

(옆면)

(앞면)

119023-3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004057-01

자근
복합
추출물을
이용한
천연
보존료
개발

자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 개발

최
종
보
고
서

2022. 04. 06

2021

주관연구기관 / 세명대학교
협동연구기관 / (주) 다정

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 개발"(개발기간 : 2019. 05. 20.
~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 06.

주관연구기관명 : 세명대학교 산학협력단 (신용국) (인)
참여기관명 : (주) 다정 (김철중) (인)



주관연구책임자 : 고성권
세부연구책임자 : 김사현
세부연구책임자 : 조순현
참여기관책임자 : 박용주

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

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)			연구개발과제번호		119023-3		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0906	50 %	LB1801	30 %	LB1799	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0201	100 %	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명	%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 개발						
전체 연구개발기간	2019. 05. 20 - 2021. 12. 31(2년 8개월)						
총 연구개발비	총 688,000 천원 (정부지원연구개발비: 516,000 천원, 기관부담연구개발비 : 172,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 신소재 개발				
	전체 내용		(연구내용) 자근 복합 추출물의 추출 조건 최적화, 성분 표준화, 유효성 시험, 항균 현장적용시험, 안전성 시험, 안정성 시험, 제조공정 최적화를 통하여 천연 보존료 소재로 개발하고자 함.				
			(연구방법) - 자근 추출 조건 최적화(1세부, 세명대 바이오식품산업학부) - 시코닌 성분 표준화(3세부, 세명대 바이오제약산업학부) - 시코닌 성분 대량 분리 동정(1세부, 세명대 바이오식품산업학부) - 항균시험 및 작용기전(2세부, 세명대 임상병리학과) - 항진균시험(3세부, 세명대 바이오제약산업학부) - 항균 현장적용시험[1세부, 세명대 바이오식품산업학부] - 안전성 시험(독성시험-단회, 반복, 유전, 4주 DRF)((주)다정, (주)DT&CRO) - 소재의 안정성 시험[1협동, (주)다정] - 소재 제조공정 최적화[1협동, (주)다정]				
			1단계 (해당 시 작성)	목표			
				내용			
n단계 (해당 시 작성)	목표						
	내용						

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)

연구개발성과	구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
	예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	생명 정보	생물 자원	정보	실물
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	1. 천연 보존료 개발로 우리 식품산업 활성화 및 세계화에 기여 2. 천연 보존료 소재 국·내외 산업 선도 3. 글로벌 천연 보존료 시장 진출 및 선점 4. 인류 건강 증진											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	17	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 · 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	자근		복합		추출물		천연		보존료			
영문핵심어 (5개 이내)	Lithospermi Radix		complex		extract		natural		preservative			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	5
1. 소재 개발	7
2. 지표성분 분석법 확립	11
3. 성분 분리 및 현장 적용 시험	20
4. 현장적용시험	25
5. 항균(진균)시험	31
6. 시험 균주 및 후보물질 확정	37
7. 성분 표준화	61
8. 안정성 시험 및 제조공정 최적화	69
9. 제조공정 표준화 및 안전성 시험	87
10. 안전성 시험(위탁연구 결과)	108
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	379
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	388
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도	391
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	392
별첨 자료 (참고 문헌 등)	393


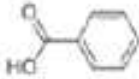
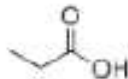
1. 연구개발과제의 개요

○ 국내 소비자들의 의식 수준이 증가하고, 식품에 대한 이해도와 건강증진에 대한 요구와 욕구가 높아짐에 따라 식품의 안전성과 건전성에 대한 요구는 날로 증가하고 있으며, 특히 보존료, 착색료, 발색제 등 식품첨가물을 함유한 식품에 대해 많은 관심을 보이는 추세이다.

○ 식품 등의 보존효과를 높이기 위해 사용되는 주된 보존료는 데히드로초산, 소르빈산, 안식향산 및 그 염류(나트륨 및 칼륨), 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산이소프로필, 파라옥시안식향산부틸, 파라옥시안식향산이소부틸, 프로피온산 등 10여종에 이른다.

○ 각각의 보존료는 식품에 따라 사용기준이 설정되어 있는 품목이 있어 식품별 잔류허용량이 설정되어 있으며, 사용기준이 설정되어있지 않은 식품의 경우 식품의 규격상 검출되어서는 안되고 검출이 된 경우 기준규격 위반으로 판매, 유통, 진열 등이 금지되고 있다.

○ 그러나 많은 연구에서 소르빈산(sorbic acid), 안식향산(benzoic acid), 프로피온산(propionic acid) 등은 다양한 천연 원료에서 자연적으로 함유되어있으며, 식물 등의 발효과정에서 생성된다는 보고가 있어 이를 사용하여 가공한 가공식품에도 천연적으로 존재 또는 발생한 보존료 성분이 가공식품 등에 이행(carry over)되어 잔존하는 경우가 발생한다.

	Sorbic acid	Benzoic acid	Propionic acid
Structure			
CAS No.	110-44-1	65-85-0	79-09-4
Molar mass	112.13 g mol ⁻¹	122.12 g mol ⁻¹	74.08 g mol ⁻¹

○ 현행 식품위생법에 의하면 보존료 사용이 허용되지 않은 식품 등에서 보존료가 검출되는 경우 식품 등의 기준, 규격 위반으로 부적합 판정을 받게 되며, 식품을 제조시 보존료를 첨가하지 않았음에도 보존료가 검출된 경우 식품공전 제 2. 일반식품에 대한 공통기준 및 규격 5. 식품일반의 기준 및 규격 3) 식품첨가물 (2) “어떤 식품에 사용할 수 없는 식품 첨가물이 그 식품첨가물을 사용할 수 있는 원료로부터 유래된 것이라면 원료로부터 이행된 범위 안에서 식품첨가물 사용기준의 제한을 받지 아니할 수 있다.”는 근거에 의하여 이행(carry over)를 인정하고 있으며, 이 경우 사용된 원재료에서의 보존료의 농도 및 배합 비율을 근거로 최종 제품에서의 보존료 허용량을 결정할 수 있다.

○ 또한 식품공전 제 1. 총칙 2. 용어의 풀이 22) “원료에서 유래되는”은 원료가 해당 기준 및 규격에 적합하거나 품질이 양호한 원료에서 불가피하게 유래되었음이 공인된 자료, 문헌으로 입증할 경우 인정할 수 있다. 라는 근거에 의하여 천연적으로 존재하거나 발효 등의 제조과정에 의하여 생성되는 천연유래 보존료에 대한 문헌 등을 제시하고 입증한 경우 검출된 보존료는 제시된

문헌의 농도 내에서 인정되고 있다.

○ 특히, 건강기능식품의 기능성 원료는 동물·식물·미생물 기원의 원재료를 그대로 가공한 것과 그 추출물·정제물, 정제물의 합성물 및 복합물이 모두 포함되는 매우 광범위한 범위를 가진다. 특히, 발효를 하여 제조되는 원료나 천연물 유래의 기능성 원료는 소르빈산(sorbic acid), 안식향산(benzoic acid), 프로피온산(propionic acid) 등이 천연적으로 존재할 가능성이 매우 크므로 해당 원료의 보존료에 대한 천연유래여부 판단의 근거 자료는 매우 시급히 요구되는 자료이다.

○ 식품 등의 보존효과를 높이기 위해 사용되는 주된 보존료 중 소르빈산은 1859년 영국에서 독일 화학자 A. W. Von Hofmann에 의해서 미숙성딸기의 기름으로부터 처음 분리된 이래 미생물 생육 억제에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며, 미생물 포자의 발아와 성장을 억제하여 미생물 세포의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 주요 항균작용 기작을 보면 소르빈산은 미생물 포자의 발아와 성장을 억제하여 미생물 세포의 생성을 막아준다.

○ 또 미생물 세포내산화적 인산화 효소계기능을 저해하여 정상적인 미생물의 생육을 억제한다. 특히 전자전달과 반응을 저해하고 아미노산 흡수를 억제하고 지방산대사 산화물을 축적시켜 미생물의 정상적인 대사를 억제하므로 결국 미생물의 생육이 저해된다. (第8版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 2007) 살균작용은 거의 없으며, 혐기성 포자 형성균과 젖산균에도 효과가 없는 것으로 알려져 있다. 보통 pH가 5.0이하인 경우에는 효과가 있으나 5.0이상인 경우에는 별 효과가 없고 7.0 정도에서는 소르빈산을 많이 첨가한다고 해도 아무 소용이 없게 된다.(지성규, 최신 식품첨가물학)

○ 여러 식물류에 천연으로 존재하는 것으로 알려진 안식향산은 1608년 Blaise de Vigenier에 의해 안식향(*Styrax benzoicum*)중에 존재하는 것이 확인되어, 안식향화(安息香華)라고 명명하였다. 그 후 1771년에 Lichtenberg가 산임을 확인하고, 1875년 항균작용에 관해서 처음으로 알려진 후 1890년 Lueck가 항균작용을 확인하였다.

○ 안식향산의 항균작용은 비해리부분에 따라 결정되어 보통 산성영역에서는 강력한 항균효과를 나타내지만 알칼리성영역에서는 항균력이 낮아 pH는 2.5~4.0사이로 알려져 있으며, 소수성인 안식향산의 비해리부분이 미생물 세포막을 통과하여 세포내의 기질 이동과 산화적 인산화 기능을 억제하거나 세포내의 특이 효소계, 예를 들면 초산대사, 산화적 인산화 등을 억제한다.

○ 또 생육에 필요한 필수 영양분의 세포막 투과를 저해하기 때문에 결국 세포는 영양 고갈 상태를 맞이하게 되어 미생물이 죽게 된다. 산성식품이나 쉽게 산화될 수 있는 식품 등에 사용된다. 곰팡이, 효모 등의 여러 종류의 미생물에 효과가 있으며, 항균범위가 넓은 것으로 알려져 있다. (第8版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 2007)

○ 프로피온산은 식물계에서 유리상태로 존재하는 것은 드물지만, 에스테르로서 정유 등에 널리 분포하고 있다. 또한 다양한 미생물 대사산물로서 발효식품에도 함유된다. 미소, 장유의 정미 및 향기성분의 하나이며, 빵생지, 포도주중에도 존재한다. 버터와 치즈에도 함유되는데, 그 중에서도 스위스치즈에는 1%나 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 효모와 세균 등에 항균작용이 확인되었다. 이 때문에 1940년이후 Miller와 O'Leary 등 많은 연구자들이 식품에 대한 이용을 연구하여, 외국에서는 일찍이 이용되고 있다.

○ 프로피온산은 곰팡이 및 호기성아포균의 발육을 저지하는데, 이 작용은 산형보존료의 특징으로, pH가 낮은 것이 유효하며 pH 조정제로서 제일인산칼슘 또는 유산, 초산 등을 병용하는 경우가 있다.(第8版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 2007)

○ 아질산나트륨은 타액 안에 있는 아민류와 반응해서 발암성이 있는 물질로 변하여 인체에 위해를 줄 수 있고, 소르빈산, 인식향산, 프로피온산은 화학합성품을 식품 보존료로 사용함으로써, 첨가량(소르빈산 0.2%이하, 아질산근 70ppm이하)을 통제하여 허용하고 있음.

○ 따라서, 천연물로서 식품 보존이 가능하고, 천연 착색이 가능한 신소재를 개발하여 공급하는 것은 인류 건강과 안전한 사회 건설의 첩경이라고 할 수 있음

○ 현재 천연 보존료 개발의 일환으로 자몽종자 추출물, 야채분말, 감초 추출물 등을 사용하고자 했으나, 보존 효과 등 여러 가지 문제로 널리 사용되고 있지 않다. 따라서, 안전하고, 항균효능이 우수하며, 천연 착색 대체 소재로도 유용한 천연 보존료 개발이 필요함

○ 특히, 미국 코넬대학의 저명한 영양학자인 콜린 캠벨 교수는 아질산 나트륨이 함유된 소시지 가공 핫도그를 암 미사일이라고 까지 표현하고 인류 건강의 커다란 발암 장애 식품으로 규정하고 있다. 따라서, 천연 보존료 개발은 우리뿐만 아니라, 전세계 인류의 건강을 위해서도 반드시 해결해야 할 과제임에 틀림이 없음

○ 식품은 가공이 완료됨과 동시에 열화가 시작되어 일정시간이 지나면 부패하게 된다. 위생적으로 안전한 시점을 제품별로 설정한 것이 유통기한이다. 유통기한이 경과된 식품은 안전을 위하여 모두 수거 폐기해야 한다. 보관, 수거, 폐기에 따른 환경 문제와 원가 압박이 심화되고 있는 상황에서 보존료의 유효성과 중요성이 재인식되고 있음

○ 식품의 저장성 향상을 위하여 첨가되는 식품첨가물인 보존료는 표기하여야 한다. 특히 인공합성 보존료는 건강위해 논란과 소비자 기피현상이 심화되고 있으며, 대사성 질환과 성인병 예방을 위하여 저염(低鹽) 저당(低糖)화는 더욱 보존성을 어렵게 하고 있음

○ 식품에서 가장 중요한 것은 안전성과 품질이다. 이를 확보하기 위해서는 식품 위생의 기본 -신속처리, 세척, 가열살균, 저온보관을 잘 지키는 것이며, 종합적으로 관리하는 시스템이 HACCP, ISO 22000 등임

○ 현재 식품의 방사선 조사는 미생물의 살균과 살충의 가장 확실한 방법이기도 하나, 국민 정서상 기피되고 있는 것도 현실이다. 방사선조사는 국제적으로 안전성이 입증되었으므로 이에 대한 인식 전환도 필요함

○ 천연물에서 유래된 항균성 물질로는 육가공품의 세균에 의해 생산되는 박테리오신(Bacteriocin), 난백 유래의 효소 리소자임(Lysozyme), 어류의 정소에서 추출한 프로타민(protamine), 유산균이 생산하는 니신(Nisin A), 겨자추출물(알릴 겨자유), 고추 수성추출물, 호프추출물(xanthohumol), 유카추출물(yucca saponin) 등이 있다. 이들은 천연 무독성 방부제 또는 천연 보존료로 표시에 대한 소비자의 저항도 없이 좋은 반응을 얻고 있음

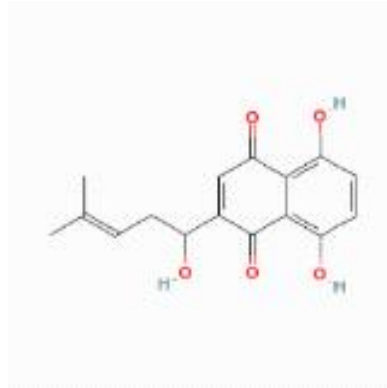
○ 항균성이 우수한 식물이나 한약재에서 기능성 성분을 추출하여 천연 보존료를 개발한다면, 식품의 안전성과 유통기한의 연장에 의한 환경개선과 원가 압박에서 벗어날 수 있는 돌파구가 될

것임

○ 한편, 천연물 중 항균 효능이 가장 우수한 천연물은 나프탈렌(naphthalene), 안트라퀴논(anthraquinone), 나프토크논(naphthoquinone) 유도체라고 하는 것은 여러 논문을 통해서 확인되고 있음.



자근



shikonin

○ 따라서, 본 연구진이 자근으로부터 추출 및 농축, 분획하여 개발중인 LRX compound는 아래 그림에서와 같이 식중독 유발 미생물인 *Bacillus cereus*에 대하여 뛰어난 항균효과를 보임



LRX compound의 항균활성 테스트(*Bacillus cereus*)

○ 위와 같은 천연 소재를 함유하고 있으면서, 식품 안전성이 확보된 천연물로서 나프토크논 유도체인 시코닌(shikonin)을 함유하고 있는 자근(Lithospermi Radix) 복합 추출물을 대상으로 천연 보존료 신소재로 개발하고자 함

○ 위와 같은 연구 필요성에 따라서, 본 연구진은 식품 부패 관련 미생물을 대상으로 우수한 항균 및 항진균작용을 나타내는 자근 복합 추출물 조성물을 개발하였고, 이를 대상으로 자근 추출 조건 최적화, 시코닌 성분 표준화, 시코닌 성분 대량 분리 동정, 항균시험 및 작용기전 연구, 항진균 시험, 항균 현장적용시험, 안전성 시험, 안정성 시험, 제조공정 최적화 시험을 실시하여 특허(출원번호 10-2020-0152300, 출원일 2020.11.13)를 출원하였고, 천연물 식품 보존료 제품 개발을 위하여 참여기업인 (주)다정에서 품목제조보고서를 제작하였고, 제품 생산을 위한 공정계획을 수립하고 있음

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

□ 연구개발 최종목표

- 자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 신소재 개발

□ 연차별 연구개발 수행 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	(주관_1세부) 신소재 개발 및 성분분리분석	<ul style="list-style-type: none"> • 자근 추출물을 이용한 천연보존료 신소재 개발 • 추출조건 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> • 계획수립 및 자료조사 • 물질 스크리닝 • 추출조건 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> • 항균작용 후보 생약 수집 • 자근 추출조건 최적화
	(2세부) 항균시험 및 작 용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> • 항균시험 • (Kirby-Bauer' s disk diffusion test) 	<ul style="list-style-type: none"> • 11종의 균주를 대상으로 16개 후보물질의 항균시험 실시 	<ul style="list-style-type: none"> • 자근 고농도 복합추출물, 솔잎, 등에서 B. cereus 억제대 형성 • 계피 오일이 11종의 모든 시험 균주에서 억제대 형성
	(3세부) 항진균시험 및 성분 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 항진균 활성 검정 	<ul style="list-style-type: none"> • Disk diffusion assay(진균) 	<ul style="list-style-type: none"> • 항진균시험 대상 균주 확보 및 항진균시험 실시 • 우수 소재 선별
	(1협동) 제조공정 표준 화 및 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 제조공정 표준화 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 제조공정 표준화 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 제조 원료 기본정보 분석 (성상, 허가사항 등) • 식품 원료로서 위해성 분석(잔류농약 등)
2차 년도 (2020)	(주관_1세부) 신소재 개발 및 성분분리분석	<ul style="list-style-type: none"> • 지표성분 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC 법을 이용한 다성분(지표성분) 동시분석 방법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 용매별 환류추출 자근 엑스 조제 • 95% 에칠 알코올 초음파 추출 자근 엑스 조제 • HPLC-페놀성 성분 분석
	(2세부) 항균시험 및 작 용기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> • 항균 메커니즘 규명 	<ul style="list-style-type: none"> • Kirby-Bauer' s disk diffusion test • Agar dilution test (Pour plate method) • 3MTM Petri-film test • 항균작용 후보물질 재선정 및 조성 농도 결정 	<ul style="list-style-type: none"> • 13차에 걸친 항균시험을 실시하였으며, 후보물질 5종 및 최종 조성물에 대한 항균활성 시험을 통해 최종 조성물 배합비율 및 농도를 결정함

	(3세부) 항진균시험 및 성분 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분에 대한 분석법을 개발하고 특이성, 정확성, 정밀성, 회수율, 직선성, 시료내 분석물질의 안정성, 감도 등에 대한 analytical method validation 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분 표준화 시험(선택성, 직선성) <ul style="list-style-type: none"> shikonin, β-hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin, deoxy shikonin, isobutyl shikonin, dimethylacryl shikonin, isovaleryl shikonin
	(1협동) 제조공정 표준화 및 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> 원료 표준화 원료 안전성 시험 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 식품의약품안전처 식품원료 등재 확인 위해성분 분석 안정성 확인을 위한 HPLC 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 원료 자근의 정상(규격) 확인 중금속, 잔류농약 분석 결과 확인 온도 안전성 평가(HPLC 결과 확인) 자근 추출물에 대한 pH 안정성 평가(HPLC 결과 확인)
3차 년도 (2021)	(주관_1세부) 성분 분리 및 현장적용시험	<ul style="list-style-type: none"> 기능성분 대량 분리 및 동정 	<ul style="list-style-type: none"> 성분 대량 분리 동정 (Column chromatography법, Preb-LC, HPCPC) 	<ul style="list-style-type: none"> 수가용부의 Diaion column 흡착 H₂O→100% MeOH로 전개 나프토퀴논 분획의 silica gel 및 C18 column 분리, 분광학적인 구조 확인 동정
	(1협동) 제조공정 표준화 및 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> 제조공정 표준화 원료 안전성 시험(위탁연구) 	<ul style="list-style-type: none"> 식품의약품안전처 식품원료 등재 확인 위해성분 분석 원료 안정성 확인을 위한 독성평가 등 외부 전문기관 위탁연구 의뢰 	<ul style="list-style-type: none"> 식품의약품안전처에 식품원료로 등재확인 자근 및 배초향 원료에 대한 위해분석 자근(지치)과 배초향(곽향) 원료에 대한 기준규격 마련 자근복합추출물에 대한 유통기한 설정시험 자근복합추출물 품목제조보고 독성평가 등 원료 안전성 분석

1. 소재 개발

1) 항균작용 후보 생약 수집 및 추출

(1) 항균작용 후보 생약 수집 - 자근, 적하수오, 수영초, 애기수영, 가는잎 조릿대, 솔잎, 오렌지, 귤, 레몬, 자몽, 소자, 소엽, 진피, 청피, 계피, 당근씨를 제천 한약재 시장(인삼당 한약방)에서 구입하였고, 얼룩조릿대는 제주도 한라산에서 채집하여 사용하였다(Fig. 1).

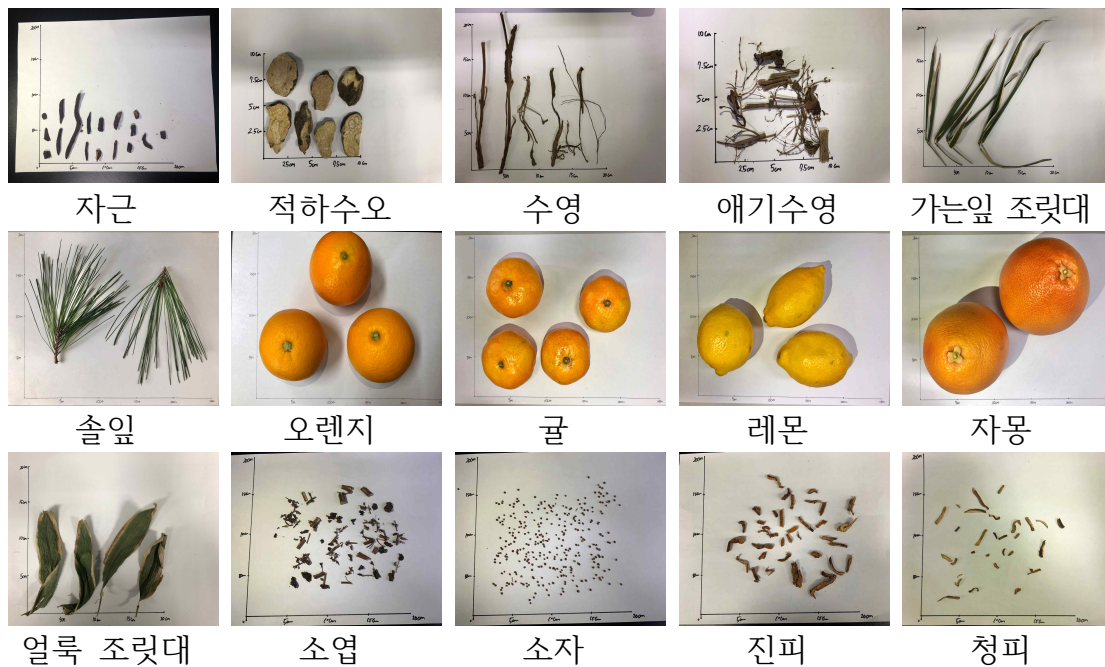


Fig. 1. The photograph of antibacterial herbal medicine.

(2) 95% Ethyl Alcohol 엑스 제조 - 생약 시료(자근, 적하수오, 수영, 애기수영, 가는잎 수영, 얼룩 조릿대) 10g씩에 95% Ethyl Alcohol 250ml를 가하여 수욕상에서 2시간씩 2회 환류추출(70℃ 이하)하여 여과 후 감압 농축하여 95% Ethyl Alcohol 엑스를 얻었다.

(3) Hexane 엑스 제조 - 정유생약 시료(소엽, 소자, 솔잎, 오렌지, 귤, 레몬, 자몽) 10g씩에 Hexane 250ml를 가하여 상온에서 2시간씩 2회 초음파 추출하여 여과 후 감압 농축하여 Hexane 엑스를 얻었다.

Table 1. Extract yield of antibacterial herbal medicine

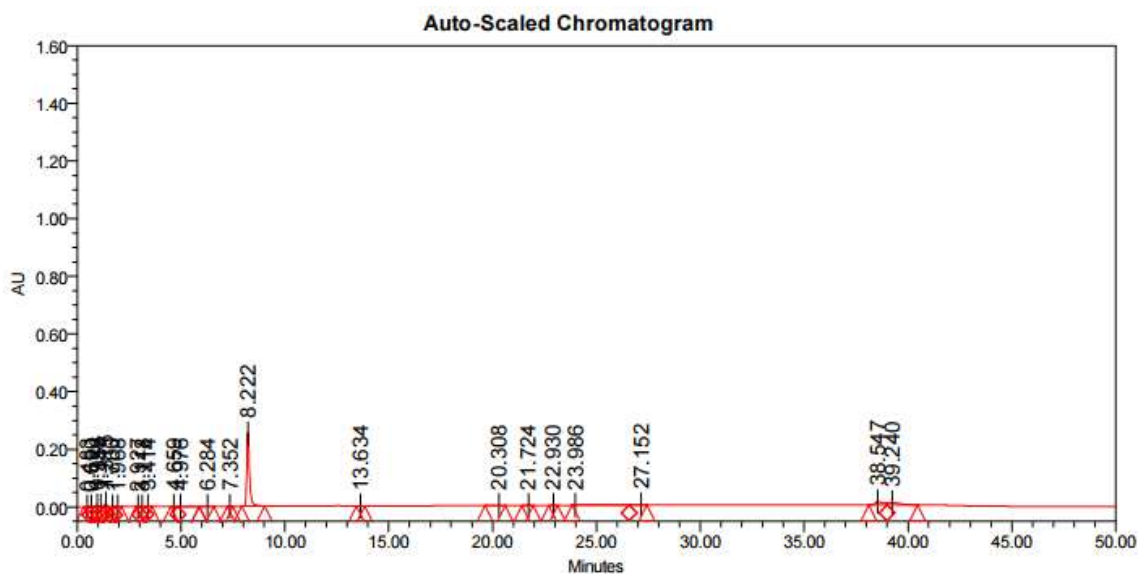
(%,w/w)

Samples	Extract yield (95% Ethyl Alcohol)	Extract yield (Hexane)
자근	24.62	-
수영	18.16	-
애기수영	5.03	-
가는잎 조릿대	3.22	-
얼룩 조릿대	11.36	-
적하수오	15.22	-
솔잎	-	1.58
자몽	-	0.02
오렌지	-	0.02
소자	-	0.42
굴	-	0.02
자소엽	-	0.18
레몬	-	0.03
진피	-	0.61
청피	-	1.49

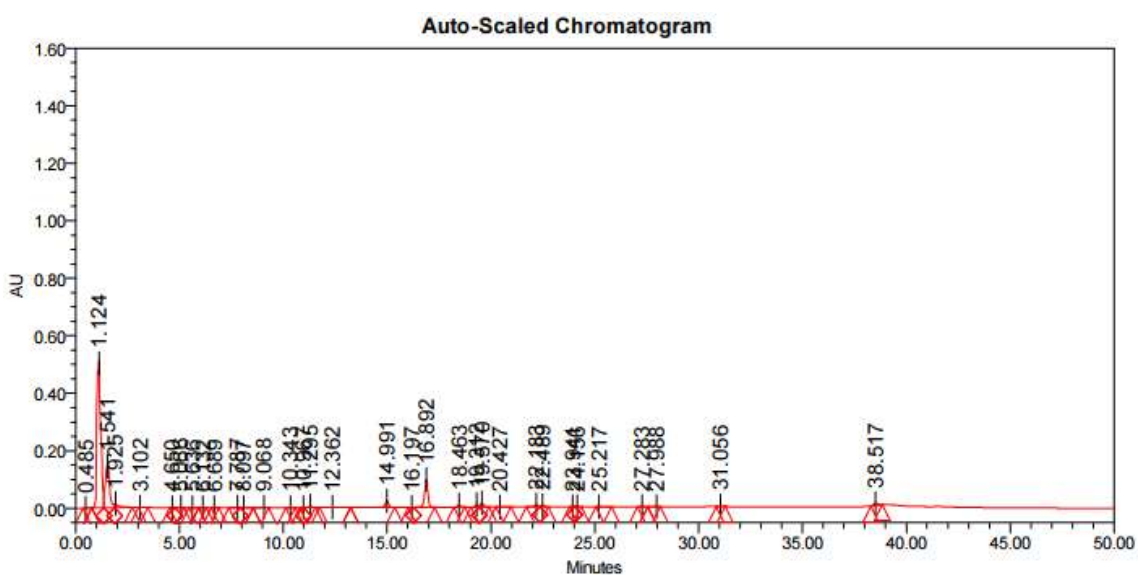
2) 자근 추출조건 최적화

(1) 자근 식초추출 최적화 - 자근을 세절하고, 건조한 시료 각각 500 g씩에 증류수 15 ℓ를 넣고, 100℃에서 1(VL-1), 2(VL-2), 3(VL-3), 4(VL-4), 5(VL-5), 6(VL-6), 7(VL-7), 8(VL-8), 9(VL-9), 10(VL-10), 11(VL-11), 12(VL-12), 13(VL-13), 14(VL-14), 15(VL-15), 16(VL-16), 17(VL-17), 18(VL-18), 19(VL-19), 20(VL-20), 21(VL-21), 22(VL-22), 23(VL-23), 24(VL-24), 36(VL-36), 48(VL-48), 60(VL-60) 그리고 72(VL-72)시간씩 1회 추출하여 여과 후, 동결건조하여 자근 식초 추출 엑스를 얻었다.

(2) 자근 식초추출물의 HPLC 분석 - 위에서 얻은 엑스틀 홍 등의 조건을 응용하여 HPLC 분석을 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 나프토퀴논 유도체의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex(U.S.A.)와 Ambo(Korea)로부터 구입한 순도 99% 이상의 나프토퀴논 유도체를 사용하였다. 사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, U.S.A.)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(3x250 mm; Knauer, Born, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade; Sigma-Aldrich Chem Co., U.S.A.)과 HPLC용 증류수(HPLC급, B&J, U.S.A.)이며, acetonitrile의 비율을 50%에서 100%(25분), 100%(35분)으로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 50%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 UV 디텍터[UV/Vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)]를 이용하여 210nm에서 검출하였다.



(Shikonin)



(VL-1)

Fig. 2. HPLC chromatogram of vinegar processed Lithospermi Radix extract

Table 2. The napthoquinone compounds according to various vinegar extraction conditions of Lithospermi Radix extract

													(%.w/w)
Napthoquinone compounds	VL-1	VL-2	VL-3	VL-4	VL-5	VL-6	VL-7	VL-8	VL-9	VL-10	VL-11	VL-12	VL-13
β -Hydroxyisovalerylshikonin	0.89±0.05	1.74±0.06	0.37±0.02	0.31±0.06	0.39±0.02	0.36±0.06	0.33±0.03	0.41±0.09	0.38±0.06	0.40±0.01	0.46±0.05	0.39±0.03	0.37±0.05
acetylshikonin	0.74±0.07	0.91±0.06	1.24±0.08	1.21±0.06	1.29±0.05	1.28±0.12	1.29±0.14	1.20±0.01	1.30±0.17	1.25±0.04	1.32±0.17	1.28±0.02	1.21±0.08
shikonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Continued

													(%.w/w)
Napthoquinone compounds	VL-14	VL-15	VL-16	VL-17	VL-18	VL-19	VL-20	VL-21	VL-22	VL-23	VL-24	VL-36	VL-48
β -Hydroxyisovalerylshikonin	0.36±0.06	0.40±0.06	0.48±0.23	0.34±0.14	0.38±0.02	0.31±0.04	0.31±0.04	0.31±0.02	0.27±0.12	0.32±0.03	0.43±0.25	0.27±0.03	0.26±0.08
acetylshikonin	1.15±0.05	1.13±0.03	1.24±0.10	1.22±0.05	1.15±0.07	0.99±0.02	1.04±0.08	1.04±0.09	1.01±0.08	0.93±0.07	0.95±0.07	0.81±0.04	0.78±0.10
shikonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Continued

		(%.w/w)	
Napthoquinone compounds	VL-60	VL-72	
β -Hydroxyisovalerylshikonin	0.24±0.04	0.32±0.19	
acetylshikonin	0.65±0.03	0.38±0.23	
shikonin	-	-	

(3) 용매 추출조건 최적화 - 자근을 각각 15 g에 30% 에칠알코올(70℃ 추출), 50% 에칠알코올(70℃ 추출), 70% 에칠알코올(70℃ 추출), 95% 에칠알코올(70℃ 추출), 증류수(100℃ 추출) 200 ml씩을 가하여 2시간 2회 반복 환류 추출 후 여과하고 감압 농축하여 용매별 자근 엑스를 얻었다.

Table 3. The naphtoquinone compounds according to various solvent extraction conditions of Lithospermi Radix extract

Naphtoquinone compounds	(%w/w)				
	VLW	VLE30	VLE50	VLE70	VLE95
β -Hydroxyisovalerylshikonin	0.01±0.04	0.02±0.19	0.10±0.11	0.50±0.11	1.50±0.11
acetylshikonin	0.15±0.03	0.38±0.23	0.62±0.11	1.50±0.11	2.71±0.11
shikonin	-	-			

* VLW : water extracted Lithospermi Radix extract, VLE30 : 30% ethyl alcohol extracted Lithospermi Radix extract, VLE50 : 50% ethyl alcohol extracted Lithospermi Radix extract, VLE70 : 70% ethyl alcohol extracted Lithospermi Radix extract, VLE95 : 95% ethyl alcohol extracted Lithospermi Radix extract,

2. 지표성분 분석법 확립

1) 실험재료 및 방법

(1) 실험재료

본 연구에 사용한 자근은 한국 영월 및 제천산과 중국 하남성 및 산서성산 자근을 제천 한약재시장에서 정품규격생약으로 2020년 2월에 구입하였다. 제품표본은 세명대학교 한방기능식품소재 연구실에 보관하고 있다(Fig. 1).

(2) 용매별 환류추출 자근 엑스 조제

영월산 자근 건조시료 각 10 g씩에 95% 에칠 알코올, 70% 에칠 알코올, 50% 에칠 알코올, 30% 에칠 알코올, 증류수를 각 250 ml를 가하여 수욕 상에서 2시간씩 2회

추출(70℃ 이하)하여 여과 후 감압 농축하여 용매별 환류추출 자근 엑스를 얻었다.

(3) 95% 에칠 알코올 초음파 추출 자근 엑스 조제

각 자근 건조시료 10 g씩에 95% 에칠 알코올 250 ml를 가하여 초음파 처리기(JAC 4020, 고도기업, 한국)에서 1시간씩 1회 추출(실온)하여 여과 후 감압 농축하여 95% 에칠 알코올 초음파 추출 자근 엑스를 얻었다.

(4) HPLC-페놀성 성분 분석

표준품은 Chromadex(Irvine, California, U.S.A.)와 Chemfaces(Wuhan, Hubei, P.R.C.)로부터 구입한 shikonin, β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin, deoxy shikonin, isobutyl shikonin, dimethylacryl shikonin, isovaleryl shikonin을 사용하였다. 표준품을 메탄올에 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 표준원액을 제조하였고, 순차적으로 4 가지 농도로 희석하여 검량선을 작성하였다. 모든 재고 및 작업 솔루션은 4℃에 보관하였으며, 결과는 평균(중량%) \pm 표준편차(S.D.)로 나타내었다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, U.S.A.)이며, 컬럼은 KNAUER Eurospher II 100-5 C18(Knauer, 3 \times 250mm, Born, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade, B&J, U.S.A.)과 HPLC 용 증류수(HPLC grade, B&J, U.S.A.) 99.9%와, acetic acid(HPLC급, Daesung, Korea) 0.1%이며 acetonitrile의 비율을 50%(0 min)에서 80%(20 min), 100%(25 min), 그리고 마지막으로 다시 0%로 조절하였고, 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 UV 검출기[UV/Vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)를 이용하여 520 nm에서 검출하였다.

2) 결과 및 고찰

자근(Lithospermi Radix)은 지치(Lithospermum erythrorhizon)의 뿌리로서 항균작용 성분으로 shikonin을 함유하고 있다. 이와 같은 Naphtoquinone계 유도체의 천연물 화학적 성분 패턴을 한국산 및 중국산 자근의 나프토크논 성분비교를 통하여 자근류 생약의 성분 정체성을 확인하고자 한다.

용매별 환류추출 자근의 성분은 한국 영월산 자근을 대상으로 실시하였다. 그 결과는 Fig. 3과 Table I에서 보는바와 같이 95% 에칠 알코올 엑스에서만 naphtoquinone계 유도체가 확인되었고, 70% 에칠 알코올, 50% 에칠 알코올, 30% 에칠 알코올, 증류수 환류추출 엑스에는 naphtoquinone계 유도체가 확인되지 않았

다. 이와 같은 결과는 Fig. 2에서 보는바와 같이 TLC 크로마토그램에서도 동일한 경향을 확인할 수 있었으며, naphthoquinone계 유도체의 화학적 극성특성과 추출시 열에 의한 화학구조변화와 관련이 있을 것으로 사료된다.

95% 에칠 알코올 엑스의 naphthoquinone계 유도체에서 가장 높은 함량을 나타내는 성분은 isovaleryl shikonin으로 0.697%를 나타내었고, 그 다음으로 β -hydroxyisovaleryl shikonin(0.627%), acetyl shikonin(0.354%) 순으로 높은 함량을 나타내었다. 그러나, 대표적인 항균 지표물질로 알려진 shikonin은 0.004%의 적은 함량을 나타내었다. 이와 같은 결과는 홍 등이 보고한 자근의 HPLC-UV 동시분석법 개발에서 β -hydroxyisovaleryl shikonin과 acetyl shikonin의 함량을 보고하였으나, 본 연구에서는 shikonin, deoxy shikonin, isobutyl shikonin, dimethylacryl shikonin 그리고 isovaleryl shikonin의 함량을 추가로 동시 분석하였다.

Naphthoquinone계 유도체에 대한 자근의 함량을 비교 검토하기 위하여 추출시 열의 영향을 주지 않기 위하여 실온에서의 초음파 추출과 Naphthoquinone계 유도체의 용출이 용이한 95% 에칠 알코올 추출을 이용하여 한국산 및 중국산 자근에 대하여 검토하였다. Fig. 4과 Table I에서 보는바와 같이 한국산 자근은 총 naphthoquinone 량에 있어서 영월산 자근이 1.409%로 제천산 자근의 0.305%보다 4.6배 높은 함량을 나타내었다. 중국산 자근은 하남성산 자근이 1.351%로 산서성산 자근의 1.267%와 비슷한 함량을 나타내었다. 이와 같은 경향은 Fig. 2에서 보는바와 같이 TLC 크로마토그램에서도 동일한 경향을 확인할 수 있었다.

Naphthoquinone계 유도체의 함량에 있어서는 한국 영월산 및 제천산 자근에서 가장 높은 함량을 나타내는 성분은 β -hydroxyisovaleryl shikonin(0.485%, 0.134%)로 가장 높은 함량을 나타내었고, isovaleryl shikonin(0.364%, 0.091%), acetyl shikonin(0.391%, 0.056%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 중국 하남성산 및 산서성산 자근에서 가장 높은 함량을 나타내는 성분은 β -hydroxyisovaleryl shikonin(0.575%, 0.554%)로 가장 높은 함량을 나타내었고, isovaleryl shikonin(0.390%, 0.368%), acetyl shikonin(0.256%, 0.235%)의 순으로 높은 함량을 나타내므로써 한국산과 같은 성분패턴을 나타내었다.

위와 같은 실온 초음파 추출 결과는 주성분에 있어서 95% 에칠 알코올 환류추출의 경우와 비슷한 경향을 나타내었으나, 가장 높은 함량을 나타내는 성분으로 실온 초음파 추출 엑스는 β -hydroxyisovaleryl shikonin이었으나, 95% 에칠 알코올 환류추출 엑스는 isovaleryl shikonin이었다. 또한, 자근의 대표적인 항균물질인 shikonin에 있어서는 한국 영월산 자근이 0.010%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 중국산 자근의 함량(0.005%, 0.006%)보다 1.7배-2배 높은 함량을 나타내었다.

3) 결론

한국 영월산 자근을 대상으로 용매별로 환류 추출하여 naphtoquinone계 유도체 성분을 분석한 결과, 95% 에칠 알코올 엑스에서만 naphtoquinone계 유도체가 확인되었고, 70% 에칠 알코올, 50% 에칠 알코올, 30% 에칠 알코올, 증류수 환류추출 엑스에서는 naphtoquinone계 유도체가 확인되지 않았다. 95% 에칠 알코올 환류추출 엑스의 naphtoquinone계 유도체에서 가장 높은 함량을 나타내는 성분은 isovaleryl shikonin이었고, 그 다음으로 β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

그러나, 대표적인 항균물질로 알려진 shikonin은 0.004%의 적은 함량을 나타내었다. 한편, 실온 초음파 추출 한국산 및 중국산 자근 엑스에서 naphtoquinone계 유도체가 가장 높은 함량을 나타내는 성분은 β -hydroxyisovaleryl shikonin이었고, isovaleryl shikonin, acetyl shikonin의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

이와 같은 자근의 naphtoquinone계 유도체 성분의 동시분석을 통하여 분석법을 확립할 수 있었으며, 특히, 95% 에칠 알코올을 이용한 추출법이 고농도 naphtoquinone계 유도체 성분 추출법이라고 하는 것을 확인할 수 있었다.

4) HPLC 동시분석조건

HPLC 장치 : Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, U.S.A.)

컬럼 : KNAUER Eurospher II 100-5 C18(Knauer, 3×250mm, Born, Germany)

이동상 : acetonitrile(HPLC grade, B&J, U.S.A.), HPLC용 증류수(HPLC grade, B&J, U.S.A.) 99.9%와, acetic acid(HPLC급, Daesung, Korea) 0.1%

검출기 : UV 검출기[UV/Vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)

측정파장 : 520 nm

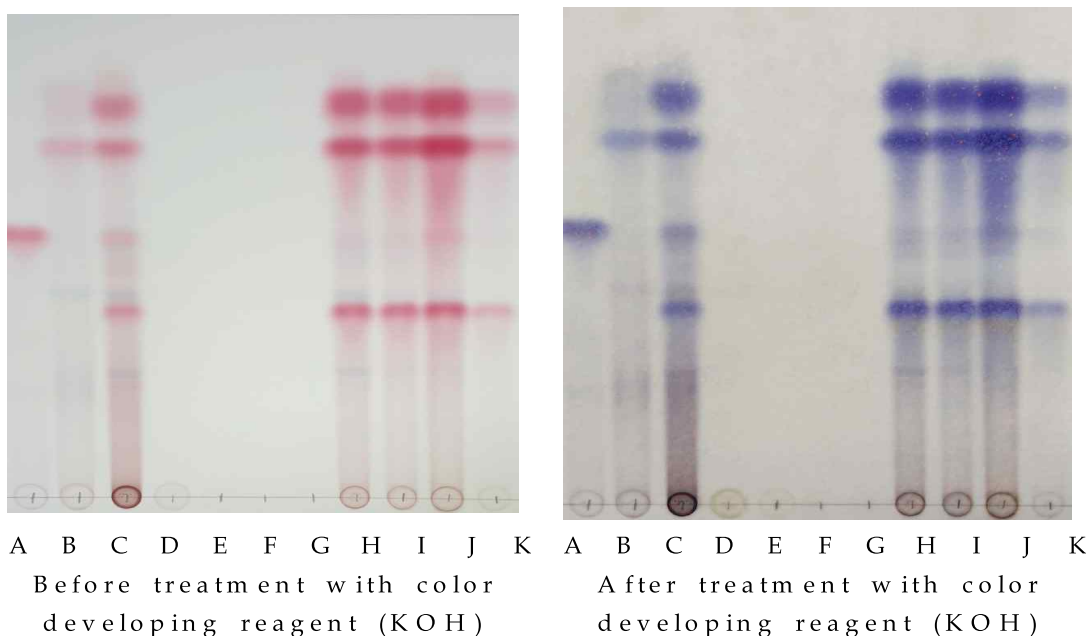
이동상 조건

Time	Flow	A%(ACN)	B%(Water)
0	0.8	50.0	50.0
20	0.8	80.0	20.0
25	0.8	100.0	00.0
35	0.8	100.0	00.0
45	0.8	50.0	50.0
55	0.8	50.0	50.0



* KYL : Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KJL : Korean Jecheon cultivated Lithospermi Radix, CHL : Chinese Henan cultivated Lithospermi Radix, CSL : Chinese Shanxi cultivated Lithospermi Radix

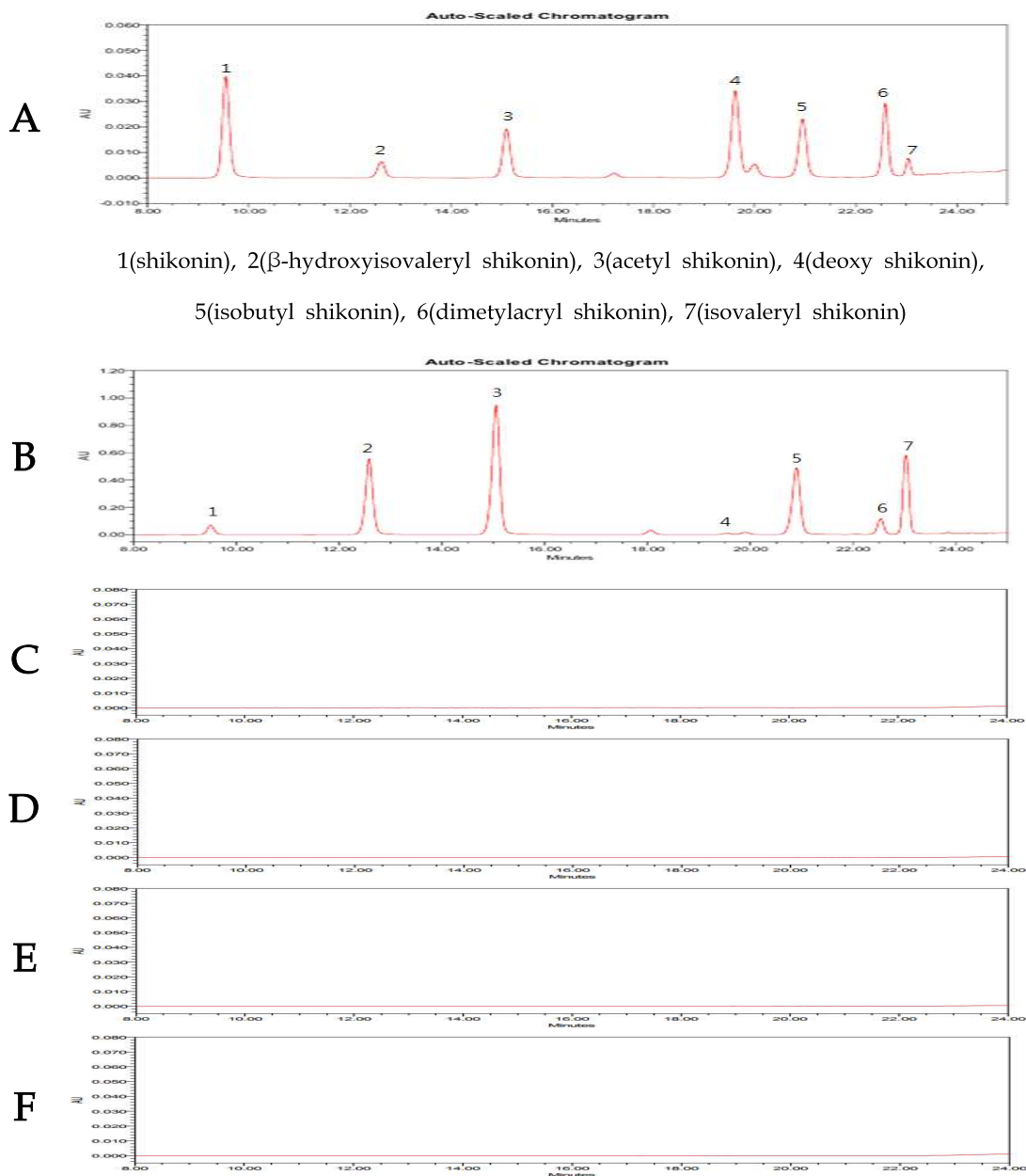
Fig. 3. The photograph of Korean and Chinese Lithospermi Radix.



A : shikonin, B : acetylshikonin, C : 95% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR95E), D : 70% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR70E), E : 50% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR50E), F : 30% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR30E), G : 100% distilled water reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR100W), H : 95% ethyl alcohol sonication extract of Chinese Henan cultivated *Lithospermi Radix*(CHS95E), I : 95% ethyl alcohol sonication extract of Chinese Shanxi cultivated *Lithospermi Radix*(CSS95E), J : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYS95E), K : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Jecheon cultivated *Lithospermi Radix*(KJS95E),

developing solvent : toluene : ethyl acetate : formic acid = 5 : 1 : 0.1,
 developing reagent : 10% KOH

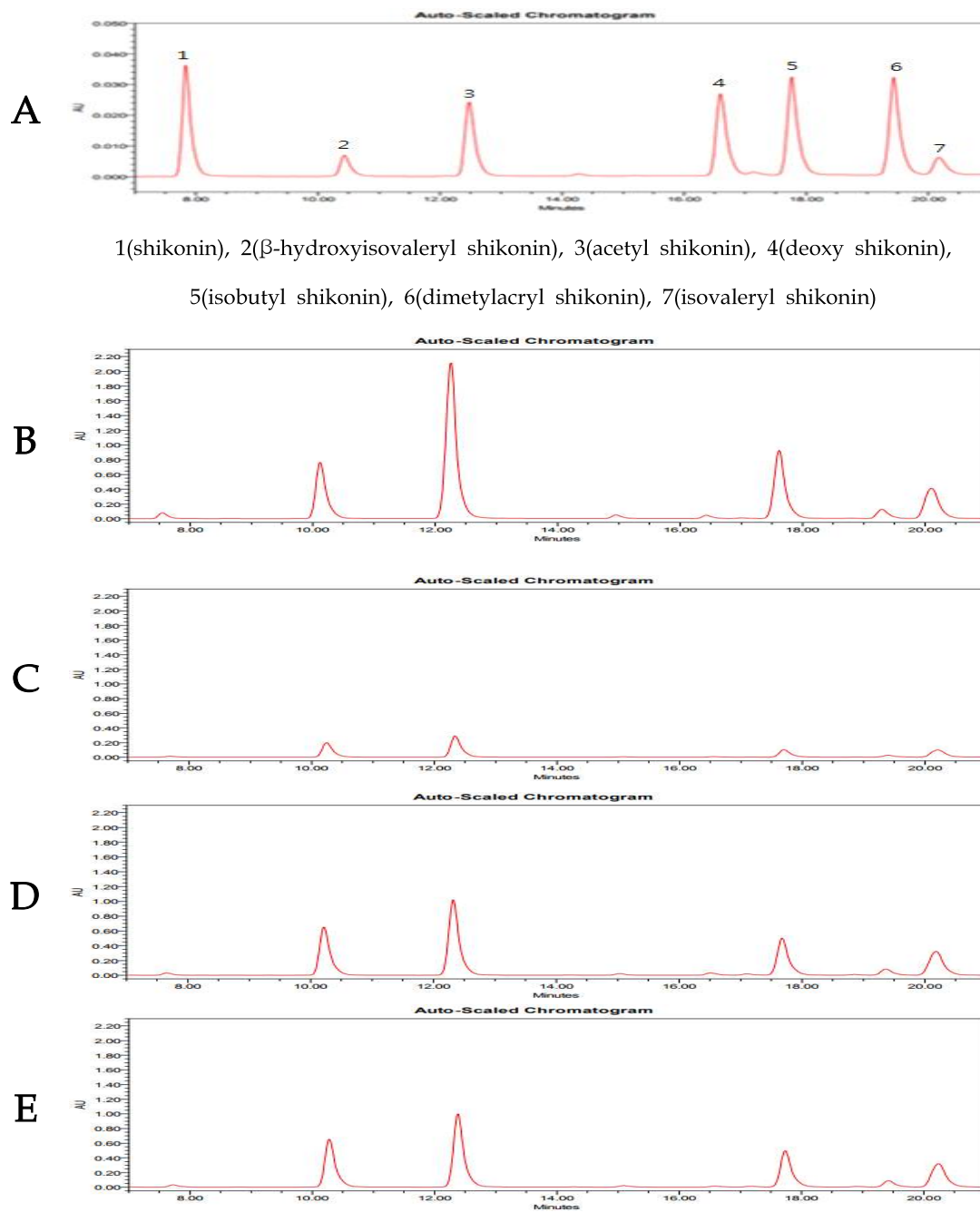
Fig. 4. TLC chromatograms of naphthoquinone derivatives detected from sonication and reflux extract of Korean and Chinese *Lithospermi Radix*.



1(shikonin), 2(β -hydroxyisovaleryl shikonin), 3(acetyl shikonin), 4(deoxy shikonin),
5(isobutyl shikonin), 6(dimethylacryl shikonin), 7(isovaleryl shikonin)

A : mixed standard of naphthoquinone derivatives, B : 95% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR95E), C : 70% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR70E), D : 50% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR50E), E : 30% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR30E), F : distilled water reflux extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYR100W)

Fig. 5. HPLC chromatograms of naphthoquinone derivatives detected from reflux extract of Korean and Chinese *Lithospermi Radix*.



A : mixed standard of naphthoquinone derivatives, B : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Yeongwol cultivated *Lithospermi Radix*(KYS95E), C : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Jecheon cultivated *Lithospermi Radix*(KJS95E), D : 95% ethyl alcohol sonication extract Chinese Henan cultivated *Lithospermi Radix*(CHS95E), E : 95% ethyl alcohol sonication extract Chinese Shanxi cultivated *Lithospermi Radix*(CSS95E)

Fig. 6. HPLC chromatograms of naphthoquinone derivatives detected from sonication extract of Korean and Chinese *Lithospermi Radix*.

Table 4. Comparison of naphthoquinone derivatives content sonication and reflux extract of Korean and Chinese Lithospermi Radix

naphthoquinone compounds	Retention time (min)	Calibration curves ¹⁾	R^2	(%,w/w)									
				KYR95E	KYR70E	KYR50E	KYR30E	KYR100W	CHS95E	CSS95E	KYS95E	KJS95E	
shikonin	7.5	y = 15240x - 22484	0.9998	0.004±0.000	-	-	-	-	-	0.006±0.000	0.005±0.000	0.010±0.000	0.002±0.000
β-hydroxyisovaleryl shikonin	10.2	y = 2154.8x - 3784.4	0.9995	0.627±0.002	-	-	-	-	-	0.575±0.000	0.554±0.000	0.485±0.000	0.134±0.000
acetyl shikonin	12.1	y = 6952.9x - 3678.1	1.0000	0.354±0.001	-	-	-	-	-	0.256±0.000	0.235±0.000	0.391±0.000	0.056±0.000
deoxy shikonin	16.3	y = 11617x + 12575	0.9999	0.002±0.000	-	-	-	-	-	0.007±0.000	0.003±0.000	0.007±0.000	0.001±0.000
isobutyl shikonin	17.5	y = 8880.4x + 1672.4	0.9996	0.155±0.001	-	-	-	-	-	0.101±0.000	0.094±0.000	0.133±0.000	0.016±0.000
dimethylacryl shikonin	19.2	y = 7264.5x + 9613.6	0.9994	0.029±0.000	-	-	-	-	-	0.016±0.000	0.017±0.000	0.018±0.000	0.004±0.000
isovaleryl shikonin	20.0	y = 1537.4x + 933.49	0.9994	0.697±0.005	-	-	-	-	-	0.390±0.000	0.368±0.000	0.364±0.000	0.091±0.000
total	-	-	-	1.868	-	-	-	-	-	1.351	1.267	1.409	0.305

* 1)y : area units, x : concentration in standard solutions (ppm), KYR95E : 95% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KYR70E : 70% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KYR50E : 50% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KYR30E : 30% ethyl alcohol reflux extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KYR100W : 100% distilled water reflux extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, CHS95E : 95% ethyl alcohol sonication extract of Chinese Henan cultivated Lithospermi Radix, CSS95E : 95% ethyl alcohol sonication extract of Chinese Shanxi cultivated Lithospermi Radix, KYS95E : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Yeongwol cultivated Lithospermi Radix, KJS95E : 95% ethyl alcohol sonication extract of Korean Jecheon cultivated Lithospermi Radix

3. 성분 분리 및 현장적용시험

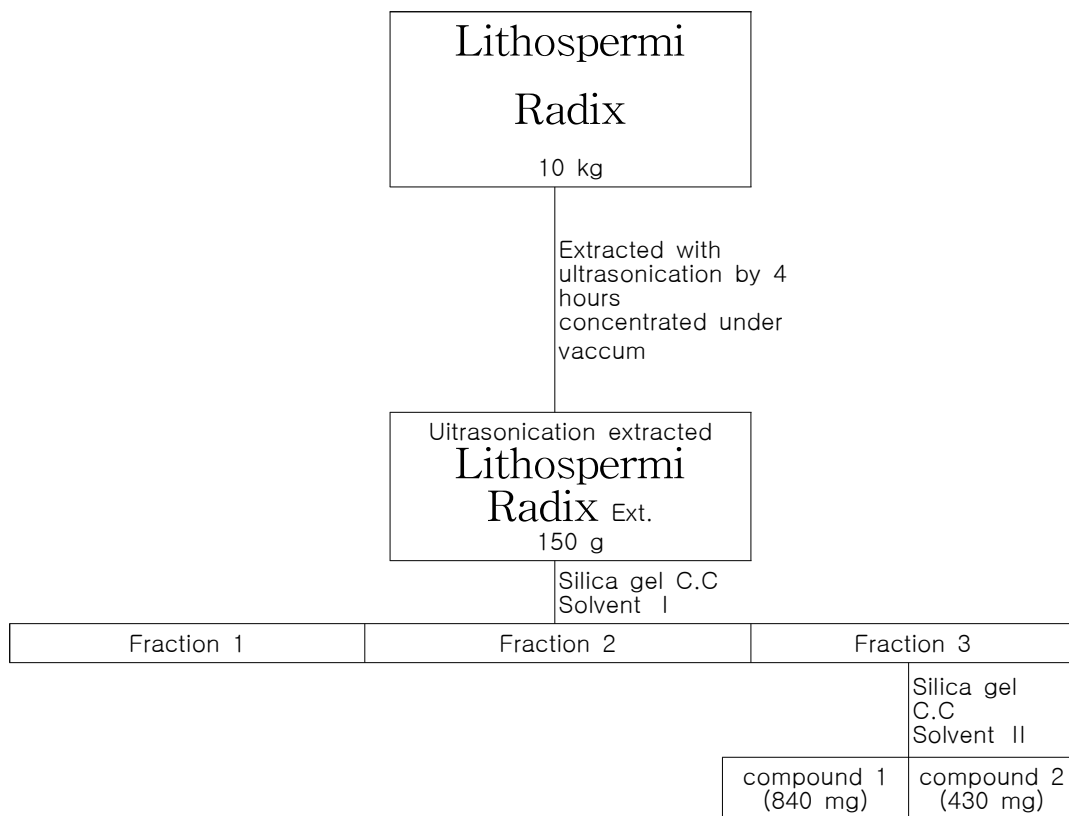
1) 기능성분 대량 분리 동정

(1) 95% 에틸알코올 초음파 추출 자근추출물 조제

자근 건조시료 10 kg에 95% 에틸알코올 10 L를 가하여 초음파 처리기(JAC 4020, 고도기업, 한국)에서 1시간씩 1회 추출(실온)하여 여과 후 감압 농축하여 95% 에틸알코올 초음파 추출 자근추출물 150 g을 얻었다.

(2) 자근 추출물로부터 나프토크논 유도체 분획 및 분리

자근 추출물 150 g을 대용량 Silica gel column에 전개 용매를 Hexane : ethyl acetate : formic acid = 5 : 0.03 : 0.1로 전개하여 Fraction 1, 2, 3으로 분획하였고, Silica gel column에 전개 용매 Hexane : ethyl acetate = 30 : 1 → 5 : 1로 전개하여 Compound 1, 2를 각각 840 mg, 430 mg을 얻었다. (scheme. 1.)



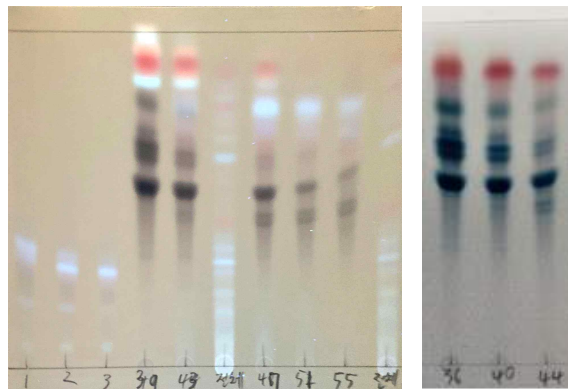
Scheme 1. Extraction and Isolation of Naphtoquinone Derivatives from Lithospermi Radix

*Solvent I : Hexane : ethyl acetate = 5 : 0.03 : 0.1

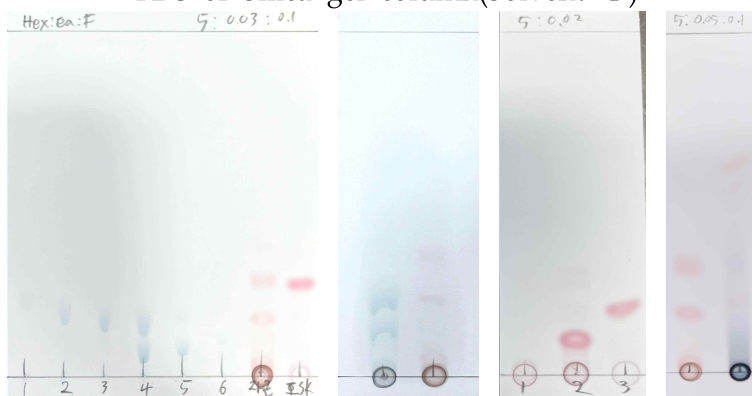
*Solvent II : Hexane : ethyl acetate = 30 : 1 → 5 : 1



[대용량 오픈컬럼(silica gel) 사진]

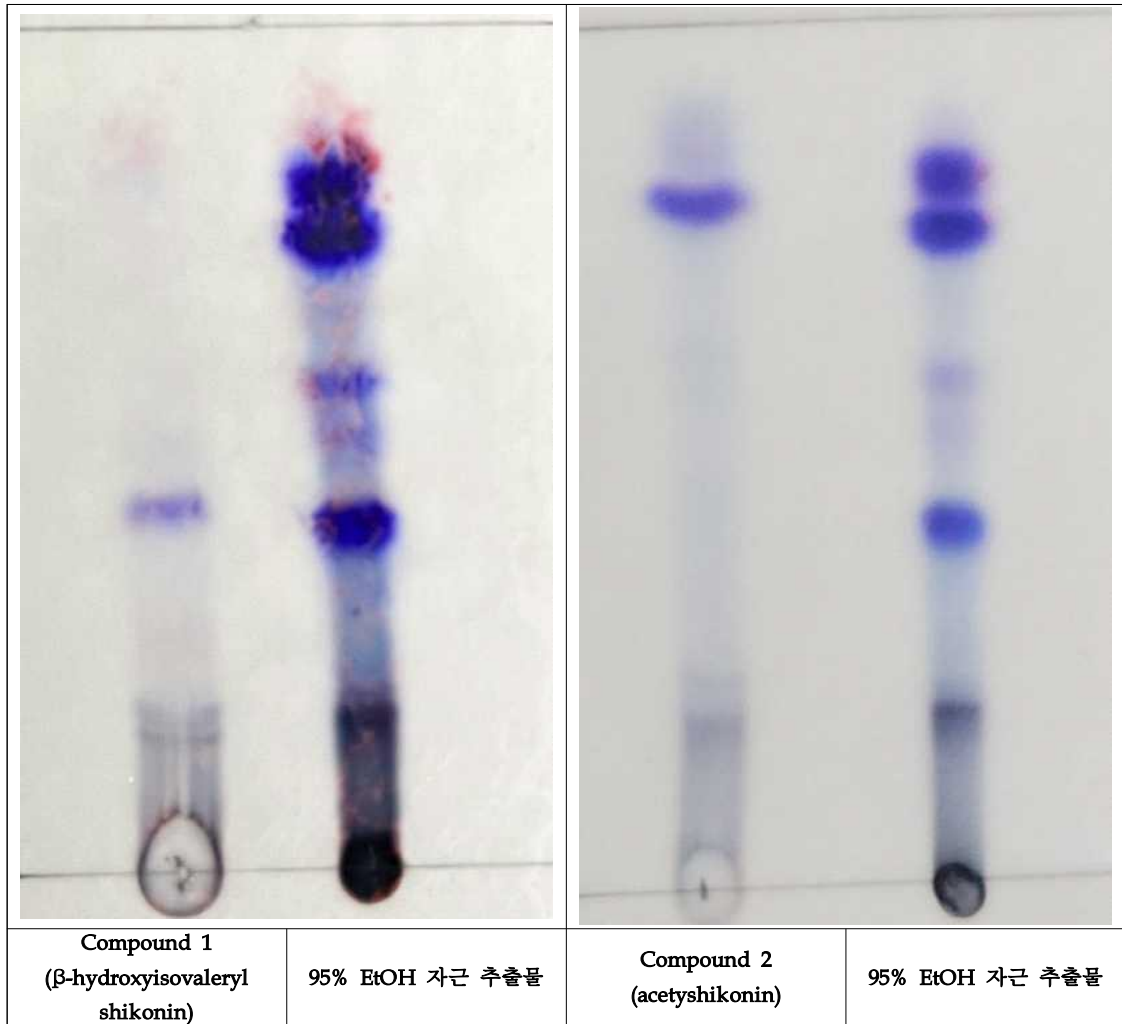


TLC of Silica gel column(Solvent I)



TLC of Silica gel column(Solvent II)

[컬럼 성분분리 TLC]



[Compound 1 - 2의 TLC]

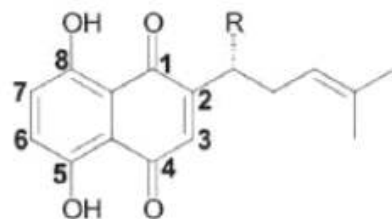
(3) NMR을 이용한 나프토크논 유도체 화학구조 동정

① Compound 1의 화학구조 동정

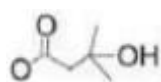
Compound 1의 TLC Rf값은 0.43(Toluene/Ethylacetate/Formic acid = 5 : 1 : 0.1/kieselgel 60 F254 Merk)이고, 발색전에 적갈색 반점을 확인할 수 있으며, 10% KOH 엔탄올 용액으로 발색하며, 청색으로 발색됨으로서 나프토크논 유도체로 추정할 수 있었고, 아래와 같은 NMR 데이터 결과 들은 자근(Lithospermum erythrorhizon)으로부터 추출 분리되었던 β -hydroxyisovalerylshikonin의 문헌[Yakhak Hoeji 59(5) 222-229] data와 일치하였다. 따라서, Compound 1을 β -hydroxyisovalerylshikonin로 동정하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, pyridine- d_5): δ 1.270(3H, s, H-4''), 1.289(3H, s, H-5''), 1.584(3H, s, H-6'), 1.648(3H, s, H-5'), 2.539(1H, m, H-2'), 2.554(2H, s, H-2''), 5.410(1H, m, H-3'), 6.385(1H, dd, $J=6.9, 4.6$ Hz, H-1'), 7.048(1H, s, H-3), 7.213(1H, s, H-6), 7.232(1H, s, H-7)

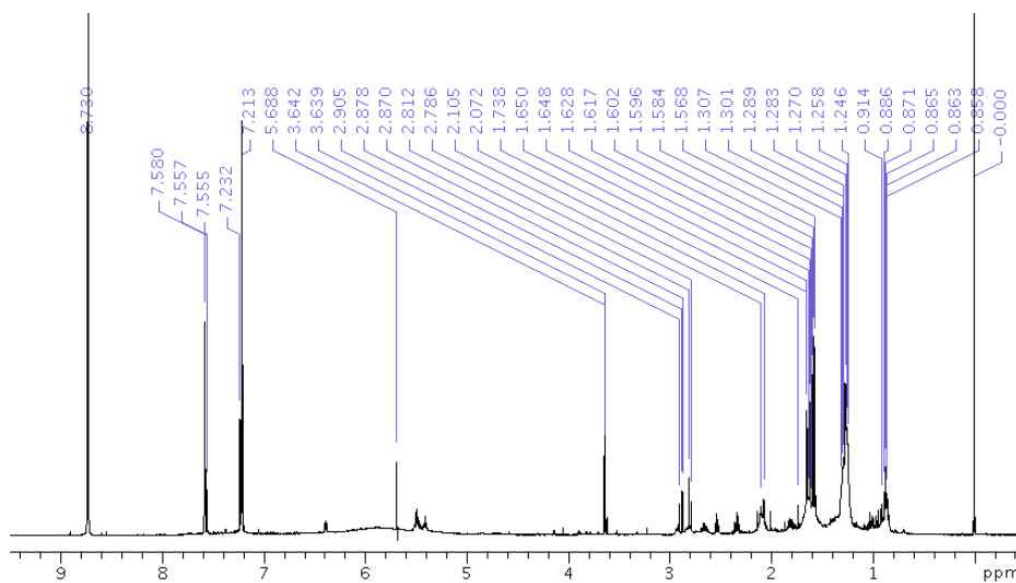
[Chemical structures of compound 1]



R



β -hydroxyisovaleryls
hikonin



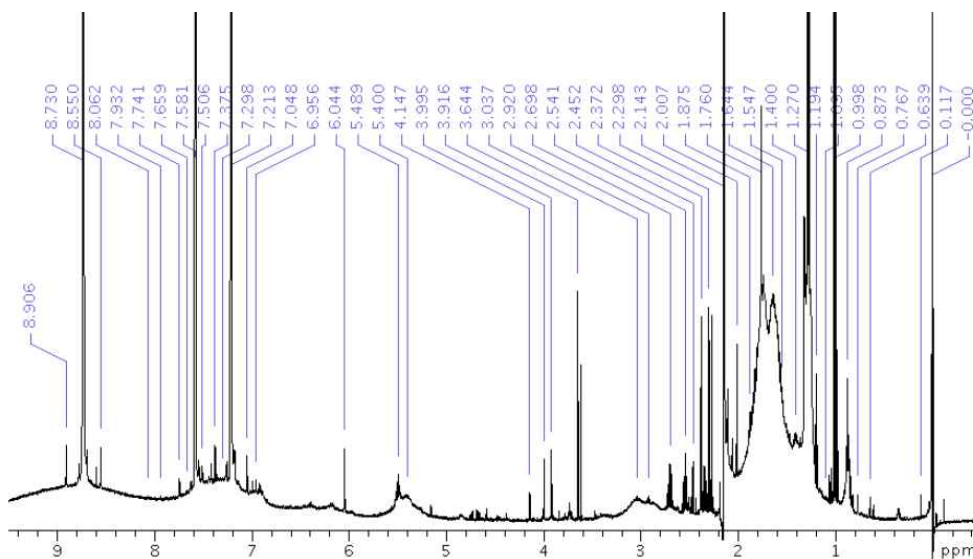
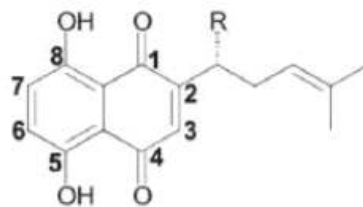
$^1\text{H-NMR}$ spectra of compound 1 (d₅-Py)

① Compound 2의 화학구조 동정

Compound 1의 TLC Rf값은 0.78(Toluene/Ethylacetate/Formic acid = 5 : 1 : 0.1/kieselgel 60 F254 Merk)이고, 발색전에 적갈색 반점을 확인할 수 있으며, 10% KOH 엔탄올 용액으로 발색하며, 청색으로 발색됨으로서 나프토크논 유도체로 추정할 수 있었고, 아래와 같은 NMR 데이터 결과 들은 자근(Lithospermum erythrorhizon)으로부터 추출 분리되었던 acetylshikonin의 문헌[Yakhak Hoeji 59(5) 222-229] data와 일치하였다. 따라서, Compound 2를 acetylshikonin로 동정하였다.

