

발간등록번호

11-1543000-002880-01

# 국내 자생되는 황칠나무의 추출물을 이용한 맞춤형 여성갱년기증후군 개선제 개발

최종보고서

2019. 09. 25.

주관연구기관 / 리후헬스케어(주)  
협동연구기관 / 아주대학교 산학협력단  
숙명여자대학교 산학협력단  
순천향대학교 산학협력단

**농 립 축 산 식 품 부**

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

## <뒷면지>

### 주 의

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

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생되는 황칠나무의 추출물을 이용한 맞춤형 여성갱년기증후군 개선제 개발” (개발기간 : 2016. 07. 07 ~ 2019. 06. 30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 09. 20

주관연구기관명 : 리후헬스케어(주)

주관연구책임자 : 이 승 식

협동연구기관명 : 아주대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 박 영 준

협동연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 장 미 선

협동연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 해 혁

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



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  | o f<br>Medici<br>n a l<br>F o o d<br>22(2) | 52<br>(중국)C<br>N<br>108463<br>231<br>A/PCT<br>/KR201<br>6/0146<br>52 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

<요약문>

1. 황칠추출분말 제조공정 표준화
2. 난소절제 랫드를 이용한 황칠추출분말의 여성갱년기 기능성 효능평가
3. 난소절제 랫드에서의 여성갱년기 효능평가에 대한 논문 게재
4. 인체적용시험약 제조
5. 황칠추출분말 건강기능식품 제품화 및 사업화
6. 건강기능성 제품의 최적 제형 조성 선정
7. 건강기능성 제품 안정성평가
8. 복합제형 연구
9. 건강기능성 제형 대량생산을 위한 공정 최적화
10. 시제품에 대한 인체적용시험을 통한 안전성 확보 및 효능 규명

보고서 면수

1. 36 쪽
2. 51 쪽
3. 60 쪽
4. 60 쪽
5. 63 쪽
6. 64 쪽
7. 72 쪽
8. 75 쪽
9. 86 쪽
10. 94 쪽

## 국문 요약문

|                        |   |
|------------------------|---|
| <p>연구의<br/>목적 및 내용</p> | <p><b>1. 연구개발 목적</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 자생하는 황칠나무를 이용하여 여성 갱년기 증상 개선에 도움을 주는 건강 기능식품 소재를 개발하는 것을 목적으로 한다.</li> </ul> <p><b>2. 연구 내용</b></p> <p>가. 주관기관 - 리후헬스케어(주) (구: 제삼바이오잠)</p> <p><b>(1) 황칠추출분말 제조공정 표준화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인체적용 시험용 황칠나무추출분말을 위탁제조업체인 알파비엔에이치(주) 대량 제조 및 생산하였음.</li> <li>- 아주대학교와 협업하여 대량 생산된 황칠추출분말 간이시험을 통하여 함량시험 적합여부를 확인하였음.</li> <li>- 국가공인 인증시험기간에 scale up 전 후 황칠추출분말 분석을 의뢰하여, scale up 과정에서 발생 할 수 있는 지표성분 함량 변화를 분석하여 재현성을 확인하였음.</li> <li>- 제조공정별 수율 및 지표성분 함량 변화를 측정였으며, 제조공정 표준화작업을 완료하였음.</li> <li>- 지표성분에 대한 시험방법벨리데이션을 완료하였으며, 분석방법을 개선하였음.</li> <li>- 황칠추출분말 내 영양성분, 미생물, 잔류농약, 중금속 등을 분석 하여 불검출 또는 기준 이하로 확인하였음.</li> </ul> <p><b>(2) 난소절제 랫드에서 에스트로겐 활성 및 골다공증 개선 바이오마커 확인</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 여성갱년기 모델인 난소적출한 랫드에서 황칠추출분말에 대한 에스트로겐 활성 및 골다공증 개선 분자적 작용기작을 평가하였음.</li> <li>- 황칠추출분말은 에스트로겐<math>\alpha</math> 활성을 유도하고, 골다공증을 유발하는 바이오마커인 CTX와 Osteocalcin의 농도를 감소하여 갱년기 여성의 골다공증 개선 효능이 있음을 증명하였음.</li> <li>- 안전성 평가로서 자궁증식 및 질의 증식을 평가하였을 때, 황칠추출분말은 자궁과 질의 변화가 나타나지 않았으므로 안전한 물질로서 규명 됨.</li> </ul> <p><b>(3) 인체적용시험약 제조</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추가 전임상 시험을 통해 인체적용 시 일일복용량을 설정하였음.</li> <li>- 인체적용시험 시 투여할 제형을 위탁제조업체인 한국노바렉스(주)와 협업하여 개발 및 생산하였음.</li> <li>- 플라시보(위약)는 효능을 나타내는 성분을 포함하지 않는 부형제 및 착색제를 사용하였으며, 외관으로 구별이 되지 않도록 담갈색 캡슐제형으로 선정하여 제조하였음.</li> </ul> <p><b>(4) 건강기능식품 제품화 및 산업화 연구</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 휴온스내츄럴에서 황칠추출물을 함유하는 ‘황제를위하여’, ‘황후미인’ 일반식품으로 개발 및 생산하였음.</li> <li>- (주)유니셀팜을 통해 황칠추출물을 부원료로 함유하는 남성 건강기능식품인 홈런킹을 개발 및 생산 판매하고 있음.</li> <li>- 식물성 원료를 이용하여 비건요거트를 개발하는 업체로, 추후 황칠추출분말을 함유하여 제품 개발을 진행 중에 있음.</li> <li>- 갱년기여성에 도움을 줌 편의 건강기능식품 개별인정형을 위한 CRO기관 선정 및 신청 완료.</li> </ul> |
|------------------------|---|

- 다양한 언론사들의 홍보와 세계제약산업박람회 전시를 통해 갱년기 증상 개선 관련 국내·외 건강기능식품 제조업체 및 제약업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 황칠나무 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있었음.

**나. 제 1협동과정 - 아주대학교 산학협력단**

**(1) 건강 기능성 제품의 최적 제형 조성 선정**

- 황칠 원료 자체 흐름성을 고려하여 습식과립법이 아닌 생산의 이점을 고려한 직 타법으로 제조하였으며, 제조 과정 시 발생한 타정장애를 제형 성상 변경과 조성 비율 변경을 통해 개선하였음.

**(2) 건강 기능성 제품의 기준 및 시험법 확립**

- 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 시험을 통해 황칠의 기능성분인 Rutin이 신뢰있게 분석됨을 확인하였음.

**(3) 건강 기능성 제형 안정성 연구**

- 위 선정된 최종 제형에 대하여 안정성 연구를 진행하였으며, 단일제형 및 복합제형 모두 6개월 해당 안정성 시험 기간동안 안정한 것으로 확인 되었으며, 이에 건강 기능성 제형에 적합함을 확인하였음.

**(4) 제형 생산공정 최적화**

- 생산의 편리성을 위해 습식과립법에서 직타법으로 변경하였으며, 제조 과정 시 발생한 타정장애를 제형 성상 변경과 조성 비율 변경을 통해 개선하였음.

**다. 제 2 협동과정- 숙명여자대학교 산학협력단**

**(1) 황칠나무추출물의 항갱년기 효능 및 분자적 작용기전 규명**

- 에스트로겐활성 활성을 지니는 황칠나무추출물의 수용체 아형 및 조직세포주 선택적인 활성의 분자적기작을 규명함으로써, 황칠나무추출물의 효능 및 안전성 발현의 분자표적을 밝히는데 기여하였음.
- 산지 및 추출조건 등에 따라 얻어진 여러 종류의 황칠나무추출물 및 개별활성물질 (rutin, chlorogenic acid, quercetin)의 에스트로겐성을 세포수준에서 평가하고, 개발후보시료를 선정하는데 기여하였음.
- 난소적제 랫드 *in vivo* 모델에서 시료의 에스트로겐성을 성공적으로 평가하여 개발후보시료의 생물학적 활성을 확인하는데 기여하였음.

**라. 제 3협동과정- 순천향대학교 산학협력단**

**(1) 예비 인체적용시험(Pilot study)을 통한 본 인체적용시험 타당성 검토 및 다양한 매체를 통한 갱년기 연구 대상자 모집**

- 기관 내 인체적용시험 관련 전산시스템 마련 (대상자 등록시스템, 약속처방 등록시스템 등).
- 인체적용시험 참여 대상자의 동의를 구하는 '대상자 설명문 및 동의서'와 임상정보를 기록보관하는 '증례기록지' 등 서류 작성
- 피해자 보상규약 마련 및 임상시험 보험 청약서 발급
- 주관, 1협동, 2협동 기관에서 제공한 황칠추출물의 안정성, 활성 평가, 제형의 규격과 기준 등의 자료를 토대로 IRB심의 서류 작성
- 필요한 설문지 자료 작성 및 설문 시기 선정(초기방문, 투약 직전, 투약 후 12주)
- 윤리적으로 임상 시험을 하기 위해 연구계획서 및 기타 서류 작성 및 순천향대학교 부천병

|                            |   |
|----------------------------|---|
|                            | <p>원 임상연구심의위원회(IRB) 심의 신청 완료</p> <p><b>(2) 인체적용시험 효능 규명 및 안전성 확보</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠추출분말을 섭취한 갱년기 여성을 대상으로 kupperman index, menopause rating scale (MRS), state-trait anxiety inventory (STAI score), vaginal maturation index (VMI), 질 pH, hot flush score 등의 갱년기 지수 변화를 평가하였음.</li> <li>- 안전성 평가를 위하여 황칠추출분말 복용 시 이상반응을 추적조사 하였으며, 유방밀도, 자궁내막의 두께, 에스트라디올, 난포자극호르몬, 황체형성호르몬 수치를 측정하였음.</li> <li>- 본 연구결과 kupperman index가 유의적으로 경감되었음을 확인하였으며, 황칠추출분말이 안전하다고 평가되었음.</li> </ul>  |
| <p>연구개발성과</p>              | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 여성갱년기 증상 개선에 대한 검증된 효능 및 연구내용을 바탕으로 비SCI 논문 3편, SCI 논문 1편 지식재산권(특허) 출원 2건(미국 · 중국 PCT 출원) 및 국내특허 등록 1건 완료함.</li> <li>2. 지표성분을 설정하여 식품의약품안전처 건강기능식품 원료 표준규격을 확립하였으며, 황칠추출분말 제조공정을 표준화하였음.</li> <li>3. 세포시험 및 동물시험을 통하여 에스트로겐활성을 및 갱년기 증상 중 하나인 골다공증개선 효능을 확인하였음.</li> <li>4. 1일 섭취량을 결정하여 인체적용시험을 통해 Kupperman index 지수가 경감되는 것을 확인하였음.</li> <li>5. 본 연구과제에 참여를 통해 황칠 내 지표성분 분석방법 개발, 전임상 및 인체에서 효능 및 안전성 평가 기술에 대한 전문인력을 7명 배출하였으며, 연구과제의 전문성을 높이기 위하여 3명의 인력을 고용하였음.</li> <li>6. 세계제약박람회에서 본 연구팀이 황칠추출분말의 갱년기증후군 개선 및 이의 제조방법 기술의 내용을 홍보함으로써 국내·외 건강기능성식품제조업체 및 제약업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 황칠나무 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있었음.</li> <li>7. 황칠추출분말의 개별인정형 획득 전에 본 소재를 부원료로 이용하여 ‘황제의 품격’, ‘황제를 위하여’, ‘황후미인’, ‘팔팔인생’, ‘흙런킹’ 제품명으로 제품 출시하였으며, 총 연구개발기간 동안 4억의 매출액을 달성하였음.</li> </ol> |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 원료인정 획득</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 과학적인 접근의 효능검증과 인체적용시험을 기반으로 특허 및 논문 등의 확보된 지식재산권을 이용하여, 개별인정형 원료 신청하였으며, 국내 자생하는 황칠로서 식품의약품안전처의 건강기능식품으로 인정되는 첫 번째 사례가 될 것 임.</li> </ul> </li> <li>2. <b>황칠나무의 원료표준화에 의한 대량생산</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 오랫동안 식품으로서 사용의 한계를 벗어나, 건강기능식품으로서의 개발의 첫 번째 사례가 될 것 이며, 원료표준화에 대한 독보적인 기술협약 및 특허권으로 황칠나무의 항갱년기에 대한 시장 독점권이 가능.</li> <li>- 제조공정 표준화로 품질 이상 없이 대량생산 가능하므로, 국내 제조처에 원활한 원료 공급이 가능할 것으로 예상되며, 대량생산으로 황칠농가의 소득이 증가할 것으로 예상됨.</li> <li>- 지표성분 등 품질에 영향을 미치는 요소에 대한 분석관련 기술을 원료 제조처에 교육 및 기술이전을 실시함으로써, 건강기능식품 분석 전문인력을 창출할 수 있음.</li> </ul> </li> </ol>  |



|  |                            |                        |              |          |           |
|--|----------------------------|------------------------|--------------|----------|-----------|
| <b>3. 건강기능식품 제품화 및 사업화</b><br>- 개별인정형 획득 후 국내·외 제약업체 혹은 건강기능식품 전문업체에 표준화된 원료를 공급할 뿐만 아니라, 직접 완제품으로 개발하여 국내 홈쇼핑, 온라인 및 대형 유통채널에서 판매할 예정.<br>- 지속적인 세계제약산업박람회에 황칠나무의 갱년기 증상 개선 효능을 홍보함으로써, 전 세계적으로 국내 바이오소재 개발의 전문성을 보여줄 수 있음.<br>- 이는 국내 농가 소득의 증가와 함께 지역경제를 활성화시키고, 고부가 가치 사업을 육성할 수 있음. |                            |                        |              |          |           |
| <b>국문핵심어<br/>(5개 이내)</b>   | 황칠나무                       | 건강기능식품                 | 여성갱년기        | 에스트로겐    | 폐경기       |
| <b>영문핵심어<br/>(5개 이내)</b>   | Dendropanax morbifera LEV. | health functional food | climacterium | estrogen | menopause |

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

# 〈 목 차 〉

|   |     |
|---|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....                            | 1   |
| 제 1 절 연구개발 목적 .....                               | 1   |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 .....                             | 1   |
| 1. 황칠나무 추출물을 이용한 자생 바이오소재 개발의 필요성 .....           | 1   |
| 2. 여성갱년기 치료제 개발의 필요성 .....                        | 2   |
| 3. 개별인정형 및 맞춤형 건강기능식품 개발의 필요성 .....               | 5   |
| 제 3 절 연구개발 대상의 국내·외 현황 .....                      | 6   |
| 1. 국내 기술 수준 및 시장현황 .....                          | 6   |
| 2. 국외 기술 수준 및 시장현황 .....                          | 13  |
| 제 4 절 연구개발의 중요성 .....                             | 17  |
| 1. 기술적 측면 .....                                   | 17  |
| 2. 사회문화적 측면 .....                                 | 21  |
| 3. 경제산업적 측면 .....                                 | 22  |
| 제 5 절 선행연구 내용 및 결과 .....                          | 24  |
| 1. 황칠나무 추출물의 일부 성분분석 및 분석법 개발 연구에 대한 예비시험 .....   | 24  |
| 2. 황칠나무 추출물의 파이토에스트로겐성의 기능성과 에너지효능에 대한 선행연구 ..... | 25  |
| 3. 여성 폐경질환 관련 예비연구 수행 .....                       | 30  |
| 4. 특허출원 .....                                     | 31  |
| 제 2 장 연구수행 내용 및 결과 .....                          | 32  |
| 제 1 절 연구범위 및 연구수행 방법 .....                        | 32  |
| 제 2 절 연구수행 결과 .....                               | 36  |
| 1. 주관연구기관-리후헬스케어(주) .....                         | 36  |
| 가. 황칠나무추출분말 제조공정 표준화 .....                        | 36  |
| 나. 난소절제 랫드를 이용한 황칠추출분말의 여성갱년기 기능성 효능평가 .....      | 51  |
| 다. 인체적용시험약 제조 .....                               | 60  |
| 라. 황칠추출분말 건강기능식품 제품화 및 사업화 .....                  | 63  |
| 2. 제 1협동과정-아주대학교 산학협력단 .....                      | 64  |
| 가. 건강 기능성 제품의 최적 제형 조성 선정 .....                   | 64  |
| 나. 조성별 처방 연구 .....                                | 69  |
| 다. 건강 기능성 최종 제형 안정성 확보 .....                      | 72  |
| 라. 복합제형 연구 .....                                  | 75  |
| 마. 건강 기능성 제품의 기준 및 시험법 확립 .....                   | 81  |
| 바. 건강 기능성 제형 대량생산을 위한 공정 최적화 .....                | 86  |
| 사. 임상시험약에 사용한 원물을 이용한 유효성분 확인시험 .....             | 90  |
| 아. 원료 안정성 시험 .....                                | 92  |
| 3. 제 3협동과정-순천향대학교 산학협력단 .....                     | 94  |
| 가. 시제품에 대한 임상시험을 통한 안전성 확보 및 효능규명 .....           | 94  |
| 나. 임상시험 결과 고찰 .....                               | 107 |
| 제 3 장 목표 달성도 및 관련분야 기여도 .....                     | 108 |
| 제 1 절 세부과제별 목표 달성도 .....                          | 108 |

|       |                                       |     |
|-------|---------------------------------------|-----|
| 제 2 절 | 관련분야에의 기여도 .....                      | 112 |
| 제 3 절 | 목표 미달성 시 원인 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) ..... | 113 |
| 제 4 장 | 연구개발성과 및 성과활용계획 .....                 | 114 |
| 제 1 절 | 연구개발 성과 .....                         | 114 |
| 1.    | 논문게재 성과 .....                         | 114 |
| 2.    | 지식재산권 성과 .....                        | 115 |
| 3.    | 학술회의 발표 성과 .....                      | 115 |
| 4.    | 인력양성 .....                            | 116 |
| 5.    | 고용창출 .....                            | 116 |
| 6.    | 홍보성과 .....                            | 116 |
| 제 2 절 | 연구개발 성과 활용계획 .....                    | 118 |
| 1.    | 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 원료 인정 획득 .....  | 118 |
| 2.    | 교육 및 홍보 계획 .....                      | 118 |
| 3.    | 사업화 전략 구색 .....                       | 118 |
| 4.    | 과학적 활용계획 .....                        | 120 |
| 붙임.   | 참고 문헌 .....                           | 121 |
| 별첨 1. | 자체평가의견서 .....                         | 122 |

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

- 국내 자생하는 황칠나무를 이용하여 여성 갱년기 증상 개선에 도움을 주는 건강기능식품 소재를 개발하는 것을 목적으로 한다. 자세하게는 원료의 안정성 및 표준화 연구를 수행하여 균일한 품질과 우수한 약효를 갖도록 지표성분 확립 및 분석법을 확보하고자 하며, 항갱년기 활성소재로서의 생리활성의 분자적 작용기작을 규명하고, 안전성을 평가함으로써 전임상 및 임상과 연계되어지는 분자적 마커를 확립과 안전한 여성 갱년기 증상 개선에 도움을 주는 국내 바이오 소재를 개발하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 황칠나무 추출물을 이용한 자생 바이오소재 개발의 필요성

- 최근, 농림 및 수자원에서부터 기능성 바이오소재를 개발하여 산업화하고자 하는 연구가 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 매우 활발히 진행되고 있으며, 친환경 산업 개발의 흐름 속에서 많은 투자가 이루어지고 있으며 연구가 집중되고 있음.
- 우리나라의 경우, 보존자원이 많지 않은 특성과 현재 한미 FTA의 발효, 나고야 의정서의 발효 예정 등으로 국내 자생 식물자원에서부터의 바이오소재 개발이 절실히 요구되고 있음.
- 특히, 나고야 의정서 발효이후에 국내기업의 타국에 있는 유전자원의 접근이 제한되고, 경제적 이익 발생 시에는 그 이익을 공유하게 됨으로서, 바이오소재의 해외의존도가 높은 우리 경제의 현실에서는 매우 우려스러운 현실이며, 이에 대한 빠른 대응책이 필요한 실정임 (산림청 2015).
- 황칠나무는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 아열대성 상록교목으로, 이로부터 전통 칠의 재료로 채취되고 관상용 절화재료로도 이용할 수 있어서 경제적 가치가 높고 평가되는 산림자원 중의 하나임. 전남의 장흥 및 해남, 완도, 보길도 등의 서남해안 지역 및 제주도의 한라산 일대에 자생하는 것으로 알려져 있고, 장흥의 경우, 지방의 농가 활성화를 위해 황칠나무 재배단지 구축하고 있음(농림축산식품부 연구결과보고서, 2003).
- 이러한 황칠나무는 국제학명이 만병통치 나무라는 뜻의 *Dendropanax morbifer* LEV.로 알려져 있으며, 우리나라에서는 산삼나무라고도 불림. 황칠의 수피에서 은은한 안식향을 내는 황금빛의 수지액이 채취되며 이는 신경계에 대한 진정작용과 강장 작용을 나타낸다고 알려져 있음(아카데미북 2013). 옛 의약서인 본초강목, 강서초약과 같은 서적에서는 황칠은 피로가 풀리고 남성은 신장 강화, 여성에게는 월경불순을 해소하는 효능이 있으며, 황칠의 뿌리와 줄기는 맛이 달고 성질은 따뜻하여 거풍습과 황혈맥, 편두통에 효능이 있다고 기록되어 있음(한국농화학회지 2000, *J. Nutr. Health.*, 47(6), 2014).
- 최근 국내·외 황칠에 대한 논문 및 특허에서는  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -elemene,  $\beta$ -selinene,  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ -muurolene, germacrene D 등의 생리활성 물질과 추출물의 항산화, 항당뇨, 알코올로 인한 간손상 억제효과, 혈중 콜레스테롤 개선효과, 경조직(뼈와치아) 재생, 면역력 증강, 신경안정, 항균/항미생물작용 및 항암효과에 대한 효능평가 등이 연구되었음. 또한 국내 의약품 개발 전문 업체인 유한양행에서는 황칠을 이용하여 숙취해소음료인 '내일엔'을 출시한 사례가 있음(그림 1). 하지만 아직까지 여성갱년기 증상에 대한 효능에 대해서는 알려져 있지 않았으며, 관련 제품도 개발되지 않은 상황이고, 국내에서는 건강보조식품으로만 제품이 출시되었을 뿐

개별인정형 건강기능식품으로서 개발은 미진한 상황임.



그림 1. 황칠나무의 효능 및 황칠나무 추출물을 이용한 숙취해소음료(유한양행)

- 따라서 본 연구에서는 토종 산림자원인 황칠나무를 활용하여 유용성분을 발굴하고 지표성분을 표준화하여 여성갱년기 증상 개선 효능 및 안전성을 검증함으로써 건강기능제품을 개발하여 개별인정을 획득함으로써 국내 유전자원의 권리를 확보할 수 있음.

## 2. 여성갱년기 치료제 개발의 필요성

### 가. 여성의 폐경기(menopause)와 갱년기(climacteric periods)

- 여성의 폐경은 태어 난 후 약 50년 정도 지나면 유전적으로 이미 결정된 난소의 기능이 수명을 다함으로써 나타나는 월경의 중단 현상으로 생식능력의 소실을 의미함. 우리나라의 경우, 폐경이 되는 평균 연령은 49.7세이며, 일반적으로 48~52세에 폐경이 되는 경우가 대부분임(유진투자증권 2013). 여성 갱년기(climacteric periods)는 폐경을 전후하여 여성의 생식능력이 감소되고 소실되는 전환시기로 신체적 및 정신적으로 매우 불안정한 시기를 말함. 그 기간은 대개 폐경 3~5년 전, 후 약 10년 동안을 갱년기라고 부름. 이와 관련하여 여성은 폐경전기-폐경기 이행기-폐경-폐경 후기로 기간이 나누어지며 기간에 따라 신체적, 정신적 변화가 달라짐(표 1).

표 1. 기간에 따른 갱년기 이상 증상(약학정보원, 여성 갱년기와 식물성 에스트로겐 요법(1))

| 기 간              | 신체기관   | 증상/질환   |
|------------------|--------|---|
| 급 성<br>(수개월)     | 신경내분비  | 안면홍조/ 얼굴 달아오름/ 발한/ 불면증/ 기<br>분변화/ 불안/ 초조/ 기억력과 집중력 감퇴 |
| 월경정지<br>(수개월-수년) | 비뇨생식기  | 질위축/ 성교 불쾌증/ 성교 통증/ 성욕 감퇴<br>/ 요도 증후군                 |
| 만 성<br>(수년)      | 혈관(동맥) | 관상동맥/ 심장질환/ 혈전증                                       |
|                  | 골격     | 골다 공증   |

### 나. 에스트로젠 수용체 (Estrogen Receptor) subtype 활성화와 갱년기증상 개선

- 에스트로젠 수용체 (Estrogen receptor; ER)는 인체의 세포로 하여금 에스트로젠이 보내는

신호에 반응하게 만드는 수용체 단백질임. 현재로는 에스트로겐 수용체 알 (ER )와 에스트로겐 수용체 베타(ER ), 두 가지 에스트로겐 수용체 subtype의 존재 및 기능에 대해 규명됨. 알파 수용체는 뼈, 혈관 세포에 발현하는 한편, 베타 수용체는 알파 수용체가 많은 자궁이나 유방 조직에는 매우 작은 양으로 발현되고 있다고 알려짐.

- 지금까지 갱년기 증상 완화 건강기능식품에 대한 관심은 높으나, 대부분이 에스트로겐 부작용 (유방암, 자궁암 또는 자궁출혈 등)을 매개하는 에스트로겐 수용체 알파를 활성화시키는 단일 또는 복합추출물에 초점이 맞추어져 왔음. 에스트로겐의 순기능(심혈관질환 및 골다공증 예방 등)과 관련하는 에스트로겐 수용체 베타에 대한 작용제 활성을 가지는 소재를 개발하는 것이 에스트로겐대체요법으로서의 기능식품 제품 연구에 도움이 될 수 있음. 하지만, 미국 제약 기업 바이오노보(Bionovo)는 FDA가 개발을 진행하고 있는 폐경기 여성 안면홍조 및 골다공증 치료제 ‘MF101’의 임상시험에서 기존 갱년기 제품에 비해 우월성을 증명하지 못하여 개발이 중단되었음. 이 결과로 유추컨대, 에스트로이 결과로 유추컨대, 에스트로겐 수용체 베타 선택적인 활성이 갱년기 증상 개선에 큰 이익을 준다고 볼 수 없음. 따라서, 에스트로겐수용체 알파를 활성화 하되 weak estrogen 활성을 유지하며 에스트로겐 수용체 베타 역시 활성화 하는 것이 갱년기증상 개선이 결국 효용성이 클 것으로 예측할 수 있음.

#### 다. 폐경이행기 및 폐경의 진단 및 치료

- 40대 이후 생리 주기가 불규칙하면서 주기가 길어지는 경우에 갱년기로 의심하게 되며 임신이 나 다른 내분비학적 이상이 아니면 폐경이행기로 진단하고, 난소의 기능이 소실되어 자연적 생리 후에 1년간 생리가 없을 때 폐경으로 진단함. 수술적으로 양측 난소가 모두 제거된 상태는 수술적 폐경으로 진단함. 대부분 호르몬 치료를 진행하며 이는 폐경으로 결핍된 여성호르몬을 외부에서 보충하는 것을 의미함. 가장 이상적인 치료 시기는 폐경이 임박한 시기이면서 갱년기 증상이 나타날 때 또는 폐경초기에 하는 것이 적절함. 하지만 호르몬치료는 많은 부작용을 동반하기 때문에 꺼리는 경우가 많음.
- 기존 연구 결과들에 의하면 호르몬 치료를 5~10년 이상 장기적으로 시행한 경우에는 유방암 발병률이 경미한 정도로 증가하는 것으로 관찰되어짐. 하지만 여성호르몬과 유방암의 상관성에 대해서는 아직 체계적이고 장기적인 연구가 미흡한 실정임. 또한 여성호르몬을 단독으로 사용하는 경우에는 자궁내막암의 발생률이 증가한다고 알려짐. 따라서 여성호르몬치료를 대체할 수 있는 치료법이 절실히 필요함.

#### 라. 여성의 평균수명 증가 및 여성 구성비의 증가

- 우리나라 여성의 평균수명 증가와 더불어 중년인구 비율이 점차 증가될 것으로 추정되며, 여성 구성비의 증가로 갱년기 폐경 여성에 대한 건강의 중요성이 새롭게 대두됨. 우리나라 여성은 남성 대비 인구 구성비가 증가하고 있으며, 기대수명 증가와 더불어 중년 및 노년인구 비율이 점차 증가되고 있음 (그림2). 또한 갱년기 증상을 겪는 여성의 수는 중년층 여성의 인구 증가에 비례하여 늘어날 것이며, 인구 고령화의 추세 속에서 갱년기 진단 인구의 95%이상을 차지하는 45~59세의 여성 인구가 2019년까지 꾸준히 늘어날 것으로 전망됨(그림2). 또한 KI지수(쿠퍼만 인덱스)를 통하여 갱년기 자가 진단을 바탕으로 병원을 찾는 인구, 즉 진단 수요비율이 높아지

면서 진단인구 또한 꾸준히 증가할 것으로 예상됨(그림 3).

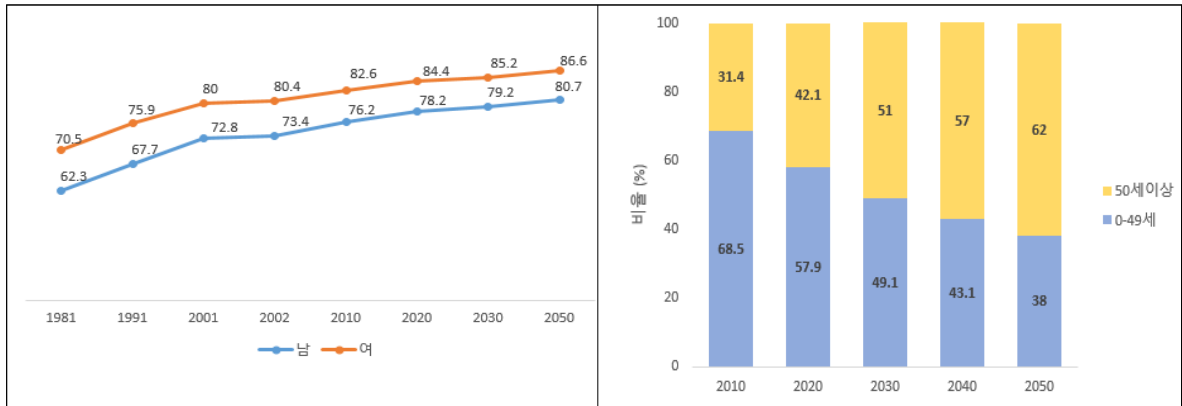


그림 2. 남녀 평균수명 추이(세)와 여성의 연령별 인구 추이 (통계청, 여성 노인인구 추계조사 및 2010 장래인구추계)

(단위: 천 명)



그림 3. 쿠퍼만인덱스(원)와 갱년기 진단인구 및 비율전망(오)

(Journal of the American Medical Association & 국가통계포털, SMIC research team 4)

### 마. 갱년기 증상 호르몬치료의 한계

- 이러한 갱년기 장애의 치료법으로는 여성호르몬인 에스트로젠을 대체 투여하는 적극적인 방법과 생활습관의 개선 및 식물성 에스트로젠을 투여하거나 기타 보조요법으로 대별할 수 있음. 호르몬 대체요법은 감소 또는 소멸된 여성호르몬의 정상적인 생리효과를 회복시키는 것을 목적으로 하여 크게 에스트로젠 제제와 프로게스테론 제제로 분류됨(그림 4).



그림 4. 호르몬대체요법에 사용되는 에스트로겐과 프로게스테론제제 (약학정보원, 여성 갱년기와 식물성 에스트로겐 요법(1))

- 세계적으로 대표적인 갱년기 증상 치료에 사용되는 여성호르몬 대체요법 (HRT: Hormone Replacement Therapy)은 폐경으로 인해 부족해지는 호르몬을 인위적으로 보충해주는 방법으로 미국 Wyeth사(이후 Pfizer에서 인수)에서 최초로 개발되어 2002년까지 세계시장 규모 \$44억까지 성장하였음. 그러나 2002년에 미국 국립보건원(NIH)에서 호르몬대체요법의 안전성 검사를 위해 ‘Women’s Health Initiative (WHI)’ 임상 연구 도중 유방암, 심장마비, 뇌졸중, 심혈관 질환 등 심각한 부작용으로 인해 연구를 중단하고 결과를 발표한 이후 대표적인 HRT 약품인 ‘Premarin’과 ‘Prempro’의 처방이 2002년 \$20억에서 2003년 \$10억으로 급감하였으며, 그 이후로 시장의 성장이 정체되어 왔음(표 2).

표 2. 미국 내 Premarin-Prempro 처방 현황 (보건산업기술 이전센터 시장정보, 2013)

| 연도   | 2000     | 2001     | 2002     | 2003     | 2004     | 2005     |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 처방 수 | 6,200만 건 | 6,100만 건 | 4,700만 건 | 2,400만 건 | 2,100만 건 | 1,800만 건 |

- 신약 개발은 어려워지고, 다른 식물성 여성호르몬제인 승마(black cohosh), 이소플라본(isoflavone) 성분들도 질출혈, 간손상, 암 유발 가능성 등 부작용이 보고돼 여성 갱년기 증상 완화시장은 현재 부작용이 없는 대체제제가 필요한 상황임. 현재 건강기능식품으로 판매되고 있는 갱년기 증상 완화제등도 많은 양을 복용해야 하고 부작용 때문에 섭취에 신중을 기하여야 함. 이러한 측면에 있어서 일상적으로 큰 제약 없이 섭취가 가능하며, 갱년기 완화에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품의 개발은 갱년기여성의 삶의 질 향상이라는 측면에 있어서 큰 도움이 될 수 있다고 판단됨.

### 3. 개별인정형 및 맞춤형 건강기능식품 개발의 필요성

- 최근 국내외적으로 건강기능제품에 대한 선호도가 증가되었고, 주요 질환에 효능이 있는 농산물을 이용한 건강기능제품 개발이 증가하고 있음. 한편, 국내 건강기능제품의 생산액이 비약적으로 증가했지만, 그 중 기능성에 많은 제한을 갖는 고시형 제품이 90% 이상을 차지하므로, 제품차별화를 위해서는 기능성을 가지는 개별인정형 제품의 개발이 필요함. 개별인정형 품목의 총 생산액은 2009년 800억 원에 비해 2010년 1,129억 원으로 약 41% 정도가 증가하였으며, 이것은



2005년 79억 원에 비해서 1,400% 이상 증가한 수치임(그림 5).

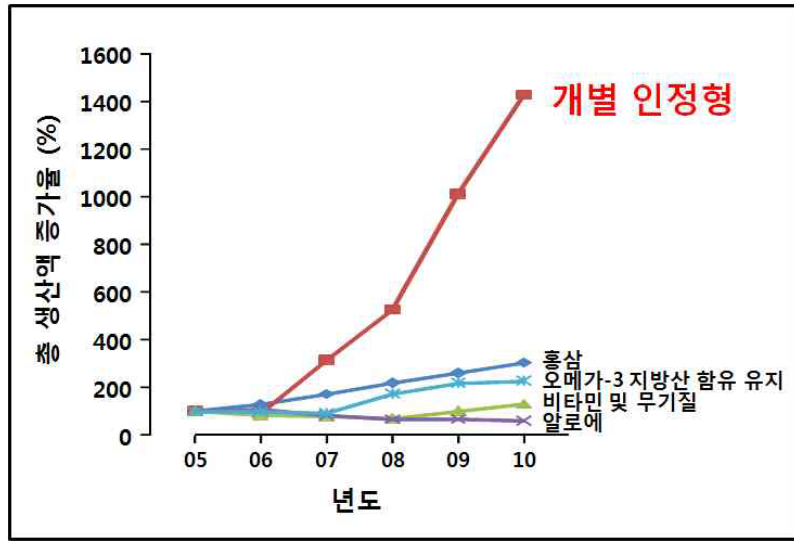


그림 5. 품목별 총생산액 증가율 추이(농림축산식품부 연구 결과보고서, 2014)

- 앞서 서술하였듯이 연령에 따른 여성갱년기 증상도 다르지만 현재 시판 중인 갱년기 완화 제품들은 폐경기 여성 대상으로만 개발되었기 때문에 맞춤형 제품 개발이 필요함. 앞으로, 폐경이행기, 즉 45세 이후부터 섭취하여 폐경기 예방 및 완화 차원의 제품 개발을 통해 건강한 폐경기를 맞이하고, 60대 이후에도 지속적인 폐경 후의 관리 및 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 개발이 요구됨 (그림 6).



그림 6. 폐경이행기와 폐경기, 그리고 기존제품과 비교하여 현 연구의 맞춤형 개발 지향

### 제 3 절 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

##### 가. 기술현황

##### (1) 황칠 기술 현황

- 황칠은 삼국시대부터 도료로서 그 사용이 중요시되다가 1937년부터 황칠나무에 대한 과학적인 연구가 진행되었음. 현재까지 황칠나무의 여러 연구들을 통해 비타민 C, 탄닌, sesquiterpene류 및  $\beta$ -sitosterol 등 생리활성 물질을 포함하고 있다고 보고 됨. 그 후 황칠을

이용하여 건강기능제품으로 많이 개발은 되었으나, 유한양행에서 숙취해소제로 나온 '내일엔'이라는 음료제품을 제외하고는 그 효능/기능이 분명히 나타나지 않음(그림 7).

- 2009년 전라남도의 “기능성 특산자원 제품화 사업”의 지원을 통해 천연자원연구원에서 본격적 연구에 착수하여 황칠나무의 기능성 및 안정성 연구를 수행하였음. 연구를 통해 ‘황칠나무를 활용한 남성 성기능 개선 및 장기능 개선’ 등에 탁월한 효과를 증명하였음. 이 기술은 천연자원 연구원에서 특허를 등록하고, 기술을 (주)새롬에 이전하였음.
- 특히, 황칠 명품화 육성RIS사업단을 발족하여 연구개발 뿐만 아니라 산업화를 위한 다양한 지역 내 기업을 위한 활발한 지원 사업을 추진하고 있음. 그 결과 8건의 특허 출원 및 등록, PCT 국제 출원 2건, 학회발표 4건등의 성과를 얻었음. 그러나, 안타깝게도 여성 갱년기 증후군 개선 효과에 대한 선행 연구는 알려져 있지 않으며, 본 연구진에 의해 최초로 연구되어 효능을 확인하였음.



본황칠(제주파니텍)



내일엔(유한양행)  
숙취해소제



황칠초(명인황칠)



황칠진액골드(명인황칠)



황칠티백(명인황칠)



황칠티백(명인황칠)

그림 7. 국내 황칠식품 목록

## (2) 항갱년기 건강기능식품 및 치료제 기술 현황

- 여성갱년기 장애 치료에 사용되는 여성호르몬 대체요법(HRT: Hormone Replacement Therapy)은 1) 폐경으로 인해 부족해지는 호르몬을 인위적으로 보충해주는 방법과 2) 바이오 소재 내 구조적, 기능적으로 17-β-estradiol과 연관되고, 에스트로젠 효과를 나타내는 식물성 에스트로젠을 이용한 식물성 에스트로젠요법을 이용하고 있음.
- 국내 바이오 소재 및 합성으로부터 개발되어 갱년기 증상 완화 건강기능제품으로 출시되어있는 예는 아래 표 3에 나타내었음.

표 3. 국내 갱년기 증상 완화 원료 현황 및 개발 기술

|                  | 소재명                                 | 부작용                |
|------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 식물성여성호르몬제        | 승마 (black cohosh)                   | 질출혈, 간손상 (영국 식약청)  |
|                  | 백수오 등 복합추출물                         |                    |
|                  | 이소플라본 (Isoflavon)                   | 암 유발 가능성 (미국국립보건원) |
| 여성호르몬 대체요법 (HRT) | Estrogen                            | 암, 심장병, 뇌졸중 등을 유발  |
|                  | Estrogen + Progesteron              |                    |
|                  | Estradiol                           |                    |
|                  | SERM (Ex. Raloxifene, bazedoxifene) |                    |
|                  | Tibolone                            |                    |

- 이미 호르몬 대체요법은 세계적으로도 심각한 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 식물 여성 호르몬제에서도 질출혈, 간손상, 암(유방암)유발 위험성이 보고되었음. 백수오와 그 복합추출물은 부작용이 없는 항갱년기성 건강기능제품으로 소개되었으나 2015년 '가짜 백수오' 사건으로 인하여 백수오를 이용한 건강기능식품이 위축되었음.

## 나. 시장현황

### (1) 건강기능식품 시장현황

- 인구 고령화 등으로 인해 건강에 대한 관심이 높아지면서, 심의 받은 개별인정형 제품의 기능성 내용을 보면 2013년 갱년기 여성 건강 기능성 제품 관련 신청이 가장 많았음
- 식품의약품안전처에서 분석한 '건강기능식품 생산실적' 결과 총 건강기능식품 생산액은 1조 4,820억원으로 '12년(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가하였고 해마다 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 특히 개별인정형 건강기능식품을 제품별로 살펴보면, 지난해 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억원)을 차지해 가장 높은 비중을 보였고, 그 뒤를 이어 헛개나무과병 추출분말(간 경강) 23%(541억원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억원) 등의 순으로 나타남.

표 4. 건강기능식품 생산실적 현황('04~'14)(코스맥스바이오 분석보고서, 2014)

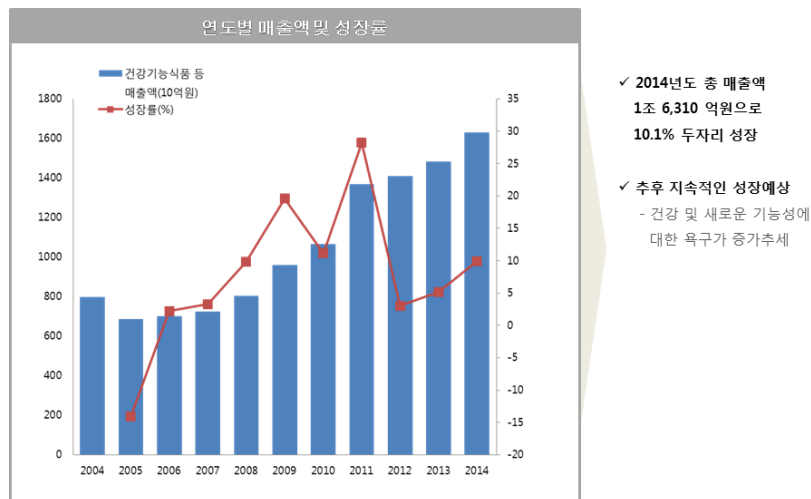


표 5. 2013년 기능성 내용별 생산실적 현황(식품의약품안전처, 2013)

| 구분        | 내수용      |        | 수출용   |        | 총 생산액  |        |      |
|-----------|----------|--------|-------|--------|--------|--------|------|
|           | 금액       | 점유율(%) | 금액    | 점유율(%) | 금액     | 점유율(%) |      |
| 계         | 28,159   | 100    | 1,452 | 100    | 29,611 | 100    |      |
| 1         | 면역기능개선   | 6,979  | 24.8  | 504    | 34.7   | 7,483  | 25.3 |
| 2         | 혈행개선     | 6,979  | 22.5  | 250    | 17.2   | 7,229  | 22.3 |
| 3         | 항산화      | 6,347  | 21.2  | 244    | 16.8   | 6,597  | 21.0 |
| 4         | 영양소보충    | 5,977  | 6.8   | 21     | 1.4    | 6,222  | 6.6  |
| 5         | 장건강      | 1,926  | 4.5   | 187    | 12.9   | 1,947  | 4.9  |
| 총계 (5품목)  |          | 22,483 | 79.8  | 1,206  | 83.0   | 23,689 | 80.1 |
| 6         | 체지방감소    | 1,111  | 3.9   | 4      | 0.3    | 1,115  | 3.8  |
| 7         | 피부건강     | 790    | 2.8   | 11     | 0.8    | 801    | 2.7  |
| 8         | 갱년기여성건강  | 726    | 2.6   | 1      | 0.1    | 727    | 2.5  |
| 9         | 운동수행능력향상 | 615    | 2.2   | 0      | 0.0    | 615    | 2.1  |
| 10        | 혈중중성지방개선 | 567    | 2.0   | 7      | 6.7    | 574    | 1.9  |
| 총계 (10품목) |          | 26,292 | 93.3  | 1,229  | 90.9   | 27,521 | 93.1 |
| 11        | 기타 기능성   | 1,867  | 6.7   | 223    | 9.1    | 2,090  | 6.9  |

다. 국내 경쟁기관현황

- 동국제약 ‘웨어민Q’는 수입되는 생약 추출물을 이용하여 개발한 제품으로 승마추출물을 주성분으로 하고 있으며, 생약 복합체에 승마추출물이 함유되도록 설계한 여성갱년기 치료제로 일반의약품으로 약국에서 판매되고 있음. 승마는 예로부터 아메리카 원주민들에게 생리통 예방식물로 애용되어 왔고, 세인트 존스워트에서 추출한 히페리시는 우울증과 불안, 초조 등의 심리적 증상을 개선하는 효과가 있다고 알려져 있음.
- CJ뉴트라 ‘에버퀸’은 회화나무 열매추출물을 주원료로 하여 생리활성이 강한 소포리코사이드 성분이 다량 함유되어 있는 갱년기 증상 완화제품으로 소개하고 있음.
- 한미약품 ‘제니스’와 내츄럴엔도텍 ‘궁’은 한약재 백수오 외 복합추출물을 함유하는 복합기능성식품으로 개발하여 호르몬 감소로 인해 발생하는 여성의 다양한 갱년기장애 개선효과를 입증하고 식약청으로부터 인증을 받았음. 그 외 백수오 원료 사용 주요 파생상품으로는 동아제약 ‘동아백수오’, 정관장 ‘화애락퀸’, 야쿠르트 ‘브이푸드’, 천호식품 ‘황후백수오’ 등이 있음.



