

발간등록번호

11-1543000-002479-01

**섬썩부쟁이를 이용한
혈중 요산감소에 도움을
주는 건강기능식품개발
최종보고서**

2019. 01. 21.

주관연구기관 / 고려은단(주)
협동연구기관 / 한국과학기술연구원
/ SK 바이오랜드(주)
/ 네오뉴트라(주)
위탁기관 / 고려대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “섬썩부쟁이추출물을 이용한 혈중 요산 감소에 도움을 주는 건강기능식품 개발” (개발기간 : 2015. 10. - 2018. 10.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 21.

주관연구기관명	: 고려은단(주)	(대표자) 조 영 조
제1협동연구기관명	: 한국과학기술연구원	(대표자) 이 병 권
제2협동연구기관명	: SK바이오랜드(주)	(대표자) 이 근
제3협동연구기관명	: 네오뉴트라(주)	(대표자) 강 제 환
위탁기관명	: 고려대학교산학협력단	(대표자) 고 제 상



주관연구책임자 : 한 은 혜
제1협동연구책임자 : 김 형 자
제2협동연구책임자 : 유 화 종
제3협동연구책임자 : 유 지 숙
위탁기관연구책임자 : 임 영 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115005-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.10.23 ~ 2018.10.22	단 계 구 분	3년/ 3년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	섬썩부쟁이추출물을 이용한 혈중 요산 감소에 도움을 주는 건강기능식품 개발			
연구책임자	한 은 혜	해당단계 참여연구원 수	총: 19 명 내부: 19 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 270,000천원 민간: 90,000천원 계: 360,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 40 명 내부: 40 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 810,000천원 민간: 270,000천원 계: 1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세부(주관기관): 고려은단(주) 협동 : 한국과학기술연구원, SK바이오랜드(주), 네오뉴트라(주)			참여기업명 고려은단(주), SK바이오랜드(주), 네오뉴트라(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 고려대학교			연구책임자: 임영희	

<요약>

<보고서 면수>

163

I. Lab scale

- 1) 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질 선정 및 구조분석
- 2) 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-dicaffeoylquinc acid(3,5-DCQA)의 Method Validation을 진행하여 시험법의 타당성 검증
- 3) 섬썩부쟁이 추출물의 다양한 실험(부위별, 채취시기별, 추출온도별, 추출시간별 등)을 통해 최적의 제조공정 확립

II. Pilot scale

- 1) 원료의 제조공정 확립
 - ① 다양한 제조공정 시험을 통해 최적화된 추출수율 확립
- 열수, 50% 주정추출, 70% 주정추출, 90% 주정추출
- 2) 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 효능시험
 - ① 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 효능 확인
 - ② potassium oxonate를 이용한 고요산혈증 동물모델을 이용한 혈중 요산 감소 효능 검증
- 3) 원료의 안정성(Stability) 확인 및 유통기한 설정
- 4) 인체적용시험에 적합한 제형과 제조공정을 확립
- 5) 인체적용시험 디자인 개발
 - ① “혈중 요산 감소”에 관한 신규허가로서 시험기준 설정
- 6) 사업화를 위한 준비
 - ① 섬썩부쟁이 추출분말의 품목제조보고 진행(SK 바이오랜드)
 - ② 건강기능식품의 부원료로 사용(고려은단)

III. Product scale

- 1) 제품의 제형 설정
- 2) 제품의 제조공정 확립
- 3) 제품의 기준 및 시험법 검증(Method Validation)
- 4) 제품의 함량 안정성 확인 및 유통기한 설정
- 5) 섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin 혼합물의 효능시험
 - ① 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 효능 확인
 - ② potassium oxonate를 이용한 고요산혈증 동물모델을 이용한 혈중 요산 감소 효능 검증
- 6) 인체적용시험으로 인체안전성을 확보

〈요약문〉

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>연구의 목적</p> <p>본 연구의 목적은 항산화 효능이 우수한 섬쭉부쟁이 추출물을 활용하여 혈중 요산 감소 효능을 검증하고, 이를 제품화할 수 있도록 원료 및 제품의 표준화를 수행하여 혈중 요산의 감소에 도움을 주는 건강기능식품을 개발하는 것임.</p> <p>연구의 내용</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 섬쭉부쟁이 추출물의 지표물질 선정 2) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 원료의 표준화 3) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 유효성 평가 4) 인체적용시험 제품의 표준화 5) 인체적용시험 계획서 개발 6) 인체적용시험 실시(에이치플러스 양지병원) 7) 제품의 표준화 8) 개별인정형 원료 식약처 신청 준비
<p>연구개발성과</p>	<p>I. Lab scale</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 섬쭉부쟁이 추출물의 지표물질 선정 및 구조분석 2) 섬쭉부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-dicaffeoylquinc acid(3,5-DCQA)의 Method Validation을 진행하여 시험법의 타당성 검증 3) 섬쭉부쟁이 추출물의 다양한 실험(부위별, 채취시기별, 추출온도별, 추출시간별 등)을 통해 최적의 제조공정 확립 <p>II. Pilot scale</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 원료의 제조공정 확립 <ol style="list-style-type: none"> ① 다양한 제조공정 시험을 통해 최적화된 추출수율 확립 - 열수, 50% 주정추출, 70% 주정추출, 90% 주정추출 2) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 효능시험 <ol style="list-style-type: none"> ① 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 효능 확인 ② potassium oxonate를 이용한 고요산혈증 동물모델을 이용한 혈중 요산 감소 효능 검증 3) 원료의 안정성(Stability) 확인 및 유통기한 설정 4) 인체적용시험에 적합한 제형과 제조공정을 확립 5) 인체적용시험 디자인 개발 <ol style="list-style-type: none"> ① “혈중 요산 감소”에 관한 신규허가로서 시험기준 설정 6) 사업화를 위한 준비 <ol style="list-style-type: none"> ① 섬쭉부쟁이 추출분말의 품목제조보고 진행(SK 바이오랜드) ② 건강기능식품의 부원료로 사용(고려은단) <p>III. Product scale</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 제품의 제형 설정 2) 제품의 제조공정 확립 3) 제품의 기준 및 시험법 검증(Method Validation) 4) 제품의 함량 안정성 확인 및 유통기한 설정

	<p>5) 섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin 혼합물의 효능시험 ① 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 효능 확인 ② potassium oxonate를 이용한 고요산혈증 동물모델을 이용한 혈중 요산 감소 효능 검증 6) 인체적용시험을 통하여 사람에서의 안전성을 확보</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>연구개발성과의 활용계획(기대효과) I. 수출에 활용 1) 일본 수출에 활용 ① “기능성표시식품 신고” 제도를 이용하여 수출을 진행할 계획임 ② 기능성을 입증할 수 있는 시험관, 동물실험 자료(SCI급 논문 활용) ③ 섭취근거 입증자료 및 안전성 자료(임상논문 SCI급 활용) ④ 생산-품질관리 입증 자료(원료 MV, 제품 MV 보고서 활용) ⑤ 안정성 입증자료(원료 안정성, 제품 안정성 보고서 활용) 2) 미국 수출에 활용 ① 세계적으로 통풍유병률이 2번째로 높은 나라로써, NDI(New Dietary Ingredient, 신규식이원료)로 등록해야 판매가 가능하여 NDI등록을 추진할 계획임 ② NDI 특성상, 안전성 내용에 초점이 맞춰져 있음. 특히, 임상시험 자료 제출 시 유리(임상논문 SCI급 활용) ③ 홍보 자료(기술이전 받은 미국특허 활용) 한국과학기술연구원에서 기술이전 받은 “고요산혈증 또는 통풍에 유효한 섬썩부쟁이 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 합성 화합물[미국특허]” 를 활용 II. 부원료로 활용 기존의 건강기능식품에 부원료로 사용하는 방법임. 울릉도 자생식물임을 홍보하고 해당 원료를 홍삼제품 혹은 스포츠 관련 제품(단백질 파우더) 등에 혼합하여 제품화한다면 기존 제품보다 업그레이드 된 제품으로 판매가 가능할 것이라 사료됨.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>섬썩부쟁이</p>	<p>고요산혈증</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>통풍</p>	<p>항산화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Aster glehni</i></p>	<p>Hyperuricemia</p>	<p>Functional Foods</p>	<p>Gout</p>	<p>Antioxidants</p>

<Summary>

Purpose & Contents	<p>Purpose The purpose of this study is to develop function foods that reduce the level of serum uric acid using <i>Aster glehni</i> extract. In this study, the hypouricemic effect of <i>Aster glehni</i> extracts was evaluated and product standardization was carried out to commercialize it.</p> <p>Contents 1) Selection of marker substance for <i>Aster glehni</i> extracts 2) Standardization of raw materials for 70% ethanol extracts of <i>Aster glehni</i> 3) Efficacy evaluation of 70% ethanol extracts of <i>Aster glehni</i> 4) Product standardization for clinical trial 5) Planning development for clinical trial 6) Implementation of clinical trial(H-plus Yangji Hospital) 7) Products standardization for materials 8) Preparation of application for individual certification of ingredients to the MFDS</p>
Results	<p>I. Lab scale 1) Selection of marker substance for <i>Aster glehni</i> extract and structural analysis 2) Method Validation for the marker substance, 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA) 3) Establishment of optimal production process of <i>Aster glehni</i> extract through various experimental conditions(by site, sampling period, extraction temperature, extraction time, etc.)</p> <p>II. Pilot scale 1) Establishment of production process of raw materials ① Establishment of optimized extraction yields through various production process tests - Hot water, 50%, 70%, 90% ethanol extracts of <i>Aster glehni</i> 2) Efficacy of 70% ethanol extracts of <i>Aster glehni</i> ① Antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory effects of 70% ethanol extracts of <i>Aster glehni</i> ② Verification of hypouricemic effect of <i>Aster glehni</i> extract on a hyperuricemia-induced animal model 3) Assurance of the stability of raw materials and establishment of expiry date on the basis of stability data 4) Establishment of production process and dosage form for Clinical trial 5) Development of clinical trial design ① Establishing a test standard for new Approval application 6) Preparation for commercialization ① Item Production Report for the extract powder of <i>Aster glehni</i> (SK</p>

	<p>Bioland) ② Usage of <i>Aster glehni</i> extract as supplementary materials (Koreaeundan)</p> <p>III. Product scale</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Establishment of product dosage form 2) Establishment of product manufacturing process 3) Verification of product specifications and analytical procedures 4) Assurance of the stability of raw materials and establishment of expiry date 5) Efficacy of <i>Aster glehni</i> extracts combined with vitamins <ol style="list-style-type: none"> ① Antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory effects of <i>Aster glehni</i> extracts combined with vitamins ② Verification of hypouricemic effect on a hyperuricemia-induced animal model 6) Ensuring safety of <i>Aster glehni</i> extracts in human by clinical trial 				
<p style="text-align: center;">Expected Contribution</p>	<p>I. Application of exports</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Preparation for export to Japan <ol style="list-style-type: none"> ① usage of the Japanese system for the export process of products ② <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> data demonstrating functionality(SCI paper) ③ Source data of ingestion and safety data in human by clinical study(SCI paper) ④ Production record and quality control record(Raw material MV report, and Product MV report) ⑤ Stability data(Raw material stability report, and Product stability report) 2) Preparation for export to the United State <ol style="list-style-type: none"> ① The second highest rate in the prevalence of gout worldwide ② Registration of NDI(New Dietary Ingredient) ③ Promotion (Use of the U.S. patent obtained by technical transfer) “<i>Aster glehni</i> extracts, fractions or compounds isolated therefrom for the treatment or prevention of Hyperuricemia or Gout” (U.S. Patent) <p>II. Use as supplementary material</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Adding <i>Aster glehni</i> extracts as supplementary ingredients to existing functional foods <ol style="list-style-type: none"> ex) mixing red ginseng products or sports-related products(protein powder) with <i>Aster glehni</i> extracts 2) Promoting products as upgraded functional foods including a Ulleungdo native plant, <i>Aster glehni</i> 				
<p>Keywords</p>	<p><i>Aster glehni</i></p>	<p>Hyperuricemia</p>	<p>Functional Foods</p>	<p>Gout</p>	<p>Antioxidants</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 연구수행 내용 및 결과	16
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	143
4. 연구결과의 활용 계획 등	156
붙임. 참고 문헌	162

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목적

항산화 효능이 우수한 섬썩부쟁이 추출물을 활용하여 효능적으로 혈중 요산의 감소를 검증하고, 제품화할 수 있도록 원료 및 제품의 표준화를 시행하여 혈중 요산의 감소에 도움을 주는 건강기능식품 개발이 최종 목표임.

2절 연구개발의 필요성

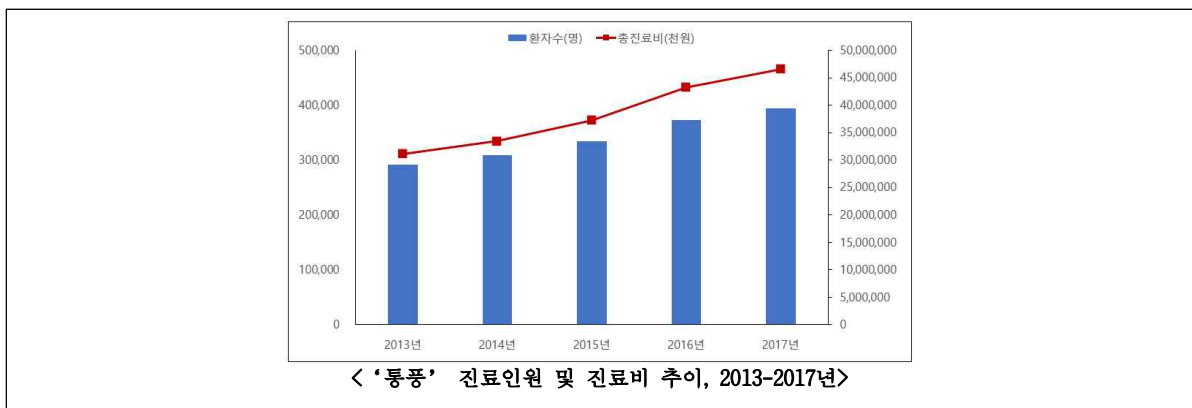
1. 바람만 스쳐도 아픈 ‘통풍(痛風)환자’ 매년 증가

- 통풍은 예로부터 너무 잘 먹어서 생기는 병이라 하여 “황제병” 또는 “귀족병”이라 불리기도 하는데, 이 병은 혈중 요산이 증가할수록 발병 가능성이 높다고 알려져 있음.
- 현대화되면서 서구화된 식생활로 인해 요산의 섭취량이 증가하게 되었고, 요산의 농도가 높아지면서 배설되지 못하고 혈액내에 남게 되는 문제점이 발생하게 되었음.

가. 혈중 요산의 증가

- 알콜이나 육류의 내장, 해산물의 섭취가 증가하면서 발생빈도도 증가.
- 연령이 높아지면 신장이나 장의 기능이 약화되어 요산을 잘 배설하지 못하게 됨.
- 장기이식 수술 후 면역억제제의 장기복용자, 이노제를 장기복용한 환자의 발생 가능성이 높음. 신기능이 저하된 여성의 경우, 가임기연령에서도 생기기 쉬움.
- 요산염이 관절에 침착되면 관절의 급성염증을 유발하게 되며 다양한 신장질환을 일으킬 수 있고, 요산에 의해 신장에 돌이 생기는 신석증이 나타나기도 하는 전신질환임.

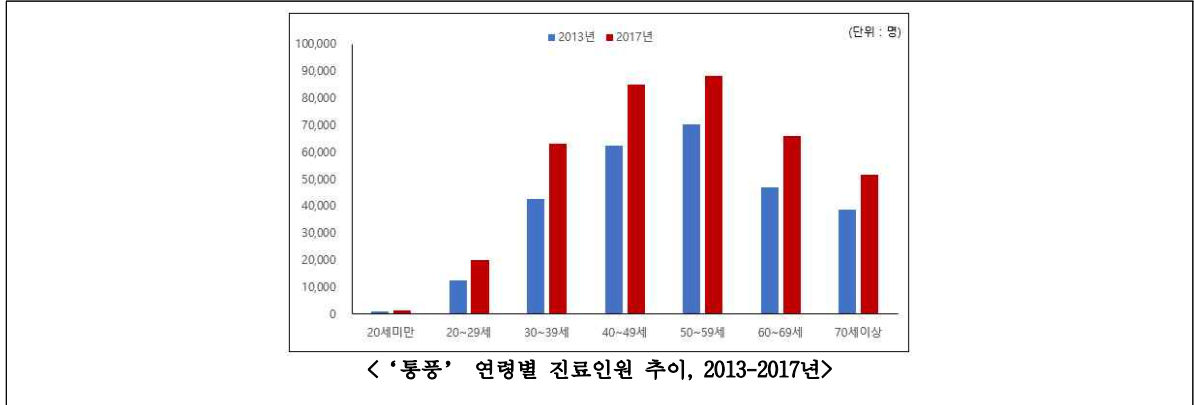
나. 통풍환자의 증가



- 건강보험심사평가원에서 2013년부터 2017년의 심사결정자료를 이용하여 ‘통풍’ 환자에 대해 분석한 결과, 2013년 통풍환자는 29만 2천명에서 2017년 39만 5천명으로 약 4년간 약 10만 3천명이 증가(35.3%)하였음.

2. 중년층 건강을 위협하는 혈중 요산의 증가

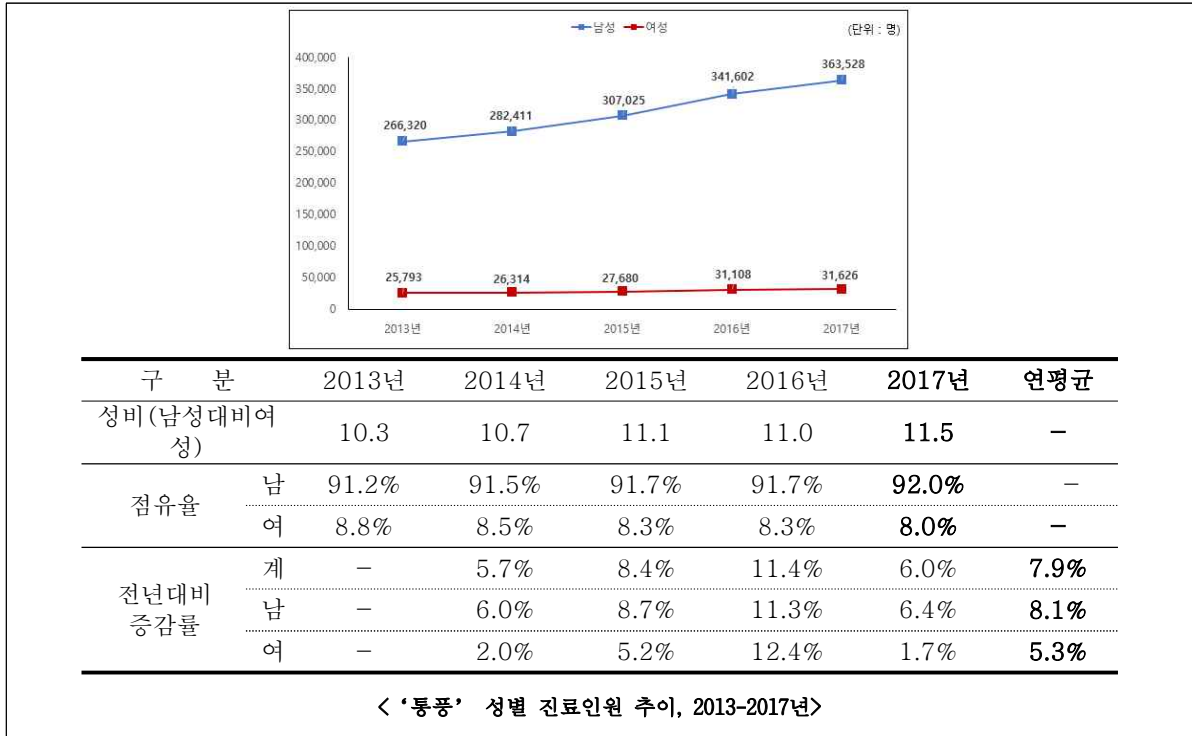
- 서구화된 식생활로 인하여 요산의 섭취량이 증가하게 되고, 체내에 요산이 제대로 분해되지 못함으로 인해 축적되면서 고요산혈증(Hyperuricemia) 질환을 유발하게 됨. 고요산혈증은 알콜이나 육류의 내장, 해산물의 섭취가 증가하면서 발생빈도가 증가하고 있으며, 고혈압, 고지혈증, 암, 당뇨병 및 비만 등으로 확대가능성이 증가될 수 있음.



- 통풍 진료인원의 연령별 점유율을 살펴보면 2017년을 기준으로 50대가 23.5%로 가장 많은 점유율을 차지했으며, 40대가 22.7%, 60대 17.5%의 순으로 점유율을 보임. 40~50대가 약 46%로 통풍 진료인원의 2명 중 1명은 40~50대의 중년층인 것으로 나타남.
- 의약품 중 현재 통풍치료제로 사용되는 알로푸리놀(Allopurinol), 벤즈브로마론(Benzbromarone), 설핀피라존(Sulfinpyrazone), 프로베네시드(Probenecid)는 1950년에서 1960년대에 개발된 약물임. 상기 약물 중 알로푸리놀(Allopurinol)은 통풍치료에 가장 잘 알려진 약물이지만 간질성 신염, 신장장애, 간독성, 혈관염, 피부 발진 이외에도 생명을 위협하는 과민성 증후군까지 일으키는 독성이 우려되고 있음. 벤즈브로마론(Benzbromarone)은 임상에서 사용된 가장 강력한 통풍치료제이나 심각한 간독성으로 사용이 제한되고 있음. 설핀프라존(Sulfinpyrazone)과 프로베네시드(Probenecid)는 최근까지 사용된 약물이지만 신장기능 장애를 초래한다고 알려져 있음.
- 이상에서 살펴본 바와 같이 통풍은 요산함량의 증가가 직접적인 발병 원인이 되고 있는 것으로 판단됨. 연구진은 본 과제를 통해서 섬쭉부쟁이(Aster glehni)가 요산함량 강하에 탁월한 효능을 가지고 있음을 확인하여 제품화 할 예정임.

3. 중년남성에게 필요한 혈중 요산의 감소 제품

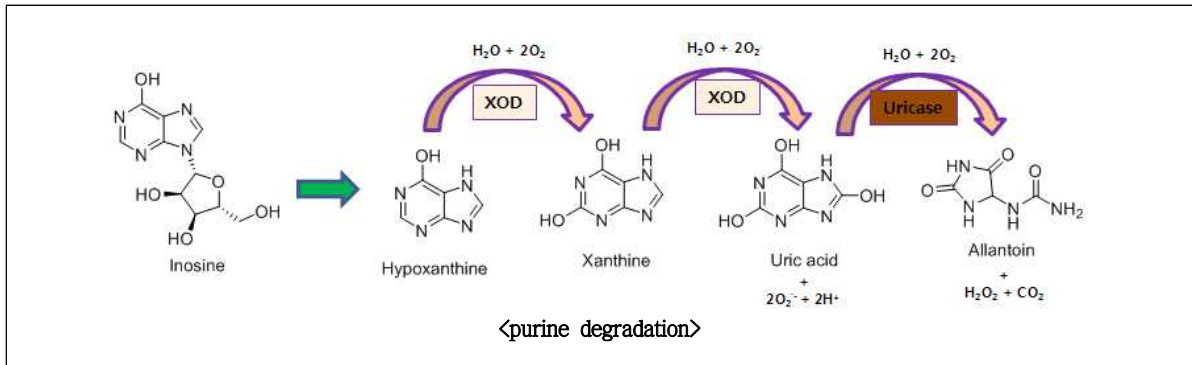
- 통풍질환을 성별로 분석해 본 결과 남성 진료인원은 2013년 266,320명에서 2017년 363,528명으로 약 9만 7천명이 증가(37%)하였으며, 여성 진료인원은 2013년 25,793명에서 2017년 31,626명으로 약 5천 8백명이 증가(22.6%) 하는 것으로 나타남. 성별 비율은 남성 진료인원이 전체 환자의 90%이상을 차지하는 추세이며, 연평균 증가율도 남성이 약 2.8% 더 높은 것으로 나타남.



- 통풍이 주로 남성에게 발생하는 이유는 남성은 신장에서의 요산 제거능력이 나이가 들수록 감소하는데 반하여 여성은 폐경 이전까지 여성호르몬의 영향으로 요산제거능력이 유지되기 때문으로 알려져 있음.
- 위의 표를 종합적으로 고려해보면 40~50대의 중년 남성이 통풍이 많이 발생하는 원인으로, 40~50대의 남성은 신장기능이 점차 약화되어 요산의 배출능력이 감소한 상황에서 과식, 과음 운동부족 또는 과다운동 등으로 요산이 과잉생성되어 통풍 발생 위험에 크게 노출되어 있기 때문으로 파악됨.
- 현재 통풍이나 혈중 요산을 감소시킬 수 있는 기능성을 가진 건강기능식품은 부재한 상황이며, 이러한 제품이 출시된다면 중년남성에게 어필할 수 있을 것으로 사료됨.

4. 혈중 요산의 증가를 예방할 수 있는 식품 필요

- 모든 세포의 핵에는 유전 정보를 가지고 있는 핵산이 존재하고, 핵산은 퓨린(purine)과 피리미딘(pyrimidine)으로 구성되어 있음. purine degradation 경로를 살펴보면 사람이나 침팬지에서는 요산(Uric acid)으로 배설이 되는데 그 외의 동물에서는 allantoin으로 배설이 됨. purine degradation 과정 중 inosine이 inosine phosphotylase에 의해 hypoxanthine이 형성되며 이후로 xanthine과 uric acid의 형성은 xanthine oxidase에 의해 이루어짐. 그러므로 xanthine oxidase 저해제를 사용할 경우 요산대사가 억제되고 혈중 요산의 농도가 감소되어 고요산혈증 및 통풍이 치료되게 함.



- 통풍은 관절의 염증에 관여하기 때문에 진정한 형태의 통풍성 관절염(Gouty arthritis)을 의미하며 다른 관절 질환과 달리 면역시스템이 아닌 주로 인체 대사에 관여함. 일반적으로 퓨린을 고농도로 함유하고 있는 식품으로서는 장기육(Organ meats), 저장육(Cured meats), 해산물, 오래된 치즈 그리고 적포도주 및 맥주 등이 있으며 이들은 통풍의 위험을 현저하게 증가시킴.
- 요산은 인체 내에서 강력한 항산화제의 역할을 하여 적정 농도일 때는 이로인한 점이 있는데 과도하게 상승하면 여러 가지 문제를 일으킴. 혈중 요산의 공급경로는 크게 두 가지로 구분할 수 있는데 그 하나는 섭취한 음식물에 포함되어 있는 퓨린에서 유래한 것이며, 다른 하나는 환자 자신의 신체에서 파괴된 세포로부터 유래된 내재성 요산임. 형성된 요산은 대부분 신장을 거쳐 소변으로 배출되는데 이러한 생산과 배출이 균형을 이루어야만 일정한 혈중 요산 농도를 유지할 수 있으며 이러한 균형이 파괴되어 요산 결정체가 형성되면 염증 반응이 나타날 수 있음.
- 정상 혈중 요산 농도는 여자는 6 mg/dL, 남자는 6.8 mg/dL 이하이지만 혈중 요산 농도가 일시적으로 정상보다 높다고 해서 통풍이 곧 발병하는 것은 아님. 요산 농도가 6 mg/dL 이하에서는 통풍이 발생하지 않고 9.6 mg/dL 이상에서는 반드시 발생하지만 그 사이 농도에서는 사람에 따라 증상이 나타나는 농도가 다르며, 혈중 요산 농도가 높을수록 요산 결정체가 더 쉽게 형성되어 여러 조직에 침착하게 되고 이런 상태가 10내지 20년간 지속된 후 여러 유발 인자에 의해서 실질적인 통풍 증상을 일으키게 되므로 일단 통풍 증상이 발생했다는 것은 과거 수년 전 부터 혈중 요산 농도가 높은 고요산혈증(Hyperuricemia)이었음을 의미함.

- 통풍은 적절하게 치료하면 장기간 건강상의 위험은 거의 없지만 방치하면 통증이 심하고, 불구의 만성질환으로 진전될 수 있음. 만성 통풍발작은 연골과 뼈를 파괴시켜서 그 결과 비가역적인 관절의 기능부전과 불구를 야기함.
- 2006년 통풍에 대한 조사결과에서 통풍을 가진 사람들의 66%가 최악의 통증을 경험하였고, 약 75%가 급성악화(Flare-ups)로 말미암아 보행이 아주 곤란하였으며, 약 70%는 운동을 하는데 지장을 보고하였고, 심지어 양말과 신발을 신을 수가 없었다고 보고함.
- 통풍을 치료하지 않으면 통풍결절(Tophi)이 골프공 크기로 커지고, 관절과 장기에 다양한 문제점을 야기하는데 신결석이 통풍환자의 10~40%에서 발생하였고, 만성 고요산혈증을 가진 환자의 약 25%가 신질환으로 진전되어 결국 종종 신부전으로 이어진다고 보고함.
- 통풍치료의 일차적 목적은 첫째, 급성발작과 연관된 통증과 염증을 경감시키고 둘째, 미래의 발작을 예방하고 셋째, 혈중의 요산 농도를 감소시키는데 있음. 급성 통풍 관리의 주류는 NSAIDs, Colchicine 그리고 전신성 또는 관절내 Corticosteroids임. NSAIDs는 부작용이 더 적기 때문에 Colchicine 보다 우선적으로 사용하며, Ibuprofen과 같은 NSAIDs를 단기간 고용량을 신속히 투여함으로써 성공적인 치료를 기할 수가 있음.
- 많은 통풍환자들은 NSAIDs 또는 Colchicine의 사용을 배제하는 경우에는 전신성 스테로이드 제제가 급성통풍 발작을 치료하는데 빈번하게 사용됨. 스테로이드의 관절내 주사는 이환관절이 단일이거나 적을 때에 적합함.
- Xanthine oxidase 억제제를 사용하는 요산염 저하요법은 혈중 요산염 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 재발성 급성악화 및 통풍결절 형성의 위험을 저하시킴. 최근 통풍에 대한 비약물 또는 대체요법이 인기리에 사용되고 있음.
- 통풍유발 위험인자로서는 설탕이 든 청량음료, 캔디, 도넛츠 등이 있는데 과잉의 알코올 소모(48시간 내 7잔 또는 그 이상)는 급성통풍발작(acute gout attacks)의 잘 알려진 유발 물질이며 대사지연, 비만, 고혈압, 당뇨병도 통풍과 연관성이 있어 대사성 증후군 발생은 통풍 환자의 경우 약 2.5배 더 높게 나타남.
- 반면에 통풍 보호인자로서는 야채, 유제품 단백질, 견과류, 콩류, 과일(당도가 낮은 것), 카페인 함유 커피 및 고용량의 비타민 C(1일 1,500mg 이상 복용), 통곡물은 건강한 식품으로 알려져 있으나 연구가 많이 이루어지지 않았을 뿐 아니라, 식품(제품)의 고요산혈증 개선 연구는 거의 전무한 실정임.

3절 연구개발 범위

No.	주제	주요 개발내용	기관
1	섬썩부쟁이 추출물의 지표물질 선정 1. 섬썩부쟁이 추출물의 성분 연구	가 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질 선정을 위한 예비실험	한국과학 기술연구원
		나 섬썩부쟁이 추출물의 순수화합물 분리	
		다 섬썩부쟁이 에탄올추출물의 HPLC profiling	
2	섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 원료의 표준화 1. 섬썩부쟁이 추출물의 제조공정연구	가 섬썩부쟁이 추출물 제조공정 연구	한국과학 기술연구원
	2. 섬썩부쟁이 추출물의 표준화	가 원재료 품질 및 추출조건 예비검토	SK 바이오랜드
		나 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 분석법 최적화	
		다 섬썩부쟁이 추출물 제조공정 개발	
		라 섬썩부쟁이 추출물의 기준 및 시험법 확립	
		마 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화	
		바 원료의 안정성 검토	
사 대량생산을 위한 원료 확보 방법 연구			
3	섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 유효성 평가 1. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 효능검색	가 Antioxidant 효능 검색	고려은단
		나 Xanthine oxidase 저해효능 검색	고려대
		다 Anti inflammation 효능 검색	
	2. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 고요산혈증 동물 모델 효능 확인 및 기전연구	가 추출조건별 섬썩부쟁이 추출물의 고요산혈증 동물모델 효능검색 I	고려대
		나 추출조건별 섬썩부쟁이 추출물의 고요산혈증 동물모델 효능검색 II	
		다 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 고요산혈증 동물모델 효능검색 III	
		라 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 고요산혈증 동물모델 효능검색 IV	
마 요산 수송체와 혈중 요산 조절 기전 연구	고려은단		
4	인체적용시험 제품의 표준화 1. 인체적용시험 원료 준비	가 Pilot 제조실험 및 인체적용시험 원료 준비	SK 바이오랜드
	2. 인체적용시험 제품 준비	가 인체적용시험 제품을 위한 제형연구	고려은단
		나 인체적용시험 제품 제조공정 연구	
		다 인체적용시험 제품의 기준 및 시험법 설정 및 검증	
		라 인체적용시험 제품의 안정성 검토	
5	인체적용시험 계획서 개발	가 “혈중 요산 감소” 관련 국내외 임상시험 자료 확보 및 선별	네오뉴트라
		나 인체적용시험 계획서 개발	
		다 인체적용시험 식품의 인체허용량 평가를 위한 섭취량 설정 및 안전성 평가 기준 근거	
		라 인체적용시험 계획서에 대한 IRB 신청 및 승인	
6	인체적용시험 실시	가 실시기관 선정 및 계약	네오뉴트라
		나 인체적용시험 진행 일정	
		다 인체적용시험 모니터링 실시	
		라 DM(Data Management) 및 통계분석	
		마 결과보고서 작성	

7	제품의 표준화 1. 섬썩부쟁이 추출물의 Vitamin 혼합물의 상승효과 검색	가	섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin 혼합물의 Antioxidant 효능 검색	고려온단
		나	섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin 혼합물의 Xanthine oxidase 저해 효능 검색	
	2. 섬썩부쟁이 추출물과 상승효과 시료의 고요산혈증 동물모델 효능 확인	가	섬썩부쟁이 추출물과 상승효과 시료의 고요산혈증 동물모델 효능검색 V	
		나	섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin C 혼합물의 고요산혈증 동물모델 효능검색 VI	
	3. 제품의 표준화	가	제품을 위한 제형연구	
		나	제품 제조공정 연구	
다		제품의 기준 및 시험법 검증		
라		제품의 안정성 검토		
		마	제품에 대한 품질관리	
8	개별인정형 원료 식약처 신청 준비	가	기준규격 등 공인시험 자료 확보	SK 바이오랜드
		나	Master File 작성	고려온단

2장 연구수행 내용 및 결과

1절 섬쑥부쟁이 추출물의 지표물질 선정

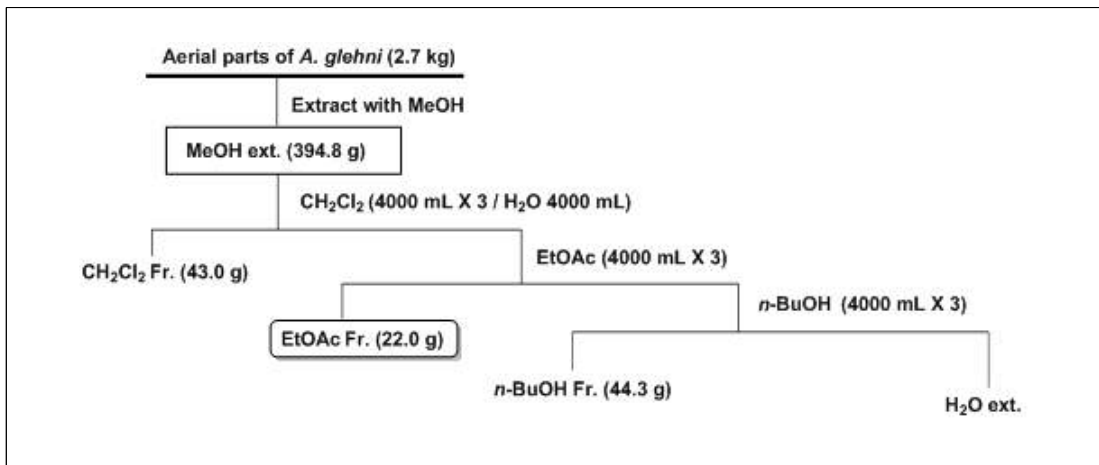
1. 섬쑥부쟁이 추출물의 성분 연구

가. 섬쑥부쟁이 추출물의 지표물질 선정을 위한 예비실험

(1) 분획물의 성분 연구

(가) 분획물 수득

울릉도에서 직접 채집한 섬쑥부쟁이(*Aster glehni*) 지상부(건조중량 2.7 kg)에 메탄올 12 l을 첨가하고 상온에서 4일 동안 추출하였음. 이를 3회 반복한 후에 여과하고 40°C에서 회전 농축기로 농축 건조시켜 메탄올 추출물 394.8 g을 수득함. 상기 메탄올 추출물에 물 4000 ml를 가하여 현탁시킨 후에, 디클로로메탄(CH₂Cl₂, 4000 ml x 3)으로 추출하였음. 물층을 에틸아세테이트(EtOAc, 4000 ml x 3)로 추출하여, 에틸아세테이트 분획물을 수득 후, 부탄올(BuOH, 4000 ml x 3)로 추출하여, 부탄올 분획물을 수득하였음.



Scheme 1. Extraction and fractionation of *Aster glehni*.

(나) 에틸아세테이트 분획물의 성분 연구

① 신규화합물 1-5의 분리

EtOAc 분획(AGEF, 971E) 15 g에 대하여 100% MeOH을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 실시하였음. 이로부터 얻은 각각의 분획들은 TLC로 확인하여 분리된 정도에 따라 유사한 분획들을 모아 9개의 분획(A~I)으로 나누었음.

971E-C 분획을 다시 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography(MeOH:H₂O=70:30, v/v)를 실시하여 9개의 소분획(1~9)으로 나누고, 소분획 971E-C4(614.4 mg)에 대하여 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음. 전개용매는 MeOH-H₂O(45:55, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 늘려가며 사용하여 10개의 소분획(A~J)으로 나누었음.

이 중 971E-C4B(68.2 mg)와 971E-C4H(47.5 mg)는 각각 MeOH-H₂O(50:50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 **5**(7.1 mg)와 순수한 화합물 **3**(17.1 mg)을 얻었음. 또한 971E-C4D(54.8 mg)에 대하여 혼합용매(CH₂Cl₂: MeOH: H₂O=6.5: 1: 0.1, v/v)를 전개용매로 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하였음. 그 결과 13개의 소분획(1~13)으로 나누었고, 이 중 971E-C4D5(9.8 mg)는 MeOH-H₂O(50: 50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 **4**(3.3 mg)를 얻었음. 그리고 971E-C4E(112.1 mg)에 대하여 혼합용매(CH₂Cl₂: MeOH = 6.5: 1 → 4.5: 1, v/v)를 전개용매로 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 12개의 소분획(1~12)으로 나누었음. 소분획 중 971E-C4E5(29.1 mg)는 MeOH-H₂O(50:50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 **1**(11.8 mg)를 얻었음.

소분획 971E-C3(385.7 mg)에 대하여 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음. 전개용매는 MeOH-H₂O(45:55, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 늘려가며 사용하여 13개의 소분획(A~M)으로 나누었음. 이 중 971E-C3J(23.4 mg)는 MeOH-H₂O(50: 50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 **2**(4.4 mg)를 얻었음.

② 신규화합물 6-18의 분리

소분획 971E-C3C(37.0 mg)에 대하여 혼합용매(CH₂Cl₂:MeOH: H₂O=7: 1: 0.1, v/v)를 전개용매로 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 소분획(1~8)으로 나누었음. 소분획 중 971E-C3C4(29.1 mg)는 MeOH-H₂O(50:50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 **17**(5.7 mg)을 얻었음. 그리고 971E-C3F(21.8 mg)에 대하여 혼합용매(CH₂Cl₂:MeOH:H₂O=7: 1: 0.1, v/v)를 전개용매로 사용하여 silica gel column chromatography를 실시하였음. 그 결과 14개의 소분획(1~14)으로 나누었고, 이 중 6번째 소분획에서 순수한 화합물 **16**(4.6 mg)을 얻었음.

소분획 971E-D(10.7112 g)에 대하여 MeOH-H₂O(70:30, v/v)을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 실시하였음. 이로부터 얻은 각각의 분획들은 TLC로 확인하여 분리된 정도에 따라 유사한 분획들을 모아 11개의 분획(1~11)으로 나누었음. 그 중 971E-D2 분획을 재결정하여 순수한 화합물 **18**(11.1 mg)을 얻었음. 그리고 971E-D4(516.5 mg)에 대하여 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음.

전개용매는 MeOH-H₂O(50:50, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 증가시켜 용출하여 9개의 소분획(A~I)으로 나누어 4번째 소분획에서 순수한 화합물 **14**(4.4 mg)와 7번째 소분획에서 순수한 화합물 **15**(145.7 mg)를 얻었음. 그리고 1번째 소분획인 971E-D4A(85.3 mg)에 대하여 MeOH-H₂O(20:80, v/v)를 전개용매로

이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 6(14.2 mg)과 13(7.0 mg)을 얻었음.

소분획 971E-D7(1.5933 g)에 대해서 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음. 전개용매는 MeOH-H₂O(30:70, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 늘려가며 사용하여 11개의 소분획(A~K)으로 나누었음. 이 중 4번째 소분획에서 순수한 화합물 8(708.4 mg), 6번째 소분획에서 순수한 화합물 11(210.5 mg), 8번째 소분획에서 순수한 화합물 9(331.9 mg)와 10번째 소분획에서 순수한 화합물 12(117.8 mg)를 얻었음. 그리고 1번째 소분획에 해당하는 971E-D7A(11.3 mg)와 3번째 소분획에 해당하는 971E-D7C(49.5 mg)에 대하여 각각 MeOH-H₂O(50:50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 7(7.7 mg)과 순수한 화합물 10(5.6 mg)을 얻었음.

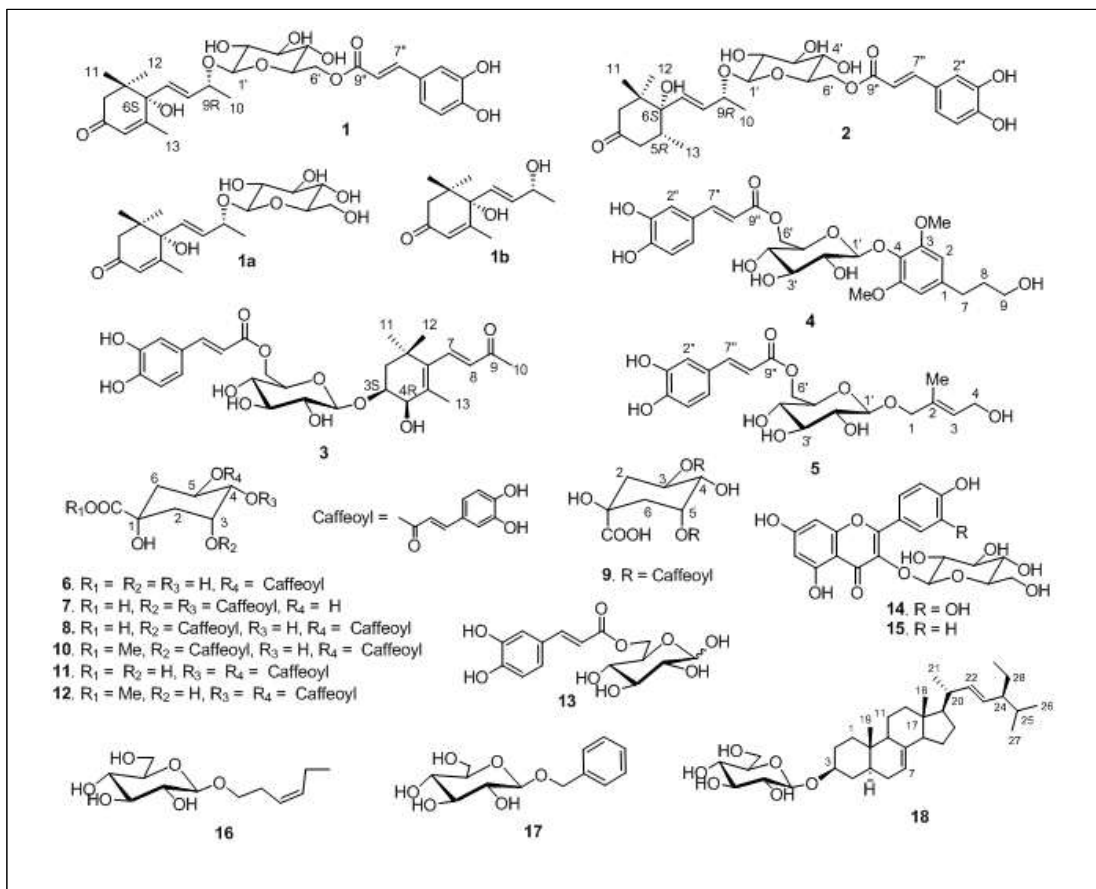


Fig. 1. 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획에서 분리한 화합물의 구조

(2) 섬쑥부쟁이 추출물 및 순수화합물의 항산화 효능 검색

(가) 실험방법

① DPPH 라디칼 소거능 검색

Organic solvent fraction과 분리한 화합물에 대한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical의 소거 효과는 잘 알려진 방법에 따라 측정하였음(Kim & Lee, 2005). 96-well microtiter plate에 DMSO에 용해한 다양한 농도의 시료와 에

탄올에 용해한 100 μ M DPPH 용액을 섞은 후, 37°C 에서 30분 동안 반응시켰음. 반응 종료 후 microplate reader (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, U.S.A)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였음. 시료의 DPPH 라디칼 소거 효능(%)은 DMSO 용액을 control group으로 비교하여 결정하였고, IC₅₀값은 DPPH radical이 50% 소거되는데 필요한 시료의 농도로 나타내었음.

② 잔틴/잔틴옥시다제 이용 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거능 검색

Superoxide anion radical의 소거 효과는 잔틴(Xanthine)과 잔틴옥시다제(Xanthine oxidase, 이하 XOD)에 의하여 생성된 음이온 라디칼을 소거하는 효능을 측정하였음(Yen & Duh, 1994). 96-well plate에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5), 1 mM xanthine, 1 mM EDTA, 250 μ M NBT와 DMSO에 용해한 다양한 농도의 시료를 넣어주었음. 반응 혼합물에 0.05 U/mL xanthine oxidase(EC 1.2.3.2)를 가하여 반응을 개시하여, 37°C 에서 20분 동안 반응시켰음. 각각의 시료에 대한 superoxide anion radical의 소거 효과는 반응 후 형성된 formazan을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였음.

③ 쥐의 간균질액을 이용한 지질과산화 저해효능 검색

쥐의 간 균질액에 iron-ascorbate에 의해 유도된 지질 과산화 저해 효능은 Sanz *et al.*(1994)의 방법을 약간의 수정하여 검색하였음. 쥐의 간 균질액(100 mL, 16 mg protein/mL), 10 mM Fe₂SO₄, 0.4 mM ascorbic acid, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)과 DMSO에 용해한 다양한 농도의 시료를 혼합하여 37 °C 에서 30분 동안 배양하였음. 지질과산화 저해효능은 Buege and Aust(1978)의 방법에 따라 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)용액을 이용하여 측정하였음. 지질과산화는 ascorbic acid를 가하여 개시되며, 0.37% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl, 0.01% butylated hydroxytoluene (TBA-TCA reagent)를 가하여 종결됨. 이 혼합물을 95 °C 에서 30분 동안 반응시킨 후 5분 동안 냉각시키고 원심분리(\times 5000g)하여 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였음. 쥐의 간 균질액의 단백질 함량은 Bradford method에 따라 bovine serum albumin을 이용하여 검량곡선을 작성하여 결정하였음 (Bradford, 1976).

④ 잔틴옥시다제 저해 효능 검색

Xanthine oxidase(XO) 저해 효능은 호기성 조건 하에서 *Noro et al.* (1983) 방법을 약간의 수정하여 측정하였음. 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 0.011 U/mL xanthine oxidase(EC 1.2.3.2)와 DMSO에 용해한 다양한 농도의 시료를 혼합하여 25 °C 에서 10분 동안 활성화 하였음. 전배양 후, 반응물에 0.1 mM xanthine을 가하여 반응을 개시하여, 25°C 에서 30분 동안 배양하였음. 반응물에 1N HCl을 첨가하여 반응을 종결시키고, 295 nm에서 흡광도를 측정하였음. xanthine oxidase 저해 효능은 % inhibition으로 평가하였고, IC₅₀값은 xanthine oxidase 억제 활성이 50%일 때의 시료 농도로 나타내었음(Table 1).

Table 1. Antioxidant activities and xanthine oxidase (XOD) inhibitory effects of organic fractions from *A. glehni*.

Samples ^a	Free radical scavenging (IC ₅₀ , μg/mL) ^b		LPO inhibition (IC ₅₀ , μg/mL) ^c	XOD Inhibitory activity (IC ₅₀ , μg/mL) ^d
	DPPH	O ₂ ^{·-}		
MeOH ex	46.3 ± 1.5	20.7 ± 0.6	152.4 ± 13.3	93.2 ± 3.6
CH ₂ Cl ₂ Fr	>500	>500	343.1 ± 33.8	69.3 ± 3.3
EtOAc Fr	7.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	14.5 ± 0.2	4.7 ± 0.1
BuOH Fr	19.7 ± 0.4	6.4 ± 0.1	53.0 ± 1.6	33.2 ± 2.4
30% EtOH ex	133.9 ± 2.0	83.7 ± 1.7	288.6 ± 12.8	162.7 ± 2.0
50% EtOH ex	118.1 ± 4.4	82.4 ± 2.5	111.2 ± 6.0	202.4 ± 4.2
70% EtOH ex	118.6 ± 3.6	84.9 ± 3.0	328.5 ± 7.3	172.5 ± 2.7
94% EtOH ex	167.1 ± 1.2	98.2 ± 2.3	365.2 ± 5.2	170.0 ± 4.2
Resveratrol	51.8 ± 0.3	>200	48.7 ± 0.7	Not tested
Ascorbic acid	47.7 ± 1.6	>200	Not tested	Not tested
Trolox	21.2 ± 0.3	198.7 ± 5.2	105.1 ± 5.5	Not tested
Allopurinol ^e	Not tested	Not tested	Not tested	3.0 ± 0.3

^a Samples: MeOH ex: MeOH extract, CH₂Cl₂Fr:CH₂Cl₂ fraction, EtOAc Fr: EtOAc fraction, and BuOH Fr: BuOH fraction.

^b IC₅₀ is the concentration of a sample needed to scavenge 50% of DPPH and superoxide anion radicals; data were represented as mean ± SEM.

^c IC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibition 50% of lipid peroxidation of a rat liver homogenate; data were represented as mean ± SEM.

^d IC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibit 50% of xanthine oxidase.

^e Positive controls.

Table 2. Antioxidant activities and xanthine oxidase (XOD) inhibitory effects of compounds 1-18 from *A. glehni*.

Compounds	Free radical scavenging (IC ₅₀ , μM) ^a		LPO inhibition (IC ₅₀ , μM) ^b	XOD Inhibitory activity (IC ₅₀ , μM) ^c
	DPPH	O ₂ ^{·-}		
1	16.7 ± 0.4	10.9 ± 0.3	91.1 ± 1.9	42.0 ± 1.4
2	18.4 ± 0.3	11.4 ± 0.3	92.3 ± 1.5	93.0 ± 1.7
3	19.8 ± 0.3	9.1 ± 0.1	77.7 ± 0.7	73.2 ± 5.1
4	17.1 ± 0.5	9.7 ± 0.2	86.7 ± 0.3	71.1 ± 3.9
5	14.8 ± 0.2	11.0 ± 0.1	82.9 ± 2.0	80.8 ± 4.9
6	24.4 ± 1.9	13.6 ± 0.9	182.9 ± 3.0	82.8 ± 1.0
7	12.6 ± 0.8	4.3 ± 0.5	10.8 ± 0.1	35.7 ± 0.5
8	10.6 ± 0.2	3.5 ± 0.4	10.7 ± 0.4	36.3 ± 3.5
9	10.4 ± 0.3	5.1 ± 0.5	10.8 ± 0.6	40.2 ± 1.5
10	8.8 ± 0.2	4.6 ± 0.3	10.1 ± 0.4	7.2 ± 0.2
11	9.9 ± 0.3	3.6 ± 0.1	10.0 ± 0.3	11.0 ± 0.6
12	7.2 ± 0.2	2.5 ± 0.2	9.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1
13	23.8 ± 0.5	10.7 ± 0.7	>200	75.3 ± 1.3
14	10.3 ± 0.4	10.7 ± 0.2	21.6 ± 0.5	76.3 ± 3.9
15	>200	>200	>200	58.7 ± 3.9

16	>200	89.4 ± 0.6	>200	>100
17	>200	>200	>200	>100
18	>200	>200	>200	>100
Resveratrol	51.8 ± 0.3	>200	48.7 ± 0.7	Not tested
Ascorbic acid	47.7 ± 1.6	>200	Not tested	Not tested
Trolox	21.2 ± 0.3	198.7 ± 5.2	105.1 ± 5.5	Not tested
Allopurinol ^e	Not tested	Not tested	Not tested	3.0 ± 0.3

^a IC₅₀ is the concentration of a sample needed to scavenge 50% of DPPH and superoxide anion radicals; data were represented as mean ± SEM.

^b IC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibition 50% of lipid peroxidation of a rat liver homogenate; data were represented as mean ± SEM.

^c IC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibit 50% of xanthine oxidase.

^d Positive controls.

(나) 결과

섬썩부쟁이의 메탄올 추출물과 유기용매 분획에 대하여 항산화 효과를 측정하였음. 그 결과 섬썩부쟁이 에틸아세테이트 분획(AGEF)의 DPPH 소거능은 IC₅₀값이 7.2 ± 0.3 μg/mL로 우수한 효능을 보였으며, superoxide anion radical 소거능은 IC₅₀값이 3.3 ± 0.1 μg/mL로 뚜렷한 효과를 나타내었고, 쥐의 간 균질액을 이용한 지질과산화 저해효능에서도 IC₅₀값이 14.5 ± 0.2 μg/mL로 나타나 용매분획 중에서 가장 강력한 지질 과산화 억제 효과를 보였음.