¹H-NMR(600 MHz, pyridine-d₅): δ 1.270(3H, s, H-6'), 1.547(3H, s, H-5'), 2.143(3H, s, H-2''), 2.452(1H, m, H-2'), 2.698(1H, m, H-2'), 5.489(1H, t, J=7.5 Hz, H-3'), 6.044(1H, dd, J=6.9, 5.2 Hz, H-1'), 7.048(1H, s, H-3), 7.213(1H, s, H-6)

[Chemical structures of compound 2]



¹H-NMR spectra of compound 2 (d₅-Py)

4. 현장적용시험

□ 항균 평가방법

연구과제 개발품을 가지고 미생물에 대한 제균 능력을 확인하기 위해 시제품에 인위적으로 미생물(일반세균)을 오염시킨 후 항균 기능을 지닌 자근복합추출물을 일정한 조성비로 시제품에 투입하여 이를 35±1℃에서 48±2시간 배양하여 제균 능력을 평가한다.

1) 시제품에 대한 제균 작용

(1) 시제품 정보

소비자가 간편하게 섭취할 수 있도록 스틱형태의 포장으로 제조어진 홍삼류 시제품이며, 내용량은 10mL 이다. 미생물에 오염된 홍삼류 제품에서는 제조공정에서 살균 및 멸균처리를 하지 않으면 짧은 시간 내에 쉽게 미생물 증식 및 부패가 발생하는 특징을 가지고 있다.



Fig. 7. 홍삼류 시제품 스틱

(2) 대조구 배합표

일반세균에 오염된 대조구

번호	원료명	배합비(%)	비고
1	정제수	70.0	
2	홍삼농축액	30.0	
합계		100.0	

(3) 시제품-A 배합표

일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.125% 함유

번호	원 료 명	배합비(%)	비 고
1	정제수	69.875	
2	홍삼농축액	30.000	
3	자근복합추출물	0.125	
합 계		100.0	

(4) 시제품-B 배합표

일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.25% 함유

번호	원 료 명	배합비(%)	비 고
1	정제수	69.75	
2	홍삼농축액	30.00	
3	자근복합추출물	0.25	
합 계		100.0	

(5) 시제품-C 배합표

일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.5% 함유

번호	원 료 명	배합비(%)	비 고
1	정제수	69.5	
2	홍삼농축액	30.0	
3	자근복합추출물	0.5	
합 계		100.0	

(6) 시제품-D 배합표

일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 1.0% 함유

번호	원 료 명	배합비(%)	비 고
1	정제수	69.0	
2	홍삼농축액	30.0	
3	자근복합추출물	1.0	
합 계		100.0	

2) 시제품 안에서의 자근복합추출물 제균 능력

번호	시험물질	자근복합추출물 함유	집락 수 결과
1	대조구	0%	67 CFU/mL
2	시제품-A	0.125%	6 CFU/mL
3	시제품-B	0.250%	3 CFU/mL
4	시제품-C	0.500%	0 CFU/mL
5	시제품-D	1.000%	0 CFU/mL



Fig. 8. 시제품 안에서의 자근복합추출물 항균효과

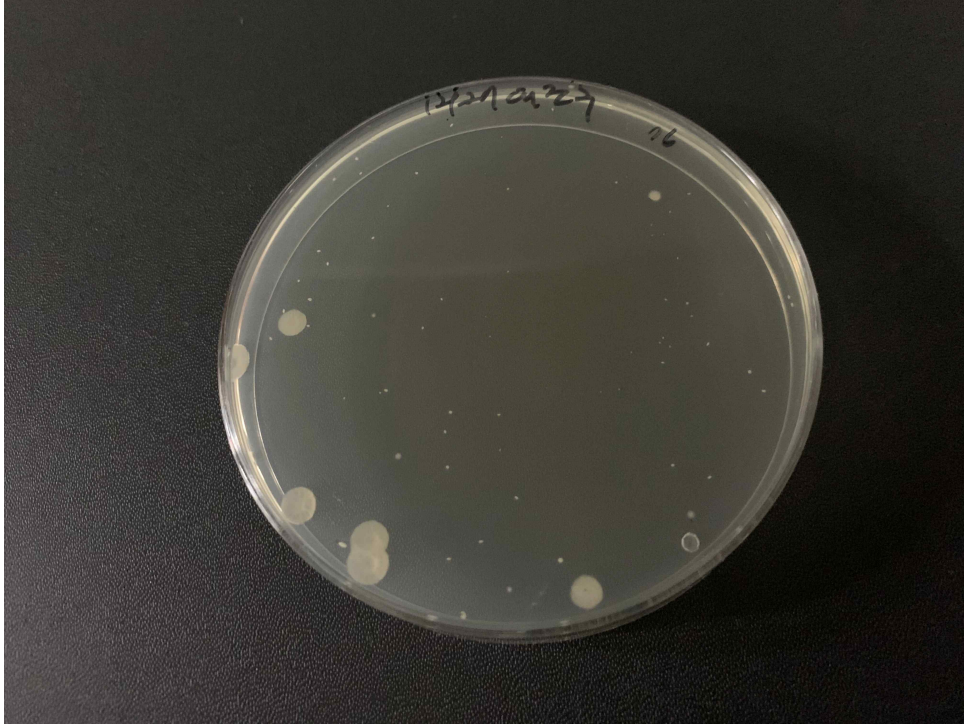


Fig. 9. 일반세균에 오염된 대조구

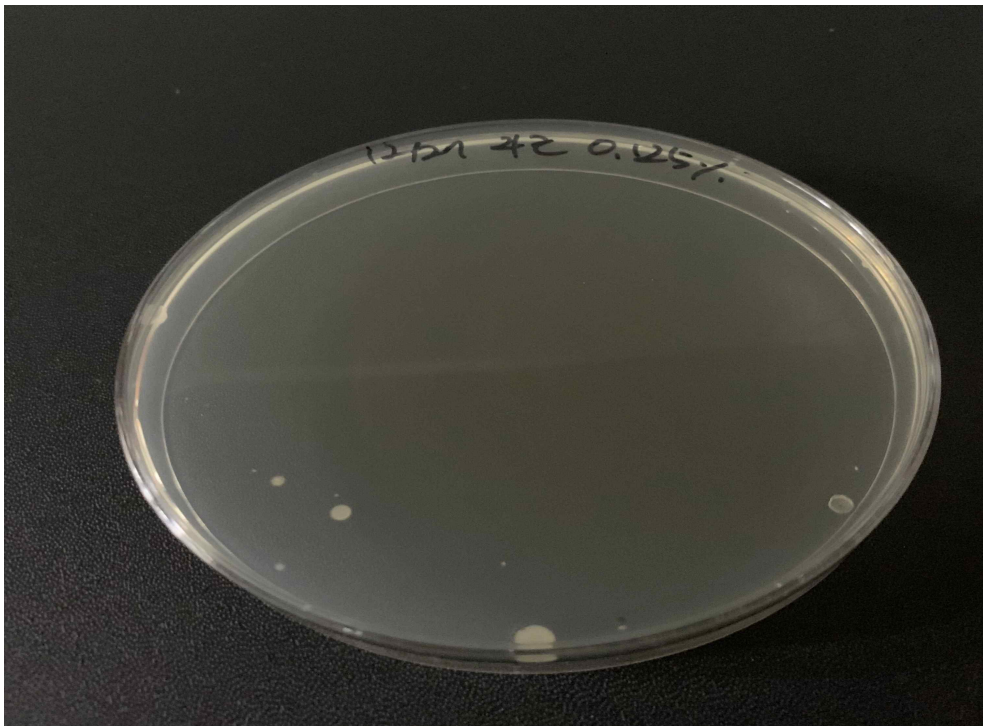


Fig. 10. 일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.125% 함유

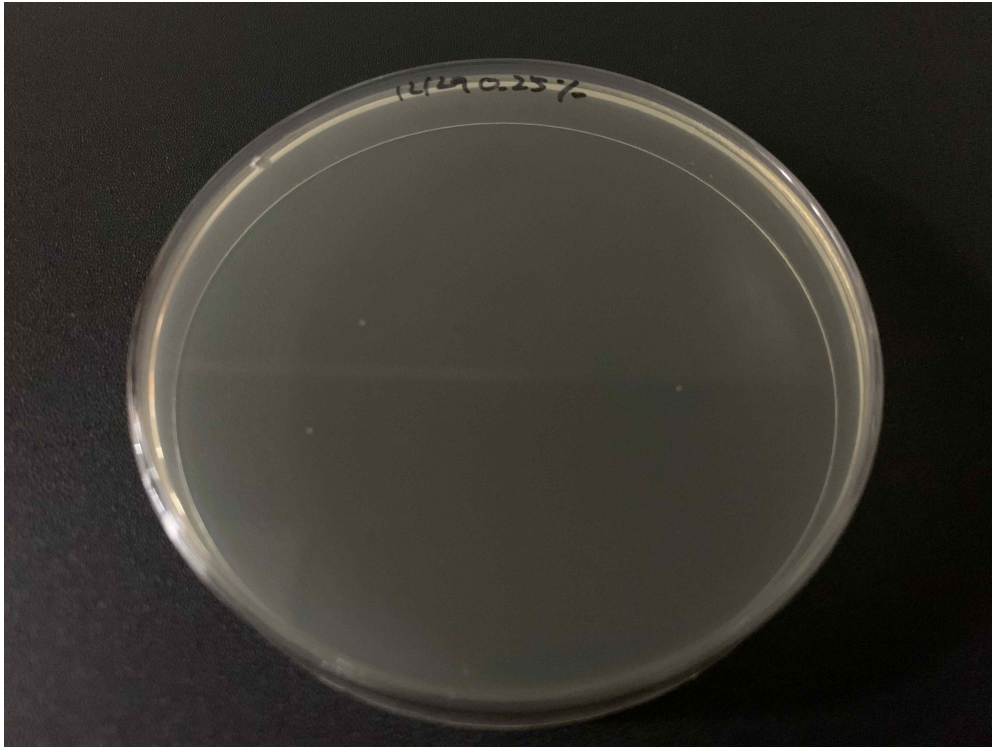


Fig. 11. 일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.25% 함유



Fig. 12. 일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 0.5% 함유



Fig. 13. 일반세균에 오염된 대조구에 자근복합추출물 1.0% 함유

3). 최종결론

일반세균에 오염되어진 시제품을 가지고 자근복합추출물의 제균 능력 평가를 진행하였다. 그 결과 자근복합추출물 함유량에 따라 제균 능력 차이를 보였으며, 제균 능력을 보이는 최소 함유량은 0.5%로 최종 확인이 되었다.

5. 항균(진균)시험

□ 항균시험

1) 시험 균주 및 후보물질 확보

(1) 항균시험 대상 균주 확보 및 구입 - *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. perfringens*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* 등 장병원성 가능성이 있거나 아포를 생성하여 제균이 어렵다고 알려진 총 11개의 표준균주를 ATCC로부터 구입하여 실험에 사용하였다(Table 5).

Table 5. Standard strains which were used in this study

	학명(ATCC No.)
1	<i>B. cereus</i> (ATCC 13061)
2	<i>B. subtilis</i> (ATCC 6051)
3	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)
4	<i>C. perfringens</i> (ATCC 13124)
5	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
6	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150)
7	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111)
8	<i>M. luteus</i> (ATCC 49732)
9	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
10	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
11	<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311)

(2) 항균작용 후보물질 확보 - 제1세부 고성권 교수 연구팀으로부터 다양한 추출물을 제공받아 항균시험을 수행하였다. 항균시험에 사용한 각 물질의 농도와 시험법은 제3세부 조순현 교수 연구팀과 상의하여 최대한 동일하게 설정하였다(Table 6).

Table 6. Candidate materials for antimicrobial test

	물질명		물질명
1	계피오일	9	자소엽
2	레몬	10	소자
3	오렌지	11	수영
4	자몽	12	가는잎조릿대
5	귤	13	하수오
6	애기수염	14	솔잎
7	청피	15	자근복합물
8	진피	16	자근주정추출물

(3) Kirby-Bauer's disk diffusion test 실시 - 항균시험에 가장 널리 통용되는 디스크 확산법을 활용하여 16종 항균작용 후보물질들의 성능을 스크리닝하였다. 각각의 물질은 DMSO에 희석하여 10 mg/ml 농도로 준비한 뒤 멸균된 펄프 디스크에 20 µl 씩 적신 뒤 충분히 건조하여 배지에 부착하였다. 항균시험에는 항균시험 전용 Mueller Hinton agar를 사용하였으며, 24시간 동안 배양한 뒤 결과를 확인하였다.

2. 항균시험 결과 분석

1) *B. cereus* (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝

■ *B. cereus* (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝

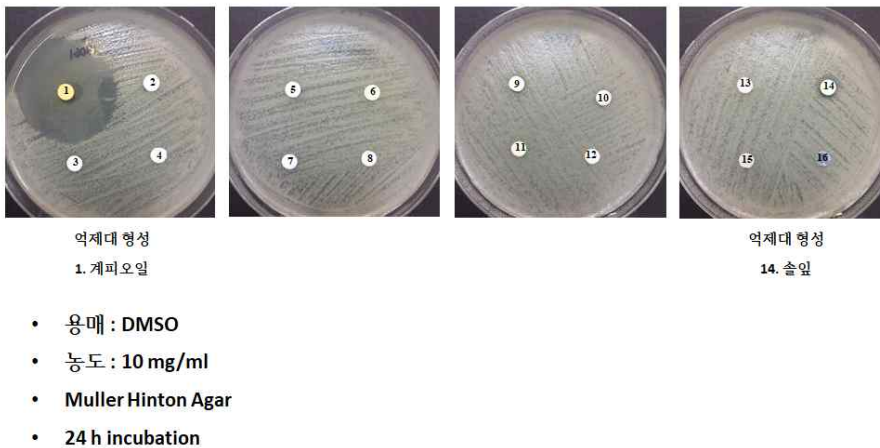


Fig. 14. 커피오일과 솔잎 추출물이 *B. cereus*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

2) *B. subtilis* (ATCC6051) 항균효과 스크리닝

■ *B. subtilis* (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝

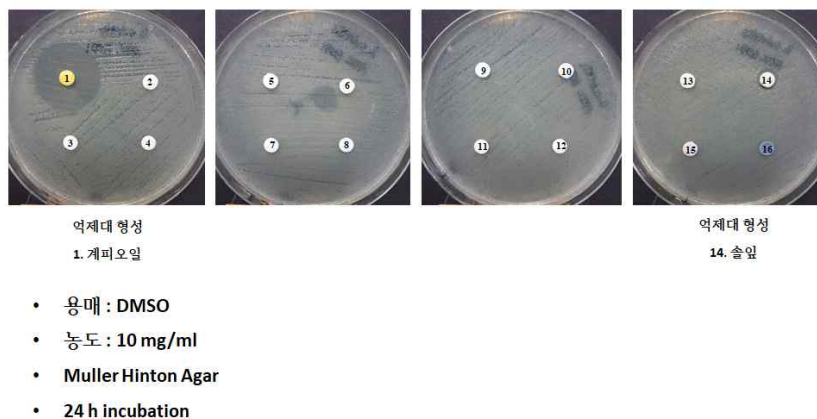


Fig. 15. 커피오일과 솔잎 추출물이 *B. subtilis*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

3) *C. albicans* (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝

■*C. albicans* (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝

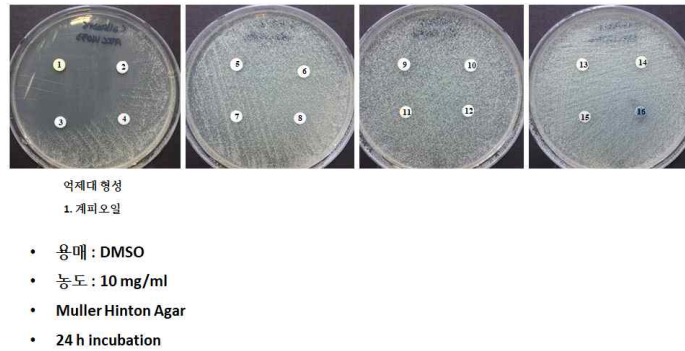


Fig. 16. 커피오일이 *C. albicans*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

4) *C. perfringens* (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝

■*C. perfringens* (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝



Fig. 17. 커피오일이 *C. perfringens*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

5) *E. coli* (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝

■*E. coli* (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝

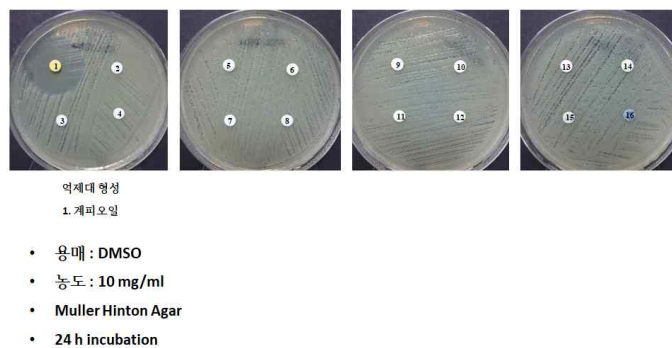
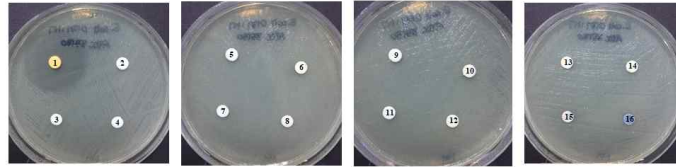


Fig. 18. 커피오일이 *E. coli*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

6) *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝

▪*E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝



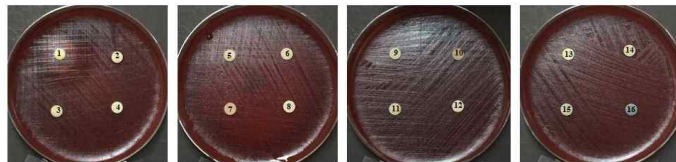
억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Agar
- 24 h incubation

Fig. 19. 계피오일이 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

7) *L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝

▪*L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝



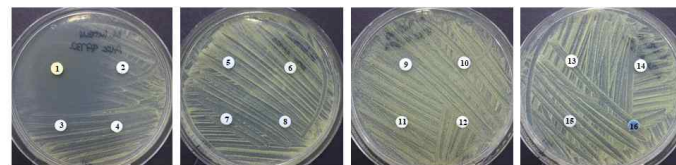
억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Blood Agar
- 24 h incubation

Fig. 20. 계피오일이 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

8) *M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝

▪*M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝



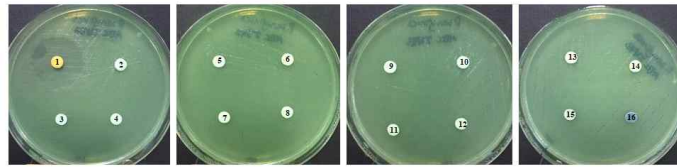
억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Agar
- 24 h incubation

Fig. 21. 계피오일이 *M. luteus*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

9) *P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝

■*P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝



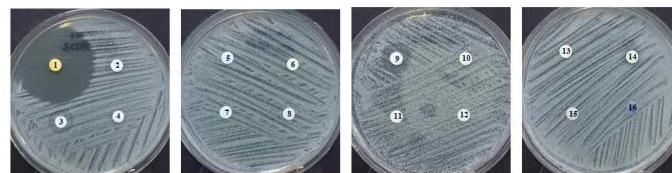
억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Agar
- 24 h incubation

Fig. 22. 계피오일이 *P. aeruginosa*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

10) *S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝

■*S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝



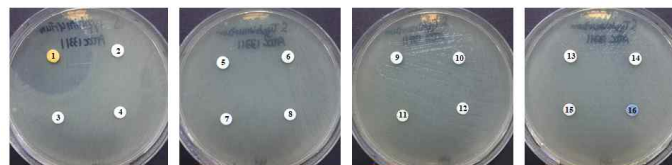
억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Agar
- 24 h incubation

Fig. 23. 계피오일이 *S. aureus*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

11) *S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝

■*S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝



억제대 형성
1. 계피오일

- 용매 : DMSO
- 농도 : 10 mg/ml
- Muller Hinton Agar
- 24 h incubation

Fig. 24. 계피오일이 *S. Typhimurium*에 대한 항균 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

□ 항진균시험

1. 시험 균주 및 항진균 활성 측정 방법

(1) 항진균시험 대상 균주 - 자균을 포함한 후보물질의 항진균효과를 검토하기 위하여 본 실험에서는 시험균주는 *Aspergillus flavus* ATCC 17082, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 등을 우선 사용하였다.

시험균에 대한 후보물질의 활성을 측정하기 위해 효모균은 Yeast extract-Malt extract medium로 28℃에서 3일간 진탕배양한 후 약 5×10^5 CFU/mL이 되도록 희석하여 시험균액으로 하였으며, 곰팡이균은 Potato dextrose agar medium으로 30℃에서 7일간 진탕배양한 후 포자를 채취하여 포자농도가 약 2×10^5 spore/mL이 되도록 희석한 포자현탁액을 시험균액으로 사용하였다.

(2) 항진균 활성 측정 방법 - 후보물질에 대한 항진균 활성측정은 Paper disc법과 Macrobrotth dilution법을 병행하여 활성 측정하였다.

각 시험균주를 해당 액체배지대시 18-24시간 배양후 0.5 McFarland 완충액 혼탁도 표준액 (turbidity standard)으로 사용하여 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 미생물의 수를 약 10^9 cells/ml되게 조절하였다. 멸균된 솜봉을 배양액에 적시어 솜봉을 시험관 내부에서 돌리면서 눌러 과량의 배양액은 제거한 후 평판배지에 골고루 도말하였다. 약 5분간 방치하여 평판배지를 밀린후 paper disc(8mm, Advantec Co.)를 평판 배지에 올리고 각종 시료를 각각의 평원반에 micropipette을 이용하여 접종한 후 (20 μ L) 24시간 냉장 보관함으로써 시료물질이 agar 층에서 충분히 확산될 수 있도록 한 후 미생물의 종류에 따라 적절한 온도에서 24시간 배양한 후 형성된 저해부위의 크기를 자로 재었다. 저해부위의 크기가 평원반의 크기를 포함하여 직경이 10mm 이하인 것은 항균력이 없는 것으로, 10-15mm 사이인 것은 중간 정도의 항균력을 가진 것으로, 그리고 15mm 이상인 것을 강한 항균력을 가진 것으로 판단하였다.

{3} 항진균 활성 결과

Table 7. 후보물질의 진균 저해효과 유효성 검정

		<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 17082	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
1	자근복합물	+	+	++
2	자근주경추출물	-	++	++
3	하수오	+	++	++
4	솔잎	-	-	-
5	진피	-	-	++
6	자소엽	-	-	-
7	청피	-	++	++
8	굴	+	-	-
9	레몬	++	-	-
10	자몽	+	++	++
11	오렌지	+	++	+
12	소자	-	-	++
13	애기수영	+	++	++
14	수영	+	+	++
15	가는잎조릿대	+	++	++
16	계피오일	++	++	++

“+”는 저해효과의 강약을 나타냄. (-; 효과없음, +;약, ++;중, +++; 강)

6. 시험 균주 및 후보물질 확정

1) 항균시험 대상 균주 목록

- *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. perfringens*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* 등 장병원성 가능성이 있거나 아포를 생성하여 제균이 어렵다고 알려진 총 11개의 표준균주를 ATCC로부터 구입하여 실험에 사용하였음(표 1).

Table 8. 항균시험 대상 균주

	학명 (ATCC No.)
1	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 13061)
2	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051)
3	<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053)
4	<i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124)
5	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ATCC 35150)
7	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19111)
8	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 49732)
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
10	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
11	<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 13311)

2) 항균작용 후보물질 재선정 및 대상 압축

- 2차년도 연구 종료시점까지 주관연구팀과 제3세부 연구팀으로부터 35종 이상의 추출물을 제

공받아 1차 항균 성능을 스크리닝하였음(표 2). 표 2의 결과에서 항균 활성을 보인 12종의 추출물을 재료로 하여 총 14차 검정을 거쳐 다양한 조합의 항균 조성물을 제작하였고, 최종 항균 조성물의 배합비와 식품 첨가 농도를 결정지었음.

Table 9. 1차 항균 성능 스크리닝 결과

물질명 / 세균명	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
01. 계피오일	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02. 레몬(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03. 오렌지(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04. 자몽(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05. 귤(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06. 메기수영(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07. 청피(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08. 진피(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09. 자소엽(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. 소자(에테르)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. 수염(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. 가는잎조릿대	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. 허수오(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. 솔잎(에테르)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. 자근복합물(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. 자근주정추출물(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. Skikinin	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
18. Isobutylyskikinin	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
19. Acetylskikinin	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
20. Deoxyskikinin	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
21. Dimethylacetylskikinin	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
22. 산서성 자근 주정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23. 솔잎 주정	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
24. 영월 자근 주정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25. 허남성 자근 주정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26. 황금 주정	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27. 솔잎 추출물(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28. 조순현 교수님 물질 (원액 사용)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29. 진피(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30. 청피(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31. 육계(주정)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
32. 계지(주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33. 계피(주정)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
34. 옷잎(70% 주정)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35. 율줄기(70% 주정)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

3) Kirby-Bauer's disk diffusion test, Agar dilution test (Pour plate method), 3MTM Petri-film test, 등 다양한 항균시험 실시

- Kirby-Bauer's disk diffusion test : 항균시험에 가장 널리 통용되는 디스크 확산법을 활용하여 60종 이상의 항균작용 후보물질들의 성능을 1차 스크리닝하였음. 각각의 물질은 DMSO에 희석하여 10 mg/ml 농도로 준비한 뒤 멸균된 펄프 디스크에 20 µl 씩 적신 뒤 충분히 건조하여 배지에 부착하였음. 항균시험 조건은 미국 임상실험실표준기관(Clinical Laboratory Standard Institution)에서 제시하는 국제표준 항균시험 규격에 따라 항균시험 전용 Mueller Hinton agar, 또는 균주의 영양 요구도에 따라 Mueller Hinton blood agar를 사용하였으며, 접종 균주의 탁도는 McFarland 0.5에 맞추었고, 이를 18~24시간 동안 35±1℃에서 배양한 뒤 결과를 확인하였음.

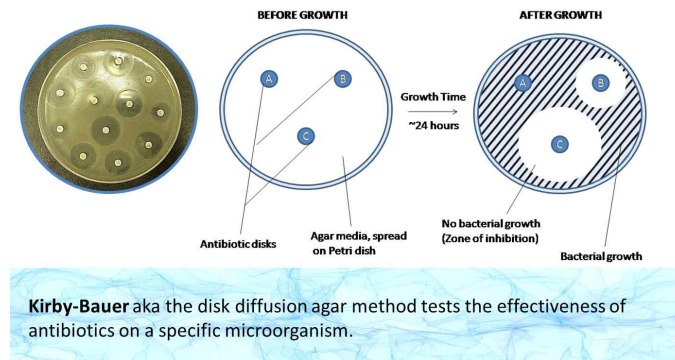


Fig. 25. Kirby-Bauer's disk diffusion test

- Agar dilution test (Pour plate method) : 본 연구에 사용된 대부분의 추출물은 각각의 고유한 색상을 띄었기 때문에 액체배양에서 세균의 탁도 변화를 측정함으로써 항균 성능을 평가할 수 없었음. 이에, 우선 액체배양을 통하여 최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정한 뒤, agar dilution test (pour plate method)를 수행하여 각각의 액체배양액을 각 세균의 배양 조건에 맞추어 Mueller-Hinton agar 또는 Mueller-Hinton blood agar에 접종하여 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 18~24시간 배양함으로써 최소 살균 농도(minimum bactericidal concentration)을 도출하였음.

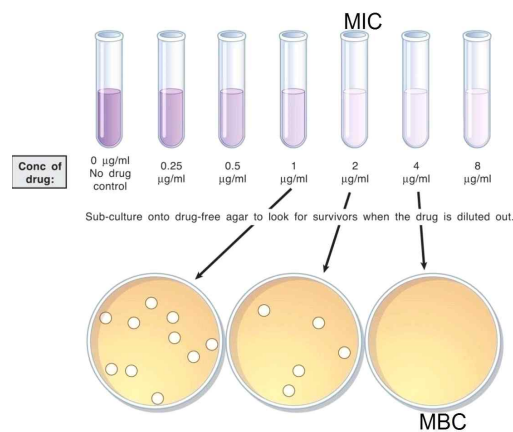


Fig. 26. Agar dilution test (Pour plate method)

- 3MTM Petri-film test : 최종 항균 조성물 후보군들의 항균 성능을 검정하기 위하여 국내외에서 공인된 항균시험법인 으로 사용되고 있는 건조필름법(3MTM petrifilm)을 이용하여 세균 및 진균류의 증식 여부를 검사하였음. 건조필름배지는 Biological film에서 세균 및 진균류가 증식할 수 있게 영양성분을 필름에 코팅한 것으로 시료를 건조필름배지에 접종하면 수분을 흡수하여 한천배지(nutrient agar, ordinary agar)와 같이 겔을 형성하여 미생물이 집락을 형성하는 dry rehydratable film media임. 지시약이 건조필름배지에 포함되어 있어 균의 판독을 한천배지보다 용이하게 해주며 한천배지와 같은 영양성분을 이용하므로 실험의 원리는 전통적인 한천배지법과 같으나 배지의 제조나 배양 시간 등을 최대한 감소하여 짧은 시간에 많은 실험

을 할 수 있도록 개발된 미생물 시험법임. 식품공전 상에도 그 방법이 설명되어 있음. 본 연구에 따른 자근 복합 조성물을 적당히 희석하여 홍삼 추출액 10 mL에 접종하여 잘 섞은 후 건조필름배지에 접종한 후 35±1℃에서 24시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하고 그 평균집락수에 희석배수를 곱한 결과 값을 가지고 판독하였음.

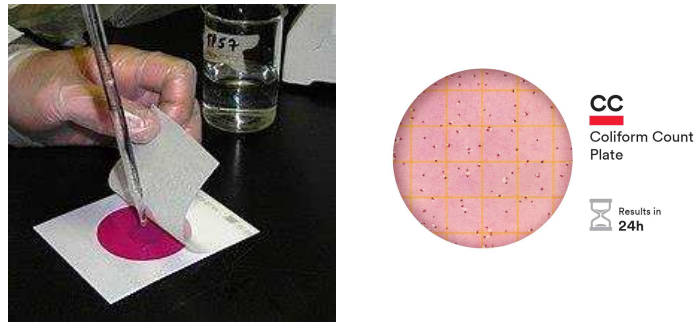


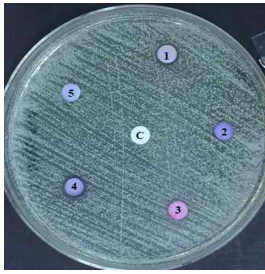
Fig. 27. 3MTM Petri-film test

2. 항균시험 결과 분석

1) 1차 검정 : Shikonin 류 5종의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 shikonin, isobutylshikonin, acetylshikonin, deoxyshikonin, dimethylacrylshikonin의 1차 항균 활성을 측정하였음.

1차 검정 : Shikonin 류 5종의 항균 활성 결과 (shikonin, isobutylshikonin, acetylshikonin, deoxyshikonin, dimethylacrylshikonin)	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p style="text-align: center;">억제대 형성</p> <p>4. Deoxyskikonin</p> <p>1. Skikonin</p> <p>3. Acetylskikonin</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p style="text-align: center;">억제대 형성</p> <p>4. Deoxyskikonin</p> <p>1. Skikonin</p> <p>3. Acetylskikonin</p> <p>2. Isobutylskikonin</p> <p>5. Dimethylacrylskikonin</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p>

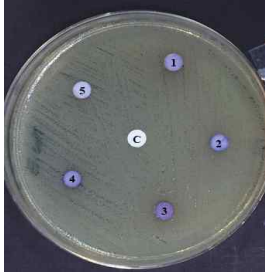


억제대 형성
4. Deoxyskikinin
1. Skikinin



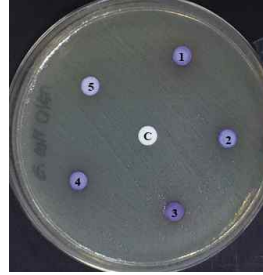
억제대 형성
4. Deoxyskikinin
1. Skikinin
5. Dimethylacrylskikinin

E. coli (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝



억제대 형성
없음

E. coli O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝



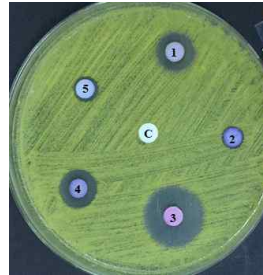
억제대 형성
없음

L. monocytogenes (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝



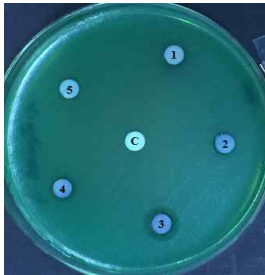
억제대 형성
없음

M. luteus (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝



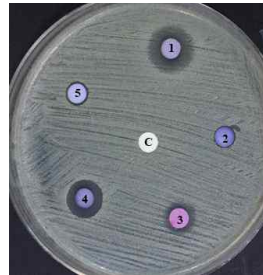
억제대 형성
3. Acetylskikinin
4. Deoxyskikinin
1. Skikinin
5. Dimethylacrylskikinin
2. Isobutylskikinin

P. aeruginosa (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝



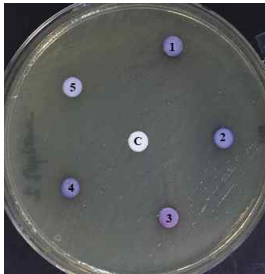
억제대 형성
3. Acetylskikinin
4. Deoxyskikinin

S. aureus (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝



억제대 형성
1. Skikinin
4. Deoxyskikinin
3. Acetylskikinin
5. Dimethylacrylskikinin
2. Isobutylskikinin

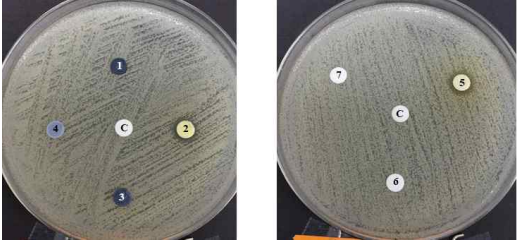
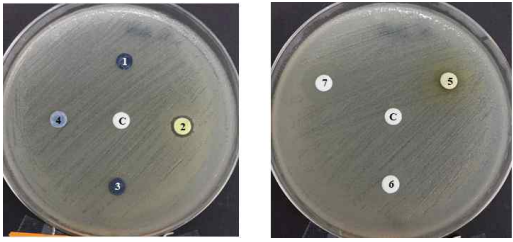
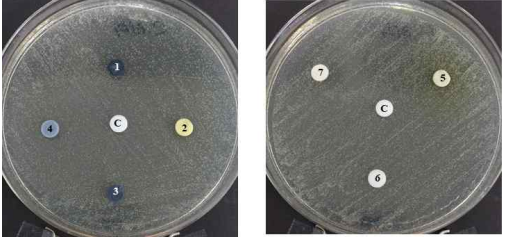
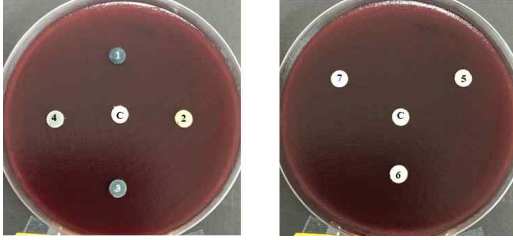
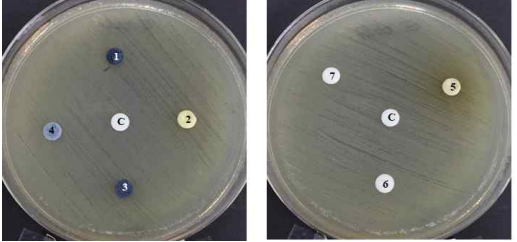
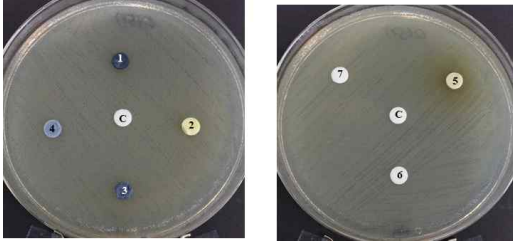

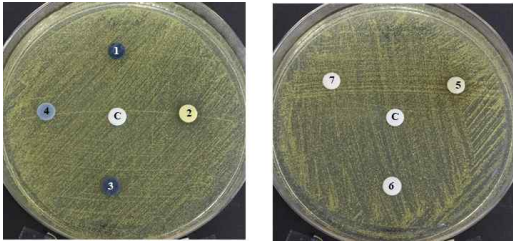
S. Typhimurium (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝



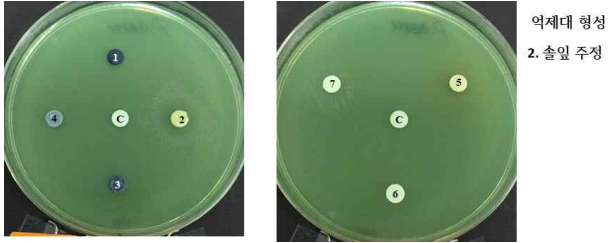
억제대 형성
없음

2) 2차 검정 : 솔잎, 자근 등 7종의 항균 활성 결과

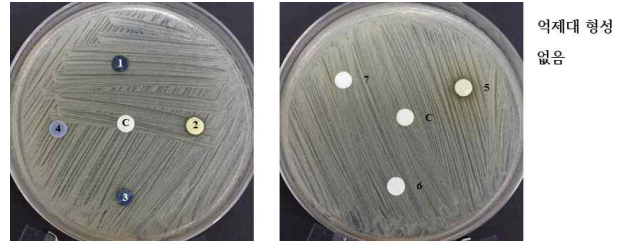
- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 산서성 자근 주정, 솔잎 주정, 영월 자근 주정, 하남성 자근 주정, 황금 주정, 솔잎 추출물, 조순현 교수님 물질 (원액 사용)의 1차 항균 활성을 측정하였음.

<p align="center">2차 검정 : 솔잎, 자근 등 7종의 항균 활성 결과 (산서성 자근 주정, 솔잎 주정, 영월 자근 주정, 하남성 자근 주정, 황금 주정, 솔잎 추출물, 조순현 교수님 물질)</p>	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 2. 솔잎 주정 5. 황금 주정</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 2. 솔잎 주정</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>
<p><i>E. coli</i> (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>	<p><i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>
<p><i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>	<p><i>M. luteus</i> (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 없음</p>

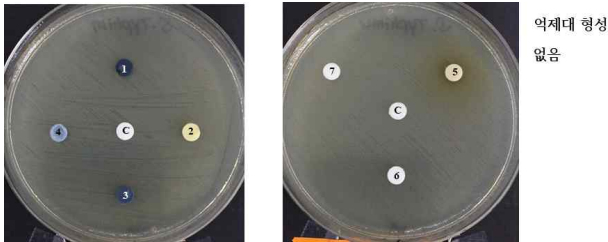
P. aeruginosa (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝



S. aureus (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝



S. Typhimurium (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝

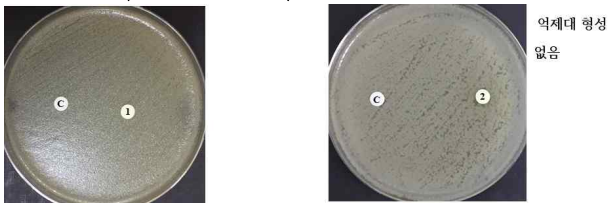


3) 3차 검정 : 꾀 추출물 2종의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 진피 95% 주정 추출물, 청피 95% 주정 추출물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

3차 검정 : 꾀 추출물 2종의 항균 활성 결과
(진피 95% 주정 추출물, 청피 95% 주정 추출물)

B. cereus (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝



B. subtilis (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝



C. albicans (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝



C. perfringens (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝



E. coli (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝

E. coli O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝

		억제대 형성 없음			억제대 형성 없음
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝			<i>M. luteus</i> (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝		
		억제대 형성 없음			억제대 형성 없음
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝			<i>S. aureus</i> (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝		
		억제대 형성 없음			억제대 형성 없음
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝					
		억제대 형성 없음			

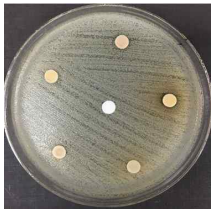
4) 4차 검정 : 계피와 옷의 여러 부위 5종 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 육계, 계지, 계피, 옷잎, 옷줄기의 1차 항균 활성을 측정하였음.

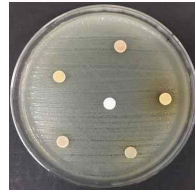
4차 검정 : 계피와 옷의 여러 부위 5종 항균 활성 결과
(육계, 계지, 계피, 옷잎, 옷줄기)

B. cereus (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝

B. subtilis (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝



-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO



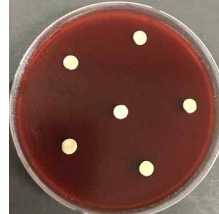
-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***C. albicans* (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝**



-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***C. perfringens* (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝**



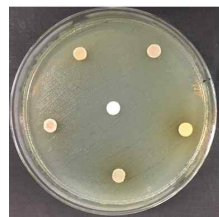
-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***E. coli* (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝**



-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝**



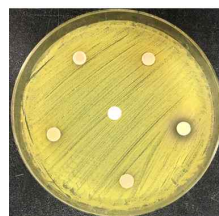
-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝**



-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝**



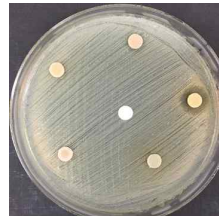
-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝**



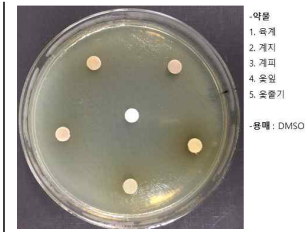
-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

***S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝**



-약물
1. 육계
2. 계지
3. 계피
4. 울말
5. 울분기
-용매 : DMSO

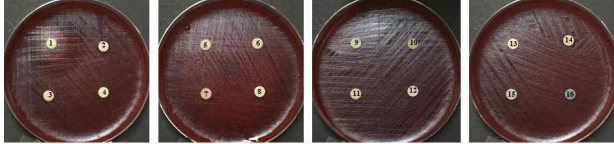
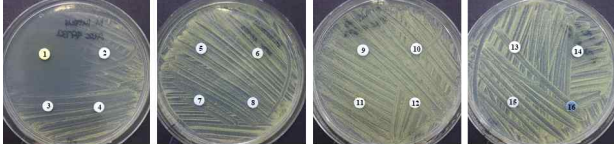
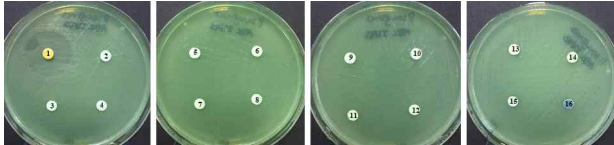
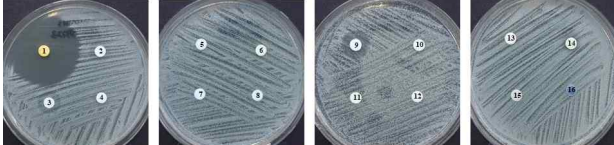
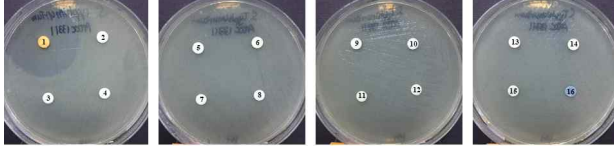
***S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝**



5) 5차 검정 : 16종 추출물의 항균 활성 결과

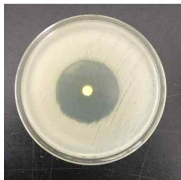
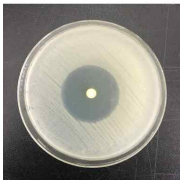
- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 계피오일, 레몬, 오렌지, 자몽, 귤, 애기수염, 청피, 진피, 자소엽, 소자, 수영, 가는잎조릿대, 하수오, 솔잎, 자근복합물, 자근주정추출물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

5차 검정 : 16종 추출물의 항균 활성 결과 (계피오일, 레몬, 오렌지, 자몽, 귤, 애기수염, 청피, 진피, 자소엽, 소자, 수영, 가는잎조릿대, 하수오, 솔잎, 자근복합물, 자근주정추출물)	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p> <p>억제대 형성 14. 솔잎</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p> <p>억제대 형성 14. 솔잎</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>
<p><i>E. coli</i> (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>	<p><i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝</p> <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>
<p><i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>M. luteus</i> (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝</p>

 <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>	 <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>
<p><i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>	<p><i>S. aureus</i> (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>
<p><i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝</p>  <p>억제대 형성 1. 계피오일</p>	

6) 6차 검정 : cinnamaldehyde의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 cinnamaldehyde의 1차 항균 활성을 측정하였음.

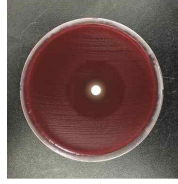
<p>6차 검정 : cinnamaldehyde의 항균 활성 결과</p>	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p>▪ Cinnamaldehyde <i>B. cereus</i></p>  <p>억제대 (40 mm)</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p>▪ Cinnamaldehyde <i>B. subtilis</i></p>  <p>억제대 (36 mm)</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p>

▪ Cinnamaldehyde
C. albicans



억제대 (64 mm)

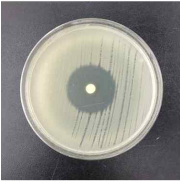
▪ Cinnamaldehyde
Cl. perfringens



억제대 (37 mm)

***E. coli* (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝**

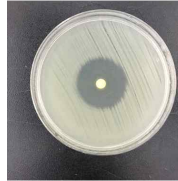
▪ Cinnamaldehyde
E. coli



억제대 (33 mm)

***E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝**

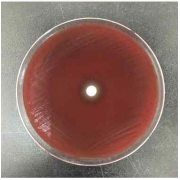
▪ Cinnamaldehyde
E. coli O157 H7



억제대 (33 mm)

***L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝**

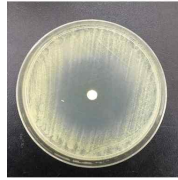
▪ Cinnamaldehyde
L. monocytogenes



억제대 (54 mm)

***M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝**

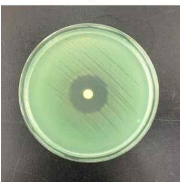
▪ Cinnamaldehyde
M. luteus



억제대 (47 mm)

***P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝**

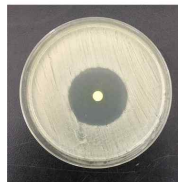
▪ Cinnamaldehyde
P. aeruginosa



억제대 (26 mm)

***S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝**

▪ Cinnamaldehyde
S. aureus



억제대 (37 mm)

***S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝**


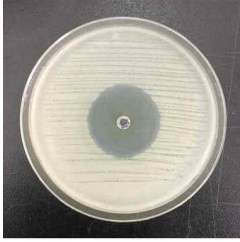

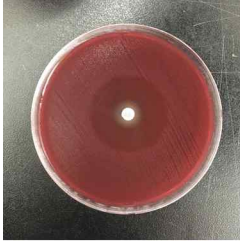
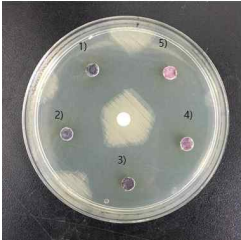

▪ Cinnamaldehyde
S. Typhimurium

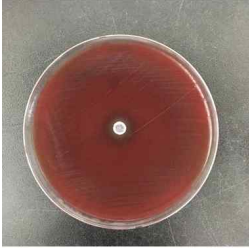


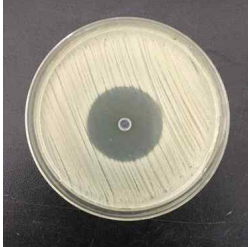



억제대 (47 mm)

7) 7차 검정 : 항균조성물 S1의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 S1 조성물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

7차 검정 : 항균조성물 S1의 항균 활성 결과	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. cereus</i></p>  <p>억제대 (39 mm)</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. subtilis</i></p>  <p>억제대 (33 mm)</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>C. albicans</i></p>  <p>억제대 (59 mm)</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>Cl. perfringens</i></p>  <p>억제대 (38 mm)</p>
<p><i>E. coli</i> (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>E. coli</i></p>  <p>억제대 (지름, mm)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1) 51 - 32 2) 52 - 32 3) 53 - 36 4) 54 - 34 5) 55 - 38 	<p><i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>E. coli</i> O157:H7</p>  <p>억제대 (지름, mm)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1) 51 - 34 2) 52 - 34 3) 53 - 36 4) 54 - 42 5) 55 - 40
<p><i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>M. luteus</i> (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝</p>

<p><i>L. monocytogenes</i></p>  <p>억제대 (52 mm)</p>	<p><i>M. luteus</i></p>  <p>억제대 (43 mm)</p>
<p><i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>P. aeruginosa</i></p>  <p>억제대 (지름, mm)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) S1 - 24 2) S2 - 25 3) S3 - 25 4) S4 - 25 5) S5 - 27 	<p><i>S. aureus</i> (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>S. aureus</i></p>  <p>억제대 (35 mm)</p>
<p><i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>S. Typhimurium</i></p>  <p>억제대 (35 mm)</p>	

8) 8차 검정 : 항균조성물 S2의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 S2 조성물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

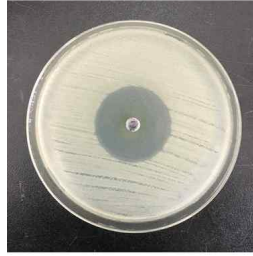
<p>8차 검정 : 항균조성물 S2의 항균 활성 결과</p>	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p>

B. cereus



억제대 (38 mm)

B. subtilis



억제대 (33 mm)

C. albicans (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝

C. albicans



억제대 (59 mm)

C. perfringens (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝

Cl. perfringens



억제대 (37 mm)

E. coli (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝

E. coli



- 억제대 (지름, mm)
- 1) S1 - 32
 - 2) S2 - 32
 - 3) S3 - 36
 - 4) S4 - 34
 - 5) S5 - 38

E. coli O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝

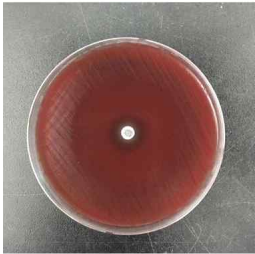
E. coli O157:H7



- 억제대 (지름, mm)
- 1) S1 - 34
 - 2) S2 - 34
 - 3) S3 - 36
 - 4) S4 - 42
 - 5) S5 - 40

L. monocytogenes (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝

L. monocytogenes



억제대 (52 mm)

M. luteus (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝




M. luteus



억제대 (43 mm)

P. aeruginosa (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝

S. aureus (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝

<p><i>P. aeruginosa</i></p>  <p>억제대 (지름, mm) 1) S1 - 24 2) S2 - 25 3) S3 - 25 4) S4 - 25 5) S5 - 27</p>	<p><i>S. aureus</i></p>  <p>억제대 (35 mm)</p>
<p><i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>S. Typhimurium</i></p>  <p>억제대 (35 mm)</p>	

9) 9차 검정 : 항균조성물 S3의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 S3 조성물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

<p style="text-align: center;">9차 검정 : 항균조성물 S3의 항균 활성 결과</p>	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. cereus</i></p>  <p>억제대 (38 mm)</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. subtilis</i></p>  <p>억제대 (33 mm)</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p>

C. albicans



억제대 (60 mm)

Cl. perfringens



억제대 (37 mm)

***E. coli* (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝**

E. coli



- 억제대 (지름, mm)
- 1) S1 - 32
 - 2) S2 - 32
 - 3) S3 - 36
 - 4) S4 - 34
 - 5) S5 - 38

***E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝**

E. coli O157:H7



- 억제대 (지름, mm)
- 1) S1 - 34
 - 2) S2 - 34
 - 3) S3 - 36
 - 4) S4 - 42
 - 5) S5 - 40

***L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝**

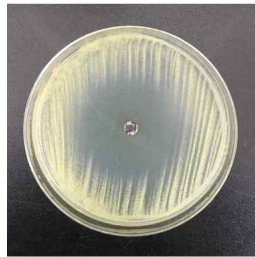
L. monocytogenes



억제대 (52 mm)

***M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝**

M. luteus



억제대 (45 mm)

***P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝**

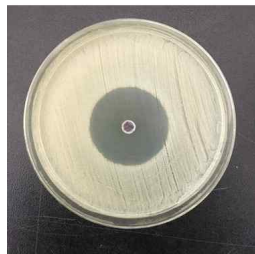
P. aeruginosa



- 억제대 (지름, mm)
- 1) S1 - 24
 - 2) S2 - 25
 - 3) S3 - 25
 - 4) S4 - 25
 - 5) S5 - 27

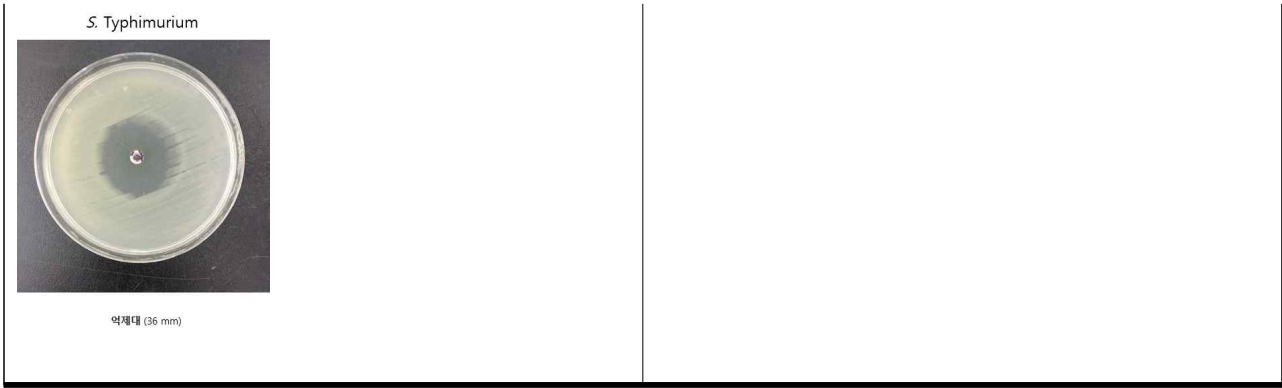
***S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝**

S. aureus



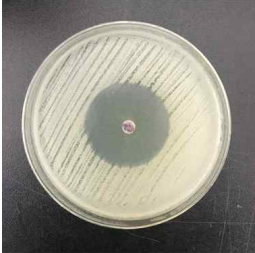
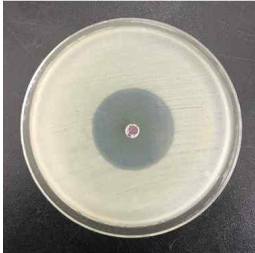

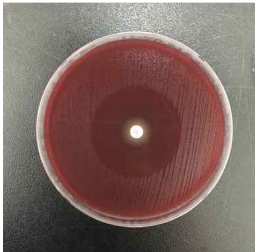
억제대 (35 mm)

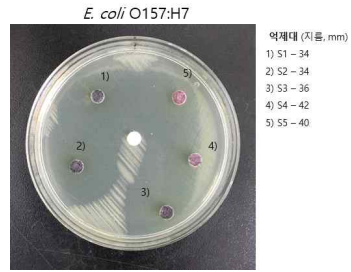
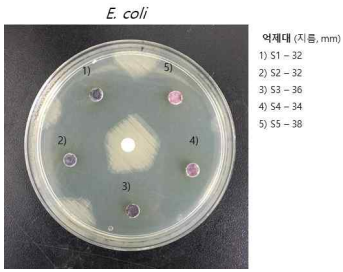
***S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝**



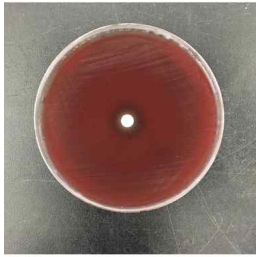
10) 10차 검정 : 항균조성물 S4의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 S4 조성물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

10차 검정 : 항균조성물 S4의 항균 활성 결과	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. cereus</i></p>  <p>억제대 (39 mm)</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. subtilis</i></p>  <p>억제대 (36 mm)</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>C. albicans</i></p>  <p>억제대 (60 mm)</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>Cl. perfringens</i></p>  <p>억제대 (42 mm)</p>
<p><i>E. coli</i> (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝</p>

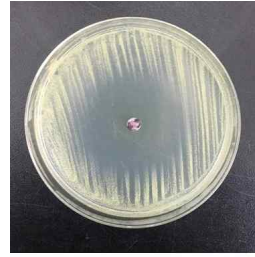


***L. monocytogenes* (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝**
L. monocytogenes



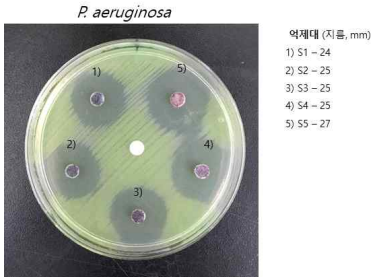
억제대 (52 mm)

***M. luteus* (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝**
M. luteus



억제대 (45 mm)

***P. aeruginosa* (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝**
P. aeruginosa



***S. aureus* (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝**
S. aureus



억제대 (36 mm)


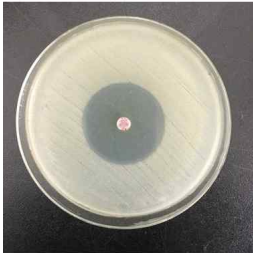
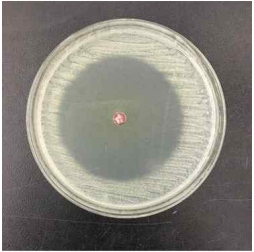
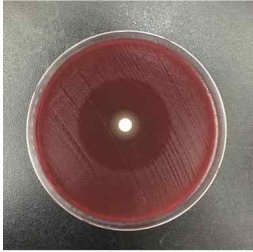
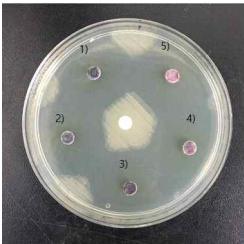

***S. Typhimurium* (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝**
S. Typhimurium



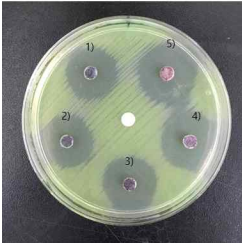

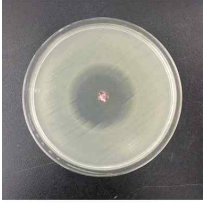


억제대 (37 mm)

11) 11차 검정 : 항균조성물 S5의 항균 활성 결과

- Table 8에서 제시한 11종 세균에서 S5 조성물의 1차 항균 활성을 측정하였음.

11차 검정 : 항균조성물 S5의 항균 활성 결과	
<p><i>B. cereus</i> (ATCC 13061) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. cereus</i></p>  <p>억제대 (40 mm)</p>	<p><i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>B. subtilis</i></p>  <p>억제대 (36 mm)</p>
<p><i>C. albicans</i> (ATCC 14053) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>C. albicans</i></p>  <p>억제대 (60 mm)</p>	<p><i>C. perfringens</i> (ATCC 13124) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>Cl. perfringens</i></p>  <p>억제대 (42 mm)</p>
<p><i>E. coli</i> (ATCC 25922) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>E. coli</i></p>  <p>억제대 (지름, mm) 1) S1 - 32 2) S2 - 32 3) S3 - 36 4) S4 - 34 5) S5 - 38</p>	<p><i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 35150) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>E. coli</i> O157:H7</p>  <p>억제대 (지름, mm) 1) S1 - 34 2) S2 - 34 3) S3 - 36 4) S4 - 42 5) S5 - 40</p>
<p><i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111) 항균효과 스크리닝</p>	<p><i>M. luteus</i> (ATCC 49732) 항균효과 스크리닝</p>

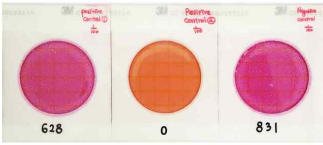
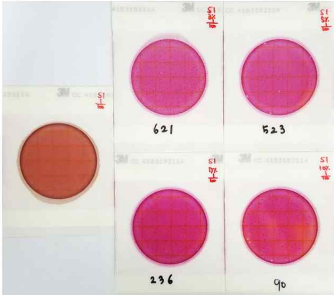
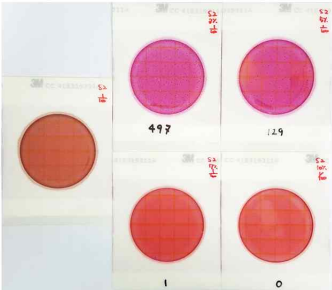
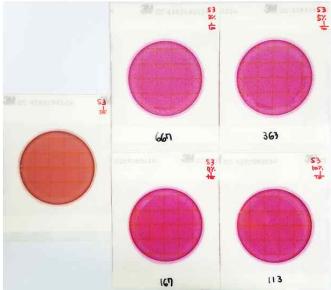
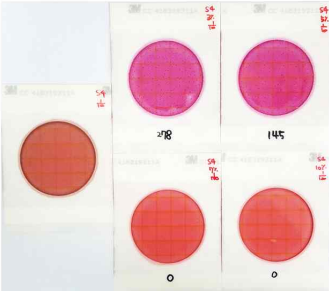
<p><i>L. monocytogenes</i></p>  <p>억제대 (52 mm)</p>	<p><i>M. luteus</i></p>  <p>억제대 (46 mm)</p>
<p><i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>P. aeruginosa</i></p>  <p>억제대 (지름, mm)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) S1 - 24 2) S2 - 25 3) S3 - 25 4) S4 - 25 5) S5 - 27 	<p><i>S. aureus</i> (ATCC 25923) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>S. aureus</i></p>  <p>억제대 (36 mm)</p>
<p><i>S. Typhimurium</i> (ATCC 13311) 항균효과 스크리닝</p> <p><i>S. Typhimurium</i></p>  <p>억제대 (40 mm)</p>	

12) 12차 검정 : 3MTM Petrifilm을 이용한 조성물의 항균 활성 결과

- 세균을 McFarland 탁도 0.33 (1×10^8 /ml) 농도로 준비
- 11차 검정에서 도출한 결과를 바탕으로 2차 항균조성물 S1-2, S2-2, S3-2, S4-2를 제조
- 준비된 세균 현탁액과 항균조성물을 1:100 부피 비율로 혼합하여 3MTM Petrifilm에 접종

12차 검정 : 3M™ Petrifilm을 이용한 조성물의 항균 활성 결과
(2차 항균조성물 S1-2, S2-2, S3-2, S4-2)

대조군	S1-2
-----	------

<p><대조군></p> <ul style="list-style-type: none"> - Positive control 1 (원액 10 mL) - Positive control 2 (원액 9 mL + CA 1 mL) - Negative control (원액 10 mL) 	<p><S1-2></p> <p>자근주정 6.7 애기수영 1 얼죽 1 명감 1 시약 0.3</p> 																														
<p>S2-2</p> <p><S2-2></p> <p>자근주정 6.5 애기수영 1 얼죽 1 명감 1 시약 0.5</p> 	<p>S3-2</p> <p><S3-2></p> <p>자근주정 6.7 애기수영 1 얼죽 1 명감 1 식첨 0.3</p> 																														
<p>S4-2</p> <p><S4-2></p> <p>자근주정 6.5 애기수영 1 얼죽 1 명감 1 식첨 0.5</p> 	<p>S2-2, S4-2 조성비에서 각각 10% 이상, 7% 이상의 농도에서 최소 살균농도(MBC)가 결정됨</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>원액(?)*</th> <th>3%</th> <th>5%</th> <th>7%</th> <th>10%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S1-2</td> <td>0</td> <td>621</td> <td>523</td> <td>236</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>S2-2</td> <td>0</td> <td>497</td> <td>129</td> <td>1</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>S3-2</td> <td>0</td> <td>667</td> <td>363</td> <td>167</td> <td>113</td> </tr> <tr> <td>S4-2</td> <td>0</td> <td>278</td> <td>145</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		원액(?)*	3%	5%	7%	10%	S1-2	0	621	523	236	90	S2-2	0	497	129	1	0	S3-2	0	667	363	167	113	S4-2	0	278	145	0	0
	원액(?)*	3%	5%	7%	10%																										
S1-2	0	621	523	236	90																										
S2-2	0	497	129	1	0																										
S3-2	0	667	363	167	113																										
S4-2	0	278	145	0	0																										

13) 13차 검정 : 항균 조성물 W의 항균 활성 결과

- 세균을 McFarland 탁도 0.33 (1×10⁸/ml) 농도로 준비
- 항균 조성물 W를 제조한 뒤, 식품에 첨가가 가능하도록 부형제를 혼합하여 수화
- 항균 조성물 W를 다양한 농도로 Mueller-Hinton broth에 혼합한 뒤, 각각의 튜브에 세균을 배양하고 24시간 뒤에 이를 각각 Mueller-Hinton agar에 pour-plate method로 접종하여 MBC를 도출하였음.
- 그 결과, 항균 조성물 W는 0.125% 이상 모든 농도구간에서 완벽한 제균 능력을 보였음



Fig. 28. 항균 조성물 W의 항균 성능 평가

14) 14차 검정 : 항균 조성물 W의 항균 최소 살균 농도 도출

- 13차 검정에서 가장 낮은 농도 조건인 0.125%에서도 세균이 확인되었으므로, 0.08~0% 구간을 0.01% 간격의 실험 조건을 나누어 13차와 동일한 방식으로 항균 성능을 평가
- 그 결과, 항균 조성물 W는 0.08% 이상의 농도구간에서 11종의 모든 시험 세균에 대한 세균 능력을 보였음

최소 살균농도
(MBC)

E. coli O157:H7

+W 0.08% +W 0.07% +W 0.06% +W 0.05% +W 0.04% +W 0.03% +W 0.02 % +W 0% 대조군



B. subtilis

최소 살균농도
(MBC)

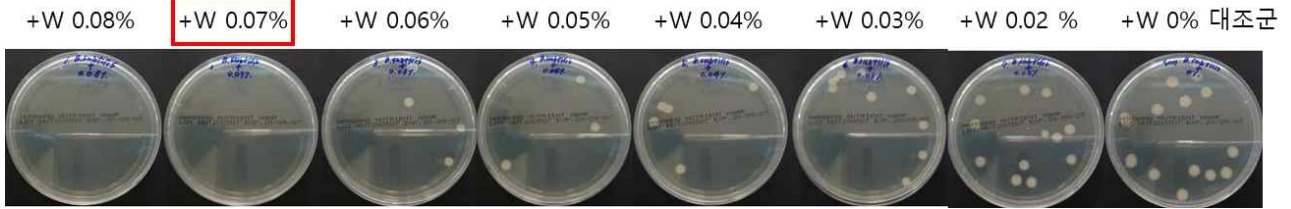


그림 5. 항균 조성물 W의 최소 살균농도 도출.