그림 8. 국내 출시된 갱년기 여성 건강기능제품

표 6. 주요 소재별 경쟁현황 (내츄럴엔도텍, LIG 투자증권 분석보고서, 2014)

| 소재명         | 주요제조사        | 경쟁형태 | 특허          | 독점기술        |
|-------------|--------------|------|-------------|-------------|
| 백수오 등 복합추출물 | 한미, 내츄럴엔도텍 등 | 완전경쟁 | 보유 (내츄럴엔도텍) | 확보 (내츄럴엔도텍) |
| 승마          | 동국제약         | 완전경쟁 | 없음          | 없음          |
| 이소플라본       | 서흥캡셀 등       | 완전경쟁 | 없음          | 없음          |
| 석류          | 다수           | 완전경쟁 | 없음          | 없음          |
| 회화나무        | 소수           | 과점   | 없음          | 없음          |

## 라. 국내 지식재산권 현황

### (1) 국내 갱년기 예방 또는 조성에 관한 특허

- 국내 Kipris 특허검색창에 ‘추출물+갱년기+여성’으로 색인어로 하여 등록 및 공개(또는 출원)된 특허만 검색하였을 때 총 58,256종의 특허들이 보고되었음. 현재 시장으로도 판매되고 있는 석류, 백수오 및 그에 대한 복합물 조성과 이소플라본이 많이 함유되어있는 대두와 발아, 발효 콩 그리고 청국장에 대해서 갱년기 치료 및 예방에 대한 조성물 그리고 이를 함유하는 건강기능식품의 개발에 대한 내용이 많았음. 단일 유효성분을 이용하기도 하나 대부분이 단일성분 외 복합물을 유효성분으로 하므로 황칠나무추출물에 대해서 여성갱년기 증상을 완화하는 임상효능 평가결과가 나오면 그 후 복합물로 항갱년기성 건강기능제품을 개발하고 있음.
- 레드클로버와 석류 복합물 건강기능식품에 관한 특허내용은 여성갱년기 및 폐경기에서 나오는 증상 뿐 만이 아니라 항비만, 항고지혈증, 지방간 및 골다공증 개선에 대한 청구항이 있음.
- 특허 선행조사에서 황칠과 관련한 여성갱년기 관련 특허는 찾을 수 없었음.
- 본 연구진은 황칠관련 특허를 출원하였음. (2015년 12월 30일). 또한, 본 연구에서는 여성 갱년기 증상으로 나타나는 증상 외, 복부지방에 대한 개선 효과를 보고자하며 더 나아가 콜레스테롤 수치 및 BMI와 같은 기본적인 비만에 대한 생리활성 지표를 확인함으로써 +α 기능을 추가하고자 함.

표 7. 추출물을 이용한 항갱년기성 특허 일부 목록

| 제목   | 등록번호/<br>등록일자               | 특허내용   |
|--|-----------------------------|--|
| 갱년기 증후군 개선 효과 갖는 조성물   | 10-0486365<br>/<br>20050421 | - 대두추출물과 홍삼추출물내 이소플라본을 함유하는 조성물과 당귀, 작약, 감초 추출물 또는 비타민을 더 첨가한 조성물 특허임.<br>- 정제, 과립제, 드링크제 등으로 제형을 특징으로하는 조성물 |
| 돼지 태반 추출물을 함유하는 갱년기/폐경기 장애 개선용 식품 조성물, 이를 포함하는 건강기능식품 및 그 제조방법 | 10-0642080<br>/<br>20061027 | - 돼지 태반 추출물을 유효성분으로 포함하는 갱년기 또는 폐경기 장애 개선용 식품 조성물<br>- 제대조직 또는 용모조직으로부터 돼지 태반 추출물을 제조하는 방법이 청구항임.            |
| 발효청국장 추출물을 포함하   | 10-0874778                  | - 발효청국장 분획 추출물과 스피루리나( <i>Spirulina</i> spp.)  |

|   |                              |   |
|---|------------------------------|---|
| 는 갱년기 질환의 예방 및 치료용 조성물  | /<br>20081211                | 용매 추출물의 혼합물을 이용한 갱년기성 골다공증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 내용   |
| 엘라그산을 포함하는 석류 추출물, 및 석류 추출물의 갱년기 증상 관련 효과를 향상시키는 방법                                   | 10-1272602<br>/<br>20130529  | - 지표성분으로 엘라그산을 포함하는 석류추출물의 여성 갱년기 증상 개선용 조성물 및 건강기능식품에 관한 내용  |
| 라리아니티다추출물로부터 분리한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 여성암과 갱년기 증상의 예방 및 치료용 약학적 조성물 | 10-1580716<br>/<br>20151221  | - 추출물로부터 분리한 화합물 4종의 갱년기 증상 예방 및 치료용 약학적 조성물<br>- 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 중 어느 하나의 형태를 갖는 건강기능식품 조성물<br>- 음료, 분말음료, 고형물, 츄잉검, 차, 비타민 복합제, 식품첨가제 중 어느하나의 형태를 갖는 식품 조성물                                 |
| 지황 및 갈근의 복합 추출물을 함유하는 갱년기 증상의 예방 또는 치료용 조성물   | 10-1486857<br>/<br>20150121  | - 지황 및 갈근의 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 갱년기 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물<br>-  |
| 백수오 추출물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물  | 10-1544532<br>/<br>20150807  | - 백수오 및 복합추출물의 여성갱년기 예방 또는 치료용 약학 조성물<br>- 열수 추출을 이용한 추출법   |
| 향부자 추출물로부터 분리된 스퀴테르페노이드계 화합물을 함유하는, 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물                             | 10-1485705<br>/<br>20150116  | - 향부자로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물   |
| 쿠메스트롤을 포함하는 콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 갱년기 증상의 예방 및 치료용 조성물                                   | 10-2014-0131881/<br>20141114 | - 쿠메스트롤을 포함하는 발아발효콩 추출물을 유효성분으로 하는 조성물<br>- 발아발효콩 제조방법  |
| 손바닥 선인장 추출물 및 부채마 추출물을 포함하는 갱년기 장애 예방 또는 치료용 조성물                                      | 10-2016-0048284/<br>20160504 | - 손바닥 선인장( <i>Opuntia ficus-indica</i> Mill) 추출물 및 부채마( <i>Dioscorea nipponica</i> Makino) 추출물을 포함하는, 갱년기 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물<br>- 위 복합물을 포함하는 건강기능식품   |
| 레드클로버 및 석류의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 여성 갱년기 개선 용도                                     | 10-2015-0120318/<br>20151027 | - 석류 및 레드클로버의 복합 추출물을 유효성분으로 포함하는 갱년기 장애 개선용 조성물<br>- 상기 갱년기 장애 개선은 갱년기 증상 개선, 항비만, 고지혈증 억제, 지방간 억제, 골다공증 억제, 간 보호 및 자궁 보호로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 갱년기 장애 개선용 조성물 (조성물 특허 및 용도 특허) |



(2) 황칠관련 특허 및 본 연구진의 국내 갱년기 예방 또는 조성에 관한 특허

- 아래 국내 황칠을 이용하여 출원 또는 등록된 특허들 중 특허권자인 황칠다담(주)와 함박재에서는 직접 재배하는 황칠나무 추출물을 활용하여 다양한 질병에 대한 예방 및 치료 효과 연구를 진행하여 특허 출원 및 등록하였음. 이 중에서 여성질환 개선음료는 여성갱년기가 아닌 월경전 증후군에 관한 내용임. 황칠에 관한 지식재산권을 조사한 결과 여성 갱년기증후군 개선 효과에 대한 지적 재산권은 없었음. 본 연구진은 이를 토대로 여성 갱년기 증후군의 효능에 대한 선행 연구를 실시하고 이를 토대로 “ 황칠나무 추출물을 유효성분 으로 함유하는 갱년기질환 예방 및 치료용 조성물”의 발명 특허 출원(출원번호 10-2015-0190242, 출원일자 2015년 12월 30일)을 완료하였음. 따라서, 본 연구수행을 통해 제품개발과 관련한 지적재산권에 대한 권리는 이미 확보한 것으로 볼 수 있음.

표 8. 황칠을 이용한 국내 지식재산권 현황

| 제목   | 등록(공개)번호/<br>등록(공개)일자        | 특허권자               |
|--|------------------------------|--------------------|
| 황칠나무를 포함하는 숙취해소제 및 그 제조방법                          | 10-1534550/20150701          | 농업회사법인(주) 황칠다담주식회사 |
| 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역조절 또는 면역증강용 조성물            | 10-2015-0144061/<br>20151224 | 농업회사법인(주) 함박재바이오팜  |
| 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 및 치료용 조성물            | 10-2015-0132955/<br>20151127 | 농업회사법인(주) 함박재바이오팜  |
| 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물                     | 10-143499/20140821           | 농업회사법인 (주)함박재농장    |
| 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈당조절용 식품 조성물                 | 10-1467407/20141125          | 농업회사법인 (주)함박재농장    |
| 여성질환 개선용 음료 및 그 제조방법                               | 10-1534554/20150701          | 농업회사법인(주) 황칠다담주식회사 |
| 숙취해소 및 소화촉진용 음료 및 그 제조방법                           | 10-1490211/20150130          | 농업회사법인(주) 황칠다담주식회사 |
| 황칠 나무 추출물을 함유하는 숙취 해소 및 예방용 조성물                    | 10-2014-0070470/20140610     | (주) 유한양행           |
| 황칠 나무 추출물을 함유하는 간 기능 개선용 조성물                       | 10-2015-0138065/20151209     | (주) 유한양행           |
| 황칠나무 추출물 및 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 천식 예방 및 치료용 약학적 조성물 | 10-2016-0033995/20160329     | 한국생명공학연구원          |
| 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포                                 | 10-2015-0005482/2015         | 재단법인 전남생물산업진흥원     |

|                           |      |  |
|---------------------------|------|--|
| 함하는 불면증 치료 또는 개선용 조<br>성물 | 0114 |  |
|---------------------------|------|--|

- 황칠나무를 이용한 "불면증 치료 및 예방"에 대한 선행 특허가 존재하나, 본 연구의 목표로 삼는 갱년기완화 제품에 대한 선행문헌과 특허가 존재하지 않아 유사, 중복성에 대한 우려는 없는 것으로 판단됨. 유사중복성 재평가하였음에도 황칠나무 추출물을 이용한 여성갱년기에 대한 내용은 검색되지 않았음.

## 2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### 가. 기술 현황

#### (1) 여성갱년기증후군 개선제 기술현황

- 1997년 북미 폐경학회에서 갱년기 치료에 관한 대체 요법이 소개되었음. 미국의 FDA 해당하는 독일의 Commission E에서는 갱년기 환자를 위한 민간요법으로 black cohosh(승마)가 폐경기 신경 증상에 효과가 있다고 하고, 유럽에서는 vitex(정조나무)도 호르몬 조절 작용이 있어서 폐경기 환자의 치료에 많이 사용함. 중국에서는 당귀를 여성 생식기 질병과 갱년기 호르몬 조절을 위하여 많이 이용하였음. 하지만 부작용에 대한 사례가 보고되고 있어 여성갱년기 증후군 예방 또는 개선을 위한 새로운 원료 발굴 또는 합성물질 개발이 시급한 상황임.

#### (2) 황칠나무 추출물을 이용한 기술현황

- 황칠에 관한 기술 현황은 아래 국외 특허검색 현황에서 보듯이, 해외에서 총4개의 출원(공개 또는 등록)이 있지만 특허권자가 국내 대학교 또는 업체이므로, 황칠나무에 대한 해외 기술보유는 아직 존재 하지 않음. 논문으로는 항암효과 및 항산화 효과 그리고 심혈관질환에 대한 생리활성 평가를 한 것들이 검색되었으며 이를 이용하여 건강기능식품으로 기술을 개발하는 자료는 나타나지 않고 있음.
- 따라서 현재 해외에서도 부작용이 없는 여성갱년기증상 치료제의 개발 또는 건강기능식품 도입이 필수이므로, 현재 본 연구진은 특허출원한 “황칠나무 추출물을 유효성분 으로 함유하는 갱년기질환 예방 및 치료용 조성물”에 대한 지식재산권을 보유함으로써 본 연구과제 수행결과로 해외시장 진출까지 예상할 수 있음.

### 나. 시장현황

#### (1) 세계 건강기능식품 및 갱년기증상 개선제 시장

- 국가별 건강기능식품 시장규모는 2012년 미국이 325억달러로 전체 시장의 33.8%를 차지해 가장 큰 시장을 형성하고 있음 그에 이어 유럽 159억달러(16.5%), 중국 119억달러(12.4%), 일본 106억달러(11.0%) 등의 순임.
- 특히 남미의 경우, 건강기능식품 시장규모에서는 세계 6위로 나타났으나, 전년대비 성장률이 12.9%로 매우 높은 성장을 보였고, 그 외 중국(전년대비 11.7% 성장), 동유럽/러시아(전년대비 10.0% 성장), 중동(전년대비 9.0% 성장) 등의 순으로 높은 성장세를 보였음. 반면 일본(0.4%), 서유럽(1.9%)은 매우 저조한 성장을 보여 향후 시장점유율이 점차 하락할 것으로 예측됨.



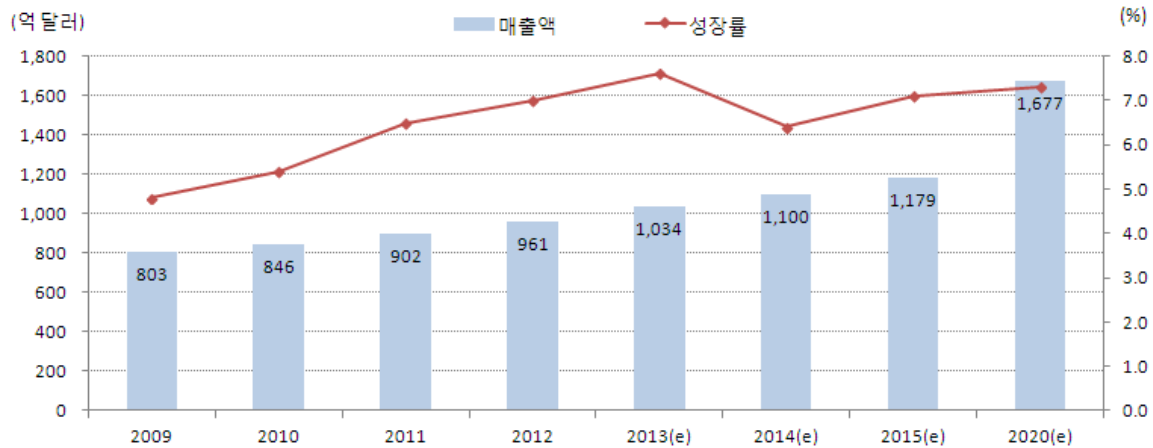


그림 9. 세계 건강기능식품 시장규모(한국건강기능식품협회, 2014)

- 갱년기 증상에 관한 제품시장을 살펴보면, 미국에서 2006년 Hot flash관련 의약에 대한 전체 시장 규모는 약 80억 달러이고 그 중 Estrogen시장이 13억 달러를 차지하고 있음.
- 또한 에스트로겐을 대체하는 새로운 제품인 Menerba를 개발하고 있는 BioNovo사에서는 2012년 비에스트로겐 제품(호르몬 포함)의 시장이 80억에 달할 것으로 추정하였고 최근 datamonitor의 보고에서는 2013년 비호르몬성 치료제의 시장이 미국과 유럽을 합하여 5억 4천만 달러로 추정하였음.
- 대표적인 여성호르몬제인 Premarin, Prempro의 미국 내 의약 처방 현황을 보면 2000~2001년까지는 6,000만 건이 넘었으나 2002년 5월 미국 국립보건원이 유방암 및 뇌졸중, 심혈관 질환 등의 부작용 발생 발표 이후 급격히 처방건수가 줄어들었음.

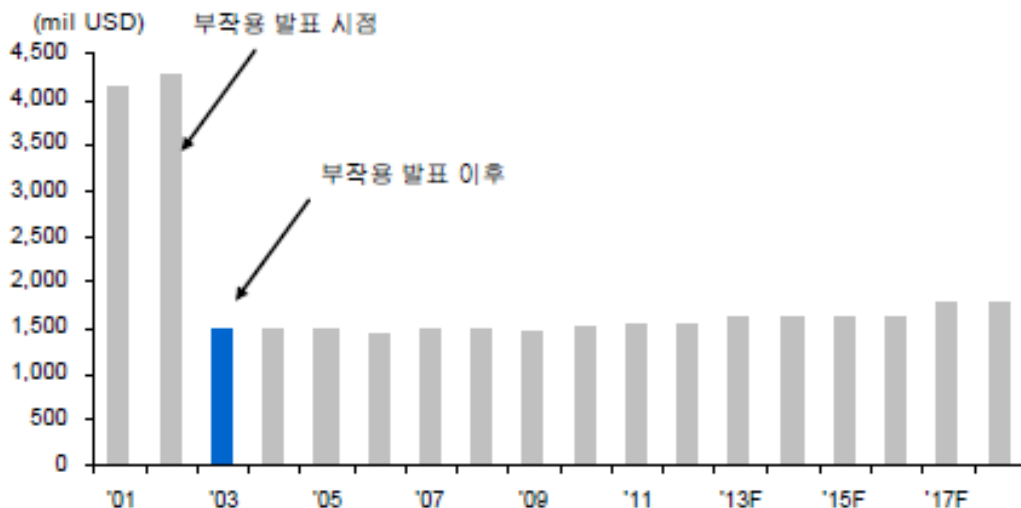


그림 10. 미국 합성에스트로겐시장 현황

#### 다. 경쟁기관현황

- 화이자 'Duavee'는 기존 호르몬 치료요법의 부작용을 개선한 제형으로 기존 호르몬 치료제의 유방암 유발 및 유방 내 통증을 개선한 제형임.

- Nature's way 'Estrosoy'는 대두의 이소플라본을 이용한 건강기능제품으로서, 아래에서 소개되는 제품이 효능과 부작용을 개선하여 출시됨.
- Novogen의 'Promensil'은 레드클로버에서 추출한 것으로 식물성 에스트로겐(이소플라본)이 콩에 있는 이소플라본보다 훨씬 더 효과가 좋으며 암을 유발하는 부작용을 줄임.
- Estradiol을 이용한 주사제형은 유방암, 구토, 피부홍반 등과 같은 부작용이 개선되지 않은 제형들로 사용 시 의사와 충분히 상담 후 환자의 증상에 따라 투여함.
- 기존 치료요법들에 비해서 부작용을 개선한 제품들이 많이 출시는 되고 있으나, 사람들마다 특성(유방암 수술 경험 등)에 따라 사용용량을 조절하거나 사용을 금기하므로 부작용과 모든 환자들에게 사용가능한 제품이 필요함.

표 9. 해외 여성갱년기완화 제품 경쟁기관 현황

|         | 소재명                 | 주요제조사                            | 경쟁형태 |
|---------|---------------------|----------------------------------|------|
| 식물성 호르몬 | 승마                  | Natures way                      | 완전경쟁 |
|         | 이소플라본               | Novogen                          | 완전경쟁 |
| HRT     | Conjugated estrogen | Pfizer                           | 독점   |
|         | Estradiol           | Warner Chilcott, Novo, Vordisk 등 | 과점   |



그림 10. 해외 출시되는 여성갱년기증후군 건강기능식품 및 치료제

### 라. 지식재산권현황(해외)

- 국내와 동일한 방법으로 kipris에서 갱년기증후군(menopausal symptoms)에 관하여 검색하였을 때, 미국 총 9,764건, 유럽 총 2,078건, 일본 89건이었음. 한국과 달리 추출물(extract)와 함께 키워드에 검색하였을 경우에는 국내의 1/10의 특허 출원 또는 등록이 되어있었으며, 그

중에서도 국내 산·학·연을 통한 해외 지식재산권 수가 상당하였음. 또한 황칠(*Dedndropanax Morbifera*)을 키워드로 하였을 때는 미국에서 3건이 검색되었으며 이 또한 국내에서 출원되어 짐.

- 따라서 해외(미국, 유럽, 일본)에서 황칠을 이용하여 개발된 지식재산권이 존재하지 않았으며, 본 연구진은 이를 토대로 여성 갱년기 증후군의 효능에 대한 선행 연구를 실시하고 이를 토대로 “ 황칠나무 추출물을 유효성분 으로 함유하는 갱년기질환 예방 및 치료용 조성물”의 발명 특허 출원(출원번호 10-2015-0190242, 출원일자 2015년 12월 30일)을 완료하였으므로, 해외 출원시 신규성·진보성 또한 본 연구 수행을 통한 산업가능성 또한 모두 보유하므로 해외에 여성갱년기증후군 치료제로서 황칠에 대한 1순위 지식재산권을 확보할 있음을 확인함.

표 10. 황칠 또는 갱년기증후군을 키워드로 한 국외 지식재산권 현황

| Key words        | 제목   | 등록(공개)번호/<br>등록(공개)날짜        | 특허권자   |
|------------------|--|------------------------------|--|
| 갱년기에 관<br>한 해외특허 | Compositions and methods for alleviating symptoms associated with perimenopausal and/or menopausal disorder or discomfort<br>- 특허권자 회사에서 개발한 PA라는 물질을 이용하여 갱년기증후군을 개선하는 조성물 특허 | 09248137<br>/20160202        | Lipogen Ltd.   |
|                  | Treatment or prevention of menopausal symptoms and osteoporosis<br>- 이소플라본 포르모노네틴을 유효성분으로 하는 폐경 증상 또는 골다공증의 치료 또는 예방을 위한 조성물   | 20020035074/<br>20020321     | Novogen, Inc.  |
|                  | Phytoestrogenic formulations for alleviation or prevention of menopausal symptoms<br>- ERβ-selective 파이토에스트로겐에 의한 갱년기증후군 예방 및 개선 조성물   | 08680140/<br>2014.03.25      | Roberta Diaz Brinton<br>University of<br>Southern California<br>Liqin Zhao |
| 황칠               | Use for <i>Dedndropanax Morbifera</i> extract for adjusting 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and PGE2 activity  | WO2013180336 A1/<br>20131205 | 조선대학교  |
|                  | Composition comprising <i>Dendropanax morbifera</i> extract or compound derived the reform as active ingredient for preventing and treating benign prostatic hyperplasi        | WO2014014177 A1/<br>20140123 | 조선대학교  |
| 황칠+<br>갱년기       | 해외 지식재산권 존재X   |                              |  |

## 제 4 절 연구개발의 중요성

### 1. 기술적 측면

- 폐경의 증상은 나타나는 시기에 따라 급성, 아 급성, 만성 증상으로 분류하며, 급성 증상으로는 혈관운동장애 증상, 불면증, 발한 등이 있고 아 급성 증상으로는 비노생식계 위축에 의한 증상 및 성욕감퇴 등이 나타남. 마지막으로 만성은 골다공증 및 심혈관 질환 등이 발생하며, 갱년기는 폐경 전후의 기간을 말함. 현재까지 나와 있는 제품들은 아래 그림에서 보듯이 50대 전·후에 대한 증상완화 또는 치료제라는 한계가 있음.
- 앞으로, 폐경이행기, 즉 45세 이후부터 섭취하여 폐경기 예방 및 완화 차원의 제품 개발을 통해 건강한 폐경기를 맞이하고, 60대 이후에도 지속적인 폐경 후의 관리 및 도움을 줄 수 있는 맞춤형 건강기능식품 개발이 요구됨.

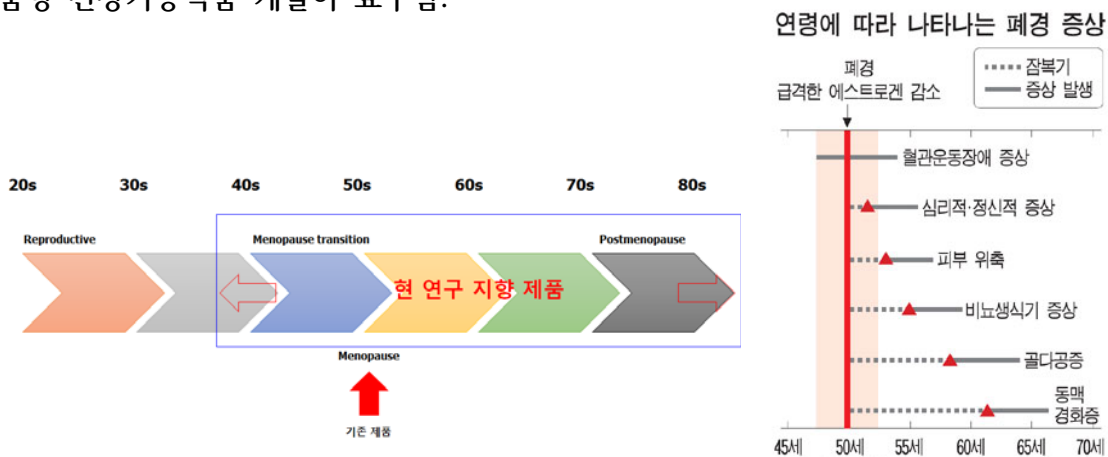


그림 11. 폐경이행기와 폐경기 그리고 연령에 따른 폐경기 증상(대한폐경학회)

- 또한 현재까지 나온 여성 갱년기증상 완화제 및 치료제는 많은 부작용의 사례가 보고되고 있으며, 그에 대한 제품 분석은 아래 표와 같음(표 11).
- 합성에스트로겐 호르몬제제의 투여는 이러한 장애들을 일부 해결할 수 있다고 알려져 있으나, 유방암 또는 자궁내막암(자궁출혈 포함)의 위험을 증가시키는 부작용이 있어 문제가 되고 있음.
- 지금까지 FDA 승인을 받은 SERM 종류에는 타목시펜, 라록시펜, 라소폭시펜, 및 바제독시펜 등이 있으며, 특히, 라록시펜(Evista, Eli Lilly)의 경우 척추 골절의 위험성을 현저하게 줄이고 골다공증이 있는 폐경 후 여성에게서 플라시보에 대한 BMD를 향상시킴. 이상적인 SERM은 유방암, 자궁 내막암에 대한 부작용을 유도하지 않고 폐경기 여성에서 나타나는 대사 장애를 감소시킬 수 있다고 보고되고있음 (Paech et al., 1997; Palacios, 2011; Mirkin and Komm, 2013).

표 11. 갱년기 건강제품 유효성분 비교분석

| 대분류         | 세부분류        | 함유식품          | 안전성                  |                                      |            |      |       | 비 고                                   |
|-------------|-------------|---------------|----------------------|--------------------------------------|------------|------|-------|---------------------------------------|
|             |             |               | FSH/E2 Level (serum) | ER- $\alpha,\beta$ Bindin g affinity | 체중 및 BMI증가 | 지질순환 | 발암및독성 |                                       |
| 백수오 등 복합추출물 | 백수오 등 복합추출물 | 백수오 + 속단 + 당귀 | X                    | X                                    | X          | X    | X     | * 수출명 : EstroG-100<br>* 1일섭취량 514mg/d |

|   |  |                                     |   |   |   |   |   |   |  |
|---|--|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
|   | (FGF271)   |                                     |   |   |   |   |   |   |  |
| Estrogen                                  | Estron (E1)<br>17-β-Estradiol (E2)<br>Estril(E3) | -                                   | 0                                       | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | * E2는 시판의약품(갱년기 호르몬 치료제, 피임약)이며, 혈중농도 상승시 자궁증량, 질출혈, 발암(자궁, 유방, 간), 뇌졸중 등 위험<br>*FSH(난포자극호르몬) 수치 상승시 갱년기 홍조유발과 불임의 원인이며, 에스트로겐과 길항 분비                      |
| Phytoestron (Estronic compound)<br>-폴리페놀계 | Isoflavones                                      | Genistein                           | 콩류(대두)<br>레드클로버<br>알팔파<br>회화나무열매(괴각)    | 0 | 0 | X | 0 | 0 | * 대두이소플라본 70mg/day 섭취 이상시 유의적 효과 but 발암 위험<br>* 적정섭취권장량 25mg/d한국, 30mg/d일본, 30-50mg/d미국<br>*회화나무열매의 지표성분은 genistein의 일종인 sophoricoside 이며, 1일 섭취량은 350mg/d |
|   |  | Daidzein                            | 콩류(대두)<br>레드클로버알팔파<br>승마 (Black Cohosh) | X | X | X | X | X |  |
|   |  | Formononetin                        | 승마 (Black Cohosh)                       | X | X | X | 0 | 0 | * 승마는 미아리아제비과 식물로 cimicifugenin도 함유<br>*간독성 주의   |
|   | Coumestans                                       | Coumestrol                          | 석류<br>알팔파<br>클로버                        | 0 | 0 | X | X | X | * 1일 섭취량 6g/d<br>*estron,estradiol함유로 알려짐  |
|   | Lignan   |                                     | 종자류(아마씨)<br>견과류                         | X | X | X | X | X | * 항암, 항혈전, 면역에 좋으며, 여성호르몬 수치를 조절하여 갱년기 증상에도 도움을 준다고 함, 열처리가 꼭 되어 있어야 함.  |
| Mycoestrogen                              | Zearalenone<br>β-Zearalenol                      | 알팔파<br>클로버                          |   |   |   |   |   |   | * mycotoxin에서 유래한 진균성 에스트로겐  |
| HRT(Prempro)                              | Estrogen + Progesterone                          | -                                   | 0                                       | 0 | 0 | X | 0 |   | * 말의 오줌에서 유래한 호르몬, 안전성 문제로 현재사용 안함   |
| 성요한풀(SaintJohn'sWort)                     | Hypericin<br>Hyperforin                          | St. John's Wort<br>(성요한풀)           | X                                       | X | X | X | 0 |   | * 항우울성분<br>*3개월 이상 장기복용 주의   |
| Xenoestrogen                              |  | PCB, BPA and Phthalates에서 유래되는 인공물질 | 0                                       | 0 | X | X | 0 |   | * 환경호르몬으로 체내에서 에스트로겐과 유사한 작용<br>*화장품, 의약품, 살충제 등에 분포   |

\* 폴리페놀계 활성 정도 : C > G > D > F, \* 숙단(*Pholomis umbrosa*) : Shanzhiside methylester \* 백수오(*Cynanchum wilfordii*) : cinnamic acid → coumestan

\* 당귀(*Angelica gigas*) : Nodakenin(식물성 여성 호르몬의 일종으로 당귀의 뿌리에 들어있는 콤파린 유도체)

- 한편, 에스트로겐과 구조가 유사하여 ER과의 결합을 통한 유전자 전사활성 및 생리활성 조절이 가능한 식물 유래의 천연 에스트로겐을 피토에스트로겐(phytoestrogen)이라고 하며, 이소플라본, 플라보노이드, 리그난 등이 피토에스트로겐(phytoestrogen) 성질을 가지는 것으로 알려져 있음. 이소플라보노이드와 같은 천연 화합물이 SERM인 동시에 세포막-ER(mER) 활성제로 작용한다는 증거가 늘어감에 따라, 골소실을 줄이고 뼈 건강을 유지하면서 에스트로겐감소로 인한 폐경기의 각종 증상을 개선 또는 치료할 수 있는 치료후보물질 또는 건강기능식품(botanical supplements)로서 천연 약초에 한 관심이 늘어나고 있음.
- 따라서, 갱년기 여성에 있어서 선택적 에스트로겐 수용체 조절제와 같은 활성을 지니면서도, 갱년기 증상을 개선하는 피토에스트로겐을 포함하는 새로운 식물을 발굴하기 위한 연구가 절실한 실정임. 그러나 갱년기 장애는 에너지 대사, 글루코스 대사, 지질 대사, 및 골 항상성에 대한 장애 등 복합적 장애를 의미하는 것이므로, 이 중 하나의 장애만을 개선하더라도 다른 장애를 개선하는 효과가 나타나지 않는다면 전반적인 갱년기 장애 개선 효과를 기대할 수 없다는 문제가 있음.
- 에스트로겐은 두 가지 ER subtype을 통해 에너지 항상성 조절 역할을 하고 있음. 따라서, 폐경 이후 에스트로겐 결핍은 체중과 복부비만 증가의 원인 중 하나로써 지목되고 있음(Weigt C, Hertrampf T, Zoth N, Fritzemeier KH, Diel P. 2012. *Mol Cell Endocrinol* **351**: 227-238; Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden MA, Nappi RE, Shah D, Villaseca P. 2012. *Climacteric* **15**: 419-429). 식물성에스트로겐은 ER과 상호작용하여 대사질환 증상(혈당, 체중, 비만 등이 관련된 복합적인 증상)을 개선시킨다고 알려져 있음. 또한 식물성에스트로겐과 peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)와 AMP-activated kinase (AMPK)의 상호작용 역시 식물성에스트로겐의 폐경 여성에서 대사질환 증상 개선과 연관이 있음이 보고되었음(Jungbauer A, Medjakovic S. 2014. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* **139**: 277-289).
- PPAR는 ER처럼 리간드와 결합후 핵 내에서 특정 유전자의 전사를 조절하는 역할을 하는 핵수용체 family에 속하며 a, b, g, d 등 4 가지 subtype이 알려져 있음. Genistein, daidzein과 같은 soy isoflavone이나 biochanin A, formononetin 등의 식물성에스트로겐이 PPAR의 agonist로서 작용함은 이미 보고된 바 있음 (Mueller et al. *Food Chemistry* 2009, 117: 660-667). 또한, 본 황철의 기능 지표 성분인 ellagic acid 역시 PPAR $\gamma$ 를 경유하는 신호전달 경로를 조절함이 보고된 바 있음(Kuo et al. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59: 5100-5108).
- 식물성에스트로겐이 대사질환증상을 개선시키는 분자 타겟과 그 작용기작은 아래와 같이 요약될 수 있음(Ungbauer A, Medjakovic S. 2014. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* **139**: 277-289에서 발췌함).

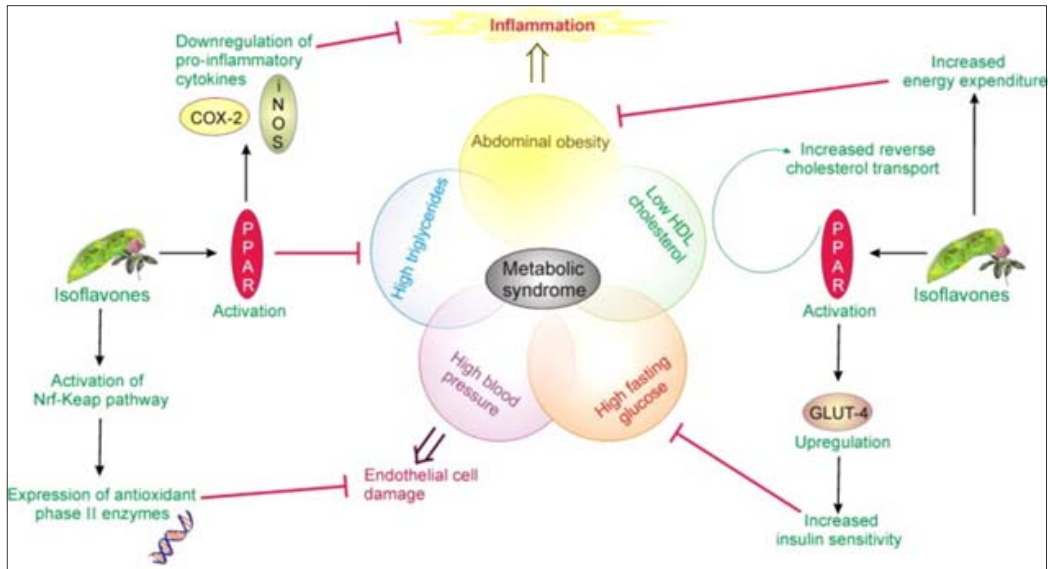


그림 12. 식물성에스트로겐의 대사증후군에 미치는 효과를 설명하는 세포 및 분자수준의 기작.

- 위 그림에서 살펴본 바와 같이 PPAR 및 AMPK를 분자표적으로 하는 식물성에스트로겐의 에너지대사조절 기능의 분자적 기작은 다음의 4 가지로 요약될 수 있음.

- (1) PPAR 활성화 --> 염증성 사이토카인, COX-2, iNOS 발현/활성 감소
- (2) PPAR를 매개로 하는 reverse cholesterol 이동 증가 --> cholesterol 감소
- (3) Glucose transporter-4 발현 증가를 통해 인슐린 민감도 증가 --> 혈당 조절 (주로 감소)
- (4) AMPK 활성화로 에너지 소비의 증가 및 지방생성 감소

- 따라서, ER, PPAR, AMPK의 활성화 효능을 갖고 있는 식물성에스트로겐을 함유하는 추출물의 경우 다양한 분자기작을 통하여 에스트로겐 부족으로 인한 갱년기 증상과 비만 등 대사증후군의 증상 개선 효과를 가져올 수 있음. 갱년기 여성에 있어서 선택적 에스트로겐 수용체 조절제와 같은 활성을 지니면서 부작용이 경미한 소재를 발굴하기 위한 절실한 실정임. 또한, 갱년기 장애는 에너지 대사, 글루코스 대사, 지질 대사 및 골 항상성에 대한 장애 등 복합적 장애를 의미하는 것 이므로, 이 중 하나의 장애만을 개선하더라도 다른 장애를 개선하는 효과가 나타나지 않는다면 전반적인 갱년기 장애 개선 효과를 기대할 수 없다는 문제가 있음.

- 현재까지 국내산 소재를 이용한 맞춤형 갱년기 증상 완화 제품 개발은 현재 부재하며, 만약 위에 소개된 제품들의 부작용이 개선되고 안전성이 확보된 맞춤형 신규 갱년기증후군 치료 및 예방 제품이 출시된다면, 중년여성 삶의 질 향상 뿐만아니라 농가의 소득 증대, 매출, 수출 증대 등 시장 파급 효과가 매우 클 것으로 기대됨.

- 개발제품의 참신성과 진보성 부분은 기존의 여성갱년기 소재와의 비교시험을 통해 확보를 할 예정이며, 특히, 갱년기 증상뿐만 아니라 여성갱년기에 나타나는 비만에 대한 효능에 대한 차별화를 추구할 계획이다.

- 또한, 소재 측면에서 국내에서만 자생하는 특별한 소재를 활용하고 있다는 측면에서 참신성이 있으며, 특허출원을 통해 신규성과 차별성을 확보한 상태이고, 적은 량으로도 에스트로젠에 대

한 우수한 효능을 확보한 상태임.

- 따라서 주관기관 리후헬스케어(주)의 총괄하에 아주대학교 박영준교수님(전 CJ 헬스케어 연구소장)의 다양한 고객니즈 맞춤형 신약 및 건강기능제품 개발 및 제품화의 경험과, 에스트로겐 및 에스트로겐수용체의 분자적 작용기전에 관하여 수년간의 연구경력을 갖고 있는 숙명여대 장민선교수님팀, 그리고 순천향의대 산부인과 이해혁교수님팀의 임상평가에 의한 실질적인 효능 평가로 황칠나무 추출물을 이용한 안전성이 확보된 고객맞춤형 여성갱년기증상 치료제를 효과적으로 진행 될 것으로 여겨짐.

## 2. 사회문화적 측면

- 인구 고령화 등으로 인해 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 그동안 각광 받아온 건강기능식품 시장도 재조명받고 있음. 전 세계에서 건강기능식품 중 가장 큰 비중을 차지하는 제품 유형은 비타민 및 무기질(이하 비타민)이며, 국내 역시 과거 정부(한국인삼공사) 주도로 시장을 거의 독점하다시피한 홍삼 제품을 제외하면, 비타민 제품이 가장 큰 비중을 차지하였음.
- 이러한 건강기능식품 시장이 최근들어 복합 섭취, 새로운 기능에 대한 요구, T.P.O (Time, Place, Occasion) 다양화 같은 customer needs 다변화에 따라 제약회사와 식음료 업체, 건강기능식품 전문업체간 경쟁이 갈수록 치열해지고 있음.
- 현재 건강기능식품 시장은 질환 치료·예방, 건강 증진, 영양 보충 및 미용·노화방지 등의 기능을 중심으로 확장해 나가고 있음.

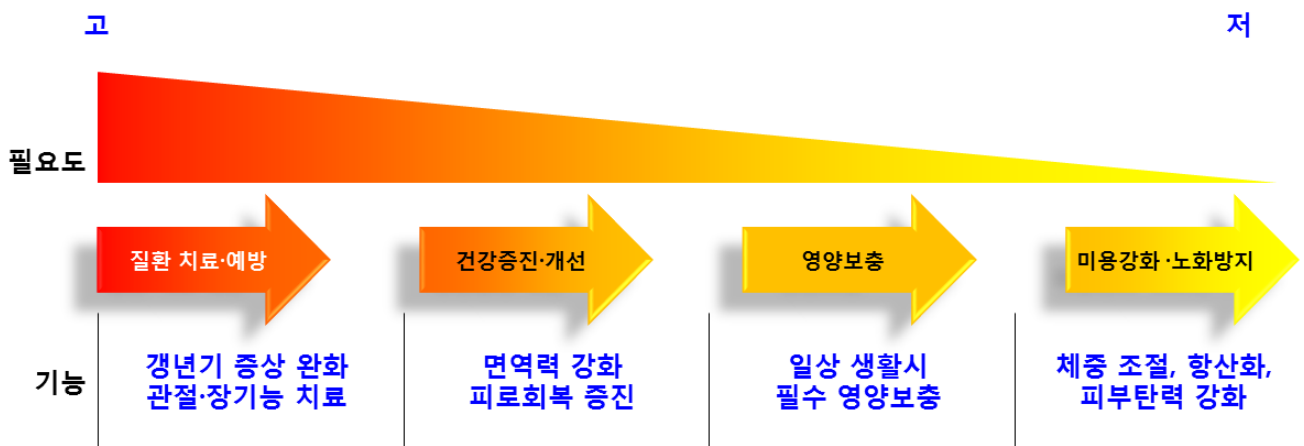


그림 13. 국내 건강기능식품 시장 필요도에 따른 구분(AT키니, 2015)

- 현재 건강기능식품 시장은 **질환 치료·예방**, 건강 증진, 영양 보충 및 미용·노화방지 등의 기능을 중심으로 확장해 나가고 있음.
- 하지만, 2015년 ‘가짜 백수오’ 사건으로 국내 소비자의 건강기능식품에 대한 불신이 증가하였음. 당시 백수오는 갱년기 장애 개선, 면역력 강화, 항산화 효과 등 갱년기 여성에게 만병통치약으로 통하면서 선풍적 인기를 끌었지만 소비원의 발표로 인하여 소비자들의 충격과 정부부처간 상반되는 주장으로 인해 소비자들의 혼란이 가중됨. 그 여진으로 인해 건강기능식품 시장을 위축시키는 요인으로 작용하였음.
- 잔뜩 움츠려든 건강기능식품 시장을 회생시키기 위해서는 소비자 개개인에 맞는 올바른 제품



선택 및 섭취 방법 등에 대한 전문적이고 신뢰할 수 있는 정보를 제공하여함. 따라서 식품의약품안전처에서도 건강기능식품 관련제도를 개선하였으며 아래 그림14에 나타냄.

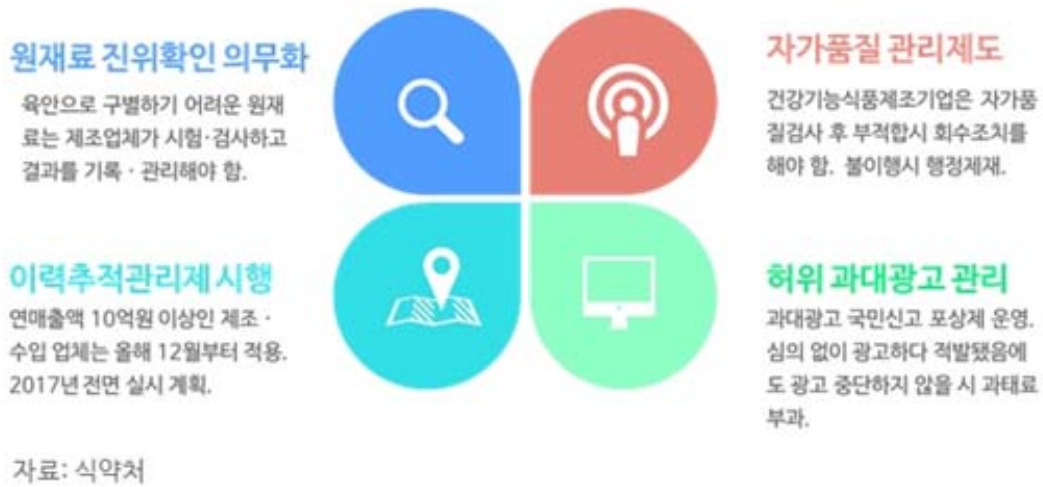


그림 14. 건강기능식품 관련제도 개선안 (식품의약품안전처)

- 따라서 처방 없이도 구매가능 한 건강기능식품 특성상 안전성과 신뢰성이 보증되어야 하므로, 전임상연구와 실제 갱년기 여성들을 타겟으로 하여 임상 효능 및 안전성이 확보되고, 이러한 데이터 결과 값이 정확히 기록 및 관리 되어야함.
- 본 연구는 주관기관에서 국내산 황칠원료를 확보하여 원료 및 제형 안정성 평가를 통한 지속적인 품질관리와 전임상 및 임상평가를 통한 효능과 독성 평가의 데이터 구축을 통하여 4기관의 신뢰가 합쳐진 국내 자생 황칠추출물을 이용한 여성갱년기증후군 치료제를 개발할 수 있을 거라 판단됨.

### 3. 경제산업적 측면

- 인구고령화에 따라 갱년기 및 폐경기 여성인구가 점차 증가하면서 국내 및 세계시장은 계속 커질 전망이다. 또한 사회진출 여성의 비율이 높아지면서 스트레스 등의 환경에 따른 조기폐경을 경험하는 여성들이 증가하고 있는 것도 갱년기 시장 확대의 주요한 요인이 되고 있음.
- 전 세계적으로 2011년 기준 대한민국 여성 인구는 총 2,584만명으로 추정되며, 그 중 45만명이 갱년기 증세와 관련한 진료를 받은 것으로 나타남. 이러한 갱년기 진료를 받은 환자들의 연령은 주로 45세에서 59세까지로 갱년기 증상 여성 호르몬제의 주 타겟 시장이며, 대한민국에 만 2013년 기준으로 동 연령대의 여성은 전체 인구의 24%인 590만명이 존재함. 여성 중 50%가 갱년기 증상을 호소한다고 가정할 경우 대한민국 여성 300만명이 황칠추출물의 항갱년기성 건강기능성 제품의 타겟이 됨(그림 15).

