발 간 등 록 번 호
11-1541000-000756-01

보안과제( ), 일반과제(●) 과제번호 108135-2

활성성분 연구와 코카시언 대상으로 한 임상연구를 통한 식물성에스트로겐 특허소재의 세계 시장 석권 추진 연구

(Globalization of Korean proprietary standardized phytoestrogen by the study of active ingredients and clinical effectiveness on Caucasian)

(주)내츄럴엔도텍

농 림 수 산 식 품 부

농림수산식품자료실

0000631

0.7
239ㅎ
011-32

편집순서 2

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “활성성분 연구와 코카시언 대상으로 한 임상연구를 통한
식물성에스트로겐 특허소재의 세계 시장 석권 추진 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 12 월 18일

주관연구기관명 : (주)내츄럴엔도텍
주관연구책임자 : 곽 보 연
세부연구책임자 : 곽 보 연
연 구 원 : 이 권 택
연 구 원 : 이 관 욱
연 구 원 : 이 재 경
연 구 원 : 이 아 름
연 구 원 : 강 병 훈
협동연구기관명 : 한양 대학교
협동연구책임자 : 이 현 규

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

활성성분 연구와 코카시언 대상으로 한 임상연구를 통한 식물성에스트로겐 특허소재의 세계 시장 석권 추진 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적

백수오등 복합추출물의 세 가지 생약에서 활성분획과 활성성분을 분리 규명하여 갱년기 증상 개선의 기작을 밝히는 기초자료를 축적하고자 하였다. 농가의 소득증대 목적으로 특용작물을 활용한 고부가가치 제품의 미국시장을 포함 전세계 시장 석권을 위해 독성시험 및 미국인을 대상으로 백수오등 복합추출물의 인체임상시험이 필요하였다. 또한 백수오등 복합추출물 및 이를 활용한 제형 개발을 위하여 안정성 시험이 요구되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 결과

1. 미국인을 대상으로 한 임상시험

표준화된 백수오등 복합추출물의 갱년기증상에 대한 효능 및 안전성을 비아시아인을 대상으로 확인하기 위해 위약대비 무작위 이중맹검 임상실험을 진행 하였다. 총 64명의 미국 비아시아 갱년기 여성을 대상으로 12주간 하루 514mg의 백수오등 복합추출물을 함유한 정제를 급여하고 급여전, 6주, 12주에 Kupperman Index의 변화를 비교하였다. 투여군(n=31)대조군(n=33) 대비 KI 값이 유의하게 감소하였다.($p<0.01$) KI의 세부항목 중 vasomotor, insomnia, nervousness, melancholia, vertigo, fatigue($p<0.01$), and rheumatic pain과 paresthesia($p<0.05$)은 대조군 대비 통계적으로 유의하게 개선되었고 KI와 별도로 추가한 질건조증 또한 유의하게 개선되었다 ($p<0.05$). Formication은 대조군 대비 6주째에 통계적으로 유의하게 개선되었다.($p<0.05$) 백수오등 복합추출물 섭취에 의한 체중, 혈중 에스트로겐 등 생화학적 지표에서 대조군과 유의적 차이가 관찰되지 않았고 심각한 부작용도 없었다. 이 결과로 보아 백수오등 복합추출물은 갱년기 여성에게 체중증가나 부작용의 발생이 없이 갱년기 증상들을 통계적으로 유의하게 개선할 수 있음을 보여주었다.

2. 독성 시험

백수오등 복합추출물의 미국시장을 포함한 해외시장진출을 위해 국내 GLP 기관을 통해 단회

독성시험과 유전독성; 복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험을 실시하였다. 랫드에 단회 경구 투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 각 4,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다. 또한 백수오등 복합추출물은 복귀돌연변이 시험결과 5,000ug/plate 수준에서 유전자 돌연변이 유발성은 음성으로 판단되었고 포유류세포를 이용한 시험에서 5,000ug/ml에서 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단된다. 또한 마우스를 이용한 소핵시험에서 2,000mg/kg에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

3. 제품의 안정성 확인

표준화된 백수오등 복합추출물원료에 대해서는 장기보관기간에 따른 품질변화를 관찰한 결과 24개월의 보관기간 동안 설정된 기준규격을 만족시켰음을 확인하였다.
또한 완제품의 경우 경질캅셀 및 정제 제품을 시생산하고 가속시험을 통하여 유통기한 24개월 이상의 안정성 자료를 확보하였다.

4. 백수오등 복합추출물의 활성성분 연구

백수오, 속단, 당귀로부터 얻은 다양한 추출물에 대해 에스트로겐 활성을 MCF-7 cell 을 이용하여 탐색하였다. 속단과 당귀 용매 추출물의 에스트로겐 활성은 열수 > 70% 에탄올 > 부탄올 > 다이클로로메탄 순으로 당귀 열수 추출물(250 ug/mL)에서 138%로 가장 높았다.
추출물의 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량은 0.6~1.6% 및 0.6~1.2%로 에스트로겐 활성과의 상관성을 보이지 않았다. 따라서, 시료 내 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량보다는 특정한 폴리페놀 성분이 에스트로겐 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 가장 높은 에스트로겐 활성을 보인 당귀 열수추출물을 C18 cartridge가 장착된 prep-HPLC로 분획한 90개의 획분에 대해 MCF-7 cell proliferation방법에 의한 에스트로겐 활성과 폴리페놀 화합물 조성분석을 통하여 가장 우수한 획분을 분리하였다. 분리된 활성성분의 구조는 Mass spectrometer와 ^{1}H-NMR을 사용하여 분석하였고, 에스트로겐 유사활성은 ER competitive binding assay, cell proliferation assay, yeast-based estrogenicity assay, pS2 mRNA expression assay를 이용하여 평가하였다. 가장 높은 활성을 보인 당귀 열수추출물로부터 얻은 90개의 획분 중 우수한 에스트로겐 활성을 보인 획분(F28)을 분리하여 구조를 분석한 결과, caffeic acid와 일치함을 확인하였다. 또한, 당귀의 에스트로겐 활성 성분으로 확인된 caffeic acid는 estrogen receptor β와 강하게 결합하고, estrogen-responsive element dependent β-galactosidase activity 와 pS2 mRNA transcription 을 효과적으로 유도하였다. 이상과 같이, 본 연구로부터 당귀 열수추출물 유래 식물성에스트로겐 활성 물질이 caffeic acid 임을 확인하였으며, 폐경기여성의 호르몬 대체요법을 위한 천연물 신약 개발의 자료로 활용될 수 있다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

백수오등 복합추출물의 활성성분은 당귀에서 유래한 caffeic acid로 밝혀져 향후 천연물신약 개발의 기초로 활용가능하다. 또한 임상시험을 통한 기능성 및 안전성을 확인한 임상시험 연구결과를 바탕으로 **한국 식품의약품안전청으로부터 개별인정형 건강기능식품 원료로 "갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음" 이라는 기능성을 인정받았다 (개별인정 제2010-20호).** 단회독성 및 유전독성의 독성 시험에서 EstorG-100의 안전성이 확보되었고, 이 결과와 더불어 임상시험결과를 활용하여 **미국 FDA로부터 New dietary ingredient (NDI)로서 인정을 받는 엄청난 성과를 얻었다.** 국내에서 뿐만 아니라 전세계적으로 백수오등 복합추출물에 대한 관심이 급증하여 **EstroG-100의 전세계 시장 석권을 기대할 수 있겠고** 이에 따라, EstroG-100의 원료인 **당귀 등 작물을 생산하는 농가의 소득증대가 기대된다.**

편집순서 4

SUMMARY

I. Title

Globalization of Korean proprietary standardized phytoestrogen by the study of active ingredients and clinical effectiveness on Caucasian

II. Purpose of the study

For the purpose of obtaining research data for the mechanism of EstroG-100 improving menopausal symptoms, we isolated and identified active fractions and a chemical from extracts of three herbs of EstroG-100. For the successful sales of EstroG-100 with high added value to industy global leaders and for the increase of the incomes of Korean farmers cultivating native herbal plants, toxicology such as acute and genetic toxicity and clinical study with Caucasian participants have been done. Stability of EstorG-100 and of finished products under the form of hard capsules and coated tablets have been performed.

III. The Researches and Results

1. Clinical test with non-Asian American women

To evaluate the efficacy and safety of EstgroG-100 the standardized mixed herbal extract of *Cynanchum wilfordii, Phlomis umbrosa*, and *Angelica gigas,* a randomized double-blind placebo-controlled clinical study for non-Asian American women has been performed. Total 64 non-Asian women in USA was enrolled and tablets containing 514mg/day of EstroG-100 or placebo were taken for 12 weeks. The mean change of Kupperman Index(KI), the constituent symptoms of KI, and vaginal dryness was compared at baseline, week 6 and week 12 between active and placebo groups. The mean KI was decreased statistically significantly in EstroG-100 group(n=31) in comparison with placebo group(n=33). The mean change at week 12 from the baseline was significantly different ($p<0.01$) for vasomotor (hot flush and night sweat), insomnia, nervousness, melancholia, vertigo, and also different with significance ($p<0.05$) for fatigue, rheumatic pain and paresthesia between both groups. The improvement of vaginal dryness was significant ($p<0.05$) in comparison with placebo group. Formication was improved at week 6 from the baseline in comparison with placebo group ($p<0.05$). There were no significant differences in body weight, serum estrogen level and other biochemical markers. Not only a single adverse event was not reported during the study, but no vaginal

spotting case was observed in the active group. We can conclude that EstroG-100 improved significantly menopausal symptoms with no adverse event without increase of body weight and without influencing serum E2..

2. Toxicity

For the globalization of the proprietary phytoestrogen or EstroG-100, single-dose oral toxicity test and genetic toxicity test including bacterial reverse mutation test, chromosomal aberration test, and micronucleus test were performed in a GLP institute in Korea. The appropriate lethal dose of EstroG-100 was observed to be over 4000mg/kg as a result of the single dose oral toxicity test with rats. There was no clear indications for mutagenic potential as a result of bacterial reverse mutation test at the 5,000ug/plate level. In Chinese Hamster Lung cells, there was no evidence of chromosomal aberration at the level of 5,000ug/ml of EstroG-100. There was no mutagenic effect on micronucleus formation in the bone marrow cells in mice at 2,000mg/kg dose.

3. Stability of EstroG-100 and its products

Stability of standardized EstroG-100 was confirmed by 24 month long storage test. Stabilities of end products of EstroG-100 under the form of hard capsules and tablets have been performed to confirm by accelerated storage test their shelf lives are 24 months.

4. The study of Active ingredient of EstroG-100

The estrogenicity of various extracts obtained from *Cynanchum wilfordii* (*C. wilfordii*), *Phlomis umbrosa* Turcz (*P. umbrosa*), and *Angelica gigas* Nakai (*A. gigas*) was investigated using MCF-7 cell. Estrogenic compound in the active extract was isolated and identified.

The estrogenicity of extracts of the three herbs using 4 different solvents was evaluated. The estrogenic activities of extracts of *P. umbrosa* and *A. gigas* were in the order of hot-water> 70% ethanol>butanol>dichloromethane and the hot-water extract of *A. gigas* showed highest estrogenic activity (138%) at 250 ug/ml.

Total polyphenols and flavonoids contents of extract were 0.6 ~ 1.6% and 0.6 ~ 1.2% respectively. But there was no relation between estrogenic activities and the contents of ploypheno1s or flvonoids. It was concluded that specific polyphenol compounds rather than total polyphenols or flavonoids might have affected estrogenic activities of extracts.

The fraction containing high-potent compound was isolated by comparing the

estrogenicity of 90 fractions with prep-HPLC fractionation with C18 column of the hot-water extract of *A. gigas* The structure of active isolate was identified with mass spectrometer and ^{1}H-NMR. Estrogenic activity of the active isolate was evaluated by ER binding assay, cell proliferation assay, yeast-based estrogenic assay, and pS2 mRNA expression assay. The highest estrogenic fraction(F28) of 90 fractions from hot-water extract of *A. gigas* was analyzed and identified to be caffeic acid. We found out that caffeic acid had strong binding affinity to ERβ and induced effectively estrogen responsive element dependant β-glactosidase and pS2 mRNA transcription. In results of this study, we concluded that one of the estrogenic chemicals in *A. gigas* was caffeic acid.

VI. Achievement and future plan

The identification of caffeic acid as an estrogenic chemical can be used for further R&D of natural herbal medicine for menopausal symptoms as an alternative of HRT. Clinical study of EstroG-100 showed that the propriatary standardized phytoestrogen can improve significantly menopausal symptoms with no adverse effect without increase of body weight and without influencing E2. With the accomplishments, EstroG-100 has been approved as a health functional food ingredient from KFDA with the functional claim of "EstroG-100 can improve health of menopausal women" (No. 2010-20). Toxicity study including single oral dose and genetic toxicity showed EstroG-100 was safe and non-toxic. Both the toxicity results and the clinical research data led EstroG-100 to a breakthrough by being approved as a New Dietary Ingredient(NDI) by FDA. As interest in EstroG-100 from domestic industries, multinational giants, and major U.S. players is being increased sharply with the approval as HFFI of KFDA and NDI of U.S. FDA, the globalization of the pure Korean technology product has since been being made. Together with the global sales of EstroG-100, it is expected that the income of farmers is surely increased.

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter I. Outline of the Research ····· 12

Chapter II. Related Researches ····· 15
Section 1. Worldwide Researches for phytoestrogens ····· 15
Section 2. Domestic Researches for phytoestrogens ····· 16

Chapter III. Material and Methods and Results ····· 18
Section 1. Materials and Methods ····· 18
1. Studies on the Shelf life of EstroG-100 ····· 18
2. Development of End Products ····· 21
3. Research on the active substance in the three herbs ····· 23
4. Safety of EstroG-100 ····· 28
5. Clinical test on Caucasian Women ····· 35
Section 2. Study Results ····· 41
1. Shelf life of EstroG-100 ····· 41
2. Development of End Products ····· 43
3. Research on the active substance in the three herbs ····· 47
4. Safety of EstroG-100 ····· 62
5. Clinical test on Caucasian Women ····· 64

Chapter IV. Achievements and Contributions ····· 81
Section 1. Achievements ····· 81
Section 2. Contribution ····· 82
1. Assessment of Efficacy of EstroG-100 by Clinical Test ····· 82
2. Characteristics of Active Substance from herbs ····· 82
3. Safety Study of EstroG-100 ····· 83
4. Development of Health Functional Food and its shelf life ····· 83

Chapter V. Study Results and their application plans ····· 84
Section 1. Commercial Outcome and Plan ····· 84
1. Commercialization Outcome ····· 84
2. Commercialization Plan ····· 84
Section 2. Outcome and Plan for securing paper and patent ····· 85
1. Publishing status ····· 85
Section 3. Additional Researches and Applications plan ····· 85
1. Development of Natural herbal Medicine ····· 85
2. Clarification of Action Mechanism of EstroG-100 ····· 85
3. New Researches Related to Anti-aging ····· 86

Chapter VI. References ····· 87

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 12

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 15
제 1 절 해외 갱년기 소재 개발현황 ····· 15
제 2 절 국내 갱년기 소재 개발현황 ····· 16

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 18
제 1 절 연구개발 수행방법 ····· 18
1. 백수오등 복합추출물 유통기한 설정 ····· 18
2. 제형개발 및 제품개발 ····· 21
3. 백수오, 속단, 당귀의 유효성분 연구 ····· 23
4. 백수오등 복합추출물의 안전성 연구 ····· 28
5. 코카시안 대상 갱년기 증상 개선 임상시험 ····· 35
제 2 절 연구개발 수행결과 ····· 41
1. 백수오등 복합추출물 장기보관시험결과 ····· 41
2. 백수오등 복합추출물 함유한 제형 및 제품개발 ····· 43
3. 백수오, 속단, 당귀의 유효성분 연구 ····· 47
4. 백수오등 복합추출물의 안전성 연구 ····· 62
5. 인체임상 ····· 64

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 81
제 1 절 목표달성도 ····· 81
제 2 절 관련분야 기여도 ····· 82
1. EstroG-100 유효성 검증 ····· 82
2. 백수오, 속단, 당귀로부터 에스트로겐 활성 물질의 분리, 정제 및 특성 분석····· 82
3. EstroG-100 안전성 검증 ····· 83
4. 건강기능식품 제형 및 유통기한 연구 ····· 83

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 84
제 1 절 산업화 실적 및 계획 ····· 84
1. 산업화 실적 ····· 84
2. 산업화 계획 ····· 84
제 2 절 논문 및 특허확보 실적 및 계획 ····· 85
1. 논문진행상황 ····· 85
제 3 절 추가연구 및 활용계획 ····· 85
1. 천연물 신약 개발 ····· 85
2. 기작연구 명확화 ····· 85
3. 신규 노화관련 연구 ····· 86

제 6 장 참고문헌 ····· 87

제1장 연구개발과제의 개요

2001년 갤럽조사에 따르면 한국여성의 평균폐경연령은 49.7세이었다. 한국의 50세 이상 여성인구는 1995년 441만명, 19.86%이었고, 2000년 508만명 22.15%, 2005년에는 620만명 22.3%(한국여성정책연구원 성인지통계정책시스템 지역성인지통계DB, http://gsis.kwdi.re.kr/)으로 급격히 증가하고 있다. 2030년에는 전체여성 중 폐경여성으로 볼 수 있는 50세 이상 여성은 50% 정도로 추정된다.(서울시 웹진 e-서울통계) 폐경이전부터 여성은 난소의 기능이 저하되고 마침내 월경이 중단되어 그 정상적인 노화과정에서 여성은 폐경 후 30년 이상의 인생을 살게 되는데, 폐경이 되면 난포의 분화발달에 의한 에스트로겐의 생산과 중추-생식소의 조절이 변화하여 안면홍조, 비뇨생식기와 피부조직의 위축, 생식기관과 유방의 위축, 골다공증의 위험이 증가하여 개인과 사회모두 중요한 의미를 갖는다.

폐경여성에서 가장 위험한 것이 골다공증이다. 한 연구에 따르면 미국 미네소타주의 50세 연령의 여성은 평생 골절의 발생가능성이 39.7% (남성은 13.1%)라고 한다(1). 연령의 증가와 산업화 및 운동의 부족이 일부 원인으로 추정되고 있지만 가장 중요한 원인은 전신호르몬의 변화로 특히 폐경 후 성선호르몬의 감소이다. 성선호르몬의 결핍 없이도 골다공증은 발생하지만 여성호르몬이 감소된 젊은 여성과 성기능 저하증의 남성에서 골다공증이 증가하는 현상으로 보아 여성호르몬의 감소가 골다공증의 가장 큰 원인이라고 할 수 있다. 여성의 골밀도는 30-40대에 최대를 이루고 그 이후부터는 연간 1%정도 감소되다가 폐경 후에는 년간 4-5% 정도 감소하게 된다. 여성호르몬의 부족에 의한 소주골의 감소와 더불어 노화에 의한 피질골의 감소가 동시에 일어나면 생명을 위협하는 대퇴골 경부 골절이 발생한다. 여성은 90세까지 20%가 골다공증에 의해 대퇴골의 골절을 경험하고 그 중 15%가 심폐계 질환으로 3개월 안에 사망한다. 골다공증은 약간의 충격에 의해서도 심한 골절을 일으킬 수 있는 병이며 어떤 이유든 폐경이 된 여성은 골절이 될 위험이 젊은 여성에 비하여 50% 더 증가한다.

가장 흔한 폐경기 증상의 하나로서, 여성은 폐경 전후 3-4년에 걸쳐 혈관운동성 장애와 심리적인 증상을 겪는다. 대부분의 여성은 안면홍조, 발한, 중심성 온도감소에 의한 오한 등 혈관운동성 증세를 경험한다. 이 증세는 폐경전 6-63%, 폐경 후 58-93%의 환자에서 나타난다. 비만한 여성에 비해 마른여성에서 빈번하고 서구에서는 80%의 여성이 경험한다. 이 증세는 여성호르몬에 의해 호전된다. 에스트로겐은 신경전달물질의 대사에 영향을 주는데 이와 함께 갱년기의 신체적인 변화가 폐경기 우울증에 영향을 주는 것으로 생각되고 있다.

폐경후 1-2년이 지나면서 빈뇨와 요실금이 생기는데 이에 대한 에스트로겐 치료의효과는 불확실하다. 성교통과 질위축은 에스트로겐의 투여로 치료할 수 있다. 구미에서는 45-55세 여성의 70%, 55-64세 여성의 60%에서 성기능이 감소되어있다.

비뇨생식기계의 변화와 함께 교원질의 감소가 일어난다. 피부아래 진피층의 교원질이 감소하면서 피부가 얇아지게 되어 피부가 건조해지고 가려움증이 자주 일어난다. 방광이나 인대, 연조직의 교원질도 감소하는데 이로 인해 관절통 등의 증상이 생긴다.

폐경 후 혈색소, 섬유소원, 혈액응고요소 VII이 증가하고 항트롬빈III가 감소하여 혈전형성이 용이해지고 체지방의 분포는 중심성으로 변화한다. 이로 인하여 죽상경화증 등 심혈관계질환은 55세이하에서 여성의 발병율은 남성의 1/3인데 점차 증가하여 75세 이후에는 남성과 동일해진다.

이러한 폐경기 증후군에 대한 호르몬 대체요법은 1930년대 개발된 말(馬) 유래 호르몬 제품(Conjugated equine estrogen, CEE)을 중심으로 확립되어 갱년기 이후의 삶의 질 향상 및 골다공증, 심혈관계질환 예방 및 치료를 위해 널리 사용되었다. 이들 에스트로겐의 효능과 위험성을 검증하기 위해 두차례의 HERS 연구가 진행되었으나 심혈관계에 대한 긍정적인 효과를 확인하지 못하였다. 16,000명을 대상으로 7년간 실시하기로 한 Women's Health Initiative (WHI) 임상시험을 심각한 부작용으로 말미암아 2년 일찍 종료함으로써 미국 FDA에서 2003년 호르몬 의약품에 대해 경고 문구를 넣도록 조치하기에 이르렀다. WHI의 임상결과를 보면, 졸중이 44% 증가하였고, 혈액응고가 2배, 치매 2배, 심장마비 29%, 유방암 26% 증가 등의 심각한 부작용이 보고되었다(2).

이에 따라 NAMS(북미폐경학회)에서는 "호르몬병합요법을 관상동맥질환의 일차나 이차 예방 목적으로 사용해서는 절대로 안된다"며 "에스트로겐 단독 요법도 확실한 연구 자료가 나올 때까지는 사용하지 말아야 할 것"이라고 강력히 권고했다.

국내 의학계에서는 국내 여성의 심혈관계질환의 유병율이 구미국가에 비해 현저히 낮으므로 심혈관계 질환의 위험이 적다고 판단하여 여성호르몬이 널리 처방되고 있다. 하지만 갱년기 여성인구의 증가에도 불구하고 의료통계에서 갱년기 환자가 감소하는 것은 소비자들 사이에 호르몬대체요법에 대한 불안감이 존재하고 있음을 보여주고 있다.

호르몬 대체요법(HRT)의 심각한 부작용으로 말미암아, 구미에서는 이소플라본을 비롯한 식물의 성분로부터 여성호르몬 활성을 가진 phytoestrogen 연구가 진행되어 다수의 제품이 개발, 판매되고 있다. 그러나 이들은 인체임상결과가 일관성이 떨어져 논란의 여지가 크다. 이소플라본의 경우, 가장 큰 시장을 형성하고 있으나, 무작위 이중맹검 인체시험을 수행한 결과, 이소플라본이 여성호르몬 활성을 가진 것으로 발표를 한 연구자는 1년 뒤 이소플라본이 아닌 대두의 다른 성분이 효과가 있을 것으로 발표하였고(3,4), Black cohosh (승마)의 경우 여성호르몬 효과가 없다는 논문도 다수 발표되고 있다(5).

본 연구팀에서는 수천 년간 사용경험을 가진 동북아의 생약재 중 한국 식약청에 의해 식품 원료로 등재된 생약재 중에서 갱년기 증상을 완화시키거나 예방할 수 있는 백수오, 속단 등의 식물추출물을 탐색완료하고, 이 중 백수오, 속단, 당귀의 복합추출물을 선정하여 동물실험을 수행하고(6,7), 최근 성균관대 의대 삼성제일병원에서 1년간 48명의 폐경기 여성들을 대상으로 무작위 이중맹검 인체시험을 실시한 결과, 위약군 대비 갱년기 증상이 5배 개선되고, 성장호르몬 농도, 골대사 지표, 대퇴골 경부 골밀도 등이 유의하게 개선됨을 확인하였다(8). 또한, 국내와 미국에서 특허등록이 완료되었고, 현재 일본, 유럽 등 선진국에 특허출원을 한 상태이다.

본 연구는 위와 같은 활성을 가진 백수오등 복합추출물에 대해 1) 제조공정에 따른 표준화를 완결하고, 이 표준화된 소재의 2) 미국시장 및 세계 시장을 확보하기 위해 Caucasian 여성을 대상으

로 갱년기 증상들에 대한 인체적용시험을 수행하였다. 동시에 3) 각 생약의 갱년기 증상에 대한 활성물질을 탐색하고 4) 백수오등 복합추출물의 안전성을 GLP 기관을 통해 검증하고, 5) 백수오등 복합추출물을 이용한 제형개발, 및 안정성 실험을 통해 최종제품화를 수행하였다. 본 연구의 과정을 통해 얻은 결과를 바탕으로 한국식품의약품안전청(KFDA)로부터 백수오등 복합추출물은 갱년기여성건강에 대한 기능성(인정번호 2010-20호)을 인정 받았으며 미국식약청으로부터는 신규 건강기능식품소재(New Dietary Ingredient, NDI)로서 승인을 획득하여 2011년 최소 300만 달러의 수출이 기대되고 있다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 해외 갱년기 소재 개발현황

WHI 임상시험 결과 많은 부작용으로 인해 다른 대체재의 도입이 많이 요구되어 선진국에서 HRT의 대안으로 식물성에스트로겐이 주목 받고 있다. 현재 가장 널리 이용되는 식물성에스트로겐은 대두 이소플라본, Red clover, Black cohosh 등이다.

그러나 이들은 그 유효성과 안전성에 문제가 있다. 실제로 Albertazzi P. 등이 1998년 폐경기 여성 104명을 대상으로 대두의 안면홍조 개선에 대한 유효성을 이중맹검 시험으로 수행한 결과 12주 후 대두 복용자들은 45%의 안면홍조 개선효과를 보인 반면, 대조군은 30%의 효과를 보였다고 발표하였으나($p<0.01$), 1년 뒤인 1999년 다시 같은 Obstet Gynecol지에 논문을 발표하여, 혈중 및 소변 이소플라본 농도와 안면홍조 개선과는 무관한 바, 안면홍조 개선에 도움을 주는 성분은 알려진 대두 이소플라본이 아닌 다른 성분일 것으로 추정하였다(3,4).

