을 확인하였음

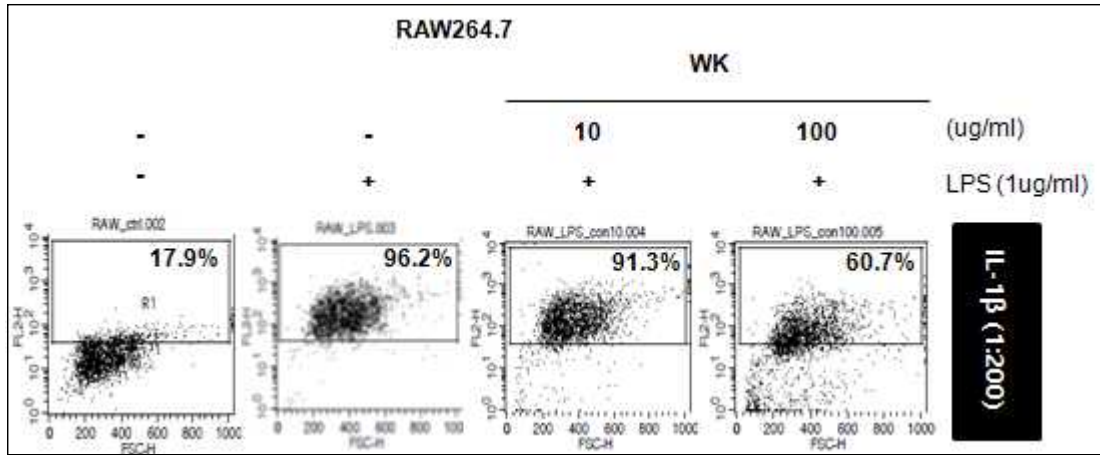


그림2.3.44. 염증관련 cytokine 억제효과 (FACS 분석)

마. 선발된 최적조합 소재의 유효성 확인 및 독성 검증

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 선발된 최적조합 소재를 2주간 매일 (주5회) 마우스에 투여하였음
- 마우스 부검을 수행하여 혈액을 채취하고, 간장, 신장, 비장, 대장을 적출하여 육안 관찰
- 다양한 혈액 생화학 검사를 수행하였으나 고추냉이, 백편두, 발아백편두 모두 독성영향이 없었음
- 슬라이드 제작 후 H&E 염색하여 현미경하에서 관찰하여 조직학적 이상 확인 결과 아무런 이상이 없었음



그림2.3.45. 독성확인을 위한 마우스 실험 일정

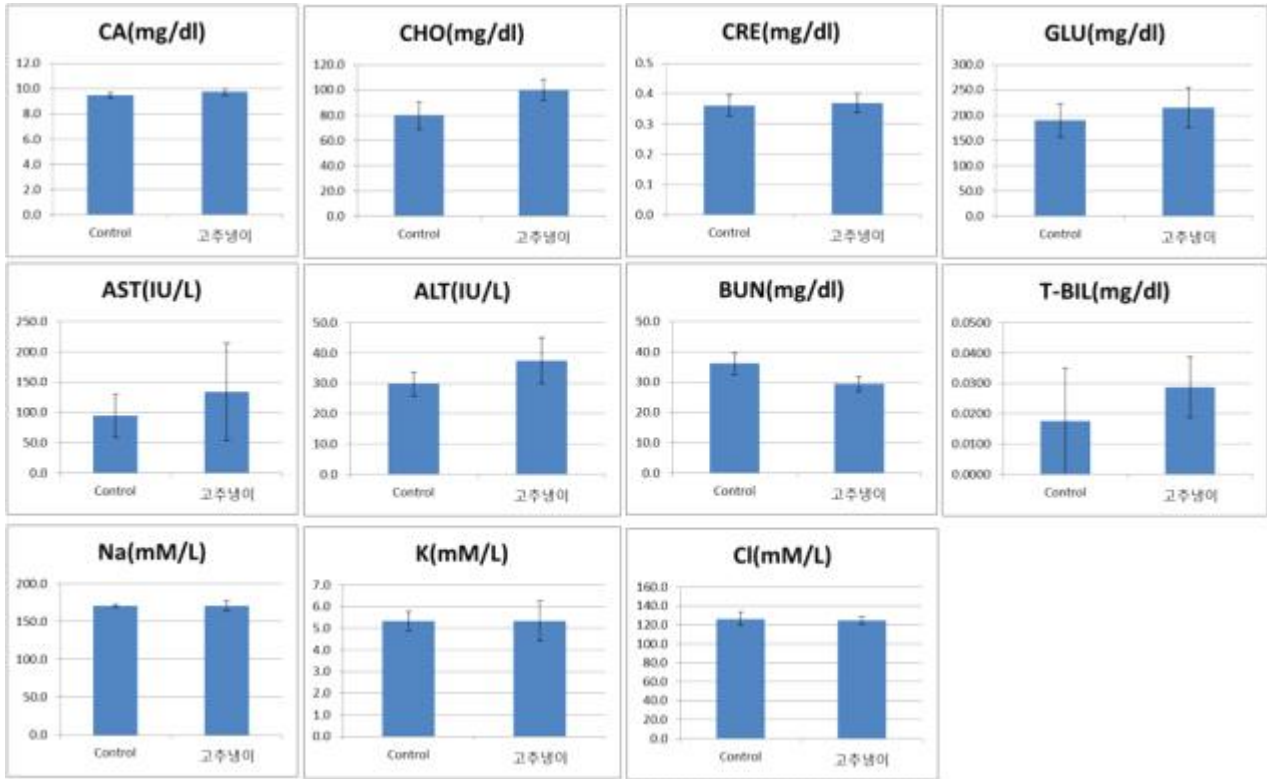


그림2.3.46. 고추냉이 투여 후 생화학 검사 결과

- CA - Calcium (test blood calcium levels, Blood coagulation)
- CHO - Cholesterol (thyroid function)
- CRE - Creatinine (Kidney function)
- Glu - Glucose (Pancreas function)
- AST - Alanine Aminotransferase (part of liver function test)
- ALT - Alanine Transaminase (part of liver function test)
- BUN - Blood Urea Nitrogen (part of kidney function test)
- T-Bil - Total bilirubin (liver function)
- Na - Sodium (test for sodium levels, urine pH regulation)
- K - Potassium (test for potassium levels, muscle function, nerve transmission)
- Cl - Chloride (Osmotic pressure)

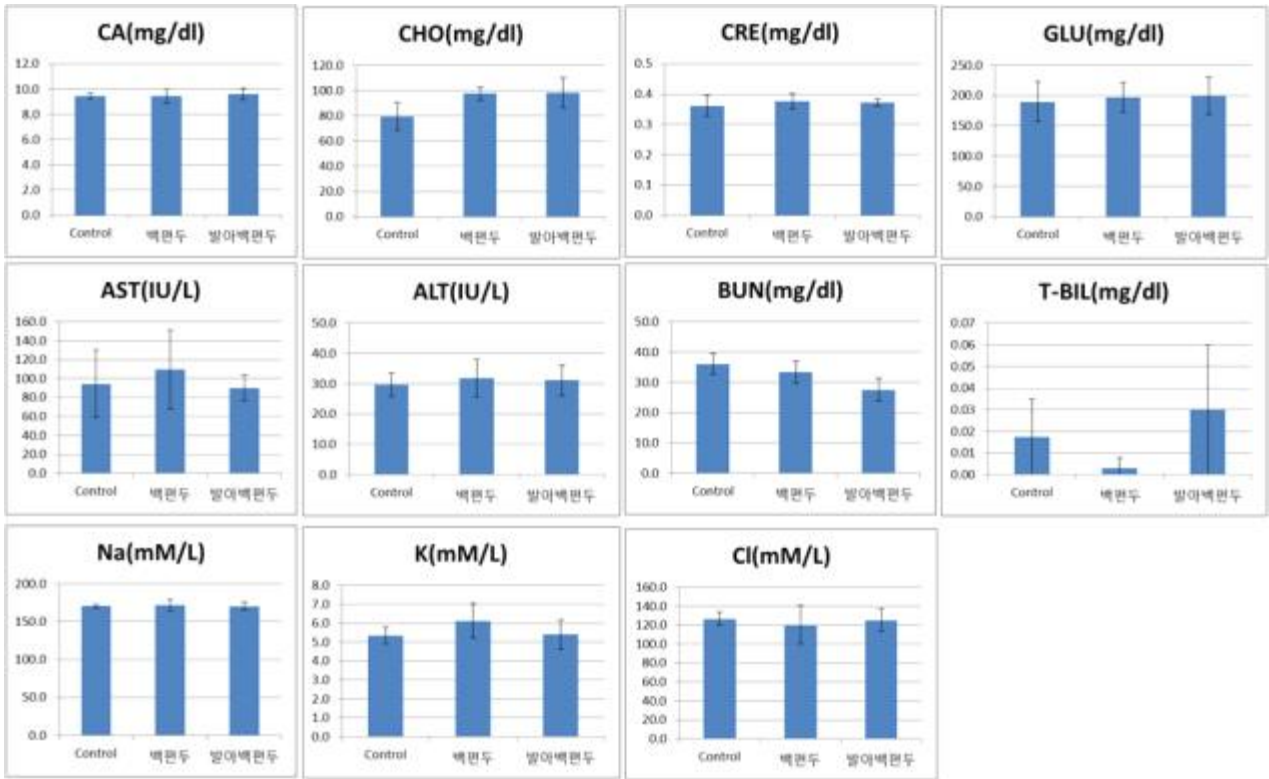


그림2.3.47. 백편두, 발아백편두 투여 후 생화학 검사 결과

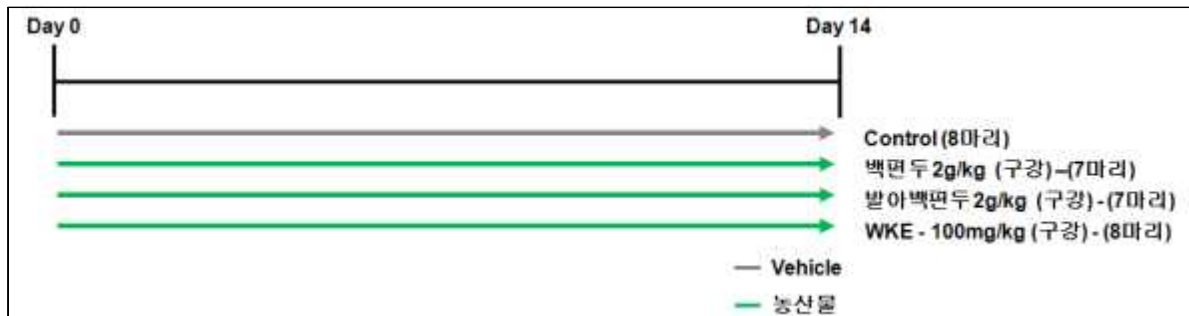


그림2.3.48. 혈액 독성확인을 위한 마우스 실험 일정

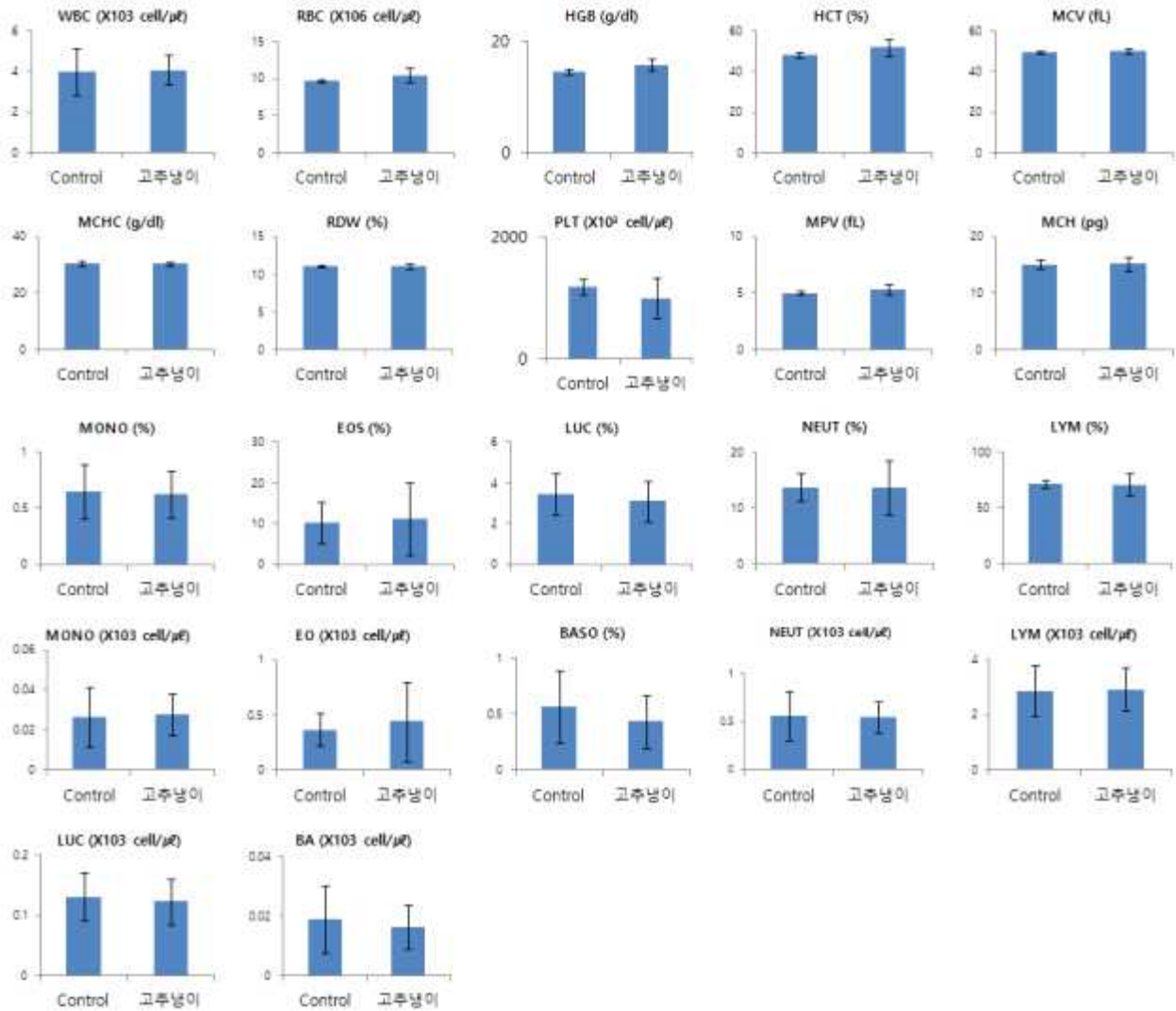


그림2.3.49. 고추냉이 투여 후 혈구검사 결과

- WBC White Blood Cells
- RBC Red Blood Cells
- HGB Hemoglobin
- HCT Hematocrit
- MCV Mean Corpuscular Volume
- MCH Mean Corpuscular Hemoglobin

- MCHC Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
- RDW Red Cell Distribution Width
- PLT Platelets
- MPV Mean Platelet Volume
- NEU Neutrophils (Sometimes labeled GR or Grans.)
- LYM Lymphocytes

- MONO Monocytes
- EOS Eosinophils
- LUC Large unstained cell (peroxidase negative)

BASO Basophils
 NEUT Neutrophils
 LYM Lymphocytes

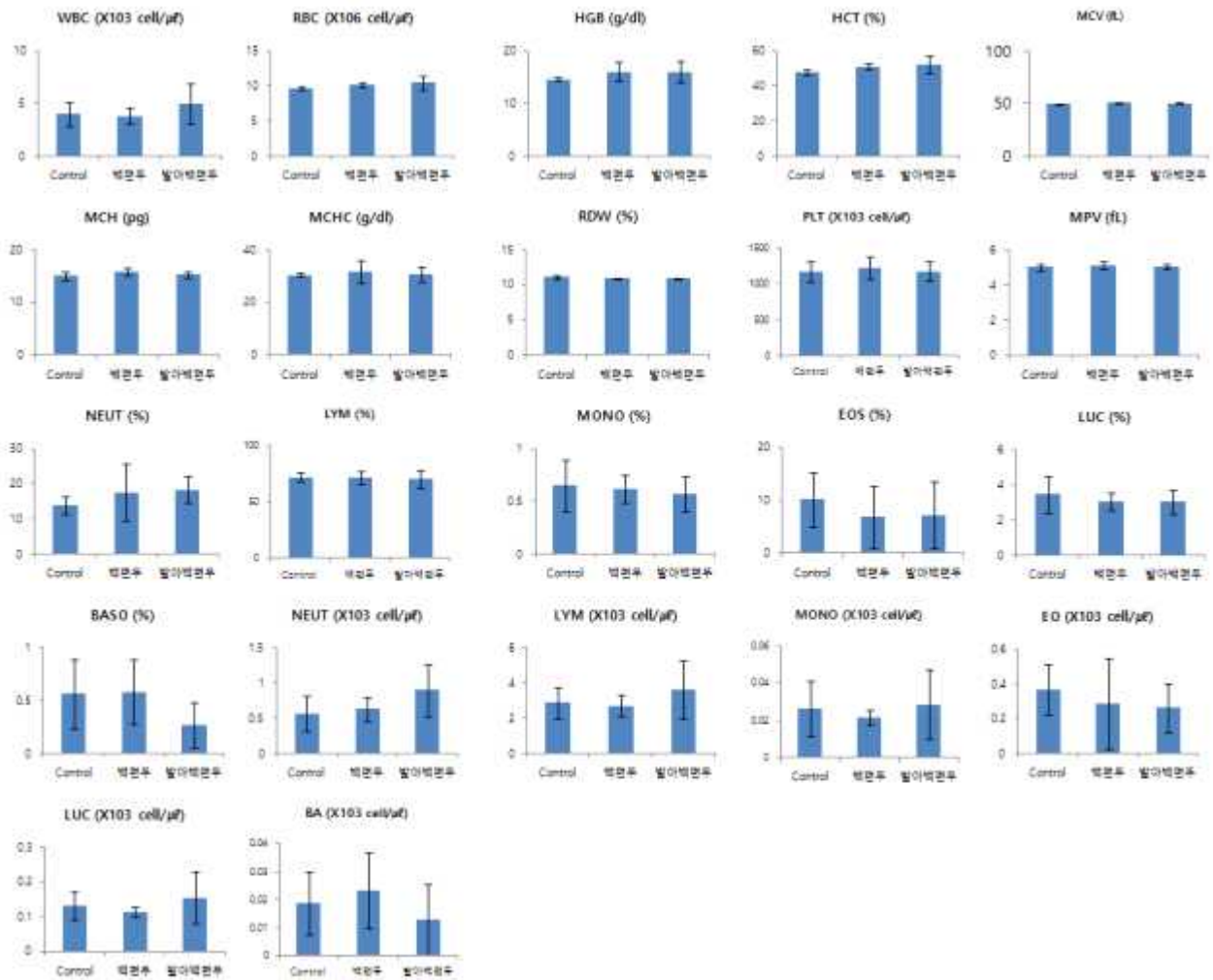


그림2.3.50. 백편두, 발아백편두 투여 후 혈구검사 결과

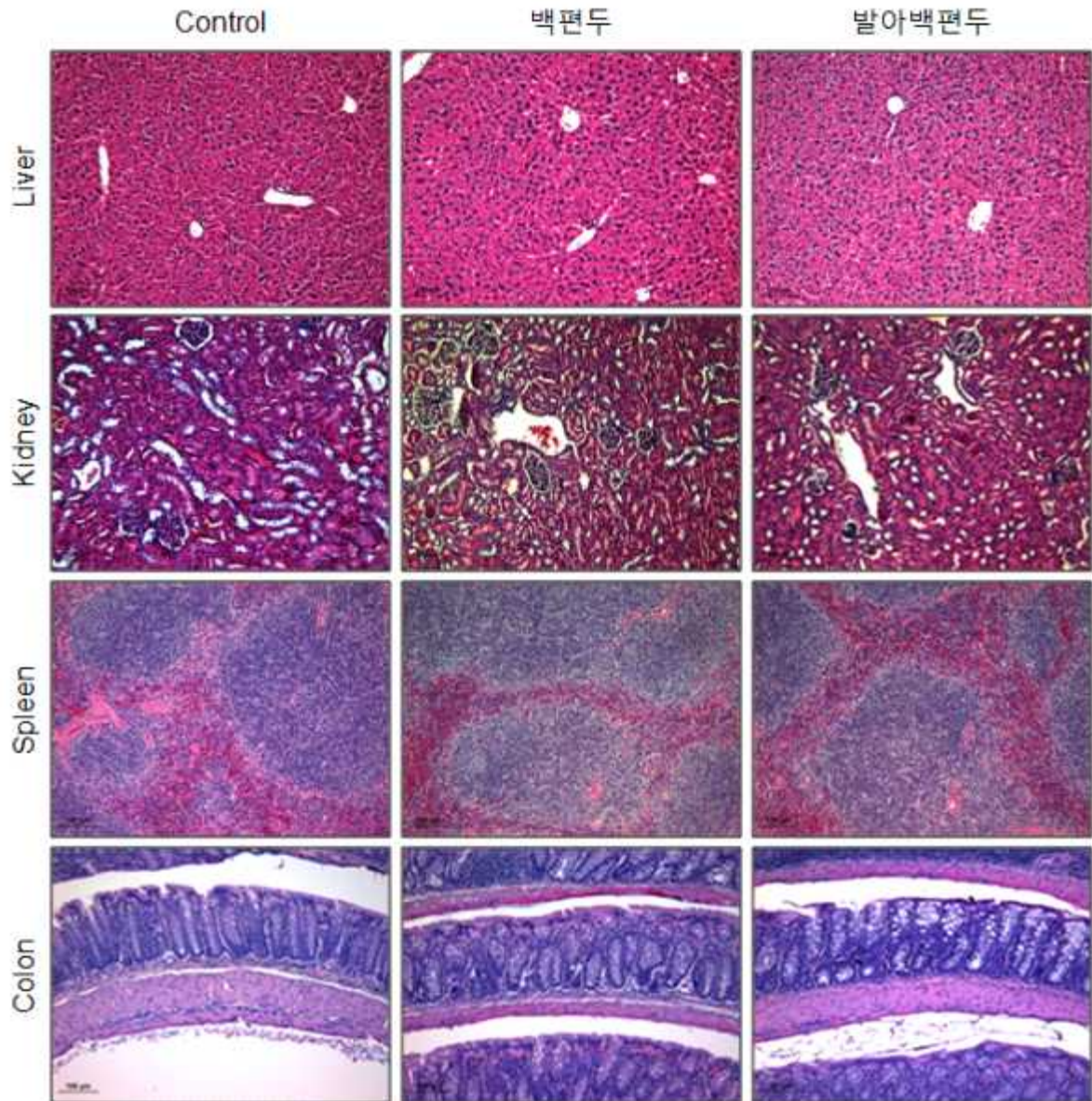


그림2.3.51. 백편두, 발아백편두 투여 후 조직 검사

4. IBD 모델을 이용한 경쟁제품 효능 비교 연구

가. 대장염 모델을 이용하여 선발된 최적조합소재와 경쟁제품의 효능 비교

- (1) 최적조합소재의 최대허용용량 (Maximum Tolerance Dose, MTD) 산출을 위한 동물실험
 - 경쟁제품 (식이섬유)과의 비교를 위한 최적조합소재 3가지 (백편두+산약+황기)의 용량산출을 위한 실험을 수행하였음
 - IPET 원료 (백편두 + 산약 + 황기) 3가지 용량을 설정하였음

| | 그룹1 | 그룹2 | 그룹3 | 그룹4 |
|------------------------------------|------|---|---|---|
| | 경쟁제품 | 최적조합소재 (식이섬유 820 mg + IPET 원료 100 mg) | 최적조합소재 (식이섬유 820 mg + IPET 원료 200 mg) | 최적조합소재 (식이섬유 820 mg + IPET 원료 400 mg) |
| 마우스 동물실험 용량 (mg/kg/day) | 820 | 920 | 1,020 | 1,220 |
| 마우스(평균 체중 20 g)으로 환산 시 (mg/day) | 16.4 | 18 | 20 | 24 |

그림2.3.52. MTD 산출을 위한 동물실험 그룹

- 5주령 암컷 C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 경쟁제품과 선발된 최적조합 소재 3가지 용량을 2주간 매일 (주 7회) 마우스에 투여하였음

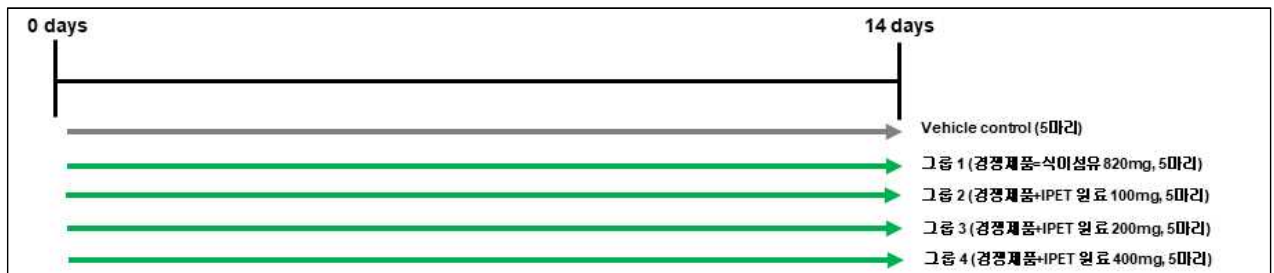


그림2.3.53. MTD 산출을 위한 동물실험 일정

- 마우스 부검을 수행하여 혈액을 채취하고, 간장, 신장, 비장, 대장을 적출하여 육안 관찰
- 다양한 혈액 생화학 검사를 수행하였으나 그룹 간 차이가 없었음

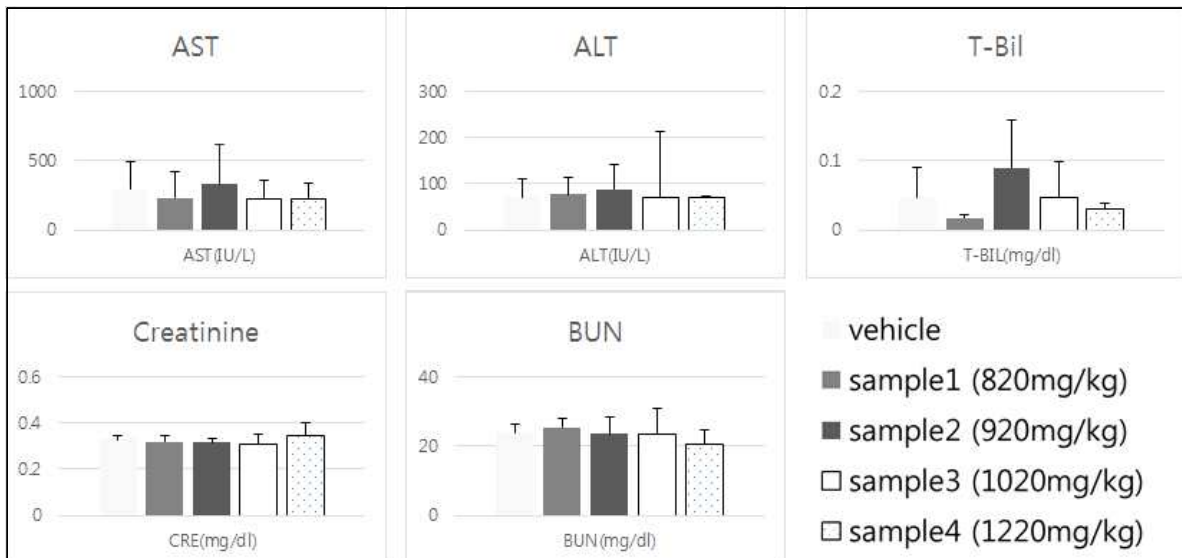


그림2.3.54. MTD 실험 마우스의 혈액을 이용한 생화학 검사

- 혈구세포 검사결과 각 그룹 간 차이가 없었음

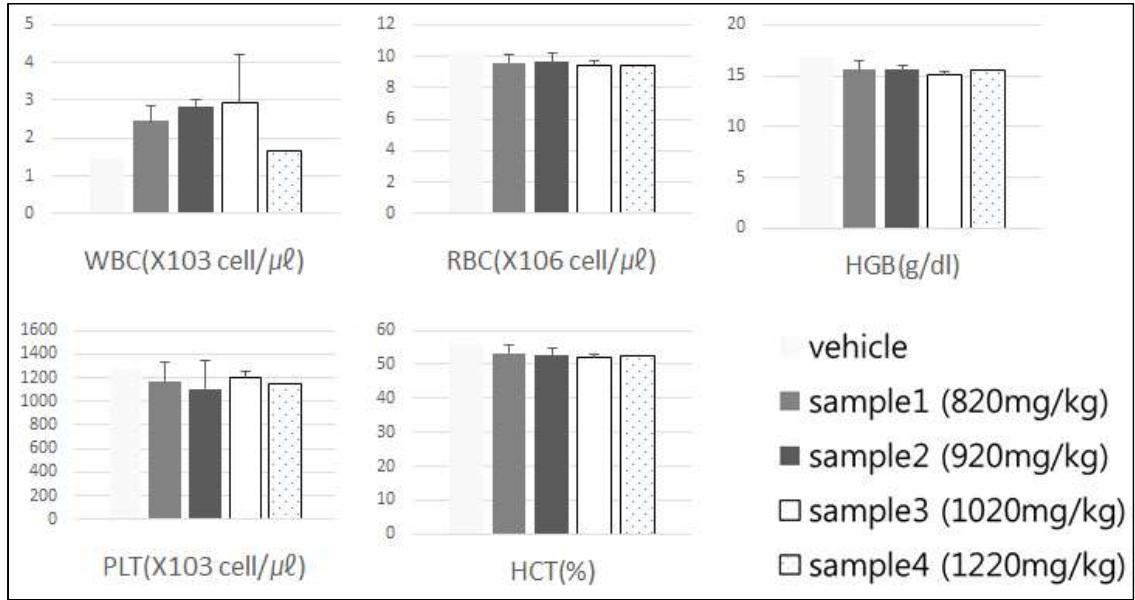


그림2.3.55. MTD 실험 마우스의 혈액을 이용한 혈구검사

- 슬라이드 제작 후 H&E 염색하여 현미경하에서 관찰하여 조직학적 이상 확인 결과 아무런 이상이 없었음 (정상이어서 사진 첨부 안함)

나. 최적조합소재와 경쟁제품의 효능 비교

- MTD 산출 실험에서 2가지 농도를 선택하여 경쟁제품과의 효능을 비교하였음

| Vehicle | DSS | 그룹1 | 그룹3 | 그룹4 |
|---------|---------|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 정상 대조군 | 대장염 대조군 | 대장염 + 경쟁제품 | 대장염 + 최적조합소재 (IPET 원료 200 mg) | 대장염 + 최적조합소재 (IPET 원료 400 mg) |

그림2.3.56. 경쟁제품과의 효능 비교를 위한 동물실험 그룹

- C57BL/6 마우스를 도입하여 1주 순화 후 경쟁제품 또는 최적조합소재를 2주간 투여하였음
- 종료 1주일 전 3% DSS 음용수 공급

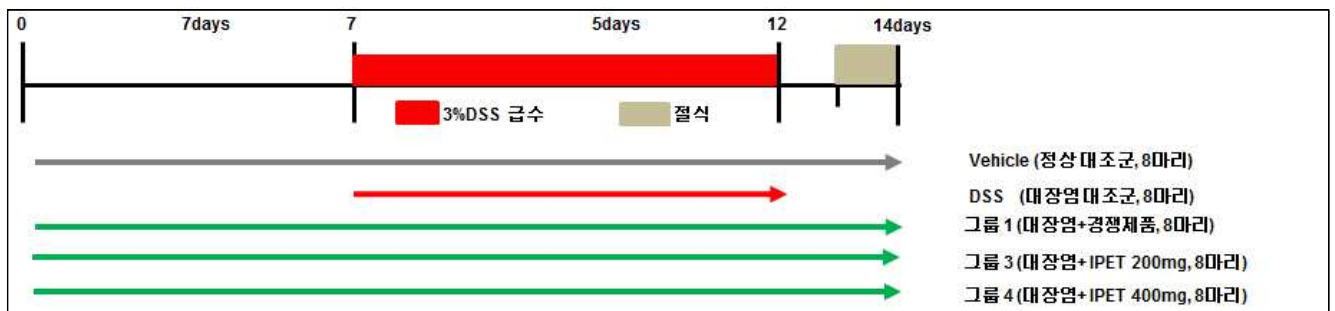


그림2.3.57. 대장염 완화효과 확인을 위한 마우스 실험 일정

- 부검 전 절식과정에서 마우스 분변을 확인하여 Disease activity index (DAI)를 산출하였음

| Score | Diarrheal stool score | Bloody stool score |
|-------|-----------------------|----------------------|
| 0 | Normal stool | Normal colored stool |
| 1 | Mildly soft stool | Brown stool |
| 2 | Very soft stool | Reddish stool |
| 3 | Watery stool | Bloody stool |

The sum of the scores of two parameters was defined as the DAI score.