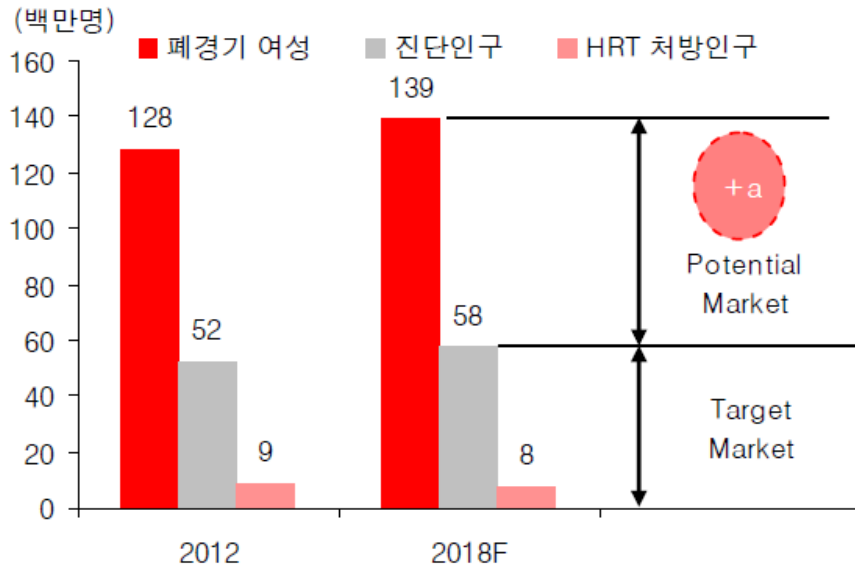


그림 15. 여성갱년기증후군 치료제 타겟 시장(유진투자증권 분석보고서, 2013)

- 폐경기 여성인 40~50대 여성의 경우 가정에서 소비 주도권을 가지고 있고, 다른 연령층 대비 소비력이 높은 편이며, 특히 우리나라의 베이비붐 이후 세대의 경우 그 이전 부모세대 보다 건강에 대한 관심이 매우 높고, 자녀에 대한 무조건적인 투자보다는 자신에 대한 투자를 아끼지 않는 소비자의 특성을 가지고 있기 때문에 갱년기 증상 개선제 시장이 긍정적임.
- 특히 HRT요법의 부작용으로 호르몬을 사용하지 않는 Non-hormone therapy 방식이 증가하고 있으며, 그 방법으로는 운동요법, 식이요법, 식물성 여성호르몬제 등 부작용이 적은 방식의 시장 수요가 증강하였음(그림 16).

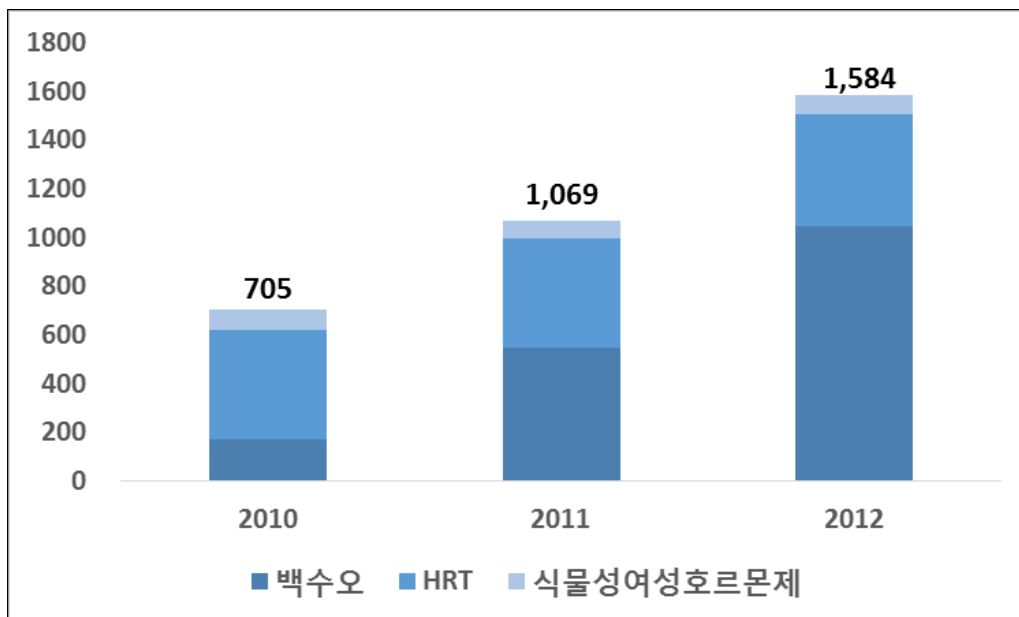


그림 16. 국내 여성 호르몬제 시장(LIG투자증권 분석 보고서, 2014)

- 전 세계 여성갱년기관련 개선 제 및 치료제 시장 규모는 앞으로 증가할 전망이므로, 본 4개의 연구팀은 HRT 처방인구의 대체 수요 확대 2) 건강을 챙기는 트렌드 확산에 따른 갱년기 처방 및 예방 수요의 증가 3) 고령화에 따른 갱년기인구의 증가로 이러한 시장규모 확대는 계속될 것으로 판단됨. 따라서 본 연구팀이 국내 자생하는 황칠을 이용하여 항갱년기성 건강식품을 개발하면, 국내뿐만 아니라 해외시장까지 그 타겟은 더욱 넓어질 것으로 판단됨.
- 국내 산지별, 시기별 연구를 통해 원료의 선정 및 여성갱년기 및 중년여성의 복부비만에 대한 개선 효능을 추가하여 차별화를 통해 국내 자생 식물의 참신성 및 진보성을 확보할 계획임. 따라서 황칠의 농가소득이 향상될 것이며, 소량으로도 우수한 효능을 확보할 수 있어 원료 가격 측면에서는 백수오나 석류보다는 경쟁력 있음 (그림 17).

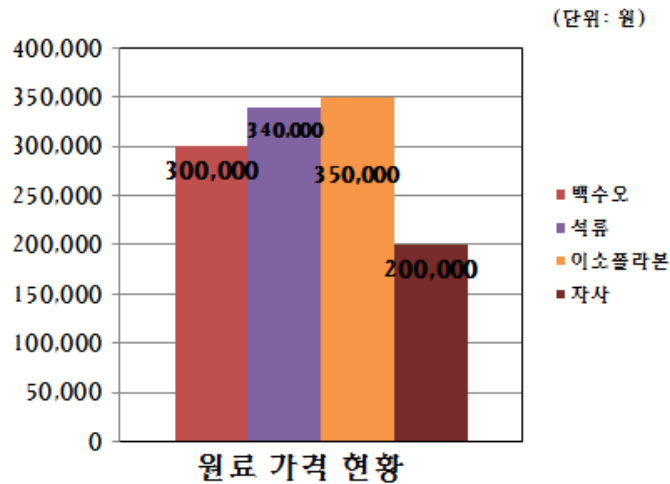


그림 17. 2016년 항갱년기성 원료 가격 현황

## 제 5절 선행연구 내용 및 결과

### 1. 황칠나무 추출물의 일부 성분 분석 및 분석법 개발 연구에 대한 예비시험

- 고성능액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 제주도 황칠나무추출물 분말을 이용하여 페놀성분 중 엘라그산(Ellagic acid) 분석을 실시하고, 기타 성분에 대한 분포를 알아봄 (그림 18).
- 분석결과 엘라그산의 양은 샘플 500 mg 중 0.121 mg이 함유되어 있음을 확인하였음. 따라서 황칠나무 추출물 내 폴리페놀 성분이 함유되어있음을 확인하였으며, 검액 조제 조건에 따른 유효성분의 경시변화도 살펴볼 필요가 있다고 판단됨.
- 탄닌성분인 엘라그산 이외에 에스트로젠성 유효성분에 대한 분석법을 확립하여, 검액조제 조건별 그 함량을 평가할 예정임.

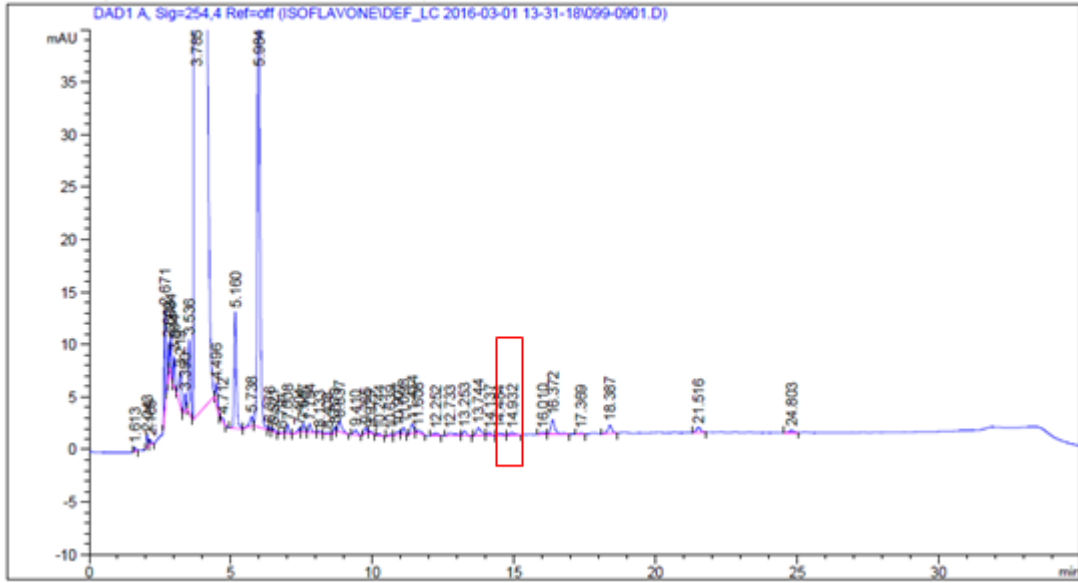


그림 18. 황칠나무추출물분말 HPLC 측정 결과 (Ellagic acid)

- 또한, 고성능액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 제주도산지에서 황칠나무추출분말의 추가 isoflavonoid 성분들에 대해서도 분석을 실시하였음.
- 각 표준품에 대하여 검량선을 작성한 뒤, area 대비 농도를 계산하여 분석법의 신뢰성 또한 확인하였음.

표 12. 황칠나무추출물분말 HPLC 측정 결과 (isoflavonoid 성분)

| RT     | Compound  | Area  | Conc.(ug/ml) | %      |
|--------|-----------|-------|--------------|--------|
| 10.966 | Daidzin   | 3.11  | 0.214        | 0.0042 |
| 11.484 |           | 2.83  | 0.078        | 0.0016 |
| 19.632 | Daidzein  | 0.78  | 0.214        | 0.0042 |
| 11.721 | Glycitin  | 17.39 | 0.808        | 0.0160 |
| 14.508 | Genistin  | 3.77  | 0.100        | 0.0020 |
| 21.815 | Genistein | 2.75  | 0.270        | 0.0054 |

- 황칠나무추출물 내에는 선행연구에서 조사된 에스트로겐활성이 있는 ellagic acid와 isoflavonoid 성분들이 존재함을 확인할 수 있었음.

## 2. 황칠나무 추출물의 파이토에스트로젠성의 기능성과 에너지효능에 대한 선행연구

- 황칠나무 추출물의 위 효능을 증명하기 위하여 세포 및 랫드 동물 모델에서 수행하였음.

### 가. 황칠나무추출물의 세포모델에서의 에스트로젠성 규명에 대한 예비시험 수행

#### (1) ERE-Luciferase 전사원리에 대한 예비시험

- 에스트로겐수용체 (Estrogen receptor; ER)은 세포내에 유입된 지용성 저분자화합물, 즉, 리간드와 화학적 상호작용을 하여 그 3차구조가 변화되어 이합체를 형성한 후 특정 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 estrogen response element (ERE)라고 알려진 특정 DNA 서열에 결합함. 이 결합은 다양한 특수 전사인자 및 RNA 중합효소의 활동을 촉진함. 그 결과 표적유

전자의 전사가 수 배 ~ 수 백배 증가하게 됨. 이런 이유로, ER은 핵에서 작용하는 전사활성인 자라고도 분류되어짐.

- 시험물질이 가지는 ER과의 상호작용을 통한 표적유전자의 전사증가 정도를 측정함으로써 해당시험물질이 ER의 작용제 (agonist)인지 길항제 (antagonist)인지를 판단할 수 있음.
- 시험물질의 ER-매개 전사활성 정도는 ERE를 프로모터 영역에 가지고 있는 luciferase 유전자가 세포내에서 시험물질 처리에 의해 발현되는 변화정도를 측정함. ERE-luciferase를 포함하는 plasmid를 세포내에 transfection시킨 후 시험물질을 처리함. 즉, luciferase 유전자 발현 정도에 따라 증가하는 Luciferase product의 발광정도를 정량적으로 측정함으로써, 전사활성 정도를 판단함.
- 아래 그림 19와 같이 ER-ERE luciferase assay방법은 fire fly Luciferase 유전자의 프로모터영역에 ligand-activated ER이 상호작용하는 DNA 부위인 ERE를 가지고 있는 플라스미드를 세포내에 transfection시킨 후, 시험물질 처리에 의한 luciferase (ER-ERE 활성화에 의해 그 전사가 조절되는 표적유전자)의 발현 정도를 측정하는 것임.

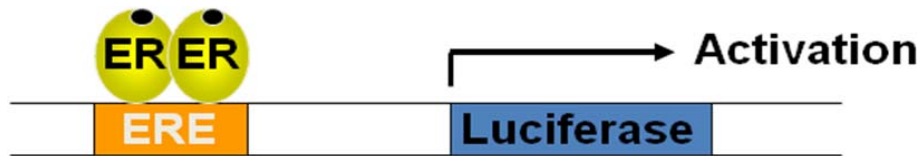


그림 19. ER-ERE Luciferase assay의 개요

- 흑점은 ER의 작용제로 작용하는 리간드 물질을 의미함. 작용제와 결합한 ER은 이합체를 이룬 후, ERE DNA 서열에 전사인자로서 작용하여 결합함. 이 결합은 많은 전사인자를 끌어들이어 결국 표적유전자 (이 실험에서는 Luciferase)의 전사를 크게 증가시킴.

#### 나. 실험의 개요

- 17 $\beta$ -estradiol (E2) (ER의 대표적인 작용제에 의해 발현이 증가하는 유전자의 프로모터부위에 존재하는 ERE 서열과 reporter gene (Luciferase)를 갖고 있는 DNA plasmid를 ER-양성 유방암세포주 (MCF-7)에 transfection시킨 후 일정농도의 시험물질 (DMSO 용액)을 이 세포에 처리함. 24시간 후 Luciferase 활성도를 측정하였음.

#### 다. 예비실험 결과

##### (1) ER 작용제로서의 활성화에 대한 예비 결과

- E2 1 nM이 나타내는 Luciferase 활성도를 100%로 잡았을 때 시험물질의 활성도를 %값으로 표시함.
- 황칠나무추출물 분말 농도 100 mg/ml 에서 E2 대비 50% 이상의 효능이 나타났으며 200 mg/ml 농도에서 E2 대비 80%의 효능을 나타내었음. 이것은 EC<sub>50</sub>값이 약 100 mg/ml 일 것이며, 시험물질은 매우 강력한 ER 작용제 (Full agonist)임을 알 수 있음 (표 13).

표 13. 황칠나무추출물의 ERE 전사 활성화도

| 황칠목추출물 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | % of maximal response of E2<br>(E2 1 nM 활성화도 = 100%) |
|--------------------------------|--|
| 50                             | 33   |
| 100                            | 56   |
| 200                            | 80   |

(2) 황칠나무 추출물의 ER 길항제 활성화에 대한 예비 실험 결과

- 시험물질을 E2 1 nM과 동시에 처리한 후 얻어진 Luciferase 활성화도를 기록하였으며, 역시 E2 1 nM 100%로 잡았을 때 시험물질 투여시 활성화도를 %값으로 나타내었음 (표 14).
- 시험농도(50, 100, 200 mg/ml) 에서 E2가 가지고 있는 ER작용제의 활성화에 거의 영향을 미치지 않았음. 이는 황칠나무추출물이 ER 길항제로서의 활성이 없음을 의미함.

표 14. 황칠나무추출물과 E2 혼합처리 시 ERE 전사활성도

| 황칠목추출물 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | % of maximal response of E2<br>(E2 1 nM 활성화도 = 100%) |
|--------------------------------|--|
| 50                             | 33   |
| 100                            | 56   |
| 200                            | 80   |

(3) 황칠나무추출물의 ERE 전사활성의 ER subtype 선택성에 대한 예비시험

- ER subtype을 각각 발현시킬 수 있는 transient transfection system에서 subtype별로 발현되는 ERE-Luciferase 활성을 기록하였음.
- 황칠나무추출물의 ERE 전사활성은 ER $\beta$ 에서 E2 대비 약 40%의 활성을 보여주었음. 하지만, DMSO 처리군에 비하여 1.5배를 나타내어, 상대적으로 약한 활성을 나타냄.
- 반면 ER $\alpha$  를 발현하는 시스템에서 전사활성이 E2 대비 70%를 달성하였음. 이때 EC<sub>50</sub>값은 약 75 mg/ml임.
- 따라서, 황칠나무추출물의 ER/ERE 전사활성은 주로 ER $\alpha$ 를 매개로 함을 알 수 있음(표 15).

표 15. 황칠나무추출물의 ER subtype 발현과 그 전사 활성화도

| 황칠나무추출물 농도<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | DMSO Fold       |                | % to E2         |                | ER $\beta$ /ER $\alpha$ ratio |
|------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
|                                    | HEK-ER $\alpha$ | HEK-ER $\beta$ | HEK-ER $\alpha$ | HEK-ER $\beta$ |                               |
| DMSO                               | 1.00            | 1.00           | 5.0             | 31.9           | 1.0                           |
| E2 (1 nM)                          | 19.92           | 3.13           | 100             | 100.0          | 0.2                           |
| 5                                  | 1.17            | 0.78           | 5.8             | 25.1           | 0.7                           |
| 10                                 | 1.27            | 0.93           | 6.4             | 29.6           | 0.7                           |
| 25                                 | 2.95            | 1.22           | 14.7            | 39.0           | 0.7                           |
| 50                                 | 5.07            | 1.08           | 25.3            | 34.6           | 0.4                           |
| 75                                 | 10.76           | 1.17           | 53.8            | 37.3           | 0.2                           |
| 100                                | 12.26           | 1.35           | 61.3            | 43.0           | 0.1                           |
| 150                                | 12.29           | 1.51           | 61.4            | 48.3           | 0.1                           |
| 200                                | 13.60           | 1.40           | 68.0            | 44.8           | 0.1                           |

## 나. 황칠나무추출물의 PPAR $\gamma$ 작용제로서의 효능에 대한 예비 시험 결과

### (1) PPAR $\gamma$ 작용제 평가 원리

- 파이토에스트로젠은 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 및 AMPK에 작용함으로써 체중 및 지방량 조절에도 기여함. 폐경기여성의 최대고민 중의 하나인 복부비만과 체중증가를 개선시킬 수 있는 PPAR 작용제 및 AMPK 활성화제로서의 황칠나무 추출물의 새로운 기능을 규명하고자 함
- ERE-luciferase assay와 유사한 원리를 활용하여 PPAR $\gamma$  response element (PPARE)-luciferase assay를 수행하여 시험물질이 가지는 PPAR $\gamma$ 와의 상호작용을 통한 표적 유전자의 전사증가 정도를 측정하여 PPAR $\gamma$ 의 작용제인지를 판단함.

### (2) 예비실험 결과

- 양성대조군 Rosiglitazone은 vehicle control (DMSO) 대비 1.2 배 정도로 PPAR $\gamma$ -Luciferase 활성을 증가시켰음. 또한, 황칠나무추출물 처리군의 경우 250 및 500 mg/ml에서 1.8배 및 1.3배 크기로 활성을 증가시켰음. 따라서, 황칠나무추출물은 PPAR $\gamma$ 작용제로서의 활성을 가짐

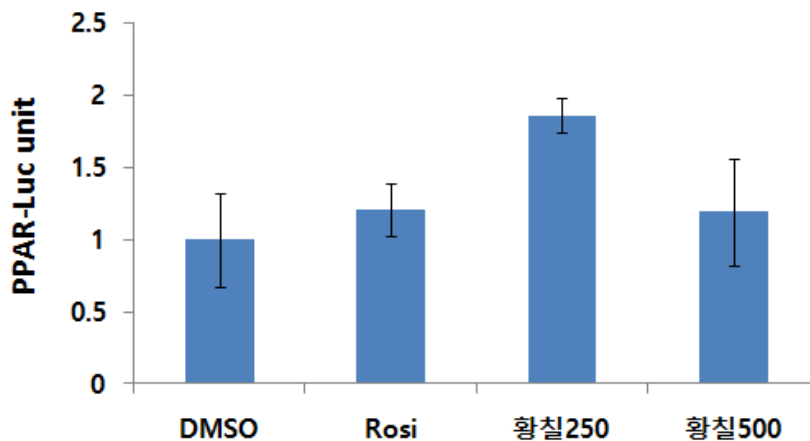


그림20. PPAR $\gamma$ -luciferase assay를 활용한 황칠나무추출물의 PPAR $\gamma$ 작용제 활성평가

- MCF7세포에 PPAR $\gamma$  및 reporter luciferase plasmid를 transfection한 후, 각 시험물질을 처리한 후 24시간 동안 배양함. Luciferase 활성을 luminometer로 측정하였음. DMSO: methysulfoxide, Rosi: Rosiglitazone, 황칠250: 황칠나무추출물 250 mg/ml.

## 다. 황칠나무추출물의 자궁적출 랫드에서 자궁증식성 예비검토 결과

### (1) 자궁증식평가 원리

- 자궁증식평가실험은 에스트로젠이 자궁내막 세포 증식을 유발함으로써 자궁 조직의 중량이 증가하는 원리를 이용하여 시험물질의 생체 내 여성호르몬성으로서 작용하는지를 평가함. 이 실험은 OECD에서 지정한 내분비교란물질의 에스트로젠성을 평가하는 실험으로 지정된 평가법임.
- 동물이 생리적으로 생산하고 있는 에스트로젠을 제거하기 위하여 암컷 랫드의 난소를 외과수술을 통하여 제거 (Ovariectomy; ovariectomized OVX)한 후, 회복기를 거친 랫드에서 시험물질을 일정기간 투여함. 실험이 종료된 후 외과적으로 자궁을 적출하여 그 무게를 측정함으로써 시험물질의 자궁증식정도를 평가함.

### (2) 실험 결과

- E2 (5 mg/kg/d; High dose group) 투여군은 대조군 (용매투여군)에 비하여 약 2.3배 증가하였고, 황칠나무추출물 (250 및 500 mg/kg; OVX DM250 및 OVX DM500) 투여군의 경우, 대조군에 비하여 약 **1.85 및 2.1배 증가**하였음.
- 일간 피하투여 후 자궁중량/체중량의 상대값을 투여군마다 산출하여 대조군 (OVX-Corn oil treatment group)과 비교한 결과 E2 (0.5 mg/kg/d; Low dose group)와 황칠나무추출물 (500 mg/kg) 병용투여군의 경우, 대조군에 비하여 약 2.6배 증가하였음 (그림 21). 따라서, 황칠나무추출물은 E2에 의한 자궁증식을 저해하지 않고 additive effect를 보여줌.

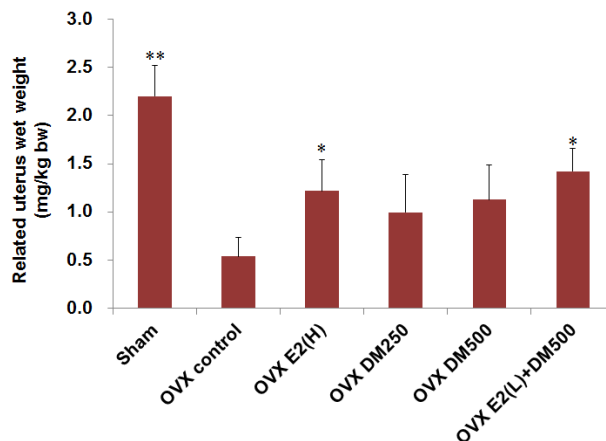


그림 21. 황칠 추출물의 OVX 랫드에서 자궁증식 효과. 난소적출 (OVX) 랫드에 시험물질을 3일 간 피하투여한 후, 5일째에 자궁을 적출하여 그 무게를 측정함. OVX control: corn oil, E2(H): E2 투여군, DM은 황칠나무추출물. DM 옆의 숫자는 mg/kg 단위의 투여용량을 의미함.



## 라. 선행 예비연구결과 요약

- 황칠나무 추출물의 에스트로겐수용체 (Estrogen receptor: ER) 리간드로서 작용제 또는 길항제 활성을 배양 세포 및 설치류 모델에서 평가하고자 함.
- 배양세포에서 황칠나무추출물의ER을 매개로 하는 전사활성 정도를 Reporter gene (Luciferase) 발현정도를 평가함으로써 고찰하고자 함. 이 전사활성은 ER양성인 사람 유선암세포인 MCF7 세포주에서 검토하였음. ER을 매개로 하는 전사활성을 E2를 양성대조군으로 하여 비교 검토한 결과, 황칠나무추출물이 **ER 작용제** 활성을 나타내었음.
- 황칠나무추출물의 ER subtype 선택성을 HEK 세포모델에서 검토한 결과, 이 소재의 에스트로겐성활성에 기여하는 subtype은 ERβ에 비하여 ERα의 관련성이 높음.
- 황칠나무추출물은 PPARγ 작용제활성을 나타내며, 이는 황칠나무추출물이 체중조절, 에너지 항상성에 관련된 생체지표에 긍정적인 영향을 나타낼 수 있음을 시사함.
- 생체모델에서 황칠나무추출물의 에스트로겐성은 난소를 적출한 랫드에 시험물질을 추출하여 자궁내막세포증식으로 인한 자궁무게 증가를 측정함 (uterotrophic assay)으로써 평가하였음. 난소적출 랫드에 황칠나무추출물을 3일간 피하투여한 후 **자궁의 무게가 유의하게 증가하였음.** 이 결과는 황칠나무추출물이 세포 뿐 아니라 생체시스템에서도 에스트로겐으로서 생리활성을 나타냄을 의미함.
- 황칠나무추출물은 ER 작용제로서 매개 신호전달경로로 연결되는 다양한 생리작용을 활성화할 수 있으며 그 결과로서 자궁내막세포의 증식을 촉진할 수 있음을 시사함. 안전성에 관한 검토를 추가적으로 수행한다는 전제하에 **본 소재는 에스트로겐대체요법 기능성소재로 개발 가능성이 매우 높음.**

## 3. 여성 폐경질환 관련 예비연구 수행

### 가. 폐경여성에서 호르몬 치료에 따른 골밀도 변화의 상호관계

- 폐경여성에서 호르몬 치료의 종류에 따른 골밀도 변화와 호르몬 치료기간에 따른 골 밀도의 변화를 조사함. 호르몬 치료를 하는 폐경기 여성 291명을 대상으로 골밀도 검사와 추적 골 밀도 검사를 시행함. 호르몬의 종류에 따른 골밀도의 향상과의 연관성은  $p=0.956$ , 호르몬 치료기간과 골밀도 향상과의 연관성 또한,  $p=0.483$ 으로 통계학적인 의미는 없었음. 하지만, 처음부터 골다공증이 있어 호르몬 치료를 시행한 군에서는 골밀도의 향상이 통계적인 의의를 나타냄 ( $p=0.001$ ).

### 나. 폐경 쥐 모델에서 두류 섭취에 따른 자궁의 비타민 D 수용체의 발현

- 폐경 쥐 모델을 이용해 식물성 에스트로겐이 포함된 두류의 체계적인 연구의 필요성과 자궁에서의 비타민 D와 Ezrin의 역할의 가능성을 규명함. 또한 호르몬 대체 요법의 대체 물질로 관심을 받고 있는 식물성 에스트로겐의 식품을 통한 섭취가 폐경기 여성 생식기의 위축과 퇴화에 분자생물학적으로 어떠한 영향이 미치는 지 확인함.

### 다. 학회에서의 자문활동 및 폐경 관련 강좌

- 제 3 협동기관 연구책임자는 2009년부터 현재까지 대한폐경학회 편집위원장을 역임하면서 폐경질환에 관해 자문활동을 시행중임.

- 순천향대학교 부천병원에서 폐경 및 갱년기 여성 질환 등 다양한 주제로 건강강좌를 꾸준히 진행 중임. 지역주민을 대상으로 폐경 및 골다공증 증상, 원인, 호르몬 치료의 오해와 진실, 관리법 등에 대해 정확한 내용을 전달함.

#### 4. 특허출원

- 선행연구의 결과를 토대로 “ 황칠나무 추출물을 유효성분 으로 함유하는 갱년기질환 예방 및 치료용 조성물”의 발명 특허 출원(출원번호 10-2015-0190242, 출원일자 2015년 12월 30일)을 완료하였음. 따라서, 본 선행연구 수행을 통해 황칠나무추출물의 파이토에스트로젠으로서의 신규 기능을 증명하였고, 특허출원을 통해 제품개발과 관련한 지적재산권에 대한 권리는 이미 확보하였음.

### 관 인 생 략 출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2015.12.30  
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출 원 번 호 10-2015-0190242 (접수번호 1-1-2015-1290537-18)  
 출 원 인 명 칭 아주대학교산학협력단(2-2004-025742-3) 외 1명  
 대 리 인 성 명 특허법인미주(9-2015-100181-3)  
 발 명 자 성 명 박영준 장민선 오성문 김성환  
 발 명 의 명 칭 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구범위 및 연구수행 방법

| 연구기관명              | 연구범위   | 연구개발 수행방법<br>(이론적 실험적 접근방법)  | 구체적인 연구내용  |
|--------------------|--|--|--|
| 주관연구기관<br>- 리후헬스케어 | 황칠나무추출분말<br>대량 제조·생산 및<br>제조공정 표준화             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠추출분말 가공업체를 건강기능식품원료 제조업체인 알파비앤에이치(주)로 선정</li> <li>- 황칠추출분말 제조공정 확립</li> <li>- 대량생산 된 원료와 lab scale로 생산된 샘플 생산 수율 및 지표성분 함량 비교</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인체적용 시험용 황칠나무추출분말을 위탁제조업체인 알파비앤에이치(주) 대량 제조 및 생산하였음.</li> <li>- 아주대학교와 협업하여 대량 생산된 황칠추출분말 간이시험을 통하여 함량시험 적합여부를 확인하였음.</li> <li>- 국가공인 인증시험기간에 scale up 전 후 황칠추출분말 분석을 의뢰하여, scale up 과정에서 발생 할 수 있는 지표성분 함량 변화를 분석하여 재현성을 확인하였음.</li> </ul> |
|                    | 난소절제 랫드에서<br>에스트로겐 활성 및<br>골다공증 개선<br>바이오마커 확인 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2017년 12월 말 식품의약품안전처 영양기능연구팀 과 회의 시 “갱년기 여성 건강에 도움을 줌”에 대한 가이드라인이 개정 될 예정으로 확인</li> <li>- 2018년 3월에 최종 가이드라인이 개정됨에 따라, 골다공증 개선 바이오마커를 확인을 위한 추가 전임상 시험 진행</li> <li>- CRO 전문업체인 ‘크로엔’ 과 추가 전임상 건에 대하여 계약 체결</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추가 골다공증개선 효능을 확인하고자 폐사의 자체 비용을 투자하여 크로엔과 총 10주에 걸쳐 여성갱년기 모델인 난소적출한 랫드에서 시험을 완료하였음.</li> <li>- 투여 4주 후, 각 해당하는 바이오마커에 대하여 시험분석 하여, 효능 확인 및 인체적용시험을 위한 유효농도를 설정하였음.</li> <li>- 최종 8주 투여 후, 여성갱년기 지표와 관련된 바이오마커확인 하였음.</li> </ul>              |
|                    | 인체적용시험용<br>시험약 생산                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전임상 시험을 통해 인체적용시험을 위한 유효농도 설정</li> <li>- 한국노바렉스(주)와 위탁 제조계약 체결 후 인체적용시험을 위한 시험약 및 위탁 제조</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추가 전임상 시험을 통해 인체적용 시 일일복용량을 설정하여 생산 계획하였음.</li> <li>- 플라시보(위약)에 대하여 시험약과 구분이 되지 않도록 제형 연구 후 생산 진행 하였음.</li> <li>- 인체적용시험 시 투여할 제형을</li> </ul>   |

|                  |  |   |  |
|------------------|--|---|--|
|                  |  |   | 위탁제조업체인 한국노바렉스(주)와 협업하여 개발 및 생산하였음.  |
|                  | 건강기능식품 제품화 및 산업화 연구                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 휴온스내츨렐과 위탁제조 계약 체결</li> <li>- ㈜유니셀팜과 위탁제조 계약 체결</li> <li>- 비거트유산균(주)와 MOU 체결</li> <li>- 기능성원료 인허가 전문 컨설팅 업체인 '네오뉴트라'와 계약체결</li> <li>- 개별인정형 신청 자료 작성 완료</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 휴온스내츨렐에서 황칠추출물을 함유하는 '황제를위하여', '황후미인' 일반식품으로 개발 및 생산하였음.</li> <li>- ㈜유니셀팜을 통해 황칠추출물을 부원료로 함유하는 남성 건강기능식품인 홈런킹을 개발 및 생산 판매하고 있음.</li> <li>- 식물성 원료를 이용하여 비건요거트를 개발하는 업체로, 추후 황칠추출분말을 함유하여 제품 개발을 진행 중에 있음.</li> <li>- 황칠나무추출분말 "갱년기 여성에 도움을 줄 수 있음"관련 개별 인정형 신청</li> </ul> |
|                  | 미국 및 중국 해외특허 출원 완료                         | - "황칠나무 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환 예방 및 치료용 조성물"에 대하여 미국특허 및 중국특허 출원  | - 2018년 6월 미국특허 및 중국특허 국내단계 진입 하였으며, 8월 이후 출원공개 및 실체심사 단계에 진입하였음.  |
|                  | 논문 게재 등록                                   | - 한국식품과학회지에 논문 투고 및 게재 진행   | - 골다공증개선 효능 시험에 대하여 논문 작성 후, 한국식품과학회지에 논문 투고, 8월 호에 게재확정.  |
|                  | 황칠추출분말 원료 및 황칠추출분말이 함유된 건강기능식품 제품 실용화 및 홍보 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2018년 8월에 개최한 Cphi Korea 박람회에 황칠추출분말로 진행 중인 여성갱년기 증상 개선 연구 활동을 홍보.</li> <li>- 그 외, 신문기사 (약업신문, 데일리팜 등)에 농림축산식품부의 정부지원을 통한 연구활동 홍보.</li> </ul>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cphi Korea 전시 부스에 농림축산식품부의 정부지원에 대한 연구활동을 홍보하였음.</li> <li>- 다국적 업체들의 방문으로, 국내 자생하는 황칠의 효능을 홍보하였음.</li> </ul>  |
| 제 1협동과정<br>아주대학교 | 건강 기능성 제품의 최적 제형 조성 선정                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종의 제품에 대한 제형 연구를 통해 최적의 부형제 및 성분 조성을 선정함</li> <li>- 제형에 대한 제조방법 확</li> </ul>  | - 황칠 원료 자체 흐름성을 고려하여 습식과립법이 아닌 생산의 이점을 고려한 직타법으로 제조하였으며, 제조 과정 시 발생한 타정장애를 제형 성상 변경과 조성  |

|                   |                                |   |  |
|-------------------|--------------------------------|---|--|
|                   |                                | 립   | 비율 변경을 통해 개선하였음.   |
|                   | 건강 기능성 제품의 기준 및 시험법 확립         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품의약품안전처에서 2014년에 개정한 『건강기능식품의 기준 및 규격』에 따라 시험법 설정 후 벨리데이션진행</li> <li>- 식품의약품안전처 2013년 『건강기능식품공전』에 나온 유해물질규격설정항목에 따라 시험 진행</li> <li>- 건강 기능성 제품에 대한 기준 및 시험방법을 설정함</li> <li>- 안정성 평가 및 1개월 이상 안정성 확보</li> </ul>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 시험을 통해 황칠의 기능성분인 Rutin이 신뢰있게 분석됨을 확인하였음.</li> </ul>  |
|                   | 건강기능성 제형 안정성 연구                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 장기, 가속, 가혹(습도, 온도 및 광) 시험 조건에서 안정성 연구</li> <li>- 안정성 평가 및 1개월 이상 안정성 확보</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 위 선정된 최종 제형에 대하여 안정성 연구를 진행하였으며, 단일제형 및 복합제형 모두 6개월 해당 안정성 시험 기간동안 안정한 것으로 확인 되었으며, 이에 건강 기능성 제형에 적합함을 확인하였음.</li> </ul>  |
|                   | 제형 생산공정 최적화                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공정연구를 통해 제형 제조 시 위험 요소가 있는 부분을 체크하여 최적의 생산공정 범위 확인</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산의 편리성을 위해 습식과립법에서 직타법으로 변경하였으며, 제조 과정 시 발생한 타정장애를 제형 정상 변경과 조성 비율 변경을 통해 개선하였음.</li> </ul>  |
| 제 3협동과정<br>순천향대학교 | 시제품에 대한 임상시험을 통한 안전성 확보 및 효능규명 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2차년도 황칠 추출물의 in vitro, 동물 모델에서의 효능 및 안정성을 확인하였음. 이를 바탕으로 3차년도 인체 적용 시험 실시함. 임상 시험이 끝난 후 결과 분석을 통해 안전성 확보 및 갱년기 증상 완화 효능을 규명함.</li> <li>- 연구대상자(시험군 35명, 위약군 35명, 총 70명)를 모집하여 총 12주 동안 임상 시험(시험군 또는 대조군의 임상시험용제품을</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- IRB 승인 후에 순천향대학교 부천병원 산부인과 연구팀은 시험군 35명, 위약군 35명, 총 70명의 대상자를 모집하여 임상시험을 실시함.</li> <li>- 쿠퍼만 갱년기 지수를 비롯한 설문도구들과 각종 임상 데이터를 통해서 황칠 추출물의 효과를 연구하여 결과를 도출함.</li> </ul> |

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
|  |  | <p>투여받는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림 연구자 주도 임상시험) 실시할 것임.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 임상 시험 종료 후 결과 분석을 통한 안전성 확보 및 갱년기 증상 완화 효능 관계 규명함.</li> <li>- 임상 평가에 의한 효능 및 안전성을 황칠의 신규성, 차별성과 접목시켜 다수의 논문, 특허 등을 출원할 것임. 이를 바탕으로 황칠 추출액이 여성 갱년기 증상 완화 및 치료 기능을 하는 건강기능식품으로서 활용될 수 있음을 뒷받침함.</li> </ul> |   |
|  | <p>갱년기 증상완화 건강기능식품 시제품의 실용화 및 홍보 전략 모색</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 병원 홍보자료 및 학술 논문 등을 활용하여 시제품의 홍보를 실시함. 또한 여성, 주부 전문지 분야 선두매체 ‘베이비뉴스’ 등을 포함한 온라인 매체를 통해 해당 시제품을 홍보함.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 임상시험을 통한 결과를 토대로 개별 인정 및 시제품 발매후 병원 홍보자료, 논문, 온라인 매체 등을 통해 홍보 예정.</li> </ul> |

## 제 2 절 연구수행 결과

### 1. 주관연구기관 - 리후헬스케어(주)

#### 가. 황칠나무추출분말 제조공정 표준화

##### (1) 황칠나무의 원재료 표준화

- 황칠나무는 서해남 지역 및 제주도 한라산 일대에서 재배되기 때문에 원산지 표준화가 우선 시 되어야 했으며 2차년도 아주대학교 분석결과를 의뢰하였음. 강진과 제주도에서 재배한 황칠 나무추출물에 지표/기능성분이 많이 함유되어 있는 것을 확인하였으나, 사업화 후 제조원가 및 배송 등을 고려하였을 때, 원재료확보가 용이한 강진산으로 원산지를 설정하였음.
- 또한, 잎 100%의 추출물과 잎 70%와 줄기 30%가 함유된 추출물의 비교 분석 결과 잎 100% 및 잎·줄기가 혼합된 추출물에서 지표성분 및 유효성분의 함량이 크게 차이가 없음을 확인하였 음.

표 16. 채취부위별 황칠추출물 지표성분 및 유효성분 함량

##### (A) 황칠추출물로서 지표성분 함량

|             | 잎 70%+줄기30% |           | 잎100%     |           |
|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
|             | 30%         | 50%       | 30%       | 50%       |
| Rutin(mg/g) | 4.76±0.40   | 8.81±0.10 | 5.29±0.18 | 9.84±0.19 |

##### (B) 황칠추출물 고형분으로서 유효성분 함량

| (µg/g)       | 잎 70%+줄기30% |            | 잎100%      |            |
|--------------|-------------|------------|------------|------------|
|              | 30%         | 50%        | 30%        | 50%        |
| Genistin     | 42.90±0.7   | 38.26±0.66 | 39.17±1.80 | 35.90±2.79 |
| Ellagic acid | 8.74±0.31   | 6.55±0.36  | 5.82±0.37  | 5.07±0.31  |
| Daidzein     | 8.39±0.41   | 3.71±0.09  | 6.39±1.11  | 5.88±1.40  |
| Genistein    | 16.97±1.02  | 14.23±0.35 | 13.35±0.85 | 11.69±0.79 |



- Pilot-scale 생산 및 실제 생산을 위하여 사용된 황칠 잎·줄 기 건조물은 전라남도 강진군 마량면에서 다산황칠농원(그림 22 참고 황칠 재배 최적지역)으로부터 수확되었으며, 2018년 에 11년 동안 재배 한 황칠나무 잎과 줄기를 사용하였음. 수 확된 잎과 줄기는 각각 70:30 비율로 혼합하여 농·수산물 건 조기(기기모델명: GN24)를 이용하여 12시간 동안 건조시킨 후 추출분말 생산을 위하여 알파비앤에이치(주)로 배송하였 음.

그림 22. 황칠나무의 재배지 (다산황칠농원)

(2) Lab scale에서 황칠추출분말 제조공정 연구

- 3차년도 폐사 내부적으로 vendor audit을 진행 하였고, 기존 추출물을 제조하는 업체에서 시설설비가 부족함을 파악하여 알파비앤에이치(주)로 위탁제조업체를 변경하였음. 추출물 제조까지의 공정은 대호양행(주)의 제조방법과 동일하게 진행하였으며, 알파비앤에이치(주)에서는 보관 및 안정성 등을 고려하여 액상에서 고형분으로 분말화하는 공정을 추가하였음(표 17).

표 17. 황칠추출분말 제조방법

| 공정 번호 | 공정       | 원료 · 시약 · 용매등   | 사용기기        | 주요변수                    |
|-------|----------|---|-------------|-------------------------|
| 1     | 원료<br>칭량 | 원물 : 황칠(별규)*<br>추출용매 : 정제수 (KP)<br>*주성분 제조원<br>상호: 강진디피라이프<br>주소: 전남 영동로 430-11 |             |                         |
| 2     | 추출1      | 공정 1의 원료<br>원물 : 추출용매 비율 = 1:10 비율 (단위, kg)                                     | 오토클레이브      | 상압 또는 가압                |
| 3     | 추출2      | 공정 2의 추출물 분리<br>원물 : 추출용매 비율 = 1:8 비율 (단위, kg)                                  | 오토클레이브      | 상압 또는 가압                |
| 4     | 여과       | 공정 2+3의 추출액   | 진동체<br>여과기  |                         |
| 5     | 진공<br>농축 | 공정 4의 여과액   | 회전<br>증발농축기 | 고형분 함량 30Birx           |
| 6     | 살균       | 공정 5의 농축액   | 가열 살균       | 일반세균: ≤100/g<br>대장균: 음성 |
| 7     | 분말화      | 공정 6의 살균액<br>말토덱스트린 6% 함유 또는<br>100% 황칠추출물                                      | 분무건조기       | 대장균: 음성                 |
| 8     | 포장       | 공정 7의 분말을 내포장지(비닐)에 밀봉 포장 후 박스 포장한다.  |             |                         |
| 9     | 실온<br>보관 | 직사광선을 피하고 실온보관  |             |                         |

(가) 분말화 공정에서 말토덱스트린 유무에 따른 분말 내 지표성분 및 유효성분 함량변화

- 황칠 추출분말을 제조하기 위해 사용 한 기기는 분무건조기(Spray dryer)이며, 100% 황칠추출분말과 6% 말토덱스트린을 함유하는 분말을 각각 생산하여 지표성분 및 유효성분의 함량을 비교 분석하였음.

- 표 18에서 지표성분 및 유효성분의 함량 결과는 100% 황칠추출분말에서 Rutin/Genistin/Genistein의 함량이 높았으며, Ellagic acid/Daidzein만이 6% 말토덱스트린이 함유된 분말에서 미미하게 높았음. 말토덱스트린은 체내에서 흡수를 도와줘 추출물을 분말로 제조 하는 공정에서 많이 사용하는 부형제이긴 하나, 황칠추출분말 내 지표 및 유효성분의 함량을 줄이는 영향을 끼친다고 판단되므로, 100% 추출물을 이용하여 분말화 공정을 진행하기로 하였음.