항산화 효능이 가장 우수하게 나타난 섬썩부쟁이 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 5종의 신규 화합물을 포함한 총 18종의 화합물에 대하여 항산화 효과를 측정하였음. 그 결과 3종의 non-phenolic compound (**16–18**)를 제외한 대부분의 분리된 화합물은 강력한 항산화 효과를 나타내었음. 신규 화합물 **1-5**는 대조 약물 [resveratrol (IC₅₀51.8 ± 0.3 μM), ascorbic acid (IC₅₀47.7 ± 1.6 μM), trolox (IC₅₀21.2 ± 0.3 μM)]과 비교했을 때 IC₅₀값이 14.8 ± 0.2에서 19.8 ± 0.3 μM 정도로 대조약물보다 우수한 DPPH radical 소거 효과를 보였음. 또한 superoxide anion radical 소거 효과 역시 신규 화합물 **1-5**는 대조 약물[resveratrol (IC₅₀438.3 ± 20.5 μM), ascorbic acid (IC₅₀>100 μM), trolox (208.4 ± 2.1 μM)]과 비교했을 때 IC₅₀값이 약 9에서 11 μM 정도로 대조약물보다 좋은 효능을 나타내었음. 또한, 6종의 dicaffeoylquinic acid 유도체(DCQAs) **6-12**의 DPPH 소거능은 IC₅₀값이 7.2 ± 0.2에서 12.6 ± 0.8 μM으로 우수한 효능이 나타나고, superoxide anion radical 소거능은 IC₅₀값이 2.5 ± 0.2에서 5.1 ± 0.5 μM로 강력한 소거능을 나타내었으며, 지질 과산화 저해효능 역시 IC₅₀값이 약 10 μM 정도로 우수한 효능을 보였음. 한편, 화합물 **6**과 **13**의 radical 소거능은 어느 정도 나타났지만 지질 과산화 저해효능은 미약한 효능을 나타내었음. 이는 DCQAs의 radical 소거 효과와 관련된 구조적 특징으로 벤젠 고리에 두 그룹의 *ortho*-dihydroxy에서 기인한 것으로 사료됨. 이는 화합물 내에 치환된 unsaturated 2,3-double bond는 phenolic radical의 안정화를 최대화한다고 보고한 문헌과 어느 정도 일치함을 알 수 있었음(Rice-Evans,

Miller, & Paganga, 1996). 그러나, 5종의 신규 화합물 1-5는 대조 약물인 trolox ($IC_{50}=105.1 \pm 5.5 \mu M$)와 비교했을 때 IC_{50} 값이 $77.7 \pm 0.7 \mu M$ 에서 $92.3 \pm 1.5 \mu M$ 로 나타나 경쟁할 만한 효능을 보이고 있으나 DCQAs의 저해효능 보다는 약 7배에서 10배정도 미약한 저해효능을 나타내었음. 이들 신규 화합물의 항산화 효과는 화합물 내에 오직 하나의 *ortho*-dihydroxy 벤젠 고리에 기인한 것으로 예상됨.

Xanthine oxidase 저해효능은 용매분획 중에서 AGEF가 IC_{50} 값이 $4.7 \pm 0.1 \mu g/mL$ 로 가장 강력한 효능을 보였으며, 분리된 화합물 중에서는 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester (12)가 가장 강력한 xanthine oxidase 저해효능($IC_{50}=2.6 \pm 0.1 \mu M$)을 보였음. 이러한 효능은 임상에서 통풍 치료제로 사용되고 있는 xanthine oxidase inhibitor인 Allopurinol의 효능($IC_{50}=3.0 \pm 0.3 \mu M$)과 비슷한 xanthine oxidase 저해효능임을 알 수 있었음.

3,5-Dicaffeoylquinic acid methyl ester (10)는 효능이 우수하게 나타난 화합물 12의 구조이성질체로 비록 활성이 화합물 12보다 약 2배에서 3배 정도 미약한 효능을 보였지만, 역시 우수한 xanthine oxidase 저해효능($IC_{50}=7.2 \pm 0.2 \mu M$)을 확인할 수 있었음. 그러나 다른 dicaffeoylquinic acid derivatives (7 - 9)는 mild한 xanthine oxidase 저해효능을 나타내었는데, IC_{50} 값이 화합물 7은 $35.7 \pm 0.5 \mu M$, 화합물 8은 $36.3 \pm 3.5 \mu M$, 화합물 9는 $40.2 \pm 1.5 \mu M$ 로 나타났음.

5종의 신규 화합물(1-5)은 화합물 1($IC_{50}=42.0 \pm 1.4 \mu M$)을 제외하고 비교적 미약한 xanthine oxidase 저해효능($IC_{50}=71.7 - 93.0 \mu M$)을 나타내었음. 이러한 결과는 2개의 caffeoyl 작용기가 포함된 quinic acid methyl ester의 구조적 특징에 의한 것이라 사료됨.

(3) Potassium oxonate에 의해 유도된 고요산혈증 쥐의 혈액내 요산 농도 측정

(가) 재료 및 방법

Oriental-Bio(Gyeonggi, Korea)로부터 구입한 12-16주 된 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 ($200 g \pm 20\%$ in weight)를 cage당 3마리씩 animal polycarbonate house에 넣어 사육하였음. 실험에 앞서 1주 정도 적응시킨 뒤 실험에 사용하였으며, 사육장의 온도는 $23 \pm 3 ^\circ C$, 상대 습도는 $55 \pm 15\%$, 명암주기는 12 h light/dark cycle로 유지하였고, standard food pellet(DreamBio Co., Seoul, Korea)에 접근이 자유롭도록 하여 사료와 물은 충분히 공급하였음. 모든 동물 실험은 한국 경기도에 위치한 한국 동물 의과학 연구소의 동물실험 관리 위원회(KAMSI-IACUC)의 지침과 정책에 따라 수행하였음(publication No: 14-KE-161). 1주일 동안 적응 후, 흰 쥐는 6일 동안 vehicle(sterile water for injection), 섬썩부쟁이 에틸아세테이트 분획(AGEF) 혹은 Allopurinol을 하루에 한 번씩 경구투여 하였음. 7일 째 되는 날, 시료 최종 투여 1시간 전에 고요산혈증을 유도시키기 위하여 potassium oxonate($250 mg/kg, i.p.$)를 주사하였음. 흰 쥐는 무작위적으로 각 10마리씩 6 그룹으로 나누었음. 그룹 I은 약물 투여 없이 normal control로 멸균주사용수를 사용한 부형제 투

여군, 그룹 II는 유발군 vehicle로 부형제 투여 후 potassium oxonate를 주사하였음. 그룹 III, IV 및 V는 50, 100 and 300 mg/kg의 AGEF를 경구 투여 후에 potassium oxonate를 주사하였음.

그룹 VI는 양성대조군으로 임상에서 사용 중인 알로푸리놀(Allopurinol) 50 mg/kg을 경구 투여 후 potassium oxonate를 주사하였음. 모든 시료 용액은 최종 부피가 2 mL/kg로 투여하였음. potassium oxonate 주입 3시간 후, 경정맥으로부터 혈액을 채취하고 실온에서 15분 동안 응고시키고 10분 동안 3000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 분석 실시 전까지 -20°C에서 보관하였음. 혈청내 요산 농도는 자동 혈액 분석기(7020 Hitachi, Japan)로 측정하였음.

Table 3. Hypouricemic effects of the ethyl acetate fraction from *A. glehni* (AGEF) and allopurinol on increases in serum uric acid levels induced by potassium oxonate (PO) in rats.

Group	Treatment	Dose (mg/kg/day)	Serum uric acid level (mg/dl)	% Reduction ^a
I	Normal control		1.01 ± 0.03	-
II	Vehicle + PO		2.54 ± 0.12**	-
III	AGEF + PO	50	2.30 ± 0.12	15.4
IV		100	1.93 ± 0.14##	39.8
V		300	2.04 ± 0.14##	32.3
VI	Allopurinol + PO	50	0.61 ± 0.05##	125.9

^a % reduction of the serum uric acid level elevated by PO from the normal control level.

Rats were treated orally once a day with vehicle (sterile water for injection), AGEF or Allopurinol for 6 days. On the 7th day, potassium oxonate (250 mg/kg, i.p.) was injected to induce hyperuricemia 1 h before final administration of the samples. Three hours after potassium oxonate injection, blood samples were analyzed for uric acid levels. Data were expressed as mean ± SEM (n=10). **p<0.01 compared with the normal control group, ##p<0.01 compared with the vehicle-treated hyperuricemic group. Data were statistically analyzed using Newman-Keuls test for multiple comparisons.

Table 3에 나타난 바와 같이, normal control 쥐의 혈청 내 요산 수준이 단지 1.01 ± 0.03 mg/dL인 반면에 potassium oxonate로 고요산혈증 유발쥐(vehicle group)는 2.54 ± 0.12 mg/dL로 그 수준이 상당히 올라갔음. AGEF 50, 100 및 300 mg 투여 그룹에서는, vehicle group과 비교 시, 각각 15.4%, 39.8% 및 32.3%로 normal control 수준으로부터 potassium oxonate에 의해 상승된 혈청 내 요산 수준을 감소시켰음.

대조약물 allopurinol은 50 mg/kg의 용량으로 처리한 것은 혈청 내 요산 수준이 normal control 수준보다 더 낮은 0.61 ± 0.05 mg/dL로 현저히 감소하였음. 이러한 *in vitro*와 *in vivo* 연구는 AGEF가 상당한 xanthine oxidase 저해효능과 potassium oxonate로 고요산혈증을 유도시킨 쥐에 대해 어느 정도 혈청 내 요산 수준을 감소시킨 효능을 확인하였음.

(4) HPLC profiling 연구

(가) HPLC 분석

- Column : Luna C18(2) (5 um, 250 × 4.6 mm, phenomenex)
- Detector: Waters 2998 PDA (320 nm)
- Pump: Waters 1525
- Temperature : Room Temp.
- Injection volume : 20 ul
- Flow rate : 1 ml/min
- Solvent system: Gradient system (linear gradient system)
23% → 63% MeOH (2.5% HOAc) for 60 min.

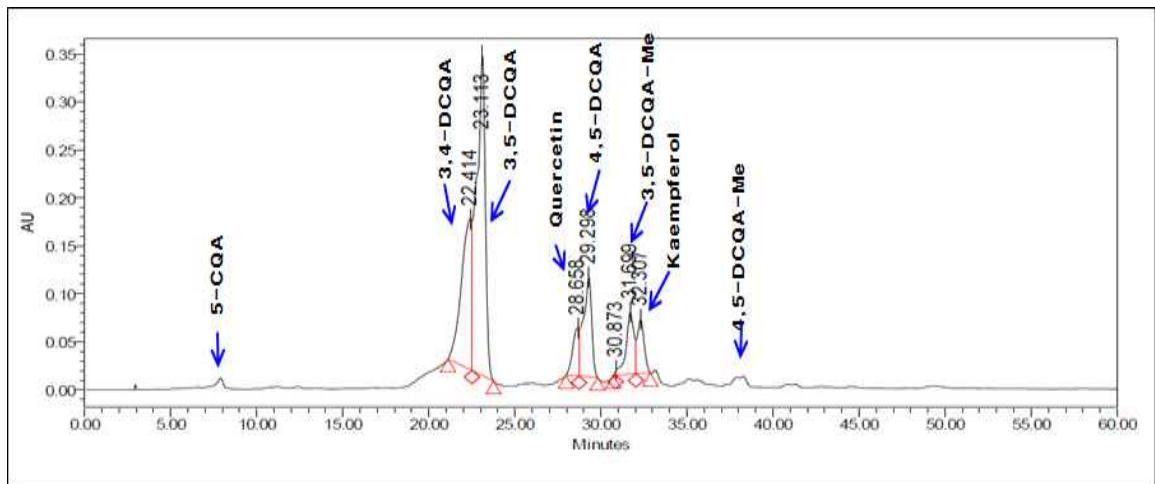


Fig. 2. HPLC profile of Ethyl acetate fraction of *A. glehni* (AGEF)

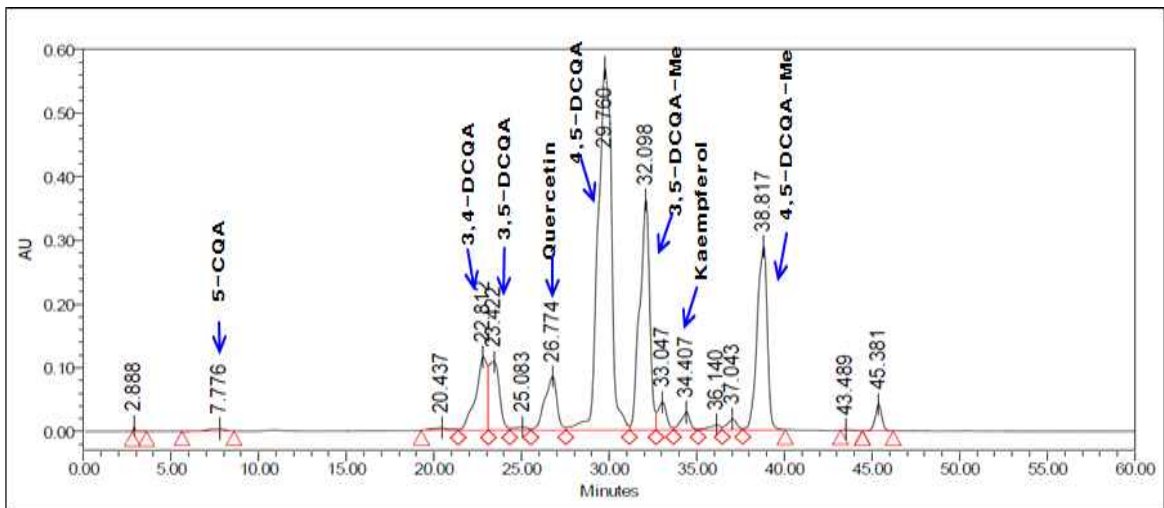


Fig. 3. HPLC profile of nine phenolic compounds isolated from AGEF

- ▶ 고요산혈증 모델에서 효능이 있었던 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물에서 함량이 가장 높은 3,5-dicaffeoylquinic acid를 지표물질로 선택함.

나. 섬쭈부쟁이 추출물의 순수화합물 분리

(1) 재료 및 방법

(가) 실험재료

본 실험에 사용된 섬쭈부쟁이 지상부(줄기 및 잎)는 2015년 7월과 10월 중순경 경상북도 소재 울릉도에서 채집하거나 2016년 4월 생초를 울릉도 농협에서 구입하여 전문가의 동정을 받아 사용하였음. 시료(971-12)는 한국과학기술연구원(KIST)에 보관하고 있음.

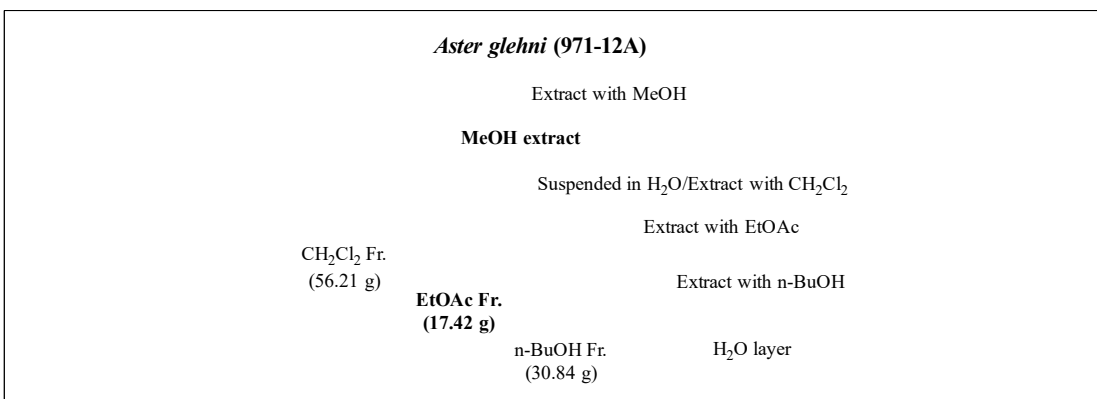
(나) 시약 및 기기

추출 및 분획용 시약은 1급 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, TLC와 column용 시약은 1급 또는 특급 시약을 그대로 사용하였고, 발색시약은 10% 황산 용액을 사용함.

Xanthine oxidase(잔틴산화효소, XOD)와 allopurinol은 시그마(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 효능검색에 사용한 검출기는 Epoch microplate spectrophotometer(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 295 nm에서 흡광도를 측정하여 억제효능을 분석하였음.

Optical rotation은 Autopol III automatic polarimeter(Rudolph Research Flanders, New Jersey)를 사용하여 측정하였으며, NMR은 Bruker 400 AMX-400(400 MHz) 또는 Varian 600 FT-NMR(600 MHz)을 사용하여 구조분석 하였음. HRFAMMS와 HRESIMS은 Waters Q-TOP Synapt G2 LC / JEOL JMS-600W mass spectrometer를 이용하여 분자량을 측정하였음. Circular dichroism(CD)은 JASCO J-715 spectropolarimeter를 사용하여 구조분석에 활용하였음.

(다) 추출, 용매분획 및 성분분리



Scheme 2. Extraction and fractionation of the MeOH extract from the aerial parts of *Aster glehni*.

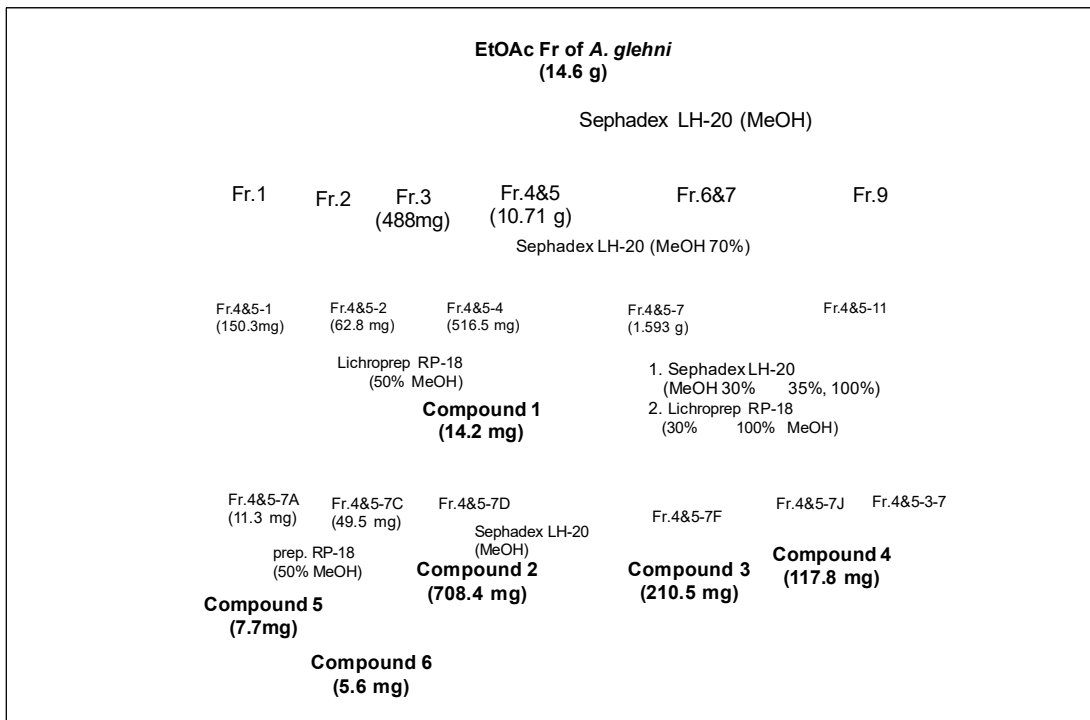
섬쭈부쟁이(2.4 kg)를 메탄올 26 L에 침적시키고 실온에서 4일간 추출한 후 여과하고 그 여액을 40 °C 이하에서 감압 농축하여(위의 조작을 3회 반복) 메탄올 추출물(394.8 g)을 얻음. 농축한 메탄올 추출물을 증류수 4 L에 현탁시킨 후 동량의 메틸렌클로라이드(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(BuOH)의 순서로 계통적 추출법에 의해 추출하여 용매분획 하였음(Scheme 2).

(2) EtOAc 분획으로부터 순수화합물 분리

(가) 화합물 1-6의 분리

섬쭉부쟁이 EtOAc 분획(AGEF, 971E) 14.6 g에 대하여 100% MeOH을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 실시하였음. 이로부터 얻은 각각의 분획들은 TLC로 확인하여 분리된 정도에 따라 유사한 분획들을 모아 9 개의 분획(E1~E9)으로 나누었음. 그 중 소분획 971E-4(10.7112 g)에 대하여 MeOH: H₂O(70:30, v/v)를 전개용매로 하여 Sephadex LH-20을 이용한 column chromatography를 실시하였음.

이로부터 얻은 각각의 분획들은 TLC로 확인하여 분리된 정도에 따라 유사한 분획들을 모아 11 개의 분획(E4-1~E4-11)으로 나누었으며, 971E4-4(516.5 mg)에 대하여 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음. 전개용매는 MeOH: H₂O(50:50, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 증가시켜 용출하여 9개의 소분획(A~I)으로 나누었음. 이 중 1번째 소분획인 971E4-4A(85.3 mg)에 대하여 MeOH: H₂O(20:80, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 1(5-caffeoylquinic acid, 5-CQA, 14.2 mg)을 순수하게 분리하였음.



Scheme 3. Compounds 1 - 6 isolated from the EtOAc fraction of *Aster glehni*.

소분획 971E4-7(1.5933 g)에 대해서 Lichroprep RP-18 column chromatography를 실시하였음. 전개용매는 MeOH: H₂O(30:70, v/v)에서 100% MeOH까지 점차적으로 MeOH의 양을 늘려가며 사용하여 11개의 소분획(A~K)으로 나누었음. 이 중 4번째 소분획에서 순수한 화합물 2(3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-DCQA, 708.4 mg), 6번째 소분획에서 순수한 화합물 3(4,5-DCQA, 210.5 mg)와 10번째 소분획에서 순수한 화

합물 4(4,5-DCQA-Me, 117.8 mg)를 얻었음. 그리고 1번째 소분획에 해당하는 971E4-7A(11.3 mg)와 3번째 소분획에 해당하는 971E4-7C(49.5 mg)에 대하여 각각 MeOH: H₂O(50:50, v/v)를 전개용매로 이용하여 preparative RP-18 TLC를 실시한 결과 순수한 화합물 5(3,4-DCQA, 7.7 mg)과 화합물 6(3,5-DCQA-Me, 5.6 mg)을 순수하게 분리하였음(Scheme 3).

(나) 화합물 1-6의 구조분석

① 화합물 1

화합물 1은 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20} +18.7^\circ$ 로 나타났으며, HRESIMS spectrum에서 분자량이 m/z 377.0852 $[M+Na]^+$ 로 관찰되었음. ¹H NMR spectrum(Fig. 4)에서는 δ_H 7.49(1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7')의 peak는 δ_H 6.21(1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8')의 peak와 coupling constant가 16.0 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_H 6.87(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6')의 peak는 δ_H 6.70(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_H 6.97(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 한 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음. δ_H 2.08-1.98에 있는 복잡한 peak와 δ_H 5.29(1H, m, H-5), 4.08(1H, m, H-3), 3.63(1H, dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz, H-4)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 H-5에서 기인한 피크가 down-field로 shift된 δ_H 5.29(1H, m)에서 나타나 quinic acid의 5번 위치에 caffeoyl group이 치환되어 있음을 예상할 수 있었음. 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 1은 5-*O*-caffeoylquinic acid로 동정하였음(Kim & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999).

HRESIMS m/z 377.0852 $[M+Na]^+$;

$[\alpha]^{20} +18.7^\circ$ (c 1.0, MeOH);

¹H NMR (CD₃OD, 400MHz): δ 7.49 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 6.97 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.87 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 6.70 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.21 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 5.29 (1H, m, H-5), 4.08 (1H, m, H-3), 3.63 (1H, dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz, H-4), 2.03 (4H, m, H-2, 6).

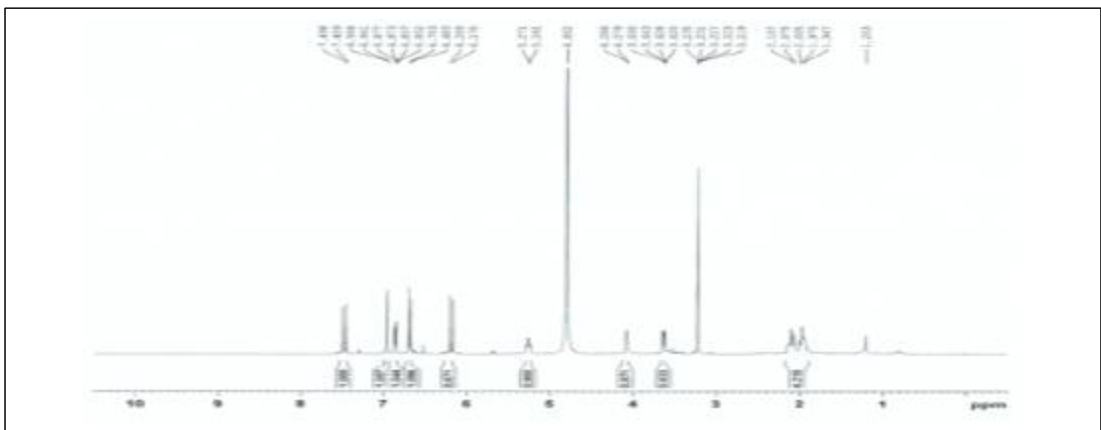


Fig. 4. ¹H NMR spectrum of 5-*O*-caffeoylquinic acid

② 화합물 2

화합물 2은 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20} -176.9^\circ$ 로 나타나며, ESIMS spectrum(negative mode)에서 분자량이 m/z 514.9 $[M-H]^-$ 로 나타났음. 1H NMR spectrum에서는 δ_H 7.47, 7.43(each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7'')의 peak는 δ_H 6.21, 6.12(each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8'')에서의 coupling constant가 각각 15.6 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_H 6.82, 6.80(each 1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6', 6'')의 peak는 δ_H 6.70(2H, d, $J = 1.6$ Hz, H-5', 5'')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_H 6.93, 6.92(each 1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2', 2'')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 두 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음. δ_H 2.18-2.04에 있는 복잡한 peak와 δ_H 5.29(2H, m, H-3, 5), 3.85(1H, dd, $J = 7.6, 3.2$ Hz, H-4)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 δ_H 5.29(2H, m, H-3, 5)의 chemical shift로 보아 quinic acid의 3번과 5번 위치에 caffeoyl group이 각각 치환되어 있음을 예상할 수 있었음(Fig. 5). 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 2은 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid로 동정하였음(im & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999).

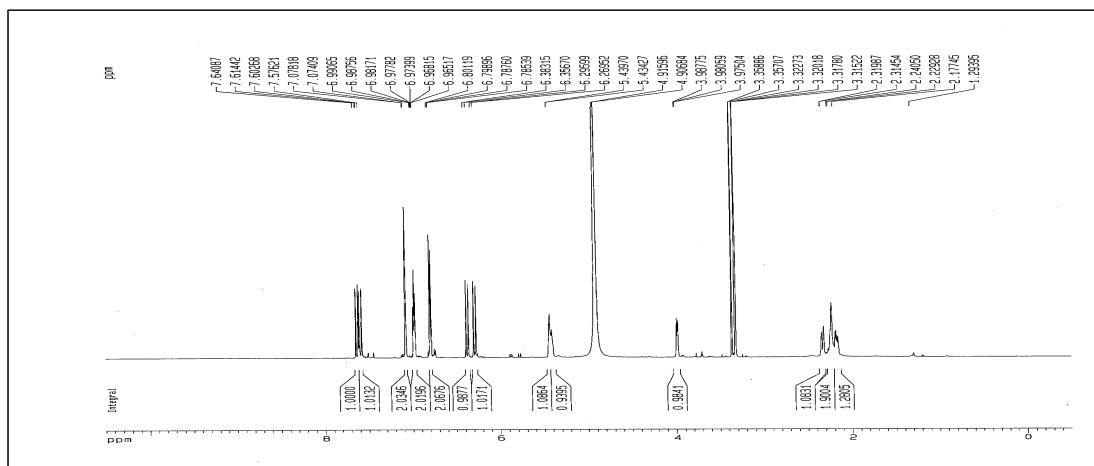
FAB-MS (negative-ion mode): $m/z = 515$;

$[\alpha]^{21}_D -154.4^\circ$ (c 0.71, MeOH);

CD nm (MeOH): 340 ($\Delta \epsilon$, -39.6), 289 (23.1);

1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 2.15 (dd, 1H, $J = 14.2, 6.40$ Hz, H-2_{ax}), 2.21 (m, 2H, H-6), 2.31 (dd, 1H, $J = 14.1, 3.4$ Hz, H-2_{eq}), 3.96 (dd, 1H, $J = 7.8, 3.2$ Hz, H-4), 5.42 (m, 2H, H-3, 5), 6.27, 6.35 (d, each 1H, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 6.77 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.96, 6.97 (dd, each 1H, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6'), 7.06, 7.07 (d, each 1H, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.58, 7.62 (d, each 1H, $J = 15.9$ Hz, H-7');

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 35.1 (C-6), 36.9 (C-2), 69.9 (C-4), 71.1 (C-5), 71.7 (C-3), 73.9 (C-1), 114.1, 114.2 (C-2'), 114.3, 114.6 (C-5'), 115.5, 115.5 (C-8'), 122.1, 122.1 (C-6'), 126.8, 127.0 (C-1'), 145.7, 145.7 (C-7'), 146.1, 146.3 (C-3'), 148.4, 148.4 (C-4'), 167.5, 168.0 (C-9'), 176.6 (COOH).



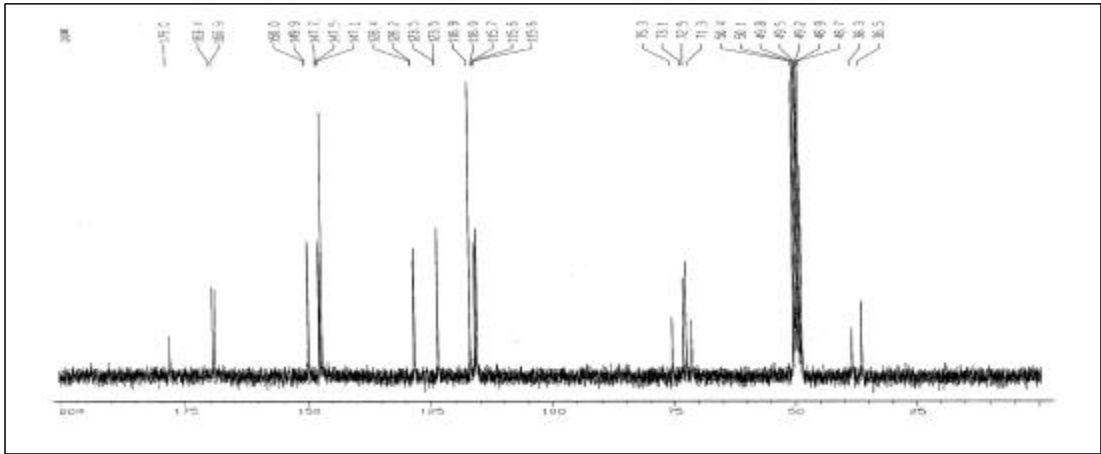


Fig. 5. ^1H (upper) and ^{13}C (below) NMR of 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid

③ 화합물 3

화합물 3은 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20} -254.8^\circ$ 로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, negative mode로 측정된 ESIMS spectrum에서 분자량이 m/z 515.0 [M-H]⁻로 나타났음. ^1H NMR spectrum에서는 δ_{H} 7.48, 7.40 (each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7'')의 peak는 δ_{H} 6.17, 6.06 (each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8'')의 peak와 coupling constant가 15.6 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_{H} 6.79, 6.78 (each 1H, dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, H-6', 6'')의 peak는 δ_{H} 6.64, 6.62 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5', 5'')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_{H} 6.90, 6.89 (each 1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2', 2'')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 두 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음.

δ_{H} 2.13-2.03에 있는 복잡한 peak와 δ_{H} 5.52 (1H, m, H-5), 5.01 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-4), 4.27 (1H, m, H-3)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 δ_{H} 5.52 (1H, m, H-5)와 5.01 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-4)의 chemical shift로 보아 quinic acid의 4번과 5번 위치에 caffeoyl group이 각각 치환되어 있음을 예상할 수 있었음 (Fig. 6). 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 3은 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid로 동정하였음 (Im & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999).

ESIMS m/z 515.0 [M-H]⁻;

$[\alpha]^{20} -254.8^\circ$ (c 2.6, MeOH);

^1H NMR (CD₃OD, 400MHz): δ 7.48, 7.40 (each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7', 7''), 6.90, 6.89 (each 1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2', 2''), 6.79, 6.78 (each 1H, dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, H-6', 6''), 6.64, 6.62 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-5', 5''), 6.17, 6.06 (each 1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8', 8''), 5.52 (1H, m, H-5), 5.01 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-4), 4.27 (1H, m, H-3), 2.08 (4H, m, H-2, 6).

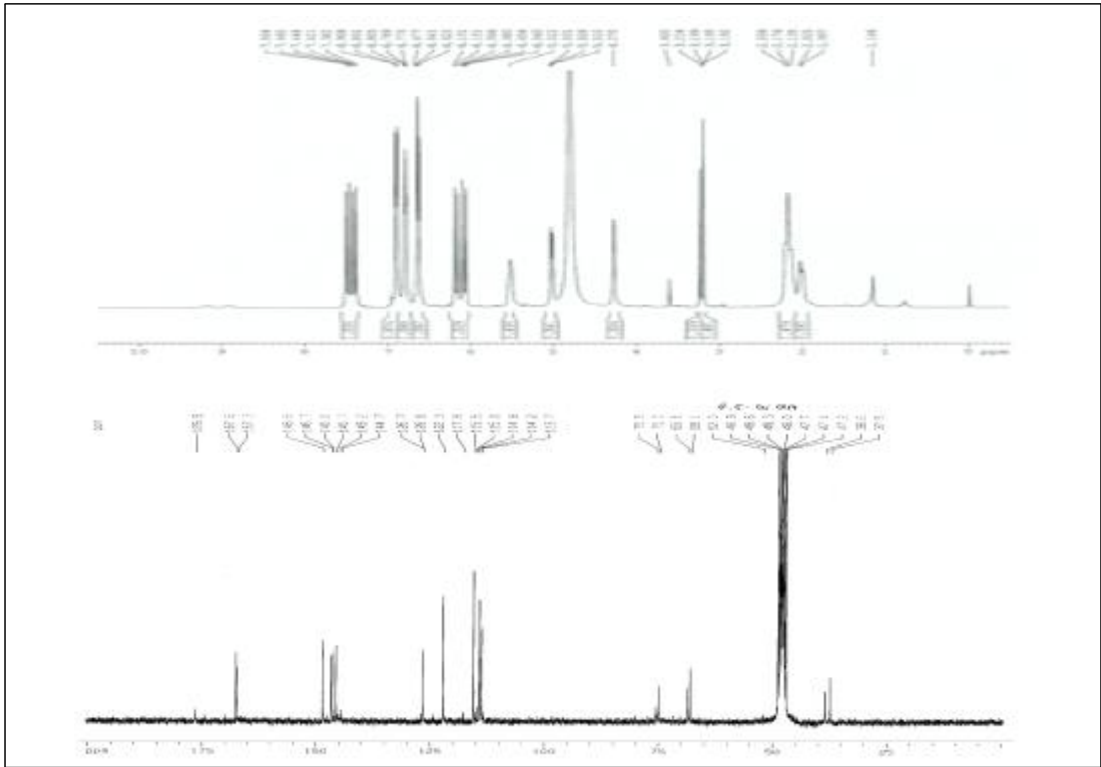


Fig. 6. ^1H and ^{13}C NMR of 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid

④ 화합물 4

화합물 4는 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20} -110.0^\circ$ 로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, negative mode로 측정된 ESIMS spectrum에서 분자량이 m/z 528.8 [M-H]로 나타났음. 화합물 4의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.63(3H, s, OMe)의 methoxy signal을 제외하고는 화합물 3과 비슷한 것을 알 수 있었음. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.50, 7.43(each 1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7', 7'')의 peak는 δ_{H} 6.22, 6.09(each 1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8', 8'')의 peak와 coupling constant가 16.0 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_{H} 6.85, 6.84(each 1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6', 6'')의 peak는 δ_{H} 6.69, 6.67(2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5', 5'')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_{H} 6.95, 6.93(each 1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2', 2'')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 두 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음.

δ_{H} 2.25-2.00에 있는 복잡한 peak와 δ_{H} 5.47(1H, m, H-5), 5.03(1H, dd, $J = 8.0, 2.8$ Hz, H-4), 4.27(1H, m, H-3)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 δ_{H} 5.47(1H, m, H-5)과 5.03(1H, dd, $J = 8.0, 2.8$ Hz, H-4)의 chemical shift로 보아 quinic acid의 4번과 5번 위치에 caffeoyl group이 각각 치환되어 있음을 예상할 수 있었음(Fig. 7). 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 4는 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid methyl ester로 동정하였다(Kim & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999).

ESIMS m/z 528.8 [M-H]⁻;

$[\alpha]^{20}$ -111.0° (c 0.1, MeOH);

¹H NMR (CD₃OD,400MHz): δ 7.50, 7.43 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-7', 7''), 6.95, 6.93 (each 1H, d, J = 2.0 Hz, H-2', 2''), 6.85, 6.84 (each 1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6', 6''), 6.69, 6.67 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-5', 5''), 6.22, 6.09 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-8', 8''), 5.47 (1H, m, H-5), 5.03 (1H, dd, J = 8.0, 2.8 Hz, H-4), 4.27 (1H, m, H-3), 3.63 (3H, s, OMe), 2.25 (1H, dd, J = 14.0, 2.8 Hz, H-2_{eq}), 2.17(2H,m,H-6), 2.00(1H,dd, J = 14.0, 6.4 Hz, H-2_{ax}).

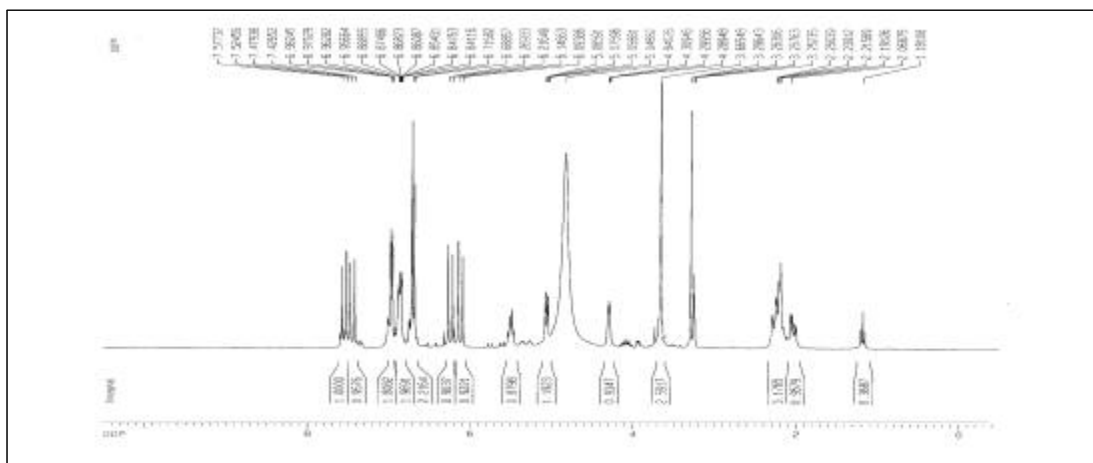


Fig. 7. ¹H NMR of 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid methyl ester

⑤ 화합물 5

화합물 5은 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20}$ -65.4° 이며, HRESIMS spectrum에서 분자량이 m/z 539.1160 [M+Na]⁺로 나타났음. ¹H NMR spectrum에서는 δ_H 7.59, 7.55(each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-7', 7'')의 peak는 δ_H 6.31, 6.28(each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-8', 8'')의 peak와 coupling constant가 16.0 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_H 6.93, 6.92(each 1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6', 6'')의 peak는 δ_H 6.78(2H, d, J = 1.6 Hz, H-5', 5'')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_H 7.07, 7.05(each 1H, d, J = 2.0 Hz, H-2', 2'')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 두 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음. δ_H 2.20-2.10에 있는 복잡한 peak와 δ_H 5.66(1H, m, H-3), 5.15(1H, dd, J = 6.8, 2.8 Hz, H-4), 4.23(1H, m, H-5)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 δ_H 5.66(1H, m, H-3)와 5.15(1H, dd, J = 6.8, 2.8 Hz, H-4)의 피크가 저자장으로 shift되어 quinic acid의 3번과 4번 위치에 caffeoyl group이 각각 치환되어 있음을 예상할 수 있었음(Fig. 8). 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 5은 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid로 동정하였다(Kim & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999).

HRESIMS m/z 539.1160 $[M+Na]^+$;

$[\alpha]^{20}$ -65.4° (c 0.2, MeOH);

^1H NMR (CD_3OD , 400MHz): δ 7.59, 7.55 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-7', 7''), 7.07, 7.05 (each 1H, d, J = 2.0 Hz, H-2', 2''), 6.93, 6.92 (each 1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6', 6''), 6.78 (2H, d, J = 1.6 Hz, H-5', 5''), 6.31, 6.28 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-8', 8''), 5.66 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, dd, J = 6.8, 2.8 Hz, H-4), 4.23 (1H, m, H-5), 2.15 (4H, m, H-2, 6).

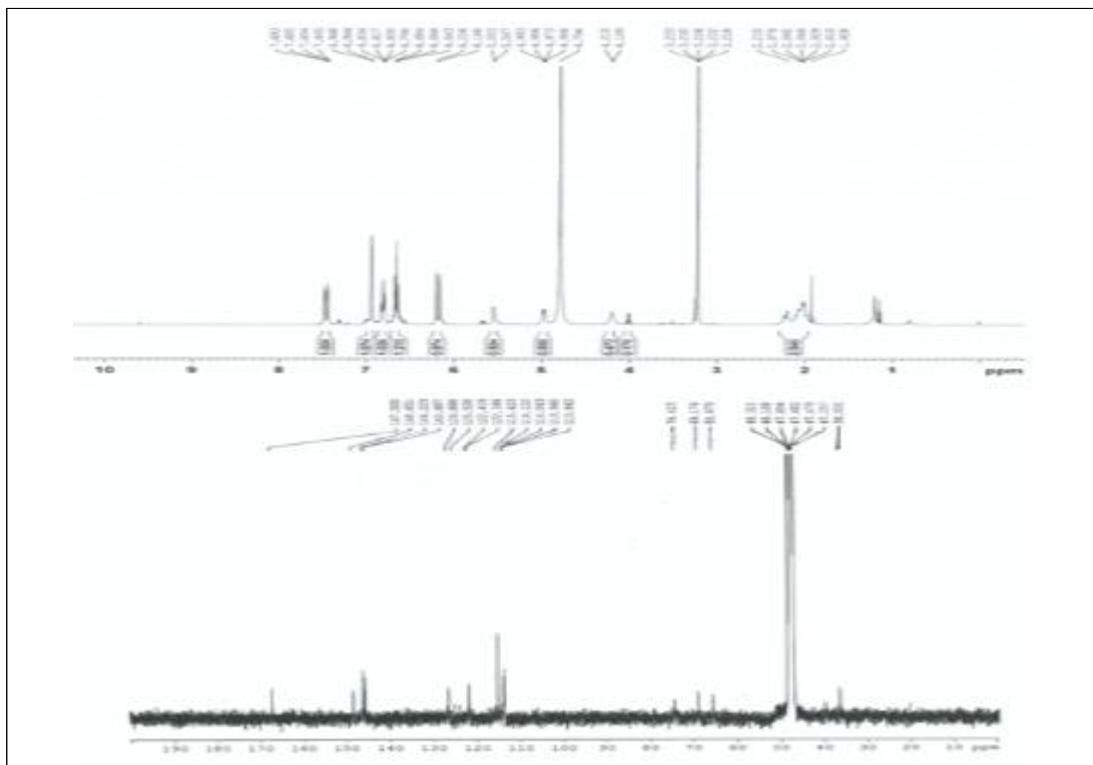


Fig. 8. ^1H and ^{13}C NMR spectrum of 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid

⑥ 화합물 6

화합물 6은 무정형 분말로 optical rotation이 $[\alpha]^{20}$ -147.8° 로 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, ESIMS(negative mode) spectrum에서 분자량이 m/z 528.9 $[M-H]^-$ 로 나타났음. 화합물 6의 ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.60(3H, s, OMe)의 methoxy signal이 나타나는 것을 제외하고는 화합물 2와 비슷한 것을 알 수 있었음. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 7.55, 7.47(each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-7', 7'')의 peak는 δ_{H} 6.27, 6.15(each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-8', 8'')의 peak와 coupling constant가 16.0 Hz로 *trans* vinyl기가 존재하는 것을 알 수 있었고, δ_{H} 6.90, 6.89(each 1H, dd, J = 8.0, 1.6 Hz, H-6', 6'')의 peak는 δ_{H} 6.71, 6.66(each 1H, d, J = 8.0 Hz, H-5', 5'')의 peak와 *ortho* coupling을, δ_{H} 6.99, 6.98(each 1H, d, J = 1.6 Hz, H-2', 2'')의 peak와 *meta* coupling을 하고 있어 aromatic ring이 ABX system으로 치환된 두 개의 caffeoyl group을 예상할 수 있었음. δ_{H} 2.26-2.08에 있는 복잡한 peak와 δ_{H} 5.32(1H, m, H-5), 5.23(1H, m, H-3), 3.90(1H, dd, J = 6.4, 3.2 Hz, H-4)의 peak를 통해 quinic acid 계열의 화합물임을 알 수 있었음. 또한 δ_{H} 5.32(1H, m, H-5)와 5.23(1H, m, H-3)의 chemical shift로 보아 quinic acid의 3번과 5번 위치에

caffeyl group이 각각 치환되어 있음을 예상할 수 있었음(Fig. 9). 이상의 결과와 문헌을 조사한 결과, 화합물 6은 3,5-*O*-dicaFFEoylquinc acid methyl ester로 동정 하였음(Kim & Lee, 2005; Basnet, Matsushige, Hase, Kadota, & Namba, 1996; Lin, Kuo, & Chou, 1999)

ESIMS m/z 528.9 [M-H]⁻;

$[\alpha]^{20}$ -147.8° (c 0.7, MeOH);

¹H NMR (CD₃OD,400MHz): δ 7.55, 7.47 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-7', 7''), 6.99, 6.98 (each 1H, d, J = 1.6 Hz, H-2', 2''), 6.90, 6.89 (each 1H, dd, J = 8.0, 1.6 Hz, H-6', 6''), 6.71, 6.66 (each 1H, d, J = 8.0 Hz, H-5', 5''), 6.27, 6.15 (each 1H, d, J = 16.0 Hz, H-8', 8''), 5.32 (1H, m, H-5), 5.23 (1H, m, H-3), 3.90 (1H, dd, J = 6.4, 3.2 Hz, H-4), 3.60 (3H, s, OMe), 2.26 (1H, m, H-2), 2.22 (1H, m, H-6), 2.13 (1H, m, H-6), 2.08(1H, m, H-2).

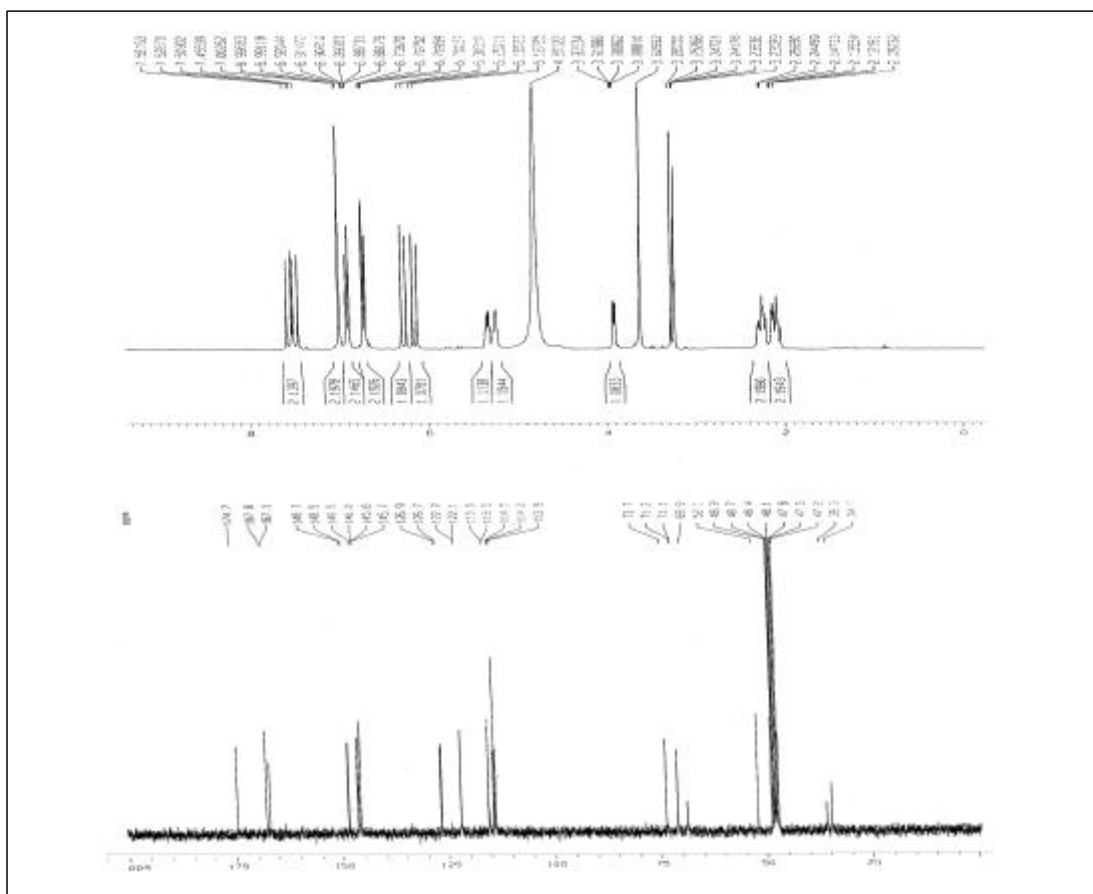


Fig. 9. ¹H and ¹³C NMR of 3,5-*O*-dicaFFEoylquinc acid methyl ester

이상으로부터 분리하여 구조를 규명한 6종의 DCQAs 구조를 Fig. 10에 나타냄.

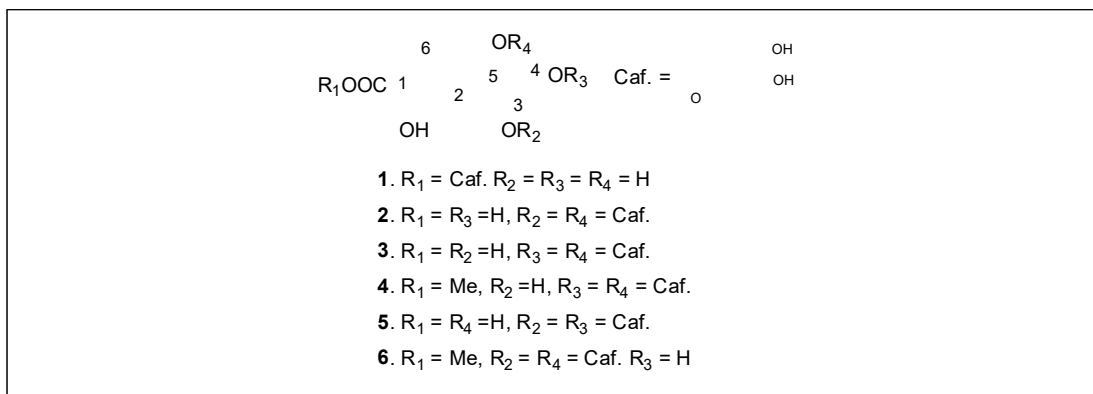


Fig. 10. Structures of compounds 1 – 6 isolated from *Aster glehni*.

다. 섬쭉부쟁이 에탄올추출물의 HPLC profiling

(1) HPLC 분석

HPLC 기기는 Waters 1500 Series system, Waters 2998 PDA detector(Worcester, MA, USA), Luna C18(2)(5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 컬럼을 사용하였으며 분석에 사용된 모든 용매는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 HPLC급 용매를 사용하였으며, 분석 조건은 아래와 같음. 분석시료는 320 nm에서 크로마토그램을 추출하여 3,5-DCQA 피크 면적을 얻은 다음 표준화합물의 검량곡선으로부터 각 화합물의 함유량을 계산하였음.

① 분석 및 조건

- Standard sample : 3,5-DCQA 메탄올용액
(250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.81 μ g/mL)
- Sample : 섬쭉부쟁이 에탄올추출물(971-AGEs)
- Column : Luna C18(2) (5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Phenomenex)
- Detector : Waters 2998 PDA (320 nm)
- Pump : Waters 1525
- Oven temperature : 25°C
- Injection volume : 5 μ L
- Flow rate : 1 mL/min
- Solvent system : Gradient system (linear gradient system)
30% \Rightarrow 100% MeOH (1.0% HOAc) for 50 min.

Time (min)	% A (MeOH)	% B (1% HOAc in H ₂ O)
Initial	30	70
10	40	60
20	60	40
30	80	20
40	100	0
50	30	70

② Packing materials

분취용 column chromatography의 packing material로는 Kieselgel 60(230-400 mesh, ASTM, Art. 9385, Merck)와 Lipophilic Sephadex LH-20(bead size 25-100 μ m, Sigma), Lichroprep RP-18(40-63 μ m, Merck)을 사용하였음.

③ 3,5-DCQA의 검량곡선 작성

3,5-DCQA 1 mg을 정밀히 취하여 메탄올 1 mL에 용해시켜 표준원액을 제조한 후 메탄올로 희석하여 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 및 7.81 μ g/mL 농도에서 반복 측정하여 검량곡선을 작성하였고(Fig. 11), HPLC profiles은 Fig. 12에 나타내었음.

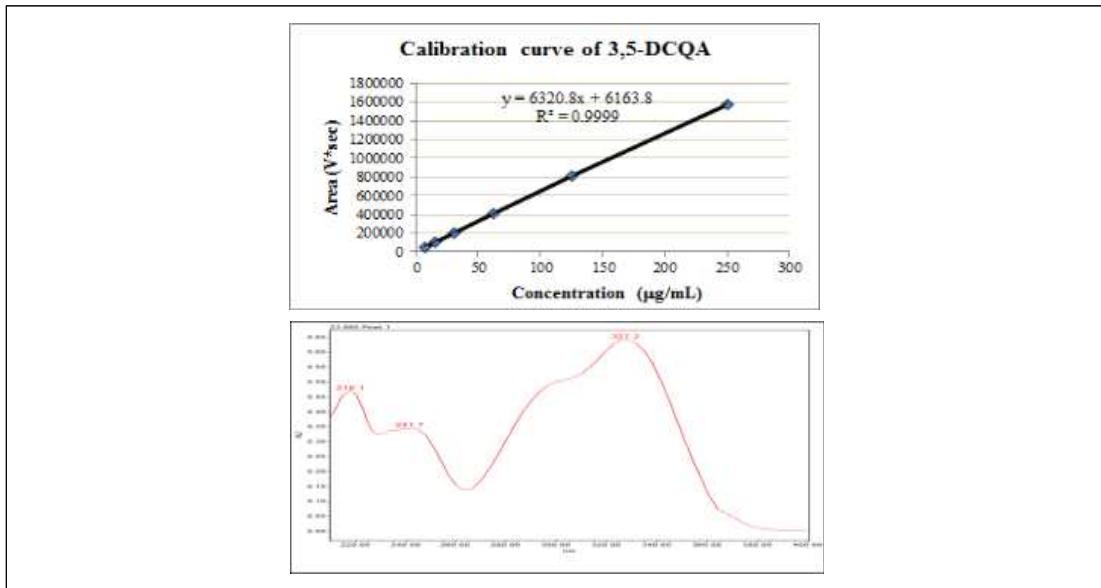


Fig. 11. Calibration curve and UV spectrum of 3,5-DCQA

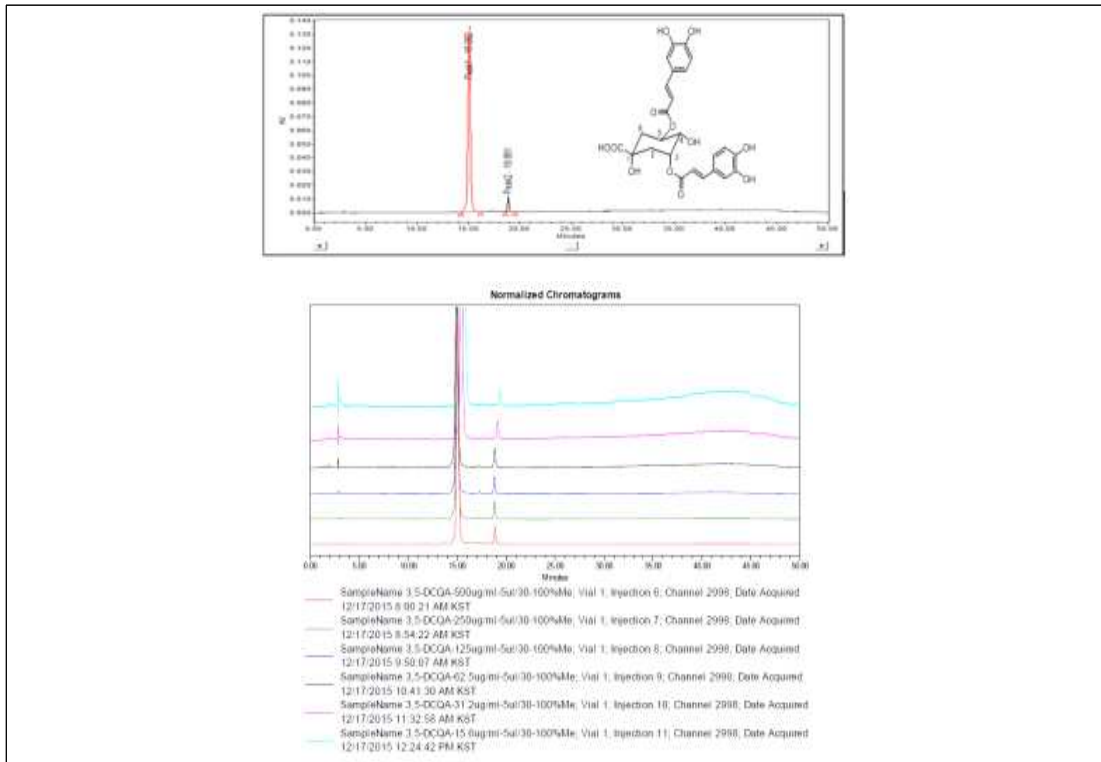


Fig. 12. HPLC analysis of 3,5-DCQA

④ 5-CQA의 검량곡선 작성 <지표물질 후보>

5-CQA 1 mg을 정밀히 취하여 메탄올 1 mL에 용해시켜 표준원액을 제조한 후 메탄올로 희석하여 400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 반복 측정하여 검량곡선을 작성하였고(Fig 13), HPLC profiles은 Fig. 14에 나타내었음.