이소플라본의 하루 권장섭취량은 30-50mg (9)이지만, 일본과 한국 그리고 중국여성은 일상 식단을 통해 그 이상의 이소플라본을 섭취하고 있음에도 불구하고, 미국이나 유럽과 동일한 비율의 폐경기 증후군 환자가 존재한다. 실제로 두부 1kg당 1,150mg, 콩나물 424mg, 된장 263mg의 이소플라본이 함유되어있다. 한 연구결과는 동양인의 식사에는 권장량 이상의 이소플라본이 함유되어 있음을 보여주었다(10). 한편 NIH에서는 제니스테인을 2년동안 rat에 투여한 결과 암컷에서 유선/뇌하수체 선암이 유발되었다고 발표하였다(NIH & FDA - National Toxicology Program, Genistein Final, Jan, 2008). 또한 일본에서는 특정보건용 식품으로 이소플라본의 하루 최대 30 mg의 이소플라본 비배당체만 허용하고 있다 (http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-singi-isoflavone _kihon.pdf).

Black cohosh (승마)의 경우에도 Jacopson 등(5)과 Pockaj 등(11)에 따르면 승마보다 위약에서 개선효과가 더 뛰어난 논문들이 발표되는 등 승마가 효과가 없는 것으로 보고된 바 있다. 2007년 1월 15일자 Natural Product Insider 기사(http://www.naturalproductsinsider.com/ articles/2007/01/nih-trial-finds-black-cohosh-ineffective-on-menopa.aspx)에서는 승마에 대한 임상에서 투여군이 대조군에 비해, 안면홍조/야간발한의 빈도에서 유의한 차이가 없었음을 보여주고 있다고 하였다. 또한 2007년 7월 30일자 기사(http://www.naturalproductsinsider.com/ articles/2007/07/usp-proposes-green-tea-black-cohosh-label-caution.aspx)에서는 European Medicines Agency Committee에서 승마섭취와 간손상의 잠재적인 상관관계를 암시하는 임상증례들에 대해 검토를 진행하였다고 보고하였다. 영국의 Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA)도 Yellow Card Scheme에 따라 승마로 인한 부작용으로 의심되는 31건의 사례들에 대해서 보고하였다(www.yellowcard.gov.uk). 그 중 22건은 15명의 비정상적 간기능에

서 1명의 간부전을 포함한 6명의 다양한 간염증세까지로 이루어져 있었다. 보통은 승마의 섭취를 중지한 후 증세가 사라졌거나 호전되었다. MHRA는 경고문구가 모든 승마제품에 부착될 예정이며 산업계 및 판매자들이 이들 제품의 이용과 관련된 잠재적인 위험을 완전히 인식하도록 알리고 있다고 하였다. Red clover의 경우에는 구미의 많은 제품들에서 이소플라본이나 승마의 보조 성분으로 많이 활용되고 있을 뿐이다.

전 세계에서 유독 일본과 한국에서 순차적으로 인기를 끌었던 석류의 경우, 1990년대 후반에 석류에 포유류의 Steroid Estrogen이 들어있으며, 식물성에스트로겐인 Coumestrol이 함유되어 있다는 주장으로 일본에서 엄청난 매출이 기록되었으나 일본 정부 기관인 국민 생활 센터(www.kokusen.go.jp)에서 "석류에는 에스트로겐이 없으며, 석류씨에도 Coumestrol이 없다"는 보고를 2000년에 발표하였다(www.kokusen.go.jp/news/data/n-20000406_2.php3).

제2절 국내 갱년기 소재 개발현황

국내에서는 건강기능식품원료로서 대두 이소플라본, 백수오등 복합추출물, 회화나무열매추출물, 석류 추출물 등이 개발되어 식약청으로부터 건강기능식품 원료로서 개별인정을 획득하였고 제약분야에서는 승마와 성요한초의 추출물이 제품화 되었다.

보락에서 이소플라본 어글리콘제법으로 특허를 취득하였고, 유젠바이오에서는 두부제조공정의 폐액에서 이소플라본추출공정을 개발하였으며, 풀무원, 정식품에서도 이소플라본 추출기술을 개발하였다. 대두추출물을 이용한 갱년기 원료는 뼈건강에 대한 기능성(기타기능Ⅱ)만을 인정받았다. 현재까지 식약청에서 대두이소플라본으로 개별인정 받은 소재에 대해 Table 1에 나타내었다. 전술한 바와 같이 대두이소플라본은 뼈 건강에 대해서만 그 기능성을 인정 받았다.

회화나무 열매추출물은 국내 업체에서 이소플라본 함유 식물로서 대두 이외의 소재로 개발한 것이며, 그 지표성분은 sophoricoside이다(12). 이 물질은 ISOGENISTIN 또는 GENISTEIN-4′-GLUCOSIDE로 결국 회화나무 열매추출물은 이소플라본 중 genistein이 주요기능성분인 추출물이다. 이 추출물은 임상에서 대조군대비 Kupperman index에서 유의한 개선(p=0.0392)을 보였지만 세부항목 중 피로(p=0.0024)를 제외한 hot flush, vaginal dryness 등 11개 증상에서 유의적 개선이 없었다. 이 소재는 2010년 5월 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음(기타기능 II)의 기능성으로 식약청으로부터 건강기능식품원료로서 개별인정을 받았다(기능성원료 인정 제2010-27호).

석류추출물에 대해서는 해외의 연구 자료가 존재하고 이를 바탕으로 국내임상 등 연구를 통해 (주)한일양행에서 추출분말과 농축액에 대해 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음(기타기능 II)의 기능성을 인정받았다.(기능성원료 인정 제2010-23호) 석류추출물은 쿼세틴으로 표준화되었고 극소량의 에스트로겐이 함유된 것으로 보인다. 인체임상에서는 안면홍조 점수, 정도, 발한 정도, MRS, MENQOL등에서 유의한 개선을 보였으나 Kupperman index에서는 전혀 개선효과가 없어 전반적으로 데이터의 일관성이 낮았다(13).

한편 승마 및 성요한초 제품은 동국제약의 훼라민큐, 진양제약의 지노플러스, 조아제약의 에스트로큐, 동성제약의 히페린, 아주제약의 레미페민 등 일반의약품으로 개발되어 시판되고 있다. 이들은 해외에서 개발한 승마/성요한초 계통의 제품의 유사제품으로 해외에서 수입한 원료를 사용하여 국내에서의 관련소재연구개발과 무관하였다.

Table 1. The list of isoflavone approved as health functional food ingredient by KFDA.

원료명	개별인정 번호	회사명	비고
피토쏘야	제2008-29호	한국유니온제약	대두를 발효하여 주정추출 기타II
소이액트(SoyAct-Y) 대두이소플라본추출물 아글리맥스(AglyMax) 30 이소플라본추출물	제2008-25호 제2008-28호 제2008-80호	풀무원건강생활(주) 씨제이(주) 대덕약업	대두발효 후 주정추출, 기타II
대두이소플라본 Soybean Extract Powder 대두이소플라본 대두이소플라본 P10 대두이소플라본 소이이소플라본 Novasoy 쏘이라이프(Soylife) 대두이소플라본	제2008-27호 제2008-72호 제2008-73호 제2008-77호 제2009-11호 제2009-13호 제2009-26호 제2009-27호 제2009-44호	씨제이(주) (주)진용내츄럴 풀무원건강생활(주) (주)뉴트렉스테크놀러지 (주)엠에스씨 (주)정식품 (주)뉴트리션웨이브 주영엔에스(주) (주)네추럴웨이	대두배아 열수추출, 기타II
바이오이소플라본	제2008-20호	(주)바이오랜드	대두배아를 산과 열수로 추출

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 수행방법

1. 백수오등 복합추출물 유통기한 설정

백수오등 복합추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료로서 제품화를 위해 시생산된 3개로트의 추출물을 24개월간 장기보관실험을 수행하여 아래 Table 2의 보관조건으로 보관기간동안 설정된 기준규격을 유지함을 확인하고자 하였다.

Table 2. Experiment condition for long storage of EstroG-100

검체	3로트의 검체
시험일정	최소 24개월
저장조건	25±2℃/ 상대습도 60±5%
검사항목	지표성분(Shanzhiside methylester, nodakenin, cinnamic aicd), 대장균군, 성상, 납, 총비소, 카드뮴, 총수은

가. 장기보관실험 방법

24개월간 상기조건에 따라 보관하면서 지표성분 3가지(cinnamic acid, shanzhiside methylester, nodakenin) 및 대장균군 중금속 등의 분석결과를 기준규격에 적합한 지를 확인하였다.

나. 지표성분별 실험방법

(1) Cinnamic acid 시험법

(가) 시험용액의 제조

시료를 정밀히 측정하고 Hydrolisis 시킨다. 시료를 중화한 후 분획하고 농축한다.

(나) 시험조작

① HPLC 조건

- 검출기: UV 280 nm+
- 컬럼: PRONTOSIL EUROBOND C18 (NC-04, 250×4.0 mm, 5.0 μm)
- 유속: 0.7 mL/min
- 주입량: 20 μL

- 이동상

A용액: Water: Acetonitrile: MeOH: Acetic acid (15:80:5:0.1)

B용액: Water: Acetonitrile: Acetic acid (97:3:0.1)

Time(min)	A (%)	B (%)
0	0	100
4	30	70
8	60	40
12	80	20
17	100	0
20	0	100
28	0	100

② 정량시험

표준용액 및 시험용액 동일한 양을 주입하여 앞의 시험조작에 따라 시험하여 다음과 같이 cinnamic acid 함량을 구한다.

$$\text{Cinnamic acid 함량 (mg/g)} = \text{시험용액의 농도 (mg/mL)} \times \frac{\text{시험용액의 전량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times \text{표준물질의 순도}$$

(2) Shanzhiside methylester 시험법

(가) 시험용액의 제조

시료를 정밀히 측정하여 환류추출한 후 여과한다. 농축물을 메탄올로 용해하여 여과한 것을 시험용액으로 한다.

(나) 시험조작

① HPLC 조건

- 검출기: UV 235 nm
- 컬럼: PRONTOSIL EUROBOND C18 (NC-04, 250×4.0 mm, 5.0 μm)
- 유속: 1.0 mL/min
- 주입량: 20 μL
- 이동상

A용액: 70% Acetonitrile

B용액: Water

Time(min)	A (%)	B (%)
0	15	85
2	20	80
4	25	75
6	30	70
7	100	0
17	100	0
20	15	85
27	15	85

② 정량시험

표준용액 및 시험용액 동일한 양을 주입하여 앞의 시험조작에 따라 시험하여 다음과 같이 shanzhiside methylester 함량을 구한다.

$$\text{Shanzhiside methylester 함량 (mg/g)} = \text{시험용액의 농도 (mg/mL)} \times \frac{\text{시험용액의 전량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times \text{표준물질의 순도}$$

(3) Nodakenin 시험법

(가) 시험용액의 제조

시료를 정밀히 측정하여 메탄올을 넣어 환류추출한 후 여과한 후, 시험용액으로 한다.

(나) 시험조작

① HPLC 조건

- 검출기: UV 330 nm
- 컬럼: PRONTOSIL EUROBOND C18 (NC-04, 250×4.0 mm, 5.0 μm) 또는 이와 동등한 것
- 유속: 1.0 mL/min, - 주입량: 20 μL
- 이동상

A용액: Acetonitrile

B용액: Water

Time(min)	A (%)	B (%)
0	20	80
3	20	80
8	30	70
18	30	70
19	50	50
40	50	50
41	90	10
50	90	10

② 정량시험

표준용액 및 시험용액 동일한 양을 주입하여 앞의 시험조작에 따라 시험하여 다음과 같이 nodakenin 함량을 구한다.

$$\text{Nodakenin 함량 (mg/g)} = \text{시험용액의 농도 (mg/mL)} \times \frac{\text{시험용액의 전량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times \text{표준물질의 순도}$$

2. 제형개발 및 제품개발

가. 시제품 생산

백수오등 복합추출물 원료를 함유하는 제형으로 경질캅셀과 코팅정제의 배합을 작성한 후 GMP 설비를 가진 업체에서 시생산을 진행하였다. 각 제형별 시생산 조건을 아래 Table 3과 같다.

나. 시생산된 각 제형별 제품에 대해 식약청의 유통기한 설정 가이드라인에 따라 6개월간의 가속실험을 수행하였다. 가속시험 조건은 Table 4에 나타내었다.

Table 3. The sample preparation of hard capsule and coated tablet

제형		경질캅셀	코팅정제
기능성원료		백수오등 복합추출물(개별인정 제2010-20호)	
지표성분		Cinnamic acid, Shanzhiside methylester, Nodakenin	
기준규격	Cinnamic acid	0.00408~0.01635 mg/g	0.00257~0.0103 mg/g
	Shanzhiside methylester	0.2048~0.6127 mg/g	0.129~0.386 mg/g
	Nodakenin	1.59048~3.26349 mg/g	1.002~2.056 mg/g
	대장균군	음성	음성
	붕해도	물에서 20분 이하	물에서 60분 이하
제조공정		원료(백수오등 복합추출물, 부원료)구매→칭량→혼합→충진→1차 포장→최종포장→품질검사→출하	원료(백수오등 복합추출물, 부원료)구매→칭량→1차 혼합→과립, 건조→2차 혼합→타정→코팅, 선별→1차 포장→최종포장→품질검사→출하

Table 4. The condition of accelerated experiment for estimation of shelf life of capsule and tablet

검체	경질캡슐 및 코팅정제 각 3 lot.
저장조건	25±2℃/상대습도 60±5%, 30±2℃, 40±2℃/상대습도 75±5%
시험기간	6개월(2개월마다 실험)
검사항목	성상, 대장균군, 붕해도, 지표성분

가속실험 결과 얻은 지표성분의 농도변화로부터 제품의 유통기한을 계산하였다. 건강기능식품 유통기한 설정 가이드라인에서 제시하는바에 따라 품질저하속도가 0차반응식 또는 1차반응식에 근사하는지 확인하고 이에 따라 지표성분의 품질저하 속도상수를 구한 다음, 유통온도에 대한 활성화 에너지를 산출한 후 제품의 설정된 유통조건에서 유통기한을 산출하였다.

(1) 품질저하속도상수 계산법

- 0차 반응식

품질 저하속도가 품질특성에 관계없이 일정한 반응을 나타내는 경우

$-\frac{dA}{dt} = KA^n$(n=0) (적분) → At = Ao-Kt → $t = \frac{A_o - A_t}{K}$

- 1차 반응식

품질 저하속도가 품질특성에 따라 지수적으로 감소하는 반응을 나타내는 경우

$-\frac{dA}{dt} = KA^n$(n=1) (적분) → LnAt = LnAo-Kt → $t = \frac{Ln[A_o] - Ln[A_t]}{K}$

Ao : 품질지표의 최초 측정값

At : 품질지표의 t시간 경과 후 측정값

K : 반응속도상수

t : 저장기간(일, 월, 년)

(2) 선정온도에서의 활성화에너지 산정법

성분 변화에 대한 온도의존성을 설명하기 위해 시간과 반응속도상수로서 표현되는 많은 화학반응식이 제안되었으나, 현재까지는 다음에 표현된 아레니우스반응식(Arrhenius equation)이 가장 널리 사용된다.

$K = Ae^{-Ea/RT}$ (자연로그(Ln)로 전환) → $LnK = -(\frac{Ea}{R})\times(\frac{1}{T}) + LnA$ → $LnK = \frac{S}{T} + I$

A : 아레니우스 상수, Ea : 활성화에너지(cal/mol), R : 기체상수(1.987 cal/mol)

T : 절대온도(=℃+273), K : 반응속도상수, S : 기울기, $-(\frac{Ea}{R})$, LnA, I : 절편

상기 식에 따라 각 지표성분의 보관온도별 활성화 에너지를 구하고 아레니우스반응식(Arrhenius equation)으로부터 구한 K의 자연로그값(Ln)인 LnK를 Y축으로 1/T를 X축으로 하

여 선형회귀분석한 후, 얻어진 직선의 식으로부터 선정한 품질지표의 Ea(활성화에너지)를 구한다.

(3) 제품의 유통기한 계산방법

- 실험제품이 1년간 우리나라 실온에 유통된다고 가정한다면, 현재 실험한 온도 구간(25, 35, 45℃)은 우리나라 1년 유통온도를 모두 반영한 것이 아니므로, 품질지표의 연간 변화량을 산출하기 위해서는 우리나라 월평균 온도를 기준으로 대표성을 갖는 온도 구간을 정하고, 그 온도 구간에서의 온도 유지일수를 산출하여 실험하지 않은 구간에 대한 반응속도상수 산출이 필요하다.

- 우리나라 연간 온도별 예상 유통일수 산출

실험하지 않은 구간의 유통온도설정은 우리나라 월별 평균온도를 고려하여 적용한다. 국내 유통온도에서 품질지표성분의 연간 변화량을 산출하기위하여 2007년도 기상청 자료를 참조하여 서울을 비롯한 7개 광역시와 강원도 1개 지역의 월평균기온을 조사하여 유통기간 산출 온도의 근거로 하였다. 조사결과 1월, 2월, 3월, 11월, 12월(5개월:152일)의 평균기온은 10℃이하였으며, 4월 13℃, 5월과 10월(2개월:61일)은 16~18℃, 6월과 9월(2개월:61일) 21℃, 7월과 8월은(2개월:61일) 25~26℃인 것으로 나타났다.

이에 따라 실온 유통시 1년간 온도별 예상 유통일수는 10℃(152일), 15℃(30일), 20℃(61일), 25℃(61일), 30℃(61일)로 하여 유통기간 산출의 근거로 사용하였다.

- 실험하지 않은 구간의 반응속도상수(K), 연간변화 반응속도상수(K′)으로부터 유통기간 산출

$$Ln\mathrm{K}= -(\frac{Ea}{R})\times(\frac{1}{T}) + Ln\mathrm{A} \rightarrow Ln\mathrm{K}= \frac{S}{T}+I \rightarrow k=e^{(\frac{S}{T}+I)}$$

- 연간변화 반응속도상수(K′)산출

해당온도유통일수(A) × 해당온도 반응속도 상수(K) = K1+K2+K3+K4+K5 = K′

- 0차 반응식으로부터 유통기한 예측

$$t=\frac{A_o-A_t}{K'} \quad \rightarrow \quad t=\frac{A_o-A_t}{e^{\frac{S}{T}+I}}$$

- 1차 반응식으로부터 유통기한 예측

$$t=\frac{Ln[A_o]-Ln[A_t]}{K'}$$

3. 백수오, 속단, 당귀의 유효성분 연구

가. 시료의 용매별 추출물 제조

백하수오, 속단, 당귀의 용매별 추출물은 각각 열수, 70% 에탄올, 부탄올, 다이클로로메탄을 이용하여 제조하였다. 열수 추출물은 시료분말에 10배의 증류수를 가하고 95-100℃에서 16시간 동안 추출한 후 여과, 농축한 다음 동결 건조하였다. 용매별 추출물은 분말 20 g에 70%

에탄올, 부탄올, 다이클로로메탄을 각각 200 mL씩 가하여 실온에서 6시간 동안 추출하고, 1,000 X g에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수하였다. 남은 잔사에 대해 3회 반복 추출한 후 얻은 상층액을 혼합하여 감압 농축한 다음 speed vacuum centrifuge (Ecospin3180C, BioTron, Inc. Bucheon, Korea)를 사용하여 용매를 제거하여 이 후 실험에 사용하였다.

나. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 및 HPLC profiling

(1) 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석

총폴리페놀 함량은 추출물 0.1 mL에 10% Folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL을 첨가하여 3분간 반응한 후, 7.5% Na_2CO_3 0.4 mL을 가하였다. 45℃ 암실에서 15분간 반응한 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다(14).

총플라보노이드 함량은 추출물 0.14 mL에 diethylene glycol 0.7 mL을 첨가한 후 1N NaOH 0.07 mL을 가하여 37℃에서 1시간 동안 반응한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 rutin을 사용하였다(15).

(2) HPLC를 이용한 페놀화합물 정성 분석

당귀의 추출물에 존재하는 식물성에스트로겐 조성은 Phenomenex Luna-C18 column(5 um, 4.6 X 250 mm, Phenomenex Inc., Torrance, USA)이 장착된 HPLC system(Waters Co., Milford, Ireland)을 이용하여 분석하였다. 이동상은 메탄올(A)과 0.5% Trifuluoroacetic acid (TFA)를 함유한 3차 증류수(B)를 사용하여 농도 구배 조건(A, 5-100%; B, 95-0%)에서 분당 1.0 mL의 유속으로 90분간 분석하였다. 시료는 20 mg/mL의 농도가 되도록 메탄올에 용해한 다음 0.2 um membrane filter (Advantec Dismic-25cs, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하여 20 uL를 주입하였다. 시료검출은 Waters 2996 Photodiode array Detector (Waters Co., Milford, Ireland)를 사용하였으며, 시료와 표준품들의 크로마토그램을 비교하였다. 본 연구에서 사용한 표준품은 당귀의 지표성분인 nodakenin, decursin을 비롯한 식물체에 존재하는 주요 폴리페놀 화합물 100여종을 사용하였다(16,17).

다. 우수 활성 소재로부터 식물성에스트로겐 활성물질 분리

당귀 열수 추출물은 Delta-Pak™ C18 cartridge(15 um, 100 Å, 25X16 mm, Waters Co., Milford, lreland) 세 개를 연결한 HTP system(Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA)을 이용하여 분획하였다. 이동상은 3차 증류수(A)와 메탄올(B)를 사용하여 농도 구배 조건(A, 0-100%; B, 100-0%)에서 분당 10 mL의 유속으로 수행하였다. 시료는 300 mg/mL의 농도가 되도록 3차 증류수에 용해시킨 다음, 0.2 um membrane filter로 여과하여 1.5 mL을 주입하였다. 시료검출은 L-7410 UV detector(Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA)를 사용하여 UV영역에서 검출된 90개의 획분을 fraction collector(L-7260 autosampler, Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA)

를 이용하여 회수한 후 감압 건조하여 유방암 세포 증식에 대한 효능을 측정하였다.
C18 cartridge 분획물에서 에스트로겐 활성이 가장 높은 획분에 대해 Phenomenex Luna-C18 column(5 um, 4.6 X 250 mm, Phenomenex Inc., Torrance, USA)이 장착된 HPLC system(Waters Co., Milford, Ireland)을 이용하여 분획하였다. 이동상은 메탄올(A)과 0.5% Trifuluoroacetic acid (TFA)를 함유한 3차 증류수(B)를 사용하였으며 농도 구배 조건(A, 0-100%; B, 100-0%)에서 분당 1 mL의 유속으로 수행하였다. 시료는 2 mg/mL의 농도가 되도록 메탄올에 용해시킨 다음 0.2 um membrane filter로 여과하여 20 uL을 주입하였다. 시료검출은 Waters 486 Tunable absorbance detector(Waters Co., Milford, Ireland)를 사용하여 220 nm에서 분석하였다.

라. 우수 활성물질의 구조 동정

(1) Mass spectrometer

Mass spectra는 LC-Mass ZQ4000(Waters Co., Milford, Ireland)을 이용하여 ESI (electrospry ionization) positive (+) mode 에서 ion source의 온도 80℃, spray voltage 4.5 Kv, desolvation gas flow 350 L/hr의 조건으로 수행하였다. 분리 정제된 에스트로겐 활성 획분은 speed vacuum concentrator를 이용하여 감압 건조하여 메탄올에 50 ppm 농도로 용해시킨 후 분석에 사용하였다.

(2) ^{1}H-NMR

분리 정제된 활성 획분은 감압 건조 후 methanol-d_4 solvent(Sigma-Aldrich Co.)에 용해시킨 다음, 600MHz high resolution NMR spectrometer(Avance 600, Bruker, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 tetramethylsilan(TMS)를 내부표준물질로 사용하여 분석하였다.

마. 우수 활성물질의 에스트로겐 활성 평가

(1) ER competitive binding assay

본 연구는 ERα 와ERβ에 대한 시료의 결합능이 높으면 상대적으로 [^{3}H]E_2가 ER과 결합하지 못함으로써 다량이 유리 상태로 존재하여 낮은 형광도 값을 나타내는 원리를 바탕으로 측정하였다(18). 50% Hydroxyapatite slurry(HAP)는 hydroxyapatite 10 g을 50 mM Tris-Cl (pH 7.4) 60 mL에 가하여 실험 시작 24시간 전에 제조하여 4℃에 보관하였다. ER binding buffer는 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10% glycerol, 2 mM dithiothrietol, 1 mg/mL bovine serum albumin을 혼합하여 준비하였다. 400 nM [^{3}H] estradiol 60 uL와 ER binding buffer 1,080 uL를 혼합하여 hot mix를 준비하였다. DMSO에 녹인 시료(0.1-250 ug/mL) 1 uL, binding buffer 46.5 uL, hot mix 47.5 uL, 2 nM의 순수한 ERα 또는 ERβ 5 uL를 혼합하여 실온에서 2시간 반응 시켰다. 반응액에 50% HAP slurry 100 uL를 현탁시킨 후 5분마다

vortexing해 주면서15분 동안 얼음 위에서 반응한 다음, ER washing buffer 1 mL을 가하고 vortexing 후 10,000g에서 1분 동안 원심분리 하는 과정을 3회 반복하였다. 회수된 HAP 침전물은 에탄올에 다시 부유시킨 다음, Ecolume scintillation cocktail(ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA)를 이용하여 radioactivity을 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 형광도에 대한 [^{3}H] estradiol의 형광도의 비를 백분율로 표시하여 [^{3}H] estradiol specifically bound값을 나타내었다.

(2) MCF-7 cell proliferation assay

MCF-7 BUS cell은 Dr. Soto(Tufts University School of Medicine, Boston, USA)로부터 분양 받아 5% fetal bovine serum(Sigma-Aldrich Co.)와 100 unit/mL penicillin-streptomycin(Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM, Lonza)에서 5% CO_2, 37℃ incubator(J-2000, Jisico Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 배양하였다(19).

에스트로겐 유사활성 측정을 위하여 사용한 charcoal-dextran treated FBS(CDFBS)는 Soto 등(20)의 방법에 따라 혈청에 함유된 에스트로겐 물질을 제거하기 위해 다음과 같은 과정을 통하여 제조하였다. 멸균수(22 mL)에 1.1 g의 활성탄을 분산시킨 후 250 rpm에서 2분간 원심분리 하여 활성탄 부유입자를 제거하는 과정을 2-3회 반복하였다. 회수된 침전물에 22 mL의 증류수를 가하여 활성탄을 분산시킨 다음, 0.11 g의 덱스트란을 첨가하고 600 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 FBS(20 mL)를 가하고 기포가 생기지 않도록 shaking water bath에서 37℃, 1시간 동안 반응 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 원심튜브로 옮기고 다시 원심분리 하는 과정을 5회 이상 반복하여 활성탄을 완전히 제거하고, 0.45 um 와 0.2 um filter 순으로 여과된 CDFBS를 5 mL씩 분주하여 -20 ℃에서 보관하면서 사용하였다.