표 18. 분말화공정에서 말토덱스트린 함유 따른 지표성분 및 유효 성분 함량

(A) 황칠추출분말 지표성분



|             | 100% 추출분말  | 말토덱스트린6% 함유 |
|-------------|------------|-------------|
| Rutin(mg/g) | 13.24±0.05 | 10.23±1.14  |

(B) 황칠추출물 고형분으로서 유효성분 함량

| (µg/g)       | 100% 추출분말  | 말토덱스트린6% 함유 |
|--------------|------------|-------------|
| Genistin     | 86.02±7.16 | 59.82±7.75  |
| Ellagic acid | 4.36±2.18  | 4.47±0.23   |
| Daidzein     | 4.84±0.01  | 6.13±0.30   |
| Genistein    | 5.03±0.26  | 2.13±0.06   |

(나) 상압 및 가압공정에 따른 지표성분 및 유형성분 함량 변화

- 공정번호 2와 3에서 추출공정 시 상압과 가압(1,500 psi)조건에 따라 추출물을 20, 30 그리고 40 Brix로 농축하여 제조한 후 지표성분 및 유효성분 함량을 비교 하였고, 20 Brix와 40 Brix에 해당하는 추출물을 분무건조 하여 분말화 후 지표성분 및 유효성분 함량을 비교 분석 하였음.
- 표 19의 결과에서 고성능액체크로마토그래프법을 이용하여 분석하였을 때, 펌프의 이상으로 인하여 일정한 압력을 유지하여 분석이 되지 않아 표준액에서도 피크유지시간이 2분정도 차이가 났었음. 따라서 많은 피크들의 겹침이 생기는 유효성분들의 함량이 부정확할 수 있으나, 지표성분인 Rutin의 경우에는 펌프 압력차이에 의하여 분석결과가 크게 영향을 미치지 않으므로 지표성분 함량만 비교하였음. Rutin 함량은 상압과 가압 조건에서 추출물 및 추출분말에서 크게 차이가 있지 않으며, 오히려 **상압조건에서 함량이 높음을 확인하였음.** 가압추출이 아닌 상압추출로 황칠나무추출물을 진행하기로 최종 결정하였음.

표 19. 상압·가압 공정에 따른 지표성분 및 유효성분 함량

(A) 황칠추출물 및 분말 내 지표성분

|             | 조건 | 농도      | 추출물        | 추출분말       |
|-------------|----|---------|------------|------------|
| Rutin(mg/g) | 상압 | 20 Brix | 23.67±0.19 | 23.88±0.14 |
|             |    | 30 Brix | 23.15±0.12 |            |
|             |    | 40 Brix | 22.76±0.05 | 24.12±0.01 |
|             | 가압 | 20 Brix | 19.75±0.04 | 19.50±0.04 |
|             |    | 30 Brix | 19.55±0.04 |            |
|             |    | 40 Brix | 19.15±0.02 | 19.50±0.11 |

(B) 황칠추출물 고형분으로서 유효성분 함량

| ( $\mu\text{g/g}$ ) | 조건 | 농도      | 추출물               | 추출분말              |
|---------------------|----|---------|-------------------|-------------------|
| <b>Genistin</b>     | 상압 | 20 Brix | 82.42 $\pm$ 40.77 | 33.84 $\pm$ 0.1   |
|                     |    | 30 Brix | 57.06 $\pm$ 24.06 |                   |
|                     |    | 40 Brix | 62.98 $\pm$ 20.79 | 34.69 $\pm$ 0.38  |
|                     | 가압 | 20 Brix | 90.33 $\pm$ 19.53 | 46.31 $\pm$ 0.27  |
|                     |    | 30 Brix | 43.85 $\pm$ 0.45  |                   |
|                     |    | 40 Brix | 20.47 $\pm$ 0.00  | 52.27 $\pm$ 0.31  |
| <b>Ellagic acid</b> | 상압 | 20 Brix | 11.69 $\pm$ 4.94  | 16.53 $\pm$ 3.97  |
|                     |    | 30 Brix | 9.67 $\pm$ 3.98   |                   |
|                     |    | 40 Brix | 3.04 $\pm$ 2.40   | 16.51 $\pm$ 0.80  |
|                     | 가압 | 20 Brix | 11.97 $\pm$ 9.43  | 8.09 $\pm$ 6.90   |
|                     |    | 30 Brix | 5.69 $\pm$ 1.64   |                   |
|                     |    | 40 Brix | 5.02 $\pm$ 3.67   | 17.43 $\pm$ 0.32  |
| <b>Daidzein</b>     | 상압 | 20 Brix | -                 | -                 |
|                     |    | 30 Brix | -                 |                   |
|                     |    | 40 Brix | -                 | -                 |
|                     | 가압 | 20 Brix | -                 | -                 |
|                     |    | 30 Brix | -                 |                   |
|                     |    | 40 Brix | -                 | -                 |
| <b>Genistein</b>    | 상압 | 20 Brix | 9.45 $\pm$ 1.80   | 21.81 $\pm$ 14.30 |
|                     |    | 30 Brix | 12.87 $\pm$ 0.00  |                   |
|                     |    | 40 Brix | 10.30 $\pm$ 0.20  | 14.97 $\pm$ 1.51  |
|                     | 가압 | 20 Brix | 24.51 $\pm$ 1.30  | 20.93 $\pm$ 4.71  |
|                     |    | 30 Brix | 22.47 $\pm$ 0.07  |                   |
|                     |    | 40 Brix | 8.01 $\pm$ 0.97   | 27.45 $\pm$ 0.02  |

(다) 최종 황칠추출분말의 lab-scale 제조공정 표준화

- 제조공정의 표준화는 각 제조단계(원물, 추출액 (농축액), 분말)에서 지표성분의 함량 변화를 측정하는 것이며, 지표성분은 각 제조공정별 함량 변화가 적어야 함. 또한, 제조공정 표준화를

통해 설정한 함량 범위는 향후 실제 생산에 있어서 지켜져야 함. 황칠추출분말 제조공정 표준화에 있어서 분석법은 앞서 2차년도에서 정립된 Rutin 정량법을 사용하였으며, lab-scale에서의 간이적으로 제조공정별 지표성분/유효성분 함량 및 수율을 측정하였음. Rutin의 함량은 원재료 1 kg당 추출액(농축액) 12.07 mg/g 그리고 건조물 13.24 mg/g으로 각 제조공정별 약 10% 이내의 함량 차이를 보였음 (표 20). 따라서 제조공정별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

표 20. Lab-scale에서의 황칠추출분말 수율 및 Rutin 함량

| 공정 번호 | 공정        | 원료, 공정, 용매 등   | 수 율   | Rutin 함량   | 비고<br>(유효성분함량)   |
|-------|-----------|--|-------|------------|--|
| 1     | 원료<br>칭량  | 황칠 원물 (앞:줄기 = 7:3)   | 1 kg  |            |  |
| 2     | 상압<br>추출1 | 추출용매: 물 ,<br>온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간   | 10 kg |            |  |
| 3     | 상압<br>추출2 | 공정 2의 추출물 분리 후<br>원물 재 추출<br>추출용매: 물 ,<br>온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간                            | 8 kg  |            |  |
| 4     | 여과        | 공정 2+3의 추출액<br>체망: 200 Mesh  | 18 kg |            |  |
| 5     | 진공<br>농축  | 공정 4의 여과액<br>온도: 60~70 °C,<br>농축 액 조건 : 고형분함량 30 brix이상  | 750 g | 12.07 mg/g | Genistin: 83.88 µg/g<br>Daidzein: 5.99 µg/g<br>Ellagic acid: 20.94 µg/g<br>Genistein: 18.70 µg/g |
| 6     | 살균        | 공정 5의 농축액,<br>온도: 90 °C<br>시간: 10분   | 750 g |            |  |
| 7     | 분말화       | 공정 6의 살균액,<br>Inlet temp.(°C): 175~180 °C<br>Outlet temp.(°C): 80°C<br>Disk atomizer: 9,500rpm | 150 g | 13.24 mg/g | Genistin: 86.02 µg/g<br>Daidzein: 4.84 µg/g<br>Ellagic acid: 4.36 µg/g<br>Genistein: 5.03 µg/g   |

(3) Pilot-scale에서 황칠추출분말 제조 및 제조공정 표준화

- Pilot-scale에서의 황칠추출분말 제조는 실험실내에서 가능한 최대의 양으로 추출물을 제조하는 것으로 실제 제조공정에서 일어날 수 있는 지표성분의 함량변화를 예측하고자 하는 작업임. 그에 따라 기초 연구 시 사용되었던 황칠 원재료의 양의 100배가 되도록 scale-up하여 추출분말을 제조하였으며, 그에 따른 지표성분 함량 및 수율을 측정하였음.

(가) Pilot-scale에서의 황칠추출분말 제조

- Pilot-scale의 추출을 위해 기초연구 시 사용되었던 황칠원재료 약 1 kg의 100배가 되도록

100 kg을 사용하였으며, 황칠원재료는 상기 다산황칠농원(주)으로부터 확보하였음. 원재료 100 kg에 정제수 1,000 kg을 투입한 후 배합탱크에서 95~100 °C 조건에서 6시간 1차 추출 하였으며, 1차 추출액을 분리한 후 원물 양 대비 8배에 해당하는 800 kg의 정제수를 다시 투입하여 95~100 °C 조건에서 6시간 동안 2차 추출하였음. 고형분은 200 Mesh 여과체로 걸러내고 추출액만을 취하여 회전 진공 농축기로 농축한 후, 90 °C 조건에서 10분간 살균하였음. 마지막으로, 살균액을 분무건조기에서 완전히 건조하여 분말화 하였으며, 원재료 대비 분말 수율은 약 14.5% 였음.

표 21. 황칠추출분말의 Pilot-scale 추출에 따른 변화

|         | 황칠추출분말     |                |
|---------|------------|----------------|
|         | 소량 추출      | Pilot-scale 추출 |
| 원재료     | 1 kg       | 100 kg         |
| 용매(정제수) | 180 kg     | 1,800 kg       |
| 수율      | 15%        | 14.7%          |
| 지표성분 함량 | 13.24 mg/g | 16.31 mg/g     |

(나) 황칠추출분말 제조공정 연구 및 표준화

- 개별인정형 기능성 원료에 대한 품질관리 기준을 확립하기 위하여 지표성분을 이용한 표준화 방법을 이용하는데, 이는 각 제조공정별 지표성분함량의 변화를 확인하는 것으로 제조공정별 지표성분 함량의 변화가 적어야 함. 따라서 실제 제조공정에서의 지표성분 함량 변화를 최소화 하기 위하여 Pilot-scale을 통한 제조공정별 지표성분함량의 변화를 통해서 실제 제조공정의 지표성분 함량변화를 예측하였음.
- Pilot-scale에서의 제조공정별 지표성분 함량 및 수율을 측정한 결과는 표 22로 Rutin 함량이 원물 100 kg 당 추출물(농축액) 16.3 6 mg/g, 건조물(분말) 16.31 mg/g으로 각 제조공정간 약 1%내외의 함량차이를 보임. 따라서 제조공정별 함량 변화가 적음을 알 수 있음.

표 22. Pilot-scale에서의 황칠추출분말 수율 및 Rutin 함량

| 공정 번호 | 공정     | 원료, 공정, 용매 등                           | 수 율      | Rutin 함량 | 유효성분함량 |
|-------|--------|--|----------|----------|--------|
| 1     | 원료 칭량  | 황칠 원물 (잎:줄기 = 7:3)                     | 100 kg   | /        | /      |
| 2     | 상압 추출1 | 추출용매: 물 ,<br>온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간 | 1,000 kg |          |        |
| 3     | 상압 추출2 | 공정 2의 추출물 분리 후<br>원물 재 추출<br>추출용매: 물 , | 800 kg   |          |        |

|   |          |  |         |            |   |
|---|----------|--|---------|------------|---|
|   |          | 온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간  |         |            |   |
| 4 | 여과       | 공정 2+3의 추출액<br>체망: 200 Mesh  | -       |            |   |
| 5 | 진공<br>농축 | 공정 4의 여과액<br>온도: 60~70 °C,<br>농축 액 조건 : 고품분함량 30 brix이상  | 70 kg   | 16.36 mg/g | Genistin: 336.02 µg/g<br>Daidzein: 2.81 µg/g<br>Ellagic acid: 23.67 µg/g<br>Genistein: 22.86 µg/g |
| 6 | 살균       | 공정 5의 농축액,<br>온도: 90 °C<br>시간: 10분   | 70 kg   |            |   |
| 7 | 분말화      | 공정 6의 살균액,<br>Inlet temp.(°C): 175~180 °C<br>Outlet temp.(°C): 80°C<br>Disk atomizer: 9,500rpm | 14.7 kg | 16.31 mg/g | Genistin: 356.57 µg/g<br>Daidzein: 3.45 µg/g<br>Ellagic acid: 48.70 µg/g<br>Genistein: 10.61 µg/g |

(4) 실제 제조공정에서 황칠추출분말 제조 및 제조공정 표준화

- 실제 제조공정에서 얻어진 추출분말의 제조공정 단계별(원재료, 추출액(농축액), 건조물(분말)) 수율 및 지표성분함량 비교를 통해 향후 품질관리 기준에 필요한 함량범위가 확립되어야 하며, 제조 각 단계에서의 추출용매, 추출공정, 추출용매의 비율, 건조과정과 같은 중요한 공정변수들이 적절하게 관리되어야함. 따라서 황칠추출분말의 실제 공정에서의 제조공정 표준화 과정을 통해 제조수율 및 지표성분의 함량을 얻음.

(가) 실제 제조공정에서의 황칠추출분말 제조

- 실제 제조공정에서 얻어진 추출분말과 Lab-scale/Pilot-scale 추출분말간의 제조공정 수율 및 지표성분 함량을 비교한 결과로 보였을 때, 황칠추출분말은 실제공정에서 낮은 수율을 나타내었음. 공인분석기관인 한국기능성식품연구원에 의뢰하여 Lab-scale/Pilot-scale/실제제조공정으로 생산한 황칠추출분말 내 Rutin 함량을 동시적으로 분석하였으며, 그 결과 지표성분의 함량은 Lab-scale에서의 추출분말에는 12.08 mg/g, Pilot-scale에서는 10.59 mg/g 그리고 실제공정의 추출분말에서는 10.89 mg/g으로 검출되었음. 나머지 유효성분들의 경우에는 극소량으로 검출되므로, 지표성분으로써 사용할 수 없으므로, 제외하였음.

표 23. 실제 제조공정 및 Lab-scale과 Pilot-scale 추출분말의 수율 및 지표성분함량 비교

|         | 황칠추출분말     |                |            |
|---------|------------|----------------|------------|
|         | 소량 추출      | Pilot-scale 추출 | 실제제조공정     |
| 원재료     | 1 kg       | 100 kg         | 350 kg     |
| 용매(정제수) | 180 kg     | 1,800 kg       | 6,300 kg   |
| 수율      | 15%        | 14.7%          | 14 %       |
| 지표성분 함량 | 12.08 mg/g | 10.59 mg/g     | 10.89 mg/g |

(나) 황칠추출분말의 실제 제조공정 표준화

- 실제 제조공정에서 얻어진 황칠추출분말의 제조공정 단계별 수율 및 지표성분 함량을 비교하여 표 24에 나타내었음. 원물은 일반 분쇄기를 이용하여 분쇄 후 전처리 하였으며, 추출액(농축액)과 고형분은 각각 1 g씩 취하여 시험방법 전처리를 취하였음. 결과적으로 Rutin의 함량은 원재료 g 당 1.35 mg, 추출물(농축물) 11.63 mg/g, 건조물(분말) 13.33 mg/g이었으며, 각 추출액과 분말 제조공정 간의 차이가 약 15% 내외의 함량차이를 보이며, 이는 분석 시 추출액에서 응집현상이 생겨 지표성분이 충분히 추출 되지 않아 차이가 날 수는 있다고 사료되며, 원물에서의 지표성분의 함량이 작았으나 원물 내의 지표성분을 최종 분말제형 내 추출하여 증가할 수 있도록 추출 제조공정을 표준화하였으며 추출용매가 유기용매가 아닌 물에서 rutin 지표성분의 추출이 더 증가함을 확인 할 수 있었음.

표 24. 실제생산에서의 황칠추출분말 수율 및 Rutin 함량

| 공정 번호 | 공정        | 원료, 공정, 용매 등   | 수 율      | Rutin 함량  |
|-------|-----------|--|----------|-----------|
| 1     | 원료<br>칭량  | 황칠 원물 (잎:줄기 = 7:3)   | 350 kg   | 1.35 mg/g |
| 2     | 상압<br>추출1 | 추출용매: 물 ,<br>온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간   | 3,500 kg | /         |
| 3     | 상압<br>추출2 | 공정 2의 추출물 분리 후<br>원물 재 추출<br>추출용매: 물 ,<br>온도: 95~100 °C,<br>시간: 6시간                            | 2,800 kg |           |
| 4     | 여과        | 공정 2+3의 추출액<br>체망: 200 Mesh  | -        |           |
| 5     | 진공<br>농축  | 공정 4의 여과액<br>온도: 60~70 °C,<br>농축 액 조건 : 고형분함량 30 brix이상  | 255.5 kg |           |
| 6     | 살균        | 공정 5의 농축액,<br>온도: 90 °C<br>시간: 10분   | 70 kg    | /         |
| 7     | 분말화       | 공정 6의 살균액,<br>Inlet temp.(°C): 175~180 °C<br>Outlet temp.(°C): 80°C<br>Disk atomizer: 9,500rpm | 14.7 kg  |           |

(5) 실제 제조공정에서 황칠추출분말 내 지표성분 분석법 확립 및 성적서 규격설정

- 기능성원료 인정 신청을 위한 제출자료 가이드라인에 따라, 황칠추출분말의 특성/지표성분 규격 및 시험방법에 관한 자료를 제출해야 하므로, 국내 공인인증시험기관 및 제조처와 협업하여

기능성원료 인정 신청 자료를 준비하였음.

(가) Rutin 지표성분 분석에 대한 시험방법벨리데이션

- 2018년 12월에 제정된 『기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드』에 제시된 각 시험 항목 규정에 따라 시험방법 벨리데이션을 진행하였음. 알파비앤에이치(주)의 자회사인 SD BIOTECH에서 시험방법벨리데이션을 진행하였으며, 예비 시험 시 기존 지표성분 정량분석방법은 샘플의 농도가 높아 검량선을 작성하였을 경우 100%이상의 범위에서 샘플 내 유효성분의 피크가 높아 직선성 범위 안에 들지 않은 문제로, 샘플(검액)의 농도를 변경하였음.

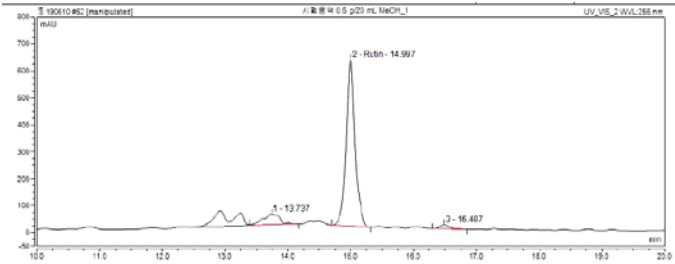
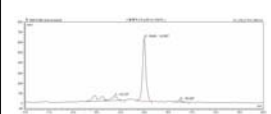
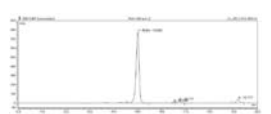
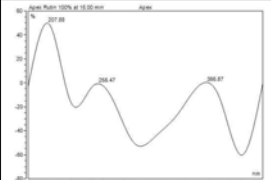
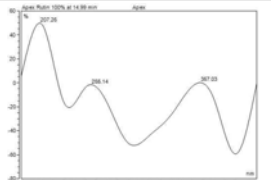
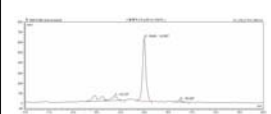
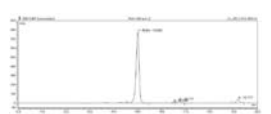
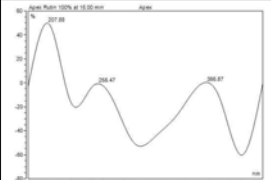
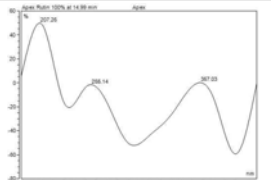
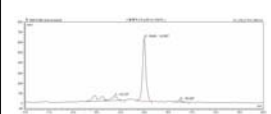
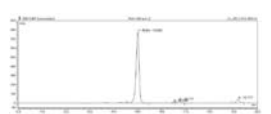
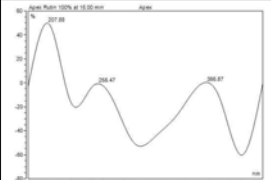
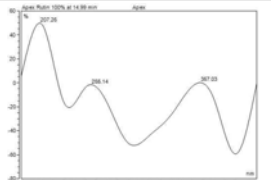
표 25. Rutin 분석방법 변경 전 후 비교

| 변경 전  | 변경 후  |
|---|---|
| <b>검액 조제</b><br>- 황칠추출분말 1 g 을 취하여 20 mL의 용량플라스크에 옮겨 담은 후, 메탄올을 약 5 mL정도 분주한 뒤 벽면에 묻지 않도록 흔들어 준다. 10 mL의 메탄올을 더 가한 후 1시간 동안 35 °C에서 초음파 추출한다. 상온에 식힌 뒤 메탄올로 표선 한 후 1,000 rpm으로 1시간동안 교반 해준다. 교반 뒤 샘플을 10 mL 원심분리 용 튜브에 옮겨담고 3,000 rpm, 25°C에서 10분동안 원심분리 한다. 원심분리 후 상등액을 검액으로 한다. | <b>검액 조제</b><br>- 황칠추출분말 0.5 g 을 취하여 20 mL의 용량플라스크에 옮겨 담은 후, 메탄올을 약 5 mL정도 분주한 뒤 벽면에 묻지 않도록 흔들어 준다. 10 mL의 메탄올을 더 가한 후 1시간 동안 35 °C에서 초음파 추출한다. 상온에 식힌 뒤 메탄올로 표선 한 후 1,000 rpm으로 1시간동안 교반 해준다. 교반 뒤 샘플을 10 mL 원심분리 용 튜브에 옮겨담고 3,000 rpm, 25°C에서 10분동안 원심분리 한다. 원심분리 후 상등액을 검액으로 한다. |

- 검액의 농도를 1/2 희석해야 직선성 범위 안으로 들기 때문에, 용량플라스크를 40 mL 혹은 검액 조제 시 희석하는 전처리 과정을 추가해야하나 정량기구인 용량플라스크는 40 mL의 용량으로 존재하지 않으며, 전처리 과정을 추가 시 희석하는 과정에서 오차가 생길 수 있으므로 샘플의 채취량을 반으로 줄이기로 하였음.

① 특이성(Specificity)

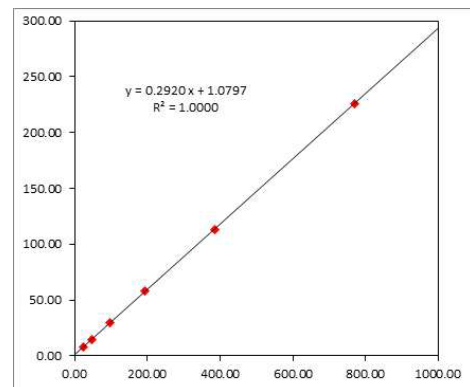
|            |  |
|------------|--|
| 특이성<br>검증법 | 1) 분리도: 표준용액과 시험용액의 크로마토그램 등을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인함<br>2) 머무름시간 & 스펙트럼 패턴: 표준용액과 시험용액에서 해당 성분에 대한 머무름시간 및 스펙트럼의 패턴이 일치함을 확인함 |
| 결과         | 1) 분리도<br>분리도 공식 : $1.18 \cdot (RT_b - RT_a) / (Width_a + Width_b)$<br>적 합 기 준 : > 1.5 간섭이 없다<br>< 시험 용액 크로마토그램 >              |

|                  |   |   |          |  |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
|------------------|---|---|----------|--|--|--------|------|---------|---------|------------|---|--------|-------|--|--------|--------|------------|---|---------|--------|--|--|--|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                  |   | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak No.</th> <th>RT평균</th> <th>Width(50%)<br/>평균</th> <th colspan="2">분리도</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Unknown</td> <td>13.7350</td> <td>0.3040</td> <td rowspan="2">3.3591</td> <td>←간섭 없음</td> </tr> <tr> <td>Rutin</td> <td>14.9980</td> <td>0.1397</td> <td rowspan="2">간섭 없음→</td> <td>5.8444</td> </tr> <tr> <td>Unknown</td> <td>16.4880</td> <td>0.1612</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>   | Peak No. | RT평균   | Width(50%)<br>평균   | 분리도    |      | Unknown | 13.7350 | 0.3040     | 3.3591  | ←간섭 없음 | Rutin | 14.9980  | 0.1397 | 간섭 없음→ | 5.8444     | Unknown   | 16.4880 | 0.1612 |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| Peak No.         | RT평균  | Width(50%)<br>평균  | 분리도      |  |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| Unknown          | 13.7350   | 0.3040  | 3.3591   | ←간섭 없음   |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| Rutin            | 14.9980   | 0.1397  |          | 간섭 없음→   | 5.8444   |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| Unknown          | 16.4880   | 0.1612  |          |  |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| 2) 머무름시간 &스펙트럼패턴 |   | <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="3">시험용액</th> <th colspan="3">표준용액</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>크로<br/>마토그램</td> <td colspan="3"> <br/> RT : 14.997 min </td> <td colspan="3"> <br/> RT : 14.993 min </td> </tr> <tr> <td>UV<br/>스펙트럼</td> <td colspan="3">  </td> <td colspan="3">  </td> </tr> <tr> <td>최대반응<br/>UV nm</td> <td>207.88</td> <td>255.47</td> <td>356.87</td> <td>207.26</td> <td>255.14</td> <td>357.03</td> </tr> </tbody> </table> |          | 시험용액   |  |        | 표준용액 |         |         | 크로<br>마토그램 | <br>RT : 14.997 min |        |       | <br>RT : 14.993 min |        |        | UV<br>스펙트럼 |  |         |        |  |  |  | 최대반응<br>UV nm | 207.88 | 255.47 | 356.87 | 207.26 | 255.14 | 357.03 |
|                  |   | 시험용액  |          |  | 표준용액   |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
|                  | 크로<br>마토그램  | <br>RT : 14.997 min   |          |  | <br>RT : 14.993 min |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| UV<br>스펙트럼       |                      |   |          |  |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| 최대반응<br>UV nm    | 207.88  | 255.47  | 356.87   | 207.26   | 255.14   | 357.03 |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |
| 최종결론             | 결과 표준용액과 황칠추출분말 시험용액의 크로마토그램을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인 하였으며, 각 해당 성분에 대한 피크 머무름시간 및 스펙트럼의 패턴이 일치함을 확인하였음. |   |          |  |  |        |      |         |         |            |   |        |       |  |        |        |            |   |         |        |  |  |  |               |        |        |        |        |        |        |

### ② 직선성(Linearity)

- 표준용액의 농도를 5개 이상으로 하여, 측정하고자 하는 함량 범위에 분포하도록 하였으며 3회 이상 반복 측정하여 결정계수( $r^2$ )가 0.990 이상 조건에 적합함을 확인하였음.

| 표준액 농도<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 순도보정농도<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 면적 값 ( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ) |        |        |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------|--------|
|                                |                                | 1 반복                                 | 2 반복   | 3 반복   |
| 25                             | 24.025                         | 7.68                                 | 7.50   | 7.67   |
| 50                             | 48.05                          | 14.95                                | 14.72  | 15.34  |
| 100                            | 96.1                           | 29.41                                | 28.78  | 30.27  |
| 200                            | 192.2                          | 57.92                                | 56.87  | 58.91  |
| 400                            | 384.4                          | 113.94                               | 112.03 | 112.40 |
| 800                            | 768.8                          | 225.35                               | 221.80 | 229.74 |
| Slope                          |                                | 0.2920                               | 0.2875 | 0.2964 |
| Intercept                      |                                | 1.2079                               | 1.0903 | 0.9409 |
| RSQ                            |                                | 1.0000                               | 1.000  | 0.9998 |



### ③ 정확도(Accuracy)



|                |  |                           |                |                   |
|----------------|--|---------------------------|----------------|-------------------|
| 정확도<br>검증법     | <p>(1) 회수율(%) = <math>C_f / C_u \times 100</math><br/> <math>C_f</math> : 분석한 분석대상물질의 함량 (시료+첨가해서 분석된 양)<br/> <math>C_u</math> : 첨가한 분석대상물질의 함량 (첨가한 양)</p> <p>(2) 첨가할 분석대상물질의 양<br/>         - 분석된 시험물질의 지표물질 평균 함량 값을 확인하여 시료에 첨가할 지표물질의 양 (100%) 결정 후, 결정된 지표물질의 양 기준 50%, 100%, 150% 시료 내 첨가함</p> <p>① 황칠목추출분말 시료의 rutin 함량 값 평균 = 13.51 mg/g<br/>         ② 결정한 첨가할 rutin의 양(100%) = 시료 1 g 당 13.5 mg</p> |                           |                |                   |
|                | 결과   | Spiking 함량 (mg/g)별 회수율(%) |                |                   |
|                |  | 6.75 mg/g (50%)           | 13.5 mg (100%) | 20.25 mg/g (150%) |
| 1              |  | 94.87                     | 93.46          | 94.94             |
| 2              |  | 95.51                     | 95.94          | 94.39             |
| 3              |  | 94.72                     | 95.58          | 96.87             |
| 4              |  | 95.32                     | 93.98          | 95.03             |
| 5              |  | 95.64                     | 95.30          | 94.84             |
| 6              |  | 94.70                     | 95.31          | 96.79             |
| 함량별 평균 회수율 (%) |  | 95.13                     | 94.93          | 95.48             |
| 전체 평균 회수율      |  | 95.18                     |                |                   |
| 회수율 구간         |  | 94.93 ~ 95.48             |                | 적 합               |
| 회수율 기준         | 92 ~ 105   |                           | ≥ 1%(1g/100g)  |                   |
| 최종결론           | <p>정확성은 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 확인하는 것이며, 3개 다른 농도(6.75mg/mL, 13.5mg/mL 그리고 20.25mg/mL)에서 6회 반복하여 측정하였음. 각 해당 분석 농도에서 평균 회수율 92.0~105.0% 이내이므로, 회수율 기준 구간 안에 존재하므로 적합함.</p>  |                           |                |                   |

④ 정밀도(Precision)

|    |               |             |       |               |
|----|---------------|-------------|-------|---------------|
| 결과 | 반복성           | 검체량         |       |               |
|    |               | 0.25 g      | 0.5 g | 0.75 g        |
|    | 1             | 13.86       | 13.76 | 12.66         |
|    | 2             | 13.86       | 13.29 | 13.21         |
|    | 3             | 13.78       | 13.47 | 13.13         |
|    | 4             | 13.87       | 13.65 | 12.75         |
|    | 5             | 13.82       | 13.36 | 13.14         |
|    | 6             | 13.78       | 13.55 | 13.10         |
|    | 분석값 평균 (mg/g) | 13.83       | 13.51 | 13.00         |
|    | RSD (%)       | 0.29        | 1.30  | 1.79          |
|    | RSD 구간 (%)    | 0.29 ~ 1.79 |       | 적합            |
|    | RSD 기준 (%)    | ≤ 2         |       | ≥ 1% (1g/100) |
|    | 재현성 (시험일간)    | 시험일 구분      |       |               |

|                       | 1일차           | 2일차      | 3일차           |
|-----------------------|---------------|----------|---------------|
| 1                     | 12.98         | 13.49    | 13.27         |
| 2                     | 13.43         | 13.32    | 13.86         |
| 3                     | 13.46         | 12.93    | 13.71         |
| 4                     | 13.01         | 13.46    | 13.30         |
| 5                     | 13.46         | 13.32    | 13.52         |
| 6                     | 13.50         | 12.93    | 13.51         |
| 분석값 평균 (mg/g)         | 13.31         | 13.24    | 13.53         |
| RSD (%)               | 1.83          | 1.91     | 1.68          |
| RSD 구간 (%)            | 1.68 ~ 1.91   |          | 적합            |
| RSD 기준 (%)            | ≤ 4           |          | ≥ 1% (1g/100) |
| <b>재현성<br/>(시험자간)</b> | <b>시험자 구분</b> |          |               |
|                       | <b>A</b>      | <b>B</b> | <b>C</b>      |
| 1                     | 13.09         | 13.04    | 13.38         |
| 2                     | 13.09         | 12.95    | 12.95         |
| 3                     | 13.06         | 13.07    | 13.05         |
| 4                     | 13.24         | 13.14    | 13.29         |
| 5                     | 13.06         | 12.98    | 12.97         |
| 6                     | 13.21         | 13.12    | 13.05         |
| 분석값 평균 (mg/g)         | 13.13         | 13.05    | 13.11         |
| RSD (%)               | 0.60          | 0.59     | 1.37          |
| RSD 구간 (%)            | 0.59 ~ 1.37   |          | 적합            |
| RSD 기준 (%)            | ≤ 4           |          | ≥ 1% (1g/100) |

⑤ 정량한계(Quantitation Limit)/검출한계(Detection Limit)

|                    |   |        |        |        |        |        |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| 검출/<br>정량한계<br>검증법 | - 3 반복 분석한 검량선의 기울기 평균값(S)과 y 절편의 표준편차(σ)를 구하고,<br>이를 계산식에 대입하여 검출한계 및 정량한계를 계산함<br>(1) 검출한계 = $3 \times \sigma / S$<br>(2) 정량한계 = $10 \times \sigma / S$ |        |        |        |        |        |
|                    | 1 반복  |        | 2 반복   |        | 3 반복   |        |
| 결과                 | ppm   | 피크면적   | ppm    | 피크면적   | ppm    | 피크면적   |
|                    | 24.025  | 7.68   | 24.025 | 7.50   | 24.025 | 7.67   |
|                    | 48.05   | 14.95  | 48.05  | 14.72  | 48.05  | 15.34  |
|                    | 96.1  | 29.41  | 96.1   | 28.78  | 96.1   | 30.27  |
|                    | 192.2   | 57.92  | 192.2  | 56.87  | 192.2  | 58.91  |
|                    | 384.4   | 113.94 | 384.4  | 112.03 | 384.4  | 112.40 |
|                    | 768.8   | 225.35 | 768.8  | 221.80 | 768.8  | 229.74 |
|                    | Slope   | 0.2920 | Slope  | 0.2875 | Slope  | 0.2964 |

|      |   |        |           |                      |           |        |
|------|---|--------|-----------|----------------------|-----------|--------|
|      | Intercept   | 1.2079 | Intercept | 1.0903               | Intercept | 0.9409 |
|      | RSQ   | 1.0000 | RSQ       | 1.0000               | RSQ       | 0.9998 |
|      | Slope average (S)   |        | 0.2920    | Intercept Stdev. (σ) |           | 0.1338 |
| 최종결론 | 검량선의 기울기 및 표준편차를 이용하여 측정하였음. 그 결과 정량한계 농도는 1.3752ppm이며, 검출한계의 농도는 4.5841ppm임. |        |           |                      |           |        |

(나) 황칠추출분말 내 지표성분의 함량

- 시험방법벨리데이션을 통하여 지표성분의 분석방법이 유효한지 증명하였으며, 3 Lot에 대한 황칠추출분말 함량을 분석한 결과, Rutin 함량은 평균 **13.33 mg/g**였으며 이에 따라 함량의 기준 80~120%을 적용하였을 때 **10.664 mg/g ~ 15.996 mg/g** 범위를 나타내며, 이를 지표성분 함량범위 설정 시 반영 할 수 있음.

(다) 원료의 유해물질 규격 설정

- 유해물질은 원재료 또는 제조과정 중 오염 또는 잔류의 가능성이 있어 인체에 유해한 물질로서 미생물, 중금속, 잔류농약 및 잔류용매를 말함.

표 26. 유해물질규격설정항목(제13조제7호가목 관련)

| 원료         | 항목   |         | 규격          | 비고       |
|------------|------|---------|-------------|----------|
| 모든 원료      | 중금속  | 납       | < 10.8µg/일  |          |
|            |      | 총비소     | < 150µg/일   |          |
|            |      | 카드뮴     | < 3.0µg/일   |          |
|            |      | 총수은     | < 2.1µg/일   |          |
|            | 미생물  | 대장균군    | 음성          |          |
|            |      | 세균수     | ≤ 100/g     | 액상제품에 한함 |
| 용매를 사용한 원료 | 잔류용매 | 헥산      | < 0.005g/kg |          |
|            |      | 이소프로필알콜 |             |          |
|            |      | 초산에틸    | ≤ 0.05g/kg  |          |
|            |      | 메틸알콜    |             |          |
|            |      | 아세톤     | ≤ 0.03g/kg  |          |

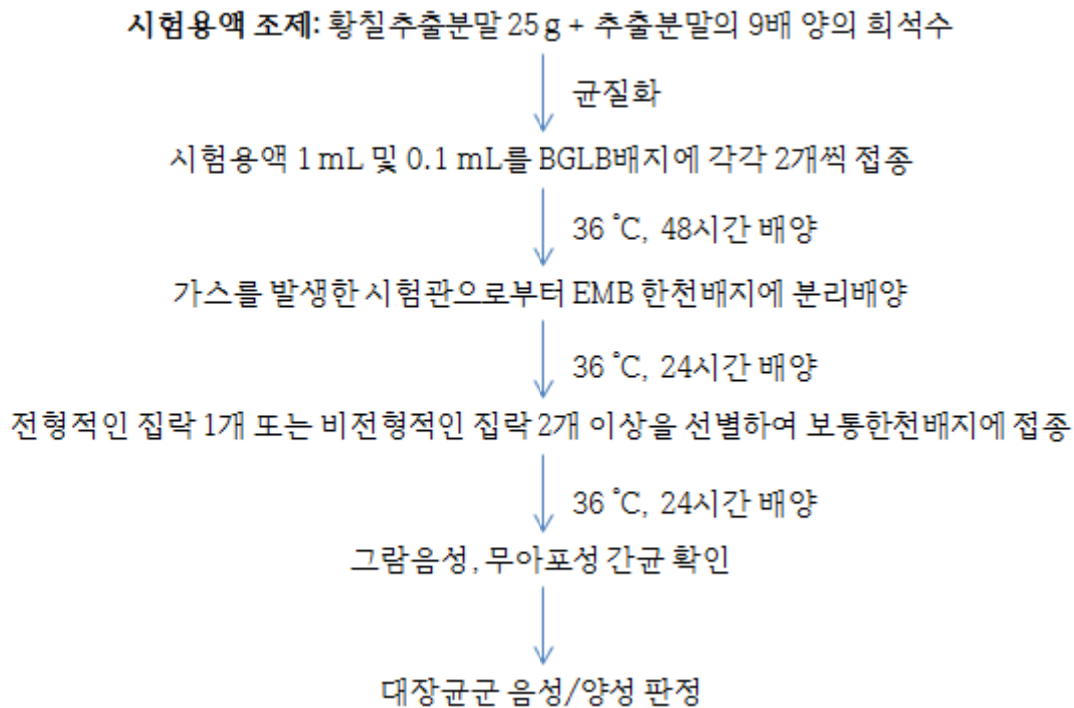
- 식품의약품안전처에서 고시된 유해물질규격 설정에 관한 내용을 조사하였을 때, 황칠추출분말은 열수추출물이므로 용매를 사용하지 않으므로, 잔류용매를 유해물질로서 분석할 필요가 없으므로, 중금속, 잔류농약과 미생물에 대한 항목만 유해물질 시험항목으로 설정하였음. 중금속 결과는 2차년도 아주대학교에서 측정 결과로 가름하고, 미생물에 대한 분석을 추가적으로 진행하였음.

① 미생물 분석결과

- 시험 검사방법은 하기의 방법으로 진행하였으며, 황칠추출분말은 고형분으로 미생물 시험 항

목 중 대장균군 만을 분석하여 시험 진행하였음. 총 3 lot를 시험 한 결과 대장균군은 모두 음성으로 판정되었음.

시험 • 검사방법



시험 • 검사 결과

| 시험항목 | 황칠추출분말 |       |       |
|------|--------|-------|-------|
|      | 1 Lot  | 2 Lot | 3 Lot |
| 대장균군 | 음성     | 음성    | 음성    |

(라) 황칠추출분말 내 영양성분 분석

① 성 상

시험 • 검사 방법

: 식품고유의 색깔, 풍미, 조직감 및 외관을 다음의 성상 채점기준에 따라 채점한 결과가 평균 3점 이상이고 1점 항목이 없어야 함.

시험 • 검사 결과

| 성 상 | 항 목 | 채 점 기 준   | 점 수 |
|-----|-----|---|-----|
|     | 색 깔 | 1. 색깔이 양호한 것은 5점<br>2. 색깔이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점<br>3. 색깔이 나쁜 것은 2점<br>4. 색깔이 현저히 나쁜 것은 1점 |     |

|     |  |      |
|-----|--|------|
| 풍미  | 1. 풍미가 양호한 것은 5점<br>2. 풍미가 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점<br>3. 풍미가 나쁜 것은 2점<br>4. 풍미가 현저히 나쁜 거나 이미, 이취가 있는 것은 1점  | 5    |
| 조직감 | 1. 조직감이 양호한 것은 5점<br>2. 조직감이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점<br>3. 조직감이 나쁜 것은 2점<br>4. 조직감이 현저히 나쁜 것은 1점  | 5    |
| 외관  | 1. 병충해를 입은 흔적 및 불가식부분 제거, 제품의 균질 및 성형상태와 포장상태 등 외형이 양호한 것은 5점으로 한다.<br>2. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 비교적 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다.<br>3. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 나쁜 것은 2점으로 한다.<br>4. 제품의 제조·가공상태 및 외형이 현저히 나쁜 것은 1점으로 한다. | 5    |
| 결과  | 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말   | 평균 5 |

## ② 열량·탄수화물

### 시험·검사 방법

: 식품의 에너지는 에트워터 계수를 사용하여 검체 100 g중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 Kcal단위로 산출하고 그 총계로 나타냄. 단위는 Kcal 또는 KJ로 하고 Kcal 단위에서 KJ 단위로의 환산은 다음 식에 따름. (1 Kcal=4.184 KJ)

### 시험·검사 결과

| 항 목  | 100 g 중 함량(g) | 열 량 (Kcal)    |
|------|---------------|---------------|
| 조단백질 | 5.35          | 21.40         |
| 조지방  | 0.39          | 3.51          |
| 수 분  | 3.46          | -             |
| 회 분  | 12.53         | -             |
| 탄수화물 | <b>78.27</b>  | 313.08        |
| 총열량  | -             | <b>337.99</b> |

: 탄수화물 함량은 78.27% 이며 총 열량은 337.99 Kca/100g 임.

## ③ 나트륨

### 시험·검사 방법

: 식품공전 일반시험법에서 2.2. 미량영성성분시험법 중 2.2.1. 무기질 분석법을 근거로하여 시험을 진행하였으며, ICP 질량 분석법을 통하여 황칠추출분말 내 존재하는 나트륨 양을 측정하였음.

시험·검사 결과

$$\text{나트륨 (mg/100g)} = \frac{\text{시험용액의 농도}(\mu\text{g/mL}) \times \text{최종부피}(\text{mL}) \times \text{희석배수} \times 100}{\text{시료채취량}(\text{g}) \times 1000} \times \text{규격}(\text{g})$$

시험용액의 농도= 6.6619  $\mu\text{g/mL}$

최 종 부 피= 50 mL

희 석 배 수= 10

시 료 채 취 량= 2.2017 g

규 격= 100 g

: 나트륨의 함량은 황칠추출분말 100 g 당 151.29 mg이 함유되어 있음.

나. 난소절제 랫드를 이용한 황칠추출분말의 여성갱년기 기능성 효능평가

(1) 재료 및 시험 방법

(가) 시험 재료

① 시험 물질

- 명 칭: 황칠추출분말
- 외 관 및 성 상: 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색 분말
- 순 도: 100 %

② 대조물질 1

- 명 칭: 석류추출물
- 외 관 및 성 상: 검붉은색 액체
- 순 도: 고형분으로서 65 Brix

③ 대조물질 2

- 명 칭:  $\beta$ -estradiol
- 외 관 및 성 상: 흰색의 분말
- 순 도: 98 % 이상

④ 부형제

- 명 칭: 멸균생리식염수

(나) 투여시험물질의 조제

- 시험물질은 순도에 대한 보정없이 사용하였으며, 시험물질은 전자저울로 칭량하여 용기에 넣고 부형제를 추가하여 설정농도로 조제하였음. 시험물질과 대조물질 1의 부형제는 멸균생리식염수를 사용하였고, 대조물질 2의 경우에는 멸균생리식염수에 용해되지 않아 1% 에탄올용액으로 조제하여 사용함. 시험물질 및 대조물질들 제조는 투여당일에 조제하였음.

(다) 시험계 및 사육환경

① 시험계

㉞ 동물정보

|        |   |      |     |                |
|--------|---|------|-----|----------------|
| 종 및 계통 | 특정 병원체 부재(SPF) 랫드, Sprague-Dawley   |      |     |                |
| 선정 사유  | 본 시험에 사용하는 Sprague-Dawley (SD) 랫드에 난소절제(Ovariectomy)를 시행한 랫드를 OVX랫드라고 하며, 여성 갱년기 시험에 주로 사용되고 있음. 이의 정상 대조군(Sham)은 SD 래스에 개복만 하고 난소절제를 하지 않았으며, Sham 랫드라고 함. |      |     |                |
|        | 성 별   |      | 수 컷 | 암 컷            |
| 동물 수   | 입수 시  | Sham | -   | 11 마리          |
|        |   | OVX  | -   | 66 마리          |
|        | 투여 개시 시   | Sham | -   | 10 마리          |
|        |   | OVX  | -   | 60 마리          |
| 주 령    | 수술 시  |      | -   | 6 주령           |
|        | 입수 시  |      | -   | 7 주령           |
|        | 투여 개시 시   |      | -   | 8 주령           |
| 체중범위   | 입수 시  | Sham | -   | 166.99~184.65g |
|        |   | OVX  | -   | 160.77~199.53g |
|        | 투여 개시 시   | Sham | -   | 182.94~208.02g |
|        |   | OVX  | -   | 190.84~228.09g |

㉟ 검역 및 순화

: 입수 시 동물 개체수를 확인하였고, 이상증상을 관찰하였음. 모든 동물은 동물실 환경에 적응하기 위해 3일 이상의 순환기가 두었으며, 순환기간 동안 모든 동물은 매일 1회 일반 증상을 관찰하였음. 동물 공급청에서 제공한 '시험계 검사성적서'를 검토한 결과 시험에 영향을 줄 만한 요인은 없었음.

㊱ 개체 및 사육상자 식별

: 개체식별은 유성매직을 이용하여 꼬리에 표시하였으며(검역 및 순화 시: 붉은색, 군 분리 후: 검정색), 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였음.