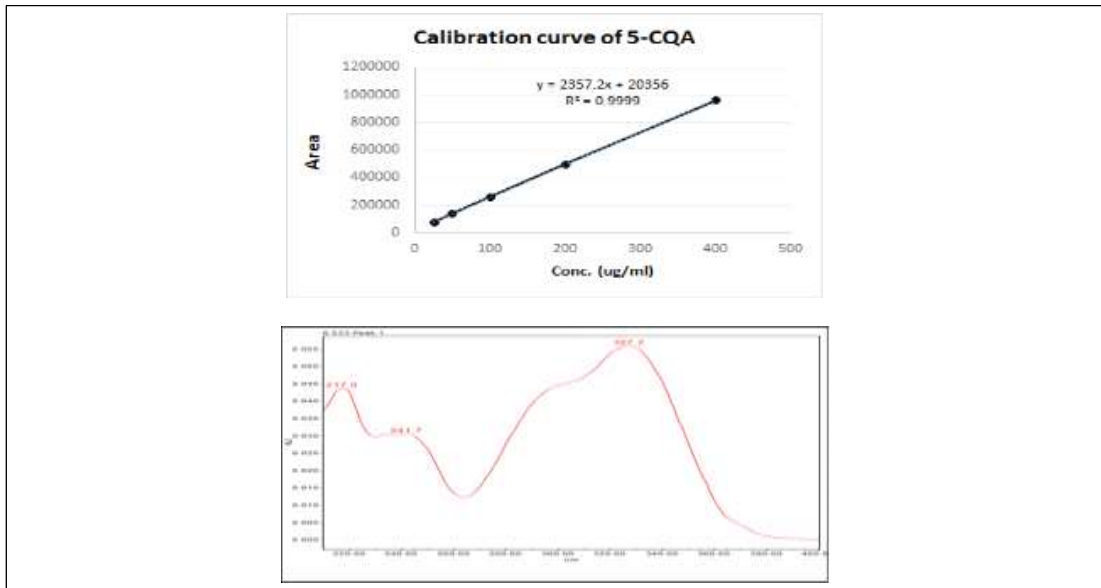


Fig. 13. Calibration curve and UV spectrum of 5-CQA

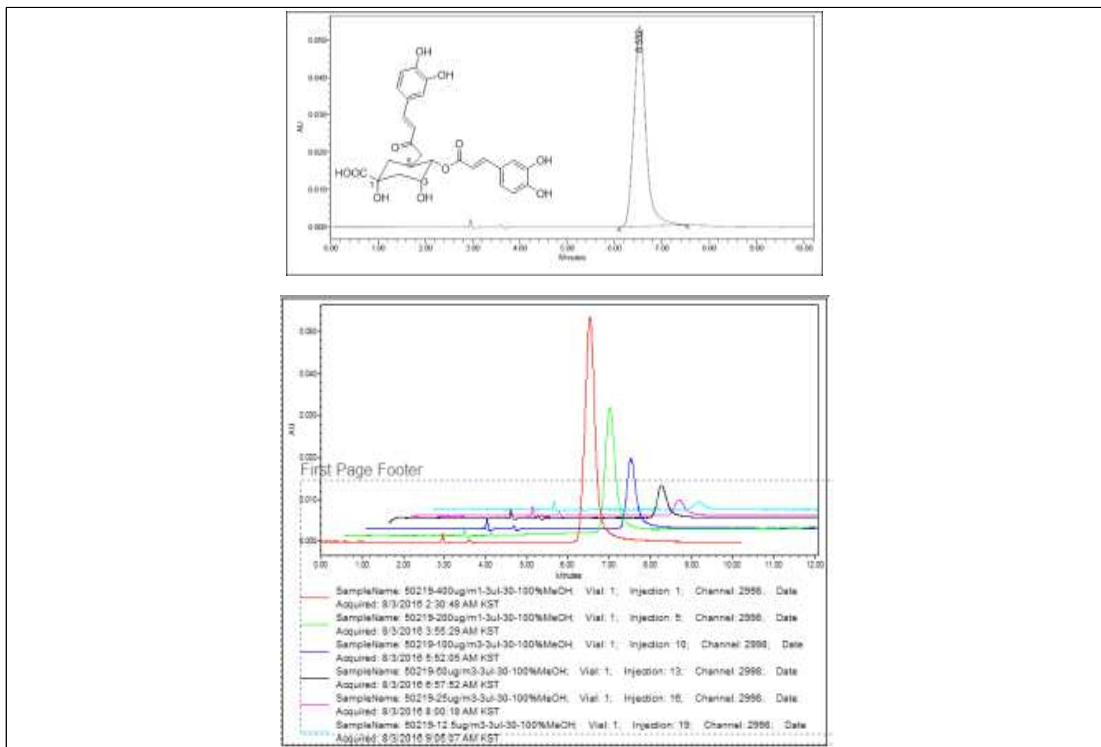


Fig. 14. HPLC analysis of 5-CQA

(2) 분석법 검증(Method Validation)

① 특이성(specificity)

표준 용액과 같이 시료 전처리 방법으로 처리한 섬썩부쟁이 추출액의 크로마토그램을 비교하여 3,5-DCQA 피크가 분리되는 지를 확인한 결과 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되었음. 표준용액 3,5-DCQA의 머무름 시간(Rt)은 15.108분이고 섬썩부쟁이 추출액에서의 3,5-DCQA의 머무름 시간은 15.208분으로 피크 유지시간이 거의 일치함을 보임.

② 직선성(linearity)

3,5-DCQA 표준용액의 검량곡선은 3회 반복 실험하여 얻은 평균값으로 계산하였으며 $y = 6320.8x + 6163.8$, 상관관계(R^2) = 0.9999로 나타나 매우 우수한 직선성을 나타냄(Fig. 11).

③ 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계와 정량한계는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 앞서 서술한 식에 의하여 결정하였으며 검출한계는 2.68 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 정량한계는 8.11 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인할 수 있었음.

④ 정밀성(precision), 정확성(accuracy) 및 회수율 측정

3,5-DCQA 표준용액 일내(intra-day), 일간(inter-day) 분석의 정밀성, 정확성 및 회수율을 측정한 결과는 Table 4에 나타냄. Intra-day 분석에서는 회수율은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료 양을 백분율로 계산하였으며, 91.81~101.08%의 범위로 나타났으며 상대오차(relative error, RE)가 10%이내였고, 상대 표준편차(relative standard deviation, RSD)는 0.20~4.41%를 나타내 5% 이내의 정밀성을 나타냄. Inter-day 분석은 95.04~103.61%를 나타내 우수한 회수율을 보여주고 있으며, RE는 0.97~4.96%로 나타났으며, RSD는 0.39~4.05%로 나타나 정확성과 정밀성(Tables 5, 6)을 확인할 수 있었음.

Table 4. Accuracy and repeatability of analytical results for 3,5-DCQA in calibration standards

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Observed conc. ($\mu\text{g/mL}$)		Recovery (%)	RSD (%) [*]	RE (%) ^{**}	
	Mean	SD				
Intra-day ^a	250	244.07	10.82	97.63	4.41	2.37
	125	125.14	5.46	100.11	4.33	0.11
	62.5	63.17	0.33	101.08	0.51	1.08
	31.2	30.23	0.35	96.74	1.14	3.26
	15.6	14.93	0.05	95.57	0.31	4.43
	7.81	7.17	0.02	91.81	0.20	8.19
Inter-day ^a	250	255.33	5.11	102.13	1.99	2.13
	125	129.51	0.71	103.61	0.55	3.61
	62.5	63.59	0.25	101.74	0.39	1.74
	31.2	30.95	0.66	99.03	2.07	0.97
	15.6	15.15	0.34	96.93	1.56	3.07
	7.81	7.42	0.11	95.04	4.05	4.96

^{*}RSD: relative standard deviation, ^{**}RE: relative error.

^aIntra- and inter-day: three times per day and two times analysis of 3,5-DCQA for two days, respectively.

Table 5. LOD and LOQ of 3,5-DCQA and 5-CQA

Standard	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	LOD	LOQ	Slope	Intercept	Correlation coefficient
		($\mu\text{g/mL}$)				
3,5-DCQA	7.81 - 250	2.68	8.11	6320.8	6163.8	0.9999
5-CQA	12.5 - 400	5.16	15.63	2357.2	20356	0.9999

Table 6. Accuracy and repeatability of 3,5-DCQA and 5-CQA

Standard	Fortified conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Observed conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area (V*sec)		Recovery (%)	RSD (%)
			Mean	SD		
3,5-DCQA	125	125.1±5.46	807,412	30208.10	101.7±3.82	3.74
	62.5	63.17±0.33	406,721	2622.27	102.1±0.66	0.64
	31.25	30.23±0.35	199,738	4608.09	99.4±2.33	2.31
5-CQA	100	100.5±2.91	257,192	6851.67	100.5±2.91	2.66
	50	50.7±0.70	139,795	1648.15	101.3±1.40	1.18
	25	23.3±0.27	75,394	638.14	93.4±1.08	0.85

(3) HPLC profiling에 의한 섬쭉부쟁이 에탄올추출물에서의 지표성분 함량 비교

① 971-1510-80-AGEs의 지표성분 함량 비교

섬쭉부쟁이 에탄올추출물(971-1510-AGEs)의 기능성 원료 개발을 위해 30, 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 80°C에서 3, 4, 5, 6시간 동안 환류 추출하여 각각의 971-1510-AGEs를 수득함. 이 추출물의 3,5-DCQA와 5-CQA의 함량은 3회 반복 실험하여 측정하여 Table 5(80°C 추출물)에 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 또한 다양한 AGE에서의 HPLC profiling은 Figure 12에 나타냄.

80°C에서 추출한 섬쭉부쟁이 추출물(971-1510-80-AGEs)에서의 3,5-DCQA 함량은 70% 에탄올 용액으로 6시간 동안 추출하였을 때 45.06 ± 4.22 mg/A. *glehni* 100 g으로 가장 높게 측정되었으며, 80% 에탄올 용액 추출물은 40.50 mg(5시간 추출), 33.64 mg/A. *glehni* 100 g(6시간 추출)으로 6시간 추출물에서 가장 낮은 3,5-DCQA의 함량을 나타냄. 한편, 5-CQA함량은 80% 에탄올추출물의 경우에 70 mg/A. *glehni* 100 g 이하로 비교적 낮게 측정되었고, 에탄올 함량에 대한 영향을 반영하지 못하고 유사하게 측정되었음.

▶ 그러므로 80°C에서 추출할 경우에는 70% 이하의 에탄올을 사용할 때 3,5-DCQA의 함량이 높은 추출물을 수득할 것으로 예상됨.

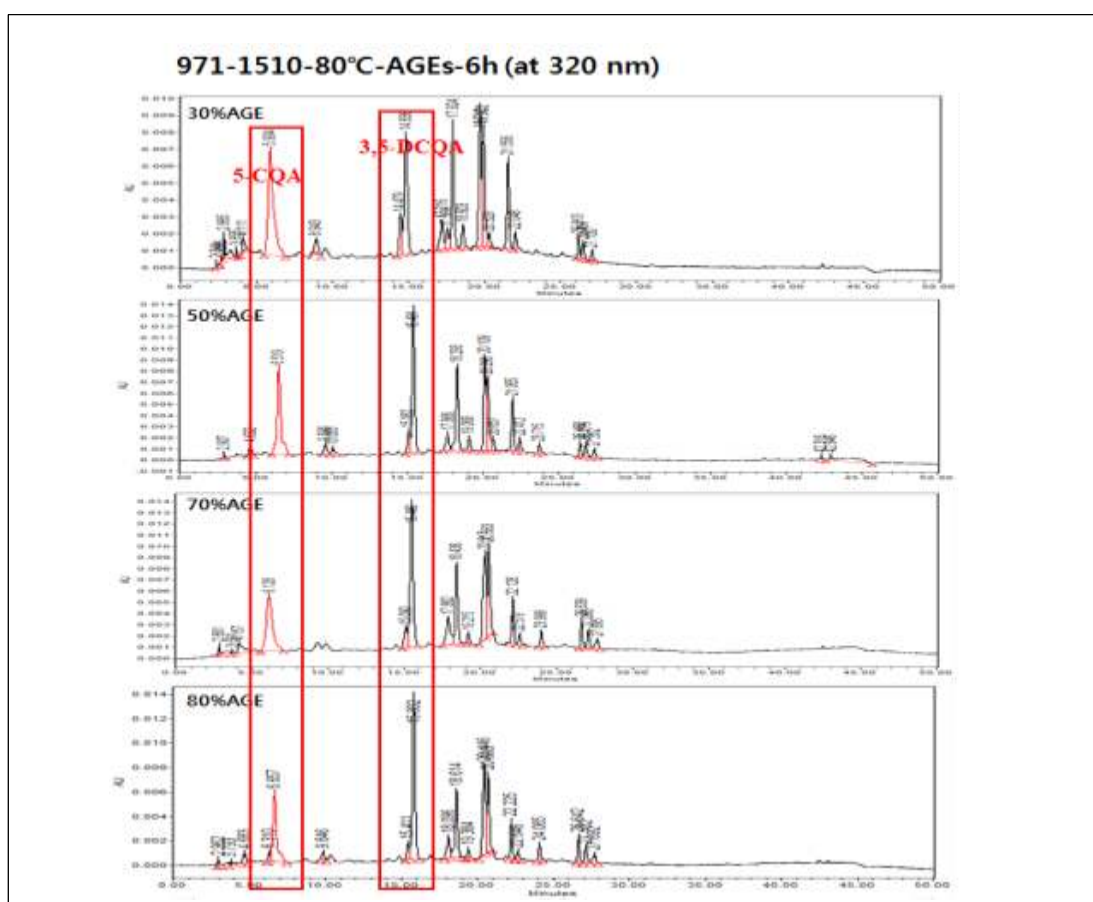


Fig. 15. HPLC profiles of the ethanol extract from *A. glehni* (971-1510-80°C-AGEs-6h).

Table 5. Contents of 3,5-DCQA and 5-CQA in the ethanol extracts from *A. glehni* (at 80° C)

Sample	3,5-DCQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g	5-CQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g
80° C-30%AGE-3h	25.50 ± 4.11	75.15 ± 0.52
4h	22.76 ± 3.56	76.20 ± 7.80
5h	20.82 ± 2.74	79.32 ± 11.33
6h	26.09 ± 3.70	88.54 ± 1.17
80° C-50%AGE-3h	18.99 ± 1.16	73.60 ± 7.01
4h	29.64 ± 2.14	60.99 ± 4.16
5h	26.11 ± 4.82	72.75 ± 7.60
6h	28.90 ± 6.53	81.46 ± 3.54
80° C-70%AGE-3h	28.03 ± 4.99	71.71 ± 12.49
4h	39.50 ± 5.85	80.14 ± 8.28
5h	31.93 ± 2.79	81.02 ± 12.63

6h	45.06 ± 4.22	72.91 ± 5.42
80° C-80%AGE-3h	37.01 ± 8.99	67.41 ± 6.07
4h	38.87 ± 2.77	58.87 ± 1.44
5h	40.50 ± 7.01	65.17 ± 7.38
6h	33.64 ± 4.09	58.85 ± 5.72

② 971-1510-70-AGEs의 지표성분 함량 비교

섬썩부쟁이(971-1510)를 70℃에서 30, 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 3, 4, 5, 6시간 동안 환류 추출하여 각각의 971-1510-70-AGEs를 수득함. 이 추출물의 3,5-DCQA와 5-CQA의 함량은 3회 반복 실험하여 측정하여 Table 6에 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 또한 다양한 AGE에서의 HPLC profiling은 Figure 16에 나타냄.

70℃에서 추출한 섬썩부쟁이 추출물(971-1510-70-AGEs)의 3,5-DCQA 함량은 Table 6에 나타낸 바와 같이 80oC에서 추출한 경우보다 다소 높게 측정되었음. 그 중에서도 70% 에탄올추출물의 경우 6시간 추출물을 제외하고 모두 3,5-DCQA 함량이 50 mg/A. *glehni* 100 g 이상으로 높게 측정되었으며, 80% 에탄올추출물에서도 42~47 mg/A. *glehni* 100 g 로 우수한 함량을 나타냄.

- ▶ 그러므로 70℃에서 추출할 경우에는 70% 에탄올을 사용할 때 3,5-DCQA 함량이 높은 추출물을 효과적으로 수득할 것으로 예상됨.

5-CQA의 함량은 70%AGE-6h가 94.93 ± 0.72 mg/A. *glehni* 100 g 을 나타내 가장 우수하였으며, 80°C에서 추출한 경우와 유사하게 에탄올 함량에 대한 영향을 반영하지 못하고 유사하게 측정되었음. 그러므로 섬쭉부쟁이 에탄올추출물 제조는 70°C에서 70% 에탄올을 사용하여 4시간 이상 추출할 때 지표물질의 함량이 높은 추출물 제조가 가능할 것으로 사료됨.

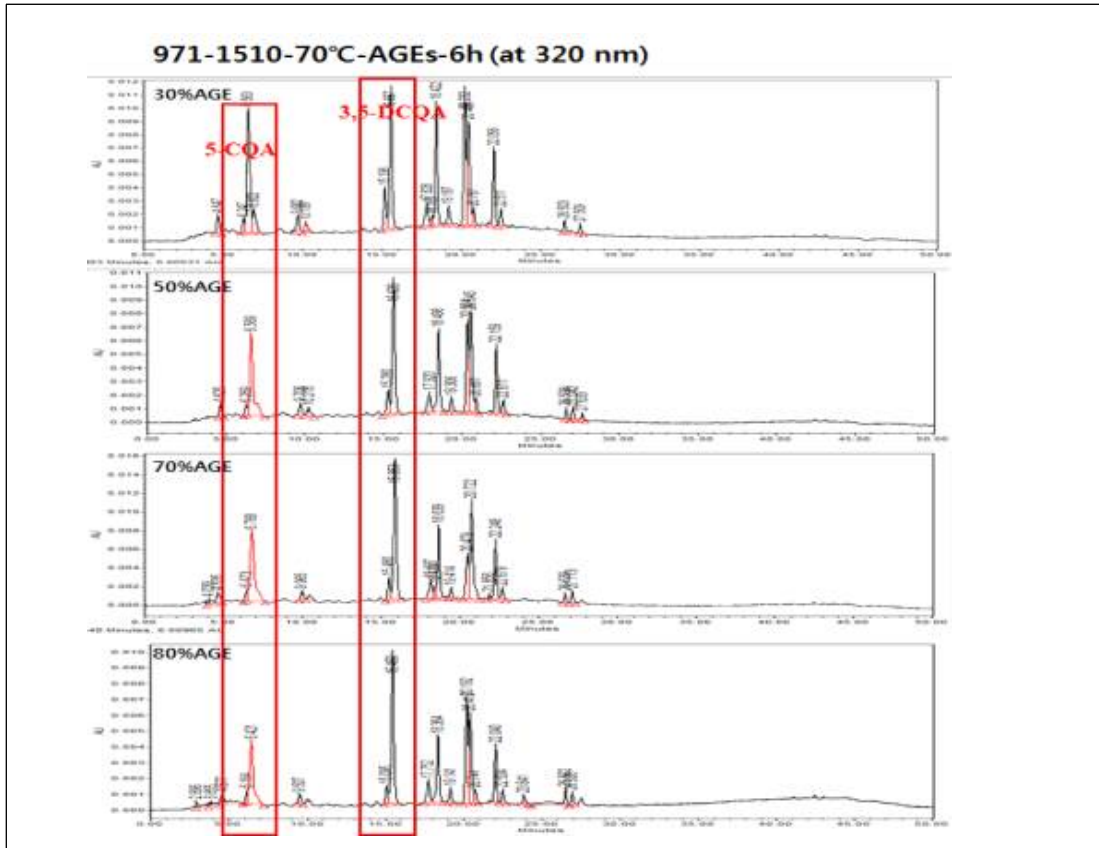


Fig. 16. HPLC profiles of the ethanol extract from *A. glehni* (971-1510-70°C-AGEs-6h).

Table 6. Contents of 3,5-DCQA and 5-CQA in the ethanol extracts from *A. glehni* (at 70° C)

Sample	3,5-DCQA mg/A. <i>glehni</i> 100 g	5-CQA mg/A. <i>glehni</i> 100 g
70° C-30%AGE-3h	36.26 ± 0.31	65.69 ± 4.40
4h	33.88 ± 1.67	52.06 ± 2.31
5h	24.64 ± 4.02	64.17 ± 2.30
6h	31.85 ± 4.33	85.31 ± 8.13
70° C-50%AGE-3h	42.89 ± 2.43	31.34 ± 0.76
4h	37.60 ± 0.62	51.19 ± 5.39
5h	41.05 ± 7.41	47.46 ± 8.92
6h	43.86 ± 1.05	57.80 ± 0.36

70° C-70%AGE-3h	50.76±8.30	34.92±0.32
4h	52.59±3.45	61.00±7.79
5h	51.64±8.76	72.29±11.24
6h	47.55±6.95	94.93±0.72
70° C-80%AGE-3h	47.30±5.07	48.15±9.10
4h	43.50±5.94	49.38±10.99
5h	47.02±3.00	58.91±13.81
6h	42.78±2.97	41.40±5.36

③ 섬쭉부쟁이 추출부위에 따른 에탄올추출물의 지표성분 함량 비교

2015년 10월 채집한 섬쭉부쟁이(971-1510)를 꽃, 잎, 줄기로 나누어 70% 에탄올을 사용하여 추출함. 이 추출물의 3,5-DCQA 함량을 분석한 결과 Table 7에 나타낸 바와 같이 꽃과 잎에서 3,5-DCQA 함량이 높게 나타났으며, 줄기에서 현저히 저조한 함량을 나타내 줄기에서의 xanthine oxidase 저해효능이 낮은 원인을 알 수 있었음. 이는 HPLC profiling(Fig. 17)에서도 입증할 수 있었음.

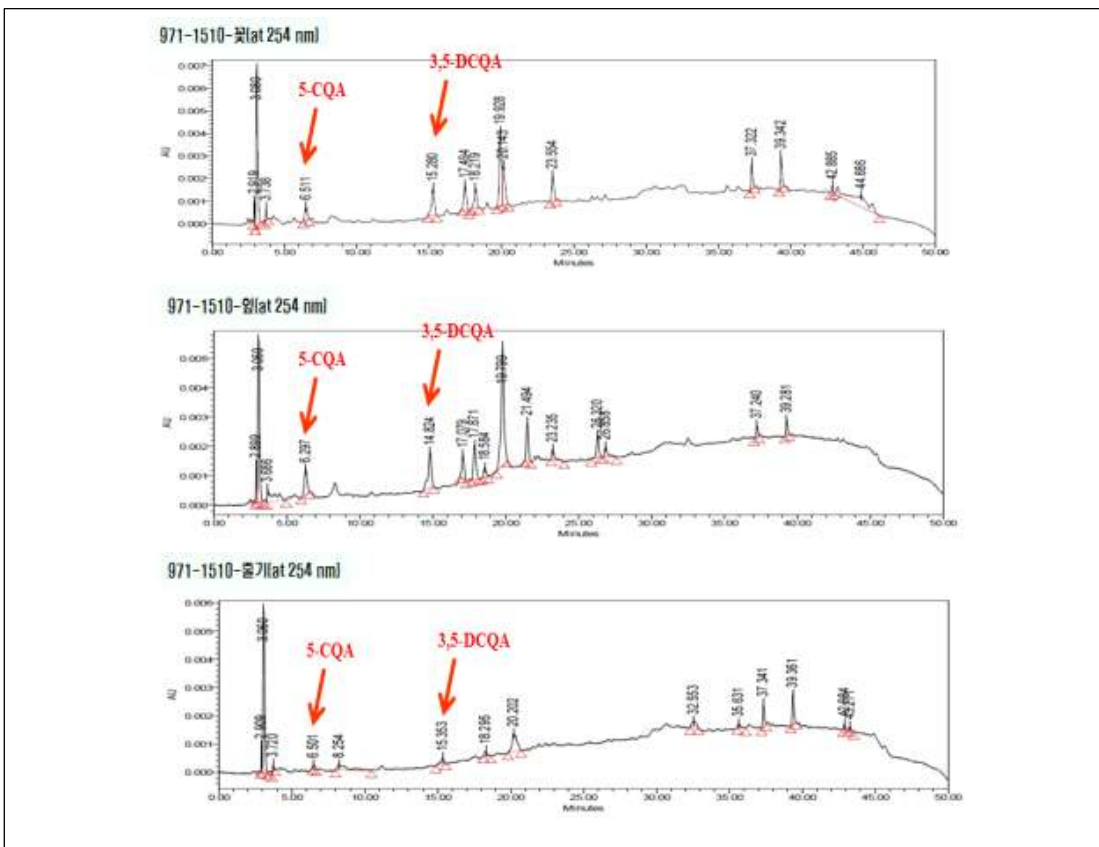


Fig. 17. HPLC profiling of the stems, flowers and leaves extract from *A. glehni* (971-1510-70°C-AGEs-6h).

Table 7. Contents of 3,5-DCQA of the stems, flowers and leaves extract from *A. glehni*

Sample	3,5-DCQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g
971-1510-70%AGE-stems	9.70
971-1510-70%AGE-flowers	398.40
971-1510-70%AGE-leaves	514.30

섬쭉부쟁이 추출부위에 따른 HPLC profiling 비교 검색 결과, 잎과 꽃 70%AGE 에서 3,5-DCQA가 다량 함유되어 있는 반면, 줄기 추출물에서는 3,5-DCQA의 함량이 낮게 나타남.

(4) 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에서 Xanthine oxidase 저해 효능 및 HPLC profiles 분석

(가) 섬쭉부쟁이 EtOAc분획의 Xanthine oxidase 저해효능을 검색

섬쭉부쟁이 추출물로부터 지표성분의 함량이 우수한 EtOAc 분획에 대하여 xanthine oxidase 저해효능을 검색함(Table 8). EtOAc 분획은 2015년 7월 채집시료 (971-1507)와 2015년 10월 채집한 섬쭉부쟁이 건조물을 상온에서 추출하여 제조한 메탄올 추출물로부터 분획하여 수득하였음. 이 EtOAc 분획의 xanthine oxidase 저해효능을 검색하고 HPLC profiles을 분석함.

Table 8. Xanthine oxidase inhibitory effects of the ethyl acetate fractions from *A. glehni*

sample	IC ₅₀ (μg/mL) ^a
971-1510-EtOAc Fr. ^b	5.77 ± 0.81
971-1507-EtOAc Fr. ^b	15.37 ± 3.34
Allopurinol IC ₅₀ (μM) ^c	2.13 ± 0.19

^aAll data were expressed as a mean ± SD. ^bEtOAc fractions were partitioned from the methanol extract of 971-1510 and 971-1507 *A. glehni* respectively. ^cPositive control.

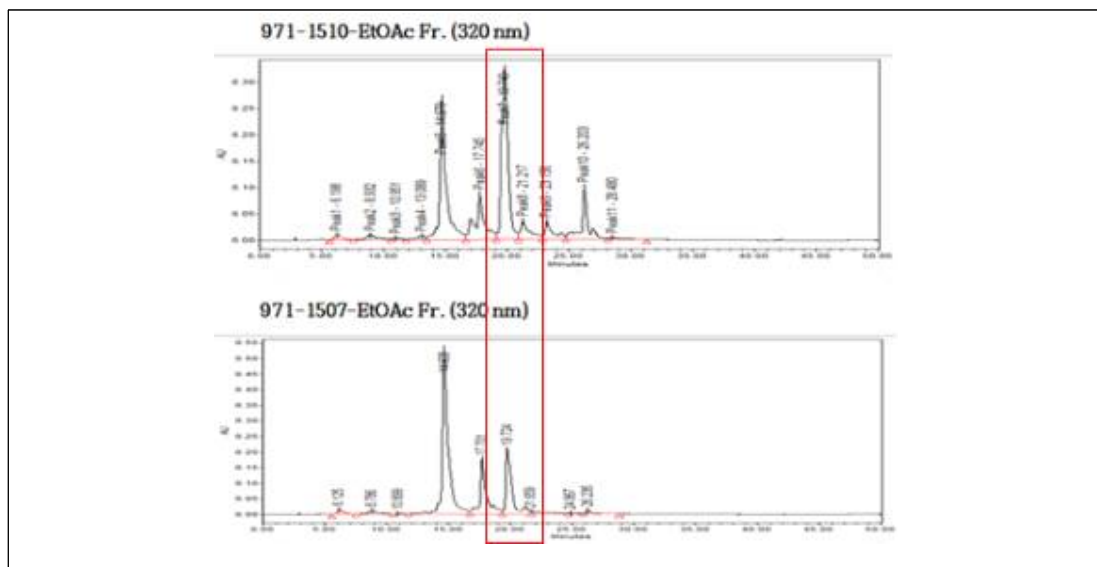


Fig. 18. HPLC profiles of the 971-1510 and 971-1507 ethyl acetate fractions from *A. glehni*.

2015년 7월과 10월의 채집시기에 따른 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획의 xanthine oxidase 저해효능 검색 결과, 10월 시료에서 우수한 효능을 나타냄. 7월 시료는 다소 미약한 효능을 나타내고 있어 제품개발을 위한 시료의 채취시기가 중요함을 확인함. 이들의 효능 차이는 두 EtOAc 분획의 HPLC profiles(Fig. 18)을 분석하여 확인할 수 있었음.

(나) 6종의 DCQA 유도체의 Xanthine oxidase 저해효능 검색과 HPLC profiles 분석

2015년 7월과 10월의 채집시기에 따른 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획의 HPLC profiles을 분석해보면, 3,5-DCQA(Rt 15 min, 지표물질)의 함량은 유사하지만 xanthine oxidase 저해효능을 나타내는 다른 DCQA 유도체들(3,5-DCQA methyl ester, 4,5-DCQA methyl ester 등)의 함량(Rt 20 min)이 큰 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었음. 이 결과는 섬쭉부쟁이에서 분리한 DCQA 유도체의 xanthine oxidase 저해효능 검색 결과(Table 9)와 DCQA 유도체의 HPLC profiles 분석 결과(Fig. 19)에서도 확인할 수 있었음.

Table 9. Xanthine oxidase inhibitory effects of DCQA derivatives from the ethyl acetate fractions of *A. glehni*

Compound	XOD Inhibitory activity (IC ₅₀ , μM) ^b
5-CQA	82.8 ± 1.0
3,4-DCQA	35.7 ± 0.5
3,5-DCQA	36.3 ± 3.5
3,5-DCQA-Me	7.2 ± 0.2
4,5-DCQA	11.0 ± 0.6
4,5-DCQA-Me	2.6 ± 0.1
Allopurinol ^c	3.0 ± 0.3

^aAll data were expressed as a mean ± SEM.

^bIC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibit 50% of xanthine oxidase.

^cPositive controls.

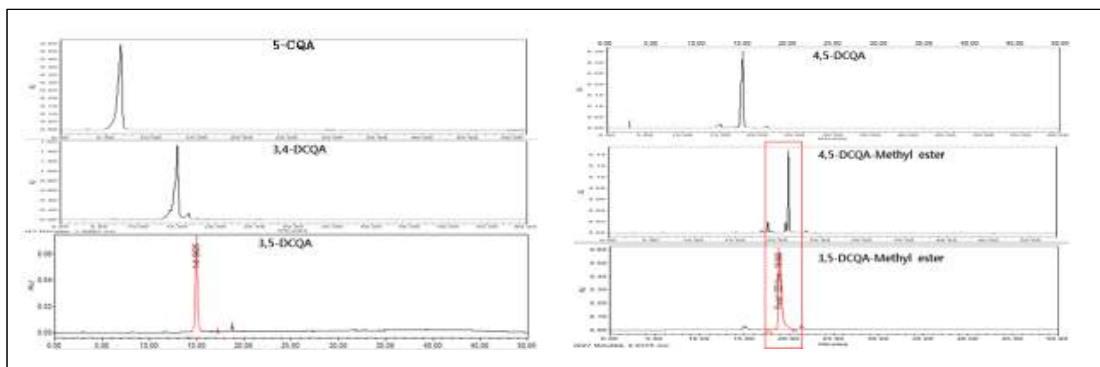


Fig. 19. HPLC profiles of six DCQA derivatives from *A. glehni*

- ▶ 이상의 결과를 종합하면, 본 연구는 3,5-DCQA를 섬쭉부쟁이 에탄올추출물의 적합한 지표물질로 설정하여 섬쭉부쟁이를 이용한 기능성식품 개발을 위한 원료 표준화에 유용한 자료가 될 것으로 사료되어짐.

2절 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 원료의 표준화

1. 섬쭉부쟁이 추출물 제조공정 연구

가. 섬쭉부쟁이 추출물의 다양한 추출물 제조

(1) 추출조건

부위	채집/구입	온도	추출 시간	에탄올 함량	sample
섬쭉부쟁이 (줄기, 잎)	2015.07 채집	60℃	3, 4, 5, 6h	30%	971-1507-60-30%AGE
				50%	971-1507-60-50%AGE
				70%	971-1507-60-70%AGE
		70℃	3, 4, 5, 6h	30%	971-1507-70-30%AGE
				50%	971-1507-70-50%AGE
				70%	971-1507-70-70%AGE
섬쭉부쟁이 (줄기, 잎, 꽃)	2015.10 채집	70℃	3, 4, 5, 6h	30%	971-1510-70-30%AGE
				50%	971-1510-70-50%AGE
				70%	971-1510-70-70%AGE
				80%	971-1510-70-80%AGE
		80℃	3, 4, 5, 6h	30%	971-1510-80-30%AGE
				50%	971-1510-80-50%AGE
				70%	971-1510-80-70%AGE
				80%	971-1510-80-80%AGE
섬쭉부쟁이 (어린순)	2016.04 구입	70℃	3, 5h	열수	971-1604-70-DWAGE
				30%	971-1604-70-30%AGE
				50%	971-1604-70-50%AGE
				70%	971-1604-70-70%AGE
		80℃	3, 5h	열수	971-1604-80-DWAGE
				30%	971-1604-80-30%AGE
				50%	971-1604-80-50%AGE
				70%	971-1604-80-70%AGE

(2) 추출수율 비교

(가) 971-1507-AGEs 추출수율 비교

2015년 7월로부터 다양한 조건에서 추출한 섬쭉부쟁이 에탄올추출물을 단 1회 추출해 농축하여 수율수율을 측정(3회 반복실험)하였으며 결과를 Table 10에 나타내었음.

Table 10. Yields of the ethanol extracts from *Aster glehni* (971-1507)

Sample (at 60°C)	추출 시간	수율 (%)*	Sample (at 70°C)	수율 (%)*
971-1507-60-30%AGE	3h	14.5 ± 0.5	971-1507-70-30%AGE	17.4 ± 0.2
	4h	15.1 ± 0.9		18.9 ± 0.9
	5h	16.2 ± 0.6		18.4 ± 0.1
	6h	16.4 ± 0.8		18.7 ± 0.7
971-1507-60-50%AGE	3h	13.8 ± 0.7	971-1507-70-50%AGE	16.5 ± 0.5
	4h	14.1 ± 1.1		15.7 ± 0.6
	5h	15.2 ± 0.9		17.0 ± 0.4
	6h	15.1 ± 0.4		17.6 ± 0.0
971-1507-60-70%AGE	3h	12.2 ± 0.5	971-1507-70-70%AGE	12.7 ± 1.6
	4h	12.2 ± 0.7		13.9 ± 0.3
	5h	13.4 ± 0.3		14.4 ± 1.2
	6h	13.4 ± 0.5		14.2 ± 0.7

*수율(%): mean ± SD.

2015년 7월에 채집한 섬쑥부쟁이 추출수율은 에탄올 함량이 낮을수록, 추출온도가 높을수록 추출수율이 증가함을 보였음. 추출시간에 따른 수율은 3-4시간 추출 조건보다 5-6시간 추출하는 조건에서 수율이 더 높았으나, 온도와 에탄올 함량의 변화에 비해서 큰 수율의 변화를 나타내지 못하였음. 그러므로 이 시기에 채집된 시료의 경우 70°C, 30% 에탄올을 사용하여 5시간 추출하는 조건이 최적의 추출수율을 나타내었음.

(나) 971-1510-AGEs 추출수율 비교

2015년 10월에 채집한 섬쑥부쟁이 에탄올추출물을 단 1회 추출해 농축하여 수출수율을 측정(3회 반복실험)하였으며 결과를 Table 11에 나타내었음.

Table 11. Yields of the ethanol extracts from *Aster glehni* (971-1510)

Sample (at 70°C)	추출 시간	수율 (%)*	Sample (at 80°C)	수율 (%)*
971-1510-70-30%AGE	3h	15.2 ± 0.5	971-1510-80-30%AGE	17.4 ± 0.3
	4h	15.8 ± 0.5		17.8 ± 0.5
	5h	16.5 ± 0.1		18.0 ± 0.4
	6h	17.1 ± 0.9		17.2 ± 0.3
971-1510-70-50%AGE	3h	14.1 ± 0.5	971-1510-80-50%AGE	16.3 ± 0.5
	4h	15.1 ± 0.8		16.8 ± 0.5
	5h	15.5 ± 0.1		17.2 ± 0.1
	6h	15.7 ± 0.6		17.2 ± 0.6

971-1510-70-70%AGE	3h	11.8 ± 1.0	971-1510-80-70%AGE	14.3 ± 0.4
	4h	12.7 ± 0.4		14.4 ± 0.5
	5h	12.7 ± 1.2		15.5 ± 0.7
	6h	13.3 ± 0.4		15.0 ± 0.5
971-1510-70-80%AGE	3h	11.0 ± 0.2	971-1510-70-80%AGE	11.7 ± 0.1
	4h	11.2 ± 0.6		12.4 ± 0.5
	5h	12.1 ± 0.1		13.0 ± 0.3
	6h	12.0 ± 0.4		13.5 ± 0.9

*수율(%): mean ± SD.

2015년 10월에 채집한 섬쭈부쟁이 추출수율은 2015년 7월에 채집한 섬쭈부쟁이와 유사하게 에탄올의 함량이 낮을수록, 추출온도가 높을수록 증가함을 보였음. 추출 시간에 따른 수율 역시 5-6시간 추출 조건이 3-4시간 추출조건보다 수율이 좋았으나, 다른 요인에 비해 큰 변화를 나타내지는 못하였음. 2015년 10월에 채집한 섬쭈부쟁이의 경우에는 80℃, 30% 에탄올을 사용하여 5시간 이상 추출하는 조건에서 최적의 추출수율을 나타냄.

(다) 971-1604-AGEs 추출수율 비교

2016년 4월에 구입한 생초인 어린순(971-1604, 부지쟁이 나물)으로부터 다양한 조건에서 추출한 섬쭈부쟁이 에탄올추출물을 단 1회 추출해 농축하여 수율수율을 측정(3회 반복실험)하였으며 결과를 Table 12에 나타내었음.

Table 12. Yields of the ethanol extracts from *Aster glehni* (971-1604)

Sample (at 70℃)	추출시간	수율 (%)*	Sample (at 80℃)	수율 (%)*
971-1604-70-DWAGE	3h	26.4 ± 0.44	971-1604-80-DWAGE	27.3 ± 0.15
	5h	27.8 ± 1.07		27.8 ± 0.31
30%AGE	3h	26.3 ± 0.86	30%AGE	28.6 ± 0.83
	5h	26.0 ± 0.77		28.2 ± 7.41
50%AGE	3h	26.0 ± 0.36	50%AGE	28.7 ± 0.31
	5h	28.0 ± 1.52		29.4 ± 0.44
70%AGE	3h	24.9 ± 0.97	70%AGE	28.6 ± 0.66
	5h	25.5 ± 0.50		29.2 ± 0.95

*수율(%): mean ± SD.

2016년 4월에 구입한 생초의 경우에는 2015년 7월과 10월에 채집한 성숙된 섬쭈부쟁이 시료와 다르게 추출수율이 우수함을 확인함. 그러나 에탄올의 함량이나 추출 시간의 변화에 따라 수율에는 큰 차이가 없었으며, 70℃에서 추출한 추출물의 경우에는 70% 에탄올을 사용하였을 때 다소 낮은 추출수율을 나타냄. 또한, 80℃에서 추출한 경우 70℃에서 추출한 추출물보다 다소 높은 수율을 나타내지만, 2015

년 채집시료와 다르게 에탄올의 함량이 낮은 추출물의 수율이 다소 낮게 나타남. 2016년 4월에 구입한 생초의 경우에는 80°C에서 30% 에탄올 이상의 함량을 사용하여 3시간 이상 추출하는 조건이 가장 우수한 추출수율을 나타낼 것으로 기대됨.

(3) 다양한 에탄올추출물의 Xanthine oxidase 저해효능 비교

(가) 971-1510-AGEs의 Xanthine oxidase 저해효능 비교

2015년 10월에 채집한 섬쭉부쟁이(971-1510-AGEs)의 xanthine oxidase 저해효능을 검색하여 Table 13에 나타난 결과, 70°C-70%AGE에서 우수한 효능을 나타내고 있었음. 그러나 80°C-30%AGE의 효능은 3-4시간 동안 추출한 경우 가장 우수한 효능을 보이거나 높은 편차로 인하여 정확한 효능을 확인하기에 어려움이 있었음.

Table 13. Xanthine oxidase inhibitory effects of the ethanol extracts from *A. glehni* (971-1510-AGEs)

Sample (971-1510)	IC ₅₀ (μg/mL) ^a	Sample (971-1510)	IC ₅₀ (μg/mL) ^a
70° C-30% AGE-3h	101.52 ± 19.77	80° C-30% AGE-3h	65.66 ± 15.85
4h	88.33 ± 11.67	4h	66.06 ± 9.50
5h	129.27 ± 13.68	5h	93.38 ± 10.97
6h	100.17 ± 21.42	6h	78.31 ± 16.97
70° C-50% AGE-3h	94.92 ± 13.00	80° C-50% AGE-3h	71.10 ± 21.50
4h	111.78 ± 13.68	4h	80.40 ± 2.83
5h	125.75 ± 11.04	5h	167.57 ± 32.42
6h	91.63 ± 15.25	6h	190.17 ± 28.93
70° C-70% AGE-3h	77.01 ± 3.13	80° C-70% AGE-3h	84.49 ± 10.77
4h	79.74 ± 4.66	4h	85.02 ± 5.56
5h	89.96 ± 3.08	5h	85.49 ± 5.51
6h	78.78 ± 10.57	6h	78.79 ± 7.40
70° C-80% AGE-3h	91.11 ± 15.71	80° C-80% AGE-3h	84.51 ± 9.17
4h	80.80 ± 7.03	4h	82.47 ± 10.82
5h	99.64 ± 7.15	5h	95.22 ± 7.07
6h	90.76 ± 8.12	6h	103.45 ± 4.07

All data were expressed as a mean ± SD. ^aIC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibit 50% of xanthine oxidase; Allopurinol (positive control): IC₅₀ = 2.14 ± 0.21 μM.

(나) 971-1604-AGEs의 Xanthine oxidase 저해효능 비교

2016년 4월 구입한 섬쭉부쟁이 생초 추출물(971-1604-AGEs)은 추출수율이 가장 우수하게 나타난 70% 에탄올추출물만 xanthine oxidase 저해효능을 검색하여 Table

14에 나타내었음. 그 결과 80℃에서 추출한 추출물보다 70℃에서 추출한 추출물의 효능이 우수함을 확인하였음. 그러나 온도별 추출시간에는 관계없이 유사한 IC₅₀값을 나타냄을 확인함. 이들의 효능은 2015년 7월과 10월 채집시료와 비교하면 현저히 낮은 xanthine oxidase 저해효능을 보임.

Table 14. Xanthine oxidase inhibitory effects of the ethanol extracts from *A. glehni* (971-1604-AGEs)

sample (971-1604)	IC ₅₀ (μg/mL) ^a
971-1604-70-70%AGE-3h	364.87 ± 64.27
5h	371.95 ± 43.65
971-1604-80-70%AGE-3h	409.68 ± 27.35
5h	421.08 ± 79.31
Allopurinol IC ₅₀ (μM) ^b	2.14 ± 0.21

^aAll data were expressed as a mean ± SD. ^bPositive control.

(다) 섬쭉부쟁이 메탄올 추출물로부터 분획한 EtOAc 분획의 Xanthine oxidase 저해효능 비교

2015년 7월과 10월에 채집한 섬쭉부쟁이를 메탄올로 추출하여 용매 극성에 따라 분획하여 유효성분의 함량이 높은 EtOAc 분획의 xanthine oxidase 저해효능을 측정하여 Table 15에 나타냄. 그 결과, 7월 채집시료의 EtOAc 분획보다 성숙된 10월의 채집시료 EtOAc 분획이 xanthine oxidase 저해효능이 현저하게 우수함을 확인하였음.

Table 15. Xanthine oxidase inhibitory effects of ethyl acetate fractions from *A. glehni*

Sample	IC ₅₀ (μg/mL) ^a
971-12A-1510-EtOAc	5.77 ± 0.81
971-12A-1507-EtOAc	15.37 ± 3.34
Allopurinol IC ₅₀ (μM) ^b	2.13 ± 0.19

^aAll data were expressed as a mean ± SD. ^bPositive control.

2. 섬쭈부쟁이 추출물의 표준화

가. 원재료 품질 및 추출조건 예비검토

(1) 원재료 품질 검토

(가) 섬쭈부쟁이 생초

- ① 섬쭈부쟁이 생초는 녹색을 주로 띠고 있음.
- ② 건조 시 수율 검토

섬쭈부쟁이 잎(생초) 40kg을 35℃에서 4일간 건조함.

건조 후 7.8kg의 건조를 얻었으며 건조 수율은 19.5%임을 확인함.

(나) 섬쭈부쟁이 건조물

- ① 섬쭈부쟁이 건조물은 지상부를 건조한 것으로 녹색이 바래져 있음.
- ② 건조물의 경우 꽃, 줄기, 잎으로 분류하여 각각 샘플 제조함.



(2) 원재료 부위별 70% 주정추출물 샘플 제조

(가) 원재료(섬쭈부쟁이 건조물) 샘플 제조

꽃, 줄기, 잎으로 선별 후, 각각 이용하여 70% 주정추출물 제조

① 70% 주정추출물 제조공정

공정	내 용	수율(% ,고형분기준)		
		잎	줄기	꽃
원료분류	원재료(섬쭈부쟁이 건조물)를 잎/줄기/꽃으로 분류, 각각 2kg씩 준비	100		
1차 추출	각 2kg에 70%주정을 잎(33L), 줄기(25L), 꽃(33L)를 투입 후 80℃에서 4시간 추출함	-		
2차 추출	잔사에 70%주정을 20L씩 투입 후 80℃에서 2시간 추출함	-		
여 과	각 추출액을 펄라이트 250g과 혼합 후 필터프레스 여과함	19.7	7.8	17.4
농 축	감압농축함	13	14.4	13.8
살 균	95℃ 1시간 살균함	-		
건 조	분무건조함	-		

② 70% 주정추출물 제조(Lot20160121)



(나) 용매별 70% 원재료 부위별 70% 주정추출물 샘플제조

- ① 2015 10월 16일 입고된 원재료(삼척부쟁이 건조물)의 잎을 열수, 50, 70, 90% 주정을 이용하여 주정추출물로 제조
- ② 열수, 50, 70, 90% 주정추출물 제조과정

공정	내 용	수율 (%고형분기준)			
		열수	50%	70%	90%
원료투입	삼척부쟁이 잎 1kg 과 - 물 25L 를 혼합 - 50%주정 30L 혼합 - 70%주정 25L 혼합 - 90%주정 25L 혼합	100			
1차 추출	열수추출 : 95℃ 에서 4 시간 추출함 주정추출 : 80℃ 에서 4 시간 추출함	17	26	19	9.8
2차 추출	잔사에 - 물 20L를 혼합 - 50%주정 20L 혼합 - 70%주정 20L 혼합 - 90%주정 20L 혼합 열수추출 : 95℃ 에서 2 시간 추출함 주정추출 : 80℃ 에서 2 시간 추출함	10	4.4	4.5	2.4
여 과	각 추출액을 펄라이트 250g과 혼합 후 필터프레스 여과함	24	29.8	23.7	11.5
농 축	감압농축함	24	24	21.2	8.1
살 균	95℃ 1시간 살균함	-			
건 조	분무건조함	-			

- ③ 열수(Lot20160303) 24%, 50% 주정(Lot20160303) 24%, 70% 주정(Lot20160303) 21.2%, 90% 주정(Lot20160303) 8.1%의 제조수율을 얻음.

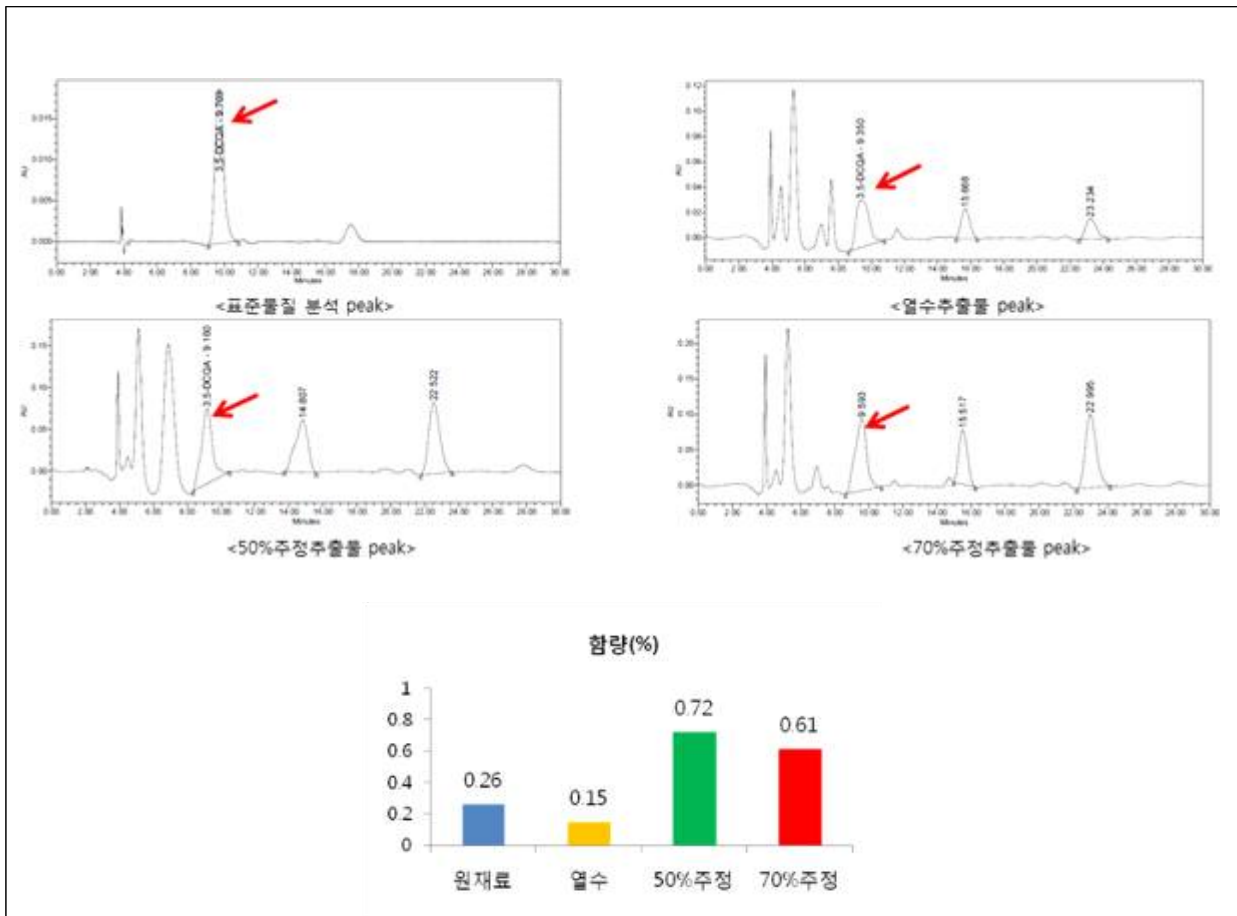


나. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 분석법 최적화

(1) 열수, 50, 70% 주정추출물 3,5-DCQA 함량 측정

(가) 열수추출물과 주정추출물의 함량 비교

▶ 열수추출물보다 주정추출물에서 3,5-DCQA의 함량이 더 높은 것을 확인



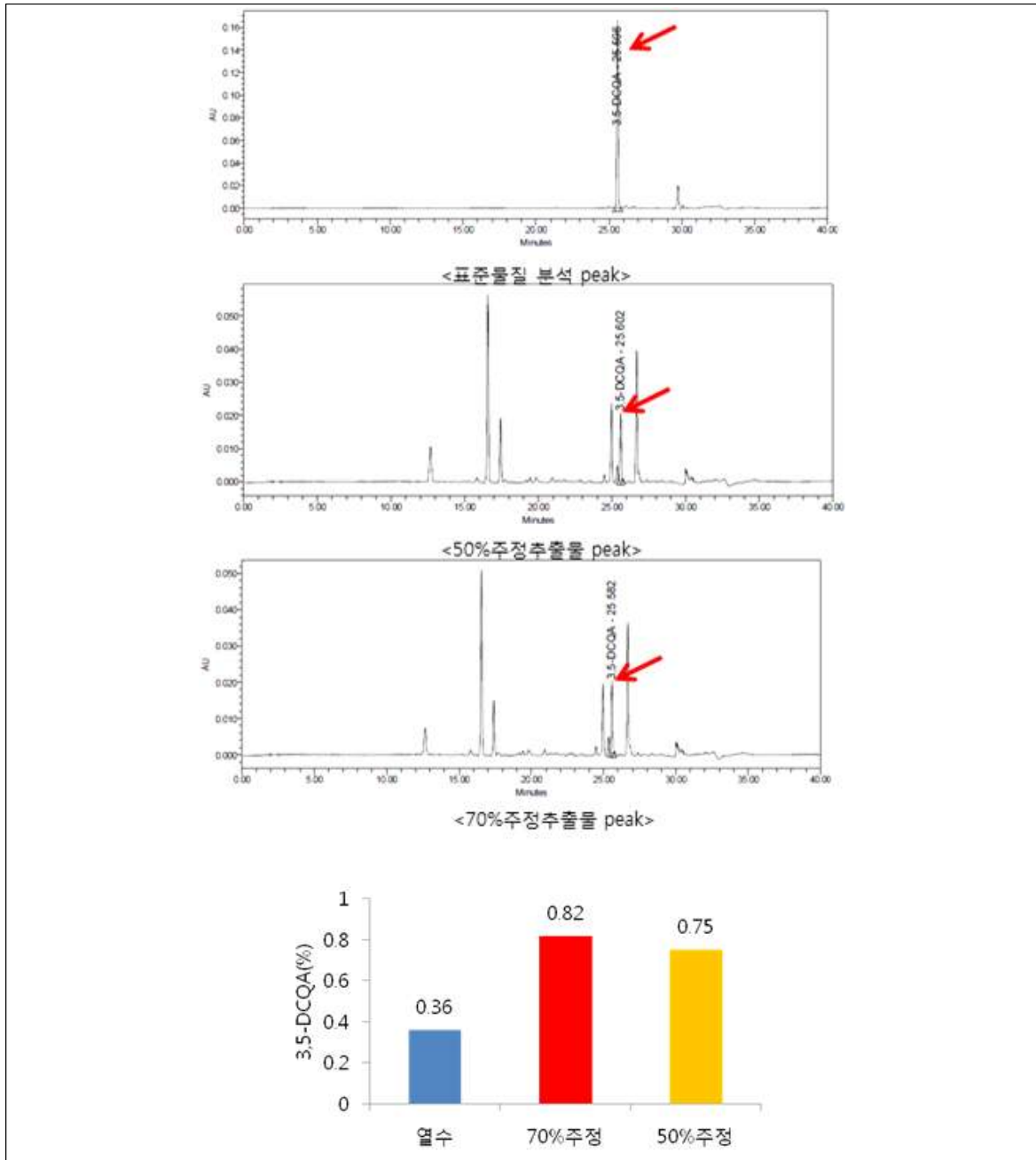
(나) 분석법 최적화

① 3,5-DCQA 함량 분석의 최적화를 위해 이동상을 메탄올과 Formic acid 대신 D.W와 Acetonitrile로 변경하고, flow rate를 1.4 ml/min으로 변환함.

