

발간등록번호

11-1543000-000839-01

**천연소재(쥐오줌풀, 미강, 레몬밤)를 이용한 항스트레스
건강기능식품 제품화**

Development of anti-stress health functional food from natural
materials(Valerian, Rice bran, Lemon balm)

주관기관 : (주)네추럴에프앤피

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “천연소재(귀오즙폴, 미강, 레몬밤)를 이용한 항스트레스 건강기능식품 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 12월 25일

주관연구기관명 : (주)네추럴에프앤피

세부연구책임자 : 곽 연 길

1 협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

1 협동연구책임자 : 황 인 구

2 협동연구기관명 : 한림대학교 산학협력단

2 협동연구책임자 : 김 도 훈

요 약 문

I. 제 목

“천연소재(귀오즙폴, 미강, 레몬밤)를 이용한 항 스트레스 건강기능식품 제품화”

II. 연구개발의 목적

천연소재(귀오즙폴, 미강, 레몬밤)로부터 항스트레스 효능을 갖는 소재 개발 및 산업화

- 가. 항스트레스 효능을 가지는 천연물질의 스크리닝 및 표준화 확립
- 나. 동물시험 혈액 분석 및 조직검사를 통한 원료의 항스트레스 효능 평가
- 다. 유효 물질을 활용한 단일 혹은 복합물을 대상으로 건강기능식품 시제품 제작
- 라. 추출물 및 제품에 대한 원료의 안전성, 안정성, 지표물질 기준 확보
- 마. 동물실험을 통한 제품의 효능 규명
- 바. 임상시험을 통한 제품의 효능 규명
- 사. 식약청의 건강기능식품 개발을 위한 개별인정 추진
- 아. 과학적 입증이 검증된 복합 건강기능식품을 통한 국제 경쟁력 확보

III. 연구개발 내용

- (1) 항 스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴
 - 가. 귀오즙폴(길초근), 미강, 레몬밤 등을 중심으로 항 스트레스 효능을 가지는 천연 소재 원료 발굴
 - 나. 동물실험을 활용한 원료의 탐색적 1차 효능 평가
 - 다. 항 스트레스 효능을 가지는 천연소재의 원료화 및 기준 설정
- (2) 항 스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 원료 소재 발굴
 - 가. 항 스트레스 효능을 가지는 천연원료를 복합물로 활용하여 건강기능식품 시제품 제작
 - 나. 동물 실험을 통한 안전성 확인 및 효능 규명
 - 다. 임상 시험을 통한 항 스트레스 효능 평가
- (3) 항 스트레스 효능을 가지는 건강기능식품의 제품화
 - 가. 기준이 명확하게 검증된 원료를 중심으로 상용화를 위한 제품화 추진
 - 나. 우수한 원료에 대하여 식약청 개별인정 추진

IV. 연구개발결과

- (1) 지표성분 분석이 가능하며, 미생물 및 중금속 등의 안전성이 확보된 항스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 소재 스크리닝 완료
- (2) 후보 추출물의 항스트레스에 대한 동물실험(혈액 및 조직 분석)을 통한 효능 검증

결과 귀오즙풀에서 가장 유효한 효능을 보임

- (3) 추출물의 지표성분에 대한 항스트레스 유효 효능 확인
- (4) 귀오즙풀 추출물을 이용하여 다양한 시제품 개발, 제형 안정성 및 제형에 따른 소비자 선호도를 확인하여 인체적용시험 시제품을 제작
- (5) 인체적용시험을 통한 귀오즙풀 추출물의 항스트레스 효능 검증
- (5) 국내 및 해외에서 소비되는 귀오즙풀에 대한 자료 조사 및 개별인정 원료 신청 자료 작성

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- (1) 본 과제 of 결과를 기초로 특허 출원 3건이 완료 되었고, 제품화 진행에 귀오즙풀의 항스트레스에 대한 시장 독점권이 가능
- (2) 본 과제 of 전임상 및 임상시험 결과를 기초로 항스트레스 효능을 가지는 개별인정형 건강기능식품 개발

Summary

I. Title

“Development of anti-stress health functional food from natural materials(Valerian, Rice bran, Lemon balm)”.

II. Purpose

Development of anti-stress health functional food from natural materials(Valerian, Rice bran, Lemon balm) for commercialization.

- 가. Screening and standardization of active natural products effective on relieving stress
- 나. Blood and tissue tests for evaluating anti-stress activity of natural products
- 다. Trial product manufacturing using single or multiple ingredients with active molecules
- 라. Safety, stability, standardization of extracts and product
- 마. Efficacy test with in vivo animal model
- 바. Efficacy test with clinical trial
- 사. Registration for Individual Licensing from KFDA
- 아. Securing the international competitiveness by developing scientifically proven health functional food

III. Contents of research and product development

- (1) Excavation of anti-stress natural products
 - 가. Screening of anti-stress natural products including Valerian, Rice bran, Lemon balm
 - 나. First efficacy test using animal model
 - 다. Materialization and standardization of active natural products
- (2) Efficacy evaluation of anti-stress natural products
 - 가. Trial anti-stress product manufacturing
 - 나. Efficacy evaluation with in vivo animal model
 - 다. Efficacy evaluation with clinical trials
- (3) Commercialization of anti-stress health functional food
 - 가. Commercialization of product with standardized materials
 - 나. Individual licensing of standardized quality materials

IV. Results

- (1) Screening of anti-stress natural products with standardization and safety guaranteed against microbials and heavy metals
- (2) anti-stress activity of Valerian extract in animal model (blood and tissue analysis)
- (3) Evaluation of anti-stress activity of index compound in the extract
- (4) Comparison of various trial products, types of stability test-type preference to choose the type of supplement for clinical trial
- (5) Efficacy evaluation of anti-stress activity of Valerian extract
- (5) Searching of all the information regarding Valerian extract and preparation of documents for individual licensing

V. Research result and outcome utilizing plan

- (1) Results of this project came up with 3 patents (pending), so exclusivity for commercialization of anti-stress health functional food with Valerian is secured.
- (2) Commercialization of individual licensed health functional food with anti-stress indication based on pre-clinical and clinical data.

Table of Contents

Chapter 1	Outline of current research project	8
Verse 1	Objectives of the research	8
Verse 2	Needs of the research	8
1.	Technical aspect	8
2.	Economic aspect	9
Chapter 2	Current technology development (domestic/abroad)	11
Verse 1	Current technology development (domestic)	11
Verse 2	Current technology development (abroad)	31
Chapter 3	Contents and results of research project	41
Verse 1	Contents of research project	41
Verse 2	Results of research project	92
Chapter 4	Goal achievement and contribution to the related fields	6
Verse 1	Achievement of goal of project	6
Verse 2	contribution to the related fields	6
Chapter 5	Outcome of research project and outcome utilizing plan	17
Chapter 6	Collected global scientific and technological information during research	21

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 1 절	연구개발과제의 목적	8
제 1 절	연구개발의 필요성	8
1.	기술적인 측면	8
2.	경제적인 측면	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
제 1 절	국내 기술개발 현황	11
제 2 절	국외 기술개발 현황	13
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 1 절	연구수행 내용	14
제 2 절	연구수행 결과	29
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	105
제 1 절	연구개발목표의 달성도	105
제 2 절	관련분야 기술 발전 기여도	106
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	107
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	109

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 과제의 목적

본 연구과제에서는 항스트레스 효과가 알려진 소재를 in vivo 실험으로 스크리닝하여 그 소재에 대한 인체적용시험을 통하여 항스트레스 효능을 규명하고자 한다. 또한 원료의 안전성 및 표준화를 위하여 미생물, 중금속 검사 및 지표성분을 확립, 분석법을 확보하고자 하며, 시제품 개발을 통한 관능적으로 우수한 제품을 개발함으로써 건강기능식품의 스트레스 제품의 다양화 및 시장 점유율 확보를 목적으로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면

가. 스트레스(Stress)란 심신에 자극이 가해지면서 이에 대응하기 위한 긴장상태를 말하며, 이때 스트레스를 야기하는 인자를 스트레서(Stresser)라 함. 스트레서는 현대 사회인에 있어서 가정과 직장생활들 전반적인 생활에 걸쳐 존재함. 스트레스는 인체에 긴장상태를 유지하여 앞으로 일어날 변화인자에 대하여 빠르게 대처할 수 있는 순기능을 부여하며, 인체 내 항상성원리에 의하여 스트레스는 완화되므로 일반적으로 크게 걱정할 필요는 없음. 하지만 심신이 감당하기 힘든 규모의 스트레서 요인이 작용하거나, 지속적인 스트레스 상태 혹은 반복적으로 스트레스에 노출 될 경우 만성화가 될 요지가 있으며, 이에 불면증이나 우울증 등이 유발되어 신체적, 정신적 기능장애가 유발될 수 있음.

표 1. 인간의 삶에서 접할 수 있는 스트레서의 크기

스트레서	점수	스트레서	점수
자식사망	74	직업을 바꿈	43
배우자사망	73	정년퇴직	41
부모사망	66	, 관유 산	38
이 혼	63	임 신	37
형제사망	60	입시, 취직 낙방	37
별거후 재결합	54	자식이 집 떠남	36
부모이혼-재혼	53	가족의 변화	36
별 거	51	부동산매입	35
직장에서 파면	50	학업중단, 시작	34
친구의 사망	50	시택, 처가, 친척과의 갈등	34
결 혼	50	직장상사와의 갈등	23
징역을 삼	49	주거의 변화	20
결혼약속	44	가벼운 병	15
중병-중상	44	가벼운 법규위반	11
사업 재정비	66		

나. 지나친 스트레스는 협심증, 당뇨, 관절염, 고혈압과 같은 질병을 악화시킬 수 있고 관상동맥질환, 긴장성 두통, 요통, 근육의 경련을 직접적으로 유발시킬 수 있으며, 면역기능을 약화시켜 알레르기 반응, 천식발작, 암 발생에 영향을 줄 수 있음.

다. 장시간 스트레스의 경우는 의학적 치료프로그램과 약물요법을 통하여 치료가 가능하지만, 일시적인 스트레스의 경우 일반인에게 빈번하게 일어남에도 불구하고, 의학적 처방을 받기 힘들. 때문에 자가 치료에 의존 할 수밖에 없음. 게다가 현재 의약품으로 판매되고 있는 항 스트레스제 및 수면제등은 부작용 때문에 처방에 신중을 기하여야 하며 의사의 관리가 필요함. 이러한 측면에 있어서 일상적으로 큰 제약 없이 섭취가 가능하며, 일상 스트레스 완화에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품의 개발은 사회인의 삶의 질 향상이라는 측면에 있어서 큰 도움이 될 수 있다고 판단 됨.

2. 경제적인 측면

가. 현재 스트레스 완화에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 원료에 있어서 식약청 개별인정 원료는 홍경천추출물, L-테아닌, PME-88 메론추출물, 유단백가수분해물(락티움), 아쉬아간 다추출물,이 현재 등록되어있음(식약청,2014년 12월 현재).

나. 국내의 원료등록현황과 별개로 현재 스트레스완화 제품 시장 규모는 매우 적음. 2001년 한국보건산업진흥원에서 제공한 미국의 건강식품 현황을 살펴보면, 스트레스 환자는 성인인구의 65%로 매우 큰 규모를 차지하고 있으며, 그에 대한 건강식품 주요 원료로써 쥐오줌풀(Valerian)과 트립토판(Tryptopan)이 차지하고 있음.

다. 일본의 경우 2000년도부터 GABA(Gamma Aminobutyric Acid)에 대한 항스트레스 효능연구가 활발하고 GABA를 활용한 스트레스 완화 제품으로 큰 시장이 형성되어 있으며 Valerian 원료 역시 일본에서도 크게 활용되어오고 있음

라. 국내에는 스트레스 완화 관련 개별인정원료가 있으며, 또한 사회적으로 스트레스에 대한 인식이 나날이 증가함에도 불구하고 스트레스 완화 제품시장이 크게 형성되지 않는 것은 항스트레스 효능이 현대 사회인의 기대치에 부합하지 못하기 때문이라고 판단됨.

마. 미국의 Valerian과 일본의 GABA원료와 같이 국내에서도 건강식품으로 항스트레스 효능을 가지는 우수한 원료를 개발하게 된다면, 국내의 잠재적인 항 스트레스 시장의 활성화는 물론 그 규모도 거대하다고 예상되어지며, 기존 활성화 되어있는 해외시장으로도 쉽게 접근이 가능하다고 판단하여 본 연구를 진행하고자 함.

표 2. 일본의 스트레스 완화 상품 (기능식품)

제조원	상품명	용량	가격	배합성분특징
야쿠르트 본사	레모리아 리프허브 & 리렉스	500 mL PET	140엔	1병당 100 mg의 테아닌을 배합. 레몬과즙 과 리프(잎)계를 중심으로 한 7종의 허브엑기스가 잘 조화된 리렉스 음료
宝酒造	GABA 50	50 mL 병	250엔	1병당 GABA를 50 mg 배합. camomile, hop, valerian 등의 허브 엑기스를 배합한 음료
Kanebo Foods	和漢菓 아시안브레드	4개	173엔	스트레스 해소가 기대되는 산사자, 회향, 생강, 현미를 배합한 기능성과자
Fancl	快眠서포트	150알	1,522엔	숙면효과가 있는 허브로서 구미에서 주목받고 있는 valerian 엑기스를 위시, hop 엑기스, 쌀베아 엑기스(GABA 함유) 등을 배합한 보조식
DHC	리렉스素	60알	955엔	1알 당 테아닌 60 mg, 레시틴(대두유래) 5mg, 비타민E 3.4 mg을 배합한 보조식
常磐植物化學 研究所	Venetron 25	120알	9,800엔	羅布麻(나포마)란 식물의 잎에서 추출 정제한 엑기스 “Venetron” 을 배합한 리렉스계 보조식품
Asahi Food& Health Care	Actio GABA & 테아닌	90알	2,280엔	GABA, 테아닌, 4종류의 허브(camomile, 나포마, linden, hop)를 배합한 보조식
森永製菓	Weider 비에스 타블렛	120알	5,250엔	4알로서 100 mg(1일 권장량)의 PS를 보급할 수 있음

*출처 : 항스트레스 식품소재의 동향, 석호문

바. 지금까지 항스트레스에 대한 관심은 높으나, 대부분이 단일추출물에 초점이 맞추어져 왔으나, 각각의 제품이 작용하는 기전이 서로 달라, 단일추출물 보다는 복합추출물이 보다 중요한 것으로 생각되며, 이러한 복합추출물은 이전의 단일추출물보다 보다 개선된 항스트레스 효과를 가져와 지금까지 나와 있는 항스트레스 물질보다 국제 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.

사. 주관연구기관인 (주)네추럴에프앤피는 과거 의약품으로만 사용이 허가되어 왔던 은행잎 추출물을 개별인정 획득을 통하여 건강기능식품의 제품화를 성공 하였으며, 평소에 일정량을 간편하게 섭취 할 수 있도록 하여 인지능력 및 혈류개선에 도움을 줄 수 있음에 대하여 인정을 받았으며, 인정받은 후 약 6개월 만에 제품이 출하되어 현재 수익 창출 중에 있음. 이러한 경험과 기술력은, 안정적이고 효과적인 스트레스 완화소재의 검증 및 항 스트레스 기능성 건강 기능식품의 개발에 보다 효과적으로 진행 될 것으로 여겨짐.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 국내 건강기능식품 시장 현황

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

나. 2012년도까지 건강기능식품 생산실적 현황을 분석한 결과, 국내생산액과 수출액을 합친 국내 생산실적이 14,091억원으로 점차 증가하였음. 2011년 (13,682억원)대비 3% 증가하였지만 예전에 비해 둔화세를 나타내고 있다. 국내·외 전반적인 경기침체에 따른 건강기능식품 수요 감소 및 중저가 제품 선호 등의 이유로 둔화세를 보였으나 꾸준한 성장을 지속하고 있는 것으로 나타났다.

다. 한국인의 일상생활스트레스와 직무스트레스 경험률이 각각 81%와 87%로 OECD 국가 중 최고 수준이다 수도권 주민 대상 실태조사에서 7.1%가 견디기 힘든 수준의 스트레스를 받고 있는 것으로 나타났다. 스트레스의 주요인은 입시경쟁과 취업난, 힘든 직장생활 결혼 비용 사교육비 주택마련 비용 노후준비 과도한 관혼상제 비용 등으로 나타났으며, 스트레스로 인한 수도권의 사회적 비용은 연간 37.5조원으로 분석되었다. OECD 국가별 웰빙수준을 측정하여 발표한 How's Life? 2013 보고서에서 우리나라의 주관적 건강수준은 30위를 차지하였음.

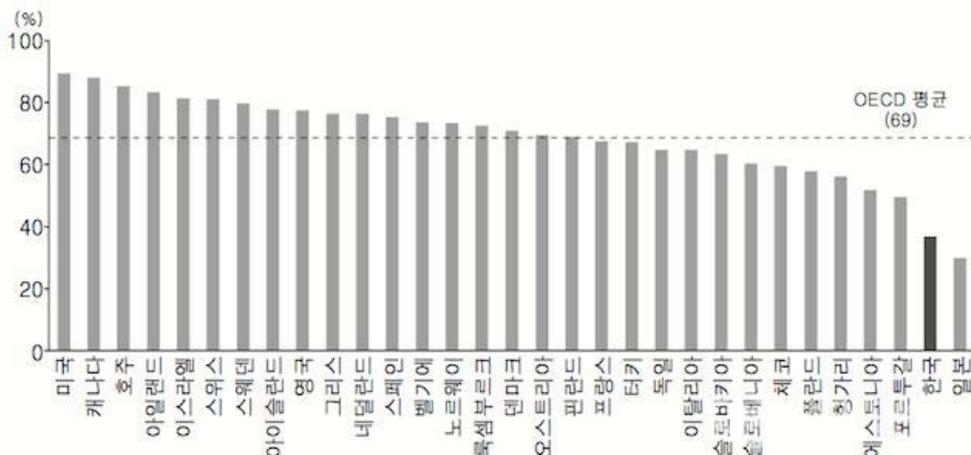


그림 1. 국가별 일상생활 스트레스 수준)

라. 스트레스 요인은 생애주기에 따라 집단별로 다르게 나타나며, 중고등학생은 과도한 학습 부담과 성적경쟁 부모의 기대와 체면유지 부담감이 스트레스 요인으로 나타났음. 대학생은 진로 취업 와 학비 생계 문제 학벌 스펙 사회에 대한 강한 불만이 스트레스를 가중시키는 것으로 분석되었음. 기성세대는 노후대비 및 주택마련 비용부담 스트레스를 가장 강하게 느끼고 있음. 특히 미혼직장인은 과도한 업무량 때문에 스트레스를 받고 있으며 이직이나 적성 불일치 스트레스가 강하게 나타났음. 기혼직장인은 동료와의 경쟁에 대한 스트레스가 높고 부모세대들은 생활비 외 축의금 부의금 등 사회적 관계와 체면유지비용 스트레스가 강하게 나타났음. 스트레스로 인한 수도권 주민 1인당 생애 비용은 1억 1,594만원에 달하는 것으로 추정되었음.

마. 이에 최근들어 정신적 건강에 속하는 스트레스 완화를 위한 시장의 니즈가 확대되며 스트레스 완화 기능성 소재 및 식품개발에 대한 연구가 각광받고 있음. 특허의 경우, 현재 여러 추출물을 활용한 항스트레스에 대한 특허는 소멸상태로 해외에선 많이 개발되고 있으나 현재 국내에는 안전성 입증문제로 특허 출원이 침체 되어 있는 상태이며, 또한 기존에 등록되어 있는 특허도 특허권자들의 소극적인 자세로 인한 소멸사례가 많음. 또 항스트레스 연구에 있어서 항산화와 연관이 되어있어 스트레스에 의해 발생하는 유리산소기가 항산화물질에 의해 제거되는 메커니즘을 통한 신경세포 보호 등의 연구가 진행되어있음.

바. 반면, 현재 항스트레스 효능을 가지는 식품은 존재하나 식약청의 관리에 의해 직접적 광고는 하지 못하는 상황, 때문에 항스트레스 기능성 식품시장은 국내에서 정체되어 있는 상태이다. 해외에서 판매되는 항스트레스 건강기능식품이 수입되고는 있으나 이 제품 역시 모두 국내에서 안전성, 효능입증을 받지 않은 제품이 대다수임 .

사. 따라 해외 기존에 항스트레스 기능성이 알려진 소재를 이용하여, 안전성 및 효능을 입증한다면 국내 항스트레스 시장 진입에 새로운 신규물질 보다 유리할 것으로 판단 됨.

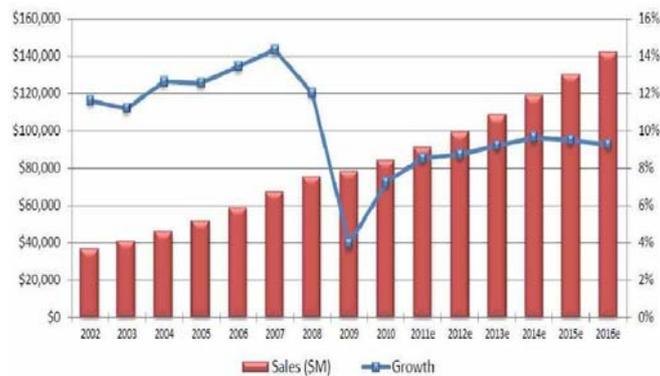
1) 출처 : How's Life?, LG 경제연구원(2014)

제 2 절 국외 기술개발 현황

1. 국외 건강기능식품 시장 현황

가. 웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되어지고 있음.

나. 건강기능식품의 분류기준에 따라 세계시장규모의 추정에는 차이가 있으며, 국내건강기능식품의 정의에 부합하는 제품의 생산실적을 비교하는데 어려움이 있으나 Nutrition Business Journal(2012)의 자료에 따르면 2010년 건강기능식품 세계시장 규모는 약845억 달러로 추정됨. 세계건강기능식품 시장규모는 2009년 대비 802억달러) 5.4%의 성장을 기록하고 있음.



(단위: 백만달러)

출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report (2012)

그림 2. 세계건강기능식품 시장 규모

○ 최근 들어 미국 음료시장에서 신경안정 기능성 음료 (Anti-Energy Drink, Non-Energy Drink)가 두각을 드러내고 있으며, 편의점과 대형 마트 음료코너에서 손쉽게 찾아볼수 있게 되었다. 장기적인 경기침체 등으로 소비자들의 스트레스가 상승하면서 긴장 이완 및 스트레스 완화에 대한 소비자의 니즈가 확산되고 있음을 보여주는 것으로 해석됨.

대표적인 신경안정 기능성 음료

제품명	제품 사진	특징
Drank		<ul style="list-style-type: none"> ■ 감기와 성분을 포함해 강력한 신경안정 효과가 있는 불법 드러그인 Purple Drank 이미지를 마케팅화한 제품으로 젊은 층에게 어필 ■ 의로입계와 전문가들의 우려에도 FDA 승인을 받아 2008년 첫 출시 ■ 주요 성분: 멜라토닌, rose hip, valerian root
Marley's Mellow Mood		<ul style="list-style-type: none"> ■ 레게음악의 대가 Bob Marley의 이름을 따서 출시된 제품 ■ 홀자와 그린티 제품도 추가 출시 ■ 주요 성분: 카모밀꽃 추출물, 멜라토닌
RockStar Relax		<ul style="list-style-type: none"> ■ 에너지 드링크 RockStar Energy의 자매품 ■ 탄산, 카페인 무첨가 ■ 주요 성분: 카모밀과 passionflower 추출물, L-theanine

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행내용

1. 항스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 소재 스크리닝

가. 연구수행방법

(1) 추출물 확보

본 연구에 사용된 쥐오줌풀, 레몬밤은 Naturex사에서 제조된 원료를 공급받아 사용하였다. 미강은 ‘(주)외송재료’ 업체에서 공급받아 사용하였으며, 발효다시마 추출물은 부산소재 ‘(주)마린바이오프로세스’ 에서 공급받아 사용하였다. 쥐오줌풀, 레몬밤은 70%주정에탄올 추출 분말을 바로 공급받아 연구에 사용하였으며, 발효다시마추출물 역시 분말상태로 공급받아 연구에 사용하였다. 미강은 정제수로 이물질 제거 한 후 80° C의 열풍건조기 내에 48시간 동안 방치하여 수분을 제거하였다. 그 후 마쇄하여 각 원료를 칭량하여 질량의 7배의 주정에탄올에서 초음파 처리를 한 후 7일간 침지시킨 후 필터링하였다. 그 후 에탄올 추출물을 증발 시킨 후 원료를 분말화 하여 사용하였다.



그림 3. 본 연구에 사용된 추출물 사진

(2) 항스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 소재 조사 및 스크리닝

(가) Valerenic acid 함량 분석

추출물의 3배 증량의 메탄올을 첨가 한 후 초음파 처리 및 0.45 μm 의 membrane filter로 여과하여 HPLC를 이용하여 지표성분 Valerenic acid 성분을 분석하였다. HPLC 조건으로서 용출용매는 증류수 (800 ml)와 acetonitrile(156.8 ml) 혼합액 (eluent A)과 증류수 (200 ml)와 acetonitrile(625.6 ml) 혼합액 (eluent B)를 사용하여 linear gradient mode로 분석하였다. 이때 flow rate는 분당 1.5 ml로 하였고, 표준품을 사용하여 절대검량선법에 의해 분석하였다.

(나) gamma-aminobutyric acid 함량 분석

추출물의 3배 중량의 메탄올을 첨가 한 후 초음파 처리 및 여액을 HPLC를 이용하여 지표성분 R-aminobutyric acid성분을 분석함. 분석방법은 AccQ-Tag™ Kit를 사용하여 분석하였다.

(다) Rosmarinic acid 함량 분석

레몬밤 추출물의 3배 중량의 메탄올을 첨가 한 후 초음파 처리 및 필터링을 하여 HPLC를 이용하여 지표성분 rosmarinic acid성분을 분석하였다. 320 nm의 흡광도에서 0.1%의 formic Acid를 첨가한 증류수와 0.1% formic acid를 첨가한 acetonitrile 용매를 선형분석방법을 사용하여 분석하였다.

(라) 미생물 및 중금속 안전성 시험(식품의 기준 및 규격 2014)

미생물 시험방법은 식품 공전을 따라 시행하였다. 중금속 안전성은 Varian사의 Spectra AA장비를 이용하여 측정하였으며, 시험방법은 건식회화법을 따라 시행하였다.

(3) 동물실험을 통한 항스트레스 효능 평가

(가) 스트레스 유발 장치 제작 및 실험 설계

스트레스 유발 장치는 가로, 세로 64 cm의 투명 아크릴에 16 cm간격으로 격벽을 설치하여 총 16개의 공간을 마련하였음. 또한 인접하지 않은 부분에는 바닥에 전기충격을 가할 수 있도록 철사를 깔았으며, 인접한 부분에는 전기가 통하지 않도록 절연체를 깔아서 사용하였다 (그림 4).

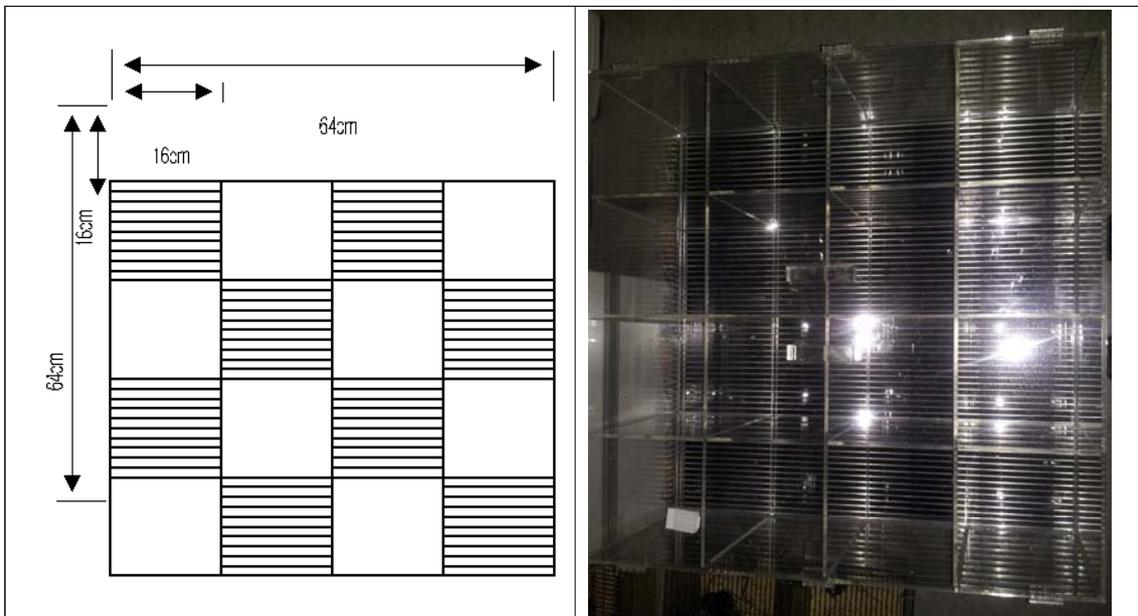


그림 4. Stress Apparatus.

쥐오줌풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스에 대해서 효

능이 있는지 확인하기 위해, 이들 추출물을 3주간 투여를 지속하며, 마지막 3일 동안 foot shock을 이용해 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스를 유발하며, 스트레스 유발은 0.3 mA로 10초간 2분 간격으로 1시간 동안 스트레스를 유도하였다 (그림 5).

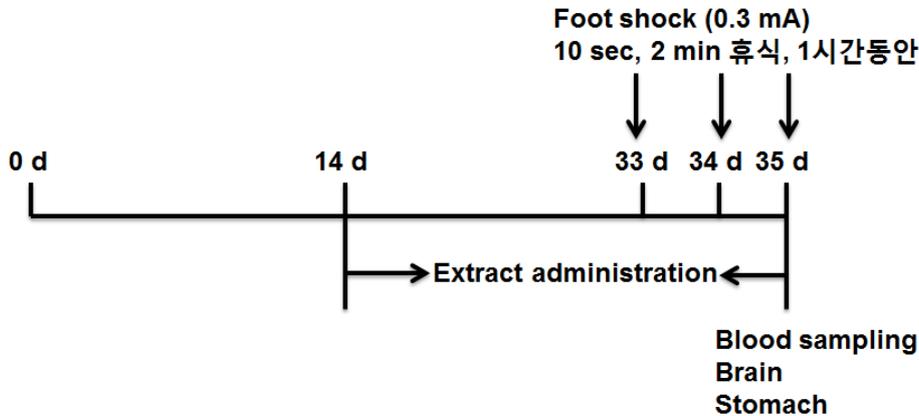


그림 5. Experimental schedule for anti-stress compound in mice.

(나) 혈액 분석

스트레스가 유발된 마우스에 후보 원료를 투여하여 혈장 내 스트레스 유발 관련 바이오 마커(Corticosterone, β -endorphine)의 농도변화 확인을 통한 항스트레스 효능 평가하였으며, 20 g내외의 마우스를 2주간 케이지에 적응시킨 후 스트레스 유발 장치를 통하여 물리적, 심리적 스트레스를 유발하였다. 스트레스를 유발한 마우스 중 실험군에 대하여 후보 원료를 투여하였으며, 이후 석유에테르, 메틸렌클로라이드를 이용한 원심분리를 통하여 Corticosterone의 혈중 정량 분석 및 실리카겔을 채운 파이렉스 컬럼을 이용하여 β -endorphine의 정량분석을 진행하였다.

(다) 조직 및 기관 분석

스트레스가 유발된 마우스에 후보 원료를 투여하여 뇌 조직 및 기관에서 스트레스 유발 관련 바이오 마커(Noradrenaline, c-fos, c-jun, serotonin, 위장장애, 위액, 위산, 총산배설물)를 확인하여 항스트레스 효능 평가하였으며, 20 g내외의 마우스를 2주간 케이지에 적응시킨 후 스트레스 유발장치를 통하여 물리적, 심리적 스트레스를 유발함. 스트레스를 유발한 마우스 중 실험군에 대하여 후보 원료를 투여하였으며, 에테르를 이용하여 안락사 한 후 뇌에서 노르아드레날린(noradrenaline: NA)의 함량은 뇌조직 amygdala에서 c-fos, c-jun의 발현 및 serotonin은 Hematoxylin & Eosin 염색을 통하여 확인하였다. 위장장애는 해부 후 고정액을 통하여 위의 굴곡을 따라 해부, 징후부분을 파악하였으며, 위장장애, 위액, 위산, 총산배설물을 확인하였다.

