

11-
1543000-
002737-
01

발간등록번호

11-1543000-002737-01

마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발 최종보고서 농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발

최종보고서

2019. 06. 17.

주관연구기관 / 고려제약 주식회사
협동연구기관 / 한국생명공학연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 고부가가치식품기술개발사업 “마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발”(개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08.

주관연구기관명 : 고 려 제 약 (주) 박 상훈 (인)
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 김 장성 (인)
참여기관명 : 고 려 제 약 (주) 박 상훈 (인)



주관연구책임자 : 최 정호

협동연구책임자 : 이 소영

참여기관책임자 : 최 정호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116038-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 01. 01 - 2018. 12. 31	단 계 구 분	3 차년도/ 3 차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발			
	세부 과제명	마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발			
연구책임자	최 정 호	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 9명 외부: 7명	해당단계 연구개발비	정부: 20,000만원 민간: 7,000만원 계: 27,000만원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 9명 외부: 7명	총 연구개발 비	정부: 57,000만원 민간: 19,700만원 계: 76,700만원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	고려제약(주)/연구개발부 한국생명공학연구원/면역조절센터			참여기업명	고려제약(주)
국제공동연구	상대국명:	해당없음		상대국 연구기관명:	해당없음
위 탁 연 구	연구기관명:	해당없음		연구책임자:	해당없음
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2	1	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>천연물 소재인 마치현(<i>Portulaca oleracea L.</i>)을 이용한 염증성 장질환의 장 기능 개선효과 및 장 기능 향상 효과를 갖는 건강기능성 식품을 위한 신규 기능성 식품 원료 개발이 목표임.</p> <p>○ 1차년도 : 소재 표준화 및 대량 생산 공정 연구 * 소재 표준화 * 대량 생산 공정 연구</p> <p>○ 2차년도 : 전임상 시험 및 제제연구 * 소재 표준화 * 전임상 시험 : 국내 CRO 기관에 의뢰하여 전임상 시험 * 대량생산 원료이용 제제연구</p> <p>○ 3차년도 : 인체효능평가 및 제형 활성화연구 * 인체효능평가 * 제형 활성화 연구</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 정량적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소재의 표준화 및 규격화: · 3종 이상의 유효 화합물이 포함된 profile 확보, 원료의 지표물질 2종 이상 선정 - IL-6 신호 저해 효과 평가 : static 화합물대비 90%이상 - 특허 출원 및 등록 각 1건씩 진행 - 기술이전 1건 실시 - 논문 2건 게재 - 개별인정형 기능성 식품 원료 신청 1건 <p>○ 정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사업화 예정 1건 - 교육 1건 - 정책건의 1건 - 타연구에 활용 1건 - 인력양성 8건 - 학술대회 발표 4건 - 홍보실적 2건, 홍보계획 1건 - 수상실적 1건 - 연구성과결과 활용 1건 - 고용창출 3건 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제로 개발된 개별인정 원료 자체 판매로 수익창출 가능 - 원료로써 다양한 건강기능식품에 응용하여 제품개발 가능하여 매출상승 및 수입대체효과 기대 - 제품 개발 판매에 의한 원생약 농가의 생산량 증가 및 소득 창출 기대 - 제품 개발에 의한 고용창출효과 - 원료판매로 인한 수출창출 기대 - 장관관련 일반의약품, 전문의약품, 건강기능식품으로의 변화개발 가능 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	천연물	마치현	건강기능식품	인터루킨-6	장 질환
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Natural product	Portulaca oleracea L.	Health functional food	Interleukin-6	IBD

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	9
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	59
4. 연구결과의 활용 계획 등	62
붙임. 참고 문헌	62

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

- 농산물 소재인 마치현(*Portulaca oleracea L.*)을 이용한 염증성 장질환의 장 기능 개선효과 및 장 기능 향상 효과를 갖는 건강기능성 식품을 위한 신규 기능성 식품 원료 개발이 목적임.

나. 연구개발의 필요성

- (1) 세계 건강 기능 식품 시장에서 미국과 유럽, 일본이 차지하는 비중은 각 38% (1,017억불)와 31% (824억불), 14% (383억불)로 세계 시장의 87%를 미국, 유럽, 일본이 형성하고 있으며 이는 건강 기능 식품이 선진국을 중심으로 발달되어 있음을 시사함. 또한, 각 국가별 10% 내외의 시장 성장률과 중남미, 중동 시장의 비약적인 시장 규모 확대를 미루어 건강기능식품의 세계적 트렌드를 확인할 수 있으며, 향후 지속적인 시장 확대가 가능할 것으로 판단됨. 우리나라 건강기능식품 시장 규모 순위는 세계 4위로 기록됨.
- (2) 건강에 대한 의식수준이 높아지면서 전 세계적으로 건강기능식품 시장이 확대되고 있음. 향후 세계 건강식품 시장은 2013~2020년 연평균 +7.9% 성장률로 성장세가 보다 강화되면서 2020년에는 6,394억 달러의 시장 규모가 형성될 전망이다.
- (3) 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 국내·외 건강기능식품의 국내 판매액 및 수출액 증가하는 추세이며 세계 건강기능식품 시장 매출액 지속적인 성장으로 시장 진입 가능성이 높음. 세계 건강기능식품 중, 장 건강 기능 보유한 제품 점유율 5%를 차지하고 있음 (식품의약품안전처).
- (4) 장 건강을 위한 장내 미생물에 초점을 둔 유산균제제가 건강기능식품 등으로 많이 개발되고 있지만 메커니즘에 기초한 농산물 원료 기반 건강기능식품은 극소수임.
- (5) 유산균제제가 아닌 천연물 제제로 장 건강 특히 염증성 장 질환에 예방과 치료에 관련된 기술을 기반으로, 건강기능식품으로 개발 되었거나 시중에 판매되는 제품은 전무한 상태임.
- (6) 특히 IL-6가 염증성 장 질환 치료에 많은 관련이 있다는 연구는 알려졌으나 이를 기반으로 건강기능성식품을 개발하려는 시도가 극소수임.

다. 연구개발 범위

- (1) 1차년도 : 소재 표준화 및 대량 생산 공정 연구
 - (가) 소재 표준화
 - ① 계약재배를 통한 소재의 동등생산
 - 재배지, 생산자 정보, 생태환경, 재배이력 확립
 - ② 소재의 수급
 - 채집: 종자, 채집, 유지, 증식 등에 대한 자료

- ③ 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석, 신규 화합물 분리
- ④ 계약재배 된 소재의 활성평가 (*in vitro*, *in vivo*)

(나) 대량 생산 공정 연구

- ① 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화
- ② CMC (Chemistry, Manufacturing, Control) 연구
 - 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성확보 R = 0.99% 이상)
 - 유해성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약등), 원료관리 (COA 규정)
 - GMP: 원료 GMP 생산, QC/QA 확립, 분석벨리데이션 확립
 - 성분구명: 지표성분 구명, 활성성분 구명, 원료생약 성분 구명

(2) 2차년도 : 전임상 시험 및 제제연구

(가) 소재 표준화

- ① 소재의 기원확립
 - 종분석, 식물학적 감정, 구성성분 프로파일(화학적, DNA 마커) 확립

(나) 전임상 시험 : 국내 CRO 기관에 의뢰하여 전임상 시험

- ① 단회투여 독성시험
- ② 13주 반복투여 독성시험
- ③ 유전독성시험

(다) 대량생산 원료이용 제제연구

- ① 원료 균질화 확립 (원료 제형 연구)
- ② 안정성 시험 : 가속/가혹, 장기시험 평가
- ③ 제형개발 연구 (경구, 연질, 경질 등)
- ④ 대량생산원료 활성연구
- ⑤ 도출된 원료의 유효성 검증 및 질병 동물 모델을 이용한 효능 평가

(3) 3차년도 : 인체효능평가 및 제형 활성연구

(가) 인체효능평가

- ① 인체효능평가 프로토콜 및 시험계획수립
- ② 인체 효능평가를 통한 후보 소재의 기능성 검증

(나) 제형 활성 연구

- ① 동물 모델 이용한 소재의 *in vivo* 효능 평가
- ② *In vitro* 및 *ex vivo* 시험 통한 소재의 작용 기작 연구
- ③ 장상피세포를 이용한 활성 기전연구

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과 기술

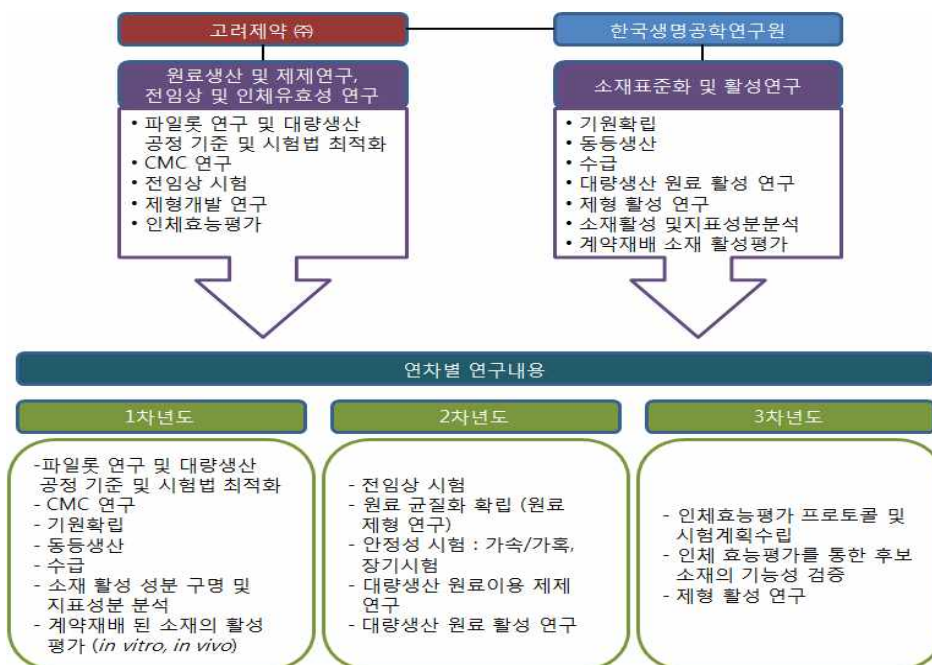
(1) 연구개발 추진전략

(가) 본 연구는 궁극적으로 마치현을 이용한 장 건강 기능성 식품 개발 위한 소재 연구이며, 부작용이 적은 국내 농산자원에서 유효한 후보소재 발굴, 유효성 평가 및 전임상 연구 3가지 분야의 상호보완적 발전이 필수적임. 이를 위해 각각의 분야에서 **전문성이 입증된 산·연(고려 제약, 생명공학연구원)으로 팀이 구성됨.**

(나) 주관 연구기관인 고려제약은 천연물을 이용한 골다공증 과제를 수행하고 있으며, 아토피 관련 제품(아토피엠디, 아토피아이비)을 판매하고 있으며, 과제책임자는 천연물 관련하여 퇴행성 관절염, 류마티스관절염 **천연물 신약 개발을 임상 2상 까지 진행한 경험이 있고 기능성화장품인 BCC를 과제로 개발하여 출시한 경험과 인지능력 브레인 건강기능성 식품을 과제를 통해 출시하여 현재 매출을 올리고 있는 경력을 가지고 있으며, J. immunol.을 비롯한 천연물 관련 SCI 29편과 특허 30여건을 보유하고 있음.**

(다) 제1협동 기관인 한국생명공학 연구팀은 아토피, 관절염 및 염증제어와 면역증강활성을 나타내는 다수의 천연소재 및 활성물질들을 개발하여 기술 이전한 바 있고, 이전한 기술들이 “대덕연구개발특구육성사업” 또는 “식품기능성평가 인체적용시험 지원 사업”등에 선정되어서 후속 사업화 및 개별인정형 기능성 식품 개발 연구를 진행한 바 있음.

(2) 연구개발 추진방법



- 아사의 국내 영업망 및 마케팅 전략으로 국내 시장 점유가 용이할 뿐만 아니라 현재 수출하고 있는 해외수출국가 (중국, 베트남, 캄보디아, 싱가포르, 필리핀, 예멘, 에콰도르)에도 수출이 가능함.



그림. 고려제약 영업망 모식도

(3) 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원																		
과제명	마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발	주관연구책임자 최정호 외 총 8명																		
기관별 참여 현황																				
구분	연구기관수	참여연구원수																		
중소기업	1	9																		
출연(연)	1	7																		
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">주관연구기관명</td> </tr> <tr> <td>과제명</td> </tr> <tr> <td>연구책임자명</td> </tr> <tr> <td>최정호 외 8명</td> </tr> <tr> <td>담당기술개발내용</td> </tr> <tr> <td>대량생산공정연구</td> </tr> <tr> <td>원료생산 및 표준화</td> </tr> <tr> <td>제제연구</td> </tr> <tr> <td>전임상, 인체시험</td> </tr> </table>		주관연구기관명	과제명	연구책임자명	최정호 외 8명	담당기술개발내용	대량생산공정연구	원료생산 및 표준화	제제연구	전임상, 인체시험	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">협동연구기관명</td> </tr> <tr> <td>과제명</td> </tr> <tr> <td>연구책임자명</td> </tr> <tr> <td>이소영 외 6명</td> </tr> <tr> <td>담당기술개발내용</td> </tr> <tr> <td>소재표준화</td> </tr> <tr> <td>원료활성연구</td> </tr> <tr> <td>제형활성연구</td> </tr> </table>		협동연구기관명	과제명	연구책임자명	이소영 외 6명	담당기술개발내용	소재표준화	원료활성연구	제형활성연구
주관연구기관명																				
과제명																				
연구책임자명																				
최정호 외 8명																				
담당기술개발내용																				
대량생산공정연구																				
원료생산 및 표준화																				
제제연구																				
전임상, 인체시험																				
협동연구기관명																				
과제명																				
연구책임자명																				
이소영 외 6명																				
담당기술개발내용																				
소재표준화																				
원료활성연구																				
제형활성연구																				

(4) 추진 일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위:천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	소재의 표준화													70,000	이소영 (한국생명공학연구원)
2	파일럿연구													52,000	최정호 (고려제약)
3	대량생산공정연구													105,000	최정호 (고려제약)
2차년도															
1	소재의 표준화													30,000	이소영 (한국생명공학연구원)
2	전임상시험 및 제제연구													200,000	최정호 (고려제약)
3	대량생산 원료 활성연구													40,000	이소영 (한국생명공학연구원)
3차년도															
1	인체효능평가													200,000	최정호 (고려제약)
3	제형활성연구													70,000	이소영 (한국생명공학연구원)

나. 연구개발성과

기술실시					
번호	기술명	실시구분	실시유형	기술실시일	기술료
1	마치현 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 IL-6 매개성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	기술이전계약 직접실시	특허등록	2018/02/12	3,000만원
사업화					
번호	기술명	제품명	업체명	사업화 형태	비고
1	장건강 건강기능식품	미정 (원료 자체 판매 및 자사 브랜드 혼합 또는 단독 제제)	고려제약	기술이전 기존업체 상품화	19년 7월 개별인정 후 10월 발매 예정
교육 및 지도 활용 내역					
번호	교육명	교재명	주요 내용		활용 년도
1	영업사원을 위한 교육	마치현 추출물 함유 제제의 생리 활성 효과	개별인정 접수된 마치현 원 료의 이해와 차후 제품 개발 시 영업 및 판매 방향 설정		2019
정책 활용 내역					
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획		활용년도
1	정책건의	농림축산식품부	-농생명소재 R&D 예타 기획 -마치현 소재로 신약개발 연결		2019

-타 농생명 소재의 개발 가능성 및 개발 방안						
타 연구개발사업에의 활용						
번호	연구사업명	연구제목			연구자	활용년도
1	농생명산업기술 개발사업	천연물 기반 송아지 설사병 예방용 사료 첨가제 및 치료용 동물의약품 개발			이소영	2018
산업재산권						
번호	출원등록명	출원등록자명	구분	종류	출원등록일	
1	페루로일타라민 화합물을 포함하는 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이의 용도	한국생명공학연구원	출원 10-2016-0179374	특허	2016/12/26	
2	상동	상동	등록 1019247370000	특허	2018/11/27	
논문기재						
번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지 게재일	SCI 구분	
1	Lactococcus lactis KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation	Journal of applied microbiology	황주태 외 7명	2017/02/05	SCI	
2	Portulaca oleracea extracts and their active compounds ameliorate inflammatory bowel diseases in vitro and in vivo by modulating TNF-alpha, IL-6 and IL-1β signalling	Food research international	김예솔 외 7명	2018/04/23	SCI	
국내 및 국제 학술회의 발표						
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소		
1	허가영	Portulaca oleracea L. extract ameliorates inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice	2017/09/14	서울, 코엑스 한국분자세포생물학회		
2	허가영	Oral administration of Portulaca oleracea L extract alleviates inflammation on dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease in a mouse mod	2017/10/24	군산, 세만금컨벤션센터 국제건강기능식품학회		
3	허가영	New Compounds of Portulaca oleracea L. suppresses inflammatory bowel disease through regulating macrophage activation	2018/04/12	제주, 라마다 프라자 대한면역학회		
4	김연용	Attenuation of Ovalbumin-induced Airway inflammation by compound of Portulaca oleracea L. Extract through Regulating Mast cell-mediated inflammatory responses	2018/11/07	세종대학교 컨벤션센터 KAI international meeting 2018		
홍보실적						
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	일시		
1	Internet/PC 통신	한경닷컴	고려제약, 마치현 이용 장건강 기능성 식품 개발	2016/07/07		
2	Internet/PC 통신	하이라이트	고려제약, 마치현 이용 장건강 기능성 식품 개발	2018/03/31		
3	중앙전문지	한국경제	고려제약, 마치현 이용 장건강 기능성 식품 개발	2019/10/31		

연구인력 활용/양성성과				
번호	인력양성명	인력양성년도	인력양성대상수	
1	건강기능식품 전임상 모니터	2017	1	
2	건강기능식품 개발	2017	1	
3	연구관리	2017	1	
4	박사학위 취득	2017	1	
5	효능평가	2018	1	
6	연구개발	2018	1	
7	석사학위 취득	2018	1	
8	석사학위 취득	2018	1	
기타 홍보실적(수상실적)				
번호	일자	구분	수상 내역	
1	2017/10/24	우수포스터상	Portulaca oleracea L 추출물을 이용하여 염증성 장 질환 마우스 모델에서 염증 완화 효능을 포스터 발표하여 우수포스터상을 수여함	
연구성과결과활용영역				
번호	연구결과		활용가능영역	활용년도
1	마치현의 건강기능성 원료 판매, 제품 개발 후 매출창출 및 항염증 작용을 이용한 염증성 장질환 신약개발		사업화 활용	2020
인증(통합)				
번호	인증명	인증기관	일자	
1	건강기능식품 개별인정 신청 및 접수	식약처	신청 18/12/21 접수 19/01/18 개별인정 예정 19/07/12	
고용창출				
번호	고용인력	고용기관명	고용창출일	고용형태
1	김다원	고려제약	2017/03/12	정규직
2	장경섭	고려제약	2018/01/23	정규직
3	이상운	고려제약	2018/10/29	정규직

다. 연구결과

(1) 1차년도

(가) 소재 표준화

① 동등생산

- 계약재배 위탁 업체인 (유)매화를 통한 이력재배 시행

원물 수매 계약서

본 계약서는 서울특별시 강남구 논현로 28길 34번지에 소재한 '고려제약주식회사' (이하 "甲"이라 한다) 와 전라남도 나주시 시청길 15-12, 5층 (송월동)에 소재한 '농업회사법인(유)매화' (이하 "乙"이라 한다) 간의 '마치현(이하 "원물"이라 한다) 수매'에 관한 계약이다.

제 1 조 (계약의 목적)

- 1) 甲은 구입하고 자 하는 "원물"을 乙에게 생산 및 전처리(수확, 건조, 가공, 세질, 포장)를 의뢰하고 乙은 甲의 규격에 맞는 "원물"을 양사가 합의한 기준에 적합하게 甲에게 제공함을 목적으로 한다.
- 2) 甲은 乙과 "원물"에 대한 시험기준 및 시험방법(함량, 건조감량, 잔류농약, 중금속, 보관방법, 포장단위)을 협의 한다.
- 3) 본 계약은 甲의 대량생산 원료규격화와 전일상시험을 위한 "원물" 구매에 한정 한다.
- 4) 인증기관에서 검사한 "원물"의 중금속 및 잔류농약은 기준치 이하여야 한다.

제 2 조 (역할)

- 1) "甲"의 역할
 - (1) 甲은 "원물"의 품질시험에 필요한 시험기준 및 시험방법을 乙에게 제공한다.
 - (2) 甲은 乙의 "원물" 생산과정에 참여하여 자문할 수 있다.
- 2) "乙"의 역할
 - (1) 乙은 "원물" 건조기준 1,000kg을 재배, 전처리하여 甲에게 제공한다.
 - (2) 乙은 제공한 "원물"에 시험기준 및 시험방법에 따라 시험하여 적합 판정이 난 즉시 甲에게 제공한다.
 - (3) 甲이 지정한 장소로 운송 및 납품 한다.

<그림. 마치현 원물 수매 계약서>

- 계약재배 위탁 업체인 (유)매화를 통한 영농일지 작성 및 현장검증 시행

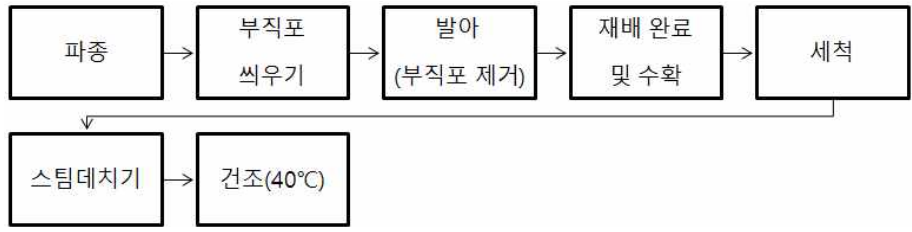
마치현 영농 일지 농업회사법인 매화

담당자- 홍영희 010-9622-6161
 포항 - 전남 나주시 세지면 죽동리 160-8
 면적 - 1200평

위도:34.9도 경도:127.4도

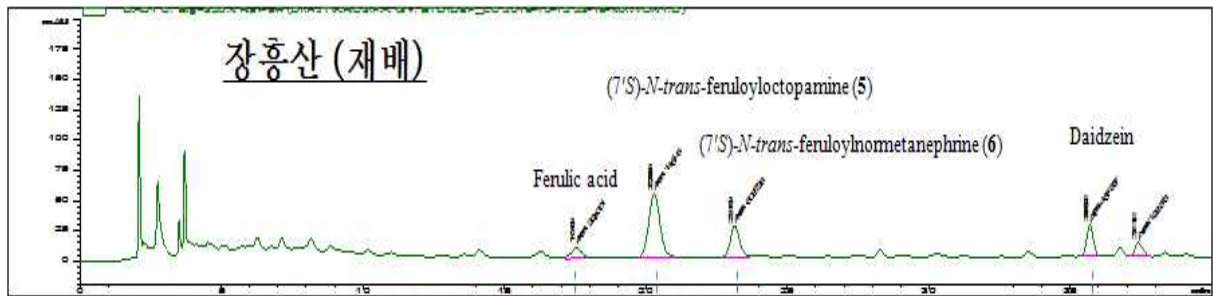
날 짜	작 업 내 용
2016년 5월 3일 날씨-맑음	경운작업
2016년 5월 6일 날씨-비	트랙터경운작업 골타기 두둑성형
2016년 5월 21일 날씨-흐림	파종준비 트레이포트 200구 400장구입 모종판 준비 상토-160포
2016년 5월 25일 날씨-흐림	트레이포트 상토담기(남자2명,여자8명) 마치현 씨앗이 작아 생수병뚜껑에 작은구멍을 내어 파종함 종자파종지-나주시세지면죽동리160-6번지하우스 파종후 지하수를 이용 물주기 및 부직포씩워줌
2016년 6월 1일 날씨-흐림	모종상 물주기 퇴비구입

<그림. 마치현 영농 일지>



<그림. 마치현 원물 재배 및 전처리 과정>

- 우수약용작물 재배 관리지침에 준하는 재배 및 영농일지를 통한 생태환경 및 재배 이력 확립
- 계약재배를 통한 원물 HPLC 분석을 통한 동등 생산 확인



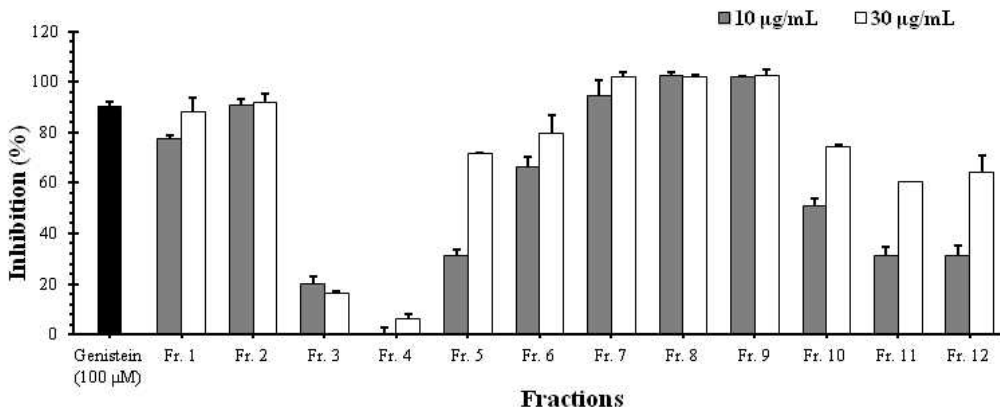
<그림. 장홍산 마치현 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램>

② 소재의 수급

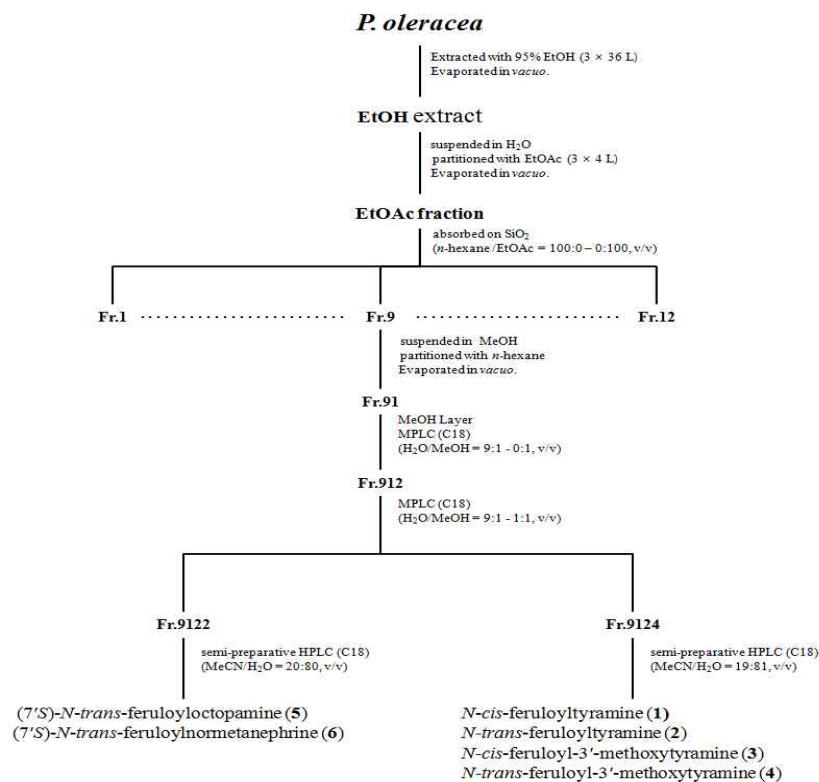
- 계약재배 위탁 업체인 (유)매화의 종자 채집, 유지, 증식, 보관 자료 확립 완료
- 계약재배 위탁 업체인 (유)매화의 GAP인증 추진 중

③ 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석, 신규 화합물 분리

- 선행연구결과 IL-6/STAT3 저해 활성을 가지는 마치현 에탄올 추출물을 대상으로 생리활성 가이드 분획에 따라 활성성분의 분리 및 정제를 실시하였음.
- 실리카를 고정상으로 이용한 1차 컬럼크로마토그래피를 통해 총 12개의 소분획물을 얻었으며, 이중 9번 분획물이 강한 IL-6/STAT3 저해 활성을 보여주었음. 따라서 9번 분획물을 중심으로 MPLC와 prep-HPLC를 이용하여 총 6종의 화합물을 분리정제 하였음.