항균조성물 W는 0.08% 이상의 농도에서 11종의 모든 시험세균을 제균할 수 있음

7. 성분 표준화

1) 선택성(Selectivity)

자근의 주성분인 Naphthoquinone성분의 각 머무름 시간은 shikonin이 약 7.5분, β -hydroxyisovaleryl shikonin이 약 10.2분, acetyl shikonin이 약 12.1분, deoxy shikonin이 16.3분, isobutyl shikonin이 17.5분, dimethylacryl shikonin이 19.2분, isovaleryl shikonin이 20.0분이었고 자근의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

2) 직선성(Linearity)

자근의 주성분 shikonin, β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin, deoxy shikonin, isobutyl shikonin, dimethylacryl shikonin, isovaleryl shikonin은 3.125~50 ppm(3.125, 6.25, 12.5, 50 ppm, 총 4개 농도)의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수(R^2)가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Fig.1 ~ Fig.7)

(1) shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	35657
Cal 1-2	6.25	68941
Cal 1-3	50	726327
Cal 1-4	100	1508043
R^2	0.9998	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=15240x-22484(R^2=0.9998)$$

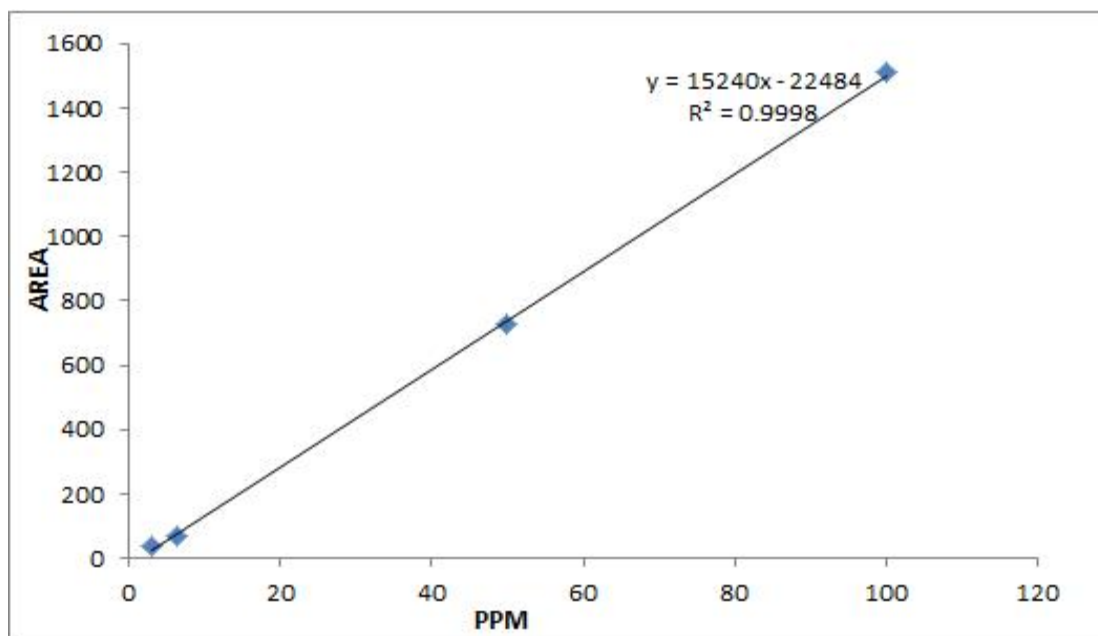


Fig. 29. Calibration curve of shikonin

○ shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(2) β -hydroxyisovaleryl shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	β -hydroxyisovaleryl shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	3680
Cal 1-2	6.25	8258
Cal 1-3	12.5	23899
Cal 1-4	50	103899
R^2	0.9995	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=2154.8x-3784.4(R^2=0.9995)$$

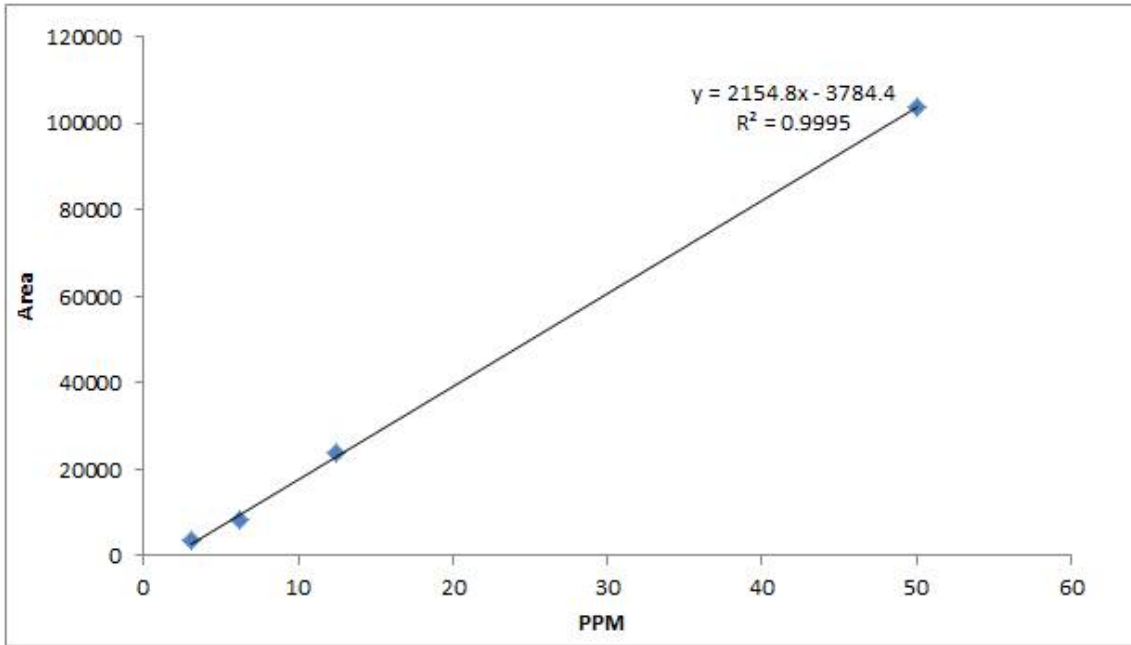


Fig. 30. Calibration curve of β -hydroxyisovaleryl shikonin

○ β -hydroxyisovaleryl shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(3) acetyl shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	acetyl shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	16780
Cal 1-2	6.25	40782
Cal 1-3	12.5	83649
Cal 1-4	50	343818
R^2	1.0000	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=6952.9x-3678.1(R^2=1.0000)$$

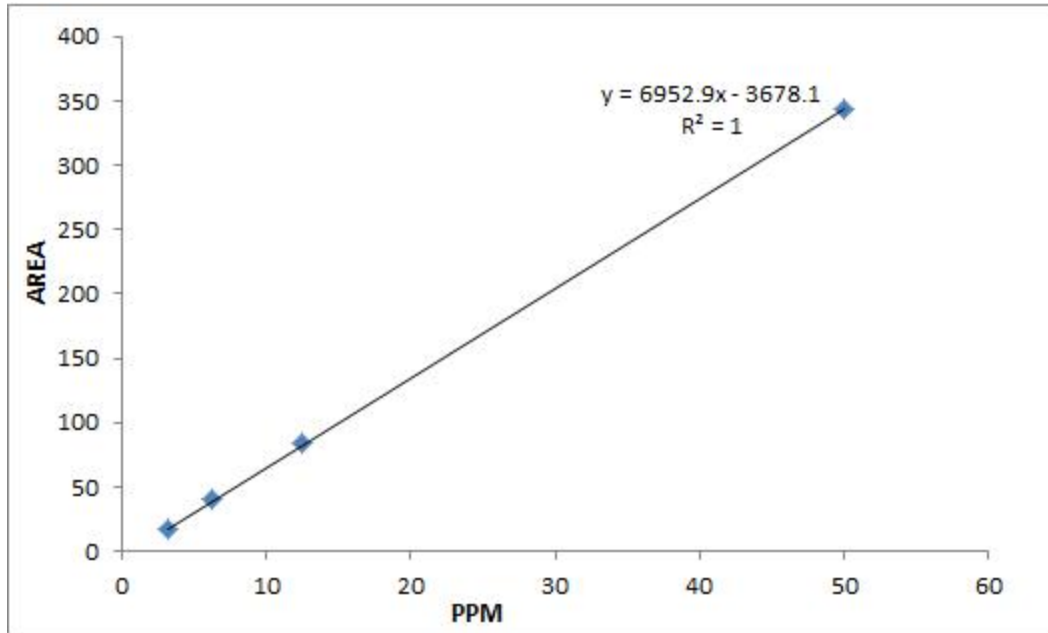


Fig. 31. Calibration curve of acetyl shikonin

○ acetyl shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(4) deoxy shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	deoxy shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	45801
Cal 1-2	6.25	85305
Cal 1-3	12.5	161486
Cal 1-4	50	592670
R^2	0.9999	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=11617x+12575(R^2=0.9999)$$

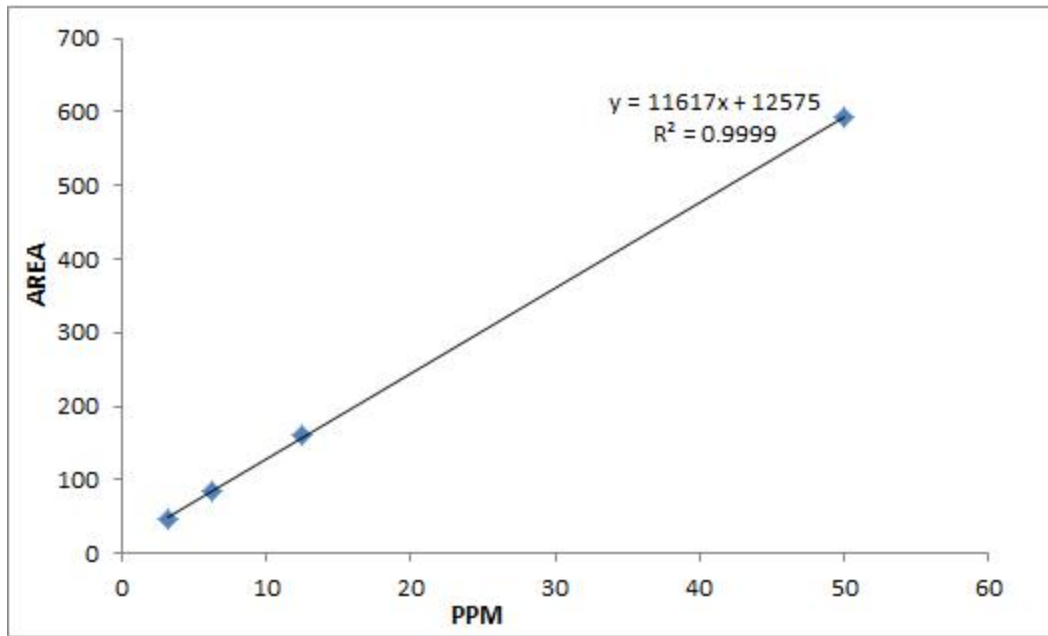


Fig 32. Calibration curve of deoxy shikonin

○ deoxy shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(5) isobutyl shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	isobutyl shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	26970
Cal 1-2	6.25	64819
Cal 1-3	50	436116
Cal 1-4	100	894104
R^2	0.9996	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=8880.4x+1672.4(R^2=0.9996)$$

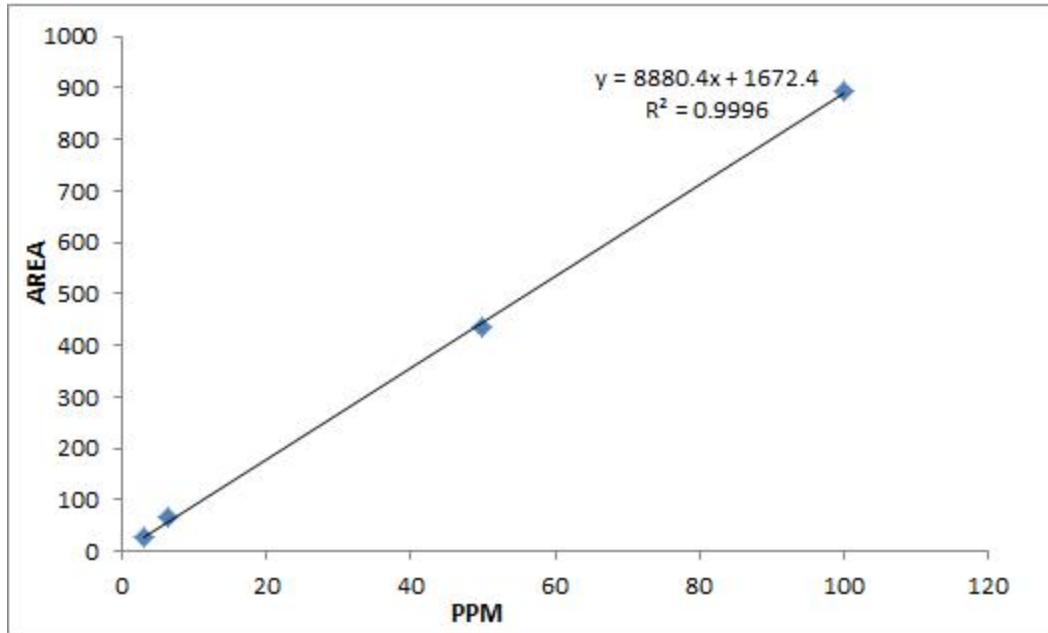


Fig 33. Calibration curve of isobutyl shikonin

○ isobutyl shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(6) dimethylacryl shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	dimethylacryl shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	26970
Cal 1-2	6.25	64819
Cal 1-3	50	436116
Cal 1-4	100	894104
R^2	0.9996	

*Cal :calibration

검량선식

$y=7264.5x+9613.6(R^2=0.9994)$

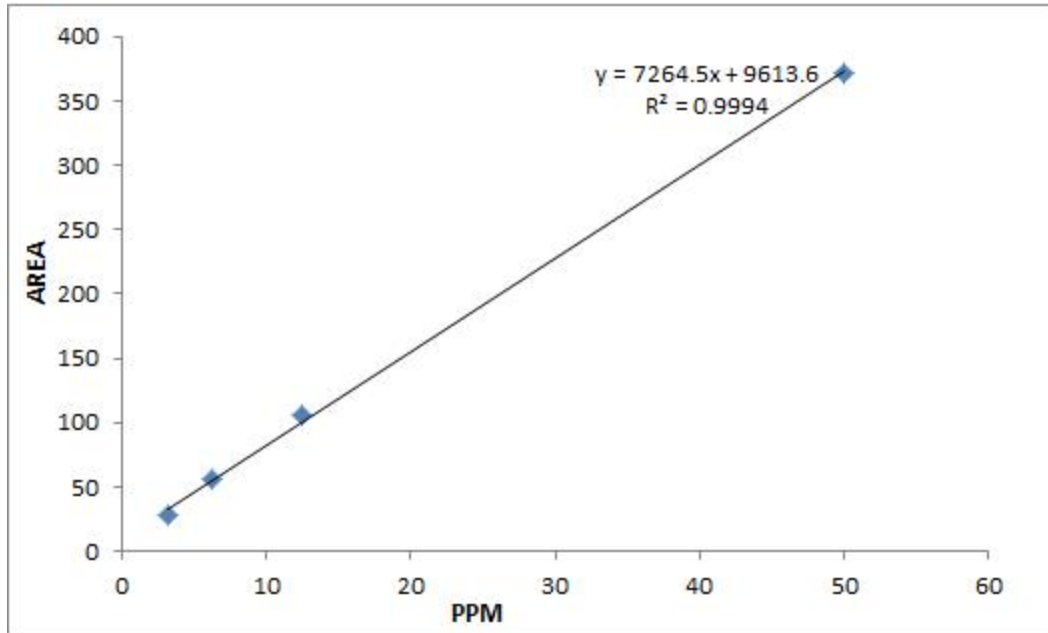


Fig 34. Calibration curve of dimethylacryl shikonin

○ dimethylacryl shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(7) isovaleryl shikonin

○ 직선성 시험 결과(1회 분석)

	isovaleryl shikonin	
	PPM(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	3.125	5879
Cal 1-2	6.25	11370
Cal 1-3	12.5	19008
Cal 1-4	50	77975
R^2	0.9994	

*Cal :calibration

검량선식

$$y=1537.4+933.49(R^2=0.9994)$$

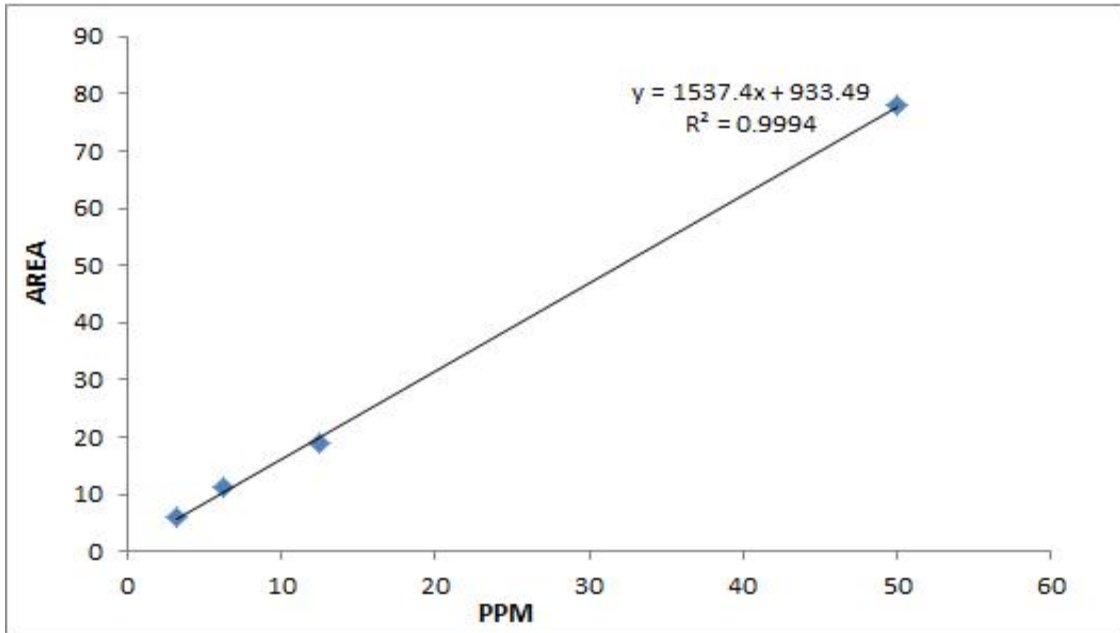


Fig 35. Calibration curve of isovaleryl shikonin

○ isovaleryl shikonin을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

(제1협동기관, (주)다정 박용주)

8. 안정성 시험 및 제조공정 최적화

1) 원료 표준화

(1) 식품의약품안전처에 식품원료로 등재

원재료	품목번호	이명 또는 영명	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
개지치	-	들지치, Mountain toothwort	<i>Lithospermum avense</i> L. / <i>Aegonychon avense</i> (L.) S.F.Gray	-	O	X	잎	-	-
거센털꽃마리	-	거센털개지치, Rooting trigonotis	<i>Trigonotis radicans</i> (Turcz.) Stevens / <i>Eritrichium radicans</i> (Turcz.) A.DC.	-	O	X	잎	-	-
지치	-	자초, 지초, Redroot gromwell	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	-	O	X	뿌리※(자근)	-	-

원재료	품목번호	이명 또는 영명	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
갯까치수염	-	갯꽃꼬리풀, 갯까치수염, Spoon-leaf yellow loosestrife	<i>Lysimachia mauritiana</i> Lam. / <i>Lubinia lineariloba</i> (Hook. & Arn.) Pax	-	O	X	잎	-	-
까치수염	-	까치수염, 꽃꼬리풀, Manchurian yellow loosestrife	<i>Lysimachia barystachys</i> Bunge	-	O	X	순, 잎	-	-
수염	-	괴성아, Sorrel, Garden dock	<i>Rumex acetosa</i> L. / <i>Acetosa pratensis</i> Mill.	-	O	X	뿌리, 잎	-	-
애기수염	-	애기괴성아, Field dock	<i>Rumex acetocella</i> L. / <i>Rumex acetosella</i> (L.) Mill.	-	O	X	순, 잎	-	-

원재료	품목번호	이명 또는 영명	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
말뚝조릿대	-	베이트키조릿대, 사라세니아 퍼푸레아	<i>Sasa veitchii</i> Rehder	-	O	X	잎	-	-

원재료	품목번호	이명 또는 영명	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
청미래덩굴	-	망개나무, 매발톱가시, 명감나무, Greenbrier, Catbrier, East Asian greenbrier	<i>Smilax china</i> L.	-	X	O	뿌리	-	-
청미래덩굴	-	망개나무, 매발톱가시, 명감나무, Greenbrier, Catbrier, East Asian greenbrier	<i>Smilax china</i> L.	-	O	X	순, 잎	-	-

(2) 원료 자근의 성상

[대한민국약전 기준규격]

지치 이 약은 뿌리로 약간 가늘고 간 방추형으로 간혹 분지되어 있고 길이 6~10cm, 지름 5~15mm이다. 바깥면은 어두운 보라색~자갈색을 띠고 피부는 거칠고 얇게 벗겨지기 쉽다. 대부분 꼬인 깊은 세로 홈이 있고 때로 목부까지 이른다. 근두에는 때로 줄기의 잔경이 붙어 있다. 꺾어지기 쉽고 꺾인 면은 입상이며 빈틈이 많다. 횡단면을 확대경으로 볼 때 피부의 바깥쪽은 어두운 보라색을 띠고 안쪽의 연한 갈색 부분은 불규칙하게 배열되고 목부는 노란색에 가깝다. 근두부의 중앙은 때로 빈틈이 있고 그 주변은 적자색을 띤다. 이 약은 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 약간 달다(그림 1).



Fig. 36. 건조되어진 자근 사진자료

(3) 위해성 분석

- 중금속 분석

식품공전 제8 일반시험법 9. 식품중 유해물질 시험법에 따라 유도결합플라즈마(ICP-MS)법을 이용하여 자근 원료의 대한 각종 무기물 분석을 진행하였으며, 그 결과는 표 1 과 그림 2 에 나타내었다.

Table 10. 자근 원료의 대한 유해물질 분석결과

분석항목	단위	결과	비고
납	mg/kg	1.3512 mg/kg	
총비소	mg/kg	0.6359 mg/kg	
카드뮴	mg/kg	0.0202 mg/kg	
총수은	mg/kg	0.0105 mg/kg	

제 D2019101602 호
문서확인 3C71-7881-7YF4

시험·검사성적서

제품명	지치(자근)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)다정	성명
	주소	충청북도 진천군 이월면 장수로 371	
제조번호		접수년월일	2019-10-18
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019101602

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2019-10-29
 시험·검사 책임자 : 이정구
 검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	1.3512 mg/kg	정다운
총비소(mg/kg)	0.6359 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0202 mg/kg	정다운
총수은(mg/kg)	0.0105 mg/kg	노화영

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.
 ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.

2019년 10월 29일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 (031)628-2465 FAX (031)628-0400-1

Fig. 37. 자근 위해성 물질 분석결과 성적서

- 잔류농약 분석

식품의약품안전처고시 제2016-148호(II.농산물 등의 유해물질 분석법, 1.잔류농약)에 따라 LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS 및 GC 를 이용하여 각 원료에 대한 잔류농약 473 성분에 대해 분석을 진행하였으며, 그 결과는 Table 11 와 Fig 37~42 에 나타내었다. 그리고 자근원료에서 잔류농약 4종이 검출된 항목들은 기준값 이하로 검출되었으나, 검출된 잔류농약 성분은 자근에 해당하는 농약성분들이 아님을 확인 하였다.

Table 11. 각 원료의 대한 잔류농약 473 성분 분석결과

번호	원료명	검출항목	기준	분석결과	해당농약 여부
1	자근 (뿌리)	플루벤디아마이드 (Flubendiamide)	0.9 mg/kg	0.016 mg/kg	자근에 해당되는 농약이 아님
		플루오피콜라이드 (Fluopicolide)	4.3 mg/kg	0.010 mg/kg	자근에 해당되는 농약이 아님
		만디프로파미드 (Mandipropamid)	2.7 mg/kg	0.086 mg/kg	자근에 해당되는 농약이 아님
		프로파모카브 (Propamocarb)	21 mg/kg	0.007 mg/kg	자근에 해당되는 농약이 아님
2	얼룩조릿대 (잎)	없음	-	불검출	
3	청미래덩굴 (뿌리)	없음	-	불검출	
4	애기수영 (순,잎)	없음	-	불검출	
5	수영 (뿌리)	없음	-	불검출	



 시험 성적서 (Test Certificate)		접수번호	PCAM - 2008 - 0307																																																																																								
		페이지	(1) / (총 1)																																																																																								
주소 34036 대전광역시 유성구 대덕로 11로 12 (달빛동 067) / 전화 [Redacted]																																																																																											
1. 시험내용		의뢰일자	2020년 8월 13일																																																																																								
기광영	위탁자	의뢰자	모범경																																																																																								
생산지/주소	-	시험장소	분석실																																																																																								
시료명	청미래덩굴뿌리	분석장비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC																																																																																								
시험기간	2020년 8월 13일 - 2020년 8월 19일	시험용경온도	(22-24) °C																																																																																								
용도	참고용	시험용경습도	70% R.H 이하																																																																																								
2. 잔류농약검사항목																																																																																											
검사 항목 473 성분																																																																																											
<table border="0" style="font-size: small;"> <tr><td>2,4-DEP</td><td>Chlorpyrifos</td><td>Zenithin-Z</td><td>Hydroxymethyl</td><td>2-Hydroxyethyl</td><td>Metolachlor</td><td>Prothioconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Abamectin</td><td>Carbendazim</td><td>Imidacloprid</td><td>Isoprotin</td><td>Methidathion</td><td>Nethyflorfen</td><td>Propiconazole</td><td>CGR9</td></tr> <tr><td>Azinphos</td><td>Carbosulfone</td><td>Demeton</td><td>Permethrin</td><td>Thiodiazinon</td><td>Methidathion</td><td>Prochloraz</td><td>Tetrazolinone</td></tr> <tr><td>Bifenthrin</td><td>Cyfluthrin</td><td>Salbutamol</td><td>Fenoxypipron</td><td>Chlorobutol</td><td>Metadathion</td><td>Pyrifos</td><td>Imidacloprid</td></tr> <tr><td>Azinphos-methyl</td><td>Diazinon</td><td>DEET</td><td>Imidacloprid</td><td>Malathion</td><td>Metolachlor</td><td>Promethin</td><td>Fluazinone</td></tr> <tr><td>Acetamiprid</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Admethion</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Azinphos</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Azinphos</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Azinphos</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> <tr><td>Azinphos</td><td>Difenthrin</td><td>Diethyltin</td><td>Imidacloprid</td><td>Metolachlor</td><td>Methidathion</td><td>Propiconazole</td><td>Terbufos</td></tr> </table>	2,4-DEP	Chlorpyrifos	Zenithin-Z	Hydroxymethyl	2-Hydroxyethyl	Metolachlor	Prothioconazole	Terbufos	Abamectin	Carbendazim	Imidacloprid	Isoprotin	Methidathion	Nethyflorfen	Propiconazole	CGR9	Azinphos	Carbosulfone	Demeton	Permethrin	Thiodiazinon	Methidathion	Prochloraz	Tetrazolinone	Bifenthrin	Cyfluthrin	Salbutamol	Fenoxypipron	Chlorobutol	Metadathion	Pyrifos	Imidacloprid	Azinphos-methyl	Diazinon	DEET	Imidacloprid	Malathion	Metolachlor	Promethin	Fluazinone	Acetamiprid	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos	Admethion	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos	Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos	Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos	Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos	Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos			
2,4-DEP	Chlorpyrifos	Zenithin-Z	Hydroxymethyl	2-Hydroxyethyl	Metolachlor	Prothioconazole	Terbufos																																																																																				
Abamectin	Carbendazim	Imidacloprid	Isoprotin	Methidathion	Nethyflorfen	Propiconazole	CGR9																																																																																				
Azinphos	Carbosulfone	Demeton	Permethrin	Thiodiazinon	Methidathion	Prochloraz	Tetrazolinone																																																																																				
Bifenthrin	Cyfluthrin	Salbutamol	Fenoxypipron	Chlorobutol	Metadathion	Pyrifos	Imidacloprid																																																																																				
Azinphos-methyl	Diazinon	DEET	Imidacloprid	Malathion	Metolachlor	Promethin	Fluazinone																																																																																				
Acetamiprid	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
Admethion	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
Azinphos	Difenthrin	Diethyltin	Imidacloprid	Metolachlor	Methidathion	Propiconazole	Terbufos																																																																																				
결과 (mg/kg)	상기한대로 불검출																																																																																										
확인	각성자 (시험자)		승인자 (기술책임자)																																																																																								
	성명: 장지혜 (인)		성명: 김현엽 (인)																																																																																								
※ 본 분석결과를 사전 경고·소속 및 법적요건으로 사용할 수 없습니다. ※ 위와 내용은 신청인이 제공한 시료에 대한 결과이며, 사용의 영정은 신청인이 책임한 것입니다. ※ 이 시험성적서는 정도 이외의 사용을 금합니다.																																																																																											
2020년 8월 19일 주식회사 피켄코리아 																																																																																											
서적P.40214-02 (13-02-21 출판)	A4(210x297)																																																																																										

Fig. 40. 청미래덩굴(뿌리) 원료에 대한 473성분 잔류농약 분석결과 성적서



 시험 성적서 (Test Certificate)		접수번호 PCAM - 2008 - 0427 페이지 (1) / (총 1)																						
부 34036 대전광역시 유성구 테크노 11로 12 (합림동 867) / 전화																								
1. 시험내용																								
기관명 ㈜다경	의뢰일자 2020년 9월 16일	생산지 ㈜다경																						
생산지 / 주소 충북 진천군 어물면 점수로 371	시험장소 본체실																							
시료명 수염뿌리	분석장비 LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC																							
시험기간 2020년 9월 16일 ~ 2020년 9월 22일	시험환경온도 (22 ~ 24) °C																							
용도 참고용	시험환경습도 70 % RH 이하																							
2. 잔류농약검사결과																								
검사항목 473 성분																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">Atrazine</td><td style="width: 15%;">Chlorpyrifos</td><td style="width: 15%;">Deltamethrin</td><td style="width: 15%;">Diflufenican</td><td style="width: 15%;">Etofenprox</td><td style="width: 15%;">Fenprophamid</td><td style="width: 15%;">Fenpyroximate</td><td style="width: 15%;">Fluorfenbutolil</td><td style="width: 15%;">Fenvalerate</td><td style="width: 15%;">Gamma-cyhalothrin</td><td style="width: 15%;">Imidacloprid</td><td style="width: 15%;">Lambda-cyhalothrin</td><td style="width: 15%;">Permethrin</td><td style="width: 15%;">Piperonyl-butoxide</td><td style="width: 15%;">Prallethrin</td><td style="width: 15%;">Pyrethrin</td><td style="width: 15%;">Pyrethroids</td><td style="width: 15%;">Spinetoram</td><td style="width: 15%;">Tebuconazole</td><td style="width: 15%;">Thiamethoxam</td><td style="width: 15%;">Triazophos</td><td style="width: 15%;">Zeta-cypermethrin</td></tr> <!-- Additional rows would follow the same pattern for all 473 components --> </table>			Atrazine	Chlorpyrifos	Deltamethrin	Diflufenican	Etofenprox	Fenprophamid	Fenpyroximate	Fluorfenbutolil	Fenvalerate	Gamma-cyhalothrin	Imidacloprid	Lambda-cyhalothrin	Permethrin	Piperonyl-butoxide	Prallethrin	Pyrethrin	Pyrethroids	Spinetoram	Tebuconazole	Thiamethoxam	Triazophos	Zeta-cypermethrin
Atrazine	Chlorpyrifos	Deltamethrin	Diflufenican	Etofenprox	Fenprophamid	Fenpyroximate	Fluorfenbutolil	Fenvalerate	Gamma-cyhalothrin	Imidacloprid	Lambda-cyhalothrin	Permethrin	Piperonyl-butoxide	Prallethrin	Pyrethrin	Pyrethroids	Spinetoram	Tebuconazole	Thiamethoxam	Triazophos	Zeta-cypermethrin			
결과 (mg/kg)	상기항목 불검출																							
확인	작성자 (시험자) 성명 : 김순기	승인자 (기술책임자) 성명 : 박주홍																						
※ 본 분석결과를 근거로 용고, 소용 품 일격요건으로 사용할 수 없습니다. ※ 위의 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것 입니다. ※ 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.																								
2020년 9월 22일 주식회사 피캠코리아 																								
서식P-A-210-02 (11-02-21 용양)	A4(210x297)																							

Fig. 42. 수영(뿌리) 원료에 대한 473성분 잔류농약 분석결과 성적서

- 자근 원료의 대한 위해성분 기준규격

번호	항목	단위	기준	비고
1	납(Pb)	ppm (mg/kg)	<5	대한민국약전
2	비소(As)	ppm (mg/kg)	<3	대한민국약전
3	수은(Hg)	ppm (mg/kg)	<0.2	대한민국약전
4	카드뮴(Cd)	ppm (mg/kg)	<0.3	대한민국약전
5	총 디디티	ppm (mg/kg)	<0.1	대한민국약전
6	디엘드린	ppm (mg/kg)	<0.01	대한민국약전
7	총 비에이치씨	ppm (mg/kg)	<0.2	대한민국약전
8	알드린	ppm (mg/kg)	<0.01	대한민국약전
9	엔드린	ppm (mg/kg)	<0.01	대한민국약전
10	티플루자마이드	ppm (mg/kg)	<1.0	대한민국약전
11	펜시쿠론	ppm (mg/kg)	<1.0	대한민국약전
12	헥사코나졸	ppm (mg/kg)	<0.2	대한민국약전

- 각 원료에 대한 잔류농약 기준규격

번호	원료명	항목	기준	분석결과
1	자근(뿌리)	플루벤디아마이드 (Flubendiamide)	0.9 mg/kg	0.016 mg/kg
		플루오피콜라이드 (Fluopicolide)	4.3 mg/kg	0.010 mg/kg
		만디프로파미드 (Mandipropamid)	2.7 mg/kg	0.086 mg/kg
		프로파모카브 (Propamocarb)	21 mg/kg	0.007 mg/kg
2	얼룩조릿대(잎)	¹⁾ 없음	¹⁾ 없음	불검출(473종)
3	청미래덩굴(뿌리)	¹⁾ 없음	¹⁾ 없음	불검출(473종)
4	수영(뿌리)	¹⁾ 없음	¹⁾ 없음	불검출(473종)
5	애기수영(순, 잎)	¹⁾ 없음	¹⁾ 없음	불검출(473종)

1)현재 식품의약품안전청 식품공전 잔류허용기준이 없으므로 확인시험을 통해 안전한 원료인지 확인한 후 사용하며, 향후 식품공전 잔류허용기준이 제정된 이후 이를 반영하여 기준규격을 설정하여 관리하고자 함.

2) 자근 추출물의 대한 온도 안정성

(1) 안정성 확인을 위한 HPLC 분석법

- 표준품 정보

- Shikonin [순도 98%, CromaDex® Inc., USA]
- Acetylshikonin [순도 98%, CFN90523, CAS No. 24502-78-1]

- 시험용액제조

자근추출물 0.1g을 10mL의 EtOH에 녹여 0.45um membrane filter로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

- HPLC 분석조건

- 컬럼 : Discovery® C18 (250mm x 4.6mm, 5um)
- 컬럼온도 : 25°C
- 검출기 파장 : UV 520nm
- 유속 : 0.8mL/min
- 이동상 :

시간 (분)	Water (초순수)	Acetonitrile
0.0	50	50
20.0	20	80
20.1	0	100
25.0	0	100
25.1	50	50
28.0	50	50

(2) 온도 안정성 실험 및 평가방법

자근추출물 일정량을 취하여 파우치에 밀봉한 후 각 온도(60°C, 70°C, 80°C, 90°C) 조건에서 5시간씩 보관한다. 대조구와 각 온도에 보관된 실험군을 HPLC 기기를 이용하여 상기 분석법으로 지표성분을 분석하고, 지표성분[시코닌(Shikonin), 아세틸시코닌(Acetylshikonin)]의 변화량을 가지고 온도 안정성을 평가한다.

(3) 온도 안정성 평가결과

각 온도에서 보관되어진 실험군을 가지고 평가한 결과 60°C 에서는 지표성분인 시코닌(Shikonin)과 아세틸시코닌(Acetylshikonin) 성분이 약 80%이상 보존되었으나, 70°C 이상에서는 안정성이 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과를 Table 12 과 Fig 43~48 에 상세하게 나타내었으

며, 제조공정 최적화에 있어서 상기와 같은 결과를 반영한다면 공정조건을 확립하는데 매우 유용하게 활용되리라 사료된다.

Table 12. 자근 성분인 시코닌과 아세틸시코닌 온도 안정성 결과

자근성분	대조구(실온)	60℃ (5시간보관)	70℃ (5시간보관)	80℃ (5시간보관)	90℃ (5시간보관)
시코닌 (Shikonin)	100%	79.6%	59.5%	16.9%	2.0%
아세틸시코닌 (Acetylshikonin)	100%	81.1%	41.5%	6.7%	0.2%

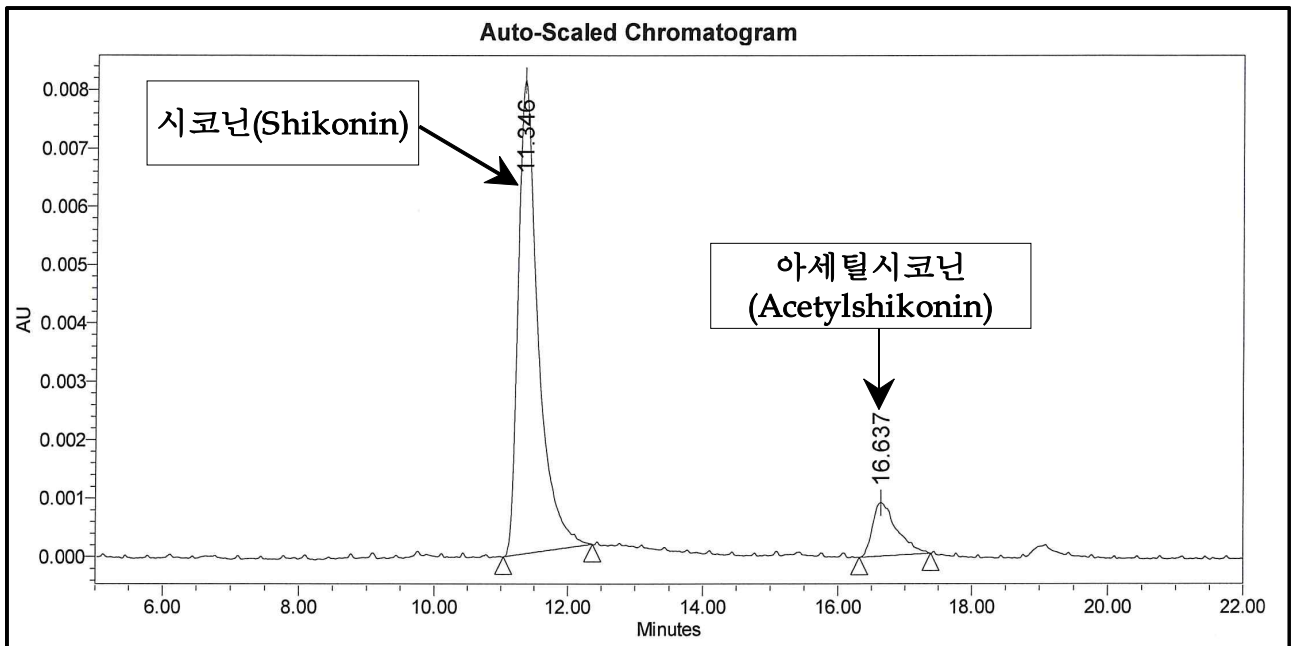


Fig. 43. 표준품 시코닌 과 아세틸시코닌 크로마토그램

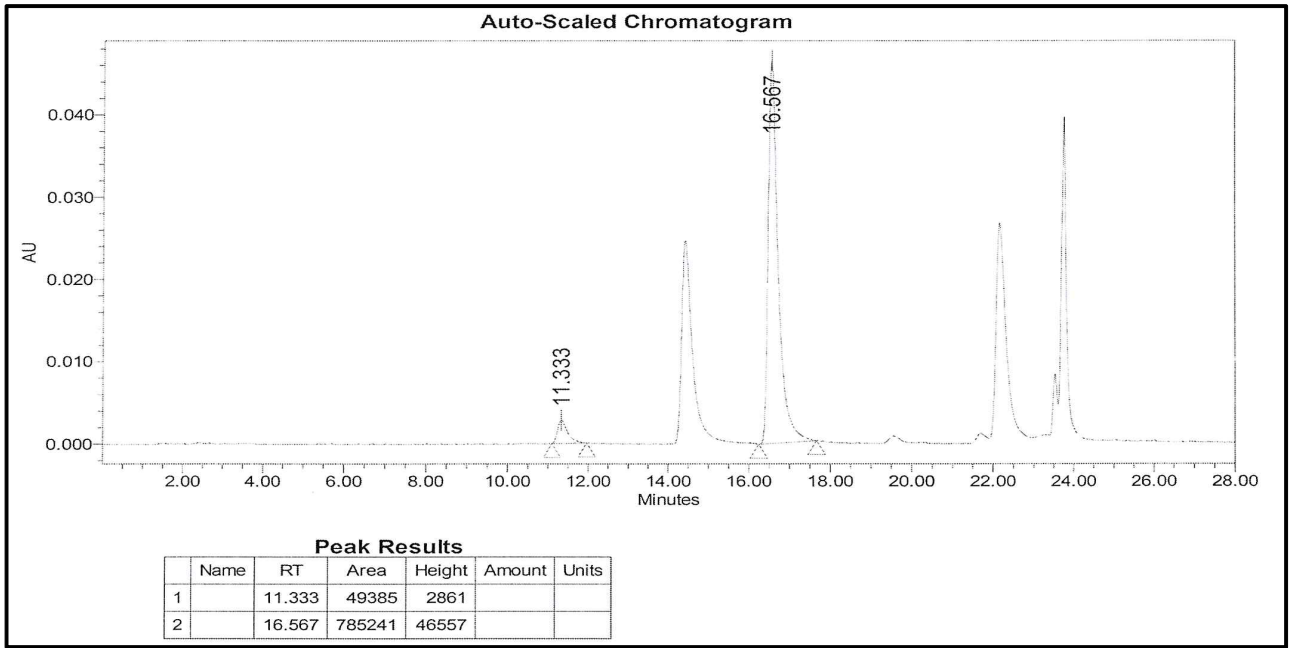


Fig. 44. 자근추출물 온도 안정성 대조구 크로마토그램

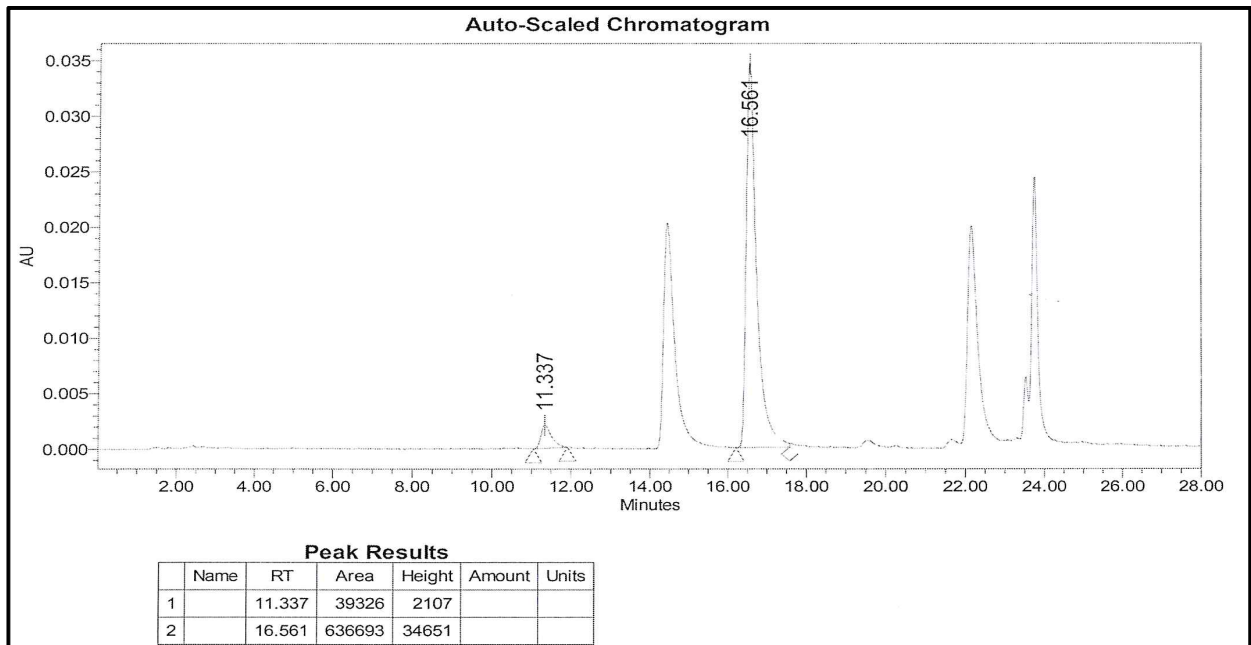


Fig. 45. 자근추출물 60°C, 5시간 안정성 크로마토그램

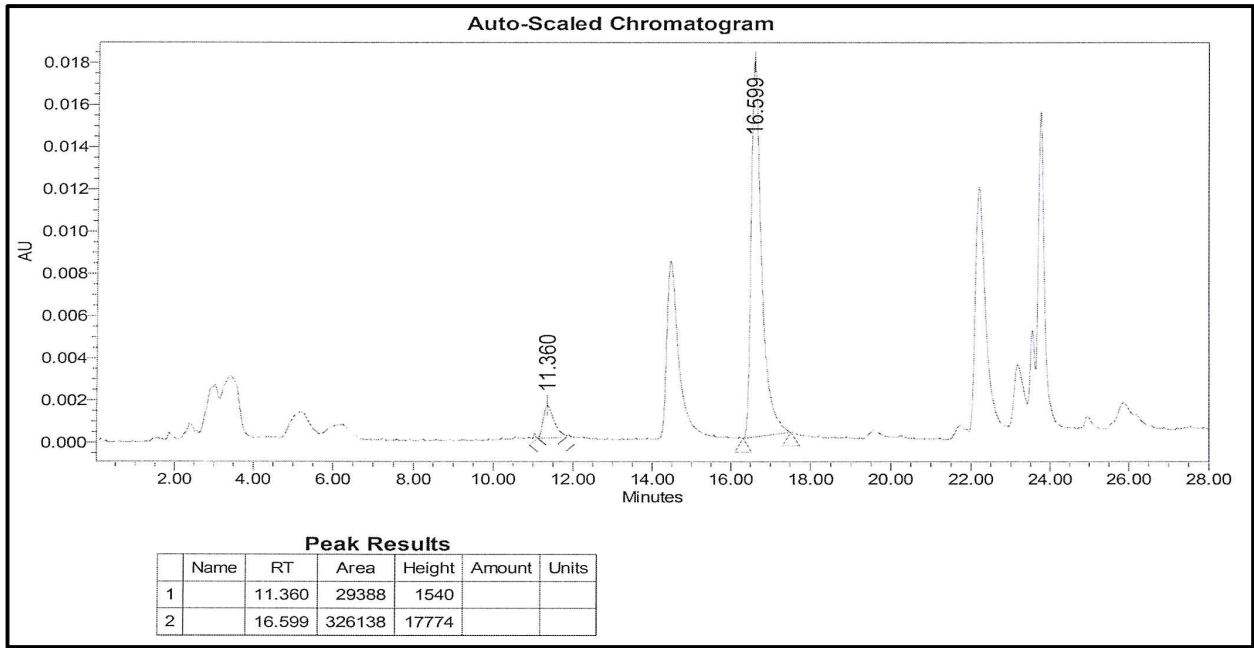


Fig. 46. 자근추출물 70°C, 5시간 안정성 크로마토그램

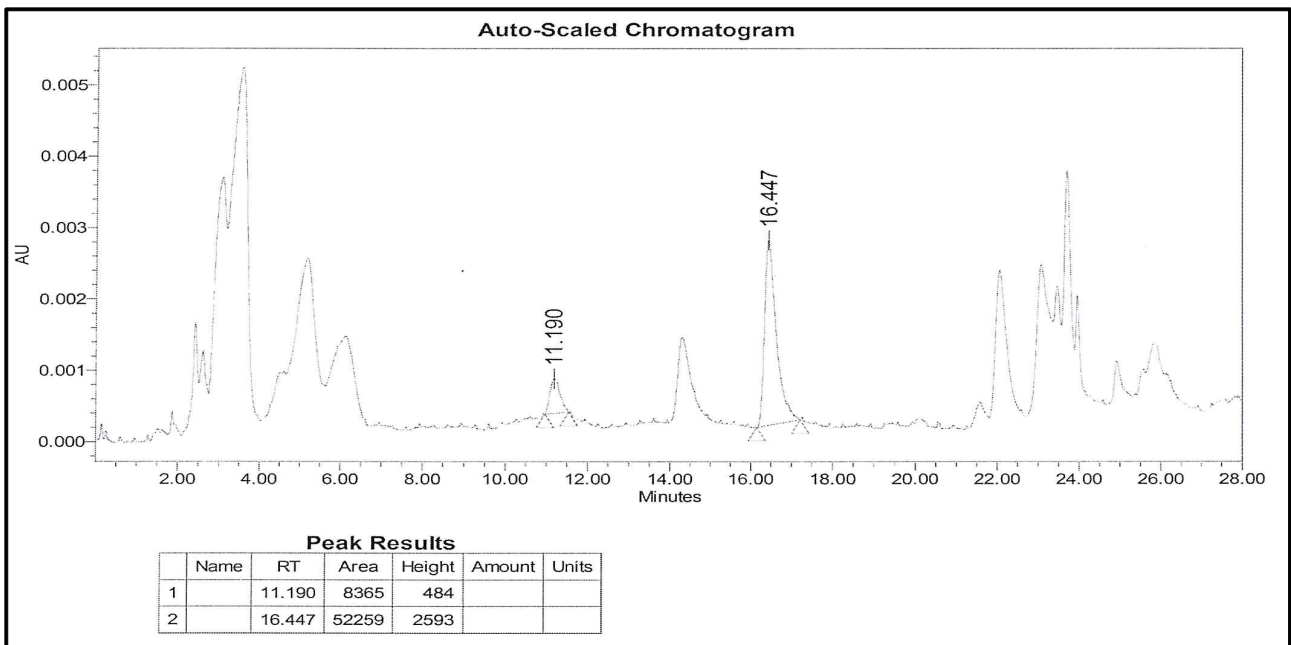


Fig. 47. 자근추출물 80°C, 5시간 안정성 크로마토그램

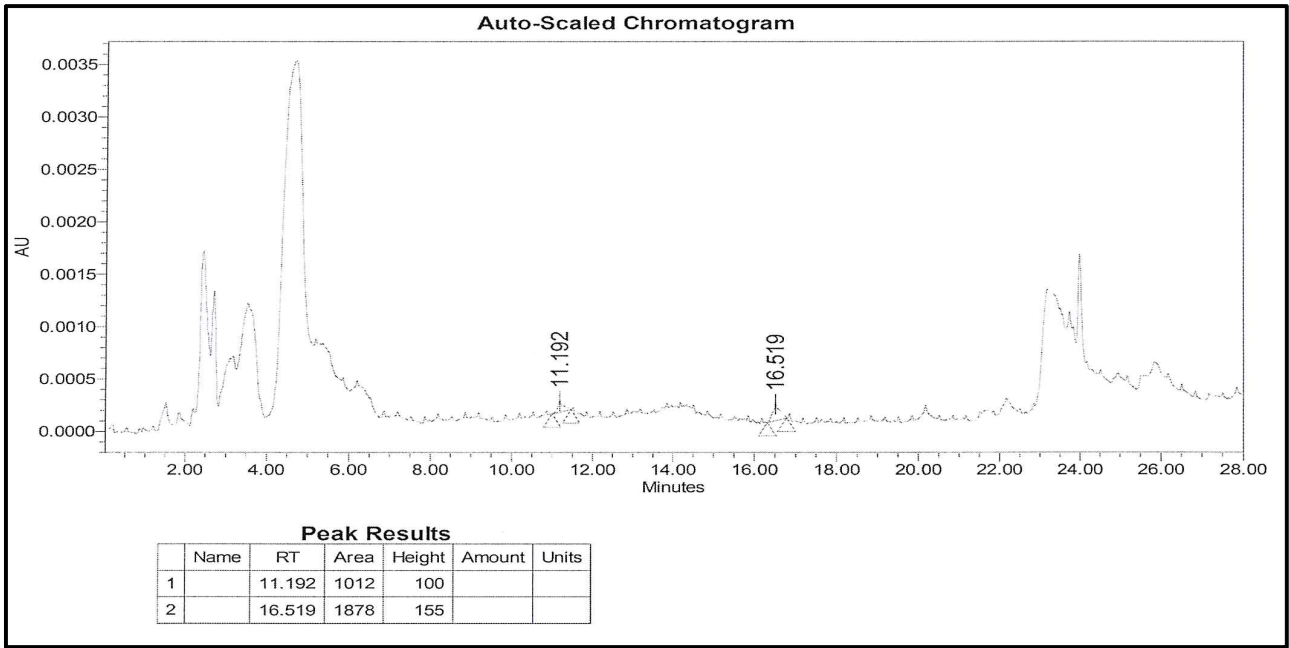


Fig. 48. 자근추출물 90℃, 5시간 안정성 크로마토그램

3) 자근 추출물의 대한 pH 안정성

(1) 안정성 확인을 위한 HPLC 분석법

- 표준품 정보

· Shikonin [순도 98%, CromaDex® Inc., USA]

· Acetylshikonin [순도 98%, CFN90523, CAS No. 24502-78-1]

- 시험용액제조

자근추출물 0.1g을 10mL의 EtOH에 녹여 0.45um membrane filter로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

- HPLC 분석조건

· 컬럼 : Discovery® C18 (250mm x 4.6mm, 5um)

· 컬럼온도 : 25℃

· 검출기 파장 : UV 520nm

· 유속 : 0.8mL/min

· 이동상 :

시간 (분)	Water (초순수)	Acetonitrile
0.0	50	50
20.0	20	80
20.1	0	100
25.0	0	100
25.1	50	50
28.0	50	50

(2) pH 안정성 실험 및 평가방법

자근추출물 일정량을 취하여 준비되어진 pH 용액(pH1.7, pH4.0, pH6.0, pH8.0, pH9.1)에 첨가하여 실온에서 17시간 보관한다. 각 pH 조건에서 보관된 실험군을 HPLC 기기를 이용하여 상기 분석법으로 지표성분을 분석하고, 지표성분[시코닌(shikonin), 아세틸시코닌(acetylshikonin)]의 변화량을 가지고 pH 안정성을 평가한다.

(3) pH 안정성 평가결과

각 pH 조건에서 보관되어진 실험군을 가지고 평가한 결과 시코닌(shikonin) 성분은 pH8.0에서 서서히 안정성이 감소되며, 아세틸시코닌(acetylshikonin) 성분은 pH4.0 에서 pH1.7 보다 52% 급격하게 감소하고, 이후 서서히 안정성이 감소된다. 이러한 결과를 Table. 13 와 Figure 49~53 에 상세하게 나타내었으며, 제조공정 최적화에 있어서 상기와 같은 결과를 반영한다면 공정조건을 확립하는데 매우 유용하게 활용되리라 사료된다.

Table. 13 자근 성분인 시코닌 과 아세틸시코닌 pH 안정성 결과

자근성분	pH 1.7 (17시간보관)	pH 4.0 (17시간보관)	pH 6.0 (17시간보관)	pH 8.0 (17시간보관)	pH 9.1 (17시간보관)
시코닌 (Shikonin)	100%	78.5%	74.7%	62.8%	0%
아세틸시코닌 (Acetylshikonin)	100%	47.2%	39.0%	25.3%	0%

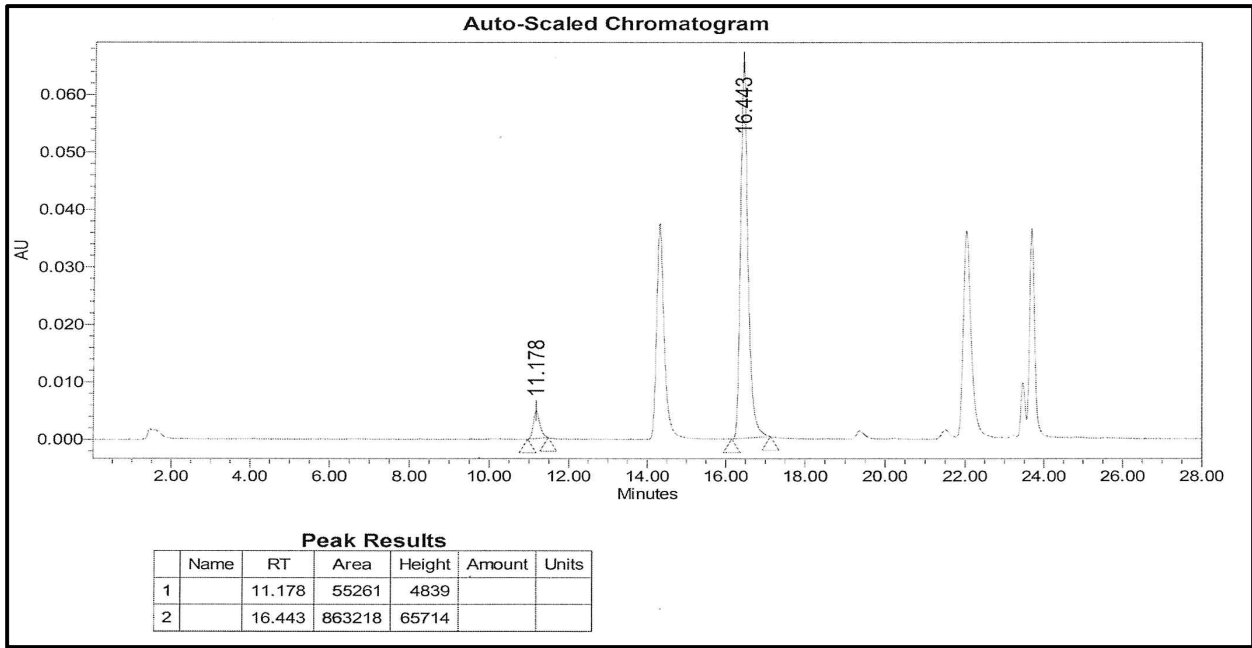


Fig. 49. 자근추출물 pH 1.7, 17시간 안정성 크로마토그램

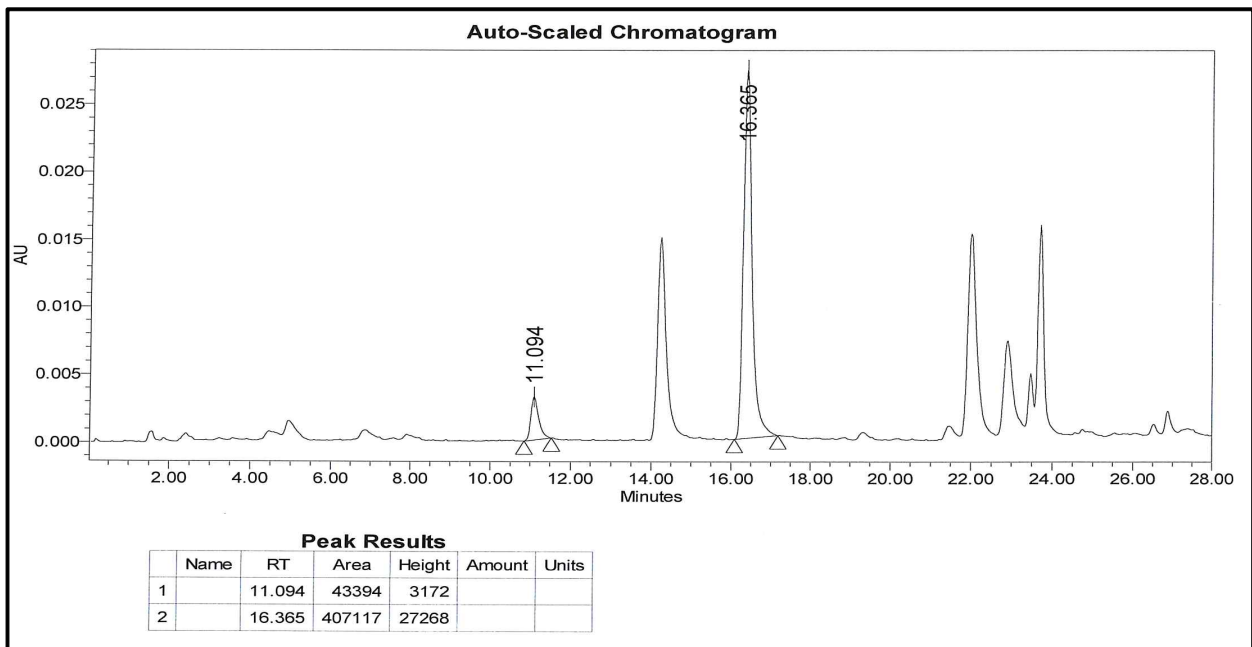


Fig. 50. 자근추출물 pH 4.0, 17시간 안정성 크로마토그램

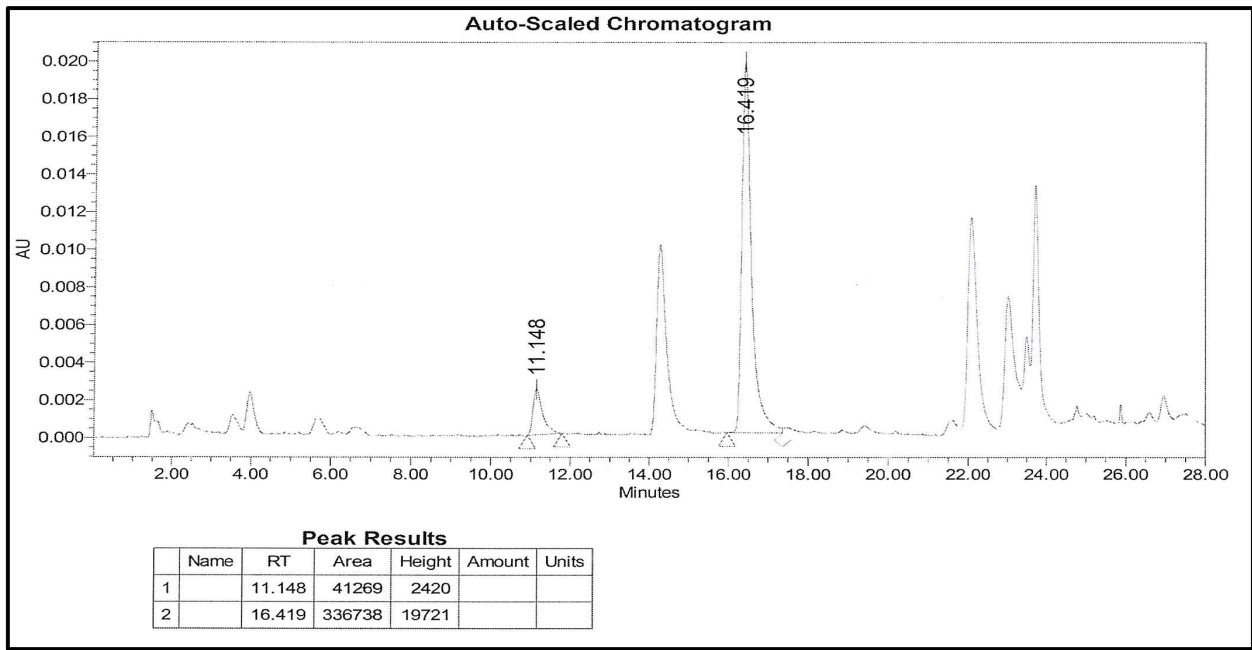


Fig. 51. 자근추출물 pH 6.0, 17시간 안정성 크로마토그램

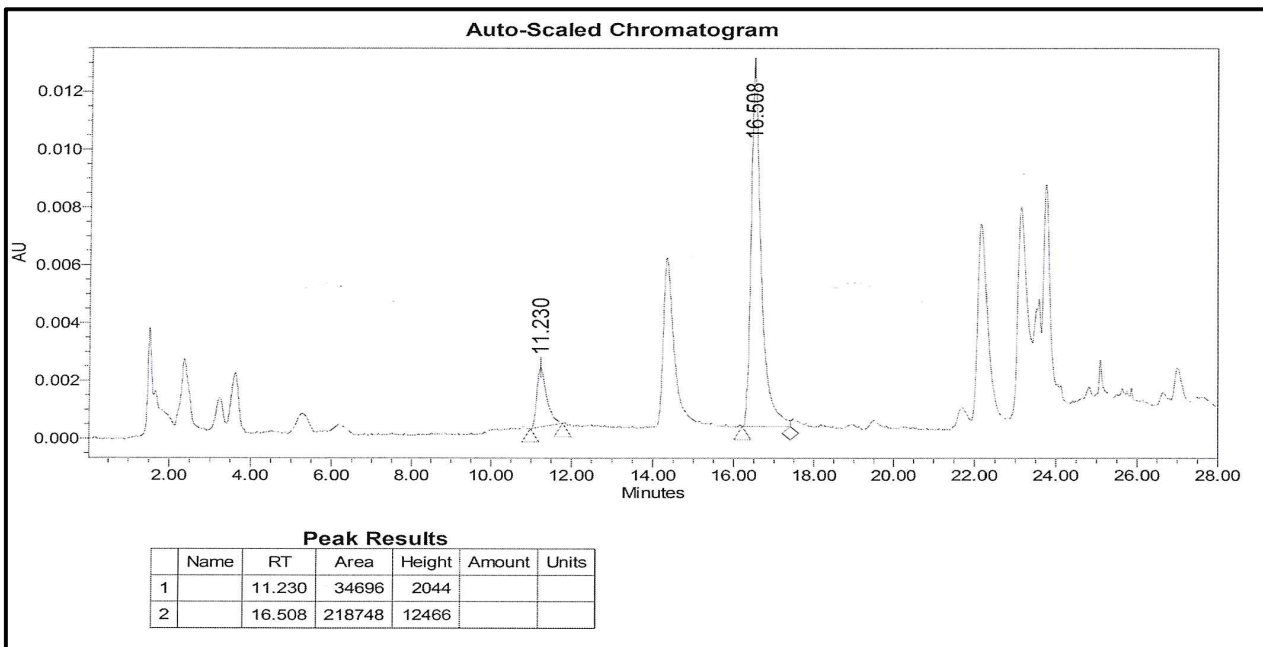


Fig. 52. 자근추출물 pH 8.0, 17시간 안정성 크로마토그램

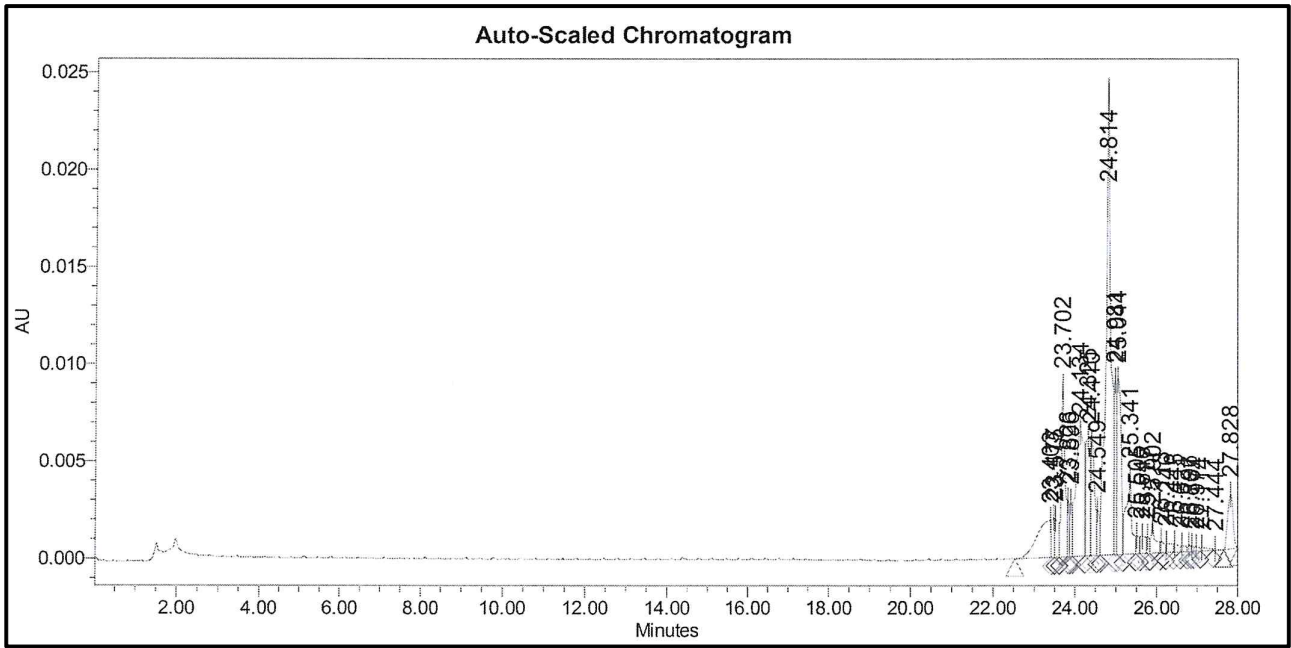


Fig. 53. 자근추출물 pH 9.1, 17시간 안정성 크로마토그램

9. 제조공정 표준화 및 안전성 시험

1) 원료 표준화

(1) 식품의약품안전처에 식품원료로 등재확인

자근(지치, 학명: *Lithospermum erythrorhizon*)과 배초향(곽향, 학명: *Agastache rugosa*)에 대한 식품원료로서의 사용여부를 식품의약품안전처 식품원료 목록을 확인한 결과 식품의 원료로 사용가능함을 확인함.

원재료	품목번호	이명 또는 영명	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
개지치	-	들지치, Mountain toothwort	<i>Lithospermum arvense</i> L. / <i>Aegonychon arvense</i> (L.) S.F.Gray	-	0	X	잎	-	-
거센털꽃마리	-	거센털개지치, Rooting trigonotis	<i>Trigonotis radicans</i> (Turcz.) Stevens / <i>Eritrichium radicans</i> (Turcz.) A.D.C.	-	0	X	잎	-	-
지치	-	자초, 지초, Redroot gromwell	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini	-	0	X	뿌리※(자근)	-	-

원재료명	품목번호	기타명칭 또는 시장명칭	학명 또는 특성	생약명	가능	제한	사용부위	사용조건	비고
Woundwort	-	우단석잠풀, 털석잠풀, 멧울곽향, Hedge nettle	<i>Stachys oblongifolia</i> Benth. / <i>Stachys imaii</i> Nakai / <i>Stachys modica</i> Hance	-	0	X	덩이줄기	-	-
배초향	-	곽향, 방아잎, Korean mint	<i>Agastache rugosa</i> O. Kuntze	지상부 (곽향)	X	0	지상부	상세페이지 확인	-

(2) 자근 및 배초향 원료에 대한 위해분석 결과

- 자근에 대한 위해분석 결과

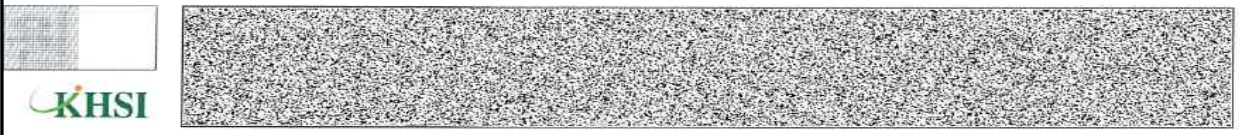
분류	항목	단위	결과	비고
중금속	납(Pb)	mg/kg	1.3520	
	총비소(As)	mg/kg	0.6359	
	총수은(Hg)	mg/kg	0.0105	
	카드뮴(Cd)	mg/kg	0.0202	
잔류농약	총 디디티(DDT)	mg/kg	불검출	
	디엘드린(Dieldrin)	mg/kg	불검출	
	총 비에이치씨(BHC)	mg/kg	불검출	
	알드린(Aldrin)	mg/kg	불검출	
	엔드린(Endrin)	mg/kg	불검출	
	티플루자מיד (Thifluzamide)	mg/kg	불검출	
	펜시쿠론(Pencycuron)	mg/kg	불검출	
	헥사코나졸(Hexaconazole)	mg/kg	불검출	

- 배초향에 대한 위해분석 결과

분류	항목	단위	결과	비고
중금속	납(Pb)	mg/kg	0.10	
	비소(As)	mg/kg	0.01	
	수은(Hg)	mg/kg	0.03	
	카드뮴(Cd)	mg/kg	0.02	
잔류농약	총 디디티(DDT)	mg/kg	불검출	
	디엘드린(Dieldrin)	mg/kg	불검출	
	총 비에이치씨(BHC)	mg/kg	불검출	
	알드린(Aldrin)	mg/kg	불검출	
	엔드린(Endrin)	mg/kg	불검출	
	티플루자מיד (Thifluzamide)	mg/kg	불검출	
	펜시쿠론(Pencycuron)	mg/kg	불검출	
	헥사코나졸(Hexaconazole)	mg/kg	불검출	

- 자근 원료에 대한 중금속 성적서

제 D2019101602 호 문서확인 3C71-7881-7YF4		시험·검사성적서																
제품명	지치(자근)	제조일자 (유통기한)																
의뢰인	업체명	(주)다정	성명 김철중															
	주소	충청북도 진천군 이월면 장수로 371																
제조번호		접수년월일	2019-10-18															
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019101602															
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-29 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>1.3512 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>중비소(mg/kg)</td> <td>0.6359 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0202 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>총수은(mg/kg)</td> <td>0.0105 mg/kg</td> <td>노화영</td> </tr> </tbody> </table> <p style="margin-top: 20px;">※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">2019년 10월 29일</p> <p style="text-align: center; margin-top: 5px;">한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	1.3512 mg/kg	정다운	중비소(mg/kg)	0.6359 mg/kg	정다운	카드뮴(mg/kg)	0.0202 mg/kg	정다운	총수은(mg/kg)	0.0105 mg/kg	노화영
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																
납(mg/kg)	1.3512 mg/kg	정다운																
중비소(mg/kg)	0.6359 mg/kg	정다운																
카드뮴(mg/kg)	0.0202 mg/kg	정다운																
총수은(mg/kg)	0.0105 mg/kg	노화영																
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400~1																		



- 배초향 원료에 대한 중금속 성적서

참 고 용 시 험 성 적 서

발급번호 : 참210012217

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

접수번호	2108-1004	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	배초향(곽향)		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유 통 기 한	
업 소 명	(주)다정	의 료 인	김철중
소 재 지	충청북도 진천군 이월면 장수로 371		
접수년월일	2021.08.10	검사완료일	2021.08.12

시 험 결 과

시험항목	결 과
납(ppm)	0.10
총 비소(ppm)	0.01
카드뮴(ppm)	0.02
총수은(ppm)	0.03

2021년 08월 12일
(주) 한국분석기술연구원




* 본 성적서는 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용될 수 없으며 법적 효력이 없음
 * 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주십시오.
 * 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해광빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2021.07.05.)