(4) 시제품 개발 및 인체적용시험 샘플 제작
(가) 연질캡셀 제조

표 3. 약제 최종 확정 배합비(왼쪽) 및 피막 배합비(오른쪽)

성분명		배합비(%)	성분명		배합비(%)
(주성분)	쥐오줌풀(길초근) 추출물	22.00	(피막기재)	젤라틴	68.03
(점도증가제)	밀납	3.00	(피막기재)	글리세린	28.57
(부형제)	대두레시틴	1.50			
(부형제)	대두유	73.5	(피막기재)	D-소르비톨 액	3.40
합계		100	합계		100

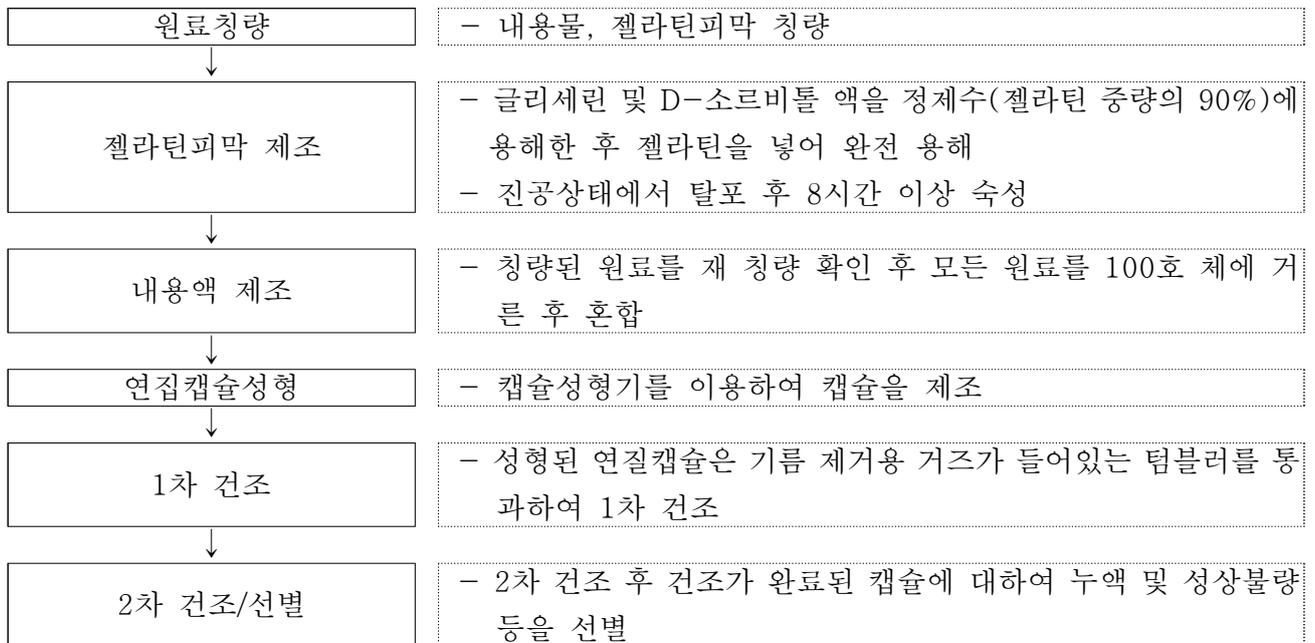


그림 6. 연질캡셀 제조방법.

(나) 경질캡슐 제조

표 4. 경질캡슐 최종확정 배합비 및 제조 방법

성분명		배합비(%)	원료 칭량	- 배합비율에 따라 각각의 원료를 칭량
(주성분)	쥐오줌풀(길초근) 추출물	20.00	↓	
(부형제)	유당혼합물	48.00	사별	- 원료를 25호 표준체(650~750 μ m) 를 사용하여 사별
(부형제)	이산화규소	1.00	↓	
(부형제)	스테아린산마그네슘	1.00	조립/ 건조	- 100%발효 주정을 이용하여 조립 을 잡고 수분함량 4%이내 까지 건조
합계		70	↓	
			캡슐 충전	- 캡슐을 충전하고 충전된 캡슐은 탈분기를 이용하여 탈분하고 탈분 이 완료된 캡슐을 선별

(다) 액상 시제품 제조

표 5. 액상 시제품 최종확정 배합비 및 제조 방법

성분명		배합비(%)	원료칭 량	- 배합비율에 따라 각각의 원료를 칭량
(천연첨가물)	시클로덱스트린	5.00	↓	
(감미료)	프락토올리고당	2.00		
(감미료)	대추농축액	2.00	↓	
(감미료)	배농축액	1.50		
(감미료)	홍삼농축액	0.40	↓	
	쥐오줌풀(길초근) 추출물	0.20		
(점도증가제)	산탄검	0.10	↓	
(감미료)	홍삼향	0.05		
	정제수	88.75	↓	
합계		100	살균/ 여과	- 90℃에서 1시간 이상 살균 후 필터 로 여과

(라) 정제 시제품 제조

표 6. 정제 시제품 최종확정 배합비 및 제조 방법

성분명		배합비(%)	원료 칭량	- 배합비율에 따라 각각의 원료를 칭량
(주성분)	쥐오줌풀(길초근) 추출물	36.70	↓	
(부형제)	결정셀룰로오스	48.90	↓	- 쥐오줌풀(길초근) 추출물과 결정 셀룰로오스를 혼합
(부형제)	말토덱스트린	12.90	↓	
(활택제)	스테아린산마그네슘	1.00	↓	- 100%발효 주정을 이용하여 조립 을 잡고 수분함량 4%이내 까지 건조
(코팅기제)	HPMC	0.45	↓	
(코팅기제)	자당지방산에스테르	0.50	↓	- 정제기를 이용하여 10Φ 원형정 제로 타정
합계		100	↓	- HPMC, 자당지방산에스테르를 이용하여 코팅

(마) 분말 시제품 제조

표 7. 분말 시제품 최종확정 배합비 및 제조 방법

성분명		배합비(%)	원료 칭량	- 배합비율에 따라 각각의 원료를 칭량
(부형제)	결정포도당	58.50	↓	
(감미료)	프락토올리고당	15.00	↓	- 원료를 25호 표준체(650~750 μm)를 사용하여 사별 후 조립 원료들을 혼합
(감미료)	자일리톨	15.00	↓	
	쥐오줌풀(길초근) 추출물	5.50	↓	- 조립원료 무게 대비 약 15%의 발효주정에 용해 한 후 조립한 후 수분함량 4%이내 까지 건조
(산미제)	무수구연산	5.00	↓	
(부형제)	이산화규소	1.00	↓	- 건조가 완료 된 조립 원료를 일 정한 입자가 되도록 25호 표준 체(650~750μm)로 정립
합계		100	↓	- 정립한 원료와 나머지 원료들을 혼합

(바) 시장성(상품성) 평가

상기의 개발된 시제품에 대하여 사내 평가단을 통하여 제품의 시장성 및 인체적용시험 진행을 통한 직접적인 제품화 제형을 선택하였다.

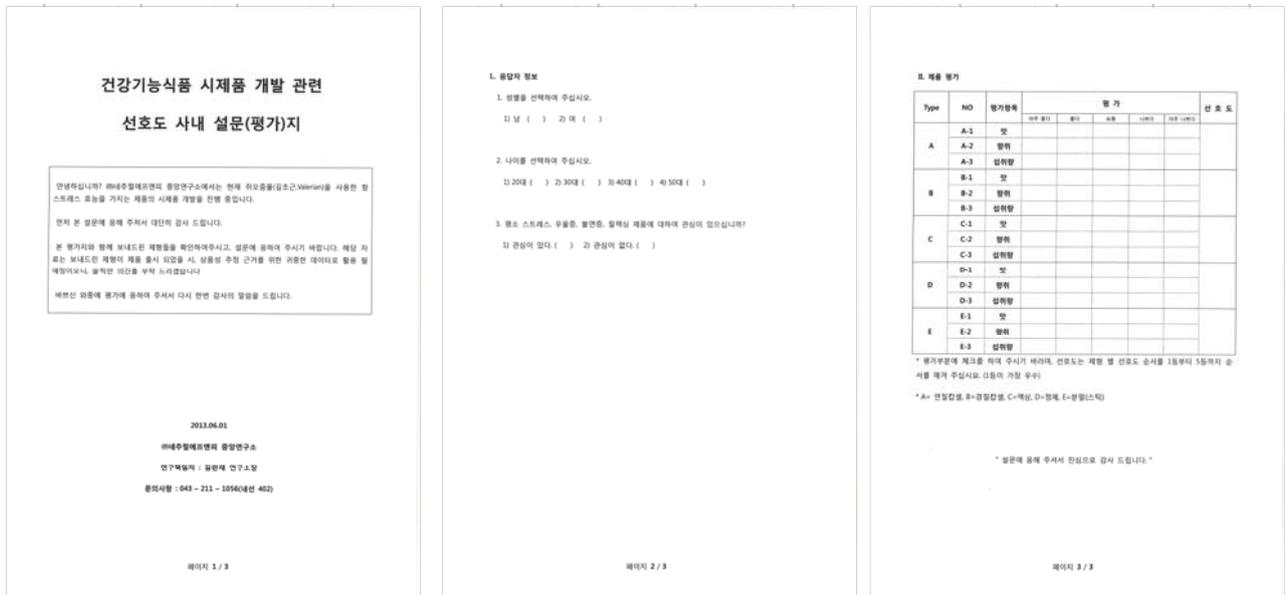


그림 7. 건강기능식품 시제품 개발 관련 선호도사내 설문(평가지).

(5) 인체적용시험을 통한 항스트레스 효능평가

(가) 연구 설계

본 연구의 설계는 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 건강기능식품 기능성시험으로서 2014년 08월 11일부터 2014년 12월 18일까지 본 연구의 취지에 자발적으로 찬성한 동의자를 대상으로 스트레스 검사 및 혈액 검사를 실시하여 연구대상 선정기준에 만족하는 자를 표본으로 선정하였다. 선정된 대상자들은 무작위 원칙에 의거하여 맹검번호가 부여 되었다. 맹검번호에 의거하여 valerian extract 또는 위약을 지급하였고 총 4주 동안 건강 기능식품 복용을 하며, 사전, 사후 검사가 이루어진다.

(나) 연구 대상 및 목표 피험자 수

본 임상시험에 참여한 피험자의 수는 총 64명이며 참여 피험자의 조건은 다음과 같다.

① 선정기준 및 절차

• 선정기준

- 20세 이상의 남녀
- 스트레스 증상 self-rating 각 항목의 점수가 4점 이상인 사람

② 선정 절차

- 우울, 불안, 불면의 정도를 1-10점 사이에서 self-rating하도록 하여 각 항목에서 4 점 이상으로 rating한 다양한 연령층(20세 이상)을 스트레스 군으로 선정함.
- DSM-IV (American Psychiatric Association, 1995) 에 근거하여 대상자들의 스트레스로 인한 증상(우울증, 불안증 등)의 심각도를 평가하여 진단 기준에 부합할 경우에는 제외함.
- 최근 1달 동안 정신과 약물치료 경력이나 알코올 및 약물중독 등의 정신질환이 있는 경우와 기타 간장 및 신장 기능의 심한 이상을 보이는 대상자는 제외 하도록 함.
- 선정된 연구 대상자들은 식품 처치군, 대조군에 각각 같은 비율로 무작위 할당 함.
- 선발된 피검자들은 본 병원의 윤리위원회에서 승인한 동의서에 서명한 후 병원 임상 연구실에서 실험을 시행함.

③ 제외기준

- 최근 2주 이내 정신과 약물치료 경력이나 정신분열증, 조울증, 알코올 및 약물중독 등의 정신질환이 있는 환자. 단, 정신약물치료로 인해 기존의 증상이 안정화된 상태에서 본 연구 시작 전후로 스트레스 증상이 유발된 경우에 기존의 정신약물을 유지하는 상태에서 본 연구에 참여하는 것을 고려할 수 있음
- 간, 신장에 심각한 이상이 있는 환자
- 자해, 타해, 자살의 위험성이 있는 환자

④ 연구대상 피험자 수

본 건강기능식품의 기능성시험에서는 통계적인 유의성을 확인하는 목적으로 기존 연구들을 참고하여 유의수준을 .05, 검정력을 .08, 임상적 유의성 기준을 5, 표준 편차를 7로 두고 아래 책정 근거에 따라 피험자 수를 산정하였다. 군당 각각 24명 정도가 적당할 것으로 산정되었으나 약 20%의 탈락률을 고려하여 30명의 대상자들을 선정하기로 하였다. 실제로 참여한 피험자는 64명이었으며, 시험군이 34명, 대조군 30명이었다.

책정근거

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\epsilon - (\mu_c - \mu_t))^2}$$

$$\frac{2(1.645+0.842)^2 \sigma^2}{(5-(0-0))^2} = 24.236$$

<sample size를 산출하기 위한 공식>

⑤ 시험중지 및 탈락 기준

시험참가에 동의한 후 본 시험에 참가하였으나 다음에 해당하는 피험자는 인체시험참여를 중지시킬 수 있다.

- 선정 / 제외기준 위반
- 피험자의 시험 중지요구
- 이상반응발생 (중대한 이상반응 포함)
- 피험자의 불순응
- 추적 관찰 불가
- 건강기능식품의 기능성시험계획서의 규정위반
- 병발 질환
- 병용금지식품 또는 약물을 복용
- 복용순응도가 60%미만인 경우
- 기타 연구자의 판단

중도 탈락한 모든 경우에 있어서 그 원인이 증례기록서와 피험자 진료차트에 자세하게 기록하였으며 중도 탈락하여 시험을 완결하지 못한 피험자들에게도 가능한 한 유효성 평가를 위하여 임상시험 검사를 실시하도록 하였다. 또한, 이상반응이 발생한 경우에는 그 이상반응의 원인이 밝혀질 때까지 추후 추적관찰이 진행하였고, 이 때 결과는 이상반응을 포함한 유효성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법에 의거하여 보고하였다. 중대한 이상반응(이상반응 페이지 참조)이 발생하여 중도 탈락하는 경우에는 즉시 임상심사위원회(IRB) 및 건강기능식품의 기능성 시험의뢰자에게 즉시 통보하였다.

(다) 시험용 건강기능식품

① 기능성시험에 사용되는 건강기능식품

임상시험에 사용되는 건강기능식품은 시험의뢰자인 네추럴에프엔피에서 제조하여 시험 건강기능식품은 1일 복용 분량인 3캡셀(1회 1캡셀, 1일 3회)을 120캡셀로 1회 연구시험기관에 공급하고 위약 또한 1일 복용 분량인 3캡셀(1회 1캡셀, 1일 3회)을 120캡셀로 1회 포장하여 연구시험기관에 공급하였다.

② 기능성시험에 사용되는 건강기능식품의 라벨링

임상시험에 사용되는 건강기능식품은 시험의뢰자가 제조하여 임상시험기관에게 공급하였다. 시험 건강기능식품 또는 위약으로 생산되는 제제는 각각 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 하며, 중량 차이도 크지 않아야 한다. 또한 동일한 라벨을 부착함으로써 피험자 및 연구자에 대하여 이중맹검(double blind)이 유지되도록 하였다. 임상시험용 건강기능식품 라벨의 기재는 시험군별 차이가 노출되지 않도록 주성분 일반명 및 제조번호(Lot No.)는 기입하지 않았다.

(라) 관찰항목, 기능성 검사 항목 및 관찰 검사 방법

① 피험자 기초 정보

사전 검사에서 피험자의 생년월일, 성별, 교육연수, 종교 및 과거병력 등 피험자 기초정보

를 자세하게 기록하였다.

② 신체검사

사전 검사에서 신장/간기능 검사를 실시하여 GOT(AST), GPT(ALT) , BUN, Creatinine 수치의 정상여부를 사전 및 사후에 기록하였다.

③ 기능성 시험 검사 항목

○ 스트레스 관련 척도

- 불안척도(Hamilton anxiety rating scale HAMA)
불안한 기분과 불안 관련 증상을 측정하기 위해서 사용되는 척도로 피험자와 면담 후 검사자가 평가한다. 총 14문항으로 구성되어 있다.
- 우울척도(Hamilton depression rating scale HAMD)
우울한 기분과 우울 관련 증상을 측정하기 위해서 사용되는 척도로 피험자와 면담 후 검사자가 평가한다. 총 17문항으로 구성되어 있다.
- Beck의 불안척도 (Beck Anxiety Inventory; BAI)
불안증상의 심각도를 측정하기 위한 척도로 피험자가 직접 자신의 증상을 평가한다. 총 21 문항으로 구성되어 있다.
- Beck의 우울척도 (Beck Depression Inventory; BDI)
우울의 정도 및 정서적, 인지적, 신체적 증상을 측정하기 위한 척도로 피험자가 직접 자신의 증상을 평가한다. 총 21 문항으로 구성되어 있다.
- 수면척도(Pittsburgh Sleep quality Index; PSQI)
수면의 질과 양을 측정하기 위한 척도로 9문항으로 구성되어 있으며, 자기보고식 척도이다.
- 스트레스 반응척도 (Stress Response Inventory; SRI)
정서적, 신체적, 인지적, 행동적으로 나타나는 스트레스 반응들을 측정하기 위한 척도로, 신체화, 우울, 분노의 하위 요인을 가지는 척도이다. 자기보고식 척도로 22 문항으로 구성되어 있다.
- 한국판 세계보건기구 삶의 질 간편형 척도 (World Health Organization Quality of Life assessment instrument-brief; WHO-5) 전반적인 삶의 질을 평가하기 위한 척도로 5문항으로 구성되어 있으며 자기보고식 척도이다.
- 스트레스 척도(Brief encounter psychosocial instrument BEPSI)
지난 한달 동안의 심리적, 사회적 스트레스를 측정하기 위한 척도로 5문항으로 구성되어 있으며, 자기보고식 척도이다.
- 사회적 직업적 기능 평가 척도(Social and occupational functioning assessment scale SOFAS)
사회적, 직업적 기능 수준을 평가하기 위한 척도로 자신이 생각하고 있는 사회 및 직업 기능에 대해서 100점 만점으로 평가하는 척도이다.
- 피로 척도(Brief fatigue inventory BFI)
피로 수준을 측정하기 위한 척도로 자기보고식 4문항으로 구성되어 있다.
- Sheehan기능 손상 척도(Sheehan disability scale SDS)

일상 생활의 기능 손상 정도를 측정하기 위한 척도로 3문항으로 구성되어 있으며 자기보고식 척도이다.

○ 심박동변이(Heart rate variability, HRV)

교감, 부교감 신경 활성 상태를 객관적으로 측정하기 위하여 HRV를 측정하였다. HRV가 클수록 스트레스와 주변 상황에 더 잘 적응해 나가는 항상성 능력이 큼을 의미한다. 측정하기 위한 기기는 아이엠바이오사의 canopy 9 RSA를 사용하였다.

HRV 검사에 대한 결과 수치는 다음과 같다.

- HR: heart rate
- SDNN: standard deviation of the NN intervals
- RMSDD: root mean square of successive difference
- pNN50: count divided by the total number of all NN intervals
- NN50: Number of pairs of adjacent NN intervals differing by more than 50 ms in the entire recording
- TP: total frequency power
- LF: low-frequency power
- HF: high- frequency power
- LFHF: ratio LF/HF
- Norm LF: normalized low- frequency
- Norm HF: normalized high - frequency

○ Cortisol

스트레스와 관련된 생체지표로 활용하기 위해서 타액을 통해 cortisol 수준을 측정하였다.

타액 수집 방법은 아래와 같다.

- 타액은 깨어나자마자 1회 시행한 후, 30분 후 1회, 1시간 후 1회, 잠들기 전에 1회 총 4회 타액을 채취하여 각각의 정해진 샘플용기에 모음.
- 타액 샘플을 모으기 10분 전부터 양치를 금하고 음주나 흡연 및 음식 섭취를 삼가하고 타액을 모아야 함.
- 타액 샘플은 냉장실에 보관하도록 하였고 타액 샘플 수거는 최대한 24시간 내에 할 수 있도록 하였음.

Cortisol 수준의 분석 방법은 아래와 같다.

- Awakening response (ACR); 기상 직후 첫 코티솔의 농도와 두 번째 (15~60분 사이) 코티솔의 농도 차이를 보는 방법
- Recovery; 코티솔은 하루 중 시간이 지남에 따라 그 농도가 점점 감소하게 되는데

저녁때 측정된 수치와 아침에 측정된 가장 높은 수치의 차이를 보는 방법

○ BDNF와 VEGF

최근 연구들에 따르면 스트레스 수준에 따라 BDNF와 VEGF 수치의 변화가 있다는 연구들이 있다. 본 연구에서도 본 건강기능식품의 복용에 따른 BDNF와 VEGF 수치의 변화를 살펴보았다.

○ 면역 기능

본 연구에서는 스트레스 상황에서 면역기능의 변화가 생긴다는 그 동안의 연구 보고에 따라 쥐오줌풀을 섭취 시에 스트레스에 의한 면역 기능의 회복이 일어나는 지를 알아보았다. 이와 관련하여 다음의 수치들을 측정하고 비교하여 보았다.

- Granulocytes/Total(%)
- CD14+ : monocyte
- CD16+ CD14- & CD15+ CD16+ neutrophil
- CD161 CD15- : unknown
- Lymphocytes /Total(%)
- CD4+ : helper T cell 종류
- CD8+ : cytotoxic T cell 종류

○ 뇌파

뇌파는 64채널로 구성된 HydroCel Geodesic Sensor Net (Electrical Geodesics, Inc.(EGI), USA)를 이용하여 측정하였다. 대상자를 10분 이상 안락의자에서 안정조건을 유지 후, 눈 감은 안정조건과 눈 뜬 안정조건에서 각각 3분간 뇌파를 기록하였다. 전극저항은 $10k\Omega$ 이하가 되도록 하며, 양 외안부와 좌안의 상하에 전극을 붙여 안구운동에 따른 전도를 측정하였다.

기록된 뇌파의 Artifact와 잡음은 Neuroguide 2.3.5 software (Applied Neuroscience, Inc., St. Petersburg, FL, USA)를 이용하여 제거하였다. 또한 프로그램으로 제거되지 않는 artifact 들은 눈으로 직접 보면서 제거하였다. 디지털 뇌파 신호는 Fast Fourier Transform (FFT) 알고리즘을 이용하여 theta (4-8 Hz), alpha (8-12Hz), beta (12-25 Hz) 그리고 high-beta (25-30 Hz) 등 각 밴드의 power를 계산했다. 또한 Neuroguide 프로그램을 이용하여 alpha coherence 를 산출하였다. 본 결과분석에는 표준화된 데이터를 토대로 나이와 성별을 맞추어 산출된 Z-score를 사용하였다.

○ Micro array로 분석한 유전자 발현 조사

건강기능식품의 복용에 따른 유전자 발현의 변화를 알아보기 위해서 Micro array로 분석을 해보았다. 스트레스와 관련성이 있다고 알려진 아래 4군의 gene system의 발현을 관찰하였다.

- UPP-related genes (ubiquitin)
- Ribosomal genes

- Stress-related and heat shock genes
- Immunity-associated genes

④ 기능성 시험에 사용되는 건강기능식품 배분방법

임상시험에 사용되는 건강기능식품은 임상시험 계획서에서 제시된 과정에 따라 본 임상시험에 참여한 피험자에게만 투여되었다. 피험자의 임상시험에 사용되는 건강기능식품 배정 및 시험 참여여부를 결정은 사전 방문에서 이루어졌다. 피험자 선정 제외기준을 확인하여 사전 방문에서 임상시험에 사용되는 건강기능식품의 투여가 결정된 피험자는 무작위배정 후 임상시험에 사용되는 건강기능식품을 배정받아 4주간 투여 받았다.

⑤ 병용요법 및 병용금지 약물

시험 참가 당시 이미 받고 있던 치료나 복용하는 건강기능식품 및 시험기간 중 추가되는 치료는 병용요법으로 간주하며, 병용투여 할 필요가 있는 경우에는 투여 내역을 증례기록서와 피험자진료차트에 기록(가급적 일반명 기재)해야 하며 가능한 한 시험기간 중에는 병용요법을 변경하지 않는다. 시험기간 중 병용약물의 투여는 최소화해야 하며 피험자의 복지를 위해 필요하고 또 건강기능식품의 기능성시험 건강기능식품에 영향을 주지 않는다고 판단될 경우에만 건강기능식품의 기능성시험 담당자의 판단에 따라 투여할 수 있다. 즉, 필요한 경우 연구자의 판단에 따라 필요한 약제를 병용투여 할 수 있다. 그러나, 시험기간 중에는 다른 의문사항이 있을 경우는 건강기능식품 기능성시험 모니터와 상의한다. 본 시험의 목적에 위배되지 않는 요법(스텐트 시술)을 시행하는 경우에도 이를 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

(마) 유효성 평가기준, 평가방법, 및 해석방법

① 효과평가기준 및 평가방법

○ 평가대상

- 선정/제외 기준에 따른 환자 선택기준에 적합한 환자.
- 임상시험용의약품을 연속하여 3일분을 초과하여 거르지 않아야 하고, 전체약물 60% 이상을 복용한 환자

○ 유효성 평가변수

유효성 평가변수는 사전(baseline) 평가에서 사후(endpoint) 평가까지의 스트레스 관련 척도, HRV, cortisol 수준의 변화량으로, 본 임상시험에서는 유효성 평가변수가 Placebo보다 우수함을 보이는 것 이다.

② 분석방법

통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 5%로 한다. 변수들에 대하여는 기초상태 (baseline), 최종 평가시점, 그리고 기초상태 에서 최종평가 시점까지의 변화량에 대하여 기술 통계량(피험자 수, 평균, 표준편차, 최소치, 최대값)을 제시한다.

③ 피험자 기초자료

사전 방문에서 측정한 인구통계학적 변수들에 대하여 각 치료군별로 요약하고, 약물 투여군의 비교를 위한 검정을 실시한다. 이를 위해 연속형 자료에 대하여는 Mann-Whitney U 검정, Wilcoxon's 순위합 검정을 이용하여 분석을 실시한다.

(라) 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준, 평가방법 및 보고방법

① 안정성 평가항목

- 이상반응
- 임상 검사치의 비정상적인 변화
- 생체징후

② 안정성 평가 대상 및 평가방법

건강기능식품의 기능성시험에 사용되는 건강기능식품을 한번이라도 투여 받고, 이후 적어도 한번 이상 방문하여 이상반응이나 생체징후 값 또는 임상검사치의 변화 등의 안전성 자료를 평가할 수 있는 피험자를 안전성 평가대상으로 한다.

③ 이상반응의 분류 및 정의

이상반응이란 건강기능식품의 기능성시험 관찰기간 중에 발생한 질환 및 사고를 비롯하여 피험자의 복지를 저해하는 모든 사건을 일컫는다. 또한, 임상적으로 유의하다고 여겨지는 임상 시험실 검사치나 대상 질환 외의 다른 진단결과도 포함 된다. (예를 들어, 계획하지 않은 진단 과정이나 치료가 필요하게 되거나 중도 탈락을 야기하는 사건)

○ 이상반응

건강기능식품의 기능성시험에 사용되는 건강기능식품을 복용한 후 바람직하지 않고 의도되지 않은 증후, 증상 또는 질병을 말한다. 반드시 해당 건강기능식품과 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

○ 이상약물반응

해당 건강기능식품과의 인과관계를 완전히 배제할 수 없는 이상반응

○ 중대한 이상반응/이상약물반응

다음에 해당하는 이상반응/이상약물반응을 말한다.

- 사망
- 생명을 위협하는 경우
- 입원을 요하거나 입원기간을 연장시키는 경우
- 영구적 불구 또는 기능저하를 초래하는 경우
- 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
- 기타 의학적으로 중요한 경우

④ 평가기준

이상반응은 아래와 같이 3단계로 분류하여 평가한다.

- 경증(Mild) = 일상적인 활동을 저해받지 않음
- 중등증(Moderate) = 일상적인 활동을 저해하며, 간단한 처치가 요구됨
- 중증(Severe) = 일상적인 활동을 수행할 수 없으며, 고도의 처치가 요구됨.

⑤ 시험물질과의 인과관계

시험물질과의 인과관계는 아래와 같이 분류하여 평가한다.

- 명확히 관련이 있음
- 관련이 있다고 생각됨.
- 관련이 있을 가능성이 있음.
- 관련이 없다고 생각됨.
- 명확히 관련이 없다고 생각됨.
- 불명

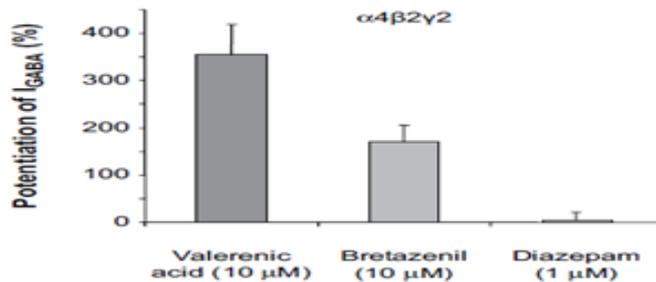
제 2 절 연구수행 결과

1. 항스트레스 효능을 가지는 천연물 유래 추출물 소재 조사 및 스크리닝

가. 원료의 탐색

(1) 쥐오줌풀(Valerian)

쥐오줌풀은 valerian, 쥐오줌풀, 생약명으로 길초근이라고 하며 제주 산간지방 및 전국에 분포하여 자생하고 있다. 쥐오줌풀 뿌리 추출물은 서양에서는 기원전부터 사용한 스트레스 완화제로 알려져 있으며, 해외에서는 이를 사용한 많은 스트레스 완화 제품이 이미 시판 중이며, 스트레스 완화제품 원료 중 큰 비율을 차지하고 있다. 그 예로 미국의 dietary supplements labels database에 등록되어 있는 제품 중 valerian 성분을 포함하는 건강기능식품은 40가지이며, 그중 12가지 제품이 제품명에 valerian으로 사용되고 있다. 쥐오줌풀의 항스트레스에 대한 연구에 의하면 지표성분으로 알려진 valerenic acid는 GABA neurotransmitter system에 관여, GABA receptor인 $\alpha 4\beta 2\gamma 2$ 에서 GABA 흡수 enhancer 역할을 하여 스트레스계를 조절함으로써 알려져 있다. 임상시험자료 조사 결과 약 38건의 시험결과가 파악되며 대부분 불면증에 대한 수면장애에 대한 연구가 보고되었다.



* 출처 : *Neuropharmacology* 56, 174-181, 2009

그림 8. Valerenic Acid의 GABA흡수 enhancer역할 확인.

○ 상세내역

원재료명	쥐오줌풀	
이명	은땡가리, 길초, 바구니나물, Valerian Root	
학명	<i>Valeriana officinalis</i> L.	
생약명	길초근	
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	
	제한적	뿌리
	불가능	
※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.		

English 검색초기화면 프린트



이미지 출처 : BRIC; 작성자: 밤톨아범

1 2

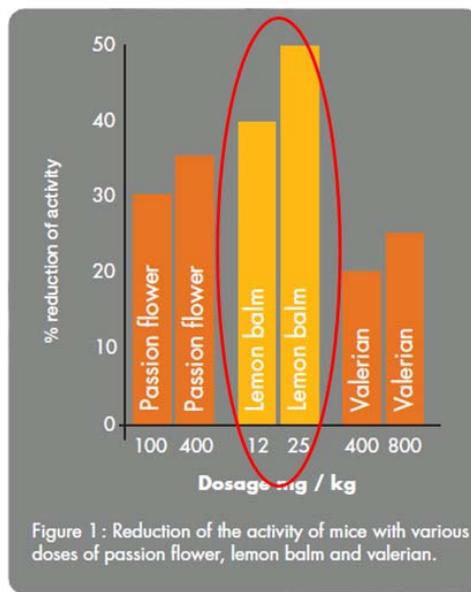
클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

그림 9. 식약처 식품원재료데이터베이스 (쥐오줌풀).

