

(옆면)

(앞면)

119012-3

소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움되는 고령친화식품 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 소재

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

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

발간등록번호

11-1543000-004037-01

# 소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발

2022.04.12

주관연구기관 / (주)에스에프씨바이오  
협동연구기관 / 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발”(개발기간 : 2019.05.20 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 12.

주관연구기관명 : (주)에스에프씨바이오

(대표자) 김 성 규

협동연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

(대표자) 백 동 현 (인)



주관연구책임자 : 김 성 규

협동연구책임자 : 박 소 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		119012-3	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1804 (맞춤형영양식품)	50%	LA0906 (기능성식품소재)	30%	LB0207 (원예특용작물 이용/품질 /수확 후 관리)	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0299 (기타 식품영양)	50%	PA0201 (기능성식품 및 소재)	30%	AA0305 (특용작물 품질 수확 후 관리)	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발						
전체 연구개발기간	2019. 05. 20 - 2021. 12. 31 (2년 8개월)						
총 연구개발비	총 848,100천원 (정부지원연구개발비 : 636,000천원, 기관부담연구개발비 : 212,100천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 원료 1종 개발 및 이를 활용한 고령친화 식품 2종 개발				
	전체 내용		<b>세부목표</b> 소엽추출물의 표준화 및 최적화 소엽추출물의 기능성 검증 소엽의 대량생산공정 확립 및 표준화 소엽추출물의 수용형 제형개발 및 검증 인지기능에 도움이 되는 소엽추출물 소재 1종, 맞춤형 고령친화 식품 2종 개발				
	1단계 (해당 시 작성)	목표					
		내용					
	n단계 (해당 시 작성)	목표					
		내용					
연구개발성과	○ 지표성분 설정 - 소엽의 주 성분인 rosmarinic acid과 선행 연구 결과 유효성분으로 제시된 아사론 유도체 중 분리된 양이 가장 많고 뛰어난 활성을 가지고 있는 rosmarinic acid와 alpha-asarone을 지표성분으로 설정하였으며, rosmarinic acid과 alpha-asarone의 동시 분석법을 확립함  ○ 분석법 제시 및 검증 (validation) - 소엽 추출물의 지표 성분으로 설정한 rosmarinic acid과 alpha-asarone 의 HPLC 동시 분석법을 확립하였으며 이 분석법은 '의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드(식품의약품안전처)' 를 바탕으로 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 농도별 표준용액을 이용하여 validation 함  ○ 지표(유효)성분 함량 평가 기준 설정						

○ 에탄올 함량 및 온도별 추출법 확립

에탄올 추출: 소엽의 지표(유효)성분을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 추출용매, 즉 에탄올 함량을 설정하기 위해서 소엽 전체 100g을 각각 0, 20, 40, 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압농축기를 활용하여 유기용매를 제거하고 동결건조하여 가루로 만들어 다음과 같이 추출물을 확보함. 수득률의 경우 에탄올 0%가 가장 높았으나 HPLC를 이용한 지표성분 함량 확인 결과 60% 에탄올로 추출을 진행하였을 때 지표(유효)성분의 함량이 가장 높아 에탄올 함량의 경우 60% 가 가장 적절한 것으로 설정함

○ 소엽추출물의 포집제형 최적제조법 확립

기호성과 소엽추출물의 포집을 향상을 위하여 제형의 입도크기를 700um 이하로 설정하였으며 300um shell 노즐을 이용하여 연구를 진행함

- 또한 core물질이 droplet 형태로 낙하하는 시점에 shell 물질을 이용하여 감싸주는 방식인 concentric nozzle을 이용할 시에는 core 물질의 loss가 일부 발생하는 반면에 대량생산이 가능하며 추가적인 유화공정이 따르지 않기 때문에 이를 활용하여 아래 조건을 확립

○ 소엽추출물의 포집제형 최적제조법 확립

지용성 소엽추출물을 식품에 적용하기 쉬운 형태인 수용성 액상형태의 중간제재를 제조하는 방법을 확립하고자 난용성 물질인 소엽추출물에 cooking oil (MCT oil 및 Corn oil)을 carrier oil로 사용하여 셔터믹서 및 초고압균질기를 이용하여 한층 더 안정한 상태의 Microemulsion 형태를 제조함

○ 소엽추출물 포집제형의 저장안정성 평가

소엽추출물 수용성분말에 대한 저장안정성 평가 결과, 저장온도 35°C의 경우 6주간 보관 시 초기 Rosmarinic acid의 함량 및 Alpha asarone 함량의 변화 없이 일정하게 유지됨을 확인

○ 소엽 원생약 성분 프로파일 개발

소엽 원생약의 지표성분 함량 평가를 위해 소엽 원생약에 함유된 지표(유효)성분인 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 함량을 HPLC 분석법을 활용하여 18곳의 소엽을 확인함 소엽의 재배지는 경북 영천이 8 곳으로 가장 많았으며 경산, 고령, 함양을 포함하여 경상남도에서 재배된 시료가 가장 많음 (12 곳) 판매처별 주정 추출물에 함유된 rosmarinic acid와 alpha-asarone은 산지에 따라 큰 차이가 있음. 같은 원산지라고 하더라도 판매처에 따라 rosmarinic acid의 함량은 낮게는 0.52 ug/g, 높게는 41.02 ug/g 을 함유하고 있으며, 그 평균값은 17.43 ug/g, RSD는 65.03%을 나타냄

○ 대량 구매 원생약 동등성 평가

대량 구매한 자소엽(광명당제약)을 확보하여 표준생약과 그 동등성을 비교하였으며 RSD%가 25% 이하로 동등성이 확인됨

○ 소엽 원생약의 최적 증 확립

5 종의 소엽 유사종 (자소엽, 깻잎, 청소엽, 주름소엽, 편접청자소)을 채취



분석하였으며, 중국에서 재배하는 소엽 유사종 5종에 함유된 rosmarinic acid는 0.14-0.38 ug/g으로, 국산 소엽에 비해 20% 이하 었음. 경남 하동에서 채취한 3종 중 자소엽과 갯잎의 rosmarinic acid는 판매처 평균과 유사하였으며, alpha-asarone의 경우 주름 소엽에서 판매처 평균과 유사한 결과치를 보임

○ 소엽 원생약의 채취 최적 시기 및 채취 부위 확립

6월 ~ 9월 사이 3주 간격으로 총 5회 제공받아 시기별로 분석함. 분석 결과, 4회차 제공 받은 시료에서 소엽과 소경 모두 rosmarinic acid 함량이 20.51, 8.17 ug/g으로 가장 높은 것을 확인하였고 5회차 제공 받은 시료에서는 소엽, 소경의 rosmarinic acid 함량이 11.27, 4.61 ug/g으로 줄어드는 것을 확인하여, 소엽의 최적 채취 시기 및 부위는 꽃대가 올라오기 전인 8월 중순의 소엽으로 확인

○ 소엽추출물의 대량추출 생산공정 최적화

생산 공정 요소를 감안하여 대량 생산이 가능하며 지표성분 함량이 가장 높은 60% 에탄올 추출을 사용한 대량 생산 공정을 개발하여 최적화

○ 원생약 동등성평가 기준 개발 및 평가

원생약인 소엽의 재배지역, 판미처에 따른 성분에 대한 동등성 평가를 할 수 있는 기준을 개발하고, 이를 통하여 품질관리에 대한 평가지표를 사용하기 위해 평가를 진행하였으며, RSD%가 25% 이하일 때 동등성이 확인되어 품질관리에 적합한 것으로 판단

○ 소엽추출물 및 유효성분이 세포생존율에 미치는 영향 검증(MTT assay)

소엽 100%, 80%, 60% 에탄올 추출물과 소엽의 디클로로메탄층에서 분리된 3종의 트리테르페노이드가 어느 정도의 농도에서 세포독성이 있는지를 실험하여, 세포독성 판정기준은 세포생존율이 80% 이상일 때에는 독성이 없다고 생각되는 것으로 판단

○ 소엽추출물이 세포생존율에 미치는 영향 검증(LDH assay)

소엽 100%, 80%, 60%에탄올 추출물이 어느 정도의 농도에서 세포독성이 있는지를 판단하기 위해 실험함

○ 소엽 추출물의 세포 보호 효과 검증(MTT assay)

소엽의 100%, 80%, 60% 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제함으로써 신경세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시하였으며, 소엽 에탄올 추출물의 농도 구배적으로 세포 생존율은 증가하였고, 이는 소엽 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드의 응집을 억제시켜 베타아밀로이드에 의해 유발된 세포독성이 감소

○ 소엽 추출물의 세포 보호 효과 검증(LDH assay)

소엽의 100%, 80%, 60% 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제함으로써 경세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시하였으며, 베타-아밀로이드만 처리한 대조군 보다 소엽 추출물을 처리한 실험군에서 세포생존률이 높아진 것을 보임.

○ 소엽 유효성분의 세포 보호 효과 검증(MTT assay)

소엽의 디클로로메탄층에서 분리한 트리테르페노이드가 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제하고 신경세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시하였으며, 3종의 트리테르페노이드를 처리한 처리군에서 농도구배적으로 세포생존율이 증가하였으며 이는 소엽의 트리테르페노이드가 베타-아밀로이드의 응집을 억제시켜 베타아밀로이드에 의해 유발된 세포독성이 감소

○ 소엽 에탄올 추출물의 안정성 평가

소엽 60%, 80% 에탄올 추출물을 각각 25°C, 35°C, 40°C에서 보관 후 45일 간격으로 225일까지 확립된 HPLC 분석하여, 80%, 60% 에탄올 추출물의 안정성 평가 결과 C(Caffeic acid)와 E(Scutellarein-7-O-glucoside)의 경우 60%, 80%에탄올 추출물 모두에서 감소하는 경향을 보임. 또한 두 에탄올 추출물을 40°C에서 저장시에는 F(Rosmarinic acid)가 감소하는 경향을 보임

○ 소엽추출물의 인지기능개선 효능 평가

60% 및 80% 소엽 주정 추출물이 Aβ로 유도한 동물모델에서 Y-maze test, 사물인지실험 (novel object recognition test), 수동회피실험(passive avoidance test) 및 모리스 물 미로실험(morris water maze test)을 통해 연구한 결과 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인

Aβ로 유도한 기억 손상 모델에서 Y-maze test를 진행한 결과 60% 소엽 주정 추출물 250 또는 500 mg/kg와 80% 소엽 주정 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 용량에서 행동량에 영향을 미치지 않고 유의하게 기억력을 개선시키는 것을 확인, 또한 사물인지실험(novel object recognition test), 동회피실험(passive avoidance test) 개선시키는 것을 확인

60% 및 80% 소엽 주정 추출물이 Aβ로 유도한 동물모델에서 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인, 바이오마커 연구를 통해 소엽 60% 에탄올 추출물은 뚜렷한 항염증 효과, 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드가 기억력 감퇴를 유도하기 전에 독성 베타아밀로이드를 제거하는 기전을 통해 기억력 감퇴를 억제하는 것일 가능성이 있음

○ 고령친화식품 시제품 개발



시제품을 개발하고 고령친화우수식품지정서 1개 제품과 2개 제품 개발을 완료하였음.

	비-트리션 제품은 사업화를 완료하여 판매중에 있으며, 뇌보식 제품은 사업화를 완료하여 2월 초부터 판매할 예정임												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 소엽 원생약의 성분에 대한 분석을 통한 국내외 재배지와 시기에 따른 적정성을 확인함</li> <li>◆ 소엽추출물 및 유효성분의 세포생존률에 미치는 영향은 영향과 in vitro 활성 분석을 통한 인지능력 개선에 대한 기초 데이터로 활용함</li> <li>◆ 소엽의 추출 공정에 따른 표준물질의 함량 분석, 각 추출물을 이용한 in vivo 동물 실험을 통하여 인지능력개선에 대한 데이터를 확보하였음</li> <li>◆ 소재의 기본적인 안정성 및 제형화 기술 개발 유통기한 설정 실험 등을 실시함</li> <li>◆ 제품화로는 고령친화식품 2종을 최종적으로 생산하였으며, 그 중 1종은 고령친화우수식품으로 인정을 받음</li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	3	2											
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	소엽		식품소재		로즈마린산		고령친화식품		인지기능				
영문핵심어 (5개 이내)	Perilla		Food material		rosmarinic acid		Senior-friendly Food		cognitive function				

최종보고서						보안등급 일반[ ], 보안[ ]							
중앙행정기관명			사업명			사업명							
전문기관명 (해당 시 작성)			사업명			내역사업명 (해당 시 작성)							
공고번호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)										
			연구개발과제번호										
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1804 (맞춤형영양식품)	50%	LA090E (기능성식품소재)	30%	LB0207 (원예특용작물 이용/품질/수확 후 관리)	20%						
	농림식품과학기술분류	PA0299 (기타 식품영양)	50%	PA0201 (기능성식품 및 소재)	30%	AA0305 (특용작물 품질 수확 후 관리)	20%						
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문											
		영문											
연구개발과제명		국문		소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발									
		영문		Development of senior-friendly foods helping to improve cognitive function using Perilla leaf extract									
주관연구개발기관		기관명		(주) 에스에프씨바이오		사업자등록번호		113-81-52744					
		주소		(06050)서울시 강남구 언주로 725, 동관2층(논현동, 보전빌딩)		법인등록번호		110111-1679955					
연구책임자		성명		김성규		직위		대표이사					
		연락처		직장전화		02-3402-7151		휴대전화					
				전자우편				국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2019. 05. 20 - 2021. 12. 31 (2년 8개월)									
		단계 (해당 시 작성)		1단계									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금			
		연구개발비		연구개발비		지방자치단체		기타( )				합계	
		현금		현금		현금		현금		현금			
총계		636,000		21,300		190,800				657,300			
1단계		1년차		166,000		5,600		49,800		171,600			
		2년차		221,000		7,400		66,300		228,400			
		3년차		249,000		8,300		74,700		257,300			
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편			
		단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단		박소영		부교수				비고 역할 기관유형			
위탁연구개발기관													
연구개발기관 외 기관													
연구개발담당자 실무담당자		성명		김인선		직위		주임					
		연락처		직장전화		041-566-7151		휴대전화					
				전자우편				국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 02월 07일

연구책임자 : 김성규

주관연구개발기관의 장: 김성규

공동연구개발기관의 장: 백동현

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	20
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	31
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	108
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	108
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	109

### 부록

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 개요

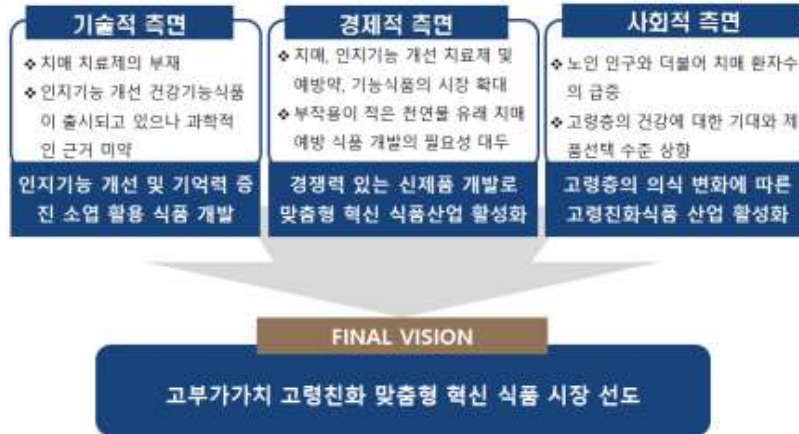


그림 3. 기술적 사회적 경제적 측면과 고령친화 맞춤형 혁신 식품

- 대한민국의 인구는 1940년 정부 수립 직후 2,000만 명에서 2010년 5,000만 명을 넘어섬. 전체 인구 변화는 1950~70년대 피라미드형, 1980~2000년대 종형, 2010년대 이후로는 초저출산 심화와 노년인구가 증가함에 따라 역피라미드형으로 변화하고 있음

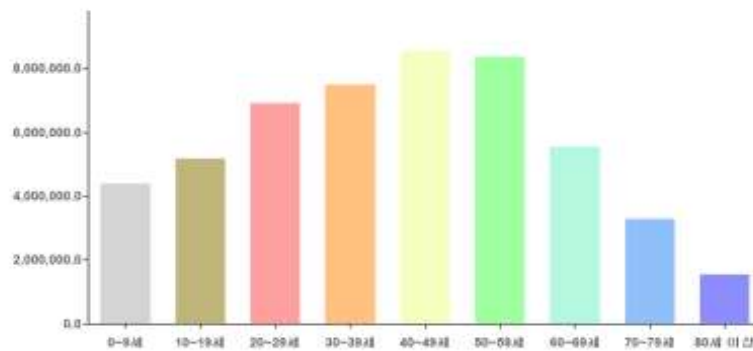


그림 4. 연령 계층별 인구 추이 (통계청, 장래인구추계, 2017)

- 그 와 더불어 의료기술의 발달로 인해 평균수명은 2000년 75.9세에서 2030년 81.5세, 2050년 83.0세로 연장될 것으로 전망하고 있음

표 3. 평균수명 추이(통계청, 장래인구추계)

	1981	1991	2000	2010	2020	2030	2050
계	66.2	71.7	75.9	78.8	80.7	81.5	83.0
남 자	62.3	67.7	72.1	75.5	77.5	78.4	80.0
여 자	70.5	75.9	79.5	82.2	84.1	84.8	86.2

(단위 : 세)

- 현재 65세 이상 인구가 전체의 11.3%(약 549만 명)로 세계 역사상 가장 빠른 속도로 고령화가 진행 중이며 연도별 예상되는 초고령 인구는 2030년에 24.3%, 2060년에는 40% 정도(2017년의 3배)로 증가할 것으로 전망함

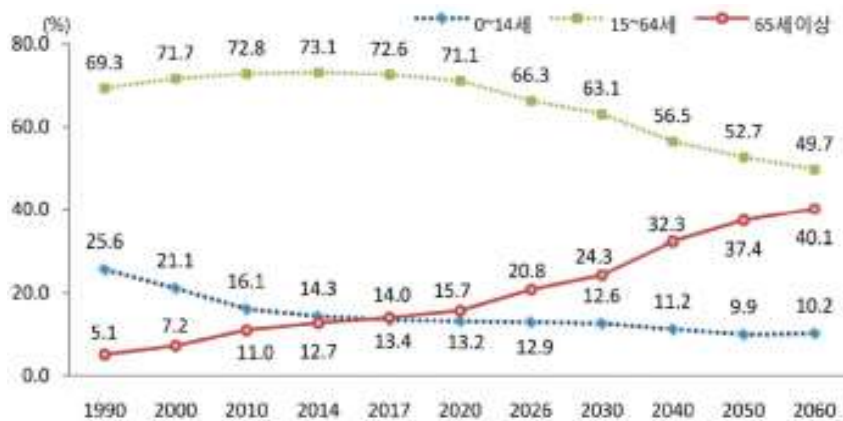


그림 5. 전체 인구의 변화 추이 (출처 : 통계청, “2014 고령자 통계(2014)”)

- 2017년 기준 75세 이상 노인의 진료 순위를 보면 치매 (2천2백만여 명)를 시작으로 배병증(1천4백만여 명), 고혈압(1천2백만여 명), 관절질환(7백만여 명), 당뇨병(6백만여 명), 치아장애(5백만여 명) 등이 있으며 치매가 다른 질병에 비해 급격하게 증가하고 있음

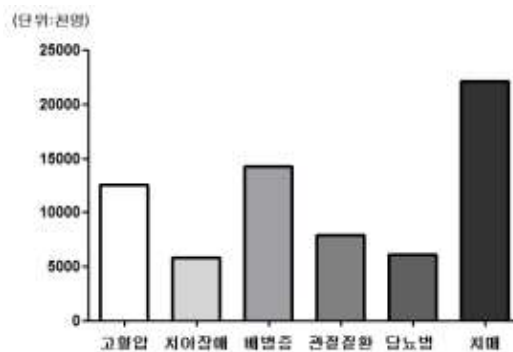


그림 6. 75세 이상 질병분류별 진료 현황

- 정부에서는 치매 국가 책임제의 일환으로 경증치매 환자에게까지 장기요양보험 대상을 확대하겠다고 밝히면서 건강보험 부담이 눈덩이처럼 불어날 것이 예상되고 그에 따른 자원 마련이 중요한 과제로 떠오르고 있음
- 보건복지부의 발표에 따르면 고령화와 치매 환자의 폭발적인 증가로 2015년 말 기준 64만 8000명으로 추



산되는 치매 환자가 2030년에는 127만 명, 2050년에는 271만 명까지 증가할 것으로 전망하고 있음. 이에 따라 치매 환자 1인당 관리비용은 2,000만원 수준으로 전체 치매 환자에 드는 비용은 13조 2000억 원에 달하고, 2050년에는 1인당 3900만 원, 전체 관리비용은 106조 5000억 원까지 증가할 것으로 추산됨

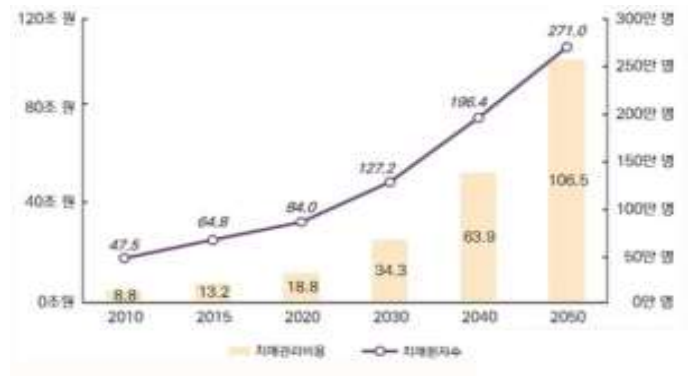


그림 7. 국내 치매관리비용(경상가) 및 치매환자 증가 추이  
(출처:치매현황분석, 중앙치매센터)

- 치매는 점진적 기억력 저하와 인지력 감소의 증세를 수반하는 노인성 퇴행성 뇌 질환이며 알츠하이머성 치매라고 불리는 치매가 전체 치매의 50% 이상을 차지함. 세계적으로 치매 환자수가 급증하고 있으며, 우리나라도 노인 인구의 급속한 증가와 더불어 치매 환자 수 및 관련 의료비가 기하급수적으로 증가하고 있음

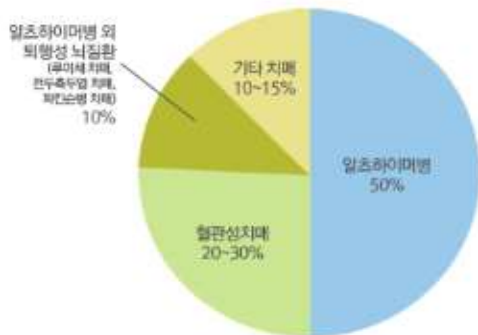


그림 8. 치매 원인 질환 비율

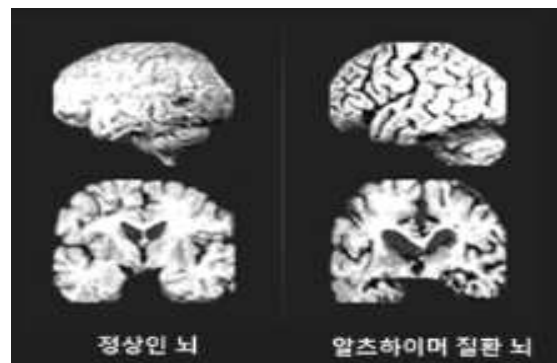


그림 9. 정상인과 알츠하이머 질환 환자의 뇌

- 현재 새로운 의료기술과 첨단 기술을 활용한 보건 산업이 성장하고 있음에도 불구하고, 만성 . 난치성 질환 발병은 계속 증가하고 있음. 특히 기억력 및 인지기능이 점차 감소해가는 치매를 앓는 환자 수가 급증하고 있음에도 명확한 치료 및 예방약이 부재한 상태임. 현재 처방되고 있는 약물은 인지 기능 저하를 일시적으로 유지하고 증상을 완화할 수는 있으나, 근본적인 치료나 예방약은 아니며 질병의 발병 원인에 대한 문제 해결책이 아님





그림 10. 우리나라의 노인인구의 치매환자 수

- 인지 기능 저하를 수반하는 치매는 오랜 기간 진행되어 발병하게 되는데, 초기 치매를 경도인지장애 (MCI, Mild Cognitive Impairment)라고 부름. 보통 경도인지장애로 진단받은 후 3년 이내 60% 이상이 치매로 진행되게 됨. 따라서 치매 초기 (경도인지장애)가 진단되었을 때 질병의 진행을 막고 치료를 위한 적절한 약물치료를 받아야 질병의 진행 및 악화를 막을 수 있으나 현재까지 치매의 원인을 차단하는 의약품 개발은 부재한 상태임
- 효과적인 MCI의 예방과 증상 개선에 도움이 되는 다양한 천연물 소재의 천연물 의약품 및 건강기능식품 개발이 필요함. 검증된 천연물 소재를 이용한 건강기능식품은 합성물질에 비해 안전성이 높고 부작용이 적기 때문에 질병이 발생하기 전부터 예방을 목적으로 장기간 섭취해야 한다는 질병의 특징을 고려할 때 대안이 될 수 있음



그림 11. 치매 유발의 각 단계별 치료와 관리의 중요성

- 급속한 인구 고령화는 신체, 정신적 건강 등 개인의 문제뿐만 아니라 보건의료 및 정치, 경제 등 사회 전반에 걸쳐 벌어지는 새로운 위기로, 국가에서는 현안으로 부각시키고 있음. 이러한 초고령화 시대에 대비한 국내 고령 친화 제품 산업은 걸음마 단계에 있을 뿐 아니라 그 필요성에 대한 인식 부족으로 산업 발전이 매우 취약함. 이러한 고령 친화 제품 산업은 중소기업이 우선권을 점유할 수 있는 사업적 특성을 가지고 있으나 연구개발 (R&D) 투자 및 전문 인력이 부족한 상황임
- 천연물을 소재로 한 의약품 개발은 약리학, 의학, 독성학, 생물학 등 여러 분야의 첨단 지식을 기반으로 하는 지식 집약적 연구, 개발 분야로서 최근 이에 대한 관심이 증가하고 있음. 천연물 소재는

상업적 적용 범위가 매우 넓으며, 보건의료, 농림, 해양수산 등 다양한 분야에서 고부가가치 제품으로 개발이 가능함. 한국은 전통의약 지식 분야에서 외국과 비교하여 상대적으로 경쟁우위를 확보하고 있으며, 천연물에 대한 다양한 경험적 지식을 확보하고 있어, R&D 부문에서도 유리한 분야임. 뿐만 아니라 기존의 신약개발 과정보다 요구되는 시간과 비용이 적고 실패 확률도 상대적으로 낮은 장점을 가짐

- 소엽추출물은 기존에 항균 및 항산화 등 다양한 효과를 가지고 있었으나, 선행연구를 통해 소엽추출물이 치매의 원인물질이자 신경세포 사멸의 원인으로 알려진 베타-아밀로이드의 응집을 차단하고 베타-아밀로이드에 의해 유발되는 세포 독성을 억제하여 신경세포를 보호하는 효과도 가지고 있다는 것을 알아냄. 따라서 소엽추출물은 치매 발병 원인을 사전에 제거하기 때문에 치매 예방 목적 또는 초기 치매(경도인지장애)의 진행 억제 및 치료 등을 기대할 수 있음. 그리고 소엽은 식품 공전에 등재되어 식품 소재로 사용할 수 있어 다양한 식품의 원료로 활용될 수 있어 고부가가치를 창출할 것임



그림 12. 소엽 사진

- 따라서 이 연구에서는 국내 천연물인 소엽을 활용하여 인지기능 개선의 소재로 개발하고, 이를 활용하여 직접적인 치료 효과보다는 건강유지 및 증진에 기여하는 기능성 식품을 개발하여 식품으로서의 시장을 확대하고자 함

○ 소엽의 인지기능개선 기능성 소재 개발의 필요성 및 중요성

- 본 기술의 핵심인 소엽은 타사의 선행기술과는 달리 알츠하이머성 치매의 가장 중요한 발병 원인인 베타-아밀로이드, 특히 신경 사멸의 원인인 베타-아밀로이드 응집체 형성을 억제함으로써 발병 기전을 사전에 원천봉쇄하여 질병을 예방 또는 치료하는 효과를 기대할 수 있음

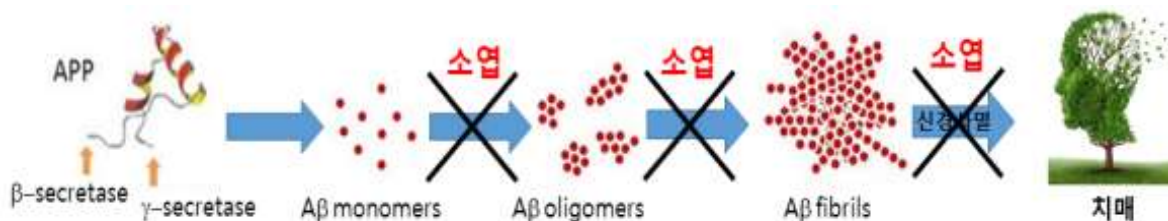


그림 13. 소엽의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과

- 또한 소엽은 이미 생성된 신경독성물질인 베타-아밀로이드 응집체를 해체(제거)하여 독성이 없는 단량체의 형태로 변화시킴으로써 병의 진행(악화)을 억제할 수 있는 기전을 동시에 가지고 있음



그림 14. 소엽의 베타아밀로이드 응집체 해체 효과

- 소엽에는 rosmarinic acid 같은 phenylpropanoid와 luteolin과 같은 flavonoid 등 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있어 항산화, 항염 효과가 뛰어나 대뇌 염증 억제 기전도 동시에 가짐

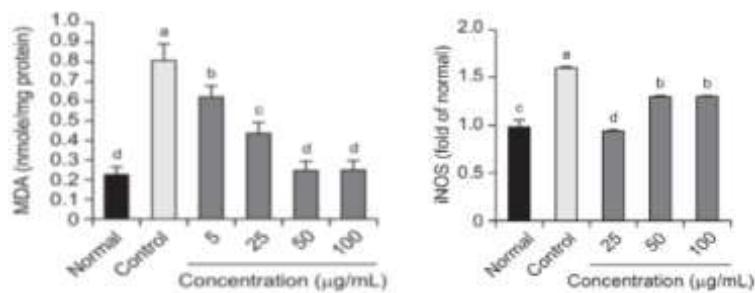


그림 15. 소엽의 항산화 및 항염 효과

- 의약품/기능성소재로서 소엽의 우수성
  - 소엽은 차즈기 *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo 또는 주름소엽 *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decaisne 의 잎 및 끝가지만을 채취한 것을 말함
  - 소엽은 소화를 돕는 한방 및 식품 소재로서 다양하게 활용되고 있음. 현재 차소엽 차가 시판되고 있으며, 탈모 예방 및 여성의 불임 치료와 예방용 소재로 활용되고 있음
  - 2016년 소엽의 생산량은 49 M/T로 전체 특용작물생산량 (998 M/T)의 약 5% 이상을 차지하고 있음 (출처: 농림축산부 2016년 특용작물 생산 실적)
  - 국내 주 생산지로는 경상북도 영천이 있으며 전체 생산량의 80% 이상을 차지하고 함



자)를 식품 원재료로 사용할 수 있으며 제한성이 한정되어 있지 않은 식품 소재임

- 따라서 소엽의 인지기능 개선 효과를 극대화한 치매 치료제 개발에 앞서 주관연구기업의 식품 개발의 강점을 살려 고령친화 맞춤형 식품 (음료와 죽)을 연구기간 동안 개발하고, 연구 결과를 바탕으로 연구가 종료된 후 개별인정형 원료로 향후 등재하여 건강기능식품을 개발하고자 함



그림 20. 소엽을 활용한 제품 개발 모식도 및 time schedule

## 1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 규모

#### ○ 기술현황

- 인지기능 및 기억력 저하를 주 증상으로 하는 알츠하이머성 치매의 원인으로는 베타-아밀로이드 (A $\beta$ ), 타우 (tau), 신경염증이 있음. 이들 3가지 원인이 상호 복합적으로 작용하여 뇌의 신경세포를 비가역적으로 파괴함으로써 알츠하이머 치매를 유발한다고 알려짐
- 따라서 증상 완화가 아닌 치매의 발병 원인을 억제하는 치매 치료제 개발을 위한 임상연구가 진행 중이며 그 소재로는 면역 관련 분자 (항체), 화학물질, 줄기세포, 펩타이드, 천연물 등이 있음. 임상 시험 중인 의약품들의 작용기전으로는 베타-아밀로이드 생성 억제 (BACE1 억제), 베타아밀로이드 분해, 베타-아밀로이드와 타우 축적 억제 등이 있음

제약사	제품명	단계	분류	기능	임상승인일
캠백스앤카일	GV1001	2상	펩타이드의약품	A $\beta$ , Tau 축적 억제	2016.12
네이처셀	아스트루스텐	1/2상(FDA)	줄기세포치료제	A $\beta$ 제거	2016.11
치바이오텍	CB-AC-02	1/2a상	줄기세포치료제	A $\beta$ 축적 억제	2015.11
대학제약	DHP1401	2b상	천연물신약	인지기능 개선	2015.8
일동제약	ID-1201	2상	천연물신약	A $\beta$ 생성 억제	2014.10
메디포스트	뉴로스텐	1/2a상	줄기세포치료제	A $\beta$ 분해	2013.9

그림 21. 국내사 치매 치료제 임상 시험 현황 (출처: 한국보건산업진흥원 (2017))

- 최근 천연물을 소재로 한 인지기능 개선 건강식품 개발 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다수의 천연물이 인

지기능 개선 용도의 개별인정형 원료로 등재됨

표 4. 기억력개선 개별인정형 건강기능식품자료[자료:MK증권(2016.02.29.)]

기술	기능성 원료
기억력 개선	녹차추출물/테아닌복합물, 인삼가시오가피 등 혼합추출물, 원지추출분말, 은행잎추출물, 테아닌등 복합추출물, 피브로인 효소가수분해물, 홍삼농축액, 당귀 등 추출복합물
인지기능 개선	참당귀뿌리추출물, 포스파티디셀린

- 바이로메드는 용안육, 단삼, 천마 추출물을 이용한 신경질환 예방 및 치료용 조성물을 개발하여 미국 특허를 획득함. 이 조성물은 아세틸콜린 에스터라제(acetylcholinesterase, AChE)의 활성을 감소시키며 신경성 인설트에 의한 손상을 억제하는 효과를 나타냄. 비록 이 조성물의 정확한 신경보호 메커니즘은 아직 확인되지 않았으나 천연물 소재를 사용함으로 인체 부작용이 거의 없다는 장점을 가지고 있음

- ㈜메디헬프라인에서는 천연물을 소재로 한 치매 치료제를 임상시험 중이며 이는 오토파지 활성화를 통해 베타 아밀로이드, 타우 등 알츠하이머성 치매의 원인이 되는 독성단백질을 제거해 신경세포의 사멸 방지 및 신경 세포 보호 효과를 나타내는 새로운 기전의 치료제라고 소개함

- BHT에서는 '지바치맥'이라는 천연물을 소재로 한 기억력 개선 제품을 건강식품으로 출시함

○ 시장규모

- 한국식품안전관리인증원의 건강기능식품 생산실적에 따르면, 2017년 건강기능식품의 총 매출액은 2014년 1조, 6,310억원에서 2017년 2조 2,374억원으로 증가, 11.2%의 연평균성장률을 나타내고 있다. 2조 3,291억 원으로 삶의 질과 건강에 대한 관심도 증가로 2011년 이후 연 평균 8.4% 증가하고 있음

표 5. 국내 건강기능식품 생산 및 매출 현황

(단위:톤, 억원)

구분	업체수	생산액 (억 원)	생산량 (톤)	총매출액 (억 원)	총매출량 (톤)	내수용		수출용	
						판매액 (억 원)	판매량 (톤)	판매액 (억 원)	판매량 (톤)
2014	460	11,208	32,494	16,310	30,545	15,640	29,500	670	1,045
2015	487	11,332	36,083	18,230	34,568	17,326	33,016	904	1,551
2016	487	14,715	45,060	21,260	43,123	20,175	41,142	1,084	1,981
2017	496	14,819	45,649	22,374	47,725	21,297	45,259	1,077	2,466
전년대비 성장률 (%)	1.8	0.7	1.3	5.2	10.7	5.6	10.0	△0.6	24.5
연평균 성장률 (%)	2.6	10.6	12.4	11.2	16.2	10.9	15.5	18.1	33.5

(출처:한국식품안전관리인증원, 2017 건강기능식품 생산실적, 2018)

- 건강기능식품의 총매출액이 2014년 이후 지속적으로 증가하는 이유는 크게 고령화 사회로의 진입과

국민소득 수준의 향상을 들 수 있음

- 통계청의 장래인구추계(2019)에 따르면, 고령 인구(65세 이상) 비율은 2015년 전체 인구의 12.8%까지 증가하였고, 이후에도 지속적으로 증가하여 2020년에는 전체 인구의 15.7%, 2025년에는 20.3%를 차지할 것으로 전망되고 있음

표 6. 연도별 품목별 건강기능식품 출하 현황

(단위:억 원)

품목명	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년
홍삼	6,980	6,294	5,627	6,093	6,685
개별인정제품	1,419	1,790	2,296	3,128	3,123
비타민 및 무기질	1,555	1,622	1,726	1,397	2,041
프로바이오틱스	278	373	618	1,214	1,320
밀크씨슬 추출물	-	-	308	676	698
알로에	691	687	628	565	530
EPA 및 DHA 함유 유지	-	-	-	-	474
가르시니아캄보지아추출물	206	440	95	217	259
인삼	231	318	272	333	239
식이섬유	116	168	167	171	235
상위 10개 품목 소계	11,476	11,692	11,736	13,793	15,605
기타	1,650	1,815	2,329	1,847	1,721
합 계	13,126	13,507	14,066	15,640	17,326

(출처:연도별 식품의약품통계연보, 식품의약품안전처)

- 최근 소비자들의 치매에 대한 관심과 인식이 높아짐에 따라 기억력 개선 및 인지기능 개선 건강기능식품에 대한 관심이 고조되고 있음
- 2016년 기준 기억력 개선제의 품목으로 시판되고 있는 제품은 약 50 ~ 60여 종에 달하는 것으로 조사됨. 또한 다양한 연령층의 소비자가 기억력 개선제에 대한 관심이 증가되고 있으며 이에 따른 객관적인 임상근거 제시가 요구되고 있음



표 7 기억력 개선 인정원료 매출액 (2017)

구분		2017
원료명	인정 수(건)	총매출액(억 원)
은행잎 추출물	2	81.9
EPA 및 DHA 함유 유지	4	625.1
녹차추출물	4	200.7
테아닌	2	21.1
피브로인효소가수분해물	1	1.2
BT-11원지추출분말	1	4.4
당귀등추출복합물	1	5.6
비파엽추출물	1	-
구기자추출물	1	-
천마 등 복합추출물(HX106)	1	-
인삼가시오갈피 등 혼합추출물	1	-
테아닌등복합추출물	1	-
합계		940.0

(출처: 한국식품안전관리인증원, 2016 건강기능식품 국내시장규모 동향 분석)

주성분	제품명	제약사	기타
포스파티딜세린	생생한인지력 1899	종근당	건가식
아세틸콜린	니세틸	동아제약	전문약품
	풍규원	한국파비스제약	건가식
우리딘 - 시티딘 - 글루타민	브레인업	한마약품	건가식
	아이큐플러스	부광약품	일반약품
피브로인	파워토닉	광동제약	건가식
코엔자임Q10	브레인플러스	대웅제약	건가식
HX106	공신보감	바이로메드	건가식

그림 22. 기억력 개선제 제품 현황과 원료

- 또한 사전경제성분석평가 결과, 기억력 및 인지능력 개선 관련 건강기능식품 매출 규모는 2017년 약 9,512억 원으로 추정됨

### ○ 경쟁기관현황

#### 1) 체력관리 및 기억력개선에 도움을 주는 '기억력 홍삼'


- 종근당건강의 제품은 홍삼, 테아닌, 필수 아미노산, 발효젖산, 칼슘, 타우린 등 항산화에 효과적인 성분을 다량 함유하고 있으며, 식품의약품안전처로부터 피로 개선, 면역력 증진, 기억력 개선, 스트레스로 인한 긴장 완화 등에 대한 기능성을 인정받음. 과일 농축액으로 홍삼의 쓴 맛을 줄이고, 식사와 관계없이 1일 1포 섭취로 복용 편의성을 높였음



	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 홍삼농축액을 주성분으로 하는 건강기능식품</li> <li>✓ 달콤한 맛과 휴대하기 편한 제품으로 복용 편의성이 높음.</li> </ul>
<p>종근당건강 사의 '기억력홍삼'</p>	


2) 기억력을 증대시키는 '브레인300'

- 두뇌활동이 많은 중장년층의 기억력개선을 도와주는 천연신물질 BT-11을 함유한 제품으로서 기억력개선 관련 제품 중 매출 상위권을 차지하고 있음. BT-11은 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소의 활성을 억제하여 혈중 코티코스테론을 감소시키며 베타-아밀로이드 단백질, C단 단백질 등의 독성을 억제하여 뇌신경세포를 보호한다는 것으로 알려짐

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ BT-11원지추출분말을 주성분으로 하는 건강기능식품</li> <li>✓ 성인 기억력 개선에 도움을 주고 같이 함유된 비타민 A에 의해 피부와 점막 형성기능과 야맹증에 효과가 있음.</li> </ul>
<p>일양약품 사의 '브레인300'</p>	

3) 기억력, 인지력 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품 '마이니 메모리 지피에스'

- 일동제약에서 포스파티딜세린, 은행잎 추출물, 비타민 E를 주원료로 제조하였고, 보조 원료로 홍삼농축액 분말, 아세로라추출분말, 8가지 허브 혼합분말들을 사용하였음. 뇌세포막의 주요 구성성분으로 알려진 포스파티딜세린으로 뇌세포막의 노화로 인해 저하되는 인지력 개선에 도움을 주고, 같이 첨가한 은행잎 추출한 플로보놀배당체로부터 기억력 개선과 혈행 개선을, 비타민 E로부터 유해산소로부터 세포를 보호하는 효과를 가지고 있음

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 포스파티딜세린, 은행잎 추출물, 비타민 E을 주성분으로 하는 건강기능식품</li> <li>✓ 기억력, 혈행 개선에 도움을 주고 유해산소로부터 세포를 보호</li> </ul>
<p>일동제약 사의 '마이니 메모리 지피에스'</p>	

4) 기억력개선 '니모신'

- 바이오 및 천연물 신약 개발 전문기업인 바이로메드에서 기억력개선에 효과를 보이는 건강기능식품 니모신은 HX106(천마등복합추출물)을 주원료로 하며 신경질환의 치료 및 기억력 감퇴 개선용 생약 조성물로 현재 한국, 일본, 미국, 유럽 등 4개국에 특허를 보유하고 있음. 천연물 소재 기반의 제품으로 안전성이 높고 파우치로 포장돼 간편하게 섭취가 가능함

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ HX106(천마등복합추출물)을 주성분으로 하는 건강기능식품</li> <li>✓ 파우치 형태로 섭취가 간편함</li> </ul>
바이로메드 사의 '니모신'	

○ 지식재산권현황

- 인지기능개선 천연물 특허현황

- 석창포, 상지, 작약, 굴피나무 등 천연물 추출물에 대한 인지기능개선 특허들이 등록 또는 출원됨. 이 천연물들의 활성 기전으로는 베타-아밀로이드 응집억제 효과뿐만 아니라 활성 산소 제거능, 항 아세틸콜린 에스테라아제 효능 등의 다양한 기전이 제시됨

표 8. 유사 선행기술 존재 여부 및 차이점

특허	등록(출원)번호 (일자)	차이점
상지 추출물을 포함하는 인지기능 개선용 건강기능식품 및 약학 조성물	1019536460000 (2019.02.25)	상지 추출물은 베타아밀로이드 응집억제 또는 활성 산소 제거 효능이 있어 알츠하이머성 치매 예방
인지기능 개선용 기능성 식품 및 그 제조방법	1016531240000 (2016.08.25)	항 아세틸콜린 에스테라아제 효능을 기전으로 하는 뇌신경질환의 치료 및 예방약. 흑삼, 상엽, 백출, 석창포 및 자소엽 추출물을 포함하는 인지기능 개선용 기능성 식품 제공
작약, 건강 혼합추출물을 포함하는 치매 및 인지기능장애 예방 또는 치료용 약제학적 조성물	1014926880000 (2015.02.05)	건강, 작약 혼합추출물을 유효 성분으로 포함하는 치매 및 인지기능장애 예방 또는 치료
석창포 및 바이칼레인을 포함하는 인지기능 개선 조성물 및 그 제조방법	1015000760000 (2015.03.02)	석창포 추출물 및 바이칼레인을 포함하고, 활성 산소종의 제거, DNA 손상에 대한 항산화, 효소 저해활성, AChE 저해 활성, NO 생성 억제활성, NOS-2 발현 증가활성 및 PC12세포에서 NF-κB 전사활성 증가 효과
기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연 또는 치료 효과를 나타내는 굴피나무 추출물, 이를 유효성분으로 하는 약제학적 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 기능성 건강보조식품 및 굴피나무 추출물의 제조방법	1014808990000 (2015.01.05)	굴피나무 추출물의 기억력 개선, 인지능력 개선, 치매 예방, 지연 또는 치료 효과
한약재 수증기 증류 추출물을	1020140008692	한약재 복합 추출물의 COX-2, 5-LOX, NO

유효성분으로 함유하는 염증 예방 또는 치료용 조성물	(2014.01.24)	생성능 억제효과를 바탕으로 하는 염증개선 효과
인지능 개선용 한방 티테라피 키트	1020150061545 (2015.04.30)	여러 한방차 중에서 증상에 따라 다양한 조합의 키트를 구성할 수 있어 치매 치료뿐만 아니라 스트레스 장애의 개선

- 자소엽의 특허 현황

- 현재 국내에서도 자소엽을 이용한 항 아세틸콜린 에스테라아제 효능 연구와 흑삼, 상엽, 백출 등과 같은 천연물 소재를 이용한 인지기능 개선용 기능성 식품 및 조성물에 대한 특허가 나오고 있음

표 9. 유사 선행기술 존재 여부 및 차이점

특허	등록번호 (일자)	차이점
자소엽 추출물을 포함하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 의약 조성물	1013844230000 (2014.04.04)	벤조[b]나프토[2,3-d]티오펜을 유효성분으로 자소엽 추출물의 항 아세틸콜린 에스테라아제 효능을 기전으로 하는 퇴행성 질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선
화합물, 의약품, 항염증제, 화장품, 식품 및 화합물의 제조 방법	1020147006691 (2014.03.05)	자소엽과 같은 꿀풀과 식물 중의 피부염증, 피부알러지성 염증 개선

○ 표준화현황

- 국내에서 출시되고 있는 기억력 및 인지기능 개선 기능성 식품은 대부분 식품의약품안전처로부터 인정받은 기능성 원료로 한 제품을 출시하고 있음

표 10. 개별인정형 기능성 원료

원료명	인정번호	기능(지표)성분	일일섭취량
참당귀뿌리 추출물	제2004-6호	Decursinol, Decursin	참당귀뿌리 추출물로서 800 mg/일
포스파티딜세린 (고시틴 원료로 전환)	제2006-6, 9호 제2008-71호 제2009-8호	L- $\alpha$ -diacylphosphatidyl-serin 포스파티딜세린	포스파티딜세린 으로서 300 mg/일
도라지추출물 (DRJ-AD)	제2013-13호	Platycoside E, Platycodin D의 합	도라지추출분말로서 3 g/일
L. helveticus 발효물	제2013-36호	젖산	<i>L. helveticus</i> 발효물 로서 1 g/일
참당귀추출분말	제2014-44호	Decursin	참당귀추출분말(Nutrigen)로서 800 mg/일

○ 기타현황

- 65세 이상 노인 치매환자의 71.5%가 알츠하이머성 치매를 앓고 있어 알츠하이머 병 치료제의 개발을 위하여 국내사의 연구도 진행 중임. 임상 단계에 진입한 국내사 개발 알츠하이머병 치료제의 경우 합성의약품과 항체치료제 비중이 높은 글로벌 파이프라인과는 달리 천연물신약과 줄기세포치료제 비중이 높음

- 2017년 9월 현 정부는 치매 국가 책임제를 발표하였으며 그 주요 내용은 개인의 부담을 정부가 덜어주고 향후 치매 치료 및 예방연구를 대폭 확대하는 것임. 2029년까지 3단계 치매 예방 연구 개발 사업을 통해 치매 원인 규명 및 예방, 혁신형 진단, 맞춤형 치료, 체감형 돌봄 연구에 나서고 관련 인프라를 계획함. 특히, 맞춤형 치료 기술이전 30건, 임상 1상 진입 약물개발 3건 등을 포함한 목표로 설정함

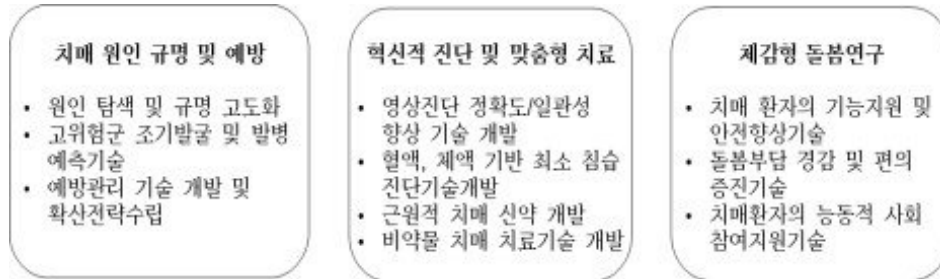


그림 23. 3단계 치매예방 연구 개발 사업 (출처: 보건복지부)

- 정부의 치매 치료제 개발 지원이 강화됨에 따라 관련 기술의 사업화 가능성이 더욱 증가함

#### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

##### ○ 기술현황

- 현재 미국 FDA에서 승인된 치매 치료제는 5가지로, 이 중 donepezil, rivastigmine, galantamine은 acetylcholinesterase (AChE) 저해제이고 memantine의 경우는 N-methyl-D -aspartate (NMDA) 수용체 길항제이며 나머지 하나는 donepezil과 memantine 합제로 뇌 내에 신경전달을 활성화 시켜주는 역할을 함
- 치매의 원인이 되는 병리기전을 직접적으로 치료하는 것이 아니라 증상을 억제 또는 지연시키는 약물들로 대증요법제 임. 최근 베타-아밀로이드의 응집 억제 및 분해시키는 신약개발이 활발하게 이루어지고 있으나 현재 상용화된 제품은 전무함

표 11. 미국 FDA에서 승인된 치매 치료제

성분명	제품명	FDA 승인	기전	대상
Donepezil	Aricept®	1996년	AChE 저해	경증-중증
Rivastigmine	Exelon®	1997년	AChE, BuChE 동시 저해	경증
Galantamine	Razadyne®	2001년	AChE 억제, nicotinic receptor 유사구조	경증
Memantine	Ebixa®	2003년	NMDA수용체 길항제	경증-중증
Donepezil + memantine	Namzaric®	2014년	AChE 저해 + NMDA수용체 길항제	중증도-중증

- 솔라네주맙 (solanezumab)은 체내에 Aβ를 제거할 수 있는 항체 신약으로 2016년 초기 임상 실험에서 효능을 보여 기대를 모았음. 하지만 대규모 임상시험에서 유의미한 결과를 얻지 못했음. Aβ의 생성에 관여하는 beta-secretase 1 (BACE 1)의 항체인 베루베세스타트(verubecestat)의 경우에도 임상 3상에서 유의미한 효능을 확인할 수 없어 중단되었음. TauRx therapeutics의 'LMTM'은 2세대 tau단백질 응집 저해제로서

2012년부터 임상 Ⅲ상 시험을 진행했으나 인지기능장애 및 임상 증상 개선 효과가 없어 개발이 중단됨

- 그 후에도 치매 치료제 개발을 위한 지속적인 연구가 진행 중이며 항체, 줄기세포, 펩타이드, 천연물을 소재로 한 베타-아밀로이드 생성억제, 응집억제, 축적 억제, 타우 억제 등의 효능을 갖는 치료제의 임상시험이 진행 중임

표 12. 국외 임상시험 중인 알츠하이머 치료제

개발 회사	제품명	임상 단계	기능	임상승인일
Biogen	Aducanumab	3상	Aβ 축적 억제	2015.08
Pfizer	PF-06751979	1상	Aβ 생성 억제	2015.07
NeuroGenetic Pharmaceuticals	NGP555	1상	Aβ 축적 억제	2015.09
Takeda	TAK-071	1상	AChE 저해	2016.05
Eli Lilly & Co.	LY3303560	2상	Tau 저해	2018.04
Tetra Discovery Partners	BPN14770	2상	AChE 저해	2018.05
AC Immune, Genentech	Crenezumab	3상	Aβ 생성 억제	2015.07
TauRx Therapeutics Ltd	Methylene Blue	3상	Tau 저해	2018.01
J & K SCIENTIFIC Ltd	Probutocol	2상	Aβ 축적 억제	2016.05
Novartis Pharmaceuticals	CAD106	3상	Aβ 생성 억제	2015.11
Actavis Pharma	Pioglitazone	3상	Aβ 저해	2009.09
Chugai MorphoSys	Gantenerumab	3상	Aβ 생성 억제	2010.10
Novartis Amgen	CNP520	3상	BACE1 저해	2015.10

### ○ 시장현황

- 세계 건강기능식품 시장규모는 15년 기준 1,179억 달러로 추정되며 연평균 7.3% 성장하여 2020년에는 1,677억 달러에 이를 것으로 전망함

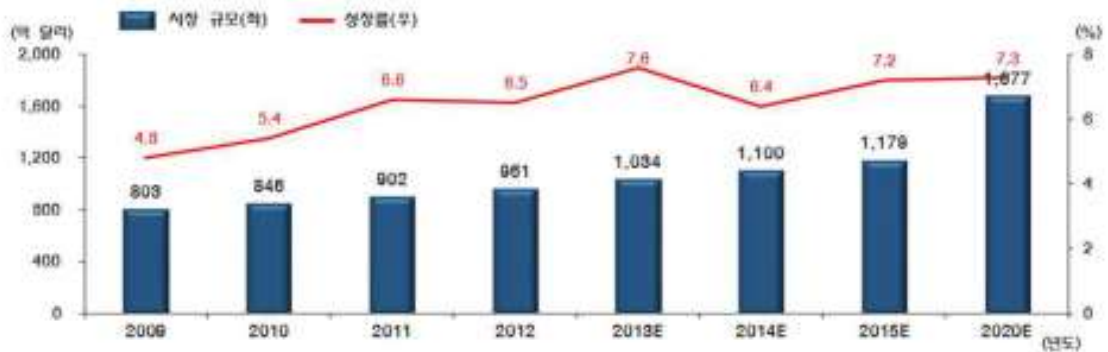


그림 24. 세계 건강기능식품 시장 규모 (출처: 건강기능식품 시장 동향, 연구성과실용화진흥원)

- 세계 시장 규모가 가장 큰 나라는 미국으로 약 404억 달러 규모이며, 중국은 약 163억 달러, 일본은 약 109억 달러 순으로 형성되어 있음

표 13. 국가별 건강기능식품 시장규모 및 전망

(단위 : 억 달러)

구 분	2015년	2020년	연평균 성장률(%)	점유율(%) (2015기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
기타	127	188	8.2	10.8
합 계	1,179	1,677	7.3	100.0

- 알츠하이머병 치료제 개발은 난이도가 높고 성공 확률이 매우 낮으나, 시장성과 잠재력이 있기 때문에 많은 제약사가 관심을 가지고 연구 중에 있음. 세계 알츠하이머 환자는 2015년 4680만 명에서 2050년 1억3150만 명에 이를 것으로 예상됨. 이에 따라 알츠하이머 치료제 글로벌 시장규모는 연평균 9.1%의 성장률을 보이며, 2011년 약 52억 달러의 규모에서 2021년 125억 달러의 규모까지 성장할 것으로 전망됨



그림 25. 세계 알츠하이머 환자 추이  
(출처: KHDI, 2014)

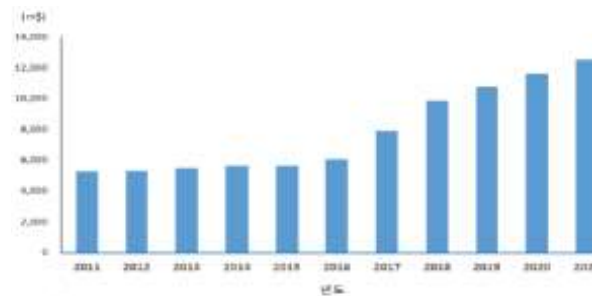


그림 26. 세계 알츠하이머병 치료제 시장규모  
(출처: 연구성과실용화진흥원, 2015)


- 현재 시판되는 알츠하이머병 치료제는 신경전달물질인 아세틸콜린의 분해를 막는 'AChE 억제제'(도네페질, 리바스티그민, 갈란타민)와, 글루탐산이 수용체와 결합하여 과도하게 활성화되는 것을 막는 'NMDA 수용체 길항제'(메만틴), 기존 2가지 성분의 복합체인 남자리이 있음. 이들은 주로 증상을 개선하는 약물로 신경전달물질 농도를 일시적으로 상승시켜 인지 개선효과를 보이는 치료제이므로 사용에 한계가 있으며, 최근에는 아밀로이드 베타(Aβ), 타우(Tau) 단백질을 타깃하는 파이프라인 비중이 높아지고 있음

- 2016년 바이오젠(미국)은 165명의 초기 알츠하이머병 환자를 대상으로 실시한 임상 1b상 연구에서 항체치료제 아두카누맙(Aducanumab)의 Aβ 제거 및 인지기능 향상 효과 확인하는 등 치매의 발병 원인을 억제하는 치매 치료제의 임상시험이 지속되고 있음

### ○ 경쟁기관현황


- 1) 인지기능 개선에 도움을 주는 '코그니테이트'
  - 포스파틸딜세린(대두추출물)을 주성분으로 하는 코그니테이트는 매나테크사에서 노화로 인한 인지기능 감소를 개선하는 것은 물론 인지기능 등과 관련된 전달물질의 적절한 공급유지에 도움을 주는 기능성 식품

으로 출시함. 부원료로 알로에베라, 쌀전분, 아라비노갈락탄, 트라가칸스검 등 다양한 건강개선에 초점을 두고 있음. 15년 10월 국내에도 출시하였음

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 포스파티딜세린(대두추출)을 주성분으로 하는 건강기능식품</li> <li>✓ 노화로 인한 인지력 감소를 개선하고, 인지 능력 등과 관련된 전달 물질의 적절한 공급 유지에 도움을 줌</li> </ul>
<p>매나테크 사의 '코그니테이트'</p>	


2) 두뇌복합영양제 'NeuroMatter Brain 90'

- 영국의 트루헬스케어에서 판매하는 NeuroMatter Brain 90은 두뇌 복합 영양제로 은행나무 추출물과 필수 비타민, 미네랄 및 이소플라본 등을 포함하여 정상적인 두뇌와 인지기능을 유지하는데 도움을 줌. 영국에서 GMP코드 및 ISO 9001 품질보증인증을 받음

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 은행나무 추출물 등을 주성분으로 하는 복합 영양제</li> <li>✓ 영국의 GMP 표준으로 제조</li> </ul>
<p>트루헬스케어 사의 'NeuroMatter Brain 90'</p>	

3) 건강을 위한 획기적인 영양 보조식품 'Cogni-Q'

- 미국의 Quality of Life Labs사의 Cogni-Q 제품은 안젤리카(*Gigas Naka*)뿌리 추출물을 주원료로 사용하고 있으며, 뇌의 아세틸콜린의 양을 증가시켜줌으로서 노화 관련 기억장애에 도움을 줌. 활성성분으로 INM-176을 포함하고 있으며 활성산소로부터 보호효과도 가지고 있음

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 안젤리카 뿌리추출물, Decursin, Decursinol 등을 주성분으로함</li> <li>✓ 경증 기억장애를 가진 80여명의 지원자에게 효과를 봄</li> </ul>
<p>Quality of Life Labs 사의 'Cogni-Q'</p>	

○ 지식재산권현황

**- 인지기능개선 천연물 특허현황**

- 적하수오, 건지황, 원지, 석창포, 감초, 호프 추출물의 유효성분으로 타우 단백질의 과인산화 억제 및 인지기능 향상에 대한 건강기능 식품 개발이 진행 중임

표 14. 해외 유사 선행기술 존재 여부 및 차이점

특허	등록(출원)번호 (일자)	차이점
PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DEMENTIA AND IMPROVING COGNITIVE FUNCTION, COMPRISING GLASSWORT EXTRACT	PCT/KR2018/005502 (2018.05.14)	통통마디 추출물을 포함하는 치매 예방, 치료 및 인지기능 개선
COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING COGNITIVE IMPAIRMENT INCLUDING ATEMOYA LEAF EXTRACT OR FRACTION THEREOF	PCT/KR2017/013247 (2017.11.21)	아테모야 잎 추출물을 함유하는 인지기능 손상을 방지하고 완화 시키는 건강기능 식품 개발
COMPOSITION FOR IMPROVING RECOGNITION FUNCTIONS	PCT/JP2017/010083 (2017.03.14)	흡 산화물질을 포함하는 조성물의 인지 기능 유지 및 개선
COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING BRAIN DISEASES	PCT/KR2009/000364 (2009.01.23)	스테인이오칼신 2를 포함하는 조성물로 뇌 질병 방지/완화, 인지기능 개선
COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CEREBROPHATHY OR NEUROLOGICAL DISORDER, CONTAINING MEDICINAL PLANT EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT	PCT/KR2015/001943 (2015.02.27)	적하수오, 건지황, 원지, 석창포 혼합 추출물을 유효 성분으로 함유하여 타우 단백질의 과인산화를 억제, 뇌 혈류량 증가, 뇌경색 완화, 인지 능력을 향상
COMPOSITION FOR TREATING LOWER OR DAMAGED COGNITIVE FUNCTION CONTAINING DEHYDROGLYASPERIN C TYPICALLY FOUND IN LICORICE	PCT/KR2012/002087 (2012.03.22)	감초 에탄올 추출물인 데하이드로글리아스페린 C 로 인해 뇌 세포를 보호하고 인지 기능을 개선
COMPOSITION FOR PROMOTING MEMORY AND LEARNING ABILITY	PCT/KR2011/006853 (2011.09.16)	청호, 팔각회향, 정력자 추출물 중 선택되는 하나 또는 둘 이상의 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 또는 인지기능장애 예방
COMPOSITION FOR PREVENTING/TREATING DEMENTIA AND/OR IMPROVING COGNITIVE FUNCTION, AND DRUG AND FOOD USING SAME	PCT/JP2014/079684 (2014.11.10)	이성질체화된 호프 추출액에서 포함된 성분은 소교 세포의 활성을 개선하여 뇌에서 이물질, 데드 셸과 기타 등등을 제거하고, 치매의 증상을 방지

**○ 표준화현황**

- 국외에서도 인지기능개선 원료로 알려진 포스파티딜세린, 참당귀뿌리 추출물의 지표성분인 Decursin, Decursinol을 포함한 제품을 출시하고 있음. 또한 필수 비타민, 알로에베라, 쌀 전분 등을 부원료로 사용하여 인지기능개선 뿐만 아니라 기능성 식품으로서 건강에 유익한 제품들을 출시하고 있음. 영국의 트루헬스케어사의 'NeuroMatter Brain 90' 같은 제품은 GMP코드 및 ISO 9001 품질보증인증을 받아 제품을 출시하고 있음



## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

### 가. 최종목표

- ▶ 소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 원료 1종 개발 및 이를 활용한 고령친화 식품 2종 개발

### 나. 세부목표

- ▶ 소엽추출물의 표준화 및 최적화
- ▶ 소엽추출물의 기능성 검증
- ▶ 소엽의 대량생산공정 확립 및 표준화
- ▶ 소엽추출물의 수용형 제형개발 및 검증
- ▶ 인지기능에 도움이 되는 소엽추출물 소재 1종, 맞춤형 고령친화식품 2종 개발



그림 27. 기관별 역할 모식도

### 다. 연차별 개발목표 및 내용

#### 가) 1차년도



그림 28. 1차년도 기관별 수행 전략 모델

#### ① 개발 목표

- 주관연구기관 (에스에프씨바이오) : 소엽추출물 유화 및 향미 억제 기술 개발
- 협동연구기관 (단국대학교 약학대학) : 소엽 추출물의 표준화

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 (에스에프씨바이오) : 소엽추출물의 특유의 향과 수용화를 위한 유화 및 향미 억제 기술 개발



그림 29. 주관연구기관 기술 개발 범위

1) 모델시스템을 활용한 소엽추출물의 제형화 기술 개발

- 소엽추출물이 포집된 액상 제형 제조
- 나노지질전달체의 구성 성분(oil, solid lipid, emulsifier, solvent 등)을 식품 등급으로 선별하여 소엽추출물 포집 나노지질전달체 액상 제형 개발
- 가교물질(펙틴, 알긴산, 키토산 등)을 활용한 정향추출물 포집 마이크로 캡슐 제조
  - 가교물질을 농도별로 가용화 정향추출물에 녹인 후 염화칼슘 용액에 떨어뜨리거나 염화칼슘 용액을 떨어뜨려 마이크로 캡슐을 제조(Encapsulator 활용)
  - 디지털 캘리퍼, 입도분석기 등을 활용하여 마이크로 캡슐 입자 크기 측정
  - 제조된 마이크로 캡슐의 정향추출물 포집능 및 안정성을 평가하여 최적 제조 조건을 확립
- 마이크로 캡슐의 분말 제조
  - 동결건조, 열풍건조 등 건조 후 정향추출물 포집 제형의 저장안정성 분석
- 마이크로 캡슐의 관능검사(소엽 특유의 향미 억제 확인)



그림 30. 소엽추출물 포집 제형 개발 모식도

2) 소엽추출물 포집 제형의 안정성 및 포집효율 향상 연구

- 개발된 입자의 이화학적 특성 분석
- 입자크기 및 분포, 제타전위, 입자안정성, 표면특성 등 분석
- 소엽추출물의 포집 효율(Encapsulation efficiency) 분석 및 외부 환경(pH, 빛, 산소, 온도 등)에 대한 안정성 평가 연구

- 협동연구기관 (단국대학교 약학과) : 소엽 추출물의 분석법 확립 및 최적 추출법 개발

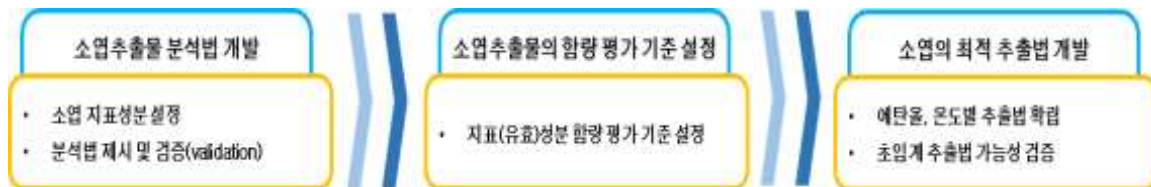


그림 31. 참여기관 연구 범위

1) 소엽추출물 분석법 개발

- 현재 약전에 제시한 소엽의 지표성분은 부재함. 단, 식약처의 용역과제 중 하나인 한약재 과학화 사업의 연구 결과물로 로즈마린산을 제시한 바 있음. 따라서 제시한 로즈마린산을 지표성분으로 설정, 분석법의 적용 가능성을 검증하고 활성과의 상관관계를 확인하여 사용 가능성 검증
- 또는 선행 연구결과 유효성분으로 제시된 아사론 유도체를 지표 성분으로 설정하고 동시 분석법을 제시할 수 있는 분석법 제시
- 제시한 분석법의 검증 (validation) 실시

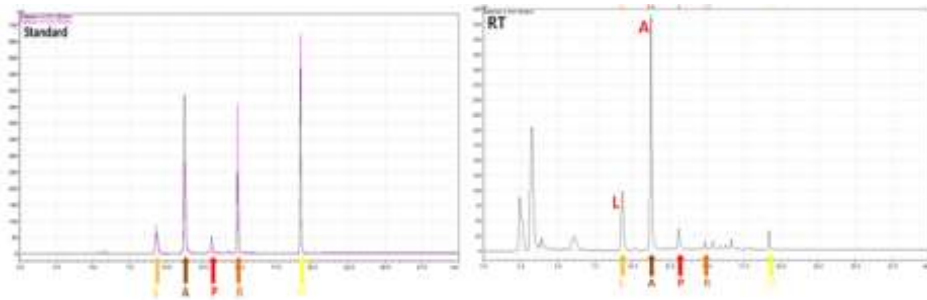


그림 32. 분석법 개발을 위한 HPLC 범위

2) 소엽추출물의 함량 평가 기준 설정

- 제시된 분석법과 지표성분 표준품을 이용한 지표 (유효) 성분의 함량 평가를 실시하고 함량 기준을 설정, 제시함

3) 소엽의 최적 추출법 개발

- 유효 성분의 함량을 효율적으로 추출할 수 있는 추출법을 확립
  - 알코올 (에탄올) 함량에 따른 추출 효율 시험 (0~60% 에탄올)
  - 온도별 추출 효율 시험 (상온~100°C)
  - 초임계 추출법 활용 가능성 검증



그림 33. 소엽 최적 추출법 모식도

나) 2차년도

① 개발 목표



그림 34. 2차년도 기관별 수행 전략 모델

- 주관연구기관(에스에프씨바이오) : 소엽추출물의 대량생산공정 확립 및 표준화, 고령화 식품 1종 개발
- 협동연구기관(단국대학교 약학대학) : 소엽의 소재 최적화

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 (에스에프씨바이오) : 대량생산 공정 확립 및 이를 활용한 고령친화식품 개발

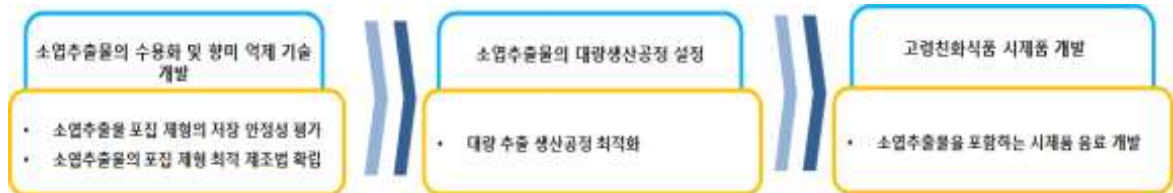


그림 35. 주관기관 개발 내용 및 범위

1) 소엽추출물의 수용화 및 향미 억제 기술 검증

- 소엽추출물 포집 제형의 저장 안정성 평가
  - 저장온도, pH, 저장시간에 따른 안정성 및 방출속도 측정
  - *In vitro* 소화 모방실험을 통한 소엽추출물의 생체이용률 연구
- 소엽추출물 포집 제형의 최적 제조법 확립
  - 포집 제형 제조공정 표준화 및 품질관리 지표 설정
  - 소엽추출물 포집 제형의 품질평가

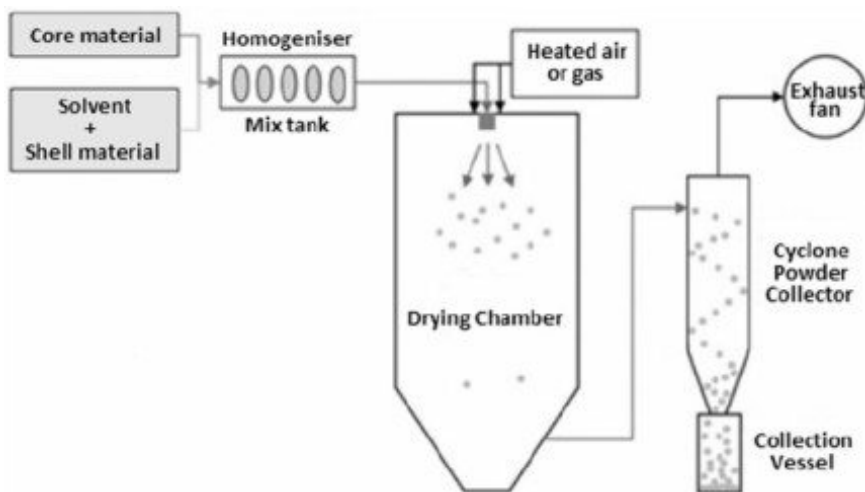


그림 36. 소엽추출물 포집 제형 제조공정도

2) 소엽추출물의 대량생산공정 설정 및 표준화

- 협동연구기관(단국대학교 약학과)에서 개발한 Lab scale의 최적 추출법을 토대로 소엽 추출물의 대량추출 및 생산공정 최적화를 위한 공정법을 확립하고 표준화

### 3) 고령친화식품 1종 개발

- 소엽추출물을 포함하는 고령친화식품 건강음료 시제품 제작
  - 고령자의 섭취, 소화, 흡수, 대사, 배설 등의 능력을 고려하여 단백질, 비타민, 칼슘, 칼륨, 식이섬유 등의 영양성분을 한국인 영양섭취기준의 10% 이상이 되도록 첨가
  - 소엽추출물 포집 제형을 첨가한 건강음료
    - 협동연구기관 (단국대학교 약학과) : 소엽 원생약의 최적화 확립

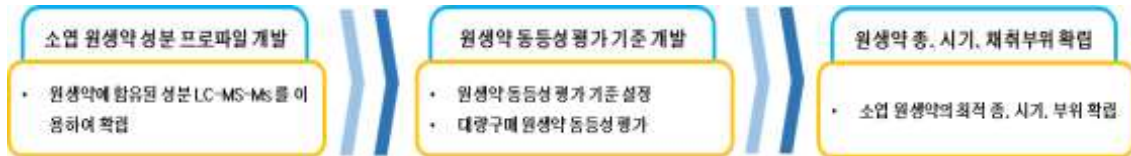


그림 37. 참여기관 연구개발 범위 및 내용

#### 1) 소엽 원생약 성분 프로파일 개발

- 지표(유효)성분 이외에 원생약에 함유된 성분 프로파일을 LC-MS-MS를 이용하여 확립

#### 2) 소엽 원생약의 최적 종, 채취 시기, 채취 부위 확립

- 소엽 원생약의 최적 종 확립
  - 소엽은 차즈기 (*Perilla frutescens* var. *acuta*) 와 주름소엽 ((*Perilla frutescens* var. *crispa*) 2종의 잎 및 끝가지를 사용하는 것으로 약전에 규정되어 있으며 청소엽도 국내에서 유통되고 있음. 또한 최근 원자력연구소에서는 새로운 품종인 차즈기 안티스페릴도를 개발함. 따라서 4종 소엽에 함유된 성분을 분석, 비교하고 활성과의 상관관계를 확인하여 최적의 종을 확립함



그림 38. 재래종차조기(왼쪽), 방사선육종신품종 ‘안티스페릴’ (오른쪽)

- 소엽 원생약의 최적 채취 시기 확립
  - 소엽은 채취 시기에 따라 성분의 함량 차이가 큰 생약으로 알려져 있음. 보통 4월에 파종한 후 9월 경 꽃이 필 때 채취함
  - 따라서 파종 후 잎이 나오기 시작하는 시기인 5월~9월 사이 2-3주 간격으로 잎을 채취하여 함유된 성분의 함량을 비교 분석하여 최적 채취시기를 설정함



- 소엽 원생약의 채취 부위 확립

- 소엽이라는 생약은 사용부위에 따라 소엽 (잎), 소자 (씨앗), 소경 (줄기)로 나눔. 잎과 끝가지를 사용하는 소엽의 경우 채취시 시간과 인력이 많이 필요로 하는 생약임. 따라서 향후 원생약 채취의 수월성을 확보하기 위해 잎 이외에 줄기의 함유 정도가 성분 함유량 및 활성에 미치는 영향을 분석하여 최적의 채취 부위를 확립함



그림 39. 소엽 (차즈기)의 사진

3) 소엽 추출물 소재 및 함유 성분의 *in vitro* 효능 검증

- 선행 연구에서 제시된 유효성분인 아사론유도체 이외에 소엽에 함유된 성분의 활성을 검증하기 위해 분리가 보고된 소엽 성분들의 *in vitro* 베타-아밀로이드 응집 효과를 확인함
- 소엽의 주 성분으로는 모노테르페노이드와 페닐프로파노이드류가 있으며 그 주된 예로는 rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ester, perillaldehyde, elemicin, dillapiole, caffeic acid, notoapiole 등이 있음. 따라서 이 성분들을 구매한 후 베타-아밀로이드 응집 억제 효과가 있는지 확인하고, 그 응집 억제 효과는 아사론 유도체 및 추출물과 비교함

다) 3차년도

① 개발 목표



그림 40. 3차년도 기관별 수행 전략 모델

- 주관연구기관(에스에프씨바이오) : 소엽추출물을 활용한 고령친화식품 1종 개발

- 협동연구기관(단국대학교 약학대학) : 소엽추출물의 기능성 및 안정성 검증

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(에스에프씨바이오) : 소엽추출물을 활용한 고령친화식품 시제품 개발

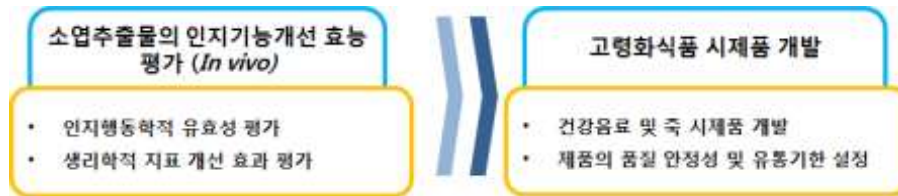


그림 41. 주관기관 개발 내용 및 범위

1) 소엽추출물의 인지기능개선 효능 평가(*in vivo*)

- 인지행동학적 유효성 평가

- 저장온도, pH, 저장시간에 따른 안정성 및 방출속도 측정

- 동물 모델로는 일반 생쥐 (ICR mice)의 대뇌에 베타-아밀로이드를 주입하여 알츠하이머병을 유발하여 사용. (필요에 따라서 APP 형질전환마우스 모델을 사용할 수도 있음)

- 예방 및 치료 효과 : 25~30 g 정도의 생후 6주된 ICR mice에 소엽 추출물 500, 200 mg/kg bw로 14일간 경구로 투여한 후 베타-아밀로이드(1-42) 400 pmole을 ICV로 투여함. 베타-아밀로이드를 투여한 후에도 10일간 더 소엽 추출물을 투여함

- 방법 : 적절한 양의 추출물 (예 : 500, 200 mg/kg)을 IP 또는 PO로 24일 간 투여함. 이 기간 동안 동물의 몸무게를 정기적으로 측정함

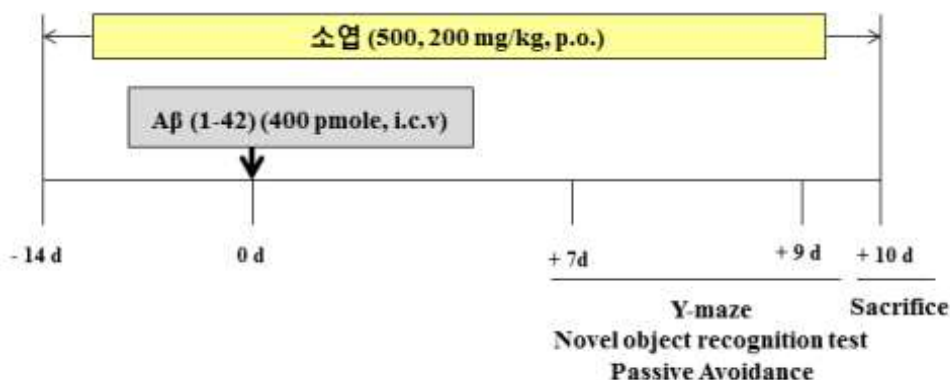


그림 42. 인지행동학적 유효성 평가 모델 실험 일정

- 인지행동학적 유효성 평가 방법

- 행동학적 인지기능개선 효과 평가 : 동물의 인지기능 개선을 측정하는 방법으로는 Water maze, Y-maze,



수동회피 시험, novel object recognition test 등 있지만 본 연구기관의 이전 결과에 따르면 water maze의 실험 방법은 variation이 크고, 동물 개체 간의 차이가 클 뿐 아니라 환경 변화에 따른 실험 결과의 오차 범위가 크게 나타남에 따라 보다 일관성 있는 결과를 제시하는 Y-maze, 수동회피 시험, novel object recognition test 등을 베타-아밀로이드를 투여하고 7일 후 소엽 투여 후 총 3주후에 시행하여 인지기능 개선 효과를 측정함.(위 실험 방법은 인지기능 개선 식약처 가이드라인에 제시된 연구법임)

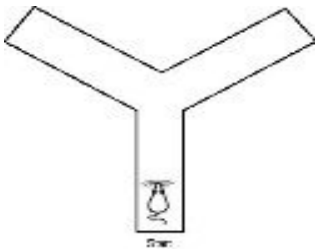


그림 43. Y-maze 시험

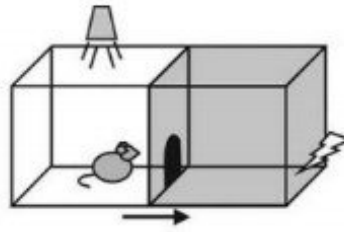


그림 44. 수동회피시험

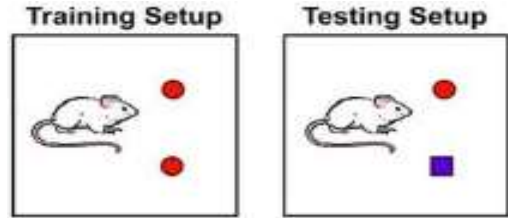


그림 45. novel object recognition test

- 생리학적 지표 개선 효과 평가

- 소엽 추출물 투여에 의한 인지기능 개선이 생리적 지표 변화에는 어떤 영향을 미쳤는지를 각종 실험법을 이용하여 측정함.