유방암 세포 증식에 대한 효능 평가는 5% CDFBS가 함유된 DMEM에 5 X 10^3 cells/well의 농도로 희석된 MCF-7 BUS cell을 96-well plate에 100 uL씩 분주하고 5% CO^2, 37℃에서 배양하였다. 24시간 후에 배지를 제거하고, 시료(추출물, 0.1-250 ug/mL; 분획물, 0.1-10 ug/mL)와 E_2(10^{-12}-10^{-7}M)를 농도별로 각각 가하여 배양하였다. 배양 6일 후에 각 well당 MTT용액 20 uL씩 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO 200 uL에 녹여 microplate reader(ELx800 Uv, Bio-Tek Instrument Inc. Winooski, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 시료의 흡광도의 비를 백분율로 표시하여 세포증식에 대한 에스트로겐 효능을 평가하였다.

(3) Yeast-based estrogenicity assay

본 연구에 사용된 재조합 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae strain* BJ3505(human estrogen receptor를 가지고 있는 recombinant yeast로 서울대학교 강경선 교수님으로부터 분

양 받아 사용하였다(21). 효모배양은 Yeast Nitrogen Base(YNB, Invitrogen, USA)를 함유한 선택배지(yeast nitrogen base, 6.74 g/L; dextrose, 20 g/L; L-lysine, 36 mg/L; L-histidine, 24 mg/L)를 사용하여 30℃, 300 rpmshakingincubator(M5Y-C, Jisico Co., Seoul, Korea)에서 수행하였다. 배양 48시간 후, 600 nm에서 효모배양액의 흡광도가 1.0-2.0정도가 되도록 조정하여 실험에 사용하였다.

재조합 효모를 이용한 에스트로겐 활성은 β-galactosidase 측정을 통하여 조사하였다. 효모 내 receptor 생산을 위하여 50 uM $CuSO_4$가 첨가된 선택배지를 이용하여 효모배양액의 흡광도가 600 nm에서 0.03이 되도록 희석하였다. 50 mL conical tube에 희석된 효모배양액 5 mL과 시료(1-40 ug/mL)와 E_2(0.001 ug/mL) 5 uL를 각각 가하여 혼합한 다음 shaking incubator (30℃, 300 rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 효모배양액의 흡광도가 600 nm에서 0.25가 되도록 희석하여 96-well plate에 100 uL씩 분주하였다. β-Galactosidase 활성은 2 mg/mL *O*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG), 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM β-mercaptoethanol과 25 U/mL zymolase(Enzogenetics, Corvallis, OR, USA)가 첨가된 100 uL Z buffer (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, pH 7.0)을 넣어 유도하였다. 20분간 상온에서 반응한 후, 420 nm와 590 nm에서 각각 흡광도를 측정하고, OD_{420nm}-OD_{590nm}값을 산출하여 음성대조군(negative control)으로 값을 나누었다.

(4) pS2 mRNA expression assay (RT-PCR)

MCF-7 cell을 56 cm^2 plate에 분주하고, 배양 24시간 후에 시료(1-20 ug/mL)와 E_2(0.01 ug/mL)를 가한 다음 6시간 동안 추가 배양하였다. Total RNA는 RNeasy Mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 추출하고, 사용 시까지 -80℃에서 저장하였다(22). 본 연구에서는 다음과 같은 primer를 사용하였다: β-actin, forward 5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3' reverse 5'-TGATCCACATCTGCTGGAAG-30; pS2, forward 5'-TTTGGAGCAGAGAGGAG GCAATGG-3' reverse 5'-TGGTATTAGGATAGAAGCACCAGGG-3'.

시료처리에 의해 생성된 RNA 1 uL에 reaction solution 20 uL (5x Improve-11™ reaction buffer 4.0 uL, dNTP Mix(final concentration 0.5 mM) 1.0 uL, oligo (dT) primer 1.0 uL, RNA 샘플 2.0 uL, $MgCl_2$(25 mM) 4.8uL, ImProm Revers Transcriptase 1.0 uL, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 uL, nuclease free water(ImProm-ll ™ Revers Transcription System, Promega, WI, USA) 6.15 uL)를 가하고 cDNA 합성을 위하여 70℃에서 5분간 배양 후, 얼음 상에서 5분간 식혔다. Reverse transcription reaction solution 15 uL를 각각의 반응액에 첨가하고, 25℃에서 5분, 42℃에서 60분간 방치한 후, transcriptase를 70℃에서 15분간 가열하여 불활성화 시키고, 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. Real-Time PCR은 cDNA 2 uL, each primer 0.4 uL, SYPR Premix Ex Tap™(2x) PCR kit(Takara Bio INC.,

Otsu, Japan) 10 uL 를 혼합하여 7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Inc. California, USA)에서 분석하였다.

바. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균±표준편차로 표시하였으며, Statistical Package for Social Sciences(SPSS, SPSS Inc., Chicago, USA) 통계 프로그램의 분산분석(Duncan, $p<0.05$) 및 상관분석(Pearson correlation, $p<0.05$)을 통하여 검증하였다.

4. 백수오등 복합추출물의 안전성 연구

백수오등 복합추출물의 세계시장 진출을 위해 미국 등에서는 알려져 있지 않은 소재인 백수오, 속단, 당귀와 이들의 혼합추출물인 백수오등 복합추출물의 안전성을 입증할 필요가 있었다. 특히 미국 FDA에서 신규 dietary supplement를 대상으로 시행하는 New Dietary Ingredient 승인을 위해 안전성 자료로서 단회독성과 복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵실험의 유전독성자료를 제시하고자 국내 GLP 기관인 바이오톡스텍(충북 청원)에 의뢰하여 아래와 같은 독성실험을 진행하였다.

가. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질은 백수오등 복합추출물 (FGF271/EstroG-100), 부형제는 주사용수(Choongwae Pharma Corp., Korea)를 사용하였고 음성대조물질은 부형제인 주사용수를 사용하였다. 양성대조물질은 아래 Table 5와 같다.

Table 5. Kind and manufacturer of positive control used for bacterial reverse mutation experiment

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	017K0136	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	S08447	실온	Aldrich, U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	S34773	실온	Aldrich, U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	11126KD	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2 furyl)acrylamide (AF2)	WKK3086	실온	Wako, Japan

균주(*Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA1535, *Salmonella typhimurium* TA1537, *Escherichia coli* WP2*uvrA*(pKM101))는 2008년 7월 14일에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM)에서 구입하여 유전자형을 확인한 후 초저온냉동고 (-70±10 ℃)에 보관하였다.

동결보관된 각 균주는 해동하여 20 mL의 nutrient broth에 배양한 후 turbidity로 균수를 측정하여 1×10^9 cells/mL 이상 되는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다. 배지는 Nutrient broth No.2 (Oxoid, UK)를 약 100 mL의 3차 증류수를 넣고 stirrer로 교반하여 용해시킨 후, 최종농도가 2.5 (w/v)%가 되도록 조제한 후 고압증기 멸균하였다.

Table 6. Names and dosages of positive control for each strains

S9 mix	균주명	명칭	용량 (μg/plate)
−	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2*uvrA*(pKM101)	AF2	0.005
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2*uvrA*(pKM101)	2-AA	2.0

최소 glucose 한천평판배지는 1 L의 3차 증류수에 bacto agar (BD, U.S.A.)를 넣고 고압증기 멸균하였다. 멸균후 VB salts 10배 농축액과 20% glucose (Glucose, DAEJUNG Chemicals&Metals Co., Ltd.)를 각각 첨가하였다.

Top agar는 염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)의 농도가 각각 0.5% 및 0.6%인 top agar를 조제하기 위하여 각각의 물질을 전자저울로 칭량한 후 3차 증류수를 가하고 고압증기 멸균하였다. 살모넬라균주용 top agar는 조제된 용액에 0.5 mM L-Histidine/D-Biotine 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 같은 비율로 혼합하여 사용하였다.

오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입한 S9 (Lot No. : 10011511)과 Cofactor A (Lot No. :A10011211)를 S9과 Cofactor A를 1 : 9의 비율로 혼합하여 Table 7과 같은 S9 mix를 조제하였다.

Table 7. Composition of S9 mix

성 분	각 성분의 함유량/mL
S9	0.1 mL
MgCl2	8 μmol
KCl	33 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Sodium phosphate buffer, pH 7.4	100 μmol

시험물질은 전자저울(CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량한 후 조제용기에 넣고 부형제를 가하여 조제하였다. 본시험의 최고용량을 결정하기 위하여 5,000 μg/plate을 포함하여 2,000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5, 8.19 μg/plate의 용량으로 첨가하였다. 또한 각각의 균주에 대한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하여 본시험과 동일한 방법으로 실시하였다. 용량설정시험의 결과, 대사활성화 존재 유무에 관계없이 모든 용량에서 생육저해가 관찰되지 않았고 시험물질의 침전도 관찰되지 않았다. 따라서, 5,000 μg/plate를 본시험의 최고용량으로 설정하고 이하 공비 2로 2,500, 1,250, 625 및 313 μg/plate의 4용량을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 각 용량의 시험물질액, 음성 및 양성대조물질을 100 μL씩 유리시험관에 넣었다. 각 용량의 비대사활성화 유리시험관에는 0.1 mol/L인산완충액 (pH 7.4)을, 대사활성화 유리시험관에는 S9 mix를 각 500 μL씩 첨가하였다. 각 용량의 비대사활성화 및 대사활성화 유리시험관에 전배양한 각 균주현탁액 100 μL씩을 첨가한 후 37 ℃에서 20분간 진탕배양하였다. 배양 후 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2*uvrA*(pKM101)에는 대장균용 top agar를 각각 2 mL 씩 첨가하여 vortexing하고, 최소 Glucose 한천평판배지에 중층하여 실온 방치하였다. Top agar가 굳은 후 페트리디쉬를 뒤집어서 37 ℃배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientific Co., LTD, Korea)에서 48시간 배양한 후 복귀변이콜로니수를 계측하였다. 본시험 실시와 동시에 미생물 오염유무를 확인하였다. 복귀변이콜로니수는 콜로니카운터 (ProtoCOL, SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하였다. 자동계측이 불가능한 경우에는 육안계수를 실시하였다. 생육저해와 침전을 구별하여 표시하였다.

변이성은 음성 및 양성대조군에서의 평균 복귀변이 콜로니수가 Historical control data의 범위내에 있고 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않으면서 오염이 없고 재현성이 있을 것는 조건에서 판정을 하였다. 관찰결과 아래의 조건을 모두 만족하는 경우양성으로 판정하였다.

- 적어도 1 개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1 용량 이상에서 음성대조군에 비해 2 배 이상 증가할 것.
- 복귀변이 콜로니수가 용량의존적으로 증가할 것.

복귀변이 콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고 평균치 및 표준편차를 구하며 통

계학적 방법은 사용하지 않았다.

나. 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

시험물질은 백수오등 복합추출물 (FGF271/EstroG-100) 은 갈색의 친수성의 분말이었다. 부형제 로는 시험의뢰자가 제공한 정보 및 부형제 검토 결과, 시험물질이 주사용수에 현탁 되었기 때문에 주사용수(Lot No. GBA9003 Choongwae Pharma Corp., Korea)를 선택하였다. 부형제인 주사용수를 음성대조물질로 사용하였다. 양성대조물질로는 Mitomycin C (MMC, 028K1815, Sigma, U.S.A.), Benzo[a]pyrene (B[a]P, 017K1044, Sigma, U.S.A.)를 사용하였다. 세포주는 Chinese Hamster Lung (CHL/IULot No.: 3375917)으로 2006년 10월 25일에 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)으로 부터 구입하였다. 배지는 EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10000 units/mL의 Penicillin G sodium 과 10000 μg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen,U.S.A.)을 100 : 1의 비율로 첨가하여 조제 후 사용 시까지 냉장 보관하였다. 생체외 유전독성시험을 위해 간균질 혼합물질(S9Mix)은 S9 (Lot No. : 10011511)과 Cofactor C (Lot No. : C10011311)를 오리엔탈효모공업주식 회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온냉동고 (-70±10℃)에 보관하였고 동결보관된 S9과 Cofactor C를 해동하여 2 mL : 4.7 mL의 비율로 혼합한 후 S9 mix를 조제하였다. 시험물질의 필요량을 전자저울 (LA230S, CP323S, Sartorius, Germany) 로 칭량하여 소량의 주사용수를 가하여 최고용량을 조제한 후, 이하 단계의 용량에 대해서는 희석하여 조제하였다. 시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다. 본시험의 최고용량은 non-GLP 시험으로 가이드라인에서 추천하는 최고용량인 5,000 μg/mL을 포함하여 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5 μg/mL의 총 9용량으로 아래 Table 8과 같은 조건으로 24시간 배양 후 MTT assay로 세포증식억제시험을 실시하였다.

Table 8. Treatment condition for chromosome aberration test

계열	S9 mix	처리군	사용량 (mL)		
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 및 시험물질액
단시간처리법	-	음성대조군	0.90		0.1
		시험물질군			0.1
	+	음성대조군	0.73	0.17	0.1
		시험물질군			0.1
연속처리법	-	음성대조군			0.1
		시험물질군	0.90		0.1

세포증식억제가 인정되는 경우, 50% 세포증식억제용량 (IC50) 을 산출하였다. 세포증식억제시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화존재 및 비존재 조건과 연속처 리법의 대사활성화

비존재 조건에서에서 세포독성이 관찰되지 않았으므로 용량을 5,000, 2,500 및 1,250 μg/mL으로 설정하였다. 양성대조물질은 Mitomycin C 와 Benzo[a]pyrene 을, 음성대조 물질은 주사용수를 사용하였다. 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 그리고 연속처리법의 비존재하조건에서 배양하였고 종료 후, 슬라이드 검체를 제작하였다. 시험물질의 침전은 시험물질 조제액의 처리시와 배양 종료후에 각 용량별로 관찰하였다. 검체제작은 배양종료 2시간전에 분열중기에서 세포를 멈추게 하기 위하여 Colcemid 용액(Invitrogen, U.S.A.)을 0.2 μg/mL되게 첨가하여 슬라이드 표본을 제작하였다. 건조 후, 3% Giemsa 염색액 (Giemsa, Sigma-Aldrich, U.S.A., in 0.01 mol/L Sörenson phosphate buffer, pH 6.8) 으로 약 20분간 염색한 후 분열중기세포를 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 400 또는 600배 배율로 관찰하였다. 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse) 및 기타 (other; o) 등 염색체 구조이상과 또한 수적 이상으로서 배수체 (polyploid; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication ; end)등의 이상을 가진 이상세포의 빈도를 퍼센트 값으로 구했다. 염색분체의 갭 (chromatid gap; ctg) 또는, 염색체의 갭 (chromosome gap; csg)에 대해서는 구조이상으로 기록하지 않고, 종합판정에서도 포함하지 않았다. 관찰결과 염색체이상을 가진 세포 (gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni 등의 판정기준에 따라 아래 Table 9와 같이 판정하였다.

Table 9. Criteria for chromosome aberration test

이상세포의 평균 출현율	판정
5% 미만	음성 (−)
5% 이상 ~ 10% 미만	의양성 (±)
10% 이상	양성 (+)

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher' exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 검증을 5% 유의수준에서 실시하였다.

다. 마우스를 이용한 소핵시험

시험물질은 백수오등 복합추출물 (FGF271/EstroG-100)이고 부형제는 주사용수 (Choongwae Pharma Corp. Korea)를, 음성대조물질은 시험물질의 부형제를 사용하였다. 양성대조물질은 Mitomycin C 2 mg에 4 mL 주사용수 (Lot No.: GBA9003, Choongwae Pharma Corp.,Korea)를 첨가하여 용해한 후 생리식염주사액 (Lot No.: DAJ9132, Choongwae Pharma Corp., Korea) 을 더하여 2 mg/kg/10 mL로 조제하고 사용시까지 초저온냉동고(-70±10 ℃) 내에 보존하였다. 사용시 해동하여 필요량을 취하여 시험에 사용하였다. 필요량의 시험물질을 전

자저울 (LA230S, CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량한 후 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁 시켰다. 또한, 부형제를 가하여 규정용량을 조제하였다.

시험계는 ICR 수컷 마우스(ORIENTBIO INC., Korea)를 검역·순화를 거쳐 군분리를 하였다. 시험물질은 부형제에 녹여 강제 경구투여 하였고 음성대조군은 시험물질액과 같은 방법으로 부형제를 강제 경구투여 하였다. 양성대조물질은 주사기 (1 mL, 26 G)를 사용하여 1회 복강투여 하였다.

예비용량설정시험은 2,000, 1,000, 300, 100 및 30 mg/kg으로 하여 군당 3마리의 동물로 수행하였고 검체제작시간 설정시험은 2,000 mg/kg의 최고용량을 사용하여 9마리에 투여 한 후 골수세포채취시간을 결정하였다.

본시험에서는 아래 Table 10과 같이 각 군당 5마리의 동물을 사용하여 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 시험물질군, 양성대조군(Mitomicin C (MMC) 2 mg/kg), 음성대조군에는 주사용수를 사용하였다.

Table 10. Experimental condition of micronucleus test

군구성	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1 음성대조	0	10
G2 저용량	500	10
G3 중용량	1,000	10
G4 고용량	2,000	10
G5 양성대조	2	10

일반증상 관찰은 투여직후(0), 투여 후 2 및 24시간에 관찰하였다. 체중은 투여직전 및 골수채취직전에 전자저울 (CP4202S, Sartorius, Germany)로 측정하였다. 시험물질 투여 후 검체제작시간에 대퇴골을 적출하여 200 μL의 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 관류시켜 채취한 골수세포로부터 3% Giemsa염색을 한 골수도말검체를 제작하였다. 검체는 1000배 배율의 현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하여 검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1000개씩 관찰하고, 1개체당 2000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 있어 소핵 다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체 당 500개의 총적혈구에 대한 다염성 적혈구의 비를 구하였다. 관찰결과 음성대조군 및 양성대조군에 있어 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data 의 범위내에 있을 때에 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman 의 추정학적 통계 방법을 사용하여 검증하였고, 처리군에서 통계학적으로 유의하게 증가할 경우 양성으로

판정하였다. 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증하였다. 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램 (version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A.) 을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 5%). 등분산인 경우, One-wayanalysis of variance (ANOVA)를 실시하였다.

라. 단회 경구투여 독성시험

시험물질은 백수오등 복합추출물 (FGF271/EstroG-100), 부형제는 주사용수(Choongwae Pharma Corp., Korea)를 사용하였다. 시험물질은 전자저울 (CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 vortex mixer 로 현탁시키고, 부형제를 가하여 규정농도 (100,200 및 400 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다. 시험계는 Sprague-Dawley 랫트(ORIENTBIO INC., Korea)로 5주령의 수컷과 암컷을 검역·순화를 거쳐 사용하였다. 시험물질 및 부형제는10 mL/kg 으로 경구투여하였다.

투여용량설정 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B10156P)으로 2,000 mg/5 mL/kg 및 4,000mg/10 mL/kg 을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과, 모든 용량에서 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 아래 Table 11과 같이 투여용량은 4,000 mg/kg 을 고용량으로 설정하였고, 공비 2 를 적용한 2,000 및 1,000 mg/kg 을 중용량 및 저용량으로 설정하였다.

대조군에는 부형제인 주사용수를 투여하였다. 일반증상은 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1 일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고 체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7 일 및 14 일 (부검일)에 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO2 가스 마취하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

Table 11. Experimental condition of single oral dose toxicity test

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)
G1 대조군	0	10
G2 시험물질투여군 1	1,000	10
G3 시험물질투여군 2	2,000	10
G4 시험물질투여군 3	4,000	10

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Bartlett test 를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 5%). 그 결과, 등분산이 인정되어 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다 (유의수준: 5%).

5. 코카시안 대상 갱년기 증상 개선 임상시험

가. 임상시험에 필요한 EstroG-100 투여 시료 및 위약 제조

(1) 생약 선정

EstroG-100 정제를 제조하기 위한 품질을 관리하기 위해 백수오(*Cyanchum wilfordii*), 속단(*Phlomis umbrosa*), 당귀(*Angelica gigas*) 생약재의 각 지표성분 함량이 수배된 생약 중 가장 높은 생약을 선정하였다. 백수오, 속단 생약재, 당귀 생약재는 각 3종 이상 (주)대흥교역과 경동시장에서 구매하였다. 각각의 지표성분 (백수오;cinnamic acid, 속단;shanzhiside methylester, 당귀;nodakenin)은 전술된 HPLC를 이용한 방법으로 지표성분의 정량분석을 실시하였다.

(2) 백수오등 복합추출물 제조

백수오, 속단, 당귀를 (주)대흥교역에서 구매하고 일부를 샘플링하여 지표성분 함량을 측정하였다. 열수추출 및 동결건조는 추출물전문제조업체인 화성 소재 (주)성일 바이오엑스에서 아래와 같이 제조하였다.

백수오 생약재 32.5 kg, 속단 생약재 32.5 kg, 당귀 생약재 35kg(1:1:1.077 비율)를 혼합하여 추출기에 투입, 세척하고 1000 L의 정제수를 가하여 95~100℃로 4 시간 추출한 후 10㎛ filter로 여과하고 60℃에서 30 brix로 감압 농축한다. 농축된 열수추출물을 일부를 샘플링하여 지표성분의 함량을 측정하였고, freeze-drying한 후 분쇄하여 백수오, 속단, 당귀 혼합 열수추출물분말(EstroG-100 powder)을 얻었다. 간략한 제조 공정도를 Fig.1에 나타내었다.

(3) 임상시험용 타정 시료 제조

임상시험용 섭취군의 시료로서 EstroG-100을 아래의 비율로 부원료와 배합하여 695mg의 코팅정을 제조하였다. 전분 및 결정셀룰로오스는 결합/붕해제로 첨가하였고 임상시험용 대조군의 시료로는 EstroG-100을 제외한 부원료의 배합으로 동일한 성상의 코팅정으로 제조하여 섞이지 않게 보관하였다. 섭취군 및 대조군의 코팅정을 동일량으로 분쇄하고 각 지표성분별로 전처리하여 정량분석 하였다. Table 12에 이번 임상시험의 섭취군 및 대조군이 섭취할 Tablet의 함량비를 나타내었다.

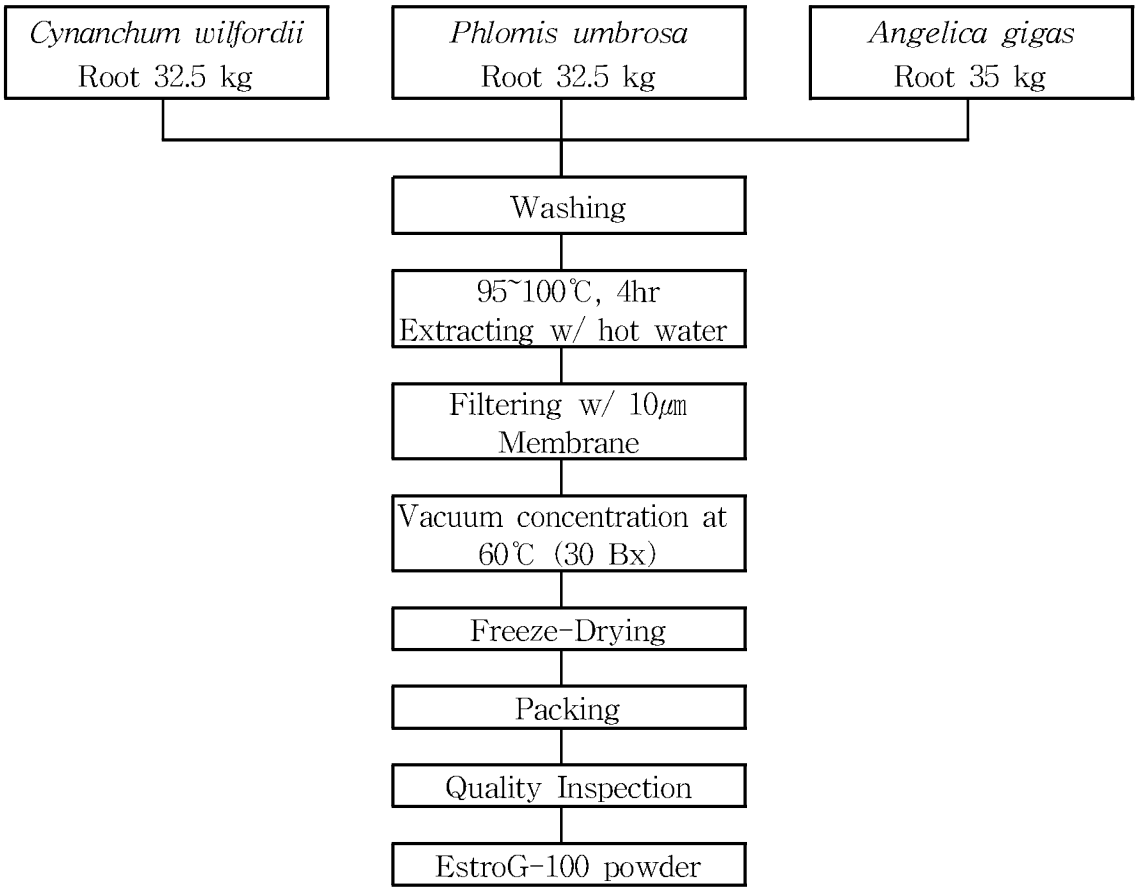

Fig. 1. Scheme of manufacturing process of EstroG-100 powder

나. Caucasian 여성을 대상으로 한 EstroG-100 투여 임상 시험

(1) 임상시험 개요

본 임상실험은 EstroG-100을 투여에 의한 vaginal dryness, hot flush, sleep disorder, mental awareness problem, joint pain, dyspepsia, urinary incontinence 및 fatigue 등 폐경전후 여성의 갱년기 증상의 개선을 평가하는 것이 목적이다. EstroG-100과 비타민, 무기질을 포함한 조성(EstroG-200)에 대해서 이미 한국의 삼성제일병원에서 한국여성에 대해 임상을 수행하였으므로 이번 연구에서는 참여자들을 비아시아계 미국여성으로 제한하였다.

이번 연구는 International Conference on Harmonization / WHO Good Clinical Practice standards (ICH-GCP)에 따라 수행되었다.

Table 12. Composition of EstroG-100 tablet and placebo tablet used for clinical study

Ingredient	Content (%)	
	EstroG-100 Treatment	Placebo
EstroG-100 powder	36.99	-
Corn Starch	23.68	51.74
Crystalline Cellulose	26.76	35.68
Silica	0.89	0.90
Mg-stearate	0.89	0.89
Lac Color	0.72	0.720
TiO2	2.16	2.16
Glycerin mono fatty acid ester	0.72	0.72
HPMC	7.20	7.20
Total	100.00	100.000

(가) 섭취량: 1 정당 695 mg, 보라색 코팅정제로서 실험군과 대조군의 외형은 동일하게 하였고 하루 2정씩 섭취 총 3개월(12주) 동안 섭취토록 하였다. EstroG-100의 섭취량은 하루 514mg으로 설정하였다.

(나) 임상 수행기관

명칭: Friends Medical Group

주소: 2654 West La Palma Ave. Anaheim, CA 92801

임상연구 책임자: ALBERT CHANG, MD

Shady Canyon Medical Group

16300 Sand Canyon, Suite 901 Irvine, CA 92618

(다) Sterling Institutional Research Board (SIRB)

Sterling Independant Service Inc.

