

116171-03

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

농생명산업기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003328-01

기관지
감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응
건강개선 건강기능식품 연구개발

감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지
건강개선 건강기능식품 연구개발

2020. 12. 18.

주관연구기관 / 종근당건강(주)

2020
농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발”(개발기간 : 2016. 12. 23 ~ 2020. 08. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 12. 18

주관연구기관명 : 종근당건강 (주) (대표자) 김호곤 (인)



주관연구책임자 : 박성선



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116171-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.12.23.~ 2020.08.22. (44개월)	단 계 구 분	-
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발			
연구책임자	박성선	해당단계 참여연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	해당단계 연구개발비 (천원)	정부: 175,000 민간: 59,000 계: 234,000
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13명 내부: 13명 외부: 명	총 연구개발비 (천원)	정부: 600,000 민간: 201,000 계: 801,000
연구기관명 및 소속부서명	종근당건강(주) 중앙연구소			참여기업명 종근당건강(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<요약>

1. 국내외 기술, 제품시장 동향, 제품개발방향 조사
2. 국내 자생소재 16종의 항산화 활성 및 세포 활성평가 측정
3. 복합비율별 항산화 활성평가 및 세포 활성평가 측정하여 최종복합비율 선정
4. HPLC를 이용한 효율적인 Baicalein 및 Luteolin의 분석방법 정립
5. 용매, 원산지, 추출시간별 최적 추출기술 및 공정 표준 설정
6. 원료 유전자 분석
7. MTT assay, NO inhibition 및 MUC5AC 발현량 측정을 통한 세포 활성평가
8. IL-6 및 IL-12, NF-kB, MAPK Pathway 등 측정을 통한 항염증 검증
9. 기관지천식, 미세먼지 모델을 이용한 동물실험 효과 검증
10. 제형 연구 및 관능평가
11. 인체적용시험 프로토콜 개발 완료 및 최종결과보고서 작성
12. 인체적용시험 완료 및 최종결과보고서
13. 대장균균, 중금속 잔류농약, 곰팡이독소, 영양 및 지표성분 공인기관 분석 완료
14. 지식재산권 3건 출원
15. 개별인정 허가서류 준비
16. 세포, 동물, 임상 결과를 근거로 개별인정 신청서 작성

보고서 면수
115

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> □ 연구목적 <ul style="list-style-type: none"> • 감국(국화)과 황금 복합추출물의 지표성분 확인 및 표준화 기능성 원료 개발 • 개발 원료를 이용한 기관지와 호흡기 기능 개선 효능 평가 및 개별인정 획득 □ 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> • 국내외 기술, 제품시장 동향 연구 • 원료 표준화 • 복합소재 분석법확립 및 제제 검토 • 최적 추출기술 및 공정 표준 설정 • 세포 활성평가(항염증 검증) 및 동물이용 효과 검증 • 인체적용시험 프로토콜 작성 및 인체적용시험 완료 • 공인분석 기관 분석의뢰 • 개별인정 허가서류 작성 및 개별인정 신청
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) 국내외 기술, 제품시장 동향 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 국내외 제품 개발 방향 조사 완료 2) 원료 표준화 <ul style="list-style-type: none"> • 국내 자생소재 16종의 항산화 활성 및 세포 활성평가 측정 • 복합비율별 항산화 활성평가 및 세포 활성평가 측정하여 최종복합비율 선정 3) 복합소재 분석법확립 <ul style="list-style-type: none"> • HPLC를 이용한 효율적인 Baicalein 및 Luteolin 7-glucoside의 분석방법 정립 4) 최적 추출기술 및 공정 표준 설정 <ul style="list-style-type: none"> • 용매별(열수, 70% 주정) 추출 수율 확인 • 감국(국화) 및 황금 원산지 크로마토그램 차별성 확인 • 추출시간별 chromatogram 차별성 확인 5) 원료 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 감국(국화), 황금 원재료의 유전자 분석 6) 세포 활성평가 <ul style="list-style-type: none"> • 독성평가: MTT assay • 활성측정: NO inhibition 및 MUC5AC 발현량 측정 7) 항염증 검증 <ul style="list-style-type: none"> • Cytokine IL-6, IL-12 등 측정 • NF-kB, MAPK Pathway 등 측정 8) 동물이용 효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> • 실험프로토콜 확립(기관지천식, 미세먼지) 및 결과 확보 9) 제형 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 복합소재를 이용한 다양한 제형 가능성 연구 • 시험 sample을 이용한 관능평가 수행 10) 인체적용시험 프로토콜 작성 및 인체적용시험 완료 <ul style="list-style-type: none"> • 프로토콜 작성 계약 완료(전북대 임상지원센터 연구팀) • 인체적용시험 완료 및 최종결과보고서 수령 11) 공인분석 기관 분석의뢰 <ul style="list-style-type: none"> • 대장균군, 중금속, 잔류농약(65종), 곰팡이독소, 영양성분 분석 완료 • 공인시험성적서 확보 12) 지식재산권 확보 <ul style="list-style-type: none"> • 지식재산권 3건 출원 완료 13) 개별인정 허가서류 작성 및 개별인정 신청 <ul style="list-style-type: none"> • 제출자료 구비 완료 • 세포, 동물, 임상을 근거로 개별인정 신청서 작성 완료
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 감국(국화)과 황금을 혼합하여 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 건강기능 식품 개발 • 감국(국화)과 황금을 주원료로 사용하는 제품 개발, 건강기능식품 소재 판로 확보

	<ul style="list-style-type: none"> 기관지 및 호흡기 질환 개선에 도움이 되는 새로운 고기능성 식품 소재를 개발 및 국내와 국외 시장 진출 				
국문핵심어 (5개 이내)	기관지	호흡기	면역	감국(국화)	황금
영문핵심어 (5개 이내)	Bronchus	Respiratory	immunity	Chrysanthemum	Skullcap

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	2
1-1. 연구개발 목적	2
1-2. 연구개발의 필요성	2
2. 연구수행 내용 및 결과	11
2-1. 연구개발 추진 전략	11
2-2. 연구 결과	11
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	105
3-1. 목표	105
3-2. 목표 달성여부	105
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) ...	106
4. 연구결과의 활용 계획 등	107
4-1. 산업화 방향	107
4-2. 산업화를 통한 기대효과	108

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

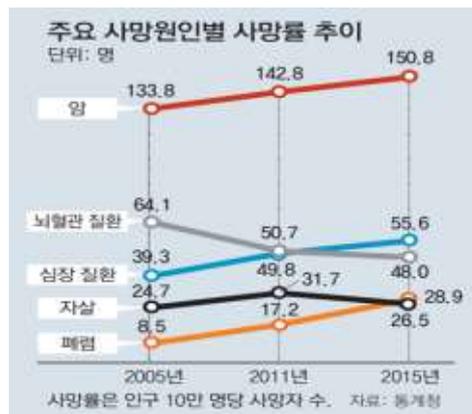
1-1. 연구개발 목적

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 지표 성분 확인 및 표준화된 기능성 원료 개발
- 개발 원료를 이용한 기관지와 호흡기 기능 개선 효능 평가 및 개별인정 획득

1-2. 연구개발의 필요성

(1) 연구개발의 개요

- 최근 WHO에서 인간의 수명과 삶의 질을 결정하는 4대 질환 중 하나로 호흡기 질환인 만성폐쇄성기도질환을 선정하였으며, 국내에서는 미세먼지 농도가 120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 일 이상인 경우가 빈번히 발생하고 있어 기관지 및 호흡기 질환이 이슈화되고 있음
- 이러한 호흡기 및 기관지 기능은 한번 저하되면 다시 회복되기가 어렵기 때문에 증상이 발병하기 이전에 예방하는 것이 중요
- 기관지와 호흡기 건강에 효과가 있다고 알려진 생약재 중 감초와 감국의 효능을 비임상시험을 통해 확보하여 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 건강기능식품의 개발 추진
- 급속한 환경 변화와 외부에서 침입한 각종 이물질, 먼지, 매연, 담배, 황사 등의 오염 물질들이 호흡기를 통해 유입됨으로 인해 발생하는 알레르기성 기관지 염증과 천식 등의 호흡기 질환은 염증 질환에 기인한 다양한 염증성 세포와 염증성 매개물이 동반되는 기도 과민반응을 발생시키는 것이 알려지면서 염증을 통한 호흡기성 질환이 새로운 핵심 연구 분야로 부각되고 있음



<주요 사망원인별 사망률 추이(통계청)>

- 통계청이 발표한 '2015년 사망원인통계'에 따르면, 지난해 폐렴(호흡기 질환)은 28.9%로 4대 주요 사망 질환으로 구분됨

- WHO에서는 2020년에 인간의 수명과 삶의 질을 결정하는 4대 질환군을 지정하였고, 이 중 하나가 기도폐색에 의한 호흡곤란을 특징으로 하는 만성폐쇄성기도질환이며, 만성폐쇄성기도질환은 가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 천식과 비가역적인 기도폐색을 특징으로 하는 만성폐쇄성폐질환(COPD)으로 구별됨
- 기도의 만성 염증으로 인해 발병되는 기관지 염증은 기관지가 과민해지고 간헐적인 기도수축이 발생하여 호흡곤란 증상을 유발하는 만성 질병으로, 아직까지 완치방법이 없는 것으로 알려져 있음
- 과거 수백 년에서 수천 년 동안 사용된 여러 가지 약용 식물들에 대한 약리작용은 잘 밝혀져 환자의 치료에 적절하게 사용되는 경우도 있으나, 많은 경우 그 작용이 모호하고 효능을 제시할 만한 임상적 근거가 부족하여 그 기능성에 대한 개발도 관심이 증가하고 있음
- 본 기술개발을 통하여 기관지 및 호흡기 건강에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재를 최초로 개발하여 신규시장 선점 및 농가소득 창출에 기여하고자 함

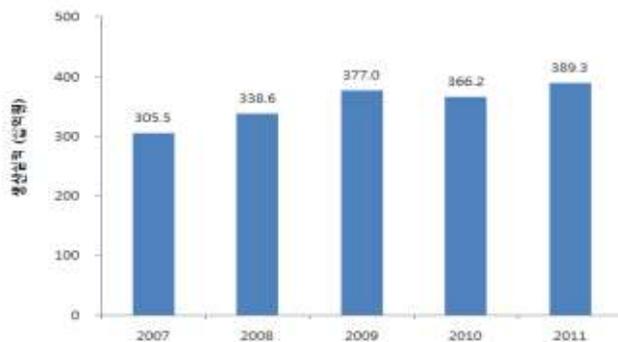
(2) 연구개발 대상의 국내·외 현황

(가) 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 호흡기 질환 치료제의 국내 시장 현황

- 2011년 완제의약품 생산액 중 호흡기관용 약의 생산실적은 3,893억 원으로 전년 대비 6.3% 성장한 것으로 보고됨

- 기관지 및 호흡기 질환에 관련된 건강기능식품에 대한 개발은 미비함



<호흡기 질환 치료제의 국내 시장 현황>

(2012 의약산업 분석 보고서, 한국보건산업진흥원)

2) 국내 제품 현황 (기관지 및 호흡기 건강 관련)

- 국내에서는 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 식품으로 대부분 액상 형태의 일반식품이 판매되고 있으며 배, 도라지(길경), 감초 추출물이 주로 사용되고 있음
- 제품의 효능을 입증할 만한 정확한 근거자료가 없음

제품명	제조사/생산자	내용량	제형	원재료 및 함량	섭취방법
 나주맑은배즙	비단고을	120 mL	액상	배와 도라지	-
 도라지즙	영화식품	100 mL	액상	5년근 도라지 80%	-
 기관지건강차	자연과건강	100 mL	액상	길경, 맥문동, 진피, 감초 등	2~3회/일 (1회 1포)
 홍삼도라지배즙	(주)에버셀	90 mL	액상	홍삼농축액 0.6% 배과즙농축액 1.3% 도라지농축액 0.5%	-
상국음차	비단고을	-	액상	상엽 6g, 길경 6g, 인동초 6g, 사상 6g, 감초 2g, 국화 2g.	상시 복용

3) 관련 지식재산권 현황

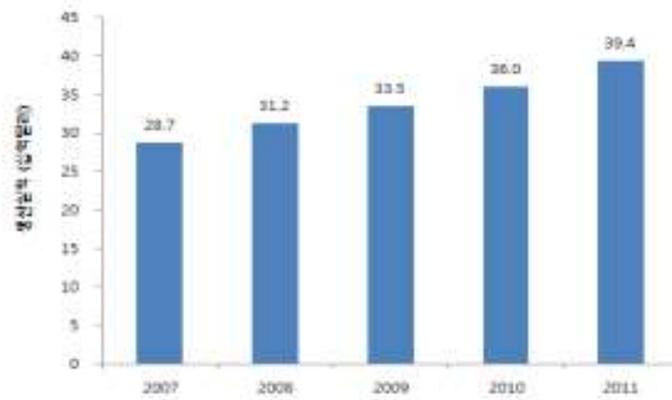
지식재산권명	지식재산권 출원인	출원국/출원번호
감초 추출물을 함유하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물	주식회사 인투바이오	한국/1020160052919
단백질 타이로신 탈인산화효소 1B 저해용 감국잎 추출물 및 이를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	재단법인 춘천바이오산업진흥원	한국/10-1430646
생약 추출물을 이용한 알러지성 피부질환 예방 및 치료용 조성물	김진홍	한국/10-0975426
항산화 및 항바이러스 활성을 가지는 화합물 및 이를 포함하는 감국 추출물	한국과학기술연구원	한국/10-0665313
천연한방약재 감초, 당귀, 고삼 혼합추출물로 항산화, 항염증억제, 주름억제, 미백 효과를 갖는 다기능 화장품 조성물	양승인	한국/1020150118293
알러지 및 염증 치료용 조성물	김수남	한국/10-0563329
생약 추출물 또는 이의 유산균 발효물을 포함하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 조성물	한국한의학연구원	한국/1020110051653
생약제제를 주재료한 피부질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 면역증강용 건강기능성식품 조성물	이규민	한국/10-1302225

(나) 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 호흡기 질환 치료제의 세계 시장 현황

- 상위 20개 약효군 세계시장 규모는 4,522억 달러로 전체 의약품 시장의 48.0%를 차지하며 그 중 호흡기 질환 치료제(Respiratory agents)가 394억 달러로 약 9%를 차지하는 것으로 나타남

- 약물로서 개발되는 천식치료제로 기관지 확장제와 염증 치료제가 있으며, 기관지 확장제로는 테오필린, 아미노필린, 독소필린 등이 주로 이용되고, 염증 치료제는 기관지 염증이냐 붓기를 완화시키는 항히스타민제, 스테로이드제, 류코트리엔 길항제가 주로 이용되고 있음



<호흡기 질환 치료제의 세계 시장 현황>
(2012 의약산업 분석 보고서. 한국보건산업진흥원)

2) 국외 제품 현황 (기관지 및 호흡기 건강 관련)

- 국외에서는 대부분 어린이를 대상으로 한 시럽 형태의 제품이 주로 판매되고 있으며, 엘더베리, 서양송악(잉글리쉬아이비), 감초를 원료로 사용하고 있으나 엘더베리와 서양송악의 경우 국내에서 식용 불가능 소재로 분류함

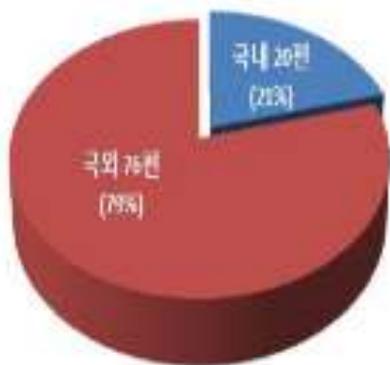
제품명	제조사/생산자	내용량	제형	원재료 및 함량	섭취방법
Elderberry 	Nature's way	575 mg	연질캡슐	Elder berry 230 mg, Elder flower 57 mg	2회/일 (1회 2캡슐)
Olbas cough syrup 	Olbas	120 mL	액상	Thyme 8 mg, Licorice extract 4 mg	12회/일 (1회 1-2 teaspoons)
Bronchial wellness tea 	Gaia herbs	1.5 g	가루	Peppermint 450 mg, Licorice(감초) 345 mg, Grindelia 225 mg	상시 복용
Lung, Bronchial and sinus health 	Natural factors	700 mg	정제	Mullein 100 mg, Horehound 100 mg, English ivy 100 mg	3회/일 (1회 1정)

- 현재 기관지 관련한 제품은 일반식품이 주를 이루고 있으며, 국내에 기관지 및 호흡기 건강에 관련하여 개별인정 허가를 받은 원료는 없음
- 감초/감국에 대한 문헌적인 연구 외에 제품화에 관한 동향은 전무하여 본 기술개발의 종료 시 호흡기 관련 건강기능식품 신규시장의 선점이 가능할 것으로 판단됨

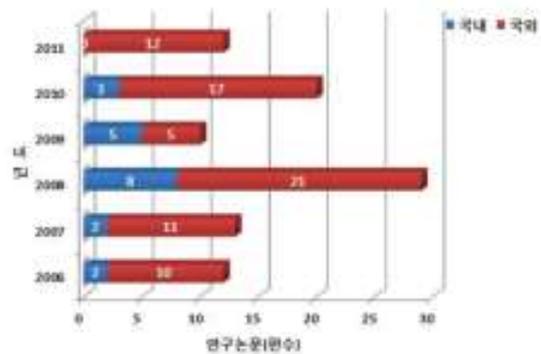
(3) 연구개발의 중요성

(가) 과학적 측면

- 염증반응은 다양한 세포와 매개물질, 사이토카인들이 참여하는 복잡한 반응으로 최근에는 만성 염증이 인구의 고령화에 따라 늘고 있는 여러 가지 만성 질환들과의 관련성이 밝혀지고 있으며, 치유가 어려운 만성 및 퇴행성 질환 치료의 새로운 패러다임으로 염증반응 조절을 통한 접근이 연구자들의 관심을 끌고 있음



<주요 호흡기 질환 관련 국내외 연구 현황>



<호흡기 질환 관련 연도별 국내외 연구 현황>

- 2006년부터 2011년까지의 주요 호흡기 질환과 관련된 건강기능식품 개발 연구에 대한 논문 분석에 의하면 국내 20건(21%), 국외 76건(79%)으로 전체 96건이 검색됨
- 국외 논문은 2006년 10건, 2007년 11건, 2008년 21건, 2009년 5건, 2010년 17건, 2011년 12건으로 검색되었으며, 2008년도에 국내외 총 29건으로 가장 활발한 연구가 진행되었음을 알 수 있음
- 감초의 유효성분인 글리시리진산(glycyrrhizic acid)은 약물중독, 음식물 중독, 파상풍, 디프테리아균 독소를 해독시키고, 고혈압 환자의 혈중 콜레스테롤 함량을 강하시키며, 혈압을 떨어뜨리는 약으로 이용됨
- 감초는 화중완급(和中緩急), 윤페지해(潤肺止咳), 청열해독(淸熱解毒)의 효능이 있고, 포제(怖製)한 것을 사용하면 비위허약, 노권에 의한 발열, 폐위해수, 동계, 경간 치료에 이용되며, 생것은 인후 중통, 위궤양, 약물중독, 식물중독을 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있음

- 처방으로 감초탕, 감초 사심탕, 감초부자탕, 복령행인 감초탕 등이 있으며, 최근에 감초를 이용한 에이즈 및 암 치료에 대한 연구가 일부 국가에서 진행 중인 것으로 알려져 있음

(나) 산업적 측면

- 상위 15개 약효군 세계시장 규모가 3,417억 달러로 전체 의약품 시장의 45.4%를 차지하고 있고, 이 중 호흡기 질환 치료제의 세계 시장은 항암제, 콜레스테롤 조절제에 이어 점유율이 세 번째로 높음
- 국내 산업 동향은 2009년 완제의약품 생산액 가운데 호흡기관용 약의 생산실적은 3,770억 원으로, 2004년 2,393억 원에 비하여 1,377억 원이 증액되었으나 2009년 전체 의약품 생산액은 131,760억 원으로 호흡기관용 약이 차지하는 비율은 전체의 2.86%에 불과함
- 국내 천식 관련 의약품 시장규모는 2011년도 기준 약 2,193억 원이며, 2009년도에 비해 31.7% 성장할 정도로 빠른 증가 추세를 보이고 있음
- 세계 천식 관련 의약품 시장은 약 25조 원으로 추산되지만, 건강기능식품 중 천식을 포함한 호흡기 질환에 대한 시장규모는 거의 전무한 상황이며 이에 대한 기능성 소재 연구개발도 일부 이루어지고 있지만 산업화된 동향은 전혀 파악되지 않고 있어, 천식과 관련된 건강기능식품 분야로서 새로운 과 연구개발이 필요함
- ‘천식’은 97% 이상 외래 진료를 받으며, 2014년 기준 입원 진료 인원은 약 5만 명, 외래 진료 인원은 약 185 만 명인 것으로 나타남. 입원, 외래 진료 인원 모두 감소하는 추세이나 2014년 1인당 입원 진료비와 1인당 입원 일수는 각각 151만 원, 14.5일로 증가된 것으로 나타남
- WHO에 따르면 호흡기 질환은 지난 20년간 꾸준히 증가 추세에 있으며, 유병률이 높은 난치성 질환으로 적절한 치료가 없고, 국내 천식치료제 시장 대부분이 외국회사의 흡인성 기관지 확장제 제품이 주류를 이루며 외국에 대한 기술적 의존도가 높고 경제적 손실이 많음
- 천식에 관련된 건강기능식품은 면역과민반응개선, 염증 치료에 도움이 되는 건강기능식품에 의존적으로 개발되어 있으며, 천식만을 위한 건강기능식품 개발은 미비함

(다) 경제적 측면

- 현재 만성폐쇄성폐질환(COPD) 세계 시장은 2013년 기준으로 42조 원 규모이며, 국내 시장은 3,000억 원 수준으로 추산되며, 성장 가능성이 높은 시장으로 예측
- 천식치료제 시장규모가 점점 확대되는 요인으로는 건강보험심사평가원의 평가 개시와 COPD 환자 증가를 들 수 있음. 또한, 국민건강보험공단 공개 자료에서는 2007년 22만 2,000명에서 2012년 24만 5,000명으로 매년 1.95%씩 증가하고 있는 것으로 보고되어 COPD 치료제를 사용하는 환자의 수가 늘어났다는 것을 확인할 수 있음

- GBI 리서치사는 ‘2019년까지 천식치료제 시장 전망 보고서’를 통해 천식 유병률의 지속적인 증가에 따라 글로벌 시장이 2012년 166억 달러에서 2019년 216억 달러로 확대될 것으로 전망
- 천식은 전 연령층에 걸쳐 유병률이 높고, 가옥구조의 서구화와 함께 실내 생활에 보내는 시간이 증가하면서 유병률이 급증하는 질환으로 미국의 경우 1993년 만성폐쇄성폐질환으로 인한 총비용은 239억 달러임
- 질환으로 인한 평균 내원 기간은 6.9일, 클리닉 방문 횟수는 14.3백만 회에 이르고 있어 사회경제적 부담이 향후 더욱 커질 것으로 예상
- 농업의 새로운 활로를 개척하고 농가소득의 증대를 위해서 특수 농산물의 효능 규명을 통하여 우수한 농산물의 개발과 미래 자원의 공급원으로 농·생물 천연자원을 활용한 기능성 식품 및 천연물 신약의 개발 필요성이 증대
- 소비자 요구에 부응한 신선하고 편의형 고부가가치, 고기능성 식품의 연구로서 호흡기성 질환의 예방 및 개선용 식품 소재의 발굴, 식품 성분의 활용도 증진, 기능성 향상 기술개발 및 산업화 연구가 이루어져야 함
- 우리나라의 감초재배는 2008년 이후부터 집계되었으며, 2008년도에 재배면적 6ha에 수량성은 351kg/10a 정도였으나, 2011년에는 전체면적 43ha에 785kg/10a로 단위면적당 생산량이 증가되어 총 335톤이 생산됨

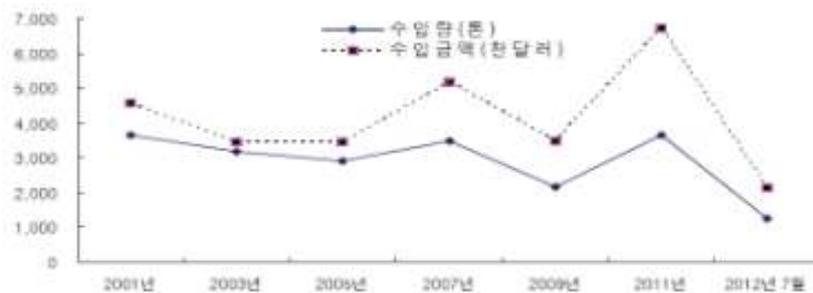
<우리나라 감초 재배면적 및 생산량>

년도	전체면적(ha)	수확면적(ha)	단수(kg/10a)	생산량(M/T)
2008	6	6	351	23
2009	31	31	362	111
2010	44	44	592	262
2011	43	43	785	335

(특용작물 생산실적, 농림수산식품부)

- 감국의 꽃은 주로 약용으로 사용하는데 10월에 꽃을 말려서 술을 담거나 차로 우려내어 마시며, 예로부터 가을철 건강차로 해열작용이 있고 초기 목감기나 기침 감기에 사용됨
- 감국차는 신경통이나 두통·기침 등에 효과적이고 피부를 아름답게 하는 것으로 알려져 있으며, 풍열을 없애고 해독·진정 작용 및 눈을 밝게 하고, 현기증·위장염·고혈압·감기 등에도 효과가 있음

- 감국은 사약의 하나로 쳐 수명을 늘리고 회춘하는 약의 재료이며, 고열, 두통, 어지럼증, 저림 치료에 효과가 있음 [신농본초경]
- 감국은 비타민 A와 B1, 콜린, 스타키드린, 아데닌 등을 함유하고 있고, 눈과 간 기능 회복에 효과가 있고, 플라보노이드 성분은 항균, 항바이러스 및 항염증 효능이 있으며, 정유는 중추신경 진정 및 해열작용이 있어 우울증, 두통, 현기증, 불면, 전신무력증 등의 치료에 사용됨
- 감국에는 항노화 물질인 셀레늄이 많고, 콜레스테롤을 분해하고 체외 배설을 촉진하는 역할을 하는 크롬 함량도 높음
- 국화꽃 추출물을 이용한 화장품 개발이 진행되고 있으며, 향기 성분을 이용한 아로마테라피와 상품화는 시작 단계임
- 감국은 민간요법으로 풍열표증, 간열로 머리가 어지럽고 아플 때, 눈이 빨갛고 눈물이 날 때, 부스럼이 생길 때, 관절 통증 및 고혈압에 사용되어 왔고, 감국은 머리를 맑게 하고 눈을 밝게 하며, 눈병을 제거하고, 혈기를 이억하게 하고 몸을 가볍게 하는 효능이 있음
- 감초는 한약재뿐만 아니라 건강기능식품, 한방화장품 및 천연의학에 이르기까지 신소재로 이용되는 고부가가치 작물이나, 현재 시중에 유통되는 감초 3천 톤 중 국내산은 100여 톤 규모에 불과한데 대부분 충북 제천지역에서 생산되며, 나머지 2,900톤은 중국과 우즈베키스탄에서 수입되고 있는 실정임



