

최 종 보 고 서

발간등록번호

11-1543000-000114-01

고려인삼 사포닌 제제가 식욕억제, 알코올 중독, 갈망 완화에 미치는 작용
기전 규명 및 임상 프로토콜 개발

(Investigation of neurobiological mechanism of effect between saponin
extracted from Korea ginseng and appetite suppression, alcoholism and
craving and development of clinical protocol)

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한식 우수성 기능성 연구사업에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2013 년 7월 29일

가톨릭대학교

연 구 진

연구기관명 : 가톨릭대학교

연구책임자 : 김대진

책임연구원 : 김대진

연 구 원 : 임슬기

연 구 원 : 광수민

연 구 원 : 권 민

연 구 원 : 최지혜

연구기관명 : (주)바이탈링크

책임연구원 : 최윤석

책임연구원 : 심인섭

연 구 원 : 이미숙

연 구 원 : 최지선

요 약 문

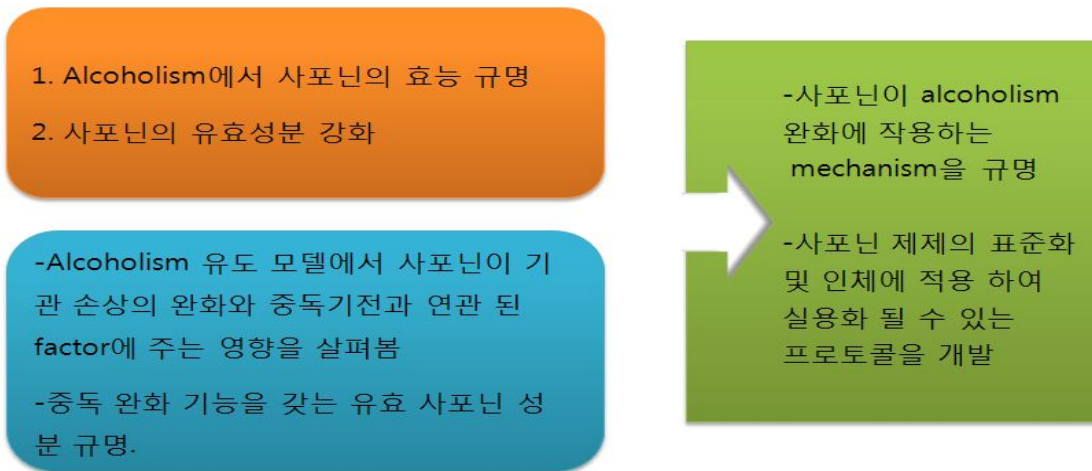
제 1장 고려인삼 사포닌 제제의 효능규명 및 임상 프로토콜 개발

제 목: 고려인삼 사포닌 제제가 식욕억제, 알코올 중독, 갈망 완화에 미치는 작용기전 규명 및 임상 프로토콜 개발

1. 연구개발의 목적 및 필요성

- ✓ 인삼 사포닌 유효성분 Ginsenoside 효능과 관련한 작용기전 규명:
- ✓ 인삼의 사포닌 성분 표준화:
- ✓ 인체 임상 프로토콜 개발:
- ✓ 알코올 중독 모델을 사용하여 인삼 사포닌이 알코올 중독에 미치는 신경 생물학적 영향 탐색:
- ✓ 인체 임상 연구를 통해 급성 알코올 섭취 후 숙취 해소에 주는 영향을 살펴봄:
- ✓ 인삼의 사포닌 성분 표준화 및 증폭 시스템 확립:
- ✓ 천연물 유래 중독 완화 제품의 실용화:

2. 연구개발 내용 및 범위



가) 1차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
고려인삼 사포닌 제제의 성분 활성효능에 따른 균일화 및 표준화	인삼사포닌 표준품 제조 연구 및 이의 균일화 연구, 타 원료 표준화 및 균일화 방안 연구	-열수 추출 및 알코올 추출물에 대한 정제도 비교 -한외여과 및 칼럼 정제에 대한 정제 효율성 비교

<p>Saponin의 섭취가 비만 관련 인자 및 식욕 관련 인자에 주는 영향 비교</p>	<p>- 일반 Rat model (Sprague-Dawley Rat)에서 고지방 식이로 비만을 유도 유전자 변형에 의해 비만이 유도되는 Zucker Rat에서 일반 식이로 비만을 유도</p> <p>- Saponin을 매일 복강내 투여하여 비만 및 식욕 관련 factor에 주는 영향을 비교함.</p>	<p>- 회생 전에 복강 내 당부하 검사를 실시함.</p> <p>- Body, Organs(Liver, Spleen, Kidney, heart, pancreas), adipose tissue(mesenteric fat, epididymal fat, perirenal fat, brown adipose tissue) 무게를 쟀 후 Organ은 쥐 무게 100g당 무게로 환산함.</p> <p>- Blood에서 lipid 관련 인자(TG, TP, TC, HDLC, LDLC, FFA), 독성을 알아보기 위한 인자(AST, ALT, BUN, Creatinine) 분석 함.</p> <p>- 간 조직 및 지방조직을 파라핀 블록을 만들어 포매 과정을 거쳐 절편하고 Hematoxylin & Eosin(H&E) Staining 후 광학현미경으로 조직병리학적 변화를 관찰함.</p> <p>- Real-time PCR을 통해 hypothalamus에서 식욕 관련 인자인 NPY와 POMC와 지방 조직에서 PPAR-γ, HO-1의 mRNA 발현양을 정량적으로 분석하였음.</p>
<p>인삼 사포닌 성분의 고 함유 정제 공정 및 유효 성분 증폭 기술 개발</p>	<p>유효 성분 강화 및 증폭 방안 연구</p> <p>최적 효소 선정을 위한 실험 (효소분해를 통한 증폭법은 일정한 비율로 증폭되고 컨트롤이 용이하고 저렴하므로 최종 효능 성분 증폭시스템 확립 방안으로서 효소분해법을 채택)</p>	<p>- 발효 및 효소분해물에 대한 효능 증폭 정도 비교 - 환류 및 팽화물에 대한 효능 증폭 정도 비교 - 주파수 발생기를 통한 효능 증폭 정도 비교</p> <p>- 효소별 지방세포의 Glucose Intake 증가도 측정 실험 - 효소별 면역조직화학법에 의한 식욕억제도 측정 실험 - NE 효소 및 CY 효소 처리에 따른 각진세노사이드의 HPLC 측정 실험 - NE 효소 5% 처리군에 대한 효소 농도별 지방세포 활성화도 측정 실험 (Western Blot) - 지방세포 L1 cell에 대해, NE 효소 농도별 지방세포 활성화도 측정 실험</p>

Pre-임상프로토콜 작성	임상 프로토콜 작성 및 임상 실험에 앞선 선행 프로토콜 작성	임상 프로토콜 작성 및 임상실험에 앞선 선행 프로토콜 작성
---------------	-----------------------------------	----------------------------------

나) 2차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> 알코올 중독 모델에서 사포닌이 손상된 기관의 회복 및 중독완화에 주는 영향 분석 	알코올-유도 OLETF, LETO model에서 사포닌의 섭취가 숙취해소능 향상과 알코올로 인한 기관 손상 완화	Liber DeCali Ethanol-containing liquid diet와 Liber DeCali regular control diet를 실험군과 대조군에게 100ml/day씩 투여하고 Ethanol군에게 Saponin을 투여하여 숙취해소능 향상과 알코올로 인한 기관 손상완화를 살펴봄
<ul style="list-style-type: none"> 임상 프로토콜 성립 및 알코올과 사포닌의 영향 평가 	임상시험에서 사포닌이 숙취해소 관련 factor의 변화에 미치는 영향을 살펴봄.	선정 기준에 만족하는 임상 실험군을 조직하여 입원시킨 후 신경 심리 검사와 물질 투여 후 채혈 및 숙취척도 등을 관찰함.
<ul style="list-style-type: none"> 표준화 및 균일화를 위한 효능 성분 분리정제 기술 확립 	극성수(bi-polarized water), 탈이온수(de-ionized water), 수소수 활용 방안 연구	홍삼 추출 효율의 실험실 조건과 plant 조건에서 공히 실시하여 홍삼 사포닌의 최적 추출 효율 조건으로서 탈 이온수를 추출 용매로 활용하는 것으로 최종 선택함.
<ul style="list-style-type: none"> 표준화 및 균일화를 위한 효능 성분 분리정제 기술 확립 	급냉식 침전 방안 연구 및 최적 필터 사이즈 결정	홍삼 추출 효율의 실험실 조건을 기준으로 plant 조건에서 급냉식 및 최적 필터 선정하여 불요성 물질의 최소화를 목적으로 함.
<ul style="list-style-type: none"> 효능성분 증폭 시스템 확립 	효소분해 조건 확립을 통한 유효 성분 강화 및 증폭 방안 연구	뉴로자임 효소 (NE) 5% 첨가하는 것을 표준화 공정으로 채택함.
<ul style="list-style-type: none"> 표준품 제조 공정 확립 	추출, 가수분해, 농축, 건조 공정 확립	인삼 (고압 증숙기, 105℃, 4시간 증숙) > 홍삼 > 파쇄, 절단 > 추출 (de-ionized water, 100℃, pH6) > 여과 (잔사 제거) > 농축 > 상등액 효소분해 (Neurozyme 5%) > 농축 > 건조 (동결건조, -80℃)

<ul style="list-style-type: none"> 대량생산시스템 scale-up 적용 	<p>효능이 최대한 증폭된 조건을 하여 시제품 제작</p>	<p>가수분해 효소 농도 Neurozyme 5%, 가수분해 온도 50°C, 가수분해 시간 72시간, 가수분해 pH 6의 조건으로 시제품 제작</p>
<ul style="list-style-type: none"> 제제화를 위한 조건 확립 	<p>분말, 과립, 정제, 액상 제형 조건 확립</p>	<p>기포안정성, 유화형성능, 유화안정성, 용해도 및 수분흡수력, 열안정성, 풍미도 평가 후 액상, 분말, 과립 제제화 조건 확립</p>
<ul style="list-style-type: none"> 맛 개선을 위한 조건 확립 	<p>- 짠맛, 단맛, 쓴맛, 신맛의 정도를 파악 - 약식 패널 테스트를 통한 최적 맛 분말 조성비 결정</p>	<p>효소분해 홍삼 가수분해물 50%, 요쿠르트맛 분말 15%, 결정과당 10%, 폴리덱스트로스 25%의 조성을 확립함.</p>

3. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 국제학술대회 포스터 발표

가. 2012 Pacific Rim College of Psychiatry

October 25 (Thu) - 27 (Sat), 2012

the Sheraton Grande Walkerhill, Seoul, Korea

“Enzymatic treated Saponin of Korea red ginseng suppresses Appetite in Dietary and Genetic-induced Obesity Rats.”

나. Keystone Symposia Neurogenesis (J7)

February 3 - February 8, 2013

Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico

“The Effect of Chronic Ethanol Intake on Type 2 Diabetes Mellitus - The Effect of BDNF on Alcohol and Diabetes-”

2. SCI journal 에 submission 예정 - e.g. Diabetes, Obesity 등

3. 고려 인삼 사포닌제제 섭취의 권장 홍보자료로 활용

현재 전 세계적으로 건강상 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 비만과 당뇨, 알코올 중독 환자에게서 사포닌의 섭취효과를 증명함으로써 건강증진 목적으로 고려 인삼 사포닌제제의 섭취를 권장할 수 있다.

4. 사포닌의 세계화 전략 정책의 홍보자료로 활용

국제학회 등을 통해 해외에 실험의 내용 및 결과를 발표함으로써 고려인삼 사포닌제제의 우수성을 알리고 구체적이고 과학적인 근거를 제시함으로써 “한식의 세계화”의 신뢰도를 높일 수 있다.

5. 고려인삼제제 사포닌의 건강기능성을 활용한 건강기능제품 개발 활용

효능성분 증폭 시스템 확립, 대량생산시스템 scale-up 적용, 제제화를 위한 조건 확립, 맛 개선을 위한 조건 확립을 통해 고려 인삼 사포닌제제의 건강기능제품 개발 활용에 기여한다.

목 차

제 1장 고려인삼 사포닌 제제의 효능규명 및 임상 프로토콜 개발	4
1. 연구개발의 목적 및 필요성	4
2. 연구개발의 내용 및 범위	4
가. 1차년도	4
나. 2차년도	6
3. 연구성과 및 성과활용 계획	7
4. 연구개발보고서 초록	11
최종보고서	16
제 2장 인삼 사포닌 성분이 비만에 미치는 영향 평가	16
1. 연구의 필요성	16
2. 연구내용 및 연구 수행 방법	17
가. 실험동물	17
1) 실험 1. High-Fat Diet 로 유도되는 비만 Sprague-Dawley(SD) Rats	17
2) 실험 2. 유전자 변형에 의해 유도되는 비만 Zuker fatty Rats	18
나. 체중 (Body Weight) 증가량과 식이 섭취량 (Food intake) 측정	18
다. 식이 효율 (Feeding efficiency ratio: FER) 측정	18
라. 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test)	18
마. 혈청생화학성분 및 호르몬 분석	18
바. 동물 부검	19
사. 간과 지방조직의 형태학적 관찰	19
아. 시상하부 (hypothalamus) NPY, POMC 측정과 장막간 지방조직 (mecentaric fat tissue) PPAR- γ , HO-1 측정	19
3. 연구수행 내용 결과	21
가. 실험1. High-Fat Diet 로 유도된 비만 SD rats	21
1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화	21
2) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과	22
3) 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과	23
4) 지방 무게 (Weight of regional fat tissues) 결과	23
5) 장기 무게 (Weight of organ) 결과	24
6) 지방조직 및 간조직의 histology 및 morphology 변화	25
7) 시상하부에서 NPY, POMC 유전자 발현과 장막간 지방조직에서 PPAR- γ , HO-1 유전자 발현	25
나. 실험 2. 유전자 변형에 의해 유도된 비만 Zuker fatty Rats	28
1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화	28
2) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과	30
3) 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과	30
4) 지방 무게 (Weight of regional fat tissues) 결과	30
5) 장기 무게 (Weight of organ) 결과	31
6) 시상하부에서 NPY, POMC 유전자 발현과 장막간 지방조직에서 PPAR- γ , HO-1 유전자 발현	32
4. 연구수행내용 결론	35

제 3장 인삼 사포닌 성분이 만성 및 급성 알코올 섭취에 미치는 영향 평가	36
1. 연구의 필요성	36
가. 연구의 필요성 및 배경	36
2. 연구 내용	37
가. 실험1. 인삼사포닌이 알코올 유도-당뇨모델에 미치는 영향 평가	37
1) 실험동물과 실험식이	38
2) 체중 (Body Weight) 증가량과 식이 섭취량 (Food intake) 측정	38
3) 식이 효율 (Feeding efficiency ratio: FER) 측정	38
4) 복강 내 당부하검사	38
5) 혈청생화학성분 및 호르몬 분석	39
6) 시료준비	39
7) 면역 형광 현미경 검사	39
8) 인슐린 저항성 및 췌장 베타 세포 기능 측정	39
9) Data Analysis	39
3. 연구수행 내용 결과	39
가. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화	40
나. 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과	40
다. 장기무게의 (weight of organ) 결과	41
라. 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과	43
1) 혈청 독성 및 지질 관련 지표에 미치는 영향	44
2) 혈청 Insulin 및 Leptin에 미치는 영향	44
마. 간 및 췌장조직의 histology 및 morphology 변화	44
1) 간 조직	45
2) 췌장 조직	45
3) Insulin	45
4) Glucagon	45
바. HOMA-IR과 HOMA-β에 미치는 영향	46
4. 연구수행내용 결론	47
가. 실험2. 고려 인삼 사포닌이 숙취에 미치는 임상연구	48
1) 연구 내용 및 개요	48
2) 연구수행 내용 결과	61
(1) 약동학적 특성 평가 결과 및 분석	61
제 2세부	67
1. 효능 성분 분리 정제 기술 확립-원료 표준화	67
가. 표준 원료 선정	67
나. 표준 추출 용매 선정	69
다. 최적 분리 정제 추출법 선정	70
2. 효능 성분 증폭 시스템 확립	71
가. 최적 효능 성분 증폭 시스템 선정 실험	71
3. 최적 효소 선정을 위한 효능 성분 증폭 시스템 확립	72
가. 효소별 지방세포의 Glucos Intake 증가도 측정 실험	72
나. 소별 면역조직화학법에 의한 식욕억제도 및 탄수화물 중독 완화도 측정 실험	73
다. NE 효소 및 CY 효소 처리에 따른 각 진세노사이드의 HPLC 측정 결과치	73
라. NE 효소 5% 처리군에 대한 효소 농도별 지방세포 활성화도 측정 실험 결과 (Western Blot)	77
4. 표준품 제조 공정 확립	79

가. 원료 홍삼 제조	79
나. 추출, 여과, 농축 공정	79
다. 효소 가수분해 표준 공정 확립	80
라. 효소 가수분해 표준 공정 실험	80
마. 건조 공정	81
바. 표준품 제조 공정	82
5. 제제화	82
가. 액상제품	82
나. 분말, 과립 및 캡슐 제품 제제화	85
6. 시제품 제작	87
가. 고려인삼 사포닌 제제의 시제품 제작	87
나. 제품 구성	87
7. 식품(식품첨가물) 품목제조 보고서	89
연구성과 및 성과활용 계획	90

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title : Investigation of neurobiological mechanism of effect between saponin extracted from Korea ginseng and appetite suppression, alcoholism and craving,, and development of clinical protocol.

II. Aims

Panax ginseng C. A. Meyer is well known as herbal medicine and the root of the ginseng has been used in therapy for over 2000 years. The pharmacological effects of ginseng are demonstrated that have various effects not only peripheral organs but also central nervous system (CNS). Ginsenosides are components in ginseng root, exert energy metabolism. The structure of ginsenosides can be changed by fermentation; it is enhanced absorption of ginsenosides.

Obesity and metabolic disease has reached epidemic proportion and concerned serious global public health problems. Furthermore, metabolic abnormality undergoes various influences like genetic and environmental factors. The consumption of high fat diets lead to an increase in visceral fat deposition responsible for many of the metabolic abnormalities in animal and human. Also, alcohol consumption exerts energy metabolism, causes inflammation and cell death. There has also been in vivo, in vitro, and epidemiological research in understanding a significant positive correlation between average dietary fat consumption and alcohol, the incidence of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Therefore we investigate the possibilities for metabolic regulation effects of ginseng saponin as developing safe and effective medicinal agents with dual properties of controlling body weight and regulation of metabolic factors.

III. Material and method

1. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on Innate obesity and High Fat Diet- induced Obesity.

This study used two animal models, genetic obesity model use zucker obesity and their control use zucker lean rat and high fat diet induced model use SD rat. The each animal model divided four groups; SD-normal diet-control (SD-N-C), SD-normal diet-saponin (SD-N-S), SD-high fat diet-control (SD-H-C), SD-high fat diet-saponin (SD-H-S) and zucker lean-normal diet-control (ZL-N-C), zucker-normal diet-saponin (ZL-N-S), zucker fatty- normal diet-control (ZF-N-C), zucker-normal diet-saponin (ZF-N-S). During 8 weeks of the experimental period including 4 weeks of FRGS treatment period, each group was fed high fat diet or normal diet including low fat. Treatment groups were daily injected with FRGS (200mg/kg i.p.) daily and the control groups also received vehicle.

2. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on alcohol related T2DM.

This study used diabetic rat model OLETF and control model LETO. During 10 weeks of the experimental period including 4 weeks of FRGS treatment period, the control group was fed a regular Lieber DeCarli liquid diet and the alcohol treated group was fed ethanol-containing

Lieber DeCarli liquid diet. Treatment groups were daily injected with FRGS (200mg/kg i.p.) daily and the control groups also received vehicle. The animal model divided six groups: LETO-regular diet-control (L-C), LETO-alcohol diet-control (L-A-C), LETO- alcohol diet-saponin (L-A-S), OLETF-regular diet-control (O-C), OLETF-alcohol diet-control (O-A-C), OLETF- alcohol diet-saponin (O-A-S).

3. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on Hangover.

The study included 7 normal adult male subjects having no systemic or mental diseases. This study was a cross-over design. All subjects were given a crude saponin or placebo, after 30 minutes intake alcohol (1g/kg, 20% ethanol). We evaluated the changes of cognitive functions before and after drinking and experimentally-induced hangover state with drawn blood at a time. The blood is analyzed ethanol pharmacokinetics.

IV. Result

1. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on Innate obesity and High Fat Diet- induced Obesity.

Fermented red ginseng saponin (FRGS) was decreased body weight gain, food efficiency ratio, adipose tissue weight, total cholesterol and lipid drop of liver, regulation NPY and POMC gene expression in hypothalamus and PPAR- γ , HO-1 gene expression in mesenteric fat.

2. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on alcohol related T2DM.

Chronic administration of FRGS was decreased body weight gain and food efficiency ratio. Although alcohol intake was decreased fasting glucose, was increased post prandial glucose in OLETF. Alcohol consumption was increased serum ATL and serum insulin, but FRGS was reduced in OLETF rats. The lipid drops of liver and pancreas decreased by treatment of FRGS, HOMA-IR and HOMA- β ameliorated in O-A-S group.

3. The effect of Fermented Saponins of Korean Red Ginseng on Hangover.

FRGS is trend to improve the cognitive function and experimentally-induced hangover state and reduce blood ethanol concentration.

CONTENTS

Chapter 1. Investigation of effect of saponin extracted from Korea ginseng and development of clinical protocol	4
1. Background and aims of the study	4
2. Study design	4
3. Outcome and plan for utilization of the study	7
4. Abstract	14
Final report	16
Chapter 2. Evaluation of effect between saponin extracted from Korea ginseng and obesity	16
1. Aims of the study	16
2. Study design	17
3. Results of the study	21
4. Discussion	35
Chapter 3. Evaluation of effect between saponin extracted from Korea ginseng and chronic and acute alcohol intake	36
1. Aims of the study	36
2. Study design	37
3. Results of the study	39
4. Discussion	47
Part 2	67
1. Establishment of purification technique and material standardization	67
2. Establishment of system for amplificated effect ingredient	71
3. Establishment of system for amplificated enzymatic effect ingredient	72
4. Establishment of process for standard product	79
5. Medicine manufacture	82
6. Making trial manufactured goods	87
7. Report of manufacture of articles	89
Outcome and plan for utilization of the study	90

4. 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 고려인삼 사포닌 제제가 식욕억제, 알코올 중독, 갈망 완화에 미치는 작용기전 규명 및 임상 프로토콜 개발		
	(영문) Investigation of neurobiological mechanism of effect between saponin extracted from Korea ginseng and appetite suppression, alcoholism and craving., and development of clinical protocol.		
연 구 기 관	가톨릭대학교	연 책 임 구 자	(소속) 가톨릭대학교
참 여 기 관	(주)바이탈링크		(성명) 김대진
연 구 비	계	삼억오천만 원	총 연 구 기 간 2011. 07.01~2013. 06.30(24 개월)
참 여 연 구 원	10명 (연구책임자: 1명, 책임연구원: 4명, 연구보조원 5 명)		

○ 연구개발 목표 및 내용

연구목표

- ✓ 동물모델을 통한 인삼 사포닌 유효성분 Ginsenoside 효능과 관련한 작용기전 규명
- ✓ 인삼의 사포닌 성분 표준화
- ✓ Pre - 임상 프로토콜 개발 및 임상 적용
- ✓ 고려 인삼의 세계화
- ✓ 알코올 중독 모델을 사용하여 인삼 사포닌이 알코올 중독에 미치는 신경 생물학적 영향 탐색.
- ✓ 인체 임상 연구를 통해 급성 알코올 섭취 후 숙취 해소에 주는 영향을 살펴봄
- ✓ 인삼의 사포닌 성분 표준화 및 증폭 시스템 확립.
- ✓ 천연물 유래 중독 완화 제품의 실용화.

연구내용

1차년도

- 일반 Rat model(Sprague-Dawley Rat)에서 고지방 식이로 비만을 유도한 경우와 유전자 변형에 의해 비만이 쉽게 유도되는 Rat model(Zucker Rat)에서 고지방 식이를 준 후 saponin의 섭취가 비만 관련 factor에 주는 영향을 비교함.
- 알코올-유도 SD Rat model에서 사포닌의 섭취가 숙취해소능 향상과 알코올로 인한 기관 손상 완화, 뇌-보상기전 관련 factor의 변화에 미치는 영향을 살펴봄.
- 식욕억제/중독 완화 기능을 갖는 고려인삼 사포닌제제(백삼,홍삼)표준화 및 균일화를 위한 효능 성분 분리정제 기술 확립
- 식욕억제/중독 완화 기능을 갖는 고려인삼 사포닌제제(백삼,홍삼)의 효능성분 증폭 시스템 확립
- 연구결과를 활용한 임상 프로토콜 개발

2차년도

- 당뇨 유발 모델인 OLETF와 대조군인 LETO를 사용해 인삼 사포닌이 알코올 중독 및 대사 장애에 미치는 영향을 살펴봄.
- 치료적 기능으로 만성 알코올 중독의 뇌기능 및 다발적 장기 기능 손상 예방 작용기전을 탐색함.
- 만성 알코올 중독에서 중독 완화 및 회복 작용기전을 탐색함.

○ 연구결과

1) 1차년도 (2011-2012)

- 식욕억제 기능을 갖는 고려인삼 사포닌제제(백삼,홍삼)표준화 및 균일화를 위한 효능 성분 분리정제 기술 확립
- 비만 유도 모델에서 사포닌이 미치는 영향 탐색
- 식욕억제 기능을 갖는 고려인삼 사포닌제제(백삼,홍삼)의 효능성분 증폭 시스템 확립
- Pre-임상프로토콜 작성

2) 2차년도 (2012-2013)

- 알코올 중독 모델에서 사포닌이 손상된 기관의 회복 및 중독완화에 주는 영향 분석
- 임상 프로토콜 성립 및 알코올과 사포닌의 영향 평가
- 표준화 및 균일화를 위한 효능 성분 분리정제 기술 확립
- 효능성분 증폭 시스템 확립
- 표준품 제조 공정 확립
- 대량생산시스템scale-up적용
- 제제화를 위한 조건 확립
- 맛 개선을 위한 조건 확립

○ 연구성과 및 성과활용 계획

1) 국제학술대회 포스터 발표

- 2012 Pacific Rim College of Psychiatry
October 25 (Thu) - 27 (Sat), 2012
the Sheraton Grande Walkerhill, Seoul, Korea
“Enzymatic treated Saponin of Korea red ginseng suppresses Appetite in Dietary and Genetic-induced Obesity Rats.”
- Keystone Symposia Neurogenesis (J7)
February 3 - February 8, 2013
Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico
“The Effect of Chronic Ethanol Intake on Type 2 Diabetes Mellitus - The Effect of BDNF on Alcohol and Diabetes-”

2) SCI journal 에 submission 예정 - e.g. Diabetes, Obesity 등

3) 고려 인삼제제 사포닌 섭취의 권장 홍보자료로 활용

현재 전 세계적으로 건강상 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 비만과 당뇨, 알코올 중독 환자에게서 사포닌의 섭취효과를 증명함으로써 건강증진 목적으로 고려 인삼제제 사포닌의 섭취를 권장할 수 있다.

4) 사포닌의 세계화 전략 정책의 홍보자료로 활용

국제학회 등을 통해 해외에 실험의 내용 및 결과를 발표함으로써 고려인삼제제 사포닌의 우수성을 알리고 구체적이고 과학적인 근거를 제시함으로써 “한식의 세계화”의 신뢰도를 높일 수 있다.

5) 고려인삼제제 사포닌의 건강기능성을 활용한 건강기능제품 개발 활용

효능성분 증폭 시스템 확립, 대량생산시스템scale-up적용, 제제화를 위한 조건 확립, 맛 개선을 위한 조건 확립을 통해 고려인삼사포닌제제의 건강기능제품 개발 활용에 기여한다.

최종 보고서

제 2장 인삼 사포닌 성분이 비만에 미치는 영향 평가

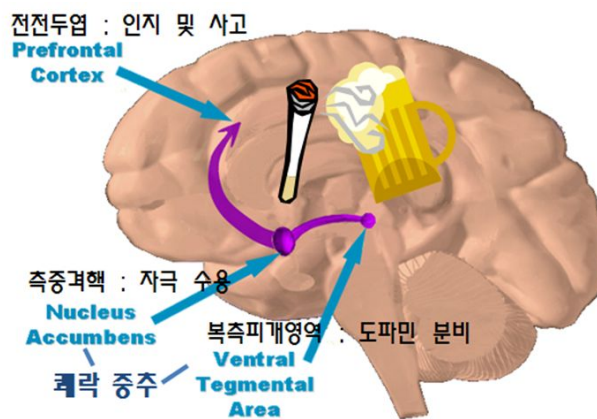
1. 연구의 필요성

● 세계적으로 국내 인삼의 효능에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 이러한 인삼의 여러 성분 중에서 약리효능을 나타내는 가장 중요한 성분은 배당체 즉 인삼 사포닌으로 알려져 있다. 비누라는 뜻의 희랍어에서 유래된 ‘사포닌(Sapona)’은 비누처럼 미세한 거품을 일으켜 인체에서 혈관을 비롯한 인체 각 기관을 비누와 같이 씻어주는 작용을 하는 것으로 이해된다. 이는 진세노사이드(Ginsenoside)라 불리는 화합물의 일종으로써 수삼을 홍삼으로 만드는 과정에서 성분의 화학적인 변화를 일으켜 인체에 더 효율적인 사포닌이 생성된다.

사포닌의 종류는 R₀, R_{b1·2}, R_c, R_d, R_e, R_f, R_{g1·2·3}, R_{h1·2} 등 모두 37가지 성분으로 나뉘는데, 인삼에는 24종의 사포닌이 있는 반면 홍삼에는 32종의 사포닌이 들어 있다. 이 중 사포닌의 주요 성분인 R_{b1}은 중추신경 억제, 해열 진통, 간 기능 보호에 효과적이며 R_{g1}은 학습 기능 개선과 항피로 작용을 한다. 그리고 R_{b2}는 암세포 및 종양 증식 억제 기능이 있는 것으로 밝혀졌다.

● 많은 연구에 따르면, 인삼 사포닌의 활성 요소인 Ginsenosides가 gamma - aminobutyric acid (GABA), Glutamate, DA, Noradrenaline, Serotonin 등의 작용과 관련하여 중추신경계(CNS)에 다양한 영향을 미치고 있음이 보고되고 있다.

따라서 이와 관련 Ginsenosides의 Dopaminergic system과 연관된 인체의 갈망(craving)을 조절하는 역할에 관한 추가 연구의 필요성이 지속적으로 제기되고 있다.



이러한 갈망을 통해 특정 대상에 대한 긍정적 감정의 도취감이 어떤 단서를 매개로 뇌의 양성강화시스템을 자극하여 행동의 반복을 유발하게 되고, dopamine 신경전달물질에 의해 이러한 뇌 보상회로(reward system)이 자극됨에 따라 쾌감을 유발할 수 있다. 보상회로에서 dopamine의 증가를 유발하는 특정행동에 대한 갈망이 강화되는 경우 이는 습관성 행동을 유발하는 물질이나 행동에 의한 중독(addiction)으로 발전하기도 하며, 이는 아편과 같은 마약성 물질 이외에도, 니코틴, 알코올, 심지어는 과도한 음식 섭취에 이르기 까지 일상의 많은 경우에서 관여하고 있다.

이에 인삼사포닌의 각각의 활성효능에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있어, 비만억제 및 치료용 파낙

사디올계 홍삼 사포닌이 특히 공개된 바 있으며 인삼추출물질 또는 인삼 사포닌이 메트암페타민, 코카인, 모르핀과 같은 중독성 약물에 의한 행동적 변화를 억제한다고 보고된 바 있다. 또한 니코틴 중독 치료 및 금연 유도용 홍삼 사포닌도 특히 공개된 바 있는 만큼 인삼의 특정 성분이 뇌신경생물학적 기전에 작용하여 식욕을 조절하고 약물, 알코올, 니코틴 등의 중독을 억제할 가능성은 매우 높다할 수 있다.

● 한편, 통계청이 발표한 '한국의 사회동향 2010'에 따르면 2008년 우리나라의 성인 비만율은 31.0%로 10년 전인 1998년의 26.0%보다 5%포인트 증가했다. 이는 2008년 기준 경제협력개발기구(OECD) 국가 평균 비만율인 48.9%보다는 낮은 수치이지만 영양상태 및 식습관 변화와 관련하여 새로운 건강문제로 비만이 증가하고 있는 추세다. 또한 경제협력개발기구(OECD)의 발표에 따르면 우리나라의 비만율은 앞으로도 지속적으로 상승할 것이라고 경고했다. OECD의 비만 보고서에 따르면 한국의 성인 과체중 비율이 향후 10년 내에 5% 정도 증가할 것으로 전망된다고 지적했다. 이와 같이 비만과 관련하여 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등 여러 질병의 위험성 뿐 아니라, 사회심리적 요인에 의해서도 비만 치료에 대한 관심이 커지고 있으며, 이러한 비만을 관리하기 위한 식이요법과 운동요법 이외에도 지속적으로 식욕을 저하시킬 수 있는 식품이나 약물에 대한 필요성이 지속적으로 대두되고 있다.

● 또한 '2009년 국민건강영양조사'에 따르면 지난해 19세 이상 성19세 이상 성인남녀의 월간음주율도 지난해 59.4%로 나타났다. 청소년 및 여성의 음주율과 관련하여 더욱 많은 문제가 발생하고 있으며, 국민 1인당 알코올 소비량은 OECD 국가 중 2위로서 음주로 인한 조기사망 뿐만 아니라 생산성 감소, 각종 질환 등으로 인한 사회적 손실 비용도 매우 크다. 특히 알코올은 지방 친화적이어서 지방 비율이 높고 수분의 비율이 낮은 여성의 경우 남성과 비교하여 같은 음주량 대비 체내 흡수 알코올 농도가 높으며, 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase (ADH)/acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)가 부족하여 같은 양의 술을 마시더라도 상대적으로 더 많은 양의 알코올이 혈중에 남아 치명적이라 할 수 있다. 이러한 여성의 연령별 고위험음주율을 살펴보면 20-40대 가임기 여성의 비율이 가장 높으며, 임신 중의 음주는 임신부의 건강을 위협할 뿐 아니라 태아에게도 영향을 미쳐 태아의 정신적, 신체적 발달장애, 두개골과 안면의 기형, 성장장애 및 정신지체 등의 태아알코올증후군(Fetal Alcohol Syndrome, FAS) 발생률이 증가하여 사회적 문제를 초래하게 된다.

● 따라서 본 연구자는 인삼 사포닌의 활성화에 따른 효능과 관련하여 식욕억제 및 중독완화의 기능으로 알코올 중독에서 나타나는 뇌기능 및 다발적 장기 기능 손상 예방 및 갈망의 억제 기능을 확인하고 임신부와 관련된 갈망 조절에 따른 태아알코올증후군의 예방 효과 등 뇌신경생물학적 작용기전을 체계적으로 규명하고자 한다. 이를 위하여 적합한 동물실험 모델을 제시하고 타당한 효과를 입증하여, 동물실험 결과를 기반으로 인삼 사포닌의 효능을 확인하기 위한 인체 적용 임상 프로토콜 및 치료 모형을 제안하고자 한다.

2. 연구 내용

1) 연구 수행 방법

가) 실험동물

실험 1. High-Fat Diet 로 유도되는 비만 Sprague-Dawley(SD) Rats

실험동물은 생후 5주령의 정상 수컷 Sprague-Dawley Rat를 각 군당 6마리씩 4군으로 사육에 들어가기 전 몸무게를 측정하고 군별 몸무게의 균형이 맞도록 적절히 배분하여 2주간 검역과정을 거친 후 8주간

사육하였다. 실험군의 분류는 Normal Diet(N) + Control(C) rats(S-N-C), Normal Diet(N) + Saponin(S) rats(S-N-S), High-Fat Diet(H) + Control(C) rats(S-H-C), High-Fat Diet(H) + Saponin(S) rats(S-H-S)으로 구분하였다. 4주간 Normal or High-Fat Diet를 주어 High-Fat Diet군의 비만을 유도하고 비만이 유도된 쥐에서 Saponin의 효능을 보기 위해 Saponin군에게 Normal or High-Fat Diet 급여와 Saponin(100mg/kg)을 4주간 처치하였다. Normal Diet와 High-Fat Diet는 Dyets Inc.(Bethlehem, PA)에서 구입하며 총 8주 동안 급여하였다.