(2) 레몬밤(Lemon Balm)

레몬밤은 지중해 연안에 자생하는 식물로써 최근 웰빙 문화에 의하여 국내에서 허브를 대단위로 재배하는 농장이 늘어나고, 그에 비례해 레몬밤을 대단위로 재배하는 농장이 늘어나고 있는 추세에 있다. 레몬밤은 현재는 대부분 향료 및 차(茶)용으로 활용되어지고 있으며, 미국, 유럽을 중심으로 레몬밤을 활용한 항스트레스 기능식품시장 형성되어 있으나(Dietary supplements labels database에 등록된 제품 중 Lemon Balm성분을 포함하는 기능성식품은 15가지이며, 대부분 스트레스 완화, 숙면 보조용 제품으로 파악됨), 국내에서는 건강기능식품의 용도로 개발이 미흡한 실정이며, 의약품 원료로 1건 사용되어지고 있다.

레몬밤에 대한 항스트레스 연구에서 마우스를 활용한 구속 스트레스 저해율을 확인한 결과 50% 까지 측정됨으로써 스트레스 억제 효능을 확인하였다.



*출처: Natlife, Naturex 출간물

그림 10. 레몬밤 투여에 따른 Mice의 구속스트레스 경감 확인.

○ 상세내역

원재료명	레몬밤	
이명	lemon balm	
학명	<i>Melissa officinalis</i> L.	
생약명		
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	있
	제한적	
	불가능	
※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.		

English [검색초기화면](#) [프린트](#)



이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

그림 11. 식약처 식품원재료데이터베이스 (레몬밤).

(3) 미강(Rice Bran)

미강은 밥을 지었을 때 식감이 좋지 않아 쌀에서 분리를 시키기 때문에 쌀을 도정 시 발생하며, 이는 쌀눈과 쌀겨를 칭한다. 최근 미강에 대한 가치가 부감됨에 따라 식품 첨가물로도 사용되어 지고 있으며, 이의 주요 유효성분으로 Gamma-Aminobutyric acid(GABA) 및 폴리페놀류로 보고되고 있다. GABA는 glutamic acid의 decarboxylase에 의한 글루탐산 (L-glutamic acid, glutamate)의 탈탄산 반응에 의해 생성되며, pyridoxal-5'-phosphate-phosphate dependent 경로로 합성되는 것으로 알려져 있다.

GABA의 효능	
① 뇌세포 대사촉진	: 정신집중력 간화, 기억력 증진, 불면 해소
② 혈압 저하	
③ 혈액중 콜레스테롤이나 중성지방의 증가 억제	
④ 알콜대사 촉진작용	: 숙취제거
⑤ 신장, 간장이나 췌장의 활성화	
⑥ 혈당치의 상승억제	
⑦ 비만방지 작용	
⑧ 체취, 구취, 생리취, 노인취, 노취 등의 소취 효과	
⑨ 감정 장애, 불안장애의 해소	
⑩ 뇌졸중 후유증 개선 작용	
⑪ 대장암 억제 작용	
⑫ 성장 호르몬 분비 촉진 작용	
⑬ 시력회복	
⑭ 피부활성화(검버섯 방지)	

GABA는 동, 식물 등 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산인 γ -아미노낙산은 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 억제계의 신경전달물질로서 신경억제작용과 정신 안정 기능을 가지며 혈압억제작용, 뇌의 대사 촉진 작용 등의 효과를 갖는 기능성 식품소재로서 주목받고 있다. 미국 NIH에서 운영하는 「Dietary supplements labels database」에서 ‘Gamma Amino Butyric Acid’를 함유하는 제품은 180가지이며, 혈행 개선 목적으로 함유한 제품이 대부분을 차지하고 있다. 일본에서는 대학, 기업, 연구기관에서 GABA에 대한 연구가 계속되고(휴식) 효과를 검증하는 연구가 활발하게 진행되어 거대한 시장이 형성되어 있으나, 국내에서는 개별인정의 한계로 인하여 시장이 형성되지 못했으며, 중소기업위주로 진행되어오다가 시장성의 문제로 진전이 없는 상태에 있다. 주요 유효성분인 GABA에 대한 개별인정 1건 있으나, 혈류개선제로 등록이 되어 있으며, 그 외의 GABA에 대한 개별인정 신청은 모두 반려됨, 안정성 데이터의 부족으로 여겨진다. 일본이나 미국의 상황으로 볼 때 국내에 곧 GABA시장이 형성될 것은 사실이며, 따라서 수입제품과 비교하여 경쟁력 있는 국산 개발품을 미리 준비해야 할 것으로 판단되어 스크리닝을 진행하고자 한다.

○ 상세내역

[검색초기화면](#) [프린트](#)

원재료명	쌀	
이명	rice, 미강, 나도근수 (나)稻根鬚), 나미(나)米), 열주 (熱酒), 현미	
학명	<i>Oryza sativa</i> L.(아시아종) <i>Oryza glaberrima</i> Steud(아프리카종)	
생약명	갱미(粳米-씨), 곡아(穀芽), 나도근수(나)稻根鬚-근경, 뿌리)	
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	씨
	제한적	
	불가능	알겨
※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.		



이미지 출처 : 위키피디아-작성사:Green

1 2

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

그림 12. 식약처 식품원재료데이터베이스 (미강).

(4) 발효다시마

발효다시마는 주요 유효성분은 Gamma-Aminobutyricacid(GABA)으로써, 쌀과 함께 GABA공급원으로 부각되고 있다. 생물 내 GABA합성의 주요 전체인 폴리글루탐산이 풍부히 함유되어 있어, 미생물 발효를 통하여 본 폴리글루탐산의 GABA화 진행을 통하여 대량의 GABA제조되고 있는 실정이다.

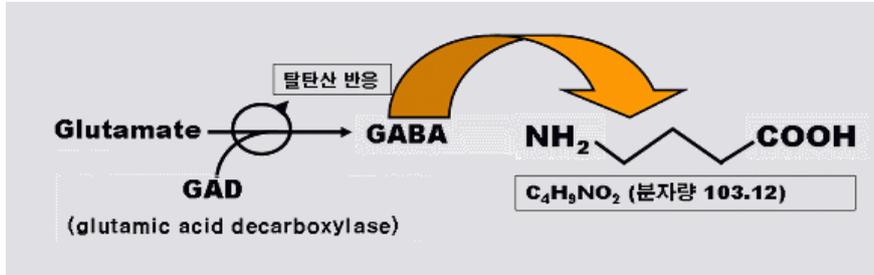


그림 13. 폴리글루탐산의 GABA생성 개요

○ 상세내역

[검색초기화면](#) [프린트](#)

원재료명	다시마 (Japanese kelp, Sea tangle, Kelp, Sea cabbage)	
이명	Laminaria japonica, Kombu(일명), 곤포	
학명	<i>Saccharina japonica</i>	
생약명		
원재료 분류	식물 (수산물)	
식용가능 여부	가능	<input checked="" type="checkbox"/>
	제한적	<input type="checkbox"/>
	불가능	<input type="checkbox"/>
	※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.	



클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

그림 14. 식약처 식품원재료데이터베이스 (다시마).

나. 추출물의 지표성분 분석

분말화된 각 원료에 대하여 지표성분 분석을 시행하였음. 알려진 항 스트레스 관련 지표성분으로 는 쥐오줌풀 추출물은 valerenic acid, 미강추출물 및 발효다시마 추출물은 r-aminobutyric acid, 레몬밤 추출물은 rosmarinic acid으로 확인하였다.

(1) 쥐오줌풀 추출물의 지표성분 분석 및 함량

Valerenic acid 표준품을 이용하여 분석한 결과, retention time이 10분에서 검출이 되었으며, 같은 방법을 통하여 쥐오줌풀 추출물 내에 valerenic acid 성분을 분석한 결과 기타 peak와 함께 valerenic acid과 같은 RT(10 min)에서 검출이 되었다. 3번의 분석을 반복한 결과 0.44%의 함량으로 지표성분이 검출되었으며, 개별인정형원료 신청 시 지표성분으로 분석이 가능할 것으로 판단된다.

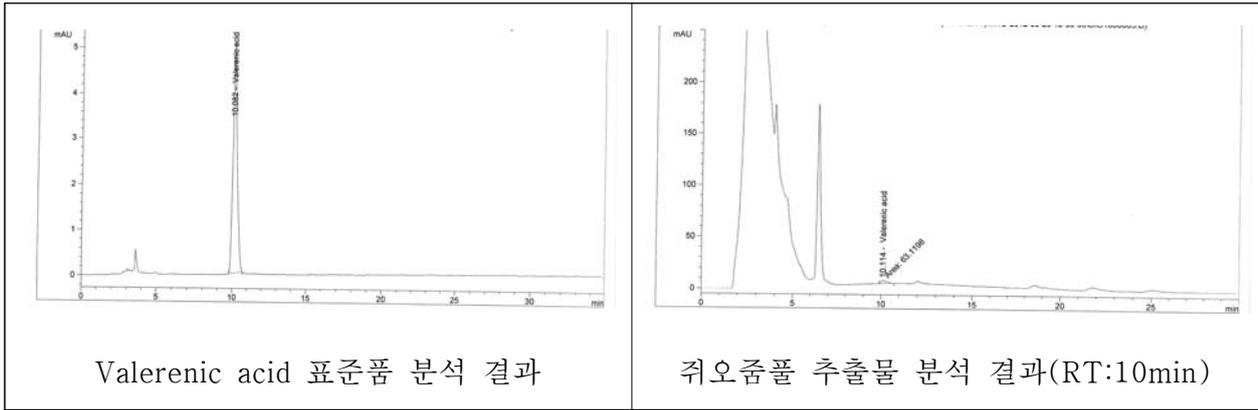


그림 15. 취오즙풀 추출물의 valerenic acid 성분 분석.

표 8. 취오즙풀 추출물의 valerenic acid 함량

분석결과		합량
1차	0.47%	0.44%
2차	0.41%	
3차	0.44%	

(2) 미강 추출물의 지표성분 분석 및 함량

r-Aminobutyric acid 표준품의 retention time은 11 min이었다. 미강 추출물 분석결과 같은 retention time에서 peak가 분리되는 것을 확인. r-aminobutyric acid 함량은 평균 1.04%로 검출되었다.

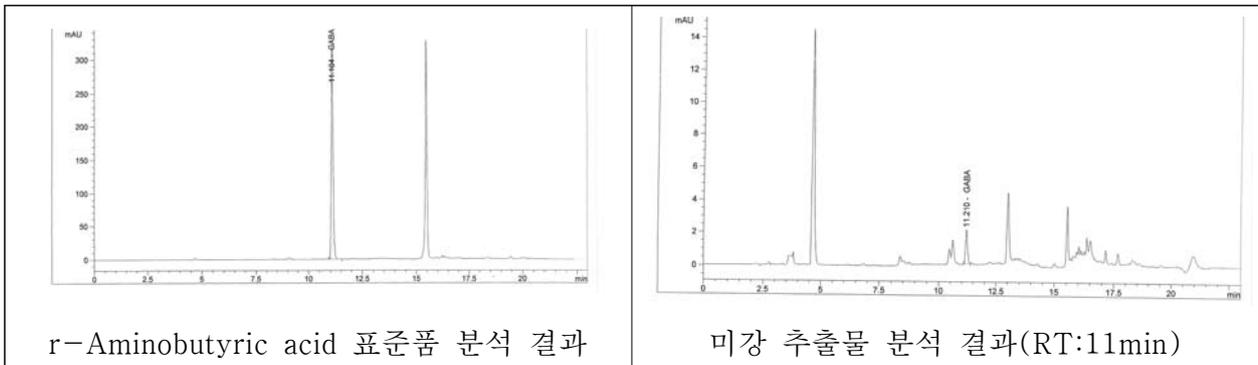


그림 16. 미강 추출물의 r-aminobutric acid 성분 분석.

표 8. 미강 추출물의 r-aminobutric acid 함량

분석결과		합량
1차	1.12%	1.04%
2차	0.98%	
3차	1.02%	

(3) 레몬밤 추출물의 지표성분 분석 및 함량

Rosmarinic acid 표준품의 retention time은 17 min이었으며, 레몬밤 추출물 분석 결과 같은 retention time에서 peak가 분리되는 것을 확인하였다. 레몬밤의 경우 다른 추출물에 비하여 간섭을 줄 수 있는 peak가 적게 검출되었다. rosmarinic acid 함량은 평균 4.43%로 검출되었다.

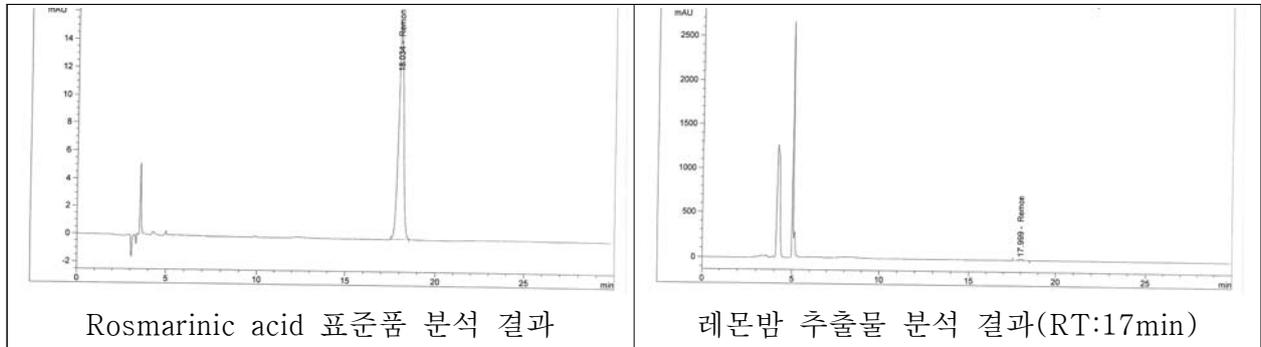


그림 17. 레몬밤 추출물의 rosmarinic acid 성분 분석.

표 9. 레몬밤 추출물의 rosmarinic acid 함량

분석결과		함량
1차	4.35%	4.43%
2차	4.51%	
3차	4.44%	

(4) 발효다시마 추출물의 지표성분 분석 및 함량

r-aminobutyric acid 표준품의 retention time은 11 min이었다. 레몬밤 추출물 분석 결과 같은 retention time에서 peak가 분리되는 것을 확인하였으며, 다른 추출물에 비하여 5.46%로 지표성분의 함량이 높게 검출 되었으나, 간섭을 줄 수 있는 peak가 많이 검출되었다.

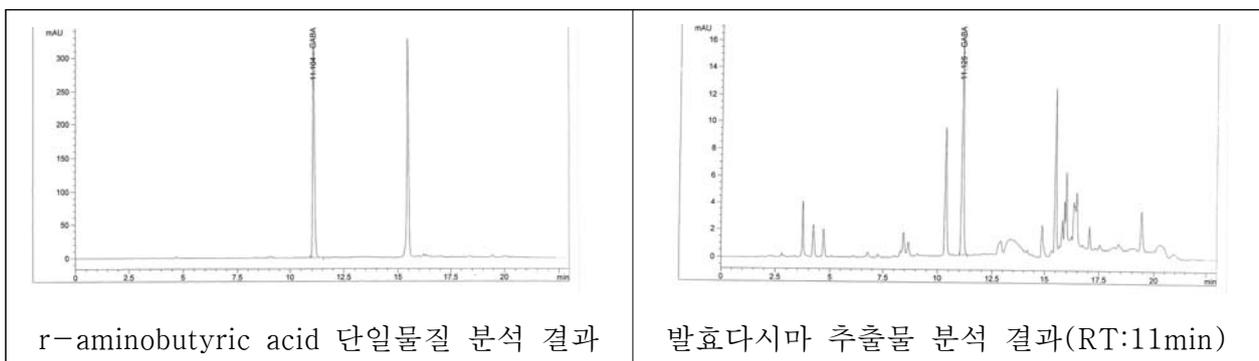


그림 18. 발효다시마 추출물의 r-aminobutyric acid 성분 분석.

표 10. 발효다시마 추출물의 r-aminobutyric acid 함량

분석결과		합량
1차	5.47%	5.46%
2차	5.40%	
3차	5.51%	

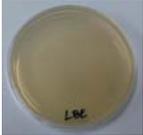
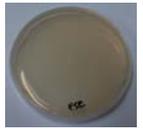
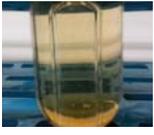
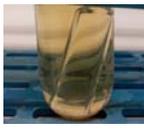
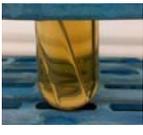
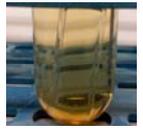
다. 추출물의 안전성 확보

귀오좁풀, 미강, 레몬밤, 발효다시마 추출물은 모두 식용 가능한 원료들임. 이 외에 본 연구를 위해서 분말화 및 구입한 원료들이 미생물 및 중금속등에서 안전한지 확인하였음.

(1) 미생물 안전성 확인

본 시험방법은 식품공전을 따라 시행하였음. 시험결과 일반세균, 효모곰팡이, 대장균군, 바실러스균에 대해 모두 불검출로 확인됨. 본 연구에 사용된 추출물 및 추출방법은 미생물에 대하여 안전하다고 판단됨.

표 11. 소재 원료들의 미생물 안전성 확인

	귀오좁풀 추출물	미강 추출물	레몬밤 추출물	발효다시마 추출물
일반세균				
진균				
대장균군				
바실러스균				

(2) 중금속 안전성 확인

귀오좁풀, 미강, 레몬밤 추출물에서는 별도의 중금속이 확인되지 않았으나, 발효다시마 추출물에서 평균 약 0.243 mg/kg의 비소가 검출되었음. 본 비소량은 식품 기준 1 μ g/kg에 미달되는 수치이며, 완제품의 원료로 사용 되었을 시, 중량대비 비소함량은 극히 미량이지만, 발효다시마 추출물의 제조공정 상에서 비소의 유입경로의 확실한 파악을 하지 못하였음. 때문에 비소의 조정이 불가능하다고 판단되어 이후 발효다시마 추출물의 연구는 중단하였음.

표 12. 소재 원료들의 중금속 안정성 확인

검사 항목	추출물의 종류			
	쥐오줌풀 추출물	미강 추출물	레몬밤 추출물	발효다시마 추출물
수은	—	—	—	—
납	—	—	—	—
비소	—	—	—	0.2423 μ g/Kg

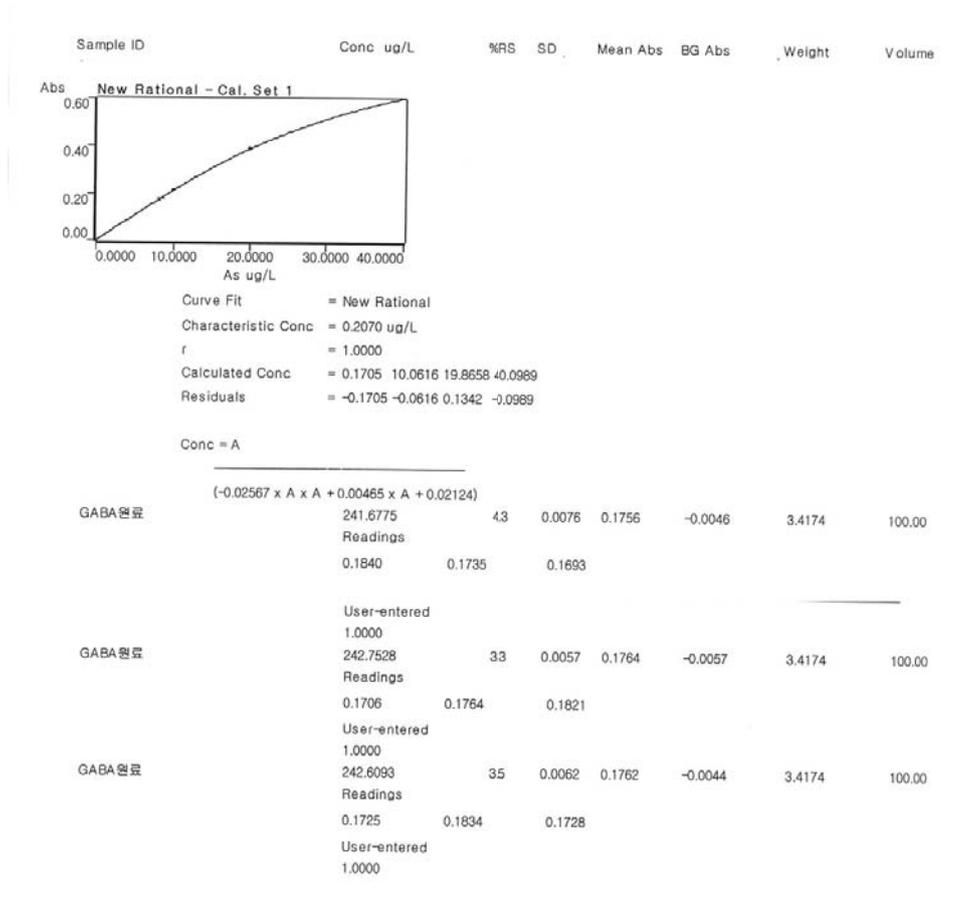


표 13. 발효다시마 추출물의 AA 측정결과

분석결과		평균
1차	0.2416 μ g/kg	0.2423 μ g/kg
2차	0.2427 μ g/kg	
3차	0.2426 μ g/kg	

라. 후보원료의 동물실험을 통한 항스트레스 효능 평가 확인

(1) 동물시험(혈액)을 통한 1차 항 스트레스 효능검증

(가) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 corticosterone의 변화 확인

귀오줌풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 스트레스에 의한 corticosterone level에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. 육체적인 스트레스를 유도한 경우 대조군에 비해 혈중 corticosterone level이 현저하게 증가하였으며, 3배 이상이었다. 귀오줌풀추출물, 레몬밤추출물을 투여한 경우 용매 투여군에 비해 현저하게 corticosterone level이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 미강의 경우 감소는 하였으나 95% 신뢰구간에서 유의성은 확인할 수 없었다(그림. 19).

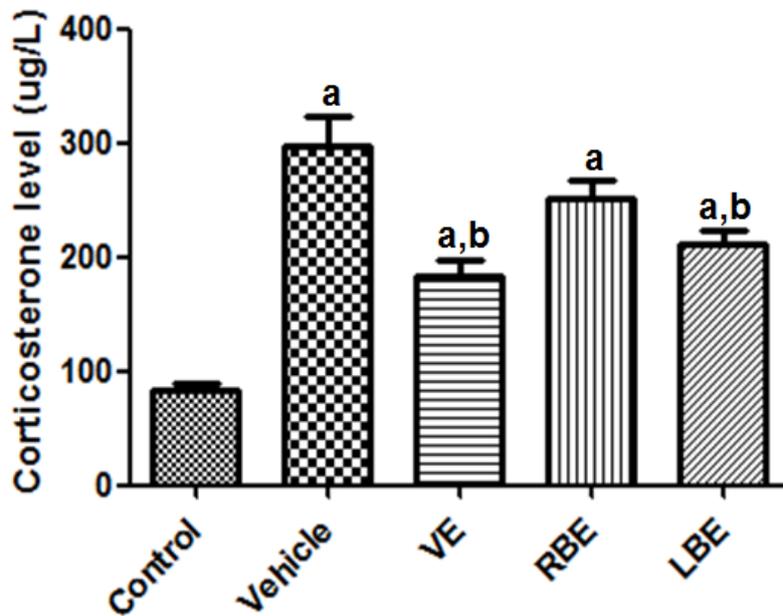


그림 19. Serum corticosterone levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under physical (foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

정신적인 스트레스를 유도한 경우도 대조군에 비해 혈중 corticosterone level이 현저하게 증가하였으나, 정상군의 1.5배 정도여서, 육체적 스트레스 유발군에 비해 corticosterone level이 유의적으로 낮았음. 한편 추출물을 투여한 실험에서 귀오줌풀추출물의 경우만 용매투여군에 비해서 유의적으로 corticosterone level이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 레몬밤추출물 및 미강추출물의 경우 감소는 하였으나 95% 신뢰구간에서 유의성은 확인할 수 없었다 (그림. 20).

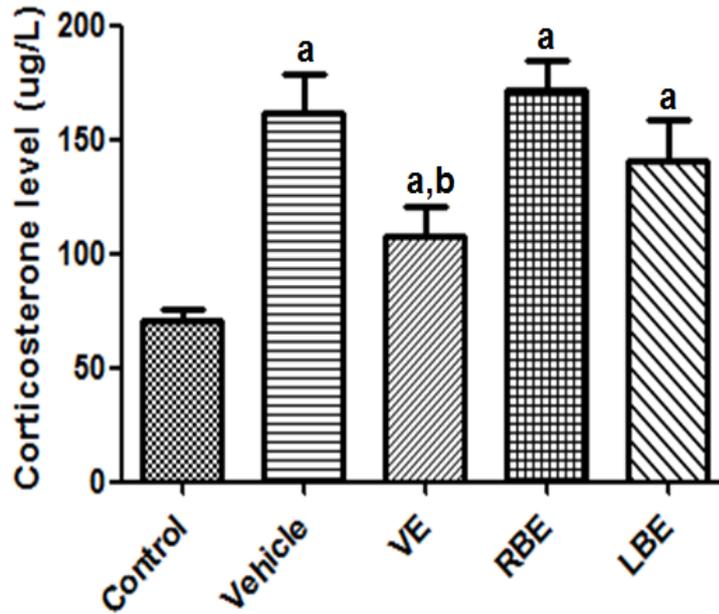


그림 20. Serum corticosterone levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under mental (non-foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(나) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 beta-endorphin의 변화 확인

귀오좁풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 스트레스에 의한 beta-endorphin level에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. 육체적인 스트레스를 유도한 경우 대조군에 비해 혈중 beta-endorphin level이 현저하게 증가하였으며, 정상군에 비해 약 2배 정도의 수치를 나타냈다. 귀오좁풀추출물, 미강추출물 모두에서 용매 투여군에 비해 현저하게 beta-endorphin level이 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 특히 귀오좁풀추출물 및 레몬밤추출물의 경우에는 정상군보다 높긴 하였으나 유의적인 차이를 관찰할 수 없을 정도로 혈중 beta-endorphin을 감소시켰다(그림 21).

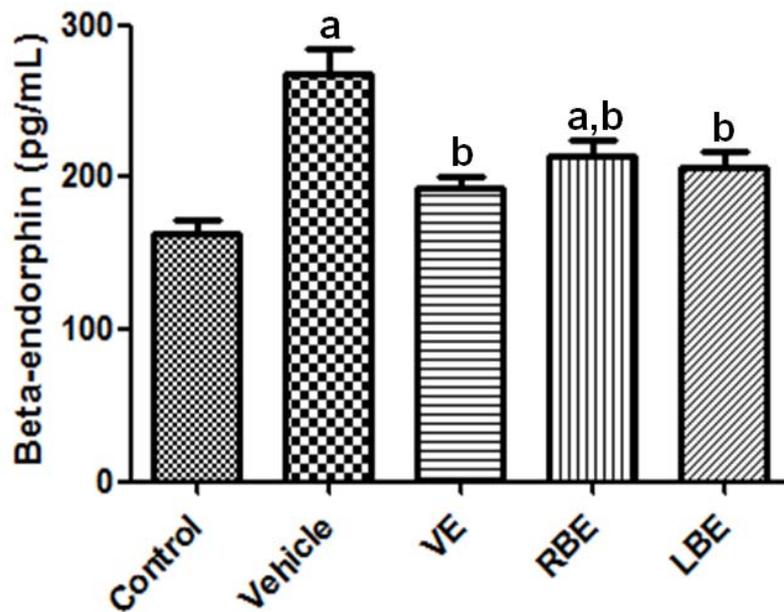


그림 21. Serum beta-endorphin levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under physical (foot shock) stress ($n = 7$ per group; $^aP < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; $^bP < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

정신적인 스트레스를 유도한 경우도 대조군에 비해 혈중 beta-endorphin level이 현저하게 증가하였으며, 육체적 스트레스군과 큰 차이를 관찰할 수 없었음. 한편 추출물을 투여한 실험에서 쥐오줌풀추출물, 레몬밤 추출물의 경우에 용매투여군에 비해서 유의적으로 beta-endorphin level이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물의 경우 용매투여군과 유의적 차이를 나타내지 않았다 (그림 22).

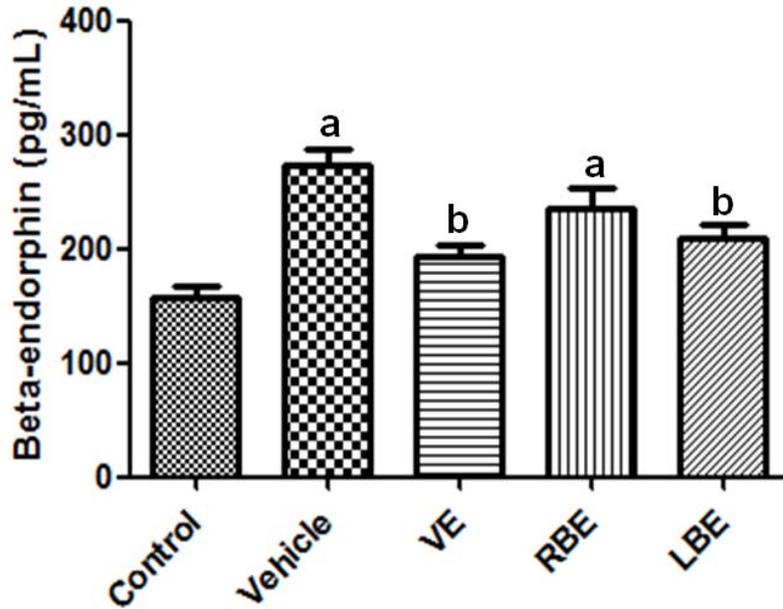


그림 22. Serum beta-endorphin levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under mental (non-foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(다). 스트레스 및 추출물 투여에 의한 ACTH의 변화 확인

쥐오줌풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 스트레스에 의해서 corticosterone의 생성 및 beta-endorphin 생성을 조절한다고 알려져 있는 ACTH level에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. 육체적인 스트레스를 유도한 경우 대조군에 비해 혈중 ACTH level이 현저하게 증가하여 대조군의 3배 정도를 나타냈으며, 쥐오줌풀추출물, 레몬밤추출물에서 용매투여군에 비해 현저하게 ACTH level이 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 미강추출물의 경우 ACTH를 저하시키는 거의 없는 것을 확인할 수 있었다(그림 22).

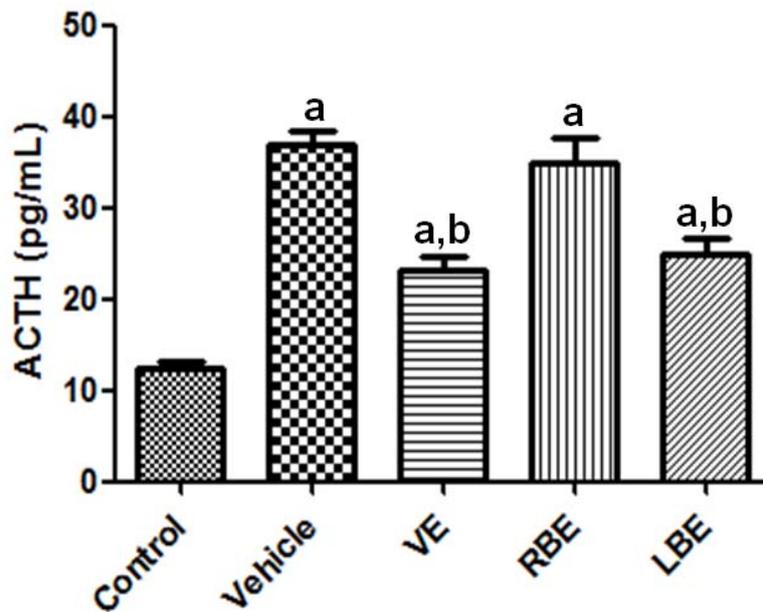


그림 22. Serum ACTH levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under physical (foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

귀오즙추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 정신적 스트레스의 유도시에 corticosterone의 생성 및 beta-endorphin 생성을 조절한다고 알려져 있는 ACTH level에 어떠한 영향을 주는지 확인하였음. 정신적 스트레스를 유도한 경우 대조군에 비해 혈중 ACTH level이 현저하게 증가하였으나, 육체적 스트레스에 비교하여 증가가 다소 적은 것을 확인할 수 있었다. 귀오즙추출물 투여군의 경우 용매투여군에 비해 현저하게 ACTH level이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 미강추출물 및 레몬밤추출물의 경우 스트레스에 의한 ACTH의 증가를 저하시키는 기능이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다 (그림 23).