<그림. 마치현 에탄올 추출물의 분획별 IL-6/STAT3 활성>



<그림. 마치현으로부터 분리된 화합물 1-6의 분리정제 스킴>

- 분리된 화합물의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 과 ESI-MS 데이터를 종합하여 기존 문헌과 비교 후 구조를 동정하였음.

N-*cis*-feruloyltyramine (1): Dark yellowish oil. ESI-MS ion peaks at m/z 314.1 [M+H]⁺ and 312.1 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (400 MHz): δ_{H} 7.35 (1H, *s*, H-2), 7.00 (2H, *d*, $J = 8.4$, H-2' and H-6'), 6.93 (1H, *d*, $J = 8.4$, H-6), 6.74 (1H, *d*, $J = 7.6$, H-5), 6.69 (2H, *d*, $J = 8.4$, H-3' and H-5'), 6.61 (1H, *d*, $J = 12.4$, H-7), 5.81 (1H, *d*, $J = 12.4$, H-8), 3.83 (3H, *s*, 3-OCH₃), 3.40 (2H, *t*, $J = 8.0$, H-8'), 2.69 (2H, *t*, $J = 8.0$, H-7'). ¹³C-NMR data in CD₃OD (125 MHz): δ_{C} 157.2 (C-4'), 148.8 (C-4), 148.8 (C-3), 138.5 (C-7), 131.4 (C-1), 130.9 (C-2' and C-6'), 128.8 (C-1'), 125.0 (C-6), 122.0 (C-8), 116.5 (C-3' and C-5'), 116.1 (C-5), 114.2 (C-2), 56.6 (C-3-OCH₃), 42.4 (C-8'), 35.7 (C-7').

N-*trans*-feruloyltyramine (2): Dark brown oil. ESI-MS ion peaks at m/z 314.1 [M+H]⁺ and 312.1 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (400 MHz): δ_{H} 7.45 (1H, *d*, $J = 15.6$, H-7), 7.10 (1H, *d*, $J = 1.6$, H-2), 7.05 (2H, *d*, $J = 8.4$, H-2' and H-6'), 7.01 (1H, *dd*, $J = 8.4, 2.0$, H-6), 6.80 (1H, *d*, $J = 8.0$, H-5), 6.72 (2H, *d*, $J = 8.6$, H-3' and H-5'), 6.42 (1H, *d*, $J = 15.6$, H-8), 3.86 (3H, *s*, H-3'-OCH₃), 3.47 (2H, *t*, $J = 7.6$, H-8'), 2.75 (2H, *t*, $J = 7.6$, H-7'). ¹³C-NMR data in CD₃OD (125 MHz): δ_{C} 157.1 (C-4'), 150.0 (C-4), 149.4 (C-3), 142.2 (C-7), 131.5 (C-1), 130.9 (C-2' and C-6'), 128.5 (C-1'), 123.4 (C-6), 119.0 (C-8), 116.6 (C-5), 116.4 (C-3' and C-5'), 111.7 (C-2), 56.5 (C-3-OCH₃), 42.5 (C-8'), 35.8 (C-7').

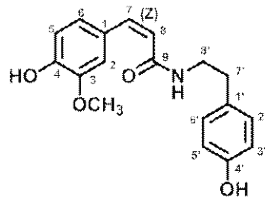
N-*cis*-feruloyl-3'-methoxytyramine (3): Dark green oil. ESI-MS ion peaks at m/z

344.0 [M+H]⁺ and 342.2 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (400 MHz): δ_H7.35 (1H, *d* *J* = 2.0, H-2), 6.91 (1H, *dd* *J* = 8.0, 2.0, H-6), 6.75 (1H, *d* *J* = 1.6, H-2'), 6.71 (1H, *d* *J* = 8.0, H-5), 6.68 (1H, *d* *J* = 8.0, H-5'), 6.59 (1H, *d* *J* = 12.4, H-7), 6.59 (1H, *dd* *J* = 8.0, 2.0, H-6'), 5.80 (1H, *d* *J* = 12.8, H-8), 3.81 (3H, *s*, H-3-OCH₃), 3.77 (3H, *s*, H-3'-OCH₃), 3.41 (2H, *t*, *J* = 7.2, H-7'), 2.69 (2H, *t*, *J* = 7.8, H-8'). ¹³C-NMR data in CD₃OD (125 MHz): δ_C149.2 (C-3), 148.9 (C-3'), 148.8 (C-4), 146.3 (C-4'), 138.6 (C-7), 132.2 (C-1), 128.8 (C-1'), 125.1 (C-6), 122.4 (C-6'), 121.9 (C-8), 116.4 (C-5), 116.1 (C-5'), 114.2 (C-2'), 113.6 (C-2), 56.5 (C-3-OCH₃), 56.5 (C-3'-OCH₃), 42.4 (C-8'), 36.1 (C-7').

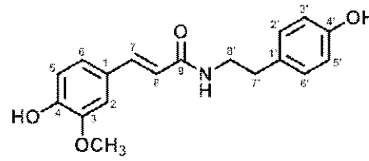
N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine (**4**): Dark brown oil. ESI-MS ion peaks at *m/z* 344.0 [M+H]⁺ and 342.2 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (400 MHz): δ_H7.38 (1H, *d* *J* = 15.6, H-7), 7.04 (1H, *d* *J* = 1.6, H-2), 6.95 (1H, *dd* *J* = 8.0, 1.6, H-6), 6.75 (1H, *d* *J* = 2.0, H-2'), 6.73 (1H, *d* *J* = 8.0, H-5), 6.66 (1H, *d* *J* = 8.0, H-5'), 6.60 (1H, *dd* *J* = 8.0, 2.0, H-6'), 6.36 (1H, *d* *J* = 15.6, H-8), 3.80 (3H, *s*, H-3-OCH₃), 3.75 (3H, *s*, H-3'-OCH₃), 3.42 (2H, *t*, *J* = 7.2, H-8'), 2.70 (1H, *t*, *J* = 7.2, H-7'). ¹³C-NMR data in CD₃OD (125 MHz): δ_C150.1 (C-4), 149.5 (C-3), 149.2 (C-3'), 146.2 (C-4'), 142.3 (C-7), 132.3 (C-1'), 128.5 (C-1), 123.4 (C-6), 122.5 (C-6'), 119.0 (C-8), 116.7 (C-5), 116.4 (C-5'), 113.7 (C-2), 111.7 (C-2'), 56.5 (C-3-OCH₃), 56.5 (C-3'-OCH₃), 42.6 (C-8'), 36.3 (C-7').

(*Z'*)-*N-trans*-feruloyloctopamine (**5**): Yellowish oil. [α]_{20D}: -8.2° (c 0.10 CH₃OH). ESI-MS ion peak at *m/z* 328.1 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (600 MHz): δ_H7.44 (1H, *d* *J* = 15.6, H-7), 7.22 (2H, *d* *J* = 8.4, H-2' and H-6'), 7.11 (1H, *d* *J* = 1.8, H-5), 7.01 (1H, *dd* *J* = 8.4, 1.8, H-6), 6.79 (1H, *d* *J* = 8.4, H-2), 6.77 (2H, *d* *J* = 8.4, H-3' and H-5'), 6.46 (1H, *d* *J* = 15.6, H-8), 4.73 (1H, *dd* *J* = 7.8, 4.8, H-7'), 3.86 (3H, *s*, H-3-OCH₃), 3.54 (1H, *dd* *J* = 13.2, 4.6, H-8' β), 3.45 (1H, *dd* *J* = 13.8, 7.8, H-8' α). ¹³C-NMR data in CD₃OD (150 MHz): δ_C169.8 (C-9), 158.3 (C-4), 150.1 (C-4'), 149.5 (C-3), 142.5 (C-7), 135.0 (C-1), 128.7 (C-2' and C-6'), 128.5 (C-1'), 123.5 (C-8), 118.9 (C-6), 116.7 (C-5), 116.3 (C-3' and C-5'), 111.8 (C-2), 73.6 (C-7'), 56.5 (C-3-OCH₃), 50.0 (C-8').

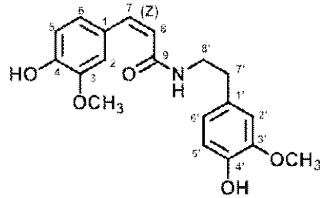
(*Z'*)-*N-trans*-feruloylnormetanephrine (**6**): Yellowish oil. [α]_{20D}: -30.4° (c 0.10 CH₃OH). ESI-MS ion peak at *m/z* 358.1 [M-H]⁺. ¹H-NMR data in CD₃OD (600 MHz): δ_H 7.42 (1H, *d* *J* = 15.6, H-7), 7.09 (1H, *d* *J* = 1.8, H-2), 7.00 (1H, *d* *J* = 7.8, H-6), 6.97 (1H, *d* *J* = 1.8, H-2'), 6.81 (1H, *dd* *J* = 7.8, 1.8, H-6'), 6.77 (1H, *d* *J* = 7.8, H-5), 6.75 (1H, *d* *J* = 7.8, H-5'), 6.45 (1H, *d* *J* = 15.6, H-8), 4.71 (1H, *dd* *J* = 7.8, 4.8, H-7'), 3.84 (3H, *s*, H-3'-OCH₃), 3.82 (3H, *s*, H-3-OCH₃), 3.52 (1H, *dd* *J* = 13.2, 7.8, H-8' α), 3.43 (1H, *dd* *J* = 13.2, 5.4, H-8' β). ¹³C-NMR data in CD₃OD (150 MHz): δ_C 169.8 (C-9), 150.1 (C-4), 149.6 (C-3'), 149.2 (C-3), 147.4 (C-4'), 142.5 (C-7), 135.7 (C-1'), 128.5 (C-1'), 123.5 (C-6), 120.2 (C-6'), 118.9 (C-8), 116.7 (C-5), 116.2 (C-5'), 111.8 (C-2), 111.1 (C-2'), 73.8 (C-7'), 55.6 (C-3-OCH₃), 55.5 (C-3'-OCH₃), 50.0 (C-8').



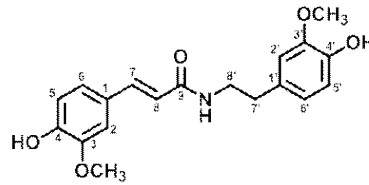
N-cis-feruloyltyramine (1)



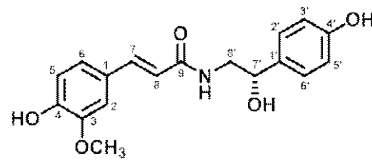
N-trans-feruloyltyramine (2)



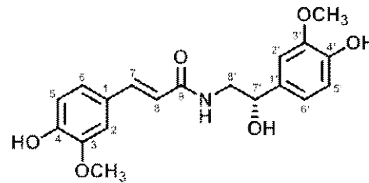
N-cis-feruloyl-3'-methoxytyramine (3)



N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine (4)



(7'*S*)-*N-trans*-feruloyloctopamine (5)



(7'*S*)-*N-trans*-feruloylnormetanephrine (6)

<그림. 마치현으로부터 분리된 화합물 1-6의 구조>

- 분리 동정된 6종의 화합물 1-6는 Hep3B cell을 이용한 IL-6/STAT3 저해 활성결과, 각각, IC₅₀ 값 19.3 (1), 5.6 (2), 16.2 (3), 6.0 (4)로 *trans*형 화합물이 *cis*형 보다 강한 활성을 보여 주었음.

Compounds	IC ₅₀ (μM)
<i>N-cis</i> -feruloyltyramine (1)	19.3
<i>N-trans</i> -feruloyltyramine (2)	5.6
<i>N-cis</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (3)	16.2
<i>N-trans</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (4)	6.0
(7' <i>S</i>)- <i>N-trans</i> -feruloyloctopamine (5)	2.6
(7' <i>S</i>)- <i>N-trans</i> -feruloylnormetanephrine (6)	13.0
Oleanolic acid acetate ^a	0.7

^a Oleanolic acid acetate was used as the positive control.

<표. 화합물 1-4의 IL-6/STAT3 저해활성 IC₅₀ 값>

- 마치현 70% 에탄올 추출물을 대상으로 분석 밸리데이션 개발을 위한 지표물질을 찾는 연구를 진행하였음.

- 마치현 샘플의 분석을 위한 전처리 공정

마치현 20 g의 건조 후 세절된 시료에 70% 에탄올 용매 200 ml를 첨가한 후 이를 70°C에서 5 시간 동안 추출하였음. 그 후 마치현 70% 에탄올추출물은 종이필터로 여과한 후 여과액을 감압 농축하였음. 농축된 마치현 추출물은 다시 메탄올 20 ml에 재용해 하였고 이는 HPLC system에 Injection 하기 전 C18 sep-pak 카트리지를 이용하여 비극성 성분을 제거하였음.

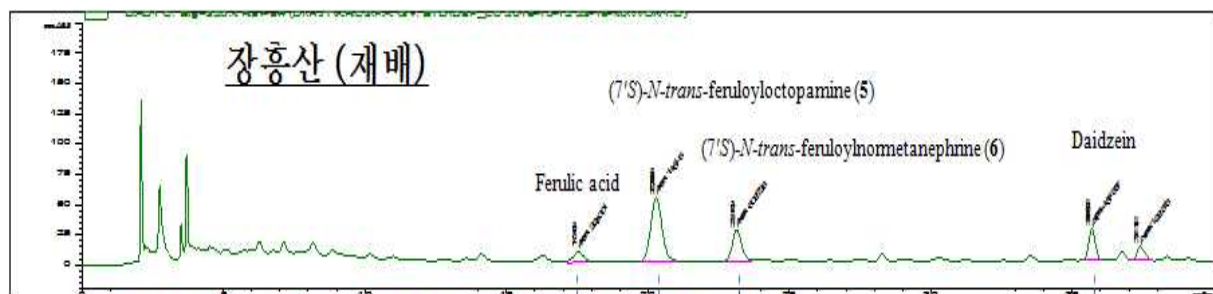


<그림. 마치현 시료의 분석을 위한 전처리 공정>

- HPLC Chromatographic system 세팅 조건

System	Agilent 1200 Series	Solvents gradients	
		MIN	% of Solvent (B)
Flow	1 ml	0	17
Sample inj.	10 µl	15	17
Column	Phenomenex Luna 5µ C18 100A (250 × 4.6 mm)	40	32.5
Oven	40 °C	40.1	100
UV/VIS-DAD	320 nm	60	100
Mobile phase	0.5% Acetic acid in H ₂ O (A) Acetonitrile (B)	60.1	17
		70	17

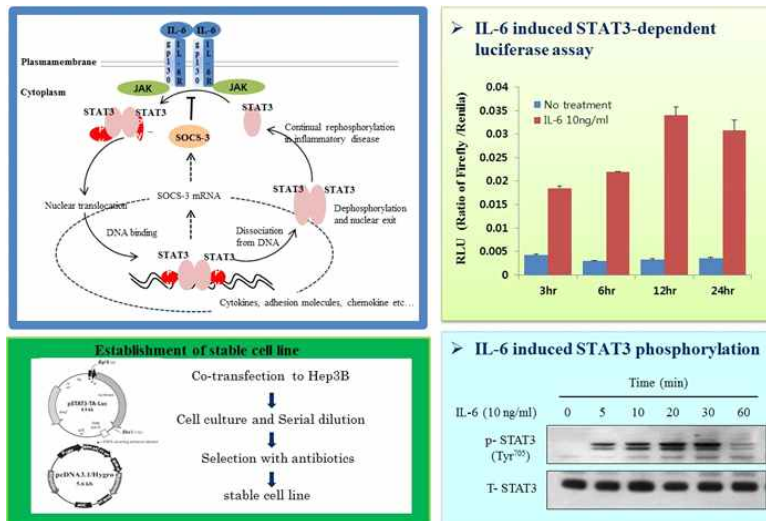
- 계약재배한 장홍산 마치현 에탄올 추출물을 대상으로 지표물질을 선정하기 위해 HPLC 분석을 진행한 결과, 두 개의 20.3분 과 23.1분대 Major peak들을 확인하였음. 두 피크는 각각 (7'S)-N-trans-feruloyloctopamine (5), (7'S)-N-trans-feruloylnormetanephine(6)로 확인되었으며, QC/QA를 위한 지표성분으로 선정하였음. 또한, 17.5분 및 35.8분대의 피크는 각각 ferulic acid 및 daidzein으로 추정됨.



<그림. 장홍산 마치현 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램>

④ 계약재배 된 소재의 활성평가 (*in vitro, in vivo*)

- 계약재배 된 마치현 추출물의 IL-6 신호 전달 저해 활성 검증 (*in vitro*)
- 염증성 장질환의 중요한 원인으로 알려져 있는 염증성 사이토카인인 IL-6의 활성 검색시스템을 운용하여 계약재배 된 마치현 추출물이 IL-6의 신호전달을 제어할 수 있는지 확인함.
- Hep3B 세포(ATCC HB-8064)에 pStat3-Luc와 pcDNA3.1(+)(Clontech laboratories, Palo Alto, CA)을 형질 감염 시킨 세포에 시료를 1시간 처리한 후 10 ng/ml IL-6를 첨가하여 배양한 후, 루시퍼라제 기질을 넣고 발색정도를 루미노미터로 측정함.



<그림. IL-6 신호 전달 저해 활성 평가>

- 계약재배 된 마치현을 20, 40, 60, 80, 100%의 에탄올로 추출하여 각 샘플을 3, 10, 30, 60 μg/ml 농도로 처리하여 IL-6 저해 활성을 확인한 결과, 에탄올 %가 높을수록 저해 활성이 좋았으나, 대량 생산 공정상 가장 높게 추출할 수 있는 70% 에탄올 추출물을 선정함. 또한, 마치현 추출물의 IL-6 저해 활성을 확인할 때 STAT3 저해제로서 논문상 기 보고된 static을 대조화합물로 사용하여 함께 확인함.

전처리 (o)		inhibition%	전처리 (x)		inhibition%
마치현 EM 100	60 μg/ml	92.68	마치현 E 100	60 μg/ml	89.51
	30 μg/ml	77.87		30 μg/ml	72.87
	10 μg/ml	40.48		10 μg/ml	49.70
	3 μg/ml	33.42		3 μg/ml	37.65
마치현 EM 80	60 μg/ml	82.19	마치현 E 80	60 μg/ml	82.98
	30 μg/ml	72.08		30 μg/ml	74.21
	10 μg/ml	49.47		10 μg/ml	51.88
	3 μg/ml	46.56		3 μg/ml	37.99
마치현 EM 60	60 μg/ml	69.63	마치현 E 60	60 μg/ml	51.98
	30 μg/ml	56.12		30 μg/ml	49.65
	10 μg/ml	33.58		10 μg/ml	44.45
	3 μg/ml	29.75		3 μg/ml	37.76
마치현 EM 40	60 μg/ml	69.35	마치현 E 40	60 μg/ml	53.57
	30 μg/ml	54.06		30 μg/ml	44.87
	10 μg/ml	45.95		10 μg/ml	41.72
	3 μg/ml	23.76		3 μg/ml	34.41
마치현 EM 20	60 μg/ml	67.47	마치현 E 20	60 μg/ml	48.65
	30 μg/ml	59.60		30 μg/ml	37.25
	10 μg/ml	43.12		10 μg/ml	35.20
	3 μg/ml	18.90		3 μg/ml	19.31
마치현 EM 0	60 μg/ml	56.41	마치현 E 0	60 μg/ml	48.61
	30 μg/ml	48.32		30 μg/ml	46.14
	10 μg/ml	40.67		10 μg/ml	33.43
	3 μg/ml	11.93		3 μg/ml	13.46

Concentration		Inhibition (%)
Stattic	5 μM	101.5
	1 μM	76.6
	0.5 μM	49.9
	0.1 μM	27.2
	0.05 μM	23.2
	0.01 μM	19.1

<표. 마치현 추출물의 IL-6 신호전달 저해 활성>

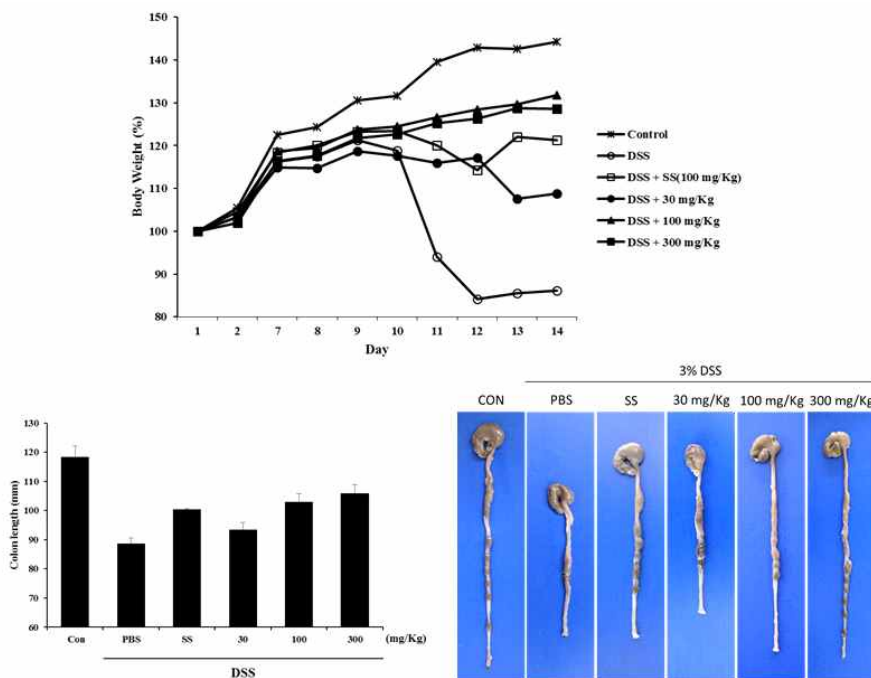
- 계약재배 된 마치현 추출물의 IL-6 신호 전달 저해 활성 검증 (*in vivo*)

IL-6 신호 전달 저해 활성을 확인한 마치현 70% 에탄올 추출물이 동물 모델에서 효능 검증을 위해 가장 널리 사용되고 있는 Dextran sodium sulfate (DSS) 유도성 염증성 대장염 모델을 확립함. DSS는 직접적으로 basal crypts의 장 상피세포에 독성을 가지며, 점막 배리어에 손상을 주어 염증성 대장염을 유도하고, DSS 유도성 대장염 모델은 사람의 염증성 대장염의 치료제 개발에 적용하기에 적당한 모델로 알려져 있음.