실험 2. 유전자 변형에 의해 유도되는 비만 Zucker fatty Rats

생후 5주령의 정상 수컷 Zucker Rat (HsdHlr:Zucker-lean)과 비만 Zucker Rat(HsdHlr:Zucker-fa, fa/fa)을 각 군당 6마리씩 4군으로 배분하여 2주간 검역과정을 거친 후 12주간 사육하였다. 실험군의 분류는 Normal Diet(N) + Control(C) Zucker lean rats(ZL-N-C), Normal Diet(N) + Saponin(S) Zucker lean rats(ZL-N-S), Normal Diet(N)+ Control(C) Zucker fatty rats(ZF-N-C), Normal Diet(N)+Saponin(S) Zucker fatty rats(ZF-N-S)으로 구분하였다. 4주간 Normal Diet로 비만이 유도된 쥐에서 Saponin의 효능을 보기 위해 Saponin군에게 Normal Diet 급여와 Saponin (100mg/kg)을 8주간 처치하였다. 구입당시 정상 Zucker Rat의 체중은 평균 100g, 비만 Zucker Rat 은 평균 125g이었는데 비만 Zucker Rat 이 생후 5주 이후부터 10주령에 정상과 비만 Zucker Rat 의 체중차이가 100g 이상으로 관찰되었다.

나) 체중 (Body Weight) 증가량과 식이 섭취량 (Food intake) 측정

투여약물 (saponin 100)이 체중증가량에는 어떤 변화를 주는지 알아보기 위하여 전자저울(CAS, Korea)을 이용하여 실험시작 전과 실험 기간 동안 일정시간에 주 3회 측정된 체중을 근거로 체중증가량을 계산하였고, 급여한 사료량에서 섭취하고 남은 양을 뺀 값을 식이섭취량으로 사용하였다.

다) 식이 효율 (Feeding efficiency ratio: FER) 측정

투여약물 (saponin 100)이 식욕과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 체중과 사료섭취량은 매주 3회 측정하여 1일 체중증가량을 사료섭취량으로 나눔으로써 식이효율을 산출하였다.

식이효율 (Feeding efficiency ratio : FER %) = 체중증가량 (g) / 사료섭취량 (g) x 100

라) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test)

복강 당부하 검사는 실험종료 3일전에 12시간 절식시킨 다음 꼬리정맥에서 채혈하여 공복시 혈당 수준을 측정하여 초기 혈당으로 한 후 50% 포도당 용액 (중의 50% 포도당 주사액, 중외제약)을 총량 2 g/kg양으로 복강내로 투여하여 측정하였다. 복강내 당부하전, 당 부하 후 30분, 60분, 90분, 120분째 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당 측정기(Accu-check, Roche, Germany)로 혈당을 측정하여 당부하능을 확인하였다.

마) 혈청생화학성분 및 호르몬 분석

동물을 부검 전일 약 12시간 동안 절식시킨 후, 마취하여 심장으로 부터 채혈하고, 원심분리 (800g X 20min)하여 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈장은 -20℃에 보관하고 혈액생화학 분석기 (Selectra 2,

Vitalab, Netherlands)를 사용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol), non-HDL-cholesterol, blood urea nitrogen (BUN), creatinine 의 혈중 농도를 각각 측정하였다.

바) 동물 부검

체혈한 뒤에 부검하여 지방조직, 간장, 췌장, 비장, 심장과 신장의 무게를 측정하고, 즉시 액체 질소에 냉동하여 -70°C에 분석까지 보관하였다.

사) 간과 지방조직의 형태학적 관찰

적출된 간 및 지방조직을 4% formaldehyde 용액에 24시간 고정한 후 증류수로 수세한 다음 70-100% alcohol로 단계적으로 1시간씩 탈수 시켰고 Xylen에서의 투명과정 후 paraffin 과정을 거쳐 포매(embedding) 하였으며, 약 4 μ m의 두께로 박절편기를 사용하여 자른 후 hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색한 다음 광학 현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

아) 시상하부 (hypothalamus) NPY, POMC 측정과 장막간 지방조직 (meenteric fat tissue) PPAR- γ , HO-1 측정

(1) 총 RNA 추출

Total RNA 는 1ml 의 trizol reagent(Sigma-Aldrich, Inc., USA)를 처리한 각 조직을 분쇄한 다음 chloroform 200 μ l을 첨가하여 vortex하고 상온에서 10분간 유지시킨 후 원심분리기 (centrifuge 5415 R, eppendorf, Germany)를 이용하여 분당 13,000rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층 액에 isopropanol 500 μ l를 첨가하여 13,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 pellet 만 남기고 모두 제거하였다. 남은 RNA pellet은 70% 알코올에 세척 한 다음 pellet을 상온에서 완전히 건조시킨 후 50-100 μ l의 DEPC(diethylpyrocarbonate)가 처리된 3차 증류수를 첨가하여 UV spectrophotometer(UV-mini240, Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 정량하였다.

(2) cDNA 합성

cDNA 합성은 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 이용하였다. 합성을 위해 각 시료에서 추출한 RNA 1 μ g에 5 \times iScript reaction mix 4 μ l, iScript reverse transcriptase 1 μ l을 첨가한 후 총 20 μ l가 되도록 nuclease-free water를 첨가하였다. 이어 ASTEC PCR Thermal Cycler (PC320; ASTEC, Japan)를 이용하여 25°C에서 5분, 42°C에서 30분, 85°C에서 5분 동안 연속적으로 배양하였다.

3) Real-Time PCR

Real-Time PCR은 제작된 cDNA를 template로 하여 Table 1에서 제시한 neuropeptide Y (NPY),

proopiomelanocortin(POMC), peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR- γ), heme oxygenase-1(HO-1) 및 Cyclophilin과 GAPDH의 특이적 primer를 각각 반응효소시약 2 \times SYBR Green Supermix(Bio-Rad, USA)와 혼합하여 CFX96 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad,USA)에서 다음과 같은 방법으로 증폭시켰다. 각각의 PCR 반응액은 멸균된 3차 증류수와 조건에 따라 희석한 templatecDNA 1 μ l, 2 \times SYBR Green Supermix 10 μ l, 10pmol의 forward와 reverse primer 각각 1 μ l에 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l가 되도록 하였다. NPY, POMC, PPAR- γ , HO-1, Cyclophilin, GAPDH의 mRNA증폭을 위한 PCR 조건은 <Fig.5>에 제시된 것처럼 모두 동일하게 하여 다음과 같은 조건에서 진행하였다. 사전 배양은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 유지시킨 후, 변성단계는 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 결합단계는 53 $^{\circ}$ C에서 30초, 연장단계는 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 하여 총 40 cycle을 수행하였다. 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대한 melting curve분석을 실시하였다. PCR 반응 후 NPY, POMC의mRNA 발현 정도는 housekeeping 유전자인 Cyclophilin으로, PPAR- γ , HO-1의mRNA 발현 정도는 housekeeping 유전자인 GAPDH에 대한 비율로 정량화 하였다.

Table 1. Real Time-PCR에 사용 된 PCR primers

Gene	Primer sequences	
GAPDH	Forward	5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'
	Reaverse	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'
PPAR-γ	Forward	5'-CTCCTGTTGACCCAGAGCAT-3'
	Reaverse	5'-CAACCATTGGGTCAGCTCTT-3'
HO-1	Forward	5'-CACGCATATACCCGCTACCT-3'
	Reaverse	5'-GAAGGCGGTCTTAGCCTCTT-3'
Cyclophilin	Forward	5'-ATTCATGTGCCAGGGTGGTGAC-3'
	Reaverse	5'-TCAGTCTTGGCAGTGCAGAT-3'
NPY	Forward	5'-CCTTGCGACACTACATCAA-3'
	Reaverse	5'-GGGGCATTCTTCTGTGCTTT-3'
POMC	Forward	5'-CGCCCGTGTTCCTCA-3'
	Reaverse	5'-TGACCCATGACGTACTION-3'

(차) 통계처리

본 실험의 결과는 SPSS 통계프로그램 (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준오차를 나타내었다. 실험군 간의 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 t-test, one-way ANOVA 를 시행한 후 Tukey test를 이용하여 분석하였다.

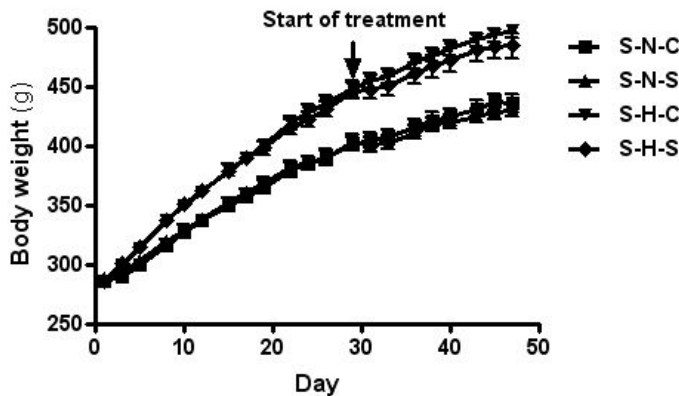
3. 연구수행 내용 결과

가) 실험1. High-Fat Diet 로 유도된 비만 SD rats

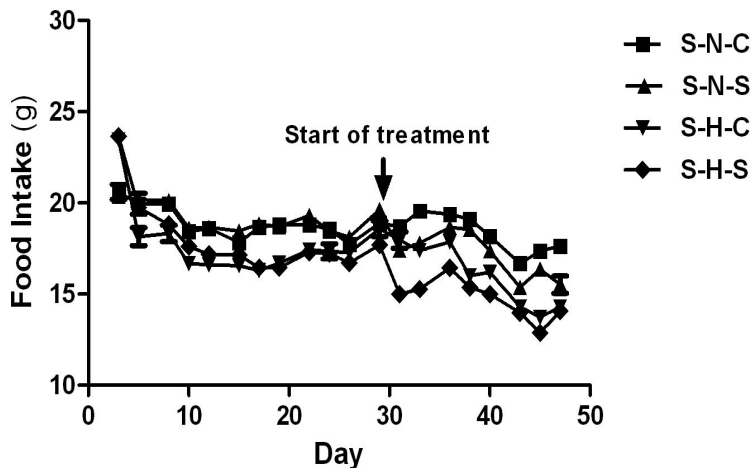
1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

실험식이 급여 후 8주 동안 측정된 체중증가량, 식이 섭취량 및 식이효율의 결과는 Fig. 1와 Table 2에 나타내었다. 4주간 High-Fat Diet를 주어 비만이 유도된 고지방 식이 (High-Fat Diet)군이 Normal Diet를 준 정상 식이(Normal Diet)군에 비해 유의적으로 높은 증가를 보였으며 실험종료 시점인 8주째는 High-Fat Diet(H) + Control(C) rats(S-H-C)이 Normal Diet(N) + Control(C) rats(S-N-C)에 비하여 유의하게 증가하였다 ($p < 0.001$). 4주동안 crude saponin (100mg/kg)을 처리한 Normal Diet(N) + Saponin(S) rats(S-N-S)은 Normal Diet(N) + Control(C) rats(S-N-C)에 비해 감소하는 경향을 보였고, High-Fat Diet(H) + Saponin(S) rats(S-H-S)의 경우 High-Fat Diet(H) + Control(C) rats(S-H-C)에 비해 적은 체중 증가량을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 1A). 식이섭취량은 S-N-S이 S-N-C에 비해 유의하게 감소하였고($p < 0.05$), S-H-S이 S-H-C에 비해 유의적인 변화가 없었다(Fig. 1B). 투여한 Saponin이 식욕과 관련이 있는지를 식이 효율로 조사한 결과 (Fig. 1C), S-H-C이 체중증가와 함께 사료효율이 상승하였으며, S-N-S는 S-N-C에 비해 S-H-S는 S-H-C에 비해 낮은 것으로 나타났으며 사료를 섭취하는 양이 많음에 비해 체중의 증가가 감소하여 식이 효율의 수치가 낮아지면 비만 조절 효과가 있다고 할 수 있다.

A



B



C

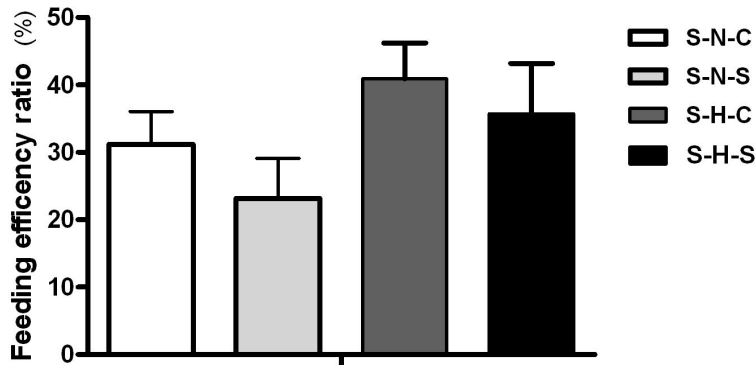


Figure 1. 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

Table 2. 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

	SD + N-diet	SD + N-diet-CS	SD + HF-diet	SD+ HF-diet-CS
Body weight (g)	435.9±7.2	430.1±5.3	496.6±5.6***	484.0±10.6
Total food intake (g)	17.6±0.04	15.5±0.58*	14.3±0.1	14.07±0.08
Food efficiency ratio (%)	31.2±4.8	23.1±6.0	40.9±5.3	35.7±7.5

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. ***P<0.001 vs. SD+N diet.

2) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과

Saponin 투여로 인한 포도당 이용능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 복강 내 당부하 검사는 당부하 후 최고 포도당 농도가 300 mg/dl 이상이고 2시간째 포도당 농도가 200 mg/dl 이상인 경우에 당뇨병으로 진단한다. 본 실험에서는 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

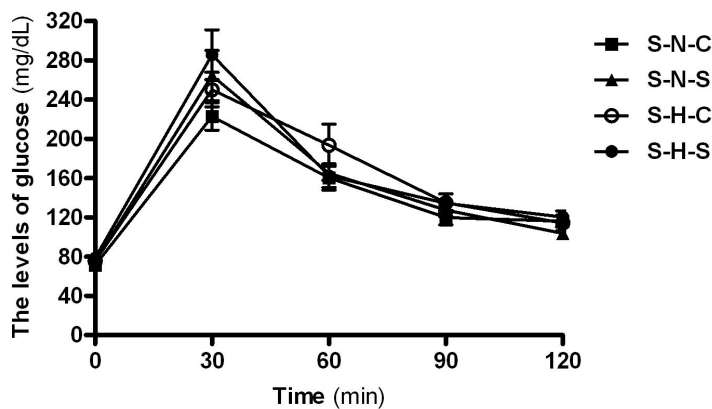


Figure 2. 4 group에서 복강 내 당부하검사 비교 (S-N-C, S-N-S, S-H-C and S-H-S)

3) 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과

약물의 비만 조절 효과가 약리작용에 의한 경우도 있지만 이의 독성으로도 생길 수 있으므로 약물의 nonspecific toxic effects를 가지는지를 알아보기 위해 혈중 간장 독성지표인 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT), 신장독성지표인 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine을 함께 측정하였다. 또한 체중조절과 관련된 지표인 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 농도를 측정하였다 (Table 3). 혈청내 AST, ALT의 농도는 S-H-C이 S-N-C에 비해 증가하는 경향을 보여 고지방 식이 섭취가 간에 대한 부담요인으로 작용하는 것으로 확인되었으며, S-H-S이 S-H-C에 비해 감소하는 경향을 보였다. 혈청내 creatinine의 농도는 S-N-S과 S-H-S 모두 각 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. 혈청 내 총 콜레스테롤은 S-N-C에 비하여 S-H-C에서 증가하는 경향을 보였고, S-H-S이 S-H-C에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$). S-H-C에서 BUN의 농도가 감소하고, HDL-cholesterol의 농도가 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$) LDL-cholesterol 농도가 유의하게 증가하여($p < 0.05$) 고지방식이 섭취로 인해 지질대사가 크게 영향을 받았을 것으로 여겨진다. 반면, S-N-S이 S-N-C에 비해 HDL-cholesterol 농도는 증가하는 경향을 보였고, S-H-S이 S-H-C에 비해 LDL-cholesterol의 농도가 감소하는 경향을 보여 Saponin 투여로 인해 지질대사에 관련된 지표가 개선되는 경향이 관찰되었다.

Table 3. 실험군의 임상생화학적 혈청

	SD + N-diet	SD + N-diet-CS	SD + HF-diet	SD+ HF-diet-CS
AST (IU/L)	61.0±3.9	68.5±9.1	76.2±22.9	60.2±14.1
ALT (IU/L)	21.4±2.1	23.8±1.9	27.4±7.8	24.6±4.2
BUN (mg/dl)	17.4±0.8	18.0±1.2	14.8±0.7	15.4±0.5
Creatinine (mg/dl)	0.3±0.02	0.2±0.08	0.3±0.1	0.3±0.01
Cholesterol (mg/dl)	65.0±2.5	67.8±4.5	73.2±8.2	68.6±7.1#
HDL (mg/dl)	39.0±0.7	35.2±1.7	23.0±0.9**	23.3±1.1
LDL (mg/dl)	5.0±0.5	5.3±0.5	7.4±0.8*	7.0±0.3

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. SD+N diet, # $P < 0.05$ vs. SD+HF diet.

4) 지방 무게 (Weight of regional fat tissues) 결과

체지방, 내장지방의 지표 (visceral tissue)인 부고환 지방 조직 (Epididymal fat tissue), 신장 지방조직 (prerenal fat tissue), 장막간 지방조직 (mesenteric fat tissue)의 무게를 측정하였다 (Table 4). 백색 지방 (White adipose tissues, WAT) 조직에 해당하는 부고환 지방, 신장지방, 장간막 지방은 S-H-C이 S-N-C에 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였다($p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.001$). 부고환 지방은 S-H-S이 S-H-C에 비해 감소하는 경향을 보였고, 신장지방은 S-N-S이 S-N-C에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 장막간 지방은 S-H-S이 S-H-C에 비해 감소하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 또한, 갈색 지방 (brown adipose tissue, BAT)은 세포내 지방산을 산화시켜 열을 방출하여 체온조절 및 에너지 균형 조절자 역할을 함으로써 체지방 축적되는 것을 억제하는 것으로 보고되었는데 이를 알아보기 위해 BAT의 변화를 살펴본 결과 (Fig. 3), Saponin 투여로 인한 유의적인 증량이 감소되는 결과는 나타나지 않았다.

Table 4. 실험군의 지방 무게 (g/kg B.W.)

	SD + N-diet	SD + N-diet-CS	SD + HF-diet	SD+ HF-diet-CS
Epididymal fat	1.00±0.1	0.91±0.1	2.38±0.1***	1.61±0.1
Perirenal fat	3.16±0.2	2.58±0.3	3.84±0.3*	3.65±0.2
Mesenteric fat	0.79±0.1	0.71±0.2	1.91±0.2***	1.52±0.1

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다.. *P<0.05, ***P<0.001vs. SD+N diet.

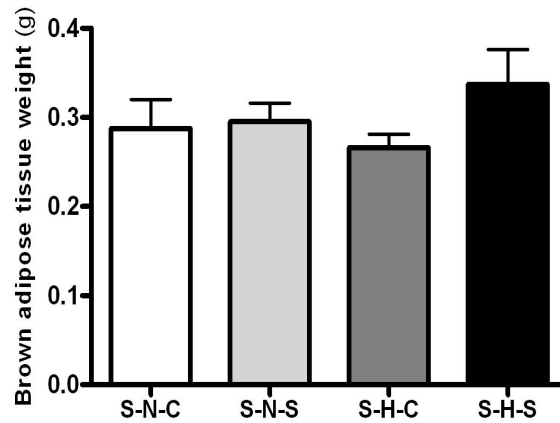


Figure 3. 실험군의 갈색 지방 무게

5) 장기 무게 (Weight of organ) 결과

8주간의 고지방 식이 섭취로 인해 S-H-C이 S-N-C에 비해 간의 중량이 유의하게 증가하였고(p<0.01), 신장, 비장, 췌장, 신장의 중량에는 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. 실험군의 간, 췌장, 비장, 신장, 심장의 무게 (g)

	SD + N-diet	SD + N-diet-CS	SD + HF-diet	SD+ HF-diet-CS
Liver (g)	4.02±0.2	4.10±0.1	4.42±0.2**	4.03±0.1
Pancreas (g)	0.43±0.3	0.45±0.1	0.40±0.0	0.41±0.1
Spleen (g)	0.16±0.0	0.17±0.0	0.14±0.0	0.20±0.0
Kidney (g)	0.63±0.0	0.63±0.1	0.68±0.0	0.63±0.0
Heart (g)	0.30±0.0	0.30±0.0	0.27±0.0	0.24±0.0

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. **P<0.01vs. SD+N diet.

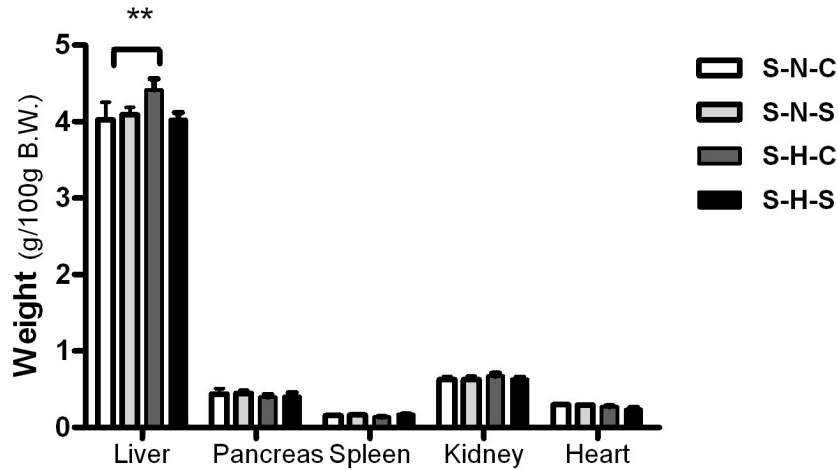


Figure 4. 실험군의 간, 췌장, 비장, 신장, 심장의 무게

6) 지방조직 및 간조직의 histology 및 morphology 변화 (Histological analysis and morphometry , size of adipocyte and hepatic lipid accumulation)

부고환 지방조직과 간조직에서 hematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 지방세포의 조직학적, 형태학적 변화와 간조직의 지방침착을 관찰하였다(Fig. 5).

부고환 지방 조직의 경우, S-H-C이 S-N-C에 비해 지방세포의 크기가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, S-N-S에서 감소하여 Saponin이 유도한 adipose tissue 무게의 감소는 주로 adipocyte size의 감소로 간주된다.

간 조직의 경우, High-Fat Diet(H) 섭취에 따른 간세포 내 지방축적이 뚜렷이 나타나 비정상적인 형태를 나타내었다. 이에 반하여 S-N-S과 S-H-S에서 지방공포 수의 크기가 감소하여 지방침착이 억제되었다.

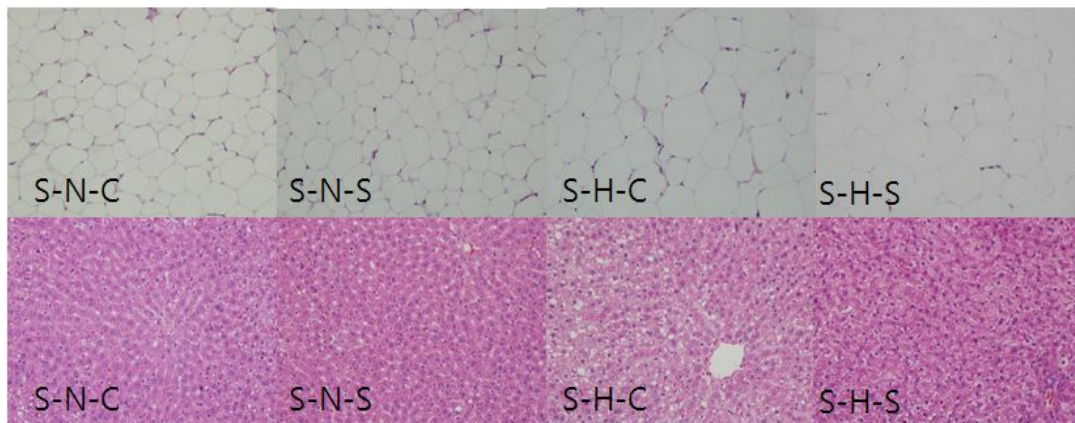


Figure 4. 실험군의 부고환 지방조직과 간조직의 Histology 변화. x200, A: epididymal adipose tissue, B: liver tissue

7) 시상하부에서 NPY, POMC 유전자 발현과 장막간 지방조직에서 PPAR-γ, HO-1 유전자 발현

실험 8주후에 식욕촉진 펩타이드인 NPY의 mRNA 수치는 S-H-C이 4.07 ± 0.58 로 S-N-C의 1.00 ± 2.75 에 비해 크게 증가하였고, 식욕 억제 신경펩타이드인 POMC의 mRNA 수치는 S-H-C이 0.36 ± 0.45 로 S-N-C

의 1.00 ± 0.77 에 비해 크게 감소하였다. S-N-S의 NPY mRNA 수치가 2.97 ± 0.33 로 S-N-C에 비해 증가하였고, S-H-S의 수치는 1.56 ± 1.80 로 S-H-C에 비해 감소하였다. 신경펩타이드인 POMC의 mRNA 수치는 S-H-S가 0.64 ± 0.51 로 S-H-C에 비해 증가하였다(Fig. 6, 7, 8, Table 5).

또한, 체지방 합성을 조절하는 지방 분화인자인 PPAR- γ 의 mRNA 수치는 S-H-C이 1.87 ± 2.25 로 S-N-C의 1.00 ± 1.52 에 비해 증가하였고 ROS 증가에 의한 산화적 스트레스로부터 지방세포를 보호하는 항비만의 표적유전자인 HO-1의 mRNA 수치는 S-H-C이 0.71 ± 1.66 로 S-N-C의 1.00 ± 1.04 에 비해 감소하였다. S-N-S의 PPAR- γ mRNA 수치가 1.01 ± 0.24 , S-H-S의 수치는 0.73 ± 0.99 로 S-H-C이 1.87 ± 2.25 에 비해 감소하였고, HO-1의 mRNA 수치는 각 군간의 차이를 보이지 않았다. (Fig. 9, 10, Table 6).

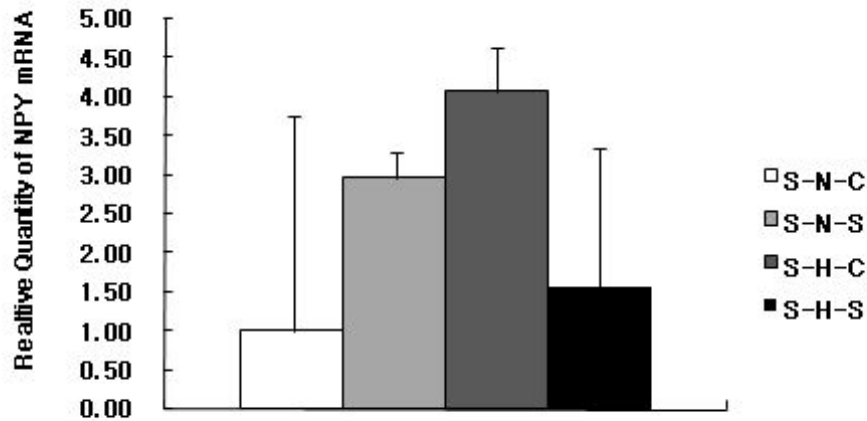


Figure 6. 시상하부에서 사포닌에 의한 NPY target 유전자 발현의 변화.

RNA는 시상하부에서 추출되었고, NPY target 유전자와 Cyclophilin의 mRNA 수치는 측정되었다. Data는 reference와 같이 Cyclophilin을 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

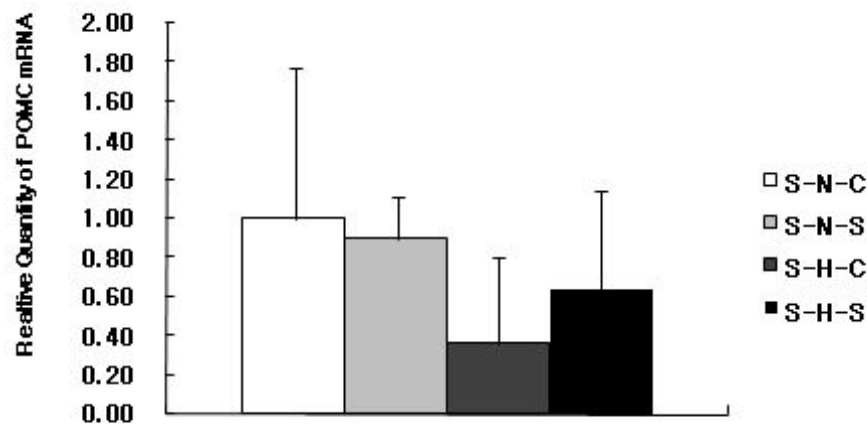


Figure 7. 시상하부에서 사포닌에 의한 POMC target 유전자 발현의 변화.

RNA는 시상하부에서 추출되었고, POMC target 유전자와 Cyclophilin의 mRNA 수치는 측정되었다.

Data는 reference와 같이 Cyclophilin을 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

Table 5. 실험군에서 mRNA의 발현.

	Expression of Hypothalamic Neuropeptides	
	NPY mRNA	POMC mRNA
SD + N-diet	1.00±2.75	1.00 ±0.77
SD +N-diet-CS	2.97±0.33	0.9 ±0.21
SD + HF-diet	4.07±0.58	0.36 ±0.45
SD+ HF-diet-CS	1.56±1.80	0.64 ±0.51

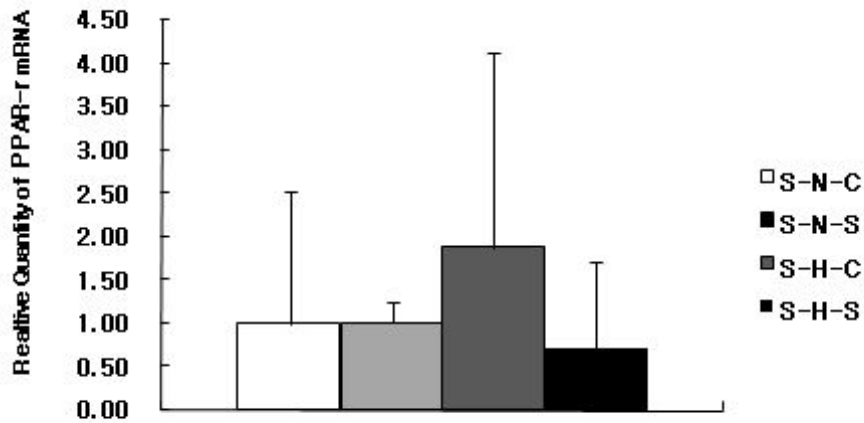


Figure 9. 장막간 지방조직 에서 사포닌에 의한 PPAR-γ target 유전자 발현의 변화.

RNA는 장막간 지방조직에서 추출되었고, PPAR-γ target 효소와 GAPDH는 mRNA 수치는 측정되었다.

Data는 reference와 같이 GAPDH을 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

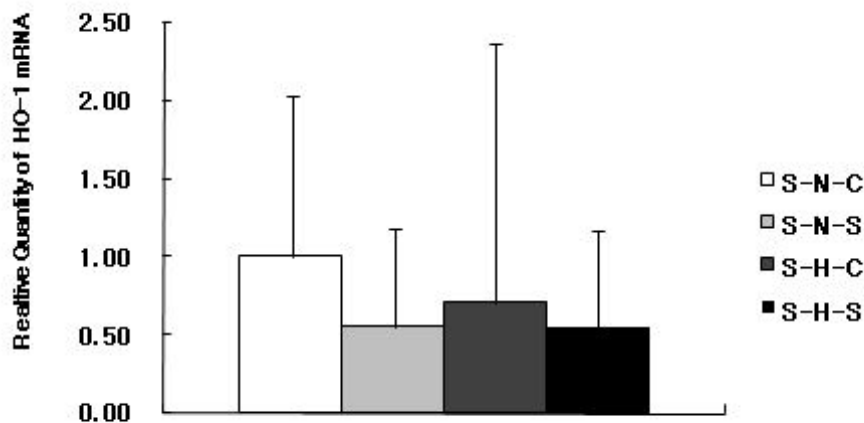


Figure 10. 장막간 지방조직에서 사포닌에 의한 HO-1 target 유전자 발현의 변화.

RNA는 장막간 지방조직에서 추출되었고, HO-1 target 유전자와 GAPDH는 mRNA 수치는 측정되었다.

Data는 reference와 같이 GAPDH을 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

Table 6. 실험군에서 mRNA의 발현.

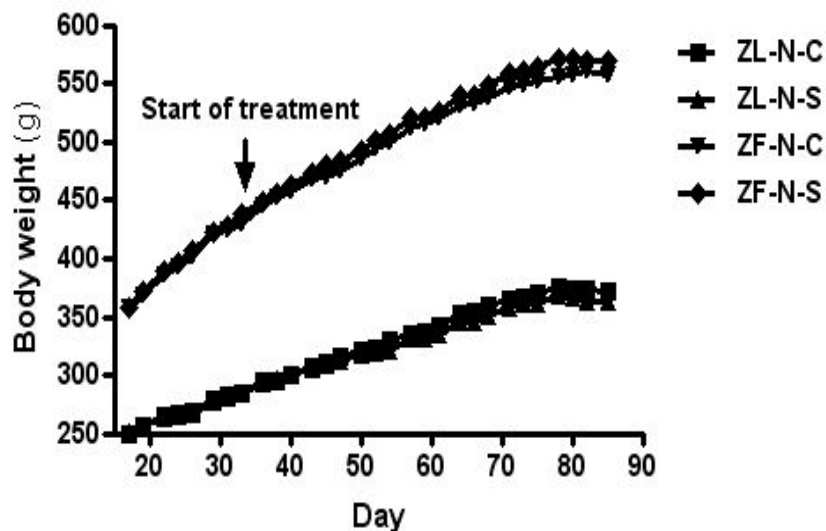
	PPAR- γ mRNA	HO-1 mRNA
SD + N-diet	1.00 \pm 1.52	1.00 \pm 1.04
SD + N-diet-CS	1.01 \pm 0.24	0.55 \pm 0.64
SD + HF-diet	1.87 \pm 2.25	0.71 \pm 1.66
SD+ HF-diet-CS	0.73 \pm 0.99	0.56 \pm 0.61

나. 실험 2. 유전자 변형에 의해 유도된 비만 Zucker fatty Rats

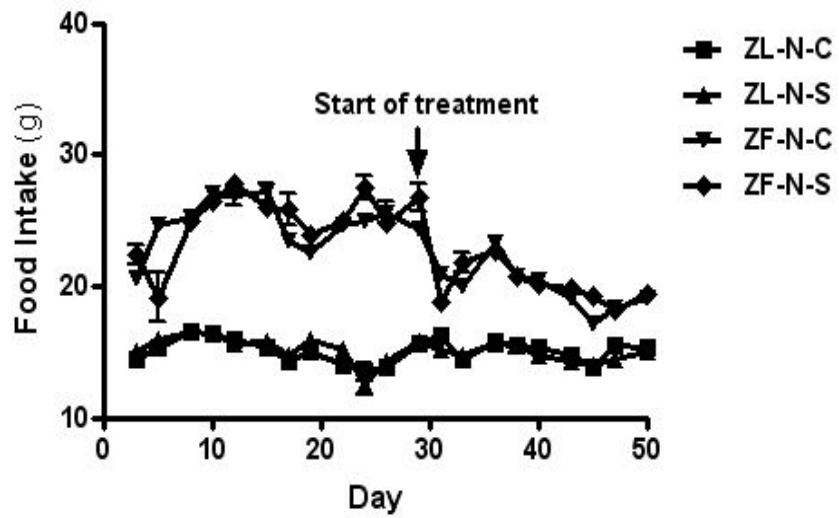
1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

실험식이 급여 후 12주 동안 측정된 체중증가량, 식이 섭취량 및 식이효율의 결과는 **Fig. 11**과 **Table 7**에 나타내었다. Normal Diet(N)+ Control(C) Zucker fatty rats (ZF-N-C)이 Normal Diet(N)+ Control(C) Zucker lean rats (Z-N-S)에 비해 유의하게 증가하였고($p < 0.001$), 8주간 saponin을 투여한 Normal Diet(N) + Saponin(S) Zucker lean rats (ZL-N-S)이 ZL-N-C에 비해 그 증가가 적은 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. Normal Diet(N)+Saponin(S) Zucker fatty rats (ZF-N-S)과 Normal Diet(N)+ Control(C) Zucker fatty rats(ZF-N-C)간의 체중차이는 없었다(**Fig. 11A**). 식이섭취량은 ZF-N-C, Z-N-S, ZF-N-C, ZF-N-S군 간의 유의미한 차이는 없었다(**Fig. 11B**). 투여한 Saponin이 식욕과 관련이 있는지를 식이 효율로 조사한 결과(**Fig. 11C**), S-H-C이 체중증가와 함께 사료효율이 상승하였으며, S-N-S는 S-N-C에 비해 S-H-S는 S-H-C에 비해 낮은 것으로 나타났으며 사료를 섭취하는 양이 많음에 비해 체중의 증가가 감소하여 식이 효율의 수치가 낮아지면 비만 조절 효과가 있다고 할 수 있다.

