

# 최 종 보 고 서

(뒷면)

(앞면)

건강기능식품으로써  
미나리추출물의  
기능성  
강화,  
원료표준화  
연구  
및  
시제품  
제조  
농림축산식품부

발간등록번호  
11-1543000-000250-01

5cm



기억력 개선 개별인정형  
건강기능식품으로써 미나리추출물의  
기능성 강화, 원료표준화 연구 및  
시제품 제조

Increment in functionality,  
standardization of the raw material  
and production of trial products using  
extracts of *Oenanthe javanica* as a  
functional food for improving memory

(주)브레인트로피아



9cm



농림축산식품부



4cm



주 의  
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑  
6cm  
↓

↑  
3cm  
↓

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로써 미나리추출물의 기능성 강화, 원료 표준화 연구 및 시제품 제조” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 09 월 17 일

주관연구기관명 : (주)브레인트로피아

주관연구책임자 : 신 기 영

세부연구책임자 : 신 기 영

연 구 원 : 이 형 근 원 범 영

윤 여 상 김 예 리

정 문 주 하 현 지

협동연구기관명 : 전라남도식품산업연구센터

협동연구책임자 : 위 지 향

연 구 원 : 양 익 준 송 현 우

윤 수 경 성 혜 미

정 경 옥 김 경 미

김 속 정

# 요 약 문

## I. 제 목

기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로써 미나리추출물의 기능성 강화, 원료 표준화 연구 및 시제품 제조

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### - 목적

#### 가. 기술적 측면

현대사회는 노령화, 스트레스, 알코올 등과 같은 요인들에 의해 뇌기능 특히, 기억력감퇴 요인들에 노출되어 있다. 많은 사람들은 이러한 뇌기능 특히, 기억력을 개선할 수 있는 식품 소재들에 많은 관심을 가지고 있다. 따라서 미나리 추출물을 이용하여 식약처 인증 기억력 개선 건강기능식품으로 개발하고자 한다.

#### 나. 산업적 측면

기억력 개선 소재는 국내는 물론 해외시장에서 많은 관심을 받고 있으며 미나리 추출 원료 개발은 분명 고부가가치 상품으로써 성공가능성이 있다.

(가) 식약처 인증 전 단계: 본 과제의 주관기관에서 기개발한 기억력 개선 소재와 혼합한 혼합제품을 개발하여 상품화를 수행하고자 한다.

(나) 식약처 인증 후 단계: 미나리 추출 원료 자체적으로 기능성 상품을 개발하여 국내 및 해외시장에 판매할 수 있는 상품화를 수행하고자 한다.

### - 필요성

뇌는 스트레스, 환경적 요인, 과음, 흡연 등의 원인으로 손상받기 쉬우며 현대인은 그런 원인에 무방비하게 노출되어 있다. 뇌의 손상은 지체장애와 같은 질환으로 등록되어있지 않으나 기억력 장애를 유발하게 되고 그 증상의 강도에 따라 많은 문제를 야기하게 된다. 현재 많은 기업과 연구소들은 기억력 장애와 같은 뇌손상을 억제할 건강기능식품 소재를 개발하고 있으며 그 성과물로 몇 가지 뇌건강 관련 건강기능식품들이 출시되어있다. 현재의 뇌건강 관련 건강기능식품은 뇌세포 보호 등의 기능을 가지고 있으나 실제 기억력을 개선하는 건강기능식품은 그 수가 적으며, 기억력 개선 건강기능식품은 그 효능의 탁월함에도 불구하고 대량생산의 어려움과 원료물질의 국내 생산 어려움으로 인해 해결해야 할 문제점을 가지고 있다. 당사가 연구개발을 수행한 원료 중 미나리 (*Oenanthe javanica*)는 미나리과의 여러 해살이 풀로서 한국, 일본, 중국 등에 분포하는 식물이다. 미나리는 정신을 맑게 하고 피를 깨끗하게 하는 효능을 비롯해 혈압강화작용이 뛰어나고 혈중 콜레스테롤 수치 경감효과를 가지고 있는 알칼리성

식품이다. 미나리는 당사가 연구 수행한 다양한 원료 중 기억력 개선과 관련된 효과가 뛰어난 것을 확인했고 특히, 알코올에 의한 기억력 감소를 억제시킨다는 결과를 나타내었다. 전임상을 통해 미나리의 강화된 기억력 개선 효능 및 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로써 표준화/제품화 (제형개발, 대량 생산법 개발, 품질관리법 개발)를 하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 미나리 추출물의 기억력 개선 효능 강화 연구 (기존 기억력 소재와 비교)
  - 세포실험 및 동물 실험을 통해 기억력 개선 효능 및 미나리 추출물이 기억력을 개선시키는 기작에 대해 연구한다.
  - 임상에 적용할 수 있는 효능 용량 설정함.
- 미나리 추출물의 기준규격 설정 (식약처 기준에 부합된 소재 개발)
  - 미나리 추출물의 유해물질, 위생관리 항목을 설정한다.
- 미나리 최적 원료 선별 및 미나리 추출물의 지표(기능)성분 설정
  - 미나리 추출물에 함유된 지표(기능)성분의 구조 확인 및 분석법 확립한다.
  - 미나리 추출물에 함유된 지표(기능)성분의 정량 분석 실시한다.
  - 설정된 분석법에 대한 method validation 실시한다.
- 미나리 추출 원료의 제조공정 표준화
  - 유사종 및 원재료 사용부위의 검토한다.
  - 원산지 및 채취시기의 차이에 따른 기능성 확인한다.
  - 미나리로부터 기능성분의 수율 및 함량을 최적화 할 수 있는 추출조건의 확립한다.
- 미나리 추출 원료의 제형 연구
  - 미나리 추출물을 이용하여 환, 정제, 캡슐 등의 제형 연구 실시한다.
- 미나리 추출 원료의 안정성 평가를 통한 원료의 유통기한 설정
  - 표준화된 방법에 의해 추출 생산된 미나리 원료에 함유된 지표(기능)성분에 대한 안정성 실험 실시한다.
- 미나리 추출 원료의 시제품 생산
  - 미나리 추출물을 이용하여 1종 이상의 시제품 생산한다.

### IV. 연구개발결과

LC-MS/MS 분석을 통해 미나리 산가수분해에서 확인되어진 Quercetin과 Isorhamnetin peak의 정확성을 재확인하였다. 미나리의 지표성분은 Isorhamnetin으로 결정하였다. 미나리추출물에서 Isorhamnetin 정량이 가능함을 확인하였다. 효소활성 억제력 실험결과, 다른 특산품에 비해 미나리는 효소활성억제력이 뛰어났다. 또한 재배조건별로 수경재배미나리와 비수경재배 미나리 모두 효능이 뛰어났다. 지역별 미나리 중 나주노안미나리가 효능이 뛰어났다. 시기별미나리 효능에서 10월 미나리의 효능이 뛰어났다. 그리고 미나리는 효소활성을 농도의존적으로 억제할 수 있었으며 무경쟁적 효소활성 억제력을 보인다. 세포실험결과, 재배조건별로 수경재배미나리와 비수경재배 미나리 모두 효능이 뛰어났다. 지역별 미나리 중 나주노안미나리가 효능이 뛰어났다. 시기별미나리 효능에서 10월 미나리의 효능이 뛰어났다. 미나리는 과산화수

소에 의한 세포사멸과 활성산소종을 억제할 수 있었다. 또한 스코폴라민 동물모델, 스트레스와 알코올성 기억력 손상을 줄여주었으며 Tg2576마우스에서 기억력을 증진시켰다. Isorhamnetin은 기준규격 1.743mg/g의 80~120%인 1.394~2.092mg/g으로 설정하였다. 중금속에서 납은 1.0ppm, 총 비소 1.0ppm, 총 카드뮴 0.5ppm, 총 수은 0.5ppm 이하로 규격을 설정하였다. 분석결과, 중금속의 항목은 모두 적합한 것으로 확인되었다. 대장균군은 음성으로 확인되었다. HPLC분석결과, 미나리품종의 차이에 의한 화합물의 조성은 차이가 없었으나 미나리의 채취시기에 의한 화합물 함량의 변화가 나타나는 것을 알 수 있다. 기존 제품과 혼합한 tablet 제품 1종을 시제품 제작하여 해외 전시에 홍보하였으며 또한 판매 전략을 수립 중에 있다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 사업의 성공 이후, 당사의 투자에 의해 전임상·인체적용시험을 통한 안전성 및 인체적용시험을 통한 기능성을 확보하고 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로 식약처에서 인증 받은 다음 국내는 물론 해외 시장에 판매할 수 있는 고부가가치 상품으로 개발하고자 한다.

## SUMMARY

### I. Title

Increment in functionality, standardization of the raw material and production of trial products using extracts of *Oenanthe javanica* as a functional food for improving memory

### II. Purpose and Necessity of R&D

- Purpose of R&D

#### A. Technological aspect

Environmental factors such as aging, stress and alcohol impair cognitive functions. Many researchers have found functional food ingredients for memory improvement. Therefore, we will develop *Oenanthe javanica* extract as a functional food supplement approved by Ministry of Food and Drug Safety.

#### B. Industrial aspect

Because both domestic and international buyers are interested in memory-enhancing materials, developing *Oenanthe javanica* extract as a high added-value supplement is a good chance of success.

(A) Before approval of Ministry of Food and Drug Safety: We will make a product mixed with *Oenanthe javanica* extract and *Polygala tenuifolia* extract previously approved by Ministry of Food and Drug Safety.

(B) After approval of Ministry of Food and Drug Safety: We will sell our product including *Oenanthe javanica* extract as a functional food material to international and domestic market.

- Necessity of R&D

Brain is highly susceptible to harmful substances such as drinking, smoking and stress. Brain damage is related to memory impairment and induces many problems. Many researchers have developed functional food supplements and merchandising some materials succeeds in functional markets and has some problems. *Oenanthe javanica* is a perennial herb and cultivated in marshy areas of Asia and Australia and is used as a salad or as a seasoning in soups and stews in Korea. Recent studies have provided evidence that it may possess liver-protective, anti-neurotoxic and anti-alcoholic effect. We will study the effect of *Oenanthe javanica* extract on memory improvement, establish a index component and

standardization of the material and make a trial product.

### III. Accomplishment contents and ranges of R&D

- Effect of *Oenanthe javanica* extract on memory improvement
  - Study on mechanisms of *Oenanthe javanica* extract
  - Establishment of dose for a clinical trial
- Establishment of standard criteria
  - Establishment of hazardous materials and sanitary administration
- Establishment of a index material
  - Confirmation of the structure of a index material
  - Confirmation of the content of a index material
  - Method validation
- Standardization of manufacturing processes
  - Comparison of similar species and used parts
  - Comparison of regional or seasonal herb extracts
  - Confirmation of extracted conditions
- Study on dosage forms
  - Study on tablet and capsule
- Establishment of expiration date
  - Study on stability
- Making of a trial product

### IV. Achievement of R&D Goals

Method development and validation of Isorhamnetin for the standardization of *Oenanthe javanica* as a functional ingredient and health food were accomplished. A X bridge C18 (4.6×150 mm, 5.0  $\mu$ m, waters) column was used with a gradient elution system of 0.1% TFA in water and acetonitrile. This method was validated according to specificity, linearity, accuracy, precision test, and recovery test. Specificity was confirmed with identical retention time, and calibration curves of Isorhamnetin showed good linear regression ( $R^2 > 0.999$ ). Relative standard deviations (RSD) of data from the intra- and inter-day experiments were less than 0.076% and 1.408 %. The results of the recovery test were from 101.4% to 102.9% with RSD values from 0.207 to 0.503%. Therefore, we performed analysis of Isorhamnetin as a marker compound in *Oenanthe javanica* extracts. The amount of Isorhamnetin in *Oenanthe javanica* was about 1.743 mg/g in the three times analysis by the validated method. These results suggest that the developed HPLC method is simple, efficient, and could contribute to the quality control of *Oenanthe javanica* extract as a functional ingredient. In efficacy test, *Oenanthe javanica* extract inhibited acetylcholinesterase activity in a dose-dependent manner and acted as an uncompetitive

inhibitor. The extract treatment blocked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and reactive oxygen species (ROS) production. In animal studies, the extract improved stress- and alcohol-induced memory impairment as well as the memory deficits of Tg2576 mice. In heavy metal test, total levels of leads are less than 1.0ppm, total levels of arsenics are less than 1.0ppm, total levels of cadmiums are less than 0.5ppm and total levels of mercury are less than 0.5ppm. It is suitable.

#### **V. Application Plan of R&D results**

We will study the safety test of animal tests and a clinical trial and gain the efficacy data of a clinical trial. After approval of Ministry of Food and Drug Safety, we will sell our product including *Oenanthe javanica* extract as a functional food material to international and domestic market.

# CONTENTS

chapter 1: Introduction of R&D .....	15
1. Purpose of R&D .....	15
2. Necessity of R&D .....	15
3. Scope of R&D .....	17
chapter 2: Domestic and International Technical Development Status .....	18
1. R&D Status .....	18
2. Different Characteristic of other R&D .....	23
chapter 3: Accomplishment Contents and Result of R&D .....	29
1. Effect of <i>Oenanthe javanica</i> extract on memory improvement .....	29
2. Establishment of standard criteria .....	56
3. Establishment of a index material .....	81
4. Standardization of manufacturing processes .....	88
5. Study on dosage forms .....	99
6. Establishment of expiration date .....	108
7. Making of a trial product .....	110
chapter 4: Achievement of R&D Goals and Contribution in Related Field .....	143
1. Achievement of R&D Goals .....	143
2. Contribution in Related field .....	149
chapter 5: Application Plan of R&D .....	150
chapter 6: The Overseas Scientific and Technical Information .....	161
which collect from R&D Process	
chapter 7: References .....	168

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	15
1. 연구개발의 목적 .....	15
2. 연구개발의 필요성 .....	15
3. 연구개발의 범위 .....	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	18
1. 국내·외 기술개발현황 .....	18
2. 기술개발의 차별성 .....	23
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	29
제 1 절 미나리 최적 원료 선별 및 미나리 추출 원료의 지표(기능)성분 표준화 .....	29
제 2 절 미나리 추출 원료의 기억력 개선 효능 입증 .....	56
제 3 절 미나리 추출 원료의 건강기능식품으로서의 기준규격화 .....	81
제 4 절 대량 생산을 위한 미나리 추출 원료의 제조공정 표준화 .....	88
제 5 절 미나리 추출 원료의 제형 연구 .....	99
제 6 절 미나리 추출 원료의 안정성 평가를 통한 원료의 유통기한 설정 .....	108
제 7 절 미나리 추출 원료의 시제품 생산 .....	110
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	143
1. 연구개발목표의 달성도 .....	143
2. 관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	149
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	150
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	161
제 7 장 참고문헌 .....	168

## 그림 목차

그림 1.	건강기능식품의 판매현황 및 품목별 판매현황 .....	18
그림 2.	국내시장 트렌드 변화 .....	18
그림 3.	건강기능식품산업 동향 및 발전전략 .....	19
그림 4.	각국의 건강식품시장의 국가별 비중 및 주요소재 .....	20
그림 5.	미국 건강식품 시장 추이 및 생리활성 물질시장 현황 .....	20
그림 6.	일본 건강식품 시장 추이 및 시장 규모 .....	21
그림 7.	EU 각국의 건강보조시작 규모 .....	21
그림 8.	미나리 기존 특허 자료 중 핵심특허 .....	25
그림 9.	기존 미나리 논문 자료 중 핵심논문 .....	27
그림 10.	예상 화합물의 구조식 .....	29
그림 11.	지표물질 예상화합물 HPLC chromatogram .....	30
그림 12.	미나리 70% EtOH ext. 산 가수분해 .....	31
그림 13.	미나리 추출물 산 가수분해 전 후 Chromatogram 및 UV spectrum .....	32
그림 14.	Isorhamnetin HPLC Chromatogram 및 UV spectrum .....	34
그림 15.	Isorhamnetin Total ion chromatogram and Molecular Ion chromatogram .....	34
그림 16.	Isorhamnetin MS spectrum .....	35
그림 17.	Isorhamnetin MS <sup>2</sup> spectrum .....	35
그림 18.	미나리 70% EtOH ext. HPLC Chromatogram 및 UV spectrum .....	36
그림 19.	미나리 70% EtOH ext. Total ion chromatogram and Molecular ion chromatogram .....	36
그림 20.	미나리 70% EtOH ext. MS spectrum .....	37
그림 21.	미나리 70% EtOH ext. MS <sup>2</sup> spectrum .....	37
그림 22.	미나리 70% EtOH ext. 산가수분해 후 HPLC Chromatogram 및 spectrum	
그림 23.	미나리 70% EtOH ext. 산가수분해 Total ion chromatogram and Molecular ion chromatogram .....	38
그림 24.	미나리 70% EtOH ext. 가수분해 후 MS spectrum .....	39
그림 25.	미나리 70% EtOH ext. 가수분해 후 MS <sup>2</sup> spectrum .....	39
그림 26.	표준용액과 산가수분해 전, 후 시험용액 중의 Isorhamnetin의 Chromatogram (A. Blank, B. Isorhamnetin 표준용액, C. 미나리추출물 산가수분해 전 시험용액, D. 미나리 추출물 산가수분해 후 시험용액) .....	44
그림 27.	Isorhamnetin과 미나리 추출물 시험용액 UV spectrum .....	45
그림 28.	peak purity test; 시험용액 중 Isorhamnetin peak 각 5점 spectrum 분석 .....	45
그림 29.	Isorhamnetin 표준용액 chromatogram 및 TIC .....	48
그림 30.	Isorhamnetin 표준용액 질량 스펙트럼 .....	48
그림 31.	미나리 추출물 chromatogram 및 TIC .....	49
그림 32.	미나리 추출물 질량 스펙트럼 .....	49
그림 33.	지역별 미나리의 효소 활성 억제력 비교 .....	58

그림 34. 나주 노안미나리 채취지 선정	59
그림 35. 채취된 미나리들	59
그림 36. 시기별 미나리의 효소 활성 억제력	60
그림 37. 미나리 재배 방법별 효소 활성 억제력	61
그림 38. 미나리추출 농도별 효소 활성 억제력	63
그림 39. 미나리추출물의 효소활성 억제 기작	63
그림 40. 지역별 미나리의 세포독성 억제력	65
그림 41. 시기별 미나리의 세포 독성 억제력	66
그림 42. 미나리 재배방법별 세포독성 억제력 비교	67
그림 43. 지역별 미나리의 활성산소 생성 억제력	69
그림 44. 시기별 미나리의 활성산소 생성 억제력 비교	70
그림 45. Scopolamine을 투여한 동물에서의 기억력 효과	72
그림 46. 알코올을 투여한 동물에서의 기억력 개선 효과	74
그림 47. 알코올을 투여한 동물 뇌에서의 AChE 활성 억제 효과	75
그림 48. 스트레스 동물에서의 기억력 개선 효과	76
그림 49. 스트레스 동물 뇌에서의 AChE 활성 억제 효과	77
그림 50. Tg2576 동물의 12주간 먹이섭취량 변화	78
그림 51. Tg2576 동물의 12주간 몸무게 변화	79
그림 52. Tg2576 동물에서의 기억력 개선 효과	79
그림 53. Tg2576 동물 뇌에서의 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 단백질 감소 효과	80
그림 54. 미나리 추출물 Lot.1의 중금속 및 대장균군 시험성적서	85
그림 55. 미나리 추출물 Lot.2의 중금속 및 대장균군 시험성적서	86
그림 56. 미나리 추출물 Lot.3의 중금속 및 대장균군 시험성적서	87
그림 57. 미나리 EtOH 농도별 추출방법	88
그림 58. 미나리 EtOH 농도별 추출물 수율	89
그림 59. EtOH 농도별 추출물의 HPLC Chromatogram	91
그림 60. 지역별 미나리 HPLC Chromatogram	93
그림 61. 미나리 품종 및 채취시기에 따른 HPLC Chromatogram	96
그림 62. 미나리 건조 방법에 따른 HPLC Chromatogram	98
그림 63. 미나리 추출 공정 과정	102
그림 64. 최종제품 제형 연구 공정 과정	106
그림 65. 저장기간에 따른 Isorhamnetin의 변화	108
그림 66. 시제품 제작을 위한 원료 이미지	117
그림 67. 품목제조 보고 대장	119
그림 68. 공인기관 검사 성적서	120
그림 69. 제조 기록 작업 (추출작업, 농축작업, 분무건조작업)	123
그림 70. 제품 시제품 제작 이미지	126
그림 71. 제품 품목제조 신고증	127
그림 72. 공인기관 검사 성적서	129
그림 73. 제조지시기록서	139
그림 74. 디자인 검토 및 광고심의 이미지	142

그림 75. 일본 기능성식품 시장 수집 자료 .....	157
그림 76. 스위스 제네바 Vitafoods 한국관 위치 .....	158
그림 77. 스위스 제네바Vitafoods전시회 참가 이미지(2013년) .....	158
그림 78. 구매관심을 갖은 buyer들의 명함(2013년) .....	161
그림 79. 홍보물 제작 .....	162
그림 80. 스위스 제네바 Vitafoods 전시회 참가 이미지(2012년) .....	163
그림 81. 구매 관심을 갖은 buyer들의 명함(2012년) .....	164
그림 82. 미나리 기억력 증진 효과에 관한 연구 포스터 .....	165
그림 83. 2013년 한국식품과학회 포스터 .....	166

## 표 목차

표 1.	건강기능식품 세계 시장 규모 추이 .....	19
표 2.	생산업체별 제품 판매가격 .....	22
표 3.	미나리특허 분석 검색 범위 .....	23
표 4.	미나리 기존 특허와의 관련성 .....	24
표 5.	미나리 논문 분석 검색 범위 .....	25
표 6.	미나리 기존 논문과의 관련성 .....	26
표 7.	미나리 추출분말 중 Isorhamnetin 분석법의 유효성 검증(요약) .....	41
표 8.	Isorhamnetin 분석을 위한 Retention time, Precursor ion 및 Product ion .....	47
표 9.	미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (1회 실험) .....	50
표 10.	미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (2회 실험) .....	50
표 11.	미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (3회 실험) .....	51
표 12.	Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험) .....	51
표 13.	Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험) .....	52
표 14.	Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험) .....	52
표 15.	분석일자, 분석자간의 Isorhamnetin 함량 .....	53
표 16.	분석일 05월 07일, 분석자 A .....	53
표 17.	분석일 05월 08일, 분석자 B .....	54
표 18.	정확성 진행방법 .....	54
표 19.	미나리추출물 정확성 및 회수율 .....	55
표 20.	지역 특산물의 효소 활성 억제력 .....	57
표 21.	Lot 별 Isorhamnetin의 함량 분석결과 .....	83
표 22.	Lot 별 Isorhamnetin의 함량 범위 결과 .....	83
표 23.	유해물질 시험항목 및 시험방법 .....	84
표 24.	Lot 별 미생물 및 중금속 분석결과 .....	103
표 25.	미나리 원료제품 공정 연구 sample 별 분말화 가능성 평가표 .....	103
표 26.	미나리 원료제품 추출용매조건 검토에 의한 수율 변화 .....	103
표 27.	미나리 원료제품추출 용매조건 검토에 의한 영양성분 변화 .....	104
표 28.	미나리 최종제품 HPMC(결합제)를 이용한 과립 조건 .....	106
표 29.	미나리 최종제품 알코올 용매(EtOH-95%,90%,85%,80%)농도별 과립 조건 .....	106
표 30.	미나리 최종제품 HPMC 및 용매 혼합 (*HPMC 배합비에 용매 Water 첨가) 조건 .....	106
표 31.	지표성분 기준 및 적합범위 .....	108
표 32.	저장기간에 따른 Isorhamnetin의 변화 .....	109
표 33.	제품 생산 계획 (1~5월) .....	110
표 34.	미나리추출분말 대량생산 계획 .....	110
표 35.	홍삼 및 비타민 신제품 개발 계획 .....	111
표 36.	미나리 원료의 시제품 제작 시장조사 현황 .....	112

표 37.	홍삼 시제품 제작의 시장조사	114
표 38.	활력제품 시제품 제작 시장조사	115
표 39.	시제품 제작 원료 배합비 및 원료 단가	125
표 40.	연차별 연구개발의 목표 및 내용	145
표 41.	연구 성과 목표	146
표 42.	연구 성과 활용 목표	146
표 43.	논문게재	147
표 44.	특허 출원 및 등록	148
표 45.	인력채용 성과	149
표 46.	산업기술인력 교육 양성 성과	149
표 47.	경제사회 고용창출 성과	149
표 48.	실용화 산업 사업화 계획(5개년도)	150
표 49.	예산 확보 및 지출계획	151
표 50.	생산 계획(2017~2019년)	152
표 51.	마케팅 추진 계획	152
표 52.	매출 효과	153
표 53.	완제품 수출효과	153
표 54.	연차별 고용효과	154
표 55.	전시회 결과 목록	159

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 목적

### 가. 기술적 측면

현대사회는 노령화, 스트레스, 알코올 등과 같은 요인들에 의해 뇌기능 특히, 기억력감퇴 요인들에 노출되어 있다 (1). 많은 사람들은 이러한 뇌기능 특히, 기억력을 개선할 수 있는 식품 소재들에 많은 관심을 가지고 있다 (2,3). 따라서 미나리 추출물을 이용하여 식약처 인증 기억력 개선 건강기능식품으로 개발하고자 한다.

### 나. 산업적 측면

기억력 개선 소재는 국내는 물론 해외시장에서 많은 관심을 받고 있으며 미나리 추출 원료 개발은 분명 고부가가치 상품으로써 성공가능성이 있다.

(가) 식약처 인증 전 단계: 본 과제의 주관기관에서 기개발한 기억력 개선 소재와 혼합한 혼합제품을 개발하여 상품화를 수행하고자 한다.

(나) 식약처 인증 후 단계: 미나리 추출 원료 자체적으로 기능성 상품을 개발하여 국내 및 해외시장에 판매할 수 있는 상품화를 수행하고자 한다.

## 2. 연구개발의 필요성

체중의 2%에 불과한 뇌는 심장에서 나온 혈액의 17%가 흘러들어가며 체내 산소의 20%를 소모할 만큼 많은 에너지가 필요한 중요 생체기관이다. 뇌는 스트레스, 환경적 요인, 과음, 흡연 등의 원인으로 손상받기 쉬우며 현대인은 그런 원인에 무방비하게 노출되어 있다. 뇌의 손상은 지체장애와 같은 질환으로 등록되어있지 않으나 기억력 장애를 유발하게 되고 그 증상의 강도에 따라 많은 문제를 야기하게 된다 (4). 현재 많은 기업과 연구소들은 기억력 장애와 같은 뇌손상을 억제할 건강기능식품 소재를 개발하고 있으며 그 성과물로 몇 가지 뇌건강 관련 건강기능식품들이 출시되고 있다 (5). 현재의 뇌건강 관련 건강기능식품은 뇌세포 보호 등의 기능을 가지고 있으나 실제 기억력을 개선하는 건강기능식품은 그 수가 적으며, 기억력 개선 건강기능식품은 그 효능의 탁월함에도 불구하고 대량생산의 어려움과 원료물질의 국내 생산 어려움으로 인해 해결해야 할 문제점을 가지고 있다. 전통적으로 우리는 질병 치료나 건강유지를 위해 사용하고 있는 천연물 또는 새로운 효능이 발견된 천연물이나 생체로부터 신약을 발견하게 된 예를 쉽게 접할 수 있다. 아시아 지역은 물론, 독일을 비롯한 유럽과 북미지역에서 전통약물들의 연간 판매량 (아시아: 4,400, 독일: 1,550, 북미: 1,000, 나머지 유럽국가: 1,800, 단위; 백만불) 을 고려해 볼 때 전 세계적으로 천연물이 현대 의약에서 아주 중요한 위치를 차지하고 있으며, 각종질환에 치료효능을 갖는 성분은 물론 안전성과 효능 면에서도 기존의 약물들보다 우수한 새로운 치료제를 유도하기 위한 노력이 매우 필요한 시기라는 것을 알 수 있다. 또한 전세계인구의 65내지 85%가 건강유지와 치료를 위하여 천연물로부터 얻는 전통 약물을 이용한다는 세계보건기구의 통계는 천연물의 가치를 인정하고 있다. 전통 약물(주로 천연물)을 이용한 건강 유지와 질병치료제 개발방법도 매우 중요한 의의를 가지고 있다. 최근 생리활성 효능검증방법이 기초의과학과 생명공학 등의 급속한 발달과 함께 다양화되고 구체화 되면서

수많은 천연물들로부터 단기간 내에 새로운 활성을 갖는 천연물을 찾아낼 수 있는 가능성이 현저히 높아졌다 (6). 각종 스트레스와 정보의 홍수 속에서 살고 있는 현대인들이 겪고 있는 대표적인 질환 중의 하나가 중추신경계질환이며 노령화 사회로 접어들면서 치매와 같은 퇴행성 뇌신경계질환 환자수의 증가 또한 사회적 문제가 될 것으로 예상되고 있다. 이들은 공통적으로 기능은 인지능력과 기억력을 향상시키고 뇌기능을 활성화 하려는 시도를 하고 있다. 최근 주요약품 판매량 통계를 보면 주요 상위 5개 치료제 중 가장 빠른 성장세를 나타내는 중추신경계 약물은 노년인구 층이 두터워지면서 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, 우울증, 불면증 등의 질환 환자수가 증가함에 따라 수요가 증가하고 있다 (1). 특히 학습량이 기하급수적으로 증가하는 청소년층과 과도한 업무를 신속하고 효율적으로 처리할 수 있는 능력을 필요로 하는 청장년층의 뇌기능 극대화를 도와줄 수 있는 제품이 요구되고 있다. 이와 같은 다양한 계층으로부터의 사용 증가 추세로 볼 때 뇌 질환 치료제가 필요한 환자뿐만 아니라 이들 질환을 예방하거나 완화시켜줄 수 있는 건강기능식품 또는 건강보조제를 필요로 하는 사람들 역시 증가하고 있다는 것을 알 수 있다. 그러므로 효능이 우수한 천연물을 발굴하여 추출물 또는 혼합물 상태에서 일차적으로 건강기능 식품의 원료로 우리가 쉽게 이용할 수 있게 제품화 할 수 있다면 그 가치 또한 매우 크다고 할 수 있다. 부작용이 적으며, 효능이 좋고, 원인적 치료 (뇌병변의 개선) 까지 가능한 새로운 학습과 기억력 증진효과를 갖는 기능식품으로 청소년층의 기억력 증진에 도움을 주고 20대 30대 40대 건망을 호소하는 사람의 건망증을 예방할 수 있고 뇌 기능 저하 및 기억력 감퇴가 급격하게 증가하는 노인들의 치매까지도 예방 할 수 있는 건강기능식품으로 개발 된다면 국민건강에 크게 기여할 것으로 판단된다. 당사가 연구개발을 수행한 원료 중 미나리 (*Oenanthe javanica*)는 미나리과의 여러 해살이 풀로서 한국, 일본, 중국 등에 분포하는 식물이며 정신을 맑게 하고 피를 깨끗하게 하는 효능을 비롯해 혈압강화작용이 뛰어나고 혈중 콜레스테롤 수치 경감효과를 가지고 있는 알칼리성 식품이다 (5). 농림부의 2001년 보고에 따르면 미나리의 생산량은 전국적으로 22,374톤에 달한다. 나주시 노안면은 우리나라 미나리 생산량의 20%를 차지하는 최대 주산지 중 한 곳이고 친환경 인증 미나리 생산량이 연간 1,400톤 가량이다. 당사는 현재 기억력 개선 건강기능식품을 개발 완료하여 개별인정형 제품 (BT-11)으로 출시 및 판매하고 있는 노하우를 바탕으로 전라남도 특산품 중 기억력 개선 효과가 있는 원료를 찾고자 하였다 (2,3,7). 미나리는 당사가 연구 수행한 다양한 원료 중 기억력 개선과 관련된 효과가 뛰어난을 확인했고 특히, 알코올에 의한 기억력 감소를 억제시킨다는 결과를 나타내었다. 미나리의 개발 가능성을 바탕으로 당사는 미나리에 대한 특허를 출원하였고, 전임상을 통해 미나리의 강화된 기억력 개선 효능 및 생체이용률을 밝히고 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로써 표준화/제품화 (제형개발, 대량 생산법 개발, 품질관리법 개발)를 하고자 하며, 본 사업의 성공 이후, 당사의 투자에 의해 전임상·인체적용시험을 통한 안전성 및 인체적용시험을 통한 기능성을 확보하고 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품으로 식약처에서 인증 받은 다음 국내는 물론 국외 시장에 판매할 수 있는 고부가가치 상품으로 개발하고자 한다. 미나리 개발사업은 본사와 (재)전라남도식품산업연구센터 및 전라남도 나주시 노안돌미나리연합회와 MOU를 체결하였으며 두 기관과 긴밀히 협조하여 사업을 성공시킬 것이며 본 제품의 성공으로 고부가가치 상품이 출시되면 농가에 안정적인 수입원이 될 수 있고 전라남도를 비롯한 전국의 미나리 농가의 수익 증대를 기대 할 수 있다.

### 3. 연구개발 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2011	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미나리 추출 원료의 기억력 개선 효능 연구</li> <li>○ 미나리 추출 원료의 기준규격 설정</li> <li>○ 미나리 추출물의 지표(기능)성분 설정</li> <li>○ 미나리 원료 및 제조공정 표준화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>미나리 추출물의 기억력 개선 효능 강화 연구</b> (기존 기억력 소재와 비교)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포실험 및 동물 실험을 통해 기억력 개선 효능 및 미나리 추출물이 기억력을 개선시키는 기작에 대해 연구함.</li> <li>- 임상에 적용할 수 있는 효능 용량 설정함.</li> </ul> </li> <li>○ <b>미나리 추출물의 기준규격 설정</b> (식약처 기준에 부합된 소재 개발)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미나리 추출물의 유해물질, 위생관리 항목을 설정함.</li> </ul> </li> <li>○ <b>미나리 최적 원료 선별 및 미나리 추출물의 지표(기능)성분 설정</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미나리 추출물에 함유된 지표(기능)성분의 구조 확인 및 분석법 확립</li> <li>- 미나리 추출물에 함유된 지표(기능)성분의 정량 분석 실시.</li> <li>- 설정된 분석법에 대한 method validation 실시</li> </ul> </li> <li>○ <b>미나리 추출 원료의 제조공정 표준화</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유사종 및 원재료 사용부위의 검토</li> <li>- 원산지 및 채취시기의 차이에 따른 기능성 확인</li> <li>- 미나리로부터 기능성분의 수율 및 함량을 최적화 할 수 있는 추출조건의 확립</li> </ul> </li> </ul>
2차년도	2012	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미나리 추출 원료를 이용한 제품의 제형 연구</li> <li>○ 미나리 추출 원료의 안정성 (stability) 실험을 통한 원료의 유통기한 설정</li> <li>○ 미나리 추출 원료를 이용한 시제품 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>미나리 추출 원료의 제형 연구</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미나리 추출물을 이용하여 환, 정제, 캡슐 등의 제형 연구 실시</li> </ul> </li> <li>○ <b>미나리 추출 원료의 안정성 평가를 통한 원료의 유통기한 설정</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 표준화된 방법에 의해 추출 생산된 미나리 원료에 함유된 지표(기능)성분에 대한 안정성 실험 실시</li> </ul> </li> <li>○ <b>미나리 추출 원료의 시제품 생산</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미나리 추출물을 이용하여 1종의 시제품 생산</li> </ul> </li> </ul>

# 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발 현황

### 가. 국내 제품생산 및 시장 현황

#### (1) 건강기능 식품의 매출액

(가) 건강기능식품 매출액은 2006년 이후 연평균 11.4%로 지속적으로 증가하여 2010년도를 기준으로 1조원을 넘어섰다.

(나) 건강기능식품 판매액이 전체적으로는 증가하고 있고, 그 중에서도 전체 건강기능식품 매출액의 54.5%가 홍삼제품이다. 또한 다른 제품에 비해 매년 지속적으로 판매량이 증가추세에 있다.

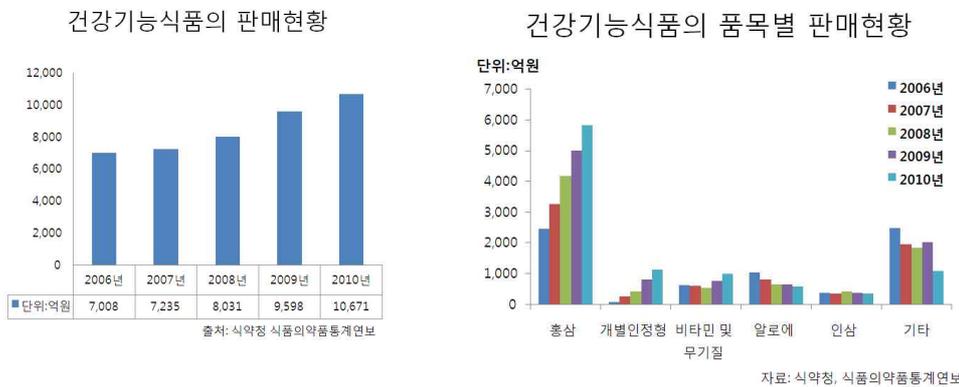


그림 1. 건강기능식품의 판매현황 및 품목별 판매현황

#### (2) 국내 식품시장 트렌드의 변화

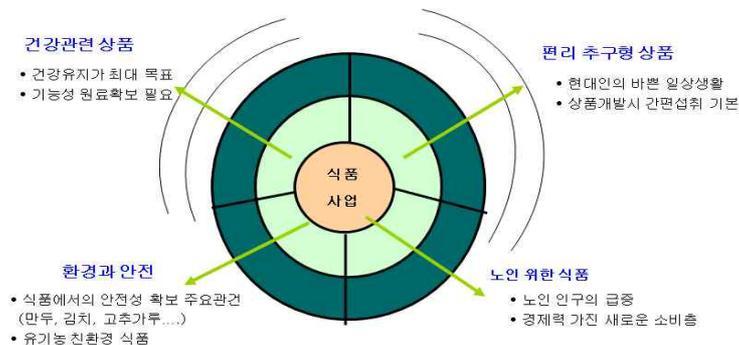


그림 2. 국내시장 트렌드 변화

(3) 국내 건강식품산업의 SWOT분석

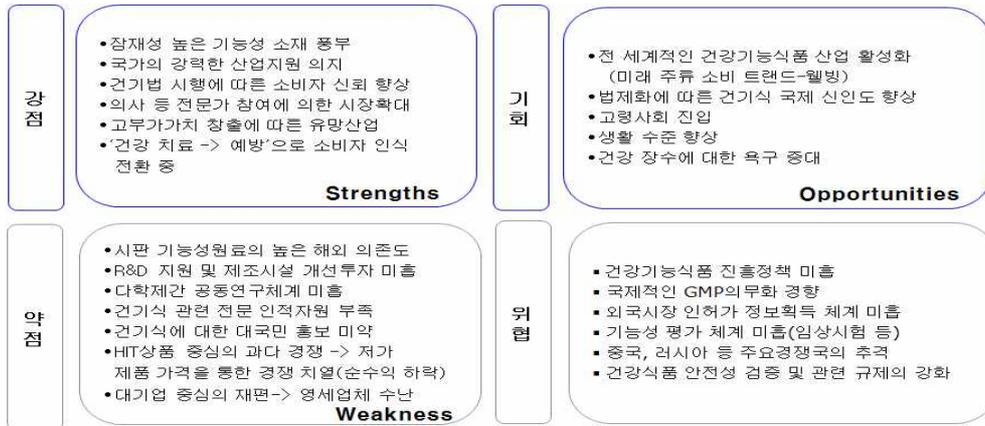


그림 3. 건강기능식품산업 동향 및 발전전략-한국보건산업진흥원 (2005. 5. 25)

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

(1) 연도별 세계 건강식품 시장현황

- (가) 식생활 및 경제여건의 발달로 식품의 일차적 기능인 영양과 이차적 기능인 맛과 조식감에 대해 식품을 1,2차적인 단순한 기능을 넘어서 생체조절기능에 대한 관심이 집중되고 있다.
- (나) 의료비 증가에 따른 국가 부담가중, 노령화 사회 진입, 소비자의 건강관심 고조, 식품산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때 건강기능식품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있다.

년도	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2007
시장규모(억달러)	650	1,090	1,280	1,380	1,501	2,023	3,771

표 1. 건강기능식품 세계 시장 규모 추이

출처: Nutrition Business Journal 2003 Food Technology USA, 2003

(2) 각국의 건강식품시장의 국가별 비중 및 주요소재

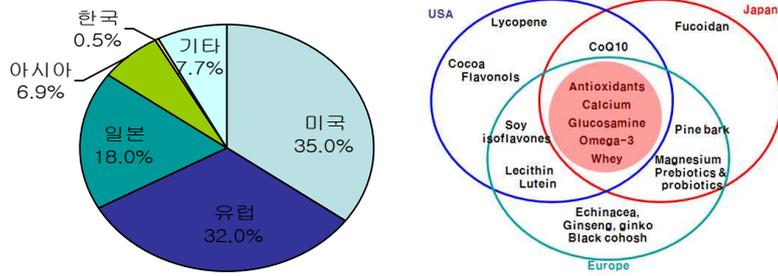


그림 4. 각국의 건강식품시장의 국가별 비중 및 주요소재

자료: Nutrition Business Journal (2003), Innovation in Functional Food and Drinks Report (2005)

(3) 세계 각국의 건강 기능 식품 시장의 특징

(가) 미국 건강기능식품 시장 현황

- ① 미국시장은 세계시장의 46%를 차지하고 있으며, 연평균 18% 이상의 성장이 예상됨.
- ② 미국은 영양표시 및 교육법(Nutrition Labeling and Education Act, 1991년), 건강보조식품 및 교육법 (The Dietary Supplement Health and Education Act, 1994년)의 규제를 받는다.
- ③ 정부관심 증가 : Baby Boomer의 Silver 세대 전환으로 관심고조
- ④ 소비자 관심 증가 : Well-being (건강유지/미용), 자연식품 및 체질에 따른 식이요법

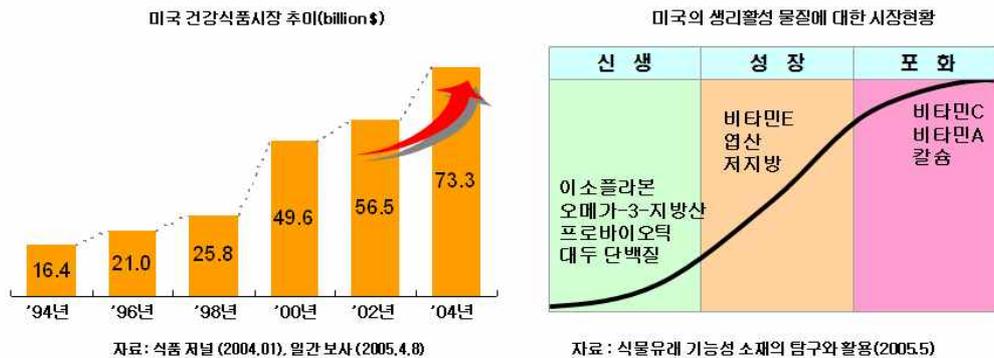


그림 5. 미국 건강식품 시장 추이 및 생리활성 물질시장 현황

(나) 일본 건강기능식품 시장 현황

- ① 일본의 건강식품규모는 2010년 3조 2천엔으로 연평균 성장률 9%이상이 예상된다.
- ② 1인당 구매액은 153달러로 세계에서 가장 높은 수준이다.
- ③ 총 특허수는 2, 256건을 보유하고 있으며, 미국 1,218건, 유럽 692건에 비해 압도적으로 많다 (2001년 기준).