- 배초향 원료에 대한 잔류농약 성적서



시험 성적서 (Test Certificate)

접수번호 PCAM - 2107 - 0223

페이지 (1) / (총 1)

우 34036 대전광역시 유성구 미크노 11로 12 (달빛동 867) / 전화 (042) 820-9182

1. 시험내용			
기 관 명	허다경	약 권 일 자	2021년 7월 13일
시 요 명	곽향(배초향)		
생산지 / 주소	충북 진천군 이월면 잠수로 371		
생 산 자	허다경	시 험 장 소	분석실
시 험 기 간	2021년 7월 13일 ~ 2021년 7월 20일	분 석 장 비	LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-MS, GC
행 도	올고용	시험환경온도	(22 - 24) ℃
		시험환경습도	70 % R.H 이하

2. 잔류농약검사결과

검 시험 품 511 성분						
Alfoclorprid	Alfoclorprid	Acetaminophen	Acetaminophen	Acesulfame K	Acesulfame K	Acylic acid
Amitrole	Amitrole	Azinphos methyl	Azinphos methyl	Baylethrin	Baylethrin	Benflumetoprol
Azinphos methyl	Azinphos methyl	Benflumetoprol	Benflumetoprol	Bifenthrin	Bifenthrin	Chloranil
Bifenthrin	Bifenthrin	Chloranil	Chloranil	Cypermethrin	Cypermethrin	Cypermethrin
Cypermethrin	Cypermethrin	Cypermethrin	Cypermethrin	Deltamethrin	Deltamethrin	Deltamethrin
Deltamethrin	Deltamethrin	Deltamethrin	Deltamethrin	Disulfoton	Disulfoton	Disulfoton
Disulfoton	Disulfoton	Disulfoton	Disulfoton	Fluorfenoxuron	Fluorfenoxuron	Fluorfenoxuron
Fluorfenoxuron	Fluorfenoxuron	Fluorfenoxuron	Fluorfenoxuron	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin
Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin
Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin	Fluthiarcin

결 과 (mg/kg)

Bifenthrin 0.009, Cyhalothrin 0.013, Cypermethrin 0.016
 Diflubenzuron 0.025, Etofenprox 0.035, Flutriafol 0.018
 Tebuconazole 0.007 외 잔기함량 불검출

승 인 자 (기술책임자)
박 주 울

2021년 7월 20일
주식회사 피켄코리아

서식P-A-210-02 (11-02-21 승인)

A4(210x297)

(3) 자근(지치)과 배초향(곽향) 원료에 대한 기준규격

원료에 대한 기준규격 설정배경은 원재료인 지치와 배초향에 대한 식품공전의 기준규격 항목이 확인되지 않으므로 대한약전의 자근 기준규격으로 설정되었으며, 배초향은 대한약전에도 확인되지 않는바 자근 기준규격 항목으로 배초향을 분석한 후 자근과 동일하게 기준규격을 설정하였음.

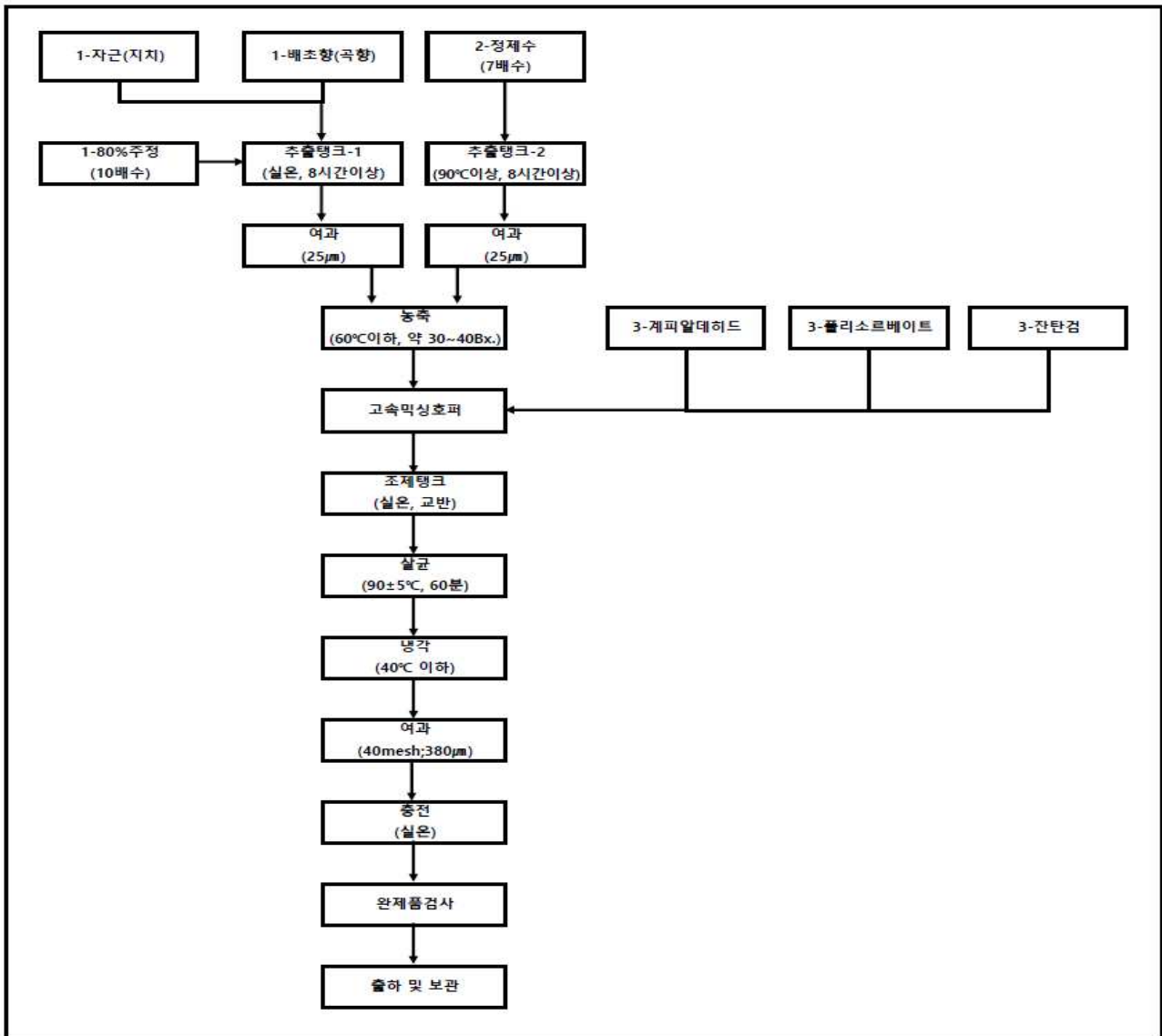
분류	항목	단위	기준	비고
중금속	납(Pb)	mg/kg	<5	
	비소(As)	mg/kg	<3	
	수은(Hg)	mg/kg	<0.2	
	카드뮴(Cd)	mg/kg	<0.3	
잔류농약	총 디디티(DDT)	mg/kg	<0.1	
	디엘드린((Dieldrin)	mg/kg	<0.01	
	총 비에이치씨(BHC)	mg/kg	<0.2	
	알드린(Aldrin)	mg/kg	<0.01	
	엔드린(Endrin)	mg/kg	<0.01	
	티플루자마이드 (Thifluzamide)	mg/kg	<1.0	
	펜시쿠론(Pencycuron)	mg/kg	<1.0	
	헥사코나졸(Hexaconazole)	mg/kg	<0.2	

2) 공정 표준화

(1) 제조 배합표

번호	원료명	배합비(%)	비고
1	자근복합추출물(액상)	64.40	
2	계피알데히드(액상)	35.00	
3	폴리소르베이트80(액상)	0.50	
4	잔탄검(분말)	0.10	
합계		100.0	

(2) 제조 공정도



(3) 제조공정 및 방법

제조공정명	제조방법	공정검사항목	검사기준
원료입고	식품공전 및 식품첨가공전에 적합한 원료를 구입하여 사용한다.	성상/이물	시험성적서 및 자사규격
원료칭량	원재료명 및 함량의 비율에 맞게 원료를 칭량한다.	무게	전자저울
추출-1	1) 칭량된 원료를 추출탱크에 투입한 후 원재료양의 해당하는 80%주정 10 배수를 투입하여 실온에서 8 시간이상 추출한다. 2) 추출액은 카트리지 필터를 사용하여 여과한 후 저장탱크로 이송한다.	80%주정 추출온도 추출시간 여과사이즈	10 배수 실온 8 시간이상 25 μ m
농축-1	여과가 반제품을 품은 또는 60°C이하에서 적정 당도가 될 때까지 감압농축 한다.	온도확인	60°C이하
추출-2	1) 추출-1 이 완료된 추출탱크에 원재료양의 해당하는 정제수 7 배수를 투입하여 90°C이상에서 8 시간이상 추출한다. 2) 추출액은 카트리지 필터를 사용하여 여과한 후 저장탱크로 이송한다.	정제수 추출온도 추출시간 여과사이즈	7 배수 90°C이상 8 시간이상 25 μ m
농축-2	여과가 완료된 반제품을 80°C이하에서 적정 당도가 될 때까지 감압농축 한다.	온도확인	80°C이하
조제-1	배합비에 해당하는 농축-2 원료 일부와 잔탄검을 고속믹서를 이용하여 실온에서 10 분 분산시킨 후 조제탱크에 투입한다.	분산시간	10 분
조제-2	1) 배합비에 해당하는 농축-2 원료 일부와 폴리소르베이트 80 을 고속믹서를 이용하여 실온에서 10 분 분산시킨 후 조제탱크에 투입한다. 2) 배합비에 해당하는 농축-2 남은 잔량을 조제탱크에 투입하여 실온상태에서 충분히 균질화 시킨다.	분산시간	10 분
살균	조제-1 과 조제-2 가 완료된 반제품은 90 \pm 5°C 에서 60 분 살균한다.	살균온도 살균시간	90 \pm 5°C 60 분
냉각	살균이 완료된 반제품은 40°C이하까지 실온수로 냉각시킨다.	조제액온도	40°C이하
조제-3	냉각이 완료된 조제탱크에 배합비에 해당하는 원료 칭량이 완료된 농축-1 과 계피알데히드를 투입한 후 실온에서 30 분 균질화 시킨다.	조제온도 혼합시간	실온 30 분
여과	조제-3 이 완료된 반제품을 40 메쉬망을 이용하여 여과하여 충전한다.	메쉬망	40 메쉬
충전	포장규격에 맞게 충전한다.	충전온도 충전량확인	실온 120g
완제품검사	포장이 완료된 완제품을 무작위로 채취하여 품질관리부에 의뢰하여 완제품검사를 한다.	기준규격	식품공전 및 자사규격
출하 및 보관	완제품검사에 적합한 제품에 한하여 출하 또는 냉장창고에 보관한다.	완제품창고	냉장창고 정리정돈 및 위생관리

(4) 자근복합추출물 기준규격

번호	항목	단위	기준규격	검사방법
1	성상	-	고유의 향미가 있고, 이미,이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상.	관능검사
2	이물	-	적합하여야 한다.	여과법
3	일반세균	-	n=5, c=1, m=100, M=1,000	미생물시험법
4	대장균군	-	n=5, c=1, m=0, M=10	미생물시험법
5	지표성분 시나믹알데히드	%	회수율 90%이상	HPLC 분석법
6	당도	Brix	35.5±1	당도측정기
7	pH	-	4.7±0.5	pH 미터기

(5) 자근복합조성물 소시지 제조공정

1) 원료육 준비

- 돼지 후지(볼기, 뒷다리 같은 이름)를 민찌기계에서 2회전 통과
- 냉동육은 완전 해동해서 고기 온도가 1도 이상 될때 사용한다.
- 냉장육일 경우, 냉장고에서 5도 이하 까지 보관후, 사용한다.

2) 부재료 준비

- 소금 : 아질산근이 첨가되지 않은 한주소금을 사용한다. (슈퍼에서 판매)
(한주소금이 없을때는 맛소금을 사용한다) 고기중량의 1.6% 사용권장함.
- * 소금의 역할 : 풍미(맛), 보존(미생물억제), 고기에 있는 염용성 단백질 추출
- 미트솔트(정제염(한주소금) + 아질산나트륨(10%) 혼합제품) 아질산나트륨 대신 자근복합조성물 대체 사용
- * 아질산나트륨의 역할 : 미생물 억제효과, 발색 (혼합수 숙성기간이 필요하면 최소한 4시간- 72시간) 축산물가공기준법에서 잔류량으로 70 ppm, 사용량으로 고기의 0.015%를 사용하면 안전하다.

고기입자가 작을수록 발색효과가 짧은 시간에 나타난다.

- NA-Ascorbate (아스코르브산나트륨: 비타민c) 고기중량의 0.055%사용 권장
- * 비타민c의 역할 : 산화방지제 제품은 절단한 면이 산소에 의해 산화되는 것을 방지 한다. (갈변 속도 늦춤)
- 인산염 : 고기중량의 0,3% 사용 권장한다.
- * 인산염의 역할 : 결합력 향상, 보수력향상 과다 사용시 짠 맛이 난다.

3) 제조방법

* 원료육 준비

민찌기계에서 1-2회 통과한 후지를 1000 g을 준비하고, 고기온도를 0-5도 이하로 유지한다.

* 부재료준비

원료육 1키로 기준, (A, B 별도계량), 종량(g)

정제염(한주소금)	정제염(한주소금)	정제염(한주소금)		15	
아스코르브산나트륨 (비타민c)	아스코르브산나트륨 (비타민c)	아스코르브산나트륨 (비타민c)	아스코르브산나트륨 (비타민c)	1	A
인산염				4	
미트솔트 (아질산10% 함유)	미트솔트 (아질산10% 함유)	미트솔트 (아질산10% 함유)	미트솔트 (아질산10% 함유)	2	B

* ice/water

얼음을 갈거나 찬물에 담근후, 물만 100 g 사용한다. (역할 : 온도관리 및 수분 보강)

* 혼합

(1) 아질산 및 자근복합조성물 미첨가 샘플 제조

원료육과 부재료 A 와 ICE WATER를 같이 용기에 넣고, 중심온도 10이하 까지 혼합해 준다. 10도 이상이 되면, 제품의 수분과 지방이 다시 배출된다. (유분리, 수분리 현상) 0도 이하에서 시작하면, 소금에 의해서 고기가 녹지 않으면, 염지가 되지 않는다. 염용성 단백질의 추출과 발색이 시작되는 온도는 5도에서 8도 사이이다. 이 온도의 조건에서 오래 치대주거나 기계로 혼합을 해줘야한다. 온도가 너무 빨리 올라가서 시간이 부족하면, 수화력 유효력이 떨어지고, 온도가 너무 낮으면, 수화력 유효력이 아예 발생하지 않는다.

* 염지 상태는 손으로 치대는데, 혼합육을 손으로 움켜쥐어서 손바닥에 혼합육이 아래로 떨어지지 않으면 다 된 것이다.

(2) 아질산 첨가 샘플 제조

1번에서 아질산 미첨가 샘플을 채취한 후, 부재료 B(미트솔트 : 아질산 함유)를 넣고, 골고루 섞어준 후, 정치염지/숙성하면, 발색제 넣을 샘플을 만들수 있다.

(3) 자근복합조성물 혼합

1번 샘플 채취한 것에 자근복합조성물을 넣고, 혼합 (발색유무를 확인하려면 두가지 방법이 있다)

① 염지육을 동그랑땡 같이 만들어서 후라이팬에 구워서 절단해 보면, 절단면이 염지육은 선홍색으로 변해 있다.

② 케이싱 대신 일회용 비닐을 이용해서 염지육을 넣은후, 소시지같이 모양을 만들어서 찜솥에서 찌서 확인 가능하다.

이 방법은 발색생태만 확인 가능하다. (유수분리가 발생할 수도 있다)

소시지 조성 및 단가

물포함중량	물포함허가	금액(원)	염지(kg)	연결육(kg)	혼합(kg)	비 고
10.00	93.66	35000.00			1.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
0.00	0.00	0.00			0.00	
10.00	93.66	35000.00	0.00	0.00	1.00	
0.15	1.40	150.00			0.015	
0.02	0.14	75.00			0.002	
0.01	0.06	120.00			0.001	
0.04	0.37	200.00			0.004	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.15	1.40	165.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.10	0.94	1500.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.10	0.94	1200.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.00	0.00	0.00			0.000	
0.56	5.25	3410.00	0.00	0.00	0.021	
10.56	98.91	38410.00	0.00	0.00	1.021	
0.1	1.09				0.100	
10.68	100.00		0.00	0.00	1.121	12.56
10.67685		3597.50				
		93.66				

3) 자근복합추출물에 대한 유통기한 설정시험자료

자근복합추출물에 대한 유통기한을 설정하기 위해 120일 동안 저장(15℃, 25℃, 45℃, 상대습도 75%)하면서 일정한 기간으로 가속시험을 진행한 결과 40.36개월의 유통기한 추정기간이 산출되었다. 하지만 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.70을 곱하여 28개월에서 최종 24개월로 설정되었다.

유통기한설정실험 결과보고서 요약((주)다정 자근복합추출물)

제 목	(주)다정에서 제조한 "자근복합추출물의 유통기한(가속)설정 실험"				
실험구분	의뢰실험((주)다정→한국표준시험분석연구원(주)) / 가속실험				
실험기간	2021년03월08일부터 2021년10월04일까지(총 210일)				
신청인	업 소 명	(주)다정	대 표 자	김철중	
	주 소	충청북도 진천군 이월면 장수로 371	연 락 처		
실험수행기관	기 관 명	한국표준시험분석연구원(주)	대 표 자	안우현	
	주 소	경기도 안산시 단원구 광덕4로 250, 5층			
실험참여자	책 임 자	박혜정	연 구 원	강석희	
	연 구 원	우연주	연 구 원	문정진	
	연 구 원	안혜인	연 구 원	이단비	
실험결과	요약				
	◆유통기한 실험결과				
	설정 실험지표 (단위)	품질한계	유통기한(개월)		
			0차유통기한	1차유통기한	
	성상(관능)	5 이상(9점 척도)	40.36	47.64	
	세균수(CFU/g)	100,000CFU/g이하	-	-	
	대장균군(CFU/g)	10CFU/g이하	-	-	
	수분(%)	15°C	-67.14%	5.54	5.52
		25°C	-62.73%		
		45°C	-62.38%		
	이물	불검출	-	-	
	납(mg/kg)	-	-	-	
	카드뮴(mg/kg)	-	-	-	
	살모넬라	n=5,c=0,m=0/25g	-	-	
	황색포도상구균	n=5,c=0,m=0/25g	-	-	
	리스테리아 모노사이토제네스	n=5,c=0,m=0/25g	-	-	
	바실루스세레우스	n=5,c=0,m=0/25g	-	-	
	클로스트리디움 피프린젠스	n=5,c=0,m=0/25g	-	-	
장출혈성대장균	n=5,c=0,m=0/25g	-	-		
가장 적절한 지표의 예상 유통기한		40.36			
예상 유통기한		28.25			
* 0차 반응식과 1차 반응식으로부터 유통기한 산출 각 요소별 활성화 에너지와 Q ₁₀ 값을 이용하여 상온에서의 각 요소별 변경시점을 환산하였다. * 유통기한 안전계수 0.70					

※ 본 유통기한설정실험에 사용된 시료는 (주)다정에서 제공하였습니다. 따라서 본 실험의 결과는 실험실 환경에서 도출된 결과로서 본 보고서에서 제시된 유통환경(상온)이외의 조건에서는 유통기한이 짧아지거나 식품의 기능을 상실할 수 있습니다.

4) 자근복합추출물 품목제조보고

발급번호 : MAMB-BAMB-XESV-UDOD-SEPD

식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 김철중			
	주소 충청북도 진천군 진천읍 포석길 23-7, 602호 (양)	전화번호 휴대전화		
영업소	명칭(상호) (주)다림	영업등록번호 19970443044		
	소재지 충청북도 진천군 미월면 장수로 371			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	19970443044378
	제품명	자근복합추출물		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기재		
	용도 용법	맛장애 기재		
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	맛장애 기재		
	섭취	고유의 향미가 있고 미취가 미취가 없는, 약한 광색의 유통성이 있는 액상		
	품목의 특성	■ 고열압 · 저열압 식품 해당 여부]예]아니오 []해당 없음 ■ 알, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부]예 []아니오 ■ 살균 · 멸균 제품의 해당 여부]비살균 []살균]멸균		
기타				

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 03월 16일
보고인 김철중

진천군수 귀하

품목보고번호 : 19970443044378

처리부서	문화경제국 식생활지원과	처리자성명	권예원	처리일자	2021년 10월 21일
------	--------------	-------	-----	------	---------------

5) 시제품

(1) 자근복합추출물 사진



(2) 시제품 자근복합추출물 분석결과

번호	항목	단위	기준규격	결과
1	성상	-	고유의 향미가 있고, 이미,이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상.	적합
2	이물	-	적합하여야 한다.	적합
3	일반세균	CFU/g	n=5, c=1, m=100, M=1,000	0
4	대장균군	CFU/g	n=5, c=1, m=0, M=10	0
5	시나믹알데히드	%	회수율 90%이상	98%
6	당도	Brix	35.5±1	35.3Brix
7	pH	-	4.7±0.5	4.74

(3) 시제품 자근복합추출물 위해분석 결과

시제품 자근복합추출물에 대한 위해분석을 진행 한 결과 중금속 및 잔류농약에서 안전한 것으로 확인이 되었다. 따라서 최종 제품인 자근복합추출물에 대한 중금속 및 잔류농약 기준규격을 설정하지 않고, 확인용으로만 진행하였다.

분류	항목	단위	결과	비고
중금속	납(Pb)	mg/kg	0.01	
	비소(As)	mg/kg	0.05	
	수은(Hg)	mg/kg	0.01	
	카드뮴(Cd)	mg/kg	0.0006	
잔류농약	총 디디티(DDT)	mg/kg	불검출	
	디엘드린((Dieldrin)	mg/kg	불검출	
	총 비에이치씨(BHC)	mg/kg	불검출	
	알드린(Aldrin)	mg/kg	불검출	
	엔드린(Endrin)	mg/kg	불검출	
	티플루자마이드 (Thifluzamide)	mg/kg	불검출	
	펜시쿠론(Pencycuron)	mg/kg	불검출	
	헥사코나졸(Hexaconazole)	mg/kg	불검출	

- 시제품 자근복합추출물 중금속 성적서

참 고 용 시 험 성 적 서

발급번호 : 참210018376

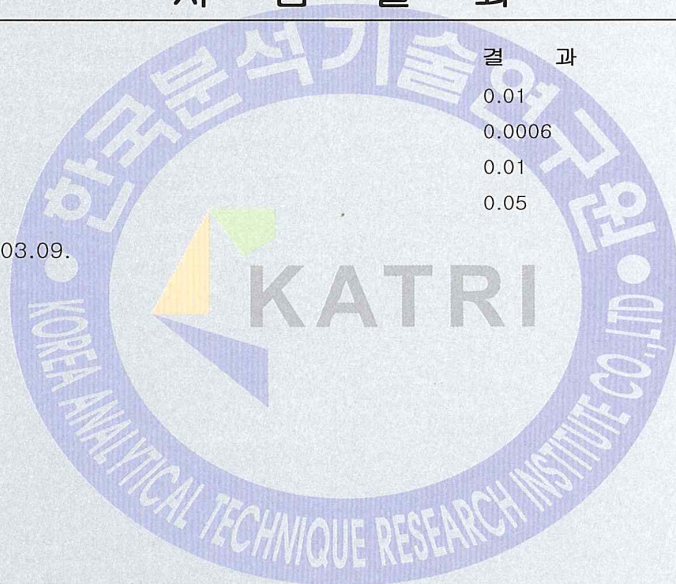
본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

접수번호	2111-2772	검 사 목 적	일반참고용
제 품 명	자근복합추출물		
제품유형	-	제 조 일 자	
		유통 기 한	
업 소 명	(주)다정	의 료 인	김철중
소 재 지	충청북도 진천군 이월면 장수로 371		
접수년월일	2021.11.22	검사완료일	2021.11.26

시 험 결 과

시험항목	결 과
납(mg/kg)	0.01
카드뮴(mg/kg)	0.0006
총 수은(mg/kg)	0.01
총 비소(mg/kg)	0.05

* 비교 : 생산일자:2021.03.09.



2021년 11월 26일

(주) 한국분석기술연구원장



* 본 성적서는 제출된 검체에 한하며, 의외목적 이외의 상품 선전, 상업용, 민형사상의 분쟁 등에 사용될 수 없으며 법적 효력이 없음
 * 성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 의문점이 있으시면 연락주십시오.
 * 본 성적서는 KOLAS 인정과 관련 없습니다.
 주소 : 부산시 동구 대영로 267(초량동) 해광빌딩, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298

양식번호(KATRI-P-24-06)

개정번호(1)

개정일자(2021.07.05.)

10. 안전성 시험(위탁연구 결과)

비임상시험(독성평가) 전문기관 : (주)DT&CRO

최종보고서

HPLC를 이용한 자근복합추출물의
조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험

시험번호 : DTN210194

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)
우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP적합진술서

시험제목 HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험
시험번호 DTN210194

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

신뢰성보증확인서

목차

페이지

신뢰성보증확인서		
요약		
1. 시험실시의 개요		
1.1. 시험제목		
1.2. 시험목적		
1.3. 시험의뢰자		
1.4. 시험의뢰자 모니터		
1.5. 시험기관		
1.6. 시험책임자		
1.7. 담당자		
1.8. 시험일정		
1.9. Good Laboratory Practice Regulations		
1.10. 시험기준		
1.11. 자료의 보관		
2. 시험재료		
2.1. 시험물질		
2.2. 표준물질		
2.3. 부형제		
2.4. 시약 및 용매		
2.5. 기기 및 기구		
2.6. 데이터 처리 소프트웨어		
3. 시험방법		
3.1. 용액의 조제		
3.2. 희석용액의 조제		
3.3. 표준원액의 조제		
3.4. 표준용액의 조제		
3.5. 검량선 시료(Standard, STD)의 조제		
3.6. 품질관리(Quality control, QC) 시료의 조제		
3.7. 시험물질의 조제		
3.8. 시료의 전처리		
3.9. 분석조건		
3.10. 데이터의 처리		

3.11. 수치의 취급
 3.12. 재분석

4. 조제물 분석법 밸리데이션 항목

4.1. 시스템 적합성(System suitability)
 4.2. 직선성(Linearity)
 4.3. 특이성(Specificity)
 4.4. 일내 재현성(Intra-day reproducibility)
 4.5. 균질성(Homogeneity)
 4.6. 안정성(Stability)
 4.7. QC 샘플(Quality control)

5. 결과

5.1. 시스템 적합성(System suitability)
 5.2. 직선성(Linearity)
 5.3. 특이성(Specificity)
 5.4. 일내 재현성(Intra-day reproducibility)
 5.5. 균질성(Homogeneity)
 5.6. 안정성(Stability)
 5.7. QC 샘플(Quality control)

6. 결론

TABLES

Table 1. System Suitability
 Table 2. Linearity

 Table 3. Specificity
 Table 4. Intra-day Reproducibility
 Table 5. Homogeneity
 Table 6. Stability

 Table 7. QC Samples

APPENDICES

Appendix 1. Protocol Deviations

ATTACHMENTS

Attachment 1. Protocol
 Attachment 2. Protocol Amendment 40
 Attachment 3. Certificate of Analysis of Test Substance and Standard Substance 42

요약

본 시험은 HPLC를 이용하여 시험물질인 자근복합추출물의 조제물 분석법 보증을 위한 밸리데이션 및 안정성 확인을 위해 수행하였다.

분석법 보증을 위해 시스템 적합성, 직선성, 특이성, 일내 재현성, 균질성 및 품질관리를 확인하였고, 조제물은 실온(1-30°C)에서 4시간, 냉장(2-8°C)에서 8일간 및 auto-sampler 내에서의 안정성을 확인하였다.

Cinnamaldehyde를 표준물질(분석물질)로 사용하였고, 주사용수를 부형제로 사용한 조제물의 분석법 및 안정성을 확인하였다.

- 1) QC 시료(5 µg/mL)를 이용하여 시스템적합성을 확인한 결과, 판정기준을 만족하였다.
- 2) 1, 2, 5, 10 및 20 µg/mL의 검량선을 작성하여 직선성을 확인한 결과, 판정기준을 만족하였다.
- 3) 이동상, 희석용액 및 부형제 내에서 간섭 피크는 검출되지않아 특이성을 가짐을 확인하였다.
- 4) Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물에 대한 일내 재현성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성 모두 판정기준을 만족하였다.
- 5) Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물에 대한 균질성을 확인한 결과, 정밀성 및 정확성 모두 판정기준을 만족하였다.
- 6) Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물은 실온(1-30°C)에서 4시간, 냉장(2-8°C)에서 8일간 및 auto-sampler(25°C) 내에서 안정한 것으로 확인되었다.
- 7) 기기의 분석조건의 타당성을 보증하기 위해 QC 시료를 분석 마지막 단계에 측정하였고, 모든 배치에서 허용기준을 만족하여 본 분석이 적합함을 확인하였다.

따라서, 시험물질인 자근복합추출물의 조제물 농도분석을 위한 본 분석법은 적합하며, Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물은 실온 4시간, 냉장 8일간 및 auto-sampler 내에서 안정한 것으로 확인되었다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험

1.2. 시험목적

본 시험은 HPLC를 이용하여 시험물질인 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인을 위하여 실시하였다.

1.3. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.4. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

T E L

E-mail:

:

1.5. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.6. 시험책임자

김양현

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

T E L

E-mail :

:

1.7. 담당자

시험물질관리책임자	김현지
주요 시험담당자	송아람
신뢰성보증업무담당자	강혜정
참여 시험담당자	김은영

1.8. 시험일정

시험개시일	2021년 11월 26일
실험개시일	2021년 11월 29일
실험종료일	2021년 12월 7일
시험종료일	2022년 1월 19일

1.9. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
 식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

1.10. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q2 (R1), Validation of analytical procedures: Text and Methodology” (Nov. 2005)

1.11. 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료, 시험물질, 검체 및 최종보고서 등은 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터의 자료보관실 (우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

1. 시험재료

1.12. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Lot/Batch No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1~30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.13. 표준물질

명칭	Cinnamaldehyde
제조번호(Lot/Batch No.)	MKCJ4653
성상	Light Yellow Liquid
순도	98.6%
제조일	2019년 3월 14일
유효기간	2024년 2월
보관조건	실온(1~30°C)
취급시 주의사항	특이사항 없음
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.14. 부형제

명칭	주사용수
Lot No.	DKN21010
보관조건	실온(1~30°C)
조제방법	부형제 검토 결과, 주사용수에 균일하게 현탁 되기에 선택하였다.

1.15. 시약 및 용매

Name of reagent and solvent	Lot/Batch No.	Specifications
Acetonitrile	V7VA1H	HPLC grade, Burdick & Jackson, U.S.A.
Water	V81G1H	HPLC grade, Burdick & Jackson, U.S.A.
Phosphoric acid	MKCN6330	Reagent grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.

1.16. 기기 및 기구

Name of instrument and apparatus	Specifications
HPLC	Alliance High Performance LC, Waters, U.S.A.
Micropipette	Research plus, Eppendorf, Germany
Balance	Practum 224, Sartorius, Germany
Ultrasonicator	CPX5800H-E, Branson, U.S.A.
Vacuum pump	MS-33 Oil-less Piston vacuum pump, Dongseo science, Republic of Korea
Hot plate/stirrer	SMHS-3, DAIHAN, Republic of Korea
Vortex mixer	VM-30, DAIHAN, Republic of Korea SI-0246A Vortex Genie 2, Scientific industries, U.S.A.
Refrigerator/Freezer	MPR-414F, Panasonic, Japan

1.17. 데이터 처리 소프트웨어

Name of software	Specifications
Empower3	Waters, U.S.A.
Microsoft Office Excel	Microsoft Co., U.S.A.

2. 시험방법

1.1. 용액의 조제

1.1.1. 이동상 A: 0.01 % phosphoric acid in water

2 L mass cylinder를 이용하여 2 L의 water를 bottle에 옮기고 0.2 mL의 phosphoric acid를 첨가한 후 교반하고, 10 분간 초음파 및 감압 처리하여 탈기하였다.

1.1.2. 이동상 B: Acetonitrile

1 L mass cylinder를 이용하여 1 L의 acetonitrile를 bottle에 옮기고, 10 분간 초음파 및 감압 처리하여 탈기하였다.

1.2. 희석용액의 조제

Water 250 mL과 acetonitrile 250 mL을 혼합하여 희석용액[Water:Acetonitrile=250:250 (v/v)]으로 사용하였다.

1.3. 표준원액의 조제

표준물질은 순도(98.6%)를 고려하여 0.0101 g을 전자저울을 이용하여 칭량 후, 용기에 넣고 10 mL의 희석용액을 첨가하였다(이론농도 1,000 µg/mL).

1.4. 표준용액의 조제

표준원액을 희석용액으로 희석하여 사용하였으며, 각각의 희석단계에서 vortex mixer를 사용하여 혼합하였다.

Final conc. of working solution (µg/mL)	Source solution		Volume of dilution solution (µL)
	Concentration (µg/mL)	Volume (µL)	
100	1,000	100	900
20	100	200	800
10	20	500	500
5	10	500	500
2	10	200	800
1	2	500	500

1.5. 검량선 시료(Standard, STD)의 조제

표준용액 1, 2, 5, 10 및 20 µg/mL를 검량선 시료로 사용하였다.

1.6. 품질관리(Quality control, QC) 시료의 조제

표준용액 5 µg/mL를 품질관리 시료로 사용하였다.

1.7. 시험물질의 조제

필요량의 시험물질을 전자저울로 칭량하여 조제용기에 넣고, 소량의 부형제를 가하여 교반기로 교반하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제를 가하여 설정농도가 되도록 조제하였다. 저농도 조제물은 고농도 조제물을 부형제로 순차적으로 희석하여 조제하였다.

Classification	Formulated Concentration (mg/mL)*
Low concentration	0.01 (0.0035)
High concentration	250 (87.5)

*: 시험물질 기준, (): Cinnamaldehyde 기준

1.8. 시료의 전처리

각 농도별 조제물은 일정량 채취한 후 희석용액을 이용하여 검량선 범위로 적절하게 희석하여 시료로 사용하였다. 검량선 범위로 희석된 희석액을 취하여 0.45 µm PTFE filter로 여과하여 vial에 옮기고 HPLC에 주입하여 분석하였다.

1.9. 분석조건

Column	Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, 100 x 2.1 mm (Serial No. H20-260925)		
Column temperature	40°C		
Mobile phase	A: 0.01% Phosphoric acid in water B: Acetonitrile Gradient elution		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	85	15
	3.45	60	40
	5.20	40	60
	5.21	85	15
	10.00	85	15
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection volume	5 µL		
Autosampler temperature	25°C		
Wave length	280 nm (UV/Vis detector)		

1.10. 데이터의 처리

1.1.3. Empower 3

검량선 작성, 검출농도 산출 및 크로마토그램 확인을 위해 사용하였다.

1.1.4. Microsoft Office Excel

정확성, 정밀성 및 변동률을 산출하기 위해 사용하였다.

1.1.5. 농도 산출

검량선은 x축에 농도를, y축에 피크면적을 이용하여 최소자승법으로 작성하였다. 검출농도는 피크면적을 검량선 계산식($y = ax \pm b$)에 대입하여 산출하였다.

1.1.6. 농도 이외의 파라미터 산출

정확성(%) = (정량값의 평균 ÷ 이론농도) x 100

정밀성(%) = (정량값의 표준편차 ÷ 정량값의 평균) x 100

변동률(%) = [(보존 후의 정량값 평균 - 시료 조제 직후의 정량값 평균) ÷ 시료 조제 직후의 정량값 평균] x 100

1.11. 수치의 취급

보고서에 기재하는 수치는 다음의 표에 명시된 숫자의 자리로 반올림하였다.

구분*	단위	파라미터의 표시
피크면적(y)	-	자연수
Retention time	min	3 소수점 자리
S/N ratio	-	2 소수점 자리
검량선의 기울기(a)	-	4 소수점 자리
검량선의 y 절편(b)	-	4 소수점 자리
검량선의 상관계수(r)	-	4 소수점 자리
검출농도(x)	µg/mL	3 소수점 자리
조제물의 산출농도	mg/mL	3 소수점 자리
정확성	%	1 소수점 자리
정밀성	%	2 소수점 자리
변동률	%	1 소수점 자리

*분석 결과 출력물은 데이터 처리 소프트웨어에서 설정되어 있는 값으로 표기하였다.

1.18. 재분석

재분석은 수행하지 않았다.

3. 조제물 분석법 밸리데이션 항목

1.1. 시스템 적합성(System suitability)

QC 시료를 전처리 후 6회 반복 주입하여 정밀성을 산출하였다. 판정기준은 피크면적과 retention time의 정밀성이 5% 이내인 것으로 하였다.

1.2. 직선성(Linearity)

검량선 시료를 각 농도별로 1회 측정하여 분석물질의 농도와 피크면적의 상관계수를 산출하였다. 판정기준은 상관계수 $r=0.9950$ 이상, 각 농도에서의 정확성은 85-115%로 하였다.

1.3. 특이성(Specificity)

이동상, 희석용액, 부형제 및 검량선 최저농도 표준용액을 확립된 분석조건에 따라 각 1회 측정하였다. 판정기준은 분석물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내며, 분석물질과 동일한 retention time에서 간섭피크가 없는 것으로 간섭 성분은 정량한계 면적의 1/5 이하인 것으로 하였다.

1.4. 일내 재현성(Intra-day reproducibility)

각 농도별 조제물의 중층에서 3회 채취하여 샘플당 1회 측정하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115% 인 것으로 하였다.

1.5. 균질성(Homogeneity)

각 농도별 조제물의 상층, 중층 및 하층에서 각 3회 채취하여 각 1회 측정하였다. 중층의 결과는 일내재현성 항목의 분석 결과 및 안정성 항목의 조제 직후 분석 결과(초기농도)로 사용하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115% 인 것으로 하였다.

1.6. 안정성(Stability)

1.1.7. 실온 안정성(Stability at room temperature)

각 농도별 조제물을 실온(1-30°C)에서 2 시간 이상 4 시간 이하 방치 후 중층에서 각 3회 채취하고 각 1회 측정하여 안정성을 확인하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기 농도에 대한 변동률은 초기 농도 기준 $\pm 15\%$ 이내로 하였다.

1.1.8. 냉장 안정성(Stability following storage under refrigeration at 2-8°C)

각 농도별 조제물을 냉장(2-8°C)에서 2 일 이상 8 일 이하 방치 후 중층에서 각 3회 채취하고 각 1회 측정하여 안정성을 확인하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기 농도에 대한 변동률은 초기 농도 기준 $\pm 15\%$ 이내로 하였다.

1.1.9. Auto-sampler내 안정성(Auto-sampler stability)

일내 재현성에서 사용한 시료를 auto-sampler 내에서 일정시간 이상 보관 후 측정하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 변동률은 초기 농도 기준 $\pm 15\%$ 이내로 하였다.

1.7. QC 샘플(Quality control)

QC 시료를 분석 종료 시에 3회 측정하였다. 판정기준은 분석결과의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115%로 하였다.

4. 결과

1.19. 시스템 적합성(System suitability)

(Table 1)

분석물질의 피크면적에 대한 정밀성은 0.24–1.30%, 분석물질의 retention time에 대한 정밀성은 0.13–0.16%로 판정기준을 만족하였다.

1.20. 직선성(Linearity)

(Table 2)

1, 2, 5, 10 및 20 µg/mL 검량선 시료를 각 농도별로 1회 측정하여 분석물질의 농도와 피크면적의 상관계수를 산출한 결과, 상관계수 r 은 0.9998–1.0000, 각 농도에서의 정확성은 89.4–109.0%로 판정기준을 만족하였다.

1.21. 특이성(Specificity)

(Table 3)

이동상, 희석용액, 부형제 및 검량선 최저농도 표준용액(1 µg/mL)을 각 1회 측정한 결과, 분석물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내었으며 분석물질과 동일한 retention time에서 간섭피크가 없는 것을 확인하였다.

1.22. 일내 재현성(Intra-day reproducibility)

(Table 4)

Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.29 및 0.61%, 정확성은 96.8 및 98.7%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

1.23. 균질성(Homogeneity)

(Table 5)

Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.34 및 0.79%, 정확성은 96.7 및 98.3%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

1.24. 안정성(Stability)

(Table 6)

1.1.1. 실온 안정성(Stability at room temperature)

Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물을 실온(1-30°C)에서 4 시간 방치한 결과, 각 조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.56 및 2.32%, 초기농도에 대한 변동률은 0.1 및 -0.8%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

1.1.2. 냉장 안정성(Stability following storage under refrigeration at 2-8°C)

Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물을 냉장(2-8°C)에서 8 일간 방치한 결과, 각 조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.10 및 0.18%, 초기농도에 대한 변동률은 3.9 및 0.9%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

1.1.3. Auto-sampler내 안정성(Auto-sampler stability)

Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물을 auto-sampler (25°C) 내에서 20 및 19 시간 보관한 결과, 각 조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.36 및 0.21%, 초기농도에 대한 변동률은 6.1 및 1.2%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

1.25. QC 샘플(Quality control)

(Table 7)

QC 시료(5 µg/mL)에 대한 정량값의 정밀성은 0.25-0.57%, 정확성은 95.4-101.1%로 판정기준을 만족하였다.

5. 결론

본 시험은 HPLC를 이용하여 시험물질인 자근복합추출물의 조제물 분석법 보증을 위한 밸리데이션 및 안정성 확인을 위해 수행하였다.

그 결과, 시험물질인 자근복합추출물의 조제물 농도분석을 위한 본 분석법은 적합하며, Low concentration (0.0035 mg/mL) 및 High concentration (87.5 mg/mL) 조제물은 실온 4시간, 냉장 8일간 및 auto-sampler 내에서 안정한 것으로 확인되었다.

TABLES

Table 1. System Suitability

Analyzed date	Classification	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Mean	SD	Precision (%)
2021.11.29	Peak area	613,134	611,083	609,475	612,268	609,679	611,991	611,272	1,468	0.24
	Retention Time (min)	5.224	5.228	5.239	5.222	5.227	5.220	5.227	0.007	0.13
2021.11.30	Peak area	577,807	560,604	573,781	580,959	571,992	579,809	574,159	7,484	1.30
	Retention Time (min)	5.245	5.233	5.228	5.234	5.239	5.251	5.238	0.008	0.16
2021.12.07	Peak area	616,545	611,263	611,235	606,698	612,986	615,659	612,398	3,558	0.58
	Retention Time (min)	5.217	5.210	5.222	5.210	5.223	5.208	5.215	0.007	0.13

SD: standard deviation

Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) × 100

Table 2. Linearity

Analyzed date	Nominal Concentration (µg/mL)	Peak area	Measured Concentration (µg/mL)	Accuracy (%)
2021.11.29	1	122,943	0.894	89.4
	2	266,918	2.077	103.9
	5	629,605	5.059	101.2
	10	1,227,571	9.974	99.7
	20	2,446,801	19.996	100.0
y = 121,655.7273x+14,184.0899, r = 1.0000, Weigh: None				
2021.11.30	1	122,416	1.090	109.0
	2	240,634	2.048	102.4
	5	573,979	4.749	95.0
	10	1,236,412	10.117	101.2
	20	2,455,368	19.995	100.0
y = 123,408.4231x-12,142.3434, r = 0.9998, Weigh: None				
2021.12.07	1	121,909	0.990	99.0
	2	239,288	1.954	97.7
	5	615,196	5.044	100.9
	10	1,222,388	10.035	100.4
	20	2,431,807	19.976	99.9
y = 121,658.4299x+1,513.6059, r = 1.0000, Weigh: None				

Accuracy(%) = (measured concentration / nominal concentration) × 100

Table 3. Specificity

Classification	Sample name	Peak area	% of standard peak area*
The lowest concentration of standard solution	Standard Solution 1 µg/mL	122,943	–
Mobile phase A	0.01% Phosphoric acid in water	0	0
Mobile phase B	Acetonitrile	0	0
Diluent Solution	50% acetonitrile in water	0	0
Vehicle	Water for Injection (주사용수)	0	0

* (control peak area ÷ standard peak area) × 100

Table 4. Intra-day Reproducibility

Classification	Nominal concentration	Measured concentration (mg/mL)	Mean (mg/mL)	SD (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
----------------	-----------------------	--------------------------------	--------------	------------	---------------	--------------

	(mg/mL)	No. 1	No. 2	No. 3				
Low concentration	0.0035	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.29	96.8
High concentration	87.5	86.930	85.940	86.140	86.337	0.523	0.61	98.7

*Based on the concentration of Cinnamaldehyde in the test substance.
 SD: standard deviation
 Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) x 100
 Accuracy (%) = (mean of measured concentration / nominal concentration) x 100

Table 5. Homogeneity

Classification	Nominal* concentration (mg/mL)	Layer	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
			No. 1	No. 2	No. 3				
Low concentration	0.0035	Top	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.34	96.7
		Middle	0.003	0.003	0.003				
		Bottom	0.003	0.003	0.003				
High concentration	87.5	Top	85.920	86.360	85.040	86.023	0.677	0.79	98.3
		Middle	86.930	85.940	86.140				
		Bottom	85.420	85.430	87.030				

*Based on the concentration of Cinnamaldehyde in the test substance.
 SD: standard deviation
 Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) x 100
 Accuracy (%) = (mean of measured concentration / nominal concentration) x 100

Table 6. Stability

Classification	Nominal* concentration (mg/mL)	Storage condition	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD (mg/mL)	Precision (%)	Variation (%)
			No. 1	No. 2	No. 3				
Low concentration	0.0035	Initial	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.29	–
		Room temperature, 4 hrs	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.56	0.1
		Refrigerator, 2–8°C, 8 days	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.10	3.9
		Auto-sampler, 25°C, 20 hrs	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.36	6.1
High concentration	87.5	Initial	86.930	85.940	86.140	86.337	0.523	0.61	–
		Room temperature, 4 hrs	83.380	86.640	86.990	85.670	1.991	2.32	-0.8
		Refrigerator, 2–8°C, 8 days	87.220	86.960	87.250	87.143	0.159	0.18	0.9
		Auto-sampler, 25°C, 19 hrs	87.410	87.130	87.470	87.337	0.181	0.21	1.2

*Based on the concentration of Cinnamaldehyde in the test substance.
 SD: standard deviation
 Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) x 100
 Variation (%) = [(mean of measured concentration after storage – mean of measured concentration immediately after dosing formulation preparation) / mean of measured concentration immediately after dosing formulation preparation] x 100

Table 7. QC Samples

Analyzed date	Nominal concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)			Mean (µg/mL)	SD (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
		No. 1	No. 2	No. 3				
2021.11.29	5	5.004	4.952	4.958	4.971	0.028	0.57	99.4
2021.11.30	5	4.780	4.786	4.742	4.769	0.024	0.50	95.4

2021.12.07	5	5.042	5.059	5.067	5.056	0.013	0.25	101.1
------------	---	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------

SD: standard deviation

Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) x 100

Accuracy (%) = (mean of measured concentration / nominal concentration) x 100

APPENDICES

Appendix 1. Protocol Deviations

Procedure	Protocol Deviations
해당없음.	

최종보고서

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를
이용한 단회 경구투여 독성시험

시험 번호 : DTN210195

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)
우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP적합진술서

시험제목 자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
시험번호 DTN210195

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
 식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

신뢰성보증확인서

시험제목 자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

시험번호 DTN210195

(주)디티앤씨알오 비임상센터 신뢰성보증업무담당자는 본 시험의 각 점검단계에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검단계, 점검일 및 점검결과보고일은 아래와 같다.

점검단계	점검일	시험책임자 및 운영책임자 점검결과보고일
시험계획서	2021년 4월 1일	2021년 4월 1일
동물의 입수 및 검역	2021년 4월 6일	2021년 4월 6일
시험물질의 조제	2021년 4월 13일	2021년 4월 13일
투여	2021년 4월 13일	2021년 4월 13일
일반증상관찰	2021년 4월 13일	2021년 4월 13일
부검	2021년 4월 27일	2021년 4월 27일
시험기초자료의 기록	2021년 5월 24일	2021년 5월 24일
최종보고서(안)	2021년 5월 24일	2021년 5월 24일
최종보고서		

상기의 점검은 GLP, 시험계획서 및 (주)디티앤씨알오 비임상센터의 표준작업지침서에 따라 실시하였으며, 본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

신뢰성보증업무담당자 _____

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

목차

페이지

신뢰성보증확인서	
요약	
1. 시험실시의 개요	
1.1. 시험제목	
1.2. 시험목적	
1.3. 시험의뢰자	
1.4. 시험의뢰자 모니터	
1.5. 시험기관	
1.6. 시험책임자	
1.7. 담당자	
1.8. 시험일정	
1.9. Good Laboratory Practice Regulations	
1.10. 시험기준	
1.11. 동물윤리	
1.12. 자료의 보관	
2. 시험재료 및 방법	
2.1. 시험물질	
2.2. 대조물질	
2.3. 시험물질 조제물의 조제방법	
2.4. 시험계	
2.5. 사육조건	
2.6. 실험설계 및 투여	
2.7. 관찰 및 검사	
2.8. 자료의 통계처리	
3. 결과 및 고찰	
3.1. 사망유무	
3.2. 일반증상	
3.3. 체중변화	
3.4. 부검	
4. 결론	
FIGURES	
Figure 1. Body weights of Male SD rats	

Figure 2. Body weights of Female SD rats

TABLES

Table 1. Summary of Mortality

Table 2. Summary of Clinical Signs

Table 3. Summary of Body Weights

Table 4. Summary of Necropsy Findings

APPENDICES

Appendix 1. Individual Clinical Signs

Appendix 2. Individual Body Weights

Appendix 3. Individual Necropsy Findings

Appendix 4. Individual Body Weights during an Acclimation Period

Appendix 5. Protocol Deviations

ATTACHMENTS

Attachment 1. Protocol

Attachment 2. Protocol Amendments

Attachment 3. Certificate of Analysis

요약

본 시험은 시험물질인 자근복합추출물을 Sprague-Dawley계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 자근복합추출물 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군과 대조군으로 구성하였고, 군당 암수 각 5마리에 단회 경구투여 하였다. 15일 동안 일반증상 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 안락사시켜 부검하였다.

관찰기간 동안, 5,000 mg/kg 투여군의 수컷 4마리가 2 및 3일, 암컷 5마리가 투여 1일에 사망하였다.

1,250 mg/kg 투여군의 암수에서 설사 또는 연변이 관찰되었고, 2,500 mg/kg 투여군의 암컷에서 설사, 점액변 또는 체온저하가 관찰되었으며, 5,000 mg/kg 투여군의 암수에서 자발운동의 저하, 자발운동의 소실, 체온저하, 설사, 불규칙 호흡, 유루, 유연, 각막혼탁, 복와위 및 횡와위가 관찰되었다.

체중측정 결과, 수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 2일에 대조군과 비교시 유의성 있는 체중감소가 관찰되었다.

부검 결과, 암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상으로, 자근복합추출물을 암수 랫드에 단회 경구투여 한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,500-5,000 mg/kg인 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

1.2. 시험목적

시험물질 자근복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 하였을 때 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

1.1. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.2. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.3. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.4. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.5. 담당자

시험물질관리책임자	김현지
검역책임자	박희원
병리책임자	박영일
주요 시험담당자	김정민
참여 시험담당자	강승구, 관준호, 김준엽, 임동준, 정혜린, 박지윤, 이안, 고영은, 이찬란, 허인재, 민혜리, 박주윤, 김홍매, 유미향, 강윤지, 문제민, 이은지, 서민지
신뢰성보증업무담당자	김정인

1.6. 시험일정

시험개시일	2021년 3월 31일
실험개시일(동물입수일)	2021년 4월 6일
균분리일	2021년 4월 12일
투여일	2021년 4월 13일
부검일	2021년 4월 27일
실험종료일	2021년 4월 27일
시험종료일	2021년 0월 00일

1.3. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

1.1. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”
식품의약품안전처 고시 제2017-71호 (2017년 8월 30일)

1.2. 동물윤리

본 시험은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: 210074)을 받았으며, 동물보호법(일부개정 2020년 2월 11일, 법률 제16977호) 및 실험동물에 관한 법률(일부개정 2018년 12월 11일, 법률 제15944호)의 동물윤리에 따라 실험을 수행하였다.

1.3. 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료 및 최종보고서는 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

1. 시험재료 및 방법

1.7. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1~30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.8. 대조물질

명칭	주사용수
제조번호(Lot No.)	DKN20014
보관조건	실온
제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea

1.9. 시험물질 조제물의 조제방법

시험물질은 시험의뢰자가 제공한 원액 그대로 사용하였으며, 비중 1.1034를 적용하여 투여액량을 산출하였다.

1.10. 시험계

1.1.1. 종 및 계통

랫드, Sprague-Dawley (NTacSam:SD), SPF

1.1.1. 생산자 및 공급자

Samtako Inc., Republic of Korea

1.1.2. 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는데 널리 사용되고 있으며, 비교할 수 있는 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다.

1.1.3. 성별, 동물 수, 주령 및 체중

기간	성별	동물 수	주령	체중범위(g)
입수 시	수컷	24	5	125.6~143.1
	암컷	24	5	102.2~119.1
투여 시	수컷	20	6	152.8~169.6

암컷	20	6	119.9~133.5
----	----	---	-------------

1.1.4. 검역 및 순화

입수 시 동물 수의 확인 및 일반증상 관찰, 체중측정을 실시하였으며, 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관하였다. 모든 동물에 대하여 검역 및 순화기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수 시 검역실에서 2일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다.

1.1.1. 개체 및 사육상자 식별

검역 및 순화기간 중에는 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역 및 순화기간 중의 개체식별카드를 부착하였다. 실험기간 중에는 동물의 꼬리에 균표시는 적색 유성펜, 개체번호는 청색 유성펜을 이용하여 표시를 하였고, 사육상자에는 실험기간 중의 개체식별카드를 부착하였다.

1.1.2. 최종검역

검역 및 순화기간 종료일(최종검역일)에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화(Appendix 4)를 확인하여 모든 동물의 건강상태에 이상이 없음을 확인하였다.

1.1.3. 군분리

최종검역 후, 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포되도록 암수 각 4군, 군당 암수 각 5마리로 군분리하였다.

1.1.4. 잔여동물 처리

군분리 후 잔여동물은 본시험에서 제외시키고, 해당 SOP에 따라 처리하였다.

1.11. 사육조건

1.1.5. 사육환경

검역실 번호	A505
동물실 번호	A501
사육상자 정보	스테인리스 철망사육상자, 260W×350L×210H (mm)
사육상자당 마리수	검역 및 순화기간 3마리 이하/사육상자 투여 및 관찰기간 1마리/사육상자
온도	19~25°C
상대습도	30~70%
환기횟수	10~15회/hr
조명주기	12시간(오전 7시 점등-오후 7시 소등)
조도	150~300 Lux
사육기자재 관리	사육상자 및 급이기는 1회/2주 이상 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

1.1.6. 사료

실험동물용 고품 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, Lot No.: 2918C-101820MA Envigo RMS, Inc., U.S.A.)를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 제조업체로부터 성적서를 받아 확인한 결과, 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

1.1.7. 음수

경기도 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 경기도 보건환경연구원(경기도 수원시 권선구 칠보로 1번길 62)에 의뢰하여 “먹는 물 수질기준

및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제833호 2019년 12월 20일 타법개정)의 전 항목에 대하여 1회/년 실시하고, 미생물 검사는 2회/년 실시하여 그 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

1.1. 실험설계 및 투여

1.1.8. 군설정

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	4.53	5 (1101-1105)	5 (2101-2105)
G2 저용량군	1,250	1.13	5 (1201-1205)	5 (2201-2205)
G3 중용량군	2,500	2.27	5 (1301-1305)	5 (2301-2305)
G4 고용량군	5,000	4.53	5 (1401-1405)	5 (2401-2405)

1.1.1. 투여

1.1.1.1. 투여용량 설정

본 시험의 예비시험(DT&CRO Study No.: DTN210195P1)으로 5,000 mg/kg 을 암수 랫드 각 1마리에 단회 경구투여 한 결과, 수컷에서 일반증상의 이상(체온저하, 자발운동의 소실, 거식 등)이 관찰된 후 5일에 사망하였다. 본 시험의 투여용량은 시험의뢰자와의 협의에 따라, 5,000 mg/kg을 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용하여 2,500 및 1,250 mg/kg을 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 고용량군과 동일한 액량의 대조물질을 투여하였다.

1.1.1.2. 투여경로 및 선택이유

시험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

1.1.1.3. 투여방법

투여액량은 저용량군은 1.13 mL/kg, 중용량군은 2.27 mL/kg, 대조군 및 고용량군은 4.53 mL/kg으로 하고, 개체별 투여량은 절식 후(투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위 내에 단회 강제 경구투여 하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급이하였다.

1.12. 관찰 및 검사

1.1.9. 일반증상 관찰

투여당일(투여 1일) 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 2일부터 15일까지 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

1.1.10. 사망동물의 처리

실험기간 중 사망동물은 발견 즉시 체중을 측정 후 부검을 실시하였으며, 즉시 부검을 실시하지 못한 경우에는 냉장 보관한 후 빠른 시간 내에 부검을 실시하였다.

1.1.11. 체중측정

모든 생존동물에 대하여 투여당일(투여 전), 2, 4, 8일 및 15일(부검일)에 체중을 측정하였다.

1.1.12. 부검

관찰기간 종료 후, 모든 생존 동물에 대해 CO₂ 가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사 시키고 부검을 실시하였다.

1.1.13. 병리조직학적 검사

병리조직학적 검사는 실시하지 않았다.

1.2. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계처리를 실시하였다.

Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산이 인정되면, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면, Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

2. 결과 및 고찰

1.3. 사망유무

(Table 1)

암수 대조군, 1,250, 및 2,500 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

5,000 mg/kg 투여군에서 1일에 암컷 5마리, 2 및 3일에 수컷 4마리가 사망(death)하였다.

1.4. 일반증상

(Table 2, Appendix 1)

[사망동물]

5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1시간부터 2일에 자발운동의 저하(decrease in locomotor activity), 자발운동의 소실(loss of locomotor activity), 체온저하(hypothermia), 설사(diarrhea), 불규칙 호흡(irregular respiration), 유루(lacrimation), 유연(salivation), 각막혼탁(increased corneal opacity), 복와위(sternal recumbency) 및 횡와위(lateral recumbency)가 수컷 1-4마리 및 암컷 1-3마리에서 관찰되었고, 투여 후 4 및 6시간에 암컷 2 및 3마리, 2 및 3일에 수컷 각 2마리가 복와위 또는 횡와위로 사망하였다.

[생존동물]

암수 대조군 및 수컷 2,500 mg/kg 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

1,250 mg/kg 투여군에서 투여 후 4시간에 설사 또는 연변(soft stool)이 암수 각 1마리에서 관찰되었다.

2,500 mg/kg 투여군에서 투여 후 2, 4 및 6시간에 설사, 점액변(mucous stool) 또는 체온저하가 암컷 각 1마리에서 관찰되었다.

5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 2시간에 설사가 수컷 1마리에서 관찰되었다.

1.5. 체중변화

(Figure 1-2, Table 3, Appendix 2)

암수 1,250 및 2,500 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

수컷 5,000 mg/kg 투여군에서 2일에 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중감소가 관찰되었다.

1.6. 부검

(Table 4, Appendix 3)

암수 대조군, 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

3. 결론

이상으로, 본 시험 조건하에서 자근복합추출물을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 2,500-5,000 mg/kg인 것으로 판단된다.

FIGURES

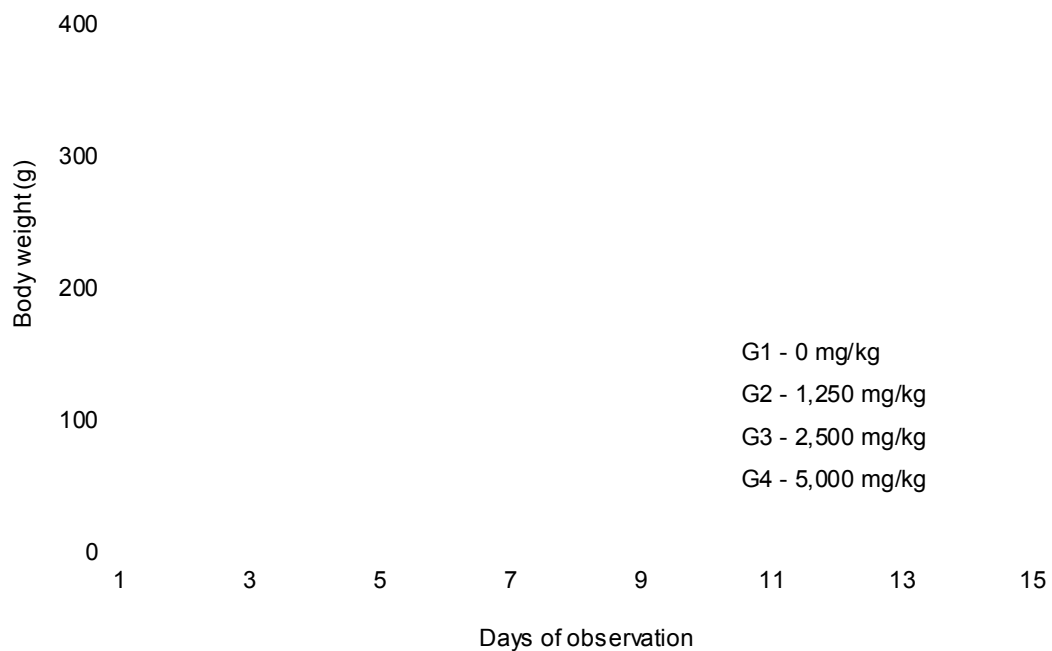


Figure 1. Body weights of Male SD rats

Figure 2. Body weights of Female SD rats

TABLES

Table 1. Summary of Mortality

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Days of observation															Mortality (dead/total)
			1 [^]	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 1,250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G3 2,500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G4 5,000	5	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 1,250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G3 2,500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G4 5,000	5	5															5/5

[^]: The day of dosing.

Table 2. Summary of Clinical Signs

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Hours (Day 1) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	NOA Diarrhea	5	5	5	4 1	5
G3 2,500	5	NOA	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA Decrease in locomotor activity Diarrhea Hypothermia Sternal recumbency Loss of locomotor activity Irregular respiration Lacrimation	5	4 1		3 3	1 4 3 3 3 1 1

Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical sign	Days of observaion													
			2 [^]	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA Loss of locomotor activity Irregular respiration Hypothermia Increased corneal opacity Sternal recumbency Death	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			2													
			2													
			2													
			1													
			2	2												
			2	2												

NOA: no observable abnormality.

[^]: The next day of dosing.

Table 3. Summary of Body Weights

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg)		Days of observaion					Gain 1–15
		1 [^]	2	4	8	15	
G1 0	Mean	161.3	184.7	203.4	248.7	317.0	155.7
	S.D.	2.0	3.2	3.9	1.5	4.2	2.5
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	161.7	181.7	202.1	243.4	302.0	140.3
	S.D.	3.0	3.3	7.0	6.9	10.4	8.8
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	161.1	179.1	197.9	239.1	299.7	138.6
	S.D.	6.3	7.4	8.4	11.2	16.6	12.4
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	160.0	159.4 **	189.0	226.3	305.0	138.8
	S.D.	4.2	12.4				
	N	5	3	1	1	1	1

Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg)		Days of observaion					Gain 1–15
		1 [^]	2	4	8	15	
G1 0	Mean	127.3	143.0	156.0	177.8	205.8	78.5
	S.D.	5.1	5.4	8.1	10.9	13.7	9.0
	N	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	Mean	127.8	142.0	153.5	172.8	200.1	72.4
	S.D.	3.5	5.8	7.6	7.6	13.2	10.8
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	Mean	128.6	141.4	153.9	175.0	206.1	77.6
	S.D.	3.4	6.7	5.2	5.7	4.7	2.9
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	128.2					
	S.D.	6.0					
	N	5					

[^]: The day of dosing.

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

Table 4. Summary of Necropsy Findings

Sex: Male				
Necropsy findings	Group / Dose (mg/kg)			
	G1	G2	G3	G4
	0	1,250	2,500	5,000
Number of animals	5	5	5	5
Number of sacrificed animals (scheduled)	5	5	5	1
No remarkable findings	5	5	5	1
Number of sacrificed animals (unscheduled)				4
No remarkable findings				4
Sex: Female				
Necropsy findings	Group / Dose (mg/kg)			
	G1	G2	G3	G4
	0	1,250	2,500	5,000
Number of animals	5	5	5	5
Number of sacrificed animals (scheduled)	5	5	5	
No remarkable findings	5	5	5	
Number of sacrificed animals (unscheduled)				5
No remarkable findings				5

APPENDICES

Appendix 1. Individual Clinical Signs

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hours (Day 1) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	1101		-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-
G2 1,250	1201		-	-	-	-	-
	1202		-	-	-	-	-
	1203		-	-	-	-	-
	1204	Diarrhea	-	-	-	+	-
	1205		-	-	-	-	-
G3 2,500	1301		-	-	-	-	-
	1302		-	-	-	-	-
	1303		-	-	-	-	-
	1304		-	-	-	-	-
	1305		-	-	-	-	-
G4 5,000	1401	Diarrhea	-	-	+	-	-
	1402	Decrease in locomotor activity	-	+	+	+	-
		Hypothermia	-	-	-	+	-
		Loss of locomotor activity	-	-	-	-	+
		Sternal recumbency	-	-	-	-	+
		Diarrhea	-	-	+	-	-
	1403	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-
		Irregular respiration	-	-	-	-	+
		Loss of locomotor activity	-	-	-	-	+
		Sternal recumbency	-	-	-	-	+
		Diarrhea	-	-	+	+	-
	1404	Hypothermia	-	-	-	+	-
		Loss of locomotor activity	-	-	-	-	+
		Lacrimation	-	-	-	-	+
		Sternal recumbency	-	-	-	-	+
Decrease in locomotor activity		-	-	+	+	+	
1405	Diarrhea	-	-	+	-	-	
	Hypothermia	-	-	-	+	+	

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Days of observaion														
			2 [^]	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 1,250	1201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1205		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 2,500	1301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1302		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1303		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1304		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1305		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 5,000	1401		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1402	Loss of locomotor activity	+	-													
		Irregular respiration	+	-													
		Hypothermia	+	-													
		Increased corneal opacity	+	-													
		Sternal recumbency	-	+													
	1403	Death	-	+													
		Sternal recumbency	+														
	1404	Death	+														
		Sternal recumbency	+														
	1405	Death	+														
		Loss of locomotor activity	+	-													
		Irregular respiration	+	-													
		Hypothermia	+	-													
		Sternal recumbency	-	+													
	Death	-	+														

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

[^]: The next day of dosing.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hours (Day 1) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	2101		-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-
G2 1,250	2201		-	-	-	-	-
	2202		-	-	-	-	-
	2203		-	-	-	-	-
	2204	Soft stool	-	-	-	+	-
	2205		-	-	-	-	-
G3 2,500	2301	Mucous stool	-	-	-	+	-
	2302		-	-	-	-	-
	2303	Diarrhea	-	-	+	-	-
	2304		-	-	-	-	-
	2305	Hypothermia	-	-	-	-	+
G4 5,000	2401	Loss of locomotor activity	-	-	-	+	-
		Hypothermia	-	-	-	+	-
		Salivation	-	-	-	+	-
		Sternal recumbency	-	-	-	+	-
		Lateral recumbency	-	-	-	-	+
		Death	-	-	-	-	+
	2402	Decrease in locomotor activity	-	+	-	-	-
		Irregular respiration	-	+	+	-	-
		Salivation	-	+	+	-	-
		Loss of locomotor activity	-	-	+	-	-
		Lateral recumbency	-	-	+	+	-
		Death	-	-	-	+	-
	2403	Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-
		Diarrhea	-	-	+	-	-
		Loss of locomotor activity	-	-	-	+	-
		Hypothermia	-	-	-	+	-
		Salivation	-	-	-	+	-
		Sternal recumbency	-	-	-	+	-
	2404	Lateral recumbency	-	-	-	-	+
		Death	-	-	-	-	+
		Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-
	2405	Lateral recumbency	-	-	-	+	-
		Death	-	-	-	+	-
		Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-
		Loss of locomotor activity	-	-	-	+	-
Irregular respiration		-	-	-	+	-	
Hypothermia		-	-	-	+	-	
	Lateral recumbency	-	-	-	+	+	
	Death	-	-	-	-	+	

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Days of observaion													
			2 [^]	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	2201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2205		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	2301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2302		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2303		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2304		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2305		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No observable abnormality.

^: The next day of dosing.