A



B



C

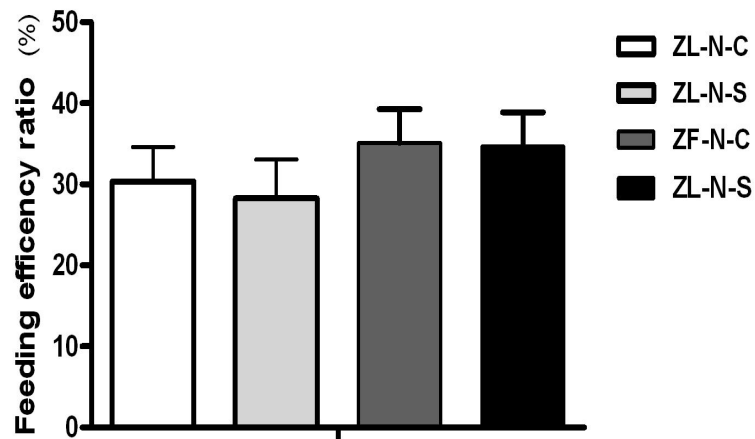


Figure 11. 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

Table 7. 실험군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

	Zuker lean + N-diet	Zuker lean + N-diet-CS	Zuker fatty + HF-diet	Zuker fatty + HF-diet-CS
Body weight (g)	372.3±9.2	363.0±9.6	557.5±5.4***	569.2±8.0
Total food intake (g)	15.2±0.4	14.7±0.5	16.1±0.1	18.8±0.3
Food efficiency ratio (%)	30.4±4.2	28.3±4.8	35.1±4.2	34.6±4.3

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. ***P<0.001 vs. Zuker lean+N diet.

2) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과

Saponin 투여로 인한 포도당 이용능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 복강 내 당부하 검사는 당부하 후 최고 포도당 농도가 300 mg/dl 이상이고 2시간째 포도당 농도가 200 mg/dl 이상인 경우에 당뇨병으로 진단한다. 본 실험에서는 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 12).

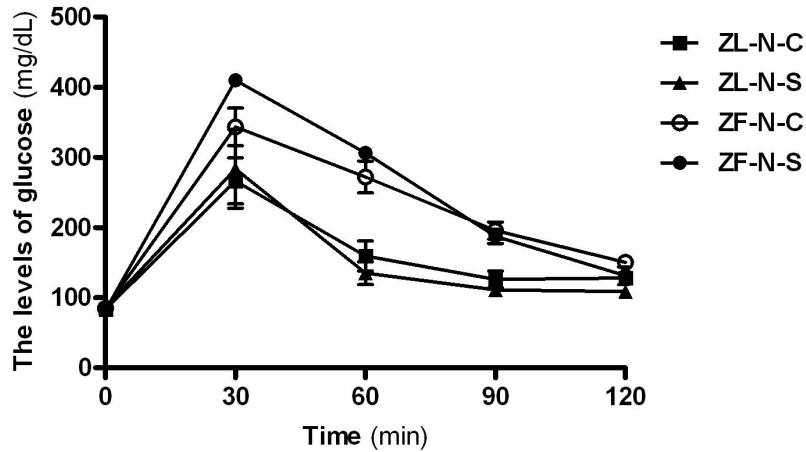


Figure 12. 4 group의 복강 내 당부하검사 비교. (ZL-N-C, ZL-N-S, ZF-N-C and ZF-N-S)

3) 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과

혈청 내 AST, ALT, BUN, creatinine, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 농도를 측정된 결과(Table 8), ZF-N-C이 ZL-N-C 비해 혈청 내 AST농도가 증가하고 ALT의 농도는 유의하게 증가하였으며, ZL-N-S와 ZF-N-S는 각 대조군에 비해 유의미한 변화는 없었다. 혈청 내 creatinine의 농도는 ZL-N-S과 ZF-N-S 모두 각 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. 혈청 내 총 콜레스테롤은 ZL-N-C에 비하여 ZF-N-C에서 유의하게 증가하는 하였고($p < 0.01$), ZF-N-S이 ZF-N-C에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다($p < 0.05$). ZF-N-C에서 HDL-cholesterol의 농도가 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$), LDL-cholesterol 농도가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 반면, ZL-N-S과 ZF-N-S에 비해 HDL-cholesterol 농도와 LDL-cholesterol의 농도가 각 대조군에 비해 유의미한 증가 및 감소를 보이지 않았다.

Table 8. 실험군의 임상생화학적 혈청

	Zuker lean + N-diet	Zuker lean + N-diet-CS	Zuker fatty + N-diet	Zuker fatty+ N-diet-CS
AST (IU/L)	96.2±23.5	96.2±7.5	128.8±26.4	91.8±10.3
ALT (IU/L)	35.6±4.1	32.2±5.4	56.4±3.0*	50.3±2.3
BUN (mg/dL)	12.8±0.9	13.8±1.2	11.6±0.9	11.3±0.5
Creatinine (mg/dL)	0.3±0.00	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Cholesterol (mg/dL)	72.0±2.8	68.2±2.3	149.0±4.7**	118.0±5.5#
HDL (mg/dL)	23.0±0.9	22.8±0.9	39.0±0.7*	36.3±1.8
LDL (mg/dL)	7.4±0.4	6.2±0.6	12.8±1.6*	10.5±1.3

각각의 data는 평균 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Zuker lean+N diet, # $P < 0.05$ vs. Zuker fatty+N diet.

4) 지방 무게 (Weight of regional fat tissues) 결과

체지방, 내장지방의 지표 (visceral tissue)인 부고환 지방 조직 (Epididmal fat tissue), 신장 지방조직 (prerenal fat tissue), 장막간 지방조직 (mesenteric fat tissue)의 무게를 측정하였다(Table 9). 백색 지방 (White adipose tissues, WAT) 조직에 해당하는 부고환 지방, 신장지방, 장간막 지방은 ZF-N-C이 ZL-N-C 비해 유의하게 증가하는 경향을 보였다($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). 다른 지방은 각 군간의 유의적인 차이가 없었다.

또한, 갈색 지방 (brown adipose tissue, BAT)은 세포내 지방산을 산화시켜 열을 방출하여 체온조절 및 에너지 균형 조절자 역할을 함으로써 체지방 축적되는 것을 억제하는 것으로 보고되었는데 이를 알아보기 위해 BAT의 변화를 살펴본 결과(Fig. 13), Saponin 투여로 인한 유의적인 중량이 감소되는 결과는 나타나지 않았다.

Table 9. 실험군의 지방 무게 (g/kg B.W.)

	Zuker lean + N-diet	Zuker lean + N-diet-CS	Zuker fatty + N-diet	Zuker fatty + N-diet-CS
Epididymal fat	0.995±0.0	0.83±0.0	2.1±0.1***	2.04±0.1
Perirenal fat	1.21±0.1	1.04±0.0	4.02±0.1***	3.98±0.1
Mesenteric fat	0.78±0.0	1.07±0.1	1.46±0.1***	1.37±0.1

각각의 data는 평균 표준로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. *** $P<0.001$ vs. Zuker lean +N diet.

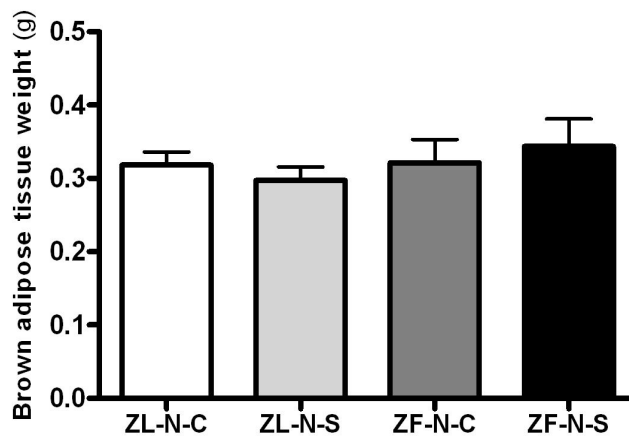


Figure 13. 실험군의 갈색 지방 무게

5) 장기 무게 (Weight of organ) 결과

ZF-N-C이 ZL-N-C 비해 간의 중량이 증가한 경향을 보였고($p<0.01$), 신장, 비장, 췌장, 신장의 중량에는 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 10, Fig. 14).

Table 10. 실험군의 간, 췌장, 비장, 신장, 심장의 무게 (g)

	Zuker lean + N-diet	Zuker lean + N-diet-CS	Zuker fatty + HF-diet	Zuker fatty + HF-diet-CS
Liver (g)	2.51±0.0	2.98±0.2	3.55±0.2**	3.48±0.1
Pancreas (g)	0.49±0.0	0.47±0.1	0.24±0.0	0.20±0.0
Spleen (g)	0.14±0.0	0.14±0.0	0.12±0.0	0.13±0.0
Kidney (g)	0.80±0.0	0.82±0.0	0.58±0.0	0.55±0.0
Heart (g)	0.33±0.0	0.30±0.0	0.25±0.0	0.26±0.0

각각의 data는 평균 표준편차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. **P<0.01vs. Zuker lean+N diet.

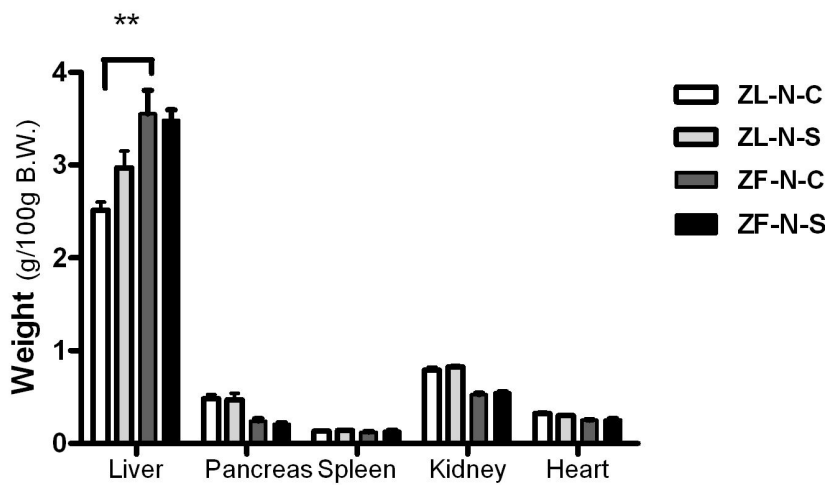


Figure 14. 실험군의 간, 췌장, 비장, 신장, 심장의 무게 (g)

6) 시상하부에서 NPY, POMC 유전자 발현과 장막간 지방조직에서 PPAR- γ , HO-1 유전자 발현

실험 8주후에 식욕촉진 펩타이드인 NPY의 mRNA 수치는 ZF-N-C이 2.15±0.93로 ZL-N-C의 1.00±0.07에 비해 증가하였고, 식욕 억제 신경펩타이드인 POMC의 mRNA 수치는 ZF-N-S이 0.64±0.51로 ZF-N-C에 비해 증가하였다. (Fig. 15, 16, 17, Table 11).

또한, 체지방 합성을 조절하는 지방 분화인자인 PPAR- γ 의 mRNA 수치는 ZF-N-C이 4.12±0.21로 ZL-N-C의 1.00±1.10에 비해 현저히 증가하였고 ROS 증가에 의한 산화적 스트레스로부터 지방세포를 보호하는 항비만의 표적유전자인 HO-1의 mRNA 수치는 ZF-N-C이 0.66±0.81로 ZL-N-C에 비해 크게 감소하였다. ZF-N-S의 PPAR- γ mRNA 수치가 1.04±0.28로 ZF-N-C에 비해 크게 감소하였고, HO-1의 mRNA 수치는 ZL-N-S가 2.35±0.81로 ZL-N-C와 ZF-N-C에 비해 증가하였다. 이는 세포내의 산화적 스트레스를 제거하여 염증반응을 억제하는 HO-1의 증가 역시 IL-6 와 TNF- α 의 낮은 발현수준을 반영한다고 할 수 있다(Fig. 18, 19, Table 12)

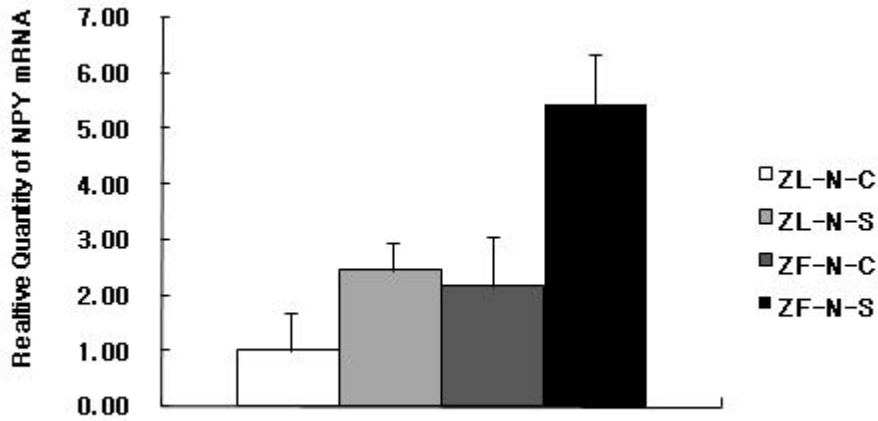


Figure 15. 시상하부에서 사포닌에 의한 NPY target 유전자 발현의 변화. RNA는 시상하부에서 추출되었고, NPY target 유전자와 Cyclophilin의 mRNA 수치는 측정되었다. Data는 reference로 Cyclophilin을 이용한 상대밀도단위 의 평균 표준오차로 나타냈다.

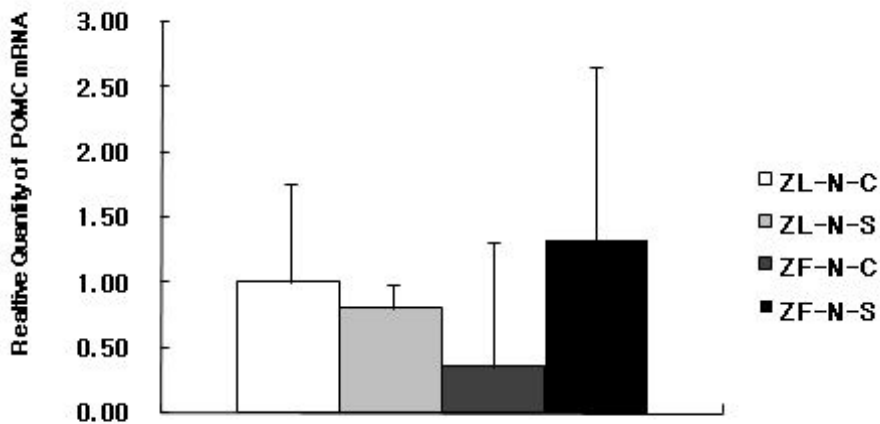


Figure 16. 시상하부에서 사포닌에 의한 POMC target 유전자 발현의 변화. RNA는 시상하부에서 추출되었고, POMC target 유전자와 Cyclophilin의 mRNA 수치는 측정되었다. Data는 reference로 Cyclophilin을 이용한 상대밀도단위 의 평균 표준오차로 나타냈다.

Table 11. 실험군에서 mRNA의 발현.

	Expression of Hypothalamic Neuropeptides	
	NPY mRNA	POMC mRNA
Zuker Lean + N-diet	1.00 ±0.70	1.00± 0.77
Zuker Lean + N-diet-CS	2.44 ±0.51	0.90±0.21
Zuker fatty + N-diet	2.15 ±0.93	0.36±0.45
Zuker fatty + N-diet-CS	5.46± 0.88	0.64± 0.51

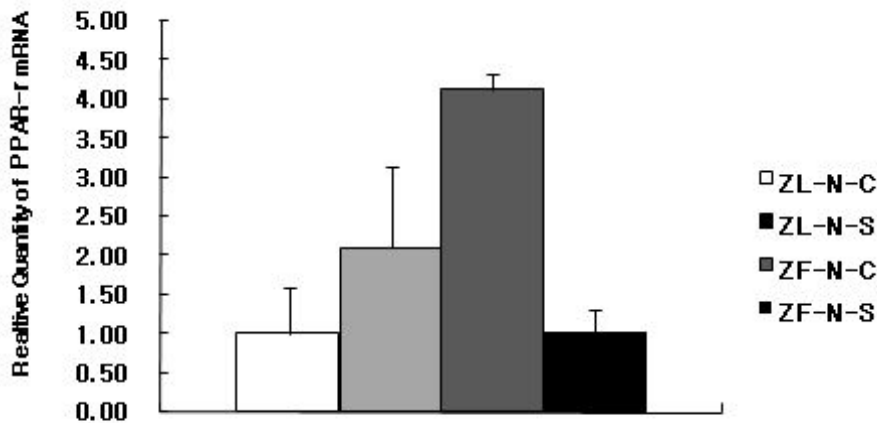


Figure 17. 장막간 지방조직에서 사포닌에 의한 PPAR- γ target 유전자 발현의 변화. RNA는 장막간 지방조직에서 추출되었고, PPAR- γ target 효소와 GAPDH는 mRNA 수치는 측정되었다. Data는 reference와 같이 GAPDH를 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

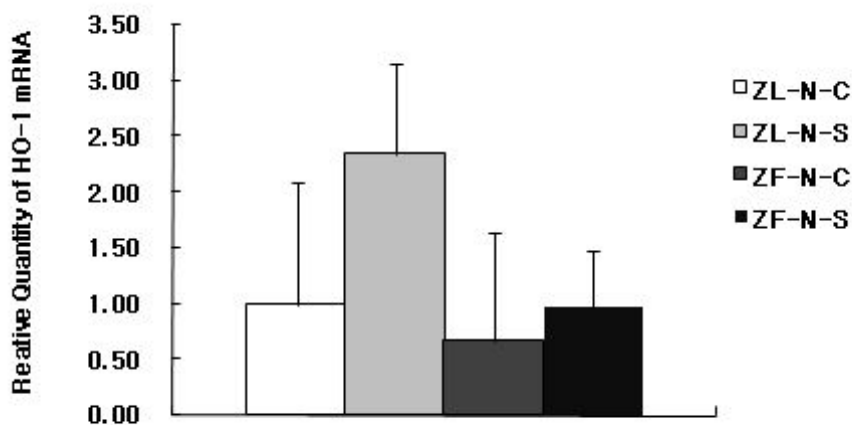


Figure 18. 장막간 지방조직에서 사포닌에 의한 HO-1 target 유전자 발현의 변화. RNA는 장막간 지방조직에서 추출되었고, HO-1 target 유전자와 GAPDH는 mRNA 수치는 측정되었다. Data는 reference와 같이 GAPDH를 이용한 상대밀도단위 의 평균표준오차로 나타냈다.

Table 12. 실험군의 mRNA 발현.

	PPAR- γ mRNA	HO-1 mRNA
Zuker Lean+ N-diet	1.00 \pm 0.60	1.00 \pm 1.10
Zuker Lean + N-diet-CS	2.11 \pm 1.04	2.35 \pm 0.81
Zuker Fatty + N-diet	4.12 \pm 0.21	0.66 \pm 0.81
Zuker Fatty +HF-diet-CS	1.04 \pm 0.28	0.98 \pm 0.81

각각의 data는 평균 표준편차로 나타난다. 통계적인 분석은 Tukey's post hoc test의 one way ANOVA를 따라 수행되었다. **P<0.01vs. Zuker lean+N diet.

4. 연구수행내용 결론

본 연구는 홍삼 사포닌 (crude saponin, CS)의 비만 억제 효과를 규명하기 위하여 고지방 식이로 유도된 비만흰쥐와 유전자 변형으로 유도된 Zuker 비만쥐에서 약제 투여 후 체중변화, 식이 섭취량 변화, 식이 효율, 체지방 축적량, 혈중 지질관련 인자의 농도 및 내당능, 간과 지방조직의 조직형태학적 변화, 시상하부에서 NPY, POMC 유전자 발현, 장막간 지방조직에서 PPAR- γ , HO-1 등의 관찰을 통해 다음과 같은 실험성적을 얻었다.

- 1) 홍삼 사포닌은 비만 대조군에 비해 체중증가량의 감소와 식이효율이 낮은 경향이 나타났다.
- 2) 홍삼 사포닌은 비만 대조군에 비해 지방조직의 중량 감소 경향이 나타났다.
- 3) 홍삼 사포닌은 혈중 ATL, AST, BUN과 creatinine의 농도 값이 생리적인 범위 안에 있어 간장독성과 신장독성으로부터 안전한 것으로 나타났다.
- 4) 홍삼 사포닌은 비만대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 지질대사와 관련된 혈중 total cholesterol의 농도 값이 낮은 것으로 나타났다.
- 5) 홍삼 사포닌은 비만 대조군에 비하여 지방세포의 크기를 감소하였고, 간의 지방축적은 감소하였다.
- 6) 홍삼 사포닌은 뇌시상하부의 NPY, POMC 유전자 발현과 장막간 지방조직에서 PPAR- γ , HO-1 유전자 발현에 영향을 주었다.

결론적으로 위의 결과들은 홍삼 사포닌의 체중감량은 식욕조절과 관련되어 있고, 뇌시상하부의 NPY, POMC 활성 변화와 지방조직의 PPAR- γ , HO-1의 활성화 기전을 통해 매개되는 것으로 생각된다.

제 3장 인삼 사포닌 성분이 만성 및 급성 알코올 섭취에 미치는 영향 평가

1. 연구의 필요성

가. 연구의 필요성 및 배경

- 알코올 의존의 심각성

‘2009년 국민 영양조사’에 2008년 19세 이상 성인 남녀의 월간 음주율은 59.4%이며, 국민 1인당 알코올 소비량은 OECD 국가 중 2위임. 이는 음주로 인한 조기 사망, 생산성 감소, 각종 질환 등으로 인한 사회적 손실 비용이 매우 큼.

또한 알코올 남용은 12%, 알코올 의존이 10%, 전체 알코올 사용장애의 평생 유병률은 22%로 남녀비는 95대 5임. 우리나라는 ‘알코올에 대한 관용’이 만연해 있어 통상적으로 알코올 의존 환자가 적다고 생각되어 지며 서구의 기준으로 본다면 이 수치보다도 더 높을 것으로 사료 됨.

- 알코올 섭취에 의한 뇌신경 세포 및 조직 손상

-신경 기능을 유지시키고 손상으로부터 회복시키는 인자인 neurotrophic factor [BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NGF(Nerve Growth Factor) 등]가 분비되어 뇌 세포의 생존을 도모함. 그러나 과도한 음주는 neurotrophic factor의 저하를 초래함.

-Neurotrophic factor는 식욕, 에너지 대사 조절은 물론 우울 정서, 인지기능 등과도 연관이 있다는 보고들이 있는데, 이는 알코올 의존증으로 인한 문제들과 공통되는 부분이 많음.

-과음은 활성 산소를 매개로 하는 조직 손상을 유발하고 이 손상은 우리 신체의 모든 세포의 사멸을 공통적으로 작용함. 이 기전이 뇌 신경조직의 손상에도 동일한 영향을 준다는 보고가 있으나, 실제 뇌 기능 저하와 그에 따른 신경인지기능 손상에 미치는 영향에 대해서는 명확히 규명된 바 없음.

-신경병리학적 소견으로 알코올 환자의 뇌는 백질이 상실되어 있고 위축되어 있음. 이를 술로 인한 염증반응으로 인한 신경손상으로 설명함. 뇌 부피의 감소는 녹아내린 뇌세포가 교세포에 의해 정리되고 알코올로 유발된 신경줄기 세포의 감소로 생김.

- 인삼은 세계적으로 주목 받고 있는 약용식물로 인삼의 약리효능을 나타내는 성분은 배당체인 인삼 사포닌으로 알려져 있음. 진세노사이드(Ginsenoside)는 사포닌의 구성 성분으로 수삼을 홍삼으로 만드는 과정에서 성분의 화학적인 변화를 일으켜 인체에 더 효율적인 사포닌이 생성 됨.

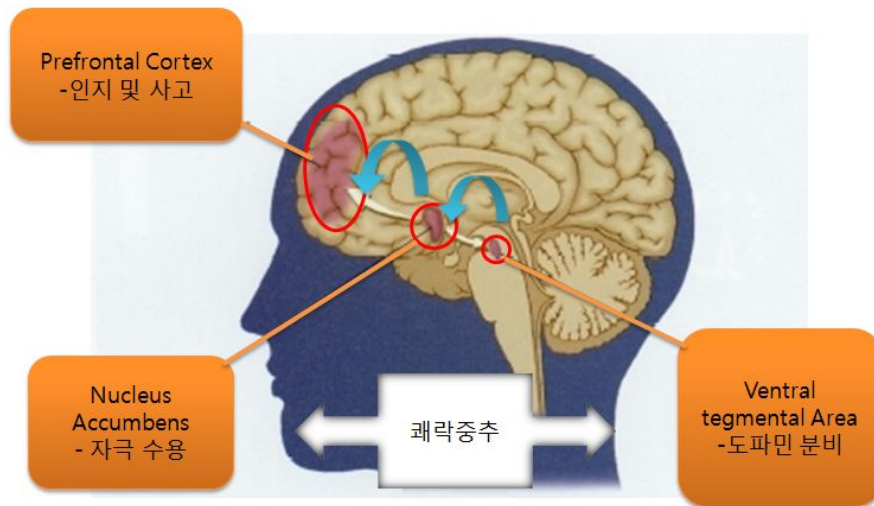
사포닌의 종류는 Ro, Rb1·2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1·2·3, Rh1·2 등 모두 37가지 성분으로 나뉘는데, 인삼에는 24종의 사포닌이 있는 반면 홍삼에는 32종의 사포닌이 있음. 이 중 사포닌의 주요 성분인 Rb1은 중추신경 억제, 해열 진통, 간 기능 보호에 효과적이며 Rg1은 학습 기능 개선과 항피로 작용을 한다. 그리고 Rh2는 암세포 및 종양 증식 억제 기능이 있는 것으로 밝혀짐.

- 많은 연구에 따르면, 인삼 사포닌의 활성 요소인 Ginsenosides가 gamma - aminobutyric acid (GABA), Glutamate, DA, Noradrenaline, Serotonin 등의 작용과 관련하여 중추신경계(CNS)에 다양한 영향을 미치고 있음이 보고되고 있음.

따라서 이와 관련 Ginsenosides의 Dopaminergic system과 연관된 **인체의 갈망(craving)을 조절하는 역할에 관한 추가 연구의 필요성**이 지속적으로 제기되고 있음.

갈망은 특정 대상에 대한 긍정적 감정이 일어나 뇌의 양성강화 시스템을 자극하여 행동을 반복적으로 유발 시키며, 쾌락을 유발시키는 도파민이 분비되어 뇌 보상회로(reward system)을 자극함으로 쾌감이 유발 됨. 보상회로에서 도파민 분비를 유도하는 특정행동에 대한 갈망이 강화되는 경우 이는 습관성 행동을 유발하는 물질이나 행동에 의한 중독(addiction)으로 발전하기도 하며, 이는 아편과 같은 마약성 물질 이외에도, 니코틴, 알코올, 심지어는 과도한 음식 섭취에 이르기 까지 일상의 많은 경우에서 관여하고 있음.

이에 인삼사포닌의 각각의 활성효능에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있어, 비만억제 및 치료용 파낙사디올계 홍삼 사포닌이 특허 공개된 바 있으며 인삼추출물질 또는 인삼 사포닌이 메트암페타민, 코카인, 모르핀과 같은 중독성 약물에 의한 행동적 변화를 억제한다고 보고된 바 있음. 또한 니코틴 중독 치료 및 금연 유도용 홍삼 사포닌도 특허 공개된 바 있는 만큼 인삼의 특정 성분이 뇌신경생물학적 기전에 작용하여 식욕을 조절하고 약물, 알코올, 니코틴 등의 중독을 억제할 가능성은 매우 높다할 수 있음.



● 만성적인 알코올 섭취에 따른 뇌 세포 및 조직의 변화를 관찰하고 사포닌의 투여에 따른 중독 완화 및 뇌기능 및 다발적 장기 기능 손상 예방 및 갈망 억제 기능을 확인 하여 신경 생물학적인 작용 기전을 체계적으로 규명하고자 함. 또한 급성 알코올의 섭취 시 동반 되는 숙취 및 알코올의 해독과정에서의 사포닌의 영향을 알아보하고자 함.

2. 연구 내용

가. 실험 1. 인삼 사포닌이 알코올 유도-당뇨모델에 미치는 영향 평가

1) 실험동물과 실험식이

실험동물로는 생후 4주된 수컷 Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐와 정상대조군인 Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 중앙실험동물(주) (Central Lab Animal Inc, Korea)에서 구입하여 가톨릭 의과대학 실험동물실 관리지침에 따라 22±1℃, 12L:12D 조건으로 무균실에서 사육하였

다. OLETF 쥐와 LETO 쥐는 출생 후 각각 16주까지는 표준 쥐 사료 (삼양사, 대한민국)와 물을 자유롭게 먹도록 하였고, 이후 10주간 실험군의 각 10 마리에 Liber DeCali ethanol Containing liquid diet(35% fat, 11% carbohydrate, 18% protein, 36% alcohol, LD102A Test diet, Richmond, VA, USA)를 투여하였고, 대조군의 각 10 마리는 Liber DeCali regular control diet(35% fat, 47% carbohydrate, 18% protein)를 120ml/day씩 먹임으로써 동일 열량을 맞추었다. 이와 같이 몸무게 증가량과 상관없이 paired feeding 하였으며 액체 사료로 적응과 알코올 적응을 위하여 2주 동안 식이만 유지하였으며 3주째 부터 사포닌을 투여하여 총 8주간의 사포닌을 투여하였다. 또한 적응 기간 동안 점진적으로 알코올의 양을 높여 최종적으로 사료 1,000 g 중 50 g의 알코올을 첨가하여 총열량 중 약 36%kcal로 조절하였다. 사포닌 투여는 조사포닌으로 200mg/kg으로 복강내 투여 하였으며 대조군에는 식염수를 투여하였다. OLETF쥐와 LETO쥐는 saline을 투여한 대조군과 알코올 (EtOH) 군, 사포닌을 투여한 알코올 군으로 나누어 다음과 같이 규정하였다. (1) LETO-Control-Control (L-C, n = 10), (2) LETO-Ethanol-control (L-A-C, n = 10), (3)LETO-Ethanol-saponin (L-A-S, n = 10), (4) OLETF-Control-control (O-C, n = 10), (5) OLETF-Ethanol-control (O-A-C, n = 10), and (6) OLETF-Ethanol-saponin (O-A-S, n = 10). 모든 연구는 실험동물 사용지침 (issued by the American Institute of Laboratory Animal Resources)에 따라 실험동물을 관리하였다.

2) 체중 (Body Weight) 증가량과 식이 섭취량 (Food intake) 측정

체중은 일주일에 한번 같은 시간에 전자저울(CAS, Korea)을 이용하여 측정하였으며 실험시작 전과 실험 기간 동안 일정시간에 매주 측정된 체중을 근거로 체중증가량을 계산하였고, 사료섭취량은 매일 같은 시간에 측정하였으며 급여한 사료 량에서 섭취하고 남은 양을 뺀 값을 식이섭취량으로 사용하였다.

3) 식이 효율 (Feeding efficiency ratio: FER) 측정

만성 알코올 섭취가 체중과 사료섭취량에 주는 영향을 알아보기 위해 사료섭취량을 매일 측정하여 1일 체중증가량을 사료섭취량으로 나눔으로써 식이효율을 산출하였다.

식이효율 (Feeding efficiency ratio : FER %) = 체중증가량 (g) / 사료섭취량 (g) x 100

4) 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test)

복강 당부하 검사는 18시간 절식시킨 다음 꼬리정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당 수준을 측정하여 초기 혈당으로 한 후 50% 포도당 용액 (중외 50% 포도당 주사액, 중외제약)을 총량 2 g/kg양으로 복강 내로 투여하여 측정하였다. 당부하 검사는 알코올 및 사포닌이 glucose 대사에 미치는 영향의 변화를 보기위해 5주 (사포닌 투여 후 3주), 8주 (사포닌 투여 후 6주), 10주 (사포닌 투여 후 8주)에 걸쳐 총 3번 측정하였다. IPGTT는 침습적인 실험이기 때문에 3번만 측정하였으며, 사포닌 투여 전 식 후 혈당을 측정하였다. 측정시간 간격은 복강 내 당부하전, 당 부하 후 30분, 60분, 90분, 120분 짜 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당 측정기(Accu-check, Roche, Germany)로 혈당을 측정하여 당부하능을 확인하였다.

5) 혈청생화학성분 및 호르몬 분석

동물을 부검 전일 약 12시간 동안 절식시킨 후, 마취하여 심장으로부터 채혈하고, 원심분리 (800g X 20min)하여 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈장은 -20℃에 보관하고 혈액생화학 분석기 (Selectra 2,

Vitalab, Netherlands)를 사용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), leptin 혈중 농도를 각각 측정하였다.

6) 시료 준비

채혈한 뒤에 부검하여 뇌, 췌장, 간, 부정소지방과 내장지방의 무게를 측정하고, 즉시 액체 질소에 냉동하여 -70°C 에 분석까지 보관하였다.

7) 면역 형광 현미경 검사

실험동물을 희생하여 간과 췌장을 적출하여 10% formalin 고정액으로 고정하였다. 조직은 파라핀 블록을 만든 후, 5 μm 의 조직박편을 만들었다. 파라핀을 제거한 후에 간과 췌장 조직은 H & E로 염색을 하였다. 면역염색을 위하여 citrate 완충액 (pH 6.0) 으로 5분간 2번 끓인 후에 염소 혈청으로 상온에서 20분간 처리하였다. 1차 항체로 insulin (Invitrogen Rockville, MD, USA), glucagon (Dako, Glostrup, Denmark)을 조직박편과 4°C 에서 16시간 반응시킨 뒤 TBS (Tris-buffered saline, pH 7.4)용액으로 3번 세척하였다. 2차 항체로 vectastain ABC kit (Vecta, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 인슐린은 biotinylated-guinea pig 항체를 이용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 TBS 용액으로 상온에서 3번씩 세척하였다. 이어서 인슐린은 streptoavidin-Alexa Fluor 546 (Invitrogen), glucagon은 rabbit-Alexa Fluor 488 (Invitrogen)을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBS로 3번 세척한 다음에, 핵염색을 위하여 DAPI가 conjugate된 medium (Dako)으로 mounting하였다. 형광현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 사진을 찍었다.

8) 인슐린 저항성 및 췌장 베타 세포 기능 측정

인슐린 저항성은 Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance(HOMA-IR)을 이용하였고, 췌장 베타 세포기능 측정은 Homeostasis Model Assessment- β cell function을 이용하여 계산하였다.

계산식은 각각 $\text{HOMA-IR} = [\text{fasting insulin}(\mu\text{U/ml}) \times \text{fasting glucose}(\text{mmol/L})] / 22.5$,

$\text{HOMA-}\beta = (20 * \text{fasting insulin}(\mu\text{U/ml})) / (\text{fasting glucose}(\text{mmol/L}) - 3/5)$ 으로 환산되었다.

9) Data Analysis

본 실험의 결과는 SPSS 통계프로그램 (version 18.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준오차를 나타내었으며, 일원분산분석, 반복측정 이원분산분석을 시행하였다. 실험군 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Tukey test에 의해 사후 검증하였다.

