

117077-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003382-01

울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선
건강기능식품 개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발

2021.01.22.

주관연구기관 / 고려은단(주)
협동연구기관 / 경희대학교
(주)캠온
네오뉴트라(주)

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2017. 11. 01. ~ 2020. 10. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 01. 22.

주관연구기관명 : 고려은단(주)	(대표자) 조 영 조 (인)
제1협동연구기관명 : 경희대학교	(대표자) 김 우 식 (인)
제2협동연구기관명 : (주)캠온	(대표자) 송 시 환 (인)
제3협동연구기관명 : 네오뉴트라(주)	(대표자) 강 재 학 (인)
위탁연구기관명 : (주)현대바이오랜드	(대표자) 이 희 중 (인)



주관연구책임자 : 임 미 경
제1협동연구책임자 : 류 종 훈
제2협동연구책임자 : 이 현 걸
제3협동연구책임자 : 유 지 숙
위탁연구책임자 : 유 희 중

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117077-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.11.01. ~ 2020.10.31	단 계 구 분	3년 / 3년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발			
연구책임자	임미경	해당단계 참여연구원 수	총: 17 명 내부: 17 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 250,000천원 민간: 83,334천원 계: 333,334천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 70 명 내부: 70 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부: 830,000천원 민간: 283,334천원 계: 1,113,334천원
연구기관명 및 소속부서명	세부(주관기관) : 고려은단(주) 협동 : 경희대학교, (주)켄온, 네오뉴트라(주)			참여기업명 고려은단(주), (주)켄온, 네오뉴트라(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (주)현대바이오랜드			연구책임자: 유희중	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 등급
-------------------------	-------

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<요약>

○ 연구개발성과

1. 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화

- 최적의 제조공정 확립, 지표성분 함량 측정 시험법 표준화, 기준 및 규격 설정 완료

2. 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명

- 신경세포보호 효과 및 기전 규명, 항염증 효능 및 기전 규명 (in vitro, in vivo)

- 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 단기기억력, 장기기억력 개선 효능 검증

3. 섬썩부쟁이 추출물의 안전성 검증(GLP 독성시험)

4. 인체적용시험 제품의 표준화

- 제형 및 제조공정 확립, 안정성 protocol 개발

5. 경도인지저하자 대상 인체적용시험 완료(유효성, 안전성 입증)

6. 제품의 표준화

- 상승효과 있는 비타민 B 복합체 배합원료로 설정
- 제품 제형 설정, 제조공정 확립, 기준 및 시험법 확립, 유통기한 설정

7. 개별인정형 원료 신청(공인시험 성적서 등의 제출자료 확보)

○ 정량성과

- 논문 게재 : SCI 2편, 비SCI 1편 게재(SCI 2편 투고중)

- 국내 학술대회 발표 : 7건

- 지적재산권 : 특허등록 1건, 특허출원 3건

- 기술실시 : 1건

- 시제품 : 3건

- 고용창출 : 18명

- 홍보전시 : 18건

보고서 면수 180p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 연구의 목적 섬썩부쟁이 추출물을 이용하여 인지능력개선에 대한 효능을 검증하고, 제품화할 수 있도록 원료 및 제품의 표준화를 실시하여 인지능력개선에 도움을 주는 건강기능식품을 개발하는 것임.</p> <p>○ 연구의 내용 1. 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화 2. 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명 3. 섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가 4. 인체적용시험 제품의 표준화 5. 인체적용시험 실시 6. 상승 및 상가 효과 원료 탐색 7. 제품의 표준화 8. 개별인정형 원료 신청</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화 - 최적의 제조공정 확립, 지표성분 함량 측정 시험법 표준화, 기준 및 규격 설정 완료</p> <p>○ 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명 - 신경세포보호 효과 및 기전 규명, 항염증 효능 및 기전 규명 (in vitro, in vivo) - 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 단기기억력, 장기기억력 개선 효능 검증</p> <p>○ 섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가 - GLP시험 완료(단회 투여 독성시험, 13주 반복 독성시험, 유전독성시험)</p> <p>○ 인체적용시험 제품의 표준화 - 제형 및 제조공정 확립, 안정성 protocol 개발</p> <p>○ 인체적용시험 실시 - 경도인지저하자에서 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 및 안전성 입증</p> <p>○ 제품의 표준화 - 상승효과 있는 비타민 B 복합체 배합원료로 설정 - 제품 제형 설정, 제조공정 확립, 기준 및 시험법 확립, 유통기한 설정</p> <p>○ 개별인정형 원료 신청 - 제출자료 확보(공인시험 성적서 등)</p>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 인지기능 및 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 제품화</p> <p>○ 본 연구결과에서 확보한 상승효과 원료(비타민 B complex 등)를 혼합한 기존 제품보다 우수한 효능의 건강기능식품 제품화</p> <p>○ 섬썩부쟁이 추출물 최적화 공정 설정 및 표준화로 원료의 산업적 생산이 가능하여 다양한 제품의 부원료로 활용</p> <p>○ 섬썩부쟁이 추출물의 인지기능 개선 효능 및 기전과 안전성에 대한 과</p>

	<p>학적 검증 자료의 마케팅 활용. 추후 수출 자료로도 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 인지기능 및 기억력 개선의 바이오마커를 다양한 원료의 효능 검증에 활용 ○ 울릉도 자생식물을 이용한 개별인정형 원료 개발로 ‘나고야의정서’ 발효에 의한 수입산 원료의 공급 및 비용적 문제에서 벗어나 국내산 원료 수급을 통한 경쟁력 강화, 농가소득 증대 및 고부가가치 창출이 기대됨 ○ 섬쑥부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-Dicaffeoylquinic acid의 유효성 검증으로 치료제 개발에 활용 가능 ○ 인지기능 및 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품을 통해 치매 예방 효과를 기대할 수 있으며 이는 치매로 인한 사회-경제적 손실을 감소시킬 수 있음. 또한, 전 세계적으로 고령화 사회로 인한 뇌 건강 관심이 고조되고 있어 수출 상품으로 활용될 수 있음 				
국문핵심어 (5개 이내)	섬쑥부쟁이	인지개선	기억력개선	건강기능식품	비타민
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Aster glehni</i>	Cognitive ability	Memory	Functional food	Vitamin

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	150
4. 연구결과의 활용 계획	166
붙임. 참고 문헌	169

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장 연구개발과제의 개요

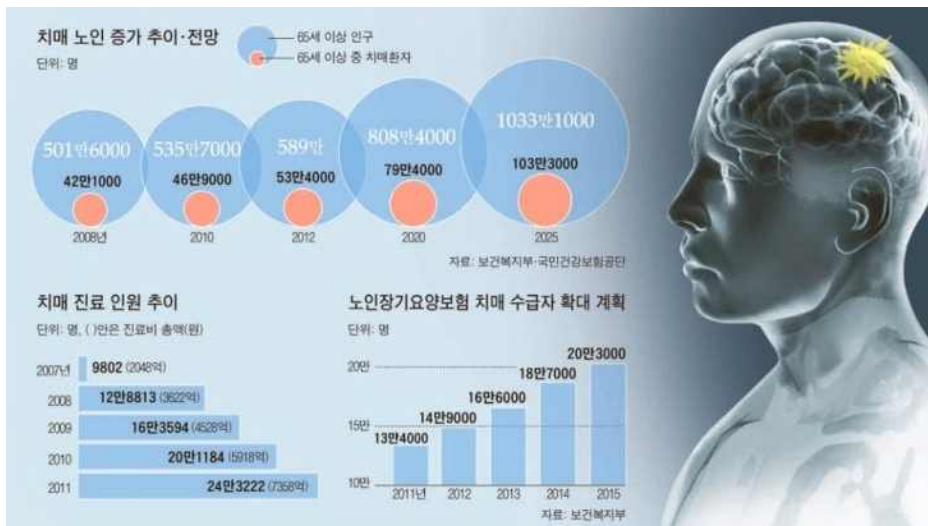
1절 연구개발 목적

섬썩부쟁이 추출물을 이용하여 인지능력개선에 대한 효능을 검증하고, 제품화할 수 있도록 원료 및 제품의 표준화를 실시하여 인지능력개선에 도움을 주는 건강기능식품을 개발하는 것이 최종 목표임.

2절 연구개발의 필요성

1. 치매 관련 국가사업실시

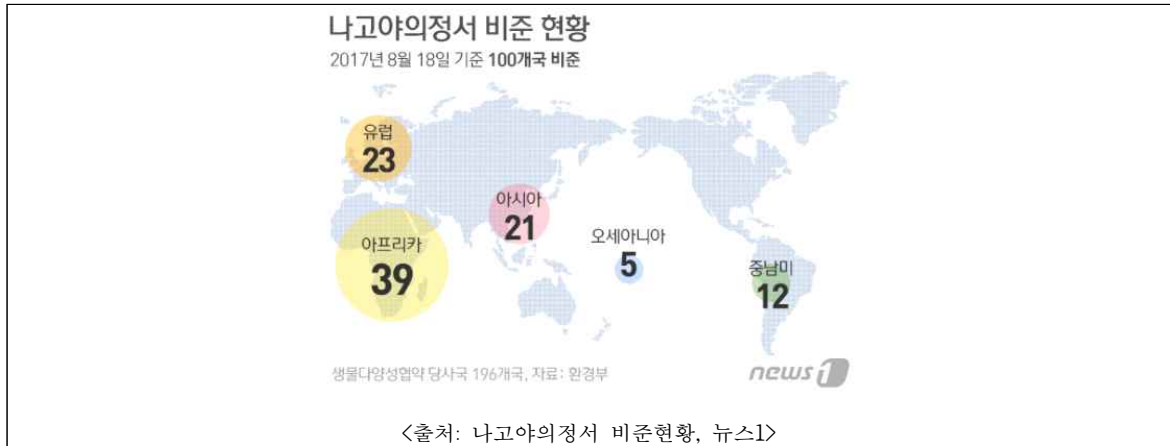
- ‘치매국가책임제’ 시행으로 2017년 10월부터 중증치매 환자의 의료비 부담 완화를 위해 질환 자체의 중증도가 높은 치매는 별도의 일수 제한 없이, 환자의 상태에 따라 의료적 필요가 발생하는 치매는 연간 최대 120일을 적용해 본인 부담율을 10%로 인하하였음. 또한, 치매 조기 발견을 위해 비급여였던 ‘인지장애 검사’를 급여로 전환하고 치매안심센터 확대, 치매환자 전용 병동 구축 등과 같은 치료 서비스를 확대함.



- ‘치매국가책임제’ 실시에 대한 시장의 반응으로 치매 치료제 또는 인지능력 및 기억력 개선 제품에 대한 관심이 매우 커지고 있음.
- 미국의 경우 알츠하이머병 극복을 위해 ‘국가 알츠하이머 프로젝트법(National Alzheimer Project Act, NAPA)’을 제정함(2011.01).
- ADNI (Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative) 사업 추진.
 치매 조기 진단을 위한 알츠하이머병의 임상적 소견과 뇌영상, 생물학적 지표 측정 및 연구에 공유. ADNI(미국), E-ADNI(유럽), J-ADNI(일본), K-ADNI(한국) 운영.

2. ‘나고야의정서’ 시행으로 인한 국가 자원 개발의 필요

- 대다수 천연물 유래 건강기능식품은 중국, 베트남 등의 값싼 해외원료에 의존하고 있어 ‘나고야의정서’ 확대 시행으로 인해 비용 증가 및 원료 수급에 악영향이 미칠 것으로 예상됨. 따라서 국내 자원 개발을 통해 안전하고 지속적인 원료 공급의 필요성이 증대되고 있음.



- 해외 유전자원 이용 시 해당 국가 법률에 따라 사전 허가를 받아야 하는 나고야의정서의 비준에 대해 우리나라 생명산업 기업 8.8%만 대응 준비 중인 것으로 조사됨. 바이오기업의 91.2%는 나고야의정서에 대한 대책이 없는 것으로 발표됨.¹⁾
- 우리나라는 지난 2011년 9월 나고야의정서에 서명했으며, 2017년 나고야의정서 비준동의안이 국회 본회의에서 가결돼 8월 17일부터 발효됨.²⁾ 천연물원료 및 의약품을 생산하는 업체는 적지 않은 영향을 받을 것으로 우려되고 있음. 특히 중국에서 원료를 수입해 천연물원료를 생산하는 업체는 상당한 타격을 받을 것으로 전망됨. 과도한 로얄티 지급 요구에 대비한 대체물질 마련, 원료수입선의 다변화 등 충격을 최소화하기 위한 다각적인 검토가 필요한 실정임.
- 그러나 본 사업에서 사용하는 원료인 섬쭉부쟁이는 울릉도에서 자생하는 섬쭉부쟁이의 전초를 활용함으로써 안정적인 국내산 원료 수급을 통한 경쟁력 강화, 농가소득 증대 및 고부가가치 창출 가능함.

3. 예방적 차원의 건강기능식품 개발을 통한 사회-경제적 손실 감소

- 의료기술의 발달로 인한 수명 연장으로 노인 인구의 증가와 함께 퇴행성 신경질환인 치매 환자의 비율이 급증하고 있음. 보건복지부에 따르면 65세 이상 치매 환자는 현재 72만 5000명으로 추산되며 2030년에는 100만명을 넘어설 것으로 예상됨. 2015년 기준으로 치매 환자 1인당 의료·요양비용은 2033만원(직접의료비 1084만원)으로 조사됐음.
- 5대 만성질환 1인당 진료비는 뇌혈관 204만원, 심혈관 132만원, 당뇨 59만원, 고혈압 43만원, 관절염 40만원임을 볼 때, 치매환자는 연간 310만원으로 5대 만성질환 진료비 보다 높음. 또한 우리나라 성인 3명 중 1명은 각종 질환 중 치매를 가장 두려워하는 것으로 나타났음. 특히, 60대 이상에서는 가장 피하고 싶은 병으로 치매를 꼽은 비율(38.9%)이 암(38.8%)을 앞섬.³⁾

1) 바이오기업 91.2% “나고야의정서 대책 없다”, iPhomics, 2016.08.08

2) 나고야의정서 18일 발효, 천연물·의약품 제약업체 ‘타격’, 약업신문, 2017.08.09

3) [치매, 이길수 있는 전쟁] 치매 환자 50여만명. 15분마다 1명꼴 생겨, 조선일보, 2013.05.02



- 일부 노년층의 질환에서 벗어나 발병연령대가 낮아지고 있어 사회적으로 문제가 되고 있고 치매를 근본적으로 치료하는 치료제의 부재와 부작용으로 인하여 예방을 위한 건강기능식품의 필요성이 증대되고 있음.

(단위 : 명, %)

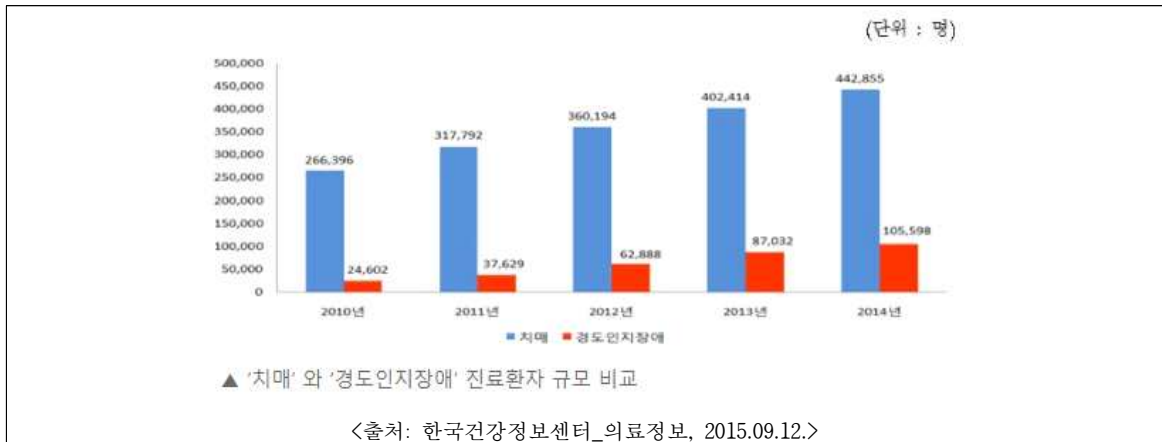
구분	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년	연평균 증감률	
계	전체	50	76	127	174	210	42.9%
	남성	33	48	78	110	133	41.9%
	여성	68	105	175	239	287	43.3%
40대 이하	전체	4	6	8	10	10	26.3%
	남성	3	4	5	6	7	25.9%
	여성	5	8	12	14	14	26.5%
50대	전체	47	68	116	148	158	35.8%
	남성	26	36	57	73	78	31.3%
	여성	67	100	175	223	238	37.5%
60대	전체	169	253	399	528	592	36.9%
	남성	110	161	247	330	369	35.3%
	여성	223	338	541	714	804	37.7%
70대	전체	399	581	899	1,220	1,470	38.6%
	남성	333	471	712	977	1,166	36.8%
	여성	446	663	1,039	1,404	1,702	39.7%
80대 이상	전체	477	679	1,079	1,450	1,780	39.0%
	남성	522	723	1,128	1,550	1,863	37.4%
	여성	457	660	1,058	1,406	1,742	39.7%

▲ 연령대별 인구 10만명 당 '경도인지장애' 진료환자 현황

(단위 : 명, %)

연령대	2010년			2011년			2012년			2013년			2014년		
	치매	경도인지장애	비중	치매	경도인지장애	비중	치매	경도인지장애	비중	치매	경도인지장애	비중	치매	경도인지장애	비중
계	266,396	24,602	9.2	317,792	37,629	11.8	360,194	62,888	17.5	402,414	87,032	21.6	442,855	105,598	23.8
40대 이하	2,450	1,398	56.9	2,562	1,923	75.1	2,695	2,907	107.9	2,535	3,424	135.1	2,353	3,434	145.9
50대	8,890	3,164	35.6	10,083	4,983	49.1	10,404	8,762	84.2	10,650	11,539	108.6	11,006	12,679	115.2
60대	36,447	6,713	18.4	39,964	10,149	25.4	40,085	16,517	41.2	39,885	22,673	56.8	41,082	26,542	64.4
70대	104,267	9,449	9.0	124,041	14,683	11.8	140,140	24,508	17.5	154,897	34,568	22.3	164,973	42,760	25.9
80대 이상	113,834	3,478	3.4	141,142	5,921	4.2	166,870	10,194	6.1	194,467	14,828	7.6	225,471	19,883	8.9

▲ 연령대별 '치매' 대비 '경도인지장애' 진료환자 현황 비교



- 치매 고위험군의 조기 발견과 선제적 치료를 통해 치매의 발병을 2년간 지연시킬 경우 20년 후에는 치매 유병률을 약 80% 수준으로 낮출 수 있고 치매 중증도도 감소시킬 수 있으며 이로 인한 국가적 차원에서의 치매 관련 비용 절감액은 2020년 3조 8,000억원, 2030년에는 약 7조 8,000억원 정도로 추산된다는 보고가 있음.⁴⁾
- 사회·경제적 파급이 큰 치매문제에 대하여 개별인정형 건강기능식품을 통한 예방 효과로 간접적 해결책 제시 가능.

4. 인지능력 및 기억력개선 개별인정형 건강기능식품 개발을 위한 국가적 연구개발투자 필요

- 전체 치매 유형 중 70% 이상을 차지하는 알츠하이머형 치매는 뇌의 특정 부위에 β -amyloid가 축적되어 뇌조직에 광범위한 구조이상을 일으키며, 콜린성 뉴런의 파괴가 주요 증상임. 따라서 섬삭부쟁이의 β -amyloid에 의한 세포사멸 억제 효과는 치매 예방을 위한 건강기능식품 개발에 중요한 기능을 할 것으로 예상됨.
- 치매 기전에 대한 명확한 연구가 미흡하기 때문에 섬삭부쟁이의 과학적 검증 자료를 통한 기전 규명으로 치매 기전 연구에 도움을 줄 수 있음. 비타민C에 의한 치매 예방효과가 보고된 바 섬삭부쟁이와의 시너지 효과 연구를 통한 차별화된 건강기능식품으로 개발될 수 있음.

5. 인지능력 개선 건강기능식품 수출 기대

- 전 세계적으로 고령화 사회로 인한 뇌 건강에 대한 관심이 커지고 있어 인지능력 및 기억력 개선과 관련된 건강기능식품 시장이 지속적으로 요구됨.
- 중국의 경우 자국 제품에 대한 불안감 때문에 수입제품 특히 우리나라 제품에 대한 신뢰도가 높음. 또한, 우리나라와 같이 예로부터 천연물질을 치료 및 예방제로 활용해 왔기 때문에 시장진입이 수월할 것으로 기대됨.
- 중국의 베이비부머 세대들의 고령화에 따라 중국으로의 수출을 통해 매출 신장이 기대되며 점차 미국, 유럽 등으로 수출 영역을 확장해 나갈 수 있을 것으로 예상됨.

4) 치매환자, 20년마다 2배 가량 증가, 메디컬투데이, 2015.02.05

3절 연구개발의 범위

No.	주제	주요 개발내용	기관	
1	섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화	1	섬썩부쟁이 추출물의 기준 및 시험법 확립을 위한 예비실험	고려은단 바이오랜드
		2	섬썩부쟁이 추출물의 원재료 판별	
		3	섬썩부쟁이 추출물 제조공정 연구	
		4	섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화	
2	섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명	1	시험관시험에서 섬썩부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효능 및 기전 검증	고려은단 경희대학교
		2	동물시험에서 섬썩부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효능 및 기전 검증	
		3	인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물의 기억력 개선 행동 평가	
3	섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가	1	설치류 단회 투여 독성시험	캠온
		2	비설치류 단회 투여 독성시험	
		3	설치류 2주 DRF 독성시험	
		4	설치류 13주 반복 독성시험	
		5	복귀돌연변이시험(유전독성시험)	
		6	염색체이상시험(유전독성시험)	
		7	소핵시험(유전독성시험)	
		8	조제물 분석	
4	인체적용시험 제품의 표준화	1	인체적용시험을 위한 원료 생산 공정 확립	바이오랜드 고려은단
		2	인체적용시험 제품 제조공정 연구	
		3	인체적용시험 제품의 기준 및 시험법 설정	
		4	인체적용시험 제품의 안정성 protocol 개발	
5	인체적용시험	1	기능성 원료의 인체적용시험 계획서(protocol) 개발	네오뉴트라
		2	인체적용시험 실시	
6	상승 및 상가 효과 원료 탐색	1	섬썩부쟁이 추출물과 배합원료 혼합물의 상가 및 상승 효과 검증	고려은단
		2	인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin B 복합체 혼합물의 상승 효과 검증	
7	제품의 표준화	1	제품화를 위한 제형 및 제제 연구	고려은단
		2	제품의 기준 및 시험법 설정	
		3	제품의 안정성(stability) 시험	
		4	제품에 대한 품질 관리 및 평가	
8	개별인정형 원료 신청	1	기준규격 등 공인시험 자료 확보	고려은단
		2	Master file 작성	

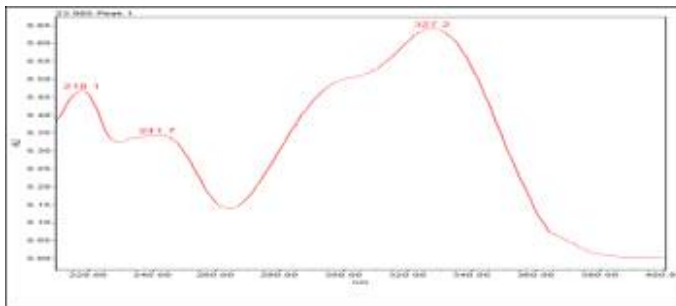
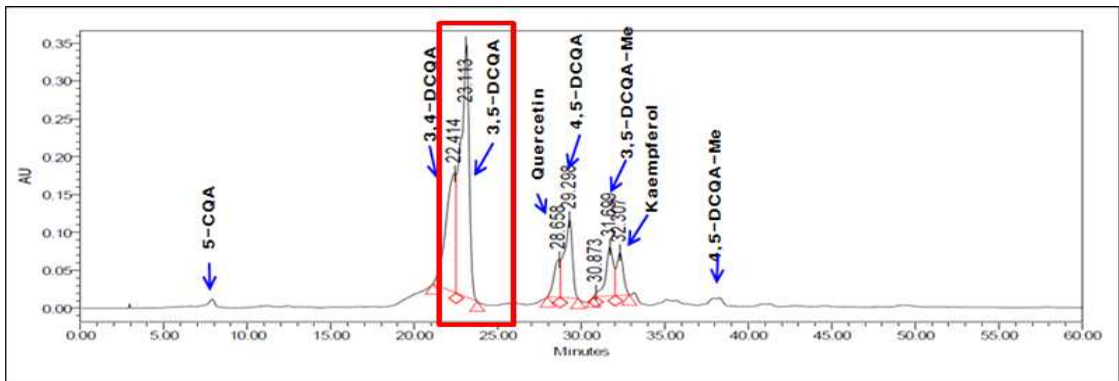
2장 연구수행 내용 및 결과

1절 섬쭈부쟁이 추출물의 원료의 표준화

1. 섬쭈부쟁이 추출물의 기준 및 시험법 확립을 위한 예비실험

가. 섬쭈부쟁이 추출물의 지표물질 선정(KIST 제공)

- (1) 섬쭈부쟁이 에틸아세테이트 분획물을 HPLC로 profiling 하였을 때 함량이 가장 높은 3,5-Dicaffeoylquinic acid(이하, 3,5-DCQA)를 지표물질로 선정함.



<UV spectrum of 3,5-DCQA>

3,5-DCQA의 최적의 UV과장은 327.3이므로, 표준화시키는 과정에서 320 ~ 330 nm를 기준으로 HPLC를 측정하도록 설정하였음.

나. 섬쭈부쟁이 추출물의 지표성분 분석법 최적화

- (1) 제품의 안정적인 품질관리를 위해 분석법 최적화 연구를 진행하였음. 이동상을 메탄올과 Acetic acid 대신 Phosphoric acid로 조절한 DW와 ACN을 사용하고 Gradient 조건을 변경함. Flow rate을 1.3 mL/min으로 변경하고 Oven temperature를 40°C로 변경하여 330 nm에서 측정하는 것으로 분석조건 변경함.

분석조건 변경 후 3,4-DCQA와의 resolution이 향상되고 피크 모양이 sharp해져 분석법이 개선됨을 확인함.

(가) 변경된 분석조건

사용기기	HPLC
컬럼	Polaris 5 C18-A(250 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent) 또는 이와 동등한 컬럼
컬럼온도	40°C
샘플온도	4°C
주입량	5 μL
이동상	Gradient mode (A) DW : Phosphoric acid = 99.5 : 0.5(v/v) (B) ACN : Phosphoric acid = 99.5 : 0.5(v/v)
유속	1.3 mL/min
검출과장	330 nm

* Mobile phase condition for HPLC analysis

Time(min)	(A)	(B)
0	95	5
7	95	5
27	70	30
28	10	90
30	10	90
31	95	5
40	95	5

(2) Method Validation을 통한 분석법 검증

설정된 분석법이 섬쑥부쟁이 추출물의 지표성분인 3,5-DCQA를 분석하기에 적합한 분석법인지 확인하기 위하여 Method validation을 진행하여 분석법을 검증하였음. 시스템적합성, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계의 항목을 각각 측정하여 기준에 적합한 결과를 나타내는지 확인함.

(가) 시스템적합성

면적의 상대표준편차 2.0%, Retention time의 상대표준편차 1.0%를 기준으로 하였을 때 각각 0.28, 0.07%로 우수한 결과를 나타냄.

① 면적

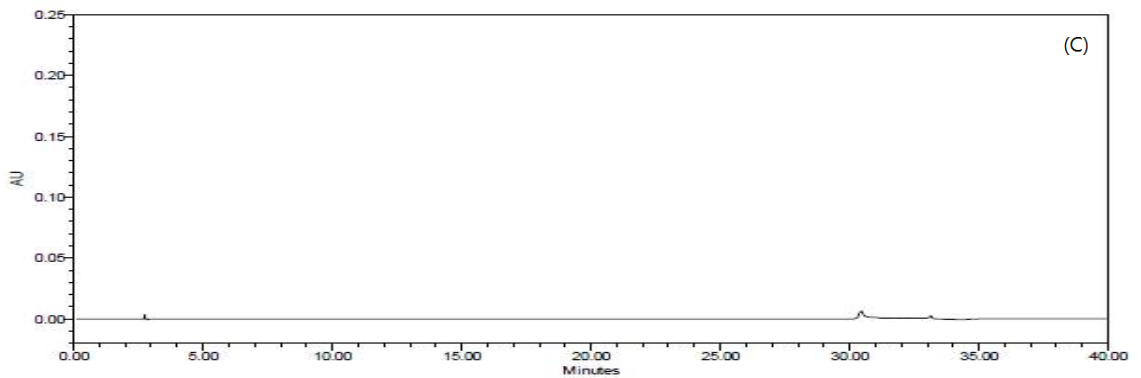
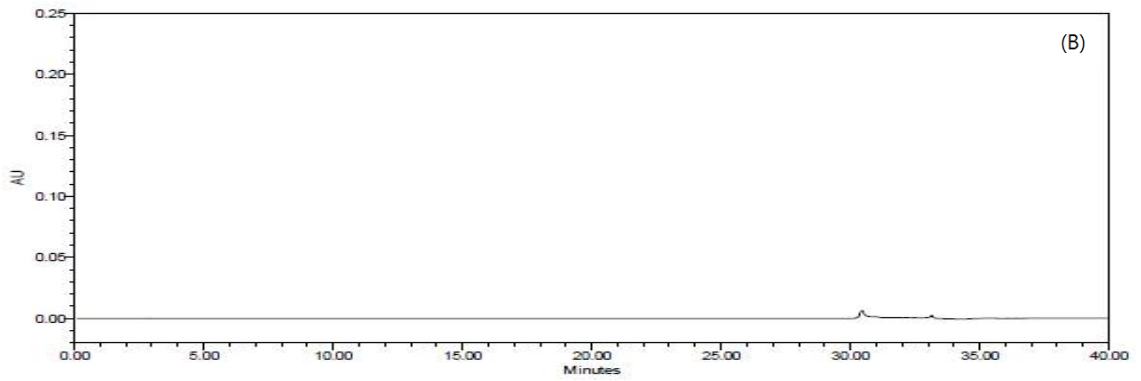
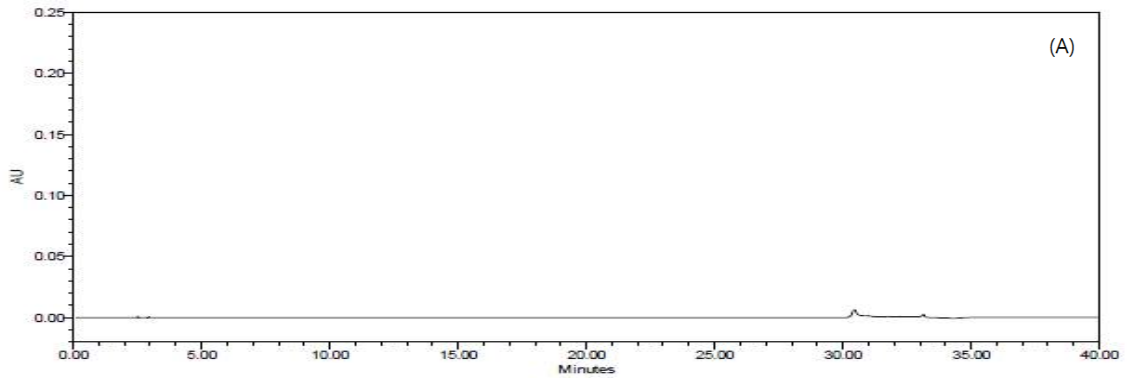
검체		Peak area	평균	표준편차	상대표준편차
농도 (μg/mL)	측정회수				
24	1	349577	348277.50	963.46	0.28
	2	349343			
	3	348183			
	4	347765			
	5	347384			
	6	347413			

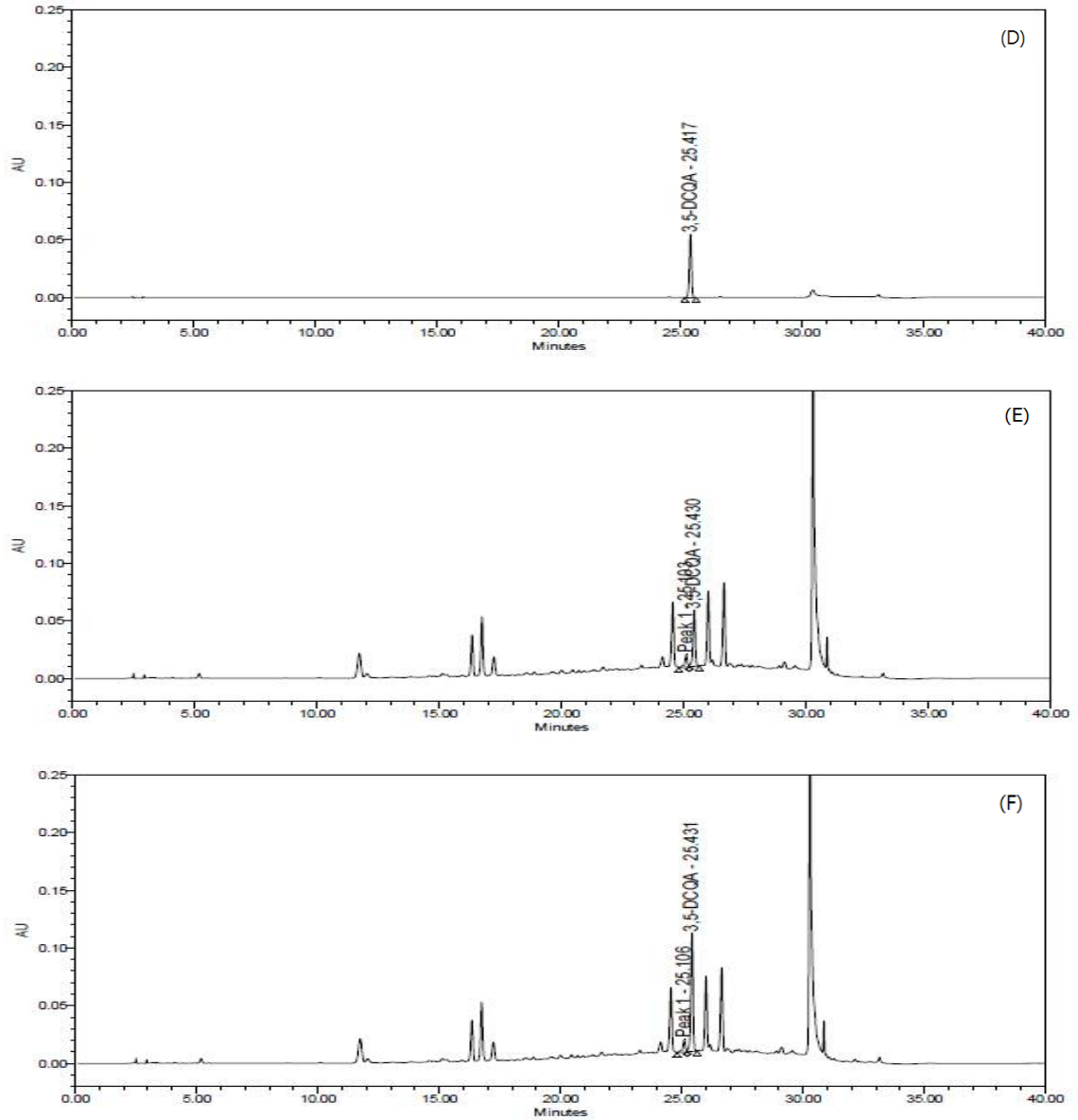
② Retention time

검체		RT	평균	표준편차	상대표준편차
농도 ($\mu\text{g/mL}$)	측정회수				
24	1	25.370	25.393	0.02	0.07
	2	25.375			
	3	25.391			
	4	25.401			
	5	25.411			
	6	25.409			

(나) 특이성

3,5-DCQA 피크가 25.4분대에 검출되는 것을 확인하였으며 주피크에 영향을 주는 인자가 없음을 확인함.



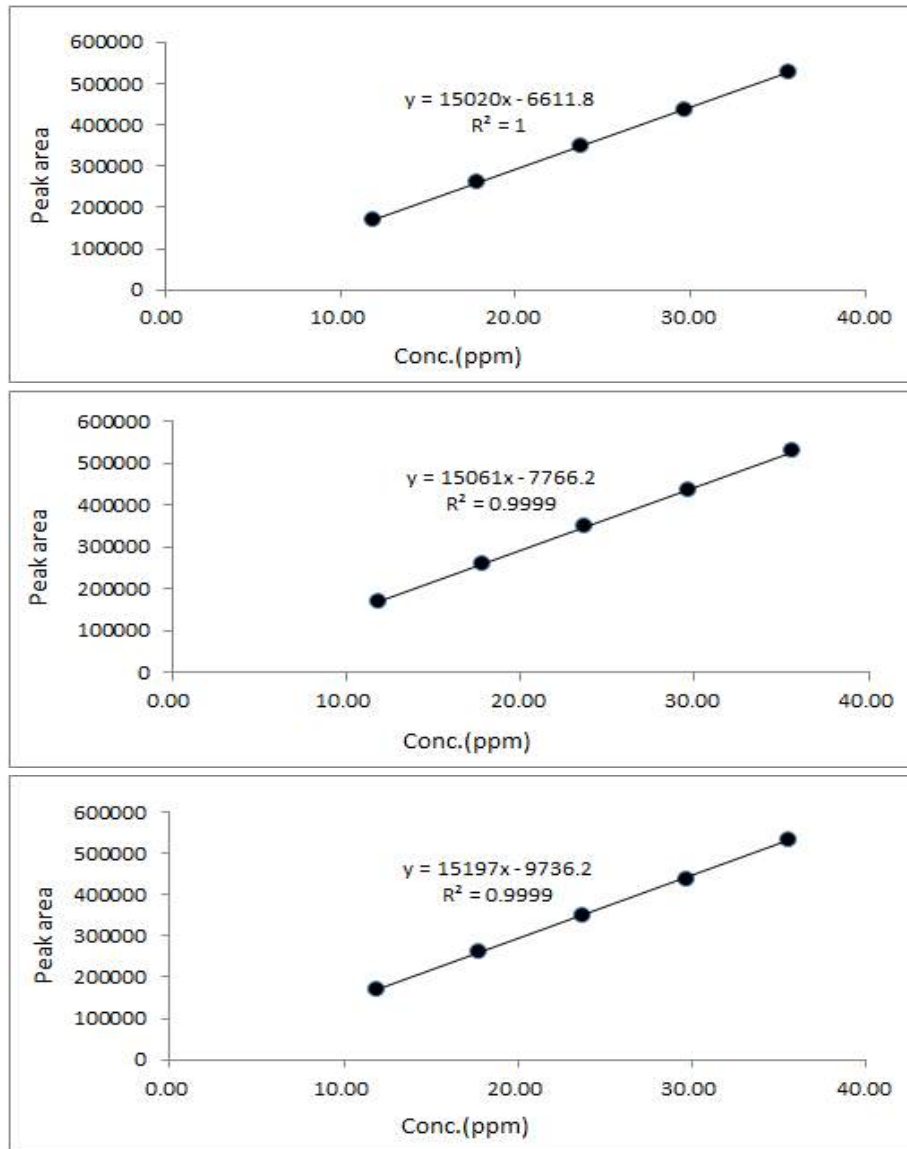


<특이성 크로마토그램>

(A) 회석액, (B) 이동상A, (C) 이동상B, (D) 표준액, (E) 검액, (F) 특이성용액

(다) 직선성

직선성은 Calibration curve로 평가하였으며 적합 기준을 $R^2=0.995$ 이상으로 설정하였을 때, 실험결과 R^2 값이 0.9999 ~ 1.0000($n=3$)으로 적합하였음.



<Calibration Curve>

(라) 정확성

회수율을 측정하여 그 값이 $100 \pm 5\%$ 를 기준으로 설정하였을 때, 18, 24, 30 ppm에서의 회수율 평균값이 각각 99.1, 100.4, 98.5%로 기준에 적합하였음.

Theoretical Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Corrected Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	Measured Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Recovery rate (%)	Difference (%)
18	17.79	254224	17.38	97.6	0.262
		260211	17.77	99.9	0.135
		260105	17.77	99.8	0.128
	Average	258180	17.64	99.1	0.175
	Standard deviation	3426.41	0.23	1.28	0.08
24	23.73	348679	23.63	99.6	0.182

		346216	23.47	98.9	0.345
		359374	24.34	102.6	0.527
	Average	351423	23.82	100.4	0.351
	Standard deviation	6995.03	0.46	1.95	0.17
30	29.66	426304	28.78	97.0	0.426
		435802	29.41	99.2	0.203
		436095	29.43	99.2	0.223
	Average	432734	29.20	98.5	0.284
	Standard deviation	5570.18	0.37	1.24	0.12

(마) 정밀성

정밀성은 반복성, 실험실내 정밀성을 확인하였으며 반복성은 정확성 측정값을 이용하여 평가하였고 실험실내 정밀성은 시험일과 시험자를 달리하여 확인하였음. 두 항목의 %RSD 기준이 3%일 때, 모두 기준에 적합한 결과를 얻었음.

① 반복성

Theoretical Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Corrected Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Peak area	Average	Standard deviation	Relative Standard deviation(%RSD)
18	17.79	254224	258180	3426.41	1.33
		260211			
		260105			
24	23.73	348679	351423	6995.03	1.99
		346216			
		359374			
30	29.66	426304	432734	5570.18	1.29
		435802			
		436095			

② 실험실내 정밀성

Theoretical Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Corrected Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Peak area	Average	Standard deviation	Relative Standard deviation(%RSD)
18	17.79	263180	264642	2988.47	1.13
		268080			
		262666			
24	23.73	358659	359252	1515.56	0.42
		358122			
		360974			
30	29.66	445652	441727	3666.08	0.83
		441139			
		438391			

(바) 검출한계 및 정량한계

검출한계, 정량한계 모두 직선성 최소 범위(12 ppm) 이하로 측정되어 적합함을

확인함.

① 검출한계

σ (standard deviation of intercept)	1579.8425	S(mean of slope)	15092.9204
Limits of Detection	0.345		ppm

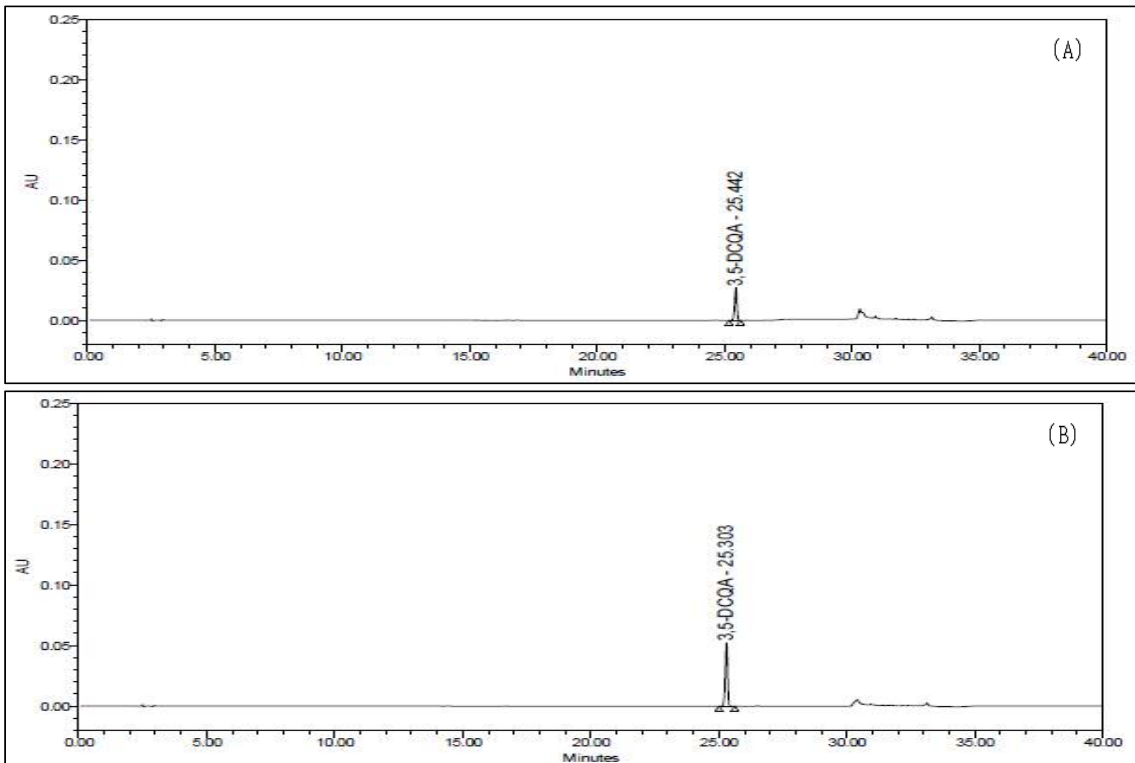
② 정량한계

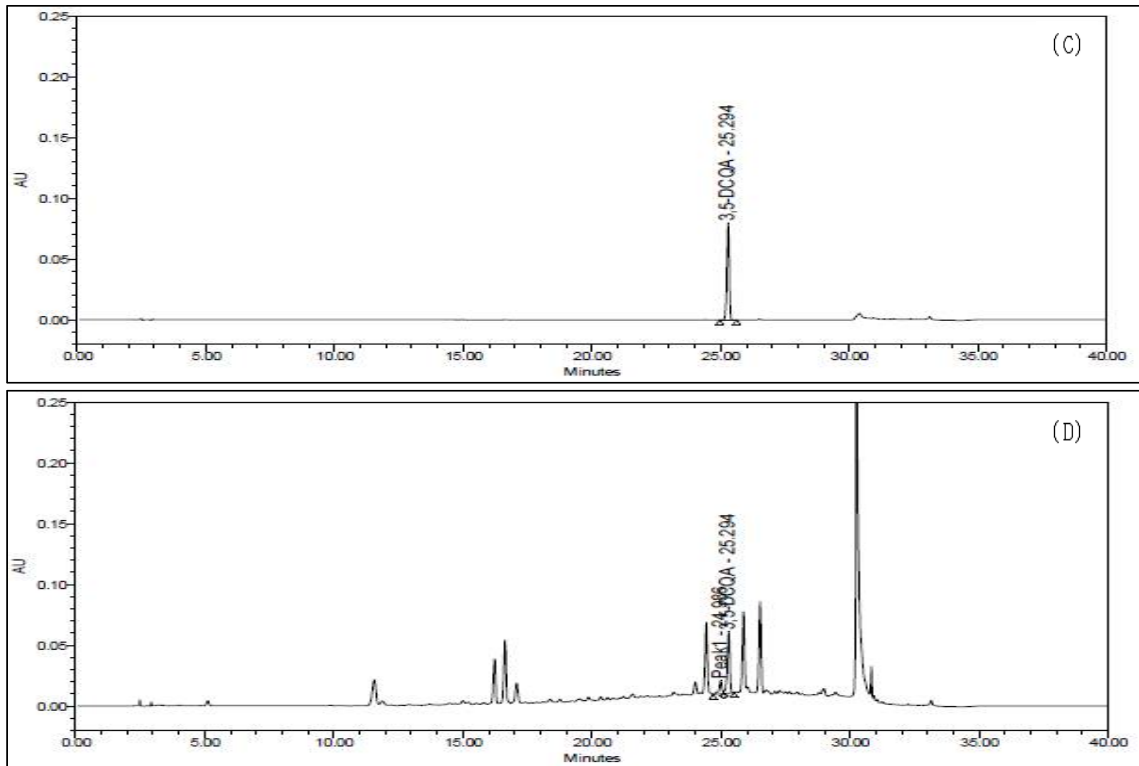
σ (standard deviation of intercept)	1579.8425	S(mean of slope)	15092.9204
Limits of Quantitation	1.047		ppm

▶ Validation 결과, 모든 항목에서 기준에 적합한 결과를 얻었으며 이를 통하여 설정한 분석법을 섬쑥부쟁이 추출물을 분석하는데 사용할 수 있을 것으로 사료됨.

(3) 섬쑥부쟁이 추출물의 함량 분석 및 기준 설정

3,5-DCQA 표준품을 30% 메탄올에 녹여 12, 24, 36 ppm의 표준용액을 조제함. 시험용액은 섬쑥부쟁이 추출물 0.2 g을 30% 메탄올 20 mL로 녹여서 조제함. 이를 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC로 측정하였음.





	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	Peak1	24.986	81645	19.27	11052					387289
2	3,5-DCQA	25.294	342044	80.73	50777	24.331	ppm	1.88	0.82	342653

Fig. 1. Chromatograms of Standards and AG-D013 (A)STD 12ppm, (B)STD 24ppm, (C)STD 36ppm, (D)sample 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)

검증된 분석법으로 섬쑥부쟁이 추출물을 분석한 결과, Standard와 동일한 Retention time에서 3,5-DCQA가 검출되었음. 또한, 3,5-DCQA와 가장 가까운 피크와의 Resolution이 1.88로 분리기준인 1.5보다 큰 결과를 보여 Resolution 또한 적합함을 확인함.

▶ 섬쑥부쟁이 추출물의 3,5-DCQA 함량을 계산하였을 때 2.4 mg/g으로 측정됨. 따라서 2.4 mg/g을 섬쑥부쟁이 추출물의 지표성분 기준값으로 설정하고 80 ~ 120% (2.4±0.48 mg/g)를 원료 품질관리를 위한 함량 기준으로 설정함.

2. 섬쑥부쟁이 추출물의 원재료 판별

섬쑥부쟁이 추출물의 품질 관리를 위하여 섬쑥부쟁이와 혼용할 수 있는 대표적 원재료인 쑥부쟁이 각각의 유전형 분석을 수행하였음. 유사한 다른 물질과의 혼용 가능성을 배제하고 원재료를 판별하는 근거를 마련함.

가. RAPD(random amplification of polymorphic DNA) 분석을 통한 유연관계 검정

(1) 시험목적

본 실험은 섬쑥부쟁이와 유사한 원료인 쑥부쟁이 간에 RAPD 분석을 통해 두 계통 간 유연관계를 분석하여 두 원료의 차이를 명확히 구별하고자 함.

(2) 시험방법

(가) 시약 및 재료

섬쭉부쟁이는 울릉도, 쭉부쟁이는 구례에서 구입하여 사용하였으며 AccuPower PCR premix와 Operon random primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였음.

(나) RAPD 분석

동일하게 농도를 맞춘 섬쭉부쟁이, 쭉부쟁이 DNA와 operon random primer, AccuPower PCR premix를 혼합하고 PCR을 통해 증폭하였음. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 loading하여 전기영동하고 gel 상에 나타나는 밴드를 통해서 유전적 다형성 및 유사성 계수를 계산하여 두 계통간 유연관계를 비교 분석함.

(다) 계산식

유전적 다형성(%)

$$= (\text{서로 겹치지 않는 밴드 개수} / \text{모든 밴드 개수}) \times 100$$

유사성 계수

$$= 2 \times N_{xy} / (N_x + N_y)$$

N_{xy} : x, y 모두에 나타난 동일한 밴드 개수


N_x : x에 나타난 밴드 개수

N_y : y에 나타난 밴드 개수

(3) 연구결과

RAPD 분석을 통해 쭉부쟁이와 섬쭉부쟁이를 비교했을 때, 총 7개의 밴드 중에서 5개의 밴드가 다형성을 보여 71.4%의 유전적 다형성을 나타내었음(Table 1). 또한, 유사도 계수 공식을 사용하여 유사도 계수를 계산한 결과 유사도 계수는 0.29로 나타났다. 동일한 식물종의 유전적 유사도가 1이므로 쭉부쟁이와 섬쭉부쟁이 간 유전적 유사도는 낮으며 이를 통해 두 종간 유연관계가 서로 멀다는 것을 확인하였음. 따라서 섬쭉부쟁이와 쭉부쟁이는 기원이 서로 다른 종임을 확인하였음.

Table 1. 섬쭉부쟁이와 쭉부쟁이 간 유전적 다형성 분석

	Primer		OPA-13
	염기서열(5' to 3')		CAGCACCCAC
	PCR 산물 수	총 밴드	7
		다형성밴드	5
다형성비율(%)		71.4	

나. ITS(internal transcribed spacer) 분석을 통한 시료간 종 동정

(1) 시험목적

본 실험은 ITS 분석을 통해 섬쭈부쟁이와 유사한 원료인 쭈부쟁이 간에 생물 동정 작업을 진행하여 두 원료의 차이를 구별하고자 함.

(2) 시험방법

(가) 시약 및 재료

섬쭈부쟁이와 쭈부쟁이는 위와 동일한 재료를 사용하였으며 G-spinIIP for plant genomic DNA extraction kit과 PCRquick-spin™ PCR product purification kit는 Intron Biotechnology(Seongnam, Korea) 제품을 사용하였음.

(나) ITS 분석

제공된 쭈부쟁이(시료 1), 섬쭈부쟁이(시료 2)는 막자사발을 이용하여 분쇄하고 G-spinIIP for Plant Genomic DNA extraction kit를 사용하여 genomic DNA를 추출하였음. 추출된 genomic DNA는 엽록체 유전체 3개 마커(*matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*)와 핵 유전체 마커인 ITS 지역을 primer로 사용하여 PCR을 통해 증폭하였음. 증폭된 PCR 산물은 PCRquick-spin™ PCR product purification kit를 통해 정제 하였으며, PCR 반응에서 사용된 primer를 이용하여 염기서열을 결정하였음. 결정된 염기서열은 Genbank에 이미 공개된 염기서열과 비교 분석함.

(3) 연구결과

추출한 DNA를 PCR을 통해 염기서열을 결정하고 Genbank의 염기서열들과 비교 분석한 결과, 쭈부쟁이(시료 1)는 동북아 지역에 분포하는 *Aster indicus*, *Aster piccolii*, *Aster mongolica* 및 쭈부쟁이(*Aster yomena*) 중 한 종으로 판단되며, 따라서 쭈부쟁이류의 식물로 사료됨. 섬쭈부쟁이(시료 2)는 일본에 서식하는 *Aster semiamplexicalis*, *Aster satumensis*, *Aster koshikiensis* 및 섬쭈부쟁이(*Aster pseudoglehni*) 중 한 종으로 판단되며, 따라서 섬쭈부쟁이류의 식물로 판단됨. 이를 통해 섬쭈부쟁이와 쭈부쟁이는 계통이 서로 다른 종임을 확인하였음(Fig. 2).

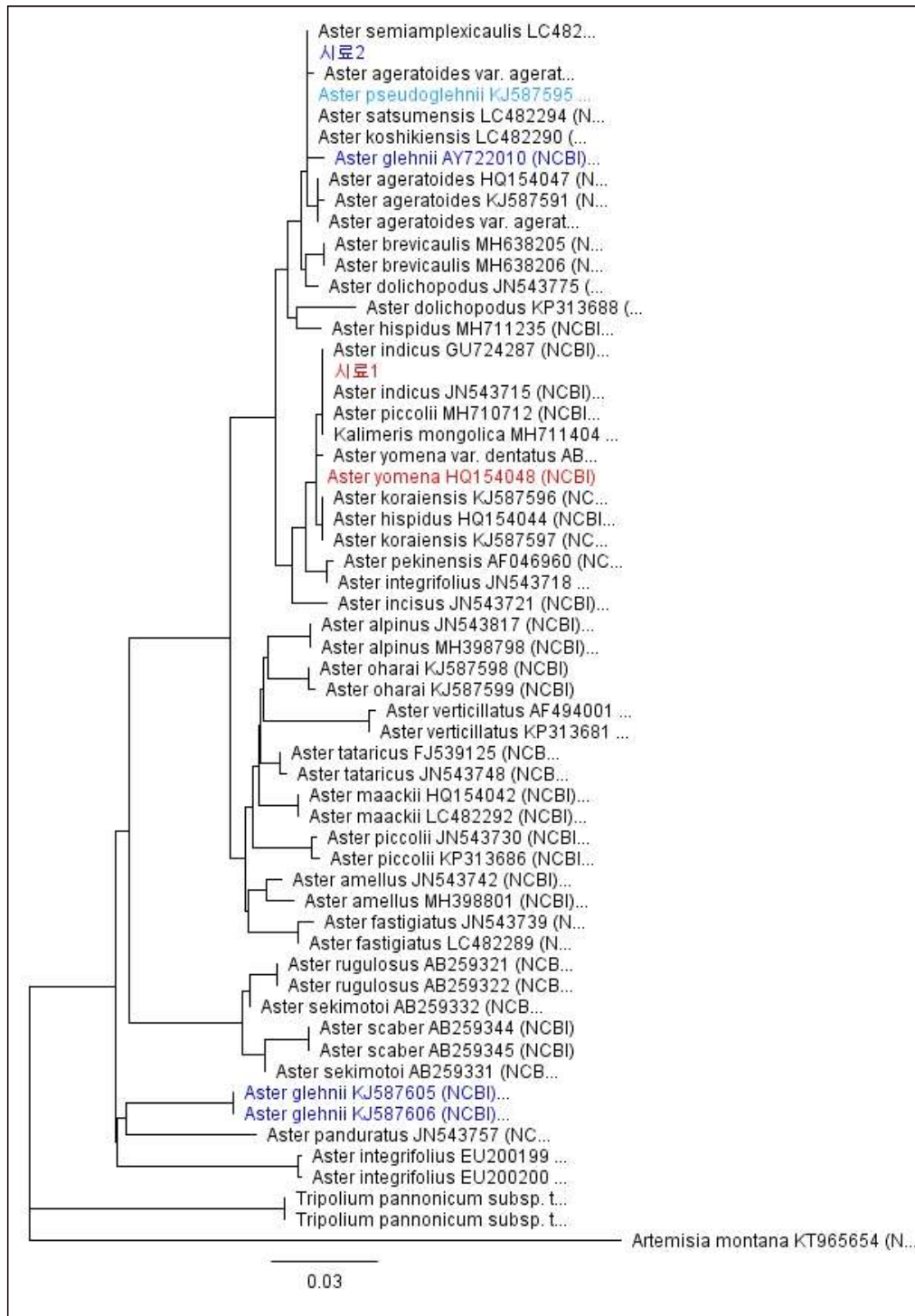


Fig. 2. 섬쑥부쟁이와 쑥부쟁이 간 neighbor joining tree

3. 섬쑥부쟁이 추출물 제조공정 연구

가. 섬쑥부쟁이 추출물의 최적화 공정 설정

(1) 실험방법

섬쑥부쟁이 전초를 주정 농도별로 추출하여 분말을 제조한 후, 제조수율, 기능(지표)성분의 함량을 비교하여 최적 공정을 설정하였음.

공정	내용	비고
원료투입	조분쇄한 전초 2.0 kg을 투입한다.	30 L 수준 테스트
추출	30%, 50%, 70% 주정을 30 L 투입 후 70℃ 6시간 추출한다.	각 주정 농도별 실험
여과	여과보조제를 첨가하여 여과한다.	
농축	여과액을 농축한다.	
살균	95℃ 1시간 살균한다.	
건조	분무건조한다.	

(2) 실험결과

각 조건별 실험결과 70% 주정추출물이 제조 수율과 지표성분 함량이 가장 적합함을 확인하였음. 그러나, 각 분무건조 조건에서 부형제를 투입하지 않고는 건조성이 어렵다는 판단으로 부형제를 고흡분대비 50%, 100% 투여하는 실험결과 고흡분대비 100%의 부형제가 투입되어야 함을 확인하였음.

조건	제조수율 %	함량 %
30% 주정추출물	39	0.11
50% 주정추출물	28	0.17
70% 주정추출물	25	0.34

이에, 섬썩부쟁이 전초 최적 추출조건은 70% 주정 농도로 설정하였으며 30 L 수준의 표준화를 아래 표와 같이 설정하였음.

공정	내용	비고
원료투입	조분쇄한 전초 2.0 kg을 투입한다.	
추출	70% 주정을 30 L(15배수) 투입 후 70℃ 6시간 추출한다.	
여과	여과보조제를 첨가하여 여과한다.	
농축	여과액을 농축한다.	
살균	95℃ 1시간 살균한다.	
건조	동량의 텍스트린을 투입하여 분무건조 한다.	

위에서 설정한 표준화 조건으로 공정수율을 검토하였음.

공정	액량(kg)	고형분(%)	수득량(g)	수율% (고형분기준)
원료투입	2	100		100
추출	23.2	1.57	364	18.2
여과	28.8	1.30	374	18.7
농축	3.0	11.02	330	16.5
살균	3.0		330	16.5
건조			280	14

나. 섬썩부쟁이 추출물의 지표성분 분석법 개선 및 검증

(1) 시험목적

예비실험에서 최적화된 분석법은 단일 peak 분리에는 개선된 방법이었으나 run time이 길었음. 이에 분석법을 개선하고 검증(밸리데이션)하여 섬썩부쟁이 전초 추출물에 함유된 3,5-DCQA 분석 가능 여부를 확인한 후 시료 중 3,5-DCQA 함량을 효율적으로 확인하는 것을 목적으로 함.