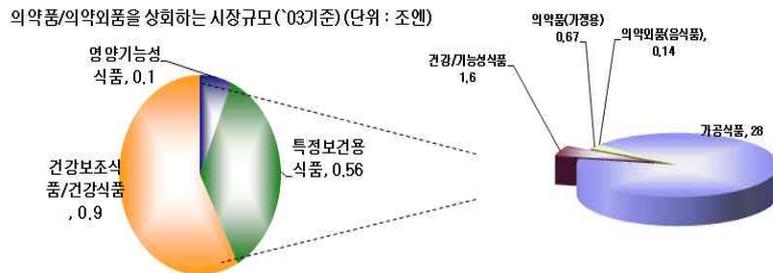


그림 6. 일본 건강식품 시장 추이 및 시장규모

(다) 유럽의 건강기능식품의 분류 체계 및 시장 현황



자료: 식품저널 (2006. 01)

그림 7. EU 각국의 건강보조시장 규모

(라) 중국의 건강기능식품 시장 현황

- ① 기능성 식품의 생산 현황 : 현재 중국의 보건식품 생산기업은 3,000여 업체이며, 2/3이상은 중소기업이다.
- ② 천연원료 사용이 광범위 (전통 양생이론을 상품설계)하고, 기술력이 낮다  
(신기능 보건식품 개발능력 부족)
- ③ 주요 생산제품 : 면역력 강화, 혈액지질 조절, 피로회복제품의 판매수익은 총 건강보조식품 판매수익의 41.4%을 차지한다.

2. 기술개발의 차별성

가. 기존 제품과의 차별성

(1) 제품생산 및 시장 현황

생산업체명	제품명	판매가격 (단위: 천원)	비고
그랜드 바이오	메모리플러스, 메모리파워 (기능성 내용: 기억력 개선에 도움을 줄 수 있습니다)	각 400mg×120캡셀= 150	제2007-5호 개별인정형제품으로 시장 점유율 판단 불가 (2007년7월, 10월 제품 출시)
CJ뉴트라	브레인슈타인 (기능성 내용: 노인의 인지능력 개선에 도움을 줄 수 있습니다)	500mg×240캡셀×2개입= 198	제2006-9호 개별인정형제품으로 시장 점유율 판단 불가
씨스팜	PME-88 멜론SOD (기능성 내용: 산화스트레스로부터 인체를 보호하는데 도움을 줄 수 있습니다)	339mg×90정= 70	제2008-9호 개별인정형제품으로 시장 점유율 판단 불가
(주)브레인트로피아	브레인300 (기능성 내용: 성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있습니다)	150mg×30캡셀×4개입 = 273	2010년 현재 기억력 개선 건강기능식품 제품 국내 시장점유율 30%이상 예상

표 2. 생산업체별 제품 판매가격

(2) 제품의 차별성

동일한 소재(미나리) 및 기능성(기억력개선효과)의 제품은 없는 실정이므로 동일한 기능성의 건강기능성제품을 비교하였다. 현재 당사의 기억력개선 원료제품(BT-11 원지추출분말)을 포함하여 6개 제품 및 업체가 식약처로부터 인정을 받았으나 수입 원료가 대부분을 차지하고 있으므로 국내산 미나리(천연물)를 이용한 개발을 하고자 한다.

현재 당사에서 기개발 판매하고 있는 BT-11원지추출분말[개별인정 제2009-12호, 성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음]의 2010년 매출은 10억 미만, 판매량은 1톤 가량의 성과를 달성하였으며, 2011년 해외 시장을 목표로 유럽 건강기능식품 박람회[비타푸드2011/스위스]에 참여하여 미국[암웨이/CDA체결 및 제품개발 단계]5톤/년, 유럽[Lonza] 7톤/년,

매출액 54억을 기대하고 있다. 본 사업의 개발제품에 관하여 해외 시장을 목표로 개발할 경우 국내 소재[농산물]의 건강기능식품으로 개발함과 동시에 높은 매출을 기대 할 수 있다. 세계 건강기능식품 시장의 90%이상을 미국, 유럽, 일본이 차지하고 있다. 유럽 시장은 2005년부터 3.7%씩 증가하여 2015년 42억불에 이를 것으로 보고되고 있으며, 전세계적으로 노령인구의 증가로 건강기능식품 특히 치매 및 기억력 관련 제품의 수요가 크게 증가 될것으로 보고되고 있다. [출처: 식품저널, 식품유통연감, 2010]

① 사업추진체계:

1차: 국내 건강기능식품 인정[KFDA/건강기능식품 개별인정]

2차: 미국[FDA/ NDA], 유럽[EFSA] 인정 진행

② 개발단계에서 자료의 확보를 해외 인증을 목표로 준비하면 시간과 비용을 절감 할 수 있으며, 국내 판매용과 비교하여 10배 이상의 매출액을 기대 할 수 있다.

나. 기존 특허와의 차별성

(1) 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(일본)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	미나리의 용매 추출물, 구체적으로 아세틸콜린에스터라제의 활성저해 및 감퇴된 기억력 증진에 유용한 효과가 있는 돌미나리의 특정 추출물 (알코올 수용액 추출물)을 치매, 구체적으로 알츠하이머 치매에 대한 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 활용하는 것에 관한 기술

표 3. 미나리 특허 분석 검색 범위

(2) 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		기억력 개선 건강기능식품 개발	(기술 2)
Keyword		미나리, 돌미나리, 물미나리, 뇌허혈, 뇌졸중, 뇌경색, 뇌신경, 치매, 파킨슨씨병, 알츠하이머, 콜린에스터레이즈, 콜린에스터라제	
검색건수		17	
유효특허건수		4	
핵심특허 및 관련성	특허명	미나리 추출물들 및 그들의 용도	
	보유국	대한민국	
	등록년도	2009	
	관련성(%)	0%	
	유사점	없음	
	차이점	미나리 메탄올 추출물의 부탄올 분획 및 이로부터 분리된 오클르로게닉 산 메틸 에스터의 항산화 효과 및 미백 효과가 있음이 기재되어 있음	

표 4. 미나리 기존 특허와의 관련성

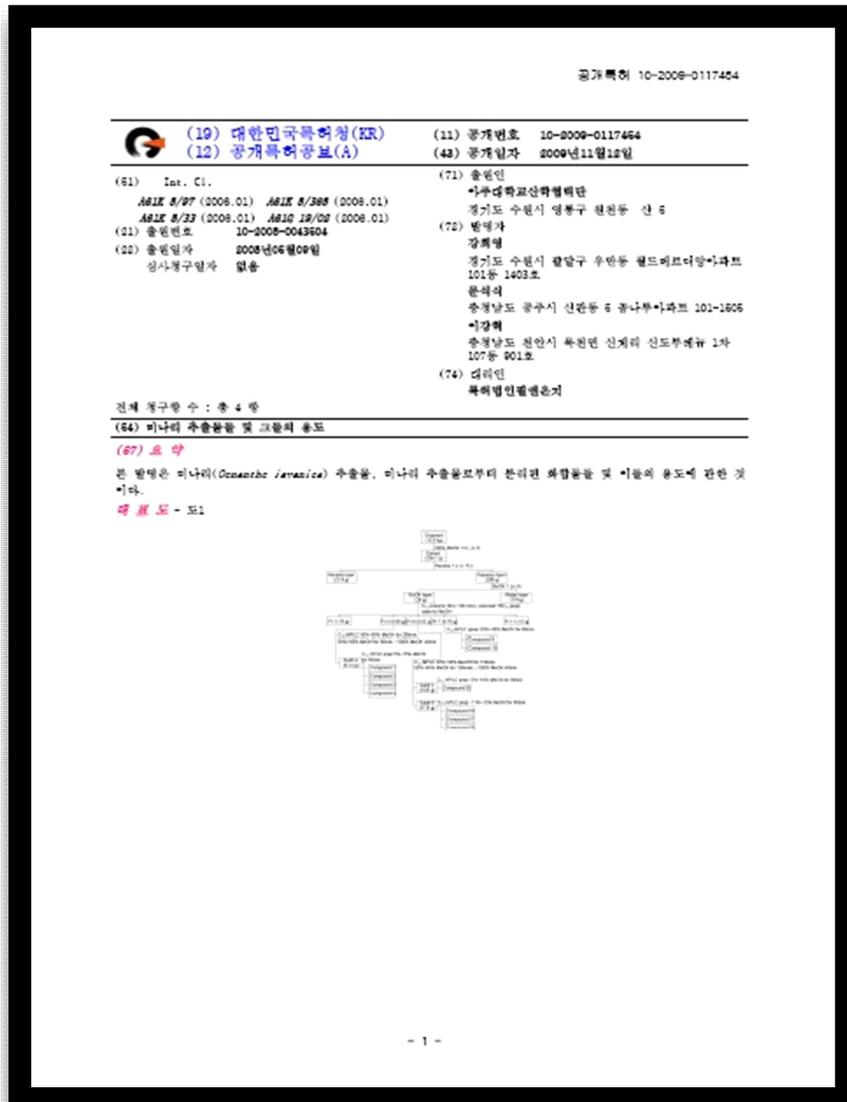


그림 8. 미나리 기존 특허 자료 중 핵심특허

## 다. 논문분석

### (1) 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed DB( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
검색기간	최근 5년간
검색범위	현재까지 보고된 미나리에 대한 효능 검증 논문 검색

표 5. 미나리 논문 분석 검색 범위

(2) 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		기억력 개선 건강기능식품 개발	(기술 2)
Keyword		미나리 ( <i>Oenanthe javanica</i> )	
검색건수		23	
유효논문건수		8	
핵심논문 및 관련성	논문명	Perisicarin from water dropwort ( <i>Oenanthe javanica</i> ) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity	
	학술지명	Phytother. Res.	
	저자	마충제 외 7인	
	게재년도	2010	
	관련성(%)	20%	
	유사점	신경세포의 보호 효과를 가짐	
	차이점	미나리 메탄올 추출물의 부탄올 분획 및 이로부터 분리된 perisicarin의 시험관 내 실험을 통한 글루탐산 신경세포 보호 효과만을 밝혔다. 신경세포보호 효과만으로 기억력 개선 효과를 입증하기는 어렵다. 따라서 본과제는 식용가능한 소재로 미나리 알코올 추출물이 기억력을 개선시킬 수 있는 기작을 세포실험을 비롯해 전임상시험을 통해 밝힐 것이다.	

표 6. 미나리 기존 논문과의 관련성

Display Settings Abstract Full Text Online

*Phytother. Res.*, 2010 Jun;24(6):913-8. doi: 10.1002/ptr.3065.

**Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity.**

Ma C.J., Lee K.Y., Jeong E.J., Kim S.H., Park J., Choi Y.H., Kim Y.C., Sung S.H.

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University, Seoul, Korea.

**Abstract**

The n-BuOH fraction of *O. javanica* significantly protected the primary cultures of rat cortical cells exposed to glutamate. Four flavonoids yielded from this fraction through bioactivity-guidance. The isolated compounds, identified as isorhamnetin (1), afzelin (2), hyperoside (3) and persicarin (4), were evaluated in vitro for their neuroprotective activity. Persicarin (4), the main constituent of *O. javanica*, showed significant neuroprotective activities in glutamate-injured rat cortical cells. Persicarin diminished calcium influx and inhibited the subsequent overproduction of nitric oxide and intracellular peroxide. In addition, persicarin significantly restored the reduced activities of glutathione (GSH) reductase and glutathione peroxidase, and the contents of GSH induced by glutamate. These results support a conclusion that persicarin greatly contributes to the neuroprotective activities of *O. javanica*.

(c) 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

PMID: 19960421 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Publication Types, MeSH Terms, Substances

LinkOut - more resources

그림 9. 기존 미나리 논문 자료 중 핵심논문

## 라. 기술 개발의 차별성 요약

### (1) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과, 기억력 개선 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 초기 성장기에 있다고 판단되며, 본 연구과제에서는 더 특화된 방향으로 연구를 추진하여 전연령의 기억력 개선 혹은 알코올성 기억력 개선 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매 준비 중임.

### (2) 특허분석 측면

- 기존 특허는 간기능성 개선 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 기억력 개선 방향으로 연구를 추진하여 기억력 더 나아가서는 치매 치료에 효과가 있는 물질로 국내 특허 등록 및 국외 특허 출원 완료했음.

### (3) 논문분석 측면

- 기존 논문은 신경세포 보호 효과 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 신경세포 보호 뿐만 아니라 기억력 개선 효과 방향으로 연구를 추진하여 기억력 개선 효과 논문 등을 SCI 및 비SCI 학술지 등에 제출하였음.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 미나리 최적 원료 선별 및 미나리 추출 원료의 지표(기능) 성분 표준화

#### 1. 지표성분 설정 및 시험방법 타당성 검토(Method validation)

##### 가. 미나리 추출물로부터 지표성분의 설정

문헌검색을 실시하여 지금까지 국내외에서 미나리와 관련된 연구결과들을 검색해본 결과 미나리에는 persicarin, quercetin 3-glucoside, hyperoside (quercetin 3-galactoside), myrcene,  $\alpha$ -pinene, ferulic acid, chlorogenic acid 등 다양한 종류의 phenolic acid, coumarin류, 플라보노이드류의 화합물이 존재함을 확인할 수 있었다 (8-13).

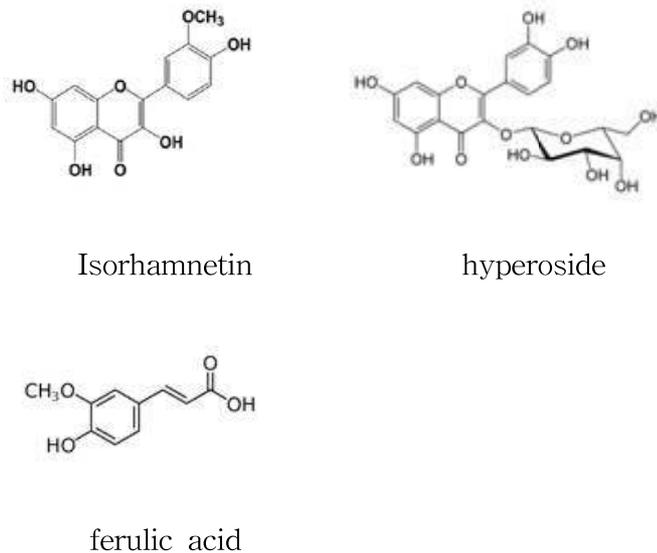


그림 10. 예상 화합물의 구조식

##### (1) 실험방법

이에 미나리에 함유된 지표성분의 설정을 위해 기존의 연구자들에 의해 밝혀진 다양한 화합물들 중에서 표준품이 판매되어지고 있는 hyperoside, isorhamnetin 등의 화합물이 미나리 추출물 분말에 존재하는지 여부를 HPLC 분석을 통하여 확인하였다.

##### - HPLC 분석 조건

- Detector: PDA detector
- Column: X bridge C<sub>18</sub> (4.6× 150 mm, 5  $\mu$ m), Waters
- Column Oven temp.: 30°C
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 0.1%TFA 함유 Water ; B, 0.1%TFA 함유 100% MeCN

min	A (%)	B (%)
0	100	0
40	0	25
80	0	75

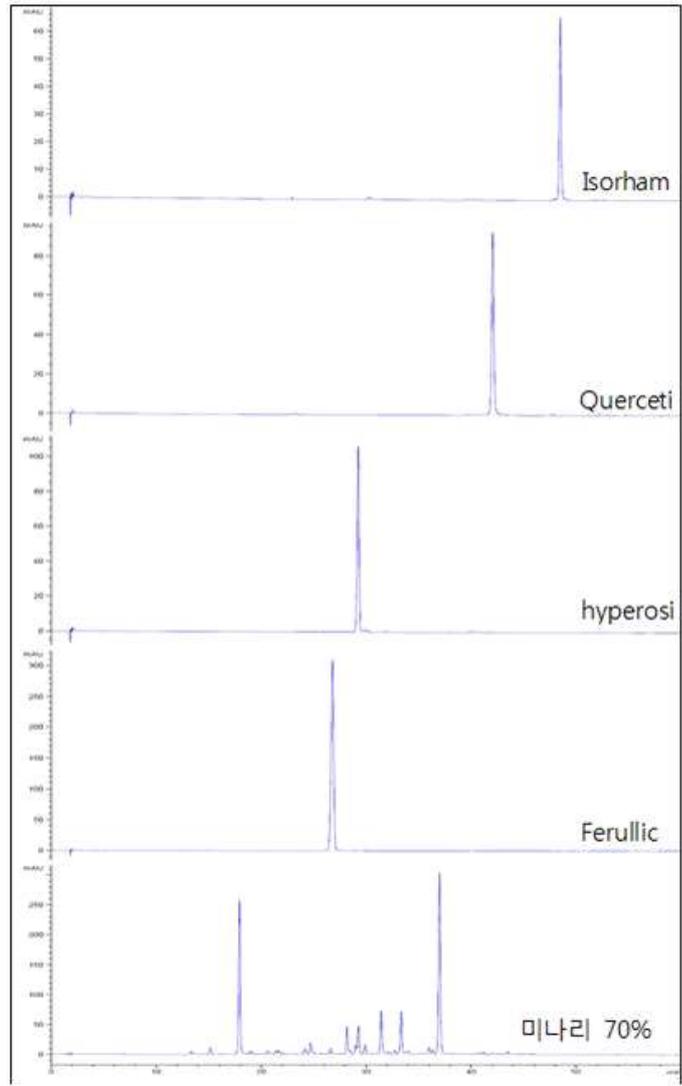


그림 11. 지표물질 예상화합물 HPLC chromatogram

(2) 결과

각각의 표준품 및 미나리 추출물 분말에 대한 HPLC 분석을 실한 결과, 미나리에 함유되어 있다고 알려진 많이 화합물들 중에서 미나리 추출분말과 retention time이 정확히 일치하는 화합물은 확인되지 않았다. 하지만 이는 화합물이 존재하지 않아서 검출되지 않는 것인지 아니면 추출물에 함유된 량이 소량이어서 검출한계 이하의 농도로 검출이 안 되는 것인지 재확인 필요한 것으로 판단된다. 이에 미나리에 여러 종류 존재하고 있는 것으로 알려진 flavonoid 배당체 화합물을 산으로 가수분해하여 flavonoid에 결합되어 있는 당을 제거한 후 aglycone 형태의 화합물이 이 존재하는지를 재확인 해 보고자 하였다. 미나리 추출물 분말의 가수분해는 아래의 그림에 나타낸 것처럼 황산을 첨가하여 90℃에서 30분간 실시하였다. 가수분해가 완료된 추출물에서 flavonoid 화합물은 EtOAc로 추출한 후 이를 농축하여 HPLC 분석을 실시하였다.

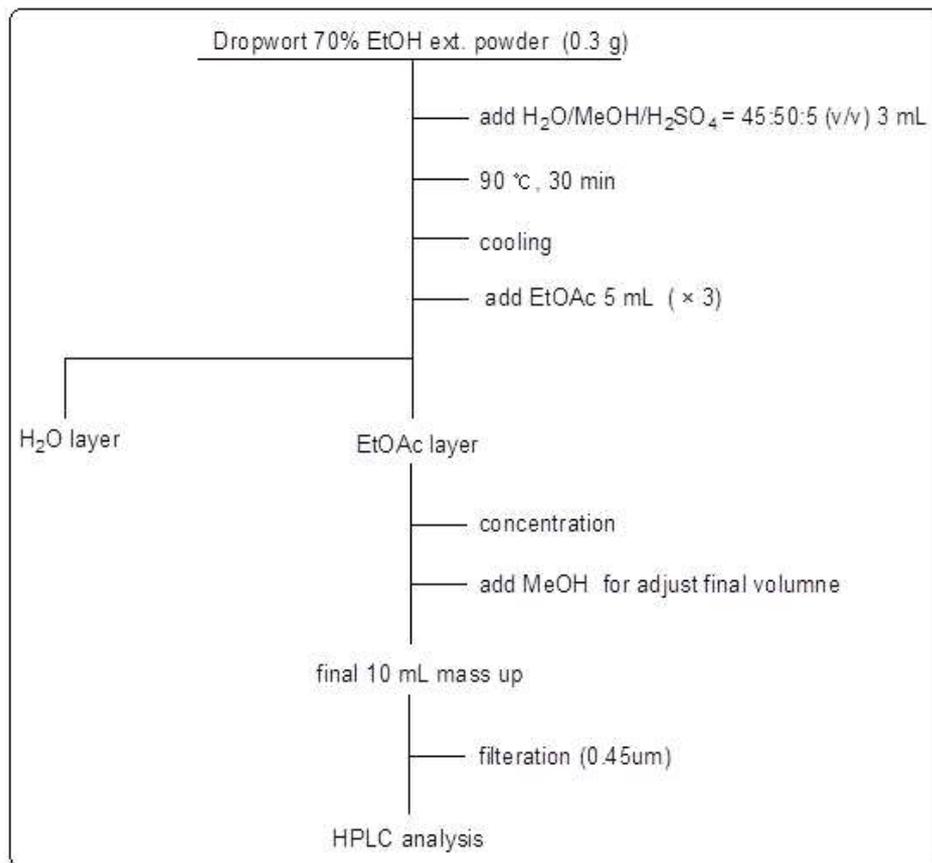


그림 12. 미나리 70% EtOH ext. 산 가수분해

## 나. 산가수분해를 이용한 지표성분 분석(HPLC 분석)

### (1) 실험방법

#### - HPLC 분석 조건

- Detector: PDA detector
- Column: X bridgr C<sub>18</sub> (4.6× 150 mm, 5 um), waters
- Column Oven: 30 °C
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 0.1%TFA 함유 10% MeCN ; B, 0.1%TFA 함유 100% MeCN

min	A (%)	B (%)
0	100	0
40	0	25
80	0	70

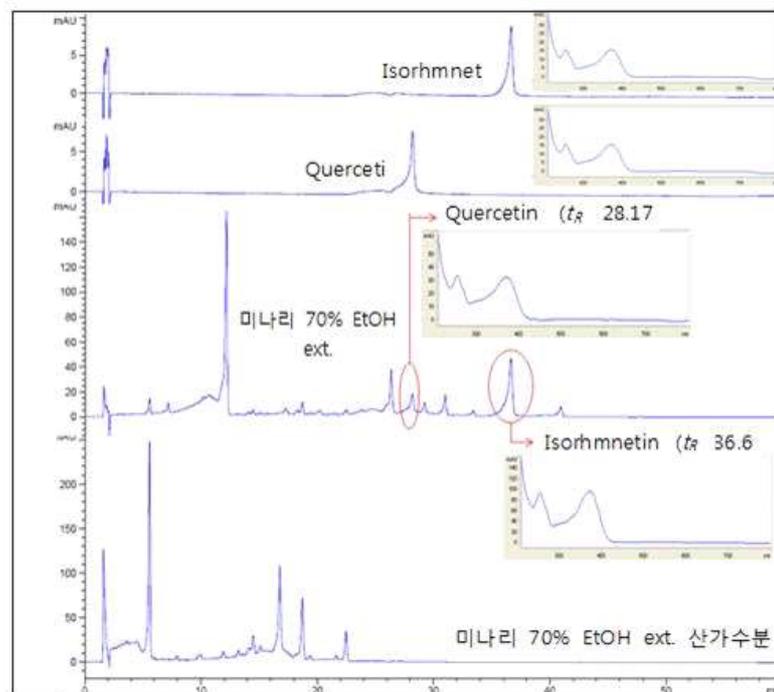


그림 13. 미나리 추출물 산 가수분해 전 후 Chromatogram 및 UV spectrum

(2) 결과

미나리 추출물 분말을 산으로 가수분해 한 후 HPLC 분석을 실시한 결과, 산 가수분해 이전에는 존재하지 않았던 peak들이 산 가수분해 후 retention time 22 min 이후부터 확인되었다. Quercetin aglycone 표준품 peak는  $t_R$  28.1 min에 검출되었으며, 미나리추출물 산 가수분해물에서도  $t_R$  및 UV spectrum이 일치하였다. Isorhamnetin 표준품은  $t_R$  36.6 min에 검출되었으며, 미나리추출물 산 가수분해물과  $t_R$  및 UV spectrum이 일치하였다. 미나리 산 가수분해물에서 확인되어진 Quercetin과 Isorhamnetin peak의 정확성을 재확인하기 위하여 LC-MS/MS 분석을 실시하였다.

다. 산가수분해를 이용한 지표성분 분석 (LC-MS/MS 분석)

(1) 실험방법

< LC-MS/MS 분석 조건 >

- HPLC: SHIMADZU LC-20A series
- Detector: Diode array detector 350, 370 nm
- Column: Shim-pack XR-ODS(2.2  $\mu$ m), 2.0 $\times$  100 mm), SHIMADZU
- Column Oven temp.: 50 $^{\circ}$ C
- Flow rate: 0.25 mL/min
- Injection volume: 5  $\mu$ L
- Mobile phase: A, 0.1% Formic acid 함유 H<sub>2</sub>O

B, 0.1% Formic acid 함유 100% MeCN

min	A (%)	B (%)
0	80	20
30	60	40
40	30	70

- MS: LCMS-IT-TOF (hybrid MS), SHIMADZU
- MS range: 150 - 1,500 m/z
- Ionization: ESI/probe voltage (4.5 kV)
- N<sub>2</sub> gas flow: 1.5 L/min
- CDL temp.: 200 $^{\circ}$ C
- MS<sup>2</sup>: precursor ion Isolation - 317.00 m/z, width - 1.0 da
- Collision gas: Ar (Cell - 50%, Energy - 80%)

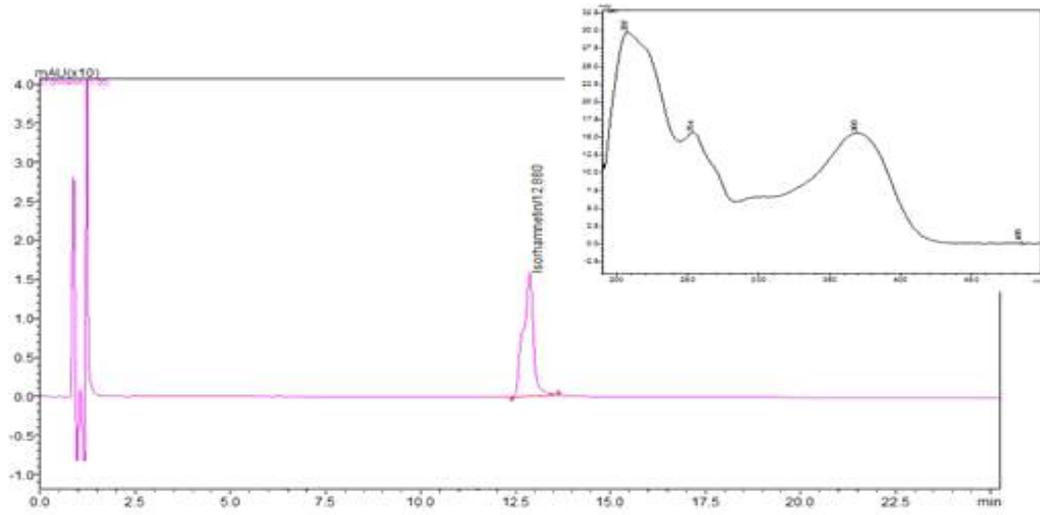


그림 14. Isorhamnetin HPLC Chromatogram 및 UV spectrum

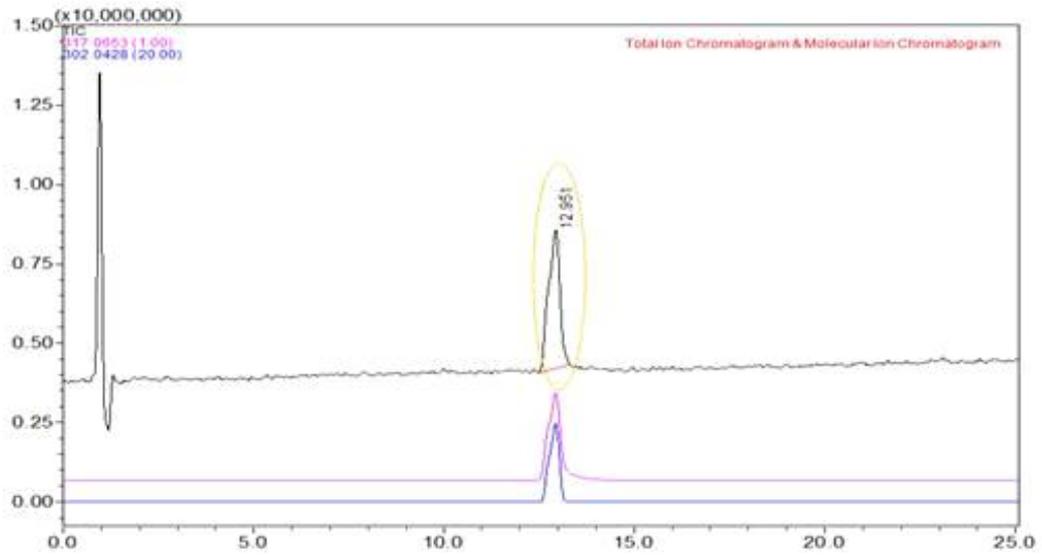


그림 15. Isorhamnetin Total ion chromatogram and Molecular Ion chromatogram

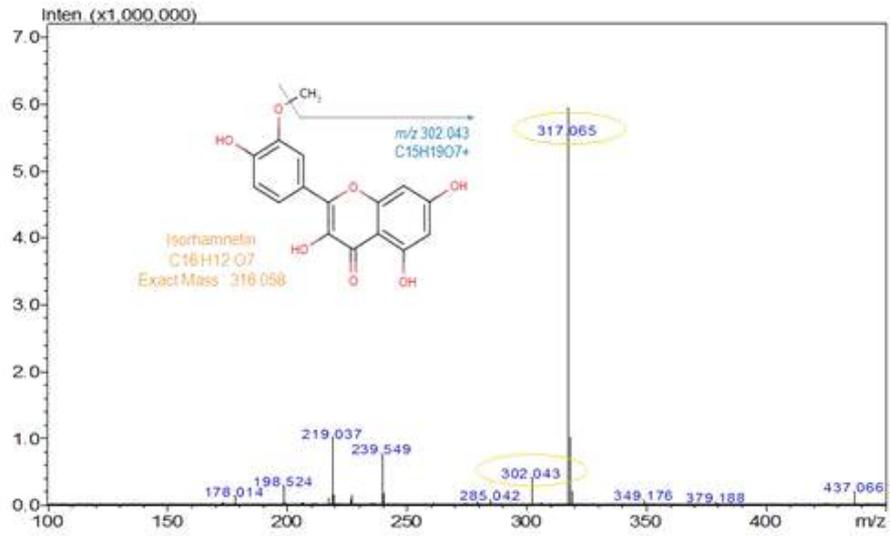


그림 16. Isorhamnetin MS spectrum

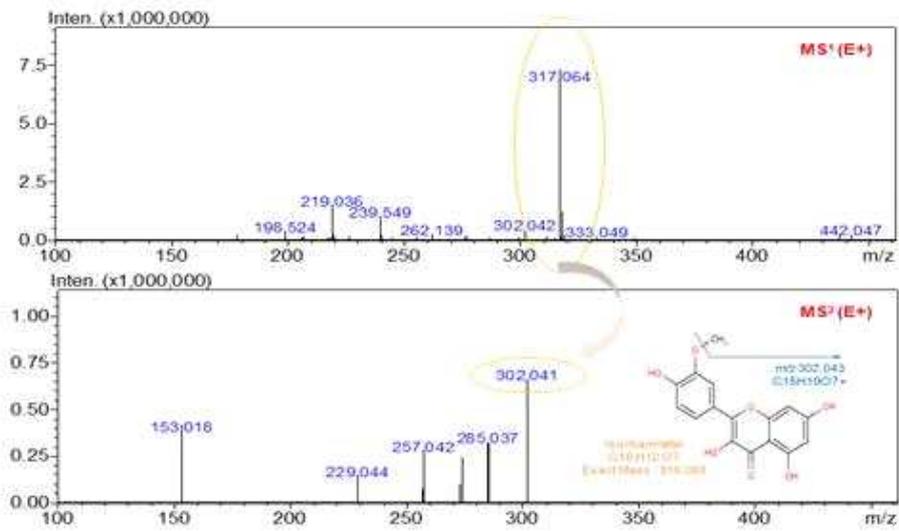


그림 17. Isorhamnetin MS<sup>2</sup> spectrum

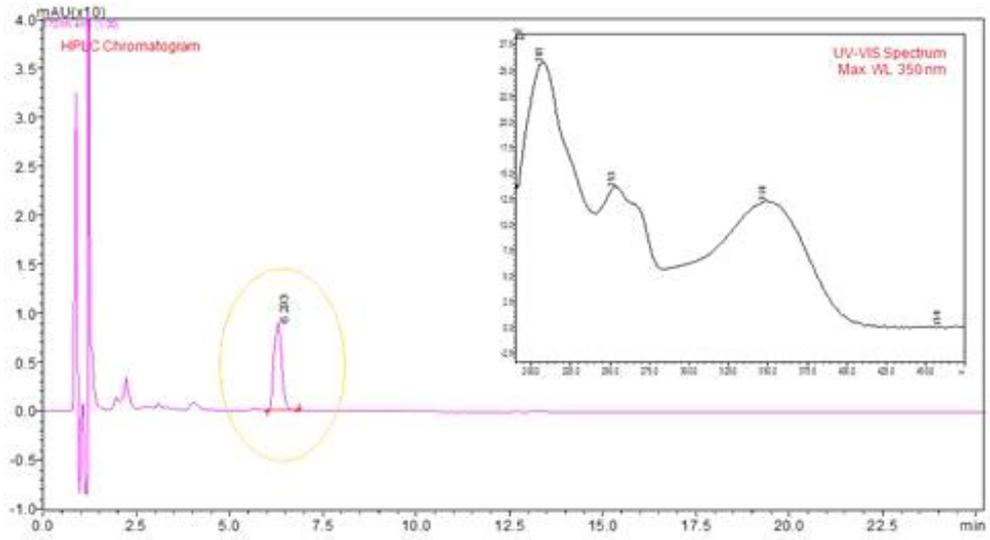


그림 18. 미나리 70% EtOH ext. HPLC Chromatogram 및 UV spectrum

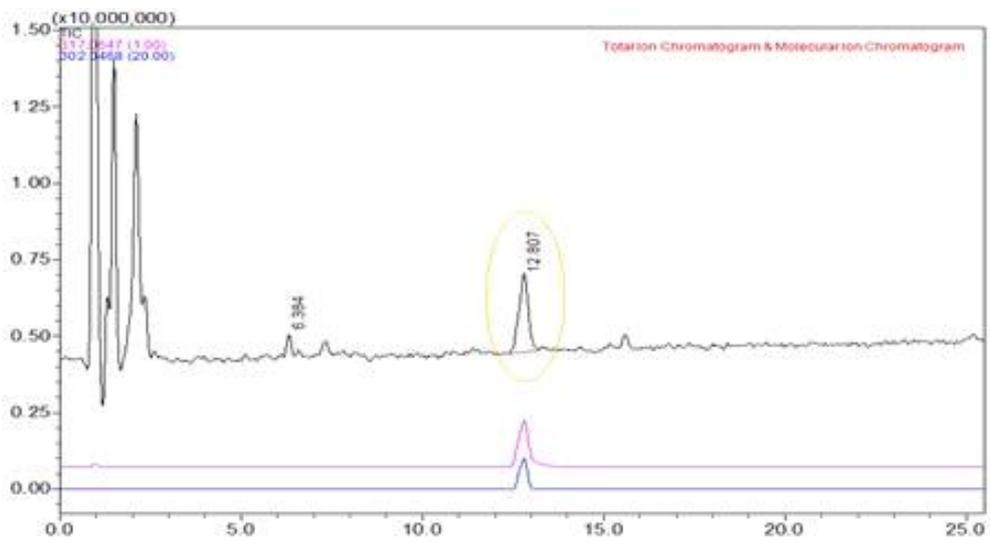


그림 19. 미나리 70% EtOH ext. Total ion chromatogram and Molecular ion chromatogram

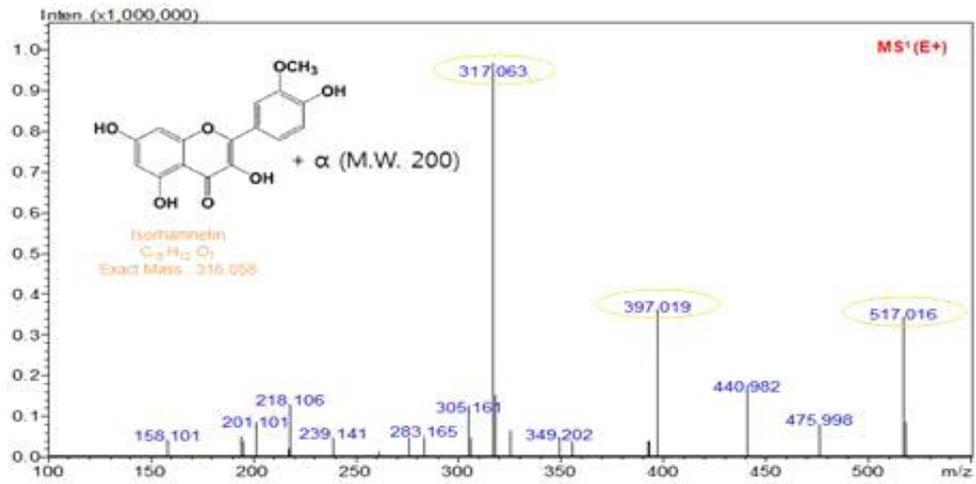


그림 20. 미나리 70% EtOH ext. MS spectrum

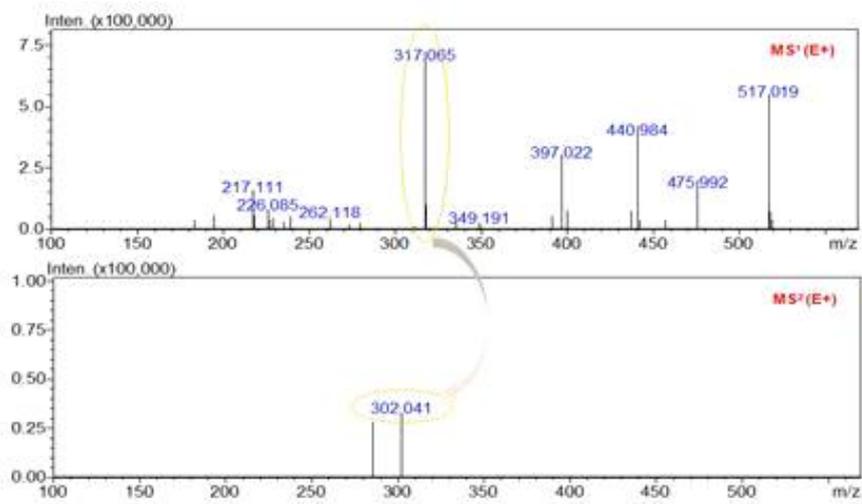


그림 21. 미나리 70% EtOH ext. MS<sup>2</sup> spectrum

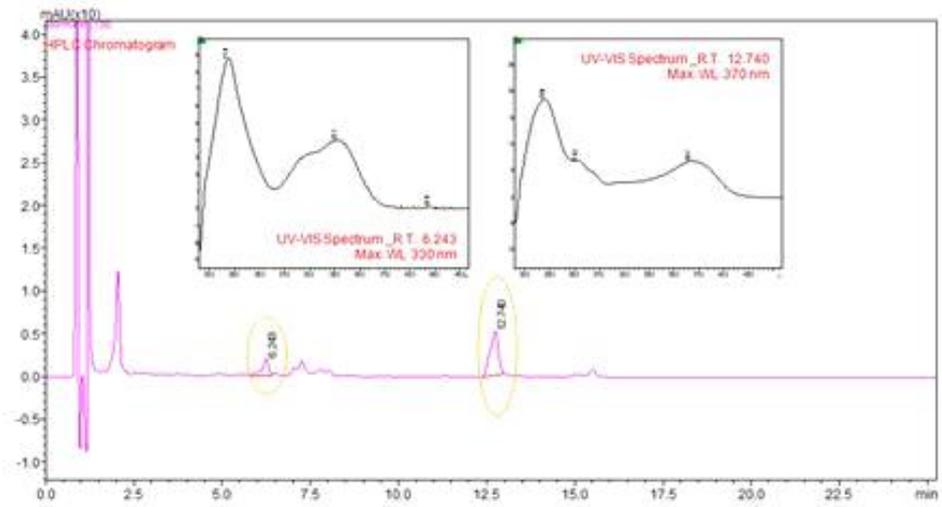


그림 22. 미나리 70% EtOH ext. 산가수분해 후 HPLC Chromatogram 및 spectrum

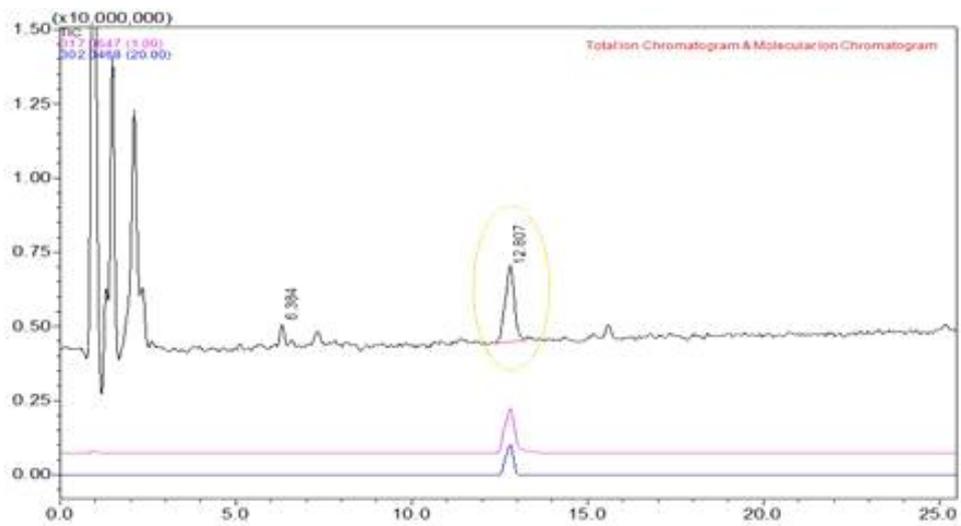


그림 23. 미나리 70% EtOH ext. 산가수분해 Total ion chromatogram and Molecular ion chromatogram

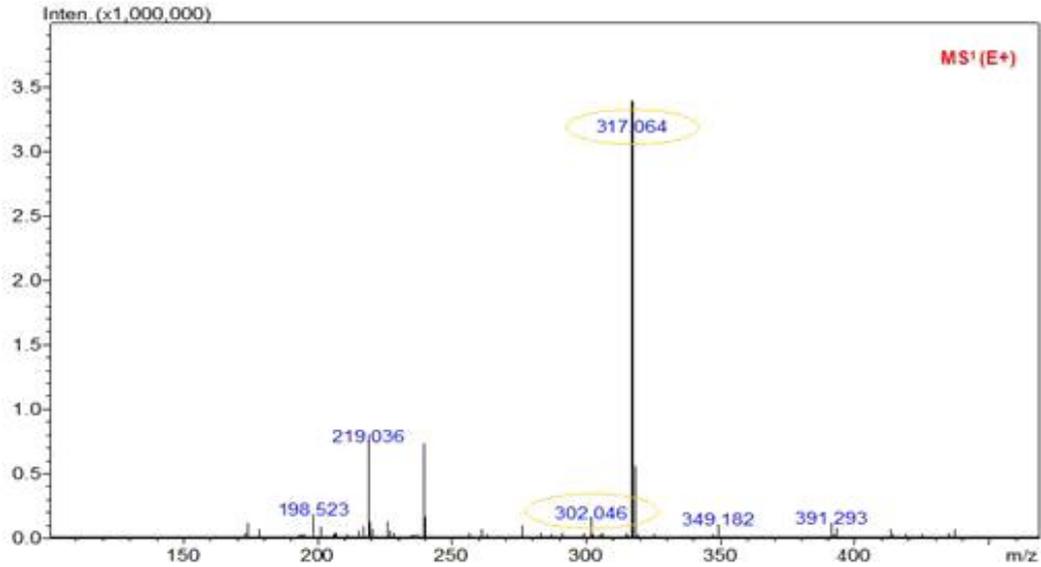


그림 24. 미나리 70% EtOH ext. 가수분해 후 MS spectrum

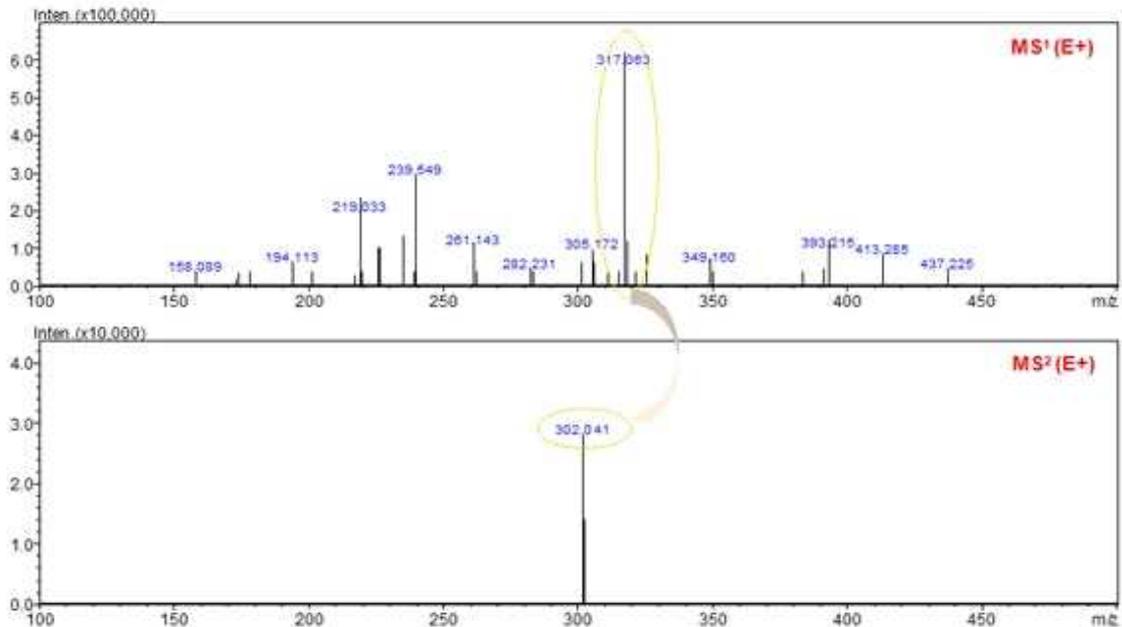


그림 25. 미나리 70% EtOH ext. 가수분해 후 MS<sup>2</sup> spectrum

## (2) 결과

미나리 산가수분해물의 LC-MS/MS 분석을 실시하여 quercetin과 isorhamnetin이 미나리 추출물에 함유되어 있는지를 확인해 본 결과, MS data에서 quercetin 표준품의 분자량과 일치하는 molecular ion은 확인되지 않아서 미나리 추출물에는 quercetin 배당체 화합물은 검출되지 않는 것으로 판단되어진다. 하지만, Isorhamnetin은 HPLC Chromatogram에서  $t_R$  12.95 min에 Isorhamnetin peak가 검출되었으며, MS에서  $m/z$  317 [ $C_{16}H_{12}O_7$ , (M<sup>+</sup>)] molecular ion과  $m/z$  302 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> fragment ion이 관찰되었다.  $m/z$  317 molecular ion을 MS<sup>2</sup> 분석 시 Isorhamnetin 구조에서 M-CH<sub>3</sub>인  $m/z$  302 fragment ion이 확인되었다. 미나리 70% EtOH ext. HPLC Chromatogram에서  $t_R$  6.384 min에 peak가 검출되었으며 UV spectrum이

Isorhamnetin과 유사한 패턴이 보였다. MS에서 분석결과  $m/z$  517 [M<sup>+</sup>] molecular ion과  $m/z$  397 [M-A]<sup>+</sup>,  $m/z$  317 [M-B]<sup>+</sup> fragment ion이 관찰되었다. Isorhamnetin molecular ion과 동일한  $m/z$  317 fragment ion이 분석되었다. 이 화합물은 Isorhamnetin에 molecular weight 200의 물질이 결합된 화합물일 것으로 추측되어진다. 그러나 미나리 70% EtOH ext. 산가수분해 후 HPLC Chromatogram에서  $t_R$  6.384 min,  $t_R$  12.7 min peak가 검출되었으며, MS분석 결과,  $t_R$  12.7 min peak는  $m/z$  317 molecular ion [C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, (M<sup>+</sup>)]과  $m/z$  302 fragment ion [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>이 관찰되었고,  $m/z$  317 molecular ion을 MS<sup>2</sup> 분석 시 Isorhamnetin와 동일하게 M-CH<sub>3</sub>인  $m/z$  302 fragment ion이 검출되어  $t_R$  12.7 min peak는 Isorhamnetin임이 확인되어 미나리의 지표성분은 isorhamnetin으로 결정하였다.

