

117080
-03

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개()발간등록번호()

고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003388-01

국내 농작물을 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발

2021.01.22.

주관연구기관 / 경방신약(주)
협동연구기관 / 이노파마스크린
경희대학교
호서대학교

2021

농림식품기술기획평가원
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “ 국내 농작물을 활용한 수련의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발 ”
(개발기간 : 2017. 11. 01 - 2020. 10. 30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 01. 22.

주관연구기관명 : (주)경방신약

(대표자) 김 중 환 (인)

협동연구기관명 : (주)이노파마스크린

(대표자) 장 인 철 (인)

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자)

김 유 석 (인)

협동연구기관명 : 호서대학교 산학협력단 (대표자)

장 병 수 (인)

주관연구책임자 : 이 옥 원

협동연구책임자 : 박 관 원

협동연구책임자 : 심 인 섭

협동연구책임자 : 정 명 신

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117080-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.11.01 ~ 2020.10.31	단 계 구 분	(총 단 계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내 농작물을 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발			
연구 책임자	이 옥 원	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:270,000천원 민간: 90,000천원 계:360,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:810,000천원 민간:270,000천원 계:1,080,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	경방신약주식회사 연구개발부			참여기업명 이노파마스크린 경희대학교, 호서대학교	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

경방신약주식회사를 주관으로 이노파마스크린, 경희대학교 및 호서대학교의 4 개의 기관에서 국내농작물을 활용해 3 차년동안 후보물질의 선정, in-vitro, in-vivo, 시험법 개발, 대량생산의 가능성 및 임상시험을 통해 수면의 질을 향상시키는 소재를 개발하기 위해 연구하였습니다.

후보물질은 대두를 선정하였으며, 효능시험, 시험법 개발, 대량생산 가능여부 및 임상시험을 실시하여 각 기관에서 수행하고자 하는 시험을 실시하였습니다. 후보물질 선정은 동물시험에서의 유의성을 확인하여 최초의 후보물질로 시작한 고삼, 길경 및 대두의 3 개 물질 중 고삼은 식품으로 사용하는 것이 어렵다고 판단되었고, 효과면에서 대두가 길경보다 우수하여 대두를 선정하였습니다.

선정된 대두를 가지고 동물시험에 사용한 추출방법으로 실험실 규모로 추출 및 농축하여 동일한 패턴의 농축액을 얻었으며 이를 가지고 in-vitro, in-vivo 테스트 및 시험법 선정을 위해 연구하였습니다. 또한 농축액을 가지고 제제화하여 임상시험용 시제품을 만들었으며, 위약은 농축액을 제외한 동일처방으로 제조하여 임상시험용 대조약으로 사용하였습니다.

제제화는 충분히 가능하다는 결론이 나왔으며, 이를 토대로 Scale-up이 가능하였고, 자사생산량인 6 만포를 8시간이내에 제조하는 것이 가능함을 확인하였습니다. 또한 제품에 대한 분석법도 확정하여 시험법에 대한 밸리데이션을 통해 시험법의 타당성도 확인하였습니다.

다만, 임상시험에서 시험약과 대조약이 효과를 나타내는데에 차이가 없어 기능식품으로의 신청은 하지 못하였으나, 일반식품으로 제조하여 출시하는데에는 어려움이 없다고 판단되었습니다.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>선행연구를 통해 선발한 후보추출물 3 종(길경, 고삼, 대두)을 활용해 수면의 질 개선 기능성 식품소재개발을 위한 최종농작물 1 종 또는 복합추출물 1 종을 선정하고 표준화하여 사업화 기반을 마련함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - in vitro & in vivo 수면효과 평가 및 기전규명 - 지표물질 선정 및 기준규격확립, 소재 안정성 확보 - 인체적용시험 및 건강기능식품 원료인정을 위한 자료 확보 - 원료 최적공정을 통한 시제품 개발 및 대량공정 연구 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 최종 후보농작물은 협동기관에서 동물을 대상으로 효과를 시험한 결과 대두로 설정 - in vitro & in vivo 수면효과 평가 및 기전규명 - 대두추출물 분석 후 지표물질 2 종 설정(Daidzin, Genistin) 추출물에 대한 정량법 확정 및 시험법 밸리데이션 완료 - CRO를 통한 임상시험 실시 경희대학교 및 세명대학교에서 임상실시 - 대두원료의 국내산 확보 - 원료에 대한 추출방법 확정 - 농축액에 대한 기준설정 - 공인기관에 의뢰하여 정량, 유해물질, 영양성분등 시험 실시 - 농축액에 대한 안정성 시험 실시 - 제품화 연구를 통해 처방확정 - 제품에 대한 시험법 확정 및 시험 - 실험실규모의 제조를 통해 실생산 적용 실시 자사의 제조설비에서 제조가 가능함을 실제 제조를 통해 확인 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 대두를 이용한 연구를 통한 논문 작성 및 발표 - 특허 출원 - 농산물 확보의 원활함을 확인 - 연구개발을 위한 인력양성 - 제품화 가능성 확인 및 제조의 일관화 가능 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	수면의질	대두	기전	임상	시제품
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	sleeping quality	Glycin max	mechanism	clinical	prototype

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

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

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 국내 농작물을 이용해 수면의 질 개선을 위한 물질을 선정한다.
- 선정된 물질을 가지고 원료제조 방법 및 제품제조 방법을 확정한다.
- 이를 위해 각 기관에서 기전연구 및 효능효과를 탐색하여, 시제품과 대조제품을 제조하여 임상시험을 통해 그 효과를 입증하여 기능성 원료 인증을 목적으로 한다.
- 기능성 인증을 통해 제품을 출시하여 국내 농작물 재배 농가의 이익창출을 통해 안정적인 물질의 공급을 꾀하고자 한다.

1-2. 연구개발의 필요성

1) 연구개발의 개요

코드번호	B-04-01
------	---------

○ 연구개발개요

- 1) 급격한 노령화 및 국민의 스트레스가 증가함에 따라 수면의 질 개선 및 스트레스장애 극복을 위한 국내농작물을 활용한 기능성 식품소재를 탐색하고 정신건강과의 상관성 연구를 통해 기능성식품 소재개발, 기능성원료인정을 위한 인체시험 및 산업화기술 개발을 목표로 함.

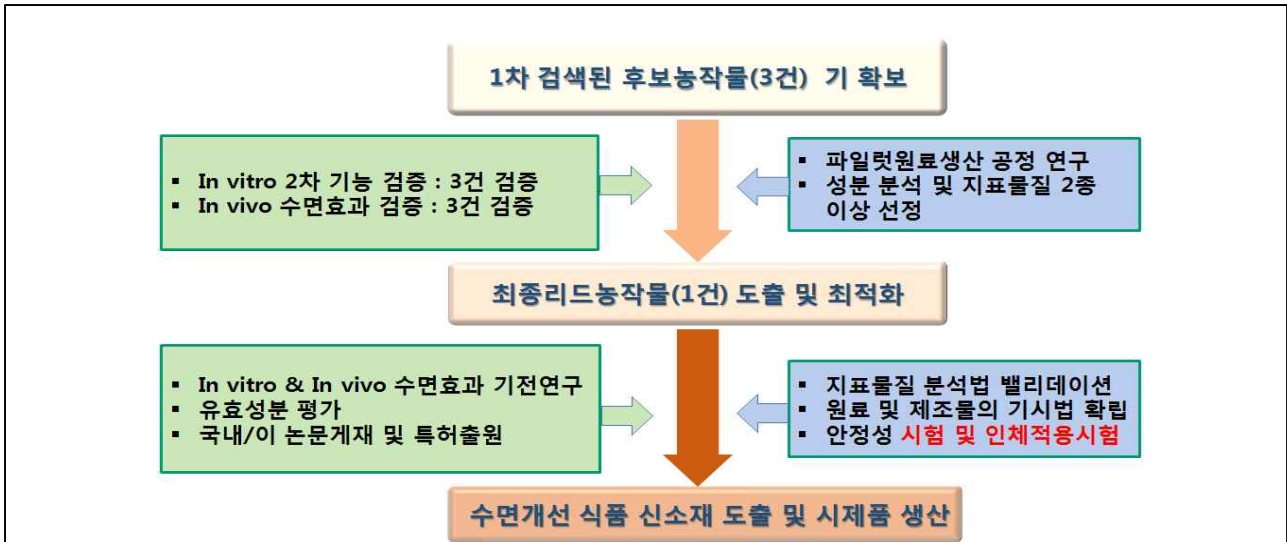
- 2) 동의보감 및 한의학교문헌 및 민간요법을 통해 알려진 수면 및 스트레스와 관련되어 국내

농산물 중 1 차 screening 시험방법(in vitro 또는 in vivo)을 사용하여 후보 농작물을 각각의 추출물로 3 종 (고삼, 길경, 대두)을 확보하였음.

- 3) 2 차 in vitro screening 방법 및 in vivo 수면개선 시험을 수행하여 후보추출물 3 종 또는 복합 추출물 중 1종을 최종 리드추출물로 선정함.
- 4) 최종리드추출물의 기능성 소재화를 위하여 in vitro & in vivo 수면효과에 대한 기전연구 수행, 지표물질 선정 및 기준규격 확립, 안정성과 안전성확보, 원료의 최적공정 및 시제품 개발을 수행하고자 함.
- 5) 수면의 질을 개선하는 인체 내의 신경전달 물질 및 호르몬으로는 GABA(γ -aminobutyric acid), 아데노신, 아세틸콜린, 세로토닌 그리고 몇가지 수면 유발 펩타이드가 알려짐. 본 연구에서는 세로토닌 작용 수용체인 2-HT_{2c}와 GABA 작용 수용체인 GABA_A-benzodiazepine receptor를 리드추출물 도출에 검색방법으로 사용함.

○ 핵심기술

- 1) In vivo 실험동물의 수면 효과 평가 기술 확보함 :
→ EEG 뇌파 측정을 통해 wake-up time, REM, NonREM 측정.
- 2) In vitro 세로토닌 수용체 (Serotonin Receptor) 작용물질 검색기술 확보함 :
→ 생체로부터 분리한 세로토닌 수용체를 사용하여 Protein chip을 자체적으로 제작함.
방사성물질을 사용하는 기존의 방법과는 달리 형광물질을 tagging 하여 수용체 binding 을 평가함.
- 3) In vitro GABA수용체(GABA_A-benzodiazepine receptor) 작용물질 검색기술 확립예정임 :
→ 생체로부터 분리한 GABA 수용체를 사용하여 Protein chip을 자체적으로 제작함.
Agonist에 형광을 부착시켜 수용체 binding을 평가함.
- 4) 기전연구를 위한 Proteomics 연구 기법 확립.
- 5) 천연물 성분 분석 기술 및 분석방법 밸리데이션 :
→ 기원료 가공의 기준으로 활용할 수 있는 최적 성분 선별 및 분석방법을 확립하여 기준 및 시험법에 활용할 수 있도록 함.



[그림 1] 연구개발 흐름도 및 최종목표

○ 기타

- 1) 인체적용시험 수행 :
 - 30 명 폐경여성을 대상으로 8 주 - 4 주 - 8 주 일정의 cross-over study 수행함.
- 2) 원료생산공정 및 시제품 생산기술(경방신약) :
 - 표준화된 원료생산 및 QC 규격이 확보된 시제품을 생산을 목표로 함.
 - GMP 원료생산 시설을 확보함.

2) 연구개발 대상의 국내·외 현황

코드번호	B-04-02
------	---------

가. 수면의 질 개선에 대한 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 국내 대부분의 업체는 정신건강과 관련된 바이오마커의 정립과 평가기술이 미비하여 관련 기술의 확립이 요구되고 있음.
- 스트레스 및 정서장애증 개선을 위한 식품 소재는 매우 한정적이고, 스트레스 및 정서장애증 관련 유전자 발현과 작용기작에 대한 연구는 초기 단계임.
- 수면의 질, 스트레스 개선 및 예방에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품은 전무한 실정이

며, 유사한 효능을 기대할 수 있는 식품 원료는 홍경천 추출물 (스트레스로 인한 피로 개선에 도움), 유단백가수분해물 (락티움, 스트레스로 인한 긴장악화에 도움), 감태 (정신건강 증진식품), 인삼, 홍삼, 매실 추출물 등이 있음.

- 만성 스트레스는 부신피질에서 부신피질자극호르몬 수용체(ACTH receptor)의 발현을 통해 코티졸 농도를 지속적으로 유지시키며, 정서장애증 증상을 나타내게 됨. 복분자, 인삼 추출물이 ACTH receptor에 작용하여 항스트레스 및 항정서장애증 효능을 나타내는 것으로 보고되었음.
- 생체리듬을 조절하는 것으로 알려진 멜라토닌은 산화방지, 노화억제, 면역강화의 기능이 있으며 낮에는 빛의 자극에 의해 멜라토닌 생성을 위한 효소의 활성을 억제함으로써 분비가 감소하고 밤에는 특정 효소의 활성으로 많은 양이 분비되어 수면을 유도하게 되며 이러한 원리를 이용하여 건강한 수면을 위한 식품 개발이 가능함.

○ 시장현황

- 국내의 경우, 정신건강 장애로 인한 사회적 비용이 약 10조원에 육박할 것으로 전망되고 있어 관련 기술 및 제품 시장이 확대될 것으로 전망됨.
- 국내의 불면증 유병률 수준이 서구 선진국의 수준까지 높아지고 있으나, 이에 대한 국가 차원 및 학계 차원에서의 관심과 개개인의 중요성 인식은 선진국에 비해 낮은 실정임.
특히, 수면 증진 건강기능식품의 경우 국내에서 거의 연구가 되지 않은 창의적인 연구분야로 전적으로 수입 수면제에 의존하는 실정임.
- 미국 및 유럽의 선진국에서는 다양한 천연 수면보조제(Dietary supplements for Sleep aid)들이 시장이 출시되고 있어 향후 외국제품의 국내시장 잠식이 예상됨.

□ 수면증진 건강기능식품

- 서울우유에서 '굿나잇밀크'가 출시되어 2008 년 히트상품으로 선정될 만큼 수면의 질 향상에 대한 국내 소비자의 욕구는 높은 것으로 보임.
- 2017 년 3 월 1 일 기준으로 식품의약품안전청에서 인정된 건강기능식품 및 기능성원료 가운데 수면 증진 및 개선에 대한 제품은 오직 한건이며 천연 식물성분을 이용한 건강기능식품 과학적 연구 및 제품화는 거의 없는 상황임.
- 2015 년 1 월 7 일 (주)에스앤디가 감태추출물의 수면의 질 개선에 도움을 줄 수 있는 원료로 생리활성기능 2등급 인정을 받음. 슬립큐 제품으로 판매됨.
- 산조인(땃대추씨, zizyphus jujuba Miller)을 주요소재로 한 제품이 있으나 식약처에 개별인정은 받지 않음.
- 기존의 원료물질 탐색연구에 백자인, 백하수오, 구절초 및 측백엽, 감초와 합환피에 관한 연구가 있음.

□ GABA 관련 제품

- GABA는 글루타민산, 글라이신과 함께 중추신경계에서 가장 일반적으로 쓰이는 신경전달물질로 발작 또는 우울증조절, 뇌세포 대사촉진 (학습능력향상), 기억력 증가, 스트레스 해소, 등 정신건강과 관련된 여러 기능이 알려져 있고, 혈압 강하, 비만 예방, 혈당 조절 기능이 알려져 있음.
- 식품에 GABA 물질의 함량을 높이는 방법으로 미생물에 의한 biotransformation기법을 사용하고 있음.

- GABA 관련 제품은 신창상역(주)의 발아현미제품 「자연미인」, (주)얼텍의 「살눈플러스」, (주)가바월드의 「발아현미미소」, (주)계명푸덱스의 「현미발아추출물」 등을 비롯하여, GABA 성분을 활용한 CJ제일제당(주)의 「햇반발아현미밥」 등이 출시.
- 빙그레, 남양, 서울우유 등의 우유업체도 GABA의 효능을 이용하는 발아현미 우유를 출시.
- 이외에도 증가집의 GABA김치, CJ의 햇반GABA, 대상의 키즈 마요네즈 등이 있음.

○ 경쟁기관현황

- 슬립큐 : 넥스트 BT (감태추출물 유통회사임)
- 감태추출물은 건강식품 개별인증원료로 등재되었고, GABA 수용체에 대한 효과는 실험적으로 확인되나, serotonin 수용체에 대한 효과는 유의성이 없는 것으로 확인됨.

○ 지식재산권현황

- 수면관련 국내특허는 기능성추출물 또는 의약품보다는 수면배계, 캡슐, 수면유도기, 유도안대, 보온장, 목도리, 수면 넥타이, 침대 등에 관한 특허가 대부분임.
- 식물소재 관련 특허는 다음과 같음.
 - 1) 수면에 영향을 주는 식물 추출물 조성물-등록번호: 1016679520000
 측백엽, 대추, 애기싸리의 잎의 추출물로 조성된 수면개선 식물추출물
 - 2) 수면장애 개선과 쾌면을 위한 건강식품 조성물-등록번호: 1009473530000
 산조인, 토란대, 연자육, 연근과 마그네슘으로 조성된 수면개선 건강식품
 - 3) 갈조류추출물을 포함하는 가바 A형-벤조디아아제핀 수용체 활성용 조성물 및 불안 완화, 경련 개선, 진정 작용, 및 수면 유도 및 개선용 조성물- 출원번호: 1020130002539
 갈조류 추출물을 유효성분으로 항불안, 항경련, 진정 및 불면증 완화 등

나. 수면의 질 개선에 대한 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황 및 시장 현황

- 수면(sleep)과 경제(economy)의 합성어인 수면경제(sleeponomics)란 신조어가 생겨날 정도로 최근 세계적으로 수면 관련 시장규모와 수면장애로 인한 사회적 비용이 크게 증가하고 있음.
- 미국의 수면관련시장은 년 200억 달러규모로 수면클리닉, 천연 수면보조제 등 다양한 산업 분야로 영역이 확대되고 있음(New York Times, 2007)
- 수면을 증진시킬 수 있는 자연요법에 대한 소비자의 관심이 높아짐에 따라 OTC 수면보조제의 시장이 확대되고 있으며, 2013년에는 75,900만 달러 규모로 성장.
- 정신건강과 관련된 식품소재는 주로 중추신경계에서 신호전달물질의 전구체 역할을 하는 필수아미노산, 복합탄수화물, 필수지방산, 비타민/미네랄 및 S-adenosylmethionine (SAM-e)를 대상으로 활발하게 연구가 진행되고 있음.
- 하버드대학교 맥린병원 연구팀은 생선, 호두, 당밀 등에 함유되어 있는 오메가-3 지방산과 유리당 전환 효소(galactose 1-phosphate uridyl transferase)을 스트레스에 노출된 쥐에게 공급한 결과 항정서장애제를 투여한 실험군과 같은 수준의 항정서장애 효능이 나타났음을 보고하였음.
- 녹차에서 추출한 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 성분을 조사 주입한 결과 알츠하이머 환자의 뇌에서 플라그형태로 형성되는 베타아밀로이드단백질의 생성량이 감소한다는 사

실을 발견함.

- 아쉬아간다 (Withania somnifera), 가시오갈피 (Eleutherococcus senticosus), 홍경천 (Rhodiola rosea)는 스트레스에 의해 나타나는 신체적 반응을 중화시킴으로서 스트레스 및 정서장애증 약화 작용을 하는 것으로 보고되었음.
- 최근 인도, 중국, 일본 등에서는 Trasina(ayurvedic herbal formulation), 중국당귀 (Angelica sinensis)등을 이용한 학습 및 기억장애 동물모델에서 기억증진효과를 보여주는 연구결과를 보여 자국 내 생약 및 유용 신물질을 개발하고 치매 치료용 신약개발을 위한 신경 회로 규명 및 이에 근거한 실험적 기억력 학습연구로 강력한 치매 치료물질을 개발하려는 움직임이 활발한 실정임.
- 일본 타이요 화학 등은 수면상태가 좋지 않은 폐경기 여성을 대상으로 차에 함유된 테아닌 200 mg을 취침 1 시간 전에 물로 복용시키고 심박수에 의해 추정되는 자율신경 활동에서 수면의 질을 검토한 결과 수면 시에 우위가 되는 부교감신경활동이 활발해지는 것을 확인했다고 보고하는 등 수면의 질 개선에 관한 연구가 활발함.
- 일본에서 스트레스나 긴장을 풀어주는 효과가 있는 소재로 주목받고 있는 것은 유자씨 엑스, 산테아닌, 고추냉이 솔피닐 등으로, 이들은 그 자체만으로는 긴장 이완이나 항스트레스 작용이 약하지만 다른 소재들과 배합함으로써 더 큰 효과를 얻을 수 있게 하는 소재의 대표 격으로 알려져 있음.
- 또한, 일본 기능성식품 시장에서 가장 주목받은 항스트레스 소재는 감마 아미노낙산 (GABA)이며, 에자키그룹이 발매한 멘탈밸런스초콜릿GABA(캔제품 GABA 420 mg 배합 · 파우치제품 GABA 140mg배합)가 히트치는등 GABA를 사용한 상품들이 출시되고 있음.

○ 지식재산권현황

- 수면관련 해외 시품 관련된 특허는 PCT(Patent Cooperation Treaty, 모든 회원국에 동시 특허 적용 국제특허) 122건, 일본에서의 특허 321건이 검색됨.
- 내생적 멜라토닌 분비리듬을 조절하는 조성물질, 인삼에서 유래한 GABA성 신경단위활성제, 헤매로칼리스 플랜트 추출물 등 다양한 식물과 허브의 추출물을 이용한 건강기능식품 소재가 등록되어 있음.

다. 불안/우울 관련 연구동향

○ 기술현황

- 우울증치료에는 이야기치료, 인지행동치료 등 정신치료 방법과 SSRIs, SNRIs 등을 사용하는 약물 치료 등이 있음.
- 이외에도 광치료나 ECT(전기경력요법), TMS(경두개자극법)등의 방법을 이용하여 치료하고 있으며, 이 중 가장 널리 사용되는 방법은 약물치료임.

○ 치료제 현황

- 현재 국내에서 처방되는 우울증치료제로 SSRIs 계열의 대표 제품은 한국룬드벡 '렉사프

로(에스시탈로프람)', 화이자 '졸로푸트(서트랄린)', 릴리 '푸로작(플루옥세틴)', GSK '세로자트(파록세틴)', 한미 '로프람(시탈로프람)' 등이며, SNRIs 계열에서는 릴리 '심발타(둘록세틴)'와 화이자 '이팩사(벤라팍신)'가 널리 처방되고 있음.

- SSRIs는 현대 항우울제의 대명사로 불릴 정도로 널리 처방되고 있으며 TCA보다 안전하다고 알려져 있지만, 최근 연구에 의하면 우울증치료제 SSRIs 아동과 청소년에게 자살 시도의 위험을 증가시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있는 등 다양한 부작용이 존재하고 있음.
- 또한, 덴마크 연구팀의 보고서에 따르면 우울증치료제 SSRIs 계열의 부작용으로 미국 FDA가 정의한 자살을 초래하는 전단계인 불안, 악몽, 초초감, 신경과민, 염려, 무기력감, 떨림, 우울감, 비정상적 바램, 비정상적 사고 등이 증가할 수 있으며 이밖에도 체중 증가, 오심, 설사, 불면증, 두통, 근경련, 위장관 장애 등의 부작용 증세가 보고되어 있음.
- 이와 같은 부작용등의 문제로 보다 안전한 천연물유래성분의 항우울 식의약소재의 개발이 지속적으로 요구되었음.

○ 시장 및 지적재산권 현황

- 국내 우울증 환자는 나이, 성별에 관계없이 증가되고 있음. 건강보험심사평가원의 '건강보험 및 의료급여 심사 결정' 자료에 따르면, 우울증 진료를 받은 환자가 2011년 약 60만 2천명에서 2015년 68만 명으로 4년 사이 13.0 % 증가함. 65세 이상의 노인 우울증 환자 수는 22만 명으로 최근 5년간 연평균 6.4 %씩 증가 추이를 보였으며, 19세 이하 인구에서도 꾸준히 증가하여 최근에는 10명 중 1명 이상 소아우울증을 겪는다고 사료됨. 통계청의 '2014년 사망원인통계 '와 보건복지부에서 발표한 '2013년 자살실태조사' 에 따르면, 10대 이상 60대 미만에서 자살에 의한 사망률이 높게 나타나며, 자살 원인 중 63.7 %로서 가장 큰 비율을 차지하는 것이 우울장애로 나타남.
- 우울증을 호소하는 환자의 증가는 시장규모의 성장을 가져왔으며, 우리나라의 우울증 시장 규모는 2014년 처방액 기준 전년대비 10.5%, 2010년 대비 22.2% 상승한 1379억원으로 점차 증가함을 볼 수 있음.
- 미국의 시장연구 및 자문업체인 글로벌데이터의 2015년 보고서에 따르면 주요우울장애 약물 시장 규모가 2015년 기준 32억 달러이며 앞으로 연평균 성장률 6.6%로 발전될 것이라 전망함.
- 우울증 치료에 관한 토론과 연구 또한 지속적 증가 추세를 보이고 있다. 미국의학협회저널에서 발표된 2015년 자료에 따르면 2013년에 발표된 논문의 양이 5년 사이 2배 이상 증가되었다고 밝힘.
- 수면장애 중 2012년 기준 '불면증' 이 23만7,931명(66.7%)으로 가장 많은 비율을 차지하고 있음. '불면증' 의 원인으로는 다양한 원인들이 관여될 수 있다. 비만인구의 증가, 급격한 환경의 변화, 스트레스 증가, 현대인의 과도한 업무에 따른 수면습관의 변화, 나쁜 수면위행(숙면을 위해 가져야 할 습관) 등이 일차적인 원인이며, 정상적인 노화과정에 따른 수면 구조의 변화에 의해서도 발생할 수 있음.
- 이러한 불면증은 스트레스와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며, 행동과학 분야

에서 관련 분야에 대해 10만개 이상의 논문과 저서가 출판될 정도로 스트레스와 수면간의 관계를 규명하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있음. 따라서 현대인들의 수면장애의 여러 원인 중 많은 원인으로 지목되고 있는 스트레스를 완화시켜 주며 불면증 증상을 개선시켜 줄 수 있는 기능성 식품 소재의 개발은 격변하는 사회로 인하여 갖가지 스트레스로 몸살을 앓고 있는 오늘을 살아가고 있는 현대인들에게는 가장 필요한 과제이며, 약물의 오·남용을 줄이고 기능성 식품소재를 섭취함으로써 건강한 삶의 질을 높이기 위한 중요한 역할을 할 것으로 보임.

3) 연구개발의 중요성

코드번호	B-04-03
------	---------

가. 정신건강 및 수면건강 개선식품의 중요성

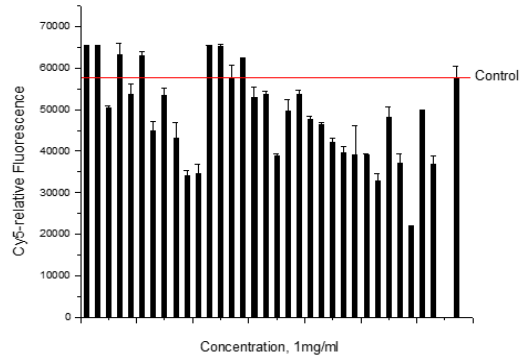
- 유럽의 대형 연구이니셔티브공동체인 ETP(Europe Technology Platform) ‘Food for Life’에서 정신건강에 대한 식품의 영향에 관한 연구가 ‘Food & Health’ 분야의 3대 전략적 연구의제 중 하나로 선정되었음.
- 정신건강 증진식품 분야는 현재 선진국 대비 기술수준 40% 및 기술격차 15년 정도로 크게 뒤쳐져 있어 단기간에 선진 G7수준과 아시아 최고수준의 기술력을 확보하기 위한 시급한 과제임.
- 서구 선진국의 경우 천연 수면보조제 시장에 대한 요구를 반영하듯이 관련 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있으며, 수면증진 효과가 있다고 알려진 대부분의 허브들에 대한 연구가 수행되었음.
- 가장 대표적인 valerian의 경우 meta분석까지 이루어졌을 정도로 폭넓게 연구되었음(Bent et al., 2006).
- 반면 국내의 경우 식품자원에 대한 수면증진 효과 연구가 미미하여 식품성분의 수면증진 효과 평가체계를 확립하고 이를 통해 고부가가치 수면증진 제품을 개발하는 것은 매우 긴급요함.
- 식품의 수면증진 효과에 대한 국내연구가 그동안 활발하게 진행되지 못했던 것은 수면에 대한 기초연구가 부족하고 과학적인 효능평가가 가능한 협동 연구시스템이 이루어지지 못했기 때문.
- 수면증진 효과를 세포 수준, 동물 및 임상에서 평가할 수 있는 융합/협동 연구를 통한 제품화가 요구됨.

나. 수면 장애와 신체적, 정신적 질병과의 상관성

- 수면은 일상생활에 많은 영향을 미치고있으며, 신체적기능 뿐 아니라 정신적기능까지 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있으며 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있음.

**수면불량으로 발생하는 신체적
정신적 기능의 이상**

기억과 학습
대사조절 및 체중, 성장
안전사고(졸음운전, 근로사고 등)
기분(우울증, 활력저하)
심혈관 건강
면역력 저하, 암 저항력 저하, 비만
및 당뇨 유발 등



[그림 2] 수면장애가 미치는 영향 출처: https://en.wikipedia.org/wiki/Sleep_deprivation

- 수면장애 및 스트레스가 동반되면서 각종 질병을 직간접적으로 유발함. 세계 인구의 1/4이 불면증을 경험하고 있으며, 이 중 10 %는 만성불면증을 겪고 있음. 성인의 50 % 정도가 1주일에 1회 이상 불면증 증상을 경험하였으며, 30 ~ 40 %가 일과성 불면증(3주 지속), 10 ~ 15 %는 만성적인 불면증(4주 이상 지속)을 호소하는 것으로 나타남¹⁾.
- 특히, 노인의 경우 수면을 정상적으로 취하지 못하면 평균수명이 단축되는 경향을 보여 고령화시대에 수면의 중요성은 더욱 확대되고 있음(Dew et al., 2003).

다. 수면 장애의 경제적인 영향

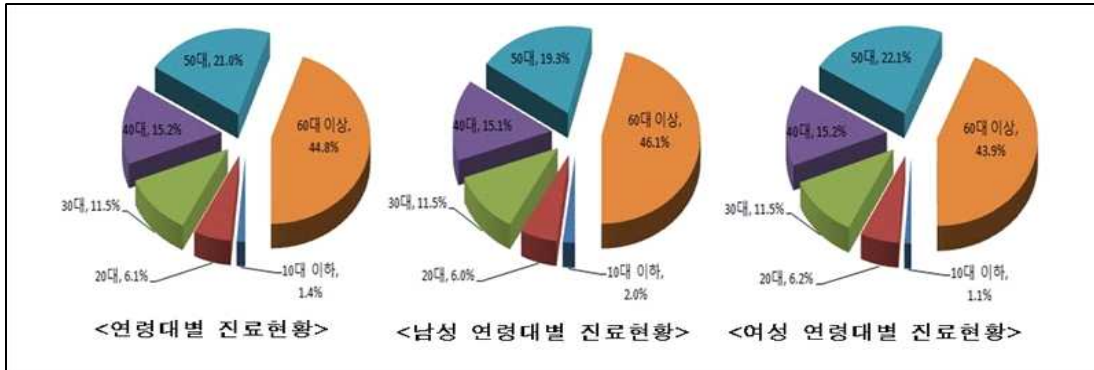
□ 국제현황

- 수면이상의 단순히 피곤한 것 이상의 일상생활에 중대한 영향을 미쳐 의학적, 사회경제적 비용을 증가시킴.
- 미국의 경우 전체 인구의 1/3가량의 수면장애를 가지고 있으며, 그 중 10 ~ 15 %가 불면증으로 진단받았음
- 일본의 경우 유병율이 21.4%, 영국의 경우 37%, 말레이시아 33.7%, 한국에서도 22.8%로 높은 비율을 유지하며 매년 증가하는 추세를 보이고 있음²⁾.
- 이러한 유병율로 인해 불면으로 인한 경제적 비용은 매우 커서 미국의 경우 매해 약 300 - 350억 달러의 비용이 소요되며 6개월간 성인이 불면증으로 인해 직간접적으로 지출하는 비용이 1253달러 이상이라는 보고가 있음³⁾
- 의학적 경제적 손실 외에도 수면불량으로 인한 낮 동안의 생산성감소로 인해 발생하는 경제적 손실까지 따질 경우 그 손해는 막대함.

□ 국내 현황

- 건강보험심사평가원 분석자료에 따르면 2015년 불면증으로 병원을 찾은 환자는 53만 3100명으로 2011년 38만 3150명 대비 39.1%증가한 것으로 나타남.
- 병원을 찾지 않는 환자가 상당수라는 점을 고려하면 실제 환자수는 더 많을 것으로 추정됨. 2014년 IMS헬스 데이터 기준 국내 수면제 전문의약품 시장 규모는 240억원으로 졸피뎀이 전체 처방성분 중 약 736%를 차지했음⁴⁾.
- 국민건강보험공단에 따르면 수면장애로 인하여 진료를 받은 사람은 지난 2008년 22만 8천명에서 2012년 35만 7천명으로 최근 5년 동안 12만 9천명(1.57배) 늘었고, 연평균 11.9% 증가한 것으로 나타남.

- 성별로는 2012년 기준 남성은 14만 5천명, 여성은 21만 2천명으로, 여성이 남성에 비해 1.46배 증가.
- 연령별 비율에서는 50대가 7만 5천명(21.0%)으로 단일 연령대로 가장 많았으나, 60대 이상 진료환자가 전체 진료환자의 44.8%를 차지하여 노년층이 수면 장애문제로 고통을 받는 것으로 나타남.



[그림 3] 수면장애를 호소하는 사람들의 특징 (2015년 국민건강보험공단)

라. 수면 장애의 기전 및 원인

- 수면장애의 시점에 따라 잠들기 힘든 입면장애, 중도각성이 많아지거나 꿈이 많아서 깊이 잠이 들 수 없는 수면유지장애, 아침 일찍 깨어 그 이후에는 잠들지 못하는 조기각성의 세 가지 형태가 있음.
- 신경망상체, 뉴런과 분자들의 수면의 많은 부분에 기여하며, 단독적인 과정이 수면을 조절하는 것이 아닌 다양한 조절 인자에 의한 복합적인 과정으로 알려져 있음.
- 수면박탈이 수면의 문제를 야기하는 것은 아니며 불면증을 호소하는 사람이 그렇지 않은 사람보다 반드시 잠을 더 못자는 것은 아니며, 불면증 호소자체가 피로나 졸리움 같은 불면증의 즉각적인 영향 그리고 우울과 불안과 같은 정서 상태와 관련이 있는 것으로 나타남.
- 비만, 극심한 스트레스, 과도한 업무 등도 수면 장애의 원인으로 사료됨.
- 기타 다른 수면장애의 원인들로는 수면 무호흡증, 하지불안 증후군, 주기적 사지운동 증후군, 수면 위상 지연 증후군, 율혈성 심부전 등이 있음.

마. 수면 장애의 약물치료, 비약물 치료

□ 약물치료

- 약물 치료제는 향정신성 약물과 비향정신성 약물로 나뉨.
- 향정신성약은 항불안제로 쓰이는 벤조디아제핀(BZ)계열제제와 졸피뎀등이 속한 비벤조디아제핀계 제제로 분류됨.
- 비향정신성약으로는 코감기약을 먹었을 때 졸리는 증상을 이용한 항히스타민제 독세핀과 생체리듬조절 호르몬 멜라토닌이 있음.

□ 비약물치료

- 비약물 치료의 경우 대표적인 것이 인지행동 치료가 있음.
- 인지행동치료는 그 효과가 무작위 임상연구를 통해 입증되었으나 널리 이용되기에는 잘 훈련된 치료사들의 수가 부족함이 있는 상황임).

- 이에 다른 보완대체의학을 통한 치료법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 대표적인 것으로는 침치료(전침치료, 이침치료, 등) 및 이완요법, 자극조절요법, 수면제한요법, 광선치료요법, 시간요법, 인지정신치료, 수면 위생 등이 있음.

바. 기존제품의 문제점 및 개선 방안

□ 기존제품의 문제점

- 벤조디아제핀계열의 수면제는 수면-각성주기를 조절하여 사람들을 잠에 들게 해주는 역할을 함.
- 수면제의 경우 현재 약 70%가 장기복용자, 50%가 60세 이상의 고령층에서 소비되고 있는데 4주 이상의 장기복용은 의존성 및 부작용의 문제를 가지며, 노인 및 임산부 등은 섭취가 제한되기도 함.
- 수면제의 경우 효과가 정밀하지 못하며, 수면 구조의 변화, 심리적 운동성과 인지기능의 저하, 약물 의존성 유발, 수면 무호흡 등의 부작용을 동반함.
- 대표적인 수면제 부작용으로 수면제를 복용한 사람 대부분이 단기 기억력 감퇴와 아침에 잠을 덜 깬 상태로 운전을 하다가 발생하는 자동차 사고 등을 들 수 있음.
- 약물치료는 단기간의 불면관리에는 효과적이거나 장기적 효과에 대한 근거는 부족한 실정이며 장기복용시 내성, 금단증상, 진정 및 정신운동 기능장애, 주간졸음 유발, 식욕부진, 복부팽만감, 소화장애, 불면증이 더욱 고착화되고 약물 의존성을 높이는 부작용이 있는 것으로 알려져 있음.

□ 개선 방안

- 인지행동 또는 기타 다른 대체요법의 사용을 병행함으로 수면의 질 개선
- 식품의 활용 등을 통한 수면의 질 개선
- 수면환경 및 일과조정으로 인한 수면의 질 개선
- 개선방안에 대한 연구가 미비하고 초기단계로 앞으로 개선방안에 관한 연구가 시급함.

사. 수면장애와 건강기능 식품

□ 수면장애 건강기능 식품

- 미국, 유럽등지에서는 valerian, hop, kava-kava, St,John's wort, chamomile 등 천연식물 추출물 및 활성성분에 대한 수면증진 기능성에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔음.
- 중국과 일본 등지에서도 관련 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있음. 이러한 기능성식품의 목표는 '편안한 수면에 도움을 준다', '밤에 자는 잠을 증진시킨다', '수면의 질을 증진시킨다' 로 불면증을 치료하는 것이 아니라 일상적인 수면의 질을 증진시키거나 건강한 수면에 도움을 줄 수 있는 측면을 강조한 식품의 기능을 살린 것임. 수면 보조제로서의 기능성, 간헐적인 불면의 경감, 휴식의 촉진을 목표로 함⁶⁾.

□ 수면증진 기능성 식품 연구개발

- 기능성식품의 연구개발 흐름은 일반적으로 그림과 같이 효능스크리닝, in vitro, in vivo 효능평가, 지표성분 분리, 작용기작 규명, 공정개발, 원료표준화, 인체적용시험등으로 이루어짐.

- In vitro 평가방법에서 선정된 대상 소재의 경우 수면증진 가능성을 가질 수 있는 가능성만을 가지고 있으며, blood-brain barrier 투과성을 알 수 없기에 동물에서의 효능 확인이 매우 중요함.
- 인체적용시험에서의 수면증진 기능성은 일반적으로 수면다원검사(polysomnography) 및 설문조사를 통해 평가되고 있음. 해외에서 이루어지는 수면증진 기능성식품 인체적용시험의 경우 대부분 수면다원검사와 설문조사를 병행하여 연구가 이루어져 있음. 설문조사를 통해 가능성과 적정 유효농도를 평가한 후 수면다원검사에 들어가는 것도 효율적인 방법이 될 수 있음.

아. 수면증진 기능식품의 효용성 및 개발 필요성

- 현재 치료법으로 사용되어지는 약물치료 및 비약물치료는 장기간의 사용이 어렵고, 전문가의 도움을 받아야 하는 등 지속적인 치료가 어렵다는 단점이 있음.
- 대부분의 수면장애의 경우 장기적인 경우가 많고 다양한 양상으로 나타나는 경향이 있으며 신체적 문제 뿐 아니라 신경정신과적 문제를 동반하는 경우가 많음. 결국 단기적인 치료법으로 일시적인 개선 효과를 기대할 뿐 근본적인 치료 및 장기적인 치료가 되지 못함.
- 따라서 장기적인 중재가 가능하고, 부작용이 없고, 수면증진의 기능이 있는 식품을 개발 될 경우 그 자체만으로 효용가치 뿐 아니라 다른 수면치료방법의 보조적인 요법으로 가치가 높을 것으로 판단됨. 실제로 서구의 여러 나라와 중국 일본 등에서는 수면개선의 기능을 가지고 있는 식품을 개발하고 있으며 이에 관한 개발 가능성은 매우 큼.
- 현재 국내의 수면증진 기능성식품의 시장은 형성단계에 있다고 볼 수 있는데 현재 국내 불면증의 급격한 증가 추세를 감안할 때 향후 5년 이내에 년 500억 원 이상의 시장 형성이 가능할 것으로 예상됨.
- 따라서 우리나라의 민간요법 및 한방 고문헌에서 알려진 국내 농산자원의 수면증진 효과를 탐색하고 과학적으로 입증된 우수한 제품의 개발이 긴요한 실정임.

4) 선행연구 내용 및 결과

코드번호	B-04-04
------	---------

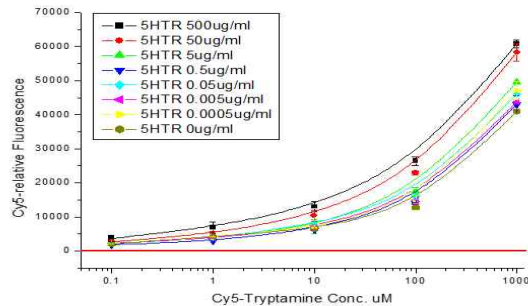
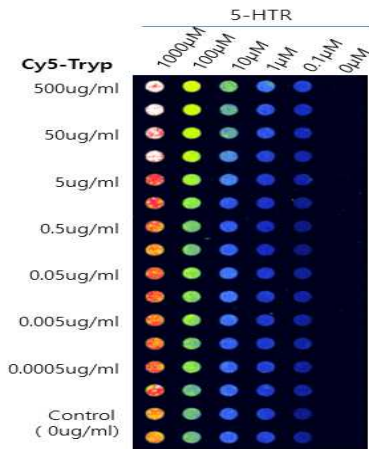
가. 수면의 질 개선 효능이 기대되는 물질 탐색

- 한의학 또는 민간의학에서 수면의 질을 개선하는 효과가 있는 물질들을 탐구하고 조사하여 약 35종의 후보추출물을 탐색함

나. In vitro에서 5-HT2c 수용체(serotonin receptor)의 길항 농산물 탐색 실험연구

□ Serotonin receptor binding system 구축

- Protein chip을 이용하여 5-HT2C 수용체를 고정시킨 후, 형광물질 Cy5로 표지한 agonist인 Tryptamin을 반응시켜 5-HT-Tryptamine 상호작용 시스템을 구축함.

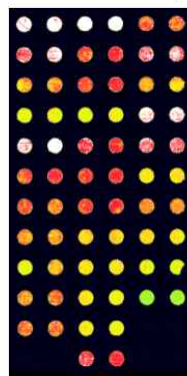


[그림 4] Serotonin receptor binding system을 이용한 탐색

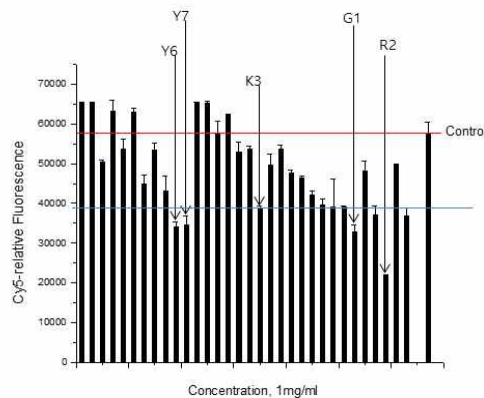
□ 5-HT2C receptor binding assay를 이용한 농산물 탐색

- 5-HT2C receptor binding assay를 이용하여 5-HT2C 수용체의 antagonist로 작용할 수 있는 농산물을 34종 이상을 탐색함.

5-HT2C Protein Chip 약제 1.0 mg/ml



C1	C2	C3
C4	Y1	Y2
Y3	Y4	Y5
Y6	Y7	O1
O2	O3	O4
K1	K2	K3
K4	K5	K6
K7	O5	S2
S3	O1	G1
P1	M1	R2
G2	SOCG	x
N.CON	Backgr ound	x

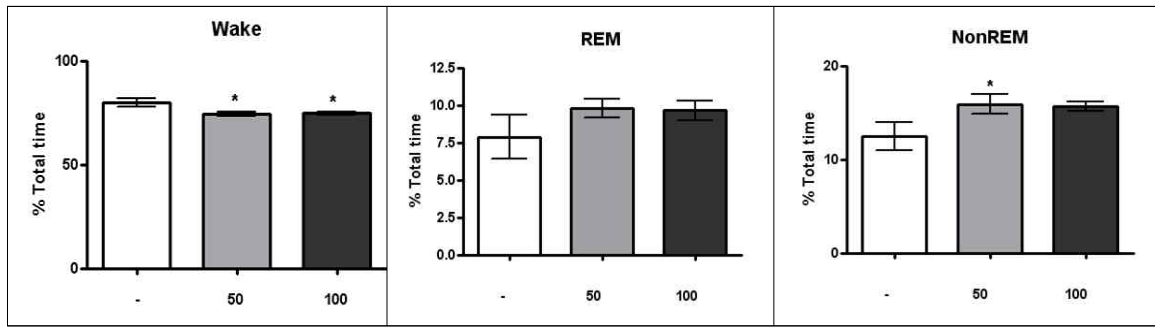


[그림 5] 5-HT2C receptor binding assay를 이용한 농산물 탐색

다. In vivo 스트레스성 수면장애 동물모델 확립.

□ In-vivo 수면효과 동물모델 확립

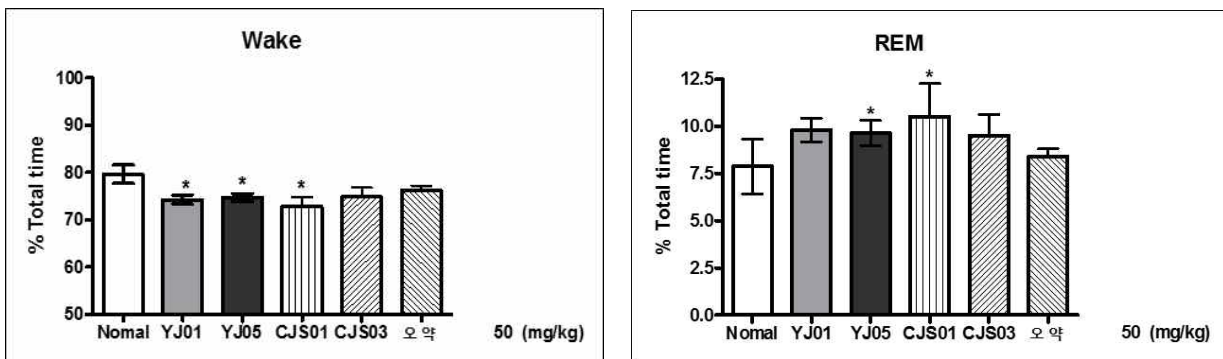
- Wake up 시간, REM, NonREM 시간 측정



[그림 6] In vivo 수면효과 동물모델 확립

□ In-vivo 동물실험에서 도출된 후보추출물

- 5가지 물질(YJ01, YJ05, CJS01, CJS03, 오약)에 대한 수면효과 검색을 실시하였으며, 각 군당 8마리의 랫드로 군을 나누고, 물질 투여량은 50mg/kg로 하였음.



[그림 7] In vivo 동물실험에서 도출된 후보추출물 결과

라. 위의 수면의질 개선 후보추출물 탐색결과 3종의 농산물의 개별추출물을 후보추출물로 확보함.

□ 고삼 :

콩과식물의 다년생식물로 줄기 및 뿌리를 사용함. 건위, 이뇨, 해열, 진통, 살충약으로 황달, 배뇨곤란, 음, 습진, 마른버짐 등에 사용한다. 수렴성지혈 작용이 있어 적리와 설사, 치질, 자궁출혈, 흰이슬에 사용함. 약리작용으로 강한 살균력, 항균소염작용, 소화기의 세균성이질, 알칼로이드들이 이뇨작용이 있음. 급성장염에 지사효과, 당뇨, 피부진균억제 등이 보고됨.

□ 길경 :

초롱꽃과의 다년생식물로 일본, 한반도, 중국과 동시베리아에 분포함. 뿌리를 사용함. 담을 제거하고 농을 없애는 효능. 폐기를 잘 통하게 하여 인후를 편하게 함. 가래와 기침을 억제하고 기관지염증에 도움이 됨. 약리작용으로 진통진정, 해열, 혈관확장, 항괴양, 진해거담, 혈당강하, 항염증, 면역 활성화, 이뇨, 항종양, 항균작용 등이 보고됨.

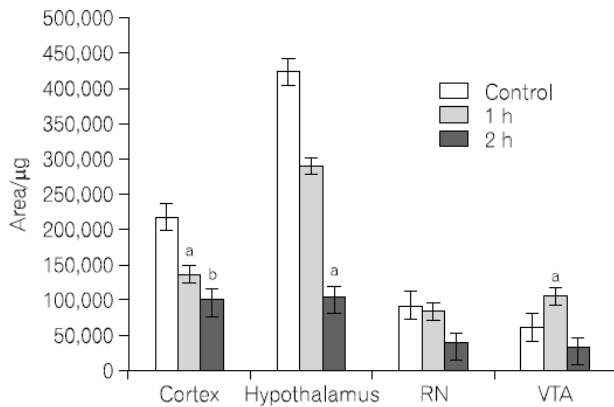
□ 대두 :

콩과식물로 단년생으로 열매를 사용함. 3대 영양소, 비타민 및 미네랄이 풍부하여 피로회복 및 건강유지에 도움이 됨. 아미노산 중 세로토닌 전구체인 트립토판 풍부하며, 정신안

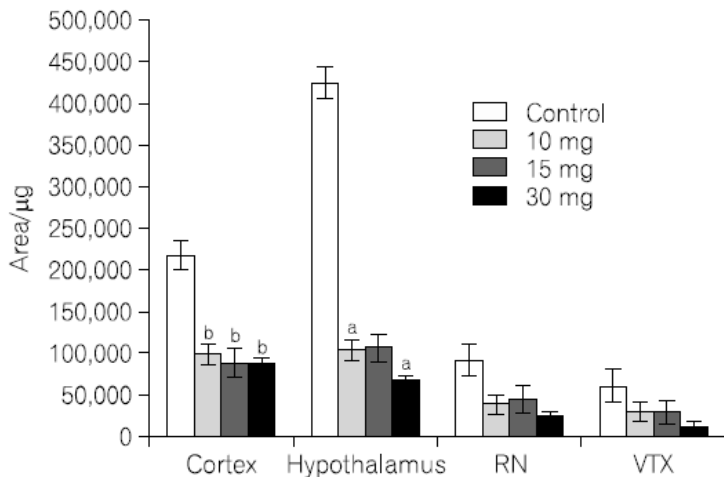
정에 관여하는 라이신, 류신, 글루타민산 등이 함유됨. 칼슘과 마그네슘이 높아 효소작용을 돕고, 긴장, 불안, 우울증, 불면증 등의 정신적 증상 완화효과 기대. 레시틴이 뇌신경전달물질의 전구체로도 사용되어 뇌의 기능을 활성화시킴. 대두 이소플라본(플라보노이드, 제니스테인 및 다이제인 등)이 폐경기여성에 도움이 됨.