(2) 실험방법

(가) 시약 및 재료

3,5-DCQA는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고 methanol, acetonitrile, phosphoric acid는 Duksan chemical(Seoul, Korea) 제품을 사용하였음.

(나) 표준용액의 제조

3,5-DCQA 표준품 약 1 mg을 10 mL 용량플라스크에 취하고 30% 메탄올 5 mL를 넣은 후 초음파 처리하여 정용한 것을 표준용액으로 함.

(다) 시험용액의 제조

- ① 섬썩부쟁이 전초 추출물 약 200 mg을 20 mL 용량플라스크에 취한 후 30% 메탄올 10 mL를 가함.
- ② 일정시간 동안 초음파 처리함.
- ③ 방냉한 후 30% 메탄올로 20 mL 정용함.
- ④ 상기 용액을 0.4 μ m syringe filter로 여과하여 시험용액으로 함.

(라) 기기분석조건

다음의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 수정이 필요할 수 있음.

기기	Waters HPLC(USA), PDA
검출파장	330 nm
주입량	5 μ L
컬럼	Kromasil 100-5-C18(4.6 * 250 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
컬럼온도	25 $^{\circ}$ C
이동상	A-0.5% Phosphoric acid in D.W. B-0.5% Phosphoric acid in ACN
유속	0.8 mL/min

Gradient 조건	Time(min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0	77	23
	5	77	23
	15	75	25
	16	10	90
	20	10	90
	21	77	23
	26	77	23

(마) 계산식

3,5-DCQA 함량(mg/g)

= 검량선 농도($\mu\text{g/mL}$) x 최종부피(mL) / 시료채취량(mg) x 표준품순도 x 희석배수

(3) 실험결과

(가) 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA의 분석 가능여부 확인

표준물질 3,5-DCQA를 분석한 결과, 시험용액과 동일하게 약 8.36분에 검출됨. 주어진 조건으로 분석할 경우 표준품과 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA의 peak 분리도는 문제가 없는 것으로 확인됨(Fig. 3).

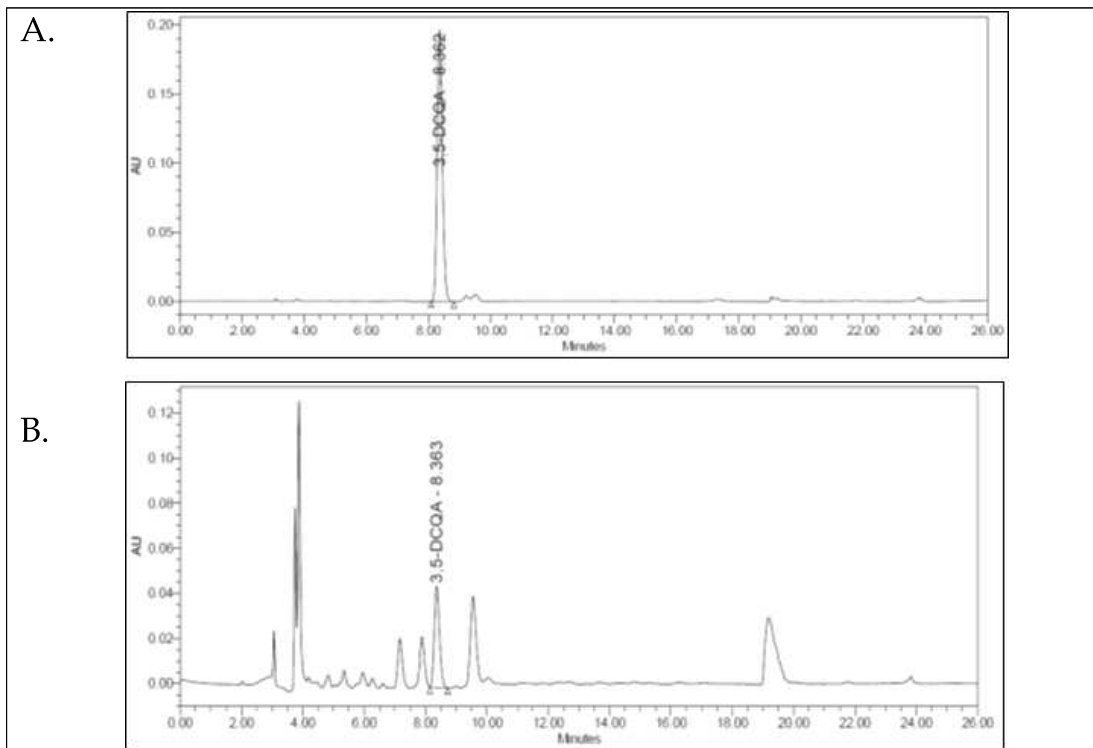


Fig. 3. 표준용액과 시험용액 중 3,5-DCQA의 크로마토그램 (A: 표준용액, B: 시험용액)

또한, 표준품과 시험용액의 PDA spectrum을 비교하여 같은 물질임을 확인하였음. PDA spectrum은 아래와 같음(Fig. 4).

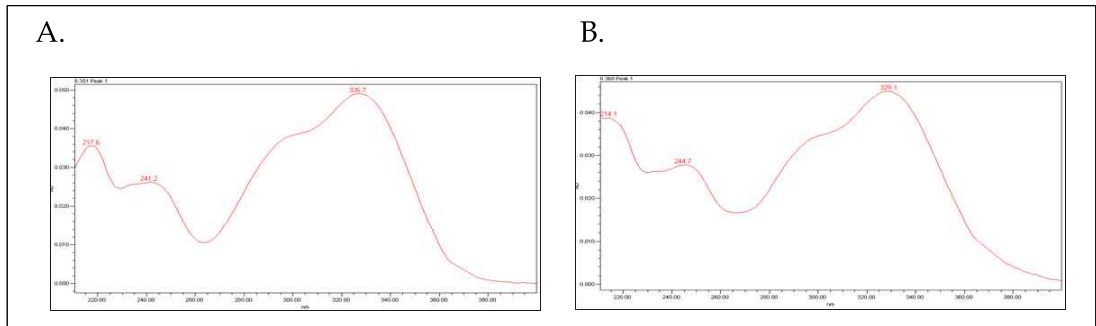


Fig. 4. 표준용액과 시험용액 중 3,5-DCQA의 PDA spectrum (A: 표준용액, B: 시험용액)

▶ 결과적으로 표준품과 시험용액에서 3,5-DCQA의 머무름 시간이 약 8.36분 경으로 개선되었으며, PDA spectrum을 비교한 결과 섬썩부쟁이 전초 추출물에서의 3,5-DCQA를 특이적으로 검출할 수 있는 시험법임을 확인하였음.

(나) 섬썩부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA의 함량 확인

① 3,5-DCQA의 직선성

표준물질 3,5-DCQA를 30% 메탄올에 녹인 후 적절한 농도로 희석하여 표준용액을 제조하였음. 3,5-DCQA의 표준용액은 5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 직선성을 확인하였음($R^2=1$). 표준품의 농도에 따른 면적값 및 검량선은 아래 표와 같음 (Table 2). 결과적으로 5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 3,5-DCQA peak 면적값을 토대로 직선식을 작성하였고 $R^2=1$ 로 농도에 따른 3,5-DCQA의 측정값이 양호한 수준임을 확인하였음.

Table 2. 3,5-DCQA standard curve

농도 ($\mu\text{g/mL}$)	면적(Area)	검량선
5	117434	
10	233305	
25	571963	
50	1139906	
100	2281984	
기울기	22773	
y절편	3561.4	

② 3,5-DCQA의 정밀성

섬썩부쟁이 전초 추출물 약 200 mg을 20 mL 용량플라스크에 취한 뒤 30% 메탄올 10 mL을 첨가하여 일정시간 동안 초음파 추출 후 정용하여 시료 중 3,5-DCQA의 함량을 산출하였음. 그 결과, 섬썩부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA와 동일한 시간대의 peak 함량은 $2.262 \pm 0.027 \text{ mg/g}$ 으로 나타났음(Table 3).

Table 3. 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA의 함량

	시험용액의 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	최종부피 (mL)	시료채취량 (mg)	희석 배수	표준품 순도(%)	함량 (mg/g)
1	23.401	20	204.2	1	100	2.292
2	23.133	20	203.1	1	100	2.278
3	22.845	20	201.8	1	100	2.264
4	22.719	20	201.5	1	100	2.255
5	22.574	20	203.3	1	100	2.221
평균						2.262 \pm 0.027

섬쭉부쟁이 전초 추출물을 약 100 mg, 150 mg, 300 mg으로 다르게 취하여 분석한 결과, 3,5-DCQA의 함량은 2.177 \pm 0.018 mg/g으로 편차 없는 결과를 나타냄 (Table 4).

Table 4. 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 시료량에 따른 3,5-DCQA의 함량

	시험용액의 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	최종부피 (mL)	시료채취량 (mg)	희석 배수	표준품 순도(%)	함량 (mg/g)
1	11.197	20	101.7	1	100	2.202
	11.173	20	101.3	1	100	2.206
	11.003	20	100.9	1	100	2.181
2	16.419	20	150.6	1	100	2.180
	16.263	20	150.7	1	100	2.158
	16.279	20	150.2	1	100	2.168
3	32.952	20	302.7	1	100	2.177
	32.651	20	302.6	1	100	2.158
	32.661	20	302	1	100	2.163
평균						2.177 \pm 0.018

③ 3,5-DCQA의 정확성(회수율)

3,5-DCQA의 정확성을 측정하기 위해, 시료에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하였음. 검출농도를 고려하여 시료 약 200 mg을 취한 후 표준용액을 검출 농도로써 2.5, 5, 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 넣은 후 동일한 전처리 방법으로 분석하였음. 표준용액 검출농도별 3반복 분석결과, 3,5-DCQA 평균 회수율은 96.84%, 표준편차(SD) 0.39%, 상대표준편차(RSD)는 0.41%로 나타냄. 100 \pm 10% 내의 회수율을 보이므로 분석방법에 문제가 없다고 사료됨(Table 5). 결론적으로 시료에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인한 결과 96.22 ~ 97.38%로 오차범위에서 회수율을 확인하였음.

Table 5. 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA의 정확성

	시료채취량 (mg)	채취량 대비 계산농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론농도 ($\mu\text{g/mL}$)	검출농도 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)	평균 회수율(%)
섬쭉부쟁이 전초 추출물	203.3	-	-	22.575	-	-
섬쭉부쟁이 전초 추출물 STD 2.5 $\mu\text{g/mL}$	201.9	22.419	24.919	24.174	97.01	96.82
	202.8	22.518	25.018	24.136	96.47	
	201.3	22.352	24.852	24.104	96.99	
섬쭉부쟁이 전초 추출물 STD 5 $\mu\text{g/mL}$	203.8	22.630	27.630	26.827	97.10	97.18
	201.7	22.396	27.396	26.592	97.06	
	204.2	22.674	27.674	26.949	97.38	
섬쭉부쟁이 전초 추출물 STD 7.5 $\mu\text{g/mL}$	201.6	22.385	29.885	28.755	96.22	96.52
	202.8	22.518	30.018	29.118	97.00	
	200.9	22.308	29.808	28.721	96.36	
전체 평균회수율(%)	96.84					
회수율 구간	96.22 ~ 97.38					

▶ 따라서 본 시험법은 섬쭉부쟁이 전초 추출물 중 3,5-DCQA 함량을 정량함에 있어 적절한 시험법이라 판단하였음.

4. 섬쭉부쟁이 추출물의 원료의 표준화

가. 제조공정도

공정	제조방법 설명
추출	(1) 섬쭉부쟁이 전초(조분쇄물)에 중량 대비 15배수(v/w)의 70% 주정을 투입 (2) 70°C로 유지하며 6시간 열처리
여과	원물의 15% 중량의 여과보조제 첨가하여 여과
농축	50 ~ 55°C에서 농축
부형제 첨가	고형분 대비 동량의 텍스트린 첨가
살균	95°C 1시간 살균
건조	분무건조
포장(원료)	(1) PE 포장재에 포장단위에 맞게 칭량 (2) 제습제를 넣고 밀봉 포장 (3) 지관 포장

나. 단위 공정별 수율, 기능 및 지표성분 변화 분석

공정	내용	고형분 수율(%)	고형분의 3,5-DCQA 함량(%)
원료투입	분쇄한 전초 120 kg을 투입	100	0.21
↓			
추출	70% 주정 1800 L 투입 후 70℃ 6시간 추출	19	0.61
↓			
여과	여과보조제로 여과	17	0.55
↓			
농축	여과액 농축	15.4	0.54
↓			
부형제 첨가	고형분 대비 동량의 덱스트린 첨가	30.8	0.27
↓			
살균	95℃ 1시간 열처리	30.8	0.26
↓			
건조	분무건조	26.7	0.24
↓			
포장	60mesh 체별/포장	26	0.24

다. 섬썩부쟁이 추출물의 기준규격 설정

항목	기준
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 분말
이물	적합하여야 한다.
수분	10% 이하
지표성분	3,5-DCQA 1.92 ~ 2.88 mg/g
세균수	3.0 X 10 ³ cfu/g 이하
대장균군	음성

2절 섬쑥부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명

1. 시험관시험에서 섬쑥부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효능 및 기전 검증 가. 신경세포사멸 억제 효능 확인(in vitro)

(1) 시험목적

신경세포가 손상되면 정상적인 뇌 기능을 할 수 없게 되며, 손상된 신경세포는 다시 재생되지 않기 때문에 신경세포를 건강하게 유지하는 것이 중요함. 본 실험은 SH-SY5Y human neuroblastoma cell line을 이용하여 세포생존율 측정을 통해 섬쑥부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-DCQA와 섬쑥부쟁이 추출물의 신경세포사멸 억제 효능을 확인하고자 하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

SH-SY5Y 세포는 고려대학교에서 제공받아 사용하였음. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), Penicillin/Streptomycin(P/S), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS), Trypsin-EDTA(0.25% Trypsin)는 Gibco(Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였고, Amyloid-beta₂₅₋₃₅(A β)는 Bachem(Torrance, CA, USA) 제품을 사용하였음. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. 3,5-DCQA는 MedChemExpress(Monmouth Junction, NJ, USA) 제품을 사용하였으며, 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 세포생존율 측정

SH-SY5Y 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 96 well plate에 1×10^4 /well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, 3일 동안 aging한 A β 를 10 μ M로 처리하였음. 48시간 이후에 5 mg/mL의 MTT 용액을 10 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시킴. 보라색 결정이 생긴 것을 현미경으로 관찰한 후, 상등액을 제거한 다음 100 μ L DMSO로 formazan 결정을 용해시켰음. Microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군 대비 백분율로 나타내어 신경세포사멸 억제 효능을 확인하였음.

(3) 연구결과

(가) 3,5-DCQA의 신경세포사멸 억제 효능

SH-SY5Y 세포에서의 3,5-DCQA에 대한 신경세포사멸 억제 효능을 MTT assay를 이용하여 확인하였음(Fig. 5). 3,5-DCQA를 농도별로 전처리 후 A β 로 세포사멸을 유도한 결과, A β 유도군의 세포생존율은 약 62.1%로 감소하여 세포사멸이 유도된 것을 확인하였음(Cell only 대비 ^{###}P-value < 0.001). 3,5-DCQA

12.5, 25, 50, 100 μ M 처리군에서 세포생존율은 A β 유도군 대비 약 4.7, 15.7, 30.1, 45.7%가 회복되며 통계적으로 유의한 결과임을 확인하였음(*P-value < 0.05, **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001).

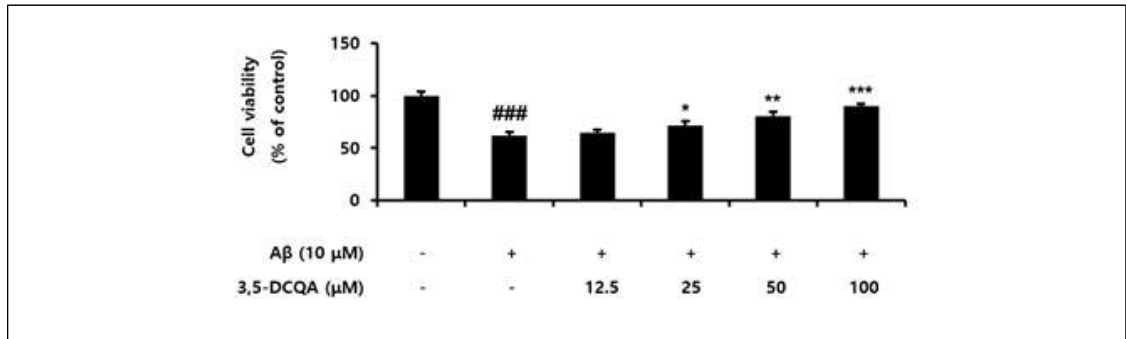


Fig. 5. 3,5-DCQA의 신경세포사멸 억제 효능

(나) 섬쑥부쟁이 추출물의 신경세포사멸 억제 효능

SH-SY5Y 세포에서의 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 대한 신경세포사멸 억제 효능을 MTT assay를 이용하여 확인하였음(Fig. 6). 섬쑥부쟁이 추출물을 농도 별로 전처리 후 A β 로 세포사멸을 유도한 결과, A β 유도군의 세포생존율은 약 66.3%로 감소하여 세포사멸이 유도된 것을 확인하였음(Cell only 대비 ###p-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 25, 50, 100, 200 μ g/mL 처리군에서 세포 생존율은 A β 유도군 대비 약 15.0, 18.4, 20.3, 35.0%가 회복되며 통계적으로 유의한 결과임을 확인하였음(*P-value < 0.05, ***P-value < 0.001).

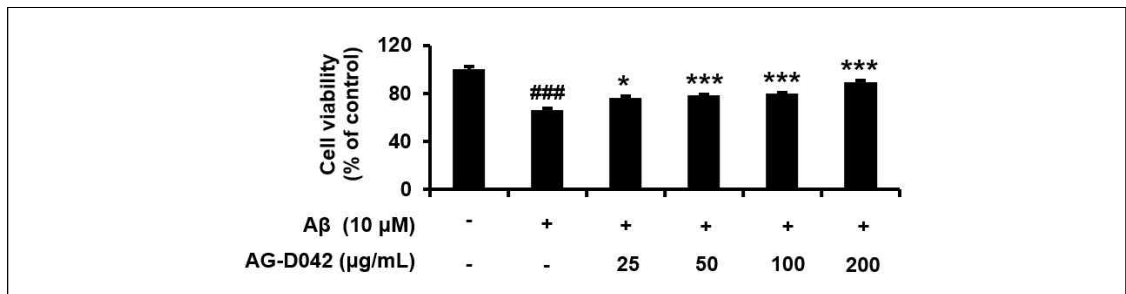


Fig. 6. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)의 신경세포사멸 억제 효능

▶ 3,5-DCQA와 섬쑥부쟁이 추출물은 신경세포사멸 억제 효능을 가지며 따라서 3,5-DCQA는 섬쑥부쟁이 추출물의 지표물질이자 신경세포사멸 억제 효능에 대한 유효물질일 것으로 판단됨.

나. 신경세포사멸 억제 효능 기전 확인(in vitro)

(1) 시험목적

시냅스의 장기강화효과나 학습행동에 관련 있는 extracellular signal regulated kinase(ERK), 신경세포의 분화에 필요한 유전자들의 전사 조절 및 해마의 공간과 기억 형성에 관여하는 cAMP response element-binding protein(CREB) 및 신경세포사멸을 보호하는 신경영양인자인 brain-derived neurotrophic factor(BDNF)는 대표적인 기

역 관련 신호전달 인자들로 알려져 있음. 본 실험은 SH-SY5Y human neuroblastoma cell line을 이용하여 기억 관련 신호전달 인자들의 단백질 및 유전자 발현 확인을 통해 3,5-DCQA와 섬썩부쟁이 추출물의 신경세포사멸 억제 효능에 대한 기전을 탐색하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

SH-SY5Y 세포 관련 시약, A β , 3,5-DCQA 및 DMSO는 위와 동일한 제품을 사용하였음. BDNF 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)의 제품을 사용하였음. CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였음. β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)의 제품을 사용하였음. 섬썩부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 기억 관련 신호전달 인자의 단백질 발현 확인(western blotting)

SH-SY5Y 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 60 mm dish에 7×10^5 로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬썩부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, 3일 동안 aging된 A β 를 10 μ M로 처리하였음(세포사멸을 유도하지 않는 조건에서는 A β 처리하지 않음). 48시간 이후에 cell lysis buffer로 cell lysate를 획득한 후 western blot하여 BDNF, p-CREB, p-ERK 단백질 발현 정도를 확인하였음.

(다) 기억 관련 신호전달 인자의 유전자 발현 확인(RT-PCR)

SH-SY5Y 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 60 mm dish에 7×10^5 로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬썩부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, 3일 동안 aging된 A β 를 10 μ M로 처리하였음. 48시간 이후에 RNA extraction kit를 이용하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 PCR하여 BDNF mRNA 발현 정도를 확인하였음.

(3) 연구결과

(가) 3,5-DCQA에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 증가

SH-SY5Y 세포를 이용하여 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질이자 유효물질로 사료되는 3,5-DCQA에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 정도를 western blotting으로 확인하였음(Fig. 7). 3,5-DCQA를 농도별로 전처리 후 A β 로 세포사멸을 유도한 결과, A β 에 의해 감소하였던 p-ERK의 단백질 발현은 3,5-DCQA 12.5 ~ 100 μ M 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, A β 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). A β 에 의해 감소하였던 p-CREB의 단백질 발현은 3,5-DCQA 25 ~ 100 μ M 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, A β 유도군 대비 *P-value < 0.05,

***P-value < 0.001). Aβ에 의해 감소하였던 BDNF의 단백질 발현도 섬쑥부쟁이 추출물 12.5 ~ 100 μM 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, Aβ 유도군 대비 *P-value < 0.05).

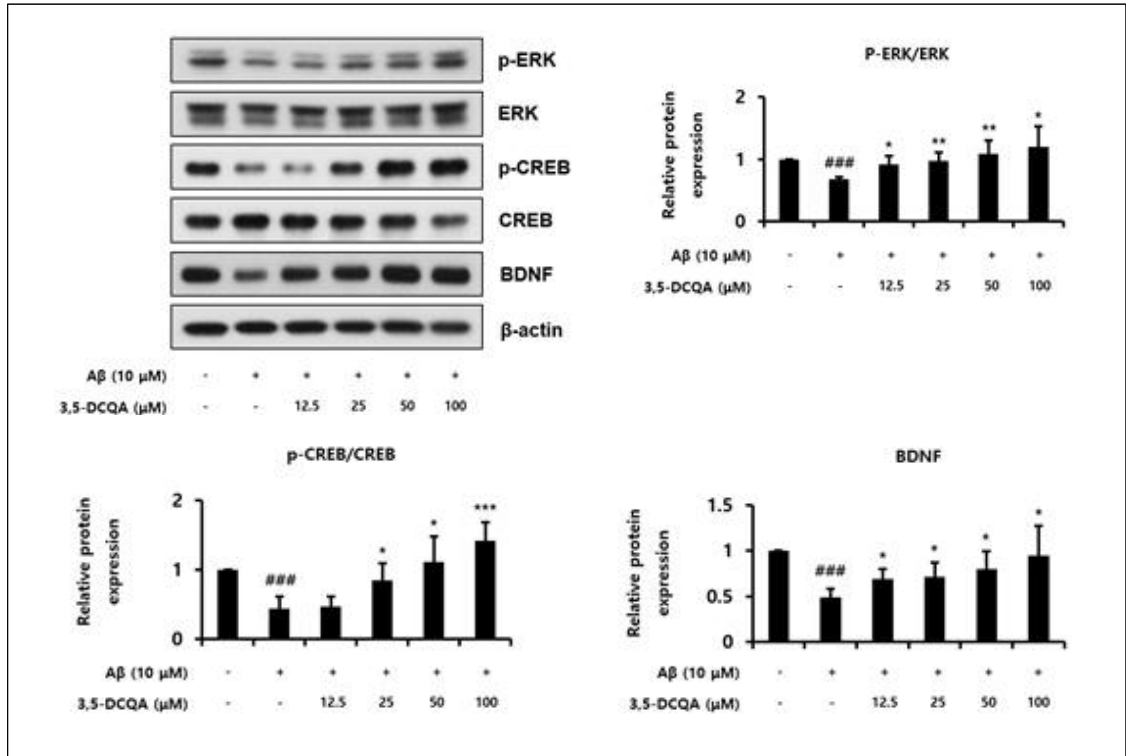


Fig. 7. 3,5-DCQA에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 증가

(나) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 p-ERK, BDNF의 단백질 발현 증가

SH-SY5Y 세포를 이용하여 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)에 의한 p-ERK, BDNF의 단백질 발현 정도를 western blotting으로 확인하였음(Fig. 8) 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 전처리 후 Aβ로 세포사멸을 유도한 결과, Aβ에 의해 감소하였던 p-ERK의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 25 ~ 200 μg/mL 처리시 농도 의존적으로 증가함을 확인하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, Aβ 유도군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). Aβ에 의해 감소하였던 BDNF의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 100, 200 μg/mL 처리시 통계적으로 유의하게 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, Aβ 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01).

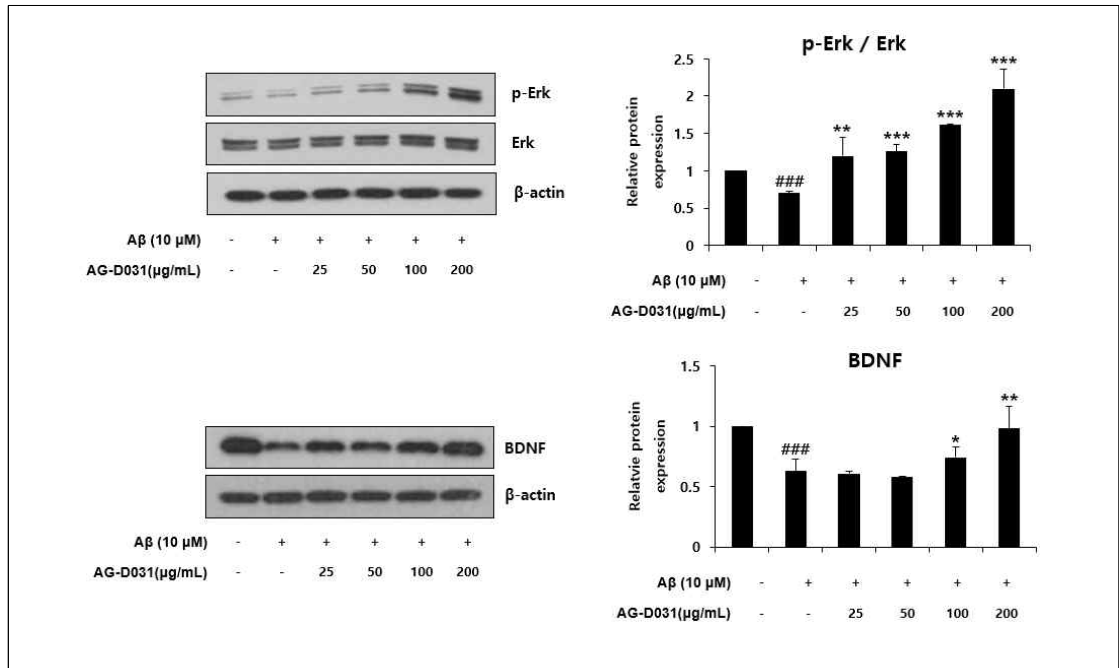
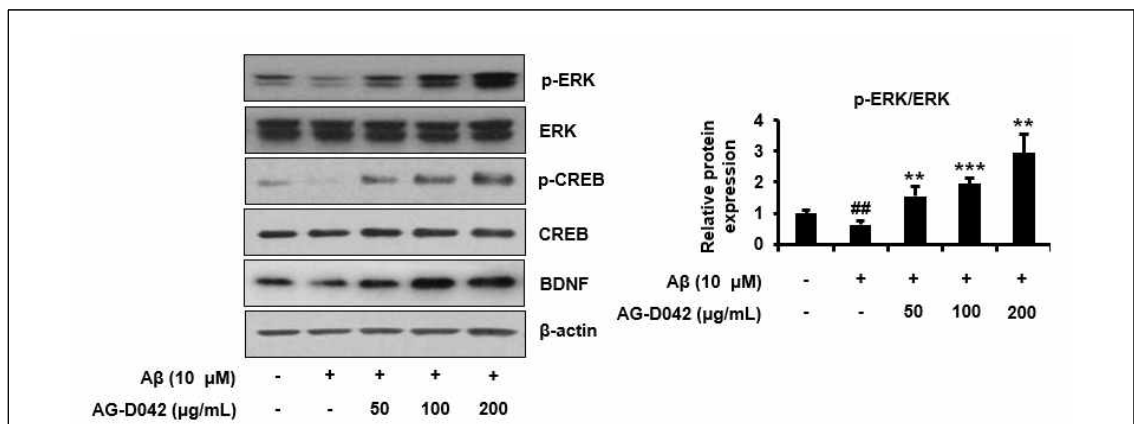


Fig. 8. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)에 의한 p-ERK, BDNF의 단백질 발현 증가

(다) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 증가

신경세포사멸을 유도한 SH-SY5Y 세포에서 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 변화를 western blotting으로 확인하였음 (Fig. 9). 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 전처리 후 Aβ로 세포사멸을 유도한 결과, Aβ에 의해 감소하였던 p-ERK의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μg/mL 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ##P-value < 0.01, Aβ 유도군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). Aβ에 의해 감소하였던 p-CREB의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 200 μg/mL 처리시 통계적으로 유의하게 증가하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, Aβ 유도군 대비 *P-value < 0.05). Aβ에 의해 감소하였던 BDNF의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μg/mL 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001, Aβ 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001).



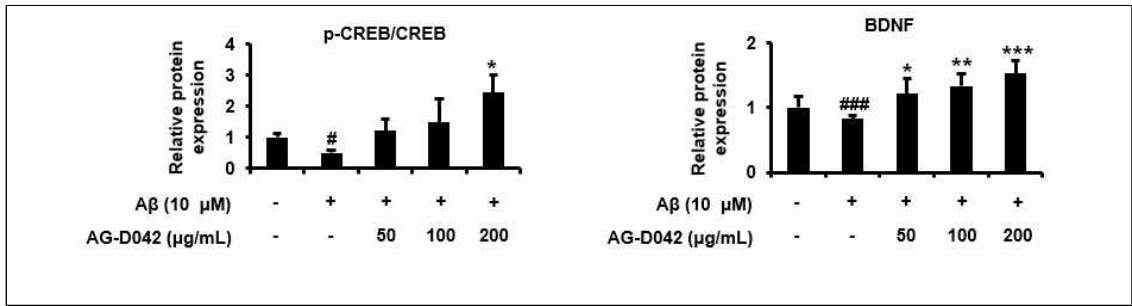


Fig. 9. 신경세포사멸 유도 조건에서 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 증가

신경세포사멸을 유도하지 않은 SH-SY5Y 세포에서 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 변화를 western blotting으로 확인하였음(Fig. 10). 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 처리한 결과, p-ERK의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μg/mL 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 ##P-value < 0.01). p-CREB의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μg/mL 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, ##P-value < 0.01, ###P-value < 0.001). BDNF의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μg/mL 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05).

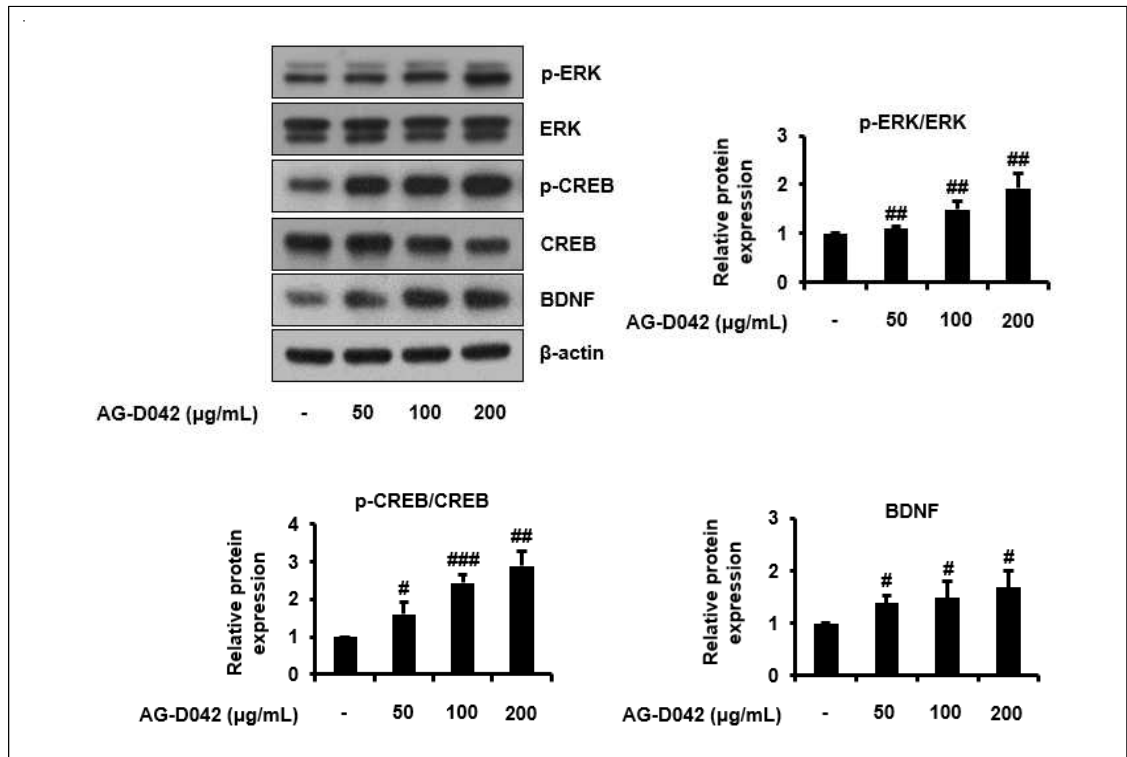


Fig. 10. 신경세포사멸 유도하지 않은 조건에서 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 p-ERK, p-CREB, BDNF의 단백질 발현 증가

(라) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 BDNF의 유전자 발현 증가

SH-SY5Y 세포에서 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 BDNF의 mRNA 유전

자 발현 변화를 RT-PCR로 확인하였음 (Fig. 11). 섬쭉부쟁이 추출물을 농도별로 전처리 후 A β 로 세포사멸을 유도한 결과, BDNF mRNA 발현은 섬쭉부쟁이 추출물 25 ~ 200 μ g/mL 처리시 농도 의존적으로 증가하였음(Cell only 대비 *P-value < 0.05, A β 유도군 대비 *P-value < 0.05).

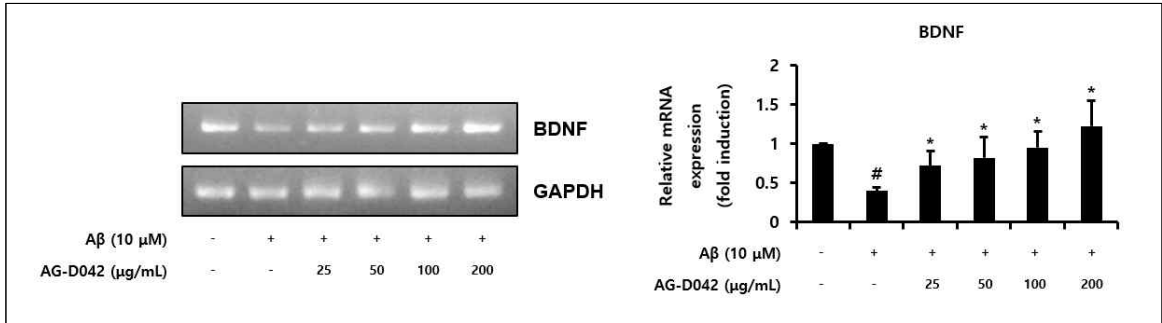


Fig. 11. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 BDNF의 mRNA 발현 증가

▶ 결론적으로 3,5-DCQA와 섬쭉부쟁이 추출물은 ERK, CREB 및 BDNF의 발현을 증가시켜 신경세포사멸 억제 효능을 나타내는 것으로 사료됨.

다. Acetylcholinesterase(AChE) 활성 억제 효능 확인(in vitro)

(1) 시험목적

Acetylcholine(ACh)은 중추신경계에서 고도의 정신기능, 운동 및 감각기능, 학습 및 기억기능을 담당하는 신경전달물질이고, acetylcholinesterase(AChE)은 ACh를 분해하는 효소로 대뇌피질 및 해마에서의 AChE 활성 억제는 기억력 개선에 도움을 주는 것으로 알려짐. 본 실험에서는 SH-SY5Y human neuroblastoma cell line을 이용하여 섬쭉부쟁이 추출물에 의해 나타나는 AChE 활성 억제 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

SH-SY5Y 세포 관련 시약 및 DMSO는 위와 동일한 제품을 사용하였음. Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. 섬쭉부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) AChE 활성 측정

SH-SY5Y 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 60 mm dish에 7 X 10⁴로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쭉부쟁이 추출물을 농도별로 6시간 전처리 후, H₂O₂를 150 μ M로 처리하였음. 18시간 이후에 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)을 넣고 cell lysis하여 enzyme를 extract하였음. 100 mM phosphate buffer(pH8.0) 1300 μ L, 10 mM DTNB 50 μ L, enzyme extract 25 μ L를 넣어서 최종 용량 1375 μ L로 만들고 상온에서 3분 동안 incubation 진행하였음.

이후 7.5 mM acetylthiocholine을 10 μ L 넣고 vortexing한 후 cuvette에 담아 412 nm에서 10분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였음. AChE의 specific activity는 Unit/mg protein으로 나타내며, 1 unit/mg protein은 1 mg protein이 ATC 존재 하에 1분 동안 DTNB를 TNB로 1 micromole 수화시킴을 의미함.

(3) 연구결과

(가) 섬쭉부쟁이 추출물의 AChE 활성 억제 효능

H₂O₂로 세포사멸을 유도한 SH-SY5Y에서 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D011)의 AChE 활성 억제 효능을 확인하였음(Fig. 12). Control에서 cell lysate 1 mg은 ATC 존재하에 1분 동안 DTNB를 TNB로 0.06 micromole 수화시켰고, H₂O₂ 처리군은 0.22 micromole 수화시켜 AChE 활성이 Control 대비 약 2.6배 증가하였음(Cell only 대비 ##P-value < 0.01). AG-D011 50 μ g/mL 처리군은 0.07 micromole 수화시켜 AChE 활성이 H₂O₂ 처리군 대비 약 68% 감소하였음(H₂O₂ 유도군 대비 **P-value < 0.01).

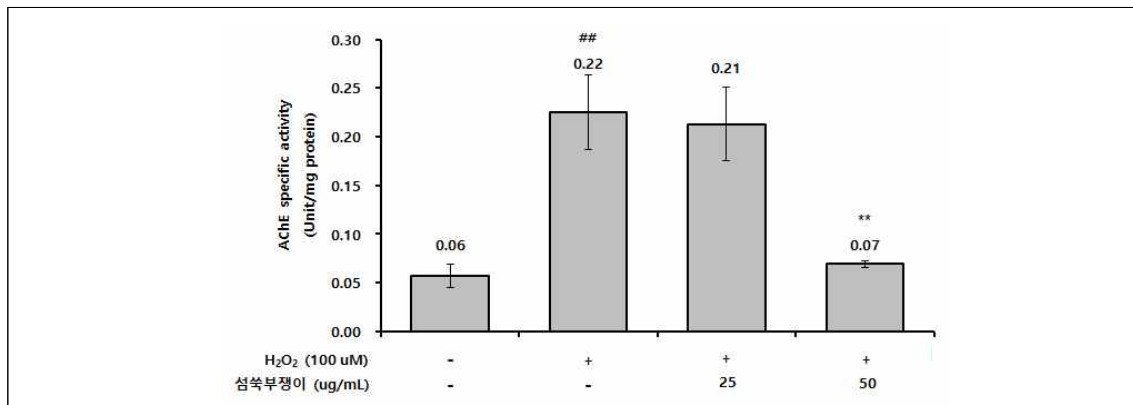


Fig. 12. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D011)의 AChE 활성 억제 효능

▶ 이를 통해 섬쭉부쟁이 추출물이 AChE의 활성 억제 효능을 나타내어 기억력 개선에 도움을 줄 것으로 예상됨.

라. 항염증 효능 확인(in vitro)

(1) 시험목적

신경염증은 신경 조직에 염증이 생기는 것으로 중추신경계에서의 신경염증은 신경 퇴행성질환의 중요한 병인임. 본 실험은 BV-2 mouse microglial cell line을 이용하여 염증매개물질인 nitric oxide(NO), pro-inflammatory cytokines의 농도 측정을 통해 섬쭉부쟁이 추출물의 항염증 효능을 확인하고자 하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

BV-2 세포는 연세대학교에서 제공받아 사용하였음. DMEM, FBS, penicillin/streptomycin, DPBS, MTT 및 DMSO는 위와 동일한 제품을 사용하였음. Lipopolysaccharides (LPS), Griess reagent는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제

품을 사용하였음. Mouse tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) ELISA kit, mouse Interleukin-1 beta(IL-1 β) ELISA kit, mouse Interleukin-6(IL-6) ELISA kit는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였음. Mouse prostaglandin E₂(PGE₂) ELISA kit는 Cayman chemical(Ann Arbor, MI, USA) 제품을 사용하였음. 섬쭉부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 세포생존율 측정

BV-2 세포는 DMEM 배지(5% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 96 well plate에 1 X 10⁴/well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쭉부쟁이 추출물을 농도별로 처리하고 LPS 처리 또는 비처리 24시간 후, 5 mg/mL의 MTT 용액을 10 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시킴. 보라색 결정이 생긴 것을 현미경으로 관찰한 후 상등액을 제거한 다음 100 μ L DMSO로 formazan 결정을 용해시켰음. Microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군 대비 백분율로 나타내어 확인하였음.

(다) NO 농도 측정

BV-2 세포는 DMEM 배지(5% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 6 well plate에 3 X 10⁵/well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쭉부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, LPS를 0.1 μ g/mL로 처리하였음. 24시간 이후에 sodium nitrate(NaNO₂)를 표준물질로 사용하여 standard curve를 그려 이를 기준으로 상등액의 NO를 측정하였음. 측정방법은 100 μ L의 상등액에 동량의 Griess reagent를 섞은 후, 10분간 상온에서 반응한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(라) Pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂) 농도 측정

BV-2 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 6 well plate에 3 X 10⁵/well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쭉부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, LPS를 0.1 μ g/mL로 처리하였음. 24시간 이후 수거한 상등액을 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 각각의 시약(conjugate, assay diluent, color reagent, stop solution)들과 함께 반응시키고 450, 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 농도를 계산하였음. PGE₂의 경우, 상등액을 PGE₂ ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(PGE₂ acetylcholinesterase tracer, PGE₂ monoclonal antibody, Ellman's reagent)들과 함께 반응시키고 412 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 PGE₂ 농도를 계산하였음.

(3) 연구결과

(가) 섬쭈부쟁이 추출물의 세포독성 유무 확인

섬쭈부쟁이 추출물(AG-D042)에 대한 항염증 효능을 검색하기 이전에 BV-2 세포에서 섬쭈부쟁이 추출물의 세포독성 유무를 조사하기 위해 세포생존율을 MTT assay를 이용하여 확인하였음(Fig. 13). 섬쭈부쟁이 추출물을 농도별로 전처리 후 LPS로 과면역을 유도한 조건과 유도하지 않은 조건에서 확인한 결과, 모든 처리군에서 세포독성은 나타나지 않음.

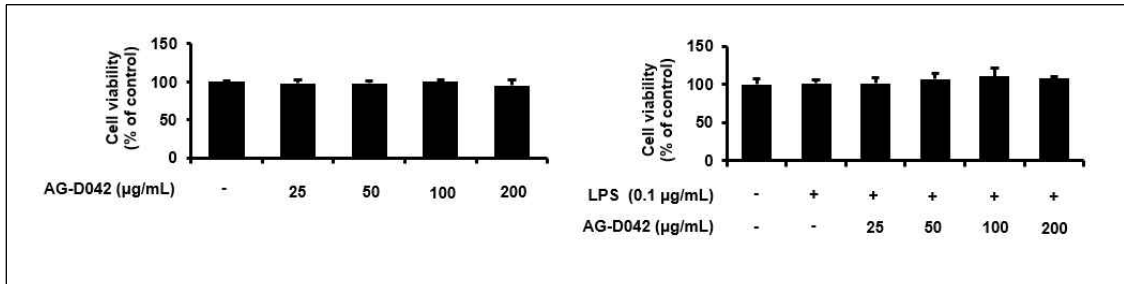


Fig. 13. 섬쭈부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 세포생존율

(나) 섬쭈부쟁이 추출물의 NO 억제 효능

BV-2 세포를 이용하여 섬쭈부쟁이(AG-D042)에 의한 NO 생성 정도를 Griess assay를 통해 확인하였음(Fig. 14). 섬쭈부쟁이 추출물을 농도별로 전처리 후 LPS로 과면역을 유도한 결과, LPS 유도군의 NO 농도는 $21.7 \pm 3.19 \mu\text{M}$ 로 유의하게 증가하였음(Cell only 대비 $\#\#P\text{-value} < 0.01$). 섬쭈부쟁이 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 NO 농도는 $12.6 \pm 2.96 \mu\text{M}$ 로 유의하게 감소하였음(LPS 유도군 대비 $*P\text{-value} < 0.05$).

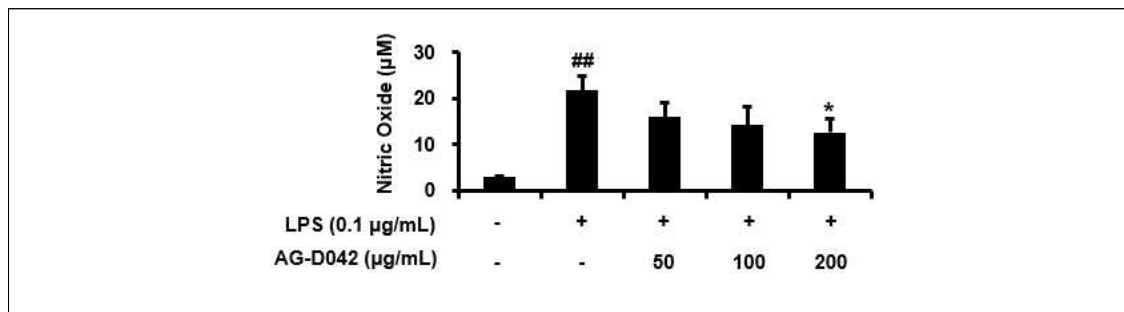


Fig. 14. 섬쭈부쟁이 추출물(AG-D042)의 NO 소거능

(다) 섬쭈부쟁이 추출물의 pro-inflammatory cytokines 감소 효과

BV-2 세포에 섬쭈부쟁이 추출물(AG-D042)을 농도별로 전처리 후 LPS로 과면역을 유도하여 염증을 촉진하는 사이토카인(TNF- α , L-1 β , IL-6, PGE $_2$) 농도를 측정하였음(Fig. 15).

TNF- α 농도를 측정한 결과, LPS 유도군의 TNF- α 농도는 약 507.7% 유의적으로 증가하였음(Cell only 대비 $\#\#\#P\text{-value} < 0.001$). 섬쭈부쟁이 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 TNF- α 농도는 약 36.2, 43.1, 45.0% 농도 의존적으로 감소하였음(LPS 유도군 대비 $**P\text{-value} < 0.01$, $***P\text{-value} < 0.001$).

IL-1 β 농도를 측정한 결과, LPS 유도군의 IL-1 β 농도는 약 70.6배 유의적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물 50, 100, 200 μ g/mL 처리시 IL-1 β 농도는 약 52.3, 85.1, 91.2% 농도 의존적으로 감소하였음(LPS 유도군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001).

IL-6 농도를 측정한 결과, LPS 유도군의 IL-6 농도는 약 4948.5배 유의적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물 200 μ g/mL 처리시 IL-6 농도는 약 36.3% 유의하게 감소하였음(LPS 유도군 대비 **P-value < 0.01).

PGE₂ 농도를 측정한 결과, LPS 유도군의 PGE₂ 농도는 약 87.6% 유의적으로 증가하였음(Cell only 대비 ###P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물 50, 100, 200 μ g/mL 처리시 PGE₂ 농도는 약 64.8, 79.3, 87.9% 농도 의존적으로 감소하였음(LPS 유도군 대비 ***P-value < 0.001).

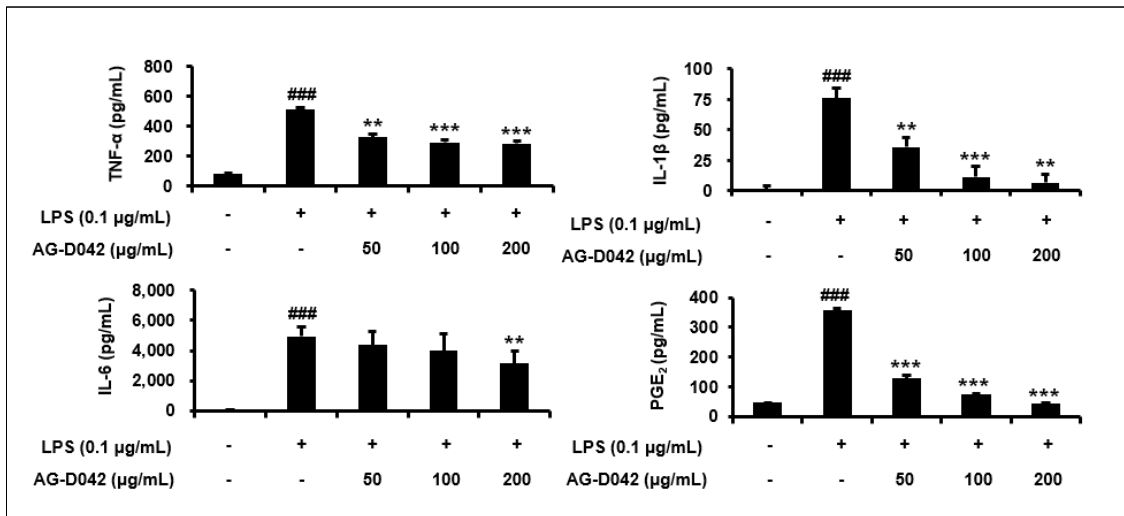


Fig. 15. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042)의 pro-inflammatory cytokines 농도 감소 효과

▶ 결론적으로 섬쭉부쟁이 추출물은 NO 및 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂) 생성을 억제시켜 항염증 효능을 나타내는 것으로 판단됨.

마. 항염증 효능 기전 확인(in vitro)

(1) 시험목적

NO 생성반응을 촉매하는 산화환원효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 산화적 스트레스에 의해 과발현되며 PGE₂를 생성하는 cyclooxygenase-2(COX-2)는 대표적인 염증 조절 관련 인자임. 또한 염증을 조절하는 중요한 전사인자인 nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells(NF- κ B)는 세포질 내에서 inhibitor of nuclear factor kappa B(I κ B)와 결합되어 불활성화된 상태로 존재하다가, 자극을 받으면 I κ B의 인산화 및 분해로 인해 활성화되고 핵 내로 들어가 염증 반응을 일으키는 것으로 알려짐. 본 실험은 BV-2 mouse microglial cell line을 이용하여 염

증 조절 관련 인자들의 단백질 및 유전자 발현 확인을 통해 섬쑥부쟁이 추출물 항염증 효능에 대한 기전을 탐색하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

BV-2 세포 관련 시약, LPS 및 β -actin은 위와 동일한 제품을 사용하였음. iNOS 항체는 Novus Biologicals(Littleton, CO, USA), COX-2, p-NF- κ B, p-I κ B- α 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였음. NF- κ B, I κ B- α 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)의 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 염증 조절 인자의 단백질 발현 확인(western blotting)

BV-2 세포는 DMEM 배지(5% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 6 well plate에 3×10^5 /well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. iNOS, COX-2 단백질 발현 확인을 위해 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, LPS를 0.1 μ g/mL로 24시간 동안 처리하였음. p-NF- κ B, p-I κ B- α 의 단백질 발현 확인을 위해 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, LPS를 1시간 처리하였음. Cell lysis buffer로 cell lysate를 획득한 후 western blot하여 iNOS, COX-2, p-NF- κ B, p-I κ B- α 단백질 발현 정도를 확인하였음.

(다) 염증 조절 인자의 유전자 발현 확인(RT-PCR)

BV-2 세포를 DMEM 배지(5% FBS와 1% penicillin-streptomycin 첨가)를 이용하여 6 well plate에 3×10^5 /well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였음. 섬쑥부쟁이 추출물을 농도별로 1시간 전처리 후, LPS를 0.1 μ g/mL로 처리하였음. 24시간 이후에 RNA extraction kit를 이용하여 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 PCR하여 iNOS, COX-2 mRNA 발현 정도를 확인하였음.

(3) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 iNOS, COX-2의 발현 감소

BV-2 세포에 섬쑥부쟁이(AG-D042)를 농도별로 전처리 후 LPS로 과면역을 유도하여 iNOS, COX-2의 단백질 및 유전자 발현 정도를 western blotting과 RT-PCR로 확인하였음(Fig. 16).

iNOS, COX-2의 단백질 발현을 확인한 결과, LPS에 의해 증가하였던 iNOS의 단백질 발현은 섬쑥부쟁이 추출물 100, 200 μ g/mL 처리에 의해 유의적으로 감소하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, LPS 유도군 대비 *P-value < 0.05). LPS에 의해 증가하였던 COX-2의 단백질 발현도 섬쑥부쟁이 추출물 50 ~ 200 μ g/mL 처리

시 농도 의존적으로 감소하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, LPS 유도군 대비 *P-value < 0.05).

iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 확인한 결과, LPS에 의해 증가하였던 iNOS의 mRNA 발현은 섬쭉부쟁이 추출물 50 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 농도 의존적으로 감소하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, LPS 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). LPS에 의해 증가하였던 COX-2의 mRNA 발현 역시 섬쭉부쟁이 추출물 50 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, LPS 유도군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001).

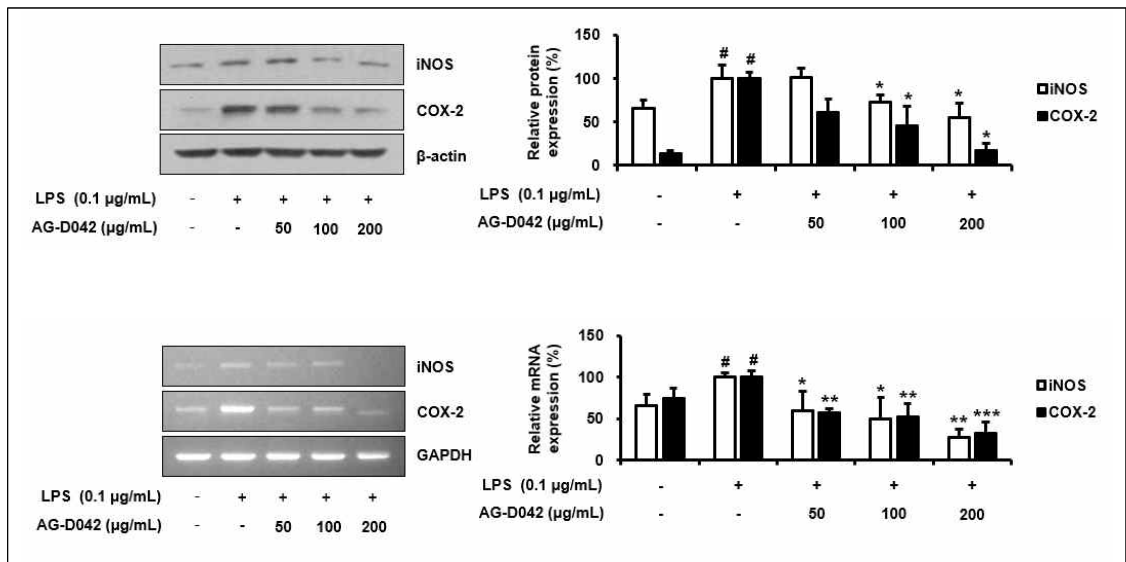


Fig. 16. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 iNOS, COX-2의 단백질 및 유전자 발현 변화

(나) 섬쭉부쟁이 추출물의 p-NF- κ B, p-I κ B- α 의 단백질 발현 감소

BV-2 세포에 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042)을 전처리 후 LPS로 과면역을 유도하여 p-NF- κ B, p-I κ B- α 의 단백질 발현 정도를 western blotting으로 확인하였음(Fig. 17). LPS에 의해 증가하였던 p-NF- κ B의 단백질 발현은 섬쭉부쟁이 추출물 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 유의적으로 감소하였음(Cell only 대비 #P-value < 0.05, LPS 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). LPS에 의해 증가하였던 p-I κ B- α 의 단백질 발현은 섬쭉부쟁이 추출물 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 유의적으로 감소하였음(Cell only 대비 ##P-value < 0.01, LPS 유도군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01).

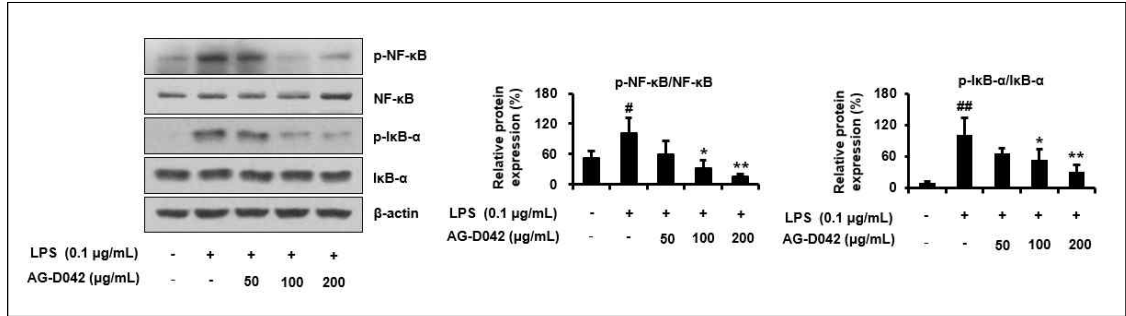


Fig. 17. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 p-NF-κB, p-IκB-α의 단백질 발현 변화

▶ 결론적으로 섬쑥부쟁이 추출물은 염증 조절 인자인 iNOS, COX-2, p-NF-κB 및 p-IκB-α의 발현을 감소시켜 항염증 효능을 나타내는 것으로 사료됨.

2. 동물시험에서 섬쑥부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효능 및 기전 검증 가. 단시간 투여에 의한 AChE 활성 억제 효능 확인(in vivo)

(1) 시험목적

ICR mouse에서 섬쑥부쟁이 추출물 단시간 투여에 의한 AChE 활성 억제 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil(DNZ), acetylthiocholine iodide, neostigmine bromide 및 5, 5'-dithio bis [2-nitrobenzoic acid](DTNB)는 Sigma Chemical Co.(St Louis., MO, USA) 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

25 ~ 30 g 이내의 체중 범위에 있는 수컷 6주령의 ICR 마우스를 선별하였으며 입수 후 7일 동안 사육실 환경에 순화시켜 본 실험에 사용하였음. 사육실 내의 온도 및 습도는 23±1°C, 60±10%로 유지하였으며 12시간 주기에 맞춰 조명을 설정하였음. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육상자, 깔개 및 물병은 주 1회 이상 교체하였음. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배한 후에 실험에 사용하였음.

(다) 시험군 구성

군	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	Vehicle	-	10	1 h	#1 ~ #5
G2	AG-D(AG-D013)	100	10	1 h	#6 ~ #10
G3	AG-D(AG-D013)	300	10	1 h	#11 ~ #15

G4	DNZ	5	10	1 h	#16 ~ #20
Vehicle: 멸균주사용수					

(3) 시험진행

(가) 시험방법

섬쑥부쟁이 추출물과 양성대조물질인 DNZ(5 mg/kg)을 경구투여하고 1시간 후에 마우스를 치사시켜 뇌를 적출함.