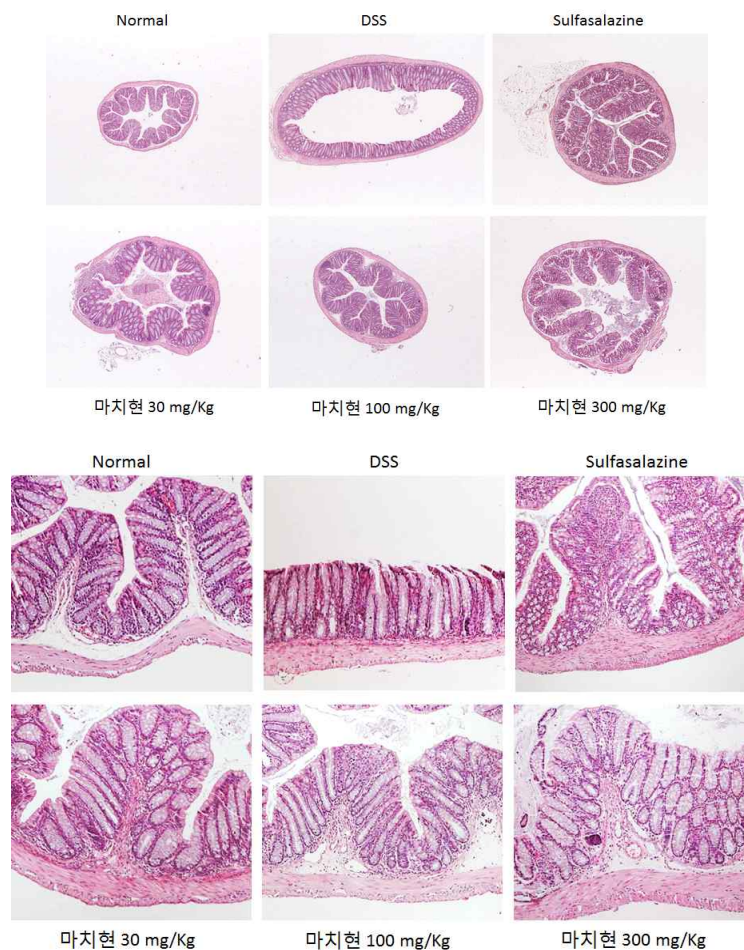
<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델>

- 실험 시작 전 7일간의 적응기를 가진 4주령의 ICR male 마우스를 이용하여 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 마치현 추출물 투여군으로 나누고, sulfasalazine 투여군과 마치현 추출물 투여군은 3% DSS 음수 2일 전부터 DSS 음수 시작 후 14일 동안 sulfasalazine 100 mg/kg, 마치현 추출물 그룹은 3, 100, 300 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음. 치료시험 기간 중에 체중 측정, 변의 형태, 혈변의 정도를 나타내는 질환 활성 지표 (disease activity index, DAI) 기준, 정상변 0, 무른변 1, 무른 변과 잠혈 2, 설사와 잠혈 3, 설사와 직장 주위에 출혈과 짓무름이 있는 경우는 4로 하여 평가하였고, 시험 종료 후에는 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시함.



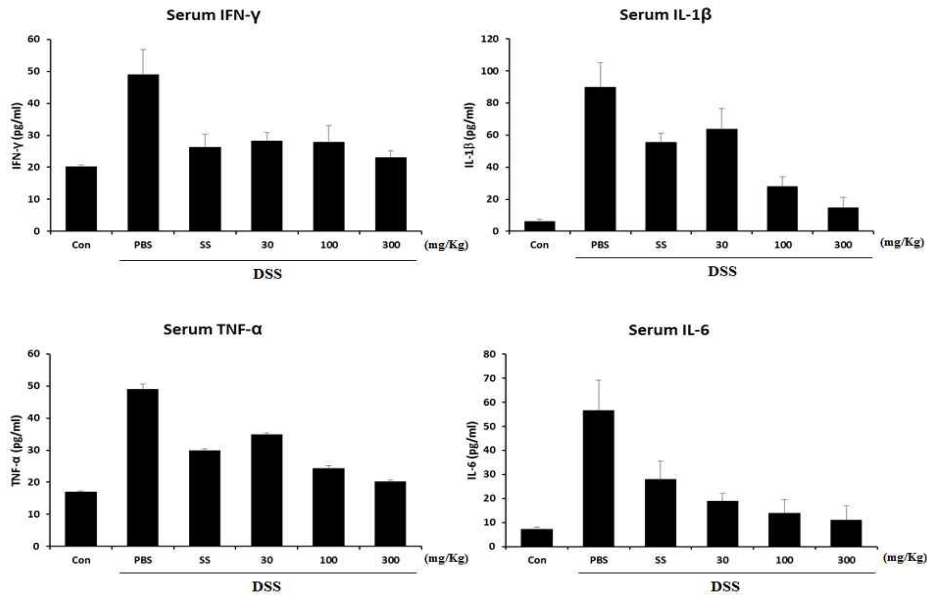
<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 체중 및 장길이 변화>

- DSS 유도성 염증성 대장염 모델 실험 결과, 3% DSS 투여군에서 보였던 급격한 체중저하 및 폐사가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여 그룹에서 완화된 것을 확인함. 또한 3% DSS 투여군에서 보이는 설사 및 혈변, 항문의 임상증상이 sulfasalazine 투여군 및 마치현 추출물 투여 그룹에서 호전된 것을 볼 수 있었고, 결장 길이 측정 및 결장의 병리 조직학 분석 결과, 대장염 유발군의 장 길이는 정상군에 비해 현저하게 줄어들었으나 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 장 길이가 회복되었고, 결장 조직 병리사진에서 대장염 유발군에서 관찰되는 장 점막층 및 근육층의 염증세포 침윤, 장 용모, 장샘 소실 등 또한 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인함. 결론적으로, 마치현 투여 그룹은 100 mg/kg, 300 mg/kg를 처리한 실험 군에서는 DSS를 치료에 의해 유도되는 염증성 대장염 증상을 치료하는 효과가 우수함을 확인함.



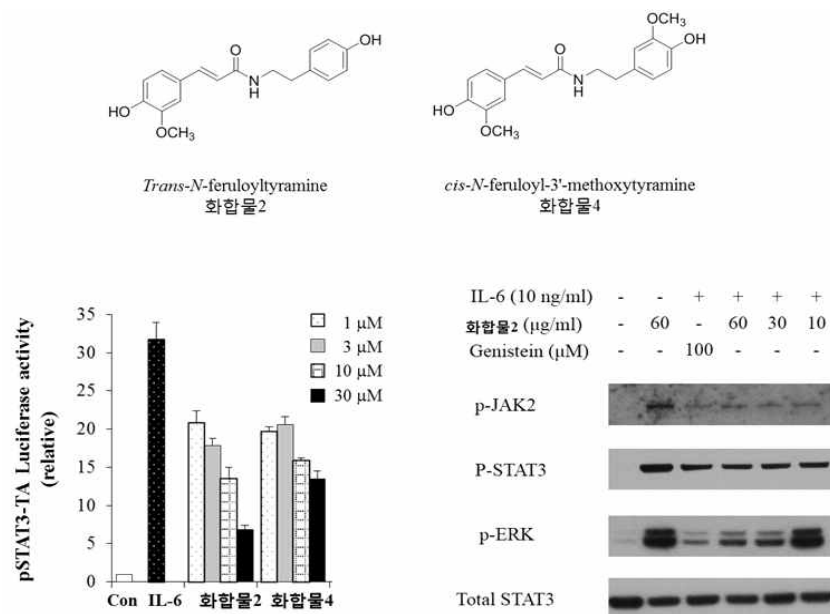
<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 결장 조직 병리 결과(현미경 배율: X12.5, X40)>

- 마치현 추출물의 염증성 대장염 임상증상 완화 효과 이외에 염증성 사이토카인인 interferon- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6의 분비량 변화를 관찰하기 위해 마우스의 혈액에서 혈청을 분리하여 각 사이토카인을 확인한 결과, 혈중 농도 또한 3% DSS로 유발한 염증성 대장염 유발군에서 증가되었다가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 추출물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인함.



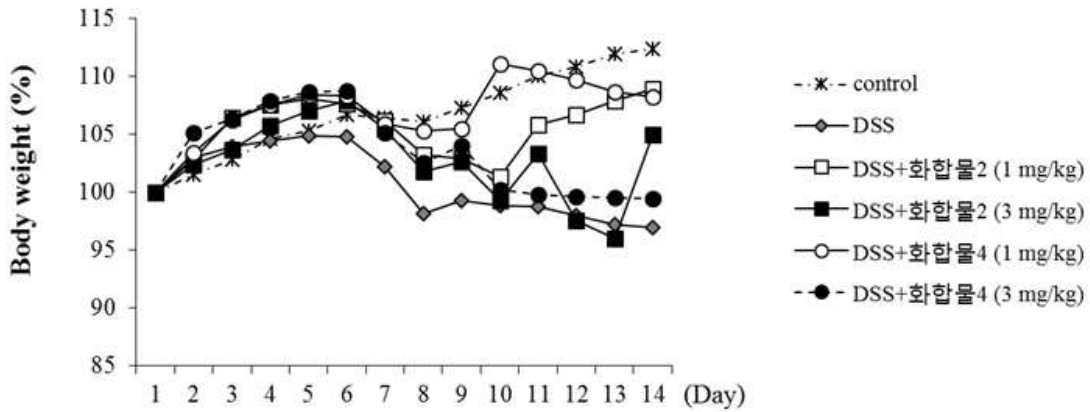
<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 혈중 사이토카인 분비량 변화>

- 마치현 추출물에서 분리한 여러 화합물 중 신규 화합물인 화합물2, 화합물4에 대한 활성 평가를 위해 세포수준에서 IL-6 신호 전달 저해 효과를 확인한 결과 저농도 1 μ M에서부터 효과가 있음을 확인하였고, 이 중 효과가 더 우수한 화합물 2의 면역과 염증에서 중요한 역할을 하는 JAK (Janus kinase), STAT3 및 ERK(Extracellular signal Regulated Kinases)의 phosphorylation 저해 효과를 Western blot을 통해 확인함.



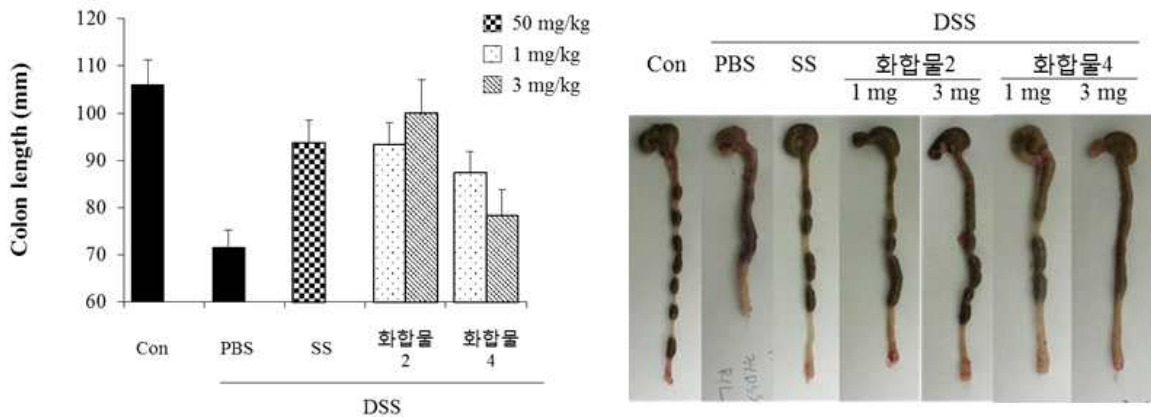
<그림. 마치현 추출물에서 분리한 신규 화합물의 활성 평가>

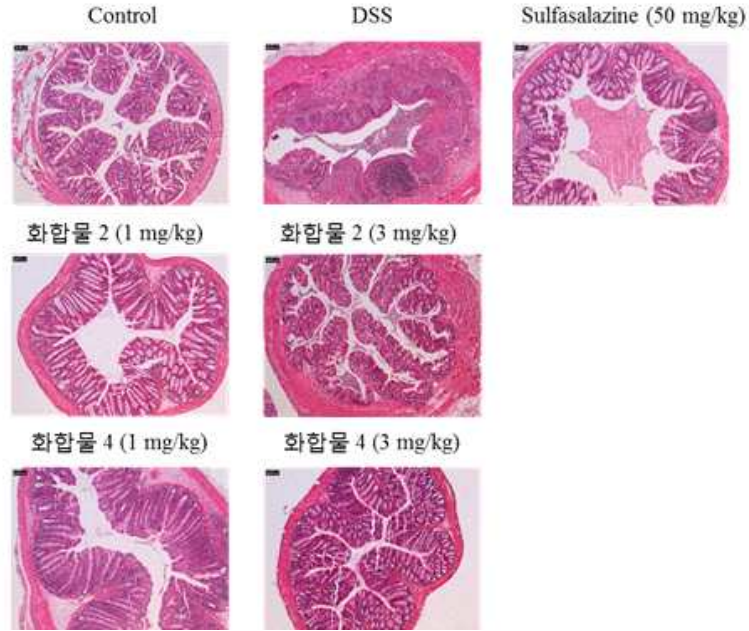
- 4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 신규 화합물 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가진 후, sulfasalazine 50 mg/kg, 신규 화합물 그룹은 1 mg/kg, 3 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음. 치료시험 기간 중에 체중 측정, 변의 형태, 혈변의 정도를 나타내는 질환 활성 지표 (disease activity index, DAI) 기준, 정상변 0, 무른변 1, 무른 변과 잠혈 2, 설사와 잠혈 3, 설사와 직장 주위에 출혈과 잇무름이 있는 경우는 4로 하여 평가하였고, 시험 종료 후에는 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시함.



<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 체중 변화>

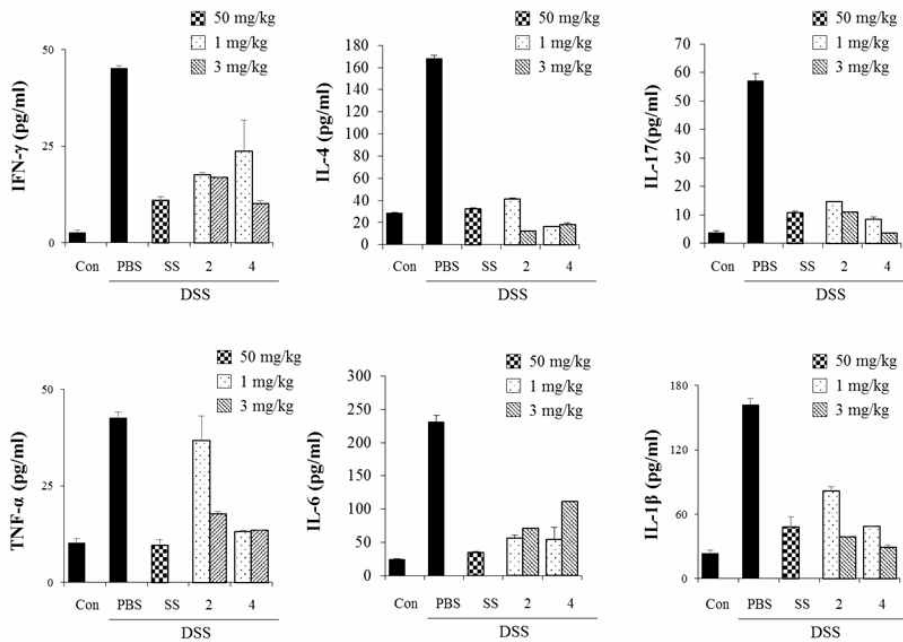
- 시험기간 체중변화를 관찰한 결과, 3% DSS 유도에 의한 급격한 체중저하 및 폐사가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물2, 화합물4 투여 그룹에서 완화됨. 또한 3% DSS 투여군에서 보이는 설사 및 혈변, 항문의 임상증상이 sulfasalazine 투여군 및 화합물 투여 그룹에서 호전된 것을 볼 수 있었고, 결장 길이 측정 및 결장의 병리 조직학 분석 결과, 대장염 유발군의 장 길이는 정상군에 비해 현저하게 줄어들었으나 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 장 길이가 회복됨. 결장 조직 병리사진에서도 대장염 유발군에서 관찰되는 장 점막층 및 근육층의 염증세포 침윤, 장 용모, 장샘 소실 등 또한 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 현저하게 감소함을 확인함. 따라서 화합물 2, 화합물 4 투여 그룹은 1 mg/kg, 3 mg/kg를 처리한 실험 군에서는 DSS를 치료에 의해 유도되는 염증성 대장염 증상을 치료하는 효과가 우수함을 확인함.





<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 장 길이 변화 및 조직 병리 결과>

- 염증성 대장염의 effector cytokine인 interferon- γ , IL-4, IL-17, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 혈중 농도 또한 3% DSS로 유발한 염증성 대장염 유발군에서 증가되었다가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 현저하게 감소함.



<그림. 마치현 추출물에서 분리한 신규 화합물의 혈중 사이토카인 분비량 변화>

(나) 대량 생산 공정 연구

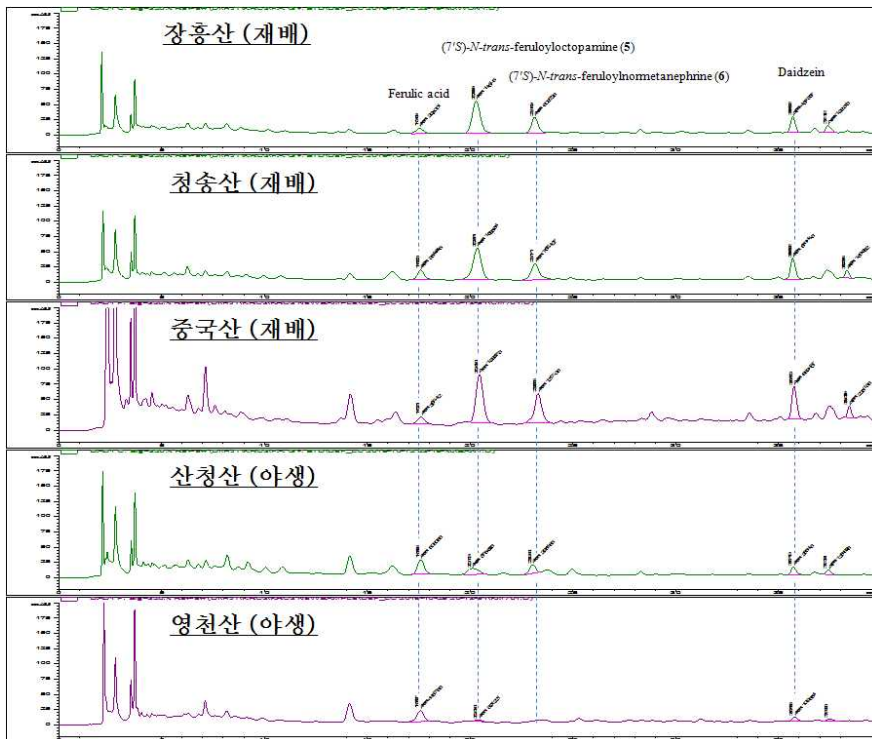
① 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화

- 마치현의 최적 추출물 제조 공정을 추출 용매의 종류, 용매의 양, 추출 온도, 추출 시간 등의 조건으로 실험, 최적 조건을 확립하였음.
- 식약처 허용 용매인 에탄올(주정)을 선정하였으며, 50%, 70%, 100% 의 에탄올 비율에 따른 마치현의 추출 효율과 활성을 비교하여 70% 에탄올 용매 조건을 최적의 추출을 위한 조건으로 확립하였음. 추출 온도는 에탄올 용매의 끓는점 (약 75℃)을 감안하여 70℃로 설정하였으며, 원물대비 용매의 양과 추출 시간은 추출 시 비용 단가와 연계하여 건조 중량 대비 10 배의 용매로 5시간 추출하는 것으로 결정하였음.

원물의 건조 중량 (g)	에탄올 함량 (%)	용매의 양	추출시간	수득량 (g)	수득율 (%)
20	50	10배	5시간	3.2348	15.7
	70	10배	5시간	3.3445	16.7
	100	10배	5시간	1.2666	6.3

<표. 마치현 원물 대비 추출용매 함량 및 추출 효율>

- 협동기관에서 확립된 분석법을 기반으로 마치현 산지별 HPLC 정성분석을 실시하였음. 분석 결과 장홍산(재배), 청송산(재배) 및 중국산(재배)에서 유사한 HPLC 패턴을 보였으며, 산청산(채집) 및 영천산(채집)에서 유사한 패턴을 확인할 수 있었음. 특히, 재배된 마치현이 채집된 마치현과 비교하여 20.3분 과 23.1분대의 성분의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었음.



<그림. 산지별 마치현 시료들의 HPLC 크로마토그램>

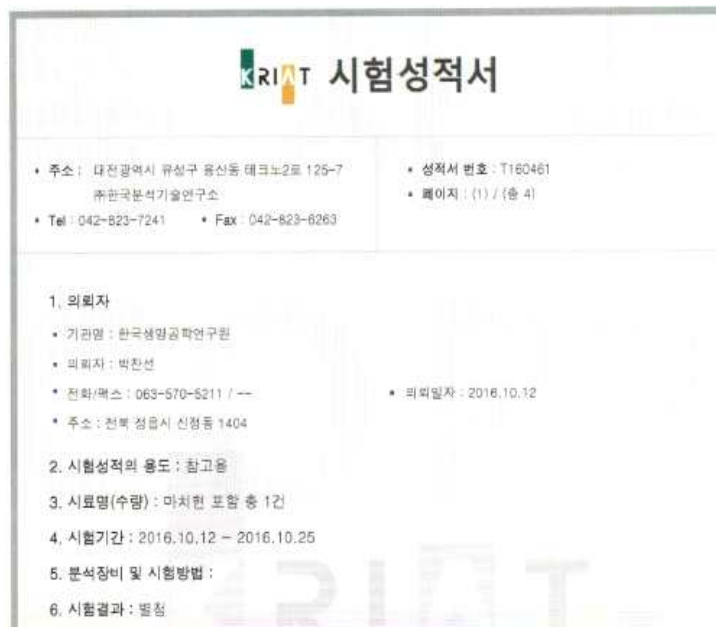
② CMC (Chemistry, Manufacturing, Control) 연구

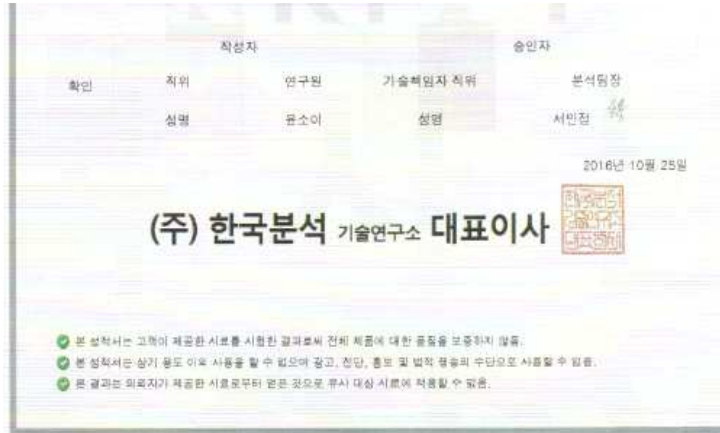
- 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성확보 R = 0.99% 이상)
 마치현(장흥 재배) 에탄올 추출물은 협동기관에서 확립된 분석방법을 적용하여 정성분석을 실시하였음. 분석조건은 320 nm 파장에서 phenomenex gemini C₁₈ 컬럼을 이용하였으며, 이동상으로는 H₂O (0.5% acetic acid)과 ACN을 이용한 step gradient 용매 조건으로 40분간 분석하였음. 분리 정제된 6종 feruloylamide 계열의 화합물을 기반으로 정성분석을 실시한 결과, 각각의 화합물은 12.8분, 14.2분, 16.5분, 18.9분, 6.0분, 6.7분대에서 확인할 수 있었음



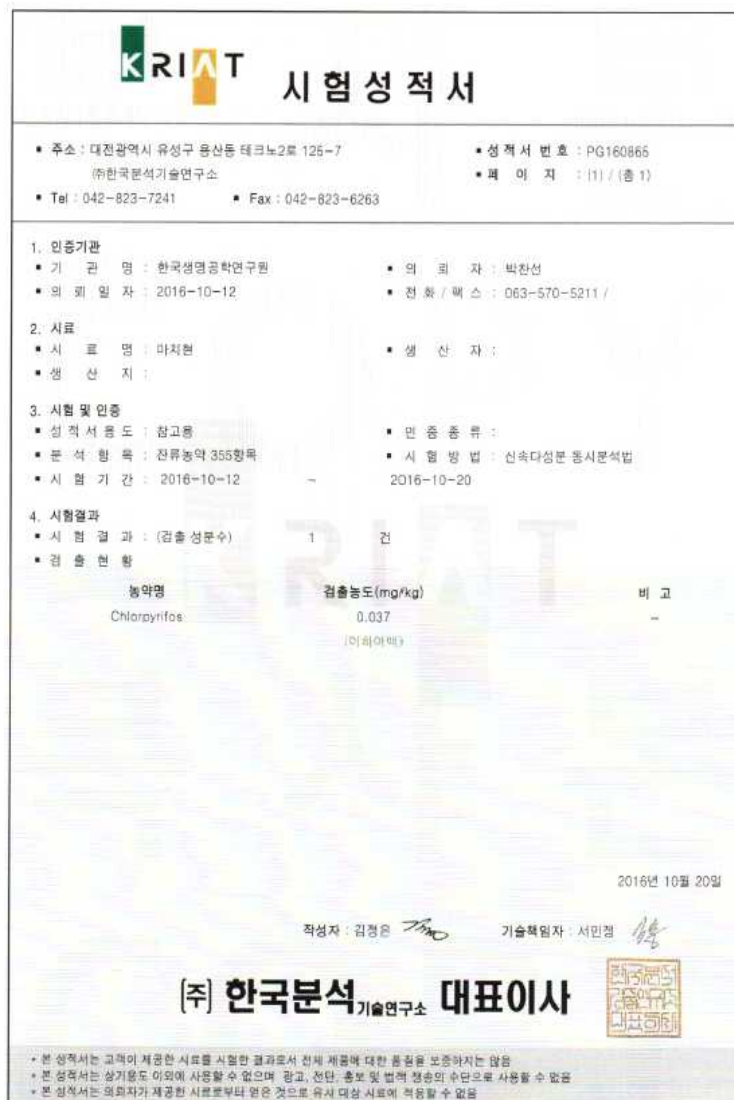
<표. 마치현으로부터 분리된 feruloylamide 계열 화합물(A) 및 에탄올 추출물(B)의 HPLC 크로마토그램 >

- 유해성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약 등), 원료관리 (COA 규정)
 유해물질 분석 인증기관인 한국분석기술연구소에서 시행 완료





<그림. 중금속 검사 시험 성적서>



<그림. 잔류농약 검사 시험 성적서>

- 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록"에 따르면 쇠비름(마치현)은 식물성 원료로 분류됨.