마. 5-HT2c, GABA 신경계와 수면 간의 상관성에 대한 연구결과

- 수면방해 물질인 카페인을 10mg/kg의 농도로 복강투여한 1, 2시간 후 뇌 부위별 GABA 농도를 측정한 결과, 시간적 경과에 따른 감소경향 및 부위별 차이를 보임. 대뇌 피질과 시상하부에서 대조군에 비해 유의미한 감소를, 슬기핵에서는 감소경향을 보임. 복측피개영역에서는 1시간 이후에 증가하다 2시간 이후에는 감소함.



- 카페인 농도별 GABA 변화량을 측정한 결과, 투여용량에 비례하여 GABA 농도의 감소경향을 보임. 대뇌피질과 시상하부에서는 유의미한 감소를, 슬기핵과 복측피개영역에서는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보임.



1-3. 연구개발 범위

1.3.1 연구개발의 최종목표

		코드번호	B-05-01
구 분	내 용		
최종목표	<p>선행연구를 통하여 선별한 후보 농작물(고삼, 길경, 대두) 3 종의 각각의 추출물을 활용하여 수면의 질 개선 건강기능식품 소재개발을 위한 최종 리드농작물 1 건 또는 복합물질 1 건을 선정하여 원료를 표준화하고 파일럿 생산을 통해 시제품을 생산함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - In vitro & in vivo 수면효과 확인 및 기전 규명 - 지표물질 선정 및 기준규격 확립 및 안정성 확보 - 건강기능 식품 원료인정을 위한 인체적용시험 수행 - 원료의 최적공정, 시제품 개발 및 제품화 연구 		

1.3.2 연구개발의 세부목표

구 분	내 용		
세부목표	<p>[원료의 최적공정 및 제품 개발 - 경방신약주식회사]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료 파일럿 공정 최적화 및 시제품 생산 - 원료 및 제조물 분석을 통한 품질관리 기준 확립 - 원료 및 소재의 안정성 연구 - CRO를 통한 인체적용시험 실시 - 대량공정을 통한 제품화 연구 및 비즈니스 모델 확립 <p>[In vitro 수면효과 확인 및 기전 규명 - 이노파마스크린]</p> <ul style="list-style-type: none"> - In vitro 5-HT2c 새로운 측정법을 사용하여 후보추출물 3 종의 2 차 기능성 평가를 통한 리드추출물 1 종 또는 복합물질 1 종을 도출. - 최종 리드추출물 1 종에 대한 기전연구. - Proteomics 기법을 사용하여 관련 신경전달물질 및 신호전달체계 연구. - in vitro 기능성시험을 통한 유효성분 확인. <p>[In vivo 수면효과 평가를 통한 리드농산물 도출 - 경희대학교]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 후보추출물 3 종 추출물에 대하여 in vivo 수면효과 평가를 통한 리드추출물 1 종 또는 복합물질 1 종을 도출. - 투여횟수와 투여기간의 최적화를 통한 리드추출물의 투여조건 최적화. - 리드추출물의 기전연구 및 유효성분의 in vivo 수면 증진 평가. <p>[지표성분 및 규격 확립 - 호서대학교]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 후보 추출물 및 용매분획의 성분 분석을 통해 지표 성분 2종 이상 도출. - 지표성분 2종의 분석 조건 확립 및 분석법 밸리데이션 연구 수행. - 산지 또는 배치에 따른 추출물 및 제조물의 지표물질분석 및 기준범위 확립. - 분획제조 및 성질규명, 유효성분 분석. 		

1.3.3 연차별 개발목표 및 내용

가. 1 차년도 개발 목표 및 내용

1. 개발 목표 : 수면의 질 개선 기능성 최종 리드농작물 도출

2. 기관별 개발목표

2.1 주관연구기관 (경방신약주식회사)

- 원료의 기시법 표준화
- 원료 가공 연구 및 파일럿 원료 생산
- 인체시험을 위한 CRO 선정 및 계약

2.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

- In vitro 5-HT_{2c} 및 GABA 수용체 시험법을 사용하여 후보추출물들 (1 차 3 종 추출물 검색에서 도출된 물질 3 종 추출물)의 2 차 기능성 평가를 통한 리드추출물 1 종 또는 복합물질 1종을 선정

2.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

- 후보추출물 (3 종)의 in vivo 수면 효과 평가를 통한 리드농산물 도출

2.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

- 후보 농산물의 성분 분석, 지표 성분 도출, 성질규명
- 2 종 물질의 지표물질에 대한 동시 분석법 확립

3. 기관별 개발내용 및 그 범위

3.1 주관연구기관 (경방신약주식회사)

3.1.1 리드추출물 원료의 표준화 및 안정성 확보

3.1.1.1 원료의 기준규격 검사

- 리드추출물의 식품공전상의 규격을 기준으로 기준규격 검사를 시행함.

3.1.1.2 구성원료의 안정성 검사

- 중금속 및 잔류농약 시험을 식품 기준에 합당하게 시행함.
- 기타 유해물질 검사를 시행함.

3.1.1.3 추출방법 [Pilot 수량으로 진행, 실생산로트크기의 0.1 ~ 0.2 배 크기]

- 추출법 : 원료투입량에 대한 정제수 투입량의 변화 (예 : 7, 8, 9, 10 배)
- 온도 : 원료와 물 투입량에 대한 최적 추출 온도 조건 설정 (예 : 80, 85, 90 ℃)
- 시간 : 추출온도와 추출시간의 복합적인 인자를 적용하여 설정 (예 : 4, 5, 6 시간)
- 여과(50 mesh)
- 농축 조건의 최적조건 설정 (예 : 농축시간, 농축탱크온도 및 감압조건 등)

3.1.1.4 제형확정 및 생산공정 확립

- 추출조건, 제형 및 생산공정을 확립하고 이를 따라 비임상용 시제품을 생산하여 추후 연구에 공급하고자 함.

3.1.1.5 파일럿 원료 생산

- 동결건조 또는 분무건조를 이용한 추출물의 농축

3.1.1.6 기준 및 시험법 설정

- 확인시험, 함량측정, 유해물질, 중금속, 미생물한도시험 등

3.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

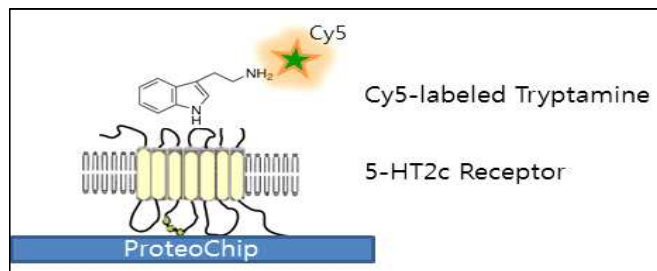
3.2.1 1차 후보추출물의 용량의존성 기능성 2차 평가

3.2.1.1 본 연구팀에서 선행 연구한 35 가지 1 차 후보추출물에서 선별한 3 종의 추출물에 대한 5-HT_{2c} receptor binding assay & GABA receptor binding assay 시험을 통한 기능성 2차 평가를 실시할 예정임

- Serotonin receptor binding assay

5-HT_{2c} receptor(50ug/ml)를 assay Buffer(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl, 1mM EDTA, 0.1% BSA pH 7.4)로 희석하여 4°C 에서 16시간 동안 단백질 칩 표면에 고정시킨 후, 10 분간 2번 세척, 4°C 에서 건조함.

건조된 5-HTR 칩은 3% BSA blocking buffer로 실온에서 1시간 동안 반응시킴. 다시 2번 세척한 후, 천연 농작물 추출물을 다양한 농도로 고정된 5-HT_{2c} 수용체 어레이에 실온에서 1시간 동안 반응시킴. Cy5-Tryptamine (500 mM)을 37°C 에서 1시간 동안 반응시킴. 반응시킨 칩은 2번 세척한 후, 4°C 에서 건조시켜 형광 스캐너를 이용하여 각 spot의 형광 값을 측정하여 serotonin receptor에 반응하는 농도를 측정함.



[그림 8] 5-HT_{2c} receptor-Tryptamine binding assay based on ProteoChip>

- 5-HT_{2c} 수용체에 의한 후보추출물 기능성 탐색

후보추출물로 도출된 7가지 이상의 물질을 농도별로 chip의 수용체와 반응시켜 Cy5-labeled Tryptamine과의 길항 정도를 분석하고 cut-off 수치를 기준으로 리드추출물을 선별함.

- GABA receptor binding assay (fluorescence) 시스템 구축

자체적으로 개발한 Protein chip을 이용하여 GABA 수용체를 고정시킨 후, agonist를 선별하여 형광물질 Cy5로 표지하고 agonist와 반응시켜 GABA 수용체-agonist 상호작용 시스템을 구축함.

- GABA 수용체에 의한 후보추출물 기능성 탐색

후보추출물로 도출된 3가지 추출물질을 농도별로 chip의 수용체와 반응시켜 Cy5-labeled agonist와의 길항 정도를 분석하고 cut-off 수치를 기준으로 리드추출물을 선별함.

3.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

3.3.1 In vivo 수면 효과 평가 리드농산물 투여법 확정

3.3.1.1 In vivo 수면 효과 평가

- 수면 촉진 효과는 수면 반응 시 유발되는 행동양상의 변화, 눈감음 등의 생리반응을 지표로 검정할 수 있으며, 뿐만 아니라 수면을 방해하는 물리적 자극(온도 변화), 화학적 자극(카페인 등) 및 전기적 자극에 대한 저항 효과를 검증함으로써 확인함.
- 실험 동물 : Sprague Dawley male 흰쥐(SD male Rat)
- 사육 조건 : 1 주일간 안정화시킨 후에 시험 목적에 맞게 처치하는데, 수면에 영향을 미칠 수 있는 인자들이 배제된 환경, 즉, 소음(40dB 이하) 조명(200~300LUX 12시간/1일), 항온($22\pm 3^{\circ}\text{C}$), 습도 ($55\pm 15\%$) 등의 조건을 유지함.
- 제품투여 용량 : 실험동물은 각 군당 6 마리를 실험하고, 제품 투여군은 50 mg/kg 또는 200 mg/kg로 나누어 진행. 최종리드추출물에 대하여는 용량의존적시험을 수행함.
- 단순 수면촉진 관련 기능성을 평가하기 위한 시험

1) Palpebral test :

본 방법은 동물이 졸음을 느끼는 정도 또는 휴식기(resting state)로 진입하고자 하는 경향정도를 측정하기 위해 Jansen에 의해 제안된 방법으로서 중추신경 진정(depression)과 이완(relaxation) 정도를 측정(Janssen, 1961). 제품을 투여하고 30분 동안 눈을 감는 시간을 측정함.

2) 뇌파(EEG) 측정(Cajochen et al., 1999)

제품을 투여 하고 30분후 Stainless steel channel을 뇌경막 층에 삽입한 후 dental cement로 고정한 후 12간 동안 EEG 측정 후 수면과의 변화를 관찰함.

3) 수면 관련 생리학적 지표연구

혈중 melatonin, 뇌내 serotonin (5-HT) ELISA kit 및 ventrolateral preoptic area (VLPO)에서 c-Fos의 발현 변화를 측정함 (Duffy et al., 2002; Dijk et al., 1999; Tu et al., 2012).

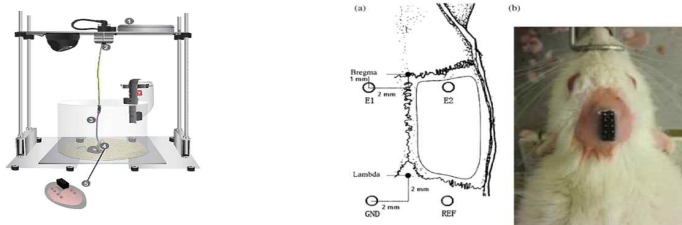
- 수면 방해 요소가 있는 상태에서 수면촉진 관련 기능성을 평가하기 위한 시험법

1) Caffeine을 이용한 수면 장애 유발 모델

제품을 투여하고 30분 후 Caffeine 1mg/체중 kg 투여 (Velluci et al., 1984)을 통해 수면을 방해하고 보행성 활동량을 측정함

2) 수면 관련 생리학적 지표

혈중 melatonin, 뇌내 serotonin (5-HT) ELISA kit 및 ventrolateral preoptic area (VLPO)부위에서 c-Fos의 발현 변화를 측정 (Duffy et al., 2002; Dijk et al., 1999; Tu et al., 2012)



[그림 8] In vivo 수면효과 동물모델

3.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

3.4.1 자료조사 및 성분분석을 통한 지표물질 선정

- 각 농작물의 알려진 성분을 조사하고 다량함유 성분 또는 농작물 특유의 성분 또는 수면 효과를 예측할 수 있는 성분을 확인함.
- 각각 성분에 분석방법을 조사하고 지표물질로 가능성 물질을 2 ~ 5종 정도 도출.
- 원료 수추출과 에탄올추출을 제조하여 선정된 후보물질을 분석하고 확인하여 지표물질을 최종 2 종 이상 선정함.
- 고삼은 주요성분 중 함량이 높은 **matrine**과 **oxymatrine**에 대한 HPLC 분석 조건을 확립.
- 길경은 사포닌 중 가장 함량이 많고 기능성 물질로 유력한 **Platycodin D** 및 **Platycodin E**에 대한 HPLC - ELSD 분석 조건을 확립
- 대두는 이소플라본들(**daidzein**, **genistein**)을 지표물질로 하여 HPLC로 분석조건을 확립.

나. 2차년도 개발 목표 및 내용

1. 개발 목표 : 리드추출물의 수면 질 개선 기전연구 및 안전성 평가

2. 기관별 개발목표

2.1 주관연구기관 (경방신약주식회사)

- 대량생산 공정연구 및 개발에 의한 Pilot Scale의 제품 제조
- 원료 안정성 시험
- CRO와 협의를 통한 인체시험 준비 : IRB 신청 및 인체시험계획서 작성

2.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

- 리드추출물의 in vitro 세포 기반 수면 효능 작용기전 규명

2.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

- 리드물질에 대한 in vivo 수면 효과의 기전연구 및 신경화학적 효과 규명

2.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

- 분석법 밸리데이션 수행
- 성분 함량 기준 설정
- 안전성시험 모니터링

3. 기관별 개발내용 및 그 범위

3.1 주관연구기관 (경방신약주식회사)

3.1.1 리드추출물의 대량공정 연구 및 안정성 연구

3.1.1.1 대량생산 공정연구 [실생산 로트크기]

- 1차년도의 추출, 여과 및 농축공정 조건들의 조합으로 실생산 로트크기에 적용하여 추출 및 농축 조건 확립
- 추출법 : 원료투입량에 대하여 정제수 투입량의 변화 (예 : 7, 8, 9, 10 배)
- 온도 : 원료와 물 투입량의 추출에 최적한 온도 조건 설정 (예 : 80, 85, 90 ℃)
- 시간 : 추출온도와 추출시간의 복합적인 인자를 적용하여 설정 (예 : 4, 5, 6 시간)
- 여과 : 50 mesh
- 농축 조건의 최적조건 설정 (예 : 농축시간, 농축탱크온도 및 감압조건 등)
- Pilot 규모의 제품 생산

3.1.1.2 안정성 시험 [시험의 목적 : 경시변화 유무를 확인하는 시험]

- 장기안정성 시험 (온도: 25°C ±2°C, 습도: 60%±5%)을 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 24개월, 36개월 차에 시험 실시함.
- 가속안정성 시험(온도: 40°C ±2°C, 습도: 75%±5%)을 3개월, 6개월 차에 시험 실시함.

3.1.2 인체시험 준비

- IRB 승인을 위한 자료 준비
- IRB 신청 및 승인 절차 수행
- 인체시험 기관 선정
- 인체시험 디자인 및 시험계획 작성
- 인체시험 피험자 모집

3.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

3.2.1 Proteomics 방법을 활용하여 리드추출물의 cytokine 및 세포신호전달 단백질의 발현 프로파일 연구 수행함으로써 작용 기전을 밝히고자 함.

3.2.1.1 생물학적 시료의 준비

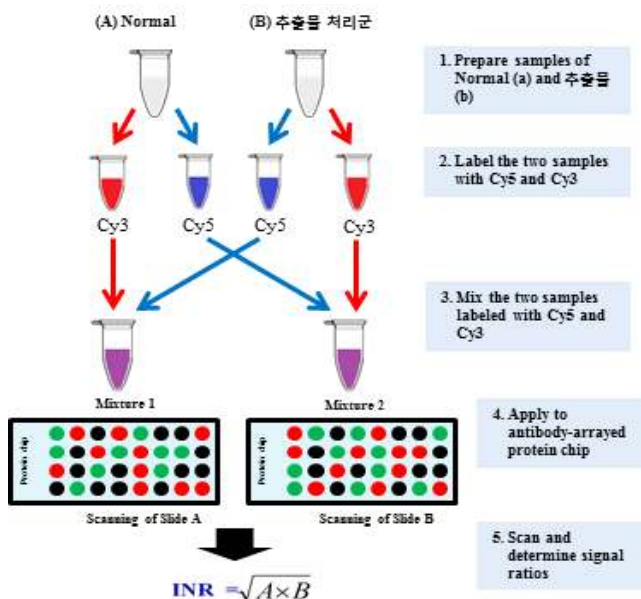
- 세포, 혈액 또는 조직과 같은 생물학적 시료를 사전에 목적에 맞도록 준비함.

3.2.1.2 단백질 추출 및 표지(labeling)

- 생물학적시료로부터 단백질들을 1mg을 각각 추출하여 형광물질(Cy5 또는 Cy3)로 표지.

3.2.1.3 항체 마이크로어레이 단백질 칩 제조 및 분석

- 단백질 칩상에 마이크로어레이어(CM-2000; Proteogen, Inc., 서울, 한국)로 지금까지 알려진 Cytokine 단백질 또는 세포신호전달 단백질들에 대한 항체를 스팟팅하여 항체 마이크로어레이(microarray)를 제조함.
- 형광물질로 표지된 세포 용해물(30 µg/ml)을 항체의 스팟(spots)에 적용함.
- 각 슬라이드를 형광 마이크로어레이스캐너를 사용하여 분석하고 소프트웨어 패키지 (Genepix 6.0)을 사용하여 계산함.



<단백질 프로파일 Procedure>

3.2.2 5-HT2c receptor와 GABA receptor binding assay를 통한 유효성분 기능성 평가

- 용매 분획 및 예측 유효성분을 협동 3과제로부터 제공받아 in vitro 기능을 평가함.
- in vitro 기능 평가 방법은 1차년도와 동일하게 수행함.

3.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

3.3.1 불면에서의 효과확인 :

- 최종 리드물질을 농도별로 투여하고 30분 후 수면방해 물질인 caffeine을 1mg/kg으로 투여 후 15 시간 동안 EEG 측정 후 wake, REM, nonREM 시간 분석을 통해 리드물질의 불면 개선 효과 확인

3.3.2 신경화학적 기전 규명 :

- EEG 측정 후 saline, paraform aldehyde를 차례로 관류하여 뇌를 고정시킨 후 frozen section을 통해 절편을 얻음.
- 수면을 관장하는 부위인 ventrolateral preoptic area에서 c-Fos 발현 변화 분석을 통해 리드물질의 불면 개선 효과의 신경화학적 기전 규명.
- 불안/우울반응을 조절하는 HPA-axis를 관장하는 paraventricular nucleus, SAM-axis에 관여하는 locus coeruleus에서의 c-fos 발현 변화를 관찰하므로 리드물질의 불안/우울 개선 여부 확인.

3.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

3.4.1 분석법 밸리데이션 연구

3.4.1.1 2 종 이상의 지표성분에 대한 동시 분석법 연구 수행

- 특이성(Specificity) : 표준물질과 비교하여 단일 물질임을 확인함.
- 직선성(Linearity) : 농도별 분석을 통하여 기울기 및 R² 값을 산출함.
- 정밀성(Precision) : 재현성(repeatability) 및 분석일자별 정밀성(intermediate precision)을 분석함.
- 정확성(Accuracy) : Blank 시료에 일정량이 용약을 첨가하여 회수율을 측정함
- 범위(Range) : 직선성, 정밀성, 정확성을 종합하여 측정범위를 설정함.
- 검출한계 및 정량한계 (Detection limit, quantitation limit) : 검출한계는 peak baseline noise에 3배 농도로 설정. 정량한계는 검출한계의 3배로 설정함.

3.4.1.2 추출물의 지표물질 농도 범위 평가

- 산지별 배치별 추출물에 대한 분석수행
- 품질관리를 위한 지표물질의 농도 범위 및 두가지 지표물질의 비율 평가
- 국내 농작물과 중국산 농작물의 지표물질 비교 평가

3.4.1.3 안전성평가 모니터링 :

- 13주 반복독성시험 진행 및 결과 모니터링 수행

다. 3차년도 개발 목표 및 내용

1. 개발 목표 : 리드추출물의 기전연구 및 시제품 생산

2. 기관별 개발목표

2.1 주관연구기관 (경방신약주식회사)

- 대량생산 공정 연구 및 개발
- 제조물 안정성 시험
- 인체적용시험 (임상시험시험)

- 사업화 방안 및 비즈니스 모델 연구 (섭취의 편리성에 따른 제형의 다양화)

2.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

- 유효성분분획 또는 유효성분에 대한 in vitro HT2c 및 GABA 수용체 작용 평가
- 유효성분분획 또는 유효성분의 in vitro 기전연구

2.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

- in vivo 수면효과 기전연구(2)
- 유효성분분획 또는 유효성분에 대한 in vivo 수면효과 평가

2.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

- 용매 분획제조 (hexane, chloromethane, ethylacetate, butanol, water 층 제조)
- 분획의 성질 규명 (alkaloid 및 isoflavone 등 확인) : HPLC & TLC 등 수행
- 분획 또는 예측 유효성분 제조 (기능성 시험을 위해 제공함)
- 유효성분 분석법 확립 및 벨리데이션 연구

3. 기관별 개발내용 및 그 범위

3.1 주관연구기관 (경방신약) :

3.1.1 제품화 연구 및 시제품 생산 / 안전성연구

3.1.1.1 대량공정 연구

- 제조공정 최적화를 확인하고 대량생산을 위한 공정연구를 함
- 사업화를 위한 마켓 기반마련

3.1.2 리드추출물 유통기한 설정 연구

3.1.3 시제품 생산

3.1.4 사업화 방안 및 비즈니스 모델 연구

3.1.5 인체적용시험 (임상시험)실시

- 인체 대상 : 폐경여성
- 인원 : 30명 이상의 cross-over study (8주 위약 또는 기능성 물질- 4주 washing period
- 8주 위약 또는 기능성 물질 위약 30건, 기능성물질 30건 확보
- 평가 방법 : 설문, actinography, polysomnography 등을 통한 평가

3.2 협동연구기관 1 (이노파마스크린)

3.2.1 Proteomics 방법을 활용하여 유효성분의 cytokine 발현 프로파일 연구를 계속 수행함.

3.2.1.1 Proteomics 결과 자료에 대한 분석 : 증감 cytokines 들을 확인하고 기전을 예측함.

3.2.1.2 Western Immunoblotting 분석을 통하여 증감 cytokines 들의 발현을 확인함.

- 상기실험을 통해 확인한 단백질발현변이를 검증하기 위해 웨스턴블롯분석을 실시.
- 시료용해물로부터 단백질을 NuPAGE™(Invitrogen사, 미국)상에서 분리시킨 후, 웨스턴 블롯으로 분석하였음.

3.2.2 HT2c receptor와 GABA receptor binding assay를 통한 유효성분 기능성 평가

- 용매 분획 및 예측 유효성분을 협동 3과제로부터 제공받아 in vitro 기능을 평가함.
- in vitro 기능 평가 방법은 1차년도와 동일하게 수행함.
- Proteomics기법을 사용하여 추출물에서 확인된 기전들을 유효성분으로 검증 함.

3.3 협동연구기관 2 (경희대학교)

3.3.1 유효성분 분획 또는 예측 유효성분에 대한 수면 효과 평가

- 유효성분 분획을 농도별로 투여 후 15시간 동안 EEG 측정 후 wake, REM, nonREM 시간 분석을 통해 리드물질의 수면 개선 효과 확인.

3.3.2 In vitro proteomics 결과 인자들에 in vivo 발현 확인

- EEG 측정 후 뇌를 생검하여 수면관련 부위인hypothalamus, cortex에서 5-HT, GABA 변화를 ELISA 및 HPLC 통해 분석하므로 유효성분의 수면 개선 뇌신경 기전 확립.
- 불안/우울 반응을 조절하는 HPA-axis를 관장하는 paraventricular nucleus, SAM-axis에 관여하는 locus coerules에서의 c-fos 발현 변화를 관찰하므로 유효물질의 불안/우울 개선 여부 확인.

3.4 협동연구기관 3 (호서대학교)

3.4.1 용매분획제조

- hexane, chloromethane, ethylacetate, butanol, water층 제조.
- 분획의 성질 규명 (alkaloid 및 isoflavone 등 확인) : HPLC 패턴 및 지표 성분의 분포 확인 & TLC 등 수행하여 물질의 종류확인함.
- 분획 또는 예측 유효성분 다량 제조 (세포 또는 동물 기능성 시험을 위해 제공함).
- 유효성분 분석법 확립 및 밸리데이션 연구.
- 수면의 질 개선 기능성 원료 인정 서류 작성.

2. 연구수행 내용 및 결과

2.1 주관기관 - 경방신약주식회사

1차년도 실적		연구목표와 개발내용 및 그 결과		
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (20 18)	리드추출물 원료의 표준화 및 안정성 확보	원료의 기준규격 검사	고삼, 길경 및 대두에 대해 시험 실시	1) 잔류농약을 포함하여 적합으로 판정 2) 대두는 위탁시험
		구성원료의 안정성 검사	중금속 등 시험 자사 및 위탁	중금속 : 납, 카드뮴 대두 : GMO여부
		추출방법 선정	추출법 : 정제수 투입량 온도 : 추출온도 변화 시간 : 추출시간 변화 농축 : 농축시간 변화	고삼, 길경 및 대두에 대하여 추출용매, 온도, 시간등을 변화하여 추출방법을 선정함.
		제형확정 및 생산공정 확립	1) 제형 선정 2) 공정도 확정	1) 정제제형 우선선정 제조 후 연조엑스등 제형 추가 설계예정 2) 생산공정도 확립 완료
		파일럿 원료생산 기준 및 시험법 설정	1) 파일럿 원료생산 완료(고삼, 길경, 대두) 2) 기시법 설정 진행 중	1) 10배수 정제수 95 ℃, 4시간 추출 60 ℃ 이하 감압농축 2) 식품공전의 농산가공품류의 기시 준용 (성상,이물, 대장균)

관리번호	KB-RD17001	제조일	-	검체채취량	300 g
원료명	고삼	입고량	30 kg	검체채취일자	2017. 12. 31
입고일자	2017. 12. 30	시험일자	2017. 12. 31	검체채취방법	R / D
시험번호	RD17001	검체채취장소	원료실	검체채취자	
규격	KP	구입원	대연제약		
시험항목	시험기준	시험결과	판정	시험일	시험자
성상	뿌리로 원기둥모양, 배깁면은 어두운 갈색 ~ 황갈색, 특유한 냄새가 있고 맛은 매우 쓰다.	적합	적합	2018. 01. 05	김세영
확인시험	1) 액은 동황색 침전이 생긴다.	동황색 침전	적합	2018. 01. 09	김세영
	2) 표준액과 동일 RI 값 및 색상.	표준액과 동일 RI 값 및 색상	적합	2018. 01. 09	김세영
순도시험(이물)	1) 줄기 : 10.0 % 이하.	2.04 %	적합	2018. 01. 09	김세영
	2) 그 밖의 이물 : 1.0 % 이하.	0.3 %	적합	2018. 01. 09	김세영
순도시험 (중금속)	납 5 ppm 이하.	0.8 ppm	적합	2018. 01. 12	김세영
	비소 3 ppm 이하.	0.14 ppm	적합	2018. 01. 11	김세영
	수은 0.2 ppm 이하.	0.002 ppm	적합	2018. 01. 11	김세영
	카드뮴 0.3 ppm 이하.	0.001 ppm	적합	2018. 01. 12	김세영
순도시험 (잔류농약)	총 디티티(p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT 및 p,p'-DDT의 합) 0.1 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 08	김세영
	디알드린 0.01 ppm 이하.	N/D			
	총 비에이치씨(α, β, γ 및 δ-BHC의 합) 0.2 ppm 이하.	N/D			
	알드린 0.01 ppm 이하.	N/D			
	엔드린 0.01 ppm 이하.	N/D			
순도시험(이산화황)	30 ppm 이하.	6.37 ppm	적합	2018. 01. 09	김세영
회분	6.0 % 이하.	2.81 %	적합	2018. 01. 15	김세영
산불용성회분	1.5 % 이하.	0.6 %	적합	2018. 01. 15	김세영
함량	건조한 것은 옥시마트린 및 마트린의 합 1.0 % 이상.	1.4 %	적합	2018. 01. 11	김세영
비고					
확인자	판정결과	판정일자	판정자		
	적합	2018년 1월 15일			

관리 번호	K8-RD17002	제조 일	-	검체채취량	900 g
원료 명	길 경	입고 량	30 kg	검체채취일자	2017. 12. 31
입고 일자	2017. 12. 30	시험 일자	2017. 12. 31	검체채취방법	R / D
시험 번호	RD17002	검체채취장소	원료 실	검체채취자	
규격	KP, 식품공전	구입원	대연제약		
시험항목	시험 기준	시험 결과	판정	시험일	시험자
성상	부리로 가늘고 긴 방추형 또는 원뿔모양, 바깥면은 회갈색, 연한 갈색 또는 흰색, 특유한 냄새가 있고 맛은 아리고 쓰다.	시험기준에 적합	적합	2018. 01. 04	권현진
확인시험	역은 지속성의 거품을 낸다.	액은 지속성의 거품을 낸다	적합	2018. 01. 04	권현진
순도시험 (중금속)	납 2.0 ppm 이하.	0.4033 ppm	적합	2018. 01. 23	권현진
	카드뮴 0.2 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 23	권현진
순도시험 (잔류농약)	플루아지포프-뷰틸 0.05 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 05	권현진
	프로클로라즈 0.05 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 05	권현진
	이축시스트로빈 0.1 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 30	권현진
	메톡시줄 0.1 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 25	권현진
	펜피복시메이트 0.1 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 30	권현진
	몰루클로수론 0.2 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 30	권현진
	피리메타닐 0.2 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 30	권현진
	말베액탄 0.2 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 01. 26	권현진
	글레토담 0.05 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 02. 08	권현진
	세복시담 0.05 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 02. 08	권현진
	할복시모프 0.1 ppm 이하.	N/D	적합	2018. 02. 06	권현진
회분	6.0 % 이하.	2.52 %	적합	2018. 01. 18	권현진
비고					
확인자	판정결과	판정일자	판정자		
ok	적합	2018년 02월 04일	장영호		



REF: IP18-RE00491

시험·검사 성적서

성적서 번호: IP18-RE00491

신청기관(인): 경방신약(주)

주 소 : 인천광역시 남동구 남동대로 394 (남촌동)

시료정보

접수번호: IP18-RE00491

시험일자: 2018. 06. 27

시료명: 대두

완료일자: 2018. 07. 06

식품의 유형: 기타

발행일자: 2018. 07. 06

제조일자 또는 유통기한: -

시험목적: 참고용

시험항목: 잔류농약 245 종

Anilofos, Acetamiprid, Acrinathrin, Alachlor, Aldicarb, Aldrin, Amisulbrom, Azinphos-methyl, Azoxystrobin, Bendiocarb, Benomyl, Benthialicarb-isopropyl, Benzoximate, BHC, Bifenox, Bifenthrin, Bitertanol, Boscalid, Bromobutide, Bromopropylate, Buprofezin, Butachlor, Cadusafos, Captan, Carbaryl, Carbazodim, Carbofuran, Carbophenothion, Chinomethionate, Chlopyrifos, Chlorantraniliprole, Chlordane, Chlorfenapyr, Chlorfenvinphos, Chlorfluazuron, Chlorobenzilate, Chlorothalonil, Chlorpropham, Chlorpyrifos-methyl, Chromafenozie, Clofentezine, Clothianidin, Cyazofamid, Cyflufenamid, Cyfluthrin, Cyhalofop-butyl, Cyhalothrin, Cymoxanil, Cypermethrin, Cyproconazole, Cyprodinil, DDT, Deltamethrin, Diazinon, Dichlofuanid, Dichlorvos, Dicofof-methyl, Dicloran, Dicofof, Dieldrin, Diethofencarb, Difenoconazole, Diflubenzuron, Dimpiperate, Dimethenamid, Dimethoate, Dimethomorph, Dimethylvinphos, Diniconazole, Diphenamid, Diphenylamine, Disulfoton, Dithiopyr, Diuron, Edifenphos, Endosulfan, Endrin, EPN, Esprocarb, Ethalbosam, Ethalfuralin, Ethiofencarb, Ethion, Ethoprophos, Etofenprox, Etoxazole, Etridiazole, Etrinfos, Fenamidone, Fenamiphos, Fenarimol, Fenazaquin, Fenbuconazole, Fenitrothion(MEP), Fenobucarb, Fenothicarb, Fenoxanil, Fenpropathrin, Fenpyroximate, Fenthion, Fenvalerate, Ferimzone, Fipronil, Flucycrypyrim, Flubendiamide, Flucythrinate, Fludioxonil, Flufenoxuron, Flumioxazine, Flupicolid, Flusilazole, Flusilazole, Flutolanil, Folpet, Forchlorfenuron, Fosthiazate, Fthallide, Furathiocarb, Halfenprox, Heptachlor, Heptachlor-epoxide, Hexaconazole, Hexaflumuron, Hexythiazox, Imazalil, Imibenconazole, Imidacloprid, Indanofan, Indoxacarb, Iprobenfos, Iprodione, Iprovalicarb, Isofenphos, Isoprocarb, Isoprothiolane, Kresoxim-methyl, Lufenuron, Malathion, Mandipropamid, Mecarbam, Mefenacet, Mepanipyrim, Mepronil, Metalaxyl, Metamifop, Metconazole, Methabenthiuron, Methidathion, Methiocarb, Methomyl, Methoxychlor, Methoxyfenozide, Metobromuron, Metolachlor, Metolcarb, Metribuzin, Mevinphos, Molinate, Myclobutanil, Napropamide, Novaluron, Nuarimol, Ofurace, Oxadiazon, Oxamyl, Oxazidomefon, Oxyfluorfen, Paclobutrazole, Parathion, Parathion-methyl, Penconazole, Pencycuron, Pendimethalin, Pentachloroaniline, Methyl-pentachlorophenyl sulfide, Pentoxazone, Permethrin, Phenthoate, Phorate, Phosalone, Phosphamidon, Piperothos, Pirimicarb, Pirimiphos, Pirimiphos-methyl, Probenazole, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Prometryn, Propanil, Propiconazole, Propoxur, Prothiofos, Pyraclofos, Pyraclostrobin, Pyrazophos, Pyribenzoxim, Pyributicarb, Pyridaben, Pyridalyl, Pyridaphenthion, Pyrimethanil, Pyrimidifen, Pyriminobac-methyl, Pyriproxyfen, Pyroquilon, Quinoclamine, Quintozene, Silafluafen, Simazine, Simeconazole, Simetryn, Spirodiclofen, Spiromesifen, Tebuconazole, Tebufenpyrad, Tebupirimfos, Teflubenzuron, Tefluthrin, Terbufos, Terbutylazine, Terbufos, Tetraconazole, Tetradifon, Thiabendazole, Thiacloprid, Thiamethoxam, Thiazopyr, Thifluzamide, Thiofenecarb, Thiodicarb, Thiophanate-methyl, Tiadinil, Tolyfluanid, Tolclofos-methyl, Tralomethrin, Triadimefon, Triadimenol, Triazophos, Tricyclazole, Trifloxystrobin, Triflumizole, Triflumuron, Trifluralin, Vinclozolin, Zoxamide

한국인터텍테스팅서비스(주)
서울특별시 성동구 아차산로 5 빌딩 7층
아주디지털타워 4층

Tel.: 02-6090-9500
Fax: 02-3409-0505
intertek.com/food

Test report approved under the direction of:
Ministry of Food and Drug Safety

This Test Report is issued by the Company subject to its Terms and Conditions of Business printed overleaf. Attention is drawn to the limitations of liability, indemnification and jurisdictional issues defined therein. This Test Report shall not be reproduced, except in full, without prior written consent of the Company.
intertek Testing Service Korea Ltd., A company registered in South Korea. Company No.: 104-85-28783



REF: IP18-RE00491

분석결과

시험항목	단위	결과
잔류농약 245 종	mg/kg	불검출

비고: 1. 이 검사성적서는 고객이 제공한 시료에 대한 결과로 전체 제품에 대한 결과를 보증하지 않습니다.
2. 이 검사성적서는 당사 동의 없이 광고 및 소송용으로 사용될 수 없습니다.

Approved by

Jade Jang / Laboratory Manager



시험·검사성적서

발행번호	R20180629-0178	접수번호	180115304-001
검사완료일	2018년 06월 29일	접수연월일	2018년 06월 26일
제품명	대두		
유형·재질·품목명	기타 농산기공품		
제조(수입)일/제조번호		유통(품질유지)기간	
품목제조신고번호			
의뢰자	성명 김중환	업체명 경방신약(주)	
	소재지 (21635)인천광역시 남동구 남동대로 394 (남촌동)		
	전화번호: 02-3499-8935	팩스번호: 02-963-2987	전자우편: jungmi.kim@polymer.co.kr
제조원	업체명		
	제조국		
	소재지		
시험·검사목적	식품 기타		

※ 시험결과(별첨) 참조

중합방법: 상기(실용화)법

시험장사명: 차원아

시험장사책임자: 김진희, 장정순

비고:

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 지령이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과는 정지된 것으로 간주 가능합니다.
 ※ 검사결과를 받고자 하는 용기·포장 등에 표시된 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2018년 06월 29일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원

13488 경기도 성남시 분당구 대왕전교로 700 9층 102호(삼명동, 과학기술훈민체육센터)

1031-628

F032-628

통과정보

신뢰도:	입항일:
B/L Number:	허가번호:
확립번호:	수량(종량):

유전자변형식품 시험정보

분석개시일	2018년 06월 27일	분석종류일	2018년 06월 29일
추출시험방법	QIAGEN Plant Maxi kit	추출시험횟수	2
시료량	① 1.5 g ② 1.8g	추출DNA량	500 µL
DNA농도	① 92.25 ng/µL ② 177.60 ng/µL	PCR반복횟수	2
DNA순도(A260/A280)	① 2.10 ② 2.12	DNA순도(A260/A230)	① 5.11 ② 3.33
PCR에 사용한 DNA농도	20 ng/µL, 2.5 µL	PCR에 사용한 Kit	Bioneer PCR premix
Primer대상유전자	Lectin, CaMV P35S, tNOS, MON89788, DP385604/3/5, DP305423-L, MON87701, CV127, MON87705, MON87708, MON87769, DAS-44406-6, DAS-68416-4, DAS-81419-2, MON87751	PCR검출형태	0.5

시료접수번호: 180115304 시료명: 대두

1. 전기영동 사진

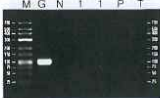
1) 내재상유전자

(1) Lectin(118 bp)

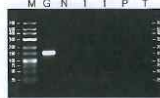


2) 스크리닝

(1) CaMV P35S(101 bp)

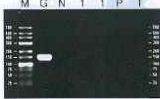


(2) tNOS(151 bp)



3) 구조유전자

(1) MON89788(139 bp)



(2) DP358643-5(145 bp)



(3) DP305423-1(149 bp)



(4) MON87701(150 bp)



(5) CV127(135 bp)



(6) MON87705(92 bp)



(7) MON87708(105 bp)



(8) MON87769(111 bp)



(9) DAS-44406-6(145 bp)



(10) DAS-68416-4(128 bp)



(11) DAS-81419-2(117 bp)



(12) MON87751(202 bp)



M: Ladder G: GMO Control N: Non-GMO Control
 1: 180115304 P: No Primer Control T: No Template Control

2. 결과판정

GMO성분(표적검사)_공: 불검출

고삼 추출 조건 설정 내용

No.	사용량 (kg)	정제수 (L)	추출온도 (°C)	추출시간 (hr)	농축온도 (°C)	건조역수량 (kg)	수득율 (%)
1	5.0	40	85	3	60	0.85	17.00
2	5.0	45	85	3	60	0.83	16.60
3	5.0	50	85	3	60	0.86	17.20
4	5.0	50	90	4	60	0.83	16.60
5	5.0	50	90	5	60	0.85	17.00
6	5.0	50	95	3	60	0.84	16.80
7	5.0	50	95	4	60	0.87	17.40
8	5.0	50	95	5	60	0.84	16.80
9	5.0	50	95	6	60	0.85	17.00

※ 상기 표에서 7. 번의 방법이 수율면에서 가장 좋은 것으로 보여 표준화 조건으로 설정하였다.

길경 추출 조건 설정 내용

No.	사용량 (kg)	정제수 (L)	추출온도 (°C)	추출시간 (hr)	농축온도 (°C)	건조역수량 (kg)	수득율 (%)
1	4.0	32	90	3	60	0.89	22.25
2	4.0	36	90	4	60	0.87	21.75
3	4.0	40	90	6	60	0.89	22.25
4	4.0	36	95	4	60	0.90	22.50
5	4.0	40	95	4	60	0.91	22.75
6	4.0	36	85	3	60	0.84	21.00
7	4.0	40	85	5	60	0.88	22.00
8	4.0	40	95	5	60	0.88	22.00
9	4.0	40	95	6	60	0.89	22.25

※ 상기 표에서 5. 번의 방법이 수율면에서 가장 좋은 것으로 보여 표준화 조건으로 설정하였다.

대두 추출 조건 설정 내용

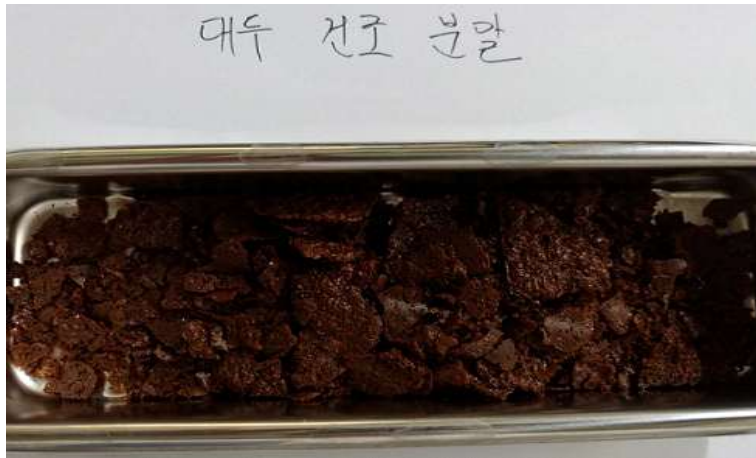
No.	사용량 (kg)	정제수 (L)	추출온도 (°C)	추출시간 (hr)	농축온도 (°C)	건조역수량 (kg)	수득율 (%)
1	6.0	48	85	5	60	0.55	9.17
2	6.0	60	90	5	60	0.51	8.50
3	6.0	54	95	5	60	0.52	8.67
4	6.0	48	90	3	60	0.50	8.33
5	6.0	60	95	4	60	0.56	9.33
6	6.0	54	95	3	60	0.48	8.00
7	6.0	48	95	3	60	0.51	8.50
8	6.0	66	95	3	60	0.52	8.67

※ 상기 표에서 5. 번의 방법이 수율면에서 가장 좋은 것으로 보여 표준화 조건으로 설정하였다.

고삼 건조 분말



대두 건조 분말



길경 건조 분말

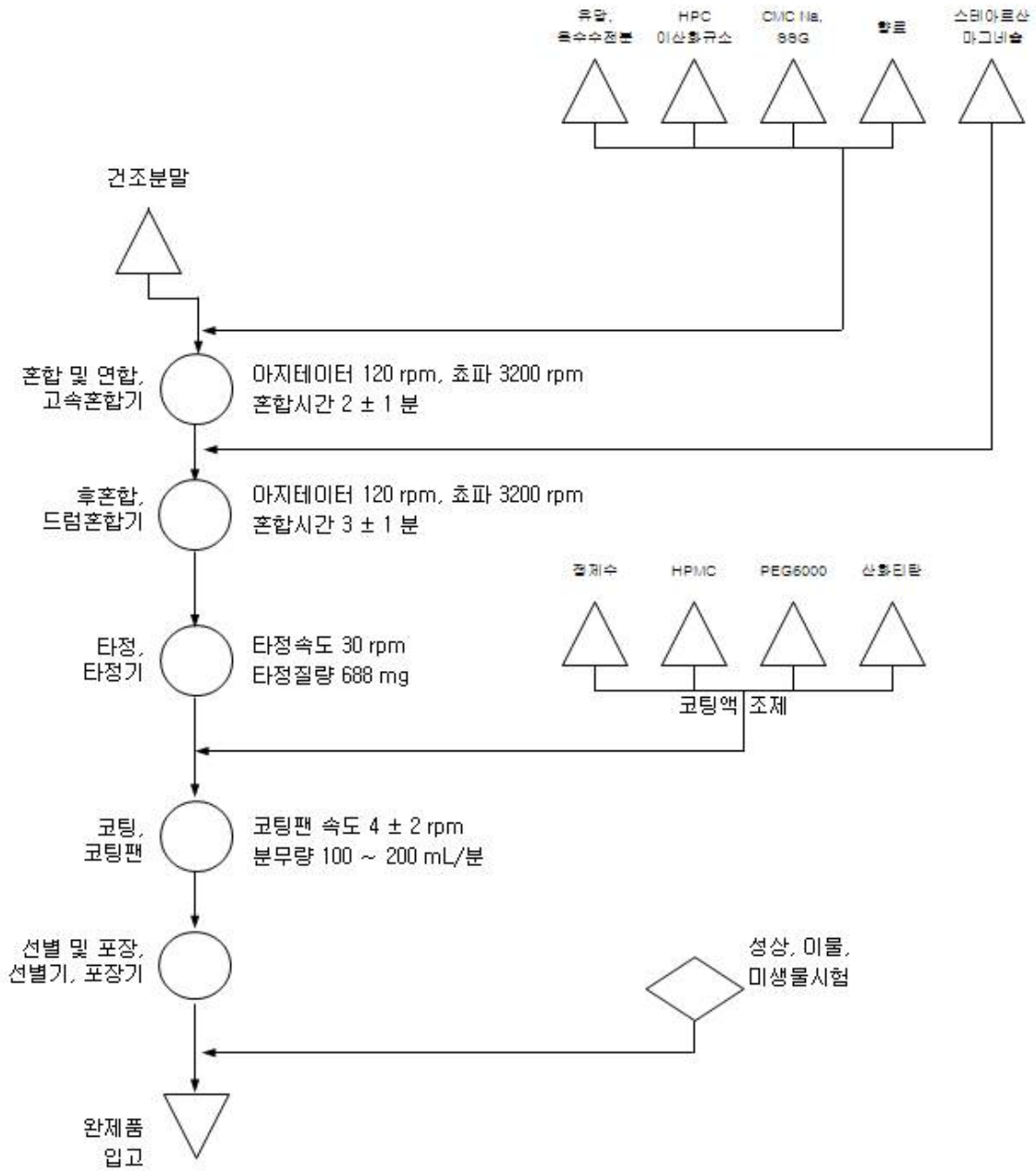


길경함유 정제

No.	원료명	고형분(%)	1정투입량 (mg)	비 고
1	길경	38.0	1,340.0	
2	건조가루	37.0	300.0	
3	유당수화물	74.0	56.0	
4	옥수수전분	51.0	79.9	
5	히드록시프로필셀룰로오스	59.0	15.0	
6	폴로이드성미산화규소	25.0	5.0	
7	카르복시메틸셀룰로오스	15.0	6.0	
8	전분글리콜산나트륨		2.0	
9	야쿠르트향		0.1	
10	스테아르산마그네슘		6.0	
소 계			470.0	
11	히프로멜로오스2910		15.0	
12	폴리에틸렌글리콜6000		3.0	
15	산화티탄		2.0	
16	정제수		0.1 mL	
합 계			490.0	

고삼함유 정제

No.	원료명	고형분(%)	1정투입량 (mg)	비 고
1	고삼	38.0	2,300.0	
2	건조가루	37.0	400.0	
3	유당수화물	74.0	60.0	
4	옥수수전분	51.0	87.9	
5	히드록시프로필셀룰로오스	59.0	10.0	
6	폴로이드성미산화규소	25.0	6.0	
7	카르복시메틸셀룰로오스	15.0	7.0	
8	전분글리콜산나트륨		2.0	
9	딸기향		0.1	
10	스테아르산마그네슘		7.0	
소 계			580.0	
11	히프로멜로오스2910		15.0	
12	폴리에틸렌글리콜6000		3.0	
15	산화티탄		2.0	
16	정제수		0.1 mL	
합 계			600.0	



원료 파일럿 규모 제조 현황

No.	원료명	사용량 (kg)	정제수 (L)	추출온도 (°C)	추출시간 (hr)	농축온도 (°C)	건조엑스량 (kg)	수득율 (%)
1	고삼	10,0	100	95	4	60	1,73	17,30
2	길경	8,0	80	95	4	60	1,81	22,63
3	대두	10,0	100	95	4	60	0,92	9,20

정제제형에 대한 기시법 설정 [식품]

No.	시험항목	기준	시험방법	비 고
1	성 상	흰색의 코팅정	육안관찰	
2	미 물	적합하여야 한다.	육안관찰	
3	대장균군	불검출	대장균군시험항에 따름.	
4	대장균	불검출	대장균시험항에 따름.	

2차 년도 실적

연구목표와 개발내용 및 그 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (20 19)	리드추출물 원료의 표준화 및 안정성 확보	원료 기준규격 검사	대두 시험 실시 안전성검사 중 일부에 대하여 시험	대두시험완료 (1차년도 구입분과 동일한 원료구입)
		원료 안정성 검사	중금속 등 시험	중금속 : 납, 카드뮴
		안정성시험 실시 중	대두 원료에 대한 가속 및 장기보존	가속 6 개월 종료, 장기보존 18 개월 진행
		추출방법 선정	추출법 : 30% 에탄올 시간 : 4 시간 추출 농축 : 고품분 20%	리드추출물로 선정된 대두에 대한 추출 및 농축
		제형선정을 위한 Pilot규모의 처방연구	1) 조제량 : 1 kg 2) 제조처방 확정	1) Lab 규모 연구 2) Pilot 규모로 Scale-up(10kg)
		제형확정 및 생산공정 확립	1) 제형 선정 2) 공정도 확정	1) 연조엑스 제형 2) 공정도 확립
		파일럿 원료생산	1) 파일럿 원료생산	1) 대두 120kg사용하여 농축액 26 kg를 얻었 으며 고품분은 22% 2) 안정성계획작성
		추출물 및 시제품 제조	대두 추출물 및 임상시험용샘플	협동기관에 추출물과 샘플 전달하여 시제품으로 연구진행
		실생산 크기 제형연구	1) 100kg규모의 제조	1) 공장리모델링으로 일정지연 2) 2차년도 종료이전 적용가능
		임상시험 준비	1) 임상대행기관(CRO) 2) 임상기관선정 3) 임상샘플제조	1) CRO와의 계약체결 2) 경희대 및 세명대 3) 시험 및 대조 60 kg

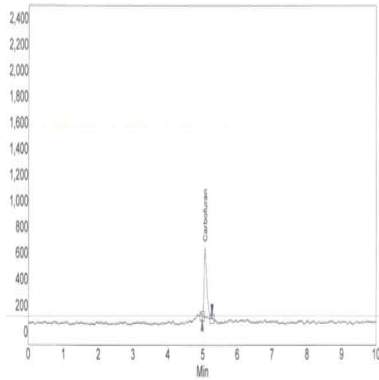
2차 년도 실적

첨부 1. 대두 잔류농약시험

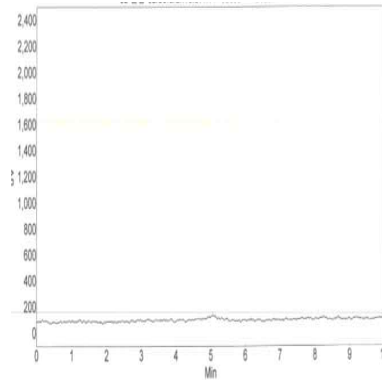
1차년도에 구입한 원료와 동일하여 해당농약성분 중 일부에 대하여 실시. 기 구입분에 대한 기관 위탁시험시 잔류농약은 전항목에서 불검출 됨.