3. 연구수행 내용 결과

가. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율의 변화

실험식이 급여 후 10주 동안 측정된 체중증가량, 식이 섭취량 및 식이효율의 결과는 Fig. 1와 Table 2에 나타내었다. 실험 종료 시점인 10주째의 쥐의 체중 변화는 대조군 LC에 비하여 알코올식이 섭취 7주차에 유의하게 감소하였고 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), LAS군은 실험 종료시점인 10주에 LC군에 비해 유의하게 감소하였다. OAC은 대조군 OC에 비하여 알코올식이 섭취 3주, 6주째에 유의하게 감소하였고 ($p < 0.01$), OAS군은 2주, 3주, 7주, 8주째에 유의하게 감소하였다. 알코올 식이 한 LETO와 OLETF rats 모두 알코올 대조군과 사포닌 처리군의 체중 증가는 유의한 차이를 보이지 않았다. (Fig. 1A). 알코올 섭취에 의한 영향을 관찰하기 위해서 식이는 pair-feeding으로 공급되었으며, 이로 인해 LETO쥐의 세 군 간의 사료섭취량과

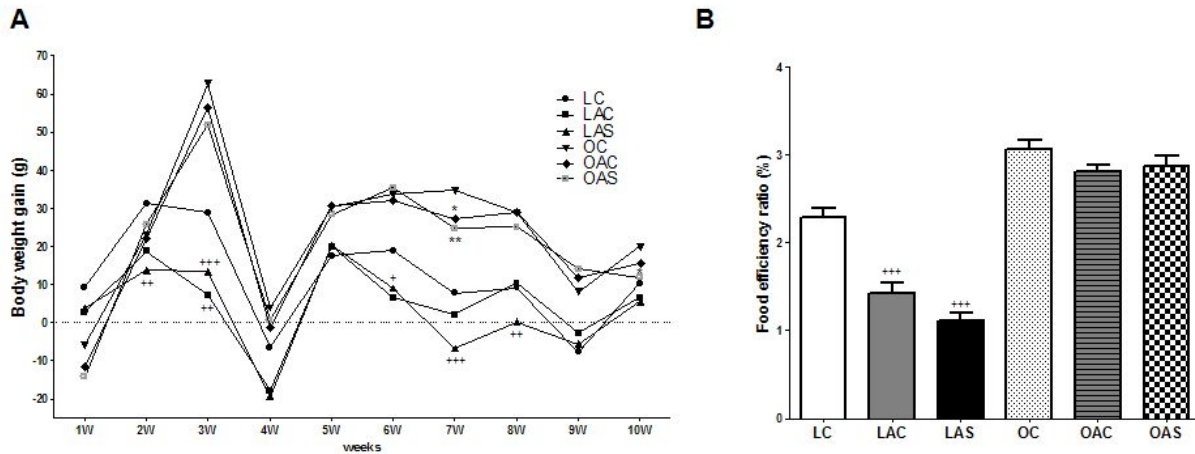


Fig 1. 실험군의 체중증가량 및 식이효율의 변화. OLETF쥐의 세 군 간에 사료섭취량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 식이 효율을 비교해 보면 (Fig. 1B), LAC, LAS는 LC에 비해서 낮은 것으로 나타났으며 OAC, OAS는 OC에 비해서 낮았다. 이러한 체중 감소는 알코올 섭취 시 알코올의 직접적인 독성 효과로 소화율이 감소하고 영양소의 흡수가 저하되어 원활한 영양공급이 이루어 지지 못하기 때문이며 또한 과량의 알코올 섭취는 열 발생을 통해 에너지 소모가 증가했기 때문이라고 사료된다.

Table 2. 실험군의 식이섭취량.

	LC	LAC	LAS	OC	OAC	OAS
Food intake (g)	85.36±2.98	79.14±1.85	77.10±2.66	116.66± 2.22	115.14± 2.78	108.09±3.83

각각의 data는 평균 ± 표준오차로 나타난다. 통계적인 분석은 one-way ANOVA 를 따라 수행되었다. +P<0.05, ++P<0.01, +++P<0.001 vs. LC, *P<0.05, **P<0.01 vs. OC

나. 복강 내 당부하검사 (IPGTT: Intraperitoneal glucose tolerance test) 결과

만성 알코올 섭취로 인한 포도당 이용 능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 복강 내 당부하 검사는 당부하 후 최고 포도당 농도가 300 mg/dl 이상이고 2시간째 포도당 농도가 200 mg/dl 이상인 경우에 당뇨병으로 진단한다. 사포닌 투여 전 2주간의 식이가 당대사에 미친 영향을 알아보기 위해 OLETF의 당뇨 단계로 넘어가는 16 주에 측정된 것으로 3주째 첫날 사포닌 투여 전 식후 혈당을 측정하였으나, 군간 유의미한 결과는 보이지 않았다, 하지만 OAC, OAS 두군 모두 OC에 비하여 혈당이 증가한 경향을 확인 할 수 있다(fig 2).

사포닌 투여 3주째 (식이 5주)에서 시행한 IPGTT에서 0분에서 공복 혈당은 알코올을 섭취한 OAC, OAS 군은 각각 78 ± 4.2, 81 ± 7.2로 99.0 ± 8.4인 OC군보다 유의하게 낮았다 ($p<0.001$, $p<0.01$). 30분에서 LAS군의 혈당이 245.6 ± 41.7 mg/dl으로 LC(300.0 ± 36.1)군에 비해 유의하게 감소하였으며 ($p<0.05$), OAS군도 389.5 ± 50.7로 OC와 OAC에(458.0 ± 56.7, 458.5 ± 23.0) 비해 유의하게 낮은 혈당을 나타내었다($p<0.05$). 120분에 LAS군은 118.3 ± 8.8 LC군과 LAS군에(138.4 ± 9.0, 132.1 ± 12.8) 비해 유의하게 감소하였다($p<0.01$, $p<0.05$)(fig3.A).

사포닌 투여 6주째 (식이 8주)에서는 90분에 LAS군이 125.7 ± 7.5로 LC보다 유의하게 낮았고($p<0.05$), OAC군이 420.1 ± 23.6으로 OC, OAS에 (353.1 ± 30.6, 345.3 ± 54.1) 비해 유의하게 높은 수준을 유

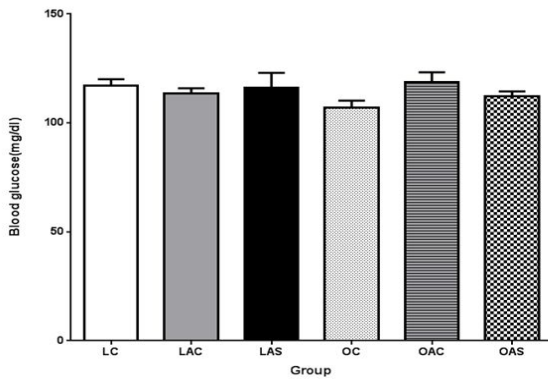


Fig 2. 실험 2주차에 측정한 식 후 혈당.

지하였다($p < 0.05$, $p < 0.001$). 120분 후에 LAS는 101.5 ± 4.4 로 OC와 OAC군에 비해 유의하게 혈당이 낮아졌고($p < 0.001$, $p < 0.05$), 사포닌을 투여한 OAS군이 273.6 ± 6 으로 364.4 ± 35.2 인 OAC군에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.01$)(fig3.B).

사포닌 투여 8주째 (식이 10주)에서는 당뇨병 모델인 OLETF에 알코올을 투여한 군인 OAC, OAS 군에서 각각 96.4 ± 7.5 , 90.1 ± 5.4 로 OC(106.7 ± 8.7)에 비해 유의하게 낮은 공복혈당을 유지하고 있었다($p < 0.05$, $p < 0.001$). 60분에서는 알코올 투여한 OAC와 OAS군이(478.4 ± 40.1 , 501.6 ± 22.7) OC(418.0 ± 27.0)군에 비해 유의하게 높은 혈당을 나타내었으나($p < 0.01$, $p < 0.001$), 대조 동물 모델인 LETO에서는 LAS군의 혈당이 160.2 ± 36.4 로 LC군에(210.0 ± 35.1) 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 이는 알코올이 당뇨에 미치는 영향으로 인해 알코올을 섭취한 정상군보다 내당능이 저하되어 나타나는 것으로 사료된다. 90분에는 LAS군이 110.0 ± 8.5 로 LC, LAC(131.7 ± 13.4 , 129.7 ± 10.4)군에 비해 유의하게 낮은 수준을 보였고($p < 0.01$), 알코올을 섭취한 OAC(384.0 ± 53.1)에 비하여 OC군이(285.0 ± 20.7) 유의하게 높았다($p < 0.01$). 120분에서 사포닌을 투여한 LAS군이 92.3 ± 12.7 로 다른 두 군에 비하여 낮은 혈당이 유지되었다(LC; 128.2 ± 9.7 , LAC; 123.1 ± 7.6)(fig3.C).

혈당의 곡선하면적은 사포닌 투여 3주와 6주에서는 통계적 유의성이 있지 않았으나 사포닌을 투여한 군(LAS, OAS)에서 알코올만 투여한 군(LAC, OAC)보다 약간 낮은 경향을 보였다. 또 사포닌 투여 6주에서 알코올을 투여한 군(LAC, LAS, OAC, OAS) 대조군(LC, OC)보다 높은 경향을 보였으며, 8주째인 실험 종료 시점에서는 OAC와 OAS군이 OC 군에 비하여 유의하게 면적이 커졌는데 이는 알코올의 만성적인 투여로 인해 당 대사 조절 능력이 떨어진 것으로 보인다.

이 결과들은 만성알코올 섭취로 인한 내당능 장애로 공복혈당은 낮게 유지되는 반면, 식후 당 조절능력이 떨어져 혈당의 차이가 크게 나는 식후 혈당장애가 동반될 가능성이 높음을 시사한다. 또한 사포닌의 투여가 알코올로 인해 저하된 내당능에 영향을 미쳐 당부하 후 2시간인 120분에서 유의하게 혈당이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

다. 장기 무게의 (weight of organ) 결과

각 군의 간, 췌장, 부고환 지방, 장간막 지방의 무게를 측정하여 나타내었다(fig 4). 모든 값은 몸무게 (body weight, B.W.) 100g당 무게로 환산하여 나타내었다. 간의 무게는 OLETF 쥐에서 증가하였는데 사포닌을 투여한 OAS군에서 OAC군보다 유의하게 감소하였다. 알코올의 독성 효과로 인해 증가한 간의 크기가 증가하는 것을 사포닌이 지연시키는 것으로 사료된다. 당 대사의 주요 장기인 췌장은 대조 모델인 LETO에 비하여 당뇨유발 모델인 OLETF에서 매우 감소하였고, LAS군에서는 LC군에 비하여 유의하게 증

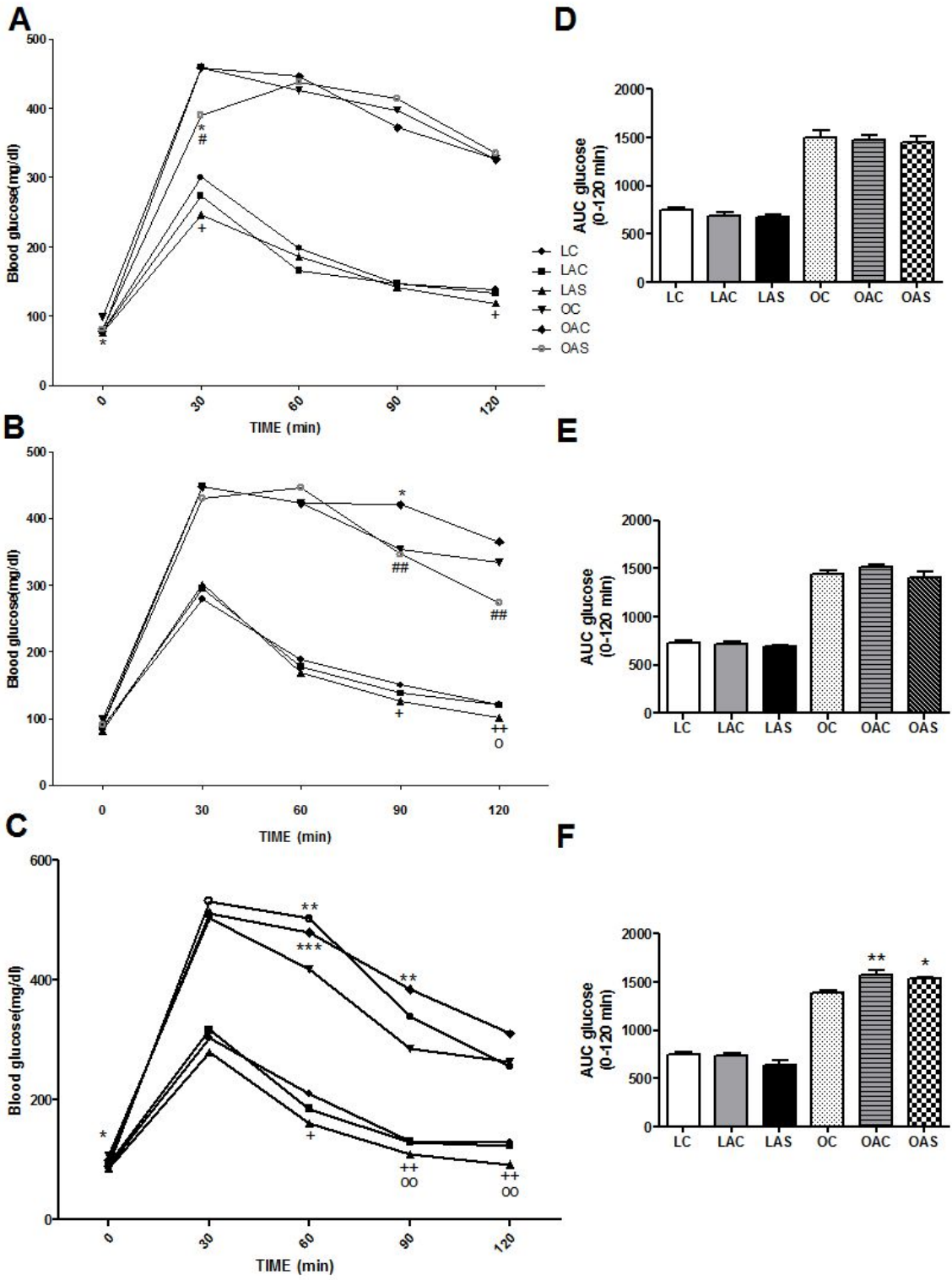


Fig 3. 복강내 당 부하 검사 (IPGTT, intraperitonear glucose tolerance test) 및 혈당 곡선하면적 (AUC, area under curve). 사포닌 투여 3주 (a,d), 6주 (b,e), 8주 (c,f)의 IPGTT와 AUC. 가하였으며, OAS 또한 OAC에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 비만으로 당뇨가 유도되는 모델인 OLETF의 부고환 지방과 장막간 지방의 양은 매우 증가하였으나, 사포닌의 투여로 인해 OAS가 OC와 OAC에 비해 유의하게 감소하였다. LETO군에서는 만성적인 알코올 투여로 인해 LC에 비하여 LAC와 LAS군 모두 유의하게 감소하였다. 이와 같은 결과는 사포닌의 장기간의 투여가 알코올에 의해 손상된 간조직의 증가와 비만으로 증가된 지방 조직의 증가를 지연시킴으로 대사 기능을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

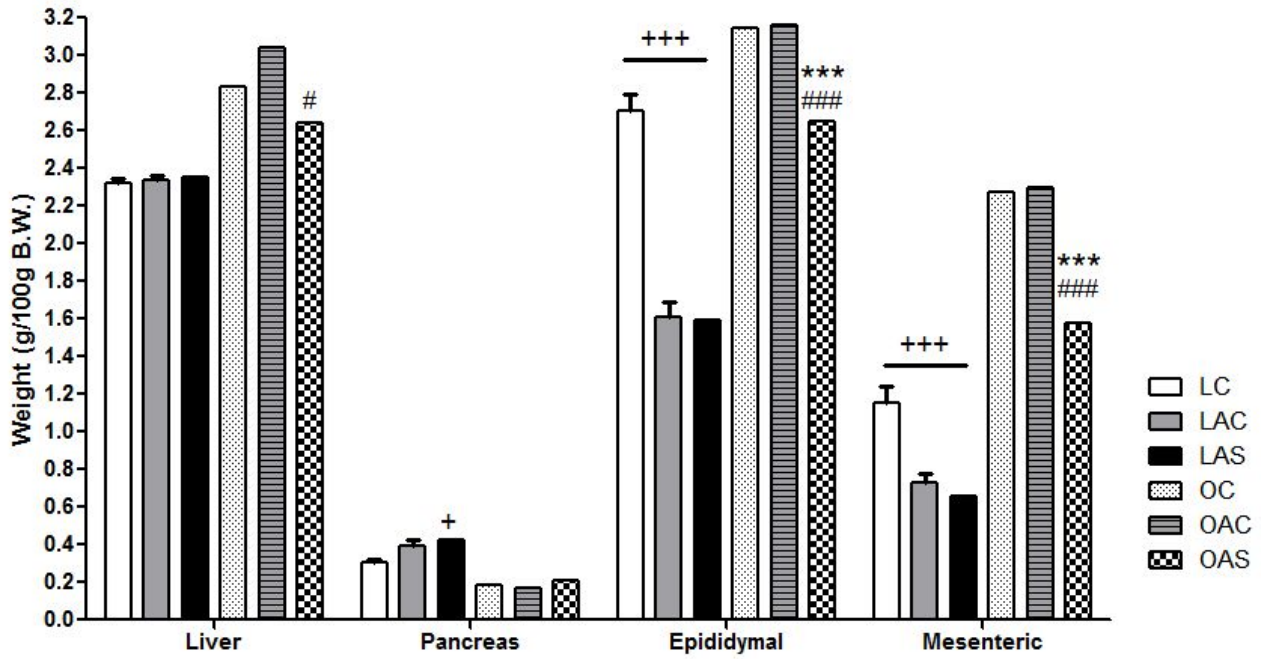


Fig. 4 실험군의 간, 췌장, 부고환 지방, 장간막 지방의 무게 (g).

라. 혈청 성분 화학적 분석 (measurement of plasma samples) 결과

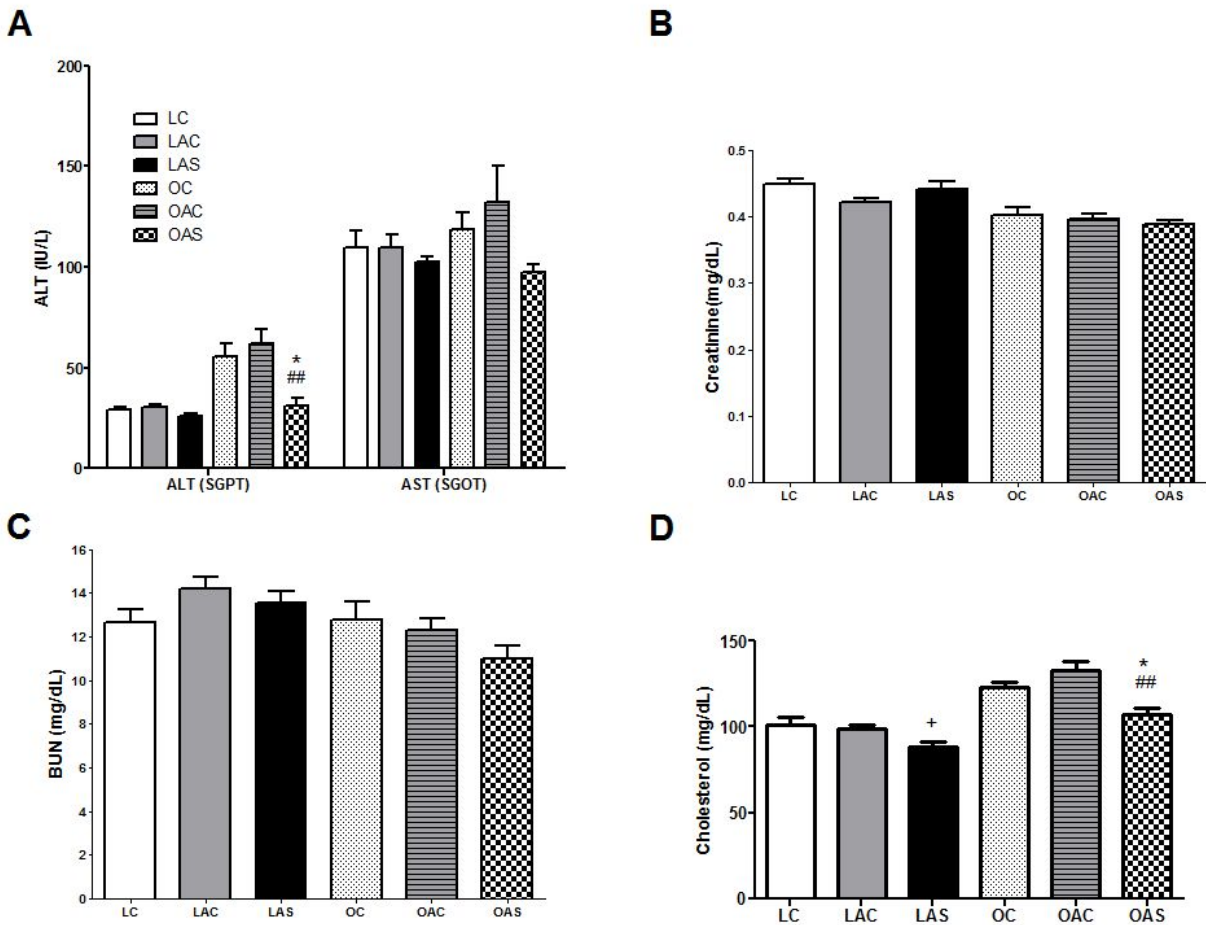


Fig 5. 혈청 ALT, AST, creatinine, BUN, cholesterol.

1) 혈청 독성 및 지질 관련 지표에 미치는 영향

알코올 및 사포닌이 미치는 독성효과를 알아보기 위해 간의 독성지표인 AST(aspirate animotransferase)와 ALT(alanine aminotransferase)를 측정하였으며, 신장 대사의 독성 지표인 BUN(blood urea nitrogen)과 creatinine을 측정하였다. 지질 대사 지표로는 total cholesterol의 혈중 농도를 측정하였다. 주로 간세포에 존재하는 효소인 ALT는 간조직의 손상에 의해 활성화 되며, AST는 간에 존재하는 근육, 적혈구 등에 존재하는 효소로 이들 세포가 손상을 입었을 때 활성화 된다. Fig 4A에서 볼 수 있듯이 LETO에 비해 OLETF군의 간 독성이 많이 증가되어 있으며 알코올 처리한 OC 군은 OAC에 비해 증가된 경향을 나타내고 있다. 하지만 사포닌을 처리하였을 때 ALT, AST 모두 알코올 대조군에 비하여 낮아진 것을 볼 수 있는데, 특히 ALT 효소의 농도가 OAS군에서 OC와 OAC 군보다 유의하게 낮았다($P < 0.05$ vs. OC, $P < 0.01$ vs. OAC.). 이는 만성 알코올 섭취로 인해 간 조직에 독성효과로 사료되며, 간 기능의 수치가 높을 경우 당뇨병의 발생 위험이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 이에 반해, 사포닌의 투여는 간 독성 효과를 감소시킴으로 알코올에 의한 간조직의 손상을 지연시킬 수 있을 것으로 사료된다. 신장 독성의 지표인 BUN과 creatinine은 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 사포닌을 투여하였을 때 LAC, OAC 군에 비해 감소하는 경향을 보였다(fig). 혈청 콜레스테롤은 OAC군이 OC군 보다 증가 된 경향을 보였지만, 사포닌을 투여한 LAS, OAS군 모두 알코올 대조군에 비하여 유의한 수준으로 감소하였고 ($P < 0.05$ vs. LAC, $P < 0.01$ vs. OAC), OC군과 비해서도 OAS군의 콜레스테롤 수치가 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$). 이는 알코올이 지질대사에 영향을 미치나 사포닌의 투여가 지질대사의 조절에 중요한 요인으로 작용하였다고 사료된다.

2) 혈청 Insulin 및 Leptin에 미치는 영향

만성 알코올을 섭취 및 사포닌이 미치는 대사적 영향을 알아보기 위해 insulin과 leptin의 혈중 농도를 측정하였다. 당 대사 조절의 중요한 insulin은 OLETF의 군에서 증가하며, OAC군에서 OC에 비교하여 유의하게 증가되어 있다($p < 0.01$). 하지만 사포닌을 투여한 OAS군에서는 유의하게 감소되어 고인슐린혈증이 개선되는 효과를 보이고 있다. 식욕을 조절하고 지방세포에서 분비 되어 대사 조절에 관여하는 leptin은 OLETF에서 매우 증가되어 고렙틴혈증을 보이고 있으나 만성적 알코올의 투여로 leptin을 분비하는 visceral fat이 줄어들어 leptin역시 감소한 것으로 사료된다. 하지만 여전히 높은 수준을 유지하고 있는 OLETF에서 사포닌의 투여로 OAS군이 유의하게 감소하여 고렙틴혈증의 감소 효과를 보이고 있다.

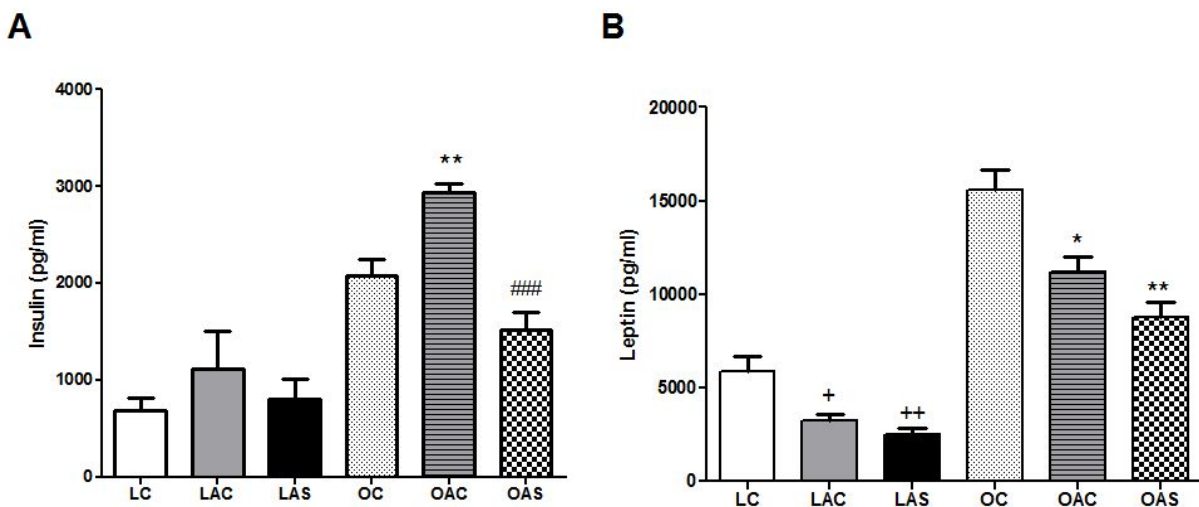


Fig 6. 실험동물의 insulin과 leptin의 농도

마. 간 및 췌장조직의 histology 및 morphology 변화

간과 췌장조직에서 hematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 간조직의 지방 침착 정도와 췌장세포의 조직학적, 형태학적 변화를 관찰하였다. 간 조직의 경우, LC가 LAC에 비해 간세포에서 지방침착이 간헐적으로 관찰되었으나 염증 소견은 없었다. OAC는 OC에 비해 알코올 섭취에 따른 간세포 내 지방축적이 뚜렷이 나타나 비정상적인 형태를 나타내었다. 염증소견은 관찰되었으나 세포괴사는 관찰되지 않았다(Fig. 7A). 또한, 알코올 섭취 후 췌도 (pancreatic islet)의 형태와 크기를 H-E 염색으로 관찰한 결과, OAC가 OC에 비해 더욱 명확하지 않은 원형형태와 감소된 크기를 보여 췌도의 손상을 확인할 수 있었다. 면역 조직화학 염색을 통해 OAC가 OC에 비해 췌도 크기가 췌도 크기는 약간 증가한 듯 보였으나 췌도가 형태학적으로 잘 유지되지 않았으며, 췌도 안의 α 세포와 β 세포 수의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 7B).

1) 간조직

간조직의 경우, LETO 쥐에 비해 OLETF의 간조직의 세포의 밀도가 낮고, 세포의 모양이 분명하지 않으며, 지방공포수가 많이 증가한 것을 볼 수 있다. 또한 알코올 섭취에 따른 간세포 조직 형태가 비정상적으로 나타내었으나, 사포닌의 투여된 군인 LAS, OAS에서는 조직 형태가 정상적으로 나타나며, 특히 OAS에서는 지방공포 수의 크기가 크게 감소하여 지방침착이 억제되었고 세포의 모양이 다소 뚜렷하게 나타나고 있다.

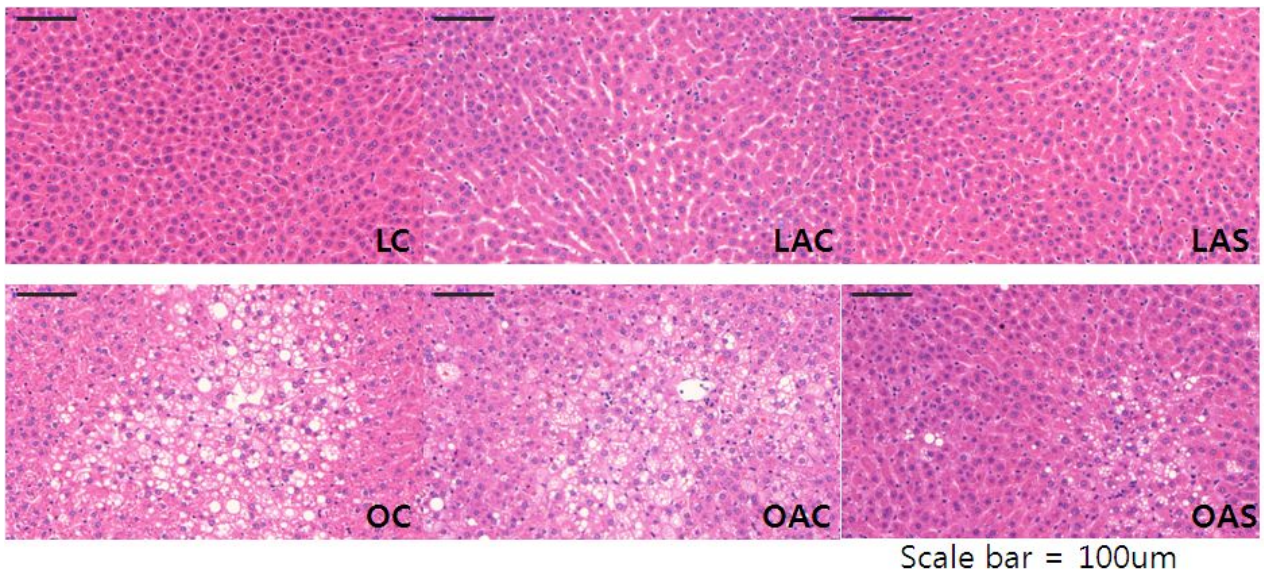


Fig 7. 실험군에서 간조직의 histology 및 morphology. x200.

2) 췌장조직

췌장조직의 경우, 알코올 섭취에 따른 Pancreatic β -Cell 형태가 감소와 파괴 정도를 볼 수 있다. LC와 LAS에 비해 OC와 OAC는 islet 수가 적고, 형태도 불분명 하다. 이에 반하여 LAS, OAS에서는 islet 형태가 정상적으로 나타나며, 특히 OAS에서는 islet의 크기와 형태가 분명하다.

3) Insulin

췌장 islet에서의 insulin immunoreactive cell 경우, 알코올 섭취에 따른 Islet 형태가 감소와 파괴 정도를 볼 수 있다. LC와 LAS에 비해 OC와 OAC는 islet 수가 적고, 형태도 불분명 하다. 이에 반하여 LAS, OAS에서는 islet 형태가 정상적으로 나타나며, islet의 중심부분과 mantle부분에서 insulin이 상당히 증가되었다.

4) Glucagon

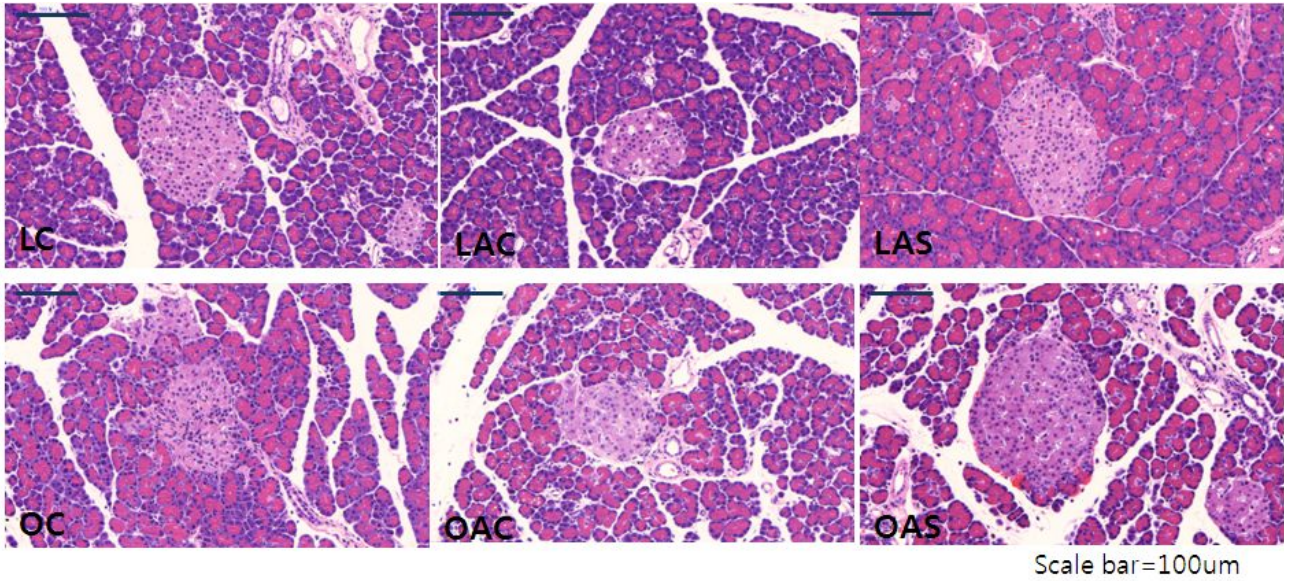


Fig 8. 실험군에서 췌장조직의 H-E staining한 histology 및 morphology 변화. x200,

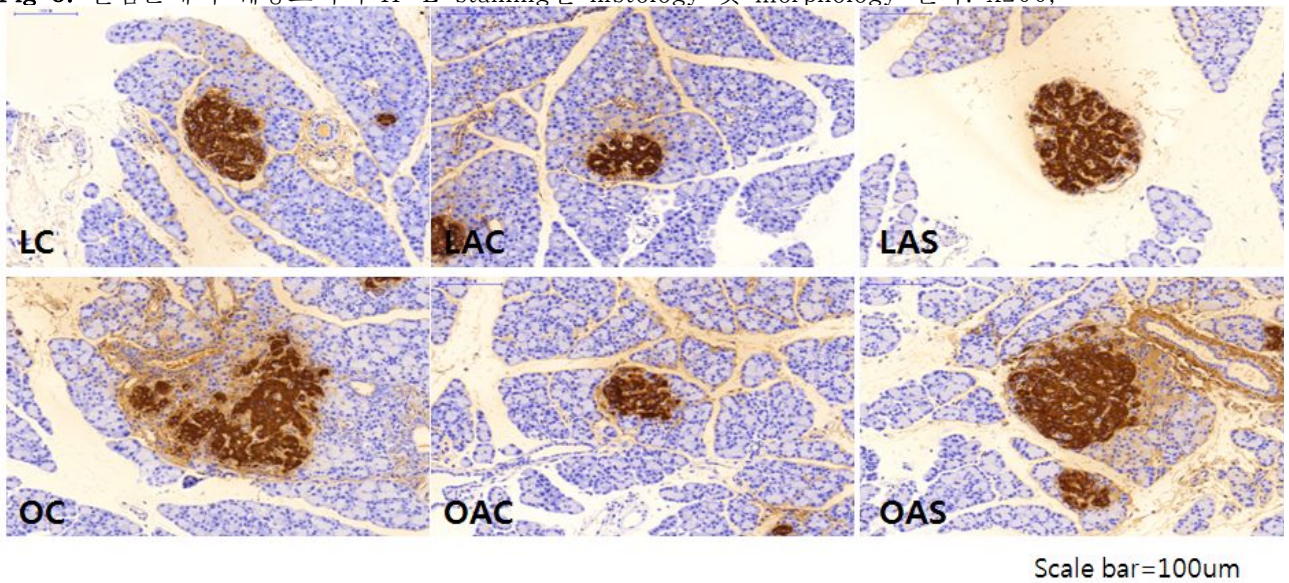


Fig 9. 실험군에서 췌장 islet에서의 insulin immunoreactive cell. x200,

췌장 islet에서의 glucagon immunoreactive cell 경우, 알코올 섭취에 따른 Islet 형태가 감소와 파괴정도를 볼 수 있다. LC와 LAS에 비해 OC와 OAC는 islet 수가 적고, 형태도 불분명 하다. 이에 반하여 LAS, OAS에서는 islet 형태가 정상적으로 나타나며, islet의 mantle 부분과 가장자리 부분에서 glucagon이 상당히 증가되었다.