6300 Powers Ferry Road, Suit 600-351 Atlanta, GA 30339

(라) 임상대상자 모집

LA Times, Orange County Register, Pennysaver 등 신문광고와 Shady Canyon 및 Friends Medical Group 병원 포스터 부착하여 자발적 참가자를 모집하였다. 참가자는 쿠퍼만 인덱스 20이상인 여성을 선발 대상으로 하였고, 지난 3개월 동안 호르몬대체요법제를 투약한 여성, 자궁절제, 당뇨 등 등 실험에 적합하지 않은 여성은 제외하였다. 아래 Fig. 2와 같이 모집광고를 내어서 병원과 가까운 지역의 여성을 대상으로 하였다.

Fig. 2. Picture of Poster at Shady Canyon and LA times advertizing for recruiting of clinical study volunteers.

(마) 선정기준

임상시험에 참여할 의사를 표시한 여성들로 설문양식에 따라 증등도 이상의 갱년기 증상 (Kupperman Menopause Index (KMI)> or=20)의 대상자를 사전에 유방암과 자궁내막암, 심혈관 질환에 대해 사전 검사를 수행하여 아래의 질환을 가지지 않은 여성을 선정하였다.

유방암과 자궁내막암의 위험이 있는 자, 지난 3개월내에 에스트로겐이나 프로게스테론을 함유한 제품을 사용한 경력이 있는자, 지난 3개월내에 갱년기 증상에 관련된 보충제를 사용한 자, SSRI 등 psychoactive 약물 사용자, BMI 40 kg/m2 초과, 폐경 1년 후에도 불규칙한 출혈이 있는자, 자궁적출수술을 받은사람, 혈압이 조절되지 않은 사람, 갑상선 질환이 있는사람, 당뇨환자, 호르몬의존성 또는 부인과 계통의 암의 경력을 지닌사람, 약물 또는 알코올 중독자, 지적장애가 있는 사람, 유방암의 가족력이 있는 사람, DVT 등 혈액응고장애가 있는 사람

(바) 투여물질과 위약은 동일한 보라색알약과 흰색 PE병에 포장하여 의사와 환자 모두 외양으로 구별할 수 없게 하였다. 실험군의 크기 결정에는 다음과 같은 기준을 적용하였다.

(사) 탈락률은 20% 이내

유의수준(α-error)은 0.05,

양측검정, 검정력은 0.8

(아) Randomization

KMI 값과 인종에 따라 모든 대상자들을 아래와 같이 fixed randomization을 하였다.

① Allocation ratio: Uniform allocation (1:1)

② Stratification: Total 4 strata

인종: 흑인여성, 백인여성

KMI: 30이하, 30초과

③ Block size : 2

(자) 시험일정

임상대상자 모집, 사전설문조사, 사전검사, randomization 수행

아래와 같이 3개월간 투여하고 검사와 설문을 수행함.

Table 13. Time table for clinical study of EstroG-100

Time	0 week	6 weeks after	12 weeks after
Questionnaire	◎	◎	◎
Pre-qualification Testing	◎		
Anthropometric measurement	◎		◎
Biochemical measurement	◎		◎
Interview with Physician	◎	◎	◎

* 설문내용은 갱년기 증상에 대한 설문으로서 Hot flush, palpitation 등을 포함하는 Kupperman's Questionnaire 사용
* 질건조증의 개선 여부에 대한 항목을 추가함.

(차) Primary Endpoints

본 임상에서 확인하고자 하는 주된 측정값은 실험군과 대조군의 12주 동안의 투여 전 후의 KMI 값의 변화로서 그 평균값의 변화가 실험군에서 대조군 대비 유의하게 감소하였는지를 확인하고자 한다. 더불어 설문의 각 세부항목별로 유의성을 평가하였고, 추가된 별도의 항목으로서 질건조증의 개선여부도 확인하였다.

(카) Measurements

본 실험에서는 추가로 효능과 안전성을 검증하기 위해 아래와 같은 항목의 측정을 병행한다.

① 생화학적, 혈액학적 지표

- 대사 및 효능관련 지표: Alkaline Phosphatase, osteocalcin, triglyceride, LDL, HDL and total cholesterol

- 안전성 지표: white blood cell, hemoglobin, platelet, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinine, total protein, albumin, fasting glucose
- 호르몬 변화: Estradiol, Follicle Stimulating Hormone, Growth Hormone

② 신체계측: 체중, BMI

③ 그 외에 심혈관질환 관련 증상을 문진을 통해 확인.

(타) 데이터 처리

통계처리는 intent-to-treat 분석을 기본으로 하여 분석하였고 빠진 data는 LOCF (last-observation-carried-forward) 방법에 따랐다. 정규성이 있는 경우 *t*-test, 비정규성이 있는 경우는 Mann-Whitney U 분석하여 유의적 차이를 분석하였으면 분석결과 p값이 0.05 이하일 경우에 통계적인 유의성이 있다고 판단하였다. 통계프로그램은 SAS for Windows 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina USA)를 이용하여 통계처리

(파) IRB 승인

Sterling Institutional Review (Sterling Independent Services, Inc., 6300 Posers Ferry Rd., suite 600-351, Atalant, GA)에 "The Effect of the Hebal Extract (EstroG-100) on Pre-, Peri-, and Post-menopausal Women: A Randomized, Double-Blind Placebo-controlled study" protocol의 임상시험승인 신청을 하였다.

제 2 절 연구 개발 수행 결과

1. 백수오등 복합추출물 장기보관시험결과

가. 이화학적 지표

(1) Cinnamic acid

EstroG-100 원료의 cinnamic acid 함량 변화를 다음 Table 14에 나타내었다.

Table 14. The changes of cinnamic acid contents in EstroG-100 during 2 years storage

저장기간(월)	기준규격(mg/g)	결과 (mg/g)	판정
0	0.01 ~ 0.04	0.0227±0.0025	적합
3		0.0221±0.0019	적합
6		0.0216±0.0022	적합
9		0.0214±0.0027	적합
12		0.0204±0.0021	적합
18		0.0202±0.0024	적합
24		0.0197±0.0024	적합

(2) Shanzhiside methylester

EstroG-100 원료의 shanzhiside methyleser 함량 변화를 다음 Table 15에 나타내었다.

Table 15. The changes of shanzhiside methylester contents in EstroG-100 during 2 years storage

저장기간(월)	기준규격(mg/g)	결과(mg/g)	판정
0	0.5 ~ 1.5	1.0238±0.0642	적합
3		1.0215±0.0474	적합
6		1.0056±0.0803	적합
9		0.9556±0.0610	적합
12		0.9487±0.0693	적합
18		0.9396±0.0530	적합
24		0.9082±0.0582	적합

(3) Nodakenin

EstroG-100 원료의 shanzhiside methyleser 함량 변화를 다음 Table 16에 나타내었다.

Table 16. The changes of nodakenin contents in EstroG-100 during 2 years storage

저장기간(월)	기준규격	결과	판정
0	3.9 ~ 8.0	6.2955±0.3283	적합
3		6.1515±0.3268	적합
6		6.0831±0.2892	적합
9		5.9860±0.3057	적합
12		5.7977±0.3825	적합
18		5.6959±0.3365	적합
24		5.4831±0.3281	적합

나. 미생물학적 지표 (대장균군)

EstroG-100의 장기보관 중 대장균군의 검출 여부를 다음 Table 17에 나타내었다.

Table 17. Coli form bacteria test of EstroG-100 during 2 years storage

저장기간(월)	기준규격	결과	판정
0	불검출	불검출	적합
3		불검출	적합
6		불검출	적합
9		불검출	적합
12		불검출	적합
18		불검출	적합
24		불검출	적합

다. 관능적 지표

EstroG-100의 장기보관 중 관능적 지표의 하나인 성상에 대한 결과를 Table 18에 나타내었다.

Table 18. Appearance change of EstroG-100 during 2 years storage

저장기간(월)	기준규격	결과	판정
0	갈색의 분말	갈색의 분말	적합
3		갈색의 분말	적합
6		갈색의 분말	적합
9		갈색의 분말	적합
12		갈색의 분말	적합
18		갈색의 분말	적합
24		갈색의 분말	적합

라. 안전성 품질 지표

EstroG-100의 원료인 생약 등에서 포함될 수도 있는 중금속에 대한 결과를 다음 Table 19에 나타내었다.

Table 19. The heavy metal contents of EstroG-100

시험항목	기준규격 (mg/Kg)	결과(mg/Kg)	판정
납	1.0 이하	0.1	적합
총비소	1.0 이하	0.0	적합
카드뮴	0.5 이하	0.0	적합
총수은	0.5 이하	0.0	적합

백수오등 복합추출물의 유통기간을 설정하기 위해 25±2℃/상대습도 60±5%의 저장조건 하에서 cinnamic acid, shanzhiside methylester, nodakenin의 이화학적 안정성과 성상 및 대장균군의 정량분석을 통해 미생물학적 및 관능적 지표를 확인하는 장기보존실험을 24개월에 걸쳐 진행하였다. 또한 안전성을 확보하기 위한 품질 지표를 추가하여 중금속 및 농약성분의 시험성적을 확인하였다.

이화학적 안정성은 백수오등 복합추출물의 지표성분인 cinnamic acid, shanzhiside methylester, nodakenin의 저장기간에 따른 함량 변화를 확인하여 판단하였다. Cinnamic acid의 기준규격은 0.01~0.04 mg/g이며, 백수오등 복합추출물의 검체인 TD 001~003의 cinnamic acid 함량을 24개월에 걸쳐 분석한 결과, 기준규격의 범위에 포함되는 0.0197±0.0024 mg/g으로 나타났다. Shanzhiside methylester의 기준규격은 0.5~1.5 mg/g이며, 백수오등 복합추출물의 검체인 TD 001~003의 shanzhiside methylester 함량을 24개월에 걸쳐 분석한 결과, 기준규격의 범위에 포함되는 0.9082±0.0582 mg/g으로 나타났다. Nodakenin의 기준규격은 3.9~8.0 mg/g이며, 백수오등 복합추출물의 검체인 TD 001~003의 nodakenin 함량을 24개월에 걸쳐 분석한 결과, 기준규격의 범위에 포함되는 5.4831±0.3281 mg/g으로 나타났다. 24개월에 걸쳐 분석한 결과치가 모두 기준규격에 만족하므로 24개월의 저장 기간 동안 이화학적 안정성을 확인하였다.

2. 백수오등 복합추출물을 함유한 제형 및 제품개발

가. 일반항목 시험

경질캅셀 및 타정제품을 GMP 업체에서 시생산한 후 가속실험 조건에 따라 보관실험을 한 결과, 아래와 Table 20, 21과 같은 data를 얻었다.

Table 20. The results of hard-capsule containing EstorG-100 in accelerated condition

조건 / 항목	초기	25±2℃/상대습도 60±5%			30±2℃/상대습도 75±5%			40±2℃/상대습도 75±5%		
기간	-	2개월	4개월	6개월	2개월	4개월	6개월	2개월	4개월	6개월
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
붕해도(분)	13	13	12	13	12	11	12	12	12	11

Table 21. The results of coated tablet containing EstorG-100 in accelerated condition

조건 / 항목	초기	25±2℃/상대습도 60±5%			30±2℃/상대습도 75±5%			40±2℃/상대습도 75±5%		
기간	-	2개월	4개월	6개월	2개월	4개월	6개월	2개월	4개월	6개월
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
붕해도(분)	31	31	32	30	30	30	30	29	30	30

나. 경질캅셀 유통기한

(1) 저장온도별 저장기간에 따른 경질 캅셀의 각 지표성분 함량 변화

EstroG-100의 가속시험에서의 3가지 지표성분 cinnamic acid, shanzhiside methylester, nodakin의 분석결과를 아래 표 22, 23, 24에 각각 나타내었다.

Table 22. Cinnmic acid contents (mg/g) of hard capsule product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	0.01260±0.00117		
2	0.01252±0.00131	0.01240±0.00110	0.01239±0.00123
4	0.01204±0.00118	0.01199±0.00103	0.01170±0.00112
6	0.01203±0.00108	0.01193±0.00101	0.01173±0.00130

Table 23. Shanzhiside methylester contents (mg/g) of hard capsule product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	0.45537±0.01494		
2	0.45260±0.01451	0.45183±0.01435	0.44942±0.01409
4	0.44577±0.01152	0.44443±0.01861	0.44266±0.01151
6	0.44478±0.01520	0.44398±0.01843	0.44210±0.01188

Table 24. Nodakenin contents (mg/g) of hard capsule product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	2.48757±0.06771		
2	2.47041±0.05907	2.46953±0.05931	2.44742±0.06310
4	2.45815±0.05866	2.45009±0.05485	2.43522±0.05684
6	2.44219±0.06864	2.43633±0.07107	2.43080±0.05247

(2) 유통기한 산출

지표성분의 감소속도를 분석한 결과 cinnamic acid는 1차 반응식에, shanzhiside methylester는 0차 반응식에 그리고, nodakenin의 변화속도는 1차 반응식에 가장 유사하였다. 유통온도가 정해지지 않은 제품에 대한 유통기한 산출방법에 따라 cinnamic acid의 경우 약 156개월, shanzhiside methylester의 경우 142개월, nodakenin의 경우 158개월로 나타났다. 이는 현재 국내에서 상업적으로 유통기한이 24개월임으로 유통기한을 24개월로 설정하는 데 무리가 없었다. 아래 Table 25, 26, 27과 같이 세 가지 지표성분에 대한 기준규격이 유지되는 기간을 나타내었다.

Table 25. Calculated shelf life of hard capsule product containing EstroG-100 regarding to cinnamic acid in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
-4.3739	-5.5018	1.1279	0.0870	155.58개월

Table 26. Calculated shelf life of hard capsule product containing EstroG-100 regarding to shanzhiside methylester in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
0.4554	0.2048	0.2506	0.0212	141.78개월

Table 27. Calculated shelf life of hard capsule product containing EstroG-100 regarding to nodakenin in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
0.9113	0.4640	0.4473	0.0340	157.69개월

나. 코팅정제 유통기한

(1) 저장온도별 저장기간에 따른 코팅정제의 각 지표성분 함량 변화

가속시험 조건에서 코팅정제에 포함된 각 지표성분의 함량 변화를 다음 Table 28,29,30에 나타내었다.

Table 28. Cinnamic acid contents (mg/g) of coated tablet product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	0.01111±0.00048	0.01111±0.00048	0.01111±0.00048
2	0.01105±0.00047	0.01101±0.00049	0.01092±0.00046
4	0.01081±0.00041	0.01070±0.00061	0.01065±0.00043
6	0.01074±0.00056	0.01070±0.00041	0.01050±0.00080

Table 29. Shanzhiside methylester contents (mg/g) of coated tablet product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	0.34006±0.00946	0.34006±0.00946	0.34006±0.00946
2	0.33837±0.00868	0.33722±0.00859	0.33560±0.00878
4	0.33144±0.00922	0.32830±0.01603	0.32670±0.01646
6	0.32857±0.01453	0.32882±0.01014	0.32802±0.01162

Table 30. Nodakenin contents (mg/g) of coated tablet product in accelerated condition

Month	25℃	30℃	40℃
0	1.65610±0.05618	1.65610±0.05618	1.65610±0.05618
2	1.63639±0.03555	1.63548±0.03480	1.62892±0.03545
4	1.61789±0.03060	1.61277±0.04478	1.61047±0.02867
6	1.61490±0.03772	1.61116±0.03155	1.60220±0.05478

(2) 코팅정제 유통기한 산출

분석 결과 cinnamic acid는 1차 반응식을, shanzhiside methylester는 0차 반응식을 그리고, nodakenin은 1차 반응식을 따르는 것으로 나타났다. 유통온도가 정해지지 않은 제품대한 유통기한 산출방법에 따라 cinnamic acid의 경우 약 293개월, shanzhiside methylester의 경우 106개월, nodakenin의 경우 128개월로 나타났다. 이는 현재 국내에서 상업적으로 유통기한이 24개월임으로 유통기한을 24개월로 설정하는 데 무리가 없었다. 아래 Table 31, 32, 33에 세 가지

지표성분에 대한 기준규격이 유지되는 기간을 나타내었다.

Table 31. Calculated shelf life of coated table product containing EstroG-100 regarding to cinnamic acid in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
-4.4999	-5.9638	1.4639	0.0598	293.62개월

Table 32. Calulated shelf life of coated table product containing EstroG-100 regarding to shanzhiside methylester in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
0.340	0.129	0.211	0.0238	106.38개월

Table 33. Calculated shelf life of coated table product containing EstroG-100 regarding to nodakenin in accelerated condition

최초함량(A)	품질규격(B)	A-B	연간변화 반응속도상수(K′)	((A-B)/K′)x12
0.5045	0.0020	0.5025	0.0469	128.47개월

3. 백수오, 속단, 당귀의 유효성분 연구

가. 백하수오, 속단, 당귀 용매별 추출물의 유방암 세포 증식 효과

에스트로겐 활성을 평가하기 위해 MCF-7 BUS cell에 대한 0.1-250 ug/mL의 농도범위에서 용매별 추출물의 세포증식효과를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다(백하수오의 경우, 추출 수율이 낮아 이 후 실험에서 제외함). 속단의 경우, 열수 추출물은 대조군에 비해 모두 유의적으로 높은 세포증식효과를 보였고, 250 ug/mL에서 121%의 증식율을 나타내었다. 70% 에탄올 추출물은 10 ug/mL과 100 ug/mL에서 각각 103%와 108%의 세포증식을 보였으나, 250 ug/mL 에서는 오히려 세포증식을 억제하는 효과를 나타내었다. 부탄올 추출물은 대조군에 비해 모든 농도에서 108%의 세포증식효과를 보인 반면, 다이클로로메탄 추출물은 250 ug/mL에서만 108%의 증식효과를 보였다. 한편, 당귀에서는 열수 추출물의 경우 모든 농도범위에서 우수한 세포증식효과를 나타내었으며, 250 ug/mL에서 최대 138%까지 증식시키는 효과를 보였다. 70% 에탄올 추출물에서는 100 ug/mL에서 111%의 증식율을 보였으나 250 ug/mL에서는 억제효과를 나타내었다. 부탄올과 다이클로로메탄 추출물에서는 1.0 ug/mL까지는 약 105% 정도로 약간의 세포증식효과를 나타내었으나, 이 후 농도가 증가함에 따라 증식이 급속하게 억제되었다. 그러

나 모든 시료에서 약물대조군인 E_2보다 낮은 증식효과를 보임으로써 partial agonist의 형태를 보였다.

Yang 등(23)은 일당귀의 80% 에탄올 추출물(4.0-62.5 ug/mL)이 MCF-7 cell 에 대해 108%의 증식효과를 나타내었으나, 250 ug/mL에서는 억제 효과를 나타내었다고 보고하였다. Amato 등(24)은 상업용 당귀 알코올 추출액이 MCF-7 cell에서 17β-estradiol에 비해 유의적인 세포증식 효과를 보고하였다. Hua 등(25)은 감초의 dimethylsulfoxide 추출물(10-100 ug/mL)이 MCF-7 cell에 대해 100 ug/mL에서 약 180%의 세포증식이 나타났으며, 100 ug/mL 이상의 농도에서는 오히려 세포 증식이 억제되었다고 하였다. 또한, 헥산 추출물에서는 모든 농도에서 증식효과가 나타나지 않은 반면, 에탄올 추출물에서는 100 ug/mL에서 약 180%의 세포 증식이 나타났으며, 물 추출물에서도 250 ug/mL에서 약 130%정도의 세포 증식을 유도함으로써 에스트로겐 활성물질이 열수 및 에탄올 추출 시 용출되는 특성을 보인다고 하였다.

나. 속단과 당귀 용매별 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석

본 연구는 극성 및 비극성 추출 용매에 따른 속단과 당귀 추출물의 총페놀 화합물 함량을 검토하기 위하여 열수, 70% 에탄올, 부탄올, 다이클로로메탄을 사용하였다. Table 34에서와 같이, 속단과 당귀 추출물의 수율과 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량은 추출용매 종류에 따라 각각 다르게 나타났다. 수율은 70% 에탄올 > 부탄올 > 다이클로로메탄 > 열수 순이었다. 특히 70% 에탄올을 추출용매로 사용한 경우의 수율이 속단과 당귀가 각각 22%와 51%로 다른 용매에 비해 각각 4배와 10배 정도 높았다. 총폴리페놀 함량은 부탄올 > 다이클로로메탄 > 70% 에탄올 > 열수 순이었고, 총폴플라보노이드 함량은 70% 에탄올 > 부탄올 > 다이클로로메탄 > 열수 순으로 분석되었다. 특히, 속단과 당귀에 대해 부탄올과 70% 에탄올을 추출용매로 이용할 때 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량이 각각 7%와 3%, 3%와 2%로 나타났다. 이는 열수추출물과 비교하면 총폴리페놀과 총플라보노이드는 최대 7배와 4배로 높았다.

식물에 존재하는 phytochemical의 일종인 폴리페놀 및 플라보노이드의 에스트로겐 활성이 보고되고 있다(26-28). 따라서 용매별 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량과 에스트로겐 활성과의 상관성을 검토하였다(Fig. 4). 에스트로겐 활성과 총폴리페놀 함량 간 상관계수와 유의확률은 각각 0.064와 -0.254, 총플라보노이드 함량에서는 각각 0.096과 -0.310으로 에스트로겐 활성과 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 간에는 직접적인 상관관계가 나타나지 않았다. Mfenyana 등(29)은 cyclopia 추출물의 에스트로겐 활성과 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 사이의 상관성을 분석한 결과, 추출물 내 함량보다는 특정한 폴리페놀 성분이 에스트로겐 활성에 영향을 미친다고 보고하였다.

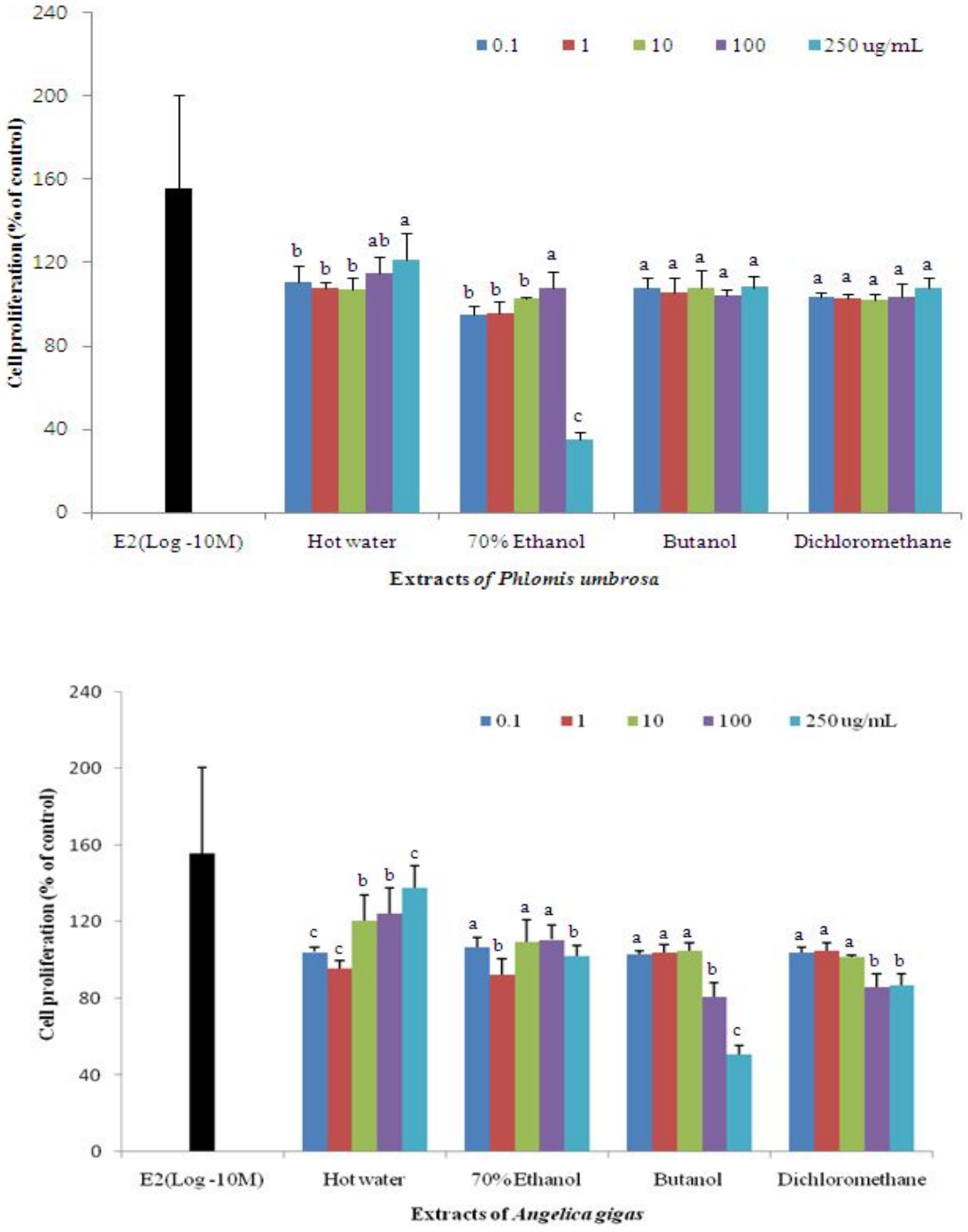

Fig. 3. MCF-7 cell proliferation of various solvent extracts from *Phlomis umbrosa* Turcz(upper panel) and *Angelica gigas* Nakai(lower panel). 17β-estradiol (E_2) was used at 10^{-10} M. Means with different letters (a-c) are significantly different at $p<0.05$.

Table 34. Yields and contents of total polyphenol and flavonoid in the various extracts from *Phlomis umbrosa* Turcz and *Angelica gigas* Nakai

Sample	Extract	Yield (%)	Polyphenol (%)	Flavonoid (%)
Phlomis umbrosa	Hot water	4.8	0.890 ± 0.04 d	0.661 ± 0.28 c
	70% Ethanol	21.9	3.483 ± 0.25 c	2.260 ± 0.53 a
	Butanol	5.5	6.986 ± 0.22 a	1.911 ± 0.19 a
	Dichloromethane	3.8	4.315 ± 0.06 b	1.188 ± 0.04 b
Angelica gigas	Hot water	4.9	0.955 ± 0.02 c	0.828 ± 0.01 c
	70% Ethanol	50.5	0.992 ± 0.03 c	1.994 ± 0.30 a
	Butanol	8.3	3.301 ± 0.14 a	1.206 ± 0.16 b
	Dichloromethane	6.8	1.621 ± 0.11 b	0.602 ± 0.01 c

Means with different letters (a-d) are significantly different at $p<0.05$.