1. 카보퓨란(Carbofuran) 0.2 ppm이하

표준액

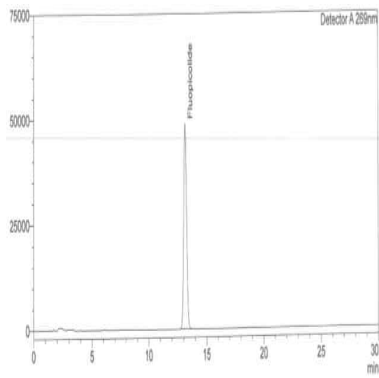


대두원료

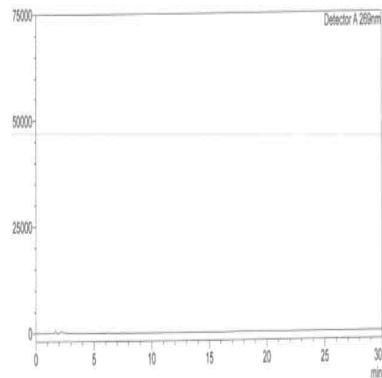


2. 플루오피클라이드(Fluopicolide) 0.05 ppm이하

표준액

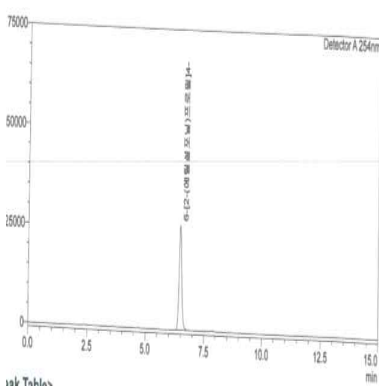


대두원료

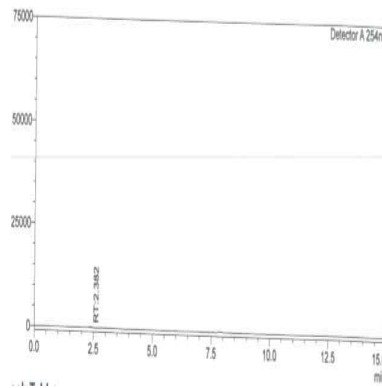


3. 세톡시딴(Sethoxydim) 0.05 ppm이하

표준액

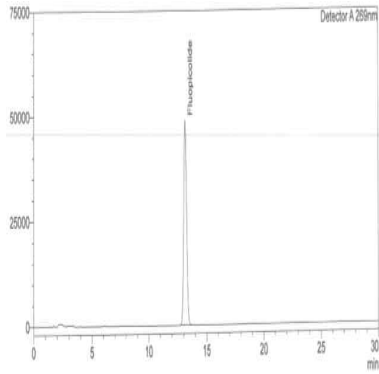


대두원료

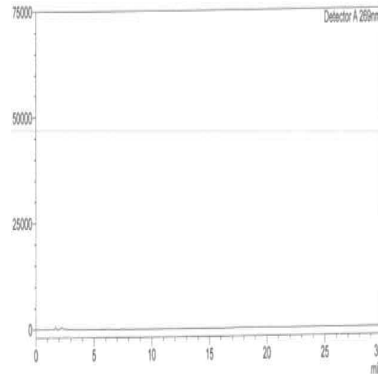


2. 플루오피콜라이드(Fluopicolide) 0.05 ppm이하

표준액

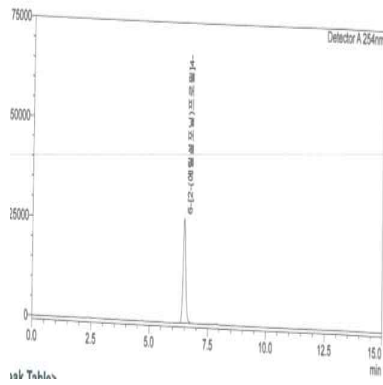


대두원료

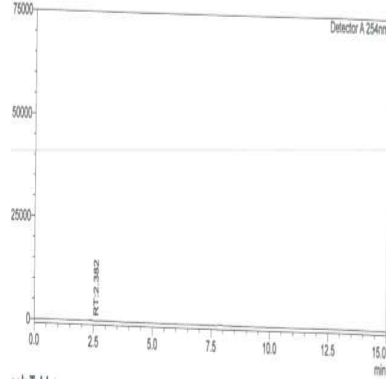


3. 세톡시딴(Sethoxydim) 0.05 ppm이하

표준액

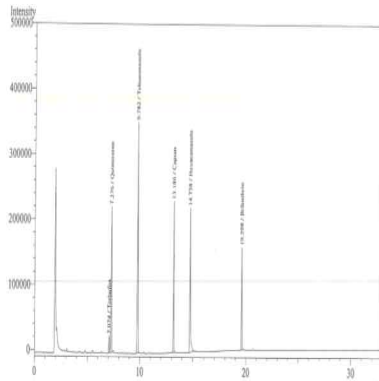


대두원료

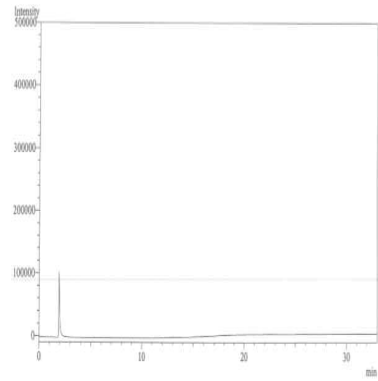


4. 비펜트린(Bifenthrin) 0.5 ppm이하

표준액



대두원료



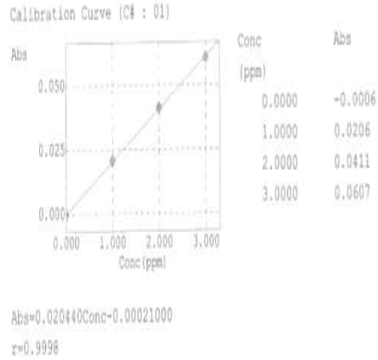
2차 년도 실적

첨부 2. 대두 안정성시험 (납, 카드뮴)

1차년도에 구입한 원료와 동일하여 중금속성분 중 일부에 대하여 실시. 기 구입분에 대한 시험시 중금속은 전항목에서 기준치 이하로 확인 됨.

1. 납(Pb) 2 ppm이하

검량선

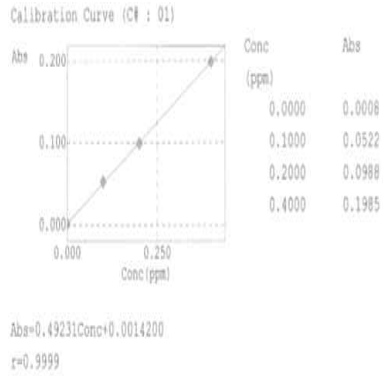


대두원료

Conc.	Abs.
0.0298	0.0004
ActualConc.	Actual Conc. Unit
0.2982	ppm

2. 카드뮴(Cd) 0.2 ppm이하

검량선



대두원료

Conc.	Abs.
-0.0011	0.0009
ActualConc.	Actual Conc. Unit
-0.0106	ppm

2차 년도 실적

첨부 3. 대두 안정성시험(가속시험)

안정성 시험 계획

품명	대두	시험구분	가속안정성			
시험번호	QD18009	보관조건	40±2℃, 75±5%			
구입일자	2017-12-30	유효(사용)기간	-			
검체량	70g (매회: 10g)	구입량	30,000g			
포장형태	포	작성일자	2017-12-30			
시험(항목)방법 및 기준<식품공전에 의함>						
시험항목	시험기준	시험방법	비고			
성상	잘 익은 씨, 바깥면은 노란색	육안검사	매회 시험			
이물	종이외의 이물은 없다.	육안검사	매회 시험			
오염물질 (중금속)	납	0.2 ppm 이하	중금속 시험법 개시, 최종회 시험			
	카드뮴	0.2 ppm 이하				
잔류농약	135 성분	GC 측정	초회, 최종회 시험			
아플라톡신	15 ppb 이하	HPLC 측정	초회, 최종회 시험			
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2018.03.30	2018.06.30					
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
인도	작성자		확인자		승인자	
	[인도]		[인도]		양승용	

시험구분	가속시험	시험항목	시험기준	시험방법	비고	
포장형태	포	보관조건	40±2℃, 75±5%	구입량	30,000g	
시험구분	가속시험	시험항목	성상	이물	오염물질(중금속)	
성상	잘 익은 씨, 바깥면은 노란색	육안검사	성상	이물	오염물질(중금속)	
이물	종이외의 이물은 없다.	육안검사	이물	오염물질(중금속)	납	
오염물질	0.2 ppm 이하	중금속 시험법	납	0.2 ppm 이하	카드뮴	
잔류농약	135 성분	GC 측정	잔류농약	135 성분	아플라톡신	
아플라톡신	15 ppb 이하	HPLC 측정	아플라톡신	15 ppb 이하		
시험(항목)방법 및 기준<식품공전에 의함>						
시험항목	시험기준	시험방법	비고	시험기간		
성상	잘 익은 씨, 바깥면은 노란색	육안검사	매회 시험	3개월		
이물	종이외의 이물은 없다.	육안검사	매회 시험	6개월		
오염물질(중금속)	납	0.2 ppm 이하	중금속 시험법 개시, 최종회 시험	9개월		
	카드뮴	0.2 ppm 이하		12개월		
잔류농약	135 성분	GC 측정	초회, 최종회 시험	18개월		
아플라톡신	15 ppb 이하	HPLC 측정	초회, 최종회 시험	24개월		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2018.03.30	2018.06.30					
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
인도	작성자		확인자		승인자	
	[인도]		[인도]		양승용	



2차 년도 실적

첨부 3. 대두 안정성시험(장기보존시험)

안정성 시험 계획

품명	대두		시험구분	장기보존안정성		
시험번호	QD18009		보관조건	25±2℃, 60±5℃		
구입일자	2017-12-30		유효(사용)기간	-		
검체량	70g (매회 : 10g)		구입량	30,000g		
포장형태	포		작성일자	2017-12-30		
시험(항목)방법 및 기준<식품공전에 의함>						
시험항목	시험기준	시험방법	비고			
성상	질 악은 씨, 바깥면은 노란색	육안검사	매회 시험			
이물	콩 이외의 이물은 없다.	육안검사	매회 시험			
오염물질 (중금속)	납	0.2 ppm 이하	중금속 시험법	개시, 최종회 시험		
	카드뮴	0.2 ppm 이하				
관류농약	135 성분	GC 측정	초회, 최종회 시험			
아플라톡신	15 ppb 이하	HPLC 측정	초회, 최종회 시험			
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14 일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2018.03.30	2018.06.30	2018.09.30	2018.12.30	2019.06.30	2020.12.30	2021.12.30
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검인	작성 자	확인 자	승인 자			
		이원	양승용			

시험구분	대두	시험번호	QD18009	구입일자	2018-12-30		
보관조건	25±2℃, 60±5℃	시험기간	30,000g	시험구분	장기보존시험		
시험항목	성상	이물	오염물질(중금속)	관류농약	아플라톡신		
시험방법	육안검사	육안검사	중금속 시험법	GC 측정	HPLC 측정		
시험결과	성상 변화 없음	이물 없음	납 0.2 ppm 이하 카드뮴 0.2 ppm 이하	135 성분 미검출	아플라톡신 15 ppb 이하		
시험일자	2018.03.30	2018.06.30	2018.09.30	2018.12.30	2019.06.30	2020.12.30	2021.12.30
시험인	작성 자	확인 자	승인 자				
		이원	양승용				

2차 년도 실적

첨부 3. 대두연조엑스가속 및 장기 안정성

가. 대두 40 kg을 이용해 9 배수의 30 % 에탄올로 추출하고 농축하여 연조엑스 8.7kg을 얻었으며, 추출 및 농축의 일관성을 확인하기 위하여 3 로트를 연속으로 제조하였다.

나. 장기보존과 가속시험안정성 계획서를 작성하여 3개의 로트 중 첫 번째 로트에 대한 계획서를 첨부한다.

다. 함량시험이 제출당시 진행중인 관계로 초기의 결과값은 3차년도 진행중에 기입하여 보고할 예정이다.

라. 연조엑스의 특성 상 안정성 기간 중에 성상의 변형이 생길 수도 있으며, 성상이 변경되는 시점에서 안정성 시험을 종료하여 원료의 사용기한을 설정하고자 한다.

마. 대두30%에탄올연조엑스를 가지고 제조한 임상시험용 시료에 대하여도 장기 및 가속 안정성 시험을 실시하여 사용기한을 설정하고자 하며, 식약처 개별인증 신청시점의 결과를 가지고 사용기한을 신청한다. 안정성시험을 계속하여 실시하여 사용기한의 연장을 신청하는 방향으로 하고자 한다.

2차 년도 실적

첨부 3. 대두연조엑스가속 및 장기 안정성

안정성 시험 계획

품명	대두30%에탄올연조엑스		시험구분	장기보존안정성		
제조번호	ME990101		보관조건	25±2℃, 60±5%		
제조일자	2019-08-12		유효(사용)기간	-		
검체량	70 g (매회 : 10 g)	제조단위	8,700 g			
포장형태	이중비닐로 밀폐		작성일자	2019-08-14		
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목	시험기준	시험방법	비고			
성상	임갈색의 연조엑스	육안검사	매회 시험			
확인	HPLC	표준액과 동일 유지시간	HPLC법	매회 시험		
순도시험	총중금속	30ppm 이하	중금속 시험법	초회,최종회 시험		
건조감량	96.0 % 이하		건조감량 시험법	초회,최종회 시험		
항량 (1 g 중)	다이오진 및 게니스틴의 합	mg 이상	HPLC법	매회 시험		
미생물 한도	대장균군 : 불검출		미생물 시험법	초회,최종회 시험		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2019.11.12	2020.02.12	2020.05.12	2020.08.12	2021.02.12	2021.06.12	2022.06.12
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검토	작성자	확인자		승인자		

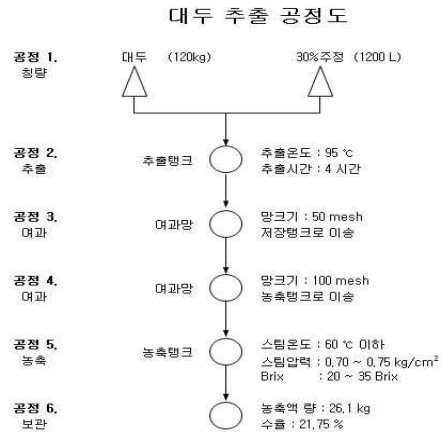
안정성 시험 계획

품명	대두30%에탄올연조엑스		시험구분	가속안정성		
제조번호	ME990101		보관조건	40±2℃, 75±5%		
제조일자	2019-08-12		유효(사용)기간	-		
검체량	70 g (매회 : 10 g)	제조단위	8,700 g			
포장형태	이중비닐로 밀폐		작성일자	2019-08-14		
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목	시험기준	시험방법	비고			
성상	임갈색의 연조엑스	육안검사	매회 시험			
확인	HPLC	표준액과 동일 유지시간	HPLC법	매회 시험		
순도시험	총중금속	30ppm 이하	중금속 시험법	초회,최종회 시험		
건조감량	96.0 % 이하		건조감량 시험법	초회,최종회 시험		
항량 (1 g 중)	다이오진 및 게니스틴의 합	mg 이상	HPLC법	매회 시험		
미생물 한도	대장균군 : 불검출		미생물 시험법	초회,최종회 시험		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2019.11.12	2020.02.12					
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검토	작성자	확인자		승인자		

2차 년도 실적

첨부 3. 대두 추출 공정도

- 가. 대두원료를 1 차년도에는 정제수를 사용하였고, 추출시간 및 추출온도등은 2차년도에도 같은 조건으로 추출하였다.
- 나. 이는 추출탱크의 방폭에 대한 보완장치가 미비하였고 이를 보완하여 협동기관에서 추출하여 시험한 용매와 동일한 추출용매를 사용하여 추출하였다.
- 다. 추출용매의 변경에도 수율, 성상 및 맛을 비롯한 관능은 동일하였다.



1. 제형선정

- 폐경기의 갱년기 여성으로 방향을 맞춤
- 정제의 경우 1 회 복용량이 4 정 이상이 되어 복용시 불편함을 호소할 수 있음.
- 대두의 냄새를 마스킹할 수 있는 연조엑스제형으로 선정함.

2. 원료약품의 분량 (시험약) 10 g / 1 회 용량

- 대두 농축액의 수율은 21.6 %이며 이를 가지고 6,000포를 제조하기 위한 처방을 설정함.

대두연조엑스 배합비

제조일자 : 2019 년 08 월 28 일

원 료 명	배합목적	결 과	배합비 (%)	분량 (g)	투입량 (kg)	비 고
대두에탄올연조엑스	주성분	20Brix		4.33	26.0	
고과당55	감미제			1.50	9.0	
맥아물엿	감미제			0.80	4.8	
CMC-Na	증점제			0.10	0.6	
정제수	용 제			3.27	19.61	
합계			100.00	10.00	60.00	

3. 원료약품의 분량 (대조약) 10 g / 1 회 용량

- 대두 농축액을 넣지 않고 6,000포를 제조하기 위한 처방을 설정함.

대두연조엑스 대조샘플 배합비

제조일자 : 2019 년 08 월 28 일

원 료 명	배합목적	결 과	배합비 (%)	분량 (g)	투입량 (kg)	비 고
고과당55	감미제			1.50	9.0	
맥아물엿	감미제			0.80	4.8	
CMC-Na	증점제			0.15	0.9	
정제수	용 제			7.55	45.30	
합계			100.00	10.00	60.00	

2차 년도 실적

첨부 3-2. 제형선정을 위한 사전 제조

처방상 CMC-Na의 양이 잘못 기입되어 이를 정정하였음.

가. 처방 1

대두농축액의 맛은 콩의 향과 맛이 강해 향과 맛을 복용에 거부감이 없게 하는데 중점을 두었음.

나. 관능검사

대상은 20대부터 50대까지 남녀를 대상으로 실시.

다. 결과

흐름성(충전의 가능성)이 좋지 않고 관능검사시 콩의 맛이 강하다는 맛이 지배적임.

대두연조엑스 시험제제 [처방 1]

제조일자 : 2019년 08월 26일

원료명	배합목적	결과	배합비 (%)	분량 (g)	투입량 (kg)	비고
대두에탄올연조엑스	주성분	20Brix		4.33	4.3	
고과당55	감미제			1.00	1.0	
백이물엿	감미제			1.00	1.0	
CMC-Na	증점제			0.05	0.1	
정제수	용제			3.62	3.62	
합계			100.00	10.00	10.00	

가. 처방 2

위의 처방을 변경하여 제제를 시험제조

나. 결과

충전에 적합한 흐름성이 있음.
콩의 맛은 약간 개선되었지만,
콩의 맛을 더 줄이면 좋겠다는 의견이 많았음.

대두연조엑스 시험제제 [처방 2]

제조일자 : 2019년 08월 26일

원료명	배합목적	결과	배합비 (%)	분량 (g)	투입량 (kg)	비고
대두에탄올연조엑스	주성분	20Brix		4.33	4.3	
고과당55	감미제			1.20	1.2	
백이물엿	감미제			1.00	1.0	
CMC-Na	증점제			0.06	0.1	
정제수	용제			3.41	3.41	
합계			100.00	10.00	10.00	

가. 처방 3

위의 처방2에서 콩의 맛을 줄이기 위해 처방을 변경하여 시험제조

나. 결과

충전의 용이성은 확보 됨.
콩의 맛이 강하게 느껴지는 부분은 많이 줄었다는 평가가 있음.

※ 3개의 처방을 통해 감미제의 양등을 조정해 위의 처방을 확정함.

대두연조엑스 시험제제 [처방 3]

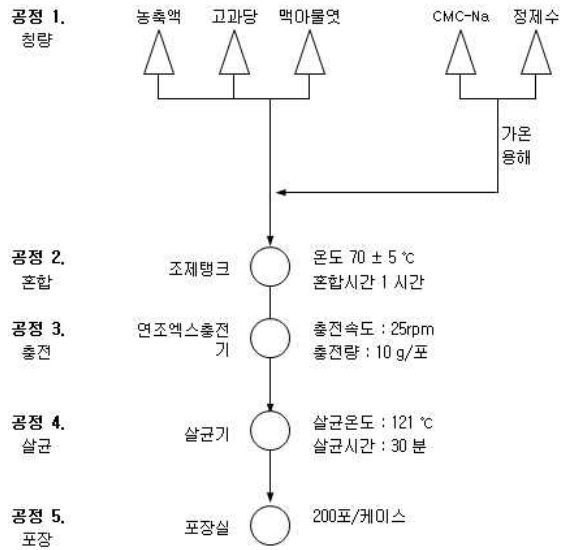
제조일자 : 2019년 08월 27일

원료명	배합목적	결과	배합비 (%)	분량 (g)	투입량 (kg)	비고
대두에탄올연조엑스	주성분	20Brix		4.33	4.3	
고과당55	감미제			1.30	1.3	
백이물엿	감미제			0.90	0.9	
CMC-Na	증점제			0.07	0.1	
정제수	용제			3.40	3.40	
합계			100.00	10.00	10.00	

가. 대두연조엑스 공정 요약

- CMC-Na를 물에 가온하여 녹인다.
- 대두농축액, 고과당 및 맥아물엿과 함께 조제탱크에 넣는다.
- 70 ℃를 유지하며 1시간동은 교반하며 액을 조제한다.
- 연조엑스충전기로 충전하기전 인쇄내용등을 확인하여 시운전한 다음, 설정된 충전량에 맞게 충전되는 지 확인하며 충전한다.
- 살균기에 넣고 살균한다.
- 포장 후 시험의뢰하여 적합판정을 받으면 출하실로 이동한다.

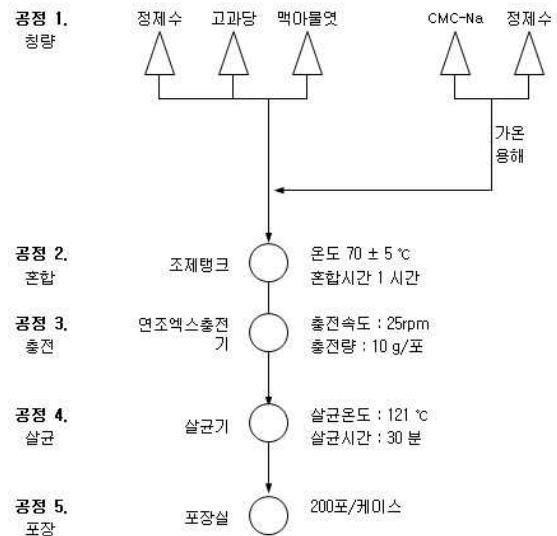
대두연조엑스 제조 공정도



가. 임상시험용 위약 공정 요약

- CMC-Na를 물에 가온하여 녹인다.
- 정제수, 고과당 및 맥아물엿과 함께 조제탱크에 넣는다.
- 70 ℃를 유지하며 1시간동은 교반하며 액을 조제한다.
- 연조엑스충전기로 충전하기전 인쇄내용등을 확인하여 시운전한 다음, 설정된 충전량에 맞게 충전되는 지 확인하며 충전한다.
- 살균기에 넣고 살균한다.
- 포장 후 시험의뢰하여 적합판정을 받으면 출하실로 이동한다.

임상시험용 위약 제조 공정도



1. 계약사항

- 해밀턴CS (대표 오준환)와 임상시험의 진행을 위해 계약실시 및 계약금 지급.
- 계약서 주요 페이지 사본 첨부.
- 시험인원 46 명으로 하여 시험 예정.
- 시험계획서는 별도로 첨부한다.

**(주)경방신약 건강기능식품(수면의 질개선)
인체적용시험 업무위탁계약서**

2019. 07. 02.

경방신약(주)/주해밀턴씨에스

1. 계약사항

- 해밀턴CS (대표 오준환)와 임상시험의 진행을 위해 계약실시 및 계약금 지급.
- 계약서 주요 페이지 사본 첨부.

2019년 07월 02일

(갑)

인천광역시 남동구 남동대로 394
경방신약 주식회사

대표이사 김 충 환 (인)



(별첨 : 견적서)

(을)

경기도 성남시 분당구 판교역로 221
투썬월드빌딩 1층 112호

주해밀턴씨에스 대표 오 준 환 (인)



1. 주관기관에서 실생산장비로 추출한 3로트의 30%에탄올연조엑스를
협동기관인 이노파마스크린, 경희대학교 및 호서대학교에 전달.
2. 연조엑스를 제조하여 위와 같이 3 개의 기관에 전달하여 이노파마스크린과 경희대학교에서는
in vivo, in vitro 시험을 경방신약과 호서대학교에서는 품질관련 시험업무를 공조할 예정
3. 원료표준화
 - 원료입고시 품질검사
 - 대두추출물에 대한 표준화 (이미 2 차년도에 연속 3 Lot에 걸친 제조방법 일관화 완료)
 - 대량생산 공정확립(3차년도 초반에 확립가능, 600kg으로 3로트, 1500kg으로 3 로트 시험)
 - 추출액 및 실생산제조시 지표성분의 함량 재현성 확인)

건강기능식품 기능성원료 인정 신청에 필요한 자료는 다음과 같다.

본 연구는 원료에 대한 기능성 인정을 신청한 후에 인증되면 제품에 대하여 진행하는 것이 타당하다.

또한 대두30%에탄올연조엑스를 분석하였을 때 가장 많이 함유하는 2 성분인 Daidzin 및 Genistin을 지표성분으로 설정하여 시험법 밸리데이션을 호서대와 공동진행하고 함량기준을 설정하고자 한다.

※ 제출자료

제출자료 전체의 총괄 요약본
기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
제조방법 및 그에 관한 자료
원료의 특성에 관한 자료
기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료>
안전성에 관한 자료
기능성 내용 및 그에 관한 자료
섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

3차 년도 실적

연구목표와 개발내용 및 그 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (20 20)	리드추출물 원료의 표준화 및 안정성 확보	대량산산 공정연구 및 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 제조공정 최적화 확인 - 대량생산 공정연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 파이로트 규모로 제제시험 - 제제연구를 통해 복용이 용이한 방법으로 임상시험용 시험제품 제조 - 실생산 규모의 제조를 통해 실생산규모로의 Scale-up가능여부 확인
		제조물 안정성 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 유통기한 설정연구 - 원료 및 시제품 안정성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 유통기한 설정을 위해 가속시험 실시 - 장기보존안정성 시험 - 3차년도에 대두 원료를 구입하여 1차년도와 동일하게 유해물질 및 GMO여부 검사
		인체적용시험 (임상시험)	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품 생산 - 임상시험 실시 	<ul style="list-style-type: none"> - 임상시험용 제품 제조 (시험제품 및 대조제품) - 다기관 임상시험 실시 - 임상시험 결과 확인
		사업화 방안 및 비즈니스 모델연구	<ul style="list-style-type: none"> - 사업화를 위한 마켓 기반마련 	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성원료 개별인증을 위한 시험위탁 - 임상시험실시 후 결과가 두드러지게 좋은 것으로 나오지 않아 개별인증을 신청하지 못함.

주관기관인 경방신약주식회사에서는 3 차년도 과제수행을 위해 대두를 구입하여 아래의 시험을 위탁하여 실시하였으며 그 결과는 다음과 같음.

항목	결과	비 고
총아플라톡신 (ug/kg)	불검출	
납 (mg/kg)	0.0343	
카드뮴 (mg/kg)	0.0151	
수은 (mg/kg)	불검출	
비소 (mg/kg)	0.0067	
잔류농약	불검출	아바멕틴외 319 종
GMO성분(정성검사)	불검출	

1. 자사에서 아플라톡신등의 시험은 가능하다.

자사의 원생약 중 감초를 비롯한 20여개의 원료에서 아플라톡신을 시험하고 있다.

2. 다만, 대두입고시 아플라톡신을 측정하는 장비를 다른 원료 및 제품시험에 사용하고 있어 부득이하게 위탁시험을 실시하였다.

3. 납을 비롯한 중금속의 경우 자사에서는 의약품의 기준으로 시험하고 있으며, 식품의 시험 방법대로 시험하는 것이 결과를 내는데 더욱 효과적일 것으로 보여 위탁시험을 실시하는 것으로 결정하여 위탁시험하였다.

4. 잔류농약시험의 경우 자사에서도 인삼, 생강등 식품공전의 적용을 받는 원료들은 위탁하여 시험을 실시하고 있다.

대두의 경우 식품공전에 300 여종의 잔류농약시험을 실시하도록 되어 있어, 자사에서 모든항목에 대한 시험을 실시할 상황이 아니라고 판단되어 위탁시험을 실시하였다.

5. GMO검사는 자사에 시험을 실시할 장비가 없어 위탁하여 시험하였다.

또한, 이 시험은 식품공전 또는 건강기능식품 공전에 없지만, 국내산 콩임을 알고자 실시하였다.

6. 시험항목에 대한 위탁시험 성적서는 다음장의 첨부로 같음하고자 한다.

제 D2020081968 호
문서확인 BIG5-29NK-G9UY

시험·검사성적서

제품명	대두		제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	정방신약(주)	성명	김중환
	주소	인천광역시 남동구 남동대로 394 (남촌동)		
제조번호		접수년월일	2020-08-24	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2020081968	

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2020-08-28

시험·검사 책임자: 이정구, 이현영

검사관련 총 책임자: 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
총아플라톡신($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	연주혜
납(mg/kg)	0.0343 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0151 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	불검출	박경덕
비소(mg/kg)	0.0067 mg/kg	정다운

* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

* 본 성적서는 용고를 성격서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 재가공검사 또는 정부기관 외 제3자 용도로 활용할 수 없습니다.

* 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

* 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 08월 28일

한국기능식품연구원장

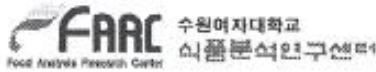


(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호: 031-628-0400-1



KHSI





시험성적서

[18333] 경기 화성시 봉담읍 주석로 1098 수원여자대학교 생활캠퍼스 309호
Tel. 031-290-8217 Fax. 031-290-8220

접수번호	A4-200824-027-01	접수일자	2020년 08월 24일
시험목적	잔류농약검사	시험종류	잔류농약
재 품 명	대두	시험항목	Abamectin 외 319종
제조일자		유통기한	
업 세 명	경방산업(주)	대 표 자	김중현
업체주소	인천광역시 남동구 남동대로 394 (남촌동)		

귀하께서 의뢰하신 견제에 대하여 다음과 같이 시험성적서를 교부합니다.

시험 결과

No.	검출성분명 (Pesticide name)	검출치 (mg/kg)	허용기준 (mg/kg)	적용기준 (Applicability MRLs)	비고
1	-	-	-	-	-

▶ 분석을 실시한 Abamectin 외 319종에서 검출된 위 성분을 제외한 나머지 성분은 검출을 없습니다.
▶ 허용기준 적용근거 : 식품공전 [별표 4]
▶ 시험법근거 : 농산물 등의 유해물질 분석법-잔류농약-제2법

* 분석을 실시한 농약 성분명(농약 320제 성분)

Abamectin, Acephate, Acetamifid, Acrinathin, Aclachlor, Aldicarb, Aldin, Ametoctradin, Amisulbrom, Ariflofos, Azoxanazole, Azimsulfuron, Azinphos-methyl, Azoxystrobin, Bendocarb, Benfluresafe, Bensulfuron-methyl, Benthiavalicarb-Isopropryl, Benzocycloflor, Benzoximate, BHC, Bifenox, Bifenthrin, Bitertanol, Bitertanol, Boscalid, Bromacil, Bromobutide, Bromocrotylate, Buprofezin, Butachlor, Butafenacil, Cadusafos, Calenafate, Carbaryl, Carbenfendim, Carbofuran, Carbofenthiol, Carbodim, Carfentrazone-ethyl, Capropanide, Chlorantraniliprole, Chlorfane, Chlorfentapyr, Chlorfenvinphos, Chlorfluazuron, Chlorobenzilate, Chlorpropham, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Chlorsulfuron, Chromafenoxide, Clethodim, Clofentezine, Clomazone, Clothianidin, Cyazofamid, Cyclosulfamuron, Cyfluthrin, Cyhalotop-butyl, Cyhalothrin, Cymoxanil, Cypermethrin, Cyproconazole, Cyprodinil, DD T, Deltamethrin, Demeton-S-methyl, Diazinon, Dichlorvos(DDVP), Diclofop-methyl, Dicyclanil, Dicyclof, Dieldrin, Diethofencarb, Difenoconazole, Diflubenzuron, Dimicloprate, Dimethenamid, Dimethenamid, Dimethoate, Dimethomorph, Dinethymylphos, Daimuron (Dymron), Diniconazole, Dinotefuran, Diphentamid, Difenmetimne, Disulfoton, Dithiopyr, Diuron, Edifenphos, Encosulfan, Endrin, EPN, Epoxiconazole, Esprocarb, Ethaboxam, Ethalfuralin, Ethionecarb, Ethion, Ethoprophos(Ethopropr), Ethoxysulfuron, Etofenprox, Etoazole, Etridazole, Etrifos, Fenoxadone, Fenamiphos, Fenalrol, Fenazaquin, Fenbuconazole, Fenclorin, Fenhexamid, Fenitrothion, Fenobucarb, Fenothiocarb, Fenoxanil, Fenoxaprop-ethyl, Fenoxycarb, Fenprophatin, Fenpyroximate, Fenthion, Fentazamide, Fensulfate, Ferimzone, Fipronil, Flonicamid, Fluacrypyrifos, Flubendiamide, Flucetosulfuron, Flucythrinate, Fludioxonil, Flufenacet, Flufenacur, Flumioxazine, Flupicloride, Fluoviam, Fluzoxonazole, Flusilazole, Flutolanil, Fluroxypyracid, Fonofos, Forchlorfenuron, Fosfhalazate, Fthalide, Furathiocarb, Gibberellic acid, Halfenprox, Halosulfuron-methyl, Haloxypol, Heptachlor, Heptachlor-epoxide, Hexaconazole, Hexaflumuron, Hexazinone, Hexythiazox, Imazalil, Imazosulfuron, Imibenconazole, Imicyclfos, Imidacloprid, Imobentilol, Indoxacarb, Indoxifos, Iprodione, Iprovalicarb, Isazofos, Isafenphos, Isocrocarb, Isochlorogenic, Isoprazoxim, Kresoxim-methyl, Linuron, Lufenuron, Malathion, Mandipropamid, Mecachem, Mefenacet, Mepanipyrim, Mepronil, Metazaly, Metamifop, Metazoxulfuron, Metconazole, Methabenzthiazuron, Methidathion, Methiocarb, Methomyl, Methoxyfenozide, Metobromuron, Metolachlor, Metolcarb, Metolene, Metribuzin, Mevinphos, Milbexectin, Molinate, Monocrotophos, Myclobutanil, Napropamide, Nicosulfuron, Noxfluron, Nualrol, Oflurac, Omethoate, Oxadiazon, Oxadixyl, Oxamyl, Oxasulfonamide, Oxyluorfen, Paclobutrazol, Parathion-ethyl, Parathion-methyl, Penconazole, Pencvouron, Pendimethalin, Penoxalam, Pentflorpyrad, Penoxazine, Permethrin, Phenothrin, Phenthoate(PAP), Phorate, Phosalone, Phosphamidon, Phosm, Procyastrobin, Piperonyl butoxide, Pibocrophos, Pirimicarb, Pirimiphos-ethyl, Pirimiphos-methyl, Pritachlor, Probenazole, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Promecarb, Prometryn, Propachlor, Propaquinocarb, Propaenil, Propaquizafop, Propazine, Prochlorazole, Propisochlor, Propoxur, Propyzamide, Prothiofos, Pyraclofos, Pyraclostrobin, Pyrazolate, Pyrazophos, Pyributaxim, Pyributicarb, Pyridaben, Pyridatyl, Pyridaphenthion, Pyridiquinazone, Pyrifosid, Pyrimethanil, Pyrimidifen, Pyriminobac-methyl, Pyrimisulfan, Pyriproxyfen, Pyroquilon, Quinalphos, Quinmerac, Quinoclamine, Quinzozone, Quizalofop-ethyl, Salkufenacil, Sethoxydim, Stalofufen, Simazine, Simeconazole, Simectryl, Spinetoram, Spirodiclofen, Spiromesifen, Spirotetramat, Sulfaxialor, Tebuconazole, Tebufenozide, Tefufenicyrad, Tebufenrimfos, Tebufenuron, Tefuthrin, Tebutos, Tebutylazine, Tebutryl, Tetraconazole, Tetradifon, Thienylchlor, Thiazabenzazole, Thiachlorid, Thiamethoxam, Thiazopyr, Thiazuron, Thiflurasulfuron-methyl, Thifluzamide, Thiobencarb, Thiodicarb, Thidiazil, Tolclofos-methyl, Tralometolol, Tridimeton, Tridimenol, Triazophos, Tricyclozole, Trifloxystrobin, Trifluzoxone, Trifluzuron, Trifluralin, Uniconazole, Vamidothion, Vindoxazin, Zoxamide

1. 위 결과는 의뢰된 시험 항목만을 대상으로 한 것입니다.
2. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 제품 및 제품명으로 시험한 결과로서 전체제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
3. 이 시험성적서는 당 센터의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용은 금합니다.
4. 당 센터는 KOLAS 공인 시험기관이다. 이 시험성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020년 09월 01일



수원여자대학교 식품분석연구소
Suwon Women's University Food Analysis Research Center





분석확인번호 : V9GB-8DHY-AWHH-STAC

시험 · 검사성적서

발행번호	R20200903-0095	접수번호	200118549-001	
검사완료일	2020년 09월 03일	접수완료일	2020년 08월 24일	
제품명	대두			
유형 · 재질 · 품목명	대두			
제조(수입)일/제조번호	유통(품질유지)기한			
품목제조신고번호				
외의자	성명	김승현	업체명	경방신약(주)
	소재지	(21635)인천광역시 남동구 남동대로 394 (남동동) 전화번호: 02-9499-8035 팩스번호: 02-963-2597 전자우편: jangml.kim@polymer.co.kr		
제조사	업체명			
	소재지			
시험 검사목적	식품 기타			

통관정보

선(면)동 :
B/L Number :
화물번호 :

입항일 :
허가번호 :
수확(명)량 :

유전자변형식품 시험정보

분석개시일	2020년 09월 01일	분석종료일	2020년 09월 03일
추출시험방법	QIAGEN Plant Maxi kit	추출시험횟수	2
시료량	⊙ 1.9 g ⊙ 1.7 g	추출DNA량	500 µL
DNA농도	⊙ 1017.00 ng/µL ⊙ 713.70 ng/µL	PCR반복횟수	2
DNA순도(A260/A280)	⊙ 1.97 ⊙ 1.57	DNA순도(A260/A230)	⊙ 1.76 ⊙ 1.73
PCR에 사용한 DNA농도	20.0 ng/µL 2.5 µL	PCR에 사용한 Kit	Bioneer PCR premix
Primer대상유전자	Lectin, CaMV P35S, tNOS, MON8788, DP356043-5, DP305423-1, MON87701, CV327, MON87705, MON87709, MON87769, DAS-44406-6, DAS-58416-4, DAS-81419-2, MON87751	PCR검출한계	0.5

이하이때

※ 시험결과(별첨) 참조

종합판결 : 상기시험확인함

시험접사원 : 허대영

시험검사책임자 : 이정구, 장정순

비고 :

※ 위 내용은 과학원 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 기타(단) 부속항 중의 시험 · 검사 항목 및 결과항목 일치여부 확인 가능합니다.
※ 검사결과를 영조하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2020년 09월 03일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원



13488 경기도 성남시 분당구 대왕전교로 700 A동 102호(삼정동, 포리아이오마루)

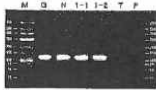
T:031-628-2400 F:031-628-0400-1

※ 시험결과(별첨)

시험접수번호 : 200118549 | 시험명 : 대두

1. 원기원료 사전

(1) Lectin(118 bp)



2. 스크리닝

(1) CaMV P35S(101 bp)

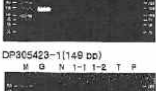


(2) tNOS(151 bp)

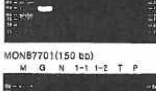


3. 구조유전자

(1) MON8788(139 bp)



(2) DP356043-5(145 bp)



(3) DP305423-1(149 bp)



(4) MON87701(1150 bp)



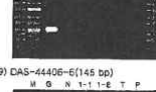
(5) CV1271(95 bp)



(6) MON87705(92 bp)



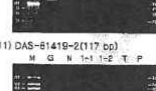
(7) MON87708(105 bp)



(8) MON87789(111 bp)



(9) DAS-44406-6(145 bp)



(10) DAS-88416-4(128 bp)



(11) DAS-81419-2(117 bp)



(12) MON87751(202 bp)



M : Ladder G : GMO Control N : Non-GMO Control
1 : 200118549 T : No Template Control P : No Primer Control

윤, 열관평
GMO성분(공생검사) : 공

3차 년도 실적

세부연구목표 :

대량생산 공정연구 및 개발

연구 수행내용 :

- 1) 대두를 가지고 추출용매의 양과 추출온도 및 추출시간을 변경하며 추출을 실시하였다.
- 2) 추출액에 대한 수율, 수분, 건조감량 및 다이드진과 게니스틴의 함량을 측정하여 수치화 하여 수율이 가장 좋은 조건을 확인하였으며 각 추출조건별 함량분석을 실시하여 함량이 가장 좋은 추출조건을 선택하였다.
- 3) 추출조건은 다음의 조건을 설정하여 시험하였다.

원료사용량(kg)	30%에탄올 사용량(kg)	추출온도 (°C)	추출시간 (시간)	농축	비 고
10	80	65	3	60 °C 이하	추출온도 ± 3 °C
10	80	65	4	60 °C 이하	
10	80	70	3	60 °C 이하	
10	90	70	3	60 °C 이하	
10	90	70	4	60 °C 이하	
10	90	75	3	60 °C 이하	
10	90	75	4	60 °C 이하	

- 4) 추출조건에 따라 추출하고 농축한 액의 결과는 다음과 같다.

일자	제조방법요약	수율 / 수분 / 고형분	함량 (mg/g)	비고
19.06.17	8배수, 65°C, 3시간	18.0%, 77.6%,17.3B	1.6	
19.06.19	8배수, 65°C, 4시간	18.4%, 75.2%,19.4B	1.6	
19.06.21	8배수, 70°C, 3시간	17.9%, 76.1%,19.2B	1.8	
19.06.25	9배수, 70°C, 3시간	18.5%, 78.0%,18.5B	2.0	
19.06.27	9배수, 70°C, 4시간	18.6%, 77.9%,18.8B	1.9	
19.07.04	9배수, 75°C, 3시간	21.6%, 80.2%,21.8B	2.3	Best
19.07.11	9배수, 75°C, 4시간	18.1%, 78.1%,18.4B	2.0	

3차 년도 실적

세부연구목표 :

대량생산 공정연구 및 개발

연구 수행내용 :

- 5) 위의 19.07.04에 실시한 조건을 사용해 대두의 사용량을 증가하여 추출을 실시하였으며 그 결과 재현성이 확인되었다.

일자	공정현황	함량 (mg/g)	비고
19.07.16	- 원료의 양을 30 kg으로 증량	2.2	
19.07.18	- 추출온도 및 시간은 동일성 부여	2.2	
19.07.26	- 재현성확인에 초점을 두고 작업	2.2	
19.08.05	- 원료의 양을 실생산크기로 증량	2.3	

- 6) 원료의 표준화 공정연구 및 개발에 대한 문서를 첨부 4로 한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 제제연구를 통해 복용이 용이한 방법으로 임상시험용 시험제품 제조

연구 수행내용 :

- 1) 2차년도의 제제연구결과를 바탕으로 최적화된 조건으로 추출 및 농축을 실시하였으며, 제조된 농축액을 가지고 임상시험용 시험제품을 제조하였다.
 - 처방의 주 목적은 대두 특유의 비린맛을 제거하기 위하여 당류를 투입하였고, 고과당은 자사에서 주로 사용하는 구하기 쉬운 부원료의 하나이다.
 - 카르복시메틸셀룰로오스나트륨은 점도를 증가시켜주는 역할을 하는 부원료이다. 냄새와 맛이 없어 점도를 조절하는데 일반적으로 사용하는 부원료이다.

제조지시 및 기록서
PRODUCTION ORDER & BATCH RECORD

제품명	제조번호	성상 및 제형	제조단위									
경방대두연조엑스	1111	갈색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포	6,000 포(1회)									
공정	원료량량											
작업 시작 : 2019.10.28 (09:00)												
원료명	규격	코드번호	시험번호	허가량 (포)		기준량 (Lot)		사용량		청량자	확인자	비고
				mg	kg	g	kg	g				
1 대두30%에탄올 연조엑스	별규	RFS01	QME99001~5	4,330	26	000	26	000	Ym	이준재		
2 고과당55	별규	REF01	QB190103	1,500	9	000	9	000	Ym	이준재		
3 액아말것	별규	RES08	QB190204	800	4	800	4	800	Ym	이준재		
4 카르복시메틸셀룰로오스나트륨	KP	REC04	QB190101	100	-	800	-	600	Ym	이준재		
5 정제수	KP	REW01	QW191028	적량	적량	-	-	-	Ym	이준재		
합계				10g	60	000	-	-	-	-	-	
작업 종료 : 2019.10.28 (09:20)												
<p>특기사항</p> <p>연조엑스는 손실량을 고려하여 10g 단위에서 올린 하여 100g 단위 까지 사용량을 표기하고, 청량 허용범위는 기준량의 ±1% 이내로 한다.</p>												

3차 년도 실적

세부연구목표 : 제제연구를 통해 복용이 용이한 방법으로 임상시험용 시험제품 제조

연구 수행내용 :

- 2) 제조된 완제품은 1회 복용량을 10 g으로 설계하였으며, 1 포에 10 g을 충전하였다.
 - 제품이 충전되기 전의 빈포의 질량은 1.0 g이었으며, 충전질량의 범위 ± 0.5 g 이내에서 진행되었음을 알 수 있다.
 - 또한 충전된 제품이 새는지를 확인하기 위해 충전이 진행되는 동안 새는 제품이 있는지도 확인하였다.
 - 자사의 제품충전기는 2 대가 있어 식품만을 충전하도록 지정이 가능하다.

포장지시 및 기록서
PACKAGING ORDER & BATCH RECORD

제 품 명	제조번호	형상 및 재형	포장단위
경방대두원조엑스	1111	갈색의 원조엑스가 충전된 알루미늄포	10g / 포

IPC	질량확인				
작업 시작 : 2019. 10. 29 (10:30)					
1. 충전 개시전, 빈 포 5개의 질량을 확인하고, 평균을 기록한다. * 빈 포의 평균 질량 : 1.0 g					
2. 충전 기준 : 10g ± 5%					
3. 충전개시, 충전기 별 충전 1시간 간격으로 5개씩 질량을 확인하여 기록한다.					
4. 질량 기준 : (9.5g + 빈포 평균질량g = 1.0g) ~ (10.5g + 빈포 평균질량g = 1.5g)					
질량(g)	1	2	3	4	5
시간					
충전개시	11.1 g	11.3 g	11.2 g	11.1 g	11.2 g
11:35	11.0 g	11.0 g	11.1 g	11.1 g	11.2 g
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
:	0	0	0	0	0
작업 종료 : 2019. 10. 29 (12:00)					
특기사항					

세부연구목표 : 제제연구를 통해 복용이 용이한 방법으로 임상시험용 시험제품 제조

연구 수행내용 :

3) 제조의 전 과정을 제조기록서를 통해 기록하였다.

- 제조기록서에는 제품명, 제조단위, 제조일자를 기록하도록 되어 있다.
- 제조에 사용되는 원료명과 그 관리번호, 그리고 사용되는 원료의 양과 투입되는 원료에 대한 칭량에 대한 내용을 포함한다.
- 제품의 제조방법과 실시사항을 기록하여 이중으로 확인하도록 되어 있어, 제조간 실수가 되었다면 바로 알 수 있도록 구성되어 있다.
- 잘못 작성된 부분은 그 내용을 알아보기 쉽게 수정하도록 되어 있다.

제조지시 및 기록서
PRODUCTION ORDER & BATCH RECORD

<제품정보>

제품명	경방대두연조엑스	제조지시번호	1P1028-1
		제조단위	6,000 포(1회)
생성 및 재형	관색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포	제조번호	1111
		제조일자	2019.10.28
		사용기한	2022.10.27
분류	임상시험용 샘플	사용기간	36개월
표준서번호	MF-LI-201	지정방법	가밀용기, 실온(1 ~ 30℃)보관
문서번호	BR-LI-201-(00)	포장단위	10g / 포

<원본>

구분	제조부서	품질부서
작성자	박재미	박재미 2019.10.28
확인자	2019.10.28	2019.10.28
책임자	이준호 2019.10.28	오승민 2019.10.28

<지시>

제조지시서 발행	제조지시 (제조부서책임자)
박재미 2019.10.28	이준호 2019.10.28

<회중검토>

제조지시·기록서의 내용을 확인한 결과 정상적으로 제조되었음을 확인함.

제조부서책임자	품질부서책임자
20 . . .	20 . . .

3차 년도 실적

세부연구목표 : 제제연구를 통해 복용이 용이한 방법으로 임상시험용 시험제품 제조

연구 수행내용 :

- 4) 포장이 완료된 제품을 가지고 자사에서 품질관리를 실시하였다.
 - 제품성적서는 자사에서 관리해야할 항목을 설정하고 그 기준을 설정한다.
 - 자사에서 설정한 모든 항목에서 기준에 적합함을 보였으며, 특히 미생물의 오염이 없음이 확인되었다.