바. HOMA-IR과 HOMA-β에 미치는 영향

HOMA-IR은 인슐린 저항성을 나타낸 것으로, OLETF에서 저항성이 많이 증가되어 있으나, 사포닌의 장기 간 투여는 OC와 OAC군에 비하여 유의하게 낮아졌다($p < 0.01$ vs. OC, $p < 0.001$ vs. OAC). 혈액에서 포도당을 근육, 간, 지방과 같은 조직에서 효과적으로 이용하도록 하는 인슐린의 효율성을 나타내는 지표로 동일한 혈당을 유지하는데 인슐린의 필요양이 증가하는 것이 인슐린 저항성을 나타낸다. 높은 인슐린 농도는 고 인슐린 혈증을 유발할 수 있고 유병기간이 길수록 인슐린 저하기능이 감소되며 이로 인해 혈당 조절

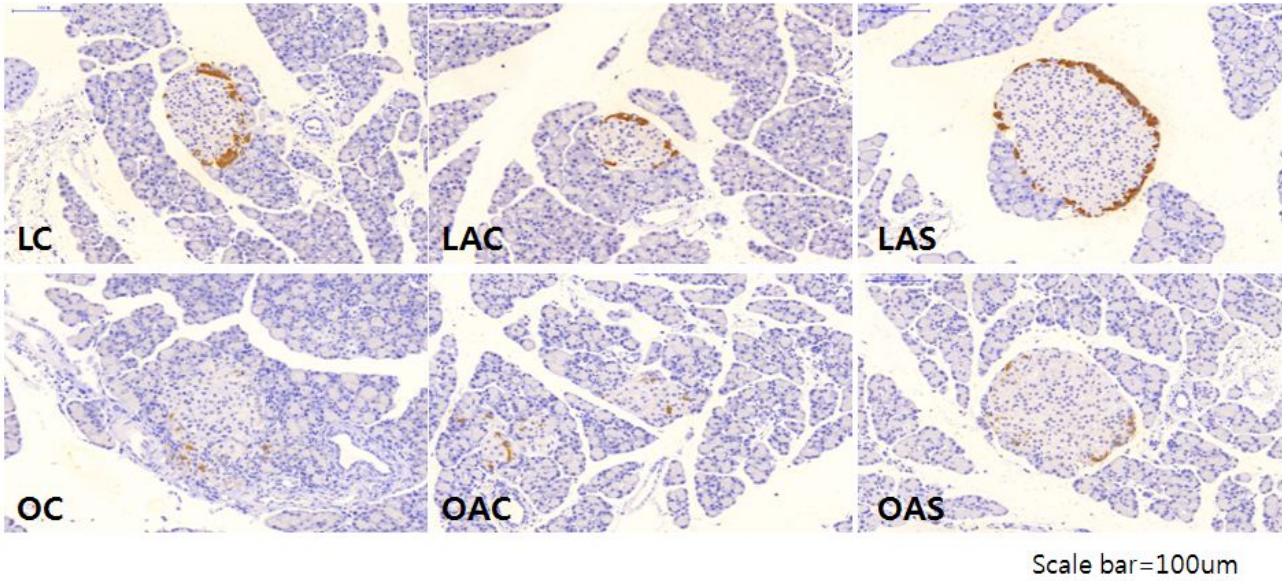


Fig 10. 실험군에서 췌장 islet에서의 glucagon immunoreactive cell. x200, 능력이 저하 된다. 이 결과로 볼 때 대사 장애가 있는 모델에서 사포닌은 인슐린의 효율을 증가시켜 내당능을 개선할 수 있는 것으로 시사된다. HOMA- β 는 췌장 β -cell 기능을 나타낸 것으로 인슐린의 분비를 나타낸다. HOMA- β 또한 OAC가 OC보다 유의하게 높아졌으나, 통계적 유의성은 없지만 사포닌의 투여한 OAS군이 감소되었다. 이는 알코올에 의해 인슐린 저항성과 β -cell의 기능이 떨어지지만 사포닌이 내당능의 개선에 기여를 한다고 사료된다.

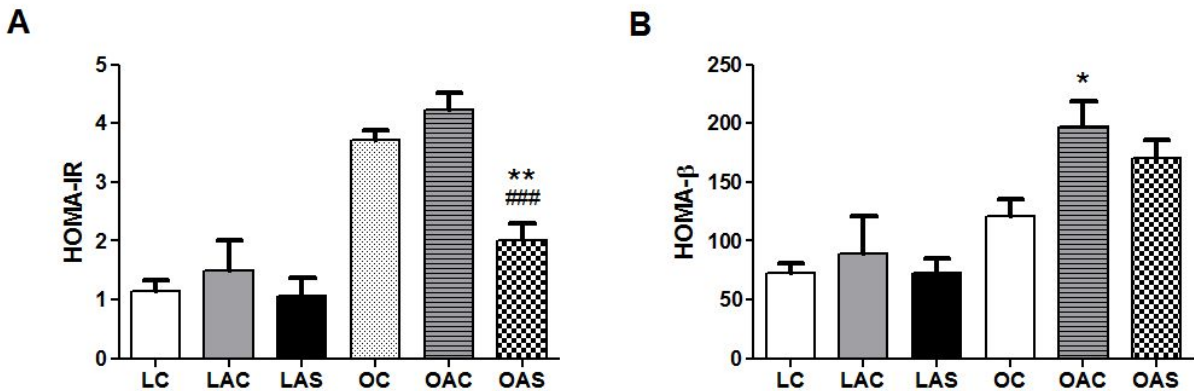


Fig 11. 실험군의 HOMA-IR과 HOMA- β .

4. 연구수행내용 결론

본 연구는 알코올 의존과 관련된 당뇨병의 신경생물학적 기전을 규명하기 위하여 식욕증가와 비만으로 인해 인슐린 저항성의 증가를 초래하여 당뇨병으로 진행되는 제 2형 당뇨의 동물모델인 OLETF 쥐와 정상대조군인 LETO 쥐에서 알코올 함유 식이로 유도된 알코올 의존 및 당뇨가 공존하는 쥐에서 체중변화, 식이 섭취량 변화, 식이효율, 내당능, 혈중 뇌 성장 인자, 장 호르몬, 당뇨관련 인자, 간 기능 지표, 지질관련 인자의 농도, 간과 지방조직의 조직형태학적 변화, 인슐린 저항성과 β -세포 분비능 등의 관찰을 통해 다음과 같은 실험 성적을 얻었다.

- 1) OLETF 쥐와 정상대조군인 LETO 쥐에서 알코올 섭취는 체중증가량의 감소와 식이효율이 낮은 경향이 나타났다.
- 2) OLETF 쥐와 정상대조군인 LETO 쥐에서 알코올 섭취는 공복 혈당은 낮추나 식후 혈당은 유의하게 상승시키는 결과를 관찰하였다.

- 3) OLETF 쥐에서 알코올 섭취는 혈중 ATL 농도 값이 유의하게 높은 것으로 나타나 간장독성이 유도된 것으로 나타났으나 사포닌의 투여한 군에서 개선되었다.
- 4) OLETF 쥐의 알코올 섭취는 혈중 insulin 농도를 유의하게 높였으나 사포닌의 투여로 고 인슐린혈증이 개선되었다.
- 5) OLETF 쥐의 leptin 농도는 정상대조군인 LETO 쥐에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났고, OLETF와 LETO쥐 모두 사포닌의 투여가 알코올군에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다.
- 6) OLETF 쥐의 알코올 섭취는 간의 지방축적이 크게 증가하였고, 체도의 형태 변화와 크기 감소가 나타났으나 사포닌의 투여로 체도의 형태 변화와 지방 공포수가 개선되었다.
- 7) OLETF 쥐에서 알코올 섭취는 췌장의 세포의 감소와 형태의 변화가 나타났고, insulin 및 glucagon의 분비가 감소하였으나 사포닌의 투여로 세포의 모양 및 호르몬의 분비가 개선되었다.
- 8) OLETF 쥐에서 알코올 섭취는 인슐린 저항성을 높이고 β -세포의 기능을 저하시켰으나 사포닌으로 인해 인슐린의 감수성이 증가되고 β -세포의 분비능의 개선을 보였다.

가. 실험 2. 고려 인삼 사포닌이 숙취에 미치는 임상연구

연구 내용

1. 임상시험 개요

(1) 제목

건강한 남성 자원자를 대상으로 고려인삼 사포닌 제제가 알코올의 약동학에 미치는 영향과 숙취해소능을 평가하기 위한 무작위배정, 이중-눈가림, 교차 임상시험

(2) 목적

건강한 성인 남성자원자를 대상으로 알코올과 함께 고려인삼 사포닌 제제를 복용한 후, 사포닌 제제가 알코올의 약동학적 특성과 숙취해소에 미치는 영향 및 사포닌 제제의 안전성을 탐색적으로 평가한다.

(3) 임상시험의 배경

OECD 국가들의 알코올섭취량이 전반적으로 감소추세에 있는 반면에 한국은 알코올 소비량이 감소하지 않는 국가 중 하나이며 OECD 국가 중 최고수준의 알코올 소비국가라고 할 수 있다.

과도한 음주로 인하여 각종 신체적, 정신적 질병이 이환되어 진료비의 부담이 증가하게 되고, 그로 인한 가족의 건강성에 문제가 생기게 되며, 음주운전 등 범죄로 인한 각종 사고율의 증가로 인한 사회경제적인 문제가 발생하게 되었다. 뿐만 아니라 생물학적 조건에 의하여 알코올에 보다 취약한 청소년과 여성의 음주와 관련하여 음주시작의 저연령화, 여성 음주율 증가 등이 큰 문제로 대두되고 있다

고려인삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer) 은 오갈피나무과 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로써 한방에서는 그 뿌리를 인삼(*Ginseng radix*)이라 하며 약용으로 사용하고 있다. 고려인삼의 화학성분 함량은 일반적으로 사포닌이 3-6%, 질소화합물 12-16%, 지용성분 1-2%, 탄수화물 60-70% 로 이루어져있다. 고려인삼의 사포닌은 다른 식물계의 사포닌과 구별하기 위하여 인삼의 배당체(glycoside)란 의미로 ginsenoside 라 불리며 부착된 당 종류 및 수와 극성에 따라 ginsenoside Ro, Rb1, Rb2, Rc, Rd 등 총 32 종류로 나뉜다. 고려인삼에서 분리된 총 32종의 ginsenoside 중 홍삼에서 32종, 백삼이 22종 존재하는데 홍삼에서 성분이 많은 것은 수삼을 홍삼으로 제조하는 과정 중에 가열 및 가수분해에 의해서 이성체화 및 분해 산물로 여겨지는 홍삼특유의 사포닌들이 생성되기 때문이다.

이중 ginsenoside Rb1 은 중추 신경 억제 및 정신안정작용, 항불안 작용 등이 있고 Rf 는 통증억제

작용이나 알코올 유도 뇌발육 장애 방어작용을 보이며, Rg1 은 기억 및 학습기능 증진작용, 항스트레스 작용이 있다. 이는 ginsenoside 가 GABA, glutamate, dopamine, noradrenalin, serotonin 등의 신경전달물질과 관련하여 중추신경계에 다양한 영향을 미치고 있기 때문으로 생각된다. 뿐만 아니라 ginsenoside 는 알코올 대사에 있어서 중요한 역할을 하는 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 와 alcohol dehydrogenase (ADH)의 작용을 증가시켜 몸 안의 알코올의 분해를 촉진하는 것으로 알려져있다.

이에 본 연구진은 고려인삼 사포닌 제제가 알코올의 약동학 및 숙취해소에 영향을 주는가를 탐색해 보고자 본 임상연구를 계획하게 되었다. 이를 위하여 본 임상연구에서는 건강한 성인 남성에게 알코올과 고려인삼 사포닌 제제를 같이 투여 후 알코올의 혈중농도를 측정하여 위약을 투여한 군과 비교하며, 숙취의 신체적, 주관적 척도 평가를 위하여 신경심리검사와 혈액검사 등을 실시할 예정이다.

(4) 임상시험 책임자

가톨릭대학교 서울성모병원 정신건강의학과 교수 김대진

(5) 공동 연구자

가톨릭대학교 의과대학 약리학교실 교수 / 가톨릭대학교 서울성모병원 임상약리과 과장 임동석

(6) 임상시험 담당자

- 1) 서울성모병원 임상약리과/ 가톨릭중앙의료원 임상연구지원센터: 한승훈, 전상일, 홍태곤, 백정기, 박갑진.
- 2) 서울성모병원 임상코디네이터/ 가톨릭중앙의료원 임상연구지원센터: 김경혜, 양희영, 김명현, 유승연, 안연주, 김보미, 이윤정.
- 3) 가톨릭대학교 서울성모병원 중독연구실: 방솔희, 곽수민, 최지혜, 임슬기.
- 4) 가톨릭중앙의료원 임상연구지원센터/ 약물분석실: 서효범, 이연희

(7) 실시 기관

가톨릭대학교 서울성모병원

(8) 분석기관

가톨릭중앙의료원 임상연구지원센터

(9) 임상시험 기간

식약청 승인일로부터 1년

(10) 대상 피험자

1) 선정기준 (Inclusion Criteria)

1. 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20세 이상 45세 이하인 건강한 성인 남성
2. 체중이 55kg 이상 70kg 이하 이면서, 이상체중(ideal body weight)의 $\pm 20\%$ 이내의 체중을 지닌 자 *이상체중(ideal body weight) = (신장cm - 100) \times 0.9
3. 선천성 또는 만성질환이 없고 내과적인 진찰결과 병적 증상 또는 소견이 없는 자.
4. 숙취 현상을 경험한 적이 있는 자
5. 본 임상시험에 대한 자세한 설명을 들은 후, 자의로 참여를 결정 하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

2) 제외기준 (Exclusion Criteria)

1. 스크리닝 당시 급성 질환이 의심되는 증상을 보이는 자
2. 임상적으로 유의하고, 활동성인 심혈관계, 호흡기계, 신장, 내분비계, 혈액학적, 소화기계, 중추신경계, 정신질환, 혹은 악성종양 등을 가진 자
3. 스크리닝 시 수행하는 건강검진(질병 기왕력, 신체검진, 활력징후, 심전도검사, 실험실적검사 등)을 통하여 피험자로 부적합하다고 판단된 자
4. 실험실적 검사 결과 중 아래에 해당하는 수치를 보이는 자
 - 혈중 AST/ALT > 정상 상한치의 1.5배
 - 혈중 Total bilirubin > 정상 상한치의 1.5배
5. 임상적으로 유의한 알러지성 질환 (투여를 필요로 하지 않는 경미한 알러지성 비염 제외)을 가진 자
6. 본 임상시험에서 사용되는 고려인삼 사포닌 제제의 성분에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
7. 의약품남용의 과거력이 있는 자
8. 시험개시(고려인삼 사포닌 제제 투여) 60일 이내에 타 임상연구의 임상시험용의약품을 투여 받은 자
9. 시험개시(고려인삼 사포닌 제제 투여) 전 60일 이내에 전혈을 공여한 자 또는 시험개시(고려인삼 사포닌 제제 투여) 전 20일 이내에 성분헌혈을 공여한 자
10. 임상시험 참여 시 제공되는 표준식사를 할 수 없는 자
11. 고려인삼 사포닌 제제의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 비정상적인 식사를 해온 자
12. 임상시험 기간 동안 자몽 함유음식물의 섭취를 금할 수 없는 자
13. 시험개시(고려인삼 사포닌 제제 투여) 14일 이내에 전문의약품이나 한약제를 복용하였거나, 7일 이내에 일반의약품 또는 비타민 제제를 복용한 자
14. 지속적으로 카페인(커피나 녹차 등>5컵/일)을 섭취하거나 입원 24시간 전부터 퇴원까지의 기간 중 카페인함유 음식물의 섭취를 금할 수 없는 자
15. 과도하게 흡연(담배>10개비/일)하거나 입원 24시간 전부터 퇴원까지의 기간 중 금연할 수 없는 자
16. 임상시험을 위한 음주를 제외하고 입원 24시간 전부터 퇴원까지의 기간 및 휴약기에 금주할 수 없는 자.
17. 20% 알코올 1g/kg 을 복용 후 의식소실이나 기억력 장애, 구토, 호흡마비 등을 경험한 자
18. 기타 사유로 인하여 시험자가 임상시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

3) 중지 및 탈락 기준

1. 피험자가 고려인삼 사포닌제제 및 알코올의 안전성이나 약동학적/약력학적 특성을 평가하는데 영향을 줄 것으로 예상되는 의약품을 투여한 경우
2. 피험자가 임상시험 중 고려인삼 사포닌제제 및 알코올의 투여 중단을 요구하거나, 시험 참여 동의를 철회하는 경우
3. 중대한 이상반응/유해반응이 발생한 경우
4. 임상시험 중 선정/제외 기준 등 중대한 계획서 위반 사항이 새롭게 발견되는 경우
5. 기타 임상시험책임자/담당자가 시험을 중지하여야 한다고 판단한 경우

(11) 건강기능식품의 원료 및 그 분량, 제형 등

임상시험에 사용되는 물질의 개요

● 시험물질 : 고려인삼 사포닌 제제

- (1) 제형 및 성상: 캡슐
- (2) 원료물질 및 분량: 1캡슐 중 고려인삼 사포닌 제제 500mg
- (3) 저장방법: 차광포장, 실온보관(1~30℃)
- (4) 용법·용량: 1일 1회 각 15캡슐 투여

● 위약:

- (1) 제형 및 성상: 캡슐
- (2) 원료물질 및 분량: 1캡슐 중 텍스트린 제제 500mg
- (3) 저장방법: 차광포장, 실온보관(1~30℃)
- (4) 용법·용량: 1일 1회 각 15캡슐 투여

1) 용량 및 설정 근거

식약청의 인삼/홍삼의 개별 기준, 규격에서 정한 제조 기준에 따르면 ginsenoside Rg1과 Rb1을 합한 함유량을 0.8-34mg/g 이어야 하고 일일 섭취량은 3~80 mg이 되어야 한다. 본 임상시험에서 사용하고자 하는 고려인삼사포닌 제제의 ginsenoside Rg1과 Rb1 이 함유량은 각각 1.43mg/g, 8.84mg/g 이었으며 이를 통해 ginsenoside 의 식약청 일일 권장 최대량인 80mg이하인 77.025 mg 을 복용할 수 있는 7.5 g을 용량으로 설정하였다. 알코올 섭취 용량은 2010년 국내에서 수행된 “울금 검 제제가 알코올의 혈중농도와 숙취에 미치는 영향”을 비롯한 기존 연구에서 사용된 용량을 참고하고 시험자의 기존의 경험을 바탕으로 하여 피험자의 안정성과 시험의 관리 및 진행에 지장이 없을 것으로 판단되는 20% 에탄올 1g/Kg 으로 정하였다.

2) 임상시험에 사용되는 물질의 생산/포장 및 라벨링

● 시험물질

: GMP인증을 획득한 공정을 갖춘 업체로부터 생산되어, 500mg씩 ‘캡슐’ 형태로 포장됨

● 위약

: GMP인증을 획득한 공정을 갖춘 업체로부터 생산되어, 500mg씩 ‘캡슐’ 형태로 포장됨

3) 건강기능식품(고려인삼 사포닌 제제)의 관리

고려인삼 사포닌 제제 및 위약은 시험책임자의 감독 하에 임상연구지원센터 실온 보관용 약장에 보관한다. 고려인삼 사포닌 제제 및 위약은 임상시험계획서에 따라서만 피험자에게 투여되도록 하고, 고려인삼 사포닌 제제 및 위약의 투여 및 관리에 대한 기록을 정확히 한다. 모든 임상시험 종료 시 고려인삼 사포닌 제제 및 위약을 적정한 절차에 의하여 반납 또는 폐기한다.

(12) 약동학 평가 및 안전성 평가

1) 약동학 평가

(1) 혈중 농도 분석

: 각 피험자로부터 채취된 혈장 시료에서 ethanol 의 농도를 측정한다. 검체 처리와 분석은 검증된 분석법에 따라 실시한다. (별첨1. 검체 보관 및 ethanol농도 측정 방법 참조)

(2) 약동학적 분석

: 약동학적 특성 분석 시 채혈 시각은 각 피험자에 따라 실제 채혈 시각을 사용하여 분석한다. 측정된 농도가 최소 정량한계 농도(LLOQ) 미만이거나, 실제 채혈을 시행하지 않았거나(not applicable) 또는 검체가 누락된 경우(missing sample)에는 사포닌 제제 및 위약의 농도값은 제외한다.

혈중 농도-시간 양상은 각 피험자에서 linear 또는 log/linear 형태의 그래프로 나타내고, 그리고 처치군에 따라 평균 혈중 농도-시간 곡선도 같은 방법으로 나타낸다. 얻어진 데이터로부터 non-compartmental method로 아래의 약동학 파라미터를 계산한다. 혈중농도-시간 곡선하면적. 혈중농도 상승구간 및 감소구간은 linear trapezoidal 합산에 의하여 계산한다. 단, 약동학채혈을 모두 마친 피험자만 약동학적 평가에 포함시키며, 약동학채혈이 종료되지 않은 상태에서 중도탈락 한 피험자는 약동학적 평가에서 제외한다.

평가 변수	
C_{max}	최고 혈중 농도
T_{max}	최근 투약으로부터 최고 혈중농도 도달시간
AUC_{max}	초회 투여 후 마지막 채혈시점(8시간)까지 계산한 혈중농도-시간 곡선하면적, LLOQ미만의 농도 값은 제외하고 계산함
$T_{1/2}$	초회 투약시 혈중농도-시간 곡선의 terminal phase에 해당하는 부분의 log-linear plot에서 직선회귀분석으로부터 얻은 상수소실속도상수(λ_z)와 $\ln(2)/\lambda_z$ 의 계산으로부터 얻은 반감기

2) 안전성 평가

(1) 자·타각 증상 등 이상반응 및 병용의약품

시험담당자는 임상시험 중 발생하는 모든 이상반응 및 병용의약품을 기록해야 한다.

증례기록서에는 이상반응 및 병용의약품에 대해 기록한다. 이상반응의 경우 이상반응의 증상 및 징후, 지속시간(시작일/종료일), 중증도, 경과, 결과, 중대성, 고려인삼 사포닌 제제와의 인과관계, 이상반응과 관련하여 취해진 조치 등에 관하여 기록한다.

임상시험 참여 이전부터 존재한 증상, 징후가 있는 경우, 이상반응으로 기록하지 않는다. 단, 임상시험 참여 이후 해당 증상, 징후의 빈도, 중증도, 범위 등에 변화가 있는 경우에는 이상반응으로 기록한다.

또한, 병용의약품의 경우에는 성분명, 투여량, 투여기간, 투여사유 등에 관하여 자세히 기록한다.

(2) 임상실험실검사

본 임상시험은 안전성과 약동학적 특성을 평가하는데 목적이 있으며, 이와 같은 임상시험의 경우 배정되는 피험자 수가 적을 뿐만 아니라 피험자 개개인에 따라 기준치가 상이하기 때문에, 임상실험실적 검사 결과에 대한 엄밀한 통계분석은 시행하지 않고, 피험자 별 임상 검사치 이상여부를 판단하여 이의 임상적 의미를 기재하고 시험의약품과의 관련성 여부를 검토한다.

(3) 모든 피험자의 임상실험실검사 결과 및 활력징후(체온, 혈압, 맥박수), 12-lead 심전도검사 결과는 도표화하여 총괄적으로 검토한다.

(13) 시험방법

시험은 단회 투여, 2원 교차 시험으로 진행한다. 피험자는 무작위 배정으로 순서군1과 순서군 2로 나누어 지며 각각의 군에 해당하는 순서대로 진행된다. Sequence A는 20% 알코올(소주) 1g/Kg 과 위약 7.5g (500mg *15캡슐)을 식후 1일 1회, Sequence B는 20% 알코올(소주) 1g/Kg 과 사포닌제제 7.5g (500mg*15캡슐)을 식후 1일 1회 투여 받게 된다. 위약 및 사포닌 제제는 알코올을 복용하기 30분 전에 투여하며, 10분간 복용하도록 한다. 경시적 채혈은 입원한 상태에서 고려인삼 사포닌 제제 투약 전(-0.5hr)부터 투약 후 8hr까지 실시한다.

Sequence	피험자수	1기	2기
순서군1 (AB)	N=7	알코올 + 위약	알코올 + 사포닌 제제
순서군2 (BA)	N=7	알코올 + 사포닌 제제	알코올 + 위약

- 총 피험자 수 : 7명 * 2군 = 총 14명
*휴약기 : 7일

A : 20% 알코올(소주) 1g/Kg + 위약 7.5g (500mg * 15캡슐)
B : 20% 알코올(소주) 1g/Kg + 사포닌제제 7.5g (500mg * 15캡슐)

1) 피험자번호 부여

임상시험에 참여하고자 서면동의한 자원자를 대상으로, 서면 동의한 순서에 따라 SXX(예. 서면동의 순서에 따라 S01, S02 등의 순서대로 부여) 형태의 스크리닝 번호를 부여하고, 재검까지 고려하여 최종 피험자로 선정한다. 고려인삼사포닌 제제 및 위약 복용을 위한 입원 첫날(-1d)에 공개 소프트웨어인 R(<http://www.r-project.org/>)을 이용하여 (또는 무작위배정 리스트를 참고하여) R01~R14까지 무작위 배정번호를 부여한다. 한 명의 피험자에게 두 개 이상의 스크리닝번호 또는 무작위 배정번호를 부여할 수 없으며, 한 개의 스크리닝번호 또는 무작위배정번호가 오직 한 피험자에게만 부여된다. 각 피험자에게 부여된 스크리닝번호, 무작위 배정번호, 이니셜은 임상시험이 끝날 때까지 피험자를 인식하는 피험자식별코드(subject identification code)로 사용된다.

2) 투여 방법 및 식사/식음

- (1) 모든 피험자는 투약일(1d, 8d) 하루 전인 -1d, 7d 오후 5시경 임상시험센터 병동에 입원하도록 하고, 예비검사 이후의 투약력 및 건강 정보를 확인 받고, 연구진이 제공하는 표준 식사로 저녁식사를 한다. 이후로 취침 시까지 식수를 제외하고 금식을 유지하며 오후 10시경 취침한다.
- (2) 입원 2일째(1d, 8d) 표준식 (오전 7시30분경) 섭취 후에 A, B 군은 오전 8시 15분경 위약 또는 고려인삼사포닌 제제 7.5g (500mg*15캡슐)을 물 240ml 와 함께10분간 각 군에 맞추어 복용한 후 오전 8시45분경에 20%알코올(소주) 1g/Kg을 복용한다. 알코올은 총 투여량을 세 번에 나누어 총 15분 간 나누어 복용한다. 시험책임자 또는 시험담당자가 직접 투여하며, 투여 후에는 시험책임자 또는 시험담당자가 구강 검사 등을 통하여 피험자가 이를 적절히 복용하였는지 확인한다.
- (3) 최초 투여 후 시험 기간 동안 사포닌 제제 및 위약 복용 후 적어도 1시간 동안은 45° 이상의 좌위 또는 기립 자세를 유지하여야 하며, 사포닌 제제 및 위약 복용 후 2시간 동안 식수를 포함한 모든 식이를 제한한다.
- (4) 투약 이후 오후12시 30분경 식사를 표준 식이로서 제공한다. 알코올 복용 시 소량의 간식을 제공한다.
- (5) 입원 기간 이외의 식이에 대해서는 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 식이는 피하도록 교육한다.

3) 병용의약품 및 주의사항

임상시험 기간 중에는 위약 및 고려인삼사포닌 제제를 제외하고, 일체의 의약품을 투여하지 않는 것을 원칙으로 한다. 단, 이상반응의 처치 등 필요한 경우에는 시험책임자의 판단에 따라 투여할 수 있다. 투여된 위약 및 고려인삼사포닌 제제가 본 임상시험의 약력학적 평가 및 안전성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상되는 경우, 해당 피험자는 탈락하게 된다(12. 중지 및 탈락 기준 참조). 투여된 모든 의약품과 투여사유는 반드시 근거문서와 증례기록서에 기재하고 시험책임자/담당자가 서명한다. 이외의 의약품 투여는 피험자가 반드시 연구진과 상의하여 결정할 수 있도록 한다.

입원 기간 중에는 제공되는 식사와 식수 및 간식 이외 어떠한 음식물 섭취도 허용하지 않음을 원칙으로 한다.

생활 습관 중 입원 1일(위약 및 고려인삼사포닌 제제 투여 48hr) 전부터 임상시험이 끝나는 기간 동안 결과에 영향을 미칠 수 있는 행동이나 식이 섭취를 제한하며, 각 피험자가 시험 기간 동안 해당 습관의 큰 변화가 없도록 교육한다.

4) 맹검의 유지

피험자는 임상시험의 설계와 본인이 투여 받는 연구용 물질의 종류에 대해서는 그 정보를 제공 받으나 본인이 어떤 순서군에 포함되는지 알 수 없다. 또한, 투약 및 채혈, 피험자 관리 등을 담당하는 임상약리과 연구진은 각 피험자에게 투여하는 연구용 물질의 종류를 알 수 있으나, 투약 준비 등 피험자가 자신에게 투여 되는 연구용 물질의 종류를 알 수 있도록 하는 절차는 피험자 입원 장소와 분리된 공간에서 진행한다. 순서군 정보는 신경심리검사 및 결과 분석 등을 진행하는 정신건강의학과 연구진에게 공개되지 않으며, 본 검사와 결과 분석 역시 실제 투약 및 채혈이 이루어지는 장소와는 분리된 곳에서 진행한다.

(14) 관찰 및 검사 항목

1) 스크리닝 검사 (-28d ~)

대상 피험자의 적합성 스크리닝 검사는 서면동의서를 작성한 피험자에 한해 실시된다. 개개의 피험자에 대하여 첫 투여 예정일 전 4주 이내에 시행하며 다음 검사에 의해 임상적으로 유의한 이상이 있는 피험자는 제외한다.

(1) 인구학적 정보 및 문진

피험자의 성명, 성별, 연령등과 같은 인구학적 정보를 비롯하여 신장(소수점 첫째 자리에서 반올림, cm), 체중(소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 한자리로 기록, kg), 그리고 병력, 헌혈력, 임상시험 참여 경험, 의약품 복용력 등을 문진한다.

(2) 신체검진

일반상태, 영양상태, 피부/점막, 눈, 이비인후계, 갑상선, 폐, 심장/순환계, 복부, 신장/비뇨생식계, 신경/정신계, 척추/사지/종양, 말초순환, 림프계

(3) 활력징후

혈압(좌위), 맥박수, 체온

(반드시 급격한 체위 변동 없이 5분 이상 좌위를 유지한 상태에서 혈압과 맥박수를 측정한다.)

(4) 12-lead 심전도

기본적인 항목 이외에 automatic analysis & recording에 의하여 별도로 출력되는 PR interval(msec), QRS(msec), QT/QTc(msec) 항목 등도 기록한다.

(5) 실험실적 검사 : 혈액학, 혈액화학, 뇨검사를 실시한다.

① 혈액학 검사

WBC with differential count, RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, platelets

② 혈액화학 검사

Glucose, BUN, uric acid, cholesterol, total protein, albumin, total bilirubin, alkaline phosphatase, AST, ALT, γ -GT, LDH, creatinine, Na, K, Cl

③ 뇨검사

Specific gravity, pH, protein, glucose, ketone, color, leukocyte, bilirubin, occult blood, urobilinogen, nitrite, microscopy

(6) 혈청검사

HBsAg, anti-HCV Ab, anti-HIV Ab

2) 입원 (-1d ~ 1d, 7d~8d)

모든 피험자는 위약 및 고려인삼사포닌 제제를 투여 받기 위해 -1d, 7d 에 서울성모병원 임상시험센터 연구병실에 입원한다.

(1) 신체검진, 혈압, 맥박수, 체온의 측정

: -1d, 7d, 사포닌 투여 전-0.5h, 알코올 투여 완료 후 4h, 8h

(2) 실험실적 검사 (혈액학, 혈액화학, 뇨검사)

: 1d 사포닌 투여 전(-0.5h), 1d(알코올 투여 완료 후8h), 8d(알코올 투여 완료 후8h)

(3) 약동학 채혈

: 1, 8d: -0.5h(사포닌 투여 전) 및 알코올 투여 완료 후0.33h, 0.67h, 1h, 1.33h, 1.67h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h (총24회)

(4) 이상반응/병용의약품 문진

: 피험자의 자발적인 보고 이외에 사포닌 투여 전 -0.5h(첫 투약 전은 제외), 1d (알코올 투여 완료 후4h, 8h) 및8d(알코올 투여 완료 후 4h, 8h), 15-16d에 실시

(5) 혈액검사 (Cytokine : IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , Methanol, Neurotrophic factor : Brain-derived

neurotrophic factor), analysis of immune cell

: -1d, 1,8d: -0.5h(사포닌 제제 투여 전), 알코올 투여 완료 후 2h, 4h, 6h, 8h

(6) 신경심리검사 (K-FENT (Kims Frontal-Excutive function Neuropsychological Test)) (별첨2)

: -1d, 1d(알코올 투여 완료 후8h), 8d(알코올 투여 완료 후8h)

(7) 퇴원

1d(알코올 투여 완료 후8h), 8d(알코올 투여 완료 후8h) 에 일정을 마친 피험자는 시험담당자의 확인 하에 퇴원할 수 있다.

3) Post-study contact

15~16d 양일 간 전화 등을 이용해 임상시험에 참여한 모든 피험자를 대상으로 유해사례 발생 여부를 확인한다.

4) 약동학 평가를 위한 채혈 방법 및 검체 보관 방법(별첨1)

위약 및 고려인삼사포닌 제제 투여 전 피험자의 팔 또는 손등의 정맥부위에 catheter를 유치하고, 공혈액으로 8ml씩을 채혈한다. 각 채혈 후에는 생리식염수 1ml를 catheter에 연결된 cap에 주입하여 혈액응고를 방지한다. 투여 후 각 채혈 시에는 cap안에 남아 있는 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 1ml의 혈액 및 생리식염수 혼합액을 빼내어 버리고, 약 8ml의 혈액을 채취한다. 혈액을 채취한 이후에는 다시 생리식염수 1ml를 catheter에 연결된 cap에 주입하여 혈액응고를 방지한다. 채취 된 혈액은 EDTA tube에 넣고 10초간 잘 혼합하고, 미리 준비된 ice-bath에 보관 후 즉시 별첨1의 검체 채취 및 보관의 방법에 따라 전처리하며 분석 전까지 냉장보관한다.

(15) 중지 및 탈락 기준

- 1) 피험자가 고려인삼 사포닌제제 및 알코올의 안전성이나 약동학적/약력학적 특성을 평가하는데 영향을 줄 것으로 예상되는 의약품을 투여한 경우
- 2) 피험자가 임상시험 중 고려인삼 사포닌제제 및 알코올의 투여 중단을 요구하거나, 시험 참여 동의를 철회하는 경우
- 3) 중대한 이상반응/고려인삼 사포닌 유해반응이 발생한 경우
- 4) 임상시험 중 선정/제외 기준 등 중대한 계획서 위반 사항이 새롭게 발견되는 경우
- 5) 기타 임상시험책임자/담당자가 시험을 중지하여야 한다고 판단한 경우

(16) 피험자의 대체

선별검사를 통해 선정되어 투여가 예정되어 있던 피험자 중 일신상의 이유 등으로 동의를 철회하거나 기타 여러 사유로 인하여 피험자의 자격을 상실하는 피험자가 발생하는 경우, 해당 피험자를 선별검사의 기준을 충족하였으나 선정 인원 초과 등으로 참여 대기상태에 있던 예비 피험자로 대체할 수 있다. 단 이는 피험자번호 부여 전으로 한정한다.

(17) 임상시험 조기 중단 기준

임상시험 진행 중 피험자의 안전과 임상시험의 진행에 심각한 영향을 줄 수 있는 중대한 이상반응(SAE)이 발생할 경우, 그 시점에서 진행 중인 피험자의 임상시험 참여를 종료하고, 해당 이상반응이 고려인삼 사포닌 제제와의 약리 작용과 관련이 있다고 생각되는 경우, 모든 임상시험 절차의 진행을 중단한다.

중대한 이상반응(SAE) 이외의 이상 반응이라 할지라도, 부작용의 빈도나 양상 등에 있어서 더 이상 임상시험을 진행하는 것에 대한 윤리적 타당성이 의심되는 경우 연구진의 논의를 거쳐 임상시험을 중단한다. 이상 반응이 발생한 해당 피험자의 임상시험 지속 참여 여부는 피험자 자신과 연구진이 논의하여 결정하며, 연구진이 의학적으로 해당 피험자가 더 이상 임상시험의 참여를 지속할 수 없다고 판단하는 경우에는 강제적으로 참여를 종료시킬 수 있다.

(18) 통계분석

본 시험의 목적은 사포닌 제제의 약동학적, 약력학적 활성을 탐색하는 것으로서, 대조군과의 비교 등을 통한 해당 제제의 효능이나 안전성 등에 대한 확증(confirmation) 시험이 아니다. 따라서 통계학적인 검정이 반드시 필요한 것은 아니나, 탐색적인 목적으로 적절한 검정을 유의수준 0.05로 실시할 수 있다. 인구통계학적 정보는 임상시험에 참여한 모든 피험자(Intention-To-Treat)를 대상으로 하며 안전성 평가는 한번이라도 임상시험용의약품 투약 받은 피험자를 대상으로 하고 약동학적 평가는 약동학 채혈을 모두 마친 피험자를 대상으로 분석한다.