## 2. Isorhamnetin에 대한 Method validation 실시

미나리 추출분말 중 Isorhamnetin 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 검출시간 : 약 14~15분</li> <li>o spectrum : <math>\lambda_{max}</math> 약 370 nm 표준용액과 시험용액 일치</li> <li>o peak purity : 시험용액 중 Isorhamnetin peak가 5 points 일치, 단일물질로 확인됨</li> </ul>
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 4개 농도에서 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 목적농도의 23.8~296.9%에서 확인 1.9~23.75 mg/L</li> <li>o <math>R^2</math> : 0.999</li> </ul>
	시료에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 목적농도의 22~229%에서 확인</li> <li>o <math>R^2</math> : 0.999</li> </ul>
정밀성 (Precision)	2명의 시험자가 동일한 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 실험실내 정밀성 함량 - 1.784~1.826 mg/g RSD(%) - 1.64%</li> <li>o 반복정밀성 함량 - 1.764~1.870 mg/g RSD(%) - 0.076~1.408%</li> </ul>
정확성 (Accuracy)	시료 중 3개 농도로 표준 물질 첨가하여 회수율 검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 검출된 표준물질농도 - 5.455~10.936 ug/ml 회수율 - 101.39~102.86%</li> <li>RSD(%) - 0.207~0.503%</li> </ul>
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	<ul style="list-style-type: none"> <li>o 시험용액 5.57~8.95 ug/mL</li> </ul>

표 7. 미나리 추출분말 중 Isorhamnetin 분석법의 유효성 검증(요약)

## 가. 분석방법

### 고속액체크로마토그래피법

#### (1) 장비

HPLC system     Agilent 1200 series, Agilent, USA  
                      Quat Pump G1311A, Autosampler G1329,  
                      Column Oven G1316A, Degasser G1322A

#### (2) 시약

(가) Isorhamnetin: Sigma, 17794, 95%

(나) 일반시약

- ① Acetonitrile: B&J, 4L, AH015-4
- ② Methanol: B&J, 4L, AH230-4
- ③ Trifluoroacetic acid (TFA): Samchun, 100 mL
- ④ Sulfuric acid: Daejung, 1 L
- ⑤ 3차 증류수

#### (3) 표준용액의 조제

표준물질 Isorhamnetin 5 mg을 정밀히 달아 MeOH 50 mL (100 ug/mL)에 녹인 후 1 mL씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용한다.

이를 50% MeOH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 희석하여 working solution으로 사용한다.

#### (4) 시험용액의 조제

미나리추출물 분말을 0.1 g을 정밀히 취하여 50% MeOH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL을 첨가하여 90°C에서 30분 동안 산가수분해를 실시하였다. 가수분해가 종료된 용액을 25 mL 정용플라스크에 담고 50% Methanol로 정용한 후 0.45 um PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

#### (5) 분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detector: UV detector (370 nm)
- Column: X bridgr C<sub>18</sub> (4.6× 150 mm, 5 um), waters
- Column Oven: 30 °C
- Injection vol.: 20 µL
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, H<sub>2</sub>O in 0.1% TFA; B, MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
25	55	45

(6) 계산

$$\text{Isorhamnetin (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도 (ug/mL)}}{\text{시료 (g)}} \times \frac{\text{정용한 volume (mL)}}{\text{시료 (g)}} \times \frac{1}{1000}$$

나. 시험법 검증 (Method Validation) 결과

(1) 특이성(Specificity)

(가) 미나리 추출물 중 Isorhamnetin의 retention time과 peak 분리도 확인

Isorhamnetin 표준물질과 미나리 추출물을 산가수분해 전, 후로 전처리하여 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 표준용액과 산가수분해를 진행한 시험용액에서 약 14분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다.

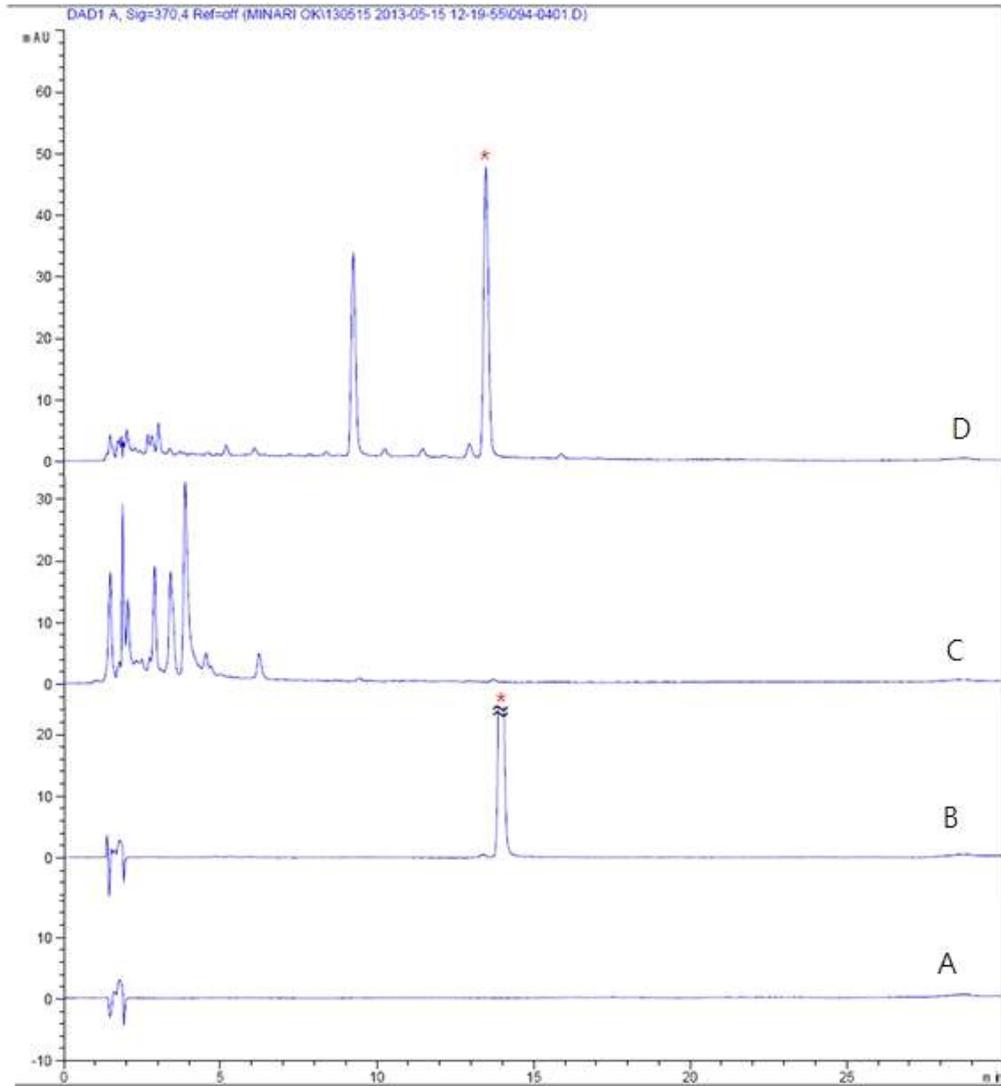


그림 26. 표준용액과 산가수분해 전, 후 시험용액 중의 Isorhamnetin의 Chromatogram (A. Blank, B. Isorhamnetin 표준용액, C. 미나리추출물 산가수분해 전 시험용액, D. 미나리 추출물 산가수분해 후 시험용액)

(나) 미나리 추출물 중 Isorhamnetin의 spectrum과 peak purity 확인

시험용액 중 검출된 Chromatogram이 표준용액인 Isorhamnetin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 14 분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 370 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인 했다. 또한 시험용액의 Isorhamnetin peak의 purity를 확인하기 위하여 peak의 5 point spectrum이 모두 일치하여 Isorhamnetin 단일물질임을 확인하였다.

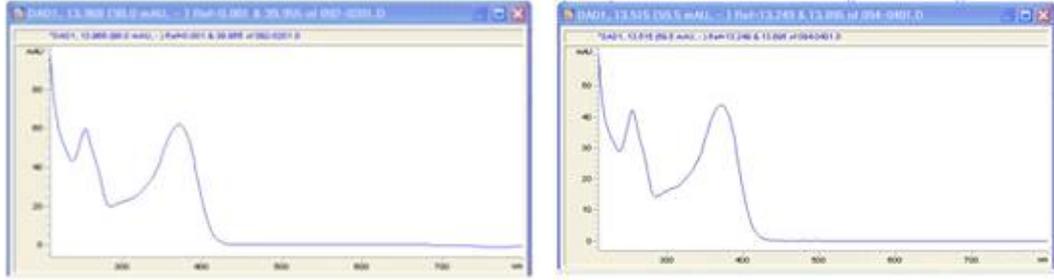


그림 27. Isorhamnetin과 미나리 추출물 시험용액 UV spectrum

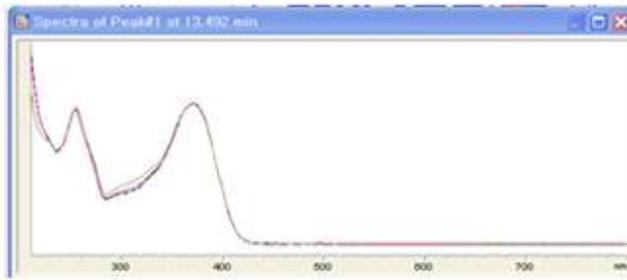


그림 28. peak purity test; 시험용액 중 Isorhamnetin peak 각 5점 spectrum분석

(다) 미나리 추출물 중 HPLC/MS/MS를 이용한 Isorhamnetin 확인

미나리 추출물 중 Isorhamnetin을 확인하기 위하여 LC/MS/MS에 적절한 분석조건을 설정하고, 표준용액과 시험용액 중의 Isorhamnetin을 확인하였다.

① 실험방법

㉠ 시약 및 시액

- Isorhamnetin 표준품: Sigma, 17794, 95%
- Acetonitrile: B&J, 4L, AH015-4
- Formic acid: Junsei, 1 kg
- 3차 증류수

㉡ 표준용액의 제조

Isorhamnetin 표준품 5 mg을 정밀하게 달아 이를 MeOH 50 mL에 녹인 후 이를 stock solution으로 하여 사용 농도에 맞게 50% MeOH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 희석하여 표준액으로 한다.

㉢ 시험용액의 제조

미나리추출물 분말을 0.1 g을 정밀히 취하여 50% MeOH in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL를 첨가 후 혼합하여 90℃에서 30분간 산 가수분해를 실시하였다. 가수분해가 완료된 추출물에 50% Methanol로 하여 25 mL로 정용한 후 0.45 um PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

㉠ 분석방법

Manual tuning mode에서 분석대상물질의  $m/z$   $[M-H]^+$  에 해당하는 peak를 확인한 후, 분석을 최적화(quantitative optimization) 과정을 수행하여 모분자(precursor ion/parent ion) 및 딸분자(product ion/daughter ion)를 확인하였다.

㉡ LC/MS/MS 조건

- Instrument:
- Detector: UV detector (370 nm)
- Column: Shim-pack XR-ODS(2.2  $\mu$ m), 2.0 $\times$ 100 mm, SHIMADZU
- Column Oven: 50  $^{\circ}$ C
- Injection vol.: 5  $\mu$ L
- Flow rate: 0.25 mL/min
- Mobile phase: A, H<sub>2</sub>O in 0.1% FA; B, MeCN in 0.1% FA

min	A (%)	B (%)
0.00	80	20
30.00	60	40
30.01	10	90
35.00	10	90

㉢ Mass 조건

- LCMS: LCMS-IT-TOF (hybrid MS)
- Ionization type: ESI/probe voltage (4.5 kV)
- MS range: 150~1,500  $m/z$
- N<sub>2</sub> gas flow: 1.5 L/min
- CDL temp.: 200 $^{\circ}$ C

② 실험결과

미나리 추출물 중 Isorhamnetin을 확인하기 위하여 LC/MS/MS을 이용하여 분석하였다. 분석결과, 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대의 Total ion Chromatogram (TIC)을 확인할 수 있었고, 질량 스펙트럼을 확인해 본 결과 precursor ion은 317  $[M-H]^+$   $m/z$ 이고, product ion 302, 153  $[M-H]^+$   $m/z$ 로 확인 할 수 있었다.

Compound	RT (min)	MW	Precursor ion (MS, m/z)	Product ion (MS <sup>2</sup> ,MS <sup>3</sup> m/z)
Isorhamnetin	13.0~13.5	316.26	317 [M-H] <sup>+</sup>	153, 302

표 8. Isorhamnetin 분석을 위한 Retention time, Precursor ion 및 Product ion

위의 제시된 분석조건으로 HPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과 표준용액과 시험용액에서 TIC에서 동일한 시간대에 peak를 확인하였고, precursor ion (317 [M-H]<sup>+</sup> m/z) 및 product ion (153, 302 [M-H]<sup>+</sup> m/z)이 유사한 값을 가지므로 표준용액과 미나리 추출물 중의 Isorhamnetin이 동일 성분임을 확일 할 수 있었으며, 미나리 추출물 중 Isorhamnetin이 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다.

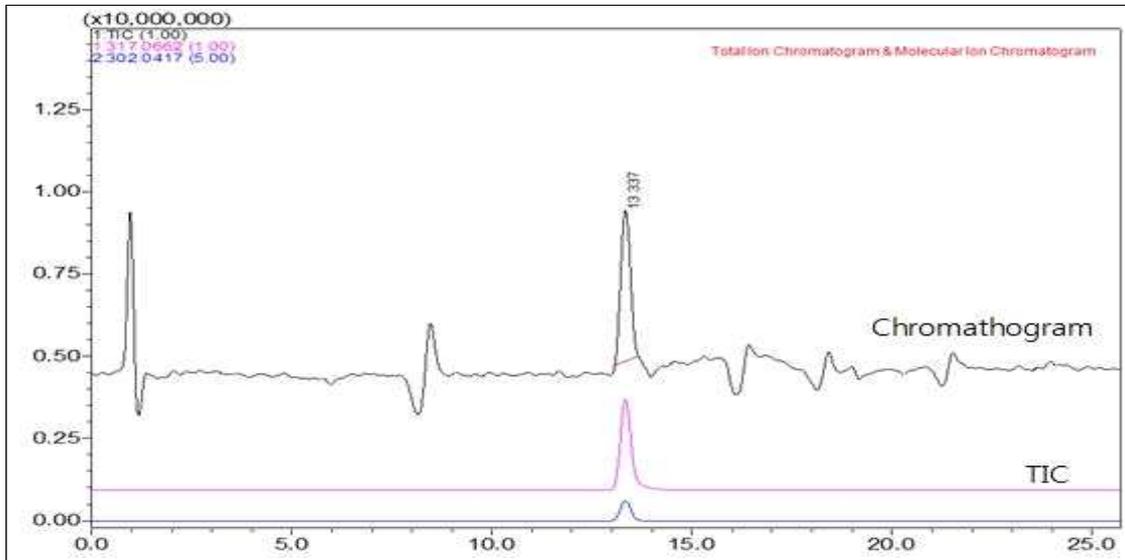


그림 29. Isorhamnetin 표준용액 chromatogram 및 TIC

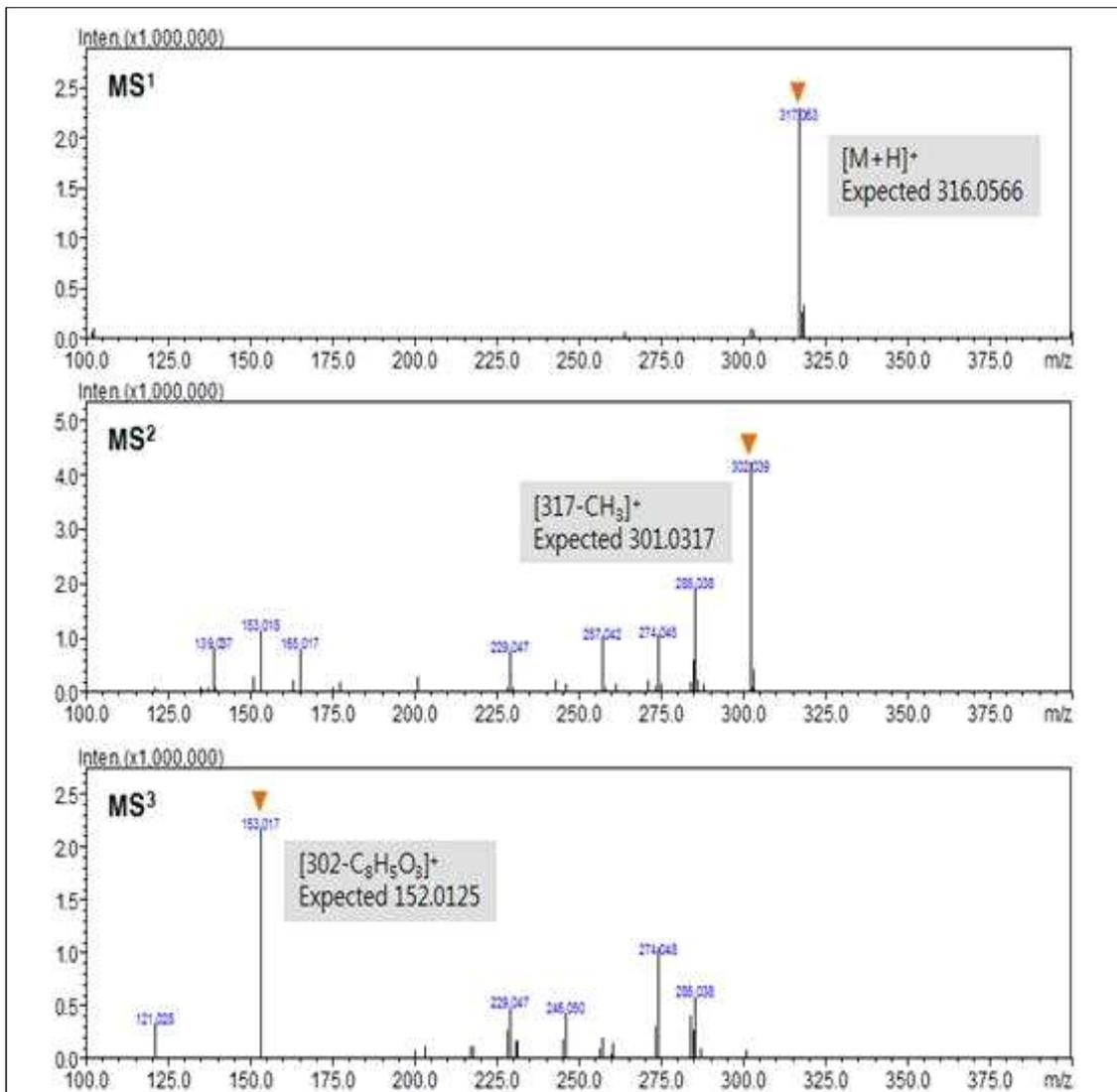


그림 30. Isorhamnetin 표준용액 질량 스펙트럼

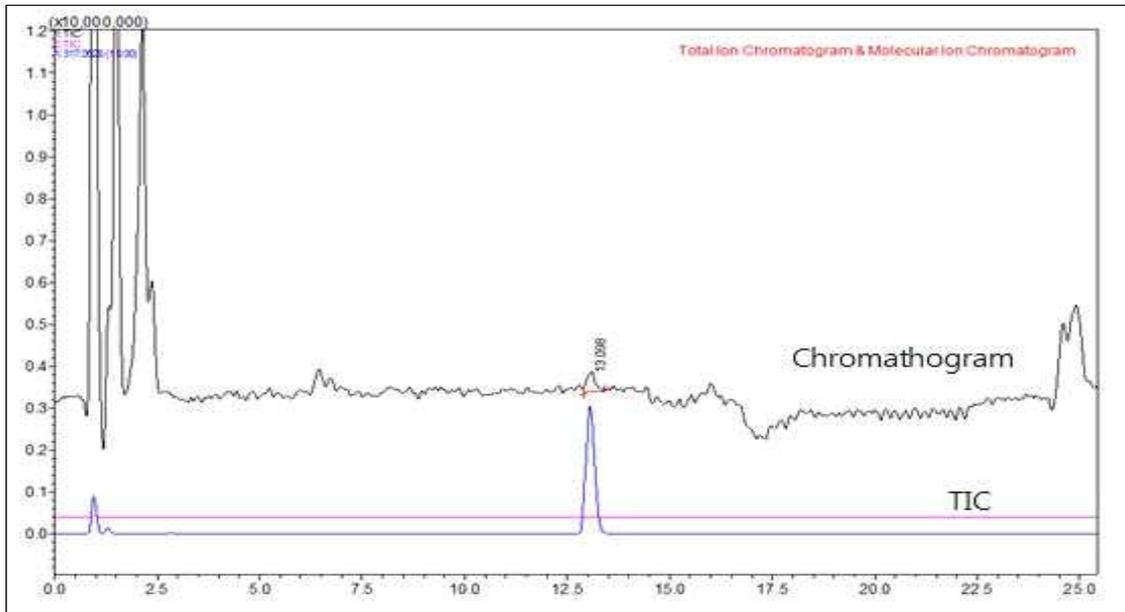


그림 31. 미나리 추출물 chromatogram 및 TIC

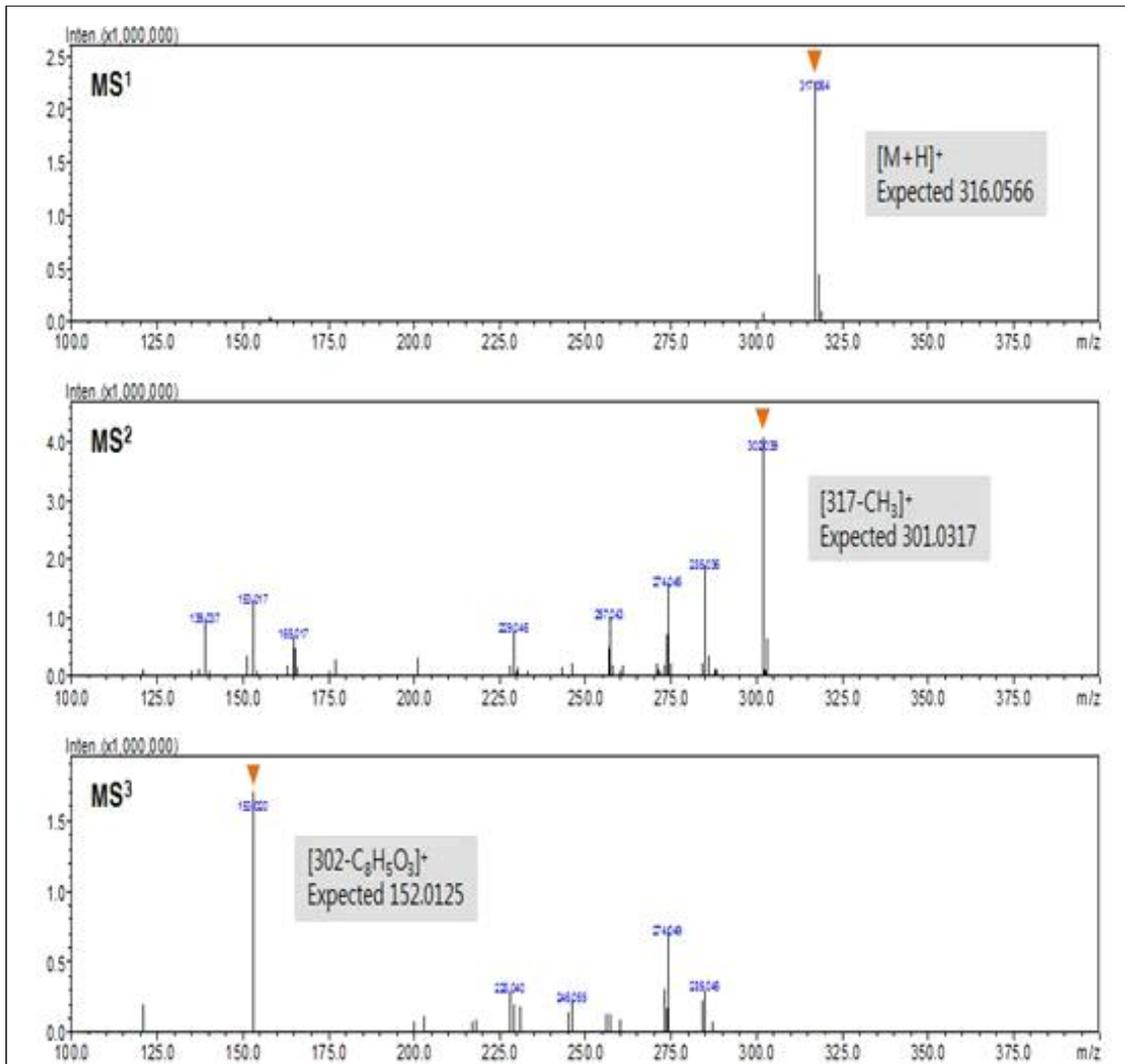


그림 32. 미나리 추출물 질량 스펙트럼

(2) 직선성 (Linearity)

(가) 시료에 대한 직선성

미나리 추출물을 중량별로 측정하여 전처리한 결과로 직선성을 평가하였다. 미나리 추출물 100 mg을 취해 50% MeOH in 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL를 가하여 산가수분해 한 후 50% MeOH로 하여 25 mL 정용한 시험용액의 검출 농도 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 22~229% 범위에서 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인 할 수 있었다.

기울기 값은 5.376~5.580, R<sup>2</sup>는 0.9990~0.9999 으로 나타났다.

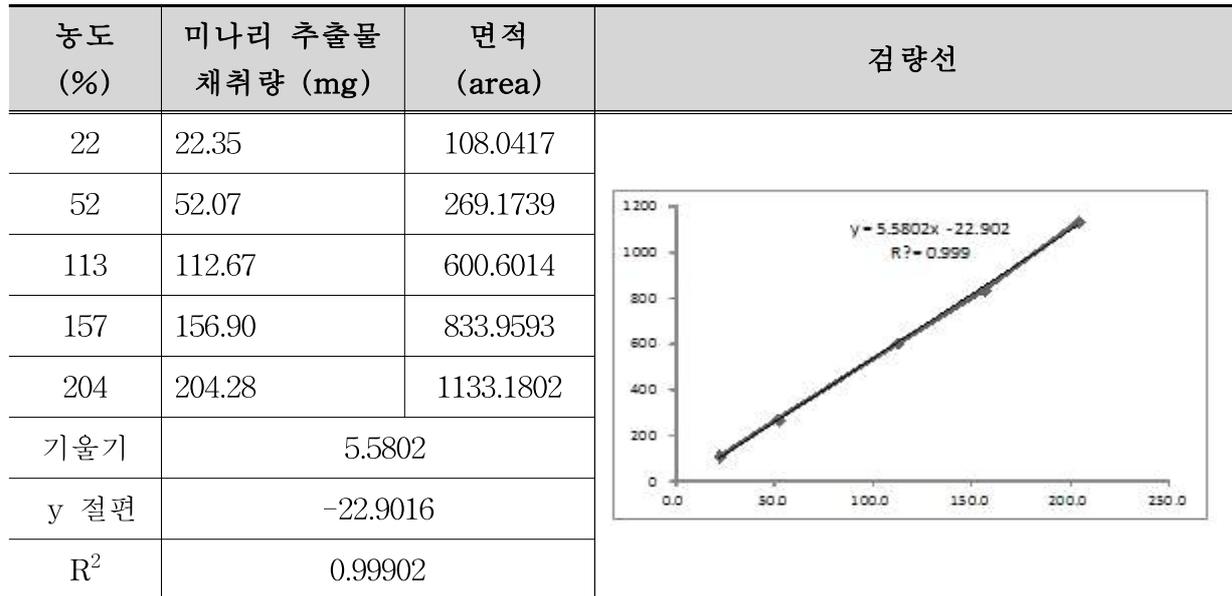


표 9. 미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

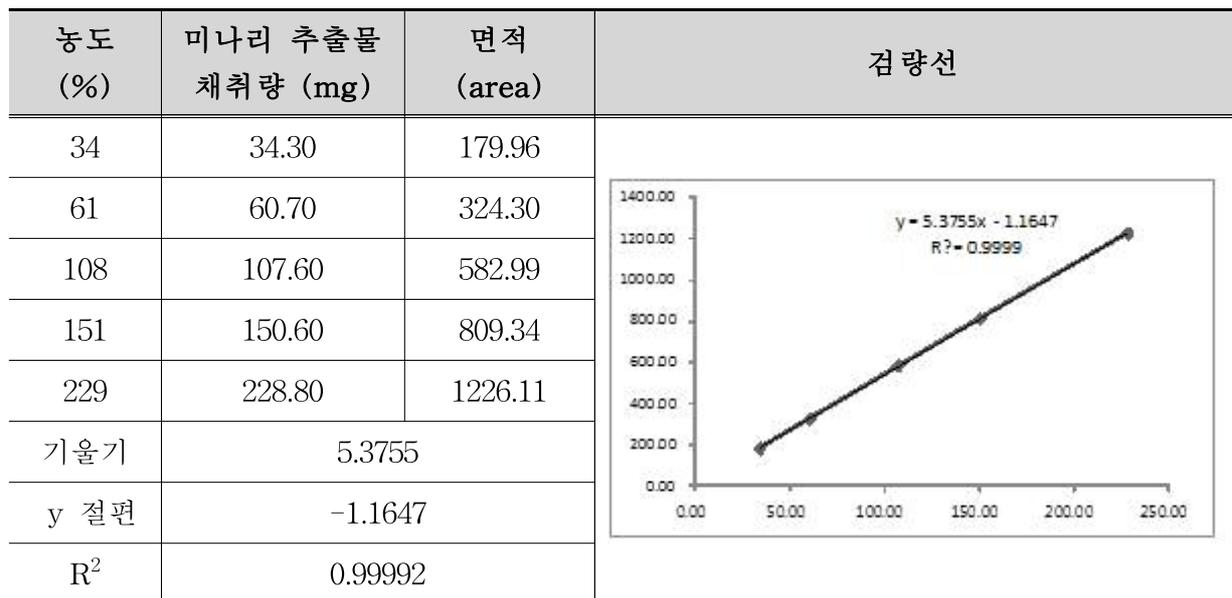


표 10. 미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

농도 (%)	미나리 추출물 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
23	23.20	119.90	
55	54.70	289.88	
106	106.20	577.11	
151	150.90	830.25	
200	199.90	1102.77	
기울기	5.5761		
y 절편	-12.5475		
R <sup>2</sup>	0.99996		

표 11. 미나리 추출물을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

(나) 표준물질에 대한 직선성

표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. Isorhamnetin의 검출농도 약 8 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 23.8~296.9% 범위에서 3회 반복 평가하였다. 분석결과 농도별로 직선성을 확인되었으며, 기울기 값은 72.776~77.787, R<sup>2</sup>는 0.9999로 나타났다.

농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
23.8	1.90	137.5625	
59.4	4.75	352.2016	
118.8	9.50	723.0752	
296.9	23.75	1835.0089	
기울기	77.820		
y 절편	-14.290		
R <sup>2</sup>	0.99998		

표 12. Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

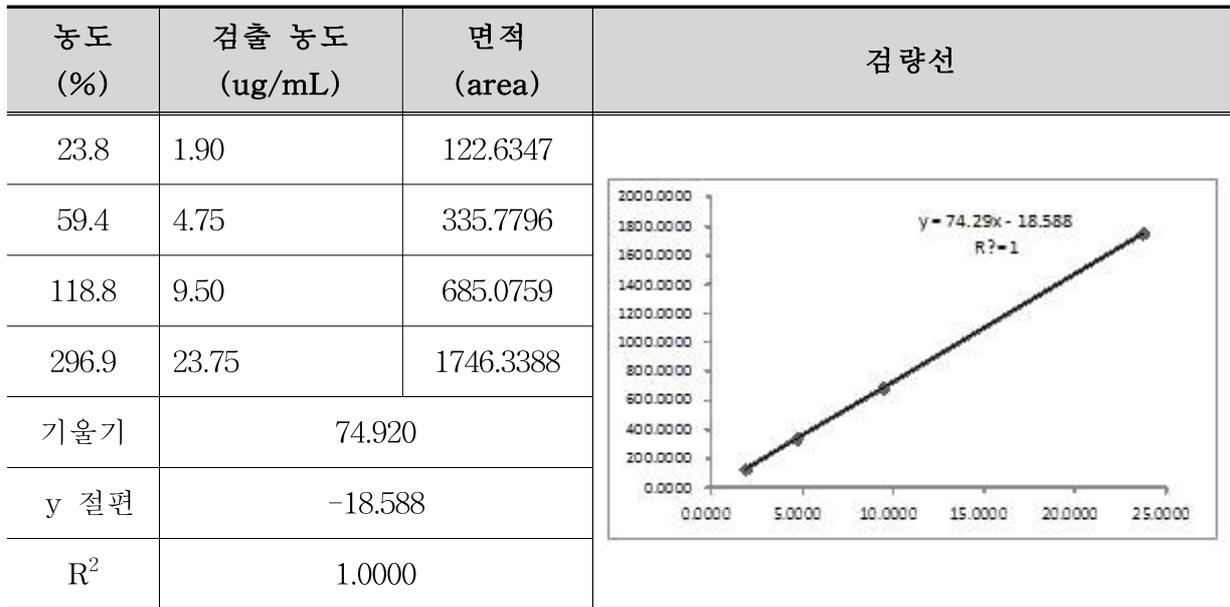


표 13. Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

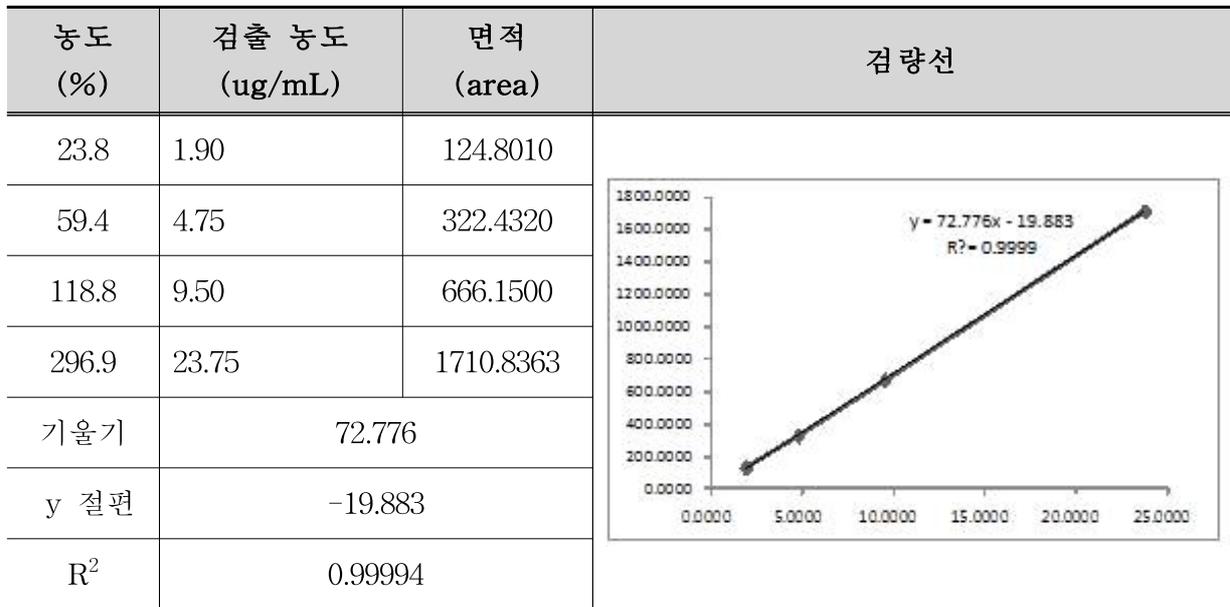


표 14. Isorhamnetin 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

### (3) 정밀성(Precision)

#### (가) 실험실내 정밀성 (Intermediate precision)

미나리 추출물 중 Isorhamnetin 함량 분석 정밀성 시험을 위해 분석자와 분석 일자를 달리하여 분석을 진행하였다, 결과는 시료를 2회 반복 전 처리한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 2일간 두명의 시험자가 분석하였다. 분석결과 Isorhamnetin 함량은 평균 1.805 mg/g, 표준편차 (SD) 0.0296 mg/g, 상대표준편차(RSD)는 1.64%로 나타났다.

	일자	분석자	Isorhamnetin 함량(mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	2013.05.07	A	1.784	1.805	0.0296	1.64
2	2013.05.08	B	1.826			

표 15. 분석일자, 분석자간의 Isorhamnetin 함량

(나) 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

미나리 추출물 중 Isorhamnetin 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한번 진행시 각각 6번의 전처리하여 분석을 진행하였다. 일자를 달리하여 측정된 결과 1.764~1.870 mg/g범위로 검출되었으며, 각 일자에서의 함량은 평균 1.784~1.826 mg/g, 표준편차(SD) 0.0137~0.0251 mg/g, 상대표준편차(RSD) 0.767~1.408%로 분석되었다.