Sample	1) 표준물질: 3,5-dicaffeoylquinic acid (SMB00131-1G, sigma 5, 25, 50ppm) 2) 섬썩부쟁이 잎 50%주정추출물 1g을 30% 메탄올 100ml에 용해 3) 섬썩부쟁이 잎 70%주정추출물 1g을 30% 메탄올 100ml에 용해
Column	Kromasil C18 (250 x 4.6mm, 5um)
Detector	Waters 2998 PDA (330 nm)
Temperature	40°C
Injection volume	5ul
Flow rate	1.4ml/min
Mobile phase	Phosphoric acid/D.W =0.5/99.5 (v/v) Phosphoric acid/ACN =0.5/99.5 (v/v)
Runtime	40min

② 그 결과 3,4-DCQA와 3,5-DCQA의 peak 분리가 가능해지며, sharp 해진 peak으로 면적 값 계산이 가능하게 됨.

▶ 함량 확인 결과 70% 주정추출물(부형제 50% 혼합)에서 지표물질인 3,5-DCQA의 함량이 가장 잘 나타남을 확인함.



다. 섬쭉부쟁이 추출물 제조공정 개발

(1) 섬쭉부쟁이 잎 추출물 최적 추출 조건 설정

(가) 섬쭉부쟁이 잎을 이용한 50, 70% 주정추출물 제조

(나) 50% 주정(Lot20160422), 70% 주정(Lot20160422)의 제조수율은 각각 30%, 27%로 50~70% 주정추출이 가능함을 확인함

(다) 50, 70% 주정추출물 제조공정

공정	내 용	수율 (%고형분기준)	
		50% 주정	70% 주정
원료투입	섬썩부쟁이 잎 2kg과 - 50%주정 25L 혼합 - 70%주정 25L 혼합	100	
1차 추출	80℃ 에서 4시간 추출함	29	25
2차 추출	잔사와 - 50%주정 20L 혼합 - 70%주정 20L 혼합 80℃ 에서 2 시간 추출함	6	4
여 과	각 추출액을 퍼라이트 250g과 혼합 후 필터프레스 여과함	32	30
농 축	감압농축함	30	27
살 균	95℃ 1시간 살균함		
건 조	동결건조함	30	27

(2) 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 표준 제조 공정 확립

(가) 70% 주정추출물 제조공정

공정	내용	수율(%)	3,5-DCQA 회수량(g)	지표성분 회수율(%)
원료투입	분쇄한 잎 2kg을 투입	100	3.84	100
1차 추출	70% 주정 20L를 투입 후 교반, 80℃ 4시간 추출	22.7	3.8	98.9
2차 추출	70% 주정 15L 투입 후 교반, 80℃ 2시간 추출			
여과	퍼라이트 여과	21.4	3.6	93.7
농축	여과액을 20Brix까지 농축	19.5	3.5	92
살균	95도 1시간 살균			
건조	분무건조	17	2.48	65

라. 섬썩부쟁이 추출물의 기준 및 시험법 확립

(1) 섬썩부쟁이 추출물 시험법 검증

(가) 표준용액 제조

- ① 표준물질 3,5-dicaffeoylquinic acid 일정량을 취하여 메탄올에 녹여 이를 표준용액으로 함
- ② 표준원액을 메탄올로 단계별 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 제조하여 사용

(나) 시험용액 제조

- ① 시료를 약 0.5g을 취한 후 30% 메탄올 50ml에 용해
- ② 0.45um 실린지 필터를 이용하여 여과한 후 분석

(다) 분석 및 조건

분석	조건		
컬럼	C18 colum(250mm x 2.6um x 5um)		
온도	40°C		
Injection volume	5uL		
Folw rate	1.4ml/min		
Detector	330nm PDA		
이동상	A) Phosphoric acid/DW = 0.5/99.5(v/v) B) Phosphoric acid/Acetonitrile = 0.5/99.5 (v/v)		
이동상 Gradient	시간(min)	이동상 A	이동상 B
	0	95	5
	7	95	5
	27	70	30
	28	10	90
	30	10	90
	35	95	5

(라) 시험법 밸리데이션 결과

- ① 특이성 : 표준품과 샘플에서의 3,5-DCQA의 머무름 시간이 26.2분 경이고, 스펙트럼을 비교한 결과 섬썩부쟁이 추출물에서의 3,5-DCQA를 특이적으로 검출할 수 있는 시험법임을 확인함.
- ② 정확성 : 섬썩부쟁이 추출물 10 mg/ml에 각각의 농도로 희석한 표준품을 혼합하여 분석한 결과, 99.0~ 100.0%의 우수한 오차범위에서의 3,5-DCQA 회수율을 확인하였음.
- ③ 직선성: 0.01~ 0.10 mg/ml의 3,5-DCQA peak 면적값을 토대로 검량선을 작성하고 기울기 값이 1.0으로 농도에 따라 직선성을 나타냄.
- ④ 정밀성: 섬썩부쟁이 추출물을 약 10 mg/ml의 농도로 용해하여 3회 반복분석한 결과 3,5-DCQA의 함량은 2.4 mg/g이었으며, 표준편차값은 0.01%로 반복분석에 대한 결과값의 오차범위를 나타내어 정밀성을 가짐.

마. 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화

(1) 섬썩부쟁이 추출물의 최적화 공정 확립

(가) 대량 생산을 위한 scale up 최적화 공정 개발

2016년 9월 초 경상북도 울릉도에 방문하여 구입한 섬썩부쟁이를 이용하여 제조공정 및 기준규격 표준화를 위한 3lot 반복 제조를 다음과 같은 공정으로 진행함

공정	내용	비고
원료투입	분쇄한 잎 1.0kg을 투입함	30L 발효조
추출	70% 주정 18L를 첨가 후 교반, 80℃ 6시간 추출함	
여과	퍼라이트 여과함	퍼라이트 220g
농축	여과액을 15Brix까지 농축함	
부형제첨가	고형분 대비 동량의 텍스트린 첨가 후 교반함	
살균	95℃ 1시간 살균함	
건조	분무건조함	

(나) 3Lot 반복 제조

섬썩부쟁이 추출물의 제조수율(%) 및 지표물질 회수율(%)은 다음과 같으며 3Lot의 지표물질 함량 평균은 0.24%임

샘플	제조수율(%)	3,5-DCQA 함량(%)	지표물질 회수율(%)
1Batch	추출액	20	-
	여과액	18	-
	농축액	14	-
	분말	22	0.25
2batch	추출액	20	-
	여과액	17	-
	농축액	15	-
	분말	24	0.24
3batch	추출액	20	-
	여과액	17	-
	농축액	15	-
	분말	24	0.22

(2) 제조공정 및 기준규격의 표준화

(가) 제조공정도 및 포장공정도

공정	제조방법 설명
추출	(1) 섬썩부쟁이 잎(분쇄물)에 중량 대비 20배(v/w)의 70% 주정을 투입 (2) 80℃로 유지하며 6시간 열처리
여과	원물의 15% 중량의 퍼라이트 첨가하여 여과

농축	40~50℃에서 고형분 15%가 될 때까지 농축
부형제 첨가	고형분 대비 동량의 텍스트린 첨가
살균	95℃ 1시간 살균
건조	분무건조
포장(원료)	(1) PE 포장재에 포장단위에 맞게 칭량 (2) 제습제를 넣고 밀봉 포장 (3) 지관 포장

(나) 단위 공정별 수율, 기능 및 지표성분 변화 분석

공정	내용	수율(%)	3,5-DCQA 함량(%)
원료투입	분쇄한 잎 100kg을 투입	100	0.15
↓			
추출	70% 주정 1800L 투입 후, 80℃ 6시간 추출	19	0.54
↓			
여과	퍼라이트 여과	17	0.53
↓			
농축	여과액을 15Brix로 농축	16	0.50
↓			
부형제 첨가	고형분 대비 동량의 텍스트린 첨가	32	0.25
↓			
살균	95℃ 1시간 열처리	32	0.25
↓			
건조	분무건조	28	0.24
↓			
체별/포장	80mesh 체별/포장	25	0.24

(다) 섬썩부쟁이 추출물의 기준규격 설정

항목	기준
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 분말
기능(또는 지표)성분	3,5-dicaffeoylquinic acid 1.92 ~ 2.88 mg/g
납	1.0 이하
총비소	1.0 이하

카드뮴	0.5 이하
총수은	0.5 이하
수분	10% 이하
일반세균	1.0 X 10 ³ cfu/g이하
대장균군	음성

① 특성

수분함량 10% 이하의 분말상으로 제조과정 중 살균처리하여 PE 포장재에 밀봉 후 분말 내 수분유입 방지를 위해 제습제를 사용함. 그 후 제품의 손상 방지를 위해 지관 포장하므로 원료의 구비요건 상 이상이 없으며, 저장 및 유통 시에도 안정한 상태를 유지함.

② 일반 시험검사

검체를 채취하여 식품공전의 일반가공식품 기준규격과 미생물학적, 이화학적 품질 검사를 실시하여 기준 규격에 적합여부를 판단 후 포장을 실시함.

㉑ 대장균군: 대장균군 음성

(식품공전 일반시험법 중 대장균군 실험기구 및 방법준용)

㉒ 일반세균: 일반세균 자가 기준 설정운영

(식품공전 중 일반세균 실험기구 및 방법준용)

㉓ 이화학적 검사: 수분, 타르색소, 이물, 중금속 등

③ 지표성분 규격 설정

섬썩부쟁이 추출물의 지표성분인 3,5-dicaffeoylquinic acid 평균함량은 0.24%으로 검출되었음.

▶ 섬썩부쟁이 추출물의 3,5-DCQA 함량규격을 검출함량의 80~ 120% 범위로 설정하여 1.92~ 2.88 mg/g으로 설정함.

▶ 원료의 표준화를 통해 “인체적용시험 원료” 준비

바. 원료의 안전성 검토

(1) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 장기 안정성

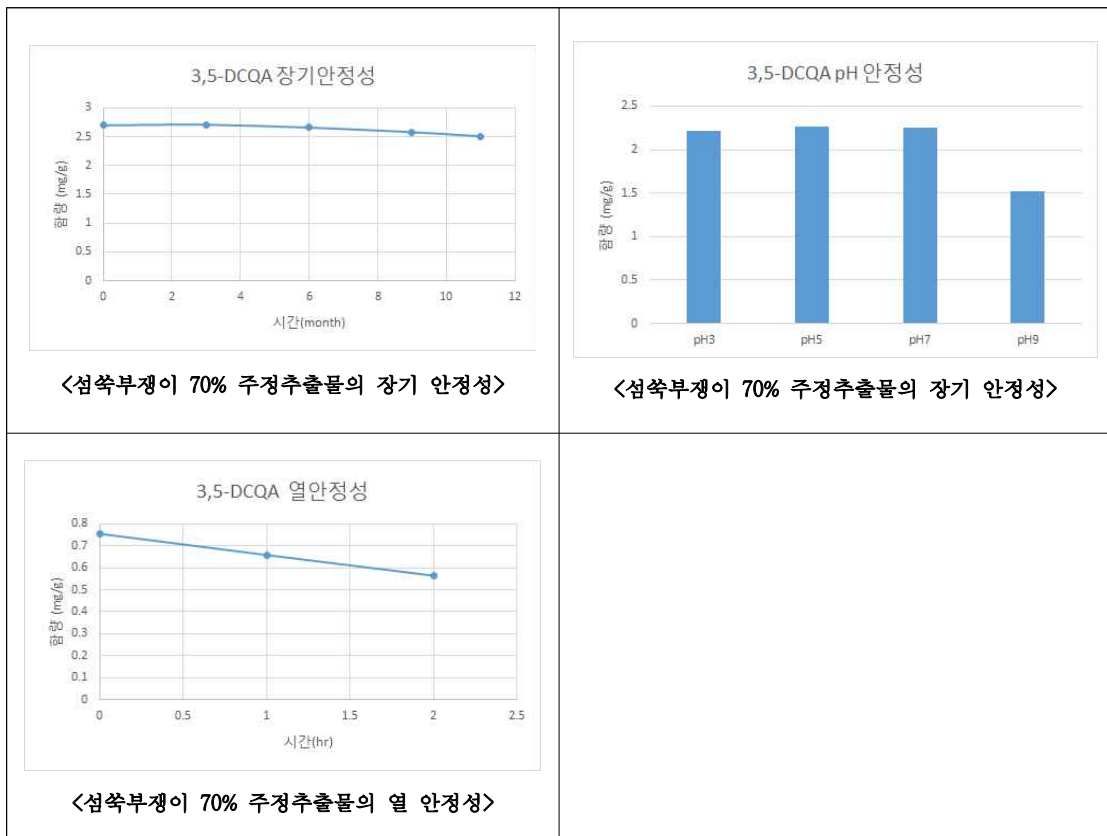
- 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 장기 안정성 결과를 확보
- 25 ± 4°C, 60% 습도 조건의 항온항습기에서 안정성 시험 수행하였으며, 지표물질인 3,5-DCQA는 3개월 주기로 측정하였음.

(2) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 pH 안정성

- 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 pH 안정성을 확인하기 위해, 각 pH 조건 하에 1시간 방치 후 지표물질인 3,5-DCQA를 측정하였음.
- 염기성조건에서 섬쭉부쟁이 추출물의 안정성이 감소되며, 중성 및 산성 조건에서 안정함을 확인

(3) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 열 안정성

- 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 열 안정성을 확인하기 위해, 95°C 조건 하에 지표물질인 3,5-DCQA를 시간별로 측정하였음
- 3,5-DCQA는 열 안정성이 낮음을 확인



사. 대량생산을 위한 원료 확보 방법 연구

(1) 원료 확보

- 울릉도에 자생하는 섬썩부쟁이를 재배 및 수확 반건조를 진행하여 (주)베이스스푸드 로 이송
- (주)베이스스푸드에서 잎과 줄기를 분리하고, 건조 및 분쇄하여 원료를 확보



3절 섬쭈부쟁이 70% 주정추출물의 유효성 평가

1. 섬쭈부쟁이 추출물의 효능검색

가. Antioxidant 효능 검색

(1) 시험목적

본 실험은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 유리라디칼에 시료의 -OH가 붙어 DPPH 라디칼이 감소되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법을 이용하여 추출조건별 섬쭈부쟁이 시료의 항산화 능력을 확인하고자 하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

DPPH와 Trolox는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매한 제품을 이용하였으며, 섬쭈부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공한 시료를 사용하였음.

(나) DPPH 라디칼 소거능 측정

시료와 양성대조군을 원하는 농도로 희석한 후 50 uL를 96 well plate에 옮기고, DPPH를 100 uL 넣은 후 실온에서 10분간 반응시켰음. DPPH가 알콜 등의 유기용매에서 안정하기 때문에, DPPH는 메탄올에 희석하였음. 10분 후 microplate reader (UVM 340, Biochrom)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였음. 시료의 DPPH 라디칼 소거능은 아래 식에 측정된 흡광도 값을 대입하여 계산하였음.

$$\text{라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

항산화능 지수로 시료물질이 총 라디칼의 50%를 제거한 농도인 IC₅₀(Inhibitory concentration 50%)을 사용하였음. 양성대조군으로 Trolox를 이용하였음.

(3) 연구결과

(가) 섬쭈부쟁이 추출조건에 따른 DPPH 라디칼 소거능 확인

각각의 추출 조건(열수추출, 50% 주정추출, 70% 주정추출)에 따른 섬쭈부쟁이의 항산화능을 비교하기 위해 IC₅₀ 값을 산출하였음. 양성대조군인 Trolox(Vitamin E)에서는 31.21 ± 3.26 ug/mL, 섬쭈부쟁이 열수추출물에서는 170.20 ± 6.92 ug/mL, 50% 주정추출물에서는 153.73 ± 10.78 ug/mL, 70% 주정추출물에서는 150.63 ± 4.43 ug/mL의 IC₅₀값을 나타내었음(Table 16).

▶ 70% 주정추출물에서 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었음.

구분	Trolox	열수추출물	50% 주정추출물	70% 주정추출물
IC ₅₀ (ug/mL)	31.21 ± 3.26	170.20 ± 6.92	153.73 ± 10.78	150.63 ± 4.43

Table 16. 섬쭈부쟁이 추출조건에 따른 DPPH 라디칼 소거능

나. Xanthine oxidase(잔틴산화효소, XO) 저해효능 검색

(1) 시험목적

통풍(痛風, gout)은 요산이 체내에 축적되어 생기는 병으로, 관절의 연골, 힘줄, 주위 조직에 날카로운 형태의 요산결정이 침착되어 조직들의 염증반응을 촉발한다고 알려져 있음. xanthine oxidase(잔틴산화효소, XO)는 이러한 요산을 생성하는 효소인데, 기질로 잔틴을 이용함. 통풍을 유발하는 혈중 요산농도를 저해하기 위해서는 XO의 활성 억제이 중요함. 본 실험은 XO의 생성물인 uric acid의 생성이 감소되는 정도를 측정하여 섬쑥부쟁이의 XO 저해 정도를 측정하고자 함.

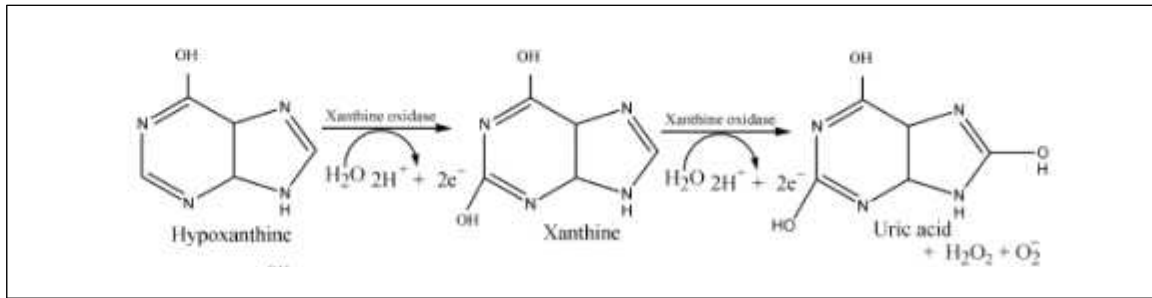


Fig. 20. Xanthine oxidase의 작용기전

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Allopurinol, xanthine, xanthine oxidase(XO)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매한 제품을 이용하였으며, 부위별(꽃, 잎, 줄기) 섬쑥부쟁이 추출물과 채집시기별(봄, 가을) 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공한 시료를 사용하였음.

(나) XO 저해 효능 측정

XO 저해 효능은 호기성 조건 하에서 Noro *et al.*(1983) 방법을 약간 수정하여 측정하였음. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5), 0.004 U/mL XO와 DMSO 또는 DW에 용해한 다양한 농도의 시료를 혼합하여 25°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 반응물에 0.12 mM xanthine을 가하여 반응을 개시한 다음 25°C에서 30분 동안 반응하였음. 1 N HCl을 첨가하여 반응을 종결시키고, 295 nm에서 흡광도를 측정함.

XO 저해 효능은 % inhibition으로 평가하였고, IC₅₀값은 XO 억제 활성이 50%일 때의 시료 농도로 나타냄. 양성대조군으로 Allopurinol을 사용하였음.

$$\text{Xanthine oxidase 저해 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료구} - \text{시료구 blank}}{\text{대조구} - \text{대조구 blank}} \right) \times 100$$

(3) 연구결과

(가) 섬쭈부쟁이의 부위별 XO 저해 효능

섬쭈부쟁이를 잎, 줄기, 꽃으로 구분하여 70% 주정으로 추출물을 제조한 후 각각의 XO 저해 정도를 확인하였음. 대조군인 allopurinol IC₅₀값이 29.76 ± 4.18 uM로 측정될 때, 잎 추출물의 경우 644.73 ± 6.94 ug/mL로 나타내는데 비해 줄기와 꽃은 3276.68 ± 893.5 ug/mL, 3239.59 ± 2310.98 ug/mL로 저해효능이 상대적으로 없었음.

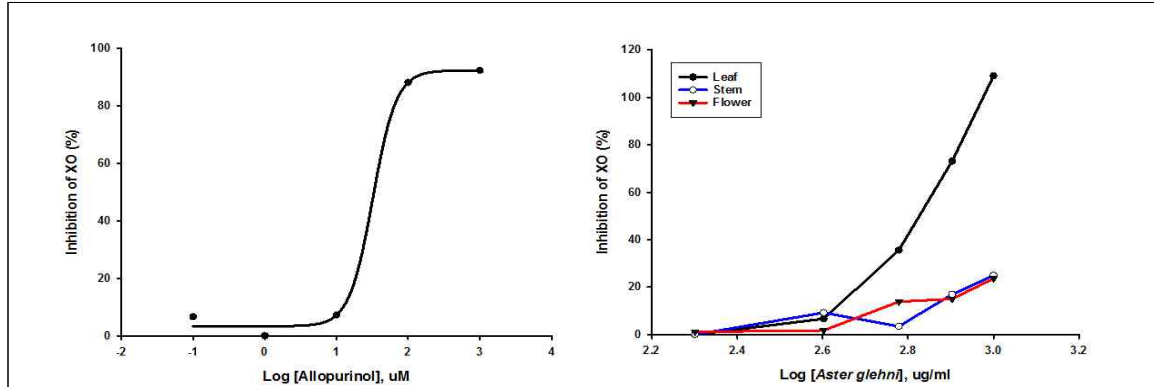


Fig. 21. 섬쭈부쟁이의 부위별 XO 저해 효능

▶ 앞에서 가장 우수한 XO 저해효능이 나타남에 따라 섬쭈부쟁이 잎으로 다양한 추출 조건을 검색하였음.

(나) 섬쭈부쟁이의 채집시기별 XO 저해 효능

봄철 수확한 섬쭈부쟁이와 가을철 수확한 섬쭈부쟁이를 열수와 50% 주정, 70% 주정을 이용하여 추출물을 각각 만든 후 XO 저해 효능을 비교하였음. 봄철 수확한 섬쭈부쟁이(부지쟁이)의 모든 추출물에서는 저해 효능이 나타나지 않은 반면 가을에 수확한 섬쭈부쟁이 추출물에서는 용매별 차이는 있지만 다음과 같이 효능이 확인되었음.

열수추출물에서의 IC₅₀값은 815.73 ± 4.6 ug/mL, 50% 주정추출물에서는 958.27 ± 29.44 ug/mL로 불안정한 저해 효능을 보이는데 비해 70% 주정추출물에서는 518.06 ± 2.27 ug/mL로 농도의존적 저해 효능을 나타냄.

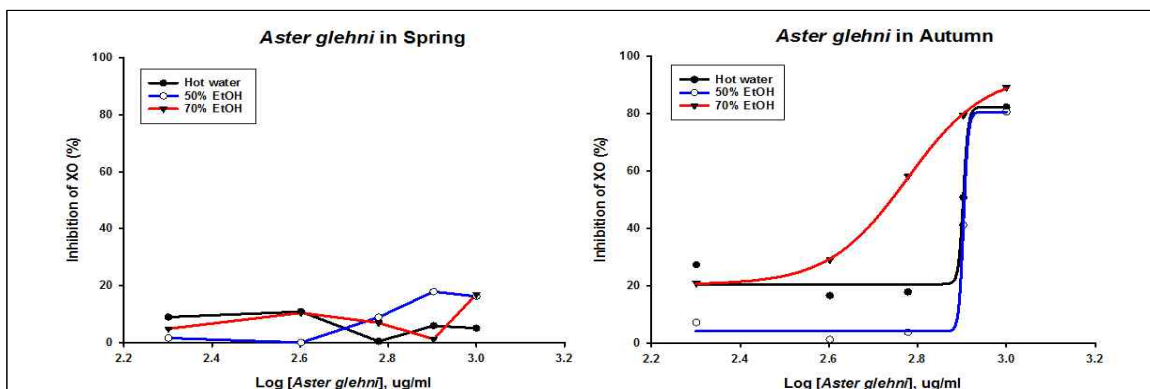


Fig. 22. 섬쭈부쟁이의 채집시기 및 추출조건별 XO 저해 효능

▶ 따라서 가을철에 수확한 섬쭈부쟁이 70% 주정추출물이 혈중 요산 감소에 효과적인 원료라고 판단함.

(다) 섬쭈부쟁이 추출물의 지표물질(3,5-DCQA)의 XO 저해 효능

섬쭈부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)의 XO 저해 효능을 확인하였음. 대조군인 Allopurinol의 IC₅₀값이 29.76 ± 4.18 uM로 측정될 때, 3,5-DCQA의 IC₅₀값은 187.54 uM로 확인됨.

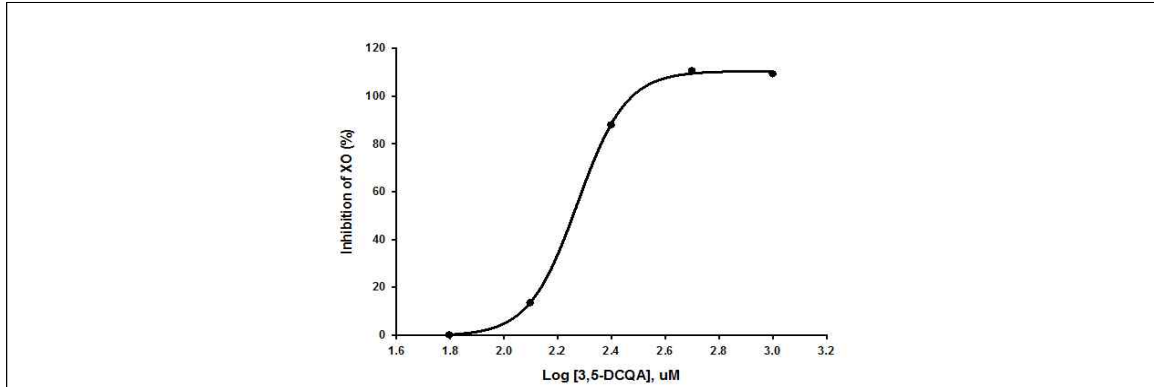


Fig. 23. 섬쭈부쟁이 추출물의 지표물질(3,5-DCQA)의 XO 저해 효능

▶ 이를 통해 3,5-DCQA가 지표물질이면서 유효물질일 것으로 사료됨.

다. Anti-inflammation 효능 검색

(1) 시험목적

염증반응은 우리 몸의 감염 또는 조직의 손상을 통해 일어나게 되며, 염증성 장질환, 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 자가면역질환(autoimmune disease) 등의 원인이 됨. 이러한 반응은 macrophage, neutrophil 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, nitric oxide(NO) 등의 염증매개물질들을 분비하여 발생하게 된다고 보고되어 있음. 이에 본 실험에서는 RAW 264.7 mouse macrophage cell line을 이용하여 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 항염증효과를 측정하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용함. DMEM, FBS, Penicillin/Streptomycin, PBS, Trypsin-EDTA는 Gibco(Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였고, Lipopolysaccharides(LPS), Nitrite ion standard solution, Griess reagent, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. Mouse Interleukin 6(IL-6) Quantikine ELISA Kit, Mouse TNF- α Quantikine ELISA Kit는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였음. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공한 시료를 사용하였음.

(나) RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 실험

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 ug/mL streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였음. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.25 × 10⁵ cells/mL로 cell수를 조정 한 후, 96 well plate에 200 uL씩 seeding 하였음. 37°C incubator 에서 하루 동안 안정화 시킨 cell에 섬썩부쟁이 70% 주정추출물을 6.25~800 ug/mL을 처리하였음.

24h 후, 상등액을 제거하고 5 mg/mL stock MTT를 배지에 1/40 희석해서 넣은 후, 37°C incubator에서 1h 반응시켰음. 보라색 결정이 생기면 상등액을 제거 한 후 DMSO를 100 uL 넣고 microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였음.

(다) Nitric Oxide(NO) 측정

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 ug/mL streptomycin을 첨가하여 37°C incubator에 5% CO₂-95% air조성으로 배양하였음. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0 × 10⁶ cells/mL로 cell수를 조정 한 후, 96 well plate에 200 uL씩 seeding 하였음. 37°C incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell에 섬썩부쟁이 70% 주정추출물을 12.5, 25, 50 ug/mL 처리하였음. 과면역 유도를 위해 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 처리 1h 후, 1 ug/mL의 LPS를 처리하였음.

처리 24h 후, sodium nitrite(NaNO_2)를 표준물질로 사용하여 standard curve를 그려 이를 기준으로 상등액의 NO를 측정하였음. 측정방법은 100 μL 의 상등액에 동량의 Griess(1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_2PO_4) 시약을 섞은 후, 10분간 상온에서 반응한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(라) Pro-inflammatory cytokines($\text{TNF-}\alpha$, IL-6) 측정

RAW 264.7 세포는 DMEM 배지에 10 % FBS, 100 units/mL penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin을 첨가하여 37 $^\circ\text{C}$ incubator에 5% CO_2 -95% air 조성으로 배양하였음. Cell이 80% confluence하게 자라면 0.05% trypsin을 이용하여 세포를 떼어내고, 1.0×10^6 cells/mL로 cell수를 조정 한 후, 96 well plate에 200 μL 씩 seeding 하였음. 37 $^\circ\text{C}$ incubator에서 하루 동안 안정화 시킨 cell에 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였음. 과면역 유도를 위해 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 처리 1h 후, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하여 주었음. 각각 $\text{TNF-}\alpha$ (6h), IL-6(24h) 반응 후, 상등액에서 cytokine을 측정하였음. 측정방법은 제조사의 instruction(ELISA set, BD Biosciences, Oxnard, CA)을 참고하였음.

(3) 연구결과

(가) RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 실험 결과

섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 RAW 264.7 세포에 처리한 후 MTT assay를 진행한 결과, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 세포 사멸을 유도하는 것으로 확인되었음(Fig. 24). 이상의 결과를 바탕으로 pro-inflammatory cytokines 측정 진행시 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 처리하였음.

(나) Nitric Oxide(NO) 저해 효능 확인

RAW 264.7 세포에서 NO 발현 정도를 측정한 결과, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 NO 발현이 전혀 되지 않은 반면, LPS를 처리한 대조군의 경우 NO가 31.52 ± 2.61 μM 로 나타났음.

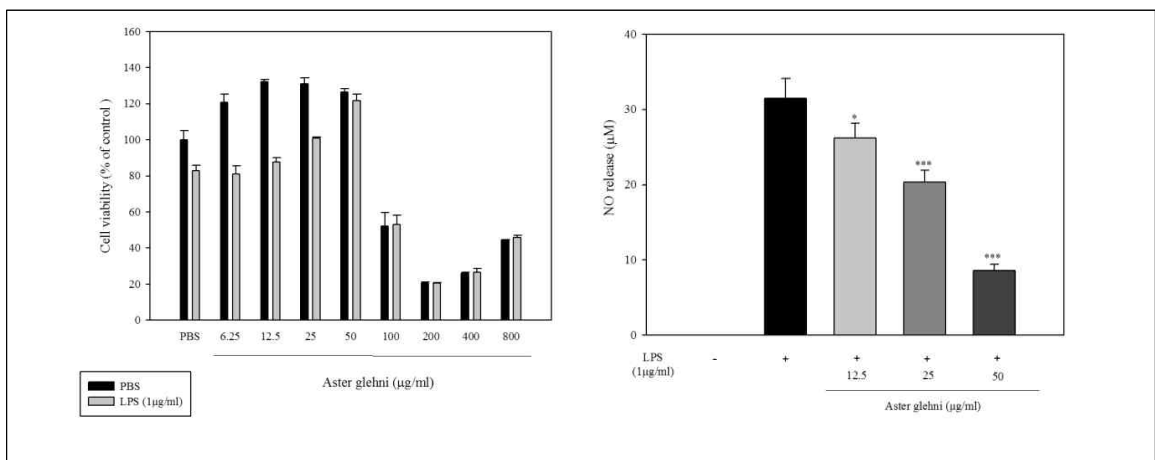


Fig. 24. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 세포독성 결과 및 NO 감소 효과

본 조건에서 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 농도별로 처리한 결과, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 12.5 ug/mL(26.24 ± 1.95 uM), 25 ug/mL(20.37 ± 1.56 uM), 50 ug/mL(8.60 ± 0.85 uM)로 NO가 농도의존적으로 감소하였으며, LPS를 처리한 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 감소하였음 (*/** : $p < 0.05/p < 0.001$ 유도군 대비)(Fig. 24).

(다) Pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-6) 감소 효과 확인

RAW 264.7 세포에서 TNF- α 발현 정도를 측정한 결과, LPS를 처리하지 않은 대조군의 경우 TNF- α 발현이 미미한 반면, LPS로 과면역을 유도한 군의 경우 TNF- α 가 4338.87 ± 19.22 pg/mL로 급증하였음.

본 조건에서 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 농도별로 처리한 결과, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 12.5 ug/mL(3741.00 ± 121.20 pg/mL), 25 ug/mL(3671.59 ± 324.53 pg/mL), 50 ug/mL(3270.03 ± 88.80 pg/mL)로 TNF- α 가 농도의존적으로 감소하였으며, LPS를 처리한 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 감소함이 확인되었음 (**/** : $p < 0.01/p < 0.001$ 유도군 대비)(Fig. 25).

면역 반응 시 증가하는 인자 중 하나인 IL-6 발현 정도를 측정한 결과에서도 TNF- α 와 같이 섬쭉부쟁이 추출물에 의해 농도의존적이며 통계적으로 유의한 감소 효과를 확인하였음(Fig. 25). RAW 264.7 세포에 LPS를 처리한 대조군의 IL-6가 2739.65 ± 65.92 pg/mL로 측정될 때, 섬쭉부쟁이 추출물 12.5 ug/mL(2639.95 ± 119.67 pg/mL), 25 ug/mL(2427.17 ± 32.26 pg/mL), 50 ug/mL(2148.32 ± 125.44 pg/mL)로 나타났음 (**/** : $p < 0.01/p < 0.001$ 유도군 대비).

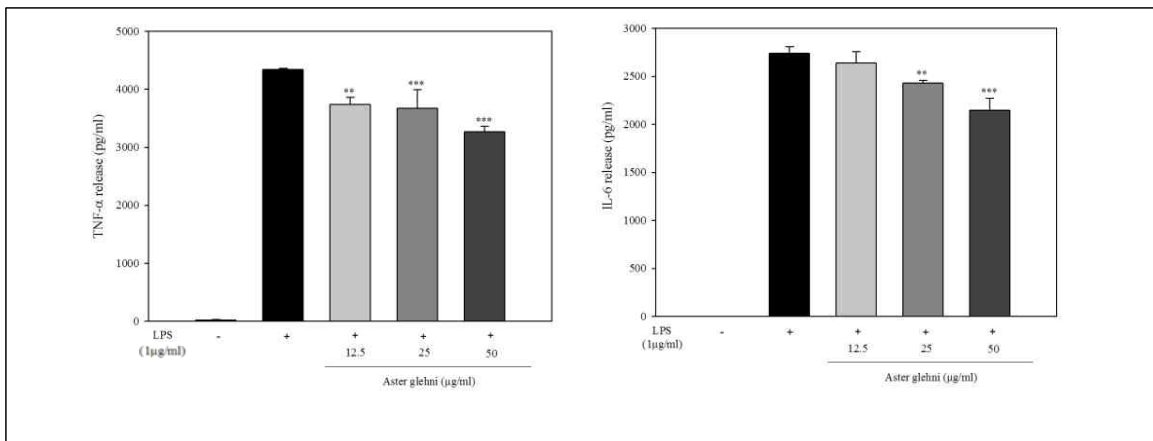


Fig. 25. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 TNF- α 감소 효과 및 IL-6 감소 효과

2. 심썩부쟁이 70% 추정추출물의 고요산혈증 동물모델 효능 확인 및 기전연구

가. 추출조건별 심썩부쟁이 추출물의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 I [고려대]

(1) 시험목적

Potassium oxonate(PO)는 요산 분해 효소를 억제하여 혈중 요산농도를 높이는 역할을 함. 이러한 PO를 복강주사하여 고요산혈증 모델을 유도한 후, 추출조건이 다른 심썩부쟁이 추출물을 경구투여하여 혈중 요산 농도가 저하되는지를 평가하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Potassium oxonate(PO)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 심썩부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음. 생화학 분석은 Fuji Dri-chem 4000i(Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였음.

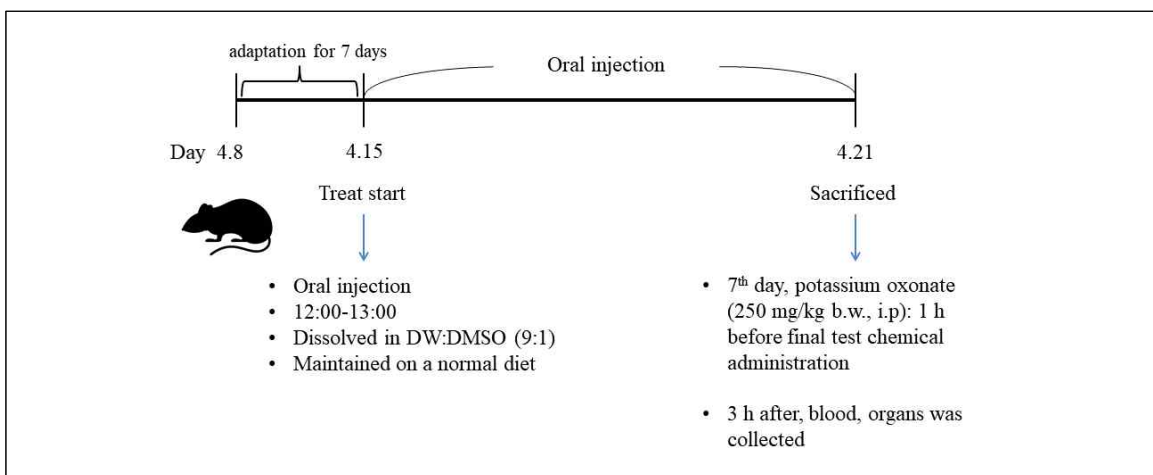
(나) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 코아텍(Peongtak, Korea)에서 분양받은 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat 을 사용하였음. 시험동물은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 12h 조명 주기 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였음. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험 연구윤리위원회의 승인(KUIACUC-2015-248) 하에 수행됨.

(3) 시험진행

(가) 시험방법

적응기간을 거친 rat에 경구투여를 통해 각각의 시료(열수, 50% 추정추출, 70% 추정추출)를 농도별(50, 100, 200 mg/kg)로 1일 1회, 7일간 반복 투여하였음. allopurinol(50 mg/kg)은 xanthine oxidase(잔틴산화효소) 저해제로 알려진 물질로, 양성대조군으로 사용되었음.



투여 마지막 날인 7일째에는 복강주사로 PO(250 mg/kg)를 투여하여 고요산혈증을 유도한 다음 1h 후에 시료를 투여하였으며 경구투여 3h 후 동물을 이소플루란 (Terrell, USA)으로 흡입 마취하여 심장에서부터 혈액을 채취하였음. 채취한 혈액은

10,000 × g, 20분간 원심분리하여 얻은 상층의 혈청을 혈액분석에 사용하였음. 혈청은 분석 시까지 -80℃에 보관하였고 간 조직 분석을 위하여, 간을 적출한 후, 분석 시까지 -80℃에 보관하였음. 일정 간격으로 몸무게를 측정하여 체중 변화를 관찰하였음.

혈중 요산 감소 효과를 확인하기 위한 UA(uric acid)와 간독성 여부를 판단하기 위한 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase) 및 염증수치와 관련된 CRP(C-reactive protein) 함량은 Fuji Dri-chem 4000i(Fuji, Japan)를 이용하여 측정함. 이 방법은 Fuji Dri-chem 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 측정하면 측정기에 내장된 프로그램내의 공식에 의해 자동으로 계산되어 각각의 혈중 함량을 mg/dl로 표시하는 방식임. 또한 적출한 간 조직을 10% formalin 용액에 고정한 후, 파라핀 블록을 제작함. 파라핀 블록을 마이크로톰을 이용하여 절단하여 5 um 조직절편을 만든 후 H&E(Hematoxylin-Eosin) 염색을 하고, 현미경을 이용하여 200배 확대하여 조직의 모양을 관찰함.

(나) 통계처리

본 연구의 모든 측정값은 평균값(mean)과 표준편차(SEM)로 나타내었고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS 12.0 package program software를 이용하여 one-way ANOVA(Tukey's test)로 검증하였음.

(4) 연구결과

(가) 체중변화 확인

모든 시험동물에 대한 체중변화를 측정하여 시료에 의한 부작용 여부를 판단한 결과를 Table 17에 나타내었음. 각 군간 체중변화를 통계 처리한 결과, 유의한 체중 변화 차이는 나타나지 않았음.

Table 17. 고요산혈증 모델 동물시험 체중 변화

시료		0 day (g)	7 day (g)
DW		232.00 ± 5.76	266.83 ± 10.68
DW + PO(250 mg/kg)		237.33 ± 6.41	279.67 ± 9.75
Allopurinol	50 mg/kg + PO	239.33 ± 10.69	276.50 ± 13.20
열수추출물	50 mg/kg + PO	235.17 ± 7.08	278.00 ± 9.76
	100 mg/kg + PO	236.50 ± 8.67	275.83 ± 12.73
	200 mg/kg + PO	236.33 ± 6.77	272.00 ± 10.37
50% 주정추출물	50 mg/kg + PO	239.00 ± 6.75	279.67 ± 9.14
	100 mg/kg + PO	239.00 ± 5.76	278.17 ± 6.49
	200 mg/kg + PO	237.67 ± 10.09	276.00 ± 15.89

70% 주정추출물	50 mg/kg + PO	233.17 ± 2.56	271.50 ± 5.36
	100 mg/kg + PO	237.17 ± 6.77	274.67 ± 9.83
	200 mg/kg + PO	232.83 ± 6.27	263.33 ± 6.28

(나) 간독성 확인

동물의 체중 변화 외에도 섬쑥부쟁이가 간독성을 유발하는지 확인하기 위해, 혈청 내 GOT와 GPT 수치도 측정하였음. GOT란 생체의 여러 가지 장기에 존재하는 효소로 주요 기능은 아미노산을 형성하는 것으로 정상 상태에서도 세포 내에서 GOT가 소량 유출되지만 장기의 세포가 파괴될 경우 다량으로 혈중에 유출되는 특징을 가짐. 특히 심장, 간, 골격근, 신장, 적혈구에 높은 농도로 존재하는 효소로서 심근 경색, 용혈 등을 진단하는데 이용함.

GPT도 GOT와 마찬가지로 주 기능은 아미노산 생성으로 GPT의 양은 GOT에 비해 소량 존재하나, GOT에 비해서 GPT는 특히 간에 많이 함유되어 있기 때문에 간기능 검사에 더욱 특화된 지표라고 할 수 있음. GOT와 GPT를 분석한 결과, 섬쑥부쟁이 추출물을 투여한 군은 음성대조군(DW만 투여한 군)과 통계적으로 유의한 평균 차이가 나지 않았음(Table 18). 그러므로 섬쑥부쟁이 추출물은 200 mg/kg내에서는 간독성을 유발하지 않음을 알 수 있었음. 염증 반응과 관련되어 염증이 유발될 경우 급증하는 CRP의 경우는 특별히 증가한 그룹은 확인되지 않았음. 따라서 사용한 농도 범위내의 섬쑥부쟁이 추출물은 염증유발과 같은 독성을 나타내지 않는 것으로 판단됨.

Table 18. 고요산혈증 모델 동물시험 혈액 생화학적 분석

시료		GOT (mg/dl)	GPT (mg/dl)	CRP (mg/L)
DW		81.2 ± 18.60	30.4 ± 5.32	<0.3
DW + PO(250 mg/kg)		97.0 ± 25.96	32.6 ± 5.41	<0.3
Allopurinol	50 mg/kg + PO	91.2 ± 17.02	28.0 ± 6.86	<0.3
열수추출물	50 mg/kg + PO	101.8 ± 12.85	29.8 ± 2.29	<0.3
	100 mg/kg + PO	93.6 ± 5.73	31.6 ± 1.95	<0.3
	200 mg/kg + PO	92.2 ± 12.06	30.0 ± 4.05	<0.3
50% 주정추출물	50 mg/kg + PO	100.4 ± 32.56	31.4 ± 5.18	<0.3
	100 mg/kg + PO	85.0 ± 15.38	34.4 ± 6.66	<0.3
	200 mg/kg + PO	126.0 ± 36.33	35.8 ± 8.96	<0.3
70% 주정추출물	50 mg/kg + PO	100.2 ± 13.48	33.8 ± 5.40	<0.3
	100 mg/kg + PO	99.2 ± 5.89	33.0 ± 1.41	<0.3
	200 mg/kg + PO	95.0 ± 15.20	34.0 ± 6.82	<0.3

혈액 생화학적 분석 외에도, 포르말린에 고정한 간 조직을 H&E 염색한 결과, 섬쭉부쟁이 추출물을 투여한 실험군에서 간손상이 관찰되지 않았으므로, 섬쭉부쟁이는 간독성 및 간손상에 영향을 미치지 않음을 확인하였음(Fig. 26).

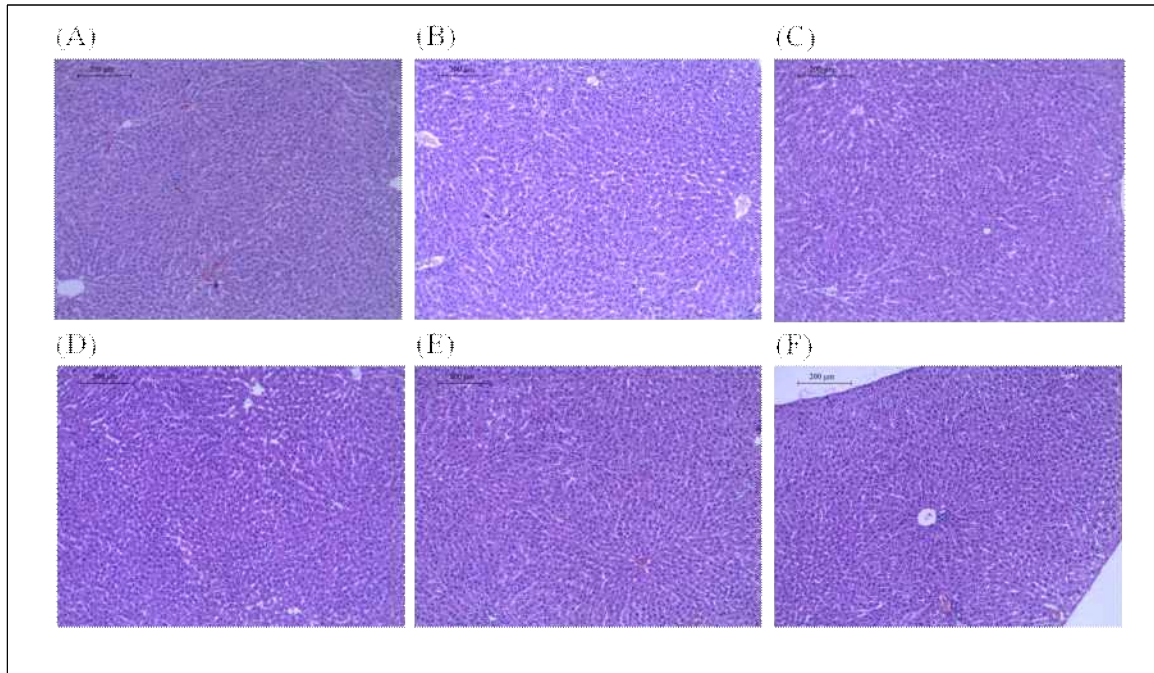


Fig. 26. 간조직의 H&E staining 결과. (A) 정상군, (B) PO를 투여한 군, (C) Allopurinol 50 mg/kg와 PO를 투여한 군, (D) 섬쭉부쟁이 50 mg/kg와 PO를 투여한 군, (E) 섬쭉부쟁이 100 mg/kg와 PO를 투여한 군, (F) 섬쭉부쟁이 200 mg/kg와 PO를 투여한 군

(다) 혈중 요산 감소 효과 확인

고요산혈증 모델 동물에 섬쭉부쟁이 추출물을 투여한 후의 혈중 요산 함량을 측정 한 결과를 보면 PO를 투여하지 않은 군(2.02 ± 0.64 mg/dl)에 비해 PO를 투여한 군(3.42 ± 0.37 mg/dl) 혈청에서 요산 농도가 유의하게 증가하였음(Fig. 27). 양성 대조군으로 사용된 allopurinol과 PO를 처리한 군에서는 혈청 요산 농도가 크게 감소하였으며(0.44 ± 0.05 mg/dl), 섬쭉부쟁이 추출물을 투여한 군에서도 감소를 보임.

섬쭉부쟁이 열수추출물을 투여한 실험군의 경우, 혈중 요산 농도가 50 mg/kg을 투여한 경우 2.48 ± 0.33 mg/dl, 100 mg/kg을 투여한 경우 1.88 ± 0.51 mg/dl, 200 mg/kg을 투여한 경우 2.16 ± 0.30 mg/dl로 세 가지 추출방법 (열수, 50% 주정추출, 70% 주정추출) 중 혈중 요산 농도가 가장 정상대조군과 유사한 함량을 보임. 50% 주정추출물을 투여한 실험군의 혈중 요산 농도는 50 mg/kg을 투여한 경우 2.14 ± 0.55 mg/dl, 100 mg/kg을 투여한 경우 2.54 ± 0.39 mg/dl, 200 mg/kg을 투여한 경우 3.00 ± 0.70 mg/dl를 나타냄. 70% 주정추출물을 투여한 실험군의 혈중 요산 농도는 50 mg/kg을 투여한 경우 2.08 ± 0.26 mg/dl, 100 mg/kg을 투여한 경우 2.52 ± 0.55 mg/dl, 200 mg/kg을 투여한 경우 2.48 ± 0.54 mg/dl를 나타내었음.

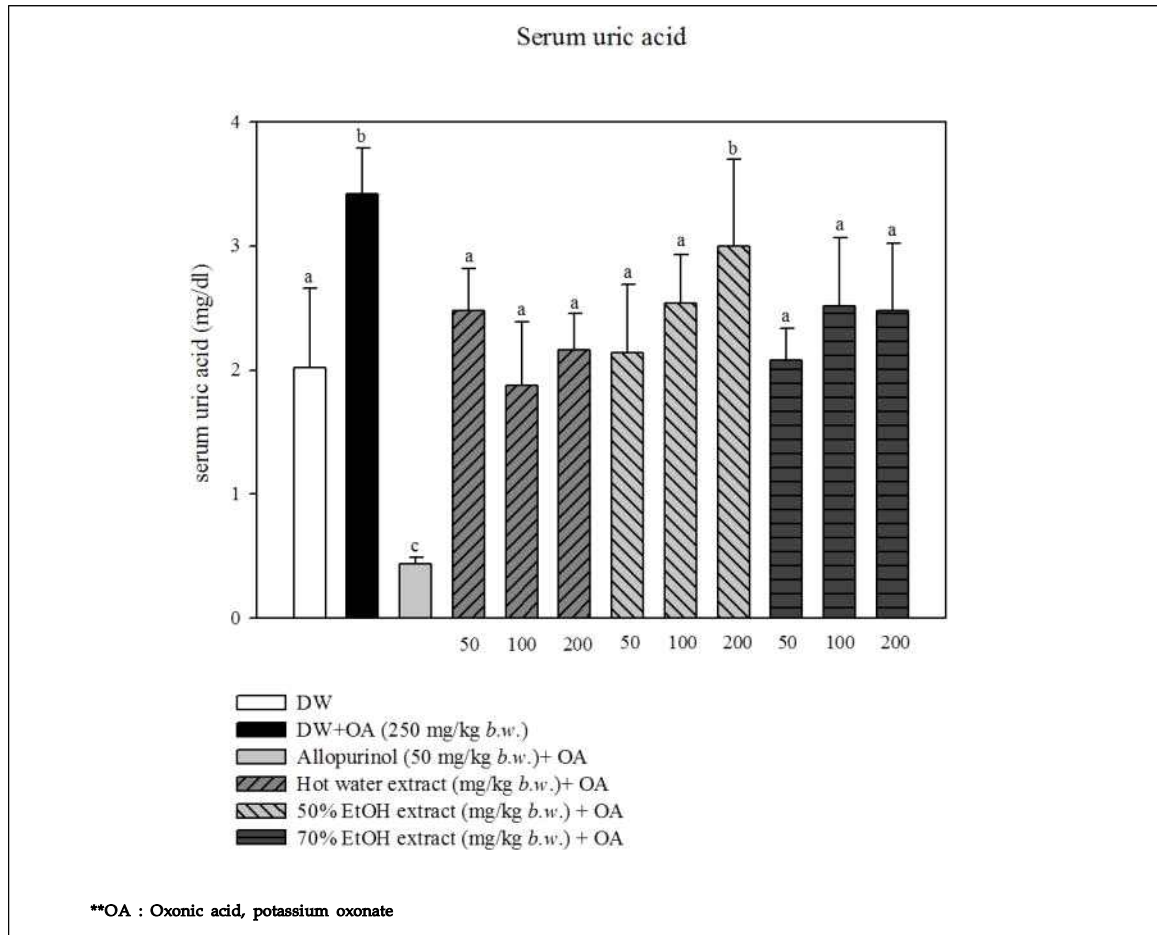


Fig. 27. 고요산혈증 모델 동물시험에서 혈중 요산 농도

- ▶ 심각한 부작용에 대한 사례가 많은 양성대조군인 Allopurinol의 경우, 체내에 필요한 요산까지 감소시키는 것이 부작용의 문제가 아닌지 의심할 수 있으며, 해당 실험의 결과로 보았을 때 혈중 요산을 체외로 많이 배출하는 것보다 정상수준으로 유지할 수 있도록 하는 방법이 더욱 효과적일 것으로 사료됨.
- ▶ 열수추출물의 효능이 가장 높은 것으로 나타났으나 1차년도 연구수행 중 SK 바이오랜드(주)에서 진행하는 추출 조건 최적화 실험에서 “열수추출물”은 대량생산 시 건조가 되지 않는 문제점과 지표물질인 3,5-DCQA의 함량이 다른 추출물에 비해 낮게 나오는 문제점이 있었음. 효율성을 검토하기 위해 열수추출물과 70% 주정추출물 비교실험을 진행하였음.