그림2.3.58. DAI 산출 기준표

- 측정결과 대장염 유도에 의해 증가된 DAI 수치는 그룹 1과 3에서만 유의성 있게 증가하였음

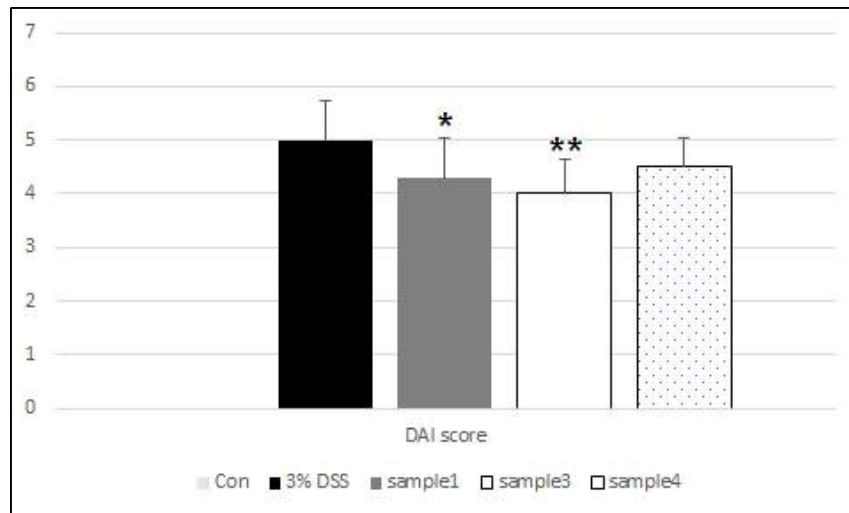


그림2.3.59. 실험에 사용된 마우스의 분변관찰 후 DAI 산출 결과

- 마우스를 부검하여 대장을 적출하고 길이를 측정한 결과 그룹 4에서만 대장염 대조군에 비해 결과 유의성 있게 장 길이가 회복되었음

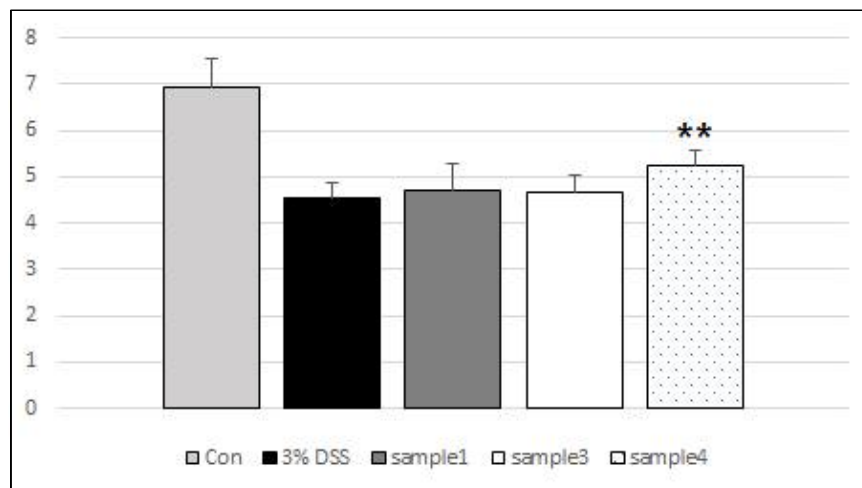


그림2.3.60. DSS 유도 대장염 마우스모델의 부검 후 대장 길이 측정

다. 확립된 대장염 모델에서 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인

- 대장염 유도시 간손상이 유발됨을 확인하였고 이러한 간 손상이 최적조합소재 저용량 (그룹3)처리에 의해 회복됨을 확인하였음 (혈청에서 AST 측정 결과)

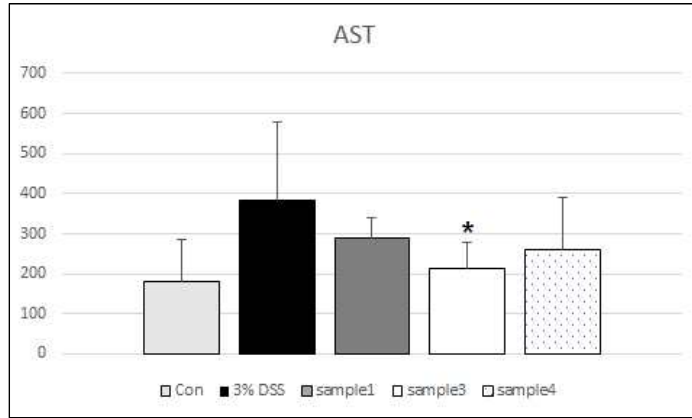


그림2.3.61. 마우스 혈청에서 AST 측정 결과

- 대장염 유도모델에서 각 그룹 마우스들의 대장 조직 표본을 제작하여 H&E 염색 후 조직학적 분석을 수행하였음
- 3% DSS만 처리한 그룹의 마우스 대장은 조직학적 구조가 파괴되고 염증세포들의 침윤 및 그에 따른 부종이 관찰되었음
- 이러한 대장조직의 손상은 3% DSS만 처리한 그룹에 비해 경쟁제품 (그룹1), 최적조합소재 저용량 그룹 (그룹3), 그리고 최적조합소재 고용량 (그룹4) 그룹 모두에서 통계적으로 유의성 있게 회복되었으나 그룹1에 비해 그룹3 또는 그룹4가 더욱 효과적인 회복을 유도하지는 않았음
- 회복이 된 대부분의 대장에서는 조직학적 구조의 파괴가 덜 일어나고 염증세포 침윤 및 부종이 완화된 것을 확인하였음

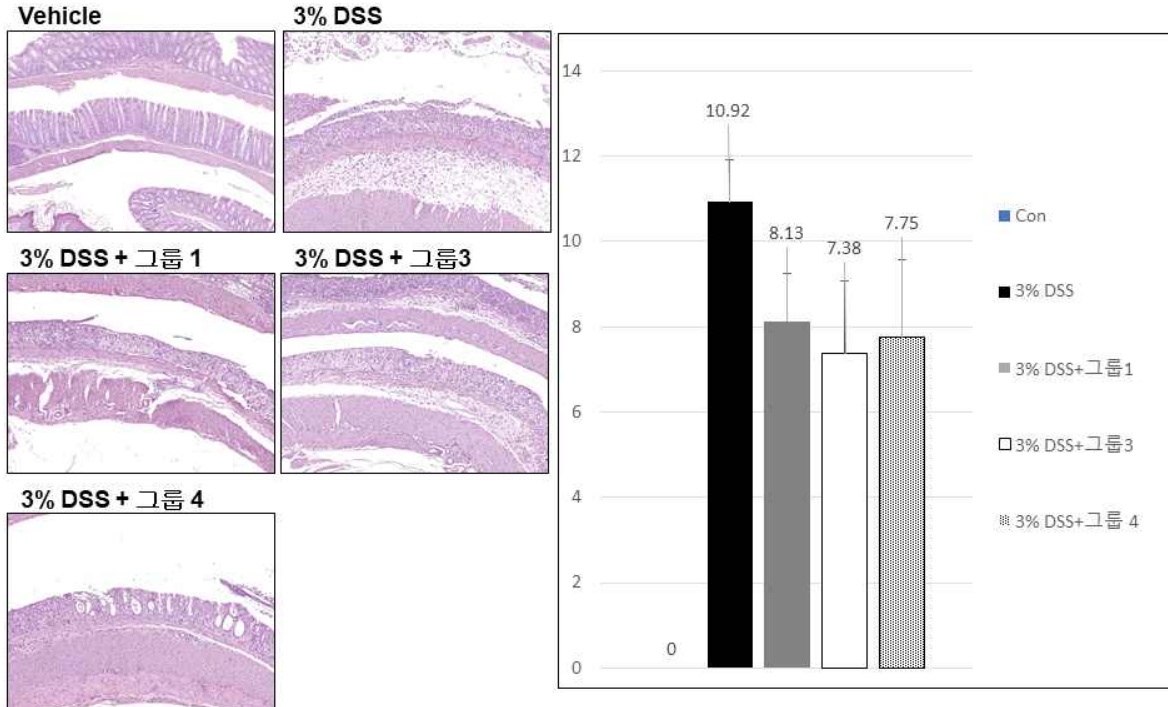


그림2.3.62. 대장조직 사진 (왼쪽)과 대장염 조직에 대한 병리학적 지표결과 (오른쪽)

라. 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석

- 3% DSS 을 이용한 마우스 대장염 모델에서 부검 시 대장 말단의 약 1 cm 조직을 적출하여 RNA를 추출하였으며 염증 cytokine의 RNA 발현 차이를 RT-PCR을 통해 분석하였

- 음
- DSS에 의해 대장염 유도 시 대표적인 염증 유발 cytokine들인 IL-1 β , TNF α , iNOS의 발현이 증가하는 것을 확인하였음
 - 대장염에 의해 증가한 이러한 염증관련 cytokine의 발현은 그룹4에서 특이적으로 IL-1 β 가 현저하게 감소됨을 확인하였음

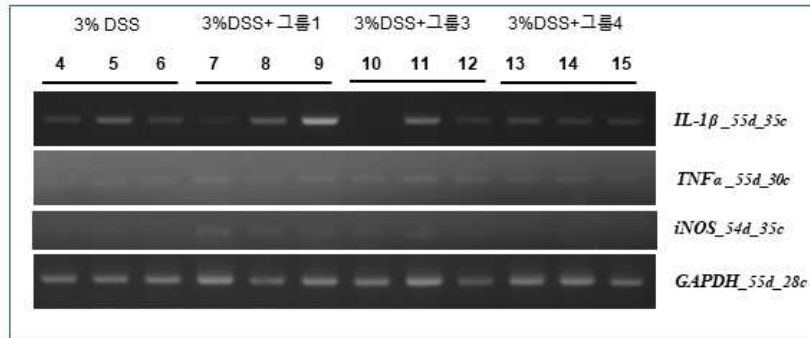


그림2.3.63. 동물실험 후 대장조직에서 RNA 추출 후 RT-PCR 결과

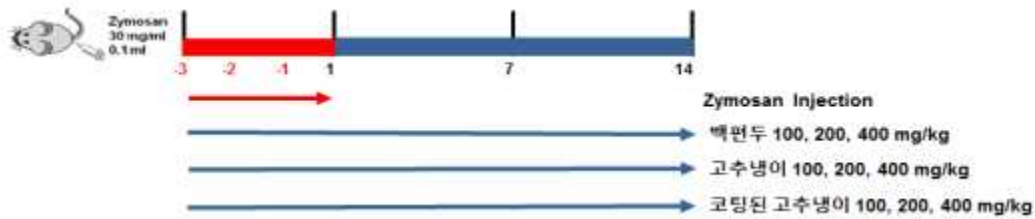
4절 [제3협동연구] 과민성장증후군 동물모델을 이용한 효능 평가 연구 Efficacy studies using animal models for irritable bowel syndrome

1. IBS 동물모델 구축

◎ IBS 동물모델을 이용한 효능평가

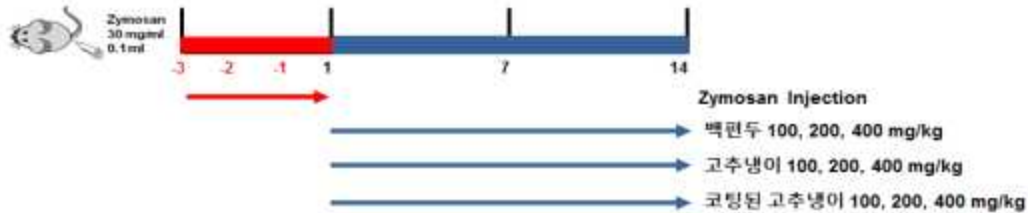
가. 몸무게 변화 및 식이량 측정

C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 Zymosan을 주입하면서 동시에 17일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 효능을 평가하였다.



나. Visceral pain related behaviors, 항우울작용, 대장의 조직학적 검사

C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 Zymosan을 주입한 후 14일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 효능을 평가하였다.



다. 용량 연구 결과

1차년도에서 12개의 후보물질 중 IBS 동물모델에서 유의적인 결과를 나타낸 백편두와 고추냉이에 대해 용량을 100, 200, 400 mg/kg으로 설정하고 실험을 진행 하였다. 또한 코팅된 고추냉이에 대해 용량을 25, 50, 100 mg/kg으로 설정하고 코팅되지 않은 고추냉이 추출물 (100 mg/kg) 과 비교실험을 진행 하였다.

2. IBS 동물모델을 이용한 효능연구

가. 백편두 (DL)

Zymosan을 대장내로 3일간 주사하여 IBS를 유발한 생쥐에 백편두 (DL)을 100, 200, 400 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였고, amitriptyline (30 mg/kg) 과 sulfasalazine (30 mg/kg) 을 양성대조군으로 사용하였다.

(1) 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

- 방법 : Zymosan을 주사한 날로부터 매일 시료를 경구 투여 하였으며, 17일까지 몸무게를 측정하였다.
- 결과 : 개체군 간의 식이량의 변화 없이 정상군에 비해 대조군에서 몸무게가 감소하였으

며, 4일과 7일째 대조군에 비하여 DL 투여군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타났다.

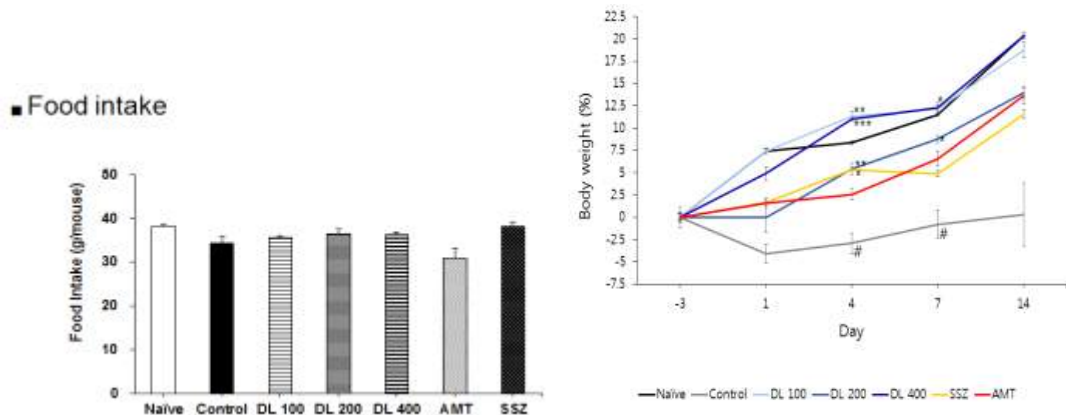


그림2.4.1. 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

(2) 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석

- 방법 : 생쥐를 투명 아크릴로 만든 관찰 박스 (18 × 13 × 15 cm)의 중앙에 놓은 후 10분 동안 자발적으로 나타나는 내장통증 행동의 횟수를 측정하였다. 본격적인 실험에 앞서 매일 10분씩 5일간 관찰 박스에 넣어 환경에 적응시켰다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 visceral pain behavior를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 visceral pain behavior를 관찰하였다. 내장통증에 의한 행동(visceral pain behavior)에는 털을 고르는 행위 없이 복부를 핥는 행동, 전신을 스트레치 하는 행동, 배를 바닥에 대고 엎드리는 행동, 복부를 잡아당겨 1-2초 동안 등을 구부리는 행동 등이 있다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상 기록하여 이후 실험군을 모르는 관찰자에게 보여주어 내장통증 행동 횟수를 측정하였다.
- 결과 : visceral pain은 대조군 (control)에서 1일과 14일째에서는 유의적인 변화가 없었으며, 7일째 양성 대조군 (positive control) 그룹에서 대조군에 비하여 유의적인 감소 효과를 보였고, DL그룹 모두 통증관련 행동의 횟수가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

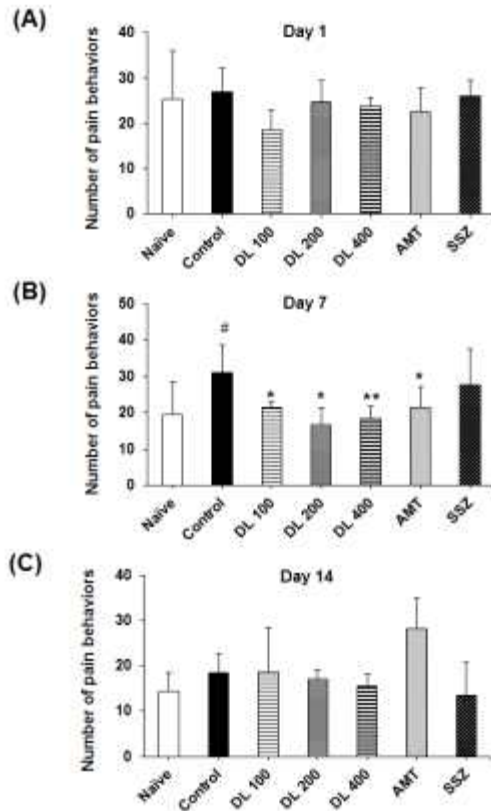


그림2.4.2. 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석

(3) 항불안 및 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

○ 방법 :

▶open field test

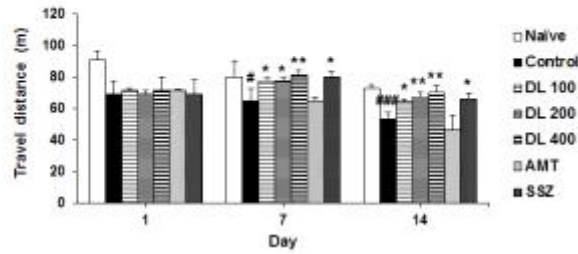
생쥐를 아크릴로 만든 관찰 박스 (30cm × 30cm)의 중앙에 놓은 후 30분 동안 상자 안에서의 이동거리를 관찰하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 open field test를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 open field test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

▶plus maze test

생쥐를 아크릴로 만든 십자미로 (50cm × 5cm × 15cm)의 중앙에 놓은 후 5분 동안 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수를 숫자로 분석하고 열려있는 방향에서의 머문 시간을 퍼센트로 분석하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 plus maze test를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 plus maze test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

○ 결과 : open field 실험에서는 총 이동거리를 분석한 결과 7일과 14일째 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였고, DL 그룹 모두 유의적인 효과를 보였다. 십자미로 실험에서는 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수와 열려있는 방향에서의 머문 시간 모두 7일과 14일째 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였고, DL 200과 400 그룹에서도 유의적인 증가 효과를 보였다.

■ Open field test



■ Plus maze

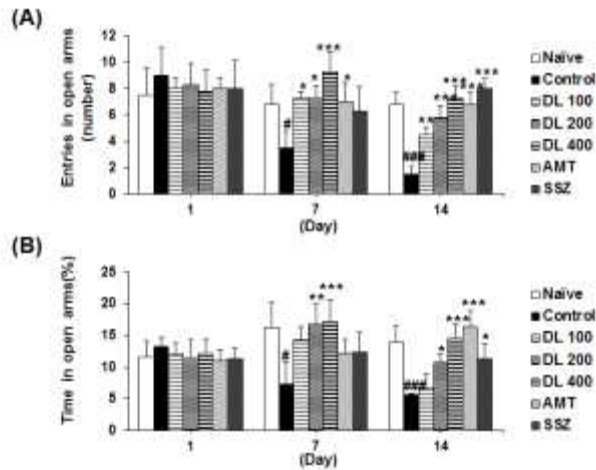


그림2.4.3. 항불안 및 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

(4) 대장의 조직학적 검사

- 방법 : 실험 종료 후 대장을 절단하고 swiss roll을 만들어 Formalin에 고정시킨 뒤 4 μm의 절편 슬라이드를 만들어 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 뒤 밝은 현미경(x200)으로 관찰하였다.
- 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 면역염색을 한 결과 control 그룹에 비하여 positive control (amitriptyline and sulfasalazine) 및 DL (100, 200, 400 mg/kg) 그룹에서 염증성 세포와 비만세포가 감소한 것을 확인하였다.

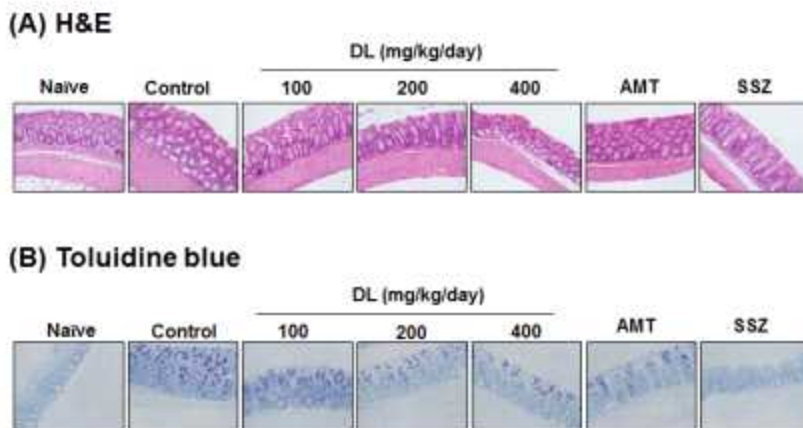


그림2.4.4. 대장의 조직학적 검사

(5) 생쥐의 플라즈마에서 TNF-α 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 혈액을 얻어 플라즈마의 TNF- α 를 ELISA 방법으로 측정하였다.
- 결과 : 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α , 또는 TNF)는 염증 반응에 포함되고 급성 기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 사이토카인이다. TNF의 비정상적인 조절은 알츠하이머, 암, 우울증, 그리고 염증성 장질환 (IBD) 등의 질병에서 나타난다. Zymosan으로 IBS가 유발된 생쥐의 플라즈마에서 TNF- α 를 측정한 결과, Control군에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 이에 비해 양성대조군과 DL 모든 그룹에서 크게 감소한 것을 확인하였다.

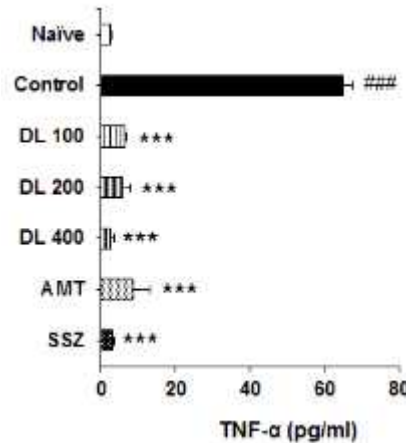


그림2.4.5. 생쥐의 플라즈마에서 TNF- α 측정

나. 고추냉이 (WK)

Zymosan을 대장내로 3일간 주사하여 IBS를 유발한 생쥐에 고추냉이 (WK)을 100, 200, 400 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였고, amitriptyline (30 mg/kg) 과 sulfasalazine (30 mg/kg) 을 양성 대조군으로 사용하였다.

- (1) Food intake 측정 - 개체군 간에 식이량에 유의적인 변화는 없었다.

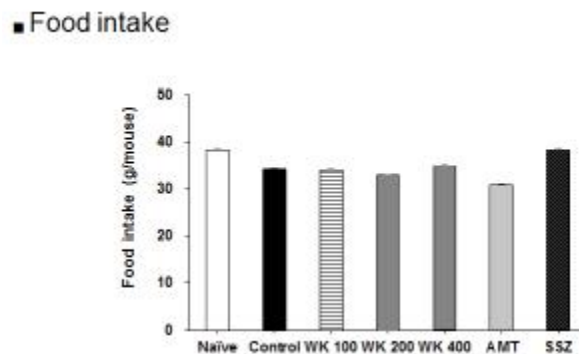


그림2.4.6. Food intake 측정

- (2) 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석

- 방법 : 생쥐를 투명 아크릴로 만든 관찰 박스 (18 × 13 × 15 cm)의 중앙에 놓은 후 10분 동안 자발적으로 나타나는 내장통증 행동의 횟수를 측정하였다. 본격적인 실험에 앞서 매일 10분씩 5일간 관찰 박스에 넣어 환경에 적응시켰다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 visceral pain behavior를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 visceral pain behavior를 관찰하였다. 내장통증에 의한 행동(visceral pain behavior)에는 털을 고르는 행위 없이 복부를 핥는

행동, 전신을 스트레치 하는 행동, 배를 바닥에 대고 엎드리는 행동, 복부를 잡아 당겨 1-2초 동안 등을 구부리는 행동 등이 있다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상 기록하여 이후 실험군을 모르는 관찰자에게 보여주어 내장통증 행동 횟수를 측정하였다.

- 결과 : visceral pain은 대조군 (control)에서 1일과 14일째에서는 유의적인 변화가 없었으며, 7일째 양성 대조군 (positive control) 그룹에서 대조군에 비하여 유의적인 감소 효과를 보였고, WK 200과 400 mg/kg 그룹에서 통증관련 행동의 횟수가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

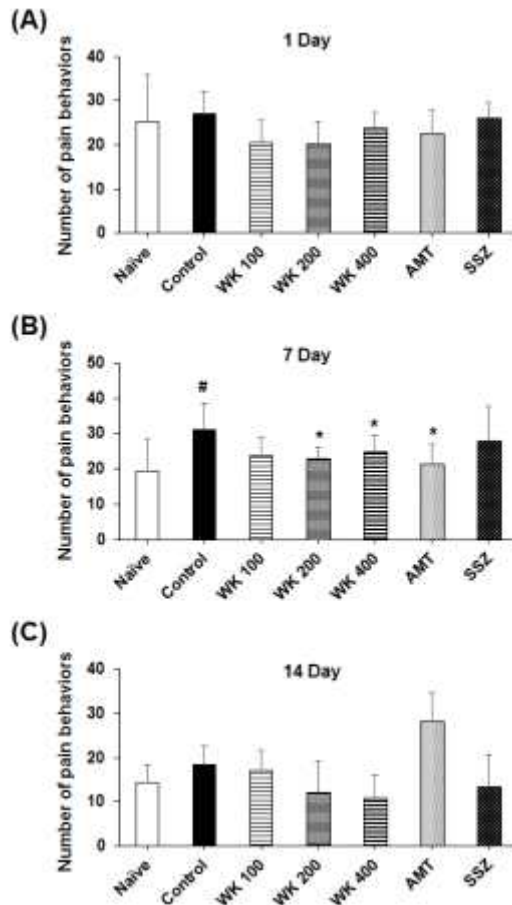


그림2.4.7. 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석

(3) 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

- 방법 :

▶open field test

생쥐를 아크릴로 만든 관찰 박스 (30 cm × 30 cm)의 중앙에 놓은 후 30분 동안 상자 안에서의 이동거리를 관찰하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 open field test를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 open field test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

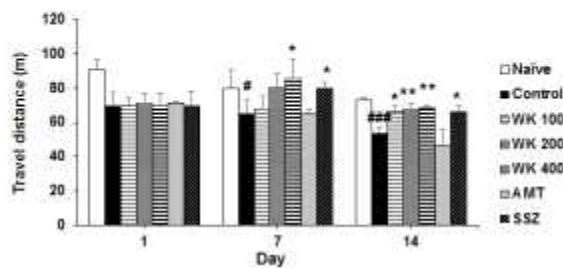
▶plus maze test

생쥐를 아크릴로 만든 십자미로 (50cm × 5cm × 15cm)의 중앙에 놓은 후 5분 동안 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수를 숫자로 분석하고 열려있는 방향에서의 머문 시간을 퍼센트로 분석하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 plus maze test를

관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 plus maze test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

- 결과 : open field 실험에서는 총 이동거리를 분석한 결과 14일째 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 효과를 보였고, WK 그룹 모두 유의적인 증가 효과를 보였다. 십자미로 실험에서는 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수와 열려있는 방향에서의 머문 시간 모두 7일과 14일째 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였고, WK 200과 400 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였다.

■ Open field test – Travel Distance



■ Plus maze

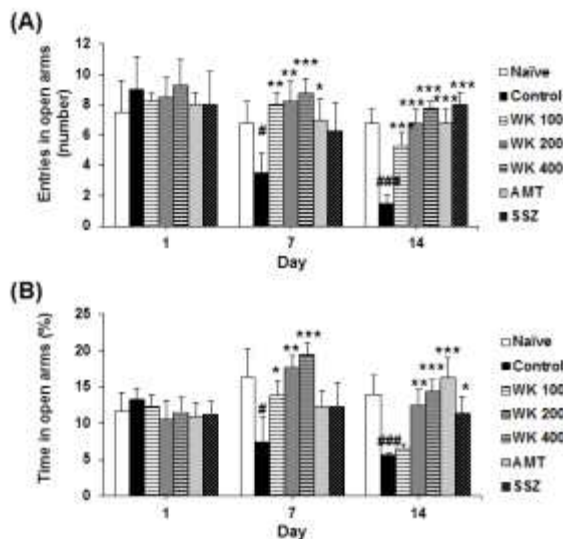


그림2.4.8. 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

(4) 대장의 조직학적 검사

- 방법 : 실험 종료 후 대장을 절단하고 swiss roll을 만들어 Formalin에 고정시킨 뒤 4 μm의 절편 슬라이드를 만들어 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 뒤 밝은 현미경(x200)으로 관찰하였다.
- 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 면역염색을 한 결과 control 그룹에 비하여 positive control (amitriptyline and sulfasalazine) 및 WK (100, 200, 400) 그룹에서 염증성 세포 및 비만세포가 감소한 것을 확인하였다.

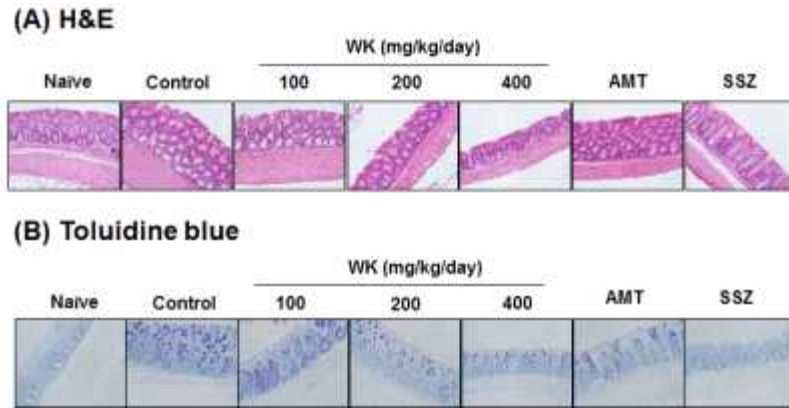


그림2.4.9. 대장의 조직학적 검사

(5) 생쥐의 플라즈마에서 TNF- α 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 혈액을 얻어 플라즈마의 TNF- α 를 ELISA 방법으로 측정하였다.
- 결과 : 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α , 또는 TNF)는 염증반응에 포함되고 급성 기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 사이토카인이다. TNF의 비정상적인 조절은 알츠하이머, 암, 우울증, 그리고 염증성 장질환(IBD)등의 질병에서 나타난다. Zymosan으로 IBS가 유발된 생쥐의 플라즈마에서 TNF- α 를 측정한 결과, Control군에서 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 이에 비해 양성대조군과 WK 모든 그룹에서 크게 감소한 것으로 나타났다.

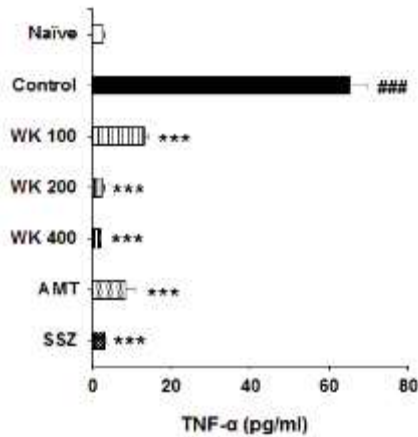


그림2.4.10. 생쥐의 플라즈마에서 TNF- α 측정

다. 코팅된 고추냉이

Zymosan으로 IBS가 유발된 생쥐에 코팅된 고추냉이(CW)를 25, 50, 100 mg/kg의 용량으로 실험하였고, 코팅되지 않은 고추냉이(UCW)는 100 mg/kg으로 실험하였으며, amitriptyline과 sulfasalazine을 양성 대조군으로 실험하였다.

(1) 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

- 방법 : Zymosan을 주사한 날로부터 매일 시료를 경구 투여 하였으며, 17일까지 몸무게를 측정하였다.
- 결과 : 개체군 간의 식이량의 변화 없이 정상군에 비해 대조군에서 몸무게가 감소하였으며, 1일과 4일, 14일째 대조군에 비하여 CW 투여군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타났다.