제 품 시 험 성 적 서(완제품)

제 품 명	경방대두연조맥스	제조번호	1111		
제조일자	2019. 10. 26	시험번호	QP-191028-1		
제조단위	6,000 포	검체채취량	100 포		
검체채취자	송 지 수	검체채취장소	포 장 실		
시험항목	시 험 기 준	시 험 결 과	관 정	시험일	시험자
성 상	갈색의 연조맥스가 충전된 알루미늄포	24.10.26에 충전된 알루미늄포	적합	2019.11.04	송지수
확인시험	표준액과 동일 유지시간을 갖는다.	충전 확인	적합	2019.11.26 2019.11.26	송지수
순도시험	총 중금속 : 30 ppm 이하.	3.92000 경방신약주식회사	적합	2019.11.04	송지수
건조감량	81.6 % 이하	88.1 %	적합	2019.11.05	송지수
결랑편차	편차 10 % 이하	-2.7 ~ 2.7 %	적합	2019.11.05	송지수
미생물함도	대장균군 : 불검출	불검출	적합	2019.11.12 2019.11.12	송지수
함 량	1 포 중 다이드진 및 게니스탄의 함 9.1 mg 이상	8.59 mg	적합	2019.11.25 2019.11.26	송지수
기밀도	누수 없음	누수 없음	적합	2019.11.04	송지수
표시사항	적합	적합	적합	2019.11.04	송지수
특기사항					
확 인 자	관 정 결 과	관 정 일 자	관 정 자		
송지수	적합	2019년 11월 26일	송지수		

- 5) 임상시험용 시험제품 및 대조제품 제조에 대한 문서를 첨부 5 및 5.1로 한다.
- 6) 또한 임상시험용 대조제품의 제조를 실시하였다. 이때 대조제품은 대두농축액을 사용하지 않고 제조하여 임상시험용 대조제품으로 했다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 실생산 규모의 제조를 통해 실생산 규모의 Scale-up 가능여부 확인

연구 수행내용 :

1) 연구를 위해 사용된 인원은 다음과 같다.

- 제조업무의 가능성을 확인하기 위해 생산부서에서 부서장 1 명과 실무자 2 명이 참여하였고, 연구개발부에서 시험항목의 설정 및 시험을 위해 1 명이 투입되었다.
- 시험항목의 설정은 성상, 유해물질의 측정, 건조감량의 측정, 지표성분의 분석 및 미생물시험을 위주로 설정하였다.
- 또한 제품의 누액을 확인하기 위해 기밀도 시험도 함께 실시하였다.

부서명	인원	주요업무	비고
연구개발부	1명	- 시험업무	시험항목 설정 및 시험
생산부	3명	- 조제 및 충전	시험약 및 위약

2) 제조에 사용된 장비는 다음과 같다.

- 사진의 장비는 자사에서 제조하는 타제품의 실제 제조에 사용되는 장비이다.
- 이외에도 원료를 추출하는 추출기와 농축기가 있지만, 실생산규모로 제조규모를 증가하여 제품의 제조연구를 하는 내용이 주를 이루는 것이 타당하다고 보여 두종류의 장비를 사용하였다.

기계명	관리번호	설치장소	설비능력	용도	장비사진
교반탱크	PL-015	조제실	1 Ton	액조제	
충전기	PP-014	충전실	5 열	충전	

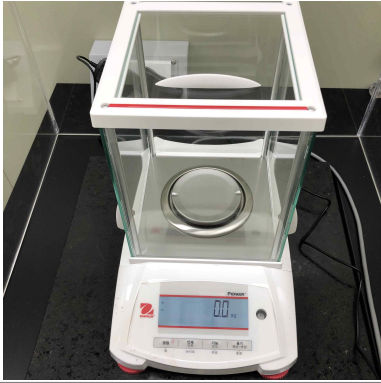

3차 년도 실적

세부연구목표 : 실생산 규모의 제조를 통해 실생산 규모의 Scale-up 가능여부 확인

연구 수행내용 :

3) 제품의 시험을 위해 사용된 장비는 다음과 같다.

- 전자저울은 정량시험시 표준품과 제품이 시험에 사용된 양을 정밀하게 측정하기 위해 사용되었다.
- HPLC는 본 제품의 지표성분인 Daidzin 과 Genistin을 분석하는데 사용되었다.

기계명	관리번호	설치장소	용도	장비사진
전자저울	RM-004	칭량실	- 정밀칭량	
HPLC	DM-002	분석실	- 정성분석 - 정량분석	
HPLC	RM-003	분석실	- 정성분석 - 정량분석	

3차 년도 실적

세부연구목표 : 실생산 규모의 제조를 통해 실생산 규모의 Scale-up 가능여부 확인

연구 수행내용 :

- 4) 제품의 Scale-up을 통해 실생산 규모로 제조하기 위해 생산 Capa의 1/2양으로 제조하고 그 후에 실생산 규모로 제조하였다.
- 수율은 일관되게 95 ~ 96 %를 유지하였다.
 - 충전과정에서 중요한 문제 (실링불량, 착인불량 등)은 보이지 않았다.
 - 이를 근거로 실생산의 양은 자사에서 제조가능한 60,000 포 규모로의 제조는 가능한 것으로 판단되었다.
 - 생산된 6 번의 제품들에 대한 정량을 실시하여 지표성분의 양을 측정하였으며, 지표성분이 동일한 수준에서 검출되었다.
 - 이를 통해 간접적으로 추출 및 농축공정은 자사에서 확립하였다고 판단할 수 있으며, 제품의 제조 및 공급에도 어려움이 없을 것으로 판단된다.

일자	제조단위	포장수량	포장수율	비고
19.12.16	300 kg, 10g 포장	28,560 포	95.2 %	
19.12.23	300 kg, 10g 포장	28,740 포	95.8 %	
20.01.06	300 kg, 10g 포장	28,530 포	95.1 %	
20.02.03	600 kg, 10g 포장	57,600 포	96.0 %	
20.02.17	600 kg, 10g 포장	57,360 포	95.6 %	
20.03.09	600 kg, 10g 포장	57,300 포	95.5 %	

- 5) 실생산규모로 Scale-up을 실시한 내용을 보고서 형태로 정리하였으며, 이 보고서를 첨부 6으로 한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 농축액에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

- 1) 대두를 가지고 추출하여 농축한 대두농축액을 대상으로 3 로트(ME990101 ~ 3)를 연속으로 제조하고 품질관리를 실시하였다.
 - 안정성 시험은 최종 시험이 완료된 시점을 기준으로 안정성시험계획을 작성하였다.
 - 제조 후 성상, 건조감량, 중금속시험 및 미생물시험은 10 일 이내에 실시하였으며, 정량시험은 시험법 밸리데이션을 위한 표준품 입고의 지연사항 (제조원의 재고 부족, 제조계획의 불확실성 등)이 발생하여 정량시험이 늦게 실시되었다.
 - 다음의 표에 제조에 대한 사항을 요약하였다.

일 자	제조번호	제조단위	농축액량	수율	시험완료일
19.08.12	ME990101	8.7 kg	8.65 kg	22.65 %	19.11.11
19.08.13	ME990102	8.7 kg	8.70 kg	21.52 %	19.11.11
19.08.14	ME990103	8.7 kg	8.70 kg	21.75 %	19.11.11

- 2) 안정성시험은 가속시험과 장기보존시험을 실시하였다.
- 3) 가속시험은 6 개월을 실시하였으며, 시험기간동안 농축액의 성상등의 변화는 나타나지 않았다.
- 4) 미생물의 발육도 보이지 않았다.
- 5) 이로 미루어 볼 때 유통기한은 최소 24 개월은 확보된 것으로 볼 수 있다.
- 6) 장기보존시험은 9 개월까지 진행되었으며, 가속시험과 마찬가지로 경시변화는 일어나지 않았으며, 특히 미생물의 발육도 보이지 않았다.

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

7) 3 로트 중 ME990101 로트의 제조기록서 칭량부분

제조지시 및 기록서(칭량)

PRODUCTION ORDER & BATCH RECORD(WEIGHING)

제조지시번호
0812-1

제 품 명		대두30%에탄올연조엑스						
제조번호	ME990101	제조단위	8.7 kg					
제조일자	2019.08.12	성상 및 제형	암갈색의 연조엑스					
사용기한	2022.08.11	저장방법	기밀용기, 실온보관					
제조지시일	2019.08.09		-					
번호	필요시설	관리번호	담당자	확인자	사용			
1	저울	WE-011	이영진	이영진	<input checked="" type="checkbox"/>			
원료명	규격	코드번호	시험번호	기준량(kg)	칭량지시량(kg)	사용량(kg)	칭량자	확인자
대두	식품공전	RFS01	801908081	40.0	100.0 40.0	40	이영진	이영진
작업 일시		2019년 08월 12일 (08:40) ~ 2019년 08월 12일 (08:55)						
<p>특기사항</p> <p>1. 기준량은 세척, 건조공정을 완료한 건조된 원료의 양이다.</p> <p>지시사항</p> <p>1. 저울은 사용하기 전 영점을 확인한다. 2. 모든 원료는 적합라벨을 확인하고, 원료의 사용기한을 확인한다. 3. 칭량한 원료에는 원료 칭량표를 부착한다. 4. 칭량표는 제조지시서 뒷면에 부착한다.</p>								
								제조부서책임자
								이영진


3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

8) 3 로트 중 ME990101 로트의 시험성적서

원료 시험 성적서

제 품 명	대두30%에탄올연조엑스	제조번호	ME990101		
제조일자	2019 년 08 월 12 일	시험번호	QME990101		
제조단위	8.7 kg	검체채취량	50 g		
검체채취자	송 지 수	공 정 명	농 축		
시험항목	시 험 기 준	시 험 결 과	판정	시험일	시험자
성 상	암갈색의 연조엑스	시험기준에 적합	적합	19.08.13	이선연
확인시험	표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	동일개간	적합	19.11.08	이수원
중금속	총 중금속 : 30 ppm 이하.	비교적보안하지 않다	적합	19.08.16	이선연
건조감량	96.0% 이하.	92.1 %	적합	19.08.17	이소현
미생물 한도시험	대장균군 : 불검출	불검출	적합	19.08.20 ~ 19.08.21	김영화
정량법	다이드진 및 게니스틴의 함 mg/g 이상.	2.2 mg/g	적합	19.11.08	이수원
특이사항					
확 인 자	판 정 결 과	판 정 일 자	판 정 자		
	적합	2019년 11월 1일	이수원		

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

9) 3 로트 중 ME990101 로트의 안정성 시험계획서 (가속시험)

안정성 시험 계획

품 명	대두30%에탄올연조엑스		시 험 구 분	가속안정성		
제 조 번 호	ME990101		보 관 조 건	40±2℃, 75±5%		
제 조 일 자	2019-08-12		유효(사용)기간	-		
검 체 량	70 g (매회 : 10 g)		제 조 단 위	8,700 g		
포 장 형 태	이중비닐로 밀폐		작 성 일 자	2019-11-14		
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목	시험기준		시험방법	비고		
성 상	암갈색의 연조엑스		육안검사	매회 시험		
확인	HPLC	표준액과 동일 유지시간	HPLC법	매회 시험		
순도시험	총중금속	30ppm 이하	중금속 시험법	초회, 최종회 시험		
건조감량	96.0 % 이하		건조감량 시험법	초회, 최종회 시험		
항 량 (1 g 중)	다이드진 및 케니스탄의 합 mg 이상		HPLC법	매회 시험		
미생물 한도	대장균군 : 불검출		미생물 시험법	매회 시험		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2020.02.14	2020.05.14			#		
※ QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검 토	작 성 자		확 인 자		승 인 자	
	김세영		김주희		김주희	

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

- 10) 3 로트 중 ME990101 로트의 안정성 시험계획서 (장기보존시험)

안정성 시험 계획

품 명		대두30%에탄올연조엑스	시 험 구 분	장기보존안정성		
제 조 번 호		ME990101	보 관 조 건	25±2℃, 60±5%		
제 조 일 자		2019-08-12	유효(사용)기간	-		
검 체 량		70 g (매회 : 10 g)	제 조 단 위	8,700 g		
포 장 형 태		이중비닐로 밀폐	작 성 일 자	2019-11-14		
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목		시험기준	시험방법	비고		
성 상		얇갈색의 연조엑스	육안검사	매회 시험		
확인	HPLC	표준액과 동일 유지시간	HPLC법	매회 시험		
순도시험	총중금속	30ppm 이하	중금속 시험법	초회,최종회 시험		
건조감량		96.0 % 이하	건조감량 시험법	초회,최종회 시험		
함 량 (1 g 중)		다이드진 및 계니스탄의 합 mg 이상	HPLC법	매회 시험		
미생물 한도		대장균군 : 불검출	미생물 시험법	매회 시험		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2020.02.14	2020.05.14	2020.08.14	2020.11.14	2021.05.14	2021.11.14	2022.11.14
※ QMNO22 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검 토	작 성 자		확 인 자		승 인 자	
	김세영		김국영		lee	

- 11) 대두농축액에 대한 제조기록서와 시험성적서 및 안정성시험계획서 및 결과표를 첨부 7, 8 및 9로 제출한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 시험제품에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

- 1) 표준화 공정연구가 완료된 대두농축액을 대상으로 임상시험용 시험제품 1 로트(1111)를 제조하고 품질관리를 실시하였다.
 - 안정성 시험은 최종 시험이 완료된 시점을 기준으로 안정성시험계획을 작성하였다.
 - 제조 후 성상, 건조감량, 중금속시험, 정량시험 및 미생물시험의 시험항목을 설정하고 그 시험방법을 작성하고 시험을 실시하였으며 모든항목에 적합한 결과를 나타내었다.
 - 다음의 표에 제조에 대한 사항을 요약하였다.

일 자	제조번호	제조단위	생산량	수율	시험완료일
19.10.28	1111	6,000 포	5,700 포	89.5 %	19.11.26

- 2) 안정성시험은 가속시험과 장기보존시험을 실시하였다.
- 3) 가속시험은 6 개월을 실시하였으며, 시험기간동안 제품의 성상등의 변화는 나타나지 않았다.
- 4) 미생물의 발육도 보이지 않았다.
- 5) 이로 미루어 볼 때 유통기한은 최소 24 개월은 확보된 것으로 볼 수 있다.
- 6) 장기보존시험은 9 개월까지 진행되었으며, 가속시험과 마찬가지로 경시변화는 일어나지 않았으며, 특히 미생물의 발육도 보이지 않았다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 시험제품에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

7) 임상시험용 시험제품 1 로트(1111)의 제조기록서 칭량부분

제조지시 및 기록서
PRODUCTION ORDER & BATCH RECORD

제품명	제조번호		성상 및 제형	제조단위							
경방대두연조엑스	1111		갈색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포	6,000 포(1회)							
공점	원료칭량										
작업 시작 : 2019.10.28 (09:20)											
원료명	규격	코드번호	시험번호	허가량 (포)	기준량 (Lot)		사용량		칭량자	확인자	비고
				mg	kg	g	kg	g			
1 대두30%에탄올 연조엑스	별규	RFS01	QME 990101 ~ 3	4,330	26	000	26	000	Ym	이준재	
2 고과당55	별규	REF01	QB 190103	1,500	9	000	9	000	Ym	이준재	
3 백아물엿	별규	RES08	QB 190204	800	4	800	4	800	Ym	이준재	
4 카르복시메틸 셀룰로오스나트륨	KP	REC04	QB 190101	100	-	600	-	600	Ym	이준재	
5 정제수	KP	REW01	QW 191028	적량	적량	-	-	-	Ym	이준재	
합 계				10g	60	000	-	-	-	-	-
작업 종료 : 2019.10.28 (09:20)											
<p>특기사항</p> <p>연조엑스는 손실량을 고려하여 10g 단위에서 올림 하여 100g 단위 까지 사용량을 표기하고, 칭량 허용범위는 기준량의 ±1% 이내로 한다.</p>											

※ 임상시험용 제품의 생산을 위한 제조이므로, 시험에 필요한 수량의 3 배 이상을 제조하였다.

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 시험제품에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

8) 임상시험용 시험제품 1 로트(1111)의 시험성적서

제 품 시 험 성 적 서(완제품)

제 품 명	경방대두연조엑스	제조번호	1111		
제조일자	2019. 10. 28	시험번호	QP-191028-1		
제조단위	6,000 포	검체채취량	100 포		
검체채취자	송 지 수	검체채취장소	포 장 실		
시험항목	시 험 기 준	시 험 결 과	판 정	시험일	시험자
성 상	갈색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포	경방대두엑스가 충전된 알루미늄포	적합	2019.11.04	송지수
확인시험	표준액과 동일 유지시간을 갖는다.	원터화인	적합	2019.11.28 2019.11.26	송지수
순도시험	총 중금속 : 30 ppm 이하.	3.47ppm 중금속이 30ppm 이하입니다.	적합	2019.11.04	송지수
건조검량	81.6 % 이하	88.1 %	적합	2019.11.05	송지수
질량편차	편차 10 % 이하	-2.7 - 2.7 %	적합	2019.11.05	송지수
미생물한도	대장균군 : 불검출	불검출	적합	2019.11.12 ~ 2019.11.13	송지수
함 량	1 포 중 다이드진 및 게니스틴의 함 7.1 mg 이상	8.59 mg	적합	2019.11.25 ~ 2019.11.26	송지수
기밀도	누수 없음	누수없음	적합	2019.11.04	송지수
표시시험	적합	적합	적합	2019.11.04	송지수
특기사항					
확 인 자	판 정 결 과	판 정 일 자	판 정 자		
de	적합	2019년 11월 26일	송지수		

※ 임상시험용 제품의 생산을 위한 제조이므로, 시험에 필요한 수량의 3 배 이상을 제조하였다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 시험제품에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

9) 임상시험용 시험제품 1 로트(1111)의 안정성 시험계획서 (가속시험)

안정성 시험 계획

품 명	경방대두연조엑스		시 험 구 분	가속안정성		
제 조 번 호	1111		보 관 조 건	40±2℃, 75±5%		
제 조 일 자	2019-10-28		유효(사용)기간	-		
검 체 량	700g (매회 : 100g)		제 조 단 위	6,000 포		
포 장 형 태	알루미늄포		작 성 일 자	2019-11-27		
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목	시험기준		시험방법	비고		
성 상	갈색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포		육안검사	매회 시험		
확인	HPLC	표준역과 동일 유지시간	HPLC법	매회 시험		
순도시험	총중금속	30ppm 이하	중금속 시험법	초회, 최종회 시험		
건조감량	81.6 % 이하		건조감량 시험법	초회, 최종회 시험		
함 량 (1 포 중)	다이드진 및 게니스틴의 함 7.7 mg 이상		HPLC법	매회 시험		
미생물 한도	대장균군 : 불검출		미생물 시험법	매회 시험		
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2020.02.26	2020.05.26					
* QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검 토	작 성 자		확 인 자		승 인 자	
	강 세영				양 승용	

3차 년도 실적

세부연구목표 : 유통기한 설정을 위한 시험제품에 대한 가속시험 실시, 장기보존안정성 시험

연구 수행내용 :

- 10) 임상시험용 시험제품 1 로트(1111)의 안정성 시험계획서 (장기보존시험)

안정성 시험 계획

품 명	경방대두연조엑스			시 험 구 분	장기보존안정성	
제 조 번 호	1111			보 관 조 건	25±2℃, 60±5%	
제 조 일 자	2019-10-28			유효(사용)기간	-	
검 체 량	700 g (매회 : 100 g)			제 조 단 위	6,000 포	
포 장 형 태	알루미늄포			작 성 일 자	2019-11-27	
시험(항목)방법 및 기준<자사기준에 의함>						
시험항목	시험기준			시험방법	비고	
성 상	갈색의 연조엑스가 충전된 알루미늄포			육안검사	매회 시험	
확인	HPLC	표준역과 동일 유지시간		HPLC법	매회 시험	
순도시험	중금속속	30ppm 이하		중금속 시험법	초회,최종회 시험	
건조감량	81.6 % 이하			건조감량 시험법	초회,최종회 시험	
함 량 (1 포 중)	다이드진 및 게니스타의 합 7.7 mg 이상			HPLC법	매회 시험	
미생물 한도	대장균군 : 불검출			미생물 시험법	매회 시험	
시험간격 및 시험예정일자(예정일 ± 14일)						
3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월
2020.02.26	2020.05.26	2020.08.26	2020.11.26	2021.05.26	2021.11.26	2022.11.26
※ QMN022 안정성시험 관리규정에 따라 경시 변화에 영향 없는 시험항목은 시험을 일부 생략한다.						
검 토	작 성 자		확 인 자		승 인 자	
	김새영		이승원		양승용	

- 11) 시험제품에 대한 제조기록서와 시험성적서, 대조제품에 대한 제조기록서와 시험성적서 및 안정성시험계획서 및 결과표를 첨부 10, 11 및 12로 제출한다.

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

- 1) 임상시험은 해밀턴씨에스사를 CRO로 하여 진행하였다.
- 2) 임상시험의 수행은 경희대학교와 세명대학교에서 실시하였다.
- 3) 임상시험의 업무위탁계약서의 계약내용은 다음과 같다.

경방신약(주) 임상시험 업무위탁계약서

인천광역시 남동구 남동대로 394 번지에 주소를 두고 있는 경방신약(주)(이하 "갑"이라고 한다)와 경기도 성남시 분당구 판교역로 221 투썸월드빌딩 1 층 112 호에 주소를 두고 있는 (주)해밀턴씨에스(이하 "을"이라고 한다)는 "주)경방신약 건강기능식품 원료의 수면질 개선에 대한 단일기관, 무작위배정, 위약대조, 인체적용시험"(이하 "계약품목"이라고 한다)의 관련 업무를 위탁의뢰 및 수탁대행에 대하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1 조 (목적)

"갑"은 "을"에게 "계약품목"의 관련 업무를 위탁하고, 그 대가로 비용을 지급하며, "을"은 "계약품목"의 관련 업무를 수탁 받아 수행 한다. 본 계약은 이에 대한 쌍방간의 조건을 명시하기 위한 것이다.

제 2 조 (기간)

본 계약의 기간은 계약체결일로부터 "갑"이 위탁한 모든 업무가 완료될 때까지로 함을 원칙으로 한다. 업무가 완료될 때까지 소요될 것으로 예상되는 기간은 약 12개월 이다.

제 3 조 (위탁 업무의 범위)

- ① "갑" 이 "을"에게 위탁하는 업무의 범위는 아래와 같다.
- ② "갑" 과 "을"은 계약기간 중 별도 협의로 모든 항목의 위탁 업무 범위를 조정 할 수 있다.
- ③ 본 계약의 업무는 아래와 같다. (Pass Through Fee포함)
 - 가. Project Management
 - 나. site Monitoring
 - 다. Data Entry in DM
 - 라. Clinical Coding & Review in DM
 - 마. Data QC in DM
 - 바. CSR Writing

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과는 다음과 같다.

- 시험제품의 효능은 인정됨.
- 다만, 대조제품에서도 동일한 효능이 인정되어 시험제품이 대조제품에 비해 월등하다는 결론은 얻지 못함.

Confidential

Clinical Study Report
(Ver0.1, 2020.08.12)

인체적용 시험 보고서

대두추출물의 수면의질 개선 기능성을 평가하기 위한 다기관,
무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

인체적용 시험책임자	경희대학교 한방병원 이범준 교수 세명대학교 제천한방병원 김형준 교수
인체적용 시험의뢰자	㈜경방신약
인체적용 시험용 건강기능식품	• 시험물질 : KB5-01, 4.33g/day (포) • 대조물질 : Placebo, 0g/day (포)
CSR Version	1.0
Protocol No.	KB-INSOM-01
단계	인체적용 시험
인체적용 시험 시작일	2020.03.10
인체적용 시험 종료일	2020.07.23
인체적용 시험 보고서 제출일	2020.08.14

기밀문서

인체적용 시험결과보고서에 포함된 정보는 ㈜경방신약의 독점자산이며 시험기관장, 인체적용 시험 책임자, 인체적용 시험 담당자, 관리약사, 관련 행정기관, 인체적용 시험기관의 인체적용 시험심사위원회(IRB)를 위한 것입니다. 본 결과보고서는 인체적용 시험을 실시 또는 평가하기 위한 목적으로만 사용할 수 있으며, 이외의 목적으로 사용하고자 하는 경우에는 ㈜경방신약의 서면동의가 필요하며, 문서의 기밀사항은 유지되어야 한다.

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential

Clinical Study Report
(Ver0.1, 2020.08.12)

1. 요약 (Synopsis)

인체적용 시험 의뢰자명: 경방방신약	보고서 Volume : Total 61 pages
제품명: KB5-01	
주성분명: 대두에탄올연조엑스	
인체적용 시험 제목: 대두추출물의 수면의질 개선 기능성 평가를 하기위한 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험 (A multi-center, randomized, double blind, clinical trial to evaluate the efficacy and safety of KB5-01 in insomnia patient)	
인체적용 시험조정자: 경희대학교 한방병원 이범준 교수	
인체적용 시험기간: 2019.03.10 ~ 2020.07.23	인체적용 시험
인체적용 시험의 목적: 본 시험은 수면의 상태가 좋지 못한 대상자를 대상으로 경방신약 대두추출물 또는 위약을 투여 후 4 주 시점의 수면 패턴을 평가하여 경 방 신 약 대 두 추 출 물 투 여 군 이 위 약 투 여 군 에 비 해 수 면 의 질 개 선 에 우 위 함 을 입증 하기 위 함 이 다.	
인체적용 시험 디자인: 다기관, 무작위배정, 이중눈가림, 병행군, 위약대조 시험	
대상자 수(계획된 수 및 분석에 포함된 수): 스크리닝 대상자수: 48명 ○ 계획된 대상자 수 - 무작위 배정 대상자 수: 40명 - 유효성 분석 대상자 수: 46명 ○ 분석에 포함된 수 - 무작위 배정번호 배정 대상자 수: 47명 - Safety 분석 대상자 수: 47명 - FA5 분석 대상자 수: 47명 - PPS 분석 대상자 수: 46명	
인체적용 시험대상: 수면장애	
선정·제외기준: 선정기준 1) 만 19세 이상의 성인남여 2) Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI, 피츠버그 수면의 질 설문평가) 총점 5점 이상인 자	

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential		Clinical Study Report (Ver0.1, 2020.08.12)
인체적용 시험 의뢰자명: ㈜경방신약	보고서 Volume : Total 61 pages	
제품명: KB5-01		
주성분명: 대두에탄올추출액		
3) 본 인체적용시험 참여에 자발적으로 동의하고 동의서에 서명한 환자		
제외기준		
1) 대두추출물을 비롯한 건강기능식품과 의약품등 복용시 과민반응 및 알레르기등 이상반응을 경험한 자 2) 하지불안증후군, 하지운동장애에 의한 수면장애로 인한 불면증으로 치료받고 있는 자 3) 베를린(Berlin) 설문지 검사상 고위험군으로 나타난 수면무호흡증을 지닌 자 * 고위험군: 세 가지 카테고리 중 두 가지 이상에서 양성인 경우 4) 중증도의 폐질환, 신경근육질환, 심부전을 지닌 자 5) 고대근무를 하거나 수면일정이 일정하지 않은 자 6) 지난 4주 이내에 시차가 있는 곳에 3회 이상 여행한자 7) BMI 32 이상 또는 18 이하 8) 인지기능장애자 9) 지난 4주 내, 수면유도제, 수면제와 같은 수면 관련 약물 복용자, 또는 수면장애 질환으로 인한 약물 복용이 필요한 자 10) 1일 3회 이상 혹은 1주일 내 6회 이상의 음주와 하루 3회 이상 카페인 음료이용자 11) 수면에 영향을 미칠 수 있는 의학적 혹은 정신적인 상태인 자 12) 5년내 암성종양 과거력이 있는 자 13) 약물 또는 알코올 중독자 14) 첫 번째 방문일 기준 1개월 이내 다른 인체적용시험에 참여한 자 15) 연구자에 의해 인체적용시험에 참여하기에 부적합한 것으로 판단된 자 16) 갱년기 증후군에 의해 불면 증상이 있는 여성 환자 17) 일부 또는 수유부		
투여경로, 방법 및 기간: 경구투여, 1 일 1 회, 1 회 1 포 저녁식사 후 복용한다. 4주 동안 복용한다.		
통계분석방법: 시험 물질 투여 후, 각 투여군에서의 수면의 질 개선 효과를 대조군과 비교 검증하는 방법으로, 투여 후에 수면시간의 변화에 대한 유효성 평가변수 변화를 비교하여 두 군 사이에 차이가 있는지 t-test 또는 Fisher's exact test 를 이용하여 검증한다.		

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential		Clinical Study Report (Ver0.1, 2020.06.12)
인체적용 시험 의뢰자명: ㈜경방신약	보고서 Volume : Total 61 pages	
제품명: KB5-01		
주성분명: 대두에탐올렌조엑스		
<p>대두추출물 투여군에서의 측정 결과 수면시간의 변화의 유효성 평가변수 변화가 통계학적으로 우위하게 되면 플라세보군에 비해 우월하다고 판정한다. 또한, 임상시험 개시 전과 개시 후의 수면의 질 개선 유효성 평가변수 변화수치의 변화가 두 군 사이에 차이가 있는지 검정하기 위하여 Student t-test 또는 비모수 검정법인 Mann-Whitney U test 를 이용한다. 개시시점 대비 종료 시점 시 군내 변화량에 차이가 있는지는 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용한다.</p> <p>본 임상시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 ITT(intention to treat)분석법과 PP(per protocol)분석법의 두 가지 형태로 분석할 것이다. ITT 분석법은 최소한 한 번이라도 시험물질을 투여 받은 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석에 포함한다. 이때 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 임상시험이 종료되기 전에 대상자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시(Last Observation Carried Forward Analysis)하는 방법으로 분석한다. 본 임상시험에서는 ITT 분석을 우선적으로 하고 PP 분석을 별도로 실시하여 ITT 분석 결과와 차이가 있는지 평가할 것이다.</p> <p>요약 및 결론:</p> <p>유효성 결과</p> <p>(1) 주평가변수</p> <p><u>시험물질 복용 전과 4주 시점의 피츠버그 수면의 질 평가 설문 변화</u></p> <p>FAS에서 주평가변수인 피츠버그 수면의 질 평가 설문에서, 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 7.57±2.11에서 5.52±1.38로 -2.04±1.36의 변화를 보였고, 대조군에서는 6.74±1.48에서 5.04±1.85로 -1.70±1.11의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.4099). 다만, 각 군내 변화량에 대해서는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0001, p-value<0.0001).</p> <p>(2) 부평가변수</p> <ul style="list-style-type: none"> ● <u>수면다원검사 수면패턴 Total recording time / index time (수면시간)의 복용 전과 복용 후 4주 시점, 변화량 비교</u> 		

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential

Clinical Study Report
(Ver0.1, 2020.08.12)

인체적용 시험 의뢰자명: ㈜경방신약	보고서 Volume : Total 61 pages
제품명: KBS-01	
주성분명: 대두에탄올연조엑스	
Total recording time (수면시간)	
<p>주평가 변수인 Total recording time(수면시간)의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 405.61±43.04에서 418.87±50.06로 13.26±42.97의 변화를 보였고, 대조군에서는 690.65±59.17에서 384.96±59.33으로 -5.70±61.62의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.2327). 그러나, 4주 시점에서의 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0419).</p>	
Index time (수면시간)	
<p>주평가 변수인 Index time(수면시간)의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 404.44±42.72에서 416.10±49.44로 11.67±42.01의 변화를 보였고, 대조군에서는 389.65±59.08에서 383.06±59.43으로 -6.59±61.74의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.2473). 그러나, 4주 시점에서의 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0463).</p>	
Total recording time / Index time (수면시간)	
<p>주평가 변수인 Total recording time/Index time(수면시간)의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 1.0028±0.0034에서 1.0066±0.0071로 0.0037±0.0066의 변화를 보였고, 대조군에서는 1.0026±0.0048에서 1.0052±0.0078로 0.0026±0.0094의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.7335).</p>	
AH Index (Apnea + Hypopnea; 무호흡-저호흡 지수)	
<p>주평가 변수인 AH index(Apnea+Hypopnea; 무호흡-저호흡 지수)의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 5.76±10.00에서 6.13±11.34로 0.37±3.89의 변화를 보였고, 대조군에서는 3.78±3.31에서 3.31±2.92로 -0.47±3.54의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.2719).</p>	
Oxygen Saturation (산소포화도)	
<p>주평가 변수인 Oxygen Saturation(산소포화도) 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 95.77±1.40에서 95.63±1.36으로 -0.14±0.84의 변화를 보였고, 대조군에서는 95.90±1.02에서 95.76±0.80으로 -0.14±0.91의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.9866).</p>	

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential		Clinical Study Report (Ver0.1, 2020.08.12)
인체적용 시험 의뢰자명: ㈜경방신약	보고서 Volume : Total 61 pages	
제품명: KBS-01		
주성분명: 대두에탄올연조엑스		
<p>● Berlin 설문지를 통한 수면무호흡증 점수의 복용 전과 복용 후 4주 시점, 변화량 비교</p> <p>FA5에서 부평가 변수인 Berlin 설문지를 통한 수면무호흡증 점수의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 1.65±1.03에서 0.87±0.97로 -0.78±0.85의 변화를 보였고, 대조군에서는 1.52±1.16에서 0.83±0.98로 -0.70±0.93의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.7415). 다만, 각 군내 변화량에 대해서는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0002, p-value=0.0034).</p> <p>● 주간졸음 측정표의 복용 전과 복용 후 4주 시점, 변화량 비교</p> <p>부평가 변수인 주간졸음 측정표의 복용 전, 복용 후 4주 및 변화량은 시험군에서 7.22±2.50에서 6.22±2.09로 -1.00±1.60의 변화를 보였고, 대조군에서는 6.22±2.76에서 5.52±1.81로 -0.70±2.24의 변화를 보였으나, 군간에 통계적인 유의한 차이는 나타나지 않았다(p=0.3898). 다만, 시험군의 군내 변화량에 대해서는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0088, p-value=0.2262).</p> <p>안전성 결과</p> <p>인체적용 시험기간 동안 발생한 전체 이상사례는 1건으로, 시험군에서만 4.35%(1/23명, 1건)이고, 대조군에서는 1건의 이상사례도 발생되지 않아, 군간 발현율의 통계적 유의한 차이는 없었다(p-value=1.0000).</p> <p>발현된 이상사례는 중대한 이상사례로 간주되었으며, 군간 발현율의 통계적 유의한 차이는 없었다(p-value=1.0000). 인체적용 시험용 제품과의 관련이 없는 것으로 평가되었다.</p> <p>발현된 이상사례가 1건으로 대부분은 근육-골격계로, 소분류는 인대장애이었으며, 이상사례 정도는 경증, 중대한 이상사례 여부는 "예"이고, 인과관계는 "관련성이 없음"이었고, 관련조치는 "동량 변화 없음"으로 고정 치료는 "발목염좌 치료를 위한 약물 복용 및 침, 전전기자극술, IR, 물리치료"로 조사되었다.</p> <p>결론</p> <p>결과적으로 본 인체적용 시험을 통해 (주)경방신약의 수면의 상태가 좋지 못한 대상자에 대한 시험물질과 위약의 치료적 유효성과 안전성을 평가하고자 시행되었다.</p> <p>KBS-01의 수면의 질 개선에 대한 유효성 측면에서 주평가인 피츠버그 수면의 질 평가 설문에서</p>		

세부연구목표 : 다기관 임상시험 실시 현황

연구 수행내용 :

4) 임상시험의 결과 (계속)

Confidential		Clinical Study Report (Ver0.1, 2020.08.12)
인체적용 시험 의뢰자명: ㈜경방신약	보고서 Volume : Total 61 pages	
제품명: KBS-01		
주성분명: 대두에탄올연조엑스		
<p>통계적으로 유의한 차이는 없었으며, 부평가 중 수면다원검사 중 수면패턴 Total recoding time과 index time의 4주 시점에서 각각 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 안전성에서는 통계적으로 유의할 만한 이상사례는 없었다. 이에 따라 시험물질을 복용함에 따른 안전성에 문제는 나타나지 않았다.</p> <p>그 밖의 안전성 평가항목에서 특별히 인체적용 시험적으로 유의할 만한 결과는 없었다.</p> <p>이에 본 인체적용 시험 결과는 인체적용 시험용 제품인 KBS-01의 수면의 질 개선에 대한 안전성을 평가는 본 인체적용 을 통해 확인되어 유의미하고 추가적인 연구를 위한 자료가 될 것으로 보이며, 유효성은 지속적인 인체적용 시험을 통하여 확인할 수 있을 것으로 판단된다. 이에 따라 시험물질을 부여에 따른 안전성은 문제가 없는 것으로 사료된다.</p>		
보고서 작성일: 2020.08.14		

5) 임상시험결과보고서는 첨부 13으로 제출한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 대두농축액 및 제품의 정량법에 대한 시험법 밸리데이션 자료

연구 수행내용 :

- 1) 농축액과 제품 중의 다이드진과 게니스틴 성분에 대한 시험법은 자사에서 설정하였으며, 설정한 시험법이 타당하다는 것을 증명하기 위해 밸리데이션을 실시하였다.
- 농축액에 대한 시험법 밸리데이션 파라미터는 다음과 같다.

6. 시험항목 및 허용기준

6.1 시험항목 및 허용기준 (HPLC 분석법)

시험항목		허용기준	결과
특이성 (Specificity)		모든 피크간 방해나 간섭 현상이 없음	/
직선성 (Linearity)		R^2 (상관계수) ≥ 0.99	
정확성 (Accuracy)	회수율(%)	80 ~ 120 %	
정밀성 (Precision : Repeatability)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	
실험실내 정밀성 (Precision : Intermediate)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	

- 농축액에 대한 시험법 밸리데이션 파라미터에 대한 측정결과는 다음과 같다.

9. 밸리데이션 결과

9.1 다이드진 성분 밸리데이션 결과표

시험항목		허용기준	결과
특이성 (Specificity)		모든 피크간 방해나 간섭 현상이 없음	확인함.
직선성 (Linearity)		R^2 (상관계수) ≥ 0.99	0.9997
정확성 (Accuracy)	회수율(%)	80 ~ 120 %	102.59
			99.88
			100.73
정밀성 (Precision : Repeatability)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	0.34
실험실내 정밀성 (Precision : Intermediate)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	0.40

9.2 게니스틴 성분 밸리데이션 결과표

시험항목		허용기준	결과
특이성 (Specificity)		모든 피크간 방해나 간섭 현상이 없음	확인함.
직선성 (Linearity)		R^2 (상관계수) ≥ 0.99	0.9998
정확성 (Accuracy)	회수율(%)	80 ~ 120 %	101.71
			100.14
			100.88
정밀성 (Precision : Repeatability)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	0.66
실험실내 정밀성 (Precision : Intermediate)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	0.39

3차 년도 실적

세부연구목표 : 대두농축액 및 제품의 정량법에 대한 시험법 밸리데이션 자료

연구 수행내용 :

- 2) 제품에 대한 시험법 밸리데이션 파라미터는 원료의 기준과 동일하며
 제품에 대한 시험법 밸리데이션 파라미터에 대한 측정결과는 다음과 같다.

9. 밸리데이션 결과

9.1 다이드진 성분 밸리데이션 결과표

시험항목		허용기준	결과
특이성 (Specificity)		모든 피크간 방해나 간섭 현상이 없음	확인함.
직선성 (Linearity)		R^2 (상관계수) ≥ 0.99	0.9997
정확성 (Accuracy)	회수율(%)	80 ~ 120 %	100.88
			102.24
			100.89
정밀성 (Precision : Repeatability)	상대표준편차(%)	3.0% 이하	2.79
			2.81
실험실내 정밀성 (Precision : Intermediate)	상대표준편차(%)	3.0% 이하	1.24
			1.34

9.2 게니스틴 성분 밸리데이션 결과표

시험항목		허용기준	결과
특이성 (Specificity)		모든 피크간 방해나 간섭 현상이 없음	확인함.
직선성 (Linearity)		R^2 (상관계수) ≥ 0.99	0.9996
정확성 (Accuracy)	회수율(%)	80 ~ 120 %	100.67
			102.16
			100.75
정밀성 (Precision : Repeatability)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	2.96
			2.84
실험실내 정밀성 (Precision : Intermediate)	상대표준편차(%)	2.0% 이하	1.23
			1.55

- 3) 농축액과 제품에 대한 밸리데이션은 첨부 14 및 15로 제출한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 기능성원료 개별인증을 위한 시험위탁 및 시험자료

연구 수행내용 :

- 1) 식약처 개별 인증을 위해서는 자사에서 설정한 시험방법에 따라 시험한 자료가 제출된다.
- 2) 이와 더불어 공인기관에서 시험한 자료를 함께 제출하도록 되어 있어 시험을 위탁하여 실시하였다.
- 3) 시험을 위탁한 기관은 한국기능식품연구원에 시험을 위탁하였다.
- 4) 시험을 의뢰한 항목은 다음과 같다.

항 목	시험로트수	비 고
성상	3 로트	
중금속	3 로트	납, 비소, 카드뮴, 수은
대장균군	3 로트	
아플라톡신	3 로트	
정량	3 로트	다이드진 및 게니스틴
잔류농약	1 로트	
열량	1 로트	
탄수화물	1 로트	
조단백질	1 로트	
조지방	1 로트	
수분	1 로트	건조감량법
회분	1 로트	
나트륨	1 로트	

3차 년도 실적

세부연구목표 : 기능성원료 개별인증을 위한 시험위탁 및 시험자료

연구 수행내용 :

5) 시험의 결과는 다음과 같은 결과를 나타내었다.

항 목	시험로트수	기능식품연구원	경방신약
성상	3 로트	회갈색의 액상	좌동
중금속	3 로트	납 0.0096 ppm, 비소 0.008 ppm, 카드뮴 0.0082 ppm, 수은 0.0030 ppm	불검출
대장균군	3 로트	불검출	불검출
아플라톡신	3 로트	불검출	불검출
정량	3 로트	2.2 mg/g	2.1 mg/g
잔류농약	1 로트	불검출	-
열량	1 로트	66.71 Kcal/100g	-
탄수화물	1 로트	13.71 %	-
조단백질	1 로트	2.00 %	-
조지방	1 로트	0.43 %	-
수분	1 로트	81.67 %	80 %
회분	1 로트	2.19 %	-
나트륨	1 로트	58.66 mg/100g	-

6) 위탁시험결과를 첨부 16으로 제출한다.

3차 년도 실적

세부연구목표 : 사업화를 위한 마켓기반마련

연구 수행내용 :

- 1) 초기의 계획은 기능성원료인증을 획득하는 것을 우선 목표로 삼았다.
- 2) 목표를 달성하기 위해 인증에 필요한 자료를 준비하였다.
- 3) 최종단계인 임상시험에서 대조제품과의 비교시 효과가 크지 않다는 결과를 얻고, 식약처 개별인증신청을 할 수가 없었다.
- 4) 이에 건강식품으로의 인증은 가능하지 않다고 판단되며, 일반 식품으로의 제품화를 염두에 두는 것이 타당하다고 판단되었다.
- 5) 자사의 제 2 공장이 운영되고 있고 식품을 제조할 수 있는 인허가를 획득한 상태이며 식품으로의 출시를 고려중에 있다.
- 6) 자사의 영업망은 전국에 있으나 현재는 의약품의 영업에 비중이 크지만 식품분야의 영업력을 증가시킬 수 있다고 판단된다.

2. 연구수행 내용 및 결과

2.2 참여기관 - 이노파마스크린 [1차년도부터 3차년도실적을 하나로 정리]

가. 서론

수면은 수명의 30%를 차지하며 필수적인 생리현상으로 건강유지 및 정신안정에 있어 매우 중요한 요소이다. 한국인의 평균 수면시간은 갈수록 줄어들며, 그에 따라 수면장애 환자 수는 지속해서 늘어가고 있으며, 수면 부족으로 인하여 다양한 위험성이 최대 8배 증가할 수 있다.

국내에서는 감태 및 쌀겨(미강) 추출물이 유일하게 개별인정 원료로 등록되었으며, 이를 이용한 제품과 중국에서 불면증 처방인 suanzaorentang의 주요 원료 산조인을 이용한 제품, 그리고 생체리듬을 조절하는 멜라토닌을 이용하여 수면 개선을 위한 제품이 출시되는 등 활발한 연구가 진행되고 있다. 학의한 고문서 및 민간요법을 통해 알려진 농산물에 대한 수면의 질 개선 효과가 과학적으로 입증되지 못하였다. 따라서 국내 농산물 및 식품 소재의 수면의 질 개선 효과에 대한 연구가 중요한 의미를 가질 것이다.

본 연구에서 수면의 질 개선 효과가 있을 것으로 기대되는 국내 농산물에서 선행연구를 통하여 선정된 대두, 길경, 고삼 3종의 물과 에탄올 추출물에 대하여, 수면과 관련이 깊은 GABA receptor 및 5-HT_{2c} receptor에 대한 결합력을 분석하여 각 수용체에 활성을 가지는 소재를 선정하였다. 또한 선정된 농작물 추출물을 세포에 처리하여 항체칩을 이용하여 세포 내 신호전달 단백질의 발현변화 패턴을 분석하여 추출물의 수면작용 기전을 규명하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 5-HT_{2c} receptor binding assay

5-HT_{2c} receptor binding assay는 human 5-HT_{2c} receptor를 과발현시킨 membrane fraction protein을 사용하였다. 동결 보관되어 있는 human 5-HT_{2c} receptor membrane fraction protein을 녹인 후, 50mM Tris-HCl(pH7.4), 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.01% Triton X-100 버퍼를 이용하여 녹인 후, 100 μ g/ml 농도로 희석하여 준비한다. Protein chip assay 진행을 위하여 IPS-Chip을 이용하여 well-chip을 준비 후, 준비한 human 5-HT_{2c} receptor를 각 well에 1 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 고정시킨다. 0.1% PBST 버퍼로 10분 2회 세척 후, 3% BSA in PBS(pH7.4)를 이용하여 상온에서 1시간 blocking 한다. 그 후, 0.1% PBST버퍼로 10분 2회, 증류수로 1분 1회 세척 후, 질소가스로 말린다. 50mM Tris-HCl(pH7.4), 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 20% glycerol 버퍼를 이용하여 Cy5-Tryptamine (1 μ M), 추출물 (1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32 μ g/ml)를 준비하여 well에 1 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다. 반응시킨 후, 0.1% PBST버퍼로 10분 2회, 증류수로 1분 1회 세척 후, 질소가스로 말리고 형광스캐너로 스캔하여 형광이미지를 얻는다. 형광이미지는 GenePix Pro 6.0 프로그램으로 분석한다.

(2) GABA receptor binding assay

수면 개선 기능성 후보물질을 탐색하기 위하여 대표적인 억제성 신경전달물질인 GABA receptor에 대한 결합력을 측정하였다. Mouse의 뇌를 적출 후, 무게의 10부피의 25mM Tris-HCl (pH 7.5, 4 $^{\circ}$ C 보관) 버퍼를 넣어 균질화하였다. 원심분리기로 800 \times g 10분간 원심분리 후, 상층액(S1)을 새 튜브로 조심히 옮긴다. 상층액(S1)은 9000 \times g에서 20분간 원심분리

후, 상층액(S2)을 새 튜브로 조심히 옮긴다. 새 튜브로 옮긴 상층액(S2)은 100,000×g에서 30분간 원심분리 후, 상층액을 제거하고 펠렛은 25mM Tris-HCl(pH7.5), 1% Triton X-100 버퍼로 재현탁 후, 분주하여 사용하기 전까지 -80°C 보관한다.

Protein chip assay는 IPS-Chip을 이용하여 well-chip을 준비 후, 50µg/ml 농도 GABA receptor를 각 well에 1µl씩 넣고 4°C에서 16시간 고정시킨다. 0.1% PBST 버퍼로 10분 2회, 증류수로 1분 1회 세척 후, 질소가스로 말린다. 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 30% glycerol in PBS(pH 7.4) 버퍼를 이용하여 Cy5-Muscimol(4 µM), 추출물(1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32µg/ml)을 준비하여 각 well에 1µl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. 반응시킨 후, 0.1% PBST버퍼로 10분 2회, 증류수로 1분 1회 세척 후, 질소가스로 말리고 형광스캐너로 스캔하여 형광이미지를 얻는다. 형광이미지는 GenePix Pro 6.0 프로그램으로 분석한다.

(3) Antibody profiling assay

SH-SY5Y 세포에 30% 에탄올 대두 추출물을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 준비한다. SH-SY5Y 세포는 cOmplete™ Lysis-M을 이용하여 세포를 용해하였다. Bradford를 이용하여 단백질을 정량하여 각 세포군의 세포 용해물의 단백질을 200µg씩 새 튜브에 넣었다. 각 튜브에 분주한 Cy5 형광 다이를 5µl씩 넣고, 1M carbonate-bicarbonate 버퍼 용액을 0.1M 농도가 되도록 넣은 뒤, 상온에서 30분간 반응시킨다. 30분 반응시키는 동안 10분에 한 번씩 탭핑하여 혼합하였다. 30분 반응 후, 4°C에서 O/N으로 반응시킨 후, SigmaSpin™ Sequencing Reaction Clean-Up column을 이용하여 결합하지 않은 형광다이를 제거한다. column으로 결합하지 않은 다이를 제거 후, Bradford를 이용하여 단백질 정량을 한다.

정량한 형광다이를 표지한 세포용해물은 반응용액(1% BSA, 0.5% Glycerol, 1×PBS)에 각 군 별로 30µg을 넣고 혼합하여 샘플을 준비한다(처리한 군 Cy5/처리하지 않은 군 Cy3, 처리한군 Cy3/처리하지않은 군 Cy5). 준비한 샘플에 항체칩을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. 세척액(0.1% PBST)로 세척하고 증류수로 가볍게 행군 후, 질소가스로 건조한다. 완벽히 건조된 슬라이드는 genepix 4100a 형광스캐너를 이용하여 형광이미지를 얻고, 이미지는 genepix pro 6.0 프로그램을 이용하여 분석한다.

다. 결 과

(1) 수면 개선 기능성 후보물질의 수면 관련 신경전달물질 수용체의 결합력 탐색

(가) 수면 증진 기능성 소재의 탐색 타겟

수면은 수명의 30%를 차지하며 필수적인 생리현상으로 건강 유지 및 정신안정에 있어 매우 중요한 요소이다. 신경 및 분자생물학적 관점에서 수면은 GABA(γ -aminobutyric acid), 5-HT(serotonin), adenosine, melatonin, dopamine 및 histamine 등 다양한 신경전달물질(neurotransmitter)에 의해 조절되고 있다. 다양한 연구에서 수면에 대한 메커니즘이 알려졌지만, 여전히 명확한 메커니즘이 규명되지 않았다.

본 연구에서는 수면증진 소재의 가능성 평가를 위하여 수면과 관련이 깊은 GABA 및 serotonin (5-HT) 수용체를 타겟으로 설정하였다.

5-HT₂ receptor에는 항우울제 계열의 약물 대부분이 작용하여 세포 내 calcium 증가를 억제함으로써 항우울 및 진정효과를 나타내게 된다. 5-HT₂ receptor에는 2A, 2B, 2C 세 개의 subtype이 존재하고, 2C receptor를 이용하였다. 5-HT_{2C} receptor antagonist는 깊은 수면인 NREM sleep을 증가시키며, 우울증으로 인한 불면증 치료에 효과적인 것으로 알려

져 있다.

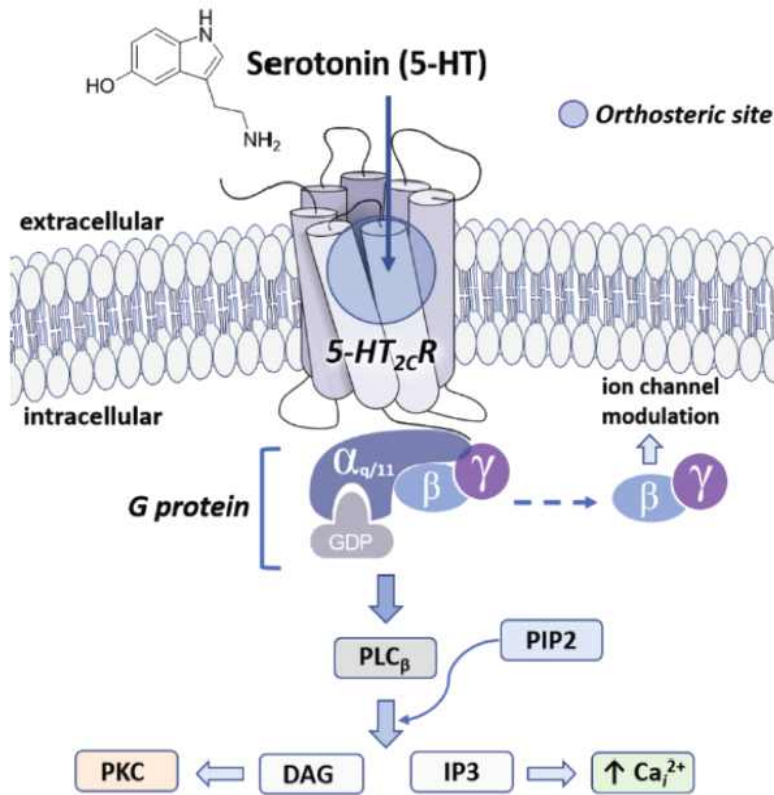


그림1. Mechanism of 5-HT_{2c} receptors.