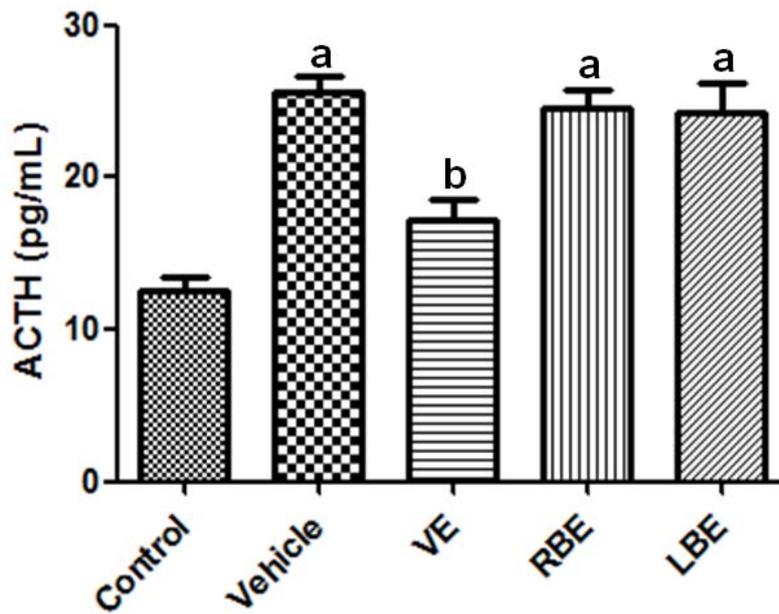


그림 23. Serum ACTH levels in the control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under mental (non-foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(2) 동물시험(조직 및 기관 분석)을 통한 1차 항 스트레스 효능검증

(가) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 gastric output의 변화 확인

귀오즙추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 스트레스의 가장 일반적인 임상증상인 위의 pH 및 gastric output에 영향을 미치는지 확인하였다. 육체적인 스트레스 (FS)를 유도한 경우 대조군에 비해 gastric output을 현저하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 감소는 귀오즙추출물 (VE), 레몬밤추출물 투여군 (LBE)에서 유의적으로 만회하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물에서는 용매투여군에 비해서 증가하는 하나, 유의적이지는 않음을 확인할 수 있었다 (그림 24).

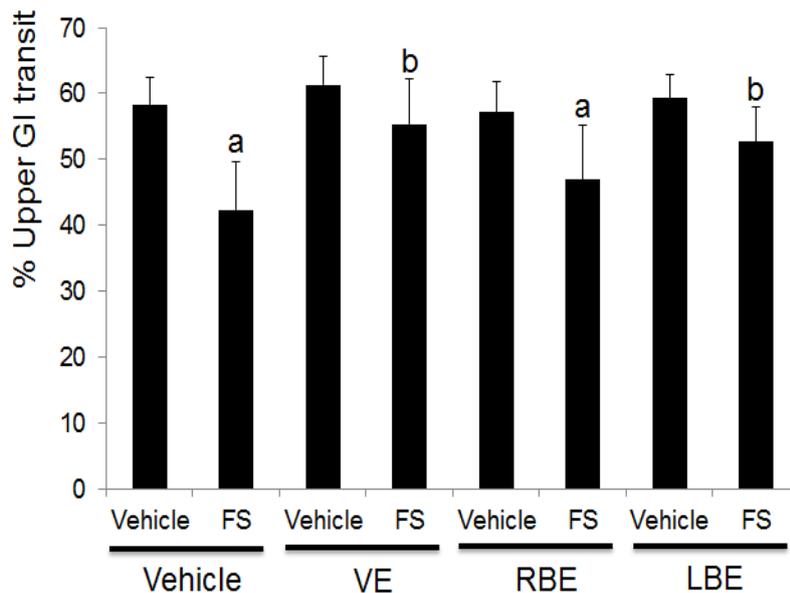


그림 24. Percentages of upper gastrointestinal (GI) output under normal (vehicle) or 2 h after foot shock (FS) stress. Upper GI transit is significantly slower in FS group in vehicle-treated group. However, upper GI transit is significantly restored in VE or LBE-treated group. Bar represents the SD. a, significantly different from vehicle (control) group; b, significantly different from vehicle-treated group.

한편 정신적 스트레스(NFS)를 유도한 경우에는 대조군에 비해 용매 투여군에서 gastric output이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 감소폭은 육체적 스트레스 군에 비해 더 큰 것을 확인할 수 있었음. 이러한 감소는 육체적 스트레스와 유사하게 쥐오줌풀추출물(VE), 레몬밤추출물 투여군(LBE)에서 유의적으로 만회하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물에서는 큰 효과가 관찰되지 않았다 (그림 25).

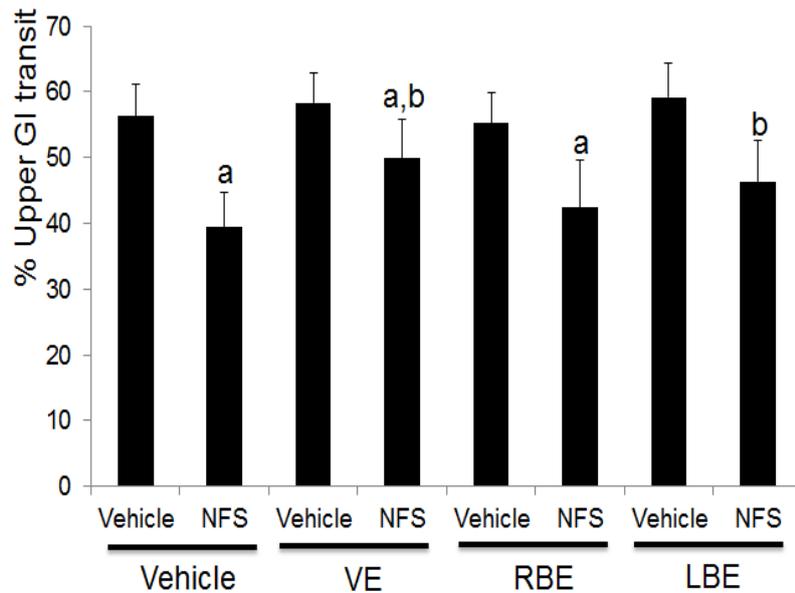


그림 25. Percentages of upper gastrointestinal (GI) output under normal (vehicle) or 2 h after non-foot shock (NFS) stress. Upper GI transit is significantly slower in FS group in vehicle-treated group. However, upper GI transit is significantly restored in VE or LBE-treated group. Bar represents the SD. a, significantly different from vehicle (control) group; b, significantly different from vehicle-treated group.

(나) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 MHPG-SO₄ 변화 확인

귀오줌풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 뇌의 부위인 해마 및 편도체에서 norepinephrine의 대사산물로 알려진 MHPG-SO₄ 변화를 확인하였다. 육체적스트레스 유발군의 경우 대조군에 비해 약 4배 정도 MHPG-SO₄ 증가를 확인할 수 있었으며, 귀오줌풀 추출물(VE), 레몬밤추출물(LBE)를 투여한 경우 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서 레몬밤추출물이 가장 큰 효능을 보였다 (그림 26).

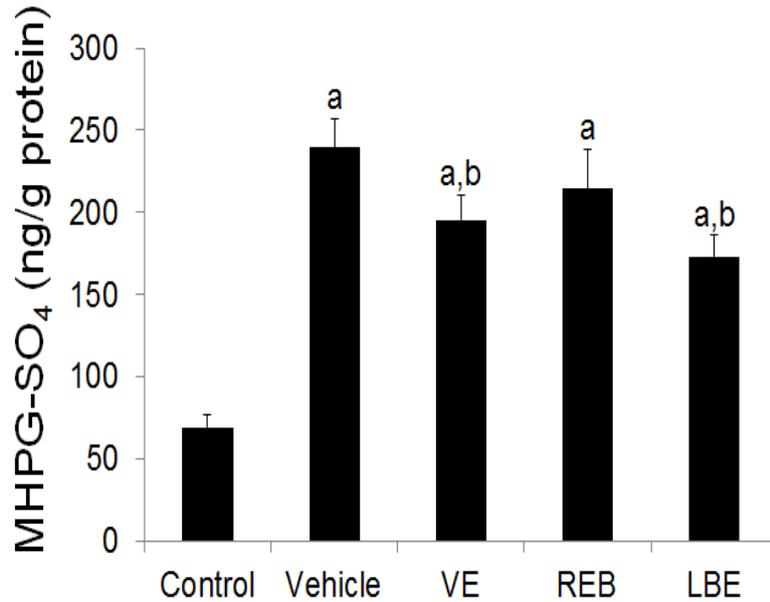


그림 26. MHPG-SO₄ levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VE, REB, and LBE groups under physical (foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^aP < 0.05, indicating a significant difference compared to the control group; ^bP < 0.05, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

한편 정신적 스트레스를 유발하는 경우에도 대조군에 비해 유의적으로 MHPG-SO₄가 증가하였으며, 대조군에 비해 2.3배 정도의 증가를 보여, 육체적 스트레스가 MHPG-SO₄의 농도를 더욱 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 한편 추출물을 투여한 경우 쥐오줌풀추출물 및 레몬밤추출물이 유의적으로 MHPG-SO₄의 농도를 감소시킴을 확인할 수 있었다 (그림 27). 그러나 미강추출물의 경우에는 용매투여군 보다 오히려 약간 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

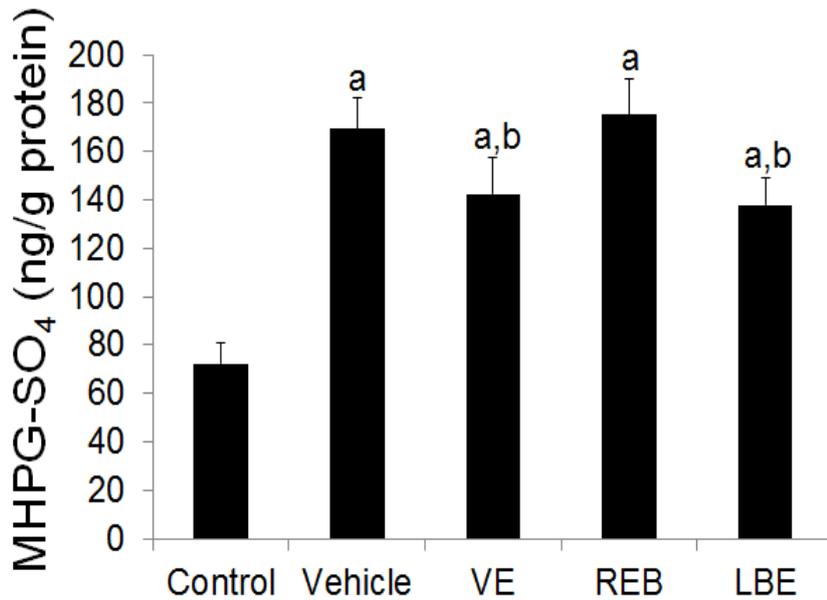


그림 27. MHPG-SO₄ levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under mental (non-foot shock) stress (n = 7 per group; ^aP < 0.05, indicating a significant difference compared to the control group; ^bP < 0.05, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(다) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 세포분화 변화 확인

스트레스가 뇌의 부위인 해마에서 신경세포재생에 매우 민감하게 작용을 하기 때문에 스트레스 시에 쥐오줌풀추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물이 해마에서 신경세포 재생에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 세포분화의 표지자인 Ki67에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 육체적인 스트레스의 유도는 Ki67에 염색된 세포수를 현저하게 저하시키는 것을 확인할 수 있었다. 한편 쥐오줌풀 추출물을 투여한 경우 Ki67에 염색된 세포수가 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물 및 레몬밤추출물의 경우에는 용매투여군에 비해 Ki67에 염색된 세포수가 다수 관찰되었으나, 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다 (그림 28).

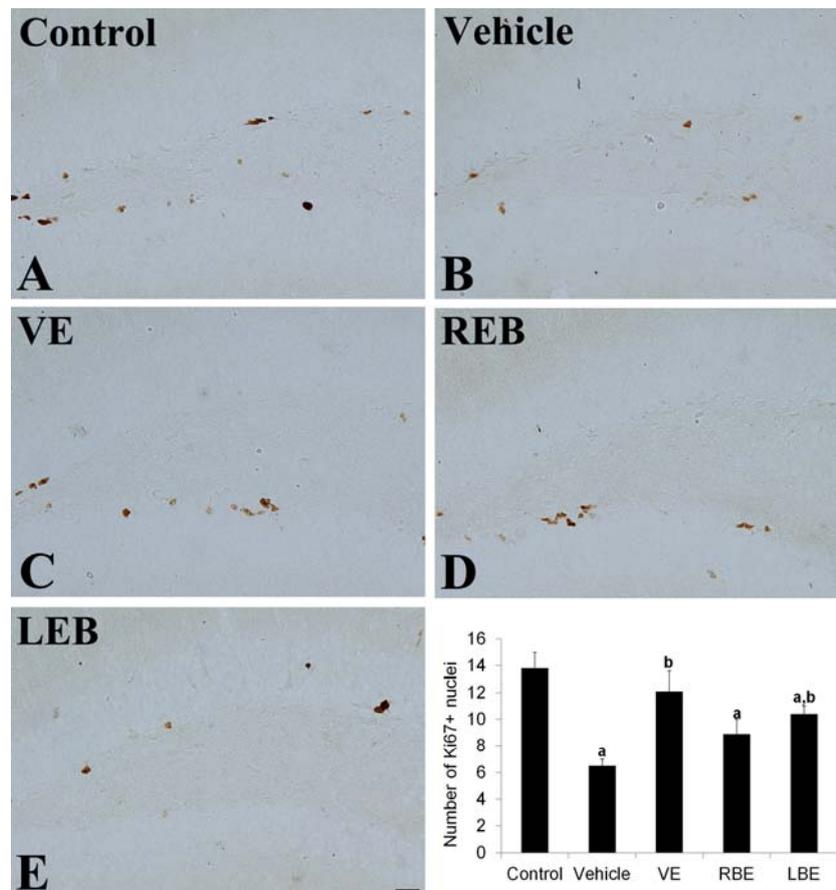


그림 28. Ki67 immunohistochemistry in the hippocampal dentate gyrus of control (A), vehicle (B), VE (C), RBE (D), and LBE (E) groups under physical (foot shock) stress. Ki67 positive nuclei are detected in the subgranular zone of dentate gyrus between granule cell layer (GCL) and polymorphic layer (PL) of dentate gyrus. The number of Ki67 positive nuclei is significantly different between groups ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

육체적인 스트레스와 유사하게 정신적 스트레스도 Ki67에 염색된 세포수를 현저하게 저하시키는 것을 확인할 수 있었음. 한편 쥐오줌풀 추출물을 투여한 경우 Ki67에 염색된 세포수가 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물 및 레몬밤추출물의 경우에는 용매투여군에 비해 Ki67에 염색된 세포수가 다수 관찰되었으나, 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다 (그림 29).

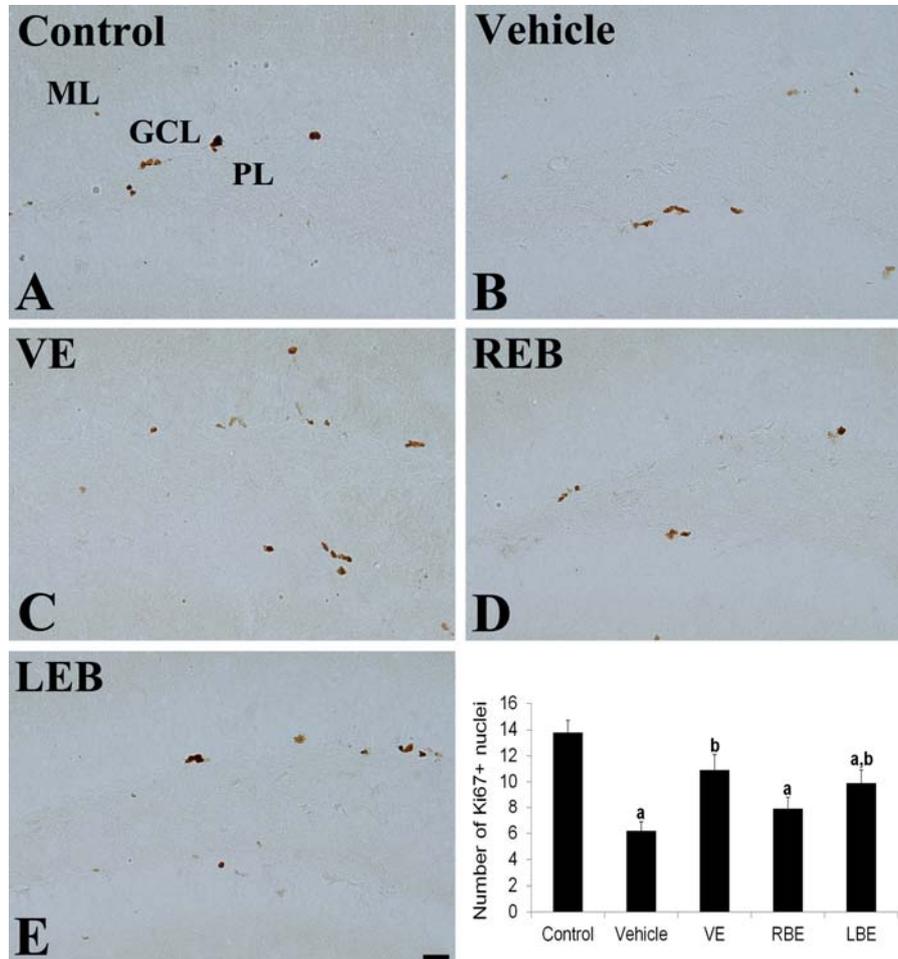


그림 29. Ki67 immunohistochemistry in the hippocampal dentate gyrus of control (A), vehicle (B), VE (C), RBE (D), and LBE (E) groups under mental (non-foot shock) stress. Ki67 positive nuclei are detected in the subgranular zone of dentate gyrus between granule cell layer (GCL) and polymorphic layer (PL) of dentate gyrus. The number of Ki67 positive nuclei is significantly different between groups ($n = 7$ per group; $^aP < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; $^bP < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(라) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 serotonin 변화 확인

육체적인 스트레스와 정신적 스트레스가 최근 우울증과 관련이 깊다고 알려진 serotonin에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, serotonin의 양을 HPLC를 이용하여 해마 균질액에서 측정하였음. Serotonin은 대사되어 5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA)로 대사되며, 본 연구에서는 serotonin 및 HIAA를 측정하였다. 육체적 스트레스를 가한 동물에서 serotonin은 유의적 변화를 나타내지 않았으며, 쥐오줌풀 추출물, 미강추출물 및 레몬밤추출물을 투여한 군의 경우 serotonin의 농도가 약간 상승한 것을 확인할 수 있었다. 이와 반면에 HIAA는 육체적 스트레스를 가한 군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 쥐오줌풀 추출물 및 레몬밤 추출물을 투여한 군의 경우 HIAA 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물의 경우 유의적인 감소는 확인할 수 없었다 (Fig. 7).

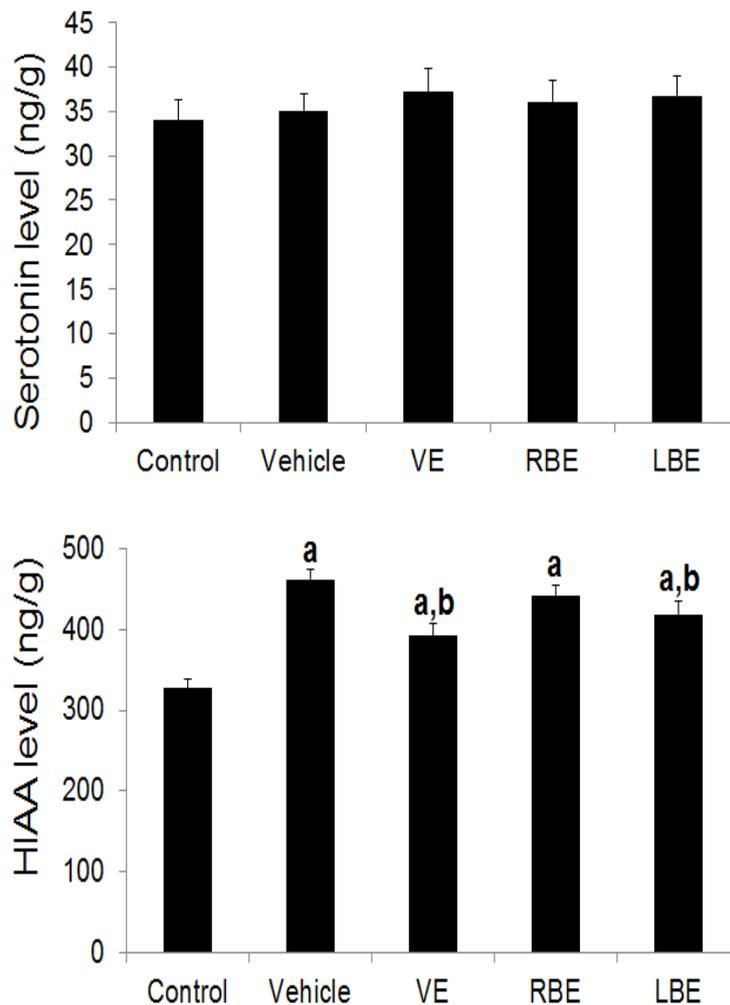


그림 30. Serotonin and HIAA levels in the hippocampus of control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under physical (foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

정신적 스트레스를 가한 동물에서는 육체적 스트레스를 유발한 경우와는 다른 패턴을 보였다. Serotonin은 정신적 스트레스를 가한 후에 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으나, 유의적이지는 않았다. 쥐오줌풀 추출물 및 레몬밤추출물을 투여한 군의 경우 serotonin의 농도가 상승한 것을 확인할 수 있었다. HIAA는 정신적 스트레스를 가한 군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 쥐오줌풀 추출물 및 레몬밤 추출물을 투여한 군의 경우 HIAA 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미강추출물의 경우 유의적인 감소는 확인할 수 없었다 (그림 31).

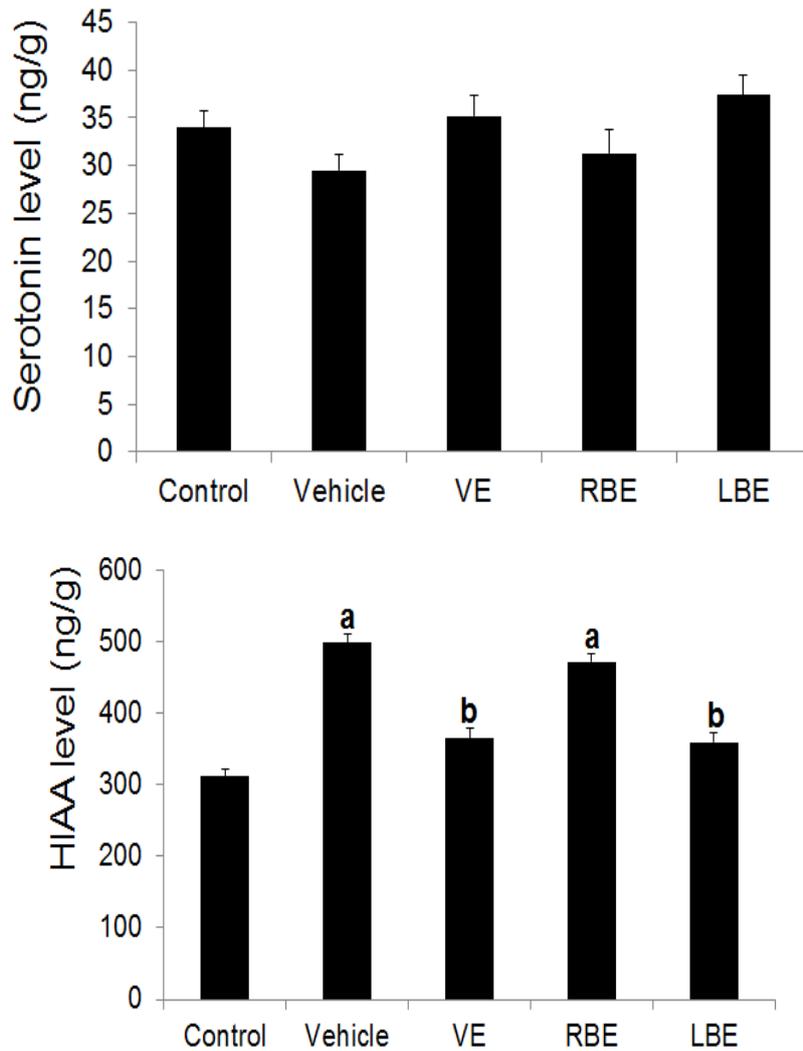


그림 31. Serotonin and HIAA levels in the hippocampus of control, vehicle, VE, RBE, and LBE groups under mental (non-foot shock) stress ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(3) 쥐오줌풀 및 레몬밤 추출물에 대하여 지표성분의 항스트레스 유효 효능 검증

(가) 스트레스 및 지표성분 (VA, RA)의 투여를 통한 gastric output의 변화 확인

1차년도에서 가장 효능이 좋다고 인정된 쥐오줌풀(길초근) 추출물의 지표성분 Valerenic Acid(VA) 및 레몬밤 추출물의 지표성분 Rosmarinic Acid (RA)를 선정하여, 스트레스에 의한 gastric output에 어떠한 영향이 있는지를 확인하기 위하여, 화합물을 3주간 투여하면서 마지막 3일 동안 foot shock을 이용해 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스를 유발하였다. 스트레스는 0.3 mA로 10초간 2분 간격으로 1시간 동안 실시하였다. 그 결과 육체적인 스트레스(foot-shock stress; FS)를 유도한 경우 정상 용매군에 비해 gastric output을 현저하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. VA 투여군의 경우 gastric output이 용매 투여군에 비해 유의적으로 감소하였으나, RA 투여군에서는 유의성을 확인할 수 없었으며, 정상군에 비해서는 유의적으로 감소된 상태로 관찰되었다 (그림 31).

한편 정신적 스트레스(non-foot-shock stress; NFS)를 유도한 경우에는 용매 투여군에 비해 정신적 스트레스군(NFS)에서 gastric output이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 감소폭은 육체적 스트레스 군에 비해 더 큰 것을 확인할 수 있었다. VA, RA 등을 투여한 경우 gastric output이 현저하게 개선되는 것을 확인할 수 있었으며, 육체적 스트레스군보다 개선 폭이 더 큰 것을 확인할 수 있었다 (그림 31).

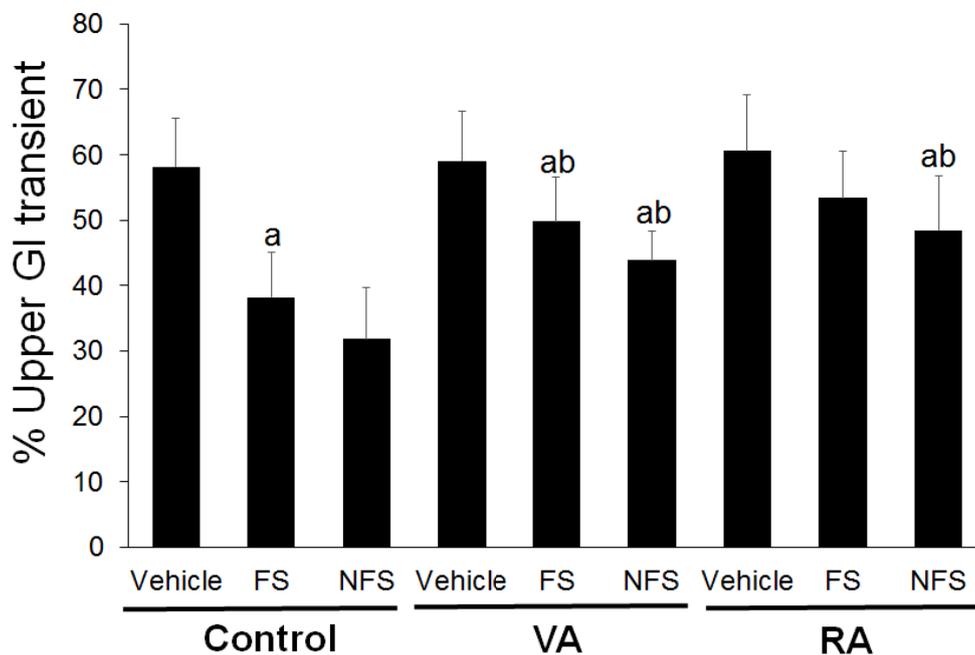


그림 31. Percentages of upper gastrointestinal (GI) output under control (vehicle), 2 h after foot shock (FS) or non-foot shock (NFS) stress for 3 days. Upper GI transit is significantly slower in FS group in vehicle-treated group. However, upper GI transit is significantly ameliorated in VA- or RA-treated group. Bar represents the SE. ^a $P < 0.05$, significantly different from vehicle group; ^b $P < 0.05$, significantly different from control-FS group.

(나) 스트레스 및 지표성분(VA, RA)의 투여에 의한 norepinephrine, MHPG-SO₄ 변화 확인

1차년도 실험에서 효능물질로 알려진 쥐오줌풀(길초근) 추출물 및 레몬밤 추출물의 지표성분인 VA, RA가 스트레스와 밀접하게 연관되어 있다고 알려진 해마 및 편도체에서 norepinephrine과 그 대사산물로 알려진 MHPG-SO₄에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 육체적 스트레스 유발군과 정신적 스트레스 유발군 모두에서 norepinephrine level이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 육체적 스트레스 유발보다는 정신적 스트레스 유발군에서 norepinephrine level이 조금 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 VA, RA 투여군에서는 norepinephrine level의 감소가 유의적으로 완화되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 효과는 RA 투여군에서 보다는 VA 투여군에서 보다 현저하였다 (그림 32).

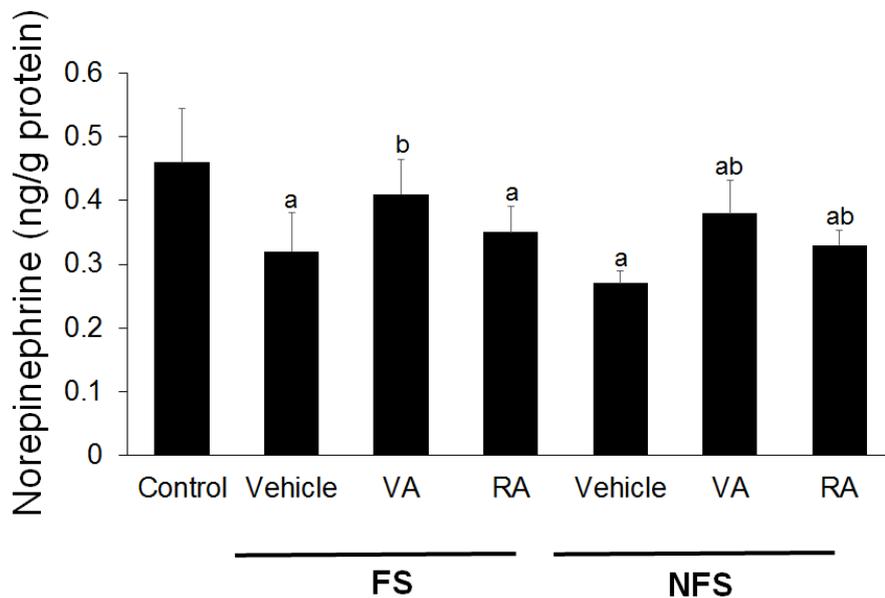


그림 32. Norepinephrine levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VA, and RA groups under physical (foot shock) and mental (non-foot shock) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

육체적 스트레스 유발군의 경우 대조군에 비해 해마에서 MHPG-SO₄가 4.3배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. VA 및 RA 투여군 모두에서 유의적인 MHPG-SO₄가 관찰되었으며, VA에 비해 RA의 효능이 더 높은 것으로 관찰되었다. 그러나 정신적 스트레스 유발군의 경우 대조군에 비해 MHPG-SO₄가 2.4배 증가하였으며, VA 투여군의 경우 MHPG-SO₄가 유의적으로 감소하였으며, RA 투여군의 경우 감소하는 패턴을 관찰할 수 있었으나, 유의성은 확인할 수 없었다 (그림 33).