1) 인구학적 정보

임상시험에 참여한 피험자의 연령, 신장, 체중을 비롯하여, 음주와 흡연 여부 등 인구학적 정보에 대해서 기술통계학적 분석을 시행한다.

2) 약동학 평가

개별피험자의 약동학적 파라미터에 대한 기술 통계량으로 표시한다. 사포닌 제제를 복용한 경우와 그렇지 않은 경우의 약동학적 파라미터 비교는 투여 후 8시간 동안의 자료를 바탕으로 한 최고혈중농도(C_{max}) 및 혈중농도 곡선하 면적(AUC_{last})을 plot하여 그 추세를 파악하며 필요 시 paired t-test 등의 적절한 통계학적 분석 방법을 이용할 수 있다.

3) 숙취의 신체적 척도 및 주관적 척도

개별피험자의 신경심리검사 점수 및 혈액검사 수치에 대한 기술 통계량으로 표시한다. 필요 시 적절한 통계학적 분석 방법을 이용할 수 있다.

4) 안전성 평가

이상반응 발생에 대해서 발생건수, 발생한 피험자수, 중증도(severity), 중대성(seriousness), 고려인삼 사포닌 제제와의 인과관계를 용량 군에 따라 기술통계학적으로 분석하고 필요에 따라 비모수적 방법을 적용하여 비교할 수 있다.

활력징후, 12-lead 심전도검사, 임상실험실검사 등의 검사 결과를 총괄적으로 검토하여 연구자에 의해 임상적으로 유의하다고 판단된 검사 항목에 한하여 필요에 따라 통계분석을 실시한다.

(19) 이상반응의 보고방법 및 평가기준

시험자는 임상시험 중 발생한 모든 이상반응에 대하여 기록하여야 한다. 증례기록서에는 이상반응의 증상 및 징후, 지속시간(시작일/종료일), 중증도, 경과, 결과, 중대성, 건강기능식품(사포닌 제제)과의 인과관계, 이상반응과 관련하여 취해진 조치 등에 관하여 기록한다.

1) 정의

(1) 이상반응(Adverse Event, AE)

임상시험에 사용되는 고려인삼 사포닌 제제를 투여 받은 피험자에서 발생한, 바람직하지 않고 의도되지 않은 징후(sign), 증상(symptom), 질병을 말하며, 해당 임상시험에 사용된 고려인삼 사포닌 제제와 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다. 여기에는 임상시험 중 발생하는 모든 바람직하지 않은 해부, 생리학적 병변이나 대사기능의 이상으로 인하여 나타나는 신체증상, 징후 및 임상검사치의 변화(단, 임상실험실검사의 비정상치는 임상적 의미가 있다고 판정된 것만 이상반응으로 수집)뿐만 아니라, 기존상태의 악화, 병발질환, 약물상호작용 등도 포함된다.

(2) 이상약물반응(Adverse Drug Reaction, ADR)

임상시험에 사용된 고려인삼 사포닌 제제의 임의의 용량에서 발생한 모든 유해하고 의도되지 않는 반응으로서, 임상시험에 사용되는 고려인삼 사포닌 제제와의 인과관계를 배제할 수 없는 경우를 말한다.

(3) 중대한 이상반응/이상약물반응(Serious AE/ADR)

임상시험에 사용되는 고려인삼 사포닌 제제의 임의의 용량에서 발생한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 각목의 1에 해당하는 경우를 말한다.

- 1) 사망을 초래하거나 생명을 위협하는 경우
- 2) 입원 또는 입원 기간의 연장이 필요한 경우
- 3) 지속적 또는 의미 있는 불구나 기능 저하를 초래하는 경우
- 4) 선천적 기형 또는 이상을 초래하는 경우
- 5) 기타 의학적으로 중요한 사항

(4) 예상하지 못한 이상약물반응(Unexpected ADR)

이용 가능한 의약품 관련 정보에 비추어 이상약물반응의 양상이나 위해 정도에서 차이가 나는 것

2) 이상반응의 기록

시험기간 중 나타나는 모든 이상반응은 책임연구자 및 임상시험담당자가 기록한다.

< 증례기록지(CRF)에 기록되어야 할 사항 >

- 이상반응 증상 및 징후
- 이상반응 시작일
- 이상반응 종료일
- 이상반응 중증도 (경증, 중등증, 중증)
- 이상반응 경과
- 이상반응 결과
- 이상반응 중대성
- 이상반응과 고려인삼 사포닌 제제와의 인과관계
- 이상반응에 대해 취해진 조치

3) 사포닌 제제와의 인과관계 평가

사포닌 제제와의 인과관계는 통계학적으로 검정할 수 없으므로 개인적 상황, 의학적 (생리학적, 병리학적, 약리학적) 가능성, 문헌정보 등을 이용하여 판단하며, 시간적 관계를 고려하는 것도 도움이 된다. 또한 사포닌제제의 투여 중지 및 재투여에 의한 소실·재발현 여부, 병용요법, 병용의약품 등을 고려한다.

인과관계	판단근거
1= 명확히 연관 있음 (Definitelyrelated)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 사포닌 제제를 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 사포닌 제제투여에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우 ➢ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우 ➢ 재투여 (가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우 ➢ 이상반응이 사포닌 제제 또는 동일 계열의 건강기능식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
2= 연관이 있음 (Probablyrelated)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 사포닌 제제를 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 사포닌 제제투여에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우 ➢ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
3= 연관의 가능성이 있음 (Possiblyrelated)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 사포닌 제제를 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 사포닌 제제 투여에 기인한다고 판단되는 경우 ➢ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
4= 연관가능성 적음 (Unlikely)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 사포닌 제제를 투여하였다는 증거가 있는 경우 ➢ 이상반응보다 가능성이 있는 원인이 있는 경우 ➢ 투여 중단 결과 음성이거나 모호한 경우 ➢ 재투여 결과가 음성이거나 모호한 경우
5= 명확히 연관이 없음 (Notrelated)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 피험자가 사포닌 제제를 투여 받지 않은 경우 ➢ 사포닌 제제와 이상반응 발현과의 시간적 순서가 타당하지 않는 경우 ➢ 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우
6= 불명 (Unknown)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우 ➢ 근거자료의 질적 수준이 떨어지거나 데이터간의 일관성이 없는 경우

4) 이상반응과 관련하여 취해진 조치

0= 취해진 조치 없음	No action taken
1= 사포닌 제제의 일시적 투여 중단	Study drug temporarily interrupted
2= 사포닌 제제의 투여중단	Study drug permanently discontinued
3= 치료의약품 병용투여	Concomitant medication taken
4= 비의약품 치료	Non-drug therapy given
5= 입원 / 입원기간의 연장	Hospitalization / Prolonged hospitalization

5) 중대한 이상반응의 보고

임상시험기간 중 중대한 이상반응/이상약물반응이 발생할 경우, 임상시험책임자 및 담당자는 피험자의 안전에 만전을 기해야 하며, 신속하고 적절한 조치를 취하여 이상반응을 최소화하여야 한다. 임상시험담당자는 즉시 임상시험책임자에게 보고하고 및 24시간 이내에 IRB에 보고하여야 한다. 중대한 이상반응 중 “예상하지 못한 심각한 이상약물반응”이 발생한 경우에는 다음 각 항에서 정한 기간 내에 신속히 식품의약품안전청장에게 보고하도록 한다.

식품의약품안전청장에게 보고하여야 하는 경우(SUSAR)의 기준은 다음에 따른다.

(1) 피험자가 시험기간 중 사망하였거나, 심각한 생명의 위험을 가져온 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고받거나 알게 된 날로부터 7일 이내에, 다만 이 경우 상세한 정보를 최초보고일로부터 8일 이내에 추가로 보고한다.

(2) 다른 모든 중대하고 예상하지 못한 이상약물반응의 경우에는 의뢰자가 이 사실을 보고 받거나 알게 된 날로부터 15일 이내에 보고한다.

의뢰자는 제1항의 보고와 관련하여 추가적인 안전성 정보를 주기적으로 해당 이상약물반응이 종결(해당 이상약물반응의 소실 또는 추적조사의 불가 등)될 때까지 보고하여야 한다.

6) 이상반응의 추적관찰

임상시험 책임자 또는 담당자는 이상반응이 나타난 피험자에 대해 증상이 완화되고 비정상적 진단검사실 검사치가 기준치로 회복되거나, 혹은 관찰된 변화에 대해 만족스러운 설명이 될 때까지 추적 관찰한다. 시험담당자는 IRB의 요구가 있는 경우에는 관찰 보고서를 IRB에 제출한다.

(20) 자료관리

본 임상시험의 자료관리는 서울성모병원 임상약리과 표준작업지침에 따라 시행하며, 시험계획서에 명시하지 않은 기타 사항에 대하여는 ICH-GCP 및 KGCP 규정에 따라 시행한다.

1) 증례기록서 기록 (Source document verification)

근거문서(source document)에는 기록해야 할 자료가 발생할 때 즉시 기록한다. 만약 임상 종료 시까지 기록되지 않은 경우 적절한 누락사유를 기록하여야 한다. 근거문서의 모든 수정사항은 먼저의 기록이 보이도록 한 줄로 그어 표시한 후 수정자료, 수정자, 수정사유, 수정일을 기록한다. 먼저의 기록이 보이지 않도록 하는 수정액 등을 사용하여서는 안 된다. 근거문서 작성이 완료된 피험자의 자료는 증례기록서에 입력한다. 모든 자료는 관련 정부기관, IRB 등의 요구에 의해 확인될 수 있도록 근거문서는 보관한다. 또한 시험자는 임상시험을 시작하기 전, 증례기록서 등 기타 적절한 곳에 정상범위나 참고치를 제시하여 자료의 확인(verification) 및 검증(validation) 하는데 사용할 수 있도록 한다.

2) 증례기록서의 작성

시험책임자로부터 위임을 받은 증례기록서 작성자는 근거문서의 내용을 증례기록서에 정확하게

입력한다.

3) 근거문서 대조 작업

시험책임자는 증례기록서 작성자와 다른 1인을 근거문서 대조 담당자로 지정하여 근거문서의 내용과 증례기록서의 내용이 일치하는 지를 확인한다.

(21) 피험자 동의서 양식

임상시험의 실시에 있어서 피험자에게 본 시험의 내용 및 고려인삼 사포닌 제제의 효과, 이상반응에 대해 사전에 충분히 설명한 후 피험자의 동의를 얻어 동의서를 작성하고 증례기록양식에 동의 취득 연월일을 기재한다.

(22) 피험자의 안전 보호에 관한 대책

- 1) 스크리닝 검사를 통하여 피험자가 본 임상시험에 적절한지 엄격히 평가한다.
- 2) 임상시험계획서에 따라 임상시험을 실시하고 시험기간 중 정기적인 검사와 검진을 통하여 이상반응 및 이상약물반응의 출현 여부와 그 정도를 평가하고 적절한 조치를 취한다.
- 3) 채혈 시 감염방지를 위해 피험자들의 혈액채취는 일반인들의 출입이 통제된 방에서 실시하며, 사용하는 기구는 완전 멸균된 1회용으로 한다.
- 4) 임상시험계획서에 따라 임상시험을 실시하고, 임상시험기간 중 정기적인 검사와 검진을 통하여 이상반응 및 이상약물반응의 발생 여부와 그 정도를 평가하고 적절한 조치를 취한다.
- 5) 응급상황 발생 시 서울성모병원에서의 응급상황에 대한 대처방안에 준하여 조치한다.

<별첨 1> 검체 보관 및 ethanol 농도 측정 방법

1. 검체 채취 및 보관

15 ml conical tube에 내부표준물질인 1-propanol (5 mg/dl in 0.6M perchloric acid)을 3 ml씩 분주하여 ice 상에서 보관한다. Cooling한 EDTA tube에 채혈된 혈액은 즉시 ice상에서 보관하고, 미리 준비된 15 ml conical tube에 1 ml씩 분주한 후 5 초간 혼합한다. 3000 rpm (4 °C)에서 8분간 원심분리한 후 상층액을 1 ml씩 20 ml headspace vial에 분주하고 곧바로 capping한다. 분석 전까지 -20 °C 냉동 보관한다.

2. 검체처리 및 분석방법

2. 1. 분석대상

혈액에서의 ethanol의 농도를 측정하기 위해 gas chromatography-tandem mass spectrometry를 사용한 참고문헌 (Ibrahim A. Wasfi et al, 2004)의 조건을 참조로 하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 안정성 등에 대한 분석방법 타당성 검증 (validation)을 완료한 후 검체 분석에 응용한다. 구체적인 방법과 조건은 변경될 수 있다.

2. 2. 분석기기 조건

전 처리된 혈액 시료는 다음의 GC/MS 분석기기 조건에서 정량한다.

- 1) Headspace 조건

- Instrument: Agilent 1888
- Vial equilibration time: 10 min
- Oven temperature: 70 °C
- Sample loop temperature: 80 °C
- Transfer line temperature: 90 °C
- GC cycle time: 20 min

2) GC 조건

- Instrument: Agilent 7890
- Column: DB-VRX capillary column (l=60 m, I.D.=0.25 mm, dF=1.4 μm)
- Column temperature: from 40 °C to 200 °C
- Back inlet temperature: 200°C
- Split ratio: 20 : 1

3) MS 조건

- Instrument: Agilent 7000B
- Thermal Auxiliary 2 temperature: 230 °C
- Ion Source temperature: 200 °C
- Ion Source mode: EI
- Electron energy: -70 eV
- Scan Function: SIM

2. 3. 검량선 작성

표준용액은 25 ml volumetric flask에 ethanol 표준원액을 가하고 DW로 정량하여 제조하며, 잘 혼합한 후 2 ml glass vial에 분주하여 4°C에 냉장 보관한다. 냉장 상태에서 계대 희석된 표준용액을 혈액에 spiking하여 혈액 중 ethanol 농도가 0.5~400 mg/dl가 되도록 표준시료를 만든다.

내부표준물질인 1-propanol (5 mg/dl in 0.6 M perchloric acid)을 4 ml씩 분주하여 ice 상에서 보관 중인 15 ml conical tube에 표준시료 1 ml을 넣고 즉시 cap을 닫는다. 5초간 혼합한 후 검체채취 및 보관의 방법과 동일하게 전처리하고 headspace 방법으로 GC/MS에 주입한다.

여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 ethanol의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성한다. 하루에 실험을 1번 실행하여 일내 재현성을 구하고 3일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구한다.

2. 4. 혈액 시료의 처리

피험자로부터 각 시간 별로 채취하여 검체채취 및 보관의 방법과 동일하게 전처리 후 -20 °C에 보관 중인 시료를 검량선과 동일한 headspace 방법으로 GC/MS에 주입한다.

2. 5. 혈중농도계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 ethanol의 피크 면적 비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈액 중 ethanol의 농도를 구한다.

2. 연구수행 내용 결과

1) 약동학적 특성 평가 결과 및 분석

본 임상시험에서 얻어진 ethanol의 모든 혈장 농도 결과 값에 대한 약동학적 통계 분석은 Phoenix WinNonlin 6.3를 이용하였으며, C_{max} , AUC_{last} 에 대한 ANOVA 분석은 SAS version9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC)를 이용하여 분석하였다. 모든 약동학적 파라미터 값은 비구획모형(Noncompartmental model)을 이용하여 산출되었으며, 기술통계학적 분석을 시행하였다. AUC는 선형사다리꼴규칙으로 계산하였다.

(1) 치료군에 따른 약동학적 특성 비교

치료군 별 ethanol의 혈장농도 변화 양상을 Figure 10.1-1 에 나타내었으며, 약동학적 파라미터를 Table 10.1-1에 요약하여 나타내었다. 최고 혈중 농도(C_{max})는 위약을 투여한 경우는 82.56 ± 9.13 mg/dl, 사포닌을 투여한 경우는 82.86 ± 14.3 mg/dl 이었다. 혈장농도 시간곡선하 면적(AUC_{last})은 위약을 투여한 경우는 369.71 ± 64.65 hr*mg/dl, 사포닌을 투여한 경우는 352.03 ± 77.49 hr*mg/dl 이었다.

위약 투여에 대한 사포닌 투여의 약동학적 평가 결과 C_{max} 의 경우 점추정치 비율 및 그 90% 신뢰구간은 1.0025(0.9372-1.0723)로 동등성 범위를 만족하였고, AUC_{last} 는 0.9531(0.8670~1.0478)로 동등성 범위를 만족하였다.

또한 C_{max} 와 AUC 0-36h, 에 대한 ANOVA 분석 결과의 $\ln(C_{max})$, $\ln(AUC_{last})$ 모두 통계적으로 유의한 차이($p=0.9407$, $p=0.3822$)가 없는 것으로 확인되었으며 순서군 효과($p=0.6720$, $p=0.4990$)와 $\ln(AUC_{last})$ 의 시기효과 ($p=0.1137$) 는 인정되지 않았으나 $\ln(C_{max})$ 의 시기효과는 ($p=0.0421$) 로 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다.

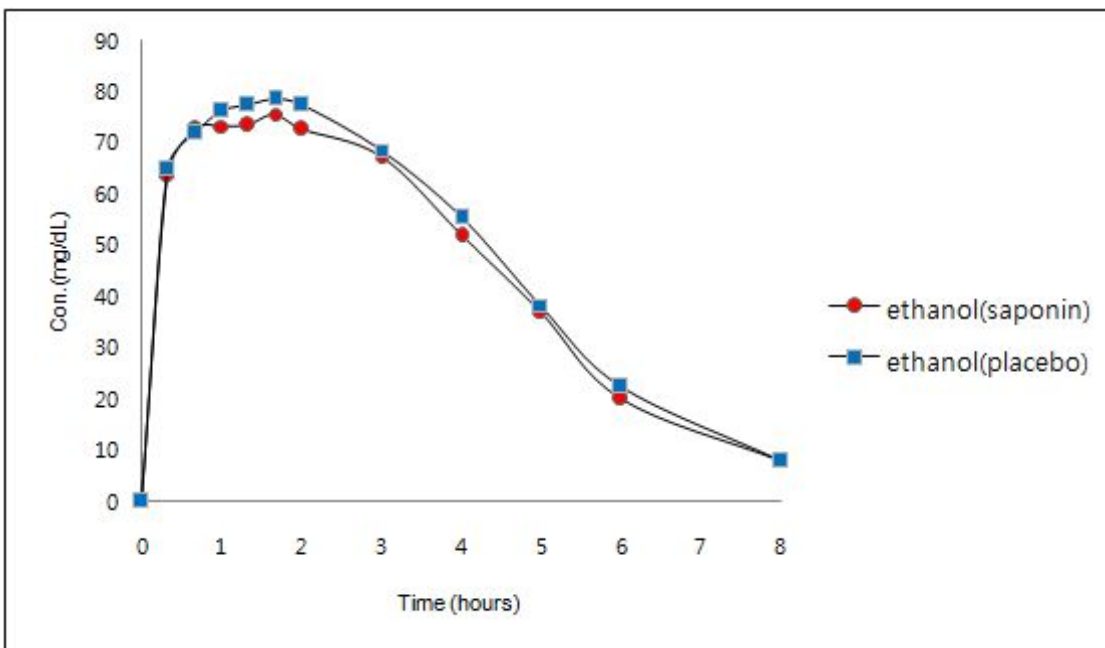


Fig. 1 Plasma Concentration of Ethanol

약동학적 파라미터	Ethanol(placebo)		Ethanol(saponin)	
	Mean ± SD	CV(%)	Mean ± SD	CV(%)
C _{max} (ng/ml)	82.56 ± 9.13	11.06	82.86 ± 14.3	17.26
T _{max} (hr)	1.18 ± 0.52	43.78	1.54 ± 0.79	51.26
AUC _{last} (hr*ng/ml)	369.71 ± 64.65	17.49	352.03 ± 77.49	22.01
T _{1/2} (hr)	1.09 ± 0.44	40.69	1.07 ± 0.58	54.69

Table 1 Pharmacokinetic parameters

(2) 위약 투여 대비 사포닌 투여의 점추정치

Table 2 위약 투여 대비 사포닌 투여의 점추정치 비율 및 90% 신뢰구간 (C_{max}, AUC_{0-36h})

Parameter	Ratio ¹⁾	90% CI
C _{max}	1.0025	(0.9372, 1.0723)
AUC _{last}	0.9531	(0.8670, 1.0478)

Table 3 ANOVA of PK parameters of alcohol. 위약 투여 대비 사포닌 투여

Ln(C _{max})					
Source	DF ¹⁾	SS ²⁾	MS ³⁾	F-stat	P-value
Sequence	1	0.0006	0.0006	0.1892	0.6720
Sequence*ID	11	0.3754	0.0341	3.7647	0.0188
Form	1	<0.0001	<0.0001	0.0046	0.9407
Period	1	<0.0001	0.0479	5.2842	0.0421
Error	11	0.0997	0.0091		
Ln(AUC _{last})					
Source	DF	SS	MS	F_stat	P_value
Sequence	1	0.0289	0.0289	0.4889	0.4990
Sequence*ID	11	0.6501	0.0591	3.2905	0.0301
Form	1	0.0149	0.0149	0.8285	0.3822
Period	1	0.0530	0.0530	2.9534	0.1137
Error	11	0.1976	0.0180		

¹⁾ Degree of Freedom

²⁾ Sum of Squares

³⁾ Mean Square

2) 약동학 및 안전성 평가 결론

(1) 약동학 평가

본 연구를 통해 고려인삼으로부터 추출한 사포닌 성분 약 77 mg 투여 이후의 알코올의 약동학적 특성을 위약군과 비교하여 평가할 수 있었다. 비록, 사포닌 투여 그룹에서 위약군에 비해 통계학적으로 유의한 알코올 농도 감소나 제거 속도 증가 등을 보여 주지는 못하였으나, 교차시험을 통해 사포닌 투여 시 위약군

에 비해 알코올 농도가 전반적으로 감소하는 경향이 있다는 것은 확인할 수 있었다. 단회 투여라는 시험 설계 상의 한계와 적은 피험자 수 등을 고려할 때, 이러한 사실을 통계학적으로 정확히 평가하기 위해서는 보다 충분한 예산 및 시간을 확보하여 비교적 큰 규모의 임상연구를 수행하는 것이 바람직하다고 판단된다. 본 연구진은 사포닌 투여 시 알코올 농도에 뚜렷한 감소를 보였거나, 신경심리검사 혹은 숙취 평가에서 현저한 변화를 보인 피험자 등을 대상으로 영향 원인에 대한 분석을 수행 중이며, 향후 논문 등으로 출판할 예정이다. (신경심리검사의 해당 항목은 신경심리검사 결과 분석 부분을 참조) 본 연구는 숙취의 주요한 원인으로 판단되는 알데히드의 농도를 측정하지 못했다는 한계를 가지고 있으나, 알데히드의 체내 생성 속도에 비해 제거 속도가 매우 빠르다는 사실이 알려져 있으므로, 이를 고려할 때, 알데히드는 단지 일시적으로 체내에 존재할 것이라 예측해 볼 수 있으며, 이에 따라 본 연구에서 측정한 알코올의 시간대 별 농도 변화가 알데히드의 농도 변화까지도 반영하고 있다고 가정할 수 있겠다. 종합적으로 판단할 때, 본 연구는 사포닌 투여 후 음주로 인해 체내에서 형성되는 알코올 및 알데히드의 농도 변화에 대한 기초 자료를 확보한 연구로서 의의가 있으며, 함께 측정한 여러 가지 생체 지표들과 신경심리검사와의 연계 분석을 수행하면, 후속 연구의 기반 정보까지도 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

(2) 안전성 평가 결론

본 임상연구계획서에 근거한 안전성 평가 항목을 미리 정해진 시점에 따라 평가하였을 때, 확인된 대부분의 이상반응은 알코올에 의한 것으로 판단되었으며, 위약에 비교하여 특징적인 사포닌의 약물유해반응으로 판단되는 증상이나 징후는 발견되지 않았다. 따라서 건강한 성인 남성에게 대한 고려인삼 사포닌 성분 약 77 mg의 경구 투여는 비교적 안전하다는 결론은 얻을 수 있었다. 이는 향후 용량 증량 혹은 반복 투여 시험의 근거 자료로 활용될 수 있으리라 기대되며, 현재의 추천 용법이 안전성 측면에서 바람직함을 지지하는 결과이기도 하다.

3) 사포닌 투여 여부에 따른 인지기능평가 수행 양상 및 주관적 숙취감의 변화

(1) 분석방법

본 실험의 결과는 SPSS 통계프로그램 (version 18.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균과 표준오차를 산출하였으며, two-way repeated ANOVA와 paired-T test를 시행하였다.

(2) 분석 결과

① 집단 간 인지기능 수행 양상 비교

two-way repeated ANOVA를 이용하여 사포닌 투여 집단과 위약 집단 간에 인지 기능 수행 양상의 변화에 차이가 있는지를 살펴본 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이는 변인은 관찰되지 않았다. 다만, 상당수의 변인들에서 위약 집단에 비해 사포닌 투여 집단이 더 나은 수행을 보이거나 수행의 손상 정도가 덜한 것으로 나타났다.

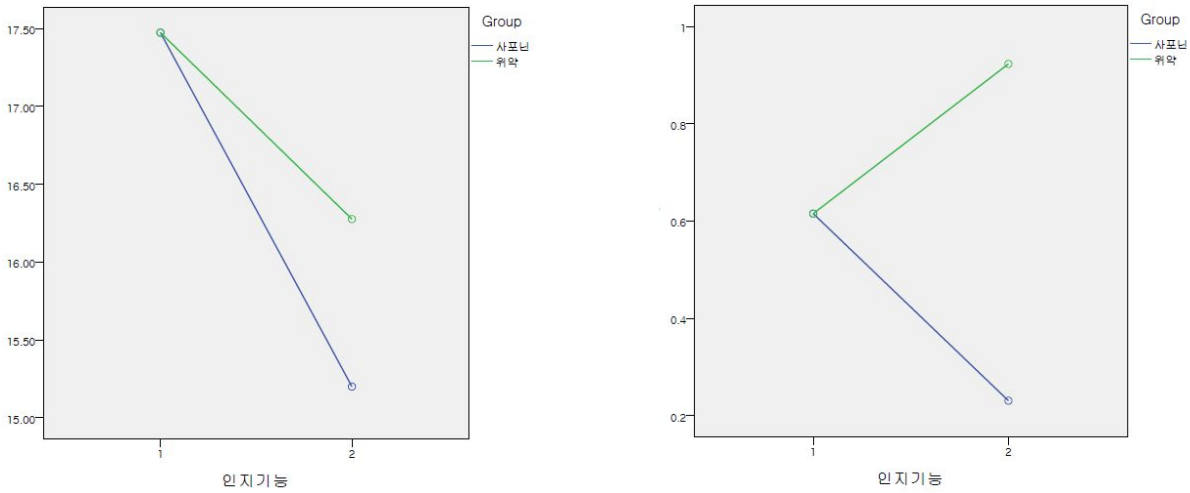


Fig 1. Cognitive Function's Stroop Test Result

Table 1. Stroop Test Result

	placebo Mean ± SD	saponin Mean ± SD
Simple Test - time	12.05 ± 2.04	11.88 ± 2.35
Simple Test - error	.19 ± .32	.08 ± .18
Middle Test - time	.12.86 ± 2.41	12.55 ± 2.27
Middle Test - error	.15 ± .24	.23 ± .25
Interference Test - time	16.88 ± 3.89	16.34 ± 3.86
Interference Test - error	.77 ± .80	.42 ± .57

분석 결과를 살펴보면, 사포닌을 투여한 집단이 위약 집단에 비해 더 짧은 수행 시간을 기록하였으며, 초기 시행에서 변화한 정도도 더 큰 것으로 나타났다. 비록 분석 결과 통계적으로 유의하지는 않았지만 상당수의 변인에서 동일한 패턴이 관찰되고 있어 사포닌 투여가 숙취 해소에 도움이 될 수 있다는 경향성은 확인할 수 있는 결과라고 할 수 있다.

② 집단 간 주관적 숙취감 변화 양상 비교

two-way repeated ANOVA를 이용하여 사포닌 투여 집단과 위약 집단 간에 주관적 숙취감 변화 양상에 차이가 있는지를 살펴본 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이는 변인은 관찰되지 않았다. 다만, 상당수의 변인들에서 위약 집단에 비해 사포닌 투여 집단이 동일 시간대에 숙취감이 더 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

분석 결과를 살펴보면, 사포닌을 투여한 집단이 위약 집단에 비해 전반적인 숙취감, 갈증, 어지러움 등에서 더 낮은 불편감을 호소하는 것으로 나타났다. 비록 분석 결과 통계적으로 유의하지는 않았지만 일부 변인에서 그래프의 변화 패턴이 시간이 지날수록 사포닌 투여 집단에서 더욱 급격한 패턴을 보이고 있는 것

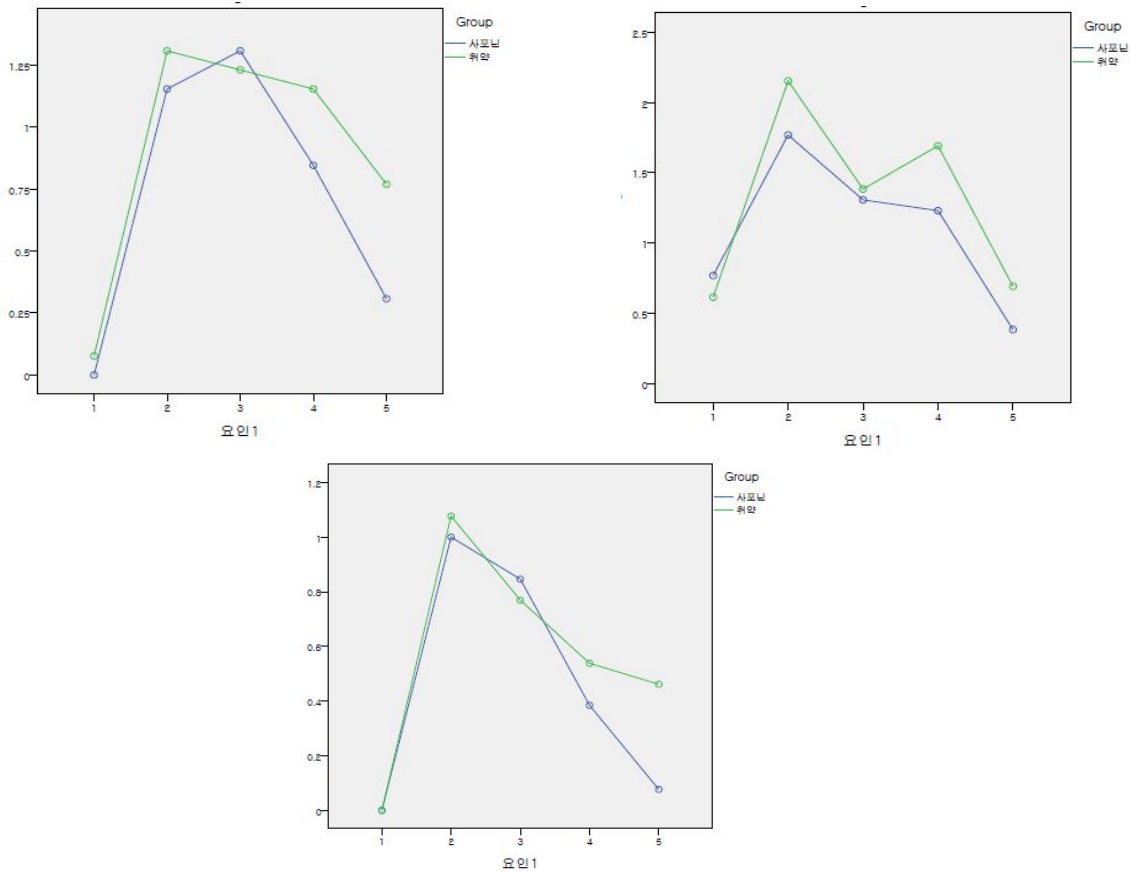


Fig 2 주관적 숙취 평가
 으로 관찰되고 있어 사포닌 투여가 숙취 해소에 도움이 될 수 있다는 경향성은 확인할 수 있는 결과라고
 할 수 있다.

Table 2. 주관적 숙취 평가

	placebo Mean ± SD	saponin Mean ± SD
숙취1(전반적인 숙취)	.91 ± .74	.72 ± .75
숙취2(갈증)	1.31 ± .87	1.1 ± .80
숙취3(피로감)	1.37 ± .78	1.49 ± .92
숙취4(두통)	.49 ± .79	.39 ± .60
숙취5(어지러움)	.57 ± .57	.46 ± .63
숙취6(식욕부진)	.09 ± .13	.19 ± .39
숙취7(복통)	.02 ± .05	.02 ± .05
숙취8(메스꺼움)	.12 ± .20	.28 ± .44
숙취9(심장두근거림)	.19 ± .34	.31 ± .59

(3) 분석 결과 고찰

사포닌을 투여 했을 때 숙취 해소에 효과가 있는지 알아보기 위하여 위약 집단과 인지 기능 및 주관적 숙취감의 변화 양상을 비교해 보았다. 결과적으로 통계적으로 유의한 결과는 나오지 않았지만, 사포닌이 숙취 해소에 어느 정도 도움이 될 수 있음을 확인하는 결과라고 할 수 있다. Fig 2에서 보이는 것과 같이 변화패턴이 뚜렷한 점을 고려할 때, 보다 많은 표본 수가 확보된다면 분석 결과 통계적 유의성을 확보할 수 있을 것으로 생각됨.

③ 대응 표본 T 검증 -통계적으로 유의한 변인

	placebo Mean ± SD	saponin Mean ± SD
숙취1(전반적인 숙취)-5번째 측정치	.77 ± .93	.31 ± .48
숙취 강도 총점-4번째 측정치	5.08.49 ± 4.15	3.77 ± 3.29

Fig 3. 대응 표본 T검증으로 분석 하였을 때 통계적으로 유의한 변인.

대응 표본 변화 패턴에서는 두 집단 간의 통계적 유의성이 확인되지 않았으나, 각 측정 시점 별 평균 비교 시 일부 변인에서 통계적 유의성이 확인되었음.

또한, 알코올 투여 후 시간이 경과 할수록 두 집단 간의 차이가 더 확연해 지는 것으로 판단 됨.

제 2 세 부

1. 효능 성분 분리 정제 기술 확립-원료 표준화

가. 표준 원료 선정

1) 백삼 및 홍삼의 일반 성분분석

4년근 백삼과 6년근 홍삼의 일반 성분 분석을 위해 식품위생법의 식품공전 제 16, 인삼제품류의 인삼 성분 분석 실험방법을 따랐으며 그 분석 방법은 다음과 같다.

*백삼과 홍삼의 일반 성분분석법

(1) 추출물 수율

시료 30g을 1L 용량의 삼각플라스크에 취하여 추출용매 6배량을 가한 후 일정하게 조정된 수욕조 상에서 냉각기를 부착하여 reflux시키면서 8시간 가온하여 추출액을 상온으로 냉각하여 여과지 (Toyo No.41)로 여과하였으며 잔류물에 대하여 같은 조작을 반복하여 여액을 합쳐 70~80℃의 수 온에서 감압농축(Buhi EL131, Rotavapor. Swiss)하여 추출물로 함.

(2) 수분

식품위생법의 식품공전(1997년) 제 7일반 시험법 1. 일반 성분 시험법 수분 분석법에 따라 105℃ 상압 건조법에 의하여 실시.

즉, 미리 가열하여 항량으로 한 접시에 검체 3 ~ 5g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 놓고 규정된 온도의 건조기에 넣어 2시간 건조한 후 데시케이터 중에서 30분간 식힌 후 무게를 측정하여 무게의 변화 차이를 백분율로 나타냄.

(3) 조단백질

조단백질의 함량은 auto-kjeldahl법(기기명 :Buchi auto-Kjeldahl B-339 system, swiss)을 사용.

시료에 진한 황산을 가하여 약간의 촉매와 같이 가열시키면 분해와 산화 환원이 동시에 일어나 시료 중의 질소는 암모니아가 되고 황산암모늄으로서 분해액 중에 남는다. 여기에 35% NaOH을 가하여 증류하고 유출되는 암모니아를 붕산 표준용액에 흡수 시켜 이를 0.1N-HCl로 적정하여 질소량을 산출한 후 단백질계수 6.25를 곱하여 조단백질 함량을 구함.

(4) 조지방

시료 중의 조지방 함량은 Soxtec system 1043 지방 추출 장치를 이용하여 추출한 조지방 함량을 정

량함.