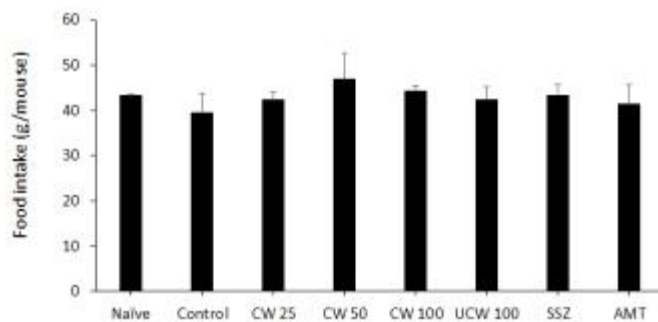
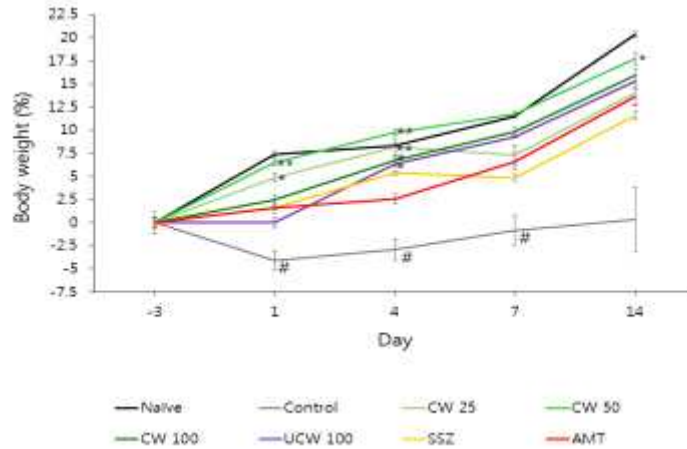


그림2.4.11. 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

(2) 항불안 및 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

○ 방법 :

▶open field test

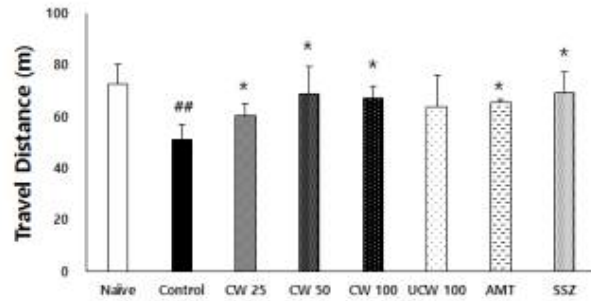
생쥐를 아크릴로 만든 관찰 박스 (30cm × 30cm)의 중앙에 놓은 후 30분 동안 상자 안에서의 이동거리를 관찰하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 open field test를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 open field test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

▶plus maze test

생쥐를 아크릴로 만든 십자미로 (50cm × 5cm × 15cm)의 중앙에 놓은 후 5분 동안 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수를 숫자로 분석하고 열려있는 방향에서의 머문 시간을 퍼센트로 분석하였다. zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 plus maze test를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 plus maze test를 관찰하였다. 관찰과 동시에 웹캠을 이용해 동영상을 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.

○ 결과 : open field 실험에서는 총 이동거리를 분석한 결과, 14일째 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였고, CW 모든 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였다. 십자미로 실험에서는 14일째 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수와 열려있는 방향에서의 머문 시간 모두 control 그룹에 비하여 positive control 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였고, CW 50, 100 (mg/kg)그룹과 UCW 그룹에서 유의적인 증가 효과를 보였다.

■ Open field test



■ Plus maze

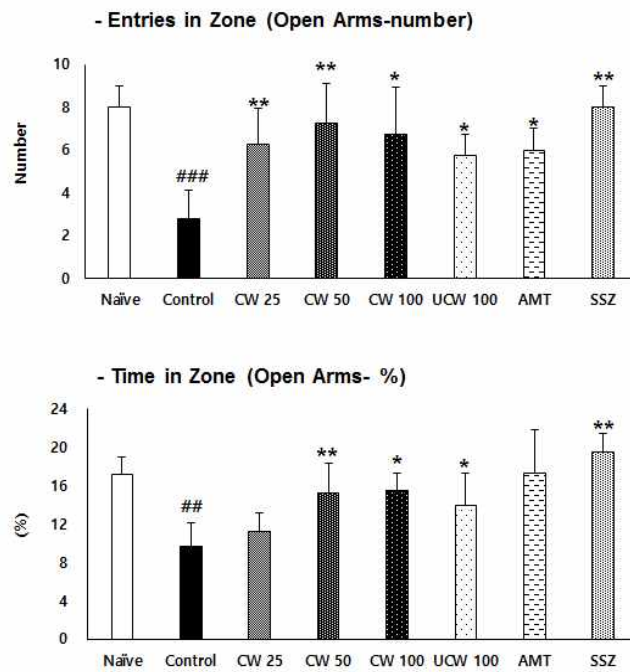


그림2.4.12. 항불안 및 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

(3) 대장의 조직학적 검사

- 방법 : 실험 종료 후 대장을 절단하고 swiss roll을 만들어 Formalin에 고정시킨 뒤 4 μm 의 절편 슬라이드를 만들어 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 toluidine blue 염색을 실시한 뒤 밝은 현미경(x200)으로 관찰하였다.
- 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 면역염색을 한 결과 control 그룹에 비하여 positive control (amitriptyline and sulfasalazine) 및 CW (25, 50, 100 mg/kg), UCW (100 mg/kg) 그룹에서 염증성 세포 및 비만세포가 감소한 것을 확인하였다.

■ Histologic examination

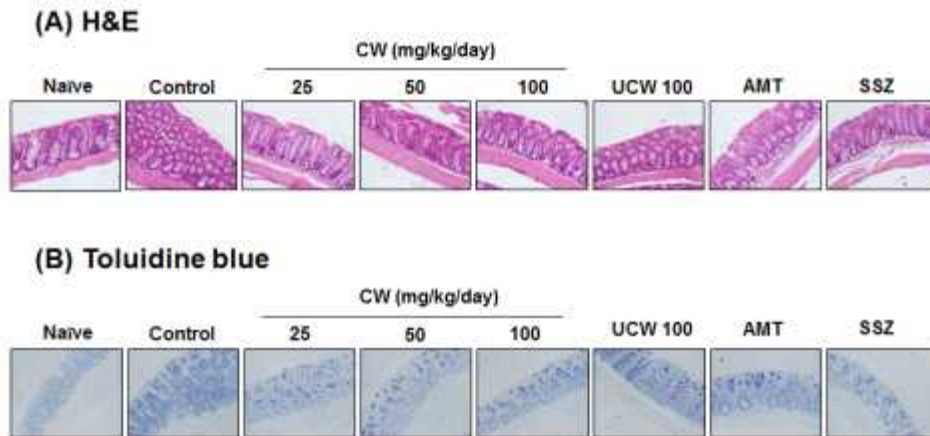


그림2.4.13. 대장의 조직학적 검사

(4) 장운동성 (GI transit) 및 fecal number 측정

○ 방법: 교토랫(250-350g) 수컷을 사용하여 절편을 제작함.

Krebs 용액이 담긴 넓은 초자용기에서 위유문동 (antrum), 회장(ileum), 결장 (colon)의 점막을 제거한 후 윤상근방향으로 2x5 mm의 크기 절편을 만든다. 절편의 한쪽은 10 ml 용량의 organ bath 안에 있는 tissue holder에 고정시키고, 다른 쪽은 고리를 만들어 등척성근수축변환기(Grass, FT-03)에 연결하여 0.5 g의 기본 장력을 가한다. 약물투여는 1시간동안의 안정화기간이 지난 후 실시하며, 안정화기간 동안 약 15분 간격으로 Krebs 용액을 교체해준다. 데이터의 기록과 저장은 데이터통합장치 Powerlab 4/22 (Adinstruments)와 소프트웨어인 Chart 7.02를 이용한다. 실험하는 동안 혼합가스(95% O₂+5%CO₂)를 주입시키고, bath 안의 온도를 37±0.5°C로 일정하게 유지시킨다.

영양액은 Krebs-bicarbonate buffer (composition in mM: 120 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 22 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, and 11.5 glucose oxygenated with 95% O₂ - 5% CO₂ ; pH 7.4)을 사용한다.

측정결과는 ANOVA test와 Newman-Keuls Multiple Comparison Test를하여 P<0.05인 경우 유의하다고 판정하였으며, 수치는 평균±표준오차로 표시하였다.

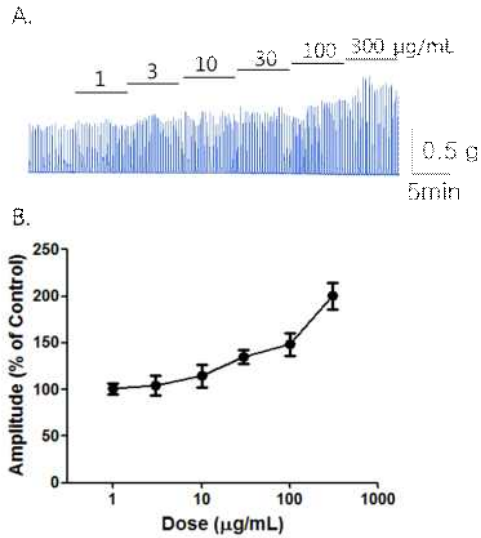


그림2.4.14. 위 유문동 절편의 자발적인 운동에 대한 백편두 추출물의 효능

○ 결과 : 백편두 추출물은 농도의존적으로 위 유문동의 자발적인 수축을 증가시켰다.

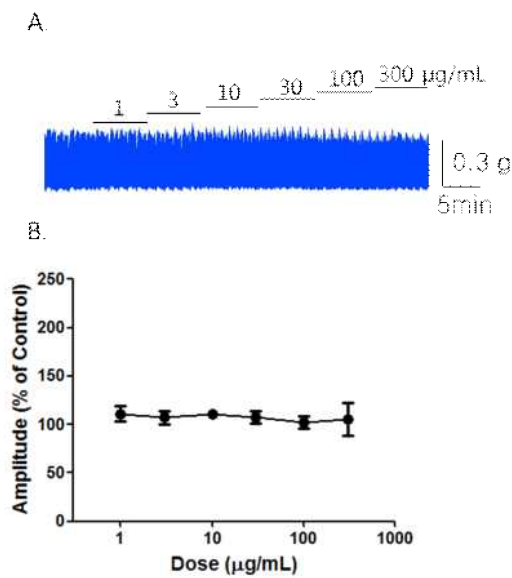


그림2.4.15. 소장의 자발적인 운동에 대한 백편두 추출물의 효능

○ 결과 : 백편두 추출물은 소장의 자발적인 운동에 대해서는 유의성 있는 영향을 주지 못하였다.

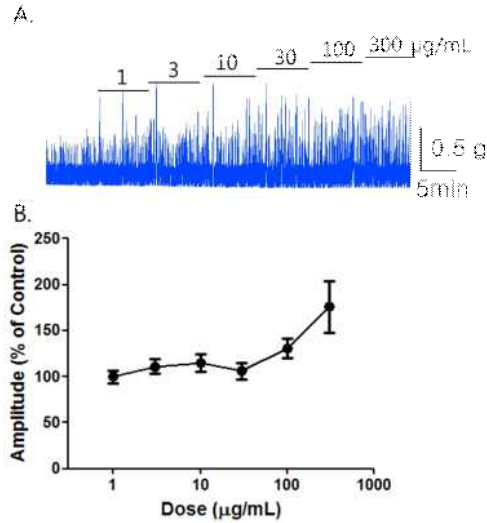
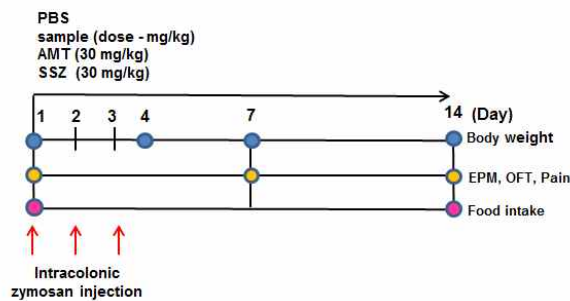


그림2.4.16. 결장의 자발적인 운동에 대한 백편두 추출물의 효능

- 결과 : 고농도 (100 µg/mL 이상)의백편두 추출물은 결장의 자발적인 운동을 유의성 있게 증가시켰다.
- 백편두 추출물은 위 유문동과 결장의 자발적인 운동을 증가시켰다.

[제3협동과제 과민성장증후군 동물모델을 이용한 효능 평가 연구 - 3차년도]

Experimental scheme : IBS mouse model



발아백편두, 고구마, 고구마+발아백편두 추출물의 최적 용량 및 효능을 평가하기 위해 1일부터 3일간 zymosan으로 과민성장증후군(IBS)을 유발함. 시료의 투여는 1일부터 14일 동안 매일 시행 되었으며 1일, 7일, 14일에는 불안/우울 관련 행동테스트를 시행함.

라. 발아백편두 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험

■ Body weight

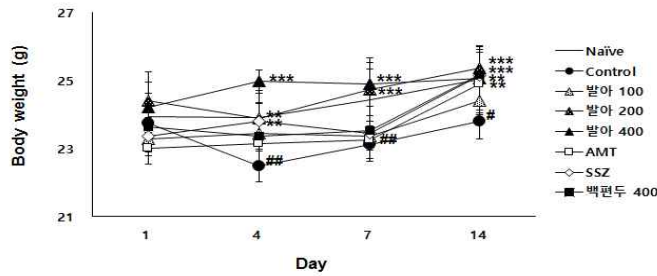
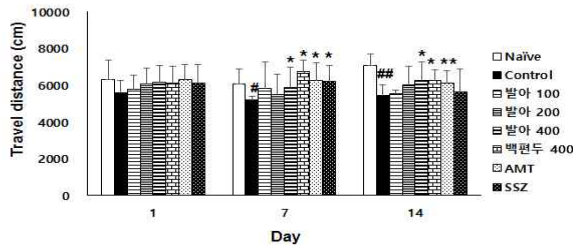


그림2.4.17. 체중 변화

- IBS를 유발한 생쥐에 발아백편두를 100, 200, 400 mg/kg/day로 구강 투여한 결과, 14일째 200, 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타남.

■ Open field test – Travel Distance



■ Plus maze

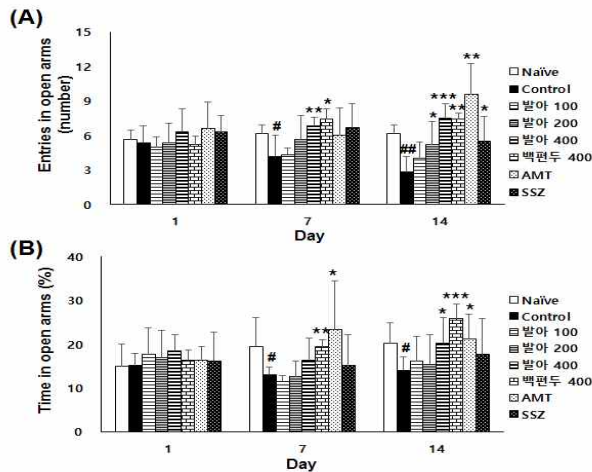


그림2.4.18. 항불안 및 항우울 작용 (open field test, plus maze test)

- 오픈필드실험 결과, 14일째 발아백편두 추출물 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.
- 십자미로실험 결과, 14일째 발아백편두 추출물 200, 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.

마. 고구마 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험

■ Body weight

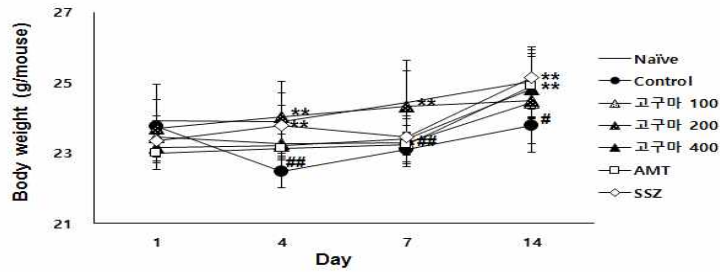


그림2.4.19. 체중변화

- IBS를 유발한 생쥐에 고구마 추출물을 100, 200, 400 mg/kg/day로 구강 투여한 결과, 4일과 7일째 200 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타남.

■ Plus maze

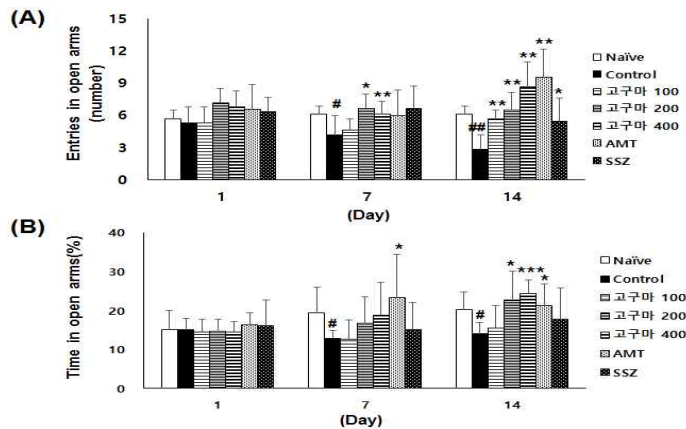


그림2.4.20. 항불안 및 항우울 작용 (plus maze test)

- 십자미로실험 결과, 14일째 고구마 추출물 200, 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.

■ Open field test – Travel Distance

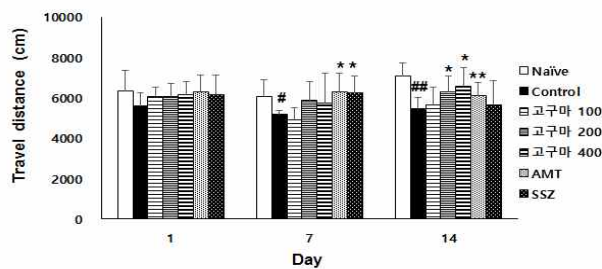


그림2.4.21. 항불안 및 항우울 작용 (open field test)

- 오픈필드실험 결과, 14일째 고구마 추출물 200, 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로

증가하는 것으로 나타남.
 바. 고구마+발아백편두 : IBS 동물모델을 이용한 용량확정실험
 ■ Body weight

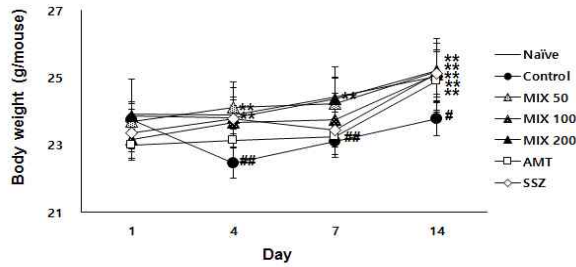


그림2.4.22. 체중 변화

- IBS를 유발한 생쥐에 고구마+발아백편두 추출물을 200+50, 200+100, 200+200 mg/kg/day로 구강 투여한 결과, 14일째 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타남.

■ Plus maze

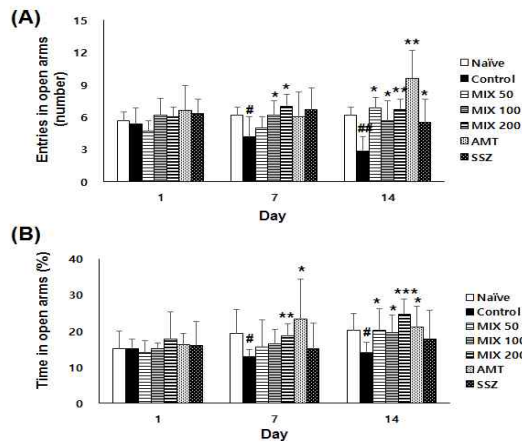


그림2.4.23. 항불안 및 항우울 작용 (plus maze test)

- 십자미로실험 결과, 14일째 고구마+발아백편두 추출물 200+50, 200+100, 200+200 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.

■ Open field test – Travel Distance

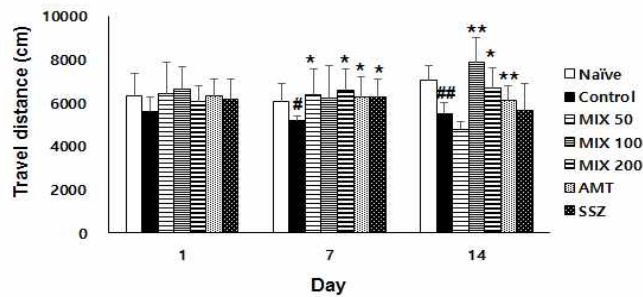
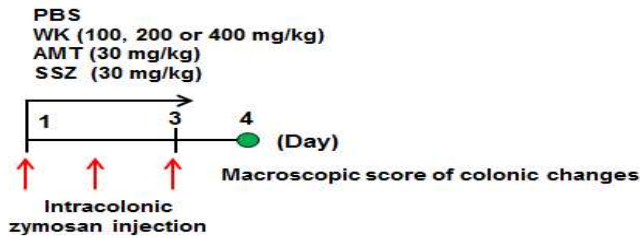


그림2.4.24. 항불안 및 항우울 작용 (open field test)

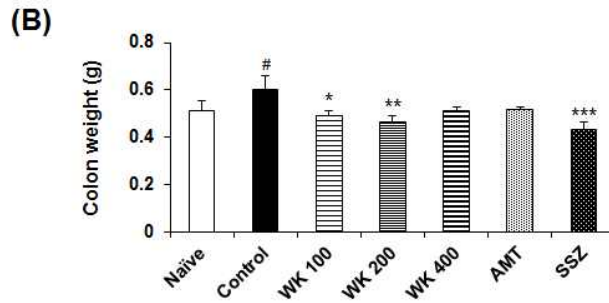
- 오픈필드실험 결과, 7일째 고구마+발아백편두 200+50, 200+200 mg/kg/day 추출물 투여군에서 유의적으로 이동거리가 증가하였고, 14일째 고구마+발아백편두 200+100, 200+200 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.

사. 고추냉이 : IBS 동물모델을 이용한 설사 개선 실험



- Macroscopic score를 측정하기 위하여 3일간 zymosan을 intracolonic 투여를 통해 과민성 장증후군을 유발함과 동시에 고추냉이 추출물을 투여하여 4일 째 되는 날, 장의 길이, 무게를 측정하고 변의 형태를 관찰함.

아. 고추냉이 추출물 투여 생쥐의 장/변 변화 측정



(C)

| Group | Length score | Weight score | Stool score | Macroscopic score |
|---------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Naive | 0.33 ± 0.58 | 0.33 ± 0.58 | 0.08 ± 0.10 | 0.75 ± 1.09 |
| Control | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 1.00 ^{##} | 1.67 ± 0.60 ^{###} | 4.67 ± 1.53 ^{###} |
| WK 100 | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.50 ± 0.60 ^{**} | 0.50 ± 0.43 ^{***} |
| WK 200 | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.42 ± 0.60 ^{**} | 0.42 ± 0.14 ^{***} |
| WK 400 | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.50 ± 0.60 ^{**} | 0.50 ± 0.25 ^{***} |
| AMT | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.50 ± 0.00 ^{**} | 0.50 ± 0.00 ^{***} |
| SSZ | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.00 ± 0.00 ^{**} | 0.58 ± 0.10 ^{**} | 0.58 ± 0.14 ^{***} |

그림2.4.25. 장 및 변의 가시적 변화 측정

- (A) 고추냉이 추출물을 경구 투여한 모든 대조군에서 장의 길이가 유의적으로 증가(회복) 되는 것으로 나타남. (B) 고추냉이 추출물 100, 200 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 장의 무게가 감소(회복)되는 것으로 나타남. (C) 변화된 장의 길이, 무게, 변의 변화를 점수화 하여 합산한 결과 고추냉이 추출물을 투여한 모든 대조군이 유의적인 점수를 획득함.

자. 고추냉이 : IBS 동물모델을 이용한 pain-relate behaviors 실험

고추냉이 추출물 투여 생쥐의 장내 통증 측정

- 인위적으로 복부 통증을 일으킨 후 통증에 관련된 행동을 취하는 횟수를 측정함. (A) 1, (B) 7, (C) 14일. 투여 7일 째에는 대조군에서 통증 관련 행동을 취하는 횟수가 유의적으로 증가하였고, 고추냉이 추출물을 200, 400 mg/kg/day 투여군에서 유의적으로 횟수가 감소한 것을 확인함.

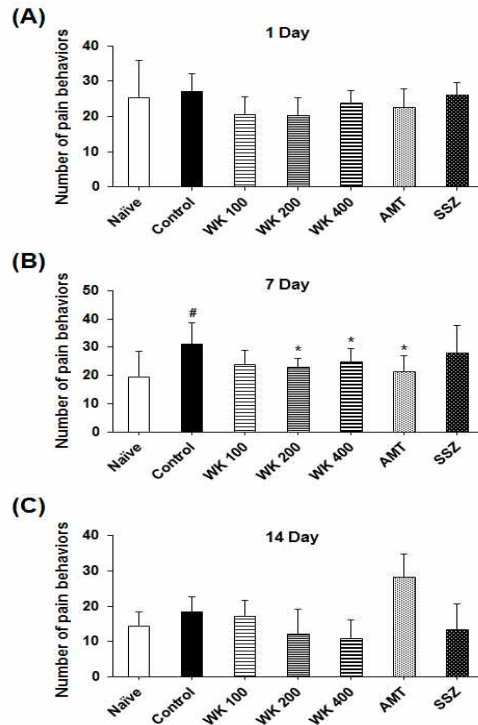


그림2.4.26. 장내통증관련 행동 측정

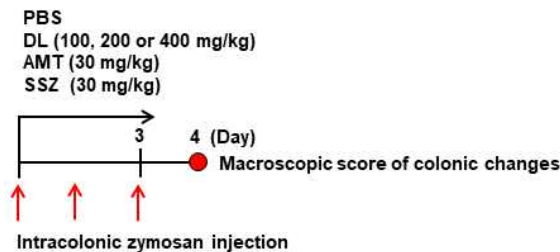
3. [4차년도] IBS 동물모델을 이용한 작용기전 연구 : 백편두

◎ Zymosan 유도 과민성장증후군 생쥐 모델에서의 백편두 추출물 투여의 효능평가 일정

Zymosan을 대장내로 3일간 주사하여 IBS를 유발한 생쥐에 백편두(DL)을 100, 200, 400 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였고, amitriptyline (30 mg/kg) 과 sulfasalazine (30 mg/kg) 을 양성대조군으로 사용하였다.

가. 장의 가시적 형태 변화 평가

- 방법 : C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 zymosan을 주입하면서 동시에 3일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 효능을 평가하였다.



3일 동안 매일 항문을 통해 zymosan을 주입하면서 동시에 3일 동안 매일 약물을 구강 투여 후 4일 째 장을 적출하여 장의 길이, 무게, 변의 형태 등을 관찰하였다. 길이의 경우 과민성장증후군이 유발 되었을 때 길이가 감소하며, 무게의 경우 증가한다. 이를 정상군에 대하여 변화량을 점수화 시켜 나타내었다

(Kimball et al., 2005). 변의 형태적 변화 (stool score)의 경우 실험에 참여하지 않은 임의의 구성원으로부터 bristol stool scale을 이용한 blind test (맹검 검사)를 실시하였다.

- 결과 : 장 길이 비교의 경우 정상군에 비해 대조군에서 감소한 것으로 나타났으며, 백편두 추출물을 투여한 모든 군에서 유의하게 정상군에 가깝게 회복된 것을 확인하였다. 무게의 경우 정상군에 비해 대조군에서 증가한 것으로 나타났으며, 백편두 추출물 200 mg/kg을 투여한 군에서 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 변의 형태적 변화는 정상군에 비해 대조군에서 설사에 우세한 점수를 획득하였다.

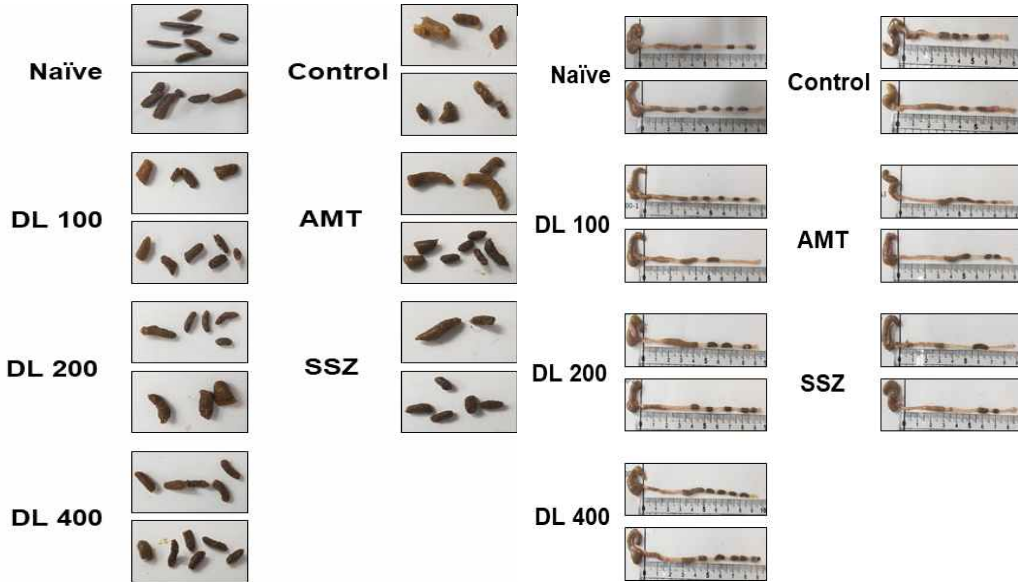


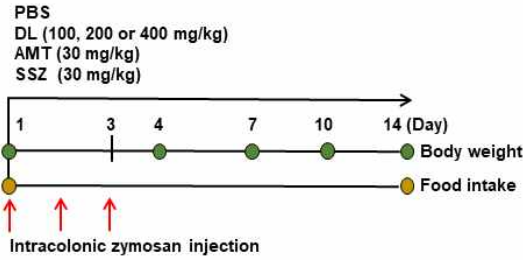
그림2.4.27. 장 및 변의 형태적 변화

표2.4.1. 장 및 변의 형태적 변화 점수

| | Length score | Weight score | Stool score | Macroscopic score |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Naïve | 0.20±0.40 | 0.00±0.00 | 0.60±0.58 | 0.80±0.86 |
| Control | 1.40±0.50 ^{###} | 3.25±0.50 ^{###} | 2.95±0.84 ^{###} | 6.95±1.72 ^{###} |
| DL 100 | 0.00±0.00 ^{***} | 1.25±0.96 | 1.30±0.69 ^{**} | 2.30±1.58 ^{***} |
| DL 200 | 0.00±0.00 ^{***} | 1.00±0.82 [*] | 1.00±0.50 ^{**} | 1.80±1.04 ^{***} |
| DL 400 | 0.00±0.00 ^{***} | 1.25±0.96 | 1.25±0.73 ^{**} | 2.25±1.24 ^{***} |
| AMT | 0.00±0.00 ^{***} | 2.25±0.96 | 1.45±0.82 [*] | 3.25±1.79 ^{**} |
| SSZ | 0.40±0.50 ^{**} | 1.00±0.82 [*] | 1.45±0.41 [*] | 2.65±1.42 ^{***} |

나. 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

- 방법 : C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 zymosan을 주입하면서 동시에 14일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 몸무게를 측정하였다.



○ 결과 : 개체군 간의 식이 섭취량의 변화 없이 정상군에 비해 대조군에서 몸무게가 감소 하였으며, 4일과 7일째 대조군에 비하여 백편두 추출물을 투여한 군에서 유의적으로 몸무게가 증가하는 것으로 나타났다.