	품목명	이명 또는 영명	학명 또는 특성	사용부위(생약명)
1062	쇠비름	돼지풀, Purslane	Portulaca oleracea L.	잎, 순, 줄기

- 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록"에 포함된 품목(건조한 것에 한함)의 경우 납, 비소 등 개별 중금속 허용 기준은 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시) 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」(식품의약품안전처 고시)에 따라 기준치 설정
- GMP: 원료 GMP 생산, QC/QA 확립, 분석벨리데이션 확립
 - 식품생산을 위·수탁하는 GMP 생산 기관이 소수인 현 상황에서 전라남도 식품산업센터 원료 GMP 생산 기관 확보 및 GMP 파일럿 생산 완료 및 대량생산 연구 완료
- 성분규명: 지표성분 규명, 활성성분 규명, 원료생약 성분 규명
- 마치현 에탄올 추출물의 HPLC 분석결과, 6.0분, 6.7분, 12.8분, 14.2분, 16.5분, 18.9분대에서 관찰된 피크는 각각 (7'S)-N-trans-feruloyloctopamine (5), 7'S)-N-trans-feruloylnorm-etanephine(6), N-cis-feruloyltyramine(1), N-trans-feruloyltyramine(2), N-cis-feruloyl-3'-methoxytyramine (3), N-trans-feruloyl-3'-methoxytyramine (4) 화합물로 확인되었음.

(2) 2차년도

(가) 소재 표준화

① 소재 기원 확립

- 마치현의 계통분류로는 피자식물문(Angiospermae), 이판화아강(중심자목), 쇠비름과(Archichlamydeae), Centrospermae (중심자목)에 속함. 학명으로는 [Portulaca oleracea] Linne으로 길가나 밭에 나는 1년초임. 키는 30cm 정도로 다육질 전체에 털이 없고 적갈색이며 뿌리는 흰색이나, 손으로 문지르면 적색으로 변하고, 줄기는 땅을 김. 잎은 대생 또는 호생, 끝부분은 윤생, 도란형, 길이 15-25mm, 끝이 둥근 모양, 가장자리는 밋밋하고, 잎자루는 짧음. 꽃은 양성화 가지 끝에 달리고 황색, 꽃잎 5장, 꽃받침 2장, 타원형 수술 7-12개이며 자방중위 암술대 5갈래, 열매는 개과 타원형 씨는 아주 작고 다수 긴자루가 달리며 일그러진 원형이고 흑색임.
- 국내에는 쇠비름과의 식물이 1속 2종이 아래 사진과 같이 분포하고 있음. 따라서 마치현과 채송화를 샘플링 하여 소재 기원 확립을 위해 아래 실험들을 비교 분석하였음.



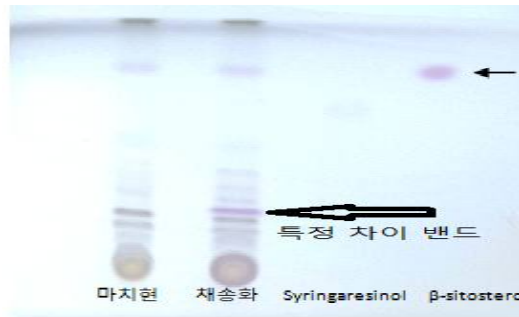
Portulaca oleracea L. (Portulacaceae), 마치현



Portulaca grandiflora (Portulacaceae), 채송화

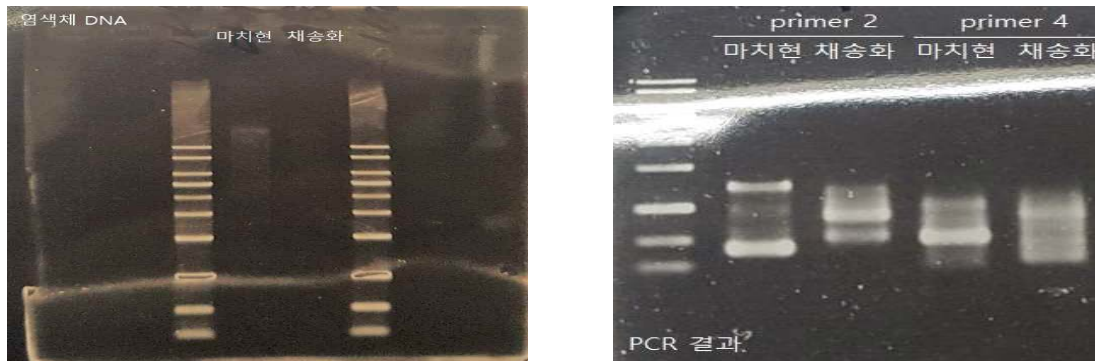
<그림. 마치현과 채송화 형태 사진>

- TLC (Thin Layer Chromatography) 기법으로 실험을 진행하였음.
- 시험방법
 - 종자은행에서 받은 쇠비름과 중 가장 많이 알려지고 국내에 존재하는 마치현과 채송화 비교 하였음.
 - 마치현과 채송화를 95% Ethanol에 환류 추출하여 필터 후 감압 농축하였음. (마치현 4.38g/200g, 채송화 2.67g/200g)
 - 농축물을 클로로포름:메탄올(1:1)에 완전히 녹였음. (10mg/ml)
 - Silica HPLC(Merk, HPTLC silica gel 60 F 254)를 이용하여 4ul씩 점적하고 클로로포름:메탄올(15:1)로 전개하였음.
 - 10% vanilin H₂SO₄로 발색하였음.
- 시험 결과
 - 마치현과 채송화 구별 TLC 패턴으로 확보하였음.



<그림. TLC 패턴 결과>

- RAPD(random amplified polymorphism DNA) 기법으로 실험을 진행하였음.
- 시험방법:
 - 마치현과 채송화의 식물 본체에서 염색체 DNA를 추출하여 시험하였음.
 - Bioneer Oligo synthesis primer (83개)를 이용하여 실험을 진행하였음.
 - PCR(Polymerase chain reaction) 조건:
 - Initial single 94 degree 5분, Denaturation 94 degree 1분, Annealing 37 degree 1분, Extraction 72 degree 2분, Final single 72 degree 5분 (Total 45 cycles)
- 시험결과, 마치현과 채송화의 분자계통학적으로 다름을 확인하였음.



<그림. RAPD 실험 결과>

(나) 전임상 시험

시험종류		종 및 계통	투여 방법	투여기간	시험물질, 용량	시험결과
단회 투여	설치류	SD Rat (M 5, F 5)	경구	1회	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (0, 5000 mg/kg/day)	· 시험결과 기재 (시험물질과 관련된 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음) · 개착치사량 : 5,000 mg/kg/day 상회
14 일 반복 투여 DRF	설치류	SD Rat (M 5, F 5)	경구	14일	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (1250, 2500, 5,000 mg/kg/day)	· 시험결과 기재 (시험물질과 관련된 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병 변 소견 없음) · 90일 반복독성 5,000mg/kg/day 설정
90 일 반복 투여	설치류	SD Rat (M 10, F 10)	경구	90일	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (1250, 2500, 5,000 mg/kg/day)	· 시험결과 기재 (시험물질과 관련된 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병 변 소견 없음) · NOAEL : 5,000mg/kg/day 상회
단회 투여	비설치류	비글견(M 2, F 2)	경구	DE	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (500, 750 1,000mg/kg/day)	· 시험결과 기재 · 750 및 1000mg/kg 구토 관찰 · 500mg/kg : 시험물질과 관련된 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음
유전 독성	복귀 돌연변이 (Ames test)	· <i>S typhimurium</i> TA98, TA100, T A 1 5 3 5 , TA1537 · <i>Escl</i> WP2 uvrA		1회	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (0-05 mg/plate)	· 음성 (복귀돌연변이를 유발하지 않음)
	염색체 이상시험	CHO-K1 cells		1회	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (상대 세포수 증가 55%의 세포독성 농도를 최고 농도로 3단계)	· 음성 (염색체 이상을 나타내지 않음)
	소핵시험	ICR 마우스 골수세포		1회	· 시험물질 KDC16-2-3 · 투여량 (500, 1000, 2000 mg/kg)	· 음성 (소핵을 유발하지 않음)

(다) 대량생산 원료이용 제제연구

① 원료 균질화 확립 (원료 제형 연구)

- 원료 균질화: 원료를 균질하게 하기 위해 spray dry를 진행하였고, 랜덤으로 sampling을 하여 원료 제형 연구한 결과 마치현 70% 에탄올건조엑스 원료 균질화를 확인함.

(함량: 80~120% 범위이내)

- 마치현 추출물로부터 Syringaresinol, 7-epi-Loliolide를 분리하였음. 7-epi-Loliolide는 현재 시중에 판매되지 않아 구입이 불가능하므로 표준품을 제작해야 하나 이는 시간이 오랜 기간 소요 됨. 따라서 건강기능식품 기준법 상 허용되는 범위의 표준 화합물1종을 Syringaresinol로 선정하였음.

- 함량 시험

1) 검 액 : 이 원료 5 g을 정밀하게 달아 250 mL 둥근 플라스크에 넣고 70% 에탄올을 100 mL 넣은 후 70 °C에서 4시간 환류냉각 추출하여 종이필터로 여과한다. 여액은 감압농축한 후 H2O에 50 mL을 넣어 현탁하고 에틸아세테이트 용매 50 mL을 넣어 분획한다. 이중 상층액 45 mL을 취하여 감압농축한 후 에틸아세테이트 용매에 5 mL에 완전히 녹인다. 이를 실리카 카트리지 (Agilent, SI, 500MG, No.102002)에 통과시키고 다시 에틸아세테이트 2 mL x 3회 흘려주어 고상추출(SPE)을 함. 이를 감압 농축한 후 HPLC 등급의 메탄올 3 mL에 용해시킨 시료를 옥타데실기결합성실리카겔 (ODS) 카트리지 (Agilent, C18, 500MG, No.12102052)에 통과시키고 메탄올 2 mL x 3회 흘려주어 고상추출을 함. 이를 감압 농축하고 메탄올을 이용하여 적정농도 (1 ~ 5 mg/mL)로 희석하고 필터한 용액을 검액으로 사용한다.

2) 표준액 : 표준화합물 7-epi-Loliolide (A), Syringaresinol (B) 1 mg을 정밀하게 달아 HPLC 등급의 메탄올 1 mL를 넣어서 녹인 후, PTFE 재질로 만들어진 0.45 µm 필터를 사용하여 여과한 검액 A, B를 각각 1:1의 비율로 정확하게 배합하여 표준품 용액 (C)를 조제한다. (A, B 각 1 mg/ml). 이 후 C를 HPLC 등급의 메탄올로 0.2, 0.1, 0.05, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, 0.003, 0.002 mg/ml (A, B 각각의 농도)가 되도록 희석하여 표준품 용액으로 사용한다.

3) 시스템적합성

표준액을 6회 반복 주입할 때 피크면적의 상대표준편차는 2.0% 이하, 피크유지시간의 상대표준편차는 2.0% 이하이어야 한다.

4) 기기조건

칼 럼 : Agilent Eclipse XDB C18 (250*4.6mm*5um) 또는 이와 유사한 컬럼

이동상 : H2O(A),Acetonitrile(B)

min	% of Solvent (B)
0	15
15	15
19	28
29	28
31	46
40	46
42	100

주입량 : 10 µl

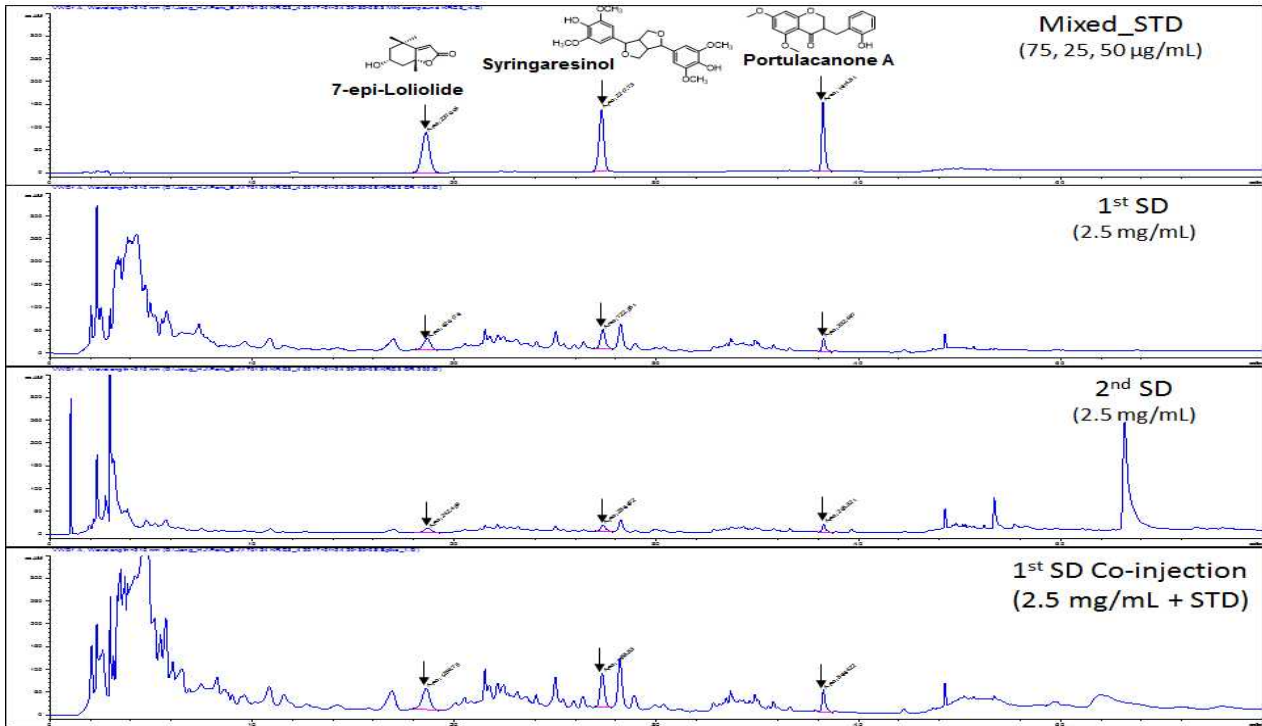
유 속 : 1.0 mL/min

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 210 nm)

온 도 : 컬럼 35 °C

5) 계 산

표준액을 주입하여 얻은 피크면적으로 검량선을 작성하고 검액의 피크면적을 가지고 농도를 구하여 함량을 계산한다.



<그림. Syringaresinol의 HPLC 크로마토그램>


② 안정성 시험 (가속/가혹, 장기시험)

- 안정성 시험: 건강기능식품인 경우, 안정성 자료를 공인인증기관에서 의뢰하여 작성된 원료 시험성적서로 대체 가능함.
- 가속 시험: 안정성시험은 원료 시험성적서로 대체가능하지만 아사에서 가속시험을 진행 중임. 온도 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $75\pm 5\%$ 조건에서 6개월 동안 가속 안정성 시험을 진행하여 마치현 70% 에탄올 건조엑스의 초기 함량, 수분 등 모든 시험항목을 확인할 예정임.

③ 대량생산 원료이용 제제연구


- 건강기능식품 원료의 제형개발연구: 연질, 경질, 분말 제형의 형태로 연구한 결과, 균질화가 가장 좋은 분말 제형으로 대량 생산을 완료함. 마치현 70% 에탄올 건조엑스는 캡슐에는 충전이 불가능하여 정제로 제제화를 진행하였음. 생약추출물을 함유하는 제제이므로 용출시험 대신 봉해시험을 실시하여 20분 내에 들도록 제제를 설계하기 위하여 첨가제 및 코팅기제를 선택하였고, 타정 및 필름코팅의 공정으로 구성된 일반방출 필름코팅정제로 개발하였음.
- 시험성적서: 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 건강기능식품 원료 개별인정을 받기 위해 경기도 의왕시에 위치한 공인인증기관인 “한국식품과학연구원”에 의뢰하여 지표성분 (syringaresinol), 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약(디디티, 디엘드린, 비에치시, 알드린, 엘드린), 대장균군, 세균수 분석을 진행 하였음. 이를 바탕으로 진행한 전임상 시험은 원료 단계에 있으며 전임상 완료 후, 3차년도에 인체적용시험을 수행하여 건강기능식품 원료 개별인정을 받을 예정임.



일반 제 11993 호							
시 험 성 적 서							
검 체 명	마치현(Portulacaoleracea L.(쇠비름과 Portulacaceae))						
회 사 명	고려제약(주)	대 표 자	박해룡, 박상훈				
주 소	경기도 이천시 신둔면 수광리 486						
시험항목	Syringaresinol 외 11항목				의뢰목적	제출용	
제조번호	1차	제조일자	2016.11.30	유통기한	2018.11.30	접수일자	2017.07.31
귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.							
외관..... 엷은 갈색의 분말임 Syringaresinol(mg/g).....0.007(3회평균) * 1회: 0.0071, 2회:0.0071, 3회:0.0070 mg/g 납(mg/kg).....0.27 비소(mg/kg).....0.07 카드뮴(mg/kg)..... 불검출 수은(mg/kg)..... 불검출 디디티(ppm)..... 불검출 디엘드린(ppm)..... 불검출 비에치시(ppm)..... 불검출 알드린(ppm)..... 불검출 엔드린(ppm)..... 불검출 세균수..... 0/g,0/g,0/g 대장균군..... 음성,음성,음성 끝.							
*비 고 : Syringaresinol의 분석결과는 의뢰사가 제공한 방법에 의한 결과임 (Lot: KDC16-2-1, 시험물질명:마치현 70% 에탄올:엑스트린(1:1))							
2017년 08월 23일							
한국식품과학연구원 							
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.							

<그림. 마치현 원료 시험성적서 1 batch>





일반 제 12072 호							
시 험 성 적 서							
검 체 명	마치현(Portulacaoleracea L.(쇠비름과 Portulacaceae))						
회 사 명	고려제약(주)	대 표 자	박해룡, 박상훈				
주 소	경기도 이천시 신둔면 수광리 486						
시험항목	Syringaresinol 외 11항목				의뢰목적	제출용	
제조번호	2차	제조일자	2016. 12. 16	유통기한	2018. 12. 16	접수일자	2017. 07. 31
귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.							
외관.....엷은 갈색의 분말임 Syringaresinol(mg/g).....0.005(3회평균) * 1회: 0.0054, 2회:0.0055, 3회:0.0054 mg/g 납(mg/kg).....0.11 비소(mg/kg).....0.05 카드뮴(mg/kg).....불검출 수은(mg/kg).....불검출 디디티(ppm).....불검출 디엘드린(ppm).....불검출 비에치시(ppm).....불검출 알드린(ppm).....불검출 엔드린(ppm).....불검출 세균수.....0/g,0/g,0/g 대장균군.....음성,음성,음성 끝.							
*비 고 : Syringaresinol의 분석결과는 의뢰사가 제공한 방법에 의한 결과임 (Lot: KDC16-2-2, 시험물질명:마치현 70% 에탄올:덱스트린(1:1))							
2017년 08월 23일							
한국식품과학연구원 							
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.							

<그림. 마치현 원료 시험성적서 2 batch>



일반 제 12073 호							
시 험 성 적 서							
검 체 명	마치현(Portulacaoleracea L. (쇠비름과 Portulacaceae))						
회 사 명	고려제약(주)	대 표 자	박해룡, 박상훈				
주 소	경기도 이천시 신둔면 수광리 486						
시험항목	Syringaresinol 외 11항목				의뢰목적	제출용	
제조번호	3차	제조일자	2017.04.04	유통기한	2019.04.04	접수일자	2017.07.31
귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.							
외관.....엷은 갈색의 분말임							
Syringaresinol (mg/g).....0.008(3회평균)							
* 1회: 0.0085, 2회:0.0084, 3회:0.0084 mg/g							
납(mg/kg).....0.06							
비소(mg/kg).....0.03							
카드뮴(mg/kg).....불검출							
수은(mg/kg).....불검출							
디디티(ppm).....불검출							
디엘드린(ppm).....불검출							
비에치시(ppm).....불검출							
알드린(ppm).....불검출							
엔드린(ppm).....불검출							
세균수.....0/g,0/g,0/g							
대장균.....음성,음성,음성 끝.							
*비 고 : Syringaresinol의 분석결과는 의뢰사가 제공한 방법에 의한 결과임 (Lot: KDC16-2-3, 시험물질명:마치현 70% 에탄올:엑스트린(1:1))							
2017년 08월 23일							
한 국 식 품 과 학 연 구 원							
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.							

<그림. 마치현 원료 시험성적서 3 batch>

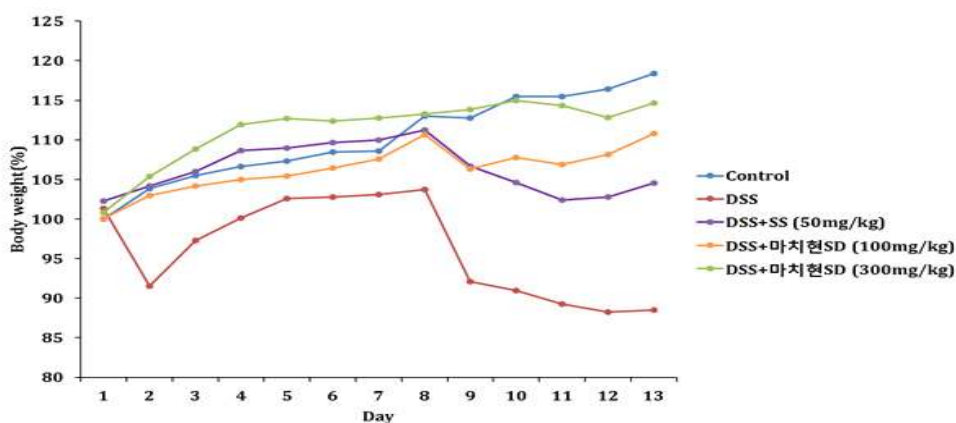
<div style="text-align: center;">  <p>제 19212 호</p> <h2 style="text-align: center;">시 험 성 적 서</h2> </div>							
검 체 명	마치현 70% 에탄올 건조엑스(마치현 70%에탄올 추출물:덱스트린, 1:1) Lot. KDC16-2-3						
회 사 명	고려제약(주)	대 표 자	박해룡, 박상훈				
주 소	경기도 이천시 신둔면 수광리 486						
시험항목	이산화황			제조번호	3차		
의뢰목적	제출용	제조일자	2017.04.04	유통기한	2019.04.04	접수일자	2018.12.07
<p>귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>외관.....엷은 갈색의 분말임 이산화황(g/kg).....불검출 됨.</p> <p>*비 고 : 한국식품과학연구원서 2017.08.23.에 보내온 시험성적서 제12073호에 대하여 법제정에 의한 추가시험</p>							
<p>2018년 12월 11일</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> <p>한 국 식 품 과 학 연 구 원</p> <p>16001 경기도 의왕시 봇들로 50 (포일동 660-4) T:02-3470-8200 F:02-523-2072</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>							
<p style="text-align: center;">이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.</p>							

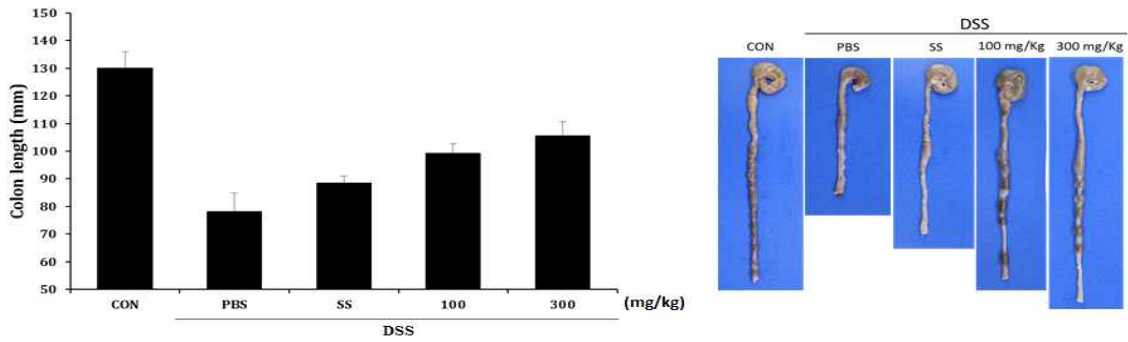
P.1/1
18-DEC-12 11:07 From:

T:02 529 6114
>그림. 마치현 원료 추가시험<

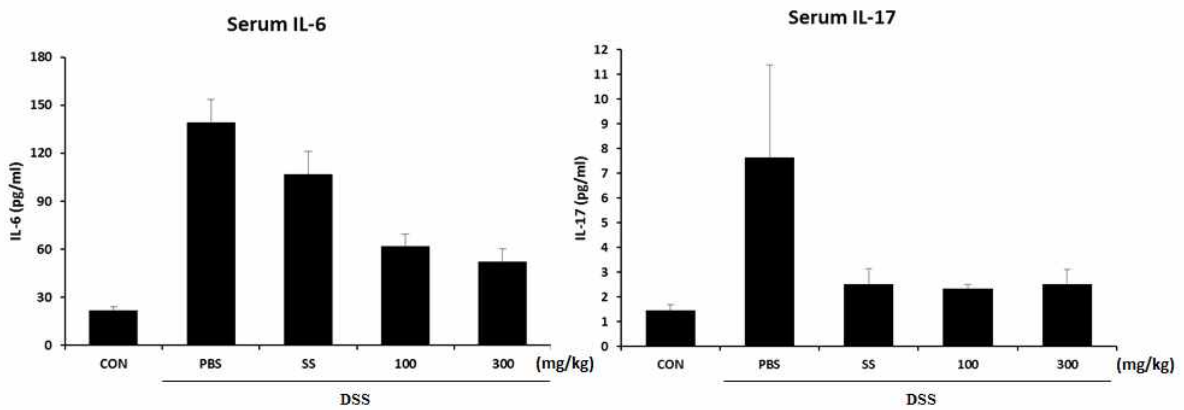
④ 대량생산 원료 활성 연구:

- 대량생산 원료의 장 질환 동물 모델을 통한 장 건강 *in vivo* 효능 평가 및 용량별 활성 비교
- 대량생산 된 원료인 마치현 spray dry (SD) 시료를 주관기관에서 공급받아 *in vivo* 효능 평가를 위해 장질환 동물 모델 실험을 수행함. 마치현 SD 원료는 마치현 70% 에탄올 건조엑스로 섞여있는 원료로서 용량별 효능 검증을 위해 100 mg/kg, 300 mg/kg 농도 (마치현 추출물 함유량 50 mg/kg, 150 mg/kg)로 경구 투여하여 동물 실험을 수행함.
- 장 질환 동물 모델은 가장 널리 사용되고 있는 Dextran sodium sulfate (DSS) 유도성 염증성 대장염 모델을 구축하여 실험함. DSS는 직접적으로 basal crypts의 장 상피세포에 독성을 가지며, 점막 배리어에 손상을 주어 염증성 장염을 유도하고, DSS 유도성 장염 모델은 염증성 장염의 치료제 개발에 적용하기에 적당한 모델로 알려져 있음.
- 4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, 염증성 대장염 치료제로 사용되고 있는 sulfasalazine 투여군, 마치현 SD 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가짐. sulfasalazine 및 마치현 SD 투여군은 3% DSS 음수 2일 전부터 DSS 음수 시작 후 14일 동안 sulfasalazine 50 mg/kg, 마치현 SD 투여군은 100 mg/kg, 300 mg/kg 의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여함. 치료시험 기간 중에는 체중 측정, 변의 형태, 혈변의 정도를 나타내는 질환 활성 지표 (disease activity index, DAI) 기준, 정상변 0, 무른변 1, 무른 변과 잠혈 2, 설사와 잠혈 3, 설사와 직장 주위에 출혈과 잇무름이 있는 경우는 4로 하여 평가하였고, 시험 종료 후에는 장 길이, 혈중 사이토카인 측정, 결장의 병리 조직학적 관찰을 실시함.
- DSS 유도성 염증성 대장염 동물 모델 실험 결과, 마치현 SD 100 mg/kg 투여군, 300 mg/kg 투여군 모두 체중저하, 폐사 등 임상증상이 완화되는 것을 확인하였고, DSS에 의해 감소된 장 길이도 회복되는 것을 검증하였으며 혈중 염증성 사이토카인 IL-6, IL-17 농도도 감소됨을 확인함. 또한 positive 약물로 사용된 sulfasalazine (SS) 투여군 보다 더 우수한 효능을 나타내는 것을 확인함.