<우리나라 연도별 감초 수입량과 수입금액(농수산물유통공사)>

- 감초는 거의 전량을 수입에 의존하고 있어, 수입대체 약용작물로서 재배면적이 늘어나고 있으나, 표준재배기술이 확립되어 있지 않음

1-3. 연구개발 범위 및 내용

연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용
국내외 기술, 제품시장 동향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 국내외 관련제품 현황파악 	<ul style="list-style-type: none"> 국내외 제품 개발 방향 조사 완료
원료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 원료 스크리닝 실험, 복합비율 설정 복합비율별 항산화 및 세포 활성평가 실시 <ul style="list-style-type: none"> - DPPH 라디칼 소거활성 - ABTS 라디칼 소거활성 	<ul style="list-style-type: none"> 국내 자생소재 16종의 항산화 활성 및 세포 활성 평가 측정 복합비율별 항산화 활성평가 및 세포 활성평가 측정하여 최종복합비율 선정
복합소재 분석법확립	<ul style="list-style-type: none"> HPLC 분석을 통한 지표물질 분석법 도출 	<ul style="list-style-type: none"> HPLC를 이용한 효율적인 Baicalein 및 Luteolin 7-glucoside의 분석방법 정립
복합소재 제제 검토	<ul style="list-style-type: none"> 품질관리 지표 설정을 위한 함량측정기준 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 복합소재의 기준 및 시험항목 설정 분석법이 확립된 복합소재 원료에 대하여 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법(안) 항목설정
최적 추출기술 및 공정 표준 설정	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 추출조건에서 추출 수율 재현성 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 용매별 추출, 추출시간별 함량 측정, 산지별 추출 	<ul style="list-style-type: none"> 용매별(열수, 70% 주정) 추출 수율 확인 감국(국화) 및 황금 원산지 크로마토그램 차별성 확인 추출시간별 chromatogram 차별성 확인
원료 유전자 분석	<ul style="list-style-type: none"> 감국(국화), 황금 유전자 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 감국(국화), 황금 원물을 이용하여 유전자 분석 완료 감국(국화), 황금과 유전자 동등성 99% 확인
세포 활성평가	<ul style="list-style-type: none"> 기관지세포주에서 복합소재의 생리활성을 평가 NCI-292, A549 세포 이용 기관지 상피에 미치는 작용 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 독성평가: MTT assay 활성측정: NO inhibition 및 MUC5AC 발현량 측정
항염증 검증	<ul style="list-style-type: none"> 기관지에 관련한 세포주에서의 항염증 지표 평가 대식세포주와 기관지 세포 이용 염증성 인자 분석 	<ul style="list-style-type: none"> Cytokine IL-6, IL-12 등 측정 NF-kB, MAPK Pathway 등 측정
동물이용 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> 복용량 근거 확보를 위한 동물평가모델 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 실험프로토콜 확립 <ul style="list-style-type: none"> -기관지천식, 미세먼지 모델 실험결과 확보
제형 연구	<ul style="list-style-type: none"> 복합소재를 이용한 여러 제형 가능성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 복합소재를 이용한 여러 제형 가능성 연구 시험 sample을 이용한 관능평가 수행
인체적용시험 프로토콜 작성	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서 작성 <ul style="list-style-type: none"> - 식약처 유효성 평가지표 반영 	<ul style="list-style-type: none"> 프로토콜 작성 계약 완료 -전북대 임상지원센터 연구팀
인체적용시험 완료	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 계획서를 바탕으로 인체적용시험 완료 	<ul style="list-style-type: none"> 인체적용시험 완료 최종결과보고서 수령
공인분석 기관 분석의뢰	<ul style="list-style-type: none"> 개별인정 신청을 위한 공인분석기관 분석의뢰 	<ul style="list-style-type: none"> 대장균군, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약(65종), 곰팡이독소, 영양성분 및 지표성분 분석의뢰 완료 공인시험성적서 확보
지식재산권 확보	<ul style="list-style-type: none"> 지식재산권 출원 	<ul style="list-style-type: none"> 지식재산권 3건 출원 완료
허가서류 작성	<ul style="list-style-type: none"> 개별인정 신청을 위한 신청서 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 제출자료 구비 완료 세포, 동물, 임상을 근거로 개별인정 신청서 작성 완료
허가신청	<ul style="list-style-type: none"> 개별인정 신청서를 바탕으로 식약처 신청 완료 	<ul style="list-style-type: none"> 개별인정 신청서 작성 중

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진 전략

- 종근당건강(주)은 건강기능식품 및 일반식품 제조업 기업으로 자사 제품을 개발 및 생산하는 일련의 프로세스 중 축적된 know-how와 전문가를 통한 지속적인 기술자문을 통하여 기술연구를 추진
- 기술문서 심사에 필요한 각종 시험 항목에 대한 평가를 공인인증기관에서 수행하며 제품화 허가에 필요한 문서 작성은 자사에서 확보
- 기관지건강 관련 기능성 소재의 개발 및 이를 위한 기술자문 위원회 개최를 통해 꾸준한 제품 품질 향상에 노력
- 신규소재에 대한 검증을 위한 테스트 항목과 방법들에 대한 논의를 바탕으로 지속적인 노력 수행



<기술개발 모식도>

2-2. 연구 결과

(1) 국내외 기술, 제품시장 동향 연구

(가) 경쟁제품(용각산) 특징점 분석

구분	약리작용	과학적 근거
기도 흡수	<ul style="list-style-type: none"> ■ 직접 목에 작용하므로 효과가 빠름 ■ 과립이 타액(침)에 의해 쉽게 용해되어 물 없이 복용할 수 있고 위를 경유하지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 입자를 미립자분말로 하며 타액(침)에 의해 현탁화 → 기도에서 체류 시간을 증가시킴
점액분비 증가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 인체의 정상적인 자정작용(점액분비, 가래에 의한 세균제거 등)을 도와 염증과 불편한 증상을 개선 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 사포닌류 거담제는 위장에서 흡수가 저해됨 → 임상실험결과 위에 직접 투여하는 실험군에 비해 경구 투여군의 기도 점막 분비가 2.5배 증가
섬모운동	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기도 내벽의 뮤신의 양을 증가시켜 기도 내벽 보호와 섬모운동을 촉진함 	<ul style="list-style-type: none"> ■ MUC5AC 등을 제어하여 뮤신의 양을 조절함

(나) 점액분비 형태에 따른 치료방법

구분	치료방법	관련약물
분비물 배출자극	기도에 직접적인 자극으로 점액선의 분비를 증가시킴으로 분비물 배출을 유도함	길경, 세네가, 인삼, 용담, 원지 등 saponin계함유 생약류, NH4Cl 등
분비물 점도저하	점액 용해제(mucolytics)를 이용하여 점액성 분비물의 점도를 낮추어 배출이 용이하게 함	ambroxol, bromhexine, cetylcysteine, S-carboxymethylcysteine

(다) 시장제품 조사

제품명	용각산	용각산콜과립
제조사	보령제약	
의약품 분류	일반의약품(비급여)	
주성분	감초가루 8.3mg, 세네가가루 500ug, 길경가루 11.7 mg, 용뇌 11mg, 행인 830ug	감초가루 17.0mg, 세네가가루 0.7mg, 길경가루 14.0mg, 행인가루 2.5mg, 인삼가루 14.0mg, 아선약 1.4mg, 노스카핀 5.0mg
제품성상	백색의 미세한 가루로서 특유의 방향과 맛이 있음	특유의 방향과 단맛, 신맛 및 청량감을 가지고 있는 과립 (복숭아향, 민트향, 블루베리향, 커피민트향)
포장단위 (복용량)	25g, 55g 성인 : 1회 1스푼 (0.3g), 1일 3~6회	700mg (1포, 7포, 12포, 18포, 200포) 성인 : 1회 1포 3-6회
가격	3,500원	3,000
매출액	연매출 약 100 억원 (2016년 기준)	
효능	기침, 가래, 인후의 염증으로 인한 불편함	기침, 가래, 인후(목구멍)의 염증에 의한 인후(목구멍)의 목쉼, 통증, 부기, 불편감
상호작용	타 진해거담제, 감기약, 항히스타민제 동시 복용금지	타 진해거담제, 감기약, 항히스타민제 동시 복용금지
부작용	발진, 발적, 구역, 구토, 식욕부진, 어지러움증	발진, 발적, 구역, 구토, 식욕부진, 어지러움증, 위알도스테론증(혈압상승, 저칼륨증 등), 근병증(저칼륨으로 인한 근육병증)

(한국소비자원)

(2) 원료 표준화

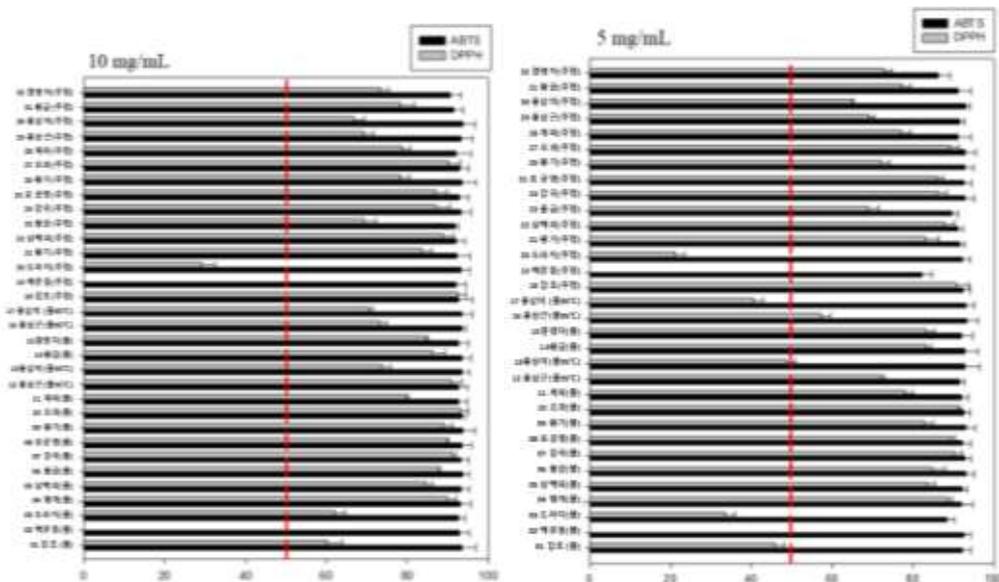
(가) 추출

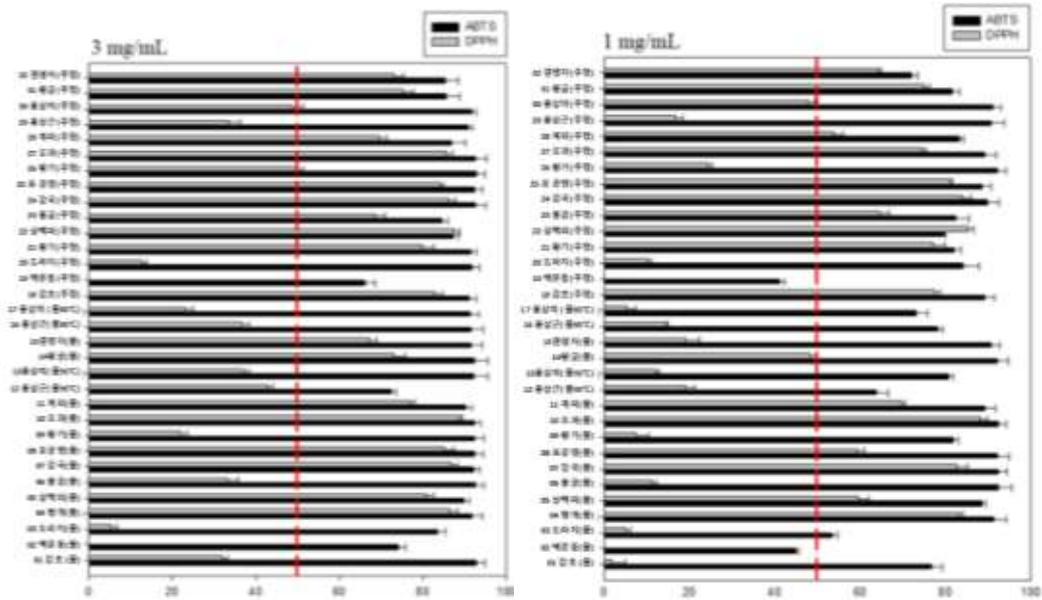
- 물 추출물(순번 : 1-17) 및 70% 에탄올 추출물(순번:18-32) 제조하여 16종 샘플의 추출용매 별 원물의 샘플 32종의 추출 수율을 확인결과 뿌리와 줄기를 사용하는 원물에서 높은 추출 수율을 확인함

순번	구분	추출 수율(%)	순번	구분	추출 수율(%)
1	감초	18.8	17	홍삼미 (85°C)	20.5
2	맥문동	49.3	18	감초	15.3
3	도라지	20.4	19	맥문동	28.5
4	형개	9.6	20	도라지	25.5
5	상백피	9.5	21	형개	8.1
6	울금	11.0	22	상백피	10.5
7	감국(국화)	15.3	23	울금	16.9
8	포공영	17.3	24	감국(국화)	24.5
9	황기	16.7	25	포공영	19.6
10	모과	18.7	26	황기	13.1
11	계피	3.9	27	모과	25.8
12	홍삼근	19.8	28	계피	5.9
13	홍삼미	22.8	29	홍삼근	16.3
14	황금	23.3	30	홍삼미	23.1
15	결명자	6.3	31	황금	21.5
16	홍삼근 (85°C)	19.7	32	결명자	4.7

(나) 산화실험(DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정)

- 맥문동(2번), 맥문동(19번)을 제외한 대부분의 추출물에서 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 나타냄
- 최종농도가 낮아질수록 몇몇 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능이 급격히 줄어드는 것을 확인함
- 이에 DPPH, ABTS 라디칼 소거능을 비교하여 낮은 농도에서 항산화능 50%를 넘지 못한 추출물을 제외한 형개(4번), 상백피(5번), 울금(6번), 감국(국화)(7번), 포공영(8번), 황기(9번), 모과(10번), 계피(11번), 감초(18번), 형개(21번), 상백피(22번), 울금(23번), 감국(국화)(24번), 포공영(25번), 모과(27번), 계피(28번), 황금(31번), 결명자(32번) 총 18개의 추출물의 항산화 활성을 확인할 수 있었음
- 항산화 활성 평가결과 감국(국화)과 황금은 저농도 (1mg/mL)에서 활성이 높은 결과 값을 확인함
- 다른 활성이 좋은 소재들은 시중에 많이 판매되고 있는 제품의 부원료 및 주원료로 많이 사용되고 있으므로, 제품 개발에 대한 차별성 및 특이성이 없음. 따라서, 제품의 차별화를 위해 항산화 활성이 높은 감국(국화), 황금을 선정함
- 항산화, 세포독성평가, 세포 활성평가(항염증) 실험데이터를 통하여 복합소재 및 복합비율을 설정함





<열수, 주정추출물의 항산화 활성>

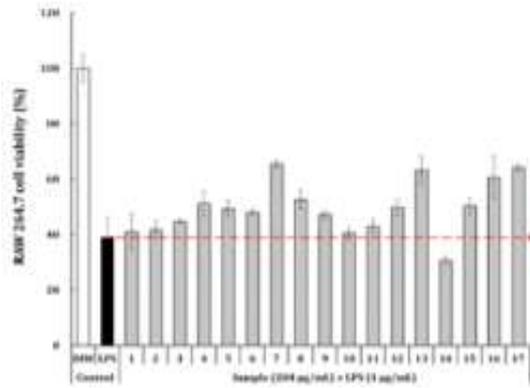
(다) 세포 활성평가

1) 열수추출물 세포독성실험

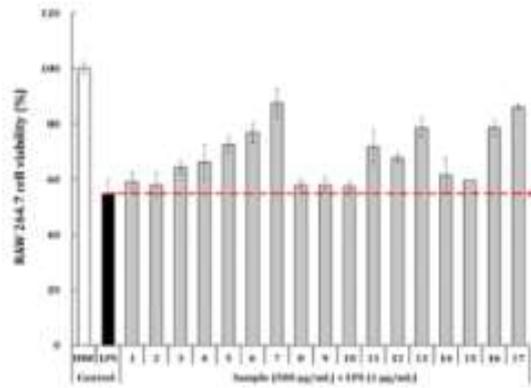
- Raw cell과 기관지세포주(A549, NCI-H292)에 추출물 샘플을 평가하여 세포독성 및 활성을 평가함.
- 1,000 ug/mL의 고농도에서 13번(홍삼미), 14번(황금), 17번(홍삼미 85°C) 시료에서 우수한 항염증 활성을 나타내기는 했으나, 세포독성이 확인되었기 때문에 이들의 활성은 결국 세포 독성에 의한 활성일 것으로 추정되었음.

2) 70% 에탄올 추출물 세포독성실험

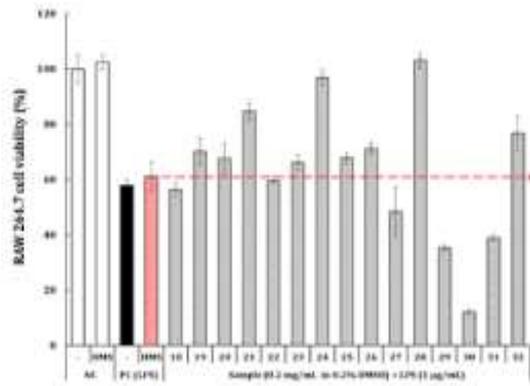
- 200 ug/mL의 저농도에서 29번(홍삼근), 30번(홍삼미), 31번(황금) 시료는 우수한 항염증 활성을 나타내기는 했으나, 세포독성이 확인되었기 때문에 이들의 활성은 결국 세포독성에 의한 활성일 것으로 추정되었음
- 500 ug/mL의 농도에서, 28번(계피), 29번(홍삼근), 30번(홍삼미) 시료는 세포에 대한 강한 독성이 나타났으며, 18번(감초) 및 31번(황금) 시료는 미약한 세포독성이 확인되었음



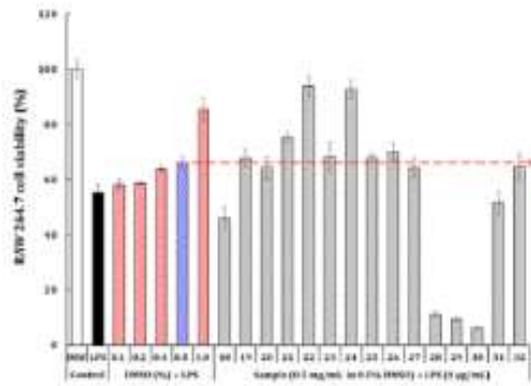
열수추출 200ug/mL



열수추출 500ug/mL

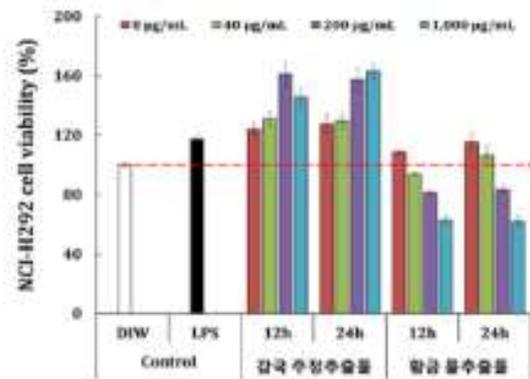


70% 에탄올추출 200ug/mL

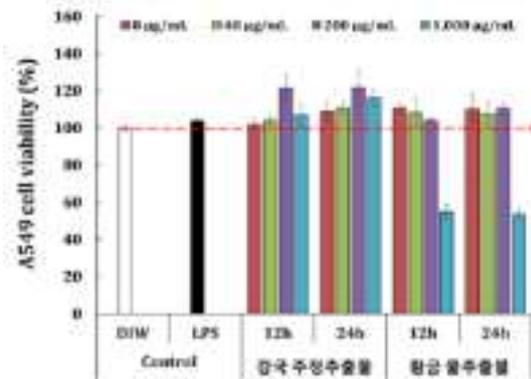


70% 에탄올추출 500ug/mL

<Raw cell 세포독성>



NCI-H292 Cell

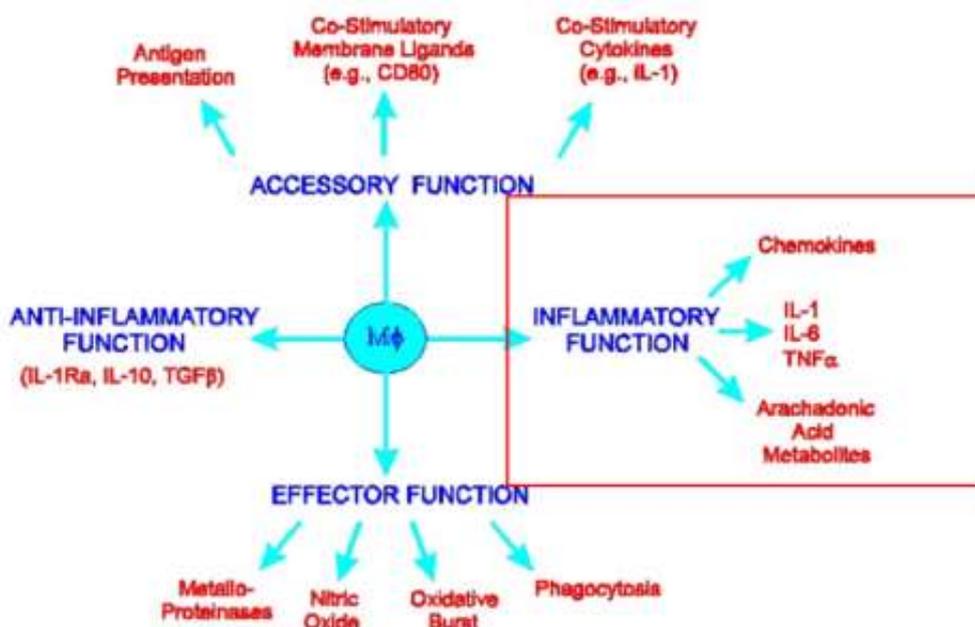


A549 Cell

<기관지세포 세포독성>

(라) 항염증 활성

- pro-inflammatory mediator(TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 및 NO)의 생성 억제를 확인함



<기관지 질환과 연관된 항염증 기작>

(J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 22(4), 439-444, 2007)

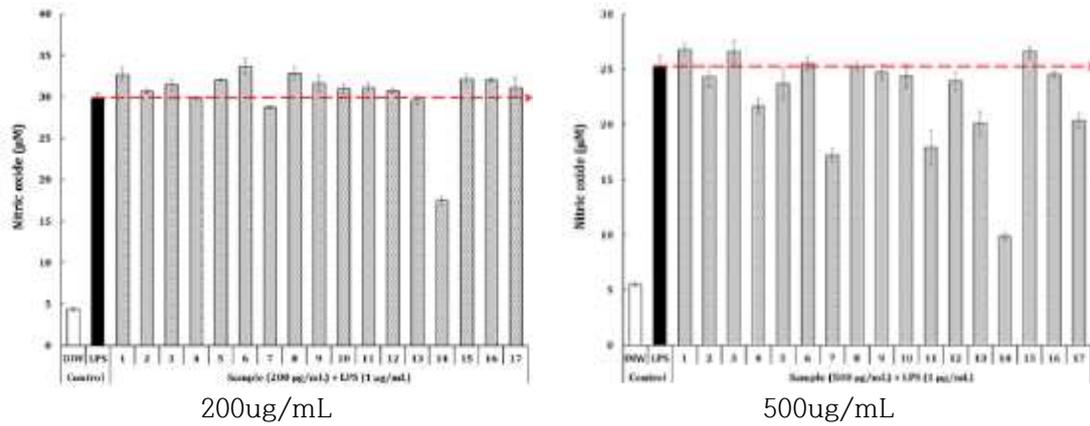
1) 열수추출물 세포 활성평가

- 200 ug/mL의 농도에서, 17종의 물 추출물 시료들 중에서 14번(황금) 시료는 약간의 세포 독성이 확인되기는 했으나, 타 시료들에서는 보이지 않는 항염증 활성이 우수하게 나타나는 것으로 확인함
- 500 ug/mL의 농도에서, 17종의 물 추출물 시료들은 모두 세포독성이 나타나지 않았으며, 14번(황금)과 함께 7번(감국(국화)) 및 11번(계피)에서는 타 시료에 비해 우수한 항염증 활성을 보임
- 이들을 제외한 11번(계피), 7번(감국(국화)), 4번(형개)에서는 세포독성이 없으면서 상대적으로 우수한 항염증 활성을 확인하였음

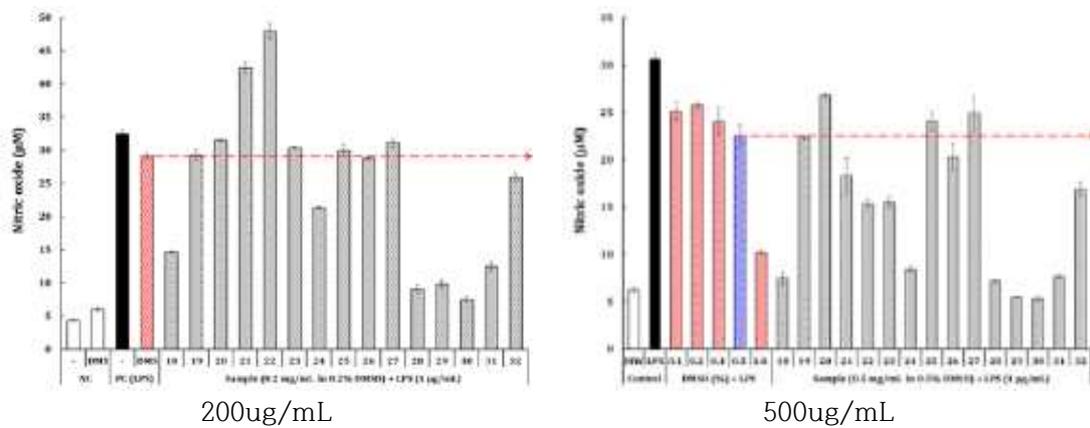
2) 70% 에탄올 추출물 세포 활성평가

- 200 ug/mL의 저농도에서 29번(홍삼근), 30번(홍삼미), 31번(황금) 시료는 우수한 항염증 활성을 나타내기는 했으나, 세포독성이 확인되었기 때문에 이들의 활성은 결국 세포독성에 의한 활성일 것으로 추정되었음
- 500 ug/mL의 농도에서, 28번(계피), 29번(홍삼근), 30번(홍삼미) 시료는 세포에 대한 강한 독성이 나타났으며, 18번(감초) 및 31번(황금) 시료는 미약한 세포독성이 확인되었음

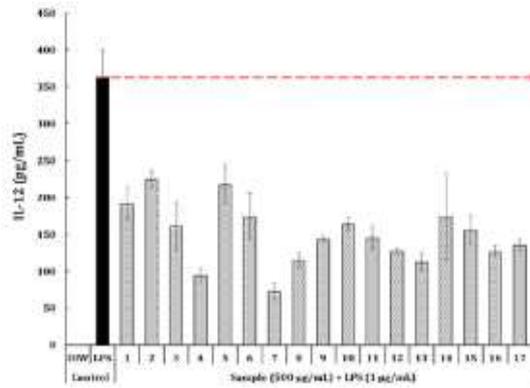
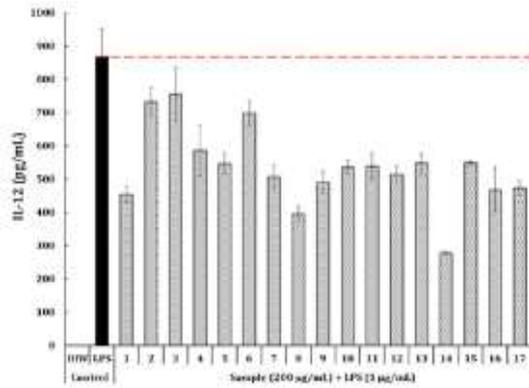
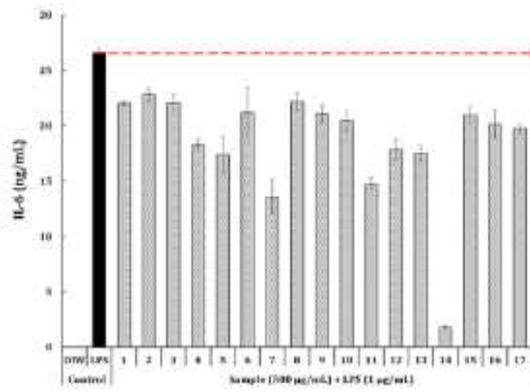
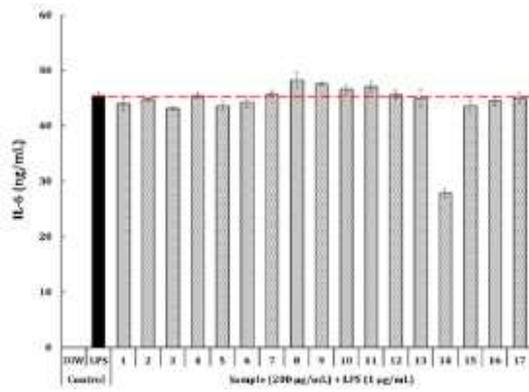
- 황금의 경우 세포독성이 발생하였으나 LPS로 유도시킨 RAW 264.7 세포의 pro-inflammatory mediator의 생성 억제능 측정된 결과, 항염효과가 우수하여 감국(국화)과 복합하여 세포독성 농도 이하에서 사용 가능할 것으로 판단됨
- 최종 스크리닝 결과, 감국 및 감초 등 17종의 소재의 세포활성평가에서 감초보다 우수한 활성을 보인 소재 황금과 기존 예비 소재이며 우수한 효능이 재검증된 감국(국화)을 최종적으로 선정함