- 베타-아밀로이드의 조직 내 생성 변화를 immunostaining 또는 ELISA로 측정
- 뇌 조직 내 acetylcholine (ACh)의 함량 측정
- 뇌 조직 내 acetylcholinesterase (AChE)활성을 측정
- 뇌 조직 내 choline acetyltransferase (ChAT) 활성을 측정 등

## 2) 고령친화식품 시제품 개발

- 건강음료 및 죽 시제품 개발

- 소엽추출물을 포함하는 고령친화식품 건강 죽 시제품 제작
- 고령자의 섭취, 소화, 흡수, 대사, 배설 등의 능력을 고려하여 단백질, 비타민, 칼슘, 칼륨, 식이섬유 등의 영양성분을 한국인 영양섭취기준의 10%이상이 되도록 첨가
- 소엽추출물 포집 제형을 첨가한 건강 죽
- 고령자가 섭취하기 용이하도록 경도 500,000 N/m<sup>2</sup>이하로 제조

- 제품의 품질 안전성 및 유통기한 설정

- 제품의 품질 안전성 분석
- 일반세균, 대장균군, 대장균, pH 등을 분석하여 품질 안전성을 평가

- 제품의 유통기한 설정

- 저장온도는 정확한 예측을 위해 최소 3~4개의 온도가 필요하므로, 제품의 저장은 유통온도 외에 최소 2개 이상의 온도를 추가하여 설정
- 저장기간은 최소 3개월 이상의 기간으로 저장
- 실험주기는 최소 6회 이상을 실시하며 제품 특성에 따라 이화학적, 미생물학적, 관능적 및 물리학적 실험을 3회 반복 수행

구분	유통온도	저장온도	상대 습도
상온 유통제품	15-25℃	• 대조구(유통온도) : 25℃ • 실험구 : 15-40℃ 범위 내 5℃ 또는 10℃간격으로 최소 2개 온도이상	75%
실온 유통제품	1-35℃	• 대조구(유통온도) : 35℃ • 실험구 : 15-45℃ 범위 내 5℃ 또는 10℃간격으로 최소 2개 온도이상	90%
냉장 유통제품	0-10℃	• 대조구(유통온도) : 10℃ • 실험구 : 15-40℃ 범위 내 5℃ 또는 10℃간격으로 최소 2개 온도이상	90% 이상
냉동 유통제품	-18℃이하	• 대조구(유통온도) : -40℃ 또는 -25℃ 또는 -18℃ • 실험구 : -5~-30℃ 범위 내 5℃ 또는 10℃간격으로 최소 2개 온도이상	100%

\* 유통온도 : 반드시 제품의 대표 유통온도를 포함하여 저장조건을 설정  
\* 수출제품의 경우 수출국의 규정을 참고하여 설정

그림 46. 유통기한 설정 실험 가이드

- 협동연구기관(단국대학교 약학대학) : 소엽의 인지기능 개선 기능성 검증 및 추출물 소재의 저장 안정성 평가

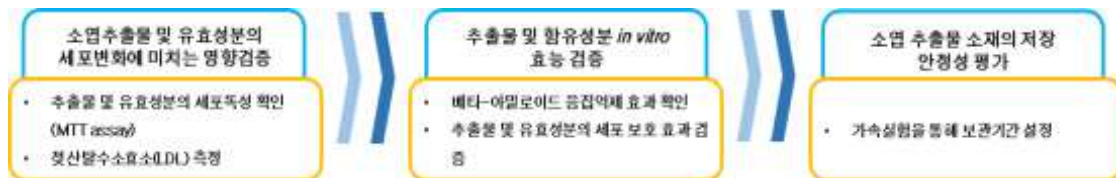


그림 47. 참여기관 개발 및 내용

1) 원생약 동등성 평가 기준 개발 및 평가

- 확립된 성분 프로파일을 바탕으로 원생약의 동등성을 평가할 수 있는 기준을 개발
- 대량 생산을 위해 기업에서 구매하는 원생약의 동등성 평가 지원

2) 소엽추출물 및 유효성분이 세포생존율에 미치는 영향 검증

- 세포 생존율에 미치는 효과 검증 : Rat pheochromocytoma 세포인 PC12 세포를 이용, 추출물 또는 유효 성분들의 세포독성을 MTT assay를 이용하여 확인함.
- 또한 세포독성은 젓산탈수소효소 (LDH)를 측정하여 검증함.

3) 소엽 추출물 소재 및 유효성분의 세포 보호 효과 검증

- 소엽 추출물 소재와 그 유효성분들이 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제하고 신경세포를 보호하는 효과가 있는지 평가함.
- 실험방법 : 시험관 상에서 베타-아밀로이드와 소엽추출물 소재를 혼합하여 일정 시간 37℃ 인큐베이터에서 반응시킨 후 PC12 세포에 추가하여 베타-아밀로이드 응집체에 의해 유발되는 세포독성의 변화를 측정함.

4) 소엽 추출물 소재의 저장 안정성 평가

- 소엽 추출물 소재의 적절한 보관 기간을 설정하기 위해 추출물 소재의 장기보존 시험을 실시해야 하나 시간적 제약으로 인해 가속실험을 실시하고자 함.

- 시험 항목 및 방법 : 표준품 안정성 시험 항목은 각 표준품의 의도된 용도 및 시험 소요량 등을 고려하여 항목을 선택하고, 선택한 항목으로 가속실험을 진행. 가속실험에는 시간의 흐름에 따라 변화되는 정도를 측정하는 경시적 시험과 규정된 보관온도보다 높은 온도에서 일정한 시간 간격으로 보관한 표준품을 동시에 측정하는 등시적 시험이 있음. 이 중 등시적 시험을 통해 안정성평가를 실시하고자 함.
- 저장온도 : 25, 35, 45, 55°C의 네 시점을 선정.
- 저장기간 : 1개월 보관 후 시험 결과 분석.
- 시험결과 : 설정한 지표성분 및 추출물의 성분을 HPLC를 이용하여 면적 백분율법에 의해 순도 평가 등의 방법으로 함량을 평가하여 소염추출물 소재의 안정성 평가를 실시하고자함.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 기. 연구수행 결과

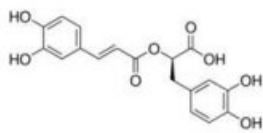
##### ○ 정성적 연구개발성과

#### 1) 소엽추출물의 분석법 확립 및 최적 추출법 개발

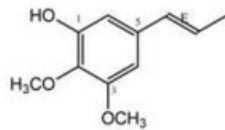
##### ■ 소엽 추출물 분석법 개발

##### ○ 지표성분 설정

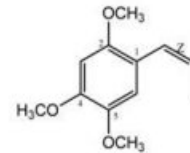
- 소엽의 주 성분인 rosmarinic acid (1) 과 선행 연구 결과 유효성분으로 제시된 아사론 유도체 중 분리된 양이 가장 많고 뛰어난 활성을 가지고 있는 alpha-asarone (6)을 지표성분으로 설정하였으며, rosmarinic acid (1)과 alpha-asarone (6)의 동시 분석법을 확립함



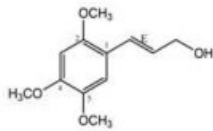
rosmarinic acid (1)



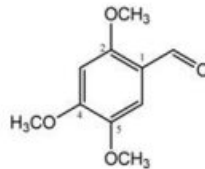
2,3-dimethoxy-5-(1E)-  
1-propen-1-yl-phenol  
(2)



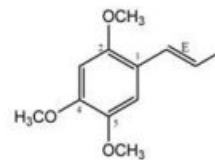
beta-asarone (3)



3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-  
(2E)-2-propen-1-ol (4)



asaronealdehyde (5)



alpha-asarone (6)

그림 48. rosmarinic acid 및 아사론 유도체의 구조

##### ○ 분석법 제시 및 검증 (validation)

◦ 소엽 추출물의 지표 성분으로 설정한 rosmarinic acid (1)과 alpha-asarone (6)의 HPLC 동시 분석법을 확립하였으며 이 분석법은 '의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드(식품의약품안전처)'를 바탕으로 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 농도별 표준용액을 이용하여 validation 함

##### ◦ 분석조건 확립

- 지표성분으로 설정한 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 동시분석을 위한 HPLC분석법을 확립함  
- 이동상으로는 아세토니트릴과 물의 Gradient elution을 적용함으로써 검체의 peak를 이상적으로 분리할 수 있음

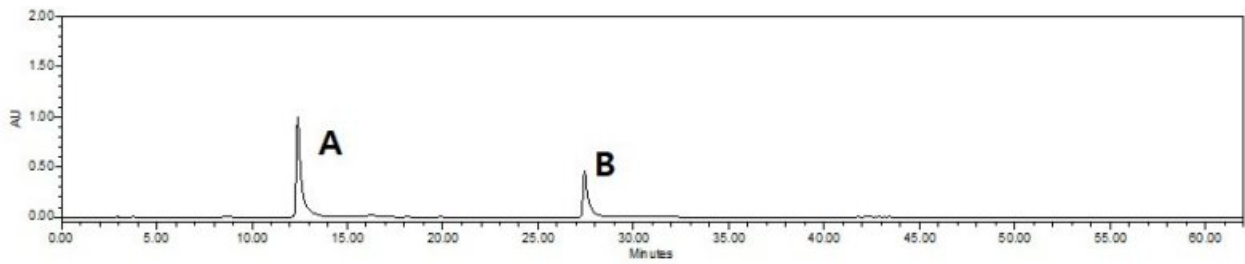


그림 49. rosmarinic acid과 alpha-asarone의 HPLC 동시분석 크로마토그램  
(A: rosmarinic acid, B: alpha-asarone)

표 15. 소엽 지표성분의 HPLC 동시분석법 조건

HPLC condition			
Column	SHISHEIDO C18 250*4.6 mm		
Flow rate	0.8 mL/min		
Wave length	260 nm		
Injection volume	10 $\mu$ L		
Mobile solvent	A: 0.1% Formic acid in ACN B: 0.1% Formic acid in water		
	<b>Time (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
	0	20	80
	10	30	70
Mobile phase	20	55	45
	22	60	40
	40	60	40
	42	100	0
	62	100	0

◦ 특이성(Specificity)

- rosmarinic acid와 alpha-asarone 표준용액과 소엽 추출물 용액의 HPLC chromatogram을 비교하여 rosmarinic acid와 alpha-asarone의 peak를 확인한 결과, 다른 물질의 간섭없이 분리되었으며 표준물질과 추출물에서 확인된 피크의 retention time (rosmarinic acid-12.3분, alpha-asarone - 27.4분)이 일치하는 것을 확인함

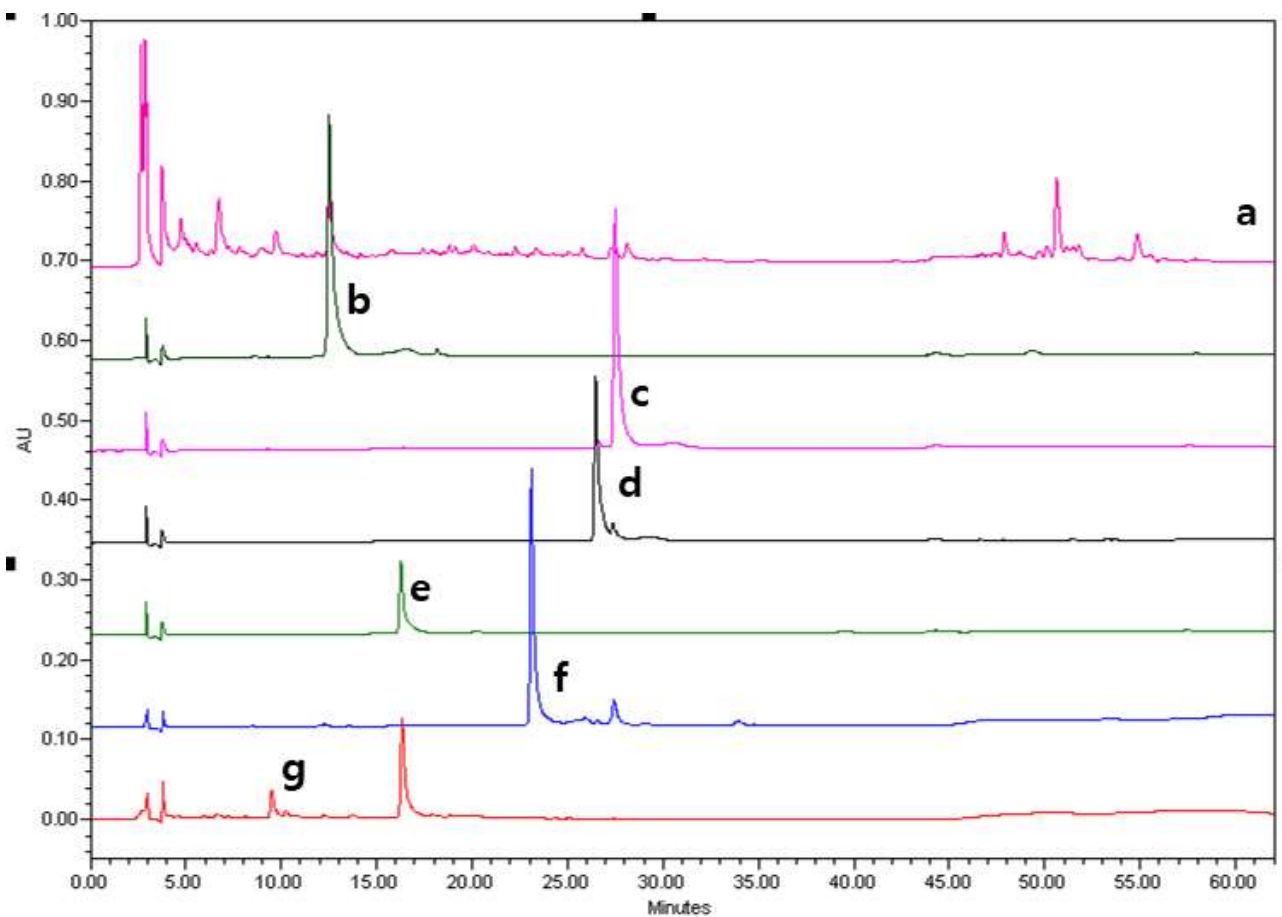


그림 50. 지표(유효)성분과 소엽 추출물의 동시분석 HPLC 크로마토그램

(a: 소엽 100% 에탄올 추출물, b: rosmarinic acid, c: alpha-asarone, d: beta-asarone, e: asaronealdehyde, f: 2,3-dimethoxy-5-(1*E*)-1-propen-1-yl-phenol, g: 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2*E*)-2-propen-1-ol )

◦ 직선성(Linearty)

- rosmarinic acid과 alpha-asarone을 혼합한 표준용액을 메탄올로 500, 50, 5, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 각각의 표준 검량선을 작성함. rosmarinic acid의 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 1.000, alpha-asarone의 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 1.000으로 매우 높은 직선성을 보임

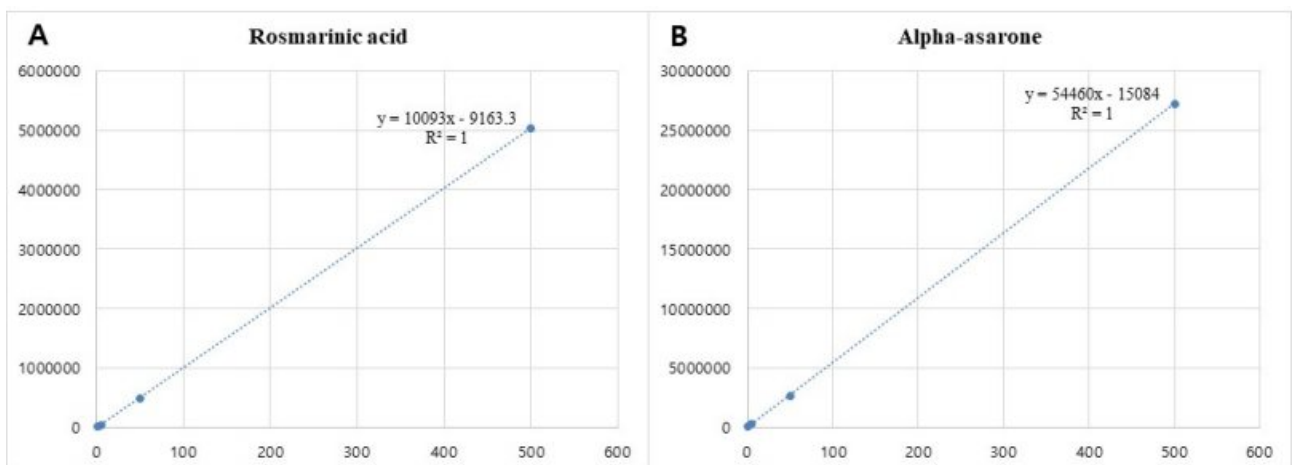


그림 51. rosmarinic acid과 alpha-asarone의 검량선

(A: rosmarinic acid, B: alpha-asarone)

- 검출한계 (limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)
- 검출한계는 rosmarinic acid는 3.2 µg/mL와 alpha-asarone는 0.9 µg/mL 수준으로 확인하였으며, 정량한계는 rosmarinic acid는 9.7 µg/mL와 alpha-asarone는 2.8 µg/mL 수준으로 확인하였음

표 16. rosmarinic acid과 alpha-asarone의 직선성 및 LOD, LOQ

Compounds	Linear range (µg/mL)	Response Slope (a)	Response Factor (b)	Correlation Coefficient (R <sup>2</sup> )	LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)
Rosmarinic acid	0.5~500	10095	-9816	1.000	9.7	3.2
alpha-asarone	0.5~500	54460	-15084	1.000	2.8	0.9

- 정확성 (Accuracy) 및 정밀성 (Precision)
- 동일 시료에 대하여 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 정확성 및 정밀성 평가를 진행함
- rosmarinic acid과 alpha-asarone을 혼합한 표준용액은 5, 25 및 500 µg/mL의 범위에서 각 시료 농도당 3일간 반복성 시험과 일 내 3회 반복하여 시험함. 정확성은 표준값과 측정값 사이의 근접성을 계산하여 확인하였으며, 정밀성은 반복 실험하였을 때 측정값들 사이의 근접성을 계산하여 확인함

표 17. rosmarinic acid과 alpha-asarone의 정밀성 및 정확성

Intra-day				
		RA	AA	
Precision	Mean RT	12.3	27.4	
	RT SD	0.2	0.1	
	RT RSD (%)	1.6	0.5	
	Conc. (ug/mL)	Area		
	0.5	3914.7	26486.3	
	5	43038.0	277802.0	
	25	502512.0	2691649.0	
	500	5096649.3	27128208.0	
			SD	
	0.5	763.0	3790.0	
	5	4069.6	11855.4	
	25	9038.6	44574.2	
	500	144338.2	407767.8	
			RSD (%)	
0.5	19.5	14.3		
5	9.5	4.3		
25	1.8	1.7		
500	2.8	1.5		
Accuracy	Injection conc.	25 ug/mL		
	1st	26.9	28.2	
	2nd	25.2	26.9	
	3rd	26.6	27.5	
	Mean	26.236	27.541	
	SD	0.919	0.643	
	RSD (%)	3.5	2.3	

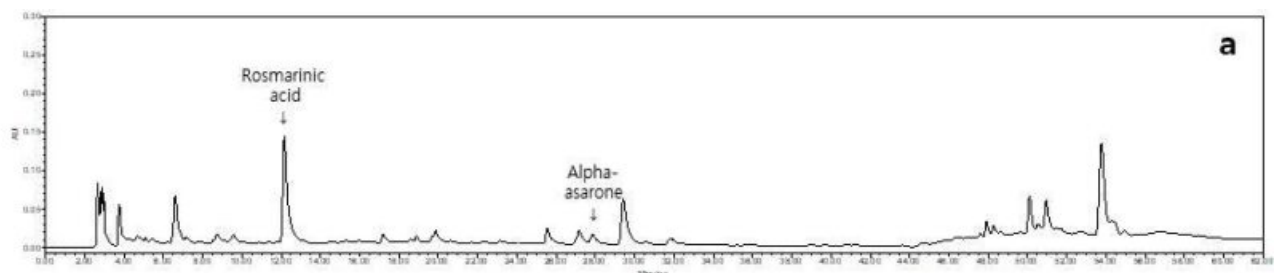
## ■ 소엽 추출물의 함량 평가 기준 설정

### ○ 지표(유효)성분 함량 평가 기준 설정

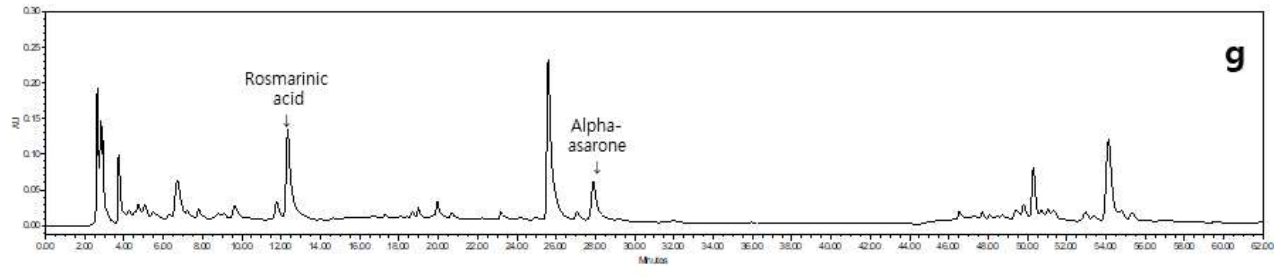
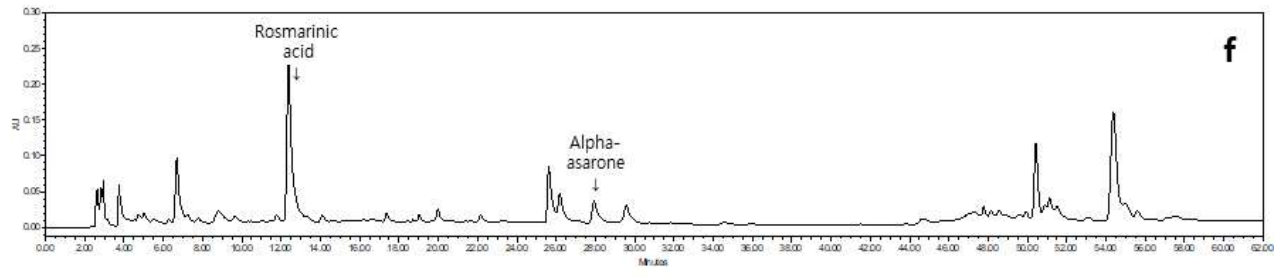
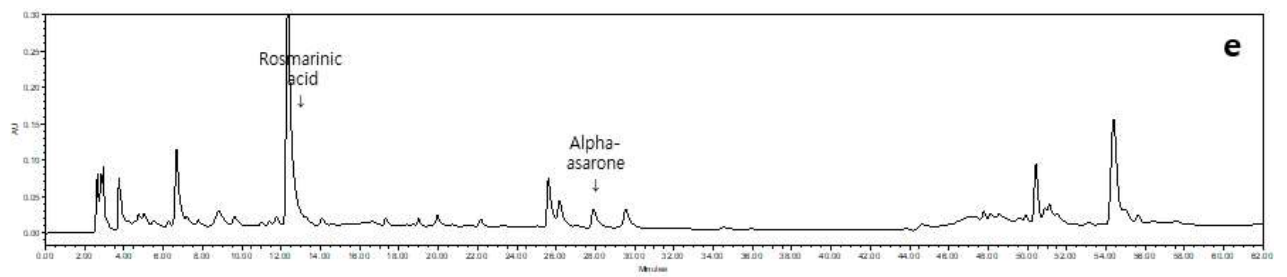
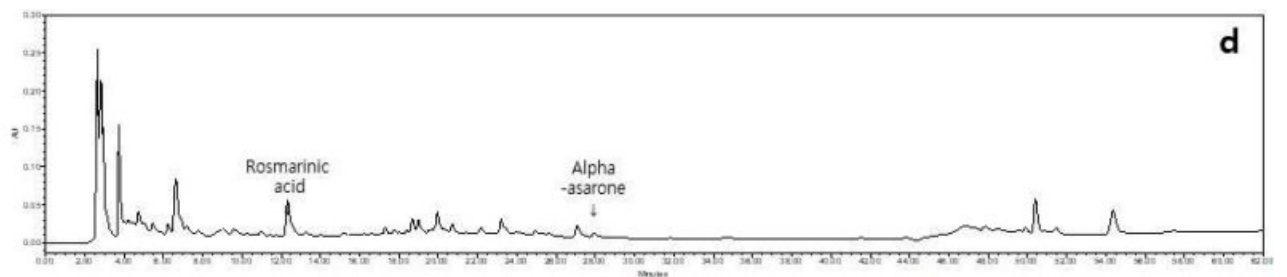
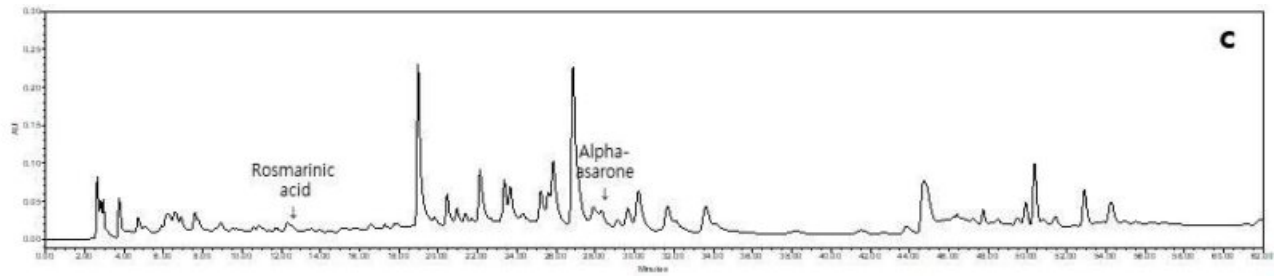
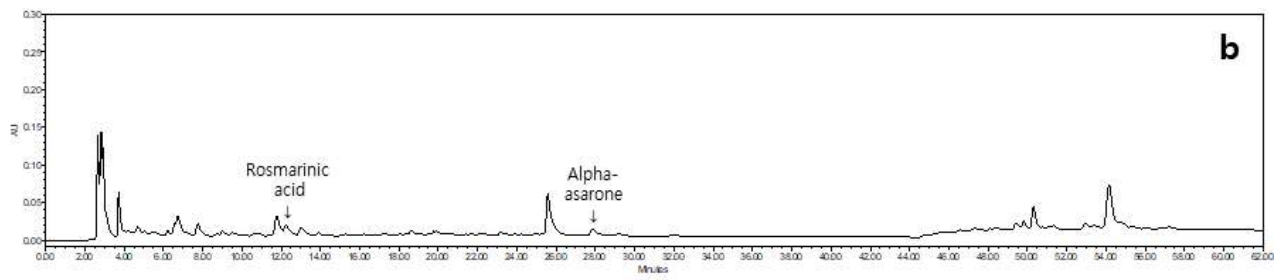
- 소엽의 지표(유효)성분으로 설정한 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 함량 평가 기준을 설정하기 위하여 다양한 판매처에서 소엽을 구매하여 시료로 사용함. 가루로 분쇄한 소엽을 동일한 양으로 (150 g 씩) 측정 후 100% 에탄올로 상온에서 12시간씩 2회 추출하였으며 여과 후 감압 농축하여 함량분석용 시료로 사용함
- 판매처 중 청수생약에서 구매한 소엽은 관능검사 결과 소엽이 아닌 것으로 판단되어 본 연구에서 제외함. 그 외 8곳에서 구매한 소엽의 에탄올 추출물에 함유된 rosmarinic acid와 alpha-asarone의 함량을 비교한 결과 구매처에 따라 지표성분 함량의 차이가 현저하게 나타남
- rosmarinic acid의 경우 %RSD가 76.18, alpha-asarone의 경우 102.78로 판매처에 따른 편차가 너무 커서 시료 구매 개수를 더 늘릴 필요가 있으며, 재배지에 따라 함량의 차이가 나는지도 비교해 볼 필요가 있음

표 18. 판매처에 따른 소엽 추출물의 수득률 및 지표성분 함량

회사명	원산지	추출물(g)	수득률(%)	Rosmarinic acid ( $\mu\text{g/g}$ )	alpha-asarone ( $\mu\text{g/g}$ )
두손애약초	경북 경산	26.6	17.7	11.31	0.00
제천허브	경북 영천	24.8	16.5	0.52	0.16
토종마을	경북 영천	27.1	18.1	3.83	0.00
대흥한방	경북 영천	26.9	17.9	27.51	0.37
오허브	전북 장수	27.0	18.0	18.59	0.43
광명당제약	전남 구례	28.1	18.7	9.70	0.98
하동소엽	경남 하동	21.6	14.4	11.1	0.2
삼흥건제약	경북 영천	23.9	15.9	6.99	0.31
mean		25.75	17.17	11.19	0.31
SD		2.15	1.44	8.5	0.31
RSD		8.37	8.37	76.18	102.78







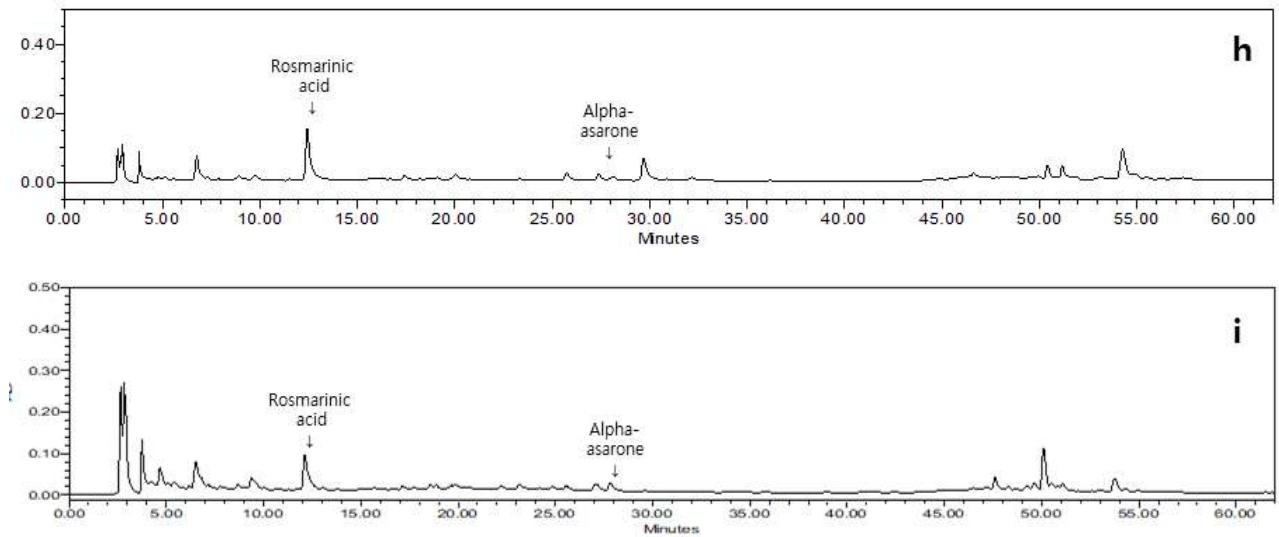


그림 52. 회사별 소엽 100% 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램

(a: 두손애약초, b: 제천허브, c: 청수생약, d: 토종마을, e: 대흥한방, f: 오허브, g: 광명당제약, h: 하동소엽, I: 삼흥건제약)

## ■ 소엽의 최적 추출법 개발

### ○ 에탄올 함량 및 온도별 추출법 확립

- 에탄올 추출: 소엽의 지표(유효)성분을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 추출용매, 즉 에탄올 함량을 설정하기 위해서 소엽 전체 100g을 각각 0, 20, 40, 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과 후, 감압농축기를 활용하여 유기용매를 제거하고 동결건조하여 가루로 만들어 다음과 같이 추출물을 확보함. 수득률의 경우 에탄올 0%가 가장 높았으나 HPLC를 이용한 지표성분 함량 확인 결과 60% 에탄올로 추출을 진행하였을 때 지표(유효)성분의 함량이 가장 높아, 이 결과에 따라 60% 에탄올이 가장 적절한 것으로 확인되어 설정함

표 19. 추출 용매에 따른 소엽 추출물의 수득률 및 rosmarinic acid과 alpha-asarone 함량

추출 용매	추출물 무게(g)	수득률(%)	지표(유효)성분 함량(µg/g)	
			Rosmarinic acid	Alpha-asarone
Ethanol 0 v/v%	14.8	14.8	0.16	0.01
Ethanol 20 v/v%	12.2	12.2	1.28	0.01
Ethanol 40 v/v%	11.8	11.8	2.24	0.01
Ethanol 60 v/v%	11.2	11.2	6.54	0.02

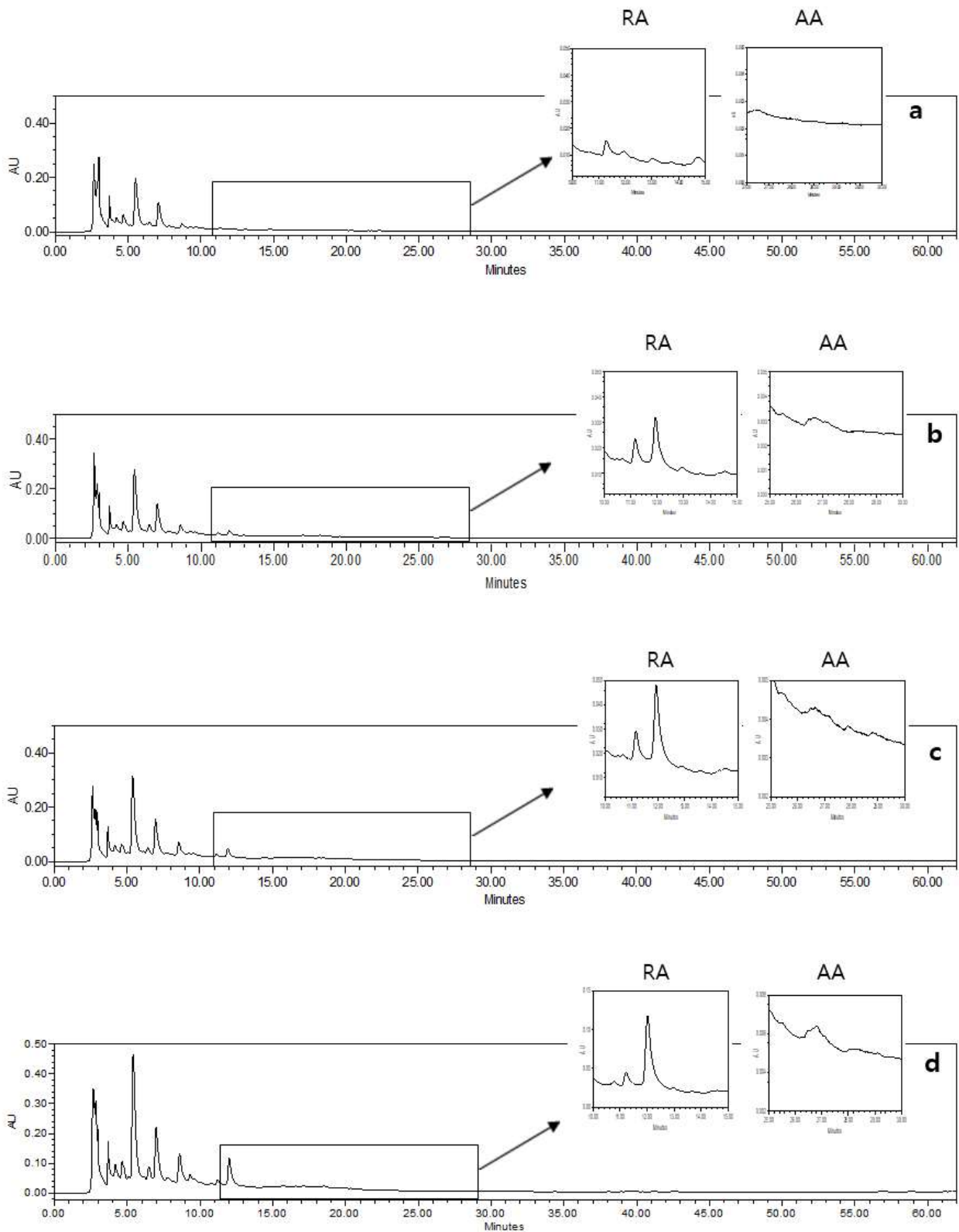


그림 53. 에탄올 함량에 따른 지표(유효)성분의 HPLC 크로마토그램  
 (a: 0% 에탄올 추출물, b: 20% 에탄올 추출물, c: 40% 에탄올 추출물, d: 60% 에탄올 추출물)  
 (RA: rosmarinic acid, AA: alpha-asarone)

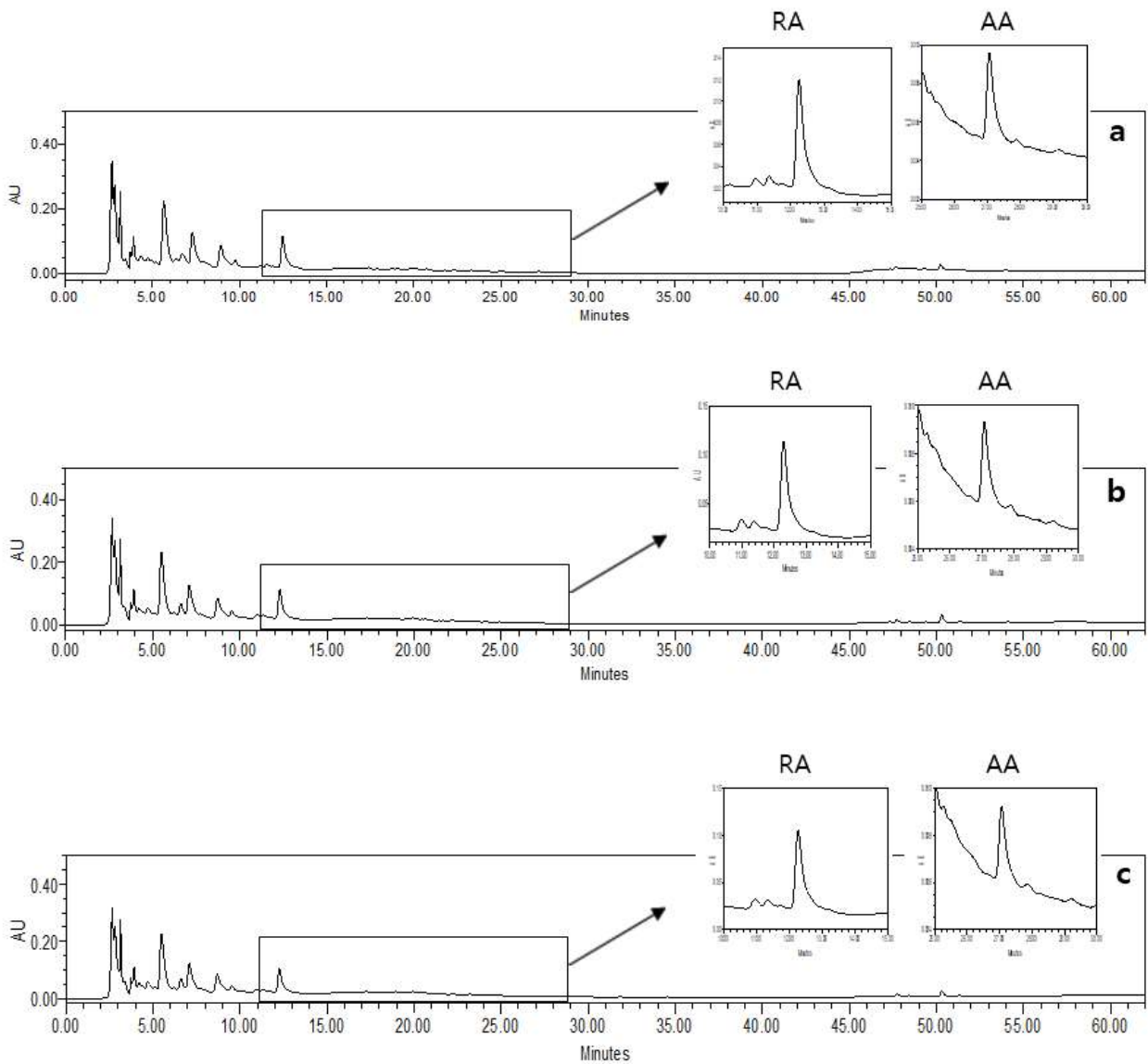
- 온도별 추출: 소엽의 지표(유효)성분을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 추출용매를 60% 에탄올로 설정한 후 최적 추출 온도를 설정하기 위해서 소엽 전체 15 g을 상온, 40, 60, 80 및 100 °C 온도에서 60% 에탄올로 각각 2시간씩 2회 추출하였음
- 모든 추출액은 여과한 후 감압농축기를 활용하여 유기용매를 제거하였으며 다음과 같이 추출물을

확보함

- 그 결과 상온에서 추출을 진행하였을 때 지표(유효)성분의 함량이 가장 높은 것을 확인함

표 20. 추출 온도에 따른 소엽 추출물의 수득률 및 rosmarinic acid과 alpha-asarone 함량

추출 온도 Ethanol 0v/v%	추출물 무게(g)	수득률(%)	지표(유효)성분 함량(μg/g)	
			Rosmarinic acid	Alpha-asarone
상온	1.5	10.0	7.72	0.02
40°C	1.9	12.6	7.22	0.01
60°C	2.1	14.0	6.86	0.01
80°C	2.5	16.6	6.70	0.01
100°C	2.2	14.6	6.62	0.01



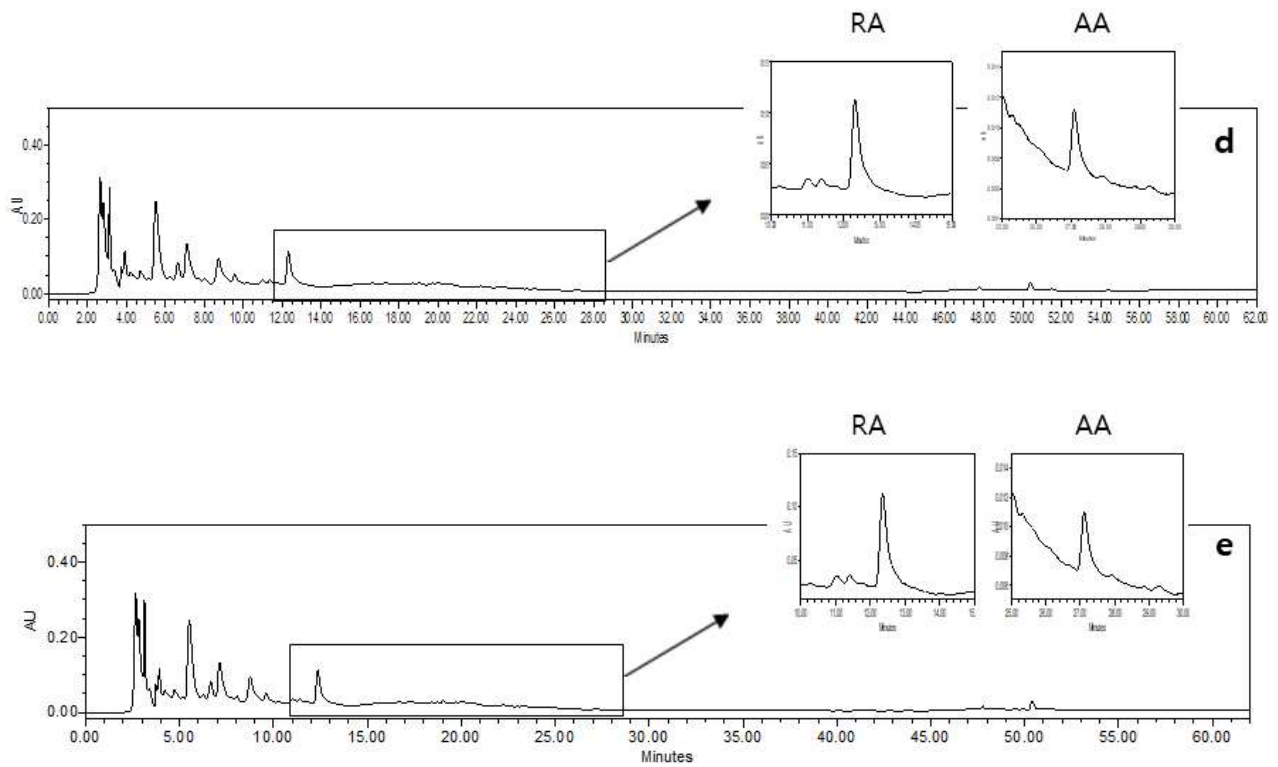


그림 54. 추출 온도에 따른 소엽 60% 에탄올 추출물 HPLC 크로마토그램  
(a: 상온 추출물, b: 40 °C 추출물, c: 60 °C 추출물, d: 80 °C 추출물, e: 100 °C 추출물)  
(RA: rosmarinic acid, AA: alpha-asarone)

- 초임계 추출: 소엽 시료를 분말상태로 '파이코일바이오테크코리아'에 기탁하여 다음과 같이 초임계 추출한 추출물을 확보함. 1차 조건의 추출 압력은 300bar, 추출 온도는 60°C, 추출 시간은 7시간으로 추출을 진행함
- 2차 조건의 추출 압력은 350bar, 추출 온도는 70°C, 추출 시간은 6시간30분으로 추출을 진행함. 에탄올 추출물에 비해 수득률 및 지표성분 함량이 낮은 것으로 확인됨

표 21. 소엽 초임계 추출물의 수득률 및 rosmarinic acid과 alpha-asarone 함량

추출 용매	시료량(g)	추출물 무게(g)	수득률(%)	지표(유효)성분 함량(µg/g)	
				Rosmarinic acid	Alpha-asarone
1차 조건	150.1	1.21	0.806	1.18	0.31
2차 조건	181.9	1.78	0.978	0.81	0.47

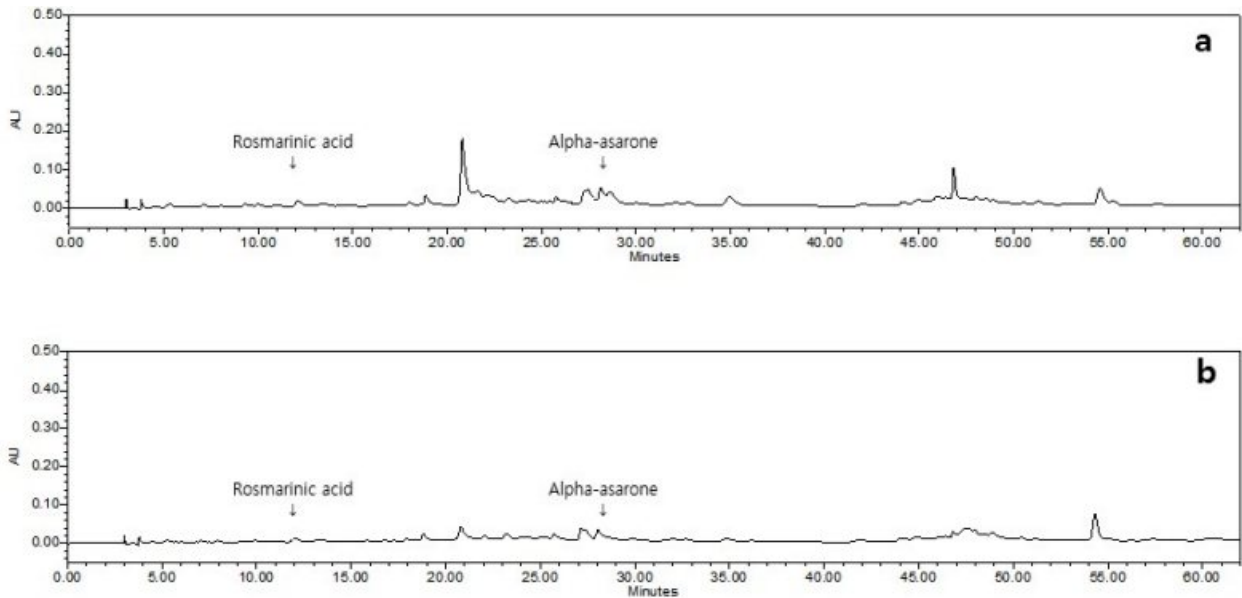


그림 55. 소엽 초임계 추출물 HPLC 크로마토그램  
(a: 1차 조건, b: 2차 조건)

## 2) 소엽추출물의 특유의 향과 수용화를 위한 유화 및 향미 억제 기술 개발

### ■ 소엽 추출물의 수용화 및 향미억제 기술 검증

#### ○ 소엽추출물의 포집제형 최적제조법 확립

- 마이크로캡슐 제조과정에서 가장 중요한 조절변수인 최종 캡슐 크기에 영향을 미치는 파라미터들은 아래와 같음

- 셸(외부)노즐크기
- 코어(내부)노즐크기
- 셸의 액체 유량
- 코어 물질의 액체 유량
- 진동 주파수
- 캡슐화 혼합물의 물리-화학적 특성

- 이 중 마이크로캡슐 비드생산의 가장 중요한 파라미터는 nozzle의 종류와 크기이며 일반적으로 최종비드 직경은 노즐크기의 약 2배를 가짐



따라서 기호성과 소엽추출물의 포집을 향상을 위하여 제형의 입도크기를 700um 이하로 설정하였으며 300um shell 노즐을 이용하여 연구를 진행함

- 또한 core물질이 droplet 형태로 낙하하는 시점에 shell 물질을 이용하여 감싸주는 방식인 concentric nozzle을 이용할 시에는 core 물질의 loss가 일부 발생하는 반면에 대량생산이 가능하며 추가적인 유화공정이 따르지 않기 때문에 이를 활용하여 아래 조건을 확립하였음

표 22. Core-Shell(300-120um)Concentric nozzle을 이용한 포집제형 최적 제조조건

Method of microencapsulation	
Nozzle size(core-shell) [um]	120-300
Alginate concentration [%]	2
Calcium chloride concentration [%]	0.1M
Air Pressure	630
Position of the flow regulating valve	8
Electrode Voltage [V]	900
Vibration Frequency [Hz]	900
Amplitude	3

표 23. 소엽추출물 함유 마이크로캡슐에 대한 안정성 평가 결과

Sample	300-120um 2%	300-120um 2.2%
Image		
Flavor&Taste	없음	없음
Solubility	없음	없음
Particle Size(um)	630	710
저장안정성	높음	높음
소엽추출물 포집함량(%)	20%	15%

○ 소엽추출물의 포집제형 최적제조법 확립

- 소엽추출물 함유 마이크로에멀전 제조
- 지용성 소엽추출물을 식품에 적용하기 쉬운 형태인 수용성 액상형태의 중간제재를 제조하는 방법을 확립하고자 하였음
- 난용성 물질인 소엽추출물에 cooking oil (MCT oil 및 Corn oil)을 carrier oil로 사용하였으며 셔터믹서 및 초고압균질기를 이용하여 한층 더 안정한 상태의 Microemulsion 형태를 제조함

표 24. Microemulsion 소엽추출물 유화액의 제조

공정	조건	
유화액	80%주정 소엽추출물	20%
	유화제	10%
	MCT 오일	10%
	정제수	60%
혼합	70℃, 2,000rpm, 10min	
초고압균질	400bar 2cycle	



◦ 소엽추출물 함유 동결건조 분말 제조

- Pilot scale의 동결건조를 이용한 수용성분말 제조 시 소엽추출물의 포집함량이 높아짐과 동시에 맛과 향미부분, 저장안정성이 보장되는 장점이 있으며 수요도를 높이고 다방면의 식품에 적용 가능한 제재가 되도록 하는 제조공정 및 제조범위를 설정하였음
- 제조방법에는 소엽추출물의 향미를 개선시킬 수 있는 저당화 물엿을 첨가 하였으며 유화안정성을 높일 수 있는 카제이나트륨과 제2인산칼륨을 사용하였음

표 25. 소엽추출물 함유 동결건조 분말의 제조 공정 및 제조범위 설정



공정	조건	
Emulsion	80%주정 소엽추출물	20%
	유화제	10%
	MCT 오일	10%
	정제수	60%
Homogenizer	400bar 1cycle	
Core - Wall Material Mixing Ratio	Emulsion	85-93%
	Corn syrup	5-10%
	Sodium Caseinate	1-3%
	Potassium Phosphate dibasic	1%
	Total	100%
Freeze Drying	Temperature : - 80℃ 동결 후 Pressure : 5 mTorr 이하 수분함량 5%이하	

◦ 소엽추출물 포집제형의 관능검사 및 방출 저장안정성 분석방법

입도분석 결과와 함께 저장 기간에 따른 소엽추출물의 방출 유무와 향미 억제 확인을 위한 관능평가를 진행하였음

오일성분의 방출확인 실험과 관능평가는 에스에프씨바이오의 연구원들을 대상으로 진행하였음 이때 소엽추출물의 방출량이 많을수록, 향미와 맛이 강할수록 강함의 세기를 높게 반영하였음 (없음 -, 거의없음 +, 일부있음++, 강함 +++)

표 26. 소엽추출물 함유 포집제형에 대한 특성 평가 결과

시료명	소엽추출물 마이크로에멀전		소엽추출물 동결건조분말(1)		소엽추출물 동결건조분말(2)		소엽추출물 동결건조분말(3)	
이미지								
구성	80%주정 소엽추출물	6%	Emulsion	85%	Emulsion	90%	Emulsion	93%
	유화제	8%	Corn syrup	5%	Corn syrup	7%	Corn syrup	10%
	MCT 오일	12%	Sodium Caseinate	1%	Sodium Caseinate	2%	Sodium Caseinate	3%
	정제수	74%						
Flavor& Taste	+++		+		+		++	
Solubility	+++		+++		+++		+++	
Particle Size (um)	1.51		3.40		2.51		3.61	
방출 안정성	-		-		-		-	
지표성분 (Rosmarinic acid) 함량(mg/g)	0.70562		4.63		4.71		4.81	
기능성분 (Alpha-asar one) 함량(mg/g)	0.000291		0.00253		0.00269		0.00271	

- 대량생산제조법을 통해 확립한 80%주정 소엽추출물을 활용하여 위와 같은 구성에 따라 소엽추출물 마이크로에멀전과 동결건조분말(1),(2),(3)을 제조하였으며 각각의 시료에 대한 특성 평가 결과를 토대로 최적 제조법을 확립하였음

- 에멀전의 관능평가결과 향미가 높아 실제 제품에 첨가하였을 시 Masking에 어려움이 있었으나 동결건조분말로 제조 시 다양한 부형제들과 혼합되므로 관능 측면에서 기호도가 상승하였음

- 지표성분의 함량 및 기능성분의 함량 분석 결과, 동결건조분말 속 소엽추출물의 함량이 높아질수록 비례하게 높아짐을 확인하였으나 오차범위 내에서 변화하는 값으로 관능 및 입자크기 측면에서 우위에 있는 소엽추출물 동결건조분말(2)를 최적 제조법으로 설정하였음

표 27. 소엽추출물 함유 동결건조 분말의 최종 건물 배합비

소엽추출물	39.1%
유화제	19.6%
MCT Oil	19.6%
카제이나트륨	4.3%
제2인산칼륨	2.2%
물엿	15.2%
합 계	100%

○ 소엽추출물 포집제형의 저장안정성 평가

표 28. 소엽추출물 수용성 분말의 저장 중 지표 및 유효성분 함량 변화

단위(mg/g)

저장온도(°C) 저장기간	35		45		55	
	rosmarinic acid	$\alpha$ -asarone	rosmarinic acid	$\alpha$ -asarone	rosmarinic acid	$\alpha$ -asarone
0주	4.71 ( $\pm 0.2355$ )	0.00269 ( $\pm 0.0001$ )	4.71 ( $\pm 0.2355$ )	0.00269 ( $\pm 0.0001$ )	4.71 ( $\pm 0.2355$ )	0.00269 ( $\pm 0.0001$ )
2주	4.71 ( $\pm 0.2355$ )	0.00263 ( $\pm 0.0001$ )	3.5 ( $\pm 0.1750$ )	0.00241 ( $\pm 0.0001$ )	3.21 ( $\pm 0.1605$ )	0.00198 ( $\pm 0.0001$ )
4주	4.70 ( $\pm 0.2350$ )	0.00260 ( $\pm 0.0001$ )	2.70 ( $\pm 0.1350$ )	0.00225 ( $\pm 0.0001$ )	2.40 ( $\pm 0.1200$ )	0.00167 ( $\pm 0.0001$ )
6주	4.70 ( $\pm 0.2350$ )	0.00259 ( $\pm 0.0001$ )	2.40 ( $\pm 0.1200$ )	0.00218 ( $\pm 0.0001$ )	2.37 ( $\pm 0.1185$ )	0.00150 ( $\pm 0.0001$ )

- 소엽추출물 수용성분말을 다양한 온도 조건에서 보관하여 저장기간 따른 지표 및 유효성분의 함량 변화를 살펴봄으로써 안정성을 보장하기 위한 보관기간 설정의 기초자료로 사용하고자 함
- 소엽추출물 수용성분말에 대한 저장안정성 평가 결과, 저장온도 35°C의 경우 6주간 보관 시 초기 Rosmarinic acid의 함량 및 Alpha asarone 함량의 변화 없이 일정하게 유지됨
- 45°C에서 6주간 보관한 결과, 4주차까지 Rosmarinic acid의 함량이 25%씩 감소했으나 6주차부터 함량의 감소 폭이 줄어들며 Alpha asarone 함량은 저장 기간에 따라 감소 폭이 점차적으로 줄어드는 것을 확인함
- 55°C에서의 저장안정성 평가 결과, Rosmarinic acid 및 Alpha asarone의 함량이 6주간 약 40% 감소하였으며 저장기간에 따라 함량의 감소 폭이 줄어들음
- 이상의 연구결과로 온도가 증가함에 따라 지표성분 및 기능성분의 함량이 줄어드는 것을 확인하였으며, 이를 통해 소엽추출물 수용성분말 저장 최적 조건을 35°C미만으로 설정하였다.

3) 소엽 원생약의 최적화 확립

■ 소엽 원생약 성분 프로파일 개발

○ 원생약에 함유된 성분 (LC-MS-MS) 확립

- 소엽의 주 성분인 roamarinic acid와 선행 연구 결과 유효성분으로 제시된 alpha-asarone 이외에 원생약에 함유된 성분을 확인하고 검증하기 위해 LC-MS-MS법을 시행함
- 분석한 시료는 소엽의 주정 추출물이며, 상온에서 12시간 씩 2회 추출함
- HPLC 분석 크로마토그램 : 확립된 분석 조건으로 소엽 추출물(표준생약)을 분석한 결과 A 피크는 protocatechuic acid, C 피크는 caffeic acid, F 피크는 rosmarinic acid 로 확인됨. 본 피크들은 구매한 지표성분과 retention time이 동일하며 PDA spectrum이 일치하여 위와 같이 동정함

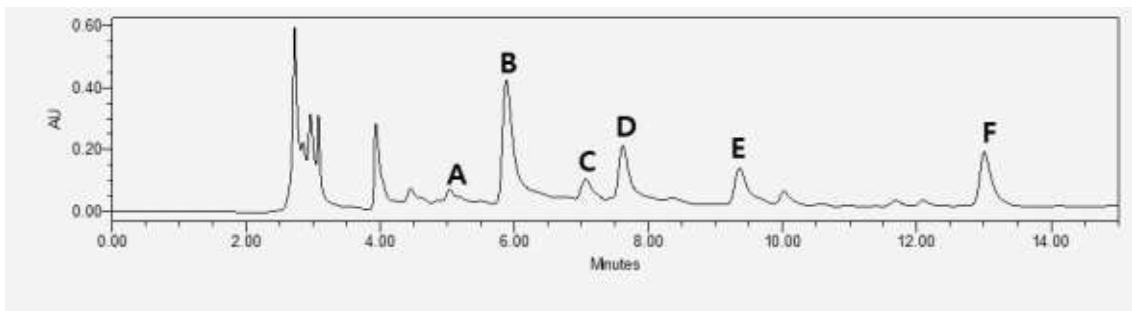


그림 60. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(A: protocatechuic acid , B: Luteolin-7-O-glucoside, C: caffeic acid, D: Lognin, E: Scutellarein-7-O-glucose, F: rosmarinic acid)



그림 61. HPLC 분석법으로 확인된 소엽의 성분 구조

- A, C, F 피크가 protocatechuic acid, caffeic acid, rosmarinic acid 임을 검증하기 위해, 또한 확인되지 않은 B, D, E 피크의 성분명을 확인하기 위해 동일 시료를 HPLC-MS-MS로 분석하여 성분을 확인함. 그 결과, B는 luteolin-7-O-glucoside, D는 loganin, E는 scutellarein-7-O-glucoside로 확인함

표 29. 추출물질의 elemental composition

Peak ID	UV RT (min)	HRMS RT (min)	HRMS data (amu) [M-H]-	Elemental Composition [M-H]-	RDB	Error (ppm)	Theo. mass
A	4.69	4.80	153.0194	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	5.5	7.87	153.01824
B	5.12	5.76	447.0938	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	12.5	3.63	447.0922
C	6.31	6.38	179.0350	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	6.5	6.25	179.03389
D	6.52	6.57	389.1459	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>	5.5	4.32	389.14422

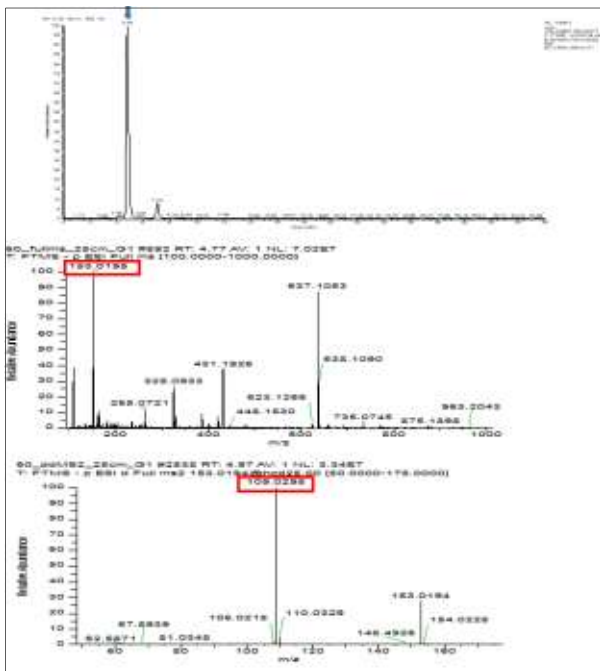
E	8.00	7.83	461.0728	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub>	13.5	1.36	461.0715
F	11.34	11.67	359.0774	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	11.5	3.48	359.07614

Peak ID	Identification	Formular	[M-H]	Major product ions	Structure Prediction	mass fragmentation
A	Protocatechuic acid	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	153.0194	109		
B	Luteolin-7-O-glucoside (Cynaroside)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447.0938	285		
C	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179.0350	161, 135		
D	Loganin	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	389.1459	269		
E	Scutellarein-7-O-glucuronide (Scutellarin)	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	461.0728	285		
F	Rosmarinic acid	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	359.0774	197, 179		

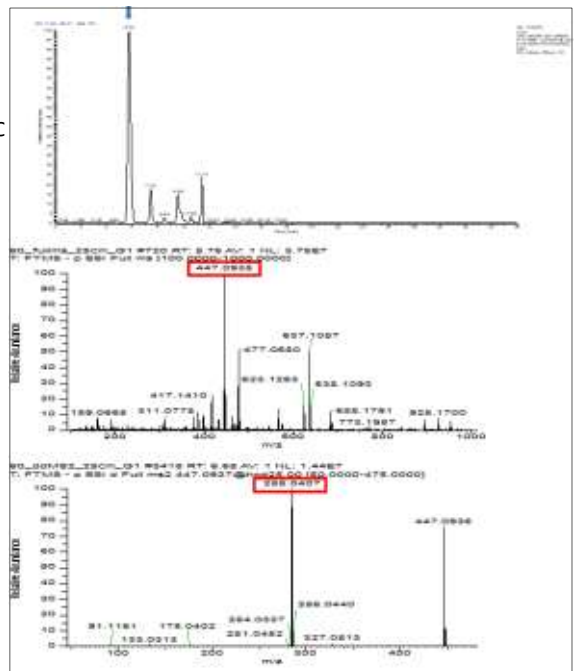
(-) ESI- HRMS의 mass 크로마토그램 및 스펙트럼 :

A. Protocatechuic acid

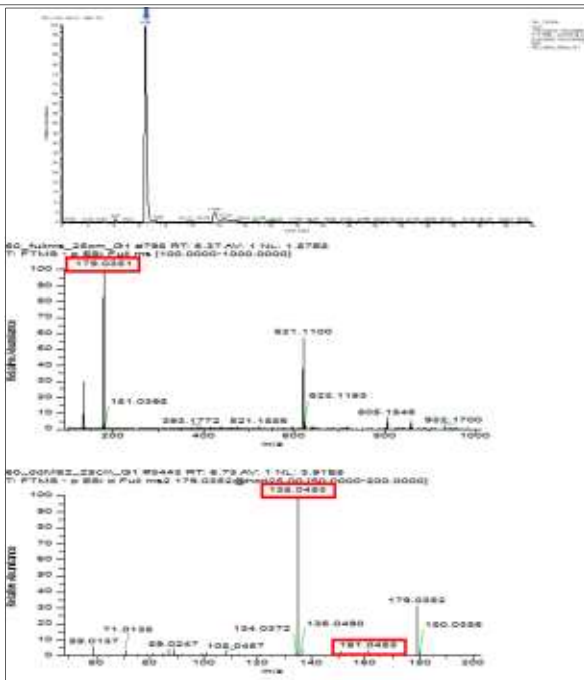
B. Luteolin-7-O-glucoside



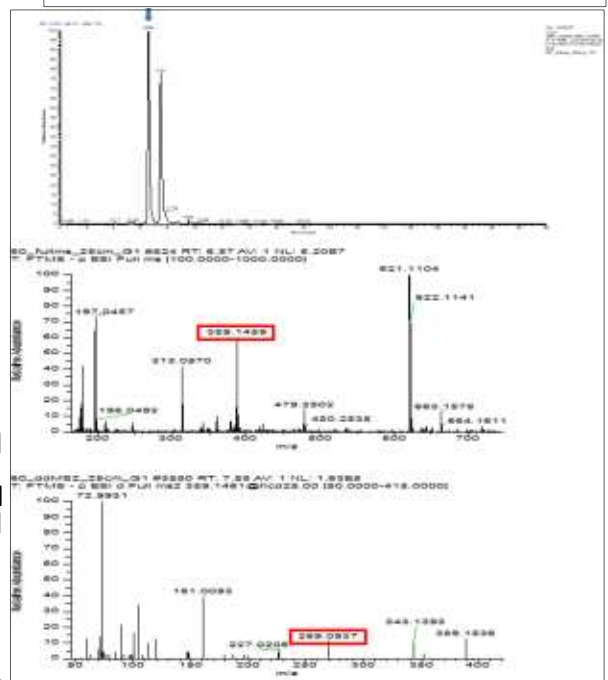
C. Caffeic acid



D. Logenin

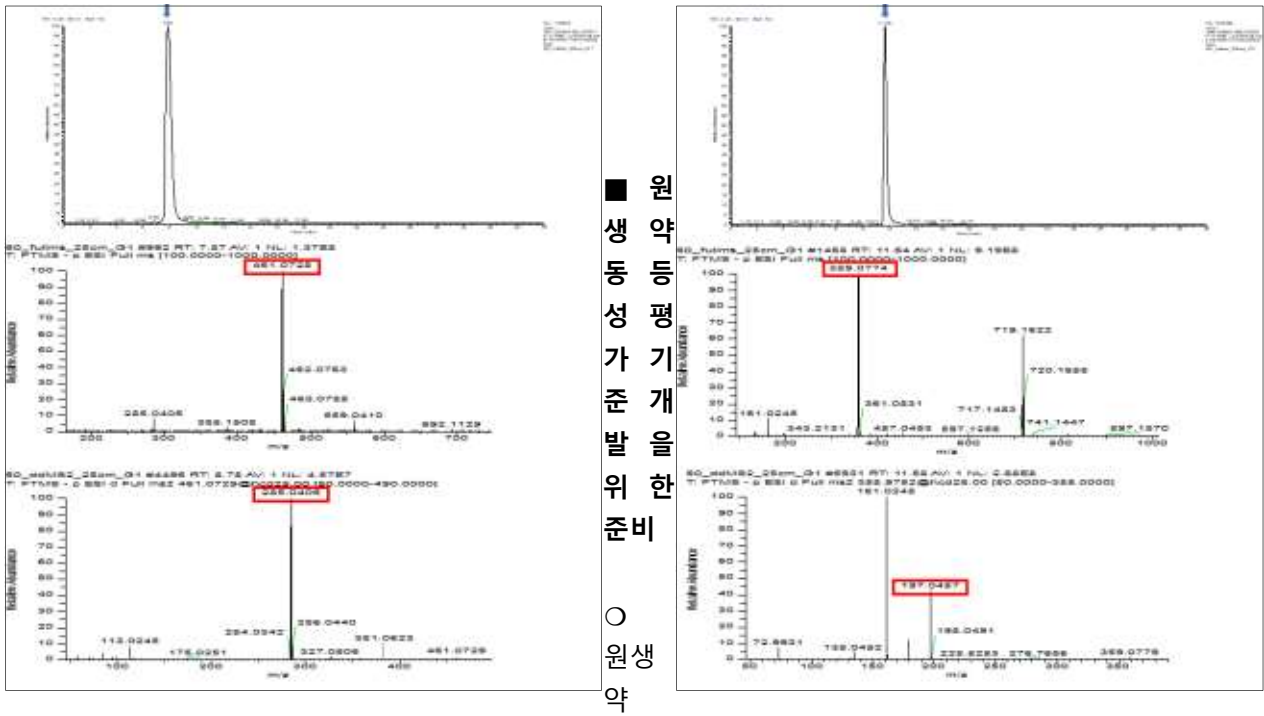


E. Scutellarein-7-O-glucoside



F. Rosmarinic acid

rinic acid



동등성 평가 기준 설정

- 소엽 표준생약의 동등성 평가 기준

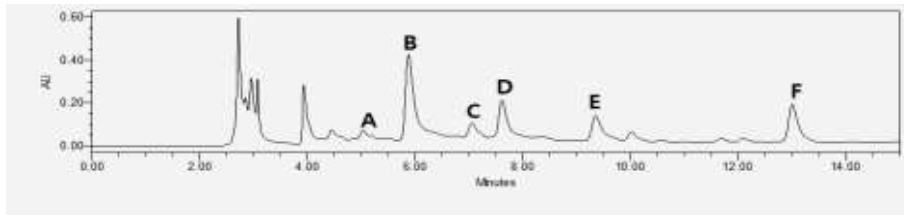


그림 62. 표준 생약의 HPLC 크로마토그램

표 30. 표준 생약 함유 성분 분석을 통한 원생약 동등성 기준 설정

Peak	A	B	C	D	E	F
Rt (min)	5.043	5.904	7.081	7.645	9.38	13.026
Area ( $\mu V \cdot sec$ )	162765	4098335	667701	1608600	1560383	2022440

- 소엽 원생약의 지표성분 함량 평가를 위해 소엽 원생약에 함유된 지표(유효)성분인 rosmarinic acid과 alpha-asarone의 함량을 HPLC 분석법을 활용하여 확인함

- 이를 위해 18 곳의 판매처에서 소엽을 구매하여 시료로 사용함

- 소엽의 재배지는 경북 영천이 8 곳으로 가장 많았으며 경산, 고령, 함양을 포함하여 경상남도에서 재배된 시료가 가장 많음 (12 곳)

- 구매한 소엽은 가루로 분쇄하고 50 g을 칭량하여 에탄올로 상온에서 12시간씩 2회 추출하였으며 여과 후 감압 농축하여 함량 분석용 시료로 사용함



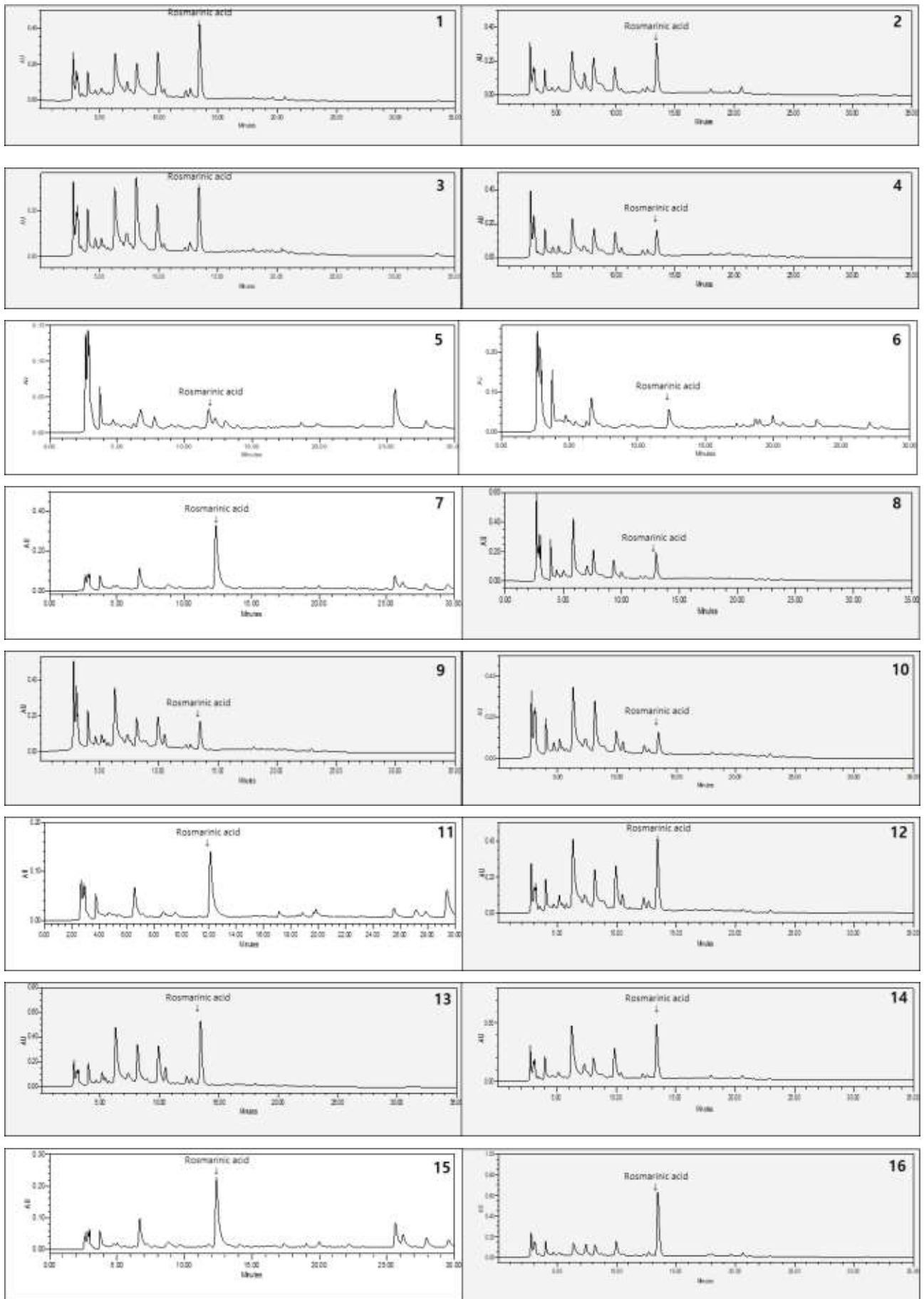
- 각 판매처별 소엽 주정 추출물에 함유된 rosmarinic acid와 alpha-asarone의 함량을 기 구축된 HPLC 분석법을 사용하고 두 성분의 HPLC 피크의 면적값을 standard curve에 적용하여 함량을 계산함

표 31. 소엽 지표성분의 HPLC 동시분석법 조건 (1차년도 확립한 조건 사용)

HPLC analysis condition			
Column	SHISHEIDO C18 250*4.6 mm		
Flow rate	0.8 mL/min		
Wave length	260 nm		
Injection volume	10 $\mu$ L		
Mobile solvent	A: 0.1% Formic acid in ACN B: 0.1% Formic acid in water		
Mobile phase	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	20	80
	10	30	70
	20	55	45
	22	60	40
	40	60	40
	42	100	0
62	100	0	

표 32. 판매처에 따른 소엽 추출물의 지표성분 함량

회사명	원산지	Rosmarinic acid ( $\mu$ g/g)	alpha-asarone( $\mu$ g/g)
정가네약초	경북 영천	26.93	0.01
자연담음	경북 영천	19.61	0.04
보현산약초	경북 영천	18.28	0.04
총명식품	경북 영천	9.03	0.01
제천허브	경북 영천	0.24	0.06
토종마을	경북 영천	1.38	0.01
대흥한방	경북 영천	17.05	0.17
삼흥건제약	경북 영천	9.55	0.14
백장생	경북 고령	9.67	0.01
다산 여성초	경북 고령	6.44	0.01
두손애약초	경북 경산	11.94	0.01
지리산청정약초	경남 함양	25.38	0.01
자연맘	전북 남원	33.49	0.01
자연천사	전북 장수	30.79	0.07
오허브	전북 장수	8.77	0.03
미산약초	대구 달성	41.02	0.02
장명식품	경기 가평	19.16	0.01
약초명가	경기 화성	24.92	0.01
<b>mean</b>		<b>17.43</b>	<b>0.04</b>
SD		11.33	0.05
RSD(%)		65.03	126.28



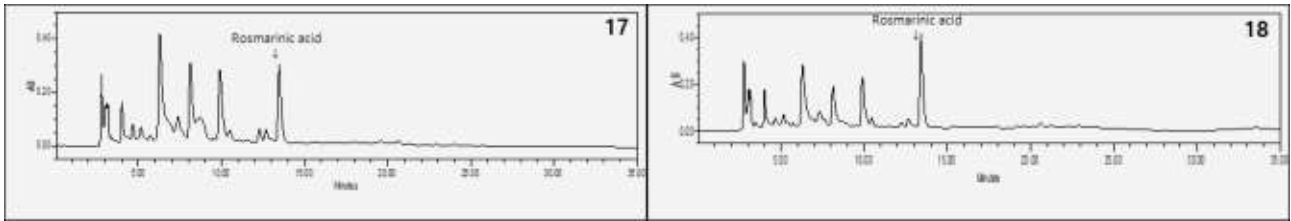


그림 63. 판매처별 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램

(1: 정가네약초, 2: 자연달음, 3: 보현산약초, 4: 총명식품, 5: 제천허브, 6: 토종바을, 7: 대흥한방, 8: 삼흥건제약, 9: 백장생, 10: 다산 어성초, 11: 두손애약초, 12: 지리산청정약초, 13: 자연맘, 14: 자연천사, 15: 오희브, 16: 미산약초, 17: 장명식품, 18: 약초명가)

- 위 분석결과 판매처별 주정 추출물에 함유된 rosmarinic acid와 alpha-asarone은 산지에 따라 큰 차이가 있음. 같은 원산지라고 하더라도 판매처에 따라 rosmarinic acid의 함량은 낮게는 0.52 ug/g, 높게는 41.02 ug/g을 함유하고 있으며, 그 평균값은 17.43 ug/g, RSD는 65.03%로 신뢰할 수 있는 수준임
- 반면 apha-asarone의 경우 원산지 및 판매처에 따라 함유량이 0.01 ~ 0.17 ug/g 이었으며 그 평균값은 0.04 ug/g, RSD는 126.28%로 높음. 의 함량을 비교한 결과 구매처에 따라 지표성분 함량의 차이가 현저하게 나타남
- rosmarinic acid의 경우 %RSD가 61.34, 177.31%로 판매처에 따른 편차가 너무 커서 특정 원산지의 (대구) 시료 구매 개수를 더 늘릴 필요가 있으며, 재배지에 따라 함량의 차이가 나는지도 비교해 볼 필요가 있음
- 그러나 원산지를 경상남도로 한정할 경우 rosmarinic acid 및 alpha-asarone의 평균값은 13.69 와 0.09 ug/g이었으며, RSD%는 65.12% 와 138.74%임
- 주관기관인 에스에프씨바이오에서는 판매처에 따른 소엽추출물의 지표성분 함량이 다르기 때문에, 원물 구매 후 사전검토 평가 단계를 도입함. 이는 원물의 지표성분이 에스에프씨바이오가 설정한 소엽추출 농축액의 규격안에 들어오는지 확인하는 과정임