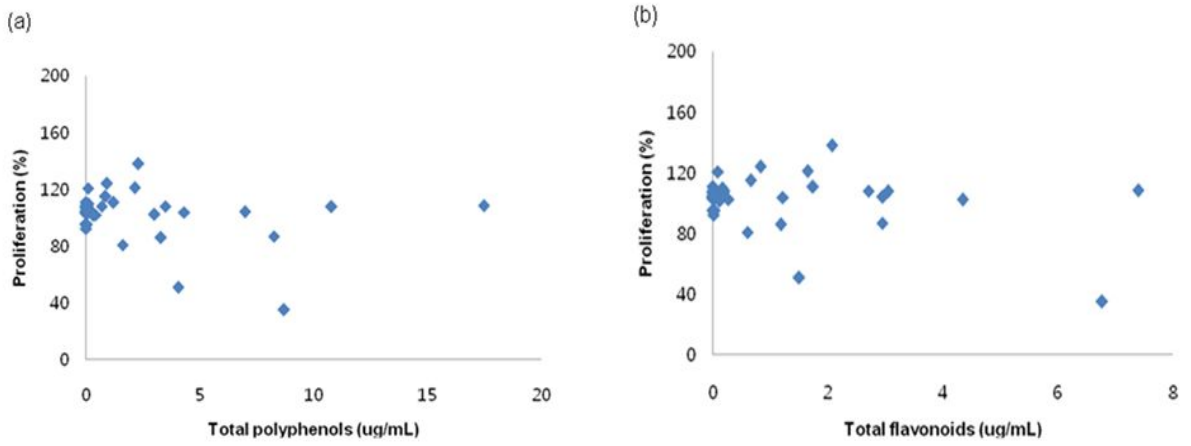

Fig. 4. Correlation between MCF-7 cell proliferation effects of various solvent extracts from *Angelica gigas* Nakai and total polyphenol (a) or flavonoid (b) contents.

Fujimoto 등(30)은 에스트로겐 활성은 폴리페놀이나 플라보노이드 외 리그난 등의 성분도 관계하며, 폴리페놀 중에서도 세포 내외로의 흡수나 전달 용이성 등의 차이로 인하여 상관성이 낮게 나온다고 하였다. 따라서, 당귀의 에스트로겐 활성은 추출물 내 폴리페놀 성분의 함량보다는 특정 폴리페놀 화합물의 존재유무에 의해 영향을 받는 것으로 판단된다. 이상과 같이, 본 연구에서 가장 높은 증식효과를 보인 당귀 열수추출물에서 에스트로겐 활성에 영향을 주는 성분이 함유되어 있음을 예상하고, 당귀 열수추출물에 대해 chromatography를 이용한 분획에 따른 활성변화를 조사하였다. 또한, 우수 활성 획분에 대해 기존에 보고된 식물성 에스트로겐 성분과 기타 폴리페놀 화합물 표준품의 크로마토그램 비교를 통하여 당귀 내 에스트로겐 활성 성분을 추정하고자 하였다.

다. 당귀 용매별 추출물 내 페놀화합물의 HPLC profiling

당귀 용매별 추출물의 에스트로겐 활성에 영향을 주는 폴리페놀 화합물의 종류를 조사하고자 HPLC를 이용한 정성 분석을 수행하였다(Fig. 5). 모든 추출물에서 공통적으로 당귀의 지표성분으로 알려진 nodakenin과 decursin이 검출되었다. 열수, 70% 에탄올, 부탄올 추출물에서는 chlorogenic acid 계열로 추정되는 성분이 검출되었으나, 다이클로로메탄올 추출물에서는 분석되지 않았다. 한편, 당귀 열수추출물에서는 다른 추출물과 달리 caffeic acid 계열로 추정되는 성분이 분석되었다. Ahn 등(31)은 당귀 메탄올추출물 내 폴리페놀 화합물은 주로 coumarin계열 성분으로 nodakenin, peucedanone, marmesin, decursinol, 7-hydroxy-6-(2R-hydroxy-3-methylbut-3-enyl) coumarin, demethylsuberosin, decursin, decursinol angelate, isoimperatorin 등임을 보고하였다. 이와 같이, 당귀의 폴리페놀 화합물은 추출조건에 따라 그 조성에서 차이는 보이지만 nodakenin, decursin과 같이 동일하게 검출되는 성분도 존재하였다. 특히, 당귀 열수추출물에서는caffeic acid와 cichoric acid가 특이적으로 검출됨을 알 수 있었다.

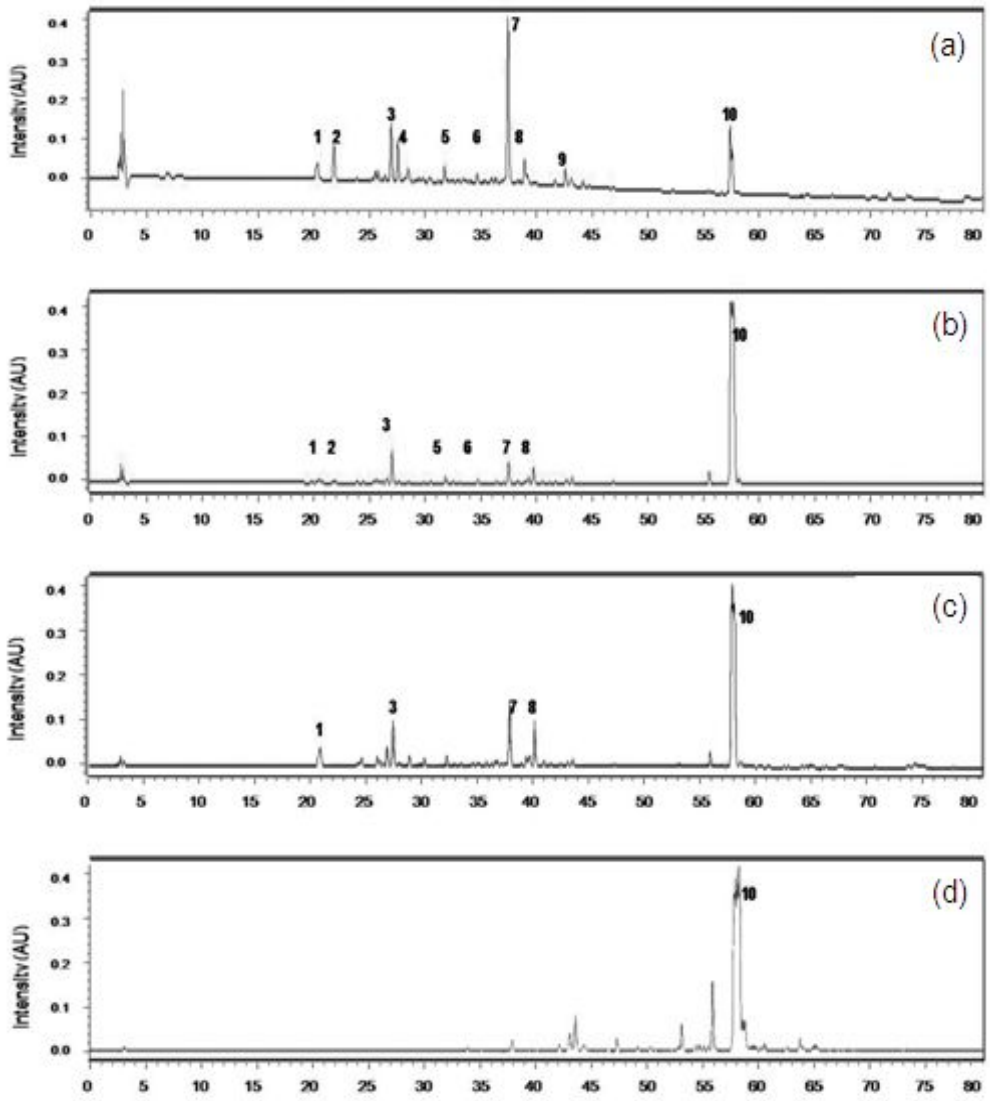

Fig. 5. HPLC chromatograms of the hot water (a), 70% ethanol (b), butanol (c), and dichloromethane (d) extracts from *Angelica gigas* Nakai. Various extracts from *A. gigas* Nakai was subjected to separation on a Phenomenex Luna-C18 column using a linear gradient of methanol (0-100%) and water (100-0%) at a flow rate of 1.0 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm. 1, unknown; 2, unknown; 3, chlorogenic acid; 4, caffeic acid; 5, unknown; 6, cichoric acid; 7, nodakenin; 8, unknown; 9, unknown; 10, decursin.

라. 당귀열수추출물로부터 식물성에스트로겐 활성물질 분리 및 구조 동정

C18 cartridge를 이용하여 얻은 당귀열수추출물의 90개 획분에 대한 유방암 세포증식 효능을 절대량 대비로 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. 90개 획분은 77-126%의 세포 증식 효과를 보였으며, 가장 높은 활성은 메탄올 함량이 약 23%와 34%인 이동상 조건에서 분리되었다. 따라서 당귀의 활성성분은 주로 23% 이상의 메탄올이 함유된 조건에서 용출됨을 확인할 수 있었다.

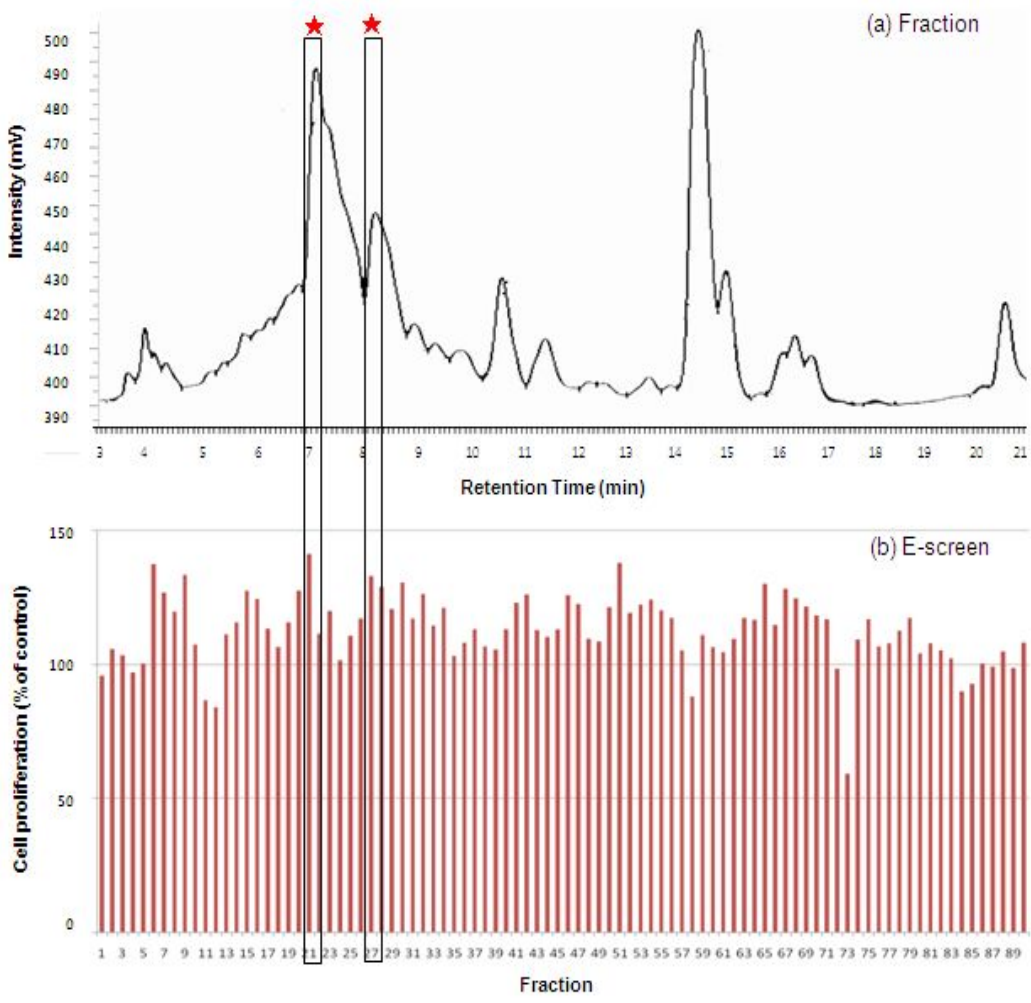

Fig. 6. HPLC chromatograms (upper panel) and MCF-7 cell proliferation (lower panel) of the fractions through high-performance liquid chromatography. Hot water extract from *Angelica gigas* Nakai was subjected to separation on a Delta-Pak™C18 cartridge using a linear gradient of methanol (0-100%) and water (100-0%) at a flow rate of 1.0 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm.

가장 우수한 세포 증식을 보인 21번(F21)과 28번(F28) 획분을 선정하여 농도별 세포증식에 대한 효능을 조사하였다(Fig. 7). 그 결과, F21과 F28은 0.1-10 ug/mL에서 각각 132-178%와 130-163%의 세포 증식을 보였다. 특히, 10 ug/mL에서 F21은 178%, F28은 163%의 최대 증식 효과를 보임으로써 당귀열수추출물(250 ug/mL에서 최대 138%)보다 정제된 활성을 나타내었다. 또한, 모든 시료에서 약물대조군인 E_2와 유사한 증식효과를 보임으로써 full agonist의 형태를 보였다. 한편, genistein 은 기존 연구와 유사하게 0.001 ug/mL에서 200%의 증식효과를 보여 F21과 F28보다 우수한 유방암 세포 증식을 보였다(32,33). 따라서 우수한 세포 증식 효과를 보인 F21과 F28을 선정하여 구조를 동정하였다.

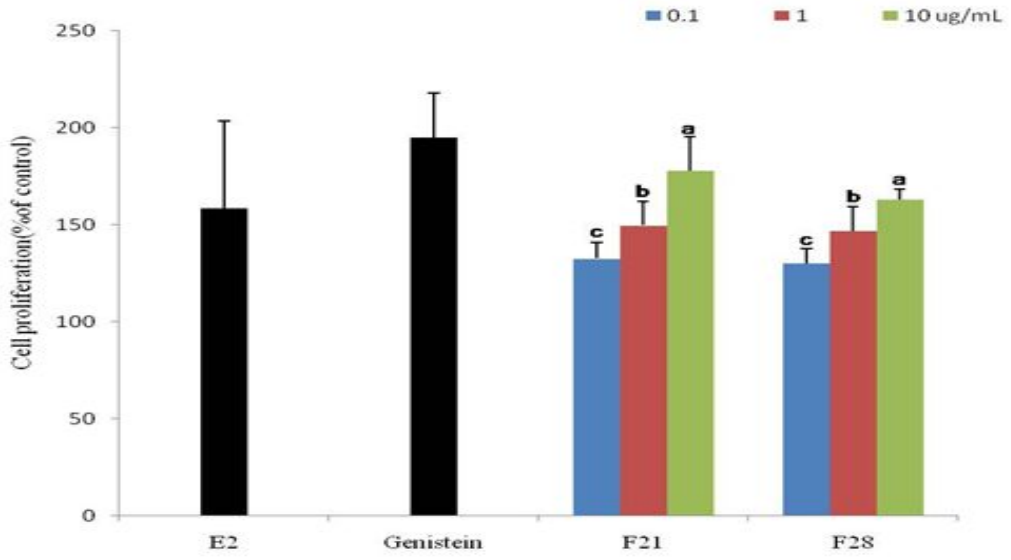

Fig. 7. MCF-7 cell proliferation of fraction 21 and fraction 28 from *Angelica gigas* Nakai. 17β-estradiol (E_2) and genistein were used at 10^{-10} M and 10^{-7}M, respectively. Means with different letters (a-c) are significantly different at $p<0.05$.

우수 활성 획분의 HPLC 분석 결과(Fig. 8), F28은 28분대의 retention time에서 단일 피크를 보였고, 표준품과 비교한 결과 caffeic acid와 일치하였다. 그러나, F21의 경우에는 23분대에 단일피크를 보이기는 했지만 일치하는 표준품이 없어 F28을 선정하여 이후 구조분석을 수행하였다.

Fig. 9와 같이, F28과 표준품으로 사용한 caffeic acid 모두 181, 163, 144 m/z에서 강한 ion peak를 보임으로써Park등이 보고한 caffeic acid와 유사한 이온화 경향을 나타내었다(34). Caffeic acid 의 hydroxyl groups의 산소원자에 양성자(H^+)가 더해져 양성화된 분자 이온인 $[M+H]^+$이 생성되어 m/z=181에서 많은 이온을 방출하게 된다. 다량의 이온들은 collision-induced dissociation에 의한 더욱 이온화가 진행되어 carboxyethenyl group으로부터 물분자의 이탈이 진행되면서 m/z=163의 피크가 용출되는데 이는 $[M+H]^+-H_2O$를 의미한다.

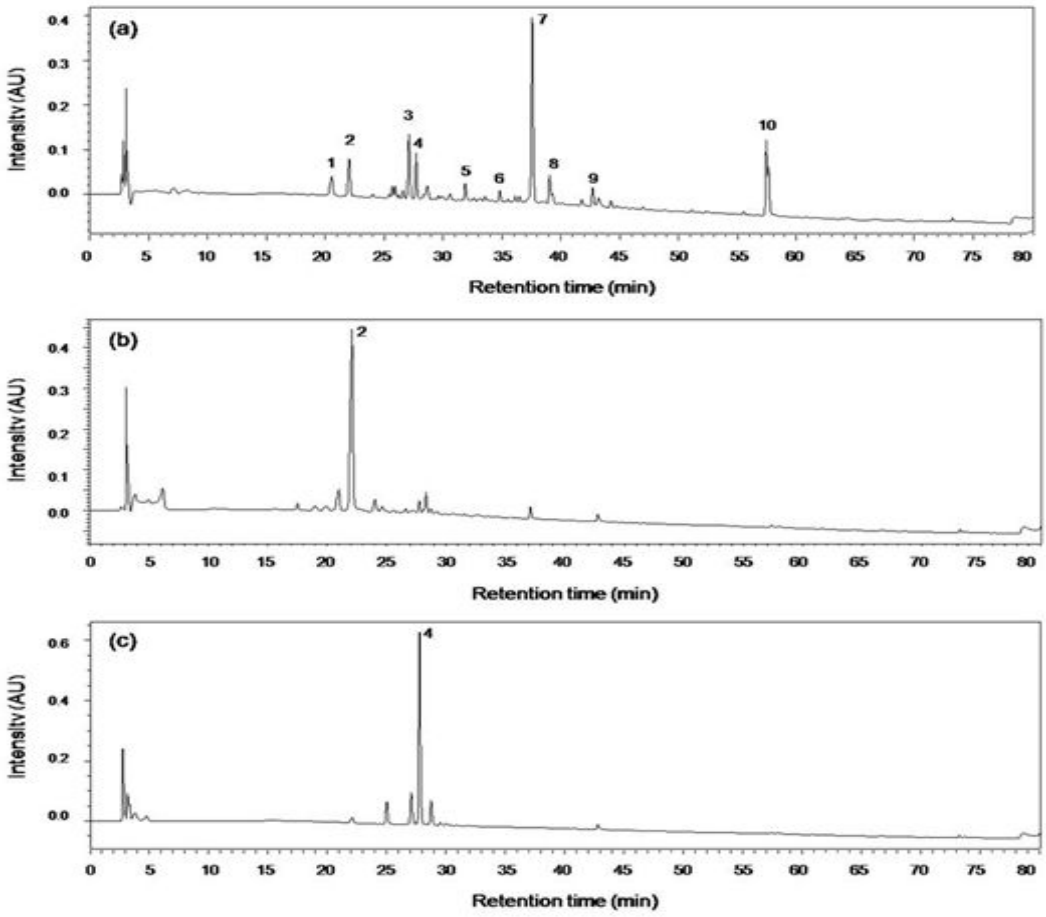

Fig. 8. HPLC chromatograms of hot water extract from *Angelica gigas* Nakai (a) and its estrogenic fractions (F21, b; F28, C).

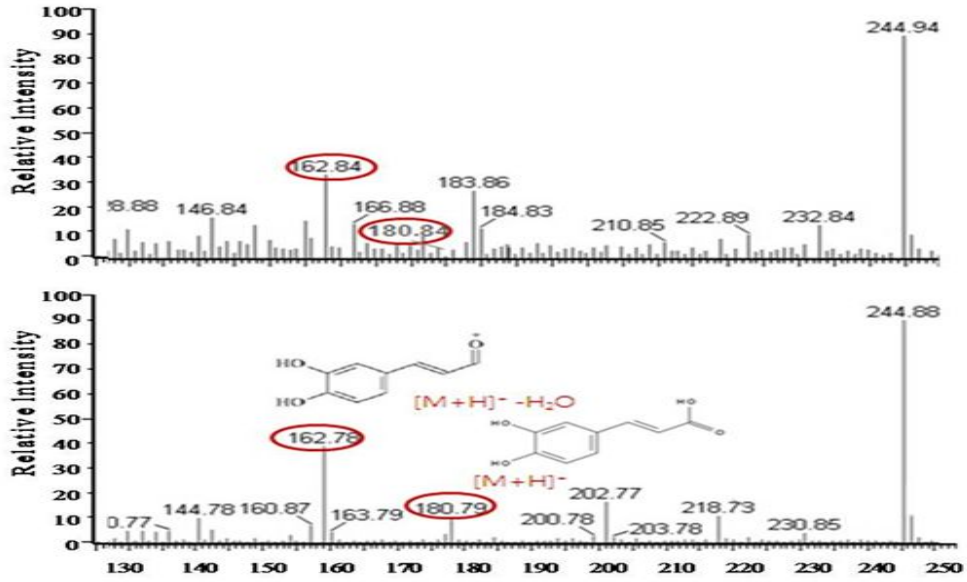

Fig. 9. Mass spectra of F28 isolated from hot water extract in *Angelica gigas* Nakai (upper panel) and caffeic acid (lower panel).

한편, ^{1}H-NMR을 통하여 F28과 caffeic acid의 spectra를 비교한 결과는 Fig 10 및 Table 35와 같다. F28은 7.53, 7.03, 6.93. 6.77, 6.22 ppm에서 caffeic acid와 유사한 signal을 보였으며, 이는 Lim 등(35)의 결과와도 일치하였다.

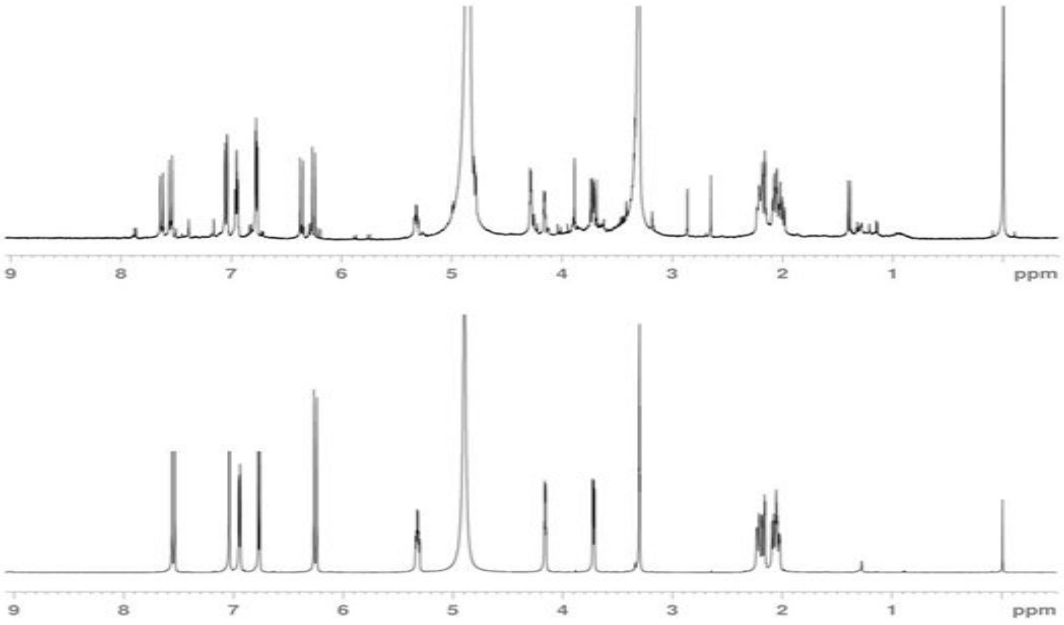

Fig. 10. ^{1}H-NMR spectra of F28 isolated from hot water extract in *Angelica gigas* Nakai (upper panel) and caffeic acid (lower panel).

Table 35. ^{1}H-NMR spectral data of F28 isolated from hot water extract in *Angelica gigas* Nakai and caffeic acid

Position	δH (ppm)		
	F28	Caffeic acid	Reference (Lim et al., 2003)
C1	-	-	-
C2	7.03	7.03	7.02
C3	-	-	-
C4	-	-	-
C5	6.77	6.77	6.77
C6	6.93	6.93	6.92
C7	7.53	7.54	7.53
C8	6.22	6.22	6.21
C9	-	-	-

이상과 같이, HPLC, Mass spectrometer, ^{1}H-NMR을 이용하여 가장 우수한 유방암 세포 증식 효과를 보인 F28의 구조를 동정한 결과, caffeic acid로 확인되었다(Fig. 11).

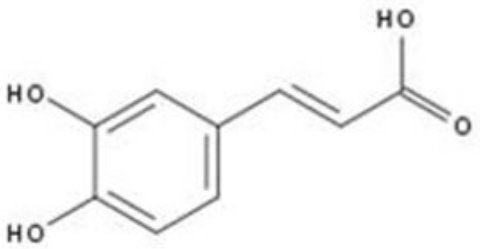

Fig. 11. Structure of caffeic acid.

마. 당귀유래 활성물질의 에스트로겐 활성 평가

당귀열수추출물 내 활성성분으로 동정된 caffeic acid를 이용하여 ER competitive binding, cell proliferation assay, yeast-based estrogenicity assay, pS2 mRNA expression assay를 이용하여 에스트로겐 활성을 확인하였다.

(1) ER competitive binding

ERα와ERβ에 대한 caffeic acid와 [^{3}H]E_2와의 경쟁적 결합능을 조사한 결과는 Fig. 12과 같다. Caffeic acid는 1-40 ug/mL 농도에서 ERα(최대 27%)보다 ERβ(최대 79%)와 더욱 강하게

결합하며 12.81 ug/mL의 IC_{50}값을 나타내었다. Boue 등(31)은 soybean, red clover등의 식물성 에스트로겐 추출물의 ER binding에서 ERβ와의 친화력이 ERα보다 높다고 하여, 본 연구와 유사한 경향을 보였다. 한편, caffeic acid phenethyl ester, kudzu root, soybean 추출물의 ERβ에 대한 IC_{50}값은 각각 13.93 ug/mL, 22 ug/mL, 100 ug/mL로 보고되었다(18,36,37). 따라서, 당귀의 활성성분인caffeic acid는 ERα 보다 ERβ와의 친화력이 더욱 강한 식물성에스트로겐으로서의 효과를 기대할 수 있었다.