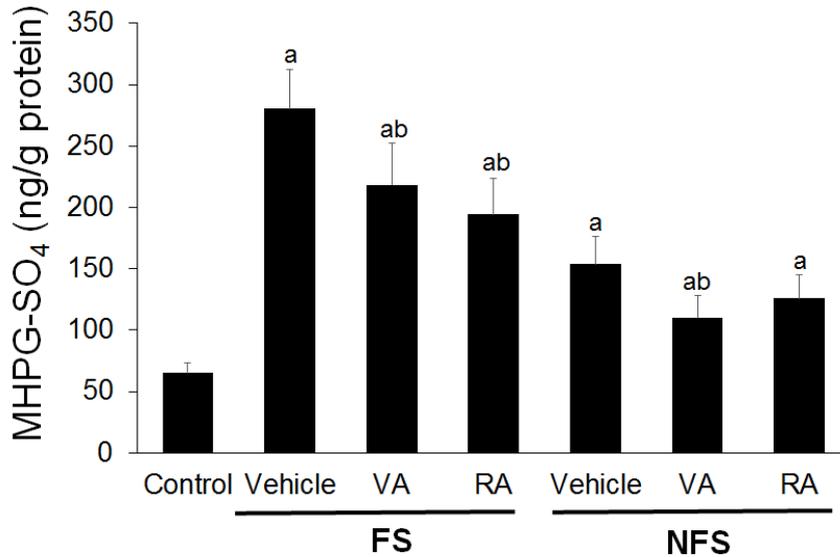


그림 33. MHPG-SO₄ levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VA, and RA groups under physical (foot shock) and mental (non-foot shock) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(다) 스트레스 및 지표성분 투여에 의한 세포분화 및 신경모세포 변화 확인

신경세포재생은 스트레스와 연관된 매우 중요한 지표 중 하나이므로, 스트레스 유도과 지표성분 VA, RA의 투여가 해마에서 신경세포 재생에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 세포분화의 표지자인 Ki67에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다. 대조군의 경우 subgranular zone에 국한되어 Ki67에 염색된 세포가 관찰되었으며, 세포들은 cluster를 이루며 관찰되었다. 또한 대조군에서 Ki67에 염색된 세포는 섹션당 평균 16.7개가 관찰되었다. 육체적 스트레스 유도군 및 정신적 스트레스 유도군 모두에서 급격한 Ki67에 염색된 세포의 감소를 보였으며, 대조군에서 관찰되던 cluster의 형태도 관찰되지 않았다. Ki67에 염색된 세포수는 육체적 스트레스 유도군에서 섹션당 평균 7.4개, 정신적 스트레스 유도군에서는 6.3개가 관찰되어 정신적 스트레스에 의한 세포 분화 감소가 더 현저하였다. 한편 VA 및 RA 투여군의 경우 육체적 스트레스나 정신적 스트레스를 유발하여도, Ki67에 염색된 세포가 급격하게 감소하지 않는 것을 확인할 수 있었다. Ki67에 염색된 세포는 대조군과 유사하게 관찰되었으나, RA투여 후에 정신적 스트레스를 유도한 군의 경우 Ki67에 염색된 세포가 VA투여군보다 적게 관찰되어 세포분화의 입장에서는 VA가 RA보다 효능이 좋은 것을 확인할 수 있었다 (그림 34).

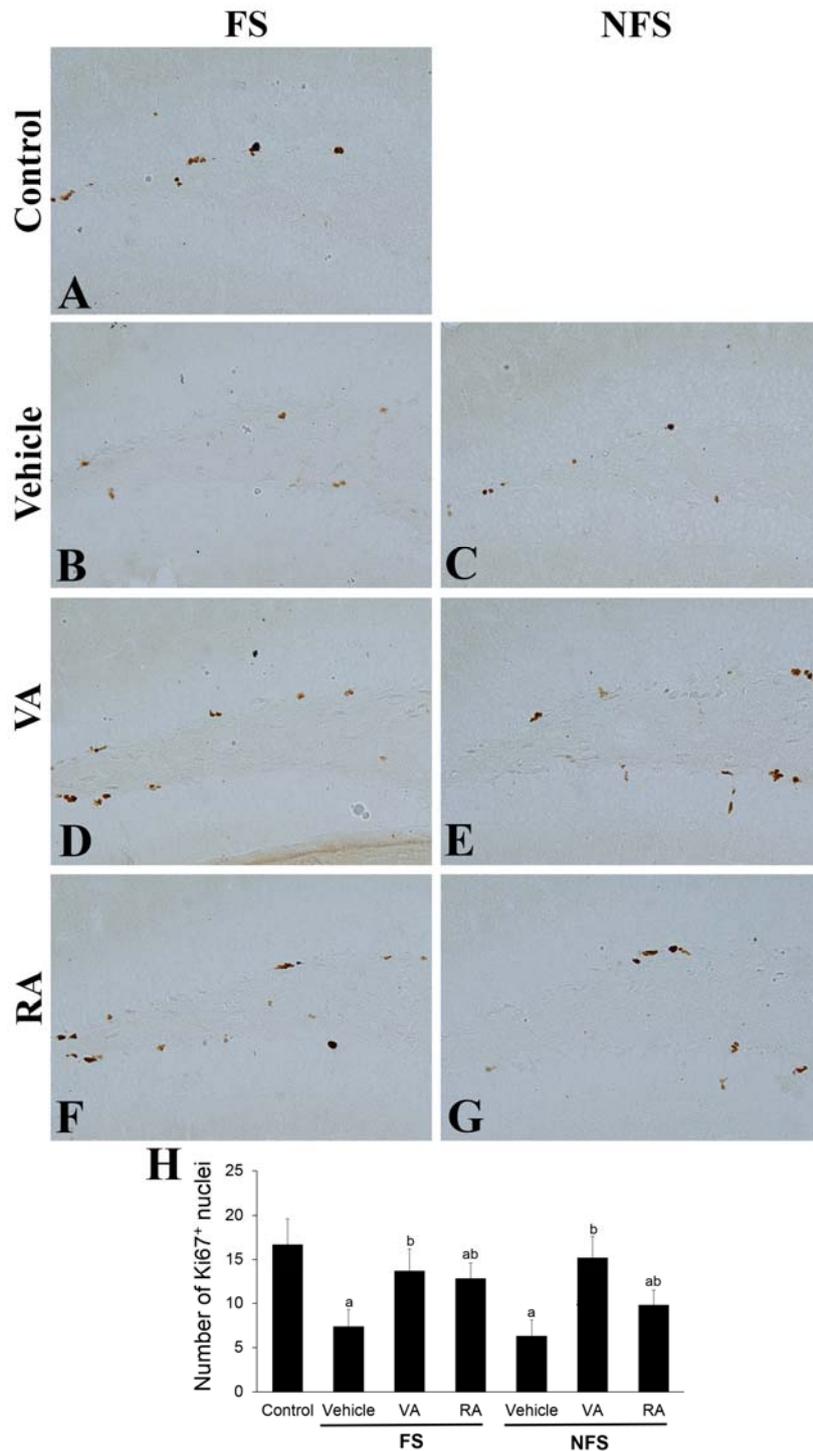


그림 34. Ki67 immunohistochemistry in the hippocampal dentate gyrus of control (A), vehicle (B, C), VA (D, E), and RA (F, G) groups under physical (foot shock; FS) and metal (non-foot shock; NFS) stress. Ki67 positive nuclei are detected in the subgranular zone of dentate gyrus between granule cell layer (GCL) and polymorphic layer (PL) of dentate gyrus. The number of Ki67 positive nuclei is significantly different between groups ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SEM.

신경세포재생과 관련하여 분화하고 있는 신경모세포에 스트레스 및 VA, RA의 투여가 어떠한

영향을 미치는지 확인하기 위하여 분화하는 신경모세포의 표지자로 알려진 doublecortin (DCX)에 대하여 면역조직화학염색을 실시하였음. 대조군의 경우 subgranular zone에 신경모세포의 신경세포체가 관찰되었으며, 돌기(process)는 molecular layer 쪽으로 투사되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 대조군에서 Ki67에 염색된 세포는 섹션당 평균 72.6개가 관찰되었다. 육체적 스트레스 유도군 및 정신적 스트레스 유도군 모두에서 DCX에 염색된 신경모세포의 감소를 확인할 수 있었으며, 신경돌기의 감소도 확인할 수 있었다. 또한 DCX에 염색된 세포모세포수는 육체적 스트레스 유도군에서 섹션당 평균 42.1개, 정신적 스트레스 유도군에서는 35.7개가 관찰되어 정신적 스트레스에 의한 세포 분화 감소가 더 현저하였다. 한편 VA 및 RA 투여군의 경우 육체적 스트레스나 정신적 스트레스를 유발하여도, DCX에 염색된 신경모세포수가 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, VA가 RA군에서의 차이는 관찰되지 않았다 (그림 35).

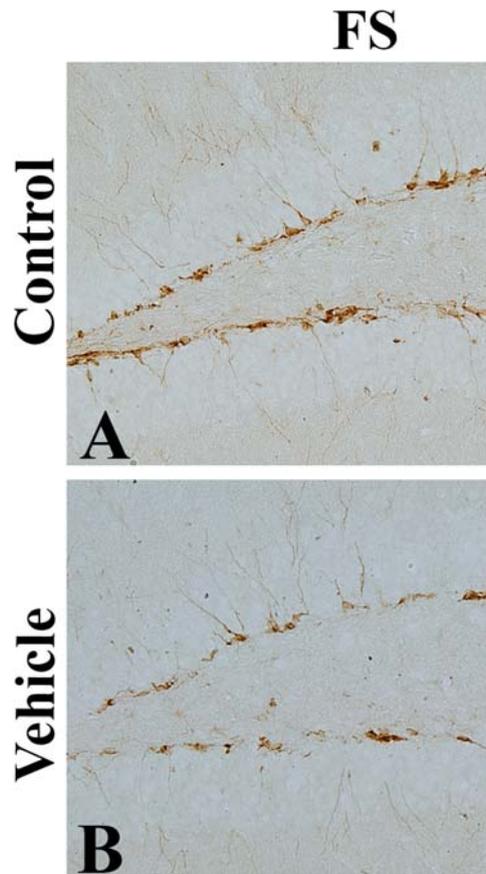


그림 35. DCX immunohistochemistry in the hippocampal dentate gyrus of control (A), vehicle (B, C), VA (D, E), and RA (F, G) groups under physical (foot shock; FS) and metal (non-foot shock; NFS) stress. DCX immunoreactive neuroblasts are detected in the subgranular zone of dentate gyrus between granule cell layer (GCL) and polymorphic layer (PL) of dentate gyrus. The number of DCX positive nuclei is significantly different between groups ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SEM.

(라) 스트레스 및 추출물 투여에 의한 serotonin 및 dopamine 변화 확인

육체적인 스트레스와 정신적 스트레스가 최근 우울증과 관련이 깊다고 알려진 serotonin과 dopamine에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, serotonin 및 대사되는 물질, dopamine의 양을 HPLC를 이용하여 해마 균질액에서 측정하였다. Serotonin은 대사되어 5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA)로 대사되며, 본 연구에서는 serotonin 및 HIAA를 측정하였다. 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스를 유도한 군 모두에서 대조군에 비해 유의적인 serotonin의 변화를 확인할 수 없었다. 그러나 정신적 스트레스 유도군의 경우 정상군에 비해 다소 낮은 serotonin 수치를 나타내었다. VA투여군의 경우 다소 높은 serotonin 수치를 나타냈으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 그러나 RA 투여군의 경우 대조군과 유사하거나 약간 낮은 serotonin level을 나타냈다 (그림 36).

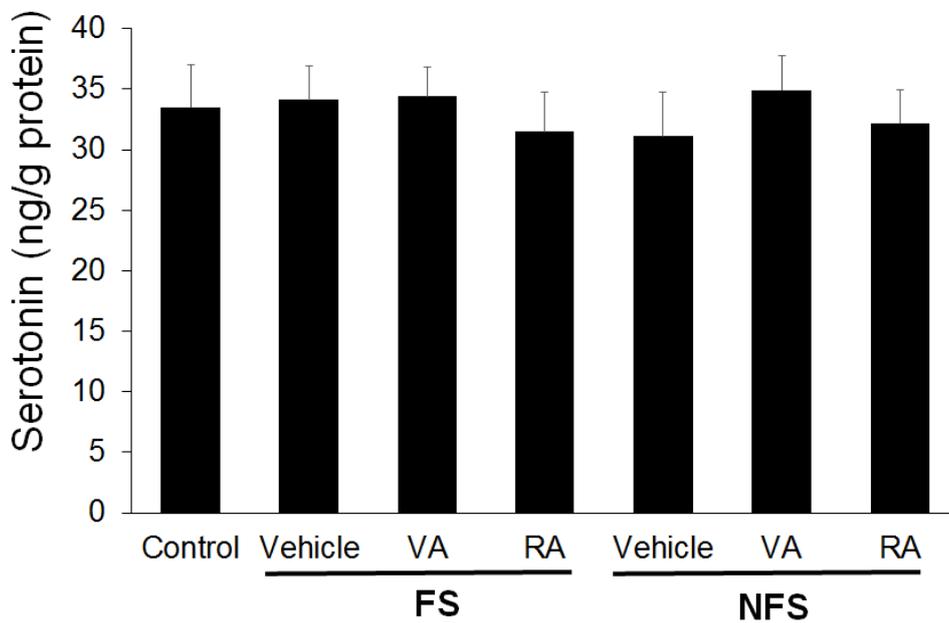


그림 36. Serotonin levels in the hippocampus of control, vehicle, VA, and RA groups under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

반면에 HIAA는 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스를 가한 군에서 대조군에 비해 HIAA level은 유의적으로 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 정신적 스트레스를 가한 군에서 HIAA level이 높게 관찰되었다. 한편 VA투여군의 경우 HIAA level이 현저하게 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 반면에 RA는 HIAA level에 큰 변화가 없었다 (그림 37).

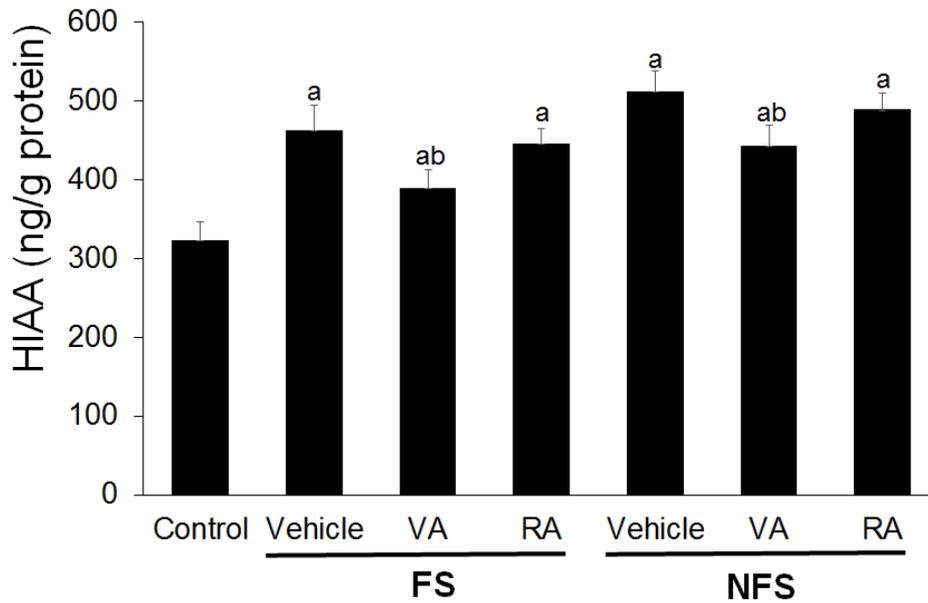


그림 37. HIAA levels in the hippocampus of control, vehicle, VA, and RA groups under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; $^aP < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; $^bP < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

Dopamine의 경우 HIAA와 정반대되는 패턴으로 관찰되었다. 즉, 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스를 가한 군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 VA를 투여한 군의 경우 dopamine level의 감소가 유의적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 효과는 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스군 모두에서 확인되었다. 그러나 RA를 투여한 군의 경우 용매투여군보다 dopamine level이 높게 관찰되었으나, 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었다 (그림 38).

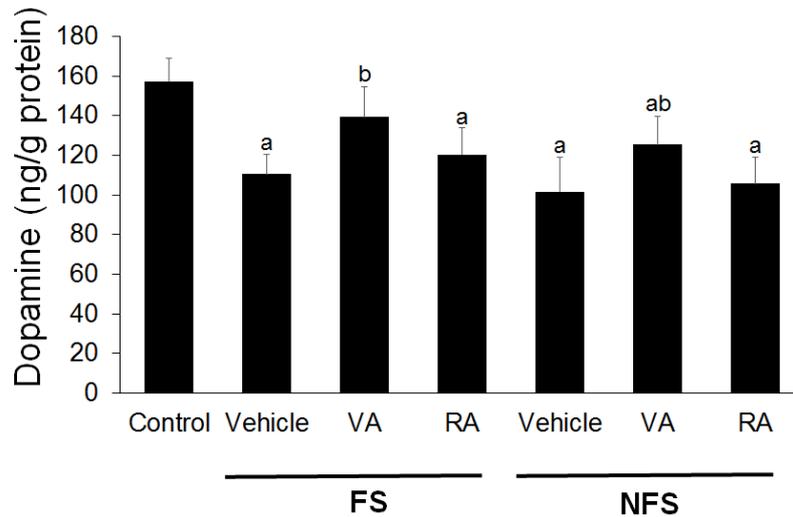


그림 38. Dopamine levels in the hippocampus of control, vehicle, VA, and RA groups under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; $^aP < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; $^bP < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

마. 시제품 개발 및 인체적용시험 샘플 제작

1차년도 연구 결과 및 현재 진행 제1협동연구기관(서울대)에서 진행 중인 연구 진행 사항을 결과로 시제품을 개발하고자 하였다. 이에 쥐오줌풀(길초근)과 미강에 대하여 유의한 효능을 확인하였으며, 쥐오줌풀(길초근) 추출물이 조금 더 효능이 우수함을 확인하였고, 해외 시장 제품 현황을 확인 한 결과, 쥐오줌풀(길초근) 추출물의 제품화가 효능적 및 시장성에서 더 유리할 것으로 판단이 되어 해당 소재에 대한 시제품 개발을 진행 하고자 함.

레몬밤과 쥐오줌풀(길초근)의 소재 사이에서는 쥐오줌풀(길초근)의 시장이 더 높고, 수요가 많음에 대한 증거라고 판단됨. 해당 제품은 식품의약품안전처에 의하여 국내에 해당 효능의 광고, 정식 시판이 되지 못하고 있다. 개발 이후 주관연구기관인(주)네추럴에프앤피에서 생산 및 제품화를 진행 할 예정이므로, 시제품은 (주)네추럴에프앤피에서 개발 및 직접 생산 가능한 제형으로 제한을 두었다. 이에, 연질캡셀, 경질캡셀, 액상, 정제, 분말스틱 제형에 대하여 시제품을 개발하였다.

2. Dietary Ingredient Name: 33 dietary ingredient found containing "valerian" as the dietary ingredient name

- [DRIED VALERIAN ROOT EXTRACT](#)
- [ORGANIC VALERIAN MAIER](#)
- [ORGANIC VALERIAN ROOT](#)
- [ORGANIC VALERIAN ROOT EXTRACT](#)
- [PURE VALERIAN ROOT](#)
- [VALERIAN](#)
- [VALERIAN \(MAIER\) CONCENTRATE](#)
- [VALERIAN \(ROOT\) EXTRACT 4:1](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS L.\) MAIER 10:1 EXTRACT](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS\) 4:1 MAIER EXTRACT](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS\) MAIER EXTRACT 4:1](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS\) MAIER EXTRACT 9:1](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS\) ROOT EXTRACT](#)
- [VALERIAN \(VALERIANA OFFICINALIS\) ROOT EXTRACT 5:1](#)
- [VALERIAN EXTRACT](#)
- [VALERIAN EXTRACT 4:1](#)
- [VALERIAN GLYCERITE](#)
- [VALERIAN HERBAL EXTRACT](#)
- [VALERIAN MAIER](#)
- [VALERIAN MAIER EXTRACT](#)
- [VALERIAN MAIER EXTRACT 4:1](#)
- [VALERIAN MAIER FLUID EXTRACT](#)
- [VALERIAN MAIER POWDER](#)
- [VALERIAN ROOT](#)
- [VALERIAN ROOT EXTRACT](#)
- [VALERIAN ROOT POWDER](#)
- [VALERIAN ROOT POWDER EXTRACT](#)
- [VALERIAN ROOT POWDER EXTRACT 10:1](#)
- [VALERIAN ROOT STANDARDIZED EXTRACT](#)
- [VALERIAN, EXTRACT](#)
- [VALERIANA OFFICINALES](#)
- [VALERIANA OFFICINALIS MAIER EXTRACT](#)
- [VALERIANA OFFICINALIS ROOT EXTRACT](#)

그림 39. 미국 국립보건원(NIH)의 Dietary Supplement Label Database에 등록된 건강기능식품 제품 중 쥐오줌풀(길초근)성분을 함유하고 있는 제품들 :33가지의 관련 성분명이 확인 되며 제품은 198가지가 확인 됨.

(1) 연질 및 경질 캡셀 시제품

연질캡셀의 경우, 쥐오줌풀(길초근) 특유의 냄새를 잡아 주고 목 넘김이 편할 수 있도록 시제품을 만들었다. 연질캡셀 특이 특성 때문에 어린이는 삼키기 힘들었다. 경질 캡셀에서 쥐오줌풀(길초근) 추출물이 새어나와 특유의 냄새가 나지 않도록 해주는 것이 필요하며 섭취 시 충분한 양의 물과 섭취해야 할 필요가 있다. 입자를 곱게 만들었을 시, 캡슐 사이로 빠져나와 특이취가 발생함. 이에 내부에 들어가는 약제를 과립형태를 잡아 입자 사이즈를 크게 하여 캡슐 사이를 빠져나오지 못하도록 하였다.



그림 39. 쥐오줌풀(길초근) 추출물을 이용한 연질캡셀(좌) 및 경질캡셀(우) 시제품.

(2) 분말 시제품

쥐오줌풀(길초근) 분말의 흐름성을 좋게 하기위해 조립을 해주며 분말스틱 형태로 제품화 할 경우 입에 털어 먹는 제품보다는 분말스틱을 물에 타서 마실 수 있게 제품화. 액상제품과 관련하여 제품이 개발되면 유리할 것으로 판단되었다. 단순 분말을 직접적으로 경구 투여함에는 부적절하였다



그림 40. 쥐오줌풀(길초근) 추출물을 이용한 분말스틱 시제품

(3) 액상 및 정제 시제품

액상시제품의 경우 쥐오줌풀(길초근) 특유의 냄새를 줄이기 위해 홍삼과 같은 원료를 첨가하여 쥐오줌풀(길초근) 추출물 액상제품을 거부감 없이 섭취할 수 있도록 제품함. 다만 타 제형과 마찬가지로 특이 취 때문에 액상에 많은 양을 설정하여 희석 형태로 만들어야 거부감이 없다. 액상의 양이 늘어났다. 스트레스와 관련하여 특이 취만 커버된다면 수분섭취와 함께 유리한 제형일 될 수 있을 것으로 판단되나, 향의 직접적 마스킹에 대하여 추가적인 연구가 필요하다. 정제 시제품의 경우 쥐오줌풀(길초근)의 독한 냄새를 제거하기 위한 고분자코팅이 필수적으로 요구되며, 향후 제품 포장 시 PTP 포장을 하여 제품이 깨져 독한 냄새가 나는 것을 방지해야 함. HPMC를 코팅제제로 선택하였다. 하지만 상업적 포장단계(대량생산)을 하였을 시 코팅이 조금만 깨어져도 제형은 유지가 되지만 특이취가 마스킹이 되지 않음. 이에 대하여 당의정 코팅을 고려하였으나, 해외 해당 제품의 형성 가격을 판단하면, 당의정 코팅은 경제성이 없기 때문에 시도를 하지 않았다.

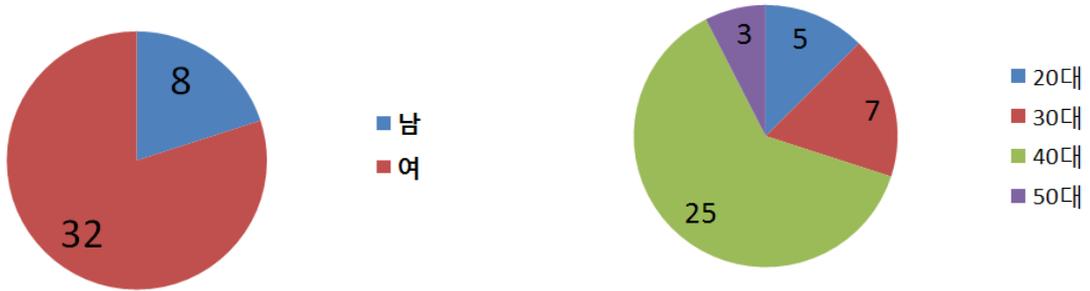


그림 41. 쥐오줌풀(길초근) 추출물을 이용한 액상(왼쪽) 및 정제(오른쪽) 시제품

(4) 시장성(상품성) 평가

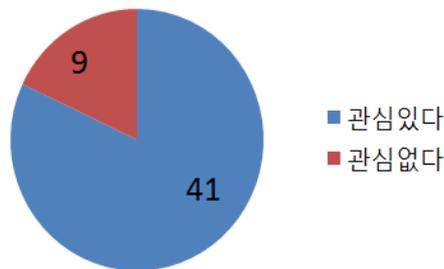
(주)네추럴에프앤피의 사내 직원을 통하여 제품의 제품력을 평가하였음. 평소 다양한 건강기능식품 및 제형을 직접적으로 접하기 때문에 객관적이고 자세한 평을 할 수 있을 것으로 판단되어 수행하였음. 이에 사내 40명의 직원을 무작위로 선정하여 제품력 평가를 위한 제품 및 설문을 수행하였으며 설문지 원본을 보관 중.

- 업체 특성상 여성의 비율이 더 높았으며 40대의 비중이 월등히 높은 상태임
- 업무 스트레스와 직접적인 연관은 힘들겠지만 대부분의 사람에게서 항 스트레스 관련 제품에 대하여 관심을 가지고 있음을 확인하였음.



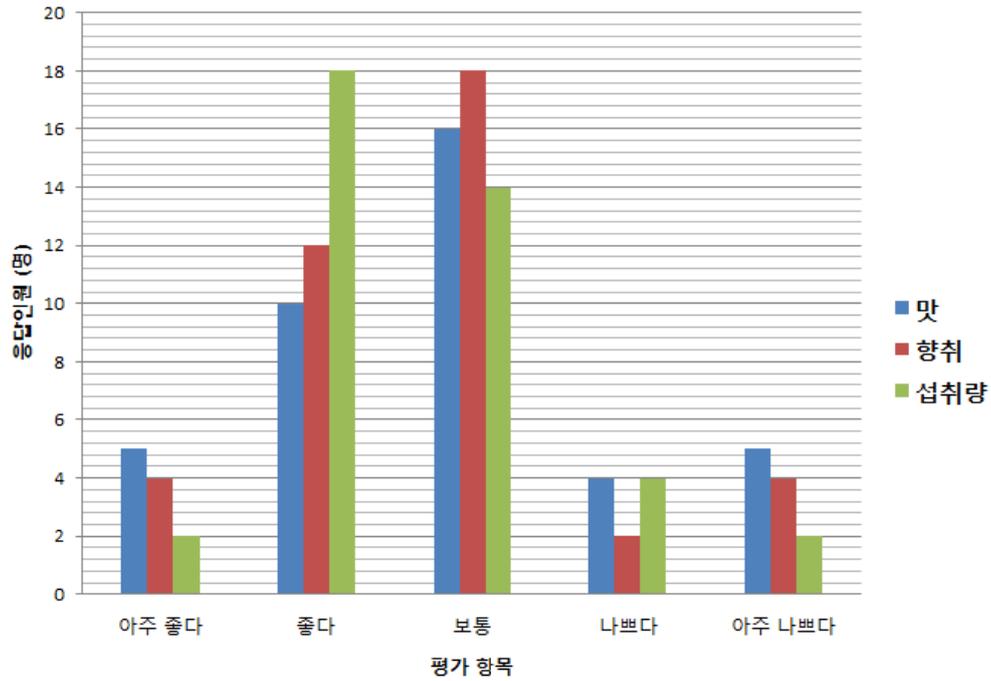
설문지 응답자 성비 구성 비율 (단위 : 명)

설문지 응답자 연령 비율 (단위 : 명)

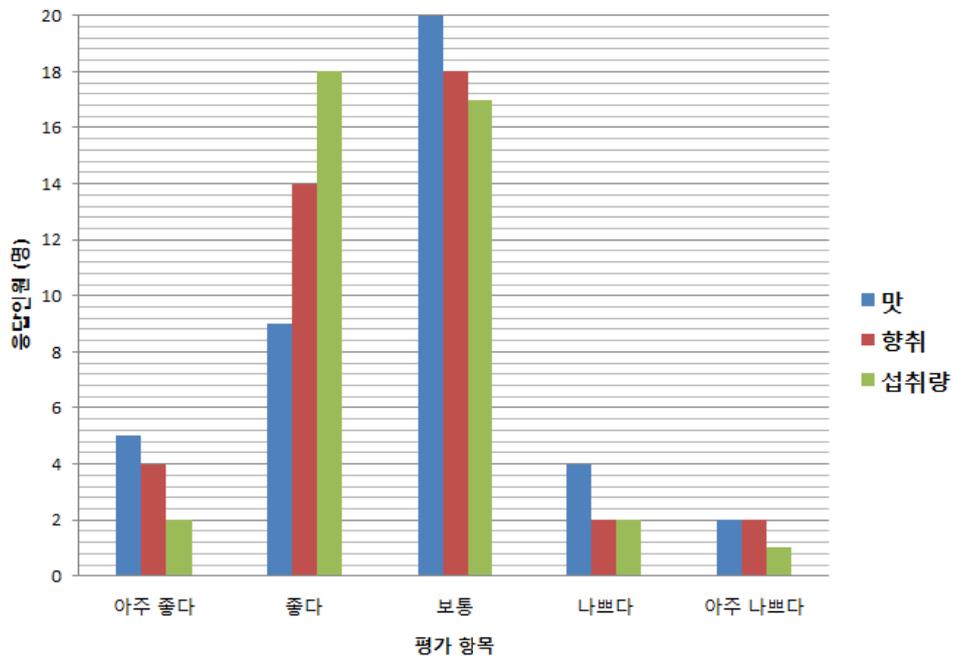


설문지 응답자 항 스트레스 제품 관심비율(단위: 명)

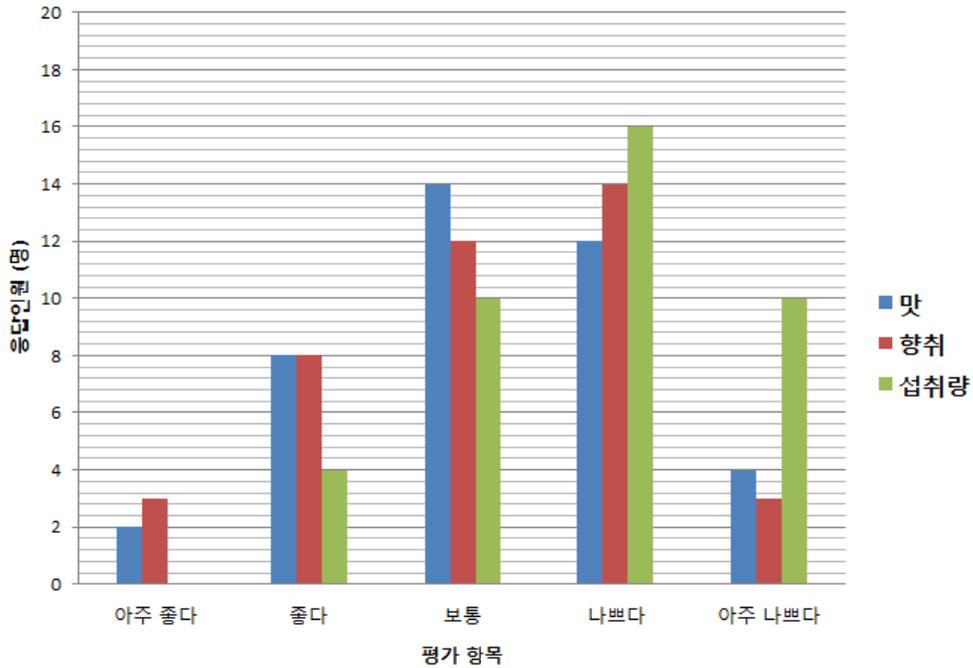
- 맛, 향취 섭취량에 대하여 각 제형별 평가를 시행하였음. 섭취량은 1회 섭취에 대한 양, 불편 등에 대한 평가임.