○ 대량 구매 원생약 동등성 평가

- 주관기관에서 대량 구매한 자소엽(광명당제약)을 확보하여 표준생약과 그 동등성을 비교하였으며 RSD%가 25% 이하로 동등성이 확인됨

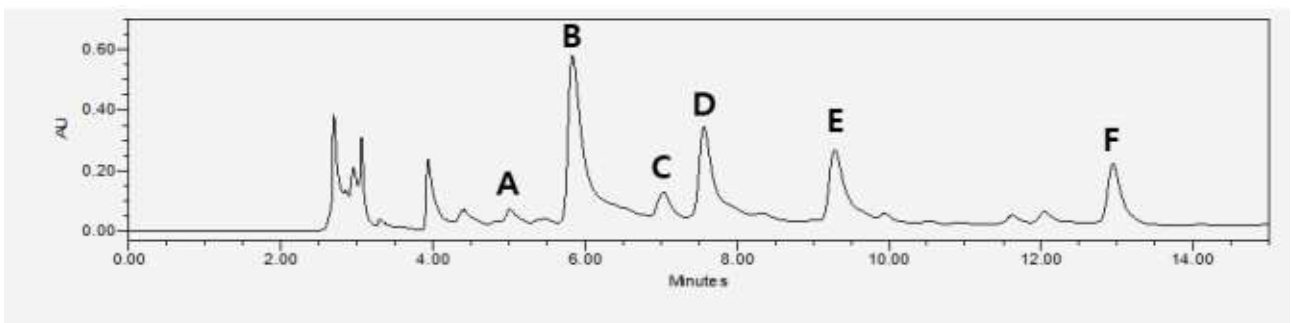


그림 64. 광명당 제약 자소엽의 HPLC 크로마토그램

표 33. 대량 구매한 광명당 제약 소엽 추출물의 원생약 동등성 평가

	A	B	C	D	E	F
Rt (min)	5.008	5.836	7.032	7.5654	9.284	12.944
Area ( $\mu V \cdot sec$ )	167854	5372713	859720	2253031	1928697	2465089
%RSD	2.18	19.03	17.78	23.60	14.93	13.95

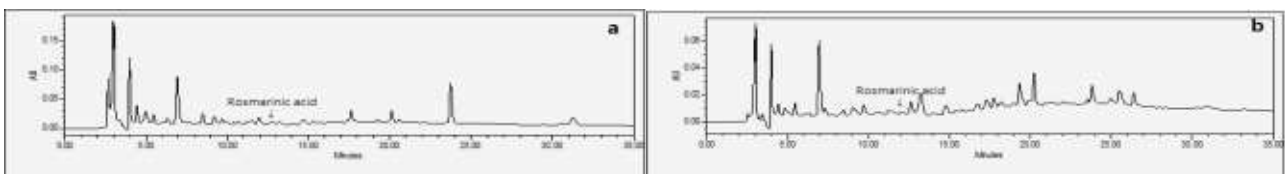
■ 소엽 원생약의 최적 종, 시기, 부위 확립

① 소엽 원생약의 최적 종 확립:

- 소엽의 지표(유효)성분을 가장 많이 함유한 종을 설정하기 위해서 중국 섬서성 (성락 지역)의 소엽 재배 단지를 방문하여 5 종의 소엽 유사종 (자소엽, 깃잎, 청소엽, 주름소엽 및 편접청자소)을 채취함
- 국내에서는 경남 하동의 소엽 재배 농가를 방문하여, 소엽 유사종 3종 (자소엽, 주름소엽 및 깃잎)을 채취함
- 채취한 소엽은 흙을 떨어내고 음건한 후 가루로 분쇄함. 분쇄한 소엽 시료는 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 함량분석용 시료로 사용함
- HPLC 분석 결과 중국에서 재배하는 소엽 유사종 5종에 함유된 rosmarinic acid는 0.14-0.38  $\mu g/g$ 으로, 국산 소엽에 비해 20% 이하였으며, alpha-asarone은 검출되지 않음. 반면, 경남 하동에서 채취한 3종 중 자소엽과 깃잎의 rosmarinic acid는 판매처 평균과 유사하였으며, alpha-asarone의 경우 주름 소엽에서 판매처 평균과 유사한 결과치를 나타냄

표 34. 판매처에 따른 소엽 추출물의 유효성분 함량

원산지	Rosmarinic acid ( $\mu g/g$ )	alpha-asarone ( $\mu g/g$ )
중국 자소엽	0.33	0.00
중국 깃잎	0.38	0.00
중국 청소엽	0.26	0.00
중국 주름소엽	0.15	0.00
중국 편접청자소	0.14	0.00
하동 주름소엽	10.64	0.02
하동 자소엽	18.27	0.00
하동 깃잎	18.67	0.00



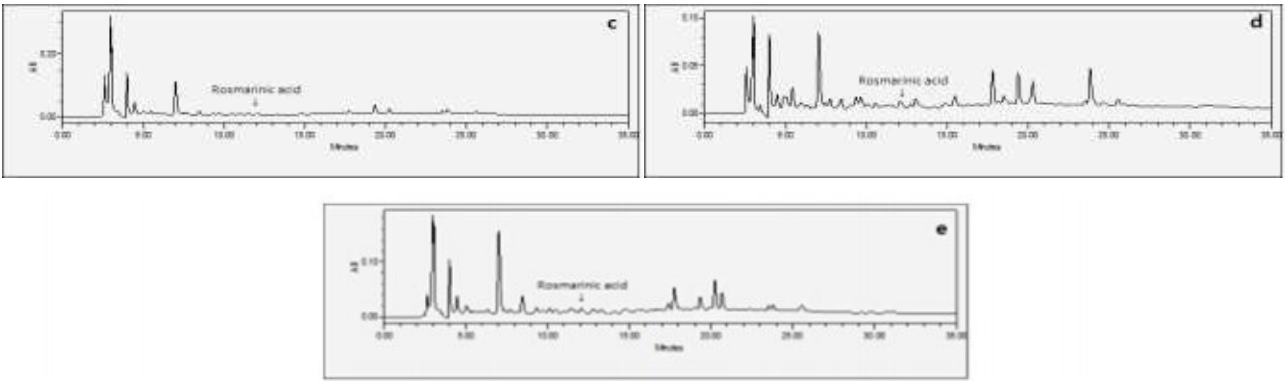


그림 65. 종류별 중국 소엽 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(a: 중국 자소엽, b: 중국 깻잎, c: 중국 청소엽, d: 중국 주름소엽, e: 중국 편집청자소)

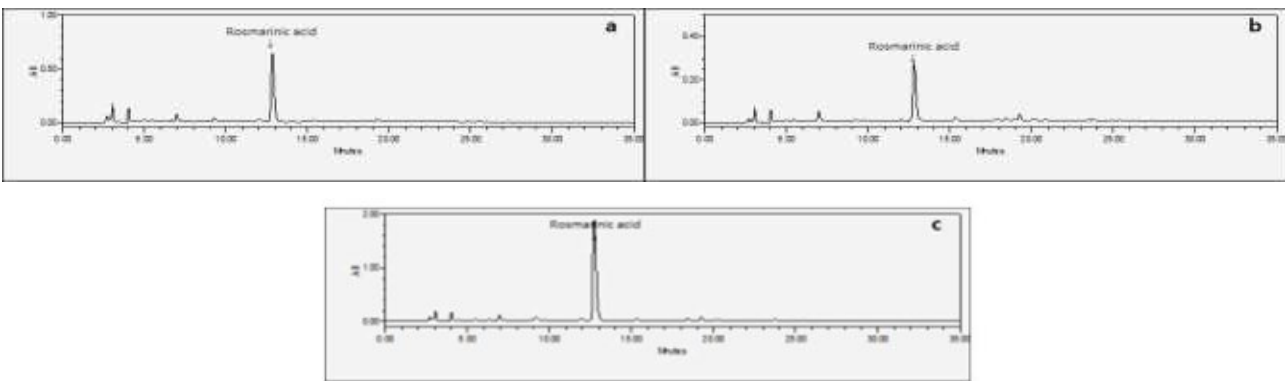


그림 66. 종류별 하동 소엽 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(a: 하동 주름소엽, b: 하동 자소엽, c: 하동 깻잎)

② 소엽 원생약의 채취 최적 시기 및 채취 부위 확립:

- 소엽은 채취 시기에 따라 성분의 함량의 차이가 큰 생약으로 알려져 있음. 따라서 소엽의 지표(유효)성분을 가장 효율적으로 추출할 수 있는 시기 및 부위를 설정하기 위해 '농부와 약초꾼'에서 6월~9월 사이 3주간격으로 총 5회 제공 받음

- 시기별로 제공 받은 생약을 소엽과 소경으로 부위를 나누어 건조, 각각 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 함량분석용 시료로 사용함. 제공 받은 시료는 모두 분석 완료하였음

- 분석 결과, 4회차 제공 받은 시료에서 소엽과 소경 모두 rosmarinic acid 함량이 20.51, 8.17 ug/g으로 가장 높은 것을 확인하였고 5회차 제공 받은 시료에서는 소엽, 소경의 rosmarinic acid 함량이 11.27, 4.61 ug/g으로 줄어드는 것을 확인 할 수 있었음. 따라서 소엽의 최적 채취 시기 및 부위는 꽃대가 올라오기 전인 8월 중순의 소엽으로 확인 하였음



그림 67. 소엽 원생약의 채취 시기별 사진

표 35. 소엽 원생약의 최적 시기 및 부위 별 유효 성분 함량

원산지		Rosmarinic acid ( $\mu\text{g/g}$ )	alpha-asarone ( $\mu\text{g/g}$ )
1회차	자소엽	13.75	0.00
	자소경	2.05	0.00
2회차	자소엽	11.23	0.00
	자소경	7.54	0.00
3회차	자소엽	11.17	0.00
	자소경	0.98	0.00
4회차	자소엽	20.51	0.00
	자소경	8.17	0.00
5회차	자소엽	11.27	0.00
	자소경	4.61	0.00

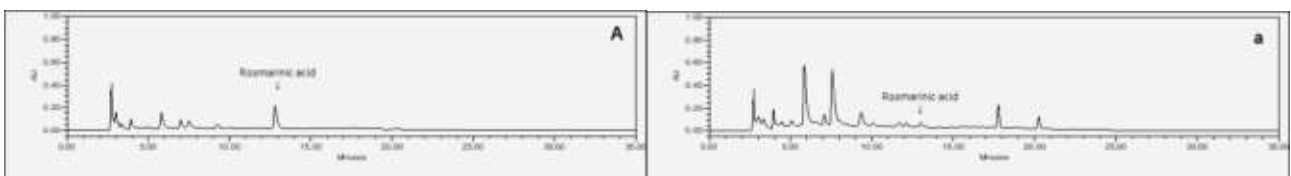


그림 68. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(A: 1회차 자소엽, a: 1회차 자소경)

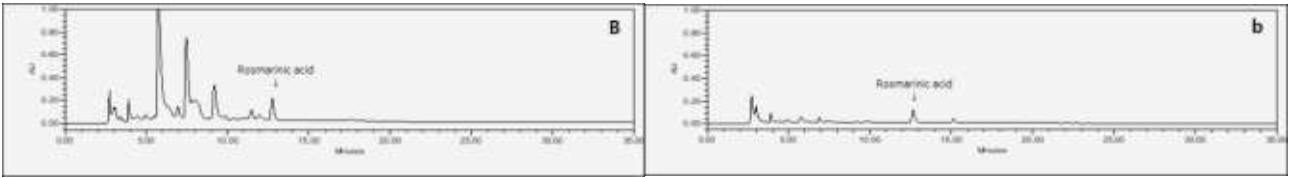


그림 69. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(B: 2회차 자소엽, b: 2회차 자소경)

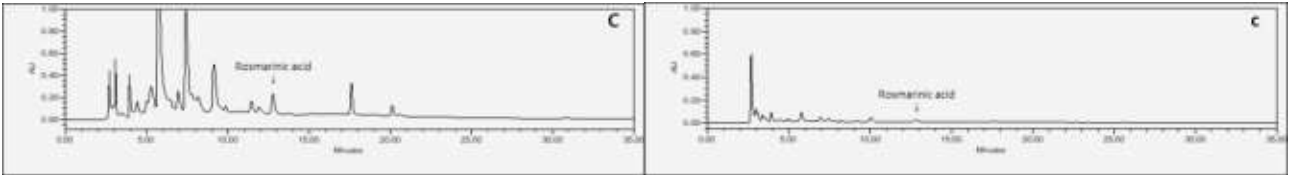


그림 70. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(C: 3회차 자소엽, c: 3회차 자소경)

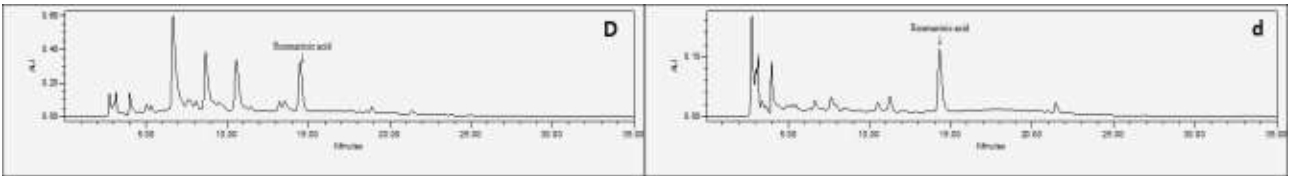


그림 71. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(D: 4회차 자소엽, d: 4회차 자소경)

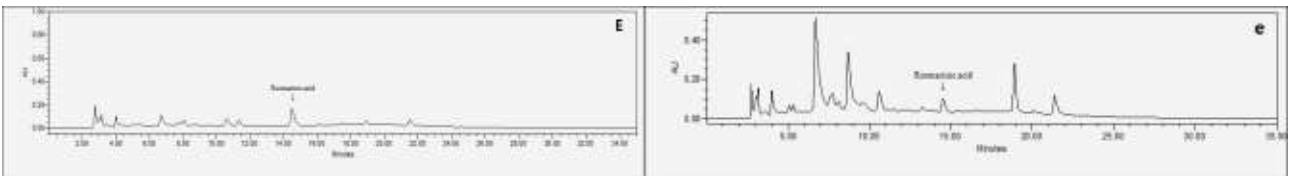


그림 72. 소엽 주정 추출물의 HPLC 크로마토그램  
(E: 5회차 자소엽, e: 5회차 자소경)

#### 4) 소엽의 인지기능 개선 기능성 검증 및 추출물 소재의 저장안정성 평가

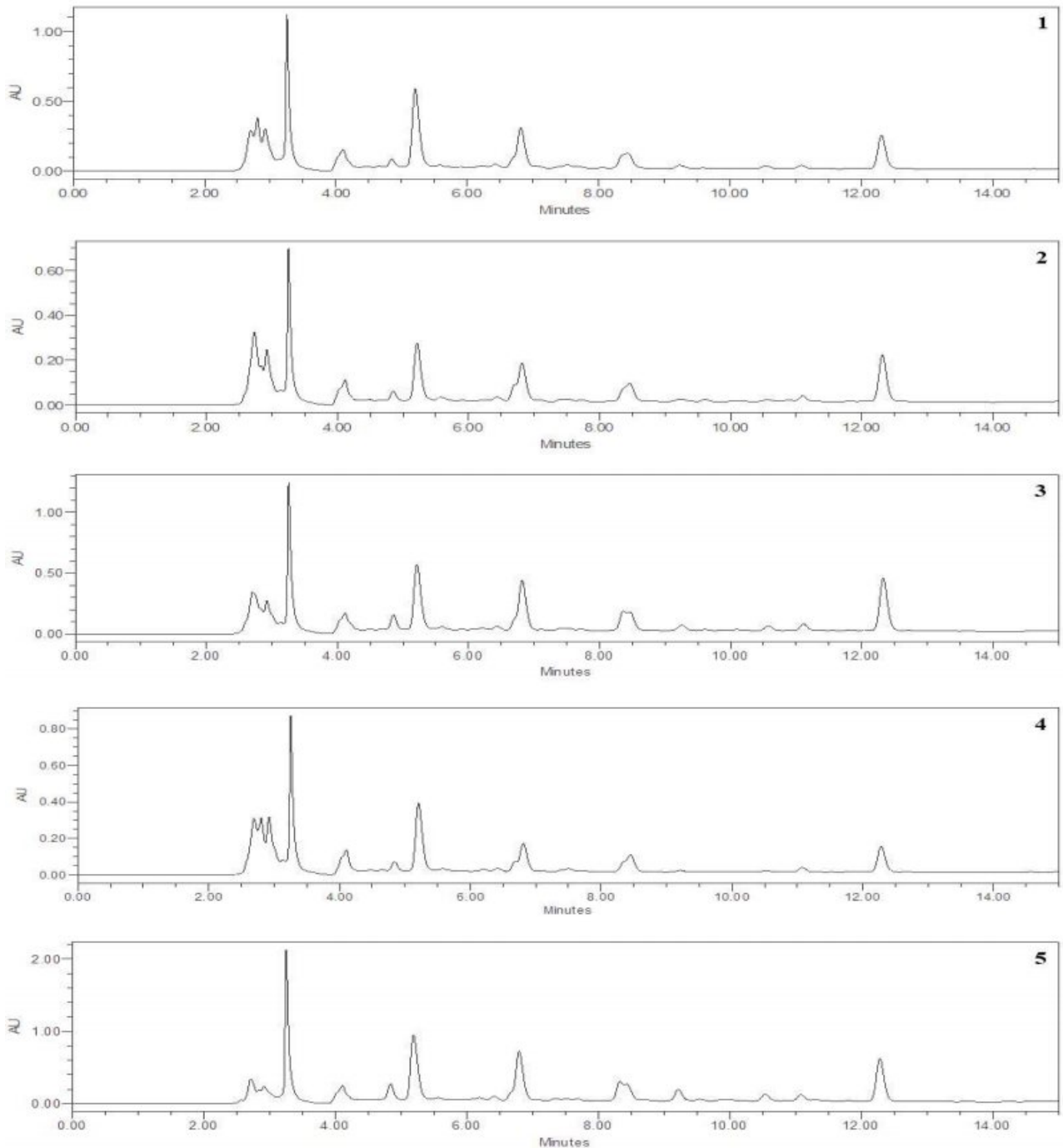
##### ■ 원생약 동등성 평가 기준 개발 및 평가

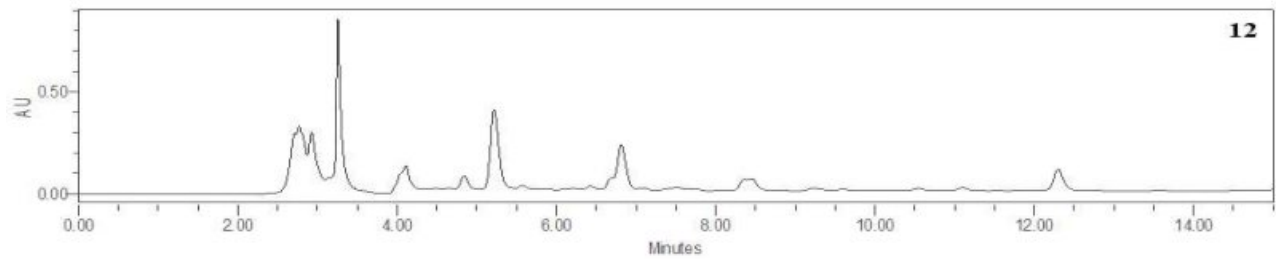
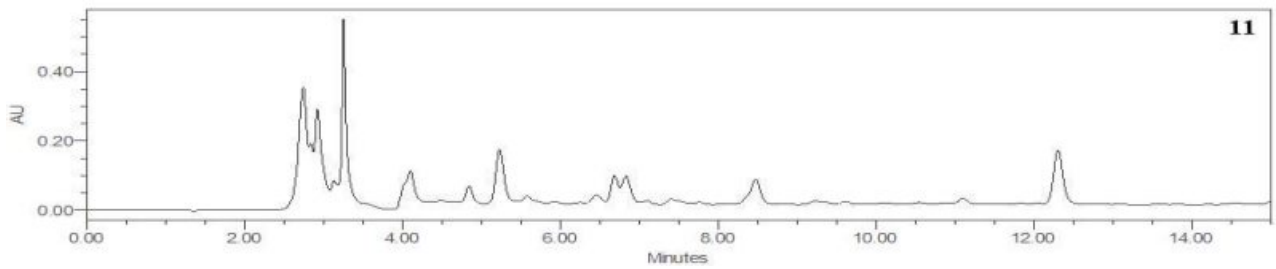
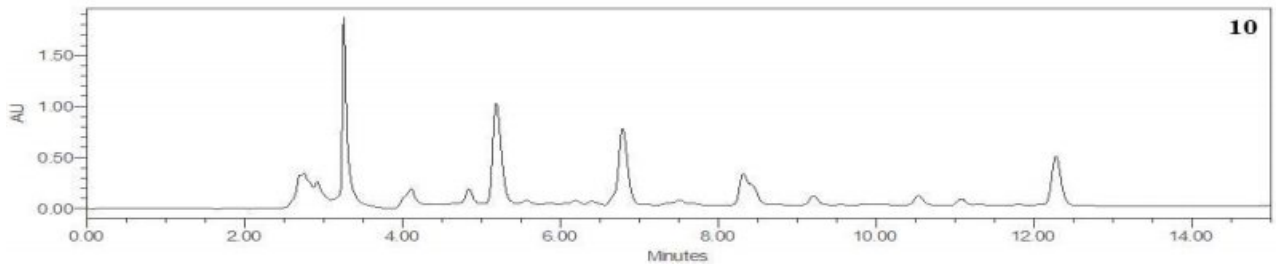
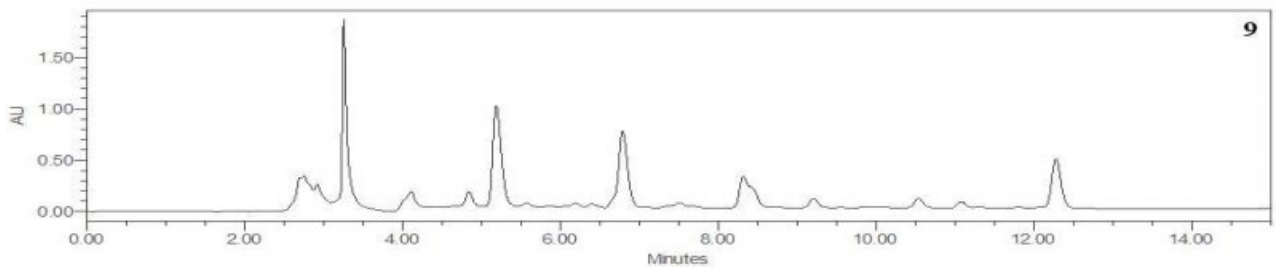
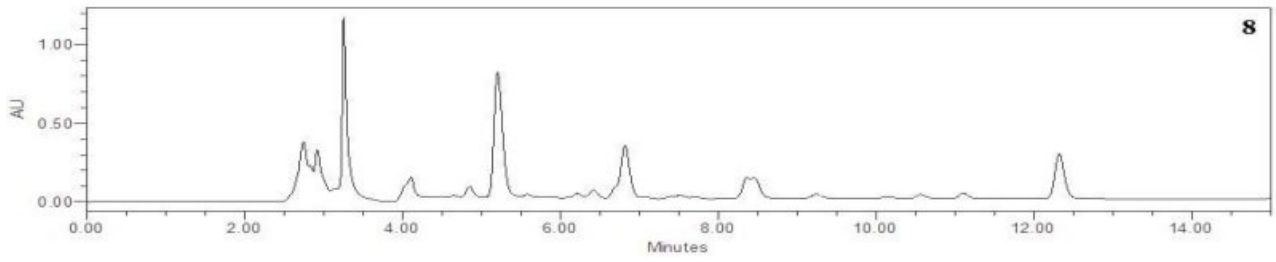
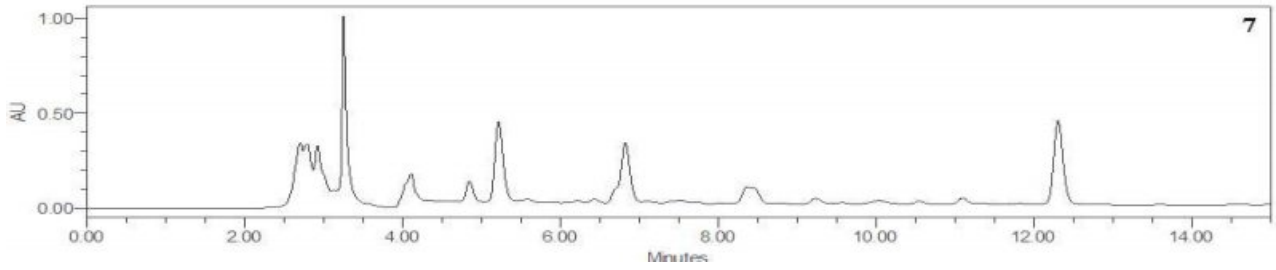
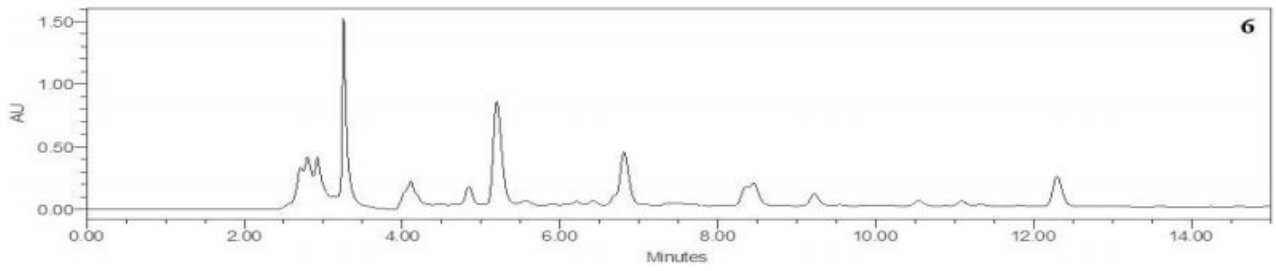
##### ○ 원생약 동등성 평가 기준 설정

- 원생약인 소엽의 재배지역, 판매처에 따른 성분에 대한 동등성 평가를 할 수 있는 기준을 개발하고, 이를 통해 대량생산을 위해 기업에서 구매하는 원생약의 동등성 평가를 지원함으로써 품질관리에 대한 평가 지표를 사용하기 위해 진행함
- 소엽의 동등성평가를 위해 18곳의 판매처에서 소엽을 구매하였으며, 소엽을 분쇄하여 60%에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 함량분석용 시료로 사용함
- 소엽의 재배지 중 경북 영천이 5곳으로 제일 많았고, 이외에 충남 논산(4곳), 경북 의성(3곳), 전북 장수(2곳), 경기 양평, 전북 남원, 대구 달성, 경북 청송 등에서 다양하게 재배되는 것을 확인함



- 소엽 원생약의 동등성 평가 기준 설정을 위해 소엽 원생약에 함유된 지표성분 6개, 즉 A(Prorocatrchuic acid), B(Luteolin-7-*O*-glucoside), C(Caffeic acid), D(Loganin), E(Scutellarein-7-*O*-glucose), F(Rosmarinic acid)의 함량을 확립된 HPLC 분석법을 통하여 확인함
- 평가 기준은 구매한 소엽 60% 에탄올 추출물을 확립된 HPLC 분석법으로 분석하고 모든 peak 중 6개 지표성분의 면적 백분율을 계산하였으며 RSD(Relative Standard Deviation)%를 구하여 동등성 평가 기준을 설정함
- RSD%가 25%이하일 경우 동등성이 확인되어 품질관리에 적합한 지표성분으로 사용 가능하다고 판단하고, 25%보다 높을 시에는 품질관리에 적합하지 않은 지표성분이라고 판단함





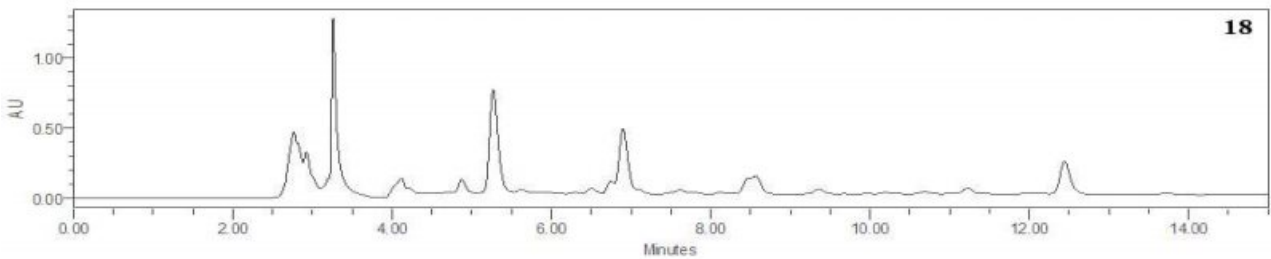
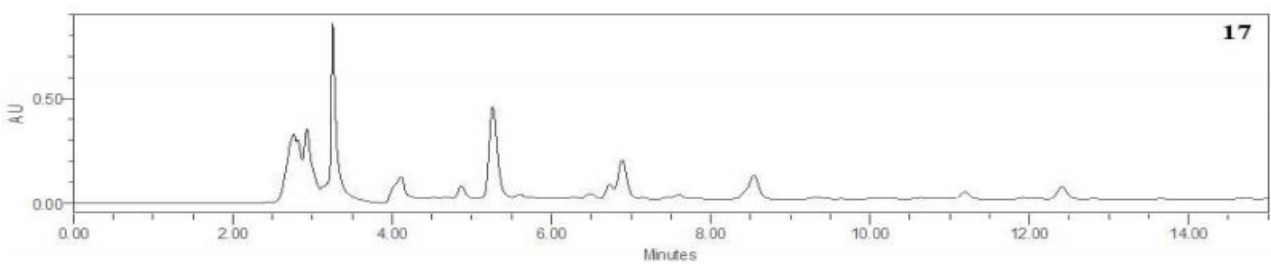
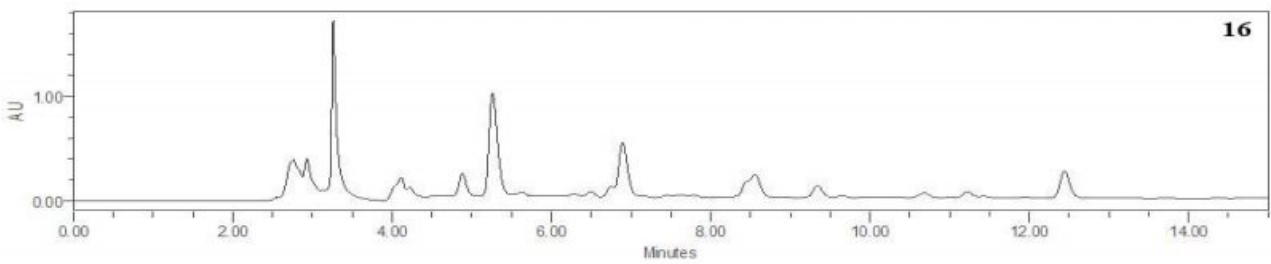
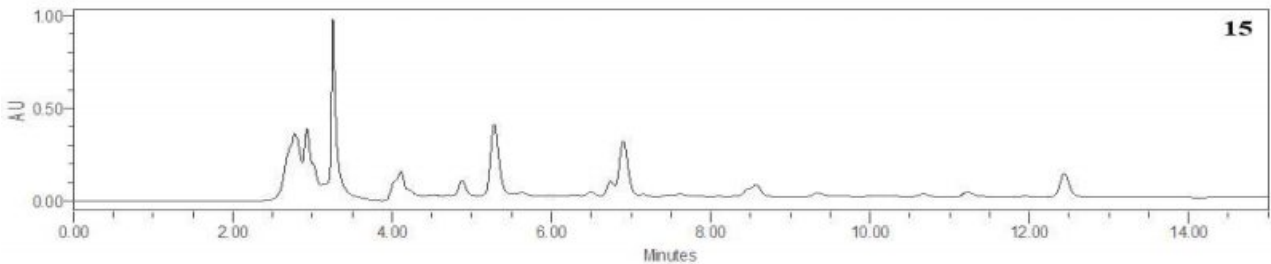
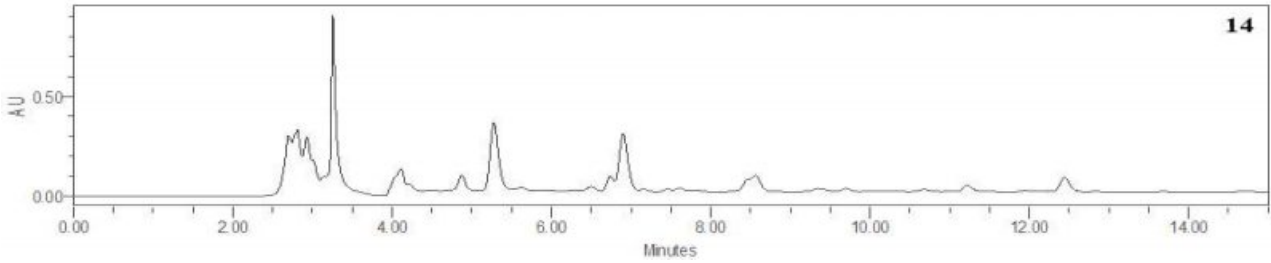
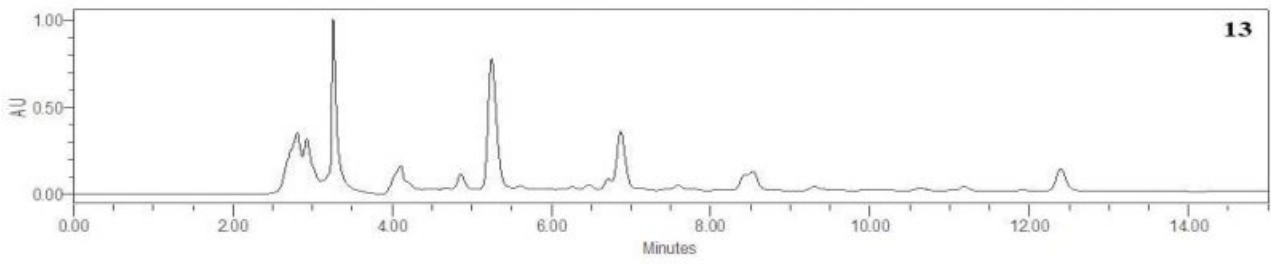


그림 73. 지역별 소엽 에탄올 추출물의 HPLC 크로마토그램

(1: 백년부역, 2: 인차 자소엽, 3: 자연을 말하다, 4: 참두리, 5: 그린내추럴, 6: 한뜻약초,

7: 건강중심, 8: 청명약초, 9: 논산팜, 10: 정우당, 11: 보담 다소니, 12: 건강왕국,

13: 다오니마켓, 14: 조은약초 자연을 담는다, 15: 산골소녀, 16: 천지가 약초, 17: 건방조감, 18: 약초선생)

표 36. 구매처별 소엽 에탄올 추출물의 성분분석

		(Area %)					
구매처	재배지역	A	B	C	D	E	F
백년부엌	충남 논산	1.47	19.5	0.24	11.23	6.03	9.09
인차 자소엽	전북 장수	1.6	12.94	0.33	10.97	6.44	11.67
자연을 말하다	경북 의성	2.52	15.13	0.32	13.27	7.94	13.73
참두리	경북 영천	1.71	16.37	0.21	8.69	6.1	7.03
그린 내추럴	경기 양평	2.9	17.57	0.25	14.9	8.77	13.07
한뜻 약초	경북 의성	2.84	20.35	0.34	11.75	7.13	6.47
건강중심	경북 영천	2.4	13.47	0.23	11.92	5.06	16.08
청명약초	경북 영천	1.5	23.72	0.21	11.54	6.83	9.45
논산팜	충남 논산	2.2	19.72	0.32	15.9	8.81	10.41
정우당	경북 영천	1.62	17.61	0.22	14.29	7.78	10.75
보담 다소니	경북 영천	2.08	8.81	0.4	8.19	4.83	11.26
건강왕국	충남 논산	2.16	16.6	0.47	11.22	4.29	5.17
다오니마켓	충남 논산	2.21	24.8	0.24	12.41	6.11	4.5
조은약초							
자연을 담는다	전북 장수	2.78	15.56	0.27	10.3	5.24	3.82
산골소녀	경북 의성	2.6	14.67	0.33	13.11	3.4	5.54
천지가 약초	전북 남원	3.48	20.64	0.31	12.96	7.72	6.15
건방조감	경북 청송	1.83	19.14	0.32	10.73	6.58	2.83
약초선생	대구 달성	1.98	19.73	0.26	15.2	6.16	7.74
	mean	2.22	17.57	0.29	12.14	6.40	8.60
	SD	0.56	3.90	0.07	2.10	1.49	3.72
	RSD%	25.28	22.19	23.77	17.32	23.24	43.28

- HPLC분석 결과 소엽 원생약의 동등성 평가 기준 설정을 위해 소엽 원생약에 함유된 지표성분 중 5가지 A(Prorocatrchuic acid), B(Luteolin-7-O-glucoside), C(Caffeic acid), D(Loganin), E(Scutellarein-7-O-glucose)의 RSD%는 25%이하로 동등성이 확인되었으나 F(Rosmarinic acid)의 경우 RSD%가 25%보다 높은 것으로 확인되었으며, 이는 Rosmarinic acid는 소엽의 품질관리 지표성분으로 적절하지 않다고 판단함.

■ 소엽추출물 및 유효성분이 세포생존율에 미치는 영향 검증

○ 소엽 추출물의 세포독성 평가(MTT assay)

- 소엽 100%, 80% 및 60% 에탄올 추출물이 어느 정도의 농도에서 세포독성이 있는지를 확인함으로써 다음 실험의 농도를 정하기 위해 세포독성평가를 실시하였으며 이 평가는 MTT assay를 이용하여 확인함
- 소엽을 분쇄하여 100%, 80% 및 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 DMSO에 녹여 세포실험의 시료로 사용함. 독성평가에 사용한 세포는Rat의 adrenal medulla에 발생한 pheochromocytoma에서 유래된 세포인 PC12 세포를 이용하였으며, 각 실험군 마다 100, 20, 4μg/mL의 농도로 실험을 진행함
- 세포독성 판정기준은 세포생존율이 80% 이상일 때에는 독성이 없다고 생각되는 것으로 판단함.

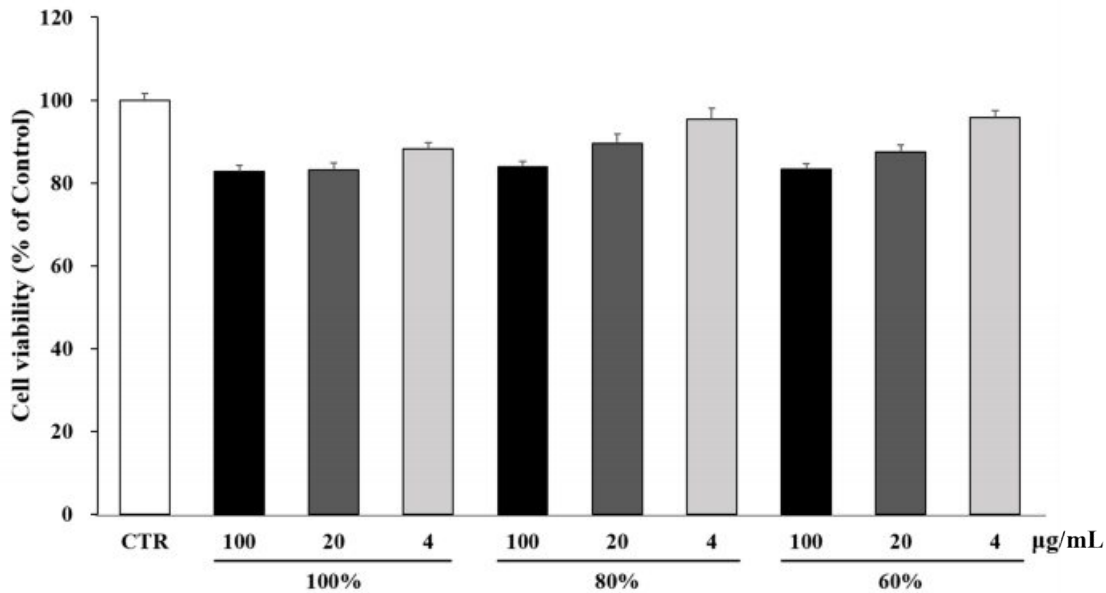


그림 74. 소엽 에탄올 추출물의 MTT assay 결과

- MTT assay 결과 소엽의 100%, 80% 및 60%에탄올 추출물은 100, 20, 4µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 80%이상으로 세포독성이 없다고 판단되었음.

○ 소엽 추출물의 세포독성 평가(LDH assay)

- 소엽 100%, 80% 및 60% 에탄올 추출물에 대한 세포독성 평가를 하기 위해 LDH assay를 통하여 검증함
- LDH assay는 젖산탈수소효소(Lactate Dehydrogenase, LDH)를 측정하는 방법의 세포독성 평가로, 세포내에 존재하는 젖산탈수소효소(LDH)는 세포가 사멸함으로써 원형질막이 손상되어 배지로 방출되는데, 이때 방출되는 LDH양을 검출하여 측정함으로써 세포독성을 평가하는 방법임
- 시료는 소엽을 분쇄하여 100%, 80% 및 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 DMSO에 녹여 세포실험의 시료로 사용함. 독성평가에 사용한 세포는 Rat의 adrenal medulla에 발생한 pheochromocytoma에서 유래된 세포인 PC12 세포를 이용하였으며, 각 실험군 마다 100, 20, 4µg/mL의 농도로 실험을 진행함.

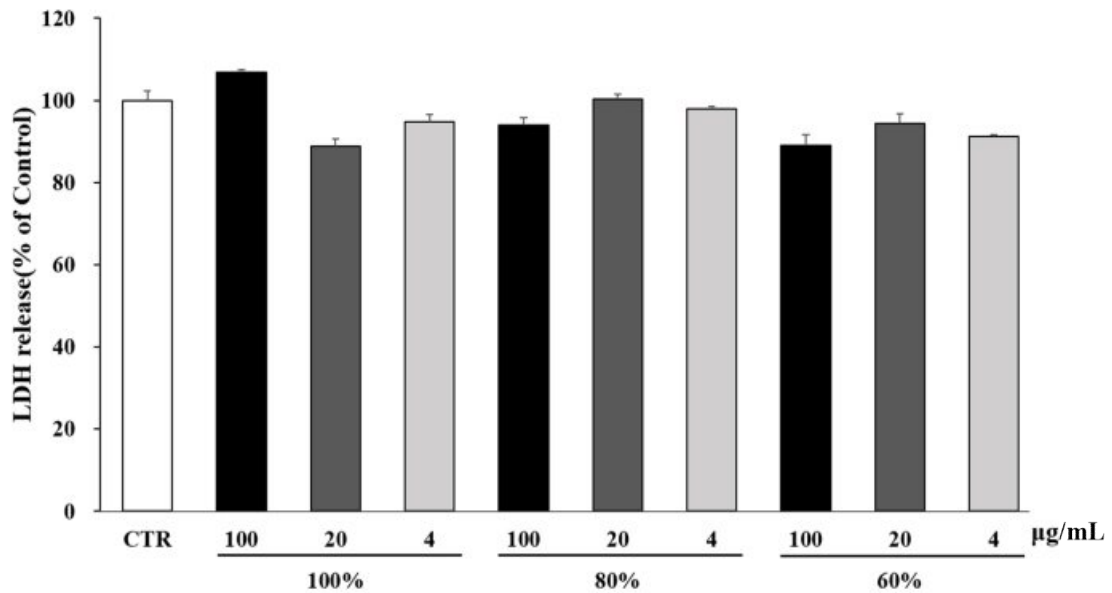
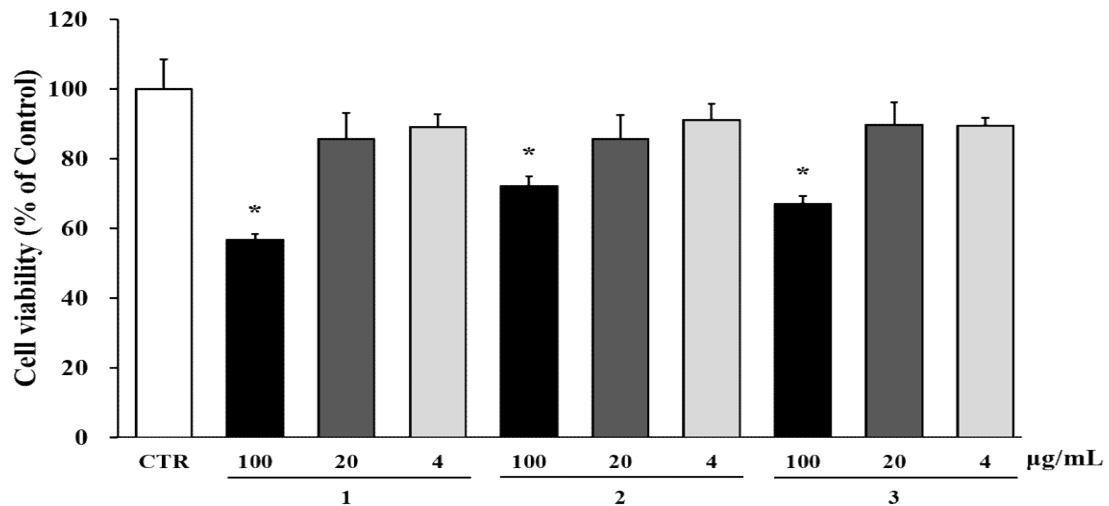


그림 75. 소엽 에탄올 추출물의 LDH assay 결과

- LDH assay로 세포독성을 평가한 결과 89~108%의 범위로 측정되었고, 추출용매에 따른 소엽 추출물 100, 20, 4μg/mL의 농도에서 세포독성이 없다고 판단됨

○ 소엽 유효성분의 세포독성평가(MTT assay)

- 디클로로메탄층에서 분리된 3개의 트리테르페노이드(1: ursolic acid, 2: tormentic acid, 3: corosolic acid)가 측정 농도에서 세포독성이 있는지를 확인 하기 위해 MTT assay를 통해 확인함.
- 디클로로메탄층에서 분리된 3개의 트리테르페노이드를 DMSO에 녹여 실험 시료로 사용하였으며, 독성평가에 사용한 세포는 Rat의 adrenal medulla에 발생한 pheochromocytoma에서 유래된 세포인 PC12 세포를 사용하였고, 각 실험군 마다 100, 20, 4μg/mL의 농도로 실험을 진행함.



\*  $p < 0.05$ , compared with the control

그림 76. 소엽 디클로로메탄층에서 분리된 트리테르페노이드의 세포독성평가 (1: ursolic acid, 2: tormentic acid, 3: corosolic acid)

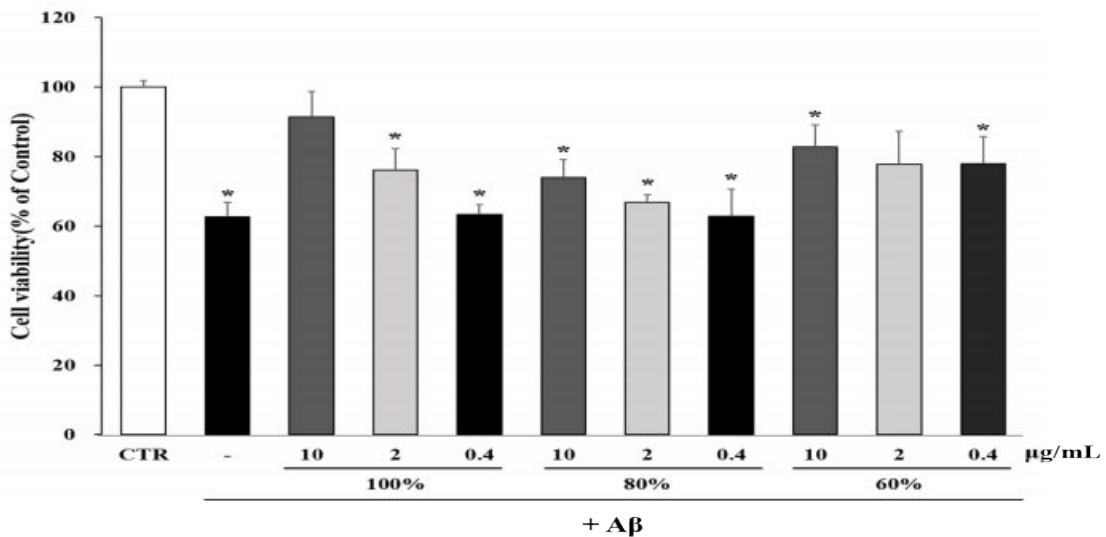
- MTT assay를 통하여 세포독성평가를 확인한 결과 화합물 1-3은 100μg/mL의 농도에서 모두 세포독성이

있는 것으로 판단되었으며, 20, 4 $\mu$ g/mL의 농도에서는 독성이 없는 것으로 판단됨. 그러므로 3개의 트리 테르페노이드에 대한 실험 진행 시 처리 농도는 세포독성이 없다고 판단된 20 $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 진행함.

■ 소엽 추출물 소재 및 유효성분이 세포 보호 효과 검증

○ 소엽 추출물의 세포 보호 효과 검증(MTT assay)

- 소엽의 100%, 80% 및 60% 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제함으로써 신경세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시함
- 베타-아밀로이드는 응집 시 신경독성을 유발하게 되는데, 응집억제의 효과가 있다고 확인된 소엽의 추출 물을 베타-아밀로이드에 처리하여 응집시킴으로써, 베타-아밀로이드의 응집을 억제함으로써 세포독성이 억제되었으며, 억제된 만큼 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 확인하고자 PC12 cell을 이용하여 MTT assay를 측정함
- 소엽을 분쇄하여 100%, 80% 및 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 DMSO에 녹여 세포실험의 시료로 사용함. PC12 cell을 통해 세포독성 평가를 진행하였으며, 소엽 추출물의 측정 농도는 10, 2, 0.4  $\mu$ g/mL로 진행함
- 실험 방법은 베타-아밀로이드와 소엽 에탄올 추출물을 함께 섞어 24시간 동안 37°C에서 방치하여 베타아밀로이드가 응집하도록 한 후 PC12 cell에 처리하여 세포생존율을 MTT assay를 통해 평가함



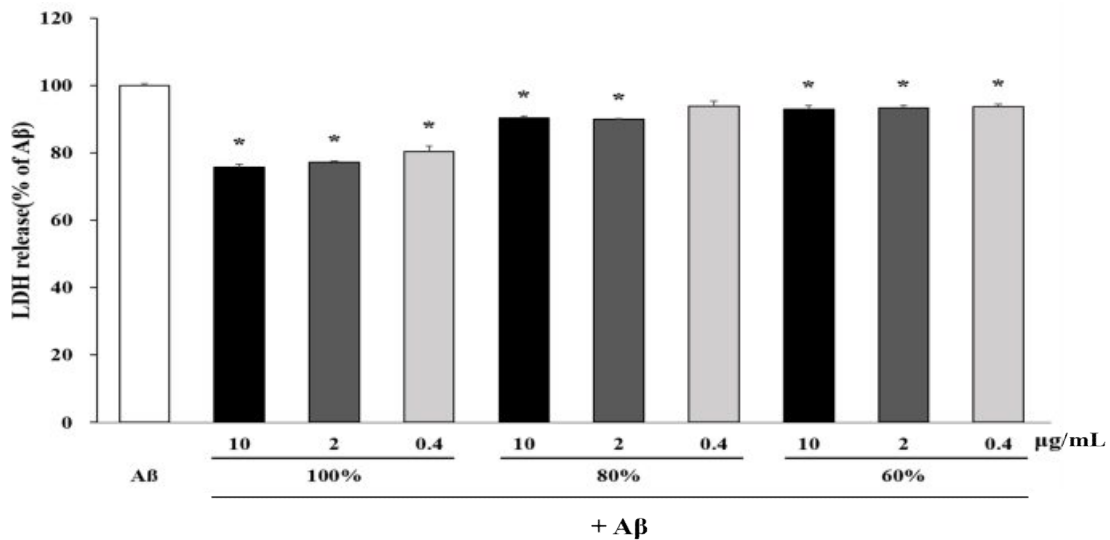
\*  $p < 0.05$ , compared with the control

그림 77. 소엽 에탄올 추출물의 세포보호효과 (MTT assay)

- 소엽 에탄올 추출물의 세포보호효과 실험 결과 베타-아밀로이드만 처리한 실험군은 베타-아밀로이드의 응집체에 의해 유발된 독성으로 세포생존율이 60%로 감소하였음. 반면 베타아밀로이드와 소엽추출물을 함께 incubation한 경우 세포 생존율이 증가한 것을 볼 수 있었으며, 소엽 에탄올 추출물의 농도 구배적으로 세포 생존율은 증가하였음. 이는 소엽 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드의 응집을 억제시켜 베타아밀로이드에 의해 유발된 세포독성이 감소하였기 때문임.

○ 소엽 추출물의 세포 보호 효과 검증(LDH assay)

- 소엽 100%, 80%, 60% 에탄올 추출물이 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제하고 신경 세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시함
- 베타-아밀로이드는 응집 시 세포독성을 유발하게 되는데 소엽 추출물을 베타-아밀로이드에 처리함으로써 베타아밀로이드 응집체 형성을 억제하게 되며, 억제된 만큼 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 LDH assay를 이용하여 평가하였음, 세포는 PC12 cell을 사용하였으며, 시료는 소엽을 분쇄하여 100%, 80%, 60% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하고, 여과하고 감압 농축하여 DMSO에 녹여 세포실험의 시료로 사용함 (10, 2, 0.4µg/mL)



\*  $p < 0.05$ , compared with the Aβ

그림 78. 소엽 에탄올 추출물의 세포보호효과 (LDH assay)

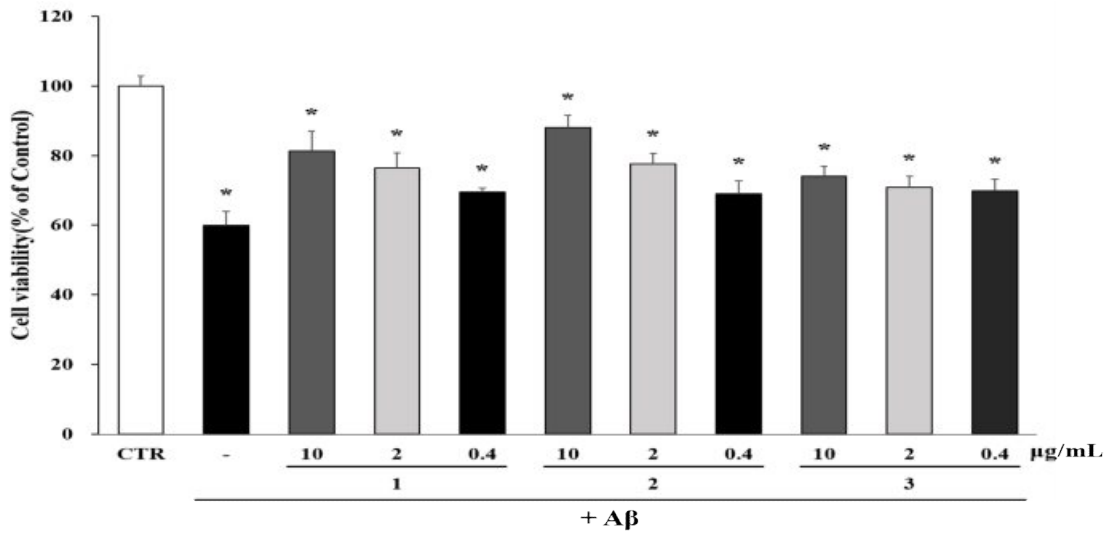
- 소엽 에탄올 추출물의 세포보호효과를 확인 한 결과 베타아밀로이드만 처리한 대조군 보다 소엽 추출물을 처리한 실험군에서 세포생존율이 높게 나왔음. 또한 100% 에탄올 추출물 처리군의 세포 생존율이 더 높았는데 이는 각 에탄올 추출물의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 시험하였을 때 100% 에탄올 추출물이 억제능이 가장 높았던 결과와 연관 있을 것이라고 생각됨. 앞선 MTT assay를 이용한 세포보호효과를 통해 확인한 결과와 일치했으며, 이는 소엽 추출물이 베타-아밀로이드의 응집을 억제시켜 세포독성을 감소시켰을 것으로 판단함.

○ 소엽 유효성분의 세포 보호 효과 검증(MTT assay)

- 소엽 디클로로메탄층에서 분리된 3개의 트리테르페노이드(1: ursolic acid, 2: tormentic acid, 3: corosolic acid)가 베타-아밀로이드 응집체가 유발하는 세포독성을 억제하고 신경세포를 보호하는 효과가 있는지를 평가하기 위해 실시함
- 베타-아밀로이드는 응집 시 세포독성을 유발하게 되는데 소엽 유효성분인 ursolic acid, tormentic acid, corosolic acid를 베타-아밀로이드에 처리함으로써 베타아밀로이드 응집체 형성을 억제하게 되며, 억제된 만큼 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 MTT assay를 이용하여 평가하였음, 세포는 PC12 cell을 사용하였으며, 시료는 소엽의 디클로로메탄 분획층에서 분리한 3종의 트리테르페노이드를 DMSO



에 녹여 세포실험의 시료로 사용함 (10, 2, 0.4µg/mL)



\*  $p < 0.05$ , compared with the control

그림 79. 소엽 디클로로메탄층에서 분리한 트리테르페노이드의 세포보호효과 (MTT assay)  
(1: ursolic acid, 2: tormentenic acid, 3: corosolic acid)

- 소엽의 디클로로메탄층에서 분리한 3종의 트리테르페노이드(1 : ursolic acid, 2 : tormentenic acid, 3 : corosolic acid)의 세포보호효과를 확인 한 결과 베타-아밀로이드를 처리한 실험군의 경우 세포 생존율이 베타-아밀로이드 응집체에 의해 유발된 독성으로 인해 세포 생존율이 약 70%까지 감소하였음. 베타-아밀로이드와 소엽에서 분리한 트리테르페노이드를 함께 incubation 한 결과 세포 생존율이 증가하였으며, 이는 소엽의 트리테르페노이드가 베타-아밀로이드의 응집을 억제시켜 베타아밀로이드에 의해 유발된 세포 독성이 감소하였기 때문임. 특히 tormentenic acid의 생존율이 가장 높아, 세포보호능이 제일 뛰어난 것으로 판단됨

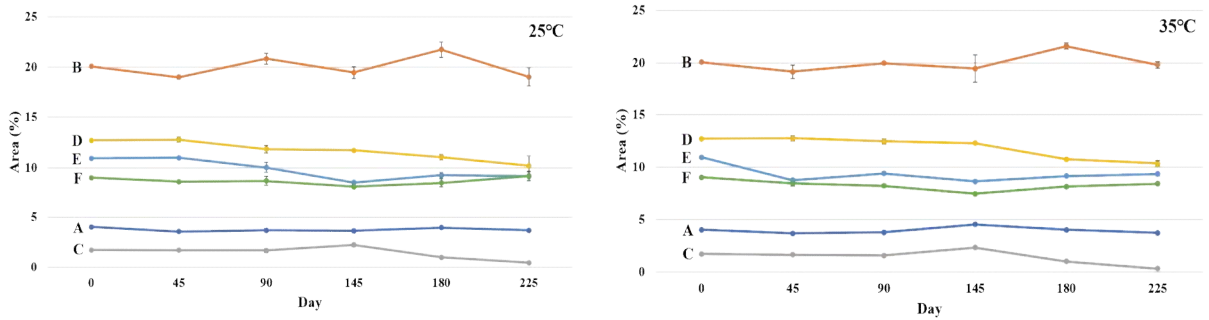
### ■ 소엽 추출물 소재의 저장 안정성 평가

#### ○ 소엽 에탄올 추출물의 안정성 평가

- 소엽 에탄올 추출물이 저장 온도와 저장 기간에 따라 6가지 지표성분(prorocatrchuic acid, luteolin-7-O-glucoside, caffeic acid, loganin, scutellarein-7-O-glucose, rosmarinic acid)에 대한 안정성을 확인하기 위하여 소엽 60%, 80% 에탄올 추출물을 각각 25°C, 35°C, 40°C에서 보관 후 45일 간격으로 225일까지 확립된 HPLC 분석조건을 이용하여 평가함
- 소엽을 분쇄하여 60%, 80% 에탄올로 12시간씩 2회 추출하였음. 모든 추출액은 여과하고 감압 농축하여 저장 날짜마다 3개의 저장용기에 각각 20mg씩 소분하여 해당 온도에 저장 후 안정성평가 시료로 사용함
- 소엽 추출물을 HPLC 분석법으로 분석한 후 모든 피크에 대한 6가지 지표성분의 면적 백분율을 평가하여 소엽추출물 소재의 안정성 평가를 실시함

A)

B)



C)

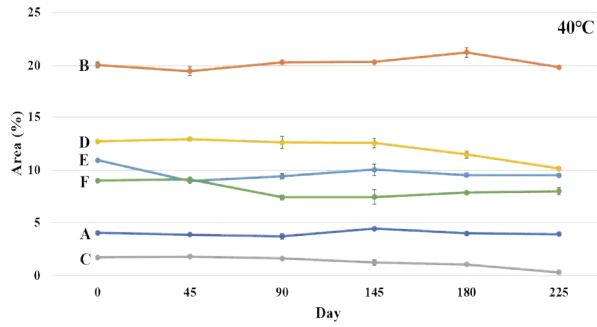
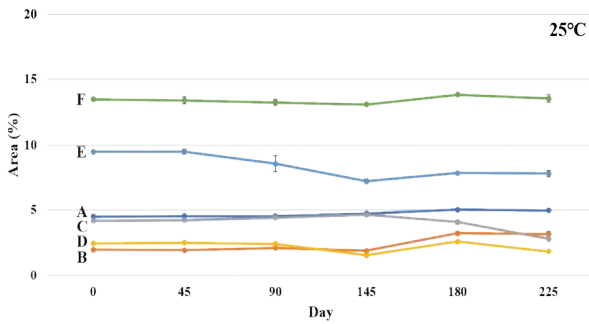


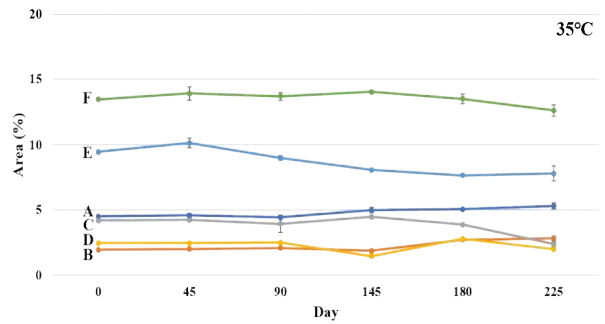
그림 80. 소엽 60% 에탄올 추출물 안정성평가

(A : protocatechuic acid, B : luteolin-7-*O*-glucoside, C : caffeic acid, D : loganin, E : scutellarein-7-*O*-glucoside, F : rosmarinic acid)

A)



B)



C)

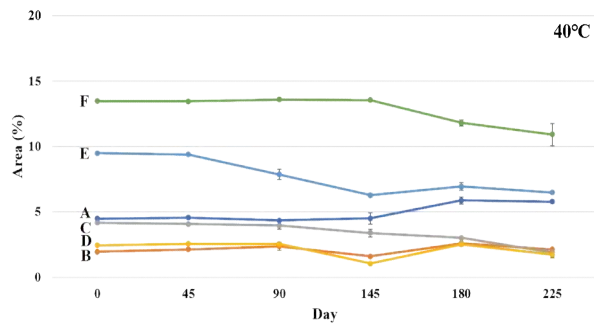


그림 81. 소엽 80% 에탄올 추출물 안정성평가

(A : protocatechuic acid, B : luteolin-7-*O*-glucoside, C : caffeic acid, D : loganin, E : scutellarein-7-*O*-glucoside, F : rosmarinic acid)

glucoside)의 경우 60%, 80%에탄올 추출물 모두에서 감소하는 경향을 보임. 또한 두 에탄올 추출물을 40°C에서 저장시에는 F(rosmarinic acid)가 감소하는 경향을 보였으며, 이는 rosmarinic acid가 온도에 영향을 많이 받는다고 판단됨.

■ 소엽추출물의 인지기능개선 효능 평가(*in vivo*)

(1) 60% 주정 소엽 추출물

○Y-maze test

- 실험동물의 단기 기억력을 평가하기 위하여 Y-maze 시험을 진행하였음.
- 변경 행동력을 계산한 결과 정상인 Normal군은 74.7±2.3 %인 반면 Aβ를 주입한 Control군은 61.5±2.1 %로 유의적으로 감소하였고( $P < 0.001$ ), 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 67.1±1.1 %, 72.9±2.4 %, 73.9±2.4 %로 Control군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 DPZ군은 71.7±2.2 %로 나타났음( $P < 0.01$ ).
- 실험동물이 들어간 총 입장 횟수는 Normal군 39.1±2.4회, Control군 34.2±1.8회, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 35.2±2.0회, 35.1±2.5회, 33.5±3.2회, DPZ군 31.3±1.9회로 모든 실험군 간 차이가 없는 것을 확인하였음(그림 74.)

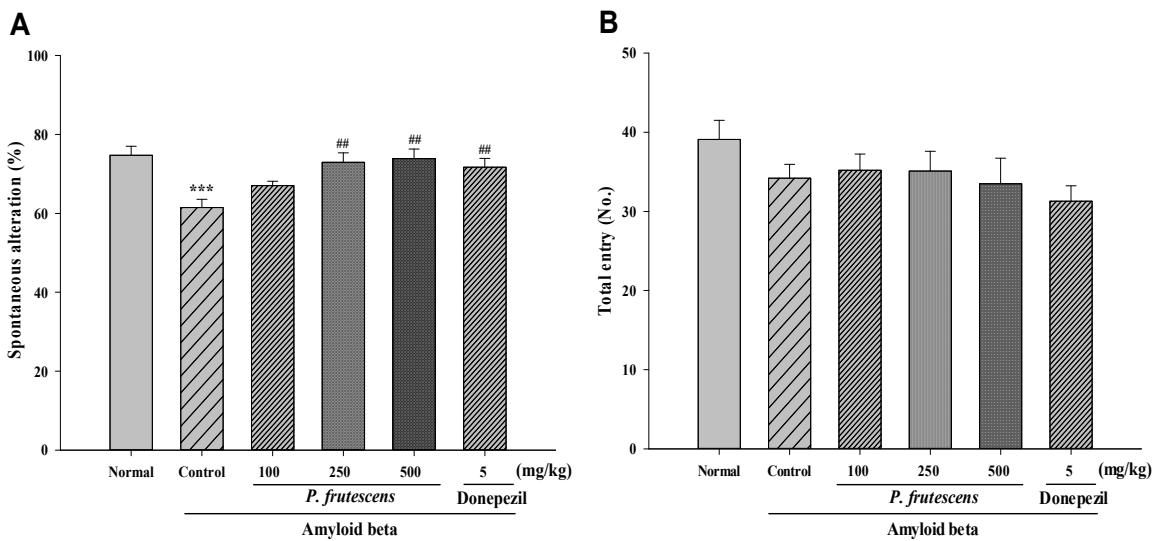


그림 82. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on Aβ-induced memory deficits in Y-maze test. The spontaneous alternation (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with normal group, ##  $P < 0.01$  compared with the control group.

○사물인지실험(novel object recognition test)

- 사물 인지능력 시험은 단기 기억 능력을 확인하는데 이용되며 새로운 환경에 노출된 mouse의 자연적인 탐구 능력에 기초를 둔 빠르고 유용한 실험방법임. 훈련 기간 동안 mouse에 동일한 두 물체를 제시하여 탐색하도록 하였고, 24시간 후 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 대체하였을 때 일반적으로 mouse가 새로운 물체에 더 많은 호기심을 가져 새로운 물체를 탐색하는 횟수가 상대적으로 증가하게 됨.

- 기억력이 손상된 mouse의 경우 기존물체와 새로운 물체를 구분하지 못해 두 물체 간 탐지 횟수에 큰 차이를 보이지 않음.
- 본 실험에서의 사물 인지능력 실험 결과를 살펴보면(Fig. 2A), 정상인 Normal군의 새로운 물체를 인지하는 비율(Novel object)이 68.73±3.7 %로 기존물체를 인지하는 비율(Familiar object)인 31.27±3.7 %와 비교하여 유의적으로 높았음(\*\* $P < 0.001$ ).
- 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군의 경우 새로운 물체 인지 비율이 39.77±3.4 %로 기존물체를 인지하는 비율인 60.23±3.4 %와 비교하여 유의적으로 낮아 인지능력의 손상을 확인하였음(\*\* $P < 0.01$ ).
- 또한 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 55.23±4.1 %에서 44.77±4.1 %, 59.06±3.6 %에서 40.94±3.6 %, 54.71±1.8 %에서 45.29±1.8 %로 기존물체에 비해 새로운 물체를 인지하는 비율이 유의적으로 증가하였으며, control군과 비교했을 때도 유의적으로 높았음(\* $P < 0.05$ ).
- 또한 사물에 대한 판별 능력 측정(Discrimination ratio)에서도 같은 결과를 확인할 수 있었음( $P < 0.01$ , Fig 2B). 이러한 결과로 60% 주정 소엽 추출물이 A $\beta$ 를 주입으로 인해 손상된 사물 인지능력을 개선하는데 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

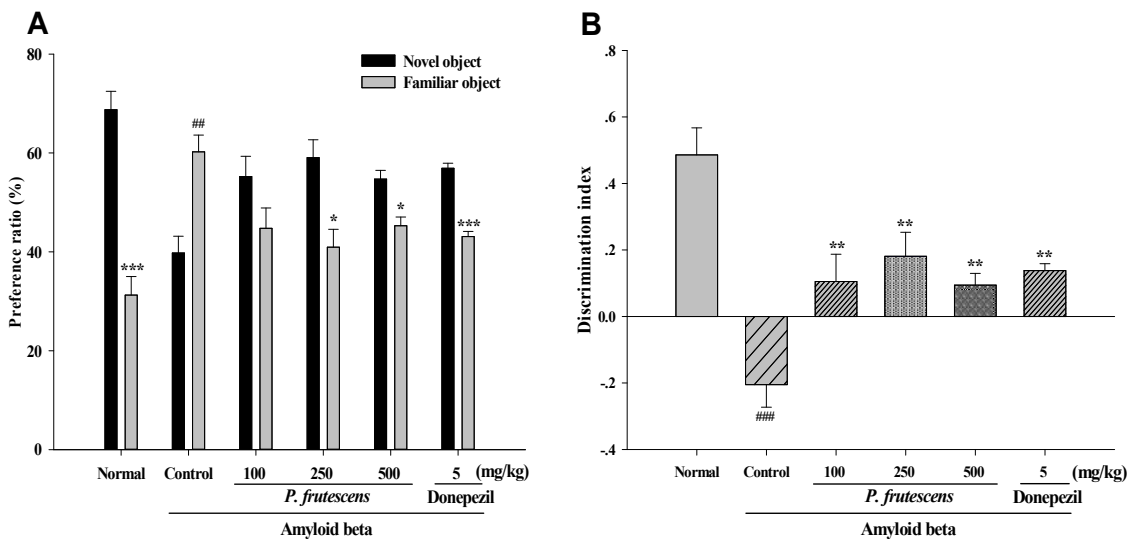


그림 83. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in Novel object recognition test. The preference ratio (A) and the discrimination index (B) in the novel object recognition test are presented. Data are expressed as mean±S.E.M, 8-10 in each group. (A) \*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , novel vs. familiar; (B) ##  $P < 0.01$  when compared with normal group, \*\*  $P < 0.01$  when compared with the control group.

○수동회피실험(passive avoidance test)

- A $\beta$ 를 주입한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg의 투여에 의하여 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였음
- A $\beta$ 를 주입에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 둘째 날 기억 시험인 retention trial에서 정상인 Normal군의 밝은 방에 머무른 시간이 227.2±16.0초인 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군은 26.4±4.9초로 통계적으로 유의성 있게 감소하였음 (\*\* $P < 0.001$ )

- 학습시험 시의 전기충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 Aβ에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각됨
- 반면에 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 90.6±8.5초, 126.9±19.8초, 137.0±9.2초로 농도 의존적으로 증가하였으며(<sup>\*\*\*</sup>*P* < 0.001), 양성대조군으로 사용한 Donepezil군은 170.8±6.4초로 나타났음(<sup>\*\*</sup>*P* < 0.001)
- 반면에 첫째 날 학습시험인 acquisition trial에서의 밝은 방에 머무른 시간은 Normal군 15.0±1.3초, Control군 14.1±2.8초, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 12.1±0.8초, 12.4±1.6초, 12.2±1.3초, Donepezil군 12.0±3.2초로 모든 실험군간 차이가 없는 것을 확인하였음(Fig. 3.)

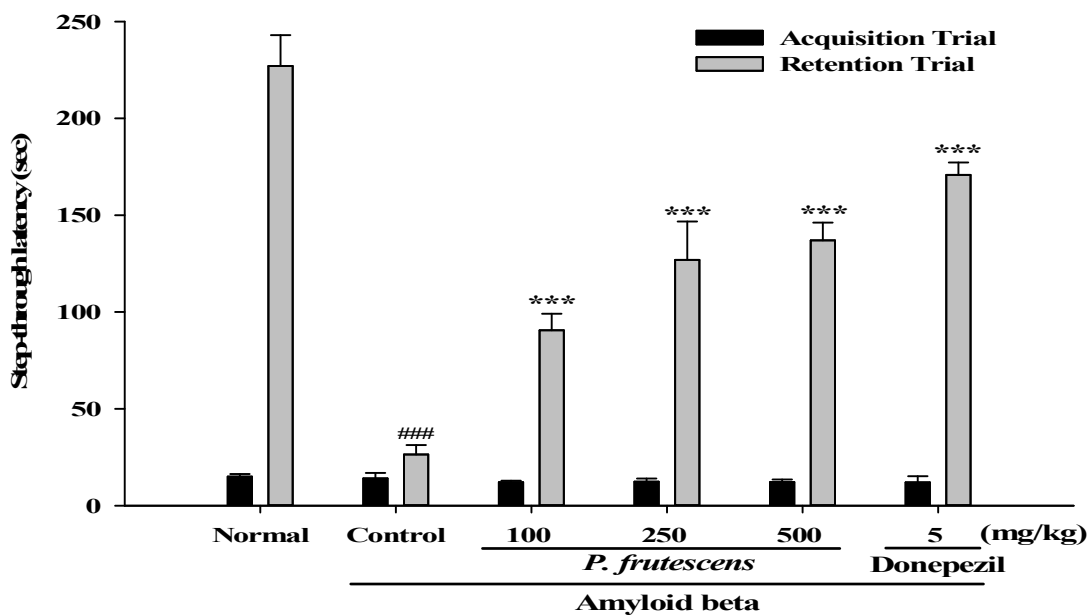


그림 84. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on Aβ-induced memory deficits in passive avoidance test. Latency time was measured and the values shown the mean±S.E.M, 8-10 in each group. ### *P* < 0.001 compared with normal group, \*\*\* *P* < 0.001 compared with the control group.

○Morris water maze test

- Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제1일째에는 정상군(Normal)은 49.73 ± 2.7초, Aβ를 주입한 Control군은 51.60 ± 1.7초, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 49.83±2.5초, 45.4±2.9초, 44.15±2.7초, Donepezil군은 44.93±2.8초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없었음
- 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 정상군(Normal)은 25.53 ± 2.5초, Aβ를 주입한 Control군은 38.35 ± 3.5초, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 29.13±5.2초, 26.4±4.0초, 24.55±2.7초, Donepezil군은 21.28±2.3초로 집단 간 유의성 있는 차이를 보였음 (<sup>\*</sup>*P* < 0.01)

- 측정 일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 Aβ를 주입한 투여군에서 정상군에 비해 학습능력이 현저히 저하되었으며 마찬가지로 주정 소엽 추출물 500 mg/kg 투여군에서도 학습수행에 유의한 증진 효과가 관찰되었는데, 즉 2일째부터 플랫폼에 도달하는 소요 시간이 Aβ를 주입한 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 양성대조군인 Donepezil 투여군 역시 비슷한 수준으로 감소하는 것을 확인하였음 (\**P* < 0.05, Fig. 77A)
- Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유수영을 시행하고 이를 ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였음
- 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, 정상군(Normal)군은 24.24 ± 1.8초인 반면 Aβ를 주입한 Control 투여군이 15.72 ± 0.5초로 유의하게 감소하였고 (*P* < 0.001, Fig. 4B), 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 18.11±1.3초, 22.06±1.2초, 23.64±1.4초로 Aβ를 주입한 Control 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였음 (\*\**P* < 0.001, Fig. 77B)
- Donepezil군 역시 24.41 ± 0.7초로 증가하는 것을 확인하였음 (\*\**P* < 0.001). 이는 60% 주정 소엽 추출물이 장기 및 공간 기억을 개선하는 것을 의미함

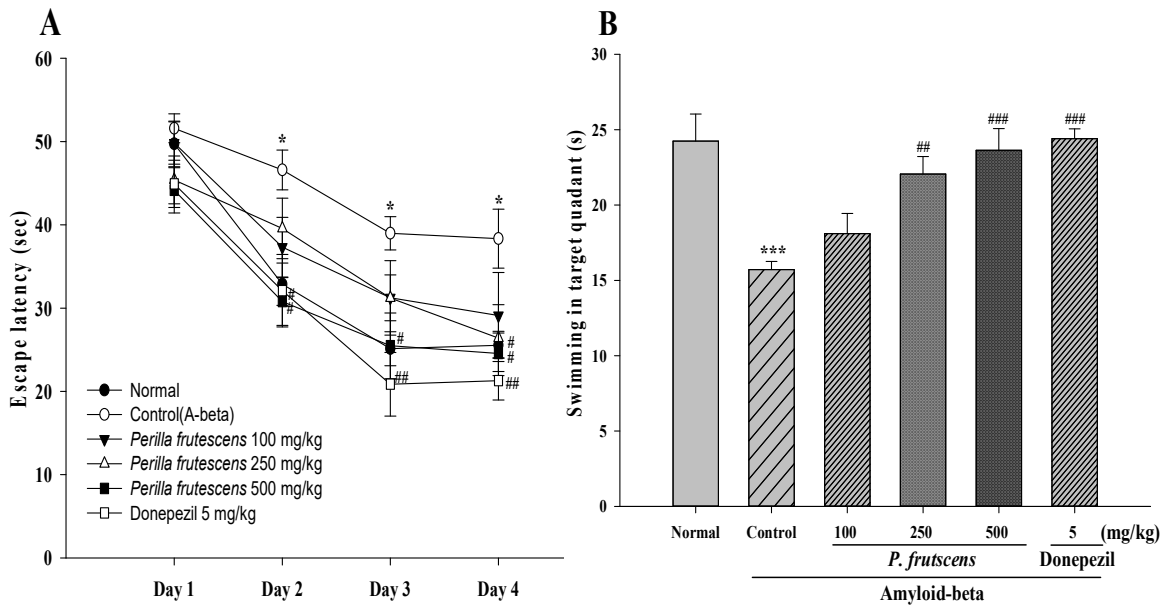


그림 85. Effects of 60% of *Perilla frutescens* on the long-term, spatial reference memory of Aβ-induced mice in Morris water maze test. (A) Escape latency in acquisition phase; (B) Swimming time in target quadrant in probe trial. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \* *P* < 0.05, \*\*\* *P* < 0.001 compared with Normal group, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01, ### *P* < 0.001 compared with the Control group.

○Western blot

- 소엽 60% 알코올 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인
- 그림 5에서 보는 바와 같이 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 iNOS의 단백질

질 양의 증가가 나타났음(\* $P < 0.05$ , Fig. 5)

- 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군에서는 이러한 베타아밀로이드에 의한 iNOS의 단백질량 증가를 유의성 있게 억제됨이 확인되었음
- 소엽 60% 추출물 500 mg/kg 투여군과 양성대조군으로 사용한 도네페질 투여군에서는 비록 유의성은 보이지 않았으나 평균값이 베타아밀로이드 투여군에 비해 각각 51%, 47% 낮은 값이 나타났음. 이상의 결과는 소엽 추출물이 베타아밀로이드에 의한 뇌 염증을 개선할 수 있음을 나타냄 (\* $P < 0.05$ , Fig. 5).