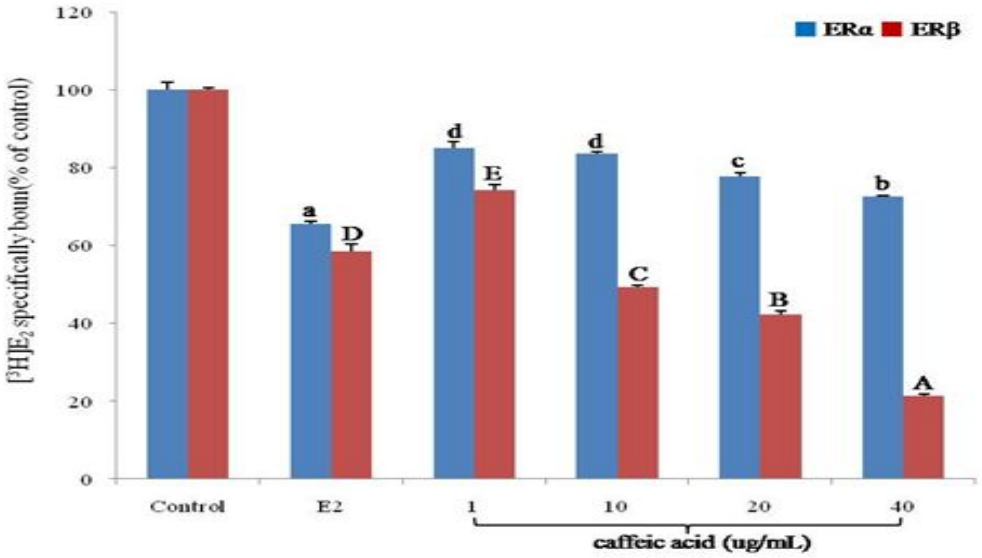

Fig. 12. Concentration-dependent displacement of [3H]17β-estradiol (E_2) binding to the human recombinant estrogen receptor (ER) α and β by unlabeled E_2 (10^{-7} M) and caffeic acid. Means with different small cases (a-d) within ERα and different upper cases (A-E) within ERβ are significantly different at $p<0.05$.

(2) MCF-7 cell proliferation

당귀의 식물성에스트로겐 성분인 caffeic acid의 유방암 세포주에 대한 증식효과는 ER-positive와 ER-negative 세포주를 이용하여 조사하였다. Caffeic acid는 ER-positive인 MCF-7 cell에 대해 0.01-40 ug/mL 에서 175-193%의 농도의존적인 세포증식 효과를 보였으나, ER-negative MDA-MB231 cell에 대한 증식효과는 보이지 않았다(Fig 13). 특히, 0.1 ug/mL에서 최대 199%로 약물대조군인 E_2와 유사한 증식효과를 보임으로써 full agonist의 형태를 보였다(39). 콩에서 분리한 glyceollin은 0.1 ug/mL에서 약 170%의 증식 효과를 나타내었고, puerarin은 0.004 ug/mL에서 177.7%의 세포 증식을 보였다(36,39). Wang 등(40)은 phloridzin의 세포증식 효능을 평가한 결과, 50 ug/mL에서 187%의 세포증식을 나타내었다. 한편, caffeic acid 유도체인 caffeic acid phenethyl ester는 MCF-7 세포의 증식에는 영향을 주지 않았다(37). 따라서, 당귀의 활성성분인 caffeic acid는 ER-positive MCF-7세포주의 증식을 강

화시켜주는 agonist로 작용하는 것을 확인하였다.

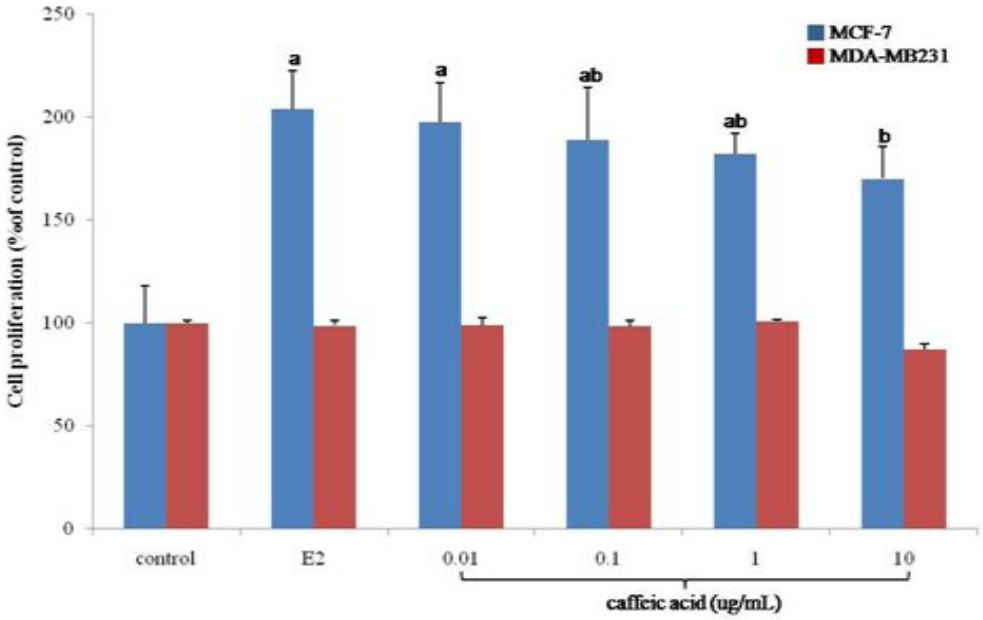

Fig. 13. Effect of caffeic acid on breast cancer cell proliferation as a function of the presence of estrogen receptor. 17β-estradiol (E_2) was used at 10^{-8} M. Means with different small cases (a-b) within MCF-7 cells (ER positive) and different upper cases within MDA-MB231 cells (ER negative) significantly different at $p<0.05$.

(3) Yeast-based estrogenicity

당귀의 활성성분인 caffeic acid의 에스트로겐 활성은 ERE gene construct의 발현이 가능하도록 재조합된 효모를 이용하여 시료에 의한 β-galactosidase 활성 측정을 통하여 평가하였다. Fig 14와 같이, caffeic acid와 E_2의 처리로 재조합 효모인 *Saccharomyces cerevisiae strain* BJ3505로부터 β-galactosidase가 생성되었다. β-Galactosidase 활성은 caffeic acid의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 향상되었고, 40 ug/mL(2.2 X 10^{-4} M)에서는 약 98% 정도로 E_2와 유사한 활성을 나타내었다. Kim 등(36)은 glyceollins이 10 ug/mL(약 10^{-4} M)에서 약 120%의 활성을 나타냄을 보고하였고, Jung 등(37)은 caffeic acid phenethyl ester가 약 10^{-5} M에서 약 68%의 활성을 나타낸다고 하였다. Wanda 등(41)도 *Millettia griffoniana*에서 분리한 40-methoxy-7-O-[(E)-3-methyl-7-hydroxymethyl-2,6-octadienyl]isoflavone(7-O-DHF), Griffonianone C(GRIF-C), 3',4'-dihydroxy-7-O-[(E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl]isoflavone(7-O-GISO) 등이 10^{-5} M에서 E_2와 유사한 활성을 나타내었다. 따라서, caffeic acid는 estrogen-responsive element 의존성 β-galactosidase 활성을 증가시킴을 확인하였다(37).

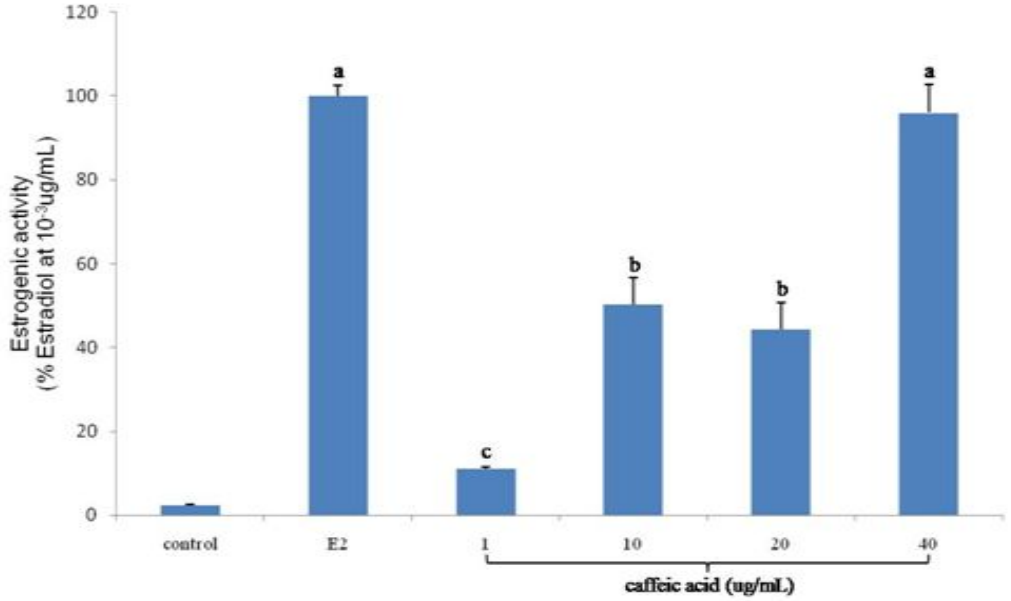

Fig. 14. Estrogenic effect of caffeic acid in the yeast-based estrogen receptor transcription assay. 17β-estradiol (E_2) was used at 10^{-8} M. Means with different letters (a-c) are significantly different at $p<0.05$.

(4) pS2 mRNA expression

ER에 반응하는 유전자인 pS2 mRNA의 발현 정도는MCF-7 cell에 caffeic acid와 E_2를 각각 처리한 후 RT-PCR을 이용하여 측정하였다(Fig. 15). Caffeic acid 는 1-20 ug/mL 범위에서 농도의존적으로 pS2 발현을 증가시켰으며, 20 ug/mL에서는 E_2(0.01 ug/mL)와 유사하게 3배 정도 증가시켰다. Oh 등(42)은 kaempferol이 28.4 ug/mL에서 pS2 발현을 약 1.3배 증가시킴을 보고하였다. Kimberly 등(43)은 커피의 trigonelline이 0.014 ng/mL의 농도에서 약 7배 정도 pS2를 발현시켰다고 하였다. Duda 등(44)은 인삼에서의 pS2 발현을 통해 식물성에스트로겐의 효능을 인삼 추출물의 MCF-7 cell에서의 반응시간에 따른 pS2 발현이 증가하는 것을 나타내었다. 이상으로부터, 당귀의 활성성분인 caffeic acid는 ER complex binding의 활성에 의해서 reporter gene expression을 유도하는 식물성에스트로겐임을 알 수 있었다.

이상과 같이, caffeic acid는 ER과 결합하여 신호전달시스템을 활성화시키고, 관련 유전자의 발현을 유도하는 활성을 보유하여 당귀의 에스트로겐 활성에 주요하게 작용하는 성분임을 확인하였다.

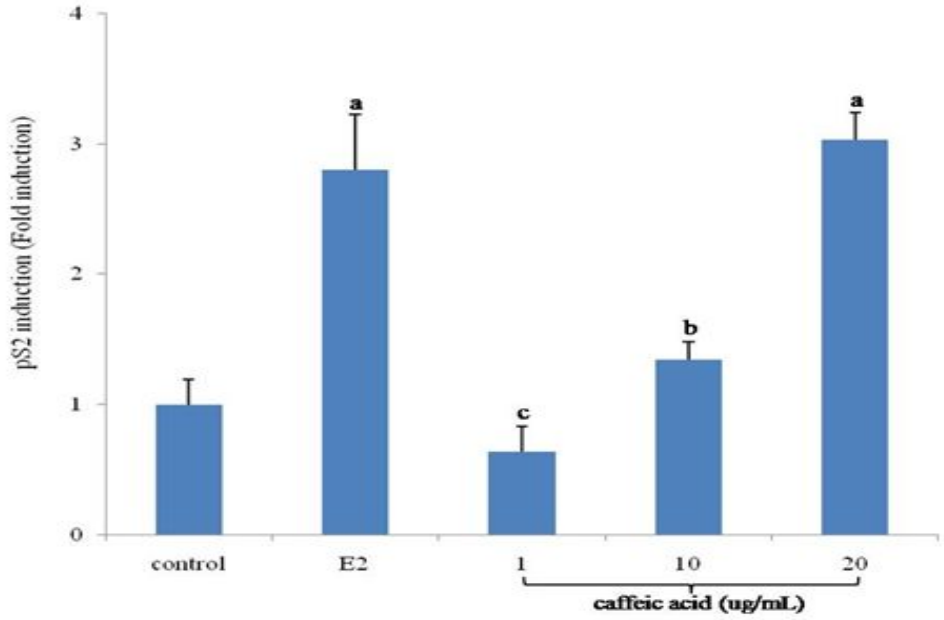

Fig. 15. Effect of caffeic acid on pS2 mRNA expression in MCF-7 cell measured by RT-PCR. 17β-estradiol (E_2) was used at 10^{-7} M. Means with different letters (a-c) are significantly different at $p<0.05$.

4. 백수오등 복합추출물의 안전성 연구

가. 복귀돌연변이 실험

용량설정시험의 결과, 대사활성화존재 유무에 관계없이 모든 용량에서 생육저해는 관찰되지 않았다. 또한 시험물질의 침전도 관찰되지 않았다 따라서, 5,000 μg/plate을 본시험의 최고용량으로 설정하고 이하 공비 2로 2,500, 1,250, 625 및 313 μg/plate의 시험물질군을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

본시험의 결과, 모든 용량의 시험물질의 복귀변이콜로니수는 대사활성화 유무에 관계없이 음성대조군과 비교하여 2배 이상의 증가는 관찰되지 않았다. 시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화존재 유무에 관계없이 관찰되지 않았다. 또한 시험물질의 침전도 관찰되지 않았다. 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균이 historical control data의 범위에 속하였으며, 본시험은 생육저해가 인정되지 않은 용량이 4용량 이상으로, 본시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다. 또한, 용량설정시험 및 본시험에서 S9 mix, 0.1 mol/L, PBS (pH7.4) 및 시험물질의 오염은 없었다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질인 백수오등 복합추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판단되었다.

나. 염색체 이상시험

세포증식억제시험에서 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 세포독성은 관찰되지 않았다. 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 1,000, 2,500 및 5,000 μg/mL 용량에서 관찰되었다.

본시험은 세포증식억제시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하에서 세포독성은 관찰되지 않았으므로 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 최고용량을 5,000 μg/mL 으로 설정하였다. 이하 공비 2 로 2,500 및 1,250 μg/mL 을 설정하였다. 양성대조물질은 Mitomycin C 와 Benzo[a]pyrene 을, 음성대조물질은 주사용수를 사용하여 염색체 이상시험을 수행하였다.

그 결과 단시간처리법의 비대사활성화 및 대사활성화, 연속처리법의 모든 용량에서 염색체 이상 출현빈도는 5% 미만이며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fisher' exact test, $p \geq 0.05$). 시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화 존재하 및 비존재하, 연속처리법의 대사활성화 비존재하의 모든 용량에서 관찰되었다. 양성대조군의 염색체이상 세포의 출현빈도가 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다 (Fisher' exact test, $p<0.05$). 따라서, 이 시험의 결과로 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배

양세포에서 염색체이상 유발성 확인은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다. 해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상 세포의 출현빈도가 historical control data 의 정상범위 내에 있었다. 양성대조군에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 음성대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 또한, 잡균 등에 의한 오염은 확인되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질인 백수오등 복합추출물 (FGF271/EstroG-100)은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

다. 소핵시험

용량설정시험 및 검체제작시간 설정시험의 2,000, 1,000, 300, 100 및 30 mg/kg의 용량에서 시험물질의 독성에 의한 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 최고용량은 2,000 mg/kg으로 설정하였다. 검체제작시간설정시험은, 최고용량인 2,000 mg/kg을 동물에 투여하고, 투여 후 24, 48 및 72시간째에 소핵형성을 관찰하였다. 골수세포에서 독성은 없었으며, 모든 시간대에서 소핵의 수도 증가하지 않았다. 따라서 본시험의 검체제작설정시간은 투여 후 24시간으로 하였다.

본시험 결과 각군 모든 동물에서 일반증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다. 각군 모든 동물의 체중은 음성대조군과 비교시 유의성 있는변화가 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA). 소핵유발 출현빈도는 시험물질군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 비율은 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, Kastenbaum & Bowman). 또한, 총적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p \geq 0.05$, ANOVA). 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조 군과 비교하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다 ($p<0.05$, Kastenbaum &Bowman). 음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성 적혈구의 출현빈도는 historical control data의 정상범위 내에 있었다. 때문에 본시험은 적절한 조건하에서 실시된 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 백수오등 복합추출물(FGF271/EstroG-100)은 본시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

라. 단회독성시험

투여 후 관찰기간동안, 암수 대조군 및 시험물질 투여군 (1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg)에서 사망례는 없었다. 암수 1,000 및 2,000 mg/kg 투여군에서 일반증상의 이상도 관찰되지 않았다. 암수 4,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1 일에 전례에서 약물혼입변 (compoundcolored stool) 및 2 ~ 3 례에서 연변 (soft stool)이 관찰되었으나, 투여 후 2 일부터는 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단되었다. 관찰기간동안, 암수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다. 부검

시, 암수 시험물질투여군의 전례에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

본시험의 조건하에서 백수오등 복합추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 각 4,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단된다.

5. 인체임상

가. 생약선정

(1) 국내산 및 중국산의 백수오, 속단 생약재와 산지별 국내산 당귀 생약재를 각각 3종씩 구매하여 지표성분의 함량을 분석한 결과 백수오의 cinnamic acid 함량은 0.197~0.280 mg/g, 속단의 shanzhiside methylester 함량은 0.76~2.73 mg/g, 당귀의 nodakenin 함량은 2.24~7.19 mg/g로 측정되었다. 각 생약의 지표성분 함량이 가장 높은 생약을 각각 선정한 결과 백수오, 속단, 당귀 생약재는 모두 국내산으로 선정하였고 이를 EstroG-100 powder 생산에 이용하였다.

백수오, 당귀, 속단 혼합 생약재 100 kg을 열수추출하고 동결건조하여 최종으로 생산된 EstroG-100의 양은 19 kg으로 투입된 혼합 생약재 대비 고형분으로서 19%의 생산수율을 나타내었다. 구매한 백수오, 당귀, 속단의 각 생약재, 혼합 생약재의 열수추출물농축액, EstroG-100 및 미국 임상실험용 EstroG-100 타정 제품을 샘플링하여 최종 제품에 대한 자가 품질 검사를 실시하여 임상시험에 사용하였다.

(2) EstroG-100 섭취 및 대조 정제 제조

EstroG-100 Tablet 제조에 사용된 생약, EstroG-100 powder 및 tablet 등을 Fig. 16에 나타내었고, 최종 제조된 EstroG-100 Tablet 및 Placebo를 하루에 2정씩 되게 1.5개월분을 흰색 PE병에 포장하여 미국 임상시험기관에 전달하여 임상시험에 사용하였다.

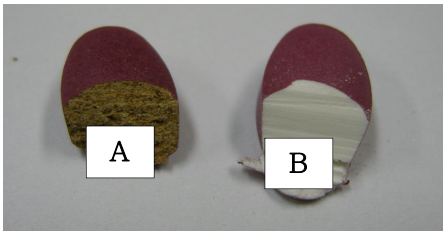

Fig. 16. Pictures of three herbs, treatment & placebo tablets, bottle containing pills, and paper can containing EstroG-100. A: Treatment B: Placebo

(3) IRB 임상시험 승인

Sterling IRB를 통해 임상 시험 신청을 하고 이 기관을 통해 수정 없이 IRB ID 3192를 부여받아 IRB 임상승인을 2009년 4월 21자로 받았다. 아래 Fig. 17은 Sterling IRB로부터 받은 승인통보서이다.

STERLING INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

STERLING INDEPENDENT SERVICES, INC.
6300 POWERS FERRY RD., SUITE 600-351, ATLANTA, GA 30339
770-690-9491 • 888-636-1062 • FAX 770-690-9492 • E-MAIL STERLINGIRB@STERLINGIRB.COM

Date Issued: April 21, 2009

Study Expiration Date: **April 15, 2010**

Sponsor Continuing Review Status Report Due: **March 15, 2010** (form available at www.sterlingirb.com)

Protocol: The Effect of the Herbal Extract (EstroG-100) on Pre-, Peri-, and Post-Menopausal Women: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study

Protocol No.: NET-ESTROG-100-001

IRB ID: **3192**

Sponsor: Naturalendo Tech Co., Ltd.

TYPE OF REVIEW: Full Board Review - Study Approval - Initial

- Protocol (Amendment Number 04, dated: 12 December 2008)
- Participant Informed Consent Form and Authorization to Use and Disclose Medical Information (Version Date: 12 December 2008)
- EstroG-100 product information
- Kupperman's Menopause Index Questionnaire

APPROVED WITHOUT MODIFICATION

Recruitment Material(s):

- Telephone Screening Script
- Print Recruitment Advertisement

APPROVED WITHOUT MODIFICATION
For these approved materials, you may insert site-specific information without resubmitting to the IRB

Fig. 17. Approval document for protocol of EstroG-100 clinical trial.

나. 임상시험 결과

(1) 임상참여자 배당

실제 임상에서 EstroG-100에 대한 안전성 및 유효성을 평가하기 위해 104명의 후보자에 대해 64명의 피험자가 실험에 등록되었다. 이중 3명의 피험자가 탈락하여 총 61명에 대해 무작위 배당으로 EstroG-100 섭취 실험군 29명, 대조군으로 31명이 배당되었고, 12주간의 섭취 후 안전성 및 유효성을 평가하였다.

(2) 섭취전 대상군의 일반적 특징

피험자의 연령별 분포를 Table 36과 같다. EstroG-100 섭취 실험군의 평균 나이는 약 53세(45~64세), 위약군은 54세(42~70세) 사이로 이들 두군 간에 통계적으로 유의적 차이는 보이지 않았다 ($p>0.05$).

Table 36. Age distribution of participants

	Group	EstroG-100	Placebo
Age	No. of Participants	29	32
	Average	53.24±5.67	54.06±5.85
	Min. - Max.	45.0 - 64.0	42.0 - 70.0

$p>0.05$, t-test

최종월경기간(Last Menstruation period)은 Table 37에 나타내었으며, EstroG-100 섭취군이 평균 61개월, 위약군이 평균 45.7개월로서 두군 간에 통계적으로 유의적 차이는 나타나지 않았고($p> 0.05$),

Table 37. Distribution of last menstruation period for participants

Months	EstroG-100	Placebo
0~1	8	4
2~12	7	8
>12	14	20
Average	61.03*±87.64	45.72±52.30

*: Compared between groups; p-valuebyt-test, $p>0.05$

연구 시작시점에서 섭취군과 대조군 간의 기초적 신체특성과 혈중 호르몬 수치(Follice stimulating hormone, estrogen(E2)). 골대사 지표, 그리고 혈중 지질 농도 등을 Table 38에 나

타내었으며, 섭취군과 대조군간의 각종 수치는 통계적으로 유의하지 않았다 (p >0.05).

Table 38. Basic characteristics of subjects

	EstroG-100	Placebo	Total
	Average	Average	Average
FSH (mIU/ml)	50.95±36.48	71.97±40.52	68.10±39.77
E2 (pg/ml)	55.26±51.78	40.83±38.27	46.39±45.39
Osteocalcin(ng/ml)	18.61±8.01	20.21±9.12	20.19±8.58
Alkaline Phosphatase(IU/L)	73.93±15.86	79.47±29.47	78.85±23.96
hGh(ng/ml)	1.16±2.26	0.56±0.66	0.63±1.64
Fasting Glucose(mg/dl)	88.90±9.65	91.97±6.72	90.51±8.32
Cholesterol(mg/dl)	212.55±30.94	217.19±25.49	217.62±28.07
HDL (mg/dl)	61.55±17.84	64.28±12.83	64.49±15.34
LDL (mg/dl)	125.76±27.89	128.50±24.11	129.18±25.79
Triglyceride(mg/dl)	127.59±66.46	120.34±61.44	118.03±63.44
Weight(lb)	160.69±37.61	160.31±26.28	160.49±31.89
Height(in)	63.72±2.51	63.47±2.72	63.59±2.60
BMI(kg/m^2)	27.83±5.79	27.94±4.19	27.89±4.97
Systolic Pressure(mmHg)	112.48±10.68	114.50±11.60	113.50±11.12
Diastolic Pressure(mmHg)	75.76±6.92	78.00±7.41	76.93±7.21

No significant difference observed between placebo and treatment groups ($p>0.05$)
FSH; Follicular Stimulating Hormone, E2: Estradiol, hGH; human Growth Hormone, HDL; High Density Lipoprotein, LDL; Low Density Lipoprotein, BMI; Body Mass Index

이상의 결과는 섭취군과 대조군간의 나이, 최종월경기간, 기초적 신체 특성 등에서 통계적으로 유의차가 나타나지 않아 무작위 배당이 잘 된 것으로 나타났다.

(3) 순응도

순응도는 섭취군에서 약 97%, 대조군에서 약 96%로 나타났고 이들 두 군 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다 (p>0.05).

(4) 갱년기증상개선효과 평가

평균 Kupperman Menopause Index (KMI)는 섭취 전 29.45±7.39에서 섭취 6과 12주 후에

각각 13.62±7.61과 11.31±5.78로 나타났고 대조군은 섭취 전 29.16±6.55에서 섭취 6과 12주 후에 각각 23.31±8.96과 23.66±7.68로 나타났으며 섭취전에 비해 두 군 모두 6주와 12주에 유의한 차이를 나타내고 있다($p<0.01$). KMI의 개선은 EstroG-100 섭취군의 경우 6주, 12주에서 각각 15.83±9.10 및 18.14±8.46으로, 대조군의 경우 5.84±6.15 및 5.50±5.34로 나타났고 섭취군과 대조군 간에는 통계적으로 유의한 차이를 보이고 있어 EstroG-100의 섭취가 갱년기 증상을 개선시키는 것으로 확인되었고($p<0.01$) 이를 Table 39와 Fig. 18에 각각 나타내었다.

Table 39. Mean change in Kupperman Menopause Index

	EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD
Week 0 (Baseline)	29.45±7.39	29.16±6.55
Week 6	13.62±7.61	23.31±8.96
Change from baseline	-15.83±9.10 ** †† ##	-5.84±6.15 ##
Week 12	11.31±5.78	23.66±7.68
Change from baseline	-18.14±8.46 ** †† ##	-5.50±5.34 ##

**; $p<0.01$ compared between groups by t - test
†† ; $p<0.01$ compared between groups by Wilcoxon rank sum test
##; $p<0.01$ compared to baseline by paired t-test

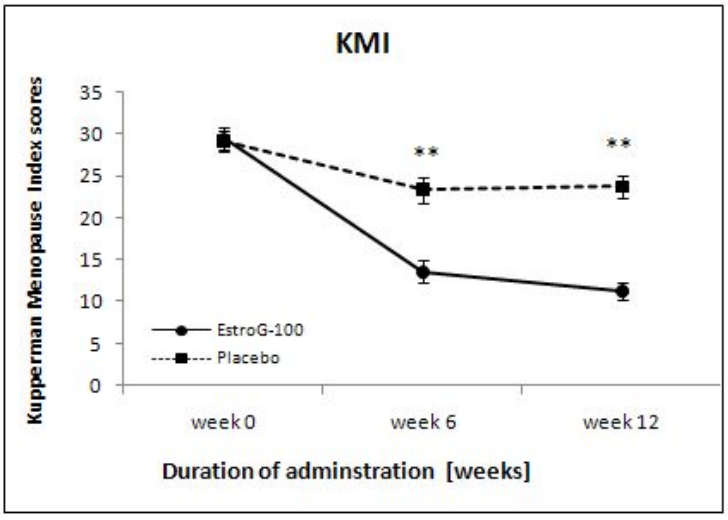

Fig 18. Changes of Kupperman Menopause Index (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$byt - test(ITT)

KMI의 11개 구성항목 중 안면홍조/발한 (Hot flush), 손발저림(Paresthesia), 수면곤란(Insomnia) 및 신경질(Nervousness) 대하여 각각 개별적인 수치의 변화를 Table 40에 나타내었다.