<열수추출물 NO생성 억제 실험데이터>



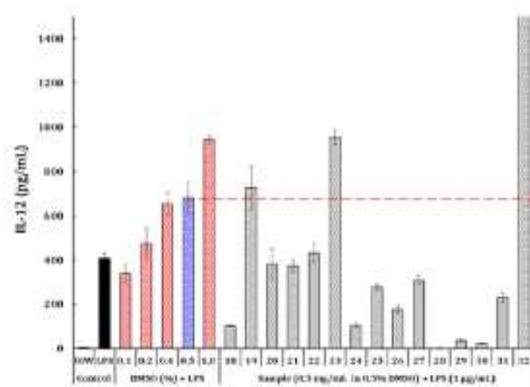
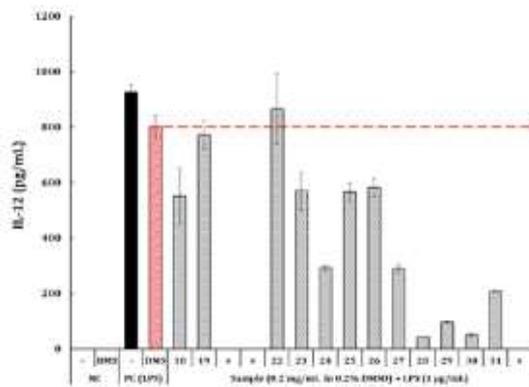
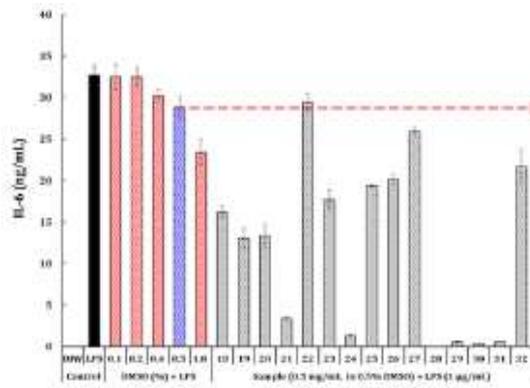
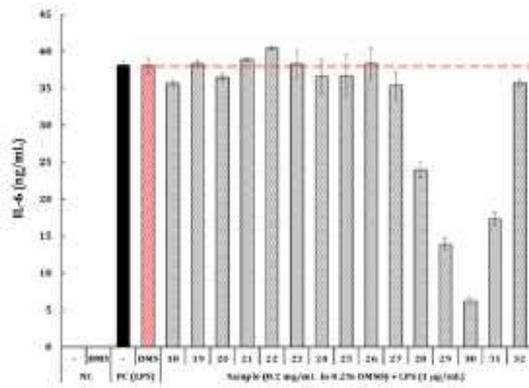
<70% 주정 추출물 NO생성 억제 실험데이터>



200ug/mL

500ug/mL

<열수추출물 농도별 세포 활성평가>



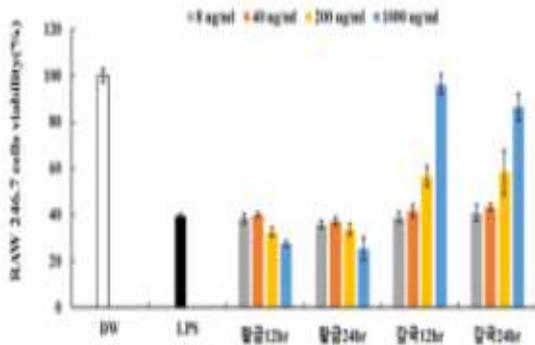
200ug/mL

500ug/mL

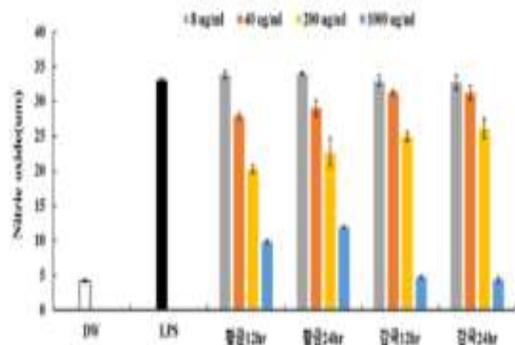
<70% 주정추출물 농도별 세포 활성평가>

3) 감국(국화) 및 황금의 추출시간별 세포 활성평가

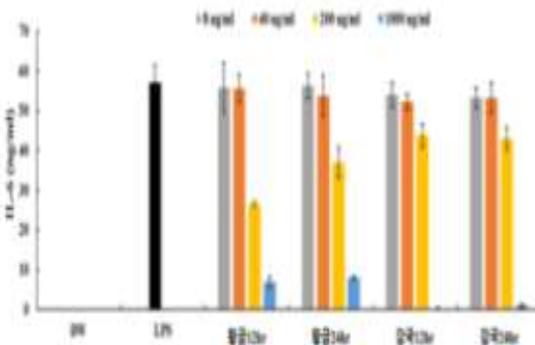
- 추출시간별 세포 활성평가 결과 시료 간 차이는 거의 없는 것으로 보이지만, 오히려 12시간 추출을 진행한 경우에 동일농도에서 항염증 활성이 근소하게 우수한 것으로 보아 추후 시료 추출 시 추출시간은 12시간이 적합할 것으로 판단됨



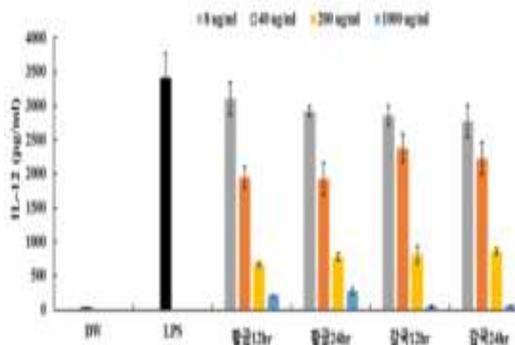
<추출시간별 세포독성>



<NO inhibition>



<IL-6 inhibition>

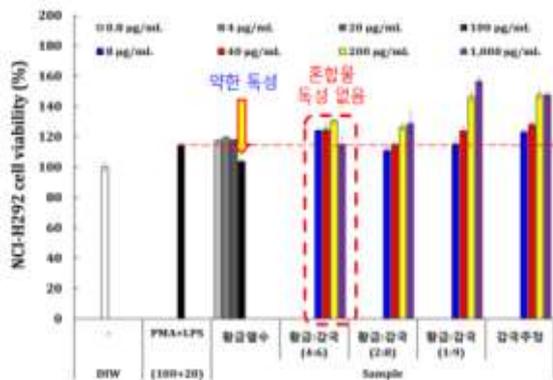


<IL-12 inhibition>

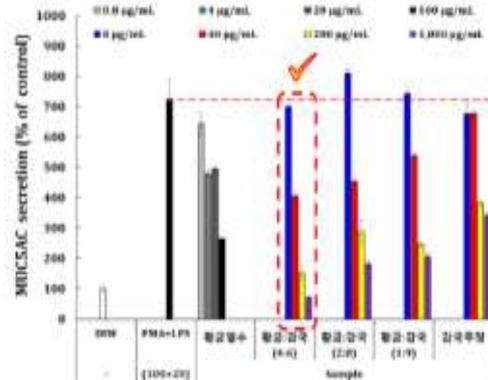
(마) 복합소재, 복합비 선정

- 항산화 효과와 항염증지표들에서 활성이 우수한 70% 주정 감국(국화) 추출물과 열수 황금을 선정하여 복합비율 실험을 선정함
- 기관지 상피세포로부터 MUC5AC의 생성을 억제할 수 있는 소재로 황금 열수추출물과 70% 주정 감국(국화) 추출물을 각기 다른 비율(1:9, 2:8 및 4:6)로 혼합한 혼합물을 조제하였으며, 다양한 농도조건에서 MUC5AC 억제활성을 평가하였음
- 70% 주정 감국(국화) 추출물은 단독 처리 시 1,000 ug/mL까지 농도를 높여도 독성이 나타나지 않았으나, 황금 열수추출물 경우 단독 처리 시 100 ug/mL의 저농도에서도 약 10% 미만의 약한 독성이 확인되었음
- 황금 열수추출물과 70% 주정 감국(국화) 추출물이 모두 포함된 혼합시료에서는 황금 열수추출물 최대 400 ug/mL이 포함되어도 독성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었음

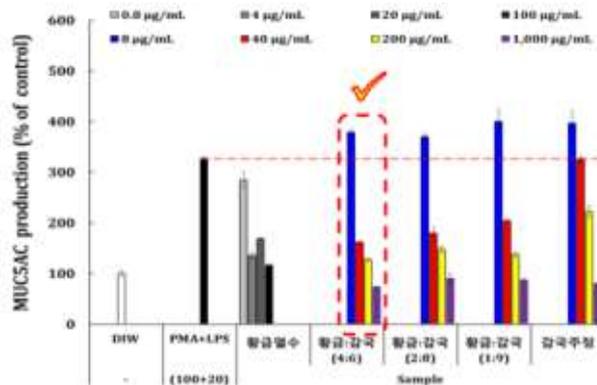
- 황금 열수추출물과 70% 주정 감국(국화) 추출물이 4 : 6의 비율로 혼합된 시료에서는 NCI-H292 기관지 세포에 독성을 나타내지 않으면서 MUC5AC의 생성과 분비를 우수하게 억제할 수 있는 것으로 나타났음
- 세포활성평가를 바탕으로 동물실험모델의 황금 열수추출물과 70% 주정 감국(국화) 추출물 투여 복합비(복합비 6:4, 7:3, 8:2) 및 원료 표준화를 위한 최종복합비를 선정함



< NCI-H292 cell viability >



< MUC5AC secretion (cultured supernatant) >



<MUC5AC production (cell lysate)>

(3) 국화 및 황금의 기원, 개발경위, 국내·외에서의 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
(가) 기원

1) 감국(국화)

- 감국(국화)과(Compositae)에 속하는 감국(국화)(Chrysanthemum)은 다년생 초본류로서 우리나라 전역에 자생하는 식물로 경관 조성과 식품재료 등으로 널리 이용되고 있으며, 우리나라를 비롯하여 감국(국화)을 식용으로 하는 나라는 중국과 일본으로 관상용 감국(국화)은 차, 약주 등으로 이용하지만, 품종에 따라 이취 및 쓴맛이 적고 향이 좋아 식용으로 쓰기 적합한 것을 선택하여 식용으로 사용하는 것으로 알려져 있음
- 감국(국화)차는 신경통이나 두통·기침 등에 효과적이고 피부를 아름답게 하는 것으로 알려져 있으며, 풍열을 없애고 해독·진정 작용 및 눈을 밝게 하고 현기증·위장염·고혈압·감기 등에도 효과가 있음

- 감국(국화)은 생약의 하나로 수명을 늘리고 회춘하는 약의 재료이며, 고열, 두통, 어지럼증, 저림 치료에 효과가 있음(출처: 신농본초경)
- 감국(국화)은 하루 4~15g을 탕제·환제·산제 형태로 만들어 먹음(출처: 한의학대사전)
- 국내에 감국(국화)차로 판매되는 제품의 경우 건조감국(국화) 10g을 차로 섭취함
- 중국에서는 음력 9월 9일, 곧 중양절에 감국(국화)주를 가지고 등고(登高)하는 풍습이 있었다고 하는데, 우리도 9월 9일에 민간에서 감국(국화)주를 담가 먹는 풍습이 있음

2) 황금

- 황금(*Scutellaria baicalensis*)은 동시베리아 원산으로 중국 동부와 우리나라 각지에서 자생 또는 재배되고 있으며 예로부터 약초로 이용되고 있음. 특히 황금의 주피를 벗긴 뿌리를 생약명으로 황금(黃芩, *Scutellariae radix*)이라 하는데 황금은 해열, 이뇨, 항바이러스, 항균, 진정, 혈압강하, 혈당상승, 이담 등 약리작용이 있어 한방에서 각종 처방약으로 사용하고 있음. 황금의 주요 약효성분은 플라보노이드류인 baicalin, baicalein, wogonin glucuronide 와 wogonin으로 알려져 있음
- 한의학에서 폐경(肺經)·대장경(大腸經)·담경(膽經)에 작용하며, 폐열(肺熱)을 제거하고 습사(濕邪)를 없애며 태아를 안정시키고 출혈을 멎게 함. 약리 실험에서 해열작용·소염 작용·이담(利膽)작용·이뇨작용·위액 분비 억제 작용·항균작용 등이 밝혀져 있으며, 주요 성분인 바이칼린 이 이담(利膽) 작용을 나타내며 항알러지 작용도 함(출처:한의학대사전)
- 폐열로 기침이 나는데, 열이 나고 가슴이 답답하며 갈증이 나는데, 설사, 이질, 황달, 임증(淋證), 결막염, 태동불안(胎動不安), 혈열(血熱)로 인한 출혈 등에 쓰임. 이 밖에 불면증, 위장염, 소장염과 대장염, 간염, 방광염, 요도염, 자궁 및 부속기관의 염증, 기관지천식 등에도 쓰임. 하루 4~12g을 탕제 형태로 만들어 먹음(출처: 한의학대사전)
- 알려진 효능성분들로서 baicalin, baicalein, wogonin, wogonoside 등의 성분이 함유되어 있다고 알려져 있어, 해열, 이뇨, 항바이러스, 진정, 혈압강하 등의 작용이 있음(출처:농촌진흥청, 생약정보시스템)

<원재료의 기원에 관한 정보 요약>

원재료명	감국(국화)추출물	황금추출물
학명	<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi
원산지	대한민국	대한민국
사용부위	꽃	뿌리

(농촌진흥청)

(나) 국내·외 인정·허가 현황

1) 국내

- 원재료 ‘감국(국화)’은 식품의 원료로 사용 가능(식약처 제2017-102호, ‘17.12.15)
- 원재료 ‘황금’은 식품의 원료로 사용 가능(식약처 제2017-102호, ‘17.12.15)
- 「식품공전」 : 감국(국화)(꽃), 황금(뿌리) 모두 “식품에 사용할 수 있는 원료”에 등재되어 있음(사용제한 없음)
- 건강기능식품 기능성원료 개별인정(황금추출물 80% 함유 원료) : 1건

<기능성원료 인정 내용>

- 원료명 : 황금추출물등복합물 (인정번호 제2006-3호)
- 기능성 : 관절건강에 도움을 줄 수 있음 (일일 섭취량 : 황금등복합물로서 1,100 mg)

- 「대한약전의한약(생약)규격집」 : ‘감국(국화)’으로 등재
 - 감국(국화) : 감국(국화)(*Chrysanthemum morifolium* Ramatuelle)의 꽃
- 「대한민국약전」 : ‘황금’으로 등재
 - 황금 : 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리

2) 국외

- 일본약전(The Japanese Pharmacopoeia, the 17th edition)에 등재
 - 품목명 : Chrysanthemum Flower, 기능성 : 해독제/항염증제/해열제
- 일본약전(The Japanese Pharmacopoeia, the 17th edition)에 등재
 - 품목명 : Scutellaria Root, 기능성 : 이뇨제, 완화제

(다) 국내·외 인정·허가 현황

1) 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	감국(국화)향기 감국(국화)차	오뚜기	0.4g 이상	-	-	침출차
	감국(국화)진액	솔향식품	100ml	-	-	추출액

2) 국외

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도
	Chrysanthemum Flower 900mg	EarhNatural Supplements	1.8g	항염증제, 피부재생효과	-	스킨케어
	Vital Guard Supreme	Supreme Nutrition	1.34g (감국(국화)추출물로서 1.12g)	항염작용, 항산화효과	-	건강보조
	Scutellaria Supreme	Supreme Nutrition	0.459g (황금추출물로서 0.459g)	항염증제 수면의 질에 도움	-	건강보조

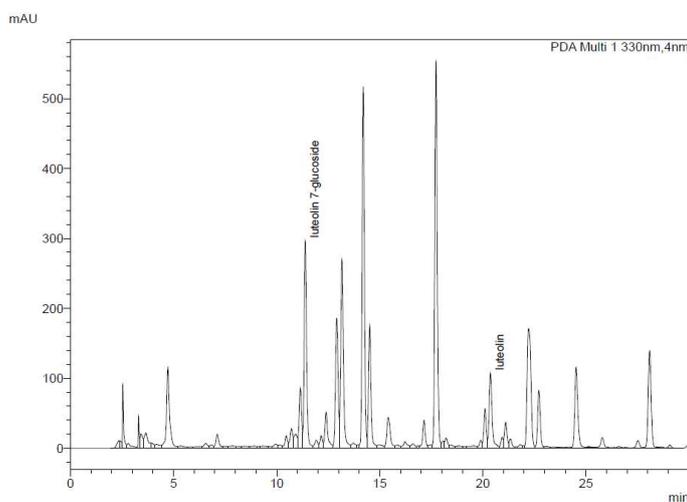
(한국소비자원)

(4) 복합소재 분석법 확립

(가) 감국(국화) 분석법 확립

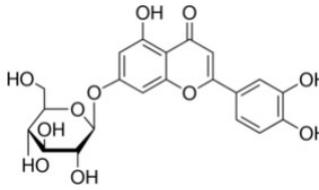
HPLC system	Prominace LC20A (SHIMADZU Co.)
Column	Waters Xselect®HSS C18 (250 X 4.6)mm, 5 μm
Mobile phase	TFA in H ₂ O (pH 3.2) (A), Acetonitrile (B) gradient (0~25min) 15%~40%B, (25~26min) 40%~100%B, (26~30min) 100%B, (30~31min) 100%~15%B, (31~40min) 15%B
Flow rate	1.0ml/min
Wave length	PDA(330nm)
Column temp.	40°C
Injection Vol.	10 μl

<감국(국화)의 분석방법>



<감국(국화)의 지표성분 chromatogram>

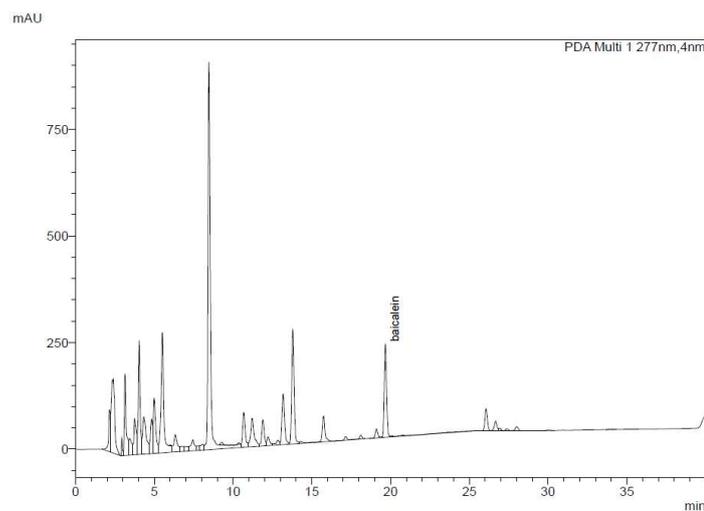
<지표성분 정보 : 루테올린 7 글루코사이드 (Luteolin 7-glucoside)>

일반명	Luteolin 7-glucoside
구조	
분자식	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
분자량	448.38
CAS No.	5373-11-5

(나) 황금 분석법 확립

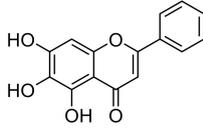
HPLC system	Prominace LC20A (SHIMADZU Co.,)
Column	Waters Xselect®HSS C18 (250 X 4.6)mm, 5 μm
Mobile phase	1% Acetic acid in H ₂ O (A), 1% Acetic acid in Acetonitrile (B) gradient (0~10min) 25%~32%B, (10~20min) 32%~45%B, (20~24min) 45%B, (24~35min) 45%~48%B, (35~36min) 48~100%B, (36~40min) 100%B, (40~41min) 100~25%B, (41~50min) 25%B
Flow rate	1.0ml/min
Wave length	PDA(277nm)
Column temp.	40°C
Injection Vol.	10 μl

<황금의 분석방법>



<황금의 지표성분 chromatogram>

<지표성분 정보 : 바이칼레인 (Baicalein)>

일반명	Baicalein
구조	
분자식	C15H10O5
분자량	270.24
CAS No.	491-67-8

(다) 복합소재 제제 검토

- 복합소재의 기준 및 시험항목 설정(QC항목 설정)
- 분석법이 확립된 복합소재 원료에 대하여 개별인정 원료 신청을 위한 기준시험법(안) 항목설정

<기준 및 시험방법 시험(안) 예비항목 리스트>

예비 항목	관련사항	분석방법	
제품명	감국(국화)과 황금 복합추출물	HPLC	
제품형태	농축액 분말	HPLC	
안전성(QC) 관련 지표	성상	한국표준색이름(산업자원부 기술표준원)참조, 검사의뢰서 참조	
	중금속	납	식품공전 제10.일반시험법 7.식품 중 유해물질시험법 7.1.2.금속별시험에 근거하여 시험 후 ICP-MS로 측정
		총비소	
		카드뮴	
총수은	식품공전 제10.일반시험법 7.식품 중 유해물질시험법 7.1.중금속시험 7.1.2.4.수은(Hg)에 근거하여 시험		
	미생물 - 대장균군	식품공전 제10.일반시험법 3.미생물시험법 3.7.대장균군 3.7.1.점성시험 가.유당배지법에 준하여 실험	
기능성관련 지표	Luteolin, baicalin, baicalein, wogonin	HPLC, UV detector	
지표물질 선정 안	Luteolin, baicalin, baicalein, wogonin	HPLC, UV detector, Phosphoric acid, 아세트오니트릴	

(라) Luteolin 7-glucoside 최적 추출기술 및 공정 표준 설정

1) 시험방법

가) 검액의 조제

- 감국(국화)과 황금 복합추출물에서 luteolin 7-glucoside의 함량을 확인하기 위해, 감국(국화)과 황금 복합추출물 1 g을 취하여 50% 메탄올 수용액 50 mL를 첨가한 후 10분 동안 초음파추출하였다. 추출된 액은 13,000 rpm에서 원심분리하였으며 상등액을 취하여 syringe membrane filter (PVDF, 0.22 µm)하여 검액으로 사용함

나) 표준액의 조제

- Luteolin 7-glucoside 표준품을 25% DMSO + 75% 메탄올 혼합액에 녹여 0.5 mg/mL의 표준액을 조제함

다) HPLC에 의한 감국(국화)과 황금 복합물 중 luteolin 7-glucoside의 동정

- 감국(국화)과 황금 복합추출물 중 luteolin 7-glucoside의 존재 여부를 동정하기 위해 다음과 같은 조건 하에서 HPLC 장비(Prominace LC20A (SHIMADZU Co.))를 이용하여 HPLC 분석을 실시함(하단 표 참조)

<Luteolin 7-glucoside 분석조건>

Column	Waters Xselect®HSS C18 (250 X 4.6)mm, 5µm		
Detector	UV 330 nm		
Mobile phase	(A) TFA in H2O (pH 3.2)		
	(B) Acetonitrile		
	Time (min)	A%	B%
	0	85	15
	25	60	40
	26	0	100
	30	0	100
31	85	15	
40	85	15	
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	40 °C		
Injection vol.	10 µL		
Reference	Luteolin 7-glucoside		
Instrument	Prominace LC20A (SHIMADZU Co.)		

2) 시험결과

가) 직선성, 검출한계, 정량한계

- 6.25~250mg/L 농도 범위에서 단계적으로 희석한 Luteolin 7-glucoside의 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며, 검량선의 상관계수(R²)는 0.999로 높은 직선성을 보임
- Luteolin 7-glucoside의 표준용액 농도 범위에서 3회 반복분석을 통해 얻은 검량선을 이용하여, 검출한계 및 검량한계를 아래 식에 의해 결정하였으며, Luteolin 7-glucoside의 검출한계는 0.838mg/L이었고, 검량한계는 2.536mg/L의 결과를 확인함

$$\text{검출한계 (LOD)} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{정량한계 (LOQ)} = 10 \times \sigma / S$$

σ : 반응의 표준편차, S : 검량선의 기울기

<검출한계, 정량한계 산출 공식>

Compound	Linear range (mg/L)	regression equation (y=a x +b)		Correlation Coefficient (R ²)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
		Slope (a)	Intercept (b)			
Luteolin 7-glucoside	6.25-250	31954.3	-139390	0.999	0.838	2.536
		32025.2	-130495			
		32047.5	-123164			

<Luteolin 7-glucoside 직선성, 검출한계, 정량한계 결과>

나) 정확성

- Luteolin 7-glucoside의 정확성을 세 농도에서 수행한 결과, 회수율이 100.46%~104.91%, RSD 값이 0.036~0.231%의 범위로 높은 정확성을 보임

Compound	Predict Conc. (mg/L)	Observed Conc. (mg/L)			Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
		R-1	R-2	R-3				
Luteolin 7-glucoside	31.25	31.382	31.403	31.400	31.395	0.011	0.036	100.46
	62.5	65.598	65.733	65.430	65.587	0.152	0.231	104.94
	125	127.253	127.642	127.271	127.389	0.220	0.172	101.91

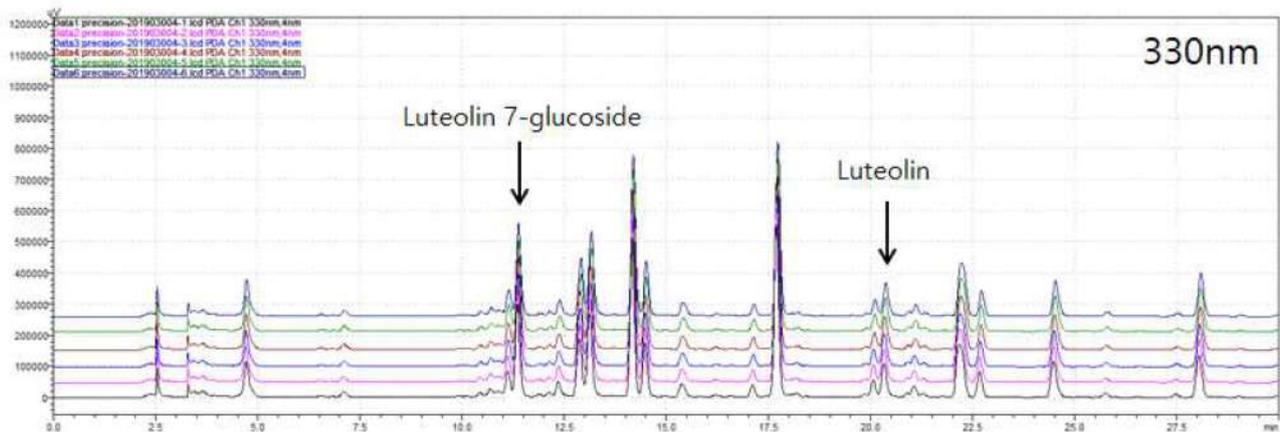
<Luteolin 7-glucoside 정확성 결과>

다) 정밀성

- 정밀성 검토를 위해 감국(국화)과 황금 복합물 시료를 6회 반복 측정한 결과, Luteolin 7-glucoside 평균값은 78.483 mg/L로 6개의 겹침크로마토그램은 아래와 같음. Luteolin 7-glucoside의 상대표준편차는 0.442%로 우수한 정밀성을 나타냄

Compound	Observed Conc. (mg/L)						Mean	SD	RSD (%)
	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6			
Luteolin 7-glucoside	78.356	78.434	78.418	78.380	78.150	79.160	78.483	0.347	0.442

<Luteolin 7-glucoside 정밀성 결과>



<Luteolin 7-glucoside HPLC chromatogram 결과>

라) 특이성

- 세가지 시험용액 (표준용액, 감국(국화)과 황금 복합물 시험용액, 표준용액과 감국(국화)과 황금 복합추출물 시험용액의 혼합액)을 3회 반복 측정한 결과, Luteolin 7-glucoside의 상대표준편차값이 0.036~0.521% 이었으며, 회수율은 95.33~100.46%으로 나타남. 즉, 감국(국화)과 황금 복합추출물 시험용액에서 지표성분인 Luteolin 7-glucoside을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있었음

Compound	Predict Conc. (mg/L)	Observed Conc. (mg/L)			Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
		R-1	R-2	R-3				
Luteolin 7-glucoside	31.25	31.382	31.403	31.400	31.395	0.011	0.036	100.46
	78.483	78.493	78.527	78.381	78.467	0.076	0.097	99.98
	54.866	52.316	52.573	52.028	52.306	0.273	0.521	95.33

<Luteolin 7-glucoside 특이성 결과>

마) 함량

- 확립된 분석법을 이용하여 감국(국화)과 황금 복합추출물의 Luteolin 7-glucoside 함량을 분석하였음. 분석결과 Luteolin 7-glucoside는 3.85 mg/g으로 확인됨

(마) Baicalein 최적 추출기술 및 공정 표준 설정

1) 시험방법

가) 검액의 조제

- 감국(국화)과 황금 복합추출물에서 Baicalein의 함량을 확인하기 위해, 감국(국화)과 황금 복합추출물 1 g을 취하여 50% 메탄올 수용액 50 mL를 첨가한 후 10분 동안 초음파추출하였음. 추출된 액은 13,000 rpm에서 원심분리하였으며 상등액을 취하여 syringe membrane filter (PVDF, 0.22 µm)하여 검액으로 사용함.