㊲ 실험동물윤리규정

: 본 시험은 “동물 보호법(제정 1991년 05월 31일 법률 제 4379호, 일부 개정 2015년 01월 20일 법률 제 13023 호)”에 따라 동물실험 윤리위원회에 의해 승인되었음 (승인번호: 18R019).

② 사육환경

㉞ 환경조건 및 측정

|         |  |
|---------|--|
| 동물실 번호  | 동물실5                                   |
| 사육상자 정보 | 철망사육상자(W 180x L 400x H 200mm)          |
| 사육 밀도   | 순화기간: 2마리이하                            |
|         | 관찰기간: 2마리이하                            |
| 온도      | 19 ~ 27 °C                             |
| 상대습도    | 38 ~ 62 %                              |
| 환기 횟수   | 20회이상/hr                               |
| 조명 주기   | 12 시간(오전8 시점등-오후8 시소등)                 |
| 조도      | 150-300 Lux                            |
| 사육 관리   | 사육상자및급이기는1 회이상/ 2 주, 급수병은1 회/1주이상교환한다. |
| 사육환경보고  | 실험기간중동물에게이상을                           |

㉔ 사료, 물 및 오염물질 검사

: 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고품사료 Charles River Rat and Mouse 18 % (5L79, LabDiet, USA)를 (주)오리엔트 바이오(경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)으로부터 공급받아 자유섭취 하도록 하였음. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었음(사용 Lot No.: JUL29173, SEP14172)

: 실험동물에 공급되는 물은 폴리카보네이트제 급수병(500 mL)에 넣고 자유섭취 하도록 하였음. (주)신성생명환경연구원(충남 아산시 배방읍 호서로 79번길 20 호서대학교 벤처창업융합관 208호)에 의해 정기적 검사(년1회)를 통해 “먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제684호 2016년 12월 30일 타법 개정)”에 적합한지 확인하였음.

(라) 시험군 구성, 투여량 설정, 군분리 및 투여

① 시험군 구성

| 군  | 투여물질                     | 투여용량<br>(mg/kg) | 투여액량<br>(mL/kg) | 동물수(동물번호)     |
|----|--------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| G1 | Sham대조군 <sup>a),b)</sup> | Vehicle         | -               | 10(2101~2110) |
| G2 | 음성대조군 <sup>a),c)</sup>   | Vehicle         | -               | 10(2201~2210) |
| G3 | 대조물질1 <sup>c)</sup>      | 석류추출물           | 770             | 10(2301~2310) |
| G4 | 대조물질2 <sup>c)</sup>      | β-Estradiol     | 0.5             | 10(2401~2410) |



|    |                        |        |      |    |               |
|----|------------------------|--------|------|----|---------------|
| G5 | 시험물질저용량군 <sup>c)</sup> | 황칠추출분말 | 200  | 10 | 10(2501~2510) |
| G6 | 시험물질중용량군 <sup>c)</sup> | 황칠추출분말 | 500  | 10 | 10(2601~2610) |
| G7 | 시험물질고용량군 <sup>c)</sup> | 황칠추출분말 | 1000 | 10 | 10(2701~2710) |

a) 부형제 투여군 (Vehicle은 멸균주사용수를 사용)

b) Sham 랫드(Shame군, 개복만 하고 난소절제 하지 않은 랫드)

c) OVX랫트(Ovariectomy군, 난소절제 시행한 랫드)

## ② 투여용량 설정

- 2차년도 숙명여자대학교의 안전성 시험항목인 자궁증식 시험평가를 통하여, 황칠추출물 1,000mg/kg (고형분으로서 약 330 mg/kg)의 농도에서 자궁증식이 증가 하지 않음을 확인. 최종 제형 형태인 황칠추출분말을 이용하여 고용량인 1,000 mg/kg까지 투여하여, 안전성 및 효능을 확인하고자 하였음. 또한 여성갱년기모델을 유도한 군(음성대조군)과 유도하지 않은군 (Sham대조군)에 대해서 부형제만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였음.

## ③ 군분리

- 순화기간 중 건강한 개체로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 평균체중에서 가까운 동물을 선택하여 '시험군 구성'표와 같이 무작위 분배하였음.

## ④ 시험물질 투여

|             |                                   |
|-------------|-----------------------------------|
| 투여경로 및 선택이유 | 경구투여, 임상예정경로를 적용                  |
| 투여횟수 및 기간   | 1 회/일, 단회투여                       |
| 투여액량 산출     | 투여일에 측정한 체중을 기준으로 10 mL/kg으로 산출   |
| 투여방법        | 경구투여용 존데를 장착한 주사기를 이용하여 위 내에직접 투여 |

## (마) 갱년기 기능성 효과의 측정방법

### ① 체중의 측정

: 주 1회 체중을 측정하였다.

### ② 혈중 바이오마커 측정

: 4주차 투여 후, 경정맥에서 채혈한 혈액 2mL과 8주차 투여 후 시험종료 시 Isoflurane으로 마취한 후, 복대동맥에서 채혈한 혈액 5mL로부터 분리한 혈청을 사용하여 Estradiol (Mybiosource, MBS843353), Pyridinoline (Mybiosource, MBS015115), CTX (collagen cross-linked C-telopeptide, Mybiosource, MBS703743), Osteoclastin (Mybiosource, MBS288743) 등 4종의 바이오마커를 각각의 ELISA 키트로 분석하고, Microplate Spectrophotometer (BioTek, Epoch)를 이용하여 측정하였음.

### ③ 간 조직 내 단백질 발현 측정

: 시험종료 시 Isoflurane으로 마취한 후, 간을 적출하여 Estrogen Receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ , abcam, ab75635), Estrogen Receptor- $\beta$ (ER- $\beta$ , Merck, 05-824), phosphorylated AKT(pAKT, Cell signaling, 4058), Protein Kinase B (AKT, Cell signaling, 9272), phosphorylated ERK (pERK, Cell signaling, 9101), Extracellular-regulated Kinase(ERK, Cell signaling, 4695),  $\beta$ -actin (Cell signaling, 4970) 등 7종의 단백질 발현정도를 Western blot 기법을 통해 이미지 분석기(Fujifilm corp, LAS4000 mini)를 사용하여 측정하였음.

#### ④ 혈청생화학 검사

: 시험종료 시 Isoflurane으로 마취한 후, 복대동맥에서 채혈한 혈액 5mL로부터 분리한 혈청을 사용하여 ALP (Alkaline phosphatase), Triglyceride, Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol을 혈액생화학 분석기(HITACHI 7180, HITACHI, Japan)로 측정하였음.

#### ⑤ 장기중량 측정

: 부검 전, isoflurane을 사용하여 마취하고 개복하여 육안적으로 장기를 검사하였고 자궁, 질 (질관 포함), 방광, 요도를 적출하여 중량을 측정하였음.

#### ⑥ 일반 증상 관찰

: 모든 동물에 대하여 시작일부터 종료일까지 일반 증상을 매일 1 회 관찰하였다.

### (바) 통계 분석

- 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures)의 경우에는 Levene test 로 등분산성을 검정한 후, one-way ANOVA test 로 유의성을 확인하였음. 사후검정 시 등분산인 경우 Scheffe multiple range test 를 이용하고, 이분산인 경우에는 Dunnett's T3-test 를 이용하여 대조군과의 유의성을 검정하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS(IBM® SPSS Statistics, ver. 24)를 이용하여 실시하며,  $P < 0.05$  인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였음.

### (2) 시험결과

#### (가) 체중변화 및 장기 중량

- 갱년기 여성은 혈중 여성호르몬 농도의 변화로 인한 체질량 수의 변화와 생식기의 위축을 겪는데(Korea Center for Disease Control and Prevention, 2013), 난소를 절제한 설치류에서도 체내 콜레스테롤의 에스트로겐 전환율이 감소하면서 혈중 콜레스테롤 상승과 지방조직 증가로 인해 체중이 증가한다고(Lee, 2006) 알려져 있음. 또한, 여성호르몬의 농도가 감소하며, 생식기 위축이 관찰 됨(Babaei, 2017; Zhu, 2013; Choi 등, 2011; Bonilla-Becerra 등, 2017).

- 난소절제 랫드에 황칠추출분말을 8주간 투여한 결과, 일반증상 관찰 시에 특이적 소견이 관찰되지 않아, 장기간 복용 시에도 부작용이 없는 안전한 물질로 확인 됨.

- 또한, 체중변화의 관찰 결과, 앞서 선행 연구들과 유사하게 난소절제대조군은 Sham대조군에 비해 체중이 유의한 차이를 보이며 증가하였으며, 에스트로겐으로서 베타 에스트라디올을 투여한 경우에는 투여 1주일 후부터 난소절제대조군에 비하여 유의적으로 낮은 체중증가율을 보였지만, 석류추출물 투여 시에는 난소절제대조군과 차이가 없는 것으로 나타났음.

- 한편, 황칠추출분말 투여 시에는 난소절제대조군보다 약간 더 낮은 체중증가율을 나타냈지만 유의적이지는 않았으나, 투여 후반으로 갈수록 증가폭이 줄어드는 것으로 보아 장기간 황칠추출분말을 투여한다면 체중증가율 폭을 조금 더 줄일 수 있을 것으로 기대 됨(그림 23).

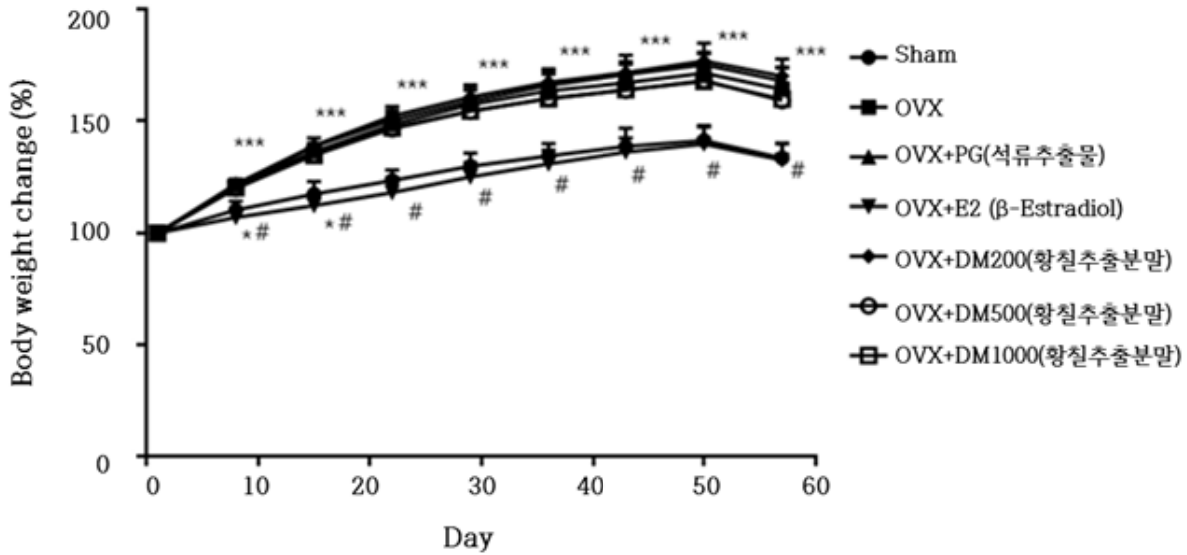


그림 23. 8주 동안 난소절제 랫드에서 체중변화율. 처음(Day 0)부터 매주 체중을 측정하여 비교하였음. # $p < 0.001$  vs Sham, \* $p < 0.05$  vs OVX, \*\* $p < 0.01$  vs OVX, \*\*\* $p < 0.001$  vs OVX. OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2:  $\beta$ -estradiol; DM: *Dendropanax morbiferus*.

- 자궁내막증식성 검토실험은 OECD에서 지정한 내분비교란물질의 에스트로겐성을 평가하는 실험으로, Sham대조군과 비교하여 에스트로겐 투여군을 제외한 난소절제를 시행한 모든 시험군에서 통계적으로 유의한 수준의 자궁, 질의 상대 무게 감소가 관찰되었음. 이는 난소를 절제하면 여성호르몬 부족에 의한 자궁 위축현상이 발생하여 자궁의 무게가 줄어드는 것인데, 호르몬 치료요법의 하나인  $\beta$ -Estradiol를 투여받은 군에서 자궁과 질무게 증가현상을 보이며 이는 자궁내막암까지 초래할 위험이 있음. 반면에 황칠추출분말은 비이상적인 자궁 및 질의 증식이 나타나지 않았으므로 갱년기 혹은 폐경기 여성에게 안전한 물질로서 복용가능 하다고 판단됨 (표.27)

표 27. 황칠추출분말 투여 후 난소절제 랫드에서의 체중대비 상대적 장기무게

| Organ  | Sham           | OVX                         |                |                                |                |                |                |
|--------|----------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|        |                | Control                     | PG             | E2                             | DM200          | DM500          | DM1000         |
| Uterus | 0.254 ± 0.0724 | 0.034 ± 0.0035 <sup>#</sup> | 0.033 ± 0.0055 | 0.184 ± 0.00392 <sup>***</sup> | 0.033 ± 0.0033 | 0.035 ± 0.0043 | 0.037 ± 0.0182 |
| Vagina | 0.076 ± 0.0104 | 0.037 ± 0.0079 <sup>#</sup> | 0.034 ± 0.0092 | 0.077 ± 0.0104 <sup>***</sup>  | 0.040 ± 0.0100 | 0.035 ± 0.0109 | 0.043 ± 0.0144 |



Data represent the mean ± SD

#*p*<0.01 vs sham, \**p*<0.05 vs OVX, \*\**p*<0.01 vs OVX, \*\*\**p*<0.001 vs OVX

(나) 황칠추출분말의 지질관련 지표 변화

- 갱년기 후기의 만성증상으로는 심혈관 질환과 비만이 대표적임. 본 연구에서는 황칠나추출분말이 심혈관 질환의 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있는지 그 가능성을 평가하기 위해 난소절제 모델에서 황칠추출분말을 투여한 후 대표적인 혈중 지질지표인 총 콜레스테롤과 중성지방, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤의 변화를 관찰하였음(Table 2).
- 황칠추출분말 투여군에 있어서, 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤의 혈중 수치 모두가 저용량(OVX+DM200)을 투여하였을 때와 비교하여 고용량(OVX+DM1000)을 투여한 군에서 용량 의존적으로 감소하였음. 고용량군 대비 저용량군의 총 콜레스테롤 수치는 117.61±18.11 mg/dL에서 104.76±9.62 mg/dL로 낮은 경향을 보였으며, 혈중 중성지방 수치는 45.67±13.07 mg/dL에서 39.23±13.74 mg/dL로, 고밀도콜레스테롤 수치는 28.18±3.52 mg/dL에서 25.67±2.19 mg/dL로, 저밀도콜레스테롤 수치는 8.22±1.20 mg/dL에서 7.28±1.39 mg/dL로 더 낮은 수치를 보였음.
- 이는 난소절제대조군 대비 유의한 감소는 아니지만, 황칠추출분말이 용량 의존적으로 지질지표들이 감소하는 경향을 보였음. 황칠추출분말 투여군에서 난소절제대조군 대비 유의한 감소를 나타내지 않은 이유에서, 황칠추출분말 일부 성분에 기인한 비의도적인 지질지표 상승 때문에 에스트로겐 효과를 가진 성분들의 지질 개선효과가 가려졌을 가능성을 배제할 수 없을 것으로 판단됨.

표 28. 황칠추출분말투여 후 난소절제 랫드에서 혈중지질 수치

| Lipid             | Sham          | OVX            |               |               |                |               |               |
|-------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
|                   |               | Control        | PG            | E2            | DM200          | DM500         | DM1000        |
| Total cholesterol | 75.25 ± 10.72 | 102.90 ± 15.87 | 101.14 ± 6.67 | 47.71 ± 16.97 | 117.61 ± 18.11 | 110.71 ± 9.02 | 104.76 ± 9.62 |
| Triglyceride      | 19.24 ± 6.08  | 40.26 ± 13.48  | 47.75 ± 13.92 | 33.65 ± 9.62  | 45.68 ± 13.07  | 40.99 ± 11.48 | 39.23 ± 13.74 |
| HDL-C             | 19.97 ± 2.09  | 25.44 ± 3.2    | 25.57 ± 1.87  | 14.11 ± 5.04  | 28.18 ± 3.52   | 26.93 ± 2.33  | 25.67 ± 2.19  |
| LDL-C             | 6.09 ± 1.50   | 6.91 ± 1.04    | 7.28 ± 2.01   | 3.42 ± 1.25   | 8.22 ± 1.20    | 8.03 ± 1.66   | 7.28 ± 1.39   |

Data represent the mean ± SD

#*p*<0.01 vs sham, \**p*<0.05 vs OVX, \*\**p*<0.01 vs OVX, \*\*\**p*<0.001 vs OVX

(다) 황칠추출분말의 골 관련 지표 변화

- 갱년기 후기에 발병율이 높은 또 하나의 질환은 골다공증이며, 폐경 전에 비해 폐경 후 골다공증의 유병율은 폐경의 진행에 따라 유의하게 증가한다는 연구결과가 있음 (Kim, 2017). 이는 혈중 에스트로겐 농도가 골밀도의 변화와 밀접한 연관이 있기 때문이며, 폐경기 여성에서 에스트로겐의 감소는 골다공증 유병률이 증가하는 주된 원인 임.
- 본 연구에서는 난소절제 랫드에서 황칠추출분말 투여시의 골 대사 관련 지표의 변화를 확인하고자 하였음. 정상적인 뼈는 재형성(bone remodeling)과정으로 인한 골 손실이 없지만, 폐경기 여성과 난소절제 랫드의 경우 에스트로겐 감소로 인해 뼈의 생성과 관련된 조골세포와 뼈의 재흡수와 관련된 파골세포 사이에 불균형이 일어나고, 불균형에 의한 골 교체율(bone turnover)이 증가하면서 골다공증을 유발하게 됨 (Park, 2007; Kim, 2008; Shin, 2016).
- 황칠추출분말 투여는 난소절제 랫드에서 CTX와 osteocalcin의 혈중 농도를 낮추는 것으로 나타났음(Figure 4). Sham대조군의 혈중 CTX농도 1832±214 pg/ml에 비해 난소절제대조군은 2206±155 pg/ml로 유의적인 차이로 상승하였으나, 황칠추출분말 투여군은 저용량 투여시 1796±189 pg/ml, 중용량 투여시 1686±145 pg/ml, 고용량 투여시 1557±133 pg/ml로 난소절제대조군에 비하여 용량 의존적으로 유의한 감소를 나타냈음.
- Osteocalcin은 골 조직에서 발견되는 골 재형성에 관여하는 단백질이기 하지만, 난소절제로 갱년기를 유도시킨 동물모델에서 골 교체율이 증가하여 파골세포의 작용이 증가하여 혈청 내 osteocalcin이 증가됨이 보고된 바 있음. 혈중 osteocalcin의 농도 또한 황칠추출분말 투여시에 용량 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, Sham 대조군과 난소절제군과에서 유의적인 차이를 보이지 않았음. 본 실험에서 사용한 랫드의 연령은 인간으로 하였을 때 10대~10대 후반의 연령대이며, osteocalcin은 청소년기와 같이 골 교체율이 증가된 시기에 높게 나타나기 때문에 Sham 대조군과 난소절제 대조군에서도 osteocalcin의 수치가 유의적인 차이가 나지 않았다고 사료 됨(Lee et al., 2005; Yoon et al., 2013).
- 즉, osteocalcin의 혈청 내 농도가 난소절제대조군과 비교하여 황칠추출분말 투여군에서 감소하는 경향을 보이고, 파골세포에 의해 콜라겐 분자의 말단부분이 분해되어 혈액 내로 방출되는 현상을 반영하는 골 흡수 지표인 CTX가 난소절제대조군과 비교하여 황칠추출분말에서 유의적인 감소를 나타내는 점으로 미루어 황칠추출분말이 갱년기 여성의 골다공증 예방 혹은 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 사료 됨(그림 24).

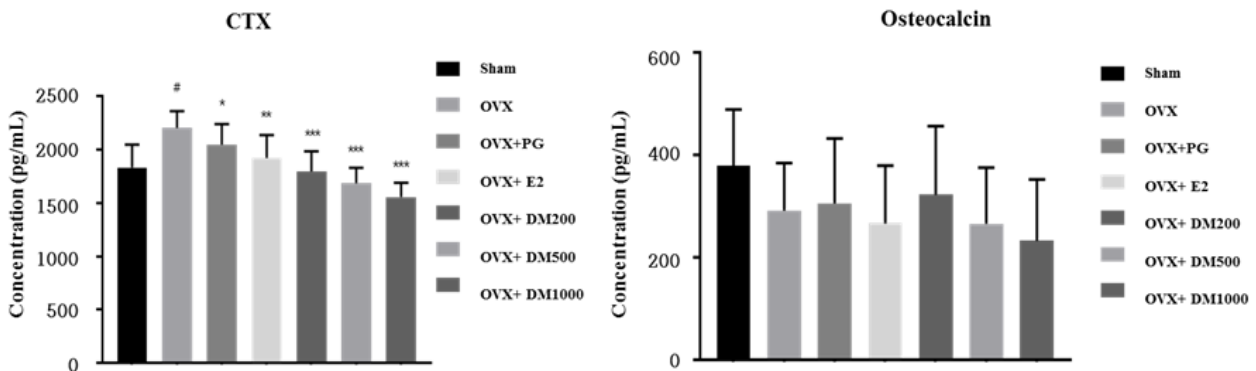


그림 24. 난소절제한 랫드 혈청에서의 골대사 관련 지표. ELISA assay is carried out after each material (PG, E2, DM) administration for 8 weeks. (A) Analyze amounts

of CTX sequences and (B) osteocalcin proteins in serum. Data represent the mean and error bars represent the SD. # $p < 0.001$  vs Sham, \* $p < 0.05$  vs OVX, \*\* $p < 0.01$  vs OVX, \*\*\* $p < 0.001$  vs OVX.

(라) 황칠추출분말의 에스트로겐 활성

- 간 조직에도 에스트로겐 수용체가 많이 분포되어 있는 것이 알려져 있고, 간조직은 많은 샘플량을 확보할 수 있다는 장점이 있으므로, 간조직 내의 에스트로겐 수용체의 발현과 ERK 단백질의 활성을 western blot을 통해 확인하였음. 여성호르몬에 의한 영향은 에스트로겐 수용체를 통해 각 조직으로 전달되며, 에스트로겐 수용체의 발현은 조직마다 차이가 있음(Mohamed과 Abdel-Rahman, 2000). 플라보노이드와 같이 에스트로겐과 유사한 구조를 가진 물질들의 에스트로겐 효과는 에스트로겐 수용체에 의한 것으로 추정되며, 이러한 에스트로겐 수용체에 의한 영향은 ER- $\alpha$ 를 통하여 활성화되는 MAPK/ERK 활성화경로의 신호전달에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있음(Bulayeva 등, 2004).
- 따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎/줄기 열수 추출물의 에스트로겐 수용체를 통한 생리활성을 확인하기 위해 ER- $\alpha$ 의 활성화와 MAPK/ERK 활성화경로에 관여하는 ERK 단백질의 활성을 확인하였으며, 그 결과 황칠추출분말을 투여한 실험군에서 ER- $\alpha$ 와 ERK단백질의 활성이 증가하는 경향을 보였음. ER- $\alpha$ 의 발현량은 난소절제대조군 대비 용량 의존적으로 증가하였는데, 에스트로겐 투여군이 1.3배 증가한데 비해 황칠나무추출분말 저용량 투여군은 1.1배, 중용량 투여군은 1.16배, 고용량 투여군은 1.28배 증가하였고, 특히, 고용량 투여군은 통계적으로 유의한 증가를 나타냈음. pERK의 발현량 또한 음성대조군에 비하여 황칠추출분말 투여 시에 증가하는 경향을 나타냈고, 고용량 투여군은 통계적으로 유의한 증가를 보였음(그림 25).
- 이와 같은 결과로 미루어, 황칠추출분말의 투여는 ER- $\alpha$ 의 단백질 발현을 증가시키고 MAPK/ERK 신호전달 경로를 활성화하는 것으로 보임. 황칠추출분말의 투여가 에스트로겐 수용체의 발현을 증가시키는 동시에 에스트로겐 수용체가 매개하는 세포내 신호전달경로를 활성화함으로써, 에스트로겐의 감소로 인한 현상들을 개선할 수 있을 것으로 평가됨.
- 에스트로겐은 지질대사 및 골대사와 밀접한 관련이 있고, 폐경 여성에서의 에스트로겐 고갈은 심혈관계 질환 및 골다공증 같은 만성 질환의 위험인자로 간주될 수 있음. 루틴을 비롯한 플라보노이드 성분은 구조적 유사성으로 인해 에스트로겐 효과를 나타낼 수 있을 것으로 추정됨. 실제로, 오일 각테일을 섭취시켜 고콜레스테롤혈증을 유발시킨 쥐에서 루틴의 투여가 지질지표들을 개선하였고(Ziaee 등, 2009), 당뇨병환자의 루틴 섭취가 지질지표들을 개선한다는 보고들이 있음(Sattanathan, 2010). 본 연구에서 난소절제 랫드에 황칠추출분말을 투여시에 골교체를 관련 지표인 CTX 및 오스테오칼신의 감소라든지, ER- $\alpha$  단백질 발현의 증가 및 ERK인산화의 증가와 같은 결과에, 황칠나무잎 추출물 성분분석시 주요 성분으로 확인된 루틴에 의한 에스트로겐 효과가 큰 영향을 미쳤을 가능성이 있음.

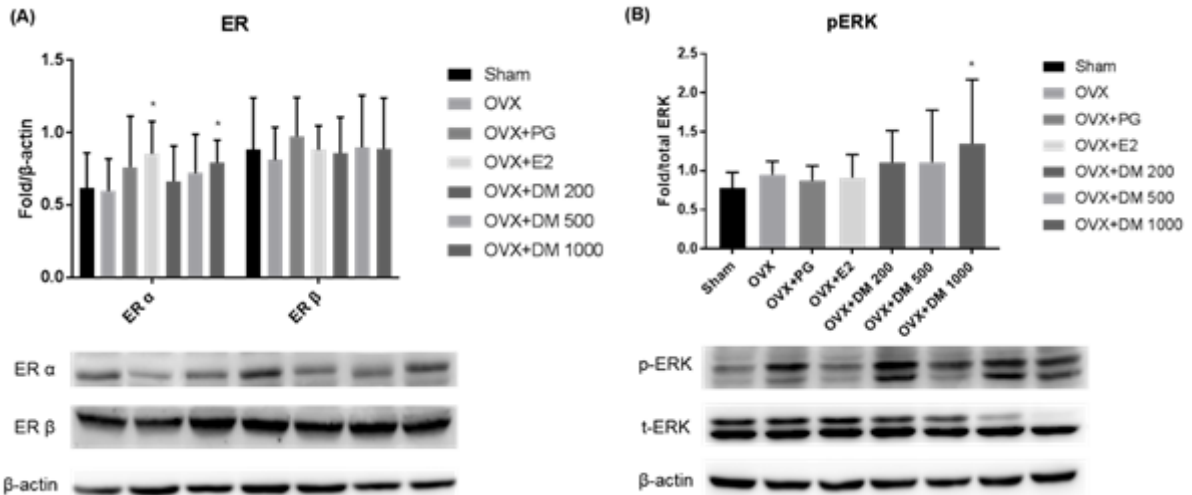


그림 25. 난소절제 랫드에서 황칠추출분말의 (A) ER- $\alpha$  와 ER- $\beta$  그리고 (B) pERK 활성 효과. Western blot is carried out after each material (PG, E2, DM) administration for 8 weeks. (A) Analyze amounts of estrogen receptor alpha and beta in liver tissue. (B) Analyze amounts of total ERK and phosphorylated ERK(p-ERK). Data represent the mean and error bars represent the SD. # $p < 0.001$  vs sham, \* $p < 0.05$  vs OVX.

(마) 난소절제 랫드에서의 황칠추출분말의 효능평가 결과

- 황칠추출분말은 여성호르몬인 에스트로겐과 구조적 유사성을 가진 루틴을 다량 함유하고 있음(황칠나무잎 추출 분말 1 g당 10~15 mg의 루틴 함유). 루틴은 식물성여성호르몬이라고 불리는 플라보노이드 성분의 일종으로, 에스트로겐 수용체를 통한 신호전달을 증가시킴. 특히 ER- $\alpha$ 로부터 세포내로 전달되는 MAPK/ERK 신호전달 경로를 활성화시킴으로써, 갱년기의 대표적인 만성증상들을 개선할 수 있는 가능성이 있음. 본 연구는 루틴이 다량 함유된 황칠추출분말을 폐경의 유도를 위해 난소를 절제한 랫드에 투여하여 여성갱년기 증상의 개선에 미치는 영향을 평가하였으며, 그 결과 골교체를 관련 지표로서 폐경기 여성에서 높다고 알려진 osteocalcin이 감소하는 경향성을 나타냈고, CTX는 유의적인 감소를 나타냈을 뿐만 아니라, 에스트로겐 수용체의 활성화를 증가시키는 경향성을 나타냈음. 이를 통해, 황칠나무잎 추출물은 골다공증의 예방 및 개선 효과를 나타내는 갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료로서의 가능성을 보여준다.

(바) 한국식품과학회 논문게재

- 한국식품과학회(Korea Society of Food Science and Technology)는 KCI 등재지로서, 식품과학의 전문적이고 학술적인 연구를 다루는 학회지 중에 하나임. 4월 중순에 상기연구내용으로 투고 완료하였으며, 8월에 게재 예정으로 승인되었음 (별첨 참조).

다. 인체적용시험약 제조

(1) 황칠추출분말 제조

- 임상약조제를 위하여 크로엔을 통하여 다산황칠농원(주)로부터 500 kg 원물구입하였으며, 표

준화 된 제조공정에 따라 알파비앤에이치(주)에서 위탁제조 하였으며(그림. 26), 최종 얻어진 황 철추출분말의 수율은 14% 였음.

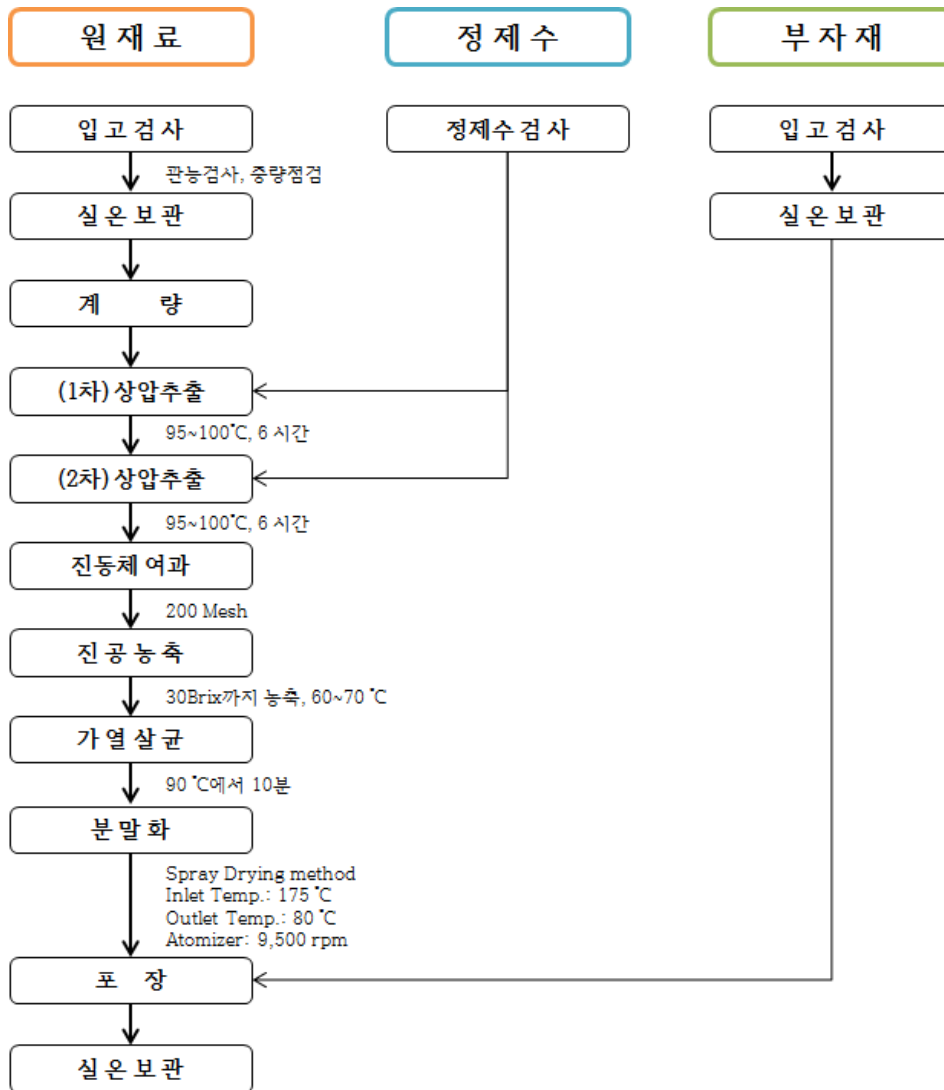


그림 26. 표준화된 황철추출분말 제조공정도

(2) 인체적용시험을 위한 시험약 및 플라시보 제조

- 건강기능성식품 제조 전문업체인 ‘한국노바렉스’에서 협약체결 후 인체적용시험을 위한 시험약과 플라시보약을 조제 연구를 진행하였음.
- 인체적용시험에 적용할 시험약 유효농도는 난소절제 랫드에서 여성갱년기 개선 효능 평가 시험을 토대로 설정하였음.
- 4주차 CTX(골 감소인자) 또한 500 mg/kg/day 투여군에서 대조군 대비 유의적으로 감소한 결과를 토대로 인간의 체표면적이 랫드 대비 약 6배에 해당하므로 이에 따라 500 mg/kg/day 에 체표면적 환산계수 6을 곱하여 3,000 mg/kg/day로 설정하였음.
- 인체적용시험약의 유효농도가 높아 복용 시 시험대상자들의 복용 편의성을 고려하여, 제립제로 진행을 하려 하였으나 황철의 특유 색으로 플라시보의 약을 제조 시 구분이 가능하여, 캡슐제 내부 충전 된 재료를 볼 수 없도록 조제 하였으며 오전, 오후 나눠서 1일 2회 4캡슐 씩 복용



용을 진행하도록 하였음.

(가) 시험약 처방 (1 캡슐 당)

| 성분명 |           | 배합비율   | 조 성     |
|-----|-----------|--------|---------|
| 주성분 | 황칠추출분말    | 88.3 % | 375 mg  |
| 부형제 | 유당        | 8.7 %  | 36.5 mg |
|     | 이산화규소     | 2.0 %  | 9.0 mg  |
|     | 스테아린산마그네슘 | 1.0 %  | 4.5 mg  |
| 합   |           | 100 %  | 425 mg  |

- 주성분의 비율이 많이 차지하므로 최소한의 부형제로 배합하였으며, 유당은 황칠의 씹쓸한 맛을 줄여주기 위해 사용하였고, 이산화규소와 스테아린산마그네슘은 캡슐 충전 시 혼합물의 원활한 흐름성을 갖도록 첨가하였음.

(나) 플라시보 처방 (1 캡슐 당)

| 성분명 |                    | 배합비율   | 조 성      |
|-----|--------------------|--------|----------|
| 부형제 | 미결정셀룰로오스           | 58.1 % | 203.4 mg |
|     | 유당                 | 33.9 % | 118.6 mg |
|     | 이산화규소              | 2.0 %  | 7.0 mg   |
|     | 스테아린산마그네슘          | 2.0 %  | 7.0 mg   |
| 착색제 | 카라멜색소              | 3.0 %  | 10.5 mg  |
|     | 치자황색소 <sup>a</sup> | 1.0 %  | 3.5 mg   |
| 합   |                    | 100 %  | 425 mg   |

a) 논문 DB검색을 통하여 치자황색소 내 Rutin이 함유되어 있지 않음을 확인하였음

- 주성분대신 미결정셀룰로오스를 동일 중량으로 넣으려고 하였으나, 미결정셀룰로오스는 bulk density가 큰 특징이 있어 동일한 캡슐에 충진을 할 수 없어 중량단위 350 mg으로 낮추어 진행하였음. 카라멜색소와 치자황색소는 미결정셀룰로오스에 정제수를 이용하여 과립을 형성한 후 건조시켰으며, 건조한 과립물을 분쇄 한 후 나머지 부형제들과 혼합하여 캡슐에 충전하였음.
- 캡슐은 담갈색 불투명으로 내부 충전제가 보이지 않는 것을 선택하였으며, 포장은 10구 PTP 포장으로 1 case당 120캡슐이 포장진행 하였음. 외관상으로 시험약과 대조약이 구분이 되지 않도록 진행.
- 모든 포장이 완료된 후에는 순천향대학교와 협의하여, 코드번호를 설정하여 각 케이스 외부에

일련번호와 QR코드를 제작하여 시험자에게 배부하였음(그림 27).



그림27. 인체적용시험에 사용한 실제 시험약과 대조약

라. 황칠추출분말 건강기능식품 제품화 및 사업화

- 황칠추출분말의 개별인정형 획득 전 과학적인 효능검증과 인체적용시험연구 결과를 토대로 건강기능식품전문업체와 협력하여 본 소재를 부원료로 포함하는 건강기능식품 및 일반식품을 제조하였으며, 하기의 제품명으로 출시하였음.
- 2017년 중반기 이후 개발된 하기 제품들은 연구종료까지 총 4억 이상의 매출을 달성하였음.

표 29. 황칠추출분말을 함유하는 건강기능식품 및 일반식품

| 품 목 명   | 유 형           | 제조처           | 제품사진 | 원재료명   |
|---------|---------------|---------------|------|--|
| 황제를 위하여 | 일반식품<br>(액상차) | 휴온스<br>내츄럴    |      | 정제수, <b>황칠농축액</b> , 석류농축액, 계피, 황기, 감초, 큰 꽃삼주, 천궁, 자황, 복령, 사양벌꿀, 블랙마카추출물 등 10가지 이상의 성분이 포함되어있음. |
| 황후미인    | 일반식품<br>(액상차) | 휴온스<br>내츄럴    |      | 정제수, 석류농축액, <b>황칠농축액</b> , 갈근농축액, 감초, 등 10가지 이상의 성분이 포함되어 있음.                                  |
| 황제의품격   | 일반식품<br>(액상차) | (주)바이오<br>로제트 |      | 정제수, 오가피, 천궁, 당귀, 영지, <b>황칠추출농축분말</b> , 산수유농축액, 홍삼농축액 등 10가지 이상의 성분이 포함되어있음.                   |

|      |                  |               |   |   |
|------|------------------|---------------|---|---|
| 팔팔인생 | 일반식품<br>(기타가공식품) | (주)한국<br>CNS팜 |  | 정제수, 벌꿀, <b>황칠농축액</b> ,<br>복분자농축액, 배농축액,<br>진생베리농축액, 비수리농축액,<br>L-아르기닌, 눈꽃동충화초농축액                   |
| 흠런킹  | 건강기능식품           | (주)유니셀팜       |  | 쏘팔메토열매추출물,<br>옥타코사놀, 비타민B2,<br>산화아연, 황산망간,<br>블랙마카추출분말,<br><b>황칠나무농축액</b> 등 10가지<br>이상의 성분이 포함되어있음. |

- 세계제약산업박람회 및 다양한 언론매개체를 통해 황칠추출분말의 전임상 효능 평가 후 여성 갱년기 증후군에 대한 개선 호능이 있음을 알렸으며, 농림축산식품부의 지원을 통한 국내 농수 산물의 개발이 활발히 이루어지고 있음을 홍보하였음.

## 2. 제 1협동과정 - 아주대학교

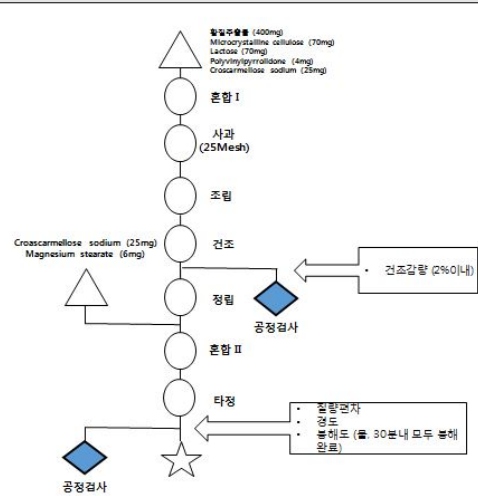
### 가. 건강 기능성 제품의 최적 제형 조성 선정

#### (1) 최종 제형 조성 선정을 위한 처방 연구

- 최종 제형 조성을 선정하기 위해 이전에 제조하였던 습식 과립법과 황칠 원료 자체 흐름성이 좋은 점을 고려하였을 때 활용할 수 있는 직타법을 모두 시도하여 제조 방법별에 대하여 평가해보고자 하였음.
- 또한, 직타법은 용매를 따로 필요로 하지 않기 때문에 주성분으로 사용되는 황칠추출분말의 안정성을 고려해야 할 사항을 최소화할 수 있다는 장점이 있음.
- 각 제조 방법별로 제조한 처방 중 사용된 첨가제 조성에 따른 차이를 평가해보고자 하였음.

#### (가) 처방 연구

- ① 제조 방법별 처방 연구
- ② 습식 과립법

| 처방 No. |                            | HIT-001 | 제조 공정도   |
|--------|----------------------------|---------|--|
| 성분명    |                            | mg/정    |  |
| 주성분    | 황칠 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004  | 400     |  |
| 부형제    | Lactose                    | 70      |  |
| 부형제    | Microcrystalline cellulose | 70      |  |
| 결합제    | Polyvinylpyrrolidone       | 4       |  |
| 결합액    | Ethanol                    |         |  |
| 붕해제    | Croscarmellose sodium      | 50      |  |

|     |                    |     |  |
|-----|--------------------|-----|--|
| 활택제 | Magnesium stearate | 6   |  |
| 합   |                    | 600 |  |

- 이전 습식 과립방법으로 제조한 자료를 참고하였을 때, 결합액을 3차 증류수로 하였을 때 원료 특성상 진득해져 과립 제조가 어려웠던 점을 고려하여 결합액을 Ethanol로 변경하여 진행하였다. 해당 결합액을 활용하여 위 처방과 같이 제조하였을 때 3차 증류수를 사용하였을 때와 달리 과립이 잘 형성되었음을 확인할 수 있었다.

㉠ 직타법

| 처방 No. |                                     | HIT-005 | 제조 공정도 |
|--------|-------------------------------------|---------|--------|
| 성분명    |                                     | mg/정    |        |
| 주성분    | 황철 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004           | 500     |        |
| 부형제    | Microcrystalline cellulose          | 150     |        |
|        | Anhydrous dibasic calcium phosphate | 100     |        |
| 붕해제    | Croscarmellose sodium               | 40      |        |
| 활택제    | Magnesium stearate                  | 10      |        |
| 합      |                                     | 800     |        |

- 황철 추출물 원료 자체 흐름성이 좋은 편임을 고려하였을 때, 습식 과립법에 비해 상대적으로 간편하게 제조할 수 있는 직타법을 활용해보았다. 위 처방을 토대로 제조하였을 때 적합한 성상을 가진 제형으로 제조되었음을 확인하였다.

(2) 제형에 대한 특성 평가

(가) 시험 방법

성 상

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 정제를 꺼내어 육안으로 관찰한다.

건조감량

- 정제를 유발과 유봉을 이용하여 가루화하여 약 1g 칭량하여 105°C에서 4시간 동안 진행하며, 결과값이 2% 이내이면 적합하다고 판정한다.

붕해시험

- 아래 작성된 식품공전 일반시험법 중 봉해시험법에 따른다.

- 1) 시 험 액: 물 (37°C)
- 2) 시험방법: 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰한다.
- 3) 결과판정: 시료를 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을 써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.
- 4) 적합여부: 30분 이내 모두 봉해가 되면 적합하다고 판정을 한다.

### 경도시험

- 경도시험은 봉해 패턴을 좌우하는 것으로 경도는 약 8-12사이로 설정하고자 한다.

### 함량시험

- Rutin의 함량이 13mg 이상을 함유할 시에 적합하다고 판정한다. 시험방법은 하기에 작성된 방법을 따라 분석한다.

### 1. 표준품 제조

#### 1.1. Rutin

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

#### 1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid

- 표준원액 제조: 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선했음.

- 표준액 제조: 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선했음.

### 2. Spiking test 샘플 제조

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 황칠 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선했음. 표선했은 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

### 3. 검액 제조

- 각 조건의 검체를 각각의 20ml 용량플라스크에 1g씩 취하여 옮겨담는다. 메탄올을 소량 첨가 후, 흔들어 벽면에 묻지 않도록 하여 주고 35°C에서 1시간동안 초음파 추출을 하였음. 실온 방치 후, 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

#### 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

#### < 이동상 Gradient 법>

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |
| 10.0  | 50.0     | 50.0     |
| 16.0  | 40.0     | 60.0     |
| 20.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.1  | 70.0     | 30.0     |
| 35.0  | 70.0     | 30.0     |

#### 흐름성시험 (Bulk density (BD) & Tapped density (TD))

- 타정하기 전, 혼합물에 대하여 흐름성 확인을 위해 아래 작성된 시험방법에 따라 시험한다.

##### 1. Bulk density (BD)

- 10ml 메스실린더에 혼합물을 눌러 다지지 않고 느슨하게 10ml까지 충전하여 해당 무게를 잰다. (g/ml)

##### 2. Tapped density (TD)



- 분체검체를 넣은 측정용용기를 기계적으로 탭하여 얻는 것으로 약 200회간 탭하여 느슨하게 충전되어 있던 혼합물이 얼마나 눌러 다져졌는지를 눈금으로 확인한다.