나. 추출조건별 섬썩부쟁이 추출물의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 II

(1) 시험목적

섬썩부쟁이 열수추출물(AG-D004)과 70% 주정추출물(AG-D011)을 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 Sprague-Dawley rat에 경구투여한 후 혈중 요산 농도를 시간별로 측정하여 각각의 시료에 의한 요산 농도 감소 효능을 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Potassium oxonate(PO), xanthine는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 섬썩부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음. Ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea)제품을 사용하였음. Hydrochloric acid solution, potassium allantoxanate, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, BCA protein assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA)제품을 사용하였음. 생화학 분석은 Fuji Dri-chem 3000(Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat을 입수하여 온도 23 ± 3℃, 상대습도 55 ± 15%로 설정한 설치류 사육구역(우정바이오)에서 1주일간 순화 후 시험을 실시하였고, 사료와 음수는 자유 섭취하게 하였음.

(다) 시험군 구성

군	동물수 (마리)	동물번호	통풍 유발여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1	6	1-6	N	부형제	-	2
G2	6	7-12	Y	부형제	-	2
G3	6	13-18	Y	Allopurinol	50	2
G4	6	19-24	Y	AG-D011	100	2
G5	6	25-30	Y	AG-D011	300	2
G6	6	31-36	Y	AG-D011	500	2
G7	6	37-42	Y	AG-D004	100	2
G8	6	43-48	Y	AG-D004	300	2
G9	6	49-54	Y	AG-D004	500	2

G1: 정상대조군, G2: 유발대조군, G3: 양성대조군, G4-G6: 섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D011), G7-G9: 섬썩부쟁이 열수추출물(AG-D004)

(3) 시험진행

(가) 시험방법

시험물질은 1일 1회로 7일간 반복 투여하였고 양성대조물질은 마지막 시험물질 투여일에 단회 경구 투여하였음. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. 투여방법은 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존데를 장착한 주사관

을 이용하여 위내에 직접 투여하였음. 마지막 시험물질 투여일에 모든 동물에 대하여 투여 전 채혈(0h)을 실시한 다음, 모든 유발 해당군에 potassium oxonate를 250 mg/kg 복강 투여하여 고요산혈증을 유발함. 유발물질 투여 후 1, 2, 3 및 4h째에 안와채혈 방법으로 채혈한 다음 부검을 진행하여 신장 및 간을 적출하였음.

(나) Hepatic xanthine oxidase(XO) activity 측정

Rat의 간을 80 mM sodium phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 파쇄하여 enzyme을 extract하였음. 1 mM potassium allantoxanate가 포함된 50 mM phosphate buffer (pH7.5) 800 uL에 enzyme extract 25 uL를 넣고 37°C에서 15분 동안 incubation 진행하였음. 그 다음 250 uM xanthine을 175 uL 넣고 37°C에서 30분 동안 incubation 하였음. 0.6 M HCl 75 uL을 넣어 반응을 정지시킨 다음 RT, 3000 x g로 5분 동안 원심분리하고 상층액 200 uL를 96 well UV plate에 담아 295 nm에서 흡광도를 측정하였음. XO의 specific activity는 unit/mg protein으로 나타내며, 1 unit/mg protein은 1 mg protein의 XO가 1분 동안 xanthine을 uric acid로 1 uM 전환시킴을 의미함.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 이용하며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 체중 및 조직 무게

시험물질 투여 전과 투여 기간 동안의 체중 및 조직 무게 측정 결과, 모든 시험군 간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않음.

(나) 추출조건별 혈중 요산 감소 효능 검토

혈액 생화학적 분석 결과, 시험물질 투여 전(0h)과 유발물질 투여 후 1, 2h째 유발 대조군(G2)의 요산 수준은 정상대조군(G1) 대비 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났다.

유발물질 투여 후 3h째에 유발대조군(G2)의 요산 농도 수준은 정상대조군(G1)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p < 0.001$), 양성대조군(G3)은 유발대조군 (G2) 대비 유의하게 낮은 것으로 나타났음 ($p < 0.001$). 다른 군에서는 미미하게 요산이 감소하는 것으로 나타났음.

유발물질 투여 후 4h째에도 유발대조군(G2)의 요산 농도 수준은 정상대조군(G1)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 ($p < 0.05$), 양성대조군(G3)은 유발대조군 (G2) 대비 유의하게 낮은 것으로 나타났음 ($p < 0.001$). 또한 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 100 mg/kg과 섬썩부쟁이 열수추출물 500 mg/kg의 요산 농도 수준이 유발대조군(G2)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났음 ($p < 0.05$)(Fig. 28).

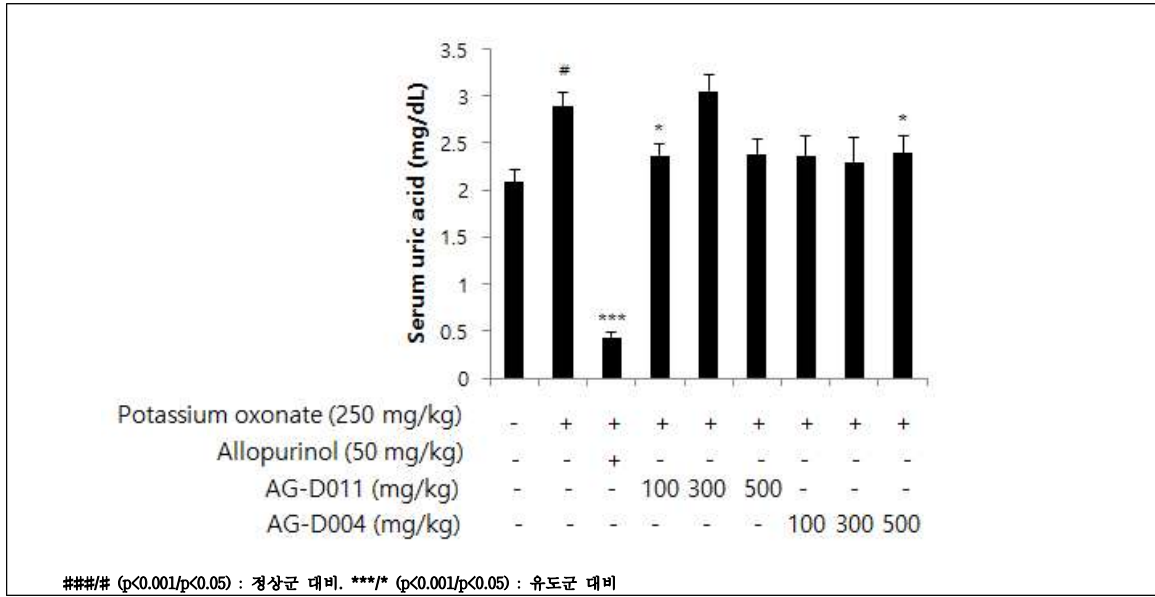


Fig. 28. 고요산혈증 모델 동물시험에서의 혈중 요산 농도(4h)

(다) Hepatic xanthine oxidase(XO) 저해 효능 측정

정상대조군의 liver protein 1 mg은 1분 동안 xanthine을 uric acid로 1.16 uM 전환시켰고 유발대조군은 2.04 uM 전환시켰음. PO에 의해 약 75% XO의 활성이 유도되었음 (P<0.01).

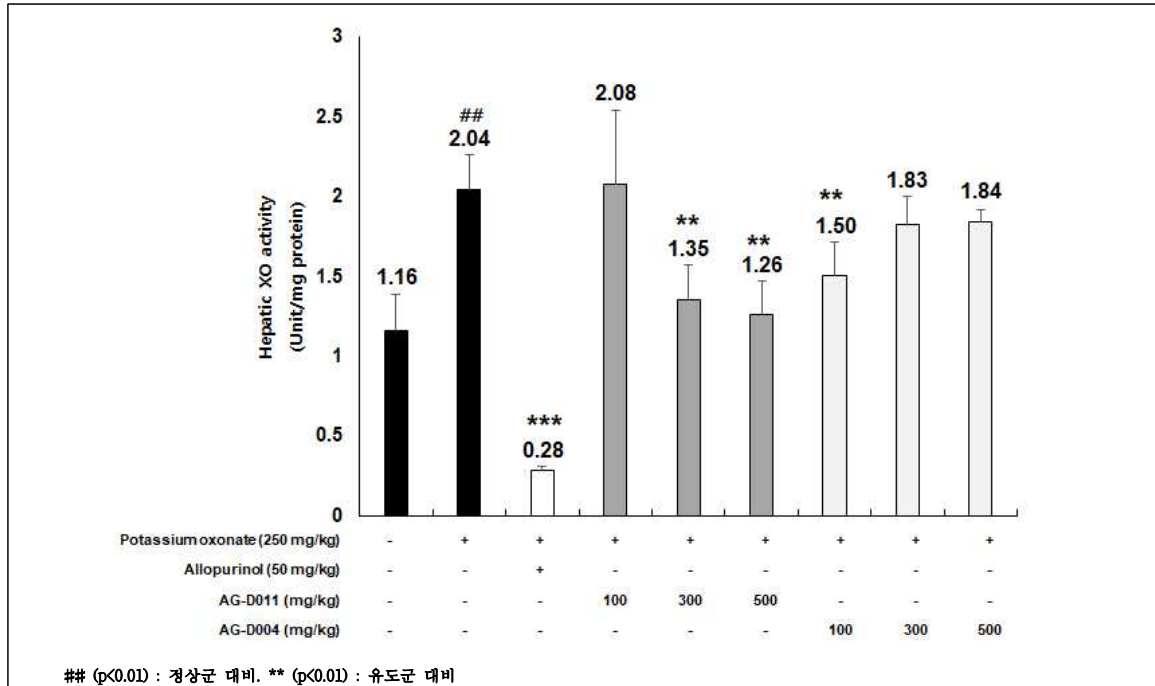


Fig. 29. 섬썩부쟁이 열수추출물(AG-D004)과 70% 주정추출물(AG-D011)의 hepatic XO 저해효능

70% 주정추출물(AG-D011) 100, 300 및 500 mg/kg 투여군의 liver protein 1 mg은 1분 동안 xanthine을 uric acid로 각각 2.08, 1.35, 1.26 uM 전환시켰고, 열수추출물(AG-D004) 100, 300 및 500 mg/kg 투여군의 liver protein 1mg은 1분 동안 xanthine을 uric acid로 각각 1.50, 1.83, 1.84 uM 전환시켰음. 열수추출물에 비해 70% 주정추출물은 농도의존적 XO 저해 효능을 확인할 수 있었으며, 70% 주정추출물 300, 500 mg/kg에서 유발대조군 대비 각각 약 33, 38%로 그 효능이 확인되었음 (P<0.01). 이를 통해 XO 저해 효능에서도 열수추출물보다는 70% 주정추출물이 더 우수한 효능이 있는 것으로 확인됨.

- ▶ 열수추출물과 70% 주정추출물 비교실험을 진행한 결과, 70% 주정추출물에서 상대적으로 더 효과가 있는 것으로 판단되어, 70% 주정추출물로만 재확인시험을 진행하였음.

다. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 III

(1) 시험목적

이전 실험을 토대로 섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D011)을 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 Sprague-Dawley rat에 경구투여한 후 혈중 요산 농도를 시간별로 측정하여 시료에 의한 요산 농도 감소 효능을 재검정하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Potassium oxonate(PO), xanthine는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 섬썩부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음. Ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea)제품을 사용하였음. Hydrochloric acid solution, potassium allantoxanate, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, BCA protein assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA)제품을 사용하였음. 생화학 분석은 Fuji Dri-chem 3000(Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat을 입수하여 온도 23 ± 3℃, 상대습도 55 ± 15%로 설정한 설치류 사육구역(우정바이오)에서 1주일간 순화 후 시험을 실시하였고, 사료와 음수는 자유 섭취하게 하였음.

(다) 시험군 구성

군	동물수 (마리)	동물번호	통풍 유발여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1	8	1-8	N	부형제	-	2
G2	10	9-16, 49-50	Y	부형제	-	2
G3	8	17-24	Y	Allopurinol	50	2
G4	8	25-32	Y	AG-D011	100	2
G5	8	33-40	Y	AG-D011	300	2
G6	8	41-48	Y	AG-D011	500	2

G1: 정상대조군, G2: 유발대조군, G3: 양성대조군, G4-G6: 섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D011)

(3) 시험진행

(가) 시험방법

시험물질은 1일 1회 7일간 반복 투여하였고 양성대조물질은 마지막 시험물질 투여일에 단회 경구투여 하였음. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. 투여방법은 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존데를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였음. 마지막 시험물질 투여일에 모든 동물에 대하여 투여 전 채혈(0h)을 실시한 다음, 모든 유발 해당군에 potassium oxonate를 250

mg/kg 복강 투여하여 고요산혈증을 유발함. 유발물질 투여 후 2, 3, 4h째에 안와채혈 방법으로 채혈한 다음 부검을 진행하여 간, 신장을 적출하였음.

(나) Hepatic xanthine oxidase(XO) activity 측정

Rat의 간을 80 mM sodium phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 파쇄하여 enzyme을 extract하였음. 1 mM potassium allantoxanate가 포함된 50 mM phosphate buffer (pH7.5) 800 uL에 enzyme extract 25 uL를 넣고 37°C에서 15분 동안 incubation 진행하였음. 그 다음 250 uM xanthine을 175 uL 넣고 37°C에서 30분 동안 incubation 하였음. 0.6 M HCl 75 uL을 넣어 반응을 정지시킨 다음 RT, 3000 x g로 5분 동안 원심분리하고 상층액 200 uL를 96 well UV plate에 담아 295 nm에서 흡광도를 측정하였음. XO의 specific activity는 unit/mg protein으로 나타내며, 1 unit/mg protein은 1 mg protein의 XO가 1분 동안 xanthine을 uric acid로 1 uM 전환시킴을 의미함.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 이용하며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 체중 및 조직 무게

시험물질 투여 전과 투여 기간 동안의 체중 측정 결과, 모든 시험군간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않음.

(나) 혈중 요산 감소 관련 효능 검토

혈액 생화학적 분석 결과, 시험물질 투여 전(0h) 모든 군의 혈중 요산 수준은 큰 차이를 나타내지 않았음.

유발물질 투여 후 2, 3, 4h째의 유발대조군은 정상대조군 대비 유의하게 높은 혈중 요산 농도를 나타내는데 비해, 양성대조군은 유발대조군 대비 유의적으로 감소한 것으로 확인되었음.

섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D011) 100 mg/kg 투여군은 3h째에서만 유의적 감소 효과를 확인할 수 있었고 500 mg/kg 투여군은 유발 후 모든 채혈 시료에서 유의적 감소 효과를 확인할 수 있었음. 또한, 유발 후 4h째에는 섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D011)에 의해 농도의존적 혈중 요산 감소 효과가 확인됨. 결론적으로 본 시험 조건하에서 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 500 mg/kg 투여 시 우수한 요산 생성 억제 및 배출 촉진 효력이 있는 것으로 사료됨.

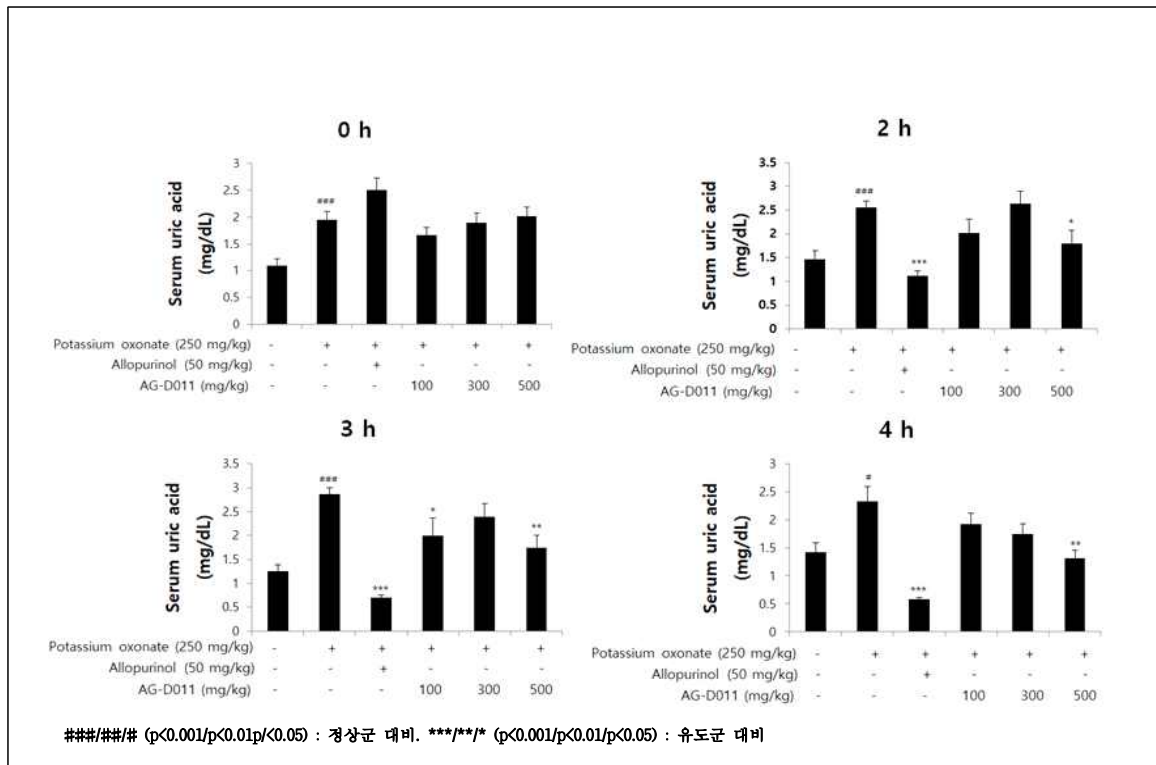


Fig. 30. 고요산혈증 모델 동물시험에서 시간별 혈중 요산 농도

(다) Hepatic xanthine oxidase(XO) 저해 효능 측정

Potassium oxonate(PO)로 활성화 된 hepatic XO가 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 (AG-D011)에 의해 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 모든 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 처리 농도에서 통계적 유의한 결과를 나타냈으며 특히, 100 mg/kg 투여군은 정상대조군 수준으로 감소된 것으로 나타남. 이를 통해 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 hepatic XO의 활성을 억제시켜 혈중 요산 감소에 도움을 줄 것으로 사료됨.

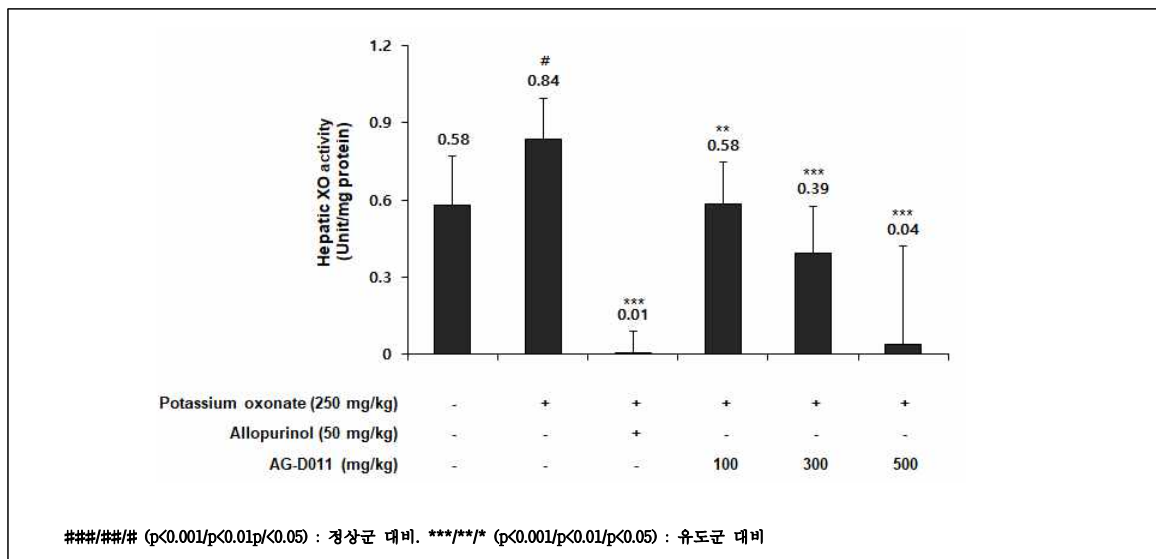


Fig. 31. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 (AG-D011)의 hepatic XO 활성 억제 효과

- ▶ 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 재확인 시험결과, 혈중 요산 감소 시험에서는 500 mg/kg에서 통계적으로 유의한 효과가 있는 것으로 확인되었으며, hepatic xanthine oxidase 저해 효능 시험에서는 농도의존적으로 xanthine oxidase의 활성이 저해되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 섬썩부쟁이 70% 주정추출물이 혈중 요산 감소 및 간 내의 xanthine oxidase 활성을 저해함으로써 통풍을 예방할 수 있는 근거를 마련한 것으로 사료됨.
- ▶ 위의 시험 이후, 지표물질로 선정된 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)도 혈중 요산 감소의 효능이 있는 지 확인하기 위해 3,5-DCQA를 포함한 동물실험을 진행함.

라. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 IV

(1) 시험목적

섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D013)과 지표물질로 선정된 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)를 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 Sprague-Dawley rat에 경구투여한 후 혈중 요산 농도를 시간별로 측정하여 대량 생산한 70% 주정추출물 및 지표성분의 효능을 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Potassium oxonate(PO), xanthine는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)는 MCE(Medchem Express, NJ, USA)에서 구매하였음. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음. Ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea)제품을 사용하였음. Hydrochloric acid solution, potassium allantoxanate, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, BCA protein assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA)제품을 사용하였음. 생화학 분석은 Fuji Dri-chem 3000(Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat을 입수하여 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%로 설정한 설치류 사육구역(우정바이오)에서 1주일간 순화 후 시험을 실시하였고, 사료와 음수는 자유 섭취하게 하였음.

(다) 시험군 구성

군	동물수 (마리)	동물번호	통풍 유발여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1	3	1-3	N	부형제	-	2
G2	3	4-6	Y	부형제	-	2
G3	3	7-9	Y	Allopurinol	50	2
G4	3	10-12	Y	AG-D013	100	2
G5	3	13-15	Y	AG-D013	300	2
G6	3	16-18	Y	AG-D013	500	2
G7	3	19-21	Y	3,5-DCQA	1	2
G8	3	22-24	Y	3,5-DCQA	5	2

G1: 정상대조군, G2: 유발대조군, G3: 양성대조군, G4-G6: 섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D013), G7-G8: 3,5-DCQA

(3) 시험진행

(가) 시험방법

시험물질은 1일 1회로 7일간 반복 투여하였고 양성대조물질은 마지막 시험물질 투여일에 단회 경구 투여하였음. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. 투여방법은 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존테를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였음. 마지막 시험물질 투여일에 모든 동물에 대하여 투여 전 채혈(0h)을 실시한 다음, 모든 유발 해당군에 potassium oxonate를 250 mg/kg 복강 투여하여 고요산혈증을 유발하였음. 또한 유발물질 투여 후 1, 2, 3h째에 안와채혈 방법으로 채혈하였음.

(나) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 이용하며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 혈중 요산 감소 관련 효능 검토

혈액 생화학적 분석 결과, 시험물질 투여 전(0h) 모든 군의 혈중 요산 수준은 큰 차이를 나타내지 않았음. 유발물질 투여 후 1, 2h째에는 정상대조군에 비하여 유발대조군에서 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 양성대조군인 Allopurinol 50 mg/kg 투여군은 2, 3h째에 유의적인 감소를 보였음 ($p < 0.05$).

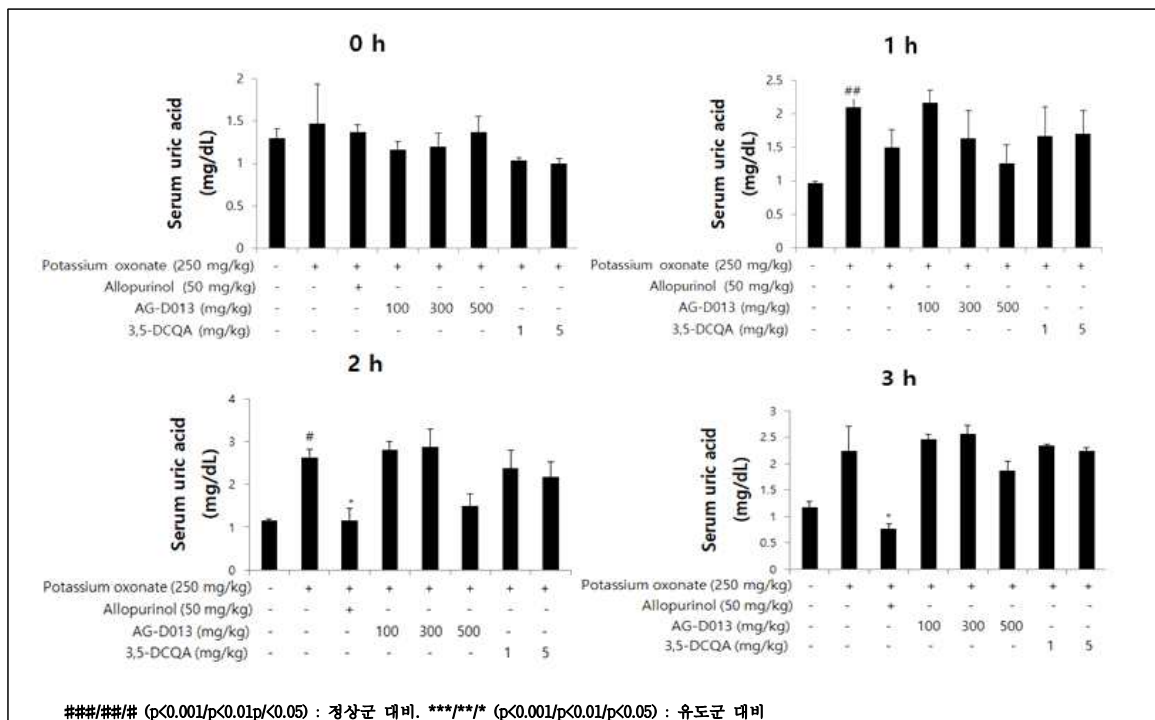


Fig. 32. 고요산혈증 모델 동물시험에서 시간별 혈중 요산 농도

유발대조군이 통계적 유의차가 확인 된 1, 2h째의 요산 수치를 분석해 보면, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물(AG-D013)는 1h째에 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 2h째에는 500 mg/kg 투여군의 요산 수치가 유의적이지는 않지만 정상대조군 수치와 유사하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 지표물질인 3,5-DCQA의 경우, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 500 mg/kg에는 못 미치지만 2h째에서 농도의존적으로 감소함을 확인함.

마. 요산 수송체와 혈중 요산 조절 기전 연구

(1) 시험목적

요산의 농도 균형 조절 기전에 관여하는 신장 근위세뇨관 내막의 요산 수송체(uric acid transporters)에는 요산의 배설을 주로 담당을 하는 OAT1(organic anion transporter 1)과 근위세뇨관에서 혈류로 요산을 재흡수 시키는 GLUT9(facilitated glucose transporter member 9)이 있음¹⁾. 이에 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 혈중 요산의 농도 균형에 요산의 수송체가 어떠한 상관관계를 나타내는지를 확인해 보고자 PO를 처리하여 고요산혈증을 유발시킨 rat에 양성대조물질인 allopurinol과 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 투여하여 실험을 진행함.

(2) 재료 및 방법

Rat의 신장 1 g당 RIPA lysis buffer를 5 mL 넣어주고 homogenizer로 파쇄하여 단백질을 추출하고, SDS-PAGE gel을 이용하여 GLUT9, OAT1의 발현을 확인함.

항체는 Santa cruz biotechnology의 mouse monoclonal β -actin(Santa Cruz, CA, USA), abcam의 rabbit polyclonal GLUT9, OAT1(Cambridge, MA, UK) 제품을 구매하여 사용하였음. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음.

(3) 연구결과

Rat의 신장에서 근위세뇨관 수송체 OAT1, GLUT9의 발현양을 확인 해 본 결과 유발대조군에서는 정상대조군에 비해 OAT1의 발현양이 감소한 반면, GLUT9 발현양이 증가한 것으로 확인 되었고, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 투여한 시험군에서는 혈류로 요산을 재흡수 시키는 GLUT9 수송체의 발현이 정상대조군, 유발대조군 및 allopurinol을 처리한 양성대조군에 비하여 현저하게 감소된 것으로 나타났음(Fig 33).

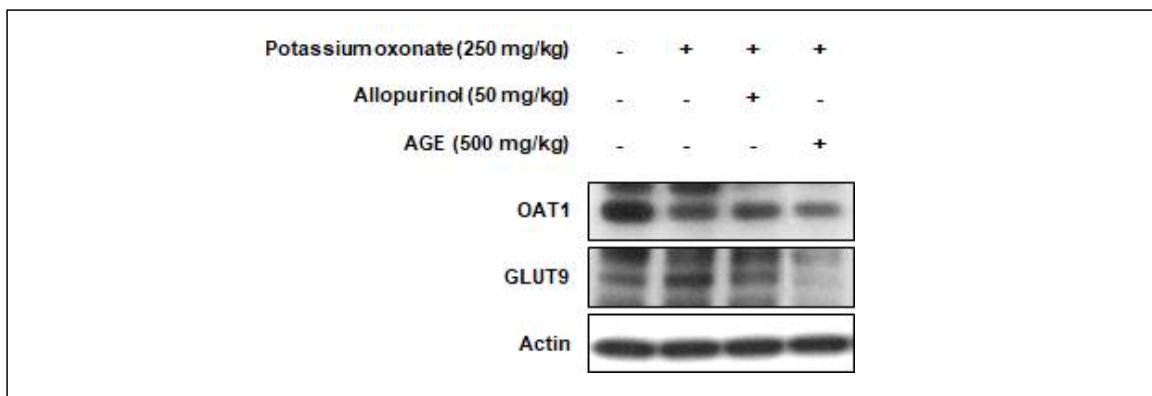


Fig. 33. 고요산혈증 모델 동물시험에서 신장 내 요산 수송체 발현양 OR 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 혈중 요산 감소 기전 확인

앞의 시험 결과를 바탕으로 Fig. 34와 같이 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 요산 농도 조절 기전을 모식도로 나타냈음. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물이 잔틴산화효소를 저해

1) The extract of *Aster glehni* leaves rich in caffeoylquinic acids prevents atherogenic index, oxidative stress, and body weight increase in high-fat diet-induced rats. *Kor J Pharmacogn.* Kim MH, Nugroho A, Choi J, Park HJ. 2011

하여 요산의 합성을 감소시키고 또한, 요산 수송체 중 GLUT9의 발현을 특이적으로 차단시킴으로써 혈액 내 요산의 재흡수를 억제시키는 기전을 통해 고요산혈증을 효과적으로 치료할 수 있을 것이라 사료됨.

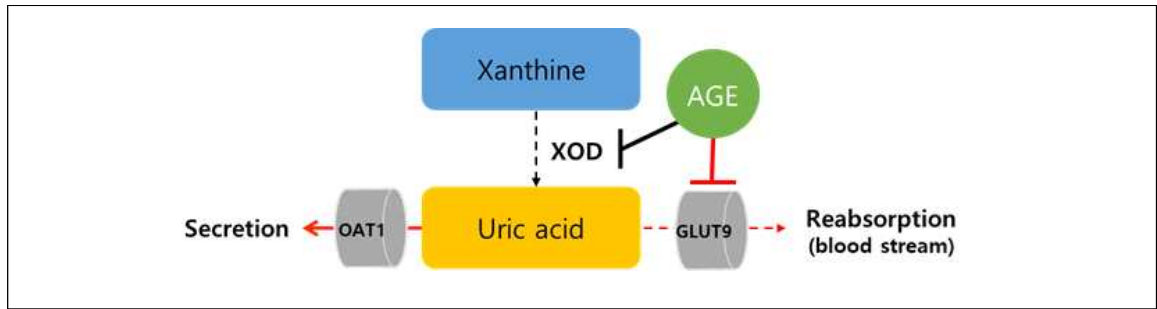


Fig. 34. 고요산혈증에서 섬쑥부쟁이 추출물의 요산 억제 기전

4절 인체적용시험 제품의 표준화

1. 인체적용시험 원료 준비

가. Pilot 제조실험 및 인체적용시험 원료 준비

(1) Pilot 제조공정 및 제조규격(생산2회 및 임상시료용 원료 생산)

공정	내용	수율(%)	3,5-DCQA 함량(%)
원료투입	분쇄한 잎 25kg을 투입	100	0.15
↓			
추출	70% 주정 500L 투입 후, 80℃ 6시간 추출	19	0.54
↓			
여과	퍼라이트 여과	17	0.53
↓			
농축	여과액을 15Brix로 농축	16	0.50
↓			
부형제 첨가	고형분 대비 동량의 텍스트린 첨가	32	0.25
↓			
살균	95℃ 1시간 열처리	32	0.25
↓			
건조	분무건조	28	0.24
↓			
체별/포장	80mesh 체별/포장	25	0.24

(2) 임상시료 제작용 원료의 영양성분 시험 성적 및 일반시험 성적

(가) 영양성분 시험 결과

항목	시험 결과
열량(Kcal/100g)	379.18Kcal/100g
탄수화물(%)	74.22%
조단백질(%)	8.92%
조지방(%)	5.18%
수분(%)	0.24%
회분(%)	11.44%
나트륨(mg/100g)	1232.95mg/100g

(나) 일반시험 결과

항목	기준	적/부
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 분말	적합
지표성분	3,5-dicaffeoylquinic acid 1.92 ~ 2.88 mg/g	적합
납	1.0 이하	적합
총비소	1.0 이하	적합
카드뮴	0.5 이하	적합
총수은	0.5 이하	적합

2. 인체적용시험 제품 준비

가. 인체적용시험 제품을 위한 제형연구

(1) 제형의 분류 (건강기능식품 가능 제형은 12개)

(2) 인체적용시험 제품의 가능 제형 검토

(가) 과립: 입상으로 만든 것


(나) 분말: 입자의 크기가 과립제품보다 작은 것

(다) 캡슐: 캡슐기계에 충전 또는 피포한 것


(라) 정제: 일정한 형상으로 압축된 것

(3) 배합성분 검토


(가) 과립: 혼합 및 연합 후 과립기를 통해 입상의 형태로 만듦. 필요에 따라 향과 맛을 낼 수 있는 원료 추가 검토

	원료	배합목적
	섬썩부쟁이 추출물	기능성원료
	결정셀룰로오스	부형제
	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제
	에탄올	용매


(나) 분말 : 혼합 및 연합 후 분쇄기를 통해 분말 형태로 만듦. 필요에 따라 향과 맛을 낼 수 있는 원료 추가 검토

	원료	배합목적
	섬썩부쟁이 추출물	기능성원료
	결정셀룰로오스	부형제
	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제
	에탄올	용매

(다) 정제: 혼합, 연합 및 과립 후 정제기를 통해 압축하여 일정한 형태로 만듦. 색상 보안을 위해 천연색소 및 코팅원료 추가 검토

	원료	배합목적
	섬썩부쟁이 추출물	기능성원료
	결정셀룰로오스	부형제
	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제
	스테아린산마그네슘	활택제
	이산화규소	고결방지제
	에탄올	용매

(라) 캡슐: 혼합, 연합 및 과립 후 캡슐기를 통해 캡슐에 충전하여 만듦. 캡슐의 색상 및 크기 변경 검토


	원료	배합목적
	섬썩부쟁이 추출물	기능성원료
	결정셀룰로오스	부형제
	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제
	스테아린산마그네슘	활택제
	이산화규소	고결방지제
	에탄올	용매
	캡슐	캡슐

나. 인체적용시험 제품 제조공정 연구

(1) 원료선정을 통한 배합비 확립(1일 2정 섭취)

성분명	배합비(%)	비고
섬썩부쟁이추출물	36.924	
결정셀룰로오스	50.976	
히드록시프로필메틸셀룰로오스	2.000	
스테아린산마그네슘	1.500	
카르복시메틸셀룰로오스칼슘	3.600	
이산화규소	1.000	
백색코팅제	3.940	히드록시프로필메틸셀룰로오스67%, 이산화티타늄 25%, 트리아세틴 8%
바닐라향	0.060	
합계	100.00	1정 650mg

(2) 보관방법 및 포장방법 설정

구분	포장형태	포장재질	특성	포장 이미지
1차	PTP	염화비닐수지(PVC) 및 알루미늄(AL)	빛과 산소 차단	
2차	필로우	폴리에틸렌(PE)	빛과 습기 차단	
3차	케이스	종이	제품 형태 보존	

다. 인체적용시험 제품 기준 및 시험법 검증

(1) 제형의 성상, 분해, 대장균 등 시험기준 설정

No.	항목	기준
1	성상	백색의 장방형 코팅 정제
2	확인시험	3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.
3	정량시험	3,5-Dicaffeoylquinic acid로써 표시량(1.152mg/1,300mg)의 80~120 %
4	분해	60분 이내
5	대장균균	음성

(2) 제형의 기준 및 시험방법을 설정하여 시험일지 및 성적서를 작성

시험일지		시험일지		시험성적서																																												
<p>시험일지</p> <table border="1"> <tr> <th>제출물</th> <td>상복부정제 정제</td> <th>규격</th> <td></td> <th>별부</th> <td></td> </tr> <tr> <th>제출번호</th> <td></td> <th>시험번호</th> <td></td> <th>시험일자</th> <td></td> </tr> <tr> <th>시험항목</th> <td colspan="5">시험방법</td> </tr> <tr> <td>1. 성상</td> <td colspan="5">백색의 장방형 코팅 정제</td> </tr> <tr> <td>결과:</td> <td colspan="5"></td> </tr> <tr> <td>2. 확인시험</td> <td colspan="5">3,5-DCQA 표준액(100µg/ml)에 준하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.</td> </tr> <tr> <td>결과:</td> <td colspan="5"></td> </tr> <tr> <td>3. 정량시험 (3,5-DCQA)</td> <td colspan="5">1) 표준용액의 조제 1.1. 3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준물 5mg (300µg)를 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(100µg/ml)을 만든다. (2, 2.4, 3.0ml)를 각각 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2) 시험용액의 조제 2.1. 당해제 본제제의 상복부정제 추출물로서 200mg 정제당 0.542g 30% 메탄올 용액에 20.6 메소클라스트제 2.0g을 넣고 10% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2.2. 20분간 Sonication시킨다. 2.3. 이 메소클라스트제 30% 메탄올로 용해한 후 0.45µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 한다. 3) 분해시험 3.1. 100°C를 이용하여 60분 분해조건에 따라 분해한다. 공시험제, 표준용액(2.4, 3.0 µg/ml), 시험용액 각각 1회씩 주입하여 분해한다. 4) 분석조건 분석기: HPLC 주입량: 10 µl 검출장비: UV 용매 조성: 40% 온도: 40°C 유동상: 0.1 mol/L NaH₂PO₄ 시스템: Gradient system 검출기: Polar 5 CTR AGSD + 44nm, Sun, Agilent 또는 이와 동등한 장비 용량: 120mm</td> </tr> </table>	제출물	상복부정제 정제	규격		별부		제출번호		시험번호		시험일자		시험항목	시험방법					1. 성상	백색의 장방형 코팅 정제					결과:						2. 확인시험	3,5-DCQA 표준액(100µg/ml)에 준하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.					결과:						3. 정량시험 (3,5-DCQA)	1) 표준용액의 조제 1.1. 3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준물 5mg (300µg)를 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(100µg/ml)을 만든다. (2, 2.4, 3.0ml)를 각각 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2) 시험용액의 조제 2.1. 당해제 본제제의 상복부정제 추출물로서 200mg 정제당 0.542g 30% 메탄올 용액에 20.6 메소클라스트제 2.0g을 넣고 10% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2.2. 20분간 Sonication시킨다. 2.3. 이 메소클라스트제 30% 메탄올로 용해한 후 0.45µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 한다. 3) 분해시험 3.1. 100°C를 이용하여 60분 분해조건에 따라 분해한다. 공시험제, 표준용액(2.4, 3.0 µg/ml), 시험용액 각각 1회씩 주입하여 분해한다. 4) 분석조건 분석기: HPLC 주입량: 10 µl 검출장비: UV 용매 조성: 40% 온도: 40°C 유동상: 0.1 mol/L NaH ₂ PO ₄ 시스템: Gradient system 검출기: Polar 5 CTR AGSD + 44nm, Sun, Agilent 또는 이와 동등한 장비 용량: 120mm				
제출물	상복부정제 정제	규격		별부																																												
제출번호		시험번호		시험일자																																												
시험항목	시험방법																																															
1. 성상	백색의 장방형 코팅 정제																																															
결과:																																																
2. 확인시험	3,5-DCQA 표준액(100µg/ml)에 준하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.																																															
결과:																																																
3. 정량시험 (3,5-DCQA)	1) 표준용액의 조제 1.1. 3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준물 5mg (300µg)를 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(100µg/ml)을 만든다. (2, 2.4, 3.0ml)를 각각 용하여 30% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2) 시험용액의 조제 2.1. 당해제 본제제의 상복부정제 추출물로서 200mg 정제당 0.542g 30% 메탄올 용액에 20.6 메소클라스트제 2.0g을 넣고 10% 메탄올을 넣어 10ml로 용액(2.4, 3.0 µg/ml)을 만든다. 2.2. 20분간 Sonication시킨다. 2.3. 이 메소클라스트제 30% 메탄올로 용해한 후 0.45µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 한다. 3) 분해시험 3.1. 100°C를 이용하여 60분 분해조건에 따라 분해한다. 공시험제, 표준용액(2.4, 3.0 µg/ml), 시험용액 각각 1회씩 주입하여 분해한다. 4) 분석조건 분석기: HPLC 주입량: 10 µl 검출장비: UV 용매 조성: 40% 온도: 40°C 유동상: 0.1 mol/L NaH ₂ PO ₄ 시스템: Gradient system 검출기: Polar 5 CTR AGSD + 44nm, Sun, Agilent 또는 이와 동등한 장비 용량: 120mm																																															

 시험일지 | Time | 0% | 10% | |------|----|-----| | 0 | 95 | 5 | | 7 | 95 | 5 | | 27 | 90 | 10 | | 28 | 10 | 90 | | 30 | 10 | 90 | | 31 | 95 | 5 | | 40 | 95 | 5 | 5) 계산 $$C = \frac{A \times V \times P}{W \times 1000 \times 0.576 \times J \times 19.9976g} \times 100$$ C: 시험용액중의 3,5-DCQA 농도(µg/ml) V: 시험용액의 용적(ml) W: 용액 (시험용액) P: 표준물 농도(%) 6) 결과 7) 대장균시험 7.1. 대장균시험의 기준 및 규격, 제 4. 장강기능성 시험법 2. 일반시험법 2.1. 분해시험에 따라 시험용 제, 60분 내에 유리관 내에 장균이 남지 않는다. 8) 분해 9) 대장균균 | **시험성적서** | 제출물 | 상복부정제 정제 | 규격 | | 별부 | | |---------|-------------------------------------|------|--|------|--| | 제출번호 | | 시험번호 | | 시험일자 | | | 시험항목 | 시험기준 | | | | | | 1. 성상 | 백색의 장방형 코팅 정제 | | | | | | 2. 확인시험 | 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다. | | | | | | 3. 정량시험 | 3,5-Dicaffeoyl acid로써 표시량의 80~120 % | | | | | | 4. 분해 | 60분 이내 | | | | | | 5. 대장균균 | 음성 | | | | | |

(3) 인체적용시험 제품의 시험법 밸리데이션 실시

(가) 인체적용시험 제품 시험법 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목	기준
1	시스템적합성	피크면적에 대한 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간에 대한 상대표준편차는 1.0% 이하
2	특이성	3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성	상관계수(R ²) = 0.990 이상
4	정확성	회수율 평균 : 100 ± 5.0%
5	범위	직선성 범위인 40 ~ 160%
6	반복성	상대표준편차 5.0% 이하
	실험실내정밀성	상대표준편차 5.0% 이하
7	정량한계	최소 범위 이하
8	검출한계	최소 범위 이하

(나) 분석조건 및 이동상 조성

분석조건	
사용기기	HPLC
컬럼	Kromasil 100-5-C18(250 × 4.6mm, 5 μm, Agilent) 또는 이와 동등한 컬럼
컬럼온도	25℃
주입량	5 μL
샘플온도	4℃
이동상	gradient mode (A) - phosphoric acid : DW = 0.5 : 99.5 (v/v), (B) - ACN : phosphoric acid = 99.5 : 0.5 (v/v)
유속	0.8 mL/min
검출과장	330 nm

이동상 조성		
Time	(A)	(B)
0	77	23
5	77	23
15	75	25
16	10	90
20	10	90
21	77	23
26	77	23

(다) 인체적용시험 제품 시험법 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목	시험방법
1	시스템적합성	24 ppm 3,5-Dicaffeoylquinic acid in 30% MeOH 용액 6회 반복주입
2	특이성	공시험액, 이동상, 표준액, Placebo용액, 검액, 특이성 용액(Placebo + 표준액) 각각 분석
3	직선성	표준품을 이용하여 50, 75, 100, 125, 150% 범위의 용액 분석 후 Calibration Curve로 상관관계수(R ²) 확인
4	정확성	75, 100, 125% 범위의 세 농도(Placebo + 표준액) 분석 후 회수율 측정
5	반복성	정확성 결과값으로 확인
	실험실내정밀성	다른 시험일, 다른 시험자로 75, 100, 125% 농도 용액(검액 + 표준액) 분석 후 피크 면적 %RSD 확인
6	정량한계	직선성의 결과로부터 표준편차(σ), 기울기(s)를 측정하여 검출한계와 정량한계 계산
7	검출한계	

(라) 시험법 밸리데이션 결과

① 시스템 적합성

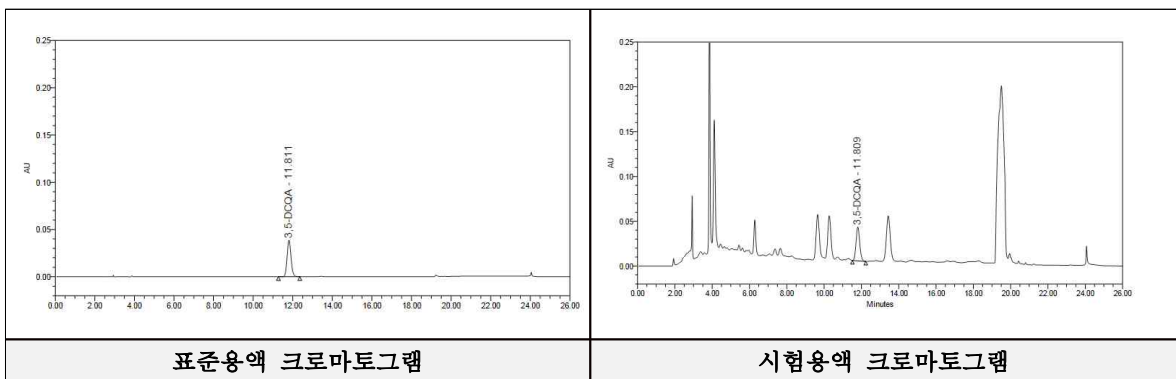
표준용액을 6회 반복측정한 결과 피크면적에 대한 상대표준편차 1.03%로 나타났고, Retention time에 대한 상대표준편차는 0.22%로 우수하게 측정됨.

검체		Peak area	평균	표준편차	상대표준편차
농도(μg/mL)	측정횟수				
24.12	1	523360	523348.33333	5385.77	1.03
	2	533406			
	3	523769			
	4	521794			
	5	518056			
	6	519705			

검체		Retention time	평균	표준편차	상대표준편차
농도(μg/mL)	측정횟수				
24.12	1	11.754	11.764	0.03	0.22
	2	11.740			
	3	11.741			
	4	11.757			
	5	11.784			
	6	11.805			

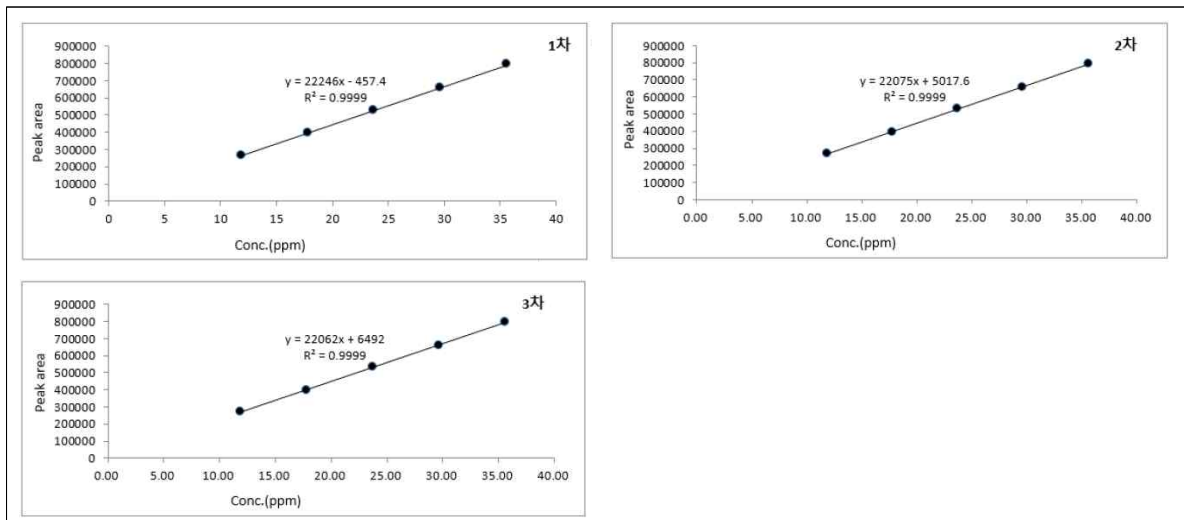
② 특이성

공시험액, 이동상, STD, 검액, 특이성용액을 분석하였을 때 3,5-Dicaffeoylquinic acid 피크에 영향을 주는 인자가 없음을 확인함.



③ 직선성

50, 75, 100, 125, 150%를 범위로 설정하여 Calibration curve로 상관계수(R²)를 확인하였을 때 R2값이 0.9999으로 우수한 직선성을 나타냄.



④ 정확성

75, 100, 125% 범위의 세 농도에 대한 회수율을 확인하였을 때 회수율 평균값이 각각 99.0, 101.4, 101.4%로 기준에 적합함.

구분	합량		
	75%(18 ppm)	100%(24 ppm)	125%(30 ppm)
1	97.3	102.7	100.3
2	100.0	100.9	100.1
3	99.6	100.8	103.8
합량별 평균회수율(%)	99.0	101.4	101.4
전체 평균회수율(%)	100.62		
전체 표준편차	1.84		
회수율 구간	99.20 ~ 102.03		

⑤ 정밀성

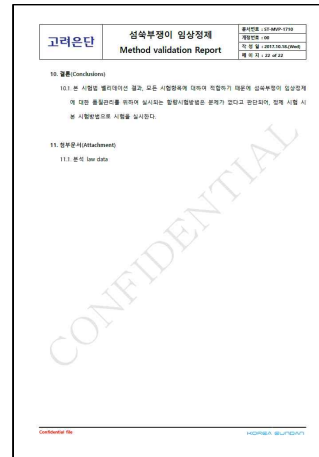
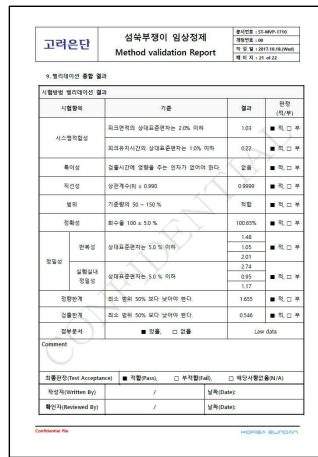
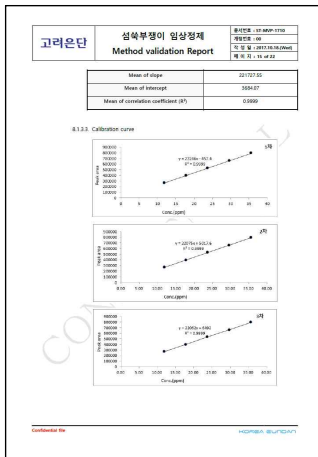
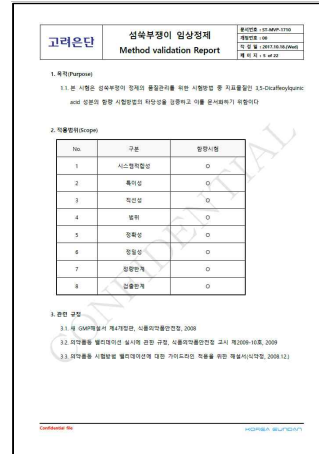
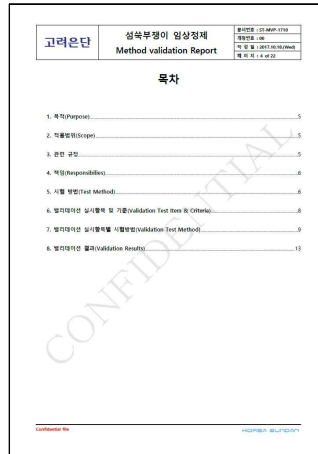
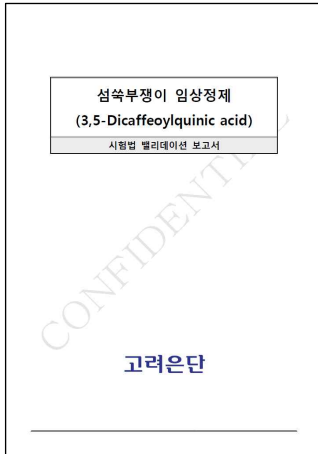
㉓ 반복성: 75, 100, 125%의 농도에서 피크면적의 %RSD를 구하였을 때 각각 1.48, 1.05, 2.01%로 측정되어 기준에 적합함.

㉔ 실험실내 정밀성: 다른 시험일, 다른 시험자로 분석한 결과, 75, 100, 125%의 농도에서 피크면적의 %RSD가 각각 2.74, 0.95, 1.17%로 측정되어 기준에 적합함.

⑥ 검출한계, 정량한계

직선성의 결과로 부터 표준편차(σ) 3661.59, 기울기(s) 22127.55을 확인하였으며 이를 이용하여 검출한계와 정량한계를 계산하였을 때, 각각 0.546 ppm, 1.655 ppm으로 확인되었음.