나) 표준액의 조제

- Baicalein 표준품을 메탄에 녹여 0.5 mg/mL의 표준액을 조제함

다) HPLC에 의한 감국(국화)과 황금 복합추출물 중 baicalein의 동정

- 감국(국화)과 황금 복합추출물 중 baicalein의 존재 여부를 동정하기 위해 다음과 같은 조건 하에서 HPLC 장비(Prominace LC20A (SHIMADZU Co.))를 이용하여 HPLC 분석을 실시하였음(하단 표 참조)

<Baicalein 분석조건>

Column	Waters Xselect®HSS C18 (250 X 4.6)mm, 5µm		
Detector	UV 277 nm		
Mobile phase	(A) 1% Acetic acid in H ₂ O		
	(B) 1% Acetic acid in Acetonitrile		
	Time (min)	A%	B%
	0	75	25
	10	68	32
	20	55	45
	24	55	45
	35	52	48
	36	10	90
	40	10	90
41	75	25	
50	75	25	
Flow rate	1 mL/min		

Column temp.	40 °C
Injection vol.	10 µL
Reference	Baicalein
Instrument	Prominace LC20A (SHIMADZU Co.)

2) 시험결과

가) 직선성, 검출한계, 정량한계

- 5~200mg/L 농도 범위에서 baicalein의 검량선을 작성하였으며, 검량선의 상관계수(R2)는 0.999로 높은 직선성을 보임
- Baicalein의 표준용액 농도 범위에서 3회 반복분석을 통해 얻은 검량선을 이용하여, 검출한계 및 검량한계를 아래 식에 의해 결정하였으며, Baicalein의 검출한계는 4.598 mg/L이었으며, 검량한계는 13.933mg/L의 결과를 확인함

$$\text{검출한계 (LOD)} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{정량한계 (LOQ)} = 10 \times \sigma / S$$

σ : 반응의 표준편차, S : 검량선의 기울기

<검출한계, 정량한계 산출 공식>

Compound	Linear range (mg/L)	regression equation (y=a x +b)		Correlation Coefficient (R ²)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
		Slope (a)	Intercept (b)			
Baicalein	5-200	27119.4	-51074.7	0.999	4,598	13,933
		26930.8	-104351			
		26884.2	-123650			

<Baicalein 직선성, 검출한계, 정량한계 결과>

나) 정확성

- Baicalein의 정확성을 세 농도에서 수행한 결과 회수율이 92.61~99.37%, RSD 값이 0.280~0.475%의 범위로 높은 정확성을 보임

Compound	Predict Conc. (mg/L)	Observed Conc. (mg/L)			Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
		R-1	R-2	R-3				
Baicalein	25	23,352	23,241	23,131	23,241	0,111	0,475	92,97
	50	46,453	46,247	46,213	46,304	0,130	0,280	92,61
	100	99,610	99,040	99,451	99,367	0,294	0,296	99,37

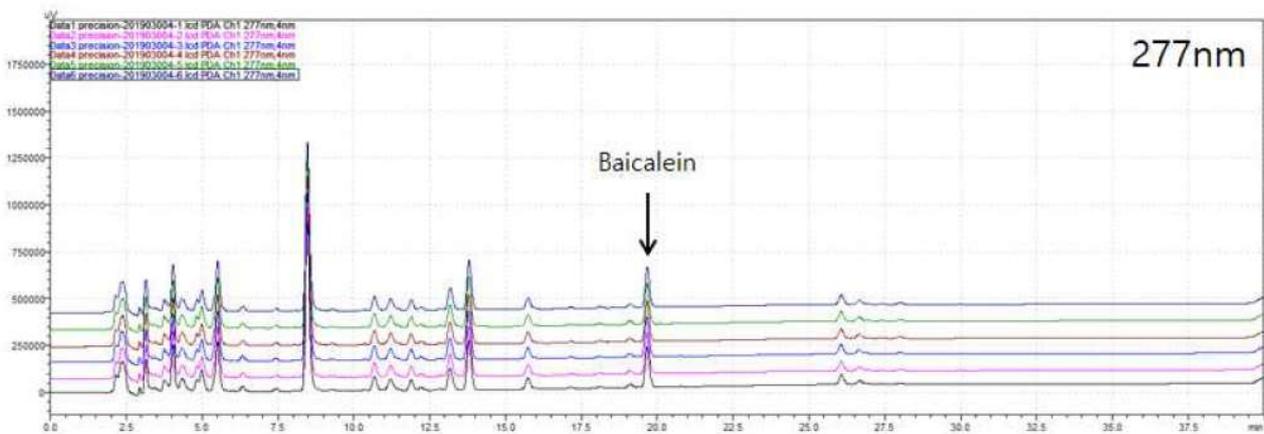
<Baicalein 정확성 결과>

다) 정밀성

- 정밀성 검토를 위해 감국(국화)과 황금 복합추출물 시료를 6회 반복 측정한 결과, Baicalein 평균 값은 84.911 mg/L으로 6개의 겹침크로마토그램은 아래와 같음. Baicalein의 상대표준편차는 0.334%로 우수한 정밀성을 나타냄

Compound	Observed Conc. (mg/L)						Mean	SD	RSD (%)
	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6			
Baicalein	84.878	84.761	84.497	85.107	85.321	84.899	84.911	0.283	0.334

<Baicalein 정밀성 결과>



<Baicalein HPLC chromatogram 결과>

라) 특이성

- 세가지 시험용액 (표준용액, 감국(국화)과 황금 복합추출물 시험용액, 표준용액과 감국(국화)과 황금 복합추출물 시험용액의 혼합액)을 3회 반복 측정한 결과 Baicalein의 상대표준편차값이 0.024~0.755% 이었으며, 회수율은 99.12~104.75%로 나타냄. 즉, 감국(국화)과 황금 복합추출물 시험용액에서 지표성분인 Baicalein을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있었음

Compound	Predict Conc. (mg/L)	Observed Conc. (mg/L)			Mean	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
		R-1	R-2	R-3				
Baicalein	100	99.146	99.101	99.109	99.119	0.024	0.024	99.12
	84.911	85.151	85.147	85.400	85.233	0.145	0.170	100.38
	92.455	96.231	96.653	97.654	96.846	0.731	0.755	104.75

<Baicalein 특이성 결과>

마) 함량

- 확립된 분석법을 이용하여 감국(국화)과 황금 복합추출물의 baicalein 함량을 분석하였음. 분석결과 Baicalein는 4.17 mg/g으로 확인됨

(5) 최적 추출기술 및 공정 표준 설정

(가) 감국(국화) 최적 추출기술 및 공정 표준 설정

1) 시험방법

가) 검액의 조제

- 감국(국화)의 지표물질인 luteolin의 함유여부를 동정하기 위해 감국(국화) 시간별 추출물 (12 h 및 24 h 추출물) 및 지역별 추출물(1차, 2차, 3차 추출물)을 각각 5 mg 씩(단, 지역별 추출물은 500 mg) 취하여 70% 에탄올 수용액 0.5 mL (지역별 추출물은 50 mL)을 첨가한 후 10분 동안 초음파추출(40 kHz, 실온) 하였음. 추출된 액은 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였으며 상등액을 취하여 syringe membrane filter (PVDF, 0.45 μm)하여 검액으로 사용함

나) 표준액의 조제

- Luteolin 표준품 1.0 mg을 각각 정밀히 달아 70% 에탄올 수용액 10 mL에 녹여 0.1 mg/mL의 표준액을 조제함

다) HPLC에 의한 감국(국화) 추출물 중 luteolin의 동정

- 감국(국화) 추출물 중 luteolin의 존재여부를 동정하기 위해 다음과 같은 조건 하에서 두 종류의 HPLC 장비(Waters Alliance system과 Shimadzu LC-20AD system)를 이용하여 HPLC 분석을 실시함(하단 표 참조)

<HPLC analytical condition of luteolin in *Chrysanthemum morifolium* Ramat extracts>

Column	Hector-M C18 (250 x 4.6 mm (i.d.), 5 μm)		
Detector	UV 330 nm		
Mobile phase	(A) 0.1% phosphoric acid in water		
	(B) acetonitrile		
	Time (min)	A%	B%
	0	85	15
	25	60	40
	26	0	100
	31	0	100
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	30 °C		
Injection vol.	10 μL		
Reference	luteolin		
Instrument	Waters Alliance system, Shimadzu LC-20AD system		

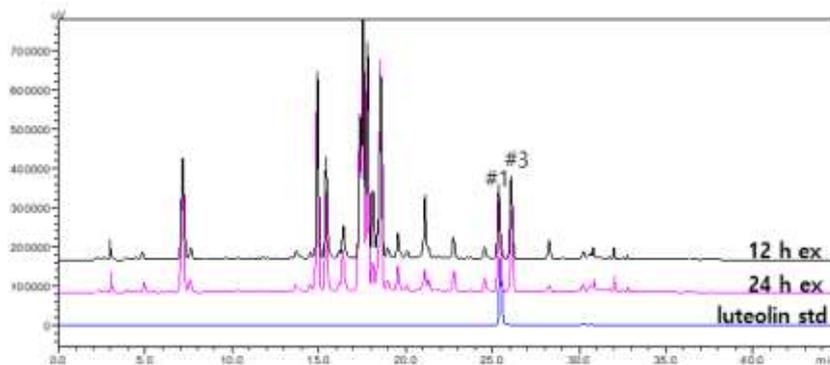
2) 시험결과

가) 시료채취량

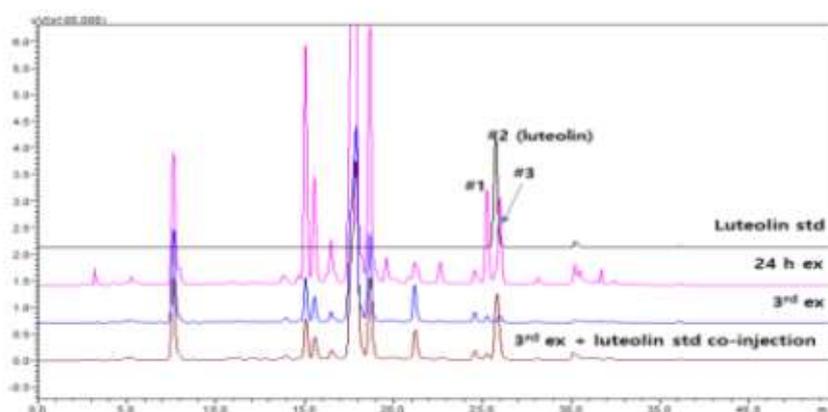
- 감국(국화) 12시간 추출물 3회 취한량: 5.0, 5.0, 5.0 mg
- 감국(국화) 24시간 추출물 3회 취한량: 5.0, 5.0, 5.0 mg
- 감국(국화) 1차(제천) 추출물 3회 취한량: 500.0, 510.0, 510.0 mg
- 감국(국화) 2차(의성) 추출물 3회 취한량: 500.0, 500.0, 510.0 mg
- 감국(국화) 3차(안동) 추출물 3회 취한량: 510.0, 500.0, 510.0 mg

나) 크로마토그램

- 아래 그림의 HPLC chromatogram과 같이 감국(국화)의 지표물질인 luteolin의 표준품은 머무름 시간(t_R)은 약 25.5분 부근에서 luteolin의 성분피크가 확인됨

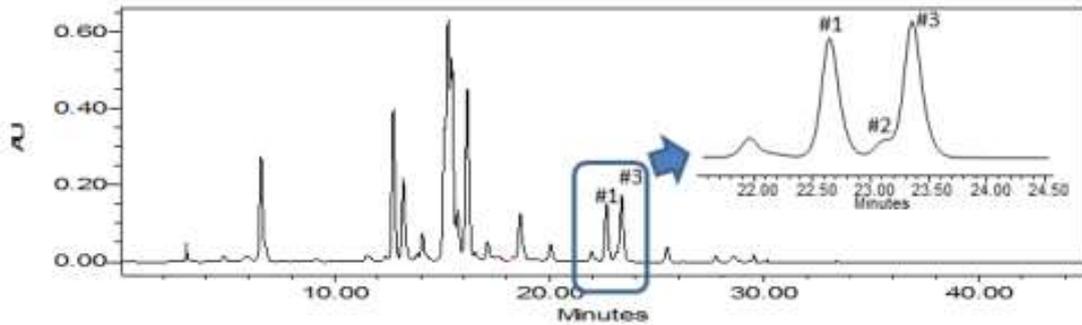


<HPLC chromatograms of *Chrysanthemum morifolium* Ramat (12 h, 24 h)>

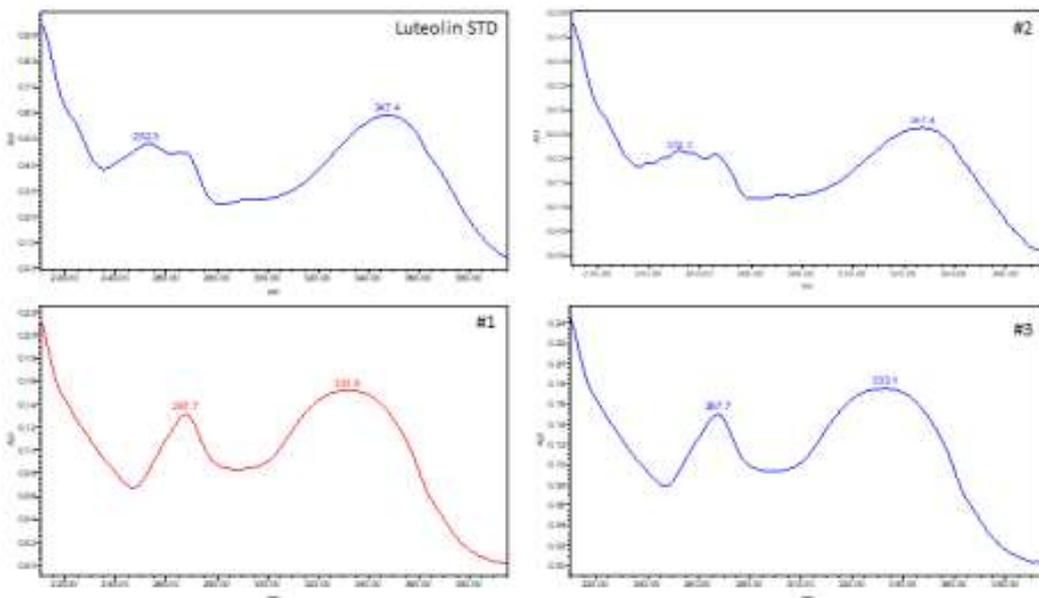


<HPLC chromatograms of *Chrysanthemum morifolium* Ramat (24 h, 3rd extraction)>

- 감국(국화) 추출물의 12 h와 24 h 추출물에서 luteolin 성분 피크로 추정되는 1번 피크와 표준품 luteolin의 머무름 시간이 정확히 일치하지 않음
- 좀 더 명확하게 확인하기 위해, 아래 그림과 같이 luteolin std와 서로 다른 두 종의 감국(국화) 추출물(24 h ex와 3rd ex)의 HPLC chromatogram 패턴을 비교한 결과, 각 추출물 시료 중 모든 성분 피크들의 머무름 시간이 서로 일치함을 알 수 있었음. 그러나 luteolin 표준품인 2번 성분 피크와 상기 그림에서 언급되었던 1번 성분 피크와는 확연한 차이를 보임
- 또한, sample 2에 luteolin 표준품을 co-injection하여 비교한 결과에서도 1번 피크와 일치하지 않았고, 오히려 3번 피크에 더 가까운 패턴을 보임
- 한편, 아래 그림과 같이 HPLC-DAD 검출기를 활용하여 uv spectrum을 비교한 결과에서도 1번과 3번 성분피크는 luteolin 표준품의 성분피크와는 uv spectrum이 확연히 다른 패턴을 보임. 이에 반해 2번 성분피크는 표준품의 UV spectrum 패턴과 완전히 일치함



<HPLC chromatogram of *Chrysanthemum morifolium* Ramat extract>

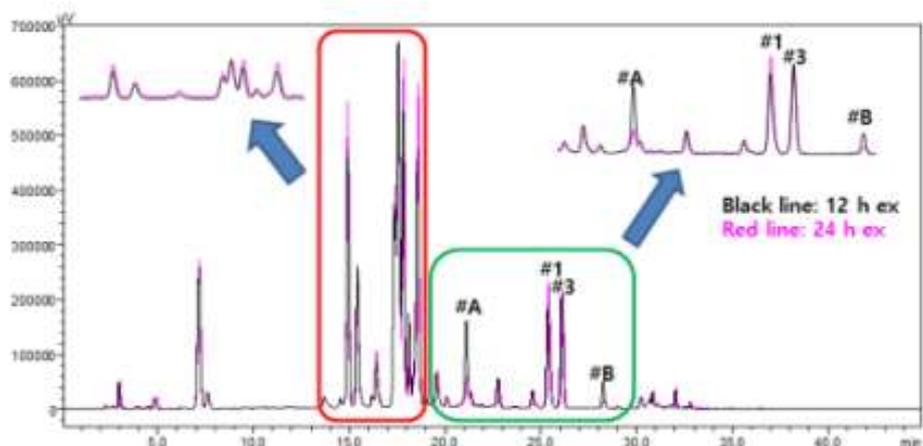


<UV spectrum of three components in *Chrysanthemum morifolium* Ramat extract>

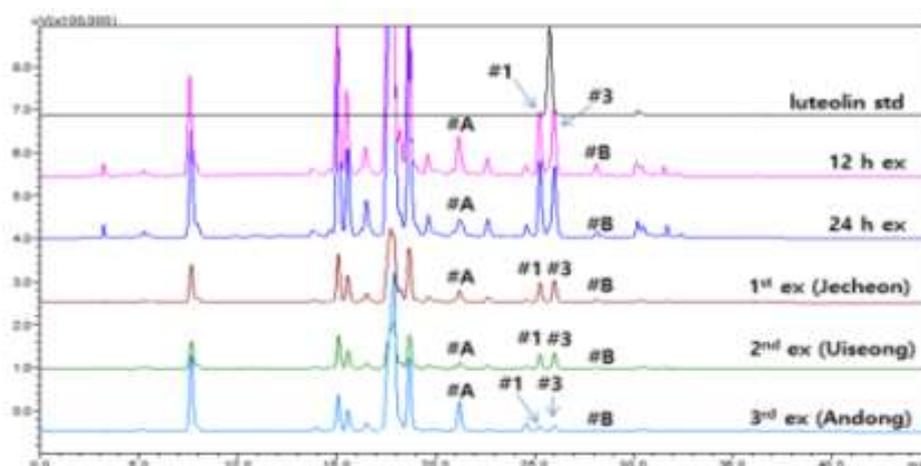
- 따라서, 감국(국화) 추출물에서 luteolin의 표준품과 일치하는 성분피크는 2번 성분피크로 판단되며, 각 추출물 중 luteolin은 비교적 소량으로 확인되므로 지표물질로 활용하기에는 다소 부족할 것으로 판단되며 상기 분석조건으로 분석 시에는 luteolin을 정확하게 정량할 수 없음을 확인함
- 그래서 이를 대체할 새로운 성분이 필요하며 후보로는 1번 피크와 3번 피크가 적합할 것으로 판단되며, 추후에 LC-MS를 활용하여 이들 성분이 정확히 무엇인지 동정할 예정임

다) HPLC 크로마토그램

- 감국(국화)의 각 추출조건별 패턴분석을 위해 아래 그림과 같이 주요 성분피크(#1, #3, #A, #B)를 선정하여 각 성분들의 피크면적을 계산하여 상대적인 피크면적 비율을 구하여 다음 표와 같이 감국(국화)의 추출시간별, 지역별 추출 시료의 함량을 비교함



<HPLC chromatogram of four components in *Chrysanthemum morifolium Ramat* >



<HPLC chromatogram of four components in *Chrysanthemum morifolium Ramat*>
(extraction time: 12 h, 24 h ; harvest region: 1st ex (Jecheon), 2nd ex (Uiseong), 3rd ex (Andong))

<The content of *Chrysanthemum morifolium Ramat* ex>

Samples		Average Peak Area ($\times 10^3$) \pm S.D.					Relative peak area ratio (%) ^a					Brix
		#1	#3	#A	#B	Total	#1	#3	#A	#B	Total	
Extraction time	12 h	2031 ± 21	1998 ± 33	1426 ± 327	400 ± 95	5856 ± 428	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-
	24 h	2442 ± 48	2005 ± 36	519 ± 5	141 ± 2	5107 ± 91	1.2	1.0	0.4	0.4	0.9	-
Harvest region	1 st ex	557 ± 15	651 ± 23	433 ± 8	109 ± 0	1750 ± 45	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	28.3 %
	2 nd ex	414 ± 9	476 ± 20	219 ± 6	47 ± 1	1155 ± 36	0.7	0.7	0.5	0.4	0.7	32.4 %
	3 rd ex	143 ± 1	180 ± 20	920 ± 10	24 ± 1	1268 ± 19	0.3	0.3	2.1	0.2	0.7	54.3 %

(extraction time: 12 h, 24 h ex), 1st (Jecheon), 2nd (Uiseong) and 3rd (Andong) ex.)

^aRelative peak area ration (%)

= {(peak area of each sample extract in each treatment / peak area of first sample in each treatment) x 100}

- 위의 표와 같이 감국(국화)의 추출시간별, 수확 지역별로 추출한 시료에 대해 감국(국화) 시료 중 4개의 주요 성분 피크 (#1, #3, #A, #B)을 선정함. 이때 선정 기준은 아래 그림과 같이 기존 luteolin과 유사한 머무름 시간을 갖고 추출조건에 따라 큰 함량편차가 없는 #1과 #3을, 그리고 추출조건에 따라 큰 함량 편차를 보이는 #A, #B를 각각 선정함
- 함량 계산은 각 추출조건 중 첫 번째 추출시료(시간별: 12 h ex; 지역별: 1st ex)를 기준으로 다른 시료의 상대적인 피크면적 비율을 비교하여 추출조건에 따른 함량 변화를 비교함
- 분석결과, 시간별 추출조건에서는 12 h 추출물이 24 h보다 일부 성분은 적게 추출되거나 전반적으로 12 h 추출물이 더 양호한 결과를 보임
- 반면에, 지역별 추출조건에서는 전반적으로 1차 (제천) 추출물이 다른 추출물보다 더 양호한 함량 결과를 보임
- 따라서, 감국(국화)으로부터 유효성분을 추출하기 위한 최적 조건은 1차 (제천) 시료를 12시간 추출하는 것이 가장 양호한 결과가 예상됨

(나) 황금 최적 추출기술 및 공정 표준 설정

1) 시험방법

가) 검액의 조제

- 황금 시간별 추출물(12 h, 24 h 추출물) 시료는 각 10 mg (단, 6시간 추출물은 5 mg) 씩을, 각 지역 추출 시료를 각 50 mg을 정밀하게 달아서 70% 에탄올 수용액 50 mL을 첨가한 후 10분 동안 초음파추출(40 kHz, 실온)함. 추출된 액은 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리함. 상등액을 취하여 syringe membrane filter (PVDF, 0.45 μ m)를 하여 검액으로 사용함

나) 표준원액의 조제

- Baicalin, baicalein, wogonin 표준품 1.0 mg을 각각 정밀히 달아 70% 에탄올 수용액 1 mL에 녹여 1 mg/mL의 표준원액을 조제함

다) 검량선의 작성

- 표준원액 0.25 mL을 각각 취하여 합한 후 70% 에탄올 수용액 일정량을 가하여 4.0, 8.0, 16.0, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 μ g/mL로 희석한 후 분석함

라) HPLC의 분석

- 다음 조건으로 분석함(아래 표 참조)

<HPLC analytical condition of compounds in *Scutellaria baicalensis* Georgi>

Column	Hector-M C18 (250 x 4.6 mm (i.d.), 5 μm)		
Detector	UV 275 nm		
Mobile phase	(A) 1% acetic acid in water		
	(B) 1% acetic acid in solution of acetonitrile - methanol (1:1) mixture		
	Time (min)	A%	B%
	0	75	25
	10	68	32
	20	55	45
	24	55	45
35	52	48	
40	0	100	
45	0	100	
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	40 °C		
Injection vol.	10 μL		
Reference	baicalin, baicalein, wogonin		

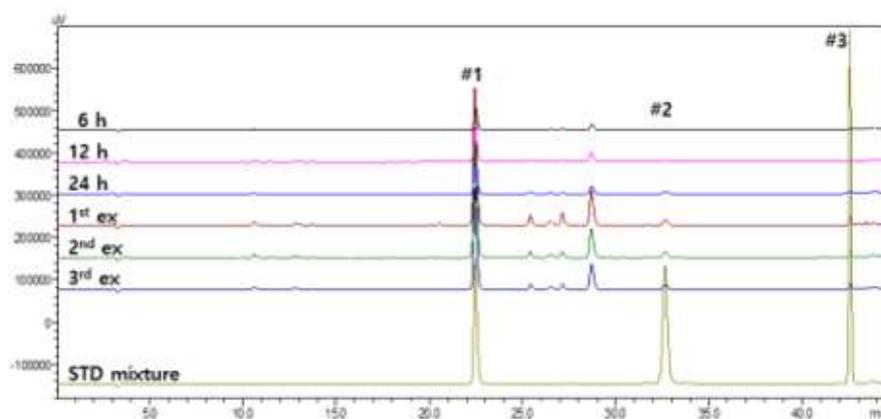
2) 시험결과

가) 시료채취량

- 황금(화순) 추출물 3회 취한량: 51.0, 51.0, 51.0 mg
- 황금(구례) 추출물 3회 취한량: 50.0, 50.0, 50.0 mg
- 황금(구례) 추출물 3회 취한량: 50.0, 50.0, 50.0 mg
- 황금 6시간 추출물 3회 취한량: 5.0, 5.0, 5.0 mg
- 황금 12시간 추출물 3회 취한량: 10.0, 10.0, 10.0 mg
- 황금 24시간 추출물 3회 취한량: 9.0, 10.0, 10.0 mg