GABA는 중추신경계의 활성을 억제하는 기능을 가지는 신경전달물질로 interneuron에 주로 존재하고 있다. GABA가 결합하는 GABA 수용체는 수면, 진정과 밀접한 관련이 있는 수용체로, GABA 수용체를 활성화하는 benzodiazepine 계열의 약물은 염소이온을 세포 내 유입을 증가시켜 신경 기능을 억제하여 수면 진정 효과를 나타낸다. 대부분의 수면제는 GABA_A receptor의 α 및 δ subunit의 benzodiazepine 부위에 결합하여 GABA_A receptor의 activity를 높여 이온통로가 열리는 횟수를 증가시켜 신경세포 내로 염소이온이 들어와 신경전달을 억제하는 메커니즘을 이용한다. GABA_A receptor는 뇌 부위 중 cerebral cortex에 가장 많이 분포하고 있으며 이 외에도 cerebellum, hippocampus, striatum에도 존재한다.

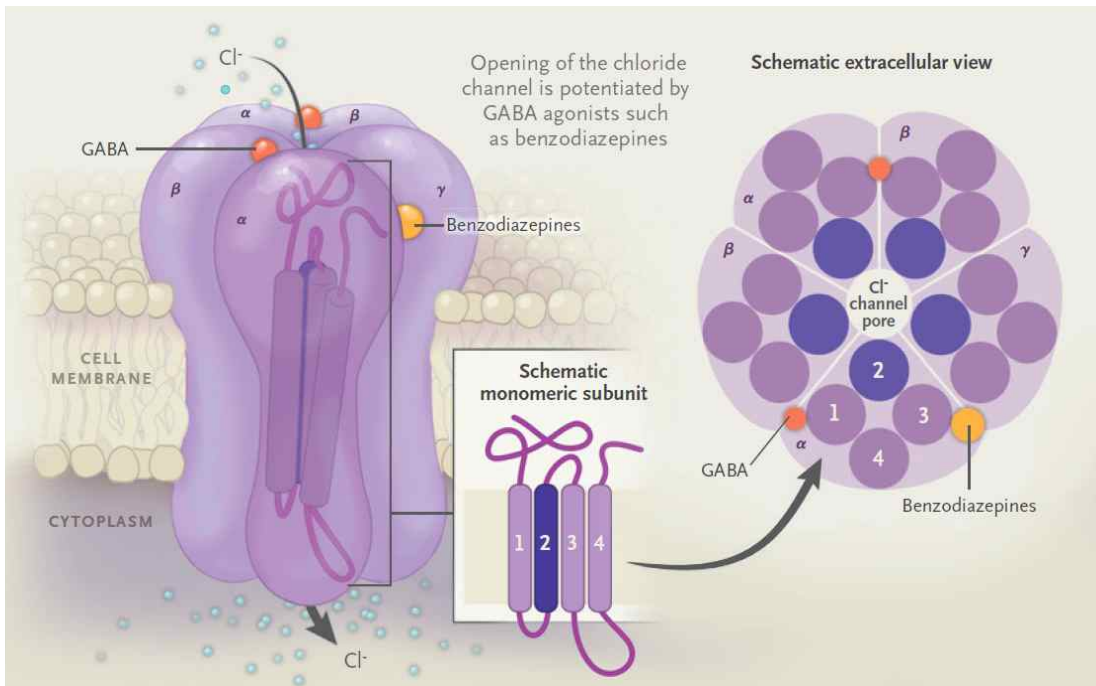


그림2. Mechanism of GABA receptors.

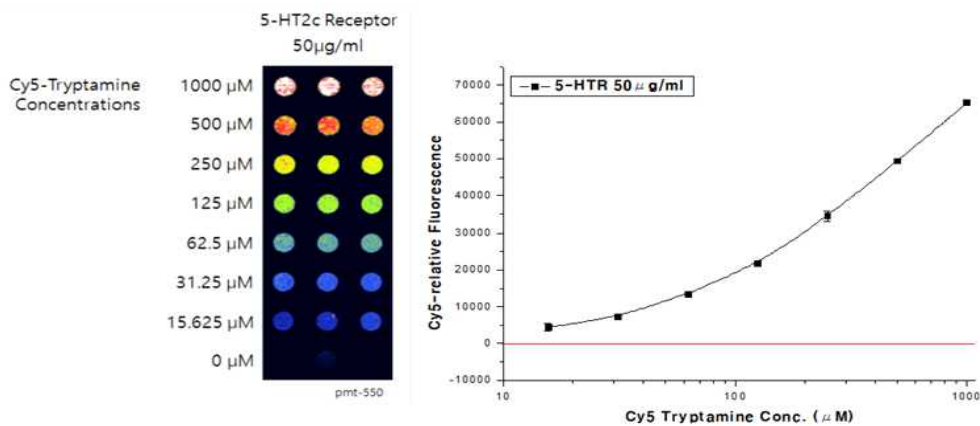
본 연구에서는 국내 농작물을 활용한 기능성 식품소재를 탐색하기 위하여 형광표지를 이용하여 5-HT_{2c} receptor와 GABA receptor binding assay를 수행하였다.

(나) 5-HT_{2c} receptor 결합력 분석

5-HT_{2c} 수용체와 GABA 수용체에 대하여 대두 추출물의 IC₅₀ 값을 비교해 보았을 때, 대두 추출물에서 GABA 수용체보다 5-HT_{2c} 수용체에 더 친화적으로 결합하는 것으로 판단되며, 5-HT_{2c} 수용체를 통하여 수면의 질을 향상시킬 수 있을 것으로 판단됩니다.

① 5-HT_{2c} receptor - Cy5-Tryptamine binding test

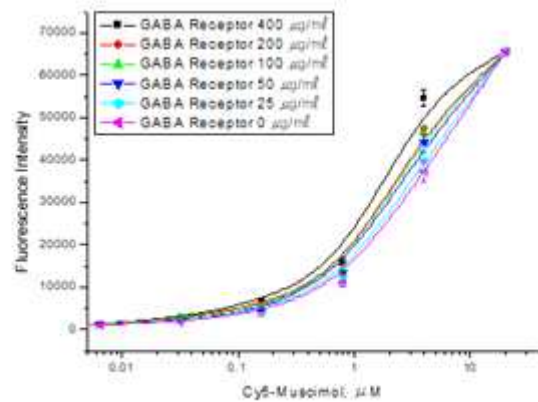
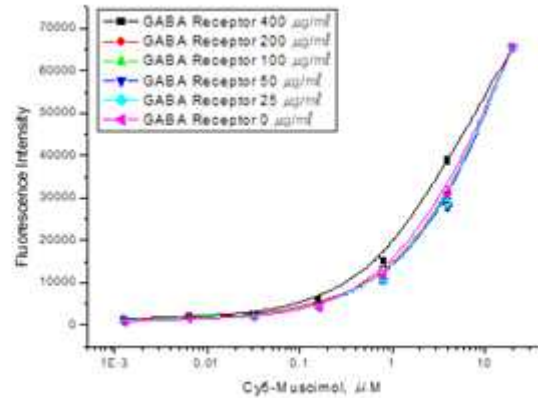
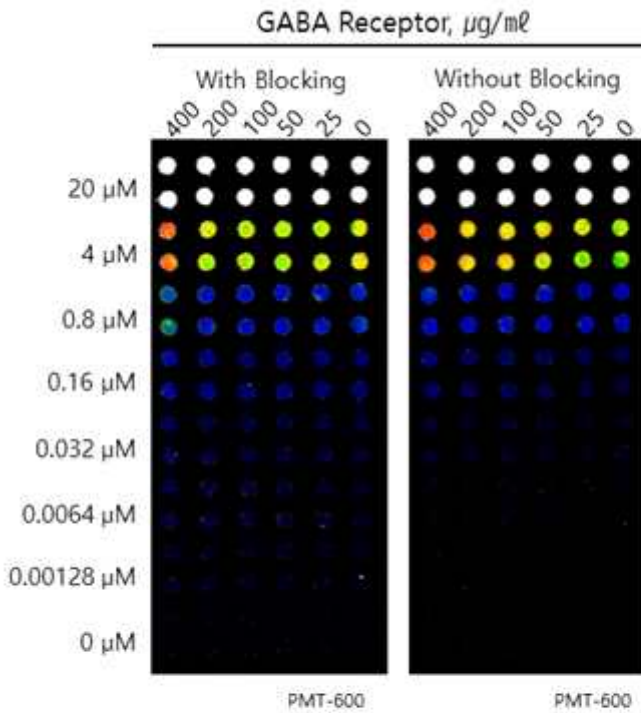
5-HT_{2c} receptor binding assay 실험에 앞서 Cy5-tryptamine의 사용 농도를 구하기 위하여 saturation 실험을 진행하였으며, Cy5-tryptamine의 농도는 500 μM 농도로 선정하였다.



Saturation curve for 5-HT_{2c} receptor binding assay.

② GABA receptor - Cy5-muscimol binding test

GABA receptor binding assay 실험에 앞서, GABA receptor와 Cy5-muscimol의 사용 농도를 구하기 위하여 saturation 실험을 진행하였으며, GABA receptor의 농도는 400 $\mu\text{g/ml}$, Cy5-muscimol의 농도는 4 μM 농도로 선정하였으며, blocking 없는 조건으로 결정하였다.



③ 물 및 에탄올 추출물의 binding assay

㉞ 5-HT_{2c} receptor binding assay

대두, 길경, 고삼 3종의 농작물에 대한 물 및 에탄올 추출물을 대상으로 5-HT_{2c} receptor binding assay를 진행하였다. 실험에 사용된 농도는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 까지 5구간으로 설정하여 Cy5-tryptamine binding inhibition을 분석하였다. 물 추출물에서 고삼 추출물에서 6.24 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 IC₅₀이 확인되었고, 에탄올 추출물에서 대두, 길경, 고삼 추출물에서 14.25 $\mu\text{g/ml}$, 21.47 $\mu\text{g/ml}$, 191.86 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 IC₅₀이 확인되었다.

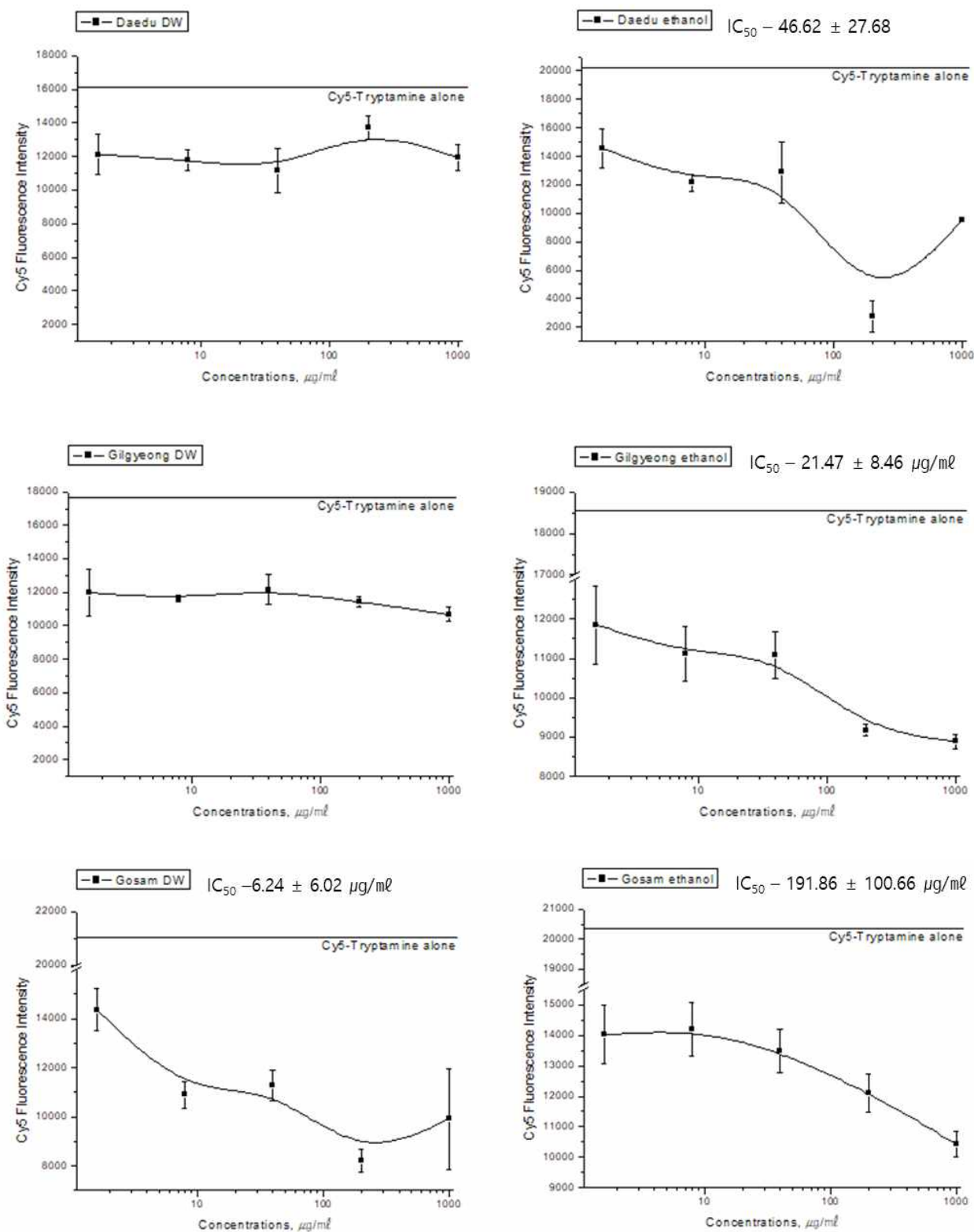


Fig 2. Dose-response curves and IC_{50} values of extract in the 5-HT_{2c} receptor binding assay.

Ⓢ GABA receptor 결합력 분석

대두, 길경, 고삼 3종의 농작물에 대한 물 및 에탄올 추출물을 대상으로 GABA receptor binding assay를 진행하였다. 실험에 사용된 농도는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 까

지 5구간으로 설정하여 Cy5-muscimol binding inhibition을 분석하였다. 에탄올 추출물 중에서, 고삼 추출물에서 172.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 IC₅₀이 확인되었다.

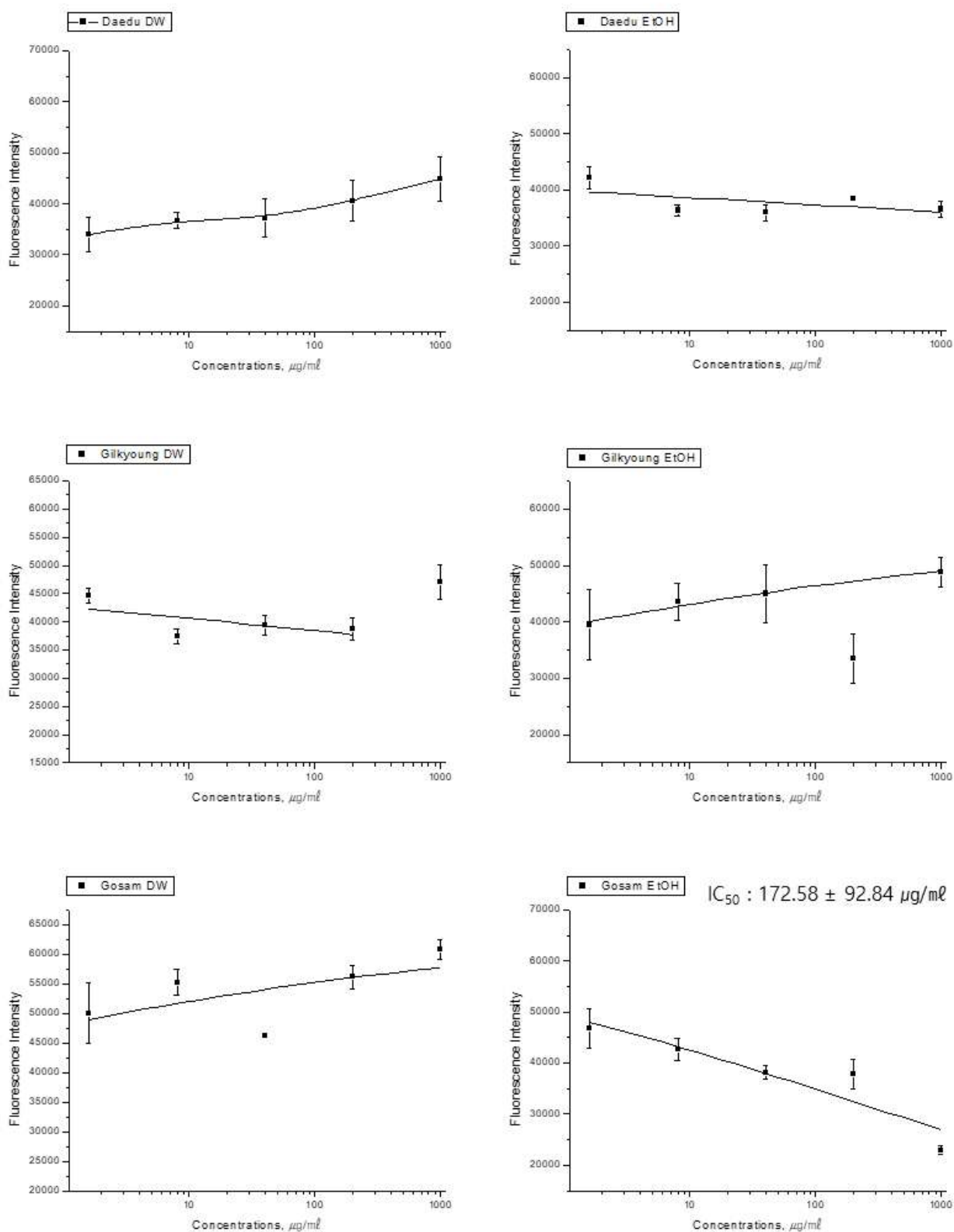
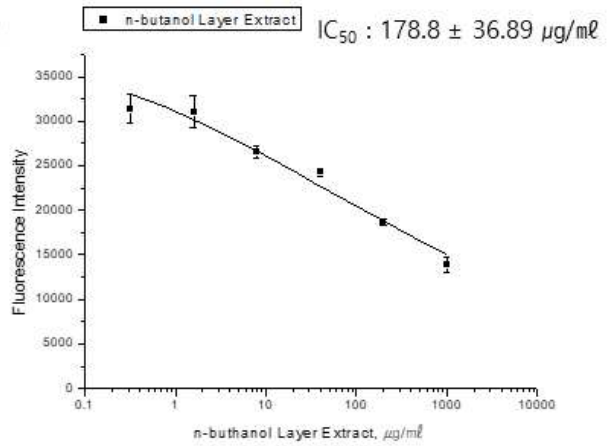
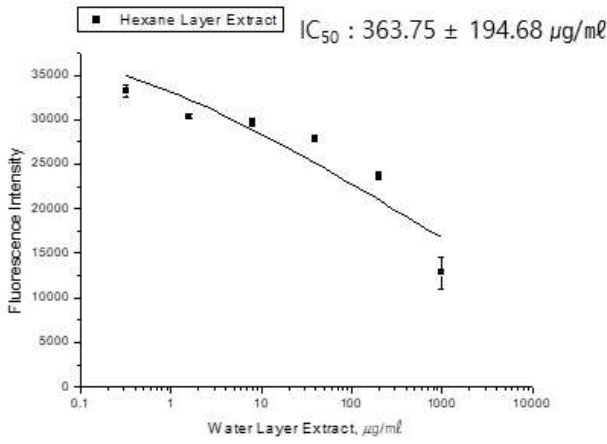


Fig 2. Dose-response curves and IC₅₀ values of extract in the GABA receptor binding assay.

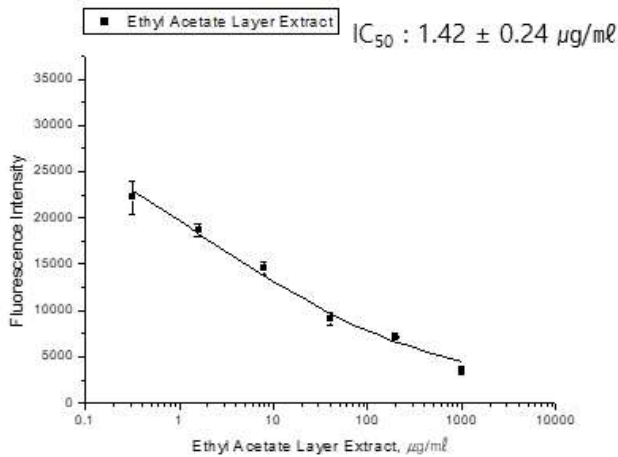
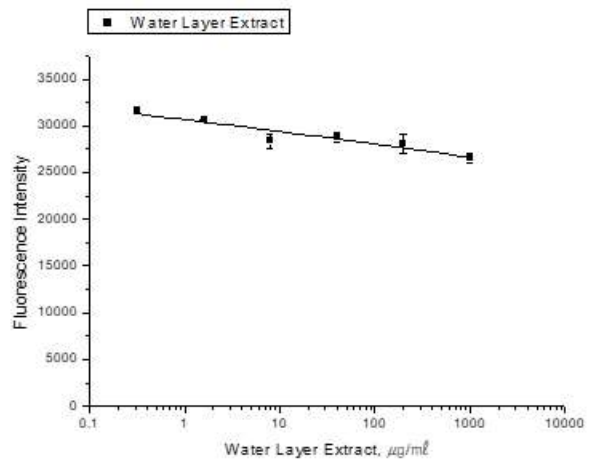
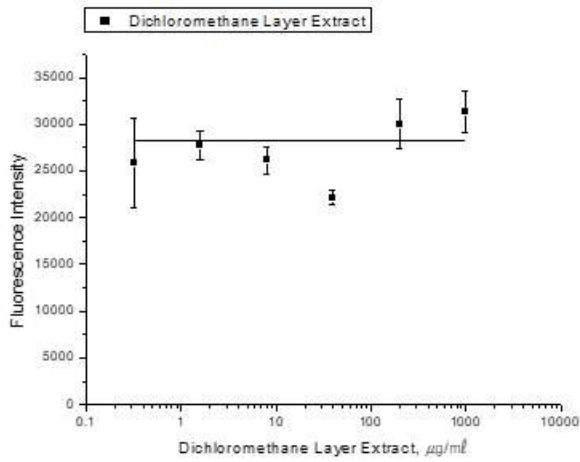
② 대두 에탄올 추출물에 대한 용매별 추출물의 binding assay

㉞ 5-HT_{2c} receptor binding assay

호서대에서 받은 대두 추출물(ethyl acetate, dichloromethane, hexane, n-butanol, water)에 대하여 5-HT_{2c} 수용체에 대하여 기능성 평가를 하였다. ethyl acetate 추출물에서 1.42 µg/ml, hexane 추출물에서 363.75 µg/ml, n-butanol 추출물에서 178.8 µg/ml의 IC₅₀ 값을 확

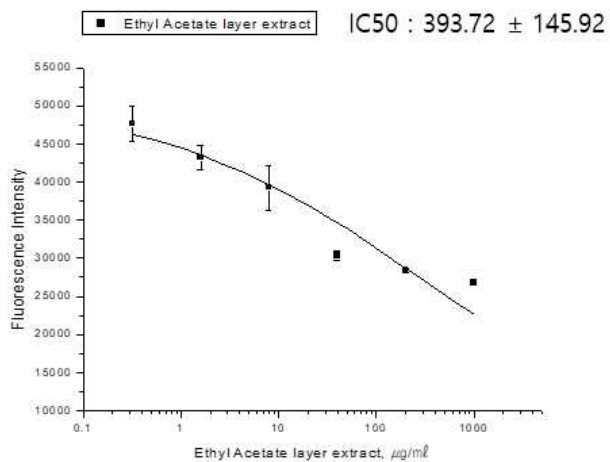
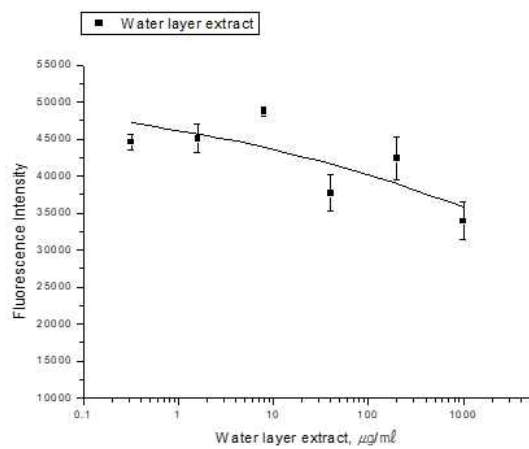
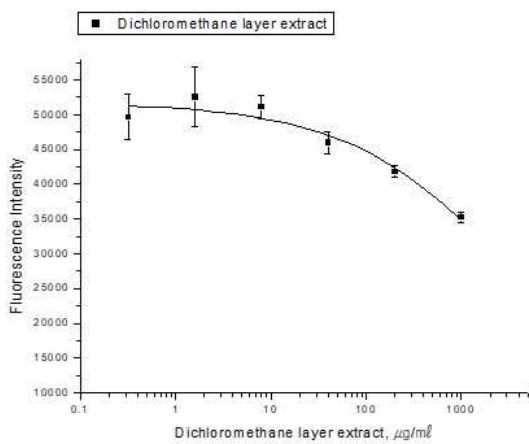
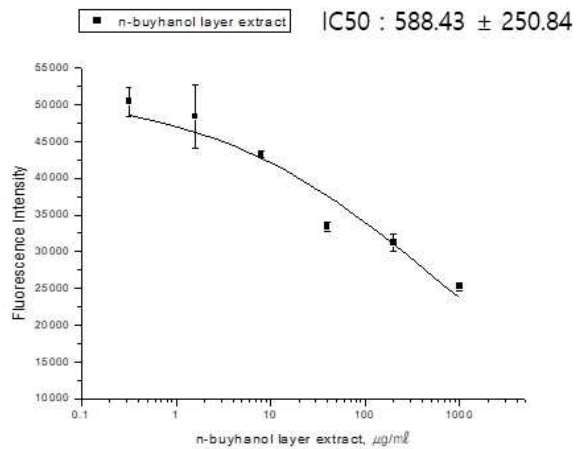
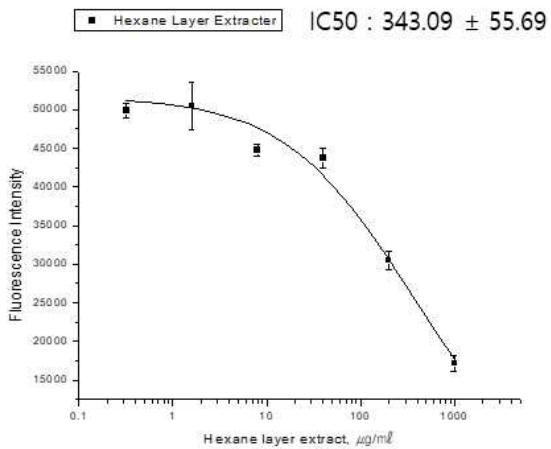


인 하 었 다



⊕ GABA receptor 결합력 분석

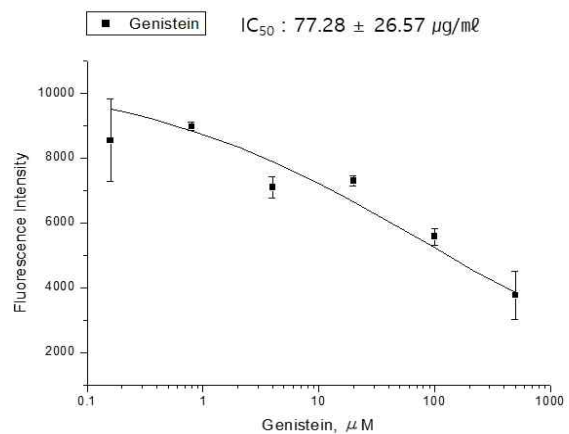
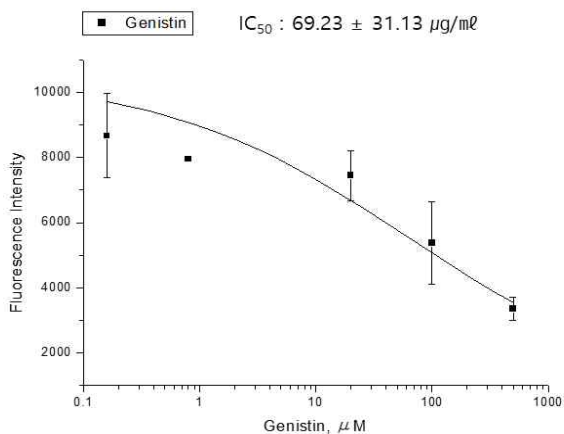
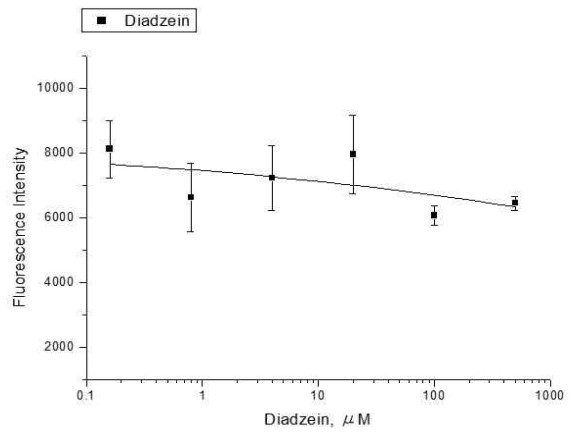
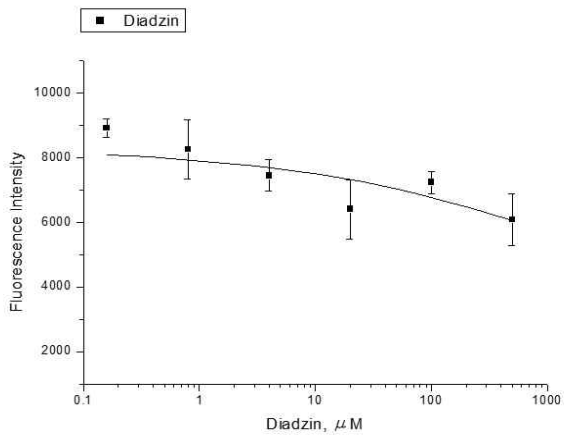
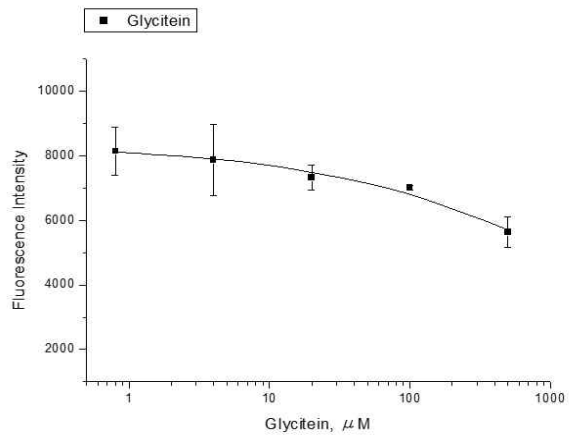
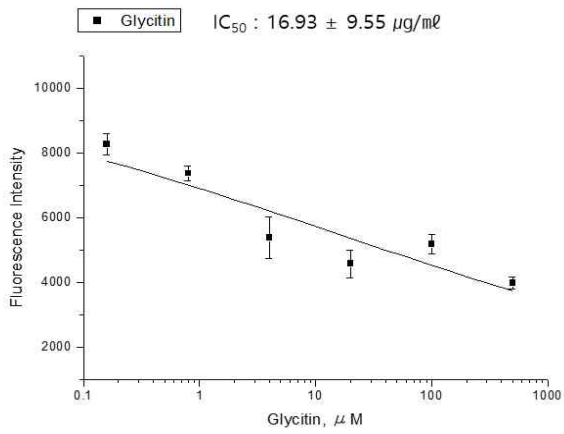
호서대에서 제공 받은 대두 추출물(ethyl acetate, dichloromethane, hexane, n-butanol, water)에 대하여 GABA 수용체에 대하여 기능성 평가를 하였다. ethyl acetate 추출물에서 393.72 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hexane 추출물에서 343.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n-butanol 추출물에서 588.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC_{50} 값을 확인하였다.



④ 대두 유효성분인 isoflavone 6 종의 binding assay

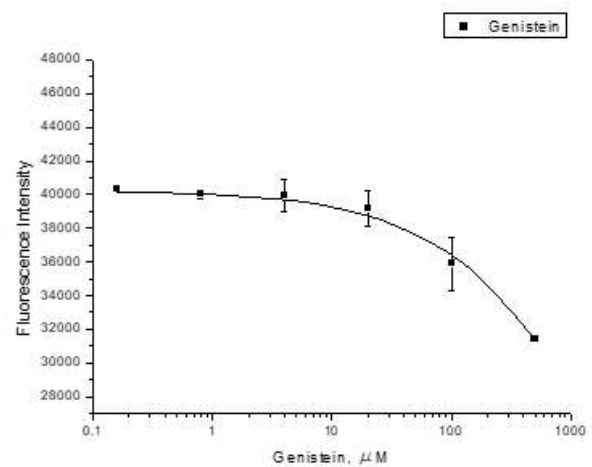
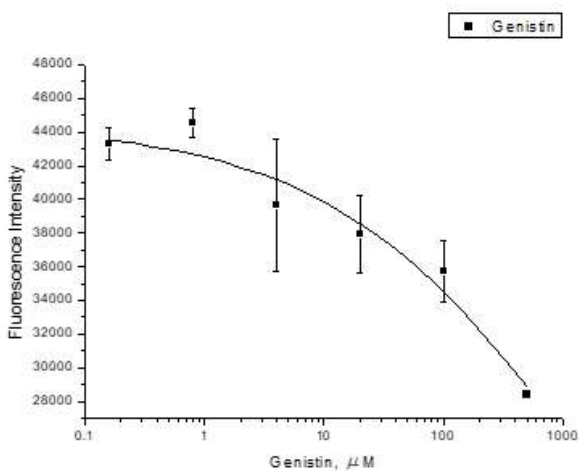
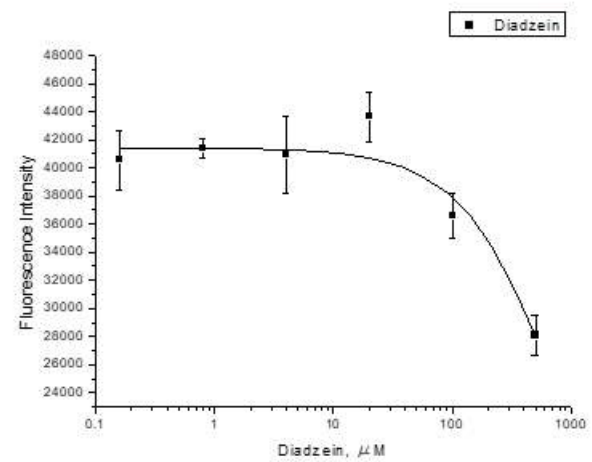
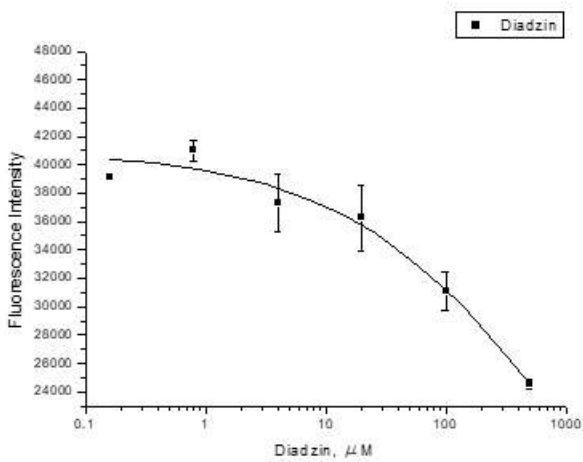
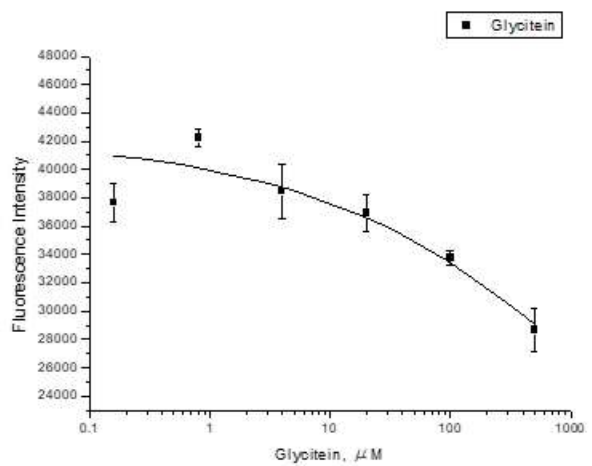
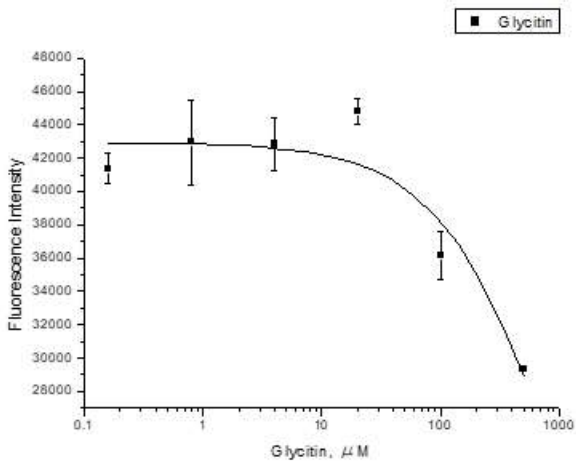
㉞ 5-HT_{2c} receptor binding assay

대두에 존재하는 것으로 알려진 대표적인 Isoflavone 6종(glycitin, glycitein, diadzin, diadzein, genistin, genistein)에 대하여 5-HT_{2c} 수용체에 대하여 기능성 평가를 하였다. glycitin에서 16.93 $\mu\text{g/ml}$, genistin에서 69.23 $\mu\text{g/ml}$, genistein에서 77.28 $\mu\text{g/ml}$ 의 IC₅₀ 값을 확인하였다.



⊕ GABA receptor 결합력 분석

Isolavone 6종(glycitin, glycitein, diadzin, diadzein, genistin, genistein)에 대하여 GABA 수용체에 대하여 기능성 평가를 하였다. Isolavone의 농도가 높아질수록 형광값이 감소하는 경향을 확인할 수 있었으나, 1mg/ml 농도 이하에서는 IC₅₀ 값을 확인할 수 없었다.



(2) 수면 증진 기능성 후보물질의 세포 기반 in vitro 작용기작 연구

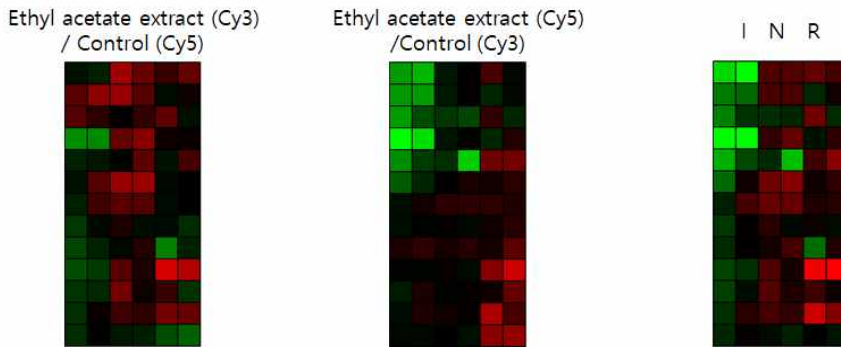
(가) 대두 에틸아세테이트 추출물에 의한 SH-SY5Y 세포에서 단백질 발현 변화

5-HT_{2c} 수용체와 GABA 수용체의 기능성 평가 실험에서 우수한 IC₅₀을 확인한 대두 Ethyl acetate 추출물을 이용하여, 대두 추출물을 24시간 처리한 SH-SY5Y 세포와 처리하지 않은 SH-SY5Y 세포에서 단백질 발현 변화를 항체 칩을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Cyclin A와 인산화된 AKT의 단백질의 변화가 유의미함을 확인했다.

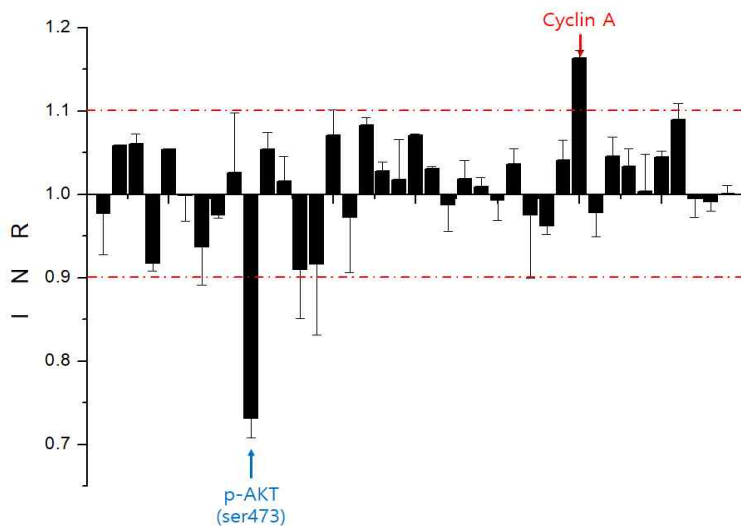
① Antibody Map

p-IKKα/β(Ser176)	p-IκBα	Nibrin
NFκB p52	p-ERK	p130
p35	FAK	Rad52
p-AKT(Ser473)	p-FAK	BID
Bax	p-ERK1/2	PLK
IκB-β	MEK kinase-1	H-Ras
Raf-1	MEK-1	ERK2
XRCC4	PCNA	GADD45y
PARP	p63	Kip2
E2F-1	MKP1	Cyclin A
Bcl-2	BRCA2	CDK1/CDC2
NFκB p65	CDC6	p-STAT1
CREB	p-CREB (Ser133)	B-actin

② Antibody profiling 형광 분석 이미지

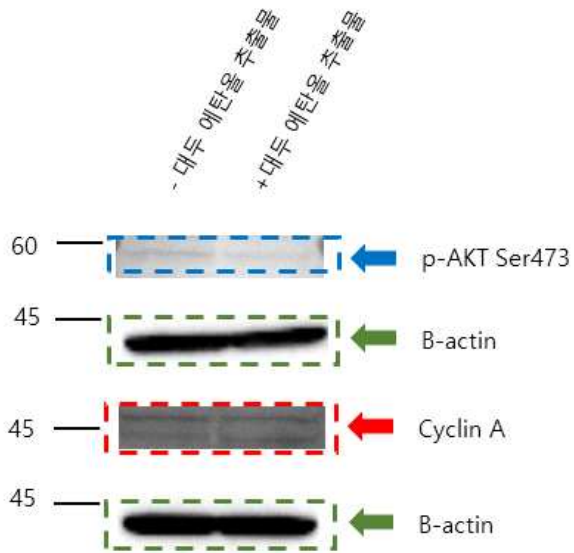


③ Antibody profiling 형광 분석 그래프

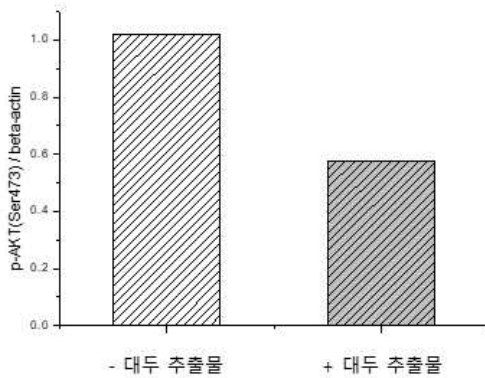


④ Western blot 분석

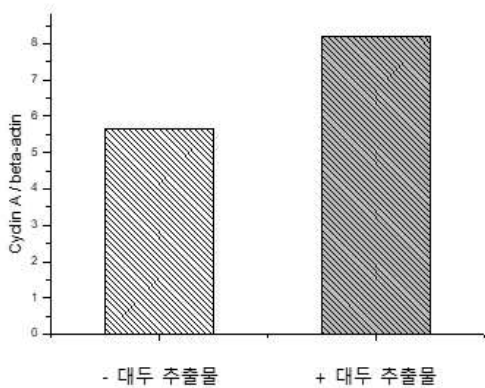
- Western blot 이미지



- p-AKT(Ser473) / beta-actin ratio



- Cyclin A / beta-actin ratio



(나) 대두 30% 에탄올 추출물에 의한 SH-SY5Y 세포에서 단백질 발현 변화

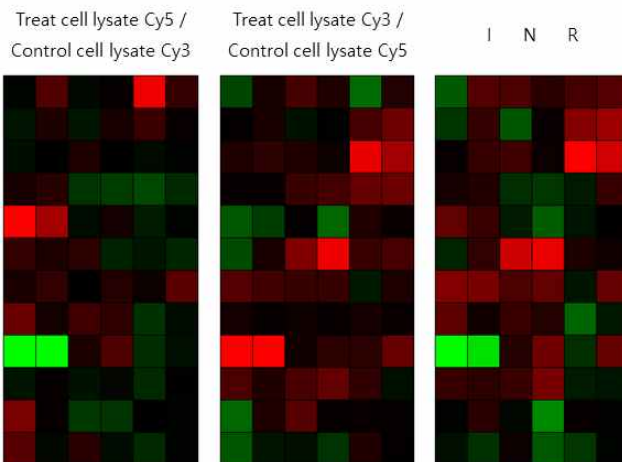
본 과제에서는 5-HT_{2c} 수용체의 기능성 평가 실험에서 우수한 IC₅₀을 확인된 농작물 중에

서 임상 테스트를 진행하는 대두 30% 에탄올 추출물을 이용하여 대두 추출물을 24시간 처리한 SH-SY5Y 세포와 처리하지 않은 SH-SY5Y 세포에서 단백질 발현 변화를 항체 칩을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Cyclin A와 MEK-1 그리고 인산화된 AKT 의 단백질의 변화가 유의미함을 확인했다.

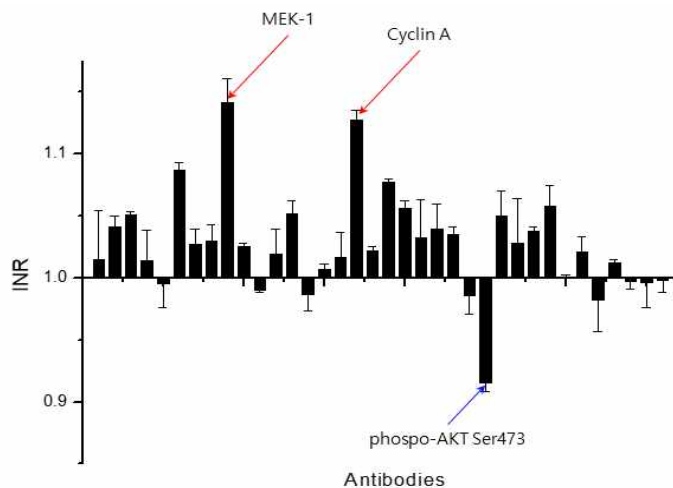
① Antibody Map

p-GRB2 (Y209)	H-Ras	Raf-1
ERK2	p-ERK	CREB
p-CREB (Ser133)	GADD45γ	MEK-1
MEK kinase-1	NFκB p100	NFκB p65
E2F-1	p130	PLK
CDKN2a(p16)	Cyclin A	Cyclin D
Kip2	CDK1/CDC2	p35
CDC6	STAT1	p-STAT1
p-AKT(Ser473)	p-PI3k p85(Y467)	p63
BRCA2	PCNA	Rad52
Nibrin	PARP	Bcl-2
BID	Bax	β-actin

② Antibody profiling 형광 분석 이미지

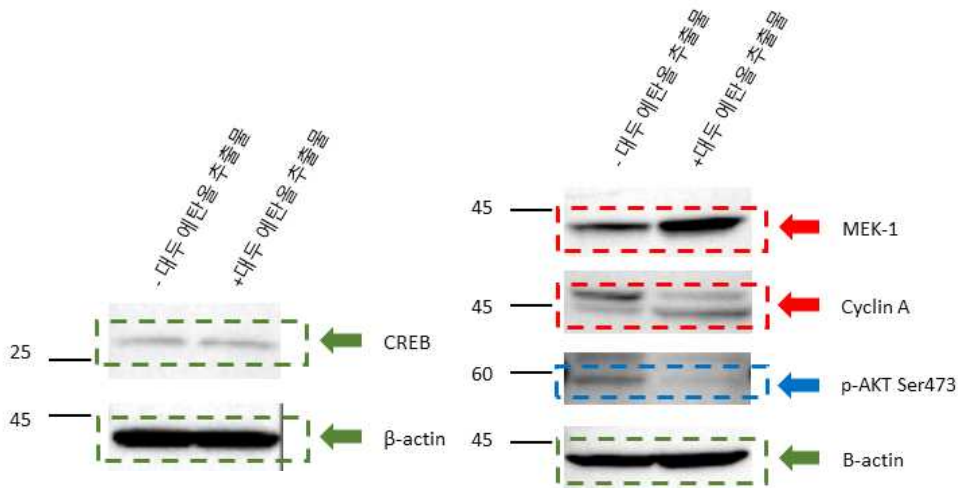


③ Antibody profiling 형광 분석 그래프

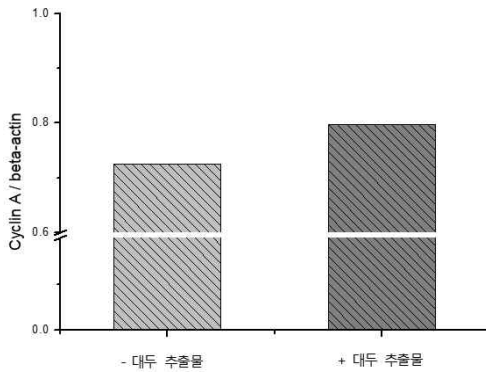


④ Western blot 분석

- Western blot 이미지



- Cyclin A / beta-actin ratio



라. 결론

본 연구에서는 수면 증진에 효과가 있을 것으로 기대되는 대두, 길경, 고삼 3종의 농산물에 대한 5-HT_{2c} 및 GABA receptor binding assay와 in vitro 기전 연구를 수행하였다. 5-HT_{2c} receptor binding assay에서는 대두 에탄올 추출물, 길경 에탄올 추출물, 고삼 물 추출물에서 결합 억제 활성이 우수하였으며, GABA receptor binding assay에서는 고삼 에탄올 추출물에서 높게 나타났다. 이들 소재 중 식품 원료 등재 및 동물모델에서 수면증진 효과 평가하여 대두 에탄올 추출물을 최종 선정하였다.