Appendix 2. Individual Body Weights

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Days of observaion					Gain
		1^	2	4	8	15	1-15
G1 0	1101	162.2	189.1	208.0	249.7	321.1	158.9
	1102	161.0	184.9	201.3	250.4	314.4	153.4
	1103	164.0	185.9	204.3	248.6	321.3	157.3
	1104	160.7	183.2	205.5	248.2	316.6	155.9
	1105	158.6	180.4	197.9	246.5	311.7	153.1
	Mean	161.3	184.7	203.4	248.7	317.0	155.7
	S.D.	2.0	3.2	3.9	1.5	4.2	2.5
N	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	1201	164.1	186.8	213.0	255.3	316.1	152.0
	1202	165.7	181.0	203.0	242.4	304.3	138.6
	1203	159.7	182.5	201.2	238.2	288.5	128.8
	1204	159.4	180.6	199.2	239.1	296.0	136.6
	1205	159.5	177.8	193.9	242.1	305.0	145.5
	Mean	161.7	181.7	202.1	243.4	302.0	140.3
	S.D.	3.0	3.3	7.0	6.9	10.4	8.8
N	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	1301	169.6	189.9	207.6	250.1	310.6	141.0
	1302	164.3	182.0	201.8	248.1	313.5	149.2
	1303	160.0	176.8	196.8	234.1	288.6	128.6
	1304	158.9	177.1	198.3	240.7	310.0	151.1
	1305	152.8	169.9	184.8	222.6	276.0	123.2
	Mean	161.1	179.1	197.9	239.1	299.7	138.6
	S.D.	6.3	7.4	8.4	11.2	16.6	12.4
N	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	1401	166.2	173.7	189.0	226.3	305.0	138.8
	1402	159.6	151.0				151.8*(Day 3)
	1403	161.4					159.6*(Day 2)
	1404	157.8					153.7*(Day 2)
	1405	155.0	153.6				151.4*(Day 3)
	Mean	160.0	159.4	189.0	226.3	305.0	138.8
	S.D.	4.2	12.4				
N	5	3	1	1	1	1	

^: The day of dosing.

*: Body weight of animal at the time of death.

Appendix 2. Individual Body Weights (continued)

Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Days of observaion					Gain 1–15
		1^	2	4	8	15	
G1 0	2101	132.6	148.2	165.8	189.6	219.0	86.4
	2102	128.9	142.7	157.1	179.7	205.0	76.1
	2103	130.7	146.5	158.3	183.1	216.1	85.4
	2104	124.6	143.3	155.6	176.0	204.9	80.3
	2105	119.9	134.1	143.3	160.4	184.1	64.2
	Mean	127.3	143.0	156.0	177.8	205.8	78.5
	S.D.	5.1	5.4	8.1	10.9	13.7	9.0
N	5	5	5	5	5	5	
G2 1,250	2201	133.1	150.2	165.1	180.3	212.9	79.8
	2202	128.7	142.8	151.8	170.3	201.5	72.8
	2203	125.4	135.7	149.3	163.2	181.2	55.8
	2204	127.8	144.1	156.0	180.9	211.6	83.8
	2205	123.9	137.4	145.2	169.3	193.5	69.6
	Mean	127.8	142.0	153.5	172.8	200.1	72.4
	S.D.	3.5	5.8	7.6	7.6	13.2	10.8
N	5	5	5	5	5	5	
G3 2,500	2301	133.5	149.7	159.8	180.7	209.1	75.6
	2302	130.3	145.3	159.1	178.8	212.7	82.4
	2303	125.7	137.7	150.7	167.8	203.9	78.2
	2304	128.0	141.8	151.2	177.7	203.9	75.9
	2305	125.3	132.3	148.6	170.2	201.0	75.7
	Mean	128.6	141.4	153.9	175.0	206.1	77.6
	S.D.	3.4	6.7	5.2	5.7	4.7	2.9
N	5	5	5	5	5	5	
G4 5,000	2401	132.8				133.1*(Day 1)	
	2402	133.5				135.0*(Day 1)	
	2403	131.2				131.4*(Day 1)	
	2404	123.5				125.6*(Day 1)	
	2405	120.2				123.0*(Day 1)	
	Mean	128.2					
	S.D.	6.0					
N	5						

^: The day of dosing.

*: Body weight of animal at the time of death.

Appendix 3. Individual Necropsy Findings

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type	Day of necropsy
G1 0	1101	All	No remarkable findings	S	15
	1102	All	No remarkable findings	S	15
	1103	All	No remarkable findings	S	15
	1104	All	No remarkable findings	S	15
	1105	All	No remarkable findings	S	15
G2 1,250	1201	All	No remarkable findings	S	15
	1202	All	No remarkable findings	S	15
	1203	All	No remarkable findings	S	15
	1204	All	No remarkable findings	S	15
	1205	All	No remarkable findings	S	15
G3 2,500	1301	All	No remarkable findings	S	15
	1302	All	No remarkable findings	S	15
	1303	All	No remarkable findings	S	15
	1304	All	No remarkable findings	S	15
	1305	All	No remarkable findings	S	15
G4 5,000	1401	All	No remarkable findings	S	15
	1402	All	No remarkable findings	US	3
	1403	All	No remarkable findings	US	2
	1404	All	No remarkable findings	US	2
	1405	All	No remarkable findings	US	3

S: scheduled, US: unscheduled.

Appendix 3. Individual Necropsy Findings (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type	Day of necropsy
G1 0	2101	All	No remarkable findings	S	15
	2102	All	No remarkable findings	S	15
	2103	All	No remarkable findings	S	15
	2104	All	No remarkable findings	S	15
	2105	All	No remarkable findings	S	15
G2 1,250	2201	All	No remarkable findings	S	15
	2202	All	No remarkable findings	S	15
	2203	All	No remarkable findings	S	15
	2204	All	No remarkable findings	S	15
	2205	All	No remarkable findings	S	15
G3 2,500	2301	All	No remarkable findings	S	15
	2302	All	No remarkable findings	S	15
	2303	All	No remarkable findings	S	15
	2304	All	No remarkable findings	S	15
	2305	All	No remarkable findings	S	15
G4 5,000	2401	All	No remarkable findings	US	1
	2402	All	No remarkable findings	US	1
	2403	All	No remarkable findings	US	1
	2404	All	No remarkable findings	US	1
	2405	All	No remarkable findings	US	1

S: scheduled, US: unscheduled.

Appendix 4. Individual Body Weights during an Acclimation Period

(g)

Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment
1101	1010	134.7	186.4	2101	2005	108.2	154.1
1102	1006	133.5	186.0	2102	2023	111.3	149.4
1103	1011	129.3	185.6	2103	2012	114.5	148.8
1104	1001	129.4	185.3	2104	2018	112.1	143.2
1105	1002	130.4	180.9	2105	2021	110.6	138.8
1201	1021	129.3	188.9	2201	2024	114.5	155.8
1202	1009	139.6	186.9	2202	2013	110.3	149.5
1203	1020	129.8	186.4	2203	2002	113.9	145.6
1204	1008	138.0	183.2	2204	2022	117.1	144.4
1205	1024	132.7	179.0	2205	2011	111.9	138.9
1301	1012	133.3	192.8	2301	2020	117.6	152.4
1302	1013	132.2	187.5	2302	2015	111.2	149.8
1303	1003	129.0	186.9	2303	2004	109.2	146.0
1304	1022	130.1	180.4	2304	2014	110.0	144.8
1305	1023	128.9	176.8	2305	2007	112.7	141.2
1401	1017	129.5	191.8	2401	2006	114.8	151.5
1402	1016	126.7	185.9	2402	2017	113.8	150.4
1403	1014	137.1	185.0	2403	2010	118.8	148.9
1404	1007	134.7	182.7	2404	2001	111.8	145.0
1405	1015	132.1	179.1	2405	2003	112.1	138.5
	1004	128.9	173.2		2008	105.4	131.0
	1005	125.6	172.6		2009	102.2	132.2
	1018	127.7	173.9		2016	104.5	134.9
	1019	143.1	198.2		2019	119.1	167.3
	Mean	131.9	184.0		Mean	112.0	145.9
	S.D.	4.3	6.2		S.D.	4.2	8.1
	N	24	24		N	24	24

Appendix 5. Protocol Deviations

Procedure	Protocol Deviations
해당사항 없음.	

최종보고서

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
4주 반복 경구투여 용량결정시험

시험번호 : DTN210196

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

진술서

시험제목 자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여
 용량결정시험
시험번호 DTN210196

본 시험은 다음의 시험기준을 참고하고, 시험계획서 및 (주)디티앤씨알오 비임상센터의 SOP에 따라 수행하였다. 본 보고서는 시험과정에서 기록된 시험기초자료를 근거로 정확하게 작성되었다.

- “의약품등의 독성시험기준”
 식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

목차

페이지

요약	
1. 시험실시의 개요	
1.1. 시험제목	
1.2. 시험목적	
1.3. 시험의뢰자	
1.4. 시험의뢰자 모니터	
1.5. 시험기관	
1.6. 시험책임자	
1.7. 담당자	
1.8. 시험일정	
1.9. 시험기준	
1.10. 동물윤리	
1.11. 자료의 보관	
2. 시험재료 및 방법	
2.1. 시험물질	
2.2. 대조물질	
2.3. 시험계	
2.4. 사육조건	
2.5. 실험설계 및 투여	
2.6. 관찰 및 검사	
2.7. 자료의 통계처리	
3. 결과 및 고찰	
3.1. 일반증상	
3.2. 체중변화	
3.3. 사료섭취량	
3.4. 혈액학적 검사	
3.5. 혈액생화학적 검사	
3.6. 장기중량	
3.7. 부검	
4. 결론	
5. 참고문헌	

FIGURES

- Figure 1. Body weights of Male SD rats
- Figure 2. Body weights of Female SD rats

TABLES

- Table 1. Summary of Clinical Signs
- Table 2. Summary of Body Weights
- Table 3. Summary of Food Consumption
- Table 4. Summary of Hematology
- Table 5. Summary of Blood Chemistry
- Table 6. Summary of Absolute Organ Weights
- Table 7. Summary of Relative Organ Weights
- Table 8. Summary of Necropsy Findings

APPENDICES

- Appendix 1. Individual Clinical Signs
- Appendix 2. Individual Body Weights
- Appendix 3. Individual Food Consumption
- Appendix 4. Individual Hematology
- Appendix 5. Individual Blood Chemistry
- Appendix 6-1. Individual Absolute Organ Weights
- Appendix 6-2. Individual Absolute Organ Weights (unscheduled)
- Appendix 7-1. Individual Relative Organ Weights
- Appendix 7-2. Individual Relative Organ Weights (unscheduled)
- Appendix 8. Individual Necropsy Findings
- Appendix 9. Individual Body Weights during an Acclimation Period
- Appendix 10. Protocol Deviations

ATTACHMENTS

- Attachment 1. Protocol
- Attachment 2. Protocol Amendments
- Attachment 3. Certificate of Analysis

요약

본 시험은 자근복합추출물을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 4주간 반복경구투여 하였을 때 나타나는 독성반응과 안전성을 평가하고, 13주 반복투여 독성시험의 용량설정에 참고하기 위하여 실시하였다.

군구성은 자근복합추출물 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군의 3개 용량과 대조군(주사용수)으로 구성하였고, 군당 암수 각 5마리에 4주간 반복 경구투여하였다.

관찰기간 동안, 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량 측정 및 부검을 실시하였다.

관찰기간 동안, 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1마리가 투여 3일에 사망하였다.

일반증상 관찰 결과, 암수 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 유연이 관찰되었고, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 자발운동의 저하, 불규칙 호흡 및 유연이 관찰되었다.

체중측정 결과, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 체중감소 경향이 관찰되었다.

사료섭취량 측정 결과, 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 사료섭취량의 감소가 일시적으로 관찰되었다.

혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사 결과, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다.

장기중량 측정 결과, 수컷 1,000 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 간의 절대 및 상대중량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었다.

부검 결과, 암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 전위의 비후가 관찰되었고, 2,000 mg/kg/day 투여군의 사망개체에서 전위의 변색이 관찰되었다. 그러나, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위로 관련된 항목에서의 변화가 관찰되지 않아 사람에 외삽하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약할 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 1,000 mg/kg/day로 설정하는 것이 타당할 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량결정시험

1.2. 시험목적

시험물질인 자근복합추출물을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 4주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성반응을 평가하여 13주 반복투여 독성시험의 용량설정에 참고하기 위하여 실시하였다.

1.1. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.2. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.3. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.4. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.1. 담당자

시험물질관리책임자	김현지
검역책임자	박희원
병리책임자	석푸름
주요 시험담당자	민혜리, 최미나
참여 시험담당자	정혜린, 박주윤, 박지윤, 강승구, 강태혁, 안희원, 양보연, 김준엽, 변유주, 고영은, 이찬란, 김태경, 이은지, 문제민, 김민정, 박혜준, 강윤지, 김홍매, 유미향, 김정민, 김희진, 서민지, 이슬기

1.2. 시험일정

시험개시일	2021년 5월 10일
실험개시일(동물입수일)	2021년 5월 14일
군분리일	2021년 5월 18일
투여기간	2021년 5월 19일-6월 15일
부검일	2021년 6월 16일
실험종료일	2021년 6월 16일
시험종료일	2021년 0월 0일

1.3. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 참고하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”
식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

1.4. 동물윤리

본 시험은 ㈜디티앤씨알오 비임상센터 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: 210121)을 받았으며, 동물보호법(일부개정 2020년 2월 11일, 법률 제16977호) 및 실험동물에 관한 법률(일부개정 2018년 12월 11일, 법률 제15944호)의 동물윤리에 따라 실험을 수행하였다.

1.5. 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료 및 최종보고서는 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 ㈜디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

2. 시험재료 및 방법

1.6. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1-30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.3. 대조물질

명칭	주사용수
제조번호(Lot No.)	DKN20014
보관조건	실온
제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea

1.1.1. 시험물질 조제물의 조제방법

시험물질은 시험의뢰자가 제공한 원액 그대로 사용하였으며, 비중 1.1034를 적용하여 투여액량을 산출하였다.

1.4. 시험계

1.1.2. 종 및 계통

랫드, Sprague-Dawley (NTacSam:SD), SPF

1.1.3. 생산자 및 공급자

Samtako Inc., Republic of Korea

1.1.4. 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는데 널리 사용되고 있으며, 비교할 수 있는 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다.

1.1.1. 성별, 동물 수, 주령 및 체중

기간	성별	동물 수	주령	체중범위(g)
입수 시	수컷	24	5	120.1-138.8
	암컷	24	5	98.3-115.4
투여 시	수컷	20	6	162.9-180.0
	암컷	20	6	122.2-146.4

1.1.1. 검역 및 순화

입수 시 동물 수의 확인 및 일반증상 관찰, 체중측정을 실시하였으며, 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관하였다. 모든 동물에 대하여 검역 및 순화기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰한다. 단, 동물입수 시 검역실에서 2일간 일반증상을 관찰 후 동물실로 이동하였다.

1.1.2. 개체 및 사육상자 식별

검역 및 순화기간 중에는 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역 및 순화기간 중의 개체식별카드를 부착하였다. 실험기간 중에는 동물의 꼬리에 균표시는 적색 유성펜, 개체번호는 청색 유성펜을 이용하여 표시를 하고, 사육상자에는 실험기간 중의 개체식별카드를 부착하였다.

1.1.3. 최종검역

검역 및 순화기간 종료일(최종검역일)에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화(Appendix 9)를 확인하여 모든 동물의 건강상태에 이상없음을 확인하였다.

1.1.4. 군분리

최종검역 후, 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포되도록 암수 각 4군, 군당 암수 각 5마리로 군분리하였다.

1.1.5. 잔여동물 처리

군분리 후 잔여동물은 본시험에서 제외시키고, 해당 SOP에 따라 처리하였다.

1.7. 사육조건

1.1.6. 사육환경

검역실 번호	A505
동물실 번호	A502
사육상자 정보	스테인리스 철망사육상자, 260W×350L×210H (mm)
사육상자당 마리수	검역 및 순화기간 3마리 이하/사육상자 투여 및 관찰기간 1마리/사육상자
온도	19-25°C
상대습도	30-70%
환기횟수	10-15회/hr
조명주기	12시간(오전 7시 점등-오후 7시 소등)
조도	150-300 Lux
사육기자재 관리	사육상자 및 급이기는 1회/2주 이상 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

1.1.7. 사료

실험동물용 고품 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, Lot No.: 2918C-110820MA, 2918C-121420MA, Envigo RMS, Inc., U.S.A.)를 급이기에 넣어

자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 제조업체로부터 성적서를 받아 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

1.1.8. 음수

경기도 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 경기도 보건환경연구원(경기도 수원시 권선구 칠보로1번길 62)에 의뢰하여 “먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제833호, 2019년 12월 20일, 타법개정)”의 전 항목에 대하여 1회/년 실시하고, 미생물 검사는 2회/년 실시하여 그 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

1.8. 실험설계 및 투여

1.1.9. 군설정

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	1.81	5 (1101-1105)	5 (2101-2105)
G2 저용량군	500	0.45	5 (1201-1205)	5 (2201-2205)
G3 중용량군	1,000	0.91	5 (1301-1305)	5 (2301-2305)
G4 고용량군	2,000	1.81	5 (1401-1405)	5 (2401-2405)

1.1.10. 투여

1.1.1.1. 투여용량 설정

단회투여 독성시험(DT&CRO Study No.: DTN210195) 결과, 5,000 mg/kg/day 용량에서 일반증상의 이상(체온저하, 자발운동의 소실, 거식 등)이 관찰되었고, 수컷 4마리 및 암컷 5마리가 사망하였다. 본 시험의 투여용량은 시험의뢰자와 협의에 따라, 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용하여 1,000 및 500 mg/kg/day를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 고용량군과 동일한 액량의 대조물질을 투여하였다.

1.1.1.2. 투여경로 및 선택이유

시험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

1.1.1.3. 투여방법

투여액량은 저용량군은 0.45 mL/kg, 중용량군은 0.91 mL/kg, 대조군 및 고용량군은 1.81 mL/kg으로 하고, 개체별 투여액량은 최근의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 4주간 1일 1회 위 내에 강제 경구투여하였다.

1.9. 관찰 및 검사

1.1.11. 일반증상 관찰

투여기간 동안, 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 첫 투여일을 Day 1로 설정하였다.

1.1.12. 사망동물의 취급

실험기간 중 사망동물은 발견 즉시 체중을 측정 후 부검을 실시하였다.

1.1.13. 체중측정

투여개시일(투여전), 투여기간 중 주 1회 체중을 측정하였다. 또한, 상대장기중량을 구하기 위해 부검일의 절식체중을 측정하였으며, 이는 평가에서 제외하였다.

1.1.14. 사료섭취량 측정

투여개시 전에는 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하고, 투여기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 부검일이 포함된 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

1.1.15. 임상 병리

1.1.1.4. 채혈

모든 생존동물에 대하여 하룻밤 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하여 용도별로 아래와 같이 처리하였다.

항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	0.5 mL 이상	K ₂ -EDTA CBC tube
혈액생화학적 검사	1 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

1.1.1.5. 혈액학적 검사

혈액학적 검사는 혈구분석기(XN-1000, Sysmex, Japan)로 아래의 항목을 측정하였다.

항목	단위
총적혈구수(Total red blood cell count, RBC)	×10 ⁶ /μL
혈색소량(Hemoglobin, HGB)	g/dL
헤마토크리트치(Hematocrit, HCT)	%
평균적혈구용적(Mean corpuscular volume, MCV)	fL
평균적혈구헤모글로빈량(Mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg
평균적혈구헤모글로빈농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL
총백혈구수(Total white blood cell count, WBC)	×10 ³ /μL
혈소판수(Platelet count, PLT)	×10 ³ /μL

1.1.1.6. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 혈액을 상온에서 0.5-1시간 동안 응고시킨 후, 원심분리(3,000 rpm, 10분)한 후 혈청을 분리하여 혈액생화학 분석기(HITACHI 7180, HITACHI, Japan)로 아래의 항목을 측정하였다.

항목	단위
아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase, AST)	U/L
알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)	U/L
알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)	U/L
혈당(Glucose, GLU)	mg/dL
혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL
크레아티닌(Creatinine, CREA)	mg/dL
총콜레스테롤(Total cholesterol, T-CHO)	mg/dL
총단백(Total protein, TP)	g/dL
알부민(Albumin, ALB)	g/dL
트리글리세라이드(Triglyceride, TG)	mg/dL
알부민/글로불린 비(Albumin/globulin ratio, A/G ratio)	-

1.1.16. 부검

모든 생존동물에 대하여 29일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥에서 방혈치사 시킨 후, 전신의 장기 및 조직에 대한 검사를 실시하였다.

1.1.17. 장기중량 측정

부검을 실시한 모든 동물은 다음 장기의 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량(%)을 산출하였다.

뇌(Brain)	심장(Heart)
간(Liver)	비장(Spleen)
신장*(Kidney)	

*: 양측성 장기는 좌우를 합하여 무게 측정.

1.1.18. 병리조직

1.1.1.7. 조직 및 장기의 보존

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기를 적출하여 10% 중성완충포름알린용액에 고정하였다. 단, 고환은 Davidson's 용액에 고정한 후, 10% 중성완충포름알린 용액에 고정하였다.

뇌(Brain)	가슴샘(Thymus)
폐 및 기관지(Lung with bronchi)	갑상샘 및 부갑상샘(Thyroid gland with parathyroid gland)
심장(Heart)	비장(Spleen)
신장(Kidney)	부신(Adrenal gland)
간(Liver)	위(Stomach)
십이지장(Duodenum)	공장(Jejunum)
회장(Ileum)	맹장(Cecum)
결장(Colon)	직장(Rectum)
췌장(Pancreas)	고환(Testis)
부고환(Epididymis)	난소(Ovary)
자궁(Uterus)	

1.1.1.8. 병리조직학적 검사

병리조직학적 검사를 실시하지 않아, 고정한 장기는 시험 종료 후 폐기한다.

1.10. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계처리를 실시하였다.

Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산이 인정되면, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면, Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

1.1. 일반증상

(Table 1, Appendix 1)

2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1마리가 투여 3일에 복와위(sternal recumbency)로 사망(death)하였다. 사망전 일반증상의 이상은 관찰되지 않았고, 부검 결과, 전위의 적색 변색(discoloration)이 관찰되었다.

500 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 암수 모든 개체에서 유연(salivation)이 투여 5-6일부터 투여종료시까지 산발적으로 관찰되었고, 2,000 mg/kg/day 투여군의 암수 모든 개체에서 유연, 자발운동의 저하(decrease of locomotor activity) 및 불규칙 호흡(irregular respiration)이 투여 4일부터 투여종료시까지 산발적으로 관찰되었다.

상기의 소견들은 모두 시험물질에 의한 영향으로 판단된다.

1.2. 체중변화

(Figure 1-2, Table 2, Appendix 2)

관찰기간 동안, 암수 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 1-4주에 대조군과 비교시 증체량의 감소경향이 관찰되었고, 투여 4주차의 평균체중을 대조군과 비교시 수컷은 8.2%, 암컷은 9.7% 낮았다. 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단된다.

1.3. 사료섭취량

(Table 3, Appendix 3)

관찰기간 동안, 암수 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군과 암컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 1주에 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 사료섭취량의 감소가 관찰되었고, 이는 체중변화와 더불어 시험물질에 의한 영향으로 판단된다.

1.4. 혈액학적 검사

(Table 4, Appendix 4)

암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 검사항목에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

1.5. 혈액생화학적 검사

(Table 5, Appendix 5)

암수 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 수컷에서만 관찰된 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없었다.

1.6. 장기중량

(Table 6-7, Appendix 6-1-7-2)

수컷 1,000 mg/kg/day 투여군 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대 및 상대중량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었다(Text Table 1). 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단되며, 추후 진행하는 장기 독성시험에서 확인이 필요할 것으로 사료된다.

Text Table 1. Changes in Organ Weights (Group Means±S.D.)

Group / Dose (mg/kg/day)	G1 0	G2 500	G3 1,000	G4 2,000
Sex	Male			
Liver				
Absolute (g)	10.08±0.55	9.95±1.03	11.40±0.99	11.02±0.74
Relative (% B.W.)	3.18±0.14	3.09±0.28	3.46±0.05*	3.75±0.23*
Sex	Female			
Liver				
Absolute (g)	6.17±0.78	5.76±0.52	5.97±0.29	6.68±0.67
Relative (% B.W.)	2.94±0.15	2.94±0.13	2.97±0.16	3.53±0.23**

Significantly different from control group: * p<0.05, ** p<0.01.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 용량상관성이 없거나 경미한 변동으로 독성학적 의미는 없었다.

1.7. 부검

(Table 8, Appendix 8)

전위(forestomach)의 비후(thickening)가 500 mg/kg/day 투여군의 수컷 4마리 및 암컷 3마리, 1,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 4마리 및 암컷 5마리, 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 4마리 및 암컷 5마리에서 관찰되었고(Text Table 2), 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1마리 사망개체(개체번호: 1403)에서 전위의 적색 변색(discoloration)이 관찰되었다(Text Table 3). 이는 시험물질 투여로 인한 위 내 반복적인 국소자극에 의한 변화로 판단된다. 그러나, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위로 관련된 항목에서의 변화가 관찰되지 않아 사람에게 외삽하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약할 것으로 판단된다^{1, 2)}.

Text Table 2. Remarkable Macroscopic Findings in Scheduled Animals

		Group / Dose (mg/kg/day)	G1 0	G2 500	G3 1,000	G4 2,000
Sex: Male						
Organ	Findings	Number Examined	5	5	5	4
Stomach	Thickening, forestomach		0	4	4	4
Sex: Female						
Organ	Findings	Number Examined	5	5	5	5
Stomach	Thickening, forestomach		0	3	5	5

Text Table 3. Remarkable Macroscopic Findings in Unscheduled Animals

		Group / Dose (mg/kg/day)	G4 2,000
Sex: Male			
Organ	Findings	Number Examined	1
Stomach	Discoloration, forestomach, red		1

4. 결론

본 시험 조건하에서, 자근복합추출물을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여 한 결과, 암수 500, 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 모든 개체에서 유연이 산발적으로 관찰되었고, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군의 암수 모든 개체에서 유연, 자발운동의 저하 및 불규칙호흡이 산발적으로 관찰되었다. 또한, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 체중감소가 관찰되었고, 수컷 1,000 mg/kg/day 투여군 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대 및 상대중량의 증가가 관찰되었다.

따라서, 13주 반복투여 독성시험의 고용량은 1,000 mg/kg/day로 설정하는 것이 타당할 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

- 1) Wester P.W. and Kroes R. (1988). Forestomach carcinogens: pathology and relevance to man. *Toxicol Pathol.* 16 (2): 165-171.
- 1) Proctor D.M. et al. (2007) Mode-of-Action Framework for Evaluating the Relevance of Rodent Forestomach Tumors in Cancer Risk Assessment. *Toxicological sciences.* 98 (2): 313-326.

FIGURES

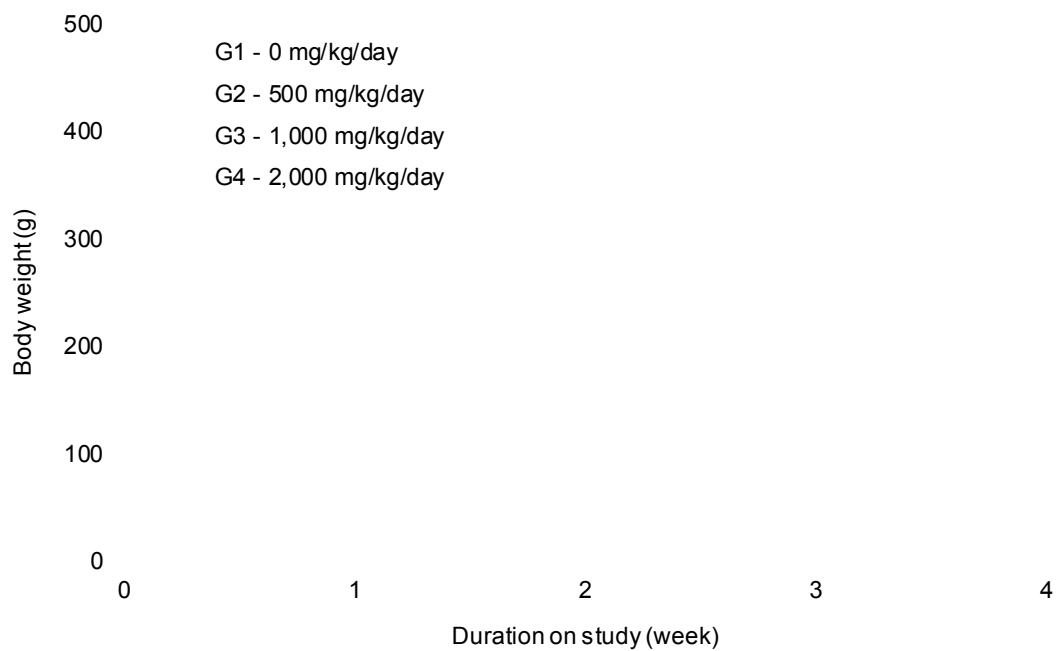


Figure 1. Body weights of Male SD rats

Figure 2. Body weights of Female SD rats

TABLES

Table 1. Summary of Clinical Signs

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Days of observation													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 500	5	NOA Salivation (after dosing)	5	5	5	5	4	3	2		4	4	5	5	5	
G3 1,000	5	NOA Salivation (after dosing)	5	5	5	5	2	2	2		4	4	2	3	3	
G4 2,000	5	NOA Decrease in locomotor activity Irregular respiration Salivation (before dosing) Salivation (after dosing) Sternal recumbency Death	5	5	4	1	2	1								
						3			1	2	2	3	3	2	3	
						3	2	2	4	4	4	4	4	1	4	
								1								
								2	2	4	1	1	3	3	3	
						1										
						1										

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Days of observation														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
G2 500	5	NOA Salivation (after dosing)	3	5	5	3	4	5	5	5	4	5	4	3	5		
G3 1,000	5	NOA Salivation (after dosing)	3	4	3		1	3	4	2	2	3	3	2	1		
G4 2,000	4	Decrease in locomotor activity Irregular respiration Salivation (after dosing)	3	3	3	3	3	3	4	2	2	1	2	2	2		
			3	1	2	3	2	1	2	2	1	3	4	4	4		
			2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	4		

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1. Summary of Clinical Signs (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Days of observation														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	5	NOA Salivation (after dosing)	5	5	5	5	5	5	4	3	1	4	4	4	5	5	5
G3 1,000	5	NOA Salivation (after dosing)	5	5	5	5	2	3	2	2	1	4	1	4	4	3	3
G4 2,000	5	NOA Decrease in locomotor activity Irregular respiration Salivation (after dosing)	5	5	5	2	3							1			
						3					2	1	1				
						3	2	5	5	5	5	5	2	1	3	1	
								2	3	4	3	3	4	3	3	4	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Days of observation														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	5	NOA Salivation (after dosing)	4	5	4	4	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5	5
G3 1,000	5	NOA Salivation (after dosing)	3	2	2	4	3	4	4	5	4	5	3	4	3	3	2
G4 2,000	5	NOA Salivation (after dosing) Irregular respiration	1	2	2												
			4	3	3	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5
						1	1	1	1			1	1	1	1	1	1

NOA: No Observable Abnormality.

Table 2. Summary of Body Weights

Sex Male							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	172.3	230.1	282.5	324.1	351.9	
	S.D.	6.2	7.2	8.2	10.4	10.3	
	N	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	171.8	226.2	282.1	323.0	351.9	
	S.D.	6.1	8.5	12.2	16.6	19.5	
	N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	172.5	224.8	288.1	333.2	364.0	
	S.D.	5.1	10.3	18.2	26.2	31.1	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	172.4	215.1	264.8	300.7	323.2	
	S.D.	6.6	13.1	14.6	11.6	9.9	
	N	5	4	4	4	4	

Sex Female							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	135.4	165.6	190.5	212.1	229.2	
	S.D.	5.8	9.3	11.4	12.5	18.9	
	N	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	135.4	161.5	185.0	202.1	216.6	
	S.D.	9.4	13.7	12.5	19.9	21.9	
	N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	136.2	159.9	188.1	204.1	219.6	
	S.D.	7.7	13.1	9.5	10.3	12.0	
	N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	136.2	158.5	183.6	200.8	207.0	
	S.D.	6.9	10.4	10.1	15.3	20.7	
	N	5	5	5	5	5	

Table 3. Summary of Food Consumption

Sex: Male		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	25.3	26.9	29.2	29.8	30.4
	S.D.	1.6	0.6	0.7	0.5	1.0
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	24.3	26.4	29.5	30.3	30.6
	S.D.	1.4	1.5	1.5	1.9	1.6
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	25.7	26.1	31.4	31.9	33.1
	S.D.	1.9	2.1	3.4	3.3	3.7
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	26.7	23.2 **	27.8	28.7	29.0
	S.D.	1.4	0.6	1.8	1.3	2.0
	N	5	4	4	4	4

Sex: Female		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	Mean	20.4	20.6	21.9	21.8	22.4
	S.D.	2.0	2.5	1.6	1.7	2.9
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	19.1	19.4	20.8	20.7	21.7
	S.D.	2.9	1.3	1.5	2.7	2.6
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	19.5	19.3	22.0	21.3	22.6
	S.D.	1.9	2.0	1.5	1.6	1.3
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	21.6	19.6	22.1	21.5	21.1
	S.D.	1.6	1.9	1.3	2.2	3.0
	N	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: ** p<0.01.

Table 4. Summary of Hematology

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	WBC ×10 ³ /μL
G1 0	Mean	8.44	16.4	46.3	55.0	19.4	35.3	1079	9.44
	S.D.	0.45	0.7	1.6	1.5	0.6	0.3	98	2.50
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	8.18	16.0	45.4	55.5	19.6	35.3	1032	9.13
	S.D.	0.14	0.4	1.0	1.2	0.6	0.4	64	1.46
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	8.04	16.1	45.3	56.3	20.1	35.6	1100	8.95
	S.D.	0.33	0.5	1.7	1.7	0.6	0.2	98	1.54
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	8.09	16.2	45.5	56.3	20.0	35.5	1059	11.76
	S.D.	0.34	0.6	1.9	2.2	0.8	0.2	100	1.05
	N	4	4	4	4	4	4	4	4

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	WBC ×10 ³ /μL
G1 0	Mean	7.93	15.7	43.5	54.9	19.9	36.1	1090	5.20
	S.D.	0.30	0.5	1.2	1.3	0.6	0.3	113	0.68
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	8.31	16.3	45.2	54.4	19.6	36.0	1086	5.90
	S.D.	0.31	0.7	1.6	0.4	0.3	0.4	100	1.40
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	8.00	15.8	44.0	55.0	19.7	35.8	1115	5.60
	S.D.	0.30	0.3	0.7	1.4	0.5	0.2	158	2.11
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	8.27	16.2	45.0	54.4	19.6	36.0	1105	5.19
	S.D.	0.24	0.5	0.9	1.3	0.5	0.5	70	0.94
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 5. Summary of Blood Chemistry

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL
G1 0	Mean	65.6	26.3	407.7	85	50	163
	S.D.	7.6	3.5	78.7	18	12	5
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	64.3	26.9	418.4	76	43	150
	S.D.	8.4	6.1	57.1	17	18	22
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	69.3	26.8	419.6	90	66	139
	S.D.	13.2	2.5	84.7	10	17	17
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	70.2	29.4	342.3	76	41	130 *
	S.D.	5.6	2.2	47.2	4	13	9
	N	4	4	4	4	4	4

Group / Dose (mg/kg/day)		BUN mg/dL	CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G ratio
G1 0	Mean	15.1	0.41	5.9	2.3	0.66
	S.D.	1.4	0.04	0.2	0.1	0.02
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	15.4	0.44	5.8	2.3	0.68
	S.D.	1.5	0.03	0.3	0.1	0.03
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	14.8	0.41	5.9	2.4	0.71
	S.D.	1.9	0.04	0.1	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	13.6	0.41	5.7	2.4	0.73
	S.D.	0.8	0.03	0.1	0.1	0.06
	N	4	4	4	4	4

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05.

Table 5. Summary of Blood Chemistry (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL
G1 0	Mean	71.8	23.0	312.6	81	16	125
	S.D.	13.3	2.3	96.7	10	5	15
	N	5	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	72.3	23.3	321.5	77	16	116
	S.D.	9.7	4.0	14.9	11	3	7
	N	5	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	81.2	23.6	320.3	81	19	114
	S.D.	10.6	3.9	44.8	20	7	18
	N	5	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	69.4	24.9	305.1	100	25	102
	S.D.	6.0	5.7	51.8	23	13	13
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		BUN mg/dL	CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G ratio
G1 0	Mean	16.0	0.42	5.8	2.6	0.78
	S.D.	1.1	0.02	0.1	0.2	0.08
	N	5	5	5	5	5
G2 500	Mean	16.6	0.42	5.8	2.5	0.75
	S.D.	3.5	0.06	0.1	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	Mean	16.0	0.45	5.7	2.5	0.76
	S.D.	1.6	0.02	0.2	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	Mean	13.4	0.37	5.7	2.5	0.81
	S.D.	2.8	0.04	0.2	0.1	0.03
	N	5	5	5	5	5

Table 6. Summary of Absolute Organ Weights

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	Mean	317.3	1.91	1.15	10.08	0.77	2.31	
	S.D.	9.5	0.13	0.09	0.55	0.08	0.13	
	N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	322.0	1.89	1.07	9.95	0.71	2.34	
	S.D.	16.4	0.08	0.05	1.03	0.11	0.22	
	N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	329.9	1.95	1.17	11.40	0.76	2.43	
	S.D.	29.0	0.10	0.15	0.99	0.10	0.21	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	293.7	1.87	1.05	11.02	0.77	2.12	
	S.D.	11.2	0.07	0.07	0.74	0.10	0.15	
	N	4	4	4	4	4	4	
Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	Mean	209.1	1.82	0.79	6.17	0.54	1.49	
	S.D.	15.8	0.04	0.06	0.78	0.07	0.09	
	N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	196.0	1.80	0.78	5.76	0.52	1.50	
	S.D.	21.0	0.11	0.09	0.52	0.07	0.17	
	N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	201.0	1.79	0.83	5.97	0.55	1.53	
	S.D.	10.0	0.05	0.09	0.29	0.05	0.08	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	189.8	1.78	0.76	6.68	0.48	1.51	
	S.D.	16.7	0.07	0.07	0.67	0.10	0.14	
	N	5	5	5	5	5	5	

Table 7. Summary of Relative Organ Weights

Sex Male								(% B.W.)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	Mean	317.3	0.60	0.36	3.18	0.24	0.73	
	S.D.	9.5	0.04	0.02	0.14	0.03	0.04	
	N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	322.0	0.59	0.33 #	3.09	0.22	0.73	
	S.D.	16.4	0.01	0.00	0.28	0.03	0.06	
	N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	329.9	0.59	0.36	3.46 #	0.23	0.74	
	S.D.	29.0	0.05	0.06	0.05	0.01	0.01	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	293.7	0.64	0.36	3.75 #	0.26	0.72	
	S.D.	11.2	0.01	0.02	0.23	0.03	0.04	
	N	4	4	4	4	4	4	
Sex Female								(% B.W.)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	Mean	209.1	0.87	0.38	2.94	0.26	0.71	
	S.D.	15.8	0.05	0.03	0.15	0.04	0.03	
	N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	Mean	196.0	0.92	0.40	2.94	0.26	0.77	
	S.D.	21.0	0.11	0.01	0.13	0.02	0.04	
	N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	Mean	201.0	0.89	0.41	2.97	0.27	0.76	
	S.D.	10.0	0.04	0.03	0.16	0.04	0.04	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	Mean	189.8	0.94	0.40	3.53 **	0.25	0.80 *	
	S.D.	16.7	0.10	0.02	0.23	0.03	0.04	
	N	5	5	5	5	5	5	

Significantly different from control by Steel test: # p<0.05.

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05, ** p<0.01.

Table 8. Summary of Necropsy Findings

Sex: Male

Necropsy findings		Group / Dose (mg/kg/day)			
		G1 0	G2 500	G3 1,000	G4 2,000
Number of animals		5	5	5	5
Number of sacrificed animals (scheduled)		5	5	5	4
Stomach	Thickening, forestomach	0	4	4	4
	No remarkable findings	5	1	1	0
Number of sacrificed animals (unscheduled)					1
Stomach	Discoloration				1
	No remarkable findings				0

Sex: Female

Necropsy findings		Group / Dose (mg/kg/day)			
		G1 0	G2 500	G3 1,000	G4 2,000
Number of animals		5	5	5	5
Number of sacrificed animals		5	5	5	5
Stomach	Thickening, forestomach	0	3	5	5
	No remarkable findings	5	2	0	0

APPENDICES

Appendix 1. Individual Clinical Signs

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Days of observation													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 500	1201	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	1202	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
	1203	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	1204	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
	1205	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	
G3 1,000	1301	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	1302	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	
	1303	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
	1304	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	1305	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
G4 2,000	1401	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	
		Irregular respiration	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	
	1402	Salivation (before dosing)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
		Irregular respiration	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	
	1403	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
		Sternal recumbency	-	-	+											
		Death	-	-	+											
	1404	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Irregular respiration	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1405	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		Irregular respiration	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Days of observation															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 500	1201	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
	1202	Salivation (after dosing)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1203	Salivation (after dosing)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1204	Salivation (after dosing)	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+		
	1205	Salivation (after dosing)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 1,000	1301	Salivation (after dosing)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+		
	1302	Salivation (after dosing)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-		
	1303	Salivation (after dosing)	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+		
	1304	Salivation (after dosing)	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-		
	1305	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
G4 2,000	1401	Decrease in locomotor activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
		Salivation (after dosing)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Irregular respiration	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1402	Irregular respiration	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
		Salivation (after dosing)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-		
	1404	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		Irregular respiration	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+		
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		
	1405	Decrease in locomotor activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		Irregular respiration	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+		
		Salivation (after dosing)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-		

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Days of observation													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 500	2201	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	2202	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	2203	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
	2204	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	
	2205	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 1,000	2301	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
	2302	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
	2303	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	2304	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	2305	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
G4 2,000	2401	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		Irregular respiration	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	2402	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Irregular respiration	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2403	Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	2404	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		Irregular respiration	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	2405	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
		Irregular respiration	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 1. Individual Clinical Signs (continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Days of observation															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 500	2201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2204	Salivation (after dosing)	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
	2205		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 1,000	2301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2302	Salivation (after dosing)	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	2303	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
	2304	Salivation (after dosing)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	2305		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 2,000	2401	Irregular respiration	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
		Salivation (after dosing)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	2402	Salivation (after dosing)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2403	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2404	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Irregular respiration	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	
	2405	Salivation (after dosing)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality.

Appendix 2. Individual Body Weights

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	1101	179.3	234.7	286.4	329.5	357.1
	1102	176.2	233.9	285.8	329.7	355.1
	1103	173.7	232.5	280.7	316.3	344.3
	1104	169.1	232.1	290.4	334.8	364.3
	1105	163.4	217.4	269.3	310.0	338.6
	Mean	172.3	230.1	282.5	324.1	351.9
	S.D.	6.2	7.2	8.2	10.4	10.3
N	5	5	5	5	5	
G2 500	1201	177.8	227.0	285.9	318.8	347.6
	1202	177.9	235.8	296.7	345.4	378.9
	1203	169.8	227.8	277.0	313.6	339.9
	1204	169.8	228.0	286.9	333.7	363.5
	1205	163.5	212.3	264.2	303.4	329.8
	Mean	171.8	226.2	282.1	323.0	351.9
	S.D.	6.1	8.5	12.2	16.6	19.5
N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	1301	177.2	232.6	303.0	359.5	398.6
	1302	177.7	235.7	309.5	362.1	394.0
	1303	171.2	227.8	287.5	324.9	357.2
	1304	171.3	214.0	268.2	304.9	330.9
	1305	165.3	214.0	272.3	314.5	339.1
	Mean	172.5	224.8	288.1	333.2	364.0
	S.D.	5.1	10.3	18.2	26.2	31.1
N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	1401	180.0	227.3	280.0	311.7	336.0
	1402	176.9	220.7	266.6	306.5	324.5
	1403	171.9				
	1404	170.5	215.5	267.6	299.8	320.1
	1405	162.9	196.8	244.9	284.9	312.2
	Mean	172.4	215.1	264.8	300.7	323.2
	S.D.	6.6	13.1	14.6	11.6	9.9
N	5	4	4	4	4	

Appendix 2. Individual Body Weights (continued)

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	2101	141.9	180.7	206.7	232.7	260.6
	2102	137.8	168.6	194.8	214.8	227.9
	2103	138.7	160.2	188.4	207.2	221.1
	2104	129.6	158.7	187.3	203.5	226.6
	2105	129.0	160.0	175.4	202.5	210.0
	Mean	135.4	165.6	190.5	212.1	229.2
	S.D.	5.8	9.3	11.4	12.5	18.9
N	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	144.7	176.2	196.4	227.4	244.3
	2202	141.7	170.8	189.4	215.6	226.3
	2203	139.1	166.4	194.0	194.4	215.5
	2204	129.3	149.4	179.3	197.0	212.3
	2205	122.2	144.8	166.1	176.2	184.5
	Mean	135.4	161.5	185.0	202.1	216.6
	S.D.	9.4	13.7	12.5	19.9	21.9
N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	142.4	173.6	201.7	216.6	236.2
	2302	142.0	168.1	189.5	209.6	217.8
	2303	138.3	157.7	188.6	203.3	221.8
	2304	135.0	160.8	185.3	201.8	219.4
	2305	123.5	139.2	175.2	189.0	202.6
	Mean	136.2	159.9	188.1	204.1	219.6
	S.D.	7.7	13.1	9.5	10.3	12.0
N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	146.4	175.5	199.6	223.8	234.4
	2402	139.8	158.7	180.4	201.0	212.5
	2403	132.7	147.3	171.9	180.9	178.5
	2404	133.0	155.3	181.7	198.2	197.3
	2405	129.0	155.6	184.2	200.1	212.2
	Mean	136.2	158.5	183.6	200.8	207.0
	S.D.	6.9	10.4	10.1	15.3	20.7
N	5	5	5	5	5	

Appendix 3. Individual Food Consumption

Sex: Male		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	1101	24.8	26.3	28.9	29.7	30.3
	1102	27.7	27.4	28.6	29.4	29.6
	1103	23.5	26.9	29.2	29.3	29.3
	1104	25.6	27.7	30.5	30.5	31.7
	1105	24.7	26.4	29.0	30.2	30.8
	Mean	25.3	26.9	29.2	29.8	30.4
	S.D.	1.6	0.6	0.7	0.5	1.0
	N	5	5	5	5	5
G2 500	1201	24.7	24.2	28.7	28.5	29.2
	1202	26.5	28.0	32.1	33.4	33.2
	1203	23.9	27.4	29.0	29.7	29.5
	1204	23.1	26.6	29.3	30.9	31.2
	1205	23.4	25.7	28.5	29.3	30.1
	Mean	24.3	26.4	29.5	30.3	30.6
	S.D.	1.4	1.5	1.5	1.9	1.6
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	1301	26.8	27.0	34.0	34.3	35.2
	1302	27.3	28.9	35.7	36.4	38.0
	1303	25.4	25.6	30.0	29.3	30.7
	1304	22.7	23.2	27.5	28.8	28.6
	1305	26.6	25.6	29.9	31.0	33.1
	Mean	25.7	26.1	31.4	31.9	33.1
	S.D.	1.9	2.1	3.4	3.3	3.7
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	1401	28.6	22.8	30.4	29.1	30.4
	1402	25.9	23.7	26.1	28.8	26.8
	1403	26.3				
	1404	25.2	23.5	27.2	26.9	27.7
	1405	27.5	22.5	27.5	30.0	30.9
	Mean	26.7	23.2	27.8	28.7	29.0
	S.D.	1.4	0.6	1.8	1.3	2.0
	N	5	4	4	4	4

Appendix 3. Individual Food Consumption (continued)

Sex: Female		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	2101	23.2	24.8	24.5	24.2	27.3
	2102	21.7	20.7	21.8	22.7	21.9
	2103	19.7	19.0	21.9	21.4	21.5
	2104	18.1	18.7	20.8	19.9	21.8
	2105	19.2	19.8	20.4	20.8	19.7
	Mean	20.4	20.6	21.9	21.8	22.4
	S.D.	2.0	2.5	1.6	1.7	2.9
N	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	21.1	20.9	22.1	24.4	25.5
	2202	20.3	20.0	21.5	21.8	21.9
	2203	20.2	19.8	21.3	18.7	19.5
	2204	20.1	19.1	21.0	21.2	22.5
	2205	14.1	17.4	18.2	17.6	19.0
	Mean	19.1	19.4	20.8	20.7	21.7
	S.D.	2.9	1.3	1.5	2.7	2.6
N	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	21.5	21.3	23.3	22.2	23.0
	2302	19.2	19.5	21.6	23.1	22.2
	2303	20.2	19.5	23.0	20.7	22.4
	2304	20.2	20.1	22.4	21.7	24.4
	2305	16.5	15.9	19.5	18.9	20.7
	Mean	19.5	19.3	22.0	21.3	22.6
	S.D.	1.9	2.0	1.5	1.6	1.3
N	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	24.2	21.7	23.9	24.5	24.6
	2402	21.3	20.6	22.6	21.9	22.7
	2403	20.2	16.5	21.2	18.4	16.8
	2404	21.9	19.3	20.5	21.1	19.7
	2405	20.4	19.9	22.5	21.7	21.8
	Mean	21.6	19.6	22.1	21.5	21.1
	S.D.	1.6	1.9	1.3	2.2	3.0
N	5	5	5	5	5	

Appendix 4. Individual Hematology

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	WBC ×10 ³ /μL
G1 0	1101	8.55	16.1	45.6	53.3	18.8	35.3	1131	9.70
	1102	8.50	16.2	46.3	54.5	19.1	35.0	953	6.12
	1103	7.79	15.8	44.6	57.3	20.3	35.4	1002	10.03
	1104	8.33	16.3	46.2	55.5	19.6	35.3	1191	12.97
	1105	9.04	17.5	49.0	54.2	19.4	35.7	1116	8.38
	Mean	8.44	16.4	46.3	55.0	19.4	35.3	1079	9.44
	S.D.	0.45	0.7	1.6	1.5	0.6	0.3	98	2.50
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 500	1201	8.28	15.9	45.6	55.1	19.2	34.9	1017	9.01
	1202	8.01	15.6	44.4	55.4	19.5	35.1	1134	7.98
	1203	8.03	16.4	45.6	56.8	20.4	36.0	967	7.76
	1204	8.30	16.5	46.9	56.5	19.9	35.2	1046	11.39
	1205	8.27	15.7	44.5	53.8	19.0	35.3	997	9.53
	Mean	8.18	16.0	45.4	55.5	19.6	35.3	1032	9.13
	S.D.	0.14	0.4	1.0	1.2	0.6	0.4	64	1.46
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	1301	8.19	16.7	47.4	57.9	20.4	35.2	1184	10.45
	1302	7.56	15.8	44.1	58.3	20.9	35.8	1184	9.41
	1303	7.98	15.5	43.6	54.6	19.4	35.6	1133	10.07
	1304	8.46	16.7	46.6	55.1	19.7	35.8	962	8.14
	1305	7.99	15.9	44.6	55.8	19.9	35.7	1038	6.69
	Mean	8.04	16.1	45.3	56.3	20.1	35.6	1100	8.95
	S.D.	0.33	0.5	1.7	1.7	0.6	0.2	98	1.54
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	1401	8.27	17.1	48.3	58.4	20.7	35.4	919	10.68
	1402	7.84	16.0	44.7	57.0	20.4	35.8	1110	11.80
	1404	7.78	15.6	43.9	56.4	20.1	35.5	1058	13.18
	1405	8.48	16.0	45.2	53.3	18.9	35.4	1148	11.38
	Mean	8.09	16.2	45.5	56.3	20.0	35.5	1059	11.76
	S.D.	0.34	0.6	1.9	2.2	0.8	0.2	100	1.05
	N	4	4	4	4	4	4	4	4

Appendix 4. Individual Hematology (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	WBC ×10 ³ /μL
G1 0	2101	7.42	15.1	41.9	56.5	20.4	36.0	1266	5.24
	2102	8.17	16.3	44.6	54.6	20.0	36.5	1128	4.73
	2103	7.97	15.2	42.6	53.5	19.1	35.7	978	4.38
	2104	7.94	16.1	44.5	56.0	20.3	36.2	1054	5.53
	2105	8.15	15.9	43.9	53.9	19.5	36.2	1023	6.11
	Mean	7.93	15.7	43.5	54.9	19.9	36.1	1090	5.20
	S.D.	0.30	0.5	1.2	1.3	0.6	0.3	113	0.68
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	8.13	15.6	44.0	54.1	19.2	35.5	988	7.47
	2202	7.89	15.6	43.4	55.0	19.8	35.9	1240	6.15
	2203	8.30	16.4	45.1	54.3	19.8	36.4	1125	4.42
	2204	8.68	17.3	47.4	54.6	19.9	36.5	1060	4.48
	2205	8.53	16.5	46.0	53.9	19.3	35.9	1019	6.96
	Mean	8.31	16.3	45.2	54.4	19.6	36.0	1086	5.90
	S.D.	0.31	0.7	1.6	0.4	0.3	0.4	100	1.40
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	8.49	16.1	44.8	52.8	19.0	35.9	1373	4.74
	2302	7.80	15.8	43.7	56.0	20.3	36.2	1096	4.93
	2303	8.08	15.9	44.5	55.1	19.7	35.7	1016	9.36
	2304	7.82	15.7	44.1	56.4	20.1	35.6	1123	4.58
	2305	7.82	15.3	42.9	54.9	19.6	35.7	965	4.38
	Mean	8.00	15.8	44.0	55.0	19.7	35.8	1115	5.60
	S.D.	0.30	0.3	0.7	1.4	0.5	0.2	158	2.11
N	5	5	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	8.00	15.9	44.8	56.0	19.9	35.5	1130	5.67
	2402	8.49	16.1	44.7	52.7	19.0	36.0	1088	5.56
	2403	8.39	16.0	44.8	53.4	19.1	35.7	1035	3.51
	2404	8.45	17.0	46.5	55.0	20.1	36.6	1060	5.60
	2405	8.03	16.0	44.0	54.8	19.9	36.4	1213	5.59
	Mean	8.27	16.2	45.0	54.4	19.6	36.0	1105	5.19
	S.D.	0.24	0.5	0.9	1.3	0.5	0.5	70	0.94
N	5	5	5	5	5	5	5	5	

Appendix 5. Individual Blood Chemistry

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL
G1 0	1101	64.5	31.6	446.6	87	69	162
	1102	61.9	24.1	308.6	56	49	159
	1103	67.5	26.2	502.8	88	54	157
	1104	77.3	27.2	433.8	86	37	168
	1105	56.8	22.4	346.7	107	43	168
	Mean	65.6	26.3	407.7	85	50	163
	S.D.	7.6	3.5	78.7	18	12	5
N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	1201	79.2	29.0	500.3	45	22	136
	1202	61.7	24.9	393.4	80	33	163
	1203	58.7	23.8	380.2	87	71	136
	1204	61.2	36.3	363.9	85	45	182
	1205	60.9	20.5	454.4	82	43	133
	Mean	64.3	26.9	418.4	76	43	150
	S.D.	8.4	6.1	57.1	17	18	22
N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	1301	63.6	23.2	453.8	89	87	126
	1302	69.6	25.8	550.8	98	75	141
	1303	63.2	26.8	375.1	80	58	151
	1304	58.3	29.1	336.0	82	68	160
	1305	91.8	29.2	382.5	102	41	119
	Mean	69.3	26.8	419.6	90	66	139
	S.D.	13.2	2.5	84.7	10	17	17
N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	1401	71.3	26.8	317.1	75	31	139
	1402	68.0	29.1	331.7	72	43	123
	1404	64.2	32.2	308.7	80	58	136
	1405	77.4	29.4	411.7	78	31	121
	Mean	70.2	29.4	342.3	76	41	130
	S.D.	5.6	2.2	47.2	4	13	9
	N	4	4	4	4	4	4

Appendix 5. Individual Blood Chemistry (continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	BUN mg/dL	CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G ratio
G1 0	1101	13.8	0.44	5.7	2.3	0.68
	1102	14.1	0.40	5.7	2.3	0.68
	1103	14.5	0.36	5.9	2.3	0.64
	1104	16.9	0.45	6.1	2.4	0.65
	1105	16.4	0.42	6.1	2.4	0.65
	Mean	15.1	0.41	5.9	2.3	0.66
	S.D.	1.4	0.04	0.2	0.1	0.02
	N	5	5	5	5	5
G2 500	1201	16.5	0.43	5.5	2.3	0.72
	1202	14.4	0.47	5.9	2.3	0.64
	1203	16.7	0.46	5.8	2.3	0.66
	1204	15.9	0.42	6.2	2.5	0.68
	1205	13.3	0.41	5.7	2.3	0.68
	Mean	15.4	0.44	5.8	2.3	0.68
	S.D.	1.5	0.03	0.3	0.1	0.03
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	1301	13.6	0.39	5.9	2.5	0.74
	1302	15.6	0.42	5.9	2.3	0.64
	1303	16.4	0.44	5.8	2.5	0.76
	1304	16.2	0.46	6.0	2.5	0.71
	1305	12.1	0.35	5.8	2.4	0.71
	Mean	14.8	0.41	5.9	2.4	0.71
	S.D.	1.9	0.04	0.1	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	1401	12.7	0.43	5.6	2.5	0.81
	1402	14.5	0.43	5.5	2.3	0.72
	1404	14.0	0.37	5.7	2.3	0.68
	1405	13.3	0.39	5.8	2.4	0.71
	Mean	13.6	0.41	5.7	2.4	0.73
	S.D.	0.8	0.03	0.1	0.1	0.06
		N	4	4	4	4

Appendix 5. Individual Blood Chemistry (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL
G1 0	2101	92.2	25.9	457.0	95	20	121
	2102	75.0	23.2	332.3	72	21	112
	2103	71.6	22.8	204.9	75	11	129
	2104	59.4	23.8	322.7	88	17	149
	2105	60.7	19.4	246.0	76	9	115
	Mean	71.8	23.0	312.6	81	16	125
	S.D.	13.3	2.3	96.7	10	5	15
N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	79.4	24.3	305.9	93	15	115
	2202	85.1	18.5	336.1	79	15	110
	2203	64.9	23.6	305.8	65	17	127
	2204	70.0	29.1	325.4	80	22	119
	2205	62.3	20.9	334.4	70	13	110
	Mean	72.3	23.3	321.5	77	16	116
	S.D.	9.7	4.0	14.9	11	3	7
N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	90.6	28.9	381.5	97	29	144
	2302	92.8	25.7	349.1	87	18	103
	2303	77.0	18.6	283.6	58	13	119
	2304	78.7	22.5	312.2	101	14	101
	2305	67.0	22.1	275.1	62	23	103
	Mean	81.2	23.6	320.3	81	19	114
	S.D.	10.6	3.9	44.8	20	7	18
N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	77.5	20.0	228.0	115	28	117
	2402	72.8	18.5	296.9	94	21	91
	2403	63.3	30.7	294.4	75	16	95
	2404	69.5	24.8	350.0	83	15	92
	2405	63.8	30.3	356.1	131	46	117
	Mean	69.4	24.9	305.1	100	25	102
	S.D.	6.0	5.7	51.8	23	13	13
N	5	5	5	5	5	5	

Appendix 5. Individual Blood Chemistry (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	BUN mg/dL	CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G ratio
G1 0	2101	16.7	0.45	5.7	2.3	0.68
	2102	17.3	0.39	5.8	2.5	0.76
	2103	15.8	0.43	6.0	2.8	0.88
	2104	14.4	0.41	5.9	2.7	0.84
	2105	16.0	0.44	5.8	2.5	0.76
	Mean	16.0	0.42	5.8	2.6	0.78
	S.D.	1.1	0.02	0.1	0.2	0.08
	N	5	5	5	5	5
G2 500	2201	15.3	0.46	5.7	2.4	0.73
	2202	14.5	0.44	5.9	2.5	0.74
	2203	15.4	0.39	5.8	2.6	0.81
	2204	14.9	0.33	5.6	2.3	0.70
	2205	22.9	0.48	5.9	2.6	0.79
	Mean	16.6	0.42	5.8	2.5	0.75
	S.D.	3.5	0.06	0.1	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G3 1,000	2301	15.9	0.45	6.0	2.6	0.76
	2302	16.6	0.48	5.7	2.4	0.73
	2303	18.4	0.45	5.7	2.5	0.78
	2304	15.3	0.43	5.6	2.3	0.70
	2305	14.0	0.45	5.5	2.5	0.83
	Mean	16.0	0.45	5.7	2.5	0.76
	S.D.	1.6	0.02	0.2	0.1	0.05
	N	5	5	5	5	5
G4 2,000	2401	12.7	0.41	5.3	2.4	0.83
	2402	16.9	0.36	5.8	2.5	0.76
	2403	11.4	0.30	5.7	2.6	0.84
	2404	15.7	0.39	5.9	2.6	0.79
	2405	10.5	0.37	5.6	2.5	0.81
	Mean	13.4	0.37	5.7	2.5	0.81
	S.D.	2.8	0.04	0.2	0.1	0.03
	N	5	5	5	5	5

Appendix 6-1. Individual Absolute Organ Weights

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	1101	321.6	2.06	1.28	9.67	0.73	2.49	
	1102	320.4	1.95	1.14	10.84	0.78	2.36	
	1103	312.1	1.98	1.15	9.62	0.89	2.34	
	1104	328.6	1.80	1.12	10.48	0.80	2.20	
	1105	303.9	1.75	1.04	9.78	0.67	2.16	
	Mean	317.3	1.91	1.15	10.08	0.77	2.31	
	S.D.	9.5	0.13	0.09	0.55	0.08	0.13	
N	5	5	5	5	5	5		
G2 500	1201	321.4	1.87	1.06	8.63	0.66	2.17	
	1202	346.2	2.01	1.15	10.44	0.65	2.33	
	1203	311.6	1.90	1.06	9.69	0.65	2.31	
	1204	327.5	1.90	1.07	11.40	0.91	2.70	
	1205	303.2	1.78	1.00	9.60	0.68	2.17	
	Mean	322.0	1.89	1.07	9.95	0.71	2.34	
	S.D.	16.4	0.08	0.05	1.03	0.11	0.22	
N	5	5	5	5	5	5		
G3 1,000	1301	362.8	1.96	1.16	12.32	0.80	2.70	
	1302	358.1	2.07	1.09	12.61	0.90	2.59	
	1303	319.1	1.83	1.34	10.87	0.72	2.35	
	1304	297.6	2.02	0.97	10.40	0.64	2.17	
	1305	312.0	1.86	1.27	10.80	0.74	2.33	
	Mean	329.9	1.95	1.17	11.40	0.76	2.43	
	S.D.	29.0	0.10	0.15	0.99	0.10	0.21	
N	5	5	5	5	5	5		
G4 2,000	1401	308.3	1.97	1.09	11.93	0.78	2.22	
	1402	295.3	1.86	1.09	10.17	0.83	2.11	
	1404	289.7	1.86	1.07	10.78	0.83	2.23	
	1405	281.5	1.80	0.95	11.18	0.62	1.91	
	Mean	293.7	1.87	1.05	11.02	0.77	2.12	
	S.D.	11.2	0.07	0.07	0.74	0.10	0.15	
	N	4	4	4	4	4	4	

Appendix 6-1. Individual Absolute Organ Weights (continued)

Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	2101	236.1	1.89	0.87	7.52	0.57	1.62	
	2102	208.3	1.80	0.77	5.89	0.43	1.50	
	2103	200.1	1.79	0.75	5.57	0.55	1.36	
	2104	205.2	1.82	0.74	6.08	0.54	1.50	
	2105	195.8	1.80	0.84	5.78	0.62	1.47	
	Mean	209.1	1.82	0.79	6.17	0.54	1.49	
	S.D.	15.8	0.04	0.06	0.78	0.07	0.09	
N	5	5	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	223.9	1.83	0.88	6.45	0.60	1.62	
	2202	205.2	1.70	0.83	5.87	0.54	1.64	
	2203	193.2	1.98	0.75	5.42	0.45	1.56	
	2204	191.5	1.73	0.80	5.95	0.56	1.47	
	2205	166.3	1.75	0.65	5.09	0.45	1.22	
	Mean	196.0	1.80	0.78	5.76	0.52	1.50	
	S.D.	21.0	0.11	0.09	0.52	0.07	0.17	
N	5	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	214.3	1.77	0.98	6.04	0.50	1.51	
	2302	206.2	1.81	0.83	5.91	0.54	1.60	
	2303	196.5	1.75	0.82	6.33	0.50	1.43	
	2304	200.4	1.88	0.79	6.02	0.60	1.61	
	2305	187.8	1.75	0.74	5.54	0.60	1.50	
	Mean	201.0	1.79	0.83	5.97	0.55	1.53	
	S.D.	10.0	0.05	0.09	0.29	0.05	0.08	
N	5	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	211.5	1.79	0.81	7.29	0.60	1.73	
	2402	194.3	1.70	0.81	6.29	0.46	1.42	
	2403	165.4	1.77	0.64	5.92	0.36	1.38	
	2404	184.9	1.89	0.76	6.43	0.42	1.46	
	2405	192.7	1.76	0.79	7.48	0.54	1.57	
	Mean	189.8	1.78	0.76	6.68	0.48	1.51	
	S.D.	16.7	0.07	0.07	0.67	0.10	0.14	
N	5	5	5	5	5	5	5	

Appendix 6-2. Individual Absolute Organ Weights (unscheduled)

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G4 2,000	1403	172.8	2.00	0.66	7.60	0.56	1.57

Appendix 7-1. Individual Relative Organ Weights

Sex: Male		(% B.W.)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	1101	321.6	0.64	0.40	3.01	0.23	0.77
	1102	320.4	0.61	0.36	3.38	0.24	0.74
	1103	312.1	0.63	0.37	3.08	0.29	0.75
	1104	328.6	0.55	0.34	3.19	0.24	0.67
	1105	303.9	0.58	0.34	3.22	0.22	0.71
	Mean	317.3	0.60	0.36	3.18	0.24	0.73
	S.D.	9.5	0.04	0.02	0.14	0.03	0.04
N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	1201	321.4	0.58	0.33	2.69	0.21	0.68
	1202	346.2	0.58	0.33	3.02	0.19	0.67
	1203	311.6	0.61	0.34	3.11	0.21	0.74
	1204	327.5	0.58	0.33	3.48	0.28	0.82
	1205	303.2	0.59	0.33	3.17	0.22	0.72
	Mean	322.0	0.59	0.33	3.09	0.22	0.73
	S.D.	16.4	0.01	0.00	0.28	0.03	0.06
N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	1301	362.8	0.54	0.32	3.40	0.22	0.74
	1302	358.1	0.58	0.30	3.52	0.25	0.72
	1303	319.1	0.57	0.42	3.41	0.23	0.74
	1304	297.6	0.68	0.33	3.49	0.22	0.73
	1305	312.0	0.60	0.41	3.46	0.24	0.75
	Mean	329.9	0.59	0.36	3.46	0.23	0.74
	S.D.	29.0	0.05	0.06	0.05	0.01	0.01
N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	1401	308.3	0.64	0.35	3.87	0.25	0.72
	1402	295.3	0.63	0.37	3.44	0.28	0.71
	1404	289.7	0.64	0.37	3.72	0.29	0.77
	1405	281.5	0.64	0.34	3.97	0.22	0.68
	Mean	293.7	0.64	0.36	3.75	0.26	0.72
	S.D.	11.2	0.01	0.02	0.23	0.03	0.04
	N	4	4	4	4	4	4

Appendix 7-1. Individual Relative Organ Weights (continued)

Sex: Female		(% B.W.)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	2101	236.1	0.80	0.37	3.18	0.24	0.69
	2102	208.3	0.86	0.37	2.83	0.21	0.72
	2103	200.1	0.89	0.37	2.78	0.27	0.68
	2104	205.2	0.89	0.36	2.96	0.26	0.73
	2105	195.8	0.92	0.43	2.95	0.32	0.75
	Mean	209.1	0.87	0.38	2.94	0.26	0.71
	S.D.	15.8	0.05	0.03	0.15	0.04	0.03
N	5	5	5	5	5	5	
G2 500	2201	223.9	0.82	0.39	2.88	0.27	0.72
	2202	205.2	0.83	0.40	2.86	0.26	0.80
	2203	193.2	1.02	0.39	2.80	0.23	0.81
	2204	191.5	0.90	0.42	3.11	0.29	0.77
	2205	166.3	1.05	0.39	3.06	0.27	0.73
	Mean	196.0	0.92	0.40	2.94	0.26	0.77
	S.D.	21.0	0.11	0.01	0.13	0.02	0.04
N	5	5	5	5	5	5	
G3 1,000	2301	214.3	0.83	0.46	2.82	0.23	0.70
	2302	206.2	0.88	0.40	2.87	0.26	0.78
	2303	196.5	0.89	0.42	3.22	0.25	0.73
	2304	200.4	0.94	0.39	3.00	0.30	0.80
	2305	187.8	0.93	0.39	2.95	0.32	0.80
	Mean	201.0	0.89	0.41	2.97	0.27	0.76
	S.D.	10.0	0.04	0.03	0.16	0.04	0.04
N	5	5	5	5	5	5	
G4 2,000	2401	211.5	0.85	0.38	3.45	0.28	0.82
	2402	194.3	0.87	0.42	3.24	0.24	0.73
	2403	165.4	1.07	0.39	3.58	0.22	0.83
	2404	184.9	1.02	0.41	3.48	0.23	0.79
	2405	192.7	0.91	0.41	3.88	0.28	0.81
	Mean	189.8	0.94	0.40	3.53	0.25	0.80
	S.D.	16.7	0.10	0.02	0.23	0.03	0.04
N	5	5	5	5	5	5	

Appendix 7-2. Individual Relative Organ Weights (unscheduled)

Sex: Male							(% B.W.)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G4 2,000	1401	172.8	1.16	0.38	4.40	0.32	0.91

Appendix 8. Individual Necropsy Findings

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type	Day of necropsy
G1 0	1101	All	No remarkable findings	S	29
	1102	All	No remarkable findings	S	29
	1103	All	No remarkable findings	S	29
	1104	All	No remarkable findings	S	29
	1105	All	No remarkable findings	S	29
G2 500	1201	All	No remarkable findings	S	29
	1202	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1203	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1204	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1205	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
G3 1,000	1301	All	No remarkable findings	S	29
	1302	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1303	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1304	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1305	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
G4 2,000	1401	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1402	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1403	Stomach	Discoloration, forestomach, red	US	3
	1404	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	1405	Stomach	Thickening, forestomach	S	29

S: scheduled, US: unscheduled.

Appendix 8. Individual Necropsy Findings (continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Organ	Necropsy findings	Type	Day of necropsy
G1 0	2101	All	No remarkable findings	S	29
	2102	All	No remarkable findings	S	29
	2103	All	No remarkable findings	S	29
	2104	All	No remarkable findings	S	29
	2105	All	No remarkable findings	S	29
G2 500	2201	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2202	All	No remarkable findings	S	29
	2203	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2204	All	No remarkable findings	S	29
	2205	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
G3 1,000	2301	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2302	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2303	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2304	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2305	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
G4 2,000	2401	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2402	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2403	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2404	Stomach	Thickening, forestomach	S	29
	2405	Stomach	Thickening, forestomach	S	29

S: scheduled.