나) 크로마토그램

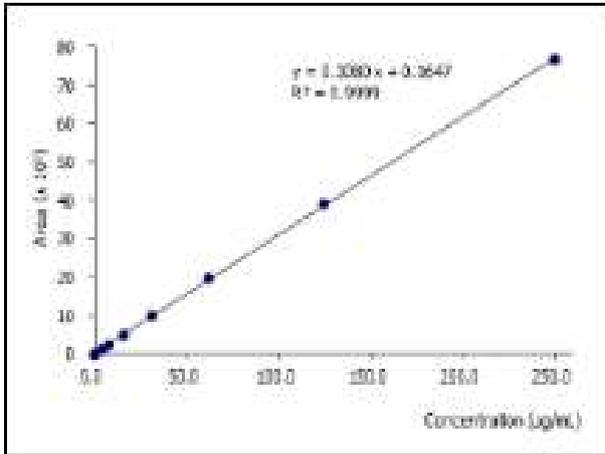
- 아래 그림에서 보는 바와 같이 머무름 시간(t_R)= 22.5 분, 32.6 분, 42.6분 부근에서 각각 baicalin, baicalein, wogonin의 성분 피크가 확인됨



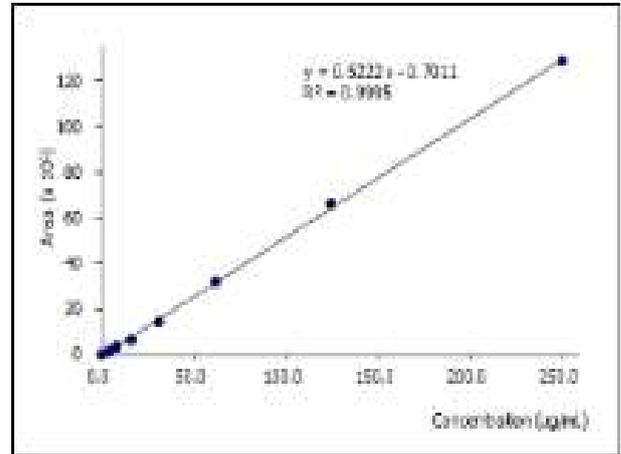
<HPLC chromatogram of *Scutellaria baicalensis* Georgi>

다) 검량선

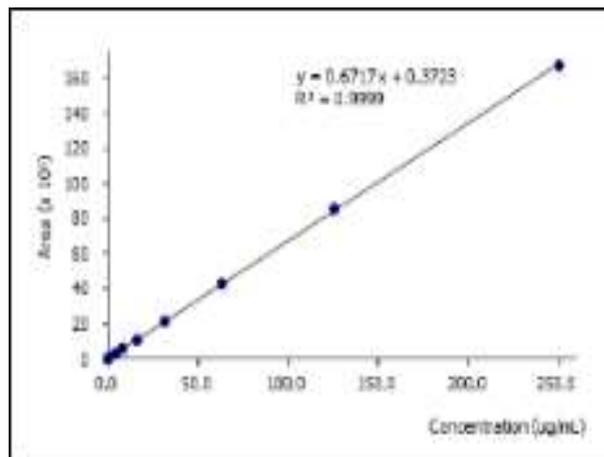
- 아래 그림에서 보이는 바와 같이 4.0 ~ 250 µg/mL의 농도 범위에서 직선의 방정식 $y = 0.3080x + 0.1647$ (baicalin), $y = 0.5222x - 0.7011$ (baicalein), $y = 0.6717x + 0.3723$ (wogonin)을 나타내었고, 이때의 정량계수(r^2)는 0.999 이상으로 양호한 직선성을 보였음



baicalin



baicalein



wogonin

<Calibration curve of baicalin, baicalein, wogonin>

라) 함량계산

- 함량분석 결과, 추출시간 별로 추출한 시료 중 황금 6 시간 추출물은 baicalin 18.2%, baicalein 1.4%, wogonin 0.3%, 황금 12시간 추출물은 baicalin 17.0%, baicalein 1.6%, wogonin 0.4%, 24시간 추출물은 baicalin 14.4%, baicalein 2.1%, wogonin 0.5%로 각각 검출되었음. 그리고 지역별로 추출한 시료 중 1차(화순) 추출물에서는 baicalin 12.9%, baicalein 0.7%, wogonin 0.2%, 2차(구례) 추출물은 baicalin 10.9%, baicalein 0.7%, wogonin 0.1%를 마지막으로 3차(구례) 추출물은 baicalin 9.7%, baicalein 0.6%, wogonin 0.1%로 각각 나타남(아래 표 참조)

<The content of baicalin, baicalein and wogonin in *Scutellaria baicalensis* Georgi>

Samples		Content (mg/ex. g)±S.D.			Brix
		baicalin	baicalein	wogonin	
Extraction time	6 h ex	182.2±2.6*	13.8±0.2*	2.8±0.0*	-
	12 h ex	170.1±1.3*	15.8±0.1*	3.7±0.0*	-
	24 h ex	143.9±5.1*	20.5±1.4*	5.2±0.5*	-
Harvest region	1st (Hwasun) ex	128.7±0.7*	6.8±0.4	1.7±0.2	71.4%
	2nd (Gurye) ex	108.8±1.0*	7.1±0.6	1.4±0.2	69.7%
	3rd (Gurye) ex	97.2±1.8*	6.4±1.0	1.2±0.4	60.1%

*Significant levels indicated at 95% ($p < 0.05$) by non-pair t-test.

- 시간별로 추출한 황금 6시간, 12시간 그리고 24시간 추출물에 대해 황금의 세 지표물질의 함량을 비교한 결과, baicalin은 6시간, 12시간, 24시간 추출물 순으로 함량이 점차 감소한 반면, baicalein과 wogonin은 6시간, 12시간, 24시간 추출물 순으로 점차 증가함
- 이는 추출과정에서 상대적으로 불안정한 baicalin이 baicalein과 wogonin으로 전환된 것으로 판단됨
- 한편, 각 추출물별 통계적 유의성을 평가하고자 Excel 프로그램을 이용하여 95% 신뢰구간에서 세 개의 지표물질을 대상으로 non-pair t-test를 실시한 결과, 시간별로 추출한 황금 시료들은 모두 95% 신뢰구간에서 $p < 0.05$ 로 확인이 되어 서로 유의적 차이가 있음을 확인하였고, 지역별로 추출한 시료 중에서 baicalin은 $p < 0.05$ 로 유의성을 보인 반면, baicalein과 wogonin 등은 $p > 0.05$ 를 나타내어 유의적 차이를 보이지 않음
- 황금의 최적 추출조건은 각 지표물질의 중요도에 따라 달라져야 할 것으로 판단되며 baicalin이 중요할 경우, 시간별 조건에서는 6시간 추출조건이, baicalein과 wogonin이 중요할 경우, 24시간 추출조건을 적합한 것으로 판단됨
- 함량편차가 가장 적은 추출시간은 12시간으로 함량 균일성을 확보하기 위하여 12시간이 가장 적합할 것으로 판단됨
- 한편, 지역별로 추출한 조건에서는 baicalin이 중요할 경우 경우는 1차 추출물인 화순이 적합하였고, baicalein과 wogonin이 중요할 경우는 세 지역 시료 모두가 적합하였음

(6) 감국(국화), 황금 유전자 분석 결과

(가) 감국(국화) 유전자 분석 결과

- ‘감국(국화)’의 원재료 확인을 위해, 원물 건조 감국(국화)을 구매하여 macrogen에 유전자 분석을 의뢰함
- ‘감국(국화)’에 대해 유전자 분석을 수행한 결과, 국화(*Chrysanthemum morifolium*) 종과 99% 동등성이 입증되었음

원재료명	감국(국화)																																																																																								
유전자 분석 결과	<p style="font-size: small; margin: 0;">World Meridian Center 10P. 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul, Republic of Korea Tel: 02-2-2190-7251 Fax: 02-2190-7100 Email: info@macrogen.com</p>																																																																																								
	<p>Sample Name</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;">Sample Name</td> <td style="padding: 2px;">Sample3_psbA</td> </tr> </table>	Sample Name	Sample3_psbA																																																																																						
	Sample Name	Sample3_psbA																																																																																							
	<p>Analysis Report</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">Name</th> <th style="width: 15%;">Read Length (Normal)</th> <th style="width: 15%;">Read Length (Q16)</th> <th style="width: 15%;">Read Length (Q20)</th> <th style="width: 35%;">GC Content</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample3_psbA</td> <td>489</td> <td>460</td> <td>460</td> <td>29.038864805725972</td> </tr> <tr> <td>Sample3_psbA_R</td> <td>449</td> <td>448</td> <td>448</td> <td>27.171492204899778</td> </tr> <tr> <td>Sample3_psbA_F</td> <td>460</td> <td>411</td> <td>395</td> <td>28.695652173913043</td> </tr> </tbody> </table>	Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content	Sample3_psbA	489	460	460	29.038864805725972	Sample3_psbA_R	449	448	448	27.171492204899778	Sample3_psbA_F	460	411	395	28.695652173913043																																																																				
	Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content																																																																																				
	Sample3_psbA	489	460	460	29.038864805725972																																																																																				
Sample3_psbA_R	449	448	448	27.171492204899778																																																																																					
Sample3_psbA_F	460	411	395	28.695652173913043																																																																																					
<p>Contig Sequence</p> <pre style="font-family: monospace; font-size: x-small; margin: 0;">GTAATGCTCATAAATTCCTCTAGACTTAGCTGCTATTGAAGCTCCATCTACAAATGGATAGSACTTTTGTCTGATTGTATAGGAGTAGTTTTGA ACTAAAAAAGGAGCAATAGCTTTCTCTTTGTTTTATCAAGAGGGCGTTATTGCTCCTTTTTTATTAGTACTATTTGCCTTACACAGTTTCTTTA AAAATATTTATAGTTTGGTTCGATTCGCGTGTTTTCTCTTTGTATTCAATTCATTTATATTATAGGTTTGTATATTCTATTCAAATTTTTTAT GAAGTTTGATTTCCAATTCAAATTCRAAACCAAAATATATATAAATTGAATTTTTGCTTATTTATTACTTTGATTTCAAAAATAAAAAAGAAATAT ATGCTCTTTTTTATGTTGAGGTAAAATATAGATAAATGCTAGATAGATATATAGTAGAGGGCGGATGTAGCCRAAGTGGATCAAGGCAGTGGATTG TGAATCCCC</pre>																																																																																									
<p>BlastN Report</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: x-small;"> <thead> <tr> <th colspan="2">Query</th> <th colspan="3">Subject</th> <th colspan="3">Score</th> <th colspan="3">Identities</th> </tr> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Description</th> <th>AC</th> <th>Leng</th> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Bit</th> <th>Raw</th> <th>EV</th> <th>Matc</th> <th>Total</th> <th>Pct.(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>487</td> <td>Chrysanthemum x morifolium voucher Chen9902 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast</td> <td>EF091623.1</td> <td>511</td> <td>14</td> <td>501</td> <td>894</td> <td>484</td> <td>0.0</td> <td>487</td> <td>488</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>487</td> <td>Chrysanthemum indicum voucher HeN001 chloroplast, complete genome</td> <td>JN867589.1</td> <td>150972</td> <td>518</td> <td>32</td> <td>889</td> <td>481</td> <td>0.0</td> <td>485</td> <td>487</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>487</td> <td>Chrysanthemum japonense var. ashihuriense voucher Chen06051 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast</td> <td>EF091610.1</td> <td>511</td> <td>14</td> <td>501</td> <td>889</td> <td>481</td> <td>0.0</td> <td>486</td> <td>488</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>487</td> <td>Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome</td> <td>NC_037388.1</td> <td>151012</td> <td>528</td> <td>42</td> <td>883</td> <td>478</td> <td>0.0</td> <td>484</td> <td>487</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>487</td> <td>Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome</td> <td>MG913594.1</td> <td>151012</td> <td>528</td> <td>42</td> <td>883</td> <td>478</td> <td>0.0</td> <td>484</td> <td>487</td> <td>99</td> </tr> </tbody> </table>	Query		Subject			Score			Identities			Start	End	Description	AC	Leng	Start	End	Bit	Raw	EV	Matc	Total	Pct.(%)	1	487	Chrysanthemum x morifolium voucher Chen9902 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	EF091623.1	511	14	501	894	484	0.0	487	488	99	1	487	Chrysanthemum indicum voucher HeN001 chloroplast, complete genome	JN867589.1	150972	518	32	889	481	0.0	485	487	99	1	487	Chrysanthemum japonense var. ashihuriense voucher Chen06051 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	EF091610.1	511	14	501	889	481	0.0	486	488	99	1	487	Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome	NC_037388.1	151012	528	42	883	478	0.0	484	487	99	1	487	Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome	MG913594.1	151012	528	42	883	478	0.0	484	487	99
Query		Subject			Score			Identities																																																																																	
Start	End	Description	AC	Leng	Start	End	Bit	Raw	EV	Matc	Total	Pct.(%)																																																																													
1	487	Chrysanthemum x morifolium voucher Chen9902 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	EF091623.1	511	14	501	894	484	0.0	487	488	99																																																																													
1	487	Chrysanthemum indicum voucher HeN001 chloroplast, complete genome	JN867589.1	150972	518	32	889	481	0.0	485	487	99																																																																													
1	487	Chrysanthemum japonense var. ashihuriense voucher Chen06051 psbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and trnA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	EF091610.1	511	14	501	889	481	0.0	486	488	99																																																																													
1	487	Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome	NC_037388.1	151012	528	42	883	478	0.0	484	487	99																																																																													
1	487	Chrysanthemum boreale chloroplast, complete genome	MG913594.1	151012	528	42	883	478	0.0	484	487	99																																																																													

(나) 황금 유전자 분석 결과

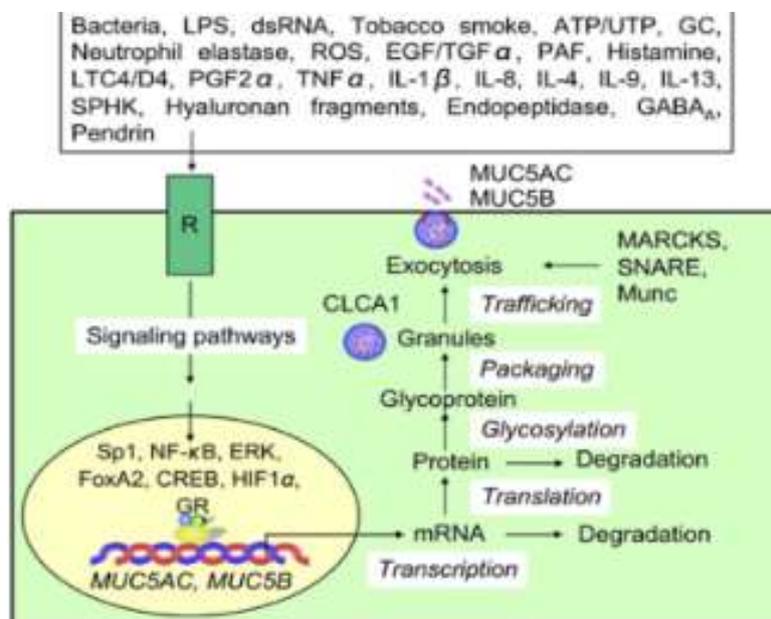
- ‘황금’의 원재료 확인을 위해, 원물 황금을 구매하여, macrogen에 유전자 분석을 의뢰하였음
- ‘황금’에 대해 유전자 분석을 수행한 결과, 황금(*Scutellaria baicalensis*) 종과 99% 동등성이 입증되었음

원재료명	황금																																																																																					
유전자 분석 결과	<p>World Meridian Center 10P, 254 Heotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul, Republic of Korea Tel: 02-2-2190-7261 Fax: 02-2190-7100 Email: info@macrogen.com</p> 																																																																																					
	<p>Sample Name</p> <table border="1"> <tr> <td>Sample Name</td> <td>Sample5_psbA</td> </tr> </table>	Sample Name	Sample5_psbA																																																																																			
	Sample Name	Sample5_psbA																																																																																				
	<p>Analysis Report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Name</th> <th>Read Length (Normal)</th> <th>Read Length (Q16)</th> <th>Read Length (Q20)</th> <th>GC Content</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sample5_psbA</td> <td>413</td> <td>388</td> <td>386</td> <td>30.99273607748184</td> </tr> <tr> <td>Sample5_psbA_R</td> <td>363</td> <td>362</td> <td>361</td> <td>28.09917355371901</td> </tr> <tr> <td>Sample5_psbA_F</td> <td>388</td> <td>385</td> <td>383</td> <td>30.412371134020617</td> </tr> </tbody> </table>	Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content	Sample5_psbA	413	388	386	30.99273607748184	Sample5_psbA_R	363	362	361	28.09917355371901	Sample5_psbA_F	388	385	383	30.412371134020617																																																																	
	Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content																																																																																	
Sample5_psbA	413	388	386	30.99273607748184																																																																																		
Sample5_psbA_R	363	362	361	28.09917355371901																																																																																		
Sample5_psbA_F	388	385	383	30.412371134020617																																																																																		
<p>Contig Sequence</p> <p>AATGCTCATAACTTCCCTCTAGACTTAGCTGCTATCGAAGCTCCAACAAATGGATAAGACTTGTCTTAGTGTGCGAGGAGTTTTTGAATAGATAAA TAGAAGGAGCAATAAACTCTTTCTTGTCTATCAAGAGGGGTTATTGCTCCTTTATTTTCTTTCAATTAGTAGTCTTTCCCTAGACTTATTTCTTT CCATTAAGAATAAAATAAGAGGATAAAAAATGATTGAAATCCATTTTTATCTTATTTTATCTTACAAGTCTAAAAAATAAAATGAAAAATC GAATTCGTAATGTAATCAATATTACATCAAAAAAATATTTAATTTTAAAGTAATTCAGTAGAGGGGGCGGATGTAGCCAAAGTGGATCAAGG CAGTGGATTGTGAATCACCCATGGCGCGA</p>																																																																																						
<p>BlastN Report</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Query</th> <th rowspan="2">Subject</th> <th colspan="3">Score</th> <th colspan="3">Identities</th> </tr> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>AC</th> <th>Leng</th> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Bit</th> <th>Raw</th> <th>EV</th> <th>Matc</th> <th>Total</th> <th>Pct.(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>412</td> <td>Scutellaria baicalensis voucher EDQM 30009 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast</td> <td>JF907428.1</td> <td>426</td> <td>16</td> <td>426</td> <td>743</td> <td>402</td> <td>0.0</td> <td>409</td> <td>412</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>411</td> <td>Scutellaria baicalensis voucher XZ-11-701 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast</td> <td>KC535508.1</td> <td>425</td> <td>16</td> <td>425</td> <td>741</td> <td>401</td> <td>0.0</td> <td>408</td> <td>411</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>412</td> <td>Scutellaria baicalensis isolate BOP028266 chloroplast, complete genome</td> <td>MF521633.1</td> <td>1518 17</td> <td>434</td> <td>24</td> <td>737</td> <td>399</td> <td>0.0</td> <td>408</td> <td>412</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>412</td> <td>Scutellaria baicalensis chloroplast, complete genome</td> <td>KR233163.2</td> <td>1527 31</td> <td>1039</td> <td>629</td> <td>737</td> <td>399</td> <td>0.0</td> <td>408</td> <td>412</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>412</td> <td>Scutellaria baicalensis isolate BOP028265 chloroplast, complete genome</td> <td>MF521632.1</td> <td>1518 24</td> <td>433</td> <td>24</td> <td>732</td> <td>396</td> <td>0.0</td> <td>407</td> <td>412</td> <td>99</td> </tr> </tbody> </table>	Query		Subject	Score			Identities			Start	End	AC	Leng	Start	End	Bit	Raw	EV	Matc	Total	Pct.(%)	1	412	Scutellaria baicalensis voucher EDQM 30009 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	JF907428.1	426	16	426	743	402	0.0	409	412	99	1	411	Scutellaria baicalensis voucher XZ-11-701 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	KC535508.1	425	16	425	741	401	0.0	408	411	99	1	412	Scutellaria baicalensis isolate BOP028266 chloroplast, complete genome	MF521633.1	1518 17	434	24	737	399	0.0	408	412	99	1	412	Scutellaria baicalensis chloroplast, complete genome	KR233163.2	1527 31	1039	629	737	399	0.0	408	412	99	1	412	Scutellaria baicalensis isolate BOP028265 chloroplast, complete genome	MF521632.1	1518 24	433	24	732	396	0.0	407	412	99
Query		Subject		Score			Identities																																																																															
Start	End		AC	Leng	Start	End	Bit	Raw	EV	Matc	Total	Pct.(%)																																																																										
1	412	Scutellaria baicalensis voucher EDQM 30009 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	JF907428.1	426	16	426	743	402	0.0	409	412	99																																																																										
1	411	Scutellaria baicalensis voucher XZ-11-701 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast	KC535508.1	425	16	425	741	401	0.0	408	411	99																																																																										
1	412	Scutellaria baicalensis isolate BOP028266 chloroplast, complete genome	MF521633.1	1518 17	434	24	737	399	0.0	408	412	99																																																																										
1	412	Scutellaria baicalensis chloroplast, complete genome	KR233163.2	1527 31	1039	629	737	399	0.0	408	412	99																																																																										
1	412	Scutellaria baicalensis isolate BOP028265 chloroplast, complete genome	MF521632.1	1518 24	433	24	732	396	0.0	407	412	99																																																																										

(7) 기관지 염증 억제 작용기전 검증(세포)

(가) 기관지 염증 억제 작용기전 연구

- 인체 내에서 염증반응에 관여하는 대식세포의 경우, 그람 음성균의 외막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)의 자극 때문에 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시킨다고 잘 알려져 있음
- 또한, 자극 때문에 활성화된 대식세포 내에서는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)로부터 NO가 합성되고 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 활성화에 의해 prostaglandine E2 (PGE2)가 생산되는데, 이들의 과도한 생성은 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상을 일으키는 것으로 보고되어 있음
- 대식세포에 의한 다양한 염증 매개물질의 생산 및 활성화 기작은 잘 확립된 세포주인 RAW 264.7을 이용한 분자메커니즘 연구를 통해 많이 확립되어 있는데, 염증 신호전달경로에서 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK 1/2), p38 kinases(p38), c-Jun NH2-terminal kinase(JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases(MARK) 경로와 nuclear factor kappa B(NF- κ B) 경로에 의한 염증의 유발/억제 기작이 대표적으로 잘 알려져 있음
- 특히 NF- κ B는 활성화되면 결합해 있던 inhibitory kappa B α (I κ B α)가 분해되면서 세포질에서 핵 내로 이동하여 다양한 사이토카인의 발현을 촉진시키는 전사인자로서 작용한다고 보고되어 있음



<기관지 염증억제 기전>

(Korean. J. Intern. Med. 20(4), 275-283, 2005)

- 한편, 천식과 같은 기관지염의 병리기전을 이해하기 위해서는 기도 염증을 유발하고, 강화하며 또한 조절하는 인자들을 확인해야 할 필요가 있음. 따라서 기도 염증에 관여하는 면역학적, 생물학적 과정을 이해하는 것이 기본이라 할 수 있을 것임

- 기관지 세포에서 염증성 MUC5AC의 생성은 LPS, TNF- α 및 IL-1 β 등과 같은 다양한 원인에 의해 대부분의 염증 관련 세포에서 잘 알려진 NF- κ B 및 epidermal growth factor receptor(EGFR)-ERK 경로를 거치는 체계로 보고된 바 있음
- 하지만, 현재까지 기관지 질환에 효과를 나타내는 다양한 천연물들이 인간 기도 상피세포에서 어떤 기작(mechanism)으로 영향을 미치는지 아닌지는 검증된 바가 거의 없는 실정임
- 지난 1년 동안 본 연구진은 동양 전통의학 문헌과 다수의 연구보고 자료의 검토를 통해 기관지 및 호흡기 질환에 효과가 있다고 알려진 15종의 천연물을 선정해 각각 열수 추출물과 에탄올추출물로 조제한 다음, 면역세포인 RAW 264.7을 이용한 항염증 활성을 비교, 평가하였음
- 선정된 8종의 활성 시료(열수 추출물 4종 및 에탄올추출물 4종)는 기관지 상피세포주인 A549를 이용한 IL-8, prostaglandin E2(PGE2) 및 cyclooxygenase-2(COX-2) 억제활성과 NCI-H292 세포의 뮤신(MUC5AC) 억제활성을 평가함으로써 최종적으로 기관지 염증에 효과가 있는 황금(*Scutellaria baicalensisindicum*)과 감국(국화)(*Chrysanthemum morifolium* Ramat)을 활성시료로 제시한 바 있음
- 또한, 두 소재는 비율별 복합소재로 조제하여 세포독성이 나타나지 않으면서 염증 억제 활성은 강화되는 최적의 복합비율을 선정하였으며, 복합소재의 우수성을 증명하였음
- 본 연구에서는 지난 연구결과에 이어 황금과 감국의 복합소재가 염증 유발-면역세포 및 기관지 상피세포에서 어떠한 작용기전으로 항염증 효과를 나타내는지 검증하고자 함
- 특히, 기관지 상피세포가 분비하는 염증성 뮤신의 분비억제 기작 연구를 통해, 활성이 검증된 복합소재를 이용한 기능성 소재 및 의약 소재로서의 개발을 위한 기초과학적 정보를 제공하고자 함

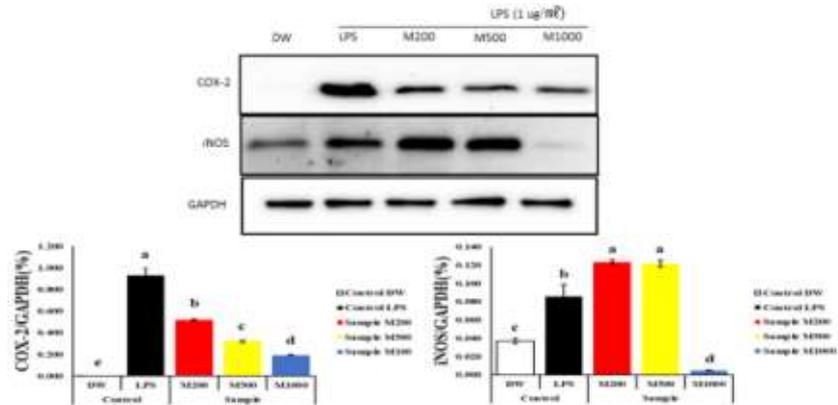
(나) 기관지 염증 억제 작용기전 연구

1) RAW 264.7 cell

- 본 기작규명에 들어가기에 앞서 PGE2 생성에 관여하는 COX-2의 억제 활성을 감국(국화)7:황금3 비율의 복합물 시료로 측정함
- 감국(국화)7 :황금3 비율의 복합물 시료를 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml의 농도로 만들어 실험을 진행한 결과, 복합물의 농도가 높을수록 즉 농도 의존적으로 COX-2 활성을 유의미하게 억제하는 것을 확인할 수 있었음
- NO (Nitric Oxide) 생성에 관여하는 iNOS의 활성을 억제 활성을 감국(국화)7 :황금3 비율의 복합물 시료로 측정함
- 감국(국화)7 :황금3 비율의 복합물 시료를 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml의 농도로 만들어 실험을 진행한 결과 LPS(positive control; LPS)보다 200, 500 μ g/ml에서 활성이 더 많

이 나타남

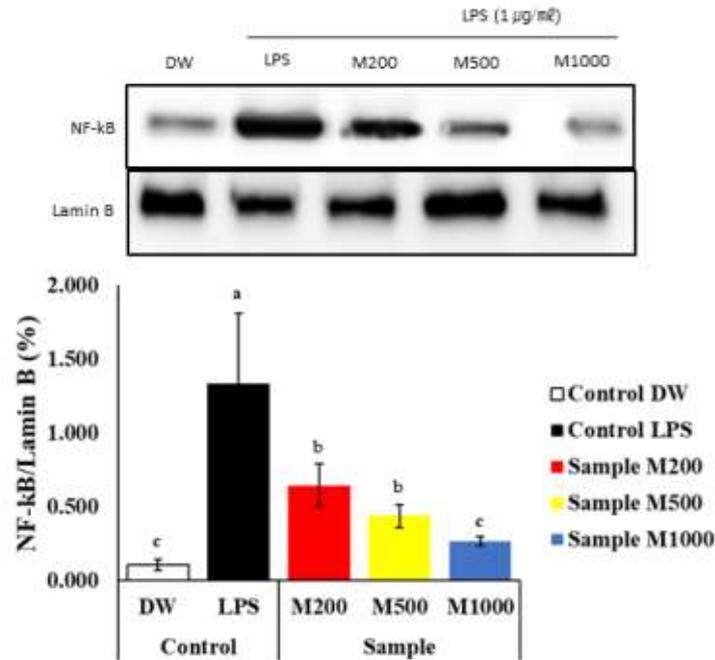
- 그러나 고농도인 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 DW(normal control; DW)보다 더 낮은 활성을 보여 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 iNOS의 활성을 많이 억제하는 것을 확인함(아래 그림)