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Isorhamnetin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	0.1032	553.78442	7.2833	1.7644	1.784	0.0137	0.076
2	0.1051	575.12115	7.5576	1.7977			
3	0.1063	574.93854	7.5552	1.7769			
4	0.1060	578.22675	7.5975	1.7919			
5	0.1022	558.90283	7.3491	1.7977			
6	0.1019	550.33301	7.2389	1.7760			

표 16. 분석일 05월 07일, 분석자 A

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Isorhamnetin 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	0.1165	605.56683	8.4016	1.8029	1.826	0.0257	1.408
2	0.1128	608.17334	8.4367	1.8698			
3	0.1157	601.88361	8.3520	1.8047			
4	0.1168	616.79016	8.5526	1.8306			
5	0.1188	620.92175	8.6083	1.8115			
6	0.1245	661.82507	9.1588	1.8391			

표 17. 분석일 05월 08일, 분석자 B

(4) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

미나리 추출물 중 Isorhamnetin의 정확성을 측정하기 위해 미나리 추출물(1.805 mg/g, 정밀성 결과)에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인하였다. 검출농도를 고려하여 미나리 추출물 약 60 mg을 취한 후 표준용액을 0.03~0.10 mg 넣은 후 동일한 전처리방법으로 분석하였다. 농도별로 3회 반복하여 진행한 결과 회수율 101.39~102.86%, 표준편차(SD) 0.212~0.513%, 상대표준편차(RSD)는 0.207~0.503%로 나타났다. 전체적으로 95% 이상의 회수율을 보임으로 정확성을 확인하였다.

이름	Isorhamnetin의 양 (25 mL 당)		분석농도 (0.181 mg/25mL) 기준 비율
	검체유래 <sup>1)</sup>	Spike Isorhamnetin <sup>2)</sup>	
정확성 1	0.108 mg	0.03 mg	76.62%
정확성 2	0.108 mg	0.07 mg	98.78%
정확성 3	0.108 mg	0.10 mg	115.40%

표 18. 정확성 진행방법

- 1) 검체 유래의 Isorhamnetin의 양  
: 미나리 추출물 정량결과(1.805 mg/g, 정밀성 결과) × 미나리 추출물 무게(g)
- 2) Spike Isorhamnetin 표준용액 유래의 Isorhamnetin 량  
: 표준용액의 농도(0.1 mg/mL) × 참가한 Isorhamnetin 표준용액의 부피(mL)

이름	시료수	검체 무게 (mg)	Isorhamnetin의 양 (mg/25 mL)		시험용액의 Isorhamnetin 분석농도(ug/mL)		회수율 (%)
			검체유래	표준품 유래	기대치	실험치	
정확성 1	1	60.50	0.1092	0.03	5.57	5.71	102.60
	2	61.00	0.1101	0.03	5.60	5.74	102.43
	3	67.80	0.1224	0.03	6.10	6.20	101.71
정확성 2	1	64.50	0.1164	0.07	7.46	7.56	101.39
	2	60.40	0.1090	0.07	7.16	7.33	102.30
	3	65.70	0.1186	0.07	7.54	7.71	102.27
정확성 3	1	68.60	0.1238	0.10	8.95	9.21	102.86
	2	67.10	0.1211	0.10	8.84	9.06	102.46
	3	65.60	0.1184	0.10	8.74	8.98	102.80

표 19. 미나리추출물 정확성 및 회수율

(5) 범위(range)

미나리 추출물 중 Isorhamnetin 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직선성과 정밀도, 정확성을 고려하여, 5.57~8.95 ug/mL의 범위로 설정하였다. 이 농도는 미나리추출물 0.1 g을 이용하여 분석하는 경우, 미나리 추출물의 Isorhamnetin의 농도가 1.38~2.08 mg/g인 검체에 대해서 정확하고 정밀한 Isorhamnetin 정량이 가능함을 확인하였다.

## 제 2 절 미나리 추출 원료의 기억력 개선 효능 입증

### 1. 효소 활성 억제력을 통한 기억력 소재 원료 입증

기억력 손상은 콜린성신경계의 손상으로 설명되어진다. 이러한 콜린성신경계의 손상은 정신 활동에 관여하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 양이 뇌에서 줄어드는 결과를 초래한다. 아세틸콜린이 줄어드는 몇 가지 방법으로 아세틸콜린을 합성하는 아세틸콜린합성효소 (choline acetyltransferase, ChAT)의 발현이 줄어들어 아세틸콜린의 양이 줄어들 수 있으며 아세틸콜린을 분해하는 아세틸콜린분해효소 (acetylcholinesterase, AChE)의 활성이 높아지면서 아세틸콜린의 양이 줄어드는 것이다 (13-15). 실제로 기억력이 손상된 알츠하이머 환자 (AD)의 뇌에서 ChAT의 발현이 줄고 AChE의 활성이 증가해 있음이 보고되었다. 따라서 기억력이 손상된 AD 환자를 치료할 목적으로 FDA에서 인정받은 치매치료제들은 대부분 AChE억제제들이 많다 (16-18). 따라서, 본 과제에서 기억력을 증진시킬 수 있는 1차적인 물질의 개발을 위해 AChE 활성을 억제할 수 있는지 검증하였다.

#### 가. 지역 특산물의 효소 활성 억제력 비교

##### (1) 실험 방법

##### ① 추출물 및 추출방법

유자, 대추, 백년초, 석류, 무화과, 신선초, 미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다.

##### ② 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 SD 랫트 (8-10 주령)의 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 추출물은 처음에 5% DMSO에서 용해되었고 그 용액은 사용 바로 전에 buffer 1 (100mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200g/ml의 농도로 희석되었다. 1.5ml의 희석된 추출물 용액과 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의 bufferd Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100µl 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수

계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

(2) 결과

유자(*Citrus junos*), 대추(*Ziziphus jujube*), 백년초(*Opuntia ficus-indica*), 석류(*Punica grantum*), 무화과(*Ficus carica*), 신선초(*Angelica keiskei*), 미나리(*Oenanthe javanica*)의 효소활성 억제력을 비교했다. 각각의 식물은 열수추출방법과 알콜추출방법을 통해 추출물을 얻었다. 신선초와 미나리는 각각 열수추출물에 비해 알콜추출물이 효소 활성 억제력이 통계적으로 유의하게 높았다. 또한, 미나리 알콜추출물은 다른 추출물들에 비해 효소활성 억제력이 월등하게 높았다.

Types of herbs	Water-extract (Average ± SEM)	Alcohol-extract (Average ± SEM)	P value
<i>Citrus junos</i>	3.00 ± 0.54	6.14 ± 1.64	NS
<i>Ziziphus jujube</i>	2.43 ± 0.88	3.31 ± 0.44	NS
<i>Opuntia ficus-indica</i> *	1.61 ± 0.58	7.14 ± 1.85	P < 0.05
<i>Punica grantum</i>	4.26 ± 2.37	6.24 ± 1.12	NS
<i>Ficus carica</i>	-2.73 ± 0.63	-0.05 ± 0.67	NS
<i>Angelica keiskei</i>	-1.28 ± 0.95	1.26 ± 0.78	NS
<i>Oenanthe javanica</i> **	2.79 ± 0.59	18.76 ± 2.25	P < 0.01

표 20. 지역 특산물의 효소 활성 억제력

나. 지역별 미나리의 효소 활성 억제력 비교

(1) 실험방법

① 추출물 및 추출방법

전주미나리, 나주미나리, 시흥미나리, 부여미나리, 청도미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공 상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다.

② 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 SD 랫트 (8-10 주령)의 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 미나리는 처음에 5% DMSO에서 용해되었고 그 용액은 사용 바로 전에 buffer 1 (100mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200g/ml의 농도로 희석되었다. 1.5ml의 희석된 미나리 용액과 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의 buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium

bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100 $\mu$ l 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

## (2) 결과

지역별 미나리의 효소 활성 억제력을 측정한 결과이다. 전주미나리 (JJ-OJE)와 나주미나리 (NJ-OJE)는 각각 34%, 37%로 나타났으며, 다른 지역의 미나리에 비하여 높은 수치를 나타내었다. 두 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 시흥미나리 (SH-OJE), 부여미나리 (BY-OJE), 청도미나리 (CD-OJE) 보다 전주미나리 (JJ-OJE)는 효소활성 억제력이 높게 나타났다. 나주미나리 (NJ-OJE) 도 3곳의 미나리보다 효소활성 억제력이 높게 나타났다. 따라서 기억력 개선에 효과적인 미나리임을 알 수 있다. 미나리는 재배지역에 따라 효소활성 억제력이 달라짐을 알 수 있었다.

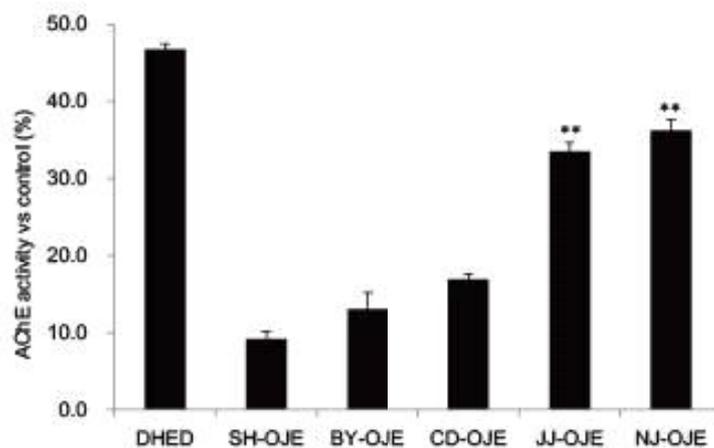


그림 33. 지역별 미나리의 효소 활성 억제력 비교

## 다. 시기별 미나리의 효소 활성 억제력 비교

### (1) 실험 방법

#### ① 추출물 및 추출방법

4월미나리, 7월미나리, 10월미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다.



그림 34. 나주 노안미나리 채취지 선정



그림 35. 채취된 미나리들

## ② 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 SD 랫트 (8-10 주령)의 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 미나리는 처음에 5% DMSO에서 용해되었고 그 용액은 사용 바로 전에 buffer 1 (100mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200g/ml의 농도로 희석되었다. 1.5ml의 희석된 미나리 용액과 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의

buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100 $\mu$ l 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수 계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

(2) 결과

아세틸콜린에스테라아제를 이용해 시기별 미나리의 효소 활성억제력이 검토되었다. 양성대조군인 DHED는 43% 정도의 효소활성을 나타냈다. 4월, 7월, 10월에 재배된 미나리 모두 효소활성 억제력이 있었다. 4월과 7월에 재배한 미나리의 효소활성 억제력은 현저하게 낮게 나타났으며, 10월에 재배한 미나리의 효소 활성 억제력은 가장 높게 나타났다. 10월에 재배된 미나리의 효소활성 억제력이 4월, 7월 재배 미나리보다 거의 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 4월 재배 미나리 와 10월 재배 미나리간의 유의적인 차이가 나타났으며, 7월과 10월 재배된 미나리에서도 유의적인 차이가 나타났다. 미나리의 재배 시기에 따라 효소 활성 억제력이 달라짐을 알 수 있었다.

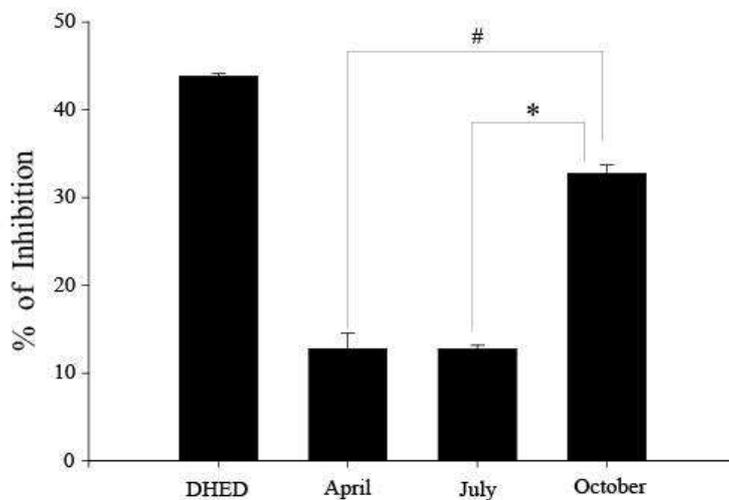


그림 36. 시기별 미나리의 효소 활성 억제력

라. 미나리 재배 방법별 효소 활성 억제력 비교

(1) 실험방법

① 추출물 및 추출방법

미나리는 화순 (34°49' ~35°12' N, 126°49' ~127°12' E) 의령 (35°15' ~35°31' N, 128°07' ~128°26' E) 및 나주 (34°53' ~36°03' N, 126°53' ~126°54' E) 지역에서 재배되는 것을 직접 구입하고 건조했다. 세 곳은 위도가 비교적 비슷한 곳으로 의령과 나주는 미나리를 수경재배하고, 화순은 미나리를 비수경재배 한다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다.

## ② 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 SD 랫트 (8-10 주령)의 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 미나리는 처음에 5% DMSO에서 용해되었고 그 용액은 사용 바로 전에 buffer 1 (100mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200g/ml의 농도로 희석되었다. 1.5ml의 희석된 미나리 용액과 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의 buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100µl 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수 계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

## (2) 결과

미나리의 재배 방법에 따른 효소활성 억제력을 검토했다. 수경B와 비수경 미나리가 높게 나타났다. 수경A와 수경B 미나리 실험군들 간의 유의적인 차이가 나타났고, 수경A와 비수경미나리 간에 유의적인 차이가 있었다. 효소활성 억제력은 비수경 미나리와 수경미나리 모두 효과가 나타났으며, 수경A와 수경B 미나리에서 보듯 재배환경에 따른 차이가 있을 수 있다.

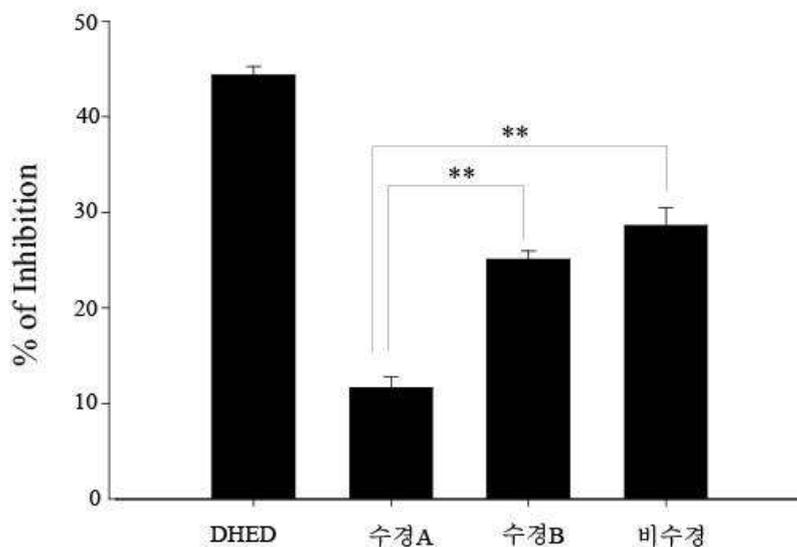


그림 37. 미나리 재배 방법별 효소 활성 억제력

## 마. 미나리추출 농도별 효소 활성 억제력 비교

### (1) 실험방법

### ① 추출물 및 추출방법

미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다.

### ② 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 SD 랫트 (8-10 주령)의 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 미나리는 처음에 5% DMSO에서 용해되었고 그 용액은 사용 바로 전에 buffer 1 (100mM sodium phosphate, pH 8.0)에 200g/ml의 농도로 희석되었다. 1.5ml의 희석된 미나리 용액과 100 $\mu$ l의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100 $\mu$ l의 buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100 $\mu$ l 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수 계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다. 50% 효소 억제 ( $IC_{50}$ )를 위해 필요로 되는 혼합물의 농도는 효소 억제 농도 반응 곡선이 linear estimate로 계산되었다. 미나리 추출물의 효소 활성 기작을 측정하기 위해 Lineweaver-Burk plot을 나타내었다. 아세틸콜린을 농도별(20-100 $\mu$ l)처리하고, 미나리추출물을 넣었을 때와 그렇지 않았을 때를 비교하였다.

### (2) 결과

미나리 추출 농도에 따른 효소 활성 억제력을 검토했다. 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml 추출을 사용했으며, 농도가 증가할수록 효소 활성 억제력도 증가되어 나타났다. 추출농도가 증가할 때마다 효소 활성 억제력도 거의 비례적으로 증가하였다. 아세틸콜린 에스터레이즈에 대한 미나리의 효소활성억제의  $IC_{50}$ 은 991.77  $\mu$ g/ml 이다.

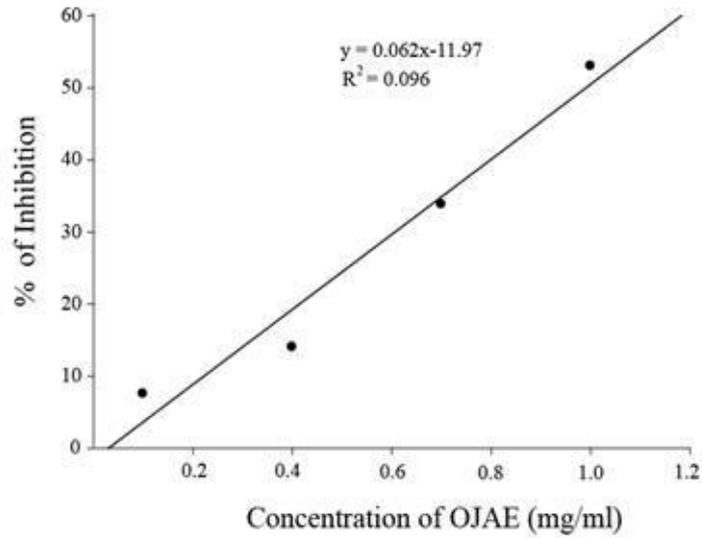


그림 38. 미나리추출물 농도별 효소 활성 억제력

미나리추출물의 효소활성 기작을 측정하기 위해 Lineweaver-Burk plot을 나타내었다. 아세틸콜린을 농도별 (20-100 $\mu$ l) 처리하고, 미나리추출물을 넣었을 때와 그렇지 않았을 때를 비교하면 두개의 반응선은 평행하게 보여준다. 두 선이 나타내는  $V_{max}$  와  $K_m$  값이 서로 다를 수 있다. 따라서 미나리는 아세틸콜린에스테라아제에 대한 uncompetitive inhibitor일 것이다.

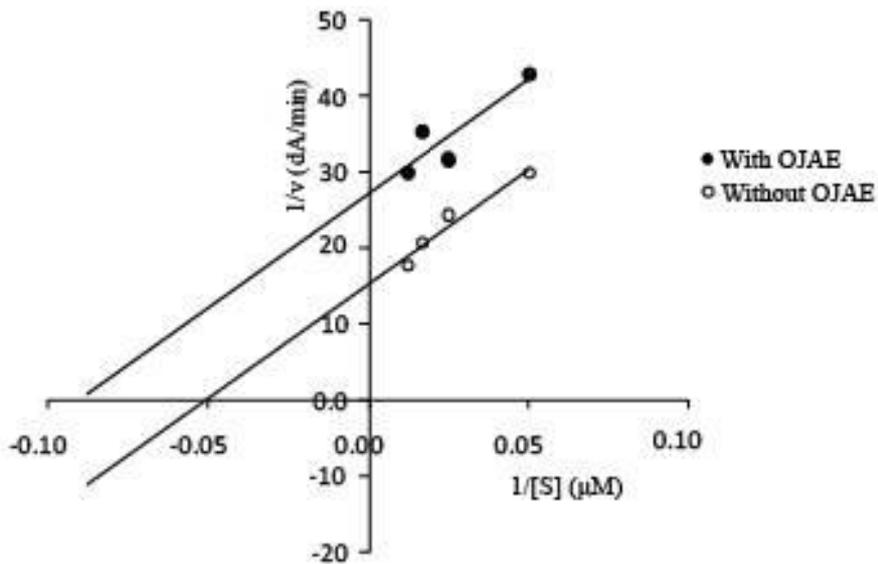


그림 39. 미나리추출물의 효소 활성 억제 기작

## 2. 세포 독성 억제력을 통한 기억력 소재 원료 입증

노화를 설명하는데 활성산소발생 (reactive oxygen species)과 연관 짓는다. 노화 이외에도 많은 질병들은 이런 활성산소발생에 적절히 대응하지 못하면서 발생한다 (1,20). 세포를 이용한 많은 실험에서 활성산소에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 보기위해 과산화수소가 이용된다 (21). 따라서 본 과제에서도 미나리가 이러한 활성산소발생 더 나아가 세포사멸을 억제할 수 있는지를 검토하였다.

### 가. 지역별 미나리의 세포독성 억제력 비교

#### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

전주미나리, 나주미나리, 시흥미나리, 부여미나리, 청도미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공 상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다. 본 실험에 사용한 DMSO 시약은 Sigma Cematical Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

##### ② 신경세포주 배양

SH-SY5Y 세포를 사용한다. 10% FBS가 들어간 DMEM에서 배양된다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양되었고, 세포가 증식하는 정도에 따라 계대배양을 한다. 실험조건에 따라 세포수를 측정하여 96well plate에 일정량을 넣어준다.

##### ③ 세포독성 분석 (WST-1)

SH-SY5Y 세포보호효과 측정을 하기 위해 750µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 4시간 전에 미나리를 전 처리했다. 세포생존도 측정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 24시간 때에 실시했다. 살아있는 세포의 WST-1 metabolizing activity는 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 간단히 말해, 24 시간 동안 세포를 배양한 후에 WST-1를 10µl의 농도로 처리하여 1 시간 동안 계속 배양하였다. 변형된 dye 의 absorbance 는 450 nm에서 측정되었다. 측정은 ELISA reader (Bio-Rad, Munich, Germany)로 측정하였다.

#### (2) 결과

지역별 미나리에 750µM의 과산화수소를 처리한 후 세포 독성 억제력을 측정하였다. 대조군보다 750µM의 과산화수소 처리군에서 cell death (%)가 높았고, 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 750µM 과산화수소 처리군과 750µM 과산화수소 처리후 DHED처리군은 유의적 차이가 있었다. 750µM과산화수소 처리군과 비교해 750µM과산화수소 처리후 시흥미나리, 부여미나리, 청도미나리, 전주미나리는 통계적으로 유의적 차이가 없었다. 750µM 과산화수소 처리후 나주미나리는 유의적 차이가 있었다. 따라서 세포 독성 억제력 측정 결과, 750µM의 과산화수소 처리군 미나리는 모두 기억력 소재 원료로써 가능성을 보여준다.

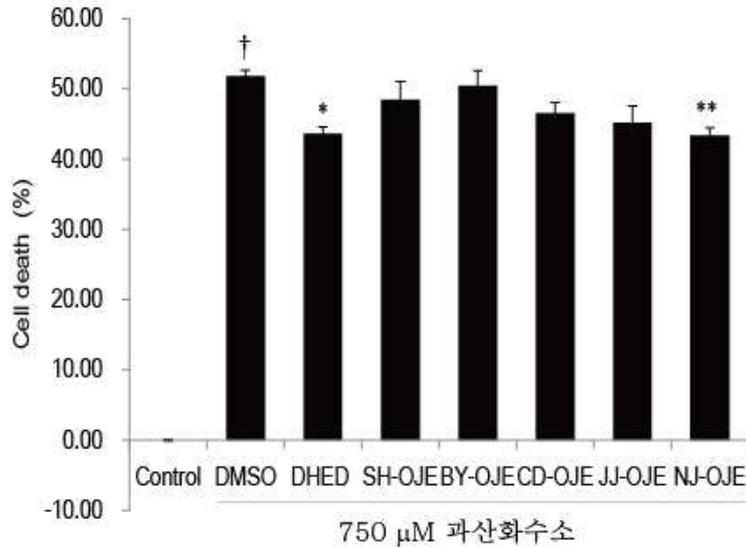


그림 40. 지역별 미나리의 세포독성 억제력

## 나. 시기별 미나리의 세포 독성 억제력 비교

### (1) 실험방법

#### ① 추출물 및 추출방법

4월미나리, 7월미나리, 10월미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다.

#### ② 신경세포주 배양

SH-SY5Y 세포를 사용한다. 10% FBS가 들어간 DMEM에서 배양된다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양되었고, 세포가 증식하는 정도에 따라 계대배양을 한다. 실험조건에 따라 세포수를 측정하여 96well plate에 일정량을 넣어준다.

#### ③ 세포독성 분석 (WST-1)

SH-SY5Y 세포보호효과 측정을 하기 위해 750μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 4시간 전에 미나리를 전 처리했다. 세포생존도 측정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 24시간 때에 실시했다. 살아있는 세포의 WST-1 metabolizing activity는 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 간단히 말해, 24 시간 동안 세포를 배양한 후에 WST-1를 10μl의 농도로 처리하여 1 시간 동안 계속 배양하였다. 변형된 dye 의 absorbance 는 450 nm에서 측정되었다. 측정은 ELISA reader (Bio-Rad, Munich, Germany)로 측정하였다.

### (2) 결과

미나리가 과산화수소에 의해 생성된 세포독성을 억제할 수 있는지 시기별로 세포사멸율을 측정 하였다. 대조군에 비해 750μM의 과산화수소를 처리한 군의 세포사멸율은 통계적으로 유의

하게 높게 나타났다. DHED에 750 $\mu$ M의 과산화수소를 처리한 군은 750 $\mu$ M의 과산화수소만 처리한군과 통계적으로 유의한 차이가 나타났다. 750 $\mu$ M의 과산화수소에 4월미나리를 처리한 세포사멸률은 750 $\mu$ M의 과산화수소만 처리한 군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 750 $\mu$ M의 과산화수소에 7월미나리를 처리한 군의 세포사멸률은 750 $\mu$ M의 과산화수소만 처리한 군에 비해 통계적으로 유의하게 적게 나타났다. 750 $\mu$ M의 과산화수소에 10월미나리를 처리한 군의 세포사멸률 또한 750 $\mu$ M의 과산화수소만 처리한 군의 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 따라서, 미나리의 채취시기에 따라 과산화수소의 세포독성 억제력은 차이를 보인다.

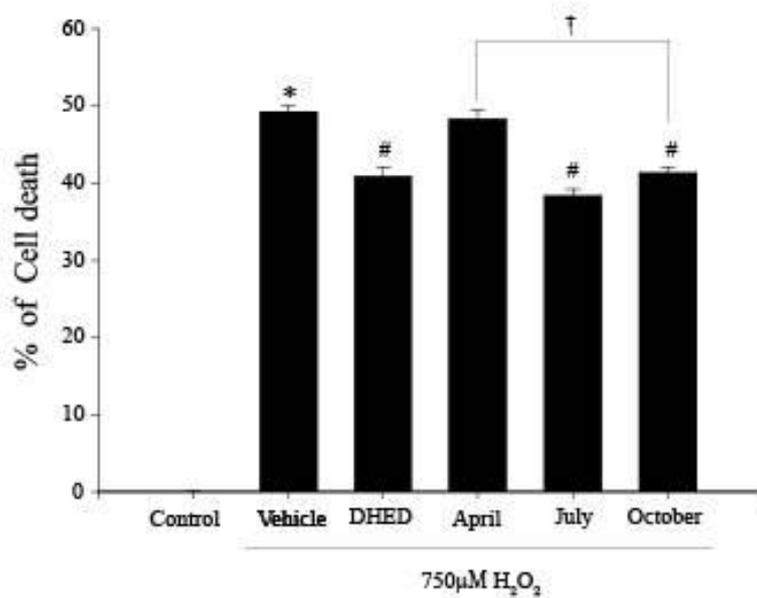


그림 41. 시기별 미나리의 세포 독성 억제력

#### 다. 미나리 재배방법별 세포독성 억제력 비교

##### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

미나리는 화순 (34°49' ~35°12' N, 126°49' ~127°12' E) 의령 (35°15' ~35°31' N, 128°07' ~128°26' E) 및 나주 (34°53' ~36°03' N, 126°53' ~126°54' E) 지역에서 재배되는 것을 직접 구입하고 건조했다. 세 곳은 위도가 비교적 비슷한 곳으로 의령과 나주는 미나리를 수경재배하고, 화순은 미나리를 비수경재배 한다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. 본 실험에 사용한 DMSO 시약은 Sigma Cematical Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

##### ② 신경세포주 배양

SH-SY5Y 세포를 사용한다. 10% FBS가 들어간 DMEM에서 배양된다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양되었고, 세포가 증식하는 정도에 따라 계대배양을 한다. 실험조건에 따라 세포수

를 측정하여 96well plate에 일정량을 넣어준다.

③ 세포독성 분석 (WST-1)

SH-SY5Y 세포보호효과 측정을 하기 위해 750 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하기 4시간 전에 미나리를 전 처리했다. 세포생존도 측정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 24시간 때에 실시했다. 살아있는 세포의 WST-1 metabolizing activity는 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 간단히 말해, 24 시간 동안 세포를 배양한 후에 WST-1를 10 $\mu$ l의 농도로 처리하여 1 시간 동안 계속 배양하였다. 변형된 dye 의 absorbance 는 450 nm에서 측정되었다. 측정은 ELISA reader (Bio-Rad, Munich, Germany)로 측정하였다.

(2) 결과

미나리가 과산화수소에 의해 생성된 세포독성을 억제할 수 있는지 재배방법별로 세포사멸율을 측정하였다. 대조군에 비해 750 $\mu$ M의 과산화수소를 처리한 군의 세포사멸율은 통계적으로 유의하게 높게 나타났다. 750 $\mu$ M의 과산화수소를 처리한 군과 750 $\mu$ M의 과산화수소에 수경재배A를 처리한 군의 세포사멸율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 750 $\mu$ M의 과산화수소만을 처리한 군에 비해 750 $\mu$ M의 과산화수소에 수경재배B를 처리한 군의 세포 사멸율은 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 750 $\mu$ M의 과산화수소만을 처리한군에 비해 750 $\mu$ M의 과산화수소에 비수경 재배를 처리한 군의 세포 사멸률 또한 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 따라서, 미나리가 과산화수소에 의한 세포 독성을 억제하며 재배 방법에 의한 차이보다는 지역 및 다른 재배 조건에 따라 효능에 차이가 있음을 알 수 있다.

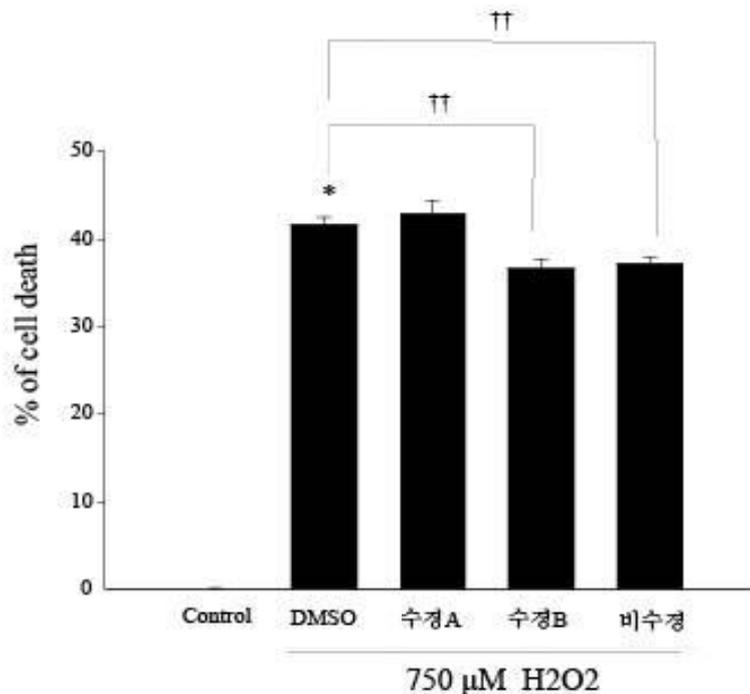


그림 42. 미나리 재배방법별 세포독성 억제력 비교

## 라. 지역별 미나리의 활성산소 생성 억제력 비교

### (1) 실험방법

#### ① 추출물 및 추출방법

전주미나리, 나주미나리, 시흥미나리, 부여미나리, 청도미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공 상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다. 본 실험에 사용한 DMSO 시약은 Sigma Cematic Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

#### ② Reactive oxygen species (ROS) 측정

SH-SY5Y 세포 내에서  $750\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의해 발생하는 ROS 측정은 fluorescent dye인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해서 측정하였다. SH-SY5Y 세포의 동일한 수를 계산하여 96 well plate의 각각의 well에 seeding한다. Seeding하고 하루 뒤에 미나리 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 DHED( $50\mu\text{M}$ )을 세포에 처리한다. 그 후 4시간 뒤에  $750\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하고 ROS발생량을 24시간 후에 측정한다. ROS측정을 위해 DCF-DA를 각각의 well에  $20\mu\text{l}$  넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 incubation한다. Washing후에 fluorescence microplate reader (SpectraMax Gemini EM; Molecular Device)를 이용해 excitation  $485\text{nm}$ /emission  $538\text{nm}$ 에서 측정한다. 측정된 값은 대조군에 대한 %값으로 계산한다.

### (2) 결과

지역별 미나리의 활성산소 생성억제력의 차이를 DCF-DA를 이용해 검토하였다.  $750\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 처리한 각 지역의 미나리는 활성 산소 생성 억제력이 높은 것으로 나타났다. 활성산소량은  $750\mu\text{M}$  과산화수소 처리 대조군이 50%로 높게 나타났으며,  $750\mu\text{M}$  과산화수소 처리 DHED가 38%로 통계적으로 유의하게 줄어들었다.  $750\mu\text{M}$  과산화수소 처리 부여, 나주, 시흥, 청도, 전주미나리 또한 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

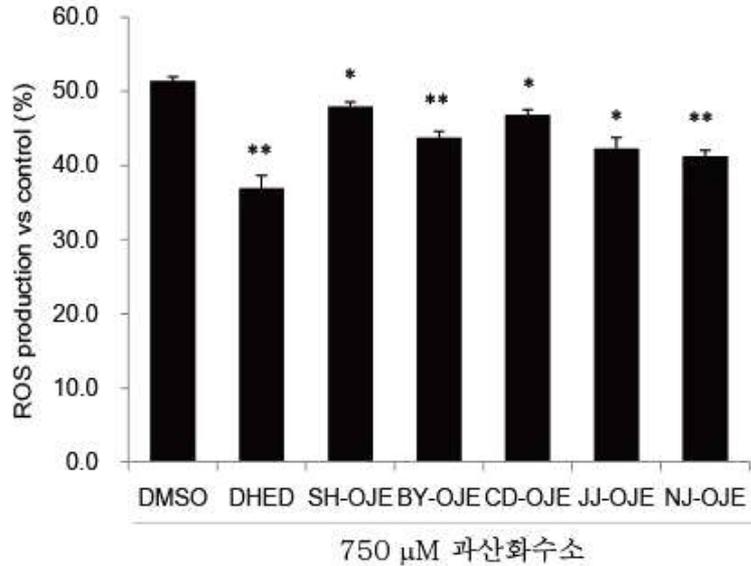


그림 43. 지역별 미나리의 활성산소 생성 억제력

#### 마. 시기별 미나리의 활성산소 생성 억제력 비교

##### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

4월미나리, 7월미나리, 10월미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. DHED는 제일약품에서 제공하였다.

##### ② Reactive oxygen species (ROS) 측정

SH-SY5Y 세포 내에서 750μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발생하는 ROS 측정은 fluorescent dye인 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용해서 측정하였다. SH-SY5Y 세포의 동일한 수를 계산하여 96 well plate의 각각의 well에 seeding한다. Seeding 하고 하루 뒤에 미나리(10μg/ml)과 DHED(50μM)을 세포에 처리한다. 그 후 4시간 뒤에 750μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 ROS발생량을 24시간 후에 측정한다. ROS측정을 위해 DCF-DA를 각각의 well에 20μl 넣고 37°C에서 30분간 incubation한다. Washing후에 fluorescence microplate reader (SpectraMax Gemini EM; Molecular Device)를 이용해 excitation 485nm/emission 538nm에서 측정한다. 측정된 값은 대조군에 대한 %값으로 계산한다.

##### (2) 결과

미나리가 과산화수소에 의해 생성된 활성산소를 억제할 수 있는지 시기별로 활성산소종 생성률을 측정 하였다. 750μM의 과산화수소를 처리한 군에 비해 DHED에 750μM의 과산화수소를 처리한 군의 활성산소종 생성률이 통계적으로 유의하게 작게 나타났다. 750μM의 과산화수소에 4월미나리를 처리한 군은 750μM의 과산화수소만 처리한 군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 750μM의 과산화수소만 처리한 군에 비해 750μM의 과산화수소에 7월미나리를 처리한 군의

활성산소종 생성률이 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 750 $\mu$ M의 과산화수소만 처리한 군에 비해 750 $\mu$ M의 과산화수소에 10월미나리를 처리한 군의 활성산소종 생성률 또한 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 따라서, 미나리 채취시기에 따라 활성산소 생성 억제력은 차이를 보인다.

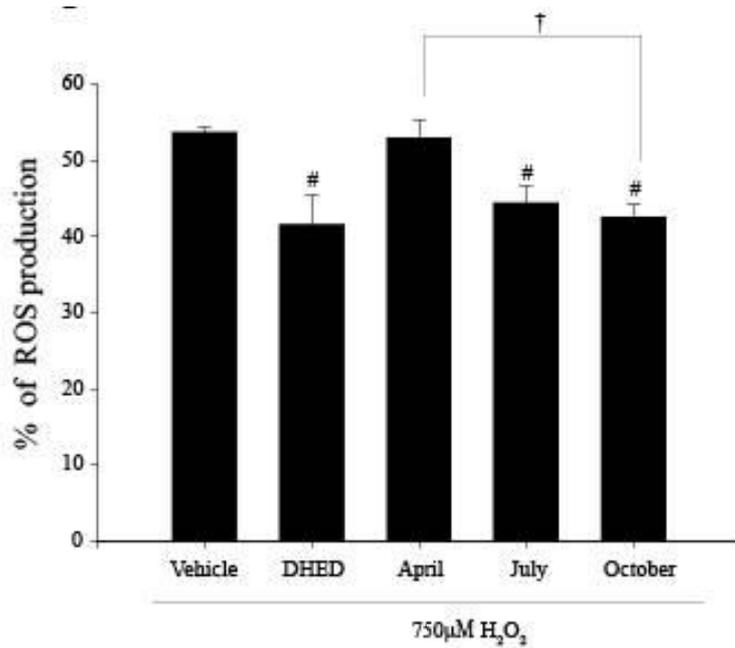


그림 44. 시기별 미나리의 활성산소 생성 억제력 비교

### 3. 동물실험을 통한 기억력 소재 원료입증

기억력에 대한 실제적인 개선 효능을 검증하기 위해 실험동물을 이용하였다. 현대사회는 기억력이 저하되는 이유로 스트레스와 알코올을 들 수 있다 (22,23). 이러한 물질들은 조기에 치료하지 않으면 이후 기능손상이 악화되어 치매와 같은 질환을 유발할 수 있다. 따라서, 본 과제에서는 단순기억력 손상모델인 scopolamine을 투여한 모델 (24,25), 알코올을 투여한 모델 (26), 스트레스 받은 모델 (27) 및 알츠하이머 치매모델인 Tg2576마우스 (28)에서 다각적으로 미나리가 기억력을 개선시킬 수 있는지 검토하였다.

#### 가. Scopolamine을 투여한 동물에서의 기억력 개선 효과

##### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

미나리는 화순 (34°49' ~ 35°12' N, 126°49' ~ 127°12' E) 의령 (35°15' ~ 35°31' N, 128°07' ~ 128°26' E) 및 나주 (34°53' ~ 36°03' N, 126°53' ~ 126°54' E) 지역에서 재배되는 것을 직접 구입하고 건조했다. 세 곳은 위도가 비교적 비슷한 곳으로 의령과 나주는 미나리를 수경재배하고, 화순은 미나리를 비수경재배 한다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해

얻어진 물질을 사용했다. 본 실험에 사용한 스키폴라민 시약은 Sigma Cematic Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

## ② 동물

200~250g 정도의 수컷 Wistar 쥐를 특정 병원균이 없는 곳에서 사육했다. 그리고 적절한 습도와 음식, 물을 주고, 12시간 간격으로 밤낮을 조절해 주었다. 모든 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회의 지침서에 따라 이루어졌다.

## ③ 수동회피테스트

기억과 학습에 대한 미나리의 효과를 알아보기 위해 수동회피테스트 기구 (Model PACS-30, San Diego Instrument Int., USA)를 사용하였다 (29). 그 기구 상자는 동일한 크기 (23.5 x 15.5 x 15.5cm)의 두 개의 방으로 나뉘어졌고 중간의 문이 이 두 방을 구분시켜준다 (6.5 x 4.5cm). 불이 밝게 켜진 방은 조명이 설치되어 있고 쥐는 중간 문을 통과해서 어두운 방으로 들어갈 수 있다. 쥐는 처음에 문이 열린 상태에서 불이 켜진 방에 놓여진다. 쥐는 탐험적인 행동을 보이다가 어두운 방으로 들어간다. 어두운 방에 들어가자마자 중간 문을 자동적으로 닫히게 된다. 쥐가 20 초 이내에 어두운 방으로 들어갈 때까지 이러한 훈련은 반복되었다. 그 훈련 24 시간 후에 스키폴라민 또는 식염수(1mg/kg)를 쥐의 복강에 투여하였다. 스키폴라민 투여 30 분 후에, 단 한번의 미나리(10mg/kg)를 쥐의 복강에 투여하고, 또 다시 30 분 후에 쥐는 빛이 있는 방에 놓여졌다. 그 쥐가 어두운 방으로 들어가는 시간은 최장 300 초를 기준으로 측정되었다. 만약 쥐가 300 초(cut-off time)이내에 어두운 방으로 들어가지 않았다면, 그것은 300 초의 값으로 측정되었다.

## (2) 결과

미나리가 스키폴라민(1mg/kg, i.p.) 을 투여한 쥐에서 기억력 개선의 효과가 있는지 수동회피 반응을 수행하여 반응 시간을 측정했다. 쥐 대조군과 비교해 스키폴라민을 투여한 쥐의 반응 시간이 통계적으로 유의하게 적게 나타났다. 수경재배(10mg/kg, p.o.) 를 한 미나리와 비수경재배(10mg/kg, p.o.) 를 한 미나리 모두 스키폴라민을 투여한 쥐에서 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 그러나 수경재배를 한 미나리와 비수경 재배를 한 미나리 모두 스키폴라민에 의해 감소된 수동회피 반응 시간을 증가시킬 수 있는 경향을 보여준다. 따라서 수동회피 실험 결과, 미나리는 스키폴라민을 투여한 쥐에서 기억력개선 효과가 있을 수 있으며 수경 재배를 한 미나리와 비수경 재배를 한 미나리의 기억력 개선 효과 차이는 없는 것을 알 수 있다.