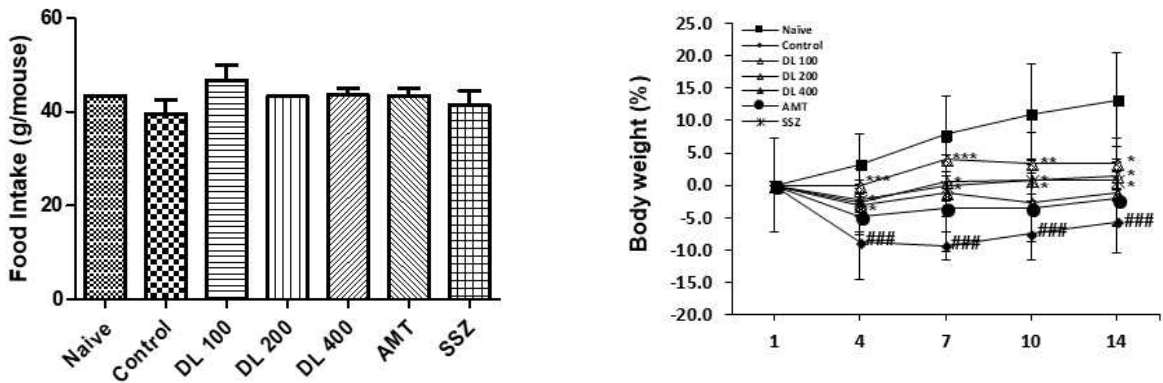


그림2.4.28. 몸무게 변화 및 식이 섭취량 측정

다. 대장 조직에서의 염증성 사이토카인 측정

○ 방법 : Zymosan으로 과민성장증후군을 3일간 유발한 뒤 4일 및 14일 째 실험 종료 후 대장조직을 적출하여 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 측정하였다.

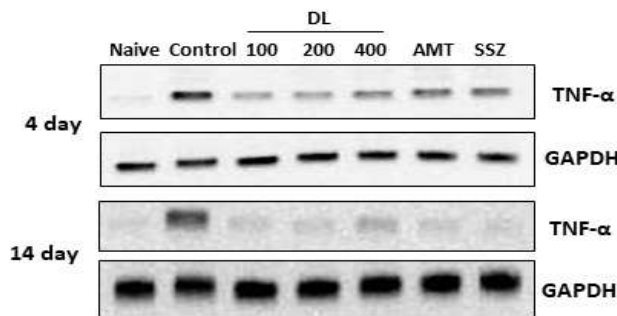


그림2.4.29. 대장 조직에서의 TNF- α 측정

○ 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 PCR 한 결과 대조군에 비하여 백편두 추출물 100, 200, 400 mg/kg를 투여한 군에서 TNF- α 수준이 감소한 것을 확인 하였다.

라. 대장의 조직학적 검사

○ 방법 : 실험 종료 후 대장을 절단하고 swiss roll을 만들어 Formalin에 고정시킨 뒤 4 μ m의 절편 슬라이드를 만들어 hematoxylin and eosin (H&E) 염색과 toluidine

blue 염색을 실시한 뒤 현미경 (x200)으로 관찰하였다.

- 결과 : IBS가 유발된 생쥐에서 대장을 적출하여 면역염색을 한 결과 control 그룹에 비하여 positive control (amitriptyline and sulfasalazine) 및 DL (100, 200, 400 mg/kg) 그룹에서 염증성 세포와 비만세포가 감소한 것을 확인하였다.

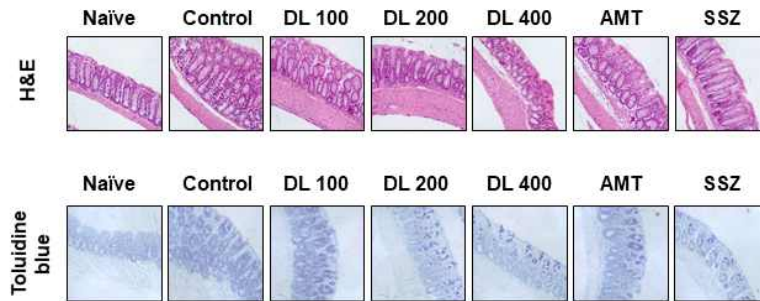
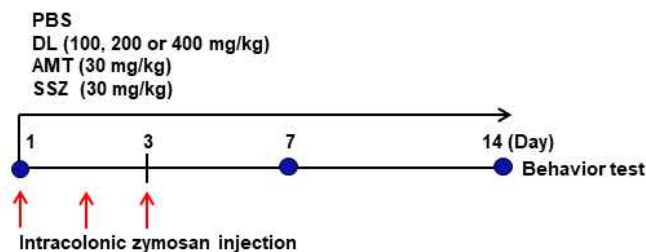


그림2.4.30. 대장의 조직학적 검사

마. 내장통증관련 행동 (visceral pain related behaviors) 분석

- 방법 : C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 zymosan을 주입한 후 14일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 효능을 평가하였다.



생쥐를 투명 아크릴로 만든 관찰 박스 (18 × 13 × 15 cm)의 중앙에 놓은 후 10분 동안 자발적으로 나타나는 내장통증 행동의 횟수를 측정하였다. 5일간 매일 10분씩 관찰 박스에 넣어 환경에 적응 시킨 후 본 실험을 시행하였다. Zymosan을 3일 연속으로 투여한 다음 날 visceral pain behavior를 관찰하였고, 약물 구강 투여 시작 후 1주일 간격으로 반복적으로 visceral pain behavior를 관찰하였다. 내장통증에 의한 행동 (visceral pain behavior)에는 털을 고르는 행위 없이 복부를 핥는 행동, 전신을 스트레치 하는 행동, 배를 바닥에 대고 엎드리는 행동, 복부를 잡아당겨 1-2초 동안 등을 구부리는 행동 등을 점수로 측정하였다. 관찰과 동시에 동영상으로 기록하여 이후 실험군을 모르는 관찰자에게 보여주어 내장통증 행동 횟수를 측정하였다.

- 결과 : Visceral pain은 대조군에서 1일과 14일째에서는 유의적인 변화가 없었으며, 7일째 백편두 추출물 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 통증관련 행동의 횟수가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

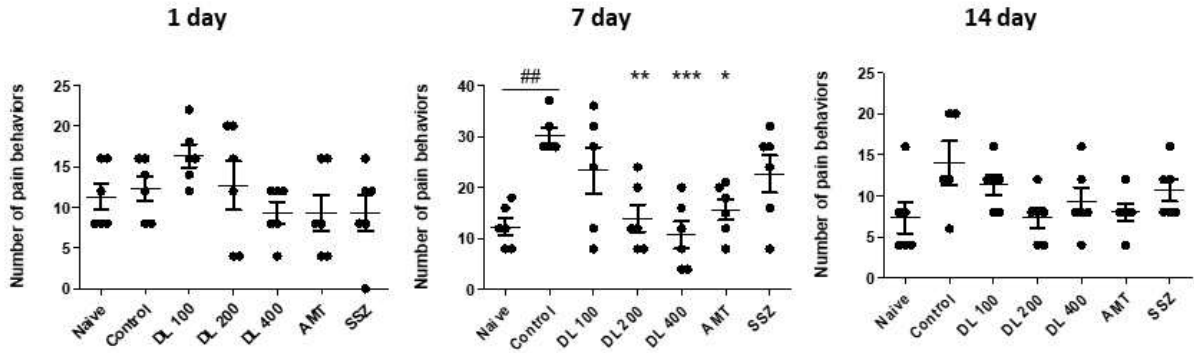


그림2.4.31. 내장통증실험을 통한 통증완화의 행동학적 효능 평가

바. 항불안 및 항우울 작용 (elevated plus maze test)

- 방법 : 고가식 십자 미로 테스트 (elevated plus maze test; EPM) - 생쥐를 아크릴로 만든 십자미로 (50 cm × 5 cm × 15 cm)의 중앙에 놓은 후 5분 동안 열려있는 방향으로의 진출 시도 횟수를 숫자로 분석하고 열려있는 방향에서의 머문 시간을 백분율(%)로 분석하였다. Zymosan을 투여한 첫째 날 시행하였고, 1주일 간격으로 반복적으로 elevated plus maze test를 시행하였다. 관찰과 동시에 동영상으로 기록하여 video tracking software (SMART 3.0; Panlab S.I., Barcelona, Spain)를 사용하여 분석하였다.
- 결과 : 대조군은 열려있는 방향으로의 진출 횟수가 점차 감소하였고, 14일 째에는 유의적으로 감소하였으며, 백편두 추출물 100, 400 mg/kg을 투여한 군에서는 정상군과 비슷한 횟수로 열려있는 방향으로 진출한 것을 확인 하였다. 열려있는 방향에서의 머문 시간에서는 백편두 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여한 모든 군에서 7일 째에 유의적으로 증가하였고, 14일째에는 백편두 추출물 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적인 증가를 확인하였다.

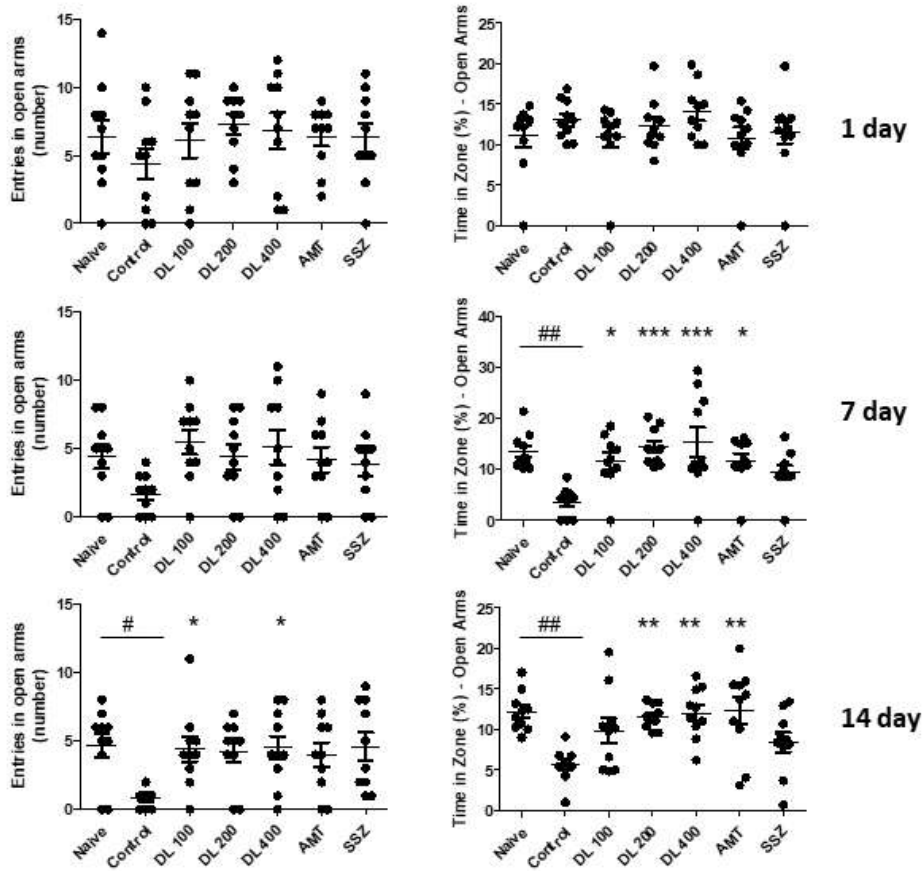
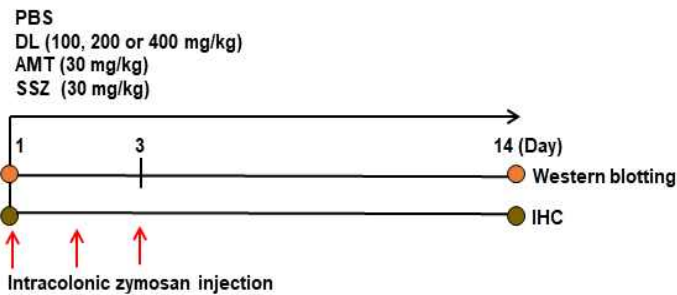


그림2.4.32. 고가식 십자 미로 테스트를 이용한 항 불안/우울의 행동학적 효능 평가

사. 대뇌 전전두엽 피질 (prefrontal cortex)에서의 c-fos 단백질 발현 분석
 - 대뇌 내 전전두엽피질 및 해마 영역에서의 단백질 발현 변화 측정

○ 방법 : C57BL/6 male 7주령 생쥐를 공급받아 일주일동안 순화시킨 뒤 3일 동안 매일 항문을 통해 zymosan을 주입한 후 14일 동안 매일 약물을 구강 투여하여 효능을 평가하였다. 실험 종료 후 생쥐의 대뇌 전전두엽 피질을 적출하여 c-fos 발현 정도를 western blot 및 immunohistochemistry (IHC) staining 방법으로 관찰하였다.



○ 결과 : 대조군에 비하여 백편두 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서는 농도 의존적으로 유의하게 c-fos 발현량이 감소한 것을 확인하였다.

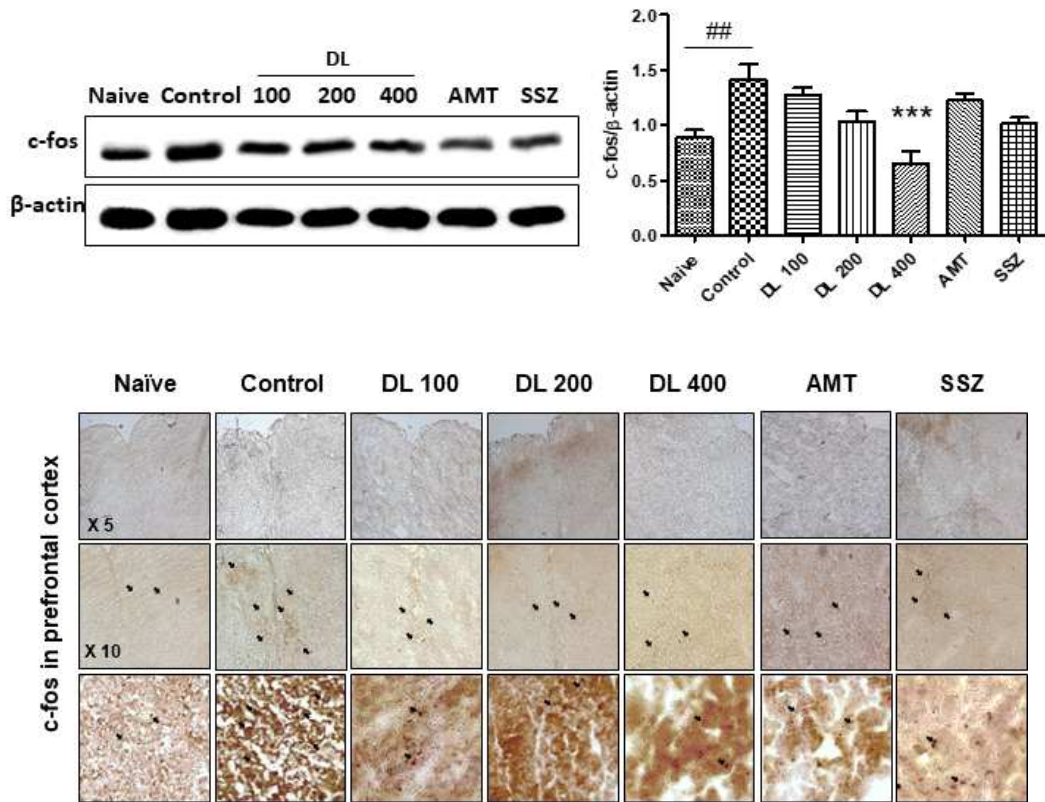


그림2.4.33. 생쥐의 전전두엽 피질에서의 c-fos 단백질의 발현

아. 생쥐의 혈액에서 코르티코스테론 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 혈액을 적출하여 혈액 내 코르티코스테론 (corticosterone) 수준을 측정하였다.
- 결과 : 대조군에 비하여 백편두 추출물 100, 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서는 혈액 내 코르티코스테론 수준이 감소하는 경향을 확인하였다.

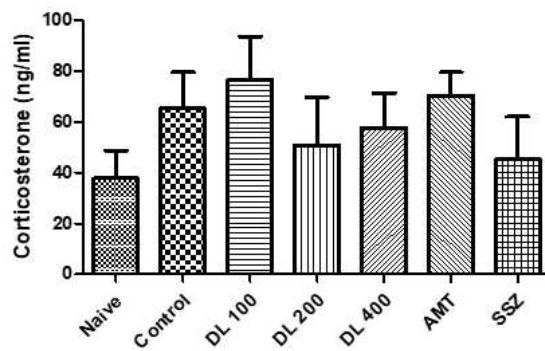


그림2.4.34. 생쥐의 혈액 내 corticosterone 수준

자. 장에서의 신경전달 물질 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 대장을 적출하여 norepinephrine (NE), epinephrine (EPI), dopamine (DP)의 수준을 측정하였다.
- 결과 : NE의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였고, 백편두 추출물

100 mg/kg을 투여한 군이 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. EPI 및 DP의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였고, 백편두 추출물 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적이게 증가하는 것을 확인하였다.

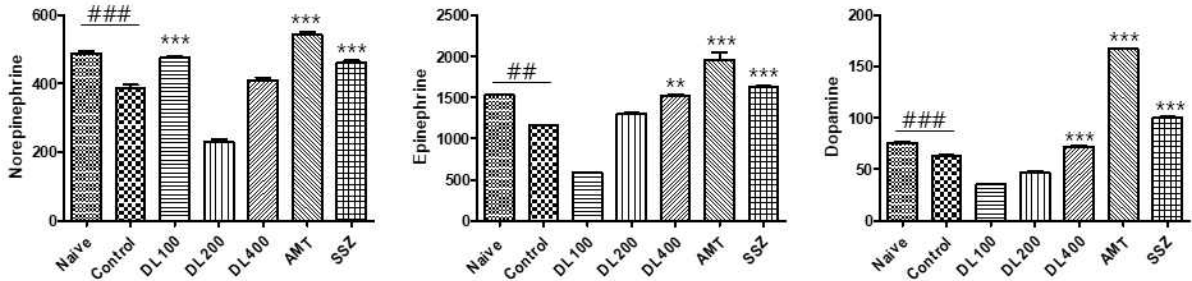


그림2.4.35. 생쥐의 대장 내 신경전달물질 수준

차. 전전두엽 피질에서의 신경전달물질 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 전전두엽 피질을 적출하여 norepinephrine (NE), epinephrine (EPI), dopamine (DP)의 수준을 측정하였다.
- 결과 : NE의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였고, 백편두 추출물 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적이게 증가하는 것을 확인하였다. EPI 및 DP의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였고, 백편두 추출물 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적이게 증가하는 것을 확인하였다.

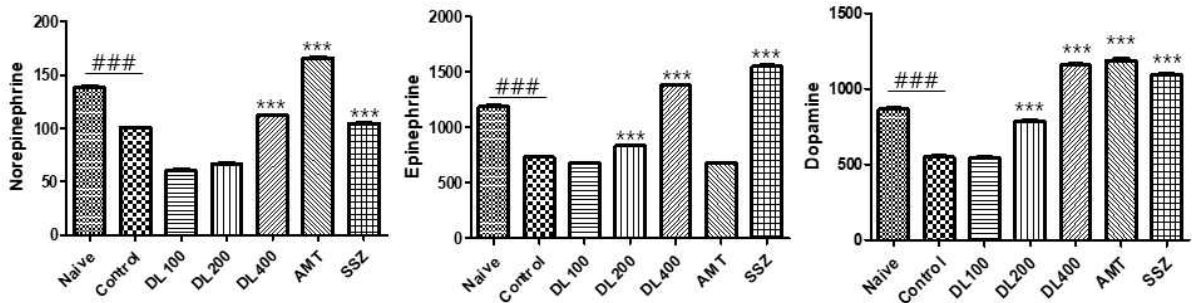


그림2.4.36. 생쥐의 전전두엽 피질 내 신경전달물질 수준

카. 해마에서의 신경전달물질 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 전전두엽 피질을 적출하여 norepinephrine (NE), epinephrine (EPI), dopamine (DP)의 수준을 측정하였다.
- 결과 : NE의 경우 정상군과 대조군 사이에 차이는 없음을 확인하였으나, 백편두 추출물 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적이게 증가하는 것을 확인하였다. EPI 및 DP의 경우 정상군에 비하여 대조군에서 유의하게 감소하였고, 백편두 추출물 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 유의적이게 증가하는 것을 확인하였다.

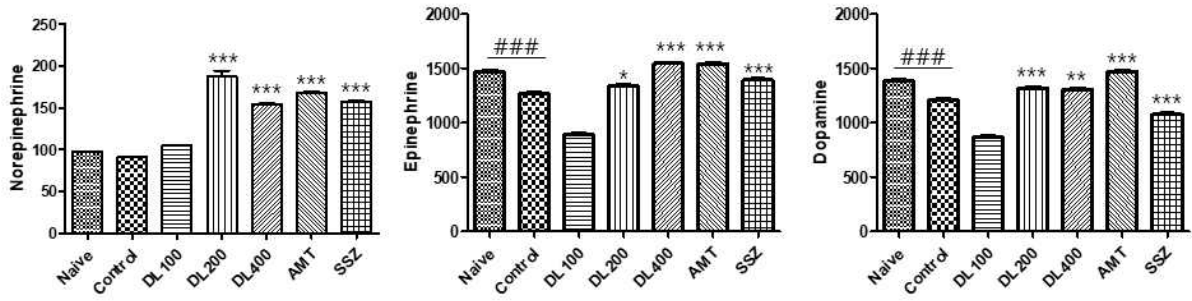


그림2.4.37. 생쥐의 해마 내 신경전달물질 수준

타. 해마에서의 BDNF 발현량 측정

- 방법 : 실험 종료 후 생쥐의 대뇌를 적출하여 포르말데히드로 고정한 뒤 조직 절편을 제작하여 신경생장인자 (brain derived neural factor; BDNF)를 immunofluorescence (IF) staining을 측정하였다.
- 결과 : 해마영역을 포함하는 대뇌의 조직을 형광 염색한 결과 정상군에 비해 대조군에서의 BDNF 발현이 감소한 것을 확인하였고, 백편두 추출물 100, 200, 400 mg/kg 을 투여한 군에서 농도 의존적으로 BDNF 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

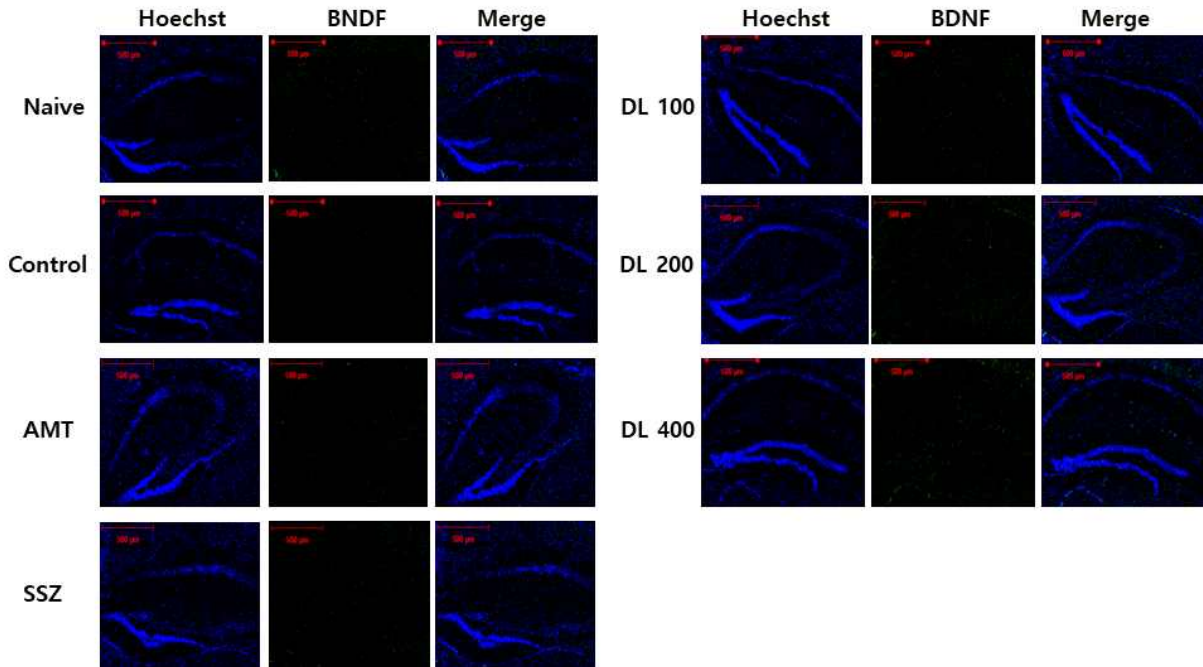


그림2.4.38. 생쥐의 대뇌 내 해마영역에서의 BDNF 발현

5절 [제1세부연구] 제품화 연구

Development of whole food type-functional food acting on multi targets for intestinal health

1. 장건강 증진용 식품 출시

가. 특허 검토

- 연구 진입 시, 총 12개의 후보 농산물 모두 특허 검토 완료 (표1).
- 무말랭이의 경우, 건강 관련 기능성 용도로 특별히 검색된 건은 없었으며, 검인의 경우, 자양 강장 용도 외의 용도를 명시적으로 나타낸 건은 없어 특허 확보 가능성이 높은 것으로 평가함.

표2.5.1. 후보원료 특허 검토

| 후보원료명 | 특허명 |
|-------|--|
| 고구마 | · 고구마 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알러지 질환의 예방 또는 치료용 조성물 (등록 10-1397975) |
| 무시래기 | · 시래기를 주성분으로 하는 건강보조식품과 그의 제조 방법(공개 2005-0061998) · 무청 추출물의 부탄올분획물을 유효성분으로 함유하는 항세균성 약학 조성물 및 건강기능 식품(공개 2014-0110659) |
| 진피 | · 기능성 식품 소재를 유효성분으로 포함하는 배변 개선용 식품 조성물(공개 2012-0122755) |
| 산약 | · 발효 산약 분말을 첨가한 항산화, 항고혈압 활성을 나타내는 GABA 고함유 기능성 요구르트(공개 2014-0105655) · 혼합 생약제 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물(공개 2013-0014659) |
| 지실 | · 백출 속 및 탕자(지실)를 유효성분으로 포함하는 염증성장질환 예방 또는 치료용 조성물(공개 2014-0118882) |
| 황기 | · 체중조절 다이어트 및 배변촉진용 조성물 및 그 제조방법(공개 2014-0081265) |
| 백편두 | · 발효된 한약재를 이용한 정장용 조성물(등록 10-1088004) |
| 포공영 | · 민들레를 이용한 포공영차 제조 방법(공개 2014-0027773) · 포공영 추출물을 함유하는 뉴로킨인 매개 질환 치료 및 예방용 약제와 건강식품(공개 2008-0062432) |
| 모시잎 | · 모시잎 함유 기능성 도토리묵 및 그 제조방법(공개 2012-0060342) |
| 고추냉이 | · 지방 대사 개선 효과가 있는 고추냉이를 함유하는 기능성식품(공개 2005-0004438) · 고추냉이를 함유하는 김치 및 그 제조 방법(공개 2005-0001965) |
| 무말랭이 | 관련 특허 없음 |
| 검인 | 관련 특허 없음 |

- 4년동안 연구결과를 토대로 총 3개의 특허를 출원함. 이 중 2건은 등록 완료함 (표2, 그림 2.5.1).

표2.5.2. 특허 출원/등록 현황

| 특허명 | 출원번호 | 등록번호 |
|---|-----------------|------------|
| 고추냉이 추출물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 약학적 및 식품 조성물 | 10-2015-0076401 | 10-1705712 |
| 백편두 추출물을 포함하는 IBS 예방 또는 치료용 약학적 및 식품 조성물 | 10-2016-0063826 | |
| 항불안, 항우울 또는 항스트레스 활성을 갖는 발아백편두 추출물을 포함하는 약학 또는 식품 조성물 | 10-2017-0158522 | 10-1851210 |



그림2.5.1. 연구결과로 등록한 특허증 2건

나. 지역농산물 후보소재 원료 확보 및 공급

- (1) 산약, 무, 황기, 고구마 원료 공급
 - 산약, 무말랭이, 황기, 고구마는 우리나라 실용 작물로서 수급 용이함.
 - 건강기능식품 소재 업체 (주)건우FP, 식품원료업체 하이스폰 등이 본 원료를 표준화된 분말상태로 판매하며, 시기에 관계없이 수급 가능함.
 - 홀푸드형 지역 농산물 제품화 실험을 위한 원료로서 산약과 황기는 제천, 무말랭이와 고구마는 여주 또는 해남산을 사용함.
- (2) 고추냉이 원료 공급
 - 고추냉이는 풍부한 수량, 수질, 수온 및 지형의 경사도 등이 갖춰지고 수온의 연중 변화가 적은 지역에서만 재배가능함. 또한 근경 생산을 위한 장기간 재배 (18개월) 기간 때문에 강원도 철원 민통선 안에 위치한 제한된 재배 면적 (철원 300평, 태백 200평)에서 생산되고 있음. 고추냉이의 건조수율은 약 22.7%로 확인함 (표3).
 - C급 (잔뿌리 포함) 생물을 매월 15 kg 확보 가능하며, 뿌리단가는 생물 (C급)이 80,000 원/kg이므로, 건조물은 약 360,000원/kg임. 원료 단가가 고가이기 때문에 미세분말화 연구를 통한 효능 증가 연구 (홀푸드 가공 기술)를 진행함.
 - 고추냉이 뿌리는 생산량이 적으므로 수요량과 생산량이 같지만, 추후 제품을 위한 대량 생산을 위해서는 계약재배 등 추가적인 생산량 확보가 필요함.
 - 2절 표준화연구를 통해 뿌리 뿐 아니라 고추냉이 잎과 줄기도 유효성분이 풍부한 것을 확인하였으며, 국내에서 대량 수급이 가능하므로 향후 제품화 소재로 가능성을 확인함.

표2.5.3. 고추냉이 부위 별 생물무게, 건조 후 중량, 건조 수율

| 고추냉이부위 | 생물 중량(g) | 자연건조 후 중량(g) | 수율(%) |
|--------|----------|--------------|-------|
| 뿌리 | 164.17 | 37.27 | 22.7 |
| 잎+줄기 | 489 | 44.58 | 9.12 |
| 잎 | 66.2 | 8.77 | 13.25 |
| 줄기 | 115.3 | 10.04 | 8.71 |
| 비가식부위 | 52 | - | - |

표2.5.4. 고추냉이, 백편두 원물 수급표

| 고추냉이 | | 백편두 (제비콩) |
|---------------|--|-----------------|
| 사용부위 | 뿌리 | 종자 |
| 형태 | 원물을 분쇄한 분말 | 원물을 분쇄한 분말 |
| 원산지 | 국산 | 선호: 인도, 비선호: 중국 |
| 실험 시 구입했던 구입처 | - 샘통농산 (철원군, 고추냉이 재배 영농조합 법인) - 맑은물 고추냉이 농장 (태백시) - 자연명가 (태백시) | |
| 기타 | | 수입 시, 식품원료로 수입 |

(3) 백편두 안정적 공급 방안 검토

- 백편두는 우리나라에서는 야생콩으로만 서식하고 있으며, 국산 백편두를 안정적으로 공급 받을 수 있는 수급처 (농가 또는 업체)는 없음을 확인함.
- 따라서, 국립식량과학원 작물기초기반과 (문중경 연구관) 컨설팅을 받아 우리나라에서 백편두를 재배할 수 있는 방안을 모색함. 백편두의 안정적 공급에 대한 세미나를 받음.

(가) 이용: Dual purpose

- ① 식용: 동남아, 동부 아프리카 지역, 채소용 (꽃, 미숙협)
- ② 사료용/녹비용: 하계 사료용

(나) 생태

- ① 토양: 사질~점질, pH (4.5~7.5)
- ② 연강수량: 650 ~ 3,000 mm
- ③ 일평균기온: 18~30℃, 고온적응력 높음. 3℃이하에서 단기간 생육가능
- ④ 생식생장: 단일 감응형, 조생종 (Highworth), 만생종 (Rongai, Endurance)

(다) 재배적 특성

- ① 경실률: 매우 낮음
- ② 파종량: 12~20 kg/ha, 조간 (80~120cm), 주간 (30~50cm)
- ③ 병충해
 - 해충: 협가해 나방류, 종자가해 바구미류
 - 병해: 선충, 탄저병, 녹병 등이 보고

(라) 생산성

- ① 건물중 : 잎 (2톤/ha), 잎/줄기 (4톤/ha)로서 동부보다 건조지에서의 생산성 높음, 꽃협 생산성 (2~7톤/ha)

(마) 유전/육종

- ① 속명: Lablab
- ② 아종: 3종
 - Lablab purpureus ssp. uncinatus (야생 조상종) 협길이 (40 mm x 15 mm)
* 원산: 동부 아프리카
 - Lablab purpureus ssp. purpureus (재배종) 협길이 (100 mm x 40 mm)
 - Lablab purpureus ssp. bengalensis (재배종) 협길이 (140 mm x 10-25 mm)

* 원산: 아시아

③ 자가수정, 염색체 2n=22

(바) 종자 생산성

① 무한형 개화, 사료용 및 녹비용은 개화기간 김. 종실용은 유한형 개화

② 종자수량 : 품종에 따라 다르나, 1~2.5톤/ha

- 국립식량과학원 작물기초기반과에서는 우리나라 농가에서 대량재배 가능한 품종으로 호주의 Koala종을 추천하였으며, 대량재배 가능성 있는 품종을 표5와 같이 안내함. 유니베라는 표6의 종자를 확보하여 작물기초기반과에 전달함.