### 3. 평가 기준

| Carr's index      |                      |
|-------------------|----------------------|
| % Compressibility | Relative flowability |
| 5-15              | Excellent            |
| 12-16             | Good                 |
| 18-21             | Fair                 |
| 23-28             | Slightly poor        |
| 28-35             | Poor                 |
| 35-38             | Very poor            |
| > 40              | Extremely poor       |

#### (3) 시험 결과

(가) 정상 / 건조감량 / 붕해시험 / 경도 / 함량시험에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-001   | HIT-005  |
|--------|---|--|
| 정상     |  |  |
| 건조감량   | 적합<br>(1.67%)   | 적합<br>(1.68%)  |
| 붕해시험   | 적합<br>(20분 이내 붕해)   | 적합<br>(23분 이내 붕해)  |
| 경도     | 8 KP  | 9.75 KP  |
| 함량시험   | 적합<br>(19.8mg/g)  | 적합<br>(20.4mg/g)   |

- 제조 방법별로 제조한 습식 과립법, 직타법 모두 특성 연구를 한 결과, 해당 시험에서 적합한 것으로 확인되었다. 결과적으로 모두 시험에 적합한 것을 고려하였을 때, 제조 방법이 편리한 것이 Scale-up 하는 것 역시 편리할 것으로 생각되어 최종적으로 직타법을 제조 방법으로 선정하였다.

(나) 흐름성에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-001         | HIT-005            |
|--------|-----------------|--------------------|
| 흐름성    | 15.9%<br>(Good) | 11%<br>(Excellent) |

- 본 원료의 흐름성이 약 18%로 각각의 제조 방법별로 시도하였을 때 두 가지 모든 방법에서 흐름성이 개선된 것을 확인할 수 있다. 그러나, 상대적으로 결합액을 사용하지 않은 제조 방법의 혼합물이 약 7% 개선된 흐름성을 나타낸 것을 확인할 수 있다.

## 나. 조성별 처방 연구

(1) 습식 과립법 - Lactose (부형제) 첨가 여부에 따른 비교 확인

(가) 처 방

| 처방 No. |                               | HIT-001 | HIT-002 |
|--------|-------------------------------|---------|---------|
| 성분명    |                               | mg/정    | mg/정    |
| 주성분    | 항질 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004     | 400     | 400     |
| 부형제    | Lactose                       | 70      | -       |
|        | Microcrystalline<br>cellulose | 70      | 140     |
| 결합제    | Polyvinylpyrrolidone          | 4       | 4       |
| 붕해제    | Croscarmellose<br>sodium      | 25      | 25      |
| 결합액    | Ethanol                       |         |         |
| 붕해제    | Croscarmellose<br>sodium      | 25      | 25      |
| 활택제    | Magnesium<br>stearate         | 6       | 6       |
| 합      |                               | 600     | 600     |

- Lactose 첨가 여부에 따른 제조 과정에 대해 유의적 변화는 없었다.

(나) 특성 연구 결과

성상 / 건조감량 / 붕해시험 / 경도 / 함량시험에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-001   | HIT-002   |
|--------|---|---|
| 성상     |  |  |



|      |  |                   |
|------|--|-------------------|
|      | 진한 갈색의 장방형 모양의 정제<br>size : 15.0 x 8.0 |                   |
| 건조감량 | 적합<br>(1.67%)                          | 적합<br>(1.62%)     |
| 붕해시험 | 적합<br>(20분 이내 붕해)                      | 적합<br>(20분 이내 붕해) |
| 경도   | 8 KP                                   | 9.31 KP           |
| 함량시험 | 적합<br>(19.8mg/g)                       | 적합<br>(20.1mg/g)  |

- 습식 과립으로 제조한 제형은 크게 다른 점이 없었음을 확인하였다.

(2) 직타법 - Polyvinylpyrrolidone (결합제) 첨가 여부에 따른 비교 확인  
(가) 처 방



| 처방 No. |  | HIT-003 | HIT-004 |
|--------|--|---------|---------|
| 성분명    |  | mg/정    | mg/정    |
| 주성분    | 황칠 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004              | 500     | 500     |
| 부형제    | Microcrystalline<br>cellulose          | 100     | 100     |
|        | Anhydrous dibasic<br>calcium phosphate | 100     | 100     |
| 결합제    | Polyvinylpyrrolidone                   | -       | 20      |
| 붕해제    | Croscarmellose<br>sodium               | 40      | 40      |
| 활택제    | Magnesium<br>stearate                  | 10      | 10      |
| 합      |  | 750     | 770     |

- 직타법으로 제조한 HIT-003의 경우, 타정 장애가 발생하여 이를 개선하기 위해 결  
합제를 전제 함량 2% 해당하는 양을 추가하여 타정하였을 때 타정 장애가 발생하지 않는 것을  
확인하였다.

(나) 특성 연구 결과

성상 / 건조감량 / 붕해시험 / 경도 / 함량시험에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-003 | HIT-004 |
|--------|---------|---------|
| 성상     |         |         |

|       |   |  |
|-------|---|--|
|       |  |  |
|       | 연한 연두색의 장방형<br>모양의 정제<br>HIT-003 size : 15.0 x 8.0                                | 연한 연두색의 타원형<br>모양의 정제<br>HIT-005 size : 15.2 x 7.5                                 |
| 건조감량  | 적합<br>(1.70%)   | 적합<br>(1.73%)  |
| 붕해시험  | 적합<br>(25분 이내 붕해)   | 적합<br>(27분 이내 붕해)  |
| 경도    | 11.3 KP   | 12 KP  |
| 함량시험  | 적합<br>(20.0mg/g)  | 적합<br>(20.3mg/g)   |
| 타정 장애 | 발생 (Capping)  | 해당 사항 없음   |

- 결합제 유무에 따른 차이는 타정 장애로 인해 발생한 성상의 차이를 제외하고 나머지 시험 항목에서는 모두 적합하였다.

(3) 직타법 - Microcrystalline cellulose (부형제) 조성비 여부에 따른 비교 확인



(가) 처방

| 처방 No. |  | HIT-003 | HIT-005 |
|--------|--|---------|---------|
| 성분명    |  | mg/정    | mg/정    |
| 주성분    | 황칠 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004              | 500     | 500     |
| 부형제    | Microcrystalline<br>cellulose          | 100     | 150     |
|        | Anhydrous dibasic<br>calcium phosphate | 100     | 100     |
| 결합제    | Polyvinylpyrrolidone                   | -       | -       |
| 붕해제    | Croscarmellose<br>sodium               | 40      | 40      |
| 활택제    | Magnesium<br>stearate                  | 10      | 10      |
| 합      |  | 750     | 800     |

- 직타법으로 제조한 HIT-003의 경우, 타정 장애가 발생하여 이를 개선하기 위해 다른 첨가제를 첨가하기보다 사용한 부형제의 양을 증가시켜 보완을 해보았다. 그 결과 타정 장애가 발생하지 않음을 확인하였다.

(나) 특성 연구 결과

① 성상 / 건조감량 / 붕해시험 / 경도 / 함량시험에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-003   | HIT-005  |
|--------|---|--|
| 성상     |  |  |
|        | 연한 연두색의 장방형 모양의 정제<br>HIT-003 size : 15.0 x 8.0                                   | 연한 연두색의 타원형 모양의 정제<br>HIT-005 size : 15.2 x 7.5                                    |
| 건조감량   | 적합<br>(1.70%)   | 적합<br>(1.68%)  |
| 붕해시험   | 적합<br>(25분 이내 붕해)   | 적합<br>(23분 이내 붕해)  |
| 경도     | 11.3 KP   | 9.75 KP  |
| 함량시험   | 적합<br>(20.0mg/g)  | 적합<br>(20.4mg/g)   |
| 타정 장애  | 발생 (Capping)  | 해당 사항 없음   |

- 부형제 조성비에 따른 차이는 타정 장애로 인해 발생한 성상의 차이를 제외하고 나머지 시험 항목에서는 모두 적합하였다.

② 흐름성에 대한 결과

| 처방 No. | HIT-003              | HIT-004         | HIT-005            |
|--------|----------------------|-----------------|--------------------|
| 흐름성    | 11.8%<br>(Excellent) | 12.2%<br>(Good) | 11%<br>(Excellent) |

- 본 원료의 흐름성이 약 18%인 것을 고려하였을 때 직타법으로 제조한 처방 모두 흐름성이 눈에 띄게 개선된 것을 확인할 수 있다. 그 중에서 타정 장애가 개선되었으면서 흐름성이 가장 좋은 HIT-005 처방이 최종 제형 처방으로 적합한 것으로 고려된다.

(4) 최종 결과

- 처방 연구를 통해 제조 방법의 편리성, 조성비에 따른 차이를 고려하였을 때, 직타법으로 제조하였으며 부형제 양이 증가된 HIT-005 처방이 최종적으로 가장 적합하다고 판단하였다.

다. 건강 기능성 최종 제형 안정성 확보

(1) 최종 제형 (HIT-005) 안정성 시험

- 최종적으로 선정된 제형(HIT-005)에 대하여 6개월간 안정성 평가를 하였음.

(2) 보관 조건

(가) 장기보관조건

- 최종 선정된 제형에 대해 25°C/60%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음

(나) 가속보관조건

- 최종 선정된 제형에 대해 40°C/75%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음

(3) 안정성 시험 항목

**성 상**

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 정제를 꺼내어 육안으로 관찰한다.

**건조감량**

- 105°C조건에서 4시간동안 원료 1g을 건조감량하여 원료 내 고형분 함량을 측정한다.
- 결과 : 2% 이내 적합함 (1.68%)

**붕해시험** : 식품공전 일반시험법 중 붕해시험법에 따른다.

**시 험 액:** 물 (37°C)

**시험방법:** 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰한다.

**결과판정:** 시료를 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래 쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 물질이 약간 있을 때 에는 적합한 것으로 한다.

**확인시험**

- 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일한지 확인.

**함량시험**

- Rutin의 함량이 13mg 이상을 함유할 시에 적합하다고 판정한다. 시험방법은 하기에 작성된 방법을 따라 분석한다.

**1. 표준품 제조**

**1.1. Rutin**

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

**1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid**

- **표준원액 제조:** 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선했음.
- **표준액 제조:** 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선했음.

## 2. Spiking test 샘플 제조

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 황칠 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 3. 검액 제조

- 각 조건의 검체를 각각의 20ml 용량플라스크에 1g씩 취하여 옮겨담는다. 메탄올을 소량 첨가 후, 흔들어 벽면에 묻지 않도록 하여 주고 35°C에서 1시간 동안 초음파 추출을 하였음. 실온 방치 후, 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

### < 이동상 Gradient 법>

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |
| 10.0  | 50.0     | 50.0     |
| 16.0  | 40.0     | 60.0     |
| 20.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.1  | 70.0     | 30.0     |
| 35.0  | 70.0     | 30.0     |

(4) 시험결과

(가) 장기보관조건

| 시 험 항 목         | 기 준                                 | Initial        | 1개월            | 2개월            | 4개월            | 6개월            |
|-----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 성 상             | ● : 연한 녹색의 장방형 모양의 정제               | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 확 인 시 험 (HPLC)  | ● : 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일 | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 함 량 시 험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유     | 적합 (19.68mg/g) | 적합 (19.39mg/g) | 적합 (18.18mg/g) | 적합 (21.87mg/g) | 적합 (21.82mg/g) |
| 붕 해 시 험         | 30분 이내 붕해                           | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             |

(나) 가속보관조건

| 시 험 항 목         | 기 준                                 | Initial        | 1개월            | 2개월            | 4개월            | 6개월            |
|-----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 성 상             | ● : 연한 녹색의 장방형 모양의 정제               | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 확 인 시 험 (HPLC)  | ● : 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일 | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 함 량 시 험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유     | 적합 (19.68mg/g) | 적합 (20.04mg/g) | 적합 (20.03mg/g) | 적합 (19.25mg/g) | 적합 (19.07mg/g) |
| 붕 해 시 험         | 30분 이내 붕해                           | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             |

(5) 최종 결과

- 최종 제형으로 제조되어진 정제에 대하여 안정성 시험을 진행한 결과, 6개월간 해당하는 안정성 시험에 모두 적합한 것으로 확인되었다. 이에 건강기능제품으로 제조하기에 적합한 제형이라고 여겨진다.

· 복합제형 연구

- 복합제를 개발하기 앞서 황칠추출물 단일성분으로 하여 정제를 개발하였으며 이에 대한 공정 연구를 통하여 최적의 조건을 확립하였다.
- 정제와 같은 경우 공정연구 결과를 바탕으로 복합 기능성 원료를 정제 내 조성에 추가하여 개발할 때 공정연구를 따로 진행하지 않아도 쉽게 제형을 개발할 수 있는 장점이 있다.
- 또한, 항산화 및 여성에게 좋은 성분으로 알려진 석류와 함께 혼합하여 복합제형으로 개발하는 것은 여성에게 긍정적인 영향을 끼칠 것으로 고려되어진다.

(1) 정제 조성 및 제조공정

| 조성  |                                     | HIT-006 | 제조 공정도 |
|-----|-------------------------------------|---------|--------|
| 성분명 |                                     | mg/정    |        |
| 주성분 | 황칠 추출분말<br>JS-GJ-P-18-004           | 250     |        |
|     | 석류                                  | 250     |        |
| 부형제 | Microcrystalline cellulose          | 150     |        |
|     | Anhydrous dibasic calcium phosphate | 100     |        |
| 붕해제 | Croscarmellose sodium               | 40      |        |
| 활택제 | Magnesium stearate                  | 10      |        |
| 합   |                                     | 800     |        |

(2) 제형 특성 연구 시험 방법

성 상

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 정제를 꺼내어 육안으로 관찰한다.

붕해시험

- 아래 작성된 식품공전 일반시험법 중 붕해시험법에 따른다.

|  |
|--|
| <p>1) 시험액: 물 (37°C)</p> <p>2) 시험방법: 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰한다.</p> <p>3) 결과판정: 시료를 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을 써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.</p> <p>4) 적합여부: 30분 이내 모두 붕해가 되면 적합하다고 판정을 한다.</p> |
|--|

함량시험

- Rutin의 함량이 13mg 이상을 함유할 시에 적합하다고 판정한다. 시험방법은 하기에 작성된 방법을 따라 분석한다.

## 1. 표준품 제조

### 1.1. Rutin

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

### 1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid

- **표준원액 제조:** 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선했음.
- **표준액 제조:** 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선했음.

## 2. Spiking test 샘플 제조

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 항질 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선했음. 표선했은 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 3. 검액 제조

- 각 조건의 검체를 각각의 20ml 용량플라스크에 1g씩 취하여 옮겨담는다. 메탄올을 소량 첨가 후, 흔들어 벽면에 묻지 않도록 하여 주고 35°C에서 1시간동안 초음파 추출을 하였음. 실온 방치 후, 메탄올로 표선했음. 표선했은 용액을 1,000rpm으로 1시간동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

### < 이동상 Gradient 법 >

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |



|      |      |      |
|------|------|------|
| 10.0 | 50.0 | 50.0 |
| 16.0 | 40.0 | 60.0 |
| 20.0 | 20.0 | 80.0 |
| 25.0 | 20.0 | 80.0 |
| 25.1 | 70.0 | 30.0 |
| 35.0 | 70.0 | 30.0 |

**(3) 제형 특성 연구 시험 결과  
성 상**



( 장축 : 15.2mm, 단축 : 7.5mm )

**붕해시험**

- 이전 공정연구 참고 시, 경도가 8-12 범위일 때 30분 내 붕해가 완료되는 것을 확인하였으므로 경도를 8-12 범위로 제조하였음.

경 도 : 10.75kp

붕해시험 : 30분내 모두 붕해가 되었음 ( 붕해시간 : 23.07분 - 24.30분 )

**확인시험**

- 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크 유지시간이 동일한 것으로 확인하였다.

**함량시험**

- Rutin의 함량이 23.69mg/g으로 13mg 이상을 함유하고 있음을 확인하였다.

**(4) 복합제형 최종 결과**

- 최종 제형 HIT-005 활용하여 복합제형을 제조하였으며, 특성 연구 결과 해당 시험에 모두 적합하며 성공적으로 복합제형을 제조하였다.
- 이에 해당하여 최종 제형으로 선정된 HIT-005와 복합제형인 HIT-006에 대하여 안정성 연구를 진행하고자 한다.

**· 건강 기능성 최종 제형 안정성 확보**

**(1) 복합제형 (HIT-006) 안정성 시험**

- 복합제형(HIT-006)에 대하여 6개월간 안정성 평가를 하였음.

**(2) 보관 조건**

**(가) 장기보관조건**

- 복합제형에 대해 25°C/60%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음

**(나) 가속보관조건**

- 복합제형에 대해 40°C/75%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음

(3) 안정성 시험 항목

**성 상**

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 정제를 꺼내어 육안으로 관찰한다.

**건조감량**

- 105°C조건에서 4시간동안 원료 1g을 건조감량하여 원료 내 고형분 함량을 측정한다.
- 결과 : 2% 이내 적합함 (1.68%)

**붕해시험** : 식품공전 일반시험법 중 붕해시험법에 따른다.

**시 험 액:** 물 (37°C)

**시험방법:** 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰한다.

**결과판정:** 시료를 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래 쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 물질이 약간 있을 때 에는 적합한 것으로 한다.

**확인시험**

- 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일한지 확인.

**함량시험**

- Rutin의 함량이 13mg 이상을 함유할 시에 적합하다고 판정한다. 시험방법은 하기에 작성된 방법을 따라 분석한다.

**1. 표준품 제조**

**1.1. Rutin**

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

**1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid**

- **표준원액 제조:** 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선했음.
- **표준액 제조:** 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선 하였음.

**2. Spiking test 샘플 제조**

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 황칠 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선했음.

음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

### 3. 검액 제조

- 각 조건의 검체를 각각의 20ml 용량플라스크에 1g씩 취하여 옮겨담는다. 메탄올을 소량 첨가 후, 흔들어 벽면에 묻지 않도록 하여 주고 35°C에서 1시간 동안 초음파 추출을 하였음. 실온 방치 후, 메탄올로 표선하였음. 표선 한 용액을 1,000rpm으로 1시간동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

### 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

#### < 이동상 Gradient 법>

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |
| 10.0  | 50.0     | 50.0     |
| 16.0  | 40.0     | 60.0     |
| 20.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.1  | 70.0     | 30.0     |
| 35.0  | 70.0     | 30.0     |

## (4) 시험결과

### (가) 장기보관조건

| 시 험 항 목 | 기 준                   | Initial | 1개월 | 2개월 | 4개월 | 6개월 |
|---------|-----------------------|---------|-----|-----|-----|-----|
| 성 상     | ● : 연한 녹색의 장방형 모양의 정제 | ●       | ●   | ●   | ●   | ●   |
| 확 인 시 험 | ● : 지표성분 함량           | ●       | ●   | ●   | ●   | ●   |

|               |                                 |                |                |                |                |                |
|---------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| (HPLC)        | 시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일        |                |                |                |                |                |
| 함량 시험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유 | 적합 (23.69mg/g) | 적합 (23.05mg/g) | 적합 (23.58mg/g) | 적합 (23.77mg/g) | 적합 (24.43mg/g) |
| 붕해 시험         | 30분 이내 붕해                       | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             |

(나) 가속보관조건

| 시험 항목         | 기준                                   | Initial        | 1개월            | 2개월            | 4개월            | 6개월            |
|---------------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 성상            | ● : 연한 녹색의 장방형 모양의 정제                | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 확인 시험 (HPLC)  | ● : 지표성분 함량 시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일 | ●              | ●              | ●              | ●              | ●              |
| 함량 시험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유      | 적합 (23.69mg/g) | 적합 (23.54mg/g) | 적합 (23.49mg/g) | 적합 (25.96mg/g) | 적합 (22.49mg/g) |
| 붕해 시험         | 30분 이내 붕해                            | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             | 적합             |

(5) 최종 결과

- 복합제형으로 제조되어진 정제에 대하여 안정성 시험을 진행한 결과, 6개월간 해당하는 안정성 시험에 모두 적합한 것으로 확인되었다. 이에 건강기능제품으로 제조하기에 적합한 제형이라고 여겨진다.

. 건강 기능성 제품의 기준 및 시험법 확립

(1) 제형에 대한 시험 방법 확립

성상

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 정제를 꺼내어 육안으로 관찰한다.

붕해시험

- 아래 작성된 식품공전 일반시험법 중 붕해시험법에 따른다.

|  |
|--|
| <p>1) 시험액: 물 (37°C)</p> <p>2) 시험방법: 보조판을 넣어 30분간 상하운동을 시킨 다음 관찰한다.</p> <p>3) 결과판정: 시료를 각각 보조통 6개에 넣고 보조통을 시험기 유리관 속에 각각 1개씩 넣어 아래쪽에 고정시키고 따로 규정이 없는 한 시험액으로 물을 써서 30분간 상하운동을 시킨 다음, 보조통을 꺼내어 관찰할 때 시료의 잔류물이 보조통 내에 없든가 있더라도 원형상태로 머무르는 것이 보조통 1개에만 있을 때 또는 피막이거나 또는 연질의 물질 또는 물질이 약간 있을 때에는 적합한 것으로 한다.</p> <p>4) 적합여부: 30분 이내 모두 붕해가 되면 적합하다고 판정을 한다.</p> |
|--|

### 질량편차 시험

- 제제 20개를 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 평균 질량을 계산할 때 그 값과 개개 질량과의 편차는 다음 값을 넘는 것이 있어도 2개 이하이고 2배를 넘는 것이 없을 때 적합하다.

| 평균 질량 (g)     | 편 차 (%) |
|---------------|---------|
| 0.12 미만       | 10      |
| 0.12 - 0.3 미만 | 7.5     |
| 0.3 이상        | 5       |

### 확인시험

- 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크 유지 시간이 동일한지 확인한다.

### 함량시험

- 아래 (2) HPLC 시험법을 활용하여 지표성분인 Rutin이 13mg 이상 함유하고 있는지 확인한다.

(2) HPLC를 이용한 유효성분에 대한 분석법 확립

#### 1. 표준품 제조

##### 1.1. Rutin

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

##### 1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid

- **표준원액 제조:** 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선하였음.

- **표준액 제조:** 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선 하였음.

#### 2. Spiking test 샘플 제조

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 황칠 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

#### 3. 검액 제조

- 정제 10정을 유발로 곱게 갈아 분말로써 1g을 취해 20ml 용량플라스크에 옮겨 담은 후 메탄올을 약 8ml정도 첨가하여 벽면에 묻지 않도록 흔들어 주었음. 10ml의 메탄올을 더 가한 후 1시간동안 35°C에서 초음파 추출하였음. 이 후 상온에 식혀 메탄올로 표선하였으며

1,000RPM으로 1시간동안 교반해주었음. 교반 뒤 샘플을 10ml 원심분리용 시험관에 옮겨 담고 3,000RPM / 25°C에서 10분동안 원심분리를 한 후 상등액을 검액으로 하였음. 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

#### 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

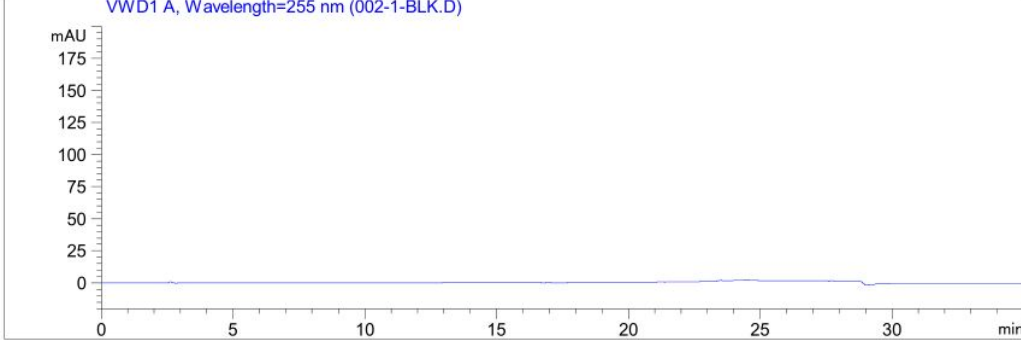
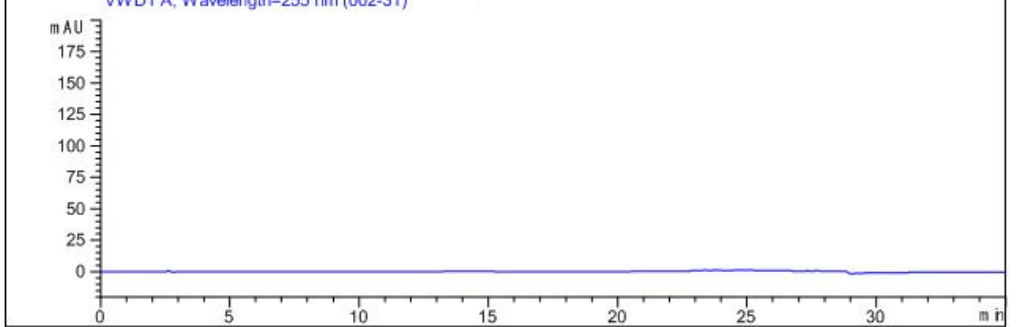
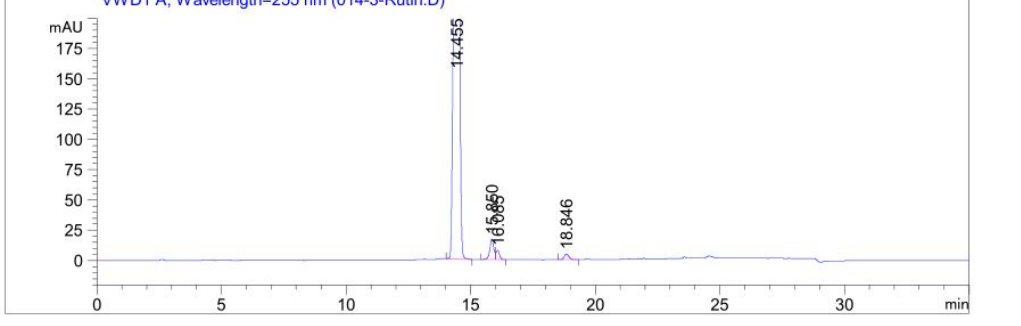
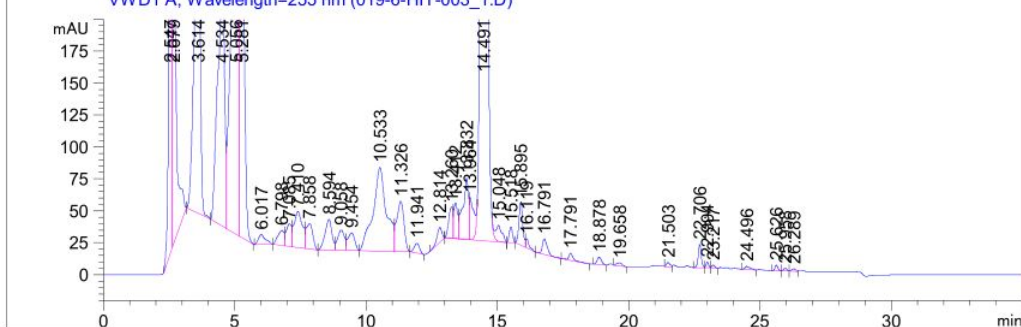
#### < 이동상 Gradient 법>

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |
| 10.0  | 50.0     | 50.0     |
| 16.0  | 40.0     | 60.0     |
| 20.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.1  | 70.0     | 30.0     |
| 35.0  | 70.0     | 30.0     |

(3) 유효성분에 대한 HPLC 분석법 결과 데이터

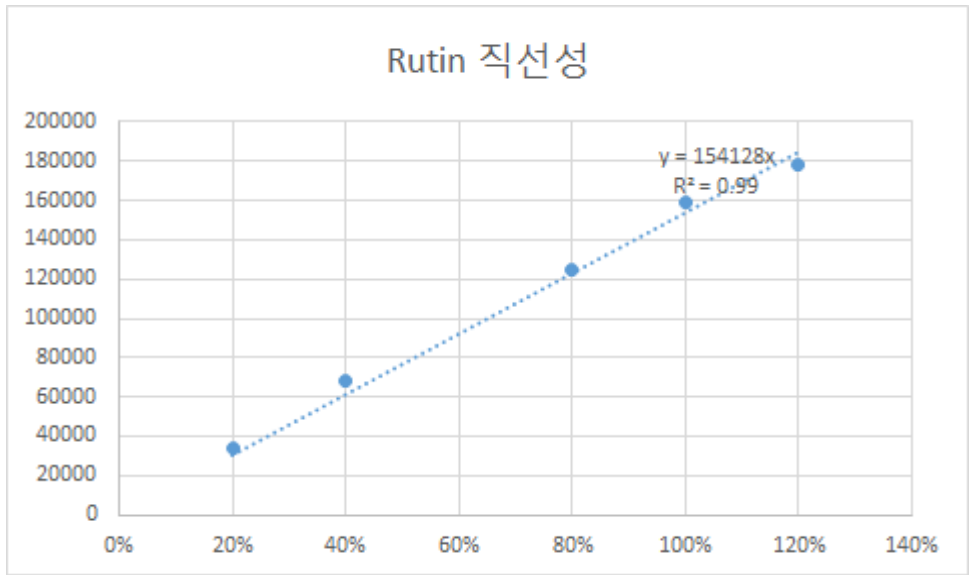
(가) 특이성

|  |                     |
|--|---------------------|
|  | <b>Chromatogram</b> |
|--|---------------------|

|   |  |
|---|--|
| <p style="text-align: center;">Blank</p>        |  <p>- Dilution 용액으로 사용되는 Methanol에 대하여 분석하였을 때 아무런 피크가 발생하지 않고 베이스라인이 평평하게 나타나는 것을 확인할 수 있다.</p> |
| <p style="text-align: center;">Mobile phase</p> |  <p>- Mobile phase가 분석하는 데 영향을 주지 않음을 확인할 수 있다.</p>   |
| <p style="text-align: center;">STD</p>          |  <p>- Rutin의 경우, 약 14.455분대의 피크를 보이고 있음을 확인할 수 있다.</p>   |
| <p style="text-align: center;">Sample</p>       |  <p>- Rutin 표준액에서 나타난 피크와 유사한 14.491분대 Rutin 으로 추정되는 피크가 발생한 것으로 확인하였다.</p>                    |

(나) 직선성

- 전 과정을 3회 반복 수행하여 추정회귀직선의 결정계수 ( $R^2$ , Coefficient of Determination) 을 계산하여 직선성을 판정하였을 때, 평가기준인  $R^2$ : 0.99 이상에 적합함을 확인하였다.



(다) 정확성

- 160 - 960ppm (20% - 120%) 사이의 3가지 농도를 선택하여 회수율을 확인한 결과  $100 \pm 2.0\%$  내 적합한 것을 확인하였다.

| 구분   | 측정 농도   | 회수율    | 농도별 평균 회수율 |
|------|---------|--------|------------|
| 80%  | 640 ppm | 99.1%  | 99.6%      |
|      |         | 99.9%  |            |
|      |         | 99.7%  |            |
| 100% | 800 ppm | 101.2% | 101.3%     |
|      |         | 101.2% |            |
|      |         | 101.4% |            |
| 120% | 960 ppm | 99.0%  | 99.0%      |
|      |         | 99.0%  |            |
|      |         | 98.9%  |            |

(라) 정밀성

- 각 시험액별로 검액 6개를 각각 함량시험 분석법에 따라 측정하여 얻어진 결과로부터 회수율을 구하고 평균 회수율 및 상대표준편차로부터 정밀성을 평가하였을 때, 평가기준인 상대표준편차 (RSD) 값이 2.0% 이하인 것을 확인하였다.

| No. | 반복 정밀성  |
|-----|---------|
| 1   | 14951.2 |
| 2   | 14926.3 |



|         |         |
|---------|---------|
| 3       | 14936.2 |
| 4       | 14956.7 |
| 5       | 15094.7 |
| 6       | 15079.7 |
| Average | 14990.8 |
| RSD (%) | 0.5     |

(마) 정량한계

- 검량선의 최저농도인 160ppm의 시그널 노이즈 비 값을 확인한 결과, 160ppm 농도 이상에서 정량 분석이 가능함을 확인하였다.

(4) 최종 결과


- 결과적으로 제형에 대한 평가항목을 설정하였으며, 기능성분인 Rutin을 분석하는 함량시험이 신뢰할 수 있는 분석법임을 확인하였다.

· 건강 기능성 제형 대량생산을 위한 공정 최적화

(1) 생산의 편리성을 위한 제조 방법 변경

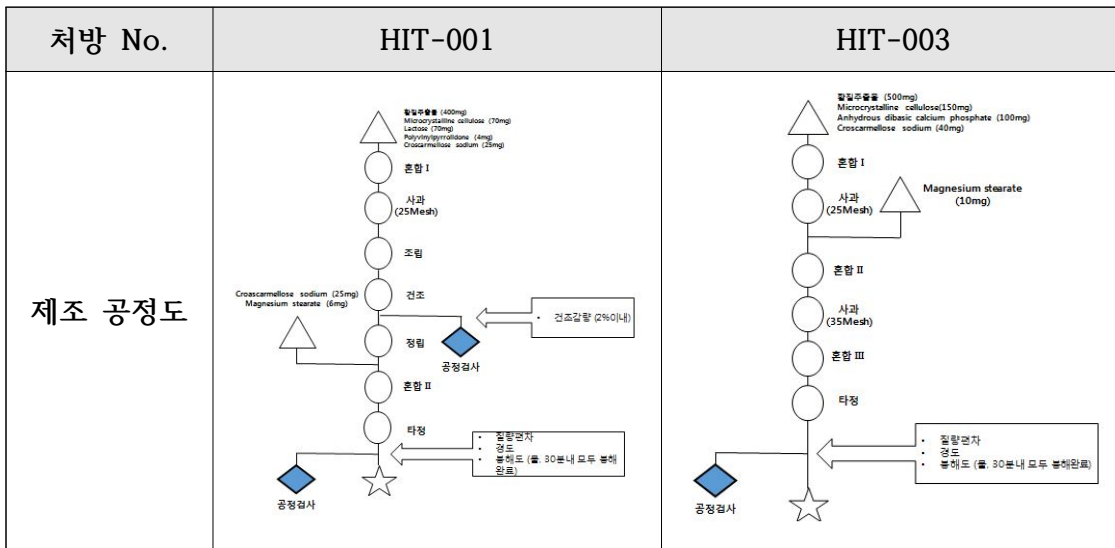
- 이전 제형 처방에 따라 습식 과립을 활용하였으나, 원료 자체 흐름성이 좋아 과립에 대한 공정을 따로 진행하지 않는 직타법으로 제조하고자 한다.
- 또한, 직타법은 용매를 따로 필요로 하지 않기 때문에 용매에 의해 원료 안정성을 영향을 주게 되는 것은 배제할 수 있다.

(가) 제조 방법 변경에 대한 처방

| 조성  |  | HIT-001 |   | HIT-003 |
|-----|--|---------|---|---------|
| 성분명 |  | mg/정    |   | mg/정    |
| 주성분 | 황칠 추출물<br>JS-GJ-P-18-004               | 400     |   | 500     |
| 부형제 | Lactose                                | 70      |   | -       |
|     | Microcrystalline<br>cellulose          | 70      |  | 100     |
|     | Anhydrous dibasic<br>calcium phosphate | -       |   | 100     |
| 결합제 | polyvinylpyrrolidone                   | 4       |   | -       |
| 붕해제 | Croscarmellose                         | 25      |   | -       |

|     |                       |     |     |
|-----|-----------------------|-----|-----|
|     | sodium                |     |     |
| 결합액 | Ethanol               |     | -   |
| 붕해제 | Croscarmellose sodium | 25  | 40  |
| 활택제 | Magnesium stearate    | 6   | 10  |
|     | 합                     | 600 | 750 |

(나) 해당 처방에 따른 제조 공정도



※ 결과적으로 습식 과립법에서 직타법으로 변경함으로써 제조하는데 있어 굉장히 편리함

(2) 제형 성상 및 타정 장애 개선

- HIT-003 동일 처방에 대하여 소비자의 복용 편의성을 향상시키기 위해 단축이 상대적으로 짧은 것으로 변경하고자 하였다.



그림 28. 정제 성상 비교 (왼쪽 : 단축 (7.5mm) , 오른쪽 : 단축 (8.0mm))

- 그러나 HIT-003 처방을 단축으로 타정하였을 시에 위 사진과 같이 타정 장애 중 하나인 Capping 현상이 발생하였다.



그림 29. Capping 현상 발생

- Capping이 나타나는 현상을 극복하기 위해 타정 시 Prepressure 및 Main pressure를 최대한 낮추어 진행해보았으나 경도가 너무 낮아져 으스러지는 현상이 발생하여 처방을 변경하여 Capping 현상을 개선하고자 하였다. 이에 일부 결합제를 1-2% 첨가하거나 그 외 다른 방안으로 부형제의 양을 증가시켜 개선해보고자 한다.

| 조성  |                                     | HIT-003 |  | HIT-004 | HIT-005 |
|-----|-------------------------------------|---------|--|---------|---------|
| 성분명 |                                     | mg/정    |  | mg/정    | mg/정    |
| 주성분 | 황칠 추출물<br>JS-GJ-P-18-004            | 500     |  | 500     | 500     |
| 부형제 | Microcrystalline cellulose          | 100     |  | 100     | 150     |
|     | anhydrous dibasic calcium phosphate | 100     |  | 100     | 100     |
| 결합제 | Polyvinylpyrrolidone                | -       |  | 20      | -       |
| 붕해제 | Croscarmellose sodium               | 40      |  | 40      | 40      |
| 활택제 | Magnesium stearate                  | 10      |  | 10      | 10      |
| 합   |                                     | 750     |  | 770     | 800     |

(가) 해결방안- 결합제 첨가한 처방

- 결합제인 Polyvinylpyrrolidone을 HIT-003 처방에 2% 해당 양만큼 첨가하여 타정하였을 때 역시 타정 장애가 나타나지 않았음을 확인하였다.
- 그러나, 결합제를 첨가한 처방의 경우 동일한 펀치, 동일한 조건으로 타정하였을 때 경도가 약 13으로 확인되었으며 압력을 더욱 낮출 경우 목표하는 경도 범위 (8-12)에 적합하지 않았음을 확인하였다.

(나) 해결방안- HIT-003 처방 변경 ▶ HIT-005

- Microcrystalline cellulose의 양을 증가시킨 HIT-005처방에 대해서는 HIT-003에서 나타난 타정 장애가 나타나지 않았음을 확인하였다.
- 또한, 경도 측정 시 목표하는 경도 범위인 8-12 kp 내에 적합하게 드는 것으로 확인하였다.

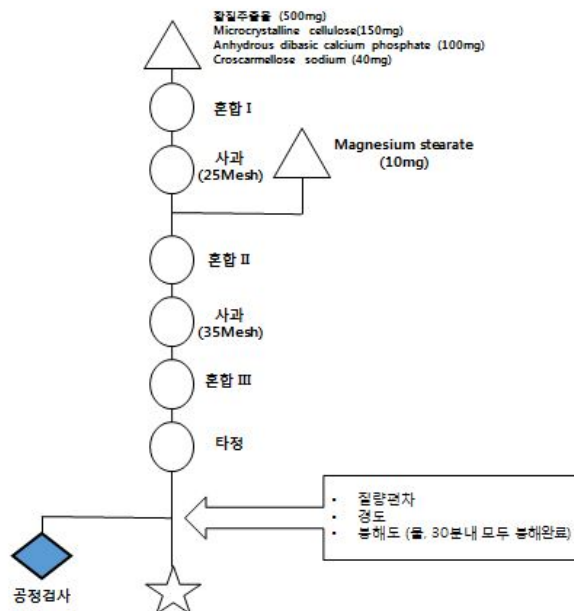


Capping 현상이 개선된 성상

- 결과적으로 부형제를 첨가하여 타정 장애를 개선할 수 있었다.

(3) 제조 공정 상세 확인

(가) 최종 제형에 따른 제조 공정도



(나) 공정 중요도

| 품질 특성 영향 | 성상 | 붕해 시험 | 질량 편차 시험 | 확인시험 | 함량시험 |
|----------|----|-------|----------|------|------|
| 혼합 I     | 낮음 | 낮음    | 낮음       | 낮음   | 낮음   |
| 사과       | 낮음 | 낮음    | 낮음       | 낮음   | 낮음   |
| 혼합 II    | 중간 | 낮음    | 낮음       | 낮음   | 중간   |
| 사과       | 낮음 | 낮음    | 낮음       | 낮음   | 낮음   |
| 타정       | 낮음 | 낮음    | 낮음       | 낮음   | 낮음   |

· 임상시험약에 사용한 원물을 이용한 유효성분 확인시험

- 임상시험약에 사용한 원물을 이용한 α18-298A, α18-298에 대하여 유효성분을 분석하였음.  
(α18-298A : powder type, α18-298 : solution type)

(1) 수분함량 측정

(가) 일회용 스포이드를 weighing dish에 올려 영점을 잡은 후, powder type인 α18-298A샘플을 280-300mg 취하여 칼피서 기계에 투입하였음.

(나) 스포이드에 남은 잔량을 칭량하여 첨가된 샘플의 양을 계산하였음.

\* 위 측정을 3회 실시하였음.

- 결과 : α18-298A 샘플에는 2.99% (n=3) 수분이 함유되어 있음.

|             | 1회   | 2회   | 3회   | 평균   |
|-------------|------|------|------|------|
| 수분함량 결과 (%) | 2.95 | 3.07 | 2.96 | 2.99 |

(2) 유효성분 분석

(가) 분석방법

- ① 원물 추출물 고형분으로서 1g을 취하여 20ml vol. flask에 넣고 메탄올로 일부 넣고 1시간동안 35°C에서 초음파 추출하였으며, 약 10분간 실온에 방치 후 표선하였음.
- ② 위 액을 1시간동안 1,000RPM으로 멀티교반기를 이용하여 교반하였음.
- ③ 이 후, 시험관에 옮겨 담아 10분동안 3,000RPM으로 원심분리하였음.
- ④ 5ml syringe로 상층액을 취하여 0.45um PVDF syringe filter한 액을 검액으로 하였음.

(나) 분석 결과

① 표준액 분석 결과

- Genistin : 13.840 min. Daidzein : 15.691 min. Ellagic acid : 17.994 min. Genistein : 20.240 min 에 분석되었음.

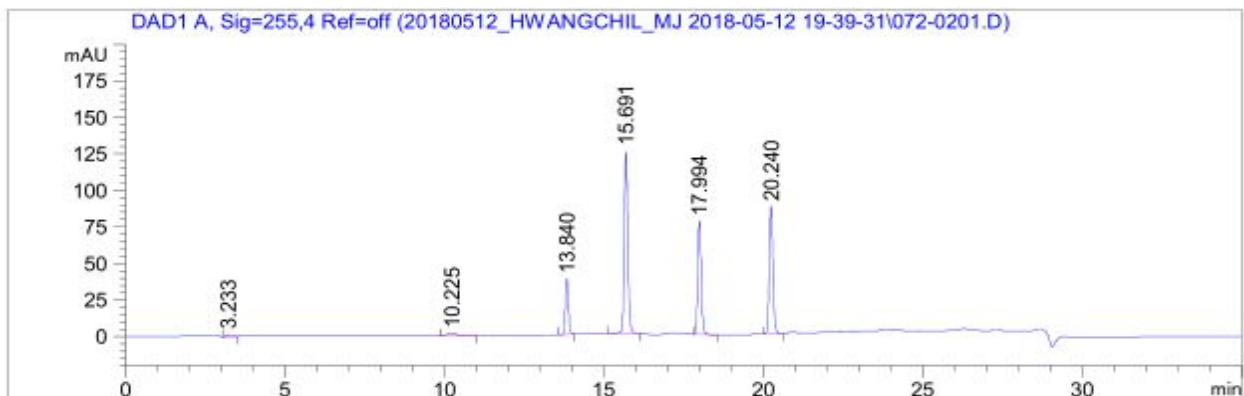


그림 30. Genistin, Daidzein, Genistin, Ellagic acid의 표준액 HPLC 분석데이터

- Rutin : 14.871 min. 에 분석되었음

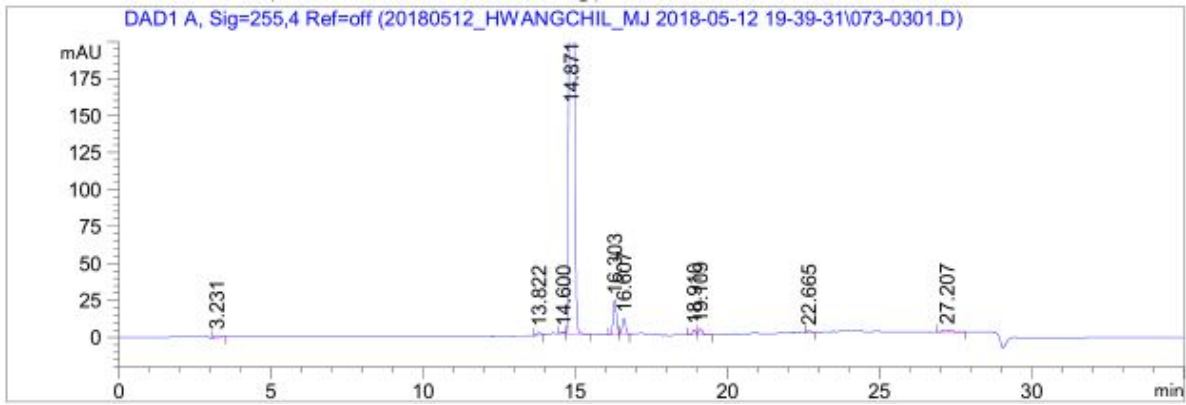


그림 31. Rutin의 표준액 HPLC 분석데이터

② 검액 분석 결과

- 임상시험약에 사용한 원물을 이용한 샘플에 대하여 함량 분석 결과를 확인하였을 때, 본 기준인 'Rutin ; 13mg 이상 함유'기준에 적합함을 확인할 수 있음. 따라서 두 가지 type 모두 원물로서 적합함을 의미할 수 있음.