대두 에탄올 추출물에 대하여 5종 용매별(ethyl acetate, dichloromethane, hexane, n-butanol, water) 추출물에 대하여 5-HT_{2c} 및 GABA receptor binding assay를 진행하였다.

5-HT_{2c} 및 GABA receptor binding assay에서는 ethyl acetate, n-butanol, hexane 추출물에서 억제활성이 나타났다. 또한 유효성분인 isoflavone 6종(glycitin, glycitein, diadzin, diadzein, genistin, genistein)에 대하여 5-HT_{2c} 및 GABA receptor binding assay를 진행하였으며, 5-HT_{2c} receptor에 대해서 glycitin, genistin, genistein의 isoflavone이 억제활성이 있는 것이 나타났다.

대두 에탄올 추출물은 glycitin, genistin, genistein의 isoflavone에 의하여 5-HT_{2c} 및 GABA

receptor에서 결합 억제 활성이 나타나는 것으로 판단되며, 이는 호서대학교 2년차 연구에서 대두 에탄올 추출물의 isoflavone 함량을 확인한 결과가 뒷받침해 주고 있다.

in vitro 기전연구에서 5-HT_{2c} 수용체와 GABA 수용체의 기능성 평가 실험에서 우수한 우수한 억제 효능을 확인한 Ethyl acetate과 에탄올 대두 추출물을 이용하여, 대두 추출물을 24 시간 처리한 SH-SY5Y 세포와 처리하지 않은 SH-SY5Y 세포에서 단백질 발현 변화를 항체 칩을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Cyclin A와 MEK-1 그리고 인산화된 AKT 의 단백질의 변화가 유의미함을 확인했다.

뉴런에서 Cyclin A를 감소시키는 것은 수면 전이를 지연시키고, 수면으로부터 각성을 유발 하며, 수면 박탈에 대한 항상성 반응을 감소시키는 결과가 보고되었다(1). 또한, Tara에 의해서 Cyclin A의 감소가 확인되었으며, Cyclin A 전사체에는 영향을 주지 않는 tara가 비전사메카니즘을 통하여 Cyclin A의 존재비에 영향을 미친다는 것을 확인한 연구에서, Cyclin A는 상황에 따라 CDK1의 활성을 억제하거나 자극할 수 있다. CDK1 과발현 또는 활성을 억제할 수 없는 실험에서 CDK1이 수면을 감소시키는 것을 보여주고 있다. 이 결과 Cyclin A는 수면 주기의 핵심조절자이며, CDK1의 활동을 억제한다. CDK1 활성은 각성을 촉진하는 반면, Tara는 CDK1 활성을 억제하는 Cyclin A의 풍부도를 증가시켜 수면을 촉진시키는 결과가 보고되었다(2).

또한, 수면에서의 MEK-1의 관련성으로, 먼저 zebrafish를 이용한 수면의 유전적 연구결과에서 EGFR 신호가 정상 수면 수준에 필요하고, 수면 부족에 대한 정상적인 항상성 반응에 필요하다는 결과가 보고되었으며(3), 랫드를 이용한 연구에서 랫드의 수면을 제한할 경우에 Ras, Raf-1, MEK-1/2, ERK1/2, p-ERK1/2의 발현이 감소되는 변화가 확인되었으며, 랫드의 수면 제한 상태에서 hippocampus의 MAPK/ERK 신호전달체계에서의 단백질 발현 변화는 중요한 연관성이 있다는 결과가 보고되었다(4).

AKT 의 인산화와 수면의 관련성으로는, 먼저 랫드에서 수면을 제한할 시에 AKT의 Serine 473 위치에서의 인산화가 억제되는 것으로 보고되고 있으며(5), REM 수면을 방해했다 수면을 회복시켰을 때, 억제된 AKT의 인산화가 증가되는 같은 동종의 동물실험 연구결과도 있어서(6), AKT의 인산화를 수면의 질과 양을 평가하는 유효지표로서의 인과관계는 어느 정도 인정된다고 할 수 있다.

본 과제에서는 대두의 Ethyl acetate 추출물이 수면에 미치는 간접적인 영향을 동물모델이 아닌 신경세포 모델인 SH-SY5Y cell을 이용하여 평가한 것으로, Proteomic assay를 통해 AKT의 인산화가 감소한 것으로 판정되었는데, 이는 앞서 언급한 다른 랫드에서의 동물실험과는 상이한 결과이다. 이런 차이점을 설명하기 위한 것으로는 첫 번째, Proteomic assay에서는 대두 추출물을 세포에 처리시 추출물의 농도변화나 처리 시간등에 따른 AKT의 인산화의 변이를 본 것이 아니라, 정해진 농도(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 시간 (24시간) 에서의 차이를 평가했기 때문에, AKT의 인산화를 랫드를 사용한 동물실험과 단순비교 할 수 없다. 따라서 추가 실험을 통해 대두추출물의 처리 시간과 농도에 따른 AKT 인산화의 변이를 측정하여 평가하여야 한다. 두 번째로는 세포주를 사용한 실험에서는 동물 실험과 다른 결과들도 보고 되고 있어서, 대두추출물에 의한 AKT 인산화의 감소가 수면의 질을 감소시킬것으로 단정지을 수는 없다는 점이다. 예를 들어, 마우스 유래 세포주를 이용한 실험에서 AKT의 인산화가 증가하면 오히려 신경세포의 각성을 유도한다는 결과도 보고 되고 있고(7), 이는 인간 세포주 H295R을 이용한 실험에서도 같은 경향이 확인되고 있다(8).

대두추출물에 의한 AKT의 인산화의 저해가 탐구된 논문들의 사례는 다음과 같다. 대두추출물의 지표물질인 genistein을 사용한 세포주 실험에서 genistein을 처리하면 AKT의 인산화를 억제하는것으로 보고가 되고 있고(9,10), 또 Li 등에 의한 논문에 따르면(11) genistein과 다른 대두추출물 배당체인 daidzein, glycitein 등을 함께 함유하는 isoflavone을 처리한 실험에서도 AKT의 인산화 저해가 보고되었는데, 이는 isoflavone이 세포의 안드로젠 수용체를 비활성화하여, 안드로젠 수용체로 매개되는 AKT/FOXO3a/GSK-3 β 신호전달체계를 저해하는 역할을 하여 결론적으로 세포의 증식을 막고 세포자살(apoptosis) 유도하는 것으로 확인되었다. 이 논문의 결과로 미루어볼 때, 우리의 실험에서 대두추출물로 인한 AKT의 인산화 저해는 수면과 밀접하게 관련되어있는 GABA 나 세로토닌 수용체에 의한 것이 아니라, 대두 추출물의 여러 다른 성분이 안드로젠 수용체와 같은 AKT의 인산화를 매개하는 막단백질에 결합하여 신호전달을 방해한 결과라고 생각하는 것이 타당하다고 본다. 세포의 표면에는 무수히 많은 서로 다른 수용체들이 있고, 이들에 특이적인 리간드의 결합에 따라 수용체의 하위 신호물질들이 활성화 또는 비활성화하는 것으로, 본 실험에 쓰인 대두추출물은 복잡한 유효 성분들을 가진 천연물이며, 여러 가지 수용체에 대해 활성화와 비활성에 걸쳐 광범위한 효과를 나타낼 것으로 추론된다. 따라서 수용체의 하위 신호전달물질인 AKT 인산화의 저해가 어떤 수용체에 의한것인지, 또는 AKT를 타겟으로 하는 여러 수용체들의 복합적인 결과인지 쉽게 결론내릴 수는 없을 것이다.

본 과제에서는 동물실험결과 대두 추출물이 수면의 질을 향상시키는 것으로 관찰되었고, 대두추출물이 수면의 질과 관련한 세로토닌 수용체, 특히 5-HT_{2C} 수용체에 높은 친화력으로 결합하것을 확인한 것으로, 이와 관련된 생체지표물질을 proteomics 기법으로 분석한 결과 Cyclin A와 MEK-1의 증가는 수면과 관련에서 적합한 유의성이 있는 지표라고 할 수 있는 반면, 관찰된 AKT인산화의 저해는 문헌조사에 미루어보면 특별하게 수면의 질에 관련된 생체지표라고 단정지을 수는 없을 것이다.

2.3 협동기관 - 경희대학교

2.3.1 이론적, 실험적 연구 방법 및 내용

가. 실험적 방법을 통한 스트레스 및 수면 장애를 유발하여 타당한 동물모델 확립

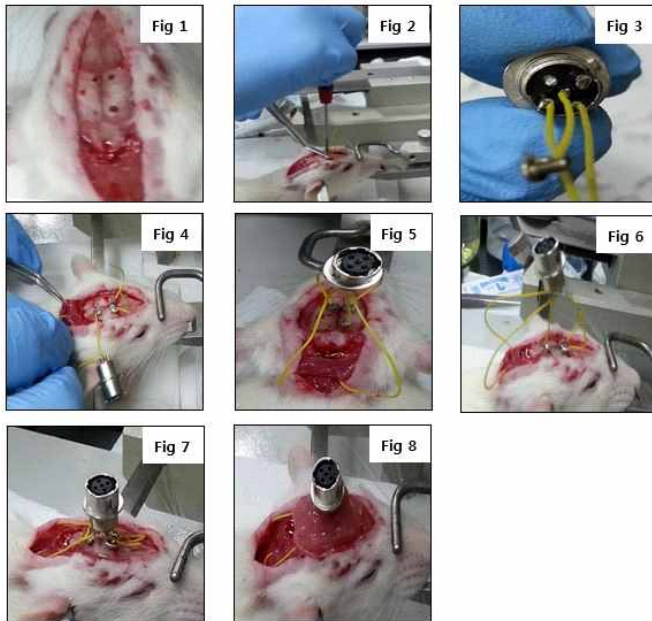
(1) Male쥐에 5일간 하루에 한번 씩 전기 자극을 이용하여 스트레스를 부과

나. 스트레스 유발 수면장애 동물 모델에서의 행동학적 변화에 관한 연구.

(1) EEG를 이용한 뇌파 분석 및 측정.

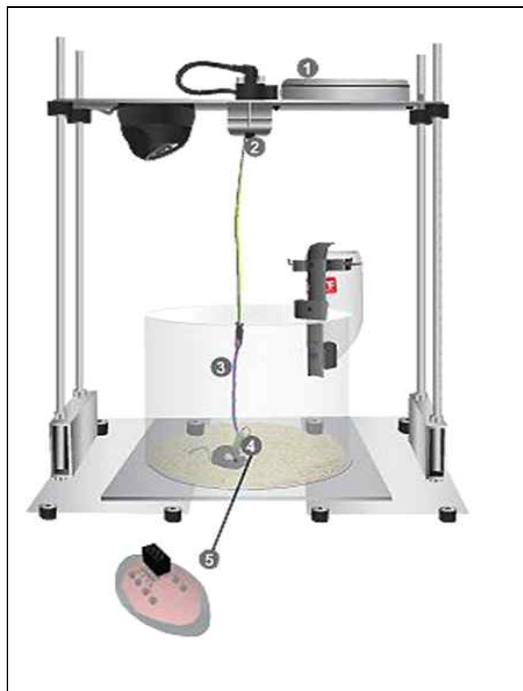
① EEG 수술

- 엔토발 300 μ l정도 투여해 마취한 후 면도하고, 눈 앞쪽에서 귀 뒤쪽까지 피부를 절개한다. Bregma 바로 아래쪽에 두 개, lamda 위에 한 개의 구멍을 드릴로 내 준 후, 1ml syringe needle로 막을 뚫어준다(Fig 1). 전선이 납땜되어있는 나사를 bregma 아래쪽 구멍 두 개에 드라이버로 고정시킨다(Fig 2). Connector 위쪽 두 부분은 3번의 전선과 납땜하고, 가운데 나사는 lamda 위 쪽 구멍에 드라이버로 고정시킨다. 아래쪽 두 부분(전선이 연결된)은 목 부분 근육에 꿰매듯이 고정시킨다(Fig 3~6). Skull쪽 전선은 잘 구부리고 목 근육 쪽 전선은 피부 밑으로 넣어준다(Fig 7). Rebase의 powder와 liquid를 적정농도로 잘 섞어서 장치가 고정되게 듬뿍 바른다(Fig 8). 절개된 부분은 black silk로 꿰맨다. 수술 후, 1주일 안정화 시킨다.



② EEG 측정 및 분석

- 수술회복 후, 쥐를 실험조건에 적응시킨후, 행동실험을 시행한다. EEG 레코딩(8:00pm 부터 12시간 동안)을 진행한다.



다. 스트레스 유발 기억장애 동물 모델에서의 신경 화학적, 분자생물학적 변화에 관한 연구
(1) PVN에서 CRF (corticotropin releasing hormone) 및 c-fos 조직염색법을 통한 스트레스 관련 인자의 활성 정도를 관찰

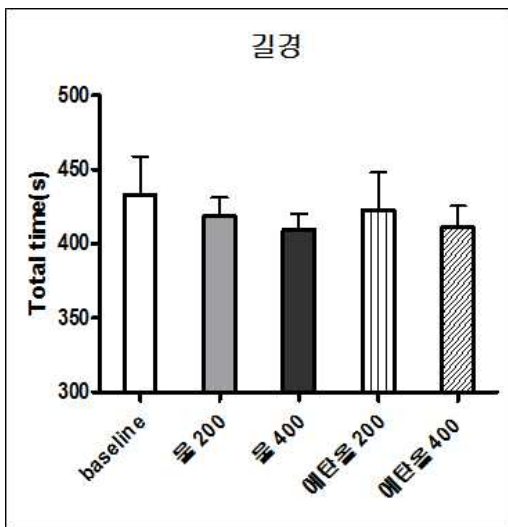
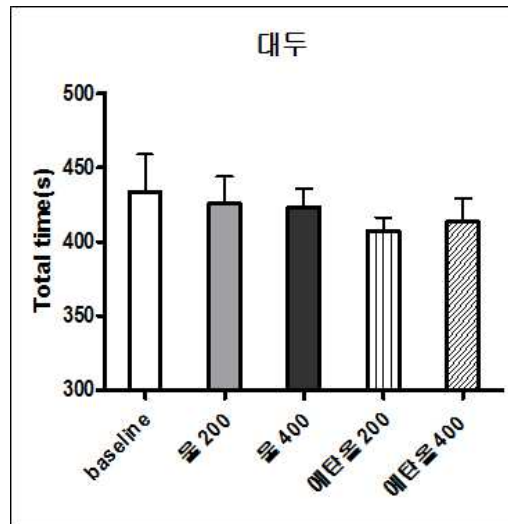
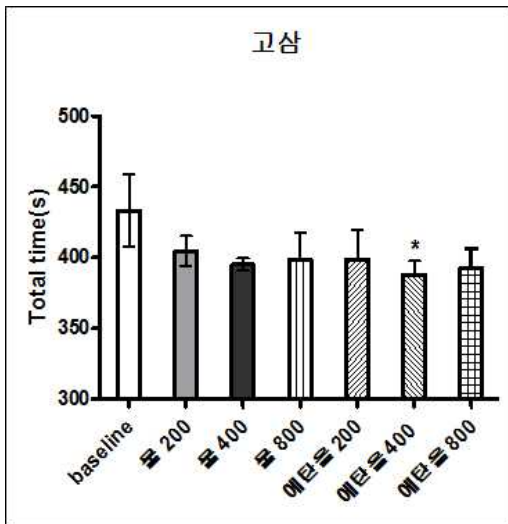
- CRF 및 c-fos 염색은 뇌조직 절편을 PBS로 수세하여 1.5% BSA blocking 용액에 1시간 동안 반응시키고 anti-CRF 및 anti c-fos 를 이용하여 4°C 에서 24시간동안 반응시킨다. PBS로 수세하고 anti-secondary antibody(Vector laboratory, USA)를 이용하여 상온에서 2시간동안 반응시킨 후 ABC(avidin-biotin compound, Vector laboratory, USA)를 상온에서 2시간 반응시킨다. PBS로 수세하고 DAB에 반응시켜 조직을 슬라이드에 건조시킨 후 현미경으로 관찰하였음

경희대학교 1차년도 실적

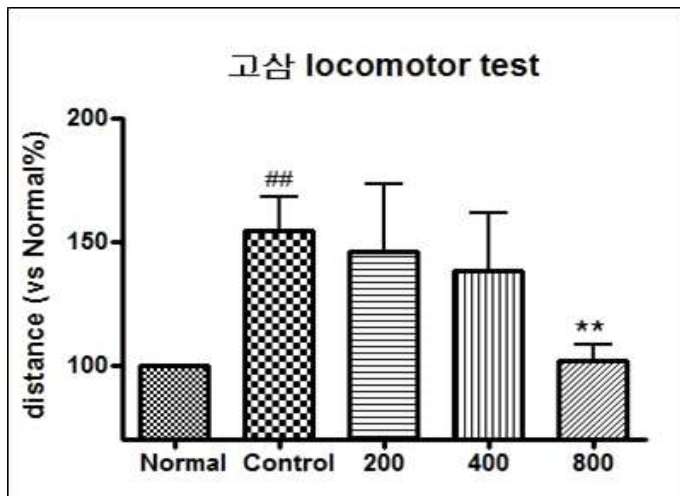
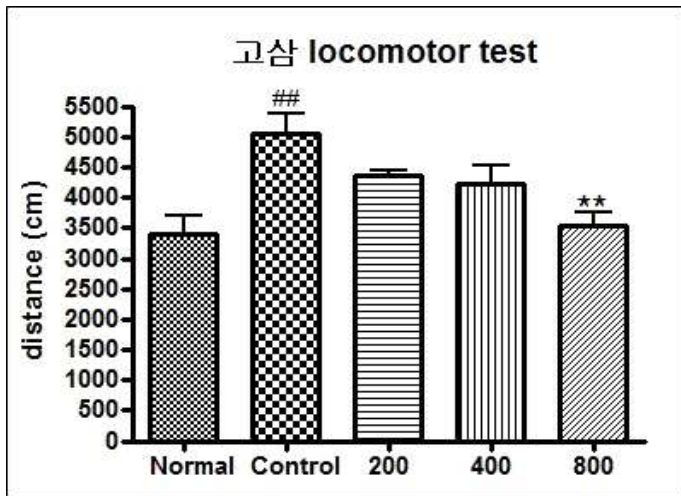
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	후보추출물(3가지))의 in vivo 수면효과 평가를 통한 리드농산물 도출	in vivo 수면효과 평가 리드농산물 투여법 확정	palpebral test	고삼 에탄올추출물에서 통계적 유의성 보임.
		caffeine을 이용한 수면장애 유발 모델	locomotor test	palpebral test에서 통계적 유의성을 보인 고삼 에탄올 추출물에서 진행. 통계적 유의성 있는 data를 획득.
		수면촉진 관련 기능성을 평가하기 위한 시험	EEG 측정	고삼 추출물에 대한 EEG 측정 및 분석을 진행중.

- 수면장애 동물모델 확립과 수면증진 후보물질 탐색

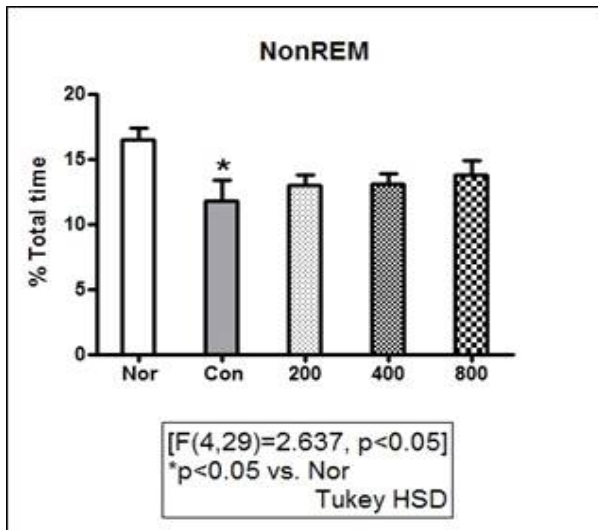
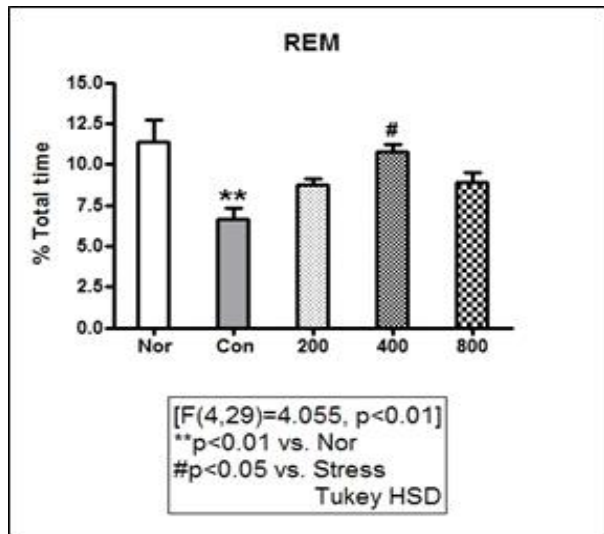
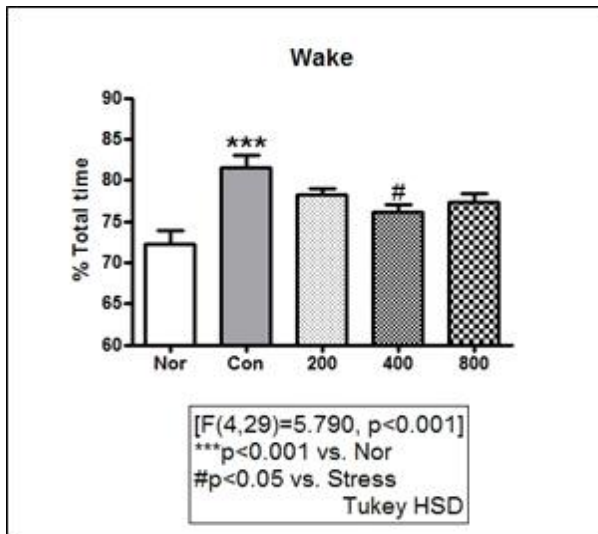
(1) Nor (baseline) / 고삼 물추출 200, 400, 800 / 고삼 에탄올추출 200, 400, 800 / 길경물
추출 200, 400 / 길경 에탄올추출 200, 400 / 대두 물추출 200, 400 / 대두 에탄올추출
200, 400 후보물질 투여 후, pentobarbital test 진행



(2) Nor (baseline) / Con (stress)/ 고삼 에탄올추출 200, 400, 800에 대한 locomotor test 진행



(3) Nor / Con (stress) / 고삼 에탄올추출 200, 400, 800 농도에 대한 EEG 측정 및 분석 진행



경희대학교 2차년도 실적

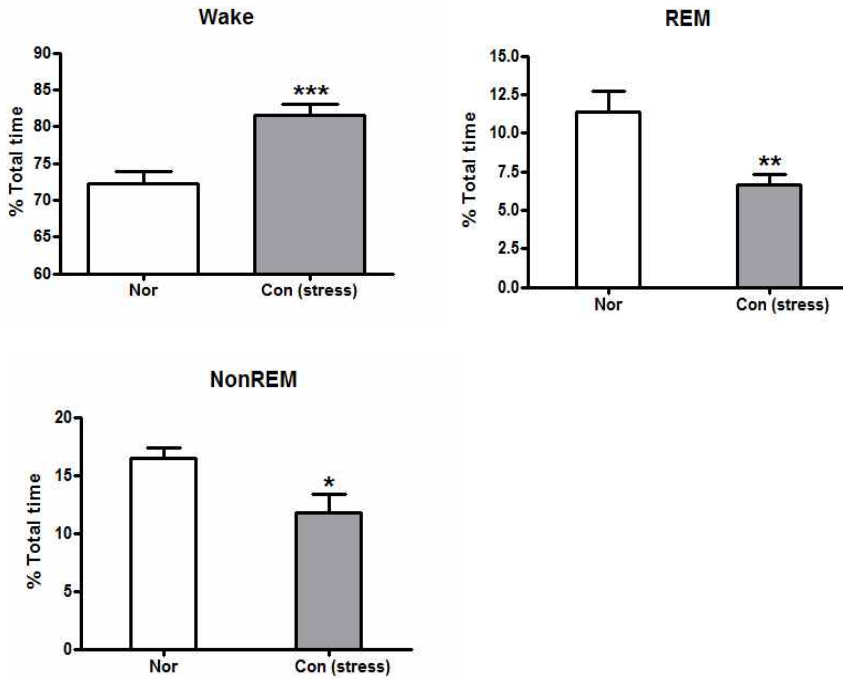
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	후보추출물에 대한 in vivo 수면 효과의 기전연구 및 신경화학적 기전 규명	Electroencephalography (EEG) 분석을 통한 후보추출물의 불면에서의 개선효과확인	in vivo에서 스트레스 유발 후 후보 추출물을 투여하여 Electroencephalogram (EEG)를 통해서 수면 기능을 평가함	- 대두 400과 길경+대두 400 그룹에서 EEG에서의 차이를 확인 - 대두의 리드물질인 genistein 30에서 EEG의 차이를 확인
		5-HT 및 stress 인자를 통한 후보추출물의 불면 개선 효과의 신경 화학적기전 규명	in vivo에서 스트레스 유발 후 후보 추출물을 투여하여 PVN, hippocampus에서 Immunohistochemistry (IHC)를 통하여 수면에 대한 약물의 기전을 밝히고자함	EEG 결과에서 통계적 유의성을 보인 대두추출물 및 그 리드성분에서 5-HT, c-fos를 PVN, hippocampus에서 IHC를 통하여 분석진행 중

후보 추출물의 EEG 분석을 통한 수면 개선효과 확인

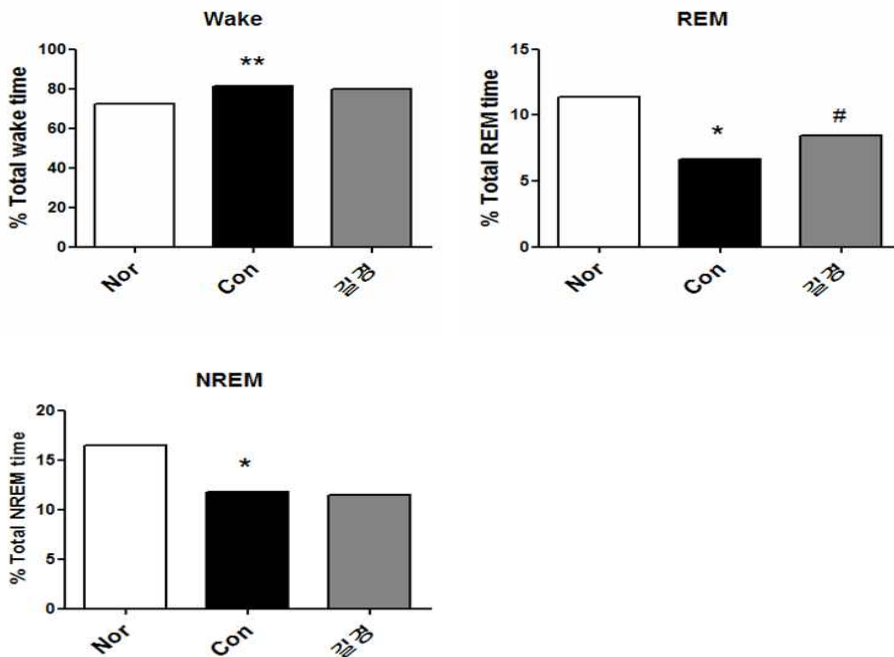
- Nor/ Con (stress)/ 길경 에탄올 추출물 400/ 대두 에탄올 추출물 400/ 길경+대두 에탄올 추출물 400/ 이소플라본 (Genistein 30)에 대한 EEG 측정 및 분석완료
- 대두의 지표물질 선정 (Genistein 30mg/kg I.p) 및 EEG 측정, 분석완료
- 대두 400과 길경+대두 400 그룹에서 wake의 유의미한 감소 확인
- 길경에서는 wake 감소의 유의성을 보이지 않았기에 길경+대두 400의 유의성은 대두에 의한 것임을 확인
- Genistein 30에서 wake의 유의미한 감소확인
- Genistein 30에서 REM수면의 유의미한 증가를 나타냄
- 대두400과 Genistein30에서 NonREM 수면의 유의미한 증가를 보임
- 대두 에탄올 추출물에서 수면 증진의 효능을 나타내었고, 지표물질인 Genistein 역시 wake 시간의 유의미한 감소를 보였고 REM가 NREM 수면에서 모두 유의미한 증가를 보였다. Genistein이 수면증진에 효과가 있는 대두효능에 영향을 주는 물질임을 확인할수있음

- 스트레스로 인한 수면장애 동물모델 확립 및 검증 된 약물의 처치 후 EEG를 통한 효능 검증

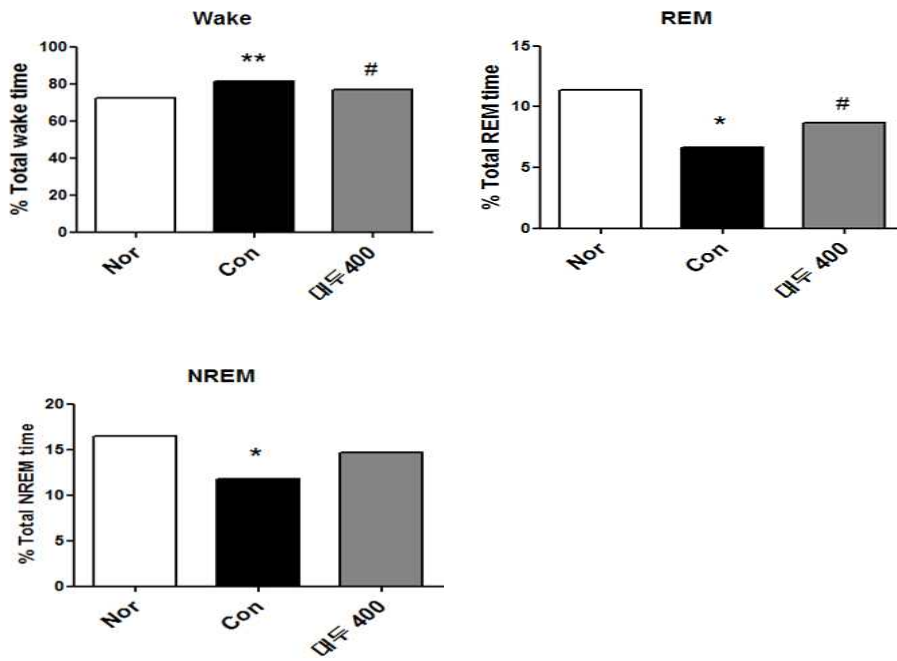
(1) 전기자극 스트레스 후 EEG 분석을 통한 NREM, REM, wake 분석 결과, 정상군에 비해 스트레스군에서 wake는 증가하고, NREM, REM은 감소함을 확인. 스트레스 유발 수면장애 동물모델 확립



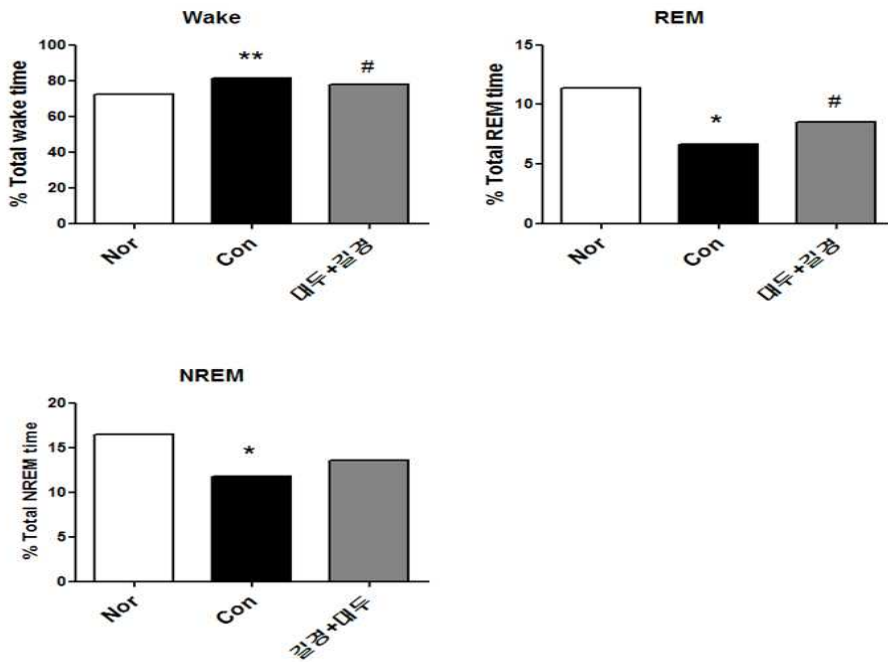
(2) 5일 동안 후보물질을 구강 투여 30분 뒤 , 전기 자극 스트레스를 준 후, EEG 분석을 통하여, 길경에서 효능 검증



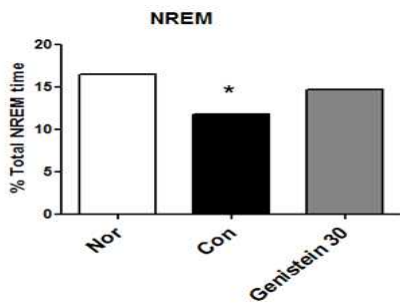
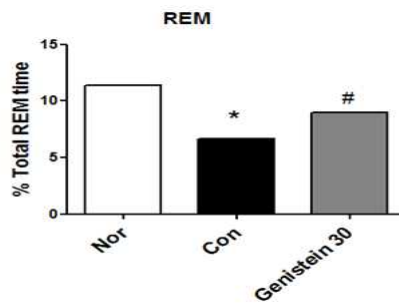
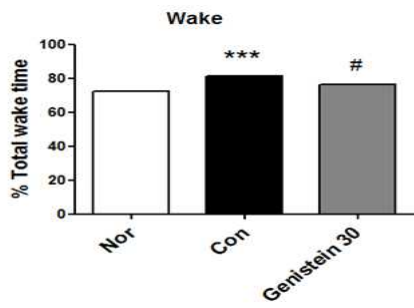
(3) 5일 동안 후보물질을 구강 투여 30분 뒤 , 전기 자극 스트레스를 준 후, EEG 분석을 통하여, 대두에서 효능 검증



(4) 5일 동안 후보물질을 구강 투여 30분 뒤 , 전기 자극 스트레스를 준 후, EEG 분석을 통하여, 대두+길경에서 효능 검증



(5) 5일 동안 후보물질을 구강 투여 30분 뒤, 전기 자극 스트레스를 준 후, EEG 분석을 통하여, Genistein에서 효능 검증



2. 후보추출물에 대한 특허 출원 신청

- 현재까지의 결과를 바탕으로 한 내용에 관하여 특허 출원 중에 있음

발명의 명칭;

고삼 추출물 또는 마트린을 포함하는 진정 또는 수면유도용 조성물
(출원번호; 10-2019-0017086, 출원일자 2019.02.14.) (첨부1 참고)

발명의 명칭(신청중):

발명의 명칭:

국내 농작물 대두를 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발



(2) 발명의 명칭; 국내 농작물 대두를 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품 개발
(출원번호;10-2019-0141-996,출원일자 2019.11.7.) (첨부2 참고)



3. 논문 성과

- eCAM 등 2편의 논문을 sci급에 투고하였으며, 심사중이거나 재투고 중에 있으며, 추가적인 실험 데이터를 통해 투고하여 당해연도에 설정된 목표 달성 예정
- Sedative-hypnotic activity of traditional medicinal plants in the rat (Submitted in eCAM)
- Effect of modified Yukmijhwang-tang on the sleep quality in the rat (Submitted in eCAM)



Manuscript Title: 1787036.v1 (Research Article)

Title	Sedative-hypnotic activity of traditional medicinal plants in the rat
Journal	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Issue	Regular
Manuscript Number	1787036 (Research Article)
Submitted On	2018-08-22
Author(s)	Choi Hyeon-yeung, M.D., Ph.D., Mian-Ah Kim, M.D., Hwang Kang, M.D., Mi Young Lee, M.D., In Chol Jung, M.D., In Chol Kang, M.D., Sang Shin
Editor	
Status	Rejected



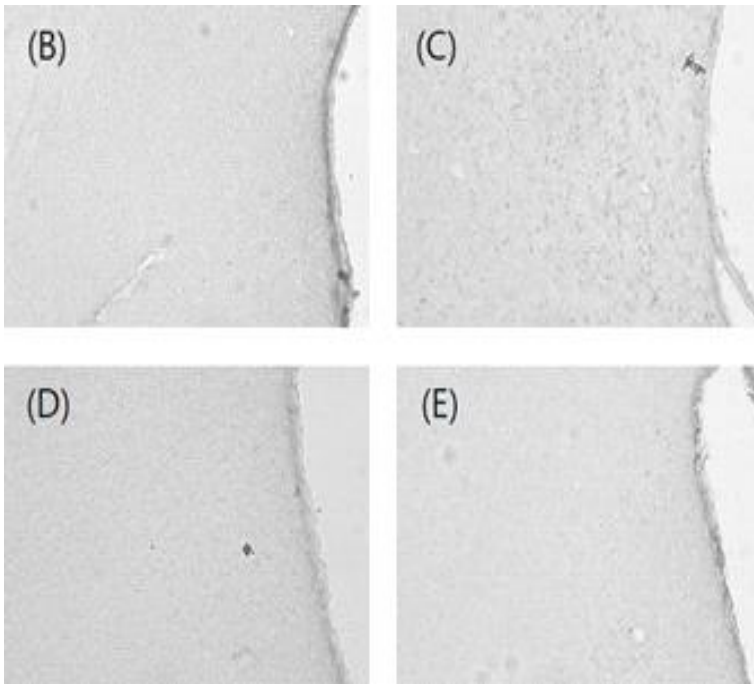
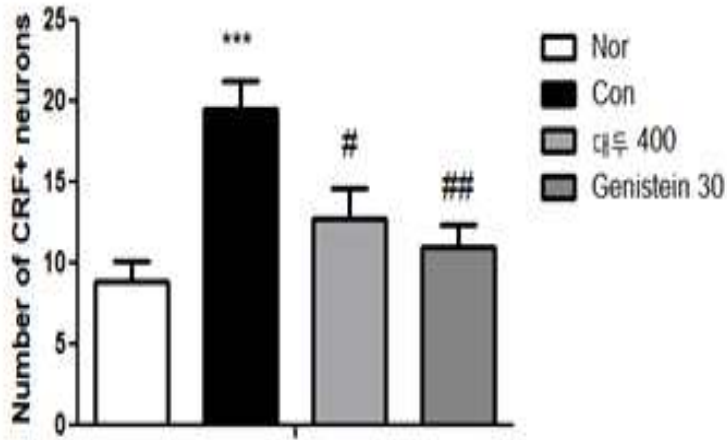
Manuscript Title: 1608356.v1 (Research Article)

Title	Effect of modified Yukmijhwang-tang on the sleep quality in the rat
Journal	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Issue	Regular
Manuscript Number	1608356 (Research Article)
Submitted On	2017-10-18
Author(s)	Choi Hyeon-yeung, M.D., Mian-Ah Kim, M.D., Hwang Kang, M.D., Mi Young Lee, M.D., In Chol Jung, M.D., In Chol Kang, M.D., Sang Shin
Editor	
Status	Rejected

경희대학교 3차년도 실적

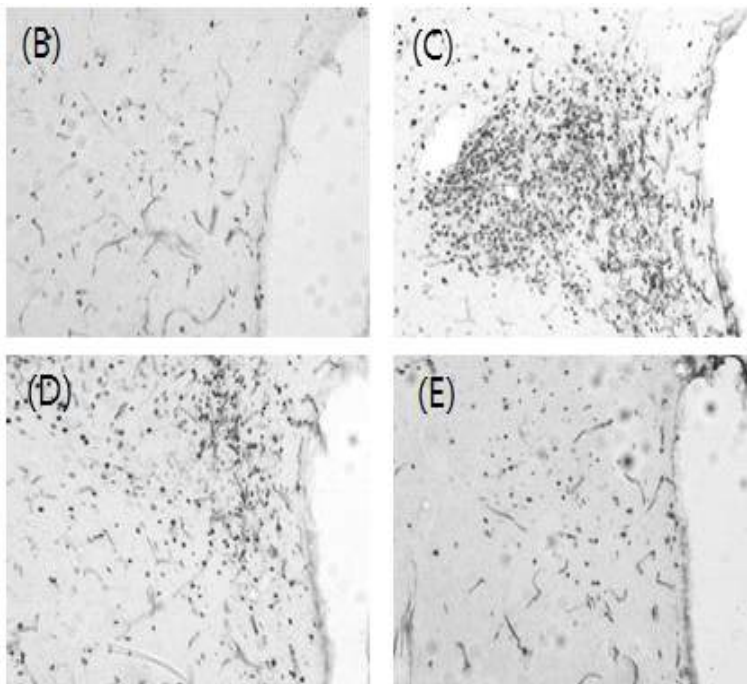
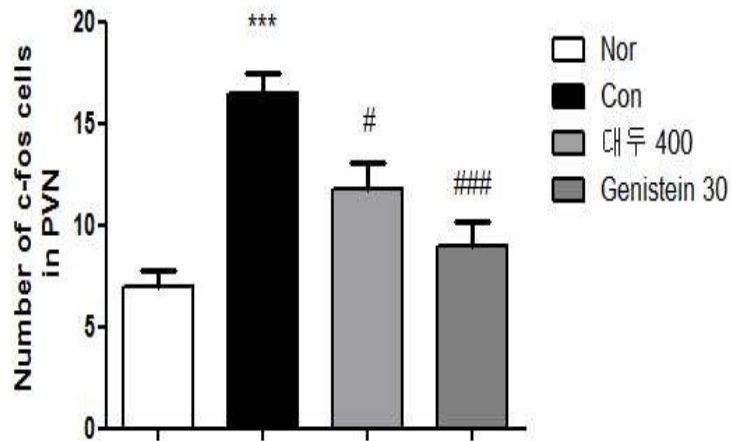
- 스트레스로 인한 수면장애 동물모델 확립 및 검증된 약물의 처치 후 생화학적 검증

(1) 검증된 약물 처치 후, 전기 자극 스트레스를 5일 동안 준 후, PVN 부위에서 CRF 변화 확인



(B) Nor, (C) Con(stress), (D) 대두 400, (E) Genistein 30

(2) 검증된 약물 처치 후, 전기 자극 스트레스를 5일 동안 준 후, PVN 부위에서 c-fos 변화 확인



(B) Nor, (C) Con(stress), (D) 대두 400, (E) Genistein 30

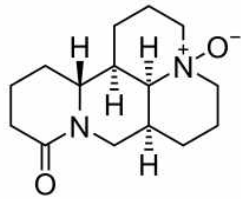
2.4 협동기관 - 호서대학교 [1차년도부터 3차년도까지 하나의 결과로 취합]

1. 후보물질 3종(길경, 고삼, 대두)에 대한 자료조사 및 지표물질 선정

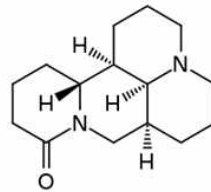
가. 고삼의 기능성 및 성분에 대한 자료 조사

- 고삼(*Sophora Radix*)은 콩과에 속하는 다년생 초본식물인 도독놈의 지팡이(*Sophora flavescens* Aiton)라는 식물의 뿌리로 한방에서는 이 식물의 뿌리를 약재로 이용하였다. 고삼은 동의치료에서 황달, 간질, 나력, 해열, 설사, 치질, 자궁출혈, 기관지염, 폐결핵, 축농증, 류마티스, 이노, 진통, 구충제 내복용으로 쓰였고 강정제로써 민간 약재로 이용되어 왔으며, 습진, 마른버짐, 심한 가려움증의 피부질환에 외용해왔다. 민간에서는 고삼의 뿌리와 줄기, 잎을 가루로 내거나 달여서 피부살충약 또는 농작물의 살충약으로 쓰였다고 한다.
- 현재까지 알려진 고삼의 성분은 alkaloid, flavonoid, flavanone, flavanol, triterpene, quinone, saponine, sapogenol류 등의 화합물 등으로 알려져 있다. Alkaloid로는 matrine, -isomatrine, allomatrine, oxymatrine, kuraramin, anagryne 등이, flavonoid 로는 isoanhydroicarine, vexibinol 등이, triterpene으로는 soyasogenol B, soyasaponin I, quinones으로는 kushenquinone이 보고 되었다. 고삼에서 항균과 항진균작용을 하는 성분은 flavonoid 류와 flavanone류라고 생각되어진다.
- 고삼(*Sophora flavescens*)와 생리 활성 물질인 matrine의 진정 효과를 쥐의 운동 활성 검사와 뇌파 검사 (electroencephalography, EEG) 분석을 통해 조사한 결과 카페인에 의한 과잉 행동의 정상화와 non-rapid eye movement: NREM 수면으로의 전환을 촉진시키는 효과가 있음을 보여주었다. 또한 고수와 matrine 투여가 수면 촉진영역인 vortrolateral preoptic nucleus (VLPO)를 활성화 하고 serotonergic transmission을 조절함으로써 NREM 수면을 촉진시킴으로써 고수가 최면제의 유용한 자연 대체물이 될 수 있다고 본다.
- 고삼의 주성분인 matrine과 oxymatrine은 산 분비의 감소와 위 운동성의 억제로 스트레스 궤양에 보호 효과가 있음이 확인되었다. matrine은 아세트산에 의해 유발 된 몸살, 펜토바비탈에 의해 유도 된 수면 시간의 연장, 저체온증 및 methamphetamine에 의해 유도 된 운동 활성의 억제하는 활성을 보임으로써 수면과의 연관성을 보여주었다.
- 고삼은 대식세포에 의한 많은 양의 NO를 생성하여 항암작용 및 항미생물 작용에 중요한 매개역할을 하는 것으로 보고되었다. 최근 고삼이 Stress성 궤양발생 예방효과, 항종유작용으로 자궁경암14 (U-14) 및 육유 S-37, 복수형 육유 S-180에 대한 일정한 억제작용 등이 있음이 확인되었다. 또한 고삼이 혈당강하 insulin 함량의 증가에 미치는 영향이 있어 당뇨병의 치료에 효과가 있다고 보고하였고, 고삼열탕액은 과민증(anaphylaxis)의 억제효과를 보인다고 보고하였다.

Oxymatrine



Matrine

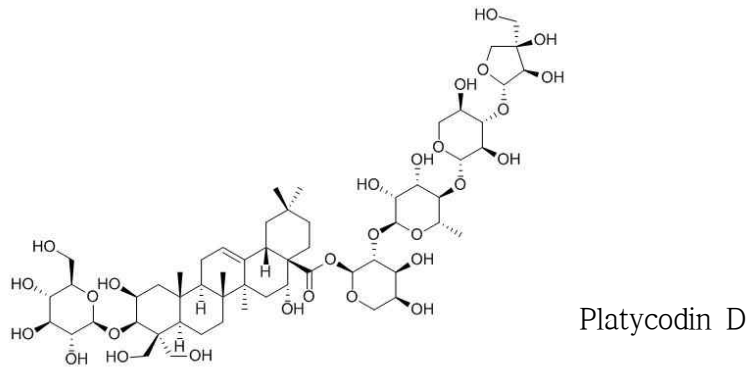


나. 길경의 기능성 및 성분 에 대한 자료조사

- 길경 즉 도라지(*Platycodon glandiflorus* (Jacq.) A.DC)는 초롱꽃과의 여러해살이풀로 오랫동안 식품의 재료와 약재로 사용되어 왔으며 인지 기능에도 상당한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 도라지의 뿌리(Root), 지상부(Aerial part), 씨앗(Seeds), 각각의 추출물로부터 마우스의 인지기능에 미치는 영향을 조사한 결과 도라지 뿌리를 투여 한 마우스가 Y자 미로 실험에서 자발적 변경률(Spontaneous alternation)의 증가와 해마에서 시냅스 형성의 증가를 보여주었다.
- 또한 도라지 뿌리와 도라지 씨앗의 주요 생체활성 화합물인 Platycodin D는 시험 관내(In vitro)에서 ERK 1/2 신호 전달경로(Signaling pathway)의 인산화(Phosphorylation)를 통하여 신경돌기 형성(Neuritic outgrowth)을 자극하였다. 이러한 결과는 Platycodin D를 함유한 도라지 뿌리가 ERK 1/2 신호 전달 경로의 활성화를 통한 시냅스 형성으로 인지기능을 향상시킨다는 것을 시사한다.
- 길경은 일반적으로 음식의 성분 혹은 한방 전통 의학에서는 기억 상실증 및 치매 치료제뿐만 아니라 염증성 질환에 치료제로 쓰였다. 특히 길경은 lipopolysaccharide -induced inflammatory을 약화시키며 신경 세포 증식을 유도하여 hippocampal neurogenesis를 향상시키는 것으로 보고됨에 따라 길경의 약리성에 대한 뇌질환 치료제로 활용의 가치를 보이고 있다. 길경의 뿌리에서 추출된 특정 성분인 triterpenes는 뇌 손상 보호작용, 인지 증진 효과를 보인다고 보고하였고 platycoside, platycodin 및 platycogalacin으로 구성된 triterpenoid saponins가 중요 생리활성을 주는 성분으로 분석되었다. 또한 길경은 신경세포에서 MAPK/ERK pathway를 증재하여 인지기능을 향상시키며 학습효과와 기억력에 도움을 줄 것으로 사료된다.
- 길경 단방의 효과보다 복방으로 처리하였을 경우 타 약재와의 상승작용에 의하여 불면증 개선 효과가 있다고 한 연구는 Tianwang Buxin 복합탕에 sleeping 효과가 있는데 Spine date seed가 주 효과 물질이며 Spine date seed에 길경을 첨가할 때, 효과가 상승하였고, 길경만은 효과가 미비하였다고 보고하였다. Tianwang buxin 에서 길경을 제거한 복합탕도 효과가 떨어진다고 보고함으로써 길경의 자체적인 효과보다는 길경이 다른 물질에 효과를 유지 또는 강화시켜주는 것으로 보고되었다. 이 연구에서는 최면 작용 메커니즘은 뇌 영역에서 5-HT(serotonin)의 방출을 향상시키며 수면효과를 가져오는데 복방에 영향을 주는 물질로 radix platycodi를 중요한 소재로 지적하였는데 이 물질은 심양지방의 허브로 지정이라 하며 길경과 흡사한 생리활성을 가진 허브이다.
- 뇌혈관성 치매(cerebrovascular dementia)와 알츠하이머병(Alzheimer disease)알츠하이머병은 많은 원인에 의해 유발되지만 콜린성신경계의 변화, 산화 스트레스, glutamate, amyloid plaque생성, tau protein 침착, Ca homeostasis의 불균형, 염증 등이 발병 인자로 제시되고 있다. 신경전달물질의 하나인 L-glutamate는 정상적인 신경반응을 유도하는 역할을 하지만,

과도한 수준의 L-glutamate는 뇌세포 조직내 단위세포로 유입되는 칼슘의 양을 증가시켜 독성 작용이 나타나 결국 세포를 손상시킨다. 뇌중 acetylcholinesterase(AChE)의 농도가 증가할수록 신경세포의 콜린성 신경전달물질이 결핍되어 기억 및 인지기능장애를 유발할 수 있다고 보고하였다.