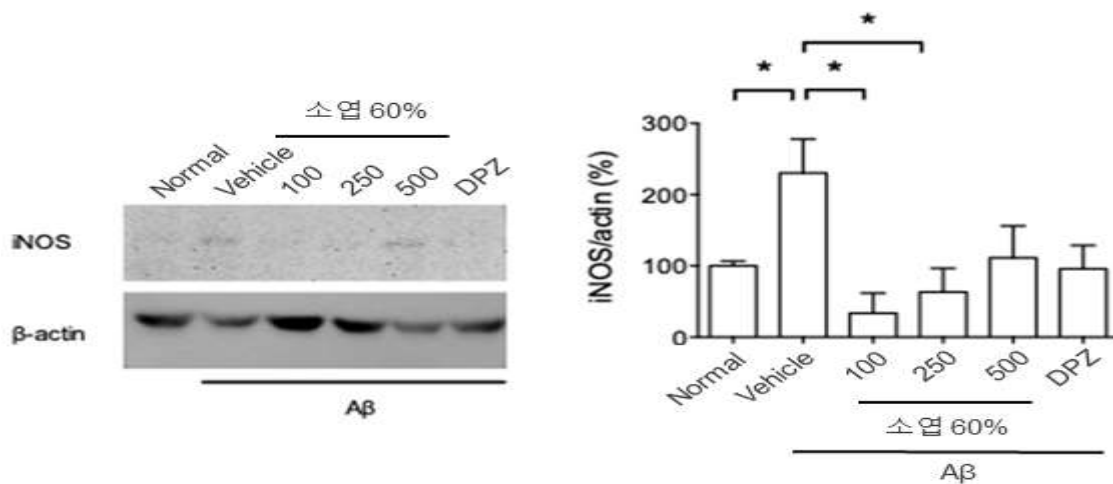


그림 86. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 iNOS 발현증가에 대한 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

○ COX-2 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 COX-2의 단백질량의 증가가 나타났음. 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군 및 DPZ군에서는 이러한 베타아밀로이드에 의한 COX-2의 단백질량 증가를 유의성 있게 억제됨이 확인되었음. 이상의 결과는 소엽 추출물이 베타아밀로이드에 의한 뇌 염증을 개선할 수 있음을 나타냄 (\* $P < 0.05$ , Fig. 6).

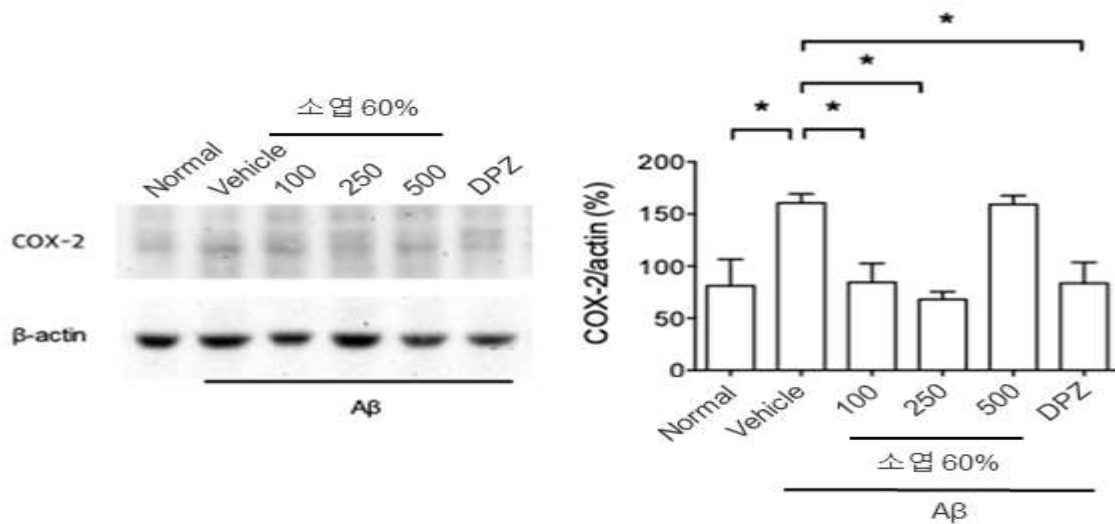


그림 87. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 COX-2 발현증가에 대한 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

○ ADAM10 발현에 미치는 영향

- $\alpha$ -secretase의 활성을 증가시키거나 발현량을 증가시켜 베타아밀로이드의 생성을 줄여 알츠하이머병의 발병을 막을 수 있음. 최근 이러한  $\alpha$ -secretase가 ADAM10이라는 것이 밝혀져 본 연구에서는 소엽 60% 에탄올 추출물이 ADAM10의 발현량에 미치는 영향을 확인해 보았음.
- 베타아밀로이드 단회 투여로는 ADAM10의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도 ADAM10의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음

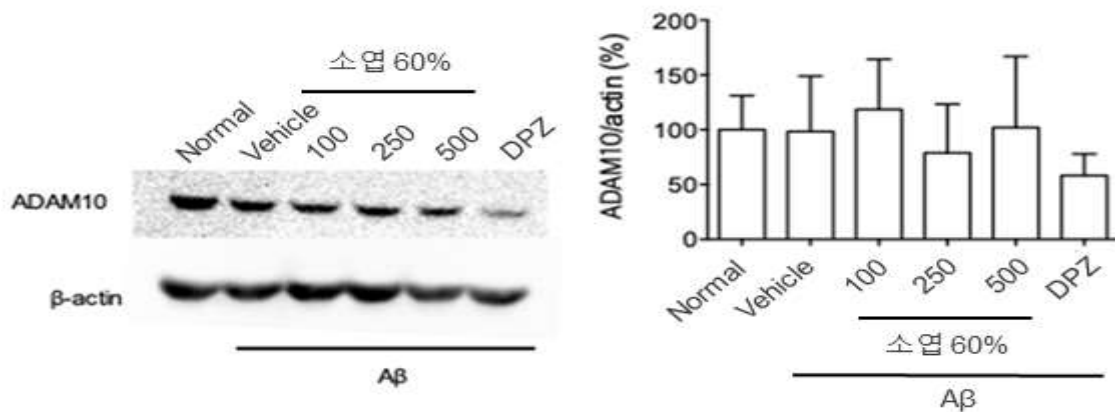


그림 88. 해마에서의 ADAM10 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

○ BACE1의 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백질효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백질분해효소는  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨에 따라서 이들 효소 중 하나만 작동을 하지 않아도 베타아밀로이드의 생성이 불가능하다는 가설을 바탕으로 수많은 연구자들이  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase의 활성을 억제하거나 발현을 억제하는 물질에 대



한 연구를 진행해왔음

- 소엽 60% 에탄올 추출물이 BACE1 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 BACE1의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도 BACE1의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음

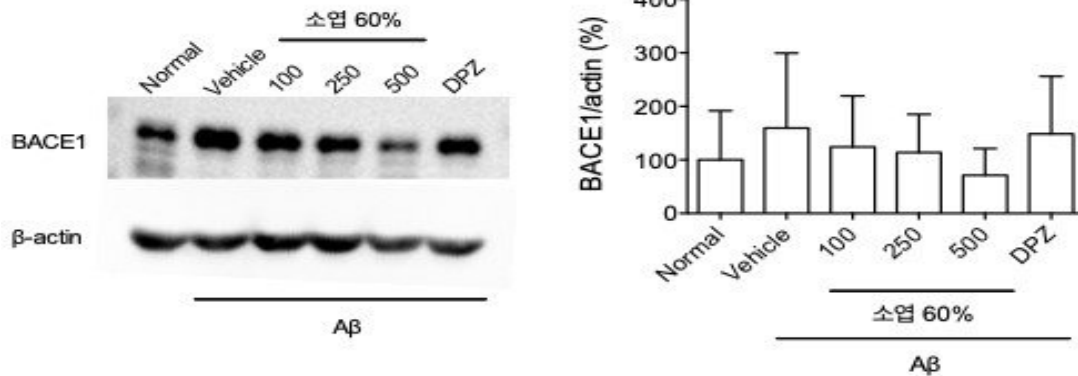


그림 89. 해마에서의 BACE1 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

○ PSD95의 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 시냅스의 기능을 방해하여 기억력 감퇴를 유발함. 단기적으로는 시냅스의 신호전달 교란을 유발하지만, 장기적으로는 시냅스 자체의 소실을 초래함.
- PSD95는 후 시냅스 뉴런의 말단에 존재하는 단백질 중합체로 시냅스 상의 다양한 단백질을 묶어주는 역할을 하고 있음. 따라서 시냅스의 소실은 PSD95의 감소를 초래하게 되고 결과적으로 기억력 감퇴를 초래하게 됨.
- 본 연구에서는 소엽 60% 에탄올 추출물이 PSD95 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 PSD95의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도 PSD95의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 9).

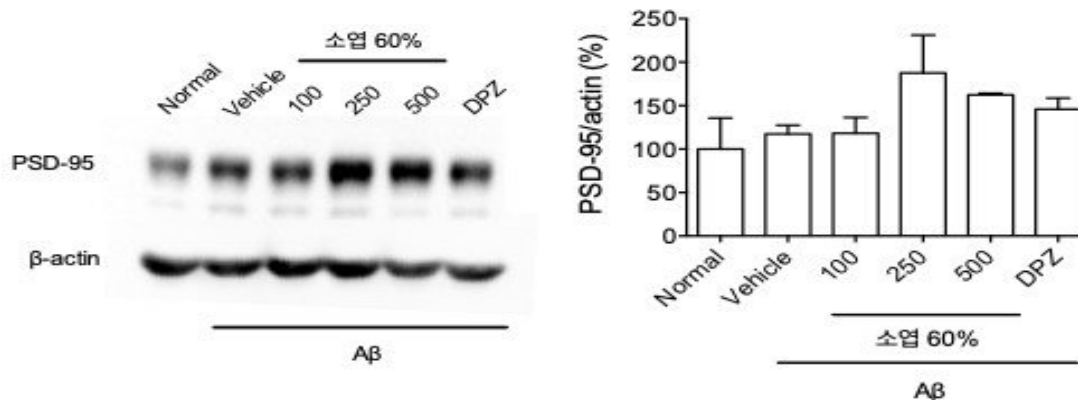


그림 90. 해마에서의 PSD-95 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

○ 면역조직화학(immunohistochemistry)

- 소엽 추출물이 이에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 Iba-1 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음.
- 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 미세교세포 수 증가가 나타났으나 유의성은 없었으며, 소

엽 60% 추출물 투여군 모두와 양성대조군에서는 정상군 수준으로 미세교세포의 수를 감소시켰으나 이 역시 유의성은 없었음(Fig. 10).

- 베타아밀로이드의 조성이 염증을 일으키는 섬유소 형태보다는 시냅스 가소성을 억제하는 올리고머형이 우세할 경우에 나타나는 현상이라고 사료됨

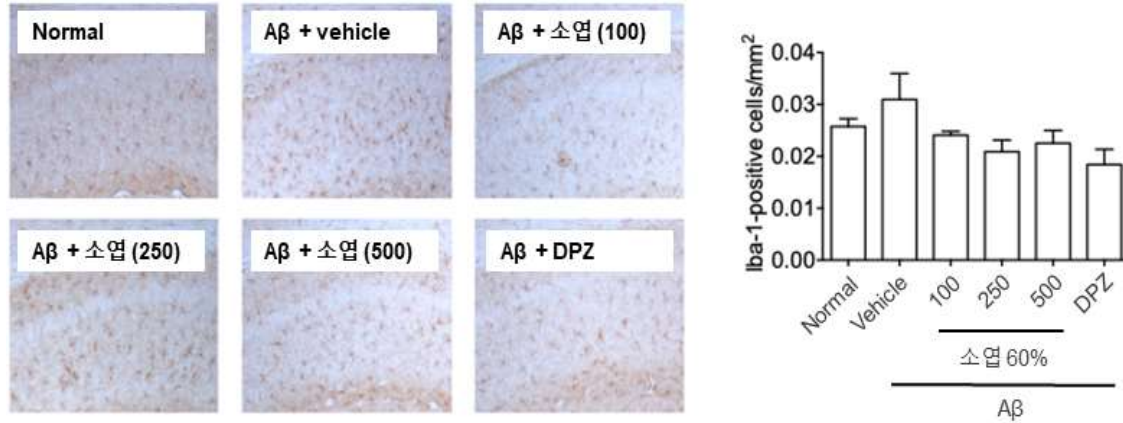


Figure 10. 해마에서의 미세교세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

#### ○성상 세포 활성화에 미치는 영향

- 성상 세포는 혈관-뇌 장벽(Blood-brain barrier)을 형성하여 혈관과 뇌 사이의 물질 이동을 통제하는 교세포라고 알려져 있음.
- 또한 신경전달물질이나 칼륨이온 등을 흡수하여 신경 신호전달이 원활하게 이루어지도록 돕는 기능을 가지고 있음. 하지만 이러한 성상 세포의 기능은 장기 염증반응에 의해 상실되고 오히려 면역세포의 역할을 하게 됨.
- 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드가 성상 세포의 활성화를 유도하는지 확인하고 이에 대한 소엽 추출물의 효과를 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 GFAP 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음.
- 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 성상 세포 수의 증가가 나타났고 이는 통계적으로 유의성이 있었음(\* $P < 0.05$ , Fig. 11). 하지만 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군은 정상군 수준의 성상 세포 수를 보였으며 나머지 군들도 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았음.
- 이는 베타아밀로이드에 의한 성상 세포 활성화가 소엽 60% 추출물에 의해 억제됨을 나타내며, 또한 COX-2와 iNOS의 발현증가가 성상 세포에서 나타나는 현상일 수 있음을 예측할 수 있음(Fig. 11).

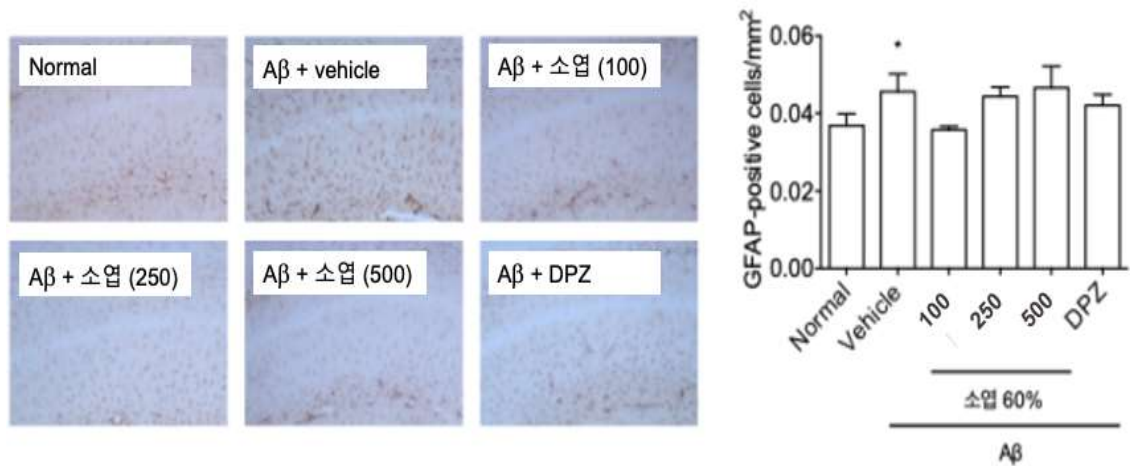


그림 92. 해마에서의 정상 세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

### (1) 80% 주정 소엽 추출물

#### ○Y자 미로 시험 (Y-maze test)

- 정상인 Normal군은 71.7±1.2 %인 반면 Aβ를 주입한 Control군은 58.3±3.0 %로 유의적으로 감소하였고( $P < 0.001$ ), 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 70.4±1.3 %, 73.9±1.5 %, 72.7±1.6 %로 Control군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 Donepezil군은 73.5±1.9 %로 나타났음(\*\* $P < 0.001$ )
- 실험동물이 들어간 총 입장 횟수는 Normal군 29.8±1.9회, Control군 27.9±3.0회, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 31.0±1.4회, 28.6±2.6회, 28.4±1.0회, DPZ군 27.7±1.3회로 모든 실험군 간 차이가 없는 것을 확인하였음

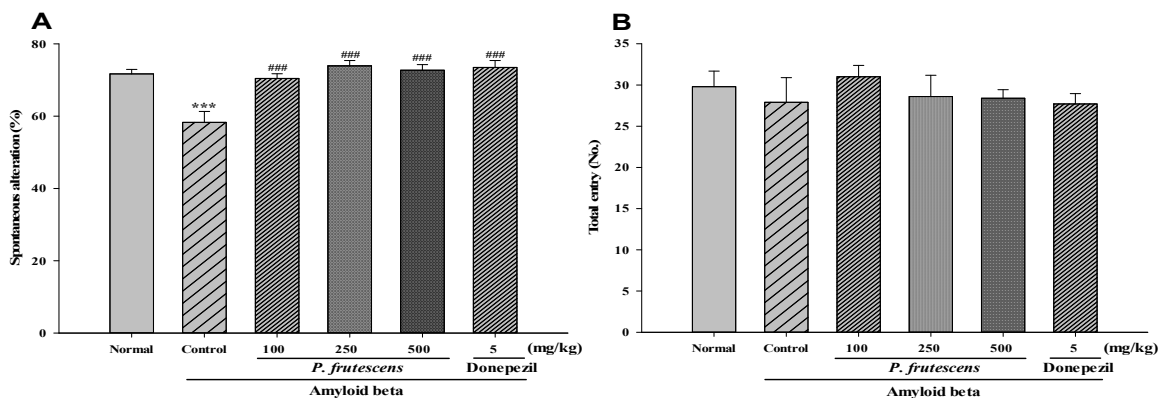


그림 93. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on Aβ-induced memory deficits in Y-maze test. The spontaneous alternation (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with normal group, ###  $P < 0.001$  compared with the control group.

#### ○사물 인지능력 시험 (Novel object recognition test)

- 사물 인지능력 실험 결과를 살펴보면, 정상인 Normal군의 새로운 물체를 인지하는 비율(Novel object)이 73.57 ±3.1 %로 기존물체를 인지하는 비율(Familiar object)인 26.43±3.1 %와 비교하여 유의적으로 높았음(\*\* $P < 0.001$ ).
- 반면 Aβ를 주입한 Control군의 경우 새로운 물체 인지 비율이 55.71±3.9 %로 기존물체를 인지하는 비율인 44.29±3.9 %와 비교하여 두 그룹 간 차이가 없었음.

- 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 75.89±1.9 %에서 24.11±1.9 %, 79.57±1.5 %에서 20.43±1.5 %, 77.20±2.3 %에서 22.80±2.3 %로 기존물체에 비해 새로운 물체를 인지하는 비율이 유의적으로 증가하였으며, control군과 비교했을 때도 유의적으로 높았음(\*\*\*  $P < 0.001$ ).
- 사물에 대한 판별 능력 측정(Discrimination ratio)에서도 같은 결과를 확인할 수 있었음( $P < 0.001$ , Fig 13B). 이러한 결과로 80% 주정 소엽 추출물이 A $\beta$ 를 주입으로 인해 손상된 사물 인지능력을 개선하는데 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

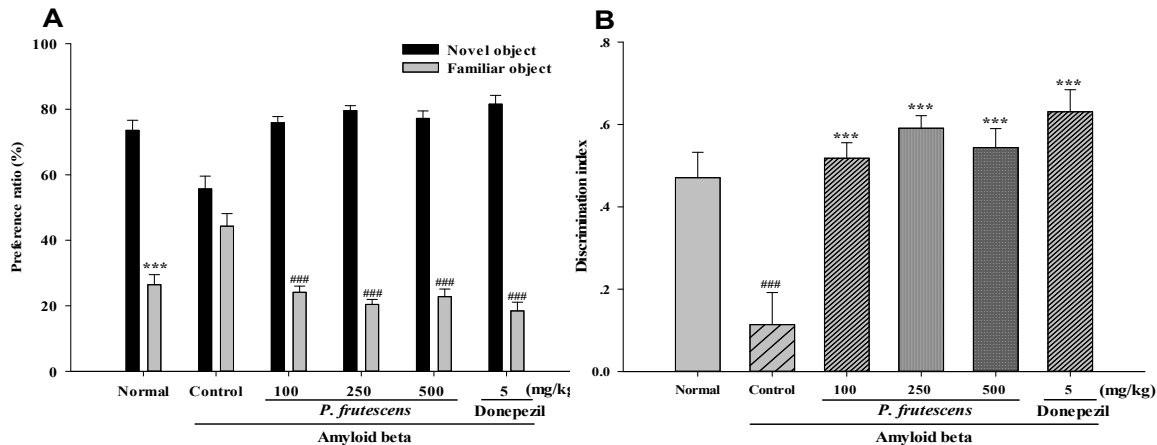


그림 94. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in Novel object recognition test. The preference ratio (A) and the discrimination index (B) in the novel object recognition test are presented. Data are expressed as mean±S.E.M, 8-10 in each group. (A) \*\*\*  $P < 0.001$ , ###  $F < 0.001$ , novel vs. familiar; (B) ###  $P < 0.001$  when compared with normal group, \*\*\*  $P < 0.001$  when compared with the control group.

### (3) 수동회피 시험(Passive avoidance test)

- A $\beta$ 를 주입에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 둘째 날 기억 시험인 retention trial에서 정상인 Normal군의 밝은 방에 머무른 시간이 192.0±38.0초인 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군은 27.1±5.6초로 통계적으로 유의성 있게 감소하였음 ( $P < 0.001$ ).
- 학습시험 시의 전기충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 A $\beta$ 에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각됨.
- 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 165.1±43.9초, 169.7±32.2초, 167.2±43.3초로 농도 의존적으로 증가하였으며( $P < 0.05$ ), 양성대조군으로 사용한 Donepezil군은 198.2±30.8초로 나타났음( $P < 0.05$ ).
- 첫째 날 학습시험인 acquisition trial에서의 밝은 방에 머무른 시간은 Normal군 14.5±2.2초, Control군 13.9±4.3초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 13.7±2.9초, 13.1±2.3초, 13.9±3.1초, Donepezil군 18.9±4.2초로 모든 실험군간 차이가 없는 것을 확인하였음

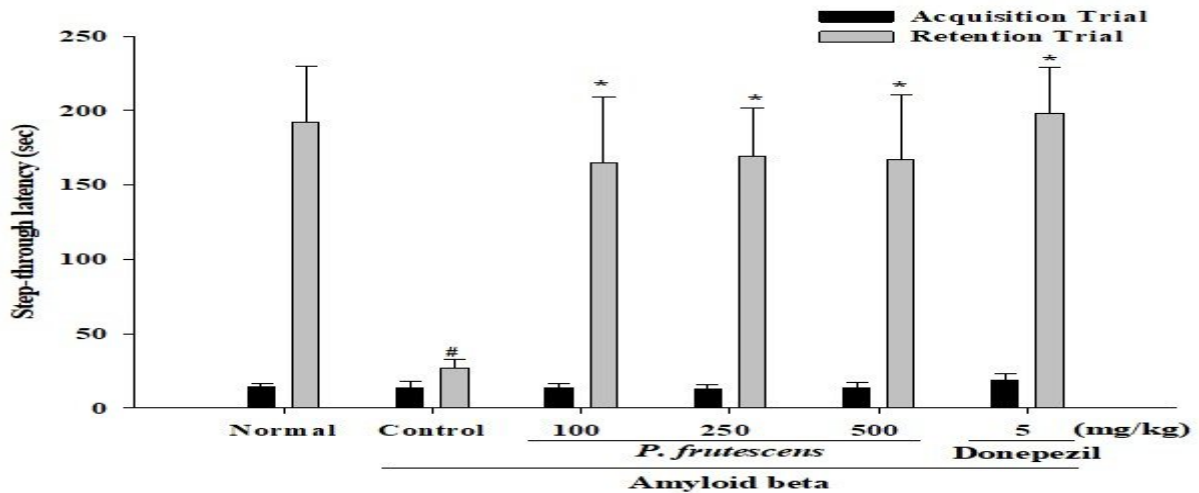


그림 95. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in passive avoidance test. Latency time was measured and the values shown the mean $\pm$ S.E.M, 8-10 in each group. <sup>#</sup>  $P < 0.05$  compared with normal group, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  compared with the control group.

#### (4) 수중미로실험 (Morris water-maze test)

- Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제1일째에는 정상군(Normal)은  $55.85 \pm 2.1$ 초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은  $53.55 \pm 1.9$ 초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각  $54.93 \pm 1.8$ 초,  $53.98 \pm 1.4$ 초,  $54.85 \pm 2.3$ 초, Donepezil군은  $51.68 \pm 2.6$ 초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없음
- 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 정상군(Normal)은  $24.23 \pm 1.6$ 초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은  $50.35 \pm 1.6$ 초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각  $37.73 \pm 4.4$ 초,  $34.63 \pm 4.9$ 초,  $33.48 \pm 2.0$ 초, Donepezil군은  $33.65 \pm 5.2$ 초로 집단 간 유의성 있는 차이를 보였음 ( $P < 0.01$ ).
- 측정 일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 3일째부터 A $\beta$ 를 주입한 투여군에서 정상군에 비해 학습능력이 현저히 저하되었으며 마찬가지로 주정 소엽 추출물 250, 500 mg/kg 투여군에서도 학습수행에 유의한 증진 효과가 관찰되었는데, 즉 3일째부터 플랫폼에 도달하는 소요 시간이 A $\beta$ 를 주입한 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 양성대조군인 Donepezil 투여군 역시 비슷한 수준으로 감소하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.05$ , Fig. 15A).
- Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유수영을 시행하고 이를 ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였음. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, 정상군(Normal)군은  $23.60 \pm 1.7$ 초인 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control 투여군이  $16.27 \pm 1.1$ 초로 유의하게 감소하였고 ( $P < 0.001$ , Fig. 15B), 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각  $16.75 \pm 0.6$ 초,  $22.12 \pm 0.7$ 초,  $21.87 \pm 1.1$ 초로 A $\beta$ 를 주입한 Control 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였음 ( $P < 0.01$ , Fig. 15B).
- Donepezil군 역시  $23.52 \pm 1.5$ 초로 증가하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.01$ ). 이는 80% 주정 소엽 추출물이 장기 및 공간 기억을 개선하는 것을 의미함.

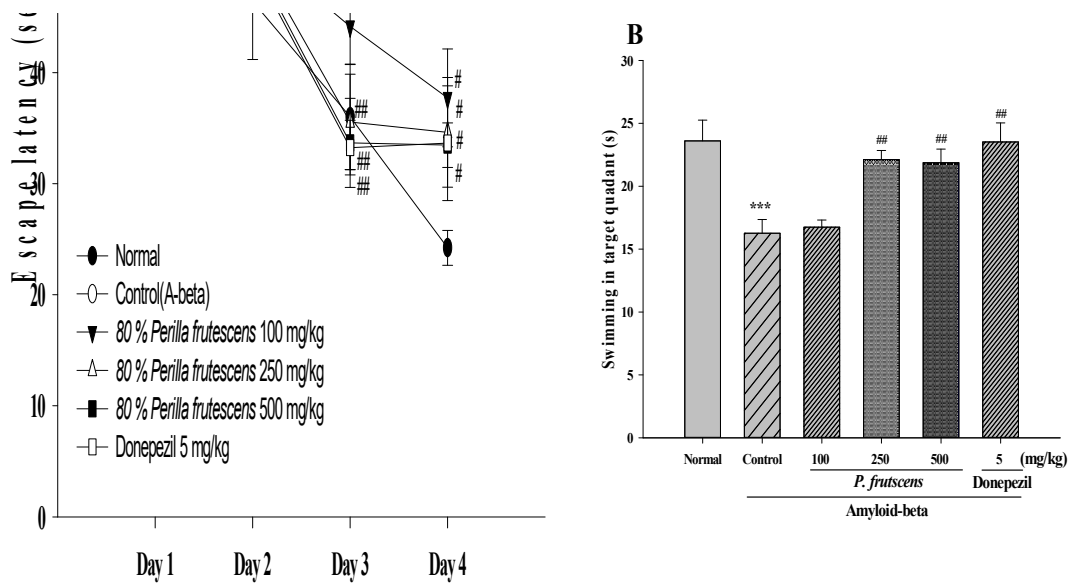


Figure 15. Effects of 80% of *Perilla frutescens* on the long-term, spatial reference memory of A $\beta$ -induced mice in Morris water maze test. (A) Escape latency in acquisition phase; (B) Swimming time in target quadrant in probe trial. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, 9-10 in each group. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with Normal group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  compared with the Control group.

## 5) 소엽추출물의 대량생산공정 확립 및 고령친화식품 개발

### ■ 소엽 추출물 대량생산

○ 소엽추출물의 대량추출 생산공정 최적화

- 1차년도 소엽 추출물 소재 및 함유 성분의 *in vitro* 효능 검증 결과를 바탕으로 원료의 대량생산 및 사업화를 위해 80% 주정을 이용한 추출 공정을 확립하였으나, 실제 소엽추출물의 대량 생산을 위해 추출 전문업체와 논의한 결과 70% 이상 에탄올을 추출 용매로 사용할 경우 별도의 방폭 장비의 추가적인 설치가 필요하며 생산 공정 최적화 과정이 필요하므로 대량 생산이 가능하며 지표성분 함량이 가장 높은 60% 에탄올 추출을 사용한 대량 생산 공정을 개발하여 최적화함

표 45. 소엽추출물의 대량추출 생산공정

공정번호	공정	세부공정	비고
1	원료 입고	원재료: 자소엽(잎, 줄기) - 수분: 6.0-5.0%	
2	1차 추출	에탄올 함량: 60% 피추출물: 추출용매(v/w)= 15 추출온도: 50℃ 추출시간: 12 시간 추출방법: 순환식	
3	여과	1 micro Nylon 필터사용	
4	2차 추출	에탄올 함량: 60% 피추출물: 추출용매(v/w)=15 추출온도: 50℃ 추출시간: 6 시간 추출방법: 순환식	
5	여과	1 micro Nylon 필터사용	
6	농축	농축온도: 50℃	
7	여과	60 mesh	

8	충진	PE 20kg 포장 후 암소에 상온 보관 - 고형분 함량: $21 \pm 1$ brix - 지표물질(rosmarinic acid) 함량: $4.5 \pm 1.0$ mg/g
---	----	--

○ 소엽 60% 주정 추출물 제품표준서

<b>SFCBIO</b> <small>SOLUTIONS WITH YOUR CHINA</small>	원재료명	제품번호	개정번호	페이지
	소엽추출농축액	SFC-원료-03	VER. 0	1/1

**1. 제품정보**

1	원재료명	소엽추출농축액
2	원료의 성상	갈색의 점조성 액상
3	지표성분 및 함유량	Rosmarinic acid    함유량 : $4.5 \pm 1.0$ mg/g
4	제품보관조건	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
5	유통기한	제조일로부터 24개월

**2. 제품 제조공정도**

공정명	내용	비고
원료	수확한 모든 원료는 원료기준규격에 적합	
건조	60°C에서 24시간 열풍건조	
1차 추출	60% 주정 15배수, 온도 50°C, 24시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
2차 추출	60% 주정 12배수, 온도 50°C, 6시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
농축	50°C	
지표성분 분석	HPLC로 기능성분 및 지표성분 함량 분석	
보관	PE 용기에 20kg 단위로 포장	

**3. 제품 규격**

분석항목	제품규격	분석주기	분석자	비고
성상 및 관능	녹색의 점조성 액체	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
지표성분 함유량	Rosmarinic acid $4.5 \pm 1.0$ mg/g	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
중금속	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
잔류농약	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	

\* 본 제품 검사규격은 관련 법규 해당기준 규격에 적합하여야 함.

(주) 에스에프씨바이오

이 문서의 소유권은 (주)에스에프씨바이오에 있습니다. 무단복제를 금지합니다.

1

○ 소엽추출물의 대량추출 생산공정 최적화



표 46. 소엽추출물 생산을 위한 용매종류 및 생산공정 조건

추출용매 종류	추출용매량(v/w)	추출온도(℃)	추출시간(hr)	여과	농축온도(℃)
Ethanol 0 v/v%	15	50	24	1micro Nylon filter	45
Ethanol 30 v/v%					
Ethanol 60 v/v%					
Ethanol 80 v/v%					
Ethanol 95 v/v%					

표 47. 추출 용매에 따른 소엽 추출물의 수득률 및 rosmarinic acid과 alpha-asarone 함량

추출 용매	추출물 무게(g)	수득률(%)	지표(유효)성분 함량(mg/g)	
			Rosmarinic acid	Alpha-asarone
Ethanol 0 v/v%	1,060(60brix)	10.6	3.709±0.472	0
Ethanol 30 v/v%	1920(60brix)	19.2	4.048±0.391	0
Ethanol 60 v/v%	880	8.8	7.491±0.680	0
Ethanol 80 v/v%	740	7.4	12.927±0.779	0.006±0.002
Ethanol 95 v/v%	675	6.8	10.620±0.232	0.318±0.016

■ 소엽 열수 추출물의 지표 성분 함량 분석 결과

The image displays three identical laboratory analysis reports for '유엔바이오 식품분석연구원' (Yuen Bio Food Analysis Research Institute). Each report is titled '검사성적서' (Analysis Report) and includes the following information:

- Header:** Company name and logo.
- Sample Information:**
  - 주요명: 바베스베르베리추출물 (Main Name: Sage Leaf Water Extract)
  - 성분명: 건조 열수추출물 (Component Name: Dried Water Extract)
  - 검량량: 2000mg (Sample Weight: 2000mg)
  - 검량일: 2024년 11월 29일 (Sample Date: 2024.11.29)
- Analysis Results Table:**

성분명	단위	결과	비고
Rosmarinic acid	mg/g	3.709, 3.182, 3.262	
α-asarone	mg/g	0.006, 0.006, 0.006	
- Footer:**
  - 주소: 충청남도 홍성군 홍성읍 118-1로 118번길 유엔바이오
  - TEL: 041-881-0200 FAX: 041-881-8202

■ 소엽 30% 주정 추출물의 지표 성분 함량 분석 결과





표 48. 소엽추출물을 이용한 대량생산공정 최적 확립 조건

공정 번호	공정 (사진)	세부공정	비 고
1	 원료칭량	원재료: 자소엽 (잎, 줄기)	국내(전남) 재배 및 수확 건조물 (수분 6.0-5.0%) 건조물 파쇄(길이 1.5cm 절단)
2		주정 추출	에탄올 함량 : 80 % 피추출물:추출용매(v/w)=15 추출온도 : 50℃ 추출시간 : 24 시간 추출방법 : 순환식
3		여과	1 micro Nylon 필터사용
4		농축	Resin 형태 수율 : 7.4% 지표물질(rosmarinic acid)함량 : 12.9±1.3 mg/g 기능성분(α-asarone)함량 : 0.006±0.0006 mg/g 방습포장 후 -18℃ 냉동보관

- 주관기관인 에스에프씨바이오에서는 확립된 대량생산제조공정을 바탕으로 추출전문 업체들과 작업하기 위한 기준 및 규격서를 아래와 같이 확립하였음

■ 소엽 80% 주정 추출물 표준 제조공정 및 규격서

	원재료명	제품번호	개정번호	페이지
	소엽농축액	SFC-원료-01	VER. 0	1/1

1. 제품정보

1	원재료명	소엽농축액
2	원료의 성상	육안으로 관찰했을 때 질감이 큰 녹색 액체
3	지표성분 및 함유량	Rosmarinic acid    함유량 : 12.9±1.3 mg/g
		α-asarone            함유량 : 0.006±0.0006 mg/g
4	제품보관조건	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
5	유통기한	제조일로부터 2년

2. 제품 제조공정도

공정명	내용	비고
원료	입고된 모든 원료는 원료기준규격에 적합	
추출	80% 주정 15배수, 온도 50°C, 24시간 추출	
여과	1micro	
농축	45°C	
지표성분 분석	HPLC로 지표성분 함량 분석	
보관	PE 용기에 20kg 단위로 포장	

3. 제품 규격

분석항목	제품규격	분석주기	분석자	비고
성상 및 관능	육안으로 관찰했을 때 질감이 큰 초록색 액체	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
지표성분 함유량	Rosmarinic acid    12.9±1.3 mg/g	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
	α-asarone            0.006±0.0006 mg/g	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
중금속	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
잔류농약	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	

※ 본 제품 검사규격은 관련 법규 해당기준 규격에 적합하여야 함.

(주) 에스에프씨바이오  
이 문서의 소유권은 (주)에스에프씨바이오에 있습니다. 무단복제를 금지합니다.

■ 소엽 60% 주정 추출물 원료 규격서

	원재료명	제품번호	개정번호	페이지
	소엽추출농축액	SFC-원료-03	VER. 0	1/1

1. 제품정보

1	원재료명	소엽추출농축액
2	원료의 성상	갈색의 점조성 액상
3	지표성분 및 함유량	Rosmarinic acid   함유량 : 4.5±1.0 mg/g
4	제품보관조건	직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
5	유통기한	제조일로부터 24개월

2. 제품 제조공정도

공정명	내용	비고
원료	수확한 모든 원료는 원료기준규격에 적합	
건조	60°C에서 24시간 열풍건조	
1차 추출	60% 주정 15배수, 온도 50°C, 24시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
2차 추출	60% 주정 12배수, 온도 50°C, 6시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
농축	50°C	
지표성분 분석	HPLC로 기능성분 및 지표성분 함량 분석	
보관	PE 용기에 20kg 단위로 포장	

3. 제품 규격

분석항목	제품규격	분석주기	분석자	비고
성상 및 관능	녹색의 점조성 액체	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
지표성분 함유량	Rosmarinic acid   4.5±1.0 mg/g	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
중금속	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
잔류농약	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	

\* 본 제품 검사규격은 관련 법규 해당기준 규격에 적합하여야 함.

(주) 에스에프씨바이오  
이 문서의 소유권은 (주)에스에프씨바이오에 있습니다. 무단복제를 금지합니다.

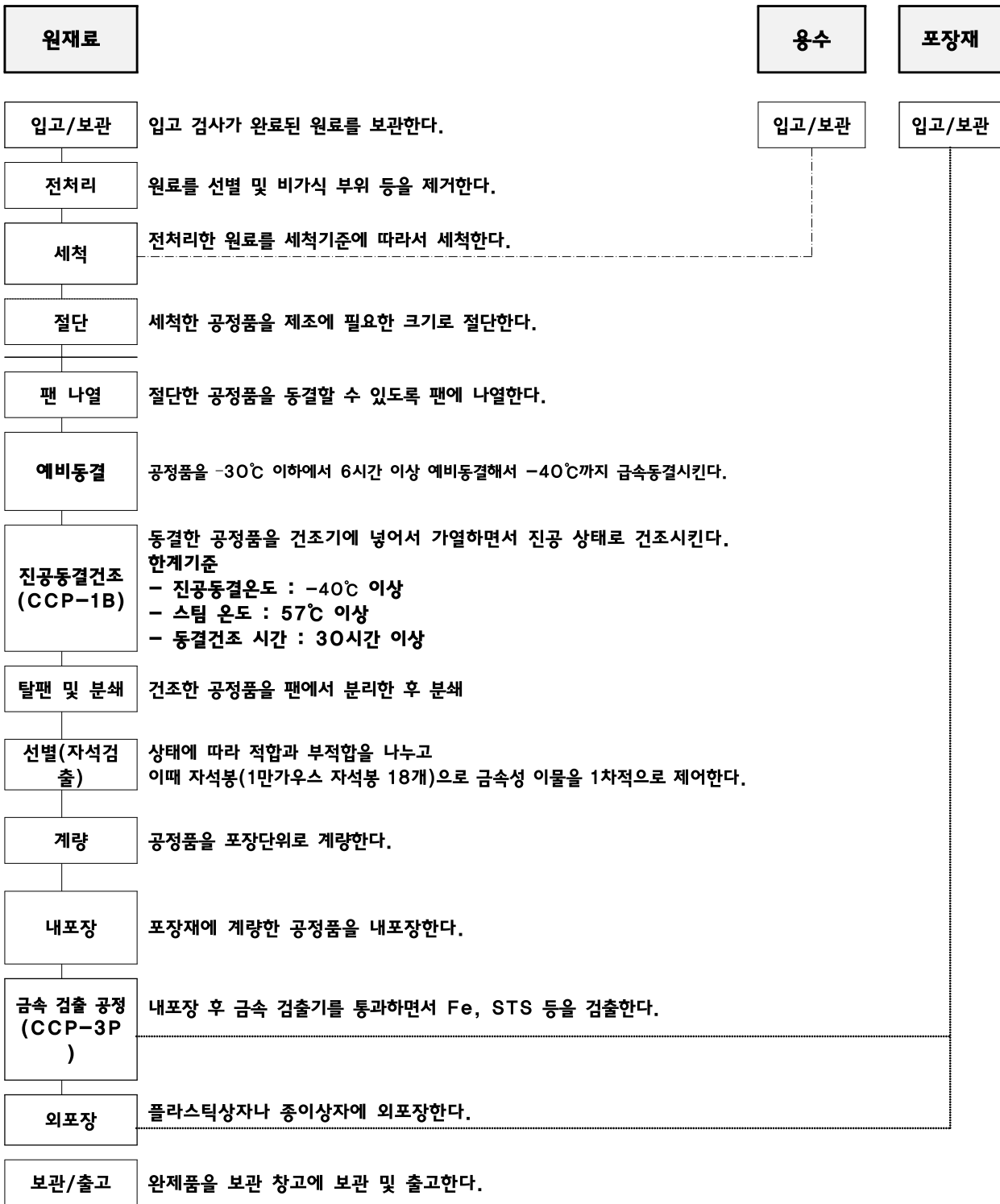
■ 소엽 추출 분말 대량생산

○ 소엽 추출 분말 대량생산 공정 확립

- 액상의 원료는 미생물 증식의 가능성이 있을 뿐만 아니라 천연물을 추출, 농축하여 층분리와 같은 요인에 대해 품질 최적화가 어렵기 때문에 다양한 제품에 적용할 수 있고 유통 및 보관이 용이한 분말 제형으로 대량 생산 실시함


- 분말 제형의 원료 규격 설정을 위해서 동결건조 전, 후로 지표성분 함량 분석을 진행 함. 지표성분 함량의 변이 또는 손실에 대한 확인을 하기 위함. 따라서 소엽 추출 분말의 규격 약 21.0 mg/g으로 설정 함

표 49. 소엽 추출 분말 제조공정도





■ 소엽 추출 분말 원료 규격서

		원재료명	제품번호	개정번호	페이지
		소엽추출물	SFC-원료-04	VER. 0	1/2

**1. 제품정보**

1	원재료명	소엽추출물
2	원료의 상세	갈색 분말
3	지표성분 및 함유량	Rosmaninic acid   함유량 : 21.0±4.0 mg/g
4	제품보관조건	실온보관
5	유통기한	제조일로부터 24개월

**2. 제품 제조공정도**

공정명	내용	비고
입고	입고된 모든 원료는 원료기준규격에 적합	
1차 추출	60% 주정 15배수, 온도 50°C, 24시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
2차 추출	60% 주정 12배수, 온도 50°C, 6시간 추출	
여과	1micro nylon filter	
농축	50°C	
분 나열	통결할 수 있도록 원료를 편에 나열	
예비동결	공정물을 -30°C 이하에서 6시간 이상 예비동결에 -40°C까지 급속동결시킴	
진공농결건조 (CCP-18)	동결한 공정물을 건조기에 넣어서 가열하면서 진공 상태로 건조시킨다. <b>관계기준</b> - 진공농결온도 : -40°C 이상 - 스팀 온도 : 57°C 이상 - 통결건조 시간 : 30시간 이상	
탈면 및 분쇄	건조된 공정물을 편에서 분리한 후 분쇄	
선별(자석검출)	자석봉(1만가우스 자석봉 18개)으로 급속성 이물물 1차적으로 제거	

(주) 에스에프씨바이오  
이 문서의 소유권은 (주)에스에프씨바이오에 있습니다. 무단복제를 금지합니다.

1

		원재료명	제품번호	개정번호	페이지
		소엽추출물	SFC-원료-04	VER. 0	2/2

지표성분 분석	HPPLC로 기능성분 및 지표성분 함량 분석	
계량	공정물을 포장단위로 계량	
내포장	포장재에 계량한 공정물 내포장	
급속검출 (CCP-3P)	내포장 후 급속검출기를 통과하면서 Fe, STS 등 검출	
외포장	종이상자에 외포장	
물고	원재물을 물고	

**3. 제품 규격**

분석항목	제품규격	분석주기	분석자	비고
상상 및 관능	갈색 분말	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
지표성분 함유량	Rosmaninic acid   21.0±4.0 mg/g	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
중금속	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	
진류농도	기준규격 이하 또는 불검출	매 LOT	생산업체/의뢰업체	

\* 본 제품 검사규격은 관련 법규 해당기준 규격에 적합하여야 함

(주) 에스에프씨바이오  
이 문서의 소유권은 (주)에스에프씨바이오에 있습니다. 무단복제를 금지합니다.

■ 고령친화식품 시제품 개발

○ 소엽추출물 함유 포집제형을 활용한 고령친화식품 시제품 제작

1) 고령친화식품 음료 개발

■ 제품 기획

- 급속한 인구 고령화로 통계청은 오는 2025년 고령인구가 20%를 넘어 본격 초고령화 사회에 진입하고 향후 20년 내 고령인구가 2배 이상 증가한 1,666만명(34.4%)에 이를 것이라고 전망하였음

- 현재 고령친화제품의 식품 범위가 건강기능식품과 급식서비스에 한정되어 환자를 위한 제품 개발이 주를 이뤘은 반면 초고령화 사회에 돌입함으로써 고령친화식품이 노인을 위한 식품과 급식서비스 까지 확대되어 고령자 모두를 위한 보편식으로 영역을 넓혀가고 있음

- 주관기관인 에스에프씨바이오에서는 개발된 소엽추출물 함유 포집제형을 활용하여 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있는 동시에 인구 고령화로 저작기능, 소화기능 저하와 이로 인한 식생활 불편 및 만성질환을 겪고 있는 노년들을 위한 연화식, 고단백, 저염식 형태의 기능성 고령친화식품을 개발하고자 함

- 고령친화식품이란 치아부실, 소화기능 저하 등을 겪는 고령자의 신체적 특성과 영양을 고려하여 제조,



가공한 식품으로 성상, 경도, 점도, 영양성분의 네 가지 품질수준을 만족해야하므로 소엽추출물 함유 포집제형을 첨가하여 단백질, 비타민, 칼슘, 칼륨, 식이섬유 등 8종의 영양성분 중 3종 이상이 제품 100g 당 한국인 영양섭취기준의 10%이상이며 경도 500,000N/m<sup>2</sup> 이하가 되도록 제조하여야 함

표 50. 고령친화식품의 품질 기준

구분	기준		
	1단계(치아 섭취)	2단계(잇몸 섭취)	3단계(혀로 섭취)
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취 및 이물이 없어야 한다.		
경도 <sup>a</sup> (N/m <sup>2</sup> )	500000 이하 ~ 50000 초과	50000 이하 ~ 20000 초과	20000 이하
점도(mPa·s)	-	-	1500 이상
영양성분 <sup>b</sup>	단백질	6g/100g 이상	
	비타민 A	75µg RAE/100g 이상	
	비타민 C	10mg/100g 이상	
	비타민 D	1.5µg/100g 이상	
	리보플라빈	0.1mg/100g 이상	
	니아신	1.6mg NE/100g 이상	
	칼슘	80mg/100g 이상	
	칼륨	0.35g/100g 이상	
식이섬유	2.5g/100g 이상		
<sup>a</sup> 단일 원료가 아닌 경우 경도가 가장 높은 원료를 기준으로 하여 적용한다.			
<sup>b</sup> 영양성분 중 3개 이상의 항목을 충족하여야 한다.			

■ 제품 개발

▫ 레시피 개발을 통한 배합비 확립

- 고령친화식품의 개발을 위해 음료 제형의 일반식품과 연하곤란자용 식품 등 고령친화식품개발의 이력 및 생산 설비를 보유하고 HACCP 인증을 통해 위생적인 제품의 생산이 가능한 업체 (연세 우유, 중앙미생물연구소, (주)더비, 더손푸드)를 선정함
- 주관기간인 에스에프씨바이오에서는 앞서 연구되었던 3가지의 제형 중 소엽추출물의 포집함량이 높고 향미와 저장안정성, 식품 다방면에 적용이 가능한 장점이 있는 동결건조를 이용한 소엽추출물 함유 분말 제형을 이용하여 고령친화식 레시피를 개발함

표 51. 음료제품 시제품 배합 소재 선정

원재료명	정제수, 원액두유(대두:외국산/미국,캐나다,호주등), 말토덱스트린, 옥배유(스페인산), 가수분해유청단백(미국산), 팔라티노스, 정백당, 탄산칼슘혼합제제(탄산칼슘, 대두다당류), 소엽추출분말, 중쇄중성지방, 영양강화제, 비타민A혼합제제(비타민A아세테이트, 디엘알파토코페롤, 말토덱스트린, 아카시아검, 옥수수전분), 비타민B <sub>12</sub> (말토덱스트린, 구연산나트륨, 비타민B <sub>12</sub> , 구연산), 비타민K <sub>1</sub> 혼합제제(비타민K <sub>1</sub> , 말토덱스트린, 전분), 비타민E혼합제제(디엘알파토코페릴아세테이트, 말토덱스트린, 변성전분, 이산화규소), 비타민D <sub>3</sub> 혼합제제(비타민D <sub>3</sub> , 디엘알파토코페롤, 중쇄중성지방, 아카시아검, 수크로오스, 이산화규소, 옥수수전분), 염화칼륨, 유화제, 잔탄검
	대두, 우유 함유

표. 52 음료제품 시제품 배합비

영양정보 총 내용량 195mL 200 kcal			
총내용량 195mL당 1일 영양성분 200kcal 기준치에 대한 비율(%)			
나트륨 100 mg	5%	비타민D 2 $\mu$ g	20%
탄수화물 31 g	10%	비타민E 2 mg $\alpha$ -TE	18%
당류 6 g	6%	비타민K 15 $\mu$ g	21%
식이섬유 1 g	4%	나이아신 3.2 mgNE	21%
지방 5.6 g	10%	엽산 80 $\mu$ g	20%
포화지방 1.6 g	11%	판토텐산 1 mg	20%
트랜스지방 0 g		비오틴 6 $\mu$ g	20%
콜레스테롤 0 mg	0%	칼슘 140 mg	20%
단백질 7 g	13%	인 140 mg	20%
비타민A 150 $\mu$ gRE	21%	칼륨 260 mg	7%
비타민B <sub>1</sub> 0.24 mg	20%	마그네슘 44 mg	14%
비타민B <sub>2</sub> 0.3 mg	21%	철 2 mg	17%
비타민B <sub>6</sub> 0.3 mg	20%	아연 2 mg	24%
비타민B <sub>12</sub> 0.48 $\mu$ g	20%	구리 0.16 mg	20%
비타민C 20 mg	20%	망간 0.7 mg	23%
성분명 및 함량 : 소엽추출분말 : 1,500 mg/195mL			

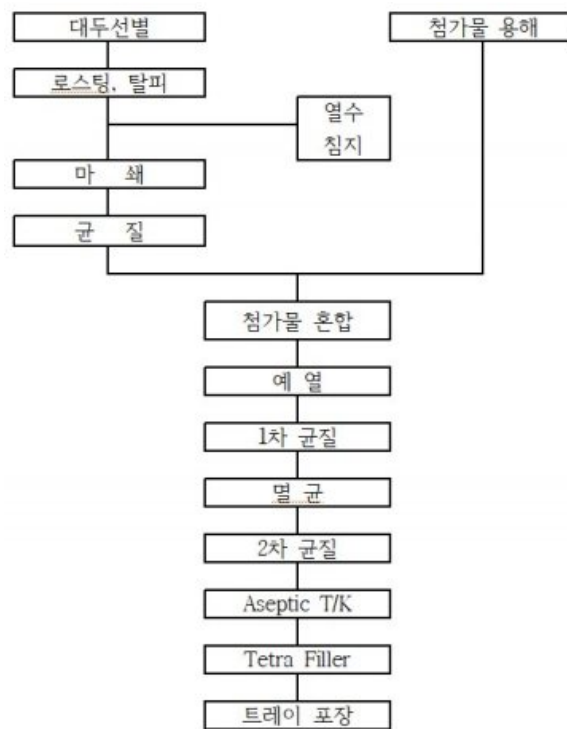


그림 100. 액상용 고령친화식품 제조공정도

## 2) 고령친화식품 워터젤리 개발

### ■ 제품 개발

#### ▫ 레시피 개발을 통한 배합비 확립

- 주관기간인 에스에프씨바이오에서는 앞서 연구되었던 3가지의 제형 중 소엽추출물의 포집함량이 높고 향미와 저장안정성, 식품 다방면에 적용이 가능한 장점이 있는 동결건조를 이용한 소엽추출물 함유 분말 제형을 이용하여 고령친화식 레시피를 개발함

표 53. 소엽추출물 동결건조분말 함유 젤리 제품 배합비

Sample No.	1	2
정제수	82.349918	80.599918
대추농축액	2	2
황기농축액	0.1	0.1
감초농축액	0.1	0.1
헛개나무농축액	2	2
프락토올리고당	5	8
꿀향	0.5	0.5
꿀	5	5
구연산	0.3	0.1
구연산나트륨	0.2	0.2
젯산칼슘	0.2	0.2
비타민A	0.00008	0.00008
비타민C	0.1	0.1
비타민D	0.000002	0.000002
슈퍼겔	0.5	0.65
<b>소엽추출물 동결건조분말</b>	<b>0.15</b>	<b>0.15</b>
레드코펜C분말	0.5	0.1
수박추출분말	0.5	0.1
마이크로바이옴시너지복합분말	0.5	0.1
합계	100	100

▣ 시제품 특성 평가

표 54. 고령친화식품 젤리 시제품 특성 평가 결과

Sample No.	1	2
이미지		
외관(색)	밝은 갈색	밝은 갈색
경도(N/m <sup>2</sup> )	14,000	18,000
향	좋음	좋음
맛	신맛이 강함	좋음
이수현상	+++	+

- 젤리 제품 1개(150g) 당 소엽추출물 동결건조분말을 250mg 첨가하여 생산된 시제품에 대해 당사 연구원들을 대상으로 특성 평가(색, 향, 맛, 질감)를 실시함

- 이수현상에 의해 수분 유출 현상이 강할수록 강함의 세기를 높게 반영함(없음 -, 거의 없음 +, 일부있음 ++, 강함 +++)

-



그림 103. 워터젤리 점도 측정 성적서

- 당류와 검질류의 함량이 모두 낮은 경우 수층과 젤리층이 분리되어 균일한 제형을 나타내지 않아 이러한 이수 현상을 줄이기 위해 검질류와 당류의 적정 비율을 확인함
- 당류(프락토올리고당, 꿀) 8.5%, 검질류(슈퍼겔) 0.65% 첨가한 경우 이수현상에 의한 제형 분리 현상이 개선되었으며 경도  $18,000\text{N/m}^2$ , 점도  $2,416.7\text{mPa}\cdot\text{s}$ 로 고령친화식품 규격을 충족하는 물성을 나타냄
- 따라서 이수현상이 최소한으로 일어나며 가장 높은 기호도 평가를 받은 2번 배합비를 최종 배합비로 설정함

## 2) 고령친화식품 죽 개발

### ■ 제품 기획

- 주관기관인 에스에프씨바이오에서는 개발된 소엽추출물 함유 포집제형을 활용하여 인지기능개선에 도움을 줄 수 있는 동시에 인구 고령화로 저작기능, 소화기능 저하와 이로 인한 식생활 불편 및 만성질환을 겪고 있는 노년들을 위한 연화식, 고단백, 저염식 형태의 기능성 고령친화식품으로 기획
- 고령친화식품은 음료, 죽, 쿠키, 분말 등 다양한 제형으로 출시되고 있으며 그 중 쉽고 간편하게 식사대용으로 섭취할 수 있는 음료와 죽 형태의 제품이 시장에 많이 유통되고 있음
- 주관기관인 에스에프씨바이오에서는 소엽추출 포집제형을 활용하여 고령친화식품 음료제품 뿐만 아니라 식사대용식이자 영양공급이 충분히 가능한 죽제품을 기획 함
- 소엽추출물 함유 포집제형의 인지기능개선 기능과 함께 저작 및 연화 기능이 저하되는 고령층의 소화흡수를 돕기 위해 양배추, 단호박, 시금치, 견과류 등의 위장관에 도움이 되는 소재를 함께 배합하여 마시는 죽 형태의 제품으로 컨셉을 설정
- 고령친화식품 죽 개발을 위해 죽 제형의 제품개발이 가능한 OEM업체와 컨택하여 상품화가 가능한 인프라를 구축

표. 55 고령친화식품 즉형태 제품의 시장 현황

제품명	마시는 단호박죽	실버웰 검은깨죽	견과류영양컵죽	연하도움식 소고기버섯	고소 전복죽
제품 사진					
식품 유형	즉석조리식품, 레토르트식품	즉석섭취식품	즉석조리식품	즉석조리식품 (살균제품)	즉석조리식품 (살균제품)
제조원	두손푸드	한국메디칼푸드	푸른가족	동보식품	푸드트리
용량	65kcal/130g	150kcal/35g	128kcal/33g	/300g	129kcal/180g
가격	1,600원/개	1,000원/개	1,500/개	4,000원/개	2,900원/개
특징	- 레토르트 멸균 공법 - 파우치 형태로 휴대가 편리함	- 물, 우유 등에 부어 섭취 가능 - 유당 미함유 - 칼슘, 비타민 A, 비타민B1 함유	- 비타민, 칼슘 보강 - 뜨거운 물을 넣어 섭취 - 컵, 손가락을 포함하여 휴대가 편리함	- 가열 필요 - 60°C에서 점성이 유지되는 연하도움 대체식품 - 즉류보다 열량이 높고 비타민, 미네랄 보강	- 가열 필요 - 미니컵 형태로 휴대가 편리함

■ 제품 개발

▫ 레시피 개발을 통한 배합비 개발

- 고령친화식품의 개발을 위해 죽 제형의 고령친화식품개발의 이력 및 생산 설비를 보유하고 HACCP 인증을 통해 위생적인 제품의 생산이 가능한 업체 ((주)더비)를 선정함
- 주관기간인 에스에프씨바이오에서는 앞서 연구되었던 3가지의 제형 중 소엽추출물의 포집함량이 높고 향미와 저장안정성이 우수하며, 수용성 분말로 수상에 쉽게 분산되어 분말뿐만 아니라 액상 및 반액상 식품 등 다방면에 적용이 가능한 장점이 있는 동결건조를 이용한 소엽추출물 함유 분말 제형을 이용하여 고령친화식 레시피를 개발함

표 56. 고령친화식품 죽 제조공정도

제조&가공 공정도	고령친화식품 죽
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">원재료</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">입 고</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">보 관</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">계 량</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px; background-color: #e0e0e0;">배 합</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px; background-color: #e0e0e0;">롤압축성형</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px; text-align: center;"> <b>배 합</b>                      <b>물성연하형성 배합공정</b> </div> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 버터를 5도씨에서 30분간 해동한다.</li> <li>2. 해동한 버터를 배합기에 넣어서 1분 60RPM으로 돌린다.</li> <li>3. 설탕을 넣고 1분 60RPM으로 돌린후 3분 1800RPM으로 설탕과 배합통의 마찰열을 형성시켜 크림화 시킨다.</li> <li>4. 소금,계란,쇼트닝을 넣고 1분 60RPM으로 돌리고 나서 다시 4분 240RPM 으로 돌려 크림배합에서 유크림 배합으로 성질 변경한다.</li> </ol>

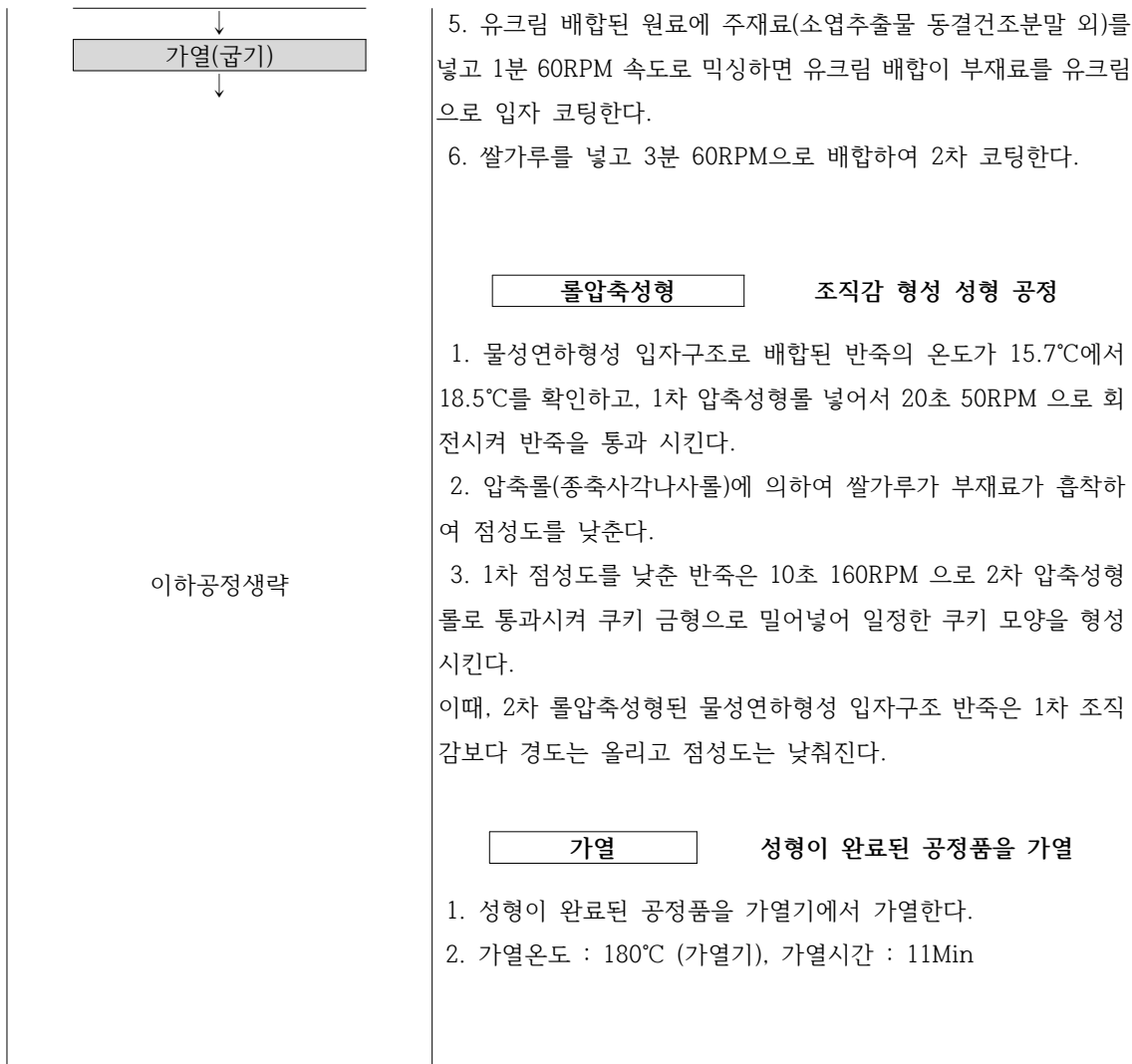


표 57. 소엽추출물 동결건조분말의 함량 증가에 따른 죽제품의 레시피 개발

Sample No.	1	2	3	4	5
쇼트닝	21.12	21.00	21.00	21.00	20.82
설탕	21.12	10.50	18.89	20.99	18.42
<b>레드코펜C분말</b>	<b>0</b>	<b>10.5</b>	<b>2.1</b>	<b>0</b>	<b>2.4</b>
소금	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
계란	11.37	11.30	11.30	11.30	11.21
누룽지쌀가루	12.19	12.11	12.11	12.11	12.01
쌀가루	16.25	16.15	16.15	16.15	16.02
알파미분	12.19	12.11	12.11	12.11	12.01
감자전분	1.42	1.41	1.41	1.41	1.40
전지분유	0.81	0.81	0.81	0.81	0.80
조청	1.02	1.01	1.01	1.01	1.00
누룽지향	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
식이섬유	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61
단백질	0.41	0.40	0.40	0.40	0.40
해조갈슘	0.81	0.81	0.81	0.81	0.80
소엽추출분말	0.2(50mg/30g)	0.8(250mg/30g)	0.81(250mg/30g)	0.81(250mg/30g)	1.62(500mg/30g)
합계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00


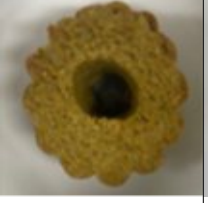



▣ 시제품 특성 평가

- 죽 제품 1개(30g) 당 소엽추출물 동결건조분말을 50mg~500mg 범위로 첨가하여 생산된 시제품에 대해

당사 연구원들을 대상으로 물리적 특성 평가(색, 두께, 무게, 맛, 죽 형성 시간)를 실시함

- 소엽추출물 동결건조분말의 함량이 높아질수록 짙은 녹색을 띠며 첨가된 누룽지향과 소엽추출물 동결건조분말 고유의 향이 혼합되어 생성된 썩떡 같은 향의 강도가 강해지고 500mg 투입한 경우 쓴맛이 강하게 남을 확인함
- 당사 원료 레드코펜C 분말을 설탕을 대체하여 투입한 결과 소량의 첨가로도 쿠키에서 죽으로 형태적 변화가 일어나는 데 영향을 주었으며 설탕의 50%를 대체한 시제품에서는 쿠키에서 죽으로 형태적 변화가 일어나지 않음을 확인함
- 따라서 쿠키에서 죽으로 형태적 변화가 일어나면서 가장 높은 기호도 평가를 받은 4번 배합비를 최종 배합비로 설정함
- 주관기관인 에스에프씨바이오는 시생산된 제품들에 대한 물리적 특성 평가 결과를 바탕으로 Control 제품과 가장 유사한 죽 형성 가능성을 나타내며 관능적 기호도를 고려하여 최종 레시피를 확정하고 품목제조신고 완료함

표 58. 소엽추출물 동결건조분말의 함량 증가에 따른 죽제품의 물리적 특성 평가

Sample No.	1	2	3	4	5
이미지					
외관(색)	노르스름	노란빛이 강함	옅은 녹색	연두빛	짙은 녹색
두께(mm)	14.1	16.2	10.0	13.1	11.2
무게(g)	14.93	14.96	14.87	14.91	14.88
죽 형성 시간(초)	20~25	점도형성이 되지 않음	60~70	35~40	60~70
맛	누룽지	단맛이 강함	썩개떡	썩개떡	쓴맛이 강함







- 주관기간인 에스에프씨바이오에서는 앞서 연구되었던 3가지의 제형 중 소엽추출물의 포집함량이 높고 향미와 저장안정성, 식품 다방면에 적용이 가능한 장점이 있는 동결건조를 이용한 소엽추출물 함유 분말 제형을 이용하여 고령친화식 배합비를 개발함

표 63. 소엽추출물 동결건조분말 함유 젤리 제품 배합비

Sample No.	1	2	3
정제수	54.849918	55.849918	55.54
대추농축액	5	2	2
황기농축액	0.1	0.1	0.1
감초농축액	0.1	0.1	0.1
헛개나무농축액	5	2	2
프락토올리고당	20	25	25
꿀향	0.5	0.5	0.5
꿀	10	10	10
구연산	0.3	0.3	0.3
비타민A	0.00008	0.00008	0.005
비타민C	0.1	0.1	0.1
비타민D	0.000002	0.000002	0.005
겔화제	1	1	1.3
카라기난	0.3	0.3	0.3
<b>소엽추출물 동결건조분말</b>	<b>1.25</b>	<b>1.25</b>	<b>1.25</b>
레드코펜C분말	0.5	0.5	0.9
수박추출분말	0.5	0.5	0.1
마이크로바이옴시너지복합분말	0.5	0.5	0.5
합계	100	100	100

▣ 시제품 특성 평가

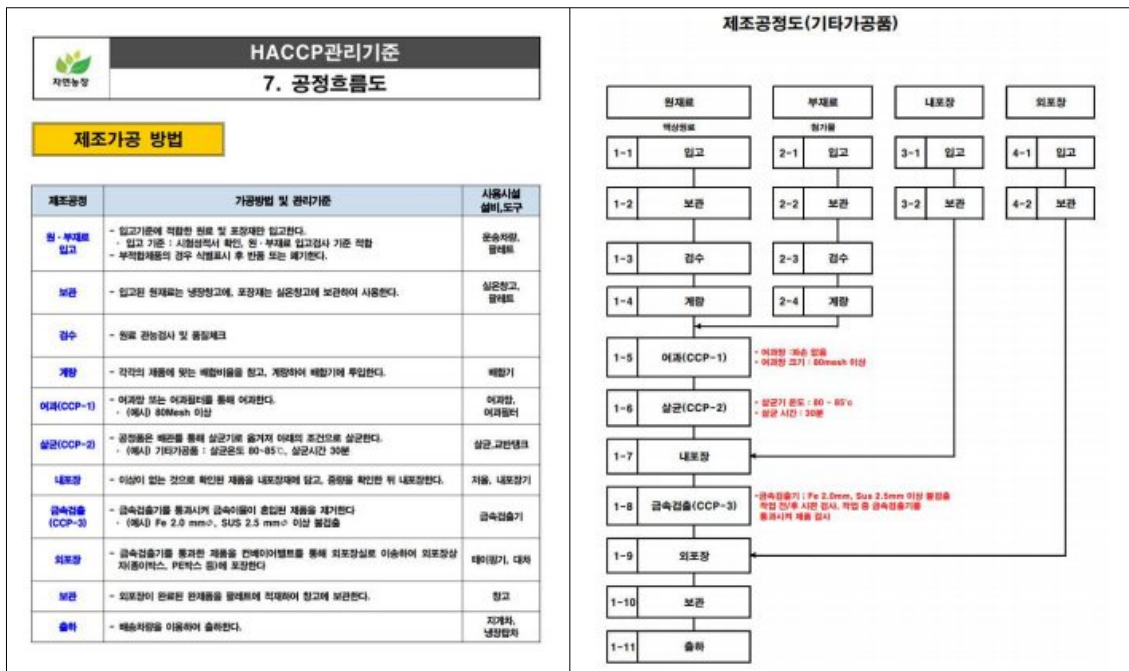
- 젤리 제품 1개(20g) 당 소엽추출물 동결건조분말을 250mg 첨가하여 생산된 시제품에 대해 당사 연구원들을 대상으로 특성 평가(색, 향, 맛, 질감)를 실시함
- 이수현상에 의해 수분 유출 현상이 강할수록 강함의 세기를 높게 반영함(없음 -, 거의 없음 +, 일부있음 ++, 강함 +++)

표 64. 고령친화식품 젤리 시제품 특성 평가 결과

Sample No.	1	2	3
이미지			
외관(색)	밝은 갈색	밝은 갈색	밝은 갈색
경도(N/m <sup>2</sup> )	14,000	24,000	33,843
향	좋음	좋음	좋음
맛	약간의 떫은 맛	좋음	좋음
이수현상	+++	++	+

- 당류와 검질류의 함량이 모두 낮은 경우 시간이 지남에 따라 젤리에서 물이 빠져나오는 이수현상이 발생하므로 이수현상을 줄이기 위해 검질류와 당류 함량을 증가시키면 경도가 증가하여 적정 비율을 사용해야 함
- 당류(프락토올리고당, 꿀) 35%, 검질류(젤화제, 카라기난) 1.6% 첨가한 경우 이수현상이 개선되었으며 고령친화식품 규격을 충족하는 물성을 나타냄
- 따라서 이수현상이 최소한으로 일어나며 가장 높은 기호도 평가를 받은 3번 배합비를 최종 배합비로 설정함
- 대량생산공정 확립
  - 시제품 특성 평가 결과를 바탕으로 소엽추출물 동결건조분말 함유 고령친화식품 젤리 제품에 대한 대량생산공정을 확립함

표 65 고령친화식품 젤리 제조공정도



■ 제품 출시

- 고령친화식품(린시아 비-트리션) 품목제조보고서
- 젤리 제품(린시아 비-트리션)의 경우 캔디류로 품목제조신고 완료함



▣ 제품 판매 및 홍보

표 66 린시아 비-트리션 제품 사진



(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2019~2021)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문(SCI)	목표(단계별)	2	2	-
		실적(누적)	2	2	-
	논문(비SCI)	목표(단계별)	1	1	-
		실적(누적)	1	1	-
	논문평균IF	목표(단계별)	1.5	1.5	5
		실적(누적)	3.7	3.7	14.3
	학술발표	목표(단계별)	3	3	3
		실적(누적)	4	4	14.3
	특허 출원	목표(단계별)	2	2	10
		실적(누적)	2	2	14.3
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	제품화	목표(단계별)	2	2	20
		실적(누적)	2	2	14.3
	매출액(백만원)	목표(단계별)	100	100	35
		실적(누적)	108.2	108.2	14.3
	고용창출	목표(단계별)	2	2	5
		실적(누적)	3	3	14.3
	인력양성	목표(단계별)	4	4	2
		실적(누적)	5	5	14.3
계	목표(단계별)	117.5	117.5	80	
	실적(누적)	130.9	130.9	100	

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Anti-Amyloidogenic Effects of Asarone Derivatives from Perilla frutescens Leaves Against Beta-Amyloid Aggregation and Nitric Oxide Production	Molecules a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry	So-Young Park	24(23)	국외		SCI	2019.11.25	1420-3049	50
2	Anti-Amyloidogenic Effects of Triterpenoids Isolated from Perilla Leaves	Korean Journal of Pharmacognosy	Ji-Yun Yeo Chung-Hyun Lee	51(4)	대한민국		비SCI	2020.12.03	0253-3073	50
3	Immunostimulatory activity of stem bark of Kalopanax pictus in RAW 264.7 macrophage	Journal of Herbal Medicine	Sunggun Kim Chung Hyeon Lee	예정	국외		SCI	예정	2210-8033	50

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국생약학회 제50회 정기총회 및 학술대회	김나연	2019.11.28	서울 드래곤시티	대한민국
2	한국생약학회	박소영	2020.12.03	e-conference	대한민국
3	한국영양학회 추계국제학술대회	이충현/고민성/박소영	2021.10.15	e-conference	대한민국
4	한국생약학회 제52회 정기총회 및 학술대회	고민성/이충현/박소영	2021.12.01	e-conference	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물	대한민국	(주)에스에프씨바이오	2020.10.28	10-2020-0141251						
2	소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 조성물	대한민국	(주)에스에프씨바이오	2021.11.30	10-2021-0168636						

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	식품	한국식품클러스터진흥원	고령친화우수식품	2021-18	2021.10.29	대한민국

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

○ 국제표준



번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

## [경제적 성과]

### □ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	뇌보식	2021.12	(주)더비		고령친화식품	6개월	한국식품산업클러스터진흥원	2021.10.29
2	린시아 비-트리션	2021.11	(주)자연과사람들		고령친화식품	3개월		

### □ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

### □ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

### □ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	소엽추출물 을 이용한 고령친화식 품(뇌보식) 개발	소엽추출 물을 함유하는 인지기능 에 도움이 되는 소재를 활용한 죽 제형의 고령친화 식품 개발	(주)에스 에프씨바 이오				
2	자기실시	신제품 개발	국내	소엽추출물 을 이용한 고령친화식 품(린시아 비-트리션) 개발	소엽추출 물을 함유하는 인지기능 에 도움이 되는 소재를 활용한 젤리 제형의 고령친화 식품 개발	(주)에스 에프씨바 이오	108,181		2021	
							40,000		2022	

### □ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
소엽추출물을 이용한 고령친화식품(린시아 비-트리션) 개발	2021	108,181		108,181	
	2022	40,000		40,000	
합계		148,181		148,181	

### □ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		소엽추출물을 이용한 고령친화식품(린시아 비-트리션) 개발			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(천원)	100,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		148,181	300,000	500,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내		
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		인지기능 개선 비고시건강식품원료 인증 후 건강기능식품개발 판매			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

### □ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	고용창출(이인재)	(주)에스에프씨바이오	1		1
2	고용창출(이진영)	(주)에스에프씨바이오		1	1
3	고용창출(박미희)	(주)에스에프씨바이오		1	1
합계			1	2	3

### □ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	7
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	11
		생산인력	0

### □ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

### □ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2019		1	1		1	1	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
2	인력양성	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
3	인력양성	2021		2			1	1	수도권	충청권	영남권	호남권	기타

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	인터넷 광고	LSP mall	비트리션	2021.1.21

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	2019 대한민국 상생발전 대상	서울 및 지역경제 활성화	기업	2019.12.6	대한민국 상생발전 추진위원회
2	수상	제21회 대한민국 디지털 경형혁신대상	디지털 경영혁신	기업	2021.12.3	중소벤처기업부

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

□ 제품 출시식

- 2022년 1월 21일 삼성동 소노펠리체 사파이어 홀에서 린시아 비-트리션 제품 출시식을 실시함.



**(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)**

**2) 목표 달성 수준**

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○소엽추출물의 표준화	○소엽 원생약 성분 프로파일 개발 ○소엽 원생약의 최적 종, 채취 시기, 채취 부위 확립 ○소엽추출물 분석법 개발 및 함량 평가 기준 설정 ○소엽 최적 추출법 개발	○100 ○100 ○100 ○100
○소엽의 인지기능 개선 기능성 검증	○소엽추출물 및 유효성분의 세포생존률에 미치는 영향 검증 ○소엽추출물 소재 및 유효성분의 세포 보호 효과 검증 ○소엽추출물 소재 및 함유 성분의 in vitro 효능 검증	○100 ○100 ○100
○소엽추출물 유화 및 향미 억제 기술 개발	○소엽추출물의 제형화 기술 개발 ○소엽추출물 포집 제형의 안정성 및 포집효율 향상 연구	○100 ○100
○소엽추출물 대량생산 공정 확립 및 표준화	○소엽추출물 대량생산 공정 확립 및 표준화 ○소엽 추출물 소재의 저장 안정성 평가	○100 ○100
○소엽추출물 활용 고령친화식품 개발	○소엽추출물을 활용한 고령친화식품 2종 개발	○100

**4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)**

**1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용**

**2) 자체 보완활동**

**3) 연구개발 과정의 성실성**

**5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도**

- 소엽 원생약의 성분에 대한 분석을 통한 국내외 재배지와 시기에 따른 적정성을 확인함
- 소엽추출물 및 유효성분의 세포생존률에 미치는 영향과 in vitro 활성 분석을 통한 인지능력 개선에 대한 기초 데이터로 활용함
- 소엽의 추출 공정에 따른 표준물질의 함량 분석, 각 추출물을 이용한 in vivo 동물 실험을 통하여 인지능력개선에 대한 데이터를 확보하였음
- 소재의 기본적인 안정성 및 제형화 기술 개발 유통기한 설정 실험 등을 실시함
- 제품화로는 고령친화식품 2종을 최종적으로 생산하였으며, 그 중 1종은 고령친화우수식품으로 인정을 받음

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 개발 기간에 출원한 특허에 대한 등록을 목표로 추가 보안에 노력을 가함
- 소용 추출물을 함유한 제품, 특히 현재 대량생산에 들어간 2종에 대한 판매 확대 계획을 수립하고, 매년 리뉴얼 및 신규 제품 출시를 목표로 함
- 추후 추가 연구 및 임상실험을 통한 기능성 확장을 목표로 새로운 기능성 개별인정형 원료의 등록을 목표로 함

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
	국내매출	3,900,000,000원	
제품개발	국외매출	400,000,000원	
	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

# 부 록

## - 특허

- 01. 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물 ..... 1
- 02. 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 ..... 18

## - 논문

- 01. Immunostimulatory activity of stem bark of *Kalopanax pictus* in RAW 264.7 macrophage ..... 40
- 02. Anti-Amyloidogenic Effects of Triterpenoids Isolated from Perilla Leaves ..... 46

## -학술발표

- 01. 학술발표 포스터 ..... 52

## -원료 성적서

- 01. 소엽추출물 동결건조분말(지표성분함량분석/잔류농약검사/아플라톡신) ..... 56

## - 시제품 (뇌보식)

- 01. 물성 결과보고서 ..... 67
- 02. 사용성평가결과보고서 ..... 68
- 03. 제품설명서 ..... 86
- 04. 품목제조보고서 ..... 88
- 05. 제품출시확인서 ..... 91
- 06. 제조공정도 ..... 93
- 07. 고령친화우수식품지정서 ..... 97

## - 시제품 (비트리션)

- 01. 경도 시험 성적서 ..... 98
- 02. 영양성분검사 ..... 99
- 03. 비타민A,D 성적서 ..... 100
- 04. 품목제조보고서 ..... 101
- 05. 제품출시확인서 ..... 104

## - 외부 기관 보고서

- 01. Rosmarinic acid, asarone 함량 분석 (휴먼 바이오) ..... 106
- 02. 소엽추출물 동결건조분말의 유통기간 설정 실험 결과보고서 (휴먼 바이오) ..... 121
- 03. 인지능력 개선 동물실험 (대구한의대) ..... 128

01. 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2020.10.28  
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(P20075)  
 출원번호 10-2020-0141251 (접수번호 1-1-2020-1147551-00)  
 (DAS접근코드 3F38)  
 출원인명칭 주식회사 에스에프씨바이오(1-2000-005689-7)  
 대리인성명 전종일(9-2008-000022-2)  
 발명자성명 김성규 김철진 박미희 이진영 금창엽 김인선  
 발명의명칭 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. DAS접근코드는 이 특허출원을 기초로 외국에 특허출원을 할 경우 파리조약 제4조D(1)에 따른 우선권주장 증명서류를 세계지식재산기구의 전자적 접근 서비스(DAS, Digital Access Service)를 통해 전자적 송달을 신청할 때 필요합니다.
9. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



**【서지사항】**

<b>【서류명】</b>	특허출원서
<b>【참조번호】</b>	P20075
<b>【출원구분】</b>	특허출원
<b>【출원인】</b>	
<b>【영칭】</b>	주식회사 에스에프씨바이오
<b>【특허고객번호】</b>	1-2000-005689-7
<b>【대리인】</b>	
<b>【성명】</b>	전종일
<b>【대리인번호】</b>	9-2008-000022-2
<b>【포괄위임등록번호】</b>	2018-092501-1
<b>【발명의 국문영칭】</b>	소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품 조성물
<b>【발명의 영문영칭】</b>	Microcapsules containing lobular extract and food composition using it
<b>【발명자】</b>	
<b>【성명】</b>	김성규
<b>【성명의 영문표기】</b>	kim Sung-Kyu
<b>【주민등록번호】</b>	
<b>【우편번호】</b>	
<b>【주소】</b>	
<b>【발명자】</b>	

**【성명】** 김철진

**【성명의 영문표기】** Kim, Chul Jin

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 박미희

**【성명의 영문표기】** Park Mi Hee

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 이진영

**【성명의 영문표기】** Lee jin young

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 금창엽

**【성명의 영문표기】** Chang Yeop Keum

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 김인선

**【성명의 영문표기】** Kim In Seon

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【출원언어】**

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1190123

**【과제번호】** 119012-3

**【부처명】** 농림축산식품부

**【과제관리(전문)기관명】** 농림식품기술기획평가원

**【연구사업명】** 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업

**【연구과제명】** 소염추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품개발

**【기여율】** 1/1

**【과제수행기관명】** (주)에스에프씨바이오, 단국대학교 산학협력단

**【연구기간】** 2019.05.20 ~ 2021.12.31

**【취지】** 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 전종일

(서명 또는 인)

**【수수료】**

<b>【출원료】</b>	0 면	46,000 원
<b>【가산출원료】</b>	11 면	0 원
<b>【우선권주장료】</b>	0 건	0 원
<b>【심사청구료】</b>	0 항	0 원
<b>【합계】</b>	46,000 원	
<b>【감면사유】</b>	소기업(70%감면)[1]	
<b>【감면후 수수료】</b>	13,800 원	
<b>【수수료 자동납부번호】</b>	054-122254-04-013	

## 【발명의 설명】

### 【발명의 명칭】

소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물  
{Microcapsules containing lobular extract and food composition using it}

### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 베타-아밀로이드 응집체를 억제할 수 있는 소엽 추출물을 코어 물질로 사용하고 알지네이트를 셸 물질로 사용하여 마이크로캡슐로 식품 조성물에 사용하기 때문에 소엽추출물의 향미를 개선하며 저장성을 높이면서 안정적으로 섭취할 수 있도록 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물에 관한 것이다.