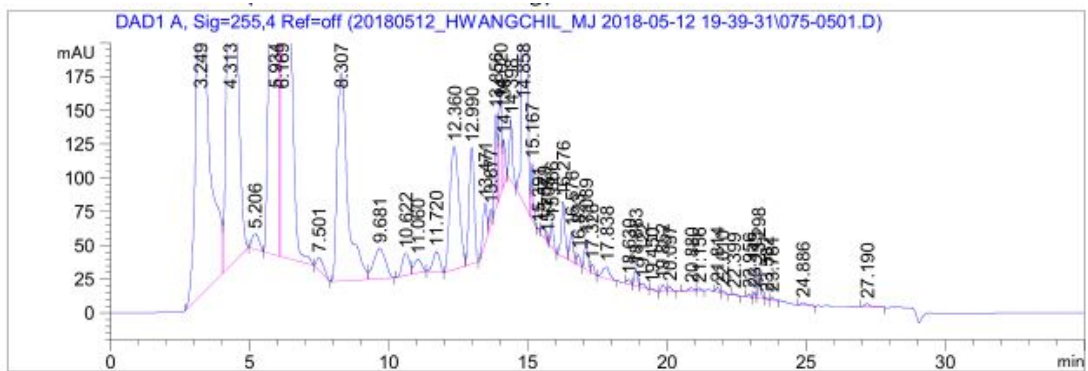


그림 32. α18-298A 검액의 HPLC 분석 데이터

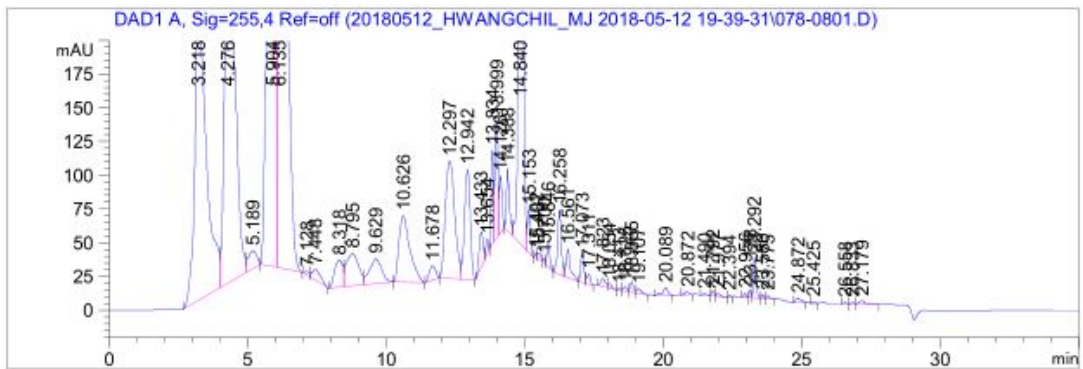


그림 33. α18-298 검액의 HPLC 분석 데이터

- 각 샘플에 대한 유효성분 농도

|          | Rutin (mg/g) | Daidzein (ug/g) | Genistein (ug/g) | Ellagic acid (ug/g) | Genistein (ug/g) |
|----------|--------------|-----------------|------------------|---------------------|------------------|
| α18-298A | 16.31        | 3.45            | 10.61            | 48.70               | 356.57           |
| α18-298  | 16.36        | 2.81            | 22.86            | 23.67               | 336.02           |

. 원료 안정성 시험

- 임상시험약에 사용한 원물을 이용한 분말 타입의 원료 JS-GJ-P-18-004에 대하여 유효성분을 분석하였다.

(1) 보관 조건

(가) 장기보관조건

- JS-GJ-P-18-004 분말 원료를 이용하여, 25°C/60%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음  
- 안정성 평가 기간은 Initial/1/2/3/6개월로 진행하였으며, Initial 2018년 4월에 진행하였음.

(나) 가속보관조건

- JS-GJ-P-18-004 분말 원료를 이용하여, 40°C/75%RH 조건에서 안정성 평가를 하였음  
- 안정성 평가 기간은 Initial/1/2/3/6개월로 진행하였으며, Initial 2018년 4월에 진행하였음.

(2) 시험방법

성 상

- 형광등 아래 흰색 바탕에서 분말 원료를 꺼내어 육안으로 아래와 같이 관찰.



그림 34. 원료의 성상

건조감량

- 105°C조건에서 4시간동안 원료 1g을 건조감량하여 원료 내 고형분 함량을 측정함.

확인시험

- 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크 유지 시간이 동일한지 확인한다.

함량시험

- Rutin의 함량이 13mg 이상을 함유할 시에 적합하다고 판정한다. 시험방법은 하기에 작성된 방법을 따라 분석한다.

1. 표준품 제조

1.1. Rutin

- Rutin 표준품 8mg을 정밀히 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 8ml을 넣은 후, 5분 동안 초음파 추출하여 모두 용해시켰음. 상온에서 약 10분 방치 후, 메탄올로 표선했음.

1.2. Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid

- **표준원액 제조:** 유효성분 각 표준품을 10.0 mg 씩 정밀히 취해 각 100ml 용량플라스크에 넣고 메탄올 80ml을 넣은 후, 5분간 초음파 추출하였음. 상온에서 식힌 후, 메탄올로 표선했음.

- **표준액 제조:** 위 표준원액 1ml을 취해 10ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선했음.

## 2. Spiking test 샘플 제조

- Genistein, Daidzein, Genistin, Ellagic acid가 포함된 표준원액 1ml을 20ml 용량플라스크에 넣고 일부 메탄올을 첨가한 뒤 황칠 분말 원료 1g을 칭량하여 20ml 용량플라스크에 넣었음. 이 후, 35°C에서 1시간 가량 초음파 추출 후 상온에 방치하여 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간 동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 3. 검액 제조

- 각 조건의 검체를 각각의 20ml 용량플라스크에 1g씩 취하여 옮겨담는다. 메탄올을 소량 첨가 후, 흔들어 벽면에 묻지 않도록 하여 주고 35°C에서 1시간동안 초음파 추출을 하였음. 실온 방치 후, 메탄올로 표선하였음. 표선한 용액을 1,000rpm으로 1시간동안 교반 후, 3,000rpm으로 10분간 원심분리를 하였음. 이어 상등액을 취해 0.45um PVDF syringe filter로 필터하여 vial에 옮겨 담았음.

## 4. HPLC 조작법

- 컬럼 : Eclipse plus C18, 5um 4.6 x 250mm
- 파장 : 255 nm (자외부흡광도계)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) 용액
- 이동상 B : 100% Methanol
- 분석시간 : 35분

### < 이동상 Gradient 법 >

| 시간(분) | 이동상 A(%) | 이동상 B(%) |
|-------|----------|----------|
| 0     | 70.0     | 30.0     |
| 8.5   | 65.0     | 35.0     |
| 10.0  | 50.0     | 50.0     |
| 16.0  | 40.0     | 60.0     |
| 20.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.0  | 20.0     | 80.0     |
| 25.1  | 70.0     | 30.0     |
| 35.0  | 70.0     | 30.0     |

### (3) 시험결과

#### (가) 장기보관조건

| 시험 항목 | 기준 | Initial | 1개월차 | 2개월차 | 3개월차 | 6개월차 |
|-------|----|---------|------|------|------|------|
|-------|----|---------|------|------|------|------|



|                 |                                     |              |             |              |              |              |
|-----------------|-------------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 성 상             | ● : 열은 갈색의 분말 타입                    | ●            | ●           | ●            | ●            | ●            |
| 확 인 시 험 (HPLC)  | ● : 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일 | ●            | ●           | ●            | ●            | ●            |
| 함 량 시 험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유     | 적합 (19.02mg) | 적합 (18.8mg) | 적합 (19.35mg) | 적합 (19.01mg) | 적합 (18.77mg) |

- 안정성 분석결과 장기보관조건에서 성상과 Rutin 함량 모두 6개월까지 유의적 변화가 없음을 확인하였음.

(나) 가속보관조건

| 시 험 항 목         | 기 준                                 | Initial      | 1개월차        | 2개월차         | 3개월차         | 6개월차         |
|-----------------|-------------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 성 상             | ● : 열은 갈색의 분말 타입                    | ●            | ●           | ●            | ●            | ●            |
| 확 인 시 험 (HPLC)  | ● : 지표성분 함량시험의 표준액과 검액의 피크유지 시간이 동일 | ●            | ●           | ●            | ●            | ●            |
| 함 량 시 험 (Rutin) | 황칠추출물 1g 당 Rutin으로서 13 mg이상을 함유     | 적합 (19.02mg) | 적합 (18.6mg) | 적합 (18.18mg) | 적합 (19.55mg) | 적합 (20.55mg) |

- 안정성 분석결과 가속보관조건에서 성상과 Rutin 함량 모두 6개월까지 유의적 변화가 없음을 확인하였음.

3. 제 3협동과정 - 순천향대학교

가. 시제품에 대한 임상시험을 통한 안전성 확보 및 효능규명

(1) 임상시험 연구 가설 및 목적

(가) 1차 목적

- 폐경이행기와 폐경기, 그 이후 여성층을 대상으로 하여 단계적으로 개발된 맞춤형 여성갱년기 증후군 개선제의 인체 임상시험(double blind, randomized case control study)을 실시함. 그리하여 항갱년기 활성을 가지는 황칠 추출 분말 건강기능식품의 갱년기 증상 완화의 효능을 규명함.

(나) 2차 목적

- 본 임상시험에서 사용된 건강기능식품의 안전성을 확인하고자함.

(2) 임상시험 연구 대상자의 선정/제외기준, 목표한 대상자의 수 및 산출 근거

(가) 연구 대상자 선정

- 본 임상시험을 진행하기 위하여 폐경 여성 총 70명(군당 35명)을 대상으로 단일기관, 무작위 배정, 이중맹검, 위약대조군의 방법(double blind, randomized case control study)으로 진행함. 본원에 내원하는 폐경 여성을 대상으로 실시하며, 자발적 연구 동의서를 받은 사람에 한해 대상자에 포함시킴. 순천향대학교 부천병원 임상연구심의위원회(IRB)가 이 연구를 승인 후 시행함(IRB 승인번호: SCHBC 2018-06-028-001). 대상자수 산출 근거는 아래와 같음.

### Two-Sample T-Tests Assuming Equal Variance

#### Numeric Results for Two-Sample T-Test Assuming Equal Variance

Alternative Hypothesis:  $\delta \neq 0$

| Power   | N1 | N2 | $\delta$ | $\sigma$ | Alpha | Beta    |
|---------|----|----|----------|----------|-------|---------|
| 0.90027 | 29 | 29 | 13       | 15       | 0.05  | 0.09973 |

#### References

Julious, S. A. 2010. Sample Sizes for Clinical Trials. Chapman & Hall/CRC. Boca Raton, FL.  
 Chow, S.-C., Shao, J., and Wang, H. 2008. Sample Size Calculations in Clinical Research (Second Edition). Chapman & Hall/CRC. Boca Raton, FL.  
 Machin, D., Campbell, M., Fayers, P., and Pinol, A. 1997. Sample Size Tables for Clinical Studies, 2nd Edition. Blackwell Science. Malden, MA.  
 Zar, Jerrold H. 1984. Biostatistical Analysis (Second Edition). Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey

#### Report Definitions

Power is the probability of rejecting a false null hypothesis.  
 N1 and N2 are the number of items sampled from each population.  
 $\delta$  is the difference between population means at which power and sample size calculations are made.  
 $\sigma$  is the assumed population standard deviation for each of the two groups.  
 Alpha is the probability of rejecting a true null hypothesis.  
 Beta is the probability of accepting a false null hypothesis.

#### Summary Statements

Group sample sizes of 29 and 29 achieve 90.027% power to reject the null hypothesis of equal means when the population mean difference is 13.0 with a standard deviation for both groups of 15.0 and with a significance level (alpha) of 0.050 using a two-sided two-sample equal-variance t-test.

| 탈락율(%)      | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
|-------------|----|----|----|----|----|
| 군당 대상자 수(N) | 33 | 35 | 37 | 39 | 42 |
| 총 대상자 수(N)  | 66 | 70 | 74 | 78 | 84 |

→ 탈락율을 15%로 가정하면, 군당 35명 (총 70명)의 대상자가 필요함.

(나) 선정기준 및 제외기준

① 선정기준

- 만 45세 이상의 여성
- 혈청 estradiol농도가 30 pg/mL 미만이면서 FSH농도가 40 mIU/mL 이상인 자
- 12개월간 자발적인 무월경 혹은 자궁절제술을 받았거나 받지 않은 양측 난소절제술 후 6주가 경과한 여성
- 임상시험에 서면으로 동의한 자

② 제외기준

- 심인성 갱년기 장애를 동반한 경우
- 최소 6개월 전에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 피험자
- 심질환(심부전, 협심증, 심근경색)이 있는 피험자
- 조절되지 않는 고혈압 피험자
- 악성종양, 협우각 녹내장 또는 폐질환이 있는 피험자
- 심한 신기능 장애나 간기능 장애가 있는 피험자(혈청 크레아티닌 >2.0 mg/dl, ALT, AST >정상 상한치 x 2.5)
- 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 피험자(정신분열증, 간질, 알코올중독, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)
- 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 피험자
- 최근 3개월 이내에 식욕억제제, 완화제(처방없이) 또는 경구용 스테로이드, 갑상선 호르몬, 암페타민, 사이프로헵타딘, 페노다이아진, 또는 흡수, 대사 배설에 영향을 주는 약물 등과 같이 체중에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 인체시험에 참여한 경험이 있는 피험자
- 체중감량을 위해 외과적 수술을 받은 경험이 있는 피험자(위성형, 장관절제술 등)
- 인체시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 피험자
- 임신부, 수유부 및 가임여성

(3) 임상시험 연구 방법

(가) 임상 시험 절차

- 본 임상시험은 총 12주동안 시험군 또는 대조군의 건강기능식품을 투여받는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림 연구자 주도 임상시험임. 각 대상자에서 치료약물의 복용은 추적 방문시 조사함. 3차 대학병원으로 수준 높은 혈액검사 시스템, 영상 촬영과 판독 시스템을 갖춘순천향대학교 부천병원내에서 임상시험이 진행되었음. 임상시험배상보험을 가입하여 연구 대상자에 대한 보호 대책을 마련함

(나) 무작위 배정 방법

- 본 임상시험에 참여하기로 서면 동의한 대상자는 서면 동의 순서에 따라 스크리닝 번호(Screening No.)를 부여받음. 이후 선정/제외기준을 모두 만족하여 임상시험에 참여하는 것이

최종적으로 적합하다고 판단된 대상자는 무작위 배정표에 의해 시험군 또는 대조군으로 배정됨. 무작위 배정표는 무작위배정 엑셀을 통해 생성하며, 대상자가 각 군에 균형있게 배정되도록 함. 이때 Block의 크기는 층화변수 및 투여군의 수를 고려하여 적절한 크기로 결정함. 시험대상자 번호는 층화구분 및 일련번호의 조합으로 구성되며, 번호별로 임상시험용 건강기능식품과 위약을 포장할 수 있도록 하고, 포장 담당자는 포장된 임상시험용 건강기능식품을 임상시험 시작 전에 임상시험 실시기관 담당자에게 송부함. 담당자는 등록된 대상자에게 배정된 임상시험 제재를 불출함. 연구자 및 연구 대상자는 모두 눈가림 상태가 유지되어야 하며, 임상시험 진행 중 눈가림 해제가 필요한 경우에는 다음 절차를 따름.

#### (다) 눈가림 및 눈가림 해제

- 무작위배정 이중눈가림(이중맹검) 위약비교 연구란 모든 대상자가 연구 대상이 되는 시험군 또는 위약군(대조군)에 무작위로 배정되고 대상자는 물론 연구자도 어느 특정 연구방법이 어느 대상자에게 시행 되었는지 모르게 설정하는 연구방법임.

본 임상시험에서는 12주간의 연구기간동안 대상자와 연구자 모두 어느 대상자가 어떤 제재를 복용하는지 알지 못하도록 제형 및 성상이 동일한 위약을 사용하여 외형상 차이가 관찰되지 않도록 양측 눈가림을 실시함으로써, 안전성 및 유효성 평가에 대한 bias를 방지하게 함. 눈가림을 해제하는 것은 사례별로 고려하며, 심각한 의학적 응급상황이나 치료군에 대한 정보가 대상자의 치료에 영향을 미칠 경우에만 고려함. 연구자 및 의뢰자가 눈가림을 해제할 필요가 있다고 판단한 경우, 의뢰자나 연구자에게 연락을 통해 눈가림 해체에 동의를 얻은 후, 가능한 의뢰자가 눈가림을 해제함. 계획되지 않은 눈가림이 발생한 경우, 눈가림에 대한 기록을 문서화하고 보관함.

#### (라) 임상시험 Flow

##### ① 1차 방문

- 첫 방문은 임상시험 시작 1주일 전 이내에 시행되며, 피험자 서면동의서 취득, 기초 정보, 산과력, 신체 검사, 과거 병력, 생체 징후, 혈액 검사를 시행함.

##### ② 2차 방문

- 두 번째 방문은 첫 번째 방문 시 시행한 검사들이 본 연구의 선정기준에 합당한 대상자만을 대상으로 시행됨. 생체징후, 갱년기 지수(KI, kupperman index), 갱년기 정도 평가 지수(MRS, menopause rating scale), 상태 · 특성 불안 조사(STAI, state-trait anxiety inventory score), 질 성숙지수(VMI, vaginal maturation index) 및 pH검사, 자궁 내막 초음파 검사 등을 시행함.

- 병용 약물을 확인하고 무작위코드 배정하고 그에 따라 건강기능식품을 처방함.

##### ③ 3차 방문 또는 전화 확인

- 세 번째 방문은 실험 시작 6주 후에 시행되며, 생체징후, 신체검사, 이상반응 확인, 순응도 확인을 시행함.

- 이 때, 3차 방문이 용이하지 않은 대상자의 경우 전화 통화로 대체할 수 있음.

④ 4차 방문

- 마지막 방문은 시험 시작 12주 후에 진행되어 생체징후, 혈액 검사, 갱년기 지수(KI, kupperman index), 갱년기 정도 평가 지수(MRS, menopause rating scale), 상태 · 특성 불안 조사(STAI score, state-trait anxiety incentive score), 질 성숙지수(VMI, vaginal maturation index) 및 pH검사, 유방 X선 검사, 자궁 내막 초음파 검사, 이상 반응 확인, 순응도 확인이 진행됨.

표 30. 임상시험 Flow

| 연구일정                          | 1차방문<br>screening | 2차방문<br>투약 시작일 | 3차방문<br>투약 6주후 | 4차방문<br>투약 12주후 |
|-------------------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|
| 서면동의서                         | ●                 |                |                |                 |
| 기초정보조사                        | ●                 |                |                |                 |
| 신체검사                          | ●                 |                | ●              | ●               |
| 병력조사                          | ●                 |                |                |                 |
| 활력징후                          | ●                 |                | ●              | ●               |
| 혈액 검사                         | ●                 |                |                | ●               |
| 병용약물조사                        | ●                 | ●              | ●              | ●               |
| 선정/제외기준확인                     | ●                 |                |                |                 |
| 건강기능식품처방                      |                   | ●              |                |                 |
| 건강기능식품<br>순응도 조사              |                   |                | ●              | ●               |
| 이상사례 평가                       |                   |                | ●              | ●               |
| 설문도구 조사 실시<br>(KI, MRS, STAI) |                   | ●              |                | ●               |
| 질 pH                          |                   | ●              |                | ●               |
| VMI                           |                   | ●              |                | ●               |
| 유방 X-선 검사                     |                   |                |                | ●               |
| 자궁 내막 초음파 검사                  |                   | ●              |                | ●               |

(마) 임상시험에 측정하는 변수(Parameter)

① 기초 검사 및 신체 계측

- 대상자의 나이와 함께 신체검사는 체중(kg), 신장(cm), 활력 징후는 혈압(mmHg), 체온 (°C), 맥박수 (beat/min)가 검사됨.

② 실험실 검사 (Laboratory test)

- 실험실 검사는 혈구 검사로 백혈구, 적혈구, 헤모글로빈 등을 검사하고 화학검사는 혈당, 간기능 수치 검사(Protein, Albumin, AST, ALT, Billirubin), 혈중 지질 수준(중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤), 신장 기능 수치(BUN,

Creatine), 전해질 수치(Na, K, Cl, P, Calcium)등을 측정함.

- 염증 상태 검사로 ESR (erythrocyte sedimentation rate)과 CRP (C-reactive protein) 검사를 시행함.
- 여성 호르몬 검사로 E2 (estradiol), FSH (follicle stimulating hormone)를 검사함.

### ③ 쿠퍼만 지수(KI, kupperman Index)

- 쿠퍼만 지수는 11문항(안면홍조, 진땀, 불면증, 신경과민, 우울증, 현기증, 집중력 저하, 관절통, 두통, 가슴 두근거림, 질 건조감)에 대하여 각각 증상없음(0점), 미약(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 나누어, 안면홍조는 4점의 가중치, 진땀, 불면증, 신경과민은 2점의 가중치, 나머지는 1점의 가중치를 두어 총 최대 51점으로 이루어짐.

### ④ 갱년기 정도 평가지수 (MRS, menopause rating scale)

- MRS는 갱년기 관련 연구에서 사용되는 지표로, 정신증상, 신체증상, 비뇨생식기증상의 3개 영역, 11개 문항으로 구성되어 있으며, 각 문항별로 없음(0점)~매우 심함(4점)까지의 점수가 부여되어 최대점수는 44점임.

### ⑤ 상태-특성 불안 척도 (STAI, state-trait anxiety inventory score)

- 갱년기에 느끼는 우울 및 불안한 증상을 측정하기 위하여 상태-특성 불안 척도를 이용할 예정임. STAI는 불안의 속성을 상태불안과 특성 불안으로 구분하여 측정하며, 임상적으로 불안한 집단과 정신과 환자의 불안을 판별하는 데 유용함. 개인의 고유한 특성이자 '일반적으로 어떻게 느끼는지'에 대해 묻는 특성 불안 문항과 '현재 어떻게 느끼는지'에 초점을 맞춘 상태 불안 문항으로 이루어져 있음.

### ⑥ 질 성숙 지수(VMI, vaginal maturation index) 및 질 pH 측정

- 대상자에게서 채취한 질 분비물을 이용하여 상피 세포의 pH를 측정함.
- 질 성숙지수 검사(VMI)는 대상자에게서 채취된 질 상피 세포들 중 기저결 세포(parabasal cell), 중간 세포(intermediate cell), 표층세포(superficial cell)들이 차지하는 비율을 점수화하는 방법임. VMI는 폐경 후에 감소하는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 폐경으로 인하여 발생할 수 있는 생식기계 변화를 객관화 할 수 있음.
- 방법 1) Pap stain 후 slide (X400) 5 구획 무작위 선정 (비교적 균등해보이는 구획으로 선정함). 2) 한 구획당 세포 갯수 20개씩 총 100개가 되도록 세어서 기저결세포(parabasal cell)/중간세포(intermediate cell)/표층세포(superficial cell)로 배열하여 3명의 독립적인 연구자가 각각 VMI 평가 후 평균 값 매김.

### ⑦ 유방 X-선 검사(Mammography) 측정

- 안전성과 관련하여 내분비 기능에 미치는 영향을 측정하기 위해서 유방 X선 검사를 통한 유방의 영상의학적 소견을 통해 변화가 없음을 확인함. 투약 12주후에 실시한 유방 X-선 검사 결과는 본 연구기관의 영상의학과 전문의의 판독 결과를 토대로 평가하였으며 BI-RADS(Breast Imaging Reporting and Data System)에 의한 분류법으로 결과를 확인함. Category 0부터 6까지로 분류하며 Category 0은 유방 X-선 검사만으로 정보가 불충분하여

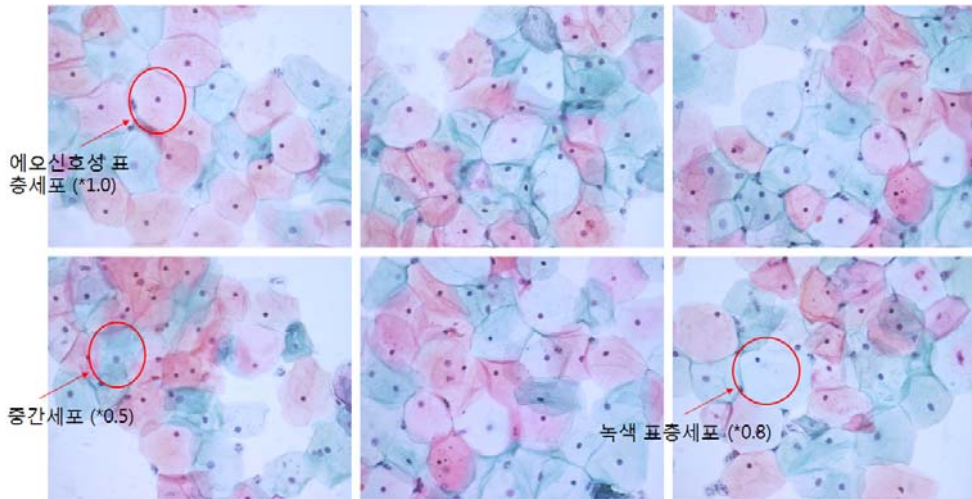


그림 35. (질 성숙 지수) 폐경전 여성의 질 상피 세포  
 추가검사를 필요한 경우이며 Category 1은 음성, Category 2는 양성, Category 3는 높은 확률의 양성질환을 의미함. Category 4부터는 유방암 가능성이 있는 이상 소견을 의미하며 BI-RADS분류법은 아래와 같음.

Category 0: Incomplete - Need additional imaging evaluation and/or prior mammograms for comparison

Category 1 : Negative

Category 2: Benign

Category 3: Probably benign

Category 4: Suspicious

Category4A: Lowsuspicion formalignancy

Category4B: Moderatesuspicion formalignancy

Category4C: Highsuspicion formalignancy

Category 5: Highly suggestive of malignancy

Category 6: Known biopsy-proven malignancy

#### ⑧ 자궁 내막 초음파 검사 측정

- 안전성과 관련하여 내분비 기능에 미치는 영향을 측정하기 위해서 초음파 검사를 통한 자궁내막의 두께 검사를 시행하여 변화가 없음을 확인함.

#### (바) 통계 분석 방법

- 양군간의 연속형 변수의 비교는 정규성 검정 결과에 따라 Student's t test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 비교는 chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용함. 자료의 분석은 SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)으로 시행되며 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미 있는 것으로 봄. 결측이 발생한 변수가 포함된 분석에서 해당 개체는 제외됨.

#### (4) 임상시험 연구 결과

##### (가) 일반사항 및 기본 특성

- 전체 분석 대상자는 총 70명으로 시험군(35명)과 위약군(35명)이며 전체 대상자의 평균 연령은 58.51세이며 연령, 키, 몸무게, 비만도(BMI, body mass index)에서 군별로 유의한 차이는 없었음.
- 전체 대상자의 평균 폐경 기간(월)은 95.30개월, 약 7.94년이었고 두 군간의 유의한 차이는 없었음.
- 산과력(TPLA분류)에서도 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 32. 군별 기본 특성 비교**

| 변수                       | 전체<br>(N=70)  | 시험군<br>(N=35) | 위약군<br>(N=35) | p-value |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| 연령 (세)                   | 58.51 ± 4.99  | 58.83 ± 5.12  | 58.2 ± 4.91   | 0.602   |
| 키 (cm)                   | 154.39 ± 5.93 | 153.65 ± 5.78 | 155.13 ± 6.07 | 0.299   |
| 몸무게 (kg)                 | 58.64 ± 9.52  | 58.01 ± 9.29  | 59.26 ± 9.85  | 0.585   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 24.53 ± 3.24  | 24.48 ± 2.95  | 24.57 ± 3.55  | 0.907   |
| 폐경 기간 (월)                | 95.30 ± 62.11 | 98.89 ± 60.95 | 91.71 ± 63.92 | 0.650   |
| <b>TPAL</b>              |               |               |               |         |
| Term birth               | 2.04 ± 0.71   | 2.11 ± 0.72   | 1.97 ± 0.71   | 0.276   |
| Preterm birth            | 0.11 ± 0.47   | 0.09 ± 0.37   | 0.14 ± 0.55   | 0.645   |
| Abortion                 | 1.30 ± 0.98   | 1.31 ± 0.87   | 1.29 ± 1.10   | 0.714   |
| Number of living child   | 2.11 ± 0.63   | 2.20 ± 0.58   | 2.03 ± 0.66   | 0.218   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.  
BMI, body mass index

(나) 활력 징후 특성 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 수축기(Systolic) 혈압, 이완기(Diastolic) 혈압, 맥박(Pulse), 체온(Temperature)의 평균값은 모두 정상수치를 기록하였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표33. 군별 활력 징후 특성 비교**

| 변수                 | 검사 시기       | 전체<br>(N=70)   | 시험군<br>(N=35)  | 위약군<br>(N=35)  | p-value |
|--------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| Systolic BP (mmHg) | Baseline    | 123.56 ± 17.21 | 125.37 ± 19.29 | 121.74 ± 14.90 | 0.573   |
|                    | 12 weeks    | 121.10 ± 15.15 | 122.29 ± 16.26 | 119.91 ± 14.10 | 0.634   |
|                    | Differences | -2.46 ± 12.59  | -3.09 ± 13.61  | -1.83 ± 11.65  | 0.507   |
| Diatolic BP (mmHg) | Baseline    | 71.61 ± 11.57  | 72.51 ± 11.76  | 70.71 ± 11.47  | 0.519   |
|                    | 12 weeks    | 73.66 ± 11.69  | 75.26 ± 11.74  | 72.06 ± 11.58  | 0.255   |
|                    | Differences | 2.04 ± 11.04   | 2.74 ± 12.77   | 1.34 ± 9.13    | 0.599   |
| Pulse (beat/min)   | Baseline    | 77.93 ± 10.7   | 76.89 ± 11.72  | 78.97 ± 9.63   | 0.438   |
|                    | 12 weeks    | 76.63 ± 8.06   | 75.80 ± 8.63   | 77.46 ± 7.47   | 0.365   |
|                    | Differences | -1.30 ± 9.15   | -1.09 ± 9.48   | -1.51 ± 8.94   | 0.944   |
| Temperature (°C)   | Baseline    | 36.51 ± 0.11   | 36.52 ± 0.07   | 36.51 ± 0.13   | 0.707   |



|             |              |              |              |       |
|-------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 12 weeks    | 36.44 ± 0.10 | 36.43 ± 0.09 | 36.45 ± 0.11 | 0.238 |
| Differences | -0.06 ± 0.15 | -0.06 ± 0.15 | -0.07 ± 0.15 | 0.740 |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

BP, blood pressure

#### (다) 혈구, 염증 검사 결과 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 혈구 검사의 수치인 백혈구(WBC, white blood cell), 적혈구(RBC, red blood cell), 혈색소(Hemoglobin), 적혈구 용적률(Hematocrit), 혈소판(Platelet)의 평균값은 모두 정상수치를 기록하였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었음.
- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 염증을 나타내는 검사의 수치인 적혈구 침강속도(ESR, erythrocyte sedimentation rate), C-반응성 단백질(CRP, C-reactive protein)의 평균값은 모두 정상수치를 기록하였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 34.** 군별 혈구, 염증 검사 결과 비교

| 변수                                      | 검사 시기       | 전체<br>(N=70)   | 시험군<br>(N=35)  | 위약군<br>(N=35)  | p-value |
|---|-------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| WBC Count (10 <sup>6</sup> /uL)         | Baseline    | 6.02 ± 1.48    | 6.17 ± 1.53    | 5.87 ± 1.43    | 0.375   |
|   | 12 weeks    | 6.17 ± 1.50    | 6.09 ± 1.08    | 6.25 ± 1.85    | 0.810   |
|   | Differences | 0.15 ± 1.53    | -0.08 ± 1.32   | 0.38 ± 1.71    | 0.424   |
| RBC Count (10 <sup>6</sup> /uL)         | Baseline    | 4.33 ± 0.33    | 4.36 ± 0.28    | 4.29 ± 0.37    | 0.685   |
|   | 12 weeks    | 4.31 ± 0.32    | 4.34 ± 0.29    | 4.28 ± 0.36    | 0.613   |
|   | Differences | -0.02 ± 0.15   | -0.02 ± 0.16   | -0.01 ± 0.14   | 0.855   |
| Hemoglobin (g/dL)                       | Baseline    | 13.16 ± 0.90   | 13.14 ± 0.82   | 13.19 ± 0.99   | 0.920   |
|   | 12 weeks    | 13.23 ± 0.92   | 13.19 ± 0.88   | 13.27 ± 0.97   | 0.925   |
|   | Differences | 0.07 ± 0.50    | 0.05 ± 0.55    | 0.09 ± 0.46    | 0.995   |
| Hematocrit (%)                          | Baseline    | 39.04 ± 2.46   | 38.97 ± 2.12   | 39.10 ± 2.79   | 0.601   |
|   | 12 weeks    | 38.98 ± 2.43   | 38.88 ± 2.20   | 39.08 ± 2.67   | 0.925   |
|   | Differences | -0.05 ± 1.41   | -0.09 ± 1.50   | -0.02 ± 1.33   | 0.916   |
| Platelet Count<br>(10 <sup>3</sup> /uL) | Baseline    | 242.64 ± 49.69 | 243.89 ± 49.31 | 241.4 ± 50.76  | 0.842   |
|   | 12 weeks    | 252.46 ± 48.59 | 259.06 ± 50.38 | 245.86 ± 46.52 | 0.424   |
|   | Differences | 9.81 ± 24.80   | 15.17 ± 21.95  | 4.46 ± 26.58   | 0.073   |
| ESR (mm/hr)                             | Baseline    | 19.61 ± 16.34  | 24.26 ± 20.07  | 14.97 ± 9.72   | 0.151   |
|   | 12 weeks    | 22.10 ± 18.02  | 26.94 ± 21.99  | 17.26 ± 11.27  | 0.129   |
|   | Differences | 2.49 ± 9.71    | 2.69 ± 11.38   | 2.29 ± 7.87    | 0.796   |
| CRP (mg/dL)                             | Baseline    | 0.14 ± 0.30    | 0.19 ± 0.42    | 0.08 ± 0.05    | 0.384   |
|   | 12 weeks    | 0.13 ± 0.27    | 0.18 ± 0.36    | 0.09 ± 0.11    | 0.620   |
|   | Differences | -0.01 ± 0.12   | -0.01 ± 0.14   | 0.00 ± 0.10    | 0.491   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein

(라) 혈중 지질 수준 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 혈중 지질 수준을 나타내는 수치인 중성지방(TG, triglyceride), 총 콜레스테롤(TC, total cholesterol), 저밀도 콜레스테롤(LDL, low-density lipoprotein cholesterol), 고밀도 콜레스테롤(HDL, high-density lipoprotein cholesterol)의 평균값은 모두 정상수치를 기록하였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 35. 군별 혈중 지질 수준 비교**

| 변수          | 검사 시기       | 전체<br>(N=70)   | 시험군<br>(N=35)  | 위약군<br>(N=35)  | p-value |
|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| TG (mg/dL)  | Baseline    | 123.27 ± 54.85 | 131.46 ± 63.53 | 115.09 ± 43.96 | 0.214   |
|             | 12 weeks    | 118.16 ± 66.42 | 120.31 ± 81.49 | 116.00 ± 48.00 | 0.418   |
|             | Differences | -5.11 ± 56.58  | -11.14 ± 53.91 | 0.91 ± 59.29   | 0.182   |
| TC (mg/dL)  | Baseline    | 207.93 ± 40.23 | 211.11 ± 35.84 | 204.74 ± 44.48 | 0.521   |
|             | 12 weeks    | 197.21 ± 42.06 | 195.37 ± 35.99 | 199.06 ± 47.82 | 0.717   |
|             | Differences | -10.71 ± 25.19 | -15.74 ± 23.38 | -5.69 ± 26.26  | 0.095   |
| LDL (mg/dL) | Baseline    | 123.59 ± 35.09 | 126.86 ± 29.07 | 120.31 ± 40.39 | 0.264   |
|             | 12 weeks    | 114.20 ± 35.80 | 114.80 ± 29.81 | 113.60 ± 41.37 | 0.769   |
|             | Differences | -9.39 ± 21.65  | -12.06 ± 20.47 | -6.71 ± 22.75  | 0.272   |
| HDL (mg/dL) | Baseline    | 56.33 ± 12.56  | 54.83 ± 13.14  | 57.83 ± 11.95  | 0.237   |
|             | 12 weeks    | 58.70 ± 14.77  | 57.06 ± 15.40  | 60.34 ± 14.15  | 0.431   |
|             | Differences | 2.37 ± 5.95    | 2.23 ± 5.28    | 2.51 ± 6.63    | 0.888   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

TG, triglyceride; TC, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; HDL, high-density lipoprotein cholesterol.

(마) 화학 검사 결과 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 간기능 수치 검사(Protein, Albumin, AST, ALT, Billirubin), 신장 기능 수치(BUN, Creatine), 전해질 수치(Na, K, Cl, P, Calcium)의 평균값은 모두 정상수치를 기록하였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 36. 군별 화학 검사 결과 비교**

| 변수              | 검사 시기       | 전체<br>(N=70)   | 시험군<br>(N=35)  | 위약군<br>(N=35)  | p-value |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| Protein (g/dL)  | Baseline    | 7.36 ± 0.37    | 7.45 ± 0.39    | 7.28 ± 0.34    | 0.052   |
|                 | 12 weeks    | 7.33 ± 0.36    | 7.39 ± 0.38    | 7.28 ± 0.35    | 0.214   |
|                 | Differences | -0.03 ± 0.39   | -0.06 ± 0.43   | 0.00 ± 0.36    | 0.507   |
| Albumin (g/dL)  | Baseline    | 4.61 ± 0.20    | 4.58 ± 0.23    | 4.63 ± 0.15    | 0.265   |
|                 | 12 weeks    | 4.57 ± 0.23    | 4.51 ± 0.26    | 4.63 ± 0.19    | 0.072   |
|                 | Differences | -0.03 ± 0.22   | -0.07 ± 0.25   | 0.00 ± 0.17    | 0.358   |
| Glucose (mg/dL) | Baseline    | 107.17 ± 32.97 | 103.89 ± 24.24 | 110.46 ± 39.94 | 0.344   |

|                       |             |               |               |                |       |
|-----------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|-------|
|                       | 12 weeks    | 99.67 ± 12.06 | 98.60 ± 12.22 | 100.74 ± 11.97 | 0.266 |
|                       | Differences | -7.50 ± 36.36 | -5.29 ± 29.55 | -9.71 ± 42.42  | 0.581 |
| BUN (mg/dL)           | Baseline    | 15.53 ± 3.59  | 14.98 ± 3.76  | 16.08 ± 3.39   | 0.272 |
|                       | 12 weeks    | 14.63 ± 3.68  | 14.50 ± 4.01  | 14.75 ± 3.38   | 0.638 |
|                       | Differences | -0.90 ± 3.57  | -0.48 ± 3.68  | -1.32 ± 3.46   | 0.404 |
| Creatine (mg/dL)      | Baseline    | 0.90 ± 0.09   | 0.91 ± 0.08   | 0.89 ± 0.11    | 0.479 |
|                       | 12 weeks    | 0.86 ± 0.11   | 0.86 ± 0.11   | 0.86 ± 0.11    | 0.961 |
|                       | Differences | -0.04 ± 0.09  | -0.04 ± 0.08  | -0.03 ± 0.09   | 0.506 |
| Billirubin (mg/dL)    | Baseline    | 0.72 ± 0.28   | 0.70 ± 0.28   | 0.75 ± 0.28    | 0.394 |
|                       | 12 weeks    | 0.70 ± 0.21   | 0.68 ± 0.21   | 0.72 ± 0.20    | 0.401 |
|                       | Differences | -0.02 ± 0.22  | -0.02 ± 0.23  | -0.03 ± 0.21   | 0.716 |
| AST (IU/L)            | Baseline    | 22.84 ± 5.39  | 21.91 ± 4.29  | 23.77 ± 6.23   | 0.322 |
|                       | 12 weeks    | 22.74 ± 5.47  | 22.17 ± 5.04  | 23.31 ± 5.90   | 0.291 |
|                       | Differences | -0.10 ± 4.36  | 0.26 ± 4.43   | -0.46 ± 4.33   | 0.535 |
| ALT ( IU/L)           | Baseline    | 19.40 ± 7.81  | 17.86 ± 6.36  | 20.94 ± 8.85   | 0.167 |
|                       | 12 weeks    | 19.76 ± 6.66  | 18.4 ± 5.63   | 21.11 ± 7.38   | 0.023 |
|                       | Differences | 0.36 ± 5.09   | 0.54 ± 4.20   | 0.17 ± 5.90    | 0.777 |
| Na (mmol/L)           | Baseline    | 142.49 ± 1.73 | 142.51 ± 1.85 | 142.46 ± 1.62  | 0.811 |
|                       | 12 weeks    | 141.79 ± 1.47 | 141.57 ± 1.42 | 142.00 ± 1.51  | 0.157 |
|                       | Differences | -0.70 ± 1.82  | -0.94 ± 1.95  | -0.46 ± 1.67   | 0.222 |
| K (mmol/L)            | Baseline    | 4.32 ± 0.43   | 4.30 ± 0.52   | 4.35 ± 0.33    | 0.252 |
|                       | 12 weeks    | 4.28 ± 0.33   | 4.31 ± 0.33   | 4.26 ± 0.34    | 0.559 |
|                       | Differences | -0.04 ± 0.47  | 0.01 ± 0.59   | -0.09 ± 0.30   | 0.096 |
| Cl (mmol/L)           | Baseline    | 104.17 ± 1.97 | 104.31 ± 2.10 | 104.03 ± 1.85  | 0.450 |
|                       | 12 weeks    | 103.74 ± 1.59 | 103.63 ± 1.70 | 103.86 ± 1.48  | 0.832 |
|                       | Differences | -0.43 ± 1.92  | -0.69 ± 1.88  | -0.17 ± 1.95   | 0.272 |
| P (mg/dL)             | Baseline    | 3.91 ± 0.46   | 3.88 ± 0.33   | 3.94 ± 0.56    | 0.791 |
|                       | 12 weeks    | 3.85 ± 0.33   | 3.89 ± 0.32   | 3.81 ± 0.35    | 0.471 |
|                       | Differences | -0.06 ± 0.43  | 0.01 ± 0.34   | -0.14 ± 0.49   | 0.166 |
| Total Calcium (mg/dL) | Baseline    | 9.17 ± 0.32   | 9.16 ± 0.32   | 9.17 ± 0.32    | 0.750 |
|                       | 12 weeks    | 9.09 ± 0.33   | 9.07 ± 0.32   | 9.10 ± 0.34    | 0.411 |
|                       | Differences | -0.08 ± 0.41  | -0.09 ± 0.41  | -0.07 ± 0.41   | 0.759 |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

BUN, blood urea nitrogen; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; P, phosphorus.

#### (바) 화학 검사 결과 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정한 여성 호르몬 E2 (Estradiol)와 FSH(follicle stimulating hormone)의 변화는 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 37.** 군별 여성 호르몬 수치 비교

| 변수 | 검사 시기 | 전체 | 시험군 | 위약군 | p-value |
|----|-------|----|-----|-----|---------|
|----|-------|----|-----|-----|---------|

|                      |             | (N=70)        | (N=35)        | (N=35)        |       |
|----------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| E2 ≥ 10pg/mL (pg/mL) | Baseline    | 4 (5.7%)      | 3 (8.6%)      | 1 (2.9%)      | 0.614 |
|                      | 12 weeks    | 9 (13%)       | 4 (11.4%)     | 5 (14.3%)     | 1.000 |
| FSH (mIU/mL)         | Baseline    | 59.99 ± 21.71 | 60.13 ± 18.56 | 59.86 ± 24.74 | 0.618 |
|                      | 12 weeks    | 58.88 ± 22.50 | 60.52 ± 18.38 | 57.25 ± 26.15 | 0.262 |
|                      | Differences | -1.11 ± 9.58  | 0.39 ± 7.00   | -2.61 ± 11.52 | 0.597 |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

E2, estradiol; FSH, follicle stimulating hormone.

(사) 질 성숙 지수(vaginal maturation index, VMI) 및 질 pH 수치 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 측정된 질 성숙 지수(VMI, vaginal maturation index)와 질 pH의 변화는 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 38.** 군별 질 성숙 지수(vaginal maturation index, VMI) 및 질 pH 수치 비교

| 변수         | 검사 시기       | 전체            | 시험군           | 위약군           | p-value |
|------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------|
|            |             | (N=70)        | (N=35)        | (N=35)        |         |
| Vaginal pH | Baseline    | 6.65 ± 0.52   | 6.66 ± 0.49   | 6.64 ± 0.54   | 0.974   |
|            | 12 weeks    | 6.36 ± 0.53   | 6.43 ± 0.50   | 6.28 ± 0.56   | 0.215   |
|            | Differences | -0.29 ± 0.52  | -0.22 ± 0.43  | -0.35 ± 0.61  | 0.435   |
| VMI        | Baseline    | 60.39 ± 10.65 | 60.24 ± 11.44 | 60.53 ± 9.98  | 0.610   |
|            | 12 weeks    | 61.37 ± 10.03 | 60.53 ± 9.04  | 62.18 ± 10.98 | 0.661   |
|            | Differences | 0.80 ± 7.69   | -0.37 ± 9.69  | 1.98 ± 4.86   | 0.637   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

VMI, Vaginal maturation index

(아) 유방 X-선 검사와 자궁내막 초음파 검사 비교

- 전체 연구 대상자 중에 임상시험 참가 이전에 시기에 상관없이 유방 X-선 검사를 측정한 경우는 총 70명 중에 59명(84.3%), 시험군중에는 27명 (77.1%), 위약군중에는 32명(91.4%)이었으며 모두 정상 소견으로 본인이 알고 있는 상태였음. 12주간에 짧은 본 임상시험의 기간 동안 두 번의 유방 X-선 검사를 시행하는 것이 인체에 안전하다는 의학적 근거가 확실하지 않기 때문에 투약 12주후에만 유방 X-선 검사를 실시함.

- 투약 12주에 각 군별로 Category 0(불충분 판단)에 해당하는 경우는 총 2명(시험군 1명, 위약군 1명)이 있었으며 Category 1(음성 소견)에 해당하는 경우는 전체 32명(45.7%)이었음. Category 2(양성 소견)에 해당하는 경우는 전체 36명(51.4%)였으며 모든 대상자는 투약 12주후 유방 X-선 검사상 악성 이상 소견이 의심되는 경우가 없었음.