(DW and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. Cox-2 protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan)

<Inhibitory activity of COX-2, iNOS of mixture>

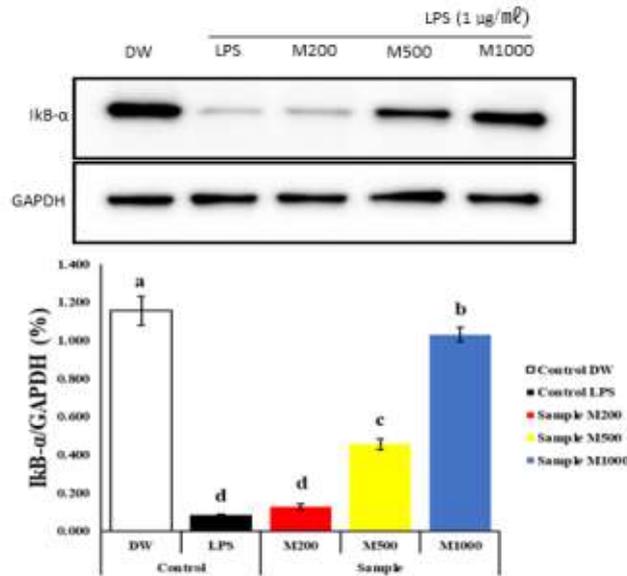
- 대표적인 염증 signaling pathway 중 하나인 NF- κ B를 RAW 264.7 세포에서 확인하기 위하여 LPS를 20분이 처리한 후 세포를 걷어서 실험을 진행
- NF- κ B는 평소에는 I κ B- α 와 결합한 형태로 있다가 LPS와 같은 물질에 의해 세포가 자극을 받게 되면 NF- κ B는 I κ B- α 와 떨어지게 되어 핵 안으로 들어가서 염증성 cytokine을 생성해 내어 최종적으로 염증을 유발
- 본 실험에서는 세포를 걷어 cell lysate 한 후 Nuclear와 cytosol을 분리하여 Nuclear에서 target protein인 NF- κ B의 발현량을 확인
- House keeping gene은 핵에만 존재한다는 Lamin B를 이용하여 확인
- 감국(국화)7 :황금3 비율의 복합물 시료를 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 만들어 실험을 진행한 결과 NF- κ B가 NC(negative control; DW)에서는 거의 발현이 되지 않았지만, PC(positive control; LPS)에서는 상당수가 발현된 것을 보아 염증이 유발된 것을 확인하였고 복합물 시료를 처리했을 때는 농도 의존적으로 NF- κ B의 발현량을 유의미하게 줄이는 것을 확인(아래 그림)



(DW and LPS (1 μ g/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. NF- κ B protein was assayed by western blot. Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the NF- κ B>

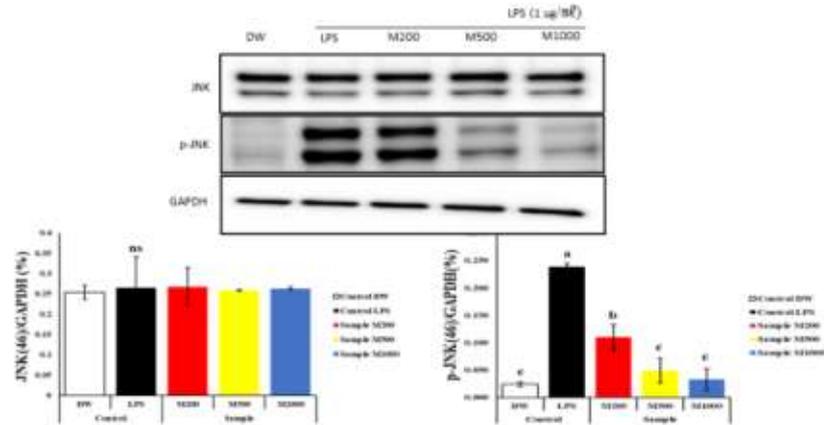
- NF- κ B pathway에서 NF- κ B를 붙잡고 있는 역할을 하는 I κ B- α 를 nuclear와 cytosol을 분리한 후 cytosol에서 발현량을 측정
- I κ B- α 가 NC(negative control; DW)에서 많이 발현되었고 PC(positive control; LPS)에서는 반대로 거의 발현되지 않은 것을 확인하였는데 이와 같은 결과는 NC에서는 염증이 유발되지 않았고 PC에서만 염증이 유발된 것을 의미
- I κ B- α 는 NF- κ B를 붙잡는 역할을 하므로 그 발현량이 많을수록 NF- κ B를 붙잡고 있다는 의미이므로 그만큼 염증이 유발되지 않음
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 200 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 처리한 결과 고농도로 갈수록 I κ B- α 의 발현량이 많아져 최종 1000 μ g/ml 에서는 NC(negative control; DW)와 같은 수준의 발현량을 보임(아래 그림)



(DW and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. IkB- α protein was assayed by western blot. Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the NF- κ B(IkB- α)>

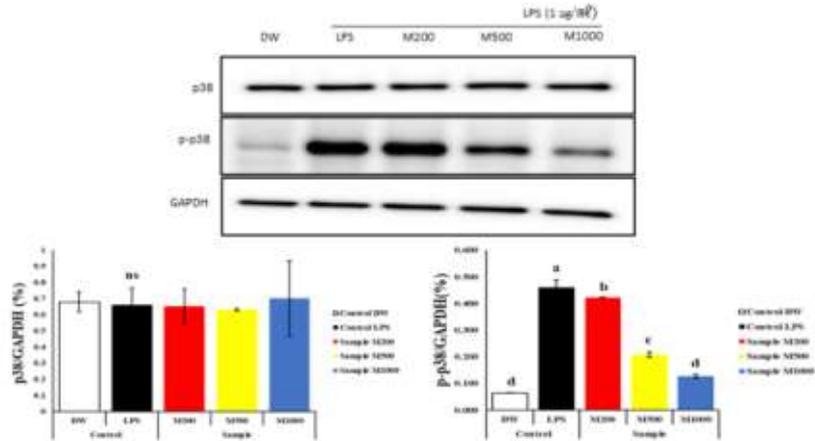
- RAW 264.7 세포에서 염증의 기작을 규명하기 위하여 염증의 대표적인 두 가지 signaling pathway 중 하나인 MAPK Pathway를 확인
- MAPK Pathway 기작을 규명하기 위해 LPS를 30분 처리하여 염증을 유발한 뒤 바로 세포를 걷어 실험을 진행
- MAPK Pathway의 family인 JNK를 phosphate form과 intact form의 발현량을 측정. JNK의 경우 band가 54, 46 kDa 크기로 두 가지가 나오는 것과 house keeping gene인 GAPDH가 일정하게 발현되는 것을 확인
- Intact form은 house keeping gene과 같이 일정하게 발현되고 phosphate form은 intact form에서 발현된 것들이 나타나는데 phosphate form을 살펴보면 NC (negative control; DW)에서는 JNK가 거의 발현되지 않았지만, PC (positive control; LPS)에서는 JNK가 상당히 많이 발현되는 것을 보아 염증이 유발된 것을 확인
- 또한, 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 농도별로 살펴본 결과 시료의 농도가 높아질수록 즉 농도 의존적으로 유의미하게 JNK의 발현량을 줄이는 것을 확인(아래 그림)



(DW and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-JNK and JNK protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the JNK>

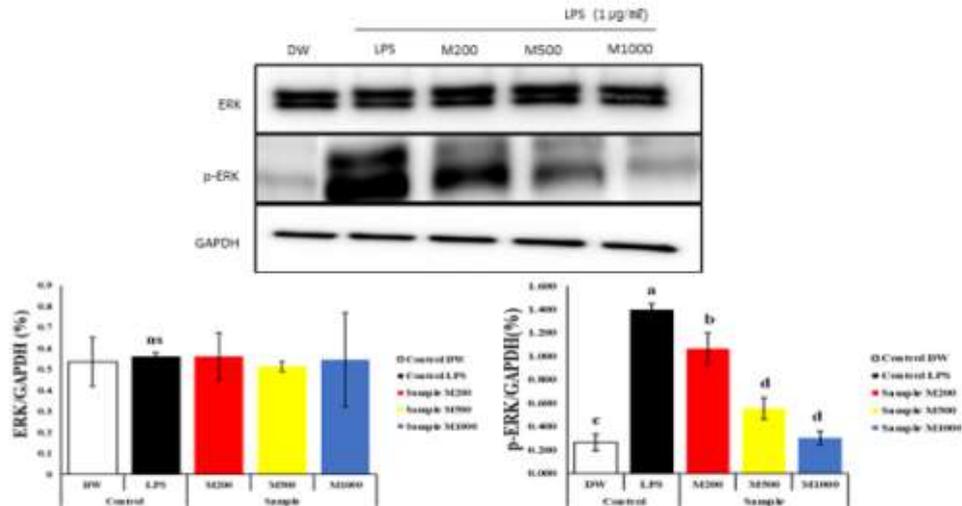
- MAPK Pathway의 family인 p38을 phosphate form과 intact form의 발현량을 측정, p38의 경우 band가 43 kDa 크기로 나오는 것과 house keeping gene인 GAPDH가 일정하게 발현되는 것을 확인
- JNK와 마찬가지로 Intact form과 Phosphate form의 발현을 살펴본 결과 NC (negative control; DW)에서는 p38이 거의 발현되지 않았지만, PC (positive control; LPS)에서는 p38이 상당히 많이 발현되는 것을 보아 염증이 유발된 것을 확인
- 또한, 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 농도별로 살펴본 결과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 PC와 비슷한 발현량을 보여 염증을 억제하지 못했지만, 시료의 농도가 높아질수록 즉 농도 의존적으로 유의미하게 p38의 발현량을 줄이는 것을 확인



(DW and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-p38 and p38 protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the p38>

- MAPK Pathway의 마지막 family인 ERK의 발현량을 측정, ERK의 경우 band가 JNK와 마찬가지로 두 가지가 나오는데 각각 크기는 44, 42 kDa이고 house keeping gene인 GAPDH가 일정하게 발현되는 것을 확인
- JNK와 마찬가지로 intact form과 phosphate form의 발현을 살펴본 결과 NC (negative control; DW)에서는 ERK가 거의 발현되지 않았지만, PC (positive control; LPS)에서는 ERK가 상당히 많이 발현되는 것을 보아 염증이 유발된 것을 확인
- 또한, 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 농도별로 살펴본 결과 시료의 농도가 높아질수록 즉 농도 의존적으로 유의미하게 ERK의 발현량을 유의미하게 줄이는 것을 확인(아래 그림)

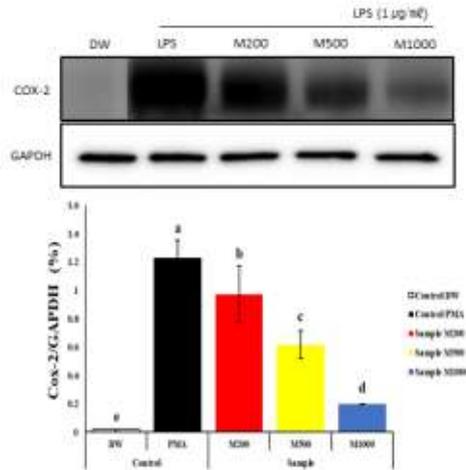


(DW and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-ERK and ERK protein was assayed by western blot. Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the ERK>

2) A549

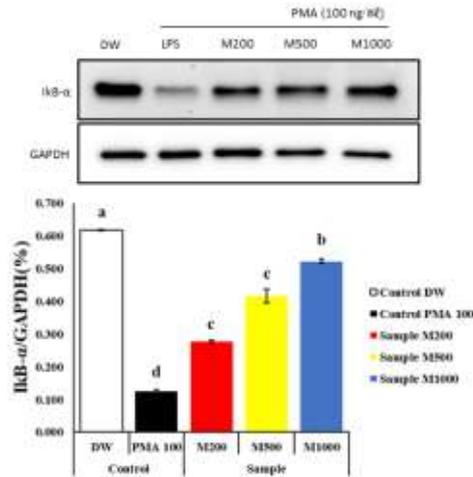
- RWA 264.7 세포를 이용하여 실험한 것과 같이 COX-2의 발현량을 확인하기 위하여 인간 유래 기관지 상피세포주인 A549 세포를 이용하여 COX-2 발현을 확인
- NC(negative control; DW)와 PC(positive control; PMA) 간의 COX-2 발현량의 차이를 보아 PMA로 인해 염증이 유발되었음을 확인
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 처리했을 때의 결과를 보면 시료의 농도가 높아질수록 COX-2의 발현을 억제하는 것을 확인(아래 그림)



(DW and PMA (100 ng/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. Cox-2 protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Inhibitory activity of COX-2, iNOS>

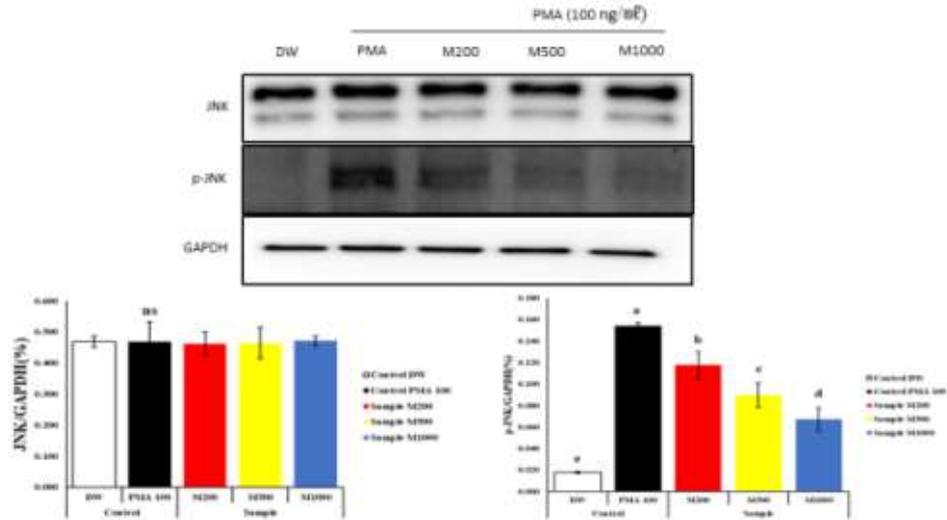
- 인간 유래 기관지 상피세포를 이용하여 대표적인 염증 signaling pathway 중 하나인 NF- κ B의 subunit인 I κ B- α 의 발현량을 측정
- 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 cell과는 다르게 LPS (Lipopolysaccharide)가 아닌 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 이용하여 염증을 유발하여 발현량 측정
- RAW 264.7 cell에서와 마찬가지로 NC(negative control; DW)가 PC (positive control; PMA)보다 월등한 발현량을 보임. 이는 그만큼 NF- κ B를 I κ B- α 가 붙잡고 있어 NF- κ B가 핵속으로 들어가지 못해 염증성 cytokine을 만들어 내지 못했다는 결론
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 농도별로 처리한 결과를 보면 저농도에서 고농도로 갈수록 I κ B- α 의 발현량이 증가하는 것을 확인 이는 고농도로 갈수록 염증이 억제된 것을 의미 (아래 그림)



(DW and PMA (100 ng/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. IkB- α protein was assayed by western blot. Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the IkB- α >

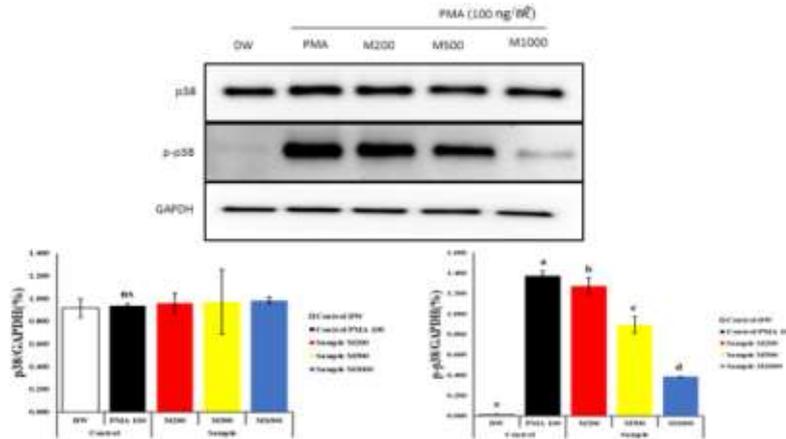
- 대표적인 염증 signaling pathway 중 하나인 MAPK pathway의 family인 JNK의 발현량을 인간 유래 기관지 상피세포(A549)를 이용하여 측정함
- NC(negative control; DW)의 JNK 발현은 거의 되지 않았지만, PC(positive control; PMA)의 JNK는 많은 수가 발현된 것을 보아 PMA로 인해 염증이 유발된 것을 확인
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 A549 세포에 처리하여 JNK의 발현량을 측정한 결과 시료의 농도가 높아질수록 JNK의 발현량이 줄어드는 것을 확인 그러나 RAW 264.7 세포에서 처럼 NC(negative control; DW)의 발현량 정도까지는 줄이지 못하는 것을 확인(아래 그림)



(DW and PMA (100 ng/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-JNK and JNK protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the JNK>

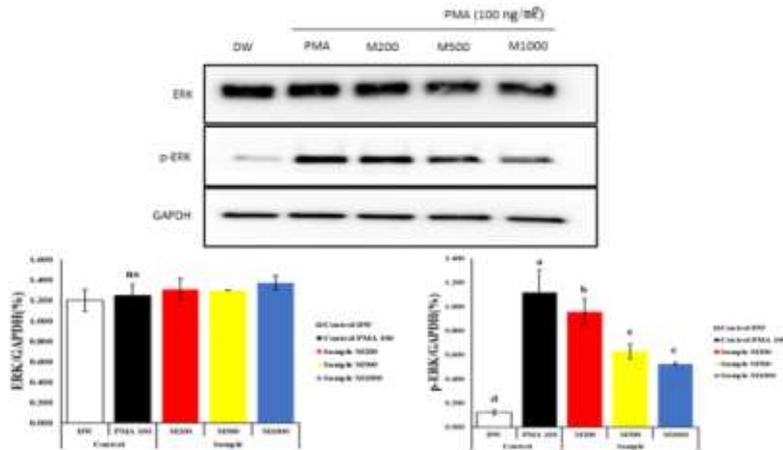
- 대표적인 염증 signaling pathway 중 하나인 MAPK pathway의 family인 p38의 발현량을 인간 유래 기관지 상피세포(A549)를 이용하여 측정함
- P38의 발현량을 보았을 때 NC (negative control: DW)는 발현이 되지 않았지만, PC(positive control: PMA)는 많이 발현된 것을 확인할 수 있었음 이는 PMA로 인해 염증이 유발되었다고 판단할 수 있음
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 A549 세포에 처리하여 p38의 발현량을 비교해본 결과 가장 낮은 농도인 200 μ g/ml 에서는 p38의 발현을 크게 억제하지 못했지만, 시료의 농도가 높아질수록 p38의 발현을 더 억제하는 것을 확인할 수 있었음(아래 그림)



(DW and PMA (100 ng/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-p38 and p38 protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the p38>

- 대표적인 염증 signaling pathway 중 하나인 MAPK pathway의 family인 ERK의 발현량을 인간 유래 기관지 상피세포(A549)를 이용하여 측정함
- ERK의 발현량을 보았을 때 NC(negative control: DW)는 거의 발현이 되지 않았지만, PC(positive control: PMA)는 상당히 많이 발현된 것을 확인할 수 있었음 이는 PMA로 인해 염증이 유발되었다고 판단할 수 있음
- 복합물 시료(감국(국화)7 :황금3)를 A549 세포에 처리하여 ERK의 발현량을 비교한 결과 시료의 농도가 높아질수록 ERK의 발현량이 억제되는 것을 확인 그러나 500, 1,000 μ g/ml 농도 간의 유의적 차이는 보이지 않음. 또한 RAW 264.7 세포에서 발현을 억제시킨것 만큼의 효과를 보여주지 못함



(DW and PMA (100 ng/ml) were used as the negative and inflammation-induced controls, respectively. p-ERK and pERK protein was assayed by western blot Values are means \pm SD (n=3). Symbols indicate significant differences by Duncan.)

<Effects of mixture on the ERK>

(8) 동물활성평가를 통한 효과 검증

(가) 실험 방법

1) 천식유도 모델

가) 실험동물의 사양 및 관리

- 실험동물인 수컷 5주령의 BALB/c 수컷 생쥐 (20~22 g)를 (주)샘타코에서 공급받아 실험 당일까지 충분한 고품사료 (Envigo, U.K.)와 물을 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용함. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회로부터 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호-DJUARB2017-018)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였음

나) 시약

- 사용된 시약은 Albumin from chicken egg white (Sigma Co., U.S.A), Aluminium hydroxigen gel (Sigma Co., U.S.A), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), Mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), Mouse OVA specific IgE ELISA kit (Biolegend Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), 24 G catheter (Becton Dickinson Co., U.S.A.), 의료용 봉합사 (대보산업, Korea), Ammonium-Chloride-Potassium lysis buffer (ACK lysis buffer : Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.) 등을 사용함

다) 기기

- 사용된 기기는 autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker

(Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.) 등을 사용함

라) 난알부민-유도 천식 마우스 모델 제작 및 약물 처리

- 알레르기성 천식 동물모델을 제작하기 위해 먼저, 난알부민 (ovalbumin, chicken egg albumin; OVA) 1 mg을 PBS와 수산화알루미늄 겔 [Al(OH)₃ gel]을 1:1 비율로 혼합한 용액을 0.3 ml씩 실험 시작일로부터 7일 간격으로 하루에 1번 각 1회씩 마우스에게 복강으로 주사하였음. 또한 마지막 복강 주사 7일 후인 21일째부터 마우스를 50x15x50 cm 크기의 아크릴상자 안에 넣고 2 mg/ml OVA용액 50 ml을 네블라이저 (nebulizer)기기를 이용하여 격일 (21, 23, 25, 27, 29일째) 간격으로 1일 1회 (30분)로 설정하여 분사함으로써 호흡을 통한 천식을 유발하였음. 실험군은 아무것도 처리하지 않는 정상군과 천식 유발을 진행하면서 증류수를 경구 투여하는 대조군, 국화와 황금을 6:4, 7:3, 8:2 비율로 혼합한 시료를 50, 100, 200 mg/kg으로 경구투여하는 실험군 등 총 11개 그룹으로 나누어 복강 내 주사 후부터 2주간 진행하였음

마) 혈액 내 면역세포 측정

- 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 채혈한 전혈을 시험검사 기관인 KPNT (Cheongju, Korea)에 백혈구와 호산구, 호중구, 호염기구, 림프구, 단핵구 수를 의뢰하여 분석하였음

바) 폐와 기관지 폐포세척액 (BALF; bronchoalveolar lavage fluid) 내 면역세포분리

- 실험 종료 후 기관지 부분을 해부하였음. 폐포 세척액으로부터 세포를 분리하기 위해 24 G catheter를 기관지 (trachea)에 주입시키고 의료용 봉합사로 묶어 고정한 후 배양액을 넣은 실린저를 연결하여 3회 순환시켜 BALF를 획득하였음. 획득한 BALF에 ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lysis buffer 100 µl를 넣어 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰음. 이를 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 면역세포수를 측정하였음

사) 혈청 및 BALF 상등액 분리

- 실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법으로 채혈한 다음 혈액을 15분간 3,000 rpm에서 원심 분리해서 혈청을 분리하였고, 분리한 BALF 세포를 5x10⁵ cell로 조정 한 후 10% fetal bovine serum (FBS)를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였음. 이후, 배양액을 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리해서 상등액을 분리하였음

아) 혈청 및 BALF 내 cytokine 생성량 측정

- 실험동물로부터 분리한 혈청, 상등액과 standard를 25 µl씩 각 well에 분주하고 matrix buffer, assay buffer 및 antibody-immobilized beads를 각 25 µl 가해 혼합한 뒤 2시간 동안 상온에서 반응시키고 washing buffer를 이용해 2회 세척하였음. 이에 다시 25 µl의 detection antibody를 가해 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 추가로 25 µl의 Streptavidin-Phycoerythrin을 가해 30분 동안 상온에서 반응시킨 뒤 washing 완충 용액

을 이용해 2회 세척하였음. 세척 후 PBS를 150 μl 넣어 5분 간 shaking한 후 Luminex를 이용해 측정하였음

자) 혈청 및 BALF 내 난알부민-특이 IgE 생성량 측정

- 분리한 혈청, 상등액과 standard를 50 μl 씩 각 well에 분주하고 matrix buffer 및 assay buffer를 각 50 μl 가해 혼합한 뒤 2시간 동안 상온에서 반응시키고 washing buffer를 이용해 4회 세척하였음. 이에 다시 100 μl 의 detection antibody를 가해 1시간 동안 상온에서 반응시키고 washing buffer를 이용해 4회 세척한 후, avidin-HRP를 100 μl 씩 넣고 30분 동안 상온에서 반응시켰음. 마지막으로 washing buffer를 이용해 4회 세척하고 substrate solution을 100 μl 씩 넣고 15분간 상온에서 빛을 차단한 채 반응시킨 후 100 μl 의 stop solution을 넣어 450 nm에서 흡광도를 측정함

차) 혈청 및 BALF 내 histamine 생성량 측정

- 분리한 혈청, 상등액과 standard를 100 μl 씩 각 well에 분주하고 10 μl 의 balance solution과 50 μl 의 conjugate를 넣어 1시간 동안 37°C에서 반응시켰음. Washing buffer를 이용하여 5회 세척 후 substrate A와 B를 각각 50 μl 씩 넣어 15분 동안 37°C에서 반응시키고 50 μl 의 stop solution을 추가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였음

카) 혈청 및 BALF 내 TGF- β 1 생성량 측정

- 분리한 혈청 40 μl 에 1 N HCl을 10 μl 씩 넣어 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 10 μl 씩 추가로 넣어 혈청을 활성화 시켰으며, 상등액은 100 μl 에 1 N HCl을 20 μl 씩 넣어 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 20 μl 씩 추가로 넣어 상등액을 활성화 시켰음. 활성화시킨 혈청, 상등액과 standard를 50 μl 씩 각 well에 분주하고 RD1-73 시약을 50 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였다. wash buffer를 이용해 4회 세척한 후 TGF- β 1 conjugate를 100 μl 씩 넣고 2시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였음. 다시 4회 세척 후 substrate solution을 100 μl 씩 넣어 30분 동안 상온에서 빛을 차단한 채 반응시킴. 마지막으로 stop solution 100 μl 를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음

타) 혈청 및 BALF 내 TSLP 생성량 측정

- 분리한 혈청, 상등액과 standard를 50 μl 씩 각 well에 분주하고 RD1-21 시약을 50 μl 씩 가하여 혼합한 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰음. wash buffer를 이용해 5회 세척한 후 TSLP conjugate를 100 μl 씩 넣고 2시간 동안 상온에서 반응시켰음. 다시 5회 세척 후 substrate solution을 100 μl 씩 넣어 30분 동안 상온에서 빛을 차단한 채 반응시켰음. 마지막으로 stop solution 100 μl 를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

파) 혈청 및 BALF 내 LTB4 생성량 측정

- 분리한 혈청, 상등액과 standard를 50 μl 씩 넣고 추가로 primary antibody solution 50 μl 를 넣어 1시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였음. 이후, LTB4 conjugate 50 μl 를 넣고 다시 3시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였음.