(나) AChE 활성 측정

소뇌를 제외한 뇌 무게의 10배의 0.1 M 인산 완충용액(pH 8.0)을 가한 후 균질화하고 4°C에서 1000 x g로 10분간 원심 분리하였으며, 상층액을 효소원으로 사용하였음. 96 well plate에 인산 완충용액, 효소원 및 Ellman 시약을 넣은 후 acetylthiocholine iodide을 넣고 10분간 반응시킨 후 neostigmine으로 반응을 정지시키고 412 nm에서 흡광도를 측정함.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 one-way analysis of variance(ANOVA)를 사용하며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물의 AChE 활성 억제 효능(단시간 투여)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D, AG-D013)을 1시간 투여한 ICR mouse의 뇌를 이용하여 AChE 활성을 측정하였음(Fig. 18). Control에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군에서 AChE 활성이 유의하게 감소하였음(Control 대비 *P-value < 0.05). 양성대조군인 DNZ 투여군에서도 Control에 비해 AChE 활성이 유의하게 감소하였음(Control 대비 *P-value < 0.05).

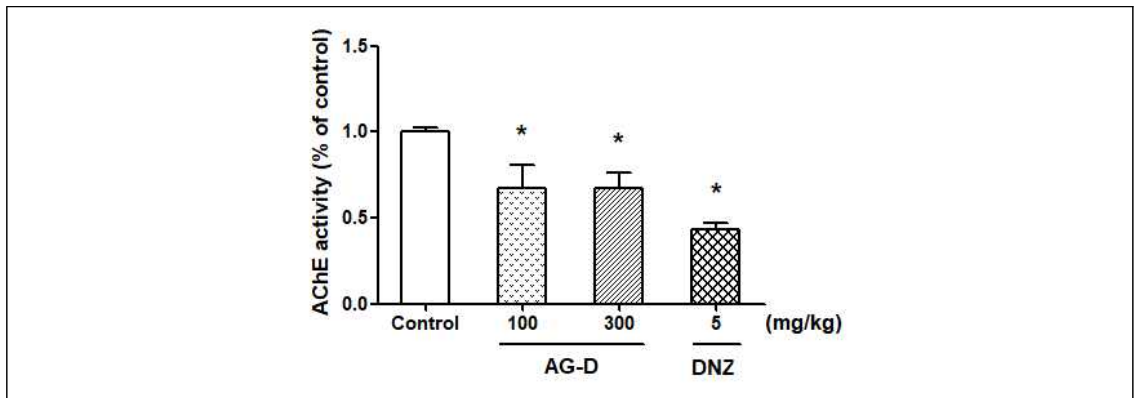


Fig. 18. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)의 AChE 활성 억제 효능(단시간)

나. 14일 투여에 의한 AChE 활성 억제 효능 확인(in vivo)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에서 섬쑥부쟁이 추출물 14일 투여에 의해 나타나는 AChE 활성을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Scopolamine, DTNB, ATC, sodium phosphate monobasic, potassium phosphate di basic은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. Ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea) 제품을 사용하였음. BCA protein assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA) 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

20 g±20% 이내의 체중 범위에 있는 수컷 4주령의 ICR 마우스를 선별하였으며 입수 후 7일 동안 사육실 환경에 순화시켜 본 실험에 사용하였음. 사육실 내의 온도 및 습도는 22±1℃, 50±10%로 유지하였으며 12시간 주기에 맞춰 조명을 설정하였음. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육상자, 깔개 및 물병은 주 1회 이상 교체하였음. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배한 후에 실험에 사용하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #4
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#5 ~ #8
G3	Y	AG-D013	30	10	D1 ~ D14	#9 ~ #15
G4	Y	AG-D013	100	10	D1 ~ D14	#16 ~ #23
G5	Y	AG-D013	300	10	D1 ~ D14	#24 ~ #31

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

섬쑥부쟁이 추출물은 경구투여를 통해 매일 1회, 14일간 위 내에 직접 투여하였음. 투여액량 산출은 투여 당일날 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. Scopolamine(1 mg/kg)은 부검을 시작하기 30분 전에 복강투여하였음. 투여 마지막 날 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 후 뇌를 적출하였음.

(나) AChE 활성 측정

ICR mouse의 brain에 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)을 넣고 파쇄하여 enzyme을 추출하였음. 100 mM phosphate buffer(pH 8.0) 650 μL, 10 mM DTNB 25 μ

L, enzyme extract 12.5 μ L를 넣어서 최종 용량 687.5 μ L로 만들고 상온에서 3분 동안 incubation 진행하였음. 이후, 7.5 mM ATC를 5 μ L 넣고 vortex한 후 96 well plate에 담아 412 nm 파장에서 10분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였음. AChE의 specific activity는 unit/mg protein으로 나타내며, 1 unit/mg protein은 1 mg protein이 ATC 존재 하에 1분 동안 DTNB를 TNB로 1 micromole 수화시킴을 의미함.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 사용하며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물의 AChE 활성 억제 효능(14일 투여)

ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)을 14일간 투여한 후 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 AChE 활성을 측정하였음(Fig. 19). 정상대조군에 비해 유발대조군의 AChE의 활성이 약 18% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 반면 유발대조군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군의 AChE 활성은 약 11.5, 14.3% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ##P-value<0.01).

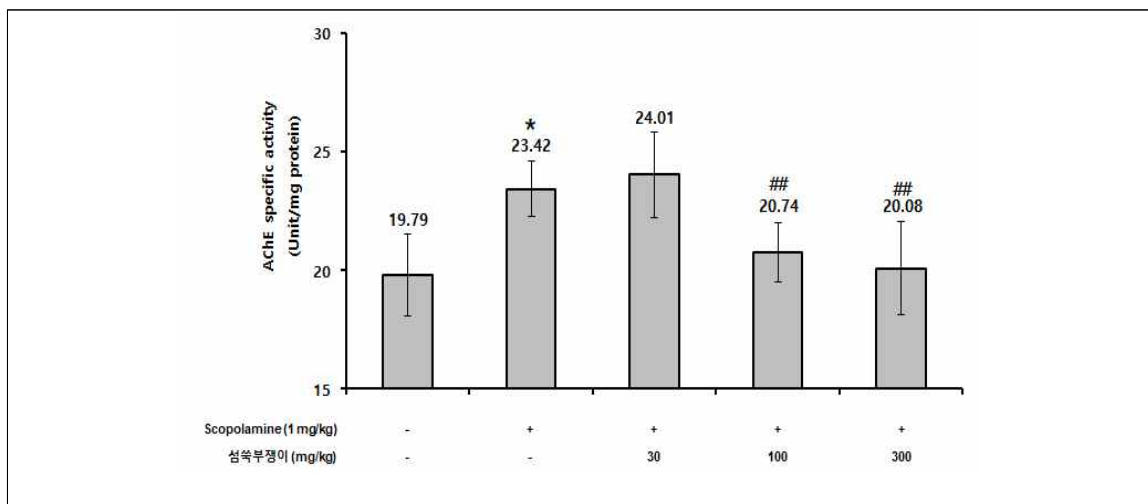


Fig. 19. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)의 AChE 활성 억제 효능 (14일)

다. 14일 투여에 의한 인지기능 및 기억력 개선 효능 확인(in vivo)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 AChE 활성 뿐만 아니라 ACh 농도와 알츠하이머의 가장 기본적인 바이오마커인 A β 의 생성량을 간접적으로 유추할 수 있는 amyloid precursor protein(APP) 발현도 확인하여 섬쑥부쟁이 추출물 14일 투여에 의한 인지기능 및 기억력 개선 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil, scopolamine, AChE 활성 측정 관련 시약 및 재료는 위와 동일하게 사용하여 실험을 진행하였음. Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters는 Millipore(Billerica, MA, USA) 제품을 사용하였음. Mouse ACh assay kit 및 mouse APP ELISA kits는 MyBioSource(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였음. 섬썩부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

위와 동일한 시험동물 사용 및 사육환경을 적용하여 실험을 진행하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #8
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#9 ~ #16
G3	Y	AG-D031	30	10	D1 ~ D14	#17 ~ #24
G4	Y	AG-D031	100	10	D1 ~ D14	#25 ~ #32
G5	Y	DNZ	5	10	D14	#33 ~ #40

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

섬썩부쟁이 추출물은 경구투여를 통해 매일 1회, 14일간 위 내에 직접 투여하였으며, DNZ(5 mg/kg)은 실험 마지막 날에만 경구투여하였음. 투여액량 산출은 투여 당일날 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. Scopolamine(1 mg/kg)은 부검을 시작하기 30분 전에 복강투여하였음. 투여 마지막 날 ICR mouse에 대하여 채혈을 실시한 후 heparin이 들어있는 튜브에 전혈을 수집하였고, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 후 brain을 적출하였음. 수집한 전혈은 원심분리하여 혈장을 채집한 후 Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters를 사용하여 농축시킨 뒤에 실험에 사용하였음.

(나) AChE 활성 측정

위와 동일한 방법으로 AChE 활성을 측정하였음.

(다) ACh 농도 측정

농축한 혈장을 mouse ACh assay kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(assay buffer, choline oxidase, HRP, colorimetric probe, AChE)들과 함께 반응시킨 뒤에 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 ACh 농도를 계산하였음.

(라) APP 농도 측정

농축한 혈장을 mouse APP ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(detection reagent, assay diluent, TMB substrate, stop solution)들과 함께 반응시킨 뒤에 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 APP 농도를 계산하였음.

(마) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 분석하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬썩부쟁이 추출물에 의한 인지기능 및 기억력 개선 효능(14일 투여)

ICR mouse에 섬썩부쟁이 추출물(AG-D031)을 14일간 투여한 후 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 AChE 활성, ACh 및 APP 농도를 측정하였음(Fig. 20).

AChE 활성을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 AChE 활성이 약 48.4% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 유발대조군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군의 AChE 활성이 각각 약 21.3, 13.3% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, ***P-value < 0.001). DNZ 투여군의 AChE 활성도 유발대조군 비해 약 35.0% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

혈장 ACh 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 ACh 농도는 약 31.03% 유의적으로 감소하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬썩부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군의 ACh 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 21.4, 20.2% 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01). 양성대조군인 DNZ 투여군의 ACh 농도도 유발대조군에 비해 39.2% 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

혈장 APP 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 APP 농도는 약 3.2배 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬썩부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군의 APP 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 45.8, 40.9% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). 양성대조군인 DNZ 투여군의 APP 농도 역시 유발대조군에 비해 72.6% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

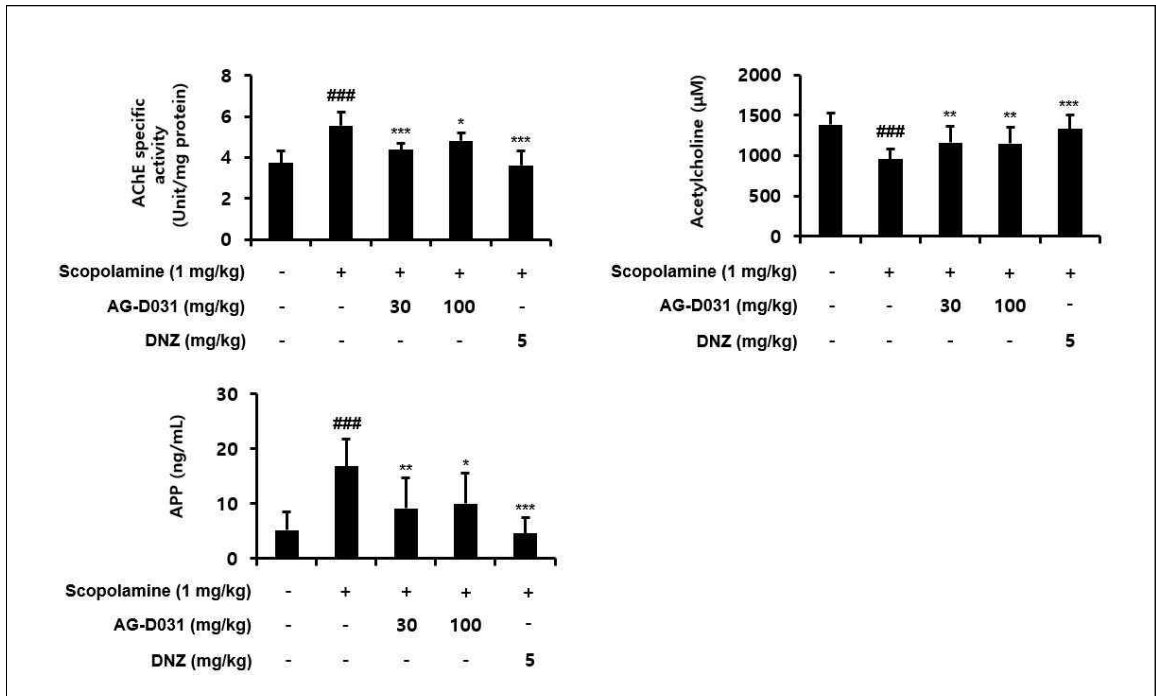


Fig. 21. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)의 인지기능 및 기억력 개선 효능(14일)

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물은 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가, APP 농도 감소를 통해 인지기능 및 기억력 개선에 도움을 주는 것으로 예측되며, 섬쑥부쟁이 추출물의 농도 의존성 확인을 위해 투여군을 추가하여 재시험을 진행하였음.

라. 14일 투여에 의한 인지기능 및 기억력 개선효능 확인(in vivo, 추가)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 AChE 활성, ACh 농도 및 APP 발현을 확인하여 섬쑥부쟁이 추출물 14일 투여에 의한 인지기능 및 기억력 개선 효능을 재확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

DNZ를 제외하고 위와 동일한 시약 및 재료를 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

위와 동일한 시험동물 사용 및 사육환경을 적용하여 실험을 진행하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #4

G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#5 ~ #8
G3	Y	AG-D031	30	10	D1 ~ D14	#9 ~ #12
G4	Y	AG-D031	100	10	D1 ~ D14	#13 ~ #16
G5	Y	AG-D031	300	10	D1 ~ D14	#17 ~ #20
Vehicle: 멸균주사용수						

(3) 시험진행

(가) 시험방법

DNZ 투여를 제외하고 위의 시험방법과 동일하게 시험을 진행하였음.

(나) AChE 활성, ACh 농도 및 APP 농도 측정

위와 동일한 방법으로 측정하였음.

(다) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 분석하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 인지기능 및 기억력 개선 효능(14일 투여, 추가)

ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)을 14일간 투여한 후 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 AChE 활성, ACh 및 APP 농도를 측정하였음(Fig. 21).

AChE 활성을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 AChE 활성이 약 50.4% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 유발대조군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 투여군의 AChE 활성이 약 23.7, 28.8, 31.0% 농도 의존적으로 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01).

혈장 ACh 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 ACh 농도는 약 21.5% 유의적으로 감소하였음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 투여군의 ACh 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 32.8, 50.5, 58.1% 농도 의존적으로 증가하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01).

혈장 APP 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 APP 농도는 약 2.3배 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 투여군의 APP 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 29.0, 41.8, 43.3% 농도 의존적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

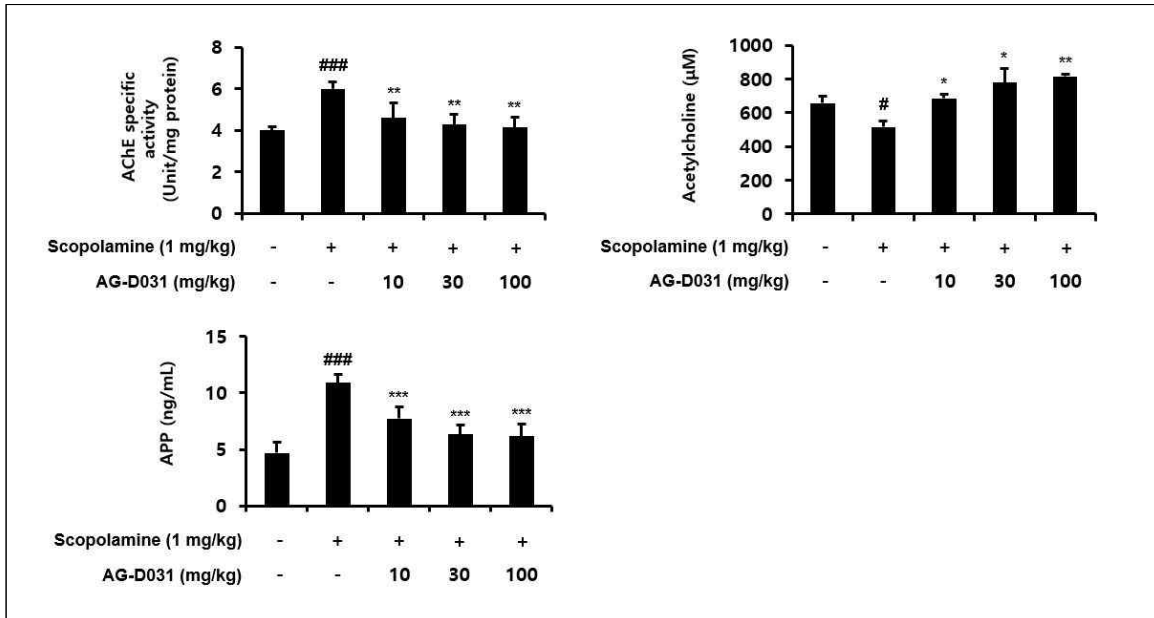


Fig. 21. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)의 인지기능 및 기억력 개선 효능(14일, 추가)

▶ 섬쑥부쟁이 추출물의 농도 의존적 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가, APP 농도 감소에 따른 인지기능 및 기억력 개선 효능을 확인하였음.

마. 인지기능 및 기억력 개선 효능 기전 확인(in vivo)

(1) 시험목적

ICR mouse에서 섬쑥부쟁이 추출물에 의해 나타나는 인지기능 및 기억력 개선 효능에 대한 기전을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

DNZ은 위와 동일한 제품을 사용하였음. Glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β), protein kinase B(Akt), pAkt, ERK, CREB 및 β-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였음. Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), pPI3K, pERK, pCREB, pGSK-3β 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였음. BDNF 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)의 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

25 ~ 30 g 이내의 체중 범위에 있는 수컷 6주령의 ICR mouse를 선별하였으며 입수 후 7일 동안 사육실 환경에 순화시켜 본 실험에 사용하였음. 사육실 내의 온도 및 습도는 23±1℃, 60±10%로 유지하였으며 12시간 주기에 맞춰 조명을 설정하였음. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육상자, 깔개 및 물병은 주 1회 이상 교체하였음. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게

분포하도록 무작위법으로 분배한 후에 실험에 사용하였음.

(3) 시험진행

(가) 시험방법

그룹당 5마리로 구성하여 섬쑥부쟁이 추출물 및 DNZ(5 mg/kg)을 경구투여하고 마우스를 치사시켜 뇌를 적출함.

(나) 기억 관련 신호전달 인자의 단백질 발현 확인(western blotting)

적출한 뇌에서 해마를 분리하여 균질화한 후, western blot하여 pERK, ERK, pCREB, CREB, pPI3K, PI3K, pAkt, Akt, pGSK-3 β , GSK-3 β , BDNF 단백질 발현 정도를 확인하였음.

(다) 통계처리

pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3 β 단백질 발현 정도에 대한 통계학적 분석은 one-way ANOVA를 사용하였고 BDNF 단백질 발현 정도에 대한 통계학적 분석은 two-way ANOVA를 사용하였으며, 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3 β 의 단백질 발현 증가

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D, AG-D013) 투여 후에 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3 β 단백질 발현을 확인하였으며, BDNF 단백질 발현의 경우 섬쑥부쟁이 추출물 투여 후 시간별로 확인하였음(Fig. 22). Control에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군에서 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3 β 단백질 발현이 유의하게 증가하였음(Control 대비 *P-value < 0.05). 양성대조군인 DNZ 투여군에서도 Control에 비해 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3 β 단백질 발현이 유의하게 증가하였음(Control 대비 *P-value < 0.05). 또한 BDNF 발현 수준의 시간적 변화를 관찰한 결과, 섬쑥부쟁이 추출물 투여 9 및 12시간 후, Control에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군에서 BDNF 단백질 발현이 유의하게 증가하였음(Control 대비 *P-value < 0.05).

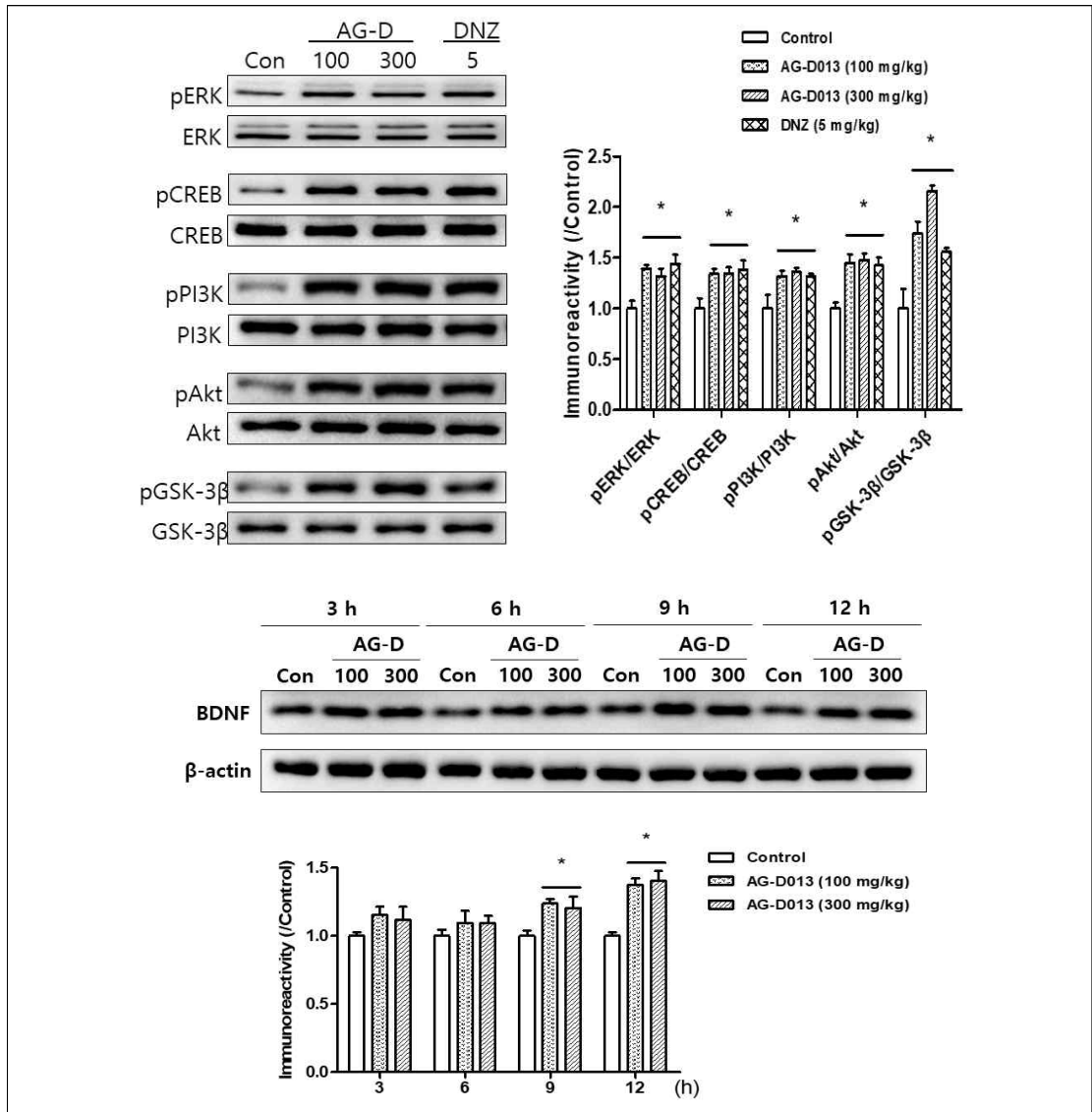


Fig. 22. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)에 의한 기억 관련 신호전달 인자 단백질 발현 변화

▶ 따라서 섬쑥부쟁이 추출물의 인지능력 및 기억력 개선 효능에 pCREB, pERK, pPI3K, pAkt, pGSK-3β, BDNF가 관여함을 확인함.

바. 14일 투여에 의한 항염증 효과 확인(in vivo)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β) 농도를 측정하여 섬쑥부쟁이 추출물 14일 투여에 의한 항염증 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil, scopolamine 및 Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters은 위와 동일한 제품을 사용하였음. Mouse TNF- α 및 mouse IL-1 β ELISA kit은 R

&D systems(Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK 바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

20 g±20% 이내의 체중 범위에 있는 수컷 4주령의 ICR 마우스를 선별하였으며 입수 후 7일 동안 사육실 환경에 순화시켜 본 실험에 사용하였음. 사육실 내의 온도 및 습도는 22±1℃, 50±10%로 유지하였으며 12시간 주기에 맞춰 조명을 설정하였음. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육상자, 깔개 및 물병은 주 1회 이상 교체하였음. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배한 후에 실험에 사용하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #8
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#9 ~ #16
G3	Y	AG-D031	30	10	D1 ~ D14	#17 ~ #24
G4	Y	AG-D031	100	10	D1 ~ D14	#25 ~ #32
G5	Y	DNZ	5	10	D14	#33 ~ #40

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

섬쑥부쟁이 추출물은 경구투여를 통해 매일 1회, 14일간 위 내에 직접 투여하였으며, DNZ(5 mg/kg)은 실험 마지막 날에만 경구투여하였음. 투여액량 산출은 투여 당일날 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. Scopolamine(1 mg/kg)은 부검을 시작하기 30분 전에 복강투여하였음. 투여 마지막 날 ICR mouse에 대하여 채혈을 실시한 후 heparin이 들어있는 튜브에 전혈을 수집하였고, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 후 brain을 적출하였음. 수집한 전혈은 원심분리하여 혈장을 채집한 후 Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters를 사용하여 농축시킨 뒤에 실험에 사용하였음.

(나) Pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β) 농도 측정

농축한 혈장을 mouse TNF- α 및 mouse IL-1 β ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 상온에서 incubation한 후, 시약(conjugate, assay diluent, color reagent, stop solution)들과 함께 반응시키고 450, 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 TNF- α 및 IL-1 β 농도를 계산하였음.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 사용하며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물의 pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β) 감소 효과(14일 투여)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)을 14일간 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 TNF- α , IL-1 β 농도를 측정하였음(Fig. 23).

혈장 TNF- α 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 TNF- α 농도는 약 25% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 #P-value < 0.05). 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군의 TNF- α 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 20.31, 19.69% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). 양성대조군인 DNZ 투여군의 TNF- α 농도도 유발대조군에 비해 44.37% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.01).

혈장 IL-1 β 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 IL-1 β 농도는 약 2.14배 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군의 IL-1 β 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 55.68, 36.54% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 양성대조군인 DNZ 투여군의 IL-1 β 농도는 유발대조군에 비해 67.17% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

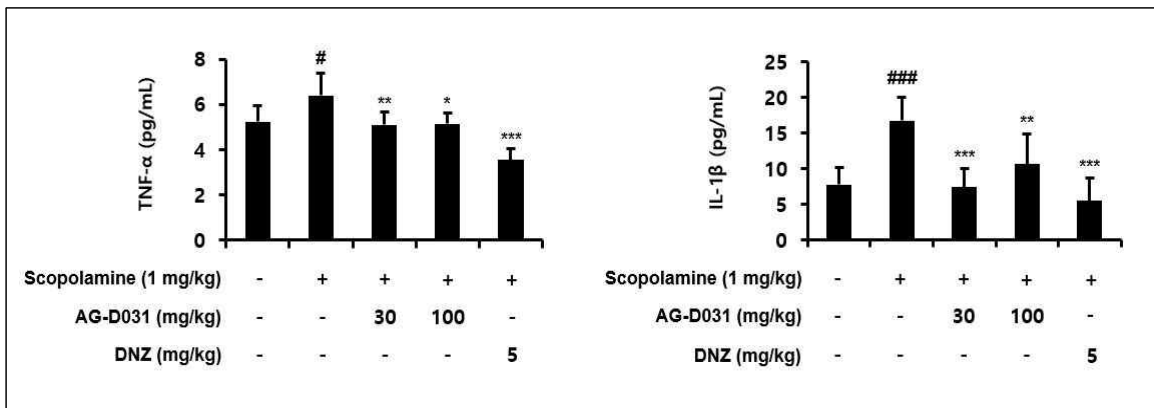


Fig. 23. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)의 pro-inflammatory cytokines 농도 감소 효과(14일)

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물은 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β) 감소를 통해 신경 염증을 억제시킬 것으로 예상되며, 농도 의존성 확인을 위해 농도 군을 추가하여 재시험을 진행하였음.

사. 14일 투여에 의한 항염증 효과 확인(in vivo, 추가)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 농도를 측정하여 섬췌부장애 추출물 14일 투여에 의한 항염증 효능을 재확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

위와 동일한 시약 및 재료를 사용하였으며, mouse IL-6 ELISA kit은 R&D systems(Minneapolis, MN, USA) 제품을 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

위와 동일한 시험동물 사용 및 사육환경을 적용하여 실험을 진행하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #6
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#7 ~ #12
G3	Y	AG-D031	10	10	D1 ~ D14	#13 ~ #17
G4	Y	AG-D031	30	10	D1 ~ D14	#18 ~ #22
G5	Y	AG-D031	100	10	D1 ~ D14	#23 ~ #27
G6	Y	DNZ	5	10	D14	#28 ~ #32

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

위와 동일한 시험방법으로 실험을 진행하였음.

(나) Pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 농도 측정

TNF- α , IL-1 β 농도 측정시 위와 동일한 방법으로 실험을 진행하였음. IL-6의 경우, 농축한 혈장을 mouse IL-6 ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 상온에서 incubation한 후, 시약(conjugate, assay diluent, color reagent, stop solution)들과 함께 반응시키고 450, 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 IL-6 농도를 계산하였음.

(다) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 분석하였음.

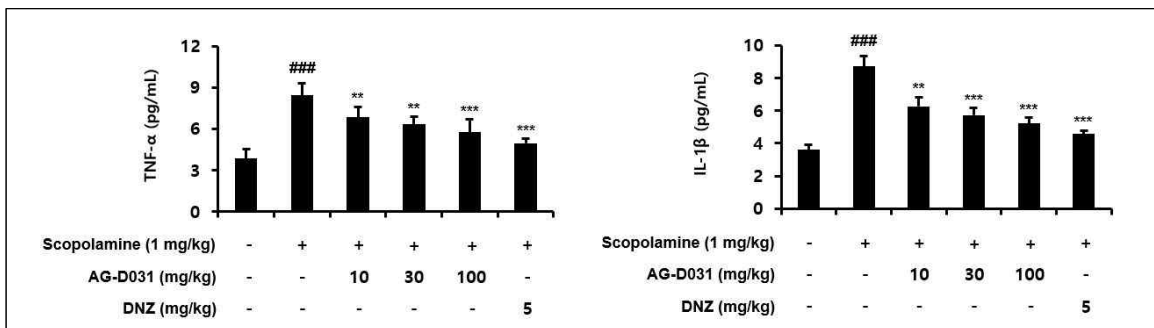
(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물의 pro-inflammatory cytokines 감소 효과(14일 투여, 추가)
 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)을 14일간 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 기억력 손상을 유발하여 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 농도를 측정 하였음(Fig. 24).

혈장 TNF- α 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 TNF- α 농도는 약 119.0% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군의 TNF- α 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 18.8, 25.0, 31.5% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 양성대조군인 DNZ 투여군의 TNF- α 농도는 유발대조군에 비해 41.2% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

혈장 IL-1 β 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 IL-1 β 농도는 약 141.8% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군의 IL-1 β 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 28.1, 34.2, 40.0% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 양성대조군인 DNZ 투여군의 IL-1 β 농도도 유발대조군에 비해 47.7% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

혈장 IL-6 농도를 측정한 결과, 정상대조군에 비해 유발대조군의 IL-6 농도는 약 177.7% 유의적으로 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군의 IL-6 농도는 유발대조군에 비해 각각 약 35.5, 65.5, 82.6% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 양성대조군인 DNZ 투여군의 IL-6 농도도 유발대조군에 비해 140.3% 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).



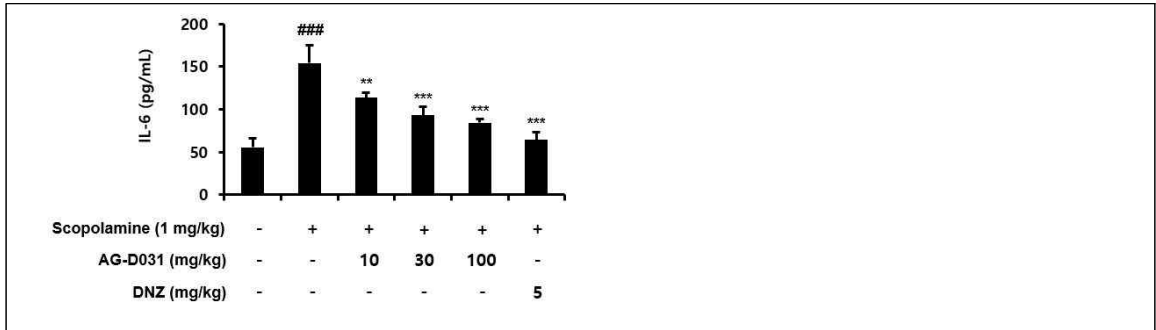


Fig. 24. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)의 pro-inflammatory cytokines 농도 감소 효과(14일, 추가)

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물은 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 감소를 통해 항염증 효능을 나타내는 것으로 판단됨.

아. 항염증 효능 기전 확인(in vivo)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 섬쑥부쟁이 추출물에 의해 나타나는 항염증 효능에 대한 기전을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

COX-2 항체는 Cayman chemical(Ann Arbor, MI, USA) 제품을 사용하였고 나머지 시약 및 재료는 위와 동일하게 사용하였음.

(나) 시험동물 및 사육환경

위와 동일한 시험동물 사용 및 사육환경을 적용하여 실험을 진행함.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간	Animal No.
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#1 ~ #6
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14	#7 ~ #12
G3	Y	AG-D031	10	10	D1 ~ D14	#13 ~ #17
G4	Y	AG-D031	30	10	D1 ~ D14	#18 ~ #22
G5	Y	AG-D031	100	10	D1 ~ D14	#23 ~ #27
G6	Y	DNZ	5	10	D14	#28 ~ #32

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

위와 동일한 시험방법으로 실험을 진행하였음.

(나) 염증 조절 인자의 단백질 발현 확인(western blotting)

적출한 뇌를 균질화한 후, western blot하여 iNOS, COX-2 단백질 발현 정도를 확인하였음.

(다) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 실험을 진행하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 iNOS, COX-2의 단백질 발현 감소(14일 투여)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)를 14일간 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 western blotting으로 확인하였음(Fig. 25). 유발대조군의 iNOS 단백질 발현이 정상대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001), 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 유발대조군의 COX-2 단백질 발현이 정상대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001), 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001).

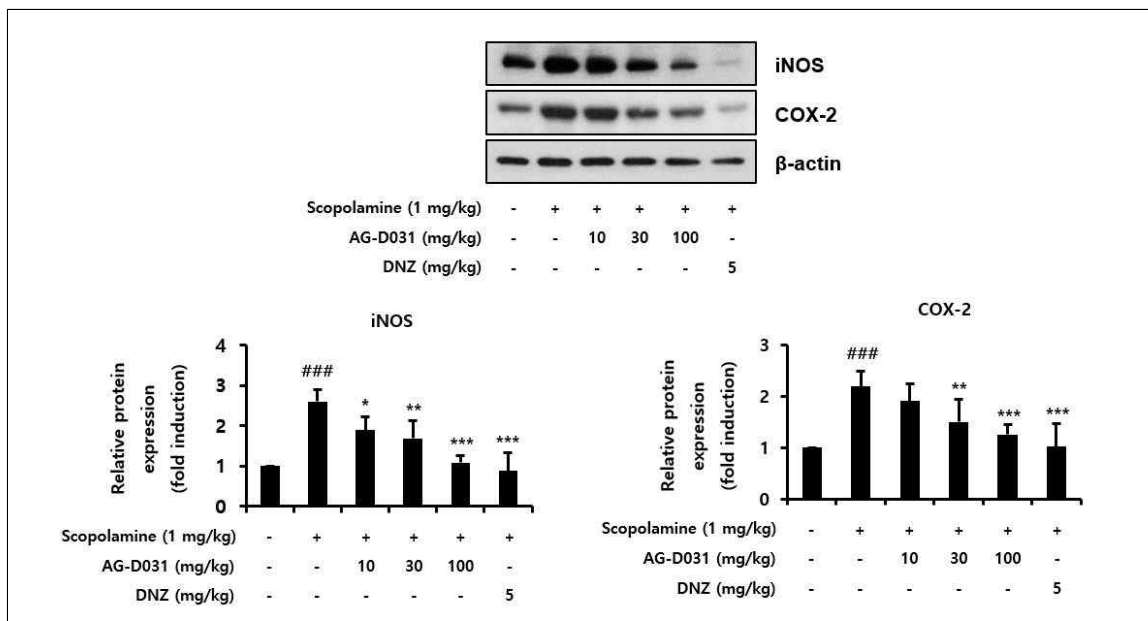


Fig. 25. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D031)에 의한 염증 조절 인자의 단백질 발현 변화

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물의 항염증 효능에 염증 조절 인자인 iNOS와 COX-2가 관여하는 것을 확인함.

3. 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬쑥부쟁이 추출물의 기억력 개선 행동 평가

가. 단기 기억력 개선 효능 확인(Scopolamine 유도)

(1) 시험목적

Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 수동회피시험 및 Y자 미로 시험 통해 섬쑥부쟁이 추출물의 단기 기억력 개선 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

3,5-DCQA, donepezil 및 scopolamine은 위와 동일한 제품을 사용하였으며, 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(3) 시험진행

(가) 시험방법

그룹당 10마리로 구성하여 섬쑥부쟁이 추출물, 3,5-DCQA 및 DNZ(5 mg/kg)을 단회 경구투여하고 scopolamine은 시험실시 30분 전에 복강투여하였음.

(나) 수동회피시험

수동회피시험은 기억(memory)이나 기억강화(memory consolidation)를 평가하는 실험으로, 실험동물이 어두운 공간을 선호하는 습성을 이용함. 밝은 공간과 어두운 공간으로 나누어진 상자의 밝은 공간에 실험동물을 넣고 어두운 공간으로 이동하였을 때 전기 자극을 가한 뒤, 24시간 후에 실험동물을 다시 같은 상자의 밝은 공간에 넣고 어두운 공간으로 이동하기까지의 시간(latency time)을 측정함.

(다) Y자 미로 시험

Y자 미로 시험(Y-maze task)은 작업 기억(working memory)과 단기 기억(short term memory)을 평가하는 실험으로 Y자 모양의 미로에 쥐를 놓아둔 뒤 8분 동안 쥐가 A, B 및 C로 규정한 미로의 통로를 겹치지 않게 탐색한 변경 행동력(spontaneous alternation)의 비율을 계산함.

(라) 통계처리

통계학적 분석은 one-way ANOVA를 사용하며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 3,5-DCQA의 단기 기억력 개선 효능(수동회피시험)

3,5-DCQA를 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 수동회피시험을 수행하였음(Fig. 26). 정상대조군에 비해 유발대조군의 지연시간(latency time)이 유의적으로 감소하였음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 3,5-DCQA 1, 3, 10 mg/kg 투여군의 지연시간은 유발대조군에 비해 유

의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). DNZ 투여군의 지연시간도 유발대조군에 비해 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05).

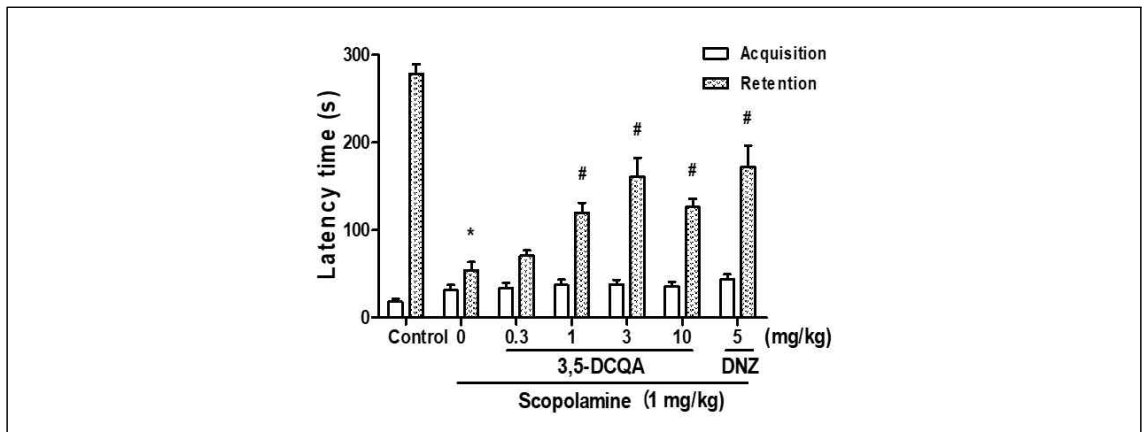


Fig. 26. 3,5-DCQA의 수동회피시험에서의 단기 기억력 개선 효능

(나) 섬쑥부쟁이 추출물의 단기 기억력 개선 효능(수동회피시험)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D, AG-D013)을 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 수동회피시험을 수행하였음(Fig. 27). 정상대조군에 비해 유발대조군의 지연시간(latency time)이 유의적으로 감소하였음(정상대조군 대비 ***P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군의 지연시간은 유발대조군에 비해 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 ##P-value < 0.01). DNZ 투여군의 지연시간도 유발대조군에 비해 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 ##P-value < 0.01).

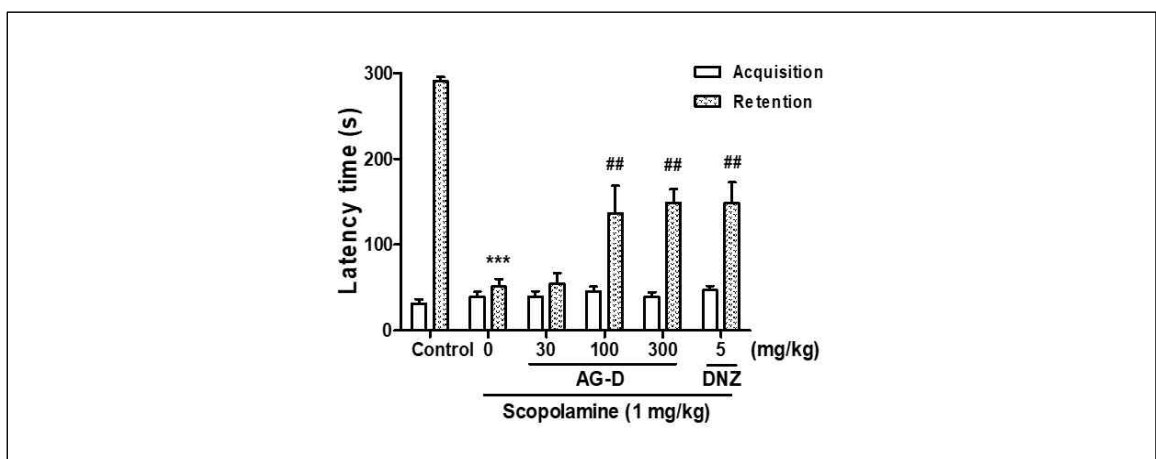


Fig. 27. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)의 수동회피시험에서의 단기 기억력 개선 효능

(다) 섬쑥부쟁이 추출물의 단기 기억력 개선 효능(Y자 미로 시험)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D, AG-D013)을 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 Y자 미로시험을 수행하였음(Fig. 28). Scopolamine 투여로 인해 변경 행동력(spontaneous alterations, %)이 유의적으로

감소하는 것을 확인함(정상대조군 대비 ***P-value < 0.001). 반면 섬쭉부쟁이 추출물 100, 300 mg/kg 투여군에서 유의적으로 변경 행동력이 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). DNZ 투여군의 변경 행동력도 유발대조군에 비해 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05).

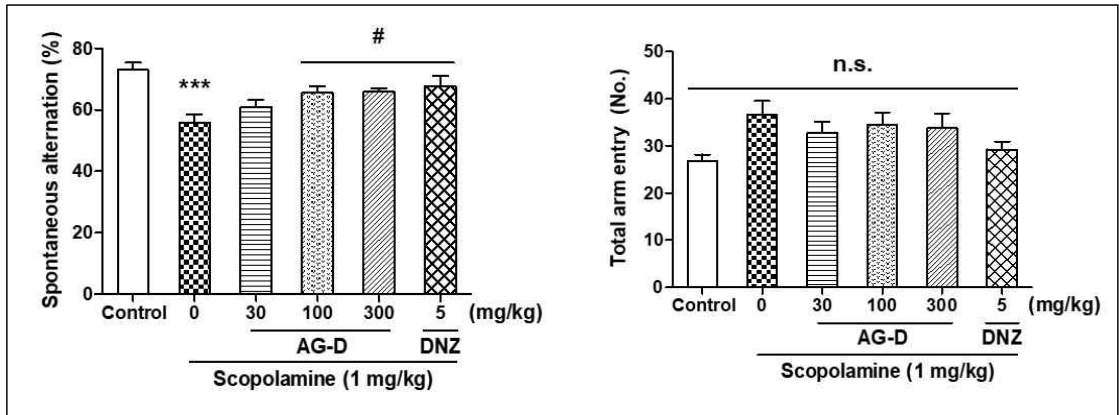


Fig. 28. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D013)의 Y자 미로 시험에서의 단기 기억력 개선 효능

▶ 이를 통해 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 동물모델에서 3,5-DCQA와 섬쭉부쟁이 추출물에 의한 단기 기억력 개선 효능을 확인함.

나. 단기 기억력 개선 효능 확인(A β 유도)

(1) 시험목적

A β 로 인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 수동회피시험을 통해 섬쭉부쟁이 추출물의 단기 기억력 개선 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil은 위와 동일한 제품을 사용하였으며, Amyloid-beta₁₋₄₀ (A β)은 Sigma Chemical Co.(St Louis., MO, USA) 제품을 사용하였음. 섬쭉부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(3) 시험진행

(가) 시험방법

마우스 측뇌실(lateral ventricles)에 A β 10 nM을 투여한 후에 섬쭉부쟁이 추출물과 DNZ(5 mg/kg)을 경구투여하였음. 총 7일간 경구투여하고 최종 투여일로부터 24시간 후, 시험을 진행하였음.

(나) 수동회피시험

위와 동일한 방법으로 시험을 진행하였음.

(다) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 분석하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물의 단기 기억력 개선 효능(수동회피시험)

Aβ로 인지능력 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)를 투여한 후에 수동회피시험을 수행하였음(Fig. 29). 유발대조군의 지연시간이 정상대조군에 비해 80.6% 유의적으로 감소하였으며(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001), 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 투여군의 지연시간은 유발대조군에 비해 2.2, 2.5, 2.8배 농도 의존적으로 증가하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). DNZ 투여군의 지연시간 또한 유발대조군의 비해 3.1배 유의적으로 증가하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

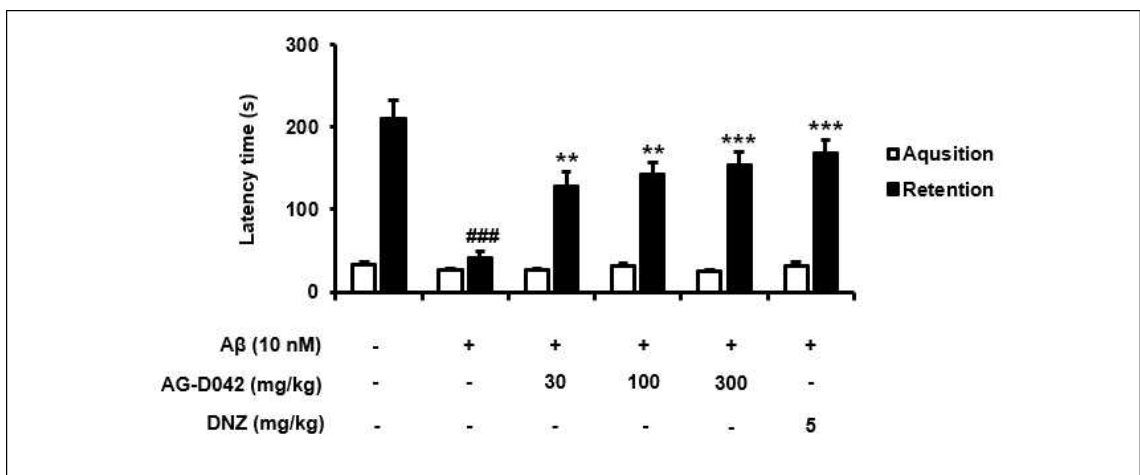


Fig. 29. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042)에 의한 수동회피시험에서의 기억력 개선 효과

▶ 이를 통해 scopolamine 뿐만 아니라 Aβ로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 동물모델에서도 섬쑥부쟁이 추출물이 단기 기억력 개선 효능을 나타냄을 확인함.

다. 장기 기억력 개선 효능 확인

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 모리스 수중 미로 시험(Morris water maze task)을 통해 섬쑥부쟁이 추출물의 장기 기억력 개선 효능을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

3,5-DCQA, donepezil 및 scopolamine은 위와 동일한 제품을 사용하였으며, 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음.

(3) 시험진행

(가) 시험방법

그룹당 10마리로 구성하여 총 5일의 훈련기간 동안 섬썩부쟁이 추출물, 3,5-DCQ A 및 DNZ을 매일 1회, 첫 번째 훈련 1시간 전에 단회 경구투여하고 scopolamine 은 30분 전에 복강투여하였음.

(나) 모리스 수중 미로 시험

모리스 수중 미로 시험은 실험동물의 공간 학습 및 장기 기억(spatial learning and long-term memory)을 평가하는 실험으로 실험동물을 물이 차 있는 원형의 수조에서 자유롭게 수영하도록 한 뒤 수조의 내벽에 부착된 단서(cue)만으로 눈에 보이지 않는 안전장소인 플랫폼(invisible platform)을 찾는 훈련을 반복함. 훈련이 완료되면 플랫폼을 제거한 뒤 실험동물이 플랫폼이 있던 사분면(target quadrant)에 머무는 시간 및 플랫폼이 있던 위치를 지나는 횡수(crossing) 및 속도(velocity)를 측정함.

(다) 통계처리

통계학적 분석은 two-way ANOVA를 사용하였으며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 3,5-DCQA의 장기 기억력 개선 효능(모리스 수중 미로 시험)

3,5-DCQA를 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발하여 모리스 수중 미로 시험을 수행하였음(Fig. 30). Training trials에서 유발대조군은 정상대조군에 비해 escape latency time의 감소폭이 더뎠을 확인할 수 있음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 이는 유발대조군에서 플랫폼을 찾는 학습이 잘 이루어지지 않음을 의미함. 3,5-DCQA 1, 3 및 10 mg/kg 투여군에서 유발대조군에 비해 escape latency time이 유의성 있게 개선됨을 관찰할 수 있었음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). DNZ 투여군의 escape latency time 또한 유발대조군에 비해 유의적으로 개선되었음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). Probe trial에서는 유발대조군에 비해 3,5-DCQA 1 mg/kg 투여군에서 swimming time이 유의성 있게 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05).

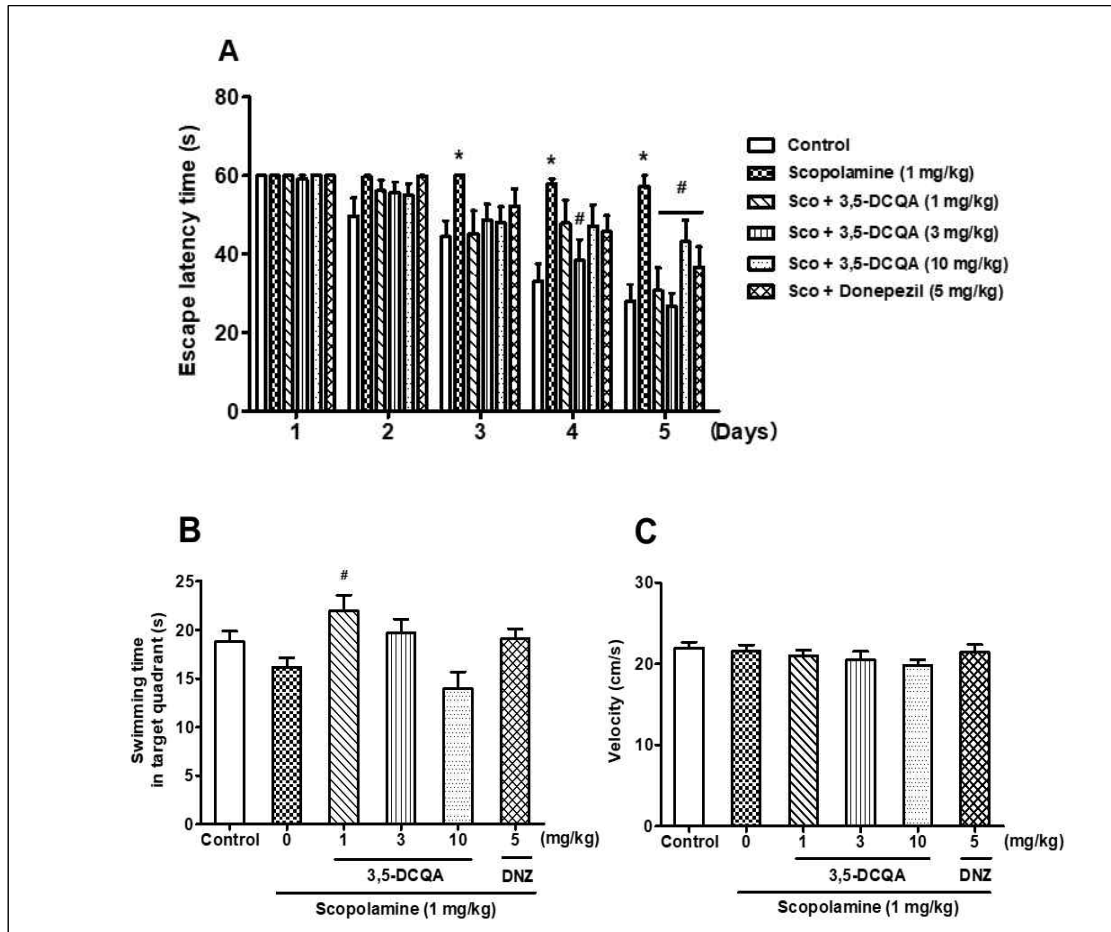


Fig. 30. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)의 수중 미로 시험에서의 공간 학습 기억 및 장기 기억력 개선 효과. 플랫폼으로 이동한 시간(A), 플랫폼 사분면에서의 수영 시간(B), 플랫폼 사분면에서의 수영 속도(C)

(나) 섬쑥부쟁이 추출물의 장기 기억력 개선 효과(모리스 수중 미로 시험)

섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)을 투여한 ICR mouse에 scopolamine으로 인지 기능 및 기억력 손상을 유발하여 모리스 수중 미로 시험을 수행하였음(Fig. 31). Training trials에서 유발대조군은 정상대조군과 비교하면 escape latency time의 감소폭이 더딤을 확인할 수 있음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 반면, 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100 및 300 mg/kg 투여군의 escape latency time이 유발대조군에 비해 유의성 있게 개선됨(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). DNZ 투여군의 escape latency time 또한 유발대조군에 비해 유의적으로 개선되었음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05). Probe trial에서 유발대조군에서는 정상대조군과 비교하여 swimming time이 유의성 있게 감소하였음(정상대조군 대비 *P-value < 0.05). 섬쑥부쟁이 추출물 30 및 100 mg/kg 투여군에서 유발대조군 대비 swimming time이 유의성 있게 증가하였음(유발대조군 대비 #P-value < 0.05).

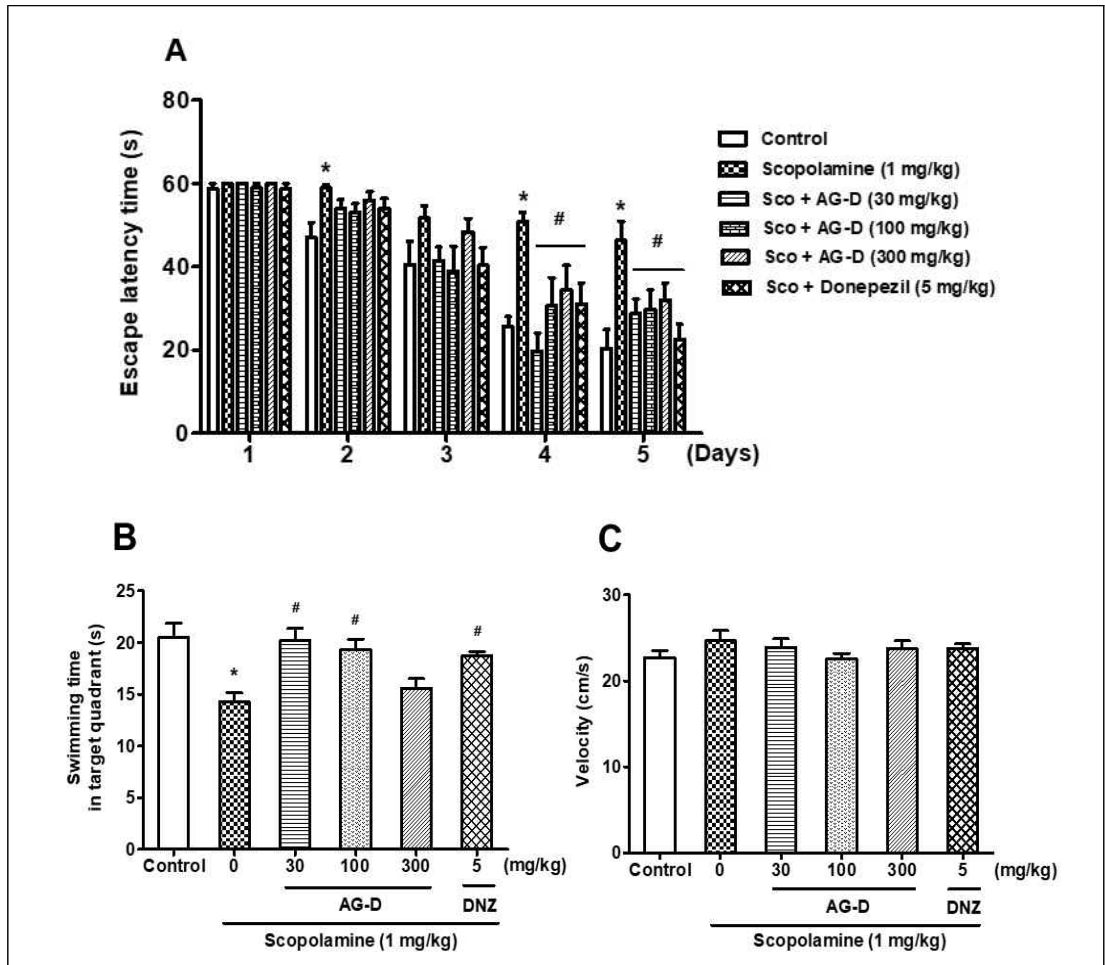


Fig. 31. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D013)의 수중 미로 시험에서의 공간 학습 기억 및 장기 기억력 개선 효과. 플랫폼으로 이동한 시간(A), 플랫폼 사분면에서의 수영 시간(B), 플랫폼 사분면에서의 수영 속도(C)

▶ 결론적으로 3,5-DCQA와 섬쑥부쟁이 추출물에 의한 단기 기억력 개선 효능 뿐만 아니라 장기 기억력 개선 효능도 확인함.

3절 섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가

1. 설치류 단회 투여 독성시험

섬썩부쟁이 추출물의 Sprague-Dawley 랫드(SD 랫드)를 이용한 단회 경구투여 독성시험

(주)캠온 GLP 시험번호 : 18-RA-0084

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행함.

나. 방법 : 섬썩부쟁이 추출물을 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10마리(암수 각 5마리)에 단회 경구투여함. 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였음.

다. 결과

(1) 사망동물은 관찰되지 않았음.

(2) 일반증상 관찰 결과, 2500 mg/kg 및 5000 mg/kg 투여군 암수에서 Day 2에 시험물질 색 변이 관찰되었음.

(3) 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(4) 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

▶ 이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 개략의 치사량(ALD, Approximate Lethal Dose)은 암수 모두에서 5000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.

2. 비설치류 단회 투여 독성시험

섬썩부쟁이 추출물의 beagle dog에 dose escalation(DE)법을 이용한 단회 경구투여 독성시험

(주)캠온 GLP 시험번호 : 18-DA-0087

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬썩부쟁이 추출물을 beagle dog에 DE법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행함.

나. 방법 : 섬썩부쟁이 추출물을 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군을 설정하였고, 암수 각 2마리에 단회 경구투여함. 1차(1250 mg/kg) 투여 후 7일간 관찰한 뒤 2차(2500 mg/kg) 투여하였음. 2차 투여 후 7일간 관찰한 뒤 5000 mg/kg으로 3차 투여하였음. 3차 투여 후 2주간 사망을 포함한 일반증상, 체중변화, 부검소견을 관찰하였음.