Appendix 9. Individual Body Weights during an Acclimation Period

(g)

Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment
1101	1009	136.9	173.2	2101	2005	113.7	138.9
1102	1005	133.6	166.7	2102	2020	113.3	136.2
1103	1018	129.2	166.7	2103	2004	110.1	134.5
1104	1023	120.1	161.8	2104	2002	108.6	125.9
1105	1024	125.8	161.7	2105	2023	102.6	124.8
1201	1013	138.8	171.4	2201	2014	114.1	139.1
1202	1015	134.5	170.6	2202	2006	115.0	138.0
1203	1008	125.6	165.8	2203	2003	114.0	134.7
1204	1004	127.9	162.9	2204	2024	100.3	127.5
1205	1001	123.4	160.2	2205	2007	103.6	121.0
1301	1010	135.6	171.9	2301	2019	115.0	138.7
1302	1002	134.9	170.8	2302	2017	113.0	136.3
1303	1017	129.6	165.1	2303	2018	106.2	135.3
1304	1007	134.3	164.5	2304	2008	108.8	128.2
1305	1011	123.6	158.0	2305	2010	106.4	121.4
1401	1021	132.5	171.4	2401	2011	115.4	139.4
1402	1022	127.5	170.9	2402	2022	109.0	136.2
1403	1020	128.8	165.0	2403	2016	107.7	130.6
1404	1014	123.0	164.9	2404	2012	108.4	129.5
1405	1019	123.2	157.9	2405	2001	102.6	124.5
	1003	125.7	153.6		2009	98.3	116.8
	1006	130.4	175.8		2013	114.0	140.9
	1012	124.1	152.8		2015	99.7	119.0
	1016	125.4	152.0		2021	100.2	120.2
	Mean	128.9	164.8		Mean	108.3	130.7
	S.D.	5.2	6.6		S.D.	5.6	7.6
	N	24	24		N	24	24

Appendix 10. Protocol Deviations

Procedure	Protocol Deviations
해당사항 없음.	

조제물분석보고서

시험제목 자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험
시험번호 DTN210198

“자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험”에서 시험물질 조제물에 대한 농도를 확인하기 위해 분석을 실시하였다.

분석책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

1. 시험재료

1.1. 표준물질

명칭	Cinnamaldehyde
제조번호 (Lot/Batch No.)	MKCJ4653
성상	Light Yellow Liquid
순도	98.6%
제조일	2019년 3월 14일
유효기간	2024년 2월
보관조건	실온(1-30°C)
취급시 주의사항	특이사항 없음
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.2. 시약 및 용매

Name of reagent and solvent	Lot/Batch No.	Specifications
Acetonitrile	V7VA1H	HPLC grade, Burdick & Jackson, U.S.A.
Water	V81G1H	HPLC grade, Burdick & Jackson, U.S.A.
Phosphoric acid	MKCN6330	Reagent grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.

1.3. 기기 및 기구

Name of instrument and apparatus	Specifications
HPLC	Alliance High Performance LC, Waters, U.S.A.
Micropipette	Research plus, Eppendorf, Germany
Balance	Sartorius, Germany
Ultrasonicator	CPX5800H-E, Branson, U.S.A.
Vacuum pump	MS-33 Oil-less Piston vacuum pump, Dongseo science, Republic of Korea
Hot plate/stirrer	SMHS-3, DAIHAN, Republic of Korea
Vortex mixer	VM-30, DAIHAN, Republic of Korea SI-0246A Vortex Genie 2, Scientific industries, U.S.A.
Refrigerator/Freezer	MPR-414F, Panasonic, Japan

1.4. 데이터 처리 소프트웨어

Name of software	Specifications
------------------	----------------

Empower3

Waters, U.S.A.

Microsoft Office Excel

Microsoft Co., U.S.A.

2. 시험방법

1.5. 이동상의 조제

1.1.1. 이동상 A: 0.01 % phosphoric acid in water

2 L mass cylinder를 이용하여 2 L의 water를 bottle에 옮기고 0.2 mL의 phosphoric acid를 첨가한 후 교반하고, 10 분간 초음파 및 감압 처리하여 탈기하였다.

1.1.2. 이동상 B: Acetonitrile

1 L mass cylinder를 이용하여 1 L의 acetonitrile를 bottle에 옮기고, 10 분간 초음파 및 감압 처리하여 탈기하였다.

1.6. 희석용액의 조제

Water 250 mL과 acetonitrile 250 mL을 혼합하여 희석용액[Water:Acetonitrile=250:250 (v/v)]으로 사용하였다.

1.7. 표준원액의 조제

표준물질은 순도(98.6%)를 고려하여 0.0101 g을 전자저울을 이용하여 칭량 후, 용기에 넣고 10 mL의 희석용액을 첨가하였다(이론농도 1,000 µg/mL).

1.8. 표준용액의 조제

표준원액을 희석용액으로 희석하여 사용하였으며, 각각의 희석단계에서 vortex mixer를 사용하여 혼합하였다.

Final conc. of working solution (µg/mL)	Source solution		Volume of dilution solution (µL)
	Concentration (µg/mL)	Volume (µL)	
100	1,000	100	900
20	100	200	800
10	20	500	500
5	10	500	500
2	10	200	800
1	2	500	500

1.9. 검량선 시료(Standard, STD)의 조제

표준용액 1, 2, 5, 10 및 20 µg/mL를 검량선 시료로 사용하였다.

1.10. 품질관리(Quality control, QC) 시료의 조제

표준용액 5 µg/mL를 품질관리 시료로 사용하였다.

1.11. 시료의 전처리

각 농도별 조제물은 일정량 채취한 후 희석용액을 이용하여 검량선 범위로 적절하게 희석하여 시료로 사용하였다. 검량선 범위로 희석된 희석액을 취하여 0.45 µm PTFE filter로 여과하여 vial에 옮기고 HPLC에 주입하여 분석하였다.

1.12. 분석조건

Column	Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, 100 x 2.1 mm (Serial No. H20-260925)		
Column temperature	40°C		
Mobile phase	A: 0.01% Phosphoric acid in water B: Acetonitrile		
	Gradient elution		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	85	15
	3.45	60	40
	5.20	40	60
	5.21	85	15
	10.00	85	15
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection volume	5 µL		
Autosampler temperature	25°C		
Wave length	280 nm (UV/Vis detector)		

1.13. 데이터의 처리

1.1.3. Empower3

검량선 작성, 검출농도 산출 및 크로마토그램 확인을 위해 사용하였다.

1.1.4. Microsoft Office Excel

정확성 및 정밀성을 산출하기 위해 사용하였다.

1.1.5. 농도 산출

검량선은 x축에 농도를, y축에 피크면적을 이용하여 최소자승법으로 작성하였다. 검출농도는 피크면적을 검량선 계산식($y = ax \pm b$)에 대입하여 산출하였다.

1.1.6. 농도 이외의 파라미터 산출

정확성(%) = (정량값의 평균 ÷ 이론농도) x 100

정밀성(%) = (정량값의 표준편차 ÷ 정량값의 평균) x 100

1.14. 수치의 취급

보고서에 기재하는 수치는 다음의 표에 명시된 숫자의 자리로 반올림하였다.

구분*	단위	파라미터의 표시
피크면적(y)	-	자연수
Retention time	min	3 소수점 자리
S/N ratio	-	2 소수점 자리
검량선의 기울기(a)	-	4 소수점 자리
검량선의 y 절편(b)	-	4 소수점 자리
검량선의 상관계수(r)	-	4 소수점 자리
검출농도(x)	µg/mL	3 소수점 자리
조제물의 산출농도	mg/mL	3 소수점 자리
정확성	%	1 소수점 자리
정밀성	%	2 소수점 자리

*분석 결과 출력물은 데이터 처리 소프트웨어에서 설정되어 있는 값으로 표기하였다.

1.15. 재분석

재분석은 수행하지 않았다.

3. 조제물 분석 항목

1.16. 시스템 적합성(System suitability)

QC 시료를 6회 반복 주입하여 정밀성을 산출하였다. 판정기준은 피크면적과 retention time의 정밀성이 5% 이내인 것으로 하였다.

1.17. 직선성(Linearity)

검량선 시료를 각 농도별로 1회 측정하여 분석물질의 농도와 피크면적의 상관계수를 산출하였다. 판정기준은 상관계수 $r=0.9950$ 이상, 각 농도에서의 정확성은 85-115%로 하였다.

1.18. 조제물 농도 분석(Concentration of dosing formulations)

각 농도별 조제물의 중층에서 3회 채취하여 샘플당 1회 측정하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115% 인 것으로 하였다.

1.19. QC 샘플(Quality control)

QC 시료를 분석 종료 시에 3회 측정하였다. 판정기준은 분석결과의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115%로 하였다.

4. 결과

1.20. 시스템 적합성(System suitability)

분석물질의 피크면적에 대한 정밀성은 0.34%, 분석물질의 retention time에 대한 정밀성은 0.13%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

Analyzed date	Classification	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Mean	SD	Precision (%)
2021.12.10	Peak area	574,588	574,527	577,386	578,284	578,860	578,406	577,009	1,958	0.34
	Retention Time (min)	5.236	5.219	5.237	5.228	5.231	5.226	5.230	0.007	0.13

SD: standard deviation

Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) × 100

1.21. 직선성(Linearity)

검량선 시료를 각 농도별로 1회 측정하여 분석물질의 농도와 피크면적의 상관계수를 산출한 결과, 상관계수 r은 1.0000, 각 농도에서의 정확성은 95.2–101.8%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

Analyzed date	Nominal concentration (µg/mL)	Peak area	Measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)
2021.12.10	1	114,903	0.952	95.2
	2	232,960	2.003	100.2
	5	579,614	5.089	101.8
	10	1,126,048	9.953	99.5
	20	2,255,140	20.004	100.0

y = 112,339.5936x+7,952.1093, r = 1.0000, Weight: None

Accuracy(%) = (measured concentration / nominal concentration) × 100

1.22. 조제물 농도 분석(Concentration of dosing formulations)

조제물에 대한 정량값의 정밀성은 0.08–0.43%, 정확성은 98.5–100.6%로 나타났다. G1 (대조군, 0 mg/mL) 조제물에서는 분석물질이 검출되지 않았다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

Analyzed date	Group	Nominal concentration (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
			No. 1	No. 2	No. 3				
2021.12.10	G2	0.137	0.135	0.136	0.135	0.135	0.001	0.43	98.5
	G3	0.273	0.271	0.270	0.270	0.270	0.001	0.21	98.9
	G4	0.547	0.540	0.541	0.542	0.541	0.001	0.18	98.9
	G5	1.094	1.095	1.095	1.099	1.096	0.002	0.21	100.2
	G6	2.188	2.208	2.196	2.200	2.201	0.006	0.28	100.6
	G7	4.375	4.384	4.371	4.408	4.388	0.019	0.43	100.3
	G8	8.75	8.810	8.766	8.810	8.795	0.025	0.29	100.5
	G9	17.5	17.580	17.572	17.598	17.583	0.013	0.08	100.5

SD: standard deviation

Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) × 100

Accuracy (%) = (mean of measured concentration / nominal concentration) × 100

1.23. QC 샘플(Quality control)

QC 시료(5 µg/mL)에 대한 정량값의 정밀성은 0.36%, 정확성은 102.1%로 나타났다. 그 결과 판정기준을 만족하였다.

Analyzed date	Nominal concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)			Mean (µg/mL)	SD (µg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
		No. 1	No. 2	No. 3				
2021.12.10	5	5.084	5.114	5.118	5.105	0.019	0.36	102.1

SD: standard deviation

Precision (%) = (standard deviation (SD) / mean) × 100

Accuracy (%) = (mean of measured concentration / nominal concentration) × 100

최종보고서

자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

시험 번호 : DTN210198

시험의뢰자: ㈜다정

㈜디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)
우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP적합진술서

시험제목 자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험
시험번호 DTN210198

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
 식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

신뢰성보증확인서

시험제목 자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호 DTN210198

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation, 시험계획서 및 (주)디티앤씨알오 표준작업지침서에 따라서 신뢰성보증부서에서 점검을 실시하였다.

- “비임상시험관리기준”
식품의약품안전처 고시 제 2018-93호(2018년 11월 21일)

모든 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다.

「시험위주의 점검」

점검단계	점검일	시험책임자 보고일	운영책임자 보고일
시험계획서	2021년 5월 20일	2021년 5월 24일	2021년 5월 20일
시험계획서의 변경(1)	2021년 12월 9일	2021년 12월 9일	2021년 12월 9일
시험계획서의 변경(2)	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일
시험물질의 조제	2021년 12월 10일	2021년 12월 10일	2021년 12월 10일
조제물의 분석	2021년 12월 10일	2021년 12월 10일	2021년 12월 10일
시험물질의 처리	2021년 12월 14일	2021년 12월 14일	2021년 12월 14일
콜로니계수	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일
시험기초자료의 기록	2022년 1월 13일	2022년 1월 13일	2022년 1월 13일
최종보고서(안)	2022년 1월 13일	2022년 1월 13일	2022년 1월 13일
최종보고서	2022년 1월 18일	2022년 1월 18일	2022년 1월 18일

「수행절차의 점검」

점검단계	점검일	시험책임자 보고일	운영책임자 보고일
전배양	2021년 10월 18일	2021년 10월 18일	2021년 10월 18일

이 최종보고서는 (주)디티앤씨알오 비임상센터 신뢰성보증부서에서 시험의 모든 과정과 결과를 점검하였으며 시험기초자료를 정확히 반영하였음을 보증한다.

신뢰성보증업무담당자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

목차

날짜

페이지

신뢰성보증확인서

요약

1. 시험실시의 개요

- 1.1. 시험제목
- 1.2. 시험목적
- 1.3. 시험의뢰자
- 1.4. 시험의뢰자 모니터
- 1.5. 시험기관
- 1.6. 시험책임자
- 1.7. 담당자
- 1.8. 시험일정
- 1.9. Good Laboratory Practice Regulations
- 1.10. 시험기준
- 1.11. 자료의 보관

2. 시험재료 및 방법

- 2.1. 시험물질
- 2.2. 음성대조물질
- 2.3. 양성대조물질
- 2.4. 조제 및 분석
- 2.5. 시험계
- 2.6. 배지
- 2.7. S9 mix의 조제
- 2.8. 용량설정시험
- 2.9. 본시험
- 2.10. 관찰 및 계측
- 2.11. 시험의 성립조건
- 2.12. 결과의 판정
- 2.13. 자료의 통계처리

3. 결과 및 고찰

- 3.1. 용량설정시험
- 3.2. 본시험

4. 결론

TABLES

Table 1. The Number of Revertant Colonies per Plate of the Dose Range Finding Study

Table 2. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation of the Main Study

Table 3. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation of the Main Study
Table 4. Historical Control Data

APPENDICES

Appendix 1. Protocol Deviations

ATTACHMENTS

Attachment 1. Protocol
Attachment 2. Protocol Amendments
Attachment 3. Dosing Formulations Analysis Report
Attachment 4. Certificate of Analysis of S9
Attachment 5. Certificate of Analysis of Test Substance

요약

시험물질 자근복합추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균(WP2uvrA 균주)을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대하여 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하에서 각각 5,000 및 1,250 µg/plate 이상, WP2uvrA 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하 모두 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 시험물질의 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량(µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
WP2uvrA	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156

본시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하에서는 모든 균주의 2,500 µg/plate 이상, 존재하에서는 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 1,250 µg/plate, WP2uvrA 균주의 2,500 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 시험물질의 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

시험물질균에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조균과 비교하여 2배를 초과하지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조균의 복귀변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물은 유전자돌연변이 유발성이 없는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

자근복합추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험

1.2. 시험목적

시험물질 자근복합추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하여 평가하였다.

1.3. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.4. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.5. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.6. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.7. 담당자

시험물질관리책임자	김현지
조제물 분석책임자	김양현
신뢰성보증업무담당자	장현수
주요 시험담당자	이승재
참여 시험담당자	고민석, 이기석, 유민주

1.8. 시험일정

시험개시일

2021년 5월 18일

실험개시일	2021년 5월 24일
용량설정시험	
균주 접종일	2021년 5월 24일
시험물질 처리일	2021년 5월 25일
복귀변이콜로니수 계측일	2021년 5월 27일
본시험	
균주 접종일	2021년 12월 13일, 12월 14일
시험물질 처리일	2021년 12월 14일, 12월 15일
복귀변이콜로니수 계측일	2021년 12월 16일, 12월 17일
실험종료일	2021년 12월 17일
시험종료일	2022년 1월 18일

1.9. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”
 식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

1.10. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”
 식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

1.11. 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료 및 최종보고서 등은 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준” 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

2. 시험재료 및 방법

1.12. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1-30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

1.13. 음성대조물질

명칭	주사용수
제조번호(Batch/Lot No.)	B1V2AG5, G3VBAG5
보관조건	실온(1-30°C)
제조사	대한약품공업(주)
선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

1.1. 양성대조물질

물질명	Batch No.	CAS No.	보관조건	제조사
2-Nitrofluorene (2-NF)	STBF2425V	607-57-8	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
Sodium azide (SA)	STBJ3927	26628-22-8	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	BCCD2865	90-45-9	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
4-Nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	WXBD1945V	56-57-5	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	SLBZ4612	50-32-8	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	STBJ3963	613-13-8	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.

1.14. 조제 및 분석

1.1.1. 부형제

1.1.1.1. 명칭	주사용수
1.1.1.1.1. 제조번호(Batch/Lot No.)	B1V2AG5, G3VBAG5
1.1.1.1.1. 선택이유	용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/plate (50 mg/mL)를 조제하기 위하여 시험의뢰자가 제공한 정보에 따라 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 균일하게 현탁되었다. 따라서 주사용수를

부형제로 선택하였다.

1.1.2. 시험물질 조제물의 조제방법

시험물질 조제물의 조제는 시험물질 처리일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후(Practum313, Practum224, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 교반기를 이용하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

1.1.3. 조제물의 분석

1.1.1.1. 균질성 및 안정성

조제물의 균질성 및 안정성은 “HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험(DT&CRO Study No.: DTN210194)”의 결과, 본시험의 처리 농도를 포함하는 0.01 및 250 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

1.1.1.2. 농도분석

조제물의 농도분석은 HPLC (Alliance High Performance LC, Waters, U.S.A.)로 수행하고, 처리 전에 각 용량의 조제물의 중층에서 3회 채취하여 각 1회 측정하였다.

그 결과, 본시험용 조제물의 정밀성과 정확성은 각각 0.08–0.43%, 98.5–100.6%로, 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85–115%의 판정기준을 만족하였다(Attachment 3).

1.1.4. 양성대조물질의 조제

각 균주에 대한 양성대조물질인 2-NF, 9-AA, 4-NQO, B[a]P 및 2-AA는 DMSO (Lot No.: K52488352, Merck, Germany)에, SA는 주사용수(Lot No.: DKN20014, DKN20015, JW중외제약(주))에 조제하였고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고(-80–60°C, DuoFreez U700, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Republic of Korea)에 동결보관하였고, 사용 직전 해동하였다.

1.1.1.1. 각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량

S9 mix	균주명	명칭	용량(µg/plate)
-	TA98	2-NF	2.0
	TA100	SA	0.5
	TA1535	SA	0.5
	TA1537	9-AA	50.0
	WP2uvrA	4-NQO	1.0
+	TA98	B[a]P	3.0
	TA100	B[a]P	2.0
	TA1535	2-AA	2.0
	TA1537	B[a]P	3.0
	WP2uvrA	2-AA	10.0

1.15. 시험계

1.1.5. 종 및 균주명

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535

Salmonella typhimurium TA1537

Escherichia coli WP2uvrA

1.1.6. 선택이유

본 시험에 사용되는 균주는 DNA손상수복기능이 결손되어 있는 화학물질의 변이원성과 독성에 대한 감수성을 높인 균주로, 가이드라인에서 추천하는 균주를 선택하였다.

1.1.7. 각 균주의 유전자형

균주명	아미노산요구성	막변이특성	약제내인성인자	자외선감수성
TA98	hisD3052	rfa	+pKM101	uvrB
TA100	hisG46	rfa	+pKM101	uvrB
TA1535	hisG46	rfa	wild	uvrB
TA1537	hisC3076	rfa	wild	uvrB
WP2uvrA	trpE	wild	wild	uvrA

1.1.8. 입수 및 보관

균주는 2019년 1월 31일에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOX™, Inc., U.S.A.)에서 입수하였다. 입수한 각 균주의 유전자형(genotype), 자발복귀변이콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다.

사용 균주 보관시에는 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합한 뒤 동결보관용 튜브에 분주하여 초저온냉동고(-80—60°C)에 보관하였다.

1.1.9. 전배양

동결보관된 각 균주를 실온에서 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양(37°C, 130 rpm, VS-8480SRN, VISION SCIENTIFIC CO., LTD, Republic of Korea) 하였다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer (측정파장 660 nm, SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, LLC., U.S.A.)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10^9 cells/mL 이상인 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.

1.16. 배지

1.1.10. Nutrient broth 배지

Nutrient broth No.2 (OXOID, UK)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 첨가하여 교반기로 교반하여 용해시켰다. 그 후, 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제 후, 고압증기

멸균하였다.

1.1.11. Minimal glucose agar (MGA) 플레이트

Bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 조제하여 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, Vogel-Bonner (VB) salts 10배 농축액과 20% glucose (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 첨가하고 플레이트에 분주하여 실온에서 굳혔다.

1.1.1.2. MGA 플레이트의 조성

성분	각 성분의 함유량
Bacto agar	15 g
VB salts 10배 농축액	100 mL
20% glucose	100 mL
초순수	800 mL
총 액량	1 L

1.1.1.3. VB salts 10배 농축액의 조성

성분	사용량	제조사
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
구연산	1.829 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
K ₂ HPO ₄	10 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O	3.58 g	KANTO CHEMICAL CO., INC., Japan
초순수	100 mL	-

1.1.12. Top agar

필요량의 초순수에 NaCl 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 넣어 용해시킨 후, 고압증기 멸균하였다. 멸균 후, histidine 요구성 균주는 top agar에 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.)을, tryptophan 요구성 균주는 top agar에 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제한 뒤, 사용시까지 드라이 오븐(50–60°C)에 보관하였다.

1.17. S9 mix의 조제

1.1.13. 입수, 보관 및 조제방법

구입한 S9 (Lot No.: 4385, 4444, MOLTOX™, Inc., U.S.A.)과 cofactor-I (Lot No.: 999002, 999101, ORIENTAL YEAST CO., LTD., Japan)은 유효기간 내에 사용하였다. S9은 냉동(-25–10°C)에 보관하고, cofactor-I은 냉장(2–8°C) 보관하였다.

조제시, S9은 주사용수(Lot No.: DKN20014, DKN21010, JW중외제약(주))를 가하여 현탁시키고, cofactor-I은 주사용수에 용해한 뒤 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 사용하였다. S9과 cofactor-I은 1:9의 비율로 혼합하여 사용하였다.

1.1.14. S9의 특성

사용동물	Sprague-Dawley rat
성별, 주령	수컷, 5-6주령
장기	간장
유도물질	Aroclor 1254
투여용량	500 mg/kg
투여경로	복강내투여

1.1.15. S9 mix의 조성

성분	각 성분의 함유량	
S9	0.1 mL	
Cofactor-I	MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 µmol
	KCl	33 µmol
	Glucose-6-phosphate	5 µmol
	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)	4 µmol
	Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)	4 µmol
	Sodium phosphate buffer, pH 7.4	100 µmol
	주사용수	0.9 mL
총 액량	1 mL	

1.18. 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 실시하였다.

1.1.16. 용량

가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1, 19.5 및 4.88 µg/plate로 총 6용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

1.1.17. 시험방법

용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 각 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

1.1.18. 본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하에서 각각 5,000 및 1,250 µg/plate 이상, WP2uvrA 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하 모두 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 시험물질의 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 생육저해가 확인된 가장 낮은 용량을 본시험의 최고용량으로 하여, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주는 대사활성화비존재하 및 존재하에 각각 5,000 및 1,250 µg/plate를, WP2uvrA 균주는 대사활성화비존재하 및 존재하 모두 5,000 µg/plate를 본시험의 최고용량으로 설정하였고,

생육저해가 관찰되지 않는 용량을 4용량 이상 확보하기 위해 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 6용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량($\mu\text{g}/\text{plate}$)
TA98, TA100, TA1535, TA1537	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
WP2uvrA	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156

1.19. 본시험

1.1.1. 시험방법

본시험은 평판법(plate incorporation method)으로 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하여 2회 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다.

각 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조군, 양성대조군 및 S9 mix 존재유무를 식별할 수 있는 번호를 기입하였다.

1.1.2. 처리방법

대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 튜브에 각각 100 μL 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액(phosphate buffer, PB, pH 7.4) 500 μL 를 첨가한 후, 시험물질의 침전을 육안으로 관찰하였다. 그 후, 각 균주 현탁액 100 μL 를 넣고, 각 균주에 따라 histidine 또는 tryptophan 요구성에 적합한 아미노산을 포함한 top agar를 각각 2 mL 첨가하여 혼합한 뒤, 그 현탁액을 MGA 플레이트에 붓고 실온에서 굳혔다.

대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L PB (pH 7.4) 500 μL 대신에 S9 mix 500 μL 를 첨가하였다. 그 외의 과정은 동일하게 실시하였다.

1.1.3. 배양법 및 배양시간

Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기(DK-LI020, Daiki Science Co., LTD., Republic of Korea)에서 48시간 이상 배양하였다.

1.1.4. 무균검사

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해, 시험물질 최고용량 100 μL , 0.1 mol/L PB (pH 7.4) 500 μL 및 S9 mix 500 μL 를 튜브에 각각 넣고, top agar를 가하여 혼합한 후, nutrient broth agar 플레이트에 붓고 실온에서 굳혔다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 약 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

1.1.5. 확인시험

아래의 경우에 해당하지 않았기 때문에 확인시험을 실시하지 않았다.

- 유전자돌연변이 유발성에 있어, 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우
- 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4용량 이상이 확보되지 않은 경우

1.20. 관찰 및 계측

1.1.19. 플레이트의 관찰

1.1.1.4. 시험물질의 침전 관찰

배양종료 후, 복귀변이콜로니수 계측시에 시험물질의 침전에 대해 육안으로 관찰하였다.

1.1.1.5. Background lawn의 관찰

배양종료 후, 복귀변이콜로니수 계측시, 생육저해 유무를 확인하기 위하여 background lawn의 형성유무를 실체현미경(45배 배율, SZ61, Olympus, Japan)으로 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 음성대조군과 비교하여 복귀변이콜로니수가 현저히 감소하거나, background lawn이 없어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

1.1.20. 복귀변이콜로니수의 계측

배양종료 후, 자동 콜로니카운터(ProtoCOL3, SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하거나 육안계수하여 복귀변이콜로니수를 계측하였다. 시험물질에 의한 생육저해 등으로 인하여 자동계측이 정확하지 않다고 판단되는 경우에는 육안계수하여 확인하였다.

1.21. 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하였기 때문에 시험이 성립하였다.

- 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀변이콜로니수가 historical control data의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것
- 오염이 없을 것

1.22. 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

- 1개 이상의 균주에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군에 비하여 2배 이상 증가하고 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것

1.23. 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치는 실측치를 표기하고 평균치 및 표준편차를 구하였으며, 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

3. 결과 및 고찰

1.1. 용량설정시험

(Table 1)

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 2.8.에 따라 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하에서 각각 5,000 및 1,250 µg/plate 이상, WP2uvrA 균주의 대사활성화비존재하 및 존재하 모두 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 시험물질의 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량(µg/plate)
TA98, TA100, TA1535, TA1537	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
WP2uvrA	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156

1.2. 본시험

(Table 2, 3)

1.1.21. 복귀변이콜로니수의 계측

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배를 초과하지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

1.1.22. 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하에서는 모든 균주의 2,500 µg/plate 이상, 존재하에서는 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 1,250 µg/plate, WP2uvrA 균주의 2,500 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 시험물질의 침전은 각 균주의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

1.1.23. 시험의 성립

음성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data (Table 4) 범위 내에 속하였고, 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다. 또한, 잡균에 의한 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단된다.

TABLES

Table 1. The Number of Revertant Colonies per Plate of the Dose Range Finding Study

Strain	Absence of metabolic activation				Presence of metabolic activation			
	Dose (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	Ratio	Dose (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	Ratio
TA98	0	20 , 20	20		0	23 , 24	24	
	4.88	18 , 17	18	0.9	4.88	24 , 20	22	0.9
	19.5	14 , 19	17	0.8	19.5	27 , 25	26	1.1
	78.1	21 , 27	24	1.2	78.1	21 , 23	22	0.9
	313	21 , 22	22	1.1	313	20 , 25	23	1.0
	1,250	13 , 18	16	0.8	1,250	27 * , 27 *	27	1.1
	5,000	0 * , 0 *	0	0.0	5,000	14 * , 18 *	16	0.7
	2-NF (2.0)	298 , 302	300	15.0	B[a]P (3.0)	364 , 328	346	14.7
TA100	0	121 , 130	126		0	137 , 134	136	
	4.88	121 , 122	122	1.0	4.88	157 , 145	151	1.1
	19.5	113 , 120	117	0.9	19.5	148 , 163	156	1.1
	78.1	121 , 126	124	1.0	78.1	167 , 162	165	1.2
	313	129 , 133	131	1.0	313	159 , 165	162	1.2
	1,250	137 , 127	132	1.1	1,250	107 * , 133 *	120	0.9
	5,000	0 * , 0 *	0	0.0	5,000	0 * , 0 *	0	0.0
	SA (0.5)	392 , 394	393	3.1	B[a]P (2.0)	679 , 678	679	5.0
TA1535	0	9 , 15	12		0	12 , 13	13	
	4.88	11 , 13	12	1.0	4.88	12 , 8	10	0.8
	19.5	12 , 17	15	1.2	19.5	14 , 10	12	1.0
	78.1	15 , 19	17	1.4	78.1	13 , 11	12	1.0
	313	18 , 23	21	1.7	313	16 , 14	15	1.2
	1,250	13 , 14	14	1.1	1,250	6 * , 15 *	11	0.8
	5,000	0 * , 0 *	0	0.0	5,000	0 * , 0 *	0	0.0
	SA (0.5)	313 , 304	309	25.7	2-AA (2.0)	129 , 147	138	11.0
TA1537	0	5 , 9	7		0	11 , 15	13	
	4.88	5 , 7	6	0.9	4.88	14 , 17	16	1.2
	19.5	6 , 6	6	0.9	19.5	15 , 11	13	1.0
	78.1	5 , 6	6	0.8	78.1	12 , 14	13	1.0
	313	6 , 5	6	0.8	313	12 , 13	13	1.0
	1,250	7 , 7	7	1.0	1,250	6 * , 10 *	8	0.6
	5,000	0 * , 0 *	0	0.0	5,000	2 * , 1 *	2	0.1
	9-AA (50.0)	255 , 281	268	38.3	B[a]P (3.0)	302 , 270	286	22.0
WP2uvrA	0	43 , 52	48		0	64 , 51	58	
	4.88	45 , 44	45	0.9	4.88	46 , 54	50	0.9
	19.5	54 , 62	58	1.2	19.5	54 , 50	52	0.9
	78.1	47 , 47	47	1.0	78.1	39 , 35	37	0.6
	313	53 , 45	49	1.0	313	47 , 44	46	0.8
	1,250	31 , 39	35	0.7	1,250	46 , 41	44	0.8
	5,000	0 * , 0 *	0	0.0	5,000	12 * , 8 *	10	0.2
	4-NQO (1.0)	748 , 766	757	15.9	2-AA (10.0)	233 , 230	232	4.0

*: Indicated growth inhibition.

2-NF: 2-nitrofluorene, SA: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, 4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide,

B[a]P: benzo[a]pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

Ratio: mean number of revertant colonies of treated plate per mean number of revertant colonies of negative control plate.

Table 2. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Absence of Metabolic Activation of the Main Study

Strain	Dose (µg/plate)	1 st Main Study				2 nd Main Study							
		Individual revertant colony counts			Mean	S.D.	Ratio	Individual revertant colony counts			Mean	S.D.	Ratio
TA98	0	25	23	24	24	1		24	23	26	24	1	
	156	22	19	23	21	2	0.9	27	22	23	24	2	1.0
	313	19	19	23	20	2	0.8	26	22	26	25	2	1.0
	625	21	22	20	21	1	0.9	29	24	26	26	2	1.1
	1,250	21	20	17	19	2	0.8	22	25	21	23	2	0.9
	2,500	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
2-NF (2.0)	299	262	275	279	15	11.6	313	306	318	312	5	12.8	
TA100	0	142	142	139	141	1		135	130	130	132	2	
	156	137	121	127	128	7	0.9	118	115	111	115	3	0.9
	313	112	125	116	118	5	0.8	120	125	122	122	2	0.9
	625	125	116	126	122	4	0.9	111	120	123	118	5	0.9
	1,250	121	127	121	123	3	0.9	125	128	122	125	2	0.9
	2,500	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
SA (0.5)	401	386	409	399	10	2.8	396	390	381	389	6	3.0	
TA1535	0	17	17	14	16	1		13	11	12	12	1	
	156	13	16	18	16	2	1.0	15	14	9	13	3	1.1
	313	13	11	11	12	1	0.7	18	13	12	14	3	1.2
	625	19	16	16	17	1	1.1	14	9	12	12	2	1.0
	1,250	15	19	16	17	2	1.0	11	12	10	11	1	0.9
	2,500	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
SA (0.5)	375	357	349	360	11	22.5	276	289	283	283	5	23.6	
TA1537	0	7	7	11	8	2		9	6	11	9	2	
	156	8	9	7	8	1	1.0	8	6	11	8	2	1.0
	313	8	9	9	9	0	1.0	7	8	9	8	1	0.9
	625	9	8	7	8	1	1.0	10	7	9	9	1	1.0
	1,250	8	8	10	9	1	1.0	8	7	10	8	1	1.0
	2,500	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
9-AA (50.0)	441	427	436	435	6	52.2	1,020	1,213	996	1,076	97	124.2	
WP2uvrA	0	35	41	43	40	3		34	37	39	37	2	
	156.25	37	46	40	41	4	1.0	39	35	35	36	2	1.0
	313	34	35	37	35	1	0.9	35	38	38	37	1	1.0
	625	43	36	35	38	4	1.0	35	37	42	38	3	1.0
	1,250	39	33	36	36	2	0.9	39	33	35	36	2	1.0
	2,500	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
4-NQO (1.0)	1,690	1,531	1,525	1,582	76	39.9	1,703	1,671	1,555	1,643	64	44.8	

*: indicated growth inhibition.

2-NF: 2-nitrofluorene, SA: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, 4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide.

Ratio: mean number of revertant colonies of treated plate per mean number of revertant colonies of negative control plate.

Table 3. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation of the Main Study

Strain	Dose (µg/plate)	1 st Main Study				2 nd Main Study							
		Individual revertant colony counts			Mean	S.D.	Ratio	Individual revertant colony counts			Mean	S.D.	Ratio
TA98	0	27	29	27	28	1		33	30	31	31	1	
	39.1	31	28	28	29	1	1.0	35	34	33	34	1	1.1
	78.1	27	25	28	27	1	1.0	35	39	34	36	2	1.1
	156	27	31	29	29	2	1.0	30	36	33	33	2	1.1
	313	29	28	30	29	1	1.0	31	32	36	33	2	1.1
	625	22	27	26	25	2	0.9	32	33	30	32	1	1.0
	1,250	23 *	25 *	20 *	23	2	0.8	33 *	36 *	29 *	33	3	1.0
B[a]P (3.0)	372	423	391	395	21	14.3	385	395	480	420	43	13.4	
TA100	0	149	145	148	147	2		146	149	149	148	1	
	39.1	153	146	142	147	5	1.0	160	152	157	156	3	1.1
	78.1	145	144	147	145	1	1.0	145	141	155	147	6	1.0
	156	146	140	144	143	2	1.0	148	157	151	152	4	1.0
	313	149	147	146	147	1	1.0	149	161	152	154	5	1.0
	625	141	141	146	143	2	1.0	138	146	147	144	4	1.0
	1,250	143 *	142 *	145 *	143	1	1.0	145 *	153 *	143 *	147	4	1.0
B[a]P (2.0)	670	691	686	682	9	4.6	711	699	720	710	9	4.8	
TA1535	0	15	13	14	14	1		9	14	13	12	2	
	39.1	12	17	15	15	2	1.0	14	15	14	14	0	1.2
	78.1	11	16	13	13	2	1.0	11	13	10	11	1	0.9
	156	12	14	15	14	1	1.0	11	15	11	12	2	1.0
	313	15	12	13	13	1	1.0	11	12	10	11	1	0.9
	625	12	12	18	14	3	1.0	13	12	18	14	3	1.2
	1,250	12 *	12 *	15 *	13	1	0.9	12 *	12 *	14 *	13	1	1.1
2-AA (2.0)	140	136	145	140	4	10.0	115	126	115	119	5	9.9	
TA1537	0	12	14	11	12	1		14	16	12	14	2	
	39.1	11	12	9	11	1	0.9	12	11	12	12	0	0.8
	78.1	15	14	12	14	1	1.1	12	12	11	12	0	0.8
	156	12	13	12	12	0	1.0	14	11	11	12	1	0.9
	313	10	10	11	10	0	0.8	15	12	15	14	1	1.0
	625	13	16	15	15	1	1.2	11	10	9	10	1	0.7
	1,250	9 *	10 *	8 *	9	1	0.7	11 *	13 *	9 *	11	2	0.8
B[a]P (3.0)	267	281	239	262	17	21.3	263	259	283	268	10	19.2	
WP2uvrA	0	43	46	42	44	2		47	42	49	46	3	
	156	36	32	39	36	3	0.8	47	40	45	44	3	1.0
	313	35	42	37	38	3	0.9	37	38	33	36	2	0.8
	625	39	36	30	35	4	0.8	32	38	33	34	3	0.7
	1,250	30	32	35	32	2	0.7	35	35	36	35	0	0.8
	2,500	34 *	33 *	34 *	34	0	0.8	33 *	32 *	34 *	33	1	0.7
	5,000	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0	0 *	0 *	0 *	0	0	0.0
2-AA (10.0)	213	236	238	229	11	5.2	225	206	213	215	8	4.7	

*: indicated growth inhibition.

B[a]P: benzo[a]pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

Ratio: mean number of revertant colonies of treated plate per mean number of revertant colonies of negative control plate.

Table 4. Historical Control Data

Historical negative control values of revertant colonies

Strain		TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA	
-S9	N	111	111	108	109	109	
	Mean ± S.D.	18.2 ± 3.5	116.8 ± 13.2	11.8 ± 2.2	7.0 ± 1.6	40.4 ± 6.9	
	Range	Lower	9.8	90.3	5.4	2.7	22.6
		Upper	26.5	143.3	18.2	11.4	58.1
+S9	N	108	108	105	106	106	
	Mean ± S.D.	24.9 ± 3.9	117.6 ± 13.9	11.6 ± 2.3	10.2 ± 2.4	42.1 ± 7.0	
	Range	Lower	14.1	86.3	5.2	4.4	22.0
		Upper	35.7	149.0	18.0	16.0	62.2

Historical positive control values of revertant colonies

Strain		TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
-S9	Positive control (µg/plate)	2-NF (2.0)	SA (0.5)	SA (0.5)	9-AA (50.0)	4-NQO (1.0)
	N	110	110	108	108	109
	Mean ± S.D.	282.2 ± 53.8	342.3 ± 25.9	292.3 ± 32.2	575.8 ± 342.5	1,345.0 ± 324.9
	Range	Lower	138.7	275.6	208.2	22.7
Upper		425.7	409.1	376.4	1,246.4	2,154.3
+S9	Positive control (µg/plate)	B[a]P (3.0)	B[a]P (2.0)	2-AA (2.0)	B[a]P (3.0)	2-AA (10.0)
	N	107	107	105	105	106
	Mean ± S.D.	364.6 ± 62.9	592.7 ± 119.9	121.9 ± 20.6	216.9 ± 46.0	325.3 ± 72.8
	Range	Lower	202.6	372.7	68.5	101.7
Upper		526.7	812.7	175.3	332.1	486.1

S.D.: standard deviation.

Negative control: water for injection, normal saline injection, dimethyl sulfoxide, acetone, methanol, tetrahydrofuran, etc.

2-NF: 2-nitrofluorene, SA: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, 4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide,

B[a]P: benzo[a]pyrene, 2-AA: 2-aminoanthracene.

N: The total number of bacterial reverse mutation test.

The above historical control values were obtained from the data pooled from Oct. 8, 2019 to May 14, 2021.

The range was calculated by the control limit of X derived from X-R-Rs value.

APPENDICES

Appendix 1. Protocol Deviations

Procedure	Protocol Deviations
해당사항없음	

최종보고서

자근복합추출물의 ICR 마우스를 이용한 소핵시험

시험번호: DTN210200

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP적합진술서

시험제목 자근복합추출물의 ICR 마우스를 이용한 소핵시험
시험번호 DTN210200

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

신뢰성보증확인서

시험제목 자근복합추출물의 ICR 마우스를 이용한 소핵시험
 시험번호 DTN210200

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation, 시험계획서 및 (주)디티앤씨알오 표준작업지침서에 따라서 신뢰성보증부서에서 점검을 실시하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2018-93호(2018년 11월 21일)

모든 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다.

「시험위주의 점검」

시험계획서	2021년 5월 16일	2021년 5월 17일	2021년 5월 17일
시험계획서의 변경(1)	2021년 12월 13일	2021년 12월 14일	2021년 12월 14일
시험계획서의 변경(2)	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일
시험물질의 조제	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일
조제물의 분석	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일	2021년 12월 16일
투여	2021년 12월 20일	2021년 12월 20일	2021년 12월 20일
검체채취(골수채취)	2021년 12월 22일	2021년 12월 22일	2021년 12월 22일
검체제작	2021년 12월 22일	2021년 12월 22일	2021년 12월 22일
검체판독	2021년 12월 29일	2021년 12월 29일	2021년 12월 29일
시험기초자료의 기록	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일
최종보고서(안)	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일
최종보고서	2022년 2월 25일	2022년 2월 25일	2022년 2월 25일

「수행절차의 점검」

점검단계	점검일	시험책임자 보고일	운영책임자 보고일
검역 및 순화	2021년 10월 5일	2021년 10월 5일	2021년 10월 5일
균분리	2021년 10월 12일	2021년 10월 12일	2021년 10월 12일

이 최종보고서는 (주)디티앤씨알오 비임상센터 신뢰성보증부서에서 시험의 모든 과정과 결과를 점검하였으며 시험기초자료를 정확히 반영하였음을 보증한다.

신뢰성보증업무담당자

(주)디티앤씨알오 비임상
센터

날짜

GLP적합진술서

신뢰성보증확인서

요약

1. 시험실시의 개요

- 1.1. 시험제목
- 1.2. 시험목적
- 1.3. 시험의뢰자
- 1.4. 시험의뢰자 모니터
- 1.5. 시험기관
- 1.6. 시험책임자
- 1.7. 담당자
- 1.8. 시험일정
- 1.9. Good Laboratory Practice Regulations
- 1.10. 시험기준
- 1.11. 동물윤리
- 1.12. 자료의 보관

2. 시험재료 및 방법

- 2.1. 시험물질
- 2.2. 음성대조물질
- 2.3. 양성대조물질
- 2.4. 조제 및 분석
- 2.5. 시험계
- 2.6. 사육조건
- 2.7. 용량설정시험
- 2.8. 본시험
- 2.9. 관찰
- 2.10. 시험의 성립조건
- 2.11. 결과의 판정
- 2.12. 자료의 통계처리

3. 결과 및 고찰

- 3.1. 용량설정시험
- 3.2. 본시험
- 3.3. 시험의 성립

4. 결론

TABLES

Table 1. Clinical Signs of the Dose Range Finding Study in Male ICR Mice

Table 2. Clinical Signs of the Dose Range Finding Study in Female ICR Mice

Table 3. Body Weights of the Dose Range Finding Study in Male ICR Mice

Table 4. Body Weights of the Dose Range Finding Study in Female ICR Mice

Table 5. Clinical Signs of the Main Study in Male ICR Mice

Table 6. Clinical Signs of the Main Study in Female ICR Mice

Table 7. Body Weights of the Main Study in Male ICR Mice

Table 8. Body Weights of the Main Study in Female ICR Mice

Table 9. Results of In Vivo Micronucleus Study in Male ICR Mice (Main Study)

Table 10. Results of In Vivo Micronucleus Study in Female ICR Mice (Main Study)

Table 11. Historical Control Data

요약

시험물질 자근복합추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성을 ICR 마우스를 이용하여 24시간 간격으로 2회 경구투여하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 수컷은 5,000 및 2,500 mg/kg, 암컷은 5,000 mg/kg에서 사망례가 관찰되었다.

따라서, 사망례가 관찰되지 않은 최고용량을 본시험의 고용량으로 설정하여, 수컷은 1,250, 625 및 313 mg/kg, 암컷은 2,500, 1,250 및 625 mg/kg을 본시험의 투여용량으로 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

암수 성차가 확인되었기 때문에 본시험에서는 암수 모두 사용하였다.

본시험의 결과, 모든 시험물질군에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다.

양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 증가가 확인되었다. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 유의한 감소가 확인되었다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물은 마우스 골수세포에 대하여 소핵을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

자근복합추출물의 ICR 마우스를 이용한 소핵시험

1.2. 시험목적

시험물질 자근복합추출물의 ICR 마우스 골수세포에 대한 소핵유발성을 평가하였다.

1.3. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.4. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.5. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.6. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.7. 담당자

시험물질관리책임자

조제물분석책임자

검역책임자

신뢰성보증업무담당자

주요 시험담당자
참여 시험담당자

1.8. 시험일정

시험개시일	2021년 5월 13일
실험개시일	2021년 5월 18일
용량설정시험	-
동물입수일	2021년 5월 18일
시험물질 투여일	2021년 5월 24일, 5월 25일
일반증상 관찰일	2021년 5월 24일-26일
본시험	-
동물입수일	2021년 12월 14일
시험물질 투여일	2021년 12월 20일, 12월 21일
검체제작일	2021년 12월 22일
검체 판독일	2021년 12월 29일-2022년 1월 26일
실험종료일	2022년 1월 26일
시험종료일	2022년 2월 25일

1.9. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

1.10. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

1.11. 동물윤리

본 시험은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: 210123)을 받았으며, 동물보호법(일부개정 2020년 2월 11일, 법률 제16977호) 및 실험동물에 관한 법률(일부개정 2018년 12월 11일, 법률 제15944호)의 동물윤리에 따라 실험을 수행하였다.

자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료, 검체(평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관) 및 최종보고서 등은 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준” 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

2. 시험재료 및 방법

2.1. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1-30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

2.2. 음성대조물질

명칭	주사용수
Lot No.	DKN20014, DKN21012
보관조건	실온(1-30°C)
제조사	JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea
선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

2.3. 양성대조물질

명칭	Mitomycin C (MMC)
Batch No.	SLBX1864
보관조건	냉장
제조사	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.

2.4. 조제 및 분석

부형제

명칭 주사용수

Lot No. DKN20014, DKN21012

선택이유 용량설정시험의 최고용량인 5,000 mg/kg (500 mg/mL)를 조제하기 위하여 시험의뢰자가 제공한 정보를 참고하여 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 균일하게 현탁되었다. 따라서 주사용수를 부형제로 선택하였다.

시험물질의 조제방법

시험물질의 조제는 시험물질 투여일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후(Practum224, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 교반기를 이용하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다.

조제물의 분석

균질성 및 안정성

조제물의 균질성 및 안정성은 “HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험(DT&CRO Study No.: DTN210194)”의 결과, 본시험의 투여 농도를 포함하는 0.01 및 250 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

농도분석

조제물의 농도분석은 HPLC (Alliance High Performance LC, Waters, U.S.A.)로 수행하였고, 처리 전에 각 용량의 조제물의 증층에서 3회 채취하여 각 1회 측정하였다.

그 결과, 본시험용 조제물의 정밀성과 정확성은 각각 0.18-0.31% 및 100.0-100.7%로, 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115%의 판정기준을 만족하였다(Attachment 3).

양성물질의 조제

MMC 2 mg에 주사용수(Lot No.: DKN21002, DKN21010, JW Pharmaceutical Co., Ltd., Republic of Korea) 4 mL를 가하여 용해시킨 후, 생리식염주사액(Lot No.: L5V4B58, 대한약품공업(주)) 6 mL를 가하여 최종농도가 0.2 mg/mL가 되도록 조제하였다.

2.5. 시험계

종 및 계통

마우스, ICR (IcrTacSam:ICR), SPF

생산자 및 공급자

선택이유

ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 수 있는 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있고, 가이드라인에서 추천하는 동물종이므로 선택하였다.

성별, 동물 수, 주령 및 체중

구분	기간	성별	동물 수	주령	체중
용량설정시험	입수시	수컷	17	7	28.7–32.6 g
		암컷	17	7	24.8–27.6 g
	1차 투여시	수컷	15	8	34.7–38.1 g
		암컷	15	8	24.2–29.7 g
본시험	입수시	수컷	27	7	30.1–34.4 g
		암컷	27	7	24.6–28.6 g
	1차 투여시	수컷	25	8	33.7–39.1 g
		암컷	25	8	23.0–31.2 g

검역 및 순화

입수시 동물 개체 수의 확인, 일반증상 관찰 및 체중측정을 실시하였다. 모든 동물은 이상 여부를 확인하였고 동물실 환경에 적응하기 위해 7일간 검역 및 순화기간을 거쳐 시험에 사용하였으며, 검역 및 순화기간 동안 모든 동물은 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 입수시 검역실에서 2일간 일반증상을 관찰한 후 동물실로 이동하였다.

개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 적색 유성펜을 이용하여 동물의 꼬리에 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역 및 순화기간 중의 개체식별카드를 부착하였다. 실험기간 중에는 군분리시 군은 적색 유성펜, 개체번호는 청색 유성펜을 이용하여 동물의 꼬리에 개체표시를 하였고, 사육상자에는 실험기간 중의 개체식별카드를 부착하였다.

최종검역

검역 및 순화기간 종료일(최종검역일)에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태를 평가하였다. 입수시와 최종검역시의 체중을 비교하여 이상이 없고, 검역 및 순화기간 동안 이상증상이 없는 동물만 시험에 사용하였다.

군분리

최종검역시 일반증상 및 체중변화에 이상이 없는 동물을 대상으로 군분리를 실시하였다. 군분리일에 측정된 체중이 평균체중의 $\pm 20\%$ 범위를 벗어나는 동물은 없었으며, 선택한 동물은 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포되도록 군분리하였다.

잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 본 시험에서 제외시켰다.

2.6. 사육조건

사육환경

검역실 번호	A311
동물실 번호	A307
사육상자 정보	폴리카보네이트 사육상자, 260W×420D×180H (mm) 폴리카보네이트 사육상자, 200W×260D×130H (mm)
사육상자당 마리수	순화기간: 8, 9마리/사육상자 실험기간: 3, 5마리/사육상자
온도	19–25°C
상대습도	40–70%
환기횟수	10–15회/시간
조명주기	12시간(오전 7시 점등–오후 7시 소등)
조도	150–300 Lux
사육기자재 관리	사육상자 및 급이기는 1회/2주, 급수병은 2회/주 이상 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

사료

실험동물용 고품 사료(Lot No.: 2918C-012621MA, 2918C-071821MA, Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, Envigo RMS, Inc., U.S.A.)를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 제조업체로부터 성적서를 받아 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

음수

경기도 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 경기도 보건환경연구원(경기도 수원시 권선구 칠보로 1번길 62)에 의뢰하여 “먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제833호 2019년 12월 20일, 타법개정)”의 전항목에 대하여 1회/년 실시하였고, 미생물 검사는 2회/년 실시하여, 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

2.7. 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 실시하였다.

각 군에 3마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였고, 성차를 확인하기 위하여 암수 모두를 사용하였다.

투여, 일반증상 관찰 및 체중측정은 본시험과 동일한 방법으로 실시하였다.

일반증상 관찰기간 동안 사망한 동물의 부검은 실시하지 않았다.

투여용량 및 투여액량

용량설정시험의 투여용량은 가이드라인에서 추천하는 5,000 mg/kg을 최고용량으로 설정하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250 및 625 mg/kg의 총 4용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

본시험의 용량설정

용량설정시험의 결과, 1,250 및 625 mg/kg에서는 암수 모두 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

2,500 mg/kg에서는 2차 투여 직후 수컷 1마리에서 자발운동의 저하(decrease in locomotor activity hypoactivity), 암컷 1마리에서 유루(lacrimation)가 관찰되었다. 2차 투여 후 2시간에 수컷 1마리가 복와위(sternal recumbency)로 사망(death)하였고, 암컷 1마리에서 자발운동의 저하 및 체온저하(hypothermia)가 관찰되었다.

5,000 mg/kg에서는 2차 투여 전 암컷 1마리에서 빈사(moribund), 체온저하 및 경련(convulsion seizure)이 관찰되었고, 2차 투여 직후 수컷에서 자발운동의 저하 및 복부팽만(abdominal distention)이 각각 1마리씩 관찰되었고, 암컷 1마리는 복와위로 사망하였으며, 체온저하가 2마리에서 관찰되었다. 2차 투여 후 2시간에 수컷 1마리가 복와위로 사망하였으며 2마리에서 자발운동의 저하, 체온저하 및 복부팽만이 관찰되었고, 암컷 2마리에서 자발운동의 저하와 체온저하가 관찰되었다. 2차 투여 후 1일에는 수컷 1마리가 복와위로 사망하였으며 이외의 수컷 1마리에서 복부팽만이 관찰되었고, 암컷 1마리가 복와위로 사망하였다.

수컷은 5,000 및 2,500 mg/kg, 암컷은 5,000 mg/kg에서 사망례가 관찰되었기 때문에 사망례가 관찰되지 않은 최고용량을 본시험의 고용량으로 설정하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 수컷은 1,250, 625 및 313 mg/kg, 암컷은 2,500, 1,250 및 625 mg/kg을 본시험의 투여용량으로 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

사망동물에서 암수 성차가 있었기 때문에 본시험에서는 암수 모두 사용하였다.

2.8. 본시험

군구성

각 군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여횟수	투여경로	동물 수(개체번호) 수컷
G1 음성대조	0	10	2	경구	5 (1101-1105)
G2 저용량	313	10	2	경구	5 (1201-1205)
G3 중용량	625	10	2	경구	5 (1301-1305)
G4 고용량	1,250	10	2	경구	5 (1401-1405)
G5 양성대조	2 (MMC)	10	1	복강내	5 (1501-1505)

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여횟수	투여경로	동물 수(개체번호) 암컷
G1 음성대조	0	10	2	경구	5 (2101-2105)
G2 저용량	625	10	2	경구	5 (2201-2205)
G3 중용량	1,250	10	2	경구	5 (2301-2305)
G4 고용량	2,500	10	2	경구	5 (2401-2405)
G5 양성대조	2 (MMC)	10	1	복강내	5 (2501-2505)

투여

투여경로

경구투여 하였다. 단, 양성대조군은 복강 내 투여하였다.

투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다. 양성대조물질 MMC는 일반적인 투여방법인 복강 내 투여를 선택하였다.

투여방법

시험물질군 및 음성대조군은 폴리에틸렌제 존대를 장착한 일회용 주사기(1 mL)를 사용하여 약 24시간 간격으로 2회 강제경구 투여하였다. 양성대조군은 검체제작 약 24시간 전에 일회용 주사기(1 mL, 26G)를 사용하여 1회 복강 내 투여하였다.

일반증상 관찰 및 체중측정

1차 투여직후 및 1차 투여 후 2시간, 2차 투여 전, 2차 투여직후 및 2차 투여 후 2시간, 2차 투여 후 1일에 각 용량의 일반증상을 관찰하였다.

체중은 일반증상 관찰 종료일(2차 투여후 1일, 골수채취직전)에 실시하였다.

검체제작

2차 투여(최종투여)후 약 24시간에 검체제작하였다. 이 방법은 가이드라인에서 추천하는 가장 기본적인 검체제작 방법이며, 소핵 유발을 충분히 확인할 수 있다고 알려져 있기 때문에

선택하였다.

시험물질 2차 투여 후 약 24시간에 동물을 경추탈골하였다. 대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 양 끝단을 가위로 절단하여 200 μ L의 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, U.S.A.)을 관류시켜 골수세포를 채취하였다. 골수세포부유액을 5분간 원심분리(1,000 rpm, 4°C, Smart R17 Plus, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea)하고, 상층액을 일부 제거하고, 침전된 골수세포를 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하고 충분히 건조시켰다.

염색 및 봉입

염색 전, 검체 슬라이드를 메탄올로 5분간 고정하였다. 메탄올 고정 후, 3% Giemsa 염색액으로 30분간 염색하고, 0.01M sorenson buffer (pH 6.8)로 1차 세정한 뒤, 0.004% citric acid로 2차 세정하였다. 염색이 완료된 슬라이드는 실온에서 충분히 건조시킨 후, 봉입제(Entellan[®]new, Merck, Germany)를 떨어뜨리고 커버글라스로 덮어 봉입하였다.

2.9. 관찰

코드화된 골수도말검체를 현미경(600배 배율, BX53, BX43, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

검체 1장당 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)를 2,000개씩 관찰하고, 1개체당 4,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현율을 구하였다.

골수세포 증식억제 지표로서, 검체 1장당 총 적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

2.10. 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하였기 때문에 시험이 성립하였다.

음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것

양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가할 것

2.11. 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가하며, 증가에 따른 용량의존성이 있고, 음성대조군의 historical

control data의 관리범위 이상으로 증가할 것

2.12. 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다.

소핵다염성적혈구의 출현빈도에 대하여 Mann-Whitney test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간의 유의차와 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검정하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중에 대하여 Bartlett test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간의 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였고 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰된 경우에는 음성대조군과 비교하여 유의차가 있는 시험물질군을 확인하기 위하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 음성대조군과 양성대조군과의 비교에 대해서는 Folded-F test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1. 용량설정시험

(Table 1-4)

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 가이드라인에서 추천하는 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 2.7.에 따라 용량설정시험을 실시한 결과, 수컷은 5,000 및 2,500 mg/kg, 암컷은 5,000 mg/kg에서 사망례가 관찰되었다.

따라서, 사망례가 관찰되지 않은 최고용량을 본시험의 고용량으로 설정하여, 수컷은 1,250, 625 및 313 mg/kg, 암컷은 2,500, 1,250 및 625 mg/kg을 본시험의 투여용량으로 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

암수 성차가 확인되었기 때문에 본시험에서는 암수 모두 사용하였다.

3.2. 본시험

(Table 5-10)

일반증상 및 체중변화

일반증상 관찰 결과, 수컷은 1,250 mg/kg에서 1차 투여 직후 1마리에서 자발운동의 저하 및 체온저하가 관찰되었으나 회복되었고, 625 및 313 mg/kg에서는 관찰기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다. 암컷은 1,250 mg/kg에서 1차 투여 직후 1마리에서 자발운동의 저하 및 경련이 관찰되었으나 회복되었고, 2,500 및 625 mg/kg에서는 관찰기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다.

암수 모두 시험물질군 및 양성대조군에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 체중변화는 확인되지 않았다.

소핵유발 출현빈도

시험물질군에서는 다염성적혈구(PCE) 중 소핵다염성적혈구(MNPCE)의 출현빈도 및 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율이 암수 모두 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 확인되지 않았다.

양성대조군에서는 암수 모두 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다.

3.3. 시험의 성립

음성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data (Table 11)의 관리범위 및 95% 범위 내에 있으며, 양성대조군에서 소핵다염성적혈구의 출현빈도가

historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가한 것으로부터, 해당 시험은 적절한 시험 조건 하에서 실시한 것이 확인되었다.

4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물의 ICR 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성은 음성으로 판단하였다.

TABLES

Table 1. Clinical Signs of the Dose Range Finding Study in Male ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	1 st dosing		2 nd dosing		1 day after 2 nd dosing
			immediately after dosing	2 hours after dosing	before dosing	immediately after dosing	
PG1 0	P1101		-	-	-	-	-
	P1102		-	-	-	-	-
	P1103		-	-	-	-	-
PG2 625	P1201		-	-	-	-	-
	P1202		-	-	-	-	-
	P1203		-	-	-	-	-
PG3 1,250	P1301		-	-	-	-	-
	P1302		-	-	-	-	-
	P1303		-	-	-	-	-
PG4 2,500	P1401		-	-	-	-	-
	P1402		-	-	-	-	-
	P1403	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-
		Death	-	-	-	-	+
	Sternal recumbency	-	-	-	-	+	
PG5 5,000	P1501	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	+
		Hypothermia	-	-	-	-	+
		Death	-	-	-	-	+
		Sternal recumbency	-	-	-	-	+
	P1502	Abdominal Distention	-	-	-	+	+
	P1503	Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-
		Death	-	-	-	-	+
Sternal recumbency		-	-	-	-	+	

-: no observable abnormality, +: observable abnormality.

Table 2. Clinical Signs of the Dose Range Finding Study in Female ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	1 st dosing		2 nd dosing		1 day after 2 nd dosing
			immediately after dosing	2 hours after dosing	before dosing	immediately after dosing	
PG1 0	P2101		-	-	-	-	-
	P2102		-	-	-	-	-
	P2103		-	-	-	-	-
PG2 625	P2201		-	-	-	-	-
	P2202		-	-	-	-	-
	P2203		-	-	-	-	-
PG3 1,250	P2301		-	-	-	-	-
	P2302		-	-	-	-	-
	P2303		-	-	-	-	-
PG4 2,500	P2401	Lacrimation	-	-	-	+	-
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	+
		Hypothermia	-	-	-	-	+
	P2402 P2403		-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-
PG5 5,000	P2501	Hypothermia	-	-	-	+	+
			-	-	-	+	+
	P2502	Hypothermia	-	-	-	+	+
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	+
		Death	-	-	-	-	-
	P2503	Sternal recumbency	-	-	-	-	-
		Moribund	-	-	+	-	-
		Convulsion seizure	-	-	+	-	-
		Hypothermia	-	-	+	-	-
Death		-	-	-	+	+	
Sternal recumbency		-	-	-	+	+	

-: no observable abnormality, +: observable abnormality.

• Table 3. Body Weights of the Dose Range Finding Study in Male ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)		
		before 1 st dosing	1 day after 2 nd dosing	Change
PG1 0	P 1101	38.1	37.8	-0.3
	P 1102	36.0	35.7	-0.3
	P 1103	35.9	34.8	-1.1
	Mean	36.7	36.1	-0.6
	S.D.	1.24	1.54	0.46
PG2 625	P 1201	38.1	35.0	-3.1
	P 1202	36.0	34.8	-1.2
	P 1203	35.8	35.2	-0.6
	Mean	36.6	35.0	-1.6
	S.D.	1.27	0.20	1.31
PG3 1,250	P 1301	37.2	38.1	0.9
	P 1302	36.1	36.3	0.2
	P 1303	35.8	36.3	0.5
	Mean	36.4	36.9	0.5
	S.D.	0.74	1.04	0.35
PG4 2,500	P 1401	37.2	37.2	0.0
	P 1402	36.6	36.4	-0.2
	P 1403	35.5		
	Mean	36.4	36.8	-0.1
	S.D.	0.86	0.57	0.14
PG5 5,000	P 1501	37.0		
	P 1502	36.9	36.1	-0.8
	P 1503	34.7		
	Mean	36.2		
	S.D.	1.30		

S.D.: standard deviation.

Table 4. Body Weights of the Dose Range Finding Study in Female ICR Mice

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)		
		before 1 st dosing	1 day after 2 nd dosing	Change
PG1 0	P2101	29.7	26.6	-3.1
	P2102	28.5	27.0	-1.5
	P2103	28.4	28.0	-0.4
	Mean	28.9	27.2	-1.7
	S.D.	0.72	0.72	1.36
PG2 625	P2201	29.6	30.3	0.7
	P2202	28.7	26.7	-2.0
	P2203	27.9	26.6	-1.3
	Mean	28.7	27.9	-0.9
	S.D.	0.85	2.11	1.40
PG3 1,250	P2301	29.2	28.8	-0.4
	P2302	28.7	27.2	-1.5
	P2303	27.4	26.2	-1.2
	Mean	28.4	27.4	-1.0
	S.D.	0.93	1.31	0.57
PG4 2,500	P2401	29.1	26.5	-2.6
	P2402	28.7	28.8	0.1
	P2403	26.7	26.2	-0.5
	Mean	28.2	27.2	-1.0
	S.D.	1.29	1.42	1.42
PG5 5,000	P2501	28.8	29.1	0.3
	P2502	28.8		
	P2503	24.2		
	Mean	27.3		
	S.D.	2.66		

S.D.: standard deviation.

Table 5. Clinical Signs of the Main Study in Male ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signs	1 st dosing		2 nd dosing			1 day after 2 nd dosing
			immediately after dosing	2 hours after dosing	before dosing	immediately after dosing	2 hours after dosing	
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-	-
G2 313	1201		-	-	-	-	-	-
	1202		-	-	-	-	-	-
	1203		-	-	-	-	-	-
	1204		-	-	-	-	-	-
	1205		-	-	-	-	-	-
G3 625	1301		-	-	-	-	-	-
	1302		-	-	-	-	-	-
	1303		-	-	-	-	-	-
	1304		-	-	-	-	-	-
	1305		-	-	-	-	-	-
G4 1,250	1401	Decrease in locomotor activity	+	-	-	-	-	-
	1402	Hypothermia	+	-	-	-	-	-
	1403		-	-	-	-	-	-
	1404		-	-	-	-	-	-
	1405		-	-	-	-	-	-
G5 ^A 2 MMC	1501		-	-	-	-	-	-
	1502		-	-	-	-	-	-
	1503		-	-	-	-	-	-
	1504		-	-	-	-	-	-
	1505		-	-	-	-	-	-

-: no observable abnormality, +: observable abnormality.

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

MMC: mitomycin C.

Table 6. Clinical Signs of the Main Study in Female ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signs	1 st dosing		2 nd dosing			1 day after 2 nd dosing
			immediately after dosing	2 hours after dosing	before dosing	immediately after dosing	2 hours after dosing	
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-	-
G2 625	2201		-	-	-	-	-	-
	2202		-	-	-	-	-	-
	2203		-	-	-	-	-	-
	2204		-	-	-	-	-	-
	2205		-	-	-	-	-	-
G3 1,250	2301		-	-	-	-	-	-
	2302	Decrease in locomotor activity	+	-	-	-	-	-
		Convulsion seizure	+	-	-	-	-	-
	2303		-	-	-	-	-	-
	2304		-	-	-	-	-	-
G4 2,500	2401		-	-	-	-	-	-
	2402		-	-	-	-	-	-
	2403		-	-	-	-	-	-
	2404		-	-	-	-	-	-
	2405		-	-	-	-	-	-
G5 ^A 2 MMC	2501		-	-	-	-	-	-
	2502		-	-	-	-	-	-
	2503		-	-	-	-	-	-
	2504		-	-	-	-	-	-
	2505		-	-	-	-	-	-

-: no observable abnormality, +: observable abnormality.

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

MMC: mitomycin C.

Table 7. Body Weights of the Main Study in Male ICR Mice.

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)		
		before 1 st dosing	1 day after 2 nd dosing	Change
G1 0	1101	39.1	39.7	0.6
	1102	37.2	38.1	0.9
	1103	37.2	38.7	1.5
	1104	35.7	35.6	-0.1
	1105	35.5	35.1	-0.4
	Mean	36.9	37.4	0.5
	S.D.	1.45	2.00	0.76
G2 313	1201	38.6	38.8	0.2
	1202	37.4	36.2	-1.2
	1203	37.2	36.9	-0.3
	1204	35.8	36.1	0.3
	1205	35.1	35.7	0.6
	Mean	36.8	36.7	-0.1
	S.D.	1.38	1.23	0.70
G3 625	1301	38.3	38.6	0.3
	1302	37.4	37.3	-0.1
	1303	37.1	36.4	-0.7
	1304	35.9	36.1	0.2
	1305	34.8	35.9	1.1
	Mean	36.7	36.9	0.2
	S.D.	1.37	1.11	0.65
G4 1,250	1401	38.0	37.5	-0.5
	1402	37.4	37.5	0.1
	1403	37.0	36.2	-0.8
	1404	35.9	35.0	-0.9
	1405	34.7	33.8	-0.9
	Mean	36.6	36.0	-0.6
	S.D.	1.31	1.61	0.42
G5 ^A 2 MMC	1501	37.8	36.4	-1.4
	1502	37.6	37.7	0.1
	1503	36.9	35.5	-1.4
	1504	36.0	36.0	0.0
	1505	33.7	33.6	-0.1
	Mean	36.4	35.8	-0.6
	S.D.	1.67	1.49	0.77

S.D.: standard deviation, MMC: mitomycin C.

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

• Table 8. Body Weights of the Main Study in Female ICR Mice .

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)		
		before 1 st dosing	1 day after 2 nd dosing	Change
G1 0	2101	31.2	29.4	-1.8
	2102	27.9	31.0	3.1
	2103	27.8	27.3	-0.5
	2104	26.6	26.7	0.1
	2105	23.9	25.3	1.4
	Mean	27.5	27.9	0.5
	S.D.	2.63	2.26	1.87
G2 625	2201	30.4	29.2	-1.2
	2202	28.3	27.0	-1.3
	2203	27.8	28.7	0.9
	2204	26.7	28.9	2.2
	2205	26.2	27.8	1.6
	Mean	27.9	28.3	0.4
	S.D.	1.64	0.90	1.61
G3 1,250	2301	30.2	30.3	0.1
	2302	28.6	27.6	-1.0
	2303	27.7	28.2	0.5
	2304	26.9	27.8	0.9
	2305	26.1	29.2	3.1
	Mean	27.9	28.6	0.7
	S.D.	1.59	1.12	1.51
G4 2,500	2401	29.9	29.2	-0.7
	2402	29.1	30.3	1.2
	2403	27.7	28.3	0.6
	2404	27.3	27.8	0.5
	2405	26.6	28.4	1.8
	Mean	28.1	28.8	0.7
	S.D.	1.35	0.98	0.93
G5 ^A 2 MMC	2501	29.4	29.8	0.4
	2502	29.4	28.7	-0.7
	2503	27.7	27.6	-0.1
	2504	27.7	27.8	0.1
	2505	23.0	28.0	5.0
	Mean	27.4	28.4	0.9
	S.D.	2.62	0.90	2.30

S.D.: standard deviation, MMC: mitomycin C.

A: The positive control substance was injected intraperitoneally once at 24 hours prior to sampling time.

Table 9. Results of In Vivo Micronucleus Study in Male ICR Mice (Main Study).

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/PCE
G1 0	1101	220 : 500	2 / 4,000
	1102	194 : 500	0 / 4,000
	1103	191 : 500	2 / 4,000
	1104	210 : 500	0 / 4,000
	1105	217 : 500	4 / 4,000
	Total	1,032 / 2,500	8 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	41.3 ± 2.65	0.040 ± 0.042
G2 313	1201	207 : 500	1 / 4,000
	1202	188 : 500	2 / 4,000
	1203	187 : 500	4 / 4,000
	1204	193 : 500	3 / 4,000
	1205	187 : 500	3 / 4,000
	Total	962 / 2,500	13 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	38.5 ± 1.71	0.065 ± 0.029
G3 625	1301	201 : 500	1 / 4,000
	1302	209 : 500	2 / 4,000
	1303	210 : 500	2 / 4,000
	1304	206 : 500	1 / 4,000
	1305	195 : 500	1 / 4,000
	Total	1,021 / 2,500	7 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	40.8 ± 1.24	0.035 ± 0.014
G4 1,250	1401	191 : 500	1 / 4,000
	1402	196 : 500	0 / 4,000
	1403	183 : 500	1 / 4,000
	1404	201 : 500	2 / 4,000
	1405	192 : 500	2 / 4,000
	Total	963 / 2,500	6 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	38.5 ± 1.33	0.030 ± 0.021
G5 2 MMC	1501	152 : 500	182 / 4,000
	1502	180 : 500	182 / 4,000
	1503	173 : 500	202 / 4,000
	1504	166 : 500	92 / 4,000
	1505	161 : 500	219 / 4,000
	Total	832 / 2,500	877† / 20,000
	%(Mean±S.D.)	33.3* ± 2.16	4.385 ± 1.228

S.D.: standard deviation, MMC: mitomycin C.