▶ 위와 같이 모든 밸리데이션 항목에서 기준에 만족하는 결과를 얻어 해당 분석 조건으로 심속부쟁이 정제를 분석하는데 적합할 것으로 판단됨



시험항목		기준	결과	판정	
시스템적합성		피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하	1.03	적합	
		RT의 상대표준편차는 1.0% 이하	0.22	적합	
특이성		검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.	영향을 주는 인자가 없다.	적합	
직선성		상관계수(R^2) \geq 0.990	0.9999	적합	
범위		각 기준량의 50~150%	50~150%	적합	
정확성		회수율 $100 \pm 5.0\%$	100.65	적합	
정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	1.48	적합
			100%	1.05	적합
			130%	2.01	적합
	실험실내 정밀성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	2.74	적합
			100%	0.95	적합
			130%	1.17	적합
검출한계		최소 범위 50% 보다 낮아야 한다.	0.546 ppm (2.275%)	적합	
정량한계		최소 범위 50% 보다 낮아야 한다.	1.655 ppm (6.896%)	적합	

라. 인체적용시험 제품의 안정성 검토

(1) 유통기한 설정을 위한 안정성시험 Protocol 및 Report 작성

(가) 코팅정제 제형으로 PTP 포장하여 유통기한 설정 Protocol 작성 및 진행

① 안정성 시험 보관 조건

구분	보관조건	
	온도(°C)	상대습도(%)
실험구1	15	90
실험구2	25	90
대조구	35	90

* 식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인(식약처, 2011.06)에 따라 보관조건 설정

② 안정성 시험 진행 결과표

㉠ 2017.10.23.부터 안정성 시험을 실시하여 대조구 12개월까지 안정성 시험을 진행

㉡ 대조구에서 설정된 유통기한인 24개월을 포함한 36개월까지 지속적인 모니터링을 통한 안정성 결과 확인 예정

안정성 시험 진행 결과표		안정성 시험 진행 결과표						
제 품 명	실적부담이 정제	제 품 명	실적부담이 정제					
제조번호	AGP-D003	제조번호	AGP-D003					
제조일자	2017.10.12	제조일자	2017.10.12					
사용기한	-	사용기한	-					
시험구분	■ 실험구1 □ 실험구2 □ 대조구	시험구분	□ 실험구1 ■ 실험구2 □ 대조구					
시험목적	■ 신제품, □ 처방변경, □ 경시변형, □ 공정변형, □ 기타	시험목적	■ 신제품, □ 처방변경, □ 경시변형, □ 공정변형, □ 기타					
2. 안정성 시험 결과		4. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	제조사	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
성상	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제
함량	3.5-Dicaffeoylquinic acid로서 표시량의 80~120%	100.92	100.97	100.9	99.88	99.1	99.41	101.37
시험자	홍수민	홍수민	홍수민	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미
확인자	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미
1. 안정성 시험 결과		3. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	제조사	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
성상	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제
함량	3.5-Dicaffeoylquinic acid로서 표시량의 80~120%	100.92	100.23	103.43	101.45	101.06	101.29	101.56
시험자	홍수민	홍수민	홍수민	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미
확인자	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미

안정성 시험 진행 결과표		안정성 시험 진행 결과표						
제 품 명	실적부담이 정제	제 품 명	실적부담이 정제					
제조번호	AGP-D003	제조번호	AGP-D003					
제조일자	2017.10.12	제조일자	2017.10.12					
사용기한	-	사용기한	-					
시험구분	□ 실험구1 □ 실험구2 ■ 대조구	시험구분	□ 실험구1 □ 실험구2 ■ 대조구					
시험목적	■ 신제품, □ 처방변경, □ 경시변형, □ 공정변형, □ 기타	시험목적	■ 신제품, □ 처방변경, □ 경시변형, □ 공정변형, □ 기타					
6. 안정성 시험 결과		5. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	제조사	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	
성상	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	
함량	3.5-Dicaffeoylquinic acid로서 표시량의 80~120%	100.92	101.91	101.3	99.06	100.35	100.9	
시험자	홍수민	홍수민	홍수민	이영미	이영미	이영미	이영미	
확인자	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	이영미	
7. 안정성 시험 결과		6. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	제조사	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
성상	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제	백색의 타원형 정제			
함량	3.5-Dicaffeoylquinic acid로서 표시량의 80~120%	100.27	100.68	101.53				
시험자	이영미	이영미	이영미	이영미				
확인자	이영미	이영미	이영미	이영미				

5절 인체적용시험 계획서 개발

1. 기능성 원료의 인체적용시험 계획서 개발

가. 인체적용시험 식품의 인체허용량 평가를 위한 섭취량 설정, 피험(대상)자 모집기준 확립

(1) 섭취량 및 섭취방법

(가) 섭취량: 섬썩부쟁이추출물로써 480 mg/day

(나) 섭취방법: 1일 2회, 1회 1정을 물과 함께 섭취

(2) 설정근거

(가) 전인체적용시험을 통해 산출

현재까지 섬썩부쟁이추출물에 대한 인체적용시험은 시행된 바 없으며, 본 인체적용시험을 통해서 인체에서 기능성을 확인함을 목적으로 하고 있음. 전인체적용시험을 통하여 산출된 유효함량을 근거로 체표면적을 이용한 HED(human equivalent dose)로 환산하여 인체대상 적용량을 산출하였으며, 최종 섭취량을 산출함.

(나) Rat에서의 유효함량 산출

Potassium oxonate를 이용한 고요산혈증모델에서 섬썩부쟁이추출물을 투여하여 혈중요산 감소에 효과가 있는지 확인하였음. Potassium oxonate에 의해 혈중요산 농도가 normal에 비해 약 1.7배 증가한 조건에서 섬썩부쟁이추출물 50, 100 및 200 mg/kg을 투여한 결과 50 mg/kg에서 normal과 유사한 정도로 혈중요산 농도가 감소됨을 확인할 수 있음. 따라서 동물시험에서의 유효 용량을 50mg/kg으로 최종 설정함.

(다) 인체대상 적용 예측량 산출

동물시험 결과에서 유효 용량을 근거로 인체대상 적용량을 예측한 결과 섬썩부쟁이추출물의 HED는 480 mg/60 kg bw[HED(mg/g)=50mg/kg × 0.16]으로 산출되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 인체에서의 1일 섭취량은 480mg으로 최종 결정

(3) 피험(대상)자 모집기준 확립

(가) 인체적용시험 대상자

① 만 20세 이상, 만 75세 이하의 혈중 요산 수치가 높은 자

(나) 선정기준: 하기 조건에 모두 부합되는 사람을 인체적용시험 대상자로 선정

① 만 20세 이상, 만 75세 이하의 남·녀

② 혈중 요산 농도가 7.0mg/dL 이상 ~ 9.0mg/dL 미만인 자

③ 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자

(다) 제외기준: 하기 조건에 한 가지 이상 해당되는 사람은 인체적용시험 대상자 제외

① 통풍으로 진단받은 자(통풍 분류 기준(ACR/EULAR:2015)에 근거한다.)

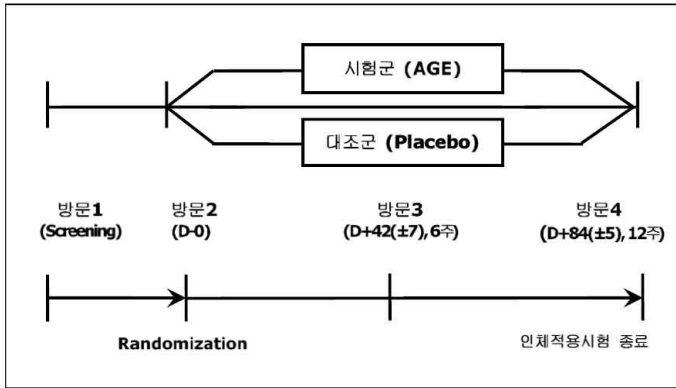
② 통풍발작을 1회 이상 경험한 자

- ③ 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 자
- ④ 정신분열증, 우울증, 약물중독 등의 정신질환자
- ⑤ 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자
- ⑥ 요산저하제(알로푸리놀, 페북소스타트, 프로베네시드 등)를 복용한 경험이 있는 자
- ⑦ 요로결석 과거력이 있는 자
- ⑧ 방문2(Baseline) 기준 1주 이내에 본 인체적용시험용 식품의 흡수, 대사, 배설 및 요산 수치에 영향을 미치는 건강기능식품 및 제산제, 비타민K 길항제, 경구용 피임약, 항진균제, 다량의 자몽주스를 섭취 및 복용한 자
- ⑨ 방문1(Screening) 기준 4주 이내에 Thiazide 계 이뇨제를 복용 중인 자
- ⑩ 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상, 10분 안정 후 측정기준)
- ⑪ 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상)
- ⑫ TSH 0.1 μ IU/ml 이하이거나, 10 μ IU/ml 이상인 자
- ⑬ AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상범위의 3배 이상인 자
- ⑭ Creatinine이 시험기관 정상범위의 2배 이상인 자
- ⑮ 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ⑯ 인체적용시험 시작 2개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 동안에 다른 임상시험에 참여할 계획이 있는 자
- ⑰ 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자

나. 인체적용시험 계획서(Protocol) 개발

(1) 인체적용시험 계획서(Protocol) 요약

인체적용시험 제목	혈중 요산 감소에 미치는 AGE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	고려은단(주) 경기도 성남시 중원구 사기막골로 100
인체적용시험 시험책임자	김창오 과장 (에이치플러스 양지병원 임상연구센터)
인체적용시험 실시기관	에이치플러스 양지병원 (서울시 관악구 남부순환로 1636)
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월
인체적용시험 대상	혈중 요산 수치가 높은 자 (무증상 고요산혈증)
인체적용시험 목적	만 20세 이상~만 75세 이하의 혈중 요산 수치가 높은 자를 대상으로 AGE(섬쭉부쟁이추출물)를 섭취했을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 혈중 요산 감소에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위함이다.

인체적용시험 단계 및 디자인	단 계: 기타 (건강기능식품) 디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조												
인체적용시험용 식품	시험식품: 섬썩부쟁이추출물(AGE) 대조식품: Placebo												
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험식품: 1일 2회, 1회 1정 섭취 (섬썩부쟁이추출물로써 480mg/day) 대조식품: 1일 2회, 1회 1정 섭취												
인체적용시험용 식품 섭취기간	12주												
인체적용시험 방법	 <p>인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정 한다. 배정된 인체적용시험대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.</p>												
인체적용시험 대상자 수	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군</th> <th>대조군</th> <th>총 시험대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP)</td> <td>35</td> <td>35</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(12%) 고려예수</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>		시험군	대조군	총 시험대상자 수	최종 평가 레수(PP)	35	35	70	Drop-out(12%) 고려예수	40	40	80
	시험군	대조군	총 시험대상자 수										
최종 평가 레수(PP)	35	35	70										
Drop-out(12%) 고려예수	40	40	80										
선정기준	<ul style="list-style-type: none"> 만 20세 이상~만 75세 이하의 남·녀 혈중 요산 농도가 7.0mg/dL 이상 ~ 9.0mg/dL 미만인 자 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자 												
제외기준	<ul style="list-style-type: none"> 통풍으로 진단받은 자(통풍 분류 기준(ACR/EULAR:2015)근거한다.) 통풍발작을 1회 이상 경험한 자 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 자 정신분열증, 우울증, 약물중독 등의 정신질환자 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자 요산저하제(알로푸리놀, 페부소스타트, 프로베네시드 등)를 복용한 												

	<p>경험이 있는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 요로결석의 과거력이 있는 자 • 방문2(Baseline) 기준 1주 이내에 본 인체적용시험용 식품의 흡수, 대사, 배설 및 요산 수치에 영향을 미치는 건강기능식품 및 제산제, 비타민K 길항제, 경구용 피임약, 항진균제, 다량의 자몽주스를 섭취 및 복용한 자 • 방문1(Screening) 기준 4주 이내에 Thiazide 계 이뇨제를 복용 중인 자 • 조절되지 않는 고혈압 환자(160/100 mmHg 이상, 10분 안정 후 측정기준) • 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상) • TSH 0.1 μIU/ml 이하이거나, 10 μIU/ml 이상인 자 • AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상범위의 3배 이상인 자 • Creatinine이 시험기관 정상범위의 2배 이상인 자 • 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자 • 인체적용시험 시작 2개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 동안에 다른 임상시험에 참여할 계획이 있는 자 • 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자
<p>유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 1차 유효성 평가변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) 혈중 요산(Uric acid) • 2차 유효성 평가변수 <ol style="list-style-type: none"> 1) 혈중 요산 농도가 7.0 mg/dL 미만인 시험대상자 비율 2) 혈중 CRP 3) 혈중 TNF-α 4) 혈중 Xanthine oxidase activity
<p>안전성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 이상반응 • 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사) • 활력징후(맥박, 혈압), 체중 • 심전도검사
<p>통계분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 유효성 <ol style="list-style-type: none"> 1) 1차 유효성 평가변수 <p>1차 유효성 평가변수인 혈중 요산(Uric acid)의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위</p>

배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있다.

2) 2차 유효성 평가변수

2차 유효성 평가변수인 혈중 CRP, TNF- α , Xanthine oxidase activity의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 군간 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있다.

혈중 요산 농도가 7.0 mg/dL 미만인 시험대상자 비율은 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

• 안전성

1) 이상반응

인체적용시험 기간 동안 보고된 모든 이상반응은 MedDRA preferred term에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화 한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석한다.

2) 임상병리검사

혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type) 자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다. 뇨검사의 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교한다.

3) 활력징후(혈압·맥박), 체중

활력징후(혈압·맥박), 체중 검사치에 대하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 군간 비교는 Two sample t-test를 이용하여 분석한다.

4) 심전도검사

심전도검사 결과는 임상적 유의성에 따라 정상과 비정상으로 분류하여 표로 제시하며, McNemar 검정을 이용하여 군내 차이를 비교한다.

6절 인체적용시험 실시

1. 인체적용시험 실시

가. 실시기관 선정 및 계약

(1) 실시기관 선정

에이치플러스 양지병원과 실시기관 계약

(2) 개시모임(Initiation Meeting) 실시

(가) 실시일자: 2017.11.02.(목)

(나) 참석자: 실시기관 책임자 및 실무자(김창오 과장 등 8명)

주관기관(고려은단 한은혜 과장 등 3명)

협동기관(네오뉴트라 박상옥 상무이사 등 3명)

(다) 주요내용: 시험절차 소개 및 향후 일정 공유, 모니터링 안내 등

<p>혈중 요산 감소에 미치는 AGE의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험</p> <p>Initiation Meeting</p> <p>Sponsor: 고려은단㈜ PI: 에이치플러스 양지병원 임상연구센터 김창오 과장 일시: 2017년 11월 2일(목) AM 11:30</p> <p>Neo NUTRA</p> <p>고려은단</p>	Protocol No. KE_AGE
	<p>Agenda</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 참석자 소개 2. Study Management 3. 인체적용시험계획서 4. 시험절차 1) 눈가림, 중도탈락, Trial master file 관리 시험절차 2) 인체적용시험용 식품의 수불관리방법, 이상반응보고 등 시험절차 3) 모니터링 5. 인체적용시험자의 책임(KGCP) <p>Neo NUTRA</p> <p>고려은단</p>
개시모임 발표자료	

나. 인체적용시험 진행일정

Period	Screening	Active Treatment		
		2	3	4
Visit	1	2	3	4
Week ¹⁾	-2	0	6	12
Window period ²⁾			+/- 7	+/- 5
서면동의서	○			
인구학적 조사 ³⁾	○			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾	○	○		
이학적검사	○		○	○
활력징후(맥박, 혈압)	○		○	○
심전도 검사 ⁵⁾	○			○

신체계측 ⁶⁾			○	○	○
식사지도 및 식이조사 ⁷⁾			○	○	○
음주 습관 설문지 ⁸⁾			○	○	○
임상병리검사 ⁹⁾		○			○
임신반응검사 ⁹⁾		○			
유 효 성 평가	혈중 요산(Uric acid)	○		○	○
	혈중CRP		○	○	○
	혈중TNF- α ¹⁰⁾		○		○
	혈중Xanthine oxidase activity ¹⁰⁾		○		○
인체적용시험대상자 적합성 평가		○	○		
무작위배정			○		
인체적용시험용 식품의 처방			○	○	
이상반응 확인				○	○
순응도 확인 ¹¹⁾				○	○
병용약물 및 병용요법 변화 확인				○	○

- 1) 스크리닝 방문 후 2주일 이내에 방문 2가 시행되어야 한다.
- 2) 방문 3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문 4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.
- 3) 방문1에 인체적용시험대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 흡연여부, 운동여부 등을 조사하여 기록한다.
- 4) 방문1, 2에 스크리닝 시점을 기준으로 3개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 4주 이내의 약물투여력을 조사하여 기록한다(단, 요산저하제는 과거의 복용 유무를 확인한다).
- 5) 방문1의 심전도 검사는 스크리닝 방문 시 30일 이내의 검사결과가 있다면 적용이 가능하다.
- 6) 신장은 방문2에서 측정하며, 체중은 방문2, 3, 4에서 측정하여 기록한다.
- 7) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 연구담당자가 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험대상자에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.
- 8) 음주 습관 설문: 2unit = 소주 약 1/3병(127ml), 맥주 약 1.5캔(568ml), 막걸리 약 반통(425ml), 포도주 약 1/3병(212ml), 양주 약 2잔(63.5ml)
- 9) 인체적용시험대상자는 채혈하기 전날 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다. 스크리닝 방문 시 14일 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하며(임신반응검사 제외), 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있다.

- 혈액학적 검사(6종) : WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Basophil
- 혈액화학적 검사(11종) : AST(GOT), ALT(GPT), Total Cholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyceride, Glucose, Total Protein, BUN, Creatinine, Ca
- 소변검사(9종) : pH, Glucose, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, RBC, WBC, Protein, Nitrite
- 임신반응검사 : Urine HCG (※ 가임기 여성만 해당)
- 갑상선호르몬검사 : TSH (방문 1에서만 시행)

- 10) 혈액 채취 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동보관 하여 중앙검사실에서 분석한다.
- 11) 방문3, 4에 인체적용시험대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 시험담당자가 점검 및 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날~다음 방문 전날' 섭취).

다. 인체적용시험 대상자 모집 및 모니터링 실시

(1) 대상자 모집

(가) 인체적용시험 대상자 선정, 제외기준에 적합한 80명을 확보하여 섭취하도록 하고, Protocol에 명시된 PP기준에 적합한 최종 유효성 평가 레수로 70명 이상(군당 35명 이상)을 분석하기로 계획하여 대상자 모집 진행

(나) 대상자 등록결과

Planned Enrollment	Screened	S/F	Randomization n (%)	Active	Dropped out	Completed
80	182	100	82(102.00%)	0	7	75
FPI (First Patient In)			2017.11.22			
LPI (Last Patient In)			2018.04.23			
LPO (Last Patient Out)			2018.07.13			

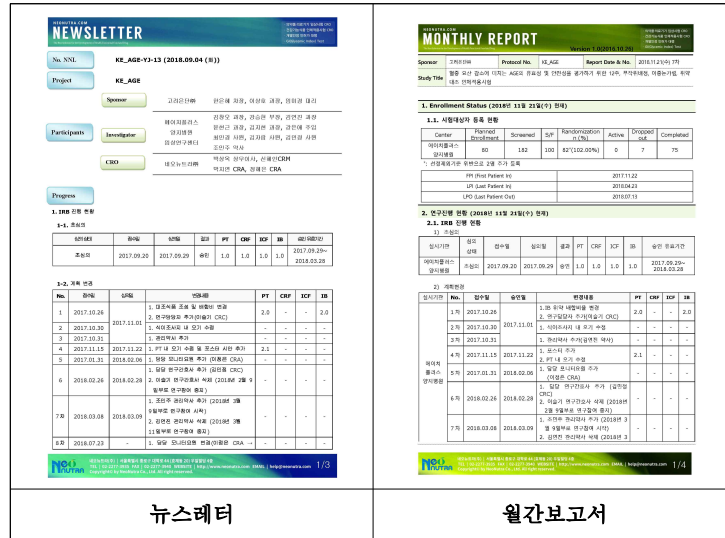
(2) 인체적용시험 모니터링의 목적

인체적용시험 대상자의 권리와 복지 보호, 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거문서와 대조하여 정확하고, 완전하며, 검증이 가능한지 여부 확인, 인체적용시험이 승인된 계획서, 의약품 임상시험관리기준 및 의약품 등 안전에 관한 규칙 제30조의 규정에 따라 수행되는지의 여부 확인을 위하여 모니터링을 실시함.

(3) 모니터링의 내용

항 목	내 용
연구자 파일	① 연구자 파일의 Subject visit log, Subject screening & enrollment log 업데이트 확인 ② IRB 문서 등 인체적용시험 관련 문서 및 의사소통 문서 업데이트 확인

- (6) 뉴스레터(Newsletter), 월간 보고서(Monthly Report) 작성
 시험대상자 등록 현황, IRB 진행 현황, 시험식품 입고/반납 현황 등 임상시험 진행현황에
 관한 보고서를 작성하고 과제 참여 연구진과 공유



라. DM(Data Management) 및 통계분석

- (1) DM 및 통계분석을 진행하여 인체적용시험의 유효성 및 안전성 분석
 (2) 유효성 평가에 대한 분석 결과
 (가) 평가 지표

본 인체적용시험의 유효성 평가는 혈중 요산(Uric acid), 혈중 요산 농도가 7.0 mg/dL 미만인 시험대상자 비율, 혈중 CRP, 혈중 TNF-a, 혈중 Xanthine oxidase activity에 대한 섭취 전후 변화를 분석 및 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였음.

① 혈중 요산(Uric acid)의 변화를 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.48 ± 1.53 mg/dl 감소하였고($p=0.0826$), 대조군은 0.31 ± 1.07 mg/dl 감소하였으나 ($p=0.0882$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음. 섭취 12주 후 시험군은 0.12 ± 1.41 mg/dl 감소하였고($p=0.6335$), 대조군은 0.26 ± 0.94 mg/dl 감소하였으나($p=0.0961$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.

② 혈중 요산(Uric acid)의 변화를 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.51 ± 1.47 mg/dl 감소하였고($p=0.0468$), 대조군은 0.31 ± 1.04 mg/dl 감소하였으나 ($p=0.0706$) 섭취 구간 임상적으로 유의한 차이는 나타나지 않음. 섭취 12주 후 시험군은 0.09 ± 1.37 mg/dl 감소하였고($p=0.6989$), 대조군은 0.23 ± 0.93 mg/dl 감소하였으나($p=0.1295$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.

③ 혈중 요산 농도가 7.0 mg/dl 미만인 시험대상자 비율을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 9명(27.27%), 대조군은 13명(35.14%)으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음($p=0.4794$). 섭취 12주 후 시험군은 8명(24.24%), 대

조군은 13명(35.14%)으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음 (p=0.3208).

- ④ 혈중 요산 농도가 7.0 mg/dl 미만인 시험대상자 비율을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 11명(30.56%), 대조군은 13명(33.33%)으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음(p=0.7967). 섭취 12주 후 시험군은 8명(22.22%), 대조군은 13명(33.33%)으로 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음 (p=0.2843).
- ⑤ 혈중 CRP 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.13 ± 0.48 mg/dl 감소하였고(p=0.1292), 대조군은 0.25 ± 0.80 mg/dl 감소하였으나(p=0.0614) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음. 섭취 12주 후 시험군은 0.17 ± 0.69 mg/dl 감소하였고(p=0.1771), 대조군은 0.22 ± 0.84 mg/dl 감소하였으나 (p=0.1164) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑥ 혈중 CRP 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 0.10 ± 0.48 mg/dl 감소하였고(p=0.2031), 대조군은 0.15 ± 1.01 mg/dl 감소하였으나(p=0.3698) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음. 섭취 12주 후 시험군은 0.15 ± 0.66 mg/dl 감소하였고(p=0.1760), 대조군은 0.21 ± 0.82 mg/dl 감소하였으나 (p=0.1178) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑦ 혈중 TNF-a 변화량을 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.04 ± 0.34 pg/ml 증가하였고(p=0.4879), 대조군은 0.05 ± 0.45 pg/ml 증가하였으나 (p=0.5067) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑧ 혈중 TNF-a 변화량을 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.05 ± 0.33 pg/ml 증가하였고(p=0.4017), 대조군은 0.03 ± 0.45 pg/ml 증가하였으나 (p=0.6478) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑨ 혈중 Xanthine oxidase activity의 변화를 PP Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.85 ± 1.48 mU/mL 감소하였고(p=0.0022), 대조군은 0.86 ± 1.70 mU/mL 감소하였으나(p=0.0039) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑩ 혈중 Xanthine oxidase activity의 변화를 FA Set으로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.90 ± 1.42 mU/mL 감소하였고(p=0.0006), 대조군은 0.82 ± 1.67 mU/mL 감소하였으나(p=0.0040) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ⑪ 시험대상자의 영양분석 조사 결과, 동물성 단백질에서 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타나(p=0.0381) 동물성 단백질과 혈중요산의 baseline을 보정하여 공분산분석(ANCOVA)을 실시하였다. 섭취 6주, 12주 째 혈중 요산에서 섭취 구간 통계적

으로 유의한 차이가 나타나지 않음.

(3) 안전성 평가에 대한 분석 결과

안전성 평가는 무작위 배정되어 인체적용시험용 식품을 적어도 한번 이상 섭취한 시험대상자 중 안전성 관련 정보가 수집된 시험대상자를 분석 대상자(Safety Set)로 하였으며, 총 82명(시험군 42명, 대조군 40명)의 시험대상자가 Safety Set에 포함되었다. 이 중 이상반응과 중대한 이상반응은 발생하지 않았으며, 이상반응으로 인한 중도탈락은 없었음.

(가) 평가 지표

본 인체적용시험에서 안전성 평가를 위한 임상병리검사는 방문1과 방문4에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었음.

- ① 혈액학적, 혈액화학적 검사결과 모든 검사항목에서 시험군과 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ② 뇨검사결과 모든 검사항목에서 시험군과 대조군 모두 섭취 전후 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ③ 맥박을 분석한 결과에서 섭취 6주 후 시험군은 5.39 ± 11.29 회 감소하였고($p=0.0070$), 대조군은 0.74 ± 10.09 회 증가하여($p=0.6479$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며($p=0.0153$), 섭취 12주 후 시험군은 7.19 ± 11.05 회 감소하였고($p=0.0004$), 대조군은 1.41 ± 10.43 회 감소하여($p=0.4037$) 섭취 군간 통계적으로 유의미한 차이가 나타남($p=0.0225$). 이외 다른 항목에서 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.
- ④ 심전도검사의 분석 결과 섭취 전후 모두 정상으로 나타남.

(4) 통계분석 및 분석결과를 작성하여 인체적용시험 결과보고서에 수록

7절 제품의 표준화

1. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin 혼합물의 효능 검색

가. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 Vitamin 혼합물의 antioxidant 효능 검색

(1) 시험목적

섬쭉부쟁이 70% 주정추출물(AG-D006)과 Vitamin, Mineral 등을 혼합하였을 때, 항산화효능이 상승하는지(Synergic effect) 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; ABTS, potassium persulfate, ascorbic acid, DMSO는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. Vitamin B₁, Vitamin B₆, Vitamin B₉, Vitamin E는 DSM(Het Overloon, NL) 제품을 사용하였고, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공된 것을 사용하였음.

(3) 시험방법

섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 ABTS free radical의 소거 효과는 Ozgen *et al.*(2006) 방법을 약간 수정하여 측정하였음. 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1로 섞어 암소에서 16h 이상 반응시켜 라디칼 생성을 유도함. 96 well plate에 DMSO 또는 DW에 용해한 다양한 농도의 시료와 라디칼 생성이 유도된 ABTS 용액을 섞은 후, 실온 암소에서 15분 동안 반응시켰음. 반응 종료 후 microplate reader(BioTek, Winooski, VT, U.S.A)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정함. 시료의 ABTS 라디칼 소거 효능(%)은 DMSO 또는 DW 용액을 control group으로 비교하여 계산하였고, IC₅₀ 값은 ABTS 라디칼이 50% 소거되는데 필요한 시료의 농도로 나타냄.

(4) 연구결과

(가) 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 Vitamin 혼합물의 항산화 효능

Vitamin과 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물을 같이 처리하여 시너지효과를 확인하기 전에 각각의 시료의 항산화능을 확인하였음. 70% 주정추출물의 ABTS 소거능 IC₅₀ 값은 44.25 ug/mL이고, Vitamin B₁, Vitamin B₆, Vitamin B₉, Vitamin C, Vitamin E의 IC₅₀ 값은 각각 105.34, 7007.71, 27.01, 9.97, 11.48 ug/mL로 나타남. 이를 토대로 ABTS 소거능 효과가 거의 나타나지 않는 Vitamin들의 농도를 선택하여 70% 주정추출물의 다양한 농도와 함께 처리하였음. 그 결과, Vitamin B₁, Vitamin B₆, Vitamin C와 같이 처리했을 때에는 그 효능이 약간 감소되는데 반해 Vitamin B₉ 또는 Vitamin E를 같이 처리한 경우에는 항산화 효능이 증가되는 것을 확인할 수 있었음. 각각의 효율은 섬쭉부쟁이 추출물 단독 대비 약 68%, 35% 증대되었으나 이는 두 시료의 시너지 효과가 아닌 비타민에 의한 상가효과임을 확인하였음.

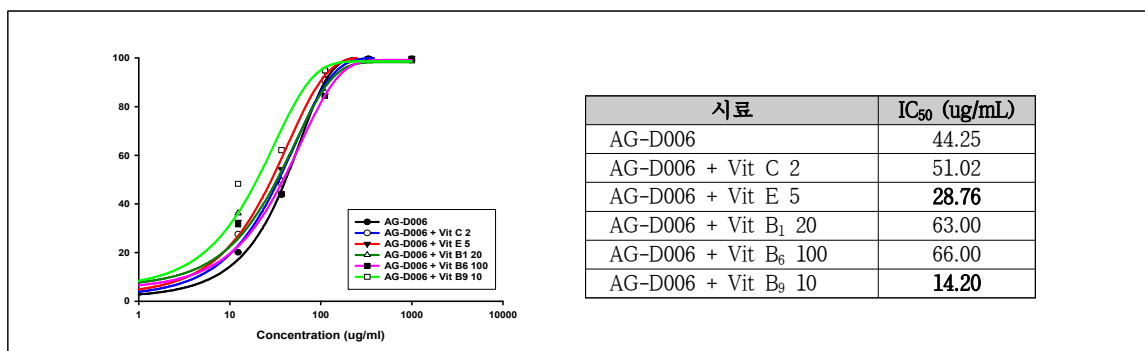


Fig. 35. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin 처리군의 항산화능

나. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 Vitamin 혼합물의 xanthine oxidase 저해 효능 검색

(1) 시험목적

섬쭉부쟁이 70% 주정추출물(AG-D006)과 Vitamin, Mineral 등을 혼합하였을 때, 잔틴 산화효소 저해 효능이 상승하는지(Synergic effect) 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

Xanthine, xanthine oxidase, DMSO, pyridoxine hydrochloride(Vitamin B₆)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. Vitamin B₁, Vitamin B₂, Vitamin B₃, Vitamin B₅, Vitamin B₉, Vitamin B₁₂, Vitamin C, taurine, collagen, zinc oxide, cupric sulfate, manganese sulfate는 DSM(Het Overloon, NL) 제품을 사용하였고 MSM는 이즈웨이에서 제공된 제품을 사용하였음. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공된 것을 사용하였음.

(3) 시험방법

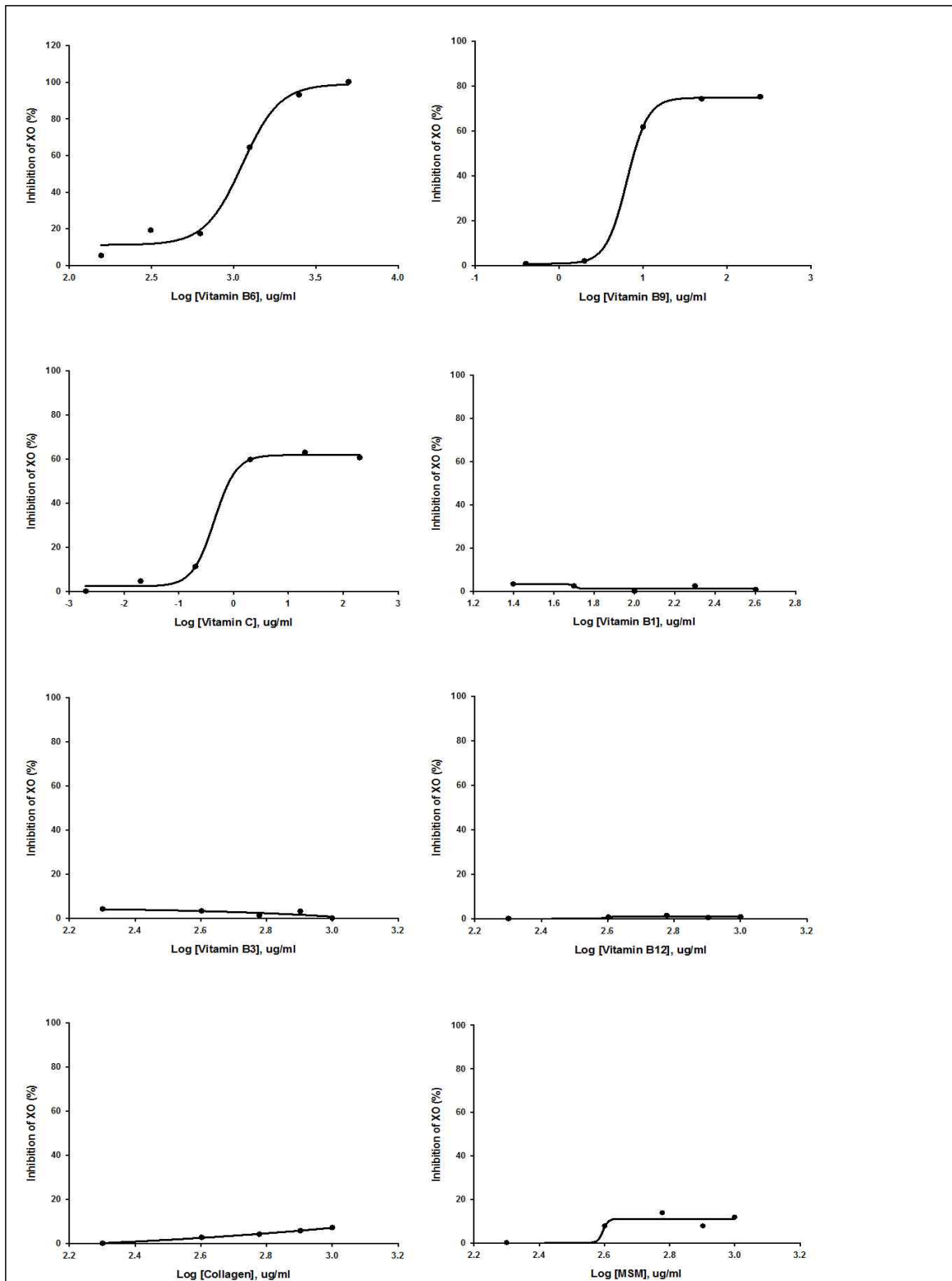
Xanthine oxidase 저해 효능은 호기성 조건 하에서 Noro *et al.*(1983) 방법을 약간 수정하여 측정하였음. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5), 0.004 U/mL xanthine oxidase와 DMSO 또는 DW에 용해한 다양한 농도의 시료를 혼합하여 25°C 에서 10분 동안 반응시킨 후, 반응물에 0.12 mM xanthine을 가하여 반응을 개시한 다음 25°C 에서 30분 동안 배양하였음. 1 N HCl을 첨가하여 반응을 종결시키고, 295 nm에서 흡광도를 측정함. xanthine oxidase 저해 효능은 % inhibition으로 평가하였고, IC₅₀값은 xanthine oxidase 억제 활성이 50%일 때의 시료 농도로 나타냄.

(4) 연구결과

(가) 배합 검토 시료의 xanthine oxidase(잔틴산화효소) 저해 효능

배합원료로 검토중인 시료 가운데 Vitamin B₂, Vitamin B₅, 산화아연, 황산동, 황산 망간은 실험에서 사용한 100 mM potassium phosphate buffer와 침전반응을 일으켜서 실험을 진행할 수 없었음. 또한 Vitamin B₁, Vitamin B₃, Vitamin B₁₂, collagen, MSM, taurine은 xanthine oxidase 저해 효과가 없는 것으로 확인됨.

반면 Vitamin B₆와 Vitamin B₉, Vitamin C에서는 xanthine oxidase 저해 효능이 확인됨. 이때의 IC₅₀값은 다음과 같이 측정되었음. Vitamin B₆는 1128.76 ug/mL, Vitamin B₉ 6.42 ug/mL, Vitamin C 0.44 ug/mL로 Vitamin B₉와 Vitamin C에서 뛰어난 xanthine oxidase 저해 효능이 있음을 알 수 있었음.



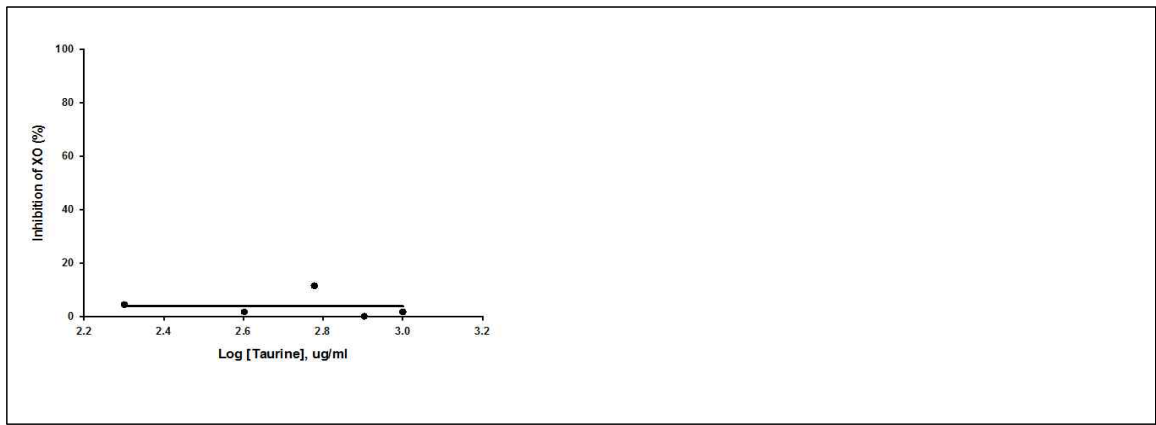


Fig. 36. 배합 검토 시료의 xanthine oxidase 저해 효능

(나) 배합원료와 상승효과

Xanthine oxidase 저해 효능이 나타났던 Vitamin B₆와 Vitamin B₉, Vitamin C를 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물(AG-D006)와 같이 처리했을 때의 시너지 효과를 확인하였음. 먼저 뛰어난 xanthine oxidase 저해 효능을 보였던 Vitamin B₉를 IC₅₀값에 근접한 5 ug/mL, 높은 저해력을 나타내는 고농도인 30 ug/mL 그리고 이 사이의 값인 15 ug/mL를 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 다양한 농도와 처리했을 때 xanthine oxidase 저해 효능이 증가되는 것을 확인할 수 있었음. 하지만 이는 시너지 효과가 아닌 단순한 두 시료의 합산된 결과로 나타남을 알 수 있었음.

반면 Vitamin B₆는 IC₅₀값에 근접한 1 mg/mL과 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물의 다양한 농도를 처리했을 때 급격한 저해 효능이 나타남을 확인할 수 있었음. 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물만 처리했을 때 거의 저해 효능이 나타나지 않았던 200 ug/mL에서도 Vitamin B₆와 같이 처리했을 때 약 100% 저해되는 것을 확인함.

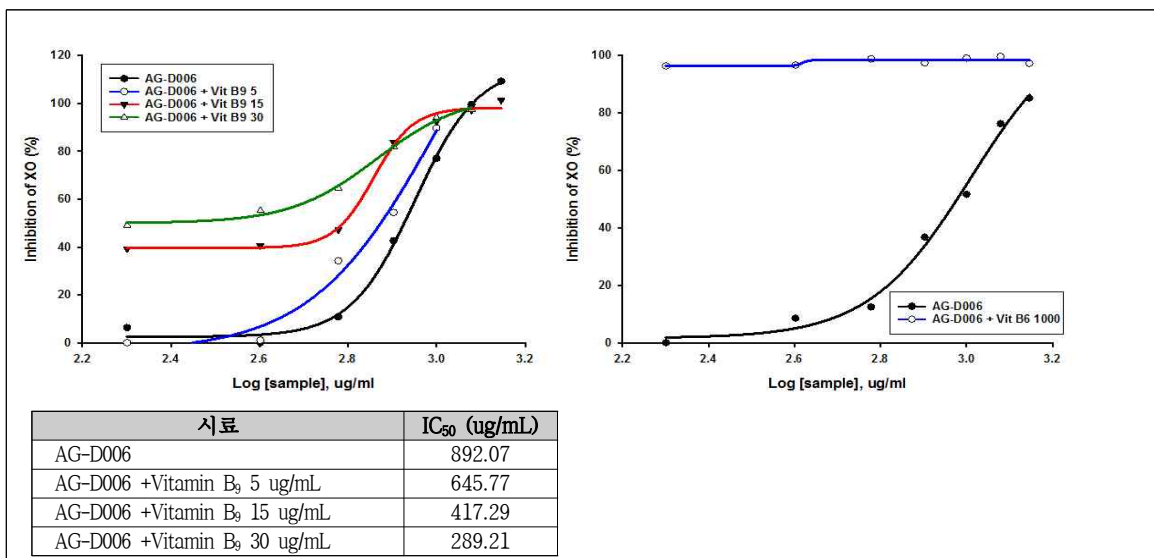


Fig. 37. 배합원료와 xanthine oxidase 저해 효능

2. 섬썩부쟁이 추출물과 상승효과 시료의 고요산혈증 동물모델에서 효능 확인

가. 섬썩부쟁이 추출물과 상승효과 시료의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 V

(1) 시험목적

섬썩부쟁이 50% 주정추출물 및 70% 주정추출물, Vitamin B₆, Vitamin B₉, 섬썩부쟁이 70% 주정추출물과 Vitamin B₆ 혼합물을 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 Sprague-Dawley rat에 경구투여한 후 혈중 요산 농도를 시간별로 측정하여 시료에 의한 요산 농도 감소 효능 및 혼합물에 의한 시너지 효과를 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Allopurinol, xanthine, xanthine oxidase, pyridoxine hydrochloride(Vitamin B₆)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. Vitamin B₉은 DSM (Het Overloon, NL) 제품을 사용하였고, 섬썩부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공된 것을 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

수컷 7 주령, Sprague-Dawley rat을 입수하여 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 환기횟수 10~20회/h, 조명시간 12h (오전 8시 점등~오후 8시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 (주)노터스 설치류 사육구역 1 호실에서 1주일간 순화 후 시험을 실시하였음. 사료와 음수는 자유 섭취하게 하였음.

(다) 시험군 구성

군	동물수 (마리)	동물번호	통풍 유발여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1	8	1-8	N	부형제	-	2
G2	8	9-16	Y	부형제	-	2
G3	8	17-24	Y	Allopurinol	50	2
G4	8	25-32	Y	Vitamin B ₉	50	2
G5	8	33-40	Y	50% 주정추출물	100	2
G6	8	41-48	Y		300	2
G7	8	49-56	Y		500	2
G8	8	57-64	Y	70% 주정추출물	100	2
G9	8	65-72	Y		300	2
G10	8	73-80	Y		500	2
G11	8	81-88	Y	70% 주정추출물(AG)	75	2
G12	8	89-96	Y		225	2
G13	8	97-104	Y		375	2
G14	8	105-112	Y	Vitamin B ₆	25	2
G15	8	113-120	Y		75	2
G16	8	121-128	Y		125	2
G17	8	129-136	Y	70% 주정추출물(AG) +Vitamin B ₆	75 + 25	2
G18	8	137-144	Y		225 + 75	2
G19	8	145-152	Y		375 + 125	2

(3) 시험진행

(가) 시험방법

시험물질은 1일 1회로 7일간 반복 투여하였고 양성대조물질은 마지막 시험물질 투여일에 단회 경구 투여하였음. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. 투여방법은 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존테를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여함. 마지막 시험물질 투여일에 모든 동물에 대하여 투여 전 채혈(0h)을 실시한 다음, 모든 유발 해당군에 potassium oxonate를 250 mg/kg 복강 투여하여 고요산혈증을 유발하였음. 시험물질 투여 후 1, 2, 3 h째에 안와채혈 방법으로 채혈하여 혈액생화학 분석에 사용하였음.

(나) 통계처리

본 시험의 결과에 대하여 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures)를 사용하였음. 모수적인 다중비교의 경우, 자료의 정규성을 가정하고, 모수적 일원분산분석(One-way ANOVA)으로 검정하였으며, 그 결과가 유의할 경우, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후검정을 실시하여 시험군간 유의한 차이를 분석하였음. 통계학적 분석은 Prism 5.03(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 및 SPSS Statistics 18.0K를 이용하여 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 체중

시험물질 투여 전 체중 측정 결과, 모든 시험군간 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.

(나) 혈중 요산 감소 관련 효능 검토

혈액 생화학적 분석 결과, 시험물질 투여 전(0h) 70% 추정추출물 저용량 투여군(G8), 70% 추정추출물 중간용량 투여군(G9), 70% 추정추출물 고용량 투여군(G10) 및 섬썩부쟁이 추출물(AG) + Vitamin B₆ 중간용량 투여군(G18)의 UA 수준은 정상대조군(G1) 및 유발대조군(G2)에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮은 것으로 나타남 (p<0.05 및 p<0.001).

시험물질 투여 후 1h 및 2h째의 요산 농도 수준은 양성대조군(G3)을 제외한 전 시험군에서 정상대조군(G1)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 (p<0.001), 양성대조군(G3)의 요산 농도 수준은 정상대조군(G1)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남 (p<0.01). 또한, 양성대조군(G3)의 요산 농도 수준은 유발대조군(G2)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남 (p<0.001).

시험물질 투여 후 3h째의 요산 농도 수준은 50% 추정추출물 저용량 투여군(G5) 및 Vitamin B₆ 저용량 투여군(G14)에서 정상대조군(G1)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났으며 (p<0.05 및 p<0.01), 양성대조군(G3)의 요산 농도 수준은 정상대조

군(G1)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났음 (p<0.001). 또한, 양성대조군(G3)의 요산 농도 수준은 유발대조군(G2)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타남 (p<0.001).

Table 19. 코요산혈증 모델 동물시험에서 시간별 혈중 요산 농도

		URIC ACID					UNIT: mg/dL
HOURS	GROUPS						
	G1	G2	G3	G4	G5		
0	1.30 ± 0.23	1.35 ± 0.14	1.26 ± 0.11	1.14 ± 0.10 [#]	1.33 ± 0.13		
1	1.34 ± 0.23	3.04 ± 0.36 ^{***}	0.59 ± 0.33 ^{*/###}	2.92 ± 0.09 ^{***}	3.05 ± 0.29 ^{***}		
2	1.38 ± 0.24	2.43 ± 0.49 ^{***}	0.27 ± 0.14 ^{***/###}	2.26 ± 0.24 ^{***}	2.46 ± 0.36 ^{***}		
3	1.68 ± 0.23	2.08 ± 0.32	0.26 ± 0.10 ^{***/###}	1.93 ± 0.27	2.18 ± 0.36 [*]		
N	8	8	8	8	8		
HOURS	GROUPS						
	G6	G7	G8	G9	G10		
0	1.13 ± 0.14 [#]	1.30 ± 0.18	0.99 ± 0.14 ^{***/###}	0.91 ± 0.11 ^{***/###}	1.07 ± 0.07 ^{*/#}		
1	3.27 ± 0.25 ^{***}	3.06 ± 0.33 ^{***}	3.01 ± 0.48 ^{***}	2.81 ± 0.33 ^{***}	3.08 ± 0.40 ^{***}		
2	2.60 ± 0.23 ^{***}	2.39 ± 0.38 ^{***}	2.37 ± 0.39 ^{***}	2.25 ± 0.40 ^{***}	2.40 ± 0.58 ^{***}		
3	1.90 ± 0.20	1.97 ± 0.36	1.98 ± 0.36	1.91 ± 0.42	2.06 ± 0.38		
N	8	8	8	8	8		
HOURS	GROUPS						
	G11	G12	G13	G14	G15		
0	1.26 ± 0.09	1.28 ± 0.17	1.37 ± 0.07	1.36 ± 0.14	1.34 ± 0.12		
1	3.01 ± 0.44 ^{***}	2.54 ± 0.36 ^{***}	2.87 ± 0.64 ^{***}	3.25 ± 0.81 ^{***}	3.15 ± 0.41 ^{***}		
2	2.27 ± 0.37 ^{***}	2.19 ± 0.33 ^{***}	2.37 ± 0.53 ^{***}	2.68 ± 0.68 ^{***}	2.53 ± 0.38 ^{***}		
3	1.81 ± 0.22	1.89 ± 0.37	2.03 ± 0.33	2.27 ± 0.51 ^{**}	1.98 ± 0.29		
N	8	8	8	8	8		
HOURS	GROUPS						
	G16	G17	G18	G19			
0	1.12 ± 0.07 [#]	1.36 ± 0.19	1.05 ± 0.29 ^{*/#}	1.12 ± 0.20			
1	2.93 ± 0.34 ^{***}	3.06 ± 0.42 ^{***}	2.72 ± 0.46 ^{***}	2.95 ± 0.40 ^{***}			
2	2.24 ± 0.31 ^{***}	2.59 ± 0.33 ^{***}	2.13 ± 0.29 ^{**}	2.41 ± 0.29 ^{***}			
3	2.07 ± 0.52	2.01 ± 0.31	1.75 ± 0.17	2.03 ± 0.26			
N	8	8	8	8			

데이터는 Mean ± S.D.값으로 나타냄. ***/** (p<0.001/p<0.01/p<0.05): 정상군 (G1)과 비교했을 때 통계적 유의성. #### (p<0.001/p<0.05): 유도군 (G2)과 비교했을 때 통계적 유의성. G1: Normal control, G2: Negative control, G3: Positive control, G4: Vitamin B₉ 50, G5: 50% 주정추출물 100, G6: 50% 주정추출물 300, G7: 50% 주정추출물 500, G8: 70% 주정추출물 100, G9: 70% 주정추출물 300, G10: 70% 주정추출물 500, G11: 70% 주정추출물(AG) 75, G12: 70% 주정추출물(AG) 225, G13: 70% 주정추출물(AG) 375, G14: Vitamin B₆ 25, G15: Vitamin B₆ 75, G16: Vitamin B₆ 125, G17: 70% 주정추출물(AG) + Vitamin B₆; 75 + 25, G18: 70% 주정추출물(AG) + Vitamin B₆; 225 + 75, G19: 70% 주정추출물(AG) + Vitamin B₆; 375 + 125

평균값으로 결과를 분석하면 효능이 없는 것처럼 보이나 개별 data를 보면 한 군 안에 효능이 우수한 개체와 미약한 개체가 분포되어 있어 개체 편차가 크다는 것을 확인할 수 있었음. 또한 이는 일부 시험물질 처리군에서 나타나는 현상이 아니라 거의 모든 시험물질 처리군에서 나타났음. 따라서 각각의 개별 data를 분석하여 시험물질의 혈중 요산 감소 효능에 대한 가능성을 예측해 볼 필요가 있다고 판단하였음.

우선, 마지막 시험물질 투여일의 투여 전(0h) 결과를 다음과 같이 분석해 보았음.

G1~G3은 부형제만 6일간 섭취한 동일 조건 상태이므로 한 그룹으로 묶어 평균 요산 농도를 구하였고, 이를 나머지 그룹 G4~G19와 비교하여 시험물질을 6일간 투여함으로 나타나는 체내 반응을 분석하였음. 그 결과, 부형제 처리군의 평균 요산 농도가 1.30으로 나타날 때 G5, G13, G14, G15, G17을 제외한 대다수의 그룹에서 그 수치보다 낮게 나타남을 확인할 수 있었음(Table 20).

Table 20. 고요산혈증 모델 동물시험에서 개체별 혈중 요산 농도(0h)

****부형제 처리군의 평균 요산 농도 1.30 이하의 수치를 표시**

또한 Vitamin B₉(G4) (p<0.01), 50% 주정추출물 300 mg/kg(G6) (p<0.01), 70% 주정추출물 100, 300, 500 mg/kg(G8, G9, G10) (p<0.001 및 p<0.05), Vitamin B₆ 125 mg/kg(G16) (p<0.01) 및 70% 주정추출물 225 mg/kg + Vitamin B₆ 75 mg/kg(G18) (p<0.05) 투여군의 평균 요산 농도는 유발대조군 대비 통계적으로도 유의하게 감소했음을 알 수 있었음. 이를 바탕으로 시험물질을 지속적으로 투여하면 혈중 요산 조절 작용이 있음을 예측할 수 있었음.

Allopurinol(양성대조군)의 경우 처리 1h 후부터 급격한 요산 수치 저하를 나타냈음. 이는 정상수치 보다 지나치게 낮으며 이를 통해 allopurinol 복용 시 나타나는 부작용을 예측할 수 있었음.

시험물질 투여 후 2h째에는 70% 주정추출물 500 mg/kg(G10) 및 70% 주정추출물 225 mg/kg과 Vitamin B₆ 75 mg/kg 혼합물(G18)의 일부 개체에서 정상대조군과 유사한 수치를 나타냈음.

마지막으로 시험물질 투여 후 3h째에는 미미하게 증가하던 정상대조군의 요산 수치가 일시적으로 소폭 상승하였음. 이렇듯 아무런 처리를 하지 않은 정상대조군에서도 요산 수치의 증가가 발생하므로 고요산혈증 유발 후의 자연적 회복 정도보다 빠르게 수치를 감소시킨 50% 주정추출물 300 mg/kg(G6), 70% 주정추출물 75 mg/kg(G11), Vitamin B₆ 75 mg/kg(G15)은 그 효과가 있다고 판단됨(3h째의 요산 수치에서 1h째의 요산 수치를 뺀 차이 비교). 또한 70% 주정추출물 75 mg/kg(G6) 및 70% 주정추출물 225 mg/kg과 Vitamin B₆ 75 mg/kg 혼합물(G18)에서 유발대조군 대비 유의한 감소효과가 있음을 확인하였음 (Student's t-test, p<0.05).

Table 21. 고요산혈증 모델 동물시험에서 개체별 혈중 요산 농도(3h)

4.33	1.30	1.34	1.30	4.00	4.31	1.34	1.00	1.00	1.10	1.0	1.30	1.31	1.30	4.44
2.18	1.9	1.97	1.98	1.91	2.06	1.81	1.89	2.03	2.27	1.98	2.07	2.01	1.75	2.03
0.36	0.2	0.36	0.36	0.42	0.38	0.22	0.37	0.33	0.51	0.29	0.52	0.31	0.17	0.26

**정상군의 평균 요산 농도 1.68 이하의 수치를 표시

결론적으로 본 시험 조건하에서 Sprague-Dawley rat을 이용한 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 모델에 대하여 시험물질(Vitamin B₆, Vitamin B₉, 섬썩부쟁이 주정추출물 및 섬썩부쟁이 주정추출물 + Vitamin B₆)의 요산 생성 억제 및 배출 촉진 효력은 양성대조물질 allopurinol에 비하여 미약하나, 각 개체의 시간별 요산 농도 수치를 분석해보면 효능을 보이는 군이 있음을 알 수 있었음.

나. 섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin C 혼합물의 고요산혈증 동물모델 효능 검색 VI [\[고려은단\]](#)

(1) 시험목적

섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028)과 Vitamin C를 potassium oxonate로 유도한 고요산혈증 Sprague-Dawley rat에 경구투여한 후 혈중 요산 농도를 시간별로 측정하여 시료에 의한 각각의 요산 농도 감소 효능과 혼합물에 의한 상승 및 상가 효과를 확인하고자 함.

(2) 시약 및 재료

(가) 시약 및 재료

Potassium oxonate(PO), xanthine는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였음. Vitamin C는 고려은단 메가도스 C를 사용하였음. 섬썩부쟁이 70% 주정추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받았음. Ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea)제품을 사용하였음. Hydrochloric acid solution, potassium allantoxanate, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, BCA protein assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA)제품을 사용하였음.

항체는 Santa cruz biotechnology의 mouse monoclonal β -actin(Santa Cruz, CA, USA), abcam의 rabbit polyclonal GLUT9, OAT1(Cambridge, MA, UK) 제품을 사용하였음.