다. 결과

(1) 사망동물은 관찰되지 않았음.

(2) 일반증상 관찰 결과, 시험물질 성상의 구토가 1250 mg/kg 투여군 암컷 1례 및 2500 mg/kg 이상 시험물질투여군 전체 암수에서 관찰되었고, 포말성 구토가 1250 mg/kg

암컷 1 레에서 관찰되었음.

(3) 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(4) 부검소견 관찰결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.

▶ 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 섬썩부쟁이 추출물을 beagle dog에 DE법을 이용하여 단회 경구투여하였을 때, 섬썩부쟁이 추출물의 고유특성에 의해 전체 섬썩부쟁이 추출물 투여군 일부 또는 전체 암수에서 포말상 및 섬썩부쟁이 추출물 성상의 구토가 관찰되었으나, 사망동물은 관찰되지 않았고, 체중변화 및 부검소견에서 섬썩부쟁이 추출물에 의한 변화는 관찰되지 않았음.

3. 설치류 2주 DRF 독성시험

섬썩부쟁이 추출물의 SD 랫드를 이용한 2주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

:(주)캠은 GLP 시험번호 : 18-RR-0085

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 2주간 반복 경구투여하였을 때, 나타나는 독성을 검사하여 추후 진행될 13주 반복투여 독성시험의 용량설정에 참고하고자 수행함.

나. 방법 : 섬썩부쟁이 추출물을 625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 10마리(암수 각 5마리)에 2주간 반복 경구투여함.

사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중변화, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰을 실시하여 부형제대조군과 비교하였음.

다. 결과

(1) 일반증상 관찰 결과, 사망동물은 관찰되지 않았고, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(2) 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(3) 사료섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(4) 물섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(5) 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았음.

(6) 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(7) 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(8) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(9) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

(10) 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

▶ 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 2주간 반복 경구투여하였을 때, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

상기 결과를 바탕으로 추후에 실시할 13주간 반복 경구투여 독성시험에서는 장기간의 투여기간을 고려하여, 5000 mg/kg/day를 고용량으로 두고, 그 아래로 공비 약 2로

두 개 군을 두는 것을 추천하였음.

4. 설치류 13주 반복 독성시험

섬썩부쟁이 추출물의 SD(Sprague-Dawley) 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성 시험

:(주)캠은 GLP 시험번호 : 18-RR-0064

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 13주간 반복 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행함.

나. 방법 : 섬썩부쟁이 추출물을 1250, 2500 및 5000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하였고, 군당 20마리(암수 각 10마리)에 13주간 반복 경구투여함. 사망률, 일반증상 관찰, 체중 측정, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰, 조직병리학적 검사를 실시하여 부형제대조군과 비교하였음.

다. 결과

- (1) 사망동물 관찰 결과, 1250 mg/kg/day 수컷 1례가 Day 65에 관찰되었음.
- (2) 일반증상 관찰 결과, 시험물질색변 및 유연이 관찰되었음.
- (3) 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (4) 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (5) 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (6) 안과학적 검사 결과, 이상소견은 관찰되지 않았음.
- (7) 요검사 결과, 케톤체(KET)가 5000 mg/kg/day 수컷에서 유의하게 높았고, 요비중(SG)은 모든 시험물질 투여군의 암컷에서 유의하게 높았음.
- (8) 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (9) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (10) 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.
- (11) 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았음.
- (12) 조직병리학적 검사 결과, 편평상피세포 과다형성이 위 비샘위(경계능부위)에서 관찰되었으나, 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았음.

이상의 결과로 보아, 섬썩부쟁이 추출물을 SD 랫드에 13주간 반복 경구투여하였을 때, 사망동물은 1250 mg/kg/day 수컷 1례가 Day 65에 관찰되었으나, 사망전 특기할만한 일반증상 및 조직병리학적인 소견 등이 관찰되지 않았고, 부검소견으로 폐와 흉강에 갈색 물질 저류 등이 관찰된 것으로 미루어 투여 실수로 추정됨. 섬썩부쟁이 추출물에 의한 영향으로 시험물질색변 및 유연이 관찰되었음. KET케톤체는 5000 mg/kg/day 수컷에서 유의하게 높았고, SG요비중은 섬썩부쟁이 추출물 투여군에서 유의하게 높았으나, 관찰범위 이내였음. 위 비샘위(경계능부위)에서 편평상피세포 과다형성이 관찰되었으나, 독성학적으로 유해한 변화는 관찰되지 않았음.

▶ 따라서 본 시험조건 하에서 무독성량(NOEL, No Observable Adverse Effect Level)은 암수 모두에서 5000 mg/kg/day로 판단하고, 표적장기는 관찰되지 않았음.

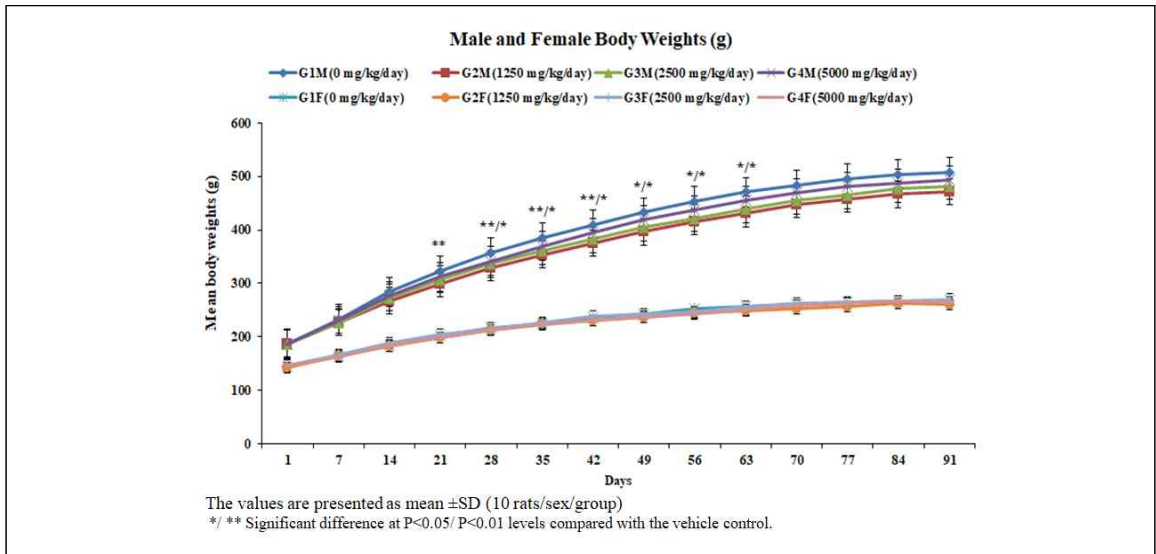


Fig. 32. 섬썩부쟁이 추출물의 13주간 반복 경구투여 독성시험에서의 SD 랫드의 체중변화

Tests	Result	Dose (mg/kg/day)							
		Male				Female			
		0	1250	2500	5000	0	1250	2500	5000
GLU	Negative	5	5	5	5	5	5	5	5
BIL	Negative	5	5	5	4	5	5	5	5
	Small	0	0	0	1	-	-	-	-
KET	Negative	3	1	4	1	5	5	4	4
	Trace	2	4	1	0	0	0	1	1
	15	0	0	0	3	-	-	-	-
SG	40	0	0	0	1*	-	-	-	-
	≤ 1.005	1	0	0	0	5	1	1	0
	1.010	4	2	4	2	0	3	2	3
	1.015	0	2	1	2	0	1	1	1
PRO	1.020	0	1	0	1	0	0*	1*	1**
	Negative	1	0	0	0	5	5	4	2
	15	1	2	2	0	0	0	0	3
URO	30	3	2	3	2	0	0	1	0
	100	0	1	0	3	-	-	-	-
NIT	0.2	5	5	5	3	5	5	5	5
	1.0	0	0	0	2	-	-	-	-
BLO	Negative	5	4	4	5	3	3	3	1
	Positive	0	1	1	0	2	2	2	4
Clarity	Negative	2	2	0	5	5	5	5	5
	Trace	3	3	5	0	-	-	-	-
Color	Clear	5	5	5	5	5	5	5	5
	Yellow	5	5	5	5	5	5	5	5

GLU, glucose; BIL, bilirubin; KET, ketone body; SG, specific gravity; PRO, protein; URO, urobilinogen; NIT, nitrite; BLO, occult blood; LEU, leucocyte.
 */ ** Significant difference at P<0.05/ P<0.01 levels compared with the control.

Fig. 33. 섬썩부쟁이 추출물의 13주간 반복 경구투여 독성시험에서의 SD 랫드의 요검사

Tests	Dose (mg/kg/day)			
	Male			
	0	1250	2500	5000
RBC (10 ⁶ /μL)	8.99 ± 0.55	9.01 ± 0.22	8.81 ± 0.37	8.87 ± 0.42
HGB (g/dL)	15.3 ± 0.5	15.5 ± 0.4	15.0 ± 0.5	15.0 ± 0.4
HCT (%)	47.3 ± 1.8	47.9 ± 1.4	46.7 ± 1.3	46.6 ± 1.6
MCV (fL)	52.7 ± 1.9	53.2 ± 1.0	53.1 ± 2.6	52.5 ± 1.1
MCH (pg)	17.1 ± 0.8	17.2 ± 0.3	17.0 ± 1.0	16.9 ± 0.5
MCHC (g/dL)	32.4 ± 0.5	32.3 ± 0.4	32.1 ± 0.8	32.3 ± 0.5
PLT (10 ³ /μL)	919.2 ± 61.3	905.9 ± 93.0	890.4 ± 71.7	933.3 ± 74.8
WBC (10 ³ /μL)	6.30 ± 1.37	7.22 ± 2.18	7.54 ± 1.16	7.91 ± 0.97
NEU (10 ³ /μL)	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.7	1.1 ± 0.2
LYM (10 ³ /μL)	4.6 ± 1.2	5.2 ± 1.6	5.4 ± 1.0	6.3 ± 1.0*
MONO (10 ³ /μL)	0.28 ± 0.12	0.31 ± 0.10	0.32 ± 0.11	0.30 ± 0.06
EOS (10 ³ /μL)	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.03
BASO (10 ³ /μL)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
PT (sec)	8.0 ± 0.2	8.1 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.8 ± 0.2
	Female			
RBC (10 ⁶ /μL)	7.98 ± 0.35	7.72 ± 0.30	7.86 ± 0.22	7.94 ± 0.28
HGB (g/dL)	14.3 ± 0.3	14.0 ± 0.4	14.1 ± 0.3	14.3 ± 0.4
HCT (%)	43.5 ± 1.3	42.8 ± 1.2	43.2 ± 1.0	43.7 ± 1.2
MCV (fL)	54.6 ± 1.8	55.5 ± 2.1	54.9 ± 0.8	55.0 ± 0.8
MCH (pg)	17.9 ± 0.6	18.1 ± 0.7	18.0 ± 0.4	17.9 ± 0.3
MCHC (g/dL)	32.8 ± 0.2	32.7 ± 0.4	32.7 ± 0.4	32.6 ± 0.4
PLT (10 ³ /μL)	969.9 ± 60.9	1023.9 ± 89.3	977.4 ± 87.8	950.3 ± 66.4
WBC (10 ³ /μL)	3.67 ± 0.95	3.75 ± 1.03	3.84 ± 1.22	4.01 ± 1.18
NEU (10 ³ /μL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
LYM (10 ³ /μL)	3.0 ± 0.9	3.0 ± 0.9	3.1 ± 1.0	3.3 ± 0.9
MONO (10 ³ /μL)	0.09 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.05
EOS (10 ³ /μL)	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
BASO (10 ³ /μL)	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
PT (sec)	7.7 ± 0.2	7.4 ± 0.2**	7.3 ± 0.2**	7.4 ± 0.2**

RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; PLT, platelet count; WBC, white blood cell; NEU, neutrophil; LYM, lymphocyte; MONO, monocyte; EOS, eosinophil; BASO, basophil; PT, Prothrombin time
Data are expressed as mean ± S.D.
*/ ** Significant difference at P<0.05/ P<0.01 levels compared with the control.

Fig 34. 섬쑥부쟁이 추출물의 13주간 반복 경구투여 독성시험에서 SD 랫드의 혈액학적 검사

Tests	Dose (mg/kg/day)			
	Male			
	0	1250	2500	5000
AST (U/L)	83.7 ± 16.7	77.2 ± 14.9	82.6 ± 15.9	70.6 ± 6.6
ALT (U/L)	33.3 ± 5.8	32.6 ± 6.3	33.1 ± 4.1	31.8 ± 3.1
ALP (U/L)	88.1 ± 15.4	82.1 ± 16.0	89.8 ± 17.8	93.5 ± 18.0
CPK (U/L)	160.9 ± 80.9	173.8 ± 124.2	157.1 ± 94.7	118.0 ± 50.8
TBIL (mg/dL)	0.149 ± 0.030	0.145 ± 0.030	0.145 ± 0.020	0.145 ± 0.020
GLU (mg/dL)	155.0 ± 19.3	149.7 ± 14.8	151.1 ± 22.1	145.0 ± 17.0
TCHO (mg/dL)	89.0 ± 21.2	101.8 ± 21.3	101.4 ± 24.0	104.8 ± 24.2
TG (mg/dL)	56.3 ± 25.8	63.2 ± 26.2	60.6 ± 19.9	65.6 ± 28.2
TP (g/dL)	6.27 ± 0.16	6.37 ± 0.19	6.29 ± 0.29	6.30 ± 0.26
ALB (g/dL)	2.90 ± 0.07	2.95 ± 0.11	2.95 ± 0.11	2.93 ± 0.09
BUN (mg/dL)	13.9 ± 1.6	14.7 ± 1.1	14.4 ± 2.3	13.6 ± 1.9
CRE (mg/dL)	0.40 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.40 ± 0.03
Female				
AST (U/L)	70.1 ± 11.2	76.8 ± 13.8	76.4 ± 14.2	73.0 ± 18.0
ALT (U/L)	22.1 ± 3.5	24.1 ± 6.3	25.0 ± 4.6	25.5 ± 3.6
ALP (U/L)	43.5 ± 15.6	54.2 ± 14.1	46.8 ± 13.4	45.8 ± 11.1
CPK (U/L)	146.6 ± 126.3	126.4 ± 84.9	149.6 ± 94.6	128.1 ± 54.7
TBIL (mg/dL)	0.169 ± 0.024	0.190 ± 0.038	0.176 ± 0.020	0.174 ± 0.018
GLU (mg/dL)	121.4 ± 14.5	129.3 ± 16.1	122.7 ± 14.6	122.0 ± 10.7
TCHO (mg/dL)	86.2 ± 20.0	92.5 ± 8.5	100.5 ± 17.6	85.3 ± 10.9
TG (mg/dL)	35.6 ± 6.3	35.0 ± 4.7	36.3 ± 8.4	32.9 ± 8.4
TP (g/dL)	5.89 ± 0.26	6.11 ± 0.21	6.02 ± 0.20	5.97 ± 0.17
ALB (g/dL)	2.99 ± 0.13	3.11 ± 0.15	3.05 ± 0.11	3.12 ± 0.11
BUN (mg/dL)	15.8 ± 2.3	15.0 ± 1.3	15.0 ± 2.4	14.3 ± 1.2
CRE (mg/dL)	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.06	0.46 ± 0.02

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; CPK, creatine phosphokinase; TBIL, total bilirubin; GLU, glucose; TCHO, total cholesterol; TG, triglyceride; TP, total protein; ALB, albumin; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine.
Data are expressed as mean ± S.D.

Fig 35. 섬썩부쟁이 추출물의 13주간 반복 경구투여 독성시험에서 SD 랫드의 혈액생화학적 검사

5. 복귀돌연변이시험(유전독성시험)

섬썩부쟁이 추출물의 박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험

:(주)캠은 GLP 시험번호: 18-VG-008

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬썩부쟁이 추출물이 대사활성계 적용 및 비적용 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였음.

나. 방법 : 대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였음. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였음. 처리용 시험물질은 멸균주사용수에 현탁한 후 이것을 동일한 부형제로 희석하여 조제함.

아래 표와 같이 설정한 농도군과 부형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험균을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용하였음.

균주명	S9 mix	농도군(ug/plate)					
		50	150	500	1500	3000	5000
TA strains	+/-	50	150	500	1500	3000	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1500	3000	5000

다. 결과

- (1) TA98 균주의 대사활성계 적용군의 3000 및 5000 ug/plate 농도군에서 음성대조군에 비하여 2.3 및 2.5배 집락 수의 증가가 관찰되었음.
- (2) 모든 균주의 시험물질 처리군에서 세포독성은 관찰되지 않았음.
- (3) 모든 양성대조군에서는 음성대조군에 비해 집락 수의 확실한 증가가 관찰되었음.

이상의 결과로, 시험물질 섬쑥부쟁이 추출물은 본 시험조건 하에서 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하는 것으로 사료되나 섬쑥부쟁이 추출물에 포함되어 있는 아미노산 등에 의한 영향일 것으로 판단됨.

식약처 [한약(생약)제제 비임상시험 가이드라인(민원인 안내서) 2017. 08.]에 의하면 [생약으로 복귀돌연변이시험을 실시하는 경우 다음과 같은 점에 주의해야 한다.]고 명시되어 있음.

생약은 정제가 되지 않은 추출물이므로 시험물질 내에 히스티딘이나 히스티딘 전구체가 존재할 수도 있어 이로 인해 위양성(false positive)의 결과가 나타날 수 있다. 양성 판정 시 이러한 가능성을 배제하기 위하여 히스티딘 등 시험물질의 조성을 확인할 필요가 있다.

이에 섬쑥부쟁이 추출물의 구성아미노산 분석을 수행하였고 섬쑥부쟁이 추출물 내에 히스티딘이 존재함을 확인하였음(Fig. 36).

▶ 따라서 복귀돌연변이 결과는 섬쑥부쟁이 추출물의 히스티딘에 의한 위양성인 것으로 판단됨. 또한 다른 유전독성시험인 체외 염색체이상시험 및 체내 소핵시험의 결과는 명확한 음성으로 확인된 바 이를 종합적으로 판단하면 섬쑥부쟁이 추출물의 유전독성은 없는 것으로 사료됨.

Table 6. Reverse mutagenicity assay results – summary

Test Strain	Chemical Treated	Dose (μ g/plate)	Colonies/plate [factor] ^{a)}							
			With S9 mix			Without S9 mix				
TA100	Test article	0	107	\pm	9		114	\pm	8	
		50	102	\pm	9	[0.9]	111	\pm	6	[1.0]
		150	120	\pm	16	[1.1]	107	\pm	15	[0.9]
		500	105	\pm	5	[1.0]	103	\pm	7	[0.9]
		1500	120	\pm	10	[1.1]	109	\pm	6	[1.0]
		3000	137	\pm	1	[1.3]	121	\pm	2	[1.1]
		5000	137	\pm	3	[1.3]	116	\pm	12	[1.0]
TA1535	Test article	0	15	\pm	2		14	\pm	2	
		50	16	\pm	5	[1.1]	12	\pm	4	[0.9]
		150	15	\pm	1	[1.0]	10	\pm	1	[0.8]
		500	17	\pm	1	[1.1]	13	\pm	1	[1.0]
		1500	15	\pm	2	[1.0]	11	\pm	1	[0.8]
		3000	13	\pm	3	[0.9]	13	\pm	2	[0.9]
		5000	13	\pm	1	[0.8]	13	\pm	1	[0.9]
TA98	Test article	0	25	\pm	3		26	\pm	4	
		50	28	\pm	3	[1.1]	25	\pm	6	[1.0]
		150	30	\pm	5	[1.2]	27	\pm	4	[1.1]
		500	34	\pm	4	[1.4]	34	\pm	5	[1.3]
		1500	40	\pm	3	[1.6]	26	\pm	5	[1.0]
		3000	56	\pm	5	[2.3]	34	\pm	5	[1.3]
		5000	63	\pm	6	[2.5]	34	\pm	2	[1.3]
TA1537	Test article	0	15	\pm	2		15	\pm	2	
		50	13	\pm	3	[0.9]	13	\pm	2	[0.9]
		150	12	\pm	3	[0.8]	15	\pm	1	[1.0]
		500	14	\pm	1	[1.0]	13	\pm	1	[0.9]
		1500	13	\pm	2	[0.9]	12	\pm	2	[0.8]
		3000	17	\pm	3	[1.2]	13	\pm	3	[0.9]
		5000	20	\pm	1	[1.3]	12	\pm	2	[0.8]
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	Test article	0	29	\pm	4		22	\pm	3	
		50	25	\pm	4	[0.9]	22	\pm	4	[1.0]
		150	26	\pm	7	[0.9]	18	\pm	3	[0.8]
		500	26	\pm	6	[0.9]	20	\pm	2	[0.9]
		1500	26	\pm	4	[0.9]	23	\pm	4	[1.0]
		3000	27	\pm	2	[0.9]	22	\pm	2	[1.0]
		5000	23	\pm	3	[0.8]	25	\pm	2	[1.1]
Positive controls		(μ g/plate)								
TA100	2-AA	1.0	1504	\pm	102	[14.0]				
TA1535	2-AA	2.0	142	\pm	19	[9.3]				
TA98	B[a]P	1.0	118	\pm	8	[4.8]				
TA1537	2-AA	1.0	182	\pm	22	[12.1]				
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	104	\pm	8	[3.6]				

TA100	SA	0.5	465	± 60	[4.1]
TA1535	SA	0.5	408	± 12	[29.9]
TA98	2-NF	2.0	225	± 16	[8.8]
TA1537	ICR-191	0.5	265	± 20	[18.1]
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5	227	± 25	[10.3]

Test article: 섬쭉부쟁이 추출물

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate
Abbreviations

2-AA, 2-aminoanthracene; SA, sodium azide; B[a]P, benzo[a]pyrene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191;
4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide; 2-NF, 2-Nitrofluorene.

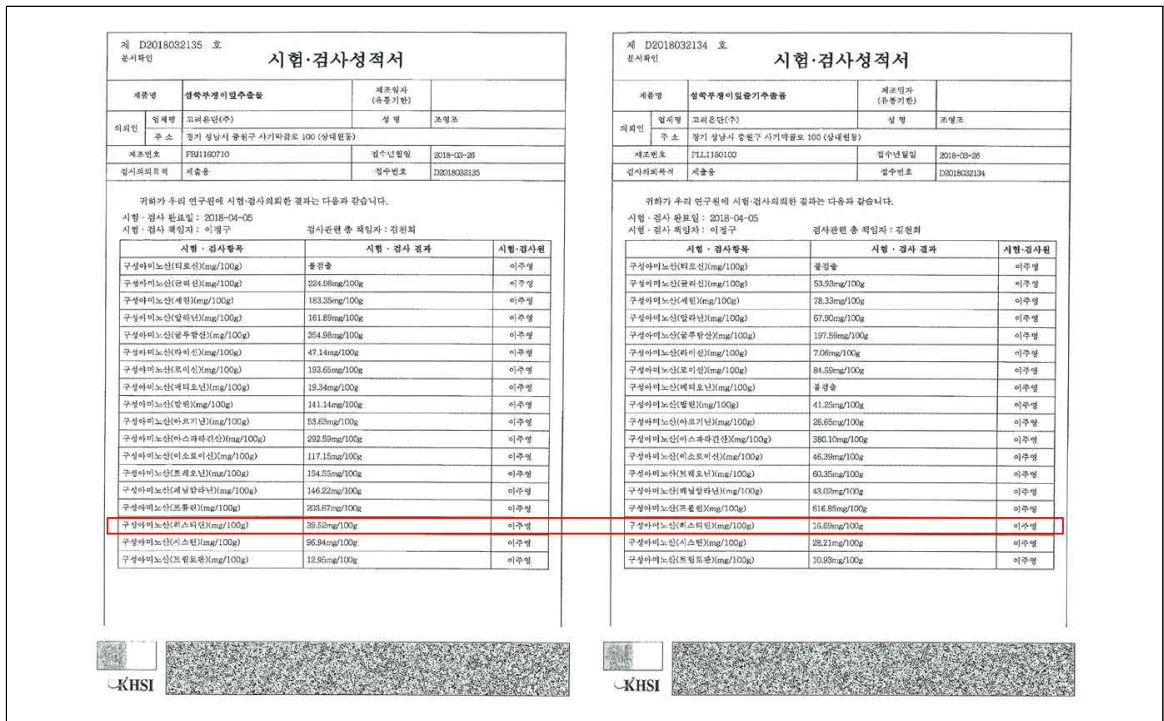


Fig. 36. 섬쭉부쟁이 추출물의 구성아미노산 분석 성적서

6. 염색체이상시험(유전독성시험)

섬쭉부쟁이 추출물의 배양 Chinese Hamster Lung(CHL) 세포를 이용한 체외 염색체이상시험

: (주)캠은 GLP 시험번호 : 18-VG-0091

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬쭉부쟁이 추출물의 염색체 이상과 관련한 유전독성 평가를 위해 수행함.

나. 방법 : 배양 CHL 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용하에 염색체이상시험을 수행함. 대사활성계로는 Aroclor 1254로 유도한 랫드의 간균질액에 cofactor를 첨가한 것을 사용하였음. 시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 처리하였음. 고농도는 Relative Increase in Cell Count(RICC)를 세포독성의 지표로 하여 결정하였음.

$$RICC(\%) = \frac{\text{시험물질 처리군 플라스크의 세포수} - \text{처리개시시 세포수}}{\text{음성대조군 플라스크의 세포수} - \text{처리개시시 세포수}} \times 100$$

음성(부형제)대조군 및 양성대조군을 포함하여 다음 표와 같이 농도군을 설정하였으며, 농도군당 2개의 플라스크를 사용하였음.

Treatment series	Metabolic activation	Treatment time - recovery time (hrs)	Dose of test article ($\mu\text{g/mL}$)	Positive control and dose ($\mu\text{g/mL}$)
1	+	6-18	0, 350, 700, 1300, 1400	B[a]P 20
2	-	6-18	0, 300, 600, 1100, 1200	4NQO 0.4
3	-	24-0	0, 225, 450, 800, 900	4NQO 0.4

활발히 증식 중인 세포를 트립신으로 분리 후, 배양면적 25 cm² 플라스크에 5 x 10⁴개의 세포를 5 mL의 배양액에 파종하여 약 3일간 배양한 후 시험물질을 처리하였음. 처리개시로부터 24시간 후에 염색체 검체를 제작하여, 플라스크당 150개(농도군당 300개)의 중기상으로부터 염색체이상을 계수함. 결과는 150 중기상당 관찰되는 구조적(혹은 수적) 이상을 가진 중기상의 빈도(%)로 나타내었음.

다. 결과

- (1) 염색체 이상을 계수한 결과, 시험물질 처리군에서 구조적인 염색체이상을 가진 중기상의 출현빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량 의존적으로 증가하지 않았으며, historical control data(이하 HCD)⁵⁾ 범위 내에 있었음.
- (2) 한편, Benzo[a]pyrene 혹은 4-Nitroquinoline-1-oxide를 처리한 모든 양성대조군에서는 확실한 양성의 결과를 얻었음.

▶ 이상의 결과로 보아, 시험물질 섬쑥부쟁이 추출물은 본 시험에 사용한 CHL 세포에 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 사료되며, 명백한 음성으로 판단됨.

Table 7. Chromosome aberration test in the presence of S9 mix-summary (6-hour treatment)^{a)}

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. cells examined	Aberrations						PP+ER		No. aberrant metaphase ^{b)}		RICC (%)
		Chromosome type		Chromatid type		Others	Gaps	No.	+Gaps	-Gaps		
		csb	csc	ctb	cte						No.	
0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(0.0)	(0.0)	(0.0)		
350	150	0	0	1	0	0	0	0	1	1	97	
	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	(mean)	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	(0.5)	(0.5)	(0.5)		
700	150	1	0	0	0	0	0	2	1	1	104	
	150	0	0	1	0	0	0	0	1	1		
	(mean)	0.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	(1.0)	(1.0)	(1.0)		
1300	150	0	0	1	0	0	1	0	2	1	57	

5) Chemon Historical Control Data, Chemon Inc., Chemon project No. 18-VO-0014N

	150	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	1.00	(0.0)	(1.5)	(0.5)	
								(0.00 %)	(1.00 %)	(0.33 %)	
1400	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(0.0)	(0.0)	(0.0)	43
								(0.00 %)	(0.00 %)	(0.00 %)	
20	150	0	2	9	23	0	1	0	28	27	
	150	0	1	4	19	0	0	0	18	18	
B[a]P	(mean)	0.00	1.50	6.50	21.00	0.00	0.50	(0.0)	(23.0)	(22.5)	52
								(0.00%)	(15.33%)	(15.00%)**	

** Significantly different from the negative control group at P<0.01 (Fisher's exact test).

Test article: 섬썩부쟁이 추출물

a) 6-hour treatment - 18-hour recovery

b) Inclusive/exclusive gaps. 150 metaphases were examined per culture.

Abbreviations

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; B[a]P, Benzo[a]pyrene(positive control article); Gaps, Chromosome type+Chromatid type gaps; csb, Chromosome type break; cse, Chromosome type exchange; ctb, Chromatid type break; cte, Chromatid type break; Other, Metaphases with more than 10 aberrations(including gaps) or with chromosome fragmentation

Table 8. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix-summary (6-hour treatment)

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. cells examined	Aberrations					Gaps	PP+ER No.	No. aberrant metaphase ^{b)}		RICC (%)
		Chromosome type		Chromatid type		Others			+Gaps No.	-Gaps No.	
		csb	cse	ctb	cte						
0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(0.0)	(0.0)	(0.0)	
300	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	98
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(0.5)	(0.0)	(0.0)	
600	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	92
	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(1.0)	(0.0)	(0.0)	
1100	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57
	150	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	(0.0)	(0.5)	(0.5)	
1200	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46
	150	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	(1.0)	(0.0)	(0.0)	
0.4 4NQO	150	0	4	4	17	3	0	0	17	17	67
	150	0	3	0	17	1	0	0	14	14	
	(mean)	0.00	3.50	2.00	17.00	2.00	0.00	(0.0)	(15.5)	(15.5)	
								(0.00%)	(10.33%)	(10.33%)**	

** Significantly different from the negative control group at P<0.01 (Fisher's exact test).

Test article: 섬썩부쟁이 추출물

a) 6-hour treatment - 18-hour recovery

b) Inclusive/exclusive gaps. 150 metaphases were examined per culture.

Abbreviations

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; 4NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide (positive control article); Gaps, Chromosome type+Chromatid type gaps; csb, Chromosome type break; cse, Chromosome type exchange; ctb, Chromatid type break; cte, Chromatid type break; Other, Metaphases with move more than 10 aberrations(including gaps) or with chromosome fragmentation

Table 9. Chromosome aberration test in the absence of S9 mix-summary (24-hour treatment)^{a)}

Dose ($\mu\text{g/mL}$)	No. cells examined	Aberrations						PP+ER No.	No. aberrant metaphase ^{b)}		RICC (%)
		Chromosome type		Chromatid type		Others	Gaps		+Gaps	-Gaps	
		csb	cse	ctb	cte						
0	150	0	0	0	1	0	0	0	1	1	100
	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	(0.5) (0.33 %)	(0.5) (0.33 %)	(0.5) (0.33 %)	
225	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	104
	150	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	(1.0) (0.67 %)	(0.5) (0.33 %)	(0.0) (0.00 %)	
450	150	0	0	0	0	0	0	1	0	0	109
	150	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	(0.5) (0.33 %)	(0.5) (0.33 %)	(0.0) (0.00 %)	
800	150	0	0	0	0	0	1	2	1	2	56
	150	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	(1.5) (1.00 %)	(1.0) (0.67 %)	(1.0) (0.67 %)	
900	150	0	0	1	0	0	0	0	1	1	49
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	(mean)	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	(0.0) (0.00 %)	(0.5) (0.33 %)	(0.5) (0.33 %)	
0.4 4NQO	150	0	2	0	11	2	3	0	14	12	64
	150	0	1	4	9	6	0	0	16	16	
	(mean)	0.00	1.50	2.00	10.00	4.00	1.50	(0.0) (0.00%)	(15.0) (10.00%)	(14.0) (9.33)**	

** Significantly different from the negative control group at $P < 0.01$ (Fisher's exact test).

Test article: 섬쑥부쟁이 추출물

a) 24-hour treatment - 0-hour recovery

b) Inclusive/exclusive gaps. 150 metaphases were examined per culture.

Abbreviations

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication; 4NQO, 4-Nitroquinoline-1-oxide (positive control article); Gaps, Chromosome type+Chromatid type gaps; csb, Chromosome type break; cse, Chromosome type exchange; ctb, Chromatid type break; cte, Chromatid type break; Other, Metaphases with move more than 10 aberrations(including gaps) or with chromosome fragmentation

7. 소핵시험(유전독성시험)

섬쑥부쟁이 추출물의 배양 수컷 ICR 마우스 골수세포를 이용한 경구투여 체내 소핵 시험

:(주)캠온 GLP 시험번호 : 18-MG-0093

가. 목적 : 본 시험은 시험물질 섬쑥부쟁이 추출물의 생체내 염색체이상의 유발 또는 유사분열기구에 대한 이상 유발 여부를 수컷 ICR 마우스의 골수세포에서의 소핵 유발 성을 지표로 하여 평가하기 위하여 실시함.

나. 방법 : 시험물질은 멸균주사용수에 현탁하여 투여하였음. 약 8주령의 수컷 ICR 마우스(군당 6마리)에 음성대조군(0), 시험물질 500, 1000 및 2000 mg/kg/day의 용량을 1일 1회 연속 2일간 경구투여함. 부형제투여군을 음성대조군으로 하였으며, 양성대조군에는 70 mg/kg/day의 cyclophosphamide monohydrate를 2회차 투여일에 1회 복강투여하였음. 최종 투여로부터 약 24시간 후에 모든 동물을 부검, 대퇴골에서 골수세포를 수거하여 소핵 유발과 세포독성을 평가하였음.

다. 결과

- (1) 소핵의 평가를 위하여 개체 당 4000개의 polychromatic erythrocyte(PCE, 다염성적 혈구) 중 micronucleated polychromatic erythrocyte(MNPCE, 소핵을 가진 다염성적 혈구)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았고, 용량상관성이 없었으며, 음성대조군의 HCD 범위 내에 있었음.
- (2) 세포독성은 PCE:red blood cell(RBC, 적혈구) 비율을 산출하여 평가하였음. 개체당 500개의 총 적혈구로부터 세포독성을 평가한 결과, 이 비율은 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었음.
- (3) 양성대조군에서는 분명한 양성의 결과를 얻었음.

▶ 이상의 결과, 시험물질 섬쑥부쟁이 추출물은 본 시험조건 하에서 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않으며, 명확한 음성으로 판단됨.

Dose (mg/kg/day)	Animals per Dose	MNPCE/4000 PCE (Mean±SD)		PCE:RBC Ratio (Mean±SD)			(% Control)
0	6	1.33	± 1.03	0.57	± 0.01		100
500	5 ^{a)}	1.20	± 0.84	0.58	± 0.02		101
1000	6	1.00	± 1.10	0.57	± 0.02		100
2000	6	1.50	± 1.38	0.57	± 0.01		99
CPA 70	6	110.50	± 29.71**	0.39	± 0.02**		69

** Significantly different from the negative control group at P<0.01.

Test article: 섬쑥부쟁이 추출물

Vehicle: Sterile distilled water for injection

Vehicle and Test article were orally administered to mice for two consecutive days.

CPA was intraperitoneally administered to mice once on the day of the 2nd admin.

Bone marrow smears were prepared about 24 hours after the final administration.

a) one of mice was died.

Abbreviations

PCE, Polychromatic erythrocyte; RBC, Red blood cells(polychromatic erythrocyte+normochromatic erythrocyte); MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte; CPA, Cyclophosphamide monohydrate(positive control article).

8. 조제물 분석

HPLC-UV를 이용한 멸균주사용수 현탁액 중 섬쑥부쟁이 추출물의 분석법 검증
:(주)캠은 GLP 시험번호 : 18-NV-0094

가. 목적 : 본 시험은 HPLC-UV를 이용한 멸균주사용수 현탁액 중 섬쑥부쟁이 추출물의 분석법을 검증하기 위해 수행함.

나. 방법

(1) 분석기기 조건

Column	Luna Omega C18 (2.1 * 100 mm, 1.6 μ m, Phenomenex)			
Column oven temp.	30°C			
Flow-rate	0.25 mL/min			
Mobile Phase	A : 0.1% phosphoric acid B : Acetonitrile			
	Time(min)	A	B	Curve
	0	78	22	-
	5	75	28	6
	6	5	95	1
7	78	22	1	
Run time	7 min			
Injection volume	2 μ L			
Auto-sampler temp.	15°C			
Needle wash	10% Acetonitrile (weak wash), 80% Acetonitrile (strong wash)			
Detector	UV detector (λ = 330 nm)			
Data processing	Empower 3 (Version 3471)			

(2) 분석기기 검증 : Specificity, System suitability, Stock standard comparison (SSC), Performance check standard (PCS), Linearity, Accuracy, Precision, Homogeneity, Stability

(가) Homogeneity : QC 시료는 조제일 및 조제 후 7일째에 용기의 상, 중, 하층에서 각각 1회 시료를 채취하여 전처리 후 분석함. 균질성은 회수율이 $100 \pm 20\%$ 이내, 변동계수가 15%를 초과하지 않아야 함.

(나) Stability

- ① Pre-processed stability : QC 시료를 조제 후 실온에서 5시간 보관하였고, 각 농도수준에서 3회 전처리하여 분석함. 전처리 전 안정성은 각 농도수준에서 이론농도에 대한 회수율이 $100 \pm 20\%$ 이내, 변동계수는 15%를 초과하지 않아야 함.
- ② Post-processed stability : QC 시료를 3회 전처리하여 15°C의 auto-sampler에서 6시간 보관한 후 분석함. 전처리 후 안정성은 각 농도수준에서 이론농도에 대한 회수율이 $100 \pm 20\%$ 이내, 변동계수는 15%를 초과하지 않아야 함.
- ③ Storage stability : QC 시료를 냉장 보관하면서 조제 후 5 및 7일째에 중층에서 3회 전처리하여 분석함. 보관 안정성은 각 농도수준에서 이론농도에 대한 회수율이 $100 \pm 20\%$ 이내, 변동계수는 15%를 초과하지 않아야 함.
- ④ Stock solution stability : 표준원액은 실온에서 5시간, 냉장조건에서 7일간 보관하고, 새롭게 조제한 표준원액과 함께 적정 농도로 희석하여 3회 분석함. 표준원액은 각각의 보관조건에서 새롭게 조제한 표준원액의 피크면적에 대한 상대오차가 $\pm 5\%$ 이내여야 함.

다. 결과

(1) Homogeneity : 조제당일 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 108.8% 및 93.3%, 변동계수는 각각 4.6% 및 5.5%였고, 조제 후 7일째 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 108.7% 및 117.5%, 변동계수는 각각 6.0% 및 0.7%로 허용기준을 충족하였음.

Batch ID	Storage conditions	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)	
			Each	Mean			
05Oct18_1	Control (Initial)	Low (10)	T	10.51	10.88	4.6	108.8
			M	11.45			
			B	10.68			
		High (500)	T	438.6	466.6	5.5	93.3
			M	489.0			
			B	472.2			
12Oct18_1	Refrigerator (7 days)	Low (10)	T	11.26	10.87	6.0	108.7
			M	11.22			
			B	10.12			
		High (500)	T	587.1	587.5	0.7	117.5
			M	583.7			
			B	591.6			

T ; Top, M ; Middle, B ; Bottom

(2) Stability

(가) Pre-processed stability : 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 106.9% 및 101.2%였고, 변동계수는 각각 2.0% 및 1.4%로 허용기준을 충족하였음.

Batch ID	Storage conditions	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)
			Each	Mean		
10Oct18_1	Room temperature (5 hrs)	Low (10)	10.78	10.69	2.0	106.9
			10.83			
			10.44			
		High (500)	507.2	506.1	1.4	101.2
			512.7			
			498.4			

(나) Post-processed stability : 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 102.7% 및 87.4%였고, 변동계수는 각각 1.1% 및 2.0%로 허용기준을 충족하였음.

Batch ID	Storage conditions	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)
			Each	Mean		
05Oct18_1	Auto-sampler (6 hrs)	Low (10)	10.15	10.27	1.1	102.7
			10.37			
			10.29			
		High (500)	433.7	437.1	2.0	87.4
			430.4			
			447.2			

(다) Storage stability : 냉장 5일째 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 102.0% 및 103.

2%, 변동계수는 각각 1.0% 및 7.3%였음. 냉장보관 7일째 저농도 및 고농도의 회수율은 각각 103.0% 및 98.5%, 변동계수는 각각 1.0% 및 11.1%였음. 이상의 결과는 허용기준을 충족하였음.

Batch ID	Storage conditions	QC level (mg/mL)	Measured conc. (mg/mL)		CV (%)	Recovery (%)
			Middle	Mean		
10Oct18_1	Refrigerator (5 days)	Low (10)	10.12	10.20	1.0	102.0
			10.31			
			10.18			
		High (500)	528.6	516.2	7.3	103.2
546.0						
473.9						
12Oct18_1	Refrigerator (7 days)	Low (10)	10.40	10.30	1.0	103.0
			10.20			
			10.32			
		High (500)	518.9	492.3	11.1	98.5
			429.7			
528.3						

(라) Stock solution stability : 표준원액을 실온에서 5시간, 냉장조건에서 7일간 보관하여 안정성을 측정한 결과, 상대오차는 각각 1.0% 및 -2.5%였음. 이상의 결과는 허용기준을 충족하였음.

Batch ID	Storage conditions	Peak area	Mean	SD	RE (%)
12Oct18_1	Control ^{a)}	290743	290707	173	-
		290519			
		290860			
	5 hrs (Room temperature)	287946	293755	8627	1.0
		303668			
		289652			
	7 days (Refrigerator)	281996	283370	1192	-2.5
		283999			
		284116			

a) Freshly prepared on the day of analysis, -: Not calculated

QC 시료는 조제 당일 상, 중, 하층에서 균질하였고, 7일간 냉장 보관하여도 균질하였음. QC 시료는 실온에서 5시간, 냉장 조건에서 7일간 그리고 전처리 후 15°C auto-sampler 내에서 6시간 안정하였음. 표준원액은 실온에서 5시간, 냉장 조건에서 7일간 안정하였음.

▶ 결론적으로 본 시험에 사용한 분석법은 멸균주사용수 현탁액 중 섬썩부쟁이 추출물을 정량하기에 적합하였음.

Analyte: 3,5-Dicaffeoylquinic acid			Batch ID: 0086-20181016G1-G4
GROUPS	Nominal conc. (mg/mL)	Calculated conc. (mg/mL)	Recovery (%)
G1	0.00	NC	NC
G2	125.0	104.9	83.9
G3	250.0	220.5	88.2
G4	500.0	450.7	90.1

Analyte: 3,5-Dicaffeoylquinic acid			Batch ID: 0086-20181204G1-G4
GROUPS	Nominal conc. (mg/mL)	Calculated conc. (mg/mL)	Recovery (%)
G1	0.00	NC	NC
G2	125.0	113.6	90.9
G3	250.0	227.3	90.9
G4	500.0	467.9	93.6

Analyte: 3,5-Dicaffeoylquinic acid			Batch ID: 0086-20190114G1-G4
GROUPS	Nominal conc. (mg/mL)	Calculated conc. (mg/mL)	Recovery (%)
G1	0.00	NC	NC
G2	125.0	120.8	96.6
G3	250.0	252.9	101.2
G4	500.0	493.0	98.6

NC: Not calculated.

Fig. 37. 십축부쟁이 추출물의 13주간 반복 경구투여 독성시험에서 조제물 분석

4절 인체적용시험 제품의 표준화

1. 인체적용시험을 위한 원료 생산 공정 확립

가. 섬썩부쟁이 추출물 제조 scale-up

(1) 제조공정 : 섬썩부쟁이 전초 300 kg 원료 투입하여 산업적 생산 능력 확보함.

공정	내용	비고
원료투입	조분쇄한 전초 300 kg을 투입한다.	
추출	70% 주정을 15배수 투입 후 80℃ 6시간 추출한다.	
여과	여과보조제를 첨가하여 여과한다.	
농축	여과액을 농축한다.	
부형제 투입	동량의 텍스트린을 첨가하여 용해한다.	
살균	95℃ 1시간 살균한다.	
건조	분무건조한다.	
포장	(1) PE 포장재에 포장단위에 맞게 칭량 (2) 제습제를 넣고 밀봉 포장 (3) 지관 포장	

(2) 제조결과

구분	결과	비고
생산량 (수율)	121 kg (40.3%)	
3,5-DCQA (mg/g)	2.38 mg/g	중간값 2.4 mg/g

- 살균 공정 후, 지표성분의 안정성 유지를 위해 60℃로 온도 유지하여 분무건조

나. 섬썩부쟁이 추출물 인체적용시험 시료 제조

(1) 확보된 산업적 생산능력 기반으로 SK바이오랜드 안산공장 GMP 시설에서 인체적용 시험 시료인 섬썩부쟁이 추출물을 30 kg 제조하여 고려은단에 제공하였음.

2. 인체적용시험 제품 제조공정 연구

가. 제형 연구를 통한 최적 배합비 확립

- (1) 1정 무게 : 650 mg
- (2) 1일 섭취량 : 1일 1회, 1회 2정(1,300 mg) 섭취
- (3) 성분 배합비

성분명	배합비(%)	함량(mg/정)	비고
섬썩부쟁이 추출물	73.847	480.0055	
결정셀룰로스	16.553	107.5945	
카복시메틸셀룰로스칼슘	3.600	23.40	
스테아린산마그네슘	1.500	9.75	
이산화규소	1.000	6.50	
백색코팅제제	3.500	22.75	히드록시프로필메틸셀룰로스 67%, 이산화티타늄 25%, 트리아세틴 8%
합계	100.00	650.00	

나. 보관방법 및 포장방법 설정

(1) 인체적용시험 제품의 코팅



(2) 빛과 습기 차단을 위한 PTP 포장 및 필로우 밀봉 포장(내포장), 제품의 형태 손상 방지를 위한 종이 케이스 포장(외포장)



다. 사용기기 및 유통기한 설정

- (1) 제품 제조 공정에 맞는 최적 사용기기 설정 및 해당 내용 바탕으로 제조지시서 작성함.
- (2) 유통기한 설정 protocol에 따라 시험 진행하여 24개월로 설정함.

완제품 입고 승인서			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	포장단위	봉
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

제조기종점검표 및 수출점검표			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

제조지시서			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

청량기록서			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

제조공정기록서 (혼합)			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

제조공정기록서 (타정)			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

공정점사기록서 (타정,생산부서)			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

공정점사기록서 (타정,품질관리부서)			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

제조공정기록서 (코팅, 선별)			
제품명	생약부형제 조성장체 (단체적용시험용)	제조번호	ASP-C001
제조번호	ASP-C001	제조일자	년 월 일
제조일자	년 월 일	제조시간	시 분 초
유통기한	년 월 일	유통기한	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
신청자(신청부): ()			
제조기종 점검표	시험 일차서	제조일자	년 월 일
포장용량 점검표	원료 분자	제조일자	년 월 일
일차서	통합 판정	제조일자	년 월 일
상기 완제품의 입고를 승인합니다.			
년 월 일			
품질관리인(인): ()			
< 특이사항 >			

KEC-HF Ver.15.1

공정검사기록서 (코팅, 품질관리부서)			
제품명	인체적용시험용 (인체적용시험용)	제조번호	AGP-C001
제조일자	제조단위	제조년월	5 kg 7.692 정
사용일자	기준용량	사용량	650 mg/정
<주요 품질검사> 1. 외관 2. 크기 3. 무게 4. 색상 5. 냄새 6. 맛 7. pH 8. 용해도		<용량검사> 1. 용량 2. 균질성	
1. 외관: 50분 이내 2. 크기: 50분 이내 3. 무게: 50분 이내 4. 색상: 50분 이내 5. 냄새: 50분 이내 6. 맛: 50분 이내 7. pH: 50분 이내 8. 용해도: 50분 이내		1. 용량: 50분 이내 2. 균질성: 50분 이내	
1. 100% 이상: 100% 이상 2. 90% 이상: 90% 이상 3. 80% 이상: 80% 이상 4. 70% 이상: 70% 이상 5. 60% 이상: 60% 이상 6. 50% 이상: 50% 이상 7. 40% 이상: 40% 이상 8. 30% 이상: 30% 이상 9. 20% 이상: 20% 이상 10. 10% 이상: 10% 이상			
KEC-HF			승인일자 7.692

포장지시 및 기록서			
제품명	인체적용시험용 (인체적용시험용)	제조번호	AGP-C001
제조일자	제조단위	제조년월	5 kg 7.692 정
사용일자	기준용량	사용량	650 mg/정
<포장지시> 1. 포장지 2. 포장재 3. 포장방법 4. 포장환경 5. 포장일			
1. 포장지: 50분 이내 2. 포장재: 50분 이내 3. 포장방법: 50분 이내 4. 포장환경: 50분 이내 5. 포장일: 50분 이내			
KEC-HF			승인일자 7.692

포장공정기록서 (내포장)			
제품명	인체적용시험용 (인체적용시험용)	제조번호	AGP-C001
제조일자	제조단위	제조년월	5 kg 7.692 정
사용일자	기준용량	사용량	650 mg/정
<포장공정내역> 1. 포장지 2. 포장재 3. 포장방법 4. 포장환경 5. 포장일			
1. 포장지: 50분 이내 2. 포장재: 50분 이내 3. 포장방법: 50분 이내 4. 포장환경: 50분 이내 5. 포장일: 50분 이내			
KEC-HF			승인일자 7.692

포장공정기록서 (외포장)			
제품명	인체적용시험용 (인체적용시험용)	제조번호	AGP-C001
제조일자	제조단위	제조년월	5 kg 7.692 정
사용일자	기준용량	사용량	650 mg/정
<외포장공정내역> 1. 포장지 2. 포장재 3. 포장방법 4. 포장환경 5. 포장일			
1. 포장지: 50분 이내 2. 포장재: 50분 이내 3. 포장방법: 50분 이내 4. 포장환경: 50분 이내 5. 포장일: 50분 이내			
KEC-HF			승인일자 7.692

3. 인체적용시험 제품의 기준 및 시험법 설정

가. 제형에 따른 성상, 분해, 대장균균 등 시험기준 설정 및 시험일지와 성적서 작성

No.	항목	기준
1	성상	백색의 장방형 코팅정제
2	확인시험	3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타낸다.
3	정량시험	3,5-DCQA로써 표시량(2.304 mg/1,300 mg)*의 80 ~ 120%
4	분해	60분 이내
5	대장균균	음성

* 인체적용시험의 섭취량은 동물실험에서의 유효 용량을 근거로 인체대상 적용량을 예측한 결과를 이용하여 섬썩부쟁이추출물로서 960 mg으로 최종 결정하였음. 이를 토대로 인체적용시험용 제품은 1정 650 mg 중 섬썩부쟁이추출물로서 480 mg을 함유하도록 배합하였고, 이 정제를 1일 2정 섭취하도록 섭취량을 설정하여 1일 섬썩부쟁이추출물로서 960 mg을 섭취하게 됨. 따라서 1일 섭취량을 기준으로 3,5-DCQA로써 2.4 mg x 960 mg / 1,000 mg = 2.304 mg임.

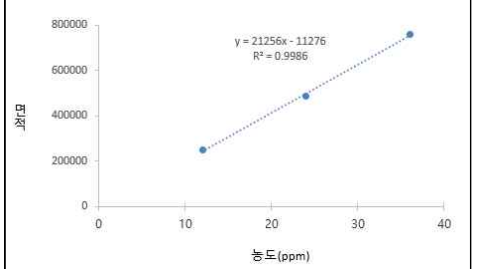
또한 개별인정형 원료 신청 시 1일 섭취량을 기준으로 제품 규격을 설정하므로 제품 규격을 2.304 mg / 1,300 mg(2정)으로 설정하였으며 상기와 같이 관련 자료를 제출함.

(1) 시험일지 및 성적서

시험일지	시험일지	시험성적서																																																																																																																																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 15%;">제품명</th> <td style="width: 35%;">삼우바이오 고장정제</td> <th style="width: 10%;">규격</th> <td style="width: 10%;">2정</td> <th style="width: 10%;">방법</th> <td style="width: 20%;">시행번호: 2021-001</td> </tr> <tr> <th>시험항목</th> <td>시험항목</td> <th>시험기준</th> <td>시행기준</td> <th>시험법</th> <td>시행법</td> </tr> <tr> <td>1. 성분</td> <td>백색의 장방형 고장정제</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>표제: 백색 300mg 300mg 2정</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>시험항목명: 3,5-DCQA</td> <td>시험법: HPLC</td> <td>시험기준: 2.304mg</td> <td>시험법: HPLC</td> <td>시험기준: 2.304mg</td> </tr> <tr> <td>2. 확인시험</td> <td>3,5-DCQA 함량시험(HPLC)에 의하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄.</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>결과: 백색 300mg 300mg 2정</td> <td>시험법: HPLC</td> <td>시험기준: 2.304mg</td> <td>시험법: HPLC</td> <td>시험기준: 2.304mg</td> </tr> <tr> <td>3. 정량시험 (3,5-DCQA)</td> <td> <p>1) 표준액의 조제</p> <p>1.1 3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액 1mg/L 을 3mg을 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(100 µg/mL). 이 액을 1,2,3,4, 3.6mL를 각각 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(2, 4, 6, 8 µg/mL).</p> <p>2) 시험용액의 조제</p> <p>2.1 정제물 200mg을 정제물 200mg을 취하여 200mg 정량용기 0.271g(0.14g)을 넣어 용액하여 20mL 메스플라스크에 넣고 30% 메탄올 약 10mL를 넣는다.</p> <p>2.2 용액 200mg을 취하여 용액 200mg을 취한다.</p> <p>2.3 약 메스플라스크에 30% 메탄올로 표준액 후 0.2µm membrane filter에 여과하여 시험용액으로 한다.</p> <p>3) 분석방법</p> <p>3.1 HPLC를 이용하여 아래의 분석조건에 따라 분석한다. 분석법: 표준액(2, 4, 6, 8 µg/mL), 시험용액: 각각 100% 주입하여 분석한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>용액</td><td>주입</td></tr> <tr><td>주입량</td><td>5 µL</td></tr> <tr><td>발전장소</td><td>25°C</td></tr> <tr><td>검출장소</td><td>UV</td></tr> <tr><td>용액</td><td>0.1M Citric acid</td></tr> <tr><td>기압</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> </table> </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	제품명	삼우바이오 고장정제	규격	2정	방법	시행번호: 2021-001	시험항목	시험항목	시험기준	시행기준	시험법	시행법	1. 성분	백색의 장방형 고장정제						표제: 백색 300mg 300mg 2정						시험항목명: 3,5-DCQA	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	2. 확인시험	3,5-DCQA 함량시험(HPLC)에 의하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄.						결과: 백색 300mg 300mg 2정	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	3. 정량시험 (3,5-DCQA)	<p>1) 표준액의 조제</p> <p>1.1 3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액 1mg/L 을 3mg을 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(100 µg/mL). 이 액을 1,2,3,4, 3.6mL를 각각 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(2, 4, 6, 8 µg/mL).</p> <p>2) 시험용액의 조제</p> <p>2.1 정제물 200mg을 정제물 200mg을 취하여 200mg 정량용기 0.271g(0.14g)을 넣어 용액하여 20mL 메스플라스크에 넣고 30% 메탄올 약 10mL를 넣는다.</p> <p>2.2 용액 200mg을 취하여 용액 200mg을 취한다.</p> <p>2.3 약 메스플라스크에 30% 메탄올로 표준액 후 0.2µm membrane filter에 여과하여 시험용액으로 한다.</p> <p>3) 분석방법</p> <p>3.1 HPLC를 이용하여 아래의 분석조건에 따라 분석한다. 분석법: 표준액(2, 4, 6, 8 µg/mL), 시험용액: 각각 100% 주입하여 분석한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>용액</td><td>주입</td></tr> <tr><td>주입량</td><td>5 µL</td></tr> <tr><td>발전장소</td><td>25°C</td></tr> <tr><td>검출장소</td><td>UV</td></tr> <tr><td>용액</td><td>0.1M Citric acid</td></tr> <tr><td>기압</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> </table>	용액	주입	주입량	5 µL	발전장소	25°C	검출장소	UV	용액	0.1M Citric acid	기압	0.05MPa	검출기	0.05MPa	검출기	0.05MPa	검출기	0.05MPa					<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">시험일지</th> <th style="width: 50%;">시험일지</th> </tr> <tr> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">Time</th> <th style="width: 25%;">(0)</th> <th style="width: 25%;">(9)</th> </tr> <tr> <td>0</td> <td>absorbance: 0.000000</td> <td>absorbance: 0.000000</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> </table> <p>의 계산</p> $C \times V \times V = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$ <p>C: 시험용액중의 3,5-DCQA 농도(µg/mL) V: 시험용액의 부피(mL) W: 무게 측정량(mg) P: 표준액 농도(mg)</p> <p>의 결과</p> $300 \times 0.14 \times 0.14 = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$ </td> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">시험항목명</th> <th style="width: 25%;">시험법</th> <th style="width: 25%;">시험기준</th> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> <tr> <td>시험항목명</td> <td>시험법</td> <td>시험기준</td> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 33%;">시험항목</th> <th style="width: 33%;">시험기준</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> </tr> <tr> <td>1. 성분</td> <td>백색의 장방형 고장정제</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>2. 확인시험</td> <td>표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>3. 정량시험</td> <td>3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>4. 용액</td> <td>60% 이하</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>5. 대량공급</td> <td>용액</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> </table> </td> <td></td> </tr> </table>	시험일지	시험일지	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">Time</th> <th style="width: 25%;">(0)</th> <th style="width: 25%;">(9)</th> </tr> <tr> <td>0</td> <td>absorbance: 0.000000</td> <td>absorbance: 0.000000</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> </table> <p>의 계산</p> $C \times V \times V = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$ <p>C: 시험용액중의 3,5-DCQA 농도(µg/mL) V: 시험용액의 부피(mL) W: 무게 측정량(mg) P: 표준액 농도(mg)</p> <p>의 결과</p> $300 \times 0.14 \times 0.14 = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$	Time	(0)	(9)	0	absorbance: 0.000000	absorbance: 0.000000	5	77	23	10	77	23	15	77	23	20	77	23	25	77	23	30	77	23	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">시험항목명</th> <th style="width: 25%;">시험법</th> <th style="width: 25%;">시험기준</th> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> <tr> <td>시험항목명</td> <td>시험법</td> <td>시험기준</td> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> </table>	시험항목명	시험법	시험기준	3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg	시험항목명	시험법	시험기준	3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 33%;">시험항목</th> <th style="width: 33%;">시험기준</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> </tr> <tr> <td>1. 성분</td> <td>백색의 장방형 고장정제</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>2. 확인시험</td> <td>표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>3. 정량시험</td> <td>3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>4. 용액</td> <td>60% 이하</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>5. 대량공급</td> <td>용액</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> </table>	시험항목	시험기준	시험법	시험법	1. 성분	백색의 장방형 고장정제	시험법	시험법	2. 확인시험	표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄	시험법	시험법	3. 정량시험	3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%	시험법	시험법	4. 용액	60% 이하	시험법	시험법	5. 대량공급	용액	시험법	시험법	
제품명	삼우바이오 고장정제	규격	2정	방법	시행번호: 2021-001																																																																																																																																
시험항목	시험항목	시험기준	시행기준	시험법	시행법																																																																																																																																
1. 성분	백색의 장방형 고장정제																																																																																																																																				
	표제: 백색 300mg 300mg 2정																																																																																																																																				
	시험항목명: 3,5-DCQA	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg																																																																																																																																
2. 확인시험	3,5-DCQA 함량시험(HPLC)에 의하여 시험용 제 3,5-DCQA 표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄.																																																																																																																																				
	결과: 백색 300mg 300mg 2정	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg	시험법: HPLC	시험기준: 2.304mg																																																																																																																																
3. 정량시험 (3,5-DCQA)	<p>1) 표준액의 조제</p> <p>1.1 3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액 1mg/L 을 3mg을 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(100 µg/mL). 이 액을 1,2,3,4, 3.6mL를 각각 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 만든다(2, 4, 6, 8 µg/mL).</p> <p>2) 시험용액의 조제</p> <p>2.1 정제물 200mg을 정제물 200mg을 취하여 200mg 정량용기 0.271g(0.14g)을 넣어 용액하여 20mL 메스플라스크에 넣고 30% 메탄올 약 10mL를 넣는다.</p> <p>2.2 용액 200mg을 취하여 용액 200mg을 취한다.</p> <p>2.3 약 메스플라스크에 30% 메탄올로 표준액 후 0.2µm membrane filter에 여과하여 시험용액으로 한다.</p> <p>3) 분석방법</p> <p>3.1 HPLC를 이용하여 아래의 분석조건에 따라 분석한다. 분석법: 표준액(2, 4, 6, 8 µg/mL), 시험용액: 각각 100% 주입하여 분석한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>용액</td><td>주입</td></tr> <tr><td>주입량</td><td>5 µL</td></tr> <tr><td>발전장소</td><td>25°C</td></tr> <tr><td>검출장소</td><td>UV</td></tr> <tr><td>용액</td><td>0.1M Citric acid</td></tr> <tr><td>기압</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> <tr><td>검출기</td><td>0.05MPa</td></tr> </table>	용액	주입	주입량	5 µL	발전장소	25°C	검출장소	UV	용액	0.1M Citric acid	기압	0.05MPa	검출기	0.05MPa	검출기	0.05MPa	검출기	0.05MPa																																																																																																																		
용액	주입																																																																																																																																				
주입량	5 µL																																																																																																																																				
발전장소	25°C																																																																																																																																				
검출장소	UV																																																																																																																																				
용액	0.1M Citric acid																																																																																																																																				
기압	0.05MPa																																																																																																																																				
검출기	0.05MPa																																																																																																																																				
검출기	0.05MPa																																																																																																																																				
검출기	0.05MPa																																																																																																																																				
시험일지	시험일지																																																																																																																																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">Time</th> <th style="width: 25%;">(0)</th> <th style="width: 25%;">(9)</th> </tr> <tr> <td>0</td> <td>absorbance: 0.000000</td> <td>absorbance: 0.000000</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> </table> <p>의 계산</p> $C \times V \times V = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$ <p>C: 시험용액중의 3,5-DCQA 농도(µg/mL) V: 시험용액의 부피(mL) W: 무게 측정량(mg) P: 표준액 농도(mg)</p> <p>의 결과</p> $300 \times 0.14 \times 0.14 = \frac{W \times 1000000}{2.304 \times 1300}$	Time	(0)	(9)	0	absorbance: 0.000000	absorbance: 0.000000	5	77	23	10	77	23	15	77	23	20	77	23	25	77	23	30	77	23	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%;">시험항목명</th> <th style="width: 25%;">시험법</th> <th style="width: 25%;">시험기준</th> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> <tr> <td>시험항목명</td> <td>시험법</td> <td>시험기준</td> </tr> <tr> <td>3,5-DCQA 함량</td> <td>HPLC</td> <td>2.304mg</td> </tr> </table>	시험항목명	시험법	시험기준	3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg	시험항목명	시험법	시험기준	3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg																																																																																																
Time	(0)	(9)																																																																																																																																			
0	absorbance: 0.000000	absorbance: 0.000000																																																																																																																																			
5	77	23																																																																																																																																			
10	77	23																																																																																																																																			
15	77	23																																																																																																																																			
20	77	23																																																																																																																																			
25	77	23																																																																																																																																			
30	77	23																																																																																																																																			
시험항목명	시험법	시험기준																																																																																																																																			
3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg																																																																																																																																			
시험항목명	시험법	시험기준																																																																																																																																			
3,5-DCQA 함량	HPLC	2.304mg																																																																																																																																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 33%;">시험항목</th> <th style="width: 33%;">시험기준</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> <th style="width: 33%;">시험법</th> </tr> <tr> <td>1. 성분</td> <td>백색의 장방형 고장정제</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>2. 확인시험</td> <td>표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>3. 정량시험</td> <td>3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>4. 용액</td> <td>60% 이하</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> <tr> <td>5. 대량공급</td> <td>용액</td> <td>시험법</td> <td>시험법</td> </tr> </table>	시험항목	시험기준	시험법	시험법	1. 성분	백색의 장방형 고장정제	시험법	시험법	2. 확인시험	표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄	시험법	시험법	3. 정량시험	3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%	시험법	시험법	4. 용액	60% 이하	시험법	시험법	5. 대량공급	용액	시험법	시험법																																																																																																													
시험항목	시험기준	시험법	시험법																																																																																																																																		
1. 성분	백색의 장방형 고장정제	시험법	시험법																																																																																																																																		
2. 확인시험	표준액과 동일한 유지시간에서 피크를 나타냄	시험법	시험법																																																																																																																																		
3. 정량시험	3,5-DCQA(3,5-dichloroquinic acid) 표준액의 60-100%	시험법	시험법																																																																																																																																		
4. 용액	60% 이하	시험법	시험법																																																																																																																																		
5. 대량공급	용액	시험법	시험법																																																																																																																																		

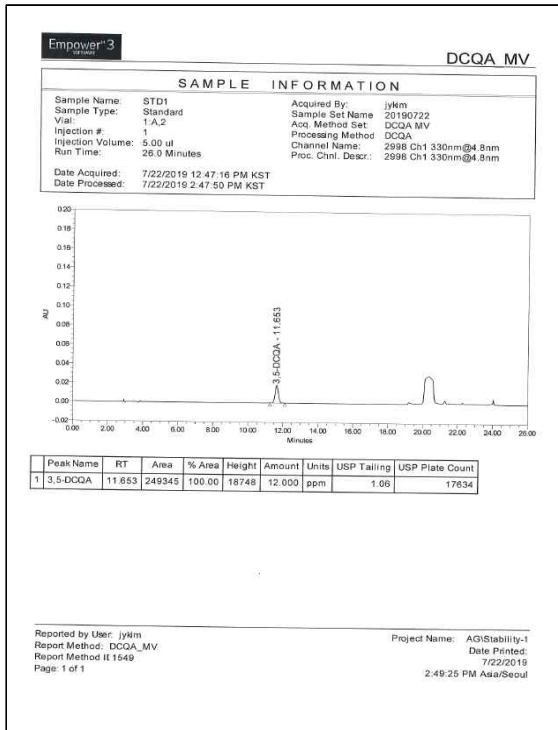
(2) 정량시험(3,5-DCQA) 결과 및 Raw data

시험법에 따라 시험하였을 때, 다음과 같은 결과를 나타냄. 표준액의 농도와 면적값을 이용한 검량선으로 $y = 21256x - 11276$ 의 수식을 도출하였음. 이를 이용하여 검액 면적값(517838)을 대입하여 24.893 ppm의 농도값을 얻었음. 이를 이용하여 인체 적용시험용 제품의 함량을 계산하였을 때, 100.3%로 측정되어 기준에 적합하였음.