### 【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 일반적으로 치매(dementia)는 정상적인 노화와는 구분해야 할 병적인 현상이며 그 원인에 따라 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증으로 오는 치매로 구별된다.

【0003】 이중, 알츠하이머성 치매의 발병기전은 명확히 알려져 있지 않으나, 신경독성단백질인 베타-아밀로이드( $\beta$ -amyloid protein)의 독성이 가장 중요한 원인으로 제시되고 있다. 이 물질은 아밀로이드 전구단백질(APP:amyloid precursor protein)의 잘못된 대사로 인해 생성되는 것으로 알려져 있고, APP의 정상 대사물

은 신경세포보호작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 유전공학적 방법을 이용한 연구결과에서는 베타아밀로이드( $\beta$ -amyloid)등의 독성 단백질이 세포와 혈관에 쌓여 신경세포에 독성을 미침으로써 결과적으로 뇌기능에 장애가 초래된다는 사실이 밝혀졌다.

【0004】 현재까지 치매 치료를 위한 약물치료는 아세틸콜린 전구체를 투여하거나 아세틸콜린의 분해를 저해하는 약물을 투여하여 뇌의 아세틸콜린 농도를 높여주는 치료방법이 사용되어 왔다. 대표적인 약물로는 타크린 (tacrine), 도네페질 (donepezil), 리바스티그민 (rivastigmine), 갈란타민 (galantamine) 등이 있다.

【0005】 다만, 기존의 치매 치료제는 주로 아세틸콜린에스터라제 억제 효과만을 가지고 있을 뿐, 베타-아밀로이드의 형성 억제 또는 이미 형성된 베타-아밀로이드 응집체의 분해 기능은 없었다. 따라서, 치매의 근원적 치료가 불가능할 뿐만 아니라, 이미 베타-아밀로이드 응집체가 형성된 치매 환자에게는 아무런 효과를 발휘할 수 없었다.

【0006】 뿐만 아니라, 여러 화학 물질들을 포함하는 현존하는 치매치료제들은 구역, 구토, 어지러움, 설사, 신경계이상 등의 부작용이 빈발하는 문제가 있다.

【0007】 이에 본 발명에서는 소엽의 열수 및 주정추출물이 베타-아밀로이드 응집체를 억제 및 분해할 수 있는 물질임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

### 【발명의 내용】

### 【해결하고자 하는 과제】

【0008】 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 베타-아밀로이드 응집체를 억제할 수 있는 소엽 추출물을 코어 물질로 사용하고 알지네이트를 쉘 물질로 사용하여 마이크로캡슐로 식품 조성물에 사용하기 때문에 소엽추출물의 향미를 개선하며 저장성을 높이면서 안정적으로 섭취할 수 있도록 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물을 제공하는 데 있다.

### 【과제의 해결 수단】

【0009】 본 발명에 따른 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐은 불순물이 제거된 소엽 추출물을 에탄올로 침진시킨 후에 농축하여 지용성 소엽 추출물 유화액을 생성하고, 지용성 소엽추출물 유화액을 코어물질로 이용하고 알지네이트를 쉘 물질로 이용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산 교반하여 제조된 것을 특징으로 한다.

【0010】 또한, 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐을 이용한 식품조성물은 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐을 성인 기준으로 1일 10 내지 5,000mg/kg 체중으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

【0011】 바람직하게, 식품조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 중의 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

### 【발명의 효과】

【0012】 본 발명에 따른 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐은 지용성의 소엽 추출물이 갖는 특유의 향기와 색상으로 인해 섭취가 어려운 문제와 취급의 어

려움을 해결할 수 있는 장점이 있다.

【0013】 또한, 본 발명에 따른 식품조성물은 소엽 추출물의 저장성을 증가시키고, 지용성이 외부로 노출되지 않아 다양한 식품에 사용하여 안정적으로 사용할 수 있어 치매의 예방 또는 개선할 수 있게 된다.

#### 【도면의 간단한 설명】

【0014】 도 1은 소엽추출물의 AB aggregation 억제 효과를 나타낸 그래프.

#### 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0015】 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명한다.

【0016】 본 발명의 소엽 추출물의 마이크로캡슐은 불순물이 제거된 소엽 추출물을 에탄올로 침진시킨 후에 농축하여 지용성 소엽 추출물 유화액을 생성하고, 지용성 소엽추출물 유화액을 코어물질로 이용하고 알지네이트를 셸 물질로 이용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산 교반하여 제조된다.

【0017】 즉, 코어물질로 지용성 소엽추출물 유화액을 사용하고, 셸 물질로 저점도의 알지네이트를 사용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산시켜 교반하면 소엽추출물의 향미를 개선하며 저장성을 높인 상태로 구형으로 유지되면서 용액상에 존재하다가 pH를 조절하여 서로 반대의 전하를 띄게 하여 코아서베이션을 일으키면 소엽추출물을 중심으로 캡슐화가 진행할 수 있게 된다.

【0018】 본 발명의 소엽 추출물의 마이크로캡슐은 지용성의 소엽 추출물이 갖는 특유의 향기와 색상으로 인해 섭취가 어려운 문제와 취급의 어려움을 해결할



수 있으며, 또한, 소엽 추출물의 저장성을 증가시켜 안정적으로 사용할 수 있어 치매의 예방 또는 개선할 수 있게 된다.

【0019】 본 발명의 소엽 추출물의 마이크로캡슐을 이용한 식품조성물은 진술한 지용성 소엽추출물 유화액의 코어물질과 알지네이트의 셸 물질로 이루어진 마이크로캡슐을 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등을 함유시켜 제조될 수 있으며, 소엽 추출물의 마이크로캡슐은 성인 기준으로 1일 10 내지 5,000mg/kg 체중, 바람직하게는 40 내지 3,000mg/kg 체중의 범위로 사용한다.

【0020】 또한, 본 발명의 식품 조성물에는 소엽 추출물의 마이크로캡슐의 제거 활성 및 생육 저해 활성에 방해가 되지 않는 성분을 포함시킬 수 있다. 예를 들면, 유효제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

【0021】 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

【0022】 <실시예 1> 소엽 추출물의 제조

【0023】 불순물이 제거된 소엽에 표 1의 농도를 갖는 에탄올을 1 : 15 중량 비율로 사용하여 24시간 상온에 침지시킨 후 여과지로 여과한 여액을 진공회전농축기를 사용하여 농축하여 소엽 추출물을 수득하였다. 에탄올 0% 추출물은 소엽을 열

수로 추출하여 수득하였다. 수득된 소엽 추출물에서 에탄올의 농도에 따른 베타-아밀로이드 응집 억제효과를 갖는 지표성분인 로즈마린산과 알파-아사론의 함량을 확인하여 함께 나타내었다.

【0024】 【표 1】

추출 용매	수득율(%)	지표성분 함량(μg/g)	유효성분 함량(μg/g)
		Rosmarinic acid 로즈마린산	Alpha-asarone 알파 아사론
Ethanol 0 v/v%	14.8	0.16	0.01
Ethanol 20 v/v%	12.2	1.28	0.01
Ethanol 30 v/v%	12	1.8	0.01
Ethanol 40 v/v%	11.8	2.24	0.01
Ethanol 60 v/v%	11.2	6.54	0.02
Ethanol 80 v/v%	10.1	11.26	0.03
Ethanol 100 v/v%	9.2	7.73	0.44

【0025】 표 1에 나타난 바와 같이, 소엽 추출물의 수득율은 에탄올의 농도 및 열수에 관계없이 유사한 것으로 확인할 수 있었다. 그러나, 열수에 비하여 에탄올의 농도가 증가할수록 지표성분인 로즈마린산과 유효성분인 알파-아사론의 함량이 증가하였다.

【0026】 실시예 2 <소엽 추출물의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과>

【0027】 상기 실시예 1에서 얻은 소엽 추출물에 대하여 Thioflavin T 형광 실험법을 이용하여 Aβ의 응집 정도를 측정하였다. 우선, Aβ(1-42)를 DMSO에 1 mM의 농도로 녹인 후 50 μl의 D.W.로 희석하였다. 이렇게 준비된 20 μM Aβ(1-42)에 20 μg/ml의 농도로 상기 실시예 1에서 얻은 소엽 추출물을 처리한 뒤 37℃에서 24시간 배양시켰다. Thioflavin T를 100 mM glycine buffer(pH 8.5)에 300 μM

농도로 녹여 준비한 다음, 사용 전 50배로 희석하여 6  $\mu$ M Th T를 만든 후 배양이 끝난 시료 50 $\mu$ l에 최종농도가 3  $\mu$ M 이 되도록 50 $\mu$ l의 6  $\mu$ M Th T를 처리하여 상온에서 30분 방치한 뒤 Multi mode microplate reader(Biotek Instruments, Winooski, USA)를 이용하여 excitation 442 nm와 emission 485 nm에서 형광 값을 측정하여 도 1에 나타내었다.

【0028】 도 1에 도시된 바와 같이, 베타-아밀로이드 억제율은 열수로 추출된 소엽 추출물과 에탄올로 추출된 소엽 추출물이 모두 효능이 있는 것을 확인할 수 있었다.

【0029】 실시예 3<소엽추출물의 코어-셀 마이크로캡슐의 제조>

【0030】 실시예 1에서 수득된 소엽 추출물 1kg에 MCT Oil 1kg, 덱스트린(Dextrin) 1kg, 글리세린에스테르 500g, 정제수 2L를 첨가하여, 가온하면서 분산, 용해하며 수상을 수득하였다. 그 후, 75℃에서 30분간 교반하며 예비 유화시킨 다음 유화액을 초고압균질기(BOB Korea 제품 : 80l/hr)를 사용하여 400bar의 압력 하에서 균질화하여 지용성 소엽추출물 유화액을 제조하였다.

【0031】 그리고, 지용성 소엽추출물 유화액을 코어물질로 이용하고 저점도(2.2% 농도) 알지네이트를 셸 물질로 이용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산시켜 교반하였다.

【0032】 그 후, 상기 용액들을 정량 공급펌프를 이용하여 8ml/min의 일정한 속도로 0.6MPa 공기 압력이 투입되고 있는 이류체 노즐 내부로 공급하여 소엽추출

2020-10-28

물을 중심으로 캡슐화시켜 소엽추출물의 마이크로캡슐을 제조하였다.

16-12

## 【청구범위】

### 【청구항 1】

불순물이 제거된 소엽 추출물을 에탄올로 침진시킨 후에 농축하여 지용성 소엽 추출물 유화액을 생성하고, 지용성 소엽추출물 유화액을 코어물질로 이용하고 알지네이트를 셸 물질로 이용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산 교반하여 제조된 것을 특징으로 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐.

### 【청구항 2】

청구항 1에 있어서, 에탄올 추출물로서 1 : 10 ~ 1 : 15의 중량비로 사용하는 것을 특징으로 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐.

### 【청구항 3】

청구항 1의 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐을 성인 기준으로 1일 10내지 5,000mg/kg 체중으로 함유하는 것을 특징으로 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐을 이용한 식품조성물.

### 【청구항 4】

청구항 1 내지 청구항 3 중의 어느 한 항에 있어서, 건강식품 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 중의 어느 하나인 것

2020-10-28

을 특징으로 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐을 이용한 식품조성물.

16-14

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 베타-아밀로이드 응집체를 억제할 수 있는 소엽 추출물을 코어 물질로 사용하고 알지네이트를 셸 물질로 사용하여 마이크로캡슐로 식품 조성물에 사용하기 때문에 소엽추출물의 향미를 개선하며 저장성을 높이면서 안정적으로 섭취할 수 있도록 하는 소엽 추출물을 함유하는 마이크로캡슐 및 이를 이용한 식품조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 소엽 추출물의 마이크로캡슐을 이용한 식품조성물은 불순물이 제거된 소엽 추출물을 에탄올로 침진시킨 후에 농축하여 지용성 소엽 추출물 유화액을 생성하고, 지용성 소엽추출물 유화액을 코어물질로 이용하고 알지네이트를 셸 물질로 이용하여 칼슘클로라이드 용액 또는 키토산 용액에 넣고 분산 교반하여 제조된 소엽 추출물의 마이크로캡슐을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

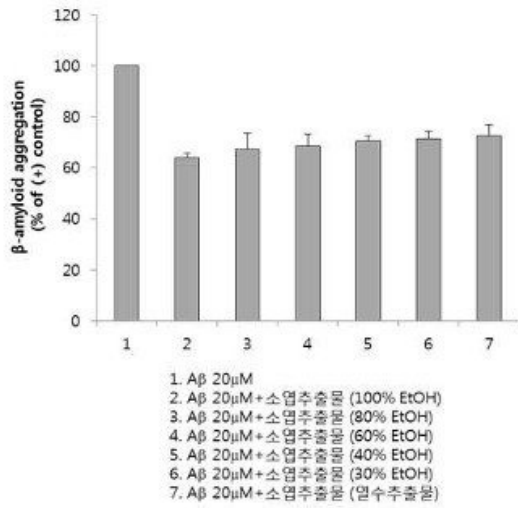
### 【대표도】

#### 도 1

【도면】

【도 1】

소엽추출물의 A $\beta$  aggregation 억제 효과





02. 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.11.30  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(2)  
출원번호 10-2021-0168636 (접수번호 1-1-2021-1386920-73)  
(DAS접근코드C917)  
출원인명칭 주식회사 에스에프씨바이오(1-2000-005689-7)  
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)  
발명자성명 김성규 김철진 박미희 김인선 김건우  
발명의명칭 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.  
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호  
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.  
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

**【서지사항】**

<b>【서류명】</b>	특허출원서
<b>【참조번호】</b>	2
<b>【출원구분】</b>	특허출원
<b>【출원인】</b>	
<b>【명칭】</b>	주식회사 에스에프씨바이오
<b>【특허고객번호】</b>	1-2000-005689-7
<b>【대리인】</b>	
<b>【성명】</b>	최규환
<b>【대리인번호】</b>	9-2005-001504-0
<b>【포괄위임등록번호】</b>	2007-002696-9
<b>【발명의 국문명칭】</b>	소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물
<b>【발명의 영문명칭】</b>	Composition for preventing, ameliorating or treating Alzheimer's dementia comprising Perilla frutescens extract mixture as effective component
<b>【발명자】</b>	
<b>【성명】</b>	김성규
<b>【성명의 영문표기】</b>	Kim, Sung-Kyu
<b>【주민등록번호】</b>	
<b>【우편번호】</b>	
<b>【주소】</b>	

**【발명자】**

**【성명】** 김철진

**【성명의 영문표기】** Kim, Chul Jin

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 박미희

**【성명의 영문표기】** Park, Mi Hee

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 김인선

**【성명의 영문표기】** Kim, In Seon

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【발명자】**

**【성명】** 김건우

**【성명의 영문표기】** Kim, Gunwoo

**【주민등록번호】**

**【우편번호】**

**【주소】**

**【출원언어】** 국어

**【심사청구】** 청구

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1190123

**【과제번호】** 119012-3

**【부처명】** 농림축산식품부

**【과제관리(전문)기관명】** 농림식품기술기획평가원

**【연구사업명】** 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업

**【연구과제명】** 소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품개발

**【기여율】** 1/1

**【과제수행기관명】** (주)에스에프씨바이오

**【연구기간】** 2021.01.01 ~ 2021.12.31

**【취지】** 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 최규환

(서명 또는 인)

**【수수료】**

<b>【출원료】</b>	0 면	46,000 원
<b>【가산출원료】</b>	15 면	0 원
<b>【우선권주장료】</b>	0 건	0 원
<b>【심사청구료】</b>	7 항	451,000 원
<b>【합계】</b>		497,000 원
<b>【감면사유】</b>	소기업(70%감면)[1]	
<b>【감면후 수수료】</b>		149,100 원

## 【발명의 설명】

### 【발명의 명칭】

소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물(Composition for preventing, ameliorating or treating Alzheimer's dementia comprising Perilla frutescens extract mixture as effective component)

### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 소엽 추출 복합물, 보다 상세하게는 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 치매(dementia)는 정상적인 노화와는 구분해야 할 병적인 현상이며, 그 원인에 따라 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증으로 오는 치매로 구별된다.

【0003】 이 중 알츠하이머성 치매의 발병기전은 명확히 알려져 있지 않으나, 신경 독성 단백질인 베타-아밀로이드( $\beta$ -amyloid protein)의 독성이 가장 중요한 원인으로 제시되고 있다. 이 물질은 아밀로이드 전구 단백질(APP:amyloid precursor protein)의 잘못된 대사로 인해 생성되는 것으로 알려져 있고, APP의 정상 대사물은 신경세포 보호작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 유전공학적 방

법을 이용한 연구결과에서는 베타아밀로이드( $\beta$ -amyloid) 등의 독성 단백질이 세포와 혈관에 쌓여 신경세포에 독성을 미침으로써 결과적으로 뇌기능에 장애가 초래된다는 사실이 밝혀졌다.

【0004】 현재까지 치매 치료를 위한 약물치료는 아세틸콜린 전구체를 투여하거나 아세틸콜린의 분해를 저해하는 약물을 투여하여 뇌의 아세틸콜린 농도를 높여주는 방법이 사용되어 왔다. 대표적인 약물로는 타크린(tacrine), 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galantamine) 등이 있다.

【0005】 하지만, 기존 치매 치료제는 주로 아세틸콜린에스테라제 억제 효과만을 가지고 있을 뿐, 베타-아밀로이드의 형성 억제 또는 이미 형성된 베타-아밀로이드 응집체의 분해 기능은 없었다. 따라서, 치매의 근원적 치료가 불가능할 뿐만 아니라, 이미 베타-아밀로이드 응집체가 형성된 치매 환자에게는 아무런 효과를 발휘할 수 없었다. 뿐만 아니라, 여러 화학 물질들을 포함하는 현존하는 치매 치료제들은 구역, 구토, 어지러움, 설사, 신경계이상 등의 부작용이 빈발하는 문제가 있다. 따라서 인체 부작용이 적은 천연물을 이용하여 베타-아밀로이드 응집체를 억제할 수 있는 치매 치료제의 개발이 요구되고 있다.

【0006】 한편, 한국공개특허 제2015-0050716호에 장수풍뎅이를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 약학 조성물과 알츠하이머성 치매 개선용 식품 조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2021-0118274호에 해삼 효소 추출물의 알츠하이머성 치매 질환 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있지만, 분발명의 소엽 추출 복합물, 보다 상세하게는 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물

을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에  
관해 개시된 바 없다.

**【발명의 내용】**

**【해결하고자 하는 과제】**

【0007】 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 소엽 추출 복합  
물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물  
을 제공하고, 상기 유효성분, 구체적으로 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물의  
베타-아밀로이드 응집 억제효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

**【과제의 해결 수단】**

【0008】 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효  
성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을  
제공한다.

【0009】 또한, 본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하  
이머성 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

**【발명의 효과】**

【0010】 본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성  
치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 소엽 추출물 및 정향 추출  
물은 세포독성이 없는 농도에서 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 효과가 우수하였  
다.



**【도면의 간단한 설명】**

【0011】 도 1은 소엽 추출물의 베타-아밀로이드 응집 억제효과를 확인한 결과이다. \*은 베타-아밀로이드 단독 처리군 대비 베타-아밀로이드 응집 정도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며,  $p < 0.05$ 이다.

도 2는 정향 추출물의 베타-아밀로이드 응집 억제효과를 확인한 결과이다. \*은 베타-아밀로이드 단독 처리군 대비 베타-아밀로이드 응집 정도가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며,  $p < 0.05$ 이다.

도 3은 소엽 추출물의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 4는 정향 추출물의 세포독성을 확인한 결과이다.

**【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】**

【0012】 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

【0013】 상기 소엽 추출 복합물은 바람직하게는 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물이고, 더 바람직하게는 소엽 추출물 1 중량부에 대하여 정향 추출물을 0.5~10 중량부 혼합한 혼합물이며, 더욱더 바람직하게는 소엽 추출물 1 중량부에 대하여 정향 추출물을 1 중량부 혼합한 혼합물인 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

【0014】 상기 소엽 추출물의 추출 용매는 물, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 바람직하게는 에탄올을 이용하여 추출하는 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0015】 상기 정향 추출물은 바람직하게는 베타카리오필렌을 90-99%(v/v) 함유하는 추출물이고, 더 바람직하게는 베타카리오필렌을 95%-99%(v/v) 함유하는 추출물이고, 더욱더 바람직하게는 베타카리오필렌을 97%-99%(v/v) 함유하는 추출물인 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0016】 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 유효성분은 베타-아밀로이드 응집을 감소시키는 효과가 있다.

【0017】 본 발명의 조성물은 베타-아밀로이드 축적형 알츠하이머를 예방 또는 개선하는데 효과적이다.

【0018】 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

【0019】 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 총 원료에 대하여 15 중

량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

【0020】 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 소엽 추출 복합물은 성인기준 1일 10~2,000mg 섭취할 수 있다.

【0021】 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

【0022】 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대,

사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

【0023】 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

【0024】 또한, 본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

【0025】 상기 소엽 추출 복합물은 바람직하게는 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물이고, 더 바람직하게는 소엽 추출물 1 중량부에 대하여 정향 추출물을 0.5-10 중량부 혼합한 혼합물이며, 더욱더 바람직하게는 소엽 추출물 1 중량부에 대하여 정향 추출물을 1 중량부 혼합한 혼합물인 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

【0026】 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

【0027】 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

【0028】 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.

【0029】 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당하는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텍솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

【0030】 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

【0031】 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

【0033】 이하, 제조예 및 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 제조예 및 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

**【0035】 제조예 1. 소엽 추출 복합물의 제조**

【0036】 1) 소엽 추출물의 제조

【0037】 건조된 소엽을 분쇄한 후, 분쇄된 소엽 1 중량부에 대하여 60, 80 또는 100%(v/v) 에탄올을 15 중량부 첨가한 후 24시간 동안 상온에 침지시킨 다음 여과한 다음 상기 여액을 진공회전농축기를 이용하여 농축하여 소엽 60, 80 또는 100%(v/v) 에탄올 추출물을 획득하였다.

【0039】 2) 정향 추출물의 제조

【0040】 건조된 정향을 분쇄한 후, 진공상태에서 250-270℃로 증기 증류하여 베타카리오필렌을 98% 함유하는 정향 추출물을 획득하였다.

**【0042】 실시예 1. 소엽 추출 복합물 구성물질의 베타-아밀로이드(A $\beta$ ) 응집 억제효과**

【0043】 티오플라빈 T(Thioflavin T, Th T) 형광 실험법을 이용하여 베타-아밀로이드(A $\beta$ )의 응집 정도를 측정하였다. 구체적으로, A $\beta$ (1-42)를 DMSO에 1mM의 농도로 녹인 후 50 $\mu$ l의 증류수로 희석하였다. 그 후, 상기 준비된 20  $\mu$ M A $\beta$ (1-42)에 농도별로 소엽 추출물 또는 정향 추출물을 처리한 뒤, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. Th T를 100mM 글라이신 완충용액(glycine buffer, pH 8.5)에 300  $\mu$ M 농도로 녹여 준비한 다음, 사용 전 50배(v/v) 희석하여 6  $\mu$ M Th T를 만든 후 배양이 끝난 시료 50 $\mu$ l에 최종농도가 3  $\mu$ M이 되도록 50 $\mu$ l의 6  $\mu$ M Th T를 처리하여 상온에서 30분 동안 방치한 뒤, 멀티 모드 마이크로플레이트 리더기(Biotek Instruments, Winooski, USA)를 이용하여 여기(excitation) 442nm 및 방출(emission) 485nm 조건에서 형광값을 측정하여 베타-아밀로이드의 응집 정도를 확인하였다.

【0044】 그 결과, 도 1 및 도 2에 개시된 바와 같이 소엽 추출 복합물 구성물질인 소엽 추출물 또는 정향 추출물은 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 효과가

농도의존적으로 증가하였다.

**【0046】 실시예 2. 소엽 추출 복합물 구성물질의 세포독성 확인**

【0047】 소엽 추출 복합물 구성물질의 세포독성을 확인하기 위해, PC12 세포에 소엽 추출물 또는 정향 추출물을 처리하여 MTT[4,5-디메틸디아졸-2-일-2,5-테페닐테트라졸리움 프로미드] 분석을 진행하였다. 구체적으로, PC12 세포를 96웰 플레이트에  $6 \times 10^4$ 개/웰의 세포 수로 분주한 후, 24시간 동안 배양하였다. 그 후 소엽 추출물 또는 정향 추출물을 각 웰에 처리한 후, 통상의 MTT 분석 방법을 통하여 세포독성을 확인하였다.

【0048】 그 결과, 도 3 및 4에 개시된 바와 같이 본 발명의 소엽 추출물 및 정향 추출물은 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 농도에서 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.



**【청구범위】**

**【청구항 1】**

소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 상기 소엽 추출 복합물은 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물인 것을 특징으로 하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**【청구항 3】**

제2항에 있어서, 상기 소엽 추출물의 추출 용매는 물, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**【청구항 4】**

제2항에 있어서, 상기 정향 추출물은 베타카리오필렌을 90-99%(v/v) 함유하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**【청구항 5】**

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 베타-아밀로이드 응집을 감소시키는 것을 특징으로 하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**【청구항 6】**

소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**【청구항 7】**

제6항에 있어서, 상기 소엽 추출 복합물은 소엽 추출물 및 정향 추출물의 혼합물인 것을 특징으로 하는 알츠하이머성 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**【요약서】**

**【요약】**

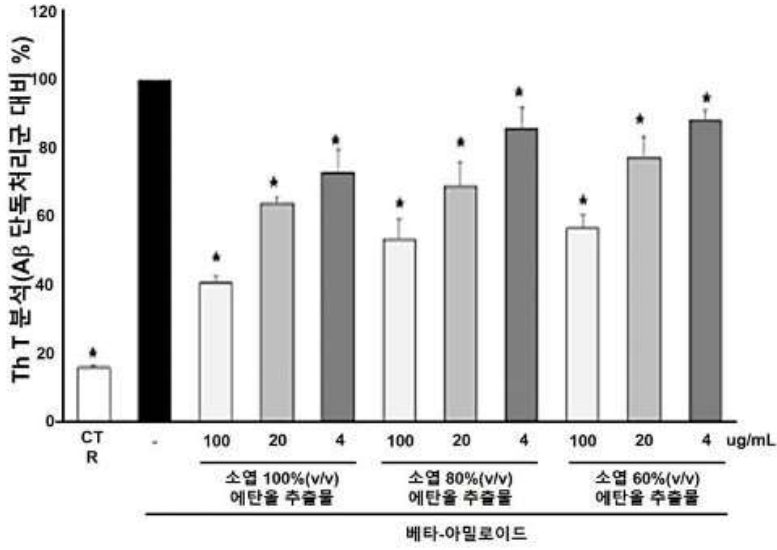
본 발명은 소엽 추출 복합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머성 치매의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 소엽 추출물 및 정향 추출물은 세포독성이 없는 농도에서 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 효과가 우수하므로, 본 발명의 유효성분을 함유하는 조성물은 알츠하이머성 치매 개선을 위한 건강기능식품 또는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

**【대표도】**

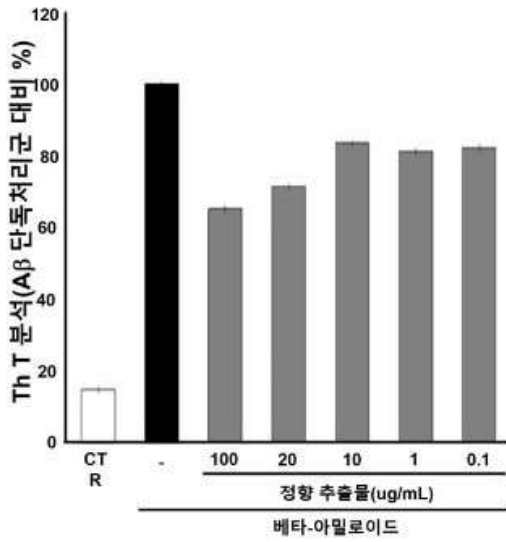
도 1

【도면】

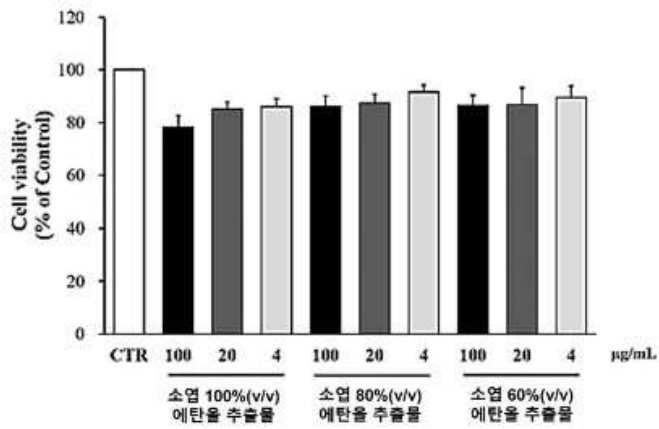
【도 1】



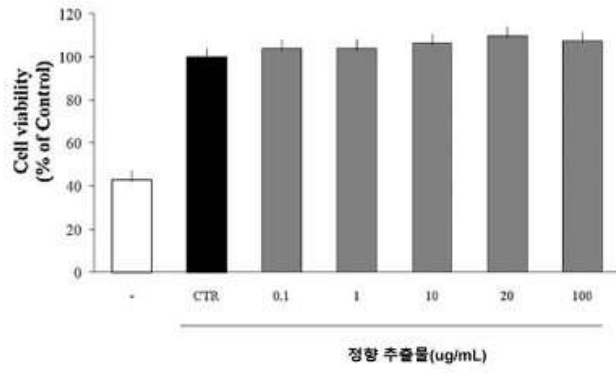
**【표 2】**



**【표 3】**



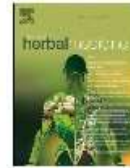
**【도 4】**





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Herbal Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/hermed](http://www.elsevier.com/locate/hermed)

Research paper

## Immunostimulatory activity of stem bark of *Kalopanax pictus* in RAW 264.7 macrophage

Sunggun Kim<sup>a,1</sup>, Chung Hyeon Lee<sup>a,1</sup>, Ji-Yun Yeo<sup>a</sup>, Kwang Woo Hwang<sup>b,\*,\*</sup>, So-Young Park<sup>a,\*,\*\*</sup><sup>a</sup> Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Dankook University, 119, Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungnam, 330-714, Republic of Korea<sup>b</sup> Laboratory of Host Defense Modulation, College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul, 06974, Republic of Korea

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Immune-enhancing activity  
Macrophage  
*Kalopanax pictus*  
RAW 264.7 cells  
Cytokines

## ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the potential immune-enhancing effects of hot water extracts from *Kalopanax pictus* (KPW) stem barks on mouse macrophage RAW 264.7 cells. Cytotoxicity and nitric oxide (NO) production were measured after KPW treatment via MTT and Griess assays, respectively. The levels of immune-related proteins such as iNOS and COX-2 were determined by Western blot analysis, and cytokines related to immune responses and phagocytic activity were examined by ELISA. KPW significantly increased NO production in a concentration-dependent manner without any cytotoxicity. In addition, the levels of certain enzymes (iNOS and COX-2) and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12) were also significantly upregulated. Furthermore, the phagocytic activity of RAW 264.7 cells was significantly enhanced by KPW treatment. Taken together, these results suggest that KPW have a potential as an immunostimulatory agent.

## 1. Introduction

Macrophages play an essential role in the innate immune system by defending against infectious and cancerous assaults (Parham, 2009). They initiate an immune reaction against invading xenobiotics (McCabe and MacNamara, 2016; Schultze and Schmidt, 2015), and they have heterogeneous phases based on their microenvironmental conditions: active macrophages (M1) are polarized by interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and LPS and boost immune reactions. However, in their alternative form, macrophages (M2) induced by IL-4 and -13 suppresses immune responses (Solinas et al., 2009; Varin and Gordon, 2009). Both macrophage phases hold each other in check to balance the host's immune system.

A basic function of these cells is phagocytosis. It is the immune mechanism through which macrophages engulf, neutralize, and process captured invaders so that antigenic pieces of the invaders can be presented to other immune cells, like T helper and B cells, to further stimulate immune responses (Krneta et al., 2013; Kudrin and Ray, 2008). Additionally, macrophages are involved in the production of immune mediators such as nitric oxide, prostaglandins, and cytokines, which lead immune cascades (Balkwill, 2009; Kalinski, 2012; Liu et al.,

2009; Murakami and Ohigashi, 2007). Thus, when macrophages' functions are compromised, the effects on a host's homeostasis can be devastating.

Though overactive immune reactions cause inflammation and autoimmune diseases, the upregulation of immune system components helps prevent pathologic infections and cancer. Moreover, many everyday stress factors such as stress, environmental toxins, sedentary lifestyle, alcohol and tobacco abuse, cortisone treatment, chemotherapy, antibiotic usage, and infections, can weaken the immune system (Jang et al., 2016). Certain natural resources with little to no toxic effects have been consumed for thousands of years; thus, they could be a valuable source of agents that can sustain the immune system (Block and Mead, 2003; Kim et al., 2008; Kwon et al., 2016; Zhang et al., 2018). Indeed, several medicinal plants have been reported to enhance immune system functions (Zhang et al., 2018).

*Kalopanax pictus*, which belongs to the *Araliaceae* family, grows naturally in northeast Asia, and the stem bark of this plant has been used to treat rheumatic arthritis, lumbago, furuncle, carbuncle, wound, diarrhea, and scabies, especially in Korea (Li et al., 2002). Phytochemical research has shown that *K. pictus* contains saponins, phenylpropanoids, lignans, simple phenols and their glycosides, and

\* Corresponding author at: Laboratory of Host Defense Modulation, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Republic of Korea.

\*\* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam, Republic of Korea.

E-mail addresses: [khwang@cau.ac.kr](mailto:khwang@cau.ac.kr) (K.W. Hwang), [soypark23@dankook.ac.kr](mailto:soypark23@dankook.ac.kr) (S.-Y. Park).<sup>1</sup> These two authors equally contributed to this work.<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100504>

Received 19 April 2019; Received in revised form 6 May 2021; Accepted 9 August 2021

Available online 12 August 2021

2210-8033/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.



polyacetylenes (Sano et al., 1991; Shao et al., 1990). Recently, multiple studies examining extracts or component(s) isolated from this plant have demonstrated its anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-rheumatoid effects (Choi et al., 2002; Kim et al., 2002; Park et al., 1998; Quang et al., 2011, 2013). Furthermore, kalopanaxsaponin A and B, two main components of *K. pictus*, showed beneficial effects in animal models regarding colitis and memory loss (Jeong et al., 2012; Joh and Kim, 2011; Joh et al., 2012). However, the immune-enhancing effect of *K. pictus* has not yet been examined. In this study, the effect of *K. pictus* on the immune system was examined with a focus on macrophage functions. Immune-related mediators, enzymes, and the phagocytic activity in murine macrophage RAW 264.7 cells were measured.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Cells were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) purchased from Welgene (Gyeongsan, Korea). Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) was acquired from Biossang (Seongnam, Korea) to measure cell viability. Griess reagent, dimethyl sulfoxide (DMSO), and lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111: B4) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) to conduct cellular assays. Antibodies specific for cyclooxygenase-2 (COX-2), tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and iNOS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used for Western blot analyses. All antibodies specific for cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12) were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

### 2.2. Plant extracts

The stem bark of *K. pictus* was obtained from a commercial market (hanyakjae.net, Seoul, Korea) in 2017. The crude drug was confirmed and authenticated by Prof. S-Y Park, and all voucher specimens were stored in the Pharmacognosy laboratory at the Dankook University College of Pharmacy. A dried sample (100 g) was pulverized and boiled in hot water at a temperature that ranged between 80 and 90 °C until the volume of the water added at the beginning was reduced to half. Then, the filtrate was lyophilized to acquire the hot water extract of *K. pictus* (KPW). Generally, the pulverized sample was extracted 3–4 times with an equal volume of water soaking all powder samples.

### 2.3. Cell culture

RAW 264.7 cells (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) were cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS. The cells were incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. An MTT assay was employed to evaluate cytotoxicity. RAW 264.7 cells (2.0 × 10<sup>4</sup> cells per well) were seeded in a 96 well plate and incubated for 24 h to allow for attachment before being tested and treated with or without KPW at various concentrations (10, 20, 50, and 100 µg/mL) for 22 h. MTT solution (5 mg/mL) was added to each well for 3 h, the supernatants were harvested, and formazans were dissolved with DMSO. Absorbances were measured with a microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) at 540 nm. A DMEM-only-treated group was used as the vehicle control.

### 2.4. Measurement of NO

Cells were incubated with or without KPW for 22 h, and the supernatants were introduced to an equal volume of Griess reagent for 15 min. The absorbance of the samples was measured at 540 nm. The positive control was an LPS-treated group (1 µg/mL).

### 2.5. Western blot analysis of immune-related enzymes

RAW 264.7 cells (2 × 10<sup>6</sup> cells per well) were placed in a 6-well plate

and incubated for 24 h to encourage attachment. The cells were then treated with or without KPW at various concentrations (10, 20, 50, and 100 µg/mL) for 22 h. To prepare cell lysates, the media was discarded, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and lysed using Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting. The membranes were blocked in 5 % skim milk in PBS. The blots were incubated overnight at 4 °C with each primary antibody diluted in PBS. Next, the membranes were exposed to secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase in 5 % skim milk for 2 h. Target proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ChemIDoc XRS+, Biorad, Hercules, CA, USA). The positive control was an LPS-treated group (1 µg/mL).

### 2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

After treatment with various concentrations of KPW extracts (10, 20, 50, and 100 µg/mL) for 22 h, the concentration of each cytokine in cell supernatants was determined by ELISA. Briefly, 96-well plates were coated (overnight at 4 °C) with antibodies specific for certain cytokines (i.e. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12). Each well was rinsed three times with 0.05 % Tween 20 in PBS (PBS-T), incubated with blocking solution for 1 h at room temperature, and rinsed four times with PBS-T. Diluted standards and cell supernatant media collected were added to the plate and the plate was incubated overnight at 4 °C. The secondary antibodies were added after washing away excess primary antibodies. The reaction was terminated after 45 min. Wells were treated with avidin-conjugated alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) and incubated at room temperature for 30 min. Wells were incubated with the substrate solution at room temperature for 5–30 min before the addition of a stop buffer. The absorbance of each sample was measured at 405 nm on a microplate reader (Emax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). An LPS (1 µg/mL)-treated group was used as a positive control.

### 2.7. Phagocytic activity measurement

A CytoSelect™ 96-well phagocytosis assay kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) was used to evaluate the phagocytic activity of RAW 264.7 cells according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were placed in a 96-well plate at 1 × 10<sup>5</sup> cells/well and incubated for 24 h. The cells were then treated with or without KPW (10, 20, 50, and 100 µg/mL). Subsequently, non-opsonized zymosan was added to each well, and the amount of engulfed zymosan was measured at 405 nm after 2 h of incubation at 37 °C using a microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA). Vehicle and LPS (1 µg/mL)-treated groups were used as negative and positive controls, respectively.

### 2.8. HPLC

A Waters LC (Waters Corp., Milford, USA) and empower software were used for HPLC analysis. Chromatographic separation was conducted using a C18 column (Kromasil, 250 × 4.6, 5 µm particle size) with a gradient solvent system composed of water with 0.05 % phosphoric acid (i) and acetonitrile (ii) (gradient profile: 0–30 min, linear 6–24 % ii). The flow rate was set to 1.0 mL/min and the detection wavelength used was from 200 to 400 nm. KPW was prepared at 5 mg/mL, and content analysis was performed by comparison with a standard curve of each standard (chlorogenic acid and syringaresinol diglucoside).

### 2.9. Statistical analysis

All values are represented as means ± standard deviation. Statistical analyses were conducted using a two-tailed Student's *t*-test in Microsoft excel ver. 2016. *p* Values < 0.05 were considered statistically significant.



### 3. Results

#### 3.1. KPW increased NO levels without any cytotoxicity

KPW treatment did not show any cytotoxicity at the concentrations tested and increased the levels of NO in a concentration-dependent manner (Fig. 1). Although cytotoxicity tended to increase in a dose-dependent fashion, it did not reach below 80 %, which was considered toxic when compared to the vehicle-treated group (Fig. 1A). On the other hand, KPW upregulated NO production up to 3 times more than that of the vehicle-treated group (Fig. 1B).

#### 3.2. Two enzymes producing immune mediators were upregulated by KPW treatment

The levels of the immune-related enzymes iNOS and COX-2 were determined by Western blot analysis. KPW increased the production of these two enzymes when compared to the vehicle-treated group in a dose-dependent manner; however, there was a difference in the magnitude of upregulation (i.e. the level of iNOS was not as strongly affected by KPW treatment as COX-2) (Fig. 2). Although a small amount of KPW treatment (100 µg/mL) showed a statistically significant increase in iNOS expression, COX-2 expression increased from 20 µg/mL of KPW treatment up to 100 µg/mL (Fig. 2).

#### 3.3. Cytokines that regulate immune reactions were stimulated by KPW

Cytokines that facilitate immune cascades such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and TNF- $\alpha$  were stimulated by KPW treatment (Fig. 3). All 4 cytokines were upregulated by KPW treatment in a dose-dependent manner, but not all were statistically significant. IL-6 levels increased as the KPW concentration increased, but the increase was not statistically significant (Fig. 3B). On the other hand, TNF- $\alpha$  levels were highly affected by KPW treatment and significantly increased at all points (10 ~ 100 µg/mL)

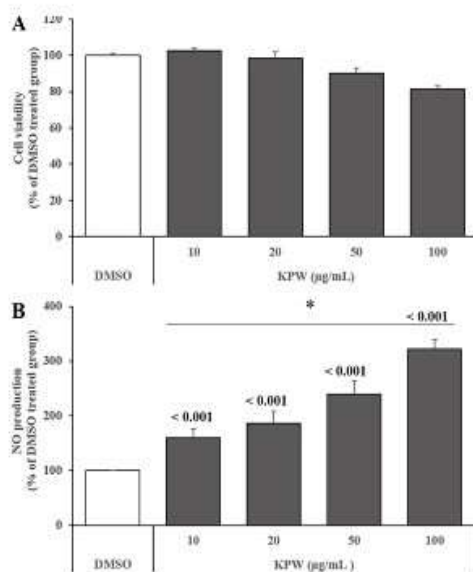


Fig. 1. The cytotoxicity of KPW (A) and its effect on NO production (B). The first left bar, colored white, represents the DMSO-treated group. Cell viability below 80 % of the vehicle-treated group was considered cytotoxic. Cells were supplemented with KPW extracts at varying concentrations (10, 20, 50, and 100 µg/mL). The increase in NO production was analyzed using a two-tailed Student's *t*-test (\*  $p < 0.05$ ; DMSO-treated group vs each concentration-treated group). The values are presented as means  $\pm$  standard deviation.

(Fig. 3D). In addition, IL-1 $\beta$  and IL-12 were upregulated more obviously by KPW when compared to IL-6 (Fig. 3A and Fig. 3C).

#### 3.4. KPW enhanced phagocytic activity

Phagocytosis is a basic and crucial mechanism for macrophages. It is non-selective and improves immune system responses. The phagocytotic activity was determined with a commercial kit that enabled the counting of engulfed zymosans extracted from yeast. KPW enhanced phagocytotic activity when compared to the vehicle group at all concentrations (Fig. 4). The 50 µg/mL KPW-treated group showed equivalent phagocytotic activity to the LPS (1 µg/mL)-treated group.

#### 3.5. Qualitative and quantitative analyses of the main active compounds in KPW

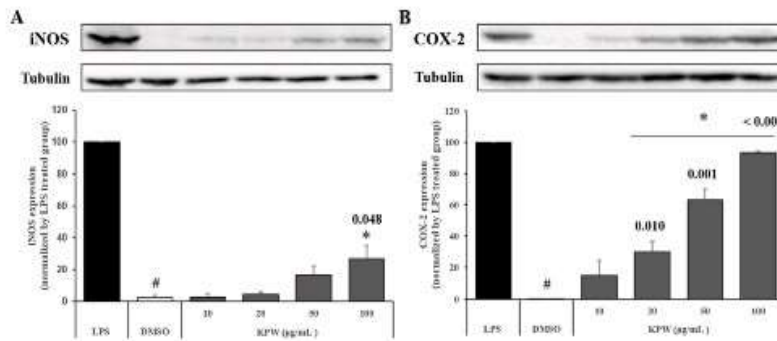
The main active compounds in KPW were separated via HPLC, and chlorogenic acid and syringaresinol diglucoside were detected at 10.7 and 17.6 min, respectively (Fig. 5). HPLC isoabsorbance profile was seen in (A) and separated chromatograms was displayed at three different wavelengths 230 (B), 254 (C) and 330 (D) nm to confirm the optimal UV absorbance of each peak. The contents of chlorogenic acid and syringaresinol diglucoside were resolved between 4.5 and 18.7 µg/mL.

### 4. Discussion

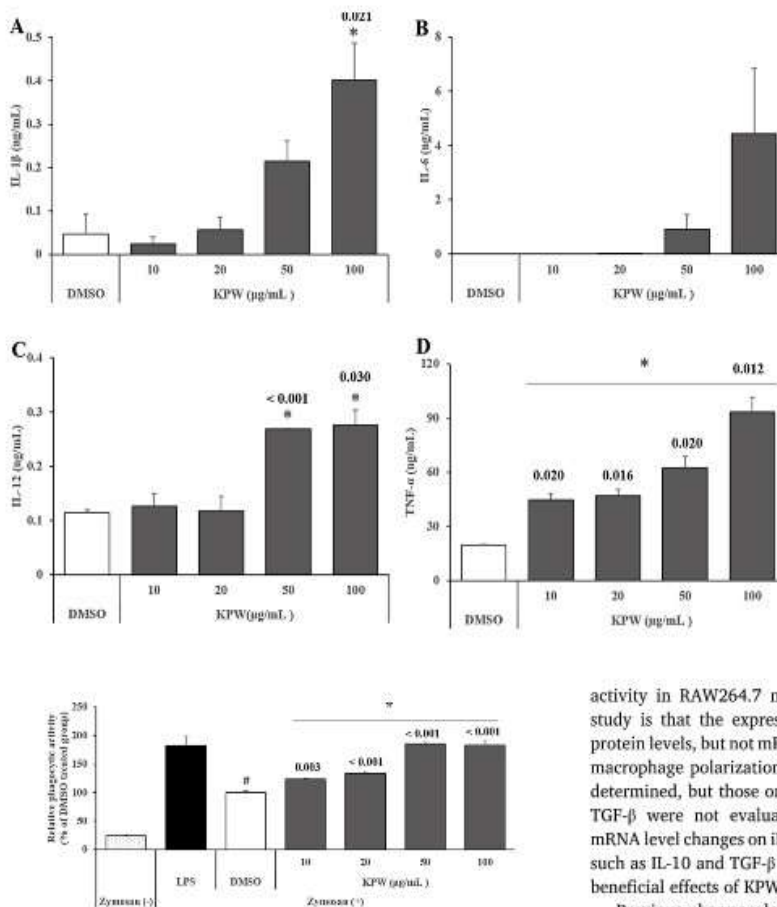
Macrophages are polarized into two phases based on their micro-environmental conditions. Once a macrophage is exposed to T1 cytokines, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF, or LPS, it becomes polarized and converts into an M1 type macrophage (Solinas et al., 2009). However, M2 polarization of macrophages is affected by cytokines IL-4 and -13, which are produced by Th2 cells, mast cells, and basophils (Varin and Gordon, 2009). Macrophages behave differently within the immune system depending on their phenotype.

M1 macrophages produce proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and IL-15, and they coordinate with chemokines like CXCL10, as well as immune mediators including reactive oxygen intermediates (ROI) and NO, to kill pathogens and/or collect other immune cells (Solinas et al., 2009). Additionally, macrophages express MHC class II on the surface to communicate with other immune cells, which is essential for a proper immune response (Movahedi et al., 2010). Consequently, the M1 phenotype is more likely to attack or defend against xenobiotics or cancer through immune activation. In contrast, M2 macrophages increase anti-inflammatory factors such as TGF- $\beta$  and IL-10 to diminish inflammatory reactions and Th1 immune signals and to induce angiogenesis, allergy responses, and tissue regeneration (Pollard, 2009; Wynn et al., 2013). Therefore, the M2 phase is advantageous in suppressing an abnormally activated immune reaction that can damage the host. Even though these two phases are crucial, severe problems can occur when either one is abnormally activated. Over-activated M1 polarization is closely related to inflammation and auto-immune diseases, and overactivated M2 polarization allows xenobiotics and cancer to settle inside the host. Therefore, natural products that encourage M1 polarization could be beneficial at maintaining M1 stage macrophages that defend against bacterial and cancerous invasions. The current study shows that KPW stimulates macrophages and encourages them to remain in an M1 state.

In regard to the present results obtained in this study, KPW increased the level of enzymes related to immune reaction such as iNOS and COX-2 from macrophages. In addition, KPW also upregulated the production of proinflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and TNF- $\alpha$  from RAW264.7 macrophages. Furthermore, KPW significantly increased the phagocytotic activity of RAW264.7 macrophages within the concentration range of 10–100 µg/mL. These results suggest that KPW exhibits immunostimulatory activity by increasing the production of immune-related enzymes (iNOS and COX-2), cytokines, and the phagocytotic

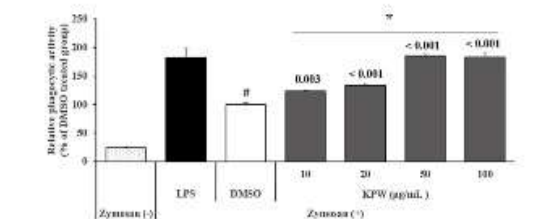


**Fig. 2.** The effect of KPW on the relative expression of iNOS (A) and COX-2 (B). Cells were treated with various concentrations of KPW extracts (10, 20, 50, and 100 µg/mL). The first left bar, colored black, represents the LPS-treated group, and the second left bar, colored white, represents the DMSO-treated group. Enzymes were quantified according to the spot density of each group followed by normalization against the house-keeper protein, tubulin. The increase in the relative expressions of the enzymes was statistically analyzed using a two-tailed Student's *t*-test (<sup>#</sup> *p* < 0.05: DMSO-treated group vs. LPS-treated group and <sup>\*</sup> *p* < 0.05: DMSO-treated group vs each concentration-treated group). The values are presented as means ± standard deviation.



**Fig. 3.** The effect of KPW on the expression of cytokines such as IL-1β (A), IL-6 (B), IL-12 (C), and TNF-α (D). Cells were treated with KPW at varying concentrations (10, 20, 50, and 100 µg/mL). The first left bar, colored white, represents the DMSO-treated group (LPS -). The concentrations of the four cytokines in cell culture supernatants were quantified by ELISA according to the standard curve of each one. The increased relative expression of each enzyme was statistically analyzed using a two-tailed Student's *t*-test (<sup>\*</sup> *p* < 0.05: DMSO-treated group vs each concentration-treated group). The values are presented as means ± standard deviation.

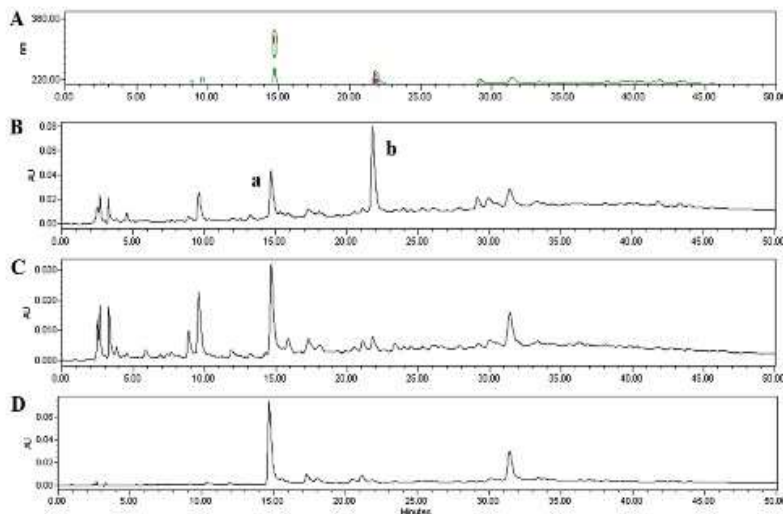
**Fig. 4.** Phagocytic activity after KPW treatment. Cells were treated with KPW at varying concentrations (10, 20, 50, and 100 µg/mL). The first left bar, colored white with cross stripes, represents the zymosan-free group, and the second left bar, colored black, and the third bar, colored white, represent the LPS- and DMSO-treated groups, respectively. The relative phagocytic activity was normalized against the DMSO-treated group. The increased relative expression of the enzymes was statistically analyzed using a two-tailed Student's *t*-test (<sup>#</sup> *p* < 0.05: DMSO-treated group vs. LPS-treated group and <sup>\*</sup> *p* < 0.05: DMSO-treated group vs each concentration-treated group). The values are presented as means ± standard deviation.



activity in RAW264.7 macrophages. However, the limitation of this study is that the expression of iNOS and COX-2 was determined at protein levels, but not mRNA level. In addition, the effects of KPW on M1 macrophage polarization including IL-1β, IL-6, IL-12, and TNF-α were determined, but those on M2 macrophage polarization such as IL-10 and TGF-β were not evaluated. Therefore, additional studies regarding mRNA level changes on iNOS and COX-2, and M2 macrophage polarization such as IL-10 and TGF-β will be performed in the future to confirm the beneficial effects of KPW on immunostimulatory activity.

Previous pharmacological studies on *K. pictus* mainly examined its anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* (Kim et al., 2002; Li et al., 2002). In addition, alcoholic extracts of *K. pictus* were mainly used in these studies. Anti-inflammatory and immune-enhancing effects may not be strictly opposing phenomena since both modulate the immune system. Depending on the basal situation, some components of *K. pictus* can have varying effects on certain functions like adaptogenic activity. Also, these results may suggest that different extraction methods of the same medicinal plant can yield completely opposite biological effects due to the different composition of chemical constituents that are included. The methanol extract of *K. pictus* was reported to have





**Fig. 5.** HPLC analysis of a KPW extract. HPLC isoabsorbance profile was seen in (A) and separated chromatograms was displayed at three different wavelengths 230 (B), 254 (C) and 330 (D) nm to confirm the optimal UV absorbance of each peak. Chromatographic analysis was performed using a C18 column (250 × 4 mm, 5 μm particle size) with a gradient solvent system composed of water with 0.05 % phosphoric acid (i) and acetonitrile (ii) (gradient profile: 0–30 min, linear 6–24 % ii). The flow rate was set to 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, and 10 μL of KPW (1 mg/mL) was injected. The peaks represent chlorogenic acid (a), and syringaresinol diglucoside (b).

anti-inflammatory activity in animal models (Lee et al., 2001). Saponins like kalopanax saponin derivatives or lignans obtained by alcohol extraction can have anti-inflammatory effects (Li et al., 2002), but the profile of the components obtained by hot water extraction might be different. Oligo- or polysaccharides or hydrophilic compounds having several monosaccharides in their structures can be extracted by hot water extraction (Jang et al., 2016; Chan et al., 2009). These substances might boost the immune system by activating immune cells, or they might be able to act as a bio-adjuvant, such as LPS, without any toxic response. Two well-known natural immune system enhancers are β-glucan, a polysaccharide isolated from mushrooms, and ginsenosides, triterpene glycosides with several sugars, and they are known to stimulate immune reactions (Block and Mead, 2003; Wynn et al., 2013). To summarise, our results suggest that KPW enhances the immune response through stimulating macrophages, and this means that: 1) some phytochemicals of *K. pictus* could be adaptogens, 2) the gap between component-profiles is dependent on the extraction method and influences activity, or 3) both could be relevant

## 5. Conclusions

In conclusion, KPW have immunostimulatory activity, which is determined by the expression levels of immune mediators (e.g. NO), proteins (e.g. iNOS and COX), cytokines (e.g. TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-12), and phagocytic activity. Therefore, the authors suggested that KPW could be used to develop natural medicines or dietary supplements to enhance the immune system. However, further *in vivo* studies are necessary to confirm these effects and their underlying mechanism(s).

## CRedit authorship contribution statement

**Sunggun Kim:** Methodology, Software, Formal analysis, Writing - Original Draft, Data Curation. **Chung Hyeon Lee:** Writing - second and third revision, Investigation, Visualization. **Ji-Yun Yeo:** Investigation, Resources. **Kwang Woo Hwang:** Conceptualization, Supervision, Writing - Review & Editing. **So-Young Park:** Conceptualization, Project administration, Funding acquisition, Supervision, Writing - Review & Editing.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Innovative Food Product and Natural Food Materials Development Program Project, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119012-3).

## References

- Balkwill, F., 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 361–371.
- Block, K.I., Mead, M.N., 2003. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review. *Integr. Cancer Ther.* 2, 247–267.
- Chan, G.C., Chan, W.K., See, D.M., 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2, 25.
- Choi, J., Huh, K., Kim, S.H., Lee, K.T., Park, H.J., Han, Y.N., 2002. Antinociceptive and anti-rheumatoid effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 79, 199–204.
- Jang, M., Lim, T.G., Ahn, S., Hong, H.D., Rhee, Y.K., Kim, K.T., Lee, E., Lee, J.H., Lee, Y. J., Jung, C.S., Lee, D.Y., Cho, C.W., 2016. Immune-enhancing effects of a high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* Hemsl. in macrophages and immunosuppressed mice. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8100600>.
- Jeong, J.J., Jang, S.E., Job, E.H., Han, M.J., Kim, D.H., 2012. Kalopanaxsaponin B ameliorates TNBS-induced colitis in mice. *Biomol. Ther.* 20, 457–462.
- Job, E.H., Kim, D.H., 2011. Kalopanaxsaponin A ameliorates experimental colitis in mice by inhibiting IRAK-1 activation in the NF-kappaB and MAPK pathways. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1731–1742.
- Job, E.H., Lee, I.A., Kim, D.H., 2012. Kalopanaxsaponins A and B isolated from *Kalopanax pictus* ameliorate memory deficits in mice. *Phytother. Res.* 26, 546–551.
- Kalinowski, P., 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188, 21–28.
- Kim, Y.K., Kim, B.G., Park, S.J., Ha, J.H., Choi, J.W., Park, H.J., Lee, E.T., 2002. In vitro anti-inflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 472–476.
- Kim, J.Y., Byeon, K.E., Lee, Y.G., Lee, J.Y., Park, J., Hong, E.K., Cho, J.Y., 2008. Immunostimulatory activities of polysaccharides from liquid culture of pine-mushroom *Tricholoma matsutake*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 95–103.
- Kheta, T., Gillgrass, A., Ashkar, A.A., 2013. The influence of macrophages and the tumor microenvironment on natural killer cells. *Curr. Mol. Med.* 13, 68–79.
- Kudrin, A., Ray, D., 2008. Cuming factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. *Immunol. Cell Biol.* 86, 232–238.
- Kwon, D.H., Cheon, J.M., Choi, E.O., Jeong, J.W., Lee, K.W., Kim, K.Y., Kim, S.G., Kim, S., Hong, S.H., Park, C., Hwang, H.J., Choi, Y.H., 2016. The immunomodulatory activity of mori folium, the leaf of *Morus alba* L., in RAW 264.7 macrophages in vitro. *J. Cancer Prev.* 21, 144–151.
- Lee, E.B., Li, D.W., Hyun, J.E., Kim, I.H., Whang, W.K., 2001. Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. *J. Ethnopharmacol.* 77, 197–201.
- Li, D.W., Lee, E.B., Kang, S.S., Hyun, J.E., Whang, W.K., 2002. Activity-guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 900–903.

- Liu, Y., Jiao, F., Qiu, Y., Li, W., Qu, Y., Tian, C., Li, T., Bai, R., Luo, F., Zhao, Y., Chai, Z., Chen, C., 2009. Immunostimulatory properties and enhanced TNF- $\alpha$  mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)<sub>20</sub> nanoparticles. *Nanotechnology* 20, 415102.
- McCabe, A., MacNamara, K.C., 2016. Macrophages: key regulators of steady-state and demand-adapted hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 44, 213–222.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysenans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In 't Veld, P., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A., 2010. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6G(high) monocytes. *Cancer Res.* 70, 5728–5739.
- Murakami, A., Ohigashi, H., 2007. Targeting NOX, iNOS and COX 2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 121, 2357–2363.
- Parham, P., 2009. *The Immune System*, third ed. Garland Science, New York.
- Park, H.J., Kim, D.H., Choi, J.W., Park, J.H., Han, Y.N., 1998. A potent anti-diabetic agent from *Kalopanax pictus*. *Arch. Pharm. Res.* 21, 24–29.
- Pollard, J.W., 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 259–270.
- Quang, T.H., Ngan, N.T., Minh, C.V., Kiem, P.V., Nhiem, N.X., Tai, B.H., Thao, N.P., Tung, N.H., Song, S.B., Kim, Y.H., 2011. Anti-inflammatory triterpenoid saponins from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *J. Nat. Prod.* 74, 1908–1915.
- Quang, T.H., Ngan, N.T., Van Minh, C., Van Kiem, P., Nhiem, N.X., Tai, B.H., Thao, N.P., Chae, D., Mathema, V.B., Koh, Y.S., Lee, J.H., Yang, S.Y., Kim, Y.H., 2013. Inhibitory effects of oleanane-type triterpenes and saponins from the stem bark of *Kalopanax pictus* on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *Arch. Pharm. Res.* 36, 327–334.
- Sano, K., Sanada, S., Iida, Y., Shoji, J., 1991. Studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 865–870.
- Schultze, J.L., Schmidt, S.V., 2015. Molecular features of macrophage activation. *Semin. Immunol.* 27, 416–423.
- Shao, C.J., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O., Kohda, H., 1990. Saponins from leaves of *Kalopanax pictus* (Thunb.) Nakai, Harigiri: structures of *Kalopanax-Saponins J1a* and *J1b*. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1087–1089.
- Solinas, G., Germamo, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1065–1073.
- Varin, A., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 214, 630–641.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Zhang, A., Yang, X., Li, Q., Yang, Y., Zhao, G., Wang, B., Wu, D., 2018. Immunostimulatory activity of water extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant in vitro and in vivo. *PLoS One* 13, e0191356.

## 자소엽에서 분리된 트리테르페노이드의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과

여지윤 · 이충현 · 박소영\*

단국대학교 약학대학 약학과

## Anti-Amyloidogenic Effects of Triterpenoids Isolated from Perilla Leaves

Ji-Yun Yeo, Chung-Hyun Lee, and So-Young Park\*

College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

**Abstract** – *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, an annual plant primarily cultivated in China, Japan, and Korea, has been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases, depression, and many anxiety-related disorders. Previously, we reported the inhibitory effects of *n*-hexane layer of *P. frutescens* var. *acuta* extract against beta-amyloid (A $\beta$ ) aggregation, and the isolation of asarone derivatives as active constituents from *n*-hexane layer. In this study, dichloromethane layer of *P. frutescens* var. *acuta* was applied to bioassay-guided isolation methods accompanied with Thioflavin T (Th T) fluorescence assay to investigate the inhibitory effect on A $\beta$  aggregation and disaggregation. As the results, three triterpenoids including ursolic acid (1), tormentic acid (2) and corosolic acid (3) were isolated. All compounds reduced A $\beta$  aggregation and increased disaggregation of preformed A $\beta$  aggregates in a dose-dependent manner. However, the inhibitory effect of three compounds on A $\beta$  aggregation was not correlated with antioxidant activity, which was measured by DPPH assay. Taken together, these results suggest that the triterpenoid derivatives from *P. frutescens* have the potential to be developed as good therapeutics or preventatives for AD.

**Keywords** – *Perilla frutescens* var. *acuta*, Beta-amyloid, Aggregation, Disaggregation, Triterpenoids

현대 의학 기술의 발달과 더불어 노인 인구가 급속히 증가하고 있으며 이에 따른 노인성 질환도 가파르게 증가하고 있다. 특히 퇴행성 질환인 치매 환자수가 급격히 증가하고 있는데 현재 국내 65세 이상 노인 인구 10명 중 1명은 치매 환자인 것으로 보고되고 있다. 치매는 기억력 감퇴, 인지 기능 저하가 언어 및 행동 장애로 이어지는 퇴행성 뇌질환으로 알츠하이머성 치매가 가장 많은 부분을 차지한다.<sup>1)</sup> 알츠하이머성 치매의 주요 원인으로는 베타-아밀로이드 단백질(A $\beta$ )을 꼽을 수 있다. 인체 내에서 과생산된 베타-아밀로이드는 서로 응집하여 응집체를 형성하게 되고, 베타-아밀로이드 응집체들이 신경독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup>

꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 1년생 초본식물인 차즈기 (*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo) 또는 주름소엽 (*P. frutescens* Britton var. *crispa* Decaisne)의 잎 및 줄 가지를 쓰는 자소엽은 중국이 원산지이며, 현재는 한국, 일본,

베트남, 중국 및 아시아 지역에 널리 분포하고 있다. 자소엽은 예로부터 기침, 구토, 만성 기관지염 등을 개선하는 용도로 사용되어 왔으며, 항염증 및 항알레르기 작용과 항균 및 항산화 효과 등의 약리작용도 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup> 자소엽의 주성분으로는 rosmarinic acid, caffeic acid와 같은 페놀성 화합물과 함께 플라보노이드, 테르페노이드 등이 분리되었다.<sup>4,6)</sup> 자소엽의 지표성분으로는 rosmarinic acid, elemicin, perillaldehyde 등이 제시되고 있는데, elemicin, perillaldehyde의 경우 자소엽이 재배되는 곳에 따라 개체 간의 성분 함유량의 편차가 커서 지표성분으로의 활용이 제한적이며, 이중 편차가 가장 적은 rosmarinic acid가 지표성분으로 가장 적합하다고 제시되고 있다.<sup>7,8)</sup>

본 연구진은 자소엽의 메탄올 추출물이 베타-아밀로이드의 응집을 억제하는 효과가 뛰어난 것을 보고한 바 있다.<sup>9)</sup> 또한, 자소엽의 메탄올 추출물을 용매 분획한 분획 중 가장 활성이 뛰어난 분획으로부터 bioassay-guided isolation 방법을 통해 유효성분을 분리하였으며 그의 구조를 아사론 유도체로 동정하였다.<sup>10)</sup> 본 연구는 그 후속 연구로서, 자소엽 추출물의 분획 중 두 번째로 베타-아밀로이드 응집 억제

\*교신저자(E-mail): soyoyark23@dankook.ac.kr  
(Tel): +82-41-550-1434

효과가 뛰어난 디클로로메탄층으로부터 아사론 유도체 이외의 새로운 유효성분을 분리하여 그 활성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료** - 실험에 사용한 자소엽(*P. frutescens* var. *acuta*)은 삼흥건재(Samhong medicinal herb market; Seoul, Korea)에서 2019년에 구입하였으며, 약학대학 박소영 교수가 감정한 후 실험에 사용하였고, 그 표본(2019-012-PF-DKU)은 단국대학교 약학대학 생약학 연구실에 보관하였다.

**기기 및 시약** -  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR은 AscendTM500(500 MHz, Bruker, Karlsruhe, Germany)를 이용하여 측정하였다(Center for Biomedical Engineering Core Facility, 단국대학교, 한국). 질량분석기는 AB Sciex사의 4000QTrap(Framingham, MA, USA)을 사용하였다. Column chromatography용 충진제는 Watchers사의 Silica gel Si 60, 40-63  $\mu\text{m}$ 를 사용하였고 TLC plate의 발색은 20% ethanol성  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액을 사용하였다. 분리용 유기 용매는 옴티젠(충주, 한국)에서 구입하였다. Beta-amyloid(1-42)는 GL Biochem(상하이, 중국)에서, Thioflavin T(Th T)는 Sigma Aldrich(Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Wako pure chemical(Japan)에서 구입하였다.

**추출 및 분리** - 구매한 자소엽(6 kg)을 분쇄한 후 100% 에탄올로 3회 추출(10 L씩 3회)한 후 여과한 여액을 감압 농축하여 650 g의 에탄올 추출물을 확보하였다. 확보한 에탄올 추출물에 소량의 메탄올을 가해 녹인 후 물에 현탁하고 *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate로 연속적으로 분획하여 *n*-hexane(116.1 g), dichloromethane(30 g), ethylacetate(263.3 g), 그리고 물층(226.7 g)을 확보하였다. 이 중 dichloromethane 층을 실리카겔을 고정상으로 사용한 오픈 컬럼크로마토그래피(chloroform : methanol = 100 : 1~5 : 5~0 : 1)에 적용하여 7개의 소분획물을 확보하였다. 이 중 PFD 2를 실리카겔을 고정상으로 사용한 오픈 컬럼크로마토그래피(*n*-hexane : acetone = 8 : 2)로 분획하고 정제(chloroform : methanol = 100 : 1~50 : 1)하여 화합물 1(120 mg)를 얻었다. 소분획물 PFD 4를 실리카겔을 고정상으로 사용한 오픈 컬럼크로마토그래피(chloroform : methanol = 100 : 1~20 : 1~0 : 1)에 적용하여 얻은 소분획물중 2개를 정제(chloroform : methanol = 20 : 1) 또는 (chloroform : acetone = 4.5 : 1~1 : 1)하여 화합물 2(41 mg)와 화합물 3(11.7 mg)를 얻었다.

**화합물 1** - White powder;  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  MS  $m/z$  457  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  5.47 (1H, brs, H-12), 3.44 (1H, dd,  $J=10.0, 5.5$  Hz, H-3), 2.62 (1H, d,  $J=11.0$  Hz, H-18), 2.31 (1H, td,  $J=13.0, 3.5$  Hz, H-15), 2.10 (1H, td,  $J=13.5, 4.0$  Hz, H-16), 1.23 (3H, s, Me-23), 1.21 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.01 (3H, s,

Me-24), 0.98 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Me-29), 0.95 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Me-30), 0.87 (3H, s, Me-25);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  181.2 (C-28), 140.5 (C-13), 126.9 (C-12), 79.4 (C-3), 57.1 (C-5), 54.8 (C-18), 49.3 (C-9, C-17), 43.7 (C-14), 41.2 (C-8), 40.7 (C-19), 40.6 (C-4, C-20), 40.3 (C-1), 38.7 (C-22), 38.5 (C-10), 34.8 (C-7), 32.3 (C-21), 30.1 (C-23), 29.9 (C-15), 29.4 (C-2), 26.2 (C-16), 25.2 (C-27), 24.9 (C-11), 22.3 (C-30), 19.9 (C-6), 18.6 (C-29), 18.5 (C-26), 17.5 (C-24), 16.4 (C-25).

**화합물 2** - White powder;  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  MS  $m/z$  489  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  5.52 (1H, brs, H-12), 4.04 (1H, ddd,  $J=10.5, 9.5, 4.5$  Hz, H-2), 3.32 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H-3), 3.06 (1H, ddd,  $J=13.5, 12.5, 4.5$  Hz, H-16), 2.98 (1H, s, H-18), 1.65 (3H, s, Me-27), 1.37 (3H, s, Me-29), 1.20 (3H, s, Me-23), 1.05 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, Me-30), 1.04 (3H, s, Me-26), 1.01 (3H, s, Me-24), 0.93 (3H, s, Me-25);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  180.4 (C-28), 144.6 (C-13), 127.7 (C-12), 83.6 (C-3), 72.4 (C-19), 68.3 (C-2), 55.7 (C-5), 54.3 (C-18), 48.5 (C-17), 48.1 (C-9), 48.0 (C-1), 42.6 (C-20), 42.1 (C-14), 40.1 (C-8), 39.8 (C-4), 38.5 (C-10, C-22), 33.2 (C-7), 29.2 (C-23), 29.1 (C-15), 26.8 (C-29), 26.7 (C-21), 26.1 (C-16), 24.6 (C-27), 24.5 (C-11), 18.9 (C-6), 17.5 (C-24), 17.1 (C-26), 16.7 (C-25), 16.4 (C-30).

**화합물 3** - White powder;  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  MS  $m/z$  489  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  5.38 (1H, brs, H-12), 4.18 (1H, d,  $J=11.0, 9.0, 4.5$  Hz, H-2), 3.48 (1H, d,  $J=6.0$  Hz, H-19), 3.18 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-18), 3.19 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-3), 1.62 (3H, s, Me-27), 1.25 (3H, s, Me-23), 1.17 (3H, s, Me-29), 1.09 (3H, s, Me-30), 1.06 (3H, s, Me-24), 1.05 (3H, s, Me-25), 1.00 (3H, s, Me-26);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Pyridine-*d*5):  $\delta$  179.1 (C-28), 139.0 (C-13), 125.3 (C-12), 83.5 (C-3), 68.3 (C-2), 55.6 (C-5), 53.2 (C-18), 47.8 (C-9, C-17), 47.7 (C-1), 42.3 (C-14), 39.7 (C-8), 39.6 (C-4), 39.2 (C-20), 39.1 (C-19), 38.2 (C-10), 37.2 (C-22), 33.2 (C-7), 30.8 (C-21), 29.1 (C-23), 28.4 (C-15), 24.6 (C-16), 23.6 (C-27), 23.4 (C-11), 21.1 (C-29), 18.6 (C-6), 17.4 (C-24), 17.2 (C-26, C-30), 16.7 (C-25).

**Th T 시험법** - 베타-아밀로이드(1-42) (GL Biochem, Shanghai, China)은 DMSO에 1 mg/mL의 농도로 녹여 보관하고, 시료도 DMSO에 녹여서 사용한다. 시료의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 측정하기 위해 베타-아밀로이드(최종농도 20  $\mu\text{M}$ )와 다양한 농도의 시료들을 함께 섞어 37°C 인큐베이터에 24 시간 방치한다. Th T(3  $\mu\text{M}$ )을 추가하고 30분 방치한 후 형광을 Emax precision microplate reader



(Molecular Devices, CA, USA)을 이용하여 excitation은 442 nm, emission은 485 nm에서 측정한다. DMSO만 처리한 베타-아밀로이드 그룹을 콘트롤 그룹으로 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복하였다. 다음으로, 이미 생성된 베타-아밀로이드를 해체하는 효과를 확인하기 위해서 베타-아밀로이드(최종농도 20  $\mu\text{M}$ )만 37°C에서 24 시간 방치하여 베타-아밀로이드가 응집하도록 한다. 그 후 시험하고자 하는 시료를 추가하고 37°C에서 24 시간 더 방치한 후 Th T를 추가한 후 형광의 변화를 측정한다. 이 경우에도 DMSO만 처리한 베타-아밀로이드 군을 컨트롤로 사용했으며 모든 실험은 3회 반복하였다.

**항산화활성 측정** - 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 측정하였다. 먼저 0.2 mM의 DPPH 시약(190  $\mu\text{L}$ )과 시험하고자 하는 시료(10  $\mu\text{L}$ )를 잘 섞어 37°C에서 30분간 방치한 후 흡광도의 변화를 E-max precision microplate reader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정한다. 알파-토코페롤을 양성대조군으로 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복되었다.

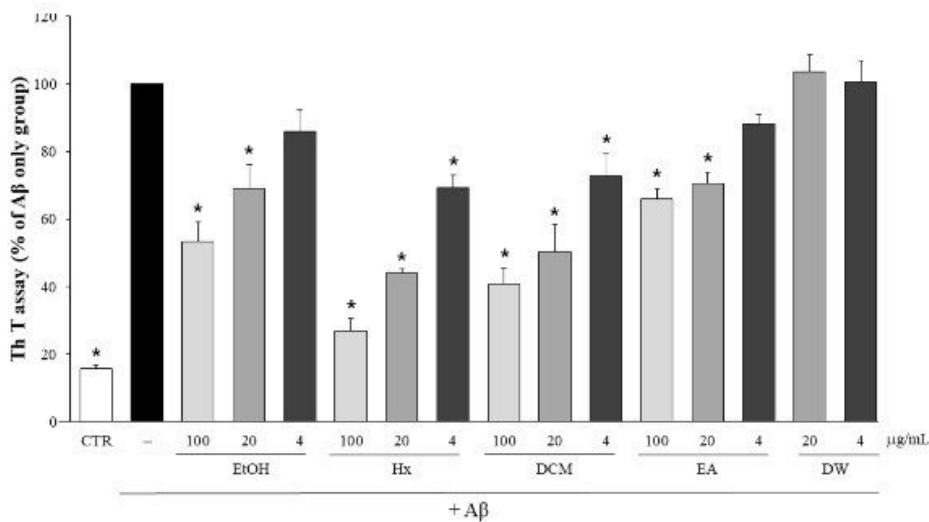
**통계처리** - 모든 실험 결과는 3번의 다른 실험 결과의 평균  $\pm$  오차로 표시한다. 통계의 유의성은 One-Way Analysis of Variance followed by Tukey post hoc test(SPSS version 17.0, Armonk, NY, USA)으로 확인하였으며  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결론 및 고찰

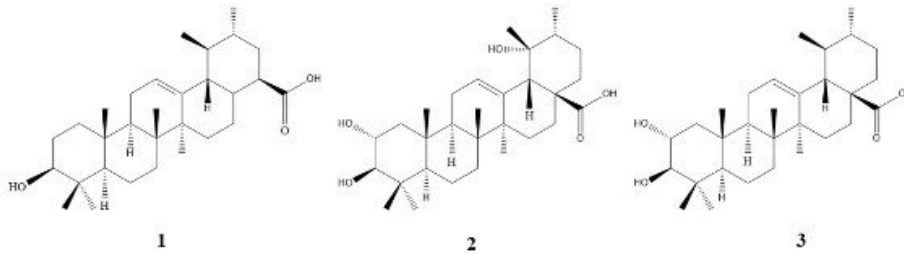
선행 연구 결과 자소엽 메탄올 추출물의 용매 분획층 중 헥산층이 뛰어난 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 나타내었으며 그 유효성분으로 5개의 아사론 유도체들을 분리하였다.<sup>10)</sup> 헥산층 이외의 분획층 중에서 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 유효성분을 분리하고자 분획층들의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 Th T assay로 시험하였다. 그 결과 디클로로메탄층이 우수한 효과를 나타내어(Fig. 1) bioassay-guided isolation을 실시하였고 3 개의 트리테르페노이드를 분리하였으며, 분리된 화합물 1, 2 및 3은 NMR, MS 결과를 문헌과 비교하여 ursolic acid,<sup>11,12)</sup> tormentic acid,<sup>11,13)</sup> 및 corosolic acid<sup>11,14)</sup>로 그 구조를 각각 동정하였다 (Fig. 2).