생화학 분석은 Fuji Dri-chem 3000(Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

시험동물은 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 7주령 수컷 Sprague-Dawley rat

을 입수하여 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$ 로 설정한 설치류 사육구역(우정 바이오)에서 1주일간 순화 후 시험을 실시하였고, 사료와 음수는 자유 섭취하게 하였음.

(다) 시험군의 구성

군	동물수 (마리)	동물번호	통풍 유발여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1	7	1-7	N	부형제	-	2
G2	7	8-14	Y	부형제	-	2
G3	7	15-21	Y	Allopurinol	50	2
G4	7	22-28	Y	Vitamin C	100	2
G5	7	29-35	Y	Vitamin C	300	2
G6	7	36-42	Y	Vitamin C	500	2
G7	7	43-49	Y	AG-D028	500	2
G8	7	50-56	Y	AG-D028 500 mg/kg + Vitamin C	100	2
G9	7	57-63	Y	AG-D028 500 mg/kg + Vitamin C	300	2
G10	7	64-70	Y	AG-D028 500 mg/kg + Vitamin C	500	2

G1: 정상대조군, G2: 유발대조군, G3: 양성대조군, G4-G6: Vitamin C, G7: 침묵부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028), G8-G10: 침묵부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028) + Vitamin C

(3) 시험진행

(가) 시험방법

시험물질은 1일 1회 14일간 반복 투여하였고 양성대조물질은 마지막 시험물질 투여일에 단회 경구투여 하였음. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. 투여방법은 경배부 피부를 고정하고 경구투여용 존테를 장착한 주사관을 이용하여 위내에 직접 투여하였음. 마지막 시험물질 투여일에 모든 동물에 대하여 투여 전 채혈(0h)을 실시한 다음, 모든 유발 해당군에 potassium oxonate를 250 mg/kg 복강 투여하여 고요산혈증을 유발하였음. 유발물질 투여 후 2, 3, 4h째에 안와채혈 방법으로 채혈한 다음 부검을 진행하여 간, 신장을 적출하였음.

(나) Hepatic xanthine oxidase(XO) 저해 효능 측정

Rat의 간을 80 mM sodium phosphate buffer(pH7.4)를 넣고 파쇄하여 enzyme를 extract하였음. 1 mM potassium allantoxanate가 포함된 50 mM phosphate buffer (pH7.5) 800 uL에 enzyme extract 25 uL를 넣고 37°C에서 15분 동안 incubation 진행하였음. 그 다음 250 uM xanthine을 175 uL 넣고 37°C에서 30분 동안 incubation 하였음. 0.6 M HCl 75 uL을 넣어 반응을 정지시킨 다음 RT, 3000 x g로 5분 동안 원심분리하고 상층액 200 uL를 96 well UV plate에 담아 295 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(다) 혈중 요산 관련 transporter의 단백질 발현 확인(Western blotting)

Rat의 신장 1 g당 RIPA lysis buffer를 5 mL 넣어 주고 homogenizer로 파쇄하여 protein을 extract하였음. SDS-PAGE gel을 이용하여 GLUT9, OAT1의 발현을 확인

하였음.

(라) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 이용하며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 체중 및 조직 무게

시험물질 투여 전과 투여 기간 동안의 체중 및 조직 무게 측정 결과, 모든 시험군 간 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않음.

(나) 혈중 요산 감소 관련 상승 및 상가 효능

혈액 생화학적 분석 결과, 시험물질 투여 전(0h) 유발대조군의 요산 수준은 정상대조군 대비 통계적 유의차는 없는 것으로 나타났음.

유발물질 투여 후 2, 3, 4h째에서는 정상대조군에 비하여 유발대조군에서 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 관찰되었으며, 양성대조군은 유의적으로 감소한 것으로 확인되었음. 그 외의 군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았음.

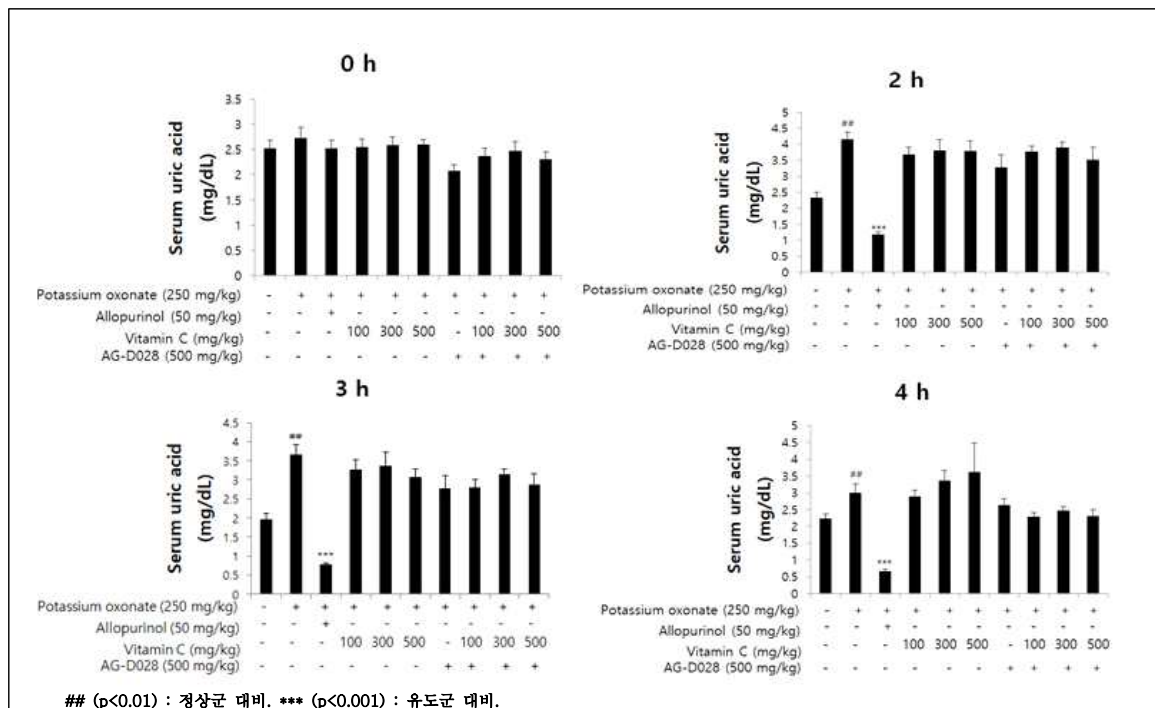


Fig. 38. 고요산혈증 모델 동물시험에서 시간별 혈중 요산 농도

평균값으로는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 혼합물에 의한 감소 효과가 관찰된 바, 각각의 개별 data를 분석하여 시험물질의 혈중 요산 감소 효능에 대한 가능성을 예측해보았음.

우선, 마지막 시험물질 투여일의 투여 전(0h) 결과를 다음과 같이 분석해 보았음.

G1~G3은 부형제만 13일간 섭취한 동일 조건 상태이므로 한 그룹으로 묶어 평균 요산농도를 구하였고, 이를 나머지 G4~G10과 비교하여 시험물질을 13일간 투여함으로써 나타나는 체내 반응을 분석하였음. 그 결과, 정상대조군의 평균 요산 농도가 2.59로 나타날 때, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028) 500 mg/kg 투여군의 모든 개체가 평균 요산 농도보다 낮음을 확인함. 또한, Vitamin C 단독 투여군에 비해 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 혼합하여 투여한 군에서 전반적으로 혈중 요산 수치가 낮음을 확인할 수 있었음.

Table 22. 고요산혈증 모델 동물시험에서 개체별 혈중 요산 농도(0h)

ANIMAL ID	Normal	Negative control	Allopuriol	Vitamin C				AG-D028	AG-D028 + Vitamin C		
			50	100	300	500	500	500 + 100	500 + 300	500 + 500	
1	2.3	2.3	2.6	3	2.9	2.5	2.4	2.4	2.8	1.9	
2	3	2.9	2.5	3.2	2.5	2.8	1.9	3	2.8	2.6	
3	2.2	2.3	1.9	2.1	2.7	2.3	2	2.7	2.1	2.6	
4	1.9	2.6	2.2	2.2	2.8	2.7	2.5	2.5	-	1.8	
5	3	3.1	2.7	2.4	1.8	2.3	1.5	1.9	1.7	1.9	
6	2.8	2.2	3.2	2.7	3.1	2.7	2.1	2.3	2.9	2.8	
7	2.5	3.7	2.6	2.2	2.3	2.9	2.1	1.8	2.5	2.5	
MEAN	2.53	2.73	2.53	2.54	2.59	2.60	2.07	2.37	2.47	2.30	
SD	0.42	0.54	0.41	0.43	0.43	0.24	0.33	0.42	0.48	0.42	

**부형제 처리군의 평균 요산 농도 2.59 이하의 수치를 표시

시험물질 투여 후 4h째에는 정상대조군의 평균 요산 농도가 2.23으로 나타날 때, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 단독 처리군 보다 Vitamin C 100, 500 mg/kg를 함께 투여한 군에서 정상대조군의 요산 농도보다 낮은 개체의 수가 많음을 확인함.

Table 23. 고요산혈증 모델 동물시험에서 개체별 혈중 요산 농도(4h)

ANIMAL ID	Normal	Negative control	Allopuriol	Vitamin C				AG-D028	AG-D028 + Vitamin C		
			50	100	300	500	500	500 + 100	500 + 300	500 + 500	
1	2.3	2.5	0.8	3.4	2.9	3	3.1	2.4	2.3	2.1	
2	1.8	2.3	0.6	3.1	2.9	3.9	2.2	2.4	3.1	2.6	
3	2.2	2.5	0.9	2.6	4.8	2.6	3.5	2.1	2.5	1.9	
4	2.1	3.1	0.5	2.3	3	2.4	2.5	2.9	-	3.2	
5	2.5	4.3	0.5	3.7	2.7	8.6	2.4	2.1	2.3	1.7	
6	2.9	3.6	0.7	2.5	3.1	2.8	2.1	2	2.3	2.1	
7	1.8	2.7	0.7	2.6	4.2	2.1	2.7	2.1	2.3	2.6	
MEAN	2.23	3.00	0.67	2.89	3.37	3.63	2.64	2.29	2.47	2.31	
SD	0.39	0.72	0.15	0.52	0.80	2.26	0.50	0.31	0.32	0.51	

**정상군의 평균 요산 농도 2.23 이하의 수치를 표시

결론적으로 본 시험 조건하에서 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물과 Vitamin C의 혼합물은 각 시험물질의 단독 처리보다 요산 생성 억제 및 배출 촉진 효력이 증가하는 것으로 판단됨.

(다) Hepatic xanthine oxidase(XO) 저해 효능

Potassium oxonate에 의해 유의적으로 xanthine oxidase 활성이 증가되었을 때, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 단독 처리 시 가장 우수한 hepatic xanthine oxidase 저해 효능이 관찰됨. Vitamin C 단독 처리 시에는 농도의존적인 저해 효능이 나타났으나 정상대조군 대비 높은 수치로 확인되었음.

한편, 섬쭉부쟁이 70% 주정추출물 500 mg/kg과 Vitamin C 100 mg/kg 혼합 투여군

은 Vitamin C 100 mg/kg 단독 투여군 보다 xanthine oxidase 활성이 급격히 저해되는 것으로 나타났음. 이를 통해 섬썩부쟁이 70% 주정추출물에 의한 상가 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

결론적으로 본 실험 조건하에서는 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 500 mg/kg과 Vitamin C 100 mg/kg이 최적의 조합임을 확인할 수 있었음.

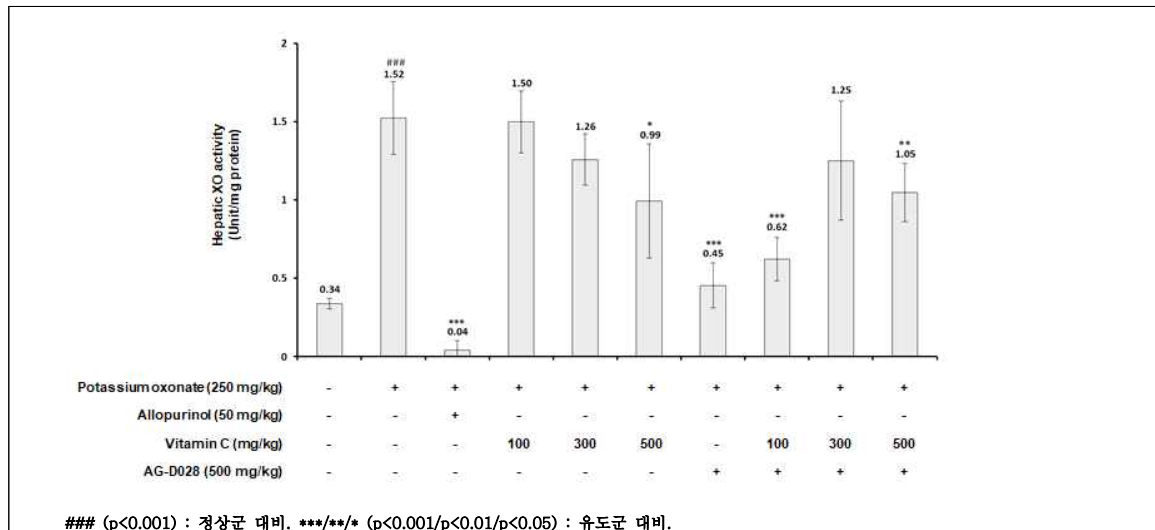


Fig. 39. 섬썩부쟁이와 Vitamin C의 hepatic xanthine oxidase 활성 억제 상승 및 상가 효과

(라) 혈중 요산 감소 기전 확인

섬썩부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028)과 Vitamin C를 투여한 rat의 신장을 이용하여 OAT1, GLUT9의 발현을 western blotting을 통해 확인해 보았음. 그 결과 potassium oxonate(PO)에 의해 OAT1의 발현이 감소되었고 Vitamin C에 의해서는 용량의존적으로 발현이 증가되었으며, 섬썩부쟁이 70% 주정추출물 500 mg/kg과 Vitamin C 500 mg/kg 투여군에서 시너지 효과가 있음이 확인되었음.

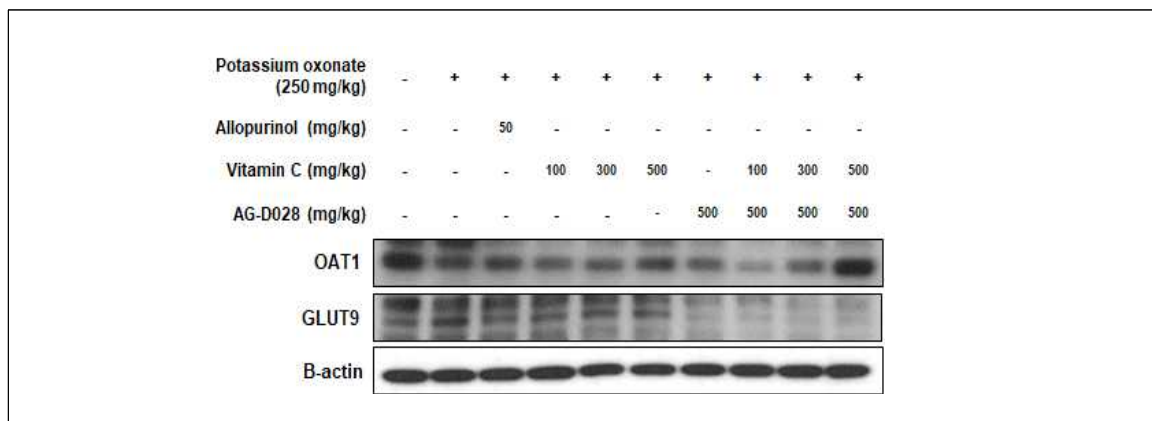


Fig. 40. 섬썩부쟁이와 Vitamin C의 혈중 요산 감소 기전 확인

Potassium oxonate에 의해 증가된 GLUT9의 발현은 섬췌부쟁이 70% 주정추출물 및 섬췌부쟁이 70% 주정추출물(AG-D028)과 Vitamin C 혼합 처리에 의해 감소되는 것이 확인되었음.

이상의 결과를 통해 혈중 요산 감소 상승 효과는 섬췌부쟁이 70% 주정 추출물과 Vitamin C 혼합 처리에 의한 OAT1 발현 증가에 기인한다고 사료됨.

3. 제품의 표준화

가. 제품을 위한 제형연구

Synergic effect가 있는 원료로 판단되는 Vitamin C를 혼합하여 제품의 표준화를 진행하였음. Vitamin C는 다양한 기능성 원료 중 자사에서 가장 쉽게 접근 가능하며, 매출이 높은 원료로서 제품 판매에 도움이 될 것으로 판단함.

(1) 제형에 적합한 배합비 확립

(가) 과립

No.	원료명	배합목적	배합비(%)	비고
1	섬썩부쟁이추출물	기능성원료	24.0000	
2	비타민C	기능성원료	5.0000	
3	말토덱스트린	부형제	69.0000	
4	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제	2.0000	
합계			100.00	

(나) 나정

No.	원료명	배합목적	배합비(%)	비고
1	섬썩부쟁이추출물	기능성원료	53.3400	
2	L-아스코르빈산칼슘	기능성원료	12.4850	
3	결정셀룰로오스	부형제	26.0750	
4	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제	2.0000	
5	스테아린산마그네슘	활택제	1.5000	
6	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	붕해제	3.6000	
7	이산화규소	고결방지제	1.0000	
합계			100.00	

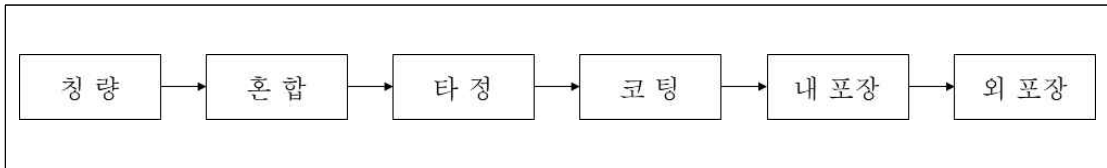
(다) 코팅정

No.	원료명	배합목적	배합비(%)	비고
1	섬썩부쟁이추출물	기능성원료	53.3400	
2	비타민C	기능성원료	12.4850	
3	결정셀룰로오스	부형제	22.0750	
4	히드록시프로필메틸셀룰로오스	결합제	2.0000	
5	스테아린산마그네슘	활택제	1.5000	
6	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	붕해제	3.6000	
7	이산화규소	고결방지제	1.0000	
8	백색코팅제	코팅제	3.9400	히드록시프로필메틸셀룰로오스 67%, 이산화티타늄 25%, 트리아세틴 8%
9	바닐라향	향료	0.0600	
합계			100.00	

나. 제품 제조공정 연구

(1) 제형연구를 통한 배합비 설정 및 제품 생산 진행

- ▶ 샘플로 제작한 제형별 성상, 향 및 간편성 등을 고려하여 코팅정제로 제형을 설정하여 배합비율을 설정함.



(2) 제품의 공정검사에 적합한 공정을 확립하여 제조지시서 확립

(가) 제조지시서 작성

각 공정별 중량, 두께, 마순도 및 봉해 확인 등을 통해 기준 설정

<h4>원제품 입고 승인서</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>부품명</th> <td></td> </tr> <tr> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>입고수량</th> <td></td> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>검체수명</th> <td></td> </tr> <tr> <th>유통기한</th> <td></td> <th>검체소형</th> <td></td> </tr> </table> <p>상기 원제품의 입고를 승인합니다. 년 월 일</p> <p>신용(서명):</p> <p>제조기류 점검부</p> <p>품질공정 점검부</p> <p>합격자</p> <p>상기 원제품의 입고를 승인합니다. 년 월 일</p> <p>품질관리(OK):</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	부품명		제조번호	AGP-	입고수량		제조일자		검체수명		유통기한		검체소형		<h4>칭량 기록서</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>제조일자</th> <td>450 kg</td> <th>500,000 mg</th> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>기준 중량</th> <td>664 mg/정</td> <th>허용범위</th> <td>AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>용량분별</th> <th>실분율</th> <th>시정분율</th> <th>배합비율 (%)</th> <th>기준량 (g)</th> <th>사용량 (g)</th> <th>일차</th> <th>합계</th> <th>확인자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>부위명(순수량)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>결정성분용량</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원소시약</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>스티라실산(그대용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>카복시시정성분용량(보조성분용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>이산화규소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>합계 100% 453 kg 452 kg</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg	제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg	용량분별	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자	원제품명									원제품명									부위명(순수량)									결정성분용량									원소시약									스티라실산(그대용)									카복시시정성분용량(보조성분용)									이산화규소									합계									<h4>제조 공정 기록서 (혼합)</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>제조일자</th> <td>450 kg</td> <th>500,000 mg</th> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>기준 중량</th> <td>664 mg/정</td> <th>허용범위</th> <td>AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>용량분</th> <th>실분율</th> <th>시정분율</th> <th>배합비율 (%)</th> <th>기준량 (g)</th> <th>사용량 (g)</th> <th>일차</th> <th>합계</th> <th>확인자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>부위명(순수량)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>결정성분용량</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원소시약</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>스티라실산(그대용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>카복시시정성분용량(보조성분용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>이산화규소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>합계 100% 453 kg 452 kg</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg	제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg	용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자	원제품명									원제품명									부위명(순수량)									결정성분용량									원소시약									스티라실산(그대용)									카복시시정성분용량(보조성분용)									이산화규소									합계																																																																																															
제품명	원제품명	부품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
제조번호	AGP-	입고수량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
제조일자		검체수명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
유통기한		검체소형																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
용량분별	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
부위명(순수량)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
결정성분용량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원소시약																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
스티라실산(그대용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
카복시시정성분용량(보조성분용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
이산화규소																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
합계																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
부위명(순수량)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
결정성분용량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원소시약																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
스티라실산(그대용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
카복시시정성분용량(보조성분용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
이산화규소																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
합계																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
<h4>제조 공정 기록서 (타정)</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>제조일자</th> <td>450 kg</td> <th>500,000 mg</th> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>기준 중량</th> <td>664 mg/정</td> <th>허용범위</th> <td>AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>용량분</th> <th>실분율</th> <th>시정분율</th> <th>배합비율 (%)</th> <th>기준량 (g)</th> <th>사용량 (g)</th> <th>일차</th> <th>합계</th> <th>확인자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>부위명(순수량)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>결정성분용량</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원소시약</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>스티라실산(그대용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>카복시시정성분용량(보조성분용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>이산화규소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>합계 100% 453 kg 452 kg</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg	제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg	용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자	원제품명									원제품명									부위명(순수량)									결정성분용량									원소시약									스티라실산(그대용)									카복시시정성분용량(보조성분용)									이산화규소									합계									<h4>공정 검사 기록서 (타정, 품질관리부서)</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>제조일자</th> <td>450 kg</td> <th>500,000 mg</th> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>기준 중량</th> <td>664 mg/정</td> <th>허용범위</th> <td>AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>용량분</th> <th>실분율</th> <th>시정분율</th> <th>배합비율 (%)</th> <th>기준량 (g)</th> <th>사용량 (g)</th> <th>일차</th> <th>합계</th> <th>확인자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>부위명(순수량)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>결정성분용량</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원소시약</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>스티라실산(그대용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>카복시시정성분용량(보조성분용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>이산화규소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>합계 100% 453 kg 452 kg</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg	제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg	용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자	원제품명									원제품명									부위명(순수량)									결정성분용량									원소시약									스티라실산(그대용)									카복시시정성분용량(보조성분용)									이산화규소									합계									<h4>제조 공정 기록서 (코팅, 선별)</h4> <table border="1"> <tr> <th>제품명</th> <td>원제품명</td> <th>제조번호</th> <td>AGP-</td> <th>제조일자</th> <td>450 kg</td> <th>500,000 mg</th> </tr> <tr> <th>제조일자</th> <td></td> <th>기준 중량</th> <td>664 mg/정</td> <th>허용범위</th> <td>AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg</td> </tr> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>용량분</th> <th>실분율</th> <th>시정분율</th> <th>배합비율 (%)</th> <th>기준량 (g)</th> <th>사용량 (g)</th> <th>일차</th> <th>합계</th> <th>확인자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원제품명</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>부위명(순수량)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>결정성분용량</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>원소시약</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>스티라실산(그대용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>카복시시정성분용량(보조성분용)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>이산화규소</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>합계</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>합계 100% 453 kg 452 kg</p> <p>특이사항:</p> <p>KEC - HF Ver.15-1</p>	제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg	제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg	용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자	원제품명									원제품명									부위명(순수량)									결정성분용량									원소시약									스티라실산(그대용)									카복시시정성분용량(보조성분용)									이산화규소									합계								
제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
부위명(순수량)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
결정성분용량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원소시약																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
스티라실산(그대용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
카복시시정성분용량(보조성분용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
이산화규소																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
합계																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
부위명(순수량)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
결정성분용량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원소시약																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
스티라실산(그대용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
카복시시정성분용량(보조성분용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
이산화규소																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
합계																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
제품명	원제품명	제조번호	AGP-	제조일자	450 kg	500,000 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
제조일자		기준 중량	664 mg/정	허용범위	AGP : ±80 mg AGP+ : ±80 mg																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
용량분	실분율	시정분율	배합비율 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	일차	합계	확인자																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원제품명																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
부위명(순수량)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
결정성분용량																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
원소시약																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
스티라실산(그대용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
카복시시정성분용량(보조성분용)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
이산화규소																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
합계																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

다. 제품의 기준 및 시험법 검증

(1) 지표성분 1(3,5-Dicaffeoylquinic acid) 시험법 검증

(가) 실시항목 및 기준

No.	항목		기준
1	시스템적합성		피크면적에 대한 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간에 대한 상대표준편차는 1.0% 이하
2	특이성		3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성		상관계수(R ²) = 0.990 이상
4	정확성		회수율 평균 : 100 ± 5.0%
5	범위		직선성 범위인 40 ~ 160%
6	정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하
		실험실내정밀성	상대표준편차 5.0% 이하
7	정량한계		최소 범위 이하
8	검출한계		최소 범위 이하

(나) 분석조건 및 이동상 조성

분석조건	
사용기기	HPLC
컬럼	Kromasil 100-5-C18(250 × 4.6mm, 5 μm, Agilent) 또는 이와 동등한 컬럼
컬럼온도	25°C
주입량	5 μL
샘플온도	4°C
이동상	gradient mode (A) - phosphoric acid : DW = 0.5 : 99.5 (v/v), (B) - ACN : phosphoric acid = 99.5 : 0.5 (v/v)
유속	0.8 mL/min
검출파장	330 nm

이동상 조성		
Time	(A)	(B)
0	77	23
5	77	23
15	75	25
16	10	90
20	10	90
21	77	23
26	77	23

(다) 제품 시험법 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목		시험방법
1	시스템적합성		24 ppm 3,5-Dicaffeoylquinic acid in 30% MeOH 용액 6회 반복주입
2	특이성		공시험액, 이동상, 표준액, Placebo용액, 검액, 특이성 용액(Placebo + 표준액) 각각 분석
3	직선성		표준품을 이용하여 50, 75, 100, 125, 150% 범위의 용액 분석 후 Calibration Curve로 상관계수(R ²) 확인
4	정확성		75, 100, 125% 범위의 세 농도(Placebo + 표준액) 분석 후 회수율 측정
5	정밀성	반복성	정확성 결과값으로 확인
		실험실내정밀성	다른 시험일, 다른 시험자로 75, 100, 125% 농도 용액(검액 + 표준액) 분석 후 피크 면적 %RSD 확인
6	정량한계		직선성의 결과로부터 표준편차(σ), 기울기(s)를 측정하여
7	검출한계		검출한계와 정량한계 계산

(라) 시험법 밸리데이션 결과

① 시스템 적합성

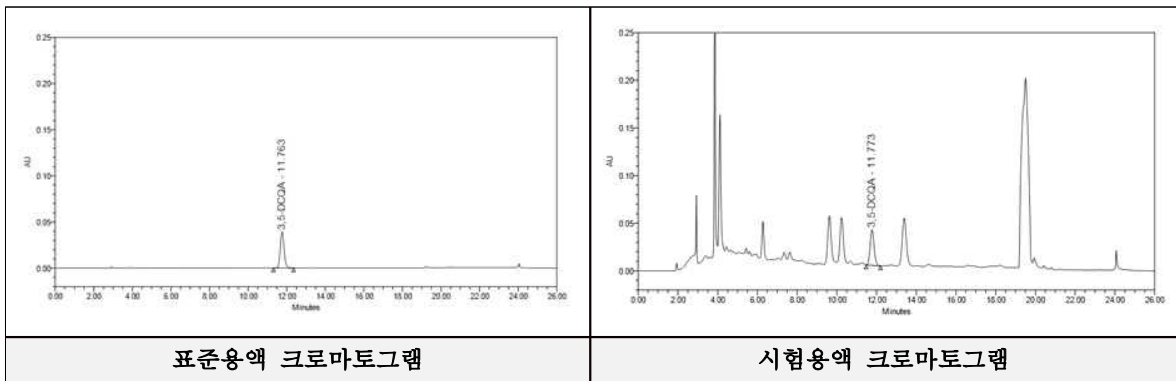
표준용액을 6회 반복측정한 결과 피크면적에 대한 상대표준편차 0.50%로 나타났고, Retention time에 대한 상대표준편차는 0.13%로 우수하게 측정됨.

검체		Peak area	평균	표준편차	상대표준편차
농도($\mu\text{g/mL}$)	측정횟수				
24.12	1	516762	514810.33333	2555.14	0.50
	2	516753			
	3	517750			
	4	513284			
	5	512113			
	6	512200			

검체		Retention time	평균	표준편차	상대표준편차
농도($\mu\text{g/mL}$)	측정횟수				
24.12	1	11.803	11.782	0.01	0.13
	2	11.776			
	3	11.763			
	4	11.770			
	5	11.787			
	6	11.792			

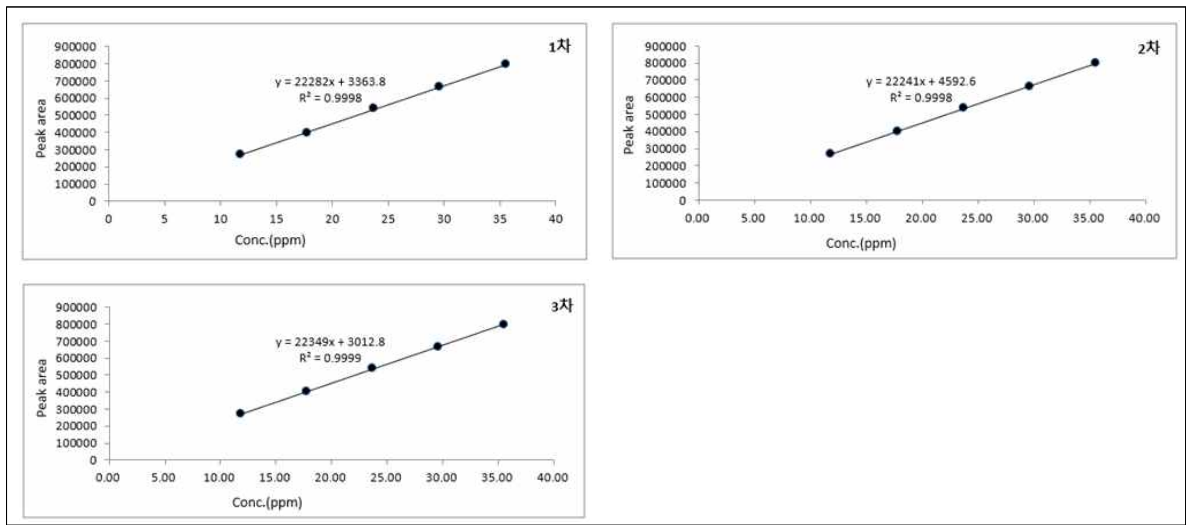
② 특이성

공시험액, 이동상, STD, 검액, 특이성용액을 분석하였을 때 3,5-Dicaffeoylquinic acid 피크에 영향을 주는 인자가 없음을 확인함.



③ 직선성

50, 75, 100, 125, 150%를 범위로 설정하여 Calibration curve로 상관계수(R²)를 확인하였을 때 R2값이 0.9999으로 우수한 직선성을 나타냄.



④ 정확성

75, 100, 125% 범위의 세 농도에 대한 회수율을 확인하였을 때 회수율 평균값이 각각 100.3, 100.6, 99.6%로 기준에 적합함.

구분	함량		
	75%(18 ppm)	100%(24 ppm)	125%(30 ppm)
1	100.6	99.9	98.2
2	100.2	100.9	99.4
3	100.2	101.0	101.1
함량별 평균회수율(%)	100.3	100.6	99.6
전체 평균회수율(%)	100.18		
전체 표준편차	0.92		
회수율 구간	99.46 ~ 100.89		

⑤ 정밀성

- ㉓ 반복성: 75, 100, 125%의 농도에서 피크면적의 %RSD를 구하였을 때 각각 0.24, 0.58, 1.45%로 측정되어 기준에 적합함.
- ㉔ 실험실내 정밀성: 다른 시험일, 다른 시험자로 분석한 결과, 75, 100, 125%의 농도에서 피크면적의 %RSD가 각각 0.40, 0.31, 1.00%로 측정되어 기준에 적합함.

⑥ 검출한계, 정량한계

직선성의 결과로 부터 표준편차(σ) 829.55, 기울기(s) 22290.75을 확인하였으며 이를 이용하여 검출한계와 정량한계를 계산하였을 때, 각각 0.123 ppm, 0.372 ppm으로 확인되었음.

시험항목		기준		결과	판정
시스템적합성		피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하		0.5	적합
		RT의 상대표준편차는 1.0% 이하		0.13	적합
특이성		검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.		영향을 주는 인자가 없다.	적합
직선성		상관계수(R^2) \geq 0.990		0.9999	적합
범위		각 기준량의 50~ 150%		50~ 150%	적합
정확성		회수율 100 \pm 5.0%		100.18%	적합
정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	0.24	적합
			100%	0.58	적합
			130%	1.45	적합
	실험실내 정밀성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	0.40	적합
			100%	0.31	적합
			130%	1.00	적합
검출한계		최소 범위 50% 보다 낮아야 한다.		0.372 ppm (1.55%)	적합
정량한계		최소 범위 50% 보다 낮아야 한다.		0.123 ppm (0.513%)	적합

(2) 지표성분 2(Ascorbic acid) 시험법 검증

(가) 실시항목 및 기준

No.	항목		기준
1	시스템적합성		피크면적에 대한 상대표준편차는 2.0% 이하 피크유지시간에 대한 상대표준편차는 1.0% 이하
2	특이성		3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.
3	직선성		상관계수(R^2) = 0.990 이상
4	정확성		회수율 평균 : $100 \pm 5.0\%$
5	범위		직선성 범위인 40 ~ 160%
6	정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하
		실험실내정밀성	상대표준편차 5.0% 이하
7	정량한계		최소 범위 이하
8	검출한계		최소 범위 이하

(나) 분석조건 및 이동상 조성

분석조건	
사용기기	HPLC
컬럼	Polaris 5 C18(250 × 4.6mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 컬럼
컬럼온도	30℃
주입량	10 μL
이동상	gradient mode (A) - 0.05M KH ₂ PO ₄ (H ₃ PO ₄ 로 pH2.5로 조정) : (B) - DW = 2 : 8
유속	1.0 mL/min
검출과장	254 nm

이동상 조성		
Time	(A)	(B)
0	20	80
8	20	80

(다) 제품 시험법 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목		시험방법
1	시스템적합성		100 ppm Ascorbic acid in 5% 메타인산 용액 6회 반복주입
2	특이성		공시험액, 이동상, 표준액, Placebo용액, 검액, 특이성 용액(Placebo + 표준액) 각각 분석
3	직선성		표준품을 이용하여 40, 70, 100, 130, 160% 범위의 용액 분석 후 Calibration Curve로 상관계수(R ²) 확인
4	정확성		70, 100, 130% 범위의 세 농도(Placebo + 표준액) 분석 후 회수율 측정
5	정밀성	반복성	정확성 결과값으로 확인
		실험실내정밀성	다른 시험일, 다른 시험자로 70, 100, 130% 농도 용액(검액 + 표준액) 분석 후 피크 면적 %RSD 확인
6	정량한계		직선성의 결과로부터 표준편차(σ), 기울기(s)를 측정하여
7	검출한계		검출한계와 정량한계 계산

(라) 시험법 밸리데이션 결과

① 시스템 적합성

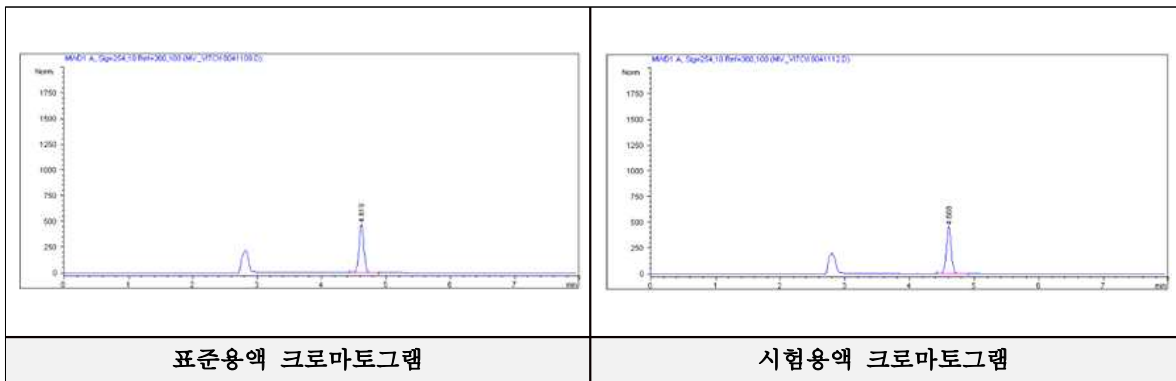
표준용액을 6회 반복측정한 결과 피크면적에 대한 상대표준편차 0.05%로 나타났고, Retention time에 대한 상대표준편차는 0.02%로 우수하게 측정됨.

검체		Peak area	평균	표준편차	상대표준편차
농도($\mu\text{g/mL}$)	측정횟수				
100	1	2429.81299	2448.00757	9.05	0.37
	2	2452.97266			
	3	2452.04004			
	4	2451.72754			
	5	2452.83374			
	6	2448.65845			

검체		Retention time	평균	표준편차	상대표준편차
농도($\mu\text{g/mL}$)	측정횟수				
100	1	4.598	4.600	0.00	0.04
	2	4.600			
	3	4.598			
	4	4.600			
	5	4.600			
	6	4.603			

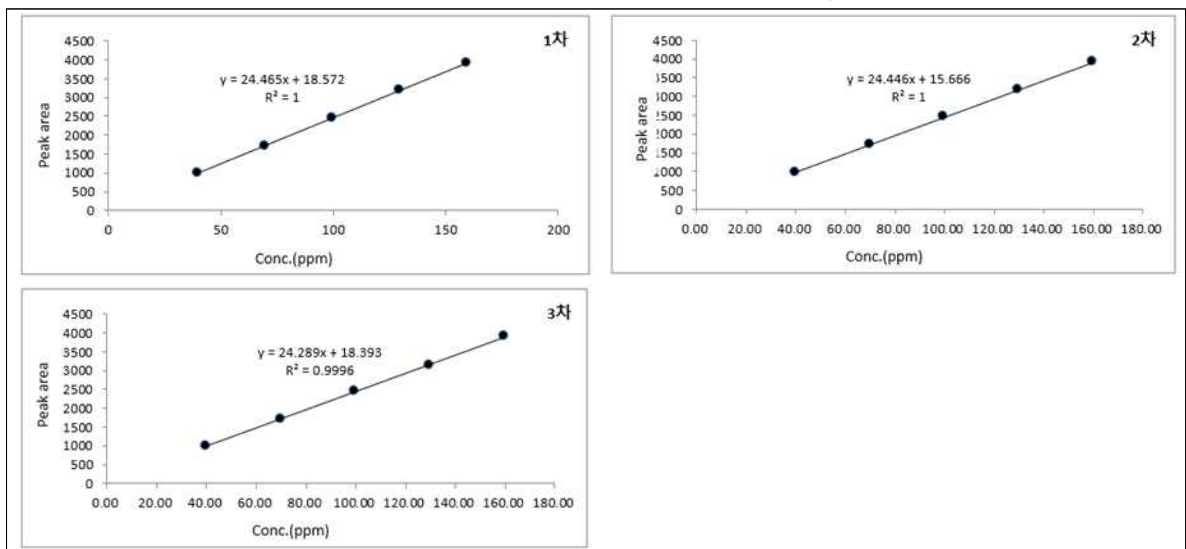
② 특이성

공시험액, 이동상, STD, 검액, 특이성용액을 분석하였을 때 Ascorbic acid 피크에 영향을 주는 인자가 없음을 확인함.



③ 직선성

40, 70, 100, 130, 160%를 범위로 설정하여 Calibration curve로 상관계수(R²)를 확인하였을 때 R²값이 1.0000으로 우수한 직선성을 나타냄



④ 정확성

70, 100, 130% 범위의 세 농도에 대한 회수율을 확인하였을 때 회수율 평균값이 각각 100.5, 100, 102.5%로 기준에 적합함.

구분	합량		
	70%(70 ppm)	100%(100 ppm)	130%(130 ppm)
1	100.1	100.1	102.6
2	100.8	100.5	102.0
3	100.7	99.4	102.9
합량별 평균회수율(%)	100.5	100	102.5
전체 평균회수율(%)	101.01		
전체 표준편차	1.22		
회수율 구간	100.07 ~ 101.97		

⑤ 정밀성

- ㉓ 반복성: 70, 100, 130%의 농도에서 피크면적의 %RSD를 구하였을 때 각각 0.39, 0.54, 0.44%로 측정되어 기준에 적합함.
- ㉔ 실험실내 정밀성: 다른 시험일, 다른 시험자로 분석한 결과, 70, 100, 130%의 농도에서 피크면적의 %RSD가 각각 0.87, 0.46, 0.18%로 측정되어 기준에 적합함.

⑥ 검출한계, 정량한계

직선성의 결과로 부터 표준편차(σ) 1.63, 기울기(s) 24.40을 확인하였으며 이를 이용하여 검출한계와 정량한계를 계산하였을 때, 각각 0.220 ppm, 0.667 ppm으로 확인되었음.

시험항목		기준		결과	판정
시스템적합성		피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하		0.37	적합
		RT의 상대표준편차는 1.0% 이하		0.04	적합
특이성		검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.		영향을 주는 인자가 없다.	적합
직선성		상관계수(R^2) \geq 0.990		0.9999	적합
범위		각 기준량의 40~160%		40~160%	적합
정확성		회수율 100 \pm 5.0%		101.01%	적합
정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	0.39	적합
			100%	0.54	적합
			130%	0.44	적합
	실험실내 정밀성	상대표준편차 5.0% 이하	70%	0.87	적합
			100%	0.46	적합
			130%	0.18	적합
검출한계		최소 범위 40% 보다 낮아야 한다.		0.667 ppm (0.67%)	적합
정량한계		최소 범위 40% 보다 낮아야 한다.		0.220 ppm (0.22%)	적합

▶ 위와 같이 모든 밸리데이션 항목에서 기준에 만족하는 결과를 얻어 해당 분석 조건으로 섬썩부쟁이 제품을 분석하는데 적합할 것으로 판단됨

마. 제품에 대한 품질관리
(1) 자사 시험일지 및 성적서

시험일지

제품명	인화제KIC	규격	없음
제품번호	KIC01-2019-001		
시험목적	시험방법		
1. 명칭	백색의 인화제 코팅 용액		
결과	KIC01-2019-001의 인화제 코팅 용액		
2. 확인사항	KIC01-2019-001의 인화제 코팅 용액의 인화제 함량 측정 결과		
결과	인화제 함량 2.4% (인화제 함량 2.4%)		
3. 시험방법	KIC01-2019-001의 인화제 코팅 용액의 인화제 함량 측정 방법		
결과	인화제 함량 2.4% (인화제 함량 2.4%)		
4. 분석방법	KIC01-2019-001의 인화제 코팅 용액의 인화제 함량 측정 방법		
결과	인화제 함량 2.4% (인화제 함량 2.4%)		

KIC-101-00100 1/1 2019.08.08

시험일지

Item	Unit	Value
phosphoric acid (DWS01-100.50%)	phosphoric acid (K27001-100.50%)	25
5	27	25
15	77	23
16	75	25
18	18	95
20	19	95
21	77	23
26	77	23

계산식: $C = \frac{W \times V \times P}{W \times 1000 \times 1.132} \times 100$ (%)

C: 시험용액중의 3.5 DCOA 농도(μg/ml)
V: 시험용액의 전체(ml)
W: 용액의 무게(g)
P: 표준용액 농도(%)

계산 결과:
3.5 DCOA 함량: $\frac{25 \times 1000 \times 1.132}{25 \times 1000 \times 1.132} \times 100 = 100\%$

시험용액명: KIC01-2019-001 시험일자: 2019.08.08

1. 표준용액의 조제
3.5 DCOA 100.50g을 용매에 녹여 1000ml로 용액의 농도를 100.50 μg/ml로 조정한다.

2. 인화제 조제
3.5 DCOA 100.50g을 용매에 녹여 1000ml로 용액의 농도를 100.50 μg/ml로 조정한다.

3. 인화제 측정
3.5 DCOA 100.50g을 용매에 녹여 1000ml로 용액의 농도를 100.50 μg/ml로 조정한다.

4. 분석방법
KIC01-2019-001의 인화제 코팅 용액의 인화제 함량 측정 방법

결과: 인화제 함량 2.4% (인화제 함량 2.4%)

2019년 10월 05일
한국기능시험연구원

시험성적서

제품명	인화제KIC	규격	없음
제품번호	KIC01-2019-001		
시험목적	시험기준	시험결과	시험일자
1. 명칭	백색의 인화제 코팅 용액	인화제 함량	2019.08.08
2. 확인사항	표준용액 용액인 용액의 인화제 함량 측정	인화제 함량	2019.08.08
3. 시험방법	3.5 DCOA 100.50g을 용매에 녹여 1000ml로 용액의 농도를 100.50 μg/ml로 조정한다.	인화제 함량	2019.08.08
4. 분석	60분 이내	인화제 함량	2019.08.08
5. 대량검사	없음	N/A	N/A

KIC-101-00100 1/1 2019.08.08

(2) 공인시험 성적서

시험·검사성적서

제명	인화제KIC	제명	인화제KIC
제번호	KIC01-2019-001	제번호	KIC01-2019-001
제명	인화제KIC	제명	인화제KIC
제번호	KIC01-2019-001	제번호	KIC01-2019-001

시험·검사 목적: 인화제 함량 측정

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목	시험·검사 결과
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%

2019년 10월 05일
한국기능시험연구원

시험·검사성적서

제명	인화제KIC	제명	인화제KIC
제번호	KIC01-2019-001	제번호	KIC01-2019-001
제명	인화제KIC	제명	인화제KIC
제번호	KIC01-2019-001	제번호	KIC01-2019-001

시험·검사 목적: 인화제 함량 측정

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항목	시험·검사 결과
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%
인화제 함량	2.4%	인화제 함량	2.4%

2019년 10월 05일
한국기능시험연구원

8절 개별인정형 원료 식약처 신청 준비

1. 기준규격 등 공인시험 자료 확보

가. 식약처 신청을 위한 성적서 확보

(1) 섬쭉부쟁이추출분말(섬쭉부쟁이 70% 추정추출물)의 중금속 성적서 3Lot

제 D2018110093 호 공인시험 성적서																		
제품명	섬쭉부쟁이추출분말	제조업체	(주)농가원															
뢰뢰인	명세명: 섬쭉부쟁이추출분말(70%추출물) 주소: 경기도 안성시 안성읍 안성로 152 (안성동)	당명	지신식															
제조번호	88381001	검수년월일	2018-11-06															
인자번호/인자	제조번호	검수번호	D2018110093															
레뢰가 주뢰 연구원레 시험-검사뢰뢰된 레뢰는 다음과 같습니레. 시험-검사 레뢰일: 2018-11-06 시험-검사 레뢰일레: 지신식 검사레뢰 중 레뢰일레: 공인레																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시험-검사항목</th> <th>시험-검사 레뢰</th> <th>시험-검사 레뢰</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.1410mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0110mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중레드(mg/kg)</td> <td>0.1325mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중구레(mg/kg)</td> <td>검출레</td> <td>레용</td> </tr> </tbody> </table>				시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰	납(mg/kg)	0.1410mg/kg	합이레	카드뮴(mg/kg)	0.0110mg/kg	합이레	중레드(mg/kg)	0.1325mg/kg	합이레	중구레(mg/kg)	검출레	레용
시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰																
납(mg/kg)	0.1410mg/kg	합이레																
카드뮴(mg/kg)	0.0110mg/kg	합이레																
중레드(mg/kg)	0.1325mg/kg	합이레																
중구레(mg/kg)	검출레	레용																
* 레 레뢰레 레뢰레 레뢰, 레뢰 레뢰레레 레뢰레레 레뢰 레뢰레. * 레뢰레 레뢰레 레뢰 레뢰, 레뢰 레뢰 레뢰레레 레뢰레 레뢰레 레뢰레 레뢰레.																		
2018년 11월 6일 한국농식품연구원																		
(시험레뢰연구원)시험레뢰 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원) http://www.khsti.ac.kr 레뢰레레 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원)																		

제 D2018110094 호 공인시험 성적서																		
제품명	섬쭉부쟁이추출분말	제조업체	(주)농가원															
뢰뢰인	명세명: 섬쭉부쟁이추출분말(70%추출물) 주소: 경기도 안성시 안성읍 안성로 152 (안성동)	당명	지신식															
제조번호	88381002	검수년월일	2018-11-06															
인자번호/인자	제조번호	검수번호	D2018110094															
레뢰가 주뢰 연구원레 시험-검사뢰뢰된 레뢰는 다음과 같습니레. 시험-검사 레뢰일: 2018-11-06 시험-검사 레뢰일레: 지신식 검사레뢰 중 레뢰일레: 공인레																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시험-검사항목</th> <th>시험-검사 레뢰</th> <th>시험-검사 레뢰</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.1361mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0140mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중레드(mg/kg)</td> <td>0.1267mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중구레(mg/kg)</td> <td>검출레</td> <td>레용</td> </tr> </tbody> </table>				시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰	납(mg/kg)	0.1361mg/kg	합이레	카드뮴(mg/kg)	0.0140mg/kg	합이레	중레드(mg/kg)	0.1267mg/kg	합이레	중구레(mg/kg)	검출레	레용
시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰																
납(mg/kg)	0.1361mg/kg	합이레																
카드뮴(mg/kg)	0.0140mg/kg	합이레																
중레드(mg/kg)	0.1267mg/kg	합이레																
중구레(mg/kg)	검출레	레용																
* 레 레뢰레 레뢰레 레뢰, 레뢰 레뢰레레 레뢰레레 레뢰 레뢰레. * 레뢰레 레뢰레 레뢰 레뢰, 레뢰 레뢰 레뢰레레 레뢰레 레뢰레 레뢰레 레뢰레.																		
2018년 11월 6일 한국농식품연구원																		
(시험레뢰연구원)시험레뢰 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원) http://www.khsti.ac.kr 레뢰레레 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원)																		

제 D2018110097 호 공인시험 성적서																		
제품명	섬쭉부쟁이추출분말	제조업체	(주)농가원															
뢰뢰인	명세명: 섬쭉부쟁이추출분말(70%추출물) 주소: 경기도 안성시 안성읍 안성로 152 (안성동)	당명	지신식															
제조번호	88381003	검수년월일	2018-11-06															
인자번호/인자	제조번호	검수번호	D2018110097															
레뢰가 주뢰 연구원레 시험-검사뢰뢰된 레뢰는 다음과 같습니레. 시험-검사 레뢰일: 2018-11-06 시험-검사 레뢰일레: 지신식 검사레뢰 중 레뢰일레: 공인레																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시험-검사항목</th> <th>시험-검사 레뢰</th> <th>시험-검사 레뢰</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.1310mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0190mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중레드(mg/kg)</td> <td>0.1363mg/kg</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>중구레(mg/kg)</td> <td>검출레</td> <td>레용</td> </tr> </tbody> </table>				시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰	납(mg/kg)	0.1310mg/kg	합이레	카드뮴(mg/kg)	0.0190mg/kg	합이레	중레드(mg/kg)	0.1363mg/kg	합이레	중구레(mg/kg)	검출레	레용
시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰																
납(mg/kg)	0.1310mg/kg	합이레																
카드뮴(mg/kg)	0.0190mg/kg	합이레																
중레드(mg/kg)	0.1363mg/kg	합이레																
중구레(mg/kg)	검출레	레용																
* 레 레뢰레 레뢰레 레뢰, 레뢰 레뢰레레 레뢰레레 레뢰 레뢰레. * 레뢰레 레뢰레 레뢰 레뢰, 레뢰 레뢰 레뢰레레 레뢰레 레뢰레 레뢰레 레뢰레.																		
2018년 11월 6일 한국농식품연구원																		
(시험레뢰연구원)시험레뢰 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원) http://www.khsti.ac.kr 레뢰레레 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원)																		

(2) 섬쭉부쟁이추출분말 영양분석

제 D2018110095 호 공인시험 성적서																											
제품명	섬쭉부쟁이추출분말	제조업체	(주)농가원																								
뢰뢰인	명세명: 섬쭉부쟁이추출분말(70%추출물) 주소: 경기도 안성시 안성읍 안성로 152 (안성동)	당명	지신식																								
제조번호	88381001	검수년월일	2018-11-06																								
인자번호/인자	제조번호	검수번호	D2018110095																								
레뢰가 주뢰 연구원레 시험-검사뢰뢰된 레뢰는 다음과 같습니레. 시험-검사 레뢰일: 2018-11-06 시험-검사 레뢰일레: 지신식 검사레뢰 중 레뢰일레: 공인레																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시험-검사항목</th> <th>시험-검사 레뢰</th> <th>시험-검사 레뢰</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>단백질(mg/100g)</td> <td>373.265cal/100g</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>탄수화물(g)</td> <td>52.01%</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>총레드(mg)</td> <td>0.20%</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>총지방(mg)</td> <td>21.1%</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>수분(mg)</td> <td>1.01%</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>칼슘(mg)</td> <td>6.20%</td> <td>합이레</td> </tr> <tr> <td>철(mg/100g)</td> <td>441.19 mg/100%</td> <td>합이레</td> </tr> </tbody> </table>				시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰	단백질(mg/100g)	373.265cal/100g	합이레	탄수화물(g)	52.01%	합이레	총레드(mg)	0.20%	합이레	총지방(mg)	21.1%	합이레	수분(mg)	1.01%	합이레	칼슘(mg)	6.20%	합이레	철(mg/100g)	441.19 mg/100%	합이레
시험-검사항목	시험-검사 레뢰	시험-검사 레뢰																									
단백질(mg/100g)	373.265cal/100g	합이레																									
탄수화물(g)	52.01%	합이레																									
총레드(mg)	0.20%	합이레																									
총지방(mg)	21.1%	합이레																									
수분(mg)	1.01%	합이레																									
칼슘(mg)	6.20%	합이레																									
철(mg/100g)	441.19 mg/100%	합이레																									
* 레 레뢰레 레뢰레 레뢰, 레뢰 레뢰레레 레뢰레레 레뢰 레뢰레. * 레뢰레 레뢰레 레뢰 레뢰, 레뢰 레뢰 레뢰레레 레뢰레 레뢰레 레뢰레 레뢰레.																											
2018년 11월 11일 한국농식품연구원																											
(시험레뢰연구원)시험레뢰 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원) http://www.khsti.ac.kr 레뢰레레 레뢰레 레뢰레(시험레뢰연구원)																											