- 갈근 등의 총 20여종 생약추출물 중 감초가 AChE 효소 저해, 지질과산화물 생성억제 및 신경세포보호 효과가 높아 퇴행성 질환의 하나인 치매 예방 가능성을 보여주었으며, 길경은 미약하게 작용하는 것으로 향후 생리활성물질 구명 및 인지기능개선 효과에 대한 분자수준의 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 20종 생약 열수추출물의 AChE 활성, 산화스트레스로 인한 지질 과산화물 생성 억제능 및 뇌신경세포 사멸에 대한 보호효과를 비교하였다. AChE의 억제활성은 산수유, 감초, 당귀 열수추출물에서 우수하였으며, 그중 산수유가 가장 높은 억제율을 나타내었다. 또한 H₂O₂/FeSO₄로 산화 스트레스를 유발시켜 생약 열수추출물의 지질과산화물 생성 억제 활성을 조사한 결과 소엽, 하수오, 계피 및 감초 열수추출물에서 높은 항산화 활성을 보였다. L-Glutamate에 의해 유도된 신경세포 독성에 대한 보호효과는 감초, 계피, 길경, 박하 열수추출물의 100 μg/mL 농도에서 관찰되었다. 본 연구를 종합적으로 살펴보았을 때, 감초 열수추출물이 치매 예방 및 개선제로써의 활용가능성이 가장 뛰어난 것으로 판단되며 길경 등 새로운 식품소재의 발굴을 위한 기초자료로 활용 가치가 있다.

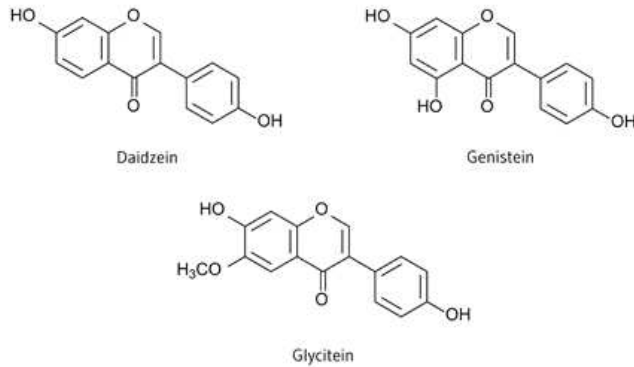


다. 대두의 기능성 및 성분 에 대한 자료 조사

- 검은 콩 추출물의 학습과 기억력 상실에 대한 회복효과에 관한 연구에서 검은 콩 종자추출물의 non-anthocyanin fraction (NAF)은 PC12 세포의 Amyloid beta protein(Aβ)세포 독성을 향상시키는 기전을 산화스트레스를 감소시킴으로써 기억력을 개선할 수 있다고 제안하였다. Q-TOF UPLC/MS 분석 결과 세 가지 주요 phenolics((-)-epicatechin, procyanidin B1, and procyanidin B2)이 나타났으며 이중 (-)-epicatechins이 가장 중요한 물질로서 검은콩 종자의 NAF의 반 건망증 효과에 기여했다고 하였다.
- 대두 이소플라본의 잠재적 항우울제 효과 평가에 관한 연구에서는 중국과 일본의 몇몇 연구에서 콩 제품 섭취가 우울증의 위험과 반비례하는 것으로 나타났으며 이소플라빈 섭취에 의하여 우울증이 호전하는 것을 관찰하였다. 대두 이소 플라본은 여러 가지 건강상의 이점을 가지고 있으므로 역학 및 임상 증거가 정신 건강의 개선을 가져올 수 있는 자료가 될 수 있다.
- 이소플라빈은 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor:ER)에 대한 결합력이 높는데 에스트로

겐 수용체는 뇌에서 시상하부, 뇌하수체, 해마에서 많이 발견되며, 이 수용체는 에스트로겐에 의하여 활성화되면 신경전달물질을 합성한다고 알려졌다. 에스트로겐은 serotonin을 분해하는 효소인 monoamine oxidase(MA)의 분해를 촉진하며, serotonin 전구물질인 tryptophan을 혈청에서 유리시켜 뇌로의 유입을 증가하면서 뇌에서의 serotonin 으로 전환되는 양을 증가시킨다. 이소플라빈의 섭취 수준이 증가할수록 뇌조직에서 5-HT와 NE의 농도가 dose-dependent하게 증가하는 경향을 보였다. 이 연구를 통하여 이소플라빈 섭취는 인지기능을 증진시키는 효과가 있으며 신경세포의 시냅스에서 신경전달물질의 합성 및 방출에 관여함을 알 있었다.

- 신경전달물질 중에는 섭취하는 음식을 통하여 그 전구체를 제공받는 신경전달물질들이 있다. 그러한 신경전달물질은 기억과 인지기능에 관여하는 아세틸콜린 (acetylcholine: Ach)과 monoamine으로서 각성 및 기분을 조절하는 노르에피네프린(norepinephrine: NE), 수면과 감정을 좌우하는 세로토닌(serotonin: 5-HT), 운동조절능력을 가지는 도파민(dopamine) 등이 있다. 아세틸콜린은 콜린에서 합성되며, NE와 dopamine은 아미노산인 tyrosine으로부터 합성되며 5-HT는 tryptophan에서 합성이 되므로 전구물질을 제공하는 식사는 중요한 의미를 가지고 있다.



라. 고삼 추출물의 지표성분 분석조건 확립

(1) 고삼 지표물질에 대한 분석 조건 확립

- 분석 조건은 참고문헌에 따라 다음의 세 가지 용매조건을 사용하여 각각 분석 후 최적용매 조건을 선정하였음. 유속은 동일하게 1ml/min 였고, detection 파장은 210 또는 220nm 였다. 컬럼은 C18 (4.6x250, 5um, INNO Column, 영진바이오크롬)을 사용하였다.

✓ 표준품 : Matrine (98.0%)은 Tokyo Chemical Industry (TCL, Japan)에서 그리고

oxymatrine은 Cayman에서 구입하였고 메탄올에 용해하여 사용하였다.

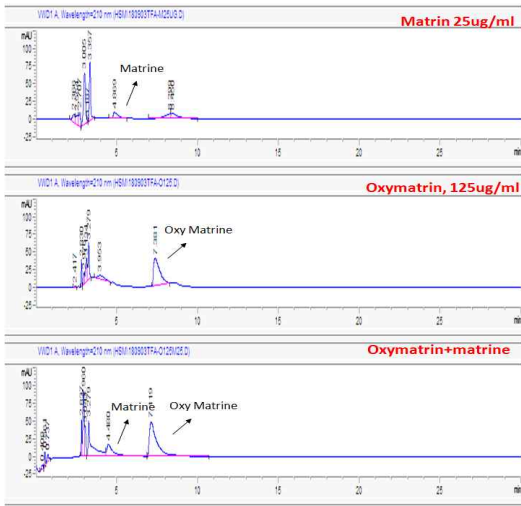
✓ 다음의 세 가지 eluents 조건을 사용하여 분석하고 결과를 비교하였다.

A. Methanol:water:trifluoroacetic acid

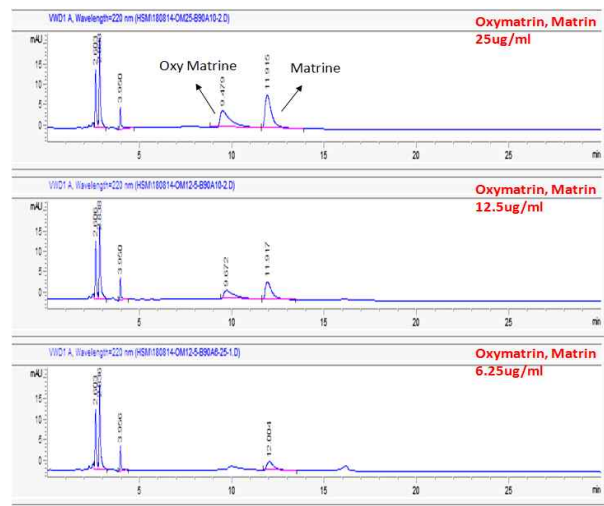
B. Acetonitrile:50mM potassium phosphate buffer(pH6.0)

C. Methanol:Acetonitrile: 5mM potassium phosphate buffer(pH6.0)

(A)



(B)



(C)

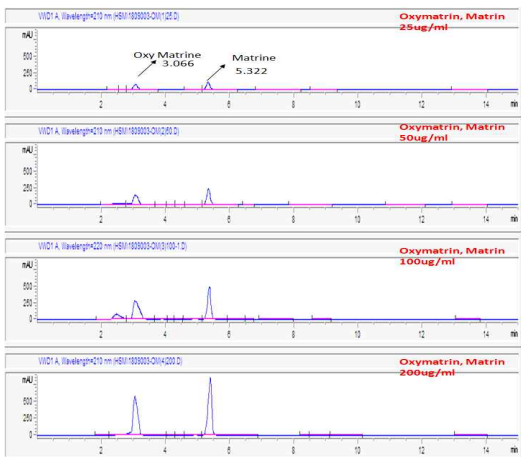


그림 1. Matrine과 oxymatrine 지표물질의 eluents 조건에 따른 HPLC 분석 프로파일

- 그림 1에 제시된 세 용매 조건에서의 HPLC 분석 프로파일은 세 번째 용매조건에서 matrine, oxymatrine의 분리도 및 농도의존성 피크 크기가 탁월한 것으로 나타났다. 두 지표 물질의 농도에 따른 standard curve의 R^2 값도 세 번째 용매조건에서 가장 1에 가까운 것으로 나타났다.

(2) 고삼 추출물 시료에서 지표성분 분석

- 위의 지표물질 분석에 따른 세 번째 eluent 조건으로 고삼 물 추출물 및 에탄올 추출물을 분석하였다. Spike test를 수행하여 추출물에서 matrine과 oxymatrine의 peak를 확인하였고 고삼 추출물의 HPLC 분석 패턴을 아래 그림 2에 제시하였으며 함량을 표 1에 제시하였다.

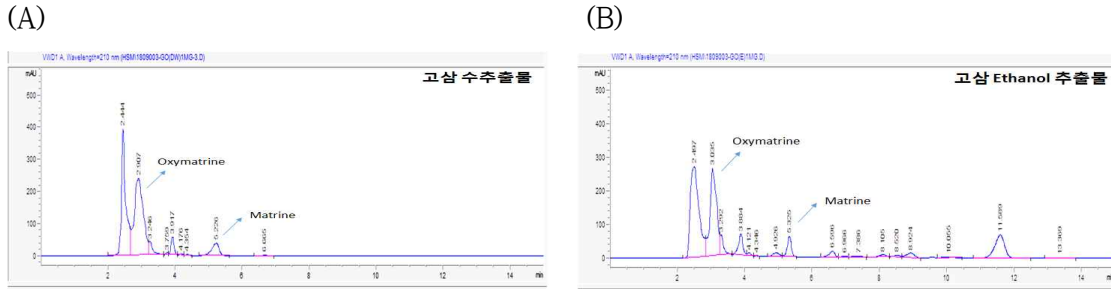


그림 2. 고삼 수추출물(A)과 에탄올추출물(B)에서 matrine과 oxymatrine 분석

표 1. 고삼 수추출물과 에탄올 추출물에서 matrine과 oxymatrine 함량

	수추출물		에탄올추출물	
	ug/ml	%	ug/ml	%
Oxymatrine	142.6	14.3	104.2	10.4
Matrine	19.3	1.9	16.2	1.6

- 고삼추출물의 HPLC 프로파일이 앞부분에서 극성 물질들이 겹치므로 3번 조건의 eluents 비율을 조정하여 최적 분석조건을 찾았고 Methanol : Acetonitrile : 5mM potassium phosphate buffer (pH6.0) = 5:3:2로 설정되었다. 2차 년도에 후보물질 3종 소재 중 대두를 선정하였기에 고삼 추출물 분석은 최적 eluents 비율을 찾은 것으로 마무리하였다.

마. 길경 추출물의 지표성분 분석조건 확립

(1) 길경 지표물질에 대한 분석 조건 확립

- 길경에 함유되어 있는 사포닌을 platycodin이라고 하며 길경에만 함유되어 있고, 이미 알려져 있는 길경 사포닌의 종류가 다양하지만, 표준물질로 구매가능한 물질이 platycodin D 한 가지 이므로 platycodin D, 1종을 지표물질로 사용하는 것으로 정하였고 다음과 같이 분석 조건을 확립하였다.
- 유속은 1ml/min, detection 파장은 204nm, 컬럼은 SB-AQ (4.6x150, 5um, Agilent)을 사용함. 용매는 water와 acetonitrile를 사용하였고 gradient 최적조건을 확립하였다.
- 용매 조건에 따른 분석 : 두 용매의 gradient 조건에 따른 분석 중, 아래 두 가지 조건의 분석 결과 그림 3에 A, B를 제시함. B 조건이 분리도가 더 좋은 것으로 평가되었다.

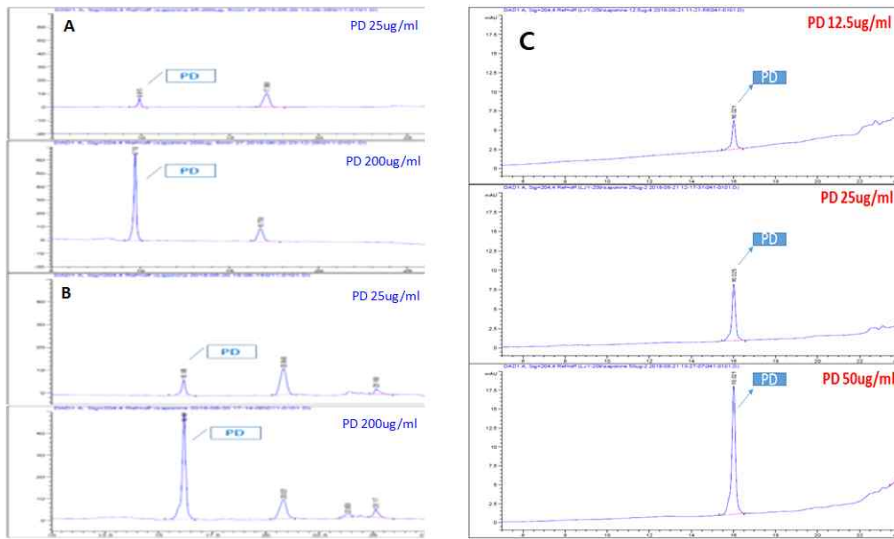


그림 3. 길경 지표물질 platycodin D의 HPLC 분석

- platycodin D (PD, Sigma) 지표물질 농도별 분석 : B 조건을 사용하여 PD 농도별 표준시료 분석을 수행하였고 HPLC 프로파일을 위(그림 3 C)에 제시하였다. 분석 eluents는 water와 acetonitrile이며 gradient 조건은 아래 표 2에 제시하였다.

표 2. 길경 지표물질 platycodin D의 HPLC 분석을 위한 eluents의 gradient 조건

시간(분)	H2O(%)	Acetonitrile(%)
0	85	15
5	80	20
20	68	32
25	55	45

(2) 길경 추출물에서 지표물질 분석

- 위의 지표물질 분석을 통해 최적화된 HPLC 분석조건으로 길경 물 추출물 및 에탄올 추출물을 분석하였다. Spike test를 수행하여 추출물에서 Platycodin D를 확인하였고 길경 추출물의 HPLC 분석 패턴을 아래 그림 4에 제시하였고 함량을 표 3에 제시하였다.

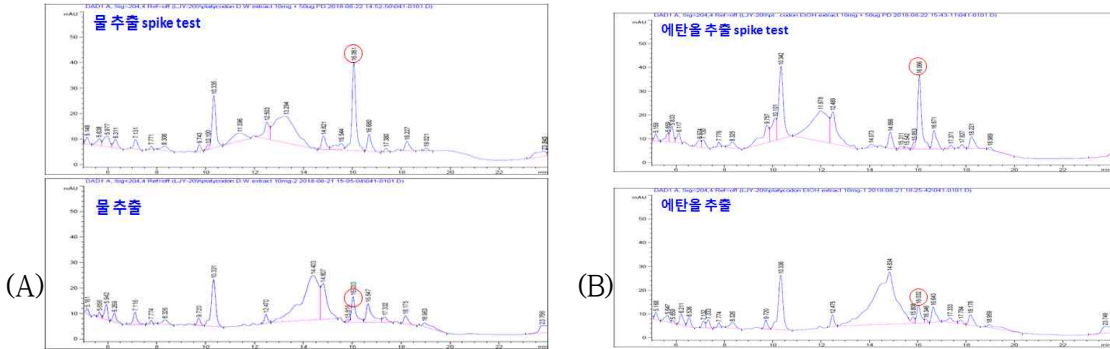


그림 4. 길경 수추출물(A)과 에탄올추출물(B)에서 platycodin D의 HPLC 분석

표 3. 길경 수추출물과 에탄올추출물에서 platycodin D의 함량 분석

	수추출물		에탄올추출물	
	mg/g	%	mg/g	%
PlatycodinD	3.05	0.35	2.3	0.23

- 위에 결과에서와 같이 HPLC-UV detector로 위의 조건에서 Platycodin D가 평가되어 질 수 있으며, HPLC-ELSD 조건 확립을 진행 중이며, 두 가지 조건을 모두 사용할 수 있도록 연구를 진행하고자 하였으나 2차 년도에 후보물질 3종 소재 중, 대두를 선정하였기에 길경 추출물 분석은 여기서 종료하였다.

바. 대두 추출물의 지표성분 분석조건 확립

(1) 대두 지표물질에 대한 분석 조건 확립

- 대두에 주요 생리활성 성분인 isoflavones 6종(daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitin, genistein)을 분석하기 위하여 아래와 같은 분석 조건을 사용하였다(표 4).
- Eluents는 (A) 0.1% acetic acid와 (B) 80% acetonitrile/0.1% acetic acid를 gradient로 조건을 변경하여 다음의 조건으로 분석하였다.

표 4. 대두의 isoflavones 분석을 위한 eluents의 gradient 조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0	88	12
8	78	22
16	70	30
20	69	31
24	69	31
32	64	36
40	60	40

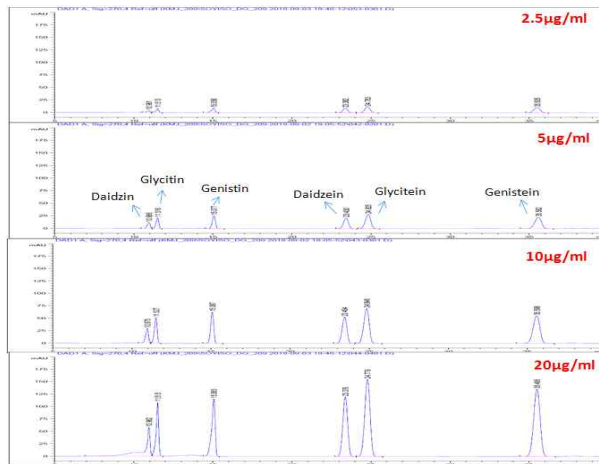


그림 5. 대두 isoflavones 6종의 농도별 HPLC 분석 프로파일

- 6종의 isoflavones 지표물질에 대한 농도별 분석 HPLC 프로파일을 그림 5에 제시하였고 그 결과 R^2 는 0.999이상 또는 1이었다.

(2) 대두 추출물 시료에서 지표물질 분석

- 대두 추출물의 HPLC 분석에서 지표물질의 spike test 를 통해 6종 이소플라본의 피크를 확인하였고 아래 그림 6에 HPLC 프로파일을 제시하였다. 검량선을 사용하여 함량을 산출하였고 아래 표 5에 제시하였다.

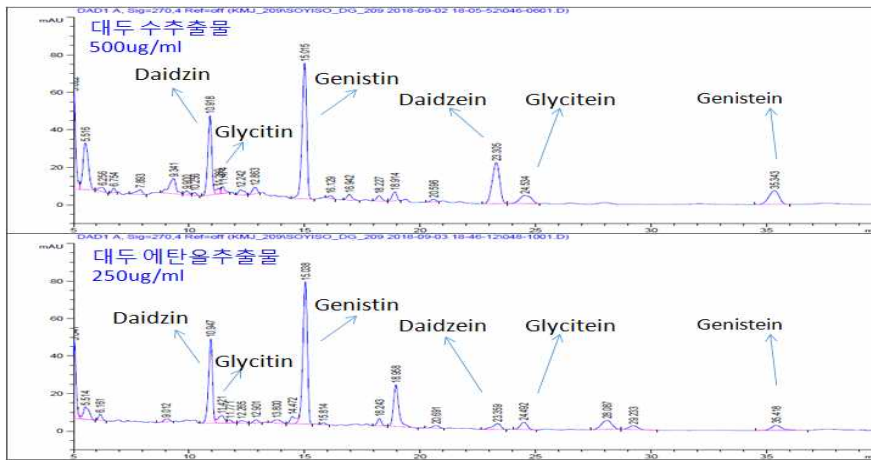


그림 6. 대두 수추출물과 에탄올 추출물에서 6종 이소플라본 HPLC 분석 프로파일

표 5. 대두 수추출물과 에탄올추출물에서 isoflavones 함량

isoflavone 종류	수추출물(ug/g)	에탄올추출물(ug/g)
Daidzin	39.34	17.99
Glycitin	6.88	2.51
Genistin	47.7	22.76
Dadzein	7.96	9.95
Glycitein	6.90	4.20
Genistein	7.74	5.19
합계	116.52	62.60

- 위의 실험들을 통하여 고삼은 2가지 지표물질 matrine과 oxymatrine을, 길경은 사포닌성분으로 길경에만 존재하는 사포닌이므로 platycodin D, 1종을, 대두는 isoflavones 으로 지표물질을 사용할 수 있음을 확인하였다.

2. 리드물질 1종 대두 추출물에 대한 지표물질 분석법 최적화 및 밸리데이션 수행

가. 지표물질 분석 조건 최적화

(1) Eluents와 columns 조건 검토

- Isoflavones 6종에 대한 분석의 최적조건을 찾기 위하여 1차년도 eluents 조성 및 gradient 조건을 변형하여 eluents 조건을 위에서와 같이 0.1% AA 함유 methanol과 0.1% AA 용액으로 정하였고, eluents의 acid 조건을 고려하여 컬럼을 C18 (INNO Column, 영진바이오크롬)에서 C18-SB (INNO Column, 영진바이오크롬) 컬럼으로 교체하였다.
- 결과적으로, Rt 값은 유사하였으며, Daidzein의 농도(area 값)가 C18-SB 컬럼에서 다소 낮은 것으로 평가되었고, 비배당체인 daidzein과 genistein의 피크 분리도는 C18-SB 컬럼에서 더 좋은 것으로 평가되었다(표 6과 그림 7).

표 6. C18과 C18-SB 컬럼의 분석 area 비교

	C18		C18-SB	
	R.T	Area	R.T	Area
Daidzin	13.222	784.4	12.605	797.9
Glycitin	13.82	37.3	13.2	27.1
Genistin	15.894	1739.9	15.275	1706.1
Daidzein	21.915	198.0	21.478	102.3
Genistein	24.713	110.8	24.113	94.0

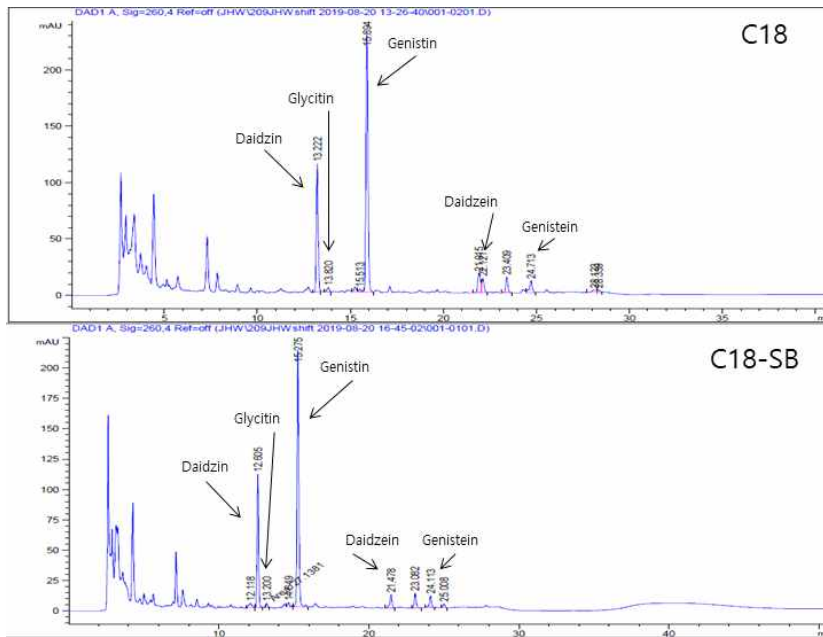


그림 7. C18과 C18-SB 컬럼의 피크 분리도 비교

(2) C18-SB 컬럼을 사용하여 스탠다드의 직선성 확인.

- C18-SB를 사용하여 다음과 같은 스탠다드 커브를 도출하였고 R^2 값이 0.999~1로 향상된 분석결과를 확인하였다.

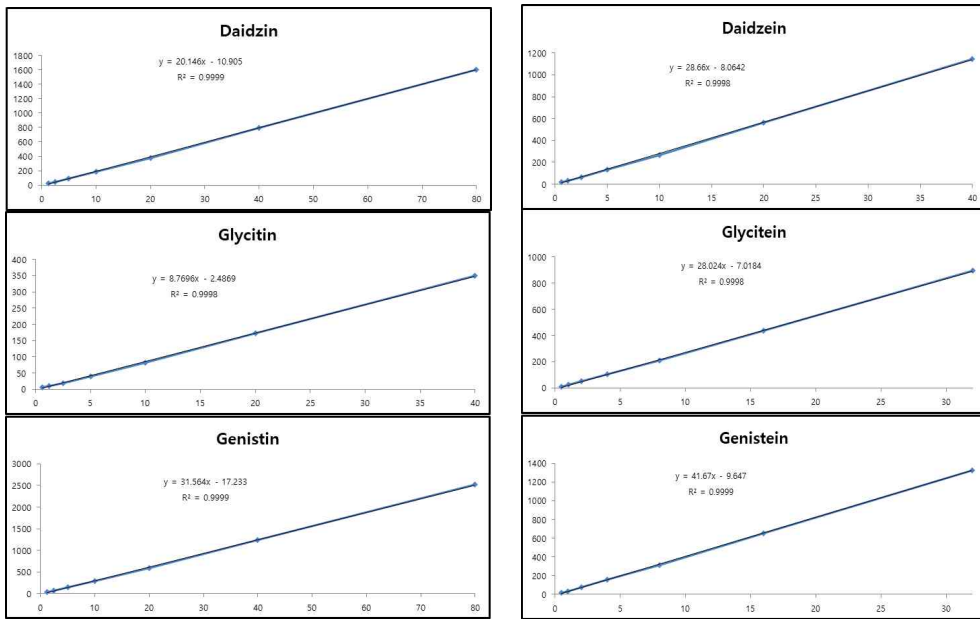
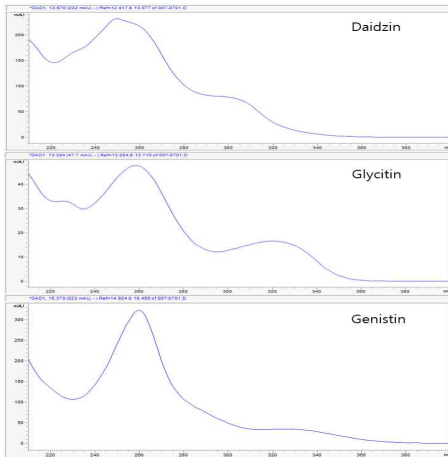


그림 8. 지표물질 6종에 대하여 농도에 따른 Standard curves

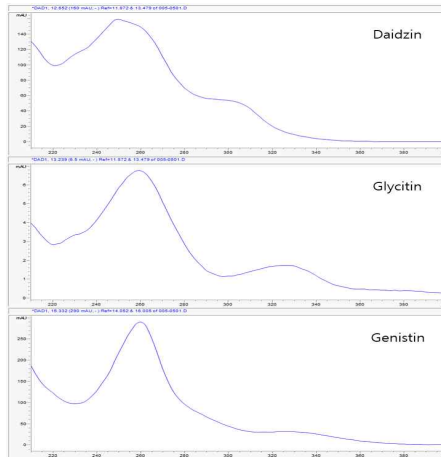
(3) 대두 추출물 isoflavones HPLC profile의 peaks 확인

대두의 에탄올 추출물을 사용하여 위에서 최적화된 분석방법으로 isoflavones 6종을 분석하였다. Spike tests를 사용하여 6종 isoflavones을 확인하였고 glycitein이 대두 에탄올 추출물에서 검출되지 않았다. 각 peak에 대한 HPLC spectrum을 분석하여 동일 isoflavones 인지를 확인하였다. 6종의 HPLC spectrum은 다음 그림 9에 제시하였다.

스탠다드 스펙트럼



시료 스펙트럼



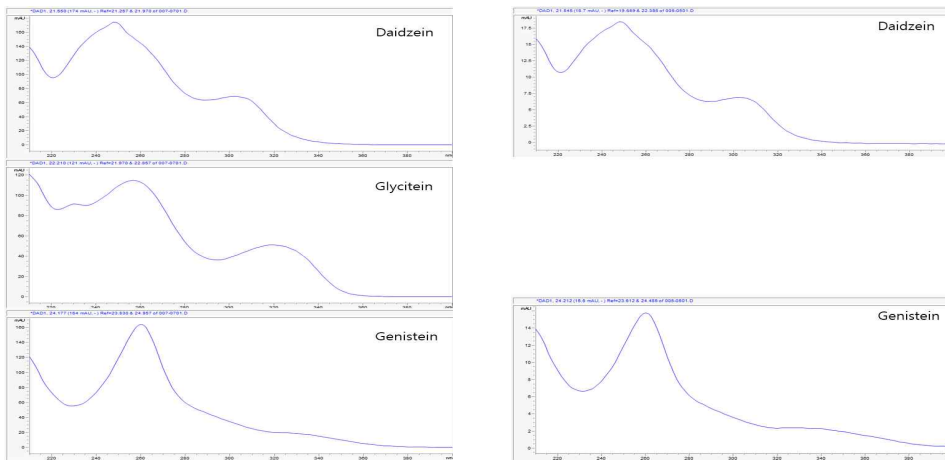


그림 9. 지표물질과 대두 에탄올 추출물에서 피크의 HPLC 스펙트럼

(4) 대두 추출물시료 전처리 조건 평가

- 다음의 4가지 방법으로 전처리를 수행하였고 그 결과로 HPLC 프로파일을 제시하였다.
- 시료 250mg을 용매(DMSO 1: MeOH 19) 5ml에 용해 후 잘 섞고 10분 sonication 후 10min 진탕배양하였다. 2000rpm 5분 centrifuge 후 PTFE 0.45, 0.22 um에 각각 filter하였다.
- 시료 250mg을 용매(DMSO 1: MeOH 19) 4.8ml과 Chloroform 0.2ml에 용해 후 잘 섞고 10분 sonication 후 10분 진탕배양 하였다. 2000rpm 5min centrifuge 후 PTFE 0.45, 0.22 um에 각각 filter하였다.
- 시료 250mg을 용매(DMSO 1: MeOH 19) 4ml에 용해 후 잘 섞고 10min sonication 후 2M NaOH 0.3ml을 추가로 넣고 10min 진탕배양 하였다. Acetic acid, Glacial 0.1ml과 용매 0.6ml을 추가로 넣고 2000rpm 5min centrifuge 후 PTFE 0.45, 0.22 um에 각각 filer하였다.
- 시료 250mg을 용매(DMSO 1: MeOH 19) 4ml과 Chloroform 0.2ml에 용해 후 잘 섞고 10min sonication 후 2M NaOH 0.3ml을 추가로 넣고 10min 진탕배양 하였다. Acetic acid, Glacial 0.1ml과 용매 0.4ml을 추가로 넣고 2000rpm 5min centrifuge 후 PTFE 0.45, 0.22 um에 각각 filer하였다.
- 전처리 비교 분석 결과를 아래 그림 10에 HPLC 프로파일과 표 7(HPLC peak area)에 제시하였다. Rt는 전처리에 따라 변하지 않았고, 비배당체인 daidzein과 genistein의 분리도가 전처리 4에서 가장 좋은 것으로 나타나서 전처리 방법으로 4번을 결정하였다.

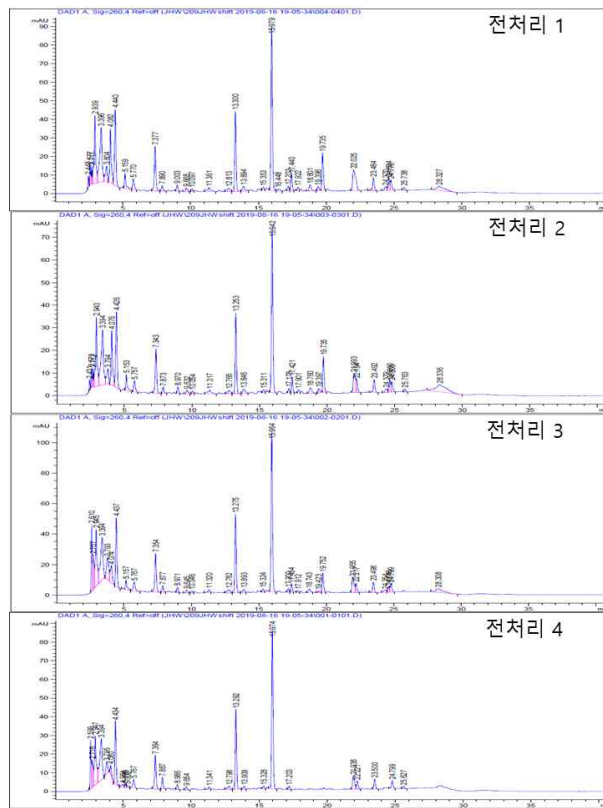


그림 10. 대두 에탄올 추출물의 전처리 방법에 따른 HPLC profile

표 7. 대두 에탄올 추출물의 전처리 방법에 따른 시료 내 isoflavones peak area

	R.T	전처리 1	전처리 2	전처리 3	전처리 4
Daidzin	13.28	309.2978	252.1039	369.2009	300.6779
Glycitin	13.885	31.50871	24.49082	19.02629	14.25069
Genistin	15.965	667.008	542.9182	792.3252	642.3257
Daidzein	21.978	180.3446	104.8825	111.9329	73.66895
Genistein	24.756	44.89607	41.43964	47.31073	36.726

나. 지표물질 분석법 밸리데이션

- 지표물질 분석법 최적화 결과를 주관기관과 공유하였고, 6종의 이소플라본을 모두 분석하는 것보다 2종을 선택해서 지표물질로 사용하는 것으로 결정하였다. 대두 에탄올 추출물에 가장 함량이 많은 2종의 이소플라본, daidzin과 genistin을 지표물질로 확정하였으며 이에 따라 2종의 이소플라본의 분석에 대한 분석법 검증을 수행하였다.
- 분석법 검증을 위하여 특이성(Specificity), 표준물질 및 시료의 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

(1) 검증을 위한 시험법

- 시료 : 대두 30% 에탄올 추출물
- 분석물질 : daizin, genistin
- 장비 : 고속액체 크로마토그래피법 (HPLC)
 - HPLC system Agilent 1260 Infinity, USA
 - G1311C 1260 Quat Pump VL
 - G1329B 1260 ALS
 - G1316A 1260 TCC
 - G1315D 1260 DAD VL

Analytical Column Inno column C18-SB (250 mm x 4.6 mm, 5um, 영진바이오클롬)

- 시약
 - ① 표준물질 :
 - Daizin (HPLC analytical grade, purity 98.2%, Sigma)
 - Genistin (HPLC analytical grade, purity 98%, Sigma)
 - ② Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma)
 - ③ Methanol, Acetonitrile, Acetate, Water (J.T Baker, HPLC grade)
- 표준용액 조제 : DMSO와 Metanol을 1:19 비율로 혼합한 용매를 만들고 daizin과 genistin을 각각 1mg/ml 농도로 혼합 표준용액의 stock을 조제하였다. 동일한 용매로 표준용액 농도범위로 희석하여 사용하였다.
- 시험용액 조제 : 대두 30% 에탄올 추출물을 동결건조한 파우더를 사용하였고 80% 메탄올을 사용하여 50 mg/ml 시료용액을 조제하였다. 상세하게는 시료 500 mg을 용매(DMSO : MeOH, 1:19) 8 ml과 Chloroform 0.4 ml에 용해 후 잘 섞고 10 min sonication 후 2 M NaOH 0.6 ml을 추가로 넣고 10 min 진탕배양 하였다. Acetic acid, Glacial 0.2 ml과 용매 0.8 ml을 추가로 넣고 2000rpm 5 min centrifuge 후 PTFE 0.45, 0.22 um에 각각 filter하였다.
- 분석조건 : 시험법 검증을 위한 HPLC 분석 조건은 표 8에 제시하였다.

표 8. 시험법 벨리데이션을 위한 HPLC 분석조건

Instrument	Agilent 1260		
Column	C18 Inno 4.6 mm×250 mm, 5.0 μm		
Mobile phase (gradient)	Time(min)	A(%)	B(%)
	0.0	80	20
	15.0	50	50
	25.0	30	70
30.0	80	20	
Detector	VWD detector UV 260nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Column temp	40°C		
A, B eluent	A) Water with 0.1% Acetic acid B) MeOH with 0.1% Acetic acid		

(2) 시험법 유효성 검증 결과

(가) 특이성(Specificity)

- Daidzin과 Genistin의 Chromatogram : 2 종 isoflavones 표준물질과 시료를 같은 분석법으로 분석하여 검출된 Peak를 확인하여 동일 물질임을 확인하였다. 각각의 retention time을 아래 표 9에 제시하였다. 표준용액과 시료의 크로마토그램은 다음과 같다(그림 11).

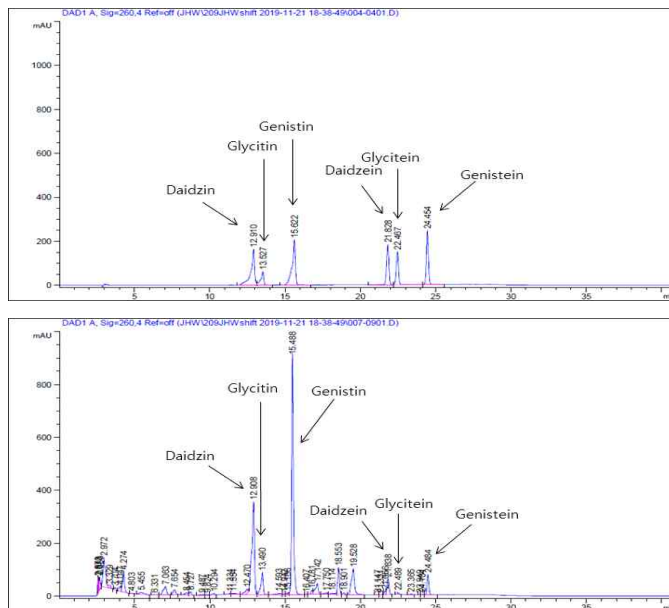


그림 11. 표준용액과 시료용액에서 isoflavones의 크로마토그램

표 9. 표준용액과 시료용액에서 daizin과 Genistin의 Retention times

	Retention time	
	Standard	Sample (30% ethanol 추출물)
Daidzin	12.910	12.908
Genistin	15.622	15.488

- Daidzin과 Genistin의 spectrum 확인 : 시료에서 검출된 크로마토그램이 표준용액과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시료의 spectrum을 확인하였다. 각각 Rt에서 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과, 표준용액과 시료에서 동일한 pattern의 spectrum을 확인하였다 (그림 12).

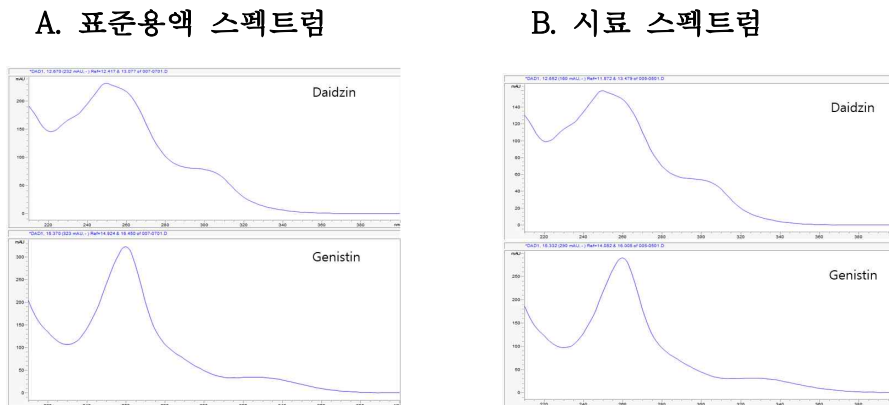


그림 12. Peak purity test : 시험용액 중 daidzin과 genistin peak 각 5점의 spectrum 분석

(나) 직선성 (Linearity)

- 표준용액의 직선성 : 표준 용액은 약 6mg을 5ml의 정용플라스크에 methanol과 DMSO를 19:1로 섞은 용매로 조제하여 사용하였다. 희석배수를 적용하여 5개 희석농도를 조제하였고 HPLC 분석에 사용하였다. 3회 반복실험 결과, Daidzin은 0.625 ~ 160 ug/ml 농도 범위에서 3회 모두 $R^2 = 1$ 로 평가되었다(표 10-1, 10-2, 10-3). Genistin은 0.469 ~ 120 ug/ml 농도 범위에서 2회의 $R^2 = 1$ 로, 1회는 0.9999로 평가되었다.

표 10-1. 표준용액을 이용한 검량선 (1차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (ug/ml)	Area	농도 (ug/ml)	Area
1	0.26	12.264	0.26	12.483
2	1.28	51.341	1.28	51.524
3	6.40	217.236	6.40	219.047
4	32.00	922.371	32.00	930.303
5	160.00	3728.272	160.00	3777.300
기울기		23.352		31.550
절편		-9.077		-10.478
R^2 값		1		1

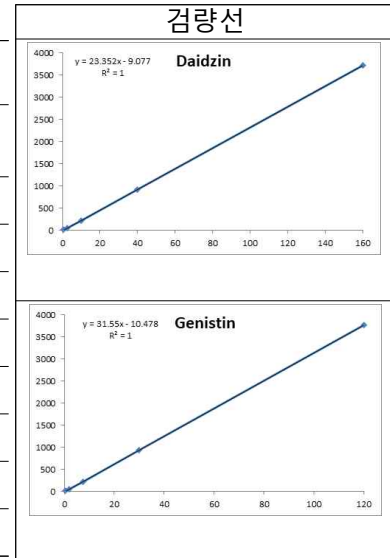


표 10-2. 표준용액을 이용한 검량선 (2차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (ug/ml)	Area	농도 (ug/ml)	Area
1	0.26	11.067	0.26	12.795
2	1.28	46.856	1.28	54.727
3	6.40	188.036	6.40	221.595
4	32.00	769.591	32.00	910.618
5	160.00	3157.1	160.00	3726.313
기울기		19.760		31.099
절편		-7.727		-8.995
R^2 값		1		1

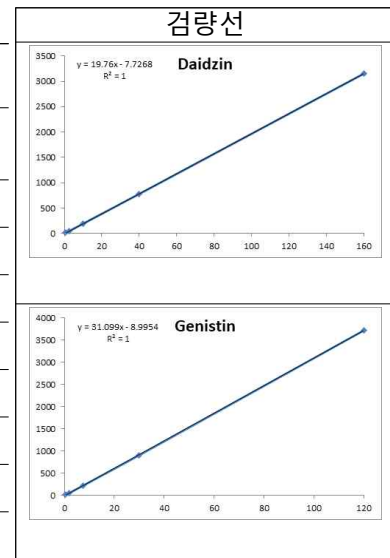


표 10-3. 표준용액을 이용한 검량선 (3차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (ug/ml)	Area	농도 (ug/ml)	Area
1	0.26	5.252	0.26	5.837
2	1.28	23.496	1.28	29.264
3	6.40	122.139	6.40	152.418
4	32.00	616.823	32.00	771.119
5	160.00	3196.385	160.00	4025.391
기울기		20.001		33.595
절편		-6.978		-10.714
R^2 값		1		0.9999

검량선

Daidzin

검량선

Genistin

- 시료의 직선성 : 시료를 농도별로 제조하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시료 (에탄올 추출물) 농도 25 mg/ml 의 농도를 목적농도 100%로 설정하였고 50~200% 범위에서 HPLC 분석을 수행하여 직선성을 평가하였다. Daidzin은 3회 모두 R^2 값이 0.999이상으로 평가되었고 Genistin은 2회는 0.999이상으로 1회는 0.9985로 평가되었다(표 11-1, 11-2, 11-3).

표 11-1. 시료에서 Daidzin과 Genistin에 검량선 (1차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (mg/ml)	Area	농도 (mg/ml)	Area
1	12.50	418.954	12.50	876.807
2	18.75	648.195	18.75	1335.686
3	25.00	862.669	25.00	1861.658
4	31.25	1088.853	31.25	2377.136
5	37.5	1277.124	37.5	2753.649
6	50.00	1717.880	50.00	3694.980
기울기		34.419		75.258
절편		-1.602		-45.036
R^2 값		0.9995		0.9985

검량선

Daidzin

검량선

Genistin

표 11-2. 시료에서 Daidzin과 Genistin에 검량선 (2차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (mg/ml)	Area	농도 (mg/ml)	Area
1	12.50	415.354	12.50	791.558
2	18.75	672.223	18.75	1256.012
3	25.00	903.512	25.00	1669.826
4	31.25	1145.403	31.25	2103.186
5	37.5	1367.409	37.5	2520.194
6	50.00	1816.358	50.00	3310.214
기울기		37.229		67.049
절편		-32.467		-13.764
R^2 값		0.9994		0.9993

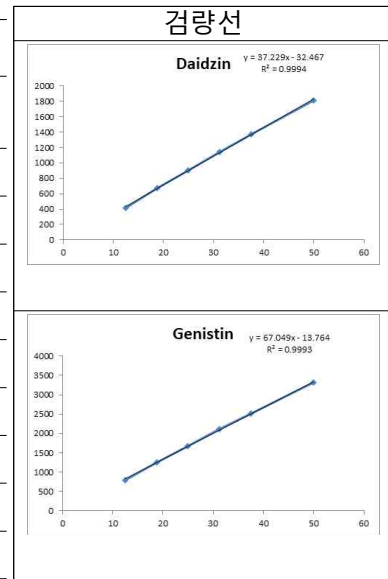
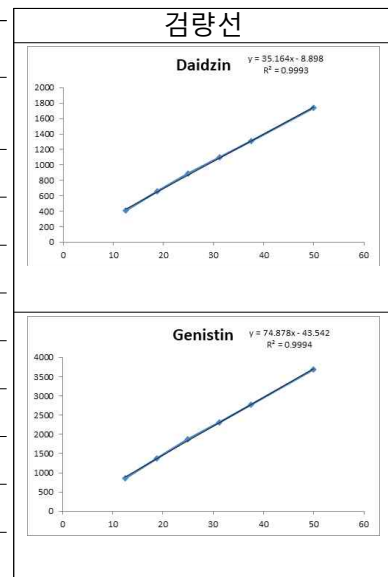


표 11-3. 시료에서 Daidzin과 Genistin에 검량선 (3차 실험)

STD	Daidzin		Genistin	
	농도 (mg/ml)	Area	농도 (mg/ml)	Area
1	12.50	412.564	12.50	858.321
2	18.75	654.611	18.75	1368.505
3	25.00	887.592	25.00	1864.773
4	31.25	1095.724	31.25	2304.281
5	37.5	1310.073	37.5	2762.005
6	50.00	1739.683	50.00	3684.557
기울기		35.164		74.878
절편		-8.898		-43.542
R^2 값		0.9993		0.9994



(다) 정확도 (Accuracy), 회수율(Recovery)

- 시료(에탄올 추출물)를 농도범위 80 ~ 120%에서 3종 농도를 선택하여 mg당 함량을 평가하여 평균농도를 설정하고 표준물질 3농도를 첨가하여 각각의 회수율을 평가하였다. 시료 1mg 당 함량은 Daidzin은 1.5562 ug/mg으로 Genistin은 2.4243 ug/mg로 평가되었다(표 12).
- Daidzin의 회수율은 97.43 ~ 99.47% 였으며 RSD는 3.1% 이하로 평가되었고, Genistin의 회수율은 97.23 ~ 103.89% 였으며 RSD는 4.02% 이하로 평가되어 기준인 5% 이하를 만족시키는 것으로 나타났다(표 13-1, 13-2).

표 12. 대두 에탄올 추출물에서 daidzin과 genistin의 함량 분석

성분	표준물질 (ug/mL)	원료 + 표준물질 (mg/L)	시료 채취량 (mg/ml)	검출농도 (ug/mL)	1mg 당 농도 (ug/mg)	평균 농도 (ug/mg)
Daidzin	0	-	30.8	48.4249	1.5722	1.5562
			36.0	55.3297	1.5369	
			41.6	64.8697	1.5594	
Genistin	0	-	30.8	73.3151	2.3804	2.4243
			36.0	86.5860	2.4052	
			41.6	103.4733	2.4873	

표 13-1. 대두 에탄올 추출물에서 표준용액 daidzin의 회수율 분석

원료 + 표준물질 (ug/mL)	시료 채취량 (mg/mL)	채취량 대비 계산농도 (ug/mL)	이론 농도 (ug/mL)	검출농도 (ug/mL)	회수율 (%)	회수율 평균 (%)	SD (%)	RSD (%)
시료 + 8.00	36.8	57.27	65.27	65.8264	100.86	99.47	2.40	2.41
	40.2	62.56	70.56	71.1530	100.84			
	40.4	62.87	70.87	68.5256	96.70			
시료 + 12.00	33.2	51.67	63.67	61.5687	96.71	97.68	2.67	2.73
	33.4	51.98	63.98	64.4194	100.69			
	39.0	60.70	72.70	69.5183	95.63			
시료 + 16.00	30.8	47.93	63.93	64.515	100.92	97.43	3.02	3.10
	32.8	51.04	67.04	64.2015	95.76			
	35.6	55.40	71.40	68.2581	95.60			

표 13-2. 대두 에탄올 추출물에서 표준용액 genistin의 회수율 분석

원료 + 표준물질 (ug/mL)	시료 채취량 (mg/mL)	채취량 대비 계산농도 (ug/mL)	이론 농도 (ug/mL)	검출농도 (ug/mL)	회수율 (%)	회수율 평균 (%)	SD (%)	RSD (%)
시료 + 6.00	36.8	89.21	95.21	92.2056	96.84	97.23	2.29	2.35
	40.2	97.46	103.46	98.4483	95.16			
	40.4	97.94	103.94	103.6109	99.68			
시료 + 9.00	33.2	80.49	89.49	89.9320	100.50	100.83	4.05	4.02
	33.4	80.97	89.97	94.4947	105.03			
	39.0	94.55	103.55	100.3902	96.95			
시료 + 12.00	30.8	74.67	86.67	92.6693	106.92	103.89	2.74	2.64
	32.8	79.52	91.52	92.9664	101.58			
	35.6	86.30	98.30	101.4240	103.17			

(라) 정밀도

- 시험법의 정밀성을 확인하기 위해 5회씩 시료를 조제하여 분석재현성을 실시하였다. 날짜별 3회, 실험자 2인 총 4회 시험을 수행하였고 아래 표 14-1, 14-2, 14-3, 14-4에 그 결과를 제시하였다.