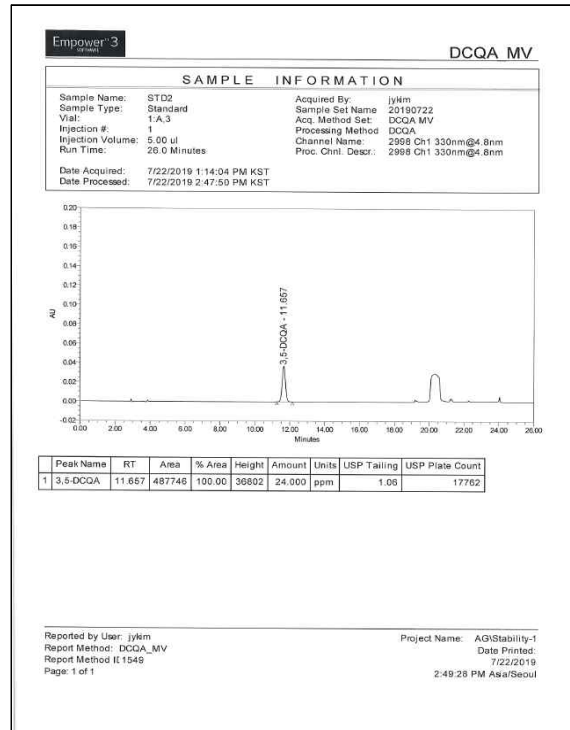
농도(ppm)	면적	
12	249345	
24	487746	
36	759477	

지표성분(3,5-DCQA) 함량 $\frac{24.893 \times 20 \times 98.25}{0.2751 \times 1000000 \times 2.304 / 1300} = 100.3\%$

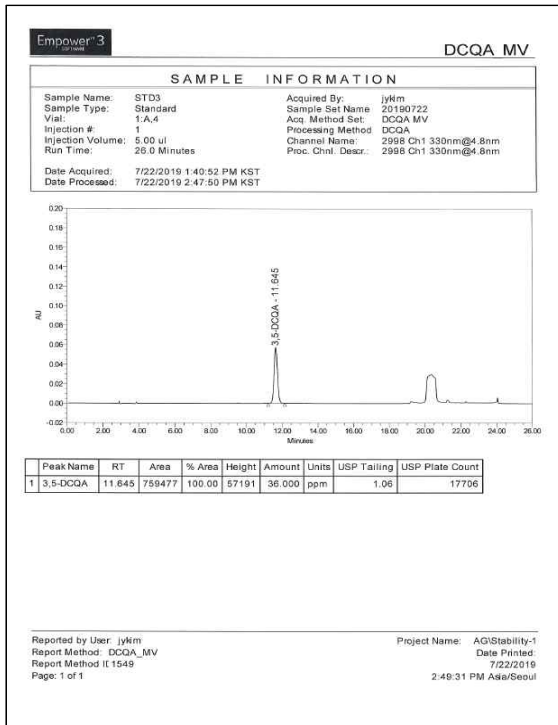
Raw data



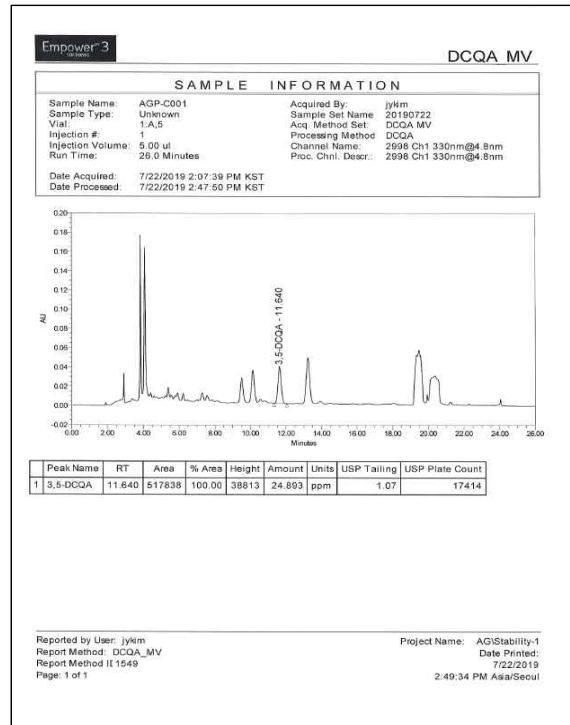
표준액(12 ppm)



표준액(24 ppm)



표준액(36 ppm)

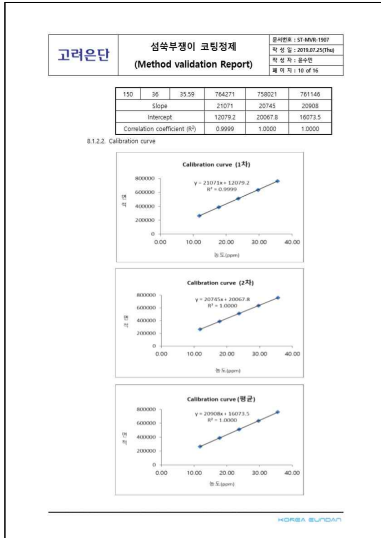


검액

나. 지표성분에 대한 시험법 밸리데이션 실시

(1) 시험법 밸리데이션 계획서

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>섬숙부쟁이 코팅정제</p> <p>시험법 밸리데이션 계획서</p> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 2차부</p> <p>목적</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 목적(Purpose)..... 3 2. 적용범위(Scope)..... 3 3. 관련 규정(Related Regulation)..... 3 4. 책임(Responsibility)..... 3 5. 용어의 정의(Definition)..... 4 6. 시험 방법(Test Method)..... 4 7. 밸리데이션 실시항목 및 기준(Validation Test Item & Criteria)..... 6 8. 밸리데이션 실시항목별 시험방법(Validation Test Method)..... 6 9. 첨부문서(Attachment)..... 6 </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 3차부</p> <p>1. 목적(Purpose)</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제의 지표성분인 3,5-Dicaffeoylquinic acid의 분석법을 확립하고 설정 분석법을 검증하여 가능성용량 인정을 위한 지표 사용가능 여부, 효율적인 품질관리를 확보하기 위하여 목적을 정한다.</p> <p>2. 적용범위(Scope)</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>구분</td> <td>항상시험</td> </tr> <tr> <td>특이성</td> <td style="text-align: center;">O</td> </tr> <tr> <td>적응성</td> <td style="text-align: center;">O</td> </tr> <tr> <td>정확도</td> <td style="text-align: center;">O</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">정밀도</td> <td>반복성</td> <td style="text-align: center;">O</td> </tr> <tr> <td>재현성</td> <td style="text-align: center;">O</td> </tr> </table> <p>3. 관련 규정(Related Regulation)</p> <p>가능성 용량 인정을 위한 적용자료 작성 가이드(식품의약품안전처, 2016.12)</p> <p>4. 책임(Responsibility)</p> <p>4.1. 작성자 4.1.1 해당 종류의 시험법 밸리데이션 관련 지식 작성과 검토서 및 기타 밸리데이션을 수행하여야 한다.</p> <p>4.2. 검토자 4.2.1 시험법 밸리데이션에 대한 검토를 검토하고 밸리데이션 수행에 대한 전반적인 내용을 확인할 책임이 있다.</p> <p>4.3. 승인자</p> </div>	구분	항상시험	특이성	O	적응성	O	정확도	O	정밀도	반복성	O	재현성	O																																											
구분	항상시험																																																									
특이성	O																																																									
적응성	O																																																									
정확도	O																																																									
정밀도	반복성	O																																																								
	재현성	O																																																								
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 4차부</p> <p>4.3.1 시험법 밸리데이션 계획에 따라 해당 시험법 준수를 용인할 수 있다.</p> <p>5. 용어의 정의(Definition)</p> <p>5.1. 시험방법(Analytical Procedure)이란 시험분석을 하기 위하여 상세히 기술한 일련의 시험과정을 말한다.</p> <p>5.2. 시험법 밸리데이션(Validation of Analytical Procedure)이란 의약품 제조 및 품질관리를 위한 시험법 법의 타당성을 미리 확인하는 과정을 말한다.</p> <p>5.3. 특이성(Specificity)이란 용출물, 분해물, 배양상 등 의 최종 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다.</p> <p>5.4. 직선성(Linearity)이란 적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 범위 중 분석대상물질의 농도(또는 농도와 비례하여 일정 범위 내의 측정 가능 범위)에 비례하여 선형적으로 측정할 수 있는 범위를 말한다.</p> <p>5.5. 정확도(Accuracy)란 측정값이 실제 값과 일치하는 정도를 나타내며, 표준물질 또는 표준시료를 사용하여 측정된 결과와 참값의 차이를 측정하는 데 각각의 측정값 사이의 근접성을 나타낸다.</p> <p>5.7. 반복성(Repeatability)은 동일 실험실에서 동일한 시험자가 동일한 장비와 기준 물질(또는 표준)의 사용, 기타 동일 조건 하에서 반복 실험을 수행하여 얻은 측정값의 일관성을 나타내며, 측정 시간과 반복 실험 횟수에 따라 다른 측정값을 나타내며, 다른 시험자, 다른 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험에 대한 측정값을 나타내며, 측정값을 나타낸다.</p> <p>6. 시험 방법(Test Method)</p> <p>6.1. 표준용량 조성: 3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 1mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다. 이 용액 1.2, 2.4, 3.6mL를 각각 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다. (12, 24, 36µg/mL)</p> <p>6.2. 시험용량 조성: 20mL 용출물(2차부)에 대해 0.25g을 취하여 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다. 조 용출물(2차부)에서 용출된 액질 후 상온에서 식힌다. 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한 후 상기 시험법을 동일한 액질에 0.2µm PTFE membrane filter로 여과하여 시험용액으로 한다.</p> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 5차부</p> <p>6.3. 표준용량, 시험용량을 HPLC에 주입하여 역상크로마토그래피로 분석한다.</p> <p>6.4. 분석조건</p> <p>6.4.1. 컬럼: Xromail 100-S-C18(250 × 4.6mm, 5µm)은 미라 유동상 혼합</p> <p>6.4.2. 유속: 0.8 mL/min</p> <p>6.4.3. 검출기: 330nm</p> <p>6.4.4. 컬럼온도: 25°C</p> <p>6.4.5. 실온온도: 4°C</p> <p>6.4.6. 주입량: 5µL</p> <p>6.4.7. 이동상: Gradient system</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>% A</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>DW: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)</td> <td>ACN: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>77</td> <td>23</td> </tr> </tbody> </table> <p>6.5. 계산</p> $C = \frac{x \cdot v \cdot v \cdot p}{W \cdot v \cdot 100000 \cdot v \cdot 250 / 1000} = \%$ <p>C: 시험용액 중의 3,5-Dicaffeoylquinic acid (µg/µg/mL) V: 시험용액의 전량(µL) W: 100 (재질무게) P: 표준용량</p> </div>	Time	% A	% B	Initial	DW: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)	ACN: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)	5	77	23	15	75	25	16	10	90	20	10	90	21	77	23	26	77	23	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 6차부</p> <p>7. 밸리데이션 실시항목 및 기준(Validation Test Item & Criteria)</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>No.</th> <th>항목</th> <th>기준</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>특이성</td> <td>3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출 시간의 정밀도를 20% 이하로 유지하고, 표준용량과 시험용량의 오차를 5% 이하로 유지한다.</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>적응성</td> <td>상온(25°C)에서 90% 이상</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>정확도</td> <td>회수율: 100 ± 5.0%</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>정밀도</td> <td>반복성: 상대표준편차 3.0% 이하 재현성: 상대표준편차 5.0% 이하</td> </tr> </tbody> </table> <p>8. 밸리데이션 실시항목별 시험방법(Validation Test Method)</p> <p>8.1. 특이성(Specificity)</p> <p>8.1.1 회색액, 표준용액, 시험용액을 주입하여 분석조건으로 시험한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>조제 방법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>표준용액</td> <td>3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.</td> </tr> <tr> <td>표준용액</td> <td>표준용량 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.</td> </tr> <tr> <td>시험용액</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> </tr> </tbody> </table> <p>8.2. 직선성(Linearity)</p> <p>8.2.1 시험농도의 50%, 75%, 100%, 125%, 150%에 해당하는 5농도의 용액을 조제하여 분석조건으로 2회 반복 분석한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>조제 방법</th> <th>농도(µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>표준용액</td> <td>8.1.1항의 표준용액을 사용한다.</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>50%</td> <td>표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table> </div>	No.	항목	기준	1	특이성	3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출 시간의 정밀도를 20% 이하로 유지하고, 표준용량과 시험용량의 오차를 5% 이하로 유지한다.	2	적응성	상온(25°C)에서 90% 이상	3	정확도	회수율: 100 ± 5.0%	4	정밀도	반복성: 상대표준편차 3.0% 이하 재현성: 상대표준편차 5.0% 이하	구분	조제 방법	표준용액	3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	표준용액	표준용량 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	시험용액	섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	구분	조제 방법	농도(µg/mL)	표준용액	8.1.1항의 표준용액을 사용한다.	100	50%	표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	12
Time	% A	% B																																																								
Initial	DW: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)	ACN: phosphoric acid(99.5 : 0.5)(V/V)																																																								
5	77	23																																																								
15	75	25																																																								
16	10	90																																																								
20	10	90																																																								
21	77	23																																																								
26	77	23																																																								
No.	항목	기준																																																								
1	특이성	3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출 시간의 정밀도를 20% 이하로 유지하고, 표준용량과 시험용량의 오차를 5% 이하로 유지한다.																																																								
2	적응성	상온(25°C)에서 90% 이상																																																								
3	정확도	회수율: 100 ± 5.0%																																																								
4	정밀도	반복성: 상대표준편차 3.0% 이하 재현성: 상대표준편차 5.0% 이하																																																								
구분	조제 방법																																																									
표준용액	3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.																																																									
표준용액	표준용량 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.																																																									
시험용액	섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.																																																									
구분	조제 방법	농도(µg/mL)																																																								
표준용액	8.1.1항의 표준용액을 사용한다.	100																																																								
50%	표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	12																																																								
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 7차부</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>농도(µg/mL)</th> <th>회수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>100%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>125%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>150%</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table> <p>6.3. 정확도(Accuracy)</p> <p>6.3.1. 시험농도의 75%, 100%, 125%에 해당하는 3농도의 spiked sample 용액을 농도마다 5회 조제를 분석조건으로 시험한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>Spiked 용액 조제 방법</th> <th>농도(µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>표준용액</td> <td>3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5.0mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>75%</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 1.2mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>100%</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>125%</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 3.6mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> <td>125</td> </tr> </tbody> </table> <p>8.4. 정밀도(Precision)</p> <p>8.4.1. 반복성</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제를 5농도의 용액에 농도마다 5회씩 조제를 분석조건으로 시험한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>조제 방법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75%</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> </tr> </tbody> </table> </div>	농도(µg/mL)	회수율(%)	75%	100%	100%	100%	125%	100%	150%	100%	구분	Spiked 용액 조제 방법	농도(µg/mL)	표준용액	3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5.0mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	100	75%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 1.2mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	75	100%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	100	125%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 3.6mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	125	구분	조제 방법	75%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 8차부</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>농도(µg/mL)</th> <th>회수율(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100%</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>125%</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table> <p>8.4.2. 재현성</p> <p>시험농도의 100%에 해당하는 농도의 용액(5회)을 분석용 분석기를 달리하여 조제 및 분석한다.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>조제 방법</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100%</td> <td>섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.</td> </tr> </tbody> </table> <p>9. 첨부문서(Attachment)</p> <p>해당 사항 없음.</p> </div>	농도(µg/mL)	회수율(%)	100%	100%	125%	100%	구분	조제 방법	100%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p>고려온단</p> <p>섬숙부쟁이 코팅정제 (Method Validation Protocol)</p> <p>문헌번호 : SP-MMP-1907 작성 일자 : 2019.07.16(Thu) 작성 자 : 홍승환 확인 자 : 9차부</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>조제 방법</th> <th>농도(µg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>표준용액</td> <td>8.1.1항의 표준용액을 사용한다.</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>50%</td> <td>표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table> </div>	구분	조제 방법	농도(µg/mL)	표준용액	8.1.1항의 표준용액을 사용한다.	100	50%	표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	12								
농도(µg/mL)	회수율(%)																																																									
75%	100%																																																									
100%	100%																																																									
125%	100%																																																									
150%	100%																																																									
구분	Spiked 용액 조제 방법	농도(µg/mL)																																																								
표준용액	3,5-Dicaffeoylquinic acid 표준용량 5.0mg을 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	100																																																								
75%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 1.2mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	75																																																								
100%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 2.4mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	100																																																								
125%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 하고, 표준용액 3.6mL를 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.	125																																																								
구분	조제 방법																																																									
75%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.15g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.																																																									
농도(µg/mL)	회수율(%)																																																									
100%	100%																																																									
125%	100%																																																									
구분	조제 방법																																																									
100%	섬숙부쟁이 코팅정제 0.25g을 용액에 30% 메탄올을 넣어 20mL로 한다.																																																									
구분	조제 방법	농도(µg/mL)																																																								
표준용액	8.1.1항의 표준용액을 사용한다.	100																																																								
50%	표준용액 1.2mL, 용액에 30% 메탄올을 넣어 10mL로 한다.	12																																																								



고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

8.1.3. 정확도

8.1.3.1. 정확도 편도 계산

8.1.3.1.1. 75% 정확도 분석

계산식	결과값
1. 395479 - 20908	16073.5
2. 491869 - 20908	16073.5
3. 393176 - 20908	16073.5
4. 391268 - 20908	16073.5
5. 382795 - 20908	16073.5

8.1.3.1.2. 100% 정확도 분석

계산식	결과값
1. 526996 - 20908	16073.5
2. 520942 - 20908	16073.5
3. 527504 - 20908	16073.5
4. 526996 - 20908	16073.5
5. 510611 - 20908	16073.5

8.1.3.1.3. 125% 정확도 분석

계산식	결과값
1. 655305 - 20908	16073.5
2. 650385 - 20908	16073.5

HORMA-BIOPHANT

고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

8.1.3.2. 정확도 회수율 계산

회수율	회수율 (%)
1	10.89%
2	10.81%
3	10.82%
4	10.81%
5	10.81%

8.1.4. 정밀도

8.1.4.1. 반복성

8.1.4.1.1. 일체형 0.15g

계산식	결과값
1. 386484 - 20908	16073.5
2. 393458 - 20908	16073.5
3. 389811 - 20908	16073.5
4. 389519 - 20908	16073.5
5. 397166 - 20908	16073.5

HORMA-BIOPHANT

고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

8.1.4.1.2. 일체형 0.20g

계산식	결과값
1. 518369 - 20908	16073.5
2. 523953 - 20908	16073.5
3. 510390 - 20908	16073.5
4. 521140 - 20908	16073.5
5. 525032 - 20908	16073.5

8.1.4.1.3. 일체형 0.15g

계산식	결과값
1. 638195 - 20908	16073.5
2. 644678 - 20908	16073.5
3. 619776 - 20908	16073.5
4. 649171 - 20908	16073.5
5. 651169 - 20908	16073.5

8.1.4.1.4. 일체 제한량

제한량 (g)	0.15g	0.20g	0.25g
1	0.15120	0.20076	0.25044
2	0.15241	0.20020	0.25091
3	0.14888	0.19799	0.25009

HORMA-BIOPHANT

고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

8.1.4.1.5. 분취성 결과

분취량	0.15g	0.20g
1	2.32	2.37
2	2.34	2.40
3	2.36	2.36
4	2.36	2.40
5	2.40	2.39

8.1.4.2. 재현성

8.1.4.2.1. 일체 제한량

제한량 (g)	A	B
1	분취자: 용수민 분석량: 19.0403	분취자: 이상호 분석량: 19.0404
2	0.20004	0.20005
3	0.20021	0.19987
4	0.20008	0.19940
5	0.19976	0.20011

8.1.4.2.2. 100% 재현성 분석

A	계산식	결과값
1	491198 - 20908	16073.5
2	527990 - 20908	16073.5
3	503720 - 20908	16073.5

HORMA-BIOPHANT

고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

8.1.4.2.3. 재현성 결과

제한량	A	B
1	2.25	2.32
2	2.39	2.39
3	2.32	2.31
4	2.38	2.26
5	2.30	2.45

8.2. 불리데이터 분석 결과

불리데이터	A	B
1	0.062	0.073
2	2.46	3.11

HORMA-BIOPHANT

고려온단 **섬식부형이 코팅정제** 문서번호 : 15T-MKH-1907
작성 일자 : 2019.07.25(화)
작성 부서 : 품질관리
페이지 : 15 중 16

(Method validation Report)

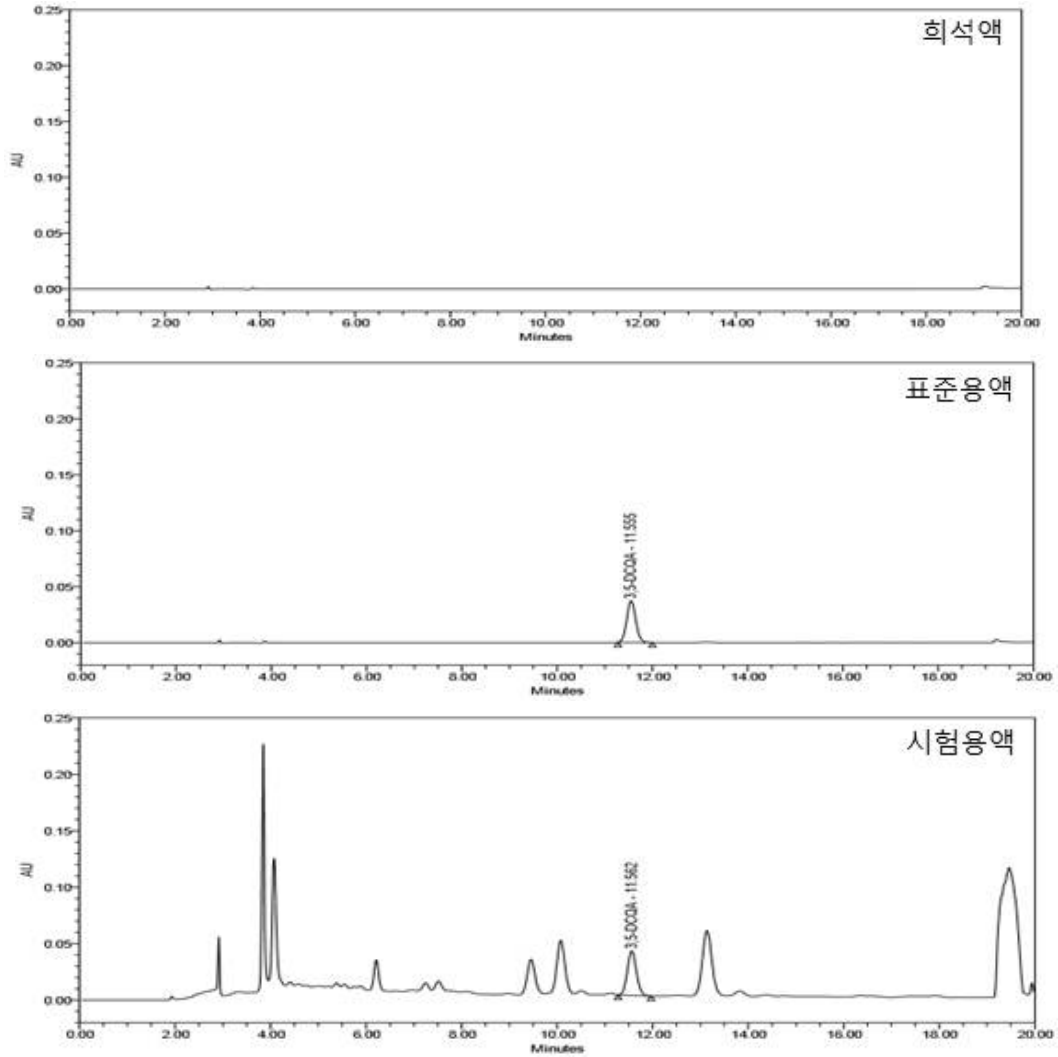
시험 항목	기준	결과	판정
특이성	1. 검출이 없는 물질 또는 2. 99.9% 이하의 양, 3. 18μm 이하의 입자 크기, 4. 1.0000 이하의 분취성, 5. 1.0000 이하의 분취성	1. 18μm 이하의 입자 크기 없음, 2. 99.9% 이하의 분취성, 3. 1.0000 이하의 분취성, 4. 1.0000 이하의 분취성	적합
정확성	정확도: 100±10.0%	98.95~102.52	적합
분취성	상대분취차는 5.0% 이하	0.15g: 1.31, 0.20g: 0.71, 0.25g: 2.08	적합
	재분취차: 용수민 분석량: 2019.07.17	상대분취차는 2.66	적합
	재분취차: 이상호 분석량: 2019.07.18	3.11	
회용기준 (Test Acceptance)	■ 적합 (Pass), □ 부적합 (Fail), □ 해당사항 없음 (N/A)		

9. 결론 (Conclusion)
본 시험법 타당성 시험 결과 모든 시험항목에 대하여 적합하기 때문에 섬식부형이 코팅정제에 실시되는 시험법 타당성 시험이 적당하다고 판단되며, 시험 시험 시 본 시험방법으로 시험을 실시한다.

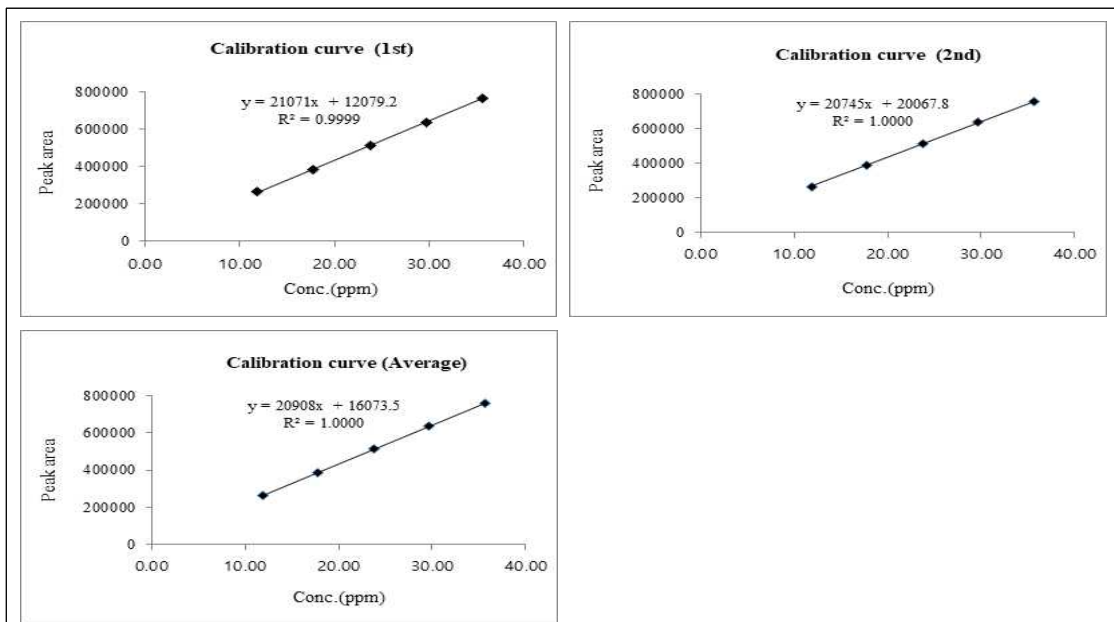
10. 첨부문서 (Attachment)
본서 Raw data

HORMA-BIOPHANT

(3) 시험법 밸리데이션 결과 세부내용
(가) 특이성



(나) 직선성



(다) 정확도

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)
18	17.79	395478	18.15	100.81
		401889	18.45	102.52
		393176	18.04	100.20
		391268	17.95	99.69
		392795	18.02	100.10
평균회수율(%)				100.67

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)
24	23.73	526996	24.44	101.82
		520942	24.15	100.61
		527504	24.46	101.92
		520698	24.14	100.56
		510611	23.65	98.55
평균회수율(%)				100.69

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)
30	29.66	655305	30.57	101.91
		650385	30.34	101.13
		639564	29.82	99.40
		650098	30.32	101.08
		649887	30.31	101.05
평균회수율(%)				100.91

전체 평균회수율(%)	100.76
회수율 구간	98.55 ~ 102.52

(라) 정밀도

① 반복성

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	분석값 (mg/g)
18	17.79	386484	17.72	2.32
		393458	18.05	2.34
		389611	17.87	2.36
		389519	17.86	2.36
		397166	18.23	2.40
분석값 평균(mg/g)				2.36
표준편차				0.031
RSD(%)				1.31

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	분석값 (mg/g)
24	23.73	518368	24.02	2.37
		523953	24.29	2.40
		510390	23.64	2.36
		521140	24.16	2.38
		525032	24.34	2.39
분석값 평균(mg/g)				2.38
표준편차				0.017
RSD(%)				0.71

이론값 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	이론값 보정농도 ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	분석값 (mg/g)
30	29.66	638195	29.76	2.35
		644476	30.06	2.38
		619776	28.87	2.28
		649171	30.28	2.40
		651169	30.38	2.40
분석값 평균(mg/g)				2.36
표준편차				0.049
RSD(%)				2.08

② 재현성

A				B			
분석자 : 윤수민 분석일 : 2019.07.17				분석자 : 이상호 분석일 : 2019.07.18			
Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	분석값 (mg/g)		Peak area	참값 ($\mu\text{g/mL}$)	분석값 (mg/g)	
1	491198	22.72	2.25	1	507736	23.52	2.32
2	527590	24.47	2.39	2	520815	24.14	2.39
3	503720	23.32	2.32	3	504721	23.37	2.31
4	520486	24.13	2.38	4	493409	22.83	2.26
5	501578	23.22	2.30	5	534869	24.81	2.45
분석값 평균(mg/g)			2.33	분석값 평균(mg/g)			2.35
표준편차			0.062	표준편차			0.073
RSD(%)			2.65	RSD(%)			3.11

4. 인체적용시험 제품의 안정성 protocol 개발

가. 유통기한 설정을 위한 안정성 시험을 실시하여 추후 본 제품의 유통기한 설정 자료로 활용

나. 「식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인(식약처, 2011.06)」에 따른 유통기한 설정 p rotocol 작성

고려온단	섬색부쟁이 코팅정제 Stability Test Protocol	문서번호 : ST-AGP-1907 개정번호 : 00 작성일 : 2019.07.26(Fri) 페이지 : 1 of 2	
1. 목적			
1.1. 본 시험은 '섬색부쟁이 코팅정제' 제품의 색상 및 함량의 안정성을 확인하는데 목적이 있다.			
2. 시험 개요			
2.1. 시험 목적			
구분	내 용		
제 품 명	섬색부쟁이 코팅정제		
검체의 포장 구분	PTP/플로우 포장		
2.2. 시험 목적 검토번호			
No.	제출번호	제출일자	표준완료일자
1	AGP-C001	2019.07.15	2019.07.15
2.3. 보존조건 및 시험 주기			
구분	보존조건	시험주기	
실험구 1	15 °C / 90 %	3개월(최초, 1, 2, 3)	
실험구 2	25 °C / 90 %	36개월(최초, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36)	
대조구(유통온도)	35 °C / 90 %	36개월(최초, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36)	
** 시험 주기에 따라 진행하며 요차 결과는 일주일 이내로 한다.			
KE-RD-303-001 HORIBA, BELUCIA™			

고려온단	섬색부쟁이 코팅정제 Stability Test Protocol	문서번호 : ST-AGP-1907 개정번호 : 00 작성일 : 2019.07.26(Fri) 페이지 : 2 of 2
3. 시험 항목 및 시험 기준		
3.1. 시험 항목 및 기준		
시험항목	시험기준	
색상	백색의 장영형 코팅 정제	
함량	3,5-Dicaffeoylquinic acid류류 표시량(2.304mg/1,300mg)의 80~120 %	
4. 시험방법		
4.1. 당사의 섬색부쟁이 코팅정제 정형 시험법(별규)에 따라 시험한다.		
5. 시험결과 기록 및 조치		
5.1. 각 시험 주기에 따라 시험 후 결과를 기록하여 보고 의도해 된다.		
KE-RD-303-001 HORIBA, BELUCIA™		

안정성시험 진행 결과표 - 실험구1

제 품 명		섬속부장이 코팅정제				
제조번호	AGP-C001	제조일자	2019.07.15	사용기한	-	
시험구분	<input checked="" type="checkbox"/> 실험구1 <input type="checkbox"/> 실험구2 <input type="checkbox"/> 대조구	보관조건	15 °C / 90 %	포장상태	PTP/필로우 포장	
1. 시험목적		<input checked="" type="checkbox"/> 신제품, <input type="checkbox"/> 처방변경, <input type="checkbox"/> 경시변화, <input type="checkbox"/> 공정변경, <input type="checkbox"/> 기타				
2. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	실시 일				
		제조시	1개월	2개월	3개월	
성상	백색의 장방형 코팅정제					
함량	3,5-Dicaffeoylquinic acid 토써 표시량의 80~120%					
시험자						
확인자						

KE-RD-303-F02

1 of 4

KOREA EUNDOAN

안정성시험 진행 결과표 - 실험구2

제 품 명		섬속부장이 코팅정제				
제조번호	AGP-C001	제조일자	2017.07.15	사용기한	-	
시험구분	<input type="checkbox"/> 실험구1 <input checked="" type="checkbox"/> 실험구2 <input type="checkbox"/> 대조구	보관조건	25 °C / 90 %	포장상태	PTP/필로우 포장	
1. 시험목적		<input checked="" type="checkbox"/> 신제품, <input type="checkbox"/> 처방변경, <input type="checkbox"/> 경시변화, <input type="checkbox"/> 공정변경, <input type="checkbox"/> 기타				
2. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	실시 일				
		제조시	1개월	2개월	3개월	
성상	백색의 장방형 코팅정제					
함량	3,5-Dicaffeoylquinic acid 토써 표시량의 80~120%					
시험자						
확인자						

KE-RD-303-F02

2 of 4

KOREA EUNDOAN

안정성 시험 진행 결과표 - 대조구

제 품 명		섬숙부쟁이 코팅정제				
제조번호	AGP-C001	제조일자	2017.07.15	사용기한	-	
시험구분	<input type="checkbox"/> 실험구1 <input type="checkbox"/> 실험구2 <input checked="" type="checkbox"/> 대조구	보관조건	35 °C / 90 %	포장상태	PTP/필로우 포장	
2. 시험목적		■신제품, □처방변경, □경시변화, □공정변경, □기타				
3. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	실시 일				
		제조시	1개월	2개월	3개월	4개월
성상	백색의 장방형 코팅정제					
함량	3,5-Dicaffeoylquinic acid 로 써 표시량의 80~120%					
시험자						
확인자						

KE-RD-303-F02

3 of 4

KOREA EUNDAE

제 품 명		섬숙부쟁이 코팅정제				
제조번호	AGP-C001	제조일자	2017.07.15	사용기한	-	
시험구분	<input type="checkbox"/> 실험구1 <input type="checkbox"/> 실험구2 <input checked="" type="checkbox"/> 대조구	보관조건	35 °C / 90 %	포장상태	PTP/필로우 포장	
2. 시험목적		■신제품, □처방변경, □경시변화, □공정변경, □기타				
3. 안정성 시험 결과						
항목	허용 기준	실시 일				
		6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
성상	백색의 장방형 코팅정제					
함량	3,5-Dicaffeoylquinic acid 로 써 표시량의 80~120%					
시험자						
확인자						

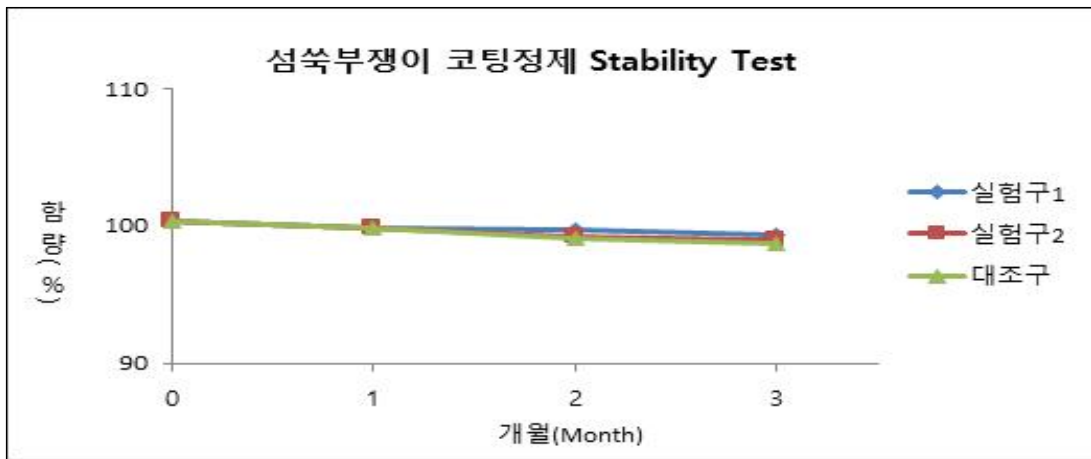
KE-RD-303-F02

4 of 4

KOREA EUNDAE

다. 유통기한 설정 protocol에 따른 시험 결과

	시험일자	15℃	25℃	35℃
0개월	2019.07.22	100.3% (2.311 mg/1,300 mg)	100.3% (2.311 mg/1,300 mg)	100.3% (2.311 mg/1,300 mg)
1개월	2019.08.22	99.8% (2.298 mg/1,300 mg)	99.9% (2.302 mg/1,300 mg)	99.9% (2.302 mg/1,300 mg)
2개월	2019.09.23	99.7% (2.297 mg/1,300 mg)	99.2% (2.284 mg/1,300 mg)	99.1% (2.283 mg/1,300 mg)
3개월	2019.10.21	99.3% (2.287 mg/1,300 mg)	99.0% (2.282 mg/1,300 mg)	98.7% (2.274 mg/1,300 mg)



라. 시험결과를 바탕으로 유통기한 설정 및 report 작성

(1) 저장온도별 저장기간에 따른 3,5-DCQA 함량변화 방정식 산출

반응차수	온도(℃)	회귀방정식	상관계수
0차	15	$Y = -0.0031X + 1.0024$	0.9730
	25	$Y = -0.0046X + 1.0029$	0.9807
	35	$Y = -0.0056X + 1.0034$	0.9899
1차	15	$Y = -0.0031X + 0.0024$	0.9732
	25	$Y = -0.0046X + 0.0029$	0.9808
	35	$Y = -0.0056X + 0.0034$	0.9899

(2) 반응속도상수(K)를 이용하여 아레니우스 방정식으로 활성화 에너지(Ea) 산출

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	LnK
15	288	0.0035	0.0031	-5.7764
25	298	0.0034	0.0046	-5.3817
35	308	0.0032	0.0056	-5.1850
아레니우스 방정식 $\text{LnK} = -(E_a/R)(1/T) + \text{LnA}$				
$\text{LnK} = -2631.65X + 3.390004$				
$E_a(\text{Kcal/mole}) = -5229.09$				

(3) 비시험 구간의 반응속도상수(K) 산출

온도(°C)	온도(K)	1/T	K	LnK
10	283	0.0035	0.0027	-5.9091
15	288	0.0035	0.0031	-5.7477
20	293	0.0034	0.0037	-5.5917
25	298	0.0034	0.0046	-5.4410
30	303	0.0033	0.0050	-5.2953
35	308	0.0032	0.0056	-5.1543
40	313	0.0032	0.0066	-5.0178
45	318	0.0031	0.0076	-4.8856

(4) 유통기한 산출

국내 연간 유통온도별 유통기한을 고려한 연간변화량을 산출하여 유통기한 산출

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도상수(B)	연간변화량(AXB)
10	5	0.0027	0.0135
15	1	0.0031	0.0031
20	2	0.0037	0.0074
25	2	0.0046	0.0092
30	2	0.0050	0.0100
Sum	12	-	0.0432

예측 유통기한(월) = (최초합량(Ao) - 규격하한(Ae)) / 연간변화량 X 12 X 안전계수
 $(1.003 - 0.8) / 0.0432 \times 12 \times 0.5 = 28.2(\text{월})$

안정성 시험 결과에 의한 유통기한은 56.4개월이었으나 시험기간(가속)이 3개월로 짧고, 섬쑥부쟁이 추출물이 신규원료이므로 유통과정 중의 안전을 고려하여 안전 계수를 0.5로 적용하여 약 28개월로 계산되었음. 따라서 본 제품의 적정 유통기한을 24개월로 설정하는 것은 품질관리 상 이상이 없음을 확인함.

<p>섬쑥부쟁이 코팅정제</p> <p>유통기한 설정 결과보고서</p>	<p>고려은단 섬쑥부쟁이 코팅정제 Expiry date Report</p> <p>문서번호 : 17-000-0000 개정일자 : 00 적용 일자 : 2019.03.21(0000) 품목 코드 : 10000</p> <p style="text-align: center;">목차</p> <p>1. 목적(Purpose).....3 2. 시험 명칭.....3 3. 관련 규정.....3 4. 시험 방법(Test Method).....3 5. 실험 결과(Results).....4 6. 결론(Conclusions).....6 7. 보충양식(Attachment).....6</p>	<p>고려은단 섬쑥부쟁이 코팅정제 Expiry date Report</p> <p>문서번호 : 17-000-0000 개정일자 : 00 적용 일자 : 2019.03.21(0000) 품목 코드 : 10000</p> <p>1. 목적(Purpose) 1.1. 본 시험은 섬쑥부쟁이 코팅정제 제품의 안정성시험 결과를 바탕으로 유통기한을 설정하고 제품 품질 관리하기 위함이다.</p> <p>2. 시험 명칭</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>구분</td> <td>섬쑥부쟁이 코팅정제</td> </tr> <tr> <td>용량</td> <td>간헐가능사용</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td>백색의 장방형 곡형 정제</td> </tr> <tr> <td>주원료</td> <td>섬쑥부쟁이 추출물</td> </tr> <tr> <td>포장재질</td> <td>PP/PE/PS 포장</td> </tr> <tr> <td>보존 및 유통온도</td> <td>실온</td> </tr> <tr> <td>보존료 사용여부</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>용량 - 용제비</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>살균 또는 멸균 방법</td> <td>-</td> </tr> </table> <p>3. 관련 규정 3.1. 시험, 사용성가용, 독성을 및 안전가능사회의 유통기한 설정 기준 3.2. 시험용 유통기한 설정 방법 가이드라인</p> <p>4. 시험 방법(Test Method) 4.1. 안정성 시험조건</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>구분</td> <td>시험 조건</td> </tr> </table>	구분	섬쑥부쟁이 코팅정제	용량	간헐가능사용	성상	백색의 장방형 곡형 정제	주원료	섬쑥부쟁이 추출물	포장재질	PP/PE/PS 포장	보존 및 유통온도	실온	보존료 사용여부	-	용량 - 용제비	-	살균 또는 멸균 방법	-	구분	시험 조건
구분	섬쑥부쟁이 코팅정제																					
용량	간헐가능사용																					
성상	백색의 장방형 곡형 정제																					
주원료	섬쑥부쟁이 추출물																					
포장재질	PP/PE/PS 포장																					
보존 및 유통온도	실온																					
보존료 사용여부	-																					
용량 - 용제비	-																					
살균 또는 멸균 방법	-																					
구분	시험 조건																					

5절 인체적용시험

1. 기능성 원료의 인체적용시험 계획서(protocol) 개발

가. 기능성 원료의 인체적용시험 계획서 개발

(1) 섭취량 및 섭취 방법

(가) 섭취량 : 섬썩부쟁이추출물로서 960 mg/day

(나) 섭취방법 : 1일 2회, 1회 1정을 물과 함께 섭취

(2) 설정근거

(가) 전인체적용시험을 통해 산출

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

(나) Mouse에서의 유효함량 산출

Scopolamine을 이용한 기억력 감퇴 모델에서 섬썩부쟁이 추출물에 의한 기억력 개선 및 증진 효과가 있는지 수동회피시험(passive avoidance test)을 이용하여 확인하였음. 섬썩부쟁이 추출물 30, 100 및 300 mg/kg을 투여한 결과, 모든 그룹의 대기시간(latency time)이 유의성 있게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 동물실험에서의 유효 용량을 200 mg/kg으로 최종 설정하였음.

(다) 인체대상 적용 예측량 산출

동물실험 결과에서 유효 용량을 근거로 인체대상 적용량을 예측한 결과 섬썩부쟁이 추출물의 HED는 960 mg/60 kg bw [HED(mg/g) = 200 mg/kg × 0.08]으로 산출되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 인체에서의 1일 섭취량은 960 mg으로 최종 결정하였음.

(3) 피험(대상)자 모집기준 확립

(가) 인체적용시험 대상자

① 만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자

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

① 만 55세 이상, 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀

② 국문해독이 가능한 자

③ CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 1.0SD 이상, 2.0SD 미만 감소한 자

(CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition)

④ 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험을 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed Consent Form)에 서명한 자

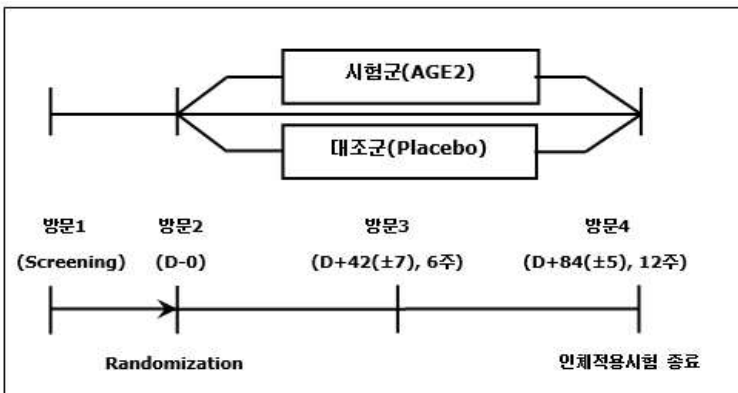
(다) 제외기준 : 하기 조건에 한 가지 이상 해당되는 사람은 인체적용시험 대상자 제외

- ① 악성종양, 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원중이거나 퇴원 후 3개월이 경과하지 않은 자
- ② 조현병을 앓고 있거나 병력이 있는 자
- ③ DSM-V 주요 우울장애에 해당하는 자
- ④ 치매, 파킨슨, 뇌경색 등 인지기능저하가 동반되는 질환이 있는 자
(치매 진단의 기준은 DSM-V에 근거한다.)
- ⑤ 인체적용시험 시작 4주 이내에 치매나 다른 인지기능의 이상으로 약물(항정신용제, 퇴행성질환용제, 뇌기능개선제, 삼환계항우울제)을 투여한 경험이 있는 자
- ⑥ 비타민E 제제 1일 투여량이 400 IU 이상이거나 투여량 감소가 불가피할 것으로 예상 되는자
- ⑦ 인체적용시험 시작 2개월 이내에 estrogen replacement therapy(국소도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자
- ⑧ 인체적용시험 시작 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자
- ⑨ 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자
- ⑩ TSH 0.1 μ IU/ml 이하이거나, 10 μ IU/ml 이상인 갑상선 질환자
- ⑪ Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- ⑫ AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- ⑬ 조절되지 않는 고혈압 환자(수축기혈압 160 mmHg 이상 또는 이완기 혈압 100 mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정 기준)
- ⑭ 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dl 이상)
- ⑮ 본 인체적용시험용 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자
- ⑯ 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
- ⑰ 본 인체적용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 인체적용시험에 참여할 계획이 있는 자
- ⑱ 시험자에 의해 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자

나. 인체적용시험 계획서(protocol) 개발

(1) 인체적용시험 계획서(protocol) 요약

인체적용시험 제목	경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 AGE2의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	고려은단(주) 경기도 성남시 중원구 사기막골로 100
인체적용시험 책임자	백종우(경희대학교병원 정신건강의학과 교수) 유승호(건국대학교병원 정신건강의학과 교수)

인체적용시험 실시기관	경희대학교병원(서울특별시 동대문구 경희대로 23) 건국대학교병원(서울특별시 광진구 능동로 120-1)												
인체적용시험 기간	임상시험심사위원회(IRB)의 인체적용시험 승인일로부터 12개월												
인체적용시험 대상	만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자												
인체적용시험 목적	본 시험은 만 55세 이상, 만 85세 이하의 경도인지저하자를 대상으로 AGE2(섬썩부쟁이추출물)을 섭취시켰을 때 대조식품(Placebo)과 비교하여 인지기능을 포함하는 학습능력 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획되었다.												
인체적용시험 단계 및 디자인	단 계 : 기타(건강기능식품) 디자인 : 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조												
인체적용시험용 식품	시험식품 : AGE2(섬썩부쟁이추출물)												
	대조식품 : Placebo												
인체적용시험용 식품 섭취방법	시험식품(AGE2) : 1일 2회, 1회 1정을 물과 함께 섭취 (섬썩부쟁이추출물로서 960mg/day)												
	대조식품(Placebo) : 시험식품과 동일한 방법으로 섭취												
인체적용시험용 식품 섭취기간	12주												
인체적용시험 방법	 <p>인체적용시험 대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정한다. 배정된 인체적용시험 대상자는 12주간 인체적용시험용 식품(시험식품 또는 대조식품)을 섭취한다.</p>												
인체적용 시험대상자 수	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험군 (AGE2)</th> <th>대조군 (Placebo)</th> <th>총 시험대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>최종 평가 레수(PP Set)</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>Drop-out(20%) 고려레수</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>		시험군 (AGE2)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수	최종 평가 레수(PP Set)	40	40	80	Drop-out(20%) 고려레수	50	50	100
	시험군 (AGE2)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수										
최종 평가 레수(PP Set)	40	40	80										
Drop-out(20%) 고려레수	50	50	100										
선정기준	<ul style="list-style-type: none"> 만 55세 이상, 만 85세 이하의 기억력 저하를 호소하는 남·녀 국문해독이 가능한 자 CERAD-K 기억력 점수가 같은 교육수준, 연령대와 비교하였을 때 												

	<p>1.0SD 이상, 2.0SD 미만 감소한 자(CERAD Word list memory or Word delayed recall or Word recognition)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)에 서명한 자
제외기준	<ul style="list-style-type: none"> • 악성종양, 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 중증의 심장질환(불안정 협심증, 심근경색, 심부전 치료를 필요로 하는 부정맥)으로 입원 중이거나 퇴원 후 3개월이 경과하지 않은 자 • 조현병을 앓고 있거나 병력이 있는 자 • DSM-V 주요 우울장애에 해당하는 자 • 치매, 파킨슨, 뇌경색 등 인지기능 저하가 동반되는 질환이 있는 자 (치매 진단의 기준은 DSM-V에 근거한다.) • 인체적용시험 시작 4주 이내에 치매나 다른 인지기능의 이상으로 약물 (항정신용제, 퇴행성 질환용제, 뇌기능 개선제, 삼환계 항우울제)을 투여한 경험이 있는 자 • 비타민E 제제 1일 투여량이 400 IU 이상이거나 투여량 감소가 불가피할 것으로 예상되는 자 • 인체적용시험 시작 2개월 이내에 Estrogen replacement therapy (국소도포용제 제외)를 투여한 경험이 있는 자 • 인체적용시험 시작 2주 이내에 인지기능 개선과 관련된 건강기능식품을 복용한 자 • 알코올 남용 및 알코올 의존도가 높은 자 • TSH 0.1 μIU/ml 이하이거나, 10 μIU/ml 이상인 갑상선 질환자 • Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상인 자 • AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상 상한치의 3배 이상인 자 • 조절되지 않는 고혈압 환자 (수축기 혈압 160mmHg 이상 또는 이완기 혈압 100mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정 기준) • 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180mg/dl 이상) • 본 인체적용시험용 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자 • 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자 • 본 인체적용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 인체적용시험에 참여할 계획이 있는 자 • 시험자에 의해 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단되는 자
유효성 평가 변수	<ul style="list-style-type: none"> • ADAS-cog 총점 • ADAS-cog 기억력 • ADAS-K • Visual C.P.T • ADCS-ADL • SGDS

2. 인체적용시험 실시

가. 실시기관 선정 및 계약

(1) 실시기관 선정

경희대학교병원 및 건국대학교병원과 실시기관 실시

(2) 개시모임(Initiation Meeting) 실시

(가) 실시일자 : 2019.08.02.(목)

(나) 참석자 : 주관연구기관, 협동연구기관 및 실시기관 책임자, 담당실무자 등 13명

(다) 주요내용 : 인체적용시험 계획 및 예상 일정 공유, 연구진행 안내 등

<p>경도인지저하자에서 인지기능 향상에 미치는 AGE2의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 대기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험</p> <p style="text-align: center;">Initiation Meeting</p> <p>Sponsor: 고려온단(주) PI: 정신건강의학과 백종우 교수 일시: 2019년 8월 2일(금) PM 12:00</p> <p style="text-align: right;">고려온단</p>	<p style="text-align: right;">Protocol No. KE_AGE2</p> <p>Agenda</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 참여자 소개 2. 진행현황 3. Study Management 4. 인체적용시험계획서 5. 시험절차 1) 눈가림, 중도탈락, Trial master file 관리 시험절차 2) 인체적용시험용 식품의 수불관리방법, 이상반응보고 등 시험절차 3) 모니터링 6. 인체적용시험자의 책임(KGCP) <p style="text-align: right;">고려온단</p>
개시모임 발표자료	

나. 인체적용시험 진행일정

Period		Screening	Active Treatment		
Visit		1	2	3	4
Week ¹⁾		-2	0	6	12
Window period ²⁾				±7	±5
서면동의서		○			
인구학적 조사 ³⁾		○			
병력 및 약물투여력 조사 ⁴⁾		○	○		
이학적검사		○		○	○
활력징후(혈압, 맥박) 측정		○		○	○
신체계측(신장, 체중) ⁵⁾			○	○	○
식사지도 및 식이조사 ⁶⁾			○	○	○
임상병리검사 ⁷⁾		○			○
임신반응검사 ⁷⁾		○			
심전도검사 ⁸⁾		○			○
CERAD-K		○			
유효성 검사	ADAS-K		○		○
	Visual C.P.T		○		○

	ADCS-ADL		○		○
	SGDS		○		○
인체적용시험 대상자 적합성 평가		○	○		
무작위배정			○		
인체적용시험용 식품의 처방			○	○	
이상반응 확인				○	○
순응도 확인 ⁹⁾				○	○
병용약물 및 병용요법 변화 확인				○	○
<p>1) 방문1 이후 2주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1의 검사결과가 모두 확인되는 경우 방문2를 동시에 실시할 수 있다. 방문1의 일부 검사가 누락된 경우에는 방문2 무작위배정 전까지 실시할 수 있다.</p> <p>2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 방문일은 지정된 날짜 전·후 5일을 허용한다.</p> <p>3) 방문1에 인체적용시험 대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 흡연력, 음주력, 운동여부, 스트레스 자각 정도를 조사하여 기록한다.</p> <p>4) 방문1 기준으로 6개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 3개월 이내의 약물투여력을 조사하여 기록한다.</p> <p>5) 신장은 방문2에서 측정하며, 체중은 방문2, 3, 4에서 측정하여 기록한다. 신장은 0.1cm, 체중은 0.1kg 단위까지 반올림하여 측정한다.</p> <p>6) 방문2에서는 하루 전날 섭취한 식사를 24시간 회상법으로 인체적용시험 담당자가 기록하며, 방문2, 3에 인체적용시험 대상자에게 식이조사지를 배부하여 방문3, 4에 회수하여 확인한다.</p> <p>7) 인체적용시험 대상자는 채혈하기 전 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다.</p> <p>8) 방문1 기준 3주(21일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하며(임신반응검사 제외), 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 재검사를 시행할 수 있다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 혈액학적 검사 : WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil ■ 혈액화학적 검사 : Glucose, Uric acid, Total Protein, Albumin, Total bilirubin, AST(GOT), ALT(GPT), ALP, BUN, Creatinine, Total Cholesterol ■ 소변검사 : SG, pH, Protein, Glucose, Nitrite, Urobilinogen, Ketone, Bilirubin, RBC(Erythrocyte), WBC(Leukocyte) ■ 임신반응검사 : Urine HCG (※ 가임기 여성만 방문1에 시행) ■ 갑상선호르몬검사 : TSH(방문1에서만 실시) <p>9) 방문1 기준 3주(21일) 이내의 검사결과가 있다면 적용 가능하다.</p> <p>10) 방문3, 4에 인체적용시험 대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 관리약사 및 인체적용시험 담당자가 점검 및 기록한다('인체적용시험용 식품 처방 날 ~ 다음방문 전날' 섭취).</p>					

다. 인체적용시험 모니터링

(1) 실시기관별 모니터링 실시

인체적용시험대상자의 권리와 복지 보호, 보고된 인체적용시험 관련 자료가 근거 문서와 대조하여 정확하고, 완전하며, 검증이 가능한지 여부 확인, 인체적용시험이 승인된 계획서, 의약품 임상시험관리기준 및 의약품 등 안전에 관한 규칙 제30조

의 규정에 따라 수행되는지의 여부 확인을 위하여 모니터링을 실시

(2) 모니터링 내용

항 목	내 용
연구자 파일	① 연구자 파일의 Subject visit log, Subject screening & enrollment log 업데이트 확인 ② IRB 문서 등 인체적용시험 관련 문서 및 의사소통 문서 업데이트 확인
근거문서	① 시험대상자의 ICF 확인 ② 시험대상자의 방문1 ~ 4증례기록서 및 근거문서 확인
약국 파일	① 보관 장소/온도/시험용 식품 보관상태 확인 ② 약국 파일의 온도기록, 불출현황 확인
기 타	① 부족한 material 확인 ② 쿼리 해결 확인

(3) 모니터링 내역

차수	모니터링 기관(병원)	일 자	실시결과
1	경희대학교병원	2019.08.27	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2019.09.10	· 모니터링 보고서 작성
2	경희대학교병원	2019.09.26	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2019.09.25	· 모니터링 보고서 작성
3	경희대학교병원	2019.11.06	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2019.11.15	· 모니터링 보고서 작성
4	경희대학교병원	2019.11.19	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2019.12.24	· 모니터링 보고서 작성
5	경희대학교병원	2019.12.20	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2020.01.30	· 모니터링 보고서 작성
6	경희대학교병원	2020.01.16	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2020.02.11	· 모니터링 보고서 작성
7	경희대학교병원	2020.05.07	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2020.02.12	· 모니터링 보고서 작성
8	경희대학교병원	2020.05.08	· 모니터링 보고서 작성
	건국대학교병원	2020.04.07	· 모니터링 보고서 작성
9	건국대학교병원	2020.04.16	· 모니터링 보고서 작성

(4) 모니터링 보고서 작성

CR-E04_001V1.3
Effective Date: 2019.08.26

Site Monitoring Visit Report

Protocol No	KE_AG2Z
Site Name / Site No.	광희대학교병원01
Principal Investigator	임신진광희대학교 핵종연구 교수

Visit Summary

Monitoring visit date	2019년 08월 27일 화요일(1차)
모니터링 장소	광희대학교병원 영과핵종연구실 지하 1층 모니터링실
방문 시 접어 연구자	김지영 CRC
방문 목적	본 모니터링 사례 PI meeting은 진행하지 않음
방문 모니터링 담당	오디영 CRA, 김지은 CRA

Routine Monitoring Visit Checklist

A. IRB	Yes	No	N/A
A-1 공중연구자 및 인체특용시험 관련 담당자가 변경되었나? (Study Specific Training 기록)		√	
A-2 지난 방문 이래 연구계획서 변경 및 procedure 변경 사항이 있었나?			
No	Submission	Approval	Result
2차	2019.08.20	2019.08.27	승인

A-3 IRB 및 Regulatory Authority 승인은 적절한 update 되었나?
- IRB 승인 유효기간: 2019.07.26-2020.07.04

B. Investigator

B-1 책임연구자는 responsible/qualified obligation을 적절히 이행하고, 연구를 수행하고 있는가? (Site Signature & Recombination Form)

Delegation of Responsibility Log에 핵종 연구자, 임상인 공중연구자, 요양에 공중연구자, 일반인 공중연구자, 임상인 연구실장, 일반인 연구실장, 헬퍼의 관리역사, 시험의 관리역사서 서명 및 날짜가 적혀 있으며, 08에 포함되어 있음을 확인함

Delegation of Responsibility Log에 임상인 공중연구자 서명 누락으로 2차 모니터링 시 확인 예정임

B-2 계약된 요양기관에 따라 대상자가 모집되었나?