3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차년도 (2015)	혈중 요산감소에 도움을 주는 섬쑥부쟁이 추출물 제조 및 표준화 연구	<ul style="list-style-type: none"> 유효성분의 기준 및 지표 물질 함량측정 	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물(원료)의 유효성분 및 지표물질 검토 HPLC profiling 실시 추출물에서의 지표물질 함량 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물로부터 6종의 dicaffeoylquinic acid(DCQA) 유도 체를 분리하여 3,5-DCQA를 지표물 질로 선정함 3,5-DCQA을 포함한 6종의 DCQAs 와 다양한 에탄올추출물의 HPLC profiling 실시 함 3,5-DCQA의 검량곡선으로부터 추 출물에서의 함량을 측정한 결과, 70℃에서 70% 에탄올을 사용하여 4시간 동안 추출한 경우에 52.59±3.45 mg/A. glehni 100 g의 함량을 측정하였음
		<ul style="list-style-type: none"> 추출물 제조공정 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 에탄올 수용액 추출 물 제조 다양한 온도에서 추출효능 검색 추출시간에 따른 추출효능 검색 	<ul style="list-style-type: none"> 채취시기가 다른(4월, 7월, 10월) 섬쑥부쟁이로부터 30, 50, 70, 80% 에탄올 수용액을 사용하여 추출물 (AGEs)을 제조함 60, 70, 80℃에서 제조한 추출물의 추출효능은 4월 시료 (971-1604-AGEs)에서 추출온도의 영향이 크지 않고 25-30% 수율을 나타냈으며, 7월(971-1507-AGEs), 10월(971-1510-AGEs)시료의 경우 에도 2-3% 포인트 범위에서 근소 한 차이를 나타내 80℃에서 제조 한 경우가 약간 우수함 3, 4, 5, 6시간 동안 추출시간 변화 에 따른 추출효능은 큰 차이가 없 었으나, 5시간 이상 추출한 경우에 근소한 효능을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물의 제조공정 개발 및 기준 및 시험법 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 원재료 품질 및 추출조건 예비검토 	<ul style="list-style-type: none"> 원료의 품질검토 추출조건에 따른 추출수율, 분모건조 가능성, 기호성, 색 택변화 등의 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 울릉도 섬쑥부쟁이를 원료로 설정 하였으며, 원료 공급처를 확보하였 음 열수추출 및 30-95% 주정추출을 수행하였으며, 70% 주정을 최적 용매로 설정하여 분말화 공정을 확립하였음
	<ul style="list-style-type: none"> 원료에 대한 성분시험법 	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분 분석법 확립 및 분 	<ul style="list-style-type: none"> 3,5-dicaffeoylquinic acid를 기능(지 	

		표준화	<ul style="list-style-type: none"> 석 공정관리, 품질관리에 적용 가능한 지표성분 설정 원산지 및 품종별 섬썩부쟁이 지표성분 함량 분석 잔류농약 확인 및 기준설정 	<ul style="list-style-type: none"> 표)성분으로 설정하였음 3,5-dicaffeoylquinic acid의 분석법을 HPLC방법으로 확립하였음 올롱도 섬썩부쟁이의 재배 시기별 원료의 기능(지표)성분의 함량을 확인하였음 잔류농약분석을 공인기관을 통하여 확인하였음
	섬썩부쟁이 추출물을 이용한 건강기능식품 제품 개발 연구	• 제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> 원료물질의 특성과약 <ul style="list-style-type: none"> - Formulation 연구 - 제품의 형태 검토 	<ul style="list-style-type: none"> 원료물질 성상 : 황갈색의 분말 배합성분검토 : 원료 및 각 제형별로 결합제, 활택제, 부형제, 고결방지제 등의 성분의 배합비율 검토 제형검토 : 과립, 분말, 정제, 캡슐 검토 및 배합을 통해 제형 검토
• 제품기획 및 개발 - 시너지 효과를 줄 수 있는 물질 검토		<ul style="list-style-type: none"> 배합원료 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화제 등 - 안정성 향상 원료 검토 - 보존제 및 식품첨가제 검토 	<ul style="list-style-type: none"> 시너지효과 검토 : 원료를 섬썩부쟁이의 다양한 농도와 함께 처리하여 잔탄산화효소 저해 효능을 확인 	
• 혈중 요산 감소 관련 효능 검토		<ul style="list-style-type: none"> 요산 합성억제 측정 요산 배출 촉진 효과 측정 요산 분해 촉진 효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 잔탄옥시다제 활성 저해 측정하여 요산합성 억제 확인 	
• 염증 저해 효과 측정		<ul style="list-style-type: none"> 염증 관련 인자 감소 효과 측정 항염증 인자 증가 효과 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 염증인자 TNF-α, IL-6, Nitric Oxide 측정하여 염증인자 감소 효능 확인 	
• 에탄올추출물의 효능검색		<ul style="list-style-type: none"> 항산화 효능검색 <ul style="list-style-type: none"> - DPPH 라디칼 소거능 - 슈퍼옥사이드라디칼소거능 - 지질과산화 저해효능 잔탄산화효소 저해효능 검색 고요산혈증 동물모델에서 혈중요산 감소효능 검색 	<ul style="list-style-type: none"> DPPH 라디칼 소거 효능 확인 추출용매별 및 농도별 요산 합성 억제 효과 확인 고요산혈증 동물모델에서의 혈중요산 농도 감소 효과 확인 	
• 고요산혈증 저해 기전 연구		<ul style="list-style-type: none"> 혈중 요산 감소효과 기전 연구 및 염증 저해 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 수송체 상호작용 검토 (Transporter assay) 고요산혈증 동물모델에서 혈중 요산 감소 효능 검색 	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 100 ug/ml에서 OAT1는 약 50%, OCT1는 약 25% 저해함을 확인 섬썩부쟁이 70% 주정 추출물과 Vitamin B₆를 함께 처리했을 때의 혈중 요산 감소 효능을 확인 	
2차년도 (2016)	고요산혈증 기전연구<고려대>	• 염증 저해 효과 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> 항염증 효능 검색 <ul style="list-style-type: none"> - NO assay 	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 250 ug/ml에서 약 25%, 500 ug/ml에서 약 80%의 NO 생성 저해 효능을 확인
• 섬썩부쟁이와 비타민의 시너지 효과 검토 (추가연구)		<ul style="list-style-type: none"> 항산화 효능 검색 <ul style="list-style-type: none"> - ABTS 라디칼 소거능 	<ul style="list-style-type: none"> ABTS 라디칼 소거능을 통해 섬썩부쟁이와 Vitamin B₉ 또는 Vitamin E를 같이 처리하면 항산화능이 향 	

			상되는 것을 확인
3,5-dicaffeoyquinic acid HPLC 분석 추가<바이오랜드>	• 3,5-DCQA의 HPLC분석	<ul style="list-style-type: none"> 3,5-DCQA HPLC 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 특이성 - 정확성 - 직선성 - 정밀성 지표성분 분석 및 잔류농약 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 지역별 함량분석 - 원료 수급 	<ul style="list-style-type: none"> 원료의 지표물질인 3,5-DCQA에 대한 시험분석 밸리데이션 실시하여 특이성, 정확성, 직선성, 정밀성 확인 타 지역에서 생산되는 섬썩부쟁이 수급 여부 확인. 잔류농약 시험 확인.
활성물질의 추출 최적화 공정설정 <바이오랜드>	• 섬썩부쟁이 추출물의 최적 추출 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 최적 추출 조건 확립 섬썩부쟁이 추출물의 대량생산체제를 위한 scale up 최적화 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물 제조를 위한 추출설비 조건 마련 섬썩부쟁이 추출물 생산을 통한 최적화 공정 확립.
제조공정의 표준화, 기준규격 표준화 <바이오랜드>	• 제조공정의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 제조공정도 및 포장공정도 작성 수율, 기능 및 지표성분 변화분석 품질기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 시생산 도입을 위한 제조공정도 및 포장공정 작성 공정진행에 따른 각 공정액 분석 및 수율 검토 섬썩부쟁이 추출물 95℃ 열안정성 실험 및 중금속 검사 진행
Pilot 제조실험 및 임상시료 준비 <바이오랜드>	• 시생산	<ul style="list-style-type: none"> Pilot 제조공정 시생산 Pilot 제조시료의 성상 및 기호성 등 품질변화 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물, 시생산 도입 섬썩부쟁이 추출물 함량 및 품질 특성 분석
인체적용시험 계획서(프로토콜)<네오뉴트라>	• 선행연구자료 수집	<ul style="list-style-type: none"> 피험자 모집기준 확립 인체적용시험 계획서 작성 IRB 승인 	<ul style="list-style-type: none"> 피험자 모집 기준 확립하여 프로토콜에 반영 인체적용시험 계획서 작성 IRB 제출 및 승인예정(9월)
인체적용시험 수행 <네오뉴트라>	• 인체적용시험 시험디자인	• 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 인체적용시험	• IRB 승인 후 인체적용시험 수행예정
제품제조공정 연구 <고려은단>	• 표준화된 제조방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> 배합비 확립 보관방법 및 포장방법 설정 사용기기 및 유통기한 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 코팅정제 제형으로 배합비율 작성 보관 방법은 실온이며, PTP 및 펠로우 포장방법으로 설정 사용기기 설정 및 안정성 보고서를 기반으로 유통기한 2년으로 설정함.
제품의 기준 및 시험법 설정 <고려은단>	• 시험일지 및 성적서 작성	<ul style="list-style-type: none"> 제형의 시험기준 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 성상, 분해, 대장균군 등 기능성성분 지표성분 함량시험 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 성상, 확인시험, 정량시험, 분해, 대장균군 기준 및 시험법 확립 기시험 적용한 시험일지 확립 시스템적합성, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, LOD, LOQ 항목

			- Method Validation Protocol & Report	<ul style="list-style-type: none"> 분석을 통해 설정 Method의 적합성 검증 Method validation Protocol 및 Report 작성
	<p>제품 안정성시험 Protocol 개발 <고려은단></p>	<ul style="list-style-type: none"> 안정성시험 Protocol 개발 	<ul style="list-style-type: none"> Protocol 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 저장온도별(15, 25, 35℃) 보관조건을 설정하여 안정성 시험 진행 및 Protocol 개발 및 작성 안정성 시험 결과 최초, 1,2,3개월동안 지표성분인 3,5-Dicaffeoylquinic acid 안정함 확인 시험결과를 바탕으로 유통기한 설정 계산식으로 유통기한 예측 안정성 시험 결과 Report 작성
	부원료 사용	<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 부원료 사용 	<ul style="list-style-type: none"> 장기보존 안정성시험 부원료 사용 	<ul style="list-style-type: none"> 유통온도조건(35℃, 90%)에서 최초,1,2,3개월까지의 안정성 결과 확인 기존 제품에 부원료로 추가 함.
3차년도 (2017)	<p>섬쭉부쟁이 추출물의 안정성 <바이오랜드></p>	<ul style="list-style-type: none"> 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 장기보존 안정성시험(11개월) 	<ul style="list-style-type: none"> 상온(25 ± 2℃) 보관조건 설정하여 11개월간 안정성 시험 진행 3개월 단위 3,5-Dicaffeoylquinic acid 측정된 결과 안정함 확인
			<ul style="list-style-type: none"> pH 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> pH 3, pH 5, pH 7, pH9 조건에서의 안정성 시험 진행 산성조건과 중성조건에서 안정성 확인하였으며, 염기성 조건에서 지표물질이 감소됨을 확인
			<ul style="list-style-type: none"> 열 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 95℃ 조건에서의 섬쭉부쟁이추출분말의 안정성 시험 진행 지표물질이 빠르게 감소하는 것으로 확인되어, 열안정성이 낮은 것으로 판단
	<p>섬쭉부쟁이 추출물의 공인시험 자료 확보 <바이오랜드></p>	<ul style="list-style-type: none"> 공인기관 시험을 통한 자료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 중금속, 영양성분, 58종 잔류농약, 지표물질(3,5-DCQA) 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 한국기능식품연구원에 중금속, 영양성분, 58종 잔류농약, 지표물질 함량 분석을 의뢰하였으며 성적서 확보 완료
	<p>원재료 확보 <바이오랜드></p>	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산을 위한 원료 확보 방법 검토 	<ul style="list-style-type: none"> 원료 적정 단가 및 확보 시스템 설계 	<ul style="list-style-type: none"> (주)베이스스푸드를 통하여 울릉도에서 재배와 수확, 이송, 원료 가공까지의 프로세스 확보

인체적용시험 수행 <네오뉴트라>	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 모니터링 	<ul style="list-style-type: none"> 대상자 모집 및 모니터링 	<ul style="list-style-type: none"> 프로토콜에 의거한 대상자 모집 모니터링 실시 및 모니터링 보고서 작성(14회 실시) 뉴스레터 및 월간 보고서 작성을 통한 시험진행 현황 공유
	<ul style="list-style-type: none"> DM 및 통계분석 	<ul style="list-style-type: none"> Data Management 통계분석 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험의 유효성 및 안전성 분석을 위한 DM/통계분석 실시 통계분석 결과를 결과보고서에 수록
	<ul style="list-style-type: none"> 결과보고서 작성 및 IRB 승인 	<ul style="list-style-type: none"> 결과보고서 작성 및 IRB 승인 	<ul style="list-style-type: none"> 시험 종료 결과 및 통계 분석 결과를 바탕으로 인체적용시험 결과 보고서 작성 완료 IRB 신청 및 승인(예정)
섬썩부쟁이 추출물을 이용한 제품 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 제품화를 위한 제형 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 원료를 추가하여 제형 및 제제 연구 	<ul style="list-style-type: none"> Synergic effect가 있는 Vitamin C를 추가하여 제형별 배합비 확립
	<ul style="list-style-type: none"> 제품 제조공정 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 제조지시서 및 품질기록서 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 각 공정별 증량, 두께, 마손도 및 봉해 확인 등을 통해 기준 설정을 통한 적합한 공정을 확립 및 제조지시서 확립 기능(지표)성분 추가로 인한 간섭 등 확인을 위한 validation 실시 성상, 확인, 정량, 봉해 등 시험 기준을 설정하여 시험일지 및 성적서 확립
	<ul style="list-style-type: none"> 제품 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 유통기한 설정 보고서 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 안정성 시험 6개월 진행한 결과로 유통기한 설정 보고서 작성하여 유통기한 24개월 확립 대조구에서 설정된 유통기한 24개월을 포함하여 지속적인 모니터링 진행
	<ul style="list-style-type: none"> 제품의 품질관리 	<ul style="list-style-type: none"> 제품 시험 및 성적서 발행 	<ul style="list-style-type: none"> 3회 시험을 실시하여 시험일지 작성 및 성적서 발행하여 품질 관리 진행 품질시험에 대하여 공인기관에 의뢰하여 성적 진행 제품 영양성분 표시를 위한 공인성적 진행
섬썩부쟁이추출물 개별인정형 기능성원료 허가 준비(추가)	<ul style="list-style-type: none"> 개별인정형 원료 식약처 신청 준비 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이추출물 MF(Master File)작성하여 제출 자료 취합

2절 목표 달성 여부

1차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
<ul style="list-style-type: none"> 유효성분의 기준 및 지표 물질 함량 측정 	한국과학기술연구원	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물로부터 분리한 3,5-DCQA를 지표물질로 선정하여 식약처 가이드라인에 따라 validation을 실시하여 다양한 에탄올추출물에서의 3,5-DCQA 함량을 측정함. 다양한 에탄올추출물의 XOD 저해효능을 검색하여 지표물질의 타당성을 검증한 결과, 3,5-DCQA 함량과 XOD 저해효능이 비례함을 확인하여 지표물질 선정을 완료함 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 추출물 제조공정 연구 	한국과학기술연구원	<ul style="list-style-type: none"> 4월, 7월, 10월에 채취한 시료에 대하여 60, 70, 80°C의 추출 온도변화, 추출시간(3, 4, 5, 6시간)의 변화, 30, 50, 70, 80% 에탄올의 함량변화에 따라 추출물을 제조하여 추출 수율, 3,5-DCQA의 함량을 비교함. 10월에 채취한 섬썩부쟁이는 잎을 사용하여 70°C에서 70% 에탄올로 4시간 동안 추출할 때 우수한 추출물 제조가 가능함을 확인하여 추출공정을 확립함. 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 원재료 품질 및 추출조건 예비검토 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 산업적 원료수급 가능성을 확인하였으며, 섬썩부쟁이 건조물의 기준 및 규격을 확립하였음 용매별 섬썩부쟁이의 추출수율 및 지표성분 함량분석을 통하여 추출 조건을 70% 주정추출물로 확인하였음 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 원료에 대한 성분시험법 표준화 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 원료설정된 시료의 지표성분 분석방법을 HPLC를 통하여 확인하였음 섬썩부쟁이의 부위별, 용매별 추출 수율 및 지표성분의 함량 분석을 통하여 성분시험법을 표준화 하였음 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출분말 표준화(추가) 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 30L 수준의 70% 주정추출 및 표준화를 확립하였음 섬썩부쟁이 추출분말의 제품화를 수행하였음 (품목제조보고 완료) 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 제형 연구 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품으로 사용되기 위한 제품의 형태 4가지 검토(과립, 분말, 정제, 캡슐) 및 해당제형의 안정성을 높일 수 있는 부형제 검토 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 제품기획 및 개발 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 비타민 및 그 외 배합원료의 잔틴산화효소 저해효능 및 시너지효과 확인 비타민C와 섬썩부쟁이의 항산화 시너지효과 확인 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 혈중 요산 감소 관련 효능 검토 	고려대	<ul style="list-style-type: none"> 고요산혈증 동물 모델 이용하여 섬썩부쟁이 추출물에 의한 혈중 요산 감소 확인 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 염증 저해 효과 측정 	고려대	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물에 의한 염증 인자 감소 측정 완료 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 주정추출물의 효능검색 	고려대	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 주정추출물에 대한 Xanthine oxidase 활성 측정 완료 	100%

2차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
<ul style="list-style-type: none"> 고요산혈증 저해 기전 연구 	고려대	<ul style="list-style-type: none"> 고요산혈증 동물모델을 이용하여 섬썩부쟁이 추출물과 비타민 혼합물에 의한 혈중 요산 감소 효과 측정 섬썩부쟁이에 의한 요산 배출 및 재흡수에 관여하는 수송체의 저해효과 측정 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 항염증 연구 	고려대	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물에 의한 염증 인자 감소 측정 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 3,5-DCQA의 HPLC 추가분석 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 3,5-DCQA 분석법의 특이성, 정확성, 직선성, 정밀성을 확인하였으며, 원재료 및 시험 시료의 전처리 방법 표준화하였음. 울릉도 이외 지역에서 섬썩부쟁이 대량 채배 지역이 없음을 확인. 울릉도산 섬썩부쟁이의 잔류농약 확인. 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물의 최적 추출 조건 확립 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출에 적합한 설비조건을 도입하여 최적추출 조건을 도입하였으며 추출공정개선을 위한 단회추출방식 및 추출용매량에 따른 추출효율 실험을 진행하여 최종 공정을 확립하였음 섬썩부쟁이 추출물 3lot 생산하여 scale up 시 제조공정 및 기준규격 확립 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 제조공정의 표준화 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 30L 수준의 70% 주정추출 및 표준화를 위해 3Lot 실험을 진행, 공정에 따른 지표물질의 함량 변화를 관찰하고 또한 품질관리기준을 설정하여 기준규격을 표준화하였음 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 시생산 	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 600L 수준의 70% 주정추출물을 제조하여 임상시료 준비하고 생산도입 전 시생산을 실시하여 제조가능성을 확인하였음 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 선행연구자료 수집 	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 선행연구자료 및 식품의약품안전처 건강기능식품 가이드라인을 바탕으로 피험자 모집기준을 확립하였으며, 이를 인체적용시험 계획서(프로토콜)에 명시. 개발된 인체적용시험 계획서(프로토콜)를 IRB 제출하여 승인받음. 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 시험디자인 	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서(프로토콜)의 IRB 승인 후 인체적용시험 수행예정 승인된 프로토콜에 의거하여 인체적용시험을 수행하며, 개시모임 진행 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 표준화된 제조방법 확립 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 코팅 정제 제형으로 배합비 및 사용기기를 확립하여 제조지시서를 작성하였으며, 제조지시서에 따라 임상 시험용 제품 제작함. 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 시험일지 및 성적서 작성 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 시험법 밸리데이션을 통한 제품의 지표성분 함량 시험법 검증 및 식약처 고시에 따른 시험항목, 시험방법으로 시험일지 확립 및 성적서 작성 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 안정성시험 Protocol 개발 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 유통기한 설정을 위해 3가지 저장온도(15, 25, 35℃) 조건을 설정하여 안정성 시험 Protocol 개발 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 부원료 사용 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 비타민C트리플골드 부원료 사용 <품목 변경 신고> 	100%

3차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
• 섬쭉부쟁이 추출물의 안정성 자료 확보	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 상온(25±2℃)의 조건하에 11개월 지표물질 안정성 자료 확보 완료 pH 조건별, 열 안정성 자료 확보 완료 	100%
• 섬쭉부쟁이 추출물의 공인 시험자료 확보	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> 한국건강기능식품연구원에 시험 의뢰하였으며, 성적서 확보 완료 시험 항목: 중금속, 영양성분, 잔류농약, 지표물질 	100%
• 원재료 대량 확보 방안	SK 바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> (주)베이스스푸드를 통하여 울릉도에서 섬쭉부쟁이의 재배와 수확 관리, 내륙이송, 원료가공에 대한 시스템을 확보 완료 	100%
• 인체적용시험 모니터링	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 프로토콜에 의거하여 선정 및 제외기준에 부합한 대상자를 모집 완료하였음(총 82명). 14회에 걸쳐 주기적 모니터링을 실시하고 이에 대한 모니터링 보고서 작성 뉴스레터 및 월간 보고서 작성을 통한 시험진행현황 공유 	100%
• DM 및 통계분석	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> Data Management 및 분석 절차 및 원칙에 따라 통계분석을 완료함. 통계분석에 대한 결과를 결과보고서에 수록 	100%
• 결과보고서 작성 칩 IRB 승인	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 종료 결과 및 통계 분석 결과를 바탕으로 결과보고서를 작성하였음. 결과보고에 대한 IRB 승인 절차를 진행 중에 있음(12월 중 완료). 	99%
• 제품화를 위한 제형 연구	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 섬쭉부쟁이 추출물과 Synergic effect가 있는 Vitamin C를 혼합하여 제형에 적합한 배합비를 확립 	100%
• 제품 제조공정 연구	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 제품의 공정검사(중량, 두께, 마손도 및 봉해) 기준을 설정하여 제조지시서를 확립 제품의 지표물질간 정량 시험 시 간섭 등을 확인하기 위해 Method Validation을 진행하여 시험법 확립 성상, 확인, 정량, 봉해 등 시험 기준을 설정하여 시험일지 및 성적서 확립 	100%
• 제품 안정성	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 안정성 시험 6개월 진행한 결과로 유통기한 설정 보고서 작성하여 유통기한 24개월 확립 대조구에서 설정된 유통기한 24개월을 포함하여 지속적인 모니터링 진행 	100%
• 제품 품질관리	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 3회 시험을 실시하여 시험일지 작성 및 성적서 발행함. 품질시험에 대하여 공인기관에 의뢰하여 성적서 발행함. 제품 영양성분 표시를 위한 공인성적서 발행함. 	100%
• 섬쭉부쟁이추출물 개별인정형원료 신청 준비	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 섬쭉부쟁이추출물 기능성원료 인정 신청을 위한 제출자료를 총괄하여 Master File로 작성함. 	100%

3절 연구성과

1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	6'- <i>O</i> -Caffeoyldihydroxyrosyngin isolated from <i>Aster glehni</i> suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression via NF- κ B and AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	Seunghwan Seo	-	영국	Pergamon Press	SCI	2016.08.24	-
2	섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 잔탄산화효소 저해효능 및 HPLC-UV를 이용한 유효성분의 함량분석	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition	강동현	45(11)	대한민국	-	비SCI	2016.11.30	-
3	Hypouricemic Effect of Ethanol Extract of <i>Aster glehni</i> Leaves in Potassium Oxonate-Induced Hyperuricemic Rats	Clinical nutrition research	Ji-Eun Park	7(2)	대한민국	-	비SCI	2018.04.24	-
4	Synergic effect in the reduction of serum uric acid level between ethanol extract of <i>Aster glehni</i> and vitamin B6	Food science and biotechnology	Eun Hye Han	27(5)	대한민국	-	SCI	2018.10.01	-
5	Efficacy and safety of <i>Aster glehni</i> extracts on subjects with slightly high serum uric acid: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial (투고)	Phytotherapy Research	Soyeon Lee	-		Wiley	SCI	-	-

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016 Spring International	강동현	2016.04.18	광주 김대중컨벤션센터	대한민국

	Convention of the pharmaceutical society of korea				
2	42 nd KSCB Summer Conference 2016	윤수민	2016.07.01	대전 인터시티호텔	대한민국
3	2016 KoSFoST Inernational Symposium and Annual Meeting	한은혜	2016.08.18	대구 EXCO	대한민국
4	EFMC-ISMC 2016 XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry	진창배	2016.08.29	Manchester, Manchester Central Convention Complex	영국
5	2016 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology	장규환	2016.10.14.	서울 COEX	대한민국
6	2016 KFN International Symposium and Annual Meeting	한은혜	2016.10.31.	제주 ICC	대한민국
7	2017 KoSFoST Inernational Symposium and Annual Meeting	장규환	2017.06.22.	제주 ICC	대한민국
8	44th KSCB Summer Conference 2017	장규환	2017.06.29.	대전 인터시티호텔	대한민국
9	The Anti-hyperuricemic and Anti-inflammatory Effects of Aster glehni Extracts on Gout	송준휘	2018.04.13	라마다프라자 제주호텔	대한민국
10	Optimization of method for marker compound analysis of Aster glehni extracts using HPLC	신동원	2018.04.19	제주ICC	대한민국

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호	
1	혈중요산감소를 위한 섬썩부쟁이 추출물과 비타민을 포함하는 조성물 (특허)	대한민국	고려 은단	2016. 08.19	10-2016- 0105739				100%
2	섬썩부쟁이 추출물을 포함하는 인지 또는 기억력 개선용 조성물 (특허)	대한민국	고려 은단	2017. 04.27	10-2017- 0054612				100%
3	Uric down (상표 제[05]류)	대한민국	고려 은단	2017. 09.27	40-2018- 0133574				100%
4	섬썩풍케어 (상표 제[05]류)	대한민국	고려 은단	2017. 09.27	40-2018- 0133579				100%
5	바람잡는날 (상표 제[05]류)	대한민국	고려 은단	2017. 09.27	40-2018- 0133577				100%

4. 전문연구 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학사	2016			1		1		1				
2	석사	2017		2				2					
3	석사	2018		1				1					

5. 산업기술 인력 양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	국가과학기술연구회 주관 이공계 인턴쉽 연수프로그램	이공계 인턴을 정부출연연구소에 서 사회에 필요한 인력양성	한국과학기술 연구원	상시 출근을 통한 현장학습	6개월	1

6. 기술거래(이전)

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수 현황	비고
1	통상실시권	섬썩부쟁이 추출물을 이용한 혈중요소산감소에 도움을 주는 건강기능식품 관련 특허 사용의 건	고려은단	2018. 03.09	40,000,000원	-	한국과학기술원 특허를 고려은단에서 기술이전 함.

7. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액(천원)		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	-	상품화	경기	섬썩부쟁이 추출 분말 생산	섬썩부쟁이추출 분말 최적화 공정을 통한 건강기능식품 원료 생산	SK바이 오랜드	18,420	0	2018	-

8. 기타

No	보고/신고 구분	식품의 유형	보고/신고일	비고
1	품목제조보고	기타가공품(섬썩부쟁이추출분말)	2016.08.16	
2	품목제조변경신고	건강기능식품(비타민C트리플 골드)	2017.08.17	섬썩부쟁이추출분말 부형제 사용

4절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

1. 목표 미달성의 원인

가. 인체적용시험에서 유의적 효능이 나지 않았던 점

(1) 동물실험과 인체적용시험에서의 효능 농도의 차이

(가) 동물실험에서 hepatic xanthine oxidase 저해 효능 측정 시, 50 mg/kg에서 정상수준으로 감소되는 것을 확인하여 저농도로 임상시험을 진행하였음.

(나) 위의 실험에서 100, 300, 500 mg/kg에서 농도의존적으로 효능이 있는 것을 확인하였으나 산업화와 관련한 미팅을 진행하였을 때, 동물 효능 농도인 500 mg/kg 기준으로 인체적용시험을 적용할 경우 양성대조군인 allopurinol처럼 부작용이 있을 수 있다는 점과 섭취용량·용법이 어려워 제품이 출시되어도 판매가 어려울 수 있다는 점에서 저농도로 설정하였음.

(다) 혈중 요산 농도의 경우, 간의 xanthine oxidase 저해 효능에 비해 다소 고용량인 500 mg/kg에서 효능이 있는 것으로 나타났는데, 이는 체내의 대사를 거치면서 혈중으로 요산 감소가 이루어지는 것으로 판단됨.

2. 후속연구의 필요성 및 차후대책

가. 후속연구의 필요성

(1) 고용량의 효능 개선 방안 모색

(가) 동물실험 결과, 혈중 요산 감소 효과가 500 mg/kg에서 있었기 때문에 사람이 섭취할 경우 약 5 g정도의 용량이 필요할 것으로 판단됨.

(나) 저용량화 및 Synergic effect를 위해 비타민, 미네랄, 천연물 추출물과 같은 다양한 원료와 혼합하여 실험을 진행하였으나 현재까지 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물만큼 효능있는 물질은 찾아내지 못하였음.

(다) 대안에 대해 사내 토의한 결과 저용량에서 효능이 없다면 고용량에서 판매할 수 있는 제형을 검토하는 것으로 의견이 모아짐.

(2) 제형 변경의 필요

(가) 고용량의 제품을 판매할 수 있는 방법은 액상제제 타입, 워터젤리 타입 등이 있으며 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물이 물에 녹지 않는 점을 감안할 때 콜로이드 형태면서 목 넘길 때 맛을 낼 수 있는 정도의 제형 및 관능개발이 필요하다고 판단함.

(3) 인체적용시험 디자인 조정이 필요

(가) 장기간 혈중 요산의 농도가 높았던 피험자를 대상으로 하면 실패를 줄일 수 있을 것으로 판단됨.

- ① 정상 혈중 요산 농도는 여자는 6 mg/dL, 남자는 6.8 mg/dL 이하로, 9.6 mg/dL 이상일 경우 통상 통풍환자라고 하며 정상 범위와 통풍환자 사이의 농도인 고요산혈증에서는 사람에 따라 증상과 정도가 다름. 혈중 요산의 농도가 높을수록 요산 결정체가 더 쉽게 형성되어 조직에 침착하게 되고 이런 상태가 10내지 20년간 지속된 후 여

러 유발 인자에 의해 실질적인 통풍 증상을 일으키게 되므로 일단 통풍이 발생했다는 것은 과거 수년 전부터 혈중 요산 농도가 높은 고요산혈증(Hyperuricemia)이었음을 의미함.

- ② 6.0 mg/dL~ 9.6 mg/dL 사이의 혈중 요산 농도는 그 차가 크다 하더라도 일시적일 수 있으므로 인체적용시험의 피험자는 혈중 요산 농도가 높은 것이 장기간 유지되었던 자로 한정하는 것이 좋을 것으로 사료됨.
- ③ 또한, 혈중 요산 농도가 변동 가능한 20~30대에 비해 장기간 고요산혈증이 유지되었던 중장년층으로 제한하여 시험하는 것이 더 적합할 것으로 사료됨.

(나) 장기간 복용

- ① 현재 통풍에 대한 기전이 정확하게 밝혀지지 않았으나, 천연물의 특성상 장기간 복용해야 효과가 있는 것이 특징이기 때문에 인체적용시험에서 적용했던 12주보다 통풍과 관련한 전문가 및 의사와 상의하여 시험기간을 늘릴 필요성이 있다고 사료됨.
- ② 또한, 동물실험에서 14일동안 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물을 투여하고, potassium oxonate를 투여하기 전인 0h 기준의 data를 분석해 보면 개체간 차이는 있지만 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물을 섭취했던 Group은 다른 Group보다 혈중 요산 수준이 약간 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었음. 이는 질병과 관계없이 지속적으로 섭취한 경우, 혈중의 요산이 증가하지 않을 수 있다는 점을 의미한다고 사료됨.

(4) 새로운 디자인을 적용한 인체적용시험 필요

- (가) 위의 내용을 종합해볼 때, 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물을 이용한 지속적인 연구가 필요한 상황이며 지금의 시행착오가 반복되지 않는 범위내에서 새로운 인체적용시험이 필요하다고 판단됨.
- (나) 또한, 치료제 중심의 기전연구에서 벗어나 예방을 할 수 있는 실험 디자인도 필요하다고 판단됨.
- (다) 피험자 입장에서 섭취가 용이한 인체적용시험이 될 수 있도록 제형연구를 하여 차후에 실시 될 인체적용시험에서는 유효한 효능이 잘 나올 수 있는 최적의 방안 마련이 필요함.

나. 수출전략 파악

- (1) 통풍은 질환이기 때문에 치료제가 아닌 이상 판매가 어려운 점을 감안할 때 효능을 입증할 수 있는 수준급의 논문이 필요하며, 해당 논문은 일본과 미국 등의 선진 건강기능식품 시장에 수출 시 유리할 수 있음.
- (2) 또한, 건강기능식품 시장에서 인체적용시험에서 효능이 나지 않았어도 수출의 경우는 이와 무방하게 판매가 가능하며 안전성입증이 더 우선되는데 이러한 면에서 섬쑥부쟁이 70% 주정추출물의 경우, 인체적용시험에서 안전성을 입증하였기 때문에 수출 판매가 가능할 것으로 사료됨.
- (3) 다만, 수출해당국에서 GLP기관의 안전성자료를 요청할 경우를 대비하여 안전성실험을 진행하는 것이 필요할 것으로 사료됨.

4장 연구결과의 활용 계획 등

1. 연구결과 및 활용계획

No.	연구결과	활용 계획
1	섬쭈부쟁이 추출물의 지표물질 선정	<ul style="list-style-type: none"> 한국과학기술연구원에서 섬쭈부쟁이 분획물의 성분 연구 및 다양한 추출 방법(계절별, 부위별, 추출온도, 추출시간 등)을 통한 합리적인 지표물질 선정함으로써 기능성 원료 허가 시, 지표물질로 타당함을 입증하는 제출자료로 사용할 예정임.
2	섬쭈부쟁이 70% 주정추출물의 원료의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 한국과학기술연구원에서 진행한 Method Validation 자료로 섬쭈부쟁이 추출물에 대한 지표물질 함량을 측정하는 시험법이 검증되었을 뿐만 아니라, 관련 논문으로 다른 논문들을 뒷받침할 수 있는 자료로 사용 가능하게 됨. SK 바이오랜드에서는 다양한 제조 공정(열수, 50% 주정추출, 70% 주정추출, 90% 주정추출)시험을 통해 최적화된 추출수율을 확립하였음. 또한, Lab scale에서 발견할 수 없는 문제점을 Pilot scale에서 발견하게 됨으로써 Product scale에서 생길 수 있는 시행착오를 미연에 방지할 수 있도록 하였음. 위와 같이 표준화된 방법으로 제조가 가능해져 추후 제조 시, 본 과제에서 진행한 원료의 표준화 방법을 활용할 예정임.
3	섬쭈부쟁이 70% 주정추출물의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 고려대학교와 고려은단에서는 섬쭈부쟁이 70% 주정추출물의 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 효능을 확인하였고, Potassium oxonate를 이용한 고요산혈증 동물모델에서도 혈중 요산이 감소하며, 간에서 잔틴산화효소가 저해되는 자료를 확보함. 위의 내용을 바탕으로 논문 1편을 확보하였고, 기전을 추가하여 수출이 가능한 수준의 논문 1편을 작성하여 수출 판매 시, 활용하고자 함. (현재 일본을 계획하고 있음) 한국과학기술연구원이 보유하고 있는 “고요산혈증 또는 통풍에 유효한 섬쭈부쟁이 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 활성화합물 [한국특허] 10-1590872(2016-01-22) [미국특허] 9,527,879(2016.12.27.)” 특허를 기술이전 함으로써 제품에 대한 경쟁력을 확보하였으며, 본 특허는 미국에도 등록되어 있기 때문에 미국 진출 시 활용할 예정에 있음.

4	인체적용시험 제품의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험에 적합한 제형 및 제조공정을 확립하고, 동시에 원료 및 인체적용시험 샘플의 안정성을 확인함으로써 제품의 이상이 없도록 하였음. • 인체적용시험 제품의 표준화를 통해 함량의 안정성을 유지하는 것을 확인하였고, 해당 부형제들을 추후 제품화 시 활용할 예정에 있음.
5	인체적용시험 계획서 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 네오뉴트라에서는 혈중 요산 감소에 관련한 임상시험 자료를 선별하여 확인함으로써 인체적용시험의 시행착오를 최대한 줄이려고 노력함. • 식약처 기능성원료로 신규허가를 진행하는 원료인 만큼 준건강인에 맞는 기준을 의사 및 전문가와 협의하여 설정함. 이 기준은 추후 인체적용시험을 시행 할 경우, 다시 활용될 수 있다고 판단됨.
6	인체적용시험 실시	<ul style="list-style-type: none"> • 기준이 까다로워 피험자 모집이 쉽지 않았으나, 인체적용시험 기관인 에이치플러스 양지병원에서 통풍위험환자들(피험자)을 관리하는 프로세스가 있어 활용할 수 있었음. • 준건강인의 설정 기준 및 인체적용시험에 적합한 용량·용법에 대한 설정에 대해 추후 인체적용시험 시행 할 경우, 활용할 수 있음.
7	제품의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 70% 주정추출물과 항산화, 항염증, 잔틴산화효소 저해 등의 시너지를 낼 수 있는 원료(비타민, 미네랄, 천연물 추출물 등)을 검색하여 건강기능식품을 제조할 때, 활용하고자 함. • 추후, 건강기능식품 제조 시, 추가 원료로 사용할 예정에 있음.
8	개별인정형 원료 식약처 신청 준비	<ul style="list-style-type: none"> • 기준규격 및 공인시험 자료 등을 확보 함. • 식약처 기능성원료 허가자료를 준비함으로써 차후 진행 시, 시간을 절약할 수 있음. • 인체적용시험을 제외하고, 허가 시 제출자료로서 모두 활용이 가능함.

2. 수출 활용 방안

가. 일본

(1) 기능성표시식품 신고 관련 자료 준비

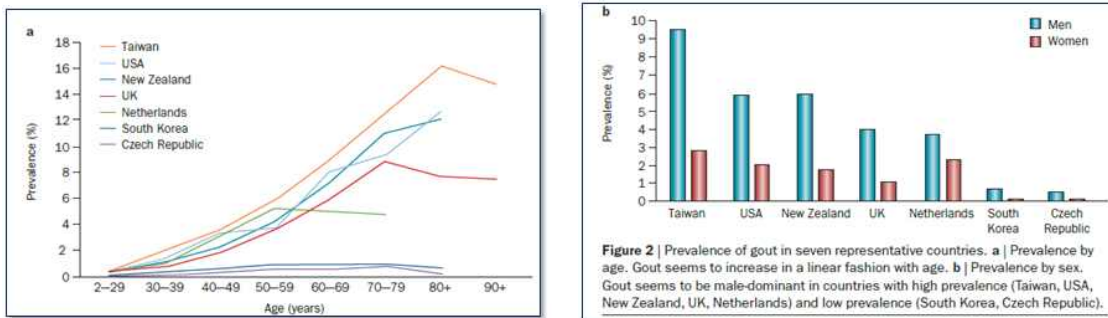
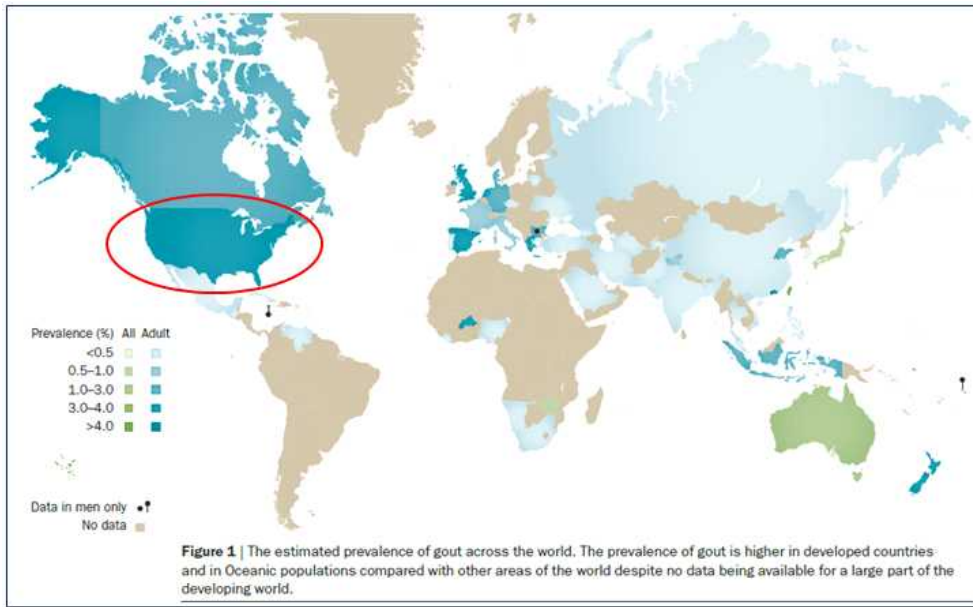
최근 일본의 건강기능식품 활성화 정책으로 등장한 “기능성표시식품 신고” 제도를 이용하여 인체적용시험에서는 효과를 확인하지 못했지만 동물실험 등 근거자료를 제출하여 가능한 기능성을 표시할 수 있도록 진행할 예정

No.	자료	내용	활용 항목
1	대상 식품 여부 판단	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 관여 성분이 명확하고, 식사섭취기준이 정해진 영양소가 아닐 것 질병이 있는 자, 미성년자, 임산부(임신을 계획 중인 자 포함), 수유 중인 자는 제외 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성에 관여하는 성분 확인 논문 제출 예정 일본과 유사국가, 지역의 섭취실적 사용 가능
2	안전성의 근거	<ul style="list-style-type: none"> 아래 한 가지 방법으로 안전성 평가 실시 <ul style="list-style-type: none"> 섭식실적으로 안전성을 설명할 수 있음 기존 정보를 조사하여 안전성을 설명할 수 있음 안전성 시험을 실시하여 안전성을 설명할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> 식약처 식품 안전나라 활용 안전성 data 제출
		<ul style="list-style-type: none"> 기능성 관여 성분의 상호작용에 관한 평가 <ul style="list-style-type: none"> 기능성 관여 성분과 의약품의 상호작용 기능성 관여 성분을 복수 포함하는 경우, 해당 성분 간의 상호작용 유무 	<ul style="list-style-type: none"> 관련 문헌 조사 예정
3	생산·제조 및 품질관리	<ul style="list-style-type: none"> 기능성표시식품에 특화된 요건은 정하지 않으나 소비자의 식품의 선택에 도움이 되는 정보로 아래의 정보를 설명할 것 <ul style="list-style-type: none"> 가공식품의 제조시설, 종업원의 위생관리 등 규격외 제품의 출하방지 체제 기능성 관여 성분의 분석방법 제품 규격을 적절하게 설정하고 제품 분석을 실시하여 적합여부 확인 	<ul style="list-style-type: none"> GMP 관리 <ul style="list-style-type: none"> SK 바이오랜드 고려은단 시험성적서 제출 원료 MV data 제출 제품 MV data 제출 MV 논문 제출
4	건강피해정보 수집체제	<ul style="list-style-type: none"> 건강피해정보의 수집체제를 갖추고 있음 	<ul style="list-style-type: none"> 일본 업체 선정 후, 허가 진행 예정
5	기능성의 근거	<ul style="list-style-type: none"> 아래 어느 한 가지 방법으로 표시하고자 하는 기능성의 과학적 근거를 설명할 수 있음 <ul style="list-style-type: none"> 최종제품을 사용한 임상시험 최종제품 또는 기능성 관여 성분에 관한 문헌고찰 	<ul style="list-style-type: none"> 일본에서 요구하는 수준의 논문을 작성하여 제출할 예정
6	표시내용	<ul style="list-style-type: none"> 용기포장으로 적정한 표시가 이루어져 있음 	<ul style="list-style-type: none"> 표시사항 확인 후 수출

나. 미국

(1) 통풍 유병률의 증가

최근 유전자 및 비만, 혈압 및 콜레스테롤, 약물 사용 등의 영향으로 통풍 발생 위험성이 증가했으며 해산물과 고기류 등 요산 수치가 높은 음식의 섭취량이 늘어나면서 전 세계 통풍 환자수는 2021년까지 1770만명에 달할 것으로 전망



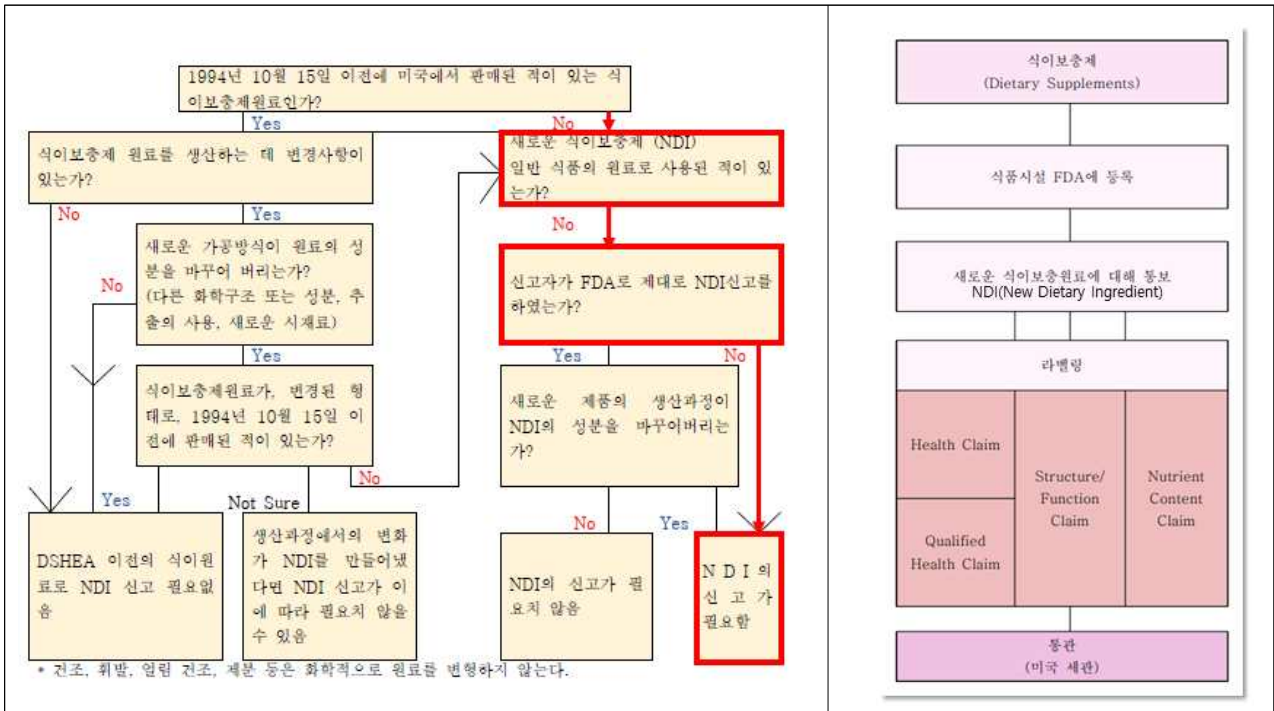
<출처:Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors / 2015 >

아시아에서는 대만이 매우 높은 통풍유병률을 가지고 있으며, 미국, 뉴질랜드, 영국, 네덜란드에서 높은 유병률을 보이는 것으로 조사됨. 모든 나라에서 나이가 증가함에 따라 통풍유병률이 증가하며, “남자”가 여자보다 월등히 높은 유병률을 나타냄.

전 세계에서 통풍유병률이 2번째로 높은 나라인 미국을 대상으로, 한국과학기술연구원에서 기술이전 한 미국특허를 활용하여 수출을 진행할 계획임. 미국은 NDI(New Dietary Ingredient, 신규식이원료)로 등록되어야 식이보충제로 판매가 가능함. NDI는 1994년 10월 15일 이전에 미국 내에서 식이보충제로 판매된 적이 없는 원료로서, 해당 허가를 진행 시, 본 과제의 성과를 적절히 활용할 예정임.

(2) NDI(New Dietary Ingredient) 관련 자료 준비

새로운 식이원료의 정의, NDI 신고 필요조건 및 NDI 불량기준			
구분	새로운 식이원료 (NDI)	NDI 신고의 필요여부	NDI 불량기준
1994년 10월 15일 이전에 미국에서 식이원료로 판매된 적이 있는 식이원료	N	N	N
1994년 10월 15일 이전에 미국에서 식이원료로 판매된 적이 없으며 일반식품의 재료로도 사용된 적이 없는 원료	Y	Y	Y



제출자료	활용 항목
① 제출자 성명과 주소	-
② 신규 식이 원료의 명칭(허브나 보태니컬의 경우, 저자를 포함하여 라틴 이름을 포함)	<ul style="list-style-type: none"> • 식약처 식품 안전나라 및 관련 논문 참고
③ 신규 식이 원료가 들어 있는 식이 보충제 설명 <ul style="list-style-type: none"> • 제품에 함유된 해당 신규 식품원료의 수준 • 표지에 서술된 해당 제품의 사용조건, 사용조건에 대한 서술이 없을 경우에는 일반적 사용조건 • 사용역사 또는 해당 식이 원료를 제품 표지에서 권고하였거나 제안한 조건에서 사용하였을 때, 안전할 것으로 합리적으로 기대되는 안전성 근거 자료 	<ul style="list-style-type: none"> • 섭취부쟁이 안전성 data 제출 • 인체적용시험 data 제출 • 섭취방법 제출
④ 담당자 사인	-

(3) Comprehensive Safety Profile for the NDI(포괄적인 NDI 안전성 개요)

포괄적인 NDI 안전성 개요는 임상 및 동물 독물학 정보를 객관적으로 요약한 것을 말함. 또한 이 개요를 통해 제시된 조건 아래에서 섭취한다면 인간에게 무해하다는 것을 보여주어야 함.

NDI가 기존에 사용된 적이 있다면 얼마나 자주, 얼마만큼 양을 섭취하고, 얼마동안 섭취하였는지의 정보 또한 같이 제공해야 함.

포괄적인 NDI 안전성 개요는 무독성량(NOEL), 허용 가능한 하루 섭취량(Acceptable Daily Intake), 그리고 하루허용치(Margin of Safety)에 대한 자료를 상세히 제공하여야 함.

**** 해당 제출자료**

- Toxicology Studies(독성학 연구)
- Human Studies(임상시험)
- Other Studies(기타 실험)
- History of Use(섭취 이력)
- Other Evidence of Safety(기타 안전성 근거)
- Other Safety and Toxicology Reference(기타 안전성 및 독물학 참고)

NDI의 안전성을 입증하기 위해 필요한 자료에 대해서는 현재 FDA의 지침이 없으며 기능성 입증에 위한 자료는 반드시 제출할 필요는 없으나 제출할 경우, 제안된 섭취량에서 안전하다는 것을 증명할 수 있으므로 NDI 등록시 유리함.

안전성 근거 자료로는 논문 또는 해당원료를 이용해 실시한 독성연구(유전독성연구, 90일 독성연구, 이상반응을 관찰하도록 잘 설계된 임상시험) 자료가 이용될 수 있으며 FDA에서 따로 규정한 근거자료 제한은 없음.

- ▶ NDI의 경우, 기능성보다는 안전성에 초점이 맞춰져 있으며 입증 자료를 제출 할 때는 인체적용시험(임상시험)까지 완료된 것을 제출하는 것이 유리하기 때문에 섬썩부쟁이 추출물을 NDI등록을 시킨 후, 식이보충제로써 판매할 예정에 있음.
- ▶ 또한 보도자료등을 동물실험등을 통해 입증했던 고요산혈증 모델에서의 효과를 홍보하고, 한국과학기술연구원에서 기술이전 한 “고요산혈증 또는 통풍에 유효한 섬썩부쟁이 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 활성화합물 [미국특허] 9,527,879(2016.12.27.)” 을 활용할 예정임.

붙임. 참고문헌

1. 식품의약품안전처 수출국표시정보 (일본)기능성표시식품 신고등에 관한 가이드라인 번역본, 2016.06
2. 식품의약품안전처 국가별규제정보 (미국)건강기능식품_수출가이드, 2016.06
3. MT. Nguyen, et al., Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (12):2231-2234, 2005
4. K. L. Rock, et al., Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 9(1):13-23, 2013
5. J. Vazquez-Mellado, et al., Relation between adverse events associated with allopurinol and renal function in patients with gout, *Ann. Rheum. Dis.*, 60(10):981-983, 2001
6. O. Taejarernwiriyaikul, et al., Hypouricemia and nephroprotection of *Coix lacryma-jobi* L. seed extract, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 37(4):441-447, 2015
7. M. R. de Souza, et al., Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents, *J. Ethnopharmacol.*, 142:845-850, 2012
8. G. Chen, et al., Green tea poly phenols decreases uric acid level through xanthine oxidase and renal urate transporters in hyperuricemic mice, *J. Ethnopharmacol.*, 175:14-20, 2015
9. F. Haidari, et al., Effects of onion on serum uric acid levels and hepatic xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase activities in hyperuricemic rats, *Pak. J. Biol. Sci.*, 11(14):1779-1784, 2008
10. X. Xu, et al., In vitro synergistic antioxidant activity and identification of antioxidant components from *Astragalus membranaceus* and *Paeonia lactiflora*, *PLoS One*, 9(5):e96780, 2014
11. M. Ozgen, et al., Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods, *J. Agric. Food Chem.*, 54:1151-1157, 2006
12. P. K. Tan, et al., Uric acid transporter inhibitors for gout, *ADMET & DMPK*, 5(2):59-74, 2017
13. Y. Zhou, et al., Research on the pharmacodynamics and mechanism of Fraxini Cortex on hyperuricemia based on the regulation of URAT1 and GLUT9, *Biomed. Pharmacother.*, 106:434-442, 2018
14. T. Yong, et al., Hypouricemic effects of *Ganoderma applanatum* in hyperuricemia mice through OAT1 and GLUT9, *Front. Pharmacol.*, 8:996, 2018
15. Y. Shi, et al., Uricosuric and nephroprotective properties of *Ramulus Mori* ethanol extract in hyperuricemic mice, *J. Ethnopharmacol.*, 143:896-904, 2012
16. A. M. Reginato, et al., The genetics of hyperuricaemia and gout, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 8:610-621, 2012

17. J. Jhang, et al., Hypouricemic effects of *Mesona procumbens* Hemsl. through modulating xanthine oxidase activity in vitro and in vivo, *Food Funct.*, 7:4239–4246, 2016
18. Folic acid reverses uric acid crystal-induced surface OAT1 internalization by inhibiting Rho A activity in uric acid nephropathy, *Mol. Med. Rep.*, 13(3):2385–2392, 2016
19. H. Huang, et al., The effects of vitamin C supplementation on serum concentrations of uric acid: results of a randomized controlled trial, *Arthritis Rheum.*, 52(6):1843–1847, 2005
20. H. K. Choi, et al., Vitamin C intake and the risk of gout in men: a prospective study, *Arch. Intern. Med.*, 169(5):502–507, 2009
21. S. S. Donia, Vitamin C supplementation with allopurinol decreases the risk of development of insulin resistance and hypertension in hyperuricemic rats, *Med. J. Cairo Univ.*, 84(2):107–115, 2016
22. O. A. Kensara, Protective effect of vitamin C supplementation on oxonate-induced hyperuricemia and renal injury in rats, *Int. J. Nutr. Metab.*, 5(4):61–68, 2013

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.