그다음 washing buffer를 이용해 2회 세척한 후 substrate solution 200 μ l를 첨가하고 상온에서 30분 동안 빛을 차단한 채 반응시켰음. 마지막으로 stop solution 100 μ l를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

하) 통계처리

- 실험 결과는 SPSS Ver. 18.0의 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였고 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 그 유의성을 검정하였음.

2) 미세먼지 유도 모델

가) 실험동물의 사양 및 관리

- 실험동물인 수컷 5주령의 BALB/c 수컷 생쥐 (20~22 g)를 ㈜샘타코에서 공급받아 실험 당일까지 충분한 고품사료 (Envigo, U.K.)와 물을 공급하고 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 15\%$, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 2주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였음. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회로부터 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호-DJUARB2017-017)을 받아 동물윤리준칙에 의거해서 실험함

나) 시약

- 사용된 시약은 aluminium hydroxigen gel (Sigma Co., U.S.A), phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), phenol red (Sigma Co., U.S.A.), sodium hydroxide (Sigma Co., U.S.A.), coal fly ash (Sigma Co., U.S.A.), diesel particulate matter (Sigma Co., U.S.A.), dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), LTB4 Parameter Assay Kit (R&D systems Co., U.S.A.), rat LTC4 ELISA kit (MyBioSource Co., U.S.A.), rat LTD4 ELISA kit (MyBioSource Co., U.S.A.) 등을 사용하였음

다) 기기

- 사용된 기기는 autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) 등을 사용하였음

라) 미세먼지 유도 마우스 모델 제작 및 약물 처리

- 미세먼지 유도 마우스 모델을 제작하기 위해 먼저, coal fly ash와 diesel particulate matter를 각각 5 mg/ml 농도로 DMSO에 용해시키고 최종농도가 coal fly ash는 0.5 mg/ml, diesel particulate matter는 0.75 mg/ml가 되도록 PBS로 희석한 후 수산화알루미늄 겔 [Al(OH)₃ gel]이 8%가 되게 첨가하여 미세먼지 혼합물을 제조하였음. 미세먼지 혼합물의 투여는 시료 투여 시작 후 3일 후, 6일 후에 총 2회로 INT (Intra-Nasal-Trachea)방법을 이용하여 미세먼지 혼합물을 주입함. 에테르를 이용하여 실험동물을 마취시키고 고무줄로 고정하여 기도를 확보한 후에 구강을 통해 기도로 미세먼지 혼합물을 50 μ l 주입하며, 동시

에 코에도 미세먼지 혼합물을 50 μl 를 함께 넣어주어 생쥐가 숨을 쉬는 과정에서 기관지를 통해 폐로 미세먼지 혼합물이 흡입될 수 있도록 유도하였음. 실험군은 아무것도 처리하지 않는 정상군과 미세먼지 유도 마우스에게 증류수를 경구 투여하는 대조군, 미세먼지 유도 마우스에게 국화와 황금을 6:4, 7:3, 8:2 비율로 혼합한 시료를 50, 100, 200 mg/kg으로 경구 투여하는 실험군 등 총 11개 그룹으로 나누어 7일간 경구 투여를 진행하였음.

마) 점액분비량 측정

- 실험 종료 30분 전에 phenol red (10 mg/kg)를 200 μl 씩 실험동물 복강에 주사하였음. 이후, ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법으로 채혈한 다음 기관 (trachea) 전체를 절제하였음. 분리된 기관을 1ml의 생리식염수에 넣어 30분간 조직을 vortexing 한 후, 5분간 10,000 rpm에서 원심분리하였으며, 분리한 상층액 900 μl 와 1M NaOH 100 μl 를 넣어 발색시키고 546 nm에서 흡광도를 측정하였음. 이를 적출한 기도의 무게로 나누어 기도에 대한 페놀레드의 비율을 구하여 기도에서의 점액분비량을 구하였음

바) 혈청 내 LTB₄ 생성량 측정

- 실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법으로 채혈한 다음 혈액을 15분간 3,000 rpm에서 원심 분리해서 혈청을 분리하였고 이후, 분리한 혈청과 standard를 50 μl 씩 넣고 추가로 primary antibody solution 50 μl 를 넣어 1시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였음. 이후, LTB₄ conjugate 50 μl 를 넣고 다시 3시간 동안 상온에서 plate shaker를 이용하여 혼합하였음. 그다음 washing buffer를 이용해 2회 세척한 후 substrate solution 200 μl 를 첨가하고 상온에서 30분 동안 빛을 차단한 채 반응시켰음. 마지막으로 stop solution 100 μl 를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음

사) 혈청 내 LTC₄, LTD₄ 생성량 측정

- 실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법으로 채혈한 다음 혈액을 15분간 3,000 rpm에서 원심 분리해서 혈청을 분리하였고 이후, 분리한 혈청과 standard를 100 μl 씩 각 well에 분주하고 10 μl 의 balance solution과 50 μl 의 conjugate를 넣어 1시간 동안 37°C에서 반응시켰음. washing buffer를 이용하여 5회 세척 후 substrate A와 B를 각각 50 μl 씩 넣어 15분 동안 37°C에서 반응시키고 50 μl 의 stop solution을 추가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

아) 통계처리

- 실험결과는 SPSS Ver. 18.0의 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였고 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 그 유의성을 검정하였음

(나) 실험결과

1) 천식유도 모델

가) 혈액 내 면역세포 수

① 백혈구

- 백혈구는 혈액 내에 존재하는 혈구세포 중 하나로, 크게 과립백혈구와 무과립백혈구로 구분하며, 과립백혈구에는 호산구, 호중구, 호염기구가 속하고 무과립백혈구는 림프구, 단핵구가 속해있음. 이러한 백혈구는 체내로 유입된 알레르겐을 포식 작용을 통해 제거하거나 항체를 형성하여 감염에 대해 저항하는 역할을 함
- 백혈구 수를 측정한 결과, 국화/황금 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200, 8:2-50 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 증가시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the WBC Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result ($\times 10^3$ cells/ μ l)	Group		Result ($\times 10^3$ cells/ μ l)
Normal		1.8 \pm 0.4	7:3	50	2.6 \pm 0.6
Control		2.0 \pm 0.7		100	4.4 \pm 0.7**
				200	4.7 \pm 0.5**
6:4	50	2.6 \pm 0.5	8:2	50	3.6 \pm 0.5*
	100	2.8 \pm 0.6		100	3.1 \pm 0.6
	200	4.8 \pm 0.6**		200	1.8 \pm 0.6

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

② 호산구

- 호산구는 IL-5에 의해 생산 및 분화가 이루어지며, major basic protein, eosinophilic-derived neurotoxin, cationic protein, peroxidase 등의 염증성 단백질을 함유하고 있음. Major basic protein은 기도 상피세포에 직접 손상을 주고, 기도 과민성을 증가시키며, 비만세포의 degranulation을 유발하여 천식 발병에 중요한 역할을 함. 또한 leukotriene을 함유하고 있어 기도수축, 혈관 투과성을 증가시킴
- 호산구 수를 측정한 결과, 국화/황금 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the Eosinophil Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (%)	Group		Result (%)
Normal		12.1 \pm 3.2	7:3	50	16.0 \pm 4.2**
Control		34.7 \pm 5.3		100	14.0 \pm 5.6**
				200	13.7 \pm 4.9**
6:4	50	22.9 \pm 3.7*	8:2	50	14.3 \pm 5.1**
	100	21.7 \pm 3.8*		100	24.4 \pm 3.8*
	200	13.4 \pm 4.8**		200	14.2 \pm 3.2**

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

③ 호중구

- 호중구는 백혈구 중 가장 많은 세포로 체내에 유입된 이물질을 제거하기 위해 1차적으로 반응하며, 특히 급성염증에 관여함. 또한 호산구와 마찬가지로 천식 발병 시 기도에 염증을 유도하며, 주로 난치성 천식에서 증가함

- 호중구 수를 측정한 결과, 국화/황금 7:3-50, 7:3-200, 8:2-100, 8:2-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the Neutrophil Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (%)	Group		Result (%)
Normal		18.8±5.4	7:3	50	20.4±3.6*
Control		27.9±4.9		100	29.6±4.5
				200	22.3±2.6*
6:4	50	25.0±4.1	8:2	50	24.6±4.4
	100	29.8±3.5		100	18.4±3.1**
	200	26.4±2.9		200	18.7±3.9**

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

④ 호염기구

- 호염기구는 백혈구 중 가장 적은 세포로 과립 내에 histamine, heparin 등의 여러 작용 인자를 포함함. 또한 세포막에는 면역글로불린 IgE에 대한 수용체가 있으며, IgE와 결합이 이루어지면 탈과립 및 작용 인자를 방출하여 알레르겐에 의한 초기 과민반응이 유발됨
- 호염기구 수를 측정한 결과, 국화/황금 7:3-200, 8:2-50, 8:2-100 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 증가시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the Basophil Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (%)	Group		Result (%)
Normal		1.2±0.1	7:3	50	0.7±0.1
Control		0.8±0.2		100	1.0±0.2
				200	1.1±0.2*
6:4	50	0.6±0.3	8:2	50	1.2±0.2*
	100	0.5±0.2		100	1.2±0.2*
	200	0.6±0.3		200	0.9±0.2

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

⑤ 림프구

- 림프구는 다양한 표적 세포에 대해서 비특이적인 세포독성 작용을 갖는 자연살해세포 (natural killer cell: NK-cell)와 항체를 만들어 항원을 물리치는 체액성 면역에 관여하는 B림프구, 직접 세포독성 물질을 분비하여 항원을 물리치는 세포성 면역에 관여하는 T림프구로 구성되며, 신체 내 면역반응에 중추적인 역할을 함
- 림프구 수를 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 6:4-100을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 증가시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the Lymphocyte Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (%)	Group		Result (%)
Normal		54.1±3.7	7:3	50	59.3±3.7**
Control		40.3±3.4		100	51.3±3.3*
				200	53.3±4.4*
6:4	50	48.1±5.1	8:2	50	53.8±4.4*
	100	44.5±5.4		100	53.5±5.1*
	200	55.7±5.1*		200	58.6±4.4**

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

⑥ 단핵구

- 단핵구는 외부로부터 유입된 물질을 식세포작용을 통해 제거하는 세포로, 염증조직 내의 대식세포는 단핵구로부터 유래함. 또한 면역반응에 있어 T세포에 대해 항원제시 세포로서 중요한 역할을 하며 다양한 염증성 사이토카인을 분비함
- 단핵구 수를 측정한 결과, 국화/황금 7:3-100, 8:2-50 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$) 증가시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the Monocyte Level in Blood of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (%)	Group		Result (%)
Normal		1.0±0.4	7:3	50	1.6±0.4
Control		1.5±0.4		100	2.2±0.4*
				200	1.7±0.5
6:4	50	1.8±0.5	8:2	50	2.2±0.3*
	100	2.0±0.4		100	1.3±0.3
	200	1.6±0.5		200	1.4±0.3

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

나) BALF 내 총 세포 수

- BALF (bronchoalveolar lavage fluid)는 기관지 폐포에 주입한 생리식염수를 회수한 기관지 폐포 세척액을 말하며, 세균 등의 병원체, 면역세포 등을 측정하여 진단을 내릴 때 보조수단으로 사용함
- BALF 내 총 세포 수를 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 7:3-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on Total Cells in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result ($\times 10^3$ cells)	Group		Result ($\times 10^3$ cells)
Normal		0.7 \pm 0.2	7:3	50	6.3 \pm 0.3
Control		6.8 \pm 0.4		100	5.4 \pm 0.2**
				200	4.9 \pm 0.3**
6:4	50	6.6 \pm 0.3	8:2	50	6.5 \pm 0.2
	100	6.2 \pm 0.1*		100	5.9 \pm 0.1*
	200	5.4 \pm 0.1**		200	5.1 \pm 0.2**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

다) 혈청 및 BALF 내 cytokine 생성량

① IL-1 β

- IL-1 β 는 다양한 자극요인에 의해 세포의 증식, 분화 및 세포사멸 등 세포활동에 관여하지만, 과 염증 상태에서는 면역세포의 침윤을 야기하여 염증반응의 중요한 중개인자 역할을 하고 T세포의 활성을 증가시켜 면역반응에 중요한 사이토카인의 생성을 증가시킴. 또한 IL-17에 의해 매개되는 천식을 유도함
- 혈청 및 BALF 내 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소시킴 (아래 표)

<Effect of Samples on the IL-1 β Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		1.0 \pm 0.4	7:3	50	1.6 \pm 0.4*
Control		1.5 \pm 0.4		100	2.2 \pm 0.4**
				200	1.7 \pm 0.5**
6:4	50	1.8 \pm 0.5	8:2	50	2.2 \pm 0.3
	100	2.0 \pm 0.4*		100	1.3 \pm 0.3*
	200	1.6 \pm 0.5**		200	1.4 \pm 0.3*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-1 β Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		30.0 \pm 0.3	7:3	50	273.4 \pm 4.8*
Control		350.0 \pm 5.2		100	267.9 \pm 3.5**
				200	259.7 \pm 2.0**
6:4	50	306.2 \pm 2.7	8:2	50	306.2 \pm 4.5
	100	295.3 \pm 4.2*		100	277.0 \pm 2.1*
	200	269.8 \pm 2.1**		200	255.2 \pm 5.7*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

② IL-2

- IL-2는 반응 세포에 존재하는 수용체와 결합하여 T 세포의 증식과 분화를 촉진시키며, B 세포 증식을 유도하고, 대식세포를 활성화함. 주로 Th1 면역반응을 통해 생산되며, Th2 반응이 우세한 천식의 면역 불균형 상태를 회복시키는 역할을 함
- 혈청 및 BALF 내 IL-2 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 증가시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-2 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		51.6±9.7	7:3	50	39.3±5.3
Control		33.9±7.6		100	45.2±3.2*
				200	52.3±3.8**
6:4	50	35.2±8.3	8:2	50	32.9±4.7
	100	37.0±6.3		100	34.7±5.1
	200	41.0±6.4*		200	36.2±3.9

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-2 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		84.2±7.8	7:3	50	64.1±4.2
Control		55.3±6.1		100	73.7±2.6*
				200	85.2±3.0**
6:4	50	57.4±6.6	8:2	50	53.7±3.8
	100	60.3±5.0		100	56.6±4.1
	200	66.9±5.1*		200	59.1±3.1

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

③ IL-4

- IL-4는 천식에서 주요 인자인 IgE의 생산을 촉진시키는데 중요한 역할을 하며, 염증세포 자극을 통한 염증 매개물질 분비를 통해 기관지의 과민성 증가와 기도 폐쇄를 일으키는 역할을 함
- 혈청 및 BALF 내 IL-4 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-4 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		36.4±4.6	50		200.5±11.1**
Control		284.5±18.1	7:3	100	165.1±13.4***
				200	116.8±15.6***
6:4	50	297.4±13.0		50	222.4±16.7*
	100	243.9±14.3*	8:2	100	152.5±16.2***
	200	224.6±19.3*		200	113.3±12.4***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-4 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		53.5±5.5	50		294.5±13.2**
Control		418.0±21.4	7:3	100	242.5±15.9***
				200	211.6±18.5***
6:4	50	436.9±15.4		50	326.7±19.8*
	100	358.3±16.9*	8:2	100	233.9±19.2***
	200	330.0±22.9*		200	216.5±14.7***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

④ IL-5

- IL-5는 IL-4를 보조하는 역할뿐 아니라 호산구 증가증을 초래하는 사이토카인이며, 호산구를 활성화시켜 호산구 내의 과립물질 분비를 촉진하여 기도의 염증반응과 기관지 과민성을 유발함
- 혈청 및 BALF 내 IL-5 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-5 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		42.0±19.7	50		194.9±19.6**
Control		291.4±24.6	7:3	100	175.1±17.4***
				200	93.0±19.2***
6:4	50	251.0±12.1*		50	289.5±12.4
	100	253.7±15.3*	8:2	100	250.7±14.9*
	200	202.0±12.2**		200	129.2±12.7***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-5 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		110.9±11.6	50		594.6±11.6**
Control		769.3±14.5	7:3	100	482.3±10.3***
				200	375.5±11.3***
6:4	50	662.7±7.1*	50		714.3±7.3
	100	639.6±9.0*	8:2	100	621.8±8.8*
	200	513.2±7.2**	200		541.2±7.5***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑤ IL-6

- IL-6는 다양한 염증반응에 관련되어 있는 사이토카인이며, 호중구의 생산을 유도하고, B 림프구의 분화와 성장을 조절하는 인자인 동시에 알레르기성 질환에서는 만성단계로 진행시킬 수 있는 인자로 작용하지만, 천식에서는 IL-17에 의해 유도되어짐
- 혈청 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시켰으며, BALF 내 IL-6 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-6 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		36.5±12.1	50		420.0±16.2**
Control		595.8±23.4	7:3	100	270.1±24.6***
				200	185.5±14.9***
6:4	50	463.5±16.6**	50		436.4±21.7**
	100	373.7±20.5**	8:2	100	298.7±10.9***
	200	334.8±11.4***	200		281.3±12.1***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-6 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		42.7±13.4	50		517.4±18.0*
Control		596.5±26.0	7:3	100	382.2±27.3**
				200	343.2±16.6***
6:4	50	568.3±18.4	8:2	50	536.5±24.1
	100	463.3±22.8*		100	475.5±12.1*
	200	417.7±12.7**		200	445.2±13.4*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑥ IL-9

- IL-9은 Th2형 싸이토카인으로 조혈모세포의 다양한 조절자로 사용되며, 세포증식을 유도하고 세포사멸을 예방함. 또한 기관지 내 점액분비를 유도하고 천식의 염증반응을 매개함
- 혈청 내 IL-9 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시켰으며, BALF 내 IL-9 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 7:3-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시켰다(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-9 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		524.3±106.4	50		1274.1±131.3*
Control		1790.9±198.7	7:3	100	674.0±120.7***
				200	404.4±165.1***
6:4	50	1290.8±108.7*	8:2	50	829.6±102.8**
	100	905.4±137.1**		100	481.3±108.4***
	200	711.8±164.5***		200	266.9±168.4***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-6 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		1305.4±63.8	50		3172.6±78.8
Control		3459.3±119.2	7:3	100	2678.3±72.4*
				200	2007.0±99.1**
6:4	50	3214.1±65.2	8:2	50	9065.6±61.7
	100	2854.5±82.3*		100	2298.5±65.0**
	200	2772.4±98.7*		200	1664.6±101.0***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

⑦ IL-10

- IL-10은 다양한 세포에서 생성되는 중요한 면역 조절 사이토카인이며, 염증반응의 억제 할 뿐만 아니라, T세포, B세포, NK-세포, 항원 제시 세포 등 여러 면역세포의 증식과 분화를 조절하는 역할을 함. 또한 IFN- γ , IL-2, IL-3 및 GM-CSF 와 같은 세포성 면역 증진 사이토카인의 합성을 억제하여 천식을 악화시키는 역할을 함
- 혈청 내 IL-10 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소시킴, BALF 내 IL-10 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-10 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		12.7±3.1	7:3	50	84.4±10.3**
Control		179.6±15.6		100	43.7±9.5***
				200	41.8±10.4***
6:4	50	137.9±16.1*	8:2	50	92.3±5.6**
	100	89.4±11.8**		100	44.0±9.6***
	200	54.5±11.3***		200	49.9±2.8***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-10 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		17.4±2.2	7:3	50	161.1±7.2*
Control		204.9±10.9		100	116.9±6.7**
				200	111.9±7.3**
6:4	50	188.1±11.3	8:2	50	176.3±3.9*
	100	170.6±8.3*		100	117.5±6.7**
	200	145.7±7.9**		200	104.2±1.9***

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

⑧ IL-12

- IL-12는 Th1 면역반응을 통해 생성되는 세포성 면역증진 사이토카인이며, Th0 세포가 Th1 세포로의 분화에 관여하며, T 세포 및 NK 세포로부터 IFN- γ , TNF- α 의 생성을 증가시키고, IL-4에 의한 IFN- γ 생성 억제를 감소시킴
- 혈청 및 BALF 내 IL-12 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200, 8:2-200 투여군은 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 나타나지 않음(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-12 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		50.9±3.3	7:3	50	39.2±2.3
Control		39.0±1.5		100	40.9±4.2
				200	43.4±3.7
6:4	50	38.4±1.2	8:2	50	38.4±3.3
	100	40.9±2.1		100	38.4±3.4
	200	42.3±1.3		200	42.6±3.7

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-12 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		71.9±1.6	7:3	50	58.5±1.1
Control		58.1±0.7		100	61.0±2.1
				200	64.7±1.8
6:4	50	57.2±0.6	8:2	50	57.2±1.6
	100	61.0±1.0		100	57.2±1.7
	200	63.0±0.6		200	63.5±1.8

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑨ IL-13

- IL-13은 천식의 대표적인 특징인 기도 과민성을 유도 IL-4와 수용체를 공유하여 기능적으로 IL-4와 유사하며 IgE 매개성 염증에서 중요한 작용 기관지 상피세포나 평활근세포를 자극하여 eotaxin 분비를 증가시키고 호산구를 활성화시켜 기도의 염증반응 및 기관지 과민성을 유발함
- 혈청 및 BALF 내 IL-13 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-13 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		16.2±3.2	7:3	50	107.2±2.4*
Control		131.7±14.7		100	69.1±3.7***
				200	63.2±1.1***
6:4	50	124.7±6.3	8:2	50	107.6±5.1*
	100	97.5±3.3**		100	88.4±3.1**
	200	79.1±2.5***		200	59.8±4.1***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-13 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		36.4±3.1	7:3	50	240.8±2.1*
Control		295.7±13.0		100	155.3±3.3***
				200	141.9±1.0***
6:4	50	257.6±5.6	8:2	50	241.6±4.5*
	100	218.9±2.9**		100	198.5±2.7**
	200	177.6±2.2***		200	134.2±3.6***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑩ TNF- α

- TNF- α 는 각 조직의 수복, 항바이러스 활성화 등의 역할을 하는 사이토카인으로 세포사멸과정 중 괴사에 영향을 미치기도 하며, 염증반응과 면역기능을 변화시키는 IL-1 β 및 IL-6와 같은 다양한 유전자 발현을 유도함. 또한 Th1 세포를 활성화시켜 암세포의 성장을 억제시키고 면역반응을 활성화시키는 역할을 한다. 천식에서 IL-17을 통해 생성이 유도되어 염증을 발생시킴
- 혈청 및 BALF 내 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 7:3-200, 8:2-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the TNF- α Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		11.9±1.7	7:3	50	296.2±14.4
Control		314.8±13.6		100	291.5±9.6
				200	170.5±5.6***
6:4	50	302.4±15.7	8:2	50	304.2±10.5
	100	297.5±15.3		100	301.7±12.8
	200	298.1±10.9		200	230.2±9.7**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the TNF- α Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		38.0 \pm 2.0	50		944.8 \pm 16.8
Control		990.2 \pm 15.9	7:3	100	929.9 \pm 11.2
				200	743.8 \pm 6.5**
6:4	50	964.6 \pm 18.4	50		970.3 \pm 12.3
	100	948.9 \pm 17.9	8:2	100	962.3 \pm 15.0
	200	951.1 \pm 12.7	200		834.3 \pm 11.3*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑩ IFN- γ

- IFN- γ 는 선천 면역의 일환으로 외부로부터 유입된 알레르겐으로부터 우리 몸을 보호하는 작용을 하는 사이토카인이며, 면역세포를 활성화시킴. 또한 Th1/Th2 반응의 항상성을 유지시키기 위해 Th1 세포를 통해 생성됨
- 혈청 및 BALF 내 IFN- γ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IFN- γ Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		333.3 \pm 14.1	50		285.7 \pm 18.9*
Control		190.5 \pm 12.5	7:3	100	337.0 \pm 12.7**
				200	362.6 \pm 9.8***
6:4	50	271.0 \pm 14.2*	50		253.9 \pm 12.2*
	100	329.6 \pm 10.4**	8:2	100	263.7 \pm 13.9*
	200	317.4 \pm 22.4**	200		307.7 \pm 15.8**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IFN- γ Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		566.3 \pm 20.6	50		485.4 \pm 27.6*
Control		383.6 \pm 18.3	7:3	100	572.5 \pm 18.5**
				200	616.0 \pm 14.3***
6:4	50	460.5 \pm 20.7*	50		431.4 \pm 17.8*
	100	460.0 \pm 15.1**	8:2	100	448.0 \pm 20.3*
	200	539.3 \pm 32.7**	200		522.7 \pm 23.1**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑫ IL-17A

- IL-17A는 활성화된 T 세포에 의해 생성되는 전 염증성 사이토카인이며, 섬유아세포, 기도평활근세포와 같은 면역세포를 자극하여 다양한 인자를 유도하고 천식에 의한 염증 및 기관지 과민성을 악화시킴
- 혈청 및 BALF 내 IL-17A 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 6:4-100 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-17A Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		15.9±4.6	50		71.4±7.5*
Control		91.4±7.6	7:3	100	51.1±6.5***
				200	38.9±2.9***
6:4	50	87.5±3.6	50		77.0±7.5*
	100	78.5±4.1	8:2	100	64.9±4.4**
	200	63.5±4.7**		200	51.7±3.7***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-17A Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		20.7±4.0	50		107.3±6.5*
Control		136.1±6.6	7:3	100	89.7±5.6***
				200	63.1±2.5***
6:4	50	120.7±3.1	50		105.0±6.5*
	100	107.1±3.5	8:2	100	88.5±3.8**
	200	96.6±4.1**		200	70.5±3.2***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑬ IL-17E

- IL-17E는 IL-25라고도 불리며, 기도 상피세포와 염증세포에서 분비되는 사이토카인으로 호산구와 선천성 림프세포를 활성화시켜 IL-4, IL-5, IL-13 같은 사이토카인의 생성을 유도함. 이를 통해 Th2 면역반응을 증가시키고 결과적으로 천식을 유발하거나 악화시킴
- 혈청 및 BALF 내 IL-17E 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 6:4-100 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-17E Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		175.8±17.1	50		457.2±28.4**
Control		761.5±58.5	7:3	100	347.1±17.6***
				200	322.2±33.9***
6:4	50	746.3±27.6	50		603.1±21.6*
	100	710.5±37.7	8:2	100	480.0±51.5**
	200	579.0±47.5*		200	461.9±26.5**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-17E Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		450.7±32.2	50		1266.6±53.6**
Control		1952.5±110.4	7:3	100	1007.9±33.2***
				200	943.9±64.0***
6:4	50	1913.5±52.1	50		1640.9±40.8*
	100	1821.7±71.2	8:2	100	1325.2±97.2**
	200	1579.0±89.7*		200	1278.8±50.0**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑭ IL-17F

- IL-17F는 IL-17A와 동일하게 활성화된 T 세포에 의해 생성되는 전 염증성 사이토카인이며, 기관지 상피세포, 정맥 내피세포, 섬유아세포 및 호산구에서 여러 가지 사이토카인, 케모카인 및 접착 분자를 유도하고 천식에 의한 염증 및 기관지 과민성을 악화시킴
- 혈청 및 BALF 내 IL-17F 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-17F Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		5.6±3.2	50		12.8±3.1*
Control		21.2±5.4	7:3	100	11.5±4.1*
				200	6.8±5.1**
6:4	50	18.4±2.1	50		17.9±4.1
	100	13.0±3.3*	8:2	100	6.4±5.1**
	200	9.3±2.8**		200	4.4±3.4**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-17F Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		13.3±2.4	7:3	50	33.5±4.2**
Control		50.1±3.1		100	30.4±5.6**
				200	19.3±2.0***
6:4	50	43.4±2.9	8:2	50	45.6±3.6
	100	30.7±2.5**		100	26.1±3.0***
	200	25.2±3.8***		200	21.4±4.6***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

⑮ IL-33

- IL-33은 IL-1 superfamily에 속하는 사이토카인으로 기생충이나 바이러스, 또는 알레르겐 유발인자의 노출에 따라 Th2 면역반응의 개시에 결정적인 역할을 담당함. 선천성 림프세포를 활성화시켜 Th2 면역반응을 담당하는 IL-4, IL-5와 IL-13의 생성을 유도하고 알레르겐에 의한 기도 염증을 악화시킴
- 혈청 및 BALF 내 IL-33 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 8:2-50 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the IL-33 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		11.2±14.6	7:3	50	175.9±20.7*
Control		222.5±19.1		100	122.5±19.6***
				200	115.1±14.7***
6:4	50	182.3±16.8	8:2	50	188.5±15.7
	100	140.9±13.9**		100	164.5±13.3*
	200	125.5±10.2***		200	144.6±12.7**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the IL-33 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group	Result (pg/ml)	Group	Result (pg/ml)
Normal	19.6±10.2	50	309.6±14.5*
Control	391.6±13.4	7:3 100	215.6±13.7**
		200	202.6±10.3**
6:4	50	50	331.8±11.0
	100	8:2 100	289.5±9.3*
	200	200	254.5±8.9**