CR-E04_001V1.3
Effective Date: 2019.08.26

Site Monitoring Visit Report

목적: 50명/2차 4개월(2019.08-2020.03)
- 환자: Screened 9명, Randomized 4명(4개월(2019.08.27 기준))

B-3 대상자 유효성에는 대상자의 서명과 날짜를 기입한 후, 연구자의 서명/날짜를 기록하여 문서화하였는가? (승인받은 용도서에 인체특용시험의 어떤 조치들 실시하기 전에 서명)			
- 헬퍼의 헬퍼 1부는 기관에서 보관 중요하고, 헬퍼서 서명 1부는 시험대상자에게 제공하였음을 확인함	√		
- 헬퍼서 서명대상자의 서명과 서명 날짜, 시험자의 서명과 서명 날짜 각각 있음을 확인함			
- p-5 ICF Verification 완료			
B-4 연구자는 abnormal laboratory result 및 comment를 적절하게 검토하였는가? - 비정상 결과에 대한 임상적 의의에 판단하여 기록되어 있음을 확인함	√		
B-5 이상한 혹은 정해진 이상반응이 발생하였나? - 본 모니터링에서 이상반응 발생하지 않음		√	
B-6 지난 방문이래 Unblinding이 발생하였나? - 본 모니터링에서 Unblinding 발생하지 않음			√
B-7 Investigator Study File 적절히 보관 및 관리되고 있나? - 보관 장소: 광희대학교병원 본관 4층 방사선종양학과 치료교육실 - 보관 파일: ISF binder tea, ICF binder tea, Source document binder tea	√		

C. Investigational Product

C-1 인체특용시험 사용용 보관하는 장소를 방문하였나?
- 보관 장소: 광희대학교병원 본관 4층 약동용 7번 임상영양
- 보관 파일: PF binder tea

C-2 인체특용시험 사용이 적절한 온도에서 보관되고, Temperature log를 관리하였나? (e.g. Temperature excursion)
- 온도 범위: 실온 보관 (1-30°C)
- 온도기록지에 working day 기준 보관 온도가 기록되어 있으며, 온도기록지에 서명이 있음을 확인함

(5) 월간 보고서(monthly report) 작성

시험대상자 등록 현황, IRB 진행 현황, 시험식품 입고/반납 현황 등 임상시험 진행 현황에 관한 보고서를 작성하고 과제 참여 연구진과 공유하였음.

CR-M02_004V2.1
Effective Date: 2019.05.29

MONTHLY REPORT

Sponsor: 고려대학교 | Protocol No.: KE_AG2Z | Report Date & No.: 2020.10.23(제) 17차

Study Title: 광도 전자파차폐에서 전자파는 방사능에 미치는 AG2Z의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 인체특용시험

1. Enrollment Status (2020년 10월 22일(목) 현재)

Center	Planned Enrollments	Screened	SF	Randomized on (%)	Active	Dropout	Completed
광희대학교병원(01)	51	54	3	8(156.0%)	0	4	47
간국대학교병원(02)	50	56	6	8(160.0%)	0	7	43
Total	101	110	9	8(158.0%)	0	11	90

2. 연구진행 현황 (2020년 10월 22일(목) 현재)

2.1. IRB 진행 현황

일시/기관 (기분코드)	심의대상	결정일	심의결과	PRT	CRF	ICF	IB	승인 유효기간
광희대학교 (01)	초심의	2019.08.05	2019.08.19	서명 후 승인	1.0	1.0	1.0	-
간국대학교 (02)	서명 후 승인	2019.08.28	2019.07.05	승인	-	-	-	-2020.07.04
간국대학교 (02)	초심의	2019.08.03	2019.08.13	서명 후 승인	1.0	1.0	1.0	-
간국대학교 (02)	서명 후 승인	2019.08.28	2019.07.04	승인	-	-	-	-2020.05.31

2.2. 변경사항

일시/기관 (기분코드)	No.	결정일	심의결과	변경 사유	PRT	CRF	ICF	IB
--------------	-----	-----	------	-------	-----	-----	-----	----

CR-M02_004V2.1
Effective Date: 2019.05.29

MONTHLY REPORT

Sponsor: 고려대학교 | Protocol No.: KE_AG2Z | Report Date & No.: 2020.10.23(제) 17차

Study Title: 광도 전자파차폐에서 전자파는 방사능에 미치는 AG2Z의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 인체특용시험

일시/기관 (기분코드)	No.	결정일	심의결과	변경내용
간국대학교 (01)	1차	2019.07.23	2019.07.31	승인 - 인체특용시험 사용용 계획의 과정에 따른 방문료 및 헬퍼비용 변경 (백색당첨제 추가)
간국대학교 (01)	2차	2019.08.20	2019.08.21	승인 - 유효성 평가 본수에 스트레스트 변수 추가 및 CRF 오기 수정
간국대학교 (01)	3차	2019.08.17	2019.08.20	승인 - 인체특용시험 참여명단 변경(Man CRA 추가-승계인)
간국대학교 (01)	4차	2020.02.10	2020.02.14	승인 - 연구자 서명 내역에 따른 연구비 인건비 내역서 변경
간국대학교 (02)	1차	2019.08.02	2019.08.08	승인 - 인체특용시험 사용용 계획의 과정에 따른 방문료 및 헬퍼비용 변경 (백색당첨제 추가)
간국대학교 (02)	2차	2019.08.09	2019.08.18	승인 - 유효성 평가 본수에 스트레스트 변수 추가 및 CRF 오기 수정
간국대학교 (02)	3차	2019.08.19	2019.10.10	승인 - 인체특용시험 참여명단 변경(Man CRA 추가-승계인)

3. 위반보고

일시/기관 (기분코드)	No.	발生日	발生日	위반내용
간국대학교 (01)	1차	2019.11.21	2019.11.28	1) 01-S04301-00044 대상자 제외기준 17 미만 인체특용시험 시작 3개월 이내에 다른 인체특용시험에 참여했거나, 본 인체특용시험 시작 이후 다른 인체특용시험에 참여할 계획이 있는 자에 해당하나 증명됨
간국대학교 (02)	1차	2020.02.27	2020.03.09	1) 02-S004 명용금지제품(중용용량) 복용 2) 02-S010 V4 Visit Window 위반(4 일) 3) 02-S025 V4 Visit Window 위반(2 일) 4) 02-S026 V4 Visit Window 위반(2 일) 5) 02-S046 V4 Visit Window 위반(4 일) 6) 02-S043 V4 Visit Window 위반(23 일) 7) 02-S044 V4 Visit Window 위반(23 일) 8) 02-S048 V4 Visit Window 위반(4 일) 9) 02-S049 V4 Visit Window 위반(4 일)
간국대학교 (02)	2차	2020.05.06	2020.05.14	

(6) DM(Data Management) 및 통계분석

(가) Data Management Plan 및 Statistical Analysis Plan 수립 : 체계적 업무 수행을 위한 일정별 수행 계획을 수립하여 절차에 따른 자료 관리 및 통계분석을 시행하였음.

(나) 유효성 통계분석

평가변수	분석결과
------	------

<p>ADAS-cog 총점</p>	<p>ADAS-cog 총점 변화량</p>	<p>○ ADAS-cog 총점 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.80 ± 2.63점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.70 ± 2.14점 감소하여($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p = 0.0354$).</p> <p>○ ADAS-cog 총점 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.70 ± 2.68점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.70 ± 2.14점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
<p>ADAS-cog 기억력</p>	<p>기억력 총점 변화량</p>	<p>○ ADAS-cog 기억력 총점 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.73 ± 2.04점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.95 ± 1.58점 감소하여($p = 0.0004$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p = 0.0347$).</p> <p>○ ADAS-cog 기억력 총점 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.68 ± 2.06점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.95 ± 1.58점 감소하여($p = 0.0004$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남($p = 0.00462$).</p>
	<p>단어재생 변화량</p>	<p>○ 단어재생 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.87 ± 0.98점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.55 ± 0.95점 감소하였으나($p = 0.0005$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 단어재생 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.89 ± 0.97점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.55 ± 0.95점 감소하였으나($p = 0.0005$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	<p>지남력 변화량</p>	<p>○ 지남력 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.16 ± 0.53점 감소하였고($p = 0.0923$), 대조군은 0.02 ± 0.56점 감소하였으나($p = 1.0000$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ ADAS-cog 기억력의 지남력 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.15 ± 0.51점 감소하였고($p = 0.0923$), 대조군은 0.02 ± 0.56점 감소하였으나($p = 1.0000$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>

	단어재인 변화량	<p>○ 단어재인 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.56 ± 1.45점 감소하였고($p=0.0209$), 대조군은 0.19 ± 0.95점 감소하였으나($p=0.1874$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 단어재인 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.49 ± 1.46점 감소하였고($p=0.0437$), 대조군은 0.19 ± 0.95점 감소하였으나($p=0.1874$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	검사지시 변화량	<p>○ 검사지시 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.14 ± 0.35점 감소하였고($p=0.0313$), 대조군은 0.19 ± 0.66점 감소하였으나($p=0.1001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 검사지시 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.15 ± 0.36점 감소하였고($p=0.0156$), 대조군은 0.19 ± 0.66점 감소하였으나($p=0.1001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
ADAS-K	ADAS-K 총점 변화량	<p>○ ADAS-K 총점 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.89 ± 2.90점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.84 ± 2.31점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ ADAS-K 총점 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.81 ± 2.95점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 1.84 ± 2.31점 감소하였으나($p < 0.0001$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	언어능력 총점 변화량	<p>○ 언어능력 총점 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.64 ± 1.26점 감소하였고($p=0.0017$), 대조군은 0.60 ± 1.16점 감소하였으나($p=0.0014$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 언어능력 총점 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.64 ± 1.22점 감소하였고($p=0.0008$), 대조군은 0.60 ± 1.16점 감소하였으나($p=0.0014$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	수행능력	○ 수행능력 총점 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서

	총점 변화량	<p>섭취 12주 후 시험군은 0.43 ± 0.90점 감소하였고($p=0.0016$), 대조군은 0.14 ± 0.83점 감소하였으나($p=0.2859$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 수행능력 총점 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.38 ± 0.90점 감소하였고($p=0.0037$), 대조군은 0.14 ± 0.83점 감소하였으나($p=0.2859$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	Non-cog (주의력 및 주의산만) 변화량	<p>○ Non-cog(주의력 및 주의산만) 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.09 ± 0.56점 감소하였고($p=0.4240$), 대조군은 0.14 ± 0.47점 감소하였으나($p=0.1094$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ Non-cog(주의력 및 주의산만) 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.11 ± 0.56점 감소하였고($p=0.3018$), 대조군은 0.14 ± 0.47점 감소하였으나($p=0.1094$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
Visual C.P.T	정반응수 변화량	<p>○ 정반응수 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.80 ± 13.63회 증가하였고($p=0.0513$), 대조군은 2.26 ± 9.64회 증가하였으나($p=0.4788$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 정반응수 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.72 ± 13.23회 증가하였고($p=0.0390$), 대조군은 2.26 ± 9.64회 증가하였으나($p=0.4788$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	누락오류수 변화량	<p>○ 누락오류수 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.80 ± 13.63회 감소하였고($p=0.0513$), 대조군은 2.26 ± 9.64회 감소하였으나($p=0.4788$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 누락오류수 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 3.72 ± 13.23회 감소하였고($p=0.0390$), 대조군은 2.26 ± 9.64회 감소하였으나($p=0.4788$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>

	과잉반응수 변화량	<p>○ 과잉반응수 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.32 ± 5.24회 증가하였고($p=0.6065$), 대조군은 0.14 ± 3.92회 감소하였으나($p=0.4015$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 과잉반응수 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.49 ± 5.48회 증가하였고($p=0.6432$), 대조군은 0.14 ± 3.92회 감소하였으나($p=0.4015$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	정반응시간 변화량	<p>○ 정반응시간 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.02 ± 0.05초 감소하였고($p=0.0050$), 대조군은 0.01 ± 0.07초 감소하였으나($p=0.0014$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 정반응시간 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.02 ± 0.05초 감소하였고($p=0.0067$), 대조군은 0.01 ± 0.07초 감소하였으나($p=0.0014$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
	표준편차 변화량	<p>○ 표준편차 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.03초 감소하였고($p=0.7930$), 대조군은 0.01 ± 0.03초 감소하였으나($p=0.0136$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ 표준편차 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.01 ± 0.03초 감소하였고($p=0.7107$), 대조군은 0.01 ± 0.03초 감소하였으나($p=0.0136$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
ADCS-ADL	ADCS-ADL 변화량	<p>○ ADCS-ADL 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.14 ± 1.76점 감소하였고($p=0.6094$), 대조군은 0.53 ± 1.68점 증가하였으나($p=0.0483$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ ADCS-ADL 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.19 ± 1.80점 감소하였고($p=0.4203$), 대조군은 0.53 ± 1.68점 증가하였으나($p=0.0483$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
SGDS	SGDS	○ SGDS 변화량을 PP Set로 분석한 결과에서 섭취 12주

	변화량	<p>후 시험군은 0.41 ± 1.86점 감소하였고($p=0.1517$), 대조군은 1.28 ± 2.48점 감소하였으나($p=0.0006$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p> <p>○ SGDS 변화량을 FA Set로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.47 ± 1.86점 감소하였고($p=0.0917$), 대조군은 1.28 ± 2.48점 감소하였으나($p=0.0006$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음.</p>
--	-----	---

(다) 안전성 통계분석

평가변수	분석결과
이상반응	<p>○ 시험군에서 총 1명의 인체적용시험대상자에게서 1건의 이상반응이 있었고, 대조군에서는 총 4명의 인체적용시험대상자에게서 4건의 이상반응이 있었으나 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음($p=0.2047$).</p> <p>○ 본 인체적용시험 기간 동안 발생한 이상반응의 증상 정도 조사에서 시험군은 경도(mild) 1건이었고, 대조군은 경도(mild) 4건이었음.</p> <p>○ 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 시험군은 ‘관련 있을 가능성 있음’ 이 1건, 대조군은 ‘관련 있을 가능성 있음’ 이 1건, ‘관련이 없다고 생각됨’ 이 1건, ‘명확히 관련이 없음’ 이 2건으로 시험자에 의해 판단되었으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음($p=1.0000$).</p> <p>○ 인체적용시험용 식품과의 관련성을 배제할 수 없는 이상반응은 시험군에서 1건, 대조군에서 1건이 발생하였으며, 두 군 모두 위장관장애였음. 상기 이상반응은 완전치유 되었음을 확인하였음.</p>
임상병리검사 (혈액학적검사, 혈액화학적검사, 뇨검사)	<p>○ 혈액학적검사 중 WBC 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 $0.44 \pm 1.49 \times 10^3/\mu\text{L}$ 감소하였고($p=0.0468$), 대조군은 $0.33 \pm 1.47 \times 10^3/\mu\text{L}$ 증가하여($p=0.1312$) 섭취군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음($p=0.0223$). Neutrophil 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 $2.39 \pm 9.50\%$ 감소하였고($p=0.0917$), 대조군은 $1.88 \pm 8.63\%$ 증가하여($p=0.1602$) 섭</p>

	<p>취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음($p=0.0287$). Eosinophil 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 $0.54 \pm 1.00\%$ 증가하였고($p < 0.0001$), 대조군은 $0.29 \pm 1.46\%$ 감소하여($p=0.4321$) 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음($p=0.0026$). 이는 정상범위 이내의 결과였으며, 이외 혈액화학적검사 항목에서 섭취 12주 후 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나 않았음.</p> <p>○ 혈액화학적검사 중 Albumin 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 0.00 ± 0.19 g/dL 감소하였고($p=0.8632$), 대조군은 0.09 ± 0.16 g/dL 증가하여($p=0.0007$) 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음($p=0.0399$). 이는 정상범위 이내의 결과였으며, 이외 혈액화학적검사 항목에서 섭취 12주 후 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나 않았음.</p> <p>○ 뇨검사의 모든 항목에서 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.</p>
활력징후 및 체중	○ 활력징후 및 체중에서 섭취 6주, 12주 후 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.
심전도검사	○ 심전도검사에서 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두 정상이었으며 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(라) 통계분석에 대한 결론

- ① 본 인체적용시험의 결과로 AGE2(섬썩부쟁이추출물) 섭취 12주 후 ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력 총점에서 대조군 대비 시험군의 명확한 개선 효과를 확인하였음.
- ② ADAS-K의 총점 및 대부분의 개별 항목은 유의한 결과는 아니었으나 섭취 12주 후 시험군에서 더 감소하였으며, Visual C.P.T, ADAS-ADL, SGDS에서는 섭취 구간 통계적으로 유의한 결과는 확인할 수 없었음.
- ③ ADAS-cog는 인지기능의 고감도 척도이며, 기억은 학습의 중심이 되는 정신적인 과정으로 ADAS-cog 총점과 기억력 평가에서 확인된 시험군의 명확한 개선 효과를 통해 결론적으로 경도인지저하자에서 AGE2(섬썩부쟁이추출물)의 섭취는 인지기능 향상에 효과가 있을 것으로 기대됨.

6절 상승 및 상가 효과 원료 탐색

1. 섬쭈부쟁이 추출물과 배합원료 혼합물의 상가 및 상승 효과 검증

가. 신경세포사멸 억제 효능 확인

(1) 시험목적

섬쭈부쟁이 추출물과 비타민 또는 천연물 추출물을 혼합 처리시 신경세포사멸 억제 효능에 대한 상가 및 상승 효과가 발생하는지 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

SH-SY5Y 세포 관련 시약, A β , MTT 및 DMSO는 위와 동일한 제품을 사용함. Vitamin A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, C는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용함. Vitamin B₇, B₁₂는 DSM Co.(Heerlen, NLD) 제품을 사용함. 섬쭈부쟁이 추출물, 화분, 녹차, 홍경천, 홍삼 및 손바닥선인장 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용함. Vitamin B complex(VBC)는 고려은단 메가도스B를 사용함.

(나) 세포생존율 측정

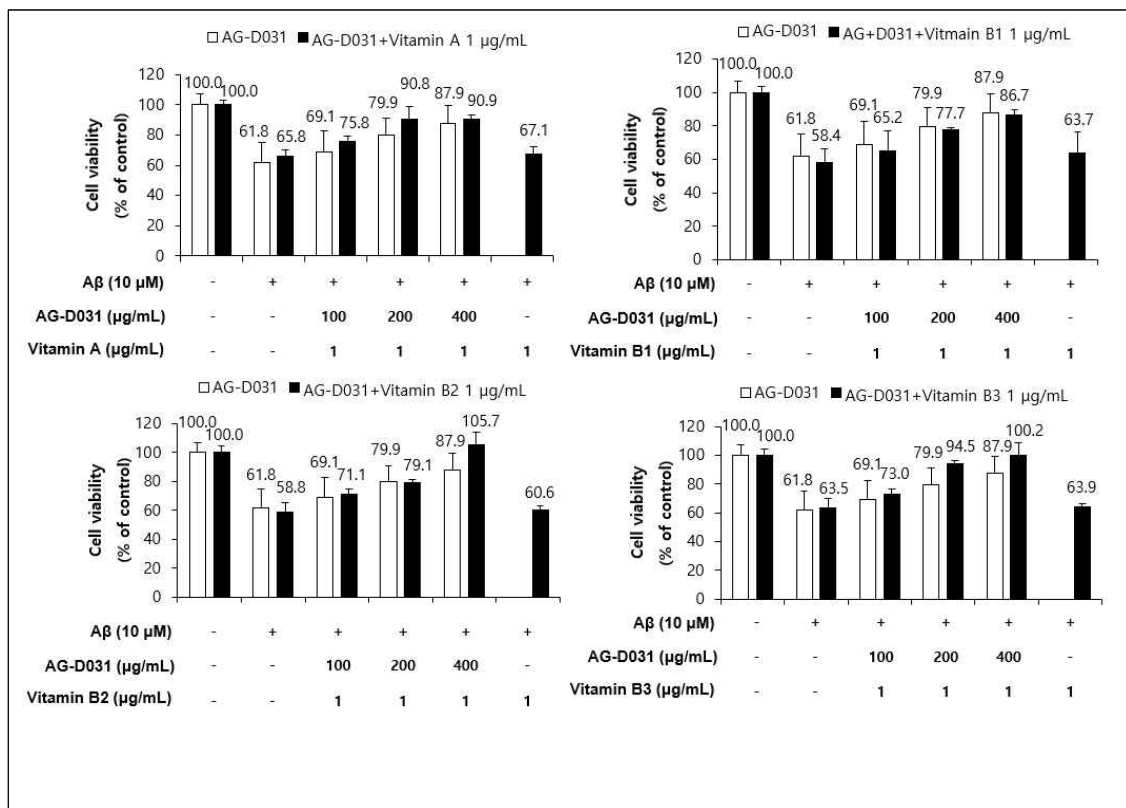
SH-SY5Y 세포를 DMEM 배지(10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 첨가)를 이용하여 96 well plate에 1 X 10⁴/well로 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 배양하였음. 섬쭈부쟁이 추출물, 비타민 및 천연물 추출물 혼합 처리군을 농도별로 1시간 전처리 후, A β 를 10 μ M로 처리하였음. 24시간 이후에 5 mg/mL의 MTT 용액을 10 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 반응시켰음. 보라색 결정이 생긴 것을 현미경으로 관찰한 후, 상등액을 제거한 다음 100 μ L DMSO로 formazan 결정을 용해시켰음. Microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 대조군 대비 백분율로 나타내어 확인하였음.

(3) 연구결과

(가) 섬쭈부쟁이 추출물 및 비타민 혼합물에 의한 신경세포사멸 억제 효능

SH-SY5Y 세포를 이용하여 섬쭈부쟁이 추출물(AG-D031) 단독 처리군과 섬쭈부쟁이 추출물 및 비타민 혼합 처리군의 세포사멸 억제 효능을 비교 분석하기 위해 세포생존율을 MTT assay를 이용하여 확인하였음(Fig. 38). 섬쭈부쟁이 추출물 단독 및 섬쭈부쟁이 추출물과 비타민 혼합 처리군을 농도별로 전처리 후 A β 로 세포사멸을 유도한 결과, A β 유도군의 세포생존율은 약 61.8%로 감소하여 세포사멸이 유도된 것을 확인하였음. 섬쭈부쟁이 추출물 단독 처리군의 세포생존율은 100, 200 및 400 μ g/mL에서 각각 약 7.3, 18.0 및 26.0%로 세포생존율이 농도 의존적으로 회복됨을 확인할 수 있었음. 각각의 비타민은 단독 처리 시 독성이 나타나지 않는 농도로 처리하였음. 섬쭈부쟁이 추출물과 비타

민 혼합 처리군에서 각각의 단독 처리군 대비 세포사멸 저해율이 10% 이상 높을 시에는 상가효과, 20% 이상 높을 시에는 상승 효과라고 판단하였음. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin A, B₁, B₅, B₆, C의 혼합 처리시, 어떠한 조합에서도 상승 및 상가 효과는 나타나지 않음. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin B₂의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 Vitamin B₂ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 19.1% 증가하여 상가효과가 나타남. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin B₃의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 Vitamin B₃ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 12.6, 10.3% 증가하여 상가 효과가 나타남. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin B₇의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 Vitamin B₇ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독처리군 대비 약 11.1% 증가하여 상가 효과가 나타남. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin B₉의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 Vitamin B₉ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독처리군 대비 약 12.7% 증가하여 상가 효과가 나타남. 섬쭉부쟁이 추출물과 Vitamin B₁₂의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 Vitamin B₁₂ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 24.7, 23.7, 22.5% 증가하여 상승 효과가 나타남. 섬쭉부쟁이 추출물과 VBC의 혼합 처리시, 섬쭉부쟁이 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 VBC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 14.4% 증가하여 상가효과가 나타남.



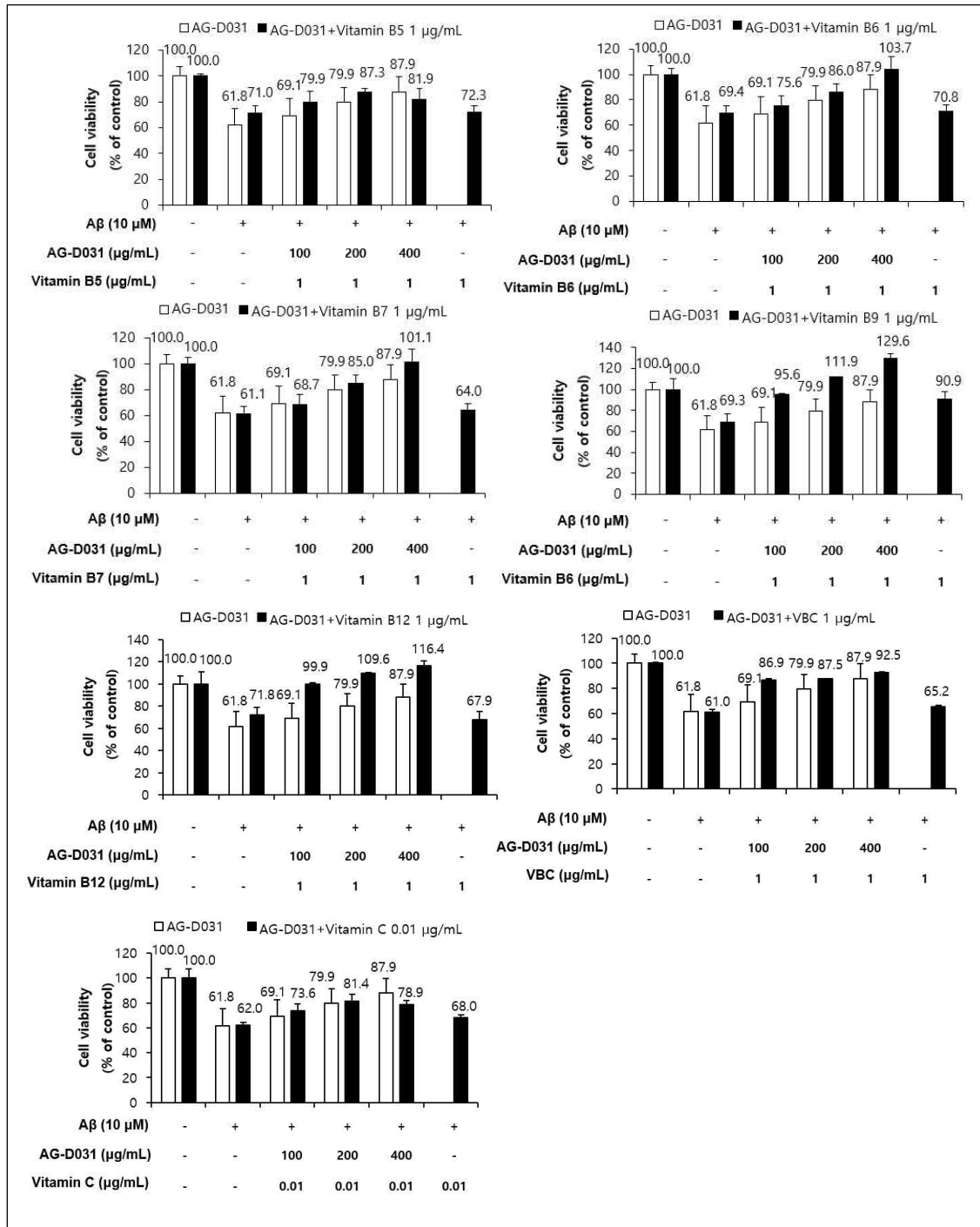
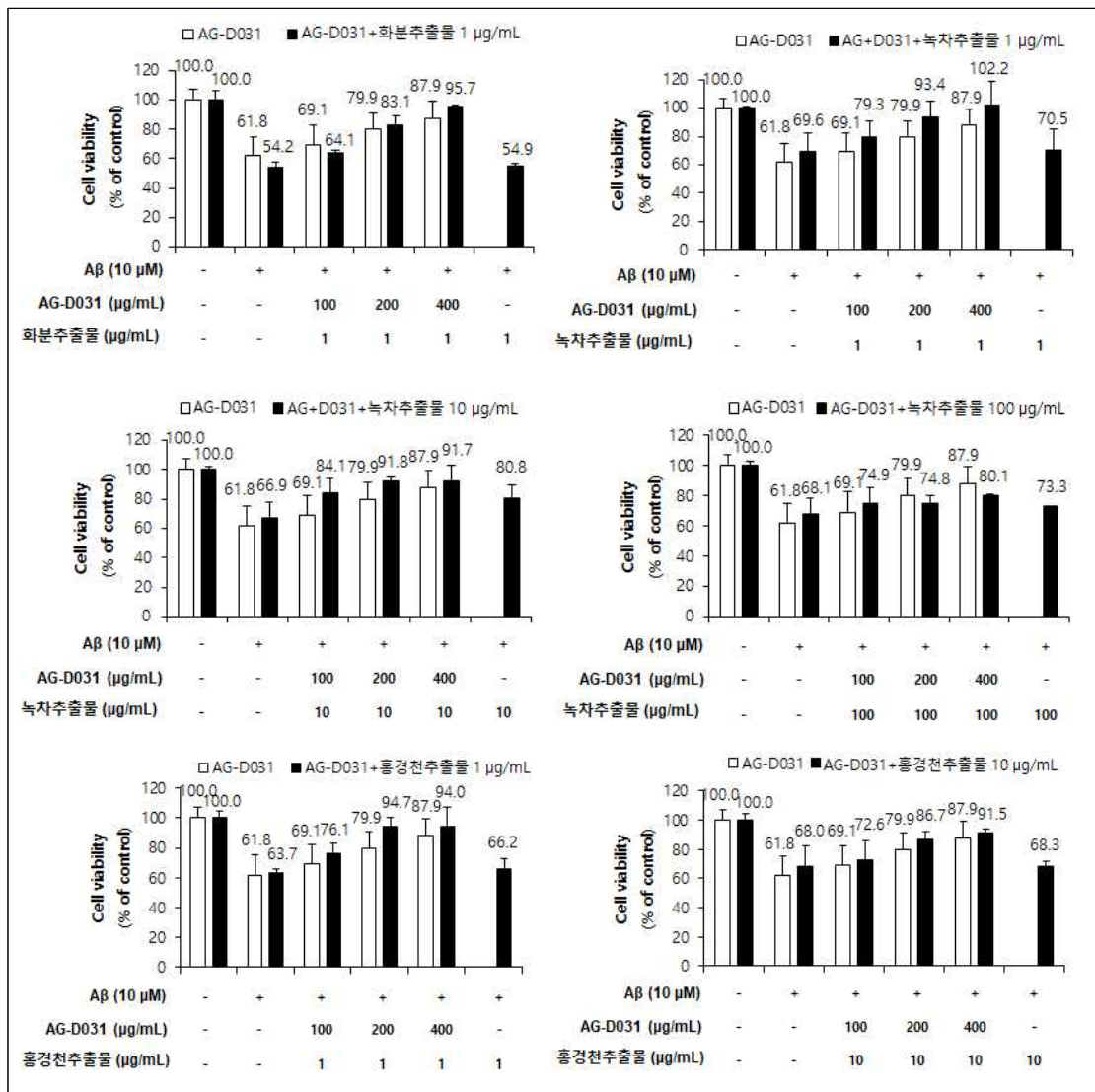


Fig. 38. 섬삭부쟁이 추출물(AG-D031) 및 비타민 혼합 처리군의 신경세포사멸 억제 효능

(나) 섬삭부쟁이 추출물 및 천연물 추출물 혼합물에 의한 신경세포사멸 억제 효능
 섬삭부쟁이 추출물(AG-D031) 단독 처리군과 섬삭부쟁이 추출물과 천연물 추출물 혼합 처리군의 세포사멸 저해율을 비교 분석하기 위해 세포생존율을 MTT assay를 이용하여 확인하였음(Fig. 39). 각각의 천연물 추출물은 단독 처리시 독성이 나타나지 않는 농도로 처리하였음. 섬삭부쟁이 추출물과 화분 추출물의 혼합 처리시, 섬삭부쟁이 추출물 100, 200 μg/mL 및 화분 추출물 1 μg/mL 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율 각각의 단독 처리군 대비 약 10.2, 14.7%

증가하여 상가 효과가 나타남. 섬쭈부쟁이 추출물과 녹차 추출물 혼합 처리시, 어떠한 조합에서도 상승 및 상가 효과는 나타나지 않았음. 섬쭈부쟁이 추출물과 홍경천 추출물의 혼합 처리시, 섬쭈부쟁이 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 홍경천 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율이 각각의 단독 처리군 대비 약 10.5% 증가하여 상가 효과가 나타남. 섬쭈부쟁이 추출물과 홍삼 추출물 혼합 처리시, 섬쭈부쟁이 추출물 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 홍삼 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 29.8% 증가하여 상승 효과가 나타남. 섬쭈부쟁이 추출물과 손바닥선인장 추출물 혼합 처리시, 섬쭈부쟁이 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 손바닥선인장 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 혼합 처리군에서 세포사멸 저해율은 각각의 단독 처리군 대비 약 21.4% 증가하여 상승 효과가 나타남.



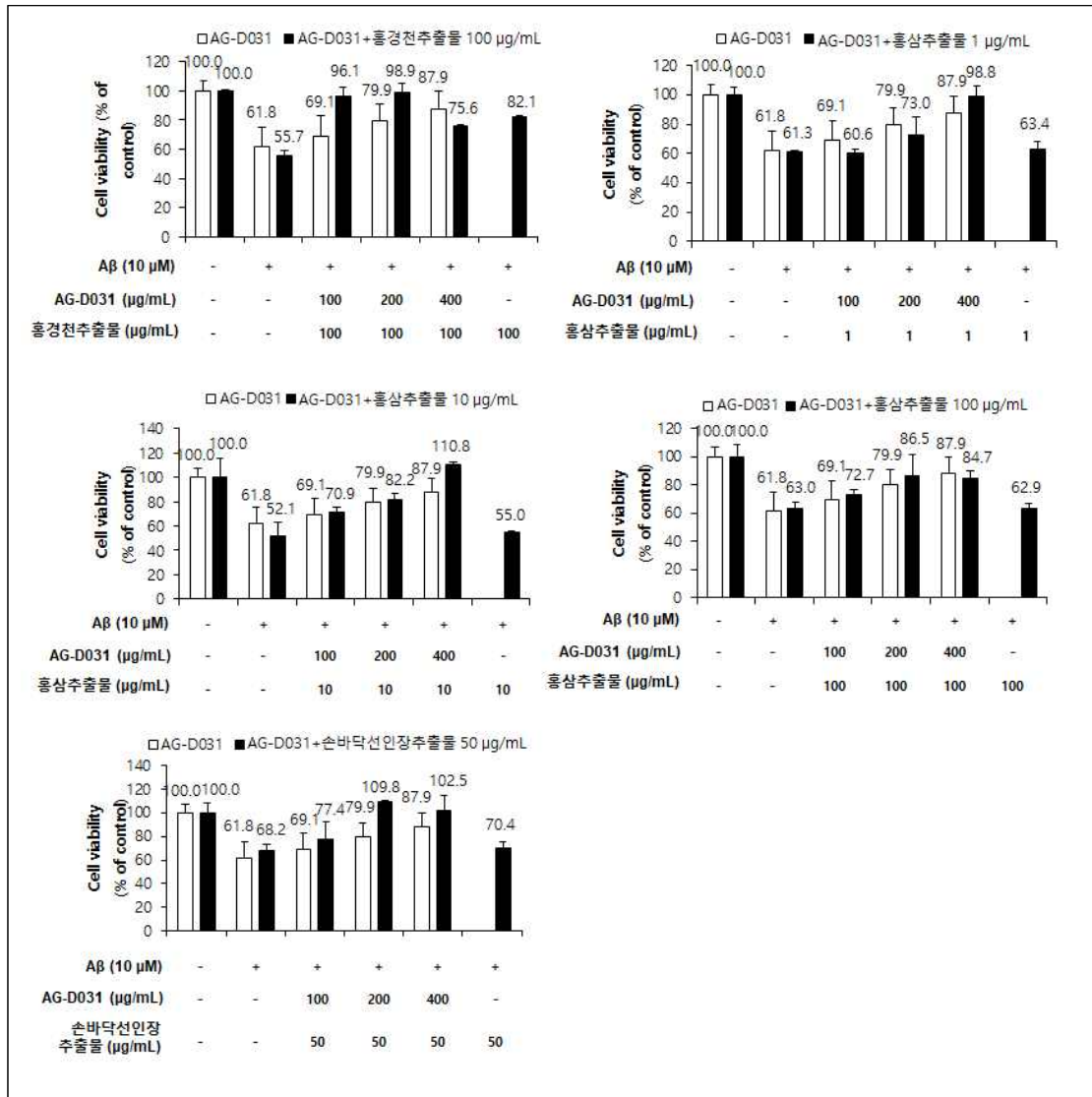


Fig. 39. 섬썩부쟁이 추출물(AG-D031) 및 천연물 추출물 혼합 처리군의 신경세포사멸 억제 효능

2. 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물과 Vitamin B 복합체 혼합물의 상승 효과 검증

가. 인지기능 및 기억력 개선 효능 확인(in vivo, 14일 투여)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 AChE 활성, ACh, APP 및 Aβ 농도를 측정하여 섬썩부쟁이 추출물과 VBC 혼합물의 상승 효과를 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil 및 scopolamine은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, ethanol, sodium hydroxide는 Duksan chemical(Seoul, Korea) 제품을 사용하였음. DTNB, ATC, sodium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였음. BCA protein

assay kit는 Thermo fisher scientific(Rockford, IL, USA) 제품을 사용하였음. ACh assay kit, mouse APP ELISA kit, mouse A β ELISA kit는 MyBioSource(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였음. Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters는 Millipore(Billerica, MA, USA) 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음. VBC는 고려은단 메가도스B를 사용함.

(나) 시험동물 및 사육환경

20 g \pm 20% 이내의 체중 범위에 있는 수컷 4주령의 ICR mouse를 선별하였으며 입수 후 7일 동안 사육실 환경에 순화시켜 본 실험에 사용하였음. 사육실 내의 온도 및 습도는 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, 50 \pm 10%로 유지하였으며 12시간 주기에 맞춰 조명을 설정하였음. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육상자, 깔개 및 물병은 주 1회 이상 교체하였음. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배한 후에 실험에 사용하였음.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14
G3	Y	AG-D042	10	10	D1 ~ D14
G4	Y	AG-D042	30	10	D1 ~ D14
G5	Y	Vitamin B complex	3	10	D1 ~ D14
G6	Y	Vitamin B complex	10	10	D1 ~ D14
G7	Y	Vitamin B complex	30	10	D1 ~ D14
G8	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	10 / 3	10	D1 ~ D14
G19	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	10 / 10	10	D1 ~ D14
G10	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	10 / 30	10	D1 ~ D14
G11	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	30 / 3	10	D1 ~ D14
G12	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	30 / 10	10	D1 ~ D14
G13	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	30 / 30	10	D1 ~ D14
G14	Y	DNZ	5	10	D14

Vehicle: 멸균주사용수

(3) 시험진행

(가) 시험방법

섬쑥부쟁이 추출물과 VBC는 경구투여를 통해 매 1회, 14일간 위 내에 직접 투여하였으며, DNZ(5 mg/kg)은 실험 마지막 날에만 경구투여하였음. 투여액량 산출은 투여 당일날 측정된 체중을 기준으로 산출하였음. Scopolamine(1 mg/kg)은 부

검을 시작하기 30분 전에 복강투여하였음. 투여 마지막 날 ICR mouse에 대하여 채혈을 실시한 후 heparin이 들어있는 튜브에 전혈을 수집하였고, 복대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈치사 후 brain을 적출하였음. 수집한 전혈은 원심분리하여 혈장을 채집한 후 Millipore Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters를 사용하여 농축시킨 뒤에 실험에 사용하였음.

(나) AChE 활성 평가

ICR mouse의 brain에 100 mM phosphate buffer(pH 8.0)을 넣고 파쇄하여 enzyme을 추출하였음. 100 mM phosphate buffer(pH 8.0) 650 μ L, 10 mM DTNB 25 μ L, enzyme extract 12.5 μ L를 넣어서 최종 용량 687.5 μ L로 만들고 상온에서 3분 동안 incubation 진행하였음. 이후, 7.5 mM ATC를 5 μ L 넣고 vortex한 후 96 well plate에 담아 412 nm 파장에서 10분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였음. AChE의 specific activity는 unit/mg protein으로 나타내며, 1 unit/mg protein은 1 mg protein이 ATC 존재 하에 1분 동안 DTNB를 TNB로 1 micromole 수화시킴을 의미함.

(다) ACh 농도 측정

농축한 혈장을 mouse ACh assay kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(assay buffer, choline oxidase, HRP, colorimetric probe, AChE)들과 함께 반응시킨 뒤에 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 ACh 농도를 계산하였음.

(라) APP 농도 측정

농축한 혈장을 mouse APP ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(detection reagent, assay diluent, TMB substrate, stop solution)들과 함께 반응시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 APP 농도를 계산하였음.

(마) A β 농도 측정

농축한 혈장을 mouse A β ELISA kit에 동봉된 microplate에 분주하여 시약(Biotinylated antibody, assay diluent, enzyme conjugate, color reagent)들과 함께 반응시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 A β 농도를 계산하였음.

(바) 통계처리

통계학적 분석은 t-test를 사용하며 유의성이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC의 혼합물에 의한 AChE 활성 억제 효능(in vivo, 14일 투여)

Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 VBC를 단독 및 혼합 투여하여 AChE 활성을 확인하였음

(Fig. 40). 유발대조군의 AChE 활성은 정상대조군에 비하여 유의하게 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물의 단독 투여시, 10, 30 mg/kg 투여군에서 AChE 활성이 유발대조군 대비 유의적으로 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). VBC의 단독 투여시에도 3, 10, 30 mg/kg 투여군에서 AChE 활성이 농도 의존적으로 감소하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물과 VBC의 혼합 투여시, 섬쭉부쟁이 추출물 10 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg의 혼합 투여군에서 AChE 활성이 섬쭉부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 22.1%, 33.0%, 37.7% 감소하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 29.8%, 18.0%, 11.0% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물 30 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 AChE 활성도 섬쭉부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 23.5%, 27.2%, 22.2% 감소하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 42.0%, 25.1%, 6.4% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). DNZ 투여군에서는 유발대조군 대비 AChE 활성이 약 65.7% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

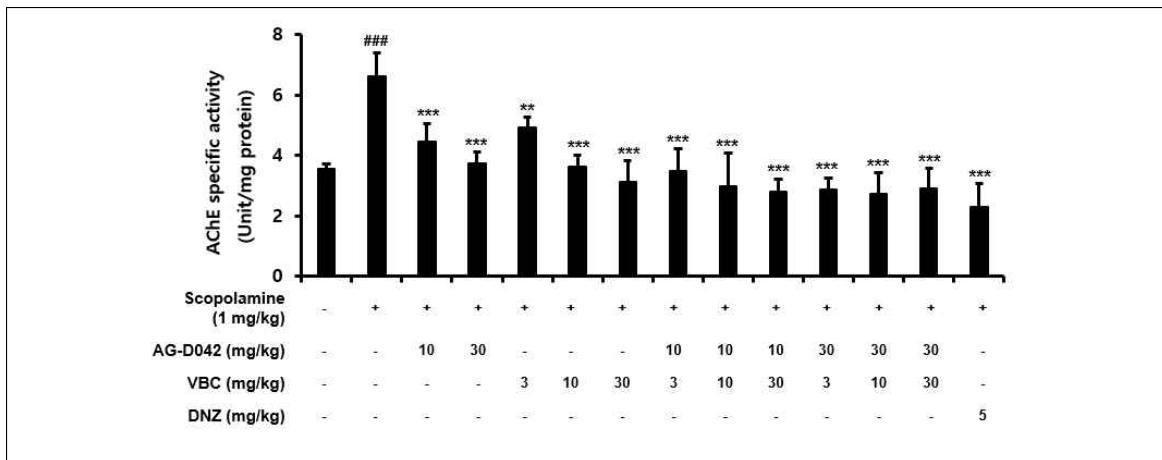


Fig. 40. 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042) 및 Vitamin B 복합체 혼합물에 의한 AChE 활성 억제 효능(in vivo, 14일)

(나) 섬쭉부쟁이 추출물과 VBC의 혼합물에 의한 ACh 농도 증가 효과(in vivo, 14일 투여) Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쭉부쟁이 추출물(AG-D042) 및 VBC를 단독 및 혼합 투여하여 혈장 ACh 농도 변화를 측정하였음(Fig. 41). 유발대조군의 ACh 농도는 정상대조군에 비하여 유의하게 감소하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쭉부쟁이 추출물의 단독 투여시, 10, 30 mg/kg 투여군에서 ACh 농도는 유발대조군 대비 유의적으로 증가하였고(유발대조군 대비 **P-value < 0.01), 모든 VBC 단독 투여군에서 ACh 농도는 농도 의존적으로 증가하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01). 섬쭉부쟁이 추출물과 VBC의 혼합 투여시, 섬쭉부쟁이 추출물 10 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 ACh 농도는 섬쭉부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 15.1%, 8.8%, 9.0% 증가하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 21.7%, 7.6%, 3.2% 증가하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **

P-value < 0.01). 섬쑥부쟁이 추출물 30 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 ACh 농도도 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 12.5%, 18.9%, 17.5% 증가하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 35.7%, 34.1%, 26.9% 증가하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). DNZ 투여군에서는 유발대조군 대비 ACh 농도가 약 108.6% 증가하였음(유발대조군 대비 * **P-value < 0.001).

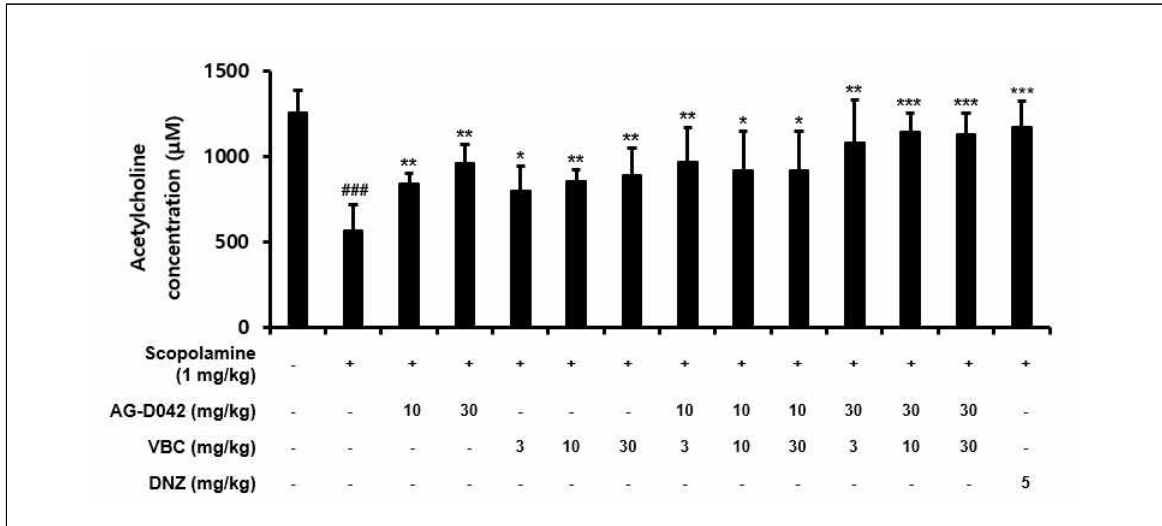


Fig. 41. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 Vitamin B 복합체 혼합물에 의한 ACh 농도 증가(in vivo, 14일)

(다) 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC의 혼합물에 의한 APP 농도 감소 효과(in vivo, 14일 투여) Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 VBC를 단독 및 혼합 투여하여 혈장 APP 농도 변화를 확인하였음(Fig. 42). 유발대조군의 APP 농도는 정상대조군에 비하여 유의하게 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물의 단독 투여시, 10, 30 mg/kg 투여군에서 APP 농도는 유발대조군 대비 유의하게 감소하였고(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001), 모든 VBC 단독 투여군에서도 APP 농도는 유발대조군 대비 유의하게 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC를 혼합 투여시, 섬쑥부쟁이 추출물 10 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 APP 농도는 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 15.9%, 12.0%, 12.4% 감소하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 17.1%, 14.5%, 12.5% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 30 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 APP 농도도 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 15.3%, 12.0%, 16.2% 감소하였으며, VBC 단독 투여군 대비 각각 18.5%, 14.5%, 13.3% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). DNZ 투여군에서는 APP 농도가 유발대조군 대비 약 47.3% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

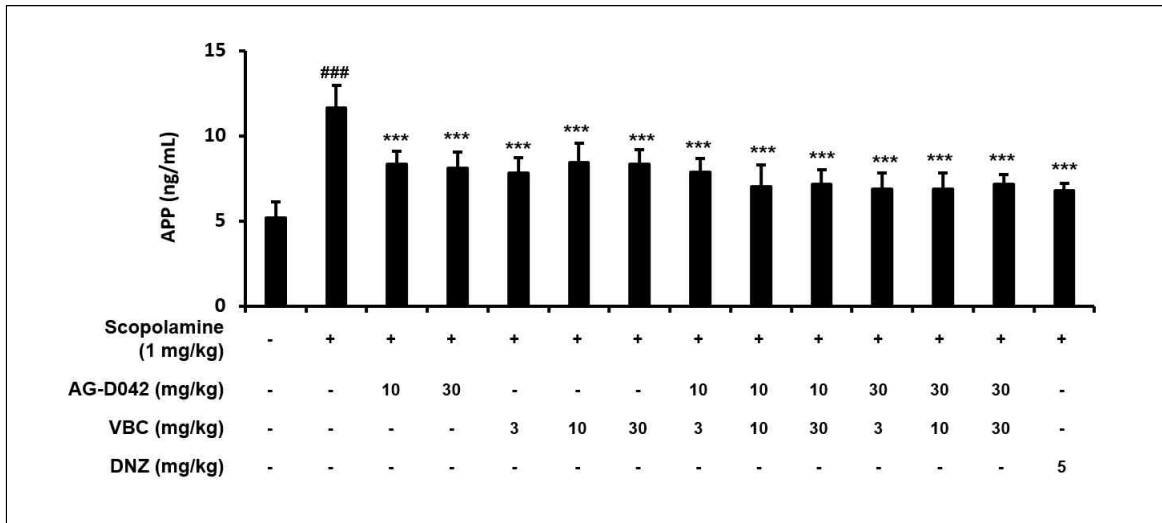


Fig. 42. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 Vitamin B 복합체 혼합물에 의한 APP 농도 감소(in vivo, 14일)

(라) 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC와의 혼합 투여에 의한 A β 농도 감소 효과(in vivo, 14일 투여)

Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 VBC를 단독 및 혼합 투여하여 혈장 A β 농도 변화를 측정하였음(Fig. 43). 유발대조군의 A β 농도는 정상대조군에 비하여 유의하게 증가하였음(정상대조군 대비 ###P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여시, 10, 30 mg/kg 투여군에서 A β 농도는 유발대조군 대비 유의하게 감소하였고(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001), 모든 VBC 단독 투여군에서도 A β 농도가 유발대조군 대비 유의하게 감소하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC를 혼합 투여시, 섬쑥부쟁이 추출물 10 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 A β 농도는 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 16.3%, 18.8%, 11.5% 감소하였으며, VBC 대비 각각 14.1%, 23.8%, 7.0% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). 섬쑥부쟁이 추출물 30 mg/kg 및 VBC 3, 10, 30 mg/kg 혼합 투여군에서 A β 농도도 섬쑥부쟁이 추출물 단독 투여군 대비 각각 15.2%, 14.4%, 10.3% 감소하였으며, VBC 대비 각각 13.3%, 19.9%, 5.9% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001). DNZ 투여군에서는 A β 농도가 유발대조군 대비 약 51.6% 감소하였음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

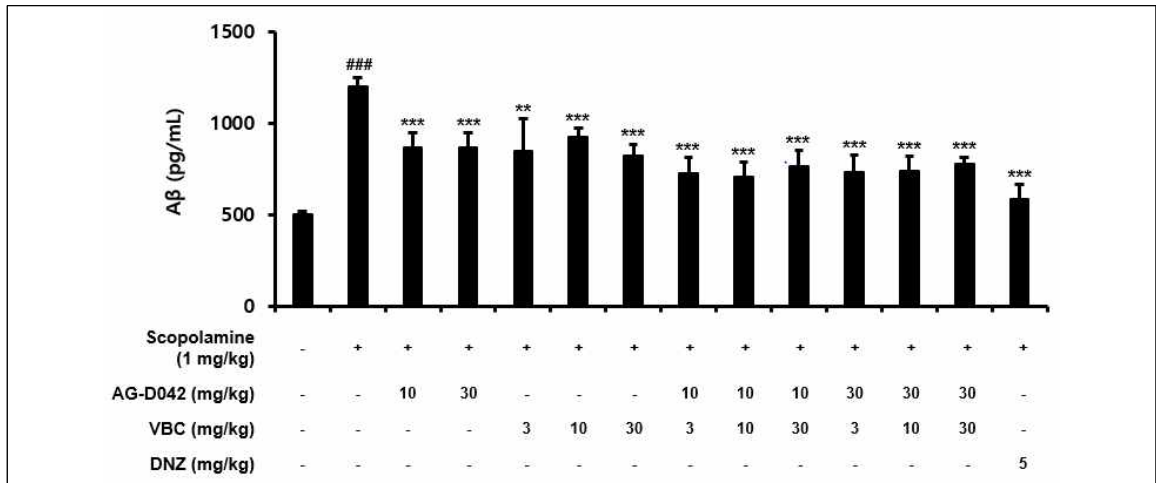


Fig. 43. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 Vitamin B 복합체 혼합물에 의한 Aβ 농도 감소(in vivo, 14일)

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC 각각의 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가, APP 및 Aβ 감소를 통한 인지기능 및 기억력 개선 효능 뿐만 아니라 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC 혼합물에 의한 상승 효과를 확인함.

나. 인지기능 및 기억력 개선 효능 기전 확인(in vivo, 14일 투여)

(1) 시험목적

인지기능 및 기억력 손상을 유도한 ICR mouse에서 기억 관련 신호전달 인자들의 단백질 발현을 확인하여 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC 혼합물의 14일간의 투여에 의한 상승 효과에 대한 기전을 확인하고자 함.

(2) 재료 및 방법

(가) 시약 및 재료

Donepezil 및 scopolamine은 위와 동일한 제품을 사용하였음. BDNF 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)의 제품을 사용하였으며, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였음. β-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)의 제품을 사용하였음. 섬쑥부쟁이 추출물은 SK바이오랜드(Ansan, Korea)에서 제공받아 사용하였음. VBC는 고려은단 메가도스B를 사용함.

(나) 시험동물 및 사육환경

위와 동일한 시험동물 사용 및 사육환경을 적용하여 시험을 진행함.