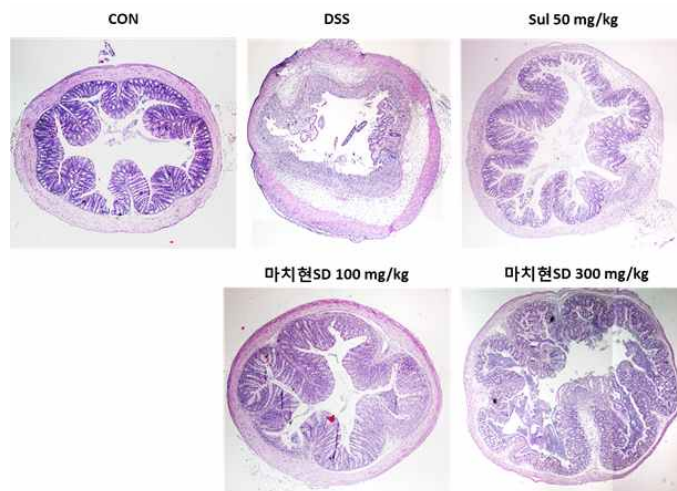


<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 마치현 SD의 활성 평가 (체중변화, 장 길이 변화)>



<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 마치현 SD의 활성 평가>
(혈중 염증성 사이토카인 농도 변화)

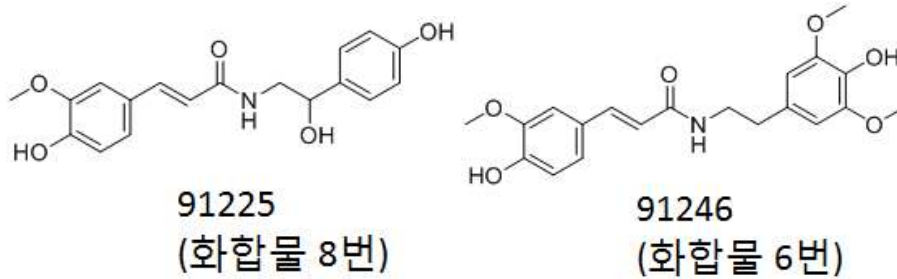
- 결장 조직 병리사진에서도 대장염 유발군에서 관찰되는 장 점막층 및 근육층의 염증세포 침윤, 장 용모, 장샘 소실 등 또한 sulfasalazine 치료제 투여군 및 마치현 SD 투여군에서 현저하게 감소함을 확인함. 따라서 마치현 SD를 100 mg/kg 투여군, 300 mg/kg로 처리한 실험군에서는 DSS를 처리에 의해 유도되는 염증성 대장염 증상을 치료하는 효과가 우수함을 확인함.



<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델의 조직 병리 결과>

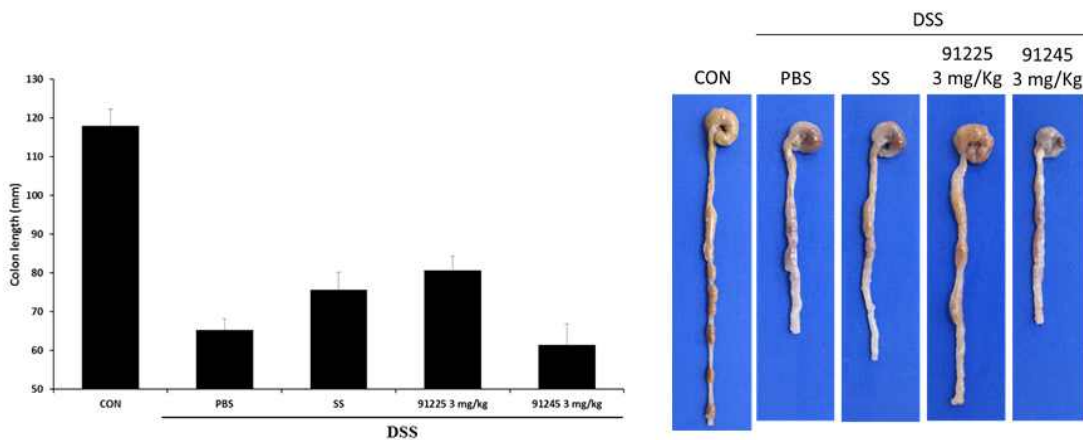
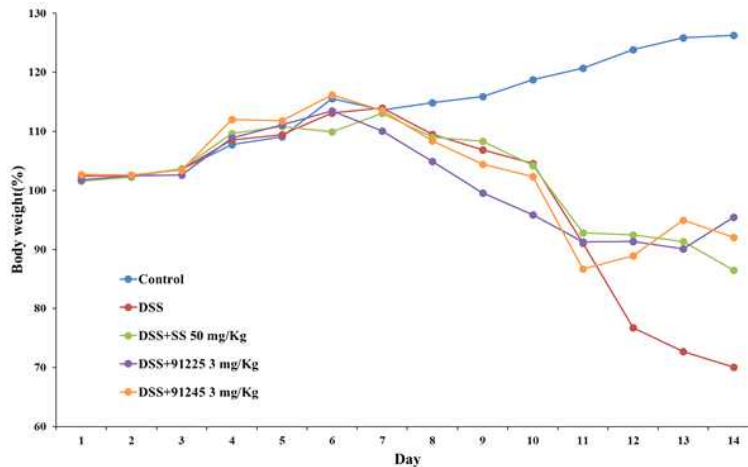
⑤ 신규화합물의 *in vivo* 효능 평가

- 마치현 추출물의 활성 기전연구를 위해 추출물에서 신규 화합물을 분리하여 활성평가를 수행하였고, 1차년도에 분리한 신규 화합물 이외에 추가로 신규 화합물 2종을 더 분리하여 장 질환 동물 모델에서 활성 평가에 대한 추가 연구를 진행함.



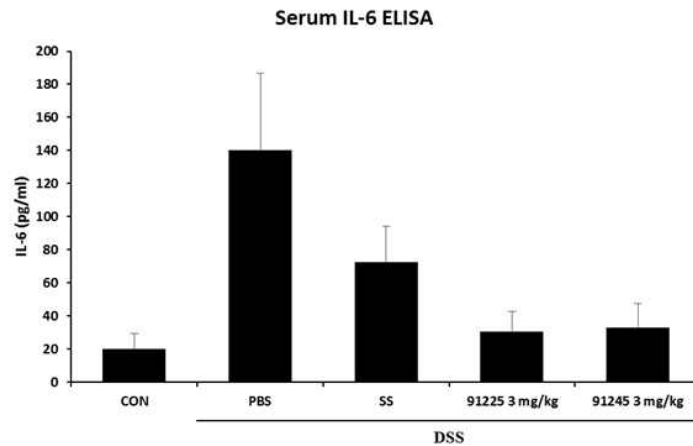
<그림. 마치현 추출물에서 추가로 분리한 신규 화합물 2종의 구조>

- 4주령의 ICR male 마우스를 정상 대조군 (Control), 3% DSS 장 염증 유발군, sulfasalazine 투여군, 신규 화합물 투여군으로 나누어 7일간 적응기를 가진 후, sulfasalazine 50 mg/kg, 신규 화합물 그룹은 3 mg/kg의 용량으로 1일 1회 경구 투여로 투여하였음. 시험 종료 후에는 체중변화, 장 길이, 혈중 사이토카인 측정을 실시함.



<그림. DSS 유도성 염증성 대장염 모델에서 신규 화합물의 활성 평가 (체중변화, 장 길이 변화)>

- 시험기간 체중변화를 관찰한 결과, 3% DSS 유도에 의한 급격한 체중저하 및 폐사가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 신규 화합물 투여 그룹에서 완화됨. 또한 3% DSS 투여군에서 보이는 설사 및 혈변, 항문의 임상증상이 sulfasalazine 투여군 및 신규 화합물 투여 그룹에서 호전된 것을 볼 수 있었고, 결장 길이 측정 및 결장의 병리 조직학 분석 결과, 대장염 유발군의 장 길이는 정상군에 비해 현저하게 줄어들었으나 sulfasalazine 치료제 투여군 및 신규 화합물 투여군에서 장 길이가 회복됨.

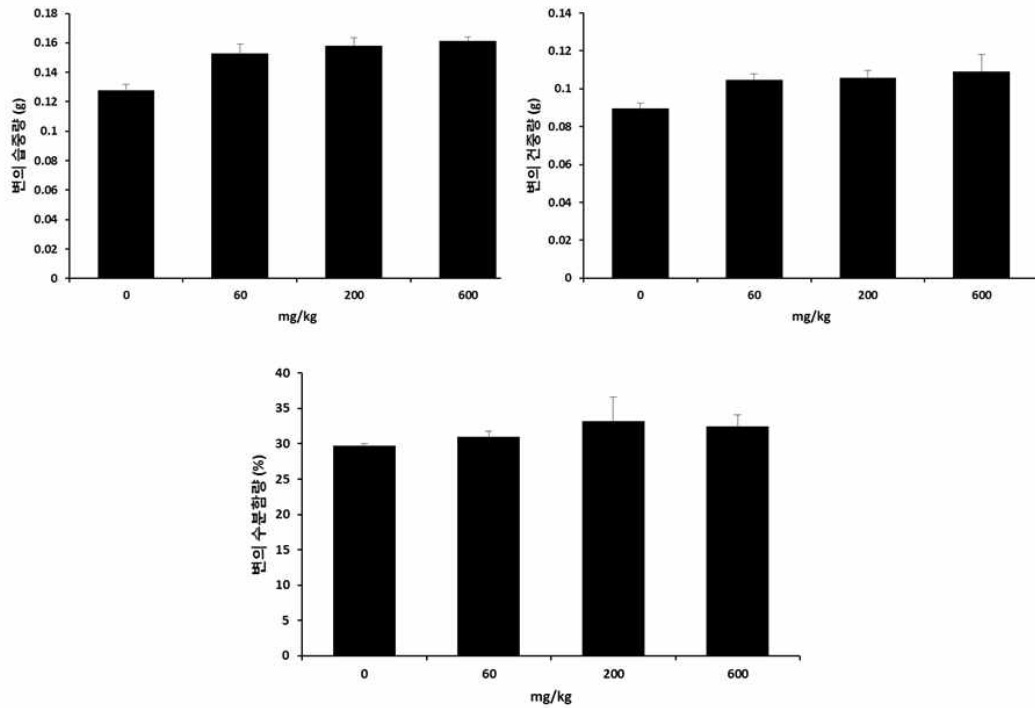


<그림. 마치현 추출물에서 분리한 신규 화합물의 혈중 사이토카인 분비량 변화>

- 염증성 대장염의 effector cytokine인 IL-6의 혈중 농도 또한 3% DSS로 유발한 염증성 대장염 유발군에서 증가되었다가 sulfasalazine 치료제 투여군 및 화합물 투여군에서 현저하게 감소함. 또한, 신규 화합물 2종 중 화합물 91225 투여군이 체중 변화 감소, 장 길이 회복 등 임상 증상이 호전되어 효능이 더 우수함을 확인함.

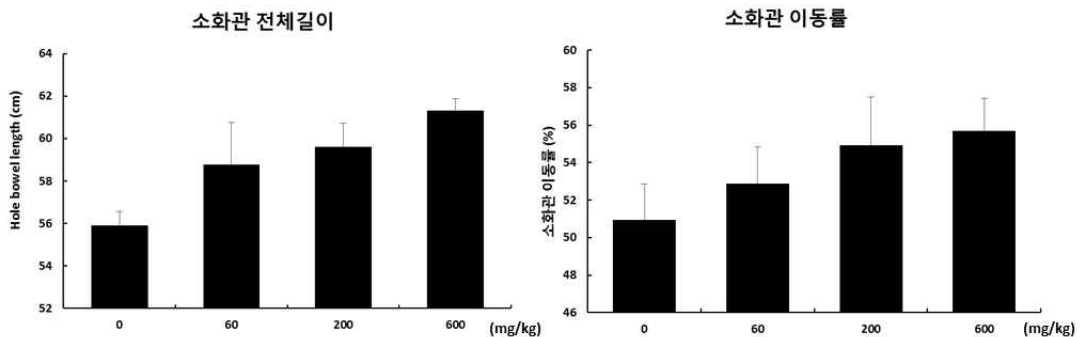
⑥ 건강기능식품 기능성 평가를 위한 추가 실험

- 마치현의 건강기능성 식품 원료 개발을 위해 식약처 건강기능식품 기능성 평가 가이드에 따라 배변활동 개선 및 소화관 운동능 마우스 실험을 수행함. 배변활동 개선 실험으로는 변의 양이 많아지면 장의 연동운동이 촉진되고, 배출시간이 감소하므로 배변활동이 개선되었음을 반영하여 실험동물의 배변활동 후 변을 채취하여 습중량을 측정하고, 24시간 60°C에서 건조하여 건조증량을 측정한 다음 변의 수분함량을 계산함.
- 4주령의 ICR male 마우스를 1주일간 마치현 SD를 60, 200, 600 mg/kg 농도로 1일 1회 경구 투여한 후 3일간 대사케이지에서 매일 1일 동안 배설되는 대변을 수집하고 수집한 대변의 무게(습중량)를 측정 후 건조시킴. 건조증량을 측정하고 수분함량(수분함량%=(습중량-건중량)/습중량×100)을 계산하여 확인해 본 결과, 마치현 SD 투여군에서 농도 의존적으로 습중량과 건조증량이 증가하는 것을 확인하였고, 수분함량 또한 증가하는 경향을 확인함.



<그림. 배변활동 개선 실험 결과>

- 소화관 운동능 마우스 실험은 소화관 이동률에 관한 실험으로 대조군과 실험군으로 나누고 대조군에는 생리식염수를 실험군에게는 마치현 SD를 60, 200, 600 mg/kg 농도로 1일 1회 경구 투여 하여 18일간 실험함. 마우스 해부 전 실험쥐를 16시간 절식한 후 소장의 운동능을 확인할 수 있는 10% 황산 바륨을 10mg/kg 농도로 경구 투여 하여 30분간 관찰함. 30분 후 마우스를 해부하여 위의 유문부에서 직장부까지 장을 적출하여 황산 바륨의 최선단부를 측정함. 소화관 운동능 마우스 실험 결과, 마치현 SD를 투여한 그룹에서 농도 의존적으로 소화관 전체 길이가 길어지고 소화관 이동률도 증가하는 것을 확인할 수 있음. 결론적으로 배변활동 개선 실험과 소화관 운동능 실험 결과를 바탕으로 마치현 SD 투여군은 장 기능 개선 효과가 우수함을 검증함.



<그림. 소화관 이동능 실험 결과>

(3) 3차년도

(가) 인체 유효성 평가

① 인체효능평가 프로토콜 및 시험계획수립

연구제목	마치현 70% 에탄올 건조엑스의 배변 습관 개선 검증을 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험						
연구목적	건강기능식품 기능성원료인 마치현 추출물의 실용화를 위하여 만성기능성 변비 증상으로 생활에 불편함을 느끼는 사람에 대한 변비 개선효과와 안정성을 평가하고자 함.						
연구유형	인체시험	IRB 구성 및 승인	Y				
실험설계	Double-blind	Randomized	Cross-over				
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	<p>1. 선정 기준</p> <p>1) 만 20~65세의 성인 남녀</p> <p>2) 50세 이상에서는 5년 내 대장내시경 검사에서 기질적 질환이 없는 자로 2차성 변비를 제외한 로마 기준 IV의 기능성 변비의 기준을 만족하는 자</p> <p>3) 소화관의 기질적 질환이나 직장 항문질환이 없는 자</p> <p>4) 대장조영술이나 대장내시경 검사와 혈액검사(말초혈액검사, 혈청생화학 검사, 혈중 칼슘, 인, 갑상선 기능검사)에서 정상 소견을 보인 자</p> <p>5) 추적 관찰을 위한 방문과 연구 기간 동안 혈액채취가 가능한 자</p> <p>6) 본 임상시험에의 참여를 자발적으로 결정하고 임상시험 준수사항을 잘 이행할 것을 서면 동의한 자</p> <p>2. 제외 기준</p> <p>1) 임신부 및 수유부</p> <p>2) 염증성 장질환, 만성 전신질환, 대사질환, 신경 질환 또는 정신질환 기왕력이 있는 자.</p> <p>3) 충수절제술 또는 담낭절제술을 제외한 소화관 수술 과거력이 있는 자</p> <p>4) 3년 이내 시행한 대장내시경에서 진행성 샘종(폴립)이 발견된 자</p> <p>5) 소화관 운동에 영향을 미치는 약제의 만성 복용 기왕력이 있는 자</p> <p>6) 유당불내성을 진단받고 치료력이 있는 자</p> <p>7) 임상시험용의약품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨병, 궤양 등)이 있는 자</p> <p>8) 마치현 추출물성분이나 동일 계열의 성분을 포함하는 약물, 또는 기타 약물(아스피린, 항생제 등)에 대한 과민반응이나 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자</p> <p>9) 간경화, 심한 심부전[NYHA grade III or IV], 심한 신기능장애 [Ccr <30ml/min], 조절이 되지 않는 고혈압, 내분비장애, 대사장애, 악성종양 병력, 면역기능 저하 자</p> <p>10) 임상시험용의약품 첫 투여일 전 30일 이내에 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 비정상적인 식이를 해온 자</p> <p>11) 임상시험용의약품 첫 투여일 전 60일 이내에 타 임상시험용의약품을 복용한 자</p> <p>12) 임상시험용의약품 첫 투여일 전 60일 이내에 전혈 헌혈 또는 30일 이내에 성분 헌혈을 하였거나, 30일 이내에 수술을 받은 자</p> <p>13) 임상시험용의약품 첫 투여일 전 30일 이내 바르비탈류 약물 등의 약물 대사효소 유도 및 억제 약물을 복용한 자</p> <p>14) 과다 알코올 섭취자 (알코올>21units/주 (1unit=순수 알코올로써 10mL))</p> <p>15) 기타 사유로 인하여 시험담당자 혹은 시험책임자가 임상시험 참여에 부적합하다고 판단한 자.</p>					
	특징	제외 기준 중 염증성 장질환, 만성 전신질환, 대사질환, 신경 질환 또는 정신질환 기왕력이 있는 자.					
시험물질	- 시험제품 : 마치현 70% 에탄올건조엑스 - 플라세보 : 맛과 향, 외형이 시험제품과 유사하게 제조할 예정임						
시험디자인	대조군	플라세보를 8주간, 1일 1회, 식후 경구섭취 (480mg/day) 시험군 : 30명					
	시험군	시험제품을 8주간, 1일 1회, 식후 경구섭취 (480mg/day) 시험군 : 30명					
디자인	디자인	무작위배정 방문(Visit 1) 시 최종적으로 적합하다고 평가된 시험대상자에 한하여 마치현 추출물 투여군 또는 위약 투여군으로 무작위배정 되어 8주간 시험약 또는 대조약을 1일 1회 경구 투여 하게 되며, 시험 기간 동안 아침과 저녁에 증상을 평가하고 그 점수를 시험대상자 다이어리에 기록 한다. 시험약 또는 대조약을 투여 받는 동안 시험대상자는 1주, 4주, 8주에 임상시험 실시기관에 방문하여 해당 방문에 실시해야 하는 절차를 진행한다.	<table border="1"> <tr> <td>섭취량</td> <td>시험물질 참조</td> </tr> <tr> <td>섭취기간</td> <td>480mg/day/8주</td> </tr> </table>	섭취량	시험물질 참조	섭취기간	480mg/day/8주
섭취량	시험물질 참조						
섭취기간	480mg/day/8주						
바이오마커	배변 습관 개선 (변의 형태, 대장통과시간, 배변 횟수, 변 굳기, 통변감) 장 불편감 개선 (방귀 횟수, 복부통증, 복부 더부룩함, 복부팽만, 삶의 질)						
통계처리	3-way analysis of variance (ANOVA), Turkey's test, Wilcoxon & Friedman test						
시험결과	배변횟수변화, 변비관련증상, 대장통과시간, 삶의 질, 변비증상 변화 유의성 있게 호전됨.						

② 인체 효능평가를 통한 후보소재의 기능성 검증

- 시험군과 대조군의 이상반응은 특별히 나타나지 않았다.

진단의학 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 직전과 투여한 8주 후의 변화량을 비교하였다. 검사 결과의 변화가 각 군에서 의미 있는 차이를 나타내지 않았고 검사 결과가 모두 정상 범위 내에서 존재하는 변화로 임상적으로 유의한 결과는 아닌 것으로 판단된다.