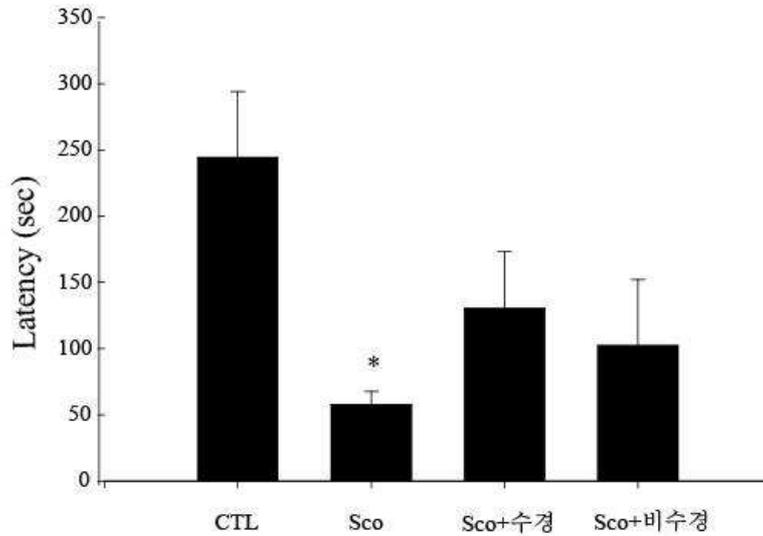


그림 45. Scopolamine을 투여한 동물에서의 기억력 효과

## 나. 알코올을 투여한 동물에서의 기억력 개선 효과

### (1) 실험방법

#### ① 추출물 및 추출방법

미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. 본 실험에 사용한 Lenoleic acid 시약은 Sigma Cematic Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

#### ② 동물

200~250g 정도의 수컷 Wistar 쥐를 특정 병원균이 없는 곳에서 사육했다. 그리고 적절한 습도와 음식, 물을 주고, 12시간 간격으로 밤낮을 조절해 주었다. 모든 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회의 지침서에 따라 이루어졌다.

#### ③ Y 미로 테스트

Y 미로 테스트는 공간기억을 평가하기 위해 사용된다. 장치는 삼등변으로 교차된 arm(길이 80cm × 높이 35cm × 넓이 15cm)을 가진 흑색 플라스틱 미로이다. 공간 표식물로는 미로의 주변에 위치한 수직 금속 기둥, 무늬 있는 종이와 주위 벽에 붙은 포스터가 포함된다. 각 쥐는 한 쪽 arm의 끝에 위치시키고 8분간 미로를 통해 자유롭게 이동할 수 있게 한다. Arm으로의 입장을 연속적으로 기록했다. arm으로의 입장의 의미는 한 arm에 모든 발이 위치함으로 정의한다. 세 개의 다른 arm으로 세 번의 연속적인 입장은 교체행동(alternation)으로 분류한다. 교체행동의 성공률은 교체행동의 총입장에서 2를 뺀 수를 나눈 것으로 결정한다 (30,31).

#### ④ 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 동물실험에 이용된 쥐들의 뇌를 group별로 적출하였다. 적출한 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의 buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100µl 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수 계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

## (2) 결과

미나리가 알코올을 투여한 쥐에서 기억력 개선 효과를 보이는지 Y-미로테스트를 수행하여 측정했다. 알코올을 투여하지 않은 쥐 대조군과 미나리(100mg/kg)를 먹었을 때의 쥐의 교체행동 성공률이 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 25%알코올(2ml/kg)만을 투여한 쥐는 대조군에 비해 교체행동이 유의하게 감소하였다. 25%알코올만을 투여한 쥐 대조군과 비교해 25%알코올을 투여 하고 미나리(100mg/kg)를 먹인 쥐의 교체행동 성공률은 통계적으로 유의하게 높게 나타났다. 25%알코올을 투여하고 lenoleic acid(100mg/kg)를 먹인 쥐의 교체행동 성공률은 25%알코올을 투여한 쥐 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 따라서 Y-미로테스트 반응 결과, 미나리는 알코올을 투여한 쥐에서 기억력을 개선시킬 수 있으며, 이것은 기억력 개선 효과가 있다고 알려진 lenoleic acid와 유사한 효능으로 lenoleic acid 역시 알코올에 대한 기억력 손상이 개선 됨을 알 수 있다.

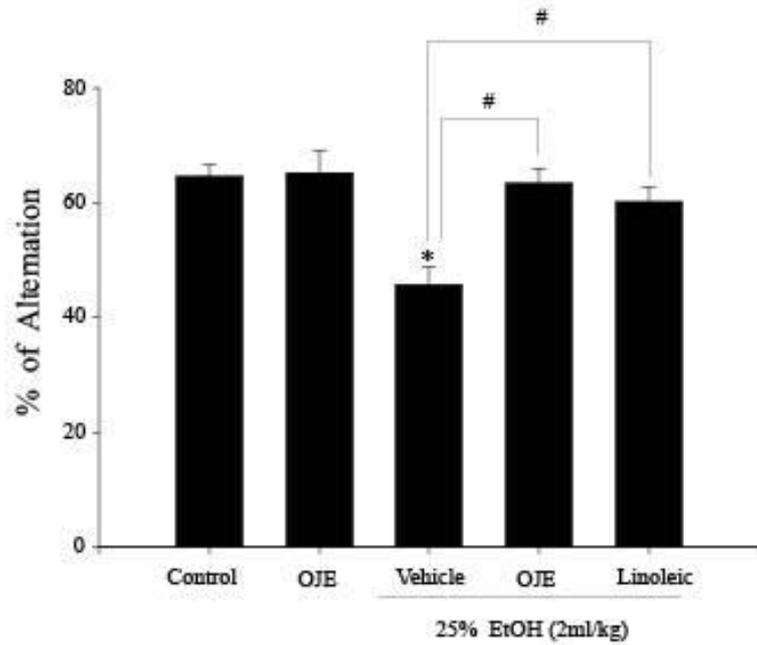


그림 46. 알코올을 투여한 동물에서의 기억력 개선 효과

미나리가 알코올을 투여한 쥐의 뇌에서 기억력 개선 효과와 관련된 효소 활성도를 측정했다. 알코올을 투여하지 않은 쥐 대조군과 미나리(100mg/kg)을 먹였을 때의 쥐의 효소활성도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 25%알코올(2ml/kg)만을 투여한 쥐는 대조군과 비교해 효소활성도가 유의하게 증가하였다. 25%알코올만을 투여한 쥐 대조군과 비교해 25%알코올을 투여하고 미나리(100mg/kg)를 먹인 쥐의 효소활성도는 통계적으로 유의하게 적게 나타났다. 25%알코올을 투여하고 linoleic acid(100mg/kg)을 먹인 쥐의 효소 활성도는 25%알코올만을 투여한 쥐대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 따라서, 미나리는 알코올을 투여한 쥐의 뇌에서 효소활성도를 낮추어 기억력을 개선시킬 수 있다.

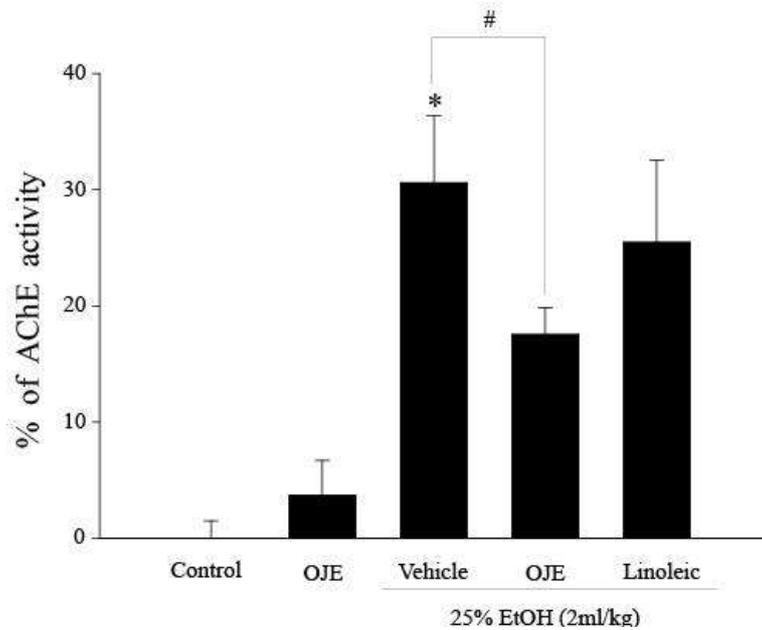


그림 47. 알코올을 투여한 동물 뇌에서의 AChE 활성억제 효과

#### 다. 스트레스 동물에서의 기억력 개선 효과

##### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

나주미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. 본 실험에 사용한 Linoleic acid 시약은 Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

##### ② 동물

200~250g 정도의 수컷 Wistar 쥐를 특정 병원균이 없는 곳에서 사육했다. 그리고 적절한 습도와 음식, 물을 주고, 12시간 간격으로 밤낮을 조절해 주었다. 모든 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회의 지침서에 따라 이루어졌다.

##### ③ Y 미로 테스트

Y 미로 테스트는 공간기억을 평가하기 위해 사용된다. 장치는 삼등변으로 교차된 arm (길이 80cm × 높이 35cm × 넓이 15cm) 을 가진 흑색 플라스틱 미로이다. 공간 표식물로는 미로의 주변에 위치한 수직 금속 기둥, 무늬 있는 종이와 주위 벽에 붙은 포스터가 포함된다. 각 쥐는 한쪽 arm의 끝에 위치시키고 8분간 미로를 통해 자유롭게 이동할 수 있게 한다. Arm으로의 입장을 연속적으로 기록했다. arm으로의 입장의 의미는 한 arm에 모든 발이 위치 함으로 정의한다. 세 개의 다른 arm으로 세 번의 연속적인 입장은 교체행동 (alternation) 으로 분류한다. 교체행동의 성공률은 교체행동의 총입장에서 2를 뺀 수를 나눈 것으로 결정한다 (30,31).

④ 아세틸콜린 분해효소 분석

아세틸콜린 분해효소 분석은 기질로서 acetylthiocholine iodide를 사용한 colorimetric의 방법으로 수행되었다 (19). 아세틸콜린분해효소 (AChE)로 사용하기 위해 동물실험에 이용된 쥐들의 뇌를 group별로 적출하였다. 적출한 뇌를 homogenization buffer (12.5mM sodium phosphate pH 7.0, 400mM NaCl)로 균질화하였다. 그리고 10분 동안 1,000 x g 에서 원심분리되었다. 상층액에 0.5% Triton X-100 이 포함된 homogenization buffer를 첨가한 후에 30 분 동안 혼합했다. 다시 10 분 동안 1,000 x g에서 원심분리하였다. 그 결과로 나온 상층액은 아세틸콜린분해효소 (AChE) 재료로 사용되었다. 모든 추출 단계는 4°C에서 수행되었다. 100µl의 acetylthiocholine iodide solution (75mM)과 100µl의 buffered Ellman's reagent (10 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]와 17.85 mM sodium bicarbonate 혼합물)를 혼합했다. 2.7ml Reaction buffer와 100µl 효소(적출된 뇌추출물)를 첨가한 다음 410 nM에서 측정하였다. 측정은 5 분 동안 30 초 간격으로 반복되었다. 효소 대신 식염수를 대체함으로써 준비된 reaction blank 가 측정되었다. 아세틸콜린 분해효소 활성은 흡수 계수 1.36 L/mmol/min를 사용해서 계산되었다. 모든 실험은 5 번 반복되었다.

(2) 결과

4주 동안의 고정스트레스를 실험동물에 주고 미나리를 동시에 투여했을 때 Y-maze에서 기억력의 차이를 검토하였다. 미나리를 투여하지 않은 쥐 대조군과 나주미나리(NJ-OJE) 100mg/kg 을 투여한 쥐 대조군 간에 유의한 차이가 없었다. 스트레스를 준 쥐는 미나리를 투여하지 않은 대조군보다 기억력이 감소되어 유의적인 차이가 있었다. 스트레스를 준 쥐에 10mg/kg의 미나리를 투여했을 때 통계적으로 유의적 차이가 나타났고, 100mg/kg의 미나리를 투여했을 때도 유의적 차이가 있었다. 대조적으로 Linoleic acid를 준 스트레스 쥐는 스트레스에 의한 감퇴된 기억력이 개선되지 않았다.

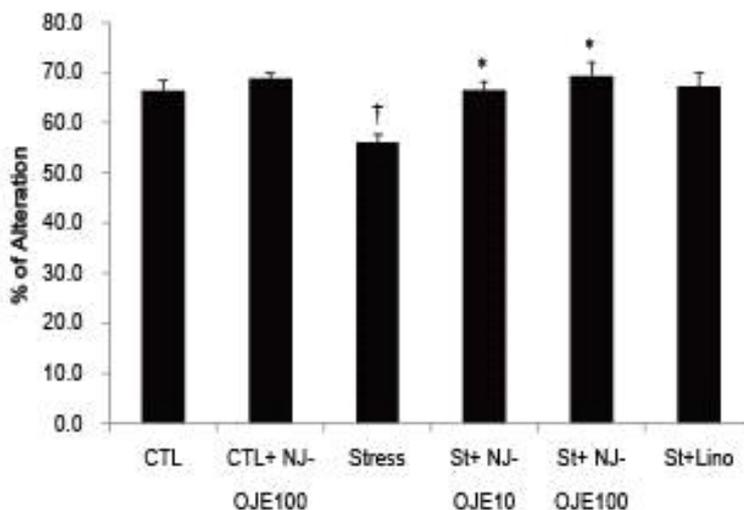


그림 48. 스트레스 동물에서의 기억력 개선 효과

4주동안의 고정 스트레스를 실험동물에 주고 미나리를 투여했을 때 뇌속의 AChE 효소 활성을 비교하였다. 스트레스를 주지 않은 대조군 쥐와 미나리(100mg/kg)를 먹었을 때의 쥐의 효소 활성 억제력은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 스트레스를 준 쥐에게 10mg/kg, 100mg/kg 미나리를 각각 투여하였을 경우 효소활성 억제력이 감소하였다. 대조적으로 Linoleic acid를 준 스트레스 쥐는 효소 활성 억제력이 크게 감소하지 않았다.

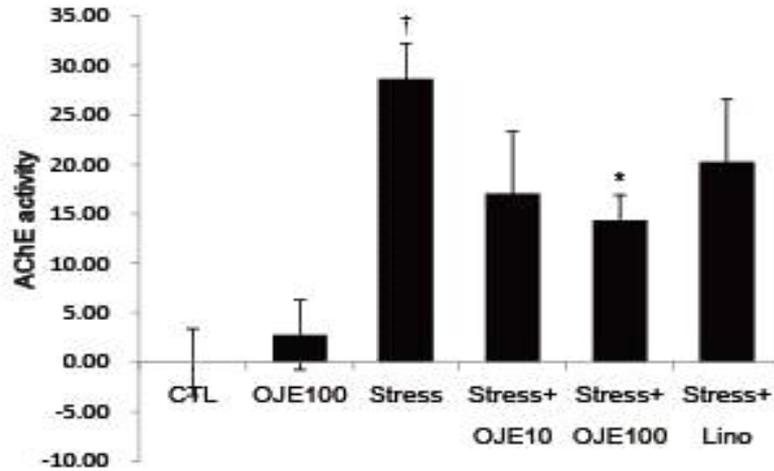


그림 49. 스트레스 동물 뇌에서의 AChE 활성억제 효과

#### 라. Tg2576 동물에서의 기억력 개선 효과

##### (1) 실험방법

##### ① 추출물 및 추출방법

인진쑥, 미나리를 구입하여 추출하였다. 에탄올에 넣고 끓는 물이 있는 수조에 3시간 동안 두었다. 이 과정을 두 번 반복하고 에탄올은 진공상태에서 농축시켰다. 이렇게 에탄올 농축을 통해 얻어진 물질을 사용했다. 본 실험에 사용한 Linoleic acid 시약은 Sigma Cematical Co., (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

##### ② 동물

9개월된 Tg2576를 특정 병원균이 없는 곳에서 사육한다. 그리고 적절한 습도와 음식, 물을 주고, 12시간 간격으로 밤낮을 조절해 준다. 11개월된 형질전환마우스에 3개월간 미나리가 함유된 사료를 매일 먹인다. 모든 실험은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회의 지침서에 따라 이루어졌다.

##### ③ 수동회피테스트

기억과 학습에 대한 미나리의 효과를 알아보기 위해 수동회피테스트 기구 (Model PACS-30, San Diego Instrument Int., USA)를 사용하였다. 그 기구 상자는 동일한 크기 (23.5 x 15.5 x 15.5cm)의 두 개의 방으로 나뉘어졌고 중간의 문이 이 두 방을 구분시켜준다 (6.5 x 4.5cm). 불이 밝게 켜진 방은 조명이 설치되어 있고 쥐는 중간 문을 통과해서 어두운 방으로 들어갈 수 있다. 쥐는 처음에 문이 열린 상태에서 불이 켜진 방에 놓여진다. 쥐는 탐험적인 행동을

보이다가 어두운 방으로 들어간다. 어두운 방에 들어가자마자 중간 문을 자동적으로 닫히게 된다. 쥐가 20 초 이내에 어두운 방으로 들어갈 때까지 이러한 훈련은 반복되었다. 그 훈련 24 시간 후에 스키폴라민 또는 식염수 (1mg/kg)를 쥐의 복강에 투여하였다. 스키폴라민 투여 30 분 후에, 단 한번의 미나리 (10mg/kg)를 쥐의 복강에 투여하고, 또 다시 30 분 후에 쥐는 빛이 있는 방에 놓여졌다. 그 쥐가 어두운 방으로 들어가는 시간은 최장 300 초를 기준으로 측정되었다. 만약 쥐가 300 초(cut-off time)이내에 어두운 방으로 들어가지 않았다면, 그것은 300초의 값으로 측정되었다.

(2) 결과

① 사료량

WT마우스와 Tg마우스의 12주 동안 먹은 사료량의 변화를 측정했다. WT마우스 대조군의 1주에서 12주동안 먹은 사료량의 차이는 없었다. WT마우스에 미나리(50mg/kg)를 먹인 군의 1주에서 12주동안 먹은 사료량의 차이도 없었다. Tg마우스 대조군도 1주에서 12주간 사료량의 차이가 나타나지 않았다. Tg마우스에 미나리(50mg/kg)를 먹인 군의 사료량 차이 또한 없었다. 따라서, 모든 실험 군에서 먹은 사료량의 변화는 없었다.

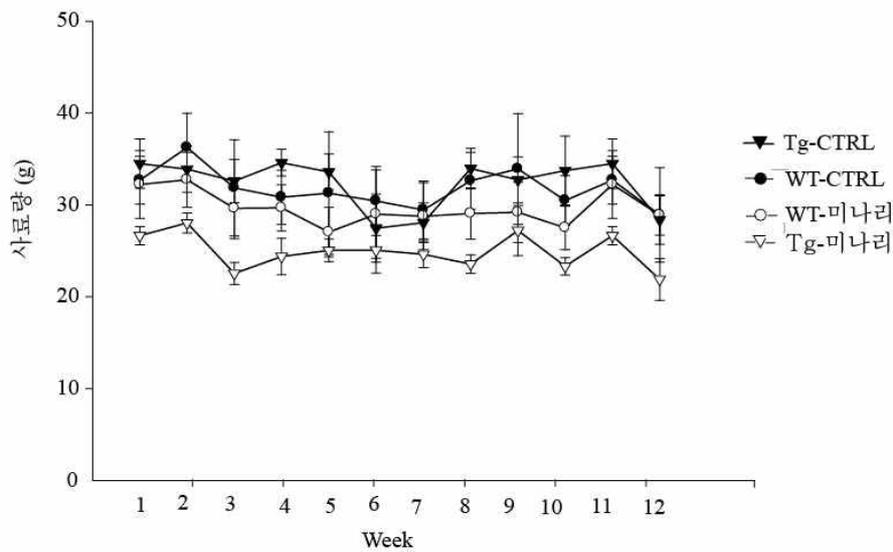


그림 50. Tg2576 동물의 12주간 먹이섭취량 변화

② 몸무게

WT마우스와 Tg마우스 간의 12주동안 몸무게 변화를 측정했다. WT마우스 대조군의 12주동안 변화는 없었다. WT마우스에 미나리(50mg/kg)를 먹인 군에서의 1주에서 12주동안의 변화는 없었으며, Tg마우스 대조군의 12주동안 몸무게 변화도 나타나지 않았다. 또한, Tg마우스에 미나리(50mg/kg)를 먹인 군의 몸무게도 12주간 차이는 없었다. 따라서, 모든 실험군에서 12주동안 마우스의 몸무게 변화는 없었다.

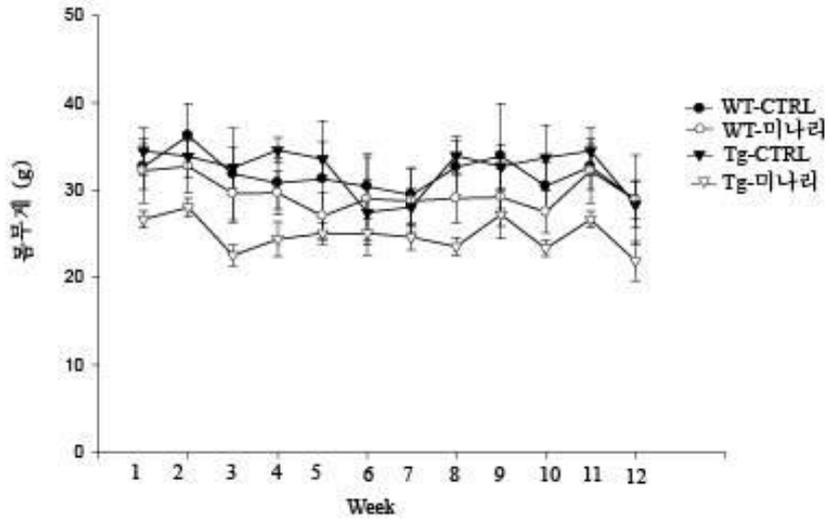


그림 51. Tg2576 동물의 12주간 몸무게 변화

③ 수동회피반응

미나리가 Tg마우스의 기억력 개선에 효과적인가를 수동회피 실험을 수행하여 측정했다. WT마우스 대조군과 WT마우스에 미나리(50mg/kg)을 먹었을 때의 마우스의 반응시간은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. WT마우스 대조군에 비해 Tg마우스 대조군의 반응시간이 통계적으로 유의하게 적게 나타났으며, Tg마우스 대조군에 비해 Tg마우스에 미나리(50mg/kg)를 먹었을 때 반응시간이 통계적으로 유의하게 짧게 나타났다. Tg마우스 대조군과 Tg마우스에 인진쑥(50mg/kg)을 먹었을 때의 반응시간은 통계적으로 유의하게 나타나지 않았다. 따라서 Tg마우스 대조군에 비해 Tg마우스에 미나리를 먹었을 때 수동회피 반응 결과, 기억력이 개선됨을 알 수 있다.

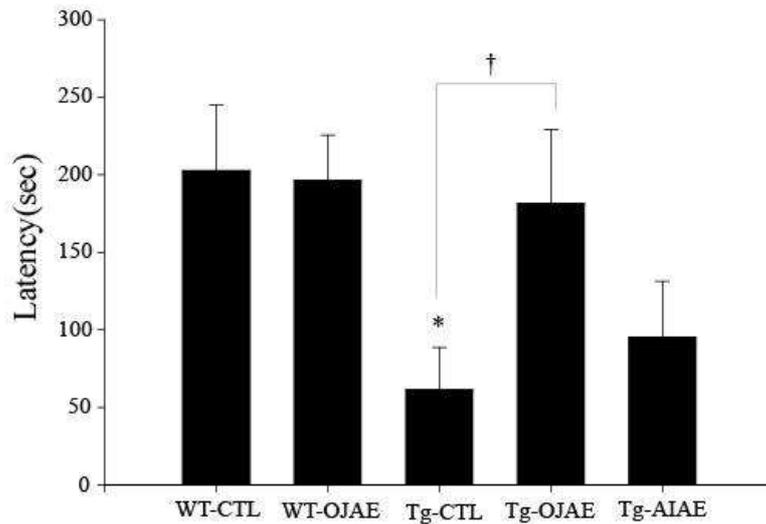


그림 52. Tg2576 동물에서의 기억력 개선 효과

④  $A\beta_{1-42}$  생성 억제

미나리가 Tg마우스의 뇌에서 발생하는  $A\beta_{1-42}$  생성을 억제할 수 있는지  $A\beta_{1-42}$ 를 ELISA로 측정했다. WT마우스의 대조군과 WT마우스에 미나리(50mg/kg)을 먹였을 때의 뇌에서  $A\beta_{1-42}$ 의 생성은 통계적으로 유의한 차이가 없었다. WT마우스 대조군에 비하여 Tg마우스 대조군의  $A\beta_{1-42}$ 의 생성이 통계적으로 유의하게 많이 나타났으며, Tg마우스 대조군에 비해 Tg마우스에 미나리를 먹였을 때  $A\beta_{1-42}$ 의 생성이 통계적으로 유의하게 적게 나타났다. Tg마우스 대조군과 Tg마우스에 인진쑥(50mg/kg)을 먹였을 때  $A\beta_{1-42}$ 의 생성은 통계적으로 유의하게 나타나지 않았다. 따라서, Tg마우스 대조군에 비해 Tg마우스에 미나리를 먹였을 때 마우스 뇌에서  $A\beta_{1-42}$ 의 생성은 줄어든다.

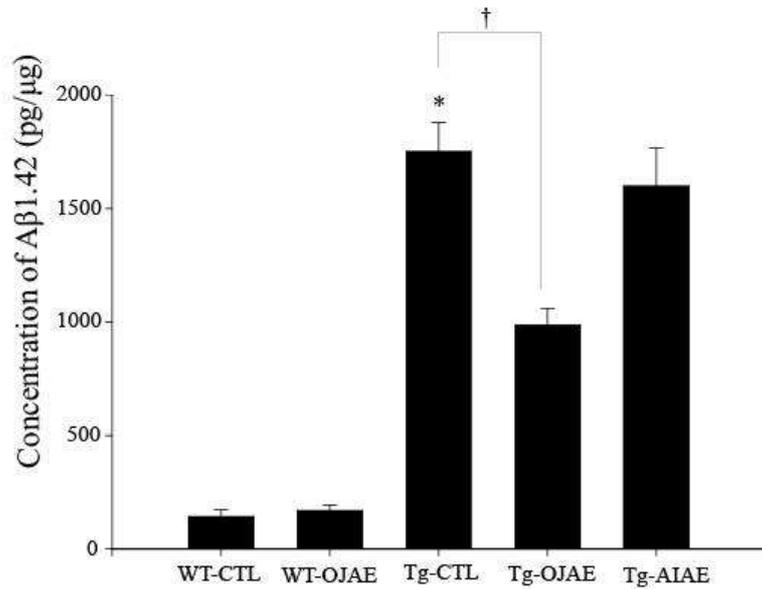


그림 53. Tg2576 동물 뇌에서의  $A\beta_{1-42}$  단백질 감소 효과

### 제 3 절 미나리 추출 원료의 건강기능식품으로서의 기준규격화

#### 1. 미나리 추출물의 기준, 규격 설정

가. 제조기준

(1) 원재료 : 미나리

나. 기준·규격

Isorhamnetin 함량 (mg/g) : 1.743 mg/g 의 80~120 %

다. 시험법

(1) Isorhamnetin 시험법(고속액체크로마토그래피법)

##### ① 장비

HPLC System      Agilent 1100 series, Agilent, USA  
Bin Pump G1312A, Autosampler G1313, DAD G1315D,  
Column Oven G1316A, Degasser G1379A

Analytical Column   X bridge C18 (4.6 × 250 mm, 5 um), waters

##### ② 시약

- ㉠. Isorhamnetin 표준품: Sigma, 17794 (LOT: BCBG9175V) 95%
- ㉡. Trifluoroacetic acid: Samchun, 99%, 100 mL
- ㉢. Methanol: Burdick&Jackson, HPLC grade
- ㉣. Acetonitrile: Burdick&Jackson, HPLC grade
- ㉤. Sulfuric acid: Daejung, 1L
- ㉥. 3차증류수

##### ③ 표준용액 조제

표준물질 Isorhamnetin 3.96 mg을 정밀하게 달아 마이크로피펫을 이용하여 MeOH 39.6 mL(100 ug/mL)에 녹인 표준용액을 1 mL씩 분주하여 냉동보관된 것을 사용한다. 이를 50% MeOH in 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 희석하여 working Solution으로 사용한다.

##### ④ 시험용액 조제

시료 약 0.1 g을 취해 50% MeOH in 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL을 넣고 90℃에서 30분 동안 산 가수분해를 실시한다. 가수분해가 종료된 용액을 25 mL 정용플라스크에 담고 50% MeOH로 정용한

후 0.45um PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

⑤ 분석조건

Instrument	HPLC system														
Detector	UV detector (370 nm)														
Column	X bridge C18 (4.6 × 250 mm, 5 um), waters														
	A - H <sub>2</sub> O in 0.1% TFA														
	B - Acetonitrile in 0.1% TFA														
Mobile Phase	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time(min)</th> <th>A(%)</th> <th>B(%)</th> <th>Flow(mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>55</td> <td>45</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>			Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)	0	80	20	1.0	25	55	45	1.0
Time(min)	A(%)	B(%)	Flow(mL/min)												
0	80	20	1.0												
25	55	45	1.0												
Injection Vol.	20 μl														
Temperature.	30°C														
Run time	25 min														

⑥ 계산

$$\text{Isorhamnetin (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \text{희석용량 (mL)}}{\text{시료량 (g)}} \times \frac{1}{1000}$$

라. 기준규격 설정 근거

(1) 기능/지표성분 규격 설정에 관한 자료

기능/지표성분의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 추출물의 경우는 표시량의 80~120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표물질의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. 미나리추출분말 중 Isorhamnetin 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 15.0) One-way ANOVA을 이용하여 각 Lot 간의 평균값(mean), 표준편차(SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한치(Upper Bound)와 하한치(Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다.

(2) 미나리 추출물 함량

미나리 추출물의 기준 규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과를 토대로 Isorhamnetin의 함량 범위를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80~120%, 각 Lot별 하한치~상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 1.743 mg/g의 80%~120%인 1.394~2.092 mg/g으로 설정하였다.

	Lot No.	Lot 1	Lot 2	Lot 3	평균
	반복수				
Isorhamnetin 함량(mg/g)	1	1.819	1.833	1.564	1.743
	2	1.795	1.790	1.617	
	3	1.834	1.808	1.624	
	평균	1.816	1.810	1.602	

표 21. Lot 별 Isorhamnetin의 함량 분석결과

Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Lot 1	0.0197	0.0114	1.80	1.83	1.7672	1.8649
Lot 2	0.0219	0.0127	1.79	1.83	1.7559	1.8649
Lot 3	0.0328	0.0189	1.56	1.62	1.5202	1.6831
전체	0.1081	0.0360	1.56	1.83	1.6596	1.8258

표 22. Lot 별 Isorhamnetin의 함량 범위 결과

(3) 유해물질 규격 미설정 에 관한 자료

(가). 중금속

건강기능식품 유해물질 규격 및 최종 원료의 섭취량을 고려하였을 때, 각 중금속의 규격은 아래범위내로 설정되어야 한다.

- ① 납: 1.0 ug/g = 1.0 ppm 이하
- ② 총비소: 1.0 ug/g = 1.0 ppm 이하
- ③ 카드뮴: 0.5 ug/g = 0.5 ppm 이하
- ④ 총수은: 0.5 ug/g = 0.5 ppm 이하

중금속은 가능한 최소 함량으로 관리하는 것이 바람직하므로 분석결과를 고려하여 납은 1.0 ppm, 총비소 1.0 ppm, 카드뮴은 0.5 ppm, 총수은은 0.5 ppm 이하로 규격을 설정하였으며, 분석 결과 중금속의 항목은 모두 적합한 것으로 확인되었다.

(나). 미생물

대장균군은 음성으로 확인되었다.

시 험 항 목		시 험 방 법
중금속	납 총비소 카드뮴	식품공전 제10.일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP 법
	총수은	식품공전 제10.일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별 시험 (5) 수은
미생물	대장균군	식품공전 제10.일반시험법 8. 미생물시험법 5) 대장균군

표 23. 유해물질 시험항목 및 시험방법

Lot No.	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
		Lot 1	Lot 2	Lot 3	
중금속 (mg/kg)	납	1.0	0.0095	0.0086	0.0055
	총비소	1.0	0.0179	0.0170	0.0126
	카드뮴	0.5	0.0014	0.0011	0.0104
	총수은	0.5	0.003	0.003	0.002
미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성

표 24. Lot 별 미생물 및 중금속 분석결과



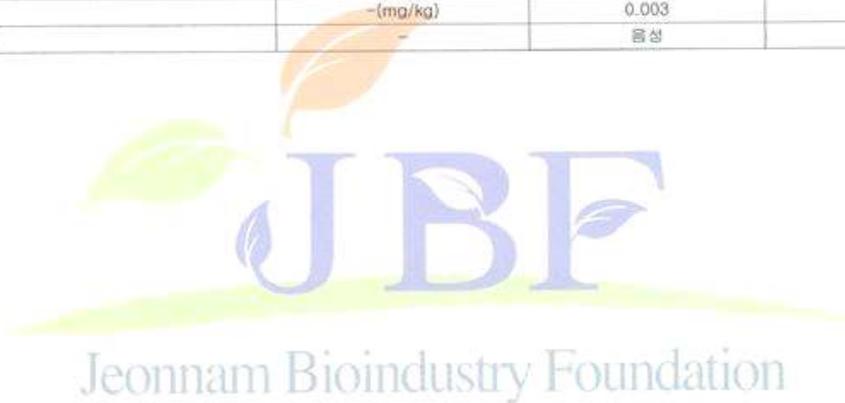
# 검사 성적서

친환경생물산업의 중심      첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자      전라남도식품산업연구센터  
 발급번호 :    참고용-1305-0040      접수번호 :    1305-02-027

제품명	미나리 추출분말 Lot.1		접수년월일	2013.05.20	
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2013.05.22
우편번호	520-330	소재지	전남 나주시 동수동 산	세부주소	15-1
의뢰업체명	전남식품산업연구센터	업체대표자	위치항	의뢰인	신현경
유통기한	-	제조일자	-	접수자	소현녀

### 시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0095	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0014	-
중비소	-(mg/kg)	0.0179	-
총수은	-(mg/kg)	0.003	-
대장균군		음성	-



판정 : -      검사자 : 송현우, 윤수경  
 책임자 : 윤수경, 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2013년 05월 27일

(재)전라남도생물산업진흥재단  
 식품산업연구센터 소장

520-330 전라남도 나주시 동수동 산15-1

TEL : 061-336-9620    FAX : 061-336-9627

그림 54. 미나리 추출물 Lot.1의 중금속 및 대장균군 시험성적서



# 검사 성적서

친환경생물산업의 중심

첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자

전라남도식품산업연구원

발급번호 : 참고용-1305-0041

접수번호 : 1305-02-028

제품명	미나리 추출분말 Lot.2			접수년월일	2013.05.20
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2013.05.22
우편번호	520-330	소재지	전남 나주시 동수동 산	세부주소	15-1
의뢰업체명	전남식품산업연구원	업체대표자	위지향	의뢰인	신현경
유통기한	-	제조일자	-	접수처	소선녀

### 시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0086	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0011	-
중비소	-(mg/kg)	0.0170	-
홍수은	-(mg/kg)	0.003	-
대장균군	-	음성	-



판정 : -

검사자 : 송현우, 윤수경

책임자 : 윤수경, 송현우, 신창석

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 법적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2013년 05월 27일

(재)전라남도생물산업진흥재단  
식품산업연구센터 소장

520-330 전라남도 나주시 동수동 산15-1

TEL : 061-336-9620

FAX : 061-336-9627

그림 55. 미나리 추출물 Lot.2의 중금속 및 대장균군 시험성적서



# 검사 성적서

친환경생물산업의 중심      첨단식품과학기술을 통한 품질관리 선두주자      전라남도식품산업연구센터  
 발급번호 :    창고용-1305-0042      접수번호 :    1305-02-029

재 품 명	미나리 추출분말 Lot.3			접수연월일	2013.05.20
식품유형	-	검사목적	참고용	검사완료일	2013.05.22
우편번호	520-330	소재지	전남 나주시 동수동 산	세부주소	15-1
의뢰업체명	전남식품산업연구센터	업체대표자	위지향	의뢰인	신현경
유통기한	-	제조일자	-	접수자	소선녀

### 시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	-(mg/kg)	0.0055	-
카드뮴	-(mg/kg)	0.0104	-
중비소	-(mg/kg)	0.0126	-
총수은	-(mg/kg)	0.002	-
대장균군	-	음성	-



관장 : -

검사자 : 송현우, 윤수경

책임자 : 윤수경, 송현우, 신창식

비고 : 이 성적은 의뢰자가 제출한 검체의 상기 분석항목에 한하며, 의료목적 이외의 상품선전 및 상업적 용도나 합  
 적인 해결의 용도로 사용할 수 없음

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

위와 같이 검사성적서를 발급합니다.

2013년 05월 27일

(재)전라남도생물산업진흥재단  
 식품산업연구센터 소장



520-330 전라남도 나주시 동수동 산15-1

TEL : 061-336-9620 FAX : 061-336-9627

그림 56. 미나리 추출물 Lot.3의 중금속 및 대장균군 시험성적서

## 제 4 절 대량 생산을 위한 미나리 추출 원료 제조공정 표준화

### 1. 원료 표준화

#### 가. 추출용매별 추출수율 검토 및 화합물 조성 비교 확인

먼저 미나리에 함유된 기능성분의 효율적인 추출방법을 확인하기 위해 추출용매의 농도별로 추출하여 얻어진 각 추출물에 함유된 화합물을 비교하고, 이로부터 얻어지는 최종 건조물의 수율을 비교 검토하고자 하였다. 먼저 미나리를 Ethanol 농도 (0%, 25%, 50%, 70%, 100% EtOH)별로 추출한 후, 각각의 추출물을 동결건조하여 얻어진 추출물의 최종 수율을 확인하였으며, HPLC 분석을 통해 각 추출물에서의 화합물 조성도 확인하였다.

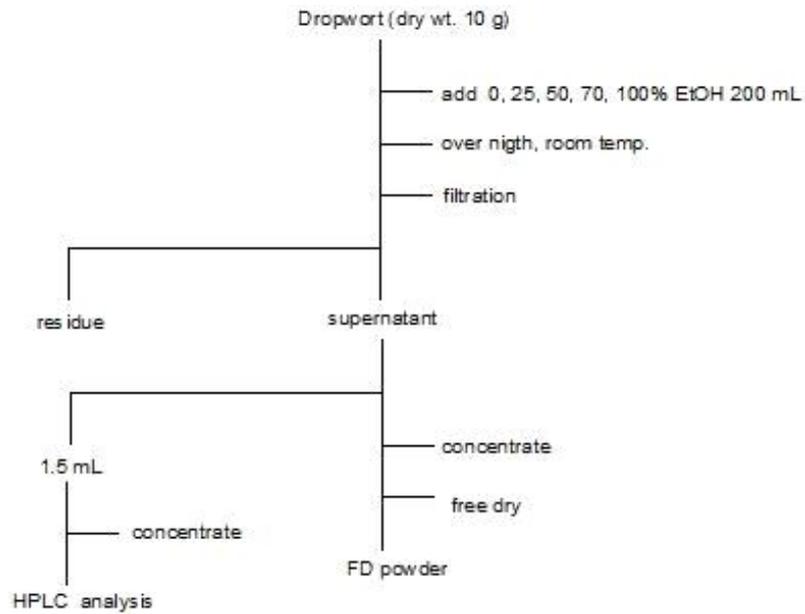


그림 57. 미나리 EtOH 농도별 추출방법

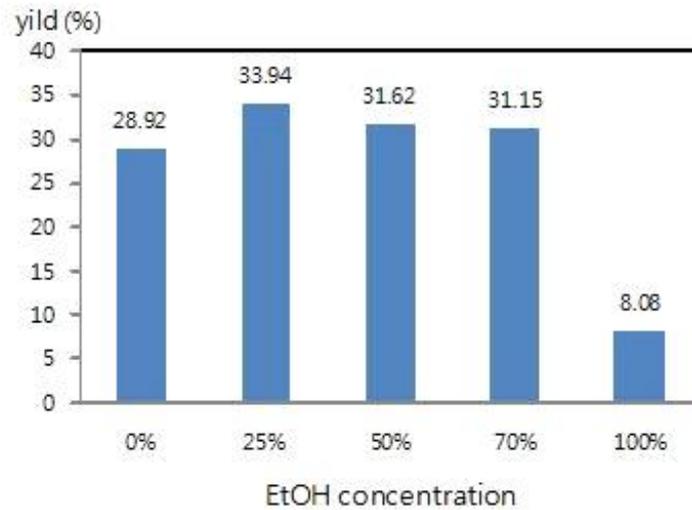


그림 58. 미나리 EtOH 농도별 추출물 수율

미나리에 함유된 화합물의 효율적인 방법을 결정하기 위해 Ethanol 농도별로 추출하여 얻어진 추출분말의 최종 수율을 확인한 결과, 25% EtOH ext.은 약 34%로 가장 높은 추출수율을 나타내었으며, 추출용매의 EtOH 농도가 증가할수록 추출수율도 증가하였으나, 100% EtOH만으로 추출할 경우에는 오히려 추출수율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 미나리에 함유된 수용성 화합물과 비수용성 화합물들이 100% EtOH 추출보다 물과 에탄올이 혼합된 상태에서 더 효율적으로 추출되어지기 때문인 것으로 추측된다. 이들 각각의 추출물에 함유된 화합물의 조성을 확인해 보기 위해 각 추출분말을 대상으로 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC 분석 조건은 아래와 같다.

- HPLC 분석 조건

- Detector: PDA detector
- Column: X bridgr C<sub>18</sub> (4.6× 150 mm, 5 um), Waters
- Column oven temp.: 30°C
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 0.1%TFA 함유 10% MeCN; B, 0.1%TFA 함유 30% MeCN

min	A (%)	B (%)
0	100	0
50	0	100
70	0	100

HPLC-PDA 분석 결과 각 과장별로 다양한 화합물의 peak가 확인되었는데 그중에서도 UV 330 nm에서의 화합물 peak가 가장 다양하고 height도 높았다. 이는 아마도 미나리 추출물에 phenolic 관련 화합물들이 다양하게 함유되어 있기 때문일 것으로 추측되어진다. 330 nm에서 각 추출물들의 화합물 조성을 비교해 보면, 이역시도 추출용매의 EtOH 농도가 증가할수록 peak height와 종류가 더 많아지는 것으로 확인되어지며 100% EtOH로 추출한 경우에는 각 화합물들이 소량씩 추출 되어지는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 미나리에 함유된 화합물들의 추출에 가장 적합한 추출용매는 추출수율이 높으면서 각 화합물들이 가장 효율적으로 추출되어지는 것으로 확인된 70% EtOH을 추출용매로 결정하였다.