Table 40. Mean change in scores of the each separate part of questionnaire

		EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD
Hot flush or cold sweat (=vasomotor)	Week 0 (Baseline)	2.24±0.69	2.22±0.66
	Week 6	1.03±0.82	1.78±0.75
	Change from baseline	-1.21±0.82 ** † † ##	-0.44±0.72 ##
	Week 12	0.79±0.73	2.06±0.76
	Change from baseline	-1.45±0.74 ** † † ##	-0.16±0.77
Numbness and tingling (=paresthesia)	Week 0 (Baseline)	1.31±0.85	1.41±0.91
	Week 6	0.59±0.78	1.13±0.94
	Change from baseline	-0.72±0.96 * † ##	-0.28±0.68 #
	Week 12	0.55±0.74	1.09±0.96
	Change from baseline	-0.76±0.87 * † ##	-0.31±0.59 ##
Trouble sleeping (=insomnia)	Week 0 (Baseline)	2.28±0.84	2.03±0.86
	Week 6	1.28±0.96	1.63±1.01
	Change from baseline	-1.00±0.93 ** † ##	-0.41±0.95 #
	Week 12	0.97±0.82	1.63±0.87
	Change from baseline	-1.31±1.07 ** † † ##	-0.41±0.91 #
Nervousness	Week 0 (Baseline)	1.72±0.88	1.56±0.84
	Week 6	0.76±0.69	1.22±0.83
	Change from baseline	-0.97±0.87 ** † † ##	-0.34±0.97
	Week 12	0.66±0.67	1.34±0.75
	Change from baseline	-1.07±1.10 ** † † ##	-0.22±0.83

* ; $p<0.05$ compared between groups, **; $p<0.01$ compared between groups by t - test
† ; $p<0.05$ compared between groups, † † ; $p<0.01$ compared between groups by Wilcoxon rank sum test
#; $p<0.05$ compared to baseline, ##; $p<0.01$ compared to baseline by paired t-test

안면홍조/발한(Hot flush)의 경우 섭취군이 섭취전 2.24±0.69에서 6주 및 12주에 각각 1.03±0.82 및 0.79±0.73으로 감소되었고 (p<0.01) 대조군은 섭취전 2.22±0.66에서 6주 후에 1.78±0.75로 감소 되었고(p<0.01), 12주 후에는 2.06±0.76으로 약간 감소되었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다. 섭취군과 대조군의 안면홍조/발한의 개선 정도를 비교하였을 때, 6주와 12주 모두 이들 두 간 개선 정도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내어(p<0.01) EstroG-100의 섭취가 안면홍조/발한 증상 개선에 유효한 것으로 나타났다(Fig. 19).

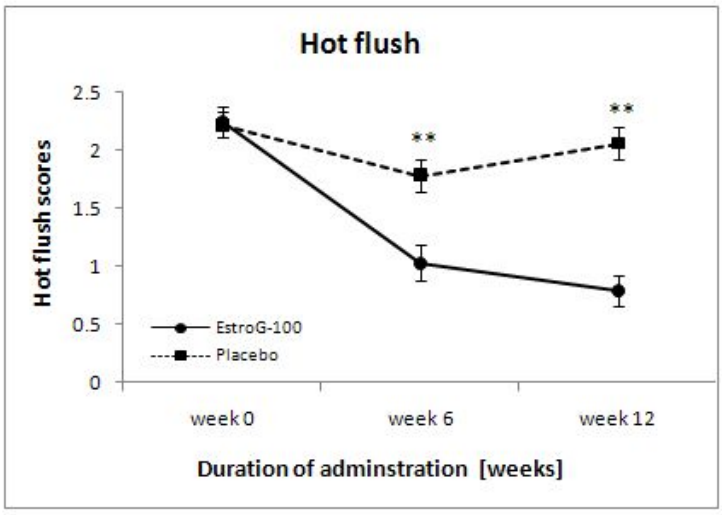

Fig 19. Changes of hot flush (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$by t - test(ITT)

손발저림(Paresthesia)의 경우 섭취군이 섭취전 1.31±0.85에서 6주 및 12주에 각각 0.59±0.78 및 0.55±0.74으로 감소되었고 ($p<0.01$), 대조군은 섭취전 1.41±0.91에서 6주 후에 1.13±0.94로 감소되었고($p<0.05$), 12주 후에는 1.09±0.96 ($p<0.01$)으로 감소되었다. 섭취군과 대조군의 손발저림 개선 정도를 비교하였을 때, 6주와 12주 모두 이들 두 군간에는 통계적으로 유의한 차이를 나타내어($p<0.05$) EstroG-100 섭취가 갱년기 증상의 하나인 손발저림에 개선 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 20)

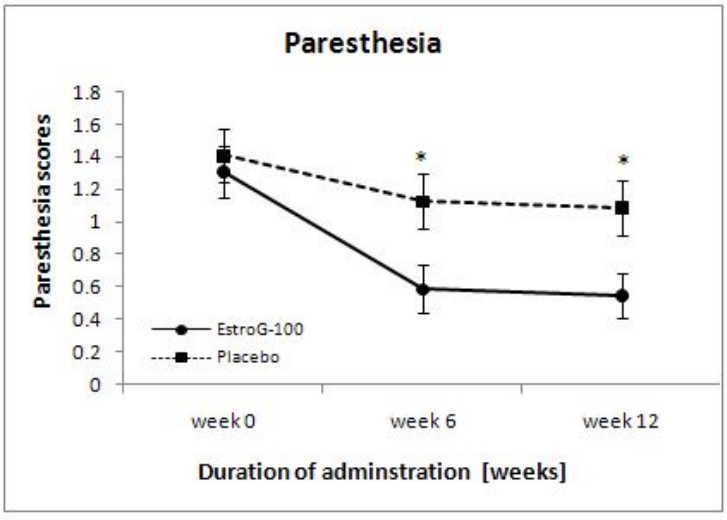

Fig 20. Changes of paresthesia (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, *: Statistically significant compared between groups; $p<0.05$byt - test(ITT)

수면곤란(Insomnia)의 경우 섭취군이 섭취전 2.28±0.84에서 6주 및 12주 후에 각각 1.28±0.96 및 0.97±0.82로 감소되었고($p<0.01$), 대조군은 섭취 전 2.03±0.86에서 1.63±1.01 및 1.63±0.87로 감소되었다($p<0.05$). 섭취군과 대조군간의 섭취 전후의 수면곤란 개선 정도를 비교하였을 때,모두 이들 두 군 간에는 통계적으로 유의한 차이를 나타났고(6주,$p<0.05$;12주,$p<0.01$), 이는 EstroG-100 섭취가 갱년기 여성의 수면곤란 증상 개선에 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 21).

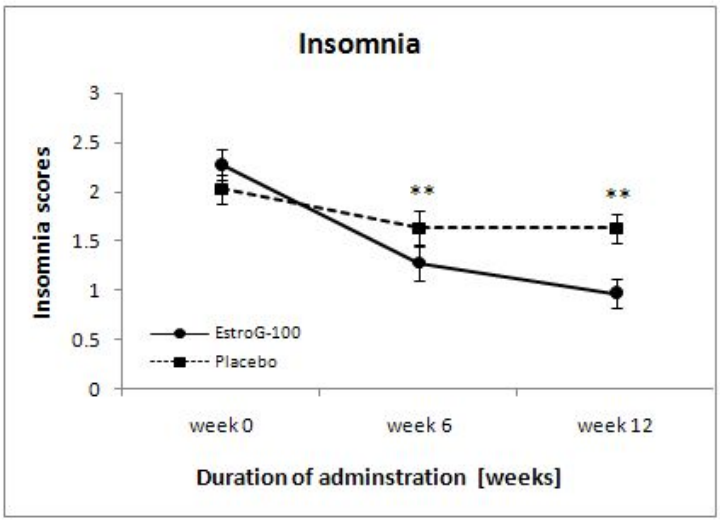

Fig 21. Changes in insomnia (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$byt - test(ITT)

신경질의 경우 섭취군이 섭취전 1.72±0.88에서 6주 및 12주 후에 각각 0.76±0.69 및 0.66±0.67로 감소되었고($p<0.01$), 대조군은 섭취 전 1.56±0.84에서 6주 및 12주 후에 각각 1.22±0.83 및 1.34±0.75로 유의적인 차이는 없었다. 섭취군과 대조군간의 섭취 전후의 신경질 개선 정도를 비교하였을 경우, 6주 및 12주에 모두 이들 두 군간에는 통계적으로 유의적인 차이를 보이고 있어 ($p<0.01$) EstroG-100 섭취가 갱년기 여성의 신경질 증상 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 22)

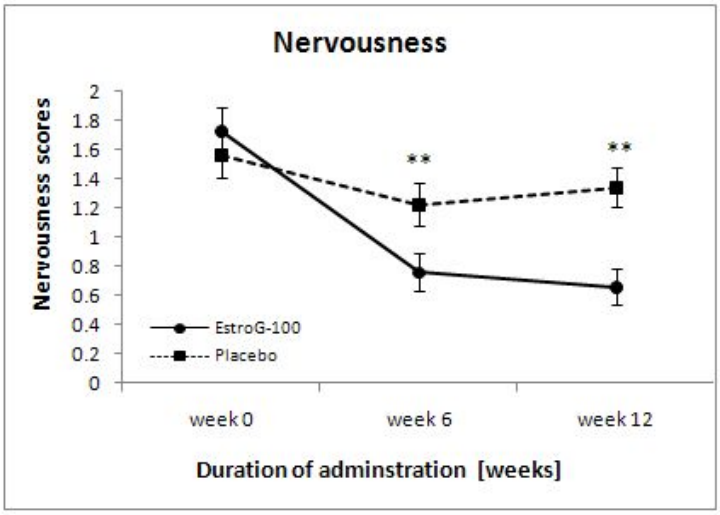

Fig 22. Changes of nervousness (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$byt - test(ITT)

KMI의 11개 구성항목 중 우울함 (Melancholia), 어지러움 (Vertigo), 피로감 (Fatigue) 및 관절통/근육통(Rheumatic pain) 대하여 각각 개별적인 수치의 변화를 Table 41에 나타내었다.

Table 41. Mean change in scores of the each individual question of KMI

		EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD
Feeling blue or depressed (=melancholia)	Week 0 (Baseline)	1.93±0.88	1.59±0.95
	Week 6	1.03±0.68	1.31±0.93
	Change from baseline	-0.90±0.90 ** †† ##	-0.28±0.89
	Week 12	0.83±0.71	1.31±0.74
	Change from baseline	-1.10±0.98 ** †† ##	-0.28±0.81
Dizzy spells (=vertigo)	Week 0 (Baseline)	0.97±0.82	0.75±0.72
	Week 6	0.21±0.49	0.72±0.77
	Change from baseline	-0.76±0.83 ** †† ##	-0.03±0.74
	Week 12	0.21±0.41	0.59±0.80
	Change from baseline	-0.76±0.69 ** †† ##	-0.16±0.77
Tired feelings (=fatigue)	Week 0 (Baseline)	2.21±0.77	2.00±0.88
	Week 6	0.90±0.77	1.69±0.90
	Change from baseline	-1.31±0.89 ** †† ##	-0.31±0.86 #
	Week 12	0.72±0.70	1.59±0.80
	Change from baseline	-1.48±0.95 ** †† ##	-0.41±0.95 #
Rheumatic pain (=arthralgia and myalgia)	Week 0 (Baseline)	1.59±1.02	1.84±0.95
	Week 6	0.79±0.94	1.63±0.83
	Change from baseline	-0.79±0.98 ** † ##	-0.22±0.87
	Week 12	0.55±0.78	1.47±0.88
	Change from baseline	-1.03±1.15 * † ##	-0.38±1.07

*; $p<0.05$ compared between groups, **; $p<0.01$ compared between groups by t - test
† ; $p<0.05$ compared between groups, †† ; $p<0.01$ compared between groups by Wilcoxon rank sum test
#; $p<0.05$ compared to baseline, ##; $p<0.01$ compared to baseline by paired t-test

우울증의 경우 EstorG-100 섭취군에서 섭취전 1.93±0.88에서 6주 및 12주 후에 각각 1.03±0.68 및 0.83±0.71로 감소되었고 ($p<0.01$), 대조군은 섭취 전 1.59±0.95에서 6주, 12주 후에 각각 1.31±0.93 및 1.31±0.74로 감소되었지만 유의적인 차이는 없었다. 섭취군과 대조군간의 섭취 전후 우울증 개선 정도는 6주, 12주에 모두 군간에 통계적인 유의성을 보이고 있어($p<0.01$), EstroG-100의 섭취가 갱년기 여성의 우울증 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 23).

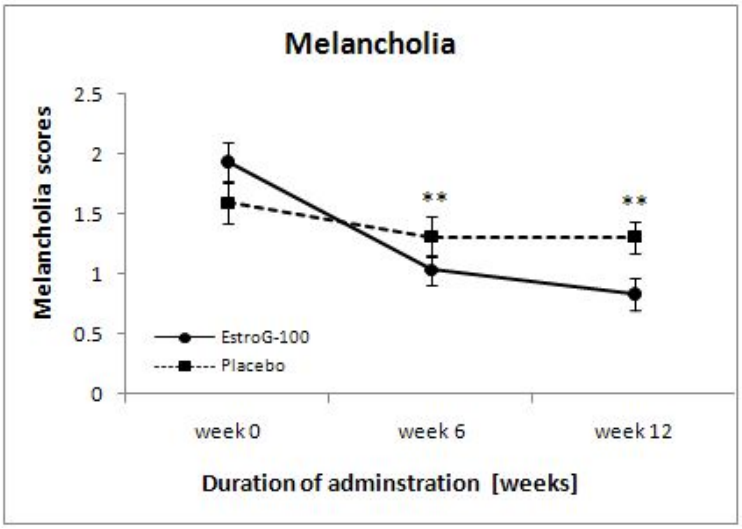

Fig 23. Changes of melancholia (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo.

SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$byt - test(ITT)

어지러움의 경우 섭취군에서 섭취전 0.97±0.82에서 6주 및 12주 후에 각각 0.21±0.49 및 0.21±0.41로 유의적으로 감소되었지만($p<0.01$), 대조군의 경우에는 섭취전, 섭취후 6주 및 12주에 수치의 감소는 유의하지 않은 것으로 나타났다. 한편 섭취군과 대조군 양군간의 섭취 전후 어리러움 개선 정도는 6주, 12주에서 모두 두군간에 통계적인 유의성을 보이고 있어($p<0.01$), 생약복합추출물인 EstroG-100 섭취가 갱년기 여성의 어지러움증 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 24).

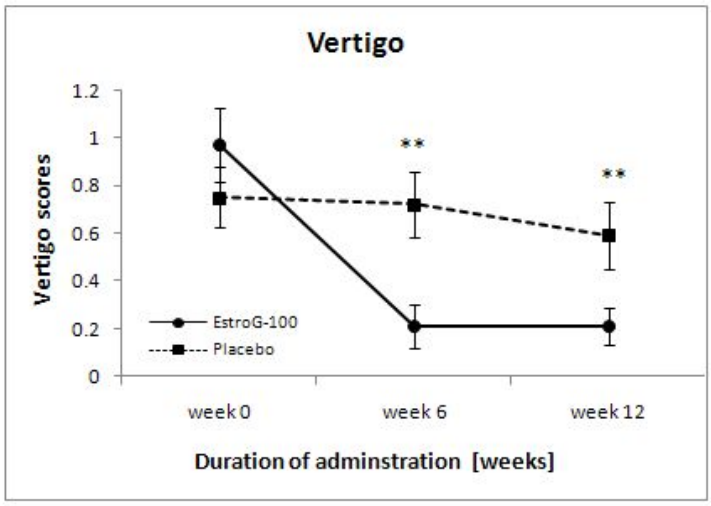

Fig. 24. Changes of vertigo (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; p<0.01byt - test(ITT)

피로감의 경우 섭취군에서 섭취전 2.21±0.77에서 6주, 12 주 섭취후에 각각 0.90±0.77 및 0.72±0.70으로 유의적인 감소를 나타냈고(p<0.01), 대조군의 경우에도 2.00±0.88에서 1.69±0.90 및 1.59±0.80으로 역시 유의적인 감소를 보였다(p<0.05). 한편 피로감의 개선 정도를 섭취군과 대조군 두군간에 비교를 하였을 때 두 군간에는 통계적으로 유의하게 차이를 보여주고 있어 (p<0.01), 생약추출물의 섭취가 갱년기 여성의 피로감 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 25).

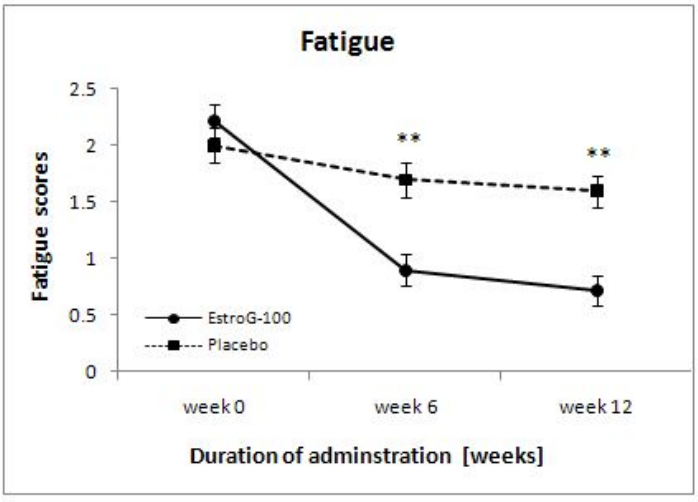

Fig. 25. Changes of fatigue (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, **: Statistically significant compared between groups; p<0.01byt - test(ITT)

관절통/근육통의 경우 섭취군의 경우에 섭취전후에 유의적인 차이를 보이고 있으나 대조군의 차이가 유의하지 않은 것으로 나타났다. 한편 개선 정도를 두 군간에 비교하였을 때는 6

주(p<0.01) 및 12주(p<0.05)에서 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이고 있어 EstroG-100 섭취가 관절통/근육통 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 26).

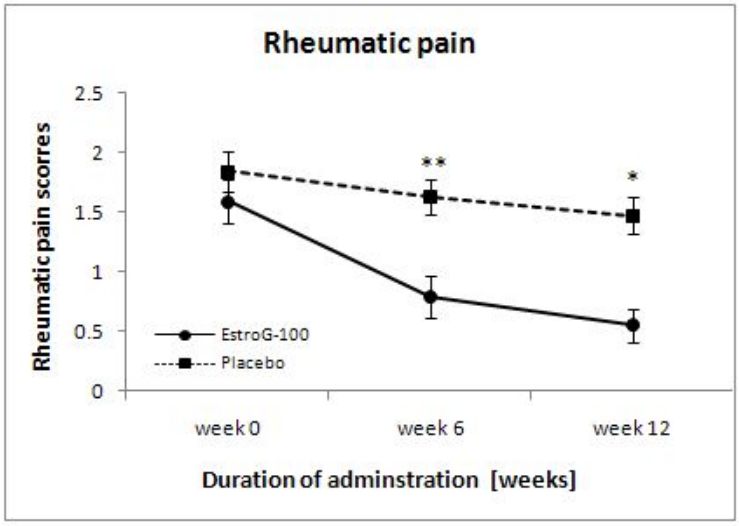

Fig. 26. Changes of rheumatic pain (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, *: Statistically significant compared between groups; $p<0.05$byt - test(ITT), **: Statistically significant compared between groups; $p<0.01$byt - test(ITT)

KMI의 11개 구성항목 중 두통(Headache), 심계항진(Palpitation) 및 의주감(Formication)에 대하여 각각 개별적인 수치의 변화를 Table 42에 나타내었다.

Table 42. Mean change in scores of the each individual question of the KMI

		EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD
Headaches	Week 0 (Baseline)	1.34±1.04	1.53±0.95
	Week 6	0.69±0.76	1.13±0.91
	Change from baseline	-0.66±1.23 ##	-0.41±0.95 #
	Week 12	0.66±0.77	0.84±0.72
	Change from baseline	-0.69±1.26 ##	-0.69±0.93 ##
Pounding of the heart (=palpitation)	Week 0 (Baseline)	1.00±0.96	1.31±0.93
	Week 6	0.48±0.69	0.91±0.82
	Change from baseline	-0.52±1.15 ##	-0.41±0.67 ##
	Week 12	0.55±0.63	0.75±0.84
	Change from baseline	-0.45±1.02 ##	-0.56±0.80 ##
Sensation of crawling on the skin (=formication)	Week 0 (Baseline)	0.83±0.85	1.25±1.05
	Week 6	0.14±0.44	0.88±1.01
	Change from baseline	-0.69±0.81 * ##	-0.38±0.55 ##
	Week 12	0.28±0.45	0.72±0.96
	Change from baseline	-0.55±0.78 ##	-0.53±0.67 ##

*; $p<0.05$ compared between groups by t - test
#; $p<0.05$ compared to baseline, ##; $p<0.01$ compared to baseline by paired t-test

두통의 경우 EstroG-100 섭취군에서 섭취전과 비교하여 6주 및 12주에서 유의적인 차이가 나타났고($p<0.01$) 대조군의 경우에도 유의적인 차이를 보이고 있다. 그러나 이들 두 군간의 개선 정도의 차이는 유의하지 않은 것으로 나타났다.

심계항진의 경우에도 두통의 경우와 마찬가지로 섭취전후에는 유의한 것으로 나타났으나 대조군과의 개선정도를 비교하였을 때는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

의주감의 경우에는 섭취군 및 대조군이 섭취전후의 비교에서는 각각 모두 유의적인 차이를 나타내고 있었지만($p<0.01$), 섭취군과 대조군간의 개선정도는 6주에만 통계적으로 유의적인 차이를 보였고($p<0.05$), 12주후에는 두 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 27).

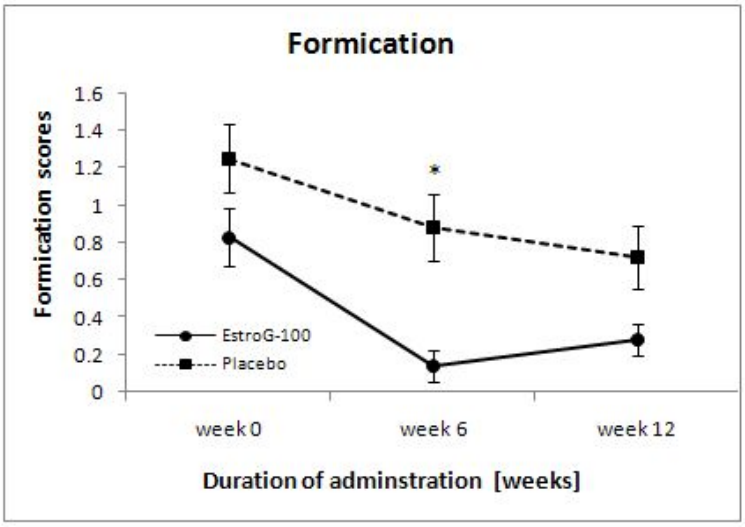

Fig. 27. Changes of formication (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, *: Statistically significant compared between groups; $p<0.05$byt - test(ITT)

KMI의 구성항목에는 들어있지 않지만 추가로 조사한 질건조(vaginal dryness)에 대한 수치변화를 Table 43에 나타내었다. 질건조는 EstroG-100 섭취군의 경우 섭취전 1.45±1.02에서 6주 및 12주후 0.72±0.88 및 0.59±0.87로 감소하였고($p<0.01$), 대조군의 경우에는 1.75±1.11에서 6주후 1.50±1.11($p<0.05$) 및 12주후 1.28±1.02($p<0.01$)로 나타났다.

Table 43. Mean change in scores of vaginal dryness

	EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD
Week0 (Baseline)	1.45±1.02	1.75±1.11
Week6	0.72±0.88	1.50±1.11
Change from baseline	-0.72±0.84 ** †† ##	-0.25±0.57 #
Week12	0.59±0.87	1.28±1.02
Change from baseline	-0.86±0.88 * ##	-0.47±0.72 ## p=0.0536

*; p<0.05 compared between groups,**; p<0.01 compared between groups by t-test
†† ; p<0.01 compared between groups by Wilcoxon rank sum test
#; p<0.05 compared to baseline, ##; p<0.01 compared to baseline by paired t-test

섭취군과 대조군 간의 질건조의 개선 정도를 비교하였을 때 6주(p<0.01)에서 통계적으로 유의적인 차이를 보이고 있고, 12주후 두 군간의 개선 정도는 유의적인 차이를 보이고 있어 (p<0.05), EstroG-100 섭취가 갱년기 여성의 질건조 개선에 효과가 있는 것을 나타났다 (Fig. 28).

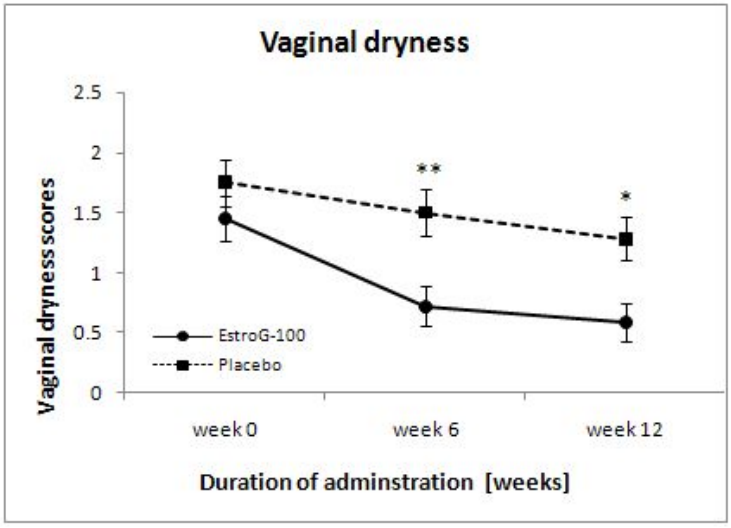

Fig. 28. Changes of vaginal dryness (Mean±SE) during 12 weeks administration of EstroG-100 and placebo. SE:Standard Error, *: Statistically significant compared between groups; p<0.05byt-test(ITT), **: Statistically significant compared between groups; p<0.01byt-test(ITT)

갱년기 여성을 대상으로 EstroG-100을 12주간 섭취하게 하였을 시 갱년기 지수인, KMI 지수와 KMI를 구성하고 있는 11가지 증상 중 9가지 증상(안면홍조/발한, 손발저림, 수면곤란, 신경질, 우울함, 어지러움, 피로감, 관절통/근육통, 및 의주감) 및 질건조 증상이 통계적으로 유의하게 개선되었다.