Table. 섭취 전후 혈액학적 검사 변화

항목	Group	Baseline	After 8 week	z	p ^a
		Mean±S.D	Mean±S.D		
WBC	대조군	5.89±1.74	5.94±1.11	-0.89	0.374
	실험군	6.56±1.90	7.00±2.92	0.08	0.938
RBC	대조군	4.55±0.38	4.57±0.39	-0.05	0.956
	실험군	4.48±0.36	4.47±0.35	-0.136	0.892
Hemoglobin	대조군	13.79±1.28	13.85±1.33	0.06	0.956
	실험군	12.98±1.36	12.99±1.26	0.14	0.892
Platelets	대조군	243.04±51.73	255.26±54.03	-0.82	0.41
	실험군	281.80±44.67	284.76±50.73	-0.01	0.992

^a : 시간에 따른 대조군/실험군 차이 Wilcoxon p-value

Table. 섭취 전후 생화학적 검사 변화

항목	Group	Baseline	After 8 week	z	p ^a
		Mean±S.D	Mean±S.D		
Glucose	대조군	93.13±12.71	98.17±13.39	-1.464	0.143
	실험군	95.68±9.65	95.00±12.80	-0.612	0.541
Creatinine	대조군	0.74±0.18	0.75±0.15	-0.32	0.75
	실험군	0.64±0.12	0.66±0.11	0.75	0.455
Uric_acid	대조군	4.48±1.58	4.41±1.22	-0.04	0.965
	실험군	4.79±0.90	4.56±1.00	-0.66	0.509
Cholesterol	대조군	173.30±36.02	165.49±47.38	0.43	0.668
	실험군	178.02±42.72	181.60±28.75	-0.22	0.823
Protein	대조군	7.37±0.41	7.38±0.34	0.02	0.981
	실험군	7.48±0.36	7.39±0.30	-1.17	0.242
Albumin	대조군	4.92±0.23	4.88±0.22	1.02	0.306
	실험군	4.90±0.23	4.78±0.22	-1.9	0.058
AST	대조군	18.78±5.08	20.91±9.80	-1.21	0.225
	실험군	17.56±4.60	19.52±4.95	1.84	0.066
ALT	대조군	18.43±13.85	19.96±14.42	0	1
	실험군	15.24±8.40	16.72±8.32	0.69	0.49
Total_bilirubin	대조군	0.59±0.29	0.68±0.33	-0.86	0.391
	실험군	0.56±0.64	0.41±0.14	0.1	0.923
BUN	대조군	19.39±25.92	16.78±21.21	0.86	0.392
	실험군	11.83±3.48	11.04±2.02	-0.29	0.771
Sodium	대조군	141.48±1.88	140.04±1.64	2.78	0.005**
	실험군	140.68±1.31	139.56±1.58	-2.61	0.009**
Potassium	대조군	4.25±0.35	4.15±0.28	1.12	0.264
	실험군	4.22±0.43	4.19±0.42	-0.13	0.899
Chloride	대조군	103.78±4.52	101.74±1.71	1.82	0.069
	실험군	102.52±2.42	102.00±2.43	-0.92	0.357
Ca	대조군	9.76±0.39	9.65±0.32	0.73	0.466
	실험군	9.58±0.28	9.51±0.34	-1.06	0.291
P	대조군	3.91±0.43	3.91±0.54	-0.15	0.877
	실험군	3.64±0.46	3.68±0.43	0.468	0.64
TSH	대조군	2.49±1.81	2.66±1.41	-0.97	0.334
	실험군	1.71±0.58	1.70±0.64	-0.4	0.691
Free_T4	대조군	1.20±0.15	1.27±0.15	-1.6	0.109
	실험군	1.22±0.10	1.27±0.13	1.57	0.116

^a : 시간에 따른 대조군/실험군 차이 Wilcoxon p-value

Table. 섭취 전 후 갑상선기능 검사 변화

항목	Group	Baseline	After 8 week	z	p ^a
		Mean±S.D	Mean±S.D		
TSH	대조군	2.49±1.81	2.66±1.41	-0.97	0.334
	실험군	1.71±0.58	1.70±0.64	-0.4	0.691
Free_T4	대조군	1.20±0.15	1.27±0.15	-1.6	0.109
	실험군	1.22±0.10	1.27±0.13	1.57	0.116

Table. 섭취 전 후 소변검사 변화

항목	Group	Baseline	After 8 week	z	p ^a
		Mean±S.D	Mean±S.D		
SG	대조군	1.02±0.01	1.02±0.01	0.81	0.416
	실험군	1.02±0.01	1.02±0.01	-1.04	0.298
pH	대조군	6.46±1.07	6.30±0.96	0.34	0.735
	실험군	6.54±0.84	6.56±0.94	0.34	0.733

- 시험 전후 유효성 평가 변수의 변화

배변 횟수의 변화

주당 자발적 배변횟수(SBM)는 시험군과 대조군에서 복용 전에 비해 각각 복용 4주와 8주 후에 차이가 없었다. 그러나, 주당 자발적 완전 배변 횟수(CSBM)는 대조군에서는 복용 전 후 차이가 없었으나, 시험군에서는 복용 전에 비해 복용 4주 후에 의미 있게 증가하였고(0.9 ± 0.9회 vs. 2.2 ± 1.4회, p = 0.01), 복용 8주 후에도 효과가 지속되었다(0.9 ± 0.9회 vs. 2.1 ± 1.5회, p = 0.005).

Change of the Frequency of Bowel Movement

Variables		대조군 (n=23)		시험군 (n=25)		p-values ^c
		Observation	Differences ^a	Observation	Differences ^b	
		(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	
자발적 완전 배변횟수 (n/week)	Baseline	1.0 ± 1.1		0.9 ± 0.9		
	After 4 weeks	1.4 ± 1.3	0.3 ± 1.4	2.2 ± 1.4	1.3 ± 1.1	0.01
	After 8 weeks	1.2 ± 1.3	0.1 ± 1.3	2.1 ± 1.5	1.2 ± 1.3	0.005
자발적 배변횟수 (n/week)	Baseline	2.4 ± 1.1		2.4 ± 1.0		
	After 4 weeks	3.3 ± 0.9	0.9 ± 1.2	2.9 ± 1.3	0.5 ± 1.3	0.23
	After 8 weeks	3.3 ± 0.9	0.9 ± 1.0	2.8 ± 1.4	0.4 ± 1.8	0.19

^a : 대조군에서 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량

^b : 시험군에서 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량

^c : 대조군과 시험군 간의 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량 비교

변비 관련 증상의 변화

변비 관련 증상(가스참/더부룩함, 가스배출, 복부팽만감, 잔변감, 과도한 힘주기, 딱딱한 변)을 10-visual scale analogue를 이용하여 평가하였을 때, 대조군에서는 각각 변수에 대해 복용 전과 후에 증상의 변화가 없었으나, 시험군에서는 복용 전에 비해 복용 4주 후부터 증상이 의미 있게 호전되었고, 8주복용 후에도 증상 호전 효과가 지속되었다. 특히, 복부팽만감, 잔변감, 과도한 힘주기와 딱딱한 변을 보는 증상이 크게 호전되었다($p < 0.001$).

The Change of Constipation-related Symptoms

Variables		대조군 (n=23)		시험군 (n=25)		p-values ^c
		Observation	Differences ^a	Observation	Differences ^b	
		(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	(mean ± SD)	
가스참/ 더부룩함	Baseline	5.0 ± 2.6		5.9 ± 1.9		
	After 4 weeks	4.3 ± 2.2	0.6 ± 1.8	3.8 ± 2.1	2.1 ± 2.1	0.01
	After 8 weeks	4.1 ± 2.0	0.9 ± 2.6	2.6 ± 2.3	3.3 ± 2.8	0.003
	Baseline	4.9 ± 2.1		5.2 ± 1.8		
가스배출	After 4 weeks	4.5 ± 2.2	0.4 ± 2.1	3.4 ± 1.8	1.8 ± 2.0	0.02
	After 8 weeks	3.8 ± 2.3	1.1 ± 2.1	2.1 ± 2.1	3.1 ± 2.6	0.005
복부팽만감	Baseline	5.1 ± 2.4		6.2 ± 1.6		
	After 4 weeks	4.4 ± 2.1	0.7 ± 1.7	3.1 ± 2.1	3.0 ± 2.2	0.0001
	After 8 weeks	3.8 ± 2.2	1.3 ± 2.4	2.0 ± 2.4	4.1 ± 2.7	0.0005
	Baseline	4.9 ± 2.3		6.4 ± 2.0		
잔변감	After 4 weeks	4.9 ± 2.1	0.0 ± 2.0	3.7 ± 2.0	2.7 ± 1.8	< 0.0001
	After 8 weeks	4.3 ± 2.1	0.5 ± 2.3	2.0 ± 1.9	4.4 ± 2.2	< 0.0001
과도한 힘주기	Baseline	5.2 ± 2.0		6.5 ± 2.3		
	After 4 weeks	4.6 ± 1.9	0.7 ± 1.8	3.4 ± 2.2	3.1 ± 2.6	0.004
	After 8 weeks	4.1 ± 2.3	1.1 ± 2.5	1.8 ± 2.2	4.7 ± 3.2	< 0.0001
	Baseline	4.4 ± 2.3		6.0 ± 2.3		
딱딱한 변	After 4 weeks	3.7 ± 1.8	0.7 ± 1.8	2.9 ± 2.2	3.0 ± 2.2	0.0002
	After 8 weeks	3.1 ± 2.2	1.3 ± 2.1	1.9 ± 2.4	4.0 ± 3.0	0.0006

각 측정값은 10-visual analogue scale로 표시됨.

^a : 대조군에서 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량

^b : 시험군에서 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량

^c : 대조군과 시험군 간의 복용 전과 비교하여 각각 복용 4주와 8주 후 변화량 비교

대장 통과시간 변화

대장 통과시간은 대조군에서는 복용 전과 복용 후에 우측, 좌측과 직장-구불결장의 분절별 통과시간과 전체 대장 통과시간의 변화가 없었다. 시험군에서는 복용 전과 복용 후에 우측과 직장-구불결장의 분절별 통과 시간은 차이가 없었으나, 좌측 대장의 통과시간은 의미 있게 단축되었고, 전체 대장 통과시간도 의미 있게 단축되었다.

The Change of Segmental and Total Colon Transit Time

Variables		대조군 (n=23)	시험군 (n=25)	p-values ^a	p-interaction ^b
		(mean ± SD)	(mean ± SD)		
Right CTT	Baseline	8.1 ± 10.8	9.1 ± 6.9	0.48	0.71
	After 7 weeks	8.8 ± 8.2	10.9 ± 9.5		
Left CTT	Baseline	11.4 ± 14.9	20.1 ± 14.3	0.47	0.008
	After 7 weeks	17.0 ± 15.3	13.2 ± 11.2		
Rectosigmoid TT	Baseline	8.8 ± 8.8	12.7 ± 11.2	0.32	0.38
	After 7 weeks	7.8 ± 8.8	7.1 ± 11.4		
Total CTT	Baseline	28.3 ± 24.1	41.8 ± 18.2	0.26	0.01
	After 7 weeks	33.0 ± 22.3	31.9 ± 20.2		

^a : 시험군과 대조군 비교, repeated measure ANOVA를 통해 산출

^b : 시험군과 대조군의 비교에서 측정시기와의 교호작용, repeated measure ANOVA를 통해 산출

CTT, colon transit time

환자의 변비 관련 삶의 질(PAC-QOL) 변화

복용 전과 후에 환자의 변비 관련 삶의 질 평가 결과, 대조군에서는 전반적인 평가 점수의 호전이 없었고, 각각 세부항목별(physical discomfort, psychosocial discomfort, worry and concern, satisfaction)로 분석하였을 때에도 세부항목별 평가 점수의 호전이 관찰되지 않았다. 반면, 시험군에서는 전반적인 삶의 질 평가 점수가 의미 있게 향상되었고, 각각 세부항목별 삶의 질 평가 점수도 향상되었다.

Change of Overall and Subscale Symptom Scores on the patient assessment of constipation quality of life (PAC-QOL) Questionnaire

Variables		대조군 (n=23)	시험군 (n=25)	p-values ^a	p-interaction ^b
		mean ± SD	mean ± SD		
Overall PAC-QOL score	Baseline	2.0 ± 0.5	2.4 ± 0.4	0.02	< 0.0001
	After 8 weeks	1.7 ± 0.3	0.8 ± 0.4		
PAC-QOL physical discomfort subscale score	Baseline	1.9 ± 0.6	2.4 ± 0.6	0.41	< 0.0001
	After 8 weeks	1.6 ± 0.7	0.8 ± 0.7		
PAC-QOL psychosocial discomfort subscale score	Baseline	1.2 ± 0.6	1.5 ± 0.5	0.73	< 0.0001
	After 8 weeks	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.4		
PAC-QOL worries and concerns subscale score	Baseline	1.7 ± 0.5	2.0 ± 0.5	0.06	< 0.0001
	After 8 weeks	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.3		
PAC-QOL satisfaction subscale score	Baseline	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.4	< 0.0001	< 0.0001
	After 8 weeks	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.6		

^a : 시험군과 대조군 비교, repeated measure ANOVA를 통해 산출

^b : 시험군과 대조군의 비교에서 측정시기와의 교호작용, repeated measure ANOVA를 통해 산출

환자의 변비 증상(PAC-SYM) 변화

복용 전과 후에 환자의 변비 증상 평가 결과, 대조군에서는 전반적인 평가 점수의 호전이 없었고, 각각 세부항목별(abdominal symptoms, rectal symptoms, stool symptoms)로 분석하였을 때에도 세부항목별 점수의 호전이 관찰되지 않았다. 반면, 시험군에서는 전반적인 변비 증상 평가 점수가 의미 있게 호전되었고, 각각 세부항목별 변비 증상 평가 점수도 호전되었다.

Overall and Subscale Symptom Scores on the Patient Assessment of Constipation Symptoms (PAC-SYM) Questionnaire

Variables (mean ± SD)		대조군 (n=23)	시험군 (n=25)	p-values ^a	p-interaction ^b
Overall PAC-SYM score	Baseline	1.4 ± 0.6	1.8 ± 0.5	0.997	< 0.0001
	After 8 weeks	1.1 ± 0.4	0.7 ± 0.6		
Abdominal symptoms subscore	Baseline	1.2 ± 0.7	1.6 ± 0.6	0.72	< 0.0001
	After 8 weeks	1.1 ± 0.6	0.7 ± 0.6		
Rectal symptoms subscore	Baseline	0.8 ± 0.7	1.3 ± 0.9	0.25	0.006
	After 8 weeks	0.6 ± 0.6	0.5 ± 0.5		
Stool symptoms subscore	Baseline	1.9 ± 0.7	2.3 ± 0.7	0.67	0.0001
	After 8 weeks	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.8		

③ 건강기능식품 개별인정 신청 및 접수

- 건강기능식품 개별인정 신청 12/28
- 건강기능식품 개별인정 접수 통보 1/18

접수증

접수번호: 20181125093 접수일자: 2019.01.18

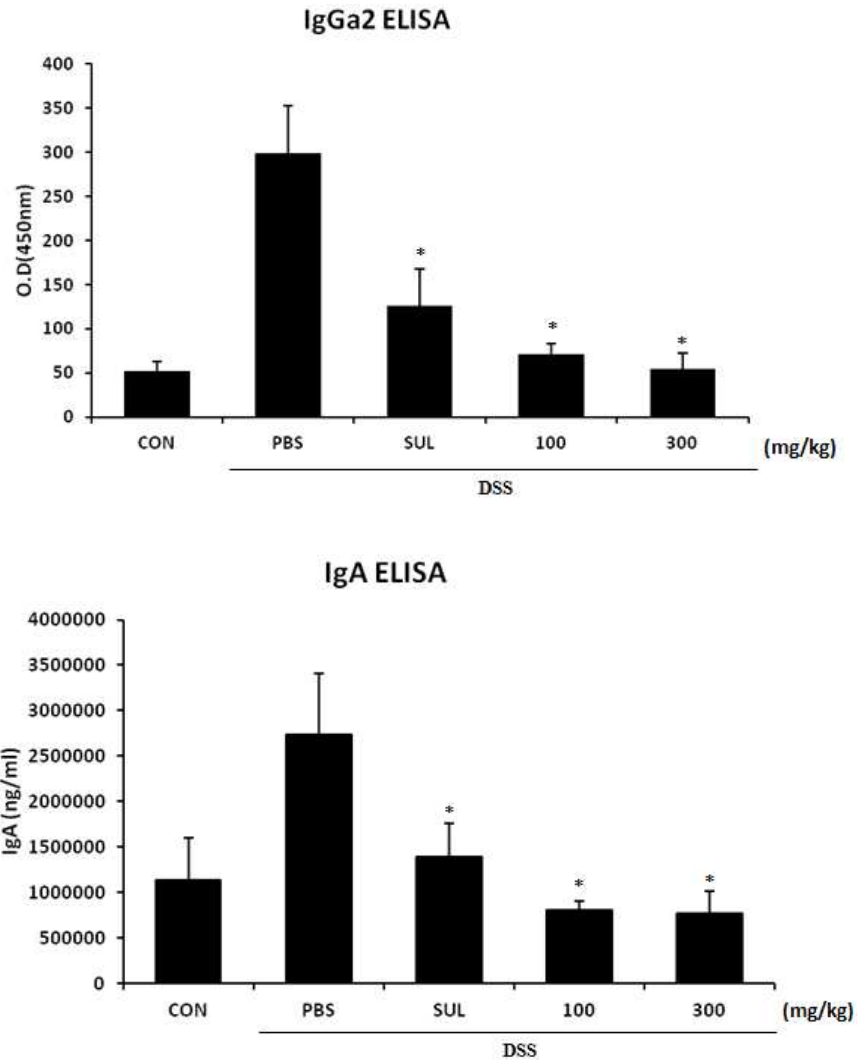
민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	5697188
민원인 (대표 또는 대리인)	박상훈(20040017054)
처리예정일	2019.07.12
처리주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀(-)
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하여야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하여야 민원서류를 수령하실 수 있습니다.
수수료	1,900,000

위 건명의 민원을 접수하였습니다.

(나) 제형 활성 연구

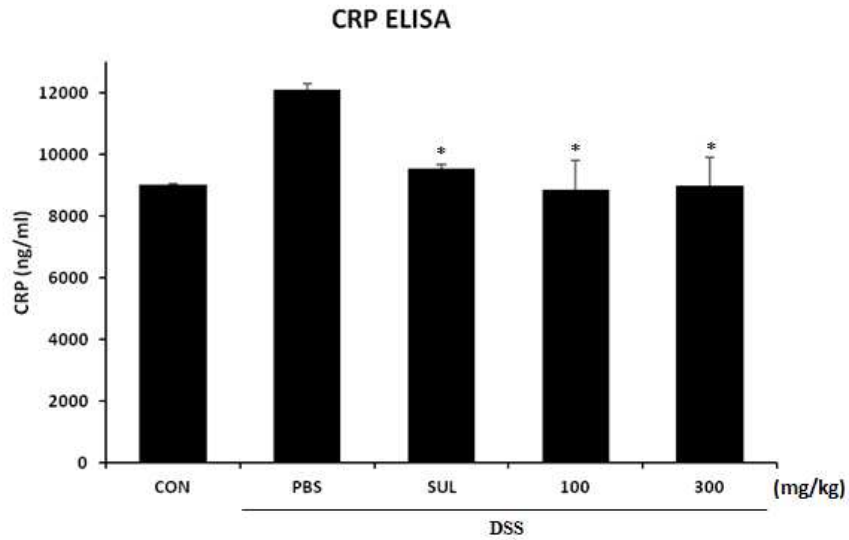
① 동물 모델을 이용한 소재의 in vivo 효능 평가

- 2차년도에 수행된 대량생산 마치현 spray dry (SD) 시료를 이용한 장질환 동물 모델 실험의 샘플의 추가 분석 실험을 수행함. 샘플은 용량별 효능 검증을 위해 마치현 SD시료를 100 mg/kg, 300 mg/kg 농도로 경구 투여한 동물 실험 샘플으로 실험함.
- DSS에 의한 대장 염증 유발 동물의 혈액 내 면역글로불린 분비능을 확인하기 위해 실험한 결과, DSS에 의해 증가한 혈중 IgG, IgA 농도가 마치현 SD 투여로 감소되는 것을 ELISA로 확인할 수 있었음.



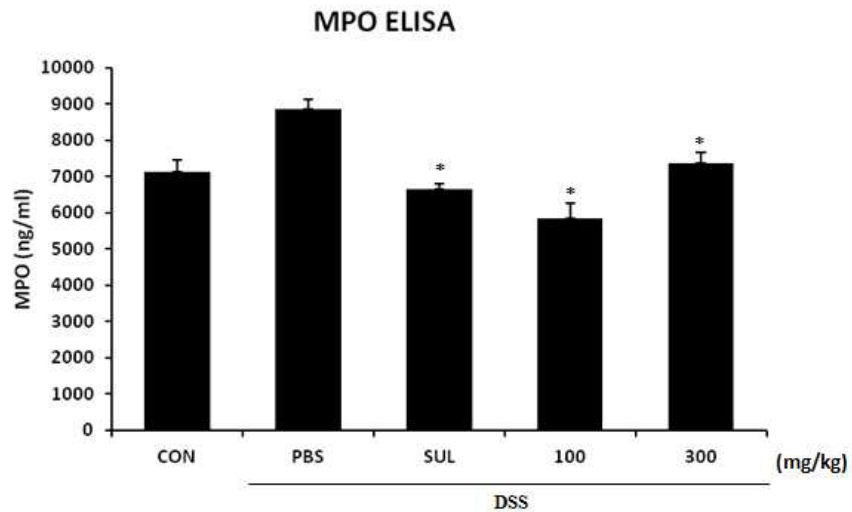
<그림. 혈중 면역글로불린 분비량 변화>

- 염증반응 여부를 확인할 수 있는 CRP 수치를 확인하기 위해 DSS에 의한 대장 염증 유발 동물의 혈액 내 CRP 활성 확인 실험을 수행한 결과, DSS에 의해 증가한 CRP 수치가 마치현 SD 투여로 감소되는 것을 ELISA로 확인함. CRP 수치감소의 결과로 장관면역의 과도한 염증 반응을 억제하는 효능이 있음을 검증함.



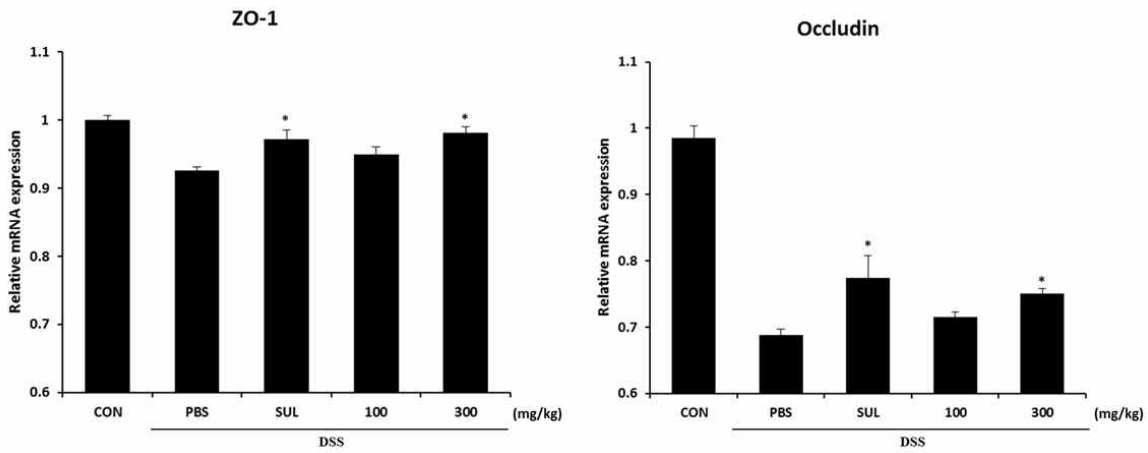
<그림. 혈중 CRP 활성 변화>

- 염증반응 시 활성화 되어 분비가 증가하는 MPO를 확인하기 위해 DSS에 의한 대장 염증 유발 동물의 혈청을 분리하여 ELISA로 확인한 결과, DSS에 의해 증가한 MPO 활성이 마치현 SD 투여로 감소하는 것을 확인함.



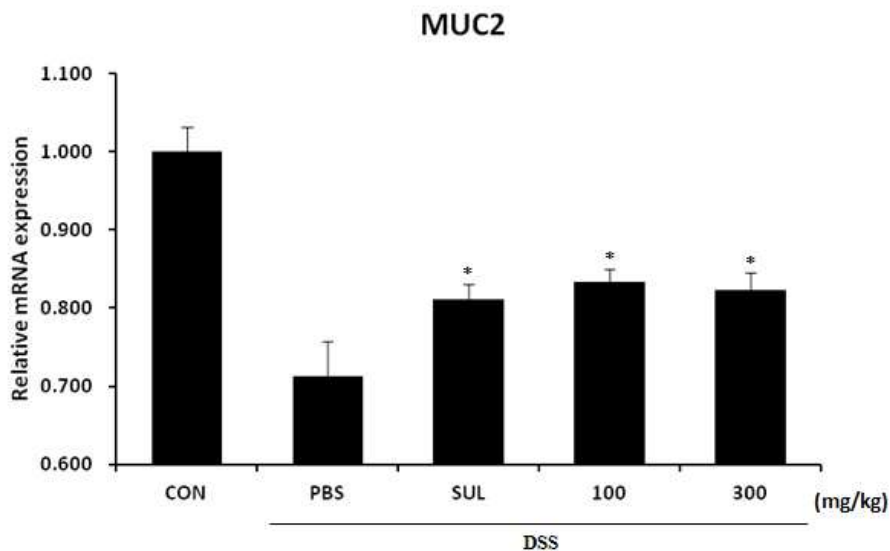
<그림. 혈중 MPO 활성 변화>

- 점막 장벽 온전성 확인을 위해 밀착연접 단백질(tight junction protein)인 ZO-1, occludin 유전자 발현이 회복됨을 장조직 내 유전자 발현 Real-time PCR을 통해 확인함. DSS에 의한 대장 염증 유발 동물의 장조직 PCR 실험 결과, DSS에 의해 감소되었던 밀착연접 단백질(tight junction protein) 유전자 발현이 마치현 SD 투여군에서 유의적으로 회복되는 결과를 통해서 점막 장벽 기능이 향상됨을 증명함.