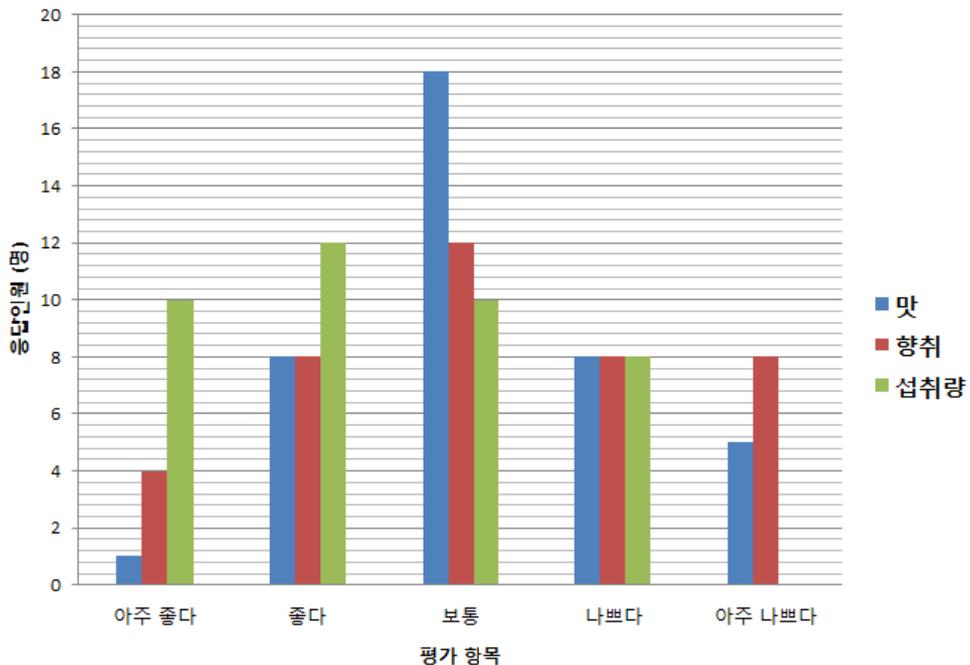
[연질 캡슐]에 대한 사용자 평가 : 일반적으로 무난하다는 평을 받음. 다만 일부 제형이 보관 중, 혹은 입안에서 분해되어 내용 약제가 방출되어 경구투여 시 직접 닿아버리는 경우가 일부 있음.



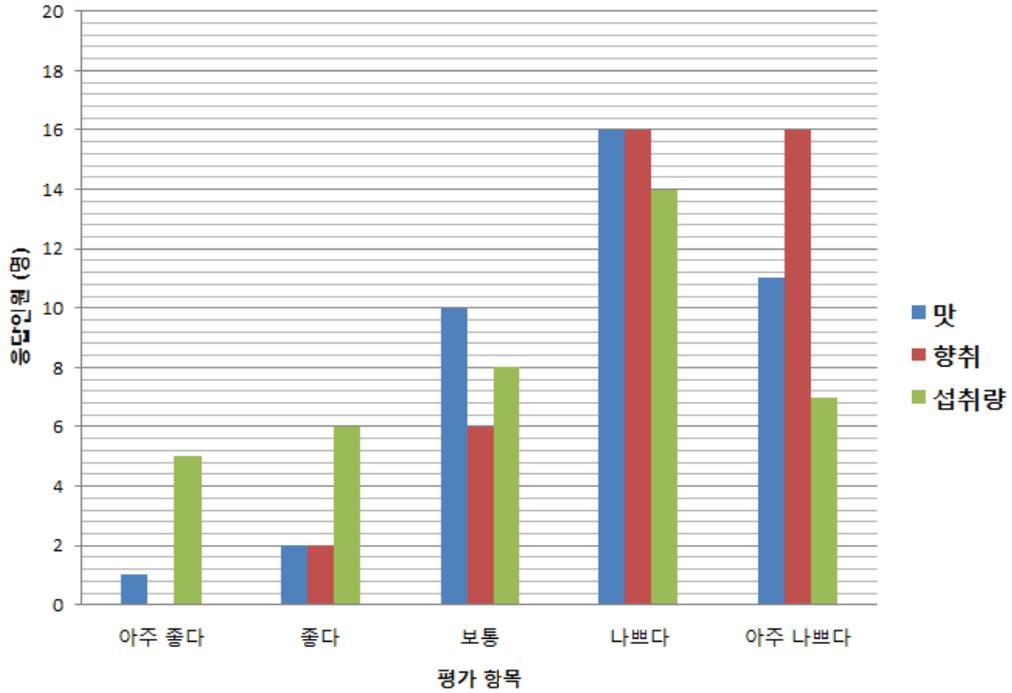
[경질 캡슐]에 대한 사용자 평가 : 원료의 특이 취 및 특이 맛이 대하여 쉽게 마스킹 되었으며, 일상적인 보관 및 섭취 시 안정함을 확인하였음.



[액상제품]에 대한 사용자 평가 : 타 부분보다 섭취량에 대하여 부정적인 견해가 많았음. 향 및 맛을 마스킹 하기 위하여 희석되는 개념으로, 타 제형보다 그 부피가 크기 때문이며, 동시에 완벽한 마스킹이 되지 않아 불쾌감이 높다고 함.



[정제제품]에 대한 사용자 평가 : 시제품 제작과정에서 예상하였던 HPMC코팅의 손상에 의하여 보관 중에 약제가 노출되어 특이 취 및 특이 맛이 발생하였음. 섭취량에 대하여는 압축 제형이기 때문에 부피가 가장 작아 높은 점수를 받았다고 판단됨.



[분말 스틱제품]에 대한 사용자 평가 : 쥐오줌풀(길초근) 추출물이 직접적으로 노출이 되어 있는 제형이기 때문에, 가장 시장성이 낮다고 평가됨. 직접경구투여로서의 제품으로도 시장성이 낮으며, 물에 타먹을 수 있는 제형으로서는 액상제형에 처지므로 사업성이 없다고 판단됨.

(5) 제형의 안정성 평가(유통기한 설정)

상기의 제형 선호도 조사 결과, 경질캡슐 및 정제 제형에 대하여 선호도가 높음을 확인하였음. 정제제형의 경우 차후 제품화에 대한 대량생산에 대한 설비적인 측면에서 유리하기 때문에 제품화 가능성이 매우 높은 제형이라고 평가됨. 하지만 본 연구의 3차년도 진행 예정인 인체적용시험수행을 위한 위약 설계 기능을 비추어 볼 때, 정제 제형은 쥐오줌풀(길초근) 원료의 특이 취 마스크링이 어려운 점이 한계점으로 작용되어, 경질캡슐 제품에 대하여 우선적인 안정성 평가를 수행하기로 하였음.

안정성 시험 일지							
제 품 명	쥐오줌풀 HC001	시험번호	03-LAB-001	제조일자	2013-06-14	포장형태	-
시험 sample 보관조건	온도:25±2°C	시험구분	가속시험	보관조건	적사광선유통과하고 사늘한곳에보관	시험담당자	
시험항목	시험기준	제조직후	1 개월	2 개월	3 개월	원제품	
성 상	백색, 갈색의 혼합 분말	적합	적합	적합	적합		
수 분	10%이하	2	2.1	2.4	2.5		
분 해	20 분이하	13 분 15 초	13 분 21 초	13 분 20 초	13 분 41 초		
납	1.0mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
중비소	1.0mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
카드뮴	0.5mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
중수은	0.5mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
대장균군	음성	불검출	불검출	불검출	불검출		
시 험 일 자		2013.06.17	2013.07.15	2013.08.16	2013.09.20		
판 경		적합	합격	합격	합격		
시 험 자		강수용	강수용	강수용	강수용		

(주)네추럴F&P

그림 42. 상온 (25 ± 2 °C) 3개월 저장안정성 시험

안정성 시험 일지							
제 품 명	쥐오줌풀 HC001	시험번호	03-LAB-002	제조일자	2013-06-14	포장형태	-
시험 sample 보관조건	온도:40±2°C, 습도:75±5%	시험구분	가속시험	보관조건	적사광선유통과하고 사늘한곳에보관	시험담당자	
시험항목	시험기준	제조직후	1 개월	2 개월	3 개월	원제품	
성 상	백색, 갈색의 혼합 분말	적합	적하	적합	적합		
수 분	10%이하	2	2.3	2.5	2.6		
분 해	20 분이하	13 분 17 초	13 분 19 초	13 분 13 초	14 분 00 초		
납	1.0mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
중비소	1.0mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
카드뮴	0.5mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
중수은	0.5mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출	불검출		
대장균군	음성	불검출	불검출	불검출	불검출		
시 험 일 자		2013.06.17	2013.07.15	2013.08.16	2013.09.20		
판 경		적합	합격	합격	합격		
시 험 자		강수용	강수용	강수용	강수용		

(주)네추럴F&P

그림 43. 고온 (50 ± 2 °C) 3개월 저장안정성 가속 시험

바. 시제품의 효능 검증

(1) 스트레스 유도 및 시제품 (Valerian root extract) 및 미국판매 제품(대조군) 투여를 통한 gastric output의 변화 확인

1차년도에서 가장 효능이 좋다고 인정된 쥐오줌풀(길초근) 추출물의 시제품을 주관기관인 (주)네추럴에프앤피에서 제공받아서 실험을 실시하였으며, 미국에서 시판중인 제품과의 비교를 위해서 Spring valley사 valerian root 제품을 구입하여 본 실험을 실시하였음 (그림 44).



그림 44. Valerian extract (commercially available in USA and prototype made by Natural F&P Co. LTD) used in this study.

우선 시제품 및 미국판매 제품이 스트레스에 의한 gastric output에 어떠한 영향이 있는지를 확인하기 위하여, 시제품 또는 미국판매제품을 3주간 매일 100 mg/kg의 용량으로 경구투여를 실시하였다. 투여 마지막 3일 동안에는 foot shock을 이용해 육체적 스트레스(foot-shock stress; FS) 및 정신적 스트레스(non-foot-shock stress; NFS)를 유발하였다. 스트레스는 0.3 mA로 10초간 2분 간격으로 1시간 동안 실시하였음. 그 결과 육체적인 스트레스(foot-shock stress; FS)를 유도한 경우 정상 용매군에 비해 gastric output을 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 본 연구를 위한 시제품과 미국 판매제품 모두 gastric output이 현저하게 개선되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 gastric output의 개선은 육체적 스트레스 군 보다는 정신적 스트레스 군에서 보다 현저하게 관찰되었다. 또한 본 연구의 시제품과 미국에서 판매되는 제품의 유의성 있는 차이는 관찰할 수 없었다 (그림 45).

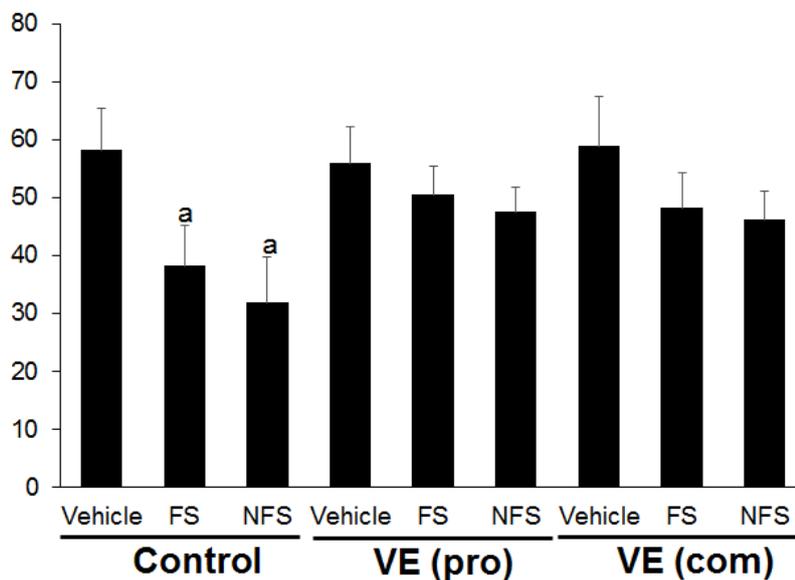


그림 45. Percentages of upper gastrointestinal (GI) output under control (vehicle), 2 h after foot shock (FS) or non-foot shock (NFS) stress for 3 days. Upper GI transit is significantly slower in FS group in vehicle-treated group. However, upper GI transit is significantly ameliorated in VE (prototype, pro)- or VE (commercially available, com)-treated group. Bar represents the SE. ^a $P < 0.05$, significantly different from vehicle group.

(2) 시제품 및 미국 내 판매제품의 투여에 의한 해마 및 편도체에서 norepinephrine, MHPG-SO₄ 변화 확인

시제품과 미국에서 구입한 제품이 스트레스와 밀접하게 연관되어 있다고 알려진 해마 및 편도체에서 norepinephrine과 그 대사산물로 알려진 MHPG-SO₄에 미치는 영향을 확인하였음. 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스의 유발은 해마 및 편도체에서 norepinephrine 수치가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 쥐오줌풀(길초근) 시제품 및 미국에서 구입한 제품의 경우 norepinephrine 수치가 용매투여군에 비해서 현저하게 높았으나, 대조군보다는 약간 낮게 관찰되었음. 육체적 스트레스 유발군의 경우에는 유의성을 관찰할 수 없었으나, 정신적 스트레스 유발군의 경우 유의성을 확인할 수 있었음 (그림 46). 본 연구에 사용한 시제품과 미국에서 구입한 제품과의 효능의 차이는 관찰할 수 없었음.

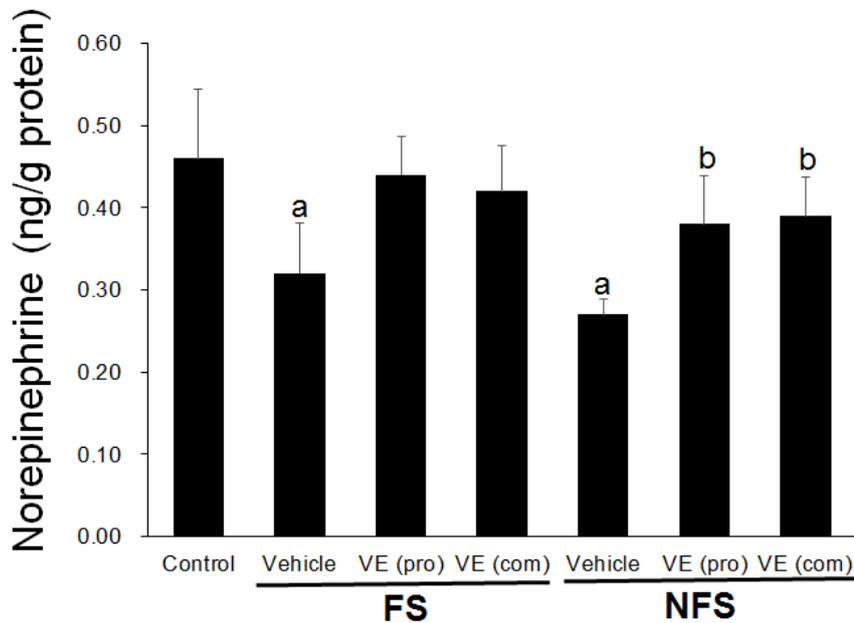


그림 46. Norepinephrine levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VE (pro), and VE (com) groups under physical (foot shock) and mental (non-foot shock) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

한편 norepinephrine이 대사되었을 때 관찰되는 MHPG-SO₄의 경우 육체적 스트레스 유발군의 경우 대조군에 비해 해마에서 MHPG-SO₄가 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 쥐오줌풀 (길초근) 추출물 시제품을 투여한 경우 MHPG-SO₄가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미국에서 판매하는 제품도 유사하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 한편 정신적 스트레스 유발군의 경우도 육체적 스트레스 유도군과 유사한 패턴을 확인할 수 있었으며, 본 연구를 위한 시제품이 미국에서 시판중인 제품에 비해 효능이 더 높은 것을 확인할 수 있었으나, 통계적인 유의성을 확인할 수 없었음 (그림 47).

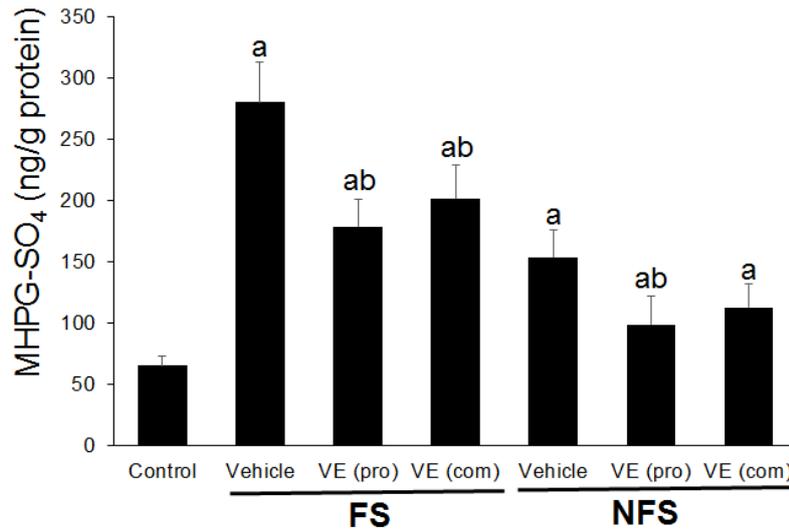


그림 47. MHPG-SO₄ levels in the hippocampus and amygdala of control, vehicle, VE (pro), and VE (com) groups under physical (foot shock) and mental (non-foot shock) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

(3) 시제품 및 미국 내 판매제품의 투여에 의한 해마에서 세포분열의 변화 확인

시제품과 미국에서 구입한 제품이 스트레스와 밀접하게 연관되어 있다고 알려진 해마에서의 세포분열을 확인하였음. 세포분열은 동물을 희생하는 순간에 세포분열 정도를 확인하는 방법으로 Ki67에 대한 면역조직화학염색을 수행하였음. 그 결과 육체적 스트레스군의 경우 용매 투여군에서 급격한 Ki67에 염색된 세포의 감소를 확인할 수 있었음. 그러나 쥐오줌풀(길초근) 시제품을 투여한 경우 Ki67에 염색된 세포가 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 대조군과 유사한 숫자로 관찰되었음. 그러나 미국에서 파는 제품의 경우 Ki67에 염색된 세포가 적게 관찰되었음. 정신적 스트레스군의 경우도 용매투여군의 경우 대조군에 비해 유의적인 Ki67 염색세포의 감소를 확인할 수 있었음. 그러나 Natural F&P에서 제작한 시제품 및 미국에서 구입한 쥐오줌풀(길초근) 추출물의 경우도 Ki67에 염색된 세포를 급격히 증가시키는 것을 확인할 수 있었음 (그림 48).

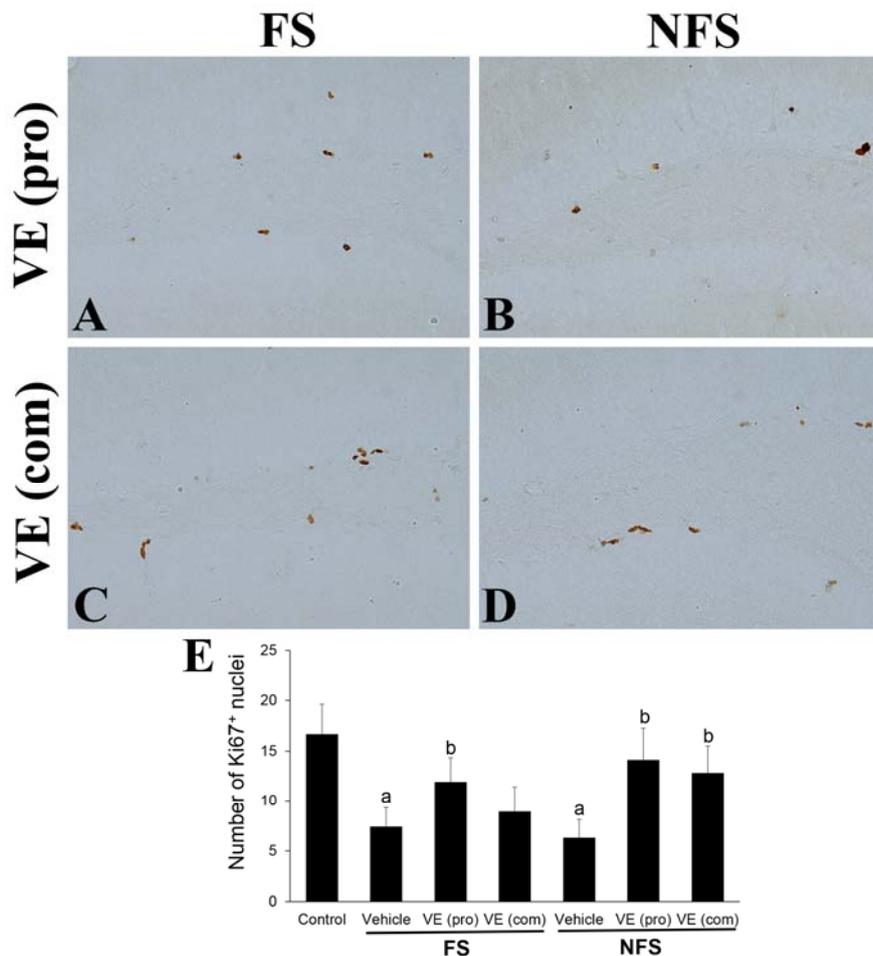


그림 48. Ki67 immunohistochemistry in the hippocampal dentate gyrus of VE (pro) (A, B), and VE (com) (C, D) groups under physical (foot shock; FS) and metal (non-foot shock; NFS) stress. The number of Ki67 positive nuclei is significantly different between groups ($n = 7$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SEM.

(4) 시제품 및 미국내 판매제품의 투여에 의한 스트레스 시 serotonin 및 dopamine 변화 확인

육체적인 스트레스와 정신적 스트레스와 monoamine의 연관성을 확인하기 위해, serotonin 및 대사물질인 5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA)를 해마조직을 균질화하여 HPLC로 측정하였음. 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스 유발 군 모두에서 serotonin 수치는 유의적인 차이가 없었으며, 쥐오줌풀(길초근) 추출물 시제품과 미국 판매제품을 투여하는 경우 약간의 증가는 확인할 수 있었으나, 통계적 유의성은 관찰할 수 없었음 (그림 49). 그러나 대사물질인 HIAA는 육체적 스트레스, 정신적 스트레스 유도군 모두에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 정신적 스트레스 군에서 더 높게 관찰되었음. 쥐오줌풀(길초근) 추출물 시제품 및 미국판매제품을 투여한 경우 HIAA 수치가 용매투여군에 비해 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (그림 50).

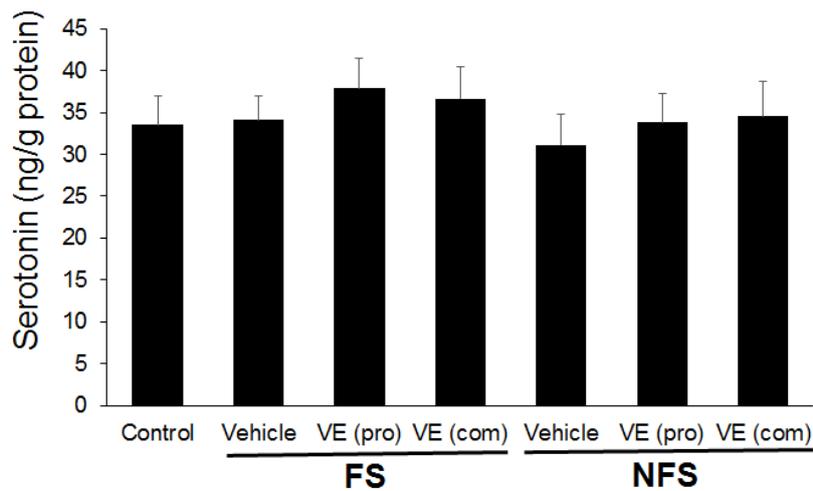


그림 49. Serotonin levels in the hippocampus of control, vehicle, VE (pro), and VE (com) groups under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

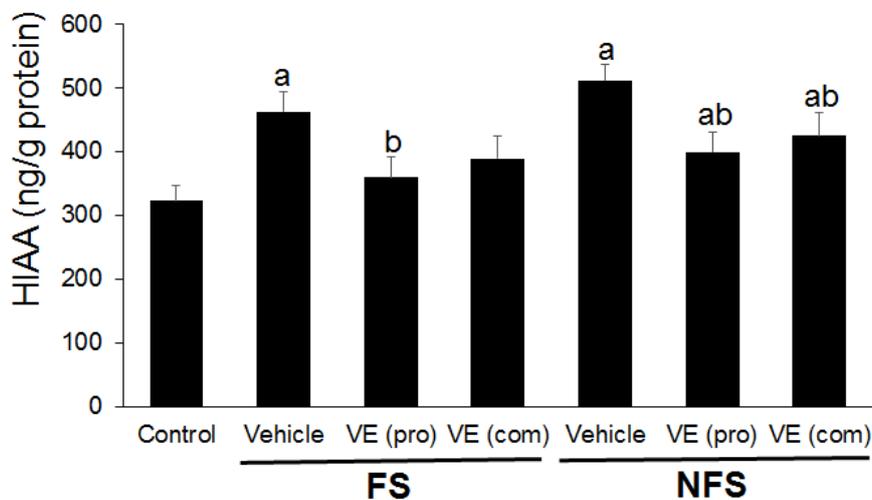


그림 50. HIAA levels in the hippocampus of control, vehicle, VE (pro), and VE (com) groups

under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

Dopamine은 육체적 스트레스 또는 정신적 스트레스를 가한 경우에 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 쥐오줌풀(길초근) 시제품 및 미국판매제품을 투여하는 경우 육체적 스트레스 및 정신적 스트레스 유도군 모두에서 용매투여군에 비해 dopamine 수치가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 쥐오줌풀(길초근) 시제품과 미국에서 판매되는 제품 사이에는 유의적 차이는 확인할 수 없었음 (그림 51).

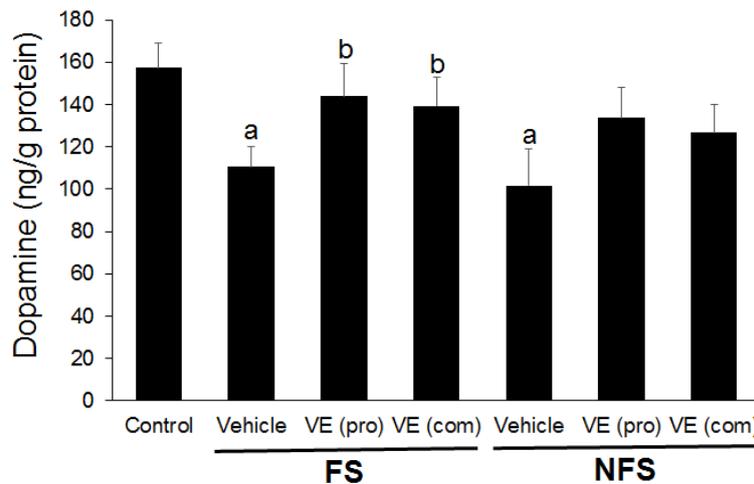


그림 51. Dopamine levels in the hippocampus of control, vehicle, VE (pro), and VE (com) groups under physical (foot shock; FS) and mental (non-foot shock; NFS) stress ($n = 10$ per group; ^a $P < 0.05$, indicating a significant difference compared to the control group; ^b $P < 0.05$, significantly different from the vehicle group). Error bar indicates SE.

마. 시제품의 인체적용시험을 통한 항스트레스 효과 검증

연구 임상시험계획서에 기술된 것과 같이 연구 결과 분석에는 방문날짜를 미준수 하였거나, 복약순응도(compliance rate)가 60% 미만의 대상자인 시험군 5명(14.7%), 대조군 7명(23.3%)은 중도 탈락으로 분석에서 제외 하였으며 분석에 포함된 시험군의 평균 복약 순응도는 86.93%, 위약군은 89.53% 로 총 52명이 최종 연구결과 분석에 포함되었다.

(1) 피험자들의 특성

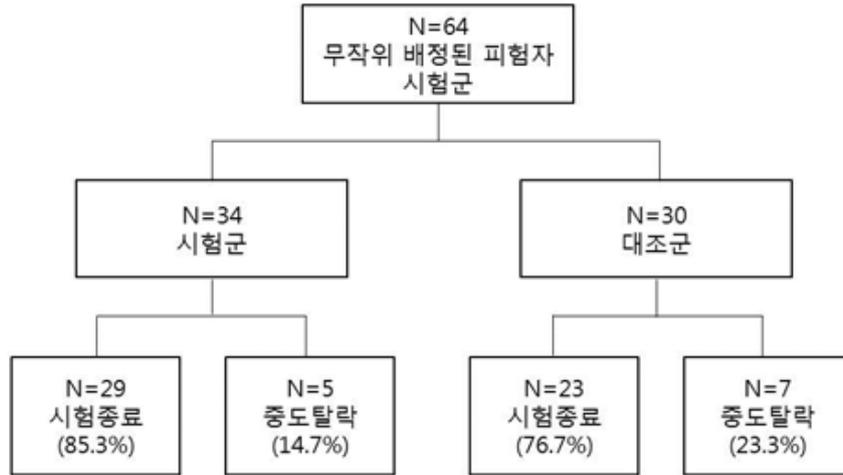


표 14. 피험자의 일반적 특성

		시험군(29명)	대조군(23명)	χ^2	p-value
성별	남자	3(10.3%)	6(26.1%)	2.221	.136
	여자	26(89.7%)	17(73.9%)		
연령대	20대	11(37.9%)	14(60.9%)	26.775	.315
	30대	6(20.7%)	0(0%)		
	40대	5(17.2%)	2(8.7%)		
	50대	6(20.7%)	6(26.1%)		
	60대	0(0%)	1(4.3%)		
	70대	1(3.4%)	0		

시험군과 대조군의 성별 분포를 보면 두 군 모두 대부분이 여자였으며, 통계적으로 유의한 차이(p=.136)는 없었다. 연령대별 분포를 살펴보면 시험군과 대조군 모두 20대가 각각 11명(37.9%), 14명(60.9%)로 가장 많았으며, 연령에 따른 군간 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다(p=.315)(표 14).

(2) 연구결과

(가) 안전성 검사

각 방문 시점 별로 시험군과 대조군의 신장/간 기능 측정치를 비교한 결과 두 군별 차이를 보이지 않았다(표 15).

표 15. 생화학적 검사 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value*
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
AST	사전	19.37±8.29	.552	47.00	9.00	17.26±5.55	.830	32.00	10.00	.465
	사후	18.73±6.87		43.00	9.30	17.61±5.18		29.00	10.00	.796
ALT	사전	17.48±11.29	.980	46.00	0.80	13.96±7.95	.337	35.00	5.00	.272
	사후	17.37±13.07		74.00	0.80	16.83±13.46		68.00	5.00	.645
BUN	사전	14.03±3.39	.330	22.10	8.80	13.29±2.69	.235	18.20	8.80	.551
	사후	14.42±3.36		21.60	9.40	14.03±3.19		20.60	9.10	.835
Creatinine	사전	1.33±3.02	.869	17.00	0.60	0.82±0.14	.352	1.20	0.60	.323
	사후	1.17±2.09		12.00	0.50	0.80±0.12		1.00	0.60	.660

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

(나) 이상반응 발현현황

시험군과 대조군에서 시험제품과의 인과관계와 상관없이 발현된 것으로 조사된 모든 이상반응 발현현황을 살펴보면, 시험군에서 발현된 이상반응은 chest pain 1건이고, 대조군에서 발현된 이상반응은 장염 1건이었다. 시험기간 중 발현한 이상반응에 대해 시험약과 대조약의 투여와 관련하여 인과관계를 '명확히 관련이 있음', '관련이 있다고 생각됨', '관련이 있을 가능성이 있음', '관련이 없다고 생각됨', '명확히 관련이 없다고 생각됨', '불명'으로 분류하여 평가하였다. 시험군에서 발현된 chest pain 이상반응은 '관련이 없다고 생각됨'으로 평가되었으며, 중증도는 '경증'으로 평가되었고, 처치결과는 '해결'으로 평가되었지만 시험제품을 복용하지 못하여 중도 탈락되었다. 대조군에서 발현된 이상반응은 '관련이 없다고 생각됨'으로 평가되었으며, 중증도는 '경증'으로 평가되었고, 처치결과는 '해결'로 평가되었으며 시험제품과의 인과관계와 상관없었지만 입원으로 인하여 시험을 중단하였다.