표2.5.5. 백편두 품종

| 품종 | 육성국가 (년도) | 비고 |
|-----------|-----------|--|
| Rongai | 호주 (1962) | 케냐 도입 (CPI 17883), 만생종, 사료용, 백색꽃, 담갈색 종피, 무한화서, 100립중(20 g) |
| Highworth | 호주 (1973) | 남부인도 도입 (CPI 30212), 조생종, 종실사료겸용, 자색꽃, 흑색 종피, 100립중 (25g) |
| Koala | 호주 (1995) | 조생종 (초상이전에 종실 확보 가능, 호주 북부 NSF, 남부 퀸스랜드), 사료용 수량은 Rongai와 Highworth의 70% |
| Endurance | 호주 (최근) | 다년생 품종, 100립중 (18 g) |

표2.5.6. 백편두 수급/보유 상황표

| No. | 구입처 / 신청기관 | 작물명 /기타 | 보유상황 |
|-----|---------------|--|------|
| 1 | 아라미오농원 | 백편두 (관상용) (3,000원/10립) | 보유 |
| 2 | 정도생약 | 백편두 (중국산, 한약재) (4,000원/500 g) | 보유 |
| 3 | 미국 NPGS | PI639278 - Lablab purpureus - Grif 1246 - India (25립) | 보유 |
| 4 | 호주 AusPGRIS | AusTRCF116883 Lablab purpureus Rongai, Kenya | - |
| 5 | 국내 농업유전자원정보센터 | IT183719 Rongai(Australia), IT223647 울릉(한국), IT223648 울릉 (한국) 제비콩(Lablab purpureus subsp. purpureus) | 보유 |
| 6 | 인도 (현지 구매) | Indian Bean/ Dolichos Bean (Lablab purpureus L.)-Arka Vijay | 보유 |
| 7 | 호주 AusPGRIS | AusTRCF309762 Lablab purpureus Koala, Australia | - |

* 호주 AusPGRIS는 미국 NPGS와 동일한 시기에 종자신청을 하였으나 회신이 오지 않음.



그림2.5.2. 아라미오농원에서 구입한 백편두 (관상용)

- 국내에서 관상용으로 판매하는 백편두를 구하여 국립식량과학원에 시험포를 심음.
- 종자 특성을 확인하고, 국내 대량 재배 가능성을 검토함.



그림2.5.3. 정도생약에서 구입한 백편두 (중국산, 한약재)

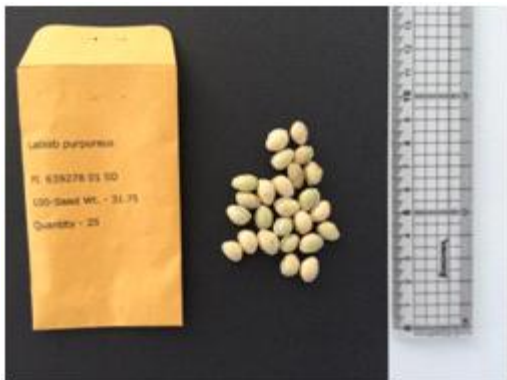


그림2.5.4. 미국 NPGS PI639278 - Lablab purpureus - Grif 1246 - India



그림2.5.5. 국내 농업유전자원정보센터
제비콩 IT223648 울콩 (한국), IT223647 울콩 (한국), IT183719 Rongai (Australia)

(4) 백편두 국내 시험 재배

- 우리나라에서 생육하는 백편두는 무한덩굴성으로 농가에서 대량으로 재배하기 부적합한 품종임 (그림5).
- 2차년도에 확보한 종자를 사용하여 국내 시험재배 (익산 국립식량원, 경기도 남양주시)를 진행함. 백편두는 재배온도가 높은 종자이므로 위도가 높은 경기지역에서 재배 가능성을 확인할 필요가 있음.
- 재배형태 (꽃색, 잎크기, 꼬투리)를 관찰하여 인도산 반덩굴성 백편두가 국내 농가에서 추가 비용 없이 키울 수 있는 적합한 종임을 전문가 (국립식량과학원 박수권 연구사)를 통해 확인함 (그림6). 일반 백편두는 설치된 담장을 넘어가는 반면, 반덩굴성 백편두는 1m 정도 높이로 직립하며 성장함.
- 대량생산 최적화를 위해서 국산과 인도산을 교배하는 방법을 추가 검토할 수 있으나, 약 10년 소요되는 연구이므로 별도의 장기 과제로 진행이 필요함을 확인함.
- 따라서, 본 연구에서는 대량 수급이 가능한 인도산 백편두를 활용하여 연구 및 제품화를 진행함.
- 백편두를 사용하게 출시한 장건강 증진용 건강기능식품(5절. 1. 타)은 출시 후 3개월동안 864백만원의 매출을 창출함.
- 향후 유니베라의 백편두의 사용량은 연간 3,000 kg가 예상되며 농가는 유니베라 제품 1종만으로 소득 약 5천만원을 확보할 수 있을 것으로 예상됨. 이는 일반 백태 단가의 2배로 고부가가치를 기대할 수 있음.



그림2.5.6. ning쿨성 백편두 재배 현장



그림2.5.7. 반닝쿨성 인도산 백편두 재배 현장

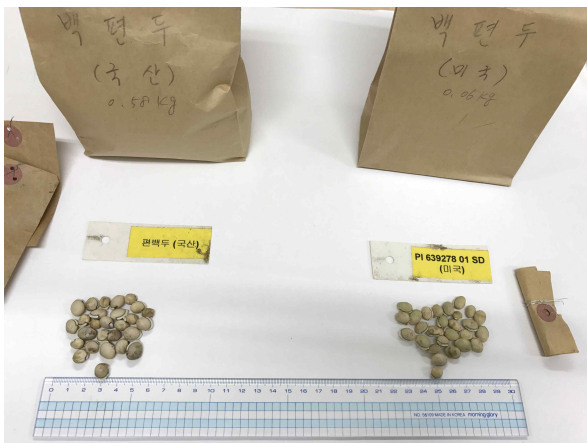


그림2.5.9. 국산/미국산 백편두 수확

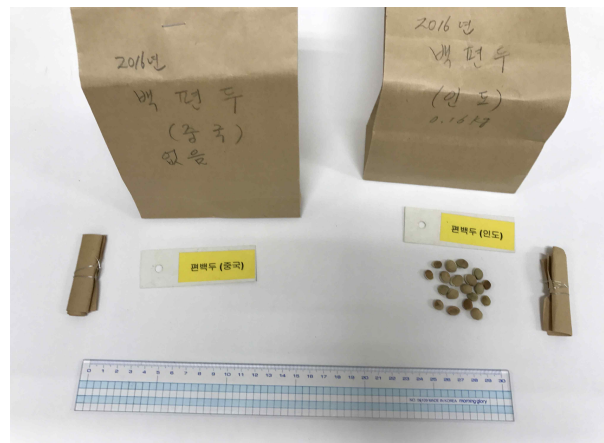


그림2.5.8. 인도산 백편두 수확

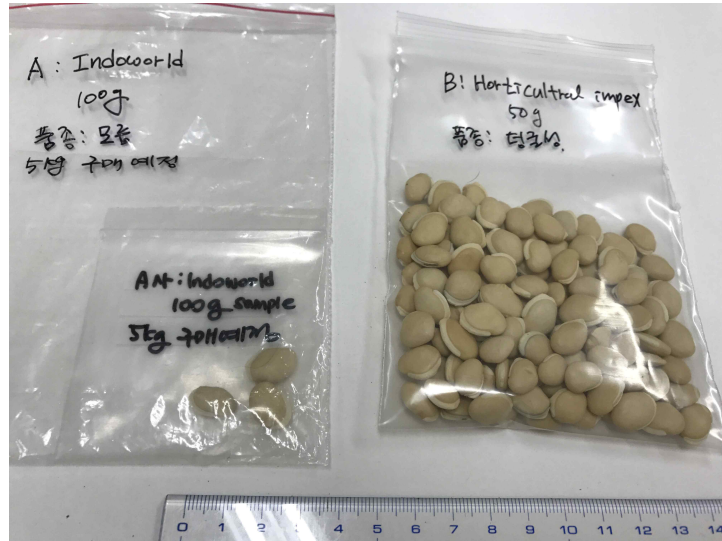


그림2.5.10. 제품용 백편두 샘플

다. 식품 가공 기술 검토

(1) 홀푸드용 천연 후보 소재 나노균질화

- 홀푸드용 천연 후보 소재인 고추냉이, 산약, 백편두를 각각 건조시켜 알맞은 크기로 자른 후 1차로 믹서기를 이용하여 갈았음.
- 가루형태의 후보 소재를 2차로 각각 유발유분을 이용하여 갈은 후 각각 2 g의 가루시료에 증류수 15 mL을 섞어 마이크로화 시료를 만들.
- 마이크로화한 시료는 고압균질기 (EmulsiFlex®-B15, Avesti)를 이용하여 15-20번의 고압균질화를 거쳐 나노미터 단위의 입자크기를 갖는 나노화 시료로 만들.
- 크기를 줄인 후보 소재들은 각각 나노입자분석기 (ELSZ-1000 Dynamic Light Scattering, Otoka Electronics)를 이용하여 입자크기를 측정함.

(2) 홀푸드용 천연 후보 소재로 부터의 지표물질 방출 분석

- 고추냉이, 산약, 백편두 지표물질의 LC-MS/MS 분석조건을 각각 설정함.
- 마이크로화한 천연 후보 소재와 나노화한 천연 후보 소재를 각각 같은 조건에서 시험관 방출 실험 (Mini GeBAflex-tube Dialysis kit (110) (MWCO 12-14 kDa), Gene Bio-Application L.T.D.)을 진행함.
- 시험관 방출 실험 시료를 LC-MS/MS를 이용하여 시간에 따른 방출 양상에 대하여 분석함.

(3) 홀푸드용 천연 후보 소재의 함유된 지표물질 추출

- 천연 후보 소재 가루시료 10 mg을 methanol (HPLC grade, J.T.Baker) 1 mL에 넣은 후 초음파 파쇄기 (VCX750 series, SONIC&MATERIALS)를 이용하여 amp 40%의 에너지를 30분 동안 가함. 이 용액을 concentrator (Concentrator plus system, Effendorf)를 이용하여 30분 동안 용매인 methanol을 증발시켜 지표물질 총 추출 시료를 만들.

(4) 홀푸드용 천연 후보 소재로 부터의 지표물질 방출 실험

- 입자크기가 마이크로화된 시료 (Micro-Wsa, Micro-Dio, Micro-Dol) 와 나노화된 시료 (Nano-Wsa, Nano-Dio, Nano-Dol) 250 μ L은 3 mL의 pH 1.2 와 pH 7.4로 조절된 생리식염수에서 각각 방출 실험을 진행함. 방출 환경 조건은 37°C, 50 rpm 이며, 방출된 지표물질의 농도 측정을 위하여 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 시간에 1 mL의 방출된 지표물질을 포함한 생리식염수를 채취한 후 다시 1 mL의 생리식염수를 가함.

(가) 시험물질 분석

① 표준원액 시료 제조

- 고추냉이의 지표물질인 sinigrin, 산약의 지표물질인 allantoin, 백편두의 지표물질인 L-Pipecolic acid 표준품 (Sigma-Aldrich)을 물에 녹여 sinigrin으로서 1 mg/mL의 농도로 제조하여 water (HPLC grade, J.T.Baker), allantoin은 methanol로 계열 희석하여 검량선 시료의 최고 농도 10배의 표준원액 시료를 만들었음.

② 내부표준물질 (internal standard, IS)을 포함한 이동상 용액

- 일반 curcumin 표준품 (TCI)을 methanol에 녹여 curcumin으로서 1 mg/mL의 농도로 제조한 후, 이동상으로 희석하여 1 μ g/mL의 내부표준물질 시료를 만들었음. 이동상 용액에 내부표준물질이 500 ng/mL이 되도록 섞어서 만들었음.

③ 검량선 및 시료의 전처리

- 검량선 표준용액 시료: 표준용액 10 μ L에 내부표준물질을 포함한 이동상 용액 10 μ L를 가한 후 30초간 균질 혼합하였음. 이 시료 2 μ L를 LC-MS/MS에 주입하여 시료 중 각 지표물질의 농도를 분석하였음. 각 지표물질의 검량선 농도는 0, 5, 25, 100, 250, 500, 1000 및 2000 ng/ml 이었음.
- 지표물질 총 추출 시료: 이동상 용액 10 μ L를 넣은 지표물질 총 추출 시료에 내부표준물질을 포함한 이동상 용액 10 μ L를 가한 후 30초간 균질 혼합하였음. 이 시료 2 μ L를 LC-MS/MS에 주입하여 시료 중 각 지표물질의 농도를 분석하였음.
- 방출 실험 시료: 방출 실험 시료 10 μ L에 내부표준물질을 포함한 이동상 용액 10 μ L를 가한 후 30초간 균질 혼합하였음. 이 시료 2 μ L를 LC-MS/MS에 주입하여 시료 중 각 지표물질의 농도를 분석하였음.

④ 분석조건

- 시료 중 각 지표물질의 농도를 LC-MS/MS (HPLC 1260 series, Agilent; MS triple quadrupole 6490 series, Agilent)를 사용하여 분석하였으며, 분석조건은 표7, 표8과 같음.

표2.5.7. Mass 분석 조건

| | M/Z ion pair | CE (Volt) | 비고 |
|------------------|--------------|-----------|----|
| Sinigrin | 357.8/96.7 | 20 | |
| Allantoin | 157.1/114.0 | 8 | |
| L-Pipecolic acid | 130.1/84.2 | 14 | |
| Curcumin (IS) | 367.1/148.9 | 14 | |

- collision gas : argon
- capillary voltage : 5 kV
- gas temperature : 200° C
- gas flow : 14 L/min
- Nebulizer Pressure : 40 psi

표2.5.8. LC 분석 조건

| 0.1% formic acid | ACN | Flow rate (μ l/min) |
|------------------|-----|--------------------------|
| 50 | 50 | 50 |

- 이동상 (Isocratic elution, 등용매용리; Acetonitrile (J.T.Baker) Formic acid (Sigma-Aldrich))
- Column : ZORBAX Extend-C18 (3.5 μ m, 1.0 \times 50 mm)
- Temperature : 35°C

- Injection volume : 2 μ L

⑤ 시료의 나누균질화 결과 및 고찰

- 고압 균질기를 통하여 나노균질화를 한 결과 고추냉이는 700 nm대로 입자의 크기가 줄었으며 균질화 전과 약 3배의 차이를 보임 (표9).
- 고압 균질기를 통하여 나노균질화를 한 결과 산약과 백편두는 600 nm대로 입자의 크기가 줄었으며 균질화 전과 약 5배의 차이를 보임.
- 나노 균질화를 하면서 다분산지수 (Polydispersity index, P.D.I) 가 낮아졌고 이는 입자의 크기가 전보다 균일해짐을 나타냄.

표2.5.9. 입자크기가 마이크로화된 시료와 나노화된 시료의 물리화학적 특성

| size reduction | Size (nm) | P.D.I | Zeta potential |
|-------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Micro-Wsa ¹⁾ | 2067.2 \pm 272.7 | 0.426 \pm 0.232 | -11.33 \pm 0.22 |
| Nano-Wsa ²⁾ | 741.4 \pm 101.7 | 0.243 \pm 0.116 | -2.87 \pm 0.24 |
| Micro-Dio ³⁾ | 3065.0 \pm 779.9 | 0.555 \pm 0.453 | -30.15 \pm 1.03 |
| Nano-Dio ⁴⁾ | 634.2 \pm 99.58 | 0.374 \pm 0.028 | -38.67 \pm 1.71 |
| Micro-Dol ⁵⁾ | 3206.1 \pm 251.01 | 0.963 \pm 0.515 | -22.21 \pm 0.02 |
| Nano-Dol ⁶⁾ | 689.3 \pm 80.23 | 0.418 \pm 0.115 | -22.21 \pm 0.02 |

1) 마이크로화된 고추냉이, 2) 나노화된 고추냉이, 3) 마이크로화된 산약, 4) 나노화된 산약, 5) 마이크로화된 백편두, 6) 나노화된 백편두

(나) 고추냉이 - Sinigrin

① 지표물질 선정

- Allyl isothiocyanate (AITC)는 기름성분이기 LC-MS/MS로 분석이 어려움.
- Sinapinic acid는 고추냉이 속 함량이 31.86 ng/g 으로 매우 낮아 방출 실험 시료의 지표물질을 LC-MS/MS로 분석하기 어려움.
- Sinigrin은 Allyl isothiocyanate로서 고추냉이 속 함량이 높아 선정함.

② 지표물질 검량선

- Sinigrin 표준시료의 검량선 추세선 R² 값이 0.9945 이었으며, 0 ~ 2000 ng/mL 범위에서 직선성을 나타냄 (그림10).

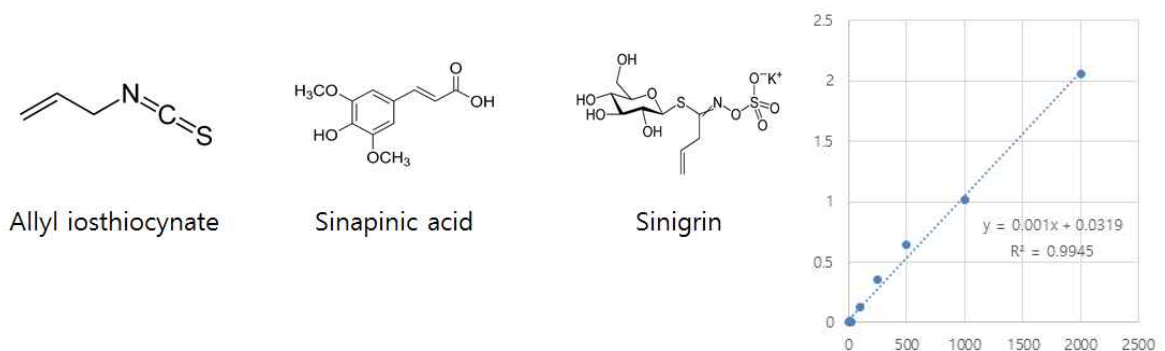


그림2.5.11. 고추냉이 지표물질 후보의 구조와 sinigrin 표준시료 검량선

③ 고추냉이의 입자크기와 방출 환경에 따른 Sinigrin 방출 양상 변화

- 고추냉이 가루시료에 함유된 Sinigrin의 함량은 778.45 μ g/g 이었음.
- pH 1.2 환경아래 Micro-Wsa와 Nano-Wsa에서 Sinigrin 방출 양상의 차이는 없음 (그림11, 표10).

- pH 7.4 환경아래 Micro-Wsa가 Nano-Wsa보다 약 2배 높은 Sinigrin 방출율을 보임.

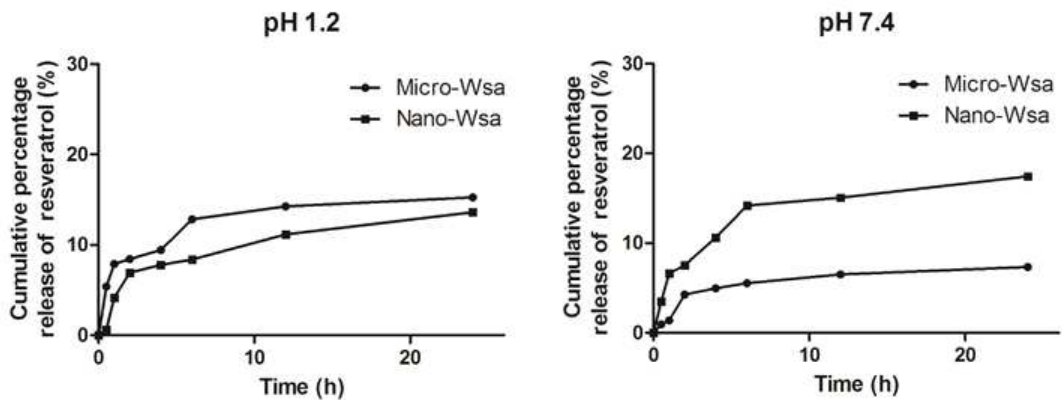


그림2.5.12. pH 1.2와 pH 7.4 환경아래 Micro-Wsa와 Nano-Wsa에서 방출된 sinigrin의 시간에 따른 양상 비교 그래프

표2.5.10. pH 1.2와 pH 7.4 환경아래 Micro-Wsa와 Nano-Wsa에서 방출된 sinigrin의 시간에 따른 양상 비교

| pH 1.2 | | | pH 7.4 | | |
|----------|----------------------|----------|----------|----------------------|----------|
| Time (h) | % cumulative release | | Time (h) | % cumulative release | |
| | Micro-Wsa | Nano-Wsa | | Micro-Wsa | Nano-Wsa |
| 0 | 0.00% | 0.00% | 0 | 0.00% | 0.00% |
| 0.5 | 5.38% | 0.64% | 0.5 | 0.94% | 3.51% |
| 1 | 7.89% | 4.17% | 1 | 1.39% | 6.62% |
| 2 | 8.45% | 6.95% | 2 | 4.26% | 7.54% |
| 4 | 9.45% | 7.79% | 4 | 4.96% | 10.61% |
| 6 | 12.83% | 8.40% | 6 | 5.53% | 14.18% |
| 12 | 14.26% | 11.17% | 12 | 6.52% | 15.06% |
| 24 | 15.27% | 13.61% | 24 | 7.35% | 17.44% |

(다) 산약 - Allantoin

① 지표물질 선정

- 산약의 활성물질인 allantoin으로 지표물질 선정

② 지표물질 검량선

- Allantoin 표준시료의 검량선 추세선 R² 값이 0.9986 이었으며, 0 - 2000 ng/mL 범위에서 직선성을 나타냄 (그림12).

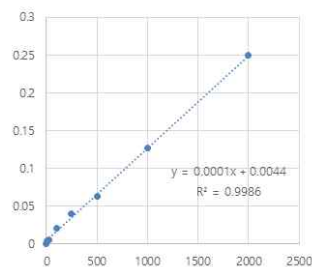
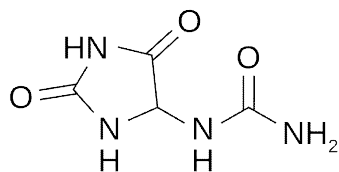


그림2.5.13. 산약의 지표물질인 allantoin의 구조와 allantoin 표준시료 검량선

③ 산약의 입자크기와 방출 환경에 따른 allantoin 방출 양상 변화

- 산약 가루시료에 함유된 allantoin의 함량은 74.08 μg/g 이었음.

- pH 1.2 환경아래 Micro-Dio와 Nano-Dio에서 allantoin의 방출 양상 차이는 없음 (그림13, 표11).

- pH 7.4 환경아래 Micro-Dio와 Nano-Dio에서 allantoin 방출 양상의 차이는 없음.

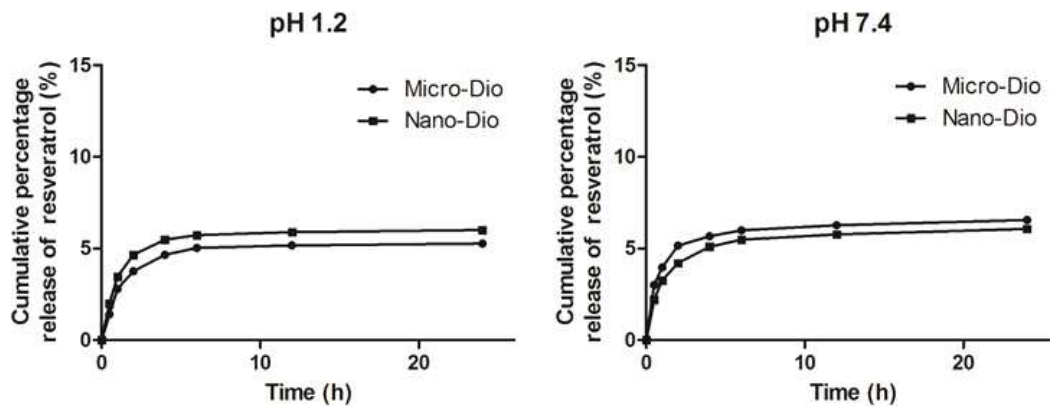


그림2.5.14. pH1.2와 pH7.4 환경아래 Micro-Dio와 Nano-Dio에서 방출된 resveratrol의 시간에 따른 양상 비교 그래프

표2.5.11. pH1.2와 pH7.4 환경아래 Micro-Dio와 Nano-Dio에서 방출된 Allantoin의 시간에 따른 양상 비교

| pH 1.2 | | | pH 7.4 | | |
|----------|----------------------|----------|----------|----------------------|----------|
| Time (h) | % cumulative release | | Time (h) | % cumulative release | |
| | Micro-Dio | Nano-Dio | | Micro-Dio | Nano-Dio |
| 0 | 0.00% | 0.00% | 0 | 0.00% | 0.00% |
| 0.5 | 1.41% | 2.00% | 0.5 | 3.00% | 2.21% |
| 1 | 2.79% | 3.47% | 1 | 3.97% | 3.25% |
| 2 | 3.75% | 4.65% | 2 | 5.15% | 4.21% |
| 4 | 4.66% | 5.48% | 4 | 5.67% | 5.10% |
| 6 | 5.03% | 5.73% | 6 | 5.99% | 5.48% |
| 12 | 5.17% | 5.89% | 12 | 6.27% | 5.77% |
| 24 | 5.27% | 6.01% | 24 | 6.55% | 6.07% |

(라) 백편두 - L-Pipecolic acid

① 지표물질 선정

- 백편두의 활성물질인 L-Pipecolic acid로 지표물질 선정

② 지표물질 검량선

- L-Pipecolic acid 표준시료의 검량선 추세선 R^2 값이 0.9633 이었으며, 0 - 2000 ng/mL 범위에서 직선성을 나타냄 (그림14).

③ 백편두의 입자크기와 방출 환경에 따른 L-Pipecolic acid 방출 양상 변화

- 백편두 가루시료에 함유된 L-Pipecolic acid의 함량은 80.18 $\mu\text{g/g}$ 이었음.

- pH 1.2에서 Micro-Dol과 Nano-Dol에서 L-Pipecolic acid 방출 양상의 차이는 없음 (그림15, 표12).

- pH 7.4에서 Micro-Dol과 Nano-Dol에서 L-Pipecolic acid 방출 양상의 차이는 없음.

- pH 7.4에서의 Micro-Dol과 Nano-Dol에서의 L-Pipecolic acid 방출율이 pH 1.2 보다 높음.

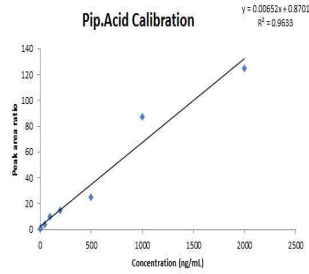
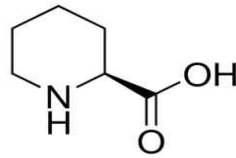


그림2.5.15. 백편두의 지표물질인 L-Pipecolic acid의 구조와 L-Pipecolic acid 표준시료 검량선

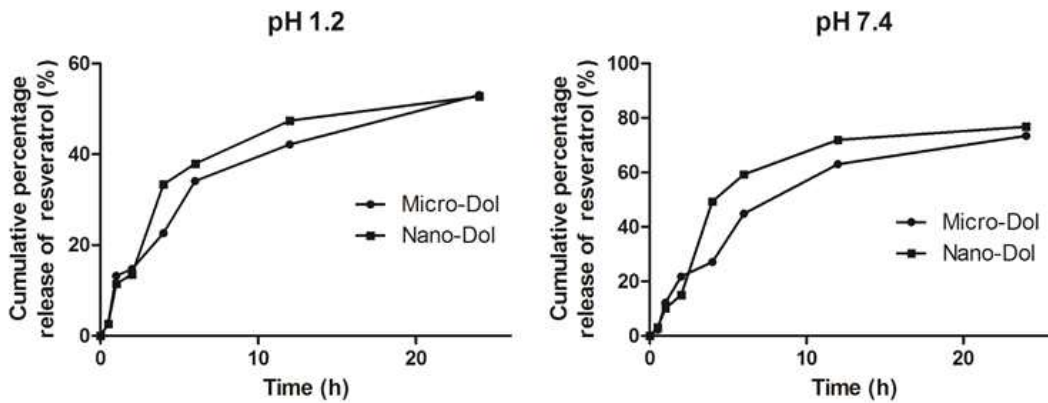


그림2.5.16. pH 1.2와 pH 7.4 환경아래 Micro-Dol과 Nano-Dol에서 방출된 L-Pipecolic acid의 시간에 따른 양상 비교 그래프

표2.5.12. pH1.2와 pH7.4에서 Micro-Dol과 Nano-Dol에서 방출된 L-Pipecolic acid의 시간에 따른 양상 비교

| pH 1.2 | | | pH 7.4 | | |
|----------|----------------------|----------|----------|----------------------|----------|
| | % cumulative release | | | % cumulative release | |
| Time (h) | Micro-Dol | Nano-Dol | Time (h) | Micro-Dol | Nano-Dol |
| 0 | 0.00% | 0.00% | 0 | 0.00% | 0.00% |
| 0.5 | 2.80% | 2.62% | 0.5 | 2.21% | 3.09% |
| 1 | 13.23% | 11.49% | 1 | 12.22% | 10.14% |
| 2 | 14.74% | 13.56% | 2 | 21.76% | 14.92% |
| 4 | 22.63% | 33.37% | 4 | 27.12% | 49.35% |
| 6 | 34.12% | 37.91% | 6 | 44.90% | 59.31% |
| 12 | 42.17% | 47.44% | 12 | 63.08% | 71.99% |
| 24 | 53.09% | 52.75% | 24 | 73.46% | 76.80% |

라. 홀푸드 가공기술개발 (bioavailability, taste masking)

(1) 고추냉이 지표물질 정량

(가) 고추냉이의 활성성분인 Sinigrin을 지표물질로 설정

(나) 고추냉이에 함유된 Sinigrin의 정량을 위하여 LC-MS/MS 기법을 이용하여 분석조건 확립

- MS2 scan 결과 (-)-mode에서 Sinigrin의 peak (357.8 m/z)를 얻어냄.

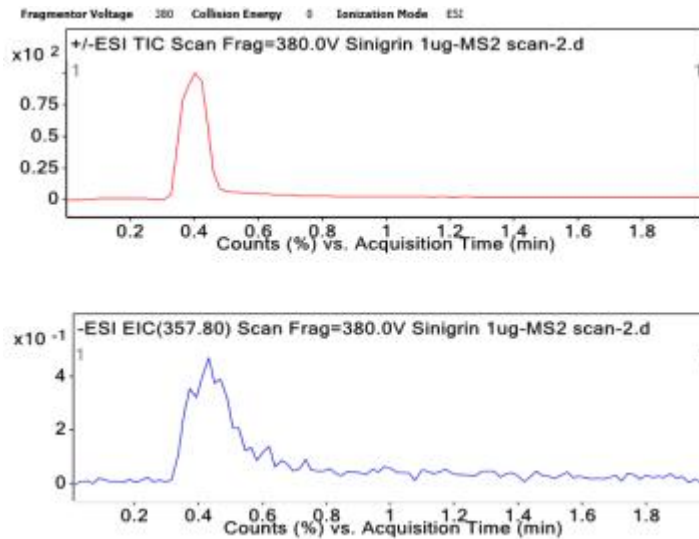


그림2.5.17. Sinigrin의 MS2 scan

- Sinigrin의 parent ion (357.8 m/z)으로부터 257.8, 96.7 m/z의 product ion 형성. (Collision energy(CE) 20 eV)

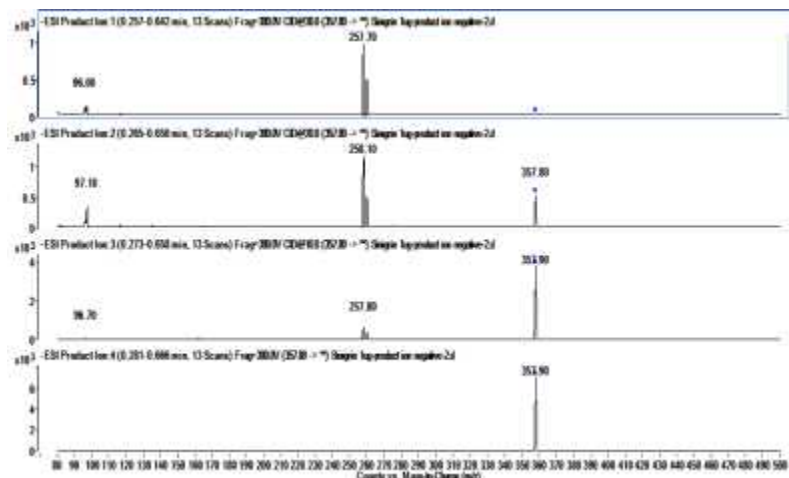


그림2.5.18. Sinigrin의 product ion

- 최종 고추냉이 속 Sinigrin을 LC-MS/MS로 정량하기 위한 방법으로 357.8 → 96.7의 짝이온과 CE 20 eV로 결정.