분리된 화합물 1-3의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과는 Th T assay를 이용하여 시험하였다(Fig. 3). 그 결과, 화합물 1-3은 유사한 베타-아밀로이드 응집 효과를 나타냈으며, 농도 의존적으로 응집을 억제하였다. 특히, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 화합물 1-3은 베타-아밀로이드의 응집을 50% 이상 억제하였다.

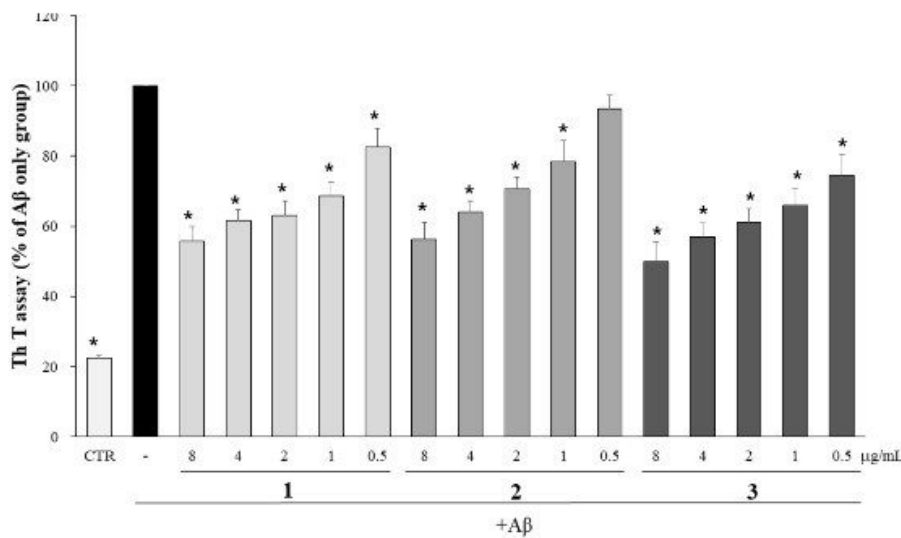
또한, 화합물 1-3이 기 응집된 베타-아밀로이드 응집체를 분해하는 효과가 있는지 Th T assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 4). 그 결과, 화합물 1-3은 효과적으로 베타-아밀로이드 응집체를 분해하는 효과를 나타냈으며, 그 효과는 농



**Fig. 1.** Inhibitory effects of ethanol extract of *P. frutescens* var. *acuta* and its solvent-partitioned fractions on A $\beta$  aggregation. The effect of extract and solvent-partitioned fractions of *P. frutescens* var. *acuta* at 4, 20, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on the aggregation of A $\beta$  was determined by Th T assay. EtOH:ethanol, Hx:hexane, DCM:dichloromethane, EA:ethylacetate, DW:distilled water). The A $\beta$  treated with DMSO was used as a control and each experiment was repeated three times. \* $p < 0.05$  compared to A $\beta$  only-treated group.



**Fig. 2.** Chemical structures of triterpenoids isolated from dichloromethane layer of *P. frutescens* var. *acuta*. (1) Ursolic acid, (2) tormentic acid, and (3) corosolic acid.



**Fig. 3.** Effect of triterpenoids isolated from *P. frutescens* var. *acuta* on Aβ aggregation. The effect of triterpenoids at 0.5, 1, 2, 4 and 8 μg/mL on the aggregation of Aβ was determined by Th T assay. The Aβ treated with DMSO was used as a control and each experiment was repeated three times. \* $p < 0.05$  compared to Aβ-treated group.

도 의존적이었다.

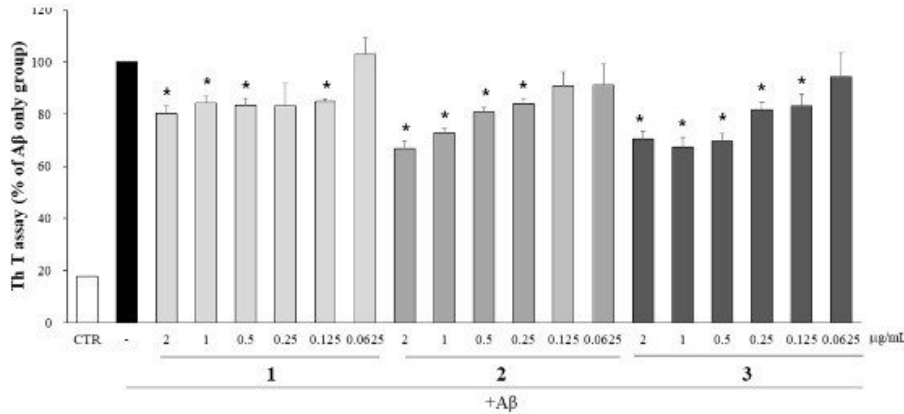
항산화활성이 높을수록 베타-아밀로이드 응집 억제 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다.<sup>15)</sup> 따라서 분리된 3개의 화합물의 항산화활성을 DPPH 법을 이용한 측정 하였다. 그러나 3개 화합물 모두 64 μg/mL 농도까지 대조군에 비해 5% 이하의 아주 낮은 DPPH scavenging 활성을 보였다(결과 나타내지 않음).

베타-아밀로이드는 처음에는 단량체로 생성이 되나 체내에서 응집하여 신경독성을 유발하는 응집체가 형성되는 것으로 알려져 있다.<sup>2,3)</sup> 베타-아밀로이드가 응집체를 형성하는 동안 발생하는 산화스트레스는 신경세포의 시냅스 기능을 방해하고 교란시킨다.<sup>16,17)</sup> 따라서 항산화 물질은 산화 스트레스에서 의해 유발되는 신경 독성을 줄여줌으로 알츠하이

머성 치매를 치료 및 예방하는 효과를 기대할 수 있다. 즉, quercetin와 kaempferol 같은 플라보노이드류,<sup>18,19)</sup> rosmarinic acid와 curcumin 같은 페놀성 화합물<sup>20,21)</sup>은 높은 항산화 활성과 함께 베타-아밀로이드의 응집을 억제하는 효과를 가지고 있다. 그러나 본 연구 결과 자소엽의 디클로로메탄 층에서 분리된 3개의 트리테르페노이드의 항산화활성은 아주 미미하였고, 따라서 베타-아밀로이드의 응집 억제 효과의 기전이 뛰어난 항산화활성에서 기인한 것이 아니라는 것을 시사한다.

반면, 최근 보고된 논문에 의하면 트리테르페노이드에 존재하는 카르복실산 그룹이 베타-아밀로이드에 있는 염기성 잔기인 Lys16, Lys28과 salt bridge를 형성하여 베타-아밀로이드 응집 과정 중 nucleation phase를 억제함으로써 응집을





**Fig. 4.** Effect of triterpenoids isolated from *P. frutescens* var. *acuta* on A $\beta$  disaggregation. The A $\beta$  preaggregated for 24 h was incubated with triterpenoids (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2  $\mu$ g/mL) for additional 24 h. Then, Th T assay was performed to measure the levels of A $\beta$  aggregation. The A $\beta$  treated with DMSO was used as a control and each experiment was repeated three times. \* $p$  < 0.05 compared to A $\beta$  only-treated group.

억제한다고 한다.<sup>22)</sup> 그 예로, 같은 트리테르페노이드이지만 카복실산을 포함하고 있는 asiatic acid는 베타-아밀로이드의 응집을 효과적으로 억제하는 반면 카복실산이 없는  $\alpha$ -amyrin은 응집 억제 효과가 나타나지 않았다.<sup>23)</sup> 이 논문에 비취볼 때, 본 연구에서 분리된 ursolic acid, tormentic acid, corosolic acid가 효과적으로 베타-아밀로이드의 응집을 억제한 것은 카르복실산 그룹을 가지고 있기 때문인 것으로 사료된다.

ursolic acid는 항산화 및 항염 효과를 가지고 있는 트리테르페노이드의 하나로 생쥐모델에서 베타-아밀로이드에 의해 유도된 기억력 감소를 개선하는 효과를 보였다.<sup>24)</sup> 항염증 효과가 알려진 tormentic acid는 amyloid precursor protein/presenilin 1 형질전환 생쥐에 복강 투여시 신경교세포의 과활성화를 억제하여 염증인자들의 발현을 억제하여 기억력 개선 및 신경세포 보호 효과를 나타냈다.<sup>25)</sup> 그러나, corosolic acid의 베타-아밀로이드 응집 억제효과 및 치매 개선 가능성은 본 논문이 첫 보고이다.

## 결론

베타-아밀로이드의 응집 효과가 뛰어난 자소엽 추출물의 디클로로메탄층으로부터 3개의 트리테르페노이드를 분리하였으며 ursolic acid, tormentic acid, corosolic acid로 구조 동정하였다. 이 3개의 화합물은 농도 의존적으로 베타-아밀로이드의 응집을 억제하였으며, 기 응집된 베타-아밀로이드를 해체하는 효과도 보였다. 따라서 자소엽에서 분리한 트리테르페노이드도 치매의 예방 또는 치료제로서의 가능성을 가지고 있다.

## 사사

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업의 지원을 받아 연구되었다(119012-3). 또한 본 연구는 단국대학교 약학과 소속저자의 결과물로서 해당학과는 2020년 단국대학교 대학혁신지원사업 연구중심학과 육성사업의 지원으로 연구되었다. 단국대학교 Center for Bio-Medical Engineering Core Facility의 NMR 지원에 감사드린다.

## 인용문헌

- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-185.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Jossatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6448-6453.
- Ward, R. V., Jennings, K. H., Jepras, R., Neville, W., Owen, D. E., Hawkins, J. and Howlett, D. R. (2000) Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of beta-amyloid peptide. *Biochemical. J.* **348**: 137-144.
- 배기환 (2019) 천연약물도감 I-II, pp 141-142 (II). 교학사, 서울.
- Zheng, J., Dong, Z. and Se, J. (1997) Modern study of Traditional Chinese Medicines, pp. 4354-4363. Xue Yuan Press, China.

6. Peng, Y., Ye, J. and Kong, J. (2005) Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 8141-8147.
7. Seo, W. H. and Baek, H. H. (2009) Characteristic aromatic compounds of Korean perilla (*Perilla frutescens* Britton) leaf. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 11537-11542.
8. Kil, H. W., Rho, T. and Yoo, K. D. (2020) Phytochemical study of hot-water extract of *Perillae Folium*. *Kor. J. Pharmacogn.* **51**: 55-64.
9. Kim, D.-J., Kim, M.-S., Kim, S., Hwang, K.-W. and Park, S.-Y. (2017) Anti-amyloidogenic effects of *Perilla frutescens* var. *acuta* on beta-amyloid aggregation and disaggregation. *J. Food Biochem.* **41**: e12393.
10. Lee, J.E., Kim, N., Yeo, J.Y., Seo, D.-G., Kim, S., Lee, J.-S., Hwang, K. W. and Park, S.-Y. (2019) Anti-Amyloidogenic effects of asarone derivatives from *Perilla frutescens* leaves against beta-amyloid aggregation and nitric oxide production. *Molecules* **24**: 4297.
11. Woo, K. W., Han, J. Y., Choi, S. U., Kim, K. H. and Lee, K. R. (2014) Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and their cytotoxic activity. *Nat. Prod. Sci.* **20**: 71-75.
12. Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R. and Kunert, O. (2003) Spectral assignments and reference data. *Magn. Reson. Chem.* **41**: 636-638.
13. Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, H., Sugita, D., Shimura, S. and Yoshida, T. (2002) Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* Calli. *Phytochemistry* **59**: 315-323.
14. Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G., Zhang, L., Wu, X. and Ni, P. (2005) Pentacyclic triterpenes. Part I: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**: 4944-4948.
15. Lee, J.-E., Kim, M.-S. and Park, S.-Y. (2017) Effect of natural antioxidants on the aggregation and disaggregation of beta-amyloid. *Trop. J. Pharmaceut. Res.* **11**: 2629-2635.
16. Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
17. Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C. and Castegna, A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* **7**: 548-554.
18. Jimenez-Aliaga, K., Bermejo-Bescos, P., Benedi, J. and Martin-Aragon, S. (2011) Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects *in vitro* and potent antioxidant activity in APP<sup>swe</sup> cells. *Life Sci.* **89**: 939-945.
19. Sharoar, MG, Thapa, A., Shah Nawaz, M., Ramasamy, VS., Woo, ER., Shin, SY. and Park, I-S. (2012) Kaempferol-3-O-rhamnoside abrogates amyloid beta toxicity by modulating monomers and remodeling oligomers and fibrils to non-toxic aggregates. *J. Biomed. Sci.* **19**: 104.
20. Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H. and Yamada, M. (2004) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* **75**: 742-750.
21. Yamada, M., Ono, K., Hamaguchi, T. and Noguchi-Shinohara, M. (2015) Natural phenolic compounds as therapeutic and preventive agents for cerebral amyloidosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **863**: 79-94.
22. Murakami, K., Yoshioka, T., Horii, S., Hanaki, M., Midorikawa, S., Taniwaki, S., Gunji, H., Akagi, K.-I., Kawase, T., Hirose, K. and Irie, K. (2018) Role of the carboxy groups of triterpenoids in their inhibition of the nucleation of amyloid  $\beta$ 42 required for forming toxic oligomers. *Chem. Commun.* **54**: 6272-6275.
23. Murakami, K. and Irie, K. (2019) Three structural features of functional food components and herbal medicine with amyloid  $\beta$ 42 anti-aggregation properties. *Molecules* **24**: 2125.
24. Liang, W., Zhao, X., Feng, J., Song, F. and Pan, Y. (2016) Ursolic acid attenuates beta-amyloid-induced memory impairment in mice. *Arq. Neuropsiquiatr.* **74**: 482-488.
25. Cui, W., Sun, C., Ma, Y., Wang, S., Wang, X. and Zhang, Y. (2020) Neuroprotective effect of tormentic acid against memory impairment and neuro-inflammation in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Med. Rep.* **22**: 739-750.

(2020. 11. 6 접수; 2020. 11. 18 심사;  
2020. 12. 3 게재확정)



# Neuroprotective effects of Perilla leaf extract and its equality evaluation



Chung Hyeon Lee, Min-Seong Ko, So-Young Park\*

College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

## Abstract

*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO has been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases, depression, and many anxiety-related disorders. We have reported that hexane layer of *P. frutescens* var. *acuta* extract inhibited the aggregation of beta-amyloid (A $\beta$ ), which is one of the causes for Alzheimer's disease. In this study, whether the inhibition of A $\beta$  aggregation by ethanol extracts of *P. frutescens* var. *acuta* could rescue PC12 cells from A $\beta$ -aggregate induced toxicity was determined by MTT assay. Perilla leaf extracts extracted with 100, 80 and 60% ethanol were not cytotoxic to PC12 cells. Pre-incubation of A $\beta$  with the extracts significantly reduced A $\beta$ -aggregate induced toxicity in PC12 cells, suggesting that the inhibition of A $\beta$  aggregation rescued PC12 cells from toxicity. In addition, for the standardization of Perilla leaf extract, simultaneous determination method using HPLC for 6 major compounds has been developed. Using this method, 10 different Perilla leaf extracts were evaluated and RSD% was less than 25%, which confirmed equality. Taken together, these results suggest that Perilla leaf extract could be developed as anti-dementia functional foods

## Introduction

*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO (Perilla leaves) is a perennial plant of *Lamiaceae*. It is primarily cultivated in China, Japan, India, Korea and other Asian countries. Perilla leaves long been used to improve coughing, vomiting, and chronic bronchitis, and pharmacological effects such as anti-inflammatory, anti-allergic, antibacterial and antioxidant effects have also been reported. Flavonoids, and terpenoids along with phenolic compounds were isolated from Perilla leaves including rosmarinic acid, caffeic acid, elemicin and perillaldehyde. Among these compounds, rosmarinic acid is suggested to be the most suitable indicator component due to the smallest deviation.

Previously, we have reported that the hexane layer of Perilla leaf extract inhibited the aggregation of beta-amyloid (A $\beta$ ), one of the causes of Alzheimer's disease. Asarone derivatives and triterpenoids were separated and identified as active constituents. As a follow-up study, optimal extraction solvent has been determined by comparing the effect of 100, 80 or 60% ethanol extracts of Perilla leaves on A $\beta$  aggregation. In addition, methods for evaluating the equivalence of crude drugs were developed and evaluated.

## Methods

Cytotoxicity of Perilla leaf ethanol extract was evaluated by MTT assay. In addition, protective 260 nm using photodiode array detector (PDA, Water 2998, USA). Equivalence evaluation was conducted based on the developed evaluation method.

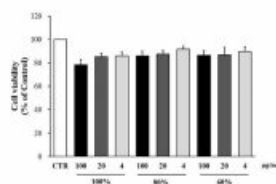
The equivalence evaluation method of Perilla leaf was developed using HPLC (e2696, Waters, USA) system with C18 columns (250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Shisheido). As the mobile phase, 0.1% formic acid in CAN (A) and 0.1% Formic acid in Water (B) were used, and the conditions are shown in Table 1. Sample injection volume was 10  $\mu$ L, and mobile phase flow rate was 0.8 mL/min analyzed at

Table 1. Perilla leaf Equivalence Evaluation HPLC Solvent Ratio Condition

Solvent ratio	Time(min)						
	0	10	20	22	40	42	62
A%	20	30	55	60	60	100	100
B%	80	70	45	40	40	0	0

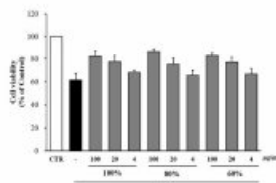
## Results

### ◆ Effect of Perilla leaf extracted with various percentage of ethanol on the viability of PC12 cells



- MTT assay was performed to confirm the cytotoxicity of the Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts (100, 20, and 4  $\mu$ g/mL).
- The Perilla leaf ethanol extracts (100, 80, and 60%) were not toxic to PC12 cells up to 100  $\mu$ g/mL.

### ◆ Effect of Perilla leaf extracts on the viability of PC12 cells from A $\beta$ -aggregate induced toxicity by the inhibition of A $\beta$ aggregation



- The protective effects of Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts by inhibiting A $\beta$  aggregation were determined by MTT assay. Briefly, A $\beta$  and extracts were mixed and incubated for 24 h. Then, this mixture was treated on PC1 cells, and the cell viability was evaluated by MTT assay.
- Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts significantly increased the cell viability of PC12 cells by inhibiting aggregation of A $\beta$  in a dose-dependent manner.

### ◆ Development of a method to evaluate the quality equivalence of Perilla leaves using HPLC

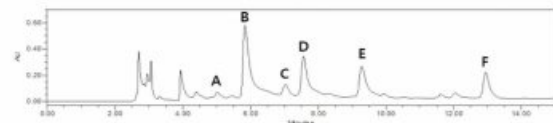


Fig 1. Chromatogram of Perilla leaf standard

(A: Protocatechuic acid, B: Latifolin-7-O-glucoside, C: Caffeic acid, D: Loganic, E: Scutellarin-7-O-glucoside, F: Rosmarinic acid)

	A	B	C	D	E	F
Rt (min)	5.008	5.836	7.032	7.5654	9.284	12.944
Area ( $\mu$ S*sec)	167854	5372713	859720	2257031	1928697	2465089

### ◆ Evaluation of quality equivalence of Perilla leaves

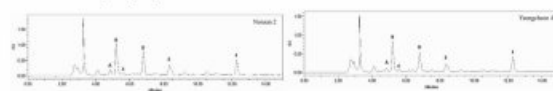


Fig 2. Chromatograms of Evaluation of equivalence for perilla leaves.

Place of origin	A	B	C	D	E	F
Nonsan 1	1.47	19.5	0.24	11.23	6.03	9.99
Yangju	1.6	12.94	0.33	18.97	6.44	11.67
Yanggyong 1	2.9	17.57	0.25	14.9	8.77	13.07
Yanggyong 2	2.4	13.47	0.23	11.92	5.06	16.08
Yanggyong 3	1.5	23.72	0.21	11.34	6.83	9.45
Nonsan 2	2.2	18.72	0.32	15.9	8.81	18.41
Yanggyong 4	1.62	17.61	0.22	14.28	7.78	18.75
Yanggyong 5	2.08	8.31	0.4	8.19	4.83	11.26
Dalsong	1.98	18.73	0.26	15.2	6.16	7.34
Yanggyong 6	1.71	18.37	0.21	8.89	6.1	7.83
mean	1.846	16.946	0.267	12.283	6.681	10.655
SD	0.46019	4.240188	0.062962	2.780766	1.385241	2.63032
RSD(%)	25.65	25.14	23.56	23.98	20.73	24.68

- Perilla leaves purchased from 10 different companies were extracted with 60% ethanol and the relative concentration was evaluated. As a result, the RSDs (%) of the six indicator components were less than 25%, confirming the quality equivalence.

## Conclusion

These results suggest that Perilla leaf extracts extracted with 100, 80 and 60% ethanol were not cytotoxic up to 100  $\mu$ g/mL and Perilla leaf extracts rescued the cells from A $\beta$  aggregated-induced toxicity by inhibiting A $\beta$  aggregation. In addition, the method which evaluates the quality equivalence of Perilla leaves was developed. RSD% of ten different Perilla leaf extracts applied to this method was less than 25%, which confirmed equality. Taken together, Perilla leaf extracts could have potential to be developed as a functional food.

## Acknowledgement

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Innovative Food Product and Natural Food Materials Development Program (or Project), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119012-3)

## References

- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Isosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6448-6453.





# Anti-Amyloidogenic Effects of Triterpenoids Isolated from *Perilla Leaves*



Ji-Yun Yeo, Chung Hyeon Lee, So-Young Park\*

College of Pharmacy, Dankook University, Chungnam 31116, Korea

## Abstract

*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO, an annual plant primarily cultivated in China, Japan, and Korea, has been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases, depression, and many anxiety-related disorders. Previously, we reported the inhibitory effects of hexane layer of *P. frutescens* var. *acuta* extract against beta-amyloid (A $\beta$ ) aggregation, and the isolation of asarone derivatives as active constituents. In this study, dichloromethane layer of *P. frutescens* var. *acuta* was applied to bioassay-guided isolation methods accompanied with Thioflavin T (Th T) fluorescence assay to investigate the inhibitory effect on A $\beta$  aggregation and disaggregation. As the results, three triterpenoids including ursolic acid (1), tormentic acid (2) and corosolic acid (3) were isolated. All compounds reduced A $\beta$  aggregation and increased disaggregation of preformed A $\beta$  aggregates in a dose-dependent manner. However, the inhibitory effect of three compounds on A $\beta$  aggregation was not correlated with antioxidant activity, which was measured by DPPH assay. Taken together, these results suggest that the triterpenoid derivatives from *P. frutescens* var. *acuta* have the potential to be developed as good therapeutics or preventatives target for AD

## Introduction

꿀풀목 (Labiatae)에 속하는 1년생 초본식물인 자스민(*Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo) 또는 주름소엽(*P. frutescens* var. *crispata* Decaisne)의 잎 및 꽃 가지를 쓰는 자소엽은 중국이 원산지이며, 현재는 한국, 일본, 베트남, 중국 및 아시아 지역에 널리 분포하고 있다. 자소엽은 예로부터 기침, 구토, 만성 기관지염 등을 개선하는 용도로 사용되어 왔으며, 항염증 및 항알레르기 작용과 항암 및 항산화 효과 등의 약리작용도 보고되고 있다. 자소엽의 주성분으로는 rosmarinic acid, caffeic acid와 같은 페닐성 화합물과 함께 플라보노이드, 테르페노이드 등이 분리되었다. 자소엽의 지표성분으로는 rosmarinic acid, elemicin, perillaldehyde 등이 제시되고 있는데, elemicin, perillaldehyde의 경우 자소엽이 재배되는 곳에 따라 개체 간의 성분 함유량의 편차가 커서 지표성분으로의 활용이 제한적이며, 이 중 편차가 가장 적은 rosmarinic acid가 지표성분으로 가장 적합하다고 제시되고 있다.

본 연구진은 자소엽의 메탄올 추출물이 베타-아밀로이드의 응집을 억제하는 효과가 뛰어난 것을 보고한 바 있다. 또한, 자소엽의 메탄올 추출물을 용매 분획한 분획 중 가장 활성이 뛰어난 분획으로부터 bioassay-guided isolation 방법을 통해 유효성분을 분리하였으며 그의 구조를 아사론 유도체로 동정하였다. 본 연구는 그 후속 연구로서, 자소엽 추출물의 분획 중 두 번째로 베타-아밀로이드 응집 억제 효과가 뛰어난 디클로로메탄층으로부터 아사론 유도체 이외의 새로운 유효성분을 분리하여 그 활성을 확인하였다.

## Materials & Methods

**추출 및 분리** 자소엽(6 kg)의 에탄올 추출물을 용매 분획하여 n-hexane(116.1 g), dichloromethane(30 g), ethylacetate(263.3 g), 그리고 물층(226.7 g)을 확보하였다. 이 중 dichloromethane 층을 실리카겔을 고정상으로 사용한 오픈 컬럼 크로마토그래피에 적용하여 화합물 1(120 mg), 화합물 2(41 mg), 화합물 3(11.7 mg)을 얻었다.

**Thioflavin T (Th T) assay** 베타-아밀로이드 (최종농도 20  $\mu$ M)와 다양한 농도의 시료들을 함께 섞어 37 °C 인큐베이터에 24 시간 방치한다. Th T (3  $\mu$ M)를 추가하고 30분 방치한 후 형광을 excitation은 442 nm, emission은 485 nm에서 측정한다. DMSO만 처리한 베타-아밀로이드 그룹을 컨트롤 그룹으로 사용하여 모든 실험은 3회 반복하였다. 다음으로, 이미 생성된 베타-아밀로이드를 해체하는 효과를 확인하기 위해서 베타-아밀로이드(최종농도 20  $\mu$ M)만 37 °C에서 24 시간 방치하여 베타-아밀로이드가 응집하도록 한 후 위와 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

**항산화활성 측정** 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용하여 측정하였다. 먼저 0.2 mM의 DPPH 시약(190  $\mu$ L)과 시료하고자 하는 시료(10  $\mu$ L)를 잘 섞어 37 °C에서 30분간 방치한 후 흡광도의 변화를 a E-max precision microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정한다. 알과-도코페롤을 양성대조군으로 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복되었다.

## Results

- 선형 연구 결과 자소엽 에탄올 추출물의 용매 분획 중 핵산층이 뛰어난 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 나타내었으며 그 유효성분으로 5개의 아사론 유도체들을 분리하였다. 핵산층 이외의 분획층 중에서 베타-아밀로이드 응집을 억제하는 유효성분을 분리하고자 분획층들의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과를 Th T assay로 시험하였다. 그 결과 디클로로메탄층이 우수한 효과를 나타내어 (Fig. 1) bioassay-guided isolation을 실시하였고 3 개의 트리테르페노이드를 분리하였으며, 분리된 화합물 1, 2 및 3 은 NMR, MS 결과를 문헌과 비교하여 ursolic acid, tormentic acid, 및 corosolic acid로 그 구조를 각각 동정하였다 (Fig. 2).

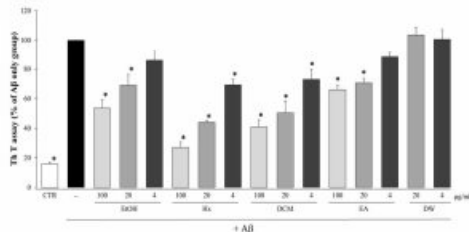


Fig. 1. Inhibitory effects of ethanol extract of *P. frutescens* var. *acuta* and its solvent-partitioned fractions on A $\beta$  aggregation.



Fig. 2. Chemical structures of triterpenoids isolated from dichloromethane layer of *P. frutescens* var. *acuta*.

- 분리된 화합물 1-3의 베타-아밀로이드 응집 억제 효과는 Th T assay를 이용하여 시험하였다. 그 결과, 화합물 1-3은 유사한 베타-아밀로이드 응집 효과를 나타냈으며, 농도 의존적으로 응집을 억제하였다. 특히, 8 mg/mL의 농도에서 화합물 1-3은 베타-아밀로이드의 응집을 50% 이상 억제하였다 (Fig. 3).

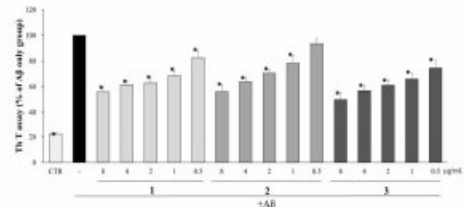


Fig. 3. Effect of triterpenoids isolated from *P. frutescens* var. *acuta* on A $\beta$  aggregation.

- 또한, 화합물 1-3이 기 응집된 베타-아밀로이드 응집체를 분해하는 효과가 있는지 Th T assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 화합물 1-3은 효과적으로 베타-아밀로이드 응집체를 분해하는 효과를 나타냈으며, 그 효과는 농도 의존적이었다 (Fig. 4).

- 항산화활성이 높을수록 베타-아밀로이드 응집 억제 효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다. 따라서 분리된 3개의 화합물의 항산화활성을 DPPH 법을 이용한 측정 하였다. 그러나 3개 화합물 64 mg/mL 농도에서 모두 대조군에 비해 5% 이하의 아주 낮은 DPPH scavenging 활성을 보였다.

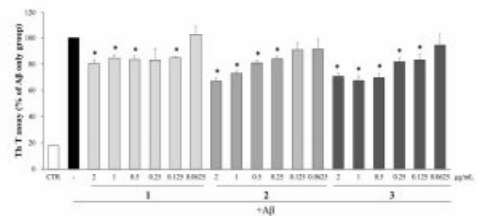


Fig. 4. Effect of triterpenoids isolated from *P. frutescens* var. *acuta* on A $\beta$  disaggregation.

## Conclusions

베타-아밀로이드의 응집 효과가 뛰어난 자소엽 추출물의 디클로로메탄층으로부터 3개의 트리테르페노이드를 분리하였으며 ursolic acid, tormentic acid, corosolic acid로 구조 동정하였다. 이 3개의 화합물은 농도 의존적으로 베타-아밀로이드의 응집을 억제하였으며, 기 응집된 베타-아밀로이드를 해체하는 효과도 보였다. 따라서 자소엽에서 분리한 트리테르페노이드 치매의 예방 또는 치료제로서의 가능성을 가지고 있다.

## Acknowledgements

본 연구는 농림축산식품부의 지원으로 농림축산검역본부의 맞춤형형 신식량 및 천연안정소재기술개발사업의 지원을 받아 연구되었다(119012-3). 또한 이 연구는 2020년도 단국대학교 대학혁신지원사업의 지원으로 연구되었다. 단국대 공동기기원(Core Facility of Dankook University)의 NMR 지원에 감사드립니다.



# Standardization of Perilla leaf extract as the agent inhibiting beta-amyloid aggregation



Min-Seong Ko, Chung Hyeon Lee, So-Young Park\*

College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

## Abstract

Previously, we have reported that hexane layer of *P. frutescens* var. *acuta* extract inhibited the aggregation of beta-amyloid (A $\beta$ ), which is one of the causes for Alzheimer's disease. In this study, the potential cytotoxicity of ethanol extracts of *P. frutescens* var. *acuta* extracted with different extraction solvent (100, 80 and 60% ethanol) was determined by MTT and LDH assay, and no toxicity was exhibited up to 100  $\mu$ g/mL. In addition, A $\beta$  pre-aggregated in the presence of ethanol extracts significantly reduced A $\beta$ -aggregate induced toxicity in PC12 cells, suggesting that the inhibition of A $\beta$  aggregation by the ethanol extracts protected PC12 cells from toxicity. In addition, for standardization of leaf extract, simultaneous determination of 6 major compounds in the 16 extracts of Perilla leaves using HPLC was developed. RSD% values of 5 compounds including protocatechuic acid, Luteolin-7-O-glucoside, caffeic acid, Loganin, scutellarein-7-O-glucoside were less than 25%, which confirmed equality. Conversely, in case of rosmarinic acid, RSD% was higher than 25%, indicating the contents of rosmarinic acid in Perilla leaves are variable and not suitable as a reference compound for Perilla leaves. In addition, stability of the extract up 225 days was also analyzed by HPLC, and The content of 6 components was not significantly changed. Taken together, these results suggest that Perilla leaf extract is good to be developed as anti-dementia functional food.

## Introduction

*Perilla frutescens* var. *acuta* KUDO (Perilla leaves) is a perennial plant of Lamiaceae. It is primarily cultivated in China, Japan, India, Korea and other Asian countries. *P. frutescens* var. *acuta* is long been used to improve coughing, vomiting, and chronic bronchitis, and pharmacological effects such as anti-inflammatory, anti-allergic, antibacterial and antioxidant effects have also been reported. Flavonoids, and terpenoids along with phenolic compounds were isolated from *P. frutescens* var. *acuta* including rosmarinic acid, caffeic acid, elemicin and perillaldehyde. Among these compounds, rosmarinic acid is suggested to be the most suitable indicator component due to the smallest deviation.

Previously, we have reported that hexane layer of *P. frutescens* var. *acuta* extract inhibited the aggregation of beta-amyloid (A $\beta$ ), which is one of the causes for Alzheimer's disease. As a follow-up study, in order to establish an optimal extraction method of *P. frutescens* var. *acuta* with excellent beta-amyloid aggregation inhibitory effect, extraction was performed with ethanol extractant at a ratio of 100, 80, or 60%. Cell viability of the ethanol extracts of different ratios was evaluated through MTT and LDH assays, and the cytoprotective effect was also evaluated. In addition, methods for evaluating the equivalence of crude drugs were developed and evaluated. And using this method, stability evaluations were made for six compounds.

## Methods

Cytotoxicity of *P. frutescens* var. *acuta* ethanol extract was evaluated by MTT and LDH assay. In 0.8 mL/min analyzed at 260 nm using photodiode array detector (PDA, Water 2998, USA). In addition, protective effect of *P. frutescens* var. *acuta* extract against A $\beta$  aggregate-induced toxicity by Equivalence and stability evaluation was conducted based on the developed evaluation method.

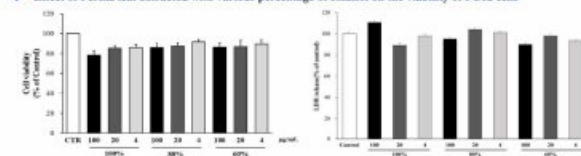
The equivalence evaluation method of *P. frutescens* var. *acuta* leaves was developed using HPLC (e2696, Waters, USA) system with C18 columns (250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Shisheido). As the mobile phase, 0.1% formic acid in CAN (A) and 0.1% Formic acid in Water (B) were used, and the conditions are shown in Table 1. Sample injection volume was 10  $\mu$ L, and mobile phase flow rate was

Table 1. Perilla leaf Equivalence Evaluation HPLC Solvent Ratio Condition

Solvent ratio	Time(min)						
	0	10	20	22	40	42	62
A(%)	20	30	55	60	60	100	100
B(%)	80	70	45	40	40	0	0

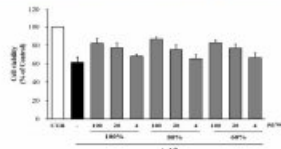
## Results

### ◆ Effect of Perilla leaf extracted with various percentage of ethanol on the viability of PC12 cells



- MTT and LDH assay was performed to confirm the cytotoxicity of the Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts (100, 20, and 4  $\mu$ g/mL).
- LDH assay was confirmed to be non-toxic at 89-110% of control.
- The Perilla leaf ethanol extracts (100, 80, and 60%) were not toxic to PC12 cells up to 100  $\mu$ g/mL.

### ◆ Effect of Perilla leaf extracts on the viability of PC12 cells from A $\beta$ -aggregate induced toxicity by the inhibition of A $\beta$ aggregation



- The protective effects of Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts by inhibiting A $\beta$  aggregation were determined by MTT assay. Briefly, A $\beta$  and extracts were mixed and incubated for 24 h. Then, this mixture was tested on PC1 cells, and the cell viability was evaluated by MTT assay.
- Perilla leaf ethanol (100, 80, and 60%) extracts significantly increased the cell viability of PC12 cells by inhibiting aggregation of A $\beta$  in a dose-dependent manner.

### ◆ Development of a method to evaluate the quality equivalence of Perilla leaves using HPLC

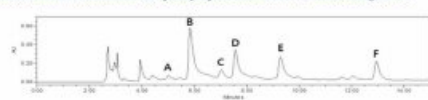


Fig 3. Chromatogram of Perilla leaf standard (A: Protocatechuic acid, B: Luteolin-7-O-glucoside, C: Caffeic acid, D: Loganin, E: Scutellarein-7-O-glucoside, F: Rosmarinic acid)

	A	B	C	D	E	F
RI (min)	5.008	5.835	7.052	7.564	9.284	12.944
Area ( $\mu$ S <sup>2</sup> min)	187854	5372713	859720	2253031	1928897	2485089

### ◆ Evaluation of quality equivalence of Perilla leaves

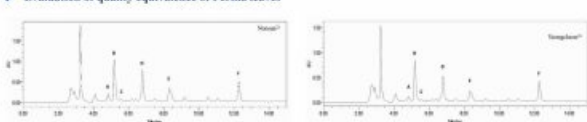
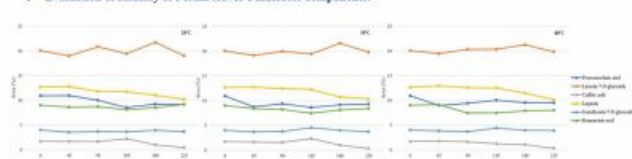


Fig 2. Chromatograms of Evaluation of equivalence for perilla leaves.

Place of origin	Area (%)					
	A	B	C	D	E	F
Norosa <sup>1</sup>	1.47	19.5	6.24	11.23	6.03	9.99
Jangja <sup>2</sup>	1.6	12.94	6.33	10.97	6.44	11.67
Uisong <sup>3</sup>	2.52	15.11	6.32	13.27	7.94	13.73
Yanggong <sup>4</sup>	2.9	17.57	6.25	14.9	8.77	13.07
Uisong <sup>5</sup>	2.84	20.35	6.34	11.75	7.13	6.47
Yeungcheon <sup>6</sup>	2.4	13.47	6.23	11.92	5.96	10.68
Yeungcheon <sup>7</sup>	1.5	23.72	6.21	11.54	6.83	9.45
Norosa <sup>8</sup>	2.2	19.72	6.32	15.9	8.81	10.41
Yeungcheon <sup>9</sup>	3.62	17.61	6.22	14.29	7.78	10.75
Yeungcheon <sup>10</sup>	2.06	8.81	6.4	8.19	4.83	11.26
Norosa <sup>11</sup>	2.16	16.6	6.47	11.22	4.29	5.17
Norosa <sup>12</sup>	2.21	24.8	6.24	12.41	6.11	4.5
Jangja <sup>13</sup>	2.78	19.26	6.27	10.3	5.24	3.82
Uisong <sup>14</sup>	2.6	14.67	6.33	13.11	3.4	5.54
Didoong <sup>15</sup>	1.98	19.72	6.26	15.2	6.16	7.24
Norosa <sup>16</sup>	3.48	28.64	6.31	12.96	7.72	6.15
Mean	2.2725	17.5125	6.2825	12.4475	6.4075	9.0525
SD	0.57043	4.119764	0.67951	1.996388	1.381185	3.617966
RSD(%)	25.11443	23.47276	10.80888	16.83847	21.407183	39.84904

- Perilla leaves purchased from 16 different companies were extracted with 60% ethanol and the relative concentration was evaluated.
- As a result, the RSDs (%) of the five indicator component (protocatechuic acid, Luteolin-7-O-glucoside, caffeic acid, Loganin, scutellarein-7-O-glucoside) were less than 25%, confirming the quality equivalence.
- However, rosmarinic acid is not suitable as an index component for quality control because RSD% is analyzed to be higher than 25%.

### ◆ Evaluation of stability of Perilla leaves 6 indicator components.



- 60% Ethanol extract was placed in an oven at 25, 35, and 40°C, and stability of the extract up 225 days analyzed by HPLC.
- Among the six components, Loganin and caffeic acid tended to decrease from 180 days, but there was no significant difference.
- During the storage period according to each temperature, the difference in content change for the 6 components was not significant.

## Conclusion

These results suggest that Perilla leaf extracts extracted with 100, 80 and 60% ethanol were not cytotoxic up to 100  $\mu$ g/mL and Perilla leaf extracts rescued the cells from A $\beta$  aggregated-induced toxicity by inhibiting A $\beta$  aggregation. In addition, the method which evaluates the quality equivalence of Perilla leaves was developed. As a result of analyzing 16 kinds of Perilla leaf extracts using this method, the RSD% of five indicator components (protocatechuic acid, Luteolin-7-O-glucoside, caffeic acid, Loganin, scutellarein-7-O-glucoside) was less than 25%. Conversely, the RSD% of rosmarinic acid was higher than 25%. These results suggest that rosmarinic acid is unsuitable as an indicator component for quality control. Stability evaluation was conducted through the developed equivalence evaluation method. There was almost no difference in the change of the six indicator components according to the temperature. After 180 days, Loganin and Caffeic acid tended to decrease, but not significantly. Taken together, Perilla leaf extracts could have potential to be developed as a functional food.

## Acknowledgement

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Innovative Food Product and Natural Food Materials Development Program Program (or Project), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (119012-3)





# Anti-Amyloidogenic Effects of Asarone Derivatives Isolated from *Perilla frutescens* Leaves Against Beta-Amyloid Aggregation and Nitric Oxide Production



Jae Eun Lee<sup>1,†</sup>, Na Yeon Kim<sup>1,†</sup>, Ji Yun Yeo<sup>1</sup>, Dae-Gun Seo<sup>1</sup>, Sunggun Kim<sup>1</sup>, Jae-Sun Lee<sup>1</sup>, Kwang Woo Hwang<sup>2</sup>, So-Young Park<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup> College of Pharmacy, Dankook University, Chungnam 31116, Korea; <sup>2</sup> College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

## Abstract

Alzheimer's diseases (AD) is a progressive, neurodegenerative brain disorder associated with loss of memory and cognitive function. Beta-amyloid (A $\beta$ ), particularly A $\beta$  aggregates are known to be highly neurotoxic and lead to neurodegeneration in AD. Therefore, blockade or reduction of A $\beta$  aggregation is a promising therapeutic approaches in AD. As the results, hexane fraction of *Perilla frutescens* was subjected to diverse column chromatography based on the activity-guided isolation methodology. As the results, five asarone derivatives including 2,3-dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1),  $\beta$ -asarone (2), 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3), asaronaldehyde (4), and  $\alpha$ -asarone (5) were isolated. All five asarone derivatives efficiently reduced the aggregation of A $\beta$  and disaggregated preformed A $\beta$  aggregation in a dose-dependent manner as determined by the Thioflavin T (Th T) fluorescence assay. Furthermore, five asarone derivatives protected PC12 cells from A $\beta$  aggregate-induced toxicity by reducing the aggregation, and significantly reduced NO production from LPS-stimulated BV2 microglial cells. Taken together, these results suggest that *P. frutescens* are neuroprotective and have the potential to be developed as good therapeutics or preventatives for AD. Furthermore, beneficial effects of the asarone derivatives from the *P. frutescens* on anti-amyloidogenic effects is under investigation with *in vivo* animal model.

## Introduction



*Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* Kado is a perennial plant of Lamiaceae, which is a mint family. It is primarily cultivated in China, Japan, India, Korea and other Asian countries. *P. frutescens* is 60-90 cm long and 5-8 cm wide, with a broad oval shape, spiny ends. It has been used as a traditional medicine to treat inflammatory diseases, depression, and many anxiety-related disorders. Many constituents have been isolated from the *P. frutescens* including rosmarinic acid, caffeic acid, luteolin, elenolic, and apigenin. *P. frutescens* has diverse biological activities such as antioxidant, antimicrobial, anti-allergic, antidepressant, anti-inflammatory, anticancer and neuroprotection effects.

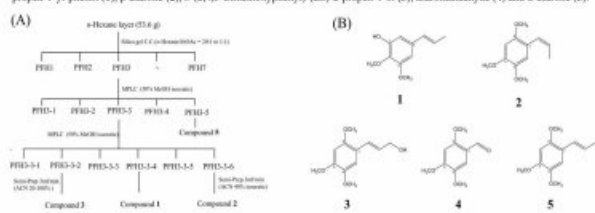
## Materials & Methods

**Materials** The leaves of *P. frutescens* (5 kg) were purchased from Samhong market in Seoul, Korea. **Extraction & Purification** Dried and pulverized *P. frutescens* leaves were extracted with 90% methanol for three times, and the extract was evaporated under vacuum to yield methanol extract. The methanol extract was suspended in distilled water and then partitioned sequentially into *n*-hexane (111.5 g), dichloromethane (5.6 g), ethyl acetate (16.9 g) and water (119 g). Each layer was dissolved in DMSO for the bioassay. **Thioflavin T (Th T) assay** To evaluate the aggregate formation of A $\beta$ , the thioflavin T (Th T) assay was performed. The A $\beta_{1-42}$  was dissolved in DMSO at 1 mg/mL concentration and 5 asarone derivatives were diluted in DMSO. 20  $\mu$ M of A $\beta_{1-42}$  was incubated together with asarone derivatives at 37 °C for 24 h. Then, 3  $\mu$ M of Th T was added and fluorescence was measured after 30 min using an Emax precision microplate reader with excitation at 442 nm and emission at 485 nm. The A $\beta$  treated with DMSO was used as a control. **Determination of NO production** BV2 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 5% FBS. NO produced by LPS-stimulated BV2 cells was determined using Griess reagents.

## Results

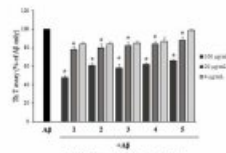
### 1. Identification of the active constituents from *P. frutescens* extract

The active constituents inhibiting A $\beta$  aggregation and nitric oxide production were isolated based on bioassay-guided isolation method from hexane fraction from *P. frutescens* of methanol extract. (A) The isolation was performed using diverse column chromatography (CC) including medium pressure column chromatography (MPLC) and high pressure liquid column chromatography (HPLC). As the results, five asarone derivatives were isolated. (B) The structures of these five compounds were elucidated as 2,3-dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1),  $\beta$ -asarone (2), 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3), asaronaldehyde (4) and  $\alpha$ -asarone (5).



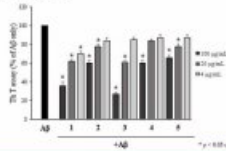
### 2. Asarone derivatives inhibited A $\beta$ aggregation

To determine the inhibition activity of each asarone derivatives isolated from *P. frutescens* on A $\beta$  aggregation, a Th T fluorescence assay was performed with DMSO-treated control group. All 5 asarone compounds inhibited the aggregation of A $\beta$  in a dose-dependent manner. 2,3-Dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1) showed the highest activity, reducing A $\beta$  aggregation to 49.7% at a concentration of 100  $\mu$ g/mL compared to A $\beta$  alone.  $\beta$ -Asarone (2), 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3), asaronaldehyde (4), and  $\alpha$ -asarone (5) were also reduced the A $\beta$  aggregation to 37.5%, 54.8%, 60.2%, and 67.3%, respectively, at the same concentration.



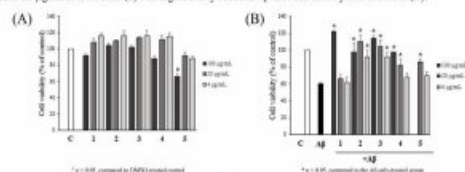
### 3. Asarone derivatives increased disaggregation of pre-aggregated A $\beta$

To evaluate the effects of isolated asarone derivatives on pre-formed A $\beta$  aggregates, A $\beta$  was aggregated before the addition of asarone derivatives. The degree of A $\beta$  aggregation was then determined using a Th T fluorescence assay. All 5 asarone derivatives efficiently reduced the levels of A $\beta$  aggregation in a dose-dependent manner, suggesting that the asarone derivatives are able to disrupt A $\beta$  oligomers. 2,3-Dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1) and 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3) were significantly effective, reducing the level of A $\beta$  aggregation compared to DMSO-treated controls to 34.4% and 24.5%, respectively, at 100  $\mu$ g/mL, and 61.7% and 58.5%, respectively, at 20  $\mu$ g/mL. However,  $\beta$ -asarone (2), asaronaldehyde (4), and  $\alpha$ -asarone (5) exhibited relatively moderate activity in terms of A $\beta$  disaggregation.



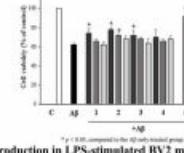
### 4. Asarone derivatives protected PC12 cells from A $\beta$ -induced toxicity

The possible cytotoxicity of asarone derivatives themselves on PC12 cells was determined by MTT assay (A).  $\alpha$ -Asarone (5) at 100  $\mu$ g/mL significantly reduced the viability of PC12 cells. Thus, the 100  $\mu$ g/mL concentration of  $\alpha$ -asarone (5) was excluded from the further experiments. To evaluate the protective effects of asarone derivatives against A $\beta$ (25-35)-induced toxicity, PC12 cells were pretreated with asarone derivatives for 1 h, followed by the incubation with A $\beta$ . Treatment of cells with A $\beta$  alone significantly reduced the viability of PC12 cells to 60.2% compared to the DMSO-treated control group. The addition of as little as 4  $\mu$ g/mL of  $\beta$ -asarone (2) and 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3) significantly attenuated A $\beta$ -induced toxicity, resembling the level observed in the DMSO-treated control group. Higher concentrations of 100  $\mu$ g/mL of 2,3-dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1) and asaronaldehyde (4), and 20  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -asarone (5) also significantly reduced A $\beta$ -induced toxicity in PC12 cells (B).



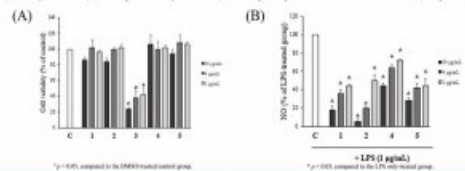
### 5. The inhibition of A $\beta$ aggregation by asarone derivatives rescued PC12 cells from A $\beta$

In order to evaluate whether the inhibition of A $\beta$  aggregation by asarone derivatives shown previously could rescue PC12 cells from A $\beta$  aggregate-induced toxicity, A $\beta$  was incubated with asarone derivatives for 24 h before addition to cells.  $\beta$ -asarone (2) at 100 and 20  $\mu$ g/mL significantly increased the viability of PC12 cells compared to treatment with A $\beta$  alone. In addition, 20 and 4  $\mu$ g/mL of  $\alpha$ -asarone (5) efficiently protected the cells against A $\beta$  aggregate-induced toxicity, resulting in cell viability of 85.7% and 76.2%, respectively. 2,3-Dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1) and 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3) at 100  $\mu$ g/mL also significantly reduced the cytotoxicity of A $\beta$  aggregate on PC12 cells.



### 6. Asarone derivatives reduced NO production in LPS-stimulated BV2 microglial cells

To evaluate the possible cytotoxicity of asarone derivatives on BV2 microglial cells, MTT assays were performed (A). With the exception of 3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3), no compounds had an effect on the viability of BV2 cells within the concentrations tested. 3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-(2E)-2-propen-1-ol (3) was excluded from the following study. We then measured the effect of asarone derivatives on LPS-induced NO production by BV2 cells. All the compounds significantly reduced LPS-stimulated NO production in a dose-dependent manner (B). 2,3-Dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1),  $\beta$ -asarone (2) and  $\alpha$ -asarone (5) at 5  $\mu$ g/mL decreased NO production to approximately half the level observed in the LPS-treated group. 20  $\mu$ g/mL of 2,3-Dimethoxy-5-(1E)-1-propen-1-yl-phenol (1) and  $\beta$ -asarone (2) were particularly effective, reducing NO production to 16.3% and 4.9%, respectively, compared to LPS alone.



## Conclusions

In this study, five asarone derivatives were isolated from *P. frutescens* based on activity-guided isolation methodology using diverse column chromatography. All 5 asarone derivatives efficiently reduced the aggregation of A $\beta$ , and furthermore, significantly increased the disaggregation of A $\beta$  aggregate. Consequently, the inhibition of A $\beta$  aggregation by asarone derivatives efficiently rescued the PC12 cells from A $\beta$  aggregate-induced toxicity. In addition, asarone derivatives significantly inhibited LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. Taken together, these observations suggest that the asarone derivatives isolated from *P. frutescens* could exert beneficial effects against AD. Therefore, the asarone derivatives and *P. frutescens* have the potential to be developed as therapeutic or preventative drugs for AD.

## Acknowledgements

This study was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) through Innovative Food Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA, Republic of Korea) (1190120311HD020)

-원료 성적서

01. 소엽추출물 동결건조분말(지표성분함량분석/잔류농약검사/아플라톡신)



참고용검사성적서				
본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다. * 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.				
발급번호	YFC-C000115101_F	접수번호	2021050000266-0001	
검사완료일	2021-05-28	접수연월일	2021-05-25	
제품명	60%소엽추출물 동결건조분말 1번			
(품목)제조번호	■	품목제조신고번호	■	
유형·재질·품목명	■			
제조(수입)원	■	유통(품질유지)기한	■	
의뢰인	성명	김성규	업체명	(주)에스에프씨바이오
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
제조원	업체명	(주)에스에프씨바이오	제조국	■
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
시험목적	참고용검사			
비고				
시험 항목 및 결과				
검사항목	단 위	결 과	비 고	
Rosmarinic acid		8.901		
α-asarone		0.000		

주식회사 휴먼바이오

## 참고용 검사 성적서

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

\* 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

발급번호	YFC-C000115102_F	접수번호	2021050000266-0002	
검사완료일	2021-05-28	접수완료일	2021-05-25	
제품명	60%소엽추출물 동결건조분말 2번			
(품목)제조번호	■	품목제조신고번호	■	
유형·재질·품목명	■			
제조(수입)일	■	유통(품질유지)기한	■	
의뢰인	성명	김성규	업체명	(주)에스에프씨바이오
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
제조원	업체명	(주)에스에프씨바이오	제조국	■
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
시험목적	참고용검사			
비고				

### 시험 항목 및 결과

검사항목	단 위	결 과	비 고
Rosmarinic acid		8.201	
α-asarone		0.000	

주식회사 휴먼바이오





### 참고용검사성적서

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

\* 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

발급번호	YFC-C000115103_F	접수번호	2021050000266-0003	
검사의료일	2021-05-28	접수연월일	2021-05-25	
제품명	60%소엽추출물 동결건조분말 3번			
〈품목〉제조번호	■	품목제조신고번호	■	
유형·재질·품목명	■			
제조(수입)일	■	유통(품질유지)기한	■	
의뢰인	성명	김성규	업체명	(주)에스에프씨바이오
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
제조원	업체명	(주)에스에프씨바이오	제조국	■
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관		
시험목적	참고용검사			
비고				
<b>시험 항목 및 결과</b>				
검사항목	단 위	결 과	비 고	
Rosmarinic acid		8.692		
α-asarone		0.000		

주식회사 휴먼





엔도설판(Endosulfan)	불검출
이마자릴(Imazalil)	불검출
이소프로치오란(Isoprothiolane)	불검출
이프로디온(Iprodione)	0.112
카바릴(Carbaryl)	불검출
카보후란(Carbofuran)	불검출
캡탄(Captan)	불검출
클로로타로닐(Chlorothalonil)	불검출
클로르피리포스(Chlorpyrifos)	불검출
클로르헨나피르(Chlorfenapyr)	불검출
트리아디메폰(Triadimefon)	불검출
트리아조포스(Triazophos)	불검출
트리플루우론(Triflumuron)	불검출
티아메톡삼(Thiamethoxam)	불검출
파클로부트라졸(Pacllobutrazol)	불검출
페메쓰린(Permethrin)	불검출
페니트로치온(Fenitrothion)	0.079
펜발러레이트(Fenvalerate)	불검출
펜토에이트(Phenthoate)	불검출
펜프로파스린(Fenpropathrin)	불검출
펜헥사미드(Fenhexamid)	불검출
포스메트(Phosmet)	불검출
프로시미돈(Procymidone)	불검출
프로클로라즈(Prochloraz)	불검출
프로페노포스(Profenofos)	불검출
플루벤디아마이드(Flubendiamide)	불검출
피라크로스트로빈(Pyraclostrobin)	불검출
피리메타닐(Pyrimethanil)	불검출
피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl)	불검출
후루디옥소닐(Fludioxonil)	불검출
디메토에이트(Dimethoate)	불검출
클로란트라닐리프로테 (Chlorantraniliprole)	0.059
클로로벤주론(Chlorobenzuron)	불검출
피프로닐(Fipronil)	불검출
루페뉴론(Lufenuron)	0.028

테부코나졸 (Tebuconazole)	0.028
이록-디아이피엔 (2,6-Diisopropyl naphthalene)	불검출
클로르피리포스-메틸 (Chlorpyrifos-methyl)	불검출
카르벤다짐 (Carbendazim)	불검출
티아벤다졸 (Thiabendazole)	불검출
클로티아니딘 (Clothianidin)	불검출
디페노코나졸 (Difenoconazole)	불검출
피리다벤 (Pyridaben)	0.020
이미다클로프리드 (Imidacloprid)	불검출
피페로닐 부톡시드 (Piperonyl butoxide)	불검출
톨펜피라드 (Tolfenpyrad)	불검출
디플루벤주론 (Diflubenzuron)	불검출

시험기기	LC-MS/MS, GC-MS/MS	시험기간	2021년 7월 13일 ~ 2021년 7월 20일
------	--------------------	------	-----------------------------

시험자	강유리 (서명)	검토자	이동욱 (서명)
-----	----------	-----	----------

- \* 본 분석결과를 선전 · 광고 · 소송 등 법적으로 사용할 수 없습니다.
- \* 위의 내용은 신청인이 제출한 시료에 대한 결과이며, 시료의 명칭은 신청인이 제시한 것입니다.
- \* 이 시험성적서는 용도 이외의 사용을 금합니다.

2021년 7월 20일

(주) SAP 분석평가연구소

















문서확인번호 : CTWC-8PUF-9MQ8-K3KX

# 참고용 시험성적서



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

발행번호	R20210721-0171	접수번호	210107879-005
검사완료일	2021-07-21	접수연월일	2021-07-12
제품명	60% 소일수출물 동결건조분말 LOT 3번		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·품목명	기다기준규격외		
제조(수입)일		유통(품질유지)기한	
의뢰자	성명	김성규	업체명 (주)에스에프씨바이오
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관	
제조원	업체명	(주)에스에프씨바이오	제조국
	소재지	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력관	
시험목적	식품 기타(제출음)		
<b>시험 항목 및 결과</b>			
시험 항목	시험 기준	시험 결과	비고
납(mg/kg)	기준없음	0.05	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.00	
비스(mg/kg)	기준없음	0.41	
수은(mg/kg)	기준없음	0.00	

종합판정 : 상기시험확인됨

시험검사원 : 박아름, 손현명

시험검사책임자 : 박민영

비고 :

※ 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용될 수 없습니다.

2021년07월21일

주식회사 휴먼바이오



(인)

32568 충청남도 공주시 원적2길 52-103 2~4층

T:041-881-9200

F:041-881-9201

※ 본 증명서는 인더넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.

도감, 문서하단의 바코드를 전용확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다. <http://lims.mfds.go.kr> Page 1 of 1

결 과 보 고 서(Report)

시 료 명 (SAMPLE) : 뇌보식  
 의뢰처 (REQUESTED BY) : ㈜더비  
 주 소 (ADDRESS) : 경기도 평택시 청북읍 현곡길 79-36  
 의뢰일자 (DATE REQUESTED) : 2021. 8. 17 (시료접수)  
 분석목적 (Object) : 참고용  
 시험결과 (Result) :

항 목	분석결과	단위	시험방법
경도 (응력, Stress) <sup>1</sup>	1447.2±98.7	N/m <sup>2</sup>	KS H 4897 시험방법(경도)
점도 <sup>2</sup>	12733.3±251.7	mPa·s	KS H 4897 시험방법(점도)

<sup>1</sup> 5회 분석 결과 최대값 및 최소값을 제외한 3회 평균값

<sup>2</sup> 3회 분석 평균값

This report may not be reproduced in whole or in part for advertising or trade purposes over our signature or in connection with our name without prior written approval. Our letters and reports apply only to sample tested and we make no guaranty that this sample is representative of the product/lot as a whole. It's only a reference for quality control of product.

이 보고서의 전부 또는 일부를 당 연구원의 문서화된 사전 동의 없이 무단으로 법적 소송이나 상품선전 등 기타의 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다. 보고서에 대한 분석 결과는 제품의 품질관리를 위한 참고자료입니다.

2021 년 8 월 19 일

02. 사용성평가결과보고서 (뇌보식)



## 사용성평가 성적서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 야탑로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p>성적서 번호 SFUT-21-01-02</p>
--	---------------------------------

**1. 의뢰인**

- 업 체 명 : 주식회사 에스에프씨바이오
- 주 소 : 서울특별시 강남구 안주로 725, 동관 2층
- 접수 일자 : 2021년 8월 20일

**2. 평가대상 제품 설명**

제 품 명	뇌보식	품목보고번호	2018032437325
규격단계	3단계	제품용량	30g
제품사진	 <p>&lt;제품 전면&gt;</p>		 <p>&lt;제품 표시사항&gt;</p>

\* 규격단계 : 1단계-치아로 섭취, 2단계-잇몸으로 섭취, 3단계-혀로 섭취

**3. 평가기간 :** 2021년 8월 20일 ~ 2021년 9월 8일

**4. 평가방법 :** 고령친화식품(즉석조리-전기포트용) 사용성평가 지표에 따름

**5. 평가결과**

섭취 안전성(M±SD)	조작 편의성(M±SD)	표시사항(M±SD)	종합 결과
적합 ( 4.56 ± 0.06 )	적합 ( 4.40 ± 0.07 )	부적합 ( 3.23 ± 0.37 )	부적합

\* 이 성적서는 의뢰인이 제공한 시료로 평가한 결과로써 전체 제품에 대한 품질을 보장하지는 않습니다.

\* 본 성적서는 사용성평가 성적서 용도 이외의 사용을 금합니다.

확 인	평가자 : 최 민 라 	평가 책임자 : 정 덕 영 
-----	---	--

2021. 9. 27.

**성남 시니어산업혁신센터**



## 사용성평가 결과보고서

**성남 시니어산업혁신센터**

- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호
- 전 화 : 031-784-7923
- 이메일 : sfut7923@gmail.com

**성적서 번호**

SFUT-21-01-02

**페이지**

( 1 ) / ( 10 )

### 〈 목 차 〉

1. 평가목적
2. 평가개요
3. 작업수행평가 결과
4. 사용성평가 결과
5. 결론
6. 첨부문서

<b>사용성평가 결과보고서</b>			
<b>성남 시니어산업혁신센터</b> - 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com		<b>성적서 번호</b> SFUT-21-01-02 <b>페이지</b> ( 2 ) / ( 10 )	
<b>1. 평가목적</b> - 주 사용자인 고령자를 대상으로 고령친화식품이 고령자의 원활한 섭취를 돕기 위해 제조하고 조리방법, 표시사항이 등이 고령자를 배려하고 사용성을 높인 제품인지를 평가하기 위함			
<b>2. 평가개요</b> 1) 평가대상 제품 정보			
<b>제 품 명</b>	뇌보식	<b>품목보고번호</b>	2018032437325
<b>규격단계</b>	3단계	<b>제품용량</b>	30g
<b>제품특징</b>	쌀가루로 만들어 소화에 용이하고 점증제 사용 없이 물(온수)에 녹여 먹는 제품		
<b>제품 이미지</b>	 <제품 전면>		
	 <제품 표시사항>		



<b>사용성평가 결과보고서</b>				
<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아탑로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b></p> <p style="text-align: center;">SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b></p> <p style="text-align: center;">( 3 ) / ( 10 )</p>			
<p><b>2) 평가 수행기간</b></p> <p style="padding-left: 20px;">- 2021년 8월 20일 ~ 2021년 9월 8일</p>				
<p><b>3) 평가 장소 및 환경</b></p> <p style="padding-left: 20px;">- <b>장소</b> : 성남 시니어산업혁신센터</p> <p style="padding-left: 20px;">- <b>주소</b> : 경기도 성남시 분당구 아탑로 205번길 26 성남 시니어산업혁신센터</p> <p style="padding-left: 20px;">- <b>환경</b></p>				
	<b>구 분</b>	<b>조 건</b>		<b>비 고</b>
		<b>201호</b>	<b>205호</b>	
	<b>조 도</b>	722 lx	540 lx	
	<b>온 도</b>	22 ℃	24 ℃	
	<b>습 도</b>	72 % R.H	65 % R.H	
<b>평가 환경</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시나리오상의 제품 평가항목을 고려하여, 사용자가 직접 제품을 조리하고 섭취할 수 있는 환경을 구성하여 평가를 진행함</li> </ul>			
<b>조리 도구</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전기포트                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제조사 : 키친아트, 모델명 : WMEK-2010GF</li> <li>- 적정용량 : 1800ml</li> <li>- 소비전력 : 1,850W, 전원 : AC 220V/60Hz</li> <li>- KC 인증번호 : JU07731-9001D</li> </ul> </li> </ul>			
<b>평가장소</b>				
	<사용성평가 수행 환경 #1>		<사용성평가 수행 환경 #2>	

## 사용성평가 결과보고서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호                  - 전 화 : 031-784-7923                  - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b></p> <p style="text-align: center;">SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b></p> <p style="text-align: center;">( 4 ) / ( 10 )</p>
--	---

#### 4) 사용성평가 참여자 정보

번호	평가 참여자	나 이(세)	성 별
1	김○순	71	여
2	김○주	73	여
3	윤○용	72	남
4	임○희	73	여
5	이○세	71	여
6	최○희	68	여
7	최○월	79	여
8	최○삼	75	남
9	선○자	74	여
10	전○순	77	여
11	서○복	69	남
12	윤○원	73	남
13	김○희	76	여
14	손○승	67	남
15	정○호	70	남
16	이○섭	70	남
<b>Mean ± SD</b>		<b>72 ± 3</b>	<b>남 : 7명 여 : 9명</b>

#### 5) 관찰자 정보

번호	관찰자	나 이(세)	성 별
1	손○영	30	여
2	김○정	26	여

<b>사용성평가 결과보고서</b>	
<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호</li> <li>- 전 화 : 031-784-7923</li> <li>- 이메일 : sfut7923@gmail.com</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b></p> <p style="text-align: center;">SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b></p> <p style="text-align: center;">( 5 ) / ( 10 )</p>
<p><b>6) 사용성평가 방법</b></p> <p>① 사용성평가 참여자 모집</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사용성평가 참여자는 저작 및 섭취기능에 문제가 없고 식품 섭취에 대한 알레르기가 없는 65세 이상의 고령자를 대상으로 함</li> </ul> <p>② 사용성평가 참여자 사전 교육(20분)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 평가 및 설문지 작성 방법에 대해 평가 참여자 대상 교육을 진행함</li> <li>- 평가자는 사용성평가 참여자에게 사용성평가 목적 및 방법, 평가 제품에 대한 개요를 충분히 설명 후, 본인 자필 서명을 받은 평가 참여에 대한 동의서를 수령함</li> </ul> <p>③ 사용성평가 수행(20분)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모든 시나리오 수행은 평가 참여자가 설명서를 읽고 이해한 대로 수행하는 것을 원칙으로 함</li> <li>- 각 시나리오에 따라 평가 참여자가 동작을 수행한 후 평가 문항에 대해 직접 평가하고 의견을 기록함</li> <li>- 만약 설명서를 읽고도 내용에 대해 충분히 이해하지 못하여 평가가 원활하게 진행되지 않을 경우 평가자가 최소한의 도움을 제공하여 수행함</li> <li>- 관찰자는 평가의 전 과정을 직접 관찰하여 평가 참여자의 시나리오 수행 여부 및 사용 오류에 대하여 기록함</li> </ul> <p>④ 고령친화식품(즉석조리-전기포트용) 사용성평가 시나리오</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Task 1 : 제품설명서와 표시사항 평가</li> <li>- Task 2 : 제품 개봉 과정 평가</li> <li>- Task 3 : 조리 평가</li> <li>- Task 4 : 섭취 안전성 평가</li> </ul>	



## 사용성평가 결과보고서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b> SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b> ( 6 ) / ( 10 )</p>
--	---

### 3. 작업수행평가 결과

#### 1) 평가 시나리오

번호	세부 작업
Task 1	<b>제품설명서와 표시사항 평가</b> ① 제품설명서(포장내용, 조리방법, 섭취방법 등)를 정독한다.
Task 2	<b>제품 개봉 과정 평가</b> ① 제품을 개봉한다. ② (해당시) 제품의 구성품을 확인한다.
Task 3	<b>조리 평가</b> ① (해당시) 제품을 준비된 그릇에 옮겨 담는다. ② 전기포트에 물을 넣고 끓인다. ③ 끓인 물을 음식이 담긴 그릇에 붓는다.
Task 4	<b>섭취 안전성 평가</b> ① 조리된 음식을 섭취한다.

#### 2) 시나리오 평가 결과

번호	세부 작업	task 완료 (O/x)
Task 1	제품설명서와 표시사항 평가	○
Task 2	제품 개봉 과정 평가	○
Task 3	조리 평가	○
Task 4	섭취 안전성 평가	○

<b>사용성평가 결과보고서</b>							
<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>				<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b> SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b> ( 7 ) / ( 10 )</p>			
<p><b>4. 사용성평가 결과</b></p> <p><b>1) 섭취 안전성 평가항목</b></p>							
문항 번호	설문문항	설문 점수 응답 분포					평균 (점)
		매우 긍정	긍정	보통	부정	매우 부정	
		5	4	3	2	1	
1	제품의 목적 및 섭취방법을 고려하였을 때 고령자가 삼키기 용이한 크기로 제조되었는가?	8	8	0	0	0	4.50
2	(반)유동식의 경우, 목넘김 시 흡착 위험이 없는가?	9	7	0	0	0	4.56
3	고령자인 소비자를 고려하여 제품의 이물(경질, 연질) 관리를 실시하였는가?	10	6	0	0	0	4.63
* 5점 만점 기준							
<p><b>2) 섭취 안전성 평가항목 평가 참여자 및 관찰자 의견</b></p>							
영역	평가 참여자	관찰자					
<b>섭취 안전성</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 쿠키 형태로 섭취 시 쪼그려워 섭취하기 약간 불편함</li> <li>• 부드럽고 목 넘김이 매우 좋음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특이사항 없음</li> </ul>					

## 사용성평가 결과보고서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호                  - 전 화 : 031-784-7923                  - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b></p> <p style="text-align: center;">SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b></p> <p style="text-align: center;">( 8 ) / ( 10 )</p>
--	---

### 3) 조작 편의성 평가항목

문항 번호	설문문항	설문 점수 응답 분포					평균 (점)
		매우 긍정	긍정	보통	부정	매우 부정	
		5	4	3	2	1	
1	사용자가 쉽게 포장을 개봉할 수 있는가?	8	7	1	0	0	4.44
2	포장의 취급 또는 개봉과정에서 신체의 손상 위험이 없는가?	9	5	2	0	0	4.44
3	전처리, 조리 등이 필요한 제품의 경우 사용자의 편리를 고려하였는가?	6	9	1	0	0	4.31

\* 5점 만점 기준

### 4) 조작 편의성 평가항목 평가 참여자 및 관찰자 의견

영역	평가 참여자	관찰자
<b>조작 편의성</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품의 용기가 작아 뜨거운 물 부을 때 조심스럽음(n=2)</li> <li>• 내용물이 충분히 풀어지지 않음(n=2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 물 붓는 양을 인지하지 못하고 제품 용기 안쪽의 표시선보다 물을 적게 따름(n=3)</li> <li>• 조리 시 내용물이 잘 풀어지지 않는다고 표현함</li> </ul>

## 사용성평가 결과보고서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호 - 전 화 : 031-784-7923 - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b> SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b> ( 9 ) / ( 10 )</p>
--	---

### 5) 표시사항 평가항목

문항 번호	설문문항	설문 점수 응답 분포					평균 (점)
		매우 긍정	긍정	보통	부정	매우 부정	
		5	4	3	2	1	
1	고령자의 가독성을 고려하여 적절한 글자크기 및 활자체를 적용하여 표시하고 있는가?(별도 설명서가 있을 시 함께 평가)	1	2	4	9	0	2.69
2	표시를 통해 연하 용이, 영양 강화 등 제품의 용도를 쉽게 설명하였는가?	0	8	5	3	0	3.31
3	연령대별 계량방법(영양섭취 기준) 안내를 이해하기 쉬운가?	2	5	7	2	0	3.44
4	조리 또는 섭취방법 및 취급 시 주의사항을 충분히 확인할 수 있는가?	2	7	4	3	0	3.50

\* 5점 만점 기준

### 6) 표시사항 평가항목 평가 참여자 및 관찰자 의견

영역	평가 참여자	관찰자
<b>표시 사항</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품설명서의 글자 크기가 작아 보이지 않고 읽기 불편함(n=14)</li> <li>• 제품 설명 글자 크기가 더 크면 좋겠음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제품설명서의 글자 크기가 작아 이해하기 힘들어함(n=5)</li> </ul>

## 사용성평가 결과보고서

<p style="text-align: center;"><b>성남 시니어산업혁신센터</b></p> <p>- 경기도 분당구 아담로 205번길 26, 317호                  - 전 화 : 031-784-7923                  - 이메일 : sfut7923@gmail.com</p>	<p style="text-align: center;"><b>성적서 번호</b></p> <p style="text-align: center;">SFUT-21-01-02</p> <p style="text-align: center;"><b>페이지</b></p> <p style="text-align: center;">( 10 ) / ( 10 )</p>
--	--

### 5. 결론

- 사용성평가 후 항목별 설문 점수의 평균은 섭취안전성 4.56점, 조작편의성 4.40점, 표시사항 3.23점으로 나타남
- 사용성평가 종합의견
  - 1) 참여자 의견
    - 제품설명서의 글자 크기가 전체적으로 너무 작아 보이지 않고 읽을 수 없어 불편함(n=14)
    - 제품 설명 글자 크기가 더 크면 좋겠음(n=1)
    - 제품 플라스틱 용기가 작아 뜨거운 물을 부을 때 화상 위험이 있어 조심스러움(n=2)
    - 제품 용기가 내용물을 충분히 풀기에는 적음(n=2)
  - 2) 관찰자 의견
    - 참여자들이 제품 설명의 글자 크기가 잘 안 보인다고 표현하고 설명서를 정독하는데 힘들어하는 모습이 관찰됨(n=5)
    - 제품의 물 붓는 양을 인지하지 못하고 제품 용기 안쪽의 표시선보다 물을 적게 따르는 모습이 관찰됨(n=3)

### 6. 첨부문서

#### 1) 평가 사진



<사용성평가 수행 #1>



<사용성평가 수행 #2>

#### 4) 심사용 제품 설명서 양식 및 작성요령

##### 1. 제품 기본 정보

◇ 생산자 정보			
업 체 명	(주)더비	영업등록번호	2018-0324373
주 소	경기도 평택시 청북읍 현곡길79-36		
◇ 제품 정보			
제 품 명	뇌보식	유 형	과자
원 재 료	농산물 및 그 가공품 : 46%, 수산물 및 그 가공품 : %		
고령자 직접 <sup>4)</sup> 사용 여부	○	용 량 (복수기재 가능)	30그램
고령자 배려 사항 (제품의 용도) ※복수체크 가능	<input checked="" type="checkbox"/> 물성조정 <input checked="" type="checkbox"/> 영양성분 조정 <input type="checkbox"/> 기타( )	고령자 배려를 위한 주요 공정 ※복수체크 가능	<input type="checkbox"/> 물성조정 <input type="checkbox"/> 영양성분 조정 <input type="checkbox"/> 기타( )
고령친화식품 규 격 단 계	<input type="checkbox"/> 1단계 <input type="checkbox"/> 2단계 <input checked="" type="checkbox"/> 3단계	기 타(인증)	고령친화식품(KS) 농식품신기술(NET) 특히 기술로 제조&가공된 제품

4) 고령자가 직접 섭취하는 경우는 ○로, 시설 납품용 등 고령자가 직접 전처리, 포장 개봉, 제품 표시사항 확인 등을 하지 않고 섭취하도록 제공되는 제품의 경우는 ×



나. 제품 개발 과정에서 반영한 설문조사 결과 등 소비자 요구사항 및 반영 결과

구분	사용성평가 결과 참여자 의견	개선사항
표시 사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품설명서의 글자 크기가 전체적으로 너무 작아 보이지 않고 읽을 수 없어 불편함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 박스단위로 시설에 판매되는 상품으로 글자14포인트 이상으로 표기사항을 준수하여 표기되었습니다.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품 설명 글자 크기가 더 크면 좋겠음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 어르신들의 편의성을 위해 '먹는방법' 사용설명서를 제품 박스에 넣어 개선하겠습니다..</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품 용기가 내용물을 충분히 풀기에는 적음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 현재까지 요양원 76개소에 판매되고 있습니다. 또한, 8개월간 지속적 고객요구를 점검하고 있습니다.</li> <li>● 한끼는 고령친화식품 KS 3단계 인증제품으로 어르신께서 컵라면처럼 간편하게 조리하여 고령친화식품 KS 3단계를 만족한 점도를 만들어 드실수 있도록 최적화된 제품입니다.</li> </ul>

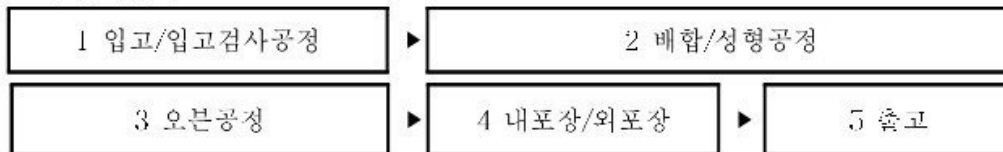


다. 기본품질기준: 단계/측정치 \* 공인성적서 별도 제출

구분	기준		측정치	시험기관
		3단계(허로 섭취)		←
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취 및 이물이 없어야 한다.		←	
점도 <sup>b,c</sup> ( <i>mPa · s</i> )	1,500 이상		4,220	
영양 성분 <sup>d,f</sup>	단백질	6 g/100 g 이상	6.2 g/100 g	휴먼바이오

라. 제조 공정

1) 전체공정



2) 고령자 배려요소:

물성 조절 : 점증제 사용없이 물량에 따라 자유롭게 조절 가능 식품  
영양성분 함유 : 단백질, 칼슘, 식이섬유 함유

3) 고령자 배려를 위한 공정

공정개요	공정명, 방법	
관리기준	제조가공 성형롤러치형, 배합온도, 수분함량, 크기, 무게	
목적	제품의 물 흡수성을 유지하고 점도력을 가지게 하기위한 품질기준	
효과	일반공정 시 :	해당공정 시 : (제조가공 성형롤)
효과의 적절성	고령친화식품 KS 3단계 품질 체계 만족	
품질검증	고령친화식품 KS 품질 체계	

**마. 크기(해당 시 작성)**

※ 심사항목 중 품질 안전 측면의 고령자 배려 - 섭취안전성 1 관련

**바. 흡착위험(해당 시)**

※ 심사항목 중 품질 안전 측면의 고령자 배려 - 섭취안전성 2 관련

요 소	연하장애(흡인성 장애)
관리기준	부착성 수치, 흡착 위험 감소를 위한 제품 개선 사항 (해당시)
품질검증	공인성적서(해당 시), 관련 자료 등 별도 제출

\* 해당없음. 사용성 평가 완료

**사. 이물관리**

※ 심사항목 중 품질 안전 측면의 고령자 배려 - 섭취안전성 3 관련

요 소	연질, 경질 이물 등
관리기준	
조치사항	해당 시 일반공정대비 추가 관리사항
증빙 사진	이물관리를 시행하는 증빙 사진(공정관리 혹은 검사 사진)

아. 기타 사항    제품의 크기 등 고령자 배려를 위한 공정 사항 작성

자. 사용성 평가 결과(별도 양식 참고) ※ 심사항목 중 편의성 및 조작성 측면의 고령자 배려 관련		
구분	사용성평가 결과 참여자 의견	개선사항
표시 사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품설명서의 글자 크기가 전체적으로 너무 작아 보이지 않고 읽을 수 없어 불편함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 박스단위로 시설에 판매되는 상품으로 글자14포인트 이상으로 표기사항을 준수하여 표기되었습니다.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품 설명 글자 크기가 더 크면 좋겠음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 어르신들의 편의성을 위해 '먹는방법' 사용설명서를 제품 박스에 넣어 개선하겠습니다..</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품 용기가 내용물을 충분히 풀기에는 적음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 현재까지 요양원 76개소에 판매되고 있습니다. 또한, 8개월간 지속적 고객요구를 점검하고 있습니다.</li> <li>● 한끼는 고령친화식품 KS 3단계 인증제품으로 어르신께서 컵라면처럼 간편하게 조리하여 고령친화식품 KS 3단계를 만족한 점도를 만들어 드실수 있도록 최적화된 제품입니다.</li> </ul>

차. 기타 사항 *제품의 크기 등 고령자 배려를 위한 공정 사항* 작성

3. 제품 조리과정(해당하는 경우 작성)

## 먹는 방법 (첫째)

### 제품기능(용도)

- 물(온수)을 넣어 죽 처럼 섭취합니다.
- 물(온수) 양에 따라 점도를 조절할 수 있습니다.
- 단백질, 칼슘,식이섬유가 함유되어 있습니다.