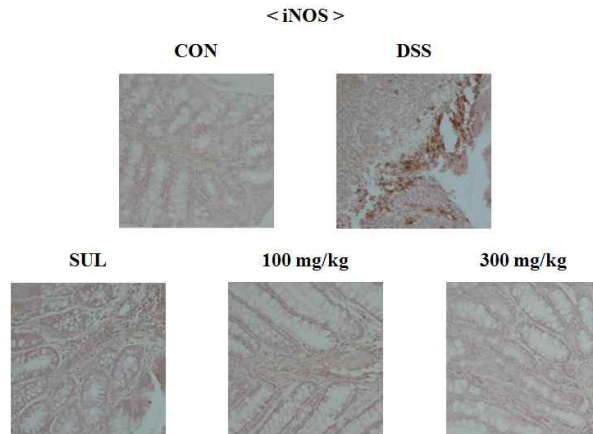
<그림. 점막 장벽 온전성 실험 결과>

- DSS에 의한 대장 염증 유발 동물의 장조직 내 뮤신 분비 유전자 발현 실험을 수행하여 확인해 본 결과, 장점막에서 분비되는 점액물질의 결장 장벽 기능을 하는 MUC2가 DSS에 의해 손상되어 감소되었다가 마치현 SD 투여 시에는 유전자 발현량이 증가한 것을 PCR로 확인함. 이는 뮤신 유전자 발현이 회복되는 결과로 마치현 SD 투여로 인해 점막 장벽 기능이 향상됨을 증명함.



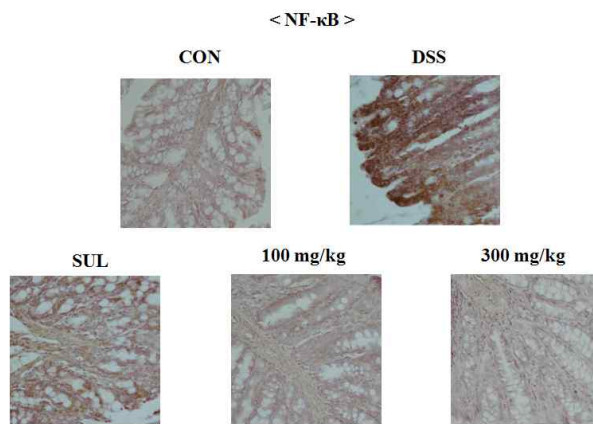
<그림. 뮤신 분비 유전자 발현 변화>

- NO를 생산하는 효소인 iNOS는 염증반응 동안에 대식세포의 세포기능을 조절하는 데 주요한 역할을 하는 것으로 TNF- α , IFN- γ 와 같은 염증성 사이토카인의 자극에 의해서 증가되어 과도한 NO 생성을 통해 만성적인 염증반응에 있어서 해로운 역할을 함. 이런 iNOS 단백질 발현정도를 마우스 장조직에서 면역염색을 통해 확인한 결과, DSS에 의해 증가한 iNOS 단백질 발현정도가 마치현 SD 투여로 감소하는 것을 확인함. iNOS의 발현 억제의 결과로 장관면역의 과도한 염증반응을 억제하는 효능이 있음을 검증함.



<그림. 장조직 내 iNOS 단백질 발현 변화>

- 염증성 사이토카인 분비 시 전사인자로 작용하는 NF- κ B는 세포에 염증을 발생하는 자극을 주게 되면 NF- κ B가 활성화 되어 핵 내의 target gene에 붙어 좋지 않은 물질들을 생성하게 됨. 따라서 장 조직 내 NF- κ B 활성을 지연시키는 것은 염증 반응을 억제함으로써 장 손상을 개선하는 데 효과가 있다고 판단함. 따라서 NF- κ B 단백질 발현정도를 마우스 장조직에서 면역염색을 통해 확인한 결과, DSS에 의해 증가한 NF- κ B 단백질 발현 정도가 마치현 SD 투여로 감소하는 것을 확인함.

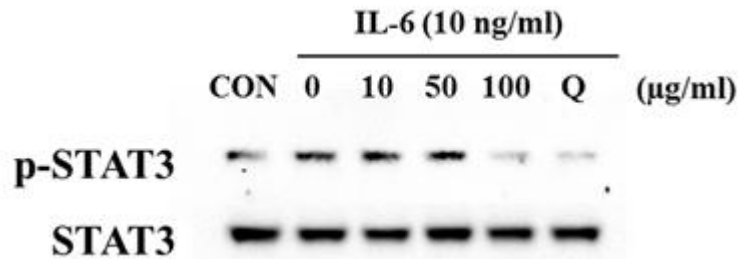


<그림. 장조직 내 NF- κ B 단백질 발현 변화>

- 결론적으로, DSS에 의한 대장 염증 유발 동물 모델을 이용하여 마치현 SD이 밀착연접 단백질(tight junction protein)인 ZO-1, occludin 유전자 발현, 장점막 관련 유전자인 뮤신 유전자를 조절하여 점막 장벽 온전성을 유지하고, 염증성 사이토카인, 면역글로블린 분비, CRP, MPO, iNOS, NF- κ B 등의 활성을 조절하여 염증반응을 억제함으로써 장기능 개선 효과를 가짐을 실험적으로 증명함.

② in vitro 및 ex vivo 시험 통한 소재의 작용 기작 연구

- IL-6 매개 염증인자들의 신호전달 저해 효과를 확인하기 위해 세포를 이용한 작용 기작 연구를 수행함. 세포내 마치현 SD 시료를 농도별(10, 50, 100 µg/ml)로 전처리하여 IL-6/STAT3 신호전달 단백질인 STAT3의 phosphorylation 저해 효과를 Western blot을 통해 확인하였음. 그 결과, 마치현 SD 처리시 농도 의존적으로 STAT3 인산화가 저해되는 것을 확인하였음.



<그림. STAT3의 인산화 저해 활성 결과>

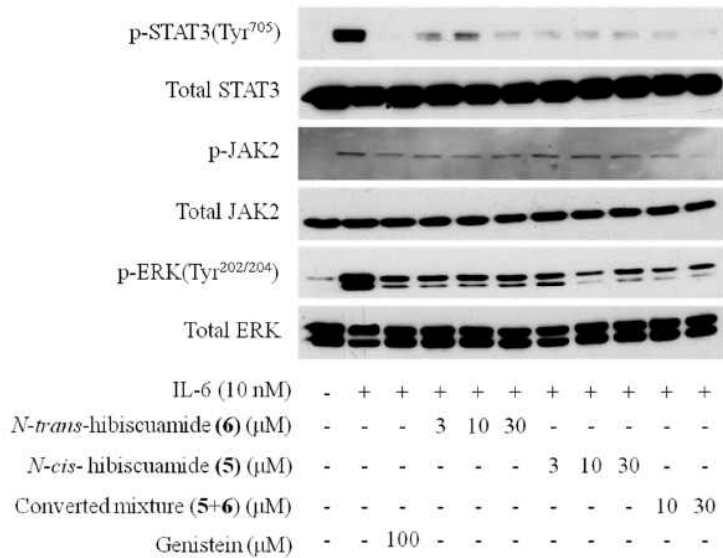
- 대량생산된 마치현 SD의 IL-6/STAT3 신호전달 저해 효과를 추가적으로 확인하기 위해 마치현에서 분리한 10종의 화합물의 IL-6/STAT3 luciferase assay를 실시하여 저해 활성을 확인하였음. IL-6/STAT3 저해 정도는 IC50(50% inhibitory concentration)를 계산하여 확인해 본 결과, 저농도에서도 IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 것을 확인하였고, 화합물 간의 조합에 따라서도 IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 것을 확인하였음.

Compounds	IC ₅₀ (µM)
<i>N-cis</i> -feruloyltyramine (1)	19.3
<i>N-trans</i> -feruloyltyramine (2)	5.6
Converted mixture (1 + 2)	15.2
<i>N-cis</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (3)	16.2
<i>N-trans</i> -feruloyl-3'-methoxytyramine (4)	6.0
Converted mixture (3 + 4)	6.5
<i>N-cis</i> -hibiscusamide (5)	6.7
<i>N-trans</i> -hibiscusamide (6)	0.2
Converted mixture (5 + 6)	5.9
(7' <i>S</i>)- <i>N-cis</i> -feruloyloctopamine (7)	19.5
(7' <i>S</i>)- <i>N-trans</i> -feruloyloctopamine (8)	2.6
Converted mixture (7 + 8)	6.7
(7' <i>S</i>)- <i>N-cis</i> -feruloylnormetanephine (9)	28.6
(7' <i>S</i>)- <i>N-trans</i> -feruloylnormetanephine (10)	13.0
Converted mixture (9 + 10)	13.7
Oleanolic acid acetate ¹	0.7

¹ Oleanolic acid acetate was used as the positive control.

<그림. IL-6/STAT3 저해 활성 결과>

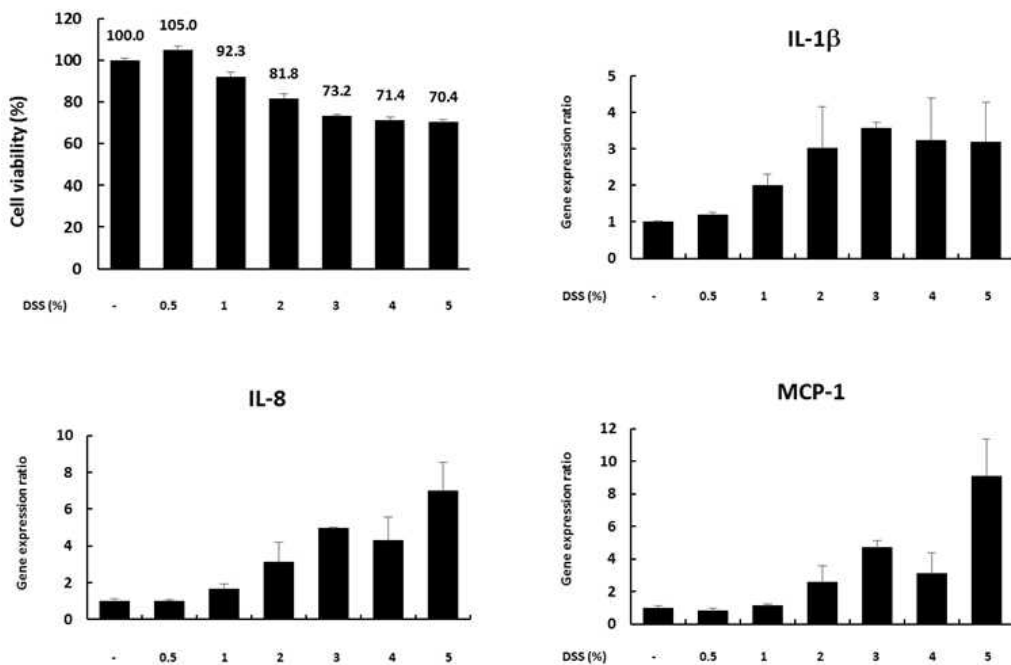
- IL-6/STAT3 저해 활성이 우수한 화합물 2종을 선정하여 면역과 염증에 중요한 역할을 하며 IL-6/STAT3 신호전달 단백질인 JAK2(Janus kinase), STAT3 및 ERK(Extracellular signal Regulated Kinases)의 phosphorylation 저해 효과를 Western blot을 통해 확인하였음. 그 결과, IL-6 자극에 의해 인산화 된 단백질을 화합물 처리 시 농도 의존적으로 활성이 억제되는 것을 확인하였음.



<그림. IL-6/STAT3 신호전달 저해 활성 결과>

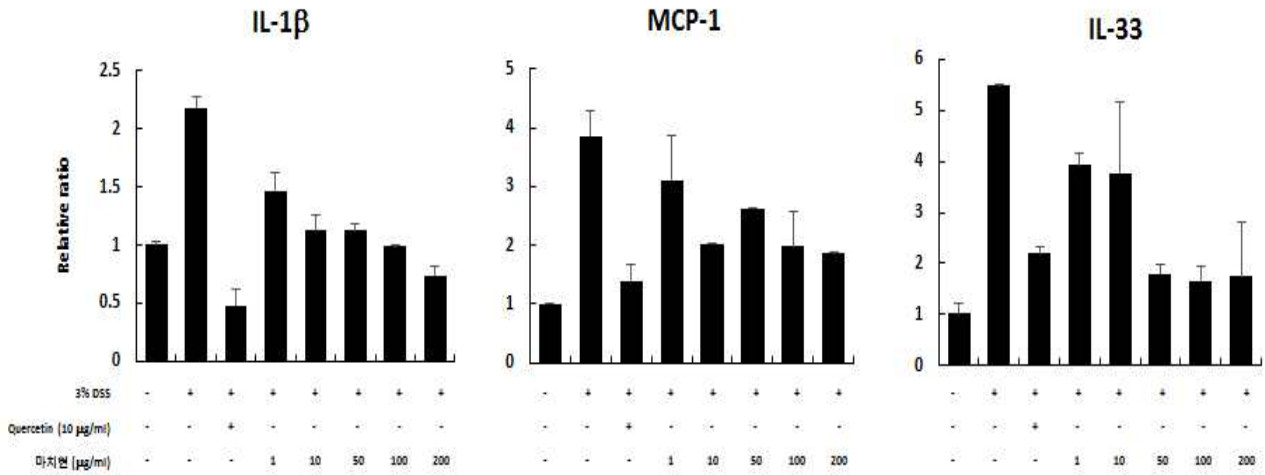
③ 장상피세포를 이용한 활성 기전연구

- Human epithelial colorectal adenocarcinoma cells인 CaCO2 cell line을 이용하여 활성 기전 연구를 수행하기 위해 동물실험에서 positive control로 이용한 DSS를 처리하여 real-time PCR의 실험 조건을 확립함.



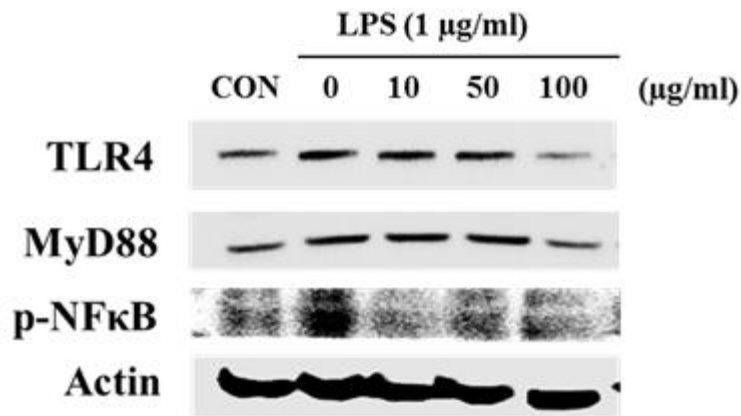
<그림. 장상피세포 내 DSS 처리 시 농도 조건 결과>

- 장상피세포에 DSS처리 시 세포 독성이 없는 농도에서 사이토카인 발현이 충분히 일어나는 DSS 3% 조건을 확립하여 마치현 SD 시료를 농도별로 전처리하여 확인한 결과, 염증성 사이토카인, 케모카인, 염증조절 사이토카인인 IL-1 β , MCP-1, IL-33의 발현이 마치현 SD 처리로 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인함.



<그림. 장상피세포 내 사이토카인 발현에서 마치현 SD 효과>

- 장상피세포내 Toll-like receptors(TLRs) 신호전달인자인 MyD88, NF- κ B의 활성을 확인하기 위해 마치현 SD 시료를 농도별로 전처리하여 LPS로 자극시킨 후 48시간 및 72시간 뒤에 Western blot을 통해 확인한 결과, 마치현 SD 처리 시 MyD88 발현량과 NF- κ B의 인산화 정도가 LPS 처리시보다 감소하는 것을 확인하여 마치현이 TLR 신호전달 저해 효과가 있음을 검증함.

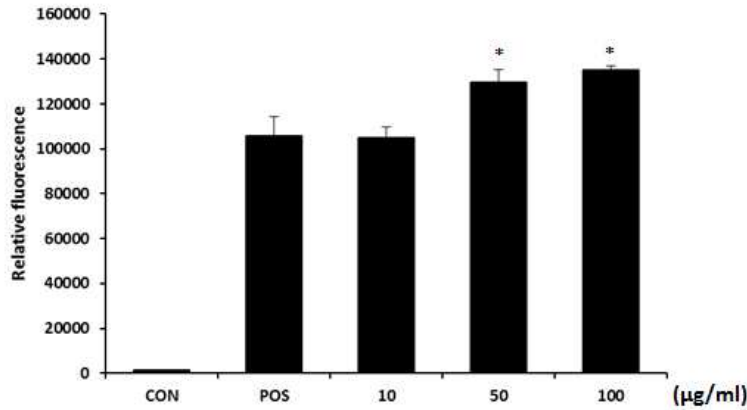


<그림. 장상피세포 내 TLR 신호전달 저해 효과>

④ 건강기능식품 기능성 평가를 위한 추가 실험

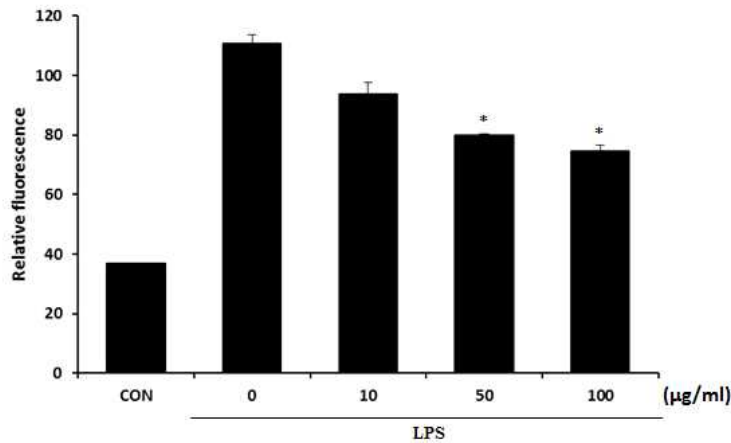
- 대량생산 원료 이용

- 마우스 대식세포 세포주인 J774A.1 세포를 이용하여 식균작용(phagocytosis)을 측정함으로써 면역기능을 평가함. 대식세포에 마치현 SD를 농도별로 처리하여 배양한 후 형광을 띄는 E. coli particle을 이용하여 식균작용 정도를 측정함. 실험 결과, 마치현 SD의 50 μ g/ml 이상의 농도에서 E. coli particle 만 처리한 POS군 보다 식균작용이 유의적으로 증가하는 것을 확인함.



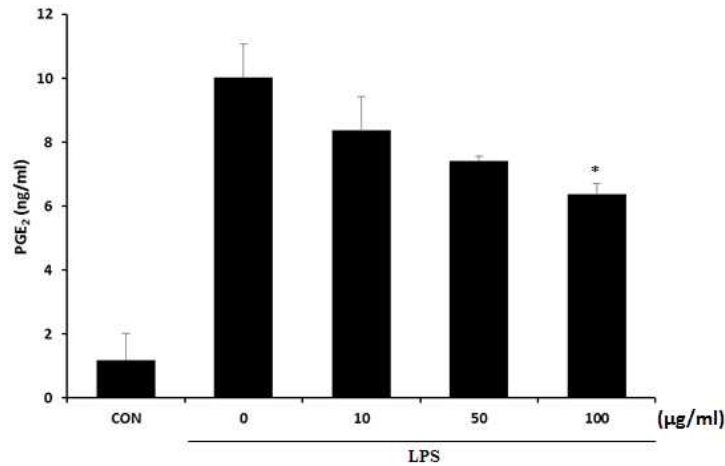
<그림. 대식세포의 식균작용 결과>

- 대식세포의 Oxidative burst 확인 실험은 세포 내 분비된 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 측정하는 것으로 식균세포가 침입한 박테리아 등을 분해 할 때 발생함. ROS 측정을 위해 마치현 SD를 농도별로 1시간 전처리한 뒤 LPS (100 ng/ml)로 자극하여 확인해 본 결과, LPS 자극에 의해 증가했었던 ROS가 마치현 SD 처리군에서 농도 의존적으로 감소시키고 50 μ g/ml 농도에서부터 유의적으로 감소시키는 것을 확인함.



<그림. 대식세포의 Oxidative burst 변화>

- 대식세포와 같은 면역 세포가 활성화되어 사이토카인이 분비되면 프로스타글란딘 합성 효소 군에 의해 프로스타글란딘 E2(PGE2)가 생성됨. PGE2는 궤양성 대장염을 포함한 장의 염증 반응에 있어 장 점막 손상을 유발하는 물질로 알려져 있음. PGE2 분비능을 확인하기 위해 마치현 SD를 농도별로 1시간 전처리한 뒤 LPS (100 ng/ml)로 자극하여 확인해 본 결과, LPS 자극에 의해 증가했었던 PGE2가 마치현 SD 처리군에서 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였으며 100 μ g/ml 농도에서는 유의적으로 감소시키는 것을 확인함.



<그림. 대식세포의 PGE2 분비 변화>

- 결론적으로, 마우스 대식세포 세포주를 이용하여 식균작용, Oxidative burst, Prostaglandin E2(PGE2) 분비능에 대한 마치현 SD의 in vitro 효과를 확인해 본 결과, 마치현 SD는 대식세포의 식균작용을 증가시키고 LPS 자극에 의해 증가한 ROS와 PGE2를 감소시켜 과도한 염증 반응을 억제하여 장관면역조절 효과가 있음을 실험적으로 증명함.

(4) 기대효과

- 현재 국내외 마치현 추출물 관련 기능성을 장 건강으로 밝힌 사례는 전무함.
- 식약처 건강기능식품 개별인정 관련하여 기술 및 제품규격, 성능을 검증 받고 있음.
- 농생명 소재로 건강기능식품 개별인정 시도는 많으나 본 연구결과의 인체적용시험과 같은 효력 수준은 전무함.
- 선진국 대비 기술수준 및 국산화율 100%임.
- 원료 자체로 판매가 가능하여 매출창출이 가능함.
- 원료로 다양한 제품에 응용 가능하여 무궁무진한 개발가능성 시사함.
- 농가생산성 향상 및 이익창출이 지속적으로 창출 가능함.
- 신사업 발생으로 일자리 창출이 지속적으로 가능함.
- 국내 농산물을 원료로 하여 수입대체 가능함.
- 탁월한 효능으로 제품 개발하여 수출 창출이 가능함.
- 장관면역에 대한 식약처 가이드라인의 실험 중 in vitro, in vivo 활성을 추가로 검증하여 인체적용시험을 통한 추가 개별인정을 받을 수 있음.
- 인체적용시험에서 들코락스와 동등성을 보이므로 전임상 보강 및 임상으로 일반의약품으로 개발 할 수 있음.
- 염증성 장질환 모델에서의 동물 실험에서 효과를 검증하여 천연물 신약으로의 개발을 모색 할 수 있음.
- 세계 건강기능식품 시장은 6,394억 달러의 규모이며 장 건강 관련 건강기능식품 시장은 이의 5%인 319.7억 달러 규모이다. 국내 건강기능식품 시장 43,000억원 규모이며 장관건강 관련 건강기능식품은 11%로 4,730억원 규모이다. 본 기술개발을 통해 국내 장관 건강 시장 점유율은 1.0%/5년, 매출액증대 50억/5년, 고용창출증대, 아사 사업기여도 10%로 예상함.
- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2년			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	10	50	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	0.2	1.0
국외		-	0.003	0.02	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	장 관련 일반의약품, 전문의약품, 다른 적응증 건강기능식품으로의 변화개발 계획 있음.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	10	50	
	수 출	-	1	5	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표

(1) 목표 달성여부

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도(%)
1차 년도 (2016)	<주관기관> 대량생산 공정연구	- 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화 · 화학적 특성 변화 분석 · 유효성분 함량 변화 분석 · 물리 화학적 안정성 조사 · 최적 원료 추출법 확립	- 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화 · 최적 원료 추출법 확립 :협동기관에서 확립된 분석법을 적용하여 재배(장흥, 청송) 및 자연산(산청, 영천) 마치현에 대한 HPLC 정성분석을 실시함. 추출된 수율과 활성 데이터를 기반으로 최적 추출조건을 확립 완료(70% 주정, 70℃, 5시간 추출)	100
		- CMC 연구 · 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성 확보 R = 0.99% 이상) · 유해성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약 등), 원료관리 (COA 규정) · GMP: 원료 GMP 생산, QC/QA 확립, 분석벨리데이션 확립 · 성분규명: 지표성분 규명, 활성 성분 규명, 원료생약 성분 규명	- CMC 연구 · 성분 프로파일 : 재배된 장흥산 마치현에 대하여 구조 동정된 feruloylamide 계열 화합물에 대한 HPLC 정성분석 완료 · 유해성분 : 마치현 원물의 중금속 및 잔류 농약 검사 완료 · GMP : 전라남도 식품산업센터 원료 GMP 생산 기관 확보 및 GMP 생산 기관에서의 대량생산을 위한 파일럿 연구 완료 예정(12월). · 성분규명 : 지표 및 활성 성분으로 6종의 feruloyl amide 계열 화합물, phenolic 화합물 및 flavonid 화합물을 규명 완료	100
	<협동기관> 소재 표준화	- 동등생산 · 재배지, 생산자 정보: 위도, 경도 등을 표기한 위치 및 면적 등의 정보자료, 생산자이력정보 확립 · 생태환경: 재배기간의 기상자료, passport 자료 · 재배이력: GAP 표준지침 확립	- 동등생산 · 계약재배 위탁 업체인 (유) 매화 통한 계약재배 생산 완료 · 우수약용작물재배 관리지침에 준하는 재배 및 영농일지를 통한 생태환경 및 재배 이력 확립 완료	100
		- 수급 · 채집:종자, 채집, 유지, 증식 등에 대한 자료 · 재배:GAP 인증, 종자 관리재배 등	- 수급 · 계약재배 위탁 업체인 (유)매화의 종 채집, 유지, 증식 보관 자료 확립 완료	100