(다) 고추냉이 속 Sinigrin의 함유량을 LC-MS/MS 기법을 이용하여 정량

- 고추냉이 100 mg을 Methanol 10mL에 넣은 후 초음파 에너지를 (2초 주입, 2초 멈춤)의 기법으로 10분 주입. 원심분리기를 이용하여 4°C, 5분, 10000 g로 원심분리 한 후 상등액 methanol 5 mL을 새 튜브로 옮기고 모든 solvent를 진공증발 시킴. 이동상 50 μL를 넣고 잘 섞어준 후 원심분리 (1분, 3000 g)를 하여 상등액 2 μL를 LC-MS/MS로 분석. 내부표준물질로 Curcumin 사용.

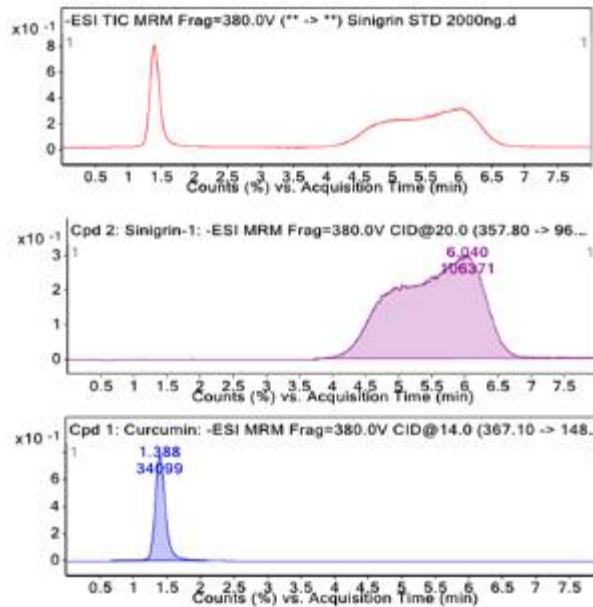


그림2.5.19. 고추냉이에서 추출한 Sinigrin과 내부표준물질의 LC-MS/MS 결과

- 고추냉이에서 추출된 Sinigrin의 함유량 계산 결과 778 ppm의 결과를 도출함.
- (2) 고추냉이의 장 질환 개선 이용을 위하여 고추냉이를 Eudragit을 이용하여 장용코팅 수행
 - 고추냉이가 대장 환경인 pH 7.0에서 방출 되어지도록 Eudragit®S100을 이용하여 코팅 함.
 - 고추냉이에 함유된 활성성분 Sinigrin은 가수분해되므로 Ethanol을 이용함.
 - Eudragit coated Wasabi를 만드는 방법은 다음과 같음.
- (가) Eudragit 표준용액 준비
 - Eudragit을 Ethanol에 100 mg/mL을 1100 rpm으로 18시간 stirring 후, 거품 제거를 위하여 실온에 1시간 방치.
- (나) 고추냉이 표준용액 준비
 - 고추냉이를 Ethanol에 100 mg/mL의 농도로 섞어서 준비.
- (다) 코팅작업
 - 고추냉이 양의 1%, 5%, 10% 에 해당되는 Eudragit을 넣어 3가지 조건의 장용코팅 고추냉이를 만듦.
 - Eudragit 표준용액과 고추냉이 표준용액은 표1의 비율로 섞은 후 2시간동안 1100 rpm 으로 실온에서 stirring.

표2.5.13. 장용코팅 고추냉이 제조 비율

| | 1% | 5% | 10% |
|---------------|--------|------|------|
| Eudragit 표준용액 | 0.5mL | 1mL | 2mL |
| 고추냉이 표준용액 | 19.5mL | 19mL | 18mL |

- 고추냉이와 Eudragit이 적정하게 혼합된 용액은 진공건조를 통하여 Ethanol을 모두 날림.
- 가루형태의 1%, 5%, 10% 장용코팅 고추냉이는 4°C에서 보관.

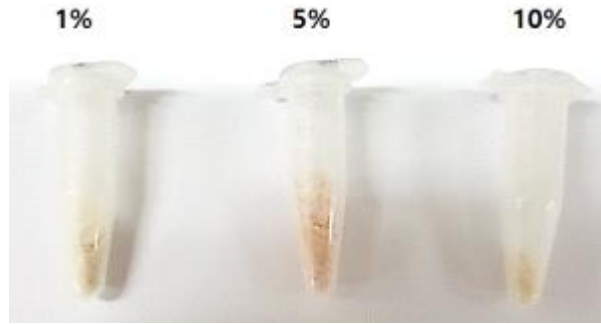


그림2.5.20. 완성된 1%, 5%, 10% 장용코팅 고추냉이 가루



그림2.5.21. 고추냉이, 장용코팅 고추냉이의 가루형태 비교

(라) 수화작업 (Hydration)

- in vitro 또는 in vivo 실험을 위해서 코팅제제를 용액상태로 만듦.
- 장용코팅 고추냉이로서 5 mg/mL의 농도로 PBS에 섞은 후 1.5시간 동안 음파에너지를 가하여 엉겨 붙은 것이 없도록 함.



그림2.5.22. 수용액 상태의 장용코팅 고추냉이

- Dynamic Light Scatter (DLS)를 이용하여 완성된 장용코팅 고추냉이의 물리화학적 특성을 분석. 코팅 전 후의 입자크기와 표면전하 (Zeta potential)를 측정함. 고추냉이는 본래 (+)의 표면전하를 띠는데 표면에 (-) 전하를 띠는 Eudragit으로 코팅이 되면서 장용코팅 고추냉이의 표면전하가 바뀌었음.

표2.5.14. 장용코팅 고추냉이의 물리화학적 성질

| | 크기 (nm) | 표면전하 (mV) |
|---------------|----------|-------------|
| 고추냉이 | 1004±87 | 30.24±1.873 |
| 1% 장용코팅 고추냉이 | 2367±137 | -2.31±0.67 |
| 5% 장용코팅 고추냉이 | 2044±126 | -20.34±1.23 |
| 10% 장용코팅 고추냉이 | 2738±161 | -15.72±1.32 |

(3) 고추냉이 지표성분 방출 실험

- 대장 환경 (pH 7.0)과 위 환경 (pH 1.2) 에서 1%, 5%, 10% 장용코팅 고추냉이로부터 시간에 따라 방출되는 Sinigrin의 양을 LC-MS/MS를 이용하여 정량분석함.
- 1% 장용코팅 고추냉이는 두 pH에서 모두 Sinigrin이 거의 방출되지 않았으며 큰 차이가

없었음. 코팅이 거의 되지 않아 수용액 상태에서 Sinigrin이 가수분해 되었다고 추측.

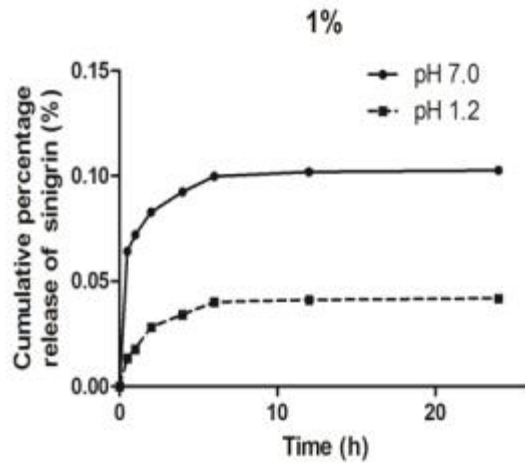


그림2.5.23. 1% 장용코팅 고추냉이의 pH에 따른 방출 실험 결과

- 5% 장용코팅 고추냉이는 pH 7.0에서 24시간 동안 80%까지 Sinigrin이 방출되는 반면, pH 1.2에서는 약 20%만 방출되었음.

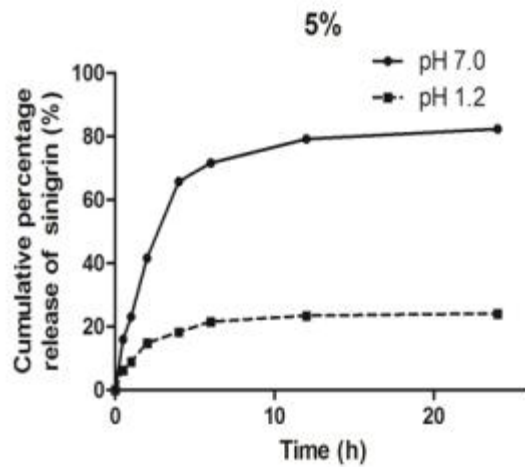


그림2.5.24. 5% 장용코팅 고추냉이의 pH에 따른 방출 실험 결과

- 10% 장용코팅 고추냉이는 24시간 동안 15% 미만의 Sinigrin이 방출되었으며 두 pH에서 큰 차이를 보이지 않음. 코팅막이 두꺼워서 방출되는 오랜 시간이 걸리는 것으로 결론.

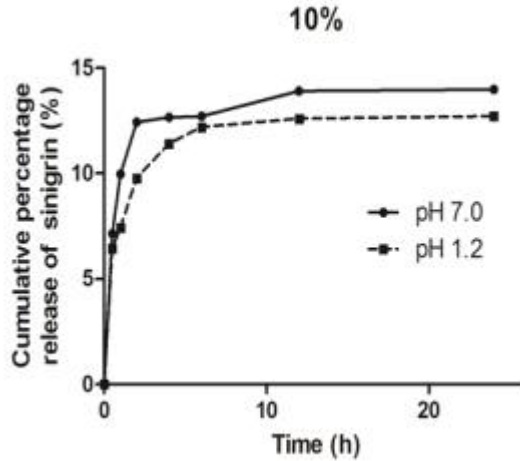


그림2.5.25. 10% 장용코팅 고추냉이의 pH에 따른 방출 실험 결과

- 3가지의 장용코팅 고추냉이의 pH 별 방출실험 결과 5% 장용코팅 고추냉이가 가장 좋은 제제임을 확인. 추가 모든 실험은 5% 장용코팅 고추냉이로 진행하기로 결정.

(4) 장용코팅 고추냉이의 최적화 및 안정성 확인

- 처음 제조했던 5% Eudragit 장용코팅 고추냉이의 입자크기가 2 μ m로 크다고 판단, 고추냉이를 Eudragit으로 코팅하기 전 유발유봉으로 한번 더 갈았음. 곱게 갈린 고추냉이는 다시 5%의 Eudragit으로 코팅한 후 물리화학적 특성 확인. 최종 장용코팅 고추냉이를 nm대의 크기로 줄임.

표2.5.15. 최적화된 5% 장용코팅 고추냉이의 입자크기 및 표면전하

| | 크기 (nm) | 표면전하 (mV) |
|-----------|---------------------|-------------------|
| 고추냉이 | 706.66 \pm 21.01 | -16.15 \pm 0.38 |
| 장용코팅 고추냉이 | 781.15 \pm 102.44 | -7.21 \pm 1.01 |

- 장용코팅 고추냉이의 실온안정성 확인. 장용코팅 고추냉이 가루를 유리 vial에 담아 실온에 두고 한달 간격으로 입자크기, 표면전하 및 함유된 Sinigrin의 양 측정.

표2.5.16. 시간에 따른 장용코팅 고추냉이의 입자크기, 표면전하 및 Sinigrin 함유량

| 시간 | 크기 (nm) | 표면전하 (mV) | Sinigrin 함유량 (%) |
|-----|-----------------------|-------------------|------------------|
| 0개월 | 781.15 \pm 102.44 | -7.21 \pm 1.01 | 100 |
| 1개월 | 1123.96 \pm 85.42 | -9.55 \pm 1.14 | 67.38 |
| 2개월 | 5061.83 \pm 1556.80 | -17.82 \pm 0.66 | 9.76 |

- 다음의 조건을 수정하여 안정성 실험을 다시 진행함.
 - 1) 무 수분 환경 (Moisture free conditions)
 - 2) 밀폐용기 (Well closed container)

(5) Eudraguard를 이용한 장용코팅 고추냉이 제조 준비

- 의약품용 Eudragit 대신 식품용 Eudraguard를 이용하여 새로운 장용코팅 고추냉이 제조 예정.
- 고추냉이에 함유된 Sinigrin의 가수분해를 막기 위해 Eudraguard를 Ethanol에 녹여 Eudraguard 표준원액 준비.

- Eudraguard의 종류에는 Control, Biotic, Natural 3가지가 있으며 Control과 Biotic은 액체상태, Natural은 고체상태(가루)임.
- Eudraguard Biotic 1 g을 동결건조를 거쳐 가루상태로 만든 다음 Ethanol에 녹임. Eudraguard Biotic은 수용성 폴리머이므로 Ethanol에 잘 녹지 않아 NaOH를 첨가하여 완전히 녹는 것을 확인.

Powder Eudraguard + Ethanol

Powder Eudraguard + NaoH + Ethanol



그림2.5.26. Eudraguard Biotic의 Ethanol 용해도 실험 결과

- Ethanol을 이용하여 Eudraguard Biotic을 이용하여 식품용 5% 장용코팅 고추냉이를 제조하고 물리화학적 특성, 함유된 Sinigrin의 방출 실험, 안정성 실험 진행.
- 실온 조건에서 9 주 동안 보관 한 S100 및 Biotic 코팅 된 와사비 제제의 경우 입자 크기, 제타 전위 및 Sinigrin 함량에 유의한 차이가 없음.

표2.5.17. 안정성 시험을 위한 장용코팅 고추냉이의 입자크기 및 표면전하

| Samples | Particle Size (nm) | Zeta Potential (mV) | Sinigrin Content (1 g of Wasabi) |
|---------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|
| Non-coated | 3316.95 ± 346.13 | -19.36 ± 0.92 | 778.45 µg |
| S100 Coated | 3363.34 ± 424.81 | -17.87 ± 1.59 | - |
| Biotic Coated | 2410.96 ± 199.28 | -19.76 ± 0.64 | - |

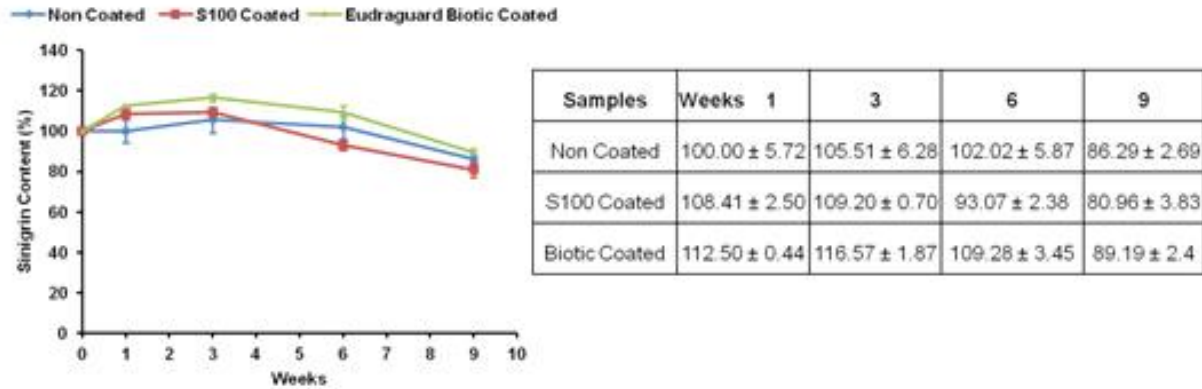
표2.5.18. 시간에 따른 장용코팅 고추냉이의 입자크기 (nm)

| Sample | Weeks 0 | 1 | 3 | 6 | 9 |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Non coated | 3316.95 ± 346.12 | 2572.84 ± 244.14 | 3329.54 ± 410.35 | 4279.7 ± 461.24 | 1693.84 ± 234.48 |
| S100 Coated | 3363.34 ± 424.81 | 2497.36 ± 129.95 | 3208.14 ± 230.74 | 4226.24 ± 403.13 | 2184.8 ± 505.83 |
| Biotic Coated | 2420.96 ± 199.28 | 2365.92 ± 138.56 | 2772.74 ± 313.10 | 3263.08 ± 372.56 | 1928.22 ± 440.98 |

표2.5.19. 시간에 따른 장용코팅 고추냉이의 표면전하 (mV)

| Samples | Weeks 0 | 1 | 3 | 6 | 9 |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Non coated | -19.36 ± | -14.96 ± 1.96 | -19.36 ± 0.39 | -21.43 ± 0.75 | -15.20 ± 0.97 |
| S100 Coated | -17.87 ± 1.59 | -14.45 ± 1.22 | -15.74 ± 1.03 | -20.08 ± 0.64 | -17.94 ± 0.57 |
| Biotic Coated | -19.75 ± 0.64 | -12.08 ± 1.34 | -16.05 ± 0.86 | -20.39 ± 0.58 | -18.27 ± 1.22 |

표2.5.20. 시간에 따른 장용코팅 고추냉이의 Sinigrin 함량 변화 (%)



- 이로써 식품원료로 사용가능한 Biotic으로 코팅한 홀푸드형 식품 가공 기술을 완료하였음. 장용성 코팅한 와사비 입자는 공기와 수분에 불안정한 유효성분 Sinigrin을 보호하는 효과를 가짐.

마. 국내외 사례 조사 (경쟁제품)

- 2013년 기준 장건강 건강기능식품 시장은 총 1,440억원 생산실적으로 상위 5개 기능성에 속하며 (그림26), 전체 기능성 시장의 약 4.9%를 점유하고 있는 것으로 조사됨.

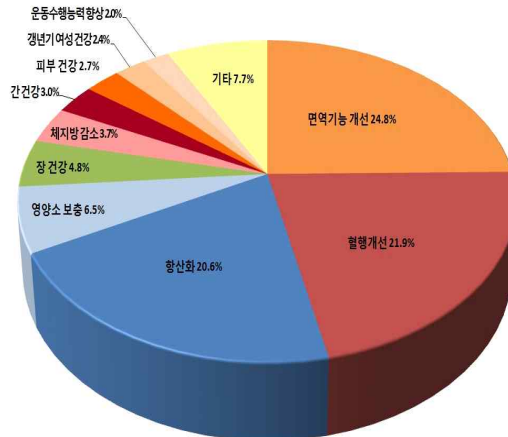


그림2.5.27. 기능성별 건강기능식품 생산실적 (점유율)('13.12.31.기준, 출처: 식약처)

- 대표적인 장건강 건강기능식품 소재는 알로에겔, 프로바이오틱스, 식이섬유 등을 꼽을 수 있으며, 개별인정형소재는 락투로스 파우더, 비즈왁스알코올, 감초추출물, 아티초크 추출물 등이 있음.

표2.5.21. 건강기능식품 장건강 원료

| Category | Sub-Category | 고시형 | 개별인정형 |
|-------------------------------|--------------------|-------|----------------|
| Gastro-intestinal (GI) Health | Stomach Health | 알로에 겔 | 비즈왁스알코올, 감초추출물 |
| | Digestive function | - | 아티초크 추출물 |

| | | | |
|--|----------------------------|--|--|
| | Colon health | 알로에 겔, 프락토올리고당, 유산균 | 이소말토올리고당, 대두올리고당, 라피노스, 커피만노올리고당분말, 자일로올리고당, 락추로스 파우더 |
| | Colon function improvement | 알로에 전잎, 식이섬유 (구아검/구아검 가수분해물, 글루코만난, 난소화성말토덱스트린, 대두식이섬유, 목이버섯, 밀식이섬유, 보리식이섬유, 아라비아검, 이눌린/치커리추출물, 차전자피, 폴리덱스트로스) | 분말한천 GA-900, 이소말토올리고당, 대두올리고당, 라피노스, 커피만노올리고당분말, 자일로올리고당 |

- 자사는 장건강 분야의 건강기능식품으로 알로에겔 제품인 ‘알로엑스골드 맥스피’와 알로에 전잎 제품인 ‘아보민플러스’를 가지고 있음 (표22).

표2.5.22. 유니베라 장건강 제품 Portfolio

| Category | Sub-Category | 유니베라 장건강 제품 | |
|------------------------------|----------------------------|-------------|-----------|
| | | 제품유형 | 제품명 |
| Gastrointestinal (GI) Health | Stomach Health | 알로에 겔 | 알로엑스골드맥스피 |
| | Digestive function | 효소식품(일반식품) | 빌리브 효소 |
| | Colon health | 알로에 겔 | 알로엑스골드맥스피 |
| | Colon function improvement | 알로에 전잎 | 아보민플러스 |

- 유니베라는 3차년도 제품화를 위한 2가지 방안을 검토함.
- 하나는 ‘아보민플러스’ 대체제품으로 ‘식이섬유와 락추로스 파우더’의 기능성을 가진 제품이 며, 다른 하나는 ‘프로바이오틱스’ 제품임.
- 두 방안 모두 건강기능식품으로 주기능성 (main health claim)으로 ‘배변활동 원활에 도움을 줄 수 있음’, ‘유익균 증식 및 유해균 억제에 도움을 줄 수 있음’이라는 복합적인 장건강 기능성을 가지는 제품임.
- 알로에전잎이 주성분인 ‘아보민플러스’ 대체 장건강 제품을 검토하기 위해 제2협동과제를 통해 알로에전잎과 락추로스 파우더의 변비해소 기능성을 비교 평가하였음. 알로에전잎은 변비에 대한 즉효성이 뛰어나므로 ‘아보민플러스’를 대체 했을 경우, 이에 상응하는 변비해 소 기능성이 있는 제품을 개발하여야 함.
- 알로에전잎의 유효성분은 안트라퀴논으로 자극성 기전으로 배변기능을 촉진하여 변비 현상 이 있을 시 섭취하도록 권장함. 반면, 락추로스 파우더는 삼투성 기전으로 배변기능을 촉진 하므로 항시 섭취가 가능함.
- 본 과제에서 도출된 소재를 활용하여 IBS/IBD로부터 도움을 줄 수 있는 종합적인 장건강 보호 건강기능식품 제품을 개발하였음.
- 2013년 소화기관용약의 생산실적은 16,327억원이었음 (2016년 18,248억원, 한국제약바이오 협회 발행 의약품생산실적 기준). 국내 의약품 장건강 시장의 주요 소재는 유산균, 무수바바 로인, 식이섬유로 건식의 소재와 크게 다르지 않은 것으로 나타남.

표2.5.23. 2013년 소화기관용약 분류별 생산실적

| | | | | (단위:천원) |
|------|---------|-------|-------------|---------|
| 분류번호 | 약 효 군 별 | 품 목 수 | 생 산 금 액 | |
| 231 | 치과구강용약 | 164 | 148,505,971 | |
| 232 | 소화성궤양용제 | 545 | 791,073,401 | |

| | | | |
|-----|------------|-------|---------------|
| 233 | 건위소화제 | 166 | 100,594,257 |
| 234 | 제산제 | 173 | 95,178,534 |
| 235 | 최토제, 진토제 | 55 | 26,527,535 |
| 236 | 이담제 | 20 | 34,377,971 |
| 237 | 정장제 | 160 | 85,348,458 |
| 238 | 하제, 완장제 | 102 | 28,947,131 |
| 239 | 기타의 소화기관용약 | 676 | 322,208,475 |
| | 합 계 | 2,061 | 1,632,761,733 |

메디락DS장용캡셀




한미약품
2013년 의약품 생산실적 약 70억원
유형: 일반의약품
바실루스서브틸리스균, 스트렙토코카스페시 음균배양
가격: 13,000원, 100캡슐 (1일 2~3캡슐)

특장점

1. 시장 점유율 No.1 Original 정장제
2. 장용피 코팅으로 위산 파괴율 Zero
3. 고농축 생균 제제로 장질환의 원인 치료
4. 항생제 부작용인 설사 치료 효과 탁월
5. 경증의 소화 불량 치료

비오비타과립



일동제약
2013년 의약품 생산실적 약 62억원
유형: 일반의약품
가격: 17,000원.

유아용, 3개월이상부터 7세까지 복용가능

1일 4회 물, 우유등과 섞어서 섭취
노란색 알갱이의 미세한 옥수수맛

식욕부진, 복부팽만감, 정장(특히 인공영양아의 정장), 장내이상발효, 묽은 변, 변비, 영양장애(이유기 유아 및 편식아)

이베로가스트 액



한화제약
유형: 전문의약품
가격: 18,000원, 100 mL
1일 20방울 (약15알분)

효능/효과


1. 기능성 소화불량 및 과민성 대장증후군 같은 기능성, 운동성 위장질환치료
2. 위염증상치료의 보조요법(복통, 가슴쓰림, 팽만감, 위경련, 구역질)

성분함량
이베리스아마라 50% 에탄올린크(1.15~2.5)...15.0mL
인질리카부리 30% 에탄올린크(1.25~3.5)...10.0mL
마르티카리아꽃 30% 에탄올린크(1.2~4)...20.0mL
캐러웨이열매 30% 에탄올린크(1.25~3.5)...10.0mL
립시시술열매 30% 에탄올린크(1.25~3.5)...10.0mL
발염 30% 에탄올린크(1.25~3.5)...10.0mL
퍼퍼민트엽 30% 에탄올린크(1.25

그림2.5.28. 대표적 의약품 경쟁제품

바. 제형 검토 및 관능평가 (장용성, 음료, 과립 등)

젤리-트리플뷰티 (LG리튬)



기능성 유형: 락투로스 파우더, 히알루론산, 비타민D, 비타민E, 아연
가격: 42,000원, 20g*10포*3박스 (30일)
셀링포인트: 장건강을 지킬 수 있는 락투로스로 장 비우기, 히알루론산으로 피부 속 보습 채우기, 항산화 비타민 E로 세포 손상방지
관능평가: 탱글탱글한 텍스처의 젤리타입. 백포도과즙농축액과 레몬농축액을 사용하여 새콤달콤한 맛을 구현함.

정제-호본정 (마임)



기능성 유형: 락투로스 파우더, 나이아신, 셀렌, 아연
가격: 215g (420mg*513정)
120,000원, 1일 9정 (2.5개월분)
셀링포인트: 장내 건강을 돕고 부족할 수 있는 영양을 보충해주는 건강기능식품
• 부원료로 자일로올리고당, 차전자피, 알로에겔농축분말 등을 더하여 장내 건강을 돕고 부족할 수 있는 영양을 보충.
• 컨셉원료: 특허성분인 건조효모4-인테린스

액상-세븐데이즈 원투 (KG라이프앤진)



기능성 유형: 알로에겔
가격: 100g*7병/7일/45,000원
셀링포인트: 디톡스 개념의 제품으로 섭취단계를 두 단계로 구분함.
1단계(3일)- 부원료로 발효함초, 다시마, 유문, 레몬농축액, 프락토올리고당 등을 처방함.
2단계(4일)-101가지 산야초 발효농축액, 베리류를 처방함.
관능평가: 액상제품으로 단맛이 매우 강함.
기타: 락투로스 파우더가 함유된 타 액상 식품도 단맛이 매우 강함 (예. 모닝유슬림(췌모닝원), 모닝프린트(췌안국건강)).



그림2.5.29. 경쟁제품 관능평가 및 제형 검토

사. 홀푸드 가공기술개발 (식감 및 기호도 증대), 처방개발연구

- 상업화된 산약, 무, 황기, 고구마 분말의 입자크기, 식이섬유 함량을 측정하여 제품화 소재로서의 적합성을 검토함.
- 시중에 판매되고 있는 농산물 (산약, 무, 황기, 고구마) 분말이 미세입자 수준으로 고운 가루 형태임을 확인함.

표2.5.24. 시중에 판매되고 있는 산약, 무, 황기, 고구마 분말 입자 크기

| Samples | 구입처 | Particle Size (nm) | | Poly Dispersity Index |
|---------|--------|--------------------|---------|-----------------------|
| 산약 | 안동마 | 3411.66 ± | 1227.27 | 1.72 ± 0.59 |
| | 고려한방식품 | 3590.67 ± | 1604.46 | 0.89 ± 0.06 |
| 무 | 산들약초 | 2756.46 ± | 772.16 | 0.91 ± 0.04 |
| | 조은약초 | 2481.97 ± | 313.17 | 1.09 ± 0.17 |
| 고구마 | 조은약초 | 3333.56 ± | 1156.83 | 0.69 ± 0.25 |
| 자색고구마 | 조은약초 | 2961.67 ± | 448.26 | 0.64 ± 0.32 |
| | 산들약초 | 2680.73 ± | 974.16 | 0.82 ± 0.32 |
| 황기분말 | 고려한방식품 | 2798.77 ± | 1605.95 | -0.3 ± 0.89 |

- OEM 업체를 통해 식이섬유 제품 사과맛과 레몬맛 샘플을 요청함. 추가 샘플 제작을 위해 맛분말, 향분말을 소싱 진행함.

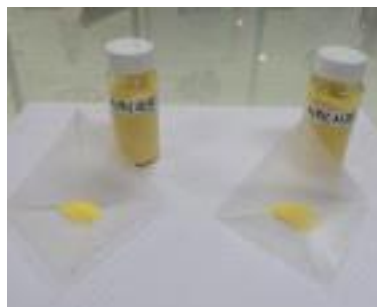


그림2.5.30. 식이섬유 제품 최초 시작품. 레몬맛, 사과맛

- 타겟하는 고객 연령층, 제품 특성에 어울리는 맛계열을 제안함.
 - ① 시지 않는 과일맛 - 레몬맛과 사과맛 모두 새콤달콤하다는 의견이 있었음.
어린아이가 좋아할 것 같으며, 신 것을 못 먹는 사람에게는 힘든 맛임.
분말이 원재료 특성상 노란색을 띄기 때문에 노란 색깔의 과일 맛이 선호됨. 예, 파인애플.
 - ② 박하맛 - 원재료명에 기재되어 있는 박하와 맛의 통일성이 있음.
 - ③ 한방 또는 곡물맛 - 누룽지맛 같은 한국적인 맛. 어르신 입맛에 맞을 것 같은 맛.
 - ④ 플레인맛 - 자연 그대로의 개념, 무합성향료의 플레인맛.

아. 관능검사

- 맛계열 제안 후 6가지 샘플을 수령함.
- 기존 레몬맛, 사과맛에 더하여 파인애플맛, 박하맛, 누룽지맛, 플레인맛 샘플을 수령하였음.
- 6가지 샘플로 유니베라 내부 관능평가를 진행하였으며, 유니베라 건대 대리점에서 실 고객층을 대상으로 관능평가를 진행함.
- 유니베라 대리점 소비자들은 6가지 샘플 중 플레인 맛을 가장 선호함.



그림2.5.31. 식이섬유 제품 외부 (유니베라 건대 대리점) 관능평가

자. 제제 및 제형 연구

- 샘플 제작을 통해 본 샘플은 인습이 잘 되며, 섭취 시 입안에서 뭉침 현상이 발생하는 것을 확인함. 또한 락투로스파우더의 particle size가 다른 배합 원료와 크기 차이를 보여 균질성 확보를 위해 과립공정이 필요함을 확인함.
- 플레인맛 샘플 10 kg를 scale-up 과립 생산하여 1차 제품 필드테스트를 진행함. 생산 공정 중 과립 공정 추가 시 이전 단순 분말 제형에 비해 인습이 없고, 입안에서 뭉침 현상이 없음.
- 두 배수로 생산된 과립 제형의 샘플은 2.25 g 또는 5 g 스틱포에 시험포장생산을 진행함.
- 2.25 g 스틱포를 하루 2회 섭취하는 제품 필드테스트를 진행함.
- 1차 제품 필드테스트 시 심한 방귀 발생을 호소하는 대상자들이 있었음. 이를 보완하기 위해 문헌검토 후 락투로스파우더와 동일한 효능이 있지만 복부 가스발생이 적은 락티톨로 원료 변경을 진행하였으며, 그 함량을 감량함.