(다) 시험군 구성

군	Scopolamine 투여여부	투여물질	투여량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여기간
G1	N	Vehicle	-	10	D1 ~ D14
G2	Y	Vehicle	-	10	D1 ~ D14

G3	Y	AG-D042	10	10	D1 ~ D14
G4	Y	AG-D042	30	10	D1 ~ D14
G5	Y	AG-D042	100	10	D1 ~ D14
G6	Y	Vitamin B complex	3	10	D1 ~ D14
G7	Y	Vitamin B complex	10	10	D1 ~ D14
G8	Y	Vitamin B complex	30	10	D1 ~ D14
G9	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	10 / 3	10	D1 ~ D14
G10	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	30 / 3	10	D1 ~ D14
G11	Y	AG-D042 / Vitamin B complex	100 / 3	10	D1 ~ D14
G12	Y	DNZ	5	10	D1 ~ D14
Vehicle: 멸균주사용수					

(3) 시험진행

(가) 시험방법

위와 동일한 시험방법으로 시험을 진행함.

(나) 기억 관련 신호전달 인자의 단백질 발현 확인(western blotting)

적출한 whole brain을 균질화한 후, western blotting을 진행하였음. 이전에 진행했던 실험결과를 바탕으로 VBC 투여농도를 고정하고 섬쑥부쟁이 추출물 투여농도를 달리하여 혼합 투여한 실험군을 선별하였음.

(다) 통계처리

위와 동일한 통계처리 방법으로 분석하였음.

(4) 연구결과

(가) 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC의 혼합물에 의한 BDNF, p-CREB, p-ERK의 단백질 발현 증가(in vivo, 14일 투여)

Scopolamine으로 인지기능 및 기억력 손상을 유발한 ICR mouse에 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 VBC를 단독 및 혼합 투여하여 BDNF, p-CREB, p-ERK의 단백질 발현 변화를 western blotting으로 확인하였음(Fig. 44). 유발대조군의 BDNF, p-CREB, p-ERK 단백질 발현이 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하였음(정상대조군 대비 #P-value < 0.05, ##P-value < 0.01, ###P-value < 0.001). BDNF의 경우, 섬쑥부쟁이 추출물 100 mg/kg 단독 투여군과 VBC 3 mg/kg 단독 투여군의 단백질 발현이 유발대조군에 비해 유의하게 증가하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05). 섬쑥부쟁이 추출물 10 mg/kg 및 VBC 3 mg/kg 혼합 투여시, 각각의 단독 투여군 대비 BDNF 발현이 증가하여 상승 효과를 나타냄(유발대조군 대비 **P-value < 0.01). p-CREB의 경우, 섬쑥부쟁이 추출물 100 mg/kg 단독 투여군과 VBC 3, 10, 30 mg/kg 단독 투여군의 단백질 발현이 유발대조군에 비해 유의하게 증가하였음(유발대조군 대비 *P-value < 0.05, **P-value < 0.01).

e < 0.01). 또한 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 및 VBC 3 mg/kg 혼합 투여시, 각각의 단독 투여군 대비 p-CREB 단백질 발현이 증가하여 상승 효과를 나타냄(유발대조군 대비 **P-value < 0.01). p-ERK의 경우, 섬쑥부쟁이 추출물 100 mg/kg 단독 투여군과 VBC 10, 30 mg/kg 단독 투여군의 단백질 발현이 유발대조군에 비해 유의하게 증가하였음(유발대조군 대비 **P-value < 0.01, ***P-value < 0.001). 또한 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 및 VBC 3 mg/kg 혼합 투여시, 각각의 단독 투여군 대비 p-ERK 단백질 발현이 증가하여 상승 효과를 나타내었음(유발대조군 대비 ***P-value < 0.001).

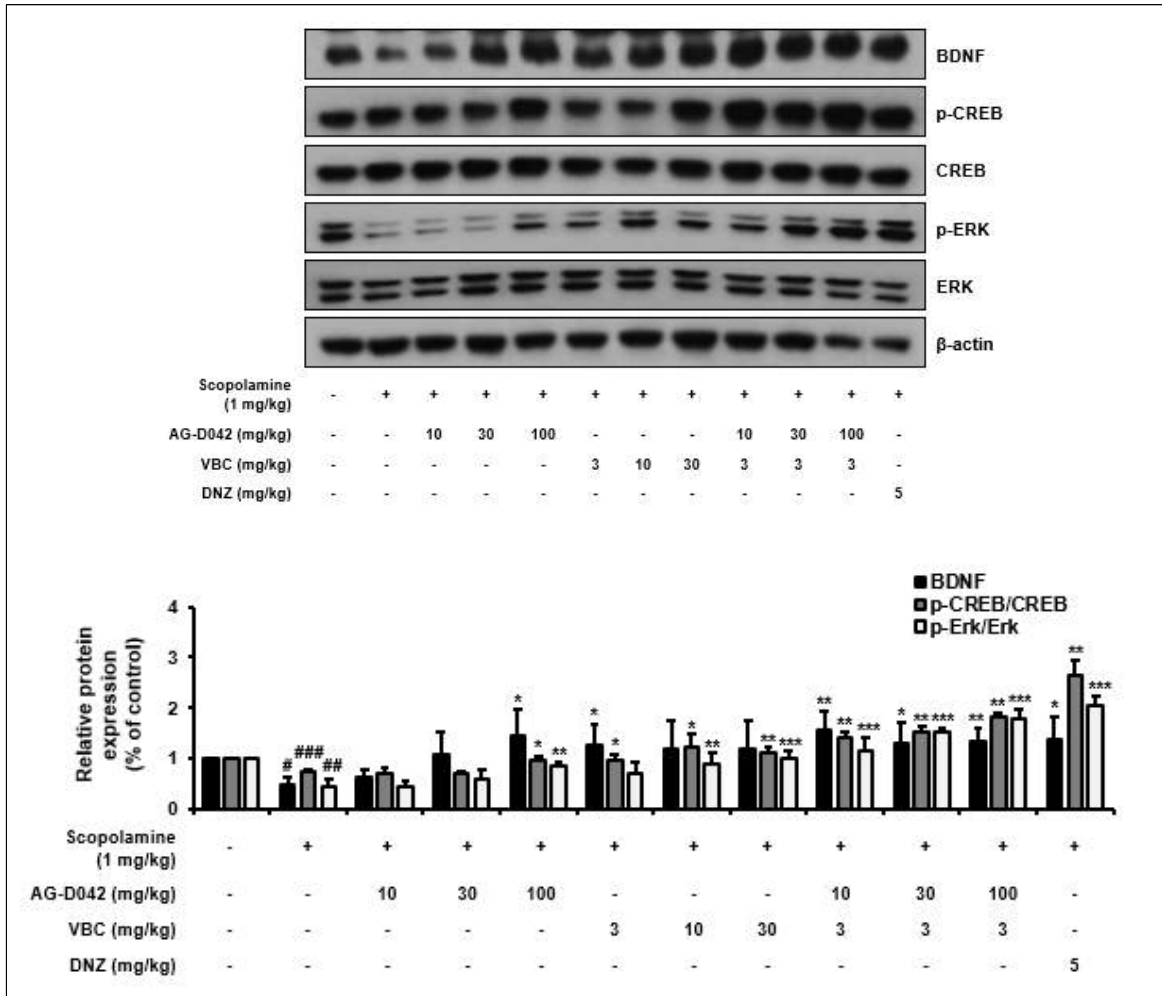


Fig. 44. 섬쑥부쟁이 추출물(AG-D042) 및 Vitamin B 복합체 혼합물에 의한 BDNF, p-CREB, p-ERK 단백질 발현 변화(in vivo, 14일)

▶ 이를 통해 섬쑥부쟁이 추출물과 VBC 혼합물의 인지기능 및 기억력 개선 효능에 대한 기전을 확인함.

7절 제품의 표준화

1. 제품화를 위한 제형 및 제제 연구

상승 효과가 있는 원료로 판단되는 Vitamin B complex를 혼합하여 제품의 표준화를 진행하였음. Vitamin B complex는 다양한 기능성 원료 중 자사에서 지속적으로 판매되고 있어 제품 개발 및 마케팅에 용이하여 제품 판매에 도움이 될 것으로 판단함.

가. 제형별 배합비 설정 및 시제품 제조

(1) 선정된 상승 효과 원료 이용 제형별 배합비 설정

배합비					
제품명	원재료명(단위)		비율		
내용량	g	2000 mg	비율		
제형	중량	표준중량			
1일 섭취량	1일 2회	배합량	2회	500	1g 팩트
시제품 호					
종류	성분명	배합비 (%)	제품 중량 (g)	비율	비율(배합비)
1	삼투투입액	48.4715	482.024	1.969199	
2	비타민 B12(1000)	1.1000	8.360	0.003400	
3	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
4	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
6	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
7	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
8	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
9	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
10	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
11	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
12	비타민 B12(1000)	1.4000	10.920	0.004000	
13	비타민 B12(1000)	1.0000	7.800	0.003000	
14		-	-	-	-
15		-	-	-	-
합 계	190.0000	860.0000	2.176.864		
도트 단량상자					

나정

배합비					
제품명	원재료명(단위)		비율		
내용량	g	2000 mg	비율		
제형	중량	표준중량			
1일 섭취량	1회 2회	배합량	2회	500	1g 팩트
시제품 호					
종류	성분명	배합비 (%)	제품 중량 (g)	비율	비율(배합비)
1	삼투투입액	48.4715	482.024	1.969199	
2	비타민 B12(1000)	1.1000	8.360	0.003400	
3	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
4	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
6	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
7	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
8	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
9	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
10	비타민 B12(1000)	0.3710	2.914	0.001200	
11	비타민 B12(1000)	0.8800	6.880	0.002800	
12	비타민 B12(1000)	1.4000	10.920	0.004000	
13	비타민 B12(1000)	1.0000	7.800	0.003000	
14		-	-	-	-
15		-	-	-	-
합 계	190.0000	860.0000	2.176.864		
도트 단량상자					

코팅정

배합비					
제품명	원재료명(단위)		비율		
내용량	g	2000 mg	비율		
제형	중량	표준중량			
1일 섭취량	1회 4회분	배합량	2회	400	1g 팩트
시제품 호					
종류	성분명	배합비 (%)	제품 중량 (g)	비율	비율(배합비)
1	삼투투입액	48.0000	340.000	1.620000	
2	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
3	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
6	비타민 B12(1000)	0.7500	5.400	0.002500	
7	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
8	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
9	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
10	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
11	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
12	비타민 B12(1000)	1.0000	7.400	0.003000	
13	비타민 B12(1000)	1.0000	7.400	0.003000	
14		-	-	-	-
15		-	-	-	-
합 계	190.0000	400.0000	600.000		
도트 단량상자					

캡슐

배합비					
제품명	원재료명(단위)		비율		
내용량	g	2000 mg	비율		
제형	중량	표준중량			
1일 섭취량	1회 1회	배합량	2회	400	1g 팩트
시제품 호					
종류	성분명	배합비 (%)	제품 중량 (g)	비율	비율(배합비)
1	삼투투입액	48.0000	340.000	1.620000	
2	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
3	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
4	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
6	비타민 B12(1000)	0.7500	5.400	0.002500	
7	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
8	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
9	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
10	비타민 B12(1000)	0.3710	2.728	0.001300	
11	비타민 B12(1000)	0.8800	6.224	0.002900	
12	비타민 B12(1000)	1.0000	7.400	0.003000	
13	비타민 B12(1000)	1.0000	7.400	0.003000	
14		-	-	-	-
15		-	-	-	-
합 계	190.0000	400.0000	600.000		
도트 단량상자					

분말

(2) 시제품 제작

제형 연구를 위해 확립된 배합비를 바탕으로 다양한 제형(나정, 코팅정, 캡슐, 분말)의 시제품을 제작하였음.

(3) 제형 연구를 통해 최종 제품 제형 선정

제형	제형별 특징
나정	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물의 맛, 향 등으로 인한 섭취불편감 • 섬썩부쟁이 추출물 고유의 맛과 향이 강해 향료 또는 맛 성분 추가로 마스킹이 어려움
코팅정	<ul style="list-style-type: none"> • 코팅공정을 통한 섬썩부쟁이 추출물의 맛, 향 등 마스킹을 통한 섭취불편감 개선 가능
캡슐	<ul style="list-style-type: none"> • 캡슐화를 통한 섬썩부쟁이 추출물의 맛, 향 등 마스킹을 통한 섭취불편감 개선 가능 • 일반적으로 사용되는 캡슐(젤라틴)이 습기에 취약하여 안정성에 영향을 줄 수 있음
분말	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물의 맛, 향 등으로 인한 섭취불편감 • 섬썩부쟁이 추출물 고유의 맛과 향이 강해 향료 또는 맛 성분 추가로 마스킹이 어려움



▶ 제형 연구 및 검토를 통해 섭취 용이성과 제품 안정성이 우수한 “코팅정” 을 최종 제품 제형으로 선정함.

(4) 최종 제형에 따른 배합비 및 제조공정 확립

(가) 배합비 확립(코팅정)

- 1일 섭취량 : 1일 2회, 1회 1정
- 중량 : 1정 850 mg

(5) 보관방법 및 포장방법 설정

(가) 포장방법

원료 특성을 고려하여 온도와 습도의 영향을 최소화할 수 있는 포장방법을 설정함. 제품의 안정성을 최대화하기 위해 3단계 포장 실시 예정임.

포장	예시
[1단계 : PTP] 재질 : 염화비닐수지(PVC), 알루미늄(AL)	
[2단계 : 필로백] 재질 : 폴리에틸렌(PE)	
[3단계 : 케이스] 재질 : 종이	

(나) 보관방법

안정성 시험 및 유통기한 설정 시험을 통해 실온에서 유통기한까지 보관 가능함을 확인함.

	내용
보관방법	<ul style="list-style-type: none"> 직사광선을 피하고 습기가 적은 서늘한 곳에 보관 변색 및 변질가능성이 있어 습기가 많은 곳이나 햇빛, 열 등의 노출 피하여 보관

2. 제품의 기준 및 시험법 설정

가. 제품의 지표 성분 함량 시험법 밸리데이션 실시(3,5-DCQA)

의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서(식품의약품안전평가원)에 따라 시험법 밸리데이션을 수행하였음.

(1) 제품의 시험법 밸리데이션 실시 항목 및 기준

No.	항목	기준	
1	시스템적합성	피크면적에 대한 상대표준편차 2.0% 이하 피크유지시간에 대한 상대표준편차 1.0% 이하	
2	특이성	3,5-Dicaffeoylquinic acid 검출시간에 영향을 주는 인자가 없어야 한다.	
3	직선성	상관계수(R^2) = 0.995 이상	
4	정확성	회수율 평균 $100 \pm 5.0\%$	
5	범위	직선성 범위인 50 ~ 150%	
6	정밀성	반복성	상대표준편차 5.0% 이하
		실험실내정밀성	상대표준편차 5.0% 이하
7	정량한계	최소 범위 이하	
8	검출한계	최소 범위 이하	

(2) 제품 시험법 밸리데이션 결과

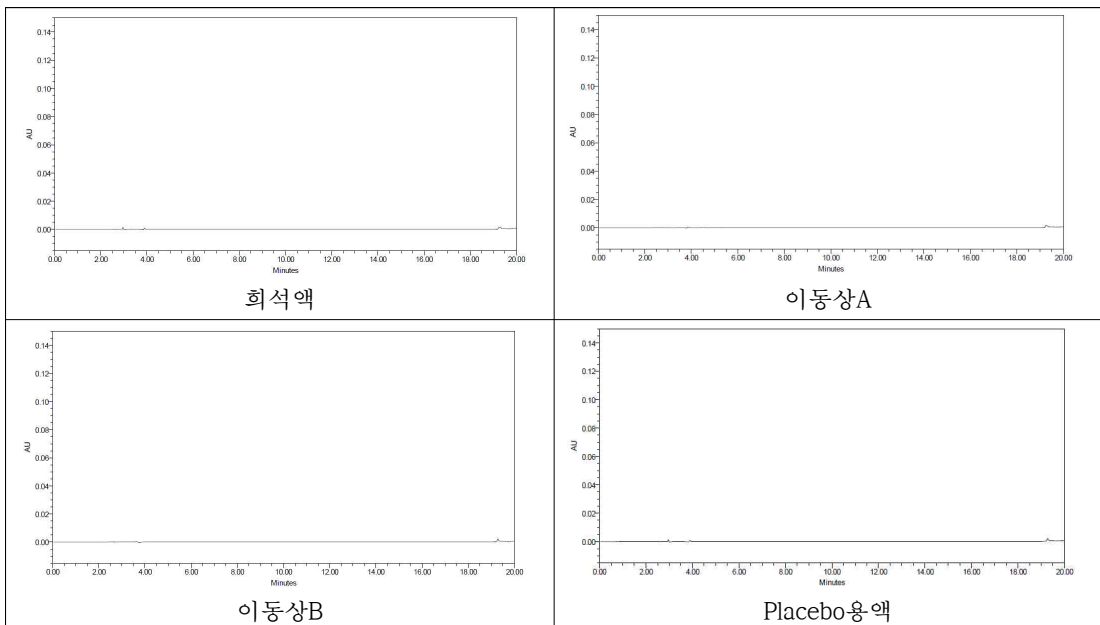
(가) 시스템적합성

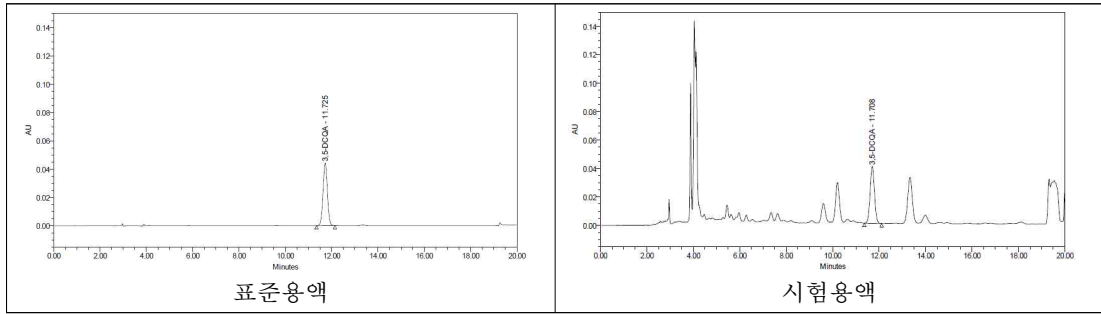
3,5-DCQA 표준품을 이용하여 제조한 24 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 표준액을 6회 반복 주입하였을 때 피크면적의 상대표준편차 0.32%, 피크유지시간의 상대표준편차 0.09%로 측정됨.

	피크면적	피크유지시간
1	573612	11.692
2	568354	11.711
3	569228	11.701
4	569915	11.701
5	569460	11.702
6	570091	11.693
평균	570110	11.700
표준편차	1821.34	0.01
상대표준편차	0.32	0.09

(나) 특이성

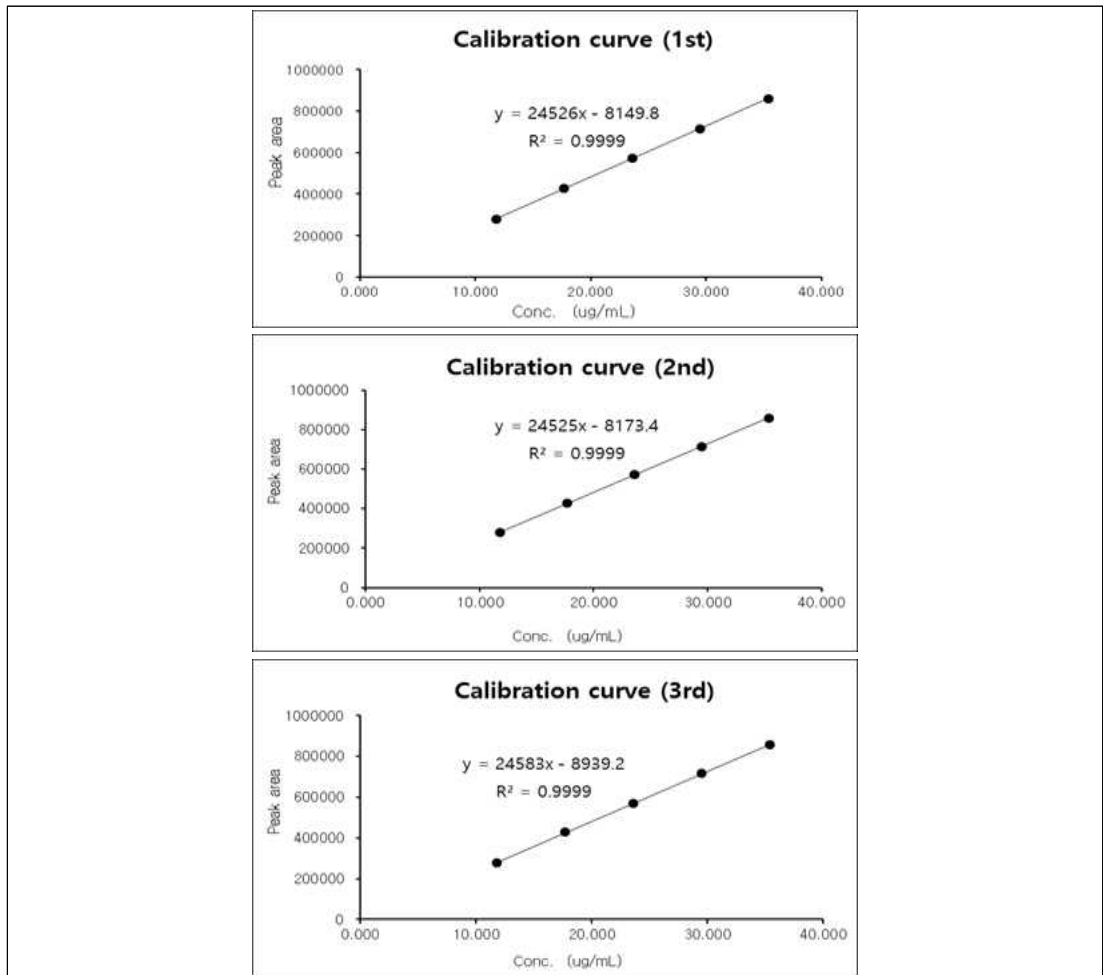
회석액, 이동상, Placebo 용액을 분석하였을 때 3,5-DCQA 피크에 영향을 주는 인자가 없음을 확인하였고, 표준용액과 시험용액을 분석하였을 때 지표성분에 대한 머무름 시간이 일치함을 확인함.





(다) 직선성

50, 75, 100, 125, 150% 범위로 하여 3회 calibration curve를 측정하여 상관계수를 확인하였을 때 R^2 값이 0.9999로 우수한 직선성을 나타내었음.



(라) 정확성

75, 100, 125% 범위의 회수율을 측정하였을 때 농도별 회수율 평균값이 각각 101.0, 100.0, 100.2%로 우수한 결과를 보였음.

구분	75%	100%	125%
1	101.0	100.0	100.1
2	101.0	100.0	100.2

3	100.9	100.1	100.3
평균값	101.0	100.0	100.2
표준편차	0.06	0.08	0.13
전체 평균회수율(%)	100.42		
회수율 구간	100.0 ~ 101.0		

(마) 정밀성

① 반복성

75, 100, 125% 범위에서 피크 면적의 상대표준편차를 확인하였을 때 각각 0.06, 0.08, 0.13%로 기준에 적합하였음.

② 실험실내 정밀성

다른 분석일, 다른 분석자로 시험한 결과, 75, 100, 125% 범위에서 피크 면적의 상대표준편차가 각각 0.28, 0.22, 0.10%로 기준에 적합하였음.

(바) 정량한계 및 검출한계

직선성의 calibration curve로부터 표준편차(σ)와 기울기(S)가 각각 449.1026, 24545.010로 측정되었음. 이를 이용하여 정량한계와 검출한계를 구하였을 때, 각각 0.183, 0.060 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인됨.

▶ 모든 밸리데이션 항목이 기준에 적합하였으므로 해당 분석법을 섬썩B 제품의 3,5-DCQA 함량 시험법으로 선정하였음.

(3) 제품 시험법 밸리데이션 결과

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 100px; margin: 0 auto;"> <p>섬썩B</p> <p>시험법 밸리데이션 보고서</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">고려은단</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">고려은단</td> <td style="text-align: center;"> <table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>2 of 15</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">목적</td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 목적 3 2. 적용범위 3 3. 관련 규정 3 4. 책임 4 5. 시험 방법 4 6. 밸리데이션 실시항목 및 기준 6 7. 밸리데이션 실시항목별 시험방법 7 8. 밸리데이션 결과 10 9. 첨부문서 15 </td> </tr> </table>	고려은단	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>2 of 15</td></tr> </table>	분석번호	IN 2024-2024	주 소 부	202404200002	주 소 명	고려은단	제 목	시험법	제 목 기	2 of 15	목적		<ol style="list-style-type: none"> 1. 목적 3 2. 적용범위 3 3. 관련 규정 3 4. 책임 4 5. 시험 방법 4 6. 밸리데이션 실시항목 및 기준 6 7. 밸리데이션 실시항목별 시험방법 7 8. 밸리데이션 결과 10 9. 첨부문서 15 		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">고려은단</td> <td style="text-align: center;"> <table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>3 of 15</td></tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2"> <p>1. 목적</p> <p>섬썩B의 주요 성분인 3,5-Dichloroquinic acid의 분석법을 확립하고 일정 분석량을 검출하여 기능성용료 안정성을 위한 자료로 사용가능한 용존 추출물을 취급하기 위함이다. 목적이 있다.</p> <p>2. 적용범위</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>적용사항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>시스템적용성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>축적성</td><td><input checked="" type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>직접성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>변위</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정확성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정밀성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>안정성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>검출한계</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> </tbody> </table> <p>3. 관련 규정</p> <p>3.1. 내·외약용시 제4차개정, 식품의약품안전청, 2009</p> <p>3.2. 약사전 시험규격(별표)의 약용 제조 및 용출기준(제2부 부속 제44호, 보건복지부령 제77호 (실시규정, 2008.12.01))</p> <p>3.3. 약약품용 밸리데이션 실시에 관한 규정, 식품의약품안전청 고시 제2009-10호, 2009</p> <p>3.4. 약약품용 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 예시(시약명, 2008.12)</p> </td> </tr> </table>	고려은단	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>3 of 15</td></tr> </table>	분석번호	IN 2024-2024	주 소 부	202404200002	주 소 명	고려은단	제 목	시험법	제 목 기	3 of 15	<p>1. 목적</p> <p>섬썩B의 주요 성분인 3,5-Dichloroquinic acid의 분석법을 확립하고 일정 분석량을 검출하여 기능성용료 안정성을 위한 자료로 사용가능한 용존 추출물을 취급하기 위함이다. 목적이 있다.</p> <p>2. 적용범위</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>적용사항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>시스템적용성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>축적성</td><td><input checked="" type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>직접성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>변위</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정확성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정밀성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>안정성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>검출한계</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> </tbody> </table> <p>3. 관련 규정</p> <p>3.1. 내·외약용시 제4차개정, 식품의약품안전청, 2009</p> <p>3.2. 약사전 시험규격(별표)의 약용 제조 및 용출기준(제2부 부속 제44호, 보건복지부령 제77호 (실시규정, 2008.12.01))</p> <p>3.3. 약약품용 밸리데이션 실시에 관한 규정, 식품의약품안전청 고시 제2009-10호, 2009</p> <p>3.4. 약약품용 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 예시(시약명, 2008.12)</p>		구분	적용사항	시스템적용성	<input type="checkbox"/>	축적성	<input checked="" type="checkbox"/>	직접성	<input type="checkbox"/>	변위	<input type="checkbox"/>	정확성	<input type="checkbox"/>	정밀성	<input type="checkbox"/>	안정성	<input type="checkbox"/>	검출한계	<input type="checkbox"/>
고려은단	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>2 of 15</td></tr> </table>	분석번호	IN 2024-2024	주 소 부	202404200002	주 소 명	고려은단	제 목	시험법	제 목 기	2 of 15																																							
분석번호	IN 2024-2024																																																	
주 소 부	202404200002																																																	
주 소 명	고려은단																																																	
제 목	시험법																																																	
제 목 기	2 of 15																																																	
목적																																																		
<ol style="list-style-type: none"> 1. 목적 3 2. 적용범위 3 3. 관련 규정 3 4. 책임 4 5. 시험 방법 4 6. 밸리데이션 실시항목 및 기준 6 7. 밸리데이션 실시항목별 시험방법 7 8. 밸리데이션 결과 10 9. 첨부문서 15 																																																		
고려은단	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>분석번호</td><td>IN 2024-2024</td></tr> <tr><td>주 소 부</td><td>202404200002</td></tr> <tr><td>주 소 명</td><td>고려은단</td></tr> <tr><td>제 목</td><td>시험법</td></tr> <tr><td>제 목 기</td><td>3 of 15</td></tr> </table>	분석번호	IN 2024-2024	주 소 부	202404200002	주 소 명	고려은단	제 목	시험법	제 목 기	3 of 15																																							
분석번호	IN 2024-2024																																																	
주 소 부	202404200002																																																	
주 소 명	고려은단																																																	
제 목	시험법																																																	
제 목 기	3 of 15																																																	
<p>1. 목적</p> <p>섬썩B의 주요 성분인 3,5-Dichloroquinic acid의 분석법을 확립하고 일정 분석량을 검출하여 기능성용료 안정성을 위한 자료로 사용가능한 용존 추출물을 취급하기 위함이다. 목적이 있다.</p> <p>2. 적용범위</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>적용사항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>시스템적용성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>축적성</td><td><input checked="" type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>직접성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>변위</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정확성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>정밀성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>안정성</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> <tr><td>검출한계</td><td><input type="checkbox"/></td></tr> </tbody> </table> <p>3. 관련 규정</p> <p>3.1. 내·외약용시 제4차개정, 식품의약품안전청, 2009</p> <p>3.2. 약사전 시험규격(별표)의 약용 제조 및 용출기준(제2부 부속 제44호, 보건복지부령 제77호 (실시규정, 2008.12.01))</p> <p>3.3. 약약품용 밸리데이션 실시에 관한 규정, 식품의약품안전청 고시 제2009-10호, 2009</p> <p>3.4. 약약품용 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 예시(시약명, 2008.12)</p>		구분	적용사항	시스템적용성	<input type="checkbox"/>	축적성	<input checked="" type="checkbox"/>	직접성	<input type="checkbox"/>	변위	<input type="checkbox"/>	정확성	<input type="checkbox"/>	정밀성	<input type="checkbox"/>	안정성	<input type="checkbox"/>	검출한계	<input type="checkbox"/>																															
구분	적용사항																																																	
시스템적용성	<input type="checkbox"/>																																																	
축적성	<input checked="" type="checkbox"/>																																																	
직접성	<input type="checkbox"/>																																																	
변위	<input type="checkbox"/>																																																	
정확성	<input type="checkbox"/>																																																	
정밀성	<input type="checkbox"/>																																																	
안정성	<input type="checkbox"/>																																																	
검출한계	<input type="checkbox"/>																																																	

시험일지		시험일지		시험일지	
1. 표준용액의 조제	1.1. 1000배 희석용액(100 µg/ml)은 0.1M 인산나트륨용액에 녹여 표준용액(100 µg/ml)을 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.	1. 표준용액의 조제	1.1. 1000배 희석용액(100 µg/ml)은 0.1M 인산나트륨용액에 녹여 표준용액(100 µg/ml)을 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.	1. 표준용액의 조제	1.1. 1000배 희석용액(100 µg/ml)은 0.1M 인산나트륨용액에 녹여 표준용액(100 µg/ml)을 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.
2. 시험용액의 조제	2.1. 10배 희석용액(10 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.2. 100배 희석용액(1 µg/ml)은 10배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.3. 1000배 희석용액(0.1 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.	2. 시험용액의 조제	2.1. 10배 희석용액(10 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.2. 100배 희석용액(1 µg/ml)은 10배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.3. 1000배 희석용액(0.1 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.	2. 시험용액의 조제	2.1. 10배 희석용액(10 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.2. 100배 희석용액(1 µg/ml)은 10배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다. 2.3. 1000배 희석용액(0.1 µg/ml)은 100배 희석용액의 용액 총 용량이 10ml가 되도록 배정한다.
3. 측정시험	3.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	3. 측정시험	3.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	3. 측정시험	3.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.
4. 계산	4.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	4. 계산	4.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	4. 계산	4.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.
5. 대량검출	5.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	5. 대량검출	5.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.	5. 대량검출	5.1. HPLC를 이용하여 100배 희석용액에 대한 분석한다. 분석방법, 표준용액, 시험용액, 검출기 조건은 각각의 시험일지에 기재한다.

(나) 제품 시험성적서

시험성적서			
제품명	위약	규격	명사/단식
제품번호		시험번호	
시험방법	시험기준		
1. 상용	비색의 광학용 코팅 방법	시험결과	시험자
2. 안정시험			
3. 3.5-DOA	표시량(2.304mg/1.7g)의 80~120%		
4. 나리안	표시량(1.590mg/1.7g)의 80~150%		
5. 바티판타	표시량(1.154mg/1.7g)의 80~180%		
6. 바티판타2	표시량(1.380mg/1.7g)의 80~150%		
7. 바티판타3	표시량(1.046mg/1.7g)의 80~180%		
8. 바티판타4	표시량(1.282mg/1.7g)의 80~180%		
9. 바티판타5	표시량(1.770mg/1.7g)의 80~150%		
10. 바티판타6	표시량(1.421mg/1.7g)의 80~150%		
11. 바티판타7	표시량(88.41mg/1.7g)의 80~180%		
12. 바티판타8	60분 이내		
13. 대량검출	정상		
합계	합계	합계	합계

3. 제품의 안정성(stability) 시험

가. 유통기한 설정근거 마련

(1) 저장조건 및 시험조건 설정

구분	시험 조건
저장온도	15, 25, 35°C
저장기간	6개월(2020.05.07 ~ 2020.11.07)
실험주기	1개월 간격
시험방법	자사 섬속B 정량 시험법(별규)에 따름

(2) Protocol 확립

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p>섬숙B</p> <p>유통기한 설정 시험계획서</p> </div> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">고려은단</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">고려은단</td> <td style="width: 30%;">섬숙B Expiry date Protocol</td> <td style="width: 50%; font-size: 8px;"> 문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26 </td> </tr> </table> <p>1. 목적</p> <p>1.1. 본 시험은 섬숙B 제품의 안정성시험 결과에 바탕으로 유통기한을 설정하고 우수한 품질로써 제품을 관리하기 위함이다.</p> <p>2. 시험 개요</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 8px;"> <tr><td>종류</td><td>섬숙B</td></tr> <tr><td>용량</td><td>100g/개/박스</td></tr> <tr><td>성상</td><td>백색의 정방형 초콜릿</td></tr> <tr><td>주요재료</td><td>식물성지방, 우유분말</td></tr> <tr><td>인대재료</td><td>비타민D, 비학산성, 비학염산, 인공색소</td></tr> <tr><td>제조장소</td><td>비학염산, 염산, 비학염, 100%인산</td></tr> <tr><td>포장 및 유통상태</td><td>20g/팩/팩/박스/목장</td></tr> <tr><td>포장재</td><td>실은</td></tr> <tr><td>포장재 사용여부</td><td>-</td></tr> <tr><td>유통/용처</td><td>-</td></tr> <tr><td>실용 또는 불용 방법</td><td>-</td></tr> </table> <p>3. 관련 규정</p> <p>3.1. 식품, 의약품시험·측정법 및 인공기능성물의 유통기한 설정 기준</p> <p>3.2. 식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인</p> <p>4. 시험 방법</p>	고려은단	섬숙B Expiry date Protocol	문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26	종류	섬숙B	용량	100g/개/박스	성상	백색의 정방형 초콜릿	주요재료	식물성지방, 우유분말	인대재료	비타민D, 비학산성, 비학염산, 인공색소	제조장소	비학염산, 염산, 비학염, 100%인산	포장 및 유통상태	20g/팩/팩/박스/목장	포장재	실은	포장재 사용여부	-	유통/용처	-	실용 또는 불용 방법	-	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">고려은단</td> <td style="width: 30%;">섬숙B Expiry date Protocol</td> <td style="width: 50%; font-size: 8px;"> 문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26 </td> </tr> </table> <p>4.1. 시험조건</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: 8px;"> <tr><td>구분</td><td>시험 조건</td></tr> <tr><td>저장온도</td><td>15, 25, 35 °C</td></tr> <tr><td>저장기간</td><td>0개월(2020.05.07 ~ 2020.11.07)</td></tr> <tr><td>실험주기</td><td>1개월 간격</td></tr> <tr><td>시험방법</td><td>자사 섬유용량 시험방법(별첨)에 적용</td></tr> </table> <p>도 시험결과를 기록 및 조치</p> <p>5.1. 각 시험 주기에 따라 시험 후 결과를 기록하고 계획된 시험에 종료되면 보고서를 작성하여 유통기한을 설정한다.</p>	고려은단	섬숙B Expiry date Protocol	문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26	구분	시험 조건	저장온도	15, 25, 35 °C	저장기간	0개월(2020.05.07 ~ 2020.11.07)	실험주기	1개월 간격	시험방법	자사 섬유용량 시험방법(별첨)에 적용
고려은단	섬숙B Expiry date Protocol	문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26																																						
종류	섬숙B																																							
용량	100g/개/박스																																							
성상	백색의 정방형 초콜릿																																							
주요재료	식물성지방, 우유분말																																							
인대재료	비타민D, 비학산성, 비학염산, 인공색소																																							
제조장소	비학염산, 염산, 비학염, 100%인산																																							
포장 및 유통상태	20g/팩/팩/박스/목장																																							
포장재	실은																																							
포장재 사용여부	-																																							
유통/용처	-																																							
실용 또는 불용 방법	-																																							
고려은단	섬숙B Expiry date Protocol	문서번호: 17-029-2004 작성일자: 2017.01.10 검토 일자: 2020.05.26(Rev.01) 발효 일자: 2020.05.26																																						
구분	시험 조건																																							
저장온도	15, 25, 35 °C																																							
저장기간	0개월(2020.05.07 ~ 2020.11.07)																																							
실험주기	1개월 간격																																							
시험방법	자사 섬유용량 시험방법(별첨)에 적용																																							

(3) 유통기한 설정 시험결과

(가) 지표성분 정량시험 결과

	15°C	25°C	35°C
0개월	102.9	102.9	102.9
1개월	102.2	102.6	102.9
2개월	101.2	101.6	101.6
3개월	101.8	101.4	101.1
4개월	101.6	101.0	100.9
5개월	101.1	100.9	100.4
6개월	100.5	100.9	100.3

(나) 저장온도별 저장기간에 따른 함량변화 방정식 산출

품질지표	반응차수	온도(°C)	회귀방정식	상관계수
3,5-DCQA 함량	0차	15	$Y = -0.0032X + 1.0026$	0.8832
		25	$Y = -0.0036X + 1.0027$	0.9369
		35	$Y = -0.0048X + 1.0289$	0.9590
	1차	15	$Y = -0.0032X + 0.0255$	0.8833
		25	$Y = -0.0035X + 0.0265$	0.9375
		35	$Y = -0.0047X + 0.0285$	0.9598

위 도출된 결과에서 0차반응보다 1차반응이 높은 상관계수를 가지므로 1차 반응식을 따르는 것을 알 수 있음. 따라서 1차 반응식의 반응속도 상수(K)인 $K_{15°C} = -0.0032$, $K_{25°C} = -0.0035$, $K_{35°C} = -0.0047$ 을 이용하여 활성화에너지(Ea)를 산출함.

(다) 아레니우스 방정식을 이용한 온도에 따른 활성화에너지(Ea) 산출

온도 (°C)	온도 (K)	1/T	K	LnK	R (기체 상수)	R2 (결정 계수)	LnK = -(Ea/R)(1/T)+LnA	
저장 온도	15	288	0.0035	0.0032	-5.7446	1.987	0.94977	LnK=-1694.13X+0.102667 Ea/R = -1694.13(R=1.987) Ea(Kcal/mole)=-3366.23
	25	298	0.0034	0.0035	-5.6550			
	35	308	0.0032	0.0047	-5.3602			

(라) 비실험구간의 반응속도상수(K) 산출

온도(°C)	온도(K)	1/T	K	LnK
10	283	0.0035	0.0028	-5.8836
15	288	0.0035	0.0032	-5.7797
20	293	0.0034	0.0034	-5.6793
25	298	0.0034	0.0035	-5.5823
30	303	0.0033	0.0041	-5.4885
35	308	0.0032	0.0047	-5.3977
40	313	0.0032	0.0049	-5.3099
45	318	0.0031	0.0054	-5.2248

(마) 유통기한 산출

국내 연간 유통온도별 유통기간을 고려하여 연간변화량을 계산하고 유통기한을 산출함.

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도상수(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0028	0.0139
15	1	0.0032	0.0032
20	2	0.0034	0.0068
25	2	0.0035	0.0070
30	2	0.0041	0.0083
Sum	12		0.0392

시험 결과에 의한 유통기한은 77.1개월이나 시험저장기간이 6개월로 짧고 섬쭉부쟁이추출물이 신규원료이므로 유통과정 중의 안전을 고려하여 안전계수를 0.5로 적용함.

▶ 따라서 약 3.21년으로 최종 유통기한을 2년으로 설정함.

나. 장기보존에 대한 안정성시험

(1) 안정성 시험 및 보관조건

구분	내용
제품명	섬쭉B

검체의 포장 구분	PTP/필로우/케이스 포장
보관조건	25℃ / 60%
시험주기	24개월(최초, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24)

(2) 안정성시험 protocol 확립

섬썩B

안정성 시험계획서

고려은단

고려은단	섬썩B Stability Test Protocol	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>용제번호</td><td>13-ASP-2005</td></tr> <tr><td>제형번호</td><td>08</td></tr> <tr><td>제조일자</td><td>2020.04.27</td></tr> <tr><td>제조업체</td><td>PTP/필로우/케이스 포장</td></tr> <tr><td>제조국</td><td>대한민국</td></tr> </table>	용제번호	13-ASP-2005	제형번호	08	제조일자	2020.04.27	제조업체	PTP/필로우/케이스 포장	제조국	대한민국
용제번호	13-ASP-2005											
제형번호	08											
제조일자	2020.04.27											
제조업체	PTP/필로우/케이스 포장											
제조국	대한민국											

1. 목적

1.1 본 시험은 "섬썩B" 제품의 색상 및 함량의 변화를 계획된 주기에 따라 확인하여 제품의 장기 보존 안정성을 확인하는데 목적이 있다.

2. 시험 개요

2.1. 시험 단계

구분	내용
제명명	섬썩B
검체의 포장 구분	PTP/필로우/케이스 포장

2.2. 시험 단계 확인표

No.	제조번호	제조일자	시험완료일자
1	ASP-0001	2020.04.27	2020.04.27

2.3. 보존조건 및 시험 주기

구분	보존조건	시험주기
장기보존	25℃ / 60%	24개월(최초, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24)

* 시험 주기에 따라 단편적인 유지 일가는 달라질 수 있다.

고려은단	섬썩B Stability Test Protocol	<table border="1" style="font-size: 8px;"> <tr><td>용제번호</td><td>13-ASP-2005</td></tr> <tr><td>제형번호</td><td>08</td></tr> <tr><td>제조일자</td><td>2020.04.27</td></tr> <tr><td>제조업체</td><td>PTP/필로우/케이스 포장</td></tr> <tr><td>제조국</td><td>대한민국</td></tr> </table>	용제번호	13-ASP-2005	제형번호	08	제조일자	2020.04.27	제조업체	PTP/필로우/케이스 포장	제조국	대한민국
용제번호	13-ASP-2005											
제형번호	08											
제조일자	2020.04.27											
제조업체	PTP/필로우/케이스 포장											
제조국	대한민국											

3. 시험 목적 및 시험 기준

3.1. 시험 항목 및 기준

시험항목	시험기준
색상	색차의 안정성 측정 한계
함량	3,5-Diethylquinoline acid(이하 DCQA) 150mg(100%) (90~120 %)

4. 시험방법

4.1. 색상: 색인코프 색상 및 모양을 확인한다.

4.2. 함량: 상사인 상태로 항상 시험방법(이하)에 따라 시험한다.

5. 시험결과의 기록 및 조치

5.1. 각 시험 주기에 따라 시험 후 결과를 기록하여 보고, 처리를 한다.

(3) 안정성시험 결과(중간)

(가) 성상 확인 결과

6개월까지의 장기보존 조건에서 섬썩B의 성상을 육안으로 평가하였을 때, 뚜렷한 색상 및 모양의 변화가 관찰되지 않았음. 이후에 계획된 시험주기에 따라 계속 품질을 평가하고 변화여부를 관찰 및 기록할 예정임.

(나) 함량 시험 결과

6개월까지의 섬썩B의 지표성분인 3,5-DCQA의 함량을 평가한 결과, 저장기간에 따른 약간의 함량 감소는 보였으나 이는 일반적인 감소의 양상이며 품질에 영향을 미칠 정도의 함량의 변화는 확인되지 않았음. 이후에 계획된 시험주기에 따라 계속 품질을 평가할 예정임.

시험일	0개월	1개월	3개월	6개월
	2020.05.07	2020.06.05	2020.08.07	2020.11.09
1	103.0%	103.0%	101.4%	101.7%
2	102.6%	102.6%	102.5%	102.9%
3	103.2%	101.6%	101.8%	99.6%
평균	102.9%	102.4%	101.9%	101.4%

(다) 결론

계획된 안정성 시험주기의 중간 평가 결과 뚜렷한 색상 및 함량의 변화가 보이지 않아 장기보존조건에서 안정한 것으로 판단하고 이후의 시험(9, 12, 18, 24개월)을 계속 진행하여 품질평가를 진행할 예정임.

4. 제품에 대한 품질 관리 및 평가

가. 제품 품질평가(공인기관 시험)

(1) 정량시험 9종

No.	항목	기준	시험결과	1일섭취량 당 함량	표시량 대비	판정
1	3,5-DCQA	표시량(2.304mg/2정)의 80~120%	1.39mg/g	2.36mg/2정	102.4%	적합
2	나이아신	표시량(15mgNE/2정)의 80~150%	11.12mgNE/g	18.90mgNE/2정	126.0%	적합
3	비타민B1	표시량(11mg/2정)의 80~180%	8.91mg/g	15.15mg/2정	137.7%	적합
4	비타민B6	표시량(11mg/2정)의 80~150%	8.12mg/g	13.80mg/2정	125.5%	적합
5	비타민B2	표시량(13mg/2정)의 80~180%	8.86mg/g	15.06mg/2정	115.8%	적합
6	판토텐산	표시량(11mg/2정)의 80~180%	7.54mg/g	12.82mg/2정	116.5%	적합
7	비타민B12	표시량(11 μg/2정)의 80~180%	10.41 μg/g	17.70mg/2정	160.9%	적합
8	엽산	표시량(120 μg/2정)의 80~150%	83.72 μg/g	142.32 μg/2정	118.6%	적합
9	비오틴	표시량(110 μg/2정)의 80~180%	52.02 μg/g	88.43 μg/2정	80.4%	적합

(2) 봉해시험, 대장균군

No.	항목	기준	시험결과	판정
1	봉해시험	60분 이내	30분 이내	적합
2	대장균군	음성	음성	적합

(3) 영양성분

No.	항목	시험결과
1	열량(Kcal/100g)	372.25
2	탄수화물(%)	80.24
3	조단백질(%)	6.77
4	조지방(%)	2.69
5	수분(%)	5.77
6	회분(%)	4.53
7	나트륨(mg/100g)	170.95

<p>시험-검사성적서</p> <p>제명: 3,5-DCQA 품명: 3,5-DCQA 제조사: KHSI 제조일자: 2023.05.27 검사일자: 2023.05.27 검사장소: KHSI 검사방법: KHSI 검사결과: 적합</p> <p>시험-결과-내역</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>기준</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3,5-DCQA(mg/2정)</td> <td>2.304mg/2정</td> <td>1.39mg/g</td> </tr> <tr> <td>나이아신(mg/2정)</td> <td>15mgNE/2정</td> <td>11.12mgNE/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B1(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>8.91mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B6(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>8.12mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B2(mg/2정)</td> <td>13mg/2정</td> <td>8.86mg/g</td> </tr> <tr> <td>판토텐산(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>7.54mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B12(μg/2정)</td> <td>11μg/2정</td> <td>10.41μg/g</td> </tr> <tr> <td>엽산(μg/2정)</td> <td>120μg/2정</td> <td>83.72μg/g</td> </tr> <tr> <td>비오틴(μg/2정)</td> <td>110μg/2정</td> <td>52.02μg/g</td> </tr> </tbody> </table> <p>2023년 05월 27일 한국기능성식품연구원 KHSI</p>	항목	기준	결과	3,5-DCQA(mg/2정)	2.304mg/2정	1.39mg/g	나이아신(mg/2정)	15mgNE/2정	11.12mgNE/g	비타민B1(mg/2정)	11mg/2정	8.91mg/g	비타민B6(mg/2정)	11mg/2정	8.12mg/g	비타민B2(mg/2정)	13mg/2정	8.86mg/g	판토텐산(mg/2정)	11mg/2정	7.54mg/g	비타민B12(μg/2정)	11μg/2정	10.41μg/g	엽산(μg/2정)	120μg/2정	83.72μg/g	비오틴(μg/2정)	110μg/2정	52.02μg/g	<p>시험-검사성적서</p> <p>제명: 비타민B 8종 품명: 비타민B 8종 제조사: KHSI 제조일자: 2023.05.27 검사일자: 2023.05.27 검사장소: KHSI 검사방법: KHSI 검사결과: 적합</p> <p>시험-결과-내역</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>기준</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>나이아신(mg/2정)</td> <td>15mgNE/2정</td> <td>11.12mgNE/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B1(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>8.91mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B6(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>8.12mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B2(mg/2정)</td> <td>13mg/2정</td> <td>8.86mg/g</td> </tr> <tr> <td>판토텐산(mg/2정)</td> <td>11mg/2정</td> <td>7.54mg/g</td> </tr> <tr> <td>비타민B12(μg/2정)</td> <td>11μg/2정</td> <td>10.41μg/g</td> </tr> <tr> <td>엽산(μg/2정)</td> <td>120μg/2정</td> <td>83.72μg/g</td> </tr> <tr> <td>비오틴(μg/2정)</td> <td>110μg/2정</td> <td>52.02μg/g</td> </tr> </tbody> </table> <p>2023년 05월 27일 한국기능성식품연구원 KHSI</p>	항목	기준	결과	나이아신(mg/2정)	15mgNE/2정	11.12mgNE/g	비타민B1(mg/2정)	11mg/2정	8.91mg/g	비타민B6(mg/2정)	11mg/2정	8.12mg/g	비타민B2(mg/2정)	13mg/2정	8.86mg/g	판토텐산(mg/2정)	11mg/2정	7.54mg/g	비타민B12(μg/2정)	11μg/2정	10.41μg/g	엽산(μg/2정)	120μg/2정	83.72μg/g	비오틴(μg/2정)	110μg/2정	52.02μg/g	<p>시험-검사성적서</p> <p>제명: 영양성분 품명: 영양성분 제조사: KHSI 제조일자: 2023.05.27 검사일자: 2023.05.27 검사장소: KHSI 검사방법: KHSI 검사결과: 적합</p> <p>시험-결과-내역</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목</th> <th>기준</th> <th>결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>열량(Kcal/100g)</td> <td>372.25</td> <td>372.25</td> </tr> <tr> <td>탄수화물(%)</td> <td>80.24</td> <td>80.24</td> </tr> <tr> <td>조단백질(%)</td> <td>6.77</td> <td>6.77</td> </tr> <tr> <td>조지방(%)</td> <td>2.69</td> <td>2.69</td> </tr> <tr> <td>수분(%)</td> <td>5.77</td> <td>5.77</td> </tr> <tr> <td>회분(%)</td> <td>4.53</td> <td>4.53</td> </tr> <tr> <td>나트륨(mg/100g)</td> <td>170.95</td> <td>170.95</td> </tr> </tbody> </table> <p>2023년 05월 27일 한국기능성식품연구원 KHSI</p>	항목	기준	결과	열량(Kcal/100g)	372.25	372.25	탄수화물(%)	80.24	80.24	조단백질(%)	6.77	6.77	조지방(%)	2.69	2.69	수분(%)	5.77	5.77	회분(%)	4.53	4.53	나트륨(mg/100g)	170.95	170.95
항목	기준	결과																																																																																	
3,5-DCQA(mg/2정)	2.304mg/2정	1.39mg/g																																																																																	
나이아신(mg/2정)	15mgNE/2정	11.12mgNE/g																																																																																	
비타민B1(mg/2정)	11mg/2정	8.91mg/g																																																																																	
비타민B6(mg/2정)	11mg/2정	8.12mg/g																																																																																	
비타민B2(mg/2정)	13mg/2정	8.86mg/g																																																																																	
판토텐산(mg/2정)	11mg/2정	7.54mg/g																																																																																	
비타민B12(μg/2정)	11μg/2정	10.41μg/g																																																																																	
엽산(μg/2정)	120μg/2정	83.72μg/g																																																																																	
비오틴(μg/2정)	110μg/2정	52.02μg/g																																																																																	
항목	기준	결과																																																																																	
나이아신(mg/2정)	15mgNE/2정	11.12mgNE/g																																																																																	
비타민B1(mg/2정)	11mg/2정	8.91mg/g																																																																																	
비타민B6(mg/2정)	11mg/2정	8.12mg/g																																																																																	
비타민B2(mg/2정)	13mg/2정	8.86mg/g																																																																																	
판토텐산(mg/2정)	11mg/2정	7.54mg/g																																																																																	
비타민B12(μg/2정)	11μg/2정	10.41μg/g																																																																																	
엽산(μg/2정)	120μg/2정	83.72μg/g																																																																																	
비오틴(μg/2정)	110μg/2정	52.02μg/g																																																																																	
항목	기준	결과																																																																																	
열량(Kcal/100g)	372.25	372.25																																																																																	
탄수화물(%)	80.24	80.24																																																																																	
조단백질(%)	6.77	6.77																																																																																	
조지방(%)	2.69	2.69																																																																																	
수분(%)	5.77	5.77																																																																																	
회분(%)	4.53	4.53																																																																																	
나트륨(mg/100g)	170.95	170.95																																																																																	
<p>3,5-DCQA, 봉해, 대장균군</p>	<p>비타민B 8종</p>	<p>영양성분</p>																																																																																	

8절 개별인정형 원료 신청

1. 기준규격 등 공인시험 자료 확보

가. 식약처 신청을 위한 성적서 확보

(1) 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 [3LOT]

지표성분(3,5-DCQA) 함량 측정에 대한 공인된 시험법이 없어 밸리데이션 완료한 자사방법으로 공인시험 기관에 의뢰하여 성적서 확보함.

반복수 \ Lot No.	1 (AG-S001)	2 (AG-S002)	3 (AG-S003)	평균
1반복	2.42 mg/g	2.42 mg/g	2.43 mg/g	
2반복	2.41 mg/g	2.41 mg/g	2.42 mg/g	
3반복	2.44 mg/g	2.41 mg/g	2.42 mg/g	
평균	2.42 mg/g	2.41 mg/g	2.42 mg/g	2.42 mg/g

제 12020002522 호
공인시험법(2020-04-08) 제248호

시험·검사성적서

제출일	검체부재사수출물	측정일자 (시험일자)	
검체명	고추분(순수)	당량	고형분
검체원	검체명(검체명) 중량(%) 시가량(%) 300 (중량%)		
계량요소	3,5-DCQA	검량방법	2020-04-08
공인시험기관	제출번호	발주번호	10000002522

본시험은 우리 연구소에 시험·검사방법(또는) 규격이 다음에 있습니다.

시험·검사항목	시험·검사 방법	시험·검사항목
3,5-DCQA(중량%)	3,5-DCQA(중량%) 고형분	검량법
검량	자사, 자사가 없으면 고형분 함량이 있는 검량법 방법	자사/자

한국기능성식품연구원

제 10000002523 호
공인시험법(2020-04-08) 제248호

시험·검사성적서

제출일	검체부재사수출물	측정일자 (시험일자)	
검체명	고추분(순수)	당량	고형분
검체원	검체명(검체명) 중량(%) 시가량(%) 300 (중량%)		
계량요소	3,5-DCQA	검량방법	2020-04-08
공인시험기관	제출번호	발주번호	10000002523

본시험은 우리 연구소에 시험·검사방법(또는) 규격이 다음에 있습니다.

시험·검사항목	시험·검사 방법	시험·검사항목
3,5-DCQA(중량%)	3,5-DCQA(중량%) 고형분	검량법
검량	자사, 자사가 없으면 고형분 함량이 있는 검량법 방법	자사/자

한국기능성식품연구원

제 10000002524 호
공인시험법(2020-04-08) 제248호

시험·검사성적서

제출일	검체부재사수출물	측정일자 (시험일자)	
검체명	고추분(순수)	당량	고형분
검체원	검체명(검체명) 중량(%) 시가량(%) 300 (중량%)		
계량요소	3,5-DCQA	검량방법	2020-04-08
공인시험기관	제출번호	발주번호	10000002524

본시험은 우리 연구소에 시험·검사방법(또는) 규격이 다음에 있습니다.