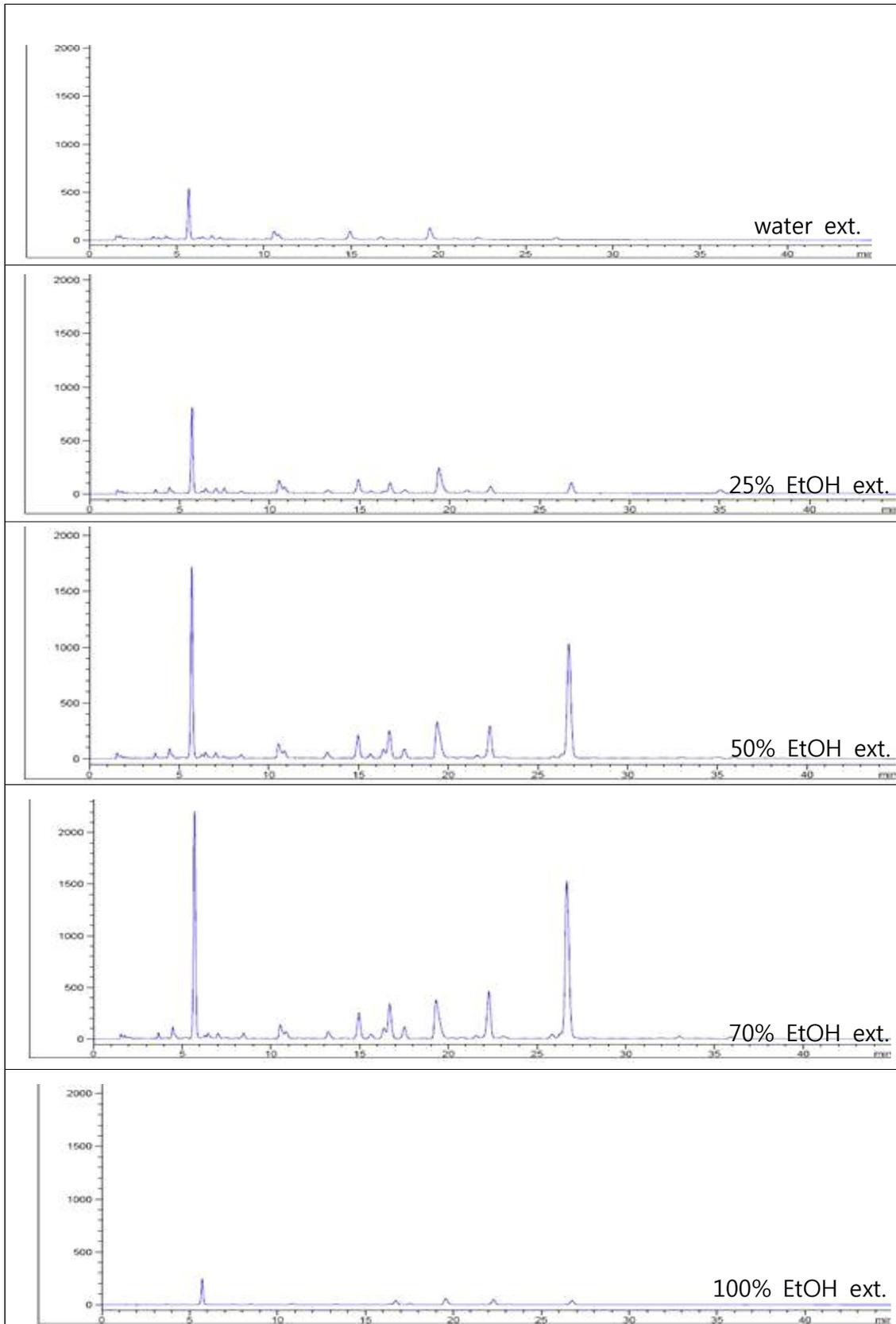


그림 59. EtOH 농도별 추출물의 HPLC Chromatogram

## 나. 재배지역별 화합물 조성의 차이 비교 확인

국내에서 재배되고 있는 미나리가 각 재배지역별로 어떻게 화합물 조성의 차이를 보이는지 확인하기 위해 경기도 (시흥시), 경상북도 (청도군), 충청남도 (부여군), 경남 (의령군), 전라북도 (전주시), 광주광역시, 전라남도 (나주시 노안면) 등에서 재배된 미나리를 각각 구입하였다. 각 지역별로 구입한 미나리를 70% Ethanol로 추출한 후 얻어진 추출분말은 상기의 HPLC 분석을 실시하여 각 추출분말에 함유된 화합물 조성을 확인하였다. 그 결과, 전남 나주에서 재배된 미나리에 가장 다양한 화합물이 다량으로 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 전라북도 전주와 광주광역시에서 재배된 미나리에도 다량의 화합물이 존재함을 확인하였다. 전남 나주시 노안면은 미나리 최대 주산지 중의 한 곳으로 가락시장 유통량의 70%를 차지할 정도이고, 노안 미나리 연합회가 결성되어 연간 약 4,800톤의 미나리를 생산하고 있으며 생산된 미나리의 품질이 일정할 수 있도록 관리하고 있는 실정이어서 전남 나주시 노안지역에서 생산되는 미나리를 사용하는 것으로 하였다.

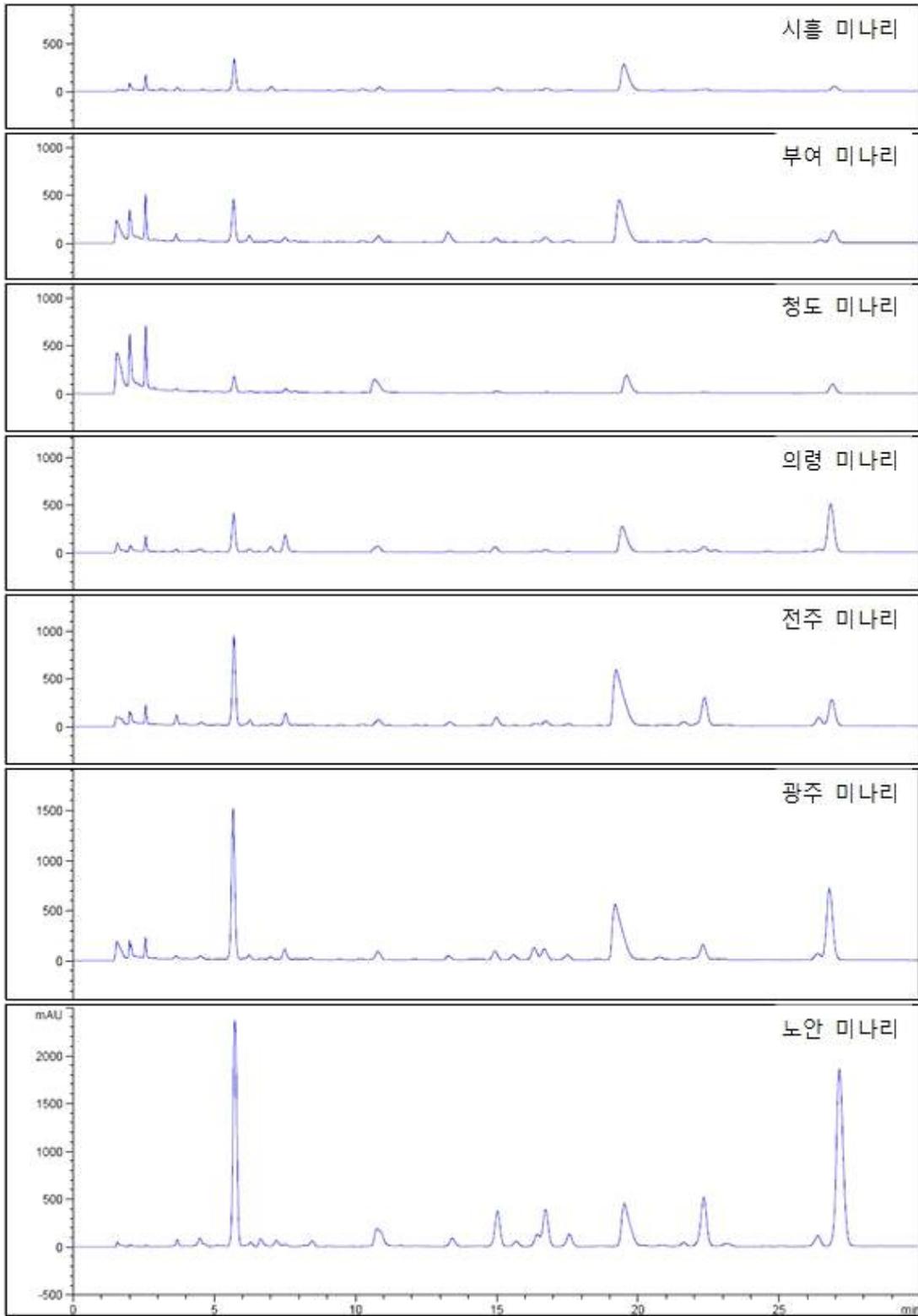


그림 60. 지역별 미나리 HPLC Chromatogram

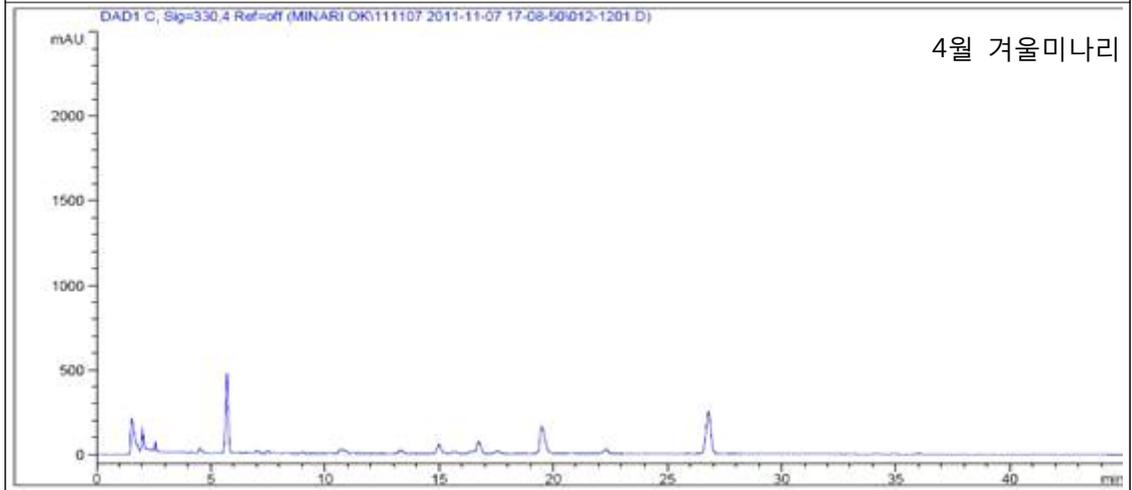
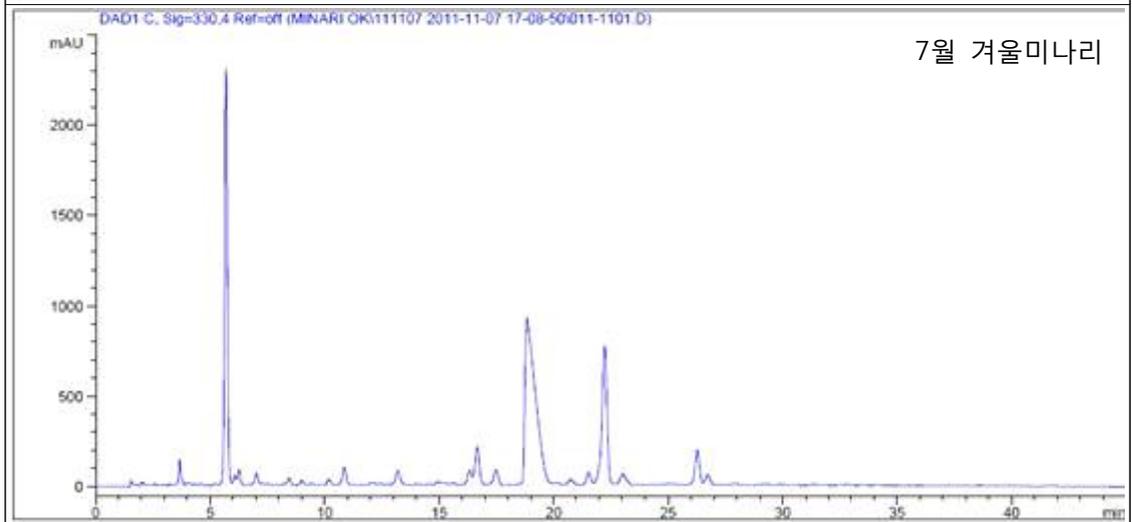
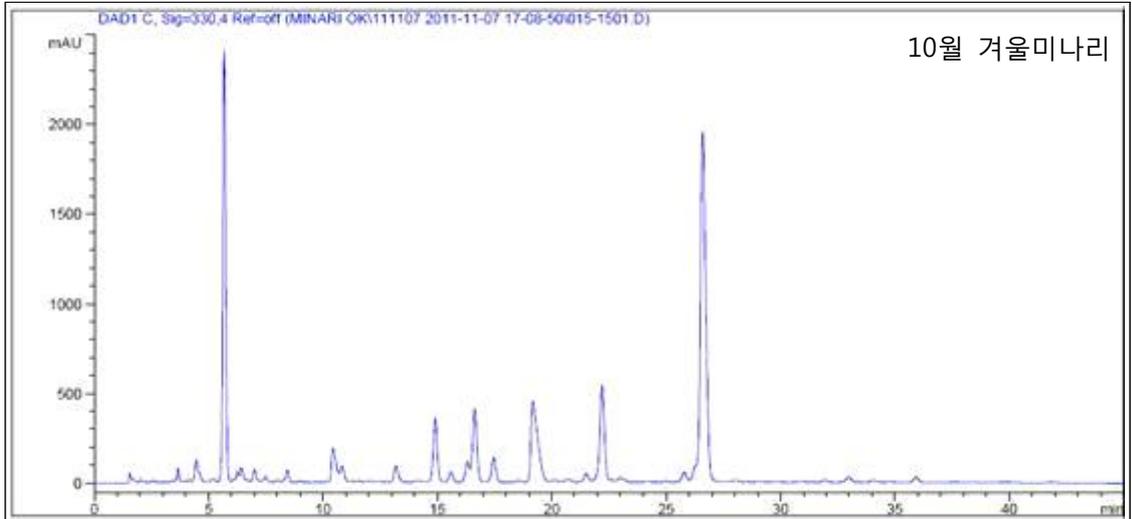
#### 다. 미나리 품종 및 채취시기별 추출물의 조성 비교 확인

미나리는 겨울에서 봄에 주로 식용하는 작물로 수경재배 하는 특징을 가지고 있다. 모종을 확보하여 영양번식을 하는 특징을 가지므로 씨가 없는 상태에서도 재배가 가능하다. 꽃은 주로 7월 초순에서 9월 중순까지 피며 꽃이 핀 이후에 씨를 얻을 수 있다. 미나리의 품종을 구별하기 위해서는 봄부터 여름 사이에 미나리가 자랄 때 줄기의 두께(굵기), 크기, 잎의 상태, 줄기의 색, 개수 등을 확인하여야만 각 미나리의 품종 구분이 가능하지만 현재 국내에서 재배하는 것은 씨를 이용하지 않고 수경재배를 하고 있어서 품종을 구별하기가 쉽지 않았다. 본 과제에서 사용하기로 한 전남 나주시 노안지역에서 보유하고 있는 미나리는 크게 2품종으로 여름미나리와 겨울미나리로 구별하여 구별하고 있으나 외관상으로는 쉽게 식별하기가 어려웠다. 미나리의 품종별 채취시기별 화합물의 조성을 비교하기 위해, 노안지역의 미나리 2품종(여름미나리, 겨울미나리)의 채취시기를 달리하여 (4월, 7월, 10월) 이들 각각을 70% EtOH 톨 추출한 후 얻어진 추출분말에 함유된 화합물의 조성을 비교 확인하였다. 즉, 채취시기를 달리한 미나리를 70% Ethanol로 추출·농축 후 동결건조하여 분말화 하였다. 미나리 70% Ethanol extract powder를 0.05 g을 정밀히 달아 증류수 1 mL에 녹인 후 0.45 um filter 후 HPLC로 분석하였다.

##### - HPLC 분석 방법

- HPLC: Agilent
- Detector: UV detector 330 nm
- Column: X bridgr C<sub>18</sub> (4.6× 150 mm, 5 um), waters
- Column Oven: 30 °C
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, 0.1%TFA 함유 10% MeCN; B, 0.1%TFA 함유 30% MeCN

min	A (%)	B (%)
0	100	0
50	0	100
70	0	100



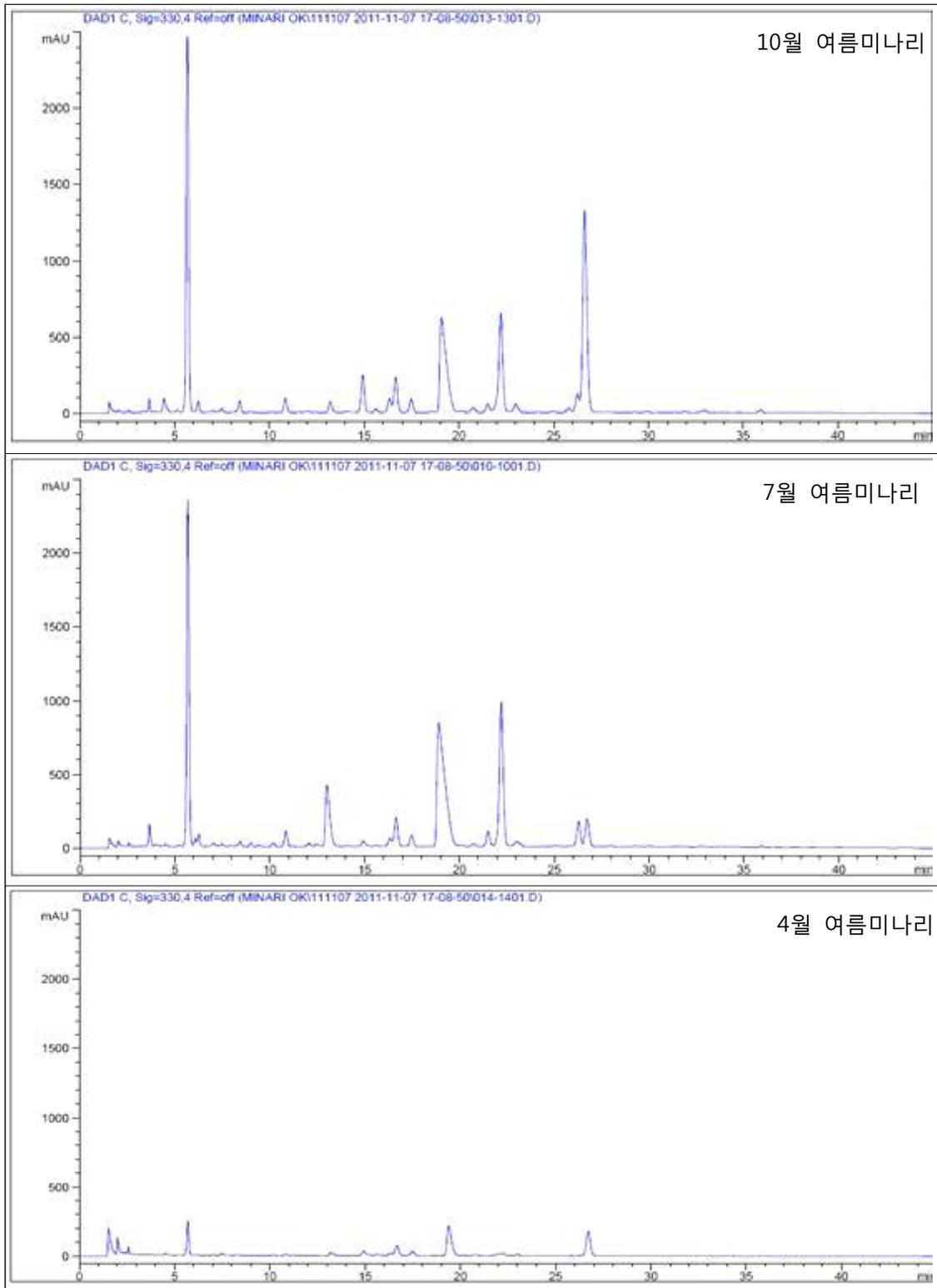


그림 61. 미나리 품종 및 채취시기에 따른 HPLC Chromatogram

HPLC 분석 결과, 미나리 품종(여름미나리, 겨울미나리)의 차이에 의한 화합물의 조성은 차이가 없으며, 미나리의 채취시기에 의해 화합물의 함량의 변화가 나타나는 것을 알 수 있었다. 즉, 4월에 수확한 미나리에 함유된 화합물이 다양하지 않고 그 양도 많이 함유되어 있지 않으나, 10월에 수확한 미나리의 경우에는 다양한 화합물이 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

#### 라. 미나리 건조방법 차이에 의한 성분 조성의 변화 여부 확인

미나리 수확 후 장기 보관을 하기 위해서는 건조하여 보관하여야 한다. 일반적으로 작물을 건조하는 방법으로는 여러 가지가 있지만 대개의 경우 동결건조 또는 열풍건조를 이용하여 건조를 진행한다. 동결건조는 화합물의 변화를 최소화 하지만 건조비용이 많이 들어서 경제적이기 못하다는 단점이 있다. 열풍건조는 동결건조에 비해 건조비용은 적게 들지만, 고온에서 건조를 하기 때문에 열에 의한 화합물의 변화가 일어날 수 있다는 것이 단점이다. 이에, 미나리 원재료를 건조하여 보관하고자 할 때 열풍건조를 실시할 때와 동결건조를 실시하였을 때 건조에 의한 화합물의 변화가 일어나는지를 확인해 보고자, 수확한 미나리의 건조방법을 달리하여 건조 시킨 후(열풍건조, 동결건조) 이를 70% EtOH로 추출하여 HPLC 분석을 실시하여 화합물의 변화 여부를 확인하였다.

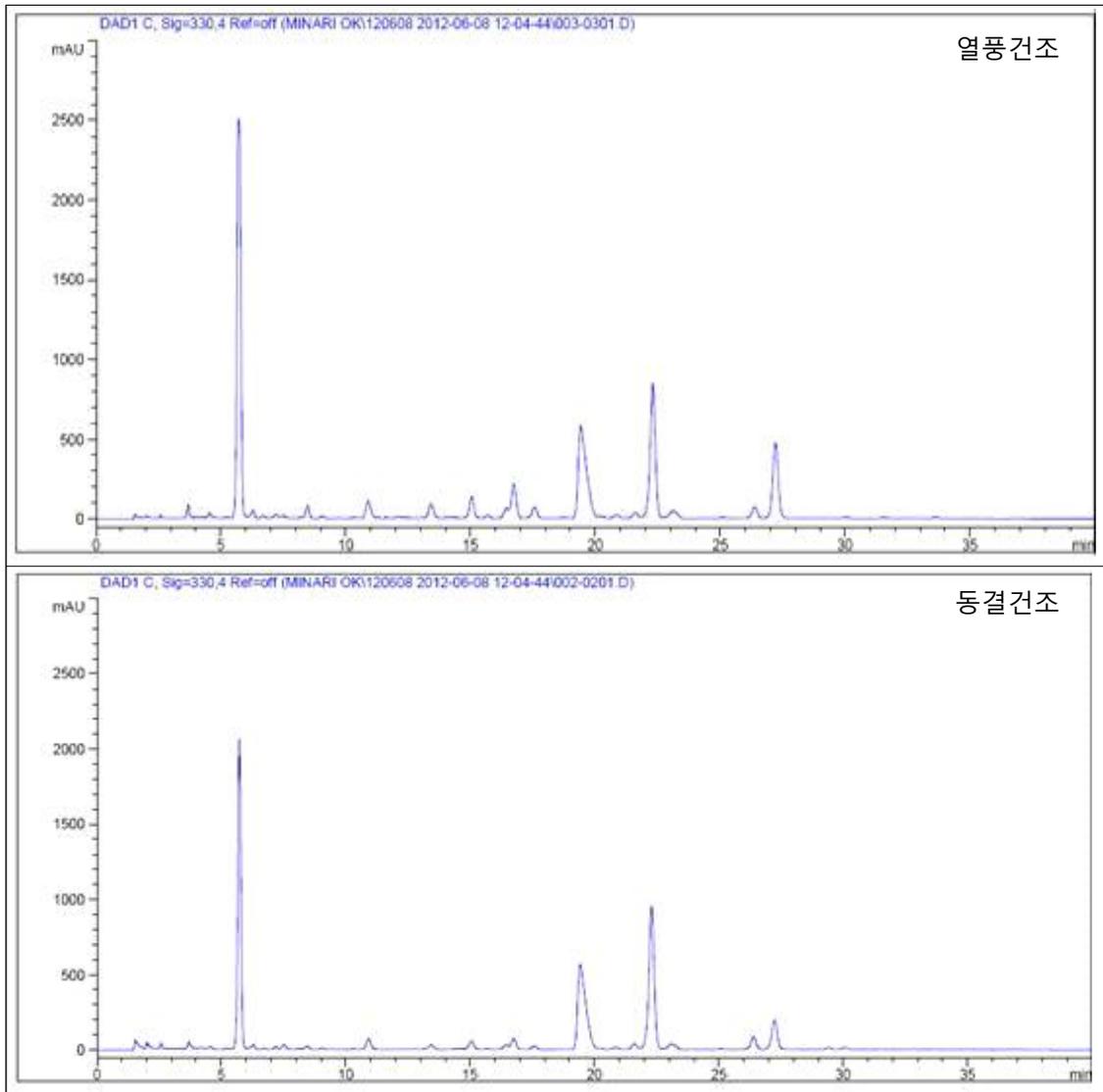


그림 62. 미나리 건조 방법에 따른 HPLC Chromatogram

5월에 수확한 미나리를 건조방법을 달리하여 추출하여 얻어진 추출물을 HPLC분석을 실시한 결과, 열풍건조하였을 때와 동결건조 하미나리 건조방법에 의한 차이를 확인 한 결과, 각 화합물의 종류에 따라 열에 의한 변화정도가 약간은 상이함을 알 수 있었다. 즉  $t_R$  22.5분의 peak는 열풍건조에 의해 화합물의 함량이 약간 감소하는 것을 확인 할 수 있었으나,  $t_R$  5.8분의 peak의 경우에는 동결건조일 때 화합물의 함량이 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 건조방법의 차이에 의해 화합물의 함량이 약간 감소하는 경우도 있었으나 전체적인 생산 비용등과 같은 경제적인 측면을 고려해 볼 때 건조 비용과 시간이 많이 소요되는 동결건조를 하는 것 보다는 비용과 시간적인 면에 있어서 훨씬 경제적일 수 있는 열풍건조에 의해 미나리를 건조하여 보관하는 것이 더 적합한 것으로 판단되어진다.

## 제 5 절 미나리 추출 원료의 제형 연구

### 1. 원료 및 제품 시제품 제작을 위한 제형 연구 개발

가. 원료 제품 제형연구 :

(1) 목적 : 최적의 기능성 및 안전성, 안정성, 생산성(표준공정)이 확립된 공정을 개발하고 하는데 목적이 있다.

(2)세부 연구내용 : a. 공정확립 및 표준 제조공정 확립  
b. 확립된 제조공정에 의한 영양성분 변화 연구

나. 완제품 제형연구 :

(1) 목적: a. 미나리 원료가 들어간 제품을 만들기 위한 분말제형의 최적 제형을 개발 하는데 그 첫 번째 목적이 있다.

b. 기능성 제품 생산 계획에 맞춰 미나리 시제품-타정(Tablet) concept 제품의 제형 연구를 통한 최적의 제형을 개발하는데 그 두 번째 목적이 있다.

다. 제형 연구 개발 기간 : 2012.02.13~ 2013.03.30

라. 원재료명 : 미나리(*Oenanthe javanica*)

마. 원료구입 및 확보 :

본 연구를 수행을 위하여 전라남도 나주시 노안면, 미나리작목반의 협조로 생 미나리 및 건조 미나리를 구입하여 연구에 사용하였다.

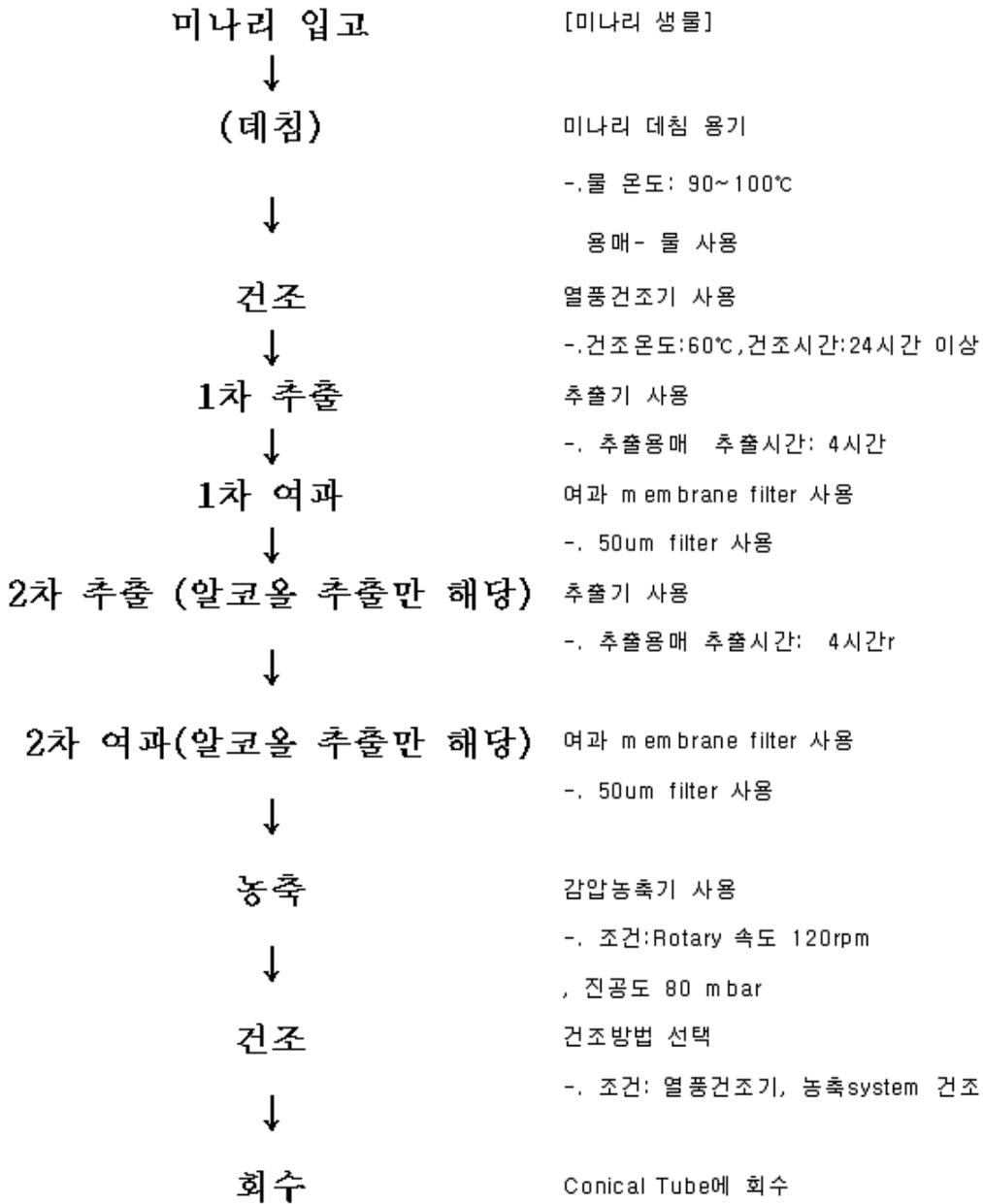
바. 기본고정도 :

세척, 데치기(Blanching), 원물건조, 1차 추출, 2차추출, 농축, 건조

사. 공정별 특이사항 :

추출용매조건 연구, 추출온도 설정, 데치기 시간 및 온도 설정, 건조 온도설정 등 각각의 공정 별 시간, 농도, 온도, 투입량 등 세부적 연구가 필요함.

아. 원료 제품 공정 연구 기본 공정도 :



자. 공정별 이미지

- 데치기, 추출, 농축 조건 검토



(선별 및 세척 공정)



(측량 공정)



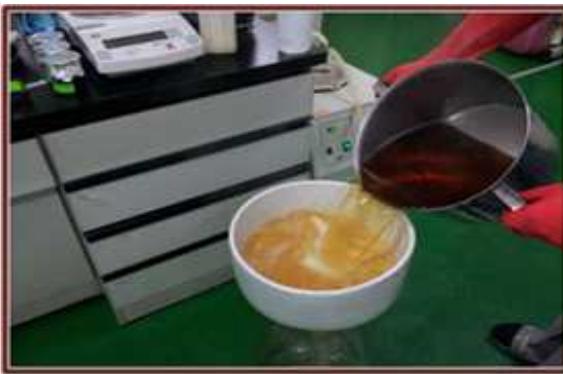
(Blanching, 데치기 공정)



( 데침 미나리 건조 공정)



(추출 공정)



(여과 공정)



(농축 공정)



(회수 공정)



(농축액 Sample)

- 건조방법 검토



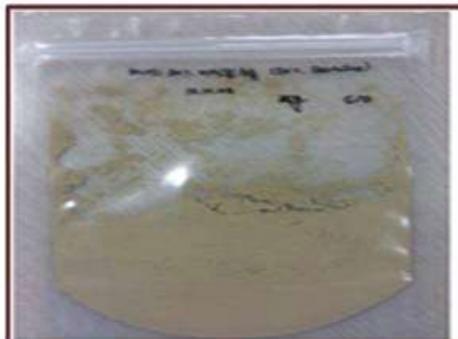
(진공건조 V/D, 건조 방법)



(진공건조 Sample)



(분무건조 S/D, 건조 방법)



(분무건조 Sample)

그림 63. 미나리 추출 공정 과정

차. 공정연구 결과

(1) 공정확립 및 표준 제조공정 확립

구분	추출방법		데침 유무	건조방법		결과	수율 (%)
	알코올 vs 열수			S/D vs V/D			
Sample1	알코올		O	V/D		분말화X	3.27
Sample2	알코올		X	V/D		분말화X	3.11
Sample3	알코올		O	S/D		분말화X	2.96
Sample4	알코올		X	S/D		분말화X	3.01
Sample5	열수		O	V/D		분말화O	3.58
Sample6	열수		X	V/D		분말화O	4.00
Sample7	열수		O	S/D		분말화O	4.02
Sample8	열수		X	S/D		분말화O	4.10

표 25. 미나리 원료제품 공정 연구 Sample 별 분말화 가능성 평가표

(가) 데치기 공정 검토 결과 데치기를 하는 공정과 하지 않은 공정에서의 수율차가 매우 크게 나타났다.

(나) 추출용매 조건 검토 결과 최적의 조건은 50%에탄올 추출에서 작업성과 수율에 적합한 것을 판단된다.

(다) 건조 분말 조건 검토에서 열풍건조, 동결건조, 진공건조, 분무건조 방법을 검토한 결과 분무건조에서 높은 수율을 얻을 수 있었으며, 작업성 검토 결과 Dextrin을 부형제로 선택하고, 미나리 추출물과 Dextrin을 각각 1: 1로 혼합하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

(2) 확립된 제조공정에 의한 영양성분 변화 연구

시험항목	시 료									
	Water		Alchol(20%)		Alchol(50%)		Alcohol(80%)		Alcohol(95%)	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
수율(%)	41.46	0.44	44.04	0.64	44.67	0.51	41.07	0.44	31.00	0.44

표 26. 미나리 원료제품 추출용매조건 검토에 의한 수율 변화

시험항목	시 료									
	Water		Alchol(20%)		Alchol(50%)		Alcohol(80%)		Alcohol(95%)	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준편 차
열량 (Kcal/100g)	116.84	0.24	113.25	0.20	112.25	0.12	119.03	0.06	98.55	0.087
탄수화물 (g/100g)	21.76	0.32	21.27	0.22	19.60	0.10	19.08	0.03	15.64	0.054
식이섬유 (g/100g)	2.06	0.22	1.17	0.10	1.75	0.07	0.32	0.04	0.06	0.039
당류(g/100g)	15.97	0.21	13.93	0.06	14.42	0.08	16.58	0.04	5.35	0.072
단백질(g/100g)	8.05	0.23	6.69	0.17	6.76	0.05	6.52	0.04	4.14	0.044
지방(g/100g)	0.18	0.07	0.39	0.02	2.25	0.04	1.89	0.04	2.17	0.027
나트륨 (mg/100g)	359.74	0.20	360.20	0.12	342.51	0.03	281.01	0.03	106.81	0.064
비타민A( $\mu$ g R.E/100g)	9.70	0.09	12.47	0.08	45.20	0.05	22.03	0.04	52.10	0.049
비타민 C(mg/100g)	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
칼슘(mg/100g)	22.84	0.15	21.82	0.12	14.98	0.05	0.51	0.04	0.30	0.048
철(mg/100g)	8.24	0.15	5.21	0.05	4.60	0.06	2.24	0.03	0.42	0.044

표 27. 미나리 원료제품 추출용매조건 검토에 의한 영양성분 변화

(가) 미나리 원료제품 추출용매조건 검토에 의한 수율변화에서 알코올의 농도가 높을수록 수율이 낮아지는 것을 확인하였다.

(나) 미나리 원료제품 추출용매조건 검토에 의한 영양성분변화에서 알코올 농도가 높을수록 영양성분의 손실이 높은 것을 확인하였다.

(다) 따라서 최적의 추출용매 조건은 50% 알코올 농도에서 수율 및 영양성분이 최적의 조건임을 확인하였다.

#### 카. 최종제품 제형연구

##### ① 공정별 이미지



(원료 칭량 및 혼합)



(혼합 및 과립)



(과립 후 건조)



(타정기 이미지)



(타정 작업)



(Sample 회수)



(최종 제품 이미지)



(경도 측정)



(연속 타정 시험 생산)

그림 64. 최종제품 제형 연구 공정 과정

다. 최종제품 제형연구 결과

구분	세부	원료투입량(g)	용매투입량(g)	전체 용량(g)	건조(시간)	잔량(g)	비고
HPMC 용액	HPMC+95%용매 (4시간용해)	6.674	37.429	70	30분	70	
HPMC용액을 이용한연합	HPMC+95%용매 (30분)	100	26	150	25분	80	

표 28. 미나리 최종제품 HPMC(결합제)를 이용한 과립 조건

구분	세부	원료투입량(g)	용매투입량(g)	전체 용량(g)	잔량(g)	건조시간(분)	비고
결합제(용매)	95%EtOH	100	11	20	11	20분	
	90%EtOH	100	9.713	21.6	11.887	27분	
	85%EtOH	100	9.803	22.5	12.687	47분	
	80%EtOH	100	15.556	24.206	8.65	55분	

표 29. 미나리 최종제품 알코올 용매(EtOH-95%, 90%, 85%, 80%) 농도별 과립 조건

구분	세부	원료투입량(g)	HPMC 용액투입량(g)	D.W. 투입량(g)	혼합용매투입량(g)	잔량(g)	건조시간(분)	결론
결합제(분말)	HPMC1	50	5	3.710	7.42	40.29	25	X
	HPMC2	50	10	2.186	10.2	32.19	30	O
	HPMC3	50	15	1.243	13	35	45	X
	HPMC4	50	20	1.453	15	40	50	X
	HPMC5	50	25	2.120	16	42	60	X

표 30. 미나리 최종제품 HPMC 및 용매 혼합(\*HPMC 배합비에 용매 Water 첨가) 조건

- (1) 결합제의 Factor를 분말형태의 HPMC 와 용매 EtOH로 선정하여 경우의 수를 설정하였다.
- (2) 먼저 HPMC를 95% EtOH로 용해해서 결합제로 썼을 때를 포함하여 용매인 95% EtOH의 경우에는 연합 및 건조까지 적절하게 이루어져 타정을 찍었지만 경도가 약해 약한 힘에도 부스러졌다.
- (3) 90%~80% EtOH 사이에서 5%로 차이로 물의 함량을 높임에 따라 연합공정에서의 연합의 용이성이 점점 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 90%~80% EtOH에서는 80%~85% EtOH에서 물의 함량을 조금 더 세밀하게 단계적으로 높여나간다면 경도성이 좋아질 것으로 판단된다.
- (4) 위의 두 Factor를 혼용하여 HPMC를 95% EtOH에 용해시킨 용액에 물의 함량을 높여 타정 경도를 확인한 결과 Factor 단독으로 사용하는 것보다 더 좋은 경도를 얻을 수 있었다.
- (5) 특히 HPMC 함량을 조금 더 높이고 여기에 물의 양을 정량적으로 조절하여 결합제로써 적절하게 사용함으로써 타정에 적합한 경도를 얻을 수 있었다.
- (6) 따라서 최종제품의 제형연구 결과 HPLC (결합제) 10g과 물 2.18g 혼합의 조건에서 최적의 경도를 유지하는 제품으로 개발이 가능할 것으로 판단된다.

## 제 6 절 미나리 추출 원료의 안전성 평가를 통한 원료의 유통기한 설정

### 1. 미나리 추출물의 장기보존에 따른 지표물질의 안정성시험

미나리 추출물의 장기보존에 따른 지표물질의 안정성을 확인하기 위하여 미나리 추출물을  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 장기보관하면서 일정한 시기별로 sampling하여 앞에서 검증된 시험법과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

지표성분명	기준값	적합범위 (80~120%)
Isorhamnetin	1.743	1.39 ~ 2.09

표 31. 지표성분 기준 및 적합범위

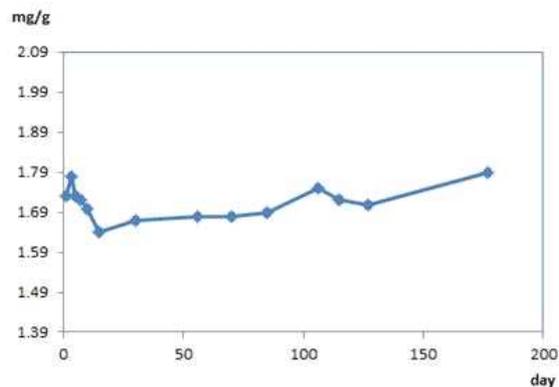


그림 65. 저장기간에 따른 Isorhamnetin의 변화

저장기간( day)	Isorhamnetin( mg/g)	표준편차 (mg/g)	상대값*(%)
1	1.73	0.060	100.0
3	1.78	0.075	102.9
5	1.73	0.074	100.0
7	1.72	0.051	99.4
10	1.7	0.031	98.3
15	1.64	0.013	94.8
30	1.67	0.064	96.5
56	1.68	0.068	97.1
70	1.68	0.054	97.1
85	1.69	0.050	97.7
106	1.75	0.059	101.2
115	1.72	0.048	99.4
127	1.71	0.069	98.8
177	1.79	0.119	103.5

표 32. 저장기간에 따른 Isorhamnetin의 변화

\*: 1일을 100%로 볼 때 상대값, %

미나리 추출물을 25±2℃에서 장기보관하면서 시료를 수거하여 육안으로 성상을 확인하고 미나리 추출물의 지표성분인 Isorhamnetin의 함량을 측정하였다. HPLC를 통하여 분석한 결과, 1.39~2.09 mg/g으로 설정된 지표성분 함량기준에 적합하였다. 저장초기 시료의 Isorhamnetin의 함량을 100%로 볼 때, 약 6개월 동안 저장된 미나리 추출물은 모두 90%이상 유지되어 6개월까지는 안정성을 확보하였다. 미나리추출물의 안정성시험은 12개월 까지 실시 될 예정이며, 현재 6개월까지의 결과를 토대로 미나리 추출물은 상온에서 6개월까지는 안정하게 품질을 유지하고 있는 것으로 판단된다.