PCE: polychromatic erythrocyte, NCE: normochromatic erythrocyte,

MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte.

Significant difference from negative control by Student t-test: * p<0.01.

Significant difference from negative control by Mann-Whitney test † p<0.01.

• Table 10. Results of In Vivo Micronucleus Study in Female ICR Mice (Main Study).

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/PCE
G1 0	2101	185 : 500	3 / 4,000
	2102	213 : 500	1 / 4,000
	2103	190 : 500	2 / 4,000
	2104	217 : 500	1 / 4,000
	2105	207 : 500	2 / 4,000
	Total	1,012 / 2,500	9 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	40.5 ± 2.83	0.045 ± 0.021
G2 625	2201	173 : 500	3 / 4,000
	2202	189 : 500	3 / 4,000
	2203	197 : 500	1 / 4,000
	2204	197 : 500	0 / 4,000
	2205	186 : 500	0 / 4,000
	Total	942 / 2,500	7 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	37.7 ± 1.98	0.035 ± 0.038
G3 1,250	2301	201 : 500	3 / 4,000
	2302	197 : 500	3 / 4,000
	2303	180 : 500	3 / 4,000
	2304	205 : 500	2 / 4,000
	2305	204 : 500	2 / 4,000
	Total	987 / 2,500	13 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	39.5 ± 2.04	0.065 ± 0.014
G4 2,500	2401	186 : 500	3 / 4,000
	2402	193 : 500	3 / 4,000
	2403	198 : 500	3 / 4,000
	2404	185 : 500	3 / 4,000
	2405	192 : 500	2 / 4,000
	Total	954 / 2,500	14 / 20,000
	%(Mean±S.D.)	38.2 ± 1.07	0.070 ± 0.011
G5 2 MMC	2501	171 : 500	219 / 4,000
	2502	163 : 500	185 / 4,000
	2503	170 : 500	232 / 4,000
	2504	159 : 500	164 / 4,000
	2505	191 : 500	238 / 4,000
	Total	854 / 2,500	1,038† / 20,000
	%(Mean±S.D.)	34.2* ± 2.47	5.190 ± 0.797

S.D.: standard deviation, MMC: mitomycin C.

PCE: polychromatic erythrocyte, NCE: normochromatic erythrocyte,

MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocyte.

Significant difference from negative control by Student t-test: * p<0.01.

Significant difference from negative control by Mann-Whitney test † p<0.01.

• Table 11. Historical Control Data.

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to total erythrocytes

Control group		Negative	Positive
N		31	31
MNPCE/PCE (%) (Mean±S.D.)		0.061 ± 0.027	4.468 ± 0.685
[MNPCE/PCE]	MIN	0.008	3.732
Range (%)	MAX	0.101	5.204
Poisson-based 95% control limit [MNPCE/PCE]		<17	-
PCE/(NCE+PCE) (%) (Mean±S.D.)		45.3 ± 3.13	36.9 ± 3.56
[PCE/(NCE+PCE)]	MIN	40.4	32.2
Range (%)	MAX	50.3	41.6

S.D.: standard deviation.

Negative control: water for injection, corn oil, 0.5% methyl cellulose 1,500 centipoise solution.

Positive control: mitomycin C (2 mg/kg, intraperitoneal, single dosing)

N: The total number of micronucleus test.

The above historical control values were obtained from the data pooled from Mar. 8, 2019 to May 7, 2021.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-R$ value.

Bone marrow harvesting was performed 24 hours after the final dosing.

최종보고서

자근복합추출물의
포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험번호: DTN210199

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP적합진술서

시험제목 자근복합추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험
시험번호 DTN210199

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

목차

페이지

GLP적합진술서	
신뢰성보증확인서	
요약	
1. 시험실시의 개요	
1.1. 시험제목	
1.2. 시험목적	
1.3. 시험의뢰자	
1.4. 시험의뢰자 모니터	
1.5. 시험기관	
1.6. 시험책임자	
1.7. 담당자	
1.8. 시험일정	
1.9. Good Laboratory Practice Regulations	
1.10. 시험기준	
1.11. 자료의 보관	
2. 시험재료 및 방법	
2.1. 시험물질	
2.2. 음성대조물질	
2.3. 양성대조물질	
2.4. 조제 및 분석	
2.5. 시험계	
2.6. 배지	
2.7. S9 mix의 조제	
2.8. 용량설정시험	
2.9. 본시험	
2.10. 관찰	
2.11. 시험의 성립조건	
2.12. 결과의 판정	
2.13. 자료의 통계처리	
3. 결과 및 고찰	
3.1. 용량설정시험	
3.2. 본시험	
3.3. 시험의 성립	

4. 결론

TABLES

Table 1. Results of the Dose Range Finding Study and the Additional Dose Range Finding Study

Table 2. Results of In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Study (Main Study)

Table 3. Historical Control Data

요약

시험물질 자근복합추출물의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주(Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 검토하였다.

본시험의 용량을 설정하기 위하여, 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하여 용량설정시험 및 추가 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 계열에서 50% 이상 세포증식을 억제하는 용량이 확인되었다. 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 각각 17.0, 190 및 15.6 µg/mL였다. 시험물질의 침전은 처리종료시 모든 계열의 5,000 µg/mL에서 관찰되었으나 세정 후 관찰되지 않았다.

따라서, 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 본시험의 최고용량으로 하여, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에 대하여 각각 17.0, 190 및 16.0 µg/mL를 본시험의 최고용량으로 설정하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 4용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량(µg/mL)
단시간처리법	-	17.0, 8.50, 4.25, 2.13
	+	190, 95.0, 47.5, 23.8
연속처리법	-	16.0, 8.00, 4.00, 2.00

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 시험물질군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

각 계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1. 시험제목

자근복합추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

1.2. 시험목적

시험물질 자근복합추출물의 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주(Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 이용하여 평가하였다.

1.3. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.4. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.5. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.6. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.7. 담당자

시험물질관리책임자
 조제물분석책임자
 신뢰성보증업무담당자
 주요 시험담당자
 참여 시험담당자

1.8. 시험일정

시험개시일	2021년 5월 18일
실험개시일	2021년 5월 24일
용량설정시험	-
세포 분주일	2021년 5월 24일
시험물질 처리일	2021년 5월 25일
세포 계수일	2021년 5월 26일
추가 용량설정시험	
세포 분주일	2021년 6월 8일
시험물질 처리일	2021년 6월 9일
세포 계수일	2021년 6월 10일
본시험	-
세포 분주일	2021년 12월 13일
시험물질 처리일	2021년 12월 14일
검체 제작일	2021년 12월 15일
검체 판독일	2021년 12월 20일-2022년 1월 3일
실험종료일	2022년 1월 3일
시험종료일	2022년 1월 28일

1.9. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

1.10. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

1.11. 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료, 검체 (평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관) 및 최종보고서 등은 품목허가일로부터 3년간 (“비임상시험관리기준” 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

2. 시험재료 및 방법

2.1. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1-30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

2.2. 음성대조물질

명칭	주사용수
제조번호(Batch/Lot No.)	B1V2AG5, G3VBAG5
보관조건	실온(1-30°C)
제조사	대한약품공업(주)
선택이유	본 시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

2.3. 양성대조물질

물질명	Batch No.	CAS No.	보관조건	제조사
Mitomycin C (MMC)	0000101926	50-07-7	냉동	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	SLBZ4612	50-32-8	실온	Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.

2.4. 조제 및 분석

부형제

명칭 주사용수

제조번호(Batch/Lot No.) B1V2AG5, G3VBAG5

선택이유 용량설정시험의 최고용량인 5,000 µg/mL의 10배 stock (50 mg/mL)을 조제하기 위하여 시험의뢰자가 제공한 정보를 참고하여 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 균일하게 현탁되었다. 따라서 주사용수를 부형제로 선택하였다.

시험물질 조제물의 조제방법

시험물질 조제물의 조제는 시험물질 처리일 또는 조제물 분석일에 실시하였다.

최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여 필요량의 시험물질을 칭량한 후(Practum224, Practum313, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 교반기로 교반하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

조제물의 분석

균질성 및 안정성

조제물의 균질성 및 안정성은 “HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험(DT&CRO Study No.: DTN210194)”의 결과, 본시험의 처리 농도를 포함하는 0.01 및 250 mg/mL의 조제물은 균질하였고, 실온 4시간 및 냉장 8일간 안정하였다.

농도분석

조제물의 농도분석은 HPLC (Alliance High Performance LC, Waters, U.S.A.)로 수행하고, 처리 전에 각 용량의 조제물의 증층에서 3회 채취하여 각 1회 측정하였다.

그 결과, 본시험용 조제물의 정밀성과 정확성은 각각 0.00-0.98%, 93.8-100.7%로, 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85-115%의 판정기준을 만족하였다(Attachment 3)

양성물질의 조제

MMC는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Lot No.: K52488352, Merck, Germany)에 10 및 5 µg/mL의 stock solution으로 조제하였고, B[a]P는 DMSO (Lot No.: K52488352, Merck, Germany)에 2,000 µg/mL의 stock solution으로 조제하여 초저온냉동고(-80--60°C, DuoFreez U700, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Republic of Korea)에 동결보관하였다.

처리방법	S9 mix	처리-회복시간(hr)	명칭	처리용량($\mu\text{g/mL}$)
단시간처리법	-	6-18	MMC	0.1
	+	6-18	B[a]P	20
연속처리법	-	24-0	MMC	0.05

2.5. 시험계

세포주명

Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line

선택이유

본 시험에 사용되는 세포주는 다양한 물질의 유전독성시험에 널리 사용되며, 염색체이상의 검출에 적합한 세포로 가이드라인에서 추천하기 때문에 선택하였다.

CHL/IU 세포의 특성

ATCC®CatalogNo.	CRL-1935
Lot No.	3375917
Modal chromosome number	25
동물	Cricetulus griseus (Hamster, Chinese)
장기	폐
형태	섬유아세포
생육특징	부착형
Doubling time	약 15시간

입수 및 보관

CHL/IU 세포는 2019년 1월 16일에 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 입수하여, 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, U.S.A.)을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)이 들어있는 75 cm²플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

CHL/IU 세포는 Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이코플라즈마 오염유무를 확인하고, 배양된 세포에 0.25% trypsin-EDTA 용액(Gibco, U.S.A.)을 배양플라스크에 가하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. 1×10⁶cells/mL가 되도록 FBS로 세포를 현탁한 후, DMSO의 최종농도가 10%가 되도록 DMSO를 첨가하여 혼합한 뒤, 동결보관용 튜브에 분주하였다. 초저온냉동고(-80--60°C)에서 1일간 보관한 후, 액체질소탱크로 옮겨 사용시까지 보관하였다.

계대배양

동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 해동하여, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어있는 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm²플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포가 배양플라스크 바닥면적의 70-80% 이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 세포를 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm²플라스크에 옮겨, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 23 이내인 세포를 사용하였다.

대수증식기의 세포에 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 배양플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10⁴cells/mL세포현탁액을 만든 후, 용량설정시험용은 6 well 플레이트(2 mL/well, Nunc, Denmark), 본시험용은 60 mm 플레이트(5 mL/plate, BD, U.S.A.) 및 6 well 플레이트(2 mL/well)에 분주하여 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 약 1일간 배양하였다. 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

2.6. 배지

EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액(Gibco, U.S.A.)을 100:1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장(2-8°C) 보관하였다.

2.7. S9 mix의 조제

입수, 보관 및 조제방법

구입한 S9 (Lot No.:4385, 4444, MOLTOX™,Inc.,U.S.A.)과 cofactor-I (Lot No.: 999002, 999101, ORIENTAL YEAST CO., LTD., Japan)은 유효기간 내에 사용하였다. S9은 냉동(-25-10°C)에 보관하고, cofactor-I은 냉장(2-8°C) 보관하였다.

조제시, S9은 주사용수(Lot No.: DKN20014, DKN21010, JW중외제약(주))를 가하여 현탁시키고, cofactor-I은 주사용수(Lot No.: DKN20014, DKN21010)에 용해한 뒤 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 사용하였다. S9과 cofactor-I은 1:9의 비율로 혼합하여 사용하였다.

S9의 특성

사용동물	Sprague-Dawley rat
------	--------------------

성별, 주령	수컷, 5-6주령
장기	간장
유도물질	Aroclor 1254
투여용량	500 mg/kg
투여경로	복강내투여

S9 mix의 조성

성분	각 성분의 함유량	
S9	0.1 mL	
Cofactor-I	MgCl ₂ ·6H ₂ O	8 µmol
	KCl	33 µmol
	Glucose-6-phosphate	5 µmol
	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)	4 µmol
	Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)	4 µmol
	Sodium phosphate buffer, pH 7.4	100 µmol
	주사용수	0.9 mL
총 액량	1 mL	

2.8. 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위하여 실시하였다.

용량

용량설정시험의 최고용량은 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/mL로 하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL로 총 9용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 1 well을 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량(mL)			분주량 (mL/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질	
단시간처리법	-	음성대조군	2.7	-	0.3	2
		시험물질군	2.7		0.3	2
	+	음성대조군	2.4	0.3	0.3	2
		시험물질군	2.4		0.3	2
연속처리법	-	음성대조군	2.7	-	0.3	2

	시험물질군	2.7		0.3	2
--	-------	-----	--	-----	---

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)으로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

시험물질 처리 후, 단시간처리법의 음성대조군 및 시험물질 최고용량군의 pH 및 삼투압을 측정하였다. 연속처리법은 단시간처리법의 대사활성화비존재하와 조성이 동일하기 때문에 측정하지 않았다. 시험물질 최고용량군의 pH가 음성대조군과 비교하여 1.0 이상 변화하지 않았고, 시험물질군에서 pH 변화도 관찰되지 않았기 때문에 최고용량군 이외의 시험물질군의 pH는 측정하지 않았다. 또한, 시험물질 최고용량의 삼투압이 음성대조군과 비교하여 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았기 때문에 최고용량군 이외의 시험물질군의 삼투압은 측정하지 않았다.

Relative Population Doubling (RPD)의 산출

용량설정시험의 전배양시, satellite대조군으로 세포독성 확인용 well 플레이트(1 well)를 제작하였다.

Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료시에 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하고 RPD를 산출하였다.

$$\text{RPD (\%)} = \frac{(\text{No. of population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

$$\text{Population doubling} = [\log (\text{Post-treatment cell number}/\text{Initial cell number})]/\log 2$$

추가 용량설정시험

용량설정시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 확인되었다. 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화존재하는 190 µg/mL이었고, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 용량설정시험의 가장 낮은 용량인 19.5 µg/mL까지 심각한 세포독성이 관찰되어 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출하지 못했다. 따라서 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출하기위해 추가 용량설정시험을 실시하였다.

추가 용량설정시험은 용량설정시험과 동일한 조건 및 방법으로 실시하였다.

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량은 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여 총 9용량(25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391 및 0.195 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정하였다.

본시험의 용량설정

용량설정시험 및 추가 용량설정시험의 결과, 모든 계열에서 50% 이상 세포증식을 억제하는 용량이 확인되었다. 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 각각 17.0, 190 및 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였다. 시험물질의 침전은 처리종료시 모든 계열의 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 관찰되었으나 세정 후 관찰되지 않았다.

따라서, 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 본시험의 최고용량으로 하여, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에 대하여 각각 17.0, 190 및 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 본시험의 최고용량으로 설정하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 4용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량($\mu\text{g}/\text{mL}$)
단시간처리법	-	17.0, 8.50, 4.25, 2.13
	+	190, 95.0, 47.5, 23.8
연속처리법	-	16.0, 8.00, 4.00, 2.00

2.9. 본시험

처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 총 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2매의 플레이트를 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량(mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질	
단시간처리법	-	음성대조군	12.6	-	1.4	5
		시험물질군	12.6		1.4	5
		양성대조군	13.86		0.14	5
	+	음성대조군	11.2	1.4	1.4	5
		시험물질군	11.2		1.4	5
		양성대조군	12.46		0.14	5
연속처리법	-	음성대조군	12.6	-	1.4	5
		시험물질군	12.6		1.4	5
		양성대조군	13.86		0.14	5

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, 플레이트를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액을 가하여 18시간 추가 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화 비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질 처리시, 처리종료시 및 배양종료시(colcemid 처리전)에 각 용량별로 관찰하였다.

용량설정시험시, pH 변화가 관찰되지 않았고 시험물질 최고용량군의 pH가 음성대조군과 비교하여 1.0 이상 변화하지 않았기 때문에 본시험에서는 pH를 측정하지 않았다. 또한, 시험물질 최고용량군의 삼투압이 음성대조군과 비교하여 50 mOsm/kg 이상 변화하지 않았기 때문에 본시험에서는 삼투압을 측정하지 않았다.

RPD의 산출

용량설정시험과 동일한 방법으로 실시하였으며, 각 용량당 1 well을 사용하였다.

Satellite대조군은 시험물질 처리시, 시험물질군은 배양종료시에 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하고 RPD를 산출하였다.

검체제작

각 계열의 모든 검체제작용 플레이트에 대하여 배양종료 2시간 전에 colcemid 용액(Gibco, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL가 되도록 첨가하여 세포분열을 중기에서 정지시켰다.

배양종료 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm으로 5분간 원심분리(FLETA 5, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Republic of Korea)하였다. 상등액을 버리고 37°C로 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액 5 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 그 후, 냉각고정액(methanol:acetic acid = 3:1) 1 mL를 첨가하고, 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 냉각고정액 5 mL를 첨가하고, 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 고정하였다. 이러한 고정작업을 1회 더 반복하였다. 소량의 냉각고정액에 세포를 부유시킨 후, 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 검체 슬라이드를 제작하였다.

건조 후, 슬라이드글라스에 코드번호를 기입하였다. 3% Giemsa 염색액으로 20분간 염색하고, 초순수로 세척 및 건조한 후, 봉입제(Entellan[®]new, Merck, Germany)로 봉입하였다.

2.10. 관찰

검체 슬라이드 관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다.

염색체 관찰 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량 이상을 설정하였다. 각 용량 당 300개의 분열중기상을 현미경(400배 배율, BX53, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

염색체이상은 구조이상, 수적이상 및 기타로 구분하였다.

구조이상에 대해서는 염색분체절단(chromatid break, ctb), 염색분체교환(chromatid exchange, cte), 염색체절단(chromosome break, csb), 염색체교환(chromosome exchange, cse), 염색분체갭 (chromatid gap, ctg), 염색체갭(chromosome gap, csg) 및 단편화(fragmentation, frg)를 관찰하였다. 1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화로 기록하였다. Gap은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로 정의하였다.

또한, 수적이상에 대해서는 배수체(polyploidy, pol) 및 핵내배화(endoreduplication, end)를 관찰하였다.

이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. Gap에 대해서는 gap이 관찰되는 세포를 포함 또는 미포함하는 이상세포를 구분하여 기록하였다.

기타(other)는 구조이상 및 수적이상에 포함되지 않는 이상으로 그 종류와 수를 기록하였다.

2.11. 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하였기 때문에 시험이 성립하였다.

음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, historical control data의 95% 범위 내에 있을 것

양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 있을 것

대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상을 300개 이상 관찰가능 할 것

시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3단계 이상일 것

2.12. 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

염색체이상을 가진 세포(gap 미포함)의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 한 용량 이상에서 통계학적으로 유의하게 증가하며, 증가에 따른 용량의존성이 있고, 음성대조군의 historical control data의 관리범위 이상으로 증가할 것.

2.13. 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계해석을 실시하였다.

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도(gap 미포함)에 대해서 Fisher's exact test를 실시하여 음성대조군과 시험물질군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차를 검증하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

용량설정시험

(Table 1)

본시험의 최고용량을 설정하기 위하여, 가이드라인에서 추천하는 5,000 µg/mL를 최고용량으로 하여 용량설정시험 및 추가 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 계열에서 50% 이상 세포증식을 억제하는 용량이 확인되었다. 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 각각 17.0, 190 및 15.6 µg/mL였다. 시험물질의 침전은 처리종료시 모든 계열의 5,000 µg/mL에서 관찰되었으나 세정 후 관찰되지 않았다.

따라서, 세포증식을 50% 이상(약 55%) 억제할 것으로 예상되는 용량을 본시험의 최고용량으로 하여, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에 대하여 각각 17.0, 190 및 16.0 µg/mL를 본시험의 최고용량으로 설정하였고, 이하 용량은 공비 2를 적용하여, 총 4용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량(µg/mL)
단시간처리법	-	17.0, 8.50, 4.25, 2.13
	+	190, 95.0, 47.5, 23.8
연속처리법	-	16.0, 8.00, 4.00, 2.00

본시험

(Table 2)

시험물질에 의한 세포독성 및 침전

시험물질에 의한 세포독성을 확인하기 위하여 측정된 RPD는 단시간처리법의 대사활성화 비존재하의 2.13, 4.25, 8.50 및 17.0 µg/mL에서 각각 94.7, 89.0, 91.4 및 67.1%, 존재하의 23.8, 47.5, 95.0 및 190 µg/mL에서 각각 90.6, 88.9, 72.8 및 59.1%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 2.00, 4.00, 8.00 및 16.0 µg/mL에서 각각 95.7, 100, 90.2 및 64.4%였다.

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화

비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

염색체이상 관찰대상 용량

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량에서 용량당 300개 이상의 분열중기상이 관찰 가능하며, 최고용량을 포함한 연속하는 3용량을 염색체이상 관찰대상 용량으로 설정하였다.

계열	S9 mix	염색체이상 관찰대상 용량($\mu\text{g/mL}$)
단시간처리법	-	17.0, 8.50, 4.25
	+	190, 95.0, 47.5
연속처리법	-	16.0, 8.00, 4.00

염색체이상 출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 시험물질군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

각 계열의 양성대조군에서는 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

시험의 성립

음성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data (Table 3)의 관리범위 및 95% 범위 내에 있으며, 양성대조군에서 염색체 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 historical control data의 관리범위 내에 있고, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 또한, 대조군 및 시험물질군의 한 용량당 분열중기상이 300개 이상 관찰되었으며, 시험물질군에서 판독 가능한 용량이 3용량 이상인 것으로부터, 해당 시험은 적절한 시험 조건 하에서 실시한 것이 확인되었다.

4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건 하에서 시험물질 자근복합추출물의 염색체이상 유발성은 음성으로 판단하였다.

TABLES

■ Table 1. Results of the Dose Range Finding Study and the Additional Dose Rang Finding Study.

1) Dose range finding study.

Dose (µg/mL)	Relative Population Doubling (RPD, %)		
	-S9 (6-18 hr)	+S9 (6-18 hr)	-S9 (24-0 hr)
0	100	100	100
19.5	15.6	92.0	-43.3
39.1	-42.5	101	N/C
78.1	N/C	68.5	N/C
156	N/C	64.8	-237
313	N/C	-25.9	-171
625	N/C	-231	N/C
1,250	N/C	N/C	N/C
2,500	N/C	N/C	N/C
5,000 †	N/C	N/C	N/C

2) Additional dose range finding study.

Dose (µg/mL)	Relative Population Doubling (RPD, %)	
	-S9 (6-18 hr)	-S9 (24-0 hr)
0	100	100
0.195	91.7	97.5
0.391	88.6	81.9
0.781	94.3	90.3
1.56	85.8	93.0
3.13	95.4	92.6
6.25	77.6	74.4
12.5	64.8	72.1
25.0	21.4	12.5
50.0	-57.7	-75.3

N/C: RPD was not calculated because of cytotoxicity.

Cytotoxicity (%) = 100 – RPD.

The methods used to calculate cytotoxicity from cell numbers counted at 24 hours after treatment, that is, RPD.

†: precipitation.

■ Table 2. Results of In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Study (Main Study).

System	Dose (µg/mL)	RPD (%)	Nb. of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations										Number of cells with numerical aberrations			Others ^{a)}				
				ctb	csb	cte	cse	fig	ctg	csg	-gap	total (%)	+gap	total (%)	end	pol		total (%)			
-S9 (6-18 hr)	0	100	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	0	0.333	0	1	1	0.333	0
			150	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.333	0	0	0	0	0
	2.13	94.7	notobserved																		
	4.25	89.0	150	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.333	1	1.00	0	2	2	0.667	0	
			150	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0.333	2	1.00	0	0	0	0.667	0	
	8.50	91.4	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0.667	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.667	0	
	17.0	67.1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.667	0	1.00	0	0	0	0.667	0	
			150	1	0	0	1	0	1	0	2	0	3	0.667	0	1.00	0	2	2	0.667	0
	0.1 (MMC)	70.9	150	3	0	17	1	0	0	0	18	0	13.7*	18	13.7	0	0	0	0.333	0	
150			6	0	18	0	0	0	0	23	0	13.7*	23	13.7	0	1	1	0.333	0		
+S9 (6-18 hr)	0	100	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.333	1	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	0
	23.8	90.6	notobserved																		
	47.5	88.9	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.333	0	0	0	0	0
	96.0	72.8	150	0	0	0	1	0	0	0	1	0.333	1	0.333	0	0	0	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	0	0.333	0	0	0	0	0	0
	190	59.1	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.000	0	1	1	0.667	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0	0.000	0	1	1	0.667	0	
	20 (B[a]P)	71.3	150	9	0	32	1	0	0	0	33	23.0*	33	23.3	0	0	0	0	0	0	
150			4	2	35	1	0	1	0	38	23.0*	37	23.3	0	0	0	0	0	0		
-S9 (24-0 hr)	0	100	150	0	0	1	0	0	0	0	1	1.00	1	1.00	0	0	0	0	0	1	
			150	1	0	0	1	0	0	0	2	1.00	2	1.00	0	0	0	0	0	0	
	2.00	96.7	notobserved																		
	4.00	100	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.333	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	1
	8.00	90.2	150	0	0	0	1	0	0	0	1	0.667	1	0.667	0	0	0	0	0	0	
			150	0	0	0	1	0	0	0	1	0.667	1	0.667	0	0	0	0	0	0	
	16.0	64.4	150	0	0	1	0	0	0	0	1	0.333	1	0.333	0	0	0	0	0	0	
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	0	0.333	0	0	0	0	0	0	
	0.05 (MMC)	79.1	150	6	0	33	1	1	0	0	38	24.0*	36	24.3	0	0	0	0	0	0	
150			5	0	33	0	0	1	0	36	24.0*	37	24.3	0	0	0	0	0	0		

Aberration; ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy.

gap-: total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: total number of cells with structural aberrations including gap.

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

MMC: mitomycin C, B[a]P: benzo[a]pyrene, RPD: relative population doubling.

Significant difference from negative control by Fisher's exact test: * p<0.01.

■ Table 3. Historical Control Data.

Historical control values of structural aberrations				
System		-S9 (6-18 hr)	+S9 (6-18 hr)	-S9 (24-0 hr)
N		44	44	44
Structural aberration cells excluding gap (%) (Mean±S.D.)		0.477 ± 0.468	0.659 ± 0.936	0.871 ± 0.994
Negative	Range (%) MIN	0	0	0
	MAX	1.55	2.23	2.29
Poisson-based 95% control limit [structural aberration cells/300 cells]		<4	<5	<5
Positive control (µg/mL)		MMC (0.1)	B[a]P (20.0)	MMC (0.05)
N		44	44	44
Structural aberration cells excluding gap (%) (Mean±S.D.)		13.58 ± 2.842	14.51 ± 3.325	31.47 ± 13.137
Positive	Range (%) MIN	5.37	5.48	16.6
	MAX	21.8	23.5	46.3

Historical control values of numerical aberrations				
System		-S9 (6-18 hr)	+S9 (6-18 hr)	-S9 (24-0 hr)
N		44	44	44
Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)		0.250 ± 0.270	0.242 ± 0.300	0.288 ± 0.284
Negative	Range (%) MIN	0	0	0
	MAX	1.03	1.19	1.01
Poisson-based 95% control limit [numerical aberration cells/300 cells]		<2	<2	<3

S.D.: standard deviation.

Negative control: water for injection, normal saline injection, dimethyl sulfoxide, acetone, tetrahydrofuran, etc.

MMC: mitomycin C, B[a]P: benzo[a]pyrene.

N: The total number of chromosome aberration test.

The above historical control values were obtained from the data pooled from May 2, 2019 to Apr. 23, 2021.

The range was calculated by the control limit of X derived from $\bar{X}-R-R_s$ value.

최종보고서

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

시험 번호 : DTN210197

시험의뢰자: (주)다정

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

GLP 적합진술서

시험제목 자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험
 및 4주 회복시험
시험번호 DTN210197

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호 (2018년 11월 21일)

시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

운영책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

날짜

신뢰성보증확인서

시험제목	자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험
시험번호	DTN210197

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation, 시험계획서 및 (주)디티앤씨알오 표준작업지침서에 따라서 신뢰성보증부서에서 점검을 실시하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2018-93호(2018년 11월 21일)

모든 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다.

「시험위주의 점검」

시험계획서	2021년 6월 30일	2021년 6월 30일	2021년 6월 30일
시험계획서의 변경(1)	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일	2022년 1월 5일
시험물질의 조제	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일
체중측정	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일
투여	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일
일반증상관찰	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일
사료섭취량측정	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일	2021년 7월 22일
시험물질의 조제	2021년 9월 16일	2021년 9월 16일	2021년 9월 17일
체중측정	2021년 9월 16일	2021년 9월 16일	2021년 9월 17일
투여	2021년 9월 16일	2021년 9월 16일	2021년 9월 17일
일반증상관찰	2021년 9월 16일	2021년 9월 16일	2021년 9월 17일
사료섭취량측정	2021년 9월 16일	2021년 9월 16일	2021년 9월 17일
안과학적검사	2021년 10월 14일	2021년 10월 14일	2021년 10월 14일
요검사	2021년 10월 19일	2021년 10월 19일	2021년 10월 19일
부검	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일
혈액학적검사	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일
혈액생화학적검사	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일
체중측정	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일
일반증상관찰	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일
사료섭취량측정	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일	2021년 11월 11일
병리조직학적검사	2022년 1월 17일	2022년 1월 18일	2022년 1월 17일
시험기초자료의 기록	2022년 2월 21일	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일
	-2022년 2월 24일		
최종보고서(안)	2022년 2월 21일	2022년 2월 24일	2022년 2월 24일
	-2022년 2월 24일		
최종보고서	2022년 3월 3일	2022년 3월 3일	2022년 3월 3일

「수행절차의 점검」

점검단계	점검일	시험책임자 보고일	운영책임자 보고일
검역 및 순화	2021년 7월 12일	2021년 7월 13일	2021년 7월 12일
균분리	2021년 7월 12일	2021년 7월 13일	2021년 7월 12일
채혈	2021년 10월 5일	2021년 10월 5일	2021년 10월 5일
채뇨	2021년 10월 6일	2021년 10월 6일	2021년 10월 6일
병리조직검체제작(삭정)	2021년 10월 12일	2021년 10월 12일	2021년 10월 12일
병리조직검체제작(포매)	2021년 10월 18일	2021년 10월 18일	2021년 10월 18일
병리조직검체제작(박절)	2021년 10월 19일	2021년 10월 19일	2021년 10월 19일
병리조직검체제작(염색)	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일	2021년 10월 21일

이 최종보고서는 (주)디티앤씨알오 비임상센터 신뢰성보증부서에서 시험의 모든 과정과 결과를 점검하였으며 시험기초자료를 정확히 반영하였음을 보증한다.

신뢰성보증업무담당자 _____

(주) 디 티 앤 씨 알 오
비임상센터

날짜 _____

GLP 적합진술서

신뢰성보증확인서

요약 8

1. 시험실시의 개요

- 1.1. 시험제목
- 1.2. 시험목적
- 1.3. 시험의뢰자
- 1.4. 시험의뢰자 모니터
- 1.5. 시험기관
- 1.6. 시험책임자
- 1.7. 담당자
- 1.8. 시험일정
- 1.9. Good Laboratory Practice Regulations
- 1.10. 시험기준
- 1.11. 동물윤리
- 1.12. 기록 및 자료의 보관

2. 시험재료 및 방법

- 2.1. 시험물질
- 2.2. 대조물질
- 2.3. 시험계
- 2.4. 사육조건
- 2.5. 군구성 및 투여
- 2.6. 관찰 및 검사
- 2.7. 자료의 통계처리

3. 결과 및 고찰

- 3.1. 일반증상
- 3.2. 체중변화
- 3.3. 사료섭취량
- 3.4. 안과학적 검사
- 3.5. 요검사
- 3.6. 혈액학적 검사
- 3.7. 혈액생화학적 검사
- 3.8. 장기중량
- 3.9. 부검

3.10. 병리조직학적 검사	
4. 결론	
5. 참고문헌	

FIGURES	
Figure 1. Body Weights of Male SD Rats	
Figure 2. Body Weights of Female SD Rats	

TABLES	
Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period	
Table 1-2. Summary of Clinical Signs during Recovery Period	
Table 2-1. Summary of Body Weights during Dosing Period	
Table 2-2. Summary of Body Weights during Recovery Period	
Table 3-1. Summary of Food Consumption during Dosing Period	
Table 3-2. Summary of Food Consumption during Recovery Period	
Table 4-1. Summary of Ophthalmological Examination of Main Group	
Table 4-2. Summary of Ophthalmological Examination of Recovery Group	
Table 5-1. Summary of Urinalysis of Main Group	
Table 5-2. Summary of Urinalysis of Recovery Group	
Table 6-1. Summary of Hematology of Main Group	
Table 6-2. Summary of Hematology of Recovery Group	
Table 7-1. Summary of Blood Chemistry of Main Group	
Table 7-2. Summary of Blood Chemistry of Recovery Group	
Table 8-1. Summary of Absolute Organ Weights of Main Group	
Table 8-2. Summary of Absolute Organ Weights of Recovery Group	
Table 9-1. Summary of Relative Organ Weights of Main Group	
Table 9-2. Summary of Relative Organ Weights of Recovery Group	
Table 10-1. Summary of Necropsy Findings of Main Group	
Table 10-2. Summary of Necropsy Findings of Recovery Group	
Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group	
Table 11-2. Summary of Histopathological Findings of Recovery Group	

요약

본 시험은 시험물질인 자근복합추출물을 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복기간을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

군구성은 자근복합추출물 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 3개 용량과 대조군 (주사용수)으로 구성하였고, 군당 암수 각 10마리에 13주간 반복 경구투여하였다. 또한, 대조군 및 1,000 mg/kg/day 투여군에는 회복군으로 암수 각 5마리를 추가하여 독성의 가역성을 평가하기 위해 13주간 경구투여 후 4주간의 회복기간을 두었다.

관찰기간 동안, 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 요검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검 및 병리조직학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

일반증상 관찰 결과, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 후 유연(salivation)이 산발적으로 관찰되었다.

체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사 결과, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성변화는 관찰되지 않았다.

장기중량 측정 결과, 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대 및 상대중량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었다.

부검 결과, 수컷 250 mg/kg/day 투여군, 암수 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 전위(forestomach)의 비후(thickening)가 관찰되었다.

병리조직학적 검사 결과, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 위에서 전위과다각화증 (hyperkeratosis, forestomach), 점막세포과다형성(hyperplasia, mucous) 및 전위편평세포과다형성 (hyperplasia, squamous cell, forestomach)이 관찰되었고, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 신장에서 세관변성(degeneration, tubule), 세관단일세포괴사(necrosis, single cell, tubule), 세포질변이(alteration, cytoplasmic), 유리방울축적(accumulation, hyaline droplet) 또는 보우만주머니과다형성(hyperplasia, Bowman's capsule)이 관찰되었으며, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군의 간에서 단핵구침윤(infiltrate, mononuclear cell) 또는 혈관주위단핵구침윤 (infiltrate, mononuclear cell, perivascular), 수컷 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 세포질변이 (alteration, cytoplasmic) 및 단일세포괴사(Necrosis, single cell), 암컷 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 쓸개관과다형성(hyperplasia, bile duct)이 관찰되었다. 상기의 변화들은 대부분 회복되었거나, 회복 경향이 관찰되어 독성학적 의미는 없었으나, 위에서 관찰된 소견은 회복기간 종료 후에도 여전히 관찰되어 독성변화로 판단하였다. 이상의 결과로부터 본 시험 조건하에서 자근복합추출물을 암수 랫드에 13주간 반복 경구투여 한 결과, 암수 모든 시험물질 투여군에서 전위의 변화가 관찰되어 무독성량(NOAEL)은 산출할 수 없었다. 다만, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위로 사람에

외삽(extrapolation)하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단되며, 전위의 변화를 제외한 NOAEL은 암수 모두 1,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단된다.

1. 시험실시의 개요

1.1 시험제목

자근복합추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

1.2. 시험목적

시험물질인 자근복합추출물을 암수 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구투여 하였을 때 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위해 수행하였다.

1.3. 시험의뢰자

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

1.4. 시험의뢰자 모니터

(주)다정

우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371

TEL:

E-mail:

1.5. 시험기관

(주)디티앤씨알오

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

1.6. 시험책임자

(주)디티앤씨알오 비임상센터

우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동)

우17042 경기도 용인시 처인구 백령로20번길 28, 나동 4층(유방동)

TEL:

E-mail:

1.7. 담당자

시험물질관리책임자

검역책임자

병리책임자

주요 시험담당자

참여 시험담당자

신뢰성보증업무담당자

1.8. 시험일정

시험개시일	2021년 6월 29일
실험개시일(동물입수일)	2021년 7월 15일
군분리일	2021년 7월 21일(수컷) 2021년 7월 22일(암컷)
투여기간	2021년 7월 22일-10월 20일(수컷) 2021년 7월 23일-10월 21일(암컷)
부검일	2021년 10월 21일-10월 22일(주시험군) 2021년 11월 18일-11월 19일(회복군)
실험종료일	2022년 2월 14일
시험종료일	2022년 3월 3일

1.9. Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulation을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2018-93호(2018년 11월 21일)

1.10. 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2017-71호(2017년 8월 30일)

1.11. 동물윤리

본 시험은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: 210194)을 받았으며, 동물보호법(일부개정 2020년 2월 11일, 법률 제16977호) 및 실험동물에 관한 법률(일부개정 2018년 12월 11일, 법률 제15944호)의 동물윤리에 따라 실험을 수행하였다.

1.12. 기록 및 자료의 보관

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 시험기관에서 생성된 모든 기록문서, 시험기초자료, 검체 및 최종보고서는 품목허가일로부터 3년간(“비임상시험관리기준”, 식품의약품안전처 고시 제2018-93호) 보관한다. 단, 보관개시일로부터 5년간은 (주)디티앤씨알오 비임상센터 자료보관실(우17042 경기도 용인시 처인구 유림로154번길 46, 나동 비임상센터(유방동))에서 보관하며, 그 이후는 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

2. 시험재료 및 방법

2.1. 시험물질

명칭	자근복합추출물(Lithospermi Radix complex extract)
제조번호(Batch/Lot No.)	21001
성상	고유의 향미가 있고, 이미, 이취가 없는 탁한 갈색의 유동성이 있는 액상
친화성	Hydrophobic
보관조건	실온(1-30°C)
제조일	2021년 3월 9일
유효기간	2023년 3월 8일
취급시 주의사항	사용시 충분히 흔들어서 사용
제공자	(주)다정 우27819 충청북도 진천군 이월면 장수로 371
잔여시험물질의 처리	반환

2.2. 대조물질

명칭	주사용수
Lot No.	DKN21002, DKN20015
보관조건	실온

시험물질 조제물의 조제방법

시험물질은 시험의뢰자가 제공한 원액 그대로 사용하였으며, 비중 1.1034를 적용하여 투여액량을 산출하였다.

2.3. 시험계

종 및 계통

랫드, Sprague-Dawley (NTacSam:SD), SPF

생산자 및 공급자

Samtako Inc., Republic of Korea

선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는데 널리 사용되고 있으며, 비교할 수 있는 시험기초자료가 풍부하여 선택하였다.

성별, 동물 수, 주령 및 체중

기간	성별	동물 수	주령	체중범위(g)
입수 시	수컷	56	5	117.3-142.7
	암컷	56	5	96.7-124.9
투여 시	수컷	50	6	170.5-206.5
	암컷	50	6	138.4-156.4

검역 및 순화

입수 시 동물의 수를 확인하고, 일반증상 관찰 및 체중측정을 실시하였으며, 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관하였다. 모든 동물에 대하여 검역 및 순화기간 동안 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

개체 및 사육상자 식별

검역 및 순화기간 중에는 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중의 개체식별카드를 부착하였다. 실험기간 중에는 동물의 꼬리에 균표시는 적색 유성펜, 개체번호는 청색 유성펜을 이용하여 표시를 하고, 사육상자에는 실험기간 중의 개체식별카드를 부착하였다.

최종검역

검역 및 순화기간 종료일(최종검역일)에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화(Appendix 12)를 확인하여 모든 동물의 건강상태에 이상이 없음을 확인하였다.

군분리

최종검역 후, 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포되도록 주시험군은 암수 각 4군, 군당 암수 각 10마리로 군분리하고, 대조군 및 고용량군에 암수 각 5마리의 회복군을 추가하였다.

잔여동물 처리

군분리 후 잔여동물은 본시험에서 제외시키고, 해당 SOP에 따라 처리하였다.

2.4. 사육조건

사육환경

동물실 번호	A501
사육상자 정보	스테인리스 철망사육상자, 260W×350L×210H (mm)
사육상자당 마리수	검역 및 순화기간 3마리 이하/사육상자 투여 및 관찰기간 1마리/사육상자
온도	19-25°C
상대습도	30-70%
환기횟수	10-15회/hr
조명주기	12시간(오전 7시 점등-오후 7시 소등)
조도	150-300 Lux
사육기자재 관리	사육상자 및 급이기는 1회/2주 교환하였다. 사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

사료

실험동물용 고품 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C, Lot No.: 2918C-030121MA, 2918C-052521MA, 2918C-062421MA, Envigo RMS, Inc., U.S.A.)를 급이기에 넣어 자유섭취 시켰다. 사료의 분석은 제조업체로부터 성적서를 받아 확인한 결과, 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

음수

경기도 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유섭취 시켰다. 음수의 분석은 경기도 보건환경연구원(경기도 수원시 권선구 칠보로 1번길 62)에 의뢰하여 “먹는 물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙(환경부령 제833호 2019년 12월 20일 타법개정)”의 전

항목에 대하여 1회/년 실시하고, 미생물 검사는 2회/년 실시한 결과, 분석결과가 본사에서 정한 허용기준에 적합하였다.

2.5. 군구성 및 투여

군구성

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	0.91	10 (1101-1110) +5* (1111-1115)	10 (2101-2110) +5* (2111-2115)
G2 저용량군	250	0.23	10 (1201-1210)	10 (2201-2210)
G3 중용량군	500	0.45	10 (1301-1310)	10 (2301-2310)
G4 고용량군	1,000	0.91	10 (1401-1410) +5* (1411-1415)	10 (2401-2410) +5* (2411-2415)

*: 회복군.

투여

투여용량 설정

4주 반복 경구투여 용량결정시험(DT&CRO Study No.: DTN210196) 결과, 2,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 1마리가 사망하였고, 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 일반증상의 이상(자발운동의 저하 및 불규칙 호흡)이 관찰되었으며, 수컷 1,000 mg/kg/day 및 암수 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량 증가와 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 위의 전위의 비후 소견이 관찰되었다. 본 시험의 투여용량은 시험의뢰자와 협의에 따라, 1,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2를 적용하여 500 및 250 mg/kg/day를 각각 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 고용량군과 동일한 액량의 대조물질을 투여하였다.

투여경로 및 선택이유

시험물질의 임상적용 예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

투여방법

투여액량은 저용량군은 0.23 mL/kg, 중용량군은 0.45 mL/kg, 대조군 및 고용량군은 0.91 mL/kg으로 하고, 개체별 투여액량은 최근의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 13주간 1일 1회 위 내에 강제 경구투여하였다.

2.6. 관찰 및 검사

일반증상 관찰

투여기간(13주) 및 회복기간(4주) 동안, 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다.

체중측정

투여개시일(투여 전), 투여기간 및 회복기간 중 주 1회 체중을 측정하였다. 또한, 상대장기중량을 구하기 위해 부검일의 절식체중을 측정하였으며, 이는 평가에서 제외하였다.

사료섭취량 측정

투여개시 전에는 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하고, 투여기간 및 회복기간에는 7일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다. 부검일이 포함된 투여 13주 및 회복 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

안과학적 검사

주시험군은 군당 암수 각 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군은 모든 동물에 대하여 회복 4주에 안과학적 검사를 실시하였다. 검사 시, 먼저 육안으로 동공대광반사 및 전안부를 관찰하고, 산동제(이속토 아트로핀 1% 점안제, Lot No.: 20I03AB, 한국알콘, Republic of Korea) 점안 후에 검안경(ALL PUPIL II, Keeler, U.K.)으로 전안부, 중간투광체, 안저에 대하여 관찰하였다.

임상병리

요검사

주시험군은 군당 암수 각 5마리에 대하여 투여 13주에, 회복군은 모든 동물에 대하여 회복 4주에 요검사를 실시하였다. 신선뇨(약 3시간 채집뇨) 및 축뇨(약 24시간 채집뇨)를 채취하여 아래 항목들을 검사하였다. 요침사는 채집뇨를 원심분리(1,500 rpm, 10분)한 후 검경하였다. 신선뇨 채취 중에는 사료급여를 실시하지 않고, 음수는 자유섭취 시켰다.

종류	항목	방법	단위
신선뇨	pH	MEDITAPE® UC-10S (Sysmex, Japan) 및 요화학 분석기 (UC-1000, Sysmex, Japan)	-
	단백(Protein, PRO)		mg/dL
	당(Glucose, GLU)		mg/dL
	케톤(Ketone, KET)		mg/dL
	빌리루빈(Bilirubin, BIL)		mg/dL
	잠혈(Blood, BLD)		c/μL
색상 및 투명도(Color and turbidity)	육안		-
	요침사(Sediment)	현미경 검경(400배, 20시야 관찰)	-
축뇨	요량(Volume)	메스실린더	mL
	요비중(Specific gravity)	요 비중계 (MASTER-URC/JM, ATAGO,	-

채혈

모든 동물에 대하여 부검 전 하룻밤 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하고, 용도별로 아래와 같이 처리하였다.

항목	혈액량	튜브
혈액학적 검사	0.5 mL 이상	K ₂ -EDTACBCtube
응고검사	약 2 mL	3.2% Sodium citrate tube
혈액생화학적 검사	1 mL 이상	Clot activator vacutainer tube

혈액학적 검사

혈액학적 검사는 혈구분석기(XN-1000, Sysmex, Japan)로 아래의 항목을 측정하였다.

항목	단위
총적혈구수(Total red blood cell count, RBC)	$\times 10^6/\mu\text{L}$
혈색소량(Hemoglobin, HGB)	g/dL
헤마토크리치(Hematocrit, HCT)	%
평균적혈구용적(Mean corpuscular volume, MCV)	fL
평균적혈구헤모글로빈량(Mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg
평균적혈구헤모글로빈농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL
망상적혈구(Reticulocytes, RET)	%
총백혈구수(Total white blood cell count, WBC)	$\times 10^3/\mu\text{L}$

항목	단위	
백혈구백분율(WBC differential)		
- 호중구(Neutrophil, NEU)	%	
- 림프구(Lymphocyte, LYM)	%	
- 단핵구(Monocyte, MONO)	%	
- 호산구(Eosinophil, EOS)	%	
- 호염구(Basophil, BASO)	%	혈액
혈소판수(Platelet, PLT)	$\times 10^3/\mu\text{L}$	

응고검사는 채취한 혈액 약 2 mL를 3.2% Sodium citrate 함유 tube에 넣고, 원심분리(3,000 rpm, 10분)한 후 혈장을 분리하여 혈액 응고 분석기(CA 600, Sysmex, Japan)로 아래의 항목을 측정하였다.

항목	단위
프로트롬빈시간(Prothrombin time, PT)	sec
부분활성트롬보플라스틴시간(Activated partial thromboplastin time, APTT)	sec

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 혈액을 상온에서 0.5-1시간 동안 응고시키고, 원심분리(3,000 rpm, 10분)한 후 혈청을 분리하여 혈액생화학 분석기(HITACHI 7180, HITACHI, Japan)로 아래의 항목을 측정하였다.

항목	단위
아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase, AST)	U/L
알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase, ALT)	U/L
알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)	U/L
감마글루타밀전이효소(γ -glutamyltranspeptidase, GGT)	U/L
총빌리루빈(Total bilirubin, T-BIL)	mg/dL
혈당(Glucose, GLU)	mg/dL
혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL
크레아티닌(Creatinine, CREA)	mg/dL
총콜레스테롤(Total cholesterol, T-CHO)	mg/dL
총단백(Total protein, TP)	g/dL
알부민(Albumin, ALB)	g/dL
트리글리세라이드(Triglyceride, TG)	mg/dL
알부민/글로불린 비(Albumin/globulin ratio, A/G ratio)	-
칼슘(Calcium, Ca)	mg/dL
인(Inorganic phosphorus, IP)	mg/dL
나트륨(Sodium, Na)	mmol/L
칼륨(Potassium, K)	mmol/L
염소(Chloride, Cl)	mmol/L

부검

모든 동물에 대하여 주시험군은 투여 92일에, 회복군은 120일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥에서 방혈치사 시킨 후, 전신의 장기 및 조직에 대한 검사를 실시하였다.

장기중량 측정

부검을 실시한 모든 동물은 다음 장기의 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량(%)을 산출하였다.

뇌(Brain)	뇌하수체(Pituitary gland)
심장(Heart)	비장(Spleen)
폐 및 기관지(Lung with bronchi)	부신*(Adrenal gland)
신장*(Kidney)	고환*(Testis)
전립샘(Prostate)	난소*(Ovary)
자궁(Uterus)	간(Liver)

*: 양측성 장기는 좌우를 합하여 무게 측정.

병리조직

조직 및 장기의 보존

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기를 적출하여 10% 중성완충포르말린용액에 고정하였다. 단, 고환, 안구 및 시신경은 Davidson's 용액에 고정한 후, 10% 중성완충포르말린 용액에 고정하였다.

뇌 Brain	뇌하수체 Pituitary gland
척수(흉수) Spinal cord (thoracic)	심장 Heart
비장 Spleen	기관 Trachea
폐 및 기관지 Lung with bronchi	갑상샘 및 부갑상샘* Thyroid gland with parathyroid gland
가슴샘 Thymus	부신 Adrenal gland
신장 Kidney	방광 Urinary bladder
고환 Testis	부고환 Epididymis
전립샘 Prostate	정낭 Seminal vesicle
난소 Ovary	자궁 Uterus
질 Vagina	간 Liver
식도 Esophagus	위 Stomach
십이지장 Duodenum	공장 Jejunum
회장 Ileum	맹장 Cecum
결장 Colon	직장 Rectum
췌장 Pancreas	장간막림프절 Mesenteric lymph node
악하림프절 Submandibular lymph node	침샘(악하샘, 설하샘, 이하샘) Salivary gland (submandibular, sublingual and parotid gland)
안구 및 시신경* Eye with optic nerve	하더리안샘 Harderian gland
대퇴골 및 골수 Femur with bone marrow	흉골 및 골수 Sternum with bone marrow
혀 Tongue	젖샘 및 피부(서혜부) Mammary gland with adjacent skin (inguinal)

*: 해당 장기·조직은 슬라이드에 존재할 때만 검경을 실시함.

병리조직학적 검사

고정한 장기·조직은 조직병리 검체제작 SOP에 준하여 검체를 제작하고, 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

조직병리학적 검사는 아래의 장기·조직에 대하여 검경하였다.

- 대조군 및 고용량군의 모든 개체의 장기·조직
- 저용량군과 중용량군의 육안소견이 관찰된 장기·조직
- 고용량군에서 시험물질에 의한 영향으로 사료되는 변화가 관찰된 경우, 저용량군 및 중용량군의 해당 장기·조직: 신장, 위 및 간

2.7. 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 요량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 통계처리를 실시하였다.

투여기간 및 주시험군의 측정치는 Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산이 인정되면, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면, Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성(유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

회복기간 및 회복군의 측정치는 Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우 Student's t-test를 실시하고, 등분산이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하여 유의성을 확인하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1. 일반증상

(Table 1-1, 1-2, Appendix 1-1, 1-2)

암수 대조군, 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

투여기간 동안, 투여 후 유연(salivation)이 250 mg/kg/day 투여군의 수컷 1-4마리에서 투여 30-90일, 암컷 1-2마리에서 투여 30-77일, 500 mg/kg/day 투여군의 수컷 1-7마리에서 투여 9-91일, 암컷 1-6마리에서 투여 8-90일, 1,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 2-13마리에서 투여 5-91일, 암컷 1-12마리에서 투여 4-91일에 산발적으로 관찰되었다. 이는 투여 후에 일시적으로 관찰된 후 회복되었고, 다른 연관된 항목에서 시험물질 투여에 기인한 독성 변화가 인정되지 않아 시험물질의 물리화학적 자극에 의한 변화로 독성학적 의미는 없는 것으로 판단하였다.

회복기간 동안, 암수 대조군 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

3.2. 체중변화

(Figure 1, 2, Table 2-1, 2-2, Appendix 2-1, 2-2)

투여기간 동안, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

회복기간 동안, 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

3.3. 사료섭취량

(Table 3-1, 3-2, Appendix 3-1, 3-2)

투여기간 동안, 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

회복기간 동안, 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 변화는 일시적으로 관찰된 경미한 변동으로 체중변화가 인정되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

3.4. 안과학적 검사

(Table 4-1, 4-2, Appendix 4-1, 4-2)

주시험군의 암수 대조군, 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

회복군의 암수 대조군 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

3.5. 요검사

(Table 5-1, 5-2, Appendix 5-1, 5-2)

주시험군의 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

회복군의 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 검출 및 빈도의 감소/증가 경향이 관찰된 항목 모두 경미한 변동으로서 우발적 분포이거나, 용량상관성이 없으며, 연관된 항목의 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

3.6. 혈액학적 검사

(Table 6-1, 6-2, Appendix 6-1, 6-2)

주시험군의 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든

검사항목에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

회복군의 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 검사항목에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

3.7. 혈액생화학적 검사

(Table 7-1, 7-2, Appendix 7-1, 7-2)

주시험군의 암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로 연관된 항목에서의 변화가 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

회복군의 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 검사항목에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

3.8. 장기중량

(Table 8-1, 8-2, 9-1, 9-2, Appendix 8-1, 8-2, 9-1, 9-2)

주시험군의 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 절대 및 상대중량의 증가 또는 증가경향이 관찰되었다(Text Table 1). 이는 병리조직학적 검사에서 관찰된 간의 형태학적 변화와 연관된 시험물질에 의한 영향으로 판단되나, 병리조직학적 검사에서 독성변화가 인정되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

Text Table 1. Changes in Organ Weights (Group Means±S.D.)

Group / Dose (mg/kg/day)	G1 0	G2 250	G3 500	G4 1,000
Sex	Male			
Liver				
Absolute (g)	12.81±1.87	13.36±1.71	13.82±1.91	15.36±2.66
Relative B.W.) (%)	2.70±0.20	2.85±0.22	2.99±0.30	3.27±0.48**
Sex	Female			
Liver				
Absolute (g)	6.35±0.36	6.13±0.38	6.14±0.53	7.01±0.62*
Relative B.W.) (%)	2.43±0.10	2.38±0.11	2.44±0.14	2.64±0.15**

Significantly different from control group: * p<0.05, ** p<0.01.

그 외, 통계학적 유의성이 관찰된 항목은 경미한 변동으로 연관된 항목에서의 변화가 관찰되지 않았으며, 병리조직학적 검사에서 형태학적 변화를 동반하지 않아 독성학적 의미는 없었다. 회복군의 암수 1,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든 측정장기에서 통계학적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

3.9. 부검

(Table 10-1, 10-2, Appendix 10-1, 10-2, Attachment 4)

주시험군에서 전위(forestomach)의 비후(thickening)가 250 mg/kg/day 투여군의 수컷 3마리, 500 mg/kg/day 투여군의 수컷 9마리 및 암컷 7마리, 1,000 mg/kg/day 투여군의 수컷 9마리 및 암컷 10마리에서 관찰되었다(Text Table 2). 해당 소견들은 병리조직학적 검사에서 그에 상응하는 형태학적 변화가 관찰되었으며, 시험물질 투여로 인한 위 내 반복적인 국소자극에 의한 변화로 판단된다. 그러나, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위로 관련된 항목에서의 변화가 관찰되지 않아 사람에게 외삽(extrapolation)하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단된다^{1, 2)}.

Text Table 2. Remarkable Macroscopic Findings

Group / Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4
Sex: Male		0	250	500	1,000
Organ	Findings Number Examined	10	10	10	10
Stomach	Thickening, forestomach	0	3	9	9
Sex: Female		10	10	10	10
Organ	Findings Number Examined	10	10	10	10
Stomach	Thickening, forestomach	0	0	7	10

회복군의 암수 대조군 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

3.10. 병리조직학적 검사

(Table 11-1, 11-2, Appendix 11-1, 11-2, Attachment 4)

시험물질 투여와 관련된 병리조직학적 변화는 신장, 위 및 간에서 관찰되었다.

[신장]

암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 세관변성(degeneration, tubule), 세관단일세포괴사 (necrosis, single cell, tubule), 세포질변이(alteration, cytoplasmic), 유리방울축적(accumulation, hyaline droplet) 또는 보우만주머니과다형성(hyperplasia, Bowman's capsule)이 관찰되었다(Text Table 3). 해당 소견들은 대조군과 비교하여 시험물질 투여군에서 발생빈도(incidence) 또는 정도(severity)가 용량상관성 있게 증가하여 시험물질에 의한 영향으로 판단되며, 유리방울축적 및 보우만주머니과다형성은 세포질변이,

세관단일세포괴사 및 세관변성으로 인해 발생한 이차적인 변화로 판단된다^{3, 4)}. 그러나, 해당 소견들은 회복기간 종료 후 대부분 회복되었거나, 회복경향이 관찰되어 독성학적 의미는 없었다.

Text Table 3. Incidence and Severity of Remarkable Microscopic Findings of Kidney

Number examined	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5
Kidney												
Degeneration, tubule												
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	3	4	0	0
Mild	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Total number affected	0	0	0	1	0	2	0	1	3	4	0	0
Necrosis, single cell, tubule												
Minimal	0	1	3	5	0	1	0	0	0	0	0	0
Mild	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
Total number affected	1	1	3	7	1	2	0	0	0	0	0	0
Alteration, cytoplasmic												
Minimal	3	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number affected	3	0	5	8	1	0	0	0	0	0	0	0
Accumulation, hyaline droplet												
Minimal	3	3	4	4	2	3	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number affected	3	3	5	9	3	4	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia, Bowman's capsule												
Minimal	0	0	0	1	3	1	0	0	1	2	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number affected	0	0	0	2	3	1	0	0	1	2	0	0

[위]

암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 전위과다각화증(hyperkeratosis, forestomach), 점막세포과다형성(hyperplasia, mucous) 및 전위편평세포과다형성(hyperplasia, squamous cell, forestomach)이 관찰되었다(Text Table 4). 해당 소견들은 시험물질 투여군에서 발생빈도 또는 정도가 용량상관성 있게 증가하여 시험물질에 의한 영향으로 판단된다. 점막세포과다형성 및 전위편평상피세포과다형성은 시험물질 투여로 인한 위 내 반복적인 국소자극에 의한 반응성 변화이며, 이로 인하여 과다각화증이 동반된 것으로 판단된다³⁾. 전위편평세포 및 점막세포의 과다형성은 자극이 없어지면 완전히 회복된다고 알려져 있으나³⁾, 회복기간 종료 후 빈도 및 정도는 감소하였으나 여전히 관찰되어 독성변화로 판단하였다. 그러나, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위이며, 점막층에서 샘세포화생(metaplasia, glandular cell) 및 미란/궤양(erosion/ulcer)과 같은 세포

손상 또는 전신 독성이 관찰되지 않아 사람에 외삽 (extrapolation)하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단된다^{1, 2)}.

Text Table 4. Incidence and Severity of Remarkable Microscopic Findings of Stomach

Number examined	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5
Stomach												
Hyperkeratosis, forestomach												
Minimal	0	5	0	0	0	1	0	5	2	0	0	0
Mild	0	1	0	0	0	1	0	3	2	0	0	0
Moderate	0	2	5	0	0	0	0	2	4	2	0	0
Severe	0	2	5	10	0	0	0	0	2	8	0	0
Total number affected	0	10	10	10	0	2	0	10	10	10	0	0
Hyperplasia, mucous												
Minimal	0	1	1	3	0	2	0	1	1	4	0	0
Mild	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	0
Total number affected	0	1	1	5	0	2	0	1	3	5	0	0
Hyperplasia, squamous cell, forestomach												
Minimal	0	4	0	0	0	3	0	6	2	0	0	3
Mild	0	5	4	1	0	2	0	4	3	3	0	0
Moderate	0	1	6	9	0	0	0	0	5	7	0	0
Total number affected	0	10	10	10	0	5	0	10	10	10	0	3

[간]

암수 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 단핵구침윤(infiltrate, mononuclear cell) 또는 혈관주위단핵구침윤(infiltrate, mononuclear cell, perivascular)이 관찰되었고, 수컷 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 세포질변이(alteration, cytoplasmic) 및 단일세포괴사(Necrosis, single cell)가 관찰되었으며, 암컷 250, 500 및 1,000 mg/kg/day 투여군에서 쓸개관과다형성(hyperplasia, bile duct)이 관찰되었다(Text Table 5). 해당 소견들은 대조군과 비교하여 시험물질 투여군에서 발생빈도 또는 정도가 용량상관성 있게 증가하여 시험물질에 의한 영향으로 판단된다. 세포질변이 및 단일세포괴사로 인해 염증세포인 단핵구 침윤이 발생하였고, 쓸개관과다형성은 단핵구침윤 및 혈관주위단핵구침윤과 연관된 것으로 판단된다^{3, 4)}. 그러나, 회복기간 종료 후 대부분 회복되었거나 회복 경향이 관찰되었고, 다른 간세포의 손상이 관찰되지 않아 독성학적 의미는 없었다.

Text Table 5. Incidence and Severity of Remarkable Microscopic Findings of Liver

Number examined	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	5	5
Liver												
Alteration, cytoplasmic												
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number affected	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltrate, mononuclear cell												
Minimal	3	2	0	4	1	1	1	2	3	2	1	2
Mild	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Total number affected	3	2	0	5	1	1	1	3	3	3	1	2
Infiltrate, mononuclear cell, perivascular												
Minimal	0	0	1	3	2	3	5	4	3	6	3	2
Mild	0	0	0	1	1	0	0	0	4	2	0	0
Total number affected	0	0	1	4	3	3	5	4	7	8	3	2
Necrosis, single cell												
Minimal	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0
Total number affected	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia, bile duct												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	3
Total number affected	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	3

그 외, 관찰된 모든 병리조직학적 변화들은 랫드에서 자연발생적 또는 우발적으로 관찰되는 변화^{5, 6)}로 시험물질과는 무관한 것으로 판단하였다.

4. 결론

본 시험 조건하에서, 자근복합추출물을 250, 500 및 1,000 mg/kg/day의 용량으로 암수 랫드에 13주간 반복 경구투여 한 결과, 암수 모든 시험물질 투여군에서 전위의 변화가 관찰되어 무독성량(NOEL)은 산출할 수 없었다. 다만, 전위는 해부학적 구조상 설치류에만 존재하는 종특이적인 부위로 사람에게 외삽(extrapolation)하는 관점에서는 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단되며, 전위의 변화를 제외한 NOEL은 암수 모두 1,000 mg/kg/day를 상회하는 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

Wester P.W. and Kroes R. (1988). Forestomach carcinogens: pathology and relevance to man. *Toxicol Pathol.* 16 (2): 165–171.

Proctor D.M. et al. (2007) Mode-of-Action Framework for Evaluating the Relevance of Rodent Forestomach Tumors in Cancer Risk Assessment. *Toxicological sciences.* 98 (2): 313–326.

STP/RITA/ESTP/BSTP/JSTP (2009–2019). International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice (INHAND) Guides.

Hoenerhoff MJ, et al. NTP Nonneoplastic Lesion Atlas. National Toxicology Program.

McInnes EF (2012). Background Lesions in Laboratory Animals. Elsevier.

Suttie AW (2018). Boorman's Pathology of the Rat. Elsevier.

FIGURES

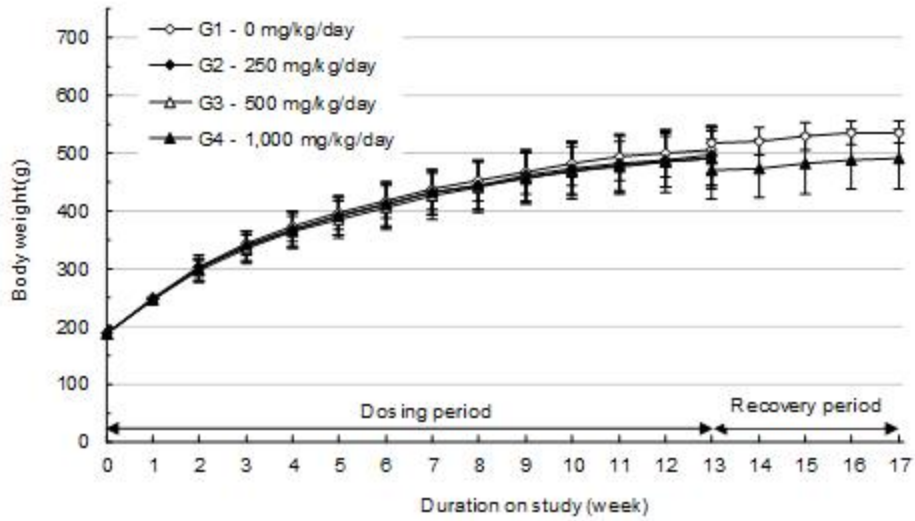


Figure 1. Body Weights of Male SD Rats.

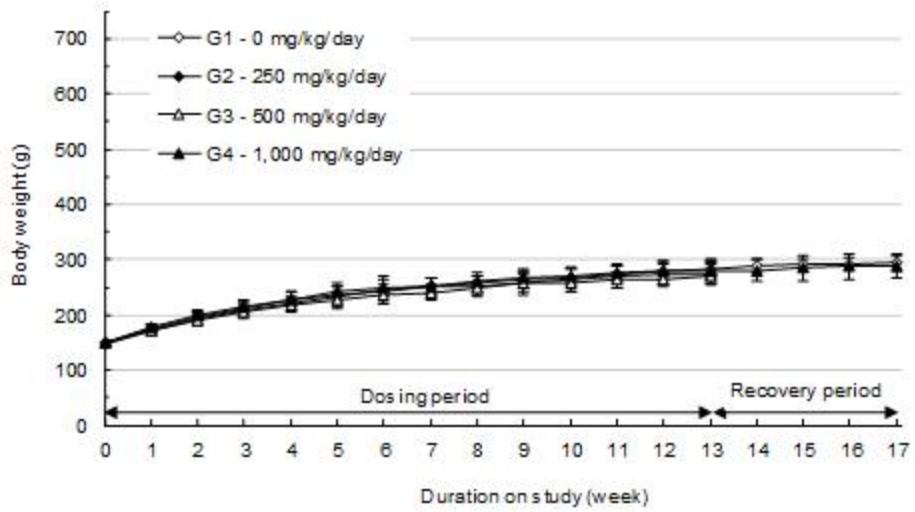


Figure 2. Body Weights of Female SD Rats.

TABLES

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period.

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7 3	8 2	10	9 1	9 1	9 1
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	15	15	15	15	12	8	10	9	3	9	13	3	2	2	2
							3	7	5	6	12	6	2	12	13	13	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day															
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15		
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	9	9	8	8	5	6	4	5	5	4	7	3	3	6		
			1	1	2	2	5	4	6	5	5	6	3	7	7	4		
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	2	2	4	4	5	7	5	3	6	6	3	6	5	11		
			13	13	11	11	10	8	10	12	9	9	12	9	10	4		

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA Salivation (after dosing)	10	8	8	8	9	9	9	9	9	10	10	7	6	8
				2	2	2	1	1	1	1	1		3	4	2	
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	4	7	5	5	3	3	3	4	4	7	7	3	3	3
			6	3	5	5	7	7	7	6	6	3	3	7	7	7
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	8	10	8	9	5	5	5	6	7	10	9	5	4	4
			7	5	7	6	10	10	11	9	8	5	6	10	11	11

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period (continued).

Sex: Male																
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA	7	6	7	7	7	8	7	7	7	9	8	8	7	8
		Salivation (after dos ing)	3	4	3	3	3	2	3	3	3	1	2	2	3	2
G3 500	10	NOA	3	3	4	5	6	6	3	3	3	3	3	4	4	5
		Salivation (after dos ing)	7	7	6	5	4	4	7	7	7	7	7	6	6	5
G4 1,000	15	NOA	4	5	5	5	7	6	4	2	2	3	2	5	8	8
		Salivation (after dos ing)	11	10	10	10	8	9	11	13	13	12	13	10	7	7

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA	9	10	10	10	10	9	10	9	10	10	10	8	9	9
		Salivation (after dos ing)	1					1		1				2	1	1
G3 500	10	NOA	4	4	4	4	4	5	5	5	3	3	5	7	6	5
		Salivation (after dos ing)	6	6	6	6	6	5	5	5	7	7	5	3	4	5
G4 1,000	15	NOA	8	8	8	8	7	8	6	8	6	10	9	10	8	8
		Salivation (after dos ing)	7	7	7	7	8	7	9	7	9	5	6	5	7	7

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	7	9	7	7	7	9	10
		Salivation (after dos ing)								3	1	3	3	3	1	
G3 500	10	NOA	8	6	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	7
		Salivation (after dos ing)	2	4	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	3
G4 1,000	15	NOA	9	9	9	8	7	7	7	7	7	7	7	7	8	10
		Salivation (after dos ing)	6	6	6	7	8	8	8	8	8	8	8	8	7	5

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period (continued).

Sex: Male			Day						
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	10	10	9	10
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	8	8	8	8	8	8	9
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	10	10	11	11	11	11	8
			5	5	4	4	4	4	7

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period (continued).

Sex: Female																	
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	10	10	10	10	10	7 3	7 3	10	10	6 4	7 3	6 4
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	15	15	15	13 2	12 3	9 6	9 6	5 10	12 3	14 1	5 10	5 10	5 10	5 10	5 10
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	7 3	6 4	8 2	7 3	6 4	7 3	6 4	7 3	6 3	7 3	7 3	6 4	8 2	8 2	6 4
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	5 10	5 10	5 10	5 10	9 6	8 7	3 12	2 13	6 9	6 9	8 7	9 6	10 5	8 7	8 7
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day														
			29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA Salivation (after dosing)	10	8 2	9 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	9 1	8 2	8 2	7 3	7 3	7 3	7 3	7 3	9 3	9 3	4 1	7 6	8 3	7 2	7 3
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	12 3	9 6	9 6	7 8	7 8	7 8	7 8	9 8	9 6	9 6	12 3	8 7	4 11	4 11	6 9

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period (continued).