### 이렇게 섭취 합니다

※ 주의사항 : 뜨거운 물 사용 시  
손잡이 부분을 잡고 저어주세요.



① 뜯는곳까지 개봉해 주세요.



② 미온수의 물을 부어 주세요.



③ 몇초(8~10초) 동안 기다려 주세요.



③ 수저로 잘 저어서 드시면 됩니다.

### 물 양을 이렇게



- 물(온수)를 선까지 넣어주세요.
- 물(온수)를 넣은 후, 10초만 기다려 주세요

## 먹는 방법 (둘째)

### 목넘김 편하게



- 수저로 잘 저어주세요
- 점도가 있어,  
목넘김이 좋아요.

### 조심해주세요

- 제품을 바닥에 놓은 상태에서 사용해 주세요
- 목넘김이 불편하신 분은 의사소견에 따라  
섭취하여 주세요.
- 박스에 다양한 정보가 있어요.



영양정보		총 내용량 30 g		1봉(30g)당	
나트륨 89 mg	4%	탄수화물 19 g	6%	당류 7 g	7%
지방 7 g	14%	트랜스지방 0 g		포화지방 3.3g	22%
식이섬유 1.0 g	3%	단백질 2 g	4%		

1일 영양성분 기준치에 대한 비율입니다. 2000 kcal 기준(10세 미만 어린이는 1500 kcal 기준)으로 계산된 값입니다. \*%는 총 에너지에 대한 비율입니다.

04. 품목제조보고서 (뇌보식)

발급번호 : MAMB-ACMA-WOCJ-YUUB-OK2P



식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 김용태	생년월일	
	주소 경기도 평택시 청북읍 고잔7길 69	전화번호 휴대전화	
영업소	영칭(상호) (주)더비	영업등록번호	20180324373
	소재지 경기도 평택시 청북읍 한국길 79-36(제1동)		
제품정보	식품의 유형	과자	품목제조보고번호 2018032437325
	제품명	뇌보식	
	유통기한	12개월	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	뒷장에 기재	
	용도 용법	뒷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	뒷장에 기재	
	성상	원형	
	품목의 특성		
■ 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 [ ]에 [ ]아니오 [0]해당 없음 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 [ ]에 [ ]아니오 ■ 살균 · 멸균 제품의 해당 여부 [0]비살균 [ ]살균 [ ]멸균			
기타			

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

2021년 07월 02일  
보고인 김용태

경기도 평택시 안중출장소장 귀하

품목보고번호 : 2018032437325

처리부서	안중출장소 환경위생과	처리자성명	김유나	처리일자	2021년 07월 19일
------	-------------	-------	-----	------	---------------

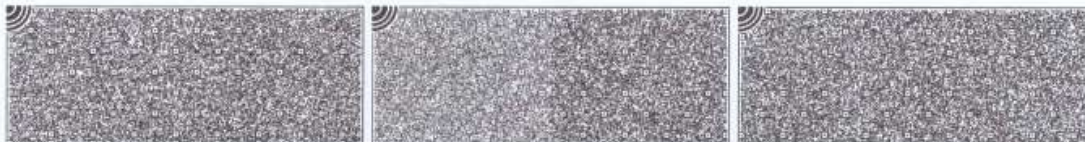






(원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)
1	차즈기잎추출분말 [소엽추출]	0.2%			
2	쇼트닝	21.12%			
3	설탕	21.12%			
4	정제소금	0.24%			
5	계란	11.37%			
6	쌀가루 [누룽지]	12.19%			
7	쌀가루	16.25%			
8	팥화미분말	12.19%			
9	감자전분	1.42%			
10	쌀조청	1.02%			
11	전지분유 [우유]	0.81%			
12	합성향료 [누룽지향]	0.24%			
13	식이섬유(고시형)	0.61%			
14	단백질(고시형)	0.41%			
15	해조칼슘	0.81%			

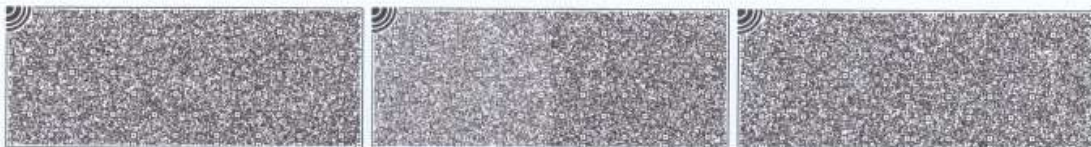




발급번호 : MAMB-ACMA-WOCJ-YUUB-OKZP




용도용법	간식
보관방법 및 포장재질	실온 PP,PE
포장방법 및 포장단위	5g ~ 20kg



05. 제품출시확인서 (뇌보식)

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발			
주관연구기관	(주)에스에프씨바이오	참여기관	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	
연구책임자	김성규	연구기간	19년 05월 ~ 21년 12월(총 3년)	
총 정부출연금	636,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	( )	기존 제품 공정개선	( )	
신제품(제품출시 완료)	( ✓ )	기 타	( )	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
뇌보식		- 인지기능개선 효능을 나타내는 소엽추출물을 함유한 고령친화식품으로서 섭취, 소화, 흡수, 대사, 배설 등의 능력을 고려하여 경도가 낮은 속 형태의 제품으로 간식 및 식사 대용으로 섭취 가능함	2021.12	100
* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수				
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				

2021년 12월 28일

연구책임자 : 김 성 규 (서명 또는 인)





06. 제조공정도 (뇌보식)

표준명	Q C 공 정 도				분류번호	더비-H-101		4 / 4			
부표 1. <span style="float: right;"><u>뇌보식 제조/QC 공정도</u></span>											
번호	도시 기호	공정명	공 정 관 리			검 사					
			항 목	기 준	방 법	항 목	방 법	조 건			
1	△	원재료입고									
2	◇	인수검사				재료표준 및 인수검사 규정에 따름					
3	○ ◇	배 합	배합	작업 표준서	작업일지	공정검사일지		품목 제조보고서	품목제조보고서		
						온도					
	○ ◇	성 형	성형	작업 표준서	작업일지	겉모양		품목 제조보고서	품목제조보고서		
						온도	물구멍위치				
								레일홈깊이			
	○ ◇	오 분					CCP-1B		HACCP	HACCP	
							온도				
							시간				
	○ ◇	포 장					CCP-2P		HACCP	HACCP	
							금속검출				
	◇	제품검사					포장상태		HACCP	HACCP	
에어리크							물방울	1개/2분			
기밀성							초중종	초중종			
4	△	보 관									

양식 A-201-2

(주) 더비

A4(210×297)

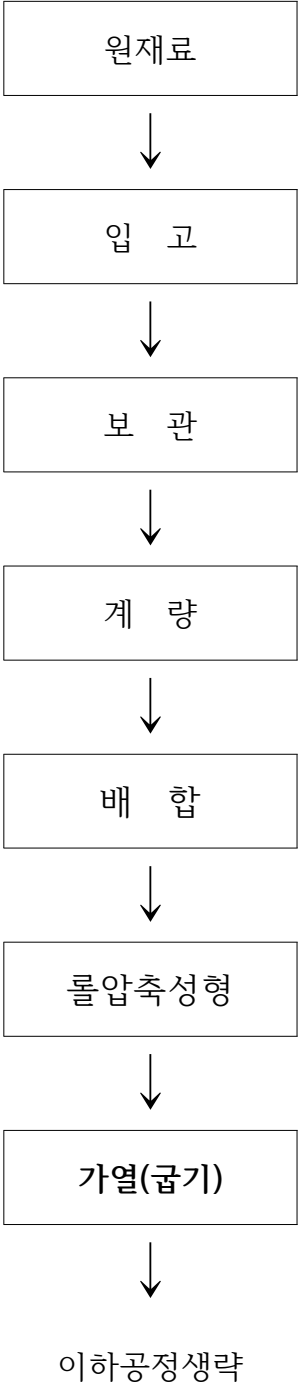
○ 고령친화식품 '뇌보식' 제조&가공 공정도

제조&가공 공정도	고령친화식품 쌀 쿠키(뇌보식)
<pre> graph TD     A[원재료] --&gt; B[입고]     B --&gt; C[보관]     C --&gt; D[계량]     D --&gt; E[배합]     E --&gt; F[롤압축성형]     F --&gt; G[가열(굽기)]     G --&gt; H[이하공정생략]             </pre>	<p>핵심공정 #1</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;"> <b>배 합</b> </div> <p>물성연하형성 배합공정</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 버터를 5도씨에서 30분간 해동한다.</li> <li>2. 해동한 버터를 배합기에 넣어서 1분 60RPM으로 돌린다.</li> <li>3. 설탕을 넣고 1분 60RPM으로 돌린후 3분 1800RPM으로 설탕과 배합통의 마찰열을 형성시켜 크림화 시킨다.</li> <li>4. 소금,계란,B.P를 넣고 1분 60RPM으로 돌리고 나서 다시 4분 240RPM 으로 돌려 크림배합에서 유크림 배합으로 성질 변경한다.</li> <li>5. 유크림 배합된 원료에 주원료(소엽추출물 동결건조분말)를 넣고 1분 60RPM 속도로 믹싱하면 유크림 배합이 부재료를 유크림으로 입자 코팅한다.</li> <li>6. 쌀가루를 넣고 3분 60RPM으로 배합하여 2차 코팅한다.</li> </ol>

○ 고령친화식품 '뇌보식' 제조&가공 공정도

제조&가공 공정도	고령친화식품 쌀 쿠키(뇌보식)
<pre> graph TD     A[원재료] --&gt; B[입 고]     B --&gt; C[보 관]     C --&gt; D[계 량]     D --&gt; E[배 합]     E --&gt; F[롤압축성형]     F --&gt; G[가열(굽기)]     G --&gt; H[이하공정생략]             </pre>	<p>핵심공정 #2</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;"> <b>롤압축성형</b> </div> <p style="margin-left: 20px;">조직감 형성 성형 공정</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 물성연하형성 입자구조로 배합된 반죽의 온도가 15.7°C에서 18.5°C를 확인하고, 1차 압축성형롤 넣어서 20초 50RPM 으로 회전시켜 반죽을 통과 시킨다.</li> <li>2. <b>압축롤(종축사각나사롤)</b>에 의하여 쌀가루가 부재료가 흡착하여 점성도를 낮춘다.</li> <li>3. 1차 점성도를 낮춘 반죽은 10초 160RPM 으로 2차 압축성형롤로 통과시켜 쿠키 금형으로 밀어넣어 일정한 쿠키 모양을 형성시킨다.</li> </ol> <p>이때, 2차 롤압축성형된 물성연하형성 입자구조 반죽은 1차 조직감보다 경도는 올리고 점성도는 낮춰진다.</p>

○ 고령친화식품 '한끼' 제조&가공 공정도

제조&가공 공정도	고령친화식품 쌀 쿠키(뇌보식)
 <pre> graph TD     A[원재료] --&gt; B[입 고]     B --&gt; C[보 관]     C --&gt; D[계 량]     D --&gt; E[배 합]     E --&gt; F[롤압축성형]     F --&gt; G[가열(굽기)]     G --&gt; H[이하공정생략] </pre>	<p>공정 #3</p> <p><b>가열</b> 성형이 완료된 공정품을 가열</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 성형이 완료된 공정품을 가열기에서 가열한다.</li> <li>2. 가열온도 : 180℃ (가열기) 가열시간 : 11Min</li> </ol>



# 고령친화우수식품 지정서

지정번호 : 제2021-18호

제 품 명 : 뇌보식

대 표 자 : 김용태

업 체 명 : ㈜더비

업 체 주소 : 경기도 평택시 청북읍 현곡길 79-36

지정기간 : 2021년 10월 29일 ~ 2023년 10월 28일

「고령친화산업 진흥법」 제12조제1항 및 같은 법 시행령 제9조 제1항에 따라 고령친화우수식품으로 지정합니다.


2021년 10월 29일

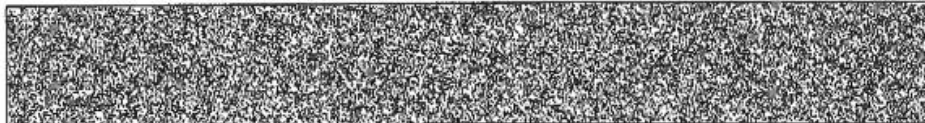
한국식품산업클러스터진흥원 이사장





01. 경도 시험 성적서 (비트리션)

제 D2021113570 호 문서확인 AJ87-398S-NV4J		<b>참고용 시험성적서</b>							
본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.									
제품명	뇌보식겔리	제조일자 (유통기한)	2021-11-24						
의뢰인	업체명	농업회사법인자연그대로(주)	성명						
	주소	경기도 양주시 백석읍 권율로1203번길 8-13							
제조번호		접수년월일	2021-11-29						
시험목적	참고용	접수번호	D2021113570						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2021-12-01                  시험·검사 책임자 : 이현영                  시험관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험 항목</th> <th style="width: 40%;">시험 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>경도</td> <td>33 843.54 N/m<sup>2</sup></td> <td>윤효선</td> </tr> </tbody> </table> <p>참.</p> <p>※ 위 결과는 의뢰된 시험 항목만을 대상으로 한 것입니다.                  ※ 본 성적서는 참고용 성적서입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 자가품질검사용 등에 사용할 수 없습니다.                  ※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용으로만 사용할 수 있습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.                  ※ 지면이 부족한 경우 시험 및 결과란은 필지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2021년 12월 01일</p> <p style="text-align: center;"><b>한국기능식품연구원</b></p> <div style="text-align: right;">  </div> <p>(사)한국건강기능식품협회 무설 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfi.re.kr">http://www.khfi.re.kr</a> 전화번호 (031)628-0400~1</p>				시험 항목	시험 결과	시험·검사원	경도	33 843.54 N/m <sup>2</sup>	윤효선
시험 항목	시험 결과	시험·검사원							
경도	33 843.54 N/m <sup>2</sup>	윤효선							



### 참고용 시험성적서

발행번호	RCTK-O211125-010		접수번호	CTK-O211125-010
검사완료일	2021-12-10		접수연월일	2021-11-25
제품명	고령친환경젤리			
(품목)제조번호		품목제조신고번호		
유형-재질-품목명				
제조(수입)일		유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명	한수정	업체명	농업회사법인 자연그대로(주)
	소재지	경기도 양주시 백석읍 권율로1203번길 8-13		
제조원	업체명		제조국	
	소재지			
시험목적	의뢰자 확인용			

#### 시험 항목 및 결과

시험 항목	시험 결과	비고
비타민 A (µg/100g)	0.67	
비타민 C (mg/100g)	89.08	
비타민 D (µg/100g)	0.27	
열량 (kcal/100g)	143.44	
탄수화물 (g/100g)	35.62	
당류 (g/100g)	35.34	
조단백질 (g/100g)	0.06	
조지방 (g/100g)	0.08	
포화지방 (g/100g)	0.04	
트랜스지방 (g/100g)	0.00	
콜레스테롤 (mg/100g)	불검출	
나트륨 (mg/100g)	29.96	

시험검사원 : 이슬빈, 조정훈, 차용병, 최보라, 허수정

시험검사책임자 : 노지훈

비고 : ① 소분포장 ② 표시사항 없음



※ 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

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

주식회사 씨티케이



### 참고용 시험성적서

발행번호	RCTK-O211223-005		접수번호	CTK-O211223-005
검사완료일	2021-12-31		접수연월일	2021-12-23
제품명	고령친화젤리			
(품목)제조번호		품목제조신고번호		
유형-재질-품목명				
제조(수입)일		유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명	한수정	업체명	농업회사법인 자연그대로(주)
	소재지	경기도 양주시 백석읍 권율로1203번길 8-13		
제조원	업체명		제조국	
	소재지			
시험목적	의뢰자 확인용			

#### 시험 항목 및 결과

시험 항목	시험 결과	비고
비타민 A (mg/100g)	1.60	
비타민 D (µg/100g)	16.95	

시험검사원 : 허수정

시험검사책임자 : 노지훈

비고 : ① 소분포장 ② 표시사항 없음



※ 동 시험성적서는 법적 효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

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

주식회사 씨티케이



04. 품목제조보고서 (비트리션)

발급번호 : MAMM-ABBK-JMFA-BZYQ-WCPA



식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 조상우	생년월일	
	주소 경기도 남양주시 화도읍 경춘로2290번길 2,100동	전화번호 휴대전화	
영업소	영칭(상호)	영업등록번호	
	자연농장 소재지 경기도 남양주시 화도읍 비룡로464번길 12(주1동, 주2동 일부)	20170333328	
제품정보	식품의 유형	캔디류	품목제조보고번호 2017033332892
	제품명	런시아 비-트리션	
	유통기한	제조일로부터 18개월	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장애 기차	
	용도 용법	맛장애 기차	
	보관방법 및 포장재질	맛장애 기차	
	포장방법 및 포장단위	맛장애 기차	
	성상	고유의 색채와 향미를 가지고 있으며 이미, 이취가 없어야 한다.	
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 [ ]예 [x]아니오 [이해당 없음] ■ 영,유아를 섭취대상으로 표시 관여하는 식품 해당 여부 [ ]예 [x]아니오 ■ 알코·열근 식품의 해당 여부 [ ]비알코 [x]알코 [ ]열근	
기타			

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

2021년 12월 22일

보고인 조상우

경기도 남양주시장 귀하

품목보고번호 : 2017033332892

처리부서	산업경제국 위생과	처리자성명	한연희	처리일자	2022년 01월 04일
------	-----------	-------	-----	------	---------------





(원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)
1	정제수	55.54%	16	감초농축액	0.1%
2	프락토올리고당	2%	17	본말비타민A [비타민A]	0.005%
3	사양분말	10%	18	혼합제제비타민D [비타민D]	0.005%
4	대추농축액	2%			
5	헛개나무농축액	2%			
6	차즈기잎추출물 [소엽추출물 중 결건조분말]	1.25%			
7	혼합제제 [루트결A]	1.3%			
8	수박추출물 [수박추출분말]	0.1%			
9	기타가공품 [레드코린C분말]	0.9%			
10	기타가공품 [다이프로바이옴시 너지복합분말]	0.5%			
11	플랑	0.5%			
12	구연산	0.3%			
13	카리기난	0.3%			
14	비타민C	0.1%			
15	황기농축액	0.1%			



발급번호 : MAMM-ABBK-JMFA-BZYQ-WCPA




용도용법	간식용/1일 1회-3회 섭취
보관방법 및 포장재질	상온보관 PE
포장방법 및 포장단위	1g~ 100kg




05. 제품출시확인서 (비트리션)

<첨부3>

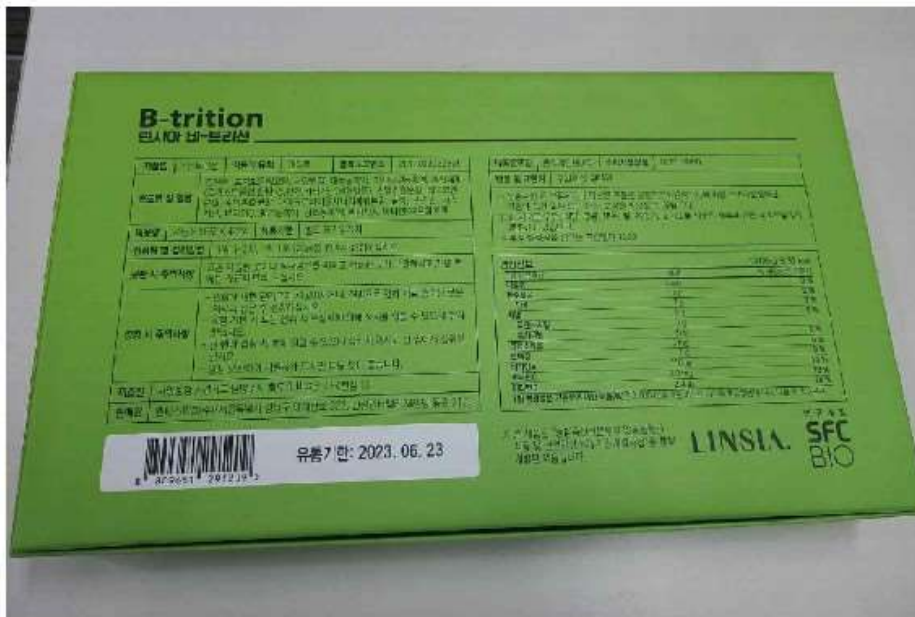
농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	소엽추출물을 이용한 인지기능에 도움이 되는 소재 개발 및 이를 활용한 고령친화식품 개발			
주관연구기관	(주)에스에프씨바이오	참여기관	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	
연구책임자	김성규	연구기간	19년 05월 ~ 21년 12월(총 3년)	
총 정부출연금	636,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	( )	기존 제품 공정개선	( )	
신제품(제품출시 완료)	( ✓ )	기 타	( )	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
린시아 비-트리션		- 인지기능개선 효능을 나타내는 소엽추출물을 함유한 고령친화식품으로서 섭취, 소화, 흡수, 대사, 배설 등의 능력을 고려하여 경도가 낮은 젤리 형태의 제품으로 간식으로 섭취 가능함	2021.11	100
* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수				
상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.				

2021년 12월 28일

연구책임자 : 김 성 규 (서명 인)







- 외부 기관 보고서

01. Rosmarinic acid, asarone 함량 분석 (휴먼 바이오)

본 문 : 휴먼 바이오에 유전자 검출로 150, 400, 2000원짜리  
 유전자 검사



검 사 성 적 서			
수신   휴먼바이오에 유전자 검사		발 신   휴먼바이오 식품분석연구원	
제목   검사 성적서 요청		발급번호   20201107-01	
		발급일   2020년 11월 07일	
<p>본시험에 대한 상세한 검사항목은 아래에 있습니다.                      검사에 적용된 검체는 유전자의 검출에 맞추어, 본시험 포함 항목에서 제시된 것입니다.                      본 시험에는, 검사자의 어떠한 어떠한 특별한 정보가 필요나 결과 및 진단을 상담할 필요로 사용할 수 없습니다.</p>			
<b>I. 검사 내용</b>			
발주번호	2020100800801-1	검 수 일	2020년 10월 08일
과 목 명	휴먼바이오에 유전자 검사 (검정검)		
소 재 지	충청남도 천안시 동남구 갈매로 159, 412호 휴먼바이오		
진 행 방	30% 초음파용액		
유 기	■		
세포종자	■	세포종자	■
유동기판	■		
검사목적	항균활성		
<b>II. 검사 결과</b>			
항목	단위	결과	비고
Rosmarinic acid	mg/g	0.000, 4.446, 4.800	
α-asarone	mg/g	0.000, 0.000, 0.000	

(주)휴먼바이오 식품 분석연구원

30558 충청남도 천안시 동남구 갈매로 159-101

TEL: 041-881-8000

FAX: 041-881-8081



## 검 사 성 적 서

수신 : 휴먼바이오(주)  
 제품 : 유산균 유제품

발 신 : 휴먼바이오 식품분석연구소  
 발급번호 : 20201109-02  
 발 신 일 : 2020년 11월 09일

본회사에 의뢰한 검체의 검사결과를 하기에 안내합니다.  
 검체에 사용된 첨가물 적출결과, 해당항 소량 이하이며 확인되었습니다.  
 본 성적서는 검사목적 이외의 임의의 사용에 용이한 정보 및 설명을 담지 않으며 사용될 수 없습니다.

### 1. 검사 내용

검수번호	2020400000001-0	발 수 일	2020년 11월 09일
의뢰처	휴먼바이오(주) (김영권)		
요청사항	유산균 유제품 유산균 유제품 1리터 4.0% 소염지방분		
검체명	200g 소염유제품		
종 류	■		
제조일자	■	제조번호	■
유통기한	■		
검사목적	합조물검사		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Formic acid	mg/kg	4.4%, 4.27%, 4.28%	
acetic acid	mg/kg	0.080, 0.080, 0.080	

(주)휴먼바이오 식품 분석연구소

## 검 사 성 직 서

수신 : ㈜에스제프라이오  
제목 : 검사 성적서 공보

발 행 인 : 휴먼바이오 식품분석연구원  
발행번호 : 20201109-03  
발 행 일 : 2020년 11월 09일

공통하여 2020년 11월의 검사결과를 아래와 같습니다.  
검사의 내용과 결과는 24시간이 경과하였으며, 24시간 이후 24시간이 지난 것임 것입니다.  
본 성적서는 영구적이며 영적인 해설에 오류나 광고 및 미정확 사항의 용어로 사용할 수 없습니다.

### 1. 검사 내용

발주번호	2020J00000001-3	발 주 일	2020년 10월 09일
위 의 인	㈜에스제프라이오 (김영희)		
주 재 지	용산 판방사 용산구 당곡로 131, 412호, 용산출판물		
검 사 명	20% 소염추출물		
공 명	■		
제조일자	■	제조번호	■
유용기간	■		
검사목적	항균용량사		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Bismuth acid	mg/kg	4.845, 1.883, 1.095	
Cr (total)	mg/kg	0.500, 0.580, 0.090	

(주)휴먼바이오 식품  분석연구원

## 검 사 성 적 서

수신 : ㈜에스엘프라이푸드  
 제품 : 김치 (김치, 고춧가루)

발 신 : 유엔바이오 식품분석연구원  
 발급번호 : 20201108-04  
 발 간 일 : 2020년 11월 09일


본 시험이 지적한 항목의 검사결과에 의해서도 없습니다.  
 검사에 사용된 방법은 지적항이 적용되었으며, 본시험 또한 지적항이 적시됨 있었나  
 은 상태에는 검사항에 수치의 범칙한 항목의 용이나 용소 및 용인한 상한의 용으로 사용될 수 있습니다.

**1. 검사 내용**

발주번호	2020000000001-4	발주일	2020년 10월 08일
제 목	에스엘프라이푸드 (김치)		
수 색 지	충청남도 홍성군 안면로 118, 303호, 신지향마을		
검 체 명	김치 (소용량용량)		
분 명	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유통기한	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사항목	항아물검사		

**2. 검사 결과**

항목	단위	결과	비고
항아물검사	항아물	0.00%, 0.00%, 0.00%	
항아물검사	항아물	0.00%, 0.00%, 0.00%	

(주)유엔바이오 식품  분석연구원



## 검 사 성 적 서

주 소 : (주)휴먼바이오  
 주 소 : (주)휴먼바이오

일 시 : 2020년 11월 05일  
 명 칭 : 20201105-05  
 발 주 : 2020년 11월 05일

본 센터에 의뢰한 검체의 검사결과를 하첨의 검출이다.  
 검사의 사실성 및 정확성은 의뢰인의 제공자료에, 정확할 수만 제한하여 제공한 것입니다.  
 본 센터는 검사목적에 따라, 일정한 검출의 용이나 당도 및 산도를 측정할 수 있으므로 사용될 수 있습니다.

### 1. 검사 내용

검 수 연 호	2020110500001-5	발 주 일	2020년 11월 05일
의 의 인	(주)휴먼바이오 (인)		
주 소 지	충남 천안시 동남구 당진로 113, 430호, 김해영식품		
검 체 명	00% 소염수용액		
동 행			
검 소 일자		검 소 연도	
유 용 기 한			
검 수 목적	제조과정		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Formic acid	mg/kg	0.144, 0.142, 0.104	
acetic acid	mg/kg	0.086, 0.086, 0.009	

(주)휴먼바이오 식품안전연구원



## 검 사 성 직 서

수신 : 휴먼바이오(주)  
 목적 : 검사 성적서 요청

발신 : 휴먼바이오 식품(주) 연구원  
 발신번호 : 00001100-00  
 발신일 : 2020년 11월 09일


본 센터에 도착한 검체의 검사결과를 아래와 같습니다.  
 검사에 사용된 방법은 적체시간 측정법입니다. 절대적 무균 상태인 채시험 되었으나,  
 본 센터에서 검사하기 까지의 열처리 과정의 용도에 관계 및 안전을 상인계 용으로 사용할 수 없습니다.

### 1. 검사 내용

발주번호	2020100000001-0	발주일	2020년 10월 09일
지리	경기도 고양시 고양구 인트로 110, 403호 신혁빌딩		
검체명	40% 소염수용액		
종류	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유통기한	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사목적	정균농도		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Microbial count	CFU/g	0.750, 0.500, 0.500	
W-Bacterial	CFU/g	0.250, 0.000, 0.000	

(주)휴먼바이오 식품  연구원  
 대표이사



## 검 사 성 적 서

주 소 : ㈜에스케이바이오  
 대 표 : 김진, 김진희, 김진

발 행 소 : (주)휴먼바이오 식품분석연구원  
 발급번호 : 20201109-02  
 발 행 일 : 2020년 11월 09일


본원에서 지정한 항목에 검사결과를 하첨해 있습니다.  
 동시에 사용의 목적은 목적에 맞게 사용하십시오. 결과를 위한 목적에 맞게 사용하십시오.  
 본 검사에는 검사목적 이외의 법적인 책임의 용이로 결과 및 신청을 담당해 용이로 사용될 수 없습니다.

### I. 검사 내용

접수번호	2020110900081-2	발 행 일	2020년 11월 09일
과 목 명	에스케이바이오 (김진희)		
소 재 지	충청남도 천안시 동남구 당진로 113, 113호 에스케이바이오		
과 목 명	00% 소염주출장		
종 류	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조장소	<input checked="" type="checkbox"/>
중량기준	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사목적	제조물검사		

### II. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Regeneron의 00%	00%	12.000, 12.000, 12.000	
0-000000%	00%	0.000, 0.000, 0.000	

(주)휴먼바이오 식품  분석연구원



## 검 사 생 직 서

주 소 : 신학합리원  
 대 목 : 검사 생 직 서 교 본

발 신 : 휴먼바이오 식품분석연구소  
 발 신 번호 : 20201109-001  
 발 신 일 : 2020년 11월 09일


본 생 직 서는 해당 생 직 서에 대한 검 사 생 직 서는 아래와 같습니다.  
 검 사 생 직 서는 해당 생 직 서에 대한 검 사 생 직 서는 아래와 같습니다.  
 본 생 직 서는 해당 생 직 서에 대한 검 사 생 직 서는 아래와 같습니다.

**1. 생 직 서 내 용**

발 신 번호	2020110900001-001	발 신 일	2020년 11월 09일
대 목	신학합리원 (신학합리원)		
주 소	분당 천안시 중앙구 천안로 218, 412호 신학합리원		
검 사 생 직 서	2020 요양주출발		
유 형	<input checked="" type="checkbox"/>		
대 목 일 자	<input checked="" type="checkbox"/>	대 목 번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유 형 기 한	<input checked="" type="checkbox"/>		
검 사 생 직 서	신학합리원		

**2. 생 직 서 결 과**

성분	단위	결과	비고
Formic acid	mg/g	15.51%, 13.72%, 12.17%	
Acetic acid	mg/g	0.80%, 0.85%, 0.88%	

(주)휴먼바이오 식품  분석연구소





## 검 사 성 적 서

주 소 : 유엔바이오  
 제 목 : 품질 경영서, 품질

발 행 소 : 유엔바이오 식품안전연구원  
 발급번호 : 20201108-09  
 발 행 일 : 2020년 11월 09일

본시험에 참여한 업체의 검사결과에 대해서 안내합니다.  
 검사에 사용된 결과는 객관성에 중점을 두며, 정확성 또한 객관성에 중점을 두었습니다.  
 본 결과는 즉시적인 처리와 법적일 때의 필요에 따라 및 새로운 상황에 필요로 사용될 수 있습니다.

### I. 검사 내용

발주번호	202011080001-9	발주일	2020년 10월 08일
의뢰선	유엔바이오 (김성권)		
소재지	충남 천안시 동남구 당포로 113, 412호, 유엔바이오		
검체명	80% 소염수용액		
종 류	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유증기판	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사목적	항균용정서		

### II. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Formic acid	mg/kg	11.799, 13.983, 12.203	
is-menthyl	mg/kg	8.085, 9.008, 9.008	

(주)유엔바이오 식품안전연구원



## 검 사 성 적 서

수신처 : 휴먼바이오식품연구소  
 명칭 : 송남-검정선-표본

발주처 : 휴먼바이오 식품연구소  
 발급번호 : 20201108-10  
 발급일 : 2020년 11월 08일

본 시험이 어떠한 용도에 사용될지를 확인할 수 없습니다.  
 검사에 사용된 검체는 적체되어 제공되었으며, 검사일 포함 적체기간을 명시한 것일 수 있습니다.  
 본 시험에는 검사목적 이외의 별첨된 재질에 용해나 첨가 및 선정한 성분적 용어로 사용될 수 없습니다.

### 1. 검사 내용

발주번호	2020110800001-10	발주일	2020년 11월 08일
제 리 언	2020세제검정선표본 (10명량)		
수 신 처	송남 천연이 향신료 연구원 118, 423호 신학빌딩		
검 제 명	99% 소염수순증		
종 류	■		
제조일자	■	제조번호	■
분류기준	■		
검수목적	정교분정서		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Formic acid	mg/kg	18.821, 18.809, 18.829	
ac-sulfonic	mg/kg	1.001, 1.001, 0.994	

(주)휴먼바이오 식품  연구원



## 검 사 설 직 서

주신 : ㈜에스케이바이오  
 제품 : 연초 생약식료분

발 행 : 휴먼바이오 식품첨가물연구원  
 발간번호 : 2020109-11  
 발 간 일 : 2020년 11월 09일

본원에 의뢰한 제품의 검사사항은 아래와 같습니다.  
 검사가 적용될 검체는 적외선외 측정하므로, 본시험 또한 적외선외 측정인 것입니다.  
 ※ 검체서는 검사직접 검체지정 방법의 용량에 따라 필요 및 불충분 사항의 용으로 사용할 수 있습니다.

**1. 검사 내용**

발주번호	202000900091-11	발 주 일	2020년 10월 09일
과 목 명	에스케이바이오 (검정교)		
소 재 지	충남 천안시 동남구 당일로 119, 413호 생약첨가물		
검 체 명	20% 초정수출물		
유 형	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유용기간	<input checked="" type="checkbox"/>		
검수목적	원료검정		

**2. 검사 결과**

항목	단위	결과	비고
Roastaric acid	mg/kg	18.454, 18.811, 20.140	
ω-agonist	mg/kg	0.327, 0.330, 0.324	

(주)휴먼바이오 식품  식품첨가물연구원



## 검 사 성 직 서

수신 : ㈜에스제프라이비오  
 제작 : 공산, 영양성, 포장

발신 : 휴먼바이오 식품분석연구원  
 발검번호 : 20221129-12  
 발 검 일 : 2022년 11월 29일

휴먼바이오 지정된 검체와 검사결과를 하첨과 일치합니다.  
 검사된 제품과 검체는 지정기간 유효하며, 판매할 것과 판매하지 않기로 결정합니다.  
 본 검사받은 검수물이 기타의 별다른 하첨의 공보나 광고 및 상인을 당감의 용어로 사용될 수 없습니다.

### 1. 검사 내용

검수번호	2022100800001-13	검 수 일	2022년 11월 09일
적 용 인	에스제프라이비오 (12명용)		
소 사 이	유산 천연성 유산균 함유로 (1)의 이유로 생화학제품		
포 배 량	25% 소량유출물		
공 명	<input checked="" type="checkbox"/>		
제작일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
인증기관	<input checked="" type="checkbox"/>		
당시위치	충무로점사		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Protein(%)	비율(%)	18.27%, 18.457, 18.289	
cr-sterile	비율(%)	0.341, 0.298, 0.298	

(주)휴먼바이오 식품 분석연구원



## 검 사 설 직 서

수신 : ㈜에스제프라이오  
 제작 : 검사 신청서 표본

발 신 : 휴먼바이오 식품분석연구원  
 발신번호 : 00281189-13  
 발 급 일 : 2020년 03월 09일

본국에서 제작된 제품에 검사할 때는 역행과 같습니다.  
 검사할 식품의 무게는 적어도 100g 이상이어야 하며, 검사할 포장 적어도 1개 이상 있어야 합니다.  
 본 신청서는 검사목적 이외의 별개의 목적에 용도나 광고 및 영업용 상업적 용도로 사용할 수 없습니다.

**1. 검사 내용**

발주번호	202000800081-13	발 주 일	2020년 03월 09일
의뢰인	㈜에스제프라이오 (김성규)		
소재지	울산광역시 동남구 대동로 118-4318 신의빌딩 4층		
검 세 명	질수 측정용량		
분 량	■		
세척일자	■	세척번호	■
검출기간	■		
검사목적	원료분석		

**2. 검사 결과**

항목	단위	결과	비고
Benzoic acid	mg/kg	0.000, 4.140, 4.000	
m-cresol	mg/kg	0.000, 0.000, 0.000	

(주)휴먼바이오 식품 분석연구원



## 검 사 성 적 서

수신 : 케세스케르바이오  
 제작 : 김오-김지선, 코푸

발 신 : 유엔바이오 식품분석연구원  
 발신번호 : 20201128-14  
 발 급 일 : 2020년 11월 28일

결과에 대한 문의는 검사결과를 바탕으로 가능합니다.  
 검사에 사용된 인력은 100%가 위생관리되며, 검사할 모든 식재료에 표시된 것일 나고,  
 본 센터에는 검사목적에 따라 검사할 재료의 용도나 용도 및 신장용 상한일 용도에 사용할 수 있습니다.

### 1. 검사 내용

발주번호	20201108000001-14	발 주 일	2020년 11월 28일
리 피 인	케세스케르바이오 (김성진)		
수 사 지	출신 별명: 김성진, 김지선, 김오, 코푸, 신석영(주)		
검 재 명	밀수 수명수출물		
종 류	<input checked="" type="checkbox"/>		
제+일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
유통기한	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사목적	성분분석		

### 2. 검사 결과

항목	단위	결과	비고
Protein(%)	mg/g	3.787, 4.297, 4.008	
Starch(%)	mg/g	8.088, 8.000, 8.008	

(주)유엔바이오 식품분석연구원



## 검 사 성 적 서

수신 : ㈜에스케이바이오  
 제품 : 검사 성적서 구분

발 신 : ㈜휴먼바이오 식품안전연구원  
 발급번호 : 20221109-15  
 발 관 일 : 2022년 11월 09일


본 성적서에 기재된 결과는 검사실과는 무관하며 검증되지 않았으며, 검사결과 또한 책임인이 직시할 것입니다.  
 즉, 당 센터는, 검사기록 이외에 어떠한 형태의 승인, 합격 및 재검을 담당할 수 없으며, 승인할 수 없습니다.

**1. 검사 내용**

발주번호	2022102800004-15	검 수 일	2022년 10월 09일
의 청 인	㈜에스케이바이오 (김성규)		
주 재 지	충남 천안시 동남구 당북로 139, 412호, 농축협지원		
검 사 명	검사 요청서 요청수출품		
문 형	<input checked="" type="checkbox"/>		
제조일자	<input checked="" type="checkbox"/>	제조번호	<input checked="" type="checkbox"/>
공통시험	<input checked="" type="checkbox"/>		
검사목적	검출물량		

**2. 검사 결과**

항목	단위	결과	비고
Domestic acid	mg/kg	0.000, 0.100, 0.000	
or iodine	mg/kg	0.000, 0.000, 0.000	

(주)휴먼바이오 식품  안전연구원  
 대표인

02. 소엽추출물 동결건조분말의 유통기간 설정 실험 결과보고서 (휴먼 바이오)

[별지 제2호 서식]

『소엽추출물 동결건조분말』의 유통기간 설정실험  
결과보고서

2021년 12월


주식회사 휴먼바이오  
대표이사 정수영





실험 결과보고서 요약				
제목	『소엽추출물 동결건조분말』의 유통기간 설정실험 결과보고서			
실험구분	자체실험( )		의뢰실험( ○ )	
실험기간	2021년 7월 19일 ~ 2021년 12월 30일			
신청인	업체명	(주)에스에프씨바이오	대표자	김성규
	주소	충남 천안시 동남구 단대로 119, 412호 산학협력단(신부동)	연락처	041-566-7151
실험수행 기관	기관명	주식회사 휴먼바이오	대표자	정주영
	주소	충남 공주시 한적2길 52-103(금홍동), 2~4층	연락처	041-881-9200
실험 참여자	책임자	장미영	연구원	김태성
실험 결과	요약			
	<p>*유통기간 실험결과</p> <p>설정된 품질지표 중 결정계수가 가장 높은 Rosmarinic acid 의 0 차 반응식을 근거로 30.6 개월의 유통기간이 산출되었다.</p> <p>여기에 유통과정 중의 안전성을 고려하고자 안전계수 0.7을 곱하여 최종 유통기간은 21 개월로 설정하였다.</p> <p>※ 관능평가는 품질변화가 거의 없어 상기 제품의 유통 기간 설정실험 지표로써 활용이 불가능하여 제외하였다.</p> <p>* 참고사항 :</p> <p>- 안전계수의 최종결정은 제조사의 수용범위(역량)에 따라 고려 사항이 다를 수 있다.</p>			

### 제1장 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	기타가공품
성상	갈색 분말
사용원료	차조기잎추출액[소엽추출물동결건조분말]
제조·가공공정	원료선별 - 건조 - 주정 추출 - 여과 - 농축 - 진공동결건조 - 분쇄 - 포장
포장재질	PE
포장방법	밀봉
포장단위	1kg, 3kg, 5kg
보존 및 유통온도	실온 보관
보존료 사용여부	-
유당·유치리	-
실균 또는 멸균방법	-
제품사진	

## 제2장 실험방법

### 가. 검체의 채취 및 취급방법

본 실험에 사용된 제품은 (주)에스에프씨바이오 에서 2021년 7월 19일에 제조된 시료를 15 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C 의 배양기에 5개월간 저장시키면서 1개월 간격으로 실험을 수행하였다.

### 나. 설정실험 지표 및 실험방법

지표		실험방법
이화학	Rosmarinic acid	업체에서 제공한 시험법
관능평가	기호도 척도법	식품, 축산물 및 건강기능식품의 유통기간 설정실험 가이드라인 IV. 유통기간 설정을 위한 관능검사가이드라인표 8. 기호도척도법

### 다. 실험조건

구분	실험방법
저장 온도	15 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C
저장 기간	5개월
실험 주기	1개월

### 라. 품질한계

지표	품질한계	근거
Rosmarinic acid	6.32 mg/ g	업체에서 설정한 기준(초기 시험값)
기호도 척도법	5 이상	식품, 축산물 및 건강기능식품의 유통기간 설정실험 가이드라인 IV. 유통기간 설정을 위한 관능검사가이드라인표 8. 기호도척도법

### 제3장 실험결과

가. 품질지표별 저장 온도 구간에서의 품질변화

저장기간 (일)	관능(기호척도법)			Rosmarinic acid(mg/g)		
	25°C	35°C	45°C	25°C	35°C	45°C
0	5			6.318 mg/g		
30	5	5	5	7.005	6.358	6.327
60	5	5	5	7.308	6.590	6.759
90	5	5	5	6.147	6.183	5.968
12	5	5	5	6.072	6.138	5.604
150	5	5	5	6.480	6.566	6.031

나. 품질지표별 유통기한 산출

1) 기능성분의 저장 온도별 저장 기간에 따른 함량변화 0차 및 1차 방정식 산출

저장개월수	25°C	Ln(Ae)		0차반응	1차반응
0	6.318	1.843402702	Slope	-0.0949214	-0.013123227
1	7.005	1.946567076	Intercep	6.78485	1.911745451
2	7.308	1.989024372	corr	-0.3395	-0.3416
3	6.147	1.816012961			
4	6.072	1.803655101			
5	6.480	1.868643347			

저장개월수	35°C	Ln(Ae)		0차반응	1차반응
0	6.318	1.843402702	Slope	0.004994	0.0006686
1	6.358	1.849713862	Intercep	6.34638	1.84786992
2	6.590	1.885522999	corr	0.0496	0.0423
3	6.183	1.821787417			
4	6.138	1.814564122			
5	6.566	1.881920049			

저장개월수	45°C	Ln(Ae)		0차반응	1차반응
0	6.318	1.843402702	Slope	-0.1255286	-0.0205911
1	6.327	1.8448578	Intercep	6.4816714	1.8691342

2	6.759	1.910800972	corr	-0.5973	-0.6040
3	5.968	1.786395107			
4	5.604	1.723552004			
5	6.031	1.796929415			

2) 저장온도별 반응상수에 의한 활성화에너지 산출

Arrhenius equation :  $-(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(°C)	온도(K)	1/T	K	lnK		
25	298	0.0034	0.013586975	-4.2986	Slope	-1845.29
35	308	0.0032	0.004994286	-5.2995	Intercep	1.501756
45	318	0.0031	0.020591134	-3.8829	corr	-0.26747
10	283	0.0035	0.0066	-5.0187	Ea	-3666.59
15	288	0.0035	0.0074	-4.9055		
20	293	0.0034	0.0083	-4.7962		
25	298	0.0034	0.0092	-4.6905		
30	303	0.0033	0.0102	-4.5883		
35	308	0.0032	0.0112	-4.4895		
40	313	0.0032	0.0124	-4.3937		
45	318	0.0031	0.0136	-4.3010		

3) 유통일수 및 변화량

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0066	0.03307
15	1	0.0074	0.00741
20	2	0.0083	0.01652
25	2	0.0092	0.01836
30	2	0.0102	0.02034
Sum	12	0.360460893	0.09570

최소함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
6.318	5.104	1.214	0.46939	30.6

실험에 의한 품질한계일 : 30.6 개월

최종 유통기한 : 30.6 개월 × 0.7(안전계수) = 21 개월

## 제4장 결론

본 제품은 제조 후부터 가속 및 상온 조건에서 5개월 동안 시험한 결과, 일반항목인 정상 결과는 모두 기준 규격에 적합하였다. Rosmarinic acid의 최소 하한치 80%에 도달하는 기간을 예측한 결과 30.6 개월로 예측되었다. 따라서 본 제품은 PE 포장으로 실은 유통되는 점을 고려하여 품질에 이상이 없었으나, 제품의 안정성을 고려하여 산출된 유통기한보다 짧은 21 개월로 유통기한을 설정하고자 한다.

## 제5장 참고자료

1. 식품의약품안전처: 식품의 기준 및 규격 (2020)
2. 식품의약품안전처: 식품, 식품첨가물, 축산물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준 (식품의약품안전처 고시 제 2019-56호)
3. 식품의약품안전처: 식품, 축산물 및 건강기능식품의 유통기한 설정실험 가이드라인 (2019)
4. 장동석 외: 식품위생학, 정문각 (2006)
5. 박형우: 가공식품의 shelf-life 설정기술교육 p. 51-68, 한국식품개발연구원(1998)



# 평가 연구용역 최종보고서

2021. 10. 30



## 제 출 문

---

본 보고서를  
「유효서 평가 실험」의  
최종보고서로 제출합니다.

2021. 10. 30.

과제기간 : 2021.03.01.~2021.10.31

연구수행기관 : 대구한의대학교 신학협력단

제출자 : (연구책임) 대구한의대학교 정지옥

(연구원) 대구한의대학교 이지혜





## 결과보고 연구요약문

<b>과 제 명</b>	<b>유효성 평가 실험</b>		
<b>연구책임자</b>	정 지 욱	소속기관명	대구의대학교 산학협력단
<b>협약기간</b>	2021년 3월 1일 - 2021년 10월 30일		

### 1. 연구목표

- 60% 및 80% 소엽 주정 추출물의 아밀로이드 베타(Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ))로 유도한 알츠하이머병 모델에서 인지기능 및 기억력 개선 효과를 확인하기 위하여 In vitro와 In vivo 조건에서 효능을 검증하고 이에 대한 작용기전을 확인하고자 함

### 2. 연구내용

- 식약처 가이드라인에 따른 알츠하이머형 치매 동물모델 확립
  - \* 마우스를 1주간 순화 후 각 군당 10마리씩 시험군에 배정
  - \* Amyloid  $\beta$  투여를 통해 알츠하이머형 치매 동물모델 확립
    - : 시험군: 정상군(Normal control), 유도군(Negative control), 대조군(Positive control, Donepezil 등), 시험군(60% 및 80% 소엽 주정 추출물)
- 유효성 관찰 및 평가
  - \* 시험물질 투여 후, 인지 행동학적 지표 평가
    - : Y-maze test / Passive avoidance test / Novel object recognition test / Morris water maze test
- 바이오마커 측정
  - \* Western blot : iNOS, COX-2, ADAM10, BACE
  - \* 면역조직화학(immunohistochemistry) : 미세교세포(microglia cell), 성상세포(astrocyte) 등


### 3. 연구 결과

- 본 연구에서 60% 및 80% 소엽 주정 추출물이  $A\beta$ 로 유도한 동물모델에서 Y-maze test, 사물인 지실험(novel object recognition test), 수동회피실험(passive avoidance test) 및 모리스 물 미로실험(morris water maze test)을 통해 연구한 결과 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인하였음.

- 소엽 추출물의 기억력 개선 작용기전을 확인하기 위하여 염증 관련 실험을 진행한 결과 60% 소엽 주정 추출물 투여군에서 염증 매개 인자인 COX-2와 iNOS의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였음. 그러나 소엽 80% 주정 추출물은 항염증 효과의 경향성은 보이나 유의적인 차이를 나타내지는 못하였음.
- 소엽 60% 및 80% 주정 추출물이 ADAM10, BACE1 및 PSD95 발현에 미치는 영향을 확인해 본 결과 베타아밀로이드 단회 투여로는 ADAM10, BACE1 및 PSD95의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 및 80% 에탄올 추출물도 변화가 나타나지 않았음.
- 베타아밀로이드에 의해 미세교세포와 성상 세포의 활성화를 연구한 결과 베타아밀로이드 투여군에서 미세교세포 수 증가가 나타났으나 유의성은 없었으며, 소엽 추출물 투여군 모두와 양성 대조군에서는 정상군 수준으로 미세교세포의 수를 감소시켰으나 이 역시 유의성은 없었음. 이는 투여된 베타아밀로이드의 조성이 염증을 일으키는 섬유소 형태보다는 시냅스 가소성을 억제하는 올리고머형이 우세할 경우에 나타나는 현상이라고 생각됨. 반면에 성상 세포 실험에서는 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 성상 세포 수의 증가가 나타났고 이는 통계적으로 유의성이 있었음. 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군은 정상군 수준의 성상 세포 수를 보였으며 이는 베타아밀로이드에 의한 성상 세포 활성화가 소엽 60% 추출물에 의해 억제됨을 나타내며, 또한 COX-2와 iNOS의 발현증가가 성상 세포에서 나타나는 현상일 수 있음을 예측할 수 있음.

#### 4. 결론 및 고찰

- 결과를 종합해 볼 때, 60% 및 80% 소엽 주정 추출물이 A $\beta$ 로 유도한 동물모델에서 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인하였으며, 또한 관련 바이오마커 연구를 통해 소엽 60% 에탄올 추출물은 뚜렷한 항염증 효과가 나타났으나 소엽 80% 에탄올 추출물은 항염증 효과의 경향성은 보이나 유의적인 차이를 나타내지는 못하였음. 이는 소엽 80% 주정 추출물이 단순히 항염증 효과를 바탕으로 베타아밀로이드에 의한 기억력 감퇴를 개선하는 것이 아니라 좀 더 복잡한 기전이 관여했을 가능성이 있음. 이를 밝히기 위한 베타아밀로이드 응집 관련 연구에서 소엽 80% 에탄올 추출물은 베타아밀로이드 응집체를 분해하거나 응집을 억제하는 효과를 나타내었으며, 이는 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드가 기억력 감퇴를 유도하기 전에 독성 베타아밀로이드를 제거하는 기전을 통해 기억력 감퇴를 억제하는 것일 가능성이 있음을 의미함. 이는 소엽 80% 주정 추출물이 베타아밀로이드에 의한 2차 독성 기전을 조절하는 것이 아닌 베타아밀로이드 자체를 억제하는 것으로서 알츠하이머병의 예방 및 초기 진행 억제가 가능하리라 생각되어 의약품으로서 개발 가능성이 충분한 천연물질을 시사하고 있음.



# 소엽 추출물의 유효성 평가

제1절 연구 목적

제2절 연구내용 및 방법

제3절 연구 결과

제4절 결론 및 고찰

첨부(투고 논문)

## 제 1 절 연구 목적

### 1. 연구개발의 최종 목표

- 60% 80% 소엽 주정 추출물의 아밀로이드 베타(Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ))로 유도한 알츠하이머병 모델에서 인지기능 및 기억력 개선 효과를 확인하기 위하여 *In vitro*와 *In vivo* 조건에서 효능을 검증하고 이에 대한 작용기전을 확인하고자 함.

### 2. 연구내용

- 식약처 가이드라인에 따른 알츠하이머형 치매 동물모델 확립
  - \* 마우스를 1주간 순화 후 각 군당 10마리씩 시험군에 배정
  - \* Amyloid  $\beta$  투여를 통해 알츠하이머형 치매 동물모델 확립
    - : 시험군 - 정상군(Normal control), 유도군(Negative control), 대조군(Positive control, Donepezil), 시험군(60% 및 80% 소엽 주정 추출물)
- 유효성 관찰 및 평가
  - \* 시험물질 투여 후, 인지 행동학적 지표 평가
    - : Y-maze test
    - Passive avoidance test
    - Novel object recognition test
    - Morris water maze test
- 바이오마커 측정
  - \* Western blot
    - : iNOS, COX-2, ADAM10, BACE
  - \* 면역조직화학(immunohistochemistry)
    - : 미세교세포(microglia cell), 성상세포(astrocyte) 등

### 3. 세부내용

#### 1) 대상 시료

- 60% 및 80% 소엽 주정 추출물 총 2개  
(투여량 각각 100, 250 및 500 mg/kg)

#### 2) 실험동물

- Male ICR mice 6주령 (23~25g)

3) 동물군의 분류

- (1) 정상군 (Normal control)
- (2) Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) 투여군 (Negative control)
- (3) 양성대조군 (Positive control, Donepezil (5 mg/kg, p.o.),  $A\beta$  + Donepezil)
- (4) 60% 및 80% 소엽 주정 추출물 (투여량 각각 100, 250 및 500 mg/kg) 투여 후  $A\beta$  투여군 ( $A\beta$  + 60% 및 80% 소엽 주정 추출물)

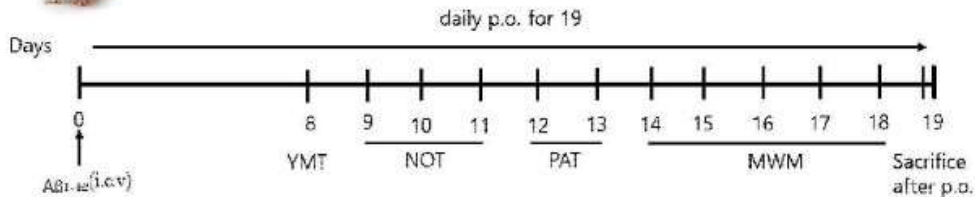
4) 선발 소재의 투여 기간

- 19일간 매일 1회, 100, 250 및 500 mg/kg 투여

ICR mice (5 weeks, male)



YMT : Y-maze test  
NOT : Novel object recognition test  
PAT : Passive avoidance test  
MWM : Morris water maze test



5) 60% 및 80% 소엽 주정 추출물의 인지 행동학적 지표 평가

- (1) 수동회피 시험(Passive avoidance test)
  - 수동회피 시험은 실험동물의 기억 능력을 검사하기 위해서 실시하는 행동 실험임. 실험동물을 주변 환경을 인식할 수 있는 방에 위치시키고 해로운 자극 (예: 전기 자극)을 가한 뒤 실험동물이 그곳에 가지 않음으로써 그 상황을 기억했음을 확인하는 시험방법임.
- (2) 모리스 수중미로시험 (Morris water maze test)
  - Morris water maze를 통한 공간 학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선 약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있음.
- (3) Y자 미로 시험 (Y-maze test)
  - 단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위하여 실시함. 측정 장비는 세 개의 가지(arm)로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접히는 각도는 120°임. 이 장치는 검은색의

polyvinyl plastic 구성되어 있고, 세 개의 가지를 각각 A, B, C로 정한 뒤에 실험을 진행함.

(4) 사물인지시험(novel object recognition task)

- 사물인지시험은 40 x 40 x 30 cm 의 open field box 안에서 이루어지며, 실험 전 물체 두 개를 box의 벽에서 5 cm씩 떨어진 곳에 위치해 놓고, 약물 처치 후 쥐를 box 중앙에 놓고 5분간 물체에 대해 탐색을 시킴. 탐색 24시간 후에, box 안의 물체 중 한 개를 새로운 물체로 바꾸고, 다시 box 중앙에 쥐를 놓고 5분간 물체에 대해 탐색을 시킴. 5분 동안 쥐가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)에 대해서 접촉, 냄새 맡기, 핥기 등의 탐색 행동을 보이는 시간을 측정 한 후, 각 물체에 대한 탐색 시간의 비율(% of exploration time)을 계산함. 새로운 물체에 대한 탐색 시간 비율이 높을수록 학습 및 기억 능력이 좋음을 나타냄.

6) 면역조직화학적 염색을 통한 신경세포 손상 지표 검토

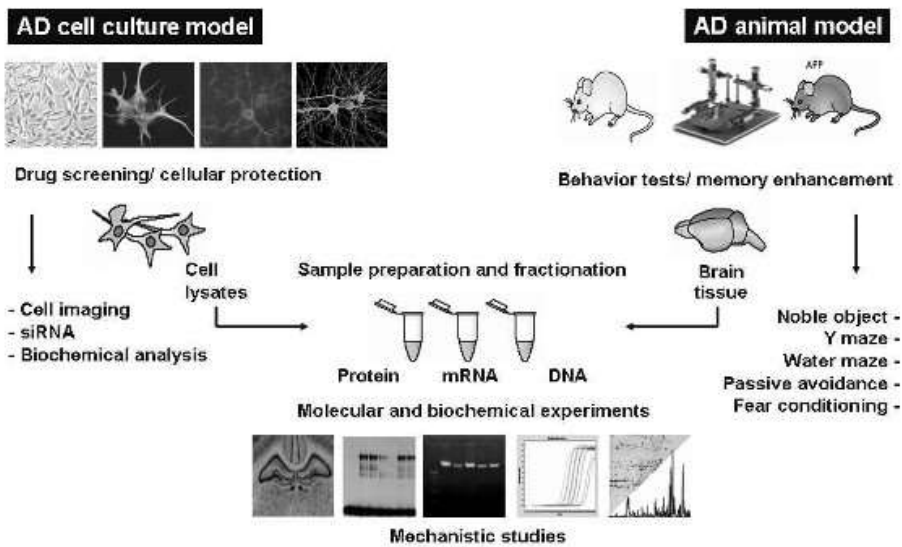
- 대조군 및 약물 투여군은 실험종료 후 뇌 조직을 고정하여 조직 염색을 실시하는데, 뇌 조직의 고정은 먼저 pentobarbital · Na으로 마취시킨 후 phosphate-buffered saline으로 심장 관류한 다음 paraformaldehyde (Sigma Co. USA)로 고정시킴. 조직절편 (40 $\mu$ m)은 먼저 조직 내 존재하는 내재성 페록시다제 (endogenous peroxidase)를 비활성화시키기 위해 PBS에 희석한 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 15분간 반응시킨 다음 5씩 3회 PBS로 세척한 후, 비특이적 항체결합을 억제하기 위하여 0.1% Triton X-100, 3% normal horse serum을 가하여 상온에서 1시간가량 incubation함. 여기에 일차 항체 (BDNF, CREB, iNOS, eNOS; Chemicon, USA)를 가하고 48시간 동안 4℃에서 진탕하면서 반응시키고, 1차 항체용액에서의 반응이 끝난 후 조직을 PBS로 5분씩 3번 수세한 다음, 2차 항체용액 (Vectastain-Elite kit의 biotinylated anti-mouse IgG를 1:200으로 희석, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시킴. 2차 항체 용액과 반응 후에 PBS로 5분씩 3차례 수세한 후 avidin-biotin-peroxidase complex 용액 (Vectastain-Elite kit의 A 용액 1:100, B 용액 1:100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시키고, 발색제로는 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride (Sigma Co. USA)을 0.05 M Tris 완충액에 0.02%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 0.003%로 사용하여 6분간 반응시키고 탈수 과정을 거쳐 봉입하여 현미경하에서 세포 수 및 optical density 등을 측정함.

7) Western blot

- BioRad protein assay kit(BioRad Laboratories, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 단백질 농도



측정한 후, 20  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 4 내지 12% Bolt™ mini gel(Novex, Life Technologies, 키리아트 시모나, 이스라엘)을 이용하여 전기영동하여 PVDF 막으로 트랜스퍼함. 이후 비특이적 결합을 줄이기 위하여 막을 5%(w/v) 스킴 밀크로 블로킹하고, 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킴. 이후 막을 세척하고, 2차 항체와 반응시킨 후 ECL 탐지 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 읍살라, 스웨덴)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 단백질 밴드를 확인함. 모든 엑스-레이 필름은 스캔한 후 시그마 젤 프로그램 버전 1.0(Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, 일리노이주, 미국)을 이용하여 밴드의 강도를 분석함.



▲ 연구의 주요내용

## 제 2 절 연구 방법

### ■ 아밀로이드 베타(Amyloid $\beta$ ( $A\beta$ )) 유도 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 소엽 주정 추출물(60%, 80%)의 개선 효과 확인

#### (1) 사육

- 수컷의 ICR mouse (SPF/VAF CrjBgi:CD-1) 5주령을 대한바이오링크(충북, 한국)로부터 공급받아 사용하였음. 실험동물은 대구한의대학교 약리학 동물실에서 7일간 적응시킨 후 사용하였으며 각 군당 10마리로 구성하였고, 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$  내외, 조명 시간 07:00~19:00(12시간 주기)로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급하였음. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 사전심의와 윤리 규정을 준수하여 수행하였음(승인번호:DHU2021-076 / DHU2021-095).

#### (2) 시료 투여

- 실험군당 총 10수의 실험동물 중 실험군에 소엽 주정 추출물(60%, 80%) 시료를 100, 250 및 500 mg/kg으로 총 19일 동안 경구 투여하였고 양성대조군에 donepezil 5 mg/kg를 동일하게 총 19일 동안 경구 투여하였음. 투여 8일째부터 동물실험을 진행하였으며 19일째 실험동물을 처치 후 뇌를 적출하여 바이오마커 연구를 시행하였음.

#### (3) $A\beta$ 유도 기억력 감퇴 동물모델

- $A\beta$  1-42 peptide(abcam, cambridge, UK)를 100% 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)에서 1 mg/ml의 농도로 용해하여 초음파 처리 한 후 HFIP/peptide 용액을 분주하여 건조시키고 DMSO를 사용하여 peptide를 다시 현탁시켜  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하며 사용하였음. 인산 완충 식염수(Invitrogen, UK)로  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 희석하여  $A\beta$  1-42를 각 실험동물 당  $5 \mu\text{l}$ 의 양으로 hamilton syringe를 이용해 mouse의 우측 뇌실(intracerebroventricular, i.c.v) 내 투여하여 AD를 유발하였음. 수술 1시간 전에 생리식염수에 녹인 소엽 주정 추출물을 매일 경구 투여하였고 행동 실험을 진행하는 날은 실험 시작 한 시간 전에 투여하였음.

#### (4) Y자 미로 시험 (Y-maze test)

- 단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위하여 실시함. 측정 장비는 세 개의 가지(arm)로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42 cm, 너비는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접히는 각도는  $120^\circ$ 임. 이 장치는 검은색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있고, 세 개의 가지를 각각 A, B, C로 정한 뒤에 실험을



- ① 실험 1시간 전 효과를 확인하고자 하는 약물을 경구 투여함.
  - ② 실험동물을 Y-maze 장비에 넣고 8분 동안 각 가지에 실험동물의 꼬리까지 가지에 들어갈 때의 횡수와 각 가지에 차례로 들어간 경우를 측정함.
  - ③ 변경 행동력(alternation behavior)과 각 가지에 들어간 총 입장 횡수(total entry)를 계산함.
- \* 순서대로 들어간 경우를 헤아려 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력은 세 가지 모두에 겹치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산한다.

변경 행동력(Spontaneous alteration, %) = 실제변경(actual alternation) / 최고변경(maximum alternation) × 100(최고변경 : 총 입장 횡수 - 2)

예 1) ABCABCABABABABCABC

총 입장 횡수 : 18

실제 변경 : 10

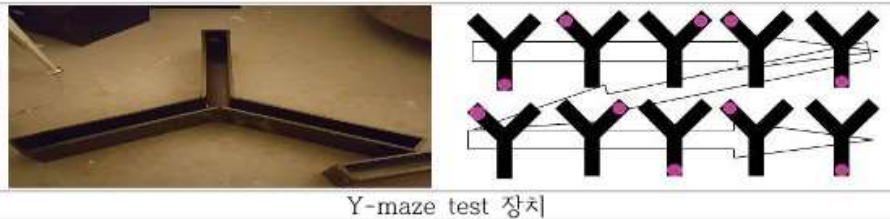
변경 행동력 =  $\{10/(18-2)\} * 100 = 62.5\%$

예 2) ABCBABCABCABCAC

총 입장 횡수 : 15

실제 변경 : 10

변경 행동력 =  $\{10/(15-2)\} * 100 = 76.9\%$

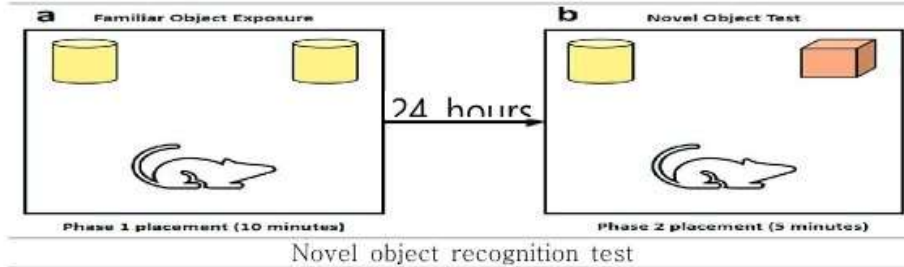


Y-maze test 장치

(5) (novel object recognition task)

- 사물인지시험은 40 x 40 x 30 cm 의 open field box 안에서 이루어지며, 실험 전 물체 두 개를 box의 벽에서 5 cm씩 떨어진 곳에 위치해 놓고, 약물 처치 후 쥐를 box 중앙에 놓고 5분간 물체에 대해 탐색을 시킴. 탐색 24시간 후에, box 안의 물체 중 한 개를 새로운 물체로 바꾸고, 다시 box 중앙에 쥐를 놓고 5분간 물체에 대해 탐색을 시킴. 5분 동안 쥐가 기존에 있던 물체(familiar object)와 새로운 물체(novel object)에 대해서 접촉, 냄새 맡기, 핥기 등의 탐색 행동을 보이는 시간을 측정한 후, 각 물체에 대한 탐색시간의 비율(% of exploration time)을 계산함. 새로운 물체에 대한 탐색시간 비율이

학습 및 기억 능력이 좋음을 나타냄.

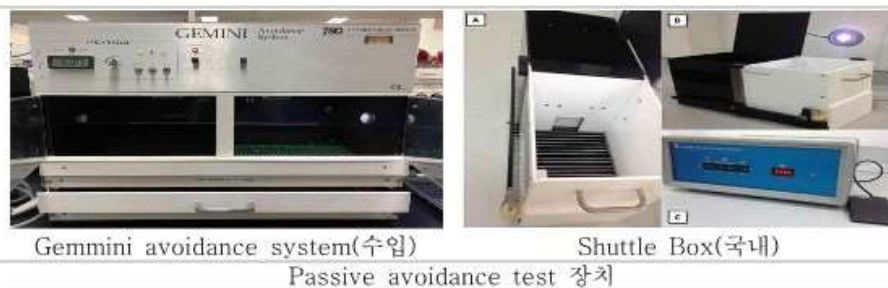


(6) 시험(Passive avoidance test)

- 수동회피 시험은 실험동물의 기억능력을 검사하기 위해서 실시하는 행동 실험임. 실험 동물을 주변 환경을 인식할 수 있는 방에 위치시키고 해로운 자극 (예: 전기 자극)을 가한 뒤 실험동물이 그곳에 가지 않음으로써 그 상황을 기억했음을 확인하는 시험방법임.

가. 조건회피 반응 시험 장치 (Gemmini avoidance system)

- 조건회피 반응 시험 장치 (Gemmini avoidance system, San Diego Instruments, San Diego, U.S.A.)는 shuttle box (52.6 × 17.3 × 21.3 cm)의 크기로 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 guillotine door (8.9 × 8.9 cm)가 설치되어 있어 자동으로 상하로 여닫을 수 있게 되어있음. 우측 방에는 매우 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였다. 좌측 방에는 빛이 전혀 들어오지 않게 하여 실험동물이 상대적으로 편안함을 느끼게 하였음.



Gemmini avoidance system(수입)

Shuttle Box(국내)

Passive avoidance test 장치

나. 수동회피 시험(Passive avoidance test)

- 실험은 LeDoux의 방법을 응용하여 시행함. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰 실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시킴.

① 학습시험 (training trial) - 1일 차

- 셔틀박스의 우측 방에 불을 켜고 실험동물의 머리가 길로틴문 (gillotin door)의 반대쪽

향하게 살며시 내려놓음. 실험동물을 10초간 탐색시킨 후 길로틴문 (gillotin door) 을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 함 (Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 실험동물은 방을 탐색하다가 본능적으로 어두운 좌측 방으로 이동하게 되는데, 이때 길로틴문 (gillotin door)이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외함. 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문 (gillotin door)이 닫히고 0.5 mA의 전기충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 됨. 길로틴문 (gillotin door)이 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정함.

② 기억검사 (retention test) - 2일 차

- 기억검사는 학습시험 (training trial)이 끝난 후, 24시간 후에 실험동물을 서틀박스에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 길로틴문 (gillotin door)이 열리고 어두운 쪽으로 mouse의 4발이 다 들어가는 데 걸리는 시간 (latency time; 머무름시간)을 300초까지 측정하였음. 어두운 쪽으로 가는 데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 의미함.

(7) **미로실험 (Morris water-maze test)**

- Morris water maze를 통한 공간 학습 및 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선 약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있음. 본 maze의 재원은 지름 90cm, 높이 45cm이며 플랫폼 (white platform)의 지름은 6cm로 구성되어 있음. 수중미로의 주변은 비디오키메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온 조절용 장치 등 공간 단서들을 항상 일정하게 유지함. 실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30cm가 되도록 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1cm 밑에 설치함. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 maze를 4분원이 되도록 나누어서 북동 (NE), 북서 (NW), 남동 (SE), 남서 (SW)로 구분하였고, maze의 한 4분원에 플랫폼을 설치함.

- Morris water maze test는 5일 동안 진행함.

① 1-4일: 하루에 각각의 마우스가 1일 4회씩 1분 동안 10분 간격으로 maze에서 수영하도록 함. 첫 번째 되는 날부터 4일째가 되는 4일간 1회의 실험방법은 이미 maze 안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마치고 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하며, 이때 플랫폼은 고정된 장소에 위치시킴.

② 5일: 플랫폼을 제거하고 60초 동안 자유롭게 수영을 시켜 플랫폼을 찾는 행위를 관찰



플랫폼이 있었던 지역에 머문 시간을 기록함.

- 모든 실험 data는 Ethovision program (Noldus, Wageningen, the Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정함.



Morris water maze test 장치(Ethovision Tracking Program)

#### (8) Western blot

- 행동 실험종료 후 실험동물의 해마를 적출하여 PBS로 2회 washing하고 lysis buffer [1XRIPA (Upstate Cell Signaling Solution, Lake Placid, NY, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 µg/mL aprotinin, 1 g/mL pepstain, and 1 g/mL leupeptin]를 이용하여 1시간 동안 lysis 시킨 다음 원심분리하여 (15000 rpm, 15 min) 단백질 상등액을 분리하였음. 단백질의 농도는 BSA kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였으며 정량한 단백질을 8 - 12%의 polyacrylamide gel에 전기영동하고 Poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200 mA로 2시간 동안 전이시켰음. 단백질 전이가 된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 첨가하고 상온에서 blocking시킨 후, 1차 항체와 반응시켰음. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:5000, Calbiochem, USA), COX-2 antibody (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, USA), ADAM10 (1:1000, SantaCruz, USA), BACE (1:1000, SantaCruz, USA), PSD95 (SantaCruz, USA), β-actin antibody (1:10000, Sigma, USA)를 이용하여 4°C에서 24시간 반응시켰음. 이후 T/TBS 용액을 사용해 5분씩 4회 세척한 다음 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를 1:5000 또는 1:10000으로 희석하여 상온 1시간 반응 후 T/TBS 용액으로 3회 세척하였음 단백질은 ECL kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad, USA)를 통해 측정하였음.

#### (9) (Immunohistochemistry)

- 행동 실험 후 실험동물을 3% isoflurane으로 마취시킨 후 PBS로 심장을 통해 관류하고 4% paraformaldehyde로 고정한 후 뇌를 적출하였음. 적출된 뇌 조직은 4%

paraformaldehyde 24시간 동안 후 고정 하였음. 이후 PBS로 5분씩 10회 세척하고 30% sucrose 용액에 담가 바닥으로 가라앉을 때까지 보관하였음. 이후 뇌 조직을 동결절편기(Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 30  $\mu$ m 두께로 냉동 절편을 만들어 보관용액(30% ethylene glycol and 30% glycerol in DW)에 담가 4°C에서 보관하였음.

- 자유 부유 조직을 PBS로 5분씩 3회 세척하고, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) 용액에 5분간 배양한 후 5분씩 3회 PBS로 세척하였음. 이후 rat anti-Iba-1 혹은 goat anti-GFAP antibody 가 포함된 0,3% Triton X-100, 1.5% normal serum을 녹인 PBS 용액에 24시간 동안 배양하였음. 이후 PBS로 5분씩 3회 세척하고, biotinlyated 2차항체(1:1000) 용액에서 1시간 30분 동안 상온에서 배양한 후 PBS로 3회 세척하고 avidin-biotin-peroxidase complex (1:100) 용액에서 1시간 동안 상온에서 배양하였음. PBS로 3회 세척 후 0.02% 3, 3'-diaminobenzidine과 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 PBS 용액에서 3분 동안 발색시켰으며 발색이 끝난 절편은 double gelatin-coated된 슬라이드에 부착시킨 후 건조시켜 ethanol로 탈수, xylene으로 투명화 과정을 거친 후 Eukitt (Riedel-deHaen, Germany)로 봉입하였음.

**(10)**

- 본 연구의 모든 실험 결과는 mean±standard error of mean(SEM)으로 표시하였으며, *in vitro* 결과는 SPSS(Version 24.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하고 Duncan 사후 검증을 하였고, *in vivo* 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 일원배치분산분석을 실시하고 Newman-Keuls test로 사후 검증을 실시하였음. 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p-value < 0.05 미만일 때 유의하다고 나타내었음.

### 제 3 절 연구 결과

#### 1. 아밀로이드 베타(Amyloid $\beta$ ( $A\beta$ )) 유도 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 60% 주정 소엽 추출물의 인지능력 및 기억력 개선 효과 확인

##### (1) Y 미로 시험 (Y-maze test)

- 실험동물의 단기 기억력을 평가하기 위하여 Y-maze 시험을 진행하였음. 변경 행동력을 계산한 결과 정상인 Normal군은 74.7±2.3 %인 반면  $A\beta$ 를 주입 Control군은 61.5±2.1 %로 유의적으로 감소하였고( $P < 0.001$ ), 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 67.1±1.1 %, 72.9±2.4 %, 73.9±2.4 %로 Control군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 DNPZ군은 71.7±2.2 %로 나타났음( $P < 0.01$ ). 실험동물이 들어간 총 입장 횟수는 Normal군 39.1±2.4회, Control군 34.2±1.8회, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 35.2±2.0회, 35.1±2.5회, 33.5±3.2회, DNPZ군 31.3±1.9회로 모든 실험군 간 차이가 없는 것을 확인하였음(Fig. 1.)

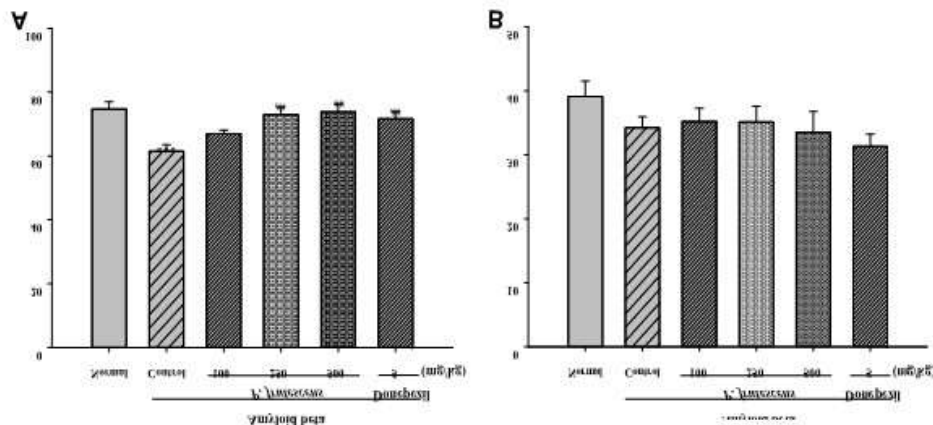


Figure 1. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on  $A\beta$ -induced memory deficits in Y-maze test. The spontaneous alternation (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with normal group, \*\*  $P < 0.01$  compared with the control group.

##### (2) 사물 인지능력 시험 (Novel object recognition test)

- 사물 인지능력 시험은 단기 기억 능력을 확인하는데 이용되며 새로운 환경에 노출된 mouse의 자연적인 탐구 능력에 기초를 둔 빠르고 유용한 실험방법임. 훈련 기간 동안 mouse에 동일한 두 물체를 제시하여 탐색하도록 하였고, 24시간 후 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 대체하였을 때 일반적으로 mouse가 새로운 물체에 더 많은 호기심을 가져 새로운 물체를 탐색하는 횟수가 상대적으로 증가하게 됨. 그러나



손상된 mouse의 경우 기존물체와 새로운 물체를 구분하지 못해 두 물체 간 탐지 횟수에 큰 차이를 보이지 않음. 본 실험에서의 사물 인지능력 실험 결과를 살펴보면(Fig. 2A), 정상인 Normal군의 새로운 물체를 인지하는 비율(Novel object)이  $68.73 \pm 3.7\%$ 로 기존물체를 인지하는 비율(Familiar object)인  $31.27 \pm 3.7\%$ 와 비교하여 유의적으로 높았음( $P < 0.001$ ). 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군의 경우 새로운 물체 인지 비율이  $39.77 \pm 3.4\%$ 로 기존물체를 인지하는 비율인  $60.23 \pm 3.4\%$ 와 비교하여 유의적으로 낮아 인지능력의 손상을 확인하였음( $P < 0.01$ ). 또한 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각  $55.23 \pm 4.1\%$ 에서  $44.77 \pm 4.1\%$ ,  $59.06 \pm 3.6\%$ 에서  $40.94 \pm 3.6\%$ ,  $54.71 \pm 1.8\%$ 에서  $45.29 \pm 1.8\%$ 로 기존물체에 비해 새로운 물체를 인지하는 비율이 유의적으로 증가하였으며, control군과 비교했을 때도 유의적으로 높았음( $P < 0.05$ ). 또한 사물에 대한 판별 능력 측정(Discrimination ratio)에서도 같은 결과를 확인할 수 있었음( $P < 0.01$ , Fig 2B). 이러한 결과로 60% 주정 소엽 추출물이 A $\beta$ 를 주입으로 인해 손상된 사물 인지능력을 개선하는데 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

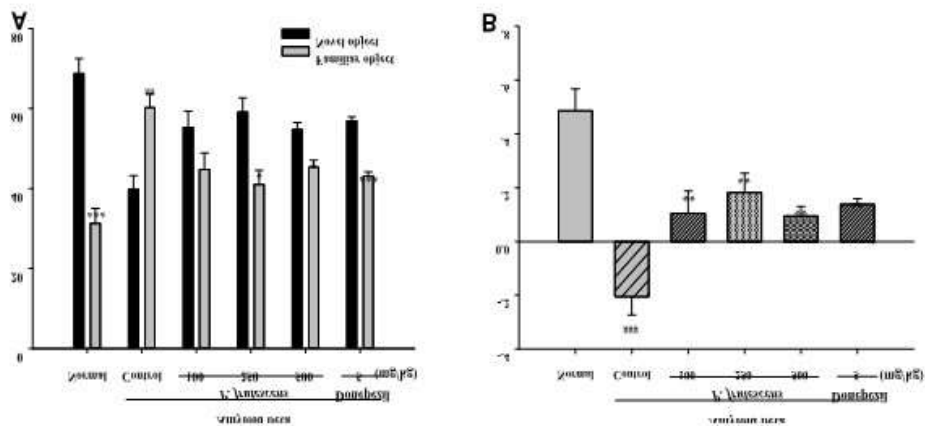


Figure 2. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in Novel object recognition test. The preference ratio (A) and the discrimination index (B) in the novel object recognition test are presented. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, 8-10 in each group. (A) \*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , novel vs. familiar; (B) \*\*  $P < 0.01$  when compared with normal group, \*\*  $P < 0.01$  when compared with the control group.