# 제 7 절 미나리 추출 원료의 시제품 생산

## 1. 제품 개발 계획서 및 계획(안)

### 가. CONCEPT

- (1) 제품유형: 건강기능식품 액상제품 및 타정제품 (홍삼 + 비타민 C, 복합제품)
- (2) 기능성: 홍삼 (피로회복/ 면역력 증진/ 혈소관응집억제를 통한 혈행/ 기억력 개선) 비타민C (결합조직 형성과 기능성유지/ 철의 흡수에 필요/ 유해산소로부터 세포 보호), 농림부과제 수행 원료 (미나리: 기억력 개선 후보 물질)
- (3) 섭취대상: 성인을 위한 복합제품
- (4) 농림부과제 수행원료인 미나리 추출분말은 알코올에 의해 손상된 기억력에 관한 개선 효과에 관하여 연구를 수행하였으며, 본 개발제품은 성인을 위한 복합제품으로서 개발하고자 한다.

### 나. 개발 계획

항목 \ 일정	1월		2월				3월				4월				5월		비 고
	4주	5주	1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주	1주	2주	
제품검토 및 확정			←→														
원료표준화 및 원료생산(미나리)							←→										
OEM사 선정			←→														
시제품 제작 및 제형연구									←→								
품목제조신고													←→				
포장재 디자인 및 제작																	
제품제조														←→			
자가품질검사																	←→
출고																	←→

표 33. 제품 생산 계획 (1~5월)

항목 \ 일정	2월				3월				
	1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주	
제조공정 확정		←→							
품질 확정		←→							
OEM사와 공정 검토				←→					
분말제품 품목신고 (일반식품)				←→					
생산						←→			

표 34. 미나리추출분말 대량생산 계획

다. 신제품 개발 계획(안)

제품명		홍삼제품(I)	홍삼제품(II)	비타민제품		
제품	식품의 유형	홍삼+비타민C	홍삼+비타민C	복합비타민		
	제형	액상제품	액상제품	액상제품		
	내용량	75ml×30개입	75ml×30개입	750mg×60개입		
	포장방법	유리병+지상자	유리병+지상자	LDPE+지상자	갈색의 2중캡	
	섭취량	1일 1회, 1개월분	1일 1회, 1개월분	1일 1회, 1개월분		
개요	주원료	홍삼농축액 비타민 C 미나리추출분말 구연산(산도조절제) 타우린	홍삼농축액 비타민 C 미나리추출분말 구연산(산도조절제) 타우린	비타민 C 비타민 B2 비타민 B6 산화아연 미나리추출분말		
원가	제조원가(원/세트)	12,367	12,345	6,514		
	원료부분	5,860	5,838	3,099		
	포장부분	4,329	4,329	1,525		
	노무비부분	2,178	2,178	1,890		
	일반관리비(30%)	이윤(30%)	3,710	3,704	1,954	
		이윤(30%)	3,710	3,704	1,954	
		총제조원가	19,787	19,752	10,422	
	1섭취량단가	659.6	658.4	347.4		
미나리 1회 섭취량	800mg	800mg	800mg			

표 35. 홍삼 및 비타민 신제품 개발 계획

※ 위의 금액은 일반적인 예상치이며, 수량 등에 따라 변동될 수 있음.

※ 원료부분은 당사에서 최소 포장단위 구매와 OEM사에 모든 것을 위임하는 방법으로 구분할 수 있음.

라. 기타

- 제품의 품목별 성분배합비 및 원가분석표는 별첨 참조.
- 단, 원부재료는 변경될 수 있음.

마. 원료 및 제품 시제품 개발 전 시장조사

(1) 원료 시제품 제작 시장조사-미나리

제품명	포장 단위	가격		제조사	식품 유형	원재료명 및 함량
발미나리즙 (돌미나리, 불미나리)	110ml ±10ml	30봉	29,000	정우당	액상차	발미나리 100% (국내산)
		60봉	49,000			
		120봉	90,000			
발미나리 인진쑥즙	110ml ±10ml	60봉	39,000	정우당	액상차	발미나리 70% (국내산) + 인진쑥 30% (국내산)
		120봉	70,000			
돌미나리환	300g		12,500	정우당	기타 가공품	돌미나리 80% (국산) 찹쌀 10% 맥아 5% 포도당 5%
청도한채 미나리 청	500ml, 700ml	500ml	25,900	한채미나리 작목회	액상차	미나리 엑기스 (미나리 60% 국산)
돌미나리즙	120ml x 20팩		18,000	장명식품		국내산 돌미나리 100% (자연재배/무농약재배)
마시는 미나리	120ml x 30EA		40,000	팔공산미 나리	액상 추출차	발효미나리(국산) 30% 생미나리(국산) 70%
돌미나리즙	120ml x 20팩		18,000	갑당약초		국내산 돌미나리 100% (자연재배 또는 무농약재배)
가이아	750ml x 3병	1병	35,000	자라뫼효 소	기타 발효 음료	유기농미나리 60%(국내산), 유기농설탕 40% (유기농원료100%)
		2병	65,000			
		3병	95,000			
A+ 미나리의 소망	500ml, 700ml	2ea 1set	25,000	새얼바이 오프드(주)	음료 (병)	EnvironmentfriendlyWaterDropwor textract54.3%,Liquefiedfruitsugar, Isomaltooligosaccharide,Enzymaticall yModifiedSteviaGlucosylStevia, andcitricacid
		3ea 1set	35,000			
A+ 미나리의 소망	340ml, 500ml	340ml	1,200	새얼바이 오프드(주)	음료 (PET)	EnvironmentfriendlyWaterDropwor textract26.5%,citricacid,Purifiedwater, Refinedsugar,Isomaltooligosaccharide
A+ 간편한 미나리	75ml	1ea	3,000	새얼바이 오프드(주)	음료 (병)	EnvironmentfriendlyWaterDropwor textract76%,citricacid,concentrateof Hoveniadulcis1%,Isomaltooligosacch aride,lotusleafextract,Enzymaticall yModifiedSteviaGlucosyl
사리수	500ml	1ea	2,000	새얼바이 오프드(주)	음료 (PET)	EnvironmentfriendlyWaterDropwor textract20%,citricacid,Agavesirup, VitaminC,Purifiedwater
비타민	340ml		1,500	새얼바이 오프드(주)	음료 (PET)	EnvironmentfriendlyWaterDropwor textract91.32%,citricacid,Inositol, EnzymaticalllyModifiedStevia,highfru ctosecornsyrup,Appleconcentrate, syntheticflavoring
미나리 수	700ml		45,000	비슬청록 농장	음료 (병)	미나리엑기스(국내산) 95%, 올리고당, 구연산
미나리 수 콜드	700ml		55,000	비슬청록 농장	음료 (병)	미나리엑기스(국내산) 95%, 올리고당, 구연산

표 36. 미나리 원료의 시제품 제작 시장조사 현황

(2) 제품 시제품 제작 시장조사-홍삼

제품명	포장단위		가격	제조사	식품유형
홍삼하나통째로	120ml x 10병	병	25000	금산덕원인삼 약초 영농조합법인/ 삼시대	일반식품
홍삼식혜	238ml x 12캔	캔	15000	금산덕원인삼 약초 영농조합법인/ 삼시대	일반식품
홍삼액PLUS	90ml x 50포	파우치	88000	금산덕원인삼 약초 영농조합법인/ 삼시대	일반식품
홍삼액GOLD	50ml x 30포	파우치	59000	금산덕원인삼 약초 영농조합법인/ 삼시대	일반식품
	50ml x 60포		110000		
홍삼액	80ml x 40포	파우치	89000	금산덕원인삼 약초 영농조합법인/ 삼시대	일반식품
	80ml x 60포		120000		
홍삼원세트	50ml x 60포	파우치	49,000	(주)한국인삼공사	홍삼음료
홍삼원세트	70ml x 30포	파우치	33,000	(주)한국인삼공사	홍삼음료
홍삼원골드세트	100ml x 24포	파우치	42,000	(주)한국인삼공사	홍삼음료
홍삼원 마일드	180ml x 30캔	캔	27,000	(주)한국인삼공사	혼합음료
활기력	20ml x 10병	병	27,000	(주)한국인삼공사	홍삼음료
홍삼진액수	75ml x 14병	병	33,900	정관장	홍삼음료
지강인 홍예당	80ml x 60포	파우치	122,500	금산홍삼랜드	건강기능식품 (식후 혈당상승억제, 콜레스테롤 개선)
지강인 홍기생 파워	80ml x 60포	파우치	103,500	금산홍삼랜드	건강기능식품(기 억력개선과면역력 증신에도움을주고 피로개선과혈소판 응집억제를 통한혈 액흐름에도움)
고려 6년근 적외선 홍삼액 (GOLD)	90ml x 15포 x 4box	파우치	160,000	금산인삼몰	일반식품
삼이랑	90ml x 60포	파우치	90,000	금산농협가공 사업소	일반식품
6년근 홍삼 키트 (어린이용)	70ml x 60포	파우치	72,000	대한고려홍삼 공사	홍삼음료
6년홍삼동충하초	50ml x 10병	병	28,000	고려인삼주식 회사	홍삼음료
아침홍삼	70ml	파우치	2,900	풀무원건강생 활(주)	홍삼추출액
힘찬홍삼	80ml	파우치	2,000	풀무원건강생 활(주)	홍삼음료

이가홍삼 진골드 홍삼액	90ml x 50포	파우치	74,500	이가홍삼	일반식품
진산삼배양근	75ml x 10병	병	18,000	종근당건강	홍삼음료

홍삼한뿌리	120ml x 10병	병	29,000	(주)렉스진바이오테크	일반식품
천년산삼	75ml x 10병	병	24,000	(주)일화	홍삼음료
황제의 꿈	75ml x 15개입	병	89,000	(주)태경식품	홍삼음료
홍삼진액	100ml x 50병	병	74,800	광동제약	홍삼음료
황진단액	50ml x 2병	병	70,000	정관장	
리얼레드	250ml	캔	2,000	정관장	
홍삼비타	100ml	병	900	정관장	
홍삼수 그린	330ml	PET	1,300	정관장	
홍삼수 오리지널	330ml	PET	1,300	정관장	
뿌리째 진한 6년근 홍삼	120ml	병	4,000	정관장	
정관장 홍삼원골드	100 ml x 24	파우치	26,900	정관장	
정관장 활삼28 (활력28)	50 ml x 10	병	50,000	정관장	
홍삼정마일드	120g		59,000	굿베이스	
홍삼추출액 순	70ml x 30포	파우치	79,000	굿베이스	
홍삼 에너지업	40ml x 30포	파우치	56,000	굿베이스	
홍삼리프레쉬	40ml x 30포	파우치	56,000	굿베이스	
홍삼이랑 키즈	4g x 90정		38,000	굿베이스	
홍삼이랑 튼튼	20ml x 7포 x 4세트		77,000	굿베이스	
홍삼이랑 쑥쑥	30ml x 7포 x 4세트		88,000	굿베이스	
홍삼 틴케어	40 ml x 28포		96,000	굿베이스	
장쾌삼 발효홍삼 활력헛개	50 ml x 30	파우치	35,000	웅진식품	건강기능식품
한삼인 홍삼활력 플러스	60 ml x 30	파우치	46,000	(주)농협한삼인	홍삼음료
홍력	50 ml x 60	파우치	66,000	정관장	

표 37. 홍삼 시제품 제작의 시장조사

(3) 제품 시제품 제작 시장조사-활력

제품명	포장단위		가격	제조사	식품유형
VigRX Premium Gold	677.5mg x 90	캡슐	248000	GFR PHARMA LTD	건강기능식품(아연보충용제품)
에너지트Z	1100mg x 120 경		117000	EnerZet herbal formula	건강기능식품(홍삼성분함유제품)
EnerZet Plex	1000mg x 120 경		149000	EnerZet herbal formula	건강기능식품(홍삼성분함유제품)
에너지트 스테민엑스	40g x 10포 x 3케이스		129,000	EnerZet herbal formula	기타가공품
에너지트 보체 공보단	1세트 3g x 60포		198,000	EnerZet herbal formula	기타가공품
명품 홍삼오자환골드	230g	환	38,000	주식회사 도화	기타가공품
활기단	3.75 g x 10	환	30,000	정관장	
활기력	20 ml x 10	병	27,000	정관장	
활력블루	50 ml x 60	파우치	-	정관장	
아사이베리포르테	70 ml x 10	파우치	99,000	고려인삼제품	과.체가공품
굿모닝 산수유 적외선 추출액	100 ml x 30	파우치	39,900	엘루나코리아(주)	
활력 산수유진액	80 ml x 30	파우치	18,000	월드바이오텍	추출음료
정관장레드맥스	70 ml x 60	파우치	280,000	한국인삼공사	기타홍삼식품
유한쏘팔메토	500mg x 120	캡슐	80,000	유한양행	건강기능식품(전립선 건강을 유지하는데 도움을 줄 수 있습니다.)
남자한테 참좋은 마시는 산수유진액	80 ml x 60	파우치	128,000	천호식품(주)	가공식품_액상
오자차	110ml x 60포	파우치	80,000	장명식품	액상차(액상의 기호성 식품)
오자환	600g	환	22,000	한우리약초	기타가공식품
남자라면 발효 오자환	100g	환	15,900	장생가	기타가공품(환제)

표 38. 활력제품 시제품 제작 시장조사

2. 원료 시제품 제작 결과 보고

가. 수행 세부 정보

- (1) 제품 유형 : 일반식품 분말제품
- (2) 개발 기간 : 2012.01.08. ~ 2013.04.10 까지
- (3) 수행 내용 : 전라남도 나주 노안면의 미나리 작목반과의 협조를 얻어 미나리를 구입하여 열풍 건조 후 시제품 제작 원료로 사용하였다.
- (4) 제작 업체 : 춘천바이오 산업 진흥원
- (5) 시제품 생산 제조 공정도

미나리 입고	[미나리 생물로써 100kg]
↓	
건조	열풍건조기 사용 -. 건조온도:60℃, 건조시간:24시간 이상
↓	
1차 추출	추출기 사용 -. 추출용매 50% 알코올, 추출시간: 4hr
↓	
여과	여과 membrane filter 사용 -. 50um filter 사용
↓	
2차 추출	추출기 사용 -. 추출용매 50% 알코올, 추출시간: 4hr
↓	
여과	여과 membrane filter 사용 -. 50um filter 사용
↓	
농축	NC(자연순환)농축기 사용 -. 조건: 70℃, 500rpm
↓	
혼합	반응조(혼합탱크) 사용(텍스트린 첨가)
↓	
살균	살균 반응조(탱크) 사용 -. 조건: 90℃, 10분
↓	
건조	Spray Dryer 사용 -. 조건: Inlet 150~180℃ Outlet 92℃
↓	
포장	PE 비닐에 포장(1kg 단위)

(6) 시제품 제작 이미지 (원료)



[미나리추출분말, 내포장(AL+PE), 외포장(지박스)]



[미나리추출분말/ 성상]



[내 포장(AL+PE)]



[외포장(지박스)]

그림 66. 시제품 제작을 위한 원료 이미지

나. 시제품 제작 과제 수행 결과물(원료)

(1) 품목제조보고대장

### 품목제조보고대장

1. 품목제조보고사항 영입신고번호 제 190 호

품목보고번호	000012	제 품 명	미니리주송농축분양		업 소 명	(주)농성인프로그리아	
·식별명 유형 (식별호)	기타가공품 (개별)	·보고일자	2013-04-12				
	규격외일반가공식품 (개별)						
원재료 또는 성분명 및 첨가물명	미니리(곡산) 100%						
·성	분말						
·포장방법 (단위)	PE포장, 500g, 1kg, 5kg, 10kg, 20kg, 25kg, 50kg						
·용도용법	식품제조 원재료						
유통기간	제조일로부터24개월까지	·품질 유지기간					
·제조업체주소	식용제조공정관리연구소	·기재자	·직	자문보건의사보			
·유통기간 ·유통사유	<small>                     *유통기한은 제조일로부터의 기간이며, 유통기한이 경과된 제품은 품질이 저하될 수 있으므로 주의하시기 바랍니다.                 </small>		·성	김창진, ...			
·기타							

2. 보고사항변경보고내용

	제 품 명	
년 월 일	변 경 제 품 명	기 재 자

4. 제조공정	
1) 원료구입 및 보관:	기준 규격에 적합한 원료를 엄선하여 적절한 장소에 보관한다.
2) 침출:	규정된 양만큼 건조자갈을 사용하여 침출한다.
3) 선별:	이물질과 같은 불가식부를 제거한다.
4) 세척:	종리는 주물물에 2~3회 세척한다.
5) 탈수:	실온에서 1시간 정도 정치한다.
5) 건조:	건조기를 사용하여 약 60℃의 온도에서 약 24시간 건조한다.
6) 분단:	분단기로 분단한다.
7) 1차 추출:	분단된 원료를 추출기에 넣고 주정 또는 주정과 정제수 혼합액을 넣고 추출한다. *추출 시간: 4시간, 추출온도: 80~84℃, 주정농도: 30~50%, 분단된 원료대비 60~70배수
8) 1차 여과:	1차 추출액을 50~100마이크로 필터를 통과시켜 여과한다.
9) 2차 추출:	분단된 원료를 추출기에 넣고 주정 또는 주정과 정제수 혼합액을 넣고 추출한다. *추출 시간: 4시간, 추출온도: 80~84℃, 주정농도: 30~50%, 분단된 원료대비 60~70배수
10) 2차 여과:	2차 추출액을 50~100마이크로 필터를 통과시켜 여과한다.
11) 농축:	1차, 2차 추출액을 모아서 진공농축기를 사용하여 농축한다. *농축온도: 60~65℃, 진공도: 600~70mmHg, 농축액 Brix: 20~30이하
12) 살균:	위 농축액을 살균탱크에 넣고 85~90℃에서 10~20분간 가열 살균한다.
13) 건조:	분무건조기(Spray Dryer)에서 건조하여 분말화 한다.
14) 충전:	분말을 각각의 포장단위별로 계측하여 적량에 맞게 충전한다.
15) 검사:	식품위생법에 의한 자가품질검사를 실시한다.

그림 67. 품목제조 보고 대장



(3) 제조 기록 작업 일보

추출 작업 일보		작업자	2013년 3월 20일						
입재명(원료)	Wheat(기타)	출력기 구분	1000 출력수출기, 4500 출력수출기, 기타						
원료 입고 일자	2013년 3월 20일	원료명(%)	50						
1. 작업기간	2013년 3월 20일	요일	수요일						
작업 공명	추출 원료량 (kg)/용매량 (L)	간처리 여부	비고						
	50 / 2,800	-							
* 작업 공명 flow: 2013년 3월 20일 2013년 3월 20일 20:00 → 21:00 → 22:00 → 23:00 → 24:00 → 25:00 → 26:00 → 27:00 → 28:00 → 29:00 → 30:00 → 31:00 → 32:00 → 33:00 → 34:00 → 35:00 → 36:00 → 37:00 → 38:00 → 39:00 → 40:00 → 41:00 → 42:00 → 43:00 → 44:00 → 45:00 → 46:00 → 47:00 → 48:00 → 49:00 → 50:00 → 51:00 → 52:00 → 53:00 → 54:00 → 55:00 → 56:00 → 57:00 → 58:00 → 59:00 → 60:00									
2. 추출 공명									
회 수	용매량-용매량(L)		온도	압력	시간	비고			
	용매 1	용매 2	용매 3	계					
# 1	1,500	1,300	200	3,000	85±1°C	0.2 MPa	15min = 2.100		
	1,500	1,300		2,800					
					추출량	80%	고형분량	수율(%)	
# 2									
					추출량	80%	고형분량	수율(%)	
# 3									
					추출량	80%	고형분량	수율(%)	
계					추출량	80%	고형분량	수율(%)	시간
특기 사항									

농축 작업 일보				작업자	지점			
업자명(원부)				일자	2017년 3월 21일 목요일			
원부 입고 일자				농축기 구분	Batch 농축기, 45리터 (농축 system)			
1. 작업기간				원료명(%)	2.76%	비고		
2017년 3월 21일 목요일				2017년 3월 21일 목요일				
2. 농축 상황								
시차	분도 (%)			진공도 (mmHg)	D/W	농축량 (t)	공급량 (t/h)	비고
	원액	농축액	실간수					
09:46	<농축 시작>			680	-	-	1,000	
10:01	59.0	63.0	17	620	-	-	1,000 + 1/2	
10:11	53.5	64.3	19	600	-	-	1,000 + 1/2	
10:16	52.2	64.2	18	6000	-	-	1,000 + 1/2	30-35 ton
10:39	52.3	63.8	17	600	-	-	1,000	
10:50	<100도 30, 60, 100도 50>							
10:58	<40도 10, 50도 10, 60도 10>							
11:08	<5도 30, 10도 30, 20도 30>							
3. 농축 결과								
농축 결과	원액		농축액					
	D/W	액량(t)	D/W	액량(t)	공급량(t/h)			
2017년 3월 21일	-	2,360	19~20	2,600	-			
특기 사항								
농축액 2000, 10도 200, 20도 200 => 200								

분무건조 작업 일보				작업자		작업 일자		장소	
업체명(제품명)	KORON(코리아) (KORON) (KORON)			분무건조기 운영		2013년 3월 31일		충청북도 청주시 상당구	
제조 및 포장 일자	2013년 3월 29일 ~ 30일			원재료명 (t)		70		분무건조기(대)	
원재료 명칭 (t)	70			KORON (KORON) (KORON)		70		KORON (KORON) (KORON)	
분무건조 목적(용도)	KORON (KORON)								
1. 작업 기간	연 월 일		요일		연 월 일		요일		
시작 시간 (시:분)	출발	제품	Air flow	이동	역동	Chemical 투입 (중량/배율)	정압률 (%) (t/h)	Feed 입 (bar)	비고
15:35	< 70kg 시작 >					100/300%	10 (100%)		
16:31	140%	86%	-	-	-	-	10 (10%)		
35	< 140% 90%, 7.95kg → 300%로 이동 >								
	100%로 이동 (90%로 이동)								
16:51	165%	40%	→ 90%로 이동 (90%로 이동)						
17:40	< 90% 90%, 3.45kg → 100%, 이동을 90%로 이동 >								
19:04	< 90% 90%, 5.45kg >								
06	140% 88%								
19:40	< 70kg 1.1kg, No 4A, 4.1kg >								
	(6) 최종 18.7kg (100%로 이동)								
2. 건조 결과									
실질수율(%)	18.7kg		생산수율(%)		74		가동 시간(h)		= 4.0시간
특기 사항									

그림 69. 제조 기록 작업 (추출작업, 농축작업, 분무건조 작업)

### 3. 제품(네이처셀 에디슨K) 시제품 제작 결과 보고

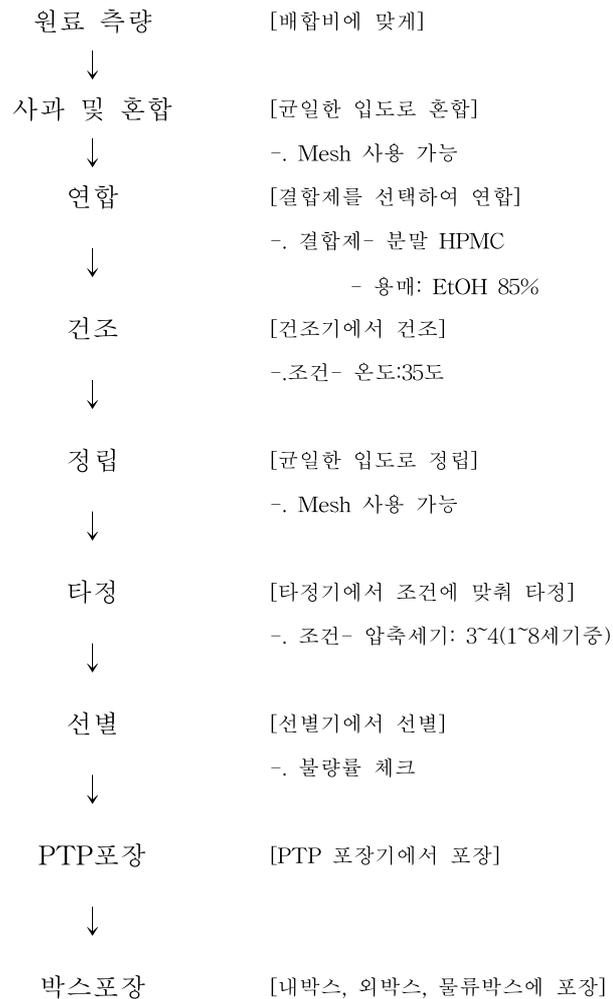
#### 가. 수행 세부 정보

- (1) 제품유형 : 건강기능식품 타정제품 (홍삼 + 비타민 C, 복합제품)
- (2) 기능성 : 홍삼 (피로회복/ 면역력 증진/ 혈소관응집억제를 통한 혈행/ 기억력 개선)  
비타민C (결합조직 형성과 기능성유지/ 철의 흡수에 필요/ 유해산소로부터 세포 보호)
- (3) 개발 기간 : 2012.01.08. ~ 2013.07.31 까지
- (4) 수행내용 : 경인식약처에 품목제조신고 (제품명: 네이처셀에디슨K 2013.05.09.)를 완료한 후 GMP 업체

인 (주)이오니아와 생산 계약서 체결 후 제품 생산을 완료함.

(5) 제작업체 : (주)이오니아

(6) 시제품 생산 제조 공정도



(7) 시제품제작 배합비 설정 및 원가 계산표(제품)

No	원료명	비율 (%)	1캡셀 합량(mg)	1개월분 (g)	1캡셀 단가(원)	원료단가 (원/kg)
1	홍삼농축액분말(진세 노사이드 Rb1, Rg1 및 Rg3의 합 15mg/g)	15.560	77.800	7	22.834	293,500
2	비타민B2(비타민B2 100%)	0.250	1.250	0.113	0.188	150,000
3	비타민B6염산염(비타 민B6 81%)	0.250	1.250	0.113	0.113	90,000
4	산화아연(아연 80%)	0.754	3.770	0.339	0.083	22,000
5	오자복합추출분말	41.786	208.930	18.804	6.059	29,000
6	미나리추출분말	19.000	95.000	8.550	47.500	500,000
7	L-아르기닌	1.500	7.500	0.675	0.263	35,000
8	스테아린산마그네슘	0.500	2.500	0.225	0.015	6,000
9	결정셀룰로오스	10.000	50.000	4.500	0.275	5,500
10	BT-11원지추출분말	10.000	2.000	4.500	35.000	700,000
11	히드록시프로필메틸셀 룰로오스	0.400	50.000	0.180	0.044	22,000
계		100.0	500.0	45.00	112.37	
	1 Set당 원료원가		90	캡셀		10,114원

표 39. 시제품 제작 원료 배합비 및 원료 단가

(8) 시제품 제작 이미지 모습(제품)



[제품명: 에디슨K, 내포장(PVC, Al foil), 외포장(지박스)]



[제품명: 에디슨K, 물류 박스(20set) 포장 모습]

그림 70. 제품 시제품 제작 이미지

나. 시제품 제작 수행 결과물(제품)

(1) 품목제조신고증

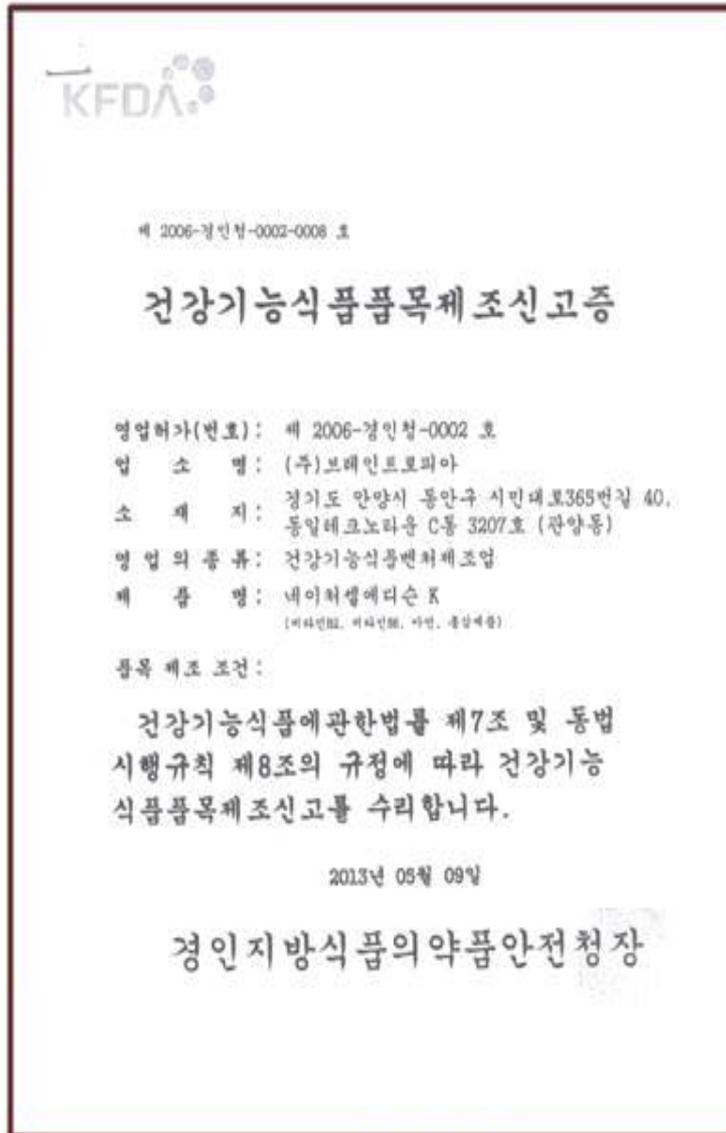


그림 71. 제품 품목제조 신고증





# 검사 성적서



생명과학연구소

발급번호 : R20130731-0037
접수번호 : 201307000296-0001

제품명	대이지올레드K			제조일자	2013-07-10
의뢰업체	(주)브레인트로피카	의뢰인	이철근	유통기한	
소재지	경기 안양시 동안구 관왕동 889-1 통일테크노타운C동 3207호			제조번호	
접수연월일	2013-07-23	검사연월일	2013-07-31	검사목적	자가품질 관리검사용
시험항목	건강기능식품(비타민B2, 비타민B6, 이연, 효소)			비고	
<b>시험 항목 및 결과</b>					
시험항목	기준	결과	합격기준		
분류시험(11종)	적합	적합	적합		
비타민 B2(표시량:1.25mg/500mg)	80이상 ~ 180이하(%)	96 (1.23mg/500mg)	적합		
비타민 B6(표시량:1.0125mg/500mg)	80이상 ~ 150이하(%)	147 (1.467mg/500mg)	적합		
이연(표시량:0.15mg/500mg)	80이상 ~ 150이하(%)	119 (0.591mg/500mg)	적합		
대장균군	음성	음성	적합		
병원미생물이 없고 고위위험항목을 가지는 단일성 균주	적합	적합	적합		
중세노사이드(1.0g/1일/3회용)(표시량:1.107mg/500mg)	80이상(%)	157 (1.827mg/500mg)	적합		
<p>판정 : <b>적합</b></p> <p>검사자 : 홍인범, 장미선, 권태환, 정지현 책임자 : 문홍권, 권태환</p> <p>본 검사성적서의 내용은 의뢰인이 제출한 시료에 대한 검사 결과로서 용도 이외의 목적으로 사용함에 따라 발생하 는 모든 사항에 대해, 당사는 그 어떠한 법적책임도 지지 않습니다.</p> <p>※ 상기판정은 의뢰인 시험항목에 한함</p>					
<p>세종특별자치시보건지정기관 제4조제2 규정에 의하여 위와 같이 검사성적서를 발급합니다.</p> <p style="text-align: right;">2013년 07월 31일</p> <p style="text-align: center;"><b>중부대학교 산학협력단</b></p>					

312-702 충남 공산군 추부면 오전리 태백로 101
TEL: 041-750-8942
FAX: 041-750-6361

그림 72. 공인기관 검사 성적서

(3) 제조지시기록서

PMF - 001 - 01

### 제 조 지 시 기 록 서

작 성 자	제조관리책임자	품질관리책임자	품질관리인
공정장 2013.7.10	김 안래	이리진	이리진

재 품 명	내이치셀에디슨K	제품유형	비타민B2.6, 아연, 홍삼제품		
제조번호	브레인트로피아-1301	재형/성상	어미, 이취가 있고 고유약품이 가 있는 연갈색의 정제		
제조일자	2013. 7. 10	유통기한	2015. 7. 9		
제조단위	1800세트/75.6kg(5%UP)	포장단위	500mg*30정(6PTP)*3케이스		
공정명	혼합	타정	선별	포장	
				PTP/명	안제품
이른생산량	95.6kg	148,200	106,000	148,200	111,500
실제생산량	94.1kg	146,000	145,300	144,450	110,600
손 실 량	1.5kg	2,200	600	900	500
수 출 (%)	98%	97.5%	99.6%	99.4%	99.3%
담 당 자	유성우	김 안래	유성우	김정환	유성우
품질관리부검제	검 제 채 취 량		비 고		
공정시험용	50T				
제품규격시험	350T				
보 관 검 제	250T				
지시	제조관리책임자 김 안래(인)	제조관리책임자 김 안래(인)	품질관리책임자 이리진(인)		
	2013년 7월 10일	2013년 7월 12일	2013년 7월 15일		

위 이 오 나 어

### 제조지시기록서(원료칭량)

QC  
승인 *[Signature]*

제품명	네이처셀에디슨K		
제조번호	브레인프로피아-1301	제조관리 책임자	<i>[Signature]</i>
작성일	2015 년 7 월 9 일	무량단위	500mg*90캡(6PTP)*3팩이스

NO.	용량명	제조사	생산일자	유통기간	투입비(%)	사용량/kg	용량자	확인자	비고
1	홍삼농축액분말(진세노사이드 Pg1과Pb1의 합 15mg/g)	다산다산	2014. 4. 20	2015. 4. 20	15.560	√11.783	한민	기안민	
2	비타민B12(비타민B12 100%)	22222222	2014. 10. 13	2016. 10. 13	0.250	√0.189	한민	기안민	
3	비타민B6(비타민B6 99.91%)	22222222	2014. 10. 13	2016. 10. 13	0.250	√0.189	한민	기안민	
4	산황아연(아연 80%)	Py-Biol (Biomax)	2014. 1. 16	2016. 1. 16	0.754	√0.570	한민	기안민	
5	오미제향추출분말	대웅인제	2014. 11. 14	2017. 11. 14	41.788	√31.590	한민	기안민	
6	미나리추출분말	신한인제	2014. 7. 29	2016. 7. 29	10.000	√14.364	한민	기안민	75.6
7	참지추출분말	신한인제	2014. 1. 14	2016. 1. 14	10.000	√7.560	한민	기안민	
8	결정셀룰로오스	ADDA PHARMACEUTICAL	2014. 4. 16	2017. 4. 16	10.000	√7.560	한민	기안민	
9	L-아르기닌	DAEJUNG PHARMACEUTICAL	2014. 7. 14	2016. 7. 14	1.500	√1.134	한민	기안민	
10	스타틴산과그대수	DAEJUNG PHARMACEUTICAL	2014. 7. 14	2016. 7. 14	0.500	√0.378	한민	기안민	
11	히드록시프로필베타딘분말	DAEJUNG PHARMACEUTICAL	2014. 7. 14	2016. 7. 14	0.400	√0.302	한민	기안민	
합계					100.0	75.60			

- 주의 사항
1. 원료의 성상, 간접, 품질관리시험번호, 유통기간, 용량을 확인할 것.
  2. 자물의 영점, 수량을 확인할 것.
  3. GMP제조관리기준서에 따라 원료의 간접부착 및 불합상대 확인하고 정확히 측정, 수량할 것.

(주) 이오니아

PMF - 019

(원료·자재)공급요청전표					QC 승인			
제품명	네이처셀에디션K							
제조번호	브레인트로피아-1301	제조관리 책임자	김영희					
작성일	2013년 7월 9일	표명단위	500mg*30정(6PTP)*3개이스					
입고일	관리번호	품명	%	단위	수량(kg)	인계자	인수자	비고
7/9		홍삼농축액분말(경세노사이드 Ag1과Pb1의 합 15mg/g)	15.560	kg	√1.783	김영희		
		비타민B2(비타민B2 100%)	0.250	"	√0.189			
		비타민B6(비타민B6 81%)	0.250	"	√0.189			
		산화아연(아연 80%)	0.754	"	√0.570			
		오자비활수출분말	41.786	"	√31.590			
		미나리수출분말	10.000	"	√14.384			
		원지수출분말	10.000	"	√7.560			
		갈분쇄물원오스	10.000	"	√7.560			
		L-아르기닌	1.500	"	√1.134			
		스테아린산메그네슘	0.500	"	√0.378			
		최드백시프로필렌글리콜원오스	0.400	"	√0.302			
		합계	100.0		√75.60			

(주) 이오니아

# 제 조 공 정 도

QC  
승인 *이보재*

NO.	공정	제조시설			공정검사	
		기계기구명	능력	수량	제조관리부	품질관리부
1	검수	육안 플린버치 전지지율	150kg	1		병표규격
2	칭량	전지지율	150kg	1	중량	
3	혼합	더블콘 혼합기	2000kg	1	혼합시간 및 속도	분량, 수분, 미생물시험
		N형 혼합기	300kg	1		
8	타경	KTM-5650	40만/일	1	중량편차, 두께	성상, 중량편차, 중해시험 경도, 미분도, 미생물시험
9	선별 급속검출	SST-1000 NMD440	70kg	1	내용량 외관	내용량 외관
				1		
10	PTP포장	평판PTP포장기		1		
11	포장	수직업			표지사항, 내용량	
12	완제품검사					성상, 이물, 외관, 내용량, 수분, 병해시험, 미생물시험
13	보관				위생관리	출회승인

(주) 이오니아

### 제조공정관리기록서

QC 승인 *이규민*

제품명	네이처셀에디슨K	제조번호	브레인트로피어-1301	
포장 단위	500mg*30정(6PTP)*3케이스	재형/성상	이더, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연갈색의 정제	
작업일	2014년 7월 7일	제조관리책임자	<i>김민서</i>	
일 자	공정명	작업내용	담당자	확인자
7/9	작업 준비	GMP제조위생관리기준서와 관련 작업복장을 착용하고, 용기 및 기계의 청결 상태를 확인 후 작업시작	<i>유성섭</i>	<i>김민서</i>
7/9	청결	-작업용의 기계기구의 청결상태 확인 -스프레이기의 청결상태를 확인 -용기를 세척하여 마크 전자자물쇠 잠금 및 소분	<i>김민서</i>	<i>김민서</i>
7/9	혼합	-최종 및 소분용 용기를 30mesh로 사과천이 균일하게 된 -프리를 혼합기에 넣고 20-30분간 혼합 *사용기계: 다량혼합기, U형 혼합기	<i>유성섭</i>	<i>김민서</i>
7/9	혼합 수율	*이론 혼합량: 25.6 kg *실제 혼합량: 25.1 kg *수율: 97.7%	<i>유성섭</i>	<i>김민서</i>
7/10	타정	-작업용 및 기계, 기구의 청결상태 확인 -25구 타정기를 이용하여 타정 -용량을 넣어 수율을 확인 *공정관리기록서 규정에 의거하여 시행하고 기록할 것 *작업자는 작업중 30분마다 전당으로 10개를 sampling하여 표기용량을 측정하여 공정기록장에 기록	<i>김민서</i>	<i>유성섭</i>
7/10	타정 수율	*이론 생산량: 143,200 정 *실제 생산량: 142,400 정 *수율: 99.5%	<i>김민서</i>	<i>유성섭</i>
7/10	시험 의뢰	품질관리부에 규격시험을 의뢰 *시험항목: 색상, 분해시험, 경도, 미순도, 중량분차, 미분율시험 *시험번호: 13-02-브레인트로피어-1301	<i>김민서</i>	<i>유성섭</i>

(주) 아오니아

### 공정 검사 일지

QC  
승인 *[Signature]*

제품명	네이처셀에디션K	재조번호	브레인트루피아-1301
포장 단위	500mg*30정(BPTP)*3케이스	재형/형상	이리, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연골색의 원주
작성일	2015년 7월 10일	제조관리책임자	<i>[Signature]</i>

원시번호	일시	20 15 7 10										공과	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
출발번호 (간격:30 초)	시간 구분												
	9:00	520	512	489	513	428	473	408	412	425	427	506	
	9:30	471	409	498	404	502	415	424	423	413	407	402	
	10:00	414	413	407	413	416	428	412	441	414	418	408	
	10:30	414	420	410	408	411	420	422	407	410	403	402	
	11:00	407	400	409	407	432	402	400	400	401	401	400	
	11:30	403	401	400	400	402	409	408	400	402	406	401	
	12:00	406	414	420	421	411	401	404	413	413	411	419	
	13:00	411	413	414	424	417	400	411	414	420	403	401	
	14:00	421	420	408	412	411	400	420	411	400	401	411	
	14:30	418	407	420	401	400	401	410	401	422	400	411	
	15:00	414	403	401	404	411	423	421	406	416	412	408	
	15:30	410	407	416	408	401	420	412	414	411	403	400	
	16:00	420	418	412	404	402	412	410	409	412	401	401	
	16:30	400	411	417	404	420	420	411	411	404	409	400	
	17:00												
	17:30												
	18:00												
	18:30												
19:00													
19:30													

(주) 이오티이



# 포장지시기록서

QC  
승인 *[Signature]*

제품명	네이처셀에디션K					제조일자	2013. 7. 10			
제조번호	브레인트로피아-1301					유통기한	2015. 7. 9			
포장단위	500mg*30봉(6PTP)*3케이스					제조단위	1600세트/75.6kg(5%UP)			
제품유형	비타민B2, B6, 아연, 홍삼제품					제조관리책임자	김인씨			
번호	소재명	단위	기준량	참수량	사용량	폐기량	반납량	인계자	인수자	비고
1	시-포일	롤	2	2	2			김인씨	김인씨	
2	PVC 필름	롤	10	10	10			김인씨	김인씨	
3	단 케이스	개	4800	4,800	4,800			김인씨	김인씨	
4	케이스	개	1600	1,600	1,600			김인씨	김인씨	
5	카운터스	개	80	80	80			김인씨	김인씨	
6		개								
7										
8										
9										

•특기사항

(주) 미오니아



GMP - 016

## 출하승인서

제 품 명	네이처셀에디슨K
제조번호	브레인트로피아-1301
제조일자	2013.07.10
유통기한	2015.07.09
포장단위	500mg*30정(6PTP)*3케이스
수 량	1600set

위 제품은 우수건강기능식품 제조(GMP) 및 품질관리 기준에 적합하므로 입고 및 출고를 승인합니다.

\* 비 고 : 브레인트로피아에서 원제품 자가품질검사 진행하기로 함.