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	8	9	9	9	9	9	10	10	10	10	
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	9	9	9	6	6	6	6	6	6	8	7	7	8	
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	6	7	7	6	5	5	5	5	7	9	7	7	9	
			9	8	8	9	10	10	10	10	8	6	8	8	6	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	8	8	8	8	9	6	5	5	5	6	7	7	7	
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	10	9	8	7	7	8	8	9	8	10	
			5	5	5	5	6	7	8	8	7	7	6	7	5	

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	
G2 250	10	NOA Salivation (after dosing)	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	
G3 500	10	NOA Salivation (after dosing)	8	8	8	8	8	8	6	6	6	6	6	7	6	
G4 1,000	15	NOA Salivation (after dosing)	11	11	11	11	11	11	9	9	9	9	9	9	10	
			4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	6	6	5	

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-1. Summary of Clinical Signs during Dosing Period (continued).

Sex: Female

Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day						
			85	86	87	88	89	90	91
G1 0	15	NOA	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	10	NOA	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	10	NOA	9	10	10	8	9	9	10
		Salivation (after dosing)	1			2	1	1	
G4 1,000	15	NOA	10	11	11	10	8	9	9
		Salivation (after dosing)	5	4	4	5	7	6	6

NOA: No Observable Abnormality.

Table 1-2. Summary of Clinical Signs during Recovery Period.

Sex: Male			Day													
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
G10	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G41,000	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female			Day													
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
G10	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G41,000	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female			Day													
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical sign	Day													
			106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
G10	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G41,000	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NOA: No Observable Abnormality.

Table 2-1. Summary of Body Weights during Dosing Period.

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	187.5	249.1	301.4	341.8	372.3	395.1	417.2
	S.D.	9.6	10.6	14.9	20.7	26.0	27.6	31.5
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	188.2	246.8	300.4	336.8	367.4	390.9	410.5
	S.D.	9.7	15.7	22.1	25.9	30.3	34.5	38.5
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	187.2	245.4	295.3	333.1	361.9	384.8	404.8
	S.D.	8.0	12.9	19.1	24.8	28.3	32.4	37.7
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	188.1	244.9	298.4	338.3	366.7	389.0	409.7
	S.D.	9.7	13.1	19.0	24.5	28.5	32.7	36.2
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	435.4	450.7	467.1	480.9	491.4	498.5	505.4
	S.D.	33.9	35.7	37.9	38.1	40.3	41.8	41.2
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	430.6	443.8	460.2	472.5	482.1	487.6	494.6
	S.D.	38.8	40.9	43.3	45.7	47.9	49.0	51.0
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	424.8	440.9	456.2	467.5	477.3	483.2	490.2
	S.D.	39.8	44.0	44.5	48.1	49.8	51.5	52.6
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	430.3	443.0	455.6	468.2	475.5	484.1	489.6
	S.D.	37.5	41.4	43.1	42.6	44.3	44.8	46.5
	N	15	15	15	15	15	15	15

Table 2-1. Summary of Body Weights during Dosing Period (continued).

Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	148.4	174.8	197.4	211.1	227.5	235.5	243.7
	S.D.	4.9	7.8	8.6	11.8	14.0	15.3	12.0
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	147.2	171.7	194.0	209.1	220.2	231.6	244.6
	S.D.	4.8	8.8	11.4	9.0	12.9	18.8	24.9
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	148.5	171.3	191.0	205.4	217.6	227.6	235.6
	S.D.	4.0	6.9	10.8	11.8	12.0	13.8	13.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	149.0	176.3	200.3	214.5	227.9	240.7	248.9
	S.D.	4.4	8.1	9.4	11.2	14.1	15.9	15.6
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	252.8	256.5	263.5	268.5	273.7	278.6	281.8
	S.D.	14.4	14.9	16.6	16.9	15.2	14.7	14.4
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	250.0	250.6	257.2	262.4	268.7	273.4	274.5
	S.D.	16.8	18.5	20.4	19.6	19.7	18.9	20.2
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	240.7	249.3	257.0	256.4	263.1	265.3	268.7
	S.D.	14.0	12.6	15.4	13.5	14.0	15.0	14.1
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	251.9	259.9	266.0	270.1	276.7	280.1	280.4
	S.D.	15.9	17.2	16.3	15.7	16.2	16.3	16.8
	N	15	15	15	15	15	15	15

Table 2-2. Summary of Body Weights during Recovery Period.

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	517.6	518.8	527.7	534.0	534.2
	S.D.	23.7	23.3	23.3	21.1	19.5
	N	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	470.0	472.8	479.8	486.9	488.4
	S.D.	50.7	50.6	51.8	51.4	50.5
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)		Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	282.1	287.4	290.4	292.3	293.2
	S.D.	8.5	12.0	12.1	10.2	14.0
	N	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	280.2	280.6	284.5	288.2	289.2
	S.D.	20.7	19.3	22.8	22.8	20.7
	N	5	5	5	5	5

Table 3-1. Summary of Food Consumption during Dosing Period.

Sex: Male		(g/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	27.7	29.8	31.8	32.8	32.5	31.8	31.1
	S.D.	1.9	1.5	1.6	1.8	2.0	2.0	2.0
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	27.7	29.2	31.2	31.7	31.6	31.4	31.0
	S.D.	2.6	2.8	3.0	3.1	3.2	3.0	3.2
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	26.9	28.6	30.0	31.1	31.1	31.1	30.2
	S.D.	2.0	1.6	1.9	2.3	2.4	2.4	2.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	28.0	29.5	31.8	33.0	33.1	32.9	32.2
	S.D.	1.4	2.0	2.7	2.6	2.9	2.9	3.0
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	31.0	30.8	31.3	31.1	31.1	30.3	30.6
	S.D.	1.6	1.8	1.9	2.1	2.3	2.3	2.5
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	31.1	30.7	31.3	30.5	30.5	29.9	30.0
	S.D.	2.9	2.9	2.9	3.0	2.9	2.7	3.2
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 250	Mean	30.6	31.0	30.2	30.6	30.0	29.6	29.5
	S.D.	2.6	3.1	2.5	2.9	2.7	2.4	2.7
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	32.6	32.2	32.1	31.8	31.2	31.3	31.0
	S.D.	3.0	3.0	2.9	2.9	2.8	3.3	3.3
	N	15	15	15	15	15	15	15

Table 3-1. Summary of Food Consumption during Dosing Period (continued).

Sex: Female		(g/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	18.0	21.1	21.5	21.1	22.5	21.5	21.1
	S.D.	1.9	1.2	0.9	1.4	1.7	1.7	1.5
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	17.8	20.5	21.6	21.4	21.5	21.9	22.4
	S.D.	3.2	1.6	1.6	1.1	2.0	2.1	2.9
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	18.7	20.2	20.6	21.3	21.7	21.6	22.7
	S.D.	2.8	1.8	1.9	1.2	1.5	1.6	4.8
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	18.7	21.4	22.4	22.3	23.1	22.9	22.5
	S.D.	2.9	2.0	1.8	2.3	3.0	2.4	2.2
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group / Dose (mg/kg/day)		Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	21.8	20.8	22.0	20.7	21.0	21.8	20.9
	S.D.	1.1	1.9	1.6	1.7	1.5	0.9	1.9
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 250	Mean	21.0	19.3	21.0	20.9	21.1	21.7	19.9
	S.D.	2.6	1.8	1.6	1.7	1.4	1.6	1.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	22.2	21.8	22.9	21.3	20.7	21.7	22.6
	S.D.	3.8	3.0	3.9	4.7	1.2	2.6	7.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	21.9	22.0	22.3	21.7	22.4	22.4	21.6
	S.D.	2.4	2.3	2.4	2.0	1.8	1.8	2.0
	N	15	15	15	15	15	15	15

Table 3-2. Summary of Food Consumption during Recovery Period.

Sex: Male		(g/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)		Week			
		14	15	16	17
G1 0	Mean	28.8	29.2	29.7	28.7
	S.D.	2.4	2.2	2.4	1.4
	N	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	29.5	29.3	29.9	28.2
	S.D.	3.5	3.6	3.0	3.4
	N	5	5	5	5

Sex: Female		(g/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)		Week			
		14	15	16	17
G1 0	Mean	21.9	21.8	22.8	20.6
	S.D.	0.9	1.5	0.9	2.2
	N	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	20.4	21.3	21.4 *	19.7
	S.D.	1.3	1.5	0.8	1.5
	N	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test. * p<0.05.

Table 4-1. Summary of Ophthalmological Examination of Main Group.

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 4-2. Summary of Ophthalmological Examination of Recovery Group.

Sex Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 5-1. Summary of Urinalysis of Main Group.

Sex		Male				Female			
Group / Dose (mg/kg/day)		G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals		0	250	500	1,000	0	250	500	1,000
Volume (mL)	Mean	10.0	9.4	9.7	11.7	4.9	5.4	5.4	7.3
	S.D.	2.3	3.4	3.8	4.2	1.8	2.5	1.5	2.5
Color	Pale Yellow	1		1	1				1
	Yellow	4	5	4	4	5	5	5	4
	Amber								
	Red								
Transparency	Clear	(-) 4	5	5	5	5	4	5	5
	Cloudy	(1+) 1					1		
	Turbid	(2+) 0							
Blood (cpL)	Negative	(-) 3	3	3	3	5	5	5	5
	10	(±) 2	2	2	2				
	20	(1+) 0							
	50	(2+) 0							
	250	(3+) 0							
Bilirubin (mg/dL)	Negative	(-) 5	5	5	5	5	5	5	5
	0.5	(1+) 0							
	1	(2+) 0							
	2	(3+) 0							
Ketone (mg/dL)	Negative	(-) 4	5	5	4	5	5	5	5
	10	(1+) 1			1				
	30	(2+) 0							
	80	(3+) 0							
Glucose (mg/dL)	Negative	(-) 5	5	5	5	5	5	5	5
	50	(±) 0							
	100	(1+) 0							
	250	(2+) 0							
	500	(3+) 0							
	2000	(4+) 0							
Protein (mg/dL)	Negative	(-) 1		1			1		1
	15	(±) 3			1	4	3	4	2
	30	(1+) 1	1	2	2	1	1	1	2
	100	(2+) 1	1	2	1				
	300	(3+) 1	1	2	1				
	1000	(4+) 1	2		1				
pH	5.0								
	5.5							3	1
	6.0	1		2	3		1	2	4
	6.5		1	3	2	2	2		
	7.0	2	2						
	7.5						2		
	8.0	2	2			2			
	8.5					1			
	9.0								

Table 5-1. Summary of Urinalysis of Main Group (continued).

Sex			Male				Female			
Group / Dose (mg/kg/day)			G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
No. of animals			5	5	5	5	5	5	5	5
Cast [†] (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5	5	5	5	5
	1-5	(1+)								
	6-10	(2+)								
	>10	(3+)								
Epithelial cell [†] (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5	5	5	5	5
	1-5	(1+)								
	6-10	(2+)								
	>10	(3+)								
Erythrocyte [†] (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5	5	5	5	5
	1-10	(1+)								
	11-50	(2+)								
	51-100	(3+)								
	>100	(4+)								
Leukocyte [†] (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5	5	5	5	5
	1-10	(1+)								
	11-50	(2+)								
	51-100	(3+)								
	>100	(4+)								
Specific gravity	1.000-1.010									
	1.011-1.020									
	1.021-1.030									
	1.031-1.040									
	1.041-1.050				1		1	2	1	3
	1.051-1.060		3	1		1	1	1	1	1
	1.061-1.070		1	1	1	2	1	1	1	
	1.071-1.080		1	3	2		1	1	1	
	1.081-1.090				1	2	1			
	1.091-1.100									1
>1.100								1		

†: Sediment

*: at 20 view microscopic findings per High-power field (x400).

Table 5-2. Summary of Urinalysis of Recovery Group.

Sex		Male		Female	
Group / Dose (mg/kg/day)		G1 0	G4 1,000	G1 0	G4 1,000
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	7.6	8.2	5.2	6.7
	S.D.	1.1	2.2	0.4	2.3
Color	Pale Yellow			1	1
	Yellow	5	5	4	4
	Amber				
	Red				
Transparency	Clear (-)	4	4	5	4
	Cloudy (1+)		1		1
	Turbid (2+)	1			
Blood (c/μL)	Negative (-)	4	3	5	5
	10 (±)		2		
	20 (1+)				
	50 (2+)	1			
	250 (3+)				
Bilirubin (mg/dL)	Negative (-)	5	5	5	5
	0.5 (1+)				
	1 (2+)				
	2 (3+)				
Ketone (mg/dL)	Negative (-)	2	4	5	5
	10 (1+)	3	1		
	30 (2+)				
	80 (3+)				
Glucose (mg/dL)	Negative (-)	5	5	5	5
	50 (±)				
	100 (1+)				
	250 (2+)				
	500 (3+)				
	2000 (4+)				
Protein (mg/dL)	Negative (-)			1	1
	15 (±)			4	2
	30 (1+)				2
	100 (2+)	1	3		
	300 (3+)	1	1		
	1000 (4+)	3	1		
pH	5.0				
	5.5			1	
	6.0			1	1
	6.5	2			1
	7.0		1	1	1
	7.5	2		1	
	8.0	1	3	1	1
	8.5		1		1
	9.0				

Table 5-2. Summary of Urinalysis of Recovery Group (continued).

Sex			Male		Female	
Group / Dose (mg/kg/day)			G1	G4	G1	G4
No. of animals			0	1,000	0	1,000
			5	5	5	5
Cast ^T (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5
	1-5	(1+)				
	6-10	(2+)				
	>10	(3+)				
Epithelial cell ^T (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5
	1-5	(1+)				
	6-10	(2+)				
	>10	(3+)				
Erythrocyte ^T (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5
	1-10	(1+)				
	11-50	(2+)				
	51-100	(3+)				
	>100	(4+)				
Leukocyte ^T (per HPF)*	0	(-)	5	5	5	5
	1-10	(1+)				
	11-50	(2+)				
	51-100	(3+)				
	>100	(4+)				
Specific gravity	1.000-1.010					
	1.011-1.020					
	1.021-1.030					
	1.031-1.040					1
	1.041-1.050					1
	1.051-1.060				1	
	1.061-1.070		1	1	3	1
	1.071-1.080		2	1	1	1
	1.081-1.090			3		1
	1.091-1.100		1			
>1.100		1				

^T: Sediment

*: at 20 view microscopic findings per High-power field (x400).

Table 6-1. Summary of Hematology of Main Group

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	RET %
G1 0	Mean	8.88	16.1	45.3	51.0	18.1	35.5	1058	2.20
	S.D.	0.29	0.6	1.3	1.2	0.6	0.5	98	0.25
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	8.89	15.8	44.6	50.3	17.8	35.4	1101	2.44
	S.D.	0.47	0.5	1.1	2.6	1.0	0.4	125	0.37
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	9.04	15.8	44.8	49.6	17.5	35.3	1130	2.19
	S.D.	0.13	0.9	1.8	2.1	1.0	0.6	92	0.18
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	8.88	15.7	44.4	50.1	17.7	35.4	1161	2.17
	S.D.	0.45	0.7	1.5	2.6	1.2	0.7	151	0.19
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ×10 ³ /μL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	PT sec	APTT sec
G1 0	Mean	6.43	17.6	72.2	8.6	1.3	0.3	8.3	16.5
	S.D.	1.52	6.8	8.9	2.4	0.5	0.1	0.2	0.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	5.95	16.9	72.1	9.6	1.2	0.2	8.2	16.2
	S.D.	1.18	3.4	4.1	1.9	0.5	0.1	0.2	0.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	7.52	19.0	71.3	8.2	1.3	0.2	8.2	16.2
	S.D.	1.88	4.8	5.9	1.8	0.6	0.1	0.2	0.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	8.15	16.7	71.6	9.8	1.7	0.2	8.0	16.2
	S.D.	1.89	3.4	4.7	1.7	0.7	0.0	0.3	0.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 6-1. Summary of Hematology of Main Group (continued).

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	RET %
G1 0	Mean	8.27	15.3	43.1	52.2	18.5	35.4	1025	2.36
	S.D.	0.39	0.4	1.3	1.7	1.0	0.9	79	0.19
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	8.19	15.4	43.4	53.1	18.8	35.4	1005	2.41
	S.D.	0.43	0.5	1.7	1.7	0.7	0.5	100	0.38
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	8.27	15.4	43.5	52.5	18.6	35.3	1075	2.14
	S.D.	0.32	0.6	1.8	1.7	0.7	0.5	111	0.32
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	8.17	15.2	42.9	52.5	18.6	35.4	1089	2.27
	S.D.	0.25	0.3	1.0	1.6	0.7	0.5	94	0.30
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ×10 ³ /μL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	PT sec	APTT sec
G1 0	Mean	3.07	14.2	77.0	6.8	1.8	0.2	7.9	14.7
	S.D.	0.54	5.1	5.2	1.5	0.8	0.2	0.2	0.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	2.97	14.3	76.4	7.1	2.0	0.2	7.9	14.3
	S.D.	0.88	8.2	9.3	1.7	0.8	0.2	0.3	0.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	3.53	14.1	76.2	7.4	2.2	0.2	7.9	14.8
	S.D.	0.65	7.0	7.2	1.9	0.8	0.1	0.3	0.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	3.37	12.6	79.4	6.1	1.9	0.1	7.6	14.6
	S.D.	1.14	4.5	6.0	1.8	0.7	0.1	0.3	0.9
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 6-2. Summary of Hematology of Recovery Group.

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	RET %
G1 0	Mean	9.09	16.0	45.6	50.2	17.6	35.2	1061	2.18
	S.D.	0.39	0.6	1.5	1.2	0.6	0.4	159	0.24
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	9.15	16.0	45.9	50.2	17.5	34.9	1046	2.15
	S.D.	0.29	0.2	0.8	0.7	0.4	0.4	166	0.22
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ×10 ³ /μL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	PT sec	APTT sec
G1 0	Mean	8.08	15.6	74.8	8.1	1.3	0.2	8.4	17.1
	S.D.	2.04	3.8	4.9	1.9	0.5	0.1	0.4	0.8
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	6.74	17.1	74.3	7.1	1.4	0.2	8.1	16.9
	S.D.	1.84	7.7	9.6	2.6	0.7	0.1	0.4	1.1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ×10 ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	PLT ×10 ³ /μL	RET %
G1 0	Mean	8.27	15.4	43.5	52.7	18.6	35.3	1000	2.28
	S.D.	0.52	0.5	1.5	2.1	0.8	0.4	111	0.59
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	8.43	15.7	43.9	52.1	18.6	35.7	1051	2.10
	S.D.	0.33	0.3	0.4	1.6	0.7	0.5	116	0.23
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ×10 ³ /μL	NEU %	LYM %	MONO %	EOS %	BASO %	PT sec	APTT sec
G1 0	Mean	3.26	10.0	80.4	7.3	2.2	0.2	7.6	14.4
	S.D.	0.79	2.2	4.1	2.2	0.3	0.2	0.3	1.3
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	2.97	11.7	77.5	7.7	2.9	0.2	7.7	15.5
	S.D.	0.99	3.0	5.5	2.3	1.2	0.2	0.1	0.7
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 7-1. Summary of Blood Chemistry of Main Group.

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)		AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	GGT U/L	T-BIL mg/dL	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	BUN mg/dL
G1 0	Mean	78.0	40.0	297.1	0.47	0.04	93	45	173	15.1
	S.D.	21.6	15.4	54.7	0.50	0.02	11	17	15	1.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	66.6	36.3	248.7 *	0.45	0.03	91	50	170	14.0
	S.D.	12.5	8.0	37.3	0.45	0.02	12	32	16	1.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	78.8	39.3	235.2 **	0.22	0.04	94	64	169	14.8
	S.D.	20.8	9.4	37.3	0.18	0.02	14	30	14	1.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	69.9	40.7	228.7 **	0.32	0.03	129	92	164	14.0 #
	S.D.	16.7	15.9	35.1	0.35	0.03	84	101	17	3.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	IP mg/dL	Ca mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	A/G ratio
G1 0	Mean	0.47	6.2	2.3	5.34	9.9	142	4.5	102	0.60
	S.D.	0.04	0.1	0.1	0.29	0.2	1	0.3	2	0.04
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	0.44	6.1	2.3	5.44	9.9	142	4.8	103	0.59
	S.D.	0.05	0.1	0.1	0.20	0.2	1	0.3	2	0.03
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	0.42	6.3	2.4	5.51	10.1	142	4.8	102	0.60
	S.D.	0.05	0.1	0.1	0.27	0.3	1	0.3	1	0.04
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	0.44	6.2	2.3	5.69	10.1	142	4.7	101	0.60
	S.D.	0.09	0.1	0.2	0.47	0.3	1	0.2	2	0.07
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05, ** p<0.01.

Significantly different from control by Steel test # p<0.05.

Table 7-1. Summary of Blood Chemistry of Main Group (continued).

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	GGT U/L	T-BIL mg/dL	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	BUN mg/dL
G1 0	Mean	80.8	27.0	205.4	1.18	0.04	82	12	143	16.0
	S.D.	23.4	5.1	53.9	0.60	0.02	15	4	17	1.2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	74.5	29.5	211.6	1.15	0.04	83	15	148	15.1
	S.D.	11.8	7.5	51.3	0.59	0.03	16	4	25	1.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	76.9	29.2	187.7	1.25	0.02	84	17	142	14.6
	S.D.	10.1	3.3	44.7	0.43	0.02	16	8	14	1.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	72.7	26.2	181.8	1.38	0.03	99	21 *	128	14.8
	S.D.	15.8	3.7	44.3	0.58	0.02	16	8	9	2.5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	IP mg/dL	Ca mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	A/G ratio
G1 0	Mean	0.53	6.1	2.5	4.46	9.5	143	4.2	105	0.69
	S.D.	0.04	0.2	0.2	0.54	0.2	1	0.3	1	0.04
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	0.49 *	6.1	2.5	4.70	9.5	142	4.2	104	0.70
	S.D.	0.03	0.1	0.1	0.55	0.2	2	0.2	2	0.05
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	0.48 **	6.1	2.5	4.91	9.6	143	4.4	105	0.69
	S.D.	0.03	0.2	0.1	0.49	0.3	1	0.1	1	0.03
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	0.47 **	6.0	2.5	5.26 **	9.7	143	4.4 *	105	0.70
	S.D.	0.04	0.1	0.1	0.60	0.2	1	0.2	2	0.04
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test: * p<0.05, ** p<0.01.

Table 7-2. Summary of Blood Chemistry of Recovery Group.

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)		AST UL	ALT UL	ALP UL	GGT UL	T-BIL mg/dL	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	BUN mg/dL
G1 0	Mean	83.4	48.9	226.8	0.72	0.03	118	116	182	16.6
	S.D.	21.4	12.8	52.0	0.35	0.02	27	61	16	2.3
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	78.2	39.9	214.2	0.44	0.06	103	59	181	16.7
	S.D.	25.3	9.0	48.9	0.25	0.01	17	43	7	1.8
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group / Dose (mg/kg/day)		CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	IP mg/dL	Ca mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	A/G ratio
G1 0	Mean	0.53	6.1	2.3	4.97	9.7	143	4.8	103	0.60
	S.D.	0.05	0.2	0.1	0.34	0.4	1	0.3	1	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	0.52	6.2	2.3	5.14	9.7	143	5.0	103	0.60
	S.D.	0.04	0.2	0.1	0.26	0.2	1	0.4	1	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)		AST UL	ALT UL	ALP UL	GGT UL	T-BIL mg/dL	T-CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	BUN mg/dL
G1 0	Mean	77.2	38.2	162.3	0.85	0.08	90	18	145	15.5
	S.D.	22.9	10.3	50.1	0.49	0.02	11	6	12	1.6
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	74.9	30.9	149.1	0.50	0.07	83	21	152	16.4
	S.D.	31.9	10.4	32.3	0.33	0.03	13	11	7	2.5
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Group / Dose (mg/kg/day)		CREA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	IP mg/dL	Ca mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	A/G ratio
G1 0	Mean	0.50	6.1	2.6	4.29	9.7	141	4.4	103	0.72
	S.D.	0.03	0.1	0.1	0.61	0.1	2	0.3	2	0.04
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	0.52	6.0	2.5	4.31	9.6	141	4.7	103	0.71
	S.D.	0.05	0.3	0.1	0.46	0.2	1	0.3	0	0.04
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 8-1. Summary of Absolute Organ Weights of Main Group.

Sex: Male							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	473.2	2.15	1.43	12.81	0.85	1.88
	S.D.	48.2	0.12	0.16	1.87	0.12	0.20
	N	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	468.2	2.16	1.42	13.36	0.83	1.80
	S.D.	47.2	0.09	0.19	1.71	0.10	0.13
	N	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	463.1	2.07	1.38	13.82	0.81	1.81
	S.D.	49.8	0.08	0.13	1.91	0.13	0.06
	N	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	469.2	2.10	1.39	15.36	0.91	1.75
	S.D.	41.1	0.07	0.11	2.66	0.17	0.13
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Testis	Prostate	Pituitary gland	Adrenal gland
G1 0	Mean	2.84	3.94	0.85	0.0129	0.0533
	S.D.	0.30	0.27	0.16	0.0022	0.0066
	N	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	2.88	3.98	0.82	0.0129	0.0497
	S.D.	0.26	0.34	0.19	0.0017	0.0058
	N	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	2.82	3.98	0.72	0.0123	0.0544
	S.D.	0.31	0.27	0.11	0.0010	0.0053
	N	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	3.23	4.03	0.76	0.0131	0.0591
	S.D.	0.71	0.25	0.14	0.0015	0.0042
	N	10	10	10	10	10

Table 8-1. Summary of Absolute Organ Weights of Main Group (continued).

Sex: Female							(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	262.1	1.92	0.95	6.35	0.65	1.26
	S.D.	14.2	0.09	0.07	0.36	0.08	0.11
	N	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	257.6	1.90	0.90	6.13	0.59	1.27
	S.D.	18.6	0.08	0.07	0.38	0.08	0.09
	N	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	252.1	1.94	0.90	6.14	0.57	1.22
	S.D.	13.8	0.06	0.05	0.53	0.06	0.12
	N	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	265.2	1.96	0.98	7.01 *	0.62	1.29
	S.D.	14.2	0.06	0.07	0.62	0.08	0.10
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Uterus	Pituitary gland	Adrenal gland	Ovary
G1 0	Mean	1.75	0.97	0.0163	0.0670	0.0874
	S.D.	0.14	0.41	0.0018	0.0067	0.0128
	N	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	1.66	0.92	0.0150	0.0607 *	0.0822
	S.D.	0.11	0.61	0.0016	0.0046	0.0088
	N	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	1.65	0.70	0.0131 **	0.0659	0.0780
	S.D.	0.10	0.25	0.0021	0.0046	0.0139
	N	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	1.81	0.65	0.0160	0.0717	0.0929
	S.D.	0.16	0.15	0.0016	0.0059	0.0133
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test * p<0.05, ** p<0.01.

Table 8-2. Summary of Absolute Organ Weights of Recovery Group.

Sex: Male							(g)
Group/ Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	507.6	2.15	1.52	13.36	0.81	1.74
	S.D.	22.6	0.14	0.13	1.65	0.08	0.14
	N	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	460.6	2.17	1.43	12.55	0.79	1.70
	S.D.	48.4	0.07	0.14	1.65	0.08	0.09
	N	5	5	5	5	5	5

Group/ Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Testis	Prostate	Pituitary gland	Adrenal gland
G1 0	Mean	3.01	3.91	0.81	0.0129	0.0517
	S.D.	0.20	0.33	0.14	0.0009	0.0063
	N	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	2.85	3.97	0.89	0.0131	0.0460
	S.D.	0.25	0.30	0.19	0.0014	0.0037
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female							(g)
Group/ Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	275.7	2.00	0.93	6.55	0.57	1.35
	S.D.	10.3	0.08	0.08	0.28	0.13	0.11
	N	5	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	271.0	1.98	0.92	6.76	0.62	1.32
	S.D.	23.4	0.09	0.06	0.52	0.08	0.04
	N	5	5	5	5	5	5

Group/ Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Uterus	Pituitary gland	Adrenal gland	Ovary
G1 0	Mean	1.75	0.93	0.0164	0.0699	0.0767
	S.D.	0.14	0.53	0.0022	0.0102	0.0111
	N	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	1.74	0.87	0.0170	0.0698	0.0790
	S.D.	0.16	0.58	0.0031	0.0056	0.0073
	N	5	5	5	5	5

Table 9-1. Summary of Relative Organ Weights of Main Group.

Sex: Male		(% B.W.)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	473.2	0.46	0.31	2.70	0.18	0.36
	S.D.	48.2	0.03	0.03	0.20	0.02	0.04
	N	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	468.2	0.46	0.30	2.85	0.18	0.39
	S.D.	47.2	0.04	0.02	0.22	0.03	0.03
	N	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	463.1	0.45	0.30	2.99	0.18	0.35
	S.D.	49.8	0.05	0.03	0.30	0.03	0.03
	N	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	469.2	0.45	0.30	3.27 ##	0.19	0.37
	S.D.	41.1	0.04	0.02	0.48	0.03	0.02
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Testis	Prostate	Pituitary gland	Adrenal gland
G1 0	Mean	0.60	0.84	0.18	0.0027	0.0113
	S.D.	0.05	0.05	0.04	0.0004	0.0012
	N	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	0.62	0.86	0.18	0.0028	0.0108
	S.D.	0.04	0.10	0.04	0.0003	0.0022
	N	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	0.61	0.87	0.16	0.0027	0.0119
	S.D.	0.03	0.10	0.02	0.0002	0.0021
	N	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	0.69	0.86	0.16	0.0028	0.0127
	S.D.	0.13	0.08	0.04	0.0003	0.0014
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Steel test: ## p<0.01.

Table 9-1. Summary of Relative Organ Weights of Main Group (continued).

Sex: Female		(% B.W.)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi
G1 0	Mean	262.1	0.73	0.36	2.43	0.25	0.48
	S.D.	14.2	0.05	0.02	0.10	0.03	0.04
	N	10	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	257.6	0.74	0.35	2.38	0.23	0.49
	S.D.	18.6	0.03	0.02	0.11	0.03	0.03
	N	10	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	252.1	0.77	0.36	2.44	0.23	0.48
	S.D.	13.8	0.05	0.01	0.14	0.03	0.04
	N	10	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	265.2	0.74	0.37	2.64**	0.23	0.49
	S.D.	14.2	0.04	0.03	0.15	0.03	0.03
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Uterus	Pituitary gland	Adrenal gland	Ovary
G1 0	Mean	0.67	0.37	0.0062	0.0257	0.0333
	S.D.	0.05	0.16	0.0006	0.0033	0.0045
	N	10	10	10	10	10
G2 250	Mean	0.65	0.36	0.0058	0.0236	0.0322
	S.D.	0.05	0.25	0.0007	0.0022	0.0049
	N	10	10	10	10	10
G3 500	Mean	0.65	0.28	0.0052**	0.0262	0.0309
	S.D.	0.04	0.09	0.0008	0.0024	0.0053
	N	10	10	10	10	10
G4 1,000	Mean	0.68	0.25	0.0061	0.0271	0.0351
	S.D.	0.05	0.06	0.0007	0.0028	0.0046
	N	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's t-test ** p<0.01.

Table 9-2. Summary of Relative Organ Weights of Recovery Group.

Sex: Male								(% B.W.)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi	
G1 0	Mean	507.6	0.42	0.30	2.63	0.16	0.34	
	S.D.	22.6	0.04	0.02	0.29	0.02	0.03	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 1,000	Mean	460.6	0.47	0.31	2.72	0.17	0.37	
	S.D.	48.4	0.04	0.04	0.18	0.00	0.05	
	N	5	5	5	5	5	5	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Testis	Prostate	Pituitary gland	Adrenal gland	
G1 0	Mean	0.59	0.77	0.16	0.0025	0.0102	
	S.D.	0.03	0.06	0.02	0.0002	0.0015	
	N	5	5	5	5	5	
G4 1,000	Mean	0.62	0.87	0.20	0.0029	0.0100	
	S.D.	0.03	0.11	0.04	0.0003	0.0008	
	N	5	5	5	5	5	

Sex: Female								(% B.W.)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Body weight (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Lung with bronchi	
G1 0	Mean	275.7	0.73	0.34	2.37	0.21	0.49	
	S.D.	10.3	0.03	0.02	0.07	0.05	0.03	
	N	5	5	5	5	5	5	
G4 1,000	Mean	271.0	0.74	0.34	2.50	0.23	0.49	
	S.D.	23.4	0.06	0.02	0.12	0.02	0.04	
	N	5	5	5	5	5	5	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Kidney	Uterus	Pituitary gland	Adrenal gland	Ovary
G1 0	Mean	0.63	0.33	0.0059	0.0254	0.0278
	S.D.	0.03	0.18	0.0008	0.0035	0.0037
	N	5	5	5	5	5
G4 1,000	Mean	0.64	0.31	0.0063	0.0260	0.0295
	S.D.	0.04	0.18	0.0011	0.0037	0.0049
	N	5	5	5	5	5

Table 10-1. Summary of Necropsy Findings of Main Group.

Necropsy findings		Group / Dose (mg/kg/day)			
		G1	G2	G3	G4
		0	250	500	1,000
Number of animals		10	10	10	10
Number of sacrificed animals		10	10	10	10
Kidney	Enlargement	0	0	0	1
Stomach	Thickening, forestomach	0	3	9	9
No remarkable findings		10	7	1	1

Necropsy findings		Group / Dose (mg/kg/day)			
		G1	G2	G3	G4
		0	250	500	1,000
Number of animals		10	10	10	10
Number of sacrificed animals		10	10	10	10
Stomach	Thickening, forestomach	0	0	7	10
No remarkable findings		10	10	3	0

Table 10-2. Summary of Necropsy Findings of Recovery Group

Sex: Male		
Necropsy findings	Group / Dose (mg/kg/day)	
	G1	G4
	0	1,000
Number of animals	5	5
Number of sacrificed animals	5	5
No remarkable findings	5	5
Sex: Female		
Necropsy findings	Group / Dose (mg/kg/day)	
	G1	G4
	0	1,000
Number of animals	5	5
Number of sacrificed animals	5	5
No remarkable findings	5	5

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group.

Sex: Male

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)			
	G1 0	G2 250	G3 500	G4 1,000
Number of animals	10	10	10	10
Number of examined animals	10	10	10	10
Adrenal gland				
- Ectopic tissue, adenocortical	(+)	1		0
- Hypertrophy, cortical, focal	++	1		2
- Vacuolation	+	2		1
No remarkable findings		7		8
Brain				
- Apoptosis, hippocampus	+	1		1
- Dilatation, ventricle	+	0		1
No remarkable findings		9		9
Epididymis				
- Infiltrate, mononuclear cell	+	2		2
No remarkable findings		8		8
Harderian gland				
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0		1
- Porphyrin, increased	+	5		4
	++	0		1
No remarkable findings		5		5
Heart				
- Necrosis/inflammatory cell infiltrate, cardiomyocyte	++	1		0
No remarkable findings		9		10

Grade: + minimal, ++ mild, (+) present.

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group (continued).

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)			
	G1 0	G2 250	G3 500	G4 1,000
Number of animals	10	10	10	10
Number of examined animals	10	10	10	10
Kidney				
- Accumulation, hyaline droplet	+ 3	3	4	4
	++ 0	0	1	4
	+++ 0	0	0	1
- Alteration, cytoplasmic	+ 3	0	2	1
	++ 0	0	2	5
	+++ 0	0	1	2
- Basophilia, tubule	+ 2	5	4	4
	++ 2	1	3	1
	++++ 0	0	0	1
- Cast, hyaline	+ 0	5	2	1
	++ 3	3	2	2
	+++ 1	0	1	1
	++++ 0	0	0	1
- Degeneration, tubule	++ 0	0	0	1
- Hyperplasia, Bowman's capsule	+ 0	0	0	1
	+++ 0	0	0	1
- Infiltrate, mononuclear cell, interstitial	+ 1	0	0	1
- Necrosis, single cell, tubule	+ 0	1	3	5
	++ 1	0	0	2
- Vacuolation, tubule	+ 2	4	4	2
	++ 0	1	1	1
	+++ 0	0	0	1
No remarkable findings	2	2	0	1
Liver				
- Alteration, cytoplasmic	+ 0	0	1	0
	++ 0	0	0	1
	+++ 0	0	0	1
- Alteration, cytoplasmic, eosinophilic	+ 4	7	2	4
	++ 1	1	2	2
- Hyperplasia, bile duct	+ 1	0	1	1
	++ 1	0	1	0
- Infiltrate, mononuclear cell	+ 3	2	0	4
	++ 0	0	0	1
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	+ 0	0	1	3
	++ 0	0	0	1
- Necrosis, focal	+ 0	0	0	1
- Necrosis, single cell	+ 0	0	0	4
- Vacuolation, hepatocyte	+ 5	3	7	5
	++ 0	2	1	0
No remarkable findings	2	1	1	0

Grade: + minimal, ++ mild, +++ moderate, ++++ severe.

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group (continued).

Sex: Male

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)			
	G1 0	G2 250	G3 500	G4 1,000
Number of animals	10	10	10	10
Number of examined animals	10	10	10	10
Lung with bronchi				
- Aggregation, alveolar macrophage	+	2		2
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	++	1		1
- Inflammation, chronic	+	0		1
No remarkable findings	7			7
Pituitary gland				
- Cyst, pars distalis	(+)	1		0
- Cyst, pars nervosa	(+)	1		0
No remarkable findings	9			10
Prostate				
- Infiltrate, mononuclear cell	+	3		3
	++	0		1
No remarkable findings	7			6
Salivary gland: parotid				
- Focus, hypertrophy, basophilic	+	4		5
No remarkable findings	6			5
Spleen				
- Extramedullary hematopoiesis	+	2		2
No remarkable findings	8			8
Stomach				
- Edema, submucosa	+	0	7	6
	++	0	0	3
	+++	0	0	2
- Hemorrhage, forestomach	+	0	0	1
- Hyperkeratosis, forestomach	+	0	5	0
	++	0	1	0
	+++	0	2	5
	++++	0	2	5
- Hyperplasia, mucous	+	0	1	1
	++	0	0	0
- Hyperplasia, squamous cell, forestomach	+	0	4	0
	++	0	5	4
	+++	0	1	6
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0	1	0
No remarkable findings	10	0	0	0
Thyroid gland				
- Cyst, ultimobranchial	(+)	1		1
No remarkable findings	9			9

Grade: + minimal, ++ mild, +++ moderate, ++++ severe, (+) present.

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group (continued).

Sex: Female					
Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)				
	G1	G2	G3	G4	
Number of animals	0	250	500	1,000	
Number of examined animals	10	10	10	10	
Adrenal gland					
- Hypertrophy, cortical, focal	+	1		0	
No remarkable findings		9		10	
Brain					
- Hemorrhage, cerebellum	+	0		1	
No remarkable findings		10		9	
Harderian gland					
- Porphyrin, increased	+	5		4	
No remarkable findings		5		6	
Kidney					
- Cast, hyaline	+	1	1	0	1
- Degeneration, tubule	+	0	1	3	4
- Hyperplasia, Bowman's capsule	+	0	0	1	2
- Mineralization	+	2	1	1	0
	++	0	0	1	0
- Pigment, accumulation, tubule	+	0	0	1	0
	++	0	0	0	1
No remarkable findings		7	7	4	2
Liver					
- Alteration, cytoplasmic, eosinophilic	+	5	3	8	6
	++	0	2	1	2
- Congestion	+	0	0	1	0
- Degeneration, hepatocyte	+	0	0	1	0
	++	0	1	0	0
- Hyperplasia, bile duct	+	0	1	2	4
- Hyperplasia, oval cell	+	0	2	5	0
- Infiltrate, mononuclear cell	+	1	2	3	2
	++	0	1	0	1
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	+	5	4	3	6
	++	0	0	4	2
- Necrosis, focal	+	1	0	0	0
- Pigment, hepatocyte	+	0	0	1	1
	++	1	0	0	0
- Vacuolation, hepatocyte	+	7	5	6	6
	++	0	2	1	1
	+++	0	0	1	0
No remarkable findings		1	0	0	0

Grade: + minimal, ++ mild, +++ moderate.

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group (continued).

Sex: Female		Group / Dose (mg/kg/day)			
Organ / Histopathological findings		G1	G2	G3	G4
		0	250	500	1,000
Number of animals		10	10	10	10
Number of examined animals		10	10	10	10
Lung with bronchi					
- Aggregation, alveolar macrophage	+	3			2
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0			2
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	+	3			0
No remarkable findings		6			7
Ovary					
- Cyst, luteal	(+)	0			1
- Fatty change	+	2			1
- Increased, follicle	+	1			0
- Pigment	+	6			5
- Vacuolation, interstitial cell	+	0			1
No remarkable findings		4			5
Pituitary gland					
- Rathke's pouch	(+)	5			0
No remarkable findings		5			10
Salivary gland: parotid					
- Ectopic tissue, mucous	(+)	1			0
- Focus, hypertrophy, basophilic	+	1			2
No remarkable findings		8			8
Stomach					
- Cyst, squamous	(+)	0	0	1	0
- Edema, submucosa	+	0	5	4	3
	++	0	0	2	5
- Hyperkeratosis, forestomach	+	0	5	2	0
	++	0	3	2	0
	+++	0	2	4	2
	++++	0	0	2	8
- Hyperplasia, mucous	+	0	1	1	4
	++	0	0	2	1
- Hyperplasia, squamous cell, forestomach	+	0	6	2	0
	++	0	4	3	3
	+++	0	0	5	7
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0	4	0	0
No remarkable findings		10	0	0	0

Grade: + minimal, ++ mild, +++ moderate, ++++ severe, (+) present.

Table 11-1. Summary of Histopathological Findings of Main Group (continued).

Sex: Female				
Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)			
	G1	G2	G3	G4
	0	250	500	1,000
Number of animals	10	10	10	10
Number of examined animals	10	10	10	10
Thyroid gland				
- Cyst, ultimobranchial	(+)	2		2
No remarkable findings		8		8
Trachea				
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0		2
No remarkable findings		10		8
Vagina				
- Infiltrate, mononuclear cell	+	1		0
No remarkable findings		9		10

Grade: + minimal, (+) present

Table 11-2. Summary of Histopathological Findings of Recovery Group.

Sex: Male

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)	
	G1 0	G4 1,000
Number of animals	5	5
Number of examined animals	5	5
Adrenal gland		
- Vacuolation	+ 1	1
No remarkable findings	4	4
Epididymis		
- Infiltrate, mononuclear cell	+ 1	0
No remarkable findings	4	5
Harderian gland		
- Porphyrin, increased	+ 4	4
No remarkable findings	1	1
Kidney		
- Accumulation, hyaline droplet	+ 2	3
	++ 1	1
- Alteration, cytoplasmic	+ 1	0
- Basophilia, tubule	+ 3	3
	+++ 1	1
- Cast, hyaline	+ 2	3
	++ 1	1
	+++ 2	1
- Degeneration, tubule	+ 0	1
	++ 0	1
- Hyperplasia, Bowman's capsule	+ 3	1
- Necrosis, single cell, tubule	+ 0	1
	++ 1	1
- Vacuolation, tubule	+ 3	3
	++ 1	0
No remarkable findings	0	0
Liver		
- Alteration, cytoplasmic, eosinophilic	+ 3	4
	++ 0	1
- Hyperplasia, bile duct	+ 2	0
	++ 1	1
- Infiltrate, mononuclear cell	+ 1	1
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	+ 2	3
	++ 1	0
- Necrosis, single cell	+ 2	0
- Vacuolation, hepatocyte	+ 3	3
	++ 0	1
No remarkable findings	0	0

Grade: + minimal, ++ mild, +++ moderate.

Table 11-2. Summary of Histopathological Findings of Recovery Group (continued).

Sex: Male

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)	
	G1	G4
Number of animals	0	1,000
Number of examined animals	5	5
Lung with bronchi		
- Aggregation, alveolar macrophage	+	1 0
No remarkable findings		4 5
Prostate		
- Infiltrate, mononuclear cell	+ ++	1 2 1 0
No remarkable findings		3 3
Salivary gland: parotid		
- Focus, hypertrophy, basophilic	+	0 2
No remarkable findings		5 3
Salivary gland: submandibular		
- Increased, granule	+	1 0
No remarkable findings		4 5
Spleen		
- Extramedullary hematopoiesis	+	0 1
No remarkable findings		5 4
Stomach		
- Cyst, squamous	(+)	0 1
- Edema, submucosa	+	0 2
- Hyperkeratosis, forestomach	+ ++	0 1 0 1
- Hyperplasia, mucous	+	0 2
- Hyperplasia, squamous cell, forestomach	+ ++	0 3 0 2
- Infiltrate, mononuclear cell	+	0 2
No remarkable findings		5 0
Thyroid gland		
- Cyst, ultimobranchial	(+)	3 0
No remarkable findings		2 5

Grade: + minimal, ++ mild, (+) present.

Table 11-2. Summary of Histopathological Findings of Recovery Group (continued).

Sex: Female			
Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)		
	G1	G4	
Number of animals	5	5	1,000
Number of examined animals	5	5	
Adrenal gland			
- Vacuolation	+ 1	0	
No remarkable findings	4	5	
Harderian gland			
- Infiltrate, mononuclear cell	++ 1	0	
- Porphyrin, increased	+ 3	2	
No remarkable findings	1	3	
Jejunum			
- Degeneration, crypt	+ 1	0	
No remarkable findings	4	5	
Kidney			
- Cast, hyaline	+ 2	2	
- Mineralization	+ 1	1	
- Necrosis, single cell, tubule	+ 1	0	
- Vacuolation, tubule	+ 0	1	
No remarkable findings	2	3	
Liver			
- Alteration, cytoplasmic, eosinophilic	+ 1	3	
- Hyperplasia, bile duct	+ 0	3	
- Hyperplasia, oval cell	+ 1	0	
- Infiltrate, mononuclear cell	+ 1	2	
- Infiltrate, mononuclear cell, perivascular	+ 3	2	
- Vacuolation, hepatocyte	+ 2	3	
	++ 1	1	
No remarkable findings	0	0	

Grade: + minimal, ++ mild, (+) present.

Table 11-2. Summary of Histopathological Findings of Recovery Group (continued).

Sex: Female

Organ / Histopathological findings	Group / Dose (mg/kg/day)	
	G1	G4
Number of animals	5	5
Number of examined animals	5	5
Ovary		
- Cyst, luteal	(+) 0	1
- Fatty change	+ 3	1
- Pigment	+ 1	1
No remarkable findings	2	2
Pituitary gland		
- Cyst, pars nervosa	(+) 1	0
- Rathke's pouch	(+) 3	1
No remarkable findings	1	4
Salivary gland: submandibular		
- Ectopic tissue, mucous	(+) 1	0
No remarkable findings	4	5
Stomach		
- Atrophy, parietal cell	+ 0	1
- Edema, submucosa	+ 0	4
- Hyperplasia, squamous cell, forestomach	+ 0	3
No remarkable findings	5	0
Thyroid gland		
- Cyst, ultimobranchial	(+) 0	1
No remarkable findings	5	4

Grade: + minimal, (+) present

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

식품 부패 관련 미생물을 대상으로 우수한 항균 및 항진균작용을 나타내는 자근 복합 추출물 조성물을 개발하였고, 이를 대상으로 자근 추출 조건 최적화, 시코닌 성분 표준화, 시코닌 성분 대량 분리 동정, 항균시험 및 작용기전 연구, 항진균시험, 항균 현장적용시험, 안전성 시험, 안정성 시험, 제조공정 최적화 시험을 실시하여 특허(출원번호 10-2020-0152300, 출원일 2020.11.13)를 출원하였고, 천연물 식품 보존료 제품 개발을 위하여 참여기업인 (주)다정에서 품목제조보고서를 제작하였고, 제품 생산을 위한 공정계획을 수립하고 있음

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (YYYY~YYYY)		n단계 (YYYY~YYYY)		계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)	목표(단계별)	실적(누적)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾		목표(단계별)					
		실적(누적)					
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾		목표(단계별)					
		실적(누적)					
		목표(단계별)					
		실적(누적)					
계							

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2019~2021)	2단계 (2022~2023)	
1			브라질/FOR WADER-KR	항균력 약함	항균력 약함	항균력 강화소재 개발	항균력 강화소재 제품화	
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	섬오가피의 추출 조건에 따른 페놀성 성분 함량 변화	생약학회지	김성기, 이재범, 조순현, 고성권	50(2)	한국	한국생약학회	비SCIE	2019. 06	0253-3073	100%
2	초단파 식초 용합 처리에 의한 섬오가피의 페놀성 성분 변화	한국화장품 미용학회지	김성기, 양병욱, 고성권	9(2)	한국	한국화장품미용학회	비SCIE	2019. 09	2234-330X	100%
3	수삼의 계절별 연구별 성분 변화	생약학회지	강성호, 고성권	50(4)	한국	한국생약학회	비SCIE	2019. 12	0253-3073	100%
4	산양삼의 재배 방법 (직파, 이식)에 따른 진세노사이드 성분 비교	한국산삼학회지	조순현, 고성권	13(1)	한국	한국산삼학회	비SCIE	2019. 12	2635-9677	100%
5	초단파 인삼 잎의 용매 추출 조건에 따른 인삼 사포닌 함량 변화	삼학회지	김선영, 고성권	13(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2019. 12	2714-0245	100%
6	Sephadex LH-20를 이용한 인삼 지상부 부탄올 엑스의 인삼 사포닌 성분분획	삼학회지	김미라, 고성권	13(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2019. 12	2714-0245	100%
7	Inhibitory Effects of β -Caryophyllene on Helicobacter pylori Infection In Vitro and In Vivo	International journal of molecular sciences	Ji Yeong Yang, Hyun Jun Woo, Sa-Hyun Kim	21(3)	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2020.03	1422-0067	100%
8	Anti-bacterial Effect of Oenothera lamarckiana Aerial Part Extract	Biomedical Science Letters	양지영, 김사현, 이평재	26(4)	한국	대한의생명과학회	비SCIE	2020.12	2288-7415	100%
9	돌의엽의 발효조건에 따른 담마란 사포닌 변화	삼학회지	조순현, 고성권	14(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2020. 12	2714-0245	100%
10	다이아이온(HP-20)을 이용한 인삼 사포닌의 성분 분획	삼학회지	오슬기, 고성권, 조순현	14(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2020. 12	2714-0245	100%
11	한국산 및 중국산 자근의 나프토크논계 성분비교를 통한 품질특성	한국화장품 미용학회지	김도형, 정민제, 고성권	10(3)	한국	한국화장품미용학회	비SCIE	2020. 12	2234-330X	100%

12	Optimization of Conditions for High Concentration of Eleutheroside E and Chlorogenic Acid Components of Acanthopanax koreanum Stem Extract	Biomedical science letters	김성기 이재범, 고성권, 김사현	26(4)	한국	대한의생명과학회	비SCIE	2020.12	2288-7415	100%
13	옻나무의 추출조건에 따른 페놀성 성분 함량 변화	한국약용작물학회지	지용우, 황유진, 양병욱, 고성권	29(1)	한국	한국약용작물학회	비SCIE	2021. 02	1225-9306	100%
14	한국전통 산양삼 식초와 홍삼 식초의 기능성분과 항산화 작용	산업식품공학	안창호, 양병욱, 고성권	25(1)	한국	한국산업식품공학회	비SCIE	2021. 02	1226-4768	100%
15	Evodiamine Inhibits Helicobacter pylori Growth and Helicobacter pylori-Induced Inflammation	International journal of molecular sciences	양지영, 김종배, 이평재, 김사현	22(7)	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2021.07	1422-0067	100%
16	에어프라이어 가공 수삼의 진세노사이드 성분 변화	삼학회지	한혜인, 고준휘, 고성권	15(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2021. 12	2714-0245	100%
17	40년산 산삼의 근권 미생물상 분석	삼학회지	이효진, 조순현, 고성권, 양병욱	15(1)	한국	고려인삼포럼	비SCIE	2021. 12	2714-0245	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2019년 한국생약학회 학술대회	Sung Ho Kang, Beom Kyun An, Yu Jin Hwang, Byung Wook Yang and Sung Kwon Ko	2019. 11. 28.	서울 드래곤시티호텔	한국
2	2020년 한국약용작물학회 학술대회	Yu Jin Hwang, Do Hyeong Kim, Jong Deuk Ahn, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2020. 10. 7.	온라인	한국
3	2020년 한국약용작물학회 학술대회	Young Woo Chi, Yu Jin Hwang, Beom Kyun An, Do Hyeong Kim, Jong Deuk Ahn, Sung Kwon Ko	2020. 10. 7.	온라인	한국
4	2020년 한국약용작물학회 학술대회	Soon Hyun Cho, Sa Hyun Kim, Yong Ju Park, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2020. 10. 7.	온라인	한국

5	2020년 고려인삼학회 추계 학술대회	Beom Kyun An, Yu Jin Hwang, Min Je Jeong, Yeo Bi Jeong, Da Hee Ko, Do Hyeong Kim, Soon Hyun Cho, Sung Kwon Ko	2020. 10. 19.	제주 라마다호텔	한국
6	2020년 고려인삼학회 추계 학술대회	Jin Ok Park, Do Hyeong Kim, Yu Jin Hwang, Beom Kyun An, Seo Yeon Jang, Hye In Han, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2020. 10. 19.	제주 라마다호텔	한국
7	2020년 고려인삼학회 추계 학술대회	Jae Young Her, Do Hyeong Kim, Yu Jin Hwang, Beom Kyun An, Min Je Jeong, Seo Yeon Jang, Hye In Han, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2020. 10. 19.	제주 라마다호텔	한국
8	2021 (사)한국산업식품공학회 추계 학술대회	Seon Young Shin, Do Hyeong Kim, Su Hui An, Hyeon Ji Oh, Seo Yeon Jang, Ye Vin Jin, Hye In Han, Zeng Xiaoyan, Yong Ju Park, Young Woo Chi, Sung Ho Kang, Chae Won Kim, Jun Hwi Ko, Hyojin Lee, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2021.10.14..	강릉시 라카아리조트	한국
9	2021 (사)한국산업식품공학회 추계 학술대회	Su Hui An, Do Hyeong Kim, Seon Young Shin, Hyeon Ji Oh, Seo Yeon Jang, Ye Vin Jin, Hye In Han, Zeng Xiaoyan, Jae Young Her, Jin Ok Park, Jun Hwi Ko, Soon Hyun Cho, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2021.10.14..	강릉시 라카아리조트	한국
10	2021 (사)한국산업식품공학회 추계 학술대회	Hyeon Ji Oh, Do Hyeong Kim, Su Hui An, Seon Young Shin, Ye Vin Jin, Zeng Xiaoyan, Jun Hwi Ko, Hyojin Lee, Soon Hyun Cho, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2021.10.14..	강릉시 라카아리조트	한국
11	2021년 고려인삼학회 추계 학술대회	Hye In Han, Do Hyeong Kim, ZengXiaoyan, Seon Young Shin, Su Hui An, Hyeon Ji Oh, Seo Yeon Jang, Ye Vin Jin, Jun Hwi Ko, Soon Hyun Cho, Byung Wook Yang, Sung Kwon Ko	2021. 10. 18.	제주 라마다호텔	한국
12	2021년 한국식품영양과학회 국제심포지엄	Eun Bi Han, Se In Park, Won Jin Lee, Do Hyeong Kim, Su Hui An, Hyojin Lee, Soon Hyun Cho, Sung Kwon Ko, Byung Wook Yang.	2021. 10. 27.	부산시 Bexco	한국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2022	최종보고서	2022. 02. 03	

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	자근(Lithospermum erythrorhizon) 추출물을 유효성분으로 포함하는 향 균 또는 향진균 조성물, 식품 첨가제, 약학적 조성물 및 화장료 조성물	한국	세명대학교 산학협력단	2020.11.13	10-2020-0152300	-	-	-	-	100%	제품화 활용

지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	자근복합추출물	2021. 03. 09	(주)다정	(주)다정	제품화	1년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		1) 국내 생약자원 활용 2) 자몽종자추출물에서 자근복합추출물로 대체 가능성 확인			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(천원)	20,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		0원	200,000	700,000	
	시장 점유율	단위(%)		현재까지	3년 후
국내		0%	-	-	
국외		0%	-	-	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		-			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출	-	-	-	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	자근복합추출물	㈜다정	4명	7명	11명
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	2명	
		생산인력	57명	
	개발 후	연구인력	2명	
		생산인력	66명	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
-	-	-	-	-
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	자근복합추출물	-	-	-	-	7	
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
-	-	-	-	-	-

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	대학	2021	3	3	3	-	6	3	4	4	-	-	1

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원
1	약용작물전공	본초학 강연	강원농업마이스터 대학	8	32	608

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용
1	유치	2021-2024	중국	박사	한식품영양	천연물 향균소재

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 신소재 개발 - 신소재 개발 및 성분분리분석 - 항균시험 및 작용기전 규명 - 항진균시험 및 성분 표준화 - 제조공정 표준화 및 안전성 시험	○ 자근 복합 추출물의 항균, 항진균 작용의 천연 보존료 특허 출원 및 품목제조보고서 제출 제품화 - 특허출원 및 최종보고서 작성 - 항균시험 및 작용기전 최종보고서 작성 - 항진균시험 및 성분 표준화 최종보고서 작성 - 제조공정 표준화 최종보고서 작성, 안전성 시험은 CRO 시험기간 문제로 시험결과 일부 최종보고서 작성	95

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

기술이전이 미완료되었으나, 특허가 등록되는 대로 기술이전을 실시할 예정이며, 3차년도 안전성 시험은 단회독성과 4주 반복 독성시험, 소핵시험, 조제물 시험 등을 완료하여 최종보고서에 보고하였으나, 장시간 시험기간이 필요한 13주 반복 독성시험, 유전독성시험 일부는 CRO GLP위탁연구기관에서 진행중에 있는 관계로 최종보고서에 시험결과가 수록되지 못하였으므로 목표 미달의 원인이 되었습니다. 안전성 시험이 완료(2022. 01. 28)되는 대로 최종보고서를 수정하여 보고하도록 하겠습니다.

2) 자체 보완활동

참여기업인 (주)다정에서 제품 생산 및 유통에 대한 시장조사와 사업계획을 준비하고 있음.

○ 자근복합추출물 판매 예상단가

보존료	자근복합추출물	자몽종자추출물	복합황금추출물
판매단가(원/kg)	약 35,000원	95,000원	38,000원

○ 기존 보존료 제품에 대한 판매현황

2020년 식품 및 식품첨가물의 생산실적 자료를 활용하면 2020년 총 식품첨가물 보존료 시장은 약 6억8천만원정도이며, 이중 자몽종자추출물은 2017년에 1백4십만원 정도이며 그 이후는 생산 실적이 없음으로 확인됨. 그리고 자료에서는 복합황금추출물은 생산실적을 확인할 수 없었음.

○ 천연보존료 사용현황

2020년 기준으로 (주)다정에서 사용되고 있는 복합황금추출물의 양은 약 100kg 수준으로 소진 되고 있으며, 이를 금액으로 환산하면 약 3백8십만원정도로 파악됨. 이는 (주)다정의 ODM 방식이 아닌 OEM 방식으로 운영이 되다 보니 사용량이 저조한 것으로 파악됨.

○ 천연보존료 제품 적용함량

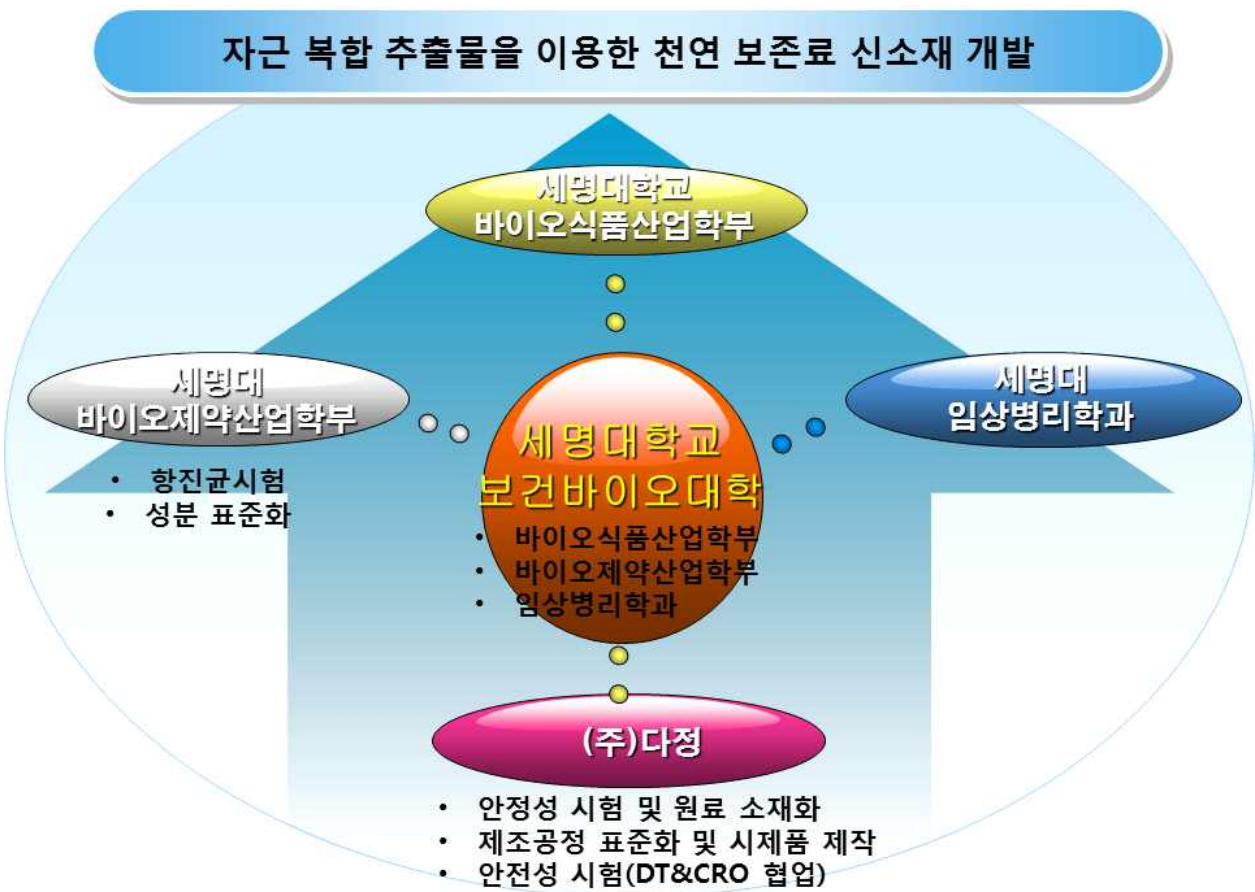
구분	자근복합추출물	복합황금추출물
투입함량	0.08%	0.1% 적용
적용대상	음료류	음료류
비고	과제 제군시험 결과	OEM 방식으로 적용

○ 천연보존료인 자근복합추출물 제품에 사업화 전략계획

(주)다정은 홍삼제품을 포함한 여러 음료류를 생산하고 있는 업체이며, OEM 과 ODM을 포함하여 연간 음료류는 약 2,500톤을 소화하고 있다. 따라서 사업화를 OEM 형태에서 ODM 형태로 전환하여 천연보존료인 자근복합추출물을 제품에 적용된다며, 보존료 매출은 기존(약 3백8십만원) 보다 상승하리라 기대하고 있다. 상기와 같은 내용으로 약 2,500톤에 해당하는 양에 천연보존료인 복합황금추출물 대신 자근복합추출물로 0.1%의 양으로 적용한다면, 약 9천여만원의 매출을 기대할 수 있을 것으로 보인다. 또한 기존 복합황금추출물 단가보다 저렴하기 때문에 연간 약 7백여만원정도 원가절감이 발생되리라 기대하고 있다.

3) 연구개발 과정의 성실성

○ 본 연구는 천연 소재를 이용한 식품 안전성이 확보된 천연물로서 자근 복합 추출물을 대상으로 천연 보존료 개발 추진하고자 하였습니다. 그 연구의 일환으로 세명대학교 보건바이오대학(1세부, 2세부, 3세부)과 참여기업 (주)다정 두 연구기관이 긴밀하게 일체화된 소통으로 공동연구를 진행하기에 어려움이 없었습니다. 1세부 연구기관인 세명대학교 바이오식품산업학부 고성권교수팀은 자근 복합 추출물 신소재 개발 및 성분 분리 및 분석 등 주요 핵심기술 개발 담당하고, 2세부 연구기관인 세명대학교 임상병리학과 김사현교수팀은 자근 복합 추출물의 Kirby-Bauer's disk diffusion test 등 항균시험 및 메커니즘 분석 등 기반기술 개발 담당하며, 3세부 연구기관인 세명대학교 바이오제약산업학부 조순현교수팀은 자근 복합 추출물의 항진균 활성(유효성 검정, MIC test)을 검증하고 또한 자근 복합 추출물 성분 표준화, 재현성 검증 등 기반기술 개발 담당하였습니다. 또한, 참여기업이며, 제품 산업화를 담당할 4세부 연구기관으로서 (주)다정 중앙연구소 박용주연구소장팀은 자근 복합 추출물을 활용한 제품 제조를 위하여 원료 제조공정 표준화 확립, 원료 안정성 연구 및 생산 적용, 안전성 시험(위탁연구 진행) 등을 통해 상용화 및 테스트 담당을 맡아서 진행하였습니다. 이를 바탕으로 천연 보존료 신소재 특허(출원번호 : 10-2020-0152300)를 출원하였고, 제품화를 이룰 수 있었습니다.



<연구개발 협력 추진 체계도>

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 측면

- 자근 복합 추출물 천연 보존료 신소재 개발
- 자근 복합 추출물 항균 신기능성 규명
- 의약품(항균 예방 및 치료) 신약 가능성 파이프 라인 확보

○ 경제적·산업적 측면

- 국내 생약 자원 활용
 - 신 천연 보존료 개발로 식품 시장과 의약품 시장 신수요 창출
 - 국산 식품 수출 증대
 - 식품 제조업의 수익성 향상과 소비 확대
 - 식품 수요 증대와 생약농가 소득 향상
 - 글로벌 천연 보존료 시장 진출 및 선점
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

천연 보존료 소재 특허(출원번호 : 10-2020-0152300)가 등록이 되는 대로 기술이전을 실시하고, 제품화한 상품을 출시할 계획이며, 인력양성으로 박사 5명을 추가로 양성하겠습니다.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사	5	
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전	1	
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업 자
근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 개발 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림수산식품기술기
획평가원)에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업의 결과임을 밝혀야
한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호			
사업구분	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업				
연구분야	천연 보존료 개발		과제구분	단위	
사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	자근 복합 추출물을 이용한 천연 보존료 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구개발기관	세명대학교		연구책임자	고성권	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019. 05. 20 - 2019. 12. 31	129,000	43,000	172,000
	2차년도	2020. 01. 01 - 2020. 12. 31	193,500	64,500	258,000
	3차년도	2021. 01. 01 - 2021. 12. 31	193,500	64,500	258,000
	계	-	516,000	172,000	688,000
참여기업	(주)다정				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021년 1월 21일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
세명대학교	교수	고성권

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

자근 복합 추출물이 기능성 소재인 β -hydroxyisovaleryl shikonin, cinnamic aldehyde, rosmarinic acid를 고농도로 함유한 조성물 개발에 성공하였고, 이 조성물이 우수한 항균 및 항진균 작용이 있음을 시험관내 시험을 통하여 확인하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

자근 복합 추출물을 활용한 천연 보존료 개발로 식품산업 활성화, 농가소득 증대, 인류건강 증진에 기여함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

자근 복합 추출물을 활용한 천연 보존료 개발, 천연 보존료 신소재 개발, 항균 신기능성 규명, 의약품(항균 예방 및 치료) 신약 가능성 파이프 라인 확보

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

자근 복합 추출물에 대한 항균 유효성, 안전성, 지표물질 표준화, 안정성 시험 등 천연 보존료 개발을 위한 충실한 자료 준비

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

논문 100% 이상(SCI 40%, 비SCI 250%) 달성하였으며, 학술발표는 200% 달성하였고, 특허는 출원하여 등록준비 중이며, 곧, 100% 달성할 것으로 사료됨.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
자근 추출 조건 최적화	10	100%	isovaleryl shikonin, β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin 등의 자근 나프토퀴논 소재를 고농도로 함유하는 95% EtOH 추출물 개발 완수
시코닌 성분 표준화	10	100%	isovaleryl shikonin, β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin 등의 자근 나프토퀴논 소재의 HPLC 동시분석 조건을 확립
시코닌 성분 대량 분리 동정	10	100%	Silica gel column chromatography법으로 β -hydroxyisovaleryl shikonin, acetyl shikonin을 대량 분리법 확립
항균시험 및 작용기전	15	100%	자근 복합 추출물 및 함유 생약과 그의 유효성분에 대한 항균시험 및 작용기전 연구 완료
항진균시험	15	100%	자근 복합 추출물 및 함유 생약과 그의 유효성분에 대한 항진균시험 및 작용기전 연구 완료
항균 현장적용시험	10	100%	참여기업의 주력생산제품인 홍삼 액제 제품에 적용하여 항균작용을 확인
안전성 시험	10	100%	독성시험으로 단회, 4주 DRF, 유전독성시험, 13주 반복 독성시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험을 완료
소재의 안정성 시험	10	100%	HPLC를 이용한 자근복합추출물의 조제물 분석법 밸리데이션 및 안정성 확인시험을 완료
소재 제조공정 최적화	10	100%	소재의 추출 시간, 온도, 용매 조건에 따른 추출제조공정 최적화 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

천연 보존료 소재개발과 더불어 항균 및 항진균시험 결과가 우수하고, 독성시험에서 안전성이 인정되어서, 향후 천연 보존료 제품 개발이 기대됨,

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

안전성 시험 등 연구기간이 장시간이 소요되는 것을 고려하여 평가시 참고하여 주시기를 부탁드립니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

자근 복합 추출물을 활용한 천연 보존료 개발, 국내 천연물 활용 정책 제언, 항균 신약 개발위한 자료 확보, 항균 기능성화장품 소재 확보가 가능함.

IV. 보안성 검토

해당사항 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	5	5			30		30	20		10										
최종 목표	1	1			1		1	20		4		5	6	2.0	6	6				
당해 년도	목표																			
	실적	1					1			8		2	15	5.9	12	9				
달성률 (%)	100	0			0		100	0		200		40	250	295	200	150				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	자근, 배초향, 계피 등을 함유하는 자근 복합 추출물 천연 보존료 소재 기술(특허 등록)
②	지표물질(β -hydroxyisovaleryl shikoniin, cinnamic aldehyde, rosmarinic acid) 성분분석 표준화 기술
③	자근 복합 추출물 제조 공정 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기술이전, 제품 개발
②의 기술	제품 품질관리
③의 기술	표준화 제품생산

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용(기))
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T 평 가 제 도	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 관 I F					
단위	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	5	5			30		30	20		10									
최종목표	1	1			1		1	20		4		5	6	2.0	6		6		
연구기간내 달성실적	1						1			8		2	15	5.9	12		9		
연구종료후 성과창출 계획		1			1			20				2	5			5			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	자근, 배초향, 계피 등을 함유하는 자근 복합 추출물 천연 보존료 소재 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000 천원
이전방식 ²⁾	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2022년 12월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)