표 14-1. 정밀성 검토를 위한 1차 분석

지표 물질	시료량 (mg)	Area	Concentration (ug/ml)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Daidzin	21.76	802.083	34.7362	1.5963	1.5955	0.0222	1.39
	23.12	853.304	36.9297	1.5973			
	24.48	903.995	39.1004	1.5972			
	27.20	983.116	42.4886	1.5620			
	29.92	1126.122	48.6125	1.6247			
Genistin	21.76	1684.86	53.7350	2.4694	2.4987	0.0420	1.68
	23.12	1799.892	57.3810	2.4819			
	24.48	1932.128	61.5723	2.5152			
	27.20	2102.642	66.9768	2.4624			
	29.92	2410.381	76.7309	2.5645			

표 14-2. 정밀성 검토를 위한 2차 분석

지표 물질	시료량 (mg)	Area	Concentration (ug/ml)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Daidzin	30.8	1121.740	48.4249	1.5722	1.5694	0.0230	1.47
	33.5	1217.638	52.5315	1.5681			
	35	1244.285	53.6726	1.5335			
	35.5	1315.016	56.7015	1.5972			
	36.3	1326.957	57.2128	1.5761			
Genistin	30.8	2302.614	73.3151	2.3803	2.4329	0.0549	2.25
	33.5	2610.478	83.0731	2.4798			
	35	2604.266	82.8762	2.3679			
	35.5	2768.997	88.0974	2.4816			
	36.3	2800.931	89.1096	2.4548			

표 14-3. 정밀성 검토를 위한 3차 분석

지표 물질	시료량 (mg)	Area	Concentration (ug/ml)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Daidzin	34.4	1223.940	52.8013	1.5349	1.5463	0.0096	0.62
	35.8	1278.838	55.1522	1.5406			
	36	1292.256	55.7269	1.548			
	36.2	1310.027	56.4879	1.5604			
	41.6	1494.394	64.3830	1.5477			
Genistin	34.4	2562.686	81.5583	2.3709	2.4154	0.0639	2.64
	35.8	2657.713	84.5702	2.3623			
	36	2690.625	85.6134	2.3781			
	36.2	2850.954	90.6951	2.5054			
	41.6	3218.772	102.3534	2.4604			

표 14-4. 정밀성 검토를 위한 4차 분석 (다른 분석자)

지표 물질	시료량 (mg)	Area	Concentration (ug/ml)	함량 (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Daidzin	36.4	1326.473	57.1921	1.5745	1.5470	0.0343	2.22
	38.8	1368.287	58.9827	1.5202			
	40.6	1418.495	61.1328	1.5057			
	42.4	1524.143	65.6569	1.5485			
	45.2	1665.064	71.6915	1.5861			
Genistin	36.4	2832.403	90.1072	2.4539	2.3908	0.0475	1.99
	38.8	2929.156	93.1738	2.4014			
	40.6	3072.428	97.7149	2.4068			
	42.4	3103.486	98.6993	2.3278			
	45.2	3360.751	106.8535	2.3640			

표 15. 대두 에탄올 추출물에서 daidzin과 genitin의 분석 재현성

지표성분	분석차수	각 실험별 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
Daidzin	1 차	1.5955	1.5646	0.0233	1.49
	2 차	1.5694			
	3 차	1.5463			
	4 차	1.5470			
Genistin	1 차	2.4987	2.4344	0.0462	1.90
	2 차	2.4329			
	3 차	2.4154			
	4 차	2.3908			

(마) 범위

- 대두 에탄올 추출물에서 분석 시험법의 직성성, 특이성, 정밀도를 고려할 때, daidain과 genistin의 정량범위는 각각 0.625 ~ 160.00 ug/ml 과 0.469 ~ 120.00 ug/ml 으로 평가되었다.

(바) 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

- 직선성에서 사용한 검량선의 y 절편의 표준편차(σ)와 검량선의 기울기(S)를 이용하여 LOD와 LOQ를 다음의 공식에서 산출하였다.
- $LOD = 3.3(\sigma/S)$ 와 $LOQ = 10(\sigma/S)$ 공식을 사용하였고 표준 검량선 3건의 기울기와 y절편을 표 16에 제시하였다.
- 따라서, $LOD = 3.3 * 1.064 / 21.038 = 0.1669$ 이며, $LOQ = 10 * 1.064 / 21.038 = 0.5058$ 으로 산출되었다.

표 16. 지표물질 검량선 3건의 기울기와 y 절편의 평균과 표준편차

지표물질	항목	1차	2차	3차	평균	편차
Daidzin	기울기	23.352	19.760	20.001	21.038	2.008
	y 절편	-9.077	-7.727	-6.978	-7.927	1.064
Genistin	기울기	31.550	31.099	33.595	32.081	1.330
	y 절편	-10.478	-8.996	-10.714	-10.063	0.931

다. 후보물질의 안전성 시험 모니터링

- 후보물질 3종 고삼, 길경, 대두 추출물에 대한 안전성 자료를 모니터링하였다. 건강기능식품 기능성원료 및 기준규격인정에 관한 규정의 14조 7목의 안전성에 관한 규정에 따라서 필요한 안전성 자료 및 시험 자료를 검토하였다.
- 길경과 대두는 섭취경험이 있는 식물 등을 제조 또는 가공한 것으로 물이나 주정을 이용한 단순한 추출물인 경우에 해당하며 알려진 부작용이 없기 때문에 독성시험자료를 산출하지 않아도 되는 것으로 확인되었다.
- 고삼은 전통의약에서 많이 사용한 경험이 있으나, 식품 원료로 그리고 건강기능식품 원료로 사용된 적이 없으므로 안전성 평가 자료를 모니터링하였다.

(1) 고삼 수추출물의 13주 반복독성시험 모니터링

- 고삼의 물추출물에 대한 안전성 평가 결과가 2015년 논문(Che JW et al. Genotoxicity and subchronic toxicity of Sophorae radix in rats: Hepatotoxic and genotoxic potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 71:379-387)으로 게재되어 논문을 검토하였고 그 결과는 다음과 같다.

- 고삼의 수추출물을 10 ~ 1500 mg/kg 농도 범위에서 13주 반복해서 경구투여 하였고, 그 결과 체중의 증가 및 간 무게의 증가가 관찰되었다. 혈중 alkaline phosphatase (ALP)와 alanine transaminase (ALT)가 높아져서 간 조직에 유해성으로 평가되었고, 적혈구, hemoglobine, hematocrit가 감소하여서 빈혈유발 가능성을 보고하였다. 따라서, NOAEL을 10mg/kg/day로 평가하였다.
- 위에 고삼의 안전성평가는 식품의약품안전처의 연구과제로 수행되었으며 고삼추출물의 제조 및 품질관리가 수행된 과제이며 GLP 기관에서 수행되었기 때문에 신뢰성이 있는 결과로 사료된다.

(2) 고삼 수추출물의 유전독성 시험

- 고삼 수추출물의 유전독성 시험은 박테리아 복귀돌연변이 시험, 세포주 활용 염색체이상시험 및 in vivo 마우스 소핵시험이 수행되었고 위의 13주 반복독성시험 기관에서 동일 수추출물로 수행하였으며 동일 논문에 게재 되었다.
- 고삼 수추출물은 박테리아 복귀돌연변이 시험에서 Salmonella tiphymurium 4종의 박테리아와 E. coli 1종의 박테리아에 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 확인되었으나, in vitro 포유동물세포주를 사용한 염색체이상시험에서는 양성물질로 평가되었다.
- in vitro 포유동물세포주에서 염색체이상 유발 물질 평가를 확인하기 위해 in vivo 생체 내에서 염색체이상 유발 여부를 확인하는 소핵시험을 수행하였으나, 생체 내 시험에서는 음성으로 판정되어 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판정되었다.
- 그러나, International conference of harmonization (ICH)의 수정 가이드라인에 따라 in vitro 포유동물세포주를 이용한 염색체이상 유발에 시험에서의 양성을 확인하는 방법으로 in vivo 소핵시험 외에 in vivo에서 한 가지 추가 시험을 더 수행할 필요를 확인하고 본 연구팀에서 in vivo Comet 시험을 최소한으로 수행하였고 그 결과는 다음과 같다.
- Comet 시험방법 : mice 수컷을 사용하였고 참고문헌의 용량을 고려하여 최고 한계 용량인 2,000와 1,000 mg/kg를 경구로 2회 24시간 간격으로 투여 후 21시간 간격의 3회 투여 후 3시간에 부검하였다. 간 조직을 적출하여 단세포 전기영동을 수행하였다.
- 결과는 다음 표 17에 제시하였다.

표 17. 마우스 간세포를 이용한 고삼 추출물의 생체 내 코멧 시험 결과

Target	Chemical	Dose (mg/kg/day)	Scored cells	Tail DNA (%)	Tail moment ²⁾
Liver	D.W	-	150	0.7±0.1 ¹⁾	0.2±0.1
	EMS	200	150	32.5±2.7	21.6±3.4
	Sophora flavescens	1000	150	2.9±1.1	2±1.1
		2000	150	2.9±1.6	2.5±1.4

¹⁾ Each value is Mean ± SD

²⁾ It is calculated by reflecting tail DNA and tail length
EMS; ethyl methyl sulfate

- 위의 모니터링 결과에 따라서 고삼추출물을 간 및 혈구 세포에 유해영향이 있기 때문에 후보물질에서 제외시키기로 하였고, 효능이 입증되어 수명의 질 개선 소재로 최종 선정된 대두추출물은 식품원료이므로 위에서 언급한 바와 같이 추가 안전성시험모니터링이 필요없는 것으로 확인하였다.

3. 리드물질의 산지 또는 제조 배치에 따른 추출물 분석 및 용매분획 연구

가. 대두 추출물의 산지 또는 제조 배치에 따른 지표물질 분석

(1) 산지별 대두 추출물의 함량 분석

- 산지별 대두 추출물의 함량 비교를 위하여 국내산 5종과 중국산 3종을 다음과 같이 구입하였고, 지표물질 daidzin과 genistin의 함량을 HPLC로 분석하였다.
- 추출조건은 초기 대량 시료 추출조건과 유사하게 하기 위하여 구입 대두를 10배의 30% 에탄올을 사용하였고 100°C 에서 2시간동안 추출하기 위해 실험실 환류장치를 사용하였다.
- HPLC 분석을 통한 지표물질의 함량은 아래 표 18, 19제시하였다.
- 산지마다 daidzin과 genistin의 함량에 많은 차이를 보이므로 함량 기준을 결정하는데 참고자료가 될 것으로 사료된다.

표 18. 국내산 대두의 산지별 및 중국산 대두의 daidzin 함량 분석

산지	분석시료량 (mg)	Area	검량선결과 (ug/ml)	함량평균 (mg/g)	표준편차 (mg/g)	RSD(%)
강원원주	52.3	1760	75.78	1.449	0.047	3.262
충남부여	49.8	2310	97.57	1.959	0.024	1.226
강원인제	50.8	6542	280.55	5.523	0.085	1.537
전남무안	52.0	2633	113.15	2.176	0.017	0.797
경기파주	51.2	2310	99.31	1.940	0.031	1.618
경북영주	60.45	1302	56.15	1.127	0.013	1.167
중국산 1	52.4	3406	146.25	2.791	0.046	1.636
중국산 2	48.2	2191	94.23	1.955	0.041	2.085
중국산 3	48.2	2394	102.89	2.135	0.034	1.604

표 19. 국내산 대두의 산지별 및 중국산 대두의 genistin 함량 분석

산지	분석시료량 (mg)	Area	검량선결과 (ug/ml)	함량평균 (mg/g)	표준편차 (mg/g)	RSD(%)
강원원주	52.3	3789	120.43	2.303	0.030	1.292
충남부여	49.8	2957	94.06	1.889	0.014	0.723
강원인제	50.8	7204	228.66	4.501	0.036	0.809
전남무안	52.0	3367	107.06	2.059	0.029	1.432
경기파주	51.2	3615	114.90	2.244	0.0111	0.495
경북영주	60.45	1787	56.97	1.144	0.0049	0.430
중국산 1	52.4	3741	118.92	2.269	0.029	1.272
중국산 2	48.2	2245	71.48	1.483	0.018	1.198
중국산 3	48.2	2369	75.40	1.564	0.015	0.938

(2) 제품의 지표물질 함량 분석

- 주관기관에서 대두의 에탄올 추출물로 수면의 질 개선을 위한 제품을 pouch 형태로 제조하였고 제품 5건을 제공하였으며 제공 받은 제품 5건에서 지표물질을 각각 3반복 분석하였고 그 결과를 표 20, 21에 평균, 표준편차 및 RSD로 제시하였다.
- Daidzin의 함량은 부형제를 포함하여 pouch 당 10 g 이었고 200mg을 취하여 HPLC 분석을 수행하였으며 pouch 당 daidzin의 함량은 2.678 ± 0.037 mg으로 평가되었고 pouch 당 genistin의 함량은 3.266 ± 0.053 mg으로 산출되었다.

표 20. 대두 에탄올 추출물을 포함한 수면의 질 개선 제품에서 daidzin 함량 분석

제품	분석시료량 (mg)	Area	검량선 결과 (ug/ml)	시료당 함량 평균 (mg/g)	제품당 함량 평균 (mg/pouch)	표준편차 (mg/pouch)	RSD (%)
1	200.2	1261	54.38	0.2716	2.716	0.014	0.531
2	201.8	1257	54.24	0.2688	2.688	0.021	0.780
3	200.0	1254	54.1	0.2705	2.705	0.086	3.170
4	200.6	1232	53.17	0.2650	2.650	0.092	3.485
5	202.8	1236	53.31	0.2629	2.629	0.015	0.560
평균					2.678 ± 0.037		1.382

표 21. 대두 에탄올 추출물을 포함한 수면의 질 개선 제품에서 genistin 함량 분석

제품	분석시료량 (mg)	Area	검량선 결과 (ug/ml)	시료당 함량 평균 (mg/g)	제품당 함량 평균 (mg/pouch)	표준편차 (mg/pouch)	RSD (%)
1	200.2	2071	66.75	0.3334	3.334	0.033	0.990
2	201.8	2018	64.29	0.3186	3.186	0.024	0.766
3	200.0	2054	65.43	0.3271	3.271	0.027	0.810
4	200.6	2054	65.43	0.3262	3.262	0.071	2.167
5	202.8	2087	66.47	0.3278	3.278	0.019	0.586
평균					3.266 ± 0.053		1.623

(3) 원액의 표준물질 함량 분석

- 주관기관에서 제공받은 제조를 위한 대두 에탄올 추출물 농축 원액을 3회 분석하였고 표 22 에 평균, 표준편차 및 RSD를 제시하였다.

표 22. 수면의 질 개선 제품을 위한 대두 에탄올 추출 농축원액에서 daidzin 함량 분석

제품	분석시료량 (mg)	Area	검량선 결과 (ug/ml)	농축 원액당 함량 평균 (mg/g)	제품당 함량 평균 (mg)	표준편차 (mg)	RSD (%)
1	202.4	2618	112.5	0.5558	2.407	0.057	2.368
2	205.8	2494	107.2	0.5207	2.255	0.024	1.059
3	206.6	2543	109.3	0.5290	2.291	0.076	3.325
평균					2.317 ± 0.0780		3.427

표 23. 수면의 질 개선 제품을 위한 대두 에탄올 추출 농축원액에서 genistin 함량 분석

제품	분석시료량 (mg)	Area	검량선 결과 (ug/ml)	농축 원액당 함량 평균 (mg/g)	제품당 함량 평균 (mg)	표준편차 (mg)	RSD (%)
1	200.2	4819	153.1	0.75632	3.275	0.00747	0.228
2	201.8	4919	156.3	0.75928	3.288	0.0285	0.867
3	200	4953	157.3	0.76142	3.297	0.0207	0.628
	200.6				3.287 ± 0.0111		0.337

나. 리드물질의 용매분획 제조 및 분획 성질 규명

(1) 대두 추출물 용매 분획 제조 및 HPLC 분석

- 유효성분을 분석하기 위한 용매분획을 조제하였고 협동연구 기관인 (주)이노파마스크린에 제공하였고 수면 효능과 관련된 in vitro 바이오마커 평가를 수행하도록 하였다.

- 용매 분획은 에탄올 추출물을 사용하였고, hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 용매를 사용하여 순차적으로 추출하였고 최종 water 층까지 감압농축 또는 동결 건조하여 건조 분획을 수득하였다.
- 용매분획에서 지표물질의 HPLC 분석을 수행하였고 HPLC 프로파일은 아래 그림 13에 제시하였다.
- 비배당체(daidzein, genistein)는 dichloromethane 층과 ethylacetate 층으로 이양된 것으로 나타났고, 대부분의 배당체(daidzin, genistin)는 ethylacetate 층으로 이양되었고 일부가 butanol에서도 관찰되었다. Hexane 층에서 소량 확인된 배당체는 hexane 추출시 점성이 있는 lecitin 함유 물질 등과 함께 hexane 층으로 넘어온 것으로 생각된다. 물 층에는 isoflavones이 검출되지 않아서 모두 용매 분획으로 이양된 것으로 확인되었다. Glycitin은 아주 소량 ethylacetate 층에서 관찰되었고 glycitein은 대두의 에탄올 추출물에서와 마찬가지로 검출되지 않았다.

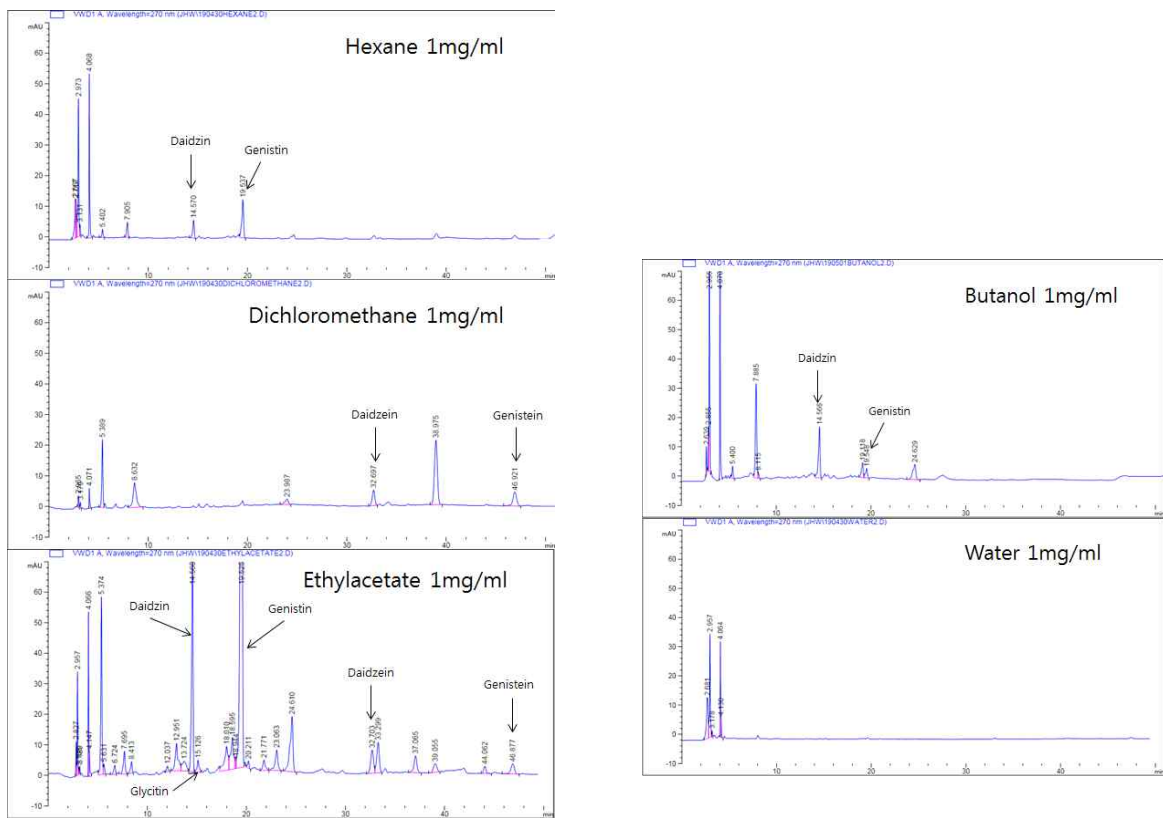


그림 13. 대두 에탄올 추출물의 유기용매 분획에서 isoflavones HPLC 분석 프로파일

(2) 대두 추출물 용매 분획의 성분분석

(주)이노과마스크린에서 수면의 질과 관련된 바이오마커들을 in vitro에서 수행한 결과 ethylacetate (EA) 층에서 탁월한 효과 그리고 butanol (BOH) 층에서도 다소 효과가 인정되어 두 분획에 대한 추가 분석을 진행하였다. UPLC/MS를 사용하여 분석하고 분획을 구성하는 물질들을 동정하였다.

(가) 시험방법

- 분석 시료 용액 조제 : 메탄올에 각 분획을 용해하였고 분석을 위한 농도는 EA과 BOH 각 0.25mg/ml, 0.5mg/ml로 하였다.
- LC, MS, MS/MS 및 Data process 조건

표 24. 대두 에탄올 추출물 용매 분획(EA & BOH)의 UPLC/MS 분석 조건

Instrument	UPLC-Q-TOF MS (Vion, Waters, Milford, MA, USA)		
LC 조건 (gradient)	Column	Acquity UPLC BEH C ₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm Waters)	
	Solvent A	water with 0.1% formic acid (FA)	
	Solvent B	ACN with 0.1% FA	
	Flow rate	0.35 mL/min	
	Inject volume	1 uL	
MS 조건 ESI-mode	Conditions	ESI-positive mode	ESI-negative mode
	Capillary voltage	3 kV	2.5 kV
	Sample cone voltage	30 V	20 V
	Desolvation gas flow	800 L/h	900 L/h
	Lock mass : Leucine-enkephalin	556.2771 Da	554.2615 Da
	Cone gas flow	30 L/h	
	Desolvation temperature	400 °C	
	Ion source temperature	100 °C	
	Data collection	<i>m/z</i> 50-1500 range with a scan time of 0.2 s	
MS/MS 조건	Collision energy ramp	10 - 40 eV (<i>m/z</i> 50-1500)	
Data process	Program	UNIFI version 1.8.2.169 (Waters)	
	LC/MS 물질 동정	Chemspider database, Metlin database (metlin.scripps.edu), human metabolome database (www.hmdb.ca), EZmass database, authentic standards	

(나) 분석 결과

- Chromatogram을 positive mode와 negative mode에서 분석하였고 그 결과를 다음 그림14와 15에 제시하였다.
- 8분 이후의 물질들은 지용성이 강한 물질들이므로 8분 이내의 피크이면서 크기가 크고 두 분획에서 동일하게 관찰되는 피크를 중심으로 물질을 동정하였고 다음의 그림에 물질명과 함께 제시하였다(표 25, 26).

- 에틸아세테이트 층에는 다양한 성분이 함유 되어있는 것으로 나타났으며, isoflavones이 주 성분으로 다양한 종류의 isoflavones 및 isoflavone derivatives (1,3,4,5,6,7,8)들이 검출되었다. HPLC 분석에서 확인된 daidzin, genistin 그리고 daidzein이 확인되었고 O-6-acetodaidzin과 O-6-acetogenistin 그리고 malonyl daidzin과 malonyl genistin이 확인되었다. Saponins (11,12,13)도 다양한 종류가 검출되었으나 상대적인 피크의 크기가 작은 것으로 관찰되었다. 그 외에도 quercitrin과 kaempferol 이 함유된 것으로 관찰되었다.
- 부탄올 분획에는 isoflavones 보다는 saponins이 주성분으로 확인되었으며, isoflavones으로는 daidzin과 genistin이 함유되어 있는 것으로 나타났고, saponin으로는 soyasaponin I 이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

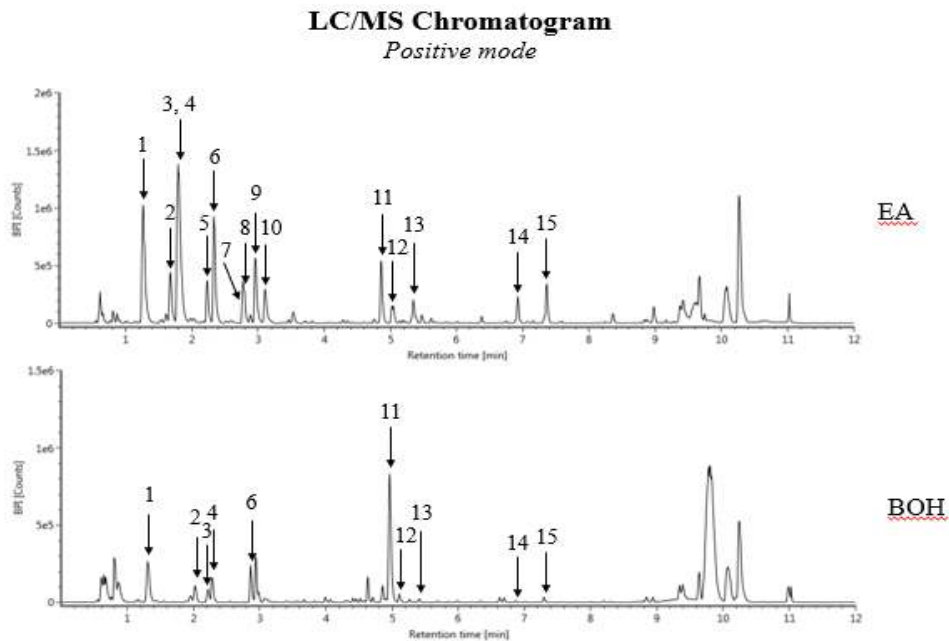


그림 14. 대두 에탄올 추출물의 용매 분획에 대한 UPLC/MS positive mode 분석 프로파일

표 25. UPLC/MS positive mode 분석에서 주요 peak에 기여하는 대사물질 동정

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	MS Fragments
1	1.26	Daidzin	417.1184	255
2	1.67	Quercitrin	449.1081	287
3	1.78	malonyldaidzin	503.1192	255
4	1.80	Genistin	433.1132	145, 255, 271
5	2.23	6-O-Acetyldaidzin	459.1289	255
6	2.33	malonylgenistin	519.1145	255, 271
7	2.77	Daidzein	255.0654	237, 137
8	2.79	6-O-Acetylgenistin	475.1239	271
9	2.96	Kaempferol	287.0552	153
10	3.10	Porphyrillic Acid	315.0501	271, 287
11	4.86	Soyasaponin I	943.528	423, 441, 599, 797
12	5.02	Soyasaponin II	913.5167	423, 441, 599
13	5.35	Soyasaponin VI	1069.5562	423, 439, 567, 743
14	6.92	LPC(18:2)	520.3405	184, 104
15	7.36	LPC(16:0)	496.3403	184, 104

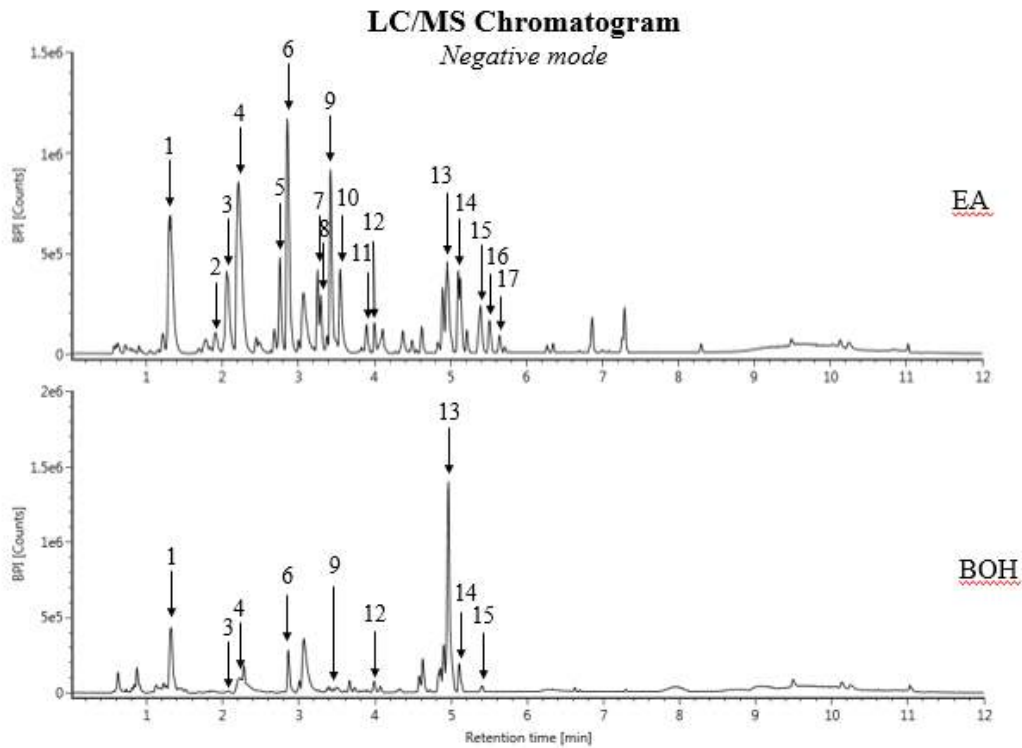


그림 15. 대두 에탄올 추출물의 용매 분획에 대한 UPLC/MS negative mode 분석 프로파일

표 26. UPLC/MS negative mode 분석에서 주요 peak에 기여하는 대사물질 동정

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M-H)	MS Fragments
1	1.31	Daidzin	461.1089	253
2	1.91	isoquercetin	463.0883	301
3	2.06	Quercitrin	447.0932	283, 285
4	2.21	Genistin	477.1039	133, 268, 269
5	2.76	6-O-Acetyldaidzin	503.1196	252, 253
6	2.86	malonylgenistin	517.0995	269
7	3.25	Daidzein	253.0507	135
8	3.29	6-O-Acetylgenistin	473.1097	268, 269
9	3.43	Kaempferol / luteolin	285.0403	133
10	3.55	wedelolactone	313.0353	298
11	3.90	Genistein	269.0458	117
12	4.00	Asparanin C	841.4599	633
13	4.96	Soyasaponin I	987.5153	927
14	5.11	Soyasaponin II	911.5002	633
15	5.39	Soyasaponin VI	1113.5471	939
16	5.52	TR-saponin B	1037.5307	633
17	5.65	Avermectin B2b	921.4848	

2-5 연구개발성과

가. 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	고삼 추출물 또는 마트린을 포함하는 진정 또는 수면유도용 조성물	대한민국	경희대 산학협력단	2019.02.14	10-2019-0017086				
2	5-HT2c receptor 길항 물질의 탐색 방법	대한민국	주식회사 이노파마스크린	2018.06.25	10-2018-0072610	주식회사 이노파마스크린	10-2091792-0000	2020.03.16	100%
3	국내 농작물 대두를 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품 개발	대한민국	경희대 산학협력단	2019.11.07	10-2019-0141-996				
4	대두 추출물을 포함하는 불면증 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법	대한민국	경희대 산학협력단	2020.11.09	10-2020-0148926				

나. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Neuroprotective Effect of Bean Phosphatidylserine on TMT-Induced Memory Deficits in a Rat Model	International journal of molecular science	Minsoo ark ye	21	swiss	MDPI	SCIE	2020.07	ijms21144901

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 최종목표

- In vitro & In vivo 수면효과 확인 및 기전규명
- 지표물질 선정 및 기준 규격 확립 및 안정성 확보
- 건강기능 식품 원료인정을 위한 인체적용시험 수행
- 원료의 최적공정, 시제품 개발 및 제품화 연구

3.2 세부목표 달성도

기관명	연차	연구개발목표	연구개발달성내용	달성도
경방신약	1	원료가공연구 및 파일럿생산 등	1) 고삼, 길경, 대두의 시험실시 2) 가공을 위한 추출시험 3) CRO 및 임상기관 선정	100 %
	2	파일럿 시제품 제조연구 원료 안정성, 인체시험준비	1) 파일럿 규모의 원료 제조조건 선정 2) 원료에 대한 안정성시험 3) 인체시험 업무위탁계약체결	100 %
	3	대량생산공정연구, 안정성, 인체적용시험, 사업화방안 및 비즈니스모델	1) 제품의 제조규모 증량제조 2) 원료 및 제품의 안정성 시험 3) 인체적용시험 실시 4) 복용의 편리성을 위한 제형결정	100 %
이노파마 스크린	1	1) 5-HT2c 수용체에 의한 추출물 기능성 평가 2) GABA 수용체에 의한 추출물 기능성 평가	1) 단백질 칩을 이용하여 물/에탄올 추출물에 대한 5-HT2c 수용체 결합력 분석 2) 단백질 칩을 이용하여 물/에탄올 추출물에 대한 GABA 수용체 결합력 분석	100 %
	2	1) 5-HT2c 수용체에 의한 후보추출물 기능성 평가 2) GABA 수용체에 의한 후보 추출물 기능성 평가 3) in vitro 세포 기반 수면 효능 작용기전 연구	1) 단백질 칩을 이용하여 대두 용매별 추출물에 대한 5-HT2c 수용체 결합력 분석 2) 단백질 칩을 이용하여 대두 용매별 추출물에 대한 GABA 수용체 결합력 분석 3) Ethyl acetate 추출물에 의한 세포내 단백질 발현변화 확인	100 %
	3	1) 5-HT2c 수용체에 의한 유효성분 기능성 평가 2) GABA 수용체에 의한 유효성분 기능성 평가 3) in vitro 세포 기반 수면 효능 작용기전 연구	1) 단백질 칩을 이용하여 유효성분 isoflavone 6종에 대한 5-HT2c 수용체 결합력 분석 2) 단백질 칩을 이용하여 유효성분 isoflavone 6종에 대한 GABA 수용체 결합력 분석 3) 30% 에탄올 추출물에 의한 세포내 단백질 발현변화 확인	100 %

기관명	연차	연구개발목표	연구개발달성내용	달성도
경희 대학교	1	후보추출물(3가지)의 in vivo 수면 효과 평가를 통한 리드농산물도출	1) 후보추출물 (3가지)의 in vivo 에서 total time 측정하여 수면 효과 평가 확인 2) Locomotor activity를 통하여 후보 추출물의 행동적 변화 확인	100 %
	2	리드추출물에 대한 in vivo 수면효과의 기전연구 및 신경 화학적 효과 규명	1) 전기충격으로 인한 스트레스로 유발된 수면장애 동물 모델 확립 2) 스트레스 유발 수면장애 동물모델에서 뇌파 변화 측정 3) 스트레스 유발 수면장애 동물모델에서 약물투여후 수면증진효과 확인	100 %
	3	1) in vivo 수면효과 기전연구 2) 유효성분분획 또는 유효성분에 대한 in vivo 수면효과 평가	1) 후보물질 중 EEG 분석결과 가장 효능이 좋은 대두추출물과 그 유효성분 확인 2) 대두추출물과 그 유효성분인 Genistein투여후 PVN에서CRF 확인 3) 대두추출물과 그 유효성분인 Genistein투여후 PVN에서 c-fos 확인	100 %
호서 대학교	1	자료조사 및 성분분석을 통한 지표물질 선정	1) 각 후보물질의 지표성분 선정 2) 지표성분의 분석방향 정립	100 %
	2	분석법 밸리데이션 연구	1) 2 종이상의 지표성분 분석법 2) 밸리데이션 실시 3) 산지별 배치별 추출물의 분석 4) 안전성평가	100 %
	3	1) 용매분획제조 2) 용매분획 성분 분석	1) 용매분획의 제조 2) 용매분획 성분 분석	100 %

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 식약처 개별인증을 실시하지 못한 부분

- * 본과제의 목표는 기능성식품소재 및 제품개발에 있다.
- * 효능과 작용기전을 밝히고 동물시험을 통해 인체에 적용가능한 양을 산출하여 제제화 연구를 진행하며, 한편으로는 인체적용시험에 필요한 시험제품과 대조제품을 제조하였다.
- * 본과제의 연구항목 중 식약처 개별인증을 염두에 둔 인체적용시험은 시험제품과 대조제품을 가지고 CRO 및 병원에서 실시하였으며 그 결과보고서도 제출하였다.
- * 한가지 아쉬운 점은 시험제품에서 나타난 효과가 대조제품에서도 동일하게 나타나는 것으로 나와서 시험제품의 우월성을 찾기가 어려웠다.
- * 이에 따라 식약처 개별인증을 위한 신청이 이루어지지 못함이 아쉽다.
- * 추후 기회가 주어진다면 새로운 제형으로 본 제품의 개발을 실시하여 도전해보고 싶은 의향이 있다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 1) 원료의 추출방법 및 농축방법의 표준화를 달성하여 제품의 제조를 위한 표준작업방법으로 설정하여 자사 및 타사에서 제조행위를 수행할 때 많은 도움이 될 것으로 판단됨.
- 2) 제품의 제조방법은 본 제품에 잘 적용될 수 있는 방법으로 제조하였으며, 제조공정상 특 특별히 주의해야 할 사항은 없도록 설계되었다. 제조의 방법은 편리성과 용이성이 있으며 안전하고 신속하게 제조할 수 있어서 제조에 도움이 될 것으로 판단됨.
- 3) 시험항목 중 지표성분의 분석에 관해서는 지표성분으로 다이드진과 게니스틴을 설정하였으며 농축액과 제품에서의 분석법을 설정하였고 설정된 분석법에 대하여 밸리데이션을 통해 타당성을 입증하였다.
이 결과를 통해 본 연구에서 사용한 소재를 가지고 제조하여 품질검사를 실시할 때 많은 도움이 될 것으로 판단됨.
- 4) 안정성 시험은 가속시험 6 개월이 종료되어 최소 24 개월의 유통기한 설정이 가능하며, 원료(대두농축액)에 대한 장기보존시험을 진행하여 36 개월의 유통기한동안 경시변화가 없음을 확인하여 유통기한 설정에 도움이 될 것으로 판단됨.
- 5) 기능성식품으로의 출시 가능여부는 본 연구에서 어려울 것으로 판단되나, 일반 식품으로의 출시를 통해 새로운 시장의 형성은 가능하다고 판단됨.

붙임. 참고문헌

- 1) 식약처 시험법 밸리데이션 가이드라인
- 2) 식약처 건강기능식품 공전 해설서
- 3) ROGULJA, Dragana; YOUNG, Michael W. Control of sleep by cyclin A and its regulator. *Science*, 2012, 335.6076: 1617-1621.
- 4) D. J. S. Afonso, D. Liu, D. R. Machado, H. Pan, J. E. C. Jepson, D. Rogulja, K. Koh, TARANIS functions with Cyclin A and Cdk1 in a novel arousal center to control sleep in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 25, 1717-1726 (2015).
- 5) Lee, Daniel A., et al. Evolutionarily conserved regulation of sleep by epidermal growth factor receptor signaling. *Science advances* 5.11 (2019): eaax4249.
- 6) Suyun Miao, Yan Liu, Ling Zhang, Min Shan, Zaijian Miao, Effects of MAPK/ERK pathway on learning and memory in sleep deprivation rats. *Int J Clin Exp Med* 2018;11(9):9160-9166
- 7) ZHU, Yong, et al. Chronic sleep restriction induces changes in the mandibular condylar cartilage of rats: roles of Akt, Bad and Caspase-3. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2014, 7.9: 2585.
- 8) SOMARAJAN, Bindu I.; KHANDAY, Mudasir A.; MALLICK, Birendra N. Rapid eye movement sleep deprivation induces neuronal apoptosis by noradrenaline acting on Alpha1 adrenoceptor and by triggering mitochondrial intrinsic pathway. *Frontiers in neurology*, 2016, 7: 25.
- 9) SOKOŁOWSKA, Paulina, et al. Orexins protect neuronal cell cultures against hypoxic stress: an involvement of Akt signaling. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, 52.1: 48-55.
- 10) CHANG, Xiaocen, et al. Orexin-A regulates cell apoptosis in human H295R adrenocortical cells via orexin receptor type 1 through the AKT signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 2015, 12.5: 7582-7588.
- 11) Chen J, Duan Y, Zhang X, Ye Y, Ge B, Chen J. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Funct.* 2015 Mar;6(3):995-1000
- 12) Li Y, Sarkar FH. Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul;8(7):2369-77
- 13) Li YL, Wang Z, Kong D, Li R, Sarkar SH, Sarkar FH. Regulation of Akt/FOXO3a/GSK-3beta/AR signaling network by isoflavone in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 Oct 10;283(41):27707-16

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내 농작물을 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발				
	(영문) The development of the food material and product to improving the sleeping quality using crops				
주관연구기관	경방신약주식회사		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 연구개발부	
참 여 기 업	이노파마스크린주식회사			(성명) 이옥원	
총연구개발비 (1,080,000 천원)	계	1,080,000천원	총 연구 기간	2017.11.01. ~ 2020. 10. 31(3년)	
	정부출연 연구개발비	810,000천원	총 참 여 수	총 인원	19 명
	기업부담금	270,000천원		내부인원	19 명
	연구기관부담금	-		외부인원	0 명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - in vitro & in vivo 수면효과확인 및 기전규명 - 지표물질 선정 및 기준규격 확립 및 안정성 확보 - 건강기능 식품 원료인정을 위한 인체적용시험 수행 - 원료의 최적공정, 시제품 개발 및 제품화연구 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - in vitro & in vivo 수면효과확인 및 기전규명 <ul style="list-style-type: none"> → 협동기관인 이노파마스크린 및 경희대학교에서 수행하여 효과와 기전을 규명함. - 지표물질 선정 및 기준규격 확립 및 안정성 확보 <ul style="list-style-type: none"> → 주관기관인 경방신약과 협동기관인 호서대학교에서 수행하여 지표물질선정, 기준규격확립에 따른 안정성 확보 - 건강기능 식품 원료인정을 위한 인체적용시험 수행 <ul style="list-style-type: none"> → 주관기관인 경방신약에서 시험제품과 대조제품을 제조하여 CRO와 임상시험실시. - 원료의 최적공정, 시제품 개발 및 제품화연구 <ul style="list-style-type: none"> → 주관기관인 경방신약에서 시제품개발 및 제조, 제품화를 위한 실생산규모의 제조 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료제조공정과 제품제조공정 및 품질관리방법을 활용가능도록 함. - 안정성시험을 토대로 유통기한 설정을 하였으며, 유통기간의 증가를 위한 시험으로 안정적인 생산이 가능하게 함. - 특히, 논문등으로 유사한 타연구에 도움이 될 것으로 보임. 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	117080-03		
사업구분	자유용모사업				
연구분야	자유연구		과제구분	단위	
사업명	고부가가치기술개발사업			주관	
총괄과제			총괄책임자		
과제명	국내 농작물을 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	경방신약주식회사		연구책임자	이옥원	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.11~2018.10	270,000	90,000	360,000
	2차연도	2018.11~2019.10	270,000	90,000	360,000
	3차연도	2019.11~2020.10	270,000	90,000	360,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	2017.11~2020.10	810,000	270,000	1,080,000
참여기업	이노파마스크린				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 12. 09

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경방신약주식회사	부장	이옥원

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

수면의 질 관련 제품들은 그리 많지 않은 상황에서 본 연구는 수면의 질 연구에 많은 도움을 주었다고 판단된다.

원료의 선정, 효능과 기전의 연구, 제조방법의 설정, 지표성분의 설정 및 시험법의 설정 분석의 제조 및 시험등은 본 연구에 많은 도움이 되었다고 본다.

아쉬운 점은 임상시험의 결과가 만족스럽지 못하다는 부분이 있긴 하지만, 임상시험을 실시한 것은 향후 이와 같은 연구에 도움이 될 것으로 본다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구개발을 통해 얻은 결실은 향후 연구에 소중하게 쓰일 것으로 보이며, 원료물질의 제조공정에 대한 개선연구 (추출용매, 수득률, 지표성분의 함량 등)에 활용될 것으로 본다.

효능연구와 기전연구에 추가적인 사항을 접목할 가능성을 배제할 수 없고 이로인해 새로운 연구가 활발히 진행될 것으로 본다.

제품의 제조는 본 연구에서는 연조엑스제로의 제조가 이루어졌지만, 원료물질의 제조공정을 바탕으로 제품의 제형개선과 제조방법의 개선이 이루어질 것으로 본다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

원료물질의 제조방법은 타연구 또는 타기관에서 참고할 수 있다고 판단되며, 이를 토대로 좀 더 개선된 방법을 사용할 수 있을 것으로 본다.

제품의 제조방법 또한 어려운 공정이 포함된 것이 아니고, 특별한 가공공정이 있는 것이 아니므로 이 제품 또는 이러한 공정을 사용하고자 하는 업체 또는 기관에서 쉽게 응용이 가능할 것으로 본다.

효능 및 기전연구는 타 연구기관에서 활용이 가능할 것으로 본다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 위해 4 개 기관에서 각자 맡은바의 연구를 성실히 수행한 것으로 판단된다. 현 시점이 코로나19 상황임을 감안해 대면미팅을 하지 못한 점은 아쉽지만, 국가적인 상황의 어려움 속에서도 각기관에서 열심히 연구를 수행하였다고 판단된다.

이 과제를 위해 노력하고 고민하고 각 기관에서 수행가능한 범위에서 최대한 역할을 다했다고 본다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1) 특허

후보추출물에 대한 특허로는 고삼추출물 또는 마트린을 포함하는 진정 또는 수면유도용 조성물 (출원일자 : 2019.02.14.)

본 연구에서 출원한 특허는 국내 농작물 대두를 활용한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발 (출원일자 : 2019. 11.07)

2) 논문

- Sedative-hypnotic activity of traditional medicinal plants in the rat (eCAM)

- Effect of modified Yukmijihwang-tang on the sleep quality in the rat (eCAM)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원료가공연구 및 파일럿생산	5	5	연구의 수행은 잘 이루어짐
대량생산공정연구 및 안정성	10	10	2차년도 미진한 부분을 3차년도에 이행함
인체적용시험	10	10	3차년도에 실시하여 결과를 얻음
5-HT2c 및 GABA 수용체에 의한 추출물, 후보추출물 및 유효성분 기능성 평가	15	15	잘 이루어짐
in vitro 세포기반 수면효능 작용기전 연구	10	10	잘 이루어짐
in vivo 기반최종후보물질 선정	10	10	잘 이루어짐
in vivo 투여회수와 투여기간의 최적화를 통한 투여조건 최적화	10	10	잘 이루어짐
리드추출물의 기전연구 및 유효성분의 in vivo 수면증진 평가	5	5	잘 이루어짐
자료조사, 성분분석을 통한 지표물질 선정	5	5	잘 이루어짐
분석법 밸리데이션 연구	10	10	잘 이루어짐
용매분획제조 및 성분분석	10	10	잘 이루어짐
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제는 연구기간 총 3 년에 걸친 공동연구였다. 주관기관인 경방신약주식회사와 참여기업인 이노파마스크린, 협동기관인 경희대학교 및 호서대학교 등 4 개의 기관에서 각자의 역할을 적절하게 분배하여 제조, in vitro, iv vivo 및 분석에 대한 연구를 진행하였다.

각 기관에서 각자의 연구를 통해 위와 같은 결과를 얻었으며 코로나사태로 대면미팅을 진행하는 것이 쉽지 않은 상황에서도 서로 소통하며 연구를 하였다.

한가지 아쉬운 점은 개별인증을 위한 시험에서 만족할 만한 결과를 나타내지 못했다는 점과 이로인해 개별인증 신청을 하지 못한점이 아쉬움으로 남는다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

지난 2년간 평가위원들로부터 좋은 조언을 많이 들었다. 이에 힘입어 연구에 더욱 매진할 수 있었으며, 과제가 종료된 상황에서 좋은 성과들을 보였다.

평가시 다음의 사항을 고려해주었으면 한다.

- 1) 원료에 대한 안정성시험은 원료물질의 시험이 종료된 시점으로부터 시험을 계획하여 가속시험은 종료되었으나, 장기안정성시험은 진행 중인 점.
- 2) 임상시험을 실시하여으며 이를 토대로 개별인증신청을 하고자 하였으나, 개별인증을 신청할 만큼 결과가 좋게 나오지는 않았다는 점.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구결과의 활용방안

- 1) 원료의 구입, 원료물질의 제조, 제품의 제조방법등은 품목제조보고시에 제출할 수 있는 자료가 되며 이를 토대로 제품출시에 활용할 예정
- 2) 안정성시험의 결과는 유통기한 설정에 크게 활용이 가능함.
- 3) 물질특허 및 논문은 타기관에서 유사한 연구를 진행할 시 참고자료로 활용이 가능함.
- 4) 연구를 통해 배출한 인력은 본 연구 및 유사연구에서 큰 역할을 하는데 활용 가능함.
- 5) 일반식품으로의 출시를 통해 재배자, 제품공급자의 수익창출에 활용할 수 있음.

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	국내 농작물을 활요한 수면의 질 개선 기능성 식품소재 및 제품개발			
주관연구기관	경방신약주식회사		주관연구책임자	이 옥 원
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	810,000,000	270,000,000		1,080,000,000
연구개발기간	2017. 11. 01 ~ 2020. 10. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(제품제조)) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 원료의 최적공정	원료물질 제조방법연구를 통한 최적공정 확립
② 원료물질 및 제품의 안정성 시험	원료물질과 제품에 대한 가속시험과 장기보존시험의 안정성시험 실시로 경시변화 및 유통기한설정을 위한 시험완료
③ 실생산규모의 제조연구 및 제품화	파이롯트규모의 제조를 통해 제품의 처방을 확정하고, 실생산규모로의 제조단위 확대 적용
④ 인체적용시험	확정된 처방으로 인체적용시험을 위한 시험제품과 대조제품을 제조하고 품질관리 실시하여 시험기관에 전달하여 임상시험 실시
⑤ 5-HT2c 및 GABA 수용체에 의한 추출물, 후보추출물 및 유효성분 기능성평가	3차년도 기간을 연차별로 구분하여 실시함.
⑥ in vitro 세포기반 수면효능 작용기전연구	3차년도 기간을 연차별로 구분하여 실시함.
⑦ in vivo 후보물질선정, 투여조건 최적화	최종물질선정을 수행하여, 투여조건 최적화를 이루었으며 이를 통해 주관기관의 제품화 연구가 가능하도록 하였음.
⑧ 리드추출물의 기전연구 및 유효성분의 in vivo 수면증진 평가	확정된 물질을 가지고 수면증진을 평가함.
⑨ 자료조사, 성분분석을 통한 지표물질 선정	한약서등을 참고하여 자료를 조사하였으며 각 물질별 지표물질을 선정하였음.
⑩ 분석법 밸리데이션, 용매분획제조	시험법을 설정하여 밸리데이션을 실시하였으며 용매별 분획을 제조하여 협동기관에 송부함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만원	백 만원	백 만원	백 만원	명	백 만원	건	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	15	10		15		10	5		10				20	5		10				
최종목표	2	1		1		1			1		1	2		1		2				
연구기간내 달성실적	2	1		0		0	0		3		2			0		2				
달성율(%)	100	100		0		0	0		300		200			0		100				

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	5-HT2c와 GABA receptor 단백질을 이용한 HTS(high-throughput screening)
②	천연물 지표성분 선정 및 분석법 검증기술
③	
·	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해	정책 자료	기타
①의 기술						V	V				V
②의 기술					V			V	V		
③의 기술											
·											
·											

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	○ 본 연구를 통해 개발된 단백질칩은 의약품 관련 산업, 특히 수면, 우울증 등과 관련된 분야에서 GABA receptor와 5-HT2c receptor의 활성을 제어하는 새로운 물질 발굴에 응용할 수 있으며 고부가가치 제품생산에 크게 기여할 것으로 예상함. ○ GABA receptor와 5-HT2c receptor를 활용하는 기초바이오 연구 분야에서 본 연구를 통해 개발된 단백질칩의 활용도가 클 것으로 전망함.
②의 기술	천연물의 소재 개발에 지표물질 선정 및 분석법 확립은 필수요건임. 모든 천연물 제품에 기술을 적용할 수 있으므로 활용도가 높은 것으로 기대됨.
③의 기술	
·	
·	

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																			
최종목표						1									1				
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획						1	180												

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) 기술 이전 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 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.