시험·검사항목	시험·검사 방법	시험·검사항목
3,5-DCQA(중량%)	3,5-DCQA(중량%) 고형분	검량법
검량	자사, 자사가 없으면 고형분 함량이 있는 검량법 방법	자사/자

한국기능성식품연구원

(2) 유해물질 규격 항목의 시험성적서

(가) 중금속 [3LOT]

항목 \ Lot No.	1 (AG-S001)	2 (AG-S002)	3 (AG-S003)
납(mg/kg)	0.2023	0.1153	0.1013
총수은(mg/kg)	불검출	불검출	불검출
카드뮴(mg/kg)	0.0082	0.0106	0.0124
총비소(mg/kg)	0.0327	0.0549	0.0555



(3) 영양성분성적서 [1LOT]

항목	AG-S001
열량(Kcal/100g)	362.47
탄수화물(%)	74.82
조단백질(%)	8.35
조지방(%)	3.31
나트륨(mg/100g)	732.13



2. Master File 작성

가. 기원, 개발경위, 국내외 안정 및 사용현황 등에 관한 자료

나. 제조방법 및 그에 관한 자료

(1) 표준화 공정이 완료된 제조 공정표

(2) 수율 및 지표 성분 함량 변화

다. 원료의 특성에 관한 자료

(1) 지표성분인 3,5-DCQA의 구조 및 설정 근거

(2) 영양성분 시험 성적서

라. 기능성분(지표성분)의 규격 및 시험방법에 관한 자료

(1) 시험법 작성 및 밸리데이션 보고서

(2) 공인시험 3Lot 성적서

마. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

(1) 중금속 및 대장균군 등 규격 설정

(2) 공인시험 3Lot 성적서

바. 안전성에 관한 자료

3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2017)	섬썩부쟁이 추출물 제조 및 표준화연구 <바이오랜드>	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물 최적화 공정 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 전초 추출물 제조 • 다양한 용매, 온도, 시간 검토 	<ul style="list-style-type: none"> • 전초 최적 추출 조건 확립
		<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물의 지표 성분 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> • 유효성분 및 지표성분 검토 • 추출물의 지표성분 함량 측정 • 표준화 실시 	<ul style="list-style-type: none"> • 제조 공정별 지표성분인 3,5-DCQA 함량 분석 • 30L 수준의 제조 공정 표준화
	인지능력개선 효능연구 <고려온단>	<ul style="list-style-type: none"> • 신경세포사멸 억제 효과 확인 및 기전 검색 	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물 및 지표물질(3,5-DCQA) 평가 • Bax, Bcl-2 등 	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 세포사멸 보호 효과는 잎, 꽃, 줄기 순으로 높은 것을 확인 • Aβ로 유도한 세포사멸 보호효과는 섬썩부쟁이 전초 추출물보다는 섬썩부쟁이 추출물이 높음을 확인 • 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-DCQA의 세포사멸 보호효과를 확인 • 섬썩부쟁이 추출물의 세포사멸 보호효과 기전이 BDNF, p-CREB, Bax, Bcl-2, pro-caspase3, Cleaved-caspase3에 의한 것임을 유전자 및 단백질 발현 비교를 통해 확인
		<ul style="list-style-type: none"> • 신경전달물질 생성 및 분비 조절 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • AChE 활성 억제 효과 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물이 AChE 활성을 억제하여 장기 및 단기 기억력 개선에 도움을 준다는 것을 확인
<ul style="list-style-type: none"> • 염증 저해 효과 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 항염증 효능 - NO - iNOS 	<ul style="list-style-type: none"> • RAW 264.7 세포를 통해 NO의 생성을 감소시키는 것을 확인 • 섬썩부쟁이 추출물이 염증성 인자인 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인 		

		<ul style="list-style-type: none"> Hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의한 세포사멸 억제 효과 검토(추가시험) 	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포사멸 보호효과 비교(잎, 전초, 썩부쟁이) 	<ul style="list-style-type: none"> H₂O₂에 의한 세포사멸 억제 효과는 썩부쟁이에 비해 섬썩부쟁이가 우수함을 확인 썩부쟁이는 낮은 농도에서 독성을 나타내는 것을 확인
		<ul style="list-style-type: none"> 배합원료와의 상승 & 상가 효과 연구(추가시험) 	<ul style="list-style-type: none"> 적절한 상승 & 상가 배합원료 탐색(항산화능) 	<ul style="list-style-type: none"> DPPH 라디칼 소거능 측정을 통해 섬썩부쟁이 추출물과 상승 & 상가효과를 내는 천연물을 탐색함
<p>섬썩부쟁이 추출물의 기억력개선 유효성 평가 <경희대></p>	<ul style="list-style-type: none"> 단기기억력 평가(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> 수동회피시험(Passive avoidance test) Y자 미로시험(Y maze test) 	<ul style="list-style-type: none"> 수동회피시험에서 스코폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 100 및 300 mg/kg 투여군 및 3,5-DCQA 1, 3, 10 mg/kg 투여군의 지연시간이 유의적으로 증가하였음 Y자 미로시험에서 섬썩부쟁이 추출물 100 및 300 mg/kg 투여군의 변경 행동력이 기억력 감퇴 유발군에 비해 유의적으로 증가하였음 스코폴라민에 의해 손상된 기억력이 섬썩부쟁이 추출물에 의해 개선되었음을 의미함 	
	<ul style="list-style-type: none"> 장기기억력 평가(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> Morris 수중미로시험 (Morris water maze test) 	<ul style="list-style-type: none"> Training trials에서 스코폴라민 유도로 기억력이 감퇴된 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 및 3,5-DCQA 1, 3, 10 mg/kg 투여군 모두에서 탈출지연시간이 유의적으로 감소하였음 Probe trial에서 섬썩부쟁이 추출물 30 및 100 mg/kg 투여군에서 플랫폼이 있던 곳에서의 수영시간이 유의성 있게 증가 	

			<ul style="list-style-type: none"> 한데 비해 3,5-DCQA는 1 mg/kg 투여군에서만 증가하는 것을 확인하였음
	<ul style="list-style-type: none"> 기억력개선 기전 연구 	<ul style="list-style-type: none"> Western blot(해마조직) 	<ul style="list-style-type: none"> • 섬쑥부쟁이 추출물이 100 및 300 mg/kg 용량에서 기억력 관련 신호전달체계를 유의적으로 강화시키는 효능이 있음을 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3β 및 BDNF 단백질 발현 증가로 확인하여 기억력 개선의 기전을 확인하였음
<p>섬쑥부쟁이 추출물의 안전성 평가 <캠온></p>	<ul style="list-style-type: none"> • 설치류 단회투여 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> • SD 랫드 • 암수 각각 5마리/군, 대조군 1(멸균주사용수), 시험군 3(1250, 2500 및 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> • 개략의 치사량(ALD) 5000 mg/kg 상회함
	<ul style="list-style-type: none"> • 유전독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 복귀독연변이(대장균1, 살모넬라균4) / 집락 관찰 • 염색체이상(햄스터 폐세포) / 세포의 구조 및 수적이상 확인 • 소핵시험(ICR 마우스, 수컷 6마리/군, 대조군 1(멸균주사용수), 시험군 3(500, 1000 및 2000 mg/kg) / 소핵 유발성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 양성 (식약처 가이드라인에 따라 섬쑥부쟁이 추출물의 구성아미노산을 분석한 결과 시험물질 자체 내에 히스티딘이 존재함. 이로 인한 위양성임을 확인함) • 음성 • 음성
	<ul style="list-style-type: none"> • 설치류 2주 DRF 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> • SD 랫드 • 암수 각각 5마리/군, 대조군 1(멸균주사용수), 시험군 4(625, 1250, 2500 및 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> • 일반증상, 체중, 사료섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검조건에서 시험물질의 영향이 관찰되지 않음 • 13주 반복은 5000 mg/kg를 고용량으로 두고, 공비 2로 2군 추천함
	<ul style="list-style-type: none"> • 설치류 13주 반복 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> • SD 랫드 • 암수 각각 10마리/군, 대조군 1(멸균주사용수), 시험군 3(1250, 2500 및 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도 실험과 연결되며, 2018.10.18. 투여개시하였음

		<ul style="list-style-type: none"> 비설치류 단회투여 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> Beagle dog 암수 각각 2마리/군, 시험군 1(1차: 1250, 2차: 2500 및 3차: 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> 투여완료 후 결과 분석
	<p>섬쑥부쟁이 추출물의 안전성 평가 <바이오랜드></p>	<ul style="list-style-type: none"> 조제물 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 시험번호 18-VG-0089 시험번호 18-VG-0091 시험번호 18-MG-0093 시험번호 18-RR-0085(2주) 	<ul style="list-style-type: none"> 분석 완료 및 성적서 발행
	<p>Pilot 제조실험 및 임상시료 준비 <바이오랜드></p>	<ul style="list-style-type: none"> 시생산 	<ul style="list-style-type: none"> 2018년 울릉도 재배 섬쑥부쟁이 원료 수급 진행(8월 말 ~ 9월 말) 	<ul style="list-style-type: none"> 전초 수급 프로세스 확립
	<p>섬쑥부쟁이 원료수급가격 책정</p>	<ul style="list-style-type: none"> 원료수급가격 책정 원료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 시생산 준비 원료수급 가격 책정 중 	
2차 년도 (2018)	인지능력 및 기억력개선 기전연구 <고려은단>	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포사멸 보호와 관련된 단백질 발현 측정 - BDNF, p-Erk 	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물이 신경독성 유도된 SH-SY5Y 세포에서 신경세포 분화 및 성장인자인 BDNF, p-Erk의 단백질 발현을 증가시키는 것을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> 항염증 기전 검토(in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> 염증 관련 단백질 발현 측정 - iNOS, COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물이 염증 유도된 SH-SY5Y세포에서 염증성 인자인 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> 신경세포사멸 보호와 관련된 단백질 발현 측정 - BDNF, p-Erk, p-CREB 	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 투여군에서 신경세포 분화 및 성장인자인 BDNF, p-Erk, p-CREB의 단백질 발현이 증가함
		<ul style="list-style-type: none"> 신경전달 물질 생성 및 분비 조절 확인(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> 신경전달 물질 생성 및 분비 조절 확인 - AChE 활성 확인 - Acetylcholine 농도 확인 - APP 농도 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군에서 AChE 활성 및 APP 농도가 유의적으로 감소함 섬쑥부쟁이 추출물 30,

				100 mg/kg 투여군에서 혈장 ACh 농도가 유의적으로 증가함
		<ul style="list-style-type: none"> 항염증 효능 평가(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> 염증인자 농도 확인을 통한 항염증 효능 평가 - TNF-α, IL-1β 	<ul style="list-style-type: none"> 신경염증작용에 관여하는 TNF-α, IL-1β 농도가 스크폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 30, 100 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소함
섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가 <캠온>	<ul style="list-style-type: none"> 설치류 13주 반복 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> SD 랫드 암수 각각 10마리/군, 대조군 1(멸균주사용수), 시험군 3(1250, 2500 및 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> 2차년도 실험과 연결되며, 2018.10.18. 투여개시하였음 무독성량은 5000 mg/kg 표적장기: 없음 	
	<ul style="list-style-type: none"> 비설치류 단회투여 독성시험 	<ul style="list-style-type: none"> Beagle dog 암수 각각 2마리/군, 시험군 1(1차: 1250, 2차: 2500 및 3차: 5000 mg/kg) 	<ul style="list-style-type: none"> 사망동물 관찰 되지 않았고, 체중 및 부검소견 이상 없음 	
	<ul style="list-style-type: none"> 조제물 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 시험번호 18-RR-0086 시험번호 18-NV-0094 	<ul style="list-style-type: none"> 분석 완료 및 성적서 발행 	
임상시료를 위한 원료 생산 공정 확립 <SK바이오랜드>	<ul style="list-style-type: none"> 공정개선(수율, 지표성분 함량 등) 	<ul style="list-style-type: none"> pilot 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 30L 수준 공정 확립 완료 	
	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산을 위한 기준 및 규격 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 대량 시생산 완료 및 기준 및 규격 설정 완료 	<ul style="list-style-type: none"> 산업적 생산 능력 확보 	
	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험을 위한 기능성 원료 공급 	<ul style="list-style-type: none"> 임상시험을 위한 기능성 원료 공급 	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 시료 제조용 원료 제조 및 제공 완료 	
임상시험제품 제조공정 연구 <고려은단>	<ul style="list-style-type: none"> 제조공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 최적 사용기기 설정 제조 방법 및 절차 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 제조 공정 전체(원료칭량 ~ 포장)에 대한 제조지시서 확립 	
	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 제품 배합비 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 제품에 대한 배합비 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 제형 중 코팅정제 제형으로 배합비율 작성 및 확립 	
	<ul style="list-style-type: none"> 보관방법 및 포장방법 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 경제·효율적 측면 고려하여 보관방법 설정 빛, 공기와의 접촉 차단 가능한 최적 포장 방법 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 보관방법은 실온으로 설정 내포장: PTP, 필로우 / 외포장: 종이케이스로 설정 	

	제품의 기준 및 시험법 설정 <고려은단>	• 기준 및 시험법 설정	• 코팅정제에 맞는 시험기준 설정	• 시험일지 확립 • 시험성적서 확립
			• 지표성분에 대한 분석법 검증	• Method validation protocol 및 Report 작성
	안정성 protocol 개발 <고려은단>	• 인체적용시험 제품의 안정성 protocol 개발	• 안정성 protocol 개발 및 안정성 시험 실시	• 식약처 가이드라인에 따른 저장 온도별(15, 25, 35℃) 보관조건 설정 • Protocol개발 및 작성 • Protocol에 따른 안정성 시험 진행
	상승&상가효과 원료 탐색 <고려은단>	• 섬쭉부쟁이 추출물의 효능을 극대화할 수 있는 원료 탐색	• 적절한 상승 & 상가 배합원료 탐색(신경세포사멸 보호효과)	• 섬쭉부쟁이와 Vit B12 또는 홍삼추출물 또는 손마닥선인장 추출물 복합 처리 시 시너지 효과 있음
	인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 <네오뉴트라>	• 인체적용시험 자료 검색 및 정리	• 인지기능개선 관련 인체적용시험 자료 확보 및 선별	• 선별된 자료를 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발에 활용
		• 인지기능개선 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발	• 인지기능개선 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발	• 프로토콜 개발 완료 • e-CRF(전자증례기록서) 개발 완료
		• IRB 승인	• 프로토콜 IRB 신청 및 승인	• 프로토콜, 신청자료 등 작성하여 IRB 제출 및 승인 완료
	인체적용시험 수행 <네오뉴트라>	• 개시모임 진행	• 인체적용시험 시작을 위한 개시모임 실시	• 개시모임 실시(2019.08.02)
		• 인체적용시험 모니터링	• 대상자 모집 및 모니터링 실시	• 대상자 모집 진행 중 및 모니터링 실시
3차년도 (2019)	인지능력 및 기억력 개선 관련 기전 연구 (추가연구) <고려은단>	• 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vitro)	• 섬쭉부쟁이 추출물 지표물질(3,5-DCQA) 평가 - BDNF, p-ERK, p-CREB	• 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 섬쭉부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-DCQA의 세포사멸 보호효과 기전이 BDNF, p-CREB, p-ERK 단백질 발현에 의한 것임을 확인함
			• 신경세포사멸 보호와 관련된 단백질 및 유전자 발현 측정 - BDNF, p-ERK, p-CREB	• 섬쭉부쟁이 추출물이 신경독성 유도 여부와 상관없이 SH-SY5Y 세포에서 신경세포 분화 및 성장인자인 BDNF, p-ERK,

				<p>p-CREB의 단백질 발현을 증가시키는 것을 확인함</p> <ul style="list-style-type: none"> • BDNF의 유전자 발현을 증가시키는 것도 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 항염증 효능 평가(in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> • 염증인자 농도 확인을 통한 항염증 효능 평가 - NO, TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 NO, TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE₂ 농도가 섬쑥부쟁이 추출물에 의해 감소하는 것을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 항염증 기전 검토(in vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> • 염증 관련 단백질 및 유전자 발현 측정 - iNOS, COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> • LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 iNOS, COX-2 단백질 및 유전자 발현이 섬쑥부쟁이 추출물에 의해 감소하는 것을 확인함
			<ul style="list-style-type: none"> • 염증 조절 인자 단백질 발현 측정 - p-NF-κB, p-IκB-α 	<ul style="list-style-type: none"> • LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 p-NF-κB, p-IκB-α 단백질 발현이 섬쑥부쟁이 추출물에 의해 감소하는 것을 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> • 항염증 효능 평가(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> • 염증인자 농도 확인을 통한 항염증 효능 평가 - TNF-α, IL-1β, IL-6 	<ul style="list-style-type: none"> • 신경염증작용에 관여하는 TNF-α, IL-1β, IL-6 농도가 스크폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소함
		<ul style="list-style-type: none"> • 항염증 기전 검토(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> • 염증 관련 단백질 및 유전자 발현 측정 - iNOS, COX-2 	<ul style="list-style-type: none"> • 신경염증작용에 관여하는 iNOS, COX-2 단백질 발현이 스크폴라민 유도 기억력 감퇴 유발군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 10, 30, 100 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소함
	<p>섬쑥부쟁이 추출물의 기억력개선 유효성 평가 (추가연구)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 단기 기억력 평가(in vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> • 수동회피시험(Passive avoidance test) 	<ul style="list-style-type: none"> • 수동회피시험에서 Aβ 유도 인지장애 유발군에 비해 섬쑥부쟁이 추출물 30, 100, 300 mg/kg 투여

<경희대>			군에서 지연시간이 유의적으로 증가하는 것을 확인함
인체적용시험 수행 <네오뉴트라>	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 모니터링 	<ul style="list-style-type: none"> 대상자 모집 및 모니터링 	<ul style="list-style-type: none"> 프로토콜에 의거한 대상자 모집 모니터링 실시 및 모니터링 보고서 작성(17회 실시) 월간 보고서 작성을 통한 임상시험 진행현황 공유
	<ul style="list-style-type: none"> DM(Data Management) 및 통계분석 	<ul style="list-style-type: none"> 체계적 업무 수행을 위한 자료 관리 및 통계분석 시행 	<ul style="list-style-type: none"> 섬쑥부쟁이 추출물 섭취 12주 후 ADAS-cog 총점, ADAS-cog 기억력 총점에서 대조군 대비 시험군의 명확한 개선 효과 확인
	<ul style="list-style-type: none"> 결과보고서 작성 및 IRB 승인 	<ul style="list-style-type: none"> 결과보고서 작성 및 IRB 승인 	<ul style="list-style-type: none"> 시험 종료 결과 및 통계 분석 결과를 바탕으로 인체적용시험 결과보고서 작성 IRB 제출 후 최종 승인
제품개발연구 <고려은단> 안정성 protocol 개발 <고려은단>	<ul style="list-style-type: none"> 시너지 효과를 줄 수 있는 물질 검토 	<ul style="list-style-type: none"> 신경전달 물질 생성 및 분비 조절 확인 - AChE 활성 확인 - ACh 농도 확인 - APP 농도 확인 - Aβ 농도 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유도 기억력 감퇴 유발모델에서 섬쑥부쟁이 추출물 및 비타민 B complex 병용투여군의 상승효과를 AChE 활성 억제, ACh 농도 증진, APP와 Aβ 농도 감소를 통해 확인함
		<ul style="list-style-type: none"> 최종 제품에 대한 배합비 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 상승효과가 있는 원료를 추가하여 제형별 배합비 설정
	<ul style="list-style-type: none"> 제품 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> 확립된 배합비를 바탕으로 다양한 제형(나정, 코팅정, 캡슐, 분말)의 시제품 제작 섭취가 용이하고 제품 안정성이 우수한 코팅정을 최종 제품 제형으로 선정
	<ul style="list-style-type: none"> 제품 제조공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 배합비 확립(코팅정) - 1일 섭취량: 1일 2회, 1회 1정 	

				<ul style="list-style-type: none"> - 중량: 1정 850 mg • 적합한 공정 확립을 위한 제조지시서 및 품질기록서 작성
			<ul style="list-style-type: none"> • 보관방법 및 포장방법 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 보관방법은 실온으로 설정 • 포장방법은 원료의 특성을 고려하여 3단계 포장 실시
		<ul style="list-style-type: none"> • 기준 및 시험법 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 지표성분에 대한 분석법 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 지표성분 함량 시험법 밸리데이션 실시 및 결과보고서 작성
			<ul style="list-style-type: none"> • 코팅정제에 맞는 시험기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 적합한 시험기준 설정을 통한 제품의 시험일지 및 성적서 작성
			<ul style="list-style-type: none"> • 최종 제품에 대한 품질 관리 및 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 정량, 분해, 대장균, 영양성분 분석을 통한 품질 평가 및 성적서 작성 • 공인성적 발급
		<ul style="list-style-type: none"> • 제품의 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 안정성 protocol 개발 및 안정성 시험 실시 	<ul style="list-style-type: none"> • 식약처 가이드라인에 따른 6개월간 저장 온도별(15, 25, 35℃) 보관조건 설정 • Protocol 개발 및 시험 • 시험결과로 유통기한 24개월 설정
<p>개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 신청 <고려은단></p>	<ul style="list-style-type: none"> • 개별인정형 원료 식약처 신청 준비 	<ul style="list-style-type: none"> • 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 	<ul style="list-style-type: none"> • 섬쭉부쟁이 추출물 master file(MF) 작성하여 제출 자료 취합 	

2절 목표 달성 여부

1차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
• 섬썩부쟁이 추출물 제조 및 지표성분 표준화	바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 전초에 다양한 용매, 온도, 시간을 적용하여 최적의 추출 조건 확립 • 섬썩부쟁이 추출물의 유효성분 및 지표성분 함량 측정 및 표준화 실시 	100%
• 세포사멸 보호효과 확인	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • Aβ로 세포사멸을 유도한 SH-SY5Y 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 및 3,5-DCQA에 의한 세포사멸 보호효과 확인 • H₂O₂로 유도한 세포사멸 보호효과는 썩부쟁이 추출물에 비해 섬썩부쟁이 추출물이 우수함을 확인 	100%
• 세포사멸 보호효과 기전 연구	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물의 세포사멸 보호효과 기전이 BDNF, p-CREB, BAX, Bcl-2, pro-caspase3, Cleaved-caspase3에 의한 것임을 유전자 및 단백질 발현 비교를 통해 확인 	100%
• 염증 저해 효능 확인	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • LPS로 과면역을 유도한 RAW 264.7 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리를 통한 NO 생성 억제 확인 	100%
• 염증저해 효능 기전 탐색	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물을 통한 iNOS, COX-2 단백질 발현 감소 확인 	100%
• 신경전달물질 생성 및 분비 조절 효능 확인	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • H₂O₂로 세포사멸을 유도한 SH-SY5Y 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 AChE 활성 억제 효과 확인 	100%
• 배합원료와의 상승 및 상가 효과 연구(추가)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> • DPPH 라디칼 소거능 측정을 통해 섬썩부쟁이 추출물과 상승 및 상가효과를 내는 천연물 탐색 	100%
• 단기 기억력 평가	경희대	<ul style="list-style-type: none"> • 수동회피시험 및 Y자 미로시험을 통해 스코폴라민 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 및 3,5-DCQA 투여시 단기 기억력 개선 확인 	100%
• 장기 기억력 평가	경희대	<ul style="list-style-type: none"> • 수중미로시험에서 섬썩부쟁이 추출물 및 3,5-DCQA 투여를 통한 장기 기억력 개선 확인 	100%
• 기억력 개선 기전 연구	경희대	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물에 의해 기억력 개선과 관련이 있는 pERK, pCREB, pPI3K, pAkt, pGSK-3β, BDNF 단백질 발현 증가 확인 	100%
• 설치류 단회투여 독성시험	캡은	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물 투여에 의한 개략의 치사량(ALD)이 5000 mg/kg을 상회하는 것을 확인 	100%
• 유전독성시험	캡은	<ul style="list-style-type: none"> • 복귀돌연변이 시험에서 양성이 나타났으나 섬썩부쟁이 추출물의 구성아미노산을 분석한 결과 시험물질 자체에서 히스티딘이 존재하는 것을 밝혀내어 위양성임을 확인 • 염색체이상시험 및 소핵시험에서는 음성이 나타나는 것을 확인 	100%
• 설치류 2주 DRF 독성시험	캡은	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 추출물 투여에 의해 특이사항이 발생하지 않는 것을 확인 	100%
• 섬썩부쟁이 추출물의 안정성 평가	바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> • 조제물 분석 및 성적서 발행 완료 	100%
• Pilot 제조실험 및 임상시료 준비	바이오랜드	<ul style="list-style-type: none"> • 섬썩부쟁이 원료 가격 책정 및 수급 진행 	100%

2차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
• 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vitro)	고려은단	• 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 섬삭부쟁이 추출물 처리를 통한 BDNF, p-ERK 단백질 발현 증가 확인	100%
• 항염증 기전 검토(in vitro)	고려은단	• 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 섬삭부쟁이 추출물 처리를 통한 iNOS, COX-2의 단백질 발현 감소 확인	100%
• 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vivo)	고려은단	• 스키폴라민 유발군에 비해 섬삭부쟁이 추출물 투여군에서 BDNF, p-ERK, p-CREB의 단백질 발현 증가 확인	100%
• 신경전달 물질 생성 및 분비 조절 확인(in vivo)	고려은단	• 스키폴라민 유발군에 비해 섬삭부쟁이 추출물 투여군에서 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가 및 APP 농도 감소 확인	100%
• 항염증 효능 평가(in vivo)	고려은단	• 스키폴라민 유발군에 비해 섬삭부쟁이 추출물 투여군에서 TNF- α , IL-1 β 농도 감소 확인	100%
• 설치류 13주 반복 독성시험	캠은	• 섬삭부쟁이 추출물의 무독성량은 5000 mg/kg이며 표적장기는 없는 것을 확인	100%
• 비설치류 단회투여 독성시험	캠은	• 섬삭부쟁이 추출물 투여에 의한 사망동물이 관찰되지 않았고, 체중 및 부검소견 이상 없는 것을 확인	100%
• 조제물 분석	캠은	• 조제물 분석 및 성적서 발행 완료	100%
• 제품 공정개선	바이오랜드	• 30L 수준 공정 확립 완료	100%
• 대량생산을 위한 기준 및 규격 설정	바이오랜드	• 대량 시생산 완료 • 기준 및 규격 설정 완료를 통한 산업적 생산 능력 확보	100%
• 임상시험을 위한 기능성 원료 공급	바이오랜드	• 인체적용시험 시료 제조용 원료 제조 및 공급 완료	100%
• 제조공정 확립	고려은단	• 제조 공정에 대한 제조지시서 확립	100%
• 인체적용시험 제품 배합비 확립	고려은단	• 다양한 제형 중 코팅정제 제형으로 배합비율 작성 및 확립	100%
• 보관방법 및 포장방법 설정	고려은단	• 경제, 효율적 측면을 고려한 보관방법 설정	100%
• 제품의 기준 및 시험법 설정	고려은단	• 코팅정제에 맞는 시험기준을 설정하여 시험일지 및 시험성적서 작성 • 시험법 밸리데이션을 통한 시험법 적합성 검증 및 보고서 작성	100%
• 안정성 protocol 개발	고려은단	• 3가지 저장 온도별(15, 25, 35 $^{\circ}$ C) 보관조건을 설정하여 안정성 시험 protocol 개발	100%
• 상승 및 상가효과 원료 탐색	고려은단	• 비타민 B ₁₂ , 홍삼추출물, 손바닥선인장 추출물 복합 처리 시 시너지 효과 확인	100%
• 인체적용시험 자료 검색 및 정리	네오뉴트라	• 인지기능개선 관련 인체적용시험 자료 확보 및 선별	100%
• 인지기능개선 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발	네오뉴트라	• 인지기능개선 인체적용시험 계획서(프로토콜) 개발 완료	100%
• IRB 승인	네오뉴트라	• 프로토콜 IRB 신청 및 승인 완료	100%
• 개시모임 진행	네오뉴트라	• 인체적용시험 시작을 위한 개시모임 실시	100%
• 인체적용시험 모니터링	네오뉴트라	• 대상자 모집 및 모니터링 실시	100%

3차년도 성과목표	관련기관	자 체 평 가	달성도
• 신경세포사멸 보호효과 기전 검토(in vitro)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 3,5-DCQA 및 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 BDNF, p-ERK, p-CREB 단백질 발현 증가 확인 신경독성이 유도된 SH-SY5Y 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 BDNF 유전자 발현 증가 확인 	100%
• 항염증 효능 평가(in vitro)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 NO, TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE₂ 농도 감소 확인 	100%
• 항염증 기전 검토(in vitro)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 iNOS, COX-2 단백질 및 유전자 발현 감소 확인 LPS로 염증작용을 유도한 BV-2 세포에서 섬썩부쟁이 추출물 처리에 의한 p-NF-κB, p-IκB-α 단백질 발현 감소 확인 	100%
• 항염증 효능 평가(in vivo)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 투여군에서 TNF-α, IL-1β, IL-6 농도 감소 확인 	100%
• 항염증 기전 검토(in vivo)	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 투여군에서 iNOS, COX-2 단백질 발현 감소 확인 	100%
• 단기기억력 평가	경희대	<ul style="list-style-type: none"> 수동회피시험에서 Aβ 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 및 투여시 단기기억력 개선 확인 	100%
• 배합원료와의 상승 및 상가 효과 확인	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 스코폴라민 유발군에 비해 섬썩부쟁이 추출물 및 비타민 B complex 병용투여군에서 인지개선 상승효과 확인 	100%
• 최종 제품에 대한 배합비 설정	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 상승효과가 있는 원료를 추가하여 제형별 배합비 설정 	100%
• 시제품 제작	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 배합비를 바탕으로 다양한 제형의 시제품 제작 	100%
• 최종 제품 제형 선정	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 섭취 용이성, 제품 안정성을 고려한 최종 제품 제형 선정 	100%
• 최종 제형에 따른 배합비 및 제조공정 확립	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 적합한 공정 확립을 위한 제조지시서 및 품질기록서 작성 	100%
• 보관방법 및 포장방법 설정	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 보관방법은 실온으로 설정하며 포장방법은 원료의 특성을 고려하여 3단계 포장 실시 	100%
• 지표성분에 대한 분석법 검증	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 지표성분 함량 시험법 밸리데이션 실시 및 결과보고서 작성 	100%
• 코팅정제에 맞는 시험기준 설정	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 적합한 시험기준 설정을 통한 제품의 시험일지 및 성적서 작성 	100%
• 최종 제품에 대한 품질 관리 및 평가	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 정량, 분해, 대장균, 영양성분 분석을 통한 품질 평가 및 성적서 작성 	100%
• 안정성 시험 protocol 개발 및 실시	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 6개월간 3가지 저장 온도별(15, 25, 35$^{\circ}$C) 보관조건을 설정하여 안정성 시험 protocol 개발 protocol에 따른 안정성 시험 진행 	100%

<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 대상자 모집 및 모니터링 	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 프로토콜에 의거한 대상자 모집 완료 모니터링 실시 및 모니터링 보고서 작성(17회 실시) 월간 보고서 작성을 통한 임상시험 진행현황 공유 	100%
<ul style="list-style-type: none"> DM 및 통계분석 	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 체계적 업무 수행을 위한 자료 관리 및 통계분석 시행 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 결과보고서 작성 및 IRB 승인 	네오뉴트라	<ul style="list-style-type: none"> 통계 분석 결과를 바탕으로 인체적용시험 결과보고서 작성 IRB 제출 후 최종 승인 	100%
<ul style="list-style-type: none"> 개별인정형 원료 신청 	고려은단	<ul style="list-style-type: none"> 섬썩부쟁이 추출물 기능성원료 신청을 위한 제출자료를 총괄하여 master file(MF)로 작성 기전 논문 게재 확정되면 즉시 신청 예정 	95%

3절 연구성과

1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	<i>Aster glehni</i> Extract Ameliorates Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Mice	Journal of Medicinal Food	Yulan Liao	22(7)	Korea	The Korean Society of Food Science and Nutrition	SCI	2019.06.21	DOI: 10.1089/jmf.2018.4302
2	The Ameliorating Effects of Bee Pollen on Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Mice	Biological and Pharmaceutical Bulletin	Yulan Liao	42(3)	Japan	Pharmaceutical Society of Japan	SCI	2019.03.01	DOI: 10.1248/bpb.b18-00552
3	스코폴라민으로 유도한 기억력 장애 동물모델에서 명자나무과실(<i>Chaenomeles speciosa</i> Nakai) 추출물의 효과	생약학회지	Jihyun Kim	50(4)	Korea	한국생약학회	비SCI	2019.10.01	-
4	Neuroprotective and Anti-Neuroinflammatory Effects of Ethanolic Extract from Leaves and Stems of <i>Aster glehni</i>	Journal of Functional Foods (투고중)	Mi Kyung Lim	-	-	-	SCI	-	-
5	Evaluation of acute and subchronic toxicity and genotoxicity of ethanolic extract from leaves and stems of <i>Aster glehni</i>	Biomed Research International (투고중)	Mi Kyung Lim	-	-	-	SCI	-	-

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품과학회	한은혜, 이경미, 송희원, 임미경	2018.06.28	부산(BEXCO)	대한민국
2	한국식품과학회	이상호, 송희원, 임미경, 한은혜	2018.06.28	부산(BEXCO)	대한민국
3	응용약물학회	구나연	2018.10.12	서울대학교 호암컨벤션센터	대한민국
4	한국실험동물학회	김주연, 정정호, 임미경	2019.07.18	제주(ICC)	대한민국

5	한국뇌신경과학회	김주연, 임미경	2019.09.22	대구(EXCO)	대한민국
6	한국식품과학회	정정호, 김주연, 임미경, 이소연	2020.07.01	광주(김대중컨벤션센터)	대한민국
7	한국식품영양과학회	김주연, 정정호, 임미경	2020.10.21	제주(ICC)	대한민국

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	섬썩부쟁이 추출물을 포함하는 인지 또는 기억력 개선용 조성물	대한민국	고려은단 외 1명	2018.04.25	10-2018-0048100	고려은단 외 1명	2019.21.10	10-2056300	50%
2	섬썩부쟁이 추출물과 손바닥선인장 추출물의 혼합물을 포함하는 인지기능 개선용 조성물 (특허)	대한민국	고려은단 외 1명	2019.09.10	10-2019-0112115	-	-	-	50%
3	섬썩부쟁이 추출물과 비타민 B12의 혼합물을 포함하는 인지기능 개선용 조성물 (특허)	대한민국	고려은단 외 1명	2019.09.10	10-2019-0112119	-	-	-	50%
4	섬썩부쟁이 추출물과 비타민 B 복합체의 혼합물을 포함하는 인지기능 개선용 조성물 (특허)	대한민국	고려은단 외 1명	2020.03.31.	10-2020-0039252	-	-	-	50%

4절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

1. 개별인정형 원료 신청 지연 사유

- 가. 개별인정형 원료 신청 전 식약처와의 면담에서 ‘기능성 내용 및 그에 관한 자료’로 동물시험에 대한 논문 자료뿐만 아니라 시험관시험에 대한 기전 관련 논문도 제출해야 한다고 하였음.
- 나. 동물시험에 대한 논문에 기전이 명시되어 있어 대체 가능 여부를 문의하였으나 불가능하다고 통보받아 시험관시험에서의 기전 논문이 필요하게 되었음.
- 다. 논문 증빙 없이 제출 시 근거자료 부족으로 심사 진행이 지연될 수 있으며 심사위원에게 부정적 이미지를 주어 추후 심사 결과에 영향이 있을 수 있음.
- 라. 따라서 기존 동물시험 논문과의 차별성을 위해 시험관시험에 대한 효능 및 기전 검증을 추가적으로 수행하여 논문 작성하였고 투고하였으나 심사 중에 있음.

2. 차후대책

- 가. 기전 논문 게재가 확정되면 바로 심사 신청할 수 있도록 그 외 자료는 준비가 완료된 상태임.
- 나. 개별인정형 허가 전 제품화를 하면 식품으로서만 판매할 수 있어 시장진입이 어려울 수 있으며 기존에 확보한 과학적 근거자료 또한 마케팅에 활용할 수 없어 판매량에도 영향을 미칠 것으로 판단함.
- 다. 심사 신청 후 허가까지 시간이 소요되더라도 개별인정형 허가를 득한 다음 제품화하는 것이 홈쇼핑에서의 판매와 같은 판매 전략에 적합함.
- 라. 따라서 기전 논문 게재 후 즉시 개별인정형 신청을 할 계획이며 심사관의 요구에 적극 대처하여 빠른 시일 내에 허가가 나올 수 있도록 할 예정임. 승인 후 제품화할 제형 및 제조공정이 이미 수립되어 있어 제품 출시에 소요되는 시간은 단축될 예정임.

* 시험관시험 기전 논문을 Journal of Functional Foods에 투고 후 두 번째 수정 요청(기한 2021.01.14)에 대한 보완 진행 중임. 이후에는 게재를 위한 편집 과정만 남아 있으며 본 저널은 매월 발간되므로 21년 3월호에는 게재될 것으로 예상됨.

Your Submission | 인쇄 | 일정등록 | 원문보기

보낸사람: + Dejian Huang
받는사람: + Mi Kyung Lim
보낸날짜: 2020/12/15 화요일 오후 10:37:11

+ 관련메일 1개

첨부파일이 없습니다.

Ms. Ref. No.: JFF-D-20-01009R1
Title: Neuroprotective and Anti-Neuroinflammatory Effects of Ethanolic Extract from Leaves and Stems of *Aster glehnii*
Journal of Functional Foods

Dear Ms. Mi Kyung Lim,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to reconsider my decision.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a rebuttal against each point which is being raised and a revised manuscript with all the modifications marked in red color. Please do not use the word track revision tool.

Your revised manuscript should be submitted no later than Jan 14, 2021

To submit a revision, please go to <https://www.editorialmanager.com/jff/> and login as an Author.

4장 연구결과의 활용 계획

1. 연구결과 및 활용계획

No.	연구결과	활용 계획
1	섬썩부쟁이 추출물의 원재료 판별	<ul style="list-style-type: none"> ITS 분석을 통한 종 동정 및 RAPD 분석을 통한 유연 관계를 검정함으로써 섬썩부쟁이와 썩부쟁이는 계통이 서로 다른 종임을 확인하였으며 기능성 원료 허가시, 원료의 특성에 관한 제출자료로 사용할 예정임.
2	섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> SK바이오랜드에서 다양한 제조 공정(30% 주정추출, 50% 주정추출, 70% 주정추출)시험을 통해 최적화된 추출수율을 확립하였으며 제조공정을 표준화하여 산업적 생산에 적용할 수 있게 됨. 지표물질 함량을 측정하는 시험법을 개선하고 Method validation을 통해 검증하여 원료의 기준 및 시험법을 설정함.
3	섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 경희대학교와 고려은단에서는 섬썩부쟁이 추출물의 신경세포사멸 억제 효능, 신경전달물질 생성 및 분비 조절, 항염증 효능을 확인하였고, scopolamine 또는 amyloid-beta를 이용한 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물에 의해 장·단기 기억력이 개선되는 자료를 확보함. 위의 행동실험 결과로 논문 1편을 확보하였고, 기전을 추가한 논문 1편도 투고하여 심사 중에 있어 과학적 검증 자료로서 마케팅 및 수출 자료로 활용하고자 함. 인지기능 및 기억력 개선의 바이오마커를 다양한 원료의 효능 검증에 활용할 예정임.
4	섬썩부쟁이 추출물의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 캠온에서 진행한 설치류 단회 투여 및 13주 반복 독성시험, 비설치류 단회 투여 독성시험, 유전독성 시험으로 섬썩부쟁이 추출물에 대한 안전성이 입증되어 기능성 원료 허가 시, 안전성을 입증하는 제출 자료로 사용할 예정임. 해당 시험 결과를 바탕으로 논문 1편을 작성하여 판매 시, 활용하고자 함.

5	인체적용시험 제품의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 인체적용시험에 적합한 제형 및 제조공정을 확립하고, 동시에 원료 및 인체적용시험 샘플의 안정성을 확인함으로써 제품에 이상이 없도록 하였음. • 인체적용시험 제품의 표준화를 통해 함량의 안정성을 유지하는 것을 확인하였고, 해당 부형제들을 추후 제품화 시 활용할 예정에 있음.
6	인체적용시험 계획서 개발 및 실시	<ul style="list-style-type: none"> • 네오뉴트라에서는 인지기능 향상과 관련한 임상시험 자료를 선별하고 확인함으로써 인체적용시험의 시행착오를 최대한 줄일 수 있는 인체적용시험 계획서를 개발함. • 위의 방법으로 인체적용시험을 실시하여 섬쑥부쟁이 추출물의 인지기능개선 효과 및 안전성이 입증되었으며 기능성 원료 허가 시 유효성 및 안전성을 입증하는 제출자료로 사용할 예정임.
7	제품의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 섬쑥부쟁이 추출물과 신경세포사멸 억제 효능 등의 시너지를 낼 수 있는 원료(비타민, 미네랄, 천연물 추출물 등)를 검색하여 건강기능식품 제조 시 활용하고자 함. • 개별인정형 원료 허가를 득하면 검색된 원료와 혼합한 형태로 제품화할 예정임.
8	개별인정형 원료 식약처 신청 준비	<ul style="list-style-type: none"> • 기준규격 및 공인시험 자료 등을 확보함. • 식약처 기능성원료 허가자료를 준비함으로써 추후 진행 시, 시간을 절약할 수 있음. • 허가 시 제출자료로서 모두 활용이 가능하여 기전 관련 논문이 게재 확정되면 바로 심사 신청할 예정임.

▶ 개별인정형 허가를 획득한 후 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품으로 제품화

▶ 제품화를 위한 원재료 수급 방안

- 섬쑥부쟁이의 경우 다년초로 현재 전초의 수확 시기는 어린 순 등 다른 수입원에 영향을 주지 않는 추석전(약 9월경)임. 따라서 가을에 대단위 재배지에서 섬쑥부쟁이를 수확하여 연간 4톤의 원료를 확보할 계획임. 또한, 섬쑥부쟁이 전초는 수확 후 울릉도 내에서 건조 및 분쇄 과정을 거쳐 건조물 형태로 공급 받는 것으로 논의되었음.

- 현재 섬쑥부쟁이의 수급은 일부 농민을 통해 진행하고 있으나, 원활한 원료 수급을 위해 안정적인 재배 지역을 확보하여 울릉농협에서 구매할 수 있도록 시스템을 마련할 예정에 있음. 관련 사항은 울릉농업기술센터와 울릉군청과의 협의를 통해 진행할 예정임.

▶ 사업화 전략

- 주요 고객군 분석

- ① 노년이지만 치매가 걸리지 않은 분들 : 치매예방 건강기능식품
- ② 40대 이상의 중년 : 치매예방 건강기능식품, 선물용, 본인 섭취용 등
- ③ 20~30대 청년 : 부모님 · 친척 · 지인 선물용

- 예상 판매가 설정

울릉도 자생식물인 섬쭉부쟁이의 수급단가를 산정하고, 물류와 유통비, 광고비 등에 대한 정보를 확인한 후 원료와 제품 단가를 설정하고, 소비자가 구매가 가능한 단위로 판매할 예정이다.

- 마케팅 및 판로계획

개별인정형 건강기능식품으로 제품 품목신고를 진행한 후,

① 마케팅

- 특정 질환인 치매를 타겟으로 인체시험을 진행한 개별인정형 원료를 이용한 제품임을 강조하며, 고려은단의 기존 베스트셀러 제품인 비타민C1000과 함께 노출하여 판매하며, “원료까지 생각한다면 고려은단 “이라는 광고 이미지로 신뢰성을 높일 예정이다.
- TV 광고, 라디오 광고, 지면 및 외부노출, 각종 학회 및 박람회 참가, 블로그 운영, PPL마케팅 등을 활용할 계획임.

② 유통

- 홈쇼핑 판매 : 호스트의 제품 설명과 효능에 대한 입증자료 제시 가능
- 대형마트 판매 : 이마트를 비롯한 국내 대형마트에 관련된 제품 판매예정
- 약국판매 : 기존 전국 약국판매망과 도매업체에 판매예정
- 온라인 판매 : 전자상거래를 통한 판매망 확대예정(G-market, 11st, Auction 등)

③ 수출

- 전 세계적으로 치매예방을 위한 제품 요구 높음. 이러한 상황에서 울릉도만의 천연 자원을 이용한 제품이라는 강점과 과학적으로 효능을 입증한 논문 및 특허를 바탕으로 안전성과 안정성을 모두 입증한 제품이라는 점을 내세워 해외에 판매가 가능할 것으로 판단됨.
- 중국 및 동남아를 비롯한 다양한 나라의 바이어와 접촉한 후, 제품의 수출기회를 확보할 예정임.

붙임. 참고문헌

1. 한국농수산물유통공사 (미국)농식품 해외시장 맞춤조사_인지기능개선제, 2018
2. 한국농수산물유통공사 (중국)농식품 해외시장 맞춤조사_인지기능 개선 보건의약품, 2018
1. C. Lu, et al., Genistein ameliorates scopolamine-induced amnesia in mice through the regulation of the cholinergic neurotransmission, antioxidant system and the ERK/CREB/BDNF signaling, *Front. Pharmacol.*, 9:1153, 2018
2. D. Y. Lu, et al., Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia, *J. Cell. Biochem.*, 110(3):697-705, 2010
3. F. C. Lau, et al., Attenuation of iNOS and COX2 by blueberry polyphenols is mediated through the suppression of NF- κ B activation, *J. Funct. Foods.*, 1(3):274-283, 2009
4. H. Supriady, et al., SMEAF attenuates the production of pro-inflammatory mediators through the inactivation of Akt-dependent NF- κ B, p38 and ERK1/2 pathways in LPS-stimulated BV-2 microglial cells, *J. Funct. Foods.*, 17:434-448, 2015
5. H. Y. Jung, et al., Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF- κ B in LPS-stimulated BV-2 microglial cells, *Exp. Mol. Med.*, 39(6):715-721, 2007
6. I. O. Ishola, et al., Isorhamnetin enhanced cortico-hippocampal learning and memory capability in mice with scopolamine-induced amnesia: Role of antioxidant defense, cholinergic and BDNF signaling, *Brain. Res.*, 1712:188-196, 2019
7. J. H. Choi, et al., Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Aster glehni* via inhibition of NF- κ B activation in mice with DSS-induced colitis, *Food. Funct.*, 8(7):2611-2620, 2017
8. J. L. Daval, et al., Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106(1):E1, 2009
9. K. Hensley, et al., Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation, *J. Alzheimers. Dis.*, 21(1):1-14, 2010
10. M. Moosavi, et al., Agmatine protects against scopolamine-induced water maze performance impairment and hippocampal ERK and Akt inactivation, *Neuropharmacology.*, 62(6):2018-2023, 2012
11. M. Ozgen, et al., Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods, *J. Agric. Food. Chem.*, 54:1151-1157, 2006
12. M. T. Heneka, et al., Neuroinflammation in alzheimer's disease, *Lancet. Neurol.*, 14(4):388-405, 2015
13. M. Y. Um, et al., Phlorotannin-rich fraction from *Ishige foliacea* brown seaweed prevents the scopolamine-induced memory impairment via regulation of ERK-CREB-BDNF pathway, *J. Funct. Foods.*, 40:110-116, 2018
14. L. Bai, et al, Brain-derived neurotrophic factor induces thioredoxin-1 expression through T

rkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells, *Biochimie.*, 160:55-60, 2019

15. L. V. Jingwei, et al., Protective effect of ginsenoside Rh2 on scopolamine-induced memory deficits through regulation of cholinergic transmission, oxidative stress and the ERK-CREB-BDNF signaling pathway, *Phytother. Res.*, 2020
16. L. Yu, et al., Multi-vitamin B supplementation reverses hypoxia-induced tau hyperphosphorylation and improves memory function in adult mice, *J. Alzheimers. Dis.*, 54(1):297-306, 2016
17. P. Deepa, et al., *Dracocephalum moldavica* attenuates scopolamine-induced cognitive impairment through activation of hippocampal ERK-CREB signaling in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 253:112651, 2020
18. R. Pariyal, et al., *Vitis labruscana* leaf extract ameliorates scopolamine-induced impairments with activation of Akt, ERK and CREB in mice, *Phytomedicine.*, 36:8-17, 2017
19. R. S. Naik, et al., Effects of Rivastigmine and Donepezil on Brain Acetylcholine Levels in Acetylcholinesterase-Deficient Mice, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 12(1):79-85, 2009
20. R. Y. Au, et al., Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages, *Osteoarthritis. Cartilage.*, 15(11):1249-1255, 2007
21. W. L., et al., PFOS Disturbs BDNF-ERK-CREB Signalling in Association with Increased MicroRNA-22 in SH-SY5Y Cells, *Biomed. Res. Int.*, 2015:302653, 2015
22. Y. Liao, et al., *Aster glehni* extract ameliorates scopolamine-induced cognitive impairment in mice, *J. Med. Food.*, 22(7):685-695, 2019
23. Y. P. Li, et al., β -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells, *Brain. Res.*, 738(2):196-204, 1996

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발					
	(영문) Development of functional foods for improving cognitive ability using native plants in Ulleungdo Island					
주관연구기관	고려은단(주)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 고려은단(주)		
참 여 기 업	(주)캠온, 네오뉴트라(주)		총 연 구 기 간	(성명) 임미경		
총연구개발비 (1,113,334천원)	계	1,113,334천원	총 참 여 수	2017.11.01 ~ 2020.10.31(3년)		
	정부출연 연구개발비	830,000천원		총 인 원	70	
	기업부담금	283,334천원		내부인원	70	
	연구기관부담금			외부인원	0	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>섬썩부쟁이 추출물을 이용하여 인지능력개선에 대한 효능을 검증하고, 제품화할 수 있도록 원료 및 제품의 표준화를 실시하여 인지능력개선에 도움을 주는 건강기능식품을 개발하는 것이 목표임.</p> <p><정성성과></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적의 제조공정 확립, 지표성분 함량 측정 시험법 표준화, 기준 및 규격 설정 완료 2. 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 평가 및 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 신경세포보호 효과 및 기전 규명, 항염증 효능 및 기전 규명(in vitro, in vivo) - 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 단기기억력, 장기기억력 개선 효능 검증 3. 섬썩부쟁이 추출물의 안전성 검증(GLP 독성시험) 4. 인체적용시험 제품의 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 제형 및 제조공정 확립, 안정성 protocol 개발 5. 경도인지저하자 대상 인체적용시험 완료(유효성, 안전성 입증) 6. 제품의 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 상승효과 있는 비타민 B 복합체 배합원료로 설정 - 제품 제형 설정, 제조공정 확립, 기준 및 시험법 확립, 유통기한 설정 7. 개별인정형 원료 신청(공인시험 성적서 등의 제출자료 확보) <p><정량성과></p> <ul style="list-style-type: none"> - 논문 게재 : SCI 2편, 비SCI 1편 게재(SCI 2편 투고중) - 국내 학술대회 발표 : 7건 - 지적재산권 : 특허등록 1건, 특허출원 3건 - 기술실시 : 1건 / 시제품 : 3건 - 고용창출 : 18명 - 홍보전시 : 18건 						

○ 연구내용 및 결과

1. 섬썩부쟁이 추출의 원재료 판별

- ITS 분석을 통한 종 동정 및 RAPD 분석을 통한 유연관계를 검정함으로써 섬썩부쟁이와 썩부쟁이는 계통이 서로 다른 종임을 확인하여 혼입 가능성을 없앴

2. 섬썩부쟁이 추출물의 원료의 표준화

- 최적의 공정을 설정하여 제조공정도 확립, 지표성분 분석법을 개선하고 검증하여 산업적으로 이용 가능, 원료의 기준 규격 설정

3. 시험관시험에서 섬썩부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선효능 및 기전 검증

- SH-SY5Y 세포에서 지표물질인 3,5-DCQA 및 섬썩부쟁이 추출물의 신경세포보호 효과를 확인하였으며 이는 BDNF, p-ERK, p-CREB 단백질 발현 증가에 의한 것임을 확인
- BV-2 세포에서 NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ 농도 감소를 통해 항염증 효능 확인
- 항염증 효능은 iNOS, COX-2 단백질 및 유전자 발현 감소와 p-NF- κ B, p-I κ B- α 단백질 발현 감소에 의한 것임

4. 동물시험에서 섬썩부쟁이 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효능 및 기전 검증

- 스코폴라민 유발군에 비해 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가 및 APP와 A β 농도 감소 확인
- 스코폴라민 유발군에 비해 TNF- α , IL-1 β , IL-6 농도가 감소함. 이는 iNOS, COX-2 단백질 발현 감소에 의한 것임

5. Scopolamine 또는 amyloid-beta를 이용한 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물에 의해 장·단기 기억력이 개선되는 것을 확인

6. GLP 독성시험 실시

- 설치류 단회 투여 독성시험 : 개략의 치사량(ALD) 5000 mg/kg 상회
- 비설치류 단회 투여 독성시험 : 이상반응 없음
- 설치류 13주 반복 독성시험 : 무독성량은 5000 mg/kg이며 표적장기는 없음
- 복귀돌연변이시험 : 양성(섬썩부쟁이 추출물의 구성아미노산을 분석한 결과 시험물질 자체에서 히스티딘이 존재하는 것을 밝혀내어 위양성임을 확인)
- 염색체이상시험 및 소핵시험 : 음성

7. 인체적용시험 제품의 표준화

- 제형(코팅정) 설정, 제조지시서 확립, 제품의 기준 및 시험법 설정, 안정성 protocol 개발 완료

8. 인체적용시험 실시 : 유효성 및 안전성 입증

9. 제품 표준화

- 상승효과가 있는 배합원료 설정, 제형 연구, 기준 및 시험법 설정, 유통기한 설정, 품질 관리

10. 개별인정형 원료 신청 : 기준규격 등 공인시험 자료 확보, Master file 작성

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 최적화 공정으로 생산된 섬썩부쟁이 추출물(원료) 판매
- 인지기능 및 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 제품화
- 상승효과 원료를 혼합한 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품 제품화
- 섬썩부쟁이 추출물의 유효성 및 안전성에 대한 과학적 검증 자료의 마케팅 활용 추후, 수출 자료로도 활용
- 울릉도 자생식물 활용으로 농가소득 증대 및 수입대체효과 기대
- 인지기능 및 기억력 개선의 바이오마커를 다양한 원료의 효능 검증에 활용
- 섬썩부쟁이 추출물의 지표물질인 3,5-Dicaffeoylquinic acid의 유효성 검증으로 치료제 개발에 활용
- 치매 예방 효과를 통한 사회-경제적 손실 감소 및 수출 상품으로 활용

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		117077-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	기능성식품 및 소재			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	올룽도			과제유형	개발
연구기관	고려은단(주)			연구책임자	임미경
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.11~2018.10	290,000	100,000	390,000
	2차연도	2018.11~2019.10	290,000	100,000	390,000
	3차연도	2019.11~2020.10	250,000	83,334	333,334
	계	2017.11~2020.10	830,000	283,334	1,113,334
참여기업	(주)켄온, 네오뉴트라(주)				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.12.11

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
고려은단(주)	과장	임미경

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	임미경
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

울릉도 자생식물인 섬쭈부쟁이의 인지기능영역에서의 신규 효능을 검증하고 지적재산권을 획득하여 독자적인 제품개발이 가능함. 기능성(시험관, 동물, 인체) 및 안전성 검증이 완료되었으며 기준규격 등을 비롯한 공인시험 자료가 확보되어 개별인정형 원료 인증이 준비되었음. 섬쭈부쟁이 원료의 표준화 및 지표성분 함량 시험법 개선·검증을 통해 산업적 이용이 용이하며 제품의 표준화가 완료되어 개별인정형 인정 후 제품 출시가 신속히 진행될 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구는 동물의 사료로 사용되거나 폐기되던 섬쭈부쟁이 전초 부위를 사용함으로써 농가소득 증대 및 고부가가치화가 예상됨. 또한 울릉도 자생식물을 사용함으로써 수입원료 대체 가능성도 증대되었으며, 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품 개발로 인한 치매 예방 효과로 사회·경제적 손실 감소 효과도 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발결과를 토대로 인지기능 및 기억력 개선 개별인정형 원료 허가를 받을 수 있음. 또한, 상승효과 원료(비타민 B complex 등)를 혼합한 효능이 증대된 건강기능식품 제품화가 가능함. 유효성과 안전성 결과의 과학적 근거자료는 마케팅 및 수출자료로 활용할 수 있으며 바이오마커를 통해 다른 원료의 검증에도 활용 가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

기관별 유기적 연구 성과 달성을 위해 협업하여 성실히 수행하였음. 연차별 목표를 계획하고 이행하였으며, 확실한 유효성 검증을 위해 계획한 연구 이외의 추가 연구를 수행하여 목표한 지적재산권 보다 높은 달성율을 확보하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

특허출원 3건, 특허등록 1건, 논문 3편, 학술발표 7건 및 홍보 18건으로 본 과제를 통한 연구 개발성과를 공개 발표하였으며 기전연구 논문 및 안전성 논문이 추가적으로 게재될 예정임.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원료의 표준화	10	100	최적화 공정으로 섬쭉부쟁이 전초 추출물 제조 및 제조공정의 표준화 진행, 지표성분 표준화, 함량을 포함한 기준 규격 설정
유효성 평가 및 기전규명	20	100	신경세포보호 효과, 항염증 효과 및 그 기전 검증, 동물행동시험 수행
안전성 평가	10	100	GLP 독성시험(일반독성-단회, 13주 반복 및 유전독성) 완료
인체적용시험 제품의 표준화	10	100	Scale up 추출공정 최적화 완료, 제형연구, 제조지시서 확립, 기준 및 시험법 설정, 안정성 시험 설정
인체적용시험	25	100	인체적용시험 protocol 개발, IRB 승인, 시험실시, 통계분석, 결과보고서 작성
상승 및 상가 효과 원료 탐색	5	100	배합원료의 상승·상가 효과 확인(in vitro, in vivo)
제품의 표준화	10	100	배합원료를 포함한 배합비 설정, 제형연구, 제조공정 확립, 보관방법 설정, 기준 및 시험법 설정, 유통기한 설정
개별인정형 원료 신청	10	95	공인시험 성적서 확보, Master file 작성, 시험관시험 기전연구 논문 게재로 인한 신청 대기중
합계	100점	99점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 울릉도 자생식물인 섬쭉부쟁이 추출물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발 과제로 섬쭉부쟁이 추출물의 인지능력개선 효능 및 기전을 규명하고 안전성을 평가한 결과를 바탕으로 인체적용시험을 수행하여 그 유효성과 안전성을 입증하였음. 또한, 원료의 표준화를 통해 산업적 생산능력을 확보하였음. 기존 제품과의 차별성을 두기 위해 상승 및 상가 효과 원료를 탐색하였으며 그 결과로 선정된 배합원료를 포함한 배합비 설정, 제형연구 등을 통해 제품의 표준화를 수행하였음. 개별인정형 원료 신청을 위한 자료를 확보하여 논문 게재 승인 후 즉시 심사 신청이 가능함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

개별인정형 원료 심사 시 필요한 시험관시험 기전 연구의 논문 수정분이 재심사중임. 동물시험에 대한 논문에 기전이 명시되어 있어 대체 가능 여부를 문의하였으나 불가능하다고 통보 받아 시험관시험에서의 기전 논문이 필요하게 되었음. 논문 증빙 없이 제출 시 근거자료 부족으로 심사 진행이 지연될 수 있으며 심사위원에게 부정적 이미지를 주어 추후 심사 결과에 영향이 있을 수 있음. 따라서 기전 논문 게재 후 즉시 개별인정형 신청을 할 계획임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

개별인정형 인증 후 인지기능 및 기억력 개선 건강기능식품 제품화 예정이며 지적재산권을 바탕으로 제품을 개발하여 기존 제품과 차별화 할 것임. 초기 제품은 홈쇼핑 등에서 판매할 예정이며 이후 다양한 판로로 확대할 계획임.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품영양	
연구과제명	울릉도 자생식물을 이용한 인지능력개선 건강기능식품 개발			
주관연구기관	고려은단(주)		주관연구책임자	임미경
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	830,000,000	283,334,000		1,113,334,000
연구개발기간	2017.11.01. ~ 2020.10.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접 사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 원료의 표준화	섬썩부쟁이 추출의 원재료 판별 기준 확립, 최적의 공정 설정, 제조공정도 확립, 지표성분 분석법 개선 및 검증, 원료의 기준 규격 설정
② 유효성 평가 및 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> - SH-SY5Y 세포에서 지표물질인 3,5-DCQA 및 섬썩부쟁이 추출물의 신경세포보호 효과를 확인하였으며 이는 BDNF, p-ERK, p-CREB 단백질 발현 증가에 의한 것임을 확인 - BV-2 세포에서 NO, TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE₂ 농도 감소를 통해 항염증 효능 확인 - 항염증 효능은 iNOS, COX-2 단백질 및 유전자 발현 감소와 p-NF-κB, p-IκB-α 단백질 발현 감소에 의한 것임 - 스코폴라민 유발군에 비해 AChE 활성 억제, ACh 농도 증가 및 APP와 Aβ 농도 감소 확인 - 스코폴라민 유발군에 비해 TNF-α, IL-1β, IL-6 농도가 감소함. 이는 iNOS, COX-2 단백질 발현 감소에 의한 것임 - 스코폴라민 또는 amyloid-beta를 이용한 인지기능 및 기억력 손상 동물모델에서 섬썩부쟁이 추출물에 의해 장·단기 기억력이 개선되는 것을 확인

③ 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 설치류 단회 투여 독성시험 : 개략의 치사량 (ALD) 5000 mg/kg 상회 - 비설치류 단회 투여 독성시험 : 이상반응 없음 - 설치류 13주 반복 독성시험 : 무독성량은 5000 mg/kg이며 표적장기는 없음 - 복귀돌연변이시험 : 양성(섬썩부쟁이 추출물의 구성아미노산을 분석한 결과 시험물질 자체에서 히스티딘이 존재하는 것을 밝혀내어 위양성임을 확인) - 염색체이상시험 및 소핵시험 : 음성
④ 인체적용시험 제품의 표준화	제형(코팅정) 설정, 제조지시서 확립, 제품의 기준 및 시험법 설정, 안정성 protocol 개발 완료
⑤ 인체적용시험 실시	유효성 및 안전성 입증
⑥ 상승 및 상가 효과 원료 탐색	상승효과가 있는 배합원료 설정(in vitro, in vivo)
⑦ 제품의 표준화	제형 연구, 기준 및 시험법 설정, 유통기한 설정, 품질 관리
⑧ 개별인정형 원료 신청	기준규격 등 공인시험 자료 확보, Master file 작성

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	20				50												20		
최종목표	2	1		1		1			3			3	2		6			6		
연구기간내 달성실적	3	1		1		1			18			2	1		7			18		
달성율(%)	150	100		100		100			600			66.7	50		116.7			300		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	섬쑥부쟁이 전초 추출물 생산 기술
②	섬쑥부쟁이 추출물 지표성분 표준화
③	인지능력개선 효능기전 규명
④	안전성 평가 프로세스
⑤	인지능력개선 인체적용시험
⑥	제품 제조공정 표준화
⑦	기준 및 시험법 설정
⑧	안정성 Protocol 개발
⑨	개별인정형 인허가 프로세스

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		V					V	V		
②의 기술					V					
③의 기술					V	V				
④의 기술					V					
⑤의 기술					V					
⑥의 기술							V	V		
⑦의 기술					V		V			
⑧의 기술					V		V			
⑨의 기술									V	

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	원료의 산업적 생산이 가능하여 섬쑥부쟁이 추출물 확보 가능
②의 기술	지표성분 시험법을 표준화하여 원료의 품질 관리에 활용
③의 기술	개별인정형 심사 신청 자료로 활용, 다른 원료의 효능 평가에 활용
④의 기술	개별인정형 심사 신청 자료로 활용, 다른 원료의 안전성 평가에 활용
⑤의 기술	개별인정형 심사 신청 자료로 활용, 다른 원료의 인체적용시험 계획서로 활용
⑥의 기술	개별인정형 승인 후 제품화 단계에서 활용
⑦의 기술	제품의 품질 관리에 활용
⑧의 기술	유통기한 설정에 활용
⑨의 기술	개별인정형 신청을 위한 자료 준비에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	20				50												20	
최종목표	2	1		1		1			3			3	2		6			6	
연구기간내 달성실적	3	1		1		1			18			2	1		7			18	
연구종료후 성과창출 계획		2				1						2	1						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
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) 기술이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.