(다) 유효성 검사

○ 스트레스 관련 척도

사전, 사후 비교 검증 결과 HAMD(p=.000, p=.000), HAMA(p=.000, p=.000), BDI(p=.000, p=.000), BAI(p=.001, p=.001), PSQI(p=.000, p=.000), SRI 총점(p=.001, p=.000), SRI 신체화(p=.003, p=.000), SRI 우울(p=.001, p=.000), SRI 분노(p=.008, p=.000), WHO-5(p=.010, p=.002), BEPSI(p=.000, p=.000), SOFAS(p=.004, p=.004), BFI(p=.000, p=.009), SDS(p=.002, p=.013)에서 시험군과 대조군 모두 유의미하게 개선되었으나, 각 시기별 집단 간의 차이는 모든 척도에서 유의미하지 않았다(표 16).

표 16. 스트레스 관련 척도 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value **
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
HAM D	사전	13.21±3.98	.000	25.00	6.00	12.70±4.00	.000	19.00	6.00	.541
	사후	5.07±4.11		17.00	0.00	4.74±4.61		14.00	0.00	.492
HAM A	사전	13.38±5.04	.000	27.00	5.00	13.00±6.09	.000	27.00	3.00	.767
	사후	4.69±3.52		14.00	1.00	3.91±3.95		12.00	0.00	.243
BDI	사전	20.24±7.58	.000	39.00	7.00	17.30±8.42	.000	35.00	7.00	.169
	사후	11.86±9.01		43.00	1.00	9.35±8.45		28.00	0.00	.178
BAI	사전	17.34±8.96	.001	43.00	3.00	16.22±10.38	.001	36.00	4.00	.501
	사후	12.66±11.02		41.00	0.00	10.39±9.10		28.00	0.00	.449
PSQI	사전	11.41±3.75	.000	20.00	5.00	10.13±3.92	.000	19.00	5.00	.177
	사후	7.86±3.75		20.00	2.00	6.74±3.41		17.00	3.00	.247
SRI 총점	사전	39.07±14.14	.001	71.00	5.00	42.96±18.99	.000	75.00	14.00	.352
	사후	27.17±15.60		78.00	5.00	23.83±17.51		57.00	0.00	.298
SRI 신체화	사전	15.66±6.13	.003	28.00	3.00	15.78±8.05	.000	30.00	3.00	.993
	사후	11.38±7.62		33.00	0.00	8.39±6.53		22.00	0.00	.135
SRI 우울	사전	13.97±6.69	.001	26.00	0.00	16.74±7.45	.000	29.00	2.00	.223
	사후	9.62±6.55		30.00	1.00	9.74±7.89		28.00	0.00	.817
SRI 분노	사전	9.45±4.62	.008	18.00	0.00	10.43±5.42	.000	19.00	1.00	.548
	사후	8.52±4.25		17.00	2.00	8.96±5.17		19.00	1.00	.912
WHO5	사전	6.52±3.47	.010	14.00	0.00	5.65±3.77	.002	14.00	1.00	.308
	사후	8.97±4.47		17.00	0.00	8.87±5.35		20.00	0.00	.789
BEPSI	사전	13.86±3.59	.000	22.00	7.00	13.52±4.11	.000	25.00	7.00	.732
	사후	10.03±2.81		19.00	7.00	9.87±3.81		20.00	5.00	.597
SOFAS	사전	72.48±11.69	.004	90.00	45.00	71.00±10.60	.004	91.00	55.00	.487
	사후	78.45±12.70		95.00	30.00	77.52±11.68		98.00	50.00	.637
BFI	사전	26.08±4.96	.000	33.33	11.50	25.55±5.90	.009	37.67	15.17	.712
	사후	19.78±7.83		34.50	6.67	19.74±6.82		29.83	6.83	.971
SDS	사전	16.66±3.79	.002	24.00	7.00	16.43±5.78	.013	26.00	2.00	.970
	사후	11.41±7.02		26.00	0.00	11.35±7.21		26.00	3.00	.782

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증
 4 주간의 식품복용을 통한 스트레스 관련 변인의 개선 효과에 대해 좀 더 객관적으로 평가하기 위하여 식품복용 전후의 척도 점수를 변화량으로 산출하여 집단 간 비교 분석하였다. 집단 간 척도 점수의 변화량의 차이는 모든 척도에서 유의미하지 않았다(표 17).

표 17. 스트레스 관련 척도 의 집단 간 변화량 비교

변인	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value*
	평균±표준편차	평균±표준편차	
HAMD	8.14±4.38	7.96±3.65	.746
HAMA	8.69±4.74	9.09±3.36	.584
BDI	8.38±7.25	7.96±7.66	.427
BAI	4.69±6.61	5.83±6.94	.904
PSQI	3.55±2.95	3.39±3.46	.875
SRI 총점	11.90±15.51	19.13±15.27	.133
SRI 신체화	4.28±6.71	7.39±6.94	.117
SRI 우울	4.34±6.59	7.00±6.67	.297
SRI 분노	0.93±1.60	1.48±1.31	.265
WHO-5	-2.45±4.28	-3.22±4.26	.941
BEPSI	3.83±3.51	3.65±3.79	.535
SOFAS	-5.97±11.19	-6.52±9.42	.794
BFI	6.30±7.70	5.81±7.77	.692
SDS	5.24±7.33	5.09±8.61	.897

* : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검증

○ HRV

사전, 사후 비교 결과 시험군에서 RMSSD(p=.016) 수치가 유의미하게 저하되었으나 임상적으로 큰 의미는 없으며, 대조군에서는 SDNN(p=.029), HRV index(p=.007), pNN50(p=.008), NN50(p=.022), TP(p=.006), LF(p=.014), HF(p=.003) 수치가 유의미하게 저하되어 환경에 적응해 나가는 항상성 능력이 저하되었다. 각 시기별로 집단 간의 차이는 모든 수치에서 유의미하지 않았다(표18).

표 18. HRV 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	**
HR	사전	73.83±13.72	.674	105.00	41.00	79.13±13.60	.676	122.00	57.00	.184
	사후	74.69±12.83		99.00	45.00	79.87±11.19		114.00	62.00	.277
Beat count	사전	725.03±122.15	.341	923.00	404.00	782.22±135.96	.073	1212.00	556.00	.253
	사후	736.83±117.34		982.00	461.00	809.09±112.27		1154.00	630.00	.085
Mean HR	사전	72.72±12.31	.552	92.57	40.32	78.41±13.58	.078	121.13	55.58	.257
	사후	73.54±11.70		98.22	46.04	81.05±11.22		115.35	62.91	.067
SDNN	사전	46.45±13.28	.301	85.79	21.64	43.20±20.70	.029	92.99	5.56	.501
	사후	40.67±16.68		94.37	13.73	38.18±15.22		74.82	19.55	.537
RMSSD	사전	37.25±23.92	.016	125.58	9.80	30.80±18.98	.224	83.92	4.11	.333
	사후	27.74±17.58		103.23	7.27	28.82±15.06		72.85	7.72	.789
HRV index	사전	11.36±2.62	.177	17.41	6.00	11.24±5.22	.007	24.65	2.22	.638
	사후	10.43±3.36		17.00	3.80	9.57±4.04		22.67	2.31	.250
pNN50	사전	13.12±16.54	.106	63.37	0.00	12.05±15.20	.008	53.04	0.00	.678
	사후	7.84±12.26		53.99	0.00	8.40±13.40		53.24	0.00	.678
NN50	사전	79.38±84.02	.088	279.00	0.00	86.17±102.39	.022	340.00	0.00	.796
	사후	49.62±65.18		257.00	0.00	63.17±93.28		362.00	0.00	.868
TP	사전	1047.11±702.60	.275	3717.21	84.42	1330.30±1539.09	.006	6795.37	8.76	.818
	사후	911.44±693.09		2967.46	50.69	854.54±845.76		3939.46	32.62	.501
LF	사전	327.12±204.70	.940	804.64	13.15	481.64±592.85	.014	2816.57	1.51	.719
	사후	350.79±337.43		1444.11	8.15	315.36±296.39		1131.62	10.03	.747
HF	사전	392.35±542.37	.082	2744.62	34.08	574.67±848.45	.003	3739.63	2.02	.905
	사후	242.66±195.75		932.16	9.30	356.96±605.14		2930.44	10.54	.876
LFHF	사전	1.54±1.31	.524	5.38	0.16	1.54±1.28	.648	4.62	0.38	.761
	사후	1.83±1.96		9.87	0.29	1.67±1.73		8.42	0.25	.638
norm LF	사전	51.71±20.06	.284	84.32	14.07	52.85±17.45	.927	82.21	27.54	.761
	사후	55.31±17.40		90.80	22.60	53.89±17.06		89.39	19.99	.638
normHF	사전	48.29±20.06	.284	85.93	15.68	47.15±17.45	.927	72.46	17.79	.761
	사후	44.69±17.40		77.40	9.20	46.11±17.06		80.01	10.61	.638

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

식품복용 전후의 수치 변화량을 산출하여 집단 간 비교 분석하였다. 집단 간 수치의 변화량의 차이는 수에서 유의미하지 않았다(표 19).

표 19. HRV 집단 간 변화량 비교

변인	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value
	평균±표준편차	평균±표준편차	
HR	-0.86±9.52	-0.74±7.60	.978
Beat count	-11.79±83.19	-26.87±71.77	.484
Mean HR	-0.82±8.39	-2.64±7.18	.423
SDNN	5.78±16.96	5.02±14.86	.963
RMSSD	9.51±24.81	1.98±10.95	.194
HRV index	0.94±3.68	1.67±2.48	.257
pNN50	5.28±16.72	3.66±7.20	.811
NN50	29.76±83.37	23.00±54.78	.956
TP	135.67±887.91	475.75±820.95	.281
LF	-23.67±315.57	166.28±485.04	.103
HF	149.69±524.90	217.70±369.45	.392
LFHF	-0.29±2.08	-0.13±1.78	.537
LF norm	-3.61±17.41	-1.04±17.46	.423
HF norm	3.61±17.41	1.04±17.46	.423

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

○ Cortisol

사전, 사후 비교 검증 결과 시험군에서 Recovery(p=.026)가 유의미하게 변화하였으나 대조군에서는 유의미한 변화가 없었다. 각 시기별 집단 간의 차이는 모든 수치에서 유의미하지 않았다(표 20).

표 20. Cortisol 수준 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value**
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
ACR1	사전	3.19±10.40	.946	31.73	-13.21	-0.98±10.80	.783	22.74	-33.63	.392
	사후	2.34±16.20		49.73	-27.99	-1.17±10.12		22.29	-27.06	.369
ACR2	사전	1.51±9.99	.785	19.42	-21.50	-1.69±11.46	.121	13.75	-34.57	.612
	사후	-1.40±17.63		29.63	-63.17	3.11±12.13		39.07	-19.68	.925
Recovery	사전	2.44±8.70	.026	15.14	-21.66	3.21±8.22	.064	26.06	-11.90	.804
	사후	12.51±15.87		43.89	-9.20	8.04±13.94		40.06	-20.50	.592

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증 (ACR1: 기상 직후 첫 코티솔의 농도와 두 번째 코티솔(30분 후)의 농도 차이, ACR2: 기상 직후 첫 코티솔의 농도와 세 번째 코티솔(60분 후)의 농도 차이)

4 주간의 식품복용을 통한 스트레스 관련 변인의 개선 효과에 대해 좀 더 객관적으로 평가하기 위하여 식품복용 전후의 수치를 변화량으로 산출하여 집단 간 비교 분석하였다. 집단 간 수치의 변화량의 차이는 모든 변인에서 유의미하지 않았다(표 21).

표 21. Cortisol 수준의 집단 간 변화량 비교

변인	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value*
	평균±표준편차	평균±표준편차	
ACR1	0.96±20.85	-0.35±15.88	.784
ACR2	3.04±19.30	-4.80±12.87	.264
Recovery	-10.50±17.57	-4.84±13.28	.579

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정 (ACR1: 기상 직후 첫 코티솔의 농도와 두 번째 코티솔(30분 후)의 농도 차이, ACR2: 기상 직후 첫 코티솔의 농도와 세 번째 코티솔(60분 후)의 농도 차이)

○ BDNF와 VEGF

사전, 사후 비교 검증 결과 시험군과 대조군에서 BDNF와 VEGF의 유의미한 변화가 없었고, 각 시기별 집단 간의 BDNF와 VEGF 차이도 유의미하지 않았다(표. 22).

표 22. BDNF와 VEGF의 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value**
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
BDNF	사전	1194.39±748.81	.206	2751.10	261.73	1283.78±745.11	0.670	2860.24	209.05	.665
	사후	1421.48±789.19		2755.16	236.34	1209.79±809.76		2542.24	190.11	.315
VEGF	사전	32.88±19.92	.837	96.32	2.50	44.77±30.58	0.191	162.64	14.06	.107
	사후	29.56±10.31		57.55	14.98	33.95±11.28		58.43	18.52	.156

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

좀 더 객관적으로 평가를 위해 식품복용 전후의 수치를 변화량으로 산출하여 집단 간 비교 분석하였으나, 집단 간 BDNF와 VEGF의 변화량의 차이는 유의미하지 않았다(표. 23).

표 23. BDNF와 VEGF의 집단 간 변화량 비교

변인	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value*
	평균±표준편차	평균±표준편차	
BDNF	-227.09±1065.01	73.98±922.86	.207
VEGF	3.32±22.25	10.82±33.52	.362

* : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검증

○ 면역 기능

사전, 사후 비교 검증 결과 시험군에서는 CD14+(p=.019), CD15-CD16-(p=.011), Lymphocytes/Total%(p=.014)이 유의미하게 저하되었고, CD15+CD16+(p=.022), CD8+(p=.029)이 유의미하게 증가하였다. 대조군에서는 CD14+(p=.010), Lymphocytes/Total%(p=.002)이 유의미하게 저하되었고, Granulocytes/Total%(p=.016)이 유의미하게 증가하였다.

표 24. 면역 관련 변인 비교

변인	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value**
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
Granulocytes /Total(%)	사전	60.74±11.83	.171	81.20	37.00	61.57±13.45	.016	79.30	26.10	.719
	사후	64.53±13.75		86.00	15.00	71.37±12.28		91.80	28.30	
CD14+	사전	13.08±3.88	.019	21.91	5.51	15.23±8.54	.010	43.70	6.28	.586
	사후	11.39±5.02		27.15	2.58	11.10±4.13		24.49	4.43	
CD16+CD14-	사전	83.88±4.99	.079	90.10	72.90	82.27±9.31	.403	93.20	52.70	.846
	사후	85.08±5.17		94.30	68.70	84.04±5.73		93.80	70.50	
CD15+CD16+	사전	81.25±5.56	.022	90.80	71.10	82.76±6.68	.939	90.10	65.40	.199
	사후	83.11±6.44		93.50	63.90	82.72±6.10		93.50	69.00	
CD16-CD15-	사전	8.00±4.48	.011	18.10	1.69	6.43±3.78	.784	17.90	2.29	.155
	사후	6.01±3.06		14.00	1.68	6.13±3.40		14.90	2.11	
Lymphocytes /Total(%)	사전	23.24±8.67	.014	41.50	7.28	20.27±7.86	.002	40.70	10.00	.125
	사후	19.97±7.04		33.60	8.06	14.79±5.64		25.50	4.10	
CD4+	사전	23.59±10.87	.179	51.00	4.87	28.53±10.92	.659	53.40	7.79	.116
	사후	25.89±11.03		55.20	8.00	29.78±13.36		61.60	11.30	
CD8+	사전	22.27±9.09	.029	40.60	8.49	22.44±6.98	.976	36.50	9.46	.712
	사후	24.47±9.23		42.40	8.53	22.53±7.57		40.60	10.10	

* : Wilcoxon's 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

각 시기별 집단 간의 차이를 비교했을 때, Granulocytes/Total(%)이 사전에는 집단 간의 차이가 없었으나, 사후에는 대조군이 유의미하게 높았고(p=.020), Lymphocytes/Total(%)은 사전에 집단 간 차이가 없었으나 사후에는 시험군이 유의미하게 더 높았다(표. 14).

시험군과 대조군에서 비슷한 면역기능의 변화 패턴을 보였는데, 이는 시험군이나 대조군에서 불안 우울 척도 등의 지표가 동일하게 호전된 것과 함께 면역기능의 변화도 스트레스 호전과 더불어

두 군에서 동일한 패턴으로 나타난 것으로 사료된다

면역 기능 관련 수치들을 변화량으로 산출하여 집단 간 비교 분석하였다. 집단 간 수치의 변화량의 차이는 모든 변인에서 유의미하지 않았다(표. 15). 시험군과 대조군의 각 면역세포의 비율변화는 통계학적으로 차이가 없었다. 결론적으로 시험군과 대조군의 면역기능의 변화 차이는 없었는데 이는 두 군에서 모두 스트레스의 호전이 있었기 때문으로 사료된다.

표 25. 면역 관련 변인의 집단 간 변화량 비교

변인	시험군(29명)		대조군(23명)		p-value*
	평균	±표준편차	평균	±표준편차	
GranulocytesTotal	-3.60	±16.31	-9.80	±15.97	.360
CD14	1.95	±4.24	4.13	±8.49	.633
CD16CD14	-1.29	±3.80	-1.78	±5.81	.755
CD15CD16	-2.33	±6.26	0.04	±5.76	.117
CD16CD15	2.20	±4.42	0.30	±4.60	.092
LymphocytesTotal	3.62	±7.36	5.49	±7.52	.514
CD4	-2.94	±9.83	-1.24	±15.62	.740
CD8	-2.76	±6.08	-0.09	±8.70	.145

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

○ 뇌파

표 26. 뇌파 비교

Z-score	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value**
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
Theta T5	사전	0.23±0.82	.315	3.44	-1.12	-0.05±0.62	.019	1.14	-1.44	.257
	사후	0.06±0.79		1.34	-2.09	0.23±0.50		1.15	-0.73	
Beta F4	사전	0.67±2.26	.107	11.24	-1.91	-0.09±1.08	.248	1.79	-2.16	.537
	사후	-0.04±1.34		2.69	-2.45	0.13±1.18		1.9	-2.41	
Beta C4	사전	0.16±2.29	.191	11	-2.11	-0.66±1.20	.121	0.91	-3.23	.625
	사후	-0.43±1.21		2.36	-2.6	-0.37±1.13		1.07	-2.87	
Beta P3	사전	0.27±1.44	.127	6.08	-2.13	-0.22±0.91	.114	1.31	-2.14	.537
	사후	-0.15±1.15		1.82	-2.73	0.06±0.94		1.38	-1.84	
High Beta_F4	사전	0.43±0.75	.010	1.63	-1.19	0.35±0.94	.770	2.46	-1.35	.513
	사후	0.08±0.76		1.05	-1.76	0.45±0.86		1.69	-1.18	

* : Wilcoxon' s 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

표 27. 뇌 Alpha Coherence 비교

Z-score	시기	시험군(29명)				대조군(23명)				p-value**
		평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	평균±표준편차	p-value*	최대값	최소값	
Alpha Coherence C3_F8	사전	1.80±0.84	.030	3.37	-1.19	2.02±0.67	.412	2.88	0.38	.273
	사후	2.02±0.74		3.21	-0.46	1.90±0.94		3.04	-1.41	.761
Alpha Coherence C_C3_T4	사전	1.92±1.03	.013	3.79	-1.2	2.33±0.93	.903	4.09	0.58	.153
	사후	2.26±0.88		3.65	-0.55	2.29±0.94		3.88	-0.06	.949
Alpha Coherence C_P3_O2	사전	0.76±1.32	.275	2.38	-3.89	0.85±1.16	.128	2.44	-2.69	.934
	사후	1.02±0.75		2.21	-0.82	0.72±1.04		2.5	-1.48	.362
Alpha Coherence C_O2_T4	사전	2.68±0.83	.009	4.19	0.19	3.04±0.68	.715	4.12	1.57	.159
	사후	3.12±0.47		4.03	2.3	2.90±1.04		3.99	-0.14	.963

* : Wilcoxon' s 순위합 검정(방문시기별): 각 집단의 사전 사후 점수의 비교 검증

** : Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 각 시기의 시험군과 대조군 점수의 비교 검증

실험군에서 대조군에 비해 Theta파가 유의하게 감소하는 양상 보였다. Beta 파는 실험군에서 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 변화를 보이는 뇌영역의 분포는 측두엽, 두정엽 및 후두엽 (T5, P3, O2, T6) 및 전두엽 일부 영역(Fz, F4, C4)도 포함되어 있었다. 즉, 쥐오줌풀 약제는 일부 뇌파의 변화를 일으킨다고 결론지을 수 있다(표. 26).

Theta 파는 수면상태로 전환 시에 나타나는 파형으로, 집중력 또는 또렷한 의식 (alertness) 상태와 관련이 있어 뇌손상이 심하면 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과 쥐오줌풀 약제는 일부 뇌 영역에서 Theta파를 감소시키는 역할을 하며, 이는 뇌기능에 긍정적인 효과를 가져올 수 있음을 시사한다(표. 26).

Beta 파가 높을수록 불안 상태를 반영하며 특히 두정엽 및 후두엽 부위의 상승은 불안 및 우울감과 관련이 있다. 본 연구 결과 두정엽 및 후두엽 근처의 beta파의 감소가 보다 뚜렷하다. 따라서 쥐오줌풀 약제의 투여가 불안 상태와 관련된 뇌파를 낮추는 효과가 있음을 시사한다.

표 28. 뇌파 변화량 비교

Z-score	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value*
	평균±표준편차	평균±표준편차	
Theta T5	0.18±0.90	-0.28±0.50	.022
Beta F4	0.70±2.33	-0.22±0.81	.044
Beta C4	0.59±2.33	-0.29±0.75	.044
Beta P3	0.42±1.47	-0.28±0.74	.017
High Beta F4	0.35±0.80	-0.09±0.74	.026

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

표 29. Alpha Coherence의 변화량 비교

Z-score	시험군(29명)	대조군(23명)	p-value*
	평균±표준편차	평균±표준편차	
Alpha Coherence C3_F8	-0.22±0.44	0.12±0.74	.030
Alpha Coherence C3_T4	-0.34±0.57	0.04±0.75	.038
Alpha Coherence P3_O2	-0.26±0.88	0.13±0.94	.046
Alpha Coherence O2_T4	-0.44±0.68	0.14±0.76	.037

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

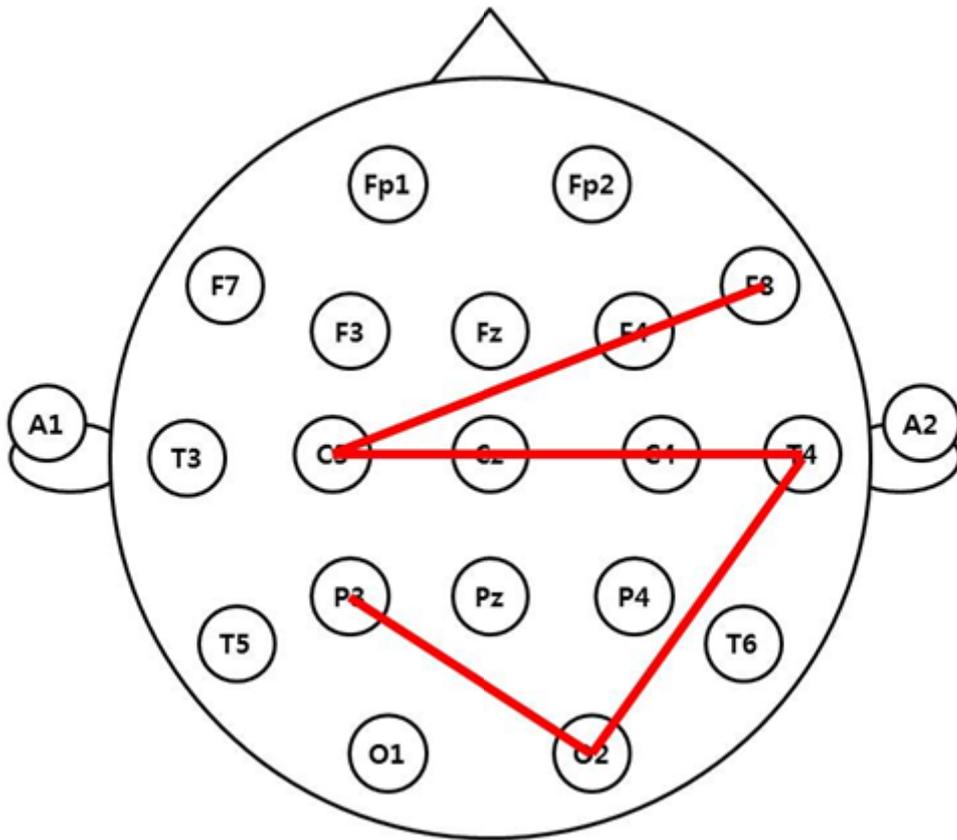


그림 30. Topographic map에서 Alpha Coherence의 변화

실험군에서 대조군에 비해 Alpha Coherence가 유의하게 증가하는 양상 보였다. 증가하는 연결 부위는 그림과 같다(그림 1). Coherence이 높을수록 뇌의 연결성이 향상됨을 의미한다(표. 19). 따라서 쥐오줌풀 약제는 몇몇 뇌 부위의 상호 연결성을 향상되는 효능이 있을 수 있음을 시사한다.

(사) Micro array로 분석한 유전자 발현 조사

○ UPP-related gens(ubiquiton)

본 연구에서 조사한 UPP-related genes 412개 유전자 중에서 쥐오줌풀 4주 투여 후 유전자 발현이 증가된 UPP-related genes은 184개였다. 대조군에서 동일한 UPP-related genes 유전자의 4주 후 발현율은 시험군과 유의한 차이를 보였다($p < .001$). 이 중에서 Log2 Ratio가 0.2보다 큰 유전자는 33개 였고 유전자 발현율이 대조군과 유의한 차이가 있었다($p < .001$). 이러한 차이는 쥐오줌풀 투여 4주후 UPP-related genes 의 유전자 발현이 대조군과 유의하게 차이가 있음을 의미한다(표. 31).

표 31. UPP-related genes 비교

Gene Symbol	Log2 Ratio (시험군)	Log2 Ratio (대조군)
TRAF6	0.436458383	0.267746
UBTD2	0.417615478	0.123563
FBXO47	0.402798436	0.066276
RNF157	0.396708064	0.070052
UBE2T	0.366947412	0.178142
RNF17	0.322181542	-0.017359
RNF40	0.315414449	0.310428
RNF40	0.315414449	0.310428
RNF220	0.310638899	0.26301
UBE2Q1	0.306639499	0.211444
UBE2U	0.295975996	-0.389252
FBXO43	0.287379256	-0.076626
UBR7	0.286909916	0.061221
42066	0.275531914	0.07865
42066	0.275531914	0.07865
RNF113B	0.268727736	0.032471
UBE2Q2	0.265570764	-0.047211
FBXO34	0.262434126	-0.208617
RNF180	0.256387963	0.424037
CAMSAP1	0.243148817	-0.017607
RNF2	0.239802642	0.436018
FBXO45	0.237985377	0.083494
UBE2R2	0.23434281	0.15078
ZNRF3	0.231221309	-0.096784
ITCH	0.230670619	-0.043723
FBXO28	0.226755353	-0.042016
PCGF6	0.224324314	0.191355
RNF4	0.222613232	0.214548
RSPRY1	0.215161876	-0.044352
SH3RF3	0.206886838	0.068902
RNF44	0.206669103	0.03916
RNFT1	0.200912102	-0.027607
MKRN3	0.200611478	-0.144904
p-value*	<.001	

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

○ Ribosomal genes

본 연구에서 조사한 ribosomal genes 182개 유전자 중에서 쥐오줌풀 4주 투여후 유전자 발현이 증가된 UPP-related genes은 81개 였다. 대조군에서 동일한 ribosomalgenes 유전자의 4주후 발현율은 시험군과 유의한 차이를 보였다 ($p < .001$). 이중에서 Log2 Ratio가 0.2보다 큰 유전자는 20개 였고 유전자 발현율이 대조군과 유의한 차이가 있었다($p < .001$). 이러한 차이는 쥐오줌풀 투여 4주 후 UPP-related genes 의 유전자 발현이 대조군과 유의하게 차이가 있음을 의미한다(표. 32).

표 32. Ribosomal genes 비교

Gene Symbol	Log2 Ratio (시험군)	Log2 Ratio (대조군)
RPS4Y2	0.655104534	0.20389
RPS4Y1	0.593179768	0.269062
RPL10L	0.511854844	-0.054013
RPL39L	0.419216041	0.040122
MRPL22	0.411376169	-0.019638
MRPL44	0.396346061	0.59763
RPL3L	0.380494946	-0.130993
RPL22L1	0.32493905	0.142478
RPS18	0.292602187	-0.430228
MRPS17	0.280164242	0.308939
MRPL4	0.265517242	-0.085907
RPS27	0.24378522	-0.04521
MRPL2	0.236803596	-0.254149
MRPL49	0.235506582	0.221454
MRP63	0.2329667	0.059691
MRPL15	0.218107552	-0.018818
MRPL45	0.216950806	0.328132
RPL15	0.214863247	0.146068
RPL17	0.201119049	-0.023632
RPS15A	0.200774502	0.031578
p-value*	<.001	

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

○ Stress-related and heat shock genes

본 연구에서 조사한 Stress-related and heat shock genes 131개 유전자 중에서 쥐오줌풀 4주 투여 후 유전자 발현이 증가된 UPP-related genes은 62개 였다. 대조군에서 동일한 Stress-related and heat shock genes 유전자의 4주 후 발현율은 시험군과 유의한 차이를 보였다(p=.016). 이 중에서 Log2 Ratio가 0.2보다 큰 유전자는 14개였고 유전자 발현율이 대조군과 유의한 차이가 있었다(p<001). 이러한 차이는 쥐오줌풀 투여 4주 후 UPP-related genes 의 유전자 발현이 대조군과 유의하게 차이가 있음을 의미한다(표 33).

표 33. Stress-related genes 비교

Gene Symbol	Log2 Ratio (시험군)	Log2 Ratio (대조군)
GPX7	0.468915572	0.073836
GSTM4	0.392808164	-0.067023
PDLIM4	0.390475295	0.111088
HSF2	0.340679676	0.417477
HSF5	0.293901888	0.012154
HSPA7	0.285591578	-0.508505
GPX5	0.279127779	-0.121476
LIMA1	0.274619352	0.20567
PYROXD1	0.261816944	-0.112177
ABLIM1	0.25976875	0.054108
GPX5	0.235495111	0.289919
HSBP1L1	0.218036728	-0.126449
GPX8	0.214696886	0.014594
GSTM5	0.20469407	0.100023
p-value	<.001	

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

○ Immunity-associated genes

본 연구에서 조사한 Immunity-associated genes 25개 유전자 중에서 쥐오줌풀 4주 투여후 유전자 발현이 증가된 UPP-related genes은 12개 였다. 대조군에서 동일한 Immunity-associated genes 유전자의 4주후 발현율은 시험군과 유의한 차이를 보였다(p= .053). 이중에서 Log2 Ratio가 0.2보다 큰 유전자는 5개 였고 유전자 발현율이 대조군과 유의한 차이가 있었다(p=.151). 이러한 차이는 쥐오줌풀 투여 4주후 Immunity-associated genes 의 유전자 발현이 대조군과 유의하게 차이가 있음을 의미한다(표 34).