그림2.5.32. 두 가지 사이즈 스틱포로 제작한 시작품

차. 장건강 증진용 식품 시작품 제작

(1) 시작품 제조 및 최종 필드 테스트 진행

표2.5.25. 필드테스트 개요

| | |
|------|---|
| 목적 | 배변활동 개선 제품의 사전 체험을 통한 효능 및 안전성 검증 |
| 대상인원 | <ul style="list-style-type: none"> 21명 (유니베라 노원제일 대리점 13명, 일산마두 대리점 8명) 평균 60세 (40대~50대 10명, 60대~70대 11명) |
| 기간 | <ul style="list-style-type: none"> 2017. 8.11 - 2017.9.11 (섭취기간 2주) |
| 선정기준 | <ul style="list-style-type: none"> 40대~70대 여성 본체험단에서는 주당 (weekly) 배변횟수가 평균 3회 이하거나, 단단하거나 덩어리진 변, 불완전 배변감 등으로 배변에 불편을 호소하는 자 콩, 산약, 황기에 알러지가 없는 자 배변활동에 영향을 미치는 중증질환이 없는 자 배변일지를 이해하고 작성할 수 있는 자 |
| 체험제품 | <ul style="list-style-type: none"> 난소화성말토덱스트린 3.9 g/day & 제비콩 (백편두)+산약+황기추출물 270 mg/day 1일 1회, 1회 1포(6 g)을 충분한 물에 녹여 섭취 |
| 평가내용 | <ul style="list-style-type: none"> Primary Endpoint : 주당 배변횟수와 변의 형태 Secondary Endpoint : 제품 섭취 전후 변비 증상에 대한 삶의 질 평가 |
| 평가방법 | <ul style="list-style-type: none"> 제품섭취전 (Week 0)와 후 (Week 2) 데이터는 Paired T-Test로 비교 형태에 따른 변비변, 정상변, 설사변 형태에 따른 횟수는 ANOVA로 통계분석 |

(가) 필드테스트결과

- 배변 빈도: 배변일수와 배변횟수 모두 유의적으로 증가
- 변의 형태: 정상변의 횟수가 설사변비형 변에 비해 유의적으로 증가
- 변비 증상에 대한 삶의 질 : 변비로 인한 근심걱정, 신체적 불편함, 심리적 불편함이 모두 유의적으로 감소

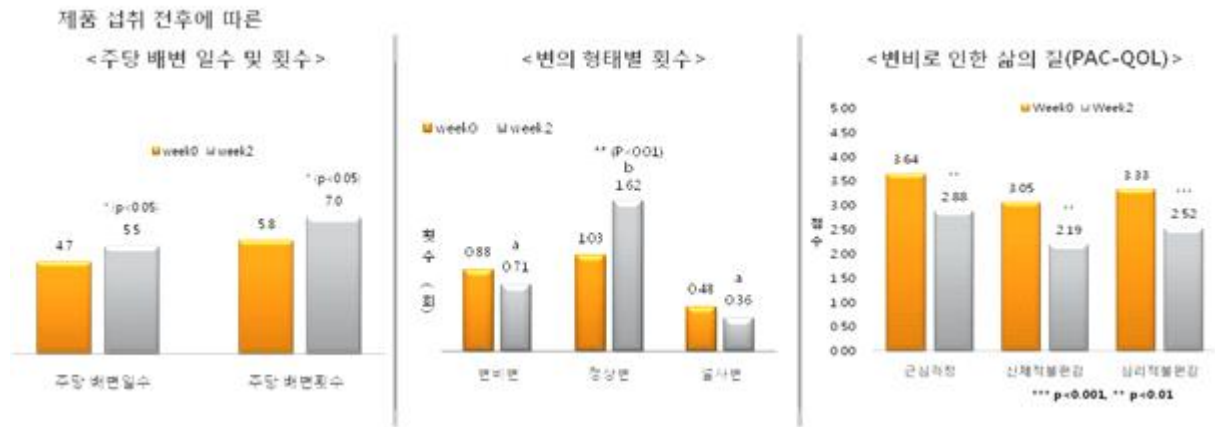


그림2.5.33. 최종 필드테스트 결과

카. 최적조합소재의 관능평가 및 taste masking

- 백편두, 산약, 향기가 배합된 장건강 증진용 식품의 내부 관능평가 및 taste masking을 진행하여 최종 제품 배합비를 도출함.



그림2.5.34. 백편두, 산약, 향기 배합비를 달리하여 샘플 준비

타. 제품 출시

200~300 ml 냉/온수 + 스틱 1포

- 원활한 배변으로 건강하고 상쾌하게
- 유니베라 독자성분 식용혼합추출물 GBC 함유(무설탕)
- 보이차, 연차유, 홍차 등 다양한 허브 함유(무설탕)

| | |
|------|--|
| 제품명 | 비움 클렌즈 |
| 제품유형 | 건강기능식품/ 난소화성말토덱스트린 |
| 제품컨셉 | 노폐물·독소 배출과 스트레스를 동시에 케어해 주는 데일리 클렌즈 |
| 제품구성 | 6g x 28 포 / 28일분 |
| 섭취방법 | 1일 1회, 1회 1포를 200~300ml의 물에 타서 섭취 |
| 소비자가 | 60,000원 |

그림2.5.35. 최종 제품 정보

- (1) 제품개발방향 : 변비 (숙변)을 유발하는 근본적인 원인을 차단 + 장내 환경 개선

- (가)식이섬유 공급으로 배변활동을 원활하게. 장내 노폐물과 독소를 빠르게 배출
- (나) 물에 타서 마시는 분말 형태의 제품으로 충분한 수분섭취
- (다) 유니베라 독자개발 소재로 장-뇌축의 안정화 (스트레스 완화, 장내 환경 (염증)개선)
- (라) 클렌즈, 심신 안정에 도움을 주는 다양한 식물소재 부원료 함유

(가) 식이섬유 공급

- ① 변의 부피 증가 및 연동운동 촉진으로 배변 활동을 활발하게 하고, 장내 독소를 빠르게 배출
- ② 장내 유익균의 먹이가 되어 장 환경 개선 (프리바이오틱스 역할)
- ③ 급원 : 주원료 - 난소화성말토덱스트린 / 부원료 - 치커리뿌리추출물, 글루코만난
- ④ 식이섬유 제공량: 약 3.35 g /day
- ⑤ + 락티톨 (삼투성 하제) : 수분을 대장으로 끌어들이어 변을 부드럽게, 배변감 증진

(나) 충분한 수분 섭취

제품 1포 (6 g)를 200~300 ml 의 물에 타서 섭취 (기호에 따라 물량 조절)

(다) 장뇌축의 안정화 (Gut-Brain Axis)

- 국책과제 (IPET) 연구를 통해 선정된 유니베라 만의 독자소재로 장-뇌축의 안정화
- ① 제비콩 (백편두): 스트레스 완화, 심신 안정을 통한 과민성장증후군 개선
- ② 산약, 황기: 장내 염증 개선을 통한 장내 환경 개선 (장벽 강화, 장누수증후군 개선)

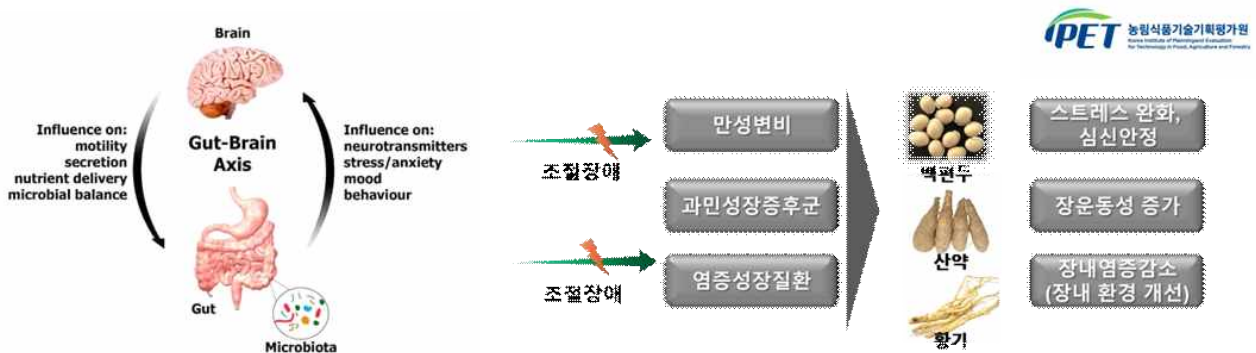


그림2.5.36. 제품컨셉 : 장뇌축의 안정화 (Gut-Brain Axis)

- 고유명칭부여: 유니베라가 독자 개발한 원료의 차별성과 기능성을 부각

(라) 다양한 부원료

- 클렌즈, 심신 안정에 도움을 주는 다양한 식물소재 부원료 함유

체내 클렌즈



레몬, 홍차, 보이차

: 항산화, 지방흡수 저해, 체지방 분해, 노폐물 배출, 이노작용에 도움

심신 완화



연자육

: 심신안정, 신경과민, 우울증, 스트레스
완화에 도움

그림2.5.37. 제품 컨셉 : 클렌즈, 심신안정에 도움을 주는 부원료



그림2.5.38. 최종 제품 제형

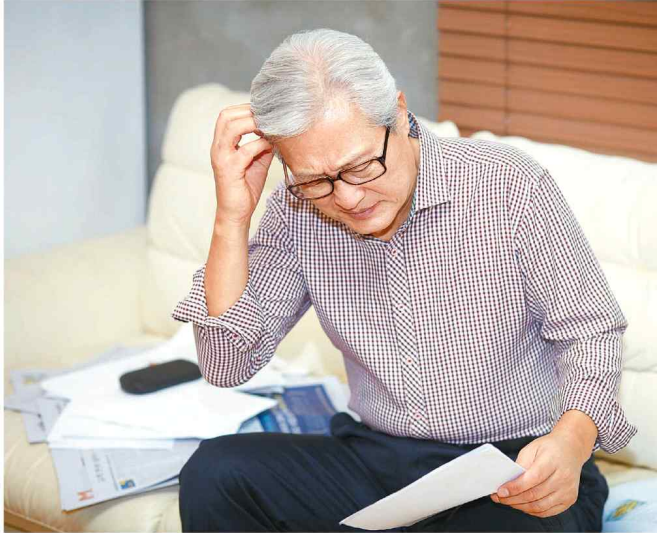
(마) 매출액

- 본 과제를 통해 출시한 제품인 비움 클렌즈는 출시 후 3개월동안 864백만원의 매출을 창출함.
- 비움클렌즈 연매출액으로 17억을 예측할 수 있음.
- 2016년 국내 건강기능식품 장건강 기능성 분야의 생산실적은 2,788억원 (2017 건강기능식품 시장 현황 및 소비자 실태조사, 한국건강기능식품협회)이므로 국내 장건강을 위한 건강기능식품 시장에서 비움클렌즈가 0.6%의 시장점유율을 가질 수 있음.



그림2.5.39. 최종 제품 홍보물

오메가3, 뇌 기능 향상 도와... “하루 500mg 이상 섭취하세요”



우리나라 노인 10명 중 1명은 치매 환자다. 중앙치매센터에 따르면 현재 711만 명의 노인 인구 중 치매 환자는 72만여 명이다. 2024년에는 100만 명, 2041년에는 200만 명을 넘어설 것으로 예상된다. 치매는 가족이 쉽게 고통 받는 질환으로 경제적 부담도 크다. 치매노인실태조사에 따르면 치매 환자 1인당 돌봄 비용은 약 2000만 원에 이른다.

DHA-EPA로 구성 오메가3지방산 체내 생성 안돼 음식으로 보충해야 고등어·참치 등 생선 해조류에 풍부

DHA, 신경 호르몬 전달 촉진하고 두뇌 작용 도와 학습능력 향상시켜

EPA, 혈중 콜레스테롤 수치 낮추고 혈전 생성 막는 ‘두뇌 건강의 핵심’

DHA 뇌세포 재생하는 주요 성분

뇌는 생각과 판단, 운동, 감각 등을 담당하는 중요한 기관이다. 무게는 약 1300g에 지나지 않지만 1000여 개 정도의 신경세포가 밀집되어 있는 신경 덩어리이다. 30세 이후부터 우리 뇌세포는 노화로 DHA를 비롯한 뇌 속 성분이 줄어들면서 기억력이 감퇴하기 시작한다. 또 지속적인 스트레스와 과도한 일로 뇌를 심취, 수면 부족, 우울함 등은 뇌세포를 파괴하게 만들고 기억력을 저하시킨다. 뇌가 늙을수록 뇌의 부피와 무게는 감소하는데 70, 80세에 이르면 20, 30세에 비해 남성은 최대 15.9%, 여성은 최대 14.5%까지 감소한다.

DHA는 세포 간 원활한 연결을 도와 신경 호르몬 전달을 촉진하고 두뇌 작용 도와 학습능력을 향상시킨다.

기억력을 개선하기 위해서는 뇌세포를 손상시키는 물질로부터 뇌세포를 보호하고 두뇌활동에 필요한 산소와 영양소를 충분히 공급해야 한다.

여기에 오메가3지방산 섭취가 도움이 될 수 있다. 오메가3는 불포화지방산의 한 종류로 체내에서 생성되지 않아 음식으로 보충해야 한다. 주로 고등어·참치·연어 같은 생선 해조류에 풍부하다. DHA와 EPA는 오메가3지방산을 구성하는 성분으로 뇌세포막을 둘러싸고 있다. DHA는 뇌, 신경조직, 망막조직의 중요 구성

성분이다. 두뇌의 60%는 지방인데 DHA가 이 지방의 20%를 차지한다. DHA는 세포 간 원활한 연결을 도와 신경 호르몬 전달을 촉진하고 두뇌 작용을 도와 학습능력을 향상시킨다.

옥스퍼드 대학 연구에 따르면 두뇌와 망막의 구성 성분인 DHA를 많이 섭취할수록 읽기와 학습 능력이 더 높은 것으로 밝혀졌다. 더불어 EPA는 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추고 혈전이 생기는 것을 막는다. 우리 몸은 심장이 박동할 때 전체 혈액의 약 20~25%가 뇌로 공급되는데 뇌의 원활한 혈액 순환은 두뇌 건강

의 핵심이다. 뇌에 혈액이 원활하게 공급되지 않으면 그만큼 두뇌가 제 기능을 하지 못하게 된다.

두뇌 기능 향상에 도움

오메가3의 뇌 기능 향상 효과는 연구를 통해 입증됐다. ‘생선-오메가3 섭취가 인지력에 미치는 영향’에 대한 연구 요약과 진보 학술지인 2013년에 발표했다. 이 연구에서는 일주일에 한 번 이상 생선을 섭취하는 68세 이상 1600명을 관찰한 결과 알

츠하이머 발병 위험이 35% 감소한 것을 확인했다. 또 다른 연구에서는 76세 이상 노인 889명을 9년 동안 추적 조사한 결과 혈중 DHA 농도의 상위그룹이 하위그룹에 비해 치매 위험이 절반인 것으로 나타났다. 혈중 DHA 농도에 따라 인지력에 차이가 있음을 확인한 것이다.

경도인지장애 노인을 대상으로 DHA와 EPA 섭취 효과를 확인한 연구결과도 있었다. 경도인지장애는 정상적인 노화에서 기대되는 수준 이하로 인지 능력, 기억력이 떨어진 상태를 뜻하는데 정상적인 노화와 치매의 중간 단계라 할 수 있다. 이러한 경도인지장애 환자들이 매일 0.3~1.7g의 DHA와 EPA를 섭취하도록 한 결과 즉각적 회상력, 집중력, 속도 등 일부 인지 기능에 있어서 유의적인 개선 효과가 나타났다.

일일 500mg 이상 섭취 권장

오메가3는 두뇌 기능 향상과 더불어 각종 혈관질환을 예방하는 효과로도 잘 알려져 있다. 콜레스테롤 수치를 낮추고 혈전 생성을 막아 혈액순환을 원활하게 한다.

북극 아누티에스키모인들은 다른 인종에 비해 심장 질환이 상당히 높은 편임에도 불구하고 심혈관질환이 드물다. 그 원인으로 학계는 생선 기름에서 필수지방산이 많은 음식을 섭취했기 때문인 것으로 보고 있다.

그러나 오메가3는 체내 생성이 불가능 식품을 통해 섭취해야 한다. 오메가3가 함유된 건강 기능식품을 구입할 때는 용량을 꼼꼼하게 체크해보는 것이 좋다. 식품의약품안전처에 따르면 오메가3 하루 권장 섭취량은 DHA-EPA 500~2000mg으로 500mg 이상의 오메가3를 복용해야 건강 효과를 기대할 수 있다. 세계 각국에서는 500~1000mg을 적절한 주요 용량으로 보며 4000mg 이하 섭취를 권장한다.

정지혜 기자 chj@donga.com

류머티즘 관절염 통증 잡으면 끝? “꾸준한 관절손상 막는 치료 필요”

올해는 이른 두워 때문에 대중교통을 비롯한 많은 사람들이 이용하는 공공 실내공간에서 에어컨 등의 냉방기기를 한여름처럼 가동시키는 일이 잦아졌다. 이런 환경에서는 평소 관절이 불편하다고 느꼈던 사람의 경우 그 증상이 더욱 심해지거나 시린 듯한 증상이 나타날 수 있다. 단순한 노화 현상이나 갑작스러운 기온 차 때문 생기는 일시적인 현상도 여겨 받아들이는 경우가 많은데 병원을 찾아 정확한 진단을 받아보는 것이 중요하다. 류머티즘 관절염의 신호일 수 있기 때문이다.



류머티즘 관절염을 앓고 있는 환자의 손 모습. 통증으로 인해 엄목 손가락 관절이 붓고 통증이 생길 수 있다. 동아일보DB

류머티즘 관절염이란 자기면역 체계의 이상으로 발생하는 질병 중 하나다. 면역 세포들이 관절을 감싸는 활막을 공격해 염증을 발생시키고 통증을 유발한다. 관절을 굳게 만들기도 한다. 단순한 관절 질환이 아닌 전신 면역성 질환으로 발병하면 신체 곳곳에서 다양한 증상들이 나타난다. 아침에 일어나 심하게 관절이 뻣뻣한 느낌이 드는 ‘조조강직’ 증상이 1시간 이상 이어지거나 스핀글 마디가 붓고 스뵤면 부위를 누르거나 움직이면 통증이 아파될 때 관절염 통증이 원인으로 의심할 수 있다. 또한 만성 피로, 근육 통증, 전신 쇠약감 등이 동반된다면 류머티즘 관절염을 의심해 볼 수 있으므로 즉시 류머티즘내과를 찾아 진단을 받아보기를 권한다.

류머티즘 관절염은 발병 이후 제대로 치료하지 않을 경우 2년 이내에 관절 변형이 발생할 확률이 80%에 달한다. 일단 관절 변형이 발생하면 되돌리기가 불가능하고 변형된 관절로 인해 여러 가지 장애가 발생할 수 있으므로 조기진단과 치료가 무엇보다 중요하다. 예전에는 환자들이

환자들이 사물을 망설이는 경우가 있다. 하지만 최근에는 통증을 80% 가까이 줄여 편의성을 높인 제제가 나오고 산정투여 적용으로 약20~10%만 환자가 부담하면 된다. 또 관절 변형이 오기 전 질병 활성도가 높을 때 사용하는 게 가장 효과적이고 의료진과 상의해 주사제를 결정하는 것이 좋다. 항TNF제제 외에도 서로 다른 기전을 가진 약제가 다양하게 개발돼 사용되고 있다. 생물학제제 선택 시에는 관절 손상을 막는 효과는 물론 평생 치료를 해야 하는 만성질환임을 감안해 장기적인 효과와 안전성, 사용상의 편의성 등을 살펴야 한다.

류머티즘 관절염 치료에서 가장 중요한 것은 꾸준함이다. 간혹, 필자를 찾아오는 환자 중에 류머티즘 관절염으로 진단받았음에도 불구하고 통증이 조금 사라지면 갑자기 치료를 중단하거나 투약을 했는데도 1~2개월 내에 크게 개선되지 않는다고 해서 임의로 약을 끊고 대증요법을 받거나 하는 경우가 꽤 있다. 질환의 특성상 다른 질환과 달리 즉시 치료 효과가 나타나는 것이 아니라 6개월 정도는 꾸준히 치료를 해야 효과가 나타나므로 인내심을 갖고 의료진의 지시에 따라야 할 것이다. 표면적으로 나타나지 않는 통증과 부기만 잡으면 되는 것이 아니라 염증 활성도를 낮춰 관절 손상을 예방하고 삶의 불편함을 최소화하는 것이 치료 목표라는 점을 의료진 뿐만 아니라 환자가 잘 이해하고 있어야 한다.

이 질환을 잘 몰라서 초기 통증이 있어도 견고하고 치료시기를 놓치거나 약의 효과가 미흡해 심한 관절 변형으로 인한 장애가 발생할 경우가 많았지만 최근 약제와 치료 방법이 발전해 조기에 발견하면 적절한 치료를 받을 수 있다. 당뇨병이나 고혈압과 같은 만성질환과 마찬가지로 충분히 관리가 가능해졌다.

류머티즘 관절염 치료는 스테로이드제와 비스테로이드소염제, 항류머티즘제, 생물학제제 등을 사용한다. 이 중 생물학제제는 류머티즘 관절염 발생에 관여하는 면역 세포를 억제해 치료 효과를 얻게 되는 약이다. 생물학제제 중 가장 많이 사용되는 항TNF제제는 인체 내에서 과도하게 활성화돼 염증을 유발하는 TNF라는 물질에 결합해 활동 자체를 차단하는 기전을 가지고 있다. 증상을 70% 이상 호정시키면서 관절 손상을 억제하는 효과가 있다. 다만 주사 시 통증과 자가 주사에 대한 거부감, 치료의 마지막 단계에서 쓰인다. 오해와 높은 비용 등으로

송 란 교수
광명희병원 류머티즘내과



백편두-황기... 상쾌한 장 건강 ‘솔루션’



복잡한 환경에서 다양한 상황을 마주하며 살아가야 하는 현대인들은 몸의 건강한 균형이 흐트러지기 쉽다. 특히 과도한 일장 속에서 긴장, 스트레스에 시달리는 직장인이나 수험생들은 ‘장뇌축(gut-brain axis: 장과 뇌의 연관 관계)’의 컨디션 저하되면서 변비와 설사 등 배변문제와 더불어 불안한 아랫배 통증으로 괴로움을 호소하는 경우가 있다.

유니베라의 비움클렌즈는 불편한 장의 원인을 다각도로 접근해 상쾌한 장 컨디션을 돕는 데 주력한 제품이다. 식물유래 시아세움인 난소화성폴리덱스트린을 주원료로 치커리 뿌리 추출물, 글루코만난 등 다양한 식이섬유와 락티폴을 담아 체내 유해 물질 배출을 돕고 건강한 장 환경 유지와 원활한 배변활동에 도움을 준다. 유니베라가 오

랜 연구를 통해 개발한 식물종합추출물 GB O(백편두, 황기, 마늘, 부들뿌리) 배합했다. 이 밖에 연자오, 보리차, 홍차, 레몬 등 다양한 원료를 담아 풍부한 맛과 향을 즐길 수 있는 것이 특징이다.

유니베라의 비움클렌즈는 상쾌한 장 컨디션을 유지할 수 있도록 돕는 ‘장기능식품’이라며 “불규칙한 생활 속에서 장 고민이 많은 분들에게 꼭 필요한 솔루션이 될 수 있기를 기대한다”고 말했다.

비움클렌즈는 차례별 간편하게 타서 마실 수 있는 분말형 제품이다. 식물유래 시아세움인 난소화성폴리덱스트린을 주원료로 치커리 뿌리 추출물, 글루코만난 등 다양한 식이섬유와 락티폴을 담아 체내 유해 물질 배출을 돕고 건강한 장 환경 유지와 원활한 배변활동에 도움을 준다. 유니베라가 오

그림2.5.40. 6월 20일 동아일보에 게재된 비움클렌즈 기사

2. 인체적용시험

가. 인체적용시험 개요

표2.5.26. IRB 제출 연구계획서 개요

| | |
|------------------|---|
| 인체적용시험 제목 | 과민성 장증후군 성인에서 DL-114006의 기능성 탐색을 위한 전향적 공개 단일군 인체적용시험 |
| 시험계획서 번호 | WMI-HCT-001 |
| 인체적용시험 디자인 | 다기관 (multi-center), 공개 (open label), 단일군 (single arm), 탐색시험 (pilot study) |
| 시험물질 | DL-114006 (백편두 추출물) |
| 대상자 | 과민성 장증후군 성인 |
| 인체적용시험 목적 | 본 인체적용시험은 과민성 장증후군 성인에 대해 복부통증의 변화를 평가함으로써, 시험물질 DL-114006의 안전성 및 유효성을 탐색적으로 측정하는 것을 목적으로 한다. |
| 인체적용시험 기간 | 2017년 11월 9일 (대상자 첫 방문일) ~ 2018년 7월 9일 (대상자 마지막 방문일) |
| 대상자 수 | 총 20명 등록 |
| 인체적용시험 의뢰자 | 대표이사: 이 병훈 (주)유니베라 서울시 성동구 아차산로 78 에코넷센터 |
| 인체적용시험기관 및 시험책임자 | 1) 대구가톨릭대학교병원 소화기내과 권중구 교수 대구시 남구 두류공원로 17길 33 2) 계명대학교 동산의료원 소화기내과 박경식 교수 대구시 중구 달성로 56 |

나. 인체적용시험 방법

(1) 대상자 선정 기준

- ① 만 18세 이상, 75세 미만의 성인
- ② 로마기준 IV 진단기준에 따라 과민성장증후군으로 진단된 자:
최소 6개월 이전에 증상이 시작되었고, 지난 3개월 동안 평균 1주일에 1일 이상은 아래 증상 중 2가지 이상과 관련된 복부통증이 있는 경우
 - 배변과 관련된 복부통증
 - 배변횟수의 변화와 관련된 복부통증
 - 대변의 형태 변화와 관련된 복부통증
- ③ 기저 시점 (Visit 2, Day 0) 기준으로 지난 2주일간 매일 평가한 복부통증의 주간 평균이 VAS \geq 30 mm 인 자.
- ④ 기저 시점 (Visit 2, Day 0) 기준으로 지난 1주일간 브리스톨 대변 형태 척도에 따른 유형 6 또는 7의 대변이 25% 이상인 자
- ⑤ 기저 시점 (Visit 2, Day 0) 기준으로 2주일 전부터 연구 종료시점까지 모든 진통제와 대장기능에 효과를 갖는 약물 및 건강기능식품 사용을 중단할 수 있는 자
- ⑥ 임신 가능성이 없으며 (1년 이상의 폐경 기간 혹은 외과적 불임), 수유하고 있지 않은 여성. 가임기 여성의 경우, 스크리닝 시점에서 임신반응 검사의 음성판정을 받은 자로서, 연구기간 동안 임신하지 않을 것을 동의하는 자
- ⑦ 전 연구기간 동안 참여할 수 있고, 대상자 일지를 이해하고 성실히 작성할 수 있는 자
- ⑧ 대상자 본인 또는 적법한 대리인이 대상자 동의서에 서명한 자

(2) 대상자 제외기준

- ① 위장관계의 기질적 질환을 가지고 있는 자
- ② 배변양상에 영향을 미칠 수 있는 위장관계 수술을 받은 이력이 있는 자. (Appendectomy, simple hernia repair 제외)
- ③ 임상적으로 유의한 심혈관계, 신경계, 내분비계, 면역계, 감염성, 종양성 질환의 병력이 있거나, 현재 질환을 가지고 있는 자

- 항정신성 의약품을 복용하고 있는 정신질환자
- 스크리닝 (Visit 1) 전 1주 이내에 항생제, 지사제, 진경제를 복용한 이력이 있는 자
- 스크리닝 검사 상 아래의 소견을 보이는 자
- ④ Serum creatinine ≥ 2.0 mg/dl
- ⑤ ALT/AST 가 정상범위 상한치의 2배 이상
- ⑥ 기타 임상적으로 심각하다고 판단되는 검사소견의 이상수치가 나타난 자
- ⑦ 시험물질이나 시험물질에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자
- ⑧ 기타 사유로 인하여 시험자가 임상시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

(3) 시험물질: DL-114005 (백편두)

(4) 시험물질 투여 기간: 8주

(5) 시험물질 복용 방법: 1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 양의 물과 함께 복용한다.

(6) 인체적용시험 방법:

인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의한 대상자는 스크리닝을 거친 후, 시험물질 투여 전 2주일간 대상자일지를 작성하고 선정제외기준을 확인하여 시험 참여를 결정한다. 시험에 참여하는 대상자는 DL-114006을 8주간 복용하며 증상의 변화를 확인한다. DL-114006 복용방법은 1일 3회 1회 2캡슐씩 충분한 양의 물과 함께 섭취한다. 시험물질 복용기간은 8주이며, 각 대상자는 시험물질을 복용한 후 4주와 8주째 되는 날 병원을 방문하여 시험물질을 배부 받고, 개선효과와 이상반응을 평가받으며, 정해진 일정에 따라 임상실험실검사, 신체검진 등을 시행한다.

(7) 유효성 평가

1차 평가 변수

VAS (0~100 mm) 로 평가한 8주째 복부통증의 변화 (주간 일평균)

2차 평가 변수

- 4주째 복부통증의 변화 (주간 일평균)
- 연구 종료시점, 과민성장증후군의 징후 및 증상에 대한 대상자의 전반적 평가 (Subject overall assessment)
- 연구 종료시점, 과민성장증후군의 징후 및 증상에 대한 연구자의 전반적 평가 (Investigator overall assessment)
- IBS-QOL, BDI 및 BAI 설문 점수의 변화
- 대변 횟수의 변화 (일일 대변횟수)
- 대변 형태의 변화: 1주일간 브리스톨 대변 형태 BSFS (Bristol stool form scale) 척도에 따른 유형 6 또는 7의 대변을 1회 이상 경험한 날짜의 수가 기저시점과 비교하여 50% 이상 감소한 자의 비율

(8) 안전성 평가

이상반응, 활력징후, 임상검사

(9) 통계분석 방법

① 이상반응

발현된 모든 이상반응은 MedDRA을 이용하여 코딩하며 신체기관별로 분류하여 자세한 설명과 함께 빈도 및 비율을 제시한다. 또한 시험물질과의 인과관계가 있는 이상반응과 인과관계가 없는 이상반응의 빈도를 기록한다. 이상반응 발현 건수와 1회 이상의 이상반응을 경험한 대상자의 비율에 대하여 90% 신뢰구간을 구한다.

② 임상실험실검사

혈액학 및 혈액화학 검사 결과, 활력 증후 등과 같은 연속형 자료는 대상자 방문별로 기술통계량을 제시하며 실험실 검사치의 평균변화량은 baseline 값을 보정하여 ANCOVA

분석법을 사용하여 비교 분석하고 활력 증후는 ANOVA 분석방법을 이용하여 분석한다. 요검사와 같은 범주형 자료는 각 범주별 빈도 및 비율을 제시하며, 방문별 정상/비정상 상태에 대하여 McNemar's test를 이용하여 분석한다.

다. 백편두 인체적용시험 샘플 제조

- 표준화, 생산성을 고려 후 일반적인 건강기능식품 원료 제형인 추출분말로써 백편두를 최종 인체적용시험 샘플로 선정함.
- 지난 연차 실험결과, 백편두 100, 200, 400 mg/kg/day로 동물모델에서의 효능을 확인함.
- 백편두 200 mg/kg/day 이상에서 IBS 관련 내장통증관련 행동, 항불안 및 항우울작용, 장운동성 및 IBD에서 나타나는 대장의 조직학적 병변 검사와 플라즈마에서 염증반응 사이토카인에서 유의적인 효과를 보였음.
- 이번 연차 실험 결과, 백편두는 발아백편두와 비교하였을 때보다 지표물질 함량이 높으며, 트립신저해제 함량이 낮아 효능 및 생산성이 발아백편두보다 뛰어나다고 판단함.
- 백편두 동물실험 용량 200 mg/kg/day를 FDA guidance²²⁾ 에 따라 인체외삽계수를 적용하여 60kg 성인 기준 일일섭취량을 1.2 g/day로 설정함.
- 백편두 추출물 200 mg을 함유하는 550 mg 연질캡슐을 생산함. 1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 양의 물과 함께 섭취함.
- 연질캡슐은 액체 (유지)를 고형물화해서 그대로 먹을 수 있는 편리성이 높은 제품 형태이며 공기 중 산소 차단성이 높아 내용물의 성분 열화방지 효과가 높음. 또한 품질의 열화요인이나 인적인 가공요인이 적음. 따라서 제조 중 성분의 화학적 변화가 극히 작고, 건강기능식품에 적합한 형태임.
- 액상, 환, 겔리, 과립 등 건강기능식품에서 실현 가능한 타 제형보다 내용물의 균일성이 높아 크기/함유량의 차이가 1~5% 이하로 상당히 적어 성분배합율이 높고, 안전성이 높으며 이물혼입이 적으며, 목이나 식도의 점막을 해치지 않음.
- 연질캡슐은 백편두와 같이 특유의 향이 있는 원료의 이미, 이취의 마스킹을 하기에 적당한 제형임.