(5) 회분

회분은 전기회화로(Nabertherm LG/SH, Germany)에서 550℃에서 5시간 가열하여 남은 잔유물을 회분으로 계산하여 백분율로 나타냄.

(6) 조사포닌 분석방법 (n-Butanol Extract)

검체 약 5.0g을 100ml의 농축플라스크에 위하고 수포화부탄을 50ml를 가하여 환류 냉각기를 붙여 수욕 중에서 70~80℃로 약 1시간 가열 추출한 다음 냉각한 후 여과하고 잔류물에 대하여 같은 조작을 계속 2회 반복. 여지는 물포화부탄을 10ml로 세척하고 여액 및 세액을 합하여 250ml 분액 깔대기에 넣고 물 20ml로 잘 진탕시켜 수세하였다.

물포화부탄을 추출액 전액을 미리 항량으로 한 농축플라스크에 옮겨 수욕 중에서 감압농축하여 부탄올을 제거한 다음 그 잔류물에 에테르 50ml를 넣고 환류냉각기를 붙여 수욕 중에서 36℃로 30분간 가열하여 탈지시킨 후 에테르를 제거하였다.

잔류물은 105℃에서 2시간 건조하고 다시 데시케이터에서 30분간 식혀 무게를 달아 다음 식에 따라 조사포닌의 양을 구하였다.

$$\text{조사포닌 (mg/g)} = (A - B) / S$$

A : 물포화 부탄올층을 농축 건조한 후의 플라스크의 무게(mg)

B : 항량으로 한 빈 플라스크의 무게(mg)

S : 검체의 채취량(g)

*백삼과 홍삼 추출물의 일반성분 및 조사포닌 분석 결과는 다음의 표 1과 같다.

표1)

항목	백삼	홍삼
수분(%)	12.1	6.8
회분(%)	6.9	5.7
조지방(%)	1.7	1.5
조단백(%)	15.8	14.8
총당(%)	67.8	75.9
조사포닌(%)	6.7	9.8

* 백삼과 홍삼의 진세노사이드 함량 측정 조건은 다음 표 2와 같다.

표2) HPLC 조건

기 구	Waters HPLC/ALC-244
팩킹 재료	Lichrosorb NH2(Merck)
칼럼	4.6(i, d) × 200mm 스테인레스 스틸
이동상	진세노사이드에 대하여 아세토나이트릴/물/n-부탄올 (80/20/10)
유속	1.0ml/min
차트 속도	0.5cm/min
검출기	RI, 8X

2) 백삼과 홍삼의 추출용매에 따른 인삼성분 변화

백삼과 홍삼의 인삼성분 추출수율과 인삼 사포닌의 변화를 조사한 결과는 표 3과 같다. 추출온도 70~80℃이며, 추출시간은 8시간동안 총 3회 진행하였다.

표3) 추출용매에 따른 인삼 성분변화 (단위 :대건물%)

구분	용매	조사포닌 수율(%)	진세노사이드 (%)		
			Rg1	Rb1	계
백삼	물	10.6	1.35	0.64	1.99
홍삼	물	12.4	1.55	0.46	2.01

위 표에서 보는 바와 같이 백삼보다 홍삼의 조사포닌 수율(%)가 더 높았으며 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합도 홍삼이 더 높았다.

이에 대한 확인 실험으로 백삼과 홍삼을 과쇄하여 각각 24시간 추출하고 필터링한 후에 상등액을 농축하여 사포닌을 획득한 후 80% 알코올로 재 추출한 사포닌에 대해 조 사포닌 추출량을 확인하였다. 실험결과 사포닌 추출 효율이 각각 건물량 1kg 당 백삼(건삼)이 295g, 홍삼이 322g 추출되었다. 따라서 홍삼은 백삼에 비해 약 9.1% 사포닌 추출량이 증가하였음을 확인하였다. 따라서 **고려인삼 사포닌 제제는 홍삼을 주원료로 하는 것이 가장 바람직하다는 결론을 내렸다.**

표4) 80% 알코올로 재 추출한 사포닌에 대한 조사포닌 추출 효율

	인삼(건삼)	홍삼
조 사포닌 추출양(g)	295g	322g
사포닌 추출효율(%)	0%	9.1% 증가

나. 백삼과 홍삼의 표준 추출 용매 선정

고려인삼 사포닌 제제의 표준 원료인 홍삼에 대한 가장 효율적인 사포닌 추출 용매를 선정하고자 하였으며, 표준 추출 용매 선정 방법으로는 물과 알코올의 농도별 추출물의 사포닌함량을 비교하였다. 실험 결과 다음과 같이 80%에탄올을 추출 용매로 진행한 경우가 사포닌의 수득율이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합도 80% 에탄올로 추출한 것이 가장 양이 많았다.

구분	용매	조사포닌 수율(%)	진세노사이드 (%)		
			Rg1	Rb1	계
백삼	물	10.6	1.35	0.64	1.99
	40%에탄올	12.5	1.92	0.91	2.83
	60%에탄올	14.1	2.02	0.93	2.95
	80%에탄올	16.6	2.25	1.05	3.3
	무수에탄올	14.5	2.09	0.92	3.01
홍삼	물	12.4	1.55	0.46	2.01
	40%에탄올	15.4	2.35	0.56	2.91

	60%에탄올	18.5	2.62	0.59	3.21
	80%에탄올	20.1	2.79	0.63	3.42
	무수에탄올	16.9	2.63	0.57	3.2

추가 확인 실험으로 추출용매를 각각 물, 20%에탄올, 30%에탄올, 40%에탄올, 60%에탄올, 80%에탄올, 무수에탄올로 나누어 TLC패턴을 조사하였는데 홍삼 10g에 해당하는 추출물별 조사포닌을 메탄올 10ml에 용해시켜 3 μ 씩 점적하였을 때의 사포닌 양이 물의 경우 96.6 μ g인데 에탄올 함량이 높아질수록 점점 증가하여 80%에탄올에서는 138.7 μ g으로 최고치에 달하고 무수에탄올의 경우 128.8 μ g으로 다시 줄어드는 것이 확인되므로, 사포닌의 함량을 최대로 높이기 위해서는 고려 인삼 사포닌 제제는 80%에탄올로 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 고려인삼 사포닌 제제의 백삼과 홍삼의 최적 추출 용매는 80% 에탄올로 선정하였다.

	물	40% 에탄올	60% 에탄올	80% 에탄올	무수 에탄올
조 사포닌 추출양(μ g)	96.6	115.4	123.4	138.7	128.8
조 사포닌 추출효율 (물대비%)	0%	19% 증가	27% 증가	43.5% 증가	33% 증가

다. 최적 분리 정제 추출법 선정

고려인삼 사포닌 제제의 원료 및 제제의 표준화를 위해 분리 정제 추출법을 표준화하고자 하였으며 홍삼으로부터 사포닌을 분리 정제 추출하는데 있어 최적 분리 정제 추출법 선정 실험을 다음과 같이 진행하였다.

가) 각 홍삼 50g (근 7 : 3 미)을 준비한다.

나) 4종류의 용수를 준비한다.

- 극성수, 탈 이온수, 수소수, 상수

다) 시험방법

(1) 각 홍삼 50g에 준비된 용수를 아래와 같이 넣는다.

- 1차 70 $^{\circ}$ C 7배수 48시간 추출
- 2차 80 $^{\circ}$ C 5배수 48시간 추출
- 3차 90 $^{\circ}$ C 5배수 48시간 추출

(2) 각 추출물을 아스피레이터를 이용 80 $^{\circ}$ C에서 농축한다.

(3) 농축물을 71brix로 맞춘다.

(4) 1~3차 추출 농축물을 이용해 Ginsenoside Rg1+Rb1을 분석한다.

(5) 분석은 건강기능식품공전 50분 시험법에 따른다.

라) 시험결과

(1) bi-polarized water (극성 강화수)

-> 71brix 농축물 33g 획득 수율 66%

-> Ginsenoside Rg1+Rb1의 합 5.5 mg/g

- (2) de-ionized water (탈 이온수)
 - > 71brix 농축물 32.9g 획득 수율 65.8%
 - > Ginsenoside Rg1+Rb1의 합 5.98 mg/g
- (3) 수소수 (H+ 이온 강화 수)
 - > 71brix 농축물 32.6g 획득 수율 65.2%
 - > Ginsenoside Rg1+Rb1의 합 4.34 mg/g
- (4) 상수 (일반 수돗물)
 - > 71brix 농축물 31.4g 획득 수율 62.8%
 - > Ginsenoside Rg1+Rb1의 합 4.78 mg/g

마) 상수 대비 용수별 결과 증감율

구분	수율	Rg1+Rb1 합	상수 대비 증감율	
상수	62.8%	4.78 mg/g	-	
극성 강화수	66%	5.5 mg/g	수율	3.2% ↑
			Rg1+Rb1	0.72 mg/g ↑
탈 이온수	65.8%	5.98 mg/g	수율	3% ↑
			Rg1+Rb1	1.2 mg/g ↑
수소수	65.2%	4.34 mg/g	수율	2.4% ↑
			Rg1+Rb1	0.44 mg/g ↓

바) 결론

일반 수돗물에 비해 사포닌 즉 진세노사이드 추출 효율은 모든 용수에서 전반적으로 추출 효율이 상승하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서 탈 이온수(de-ionized water)로 추출한 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합이 일반 수돗물에 비해 1.2mg/g 상승 하였다.

따라서 탈 이온수(de-ionized water)로 홍삼을 추출하는 것이 사포닌 추출 효율에 있어 가장 바람직한 것임을 확인할 수 있으므로 탈이온수(de-ionized water)를 표준 추출 용매로 선정하였다.

2. 효능 성분 증폭 시스템 확립

고려인삼 사포닌 제제의 탄수화물 증폭(식욕억제) 효능과 알코올 증폭 완화 효과 실험에 있어서 효능 성분인 사포닌의 함량을 최대화하기 위한 효능 증폭 시스템을 선정하고자 하였다.

가. 최적 효능 성분 증폭 시스템 선정 실험

고려인삼 사포닌 제제의 최적적인 효능성분 증폭 시스템 선정을 위해 환류, 한외여과, 주파수 발생기, 효소를 활용하는 방법에 대해 다음과 같은 효능 성분 추출 효율 측정 실험을 진행하였다.

1) 시험준비

1. 각 홍삼 100g (근 7 : 3 미)을 준비한다.
2. 4종류의 실험을 진행.

- 1) 환류를 통한 추출: 70℃ 홍삼 중량비 7배수의 물로 70℃에서 48시간 환류후, 100℃에서 48시간 추출
- 2) 한외여과를 통한 추출: 0.2µm 제균 필터 및 한외여과막 (50K cut-off(cross flow filter: stabilized cellulose membrane (Sartorius), feed pressure 1.5bar, permeate rate:0.2µm

Membrane=>80 L/h, 50kd. Membrane=>25 L/h,) 통과한 후 잔여물에 대해 100℃에서 48시간 추출

- 3) 주파수 발생기를 통한 추출: 주파수 발생기(PRW Q 8000)을 사용하여 28HZ, intensity 75로 조정 한 후, 8시간 가한 후, 100℃에서 48시간 추출
- 4) 효소를 통한 추출: NE효소 5%(홍삼 중량비)첨가하여 8시간 50℃로 가한 후 100℃에서 48시간 추출

2) 시험방법

1. 각 추출물을 아스피레이터를 이용 80℃에서 농축.
2. 농축물을 71brix로 맞춤.
3. 추출 농축물을 이용해 Ginsenoside Rg1+Rb1과 조사포닌을 분석.
4. 분석은 건강기능식품공전 50분 시험법에 따름.

3) 시험결과

1. 환류 추출물
 - > 71brix 농축물 65.9g 획득 수율 65.9%
 - > 조사포닌 함량 : 55.53mg/g
2. 한외여과를 통한 추출
 - > 71brix 농축물 69.6g 획득 수율 69.6%
 - > 조사포닌 함량 : 50.01mg/g
3. 주파수 발생기를 통한 추출
 - > 71brix 농축물 72.5g 획득 수율 72.5%
 - > 조사포닌 함량 : 85.95mg/g
4. 효소를 통한 추출
 - > 71brix 농축물 73.1g 획득 수율 73.1%
 - > 조사포닌 함량 : 67.72mg/g

4) 상수 대비 용수별 결과 증감율

구분	수율	상수 대비 증감율
환류 추출물	65.9%	control
한외여과를 통한 추출	69.6%	3.7% ↑
주파수 발생기를 통한 추출	72.5%	6.6% ↑
효소를 통한 추출	73.1%	7.2% ↑

5) 결론

실험 결과, 효소를 이용한 사포닌 추출 효율이 73.1%로 가장 높으므로 고려인삼 사포닌 제제의 효능성분 증폭 시스템은 효소 가수분해 공정을 표준 공정으로 추천되었으며, 추가적인 증폭 시스템으로는 추천되는 효능 성분 증폭 시스템은 주파수 발생기를 장착한 시스템이 다. 따라서 본 연구에서는 효소분해 공정을 표준 효능 성분 증폭 시스템으로 채택한다.

3. 최적 효소 선정을 위한 효능 성분 증폭 시스템 확립

가. 효소별 지방세포의 Glucose Intake 증가도 측정 실험

홍삼의 효능을 증폭시키기 위한 방법으로 80% 알코올 추출한 홍삼 사포닌에 대해, 베타-글루카네이즈(β -glucanase), 펙티네이즈(pectinase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulase), 셀룰레이즈(cellulase), 아라비네이즈(arabinase) 및 자일라네이즈(xylanase) 등이 복합적으로 들어있는 '사이톨라제'와 '뉴로자임' 그리고 이 두가지 효소를 함께 첨가한 '사이톨라제'+ '뉴로자임'을 효소 처리하여 홍삼을 가수분해 시킨 후, 지방세포를 통해 Glucose Intake 및 AMPK Western blot 실험을 진행하였다. 실험 결과, 신경전달물질 수용체 바인딩 효능이 뛰어나도록 제조된 '뉴로자임' 단독 효소 처리군에서 지방세포의 Glucose Intake 증가도가 가장 낮으므로 최종 시료로서 '뉴로자임' 처리군을 효능증폭을 위한 최적 효소로 판단된다.

Rb1이 증가할수록 식욕억제 및 탄수화물 중독 효율이 떨어지는 것으로 보고되고 있는데, 본 실험을 통해서도 확인해 본 결과 Rb1의 증가할수록 홍삼 사포닌의 식욕억제 효과 및 탄수화물 중독 완화 효과가 큰 것으로 확인되었다. 아울러 알코올 중독도 탄수화물 중독과 동일한 뇌 신경계에서의 작용기전을 나타내고 있으므로 알코올 중독 증세도 탄수화물 중독과 동일한 조건으로 시료를 추출하여 제조하였다.

홍삼 사포닌 (80% 알코올 추출물)	효소 무처리 사포닌(RG)	뉴로자임(NE)	사이톨라제(CY)	사이톨라제+뉴 로자임(NE+CY)
지방세포 Glucose Intake 증가도	172	38	193	185
Rb1 함량 증가도	0	+0.084	-2.856	-2.775

나. 효소별 면역조직화학법에 의한 식욕억제도 및 탄수화물 중독 완화도 측정 실험

정상생쥐를 이용하여 뉴로자임과 사이톨라제에 대하여 1주일간 고려인삼 사포닌 제제의 용량을 달리한 후, 경구투여하여 면역조직화학법을 실시하였다. 식욕조절을 담당하는 중추인 시상하부에서 식욕 증진과 관련된 neuropeptide Y(NPY)의 발현정도를 측정하였다. 경구 투여 4주 후 면역 조직 화학법을 이용하여 시상하부의 paraventricular nucleus(PVN)과 lateral hypothalamic area(LHA)에서 식욕 증진에 관여하는 NPY의 발현을 측정한 결과는 다음과 같다.

PVN에서의 NPY 발현은 대조군에 비해 뉴로자임(NE) 처리군은 감소된 경향을, 사이톨라제(CY) 처리군은 증가된 경향을 보였으며(Fig.1) 대조군이 104.58 ± 1.98 , NE-0.1군이 94.13 ± 3.05 , NE-1군이 85.63 ± 3.90 , CY-0.1군이 106.50 ± 2.00 , CY-1군이 109.13 ± 2.67 로 나타나서 투여량이 많을수록 감소 경향을 보였다. CY군의 NPY 발현은 대조군에 비해 증가 되고 투여량이 많을수록 증가되어 식욕이 증가하는 경향을 나타내었다.

LHA에서의 NPY 발현은 대조군에 비해 NE군은 감소된 경향을, CY군은 증가된 경향을 보였으며(Fig. 2) 대조군이 98.88 ± 2.10 , NE-0.1군이 103.00 ± 2.49 , NE-1군이 90.25 ± 3.18 , CY-0.1군이 106.25 ± 1.25 , CY-1군이 110.75 ± 2.26 로 나타났다. CY군의 NPY 발현은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 투여량이 많을수록 증가 경향을 보였다.

	Control	NE group		CY group	
		0.1g/kg	1g/kg	0.1g/kg	1g/kg
PVN	104.58 ± 1.98^b	94.13 ± 3.05^a	85.63 ± 3.90^a	106.50 ± 2.00^b	109.13 ± 2.67^b
LHA	98.88 ± 2.10^b	103.00 ± 2.49^{bc}	90.25 ± 3.18^a	106.25 ± 1.25^{cd}	110.75 ± 2.26^d

A: Control group, B: NE³⁾-0.1 group, C: NE-1 group, D: CY⁴⁾-0.1 group, E: CY-1 group.

¹⁾ NPY: Neuropeptide Y.

²⁾ PVN: Paraventricular nucleus.

³⁾ NE:: 뉴로자임 처리군.

⁴⁾ CY:: 사이톨라제 처리군.

다. NE 효소 및 CY 효소 처리에 따른 각 진세노사이드의 HPLC 측정 결과치

1. NE 5% 처리 진세노사이드 증감수치 비교데이터						
진세노사이드	<비교대조샘플> control	NE 5%	증/감수치	증/감	증감 %	
	합량(mg/g)					
Rg1	0.488	0.474	-0.014	감소		
Re	0.415	0.409	-0.006	감소		
Rf	0.299	0.383	0.084	증가	128.1	
Rb1	3.025	3.109	0.084	증가	102.8	
Rc	0.948	0.949	0.001	증가	100.1	
Rg2	0.62	0.614	-0.006	감소		
Rh1	0.796	0.796	변동없음			
Rd	0.499	0.038	-0.461	감소		
F1	0.023	0.44	0.417	증가	1913.0	
F2	0.385	0.344	-0.041	감소		
Rg3	0.722	0.657	-0.065	감소		
PPT	0.062	0.126	0.064	증가	203.2	
Rk1	1.713	1.527	-0.186	감소		
Rg5	1.049	0.959	-0.09	감소		
com k	0.007	0	-0.007	감소		
Rh2	0.029	0.015	-0.014	감소		
PPD	0.264	0.255	-0.009	감소		

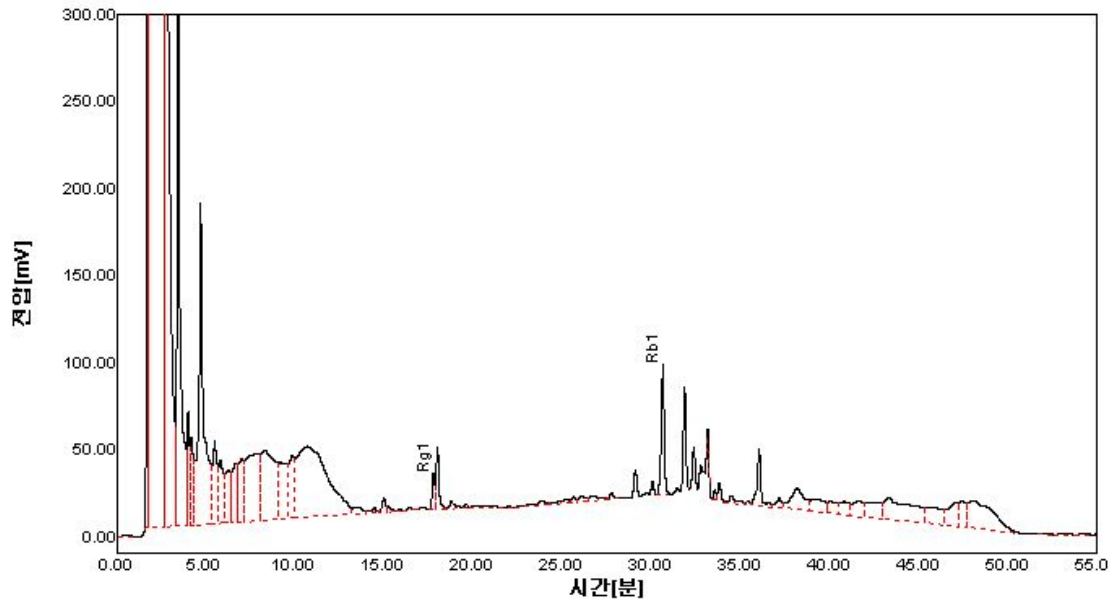
시료 이름: NE 5% 처리
 시료 ID:
 파일 이름: 0006.RAW
 분석 시간: 2012-04-13오후 09:36:16
 수집 채널: 1. YL9120 UVD A

▶ 크로마토그램

▶ 적분 결과

번호	피크이름	RT[분]	면적[mV*s]	높이[mV]	농도[]
1	Rg1	17.7700	194.8193	20.5495	24.3024
2	Rb1	30.6267	848.2954	74.1667	147.5051
합계			1043.1147	94.7162	171.8076

Rg1+ Rb1 = 3.98mg/g



2. CY 5% 처리 진세노사이드 증감수치 비교데이터

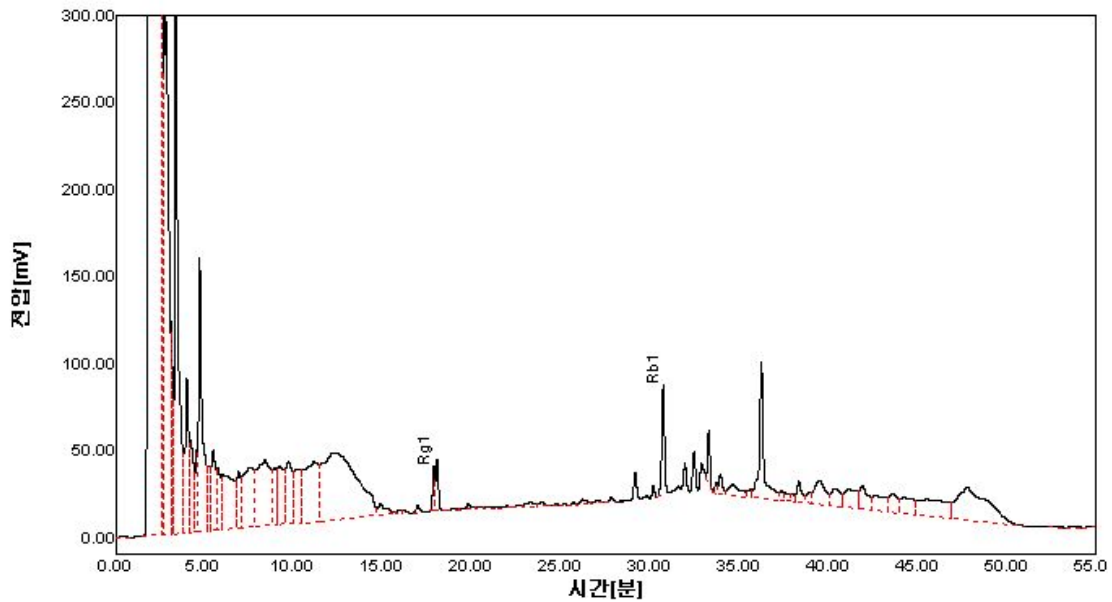
진세노사이드	<비교대조샘플> control	CY 5%	증/감수치	증/감	증감 %
	함량(mg/g)				
Rg1	0.488	0.681	0.193	증가	139.5
Re	0.415	0.345	-0.07	감소	
Rf	0.299	0.098	-0.201	감소	
Rb1	3.025	0.169	-2.856	감소	
Rc	0.948	0.19	-0.758	감소	
Rg2	0.62	0.024	-0.596	감소	
Rh1	0.796	0.888	0.092	증가	111.6
Rd	0.499	2.801	2.302	증가	561.3
F1	0.023	0.068	0.045	증가	295.7
F2	0.385	0.45	0.065	증가	116.9
Rg3	0.722	0.723	0.001	증가	100.1
PPT	0.062	0.22	0.158	증가	354.8
Rk1	1.713	1.701	-0.012	감소	
Rg5	1.049	0.987	-0.062	감소	

com k	0.007	0.044	0.037	증가	628.6
Rh2	0.029	0.037	0.008	증가	127.6
PPD	0.264	0.784	0.52	증가	297.0

분석 정보

시료 이름: CY 5% 처리
 시료 ID:
 파일 이름: 0004.RAW
 분석 시간: 2012-04-13오후 07:45:34
 수집 채널: 1. YL9120 UVD A

▶ 크로마토그램



▶ 적분 결과

번호	피크이름	RT[분]	면적[mV*s]	높이[mV]	농도[]
1	Rg1	17.8500	234.6307	25.5618	29.2686
2	Rb1	30.7067	668.9478	62.8271	116.3194
합계			903.5785	88.3889	145.5881

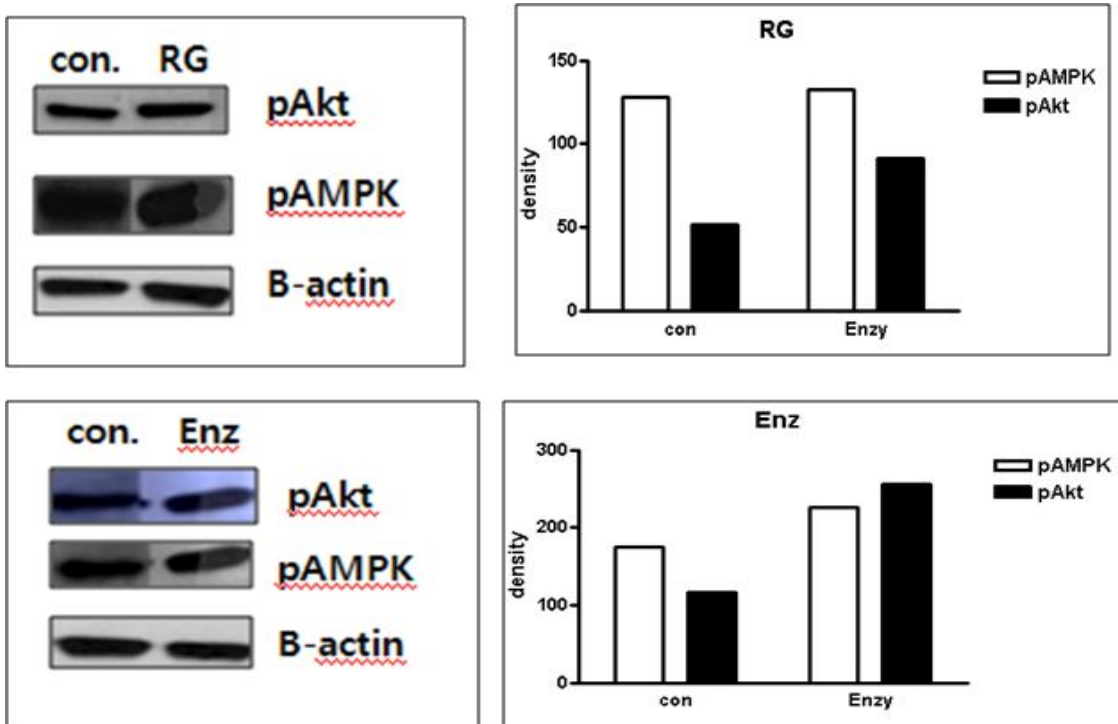
Rg1+ Rb1 = 3.54mg/g

▶ 결론: NE 효소와 CY 효소에 대한 무처리군 비교 HPLC 진세노사이드 군별 함량 비교 결과, 식욕억제와 관련있는 Rb1의 함량은 NE 효소처리시 많은 증가하는 것으로 확인되어, NE 효소 처리군이 탄수화물 중독 및 식욕억제 효과를 증폭시키는 것으로 확인됨.

라. NE 효소 5% 처리군에 대한 효소 농도별 지방세포 활성화도 측정 실험 결과 (Western Blot)

▶ 결론:

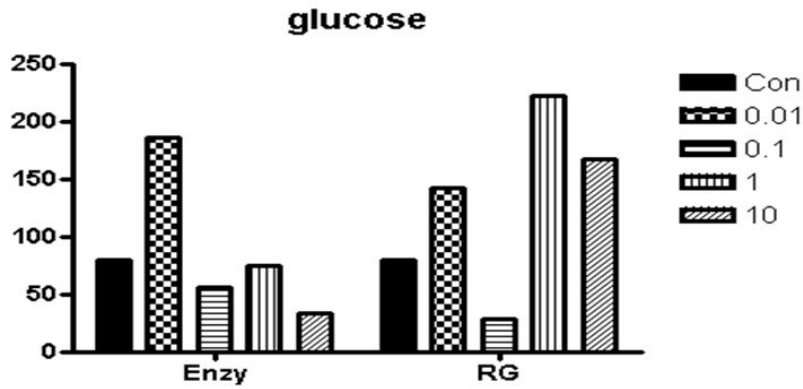
식욕억제 효능 증폭 시스템 확립을 위한 지방세포에 대한 경향성 실험결과, NE효소(Enz) 효소처리한 군이 효소 처리하지 않은 컨트롤(RG)군에 비해 AMPK, Akt의 인산화가 증가됨을 확인하였다. 이는 '뉴로자임' 효소 처리한 군이 에너지의 장기 저장소인 지방세포를 활성화시켜 이용할 수 있음을 암시한다. 효소처리하지 않은 사포닌 컨트롤군 (RG)에서는 Akt의 인산화만 증가되었다.



2-5. 지방세포 L1 cell에 대해, NE 효소 농도별 지방세포 활성화도 측정 실험 결과

결론: NE 효소 0.1, 10 처리한 군에서 에서, 처리 전보다 glucose 농도가 크게 감소되는 것으로 보아, 세포 내로의 glucose uptake가 증가되는 것을 알 수 있다

▶ 최종 결론:



본 연구를 통해 식욕억제 및 탄수화물 증독 완화 효능을 가진 고려인삼 사포닌 제제의 표준화 및 효능 증폭 시스템 확립을 위한 최종방안은 다음과 같으며 이에대한 기대효과는 다음과 같다. 80% 에탄올 추출시 추출 효율이 약 40% 증가함.

	물	80% 에탄올
조 사포닌 추출양	96.6	138.7
조 사포닌 추출효율 (물대비%)	0%	43.5% 증가

효능증폭 시스템 확립 방안: 뉴로자임 효소 5% 중량비 첨가시 효능 증폭 효율이 약77% 증가시킬 수 있음.

홍삼 사포닌 (80% 알코올 추출물)	효소 무처리 사포닌	뉴로자임(NE)처리 사포닌
지방세포 Glucos Intake 증가도	172	38

▶ 본 연구를 통해 도출된 성과물의 식욕억제 및 알코올 증독 완화 기능성 물질의 성분 분석 결과.

구분	결 과
Ginsenoside Rg1	1.43 mg/g
Ginsenoside Rb1	8.84 mg/g
Ginsenoside Rg3(s)	3.72 mg/g

-시료명: 홍삼 효소 가수분해 농축액

-시험방법

1. 동결건조 홍삼농축액 1g을 초순수 50ml에 녹인다.
2. 50ml 정량 후 멤브레인 필터로 여과하여 시료로 사용한다.

-분석기기

HPLC UV/Vis Detector

SunFire C18 3.5 μ m 4.6 \times 150mm Column

▶ 홍삼 효소 가수분해물의 당뇨 및 혈류 개선 기능에 있어서의 성분 표준화 결과

Saponin 투여로 인한 포도당 이용능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 복강 내 당부하 검사를 실시하였는데 당부하 후 최고 포도당 농도가 300 mg/dl 이상이고 2시간째 포도당 농도가 200 mg/dl 이상인 경우에 당뇨병으로 진단한다. 본 실험에서는 다음과 같이 홍삼 효소가수분해물 첨가군과 control 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 12).

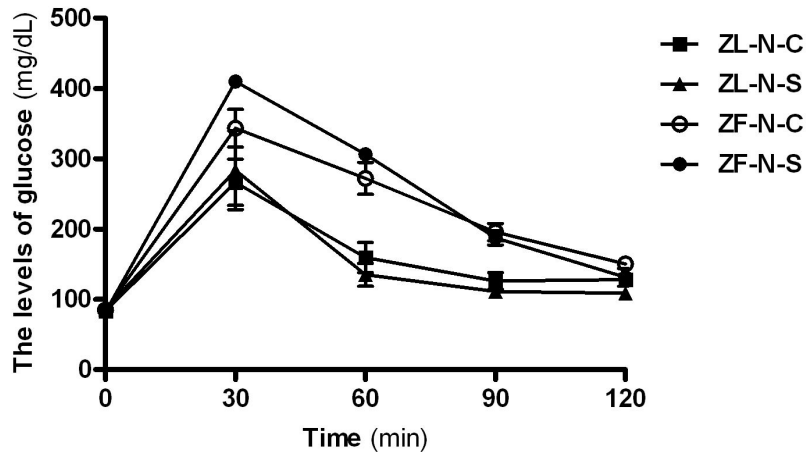


Figure 12. 4 group의 복강 내 당부하검사 비교. (ZL-N-C, ZL-N-S, ZF-N-C and ZF-N-S)

따라서 홍삼 효소 가수분해물은 기존의 홍삼 제제에 비해 특별하게 혈당 저하 기능이 강화되거나 혈류 개선에 끼치는 영향은 없는 것으로 판단되었다. 마찬가지로 만성 알코올 섭취로 인한 포도당 이용 능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시한 복강 내 당부하 검사는 당부하 후 최고 포도당 농도가 300 mg/dl 이상이고 2시간째 포도당 농도가 200 mg/dl 이상인 경우에 당뇨병으로 진단하는데 3주째 첫날 사포닌 투여 전 식후 혈당을 측정하였으나, 군간 유의미한 결과는 보이지 않았다, 하지만 OAC, OAS 두군 모두 OC에 비하여 혈당이 증가한 경향을 확인 할 수 있다(fig 2).

다만 사포닌의 투여가 알코올로 인해 저하된 내당능에 영향을 미쳐 당부하 후 2시간인 120분에서 유의하게 혈당이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 홍삼 효소 가수분해물이 알코올로 인해 저하된 내당능에는 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

4. 표준품 제조 공정 확립

표준품 제조 공정은 차후 산업화시에 균일한 제품을 출시함으로써 품질 관리에 철저를 기하기 위함이다. 아울러 실험실의 결과를 대량 생산 체제에 scale-up 하여 적용 시 이론과 실제에 있어서 많은 차이가 있을 수 있어 사업에 실패할 확률이 높은 점을 감안하여 이를 보완하기 위하여 실제 대량 생산 공정에 적용하여 표준화 작업의 일환으로 추출, 효소 가수분해, 농축, 건조 공정을 실시하였으며 실험 결과에 따라 표준품 제조 공정을 확립하였다. 특히 효소분해 공정은 효능 성분 증폭에 있어서 가장 중요한 공정이므로 정밀하게 실시하였으며, 다음과 같은 표준품 제조 공정을 확립하였다.