		- 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석	- 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석 · 에탄올 추출물로부터 6종의 feruloyl amid를 분리정제하고 기 분석을 통하여 구조를 동정 완료 · QA/QC 분석을 위한 지표성분으로 함량이 높은 2종을 선정 완료	100
		- 계약재배 된 소재의 활성평가 (<i>in vitro, in vivo</i>)	- 계약재배 된 소재의 활성평가 (<i>in vitro, in vivo</i>) · 계약재배 된 마치현을 에탄올 %별로 추출하여 IL-6 저해 활성(<i>in vitro</i>)을 확인하여 70% 에탄올 추출물을 선정함. 선정된 70% 에탄올 추출물은 농도별로 염증성 대장염 마우스 질환 모델(<i>in vivo</i>)을 이용하여 효능을 검증완료 · 마치현 추출물에서 분리된 화합물 중 신규 화합물 2종의 활성 평가를 위해 IL-6 저해 활성(<i>in vitro</i>), 염증성 대장염 마우스 질환 모델(<i>in vivo</i>)을 이용하여 효능을 검증 완료	100
2차 년도 (2017)	<주관기관> 전임상 시험	- 단회투여 독성시험	· 단회투여 독성시험(랫드) : 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 랫드에 단회 독성 시험 완료. · 단회투여 독성시험(비글견) : 본 시험의 조건 하에서 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 비글견에 단회 독성 시험 완료	100
		- 13주 반복투여 독성시험	· 13주 반복투여 독성시험: 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 랫드에 13주 반복투여 독성시험 완료	100
		- 유전독성시험	· 유전독성시험: 마치현 70% 에탄올 건조엑스의 소핵시험 완료	100
	<주관기관> 대량생산 원료이용 제제연구	- 원료 균질화 확립 (원료 제형 연구)	· 원료 균질화 확립: 마치현 70% 에탄올 건조엑스 원료의 균질화 확립 완료	100
		- 안정성 시험 (가속/가혹, 장기시험)	· 안정성 시험: 공인인증기관에서 3batch 원료 시험성적서 확보로 안정성 시험 완료	100
		- 대량생산 원료 이용 제제연구 · 제형개발 연구	· 대량생산 원료 이용 제제연구: 대량생산 원료의 제형 연구 및 원료 이용 제제 연구 완료	100

	<협동기관> 소재 표준화	- 소재 기원확립 · 중분석, 식물학적 감정, 구성성분 프로파일(화학적, DNA 마커) 확립	· 소재 기원확립: - 마치현 소재의 학명 정보, 식물표본자료 등을 통해 소재 기원 확립 완료 - 계약재배 된 마치현의 소재 기원 확립을 위해 RAPD (random amplified polymorphism DNA), TLC (thin later chromatography) 기법을 이용하여 분자계통학적 분석, DNA 분석 등의 실험을 완료	100
	<협동기관> 대량생산 원료이용 제제연구	-대량생산 원료이용 제제연구 · 대량생산 원료의 장 질환 동물 모델을 통한 장 건강 in vivo 효능 평가 · 대량생산 원료의 장 질환 동물 모델 용량별 활성 비교	- 대량생산한 분말 제형의 마치현 원료의 효능 평가를 위해 장질환 동물모델 활성 평가 완료 - 건강기능성 식품 원료 개발을 위해 배변활동 및 소화관 운동능 마우스 실험을 통해 활성 평가 완료	100
3차 년도 (2018)	<주관기관> 인체효능평가	- 인체표능평가 프로토콜 및 시험계획수립	· 인체적용시험 계획서 완료 · IRB 승인 완료(천안 단국대병원)	100
		- 인체 효능평가를 통한 후보 소재의 기능성 검증	· 인체적용시험 완료 · 건강기능식품 개별인정 신청 및 접수 완료	100
	<협동기관>	- 동물 모델을 이용한 소재의 in vivo 효능 평가	- DSS에 의한 장질환 동물 모델을 이용하여 마치현 SD에 의한 혈중 면역글로불린 분비, CRP, MPO의 저해 활성 평가 완료 - 동물 모델의 장조직 내 밀착연접 단백질(tight junction protein)인 ZO-1, occludin 유전자 발현, 장점막 관련 유전자인 뮤신 유전자 발현과 iNOS, NF-κB의 활성 평가 완료	100
	<협동기관> 제형 활성 연구	- in vitro 및 ex vivo 시험 통한 소재의 작용 기작 연구	- 마치현 SD에 의한 STAT3 인산화 저해 활성을 확인하였고, 마치현에서 분리한 화합물들의 저해활성은 IL-6 매개 염증인자인 JAK2, STAT3, ERK 발현정도를 Western blot을 통해 평가 완료	100
		-장상피세포를 이용한 활성 기전연구	- 장상피세포에서 마치현 SD의 사이토카인 분비 억제 효과, TLR 신호전달 억제 효과 평가 완료 - 건강기능식품 개별인증을 위한 대식세포 식균작용, 항산화효과, PGE2 분비 억제효과의 추가 효능평가 완료	100

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 변비 관련 일반의약품 개발 : 본 과제에서 인체적용시험의 대조약인 들코락스와 비교하여 등등성을 확보하였으므로 전임상 및 임상시험 등을 보강하여 일반의약품으로의 개발이 가능함.
- 염증성 장질환 전문의약품 : 본 과제를 통해 작용기전 및 이의 활성화기전을 밝혔고 이를 이용하여 전임상 및 임상시험 등을 보강하여 염증성 장질환 신약개발이 가능함.
- 타 적응증 건강기능식품 : 본 과제의 연구기간 및 연구비의 한계 또한 국내 소화기 내과 전문의들과의 상담을통해 배변 활동개선에 대한 활성을 보았으나 추가 연구를 통해 장관 면역의 기능성 개별인정이 가능함.
- 본 과제를 통해 변비관련 일반의약품, 염증성 장질환 신약, 장관 면역 개별인증으로의 개발의 농산물 소재로써 마치현의 충분한 가능성을 증명했으며 인체적용 시험 수준까지의 효력 가능성을 보였으므로 추가 연구의 필요성이 있고, 타 연구에의 충분히 응용가능하며, 국책사업, 기술 이전 등으로 파트너 기업의 매칭과 자체 사업화등으로 보다 확실하고 효율성 있는 개발이 가능함.

붙임. 참고문헌

- (1) 신선, 박성선, 이환명 and 허정무. 치커리 화이버 발효물의 장 기능 및 변비개선 효과. 한국식품영양과학회지. 43: 54-59. 2014
- (2) 오현경 and 임현숙. 생다시마 가공제품의 배변활동 개선 효과. 한국식품영양과학회지. 36: 720-726. 2007
- (3) 박주현, 최상윤, 이경원, 김성수, 조경동 and 한찬규. 홍국고구마가 고지방식이를 급여한 흰쥐의 배변량 및 지질대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 41: 487-493. 2012
- (4) 전우규. 장건강 및 면역질환의 보완통합의학적 접근. Hanyang medical reviews. 30. 2010
- (5) Im JH, Choi JK, Lee MH, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Kim GB, Effect of Functional Yoghurt (R&B Rhythm) on the Improvement of Constipation in Animal Models, Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 31(3), 442~450, 2011
- (6) Andrew CN, Storr M. The pathophysiology of chronic constipation, Can J Gastroenterol 25(B):16B.21B, 2011
- (7) Beong Ou Lim, Yong Jun Jeong, Mi Hyoun Park, Jong Dai Kim, Sung Joo Hwang and Byung Pal Yu. Immunoregulatory Effects of Saengshik on DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in Mouse Model System. J Korean Soc Food Sci Nutr. 36(1): 32~42. 2007
- 8) Bouhnik Y, Flourie B, D'Agay-Abensour L, Pochart P, Gramet G, Durand M, Rambaud J C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. J Nutr. 127(3):444-8. 1997
- (9) Choudari CP, O'Mahony S, Brydon G, Mwantembe O, Ferguson A. Gut lavage fluid protein concentrations: objective measures of disease activity in inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterology. 104. 1064-1071. 1993

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발		
	(영문) Development of new function food using <i>Portulaca oleracea</i> L.		
주관연구기관	고려제약(주)		주 관 연 구 (소속) 고려제약(주)
참 여 기 업	고려제약(주)		책 임 자 (성명) 최 정호
총연구개발비 (767,000천원)	계	767,000천원	총 연 구 기 간 2016. 07. 07 - 2018. 12. 31 (30개월)
	정부출연 연구개발비	570,000천원	총 참 여 연 구 원 수
	기업부담금	197,000천원	
	연구기관부담금	-	
			총 인 원 16명 내부인원 9명 외부인원 6명(협동)

○ 연구개발 목표 및 성과
천연물 소재인 마치현(*Portulaca oleracea* L.)을 이용한 염증성 장질환의 장 기능 개선효과 및 장 기능 향상 효과를 갖는 건강기능성 식품을 위한 신규 기능성 식품 원료 개발이 목표임.

○ 정량적 성과
- 소재의 표준화 및 규격화:
· 3종 이상의 유효 화합물이 포함된 profile 확보,
원료의 지표물질 2종이상 선정
- IL-6 신호 저해 효과 평가 : static 화합물대비 90%이상
- 특허 출원 및 등록 각 1건씩 진행
- 기술이전 1건 실시
- 논문 2건 게재
- 개별인정형 기능성 식품 원료 신청 1건

○ 정성적 성과
- 사업화 예정 1건, - 교육 1건, - 정책건의 1건, - 타연구에 활용 1건, - 인력양성 8건
- 학술대회 발표 4건, - 홍보실적 2건, 홍보계획 1건, - 수상실적 1건, - 연구성과결과 활용 1건
- 고용창출 3건

○ 연구내용 및 결과

① 소재 표준화
- 계약재배를 통한 소재의 동등생산
· 재배지, 생산자 정보, 생태환경, 재배이력 확립
- 소재의 수급
· 채집: 종자, 채집, 유지, 증식 등에 대한 자료
- 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석, 신규 화합물 분리
- 계약재배 된 소재의 활성평가 (*in vitro in vivo*)

② 대량 생산 공정 연구
- 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화
- CMC (Chemistry, Manufacturing, Control) 연구
· 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성확보 R = 0.99% 이상)
· 유해성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약등), 원료관리 (COA 규정)
· GMP: 원료 GMP 생산, QC/QA 확립, 분석 벨리데이션 확립
· 성분규명: 지표성분 규명, 활성성분 규명, 원료 생약 성분 규명

③ 소재 표준화

- 소재의 기원확립
- 종분석, 식물학적 감정, 구성성분 프로파일(화학적, DNA 마커) 확립

④ 전임상 시험

- 단회투여 독성시험
- 13주 반복투여 독성시험
- 유전독성시험

⑤ 대량생산 원료이용 제제연구

- 원료 균질화 확립 (원료 제형 연구)
- 안정성 시험 : 가속/가혹, 장기시험 평가
- 제형개발 연구 (경구, 연질, 경질 등)
- 대량생산원료 활성연구
- 도출된 원료의 유효성 검증 및 질병 동물 모델을 이용한 효능 평가

⑥ 인체효능평가

- 인체효능평가 프로토콜 및 시험계획수립
- 인체 효능평가를 통한 후보 소재의 기능성 검증

⑦ 제형 활성 연구

- 동물 모델 이용한 소재의 in vivo 효능 평가
- In vitro 및 ex vivo 시험 통한 소재의 작용 기작 연구
- 장상피세포를 이용한 활성 기전연구

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 본 과제로 개발된 개별인정 원료 자체 판매로 수익창출 가능
- 원료로써 다양한 건강기능식품에 응용하여 제품개발 가능하여 매출상승 및 수입대체효과 기대
- 제품 개발 판매에 의한 원생약 농가의 생산량 및 수입 창출
- 고용창출효과
- 장관관 일반의약품, 전문의약품, 건강기능식품으로의 변화개발 가능

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	116038-03		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	LB1801, LC1110, LC0106 PA0201, PA0204, PA0103		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	-		총괄책임자	-	
과제명	마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발		과제유형	개발	
연구기관	고려제약(주)/한국생명공학연구원		연구책임자	최정호	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 07. 07 - 2016. 12. 31	170,000	57,000	227,000
	2차연도	2017. 01. 01 - 2017. 12. 31	200,000	70,000	270,000
	3차연도	2018. 01. 01 - 2018. 12. 31	200,000	70,000	270,000
	계	2016. 07. 07 - 2018. 12. 31	570,000	197,000	767,000
참여기업	고려제약(주)				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 02. 28.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
고려제약(주)	부소장	최정호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	최정호
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구결과는 지식재산권 확보를 통해 독창성을 가지며 기술을 검증하고 건강 기능성 식품 개발의 개별인정 인허가에 필수적인 효능 평가의 기초자료로 활용할 것임.
- 천연물 소재인 마치현(*Portulaca oleracea L.*)을 활용한 차별화된 건강기능성 식품 개발은 유일함.
- 농산물 소재의 고부가가치화 실현함.
- 농가소득을 증대에 기여함.
- 마치현의 다른 개발가능성(변비 일반의약품, 장관면역 건강기능식품, 염증성 장질환 전문 의약품)을 검증함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 원료 자체로 판매가 가능하여 매출창출이 가능함.
- 원료로 다양한 제품에 응용가능하여 무궁무진한 개발가능성 시사함.
- 농가생산성 향상 및 이익창출이 지속적으로 창출 가능함.
- 신사업 발생으로 일자리 창출이 지속적으로 가능함.
- 국내 농산물을 원료로 하여 수입대체 가능함.
- 탁월한 효능으로 제품 개발하여 수출 창출이 가능함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 장관면역에 대한 식약처 가이드라인의 실험 중 in viro, in vivo 활성을 추가로 검증하여 인체적용시험을 통한 추가 개별인정을 받을 수 있음.
- 인체적용시험에서 들코락스와 동등성을 보이므로 전임상 보강 및 임상으로 일반의약품으로 개발 할 수 있음.
- 염증성 장질환 모델에서의 동물 실험에서 효과를 검증하여 천연물 신약으로의 개발을 모색 할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 원 과제 계획서에 명시된 정량적 목표 이외에 다음과 같은 정성적 성과를 창출하였음.
- 사업화 예정 1건, - 교육 1건, - 정책건의 1건, - 타연구에 활용 1건, - 인력양성 8건
학술대회 발표 4건, - 홍보실적 2건, 홍보계획 1건, - 수상실적 1건, - 연구성과결과 활용 1건
고용창출 3건의 추가 정성적 목표를 달성하였음.
- 타 활용 개발가능성을 시사했음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 원 과제 계획서상 논문 2편, 지적소유권인 특허의 출원 등록 각 1건 이외에도 학술대회 발표 4건의 추가실적 및 인체적용시험 결과의 논문, 원료에 대한 효능관련 논문 (19년 3월 예정) 등 추가 연구개발성과를 진행하고 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
소재 표준화 및 대량 생산 공정 연구	20	100	당초 계획 달성 완료
전임상 시험 및 제제연구	30	100	당초 계획 달성 완료
인체효능평가 및 제형 활성화연구	50	100	당초 계획 달성 완료
합계	100점	100	당초 계획 달성 완료

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 과제 계획서의 정량적 목표를 모두 달성하였으며 정성적 목표를 추가적으로 수행하였음. 인체적용시험으로 확인되는 변비관련 일반의약품, 식약처 가이드라인의 장관면역 관련 in vitro, in vivo 효능평가로 새로운 기능성 개별인증의 가능성 및 염증성 장질환에 대한 천연물 신약으로의 개발 가능성을 시사하여 역대 농림부 과제 중 우수한 과제 수행으로 마무리 하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 과제 RFP상 회계연도로 한정하여 1 차년도 과제를 진행하여야 하였으므로 1차년도에 정부 지원금의 입금으로부터 4개월에 결과를 내어야 했으므로 애로사항이 있었음.
 - 연구 기간과 연구비의 한계로 인해 연구책임자의 역량으로 현재 통용되지 않는 전임상 및 인체적용시험 비용으로 과제를 진행하였음.
 - 소화기 내과 전문의들과의 컨설팅에 의해 배변습관 개선에 대한 개별인증을 선택 연구기간과 연구비의 한계를 극복하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 장관면역에 대한 식약처 가이드라인의 실험 중 in viro, in vivo 활성을 추가로 검증하여 인체적용시험을 통한 추가 개별인증을 받을 수 있음.
 - 인체적용시험에서 들코락스와 동등성을 보이므로 전임상 보강 및 임상으로 일반의약품으로 개발 할 수 있음.
 - 염증성 장질환 모델에서의 동물 실험에서 효과를 검증하여 천연물 신약으로의 개발을 모색할 수 있음. 현재 농림소재개발사업에 이어달리기 과제 또는 농림부 신규 과제로 사업 진행을 하였으면 함.

IV. 보안성 검토

특이사항 없음

1. 연구책임자의 의견

과제계획서 상의 모든 목표를 성실히 수행하였으며 농산물 소재로서의 마치현에 대한 많은 활용성을 검증하였고, 다른 농산물 소재의 연구개발 가능성 및 최소 비용과 최단 기간으로의 연구 프로세스를 확보하여 과제를 수행한 것에 의의가 있음

2. 연구기관 자체의 검토결과

모든 부분에서 초과 달성하여 매우 우수하게 수행된 과제임

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	LB1801, LC1110, LC0106 PA0201, PA0204, PA0103
연구과제명	마치현 추출물을 이용한 신규 기능성 식품 원료 개발		
주관연구기관	고려제약(주)	주관연구책임자	최 정 호
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금
	570,000	197,000	-
연구개발기간	2016. 07. 07 - 2018. 12. 31		
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(타과제활용) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 소재 표준화 - 계약재배를 통한 소재의 동등생산 · 재배지, 생산자 정보, 생태환경, 재배이력 확립 - 소재의 수급 · 채집: 종자, 채집, 유지, 증식 등에 대한 자료 - 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석, 신규 화합물 분리 - 계약재배 된 소재의 활성평가 (<i>in vitro in vivo</i>)	- 동등생산 · 계약재배 위탁 업체인 (유) 매화 통한 계약재배 생산 완료 · 우수약용작물재배 관리지침에 준하는 재배 및 영농일지를 통한 생태환경 및 재배 이력 확립 완료 - 수급 · 계약재배 위탁 업체인 (유)매화의 종자 채집, 유지, 증식 보관 자료 확립 완료 - 소재 활성 성분 구명 및 지표성분 분석 · 에탄올 추출물로부터 6종의 feruloyl amid를 분리정제 하고 기기분석을 통하여 구조를 동정 완료 · QA/QC 분석을 위한 지표성분으로 함량이 높은 2종을 선정 완료 - 계약재배 된 소재의 활성평가 (<i>in vitro in vivo</i>) · 계약재배 된 마치현을 에탄올 %별로 추출하여 IL-6 저해 활성(<i>in vitro</i>)을 확인하여 70% 에탄올 추출물을 선정함. 선정된 70% 에탄올 추출물은 농도별로 염증성 대장염 마우스 질환 모델(<i>in vivo</i>)을 이용하여 효능을 검증완료 · 마치현 추출물에서 분리된 화합물 중 신규 화합물 2종의 활성 평가를 위해 IL-6 저해 활성(<i>in vitro</i>), 염증성 대장염 마우스 질환 모델(<i>in vivo</i>)을 이용하여 효능을 검증 완료

<p>② 대량 생산 공정 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화 - CMC (Chemistry, Manufacturing, Control) 연구 · 성분 프로파일: 지문분석법 확립(HPLC, TLC 분석, 동등성 확보 R = 0.99% 이상) · 유효성분: 원료생약 관리 (중금속, 잔류농약등), 원료관리 (COA 규정) · GMP: 원료 GMP 생산, QC/QA 확립, 분석 벨리데이션 확립 · 성분규명: 지표성분 규명, 활성성분 규명, 원료 생약 성분 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 파일럿 연구 및 대량생산 공정 기준 및 시험법 최적화 · 최적 원료 추출법 확립 :협동기관에서 확립된 분석법을 적용하여 재배(장홍, 청송) 및 자연산(산청, 영천) 마치현에 대한 HPLC 정성분석을 실시함. 추출된 수율과 활성 데이터를 기반으로 최적 추출조건을 확립 완료(70% 주정, 70℃, 5시간 추출) - CMC 연구 · 성분 프로파일 : 재배된 장홍산 마치현에 대하여 구조 동정된 feruloylamide 계열 화합물에 대한 HPLC 정성분석 완료 · 유효성분 : 마치현 원물의 중금속 및 잔류 농약 검사 완료 · GMP : 전라남도 식품산업센터 원료 GMP 생산 기관 확보 및 GMP 생산 기관에서의 대량생산을 위한 파일럿 연구 완료 예정(12월). · 성분규명 : 지표 및 활성 성분으로 6종의 feruloylamide 계열 화합물, phenolic 화합물 및 flavonoid 화합물을 규명 완료
<p>③ 소재 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소재의 기원확립 · 중분석, 식물학적 감정, 구성성분 프로파일(화학적, DNA 마커) 확립 	<ul style="list-style-type: none"> · 소재 기원확립: - 마치현 소재의 학명 정보, 식물표본자료 등을 통해 소재 기원 확립 완료 - 계약재배 된 마치현의 소재 기원 확립을 위해 RAPD (random amplified polymorphism DNA), TLC (thin later chromatography) 기법을 이용하여 분자계통학적 분석, DNA 분석 등의 실험을 완료
<p>④ 전임상 시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여 독성시험 - 13주 반복투여 독성시험 - 유전독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> · 단회투여 독성시험(랫드) : 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 랫드에 단회 독성 시험 완료. · 단회투여 독성시험(비글견) : 본 시험의 조건 하에서 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 비글견에 단회 독성 시험 완료 · 13주 반복투여 독성시험: 마치현 70% 에탄올 건조엑스를 랫드에 13주 반복투여 독성시험 완료 · 유전독성시험: 마치현 70% 에탄올 건조엑스의 소핵시험 완료
<p>⑤ 대량생산 원료이용 제제연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료 균질화 확립 (원료 제형 연구) - 안정성 시험 : 가속/가혹, 장기시험 평가 - 제형개발 연구 (경구, 연질, 경질 등) - 대량생산원료 활성연구 · 도출된 원료의 유효성 검증 및 질병 동물 모델을 이용한 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> · 원료 균질화 확립: 마치현 70% 에탄올 건조엑스 원료의 균질화 확립 완료 · 안정성 시험: 공인인증기관에서 3batch 원료 시험성적서 확보로 안정성 시험 완료 · 대량생산 원료 이용 제제연구: 대량생산 원료의 제형 연구 및 원료 이용 제제 연구 완료 - 대량생산한 분말 제형의 마치현 원료의 효능 평가를 위해 장질환 동물모델 활성 평가 완료 - 건강기능성 식품 원료 개발을 위해 배변활동 및 소화관 운동능 마우스 실험을 통해 활성 평가 완료

<p>⑥ 인체효능평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 인체효능평가 프로토콜 및 시험계획수립 - 인체 효능평가를 통한 후보 소재의 기능성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> · 인체적용시험 계획서 완료 · IRB 승인 완료(천안 단국대병원) · 인체적용시험 완료 · 건강기능식품 개별인정 신청 및 접수 완료
<p>⑦ 제형 활성 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동물 모델 이용한 소재의 in vivo 효능 평가 - In vitro 및 ex vivo 시험 통한 소재의 작용 기작 연구 - 장상피세포를 이용한 활성 기전연구 	<ul style="list-style-type: none"> - DSS에 의한 장질환 동물 모델을 이용하여 마치현 SD에 의한 혈중 면역글로블린 분비, CRP, MPO의 저해 활성 평가 완료 - 동물 모델의 장조직 내 밀착연접 단백질(tight junction protein)인 ZO-1, occludin 유전자 발현, 장점막 관련 유전자인 뮤신 유전자 발현과 iNOS, NF-κB의 활성 평가 완료 - 마치현 SD에 의한 STAT3 인산화 저해 활성을 확인하였고, 마치현에서 분리한 화합물들의 저해활성은 IL-6 매개 염증인자인 JAK2, STAT3, ERK 발현정도를 Western blot을 통해 평가 완료 - 장상피세포에서 마치현 SD의 사이토카인 분비 억제 효과, TLR 신호전달 억제 효과 평가 완료 - 건강기능식품 개별인증을 위한 대식세포 식균작용, 항산화효과, PGE2 분비 억제효과의 추가 효능평가 완료

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	1	1		1						1	2									
연구기간내 달성실적	1	1		1						1	2									
달성율(%)	100	100		100						100	100									

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	배변습관 개선 in vitro, in vivo, 인체적용시험 평가 기술
②	장관면역 개선 in vitro, in vivo 평가 기술
③	염증성 장질환 in vitro, in vivo 평가 기술
④	지표화합물 및 유용화합물 분리정제 및 구조동정 기술
⑤	지표화합물을 활용한 표준 분석법 개발 기술
⑥	건강기능식품 개별인정 인허가 프로세스
⑦	in vitro, in vivo 및 인체적용시험 성공 판단 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술					V		V	V	V	
②의 기술					V		V	V	V	
③의 기술					V		V	V	V	
④의 기술					V	V		V		
⑤의 기술					V		V	V		
⑥의 기술					V	V	V	V		
⑦의 기술					V		V	V		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	다른 소재들의 배변습관 건강기능 개별인정 진행 가능
②의 기술	마치현 등 소재들의 장관면역 건강기능식품 개별인정 진행 가능
③의 기술	마치현 등 소재들의 염증성 장질환 의약품 개발 가능
④의 기술	새로운 화합물의 규명 가능
⑤의 기술	식약처 인허가 및 천연물 제제의 재평가에 이용가능
⑥의 기술	많은 소재들의 효율적인 개별인정 가능
⑦의 기술	다방면으로 개발가능성 타진 가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균 IF			학술발표	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표	1	1		1							1	2								
연구기간내 달성실적	1	1		1		30		3		1	2		4	1	8		2	2		
연구종료 후 성과창출 계획						1		1			1	1				1	1	1		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

- 현재 핵심 기술에 대한 기술이전 조건은 미 설정하였으며 국가 과제나 자체 개발로 주관기관에서 진행하려고 계획하고 있음. 다만 파트너 업체가 선정되면 협의 하에 기술이전조건을 결정하겠음.

<뒷면지>

주 의

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