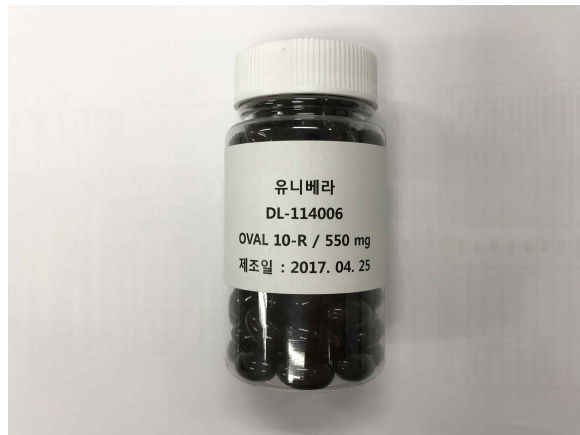


그림2.5.41. 백편두 인체적용시험 샘플 (연질캡슐)

라. 인체적용시험 시험물질

- 개발명: DL-114006
- 원료 및 분량: 매 캡슐 550 mg 당 DL-114006 200.0 mg (트리코넬린 (Trigonelline)로서 2.72 ~ 4.08 mg)
- 제형: 연질캡슐
- 섭취방법: 1일 3회, 1회 2캡슐을 충분한 양의 물과 함께 복용
- 제조원: (주)네이처텍

마. 인체적용시험 결과

(1) 대상자 요약

- 본 인체적용시험은 과민성 장증후군 성인을 대상으로 DL-114006 복용 전후의 복부통증의 변화를 평가함으로써 DL-114006의 효과를 탐색적으로 측정하기 위해 계획함.
- 국내 2개 기관에서 총 24명의 대상자가 Screening되었으며 20명의 대상자가 본 인체적용 시험에 등록됨. 등록된 20명의 대상자는 모두 시험물질을 1회 이상 복용하였고 유효성 평가가 가능하여 ITT 군으로 분석함. 20명의 대상자 중 중도탈락은 없었으며 1명은 병용 금지약물을 복용하였기에 PP 군에서 제외되어 19명이 PP군으로 분석함.

(2) 유효성 평가결과

(가) 1차 유효성 평가: VAS(0~100mm)로 평가한 복부통증의 변화

- VAS (0~100mm)로 평가한 복부통증의 변화는 대상자 일지를 통해 자료를 수집함.
- ITT 분석군에 대한 복부통증의 VAS 주간 일평균값은 Baseline 시점에 46.5 ± 15.6 이었고 4주째 31.8 ± 16.8 이고 8주째 26.1 ± 17.3 으로 점차 감소함. 평균변화량은 4주째 -14.6 ± 14.4 이고 8주째 -20.4 ± 14.7 로 Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째 (p -value=0.0002)와 8주째 (p -value<0.0001) 모두 복부통증의 유의한 감소를 확인할 수 있었음.
- PP 분석군에서 복부통증의 주간 일평균값은 Baseline 시점에 46.6 ± 16.0 이었고 4주째 31.4 ± 17.2 이고 8주째 25.9 ± 17.7 로 점차 감소함. 평균변화량은 4주째 -15.2 ± 14.6 이고 8주째 -20.7 ± 15.0 으로 Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째 (p -value=0.0003)와 8주째 (p -value<0.0001) 모두 복부통증의 유의한 감소를 확인할 수 있었음.

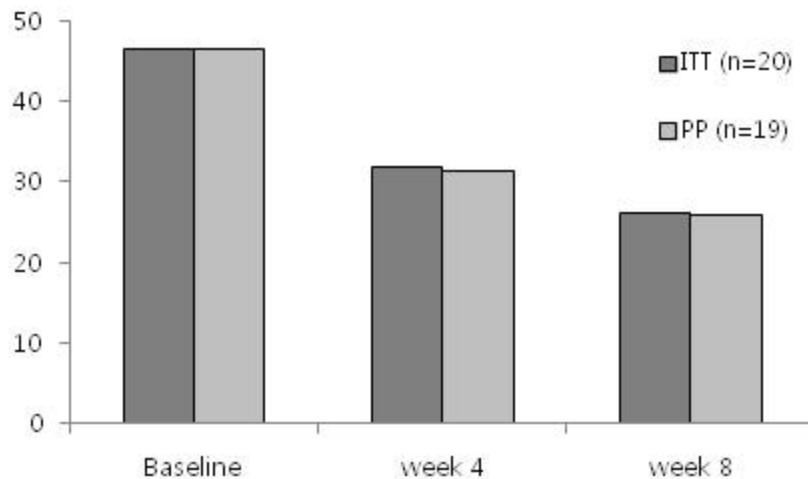


그림2.5.42. VAS로 평가한 복부통증의 변화

(나) 2차 유효성 평가:

- 대상자의 전반적 평가 (Subject overall assessment)에 대한 ITT 군 분석에서 4주째에 7명 (35.0%)이 ‘변하지 않음’으로 평가하였고 11명 (55.0%)은 ‘중간 정도 좋아짐’, 2명 (10.0%)은 ‘현저하게 좋아짐’으로 평가하여 13명 (65.0%)이 개선되었다고 답변함.
- 8주째 대상자의 전반적 평가 (Subject overall assessment)는 1명 (5.0%)이 ‘중간 정도 나빠짐’, 2명(10.0%)이 ‘변하지 않음’으로 평가하였고 12명 (60.0%)은 ‘중간 정도 좋아짐’, 5명 (25.0%)은 ‘현저하게 좋아짐’으로 평가하여 17명 (85.0%)이 개선되었다고 답변함.
- 연구자의 전반적 평가 (Investigator overall assessment)에 대한 ITT 군 분석에서 4주째에는 7명(35.0%)이 ‘변하지 않음’으로 평가되었고 12명 (60.0%)은 ‘중간 정도 좋아짐’, 1명

- (5.0%)은 ‘현저하게 좋아짐’으로 평가되어 13명 (65.0%)이 개선되었다고 평가됨.
- 8주째 연구자의 전반적 평가 (Investigator overall assessment)는 1명 (5.0%)이 ‘중간 정도 나빠짐’, 3명(15.0%)이 ‘변하지 않음’으로 평가되었고 12명 (60.0%)은 ‘중간 정도 좋아짐’, 4명 (20.0%)은 ‘현저하게 좋아짐’으로 평가되어 16명 (80.0%)이 개선되었다고 평가됨.

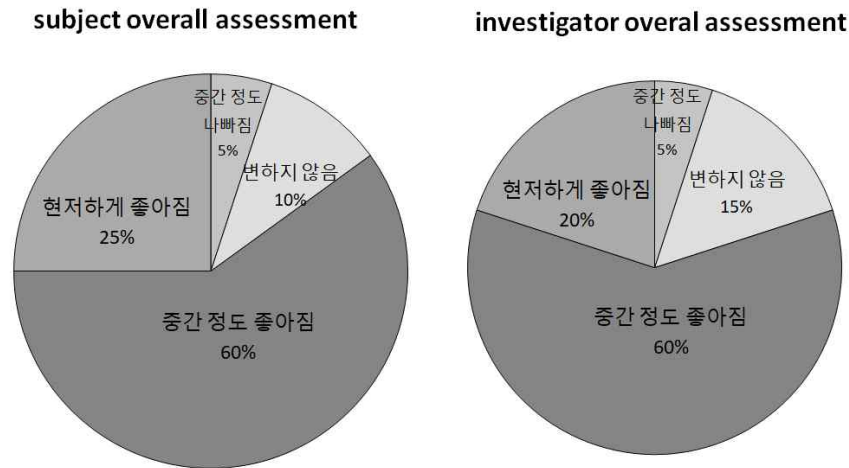


그림2.5.43. 8주째 overall assessment (ITT population)

- IBS-QOL 에 대한 ITT 군 분석에서 Baseline 시점의 평균값은 66.2 ± 27.4 이었고 4주째 57.7 ± 22.4 이고 8주째 55.5 ± 22.1 로 점차 감소하여 개선됨.
- 4주째 평균변화량은 -8.6 ± 19.6 이고 8주째 평균변화량은 -10.7 ± 19.3 이었음.
- Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째는 유의한 감소를 (p -value=0.0656) 보이지 않았으나 8주째는 p -value 0.0225로 유의한 감소를 확인할 수 있었음.
- BDI 에 대한 ITT 군 분석에서 Baseline 시점의 평균값은 14.1 ± 11.2 이었고 4주째 9.9 ± 9.2 이고 8주째 10.1 ± 10.4 로 감소함.
- 4주째 평균변화량은 -4.2 ± 5.2 이고 8주째 평균변화량은 -4.0 ± 5.7 이었음.
- Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째 (p -value=0.0021)와 8주째 (p -value=0.0059) 모두 유의하게 감소함.
- BAI 에 대한 ITT 군 분석에서 Baseline 시점의 평균값은 9.0 ± 8.0 이었고 4주째 6.3 ± 6.8 이고 8주째 6.3 ± 7.2 로 감소함.
- 4주째 평균변화량은 -2.7 ± 5.1 이고 8주째 평균변화량은 -2.7 ± 6.1 이었음.
- Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째 (p -value=0.0295)는 유의하게 감소하였으나 8주째 (p -value=0.0606)는 유의한 감소를 확인할 수 없었음.

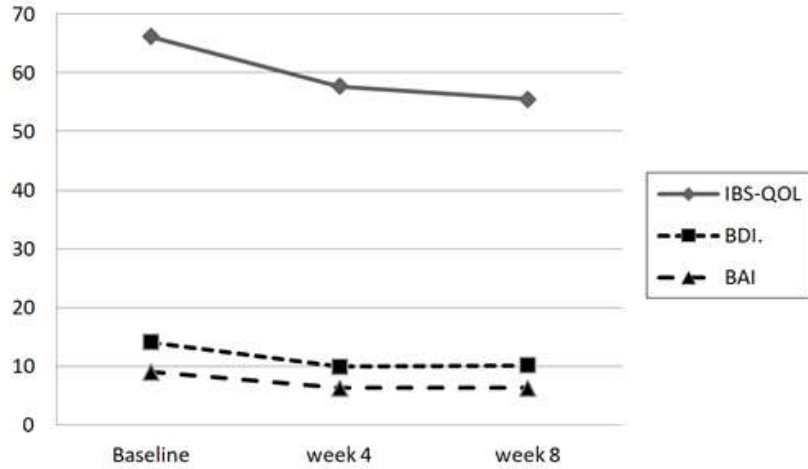


그림2.5.44. IBS-QOL, BDI, BAI의 변화 (ITT population)

- 대변횟수의 변화에 대한 ITT 군 분석에서 주간 일평균값은 Baseline 시점에 2.0 ± 0.6 이었고 4주째 1.5 ± 0.6 이고 8주째 1.5 ± 0.6 으로 감소함.
- 평균변화량은 4주째 -0.5 ± 0.5 이고 8주째 -0.5 ± 0.5 로 Paired t-test를 이용한 전후 비교에서 4주째 (p-value=0.0001)와 8주째 (p-value=0.0001) 모두 대변 횟수의 유의한 감소를 확인할 수 있었음.
- 대변 형태의 변화에 따른 반응률 (1주일간 브리스톨 대변 형태 BSFS(Bristol stool form scale) 척도에 따른 유형 6 또는 7의 대변을 1회 이상 경험한 날짜의 수가 기저시점과 비교하여 50% 이상 감소한 자의 비율)은 ITT 분석군에서 4주 시점에 85.0% (17명/20명) 였고 90% 신뢰구간은 65.6 ~ 95.8% 였음. 8주 시점에는 80.0% (16명/20명) 였고 90% 신뢰구간은 59.9~92.9%였음.

(3) 안전성 평가결과

- Safety 분석군 20명의 대상자 중 최소 하나 이상의 이상반응 (AE) 발생률은 2명/20명 (10.0%)이었고, 이상약물반응을 경험한 대상자는 없었음. 중대한 이상반응 (SAE) 발생은 전체 시험 기간 중 총 1건이 발생하였으나 이상반응명은 'upper respiratory infection'으로 시험물질과 관련성은 없는 것으로 평가되었음. 활력징후와 실험실 검사에서도 임상적으로 유의한 변화는 관찰할 수 없었음.

(4) 고찰 및 전반적 결론

- VAS (0~100mm)로 평가한 복부통증의 분석에서 4주째 (p-value=0.0002)와 8주째 (p-value<0.0001) 모두 복부통증의 유의한 감소를 확인할 수 있었음. 대변횟수의 감소도 유의하게 관찰되었으며 대변형태로 평가한 반응률도 4주째 85.0% (17명/20명)이고 8주째 80.0% (16명/20명)로 관찰되었기에 추후 기능성 검증을 위해서는 통계적으로 유의할 만한 대상자수를 확보한 확증연구가 필요할 것임.

3. 소재 전시회 출품

- 백편두, 고추냉이를 국제 건강기능식품 원료 박람회에 출품.

표2.5.27. 미국 건강기능식품 기능성 소재 박람회 개요

| | |
|------|--|
| 박람회명 | SupplySide West 2016 |
| 기간 | 10/04/2016 - 10/08/2016 |
| 장소 | Mandalay Bay Resort & Convention Center, Las Vegas |
| 참여품목 | 건강기능식품 기능성소재 |

uniVera

Wasabia koreana Extract

- **Wasabia koreana**
 - > A perennial crop cultivated primarily for its short, pungent-tasting rhizome
 - > Traditionally used for several gastrointestinal disorders in Korean medicine
- **Encapsulated Wasabia koreana**
 - > Improve bioavailability with ensured volatile compounds
 - > Mask pungent taste
 - > Deliver on targeted organ
- **Wasabia koreana ethanol extract (WAKE) and WAKE-coated** are effective for the amelioration of DSS-induced acute colitis, recovering epithelial barrier function and pro-inflammatory cytokines.
- **Wasabia koreana** is a potential therapeutic natural product for treatment of human colitis.

Efficacy confirmation

Effects of WAKE on acute inflammation in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice

Nano-encapsulation of WAKE (WKEE-coating)

Effects of WKEE-coated on anti-inflammation in DSS-induced colitis

Effects of WKEE on damaged intestinal epithelial barrier (DSS-treated Caco-2 cell multilayer)

Effects of WKEE in mice with DSS-induced colitis.

This product is supported by High Value-added Food Technology Development Program 114006-04, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. UniVera, Inc. Bringing the best of nature to humankind. UNIKOREA/UNIKOREA CENTER, 70, Anheon-ro, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea. TEL: +82-31-850-1000 FAX: +82-31-850-1000 UNIKOREA/UNIKOREA CENTER, 70, Anheon-ro, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea. TEL: +82-31-850-1000 FAX: +82-31-850-1000

그림 2.5.45. 고추냉이 연구실적 Poster

uniVera

Dolichos Lablab Extract

Indications

Highly concentrated extract of *Dolichos Lablab*

Hyacinth Bean Extract is a natural and safe alternative to pharmaceutical IBS (Irritable Bowel Syndrome) medications with comparable effects.

Patented indication as natural solution for digestive and mood destructions caused by IBS.

Health benefits

- Gastro-intestinal Disorders
- Anxiety
- Stress-related Disorders
- Mood Disorders
- Keeps your physical & Emotional equilibrium

The Brain-Gut Axis Concept

Improvement of physical & psychological symptoms of stress

Product information

- Standardized on L-alanine and L-pipecolic acid >0.1%
- Type of extract: Powder
- Dosage: 0.6 gr/day

Science

Pre-clinical studies to verify the mechanism of action

- Weight gaining
- Colon weight, length
- Immunohistochemical staining
- Behavioral testing: Open field test, Elevated plus maze

This product is supported by High Value-added Food Technology Development Program 114006-04, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. UniVera, Inc. Bringing the best of nature to humankind. UNIKOREA/UNIKOREA CENTER, 70, Anheon-ro, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea. TEL: +82-31-850-1000 FAX: +82-31-850-1000 UNIKOREA/UNIKOREA CENTER, 70, Anheon-ro, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea. TEL: +82-31-850-1000 FAX: +82-31-850-1000

그림 2.5.46. 백편두 홍보용 leaflet

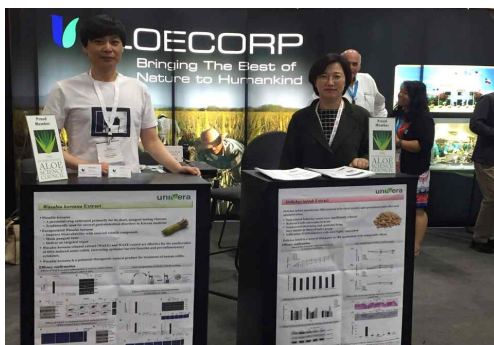


그림 2.5.47. SupplySide West 2016 참가

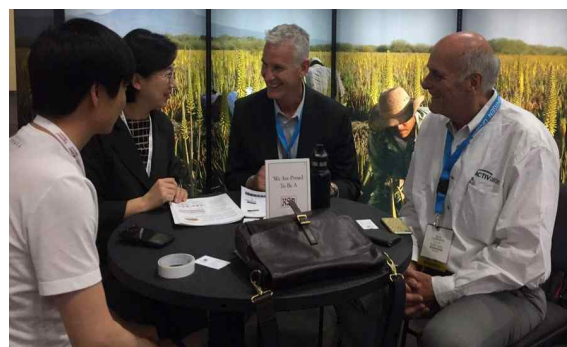


그림 2.5.48. 건강기능식품 소재 홍보

3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 연차별 연구개발의 목표 및 달성도 가. 1차년도 (2014.08 - 2015.07)

| 세부 | 연구개발의 목표 | 달성도 (%) | 연구개발의 내용 |
|------|--|---------|---|
| 제1세부 | - 지역농산물 후보소재 원료 확보 및 공급 - 후보 지역 농산물 제품화 가능성 검토 | 100 | - 국내외 사례 조사 (경쟁제품) |
| | | 100 | - 안정적 원물공급 방안 검토 |
| | | 100 | - 특허 검토 |
| | | 100 | - 제형 검토 및 관능평가 (장용성, 음료, 과립 등) |
| | | 100 | - 식품 가공 기술 검토 |
| 제1협동 | - 후보소재 표준 추출물 제조 - 후보소재 홈푸드형 원료 제조 - 개별 분석법 개발 | 100 | - 문헌정보 수집 및 관련제제 조사 |
| | | 100 | - 생산지별 유통지별 후보소재 수집 |
| | | 100 | - 효능평가용 후보소재 추출최적화 시험 및 소재공급 |
| | | 100 | - 연구대상 선정을 위한 대량시료 추출물 공급 |
| | | 100 | - 각각의 후보소재의 표준추출물, 홈푸드형 원료를 확보하기 위하여 산지별, 유통사별 유사도 분석 |
| | | 100 | - 표준추출물, 홈푸드형 원료 선정 및 각각의 개별 소재 분석법 개발 및 지표성분 설정 |
| 100 | - 분석법 validation과 기준 및 시험법 확립 | | |
| 제2협동 | - IBD 질환 모델 확립 및 후보소재 (일반추출, 홈푸드) 효능 연구 | 100 | - 급성, 만성 대장염 마우스 모델 확립 |
| | | 100 | - 12종 후보에 대한 기능성 평가 후 우수한 천연소재 선정 |
| | | 100 | - 선발된 천연소재의 용량별 예방 효과를 병리조직학적으로 확인 → 단일추출물 2가지 연구 개시 |
| | | 100 | - 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 |
| | | 100 | - 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석 |
| | | 100 | - 장건강 식음료 제품화를 위한 추가 평가 |
| | | 100 | - ZO-1 염색 및 NF-kB 활성억제 탐색 → 단일추출물 실험 (알로에신, 알로에겔) |
| | | 100 | - 마우스, 랫트 변비모델 확립 |
| | | 100 | - 락추로스 파우더와 알로에 전잎의 변비완화 확인 |
| 제3협동 | - IBS 모델 구축 및 후보소재 (일반추출, 홈푸드) 효능 평가 | 100 | - 12종 후보에 대한 기능성 평가 |
| | | 100 | - IBS 동물 모델 확립 |
| | | 100 | - 1개 용량을 이용한 기능성 평가 |
| | | 100 | - 소장 및 대장의 조직학적 검사 |
| | | 100 | - Food intake 측정 |
| | | 100 | - 체중 변화 측정 |
| | | 100 | - 항우울 작용 (forced swimming test, plus maze test) 측정 |
| | | 100 | - 장운동성 (GI transit) 및 fecal number 측정 조사 |

나. 2차년도 (2015.08 - 2016.07)

| 세부 | 연구개발의 목표 | 달성도 (%) | 연구개발의 내용 |
|------|--|---------|--|
| 제1세부 | - 장건강 증진용 식음료 제품화 | 100 | - 홀푸드 가공기술개발 (bioavailability, taste masking, 식감 및 기호도 증대) |
| | - 시작품 제작 | 100 | - 제제 및 제형 연구 |
| | - 인체적용시험 protocol 개발 | 100 | - 지방개발연구 |
| | - 지역농산물 후보소재 원료 확보 및 공급 [백편두] | 100 | - 관능검사 |
| | - 장건강 증진용 식음료 제품화 [고추냉이] | 100 | - 인체적용시험 protocol 개발 |
| 제1협동 | - 선정된 표준소재, 홀푸드형 원료 기준 및 시험법 확립 | 100 | - 선정된 표준소재의 분석법 개발 및 지표성분 설정 |
| | - 표준소재 유래의 지표/유효 성분 연구 | 100 | - 분석법 validation과 기준시험법 확립 |
| | - 최적복합소재 도출 및 시험용 시료생산 | 100 | - 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 |
| | - 개별인정 원료 시료를 위한 시험 분석법 확립(고추냉이, 백편두) | 100 | - 기전연구를 위한 유효성분 제공 |
| | | 100 | - 최적 홀푸드형 시료 제조과정에서의 지표성분 모니터링 |
| 제2협동 | - IBD 동물 모델을 이용한 용량 확정 실험, 최적 조합 도출 연구 | 100 | - 최적복합소재 추출물 제공 |
| | | 100 | - AITC의 휘발성을 고려한 분석법 최적화 |
| | | 100 | - 개별인정 원료용 신규 지표물질 탐색 및 분석법 개발 |
| | | 100 | - 개별인정 원료의 부위별 특성 분석 |
| | | 100 | - 1차년도에 선별된 후보 소재를 이용하여 최적 조합 도출 |
| | | 100 | - 선별된 후보소재의 대장염 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 조절 분석 |
| | | 100 | - 대장염 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석 |
| | | 100 | - 대장염 억제 기전 확인을 위한 염증관련 면역세포의 분포 유세포분석 |
| 제3협동 | - IBS 동물 모델을 이용한 용량 확정 실험, 최적 조합 도출 연구 | 100 | - 대장염 매개성 대장암 모델의 확립 |
| | | 100 | - 선발된 후보소재의 변비완화효과 확인 |
| | | 100 | - 1협동에서 제공한 후보 소재 발효콩보리의 대장염 억제효과 확인 |
| | | 100 | - 1차년도에 선별된 후보 소재를 이용하여 최적 조합 도출 |
| | | 100 | - 용량 연구 |
| | | 100 | - 대장의 조직학적 검사 |
| | | 100 | - Food intake 측정 |
| | | 100 | - 체중 변화 측정 |
| 100 | - 항우울 작용 (open field test, plus maze test) | | |
| 100 | - 장운동성 (GI transit) 및 fecal number 측정 | | |

다. 3차년도 (2016.08 - 2017.07)

| 세부 | 연구개발의 목표 | 달성도 (%) | 연구개발의 내용 |
|------|--------------------------------------|---------|--|
| 제1세부 | - 인체적용시험 개시 | 100 | - CRO 계약 - IRB 승인 - 인체적용시험 개시모임 |
| | - 장건강 증진용 식품 최적화 - 소재 전시회 출품 | 100 | - 최적조합소재 생산 기술 연구 - 최적조합소재의 관능평가 및 taste masking |
| 제1협동 | - 최적복합소재 성분 연구 | 100 | - 유효성분 분리, 구조 규명 및 확보 - 기전연구를 위한 유효성분 제공 |
| | - 최적복합제제 기준 및 시험법 확립 | 100 | - 분석법 validation과 기준 및 시험법 확립 |
| | - 지표성분 대량 확보 | 100 | - 품질관리를 위한 지표성분 대량 확보 |
| | - Chemical fingerprint를 이용한 동등성 평가 | 100 | - NMR, MS, HPLC-DAD, LC-MASS를 이용한 동등성 평가법 개발 |
| | - 안정성 평가 | 100 | - 장기보존시험 - 가속시험 |
| 제2협동 | - IBD 모델을 이용한 (IRB 제출을 위한) 전임상 기반 연구 | 100 | - 대장염 및 대장염 매개 대장암 모델에서 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인 |
| | | 100 | - 대장 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 |
| | | 100 | - 대장염/암 억제 기전 확인을 위한 단백질/RNA 발현 분석 |
| | | 100 | - 유세포분석을 이용한 염증관련 면역세포의 분포 분석 |
| | | 100 | - 유효성 확인 및 독성 검증 |
| 제3협동 | - IBS 모델을 이용한 (IRB 제출을 위한) 전임상 기반 연구 | 100 | - 발아백편두, 고구마, 고구마+발아백편두 추출물 시료를 이용한 효능 연구 |
| | | 100 | - 용량 확정 실험 |
| | | 100 | - 체중 변화 측정 |
| | | 100 | - Food intake 측정 |
| | | 100 | - 불안/우울 작용 행동테스트 측정 |
| | | 100 | - 고추냉이 투여 생쥐의 장/변 macroscopic score 측정 |

라. 4차년도 (2017.08 - 2018.07)

| 세부 | 연구개발의 목표 | 달성도 (%) | 연구개발의 내용 |
|------|--|---------|--|
| 제1세부 | - 장건강 증진용 식품 출시 - 인체적용시험 완료 - 개별인정 신청 - 안정성 개선 연구 | 100 | - 장건강 증진용 식품 출시 |
| | | 100 | - 인체적용시험 완료 |
| | | 0 | - 식약처 개별인정 자료 작성 |
| | | | |
| 제1협동 | - 개별인정형 최적 조합 표준화 - 개별인정형 제제 표준화 성분연구 - 안정성 시험 | 100 | - 최적 조합 시료의 분석법 개발 |
| | | 100 | - 지표성분 규명 및 각 소재 및 최적조합소재의 지표성분 정성, 정량분석연구 |
| | | 100 | - 시료 장기보관에 따른 안정성 시험 |
| 제2협동 | - IBD 모델을 이용한 경쟁제품 효능 비교 연구 | 100 | - 대장염 모델을 이용하여 선발된 최적조합소재와 경쟁제품의 효능 비교 |
| | | 100 | - 확립된 대장염 및 염증매개성 대장암 모델에서 선발된 최적조합 소재의 효능을 조직병리학적으로 확인 |
| | | 100 | - 대장염/대장암 조직에서의 염증관련 유전자의 단백질/RNA 발현 분석 |
| 제3협동 | - IBS 모델을 이용한 (IRB 제출을 위한) 전임상 기반 연구 | 100 | - 최적조합의 안전성 연구 |
| | | 100 | - 기전연구 |
| | | 100 | - 혈중 ACTH 및 cortisol 등 호르몬 level 분석 |
| | | 100 | - 대뇌 모노아민 (세로토닌, 도파민, 노르에피네프린) 농도 분석 |
| | | 100 | - Brain derived neurotrophic factor (BDNF, 뇌신경 성장인자)를 뇌조직에서 분석 |

2. 목표 미달성 시 원인 (사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)

- 본 연구에서 진행한 Pilot 인체적용시험은 대상자수 20명으로 2개 연구기관 (multi-center, 대구가톨릭대병원과 계명대병원)에서 대상자 모집기간만 10개월이 소요됨.
- 식약처 가이드라인에 따라 대상자수 100명으로 2개 연구기간에서 인체적용시험을 진행할 시, 50개월 (인체적용시험 기간 4년 2개월)이 필요함.
- 주어진 과제 연구기간 (대상자 모집기간 약 10개월) 내에 인체적용시험을 완료하기 위해서는 10개 연구기관 의뢰, 10억 이상의 비용이 필요하였음.

| 시험기관 수 | 10 site |
|--------------|---------------|
| 대상자 수 (명) | 100 |
| CRO 비용 (원) | 500,000,000 |
| 병원 연구 비용 (원) | 500,000,000 |
| 합 (원) | 1,000,000,000 |

- 식약처 가이드라인에 따라 인체적용시험을 수행하기 위해서는 기업에서 과제 연구비 이외에 약 7억원 이상의 별도의 추가 투자가 필요함.

- 따라서, 추가 투자 가능성 확인을 위해 탐색연구 (pilot study)가 우선 수행되어야 하며, 연구기간과 연구비를 고려하여 탐색연구를 아래와 같은 디자인으로 수행함.

| [대상자 모집기간 10개월] | 2 site |
|-------------------|-------------|
| 대상자 수 (명) | 20 |
| HCT design | 전후비교 |
| CRO 비용 (원) | 162,640,000 |
| 병원 연구비용 (원) | 130,160,000 |
| 합계 (원) | 292,800,000 |

3. 연구결과의 활용 계획 등

가. 제품화 출시 및 매출 달성

- 농산물 연계 장건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 출시를 통한 매출 달성 (20억원/년 이상)
- 개별인정형 건강기능식품 소재 및 제품 개발을 통한 글로벌 제품 출시 및 매출 달성

나. 장 질환 관련 천연물 신약 개발 기반 마련

- 일반 신약에 비해 개발 비용이 적고, 산업 성공률이 높을 뿐 아니라 투자기간이 비교적 짧아 고부가가치를 이끌어 낼 수 있음
- 장질환과 이에 따른 이차질환 증가는 고령사회에 진입하는 한국에서 삶의 질 저하 및 사회적 비용을 증가시킬 것이므로 이를 예방 및 치료할 수 있는 건강기능식품과 신약 개발에 대한 기반 제공
- 장기간 복용가능하고 부작용이 적은 천연물 및 농산물 유래의 건강기능식품은 앞으로 사람들이 가장 선호하는 예방책이 될 것으로 예상됨

다. 농촌 지역 기반 6차 미래형 산업 기반 모델 제시 통한 지역 주민 고부가가치 소득 및 고용 창출

- 농촌 지역 커뮤니티 연계 판매/체험/치유 통합형 서비스 모델 개발
- 참여기업 내 지역 판매조직과의 Co-marketing 통한 지역사회 네트워크 활성화

4장 참고문헌

- 1) Quigley EM et al. 2005. Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated disease? *Chin. J. Dig. Dis.* 6:122-132
- 2) Simren M et al. 2002. Quality of life in inflammatory bowel disease in remission: the impact of IBS-like symptoms and associated psychological factors. *Am. J. Gastroenterol.* 97: 389-396
- 3) Camilleri M, et al. 2006. Pharmacological and pharmacokinetic aspects of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology.* 130(5):1421-34
- 4) Bensoussan A et al. 1998. Treatment of irritable bowel syndrome with Chinese herbal medicine: a randomized controlled trial. *JAMA,* 280:1585-1589
- 5) Wang G, et al. 2006. Tond-xie-ning, a chinese herbal formula, in treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Chin. Med. J.* 119(24):2114-9
- 6) Roja Rahimi et al. 2012. Herbal medicines for the management of irritable bowel syndrome: A comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology.* 21;18(7)589-600
- 7) Koo HN et al. 2008. *Int. J. Neurosci.* 118:365-374
- 8) Chen H et al. 2003. *Nutrition.* 19:646-651
- 9) Hou WC et al. 2002. *Planta. Med.* 68:1072-1076
- 10) Hou WC et al. 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49:956-4960
- 11) Hou WC et al. 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47:2168-2172
- 12) Hong CY et al. 1992. *Am. J. Chin. Med.* 20:289-294
- 13) Zhao KS et al. 1990. *Immunopharmacology.* 20: 25-233
- 14) Chu DT et al. 1988. *J. Clin. Lab. Immunol.* 25:125-129
- 15) Chu DT et al. 1988. *J. Clin. Lab. Immunol.* 25:119-123
- 16) Kang H et al. 2004. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1946-1950
- 17) Ai P et al. 2008. *J. Ethnopharmacol.* 116:413-421
- 18) Zhang ZL et al. 1990 *J. Ethnopharmacol.* 30:145-149
- 19) Zhang WJ et al. 2003. *Thromb. Haemost.* 90:904-914
- 20) Toda S et al. 2000 *Phytother. Res.* 14:294-296
- 21) Kollet O et al. 2000. *Exp. Hematol.* 28:726-736
- 22) Rockville, MD: US Food and Drug Administration. 2005. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer

주 의

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