### (3) 수동회피 시험(Passive avoidance test)

- A $\beta$ 를 주입한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg의 투여에 의하여 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였음. A $\beta$ 를 주입에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 둘째 날 기억 시험인 retention trial에서 정상인 Normal군의 밝은 방에 머무른 시간이  $227.2 \pm 16.0$ 초인 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군은  $26.4 \pm 4.9$ 초로 통계적으

유의성 있게 감소하였음 ( $P < 0.001$ ). 이는 학습시험 시의 전기충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 A $\beta$ 에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각됨. 반면에 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 90.6 $\pm$ 8.5초, 126.9 $\pm$ 19.8초, 137.0 $\pm$ 9.2초로 농도 의존적으로 증가하였으며( $P < 0.001$ ), 양성대조군으로 사용한 Donepezil군은 170.8 $\pm$ 6.4초로 나타났음( $P < 0.001$ ). 반면에 첫째 날 학습시험인 acquisition trial에서의 밝은 방에 머무른 시간은 Normal군 15.0 $\pm$ 1.3초, Control군 14.1 $\pm$ 2.8초, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 12.1 $\pm$ 0.8초, 12.4 $\pm$ 1.6초, 12.2 $\pm$ 1.3초, Donepezil군 12.0 $\pm$ 3.2초로 모든 실험군간 차이가 없는 것을 확인하였음(Fig. 3.)

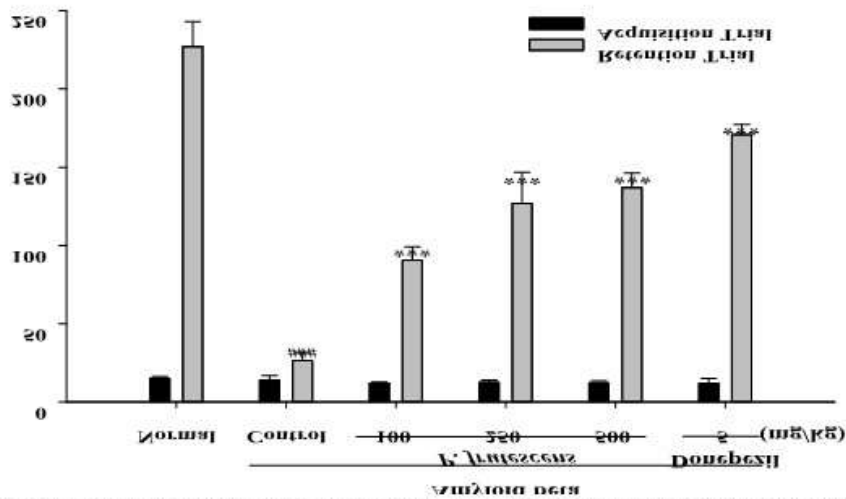


Figure 3. Effect of 60% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in passive avoidance test. Latency time was measured and the values shown the mean $\pm$ S.E.M, 8-10 in each group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with normal group, \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the control group.

#### (4) 수중미로실험 (Morris water-maze test)

- Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제1일째에는 정상군(Normal)은 49.73  $\pm$  2.7초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은 51.60  $\pm$  1.7초, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 49.83 $\pm$ 2.5초, 45.4 $\pm$ 2.9초, 44.15 $\pm$ 2.7초, Donepezil군은 44.93 $\pm$ 2.8초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 정상군(Normal)은 25.53  $\pm$  2.5초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은 38.35  $\pm$



3.5, 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 29.13±5.2초, 26.4±4.0초, 24.55±2.7초, Donepezil군은 21.28±2.3초로 집단 간 유의성 있는 차이를 보였음 ( $P < 0.01$ ). 이에 측정 일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 Aβ를 주입한 투여군에서 정상군에 비해 학습능력이 현저히 저하되었으며 마찬가지로 주정 소엽 추출물 500 mg/kg 투여군에서도 학습수행에 유의한 증진 효과가 관찰되었는데, 즉 2일째부터 플랫폼에 도달하는 소요 시간이 Aβ를 주입한 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 양성대조군인 Donepezil 투여군 역시 비슷한 수준으로 감소하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.05$ , Fig. 4A).

- Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 시행하고 이를 ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였음. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, 정상군(Normal)군은 24.24 ± 1.8초인 반면 Aβ를 주입한 Control 투여군이 15.72 ± 0.5초로 유의하게 감소하였고 ( $P < 0.001$ , Fig. 4B), 60% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 18.11±1.3초, 22.06±1.2초, 23.64±1.4초로 Aβ를 주입한 Control 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였음 ( $P < 0.001$ , Fig. 4B). Donepezil군 역시 24.41 ± 0.7초로 증가하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.001$ ). 이는 60% 주정 소엽 추출물이 장기 및 공간 기억을 개선하는 것을 의미함.

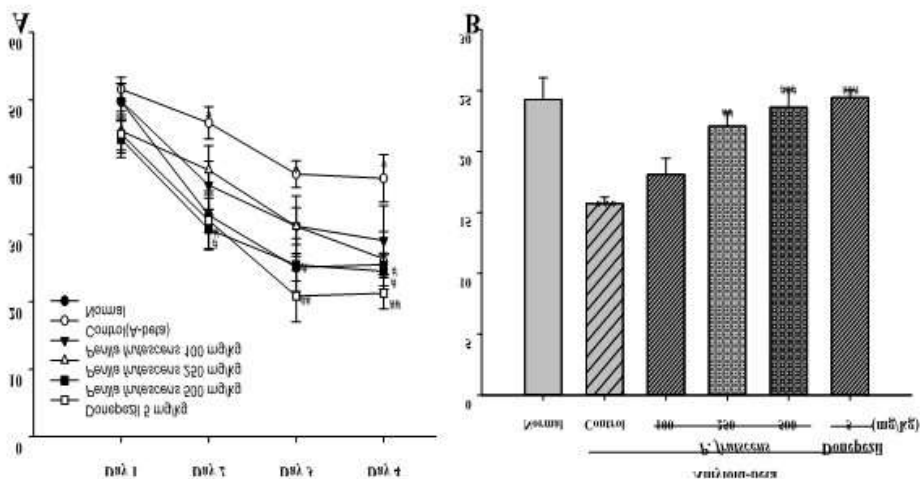


Figure 4. Effects of 60% of *Perilla frutescens* on the long-term, spatial reference memory of Aβ-induced mice in Morris water maze test. (A) Escape latency in acquisition phase; (B) Swimming time in target quadrant in probe trial. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with Normal group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  compared with the Control group.

## 2. 60% 주정 소엽 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 바이오마커 측정

### (1) iNOS 미치는 영향

- NOS는 효소의 한 부류로 L-아르기닌으로부터 NO를 생성하는 반응을 촉매함. NO는 세포 신호전달에 중요한 분자이며, 많은 생물학적 과정에서 중요한 역할을 수행함. 세포 신호전달은 혈관 저항(즉, 혈압)을 조절하고, 인슐린 분비, 기도저항, 연동운동, 그리고 혈관 생성과 신경계의 발생과 관련이 있음. 신경전달물질로 역할을 한다고 믿어지며, 기억에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있음. 산화질소 신호는 eNOS(내피세포 산화질소 합성효소, endothelial NOS)와 nNOS(신경 산화질소 합성효소, neuronal NOS)로 포유류와 연관되어 있으며 분비 가능한 형태의 iNOS는 면역 반응과 관련되어 있음. 칼모듈린과 결합하여 많은 양의 일산화질소(NO)를 생성하여 면역 기작에서 역할을 함. 특히 iNOS는 면역세포에서 발현되며 염증반응에서 과발현되기 때문에 뇌의 염증 상태를 확인하기 위한 인자로 많이 관찰되고 있음. 특히 베타아밀로이드로 인한 기억력 감퇴의 중요한 기전으로 알려져 있어 소엽 60% 알코올 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 그 결과 그림 5에서 보는 바와 같이 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 iNOS의 단백질 양의 증가가 나타났음( $P < 0.05$ , Fig. 5). 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군에서는 이러한 베타아밀로이드에 의한 iNOS의 단백질량 증가를 유의성 있게 억제됨이 확인되었음. 소엽 60% 추출물 500 mg/kg 투여군과 양성대조군으로 사용한 도네페질 투여군에서는 비록 유의성은 보이지 않았으나 평균값이 베타아밀로이드 투여군에 비해 각각 51%, 47% 낮은 값이 나타났음. 이상의 결과는 소엽 추출물이 베타아밀로이드에 의한 뇌 염증을 개선할 수 있음을 나타냄 ( $P < 0.05$ , Fig. 5).

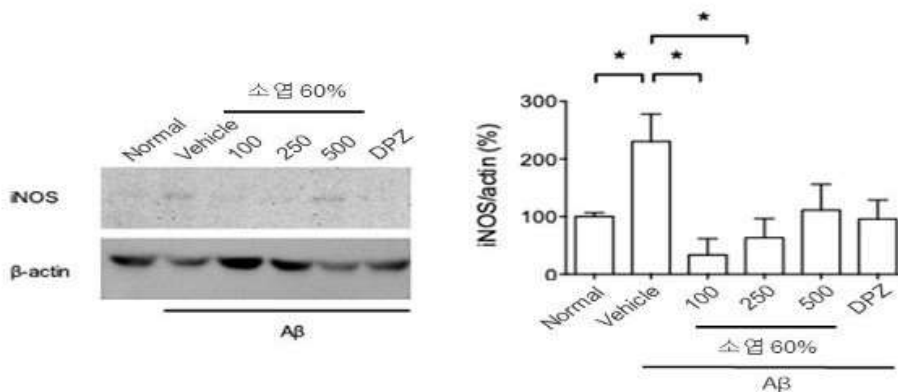


Figure 5. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 iNOS 발현증가에 대한 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(2) COX-2 미치는 영향

- COX (cyclooxygenase)는 prostaglandin-endoperoxidase (PTGS)라고도 알려져 있는 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 생성하는데 필요한 효소임. 많은 염증반응에서 염증 관련 세포로부터 COX의 합성이 증가되고 이러한 COX의 증가에 의해 만들어지는 다량의 prostaglandin들에 의해 발열, 통증 등과 같은 염증반응이 매개된다고 알려져 있음. 따라서 약물학적으로 COX의 저해는 염증과 통증을 경감시키는 효능이 있음. 뇌에서 염증의 발현은 뇌에 존재하는 면역세포인 미세교세포와 성상세포에 의해 매개되는데 다양한 염증 유발 자극들이 이들 세포에서 COX의 발현을 증가시키며 특히 베타아밀로이드의 응집체는 과도한 면역 반응을 통해 다양한 치매 증상을 유발하는데 COX의 발현증가도 이에 포함됨. 따라서 소엽 60% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드에 의해 증가되는 COX의 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 그 결과 그림 6에서 보는 바와 같이 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 COX-2의 단백질량의 증가가 나타났음. 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군과 250 mg/kg 투여군 및 DPZ군에서는 이러한 베타아밀로이드에 의한 COX-2의 단백질량 증가를 유의성 있게 억제됨이 확인되었음. 이상의 결과는 소엽 추출물이 베타아밀로이드에 의한 뇌 염증을 개선할 수 있음을 나타냄 ( $P < 0.05$ , Fig. 6).

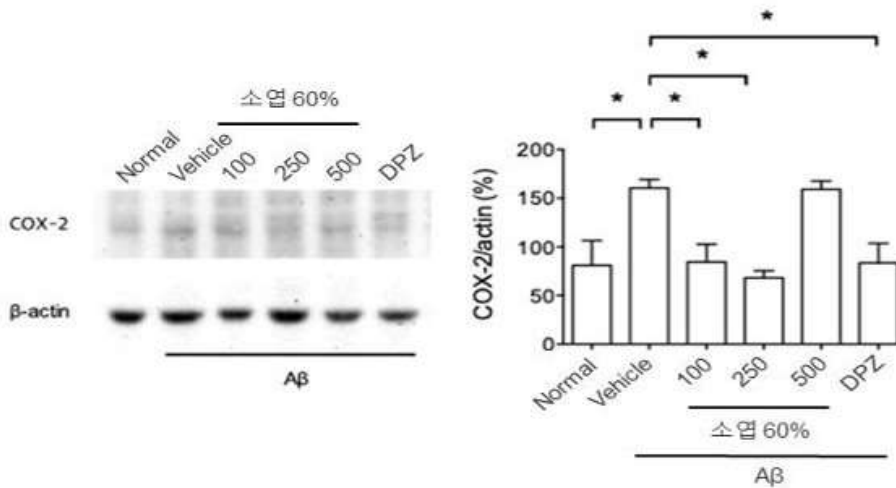


Figure 6. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 COX-2 발현증가에 대한 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.



(3) ADAM10 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백분해효소는  $\beta$ -secretase와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨. 하지만 아밀로이드 전구단백을 분해하는 효소에는  $\alpha$ -secretase도 있는데  $\alpha$ -secretase에 의해 분해된 아밀로이드 전구단백은 베타아밀로이드를 생성하지 못함에 따라서  $\alpha$ -secretase의 활성을 증가시키거나 발현량을 증가시켜 베타아밀로이드의 생성을 줄여 알츠하이머병의 발병을 막을 수 있음. 최근 이러한  $\alpha$ -secretase가 ADAM10이라는 것이 밝혀져 본 연구에서는 소엽 60% 에탄올 추출물이 ADAM10의 발현량에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 ADAM10의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도 ADAM10의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 7).

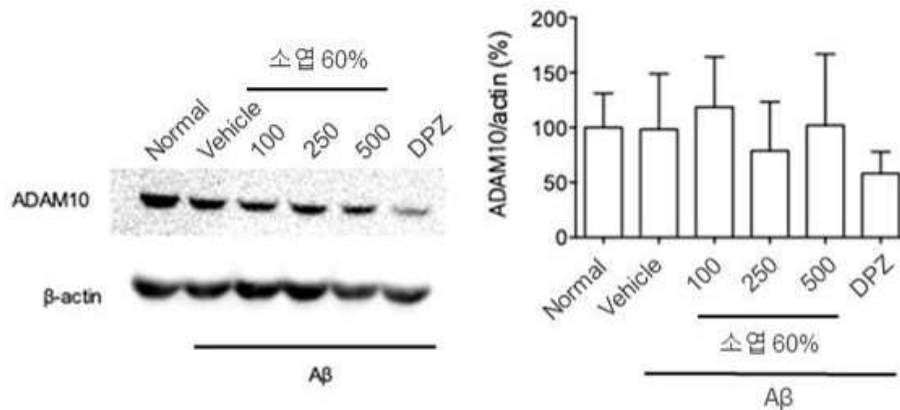


Figure 7. 헤마에서의 ADAM10 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(4) BACE1의 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백분해효소는  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨에 따라서 이들 효소 중 하나만 작동을 하지 않아도 베타아밀로이드의 생성이 불가능하다는 가설을 바탕으로 수많은 연구자들이  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase의 활성을 억제하거나 발현을 억제하는 물질에 대한 연구를 진행해왔음. 따라서 본 연구에서는 소엽 60% 에탄올 추출물이 BACE1 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 BACE1의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도

BACE1 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 8).

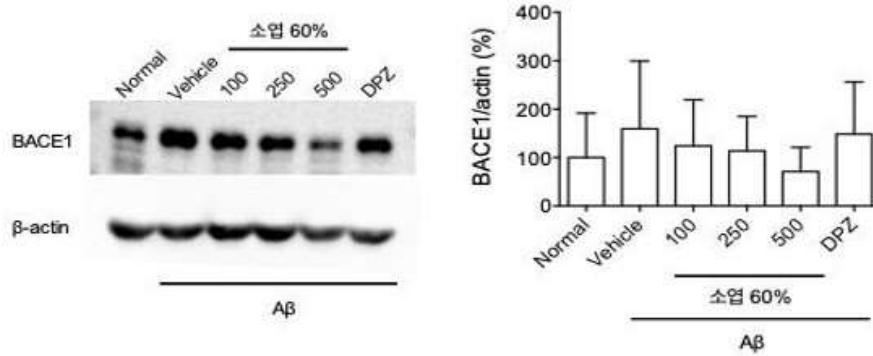


Figure 8. 해마에서의 BACE1 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(5) PSD95의 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 시냅스의 기능을 방해하여 기억력 감퇴를 유발함. 단기적으로는 시냅스의 신호전달 교란을 유발하지만, 장기적으로는 시냅스 자체의 소실을 초래함. PSD95는 후 시냅스 뉴런의 말단에 존재하는 단백질 중합체로 시냅스 상의 다양한 단백질을 묶어주는 역할을 하고 있음. 따라서 시냅스의 소실은 PSD95의 감소를 초래하게 되고 결과적으로 기억력 감퇴를 초래하게 됨. 본 연구에서는 소엽 60% 에탄올 추출물이 PSD95 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 PSD95의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 에탄올 추출물도 PSD95의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 9).

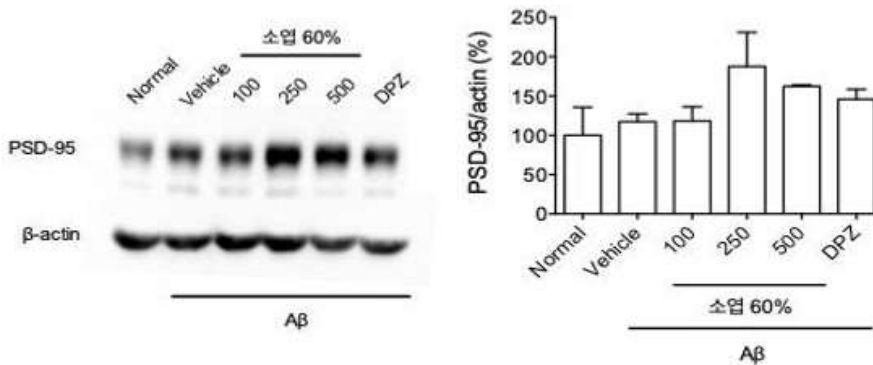


Figure 9. 해마에서의 PSD-95 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(6) 활성화에 미치는 영향

- 미세교세포는 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경교세포임. 일반적으로 중배엽성이며 단구(單球)유래로 보고 있음. 태생 후기에 뇌실, 수막 주위에 출현하여 점점 뇌실질 내로 이동하여 생후 2주를 정점으로 수가 감소하여 가지가 나누어진 휴지형 세포가 됨. 성숙 뇌에서는 전(全) 신경교세포의 수 %가량이 됨. 염증이나 신경 변성 시에는 아메바 모양 및 막대 모양 미소 신경교가 증가한다고 알려져 있음. 형태학적으로는 대식세포와 유사하여 그의 표지는 대부분이 미소 신경교의 동정에 사용함. 유주능, 탐식능이 있고, 발생기에는 노폐물처리를 담당하는 기능 외에 활성산소, 일산화질소, 산성 인산 가수분해효소, 프로스타글란딘을 생산하여 염증세포로의 기능도 갖고 있음. 뇌 내에 유일 클래스II 주요 조직적합성항원이나 CD4항원이 있어 활발하게 사이토카인을 생산하는 점에서 면역 조절 세포로서 신경-면역 상호작용에 중요한 역할을 담당한다고 생각되고 있음. 베타아밀로이드 섬유소의 뇌 내 침착은 주변의 미세교세포를 활성화 시키고 이러한 활성화가 장기화되어 과도한 염증으로 인해 뇌세포 사멸이 나타나기도 함. 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드에 의해 미세교세포가 활성화 되는지 확인하고 소엽 추출물이 이에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 Iba-1 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음. 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 미세교세포 수 증가가 나타났으나 유의성은 없었으며, 소엽 60% 추출물 투여군 모두와 양성대조군에서는 정상군 수준으로 미세교세포의 수를 감소시켰으나 이 역시 유의성은 없었음(Fig. 10). 이는 투여된 베타아밀로이드의 조성이 염증을 일으키는 섬유소 형태보다는 시냅스 가소성을 억제하는 올리고머형이 우세할 경우에 나타나는 현상이라고 생각됨.

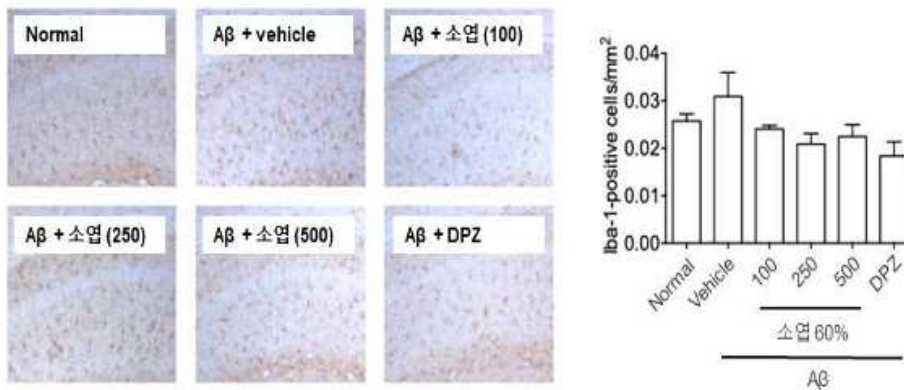


Figure 10. 해마에서의 미세교세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(7) 세포 활성화에 미치는 영향

- 정상 세포는 혈관-뇌 장벽(Blood-brain barrier)을 형성하여 혈관과 뇌 사이의 물질 이동을 통제하는 교세포라고 알려져 있음. 또한 신경전달물질이나 칼륨 이온 등을 흡수하여 신경 신호전달이 원활하게 이루어지도록 돕는 기능을 가지고 있음. 하지만 이러한 정상 세포의 기능은 장기 염증반응에 의해 상실되고 오히려 면역세포의 역할을 하게 됨. 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드가 정상 세포의 활성화를 유도하는지 확인하고 이에 대한 소엽 추출물의 효과를 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 GFAP 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음. 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 정상 세포 수의 증가가 나타났고 이는 통계적으로 유의성이 있었음( $P < 0.05$ , Fig. 11). 하지만 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군은 정상군 수준의 정상 세포 수를 보였으며 나머지 군들도 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았음. 이는 베타아밀로이드에 의한 정상 세포 활성화가 소엽 60% 추출물에 의해 억제됨을 나타내며, 또한 COX-2와 iNOS의 발현증가가 정상 세포에서 나타나는 현상일 수 있음을 예측할 수 있음(Fig. 11).

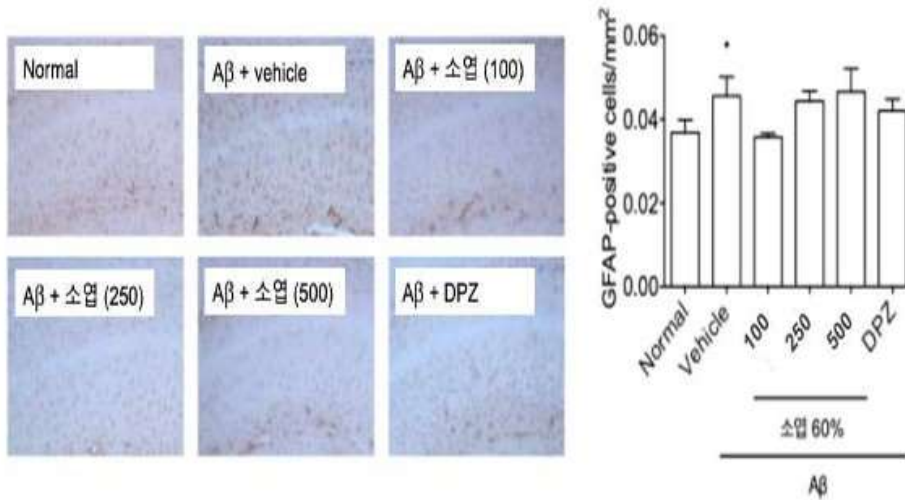


Figure 11. 해마에서의 정상 세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.



### 3. 아밀로이드 베타(Amyloid $\beta$ (A $\beta$ )) 유도 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 80% 주정 소엽 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 효과 확인

#### (1) Y 미로 시험 (Y-maze test)

- 실험동물의 단기 기억력을 평가하기 위하여 Y-maze 시험을 진행하였음. 변경 행동력을 계산한 결과 정상인 Normal군은 71.7 $\pm$ 1.2 %인 반면 A $\beta$ 를 주입 Control군은 58.3 $\pm$ 3.0 %로 유의적으로 감소하였고( $P < 0.001$ ), 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 70.4 $\pm$ 1.3 %, 73.9 $\pm$ 1.5 %, 72.7 $\pm$ 1.6 %로 Control군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 Donepezil군은 73.5 $\pm$ 1.9 %로 나타났음( $P < 0.001$ , Fig. 12A). 실험동물이 들어간 총 입장 횟수는 Normal군 29.8 $\pm$ 1.9회, Control군 27.9 $\pm$ 3.0회, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 31.0 $\pm$ 1.4회, 28.6 $\pm$ 2.6회, 28.4 $\pm$ 1.0회, DNPZ군 27.7 $\pm$ 1.3회로 모든 실험군 간 차이가 없는 것을 확인하였음(Fig. 12B.)

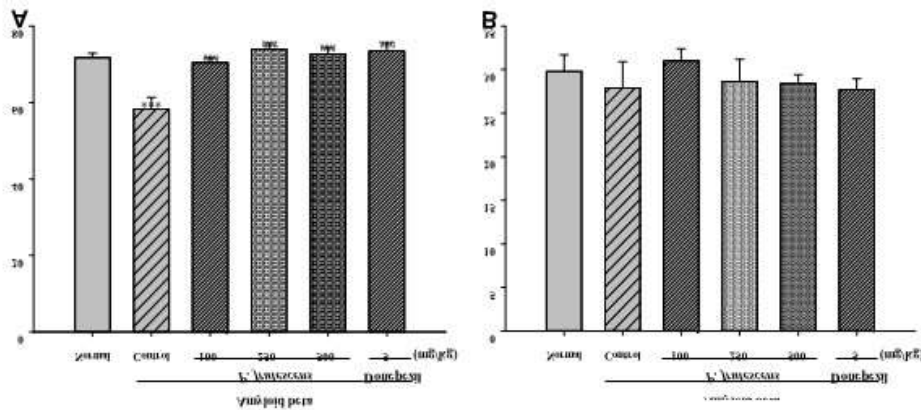


Figure 12. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in Y-maze test. The spontaneous alternation (A) and the number of arm entries (B) during an 8 min session were measured. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M, 9-10 in each group. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with normal group, \*\*\*  $P < 0.001$  compared with the control group.

#### (2) 사물 인지능력 시험 (Novel object recognition test)

- 사물 인지능력 시험은 단기 기억 능력을 확인하는데 이용되며 새로운 환경에 노출된 mouse의 자연적인 탐구 능력에 기초를 둔 빠르고 유용한 실험방법임. 훈련 기간 동안 mouse에 동일한 두 물체를 제시하여 탐색하도록 하였고, 24시간 후 두 물체 중 하나를 새로운 물체로 대체하였을 때 일반적으로 mouse가 새로운 물체에 더 많은 호기심을 가져 새로운 물체를 탐색하는 횟수가 상대적으로 증가하게 됨. 그러나 기억력이 손상된 mouse의 경우 기존물체와 새로운 물체를 구분하지 못해 두 물체 간 탐지 횟수에 큰 차이를 보이지 않음. 본 실험에서의 사물 인지능력 실험 결과를 살펴보면(Fig. 13A), 정상인 Normal군의 새로운 물체를 인지하는 비율(Novel object)



73.57±3.1 %로 기존물체를 인지하는 비율(Familiar object)인 26.43±3.1 %와 비교하여 유의적으로 높았음( $P < 0.001$ ). 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군의 경우 새로운 물체 인지 비율이 55.71±3.9 %로 기존물체를 인지하는 비율인 44.29±3.9 %와 비교하여 두 그룹 간 차이가 없었음. 또한 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg를 투여한 군은 각각 75.89±1.9 %에서 24.11±1.9 %, 79.57±1.5 %에서 20.43±1.5 %, 77.20±2.3 %에서 22.80±2.3 %로 기존물체에 비해 새로운 물체를 인지하는 비율이 유의적으로 증가하였으며, control군과 비교했을 때도 유의적으로 높았음( $P < 0.001$ ). 또한 사물에 대한 판별 능력 측정(Discrimination ratio)에서도 같은 결과를 확인할 수 있었음( $P < 0.001$ , Fig 13B). 이러한 결과로 80% 주정 소엽 추출물이 A $\beta$ 를 주입으로 인해 손상된 사물 인지능력을 개선하는데 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

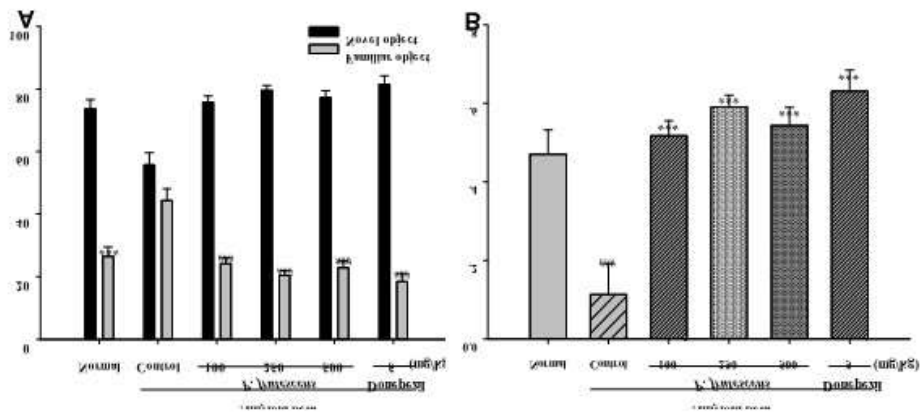


Figure 13. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in Novel object recognition test. The preference ratio (A) and the discrimination index (B) in the novel object recognition test are presented. Data are expressed as mean±S.E.M, 8-10 in each group. (A) \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.001$ , novel vs. familiar; (B) \*\*\*  $P < 0.001$  when compared with normal group, \*\*\*  $P < 0.001$  when compared with the control group.

### (3) 수동회피 시험(Passive avoidance test)

- A $\beta$ 를 주입한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg의 투여에 의하여 기억력 손상을 억제하는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였음. A $\beta$ 를 주입에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 둘째 날 기억 시험인 retention trial에서 정상인 Normal군의 밝은 방에 머무른 시간이 192.0±38.0초인 반면 A $\beta$ 를 주입한 Control군은 27.1±5.6초로 통계적으로 유의성 있게 감소하였음 ( $P < 0.001$ ). 이는 학습시험 시의 전기충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 A $\beta$ 에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각됨. 반면에 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 165.1±43.9 초, 169.7±32.2초, 167.2±43.3초로 농도 의존적으로 증가하였으며( $P < 0.05$ ), 양성대조

사용한 Donepezil군은 198.2±30.8초로 나타났음( $P < 0.05$ ). 반면에 첫째 날 학습시험인 acquisition trial에서의 밝은 방에 머무른 시간은 Normal군 14.5±2.2초, Control군 13.9±4.3초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 13.7±2.9초, 13.1±2.3초, 13.9±3.1초, Donepezil군 18.9±4.2초로 모든 실험군간 차이가 없는 것을 확인하였음(Fig. 14.)

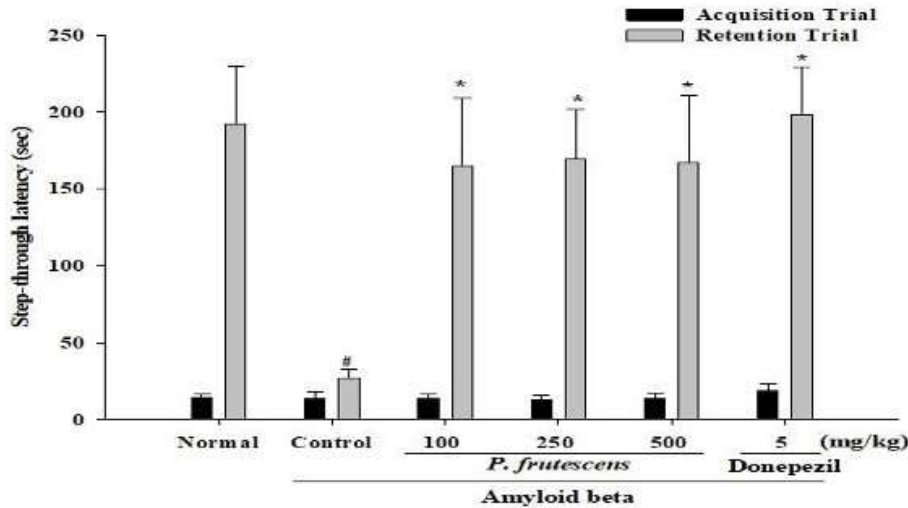


Figure 14. Effect of 80% of *Perilla frutescens* on A $\beta$ -induced memory deficits in passive avoidance test. Latency time was measured and the values shown the mean±S.E.M, 8-10 in each group. #  $P < 0.05$  compared with normal group. \*  $P < 0.05$  compared with the control group.

#### (4) 수중미로실험 (Morris water-maze test)

- Morris 수중미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 학습시험에서 제1일째에는 정상군(Normal)은 55.85 ± 2.1초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은 53.55 ± 1.9초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 54.93±1.8초, 53.98±1.4초, 54.85±2.3초, Donepezil군은 51.68±2.6초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 정상군(Normal)은 24.23 ± 1.6초, A $\beta$ 를 주입한 Control군은 50.35 ± 1.6초, 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각 37.73±4.4초, 34.63±4.9초, 33.48±2.0초, Donepezil군은 33.65±5.2초로 집단 간 유의성 있는 차이를 보였음 ( $P < 0.01$ ). 이에 측정 일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 3일째부터 A $\beta$ 를 주입한 투여군에서 정상군에 비해 학습능력이 현저히 저하되었으며 마찬가지로 주정 소엽

250, 500 mg/kg 투여군에서도 학습수행에 유의한 증진 효과가 관찰되었는데, 즉 3일째부터 플랫폼에 도달하는 소요 시간이 Aβ를 주입한 투여군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 양성대조군인 Donepezil 투여군 역시 비슷한 수준으로 감소하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.05$ , Fig. 15A).

- Morris 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 시행하고 이를 ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였음. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, 정상군(Normal)군은  $23.60 \pm 1.7$ 초인 반면 Aβ를 주입한 Control 투여군이  $16.27 \pm 1.1$ 초로 유의하게 감소하였고 ( $P < 0.001$ , Fig. 15B), 80% 주정 소엽 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 투여군은 각각  $16.75 \pm 0.6$ 초,  $22.12 \pm 0.7$ 초,  $21.87 \pm 1.1$ 초로 Aβ를 주입한 Control 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였음 ( $P < 0.01$ , Fig. 15B). Donepezil군 역시  $23.52 \pm 1.5$ 초로 증가하는 것을 확인하였음 ( $P < 0.01$ ). 이는 80% 주정 소엽 추출물이 장기 및 공간 기억을 개선하는 것을 의미함.

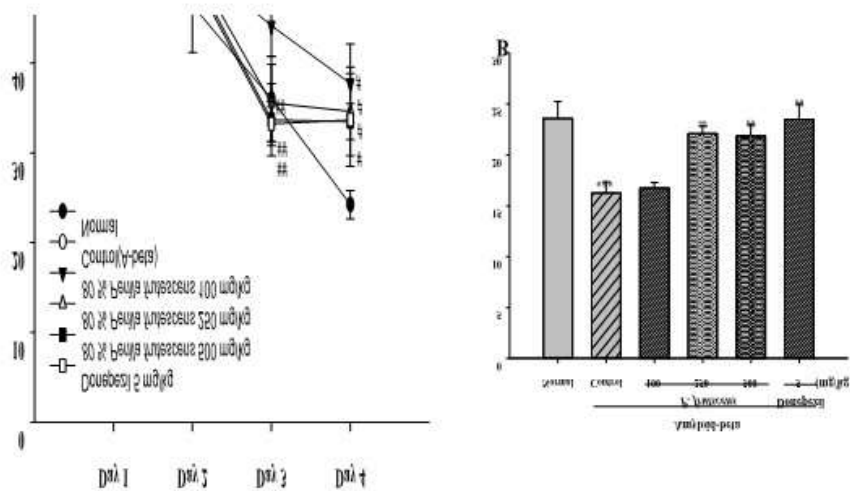


Figure 15. Effects of 80% of *Perilla frutescens* on the long-term, spatial reference memory of Aβ-induced mice in Morris water maze test. (A) Escape latency in acquisition phase; (B) Swimming time in target quadrant in probe trial. Data are expressed as mean±S.E.M, 9-10 in each group. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with Normal group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with the Control group.

#### 4. 80% 주정 소엽 추출물의 인지기능 및 기억력 개선 바이오마커 측정

##### (1) iNOS 발현에 미치는 영향

- NOS는 효소의 한 부류로 L-아르기닌으로부터 NO를 생성하는 반응을 촉매함. NO는 세포



중요한 분자이며, 많은 생물학적 과정에서 중요한 역할을 수행함. 세포 신호 전달은 혈관 저항(즉, 혈압)을 조절하고, 인슐린 분비, 기도저항, 연동운동, 그리고 혈관 생성과 신경계의 발생과 관련이 있음. 신경전달물질로 역할을 한다고 믿어지며, 기억에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있음. 산화질소 신호는 eNOS(내피세포 산화질소 합성효소, endothelial NOS)와 nNOS(신경 산화질소 합성효소, neuronal NOS)로 포유류와 연관되어 있으며 분비 가능한 형태의 iNOS는 면역 반응과 관련되어 있음. 칼모둘린과 결합하여 많은 양의 일산화질소(NO)를 생성하여 면역 기작에서 역할을 함. 특히 iNOS는 면역세포에서 발현되며 염증반응에서 과발현되기 때문에 뇌의 염증 상태를 확인하기 위한 인자로 많이 관찰되고 있음. 특히 베타아밀로이드로 인한 기억력 감퇴의 중요한 기전으로 알려져 있어 소엽 80% 알코올 추출물이 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 그 결과 그림 15에서 보는 바와 같이 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 iNOS의 단백질 양의 증가가 나타났음( $P < 0.05$ , Fig. 16). 소엽 80% 추출물 투여군과 양성대조군으로 사용한 도네페질 투여군에서는 비록 유의성은 보이지 않았으나 평균값이 베타아밀로이드 투여군에 비해 낮고, 정상군과 유의성 있는 차이가 나지 않았다. 이는 베타아밀로이드에 의한 iNOS의 유의적인 증가를 소엽 80% 추출물이 어느 정도 억제하는 효과가 있음을 나타냄.

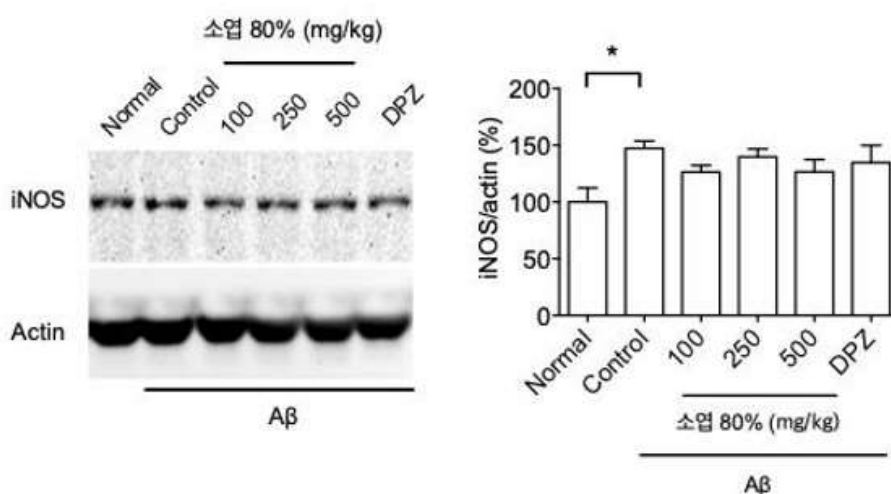


Figure 16. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 iNOS 발현 증가에 대한 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

## (2) COX-2 발현에 미치는 영향

- COX (cyclooxygenase)는 prostaglandin-endoperoxidase (PTGS)라고도 알려져 있는

arachidonic acid prostaglandin을 생성하는데 필요한 효소임. 많은 염증반응에서 염증 관련 세포로부터 COX의 합성이 증가되고 이러한 COX의 증가에 의해 만들어지는 다량의 prostaglandin들에 의해 발열, 통증 등과 같은 염증반응이 매개된다고 알려져 있음. 따라서 약물학적으로 COX의 저해는 염증과 통증을 경감시키는 효능이 있음. 뇌에서 염증의 발현은 뇌에 존재하는 면역세포인 미세교세포와 성상세포에 의해 매개되는데 다양한 염증 유발 자극들이 이들 세포에서 COX의 발현을 증가시키며 특히 베타아밀로이드의 응집체는 과도한 면역 반응을 통해 다양한 치매 증상을 유발하는데 COX의 발현증가도 이에 포함됨. 따라서 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드에 의해 증가되는 COX의 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 그 결과 그림 17에서 보는 바와 같이 베타아밀로이드 투여군(vehicle)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인 COX-2의 단백질량의 증가가 나타났음. 소엽 80% 추출물 투여군과 양성대조군으로 사용한 도네페질 투여군에서는 비록 유의성은 보이지 않았으나 평균값이 베타아밀로이드 투여군에 비해 낮고, 정상군과 유의성 있는 차이가 나지 않았음. 이는 베타아밀로이드에 의한 COX-2의 유의적인 증가를 소엽 80% 추출물이 어느 정도 억제하는 효과가 있음을 나타냄.

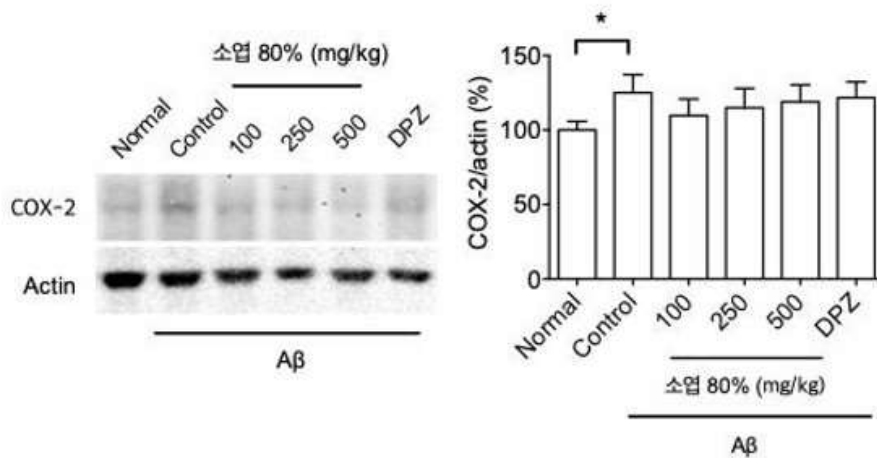


Figure 17. 베타아밀로이드에 의한 해마에서의 COX-2 발현증가에 대한 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

### (3) ADAM10 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백분해효소는  $\beta$ -secretase와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨. 하지만 아밀로이드 전구단백을 분해하는

$\alpha$ -secretase도 있는데  $\alpha$ -secretase에 의해 분해된 아밀로이드 전구단백은 베타아밀로이드를 생성하지 못함에 따라서  $\alpha$ -secretase의 활성을 증가시키거나 발현량을 증가시켜 베타아밀로이드의 생성을 줄여 알츠하이머병의 발병을 막을 수 있음. 최근 이러한  $\alpha$ -secretase가 ADAM10이라는 것이 밝혀져 본 연구에서는 소엽 80% 에탄올 추출물이 ADAM10의 발현량에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 ADAM10의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 80% 에탄올 추출물도 ADAM10의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 18).

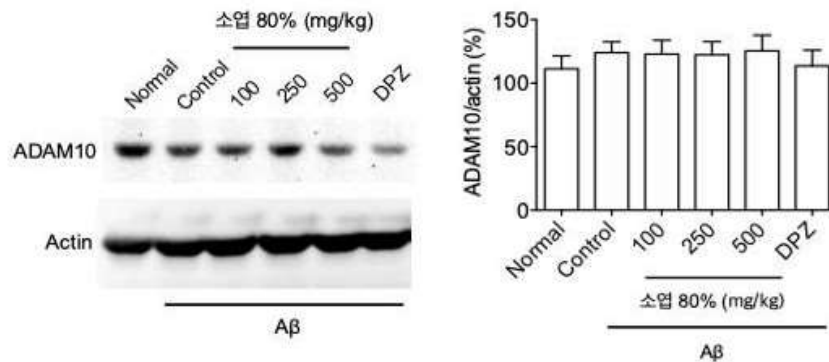


Figure 18. 해마에서의 ADAM10 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

#### (4) BACE1의 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백분해효소는  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨에 따라서 이들 효소 중 하나만 작동을 하지 않아도 베타아밀로이드의 생성이 불가능하다는 가설을 바탕으로 수많은 연구자들이  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase의 활성을 억제하거나 발현을 억제하는 물질에 대한 연구를 진행해왔음. 따라서 본 연구에서는 소엽 80% 에탄올 추출물이 BACE1 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 BACE1의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 80% 에탄올 추출물도 BACE1의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 19).

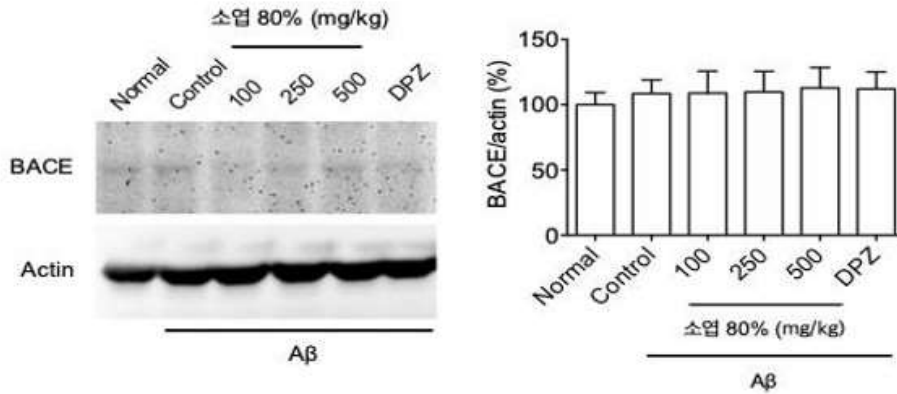


Figure 19. 해마에서의 BACE1 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(5) PSD95 발현에 미치는 영향

- 베타아밀로이드는 시냅스의 기능을 방해하여 기억력 감퇴를 유발함. 단기적으로는 시냅스의 신호전달 교란을 유발하지만, 장기적으로는 시냅스 자체의 소실을 초래함. PSD95는 후 시냅스 뉴런의 말단에 존재하는 단백질 중합체로 시냅스 상의 다양한 단백질을 묶어주는 역할을 하고 있음. 따라서 시냅스의 소실은 PSD95의 감소를 초래하게 되고 결과적으로 기억력 감퇴를 초래하게 됨. 본 연구에서는 소엽 80% 에탄올 추출물이 PSD95 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 아래 그림과 같이 베타아밀로이드 단회 투여로는 PSD95의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 80% 에탄올 추출물도 PSD95의 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음(Fig. 20).

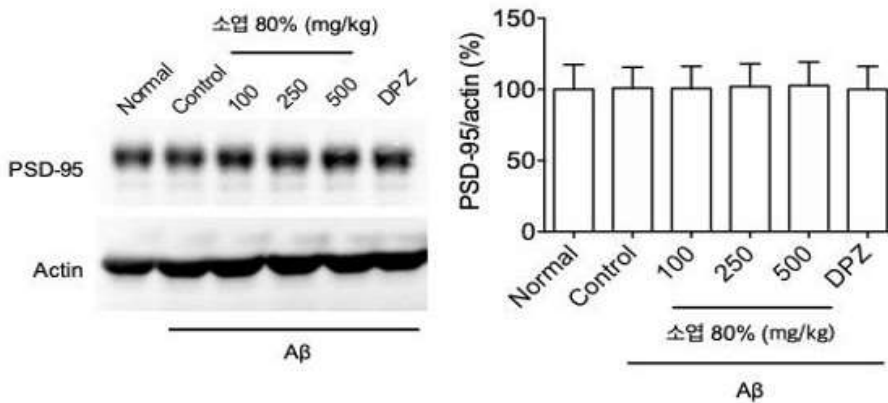


Figure 20. 해마에서의 PSD-95 발현에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.



(6) 활성화에 미치는 영향

- 미세교세포는 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경교세포임. 일반적으로 중배엽성이며 단구(單球)유래로 보고 있음. 태생 후기에 뇌실, 수막 주위에 출현하여 점점 뇌실질 내로 이동하여 생후 2주를 정점으로 수가 감소하여 가지가 나누어진 휴지형 세포가 됨. 성숙 뇌에서는 전(全) 신경교세포의 수 %가량이 됨. 염증이나 신경 변성 시에는 아메바 모양 및 막대 모양 미소 신경교가 증가한다고 알려져 있음. 형태학적으로는 대식세포와 유사하여 그의 표지는 대부분이 미소 신경교의 동정에 사용함. 유주능, 탐식능이 있고, 발생기에는 노폐물처리를 담당하는 기능 외에 활성산소, 일산화질소, 산성 인산 가수분해효소, 프로스타글란딘을 생산하여 염증세포로의 기능도 갖고 있음. 뇌 내에 유일 클래스II 주요 조직적합성항원이나 CD4항원이 있어 활발하게 사이토카인을 생산하는 점에서 면역 조절 세포로서 신경-면역 상호작용에 중요한 역할을 담당한다고 생각되고 있음. 베타아밀로이드 섬유소의 뇌 내 침착은 주변의 미세교세포를 활성화 시키고 이러한 활성화가 장기화되어 과도한 염증으로 인해 뇌세포 사멸이 나타나기도 함. 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드에 의해 미세교세포가 활성화 되는지 확인하고 소엽 추출물이 이에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 Iba-1 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음. 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 24% 정도의 미세교세포 수 증가가 나타났으나 유의성은 없었으며, 소엽 80% 추출물 투여군 모두와 양성대조군에서는 정상군 수준으로 미세교세포의 수를 감소시켰으나 이 역시 유의성은 없었음(Fig. 21). 이는 투여된 베타아밀로이드의 조성이 염증을 일으키는 섬유소 형태보다는 시냅스 가소성을 억제하는 올리고머형이 우세할 경우에 나타나는 현상이라고 생각됨.



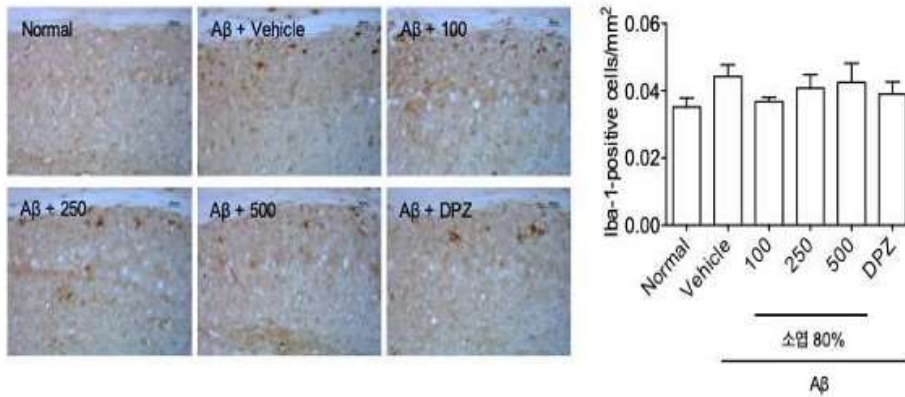


Figure 21. 해마에서의 미세교세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(7) 세포 활성화에 미치는 영향

- 정상 세포는 혈관-뇌 장벽(Blood-brain barrier)을 형성하여 혈관과 뇌 사이의 물질 이동을 통제하는 교세포라고 알려져 있음. 또한 신경전달물질이나 칼륨 이온 등을 흡수하여 신경 신호전달이 원활하게 이루어지도록 돕는 기능을 가지고 있음. 하지만 이러한 정상 세포의 기능은 장기 염증반응에 의해 상실되고 오히려 면역세포의 역할을 하게 됨. 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드가 정상 세포의 활성화를 유도하는지 확인하고 이에 대한 소엽 추출물의 효과를 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 GFAP 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음. 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 34% 정도의 정상 세포 수의 증가가 나타났고 이는 통계적으로 유의성은 없었음. 하지만 소엽 80% 추출물 투여군은 투여 용량이 증가할수록 정상군 수준의 정상세포 수를 보였음. 비록 전체 실험군에서 통계적인 유의성은 나타나지 않았으나 베타아밀로이드 투여군에서 평균 정상세포수의 증가가 나타났고, 이를 소엽 80% 추출물이 감소시키는 경향을 보였음(Fig. 22). 본 연구에서 베타아밀로이드 투여군에서 정상세포, 미세교세포와 같은 염증 관련 뇌세포의 활성화는 일어나지 않고, 염증 관련 지표인 iNOS와 COX의 증가만 관찰되었음. 이는 베타아밀로이드에 의한 기억력 감퇴가 과도한 염증에 의해 나타난 것이 아닐 수 있음을 의미함. 베타아밀로이드는 염증뿐만 아니라 산화적 손상 및 신경전달의 억제 등을 통해 기억력 감퇴를 일으킬 수 있음. 따라서 소엽 80% 에탄올 추출물은 항염증 효과보다는 항산화, 시냅스 기능 개선 혹은 베타아밀로이드의 분해 등 항염증 효과가 아닌 다른 기전을 통해 기억력 개선 효과를 나타낸다고 생각됨.

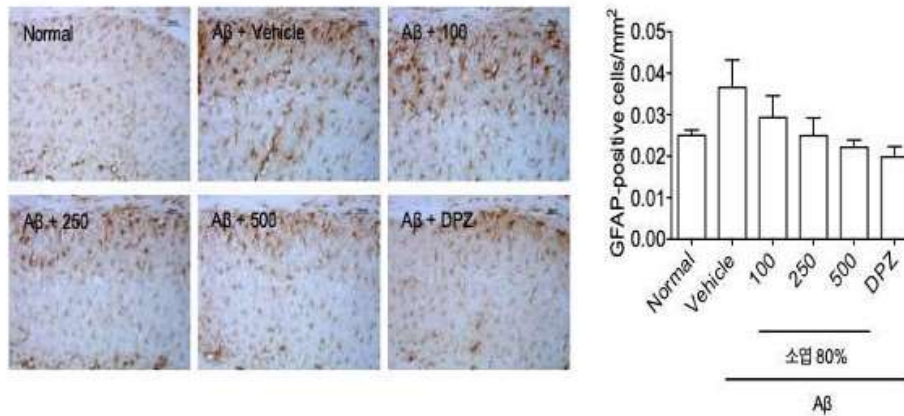


Figure 22. 헤마에시의 정상 세포 활성화에 대한 베타아밀로이드 및 소엽 60% 에탄올 추출물의 효과. DPZ, donepezil.

(8) 응집에 대한 효과

[실험방법]

1) ThT assay

- 아밀로이드 베타의 응집 저해 측정은 형광 분석법을 이용한 SensoLyteR Thioflavin T  $\beta$ -Amyloid(1-42) Aggregation Kit (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA)를 사용하여 측정하였음. 아밀로이드 베타(A $\beta$ 1-42) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종 농도는 100  $\mu$ g/mL로 사용하였음. 형광물질로 사용하는 thioflavin T는 assay buffer (50 mM Tris/150 mM NaCl (pH=7.2), 20 mM HEPES/150 mM NaCl (pH=7.2), 10 mM phosphate/150 mM NaCl (pH=8.0))에 녹여 제조하여 2 mM 농도로 사용하였음. 시료는 assay buffer에 녹여 최종 농도 1, 5, 10, 50  $\mu$ g/mL로 사용하였음. A $\beta$ 1-42 응집 억제 정도를 측정하기 위하여 96 well plate (black microplate)에 thioflavin T (ThT) 10  $\mu$ L와 A $\beta$ 1-42 85  $\mu$ L를 넣은 후 일정 농도로 만든 시료 5  $\mu$ L와 혼합하여 형광 분광 분석기로 측정하였음. 이때 사용한 형광 분광 분석기의 파장 값은 440 nm/484 nm(excitation/emission)이며, 37°C에서 20분 간격으로 총 2시간 측정하였음. 활성 비교를 위하여 양성대조군으로 curcumin을 사용하였고, 결과는 응집 저해능에 대한 %로 표시하였으며, 계산식은 아래와 같음.
- 응집 분해능은 시료와 ThT를 뺀 A $\beta$ 1-42 용액을 24시간 동안 응집시킨 후 시료를 5  $\mu$ L 가하고 다시 24시간 동안 배양 후 thioflavin T (ThT) 10  $\mu$ L를 가하고 형광 분광 분석기로 측정하였음. 이때 사용한 형광 분광 분석기의 파장 값은 440 nm/484 nm(excitation/emission)이며, 37°C에서 20분 간격으로 총 2시간 측정하였음.

$$\text{aggregation inhibition (\%)} = [1 - \{(S-S') / (C-C')\}] \times 100$$

- S: samples (sample solution, assay buffer with ThT, amyloid-solution)
- S': samples (sample solution, assay buffer with ThT, without amyloid-solution)
- C: control (assay buffer with ThT, amyloid-solution)
- C': control (assay buffer with ThT, without amyloid-solution)

2) 조직절편의 제작

- 마우스를 흡입 마취제인 이소플루란을 사용하여 마취하였고, 경추 탈골하여 안락사시킨 후, 마우스의 뇌는 적출 즉시 차가운 인공 뇌척수액(95% O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>; NaCl 124 mM; KCl 3 mM; NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; D-glucose 10 mM)에 담가 손상을 최소화하였음. 해마는 McILWAIN tissue chopper를 이용하여 400 μm 두께로 절단하였고, hippocampal slice는 인공 뇌척수액(20-25°C)에서 1시간 이상 배양한 다음 실험에 사용하였음.

3) 전기생리

- Hippocampal slice를 약 1시간가량 배양한 다음 recording chamber로 이동함. Chamber는 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>가 환기되는 28~30°C의 인공 뇌척수액이 분당 3 ml의 속도로 공급되도록 유지하였음. 해마의 CA1 영역 피라미드층의 신호를 측정하였고, 자극 전극은 schaffer-colleteral pathway에 위치시켰음. LTP를 유도하기 위한 방법으로는 세타 버스트 자극(theta-burst stimulation; TBS, 5 pulses at 100 Hz with 200ms inter-burst intervals)을 사용하였으며, LTP 유도 전 20분간 baseline을 측정하였음. 또한 NMDA 수용체 매개 field 흥분성 시냅스후 전위(field excitatory postsynaptic potential; fEPSP)를 확인하기 위하여 AMPA 수용체 길항제인 NBQX(50 μM)을 관류하였음.

[실험 결과]

1) 소엽 80% 에탄올 추출물의 베타아밀로이드 응집에 대한 효과

- 베타아밀로이드는 아밀로이드 전구단백으로부터 생성되는 독성물질로 알츠하이머병의 원인물질로 알려져 있음. 베타아밀로이드는 단량체일 경우 아무런 독성을 나타내지 않으나 올리고머와 섬유소 형태가 될 경우 독성을 나타냄. 특히 올리고머형의 베타아밀로이드는 세포독성 및 시냅스 독성을 나타내고, 섬유소 형태의 베타아밀로이드는 염증을 일으키며, 따라서 베타아밀로이드가 응집되는 것을 억제한다면 알츠하이머병을 예방할 수 있음. 본 연구에서는 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드 응집에 미치는 효과를 알아보기 위해 ThT assay를 실시하였음. 소엽 80% 에탄올 추출물은 5, 10, 50 μg/mL의 농도에서 유의성 있는 응집 억제 효과를 나타내었고, 10 μg/mL 와 50 μg/mL에서는 양성대조군으로 사용한 curcumin보다 우수한 효과를 나타내었음(Fig. 23).



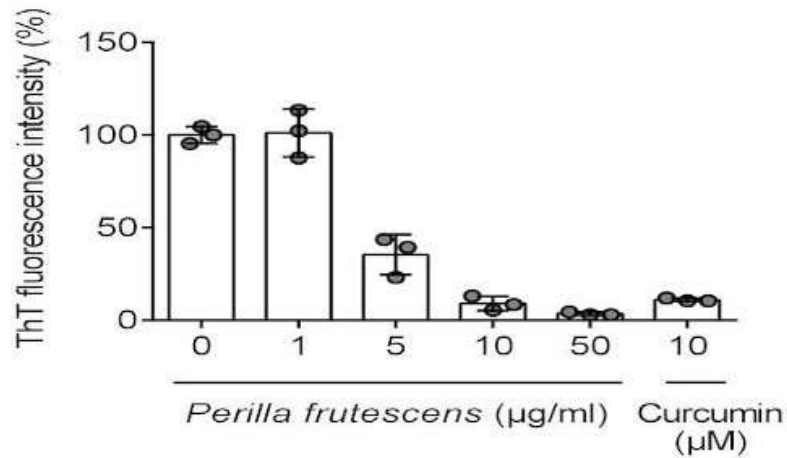


Figure 23. 소엽 80% 에탄올 추출물의 베타아밀로이드 응집 억제 효과

2) 80% 에탄올 추출물의 베타아밀로이드 응집체 분해 효과

- 베타아밀로이드는 단량체일 경우 아무런 독성을 나타내지 않으나 올리고머와 섬유소 형태가 될 경우 독성을 나타냄. 특히 올리고머형의 베타아밀로이드는 세포독성 및 시냅스 독성을 나타내고, 섬유소 형태의 베타아밀로이드는 염증을 일으키게 됨. 이러한 베타아밀로이드의 응집과 뇌 내 침착은 알츠하이머 발병 20년 전부터 시작되었으며, 이는 알츠하이머병으로 진단을 받으면 이미 베타아밀로이드의 응집이 상당히 진행된 상황임을 의미함. 따라서 알츠하이머병 치료제는 이미 응집된 베타아밀로이드를 분해할 수 있어야 함. 본 연구에서는 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드 응집체에 미치는 효과를 알아보기 위해 ThT assay를 실시하였음. 소엽 80% 에탄올 추출물 10 µg/mL은 유의성 있는 응집체 분해효과를 나타내었고, 이는 양성대조군으로 사용한 curcumin보다 우수한 효과를 나타내었음(Fig. 24).

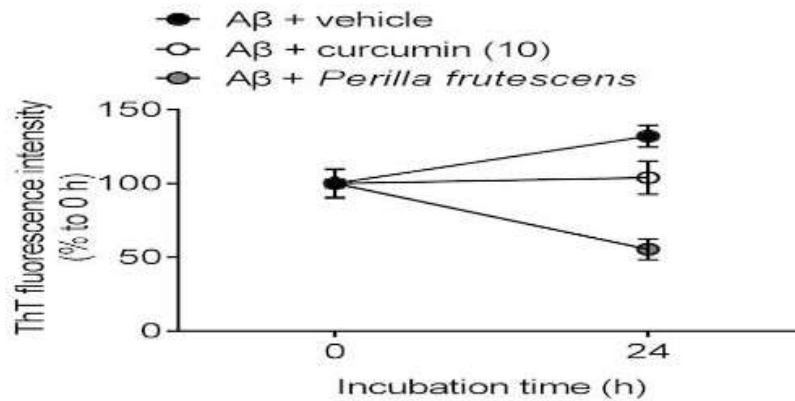


Figure 24. 소엽 80% 에탄올 추출물의 베타아밀로이드 응집체 분해 효과

3) 응집체에 의한 시냅스 가소성 억제에 대한 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과

- 베타아밀로이드를 24시간 37°C에서 응집시키면 다양한 형태의 올리고머와 섬유소형이 생성됨. 이들을 해마 조직에 가하면 해마 조직에서 나타나는 다양한 시냅스 기능의 변화를 초래하는데 특히 기억의 세포 수준의 기전이라 알려진 시냅스 장기강화(long-term potentiation, LTP)를 억제함. 따라서 소엽 추출물이 베타아밀로이드 응집체를 분해하는 효과가 이러한 베타아밀로이드의 시냅스 독성을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 베타아밀로이드 응집체에 의한 시냅스 가소성 억제에 대한 소엽 추출물의 효과를 확인하고자 하였음. 정상 해마 조직에서는 2회의 HFS가 시냅스의 장기강화를 유도하였음. 반면 베타아밀로이드 응집체만 가한 해마 조직에서는 이러한 시냅스 장기강화가 유도되지 않았음. 이러한 베타아밀로이드의 시냅스 장기강화 억제 효과는 소엽 추출물과의 공동 배양에 의해 사라짐을 확인할 수 있음. 이는 소엽 추출물이 베타아밀로이드 응집체를 분해하여 시냅스 장기강화를 억제하는 효과를 방해한 것이라 생각됨(Fig. 25).

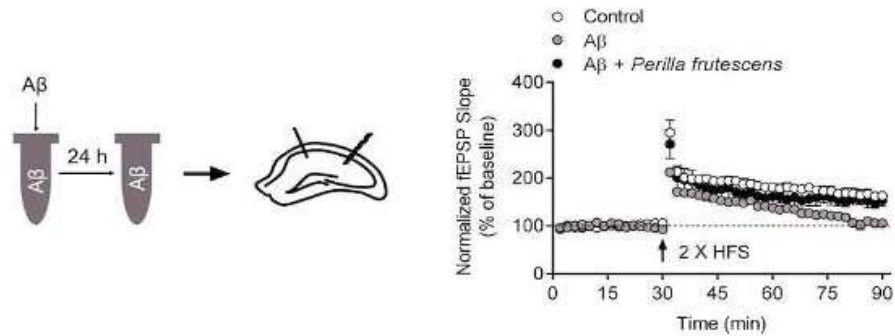


Figure 25. 베타아밀로이드 응집체에 의한 시냅스 가소성 억제에 대한 소엽 80% 에탄올 추출물의 효과

- 4) 80% 에탄올 추출물에 의한 베타아밀로이드 응집체 분해물의 시냅스 독성 확인
- 베타아밀로이드 응집체 분해는 자칫 섬유소의 분해에 의해 올리고머형의 베타아밀로이드가 많이 생성되는 결과를 초래할 수 있음. 시냅스에 대한 독성은 섬유소 보다는 올리고머형의 베타아밀로이드가 크므로 이러한 경우 오히려 응집체 분해효과에 의해 독성이 증가되는 결과를 초래할 수 있음. 따라서 이러한 현상을 검증하기 위해 기 응집된 베타아밀로이드에 소엽 추출물을 가하여 분해시키고 이 분해물이 시냅스 가소성에 미치는 영향을 확인하였음. 그 결과 이전 실험과 마찬가지로 정상 해마 조직에서는 2회의 HFS가 시냅스의 장기강화를 유도하였음. 반면 베타아밀로이드 응집체만 가한 해마 조직에서는 이러한 시냅스 장기강화가 유도되지 않았음. 하지만 소엽 추출물에 의해 생성된 베타아밀로이드 응집체 분해물은 시냅스 가소성을 억제하지 못하였음. 이는 소엽 추출물이 섬유소뿐만 아니라 올리고머형 베타아밀로이드도 분해할 수 있음을 나타냄(Fig. 26).

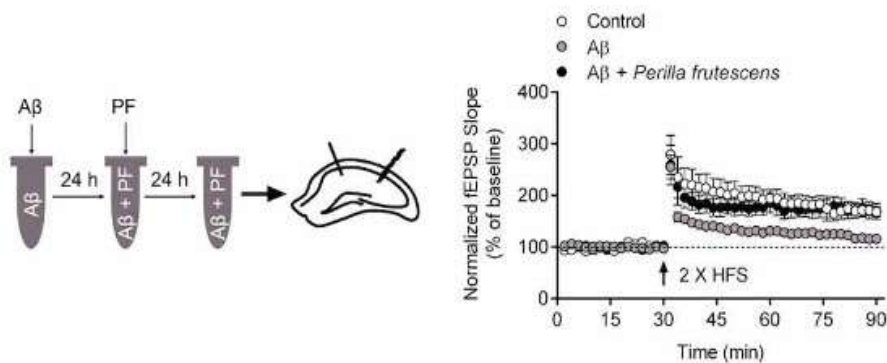


Figure 26. 독성 베타아밀로이드 응집체의 분해 효과

## 제 4 절 결론 및 고찰

- 연구에서 60% 및 80% 소엽 주정 추출물이 A $\beta$ 로 유도한 동물모델에서 Y-maze test, 사물인지실험(novel object recognition test), 수동회피실험(passive avoidance test) 및 모리스 물 미로실험(morris water maze test)을 통해 연구한 결과 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인하였음. 또한 관련 바이오마커 연구를 통해 60% 소엽 주정 추출물이 iNOS, COX-2 발현 억제를 통한 항염증 효과와 관련이 있음을 확인하였음. 그러나 80% 소엽 주정 추출물에서는 항염증 효과의 경향성은 보이나 유의적 차이가 나타나지 않아 추가적으로 베타아밀로이드 응집 관련 연구를 진행하였음. 그 결과 80% 소엽 주정 추출물이 베타아밀로이드 응집체를 분해하거나 응집을 억제하는 효과를 나타내었음.
- Amyloid  $\beta$  peptide(A $\beta$ )는 지방산화 및 free radical의 생산에 의해 신경세포의 apoptosis를 유도하거나 산화적 스트레스를 증가시키는 원인이 되는 물질로 알려져 있으며, 알츠하이머와 같은 신경계 질환은 뇌에 아밀로이드 베타 단백질들의 축적에 의해서 일어난다고 보고되어 있음. 따라서 A $\beta$ 의 변화는 콜린성 신경계가 관련된 학습 및 기억 연구를 조사하는데 매우 중요한 물질임. A $\beta$ 로 유발된 기억력 장애는 중추신경계 기능 장애에서 발견되는 것과 유사하다는 것으로 널리 알려져 있으며 이러한 기억장애의 동물모델은 치매 질환의 분자생물학적 작용기전을 이해하고 치료 약물을 찾는 데 사용되고 있음.
- 본 연구에서는 기억력 감퇴 모델을 구축하기 위해 정상 ICR mice의 뇌실에 A $\beta$ 를 주입 8일 후 행동 실험을 진행하였음.
- A $\beta$ 로 유도한 기억 손상 모델에서 Y-maze test를 진행한 결과 60% 소엽 주정 추출물 250 또는 500 mg/kg와 80% 소엽 주정 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 용량에서 행동량에 영향을 미치지 않고 유의하게 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었음.
- A $\beta$ 로 유도한 기억 손상 모델에서 사물인지실험(novel object recognition test)를 진행한 결과 60% 소엽 주정 추출물 250 또는 500 mg/kg와 80% 소엽 주정 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 용량에서 행동량에 영향을 미치지 않고 유의하게 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었음.
- A $\beta$ 로 유도한 기억 손상 모델에서 수동회피실험(passive avoidance test)를 진행한 결과 60% 및 80% 소엽 주정 추출물 100, 250 또는 500 mg/kg 용량에서 환경에 영향을 미치지 않고 유의하게 기억력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었음.
- A $\beta$  유도 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 60% 및 80% 소엽 주정 추출물의 개선 효과를 확인하기 위하여 Morris 수중 미로 학습에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기



소요 시간을 측정하는 학습시험에서 학습이 진행될수록 NOR군과 60% 및 80% 소엽 주정 추출물 투여군은 플랫폼에 도달하는 시간이 감소하는 반면 AB로 유도한 CON군은 첫날과 비슷한 수준으로 변함이 없었으며 마지막 날인 제5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 플랫폼에 있었던 4 분원에 머무는 시간을 측정한 결과 NOR군과 60% 및 80% 소엽 주정 추출물 투여군은 CON군에 비해 머무는 시간이 유의하게 증가하였음.

- 알츠하이머 치매의 임상시험에서 다양한 AB 제거 전략이 시도되고 있지만, 여전히 실패하고 있기 때문에, AD를 조절하는 데 있어 신경염증이 주요한 치료전략으로 떠오르고 있음. 비록 이전 임상시험에서 항염증제 또한 실패하였지만, AD 치료에 있어 신경염증이 여전히 주요한 요인으로 알려져 있음. 본 연구에서는 소엽 추출물의 기억력 개선 작용기전을 확인하기 위하여 먼저 염증 관련 실험을 진행한 결과 60% 소엽 주정 추출물 투여군에서 염증 매개 인자인 COX-2와 iNOS의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였음. 그러나 소엽 80% 주정 추출물은 항염증 효과의 경향성은 보이나 유의적인 차이를 나타내지는 못하였음. 이는 소엽 80% 주정 추출물이 단순히 항염증 효과를 바탕으로 베타아밀로이드에 의한 기억력 감퇴를 개선하는 것이 아니라 좀 더 복잡한 기전이 관여했을 가능성이 있음. 이를 밝히기 위해 추가적으로 베타아밀로이드 응집 관련 연구를 진행한 결과 소엽 80% 주정 추출물이 베타아밀로이드 응집체를 분해하거나 응집을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였음.
- 베타아밀로이드는 막단백질인 아밀로이드 전구단백의 단백효소 분해에 의해 생성된다고 알려져 있음. 여기에 관여하는 단백분해효소는  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase로 두 효소가 모두 작용을 해야 베타아밀로이드가 생성됨에 따라서 이들 효소 중 하나만 작동을 하지 않아도 베타아밀로이드의 생성이 불가능하다는 가설을 바탕으로 수많은 연구자들이  $\beta$ -secretase (BACE1)와  $\gamma$ -secretase의 활성을 억제하거나 발현을 억제하는 물질에 대한 연구를 진행해왔음. 또한, 베타아밀로이드는 시냅스의 기능을 방해하여 기억력 감퇴를 유발함. 단기적으로는 시냅스의 신호전달 교란을 유발하지만, 장기적으로는 시냅스 자체의 소실을 초래함. PSD95는 후 시냅스 뉴런의 말단에 존재하는 단백질 중합체로 시냅스 상의 다양한 단백질을 묶어주는 역할을 하고 있음. 따라서 시냅스의 소실은 PSD95의 감소를 초래하게 되고 결과적으로 기억력 감퇴를 초래하게 됨. 따라서 본 연구에서는 소엽 60% 및 80% 에탄올 추출물이 ADAM10, BACE1 및 PSD95 발현에 미치는 영향을 확인해 보았음. 그 결과 베타아밀로이드 단위 투여로는 ADAM10, BACE1 및 PSD95의 변화는 나타나지 않았고, 소엽 60% 및 80% 에탄올 추출물도 마찬가지로 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었음.

- 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경교세포임. 일반적으로 중배엽성이며 단구(單球)유래로 보고 있음. 염증이나 신경 변성 시에는 아메바 모양 및 막대 모양 미세교세포가 증가한다고 알려져 있음. 베타아밀로이드 섬유소의 뇌 내 침착은 주변의 미세교세포를 활성화하고 이러한 활성화가 장기화하여 과도한 염증으로 인해 뇌세포 사멸이 나타나기도 함. 정상 세포는 혈관-뇌 장벽(Blood-brain barrier)을 형성하여 혈관과 뇌 사이의 물질 이동을 통제하는 교세포라고 알려져 있음. 또한 신경전달물질이나 칼륨 이온 등을 흡수하여 신경 신호전달이 원활하게 이루어지도록 돕는 기능을 하고 있음. 하지만 이러한 정상 세포의 기능은 장기 염증반응에 의해 상실되고 오히려 면역세포의 역할을 하게 됨. 따라서 본 연구에서는 베타아밀로이드에 의해 미세교세포와 정상 세포가 활성화 되는지 확인하고 소엽 추출물이 이에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험동물의 해마 절편에서 Iba-1, GFAP 단백질 발현 정도를 면역염색을 통해 확인하였음. 베타아밀로이드 투여군에서 미세교세포 수 증가가 나타났으나 유의성은 없었으며, 소엽 60% 및 80% 추출물 투여군 모두와 양성대조군에서는 정상군 수준으로 미세교세포의 수를 감소시켰으나 이 역시 유의성은 없었음. 이는 투여된 베타아밀로이드의 조성이 염증을 일으키는 섬유소 형태보다는 시냅스 가소성을 억제하는 올리고머형이 우세할 경우에 나타나는 현상이라고 생각됨. 반면에 정상 세포 실험에서는 베타아밀로이드 투여군에서 정상군 대비 21% 정도의 정상 세포 수의 증가가 나타났고 이는 통계적으로 유의성이 있었음. 소엽 60% 추출물 100 mg/kg 투여군은 정상군 수준의 정상 세포 수를 보였으며 이는 베타아밀로이드에 의한 정상 세포 활성화가 소엽 60% 추출물에 의해 억제됨을 나타내며, 또한 COX-2와 iNOS의 발현증가가 정상 세포에서 나타나는 현상일 수 있음을 예측할 수 있음.
- 이러한 결과를 종합해 볼 때, 60% 및 80% 소엽 주정 추출물이 A $\beta$ 로 유도한 동물모델에서 농도 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과가 있음을 확인하였으며, 또한 관련 바이오마커 연구를 통해 소엽 60% 에탄올 추출물은 뚜렷한 항염증 효과가 나타났으나 소엽 80% 에탄올 추출물은 항염증 효과의 경향성은 보이나 유의적인 차이를 나타내지는 못하였음. 이는 소엽 80% 주정 추출물이 단순히 항염증 효과를 바탕으로 베타아밀로이드에 의한 기억력 감퇴를 개선하는 것이 아니라 좀 더 복잡한 기전이 관여했을 가능성이 있음. 이를 밝히기 위한 베타아밀로이드 응집 관련 연구에서 소엽 80% 에탄올 추출물은 베타아밀로이드 응집체를 분해하거나 응집을 억제하는 효과를 나타내었으며, 이는 소엽 80% 에탄올 추출물이 베타아밀로이드가 기억력 감퇴를 유도하기 전에 독성 베타아밀로이드를 제거하는 기전을 통해 기억력 감퇴를 억제하는 것일 가능성이 있음을 의미함. 이는 소엽 80% 주정 추출물이 베타아밀로이드에 의한 2차 독성기전을

것이 아닌 베타아밀로이드 자체를 억제하는 것으로서 알츠하이머병의 예방 및 초기 진행 억제가 가능하리라 생각되어 의약품으로서 개발 가능성이 충분한 천연물 질임을 시사하고 있음.

## ※ 첨부 자료

논문 - 현재 2차 심사 중

논문 제목 - 'Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta* in Amyloid  $\beta$  toxicity and Alzheimer's disease-like pathology in 5XFAD mice'

저널명 - Food and Chemical Toxicology

**Effects of *Perilla frutescens* var. *acuta* in Amyloid  $\beta$  toxicity and Alzheimer's disease-like pathology in 5XFAD mice**

Eunbi Cho<sup>a</sup>, Jihye Lee<sup>b</sup>, Jae Seong Sin<sup>c</sup>, Sung-kyu Kim<sup>d</sup>, Chul Jin Kim<sup>e</sup>, Mi Hee Park<sup>e</sup>, Wan-Seob Cho<sup>c</sup>, Minho Moon<sup>f</sup>, Dong Hyun Kim<sup>a,\*</sup>, Ji Wook Jung<sup>g,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Department of Advanced Translational Medicine, School of Medicine, Konkuk University, Seoul, 05029, South Korea

<sup>b</sup> Division of Endocrinology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 41944, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Health Sciences, The Graduate School of Dong-A University, Dong-A University, Busan 49315, Korea

<sup>d</sup> SFC bio Co., Ltd., Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea

<sup>e</sup> Jeonju AgroBio-Materials Institute, Jeonju-si 54810, Jeollabuk-do, Republic of Korea

<sup>f</sup> Department of Biochemistry, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

<sup>g</sup> Department of Herbal Medicinal Pharmacology, College of Herbal Bio-industry, Daegu Haany University, Kyungsan 38610, Republic of Korea

\*Corresponding author

E-mail: mose79@dau.ac.kr (Kim DH)

Tel: +82-51-200-7583 (Kim DH)

Fax: +82-51-200-5748 (Kim DH)

\*\*Co-corresponding author

E-mail: jwjung@dhu.ac.kr (Jung JW)

### Acknowledgement

This work was supported by the customized innovative food and natural safe material technology development project of the Institute of Agriculture, Forestry and Food Technology Planning and Evaluation with funding from the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (119012-3).

## 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.