20 14 년 7 월 21 일

품질관리 책임자 이 회 전 (인)

㈜ 이오니아

그림 73. 제조지시기록서







그림 74. 디자인 검토 및 광고심의 이미지

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연도별 연구목표

#### 가. 연구목표

- 미나리 추출물을 이용하여 기억력 개선 건강기능식품으로 개발하고자 함.
- (1) 미나리 최적 원료 선별 및 미나리 추출 원료의 지표(기능)성분 표준화
  - (2) 미나리 추출 원료의 기억력 개선 효능 입증
  - (3) 미나리 추출 원료의 건강기능식품으로서의 기준규격화
  - (4) 대량 생산을 위한 미나리 추출 원료 제조공정 표준화
  - (5) 미나리 추출 원료의 제형 연구
  - (6) 미나리 추출 원료의 안정성 평가를 통한 원료의 유통기한 설정
  - (7) 미나리 추출 원료의 시제품 생산

#### 나. 연차별 연구개발의 목표, 내용 및 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도 (%)	내용
1차 년도	2011	효소실험을 통해 기억력 개선 효능 및 미나리 추출물이 기억력을 개선시키는 기작에 대해 연구함	100	-기억력감소와 관련된 효소인 아세틸콜린에스터라제의 활성을 억제할 수 있는지 시기별, 지역별 미나리 추출물을 이용하여 검토함
		세포실험을 통해 기억력 개선 효능 및 미나리 추출물이 기억력을 개선시키는 기작에 대해 연구함	100	-세포 실험을 이용하여 미나리의 기억력 개선 효능에 대한 기작을 밝힌다. 과산화수소 혹은 글루탐산과 같은 독성 물질을 세포에 처리하고 이에 대한 독성 억제 효과 등 밝힘
		동물 실험을 통해 기억력 개선 효능 및 미나리 추출물이 기억력을 개선시키는 기작에 대해 연구하며 임상에 적용할 수 있는 효능 용량 설정함	100	-전임상에서 기억력테스트 방법으로 Y-미로테스트, 수동회피반응을 이용함. Scopolamine 투여모델 알코올 투여모델 및 스트레스모델의 기억력이 감퇴된 설치류 또는 치매동물모델을 이용하여 미나리 추출물의 투여로 감퇴된 기억력이 개선될 수 있는 용량을 설정함. 임상에 적용할 수 있는 효능 용량의 범위가 설정.
		미나리 추출물의 지표(기능)성분	100	-본 과제 의 원료인 미나리 추출물은 건강기능식품의 기준과 규격이 고시

	항목을 설정함		되어있지 않기 때문에 건강기능식품의 기능성원료로서 당해 식품의 기준·규격, 안전성 및 기능성 등에 관한 자료를 식품의약품안전처에 제출하여 건강기능식품의 기준·규격으로 인정받아야 하며 인정 후 자가품질검사 항목으로 평가됨 -기준·규격 및 그 설정 항목으로는 지표(기능)성분 항목을 설정.
	미나리 추출물의 유해물질 항목을 설정함	100	-기준·규격 및 그 설정 항목으로는 유해물질 항목을 설정.
	미나리 추출물의 위생관리 항목을 설정함	100	-기준·규격 및 그 설정 항목으로는 위생관리 항목을 설정.
	미나리 추출무로에 함유된 지표(기능)성분의 구조 확인 및 분석법 확립	100	-미나리 추출물의 지표성분으로 Isorhamnetin을 설정함. -HPLC 및 MS 분석을 통하여 Isorhamntin의 peak를 확인함
	미나리 추출물에 함유된 지표(기능)성분의 정량 분석 실시	100	-미나리 추출물 중의 Isorhamnetin의 함량을 정량분석을 통하여 확인
	설정된 분석법에 대한 method validation 실시	100	-Isorhamnetin의 분석법에 대한 특이성, 정밀성, 정확성, 진선성분석 진행
	유사종 및 원재료 사용부위의 검토	100	-미나리는 뿌리를 제외한 잎, 줄기, 모두를 식품원료로 사용가능하여 사용부위를 구별하지 않고, 잎, 줄기 모두를 사용. -미나리 품종에 대한 정확한 구별은 없으나 각 품종별로 비교 분석한 결과 품종에 의한 성분의 차이는 없는 것으로 확인됨.
	원산지 및 채취시기의 차이에 따른 기능성 확인	100	-미나리의 재배지역별 화합물의 성분 변화 확인 완료 -미나리의 채취시기별 성분 변화 확인 완료
	미나리로부터 기능성분의 수율 및 함량을 최적화 할 수 있는 추출조건	100	-미나리 추출용매의 EtOH 농도별 추출 수율 및 화합물 함량 변화를 비교 확인 하여 최적의 추출조건 확립 완료

		의 확립		
2차 년도	2012	미나리 추출원료의 기억력 개선 효능 연구를 위해 효소활성억제력, 세포사멸 억제력, 전임상 기억력 효능시험 실시함	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-기억력감소와 관련된 효소인 아세틸콜린에스터라제의 활성을 억제할 수 있는지 시기별, 지역별 미나리추출물을 이용하여 검토함</li> <li>-세포실험을 이용하여 미나리의 기억력 개선 효능에 대한 기작을 밝힌다. 과산화수소 혹은 글루탐산과 같은 독성 물질을 세포에 처리하고 이에 대한 독성 억제 효과 등 밝힘.</li> <li>-전임상에서 기억력테스트 방법으로 Y-미로테스트, 수중미로테스트, 수동회피반응을 이용함. 알코올 투여 혹은 스트레스에 의한 기억력이 감퇴된 설치류 또는 치매동물모델을 이용하여 미나리 추출물의 투여로 감퇴된 기억력이 개선 될 수 있는 용량을 설정함. 임상에 적용할 수 있는 효능용량의 범위가 설정될 것임.</li> </ul>
		미나리 추출물의 기준·규격 설정 및 잔류농약 성분 검토	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-미나리 추출물의 지표(기능)성분 항목을 설정(Isorhamntin).</li> <li>-미나리 추출물의 유해물질 항목을 설정(납, 비소, 카드뮴, 수은)</li> <li>-미나리 추출물의 위생관리 항목을 설정(수분, 세균수, 대장균)</li> <li>-미나리 원료에서의 잔류농약성분 검토(생미나리, 건조미나리)</li> </ul>
		미나리 추출물의 지표(기능)성분 설정 및 미나리에 함유된 화합물의 구조확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-미나리 추출물 분말에 대한 LC/MS/MS 분석에 의한 지표성분(Isorhamnetin) 확인</li> <li>-설정된 지표성분의 정량분석 실시</li> <li>-지표성분에 대한 Method validation</li> </ul>
		미나리 원료 및 제조공정 표준화를 하고, 미나리 추출용매별, 품종별, 재배지역별, 건조방법별 화합물 조성 비교 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-미나리 추출용매의 차이에 의한 화합물의 조성 비교 확인</li> <li>-미나리 채취시기별 화합물 조성 비교</li> <li>-미나리 재배지역별 화합물 조성 비교 확인</li> <li>-미나리 품종별 화합물 비교</li> <li>-열풍, 동결건조 방법의 차이에 의한 화합물 변화 비교</li> </ul>

표 40. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

다. 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

(가) 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호		유전자원 등록	SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	1							1	2	
	달성	2							0	0	
2차년도	목표		1						1	2	
	달성		1						3	2	
3차년도	목표										
	달성										
4차년도	목표										
	달성										
5차년도	목표										
	달성										
계	목표	1	1						2	4	
	달성	2	1						3	2	

표 41. 연구성과 목표

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	1			2	
	달성	0	1			3	

표 42. 연구성과 활용 목표

(나) 논문게재 성과

게재연 도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분	비고
		주저자	교신저자	공동저자					
	Beneficial effects of <i>Oenanth javanica</i> extracts on stress-induced cognitive deficits via inhibition of acetylcholinesterase activity	신기영	서유현	김희진, 장근아, 원범영, 이형근, 김혜선	Neurosc i e n c e Letters		국외	SCI	심사중
	<i>Oenanth javanica</i> extracts improve ethanol-induced memory impairment as an acetylcholinesterase inhibitor	신기영	신기영	원범영, 김예리, 정문주, 하현지, 윤여상, 서유현	Nutritio n a l Neurosc ience		국외	SCI	심사중
	<i>Oenanth javanica</i> extracts improve memory impairment of Tg2567 mice via inhibition of Abeta production and acetylcholinesterase activity	신기영	신기영	원범영, 김예리, 장근아, 정문주, 하현지, 윤여상, 이형근, 서유현	Neurosc i e n c e Letters		국외	SCI	심사중
	재배유형별 미나리 추출물의 아세틸콜린분해효소 및 세포사멸에 미치는효과	신기영	이형근	하현지, 위지향, 원범영, 정문주, 김예리, 윤여상, 정경옥,	한 국 식 품 과 학 회지		국내	비SCI	심사중
	미나리 알코올 추출물의 알코올 농도에 의한 추출물의 영양 성분변화에 미치는 영향	원범영	이형근	신기영, 윤여상, 김예리, 정문주, 하현지	한 국 식 품 과 학 회지		국내	비SCI	심사중

표 43. 논문게재

(다) 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 학습능력 또는 기억력 장애 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	(주) 브레인트로피아, 전남 식품산업연구센터	대한민국	10-2011-0090830		미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 학습능력 또는 기억력 장애 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	(주) 브레인트로피아, 전남 식품산업연구센터	대한민국	제 10-1280421호
2011	미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 학습능력 또는 기억력 장애 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	(주) 브레인트로피아, 전남 식품산업연구센터	PCT 국제출원	PCT/KR2011/006591					

표 44. 특허 출원 및 등록

(라) 인력활용/양성 성과

(1) 인력채용 성과

년도	채용 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2011			1			1	1		
2012		1				1	1		

표 45. 인력지원 성과

(2) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
실험동물 운영교육	실험동물실 운영 등	서울대학교	매월	24	2
식품위생교육	식품제조 위생관리	한국식품연구원	년 1회	8	2

표 46. 산업기술인력 교육 양성 성과

(마) 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
					2	2

표 47. 경제사회 고용창출 성과

2. 관련분야의 기술관점에서의 기여도

가. 경제·산업적 측면

- 미나리의 기능성 (기억력 개선)을 확보하여 제품화 한 결과는 농가수익 증대에 기여한다. 아울러 임상시험 종료 후 건강기능식품 원료로써 개발 완료되면 고부가가치 원료로써 더 많은 소득 증대에 효과가 있을 것이다.
- 원료표준화 및 지표성분 설정은 향후 FDA의 NDI를 받기 위한 자료로 활용되며 이는 국내는 물론 해외시장 판매에 기여하여 국가 경쟁력 제품으로 개발이 가능하다.
- 현대사회는 기억력 저하를 호소하는 사람들이 많고, 이들을 치료하기 위한 개인적 국가적 사회적 비용이 많이 소요될 것이나 본 과제에서 개발된 기능성 원료는 이러한 사회적 비용을 줄이는데 도움이 될 것이다.
- 본 과제를 수행하면서 2명의 고용창출이 발생하였으며, 향후 건강기능식품 원료로 개발 이후 더 많은 고용창출이 이루어 질 것이다.

나. 기술적 측면

- 미나리의 기능성 (기억력 개선)을 전임상에서 확보하여 향후 임상시험을 통한 효능 및 안전성 시험자료로 활용 가능하다.
- 원료표준화 및 지표성분 설정은 향후 FDA의 NDI를 받기 위한 자료로 활용 가능하다.
- 본 과제에서는 기억력 개선에 대한 효능을 검증하였으나 향후 미나리의 기능으로써 잘 알려진 간기능과 같은 건강기능식품을 개발하는데 있어 활용 가치가 있다.

# 제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1. 실용화 산업화 계획 (기술실시 등)

<사업화 계획 (5개년도)>

(단위 : 억원)

구 분		사 업 화 년 도				
년 도		2013년	2014년	2015년	2016년	2017년
사업목표		시장진입	시장개척	제품인증	신제품출시	제품홍보
사업화과제		기존 제품과의 차별성	해외시장의 시장성 검토	개별인증 획득	개발 제품의 마케팅 전략 및 FDA 인증	해외판로 개척
사업화 품목		-기억력개선 제품의 부원료	-기억력개선 제품의 부원료	- 기억력 개선 개별인증 제품	-기억력개선 개별인증 제품	- 기억력 개선 개별인증 및 해외인증 제품
투자계획	인건비	0.7	0.7	1	1.3	1.6
	재료비 및 설비투자비	0.8	0.8	1.2	1.5	1.8
	경상운영비	0.5	0.5	0.7	1	1.2
	계	2	2	2.9	3.8	4.6
생산계획		3	3	5	5	10
판매계획	매출 (억원)	1	2	5	6	8
	수출 (만불)				20	70
	계	1	2	5	8	15

표 48. 실용화 산업 사업화 계획(5개년도)

(1) 시장진입을 위한 단계적 전략 (시장진입시기, 현지화 전략 등)

- ① 단기(개발 기간 내 ~ 개발 종료 후 3년 이내), 기능성 원료 인정 단계
  - 특허 및 논문 등 지적재산권의 확보와 연구데이터 축적에 중점적으로 노력을 한다.
  - 건강기능식품으로서 인체에서의 기능성 확인(인체적용시험) 실험을 추진한다.
  - 표준화 및 기능성자료, 제품화(제형, 기준/규격)자료 등을 확보하여 식품의약품안전처에 건강기능식품의 기능성 원료로 인정을 받는다.
  - 기존 제품을 극복할 수 있는 제품으로 시장에 시제품을 출시하고 시장동향을 파악한다.
- ② 중장기(개발 종료 후 3년 이후), 건강기능식품 제형의 확대 및 해외 판매 개시
  - 대량생산을 위한 공장을 건립하고 건강기능식품 인정 후 본격적으로 해외시장에 진출한다.
  - 캡슐 및 분말, 에멀전 형태 등 다양한 형태의 제품을 개발, 출시한다.
  - 일반 식품에 첨가할 수 있는 제형을 마련한다.
  - 기능성 음료수 제품 개발에 적용한다.
  - 각 국가별 인증을 받을 수 있는 대관 절차를 진행한다.
  - 기 개발제품의 성능 개선을 통한 파생상품 개발을 추진한다.
  - 전략적 제휴 등을 통한 해외 판매업체와 공동으로 해외 수출시장을 개척한다.

(2) 생산, 설비투자, 마케팅 등에 대한 추진전략

가. 예산 확보 및 지출계획

(단위 : 억원)

구 분		추정소요자금				자금조달계획	
		2016	2017	2018	2019	자기자금	타인자금
시 설 자 금	1. 부지매입	10				5	5
	2. 공장건축		6			3	3
	3. 생산설비		6			3	3
	4. 임차보증금						
	5. 기타			2	2	4	
	(소 계)	10	12	2	2	15	11
운 전 자 금	1. 인건비	3	4.5	5	5	17.5	
	2. 재료비	5	7	10	12	34	
	3. 경비	3	5	7	9	24	
	4. 기타	2	2	3	3	10	
	(소 계)	13	18.5	25	29	85.5	
합 계		23	30.5	27	31	100.5	11

표 49. 예산 확보 및 지출계획

나. 생산 계획 (설비 투자 계획 포함)

구분	구분	단위	생산 능력	2017년	2018년	2019년	합계
기억력 제품	시제품	톤	100				
	샘플	톤	100	0.1	0.1	0.1	0.3
	양산계획	톤	100	20	50	100	170
합계				20.1	50.1	100.1	170.3

표 50 생산 계획(2017~2019년)

다. 마케팅 계획

년도	구분	추진계획	비고
2015	전시회 참가	국내외 전시회 참가계획	
	공급·유통 채널 확보를 통 한 판로 개척	- 부처(중기청 등), 기술혁신기관(TP 등)의 해외 마 케팅 지원사업 등을 활용한 판로 확보, 해외 네트워 크를 활용한 해외 파트너 확보 등 국내판매의 경우, (주)네이처셀 혹은 일양약품을 이 용한 신문, 홈쇼핑, 약국, 방문판매 등의 전략을 통해 상품을 판매할 계획임 해외판매의 경우, 암웨이를 이용한 54개국 판매 전 략. 암웨이는 기억력 소재에 대한 관심이 높기 때문 에 제품이 출시 되면 이에 대한 판매가 암웨이를 통 해 이루어질 수 있을 것으로 판단됨.	
	판매 전략	당사의 강점을 부각한 판매전략 기술 (품질의 우수 성, 가격 경쟁력 등)	
2016	On/Off 홍보 활동	언론(일간지, 경제지 등) 홍보, 제품설명회 및 수요기 업 대상 설명회 등 Off-Line 홍보 SNS(페이스북, 트위터, UCC 등) 등 On-Line 홍보 방안	

표 51. 마케팅 추진 계획

(3) 기대효과

(가) 기술적 측면

- 기능성 식품의 신소재 개발과 더불어 원료 제형화 원천기술 확보가 가능함.
- 특허 및 논문 등 지적재산권의 확보와 연구데이터 축적됨
- 기능성자료를 확보하며 이에 추가적으로 안전성자료, 제품화(제형, 기준/규격)자료 등을 확보하여 식품의약품 안전처에 건강기능식품의 기능성 원료로 인정받을 수 있음.
- 식품의약품안전처의 건강기능식품 개별인정형 원료 등록 후 제품을 생산할 수 있음.
- 캡슐 및 분말, 에멀전 형태 등 다양한 형태의 제품을 개발, 출시할 수 있음.

- 기존에 잘 알려진 미나리의 효능에 기억력 개선 효과를 가진 복합 기능성 제품을 개발할 수 있음.

(나) 경제적 측면

① 매출 효과

기관명	창출내용	매출목표 (억원)					
		1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
(주)브레인트로피아	① 완제품 출시	1	2	5	6	8	22
	②						
	③						
	소계	1	2	5	6	8	22
	① 완제품 출시						
	②						
	③						
	소계						
합계		1	2	5	6	8	22

표 52. 매출효과

② 수출 효과

기관명	창출내용	수출목표 (만불)					
		1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
(주)브레인트로피아	① 완제품 출시				20	70	90
	②						
	③						
	소계				20	70	90
	① 완제품 출시						
	②						
	③						
	소계						
합계				20	70	90	

표 53. 완제품 수출효과

③ 고용 효과

기관명	창출내용	고용목표 (명)					
		향후 년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
(주)브레인 트로피아	① 연구인력		1	1			2
	② 영업인력			1	1	1	3
	③ 생산인력		1		1	2	4
	소계		2	2	2	3	9
합계		2	2	2	3	9	

표 54. 연차별 고용효과

④ 기타 경제적 효과

- 현재 참여기업에서 기개발 판매하고 있는 BT-11원지추출분말[개별인정 제2009-12호, 성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음]의 2010년 매출은 7억 미만, 판매량은 1톤 가량의 성과를 달성하였으며, 2011년 해외 시장을 목표로 유럽 건강기능식품 박람회[비타푸드2011/스위스]에 참여하여 미국[암웨이/CDA체결 및 제품개발 단계]5톤/년, 유럽[Lonza] 7톤/년, 매출액 54억을 기대하고 있다.
- 본 사업의 개발제품에 관하여 해외 시장을 목표로 개발할 경우 국내 소재[농산물]의 건강기능식품으로 개발함과 동시에 높은 매출을 기대 할 수 있다.

2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

○ 본 연구의 성공적인 수행을 위해 (주)브레인트로피아 및 나주노안 미나리연합회는 정보교환을 원활히 수행하며 진행된 연구결과의 철저한 분석을 통해 효율적이고 유기적인 공동연구를 추진하고 연구의 효율성을 높이며 기억력 관련 개별인정형 건강기능식품 개발에 소요되는 시간을 단축함.

○ 전라남도에서는 바이오식품을 전남발전의 핵심 전략산업으로 선정하였으며 그 중심이 되는 연구기관으로 전라남도생물산업진흥재단 식품산업연구센터가 있음. 당사는 연구센터에 입주기업으로 우수생산시설기준인 GMP 시설을 이용하여 제품을 생산할 계획임.

○ 나주노안 미나리연합회는 국내 미나리 생산지를 보유하고 있으며 미나리를 이용하여 엽록소함유 건강기능식품으로 판매하고 있는 전남지역 업체 중 하나이며 그곳 미나리 재배단지과 유기적인 연대를 통해 미나리 최적의 생산성과 원료의 원활한 공급 등의 문제를 해결하여 건강기능식품의 원료를 원활히 공급할 수 있도록 노력함.

○ 제품의 구매를 약속한 (주)네이처셀은 건강기능식품 이외에 일반식품을 생산, 판매하고 있는 기업으로 초기 판매는 (주)네이처셀에서 담당하도록 하며 그와 병행하여 일양약품 혹은 다른 유통업체와의 협력을 통해 과제에서 개발된 제품을 판매할 것임.

○ 개발 기간 내에는 생산인력 위주의 채용을 하며 본과제가 성공할 수 있도록 진행할 것이며 사업이 완료 되는 시점에서는 연구인력, 마케팅인력 및 생산직 인력을 확충하여 해외시장 판매에 차질이 없도록 한다. 기존 인력의 자기 개발을 위해 교육참가 등의 기회를 적극 장려하여 본과제를 성공적으로 수행하며 경쟁력 있는 제품을 개발한다.

### 3. 특허 · 논문 등 기술확산 계획 등

○ 특허는 기능성 특허로 현재 국내에 등록되어 있고 해외로는 중국에 출원 중에 있다. 중국에 출원된 특허가 등록될 수 있도록 최대의 노력을 할 것이다.

○ 논문은 현재 SCI 3편과 비SCI 2편을 제출하여 심사를 기다리고 있으며 이들 논문이 게재될 수 있도록 최대의 노력을 할 것이다.

### 4. 추가연구· 타연구에 활용 계획 등

○ 향후 임상시험을 진행할 것이다. 본 과제에서 수행된 전임상시험을 바탕으로 임상용량을 설정할 수 있으며 이러한 자료를 바탕으로 임상시험이 진행되면 임상시험의 효능자료와 안전성 자료를 확보할 수 있다.

○ 본 과제에서 수행된 지표성분설정 및 성분연구에 대한 자료는 향후 FDA의 NDI 신청시 필요한 성분조사에 활용할 수 있다. NDI로 인정받게 되면 해외마케팅에 중요하게 사용될 수 있다.

○ 본 과제에서 수행된 제형연구 및 시제품 제작은 추가적인 제품화의 근거로 사용될 것이다.

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 제17회 일본 건강식품박람회(iffia.japan HFEjapan) 참석

(1) 일시 및 장소 : 2012년 5월23-25일, 일본 도쿄

#### (2) 출장목적

- 일본의 건강기능식품 관련 시장의 트렌드는 국내의 시장 트렌드와 거의 유사하게 형성되어지고 있는 상황으로 일본의 건강기능식품관련 트렌드를 파악하여 국내시장의 소비 트렌드를 파악할 수 있을 것으로 판단되어짐.
- 일본 건강식품박람회는 건강식품관련 최신의 정보를 제공하는 전시회로 2012년에는 특히 식품자원을 ‘진심, 탐구, 창조’ 라고 하는 각양각색의 의미가 담겨진 3개의 힘을 통해 더욱 유용하게 활용해서 사람들의 건강생활에 공헌하는 것을 명제로 건강기능식품, 서플리먼트, 비타민, 미네랄, 특정보건용식품, 영양기능식품, 건강지향식품 등에 대한 전시가 이루어짐.

#### (3) 수집 정보 자료

- 일본 기능성식품 시장의 키워드는 피부미용, 실버세대, 멘탈케어, 대사증후군, 아이케어, 면역 등으로 정리할 수 있음

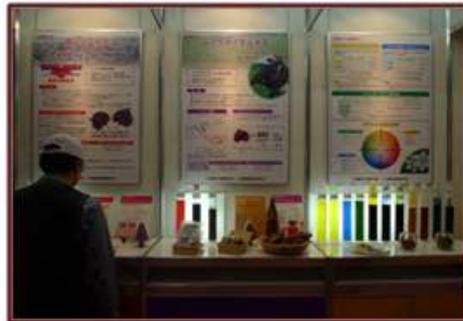




그림 75. 일본 기능성식품 시장 수집 자료

## 2. Vitafoods International 2012, 2013(Vitafoods)참석

(1) 일시 및 장소 : 2012.05.20.(일)~05.26(토) and 2013.05.14.(화)~05.16(목),  
스위스 제네바(Palexpo 전시장)

### (2) 출장 목적

- Vitafoods Europe 국제 건강기능식품 전시회는 기능성 식품의 동향과 관련 규정 등 많은 정보와 각국의 바이어들로부터 많은 관심을 받는 행사로서 브레인트로피아에서는 2011년부터 매년 참가하여 제품홍보 및 시장조사를 하고 있음.
- 유럽시장은 미국과 더불어 세계 2대 기능성 건강식음료/ 소재시장으로, 인구 노령화 경향이 강하며 소비자의 구매력이 강하고 건강에 대한 의식과 관련 제품 수요가 큼.
- 따라서 본 과제 결과물 및 관련제품을 전시하여 홍보 및 판매를 목적으로 참가하였음.

(3) 수집 정보 자료

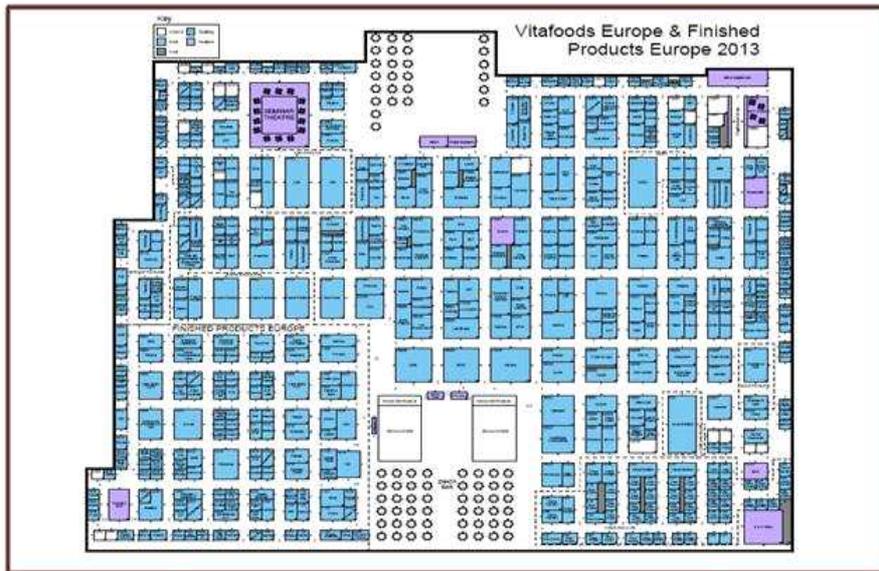


그림 76. 스위스 제네바 Vitafoods 한국관 위치



그림 77. 스위스 제네바 Vitafoods 전시회 참가 이미지(2013년)

일자	회사명/국가	이름/직함	논의내용
5/14	Prinova /London	Amy Fox /Product Manager	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/14	Afriple /south Africa	Retha Conrad / M a n a g e r Operatons	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/14	TCI Co., Ltd /Taiwan	Jan Jaap Braam /Sales Maager	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health) ■ ODM 업체
5/14	LONZA /Switzerland	Gerhard Merkt/ Project Manager	■오메가 3 + BT-11 combine에 대한 논의 재검토
5/14	IVC Nutrition Corp./China	Justin Qian /Saels Executive	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/15	Indena/Italy	GiusiLosi/Marketing Department Manager	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/15	AIESCO/Italy	Gianni Lazzarin /President	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/15	BGG/China	Alma Jiang/ Key Account Manager	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health) ■ Global Network
5/16	gonmisol /Spain	Ben Field /Sales department	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/16	S T R O N G NATURE	Vladimir Mirovic/ Export -manager	■BT-11원지추출분말(건강기능성원료) ↳ 제안서 보내기(Brain Health)
5/14	Nutraveris /France	Marion ALARD /Master's Manager	■EFSA 허가 절차에 대한 Consulting 업체
5/14	A&R(Analyz e & Realize) /Germany	Christiane Alexander, PhD/Biologist, Senior Consultant	■EFSA 허가 절차에 대한 Consulting 업체
5/15	TQF(Total Quality Food Consultants) /Italy	Silvia Romagnoli/ Consultant	■EFSA 허가 절차에 대한 Consulting 업체
* 상기 외 75 개 업체와 상담 진행(총 121개 업체와 방문 상담 진행)			

표 55. 전시회 결과 목록



[구매관심을 갖은 buyer들의 명함(2013)]



그림 78. 구매관심을 갖은 buyer들의 명함(2013년)



그림 79. 홍보물 제작

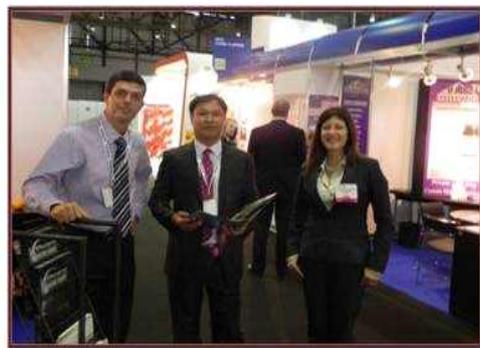


그림 80. 위스 제네바 Vitafoods 전시회 참가 이미지(2012년)



### 3. 2013년 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회 참석

(1) 일시 및 장소 : 2013. 5. 9-10. 전남대학교 컨벤션홀

(2) 출장목적

- 본 연구과제를 수행하면서 얻어진 결과로 한국약용작물학회에서 포스터 발표를 위한 학회 참석 및 약용자원의 부가가치 향상을 위한 산업화 전략 도모
- 약용작물 활용 천연물신약개발 및 건강기능식품 향후 시장방향 파악

(3) 세부내용

- 학회 포스터 발표 1건
- 학회 포스터 사진

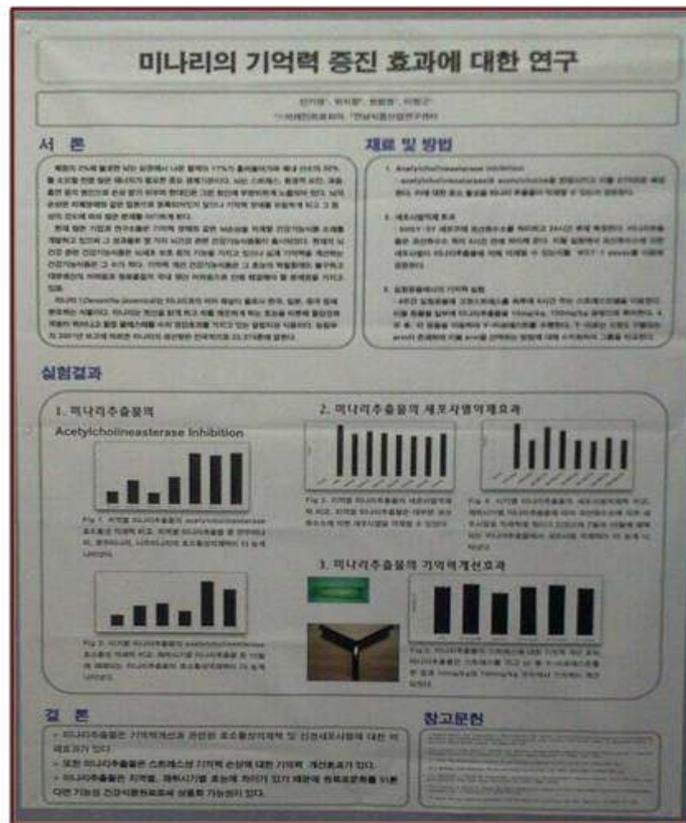


그림 82. 미나리 기억력 증진 효과에 관한 연구 포스터

- 약용작물을 이용한 기능성식품으로써의 활용 관련 강연 청강
  01. 약용작물 원료 생산 및 산업화 개선 방안. (순천대학교, 박종철 교수)
  02. 약용 식물자원으로부터 천연물 신약소재 개발사례.
    - (한국생명공학연구원, 오세량 박사)
  03. 약용작물 활용 기능성 식품. (가천대학교, 강세찬 교수)
  04. Medicinal crop, new cultivar of *Rehmannia glutinosa* Libosch. ex Steud. "Yeongang". (Department of Herbal Crop Research, NHHS, Chun-Geon Park)
  05. Anti-oxidant and Tyrosinase Inhibitory Effect of 44 Species of Medicinal Plants. (Kangwon National University, Hye-min Han)

#### 4. 2013년 제 80차 한국식품과학회 학술대회 참석

(1) 일시 및 장소 : 2013. 8. 28-30. 천안 예술의전당

(2) 출장목적

- 본 연구과제를 수행하면서 얻어진 결과로 한국식품과학회 학술대회에서 2편의 포스터 발표를 위한 학회 참석 및 최근 한국식품과학의 방향 및 동향을 파악

(3) 세부내용

- 학회 포스터 발표 2건
- 학회현장 사진

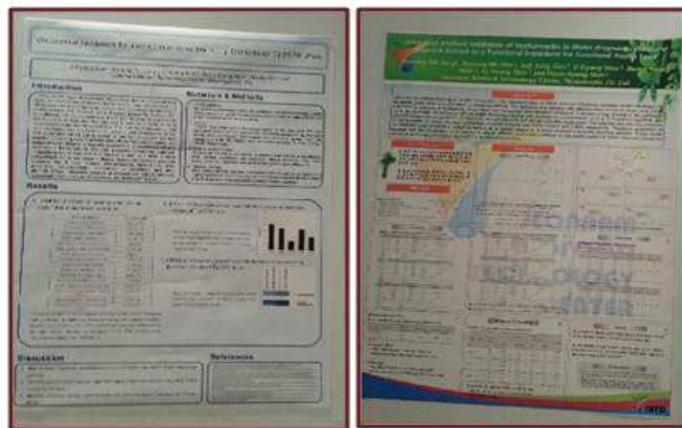


그림 83. 2013년 한국식품과학회 포스터

- 건강기능식품 분과의 Brain Food 관련 강연 청강
  01. Brain Foods: The action of foods on cognition, emotions, and prevention of mental illness *Fernando Gomez-Pinilla (UCLA)*
  02. Effects of Functional Foods on Brain Functions *Jong-Sang, Kim (Kyungpook*

*National University)*

03. Anti-amnesic effects of black soybean (*Glycine max* Merr.) seed coat on cholinergic and neurotoxic model *Ho Jin Heo (Gyeongsang National University)*
04. Bioactivity and Functional Properties of Isoflavones in Metabolic Disorders  
*Young-Cheul Kim (U Mass, Amherst, USA)*

## 제 7장 참고문헌

1. Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein and a-synuclein : Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 2002;54(3):469-525
2. Shin KY, Lee JY, Won BY, Jung HY, Chang KA, Koppula S, Suh YH. BT-11 is effective for enhancing cognitive functions in the elderly humans. *Neuroscience Letters.* 2009;465:157-159
3. Lee JY, Kim KY, Shin KY, Won BY, Jung HY, Suh YH. Effect of BT-11 on memory in healthy humans. *Neuroscience Letters.* 2009;454:111-114
4. Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2003;18( suppl 1):S1-S5
5. 2013년 건강기능식품과 기능성식품소재 시장현황. 임팩트. 2013.
6. 김미경, 권오란, 전향숙, 원혜숙, 김지연, 강병철, 제정환, 한재갑, 홍성화, 복혜숙, 김우선, 피재호, 박현용, 김현정. 건강기능식품(개정판). 교문사. 2010.
7. Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH. Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutasecarpa*. *Planta Med.* 1996;62:405-09
8. 조현우, et al. "미나리 지상부에서 라디칼 소거 활성을 가지는 페놀성 화합물의 분리." *생약학회지* 39.2 (2008): 142-145.
9. Ma, Choong Je, et al. "Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate induced neurotoxicity." *Phytotherapy Research* 24.6 (2010): 913-918.
10. Lee, M. K., et al. "Isorhamnetin from *Oenanthe javanica* Attenuates Fibrosis in Rat Hepatic Stellate Cells via Inhibition of ERK Signaling Pathway." *Natural Product Sciences* 14 (2008).
11. Ma CJ, Lee KY, Jeong EJ, Kim SH., et al. Persicarin from water dropwater (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytother Res.* 24.6 (2010) : 913-8
12. Yang JH, Kim SC, Shin BY, Jin SH, Jo MJ, Jegall KH, Kim YW, Lee JR, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. O-methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF-Kb Activation. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:362-372
13. Puneet R, Anil K. Quercetin along with piperine prevents cognitive dysfunction, oxidative stress and neuro-inflammation associated with mouse model of chronic unpredictable stress. *Arch. Pharm. Res.* DOI 10.1007/s12272-013-0205-4
14. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Phamacol.* 1997;74:225-41
15. Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem.* 1998;70:2179-87
16. Wilinon DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parrush J. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging.* 2004;21:453-78
17. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil study Group. *Neurology.* 1998;50:136-45
18. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, et. al. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann. Intern. Med.* 2008;148:379-97
19. Ellman GL, Lourtney DK, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95
20. Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide, radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Bio Chem.* 1974;249:2447-2452

21. Kopalli SR, Noh SJ, Koppula S, Suh YH. Methylparaben protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and improved behavioral impairments in mouse model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*. 2013;34:25-32
22. Oliveira-da-Silva A, Vieira FB, Crstina-Rodrigues F, Filgueiras CC, Manhaes AC, Abreu-Villaca Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int. J. Devl Neurosci*. 2009;27:539-48
23. Gulick D, Gould TJ. Interactive effects of ethanol and nicotine on learning, anxiety, and locomotion in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Neuropharmacology*. 2009b;57:302-10
24. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist beta-carbolines. *Psychopharmacol*. 1998; 94:491-95
25. Tsukada H, Kakiuchi T, Ando I, Ouchi Y. Functional activation of cerebral blood flow abolished by scopolamine is reversed by cognitive enhancers associated with cholinesterase inhibition: a positron emission tomography study in unanesthetized monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*.1997;281:1408-14
26. Berry RB, Matthews DB. Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. *Alcohol*. 2004;32(1):9-18
27. Dolezal V, Tucek S. Positive and negative effects of tacrine (Tetra-hydroaminoacridine) and Methoxytacrine on the metabolism of acetylcholine in brain cortical prisms incubated under "resting" conditions. *J Neurochem*.1991;56:1207-15
28. Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, et. al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 1996;16:881-91
29. Yaguchi T, Nagata T, Mukasa T, Fujikawa H, Yamamoto H, Yamamoto S, et. al. Linoleic acid derivated DCP-LA improves learning impairment in SAMP8. *Neuroreport*. 2006;17(1):105-8
30. Yamada K, Noda Y, Hasegawa T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, et. al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1996;276:460-66
31. Mishra N, Sasmal D, Singh KK. Attenuating A $\beta$ 1-42-induced toxicity by a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Neuroscience*. 2013;DOI10.1016/
32. 김윤정, et al. "고창 복분자의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분으로서 Ellagic Acid의 분석법 개발." *한국식품영양과학회지* 41.11 (2012): 1554-1558.
33. 2. 차용준. "건강기능식품 기능성원료로서 창녕양파추출액의 지표성분 Quercetin 분석법." *한국식품영양과학회지* 40.4 (2011): 565-569.
34. Arendt T, Allen Y, Marchbanks RM, Schugens MM, Sinden J, Lantos PL, et. al. Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system. *Neurosci*. 1989;33(3):435-62
35. Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms invoked in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int*. 1995;26(4):305-36
36. Choi HJ, You YH, Hwang KT, Lee JM, Chun JY, Chung JW, et. al. Isolation and Identification of Compound from Dropwort (*Oenanthe javanica*) with Protective Potential against Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Food Sci. Biotechnol*. 2011;20(6):1743-46
37. Kim JY, Kim KH, Lee YJ, Lee SH, Park JC, Nam DH. *Oenanthe javanica* extract accelerates ethanol metabolism in ethanol-treated animals. *BMB reports*. 2009;42(8):482-85
38. Ma CJ, Lee KY, Jeong EJ, Kim SH, Park J, Choi YH, Kim YC, Sung SH. Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat

- cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytother Res.* 2010;24(6):913-18
39. Pai SR, Pawar NV, Nimbalkar MS, Kshirsagar PR, Kplar FK, Dixit GB. Seasonal variation in content of camptothecin from the bark of *Nothapodytes nimmoniana* (Grah.) Mabb., using HPLC analysis. *Pharmacognosy Res.* 2013;5(3):219-23
  40. Green LC, Wagner DA, Glogowski j, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131-8
  41. Guerri C. Mechanisms involved in central nervous system dyfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002;4:327-35
  42. Pirlich M, Kiok K, Sandig G, Lochs H, Grune T. Alpha-lipoic acid prevents ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurosci. Lett.* 2002;328:93-6
  43. Oberdoerster J, Kamer AR, Rabin RA. Differential effect of ethanol on PC12 cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998;287:359-65
  44. Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol. Aging.* 2005;Suppl(1):128-32
  45. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 1: CD005593. doi:10.1002/14651858
  46. Hodges H, Allen Y, Sinden J, Mitchell SN, Arendt T, Lantos PL, et. al. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res.* 1991;43(1):7-28
  47. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.*1994;77:817-27
  48. Bores GM, Huger FP, Petko W, Mutlib AE, Camacho F, Rush DK, et. al. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277:728-38
  49. Enz A, Boddeke H, Gray J, Spiegel R. Pharmacologic and clinic-pharmacologic properties of SDZ ENA713, a centrally selective acetylcholinesterase inhibitor. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;640:272-75
  50. Gulick D, Gould TJ. Effects of ethanol and caffeine on behavior in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Behav Neurosci.* 2009a;123:1271-78
  51. Gulick D, Gould TJ. Ethanol acts in the anterior cingulate, but not dorsal or ventral hippocampus, to reverse ethanol-induced learning impairments in the plus-maze discriminative avoidance task. *Addict Biol.* 2011;16:176-88
  52. Hoffman SE, Matthews DB. Ethanol-induced impairments in spatial working memory are not due to deficits in learning. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25:856-61
  53. Huang ZM, Zhang ZM, Yang XB, Cao WB. Study of Shui Qin on antihepatitis. *Pharmacol Clin Chin Mat Med.* 1991;7:11-3
  54. Ji G, Yao X, Zang Z, Huang Z. Antiarrhythmic effect of *Ononantho javanica* (Bl.) DC. Injection.1990;15(7):429-31,448
  55. Monk BR, Leslie FM, Thomas JD. The effects of perinatal choline supplementation on hippocampal cholinergic development in rat exposed to alcohol during the brain growth spurt. *HIPPOCALPUS.* 2012;22:1750-57
  56. Rosler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gaythier S, Agid Y, Dal-Bianco P, et. al. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomized controlled trial. *BMJ.* 1999;318:633-38
  57. Ryabinin AE, Miller MN, Durrant S. Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002;71:307-12
  58. Snape MF, Misra A, Murray TK, De Souza RJ, Williams JL, Cross AJ, et. al. A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacol.* 1999;38:181-93

59. Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C. A 50month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 study Group. *Neurology* . 2000;54:2269-76
60. Umezawa M, Ohta A, Tojo H, Yagi H, Hosokawa M, Takeda T. Dietary alpha-linolenate/linoleate balance influences learning and memory in the senescence-accelerated mouse(SAM). *Brain Res.* 1995;669(2):225-33
61. Wang T, Tang XC. Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (-) -huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *Eur J Pharmacol.* 1998;349:137-42
62. Wang WN, Yang XB, Liu HZ, Huang ZM, Wu GX. Effect of Oenanthe javanica flavone on human and duck hepatitis Bvirus infection. 2005;26(5):587-92
63. Yang XB, Huang ZB, Cao WB. Effect of an aqueous extract from Oenanthe javanica on rat cardiovascular system. *Chin Tradit Herb Drugs* 1998;10:47-9
64. Yang XB, Huang ZM, Cao WB, Zheng M, Chen HY, Zhang JZ. (Antidiabetic effect of Oenanthe javanica flavone. 2000;21(3):239-42
65. Zhang JZ, Cao WB, Yang XB, Huang ZM. Anti-anaphylactic effect of the decoction of SQ. *Pharmacol Clin Chin Mat Med* 1992;8(suppl):29-32
66. Bartus RT, Dean 3rd RL, Beer B, Lippa A S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Sci.*1982;217:408-14

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.