표 34. Immunity-associated genes 비교

DEFA3	0.423600092	1.398694
IRF4	0.337276724	-0.186533
IRF6	0.332831762	-0.296238
OAS2	0.257918765	0.232264
IRF2BP1	0.238994329	-0.171845
p-value	0.151	

*: Mann-Whitney U 검정(시험군과 대조군): 시험군과 대조군의 점수 변화량에 대한 비교 검정

본 건강기능식품을 복용하는 동안 스트레스 관련있다고 보고된 4개 Gene system에서 유전자 발현을 조사한 결과 쥐오줌풀 투여 4주후34개 관련 Gene system에서 유전자 발현이 대조군과 유의하게 차이가 있었다. 이는 전술한 심리척도 결과와 상반된 결과로서 쥐오줌풀이 단순한 위약효과로 인해 스트레스 감소효과가 나타난 것이 아님을 시사하는 연구결과로 사료된다. 상기 gene과 관련하여 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

(아) 시험군과 이완요법군의 간접 비교 분석

본 건강기능식품의 효과에 따른 변화를 좀 더 다각적으로 평가하기 위하여 이완요법을 실시한 21명의 시험 참가자들과 본 이중맹검연구의 참여한 군에서 쥐오줌풀을 4주 복용한 시험군과의 차이를 비교해 보았다. 이완요법에 참여한 군은 open label로 총 4주 동안 1주일에 한번 총 4번의 이완요법(기도 또는 명상) 교육을 받고 스스로 하루 2번 이상 이완요법을 시행하도록 하였다.

○ 스트레스 관련 척도

이완요법을 4주 동안 실시한 21명의 참가자와 시험군의 HAMD, HAMA, PSQI 점수의 변화량을 비교하였다. 이완요법군에 비하여 시험군이 HAMD($p=.0.30$), HAMA($p=.022$), PSQI($p=.005$)가 유의미하게 저하된 것으로 나타났다. 전술한 이중맹검 연구에서 쥐오줌풀 섭취군이 4주후에 스트레스 척도의 호전이 있었지만 대조군에서도 동일한 호전효과가 있어 위약효과로 인한 스트레스 감소를 부정할 수 없었다. 그러나 쥐오줌풀 투여군이 이완요법군에서 비해서 스트레스 척도의 호전이 유의미하게 나온 것으로 보아 쥐오줌풀의 스트레스 호전효과가 단순한 위약효과로 단정지을 수 없을 것으로 사료된다.

○ HRV

이완요법을 실시한 21명의 HRV 수치들의 변화량과 시험군의 변화량을 비교하였으나 임상적으로 유의미한 차이는 없는 것으로 나타났다.

○ Cortisol

이완요법을 실시한 21명의 cortisol 관련 수치들의 변화량과 시험군의 변화량을 비교하였으나 임상적으로 유의미한 차이는 없는 것으로 나타났다.

(4) 결론

(가) 쥐오줌풀 추출물의 스트레스 반응 개선 효과 평가

시험군에서 모든 스트레스 관련 척도들에서 스트레스 반응의 유의미한 개선효과를 보였으나 대조군과는 차이가 없었다. 스트레스의 생물학적 지표로 알려진 HRV, cortisol, 면역지표 연구에서 대조군과 유의한 차이가 보이지 않았다. 그러나 뇌기능 뇌파 연구에서 쥐오줌풀군이 유의하게 스트레스 관련 뇌기능을 호전 시키는 결과가 있었으며 스트레스 관련 유전자가 쥐오줌풀 군에서 대조군에 비해 유의한 변화가 나타났었고, 이완요법과 간접비교에서 스트레스 관련 척도가 유의하게 호전이 있는 것으로 나타났었다. 이는 쥐오줌풀의 스트레스 경감효과가 단순히 위약 효과로 인한 것이 아님을 시사한다고 사료된다.

본 건강기능식품은 스트레스에 관하여 어느 정도 효과를 나타내는 것으로 보이나, 대조군에서의 위약효과로 인해서 그 효과가 명확하게 밝혀지지 못한 것으로 보인다. 본 건강기능식품의 효과를 검증하기 위해서 위약효과를 최소화하는 조건에서 추후연구를 진행해볼 필요가 있다.

바. 쥐오줌풀 추출물의 영양성분 자료

원재료인 발레리안 뿌리에는 다양한 성분이 존재하며, 대표적으로 에센셜 오일과 그것의 sesquiterpenoids(valerenic acid), epoxy iridoid(valepotiates) 그리고 baldrinal, homobaldirinal, amino acid(arginine, GABA, glutamine, tyrosine), alkaloid와 같은 분해물을 포함하고 있다. 또한 발레리안은 적은 양의 phenolic acid와 flavonoid, valerosidatum, chlorogenic acid, caffeic acid, choline, β-sitosterol, fatty acid, 다양한 mineral을 생성하는 것으로 보고되고 있다²⁾.

발레리안 추출물은 지표성분(total valerenic acid)이 8 mg/g 이상 함유된 원료이며, 영양학적으로는 다음과 같다.

[자가시험성적]³⁾

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	377	수분(%)	3
탄수화물(%)	75	회분(%)	8
조지방(%)	4	나트륨(mg/100g)	62.4
조단백질(%)	9		

사. 쥐오줌풀 추출물의 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

(1). 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

- 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(식약청고시 제 2013-10호)[별표 2]에 따른 근거 설정에 준함.
- 원료의 일일 최대 섭취량 300 mg을 기준으로 "기능성원료 인정에 관한 유해물질에 대한 규격"에 근거하여 계산한 일일 최대 노출 허용 기준 미만의 범위 내에 해당하며, 시험결과(자가, 공인 시험결과)를 근거로 충분히 안전한 범위로 규격으로 설정하였다.

[한국기능식품연구원]⁴⁾

중금속명	실측치(mg/kg)(A)			제안규격(mg/kg)(B)	신청원료의 최대 1일섭취량(kg)	신청원료 중 중금속 1일 노출량(μg)	중금속 1일 최대 노출허용량(μg)
납	0.1498	0.0943	0.1078	3.0	0.0003 kg (300 mg)	0.9	10.8
총비소	0.3498	0.4748	0.2516	1.0		0.3	150
카드뮴	0.0132	0.0096	0.0106	1.0		0.3	3.0
총수은	0.005	불검출	불검출	1.0		0.3	2.1

2) 첨부서류 [09. Amerian Herbal Phamacoeia, Valerian root] 참조

3) 첨부서류 [27. 자사성적서] 참조

4) 첨부서류[26. 한국기능식품연구원검사성적서, D2014120280호], [34. 한국기능식품연구원검사성적서, D2014120281호], [34. 한국기능식품연구원검사성적서, D14120282호] 참조

(2) 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

○ 「식품의 기준 및 규격」에 신청 원료에 대한 농약의 잔류허용기준이 「대한민국약전」에 고시되어 있으며, 이에 따라 「수입식품등 검사에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시 제2014-23호, 2014.2.12개정) 별표3. 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목(59종) 잔류농약에 대하여 한국기능식품연구원에 의뢰하였으며, 그 결과 '보스칼리드 0.1392 mg/kg, 아족시스트로빈 0.0037 mg/kg, 피라크로스트로빈 0.0047 mg/kg'이 검출되었으며, 이는 「잔류농약데이터베이스, <http://fse.foodnara.go.kr/residue>」에서 농약잔류허용기준 범위 안에 있음을 확인하였다.

[시험기관명 : 한국기능식품연구원]⁵⁾

잔류농약명	잔류농약데이터베이스	실측치
보스칼리드	Codex, 근채류 기준 2 mg/kg	0.1392 mg/kg
아족시스트로빈	Codex, 근채류 기준 1 mg/kg	0.0037 mg/kg
피라크로스트로빈	기타농산물 기준, 해당농약 최저치 0.05 mg/kg	0.0047 mg/kg

(2)

■ 시험성적서 요약표

[시험기관명 : 한국기능식품연구원]⁶⁾

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
규격항목	성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 회갈색 분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 회갈색 분말			
	기능성분(지표성분)(mg/g)	Total valerenic acid	0.88	0.91	0.91	
	중금속 (mg/kg)	납	3.0 이하	0.1498	0.0943	0.1078
		총비소	1.0 이하	0.3498	0.4748	0.2516
		카드뮴	1.0 이하	0.0132	0.0096	0.0106
		총수은	1.0 이하	0.005	불검출	불검출
미생물	대장균군	음성	음성	-	-	
규격 미설정 항목	잔류농약	59종 보스칼리드 0.1392 mg/kg 아족시스트로빈 0.0037 mg/kg 피라크로스트로빈 0.0047 mg/kg				

5) 첨부서류[26. 한국기능식품연구원검사성적서, D2014120280호] 참조

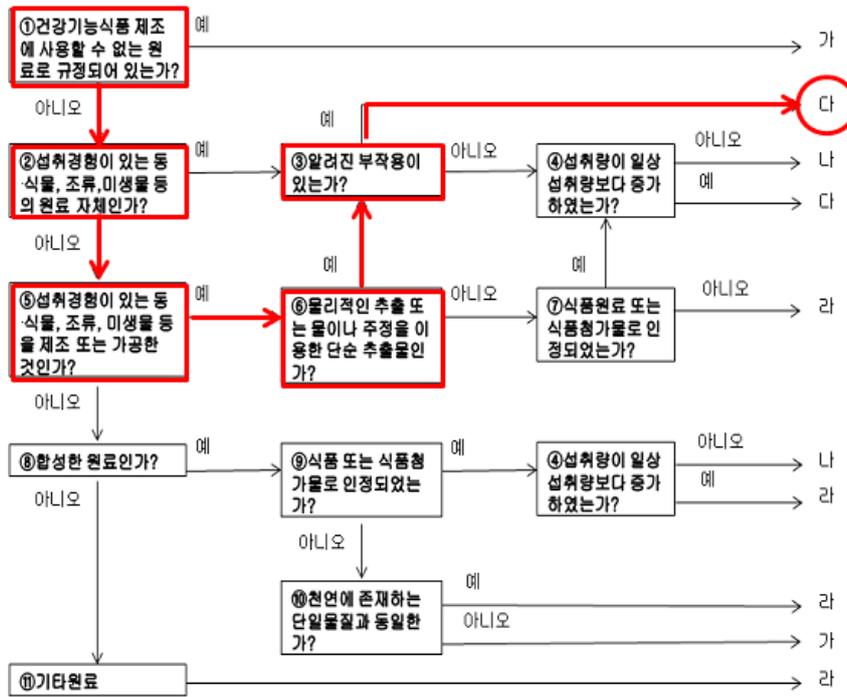
6) 첨부서류[27. 자사성적서], [26. 한국기능식품연구원검사성적서, D2014120280호]

아. 쥐오줌풀 추출물의 안전성 관련 자료

(1) 안전성 확보

섭취경험이 있는 발레리안(*Valeriana officinails* L., 식품원료 제한적으로 사용가능)의 뿌리를 주정을 이용하여 추출하였으며, 의사결정도 '다'에 해당

◆ 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도(제14조 제7호 나목 관련)[별표 3]



◆ 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료		√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료		√	√	√
섭취량평가자료		√	√	√
영양평가자료, 생물학적 유용성자료, 인체적용시험자료			√	√
독성시험자료				√

(가) 섭취근거자료

○ 미국 약전(USP) 확인

- Valerenic Acid, Acetoxyvalerenic Acid, Hydroxyvalerenic Acid를 지표성분으로 하는 Valerian Extract⁷⁾
- VALERIAN, USP 29-NF 24 p. 2384, PF 32(2) p. 394, Microbial enumeration <2021>⁸⁾

Powdered Valerian Extract
LOT F0L397

Molecular Formula
n/f

Molecular Weight
n/f

CAS Number
8057-49-6

Valerenic acid
Chemical Formula: C₁₁H₁₆O₂
Molecular Weight: 172.25

Acetoxyvalerenic acid
Chemical Formula: C₁₃H₁₈O₃
Molecular Weight: 234.27

Hydroxyvalerenic acid
Chemical Formula: C₁₁H₁₆O₃
Molecular Weight: 188.23

LABEL TEXT

USP REFERENCE STANDARD

POWDERED VALERIAN EXTRACT 1 g

Do not dry. Keep container tightly closed.
Protect from light. Protect from moisture.
Store at controlled room temperature.

USP, 1200 I Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-051-0666
CAT. NO. 1707931 Material mfg. in Italy

Revisions to USP 30–NF 25, First Supplement
Published February 2007

General Chapters
Monographs: A–C **D–N** O–S T–Z

Upcoming Revisions to USP 30–NF 25, First Supplement	Scientific Liaison
THIABENDAZOLE TABLETS USP 27, p. 1821 PF29(6) p. 1991 Current Title (not to change until February 1, 2007) PF29(6) p. 1991 New Title: Thiabendazole Chewable Tablets (to become official February 1, 2007) Definition Packaging and storage Labeling USP Reference standards Identification A, B Uniformity of dosage units Assay	0

○ European Food Safety Authority 확인

- Valerian Extract가 침출차용도로 사용 가능함을 확인⁹⁾(...modify the existing MRL for cyprodinil in herbs (chervil, chives, celery leaves, parsley, sage, rosemary, thyme, basil, bay leaves, tarragon), beet leaves (chard), beetroots, roots of herbal infusions (valerian root, ginseng root), roots of spices (liquorice, ginger, turmeric, horseradish).)

Overview of the proposed EC MRLs

Commodity	Existing EC MRL (mg/kg)	Proposed EC MRL (mg/kg)	Justification for the proposal
Cyprodinil			
Herbs, beet leaves (chard)	0.05*	10 (or 13)*	The MRL proposal is supported by data and no risk for consumers was identified for the proposed uses.
Beetroots	0.05*	1	The MRL proposal is supported by data and no risk for consumers was identified for the proposed uses.
Roots of herbal infusions (valerian root, ginseng root) and roots of spices (liquorice, ginger, turmeric (curcuma), horseradish)	0.05*	1	For the proposed uses no risk for consumers was identified and the MRL proposal is acceptable provided that the growth conditions for the crops like ginger, liquorice, ginseng, turmeric are comparable to the growth conditions of carrots

(*) Indicates that the MRL is set at the limit of analytical quantification.
* – 10 mg/kg is the applicant's MRL proposal, 13 mg/kg is derived from the MRL calculations

7) 2012 The United States Pharmacopeial Convention.

8) 2007.02 Revisions to USP 30–NF 25, First Supplement

9) 2009.02 REASONED OPINION OF EFSA, Modification of the existing MRLs for cyprodinil in various crops, Prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR)

(나) 안전성 정보 자료

○ PubMed 확인

- 42명의 중환자에 대하여 처방하였으며, 환자의 수면시간이 증가함을 확인하였음. 직접적인 부작용은 확인되지 않음¹⁰⁾(This study supports the hypothesis that valerian acupressure on the Shenmen,Neiguan, and Yongquan acupoints could improve the sleeping time and quality of ICU patients)

Table 2
Comparison of sleep conditions between the two groups.

	Experimental (n = 41)		Control (n = 44)		p ^a
	M	(SD)	M	(SD)	
Sleep hours by observation					
Hours of sleep					
1st night	2.3	(1.6)	2.8	(1.9)	.26
2nd night	3.4	(1.7)	2.6	(1.5)	.03*
p	<.001*	.62			
Hours spent awake					
1st night	5.2	(1.7)	4.7	(1.9)	.23
2nd night	4.3	(1.7)	4.6	(1.8)	.51
p	.01*	.52			
Uncertain hours					
1st night	0.5	(0.8)	0.5	(0.7)	.82
2nd night	0.3	(0.7)	0.8	(1.5)	.04*
p	.27	.19			
Sleep hours by actigraphy					
Hours of sleep					
1st night	7.3	(1.3)	7.3	(1.2)	.99
2nd night	7.8	(0.3)	7.1	(1.4)	<.001*
p	.01*	.55			
Minutes spent awake					
1st night	45.1	(82.5)	45.3	(72.7)	.99
2nd night	14.2	(17.0)	54.6	(86.1)	<.001*
p	.01*	.99			
Waking frequency					
1st night	4.6	(6.2)	4.3	(4.4)	.84
2nd night	2.3	(2.8)	6.3	(8.2)	<.001*
p	.02*	.048*			
Stanford Sleepiness Scale					
1st night	2.9	(0.7)	3.7	(1.2)	<.001*
2nd night	2.5	(0.5)	3.4	(1.1)	<.001*
p ^b	.03*	.18			

^a Examined by independent t test.
^b Examined by paired t test.
* p < .05.

- 227명의 암환자에 대하여 불면증 개선 효능을 평가하였으나, 추가적인 연구가 필요함. 일상적인 부작용증상(Baseline)외에 알려진 부작용에 대하여 보고되지 않음¹¹⁾(In terms of toxicity, there were no significant differences between arms for the self reported side effect items (headache, trouble waking, nausea) at baseline, week 4 or week 8).

Percent of patients reporting categorical changes from baseline on the pittsburgh sleep Quality Index Subscales

		Valerian	Placebo	P value	
Sleep Quality	Worse	2(3%)	5(8%)	0.199	
	Same	33(49%)	37(57%)		
	Better	33(49%)	25(35%)		
	Worse	3(5%)	2(3%)		0.027
	Same	28(41%)	25(28%)		
	Better	35(55%)	33(48%)		
Sleep Latency	Worse	6(10%)	18(28%)	0.010	
	Same	30(48%)	26(40%)		
	Better	27(43%)	21(32%)		
	Worse	3(5%)	11(18%)		0.072
	Same	28(47%)	29(48%)		
	Better	27(47%)	21(34%)		
Sleep Duration	Worse	6(9%)	10(16%)	0.244	
	Same	26(39%)	29(46%)		
	Better	34(52%)	24(38%)		
	Worse	8(13%)	4(7%)		0.148
	Same	19(31%)	28(48%)		
	Better	34(56%)	27(46%)		

- 10) The effectiveness of valerian acupressure on the sleep of ICU patients: A randomized clinical trial, Ji-Han Chen, Yuh-Huey Chao, International Journal of Nursing Studies, 49, 2012, 913-920
- 11) The Use of Valeriana Officinalis (Valerian) in Improving Sleep in Patients Who Are Undergoing Treatment for Cancer: A Phase III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study: NCCTG Trial, N01C5, Debra L, Barton, J Support Oncol. 2011 ; 9(1): 24-31

- 18세~75세의 405명을 대상으로 수면의 질 개선에 대한 효능을 평가함. 보고할만한 부작용은 확인되지 않음¹²⁾(There were no serious adverse events and no important or statistically significant differences in minor adverse events).

Table 2. Run-in period results

	Valerian (N= 202)	Placebo (N= 203)
Sleep quality (1 = very bad to 7 = very good)		
Mean (standard deviation)	3.89 (0.83)	3.91 (0.75)
Median (range)	3.93 (1.00–6.36)	3.93 (1.29–6.14)
asleep onset latency (1 = <5 minutes to 7 = ≥3 hours)		
Mean (standard deviation)	3.61 (1.13)	3.47 (1.04)
Median (range)	3.56 (1.00–7.00)	3.36 (1.14–6.93)
Night awakenings (1 = none to 7 = >10 times)		
Mean (standard deviation)	2.53 (0.93)	2.40 (0.80)
Median (range)	2.43 (1.00–7.00)	2.29 (1.00–6.79)
Sleep duration (1 = <4 hours to 7 = ≥8 hours)		
Mean (standard deviation)	3.98 (1.04)	4.08 (0.98)
Median (range)	4.00 (1.00–6.79)	4.15 (1.14–6.21)
Energy level next day (1 = very unenergetic to 7 = very energetic)		
Mean (standard deviation)	3.91 (0.80)	3.83 (0.68)
Median (range)	3.88 (1.71–6.50)	3.86 (1.79–6.14)

12) A Televised, Web-Based Randomised Trial of an Herbal Remedy (Valerian) for Insomnia, Andrew D, Oxman, Plos one, 10, 2007

(다) 섭취량 평가 자료

- 미국 시판 중인 관련 제품의 Dosage 확인

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
USA		Valerian Root 450mg	Nature's Bounty	450 mg	Valerian (Valeriana officinalis) (root) 450 mg	-임신, 수유 또는 약물 복용 중인 경우, 사용하기 전에 의사와 상의하십시오. - 과도한 섭취는 중장비 또는 자동차를 작동할 때 어려움이 있을 수 있습니다.	relaxation sleepiness
Australia		Faulding® Remedies Valerian Forte 2000	Faulding®	2,000 mg	Valeriana officinalis(Valerian) extract Equiv dry root & rhizome 2g	-비타민보충제는 건강한 신단으로 대체하십시오. -증상이 지속되면 전문가와 상의하십시오	stress and mild anxiety, sleeplessness relieve nervous tension
Australia		Valerian 1000 Herbal Relaxer 60 Tabs	Australia NutralCare Product	2,000 mg	Valeriana officinalis(Valerian) root 1,000mg*2	-비타민보충제는 건강한 신단으로 대체하십시오. -증상이 지속되면 전문가와 상의하십시오	stress, mild anxiety, muscle cramps of the digestive system, nervous tension, Insomnia
USA		Nature's Way® Valerian Root	Nature's Way®	1,590 mg	Valerian (root)1,59mg	-진정제를 복용하거나 임신, 수유 중인 경우 의사와 상의하십시오. -술을 피하고 운전하거나 기계를 작동하지 마십시오.	sleep
USA		NATURE'S ANSWER® - VALERIAN ROOT	NATURE'S ANSWER®	1 ml	Valerian Root extract 1,000 mg	-임신, 수유중에는 사용하지 마십시오 -처방약물을 복용하는 경우 의사와 상의하십시오 바랍니다.	restful sleep
USA		Valerian Extract - 60 Vegetarian Capsules	21st Century HealthCare	300 mg	Valerian Extract(root) 300 mg		restful sleep
USA		GNC Herbal Plus® Standardized Valerian Root	GNC Herbal Plus®	500 mg	Valerian root extract (Valeriana officinalis L.) (0.8% Valerenic acid =4 mg)	-임신, 수유 또는 약물을 복용하는 경우, 의사와 상의하십시오 -수술 2주전에는 사용을 중단하십시오.	restful sleep

(라) 영양 평가 자료

- 발레리안 추출물이 CYP3A4대사 및 P-Glycoprotein 활성을 저해시킴¹³⁾
- 발레리안 추출물이 midazolam, caffeine, chlorzoxazone, debrisoquine, dextromethorphan, alprazolam level의 약물 상호작용이 거의 없는 것으로 나타남^{14),15)}
- 발레리안을 섭취 시 Isoflurane(흡입 마취제)로 마취를 진행 시 상승작용에 결합이 나타났으며, midazolam(주사 마취제)로 마취 시 축적효과가 나타남.

(마) 생물학적 유용성 정보

- 발레리안 추출물 single dose로 600 mg 섭취 후 혈액에서 약 3시간안에 valerenic acid 함량이 최대로 높아졌다가 8시간 이후 거의 검출되지 않음($T_{1/2}$ 0.4~1.9 hr, AUC 2.53~9.83 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{hr}$)¹⁶⁾
- 발레리안 추출물을 single dose 300 mg 섭취하였을 때 T_{max} 는 평균 1.7 hr, $T_{1/2}$ 는 1.02 hr, AUC 6.54 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{hr}$ 로 나타났으며, multi-dose로 2주 동안 매일 300 mg 섭취하였을 경우 T_{max} 는 평균 1.8 hr, $T_{1/2}$ 는 1.21 hr, AUC 6.35 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{hr}$ 로 보고됨¹⁷⁾.

13) Bent H. In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-Glycoprotein-Mediated transport by trade herbal Products, *Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102, 466-475

14) Silje Engdal et al. Identification and exploration of herb-drug combinations used by cancer patients, *Intergrative cancer therapies*, 8, 29-36, 2009

15) Bill J. et al. In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P400 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4 phenotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 77(5) 415-426, 2005

16) Gail D et al. Pharmacokinetics of valerenic acid after administration of Valerian in healthy subjects. *Phytother. Res.* 19, 801-803, 2005

17) Gail D et al. Pharmacokinetics of valerenic acid after single and multiple doses of valerian in older women. *Phytother. Res.* 24, 1442-1446, 2010

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 연도별연구목표에 따른 달성도

구분	연구개발의 목표	수행내용 및 달성도
1차년도	항스트레스 효능을 가지는 천연유래 추출물 확보	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 쥐오줌풀, 미강, 레몬밤 등 소재 스크리닝 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	동물실험을 통한 항스트레스 효능 검증 1(혈액 검사)	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재들의 혈액 내 스트레스 조절 인자들을 비교 평가하여 항 스트레스 개선 효과 확인 ▶ 논문 및 특허 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	동물실험을 통한 항스트레스 효능 검증 2(조직 및 기관 검사)	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재들의 스트레스에 따른 조직 및 기관 검사를 통한 항 스트레스 개선 효과 확인 ▶ 논문 및 특허 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
2차년도	인체적용 시험용 시제품 제작	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 인체적용시험에 필요한 시제품 및 위약 설계 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	원료 기준 확립	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발 시제품의 제형 안정성 가속 시험 및 평가 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	개별인정 자료 수집	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 국내외 안전성 평가 자료 확보 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	동물실험을 통한 추출물의 유효성분 투여에 의한 스트레스 효능 검증	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 스트레스 유도 동물의 각추출물의 유효성분 투여를 통한 효능 검증 ▶ 논문 및 특허 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	동물실험을 통한 추출물 함유 제품의 스트레스 효능 검증	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 스트레스 유도 동물의 시제품 및 미국 판매 제품(대조군) 투여를 통한 효능 검증 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
3차년도	인체적용시험 제품 개발	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 인체적용시험용 시제품(본약 및 위약) 파일럿 단위 생산 진행 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	원료의 제품화	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 쥐오줌풀 추출물을 활용한 건강기능식품 개발 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	개별인정원료 추진	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 항스트레스 효능을 가지는 개별인정형 원료 추진 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	인체적용시험을 통한 안전성 확보 및 효능 규명	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 쥐오줌풀 추출물의 항스트레스 효과를 다양한 심리 사회적, 생물학적 표지자를 통하여 확인 ▶ 산업화 적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%

제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

- 4가지 천연 추출물의 지표성분의 분석 가능 여부를 확인하고 미생물 및 중금속 안전성을 점검하여 개별인정진행에 충족하는 추출물을 확보하였음.
- 본 연구는 표준화가 가능한 천연소재를 screening 한 후 원료의 지표물질을 제시하고 아울러 그 기능성분의 동물실험(1차, 2차) 검증을 통한 생리활성 연구를 통해 항스트레스 유력 소재 개발을 목표로 in vivo 및 인체적용시험상의 실험을 통하여 항스트레스 효능을 평가하였음.
- 추출물의 동물실험에서 신체적, 정신적인 스트레스에 대한 저항 능력을 혈액검사, 조직 및 기관검사를 통하여 효능 평가하였으며, 그 중 가장 높은 효능을 나타내는 쥐오줌풀 산업화를 진행하였음.
- 시제품의 제형 연구를 통하여 총 5가지 제형을 개발하였으며, 본 시제품의 안정성 평가를 통하여 유통기한을 설정하였다. 시장성(상품성)평가를 통하여 제품화 진행 방향 설정하였음.
- 쥐오줌풀 추출물시제품과 미국 내 판매 제품의 신체적 및 정신적 스트레스에 대한 효과를 평가하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

○ 연구개발 성과(논문)

논문명	발표자	학술지명	국내외여부
Valeriana officianalis extract and its main component, valerenic acid, ameliorate D-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differetiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation	남성민, 최정훈, 유대영, 김우석, 정효영, 김종휘, 강수용, 박재일, 김동우, 김완재, 윤여성, 황인구	Experimental Gerontology 48(2013)1369-1377	해외
Vaeriana officinalis extracts ameliorate neuronal damage by reducing lipid peroxidation in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia	유대영, 정효영, 남성민, 김종휘, 최정훈, 곽연길, 유미영, 이상희, 윤여성, 황인구	Journal of Medicinal Food	해외
Ameliorative effects of valerenic acid against physical and psychological by reducing the turnover of serotonin and norepinephrine in mouse hippocampus-amygdala region	정효영, 유대영, 남성민, 김종휘, 최정훈, 유미영, 이상휘, 윤여성, 황인구	Journal of Medicinal Food	해외
Valeriana officinalis root extract suppress physical stress by electric shock and psychological stress by nociceptive stimulation-evoked responses by decreasing the ratio of monoamine neurotransmitters to their metabolites	정효영, 유대영, 김우석, 남성민, 김종휘, 최정훈, 곽연길, 윤여성, 황인구	BioMed Central	해외

○ 연구개발 성과(특허)

출원일자	발명의 명칭	출원인	출원번호
13.03.28	레몬밤 추출물을 함유하는 스트레스 완화용 기능성 식품 조성물	(주)네추럴에프앤피/ 서울대학교 산학협력단	10-2013-0033575
13.12.24	귀오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	(주)네추럴에프앤피/ 서울대학교 산학협력단	10-2013-0162717
14.08.26	귀오줌풀 추출물을 이용한 허혈성 뇌혈관 질환 예방 또는 치료용 조성물 및 그이 제조 방법	(주)네추럴에프앤피/ 서울대학교 산학협력단	10-2014-0111385

○ 성과활용 계획

- 본 연구결과를 토대로 항스트레스 효능을 가지는 발레리안 추출물의 개별인정형 원료로 승인 받아 건강기능식품 제품화할 계획임.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

퀴오좁풀의 안전성과 건강 기능성에 관한 해외 과학 기술 정보를 아래 표에 정리하였다. 그러나 퀴오좁풀을 이용하여 설문지 법을 이용한 항스트레스 효능 분석은 보고되었으나, 물리적인 효능 분석에 대한 검사는 전무한 실정이다.

Bent H. Hellum, Odd Georg Nilsen	<i>In vitro</i> Inhibition of CYP3A4 Metabolism and P-Glycoprotein-Mediated Transport by Trade Herbal Products
Silje Engdal, MPharm, Olbjørn Klepp, MD, PhD, Odd Georg Nilsen, PhD	Identification and Exploration of Herb-Drug Combinations Used By Cancer Patients
R. Awad, D. Levac, P. Cybulska, Z. Merali, V.L. Trudeau, and J.T. Arnason	Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the g-aminobutyric acid (GABA) system1
Miguel Hattesohtl., Bjoj\$ rn Feistel, Hartwig Sievers, Romanus Lehnfeld, Mirjam Hegger, Hilke Winterhoff	Extracts of Valeriana officinalis L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties
Bradly P. Jacobs, MD, MPH, Stephen Bent, MD, Jeffrey A. Tice, MD, Terri Blackwell, MA, and Steven R. Cummings, MD, FACP	An Internet-Based Randomized, Placebo-Controlled Trial of Kava and Valerian for Anxiety and Insomnia
Gail D. Anderson, Gary W. Elmer, Eric D. Kantor, Ian E. Templeton and Michael V. Vitiello	Pharmacokinetics of Valerenic Acid after Administration of Valerian in Healthy Subjects
Gail D. Anderson, Gary W. Elmer, Diana M. Taibi, Michael V. Vitiello, Eric Kantor, Thomas F. Kalhorn, William N. Howald, Suzanne Barsness and Carol A. Landis	Pharmacokinetics of Valerenic Acid After Single and Multiple Doses of Valerian in Older Women
Miyasaka LS, Atallah AN, Soares B	Valerian for anxiety disorders(review)
Roberto Andreatini, vania A. Sartori, Maria L. V. Seabra, Jose Roberto Leite	Effect of Valeporiates(valerian Extract) in generalized anxiety disorder : a randomized placebo-controlled pilot study
Ma Isabel Fernandez-San-Martin, Roser Masa-Font, Laura Palacios-Soler, Pilar Sancho-Gomez, Cristina Calbo-Caldentey, Gemma Flores-Mateo	Effectiveness of Valerian on insomnia: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials
Gisela Balderer and Alexander A. Borb-ly	Effect of valerian on human sleep
J. J. Torrado	In vitro release of valerenic and hydroxyvalerenic acids from valerian tablets
Bill J. Gurley, PhD., Stephanie F. Gardner, PharmD., Ed.D., Martha A. Hubbard, MS, D. Keith Williams, PhD., W. Brooks Gentry, MD., Ikhlas A. Khan, PhD, and Amit Shah.	In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4 phenotypes

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.