- 자궁 내막 초음파 검사 결과 두 군 모두 자궁 내막 두께(Endometrial Thickness)가 감소하였으나 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

**표 38.** 유방 X-선 검사와 자궁내막 초음파 검사 비교

| 변수                    | 검사 시기           | 전체<br>(N=70) | 시험군<br>(N=35) | 위약군<br>(N=35) | p-value |
|-----------------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------|
| Endometrial Thickness | Baseline        | 3.86 ± 1.47  | 4.04 ± 1.48   | 3.68 ± 1.46   | 0.354   |
|                       | 12 weeks        | 3.46 ± 1.47  | 3.34 ± 1.46   | 3.58 ± 1.49   | 0.470   |
|                       | Differences     | -0.40 ± 1.69 | -0.70 ± 1.56  | -0.10 ± 1.78  | 0.212   |
| Mammography 정상        | Before Baseline | 59 (84.3%)   | 27 (77.1%)    | 32 (91.4%)    | 0.188   |
| Category 0            | 12 weeks        | 2 (2.9%)     | 1 (2.9%)      | 1 (2.9%)      | 0.277   |
| Category 1            | 12 weeks        | 32 (45.7%)   | 13 (37.1%)    | 19 (54.3%)    | 0.277   |
| Category 2            | 12 weeks        | 36 (51.4%)   | 21 (60.0%)    | 15 (42.9%)    | 0.277   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

#### (자) 쿠퍼만 지수 등 설문 도구 비교

- 전체 연구 대상자가 투약전, 투약 12주후에 작성한 설문 도구인 갱년기 정도 평가지수 (MRS, menopause rating scale)와 상태-특성 불안 척도 (STAI, state-trait anxiety inventory score)점수는 소폭 감소하였으나 두 군간의 유의한 차이는 없었음.

- 두 군의 쿠퍼만 지수(KI, kupperman index)의 값의 변화는 시험군(-4.83 ± 4.59)이 위약군(-0.57 ± 4.74)보다 유의적으로 감소하여 여성 갱년기 건강에 효과적임을 확인되었음.

**표 39.** 군별 쿠퍼만 지수 등 설문도구 비교

| 변수                         | 검사 시기       | 전체<br>(N=70)  | 시험군<br>(N=35) | 위약군<br>(N=35) | p-value |
|----------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Kupperman index            | Baseline    | 15.84 ± 9.13  | 15.86 ± 8.19  | 15.83 ± 10.10 | 0.751   |
|                            | 12 weeks    | 13.14 ± 8.46  | 11.03 ± 7.73  | 15.26 ± 8.73  | 0.054   |
|                            | Differences | -2.70 ± 5.10  | -4.83 ± 4.59  | -0.57 ± 4.74  | <0.001  |
| MRS                        | Baseline    | 11.4 ± 7.43   | 11.09 ± 7.13  | 11.71 ± 7.80  | 0.828   |
|                            | 12 weeks    | 7.97 ± 6.05   | 7.31 ± 5.53   | 8.63 ± 6.54   | 0.575   |
|                            | Differences | -3.43 ± 4.67  | -3.77 ± 4.12  | -3.09 ± 5.19  | 0.198   |
| STAI Score<br>(1) STAI-X-1 | Baseline    | 41.71 ± 11.09 | 39.43 ± 11.10 | 44.00 ± 10.75 | 0.099   |
|                            | 12 weeks    | 39.91 ± 10.49 | 40.17 ± 11.81 | 39.66 ± 9.16  | 0.962   |
|                            | Differences | -1.80 ± 8.79  | 0.74 ± 9.41   | -4.34 ± 7.40  | 0.057   |
| (2) STAI-X-2               | Baseline    | 39.93 ± 11.41 | 37.66 ± 11.85 | 42.20 ± 10.65 | 0.079   |
|                            | 12 weeks    | 37.76 ± 9.74  | 37.06 ± 10.36 | 38.46 ± 9.18  | 0.477   |
|                            | Differences | -2.17 ± 6.94  | -0.60 ± 6.70  | -3.74 ± 6.90  | 0.352   |

데이터는 연속형 변수의 경우 평균과 표준편차로, 범주형 변수의 경우 빈도와 백분율로 표기하였음.

P-value는 연속형 변수의 경우 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test로, 범주형 변수의 경우 Fisher's exact test로 도출되었음.

KI, kupperman index; MRS, menopause rating scale; STAI, state-trait anxiety inventory score

## 나. 임상시험 결과 고찰

- 황칠 추출물을 이용한 임상시험의 결과 시험군과 위약군에서 기본특성, 신체 계측 및 혈액검사(혈구검사, 화학검사, 여성호르몬)를 분석한 결과 두 군간에 유의한 차이가 없었음. 또한 안전성 확인을 위한 유방 X-선 검사와 자궁내막 초음파 검사 결과도 두 군간에 유의한 차이가 없었음. 설문 도구 중에 쿠퍼만 지수의 경우 시험군과 위약군 모두 투약전과 투약 12주후 변화량이 감소하는 경향을 보였으나 시험군이 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었음 ( $p < 0.001$ ).
- 초기 스크리닝 단계에서 6명이 탈락하였으나 선정 기준에서 벗어난 경우(4명)와 투약전 몸 상태 이상(간수치 상승, 컨디션 난조 각 1명)인 경우였으며 시험군과 위약군에게 투약을 시작한 이후에는 탈락한 대상자가 없었음. 시험군과 위약군에서 투약후 발생한 부작용은 가려움(3건), 두통(1건), 소화장애(5건), 열감(1건)이 발생했으나 두 군간에 유의한 차이는 없었고 자연 호전되었음.
- 전체적으로 황칠 추출물을 이용한 임상시험의 결과 대상자에게 유해한 영향을 미치지 않았음을 확인하여 안전성을 확보하였으며 쿠퍼만 지수의 변화를 통해 황칠 추출물의 갱년기 증상 완화 효능 관계 규명하였다고 사료됨.

### 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 제 1 절 세부과제별 목표 달성도

| 구분<br>(연도)     | 세부과제명   | 세부연구목표  | 비중<br>(%) | 달성도<br>(%) | 자체평가   |
|----------------|---|---|-----------|------------|--|
| 1차년도<br>(2016) | [주관기관]<br>산지별/채취시기별<br>황칠나무 추출물 확보  | 황칠나무 산지 조사와<br>재배단지별/채취시기<br>별 황칠 추출물 확보            | 60        | 100        | 산지에 따른 지표성분 및<br>유효성 평가를 위하여 장흥,<br>해남 제주에서 재배된<br>황칠나무추출물을<br>확보하였으며, 지표성분과<br>유효성을 비교하였음.<br>황칠나무에 대한 자료조사 후<br>3~8월 시기에는 황칠나무의<br>약리효능이 없음을<br>확인하였고, 약리적 효능이<br>좋아지는 9~2월에 채취함.<br>장흥황칠다담과의 협업으로<br>자체적으로 진행한 연구결과에<br>따르면, 9~2월의 채취시기별로<br>약효에는 큰 차이가 없음을<br>확인하였음. |
|                | [주관기관]<br>원료 제조공정 개발<br>및 생산 공정 개발  | 황칠나무추출물과<br>말토덱스트린의<br>혼합비율 개발                      | 10        | 100        | 장흥 및 제주 진액과<br>말토덱스트린 비율(2:1 / 3:1)<br>로 분말화 된 샘플로<br>지표성분을 분석한 결과,<br>추출물내 유효성분 및<br>지표성분의 함량이 매우<br>적음을 확인하였음.   |
|                |   | 황칠나무추출물의<br>분말화 공정 개발                               | 30        | 80         | 말토덱스트린을 함유하여<br>분말화 공정을 진행하였지만,<br>진액에 비해서 말토덱스트린을<br>함유하는 분말에서 유효성분의<br>함량이 낮음을 확인하였음.<br>분말화 공정에 대하여 추가<br>개발이 필요하였음.  |
|                | [제1협동과정]<br>황칠나무추출물<br>원료의<br>기능/지표성분 선정<br>및 품질 기준확립을<br>통한 안전한 제형<br>개발 | 황칠나무추출물의<br>성분 분석 및<br>지표성분 선정과<br>원료특성 평가 및<br>표준화 | 50        | 70         | 산지별 분석은 하였으나,<br>유효성분의 농도가 매우 낮고,<br>지표성을 나타내는 분석연구가<br>더 필요하다고 사료되었음.   |
|                |   | 지표(기능)성분과<br>유해물질의 규격 및<br>시험방법 설정                  | 50        | 70         | 유효성분에 대한 농도가 낮아<br>지표성분으로서 적합하지 않아<br>추가 연구가 필요하였음.  |
|                | [제2협동과정]<br>황칠나무추출물의<br>항개년기 효능 및<br>분자적 작용기전 규명                          | 시험물질의<br>에스트로겐수용체<br>(ER)을 매개로 하는<br>에스트로겐표적유전      | 60        | 100        | 에스트로겐활성 활성을<br>지니는 황칠나무추출물의<br>수용체 아형 및 조직세포주<br>선택적인 활성의 분자적기작을<br>규명함으로써, 효능 및   |

|             |  |  |    |     |  |
|-------------|--|--|----|-----|--|
|             |  | <p>자의 전사활성을 Luciferase reporter assay를 이용하여 정량적으로 평가</p>   |    |     | <p>분자표적을 밝히는데 기여하였음.</p>   |
|             |  | <p>시험물질의 세포기반 독성 및 암예방 활성을 MTT dye를 이용한 assay를 이용하여 평가</p> | 40 | 100 | <p>세포기반에서 황칠나무추출물의 안전성 밝히는데 기여하였음.</p>   |
| 2차년도 (2017) | [주관기관]<br>황칠나무추출물의 생산 제조 공정 최적화 (원료 표준화)       | <p>황칠나무 산지 재조사와 재배단지별/채취시기 별 황칠 추출물 재확보</p>                | 30 | 100 | <p>제조업체의 생산 시설의 개별 평가 시 매우 낙후되어, 기존 시험했던 산지를 다시 초기화하고, 강진/해남/제주/장흥 원물만을 확보하여 제조설비를 확보한 곳에 추출액(농축액)생산 의뢰하였으며, 1차년도에 미진한 연구 대비 2차년도에는 산지가 최종적으로 확보 되었다고 판단하여 목표달성을 하였다고 평가됨.</p> |
|             |  | <p>황칠나무 추출액(농축액) 그리고 분말 제조공정 개발</p>                        | 20 | 80  | <p>추출액(농축액)내 고형분 농도별로 지표성분을 평가하였으며, 추출액으로서의 농도 설정을 진행하였음. 보관 및 안정성의 이슈로 분말화공정 개발하였음. 최종제형에 대하여 선정이 지연되었으므로 목표대비 80%로 평가됨.</p>  |
|             |  | <p>황칠나무 추출액(농축액)의 생산 제조 공정 최적화</p>                         | 20 | 80  | <p>추출액(농축액) 생산공정은 최적화 되었으나, 추출분말의 공정에 대하여 추가 연구가 필요하여 80%로 평가하였음.</p>  |
|             | [주관기관]<br>황칠나무추출물의 인체적용시험용 제품 제조               | <p>인체적용시험 황칠추출분말 제조</p>                                    | 10 | 60  | <p>인체적용시험을 위하여 산지를 확보하였으나, 12월 식품의약품안전처 모듬토의 후 인체적용시험에 대한 가이드라인 변경이 있을 예정이므로, 가이드라인이 2018년 3월에 개정될 예정으로 인체적용시험이 지연되었으며, 3차년도에서 시행하였음.</p>                                      |
|             | [주관기관]<br>황칠나무추출물 (원료)를 함유한 건강기능성 제품의 설계(복합제제) | <p>황칠추출물 완제품 적용</p>  | 20 | 80  | <p>황칠추출물(분말)을 이용하여 건강기능식품 부원료 적용하였으며, 황칠추출액(농축액)을</p>  |



|  |  |     |     |   |                           |
|--|--|-----|-----|---|---------------------------|
|  |  |     |     |   | 이용하여 건강기능식품 및 일반식품 적용하였음. |
| [제 1 협동 과정]<br>황칠추출물의 원료특성 연구, 지표성분 발굴, 품질기준 및 시험방법 개발, 원료 규격화, 제형 개발 및 안정성 평가 | 효능관련 유효성분에 대한 추가 발굴 및 분석법 개발 / 동시정량법 확립                          | 30  | 80  | 시험방법벨리데이션을 통하여 유효서분 3종에 대해서는 분석방법의 유효성을 평가하였으나, 지표성분으로 설정한 rutin에 대해서는 시험방법 벨리데이션 진행을 3차년도로 미뤄진바가 있어 80%로 평가하였음             |                           |
|  | 원료의 기준 및 유해물질규격 시험방법 개발  | 20  | 80  | 지표성분의 기분을 평균함량 80~120%로 해야하나 정확한 기준을 설정이 없음.  |                           |
|  | 인체적용시험 제형 설계연구   | 20  | 60  | 가이드라인 개정으로인하여 인체적용시험이 지연되었음.  |                           |
|  | 복합제형 연구  | 10  | 70  | 복합제로서의 연구가 되어있지 않지만, 다양한 제형 종류를 나타내었음.  |                           |
|  | 제형의 기준 및 시험방법 개발   | 20  | 90  | 제형 기준 및 시험방법은 개발하였음.  |                           |
| [제2협동과정]<br>황칠나무추출물의 항갱년기 효능 및 분자적 작용기전 규명                                     | 황칠나무추출물의 활성성분에 대한 에스트로겐성 및 프로게스테론성평가                             | 30  | 100 | 산지 및 추출조건 등에 따라 얻어진 여러 종류의 황칠나무추출물 및 개별활성물질 (rutin, chlorogenic acid, quercetin)의 에스트로겐성을 세포수준에서 평가하고, 개발후보시료를 선정하는데 기여하였음. |                           |
|  | 황칠나무추출물의 <i>in vivo</i> 에스트로겐성 평가                                | 40  | 100 | 난소적제랫드 <i>in vivo</i> 모델에서 시료의 에스트로겐성을 성공적으로 평가하여 개발후보시료의 생물학적 활성을 확인하는데 기여하였음.   |                           |
|  | 황칠나무추출물의 개별성분 활성평가 및 항갱년기 효과의 분자적 기작 규명                          | 30  | 80  | 에스트로겐활성 활성을 지니는 황칠나무추출물의 수용체 아형 및 조직세포주 선택적인 활성의 분자적기작을 규명함으로써, 황칠나무추출물의 효능 및 안전성 발현의 분자표적을 밝히는데 기여하였음.                     |                           |
| [제 3협동과정]<br>항갱년기 활성을 가지는 황칠나무추출물의 시제품 제작 및 안전성/효능 규명, 심도있는 임상시험 수행            | 예비 임상시험(Pilot study)을 통한 본 임상시험 타당성 검토 및 다양한 매체를 통한 갱년기 연구대상자 모집 | 100 | 30  | 2차년도 황칠 추출물의 <i>in vitro</i> , 동물 모델에서의 효능 및 안정성을 확인하였음. 이를 바탕으로 임상시험 계획을 세우고 임상연구심의위원회(IRB) 심의 신청함. IRB 시정 사항을             |                           |

|                         |   |                                 |    |     |  |
|-------------------------|---|---------------------------------|----|-----|--|
|                         |   |                                 |    |     | 보안하여 재심의 신청함.  |
| 3차년도<br>(2018~<br>2019) | [주관기관]<br>황칠나무추출물 대량<br>제조/생산에 대하여<br>제조공정 표준화 및<br>개별인정형 원료 신청 | 황칠추출분말<br>제조공정 표준화              | 30 | 100 | 제조공정 별 수율을<br>확인하였으며, 지표성분을<br>확인하였음.<br>시험생산, Pilot생산 및<br>대량생산에서 지표성분의 함량<br>변화가 적음을 확인하였으며,<br>황칠추출분말 제조공정을<br>표준화 하였음.                                 |
|                         |   | 인체적용시험을<br>위하여 제형 개발            | 20 | 100 | 추가 동물실험을 통하여<br>인체적용 시 적용할<br>유효농도를 설정하였으며,<br>인체적용시험 시 플라시보군과<br>시험약의 제형적 차이를<br>줄이고자 캡슐로 충전하여<br>진행하였음.  |
|                         |   | 해외특허 출원                         | 10 | 100 | 중국 및 미국에 PCT출원으로<br>개별 국가 특허청에 출원 및<br>심사 단계에 있음.  |
|                         |   | 황칠추출분말(원료)의<br>개별인정형 신청         | 30 | 70  | 인체적용시험 보고서 및<br>전임상시험에 대한 논문이<br>확보가 지연됨에 따라<br>연구종료기간에 신청접수를<br>하게 되어, 목표달성도가<br>70%로 부진했다고 보임.   |
|                         |   | 황칠추출분말 원료<br>홍보                 | 5  | 100 | Cphi Korea를 통하여 국내<br>원료를 이용한 연구개발이<br>활발하게 이루어지고 있음을<br>홍보하였으며, 건강기능식품<br>또는 건강식품 제조업체와<br>MOU체결하여 부원료로서<br>사용함으로써 간접적으로<br>제품에 대하여 홍보가 충분히<br>이루어 졌다고 봄. |
|                         |   | 건강기능식품 전문<br>업체와 협업하여<br>완제품 제조 | 5  | 100 | 개별인정형 신청이 완료되지<br>않았기에, 건강기능식품으로서<br>개발은 진행하지 못하였지만,<br>식품으로서 활용하여<br>건강기능식품 제조처와<br>위탁제조계약을 체결하여<br>상품화하여 판매중에 있음.  |
|                         | [제 1협동과정]<br>제형 최적화 및<br>분석방법 확립                                | 건강 기능성 제품의<br>최적 제형 조성 선정       | 20 | 90  | 부형제의 특성 및 제조방법에<br>따른 제형 연구는 충실히<br>이행되었음.   |
|                         |   | 건강 기능성 제품의<br>기준 및 시험법 확립       | 20 | 100 | 분석법에 대하여 시험방법<br>벨리데이션이 진행 되지 않아<br>유효성이 확보되지 않음.  |
|                         |   | 건강기능성 제형<br>안정성 연구              | 30 | 100 | 장기 및 가속안정성 평가를<br>충실히 이행하였음.   |
|                         |   | 제형 생산공정 최적화                     | 30 | 70  | 제형의 제조특성 부형제 특성  |

|                                      |  |    |       |  |   |
|--------------------------------------|--|----|-------|--|---|
|                                      |  |    |       |  | 등에 대하여 연구가 충실히 되어있으나, 제형 공정에서 품질에 영향을 끼치는 공정에서 시험 결과가 없음. |
| [제3협동과정]<br>인체적용시험 효능<br>규명 및 안전성 확보 | 시제품에 대한<br>임상시험을 통한<br>안전성 확보 및<br>효능규명      | 95 | 100   | 임상연구심의위원회(IRB)에서 연구 승인후 연구대상자 70명을 모집하여 총 12주동안의 임상시험을 실시함. 임상 시험 종료 후 결과 분석을 통한 안전성 확보 및 갱년기 증상 완화 효능 관계 규명함. |   |
|                                      | 갱년기 증상완화<br>건강기능식품<br>시제품의 실용화 및<br>홍보 전략 모색 | 5  | 70    | 병원 홍보자료 및 학술 논문 등을 활용하여 시제품의 홍보를 방안을 위한 결과 도출. 여성, 주부 전문지 '베이비뉴스'를 포함한 온라인 매체에 홍보자료 추후 기재 예정                   |   |
|                                      | 합계   |    | 85.15 |  |   |

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

- 황칠의 기능/지표성분의 분석 가능 여부를 확인하였고, 미생물, 중금속 및 잔류용매 안전성을 점검하여 개별인정형 진행에 충족하는 추출분말을 확보하였음.
- 황칠추출분말 제조공정의 표준화 및 기준규격 설정을 통한 품질관리기준을 확립하였음.
- 황칠추출분말의 지표성분인 Rutin은 갱년기 모델 쥐에서 에스트로겐 활성효능을 나타냈으며, 전문적인 제품 개발 목표에 기여할 수 있음.
- 원료표준화 작업을 아울러 전임상 및 인체적용시험으로 생리활성을 평가하여 갱년기증후군 개선 원료 개발을 목표로 하였음.
- 황칠추출분말을 갱년기모델인 난소절제 랫드에서 항갱년기 효능을 혈액검사 및 조직검사를 시행하였으며, 시험 결과 에스트로겐 활성화에 의한 골다공증 개선 효능을 증명하였음.
- 황칠추출분말 생리활성 연구를 통해 중년 여성을 타겟으로하는 건강식품을 개발하였음.
- 황칠추출분말의 인체적용시험으로 효능과 안전성에 대한 과학적 근거가 확보된 우수한 건강 기능제품의 소재를 개발하였음.
- 기존 여성갱년기관련 제품과 비교할 때, 황칠은 국내 자생하는 식물자원으로 해외 의존도가

높은 바이오소재의 한계를 벗어나 국내 농가 소득을 증대하여 국내 경쟁력을 확보할 수 있음.

○ 새로운 고기능성 건강 기능성 제품 수출 증대를 통한 수입대체 효과에 기여 할 수 있음.

○ 기능성 제품 개발업체에 산업정보 및 기반 기술을 제공하고, 황칠 재배 농가와와의 협업을 통한 질적 양적 확대를 가능하게 할 수 있음.

### 제 3 절 목표 미달성 시 원인 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 식품의약품안전처의 “갱년기 여성에 도움을 줌“편 가이드라인의 개정으로 연구가 지연되었으며, 전임상에 대한 논문 및 인체적용시험 보고서 확보가 지연되는 점이 있어, 개별인정형 신청이 지연된 점이 있었음. 현재 순천향대학교 사후 IRB 승인 검토만이 남았으며, 개별인정형 인허가 전문업체인 네오뉴트라(주)와 최종결과보고서 검토 후 개별인정형 신청 예정임. 연구과제가 종료되더라도 개별인정형 원료로 인증을 반드시 이뤄 내어 건강기능제품산업의 발전과 황칠 재배 농가의 소득을 증대하는 데 기여할 것 임.

## 제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 등

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문게재 성과

| 게재<br>연도 | 논문명   | 저자                         |              |   | 학술지명                      | Vol<br>No.         | 국내외<br>구분 | SCI<br>구분 | 과제연관성  |
|----------|---|----------------------------|--------------|---|---------------------------|--------------------|-----------|-----------|--|
|          |   | 주저자                        | 교신저자         | 공동저자  |                           |                    |           |           |  |
| 2017     | The Clinical Effects of <i>Dendropanax morbifera</i> on Postmenopausal Symptoms: review article.                              | 김미진                        | 이해혁          | 박유진,<br>임희숙,<br>김태희,<br>이보라   | 대한폐경학<br>회                | 23(3)              | 국내        | KCI       | 폐경 여성의 증상에 황칠 추출물이 미치는 임상적 영향에 대한 리뷰 논문으로 본과제와 100% 연관됨                      |
| 2017     | Relationship between Serum 25-hydroxy-vitamin D Concentration and Risk of Metabolic Syndrome in Patients with Fatty Liver     | 임희숙                        | 박윤형          | 김태희,<br>이해혁,<br>김순경,<br>이보라   | 대한골대사<br>학회               | 24(4)              | 국내        | KCI       | 평균 57.3세의 폐경기 후 나이의 대상자의 대사증후군과 비타민D에 연관성을 연구한 내용으로 본 과제와 50% 연관됨.           |
| 2019     | Effects of <i>Dendropanax morbifera</i> Leaf Extracts on Postmenopausal Syndrome in Ovariectomized Rats                       | 오가희                        | 오가희          | 오성문,<br>이승식,<br>김지현,<br>오주연,<br>박영준,<br>김주은   | 한국식품<br>과학회               | Vol.<br>51<br>No.4 | 국내        | KCI       | 인체적용시험 제형과 동일하게 황칠추출분말로 난소절제한 랫드에서 골대사 지표 및 에스트로겐 활성 확인하였으므로 본 과제와 100% 연관됨. |
| 2019     | Characterization of Soybean Germinated Embryo Extract as an Estrogen Receptor Subtype-Selective and Tissue-Specific Modulator | Hyesoo Jeong,<br>Jimin Lee | Minsun Chang | Soolin Kim,<br>Sujeong Park,<br>Hwasun Yang,<br>Byoung Ha Ahn,<br>Chang Young Jang. | Journal of Medicinal Food | 22 (2)             | 국외        | SCI       | 에스트로겐수용체 선택적 활성을 나타내는 파이토에스트로겐 함유 식물추출물에 대한 구성성분 및 활성 프로파일에                  |

|  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  | Hyun<br>Cheol<br>Jeong,<br>Sung-Jin<br>Lee, Sun<br>Lim Kim,<br>Woo Duck<br>Seo,<br>Johann<br>Sohn |  |  |  |  | 관한 연구<br>측면에서<br>과제 연관성<br>있음.<br>본 과제<br>기여도 50%. |
|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|

## 2. 지식재산권 성과

| 출원<br>연도 | 특허명  | 출원인                                | 출원국 | 출원번호  | 등록번호                       |
|----------|--|------------------------------------|-----|---|----------------------------|
| 2015     | 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는<br>갱년기 질환 예방 및 치료용 조성물   | 아주대학교<br>산학협력단/<br>제삼바이오잡          | 국내  | 10-2015-0<br>190242                           | 10-1726757<br>(2017.04.07) |
| 2018     | COMPOSITION FOR PREVENTING AND<br>TREATING CLIMACTERIC DISORDER<br>CONTAINING EXTRACTS OF DENDROPANAX<br>MORBIFERA LEV. AS ACTIVE INGREDIENT | Jesambiozam/<br>Ajou<br>university | 미국  | 16066986<br>PCT/KR201<br>6/014652             |                            |
| 2018     | 含有黄漆木提取物作为有效成分的更年期疾病的预<br>防及治疗用组合物   | Jesambiozam/<br>Ajou<br>university | 중국  | CN<br>108463231<br>A<br>PCT/KR201<br>6/014652 |                            |

## 3. 학술회의 발표 성과

| 발표<br>일시       | 발표제목   | 발표자         | 국내외<br>구분 | 학술대회명   | 장소  |
|----------------|--|-------------|-----------|---|---|
| 2016.<br>06.15 | <i>In vitro</i> and <i>Ex vivo</i> Metabolism of PC<br>Extracts in Rat Liver Microsomes  | 정혜수         | 국내        | 2016<br>한국질량분석학<br>회 정기여름<br>학술대회   | 경주 화백<br>컨벤션<br>센터                            |
| 2016.<br>11.01 | Modulation of Hepatic Phase I Drug<br>Metabolizing Enzymes by <i>Opuntia ficus indica</i><br>in Postmenopausal Animal Models             | 김수린         | 국내        | 2016<br>한국식품영양과<br>학회<br>국제심포지엄<br>및<br>정기학술대회  | 제주<br>국제컨벤션<br>센터                             |
| 2017.<br>01.24 | Modulation of Hepatic Phase I and Phase II<br>Drug Metabolizing Enzymes by Soy Isoflavone<br>Concentrate in Postmenopausal Animal Models | 정혜수         | 국외        | 12th<br>International<br>Conference<br>on "Medical,<br>Medicine and<br>Health<br>Sciences"<br>(MMHS- 2017<br>Osaka) | Internatio<br>nal<br>Conventi<br>on<br>Center |
| 2017.<br>04.20 | <i>In vitro</i> Metabolism of Flavonoids in Human<br>and Rat Liver Microsomes  | 정혜수         | 국내        | 2017<br>대한약학회<br>춘계 학술대회  | 충청북도<br>C&V 센터                                |
| 2017.<br>05.13 | <i>Relationship between Physical Activity, Dietary<br/>Quality and Health-related Quality of Life in<br/>Korean Elderly Women</i>        | 변동원,<br>이해혁 | 국외        | 유럽골대사학회<br>ECTS 2017  | 오스트리아<br>잘츠부르크                                |
| 2017.<br>05.18 | Simultaneous determine of ellagic acid,<br>genistein an daidzein in <i>Dendropanax<br/>morbiferus</i> LEV. by HPLC                       | 박진현         | 국내        | 2017<br>한국분석과학회   | 원주  |
| 2017.          | Hepatic metabolism-mediated interaction of   | 김수린         | 국외        | Osaka 18th  | Internatio                                    |

|             |  |     |    |   |                                 |
|-------------|--|-----|----|---|---------------------------------|
| 06.28       | drug and Opuntia ficus indica extract in preclinical postmenopausal models   |     |    | International Conference on "Medical, Medicine and Health Sciences" (MMHS-2017 Osaka) | International Convention Center |
| 2017. 10.19 | Gender-Dependent Drug-Herb Interaction Potential of Soy Isoflavone Concentrate in Rat Model                        | 정혜수 | 국내 | 2017 대한약학회 추학술대회  | 서울 The-K Hotel                  |
| 2017. 10.19 | Selective Estrogen Receptor Modulating Activity of <i>Passiflora incarnata</i> Extract                             | 이지민 | 국내 | 2017 대한약학회 추학술대회  | 서울 The-K Hotel                  |
| 2018. 11.01 | Detoxification of Tebupirimfos in Soil of Korean Ginseng Field by Human Recombinant Glutathione S-transferase M2-2 | 정혜수 | 국내 | 2018년 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회   | 부산 벅스코                          |

#### 4. 인력양성

| No. | 인력양성성명     | 학 위 수 | 인력양성년도 | 인력양성 대상수 |
|-----|------------|-------|--------|----------|
| 1   | 오가희 (제1협동) | 박 사   | 2018   | 1        |
| 2   | 박진현 (제1협동) | 석 사   | 2018   | 1        |
| 3   | 서다운 (제1협동) | 석 사   | 2019   | 1        |
| 4   | 백지혜 (제1협동) | 석 사   | 2019   | 1        |
| 5   | 이지민 (제2협동) | 석 사   | 2017   | 1        |
| 6   | 김수린 (제2협동) | 석 사   | 2017   | 1        |
| 7   | 김연숙 (제3협동) | 석 사   | 2017   | 1        |
| 8   | 박유진 (제3협동) | 석 사   | 2018   | 1        |
| 9   | 이은경 (제3협동) | 석 사   | 2019   | 1        |

#### 5. 고용창출

| No. | 고용인력 | 고용기관명                 | 고용창출일        | 고용형태 |
|-----|------|-----------------------|--------------|------|
| 1   | 임서은  | 올릭스                   | 2017. 10. 24 | 정규직  |
| 2   | 이승식  | 리후헬스케어<br>(구: 제삼바이오잠) | 2017. 09. 04 | 정규직  |
| 3   | 최운낙  | 리후헬스케어<br>(구: 제삼바이오잠) | 2017. 02. 01 | 정규직  |
| 4   | 박진현  | 명인제약                  | 2018. 02. 20 | 정규직  |
| 5   | 오가희  | 리후헬스케어<br>(구: 제삼바이오잠) | 2018. 03. 01 | 정규직  |

#### 6. 홍보성과

| 일시 | 홍보유형 | 홍보내용 | 매체명 | 성과자 |
|----|------|------|-----|-----|
|----|------|------|-----|-----|

|                       |             |   |           |        |
|-----------------------|-------------|---|-----------|--------|
| 2016. 07. 27          | 신문기사        | 농림축산식품부의 '건강기능식품 고부가가치 식품기술개발 사업'을 통하여 여성갱년기 증후군 개선제 개발   | 약업신문      | 리후헬스케어 |
| 2017. 04. 27          | 신문기사        | 황칠추출물을 이용한 여성갱년기 증후군 개선제 개발에 대한 특허 등록 홍보 및 농림축산식품부 고부가가치기술개발 사업에 대한 홍보                          | 프라이مج제    | 리후헬스케어 |
| 2017. 05. 01          | 신문기사        | 황칠추출물에 대한 인체적용시험 홍보 및 특허 등록   | 헤럴드경제     | 리후헬스케어 |
| 2017. 05. 31          | 신문기사        | 제주대학교 산학협력단과 황칠추출물 개발 MOU 체결  | 뉴스핌       | 리후헬스케어 |
| 2017. 07. 06          | 신문기사        | 황칠추출물이 함유된 남성건강식품 신제품 데일리팔팔 출시  | 공감신문      | 리후헬스케어 |
| 2018. 02. 20          | 신문기사        | 황칠추출물이 함유된 남성건강기능식품 '홈런킹' 제품 출시   | 헤럴드경제     | 리후헬스케어 |
| 2018. 08. 28 ~ 08. 30 | Cphi 박람회 전시 | 황칠추출분말의 전임상 효능 평가 후 여성갱년기 증후군에 대한 개선 효능이 있음을 알렸으며, 정부의 지원을 통한 국내 농수산물의 개발이 활발히 이루어지고 있음을 홍보하였음. | 세계제약산업전시회 | 리후헬스케어 |
| 2019. 01. 30          | 신문기사        | 황칠추출 갱년기 개선 특허를 기반으로 신제품 출시   | 메디컬투데이    | 리후헬스케어 |
| 2019. 06. 13          | 신문기사        | 비거트유산균 제조업체와 황칠을이용한 요거트 개발 MOU체결  | 뉴스핌       | 리후헬스케어 |



## 제 2 절 연구개발 성과 활용계획

### 1. 식품의약품안전처 건강기능식품 개별인정형 원료 인정 획득

- 인체적용시험의 지연으로 개별인정원료 신청이 지연되었지만, 황칠추출분말의 추가 동물실험 및 인체적용시험에서의 효능 및 안전성에 대한 충분한 과학적 근거를 통해 건강기능식품 안전 관리 및 식품사업의 발전에 이바지 할 수 있음.
- 사후 IRB 승인 후 개별인정형 인허가 전문업체인 네오뉴트라(주)와 최종 IRB 결과보고서 검토 후 개별인정형 신청 예정.
- 건강기능식품 개별인정원료 신청의 행정처리 기한은 90일로 휴무일 포함 약 5~6개월 소요되어 2020년 상반기 중 인정 승인 완료될 것으로 예상.
- 국내 자생하는 황칠로서 식품의약품안전처의 건강기능식품으로 인정되는 첫 번째 사례가 될 것임 (식품안전나라 건강기능식품 원료별정보에 대하여 검색하였을 때, 황칠에 대하여 기능성 원료 및 개별인정원료로 검색되지 않음).

### 2. 교육 및 홍보 계획

#### 가. 교육

- 주관기관인 리후헬스케어(주)는 건강기능식품 판매업체인 에스엠에프앤비(주)를 자회사로 운영하고 있음. 현재, 국내 대형 건강기능식품 제조업체 및 중소기업 위탁제조업체와 협업하여 다양한 건강기능식품 및 식품 등을 생산하여 판매하고 있음.
- 따라서, 각 유통 채널 및 건강기능식품 제조업체 등을 타겟으로 갱년기증후군 개선 효능을 가지는 황칠추출분말에 대한 이론 및 시험법에 대하여 교육할 예정임.
- 황칠추출분말을 제조하는 업체에게 지표성분의 분석방법에 있어 교육하여 지속적인 품질관리가 가능하도록 할 예정임.

#### 나. 홍보 계획

- 주관기관인 리후헬스케어(주)는 언론홍보 전문업체인 아이러브피알(주) 광고 대행업체와 지속적으로 황칠추출분말에 대한 내용을 홍보하고있음.
- 2019년 8월에 개최하는 세계제약발람회에서도 다시한번 국내·외로 갱년기증후군 개선 효능을 나타내는 황칠추출분말에 대한 전임상 및 인체적용시험의 과학적인 근거내용들을 홍보할 예정임.

### 3. 사업화 전략 구색

#### 가. 체계적인 제품 및 시장 분석

- 현재 갱년기 증상 완화 효능을 가지는 건강기능식품으로는 승마, 대두 (isoflavone) 등 에스트로겐 활성 제품이 대부분이지만, 암유발, 간손상, 질출혈과 같은 부작용에 대한 문제가 지속되고 있음.
- 백수오는 부작용이 없는 항갱년기성 건강기능식품으로 대두되었으나, 최근 백수오 사건에의한 국내 시장 점유율이 줄어들고 있음. 따라서 국내 및 국외 모두 건강기능식품의 안전성의 중요성이 증가하고 있음.
- 본 연구는 “「건강기능식품 공전」제 14조 7항 다. 안전성 자료의 요건 중 섭취 근거 자료는 당해 원료가 안전하다고 판단할 수 있는 역사적 사용 기록 뿐 아니라 제조방법, 용도, 섭취량 등이 기술된 과학적 자료”로 대신할 수 있음. 따라서, 황칠나무 추출물은 역사적 사용이 많으며 기존 간기능

개선제 건강기능식품(유한양행 “내일엔”)으로 이미 출시되어 있으므로 안전성에 대해서는 확보됨.

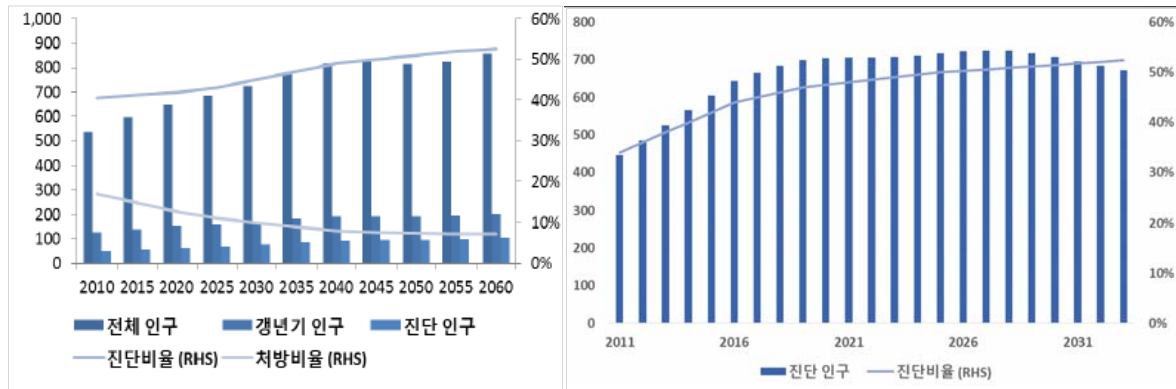


그림. 세계 호르몬 시장 성장 추이 및 갱년기 진단 인구와 비율 전망  
(국가통계포털, SMIC research team)

- 상기 연구결과 성과에 따라 **황칠추출분말은 효능과 안전성에 대한 과학적 근거가 확보된 우수한 건강기능제품의 소재로서, 신뢰할 수 있는 식·의약소재개발의 새로운 모델 제시 및 잠재되어있는 갱년기증상 완화 시장의 활성을 이끌 수 있다고 여겨짐.**

## 나. 개발기술의 산업화 방향 설정

### (1) 황칠원물 확보 계획

- 황칠나무 원료 중장기적 확보를 위하여, 강진/해남/제주 등의 산지 농가의 재배규모 확인 및 신규 재배단지 조성 또한 고려할 계획임.
- 본 연구는 11년생 황칠원물 중 9월 ~ 2월에 재배한 원물을 사용하였으나, 황칠나무 산지/시기(계절) 및 황칠나무 연생별로 지표성분으로 설정한 Rutin의 함량 분석을 통하여 원료의 양적 확보를 할 수 있도록 진행 할 계획임.
- 또한, 현재 잎 70% 및 줄기 30%가 함유된 원물을 사용하고 있는 데, 이는 부피와 중량에 따라 각각 시험 생산하여 지표성분을 측정 할 예정이며, 필요하면 시험관으로서 에스트로겐 활성 시험도 고려 중 임.

### (2) 황칠추출분말 원료사업

- 건강기능식품 개별인정형 원료로 개발되어 국내 및 국외의 대규모 건강기능식품 제조업체에 납품 공급 가능성이 있음.
- 또한, 갱년기증후군 개선 효능을 나타내고, 표준화된 황칠추출분말 제조방법 기술력은 리후헬스케어(주) 독보적이므로, 건강기능식품 제조업체와 제약업체 등 항갱년기 활성의 황칠추출분말의 공급에 독점권이 있음.

### (3) 건강기능식품(완제품) 사업

- 특히 당사는 이미 국내 건강기능식품 대규모 기업과의 협력관계를 유지하고 있어 제품 적용이 용이한 장점이 있음.
- 중소기업 건강기능식품 위탁제조업체에 공급하여 중소 건강기능식품 유통판매업체에 공급 직접 완제품으로 개발하여 국내 홈쇼핑, 대형 유통채널에 공급하며 해외 전시회 등을 통하여 해외 시장에 자체 브랜드로 직접 진출함으로써 수출을 통한 외화획득 가능성이 있음.

#### 4. 과학적 활용계획

##### (1) 논문 및 연구 계획

- 인체적용시험에 대한 연구에 대한 논문 작성 중에 있음.
- Rutin은 황칠만이 가진 성분이 아니지만, 2012년에 게재된 The effect of administration of Rutin on plasma levels of estrogen, prolactin, growth hormone and gene expression of their receptors in mammary glands in ovariectomized rats (Journal of Integrative Agriculture)에 따르면 난소절제랫트에서 에스트로겐 활성효능을 나타냈음을 증명하였고, 황칠열수추출분말 내 rutin의 함량이 가장 많이 존재하므로 갱년기 증상 개선 효능을 나타냈다고 할 수 있다고 판단됨. 추가적으로 개별인정형에 필요할 시 rutin성분과 황칠추출분말을 시험관에서 에스트로겐활성을 평가하는 것을 고려할 계획임.

##### (2) 특허출원

- "황칠추출분말의 폐경기 또는 갱년기여성의 골다공증개선용 조성물 및 이의 제조방법"에 대하여 변리사와 미팅 완료하였고 실시 예 부분에 대하여 작성 후 특허사무소에 송부예정 임.

## 붙임. 참고문헌

1. Ahn KH, Kim SM, Yi KW, Park HT, Shin JH, Kim YT, Hur JY, Kim SH, Lee KW, Kim T. The Effect of Pomegranate on Postmenopausal Syndrome: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Journal of menopausal medicine*. 16: 99-107 (2010a)
2. Ahn KH, Yi KW, Park HT, Shin JH, Hur JY, Kim YT, Kim SH, Lee KW, Kim SH, Bae CS, Kim T. The Effect of Pomegranate on Depression, Anxiety, and Food Intake in Ovariectomized Rats. *Journal of menopausal medicine*. 16(1): 39-45 (2010b)
3. Babaei P, Dastras A, Tehrani BS, Pourali RS. The Effect of Estrogen Replacement Therapy on Visceral Fat, Serum Glucose, Lipid Profiles and Apelin Level in Ovariectomized Rats. *J Menopausal Med*. 23(3): 182-189 (2017)
4. Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *CLIMACTERIC*. 18: 260-269 (2015)
5. Dasom Shin, Seong Bin Hong, Jeong Ho Geum, Jin Yeul Ma, Hwan-Suck Chung. Effects of Schisandrae Fructus on menopause symptoms in ovariectomized mice. 37(3): 39-46 (2016)
6. Jun Koo Yeo, Su Jin Lee, Il Woo Joo, Jung A Kim, Han Jin Oh. Age-related Changes of Serum Bone Turnover Marker (Osteocalcin, Bone Specific Alkaline Phosphatase and Cross-linked C Telopeptides of Type I Collagen) and the Relationship with Bone Mineral Density in Korean Women. 6(1): 43-50 (2008)

## 별첨 1. 자체평가의견서

### I. 연구개발실적

#### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

황칠은 역사적으로 식품 및 건강식품으로 오래 사용되어 왔지만 효능에 대한 기초적인 연구 뿐 현재까지 전문적인 기초 연구와 임상학적인 효능에 대한 연구는 미비하였음. 갱년기 여성의 건강에 도움을 주는 원료가 제한적이었으나, 국내자생 하는 황칠을 이용한 여성갱년기 효능 규명은 국내 농수산 식품사업 발전 및 국민 건강 보전에 크게 기여할 수 있다고 사료 됨.

#### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

국내 자생종인 황칠나무의 추출물을 이용하여 건강기능식품으로 활용함으로써, 국내 자생 천연물을 이용한 산업화가 확대될 것으로 판단되며, 갱년기 여성건강에 도움을 주는 신규 원료 개발로 국내·외 중년 여성 건강을 타겟으로 개발 및 사업시장이 증가할 것으로 판단됨.

#### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

황칠 추출물을 이용한 인체적용시험의 유의적 결과도출로 향후 예방차원의 여성갱년기증후군을 개선하여 중년여성의 삶의 질을 개선할 수 있는 다양한 형태의 제품이 출시되고 시장을 선도할 것임.

#### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

임상 진행시 우수한 결과를 도출하고자 참여기관과 유기적으로 협력하였으며, 개별인정형 신청을 위하여 추가 데이터 확보하고자 추가 전임상시험 (난소절제 랫드에서의 골개선 효능), KCI논문 작성 및 공인인증기관에서의 분석 등 주관기관 자부담으로 진행하여 과제의 연구개발이 성공하도록 적극 노력하였음.

#### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

난소절제 랫드에서 에스트로겐활성 및 골다공증개선의 효능을 확인한 논문은 인체적용시험에서 유의적인 효능을 나타낸 근본자료로 사용될 수 있으며, 그 외 다수의 논문을 출간하였고, 10회 이상의 발표회로 연구팀의 우수성을 확보 국내 특허등록 및 중국 및 미국 PCT출원은 추후 국외시장에 황칠나무에 대한 효능을 알릴 수 있는 발판이 될 것 임.

## II. 연구목표 달성도

: 상기 내용은 제 4장 1절 세부과제별 목표 달성도를 참조로 한다.

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

이전 황칠을 활용한 건강기능식품이 전무한 상태에서 인체적용시험까지 수행하여 유의적 결과를 도출함으로 국내 자생한 황칠의 유용한 활용 범위를 증명함으로써 과제의 성공이 증명되었다고 판단됨.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

백수오 사건 이후 식품의약품안전처의 건강기능식품 개별인정형 원료의 등록이 장기간 유보된 상황과 여성갱년기 인정 평가기준 개정으로 개별인정형 원료 등록을 접수까지만 수행함.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

개별인정형 원료등록을 완료후 여성갱년기 질환의 예방 건강기능식품으로 산업화하여 시장 선도 제품으로 안착시킬 계획임.

## IV. 보안성 검토

해당사항 없음

### 1. 연구책임자의 의견

황칠 재배지역의 한정성으로 양질의 황칠나무를 확보하여 추출물을 제품화 하는 것이 산업화의 첫 번째 조건으로 판단됨.

### 2. 연구기관 자체의 검토결과

개별인정형 원료 등록 후 황칠나무 재배지인 강진, 해남등 남해안 지역과 제주도의 전 산지를 실지 조사 및 샘플 수령으로 기등록된 원료와의 지표물질등 동등성 확인후 제품원료로 사용할 계획임.