(5) 혈청학적 지표 및 안전성

체중 및 BMI의 변화는 섭취 12주 후에 EstroG-100 및 대조군 모두 유의적인 변화가 없었다. 또한, 생화학적 혈청 지표인 estrogen(E2), growth hormone (hGH), osteocalcin, alkaline phosphatase, total cholesterol, LDL, HDL 및 triglyceride의 변화는 섭취전과 섭취 12주후 섭취군 및 대조군내에서 통계적으로 유의한 차이는 발견되지 않았을 뿐만 아니라 섭취군 및 대조군간의 비교에서도 유의적인 변화는 없었다($p>0.05$). 혈청 follicle stimulating hormone(FSH)농도는 12주 섭취 전후 변화에 있어 섭취군 및 대조군 두 군 간에 통계적으로 유의한 것으로 나타났지만($p<0.05$), EstroG-100뿐만 아니라 E2 섭취군내에서 12주 섭취 전후에 통계적으로 유의하지 않는 것으로 나타났다. 섭취 전후에 섭취군 및 대조군의 각종 변수의 변화를 Table 44에 나타내었다.

Table 44. Change of the variables for 12 weeks of treatment with EstroG-100

	EstroG-100			Placebo			Total		
	post treat	pre treat	Mean differ(%)	post treat	pre treat	Mean differ(%)	post treat	pre treat	Mean differ(%)
FSH(mlu/ml)	52.43 ±35.30	50.95 ±36.48	2.90	59.93 # ±30.44	71.97 ±40.52	-16.73	59.78 * ±32.82	68.10 ±39.77	-12.22
E2(pg/ml)	40.60 ±26.62	55.26 ±51.78	-26.54	45.40 ±32.47	40.83 ±38.27	11.20	42.91 ±29.63	46.39 ±45.40	-7.51
Fasting Glucose (mg/dl)	90.24 ±8.77	88.90 ±9.65	1.51	89.39 ±9.07	91.97 ±6.72	-2.81	89.80 ±8.86	90.51 ±8.32	-0.78
Osteocalcin (ng/ml)	20.7 ±9.29	20.2 ±9.12	2.30	19.5 ±7.40	18.6 ±8.01	4.76	20.9 ±8.38	20.2 ±8.58	3.37
Alkaline Phosphatase(IU/L)	81.5 ±24.7	79.5 ±29.5	2.62	78.1 ±19.5	73.9 ±15.9	5.64	81.8 ±22.2	78.8 ±24.0	3.77
hGh(ng/ml)	1.17 ±1.54	0.56 ±0.66	108.4	1.92 # ±2.70	1.16 ±2.26	64.9	1.61 ±2.20	0.63 ±1.64	154.5
Cholesterol (mg/dl)	211.8 ±35.1	217.2 ±25.5	-2.49	209.8 ±31.4	212.6 ±30.9	-1.31	212.7 ±33.1	217.6 ±28.1	-2.28
HDL (mg/dl)	60.6 ±14.3	64.3 ±12.8	-5.66	59.6 # ±15.9	61.6 ±17.8	-3.25	61.3 ±15.0	64.5 ±15.3	-4.88
LDL (mg/dl)	127.8 ±28.8	128.5 ±24.1	-0.54	127.4 ±28.0	125.8 ±27.9	1.34	127.3 ±28.2	129.2 ±25.8	-1.42
Triglyceride (mg/dl)	114.8 ±83.9	120.3 ±61.4	-4.57	112.0 ±50.3	127.6 ±66.5	-12.2	113.5 ±68.5	123.8 ±63.4	-8.32
Weight(lb)	159.66# ±37.35	160.69 ±37.61	-0.64	160.25 ±27.43	160.31 ±26.28	-0.04	159.78 ±32.49	160.49 ±31.89	-0.44
BMI (kg/m^2)	27.66 ±5.73	27.83 ±5.79	-0.62	28.00 ±4.27	27.94 ±4.19	0.34	27.85 ±5.01	27.89 ±4.97	-0.13

*; Significantly different between goups, $p<0.05$,t-test. #; Significantly different from baseline, $p<0.05$, paired t-test FSH; Follicular Stimulating Hormone, E2; 17ß-estradiol BMI; Body Mass Index, hGH; human Growth Hormone, HDL; High Density Lipoprotein cholesterol, LDL; Low Density Lipoprotein cholesterol

White blood cell(WBC)수, neutrophi 수, 총단백질, 알부민은 EstroG-100 섭취군에서 섭취 12주후에 섭취전과 유의한 변화를 나타내고 있으나 모든 수치는 정상범위 안에 속한다. 두 군

간에 neutrophil의 수치는 유의적인차이가 있으나($p<0.05$) 모든 섭취전과 섭취 12주의 수치는 앞서와 마찬가지로 정상범위에 속한다. creatinine 농도의 경우 대조군에서 유의적인 차이가 있었으나 EstroG-100 섭취군에서는 유의적인 차이가 없었다.

혈청학적인 안전성 모든 변수는 섭취군과 대조군 모두 섭취 전후의 수치는 정상적인 범위에 있었으며 이를 Table 45에 나타내었다.

Table 45. Serum safety factor analysis

Factors		EstroG-100 Mean±SD	Placebo Mean±SD	Normal range (unit)
WBC	Week0 (Baseline)	6.27±1.92	6.50±1.72	4.0~11 ($*10^3$/uL)
	Week12	5.80±1.85	6.53±1.69	
	Change from baseline	-0.47±1.06 #	0.04±1.44	
Neutrophil	Week 0 (Baseline)	3.67±1.47	3.55±1.24	1.8~8.3 ($*10^3$/uL)
	Week 12	3.33±1.29	3.83±1.30	
	Change from baseline	-0.34±0.86 * #	0.28±1.31 *	
Total Protein	Week 0 (Baseline)	7.54±0.53	7.45±0.40	6.4~8.3 (g/dL)
	Week 12	7.21±0.36	7.06±0.43	
	Change from baseline	-0.33±0.43 ##	-0.39±0.51##	
Albumin	Week 0 (Baseline)	4.54±0.22	4.56±0.30	3.3~5.0 (g/dL)
	Week 12	4.31±0.20	4.26±0.27	
	Change from baseline	-0.23±0.22 ##	-0.30±0.29 ##	
Creatinine	Week 0 (Baseline)	0.76±0.12	0.78±0.12	0.5~1.3 (mg/dL)
	Week 12	0.73±0.11	0.71±0.13	
	Change from baseline	-0.02±0.11	-0.07±0.13 ##	

*; $p<0.05$compared between groups by t-test

#; $p<0.05$compared to baseline, ## ; $p<0.01$compared to baseline by paired t-test

(6) 부작용

임상시험 중에 발생한 부작용은 등록된 64명의 피험자 중 1건이 보고되었다. 이 섭취자는 6주 방문시에 섭취 후 1주 후에 질출혈이 발생하고 출혈이 멈추었다고 연구팀에 보고하였고, 연구팀은 곧바로 IRB에 보고하였다. 이 피험자는 나중에 위약군으로 판명되었고 더 이상의 추가 대응은 필요치 않았다. 피험자는 6주 방문 시에 2번째 KMI 설문조사를 작성하였지만 임상시험에서는 제외시켰다. 이외의 부작용은 보고되지 않았다.

(7) 결론

Women's Health Initiative (WHI)-16000여명의 폐경기 여성을 대상으로 실시된 multi-center, 무작위 이중맹검, 위약 대조 임상시험-의 임상시험 중단은 어떻게 갱년기증상의 치료하느냐 하는 방법의 변화를 초래하였다. WHI의 결과 호르몬대체요법에 의한 호르몬 투여군에서 위약대비 유방암발생 26%, 심장질환 29%, 뇌졸중 41%가 증가하여 부작용이 심각하다는 결과를 보여주었다. 또한 혈액응고는 호르몬 투여군에서 위약대비 2배정도 증가하였다. 대안으로, 효과는 약하지만 호르몬 투여 배비 훨씬 안전한 식물성에스트로겐에 대한 보고가 있다. 현재 일부 식물에스트로겐 제품은 갱년기증상 개선에 널리 사용되어지고 있지만 대부분이 과학적인 증거와 인정된 연구가 거의 없는 실정이다. 과학적인 증거 부족과 암 및 다른 부작용의 위험성이 존재하고 있는 것 때문에 점차 관심을 더해가고 있는 식물성에스트로겐에 대해 연구하였다. 이번 연구에서는 EstroG-100가 갱년기여성의 증상에 미치는 영향에 대해 위약군 대비 효과에 대해 임상시험여구를 수행하였다. 안전성 평가를 위한 생화학적마커와 더불어 갱년기 증상의 개선 효과를 함께 측정하였다.

이번 연구에서 EstroG-100섭취군에서 안면홍조/발한, 손발저림, 불면증, 신경질, 우울증, 어지러움증, 피로감, 관절통/근육통과 질건조증이 대조군에 비해 통계적으로 유의적인 개선이 있었다. EstroG-100 섭취군에서 부작용은 보고 되지 않았다. 또한 체중, 생화학적 안전성 마커뿐만 아니라 혈액내 호르몬 농도 변화는 유의적인 변화를 보이지 않았다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

Table 46. Purpose and achievement rate

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	EstroG-100의 임상시험 수행 및 건강기능식품 제형 적용 연구	EstroG-100의 유효성 검증	100%	임상시험에 필요한 EstroG-100 투여 시료 및 위약 제조 공급
			100%	Caucasian 여성을 대상으로 한 EstroG-100 투여 임상시험: Protocol, IRB 통과, Mammogram, Ultrasonic, 혈청검사 등을 통해 Inclusion Criteria에 해당되는 임상시험 참여자 선발 완료
	백하수오, 속단, 당귀로부터 에스트로겐 활성 물질의 분리, 정제 및 특성 분석	백하수오, 속단, 당귀 추출물의 에스트로겐 활성 탐색 및 분획 특성	100%	백하수오, 속단, 당귀 추출물의 에스트로겐 활성 탐색
			100%	식물 추출물의 용매별 분획에 따른 활성 변화
			100%	우수 활성성분 정제 방법 탐색
2차 연도 (2010)	EstroG-100의 유효성 검증	EstroG-100임상을 통한 유효성 검증	100%	대조군대비 KI개선 ($p<0.01$), KI 1개 세부증상중 9개 증상과 질건조증 유의하게 개선, 부작용 없었음.
	EstroG-100의 건식제형 연구	- 경질 캅셀 및 코팅정제 시생산	100%	경질캅셀 및 코팅정제 개발 시생산 완료
		- 시제품의 유통 기간 설정을 위한 가속 시험	100%	상기 두가지 제형에 대한 유통기한 설정
	EstroG-100 안전성 검증	단회독성, 유전독성 진행	100%	GLP 기관을 통한 안전성 평가 결과 확보

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	백하수오, 속단, 당귀로부터 에스트로겐 활성 물질의 분리, 정제 및 특성 분석	다양한 크로마토그래피법을 이용한 활성성분 분리, 정제	100%	1차년에서 선정된 약재 추출물로부터 90개의 획분 회수(Delta-Pak™ C18 cartridge)
			100%	우수 활성성분의 정제 및 분리(C18 column을 이용한 liquid chromatography)
		에스트로겐 활성물질의 특성 분석	100%	최종 활성성분에 대한 Mass spectrometer 및 NMR 분석을 통한 구조 동정
			100%	최종 활성성분의 에스트로겐 활성 검증(ER competitive binding assay, cell proliferation assay, yeast-based estrogenicity assay, pS2 mRNA expression assay)

제 2 절 관련분야 기여도

1. EstroG-100 유효성 검증

백수오등 복합추출물은 식품의 원재료로 이용가능한 천연생약소재로부터 안전하게 추출함 물질로서 기존 부작용과 효능이 의심되는 에스트로겐 및 그 대체물질들의 단점을 보완하는 물질이다. 이 소재가 인체임상을 통해 갱년기 증상을 뚜렷하게 개선하였음이 확인되어 타 소재에 비해 우수한 물질로서 개발되었다. 이로써 폐경 전 후의 갱년기 여성을 포함하여 여성호르몬의 소실이나 불규칙한 분비로 인해 어려움을 겪고 있는 여성들이 안심하고 사용할 수 있는 대안이 제시되었다. 또한 수천종의 한약소재를 보유하고 있는 한국으로서는 본 연구의 결과를 통해 노화, 성인질환 등의 다양한 기능성에 대한 개발을 촉진할 것으로 판단된다.

2. 백수오, 속단, 당귀로부터 에스트로겐 활성 물질의 분리, 정제 및 특성 분석

본 연구로부터 당귀 열수추출물 유래 식물성에스트로겐 활성 물질이 caffeic acid 임을 확인하였으며, 당귀열수추출물 또는 caffeic acid를 함유하는 저렴한 소재 등, 여성호르몬관련 제품의 개발을 위한 소재로의 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

3. EstroG-100 안전성 검증

국내에서 기존 섭취역사를 가진 소재에 대해 해외시장진출을 검토하는 경우 국가간의 이용역사와 제도차이로 인한 장벽이 존재하지만 이를 국제적으로 공인되는 수준의 독성시험을 진행함으로써 극복한 사례로서 여타 유사한 요구를 가진 연구자와 기업에 대해 연구개발의 가능성을 제시하였다.

4. 건강기능식품 제형 및 유통기한 연구

Fig. 29. 백수오등 복합추출물 개별인정형 경강기능식품 개발사례

당사는 제형개발과 유통기한 설정실험을 통해 코팅정제는 에스트지(R) 로제골드 등 5종의 제품을 경질캡셀은 에스론플래티넘 등 7종을 개발하여 시판중이며 HRT 등의 우려로 인해 침체된 여성갱년기 증상 관련 시장에서 우수한 건강기능식품으로 시장을 활성화 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 산업화 실적 및 계획

1. 산업화 실적

가. 개별인정 획득

본 과제의 연구결과인 인체임상결과를 바탕으로 개별인정 신청을 수정보완 제출하여 4월 27일자로 아래와 같이 개별인정을 획득하였다.

○ 원료명 : 백수오등 복합추출물

○ 인정번호 : 기능성원료 인정 제2010-20호('10.04.27)((주)내츄럴엔도텍)

○ 기능성내용 : 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음(기타기능 II)

○ 일일섭취량 : 백수오, 속단, 당귀 열수추출물로서 514 mg/day

나. 미국 FDA로 부터의 NDI 획득

미국의 Dietary Supplement Health and Education Act (1994)에 따르면 1994년 10월 15일 이전에 미국에서 시판되지 않은 기능성소재에 대해서는 NDI notification 제출을 의무화하였으며 당사는 2010년 10월 21일자로 NDI 승인을 획득하는 엄청난 성과를 거두었다.

다. 국내 개별인정 제품화 및 매출실적

(1) 타정 및 경질캡셀 제형의 시제품을 생산하고 가속실험을 통해 이들의 지표성분의 변화를 측정하여 유통기한을 설정하였다.

(2) 원료추출물의 유통기한은 장기보관실험으로 설정하였다.

(3) 개별인정 획득 후 원료 및 제품의 품목신고를 진행하여 백수오등 복합추출물 개별인정형 건강기능식품으로서 30억원의 매출을 달성하였다.

2. 산업화 계획

가. 국내 매출계획

2011년 당사 백수오등 복합추출물 개별인정형 원료 및 제품의 매출예상은 70억원으로 대비 233%로 증가할 것으로 추정된다. 식약청으로부터 과학적 근거에의해 그 기능성이 인정받은 후 백수오등 복합추출물 개별인정 원료에 대한 시장의 인식이 확산된 데 기인한다 하겠다.

나. 해외매출계획

본 연구의 결과 1)한국식품의약품 인전청으로부터 그기능성과 안정성이 인정받았고 2)미국 FDA로부터 NDI(New Dietary Ingredient)로서 인정을 받은 이후 미국의 주요 건강기능식품회사, 2대 홈쇼핑 회사, Mass Merchandiser (Walmart, Costco 등), 건강매장, 미국 최대 병의원 건기식 공급업체 등이 백수오등 복합추출물의 계약 / 주문/ 제품디자인 작업 / 마케팅 정책 수

립 등을 개시하는 등 내년 최소 3백만불 이상의 수출이 가능할 것으로 추정되고 매년 매출이 늘어날 것으로 판단된다.

제 2 절 논문 및 특허확보 실적 및 계획

1. 논문진행상황

가. 논문 2건 추진 중

(1) Isolation and Identification of Phytoestrogenic Compound from *Angelica gigas* Nakai. Food Chemistry (투고 준비 중, 2010년 12월)

(2) The Effect of Herbal Extract (EstroG-100) on Pre-, Peri-, and Post-Menopausal Women: A Randomized Double-blind Placebo-controlled Study. PLoS One (투고중)

나. 국내외 학술발표(국내1건, 해외 1건)

(1) Evaluation of the Estrogenic Effects of Various Extracts from *Phlomis umbrosa* Turcz and *Angelica gigas* Nakai. 한국식품과학회 (2010년 6월 16-18일)

(2) Development and Validation of an Herbal Product for Treatment of Menopause Symptoms In Asian and Caucasian Populations. 2010 World Congress FIP Pharmaceutical Sciences in association with AAPS Annual Meeting and Exposition www.pswc2010.org, New Orleans, Louisiana, USA, November 14 ~18, 2010.

제 3 절 추가연구 및 활용계획

1. 천연물 신약 개발

다수의 임상실험을 포함하여 인체에 대한 과학적인 효능근거를 가지고 신뢰성 소비자판매 국내외 시장에서 갱년기 증상 개선제품은 주로 의약품인 호르몬 제제와 승마/히스페린 제제이나 에스트로겐의 부작용과 승마의 간독성으로 인해 그 사용이 급격히 감소하였다. 당사는 백수오 등 복합추출물을 천연물 신약으로 개발할 예정이다. 이를 위해서 프로파일을 이용한 원료표준화 및 in vivo 효력실험을 수행하고 추가로 임상을 수행하여 천연물 신약으로 승인을 받고자한다. 연구과정에서 국제적으로 인정받을 수 있는 수준으로 진행함으로써 타국에서 더욱 우수하고 국제적으로 공인되는 자료를 바탕으로 천연물의약품 또는 diet supplement 소재로서 해당 주요시장에 진출할 수 있을 것이다.

2. 기작연구 명확화

백수오등 복합추출물의 구성생약별로 작용기작을 더욱 명확히 연구함으로써 제품의 과학적 근거를 명확히 제시할 필요가 있다. 이러한 연구의 성과는 각 생약의 작용기작을 명확히 밝힘

과 동시에 밝혀진 활성을 이용하여 다양한 분야에 적용이 가능할 것이다.

3. 신규 노화관련 연구

상기 연구성과를 바탕으로 여성 및 남성의 노화와 관련하여 백수오등 복합추출물에 사용된 소재 외에 다른 생약소재에서 우수한 기능성을 확인하여 이를 활용하여 호르몬 또는 노화관련 다양한 연구성과를 창출할 수 있을 것으로 판단된다.

제 6 장 참고문헌

1. Melton LJ 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL.Perspective. How many women have osteoporosis?J Bone Miner Res. 7(9):1005-10.1992

2. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators.Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.JAMA. 2002 Jul 17;288(3):321-33.

3. Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D., The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. Obstet Gynecol. 91(1):6-11 (1998).

4. Albertazzi P, Pansini F, Bottazzi M, Bonaccorsi G, De Aloysio D, Morton MS., Dietary soy supplementation and phytoestrogen levels. Obstet Gynecol. 94(2):229-31 (1999).

5. J. S. Jacobson, Andrea B. Troxel, Joel Evans, Lorissa Klaus, Linda Vahdat, David Kinne, Randomized trial of black cohosh for the treatment of hot flashes among women with a history of breast cancer. J Clin Oncol. 2001 May 15;19(10):2739-45.

6. Soo Nam Kim, Yong Chun Li, Hong De Xu, Dong Geun Yi, Min Seop Kim, Sung Pyo Lee, Kwon-Taek Yi, Jae Kyoung Lee, Jae Soo Kim, Myung-Sang Kwon, Pahn-Shick Chang, and Bo-Yeon Kwak, Phytoestrogenic Effects of Combined Plant Extracts on the Change of Bone Metabolism of OVX Rats, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 40(3): 316~320 (2008)

7. Nam-Jin Lee, Geun-Soo Kim, Bo-Yeon Kwak, Kwon-Taek Yi, Jae-Kyung Lee, Yu-Ri Jeong, Chun Mei Lin, Jae Soo Kim and Jong-Koo Kang Anti-menopausal Effect of the Newly-Developed Phytoestrogen, FGF271, in Vitro and in Vivo, Lab. Anim. Res. 24(2): 167-172 (2008)

8. Ki Ho Lee, Duck Joo Lee, Sang Man Kim, Sang Hyeun Je, Eun Ki Kim, Hae Sung Han, In Kwon Han, Evaluation of effectiveness and safety of natural plants extract(Estromon) on perimenopausal women for 1 year, J. Korea Soc. Menopause, 11(1):16-25 (2005)

9. Kenneth DR Setchell, Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones, Am J Clin Nutr 68(suppl):1333S - 6S (1998)

10. Kim J.S., S. Yoon., Isoflavone contents and ββ-glucosidase activitites of soybeans, Meju, and Doenjang. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 31(6): 1405-1409 (1999)

11. Pockaj BA, Gallagher JG, Loprinzi CL, Stella PJ, Barton DL, Sloan JA, Lavasseur BI, Rao RM, Fitch TR, Rowland KM, Novotny PJ, Flynn PJ, Richelson E, Fauq AH. Phase III

double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial of black cohosh in the management of hot flashes: NCCTG Trial N01CC1. J Clin Oncol. 24(18):2836-41 (2006)
12. Jeongrai Lee, Kuk Whan Kim, Hyun-Kyu Kim, Soo-Wan Chae, Jae-Chul Jung, Suk Hyung Kwon, and Chul Hee Rheu The Effect of Rexflavone (Sophorae Fructus Extract) on Menopausal Symptoms in Postmenopausal Women: A Randomized Double-blind Placebo Controlled Clinical Trial, Arch Pharm Res 33(4):523-530 (2010)
13. Hyung Jun Kim, Do Hyeong Kwon and Eun Joo Kum, Effects of Punica granatum (Pomegranate) Extracts on the Menopause Women, J. Exp. Biomed. Sci. 16(1):53~64 (2010)
14. Mokbel, M.S, Hashinaga, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from butan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. Food Chem. 94:529-534 (2006)
15. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-559 (1999)
16. Ahn MJ, Lee MK, Kim YC, Sung SH. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography - diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 46:258 - 266 (2008)
17. Kim KM, Jung JY, Hwang SW, Kim MJ, Kang JS. Isolation and purification of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* Nakai. J Korean Soc Food Sci Nutr. 38:653-656 (2009)
18. Boue´ SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. J Agric Food Chem. 51:2193-2199 (2003)
19. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. Korean J. Immunol. Methods. 65:55-63 (1983)
20. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspect. 103:113-122 (1995)
21. Gaido KW, Leonardo LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. Toxicol Appl Pharmacol 143:205-212 (1997)
22. Knowlden JM, Gee JM, Bryant S, McClelland RA, Manning DL, Mansel R, Ellis IO, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction methodology to detect estrogen-regulated gene expression in small breast cancer specimens. Clin Cancer Res. 3:2165-2172 (1997)
23. Yang JW, Choi EM, Kwon MG, Koo SJ. In vitro estrogenic activity of silkworm

(*Bombyx mori*) pupa and herbs. J. East Asian Soc. Dietary Life. 15: 315-322 (2005)
24. Amato P, Christophe S, Mellon PL. Estrogenic activity of herbs commonly used as remedies for menopausal symptoms. Menopause 9:145-150 (2002)
25. Hua C, Liub H, Duc J, Moa B, Qic H, Wang X. Estrogenic activities of extracts of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root in MCF-7 breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 113:209-216 (2009)
26. Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, McLachlan JA. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and independent mechanisms. Nutr. Cancer. 38:229-244 (2000)
27. Miksicek RJ. Commonly occurring flavonoids have estrogenic activity. Mol. Pharmcol. 44:37-43 (1993)
28. Breinholt V, Larsen JC. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF-7 cell proliferation assay. Chem. Res. Toxicol. 11:622-629 (1998)
29. Mfenyana C, DeBeer D, Joubert E, Louw A. Selective extraction of Cyclopia for enhanced in vitro phytoestrogenicity and benchmarking against commercial phytoestrogen extracts. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 112:74-86 (2008)
30. Fujimoto N, Kohta R, Kitamura S, Honda H. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Life Sci. 74:1417-1425 (2004)
31. Ahn MJ, Lee MK b, Kim YC, Sung SH. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography - diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. J Pharmaceut. Biomed. 46:258-266 (2008)
32. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Metabolic activation promotes estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. Maturitas. 59:128-136 (2008)
33. Wang, TT, Sathyamoorthy N, Phang, JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis 17:271 - 275 (1996).
34. Park WH, Kim SH, Kim CH. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of Euonymus alatus: isolation and structure determination. Toxicology 207:383-390 (2005)
35. Lim EK, Higging GS, Yi LI Y, and Bowles DJ. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: glucosyltransferase is maintained in planta. Biochem. J. 373:987-992 (2003)
36. Kim HJ, Suh HJ, Kim JH, Kang SC, Park SM, Lee CH and Kim JS. Estrogenic activity of glyceollins isolated from soybean elicited with *Aspergillus sojae*. J Med Food.

13:1-9 (2010)
37. Jung BI, Kim MS, Kim HA, Kim DS, Yang JW, Her S, Song YS. Caffeic acid phenethyl ester, a component of Beehive Propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator. Phytother. Res. 24:295-300 (2010)
38. Kim SN, Li YC, Xu HD, Yi DG, Kim MS, Lee SP, Yi KT, Lee JY, Kim JS, Kwon MS, Chang PS, Kwak BY. Phytoestrogenic effects of combined plant extracts on the change of bone metabolism of OVX rats. Korean J. Food Sci. Technol. 40:316-320 (2008)
39. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Metabolic activation promotes estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. Maturitas 59:128-136 (2008)
40. Wang J, Chung MH, Xue B, Ma H, Ma C, Hattori M. Estrogenic and antiestrogenic activities of Phloridzin. Biol. Pharm. Bull. 33:592-597 (2010)
41. Wanda K, Njamen D, Yankep E, Fotsing MT, Fomum Z.T, Wober J, Starcke S, Zierau O, Vollmer G. Estrogenic properties of isoflavones derived from *Millettia griffoniana*. Phytomedicine. 13:139-145 (2006)
42. Oh SM, Kim YP, Chung KH. Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. Arch. Pharm. Res. 29:354-362 (2006)
43. Kimberly F, Katarina M, Yackley, Jairam V, Clinton D. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. J. Nutr. 139:1833-1838 (2009)
44. Duda RB, Taback B, Kessel B, Dooley DD, BS, Yang H, Marchiori J, Slomovic BM, Alvarez JG. pS2 Expression induced by american ginseng in MCF-7 breast cancer cells. Annals Surgical Oncol. 3:515-520 (1996)