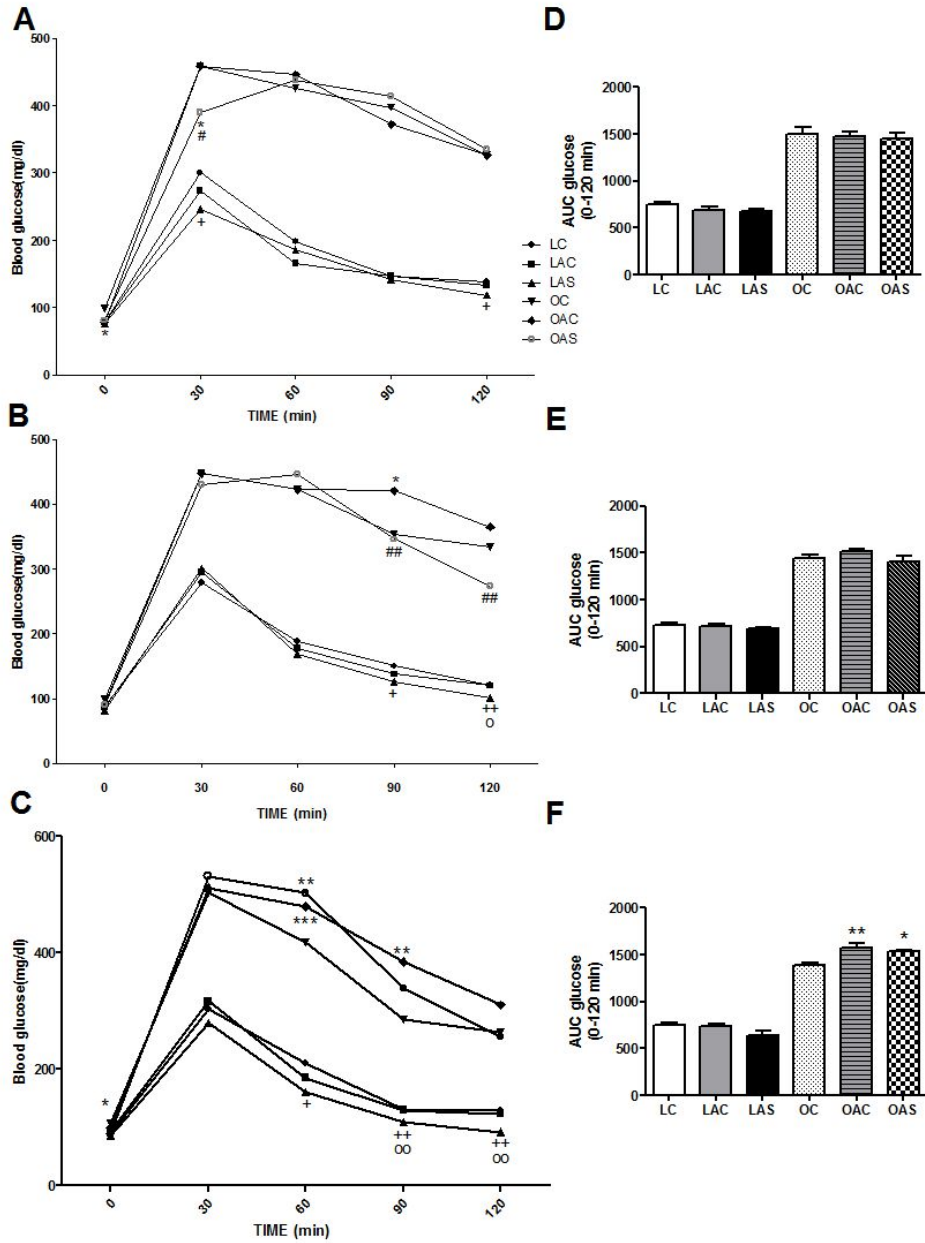


Fig 3. 복강내 당 부하 검사 (IPGTT, intraperitonear glucose tolerance test) 및 혈당 곡선하면적 (AUC, area under curve). 사포닌 투여 3주 (a,d), 6주 (b,e), 8주 (c,f)의 IPGTT와 AUC.

가. 원료 홍삼 제조

인삼을 구입하여 고압증숙기를 통해 4시간씩, 3회 반복 증숙하여 홍삼으로 제조

나. 추출, 여과, 농축 공정

앞선 실험을 통해 de-ionized water를 용수로 하여 2톤 반응조에 홍삼 건조 중량 100kg 단위로 투여한 후, 용수를 1톤 첨가하여 100°C에서 24시간 추출한다. 여과 공정은 한외여과기를 통해 실시하는데 0.1µm 미반(100kd) 이상의 잔사를 제거한 후 상등액만을 농축공정으로 보낸다. 농축공정에서는 71brix가 될 때까지 80°C로

가온 농축한다.

다. 효소 가수분해 표준 공정 확립

1) 실험 준비

교반, 온도조절 및 수증기 응축/회수가 가능한 2톤 반응조에서 실시

(1) 홍삼 준비 : 2톤 반응조에 100kg의 홍삼을 투입, 반응액량을 1,000 L에 맞춤

(2) 효소 준비 : Neurozyme 효소 홍삼 건조중량 대비 5% 투입,
반응온도 50~60℃, pH 5~7로 조정

(3) 효소가수분해 : 48시간(2일)과 72시간(3일)동안 가수분해 실시. 가수분해반응의 정확성을 기하기 위하여 반응조의 Air Vent측에 냉각수를 통과시켜 응축수를 회수함.

(4) 상등액 분리 : 원심분리기를 사용하여 내부온도 4℃, 5,000rpm으로 원심분리 실시, 잔사 분리, 폐기, 상등액만 회수

(5) 한외여과 : 상등액을 10kd mwco 한외여과막(Sartorius cross flow filter:stabilized cellulose membrane,운전압력 1.5~2bar, 액 온도20℃) 으로 여과, 분자량 10kd 이하만 회수.

라. 효소 가수분해 표준 공정 실험

1) 가수분해효소 Neurozyme의 농도별 진세노사이드 Rb1함량 변화(2톤 가수분해조에서 실시, pH6, 온도 50℃, 48시간 동안 실시, 건물양 대비 농도 산정)

	Neurozyme 0.1%	Neurozyme 1%	Neurozyme 5%
Rb1함량	0.45mg/g	2.5 mg/g	3.1 mg/g

*원심분리하여 잔사 제거 후 상등액을 71brix 로 농축한 후 동결건조하여 Rb1 농도 측정

*3회 반복실시의 평균값임.

위의 결과를 살펴보면 Neurozyme 5% 일 때 진세노사이드 Rb1의 함량이 3.1mg/g 으로 가장 높으므로 Neurozyme 5% 를 최적 효소 농도로 선정하였다.

2) 효소 가수분해 시간 48시간(2일), 72시간(3일)별로 그리고 pH 농도별로 진세노사이드 Rb1 의 수득율을 측정하였다. (Neurozyme농도는 5%)

가수분해시간/pH	pH5	pH6	pH7
48hr.	2.16 mg/g	2.52 mg/g	2.32 mg/g
72hr.	2.87 mg/g	2.94 mg/g	2.47 mg/g

*가수분해 후 원심분리하여 잔사를 제거하고 상등액을 동결건조하여 진세노사이드 Rb1 농도 측정

*3회 반복실시의 평균값임.

위의 결과를 살펴보면 pH6, 72시간 효소분해 했을 때 생산성이 가장 우수함. 따라서 효소 가수분해 표준 공정으로는 Neurozyme 5% pH 6, 가수분해 시간 72시간 (3일)간 진행하는 것이 진세노사이드 Rb1 의 수득율이 가장 높음,

3) 결론: 대량 생산 체제에서 표준품 제조를 위한 최적 효소 분해 공정은 다음과 같음.

항목	가수분해 효소 농도	가수분해 온도	가수분해 시간	가수분해 pH
수치	Neurozyme 5%	50℃	72시간	6

마. 건조 공정

1. 분무 건조: 농축액을 열풍 배기온도 98℃~100℃로 조정된 분무건조기로 건조
2. 동결 건조: 농축액을 진공 감압 20psi, -80℃로 3일간 동결 건조

두 방법 모두 일반적으로 사용되고 있는 건조 방법으로서 액상제품의 농축 정도에 따라 건조 감량은 동일하므로 수득율에 있어서의 차이점은 거의 없었으나 작업성 면에서는 동결 건조 방법이 월등히 뛰어나므로 최종 제품의 건조 공정은 동결 건조 공정으로 결정하였다.

바. 표준품 제조 공정

위의 실험 결과에 의거 대량 생산 체제에 맞는 표준품 제조 공정을 간략하게 정리하면 다음과 같다.

표준 공정

인삼 (고압 증숙기, 105℃, 4시간 증숙) > 홍삼 > 파쇄, 절단 > 추출 (de-ionized water, 100℃, pH6) > 여과 (잔사 제거) > 농축 > 상등액 효소분해 (Neurozyme 5%) > 농축 > 건조 (동결건조, -80℃)

5. 제제화

고려인삼 사포닌 제제의 액상, 분말, 과립, 캡슐 제제에 대한 제형 조건을 다음과 같이 확립하였다.

가. 액상제품

홍삼의 효소 가수분해 결과물의 상등액을 evaporator에서 감압농축(60℃, brix 50±5 까지 농축), 30℃로 냉각 paste 제조하였다. 액상소재를 적용함에 가장 중요한 용해도, 흡습성, 유화성 및 유화 안정성을 평가하였다.

1) 기포안정성 평가방법

0.5% 용액 (20 ml)을 1.0 N HCl 또는 1.0 N NaOH로 pH 3.0에서 pH 8.0으로 각각 조정 한 후 2분간 blender (IKA labortechnik, T25B, Germany)로 10,000 rpm에서 2분간 교반한다. 교반 직후 용액을 메스실린더로 옮겨 30초후의 부피를 측정하여 다음 계산식에 의해 기포형성능 (foaming capacity)을 구한다.

$$\text{Foaming capacity (\%)} = \frac{(\text{Vol. after whipping} - \text{Vol. before whipping}) (\text{ml})}{\text{Vol. before whipping} (\text{ml})} \times 100$$

거품이 발생된 용액을 20℃에서 3분간 방치 후 부피를 측정하여 기포안정성 (foam stability)을 다음식에 의해 계산한다.

$$\text{Foam stability (\%)} = \frac{(\text{Vol. after standing} - \text{Vol. before whipping}) (\text{ml})}{\text{Vol. before whipping} (\text{ml})} \times 100$$

2) 유화형성능 및 유화안정성 평가 방법

유화형성을 위하여 0.5% 용액을 1.0 N HCl 또는 1.0 N NaOH로 pH 3.0에서 pH 8.0으로 각각 조정하고, 각 용액 12 ml과 옥수수기름 4 ml를 blender (IKA labortechnik, T25B, Germany)로 12,000 rpm에

서 1분간 교반한다. 유화용액 50 μ l를 취하여 5 ml의 0.1% sodium dodecyl sulfate 용액을 가하여 500 nm에서 흡광도를 측정한다. 모든 실험은 실온에서 실시하였으며, 유화형성능 (emulsifying activity index: EAI)은 아래 계산식에 의해 구하였다.

$$EAI (m^2 / g) = \frac{(2T \times D)}{(\phi \times C \times 10^4)} = \frac{(4.606 \times A \times D)}{(\phi \times C \times L \times 10^4)}$$

<T: 탁도, D: 희석배수, ϕ : oil 분획의 부피, C: 유화형성전 물출분획당 단백질의 양, A: 흡광도, L: 빛 통과길이>

유화안정성 (emulsion stability)은 유화형성 후 탁도가 절반으로 줄어드는데 걸리는 시간.

3) 용해도 및 수분흡수력 평가 방법

40 ml의 증류수에 2.5 g의 UF 처리한 홍삼 사포닌 효소가수분해물을 넣고 교반 후 2 N HCl를 사용하여 pH를 2.0 조정 한 후 전체 부피를 100 ml로 조정하였다. 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 교반하여 3000 \times g에서 10분간 원심분리하여 #4 Whatman filter paper로 여과하여 얻은 여과액의 total nitrogen양을 측정하여 아래 계산식에 의해 용해도를 측정하였다.

$$\% \text{ Solubility} = (TN_s / TN_i) \times 100, \quad (TN_s: \text{여과액의 total nitrogen}, TN_i: \text{용액의 total nitrogen})$$

수분흡수력 (moisture sorption)은 작은 데시케이터를 22 $^{\circ}$ C로 조정하여 water adsorption isotherm을 구하였다. 즉, 각 데시케이터에 500 ml의 포화용액을 바닥에 넣고 1 g의 시료를 무게접시에 담아 각 데시케이터에 6일간 방치하면서 매일 일정시간에 시료의 무게를 측정하여 평형에 도달한 무게를 측정하였다.

4) 열안정성 평가 방법

증류수 10 ml에 0.5 g의 홍삼 사포닌 효소가수분해물 소재를 가한 용액을 130–160 $^{\circ}$ C의 온도에서 각각 5분간 처리시 각 온도에서 각 시간에 따른 사포닌의 함량의 변화를 측정하여 열안정성을 평가하였다.

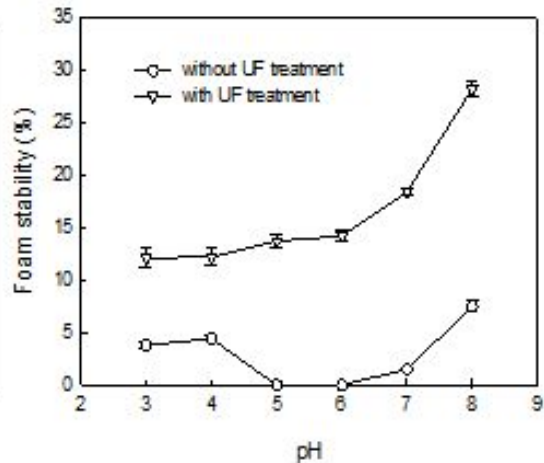
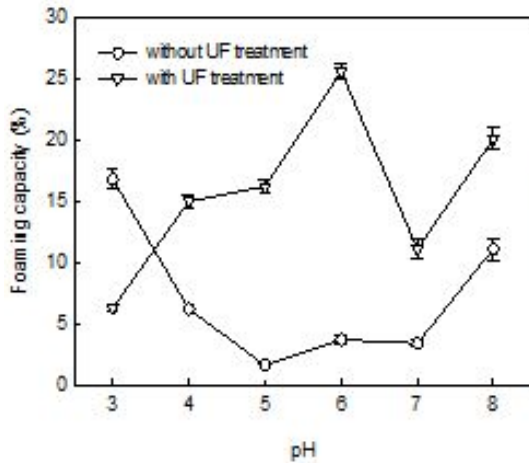
5) 실험 결과

액상 소재의 기능적 특성인 기포성, 유화성, 용해도 및 수분흡수력과 열에 대한 안전성을 평가하였다.

(1) 기포형성능 및 기포안전성 평가 결과

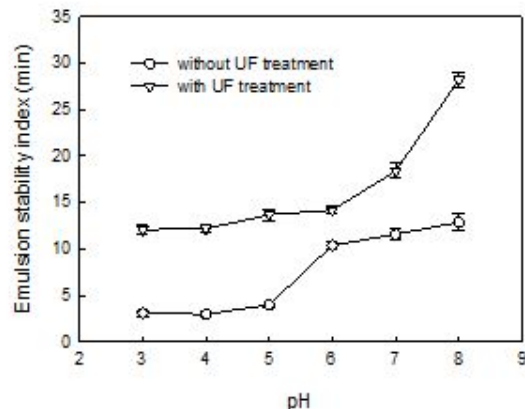
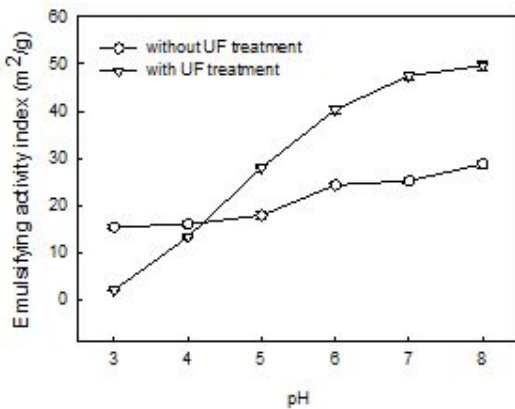
0.5% 용액을 1.0 N HCl 또는 1.0 N NaOH를 사용하여 pH 3.0에서 pH 8.0으로 각각 조정 한 후 실험방법에 따라 기포형성능과 기포안전성을 각각 평가하였다.

고려인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물을 만들기 위해 한외여과 (ultra-filtration, UF) 처리과정을 거치게 되는데 이때 한외여과전과 후의 기포형성능과 기포안전성을 평가한 결과 (Fig. 1), 한외여과 처리하여 얻은 소재가 한외여과 처리전의 소재에 비하여 기포형성능이나 기포안전성이 우수한 곳으로 나타났다. 기포형성능은 한외여과처리전 소재는 pH가 산성에서 중성으로 변할수록 기포형성능이 감소한 반면, 한외여과처리한 소재는 기포형성능이 점차 증가하는 경향을 보였다. 기포안전성은 두가지 소재 모두 동일pH가 증가할수록 기포안전성이 증가하는 경향을 보였다.



2) 유화형성능 및 유화안전성 평가 결과

홍삼 추출액을 기능성 식품으로 활용시 대부분 다른 소재, 즉, 지방이 함유된 성분과 같이 활용할 경우가 많으므로 지방성분과 병용 사용시 유화제의 사용량은 소재의 유화특성과 밀접한 관계를 가지게 된다. 고려인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물의 유화성을 평가한 결과, 한외여과 처리한 소재는 한외여과 처리전 소재에 비하여 유화형성능이나 유화안전성이 우수한 것으로 평가 되었다. 소재의 pH가 산성에서 중성으로 증가함에 따라 유화형성능이나 유화안전성이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 지방 성분과 혼합 사용시 산성쪽 보다는 중성부근에서 사용하는 것이 식품의 물성 개선에 도움을 줄 것으로 생각된다.



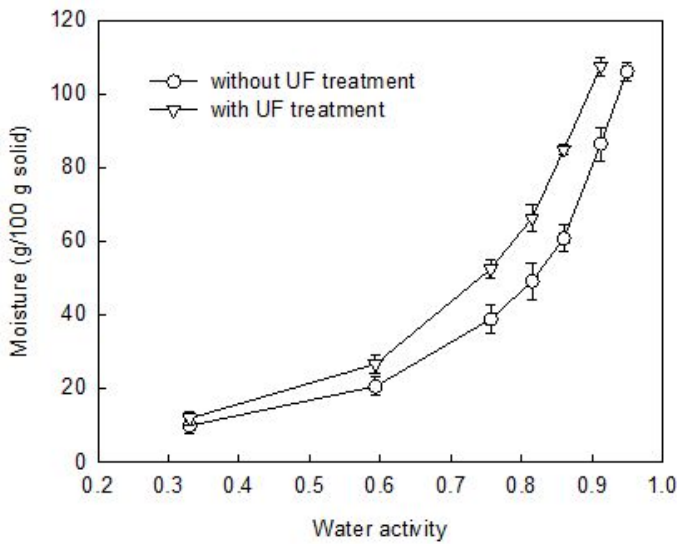
3) 용해도 및 수분흡수력 평가 결과

고려인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물을 액상상태로 활용시 용해도가 중요한 의미를 가지게 된다. 특히 생리활성을 부여할 정도의 함량을 지니는 기능성 음료를 개발시 pH에 따른 용해도의 평가는 선행되어야 한다. 따라서 표준상태에서의 용해도를 측정된 결과 (Table 1), pH 2.0에서 pH 8.0사이에서의 pH 변화에 따른 용해도의 차이는 없었으며, 모두 다 용해되는 것을 확인하였다. 따라서 고려인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물 함유 음료 제조시 pH의 영향은 미미할 것으로 추정되며, 특히 대부분의 음료가 약산성을 띠므로 CHP 함유 소재는 음료에도 적용이 가능한 소재로 추정된다. 한외여과전과 한외여과후의 각 소재의 물에 대한 용해도는 18.9%와 24.3%의 매우 높은 용해도를 가지고 있음을 확인하였다.

pH		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
Solubility	without UF treatment	99.8±	99.2±	99.7±	98.7±	98.5±	99.3±	99.4±
		2.0	1.0	1.1	1.3	0.8	1.4	0.8
	with UF treatment	99.9±	99.4±	99.8±	99.3±	99.6±	99.8±	99.7±
		1.0	1.5	2.1	1.4	0.6	0.7	0.6

Table. Effect of pH on solubility of red ginseng hydrolysate

비교적 용해도가 높은 홍삼 효소 가수분해물 소재의 수분흡수력을 측정한 결과 (Fig. 3), 수분활성도가 증가할수록 수분보수력이 증가하는 경향을 보였으며, 한외여과 처리한 소재의 경우 한외여과 처리전 소재에 비하여 수분보수력이 높게 나타났으며, 수분활성도 0.6이상의 경우 수분보수력이 급격히 증가되는 경향을 보였다. 한외여과처리한 소재는 한외여과전 소재에 비하여 높은 수분보수력을 보임에 따라 가공식품 가공 시 수분 결합체로 긍정적인 효과도 기대할 수 있으나 소재 단독으로 보존시 수분흡수력이 높으므로 저장 시 문제를 초래할 수도 있기 때문에 건조된 상태에서의 보관에 주의를 기울여야한다.



4) 풍미도 테스트

액상 제품의 경우 풍미도가 매우 중요하므로 다음과 같은 설문지를 통해 대학생 10명을 대상으로 실험을 하였다.

최적 결과는 다음과 같다.

시료구분		가	나	다	라
배합성분비 (중량%)	홍삼 효소분해 농축액	70	70	60	60
	요쿠르트맛 분말	15	20	10	5
	결정과당	15	10	30	35
시험항목	맛	B	A	B	C
	향	A	A	B	C

점수 환산: A-4점 아주좋다, B-3점 좋다, C-2점 보통이다, D-1점 나쁘다

따라서 액상 제품의 최적 배합비는 다음과 같다.

원료명	배합비율
효수분해 홍삼 가수분해물	70%
요쿠르트 맛 분말	20%
결정과당	10%
계	100%

나. 분말, 과립 및 캡슐 제품 제제화

1) 분말 제제화

분말 제제화를 위해서는 상기 건조 과정에서 동결건조를 통해 건조를 하였을 경우에는 분쇄가 아주 용이하므로 간단한 분쇄기를 활용하면 된다. 분말의 입도는 80 메쉬 이상을 기준으로 하여 분쇄하는 것이 작업성 면에서 최적적인 것으로 나타났다.

2) 과립 제제화

홍삼 효소 가수분해물을 분말화 후 이를 과립으로 제제화하기 위해서 반드시 성형 과정을 거쳐야만 과립으로 제제화가 진행될 수 있다.

과립으로 성형하기 위해서는 상기 액상 제품 제제화와 마찬가지로 동일한 용해도, 흡습성, 유화성 및 유화 안정성 그리고 열 안정성 등을 평가한 후 성형을 하여야만 최적적인 과립을 제조할 수 있다. 효능 성분 만으로는 성형(반죽)이 안되므로 결정과당, 폴리텍스트로스를 과립 성형 보조소재로 사용하여 성형하였다. 그 결과 최적 과립 제조를 위한 원료별 첨가 비율은 다음과 같다.

3) 과립 제제 풍미 선호도 테스트

10명의 대학생에게 아래의 설문지를 기준으로 풍미도를 실험하였다.

시료구분		가	나	다	라
배합성분비 (중량%)	홍삼 효소분해	50	50	50	50
	동결 건조분말				
	요쿠르트맛 분말	15	5	0	5
	결정과당	10	15	10	5
	폴리텍스트로스	25	30	40	40
시험항목	맛	A	A	B	C
	향	A	A	C	B
	구강내 분산 정도	A	B	C	C

점수 환산: A-4점 아주좋다, B-3점 좋다, C-2점 보통이다, D-1점 나쁘다

4) 결론

풍미도 실험을 결과로 다음과 같은 최적 과립 성형 비율을 얻었다. .

원료명		배합비율
효수분해 홍삼 가수분해물		50%
과립성형 보조소재	요쿠르트맛 분말	15%
	결정과당	10%,
	폴리텍스트로스	25%

계	100%
---	------

캡슐 제제를 제조하기 위해서는 분말 형태 그대로 캡슐 충전기를 통해 충전하는 방법이 있고, 아니면 과립으로 제조한 후 이 과립을 캡슐에다 충전하는 방법이 있다.

분말 형태로 충전이 불가능한 원료는 흡습성이 높거나 흐름성이 떨어지는 제제일 경우이다.

본 홍삼 효소 가수분해물은 점액성이 매우 높고 흡습성이 높으므로 분말 그대로 충전할 경우 작업성이 매우 떨어진다. 따라서 고려인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물은 과립으로 성형하고 그 후 과립 입자의 흐름성을 좋게 하는 부원료를 첨가한 후 캡슐에 충전하여야 하는 것을 표준 공정으로 하여야 한다. 홍삼 효소 가수분해물의 캡슐 제제화를 위해 첨가하는 부원료로는 스테아린산 마그네슘으로 정하였으며 첨가량은 총 건조중량의 1%를 첨가하여 충전하였다.



【제품명】 릴렉슬림
 【식품의 유형】 기타가공식품
 【내용량】 540gr
 【제조년월일】 박스에 표기
 【유통기한】 제조일로부터 24개월
 【원재료 및 원산지】
 【포장재질】 내피-PE, 외피-펄프 종이상자
 효모헵타이드(SCP-20)국산, 효모헵타이드(DNF-10)국산, 발효인삼 사포닌복합분말(인삼)국산, 차전자피(국산), 뉴로자임(국산), 가르시니아 캄보지아(HCA)인도산, L-카르니틴(미국산), 진피추출물 분말(국산), 레몬맛분말(국산), 레몬향분말(국산), 비타민C(중국산)

6. 시제품 제작

가. 고려인삼 사포닌 제제의 시제품 제작

1차 년도 실험 결과를 토대로 식욕억제 기능이 있는 고려 인삼 사포닌 제제로서 홍삼 효소 가수분해물 과립을 시제품으로 제작하였다.

나. 제품 구성

1) 제품명: 탄수화물 중독 억제 기능을 갖는 식품 : 릴렉슬림 (과립)

2) 구성성분

주요성분: 발효인삼사포닌 복합분말 가르시니아 캄보지아, L-카르니틴, 진피 추출물 분말, 효모헵타이드 분말

3) 제조 방법 설명서

1. 제품명 : 릴렉슬림
2. 식품유형 : 기타가공식품

3. 성분 및 배합비율 등

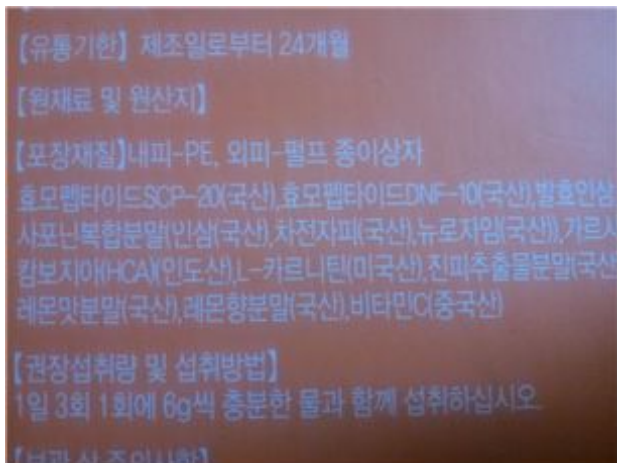
성분명	배합비율	성분내역		
		신고관청	제조원(수입원)	비고
계	100 %	시흥시 위생과	(주)바이탈링크	
효모펩타이드 SCP-20	25	시흥시 위생과	(주)바이탈링크	국산
효모펩타이드 DNF-10	14	시흥시 위생과	(주)바이탈링크	국산
발효인삼사포닌복합분말	14	시흥시 위생과	(주)바이탈링크	국산
차전자피	8	식품의약품안전청	(주)아이비티	인도산
뉴로자임	1	시흥시 위생과	(주)바이탈링크	국산
가르시니아 캄보지아(HCA)	9	식품의약품안전청	(주)아이비티	인도산
L-카르니틴	12	식품의약품안전청	(주)아이비티	미국산
진피추출물 분말	2	포천시 위생과	인그린	국산
레몬맛 분말	5	천안시 위생과	(주)코시스	국산
레몬향 분말	5	식품의약품안전청	(주)코시스	중국산
비타민 C	5	식품의약품안전청	(주)아이비티	중국산

4. 제조공정

- 가) 원료검사 : 각 원료를 자가품질규격에 의거 품질검사를 한다.
- 나) 혼합 : 혼합기에 위의 원료들을 배합비에 맞추어 넣은 후, 골고루 섞어준다.
- 다) 과립 : 위의 혼합물을 물과 함께 반죽하여 과립으로 만든다.
- 라) 건조 : 위의 과립을 건조기에 넣고 건조한다.
- 라) 검사 : 균일도 이물질 혼입도 등을 검사한다.
- 마) 포장 : 포장한다.

5. 성 상 : 황갈색 분말

6. 섭취방법 : 1일 2회, 1회에 1포씩 또는 6그램씩 물과 함께 섭취



- 7. 포장방법 : 포, 폴리에틸렌 병, 내포장(폴리에틸렌), 외포장(펄프 종이상자)
- 8. 포장단위 : 1. 포 6g * 30포, 60포, 90포, 1kg포, 20kg포
2. 병 180g*1병, 360g*1병
- 9. 용도 및 사용방법 : 식품으로 사용한다.
- 10. 유통기한 : 제조일로부터 24개월(실온)

식품(식품첨가물)품목제조보고서

보고인	① 성 명	박상희	② 주민등록번호		
	③ 주 소	서울시 은평구 진관동 102 박석고개아파트			
영업소	④ 명 칭 (상 호)	(주)바이탈링크	전화 번호	회사	
	⑤ 소재지	경기도 시흥시 정왕동 2121-2 생산기술연구원 1동 201호			
⑥ 식품의 유형		기타가공식품		⑦ 영업허가 (신고)번호	제 254 호
⑧ 제 품 명		릴렉 슬림	⑨ 유통 기간	제조일로부터 24개월(실온)	
⑩ 원재료명 또는 성분명 및 배합비율		별첨			
⑪ 용 도 방 법		식품으로 사용			
⑫ 포장방법 및 포장단위		별첨			
⑬ 성 상		갈색 과립			
⑭ 기 타					
<p>식품위생법 제22조 제6항 및 동법시행규칙 제25조의 규정에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p style="text-align: center;">2012 년 5월 일</p> <p style="text-align: center;">보고인 박 상 희 (서명 또는 인)</p> <p>지방식품의약품안전청장 시장·군수·구청장 귀하</p>					
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부(제4조제1항의 규정에 이한 식품등의 한시적 기준 및 규격의 인정을 받을 수 있는 대상에 해당하는 식품 등에 한한다. 					
<p>※ 유의사항</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시전이나 개시후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분에 한한다. 					

연구성과 및 성과 활용 계획

본 연구의 성과는 다음과 같다.

구분	연구논문	학술발표	지식재산권	기술이전/제품화	기타	계
1년도	1	1				
2년차		1		1		

1) 국제학술대회 포스터 발표

가. 2012 Pacific Rim College of Psychiatry

October 25 (Thu) - 27 (Sat), 2012

the Sheraton Grande Walkerhill, Seoul, Korea

“Enzymatic treated Saponin of Korea red ginseng suppresses Appetite in Dietary and Genetic-induced Obesity Rats.”

나. Keystone Symposia Neurogenesis (J7)

February 3 - February 8, 2013

Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, New Mexico

“The Effect of Chronic Ethanol Intake on Type 2 Diabetes Mellitus - The Effect of BDNF on Alcohol and Diabetes-”

2) SCI journal 에 submission 예정 - e.g. Diabetes, Obesity 등

“Fermented Saponins of Korean Red Ginseng ameliorates High Fat Diet-induced Obesity through the attenuation of Appetite.”

Fermented Saponins of Korean Red Ginseng ameliorates High Fat Diet-induced Obesity through the attenuation of Appetite.

Seul-Gi Lim¹, Soo-Jeong Kim¹, Su-Min Kwak¹, Won-Ho Kim², Dai-Jin Kim^{1†}

Department of Psychiatry, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea;

²Division of Metabolic Diseases, Center for Biomedical Sciences, National Institute of Health, #187 Osong Saengmyeong2-ro, Osong-eup, Cheongwon-gun, Chungbuk, 363-951, Korea

Corresponding author: Dai-Jin Kim

Department of Psychiatry, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea

E-mail: kdj922@catholic.ac.kr

Running title: Anorectic Effects of Enzymatic treated Saponin of Korea red ginseng in High Fat Diet-induced Obese Rats

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether fermented red ginseng saponin (FRGS), which is improved ginsenoside biological activity through commercial enzymes, could be a better tolerated anti-obesity drug expanding the understanding of peripheral signals and CNS pathways involved in the regulation of adiposity to treat obesity. The effects of intraperitoneal administration of FRGS (200mg/kg, i.p) for 4weeks on body weight, food intake, fat contents, blood biochemical components and hormones in high fat diet (HFD)-induced obese were assessed. We also examined the effects of FRGS on leptin in white adipose tissue and, leptin receptors (OB-Ra, OB-Rb), neuropeptide Y (NPY), agouti related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the hypothalamus of brain. Chronic FRGS administration significantly reduced body weight, total food intake, and fat weight in HFD group. Additionally, a reduction in adipocyte size of the epididymal adipose tissue was observed in the FRGS-administrated HFD group (HF-FRGS). The level of serum leptin increased and adiponectin decreased in HF-CS. Similarly, FRGS treatment inhibited leptin gene expression increased in mesenteric fat tissue of HFD group and attenuated the decrease of leptin receptors, OB-Ra and OB-Rb, expression in hypothalamus. As well, FRGS significantly decreased the gene expression of NPY or AgRP increased and POMC decreased in the hypothalamus of HFD groups. Taken together, our results suggest that FRGS may exert anti-obesity activity through modulation of peripheral and central appetite-regulating signals. And also, FRGS may be a potential benefit for dietary cure of obesity.

Keywords: Fermented Red Saponin of Korea red ginseng, leptin, OB-Ra, OB-Rb, neuropeptide Y, agouti related peptide (AgRP), proopiomelanocortin (POMC)

3) 시제품 제작 :탄수화물 중독 억제 기능을 갖는 식품 - 릴렉슬림 (과립)



그리고 추후 2차년도 연구와 관련된 논문도 작성하여 SCI급 journal에 submission할 예정이다.

그 외 연구성과 활용계획은 다음과 같다.

1) 고려 인삼 사포닌제제 섭취의 권장 홍보자료로 활용

현재 전 세계적으로 건강상 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 비만과 당뇨, 알코올 중독 환자에게서

사포닌의 섭취효과를 증명함으로써 건강증진 목적으로 고려 인삼 사포닌제제의 섭취를 권장할 수 있다.

2) 사포닌의 세계화 전략 정책의 홍보자료로 활용

국제학회 등을 통해 해외에 실험의 내용 및 결과를 발표함으로써 고려인삼 사포닌제제의 우수성을 알리고 구체적이고 과학적인 근거를 제시함으로써 “한식의 세계화”의 신뢰도를 높일 수 있다.

3) 고려인삼제제 사포닌의 건강기능성을 활용한 건강기능제품 개발 활용

본 연구 결과를 바탕으로 대량 생산 시스템에 적용할 수 있는 scale up 조건을 확립하였다. 그래서 실험실 연구로만 끝낸 것이 아니라 실제 산업 현장에 적용하여 대량 생산체제에 맞는 최적 추출 조건, 효능 성분 증폭 시스템 구축 및 표준품 제조를 위한 제제 개발 조건을 확립함으로써 우선 식욕억제 탄수화물 중독 억제에 효능이 있는 시제품 1건을 제작하였으며, 2차년도의 인체 임상 결과를 토대로 홍삼 효소 가수분해물을 주 원료로한 숙취 해소 음료 및 캡슐 제제의 시제품이 1건이 곧 제작 완료될 예정이다.

본 연구를 통해 최종 제품의 분말, 과립, 정제 및 액상 제형에 따르는 4종의 생산 조건 모두를 확립하였고 또 맛 개선을 위한 제제화 조건도 확립함으로써 고려 인삼 사포닌 제제가 국내외국민들에게 있어서 식욕억제 및 알코올 중독 완화 그리고 숙취 해소 효능만 우수할 뿐만 아니라, 맛에 있어서도 우수하도록 하여 고려인삼 사포닌 제제의 대외 경쟁력을 더욱 높였다.

4) 특허 등록 가능성

본 연구의 핵심 결과를 토대로 다음과 같은 3건의 홍삼 효소 가수분해물에 대한 제조 방법 특허 등록이 가능하다.

가. 특수 용매를 사용한 추출 조건에서 물 이외에 de-ionized water를 사용할 경우와 극성 강화 기기를 통한 추출 효율은 약 5% 이상 증가될 것으로 예상되므로, 특허 등록이 가능할 것으로 평가된다.

특허명: 추출 용매를 달리한 홍삼 사포닌 추출 효율 증대법

특허명: 추출 기기를 이용한 사포닌 추출 효율 증대법

나. 임상 결과를 토대로 원료의 용도에 대한 특허 출원도 가능할 것으로 평가된다.

위의 결과를 바탕으로 홍삼에 대한 효소 가수분해시 적용된 뉴로자임 효소의 특징과 효소 가수분해의 조건을 토대로 특허 청구항을 작성하고 최종 기능성 물질에 대한 규격을 진세노사이드 Rg1, Rb1, Rg3의 함량 과 그 함에 대한 퍼센트 비율로 결정하면, 동물 실험 및 인체 임상 자료가 뒷받침되므로 홍삼 효소 가수분해물의 식욕억제 및 알코올 중독 완화 제제로서의 용도에 관한 특허 등록이 가능할 것으로 판단된다.

특허명: 홍삼 효소 가수분해물의 식욕억제 효과 및 알코올 중독 완화 효과

주 의

1. 이 보고서는 농림수산물식품부에서 시행한 한식 우수성 기능성 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산물식품부에서 시행한 한식 우수성 기능성 연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.