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

라) 혈청 및 BALF 내 난알부민 특이-IgE 생성량

- IgE는 알레르기성 질환의 발생에 관여하는 면역글로불린의 한 종류로 국소의 점막 조직과 분비물 내에 결합되지 않은 상태로 존재하거나, 비만세포에 결합된 상태로 존재하며 혈액의 순환을 통해 몸 전체의 비만세포 또는 호염기구로 전달됨. 이후 외부로부터 알레르겐이 유입되면 기도의 비만세포를 활성화시켜 각종 염증성 물질을 생산하도록 유도하여 기도 염증반응에 관여함. 이와 같은 이유로 혈청 내 총 IgE를 측정하여 알레르기성 질환을 진단하는데 사용되고 있음
- 혈청 내 난알부민 특이-IgE 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 6:4-100, 8:2-200 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시켰으며, BALF 내 난알부민 특이-IgE 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 8:2-200 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the OVA-specific IgE Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group	Result (pg/ml)	Group	Result (pg/ml)
Normal	0.6±0.5	50	1.8±0.3*
Control	2.8±0.3	7:3 100	1.6±0.3*
		200	1.3±0.3**
6:4	50	50	1.7±0.3*
	100	8:2 100	1.8±0.3*
	200	200	2.8±0.3

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the OVA-specific IgE Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		60.6±17.4	50		178.1±7.5**
Control		278.4±16.1	7:3	100	164.5±11.0**
				200	132.1±5.9***
6:4	50	226.5±16.7*	8:2	50	166.1±18.1**
	100	224.5±24.5*		100	180.8±17.7**
	200	137.7±15.4***		200	249.8±11.1

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

마) 혈청 및 BALF 내 histamine 생성량

- Histamine은 알레르기 반응이나 염증에 관여하는 화학물질이며, 항원항체 반응을 통해 면역세포에서 유리되어 모세혈관 확장, 투과성 증대 (콧물이나 부종), 기관지 수축 및 기관지 내 점액분비 등을 일으킴. 천식에 의해 생성된 IgE가 면역세포들을 자극하여 유리된 되는데, 이는 기관지 수축 및 기관지 내 점액분비를 유도함
- 혈청 및 BALF 내 histamine 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-50, 8:2-100, 8:2-200 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the Histamine Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (ng/ml)	Group		Result (ng/ml)
Normal		63.4±5.3	50		50.3±5.1*
Control		66.3±4.2	7:3	100	46.3±3.5**
				200	45.2±5.2**
6:4	50	66.6±3.1	8:2	50	52.0±4.2*
	100	54.1±4.5*		100	64.9±2.5
	200	52.2±3.5*		200	60.0±4.8

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the Histamine Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (ng/ml)	Group		Result (ng/ml)
Normal		6.7±0.6	50		5.3±0.6*
Control		7.0±0.4	7:3	100	4.9±0.5*
				200	4.8±0.6*
6:4	50	7.1±5.7	8:2	50	5.5±0.4*
	100	5.7±0.5*		100	6.9±0.2
	200	5.5±0.2*		200	6.3±0.3

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

바) 혈청 및 BALF 내 TGF-β1 생성량

- TGF-β1은 세포성장, 세포증식, 세포분화 및 세포사멸의 조절을 포함하여 많은 세포기능을 수행하는 사이토카인으로 IFN-γ, TNF-α 등 다양한 사이토카인의 분비 및 활성을 억제함. 천식에서 IL-17을 유도시켜 알레르기성 질환을 악화시키는 역할을 함
- 혈청 및 BALF 내 TGF-β1 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-100, 7:3-100, 8:2-100, 8:2-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the TGF-β1 Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group	Result (ng/ml)	Group	Result (ng/ml)	
Normal	86.2±1.9	50	89.9±5.3	
Control	89.0±7.7	7:3 100	74.8±1.2*	
		200	79.9±3.3	
		50	92.8±2.0	
6:4	50	88.0±5.8	50	92.8±2.0
	100	75.9±3.4*	8:2 100	66.0±4.4*
	200	95.5±3.9	200	71.9±4.7*

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the TGF-β1 Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group	Result (pg/ml)	Group	Result (pg/ml)	
Normal	435.2±46.2	50	530.5±48.7	
Control	525.2±45.4	7:3 100	441.2±11.4*	
		200	471.5±19.3*	
		50	519.1±34.0	
6:4	50	519.1±34.0	50	547.7±12.2
	100	448.0±20.1*	8:2 100	389.5±55.6**
	200	563.5±14.1	200	424.4±57.2*

(Significance of results, * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ compare to control)(n = 8)

사) 혈청 및 BALF 내 TSLP 생성량

- TSLP는 항원제시세포의 활성화를 통해 T세포 집단의 성숙에 중요한 역할을 하는데, 주로 섬유아세포나 상피세포에서 생성됨. 외부로부터 유입된 알레르겐에 의해 항원제시세포가 활성화되고 이를 통해 Th2 세포를 성숙시켜 Th2 반응을 유도함
- 혈청 및 BALF 내 TSLP 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 8:2-50, 8:2-100 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the TSLP Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		2.7±0.3	7:3	50	4.6±0.2*
Control		5.5±0.2		100	2.8±0.4**
				200	2.7±0.3**
6:4	50	3.2±0.5**	8:2	50	5.5±0.5
	100	4.4±0.2*		100	4.6±0.4
	200	4.3±0.3*		200	4.2±0.6*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the TSLP Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		0.9±0.3	7:3	50	2.0±0.1
Control		2.4±0.2		100	1.2±0.2**
				200	1.2±0.2**
6:4	50	1.4±0.3**	8:2	50	2.3±0.3
	100	1.9±0.2*		100	2.0±0.2
	200	1.9±0.1*		200	1.8±0.3*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

아) 혈청 및 BALF 내 LTB₄ 생성량

- LTB₄는 염증 촉진 유도물질로 천식반응에서의 염증유도와 기관지 수축에 관여함. 호중구, 호산구, 대식세포와 비만세포들과 같은 선천면역세포에서 주로 생성 및 분비되며 염증부위의 염증세포들의 결집을 촉진하는 대표적인 화학주성인자이며 염증유발 인자임
- 혈청 및 BALF 내 LTB₄ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3-100 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소시켰으며, BALF 내 LTB₄ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-200, 7:3-100 투여군을 제외한 모든 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소시켰음(아래 표)

<Effect of Samples on the LTB₄ Level in Serum of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (ng/ml)	Group		Result (ng/ml)
Normal		9.5±0.1	7:3	50	7.0±0.6**
Control		10.2±0.7		100	11.0±0.5
				200	8.0±0.7*
6:4	50	8.3±0.5*	8:2	50	7.2±0.9*
	100	8.7±0.7		100	6.1±0.9**
	200	10.7±0.5		200	5.5±0.3**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

<Effect of Samples on the LTB₄ Level in BALF of OVA-induced Asthma Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		77.1±5.0	7:3	50	58.4±6.4**
Control		85.6±8.8		100	92.0±6.0
				200	66.9±7.2*
6:4	50	69.1±4.3*	8:2	50	60.1±5.1**
	100	73.0±6.9*		100	51.3±9.0***
	200	89.7±7.4		200	46.0±4.3***

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

2) 미세먼지 유도 모델

가) 점액 분비량

- 생체의 점액 분비작용은 수분을 비롯한 점액의 분자를 촉진시켜 그 양을 증가시키거나, 직접적인 작용으로 점액 혹은 담의 점성을 낮추고 섬모운동의 촉진 등 다양한 기전에 의해 이루어짐. 이를 통해 기관지 속으로 유입된 이물질의 배설을 용이하게 함
- 기관지 내 점액 분비량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3, 8:2 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the Phenol Red Level in Trachea of Fine Dust-induced Mice>

Group		Result (µg/g)	Group		Result (µg/g)
Normal		28.7±2.2	7:3	50	23.8±3.4*
Control		19.7±2.1		100	26.0±3.8**
				200	26.7±2.0***
6:4	50	20.3±2.8	8:2	50	24.1±1.9**
	100	25.6±2.8**		100	24.8±3.4**
	200	25.2±3.5**		200	26.6±4.1**

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

나) LTB₄ 생성량

- LTB₄는 염증 촉진 유도물질로 염증유도와 기관지 수축에 관여한다. 호중구, 호산구, 대식세포와 비만세포들과 같은 선천면역세포에서 주로 생성 및 분비되며 염증부위의 염증세포들의 결집을 촉진하는 대표적인 화학주성인자이며 염증유발 인자임
- 혈청 내 LTB₄ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200, 8:2-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the LTB₄ Level in Serum of Fine Dust-induced Mice>

Group		Result (ng/ml)	Group		Result (µg/g)
Normal		9.7±0.7	7:3	50	13.4±1.1
Control		14.5±1.5		100	12.4±1.4*
				200	12.2±1.5*
6:4	50	13.2±1.2	8:2	50	14.8±1.1
	100	12.3±1.6*		100	12.7±1.9
	200	11.8±1.4**		200	12.3±2.1*

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

다) LTC₄ 생성량

- LTC₄는 류코트리엔의 일종으로 강력한 기도 평활근 수축작용, 기도점액분비작용, 혈관투과성 작용이 있어, 기관지 질환이나 염증의 중요한 매개체로 생각되고 있음
- 혈청 내 LTC₄ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4, 7:3 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the LTC₄ Level in Serum of Fine Dust-induced Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		7.5±0.6	7:3	50	9.1±1.4*
Control		11.0±1.3		100	8.0±1.5**
				200	7.7±1.8***
6:4	50	8.9±1.9*	8:2	50	10.9±1.8
	100	8.1±2.1**		100	9.9±1.5
	200	7.7±1.4***		200	9.8±1.0

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

라) LTD₄ 생성량

- LTD₄는 γ -GTP에 의해 LTC₄가 변환한 형태로, LTC₄보다 강력한 기도 평활근 수축작용, 기도점액분비작용, 혈관투과성작용이 있어, 기관지 질환이나 염증의 중요한 매개체로 생각되고 있음
- 혈청 내 LTD₄ 생성량을 측정한 결과, 국화/황금 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게 (** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소시킴(아래 표)

<Effect of Samples on the LTD₄ Level in Serum of Fine Dust-induced Mice>

Group		Result (pg/ml)	Group		Result (pg/ml)
Normal		6.1±0.9	50	8.4±1.0	
Control		10.0±1.6	7:3	100	7.6±1.4**
			200	6.4±1.1***	
6:4	50	8.7±1.6	8:2	50	9.8±1.6
	100	8.3±1.7	100	8.3±1.2	
	200	7.4±0.9**	200	7.9±1.4	

(Significance of results, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compare to control)(n = 8)

(다) 결론

1) 천식유도 모델

- 천식에 대한 국화/황금 복합물의 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 난알부민-유도 천식 마우스 모델에 국화/황금 복합물을 6:4, 7:3, 8:2 비율로 제작 후 50, 100, 200 mg/kg 농도로 투여한 후 마우스의 혈액 및 폐포 세척액을 통한 천식 관련 바이오마커들을 확인한 결과, 국화/황금 복합물의 유의적인 항천식 효능을 확인하였음(아래 표)

<Effect of Samples on OVA-induced Asthma Mice>

Factor	Group								
	6:4			7:3			8:2		
	50	100	200	50	100	200	50	100	200
백혈구	-	-	↑↑	-	↑↑	↑↑	↑	-	-
호산구	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓
호중구	-	-	-	-	-	-	-	↓↓	↓↓
호염기구	-	-	-	-	-	-	↑	↑	-
림프구	-	-	↑	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑↑
단핵구	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-
BALF	-	↓	↓↓	-	↓↓	↓↓	-	↓	↓↓
IL-1β	혈청	-	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓
	BALF	-	↓	↓↓	↓	↓↓	-	↓	↓
IL-2	혈청	-	↑	-	-	↑	-	-	-
	BALF	-	↑	-	-	↑↑	-	-	-
IL-4	혈청	-	↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓	↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
IL-5	혈청	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓	↓↓
	BALF	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓	↓↓
IL-6	혈청	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓	↓↓	↓	↓↓	-	↓	↓
IL-9	혈청	↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓	↓	-	↓	-	↓↓	↓↓
IL-10	혈청	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓	↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
IL-12	혈청	-	-	-	-	-	-	-	-
	BALF	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-13	혈청	-	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓
TNF-α	혈청	-	-	-	-	-	↓↓	-	↓↓
	BALF	-	-	-	-	-	↓	-	↓

IFN- γ	혈청	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑↑
	BALF	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑↑
IL-17A	혈청	-	-	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓↓
	BALF	-	-	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓↓
IL-17F	혈청	-	↓	↓↓	↓	↓	↓↓	-	↓↓	↓↓
	BALF	-	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	-	↓↓↓	↓↓↓
IL-17E	혈청	-	-	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓
	BALF	-	-	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓
IL-33	혈청	-	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	-	↓	↓↓
	BALF	-	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓↓↓	-	↓	↓↓
IgE	혈청	-	-	↓↓	↓	↓	↓↓	↓	↓	-
	BALF	↓	↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	-
histamine	혈청	-	↓	↓	↓	↓↓	↓↓	↓	-	-
	BALF	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-
TGF- β	혈청	-	↓	-	-	↓	-	-	↓	↓
	BALF	-	↓	-	-	↓	-	-	↓	↓
TSLP	혈청	↓↓	↓	↓	↓	↓↓	↓↓	-	-	↓
	BALF	↓↓	↓	↓	-	↓↓	↓↓	-	-	↓
LTB ₄	혈청	↓	-	-	↓↓	-	↓	↓	↓↓	↓↓
	BALF	↓	↓	-	↓↓	-	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓

- 혈액 내 면역세포 수 분석에서 국화/황금 복합물은 천식으로 인한 기도 염증에 대항하는 백혈구, 호염기구, 림프구, 단핵구의 수를 대조군에 비하여 유의적으로 증가시켰고 천식으로 인하여 증가하는 호산구와 호중구 수를 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰음
- BALF 내 총 세포수 분석을 통해 천식으로 인해 증가하는 염증세포 수를 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰음
- 혈청 및 BALF 내 cytokine 생성량 분석에서 국화/황금 복합물은 천식으로 인한 염증을 통해 증가하는 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-17E, IL-33, TNF- α 생성량을 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰고, Th2 반응이 우세하게 나타나는 천식으로 인해 감소하는 IL-2, IL-12, IFN- γ 생성량을 대조군에 비하여 유의적으로 증가시켰음
- 혈청 및 BALF 내 바이오마커 생성량 분석에서 국화/황금 복합물은 천식으로 인한 염증을 통해 증가하는 IgE, histamine, TGF- β 1, TSLP, LTB₄ 생성량을 대조군에 비하여 유의적으로 감소시켰음
- 이상의 결과들을 종합해 볼 때 난알부민으로 유도한 천식 모델에서 국화/황금 복합물은 면역세포 및 다양한 바이오마커에서 모두 유의적인 천식 개선 효능을 나타내어 염증 및 기관지 수축 완화와 면역 불균형 상태 회복을 통해 천식에 대한 개선 효능이 확인되었음. 또한 세가지 국화/황금의 혼합비율 중 7:3 혼합비에서 다른 혼합비에 비해 우수한 효능이 나타났으며, 농도 의존적인 결과가 도출되었고 특히 IgE와 Th2 반응을 통해 생성되는 싸이토카인들의 유의적인 감소는 추후 임상실험 결과가 뒷받침된다면 천식 개선을 위한 건강기능식품으로서의 개발 가능성을 시사하고 있음

2) 미세먼지 유도 모델

- 미세먼지에 대한 국화/황금 복합물의 효능을 객관적으로 검증하기 위하여 미세먼지 유도 마우스 모델에 국화/황금 복합물을 6:4, 7:3, 8:2 비율로 제작 후 50, 100, 200 mg/kg 농도로 투여한 후 마우스의 기관지 내 점액 분비량 및 혈액 내 기관지 수축, 염증관련 바이오마커들을 확인한 결과, 국화/황금 복합물의 유의적인 미세먼지에 대한 효능을 확인하였음(아래 표)

<Effect of Samples on Fine Dust-induced Mice>

Factor	Group								
	6:4			7:3			8:2		
	50	100	200	50	100	200	50	100	200
Phenol red	-	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
LTB ₄	-	↓	↓↓	-	↓	↓	-	-	↓
LTC ₄	↓	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓↓	-	-	-
LTD ₄	-	-	↓↓	-	↓↓	↓↓↓	-	-	-

- 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3, 8:2 투여군은 기관지 내 점액 분비량을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰음
- 국화/황금 6:4-100, 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200, 8:2-200 투여군은 혈청 내 LTB₄ 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰음
- 국화/황금 6:4, 7:3 투여군은 혈청 내 LTC₄ 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰음
- 국화/황금 6:4-200, 7:3-100, 7:3-200 투여군은 혈청 내 LTD₄ 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰음
- 이상의 결과들을 종합해 볼 때 미세먼지로 유도 마우스 모델에서 국화/황금 복합물은 거담 배출능을 평가할 수 있는 phenol red 및 기도 과민성을 유도하는 류코트리엔 생성량을 측정 한 결과, 국화/황금 복합물은 거담 배출능을 증가시키고, 류코트리엔 생성량을 감소시킴으로써 미세먼지에 의한 호흡기 질환 개선에 대한 효능이 확인되었다. 이를 바탕으로 추후 심도 있는 연구를 통해 본 연구결과가 더욱 뒷받침할 수 있는 구체적인 검증을 진행하고자 하며, 이를 통한 결과가 뒷받침된다면 미세먼지로 인한 호흡기 질환 개선을 위한 건강기능식품으로서의 개발 가능성을 시사하고 있음

(9) 제형 연구

(가) 복합소재 제제 검토 및 제형검토

1) 제형개발을 위한 분말 흐름성 개선 연구

- 감국(국화)과 황금 복합추출물을 이용하여 타정, 액상 및 분말제형에 유용한 과립을 제조하였음

가) 실험방법

- 아래의 표의 같은 조성으로 용제에 부형제를 용해시켜 결합액을 제조하였음
- 결합액을 이용하여 감국(국화)과 황금 복합추출물을 연합 및 건조하여 과립 물성을 확인하였음

<원료 과립 제제 배합>

단위 : g

구분	원료명	1	2	3	4	5	6	7
주성분	감국(국화)과 황금 복합추출물	100	100	100	100	100	100	100
결합제	히드록시프로필셀룰로스		0.5	0.7	1.0	1.2	1.5	2.0
용제	주정		10	10	10	10	10	10

나) 실험결과

- 감국(국화)과 황금 복합추출물은 과립공정을 거치지 않고는 타정이 불가능함 (Sticking 발생으로 타정 몰드에 붙는 현상 발생)
- 1~3번 배합 : 결합력 부족으로 입자 형성이 불가능함
- 5~7번 배합 : 입자 형성은 잘되었으나, 봉해 문제가 발생함
- 추가적인 타정을 위해 검토한 과립공정의 적정 결합액 비율을 HPMC : 주정 = 1.0 : 10임을 확인함
- 최종과립의 조성은 HPMC 1%, 과립물 대비 20%로 확인함

2) 정제의 분해 연구

- 본 시험에서 검토된 과립물을 이용하여 정제를 검토를 진행하였으며, 일반적인 배합비에서 봉해가 지연되는 현상이 발생하여 봉해 개선 시험을 수행하였음

가) 실험방법

- 아래의 표 조성으로 과립을 제조하여, 1000mg 장방형 정제로 타정 후 봉해 시험을 진행함

<정제 제제 배합>

단위 : g

구분	원료명	1	2	3	4	5
주성분	감국(국화)과 황금 복합추출물	10.0%	10.0%	10.0%	10.0%	10.0%
	결정셀룰로오스	60.0%	60.0%	60.0%	60.0%	60.0%
부원료	유당분말	26.5%	25.5%	24.5%	22.5%	17.5%
	스테아린산마그네슘	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
	이산화규소	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
붕해제	카복시메틸셀룰로오스 스칼슘	1.0%	2.0%	3.0%	5.0%	10.0%
	합계	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

나) 실험결과

- 흐름성 개선 시험과 동일한 비율로 과립을 진행한 후, 위의 배합으로 혼합 후 타정을 하여 정제를 제조함
- 건강기능식품 Ⅲ.2.1 붕해시험법과 동일한 조건으로 시험을 진행함

<붕해시험 시험조건>

구분	1	2	3	4	5
붕해시간(분)	50	48	38	32	23

- 상기의 시험결과와 같이 복용 편의성을 고려하여 최종 정제 질량을 1,000mg으로 설정하고 카복시메틸셀룰로오스칼슘을 투입하였을 때, 붕해시간이 기존 60분 이상에서 감소하였으나, 나정 30분 기준에 통과하는 조건은 5번 샘플로 확인됨
- 카복시메틸셀룰로오스칼슘을 10% 이상을 투입하여야 붕해조건이 충족하나 카복시메틸셀룰로오스칼슘의 비율이 높으면, 코팅공정에서 문제(정제가 녹는 현상)가 발생하며 그로 인하여 정제제품으로 진행할 수 없을 것으로 판단됨

3) 액상제품 개발

- 제형개발을 위해 감국(국화)과 황금 복합추출물 원료의 용해성 문제해결이 필수적이기 때문에 배합비를 달리하여 액상제품 적용성 평가를 수행함

가) 국화, 황금복합물을 포함한 제품 혼합

- 감국(국화)과 황금 복합추출물 원료를 1%, 3%, 5% 처방으로 배합함
- 1차적으로 분산 및 제형에 관한 안정성에는 문제가 발생되지 않아, 액상제형에 혼합 시 문제가 없을 것으로 판단됨

<액상 시제품 정보>

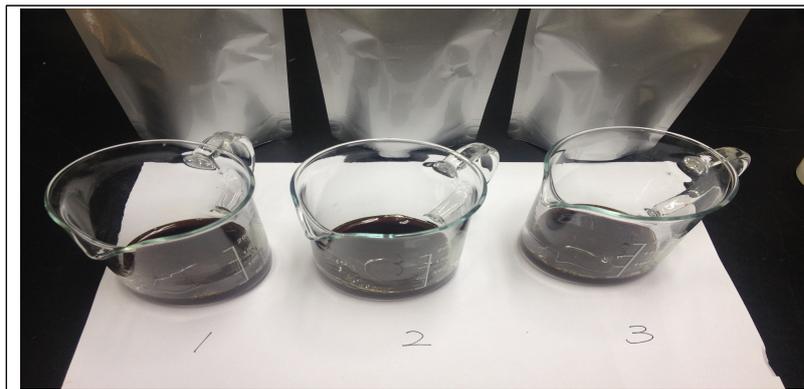
제품명	감국(국화)과 황금 복합추출물		
제형	액상		
일일 복용량	1회 20ml, 1회 섭취		
감국(국화)과 황금복합추출물 원료 처방비	1%	3%	5%

나) 원료향미 개선을 위한 제형 검토결과

- 주관기관인 종근당건강(주)에서 감국(국화)과 황금 복합추출물을 이용하여 원료 처방비에 따라 제조된 제품을 이용하여 이미, 이취에 대한 제품 적용능 평가를 수행함

다) 평가수행 방법 및 결과

- 대상 : 종근당건강 직원 20명 (남성 12명, 여성 8명)
- 시험 sample : 감국(국화)과 황금 복합추출물 1%, 3%, 5% 처방한 3가지 sample에 대한 관능평가 진행



<감국(국화)과 황금 복합추출물을 적용한 제품관능평가>

- 평가방법 : 5점 척도법과 SPSS 활용하여 평가를 진행
- 평가결과 : 기존 제품 대비 이미, 이취에 대한 영향 평가결과, 4.8±0.41점, 4.26±0.7점으로 확인됨

<표 89> 액상 시제품 이미, 이취 영향 평가결과

관능평가 항목	샘플명	기술통계
이취	1	4.26 ± 0.7 ^a
	2	3.00 ± 0.65 ^b
	3	1.80 ± 0.56 ^c
이미	1	4.8 ± 0.41 ^a
	2	3.8 ± 0.91 ^b
	3	2.2 ± 0.41 ^c

*1 (1%처방), 2 (3%처방), 3 (5%처방)

4) 분말제품 개발

- 제형기술개발을 위해 제품의 배합비를 달리하여 분말 제품 적용성 평가를 수행함

가) 감국(국화)과 황금 복합추출물을 포함한 제품 혼합

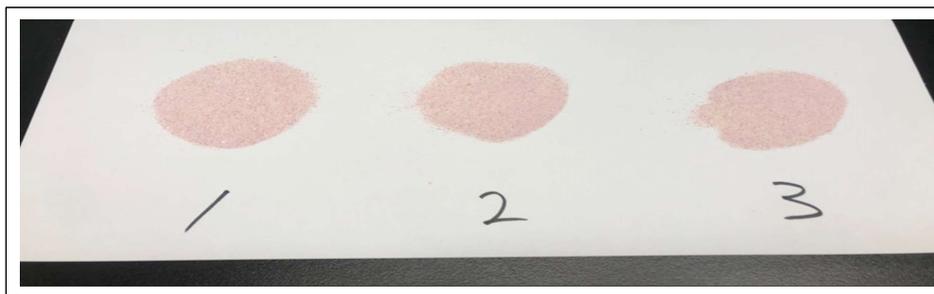
- 감국(국화)과 황금 복합추출물 10%, 20%, 30% 처방으로 배합함

<분말 시제품 정보>

제품명	감국(국화)과 황금 복합추출물		
제형	분말		
일일 복용량	1회 2g, 2회 섭취		
감국(국화)과 황금복합추출물 원료 처방비	10%	20%	30%

나) 원료향미 개선을 위한 제형 검토결과

- 주관기관인 종근당건강(주)에서 감국(국화)과 황금 복합추출물을 이용하여 원료 처방비에 따라 제조된 제품을 이용하여 이미, 이취에 대한 제품 적용성 평가를 수행함
- 대상 : 종근당건강 직원 20명 (남 12명, 여 8명)
- 시험 sample : 감국(국화)과 황금 복합추출물 10%, 20%, 30% 처방한 3가지 sample에 대한 관능평가 진행함
- 평가방법 : 5점 척도법과 SPSS 활용하여 평가를 진행함
- 평가결과 : 기존 제품 대비 이미, 이취에 대한 영향 평가결과, 4.2±0.40점, 4.32±0.2점으로 확인하였음



<분말을 적용한 제품 관능평가>

<감국(국화)과 황금 복합추출물 분말 시제품 이미, 이취 영향 평가결과>

관능평가 항목	샘플명	기술통계
이취	1	4.32 ± 0.2 ^a
	2	3.10 ± 0.65 ^b
	3	1.20 ± 0.56 ^c
이미	1	4.20 ± 0.40 ^a
	2	3.80 ± 0.91 ^b
	3	2.12 ± 0.41 ^c

*1 (10%처방), 2 (20%처방), 3 (30%처방)

5) 시험제품 개발

- 감국(국화)과 황금 복합추출물 원료는 본 과제를 통해 기관지건강 개선에 관한 가능성을 확인하였으며, 신제품 “국화와 황금을 함유한 목편한 도라지배즙”을 개발한 후 판매 중에 있음

가) 품목신고 및 제품화

- 기관지건강에 도움을 주는 제품에 감국(국화)과 황금 복합추출물 원료를 처방하여 기관지 건강 일반식품으로 제품화하는데 성공함

<‘국화와 황금을 함유한 목편한 도라지배즙’ 제품 요약>

제품명	국화와 황금을 함유한 목편한 도라지배즙
식품유형	일반식품(액상차)
섭취량	1일 1~2회, 1회 1포
규격	1포당 10 ml
원료명	도라지추출액, 배농축액, 사양벌꿀, 국화황금복합물
제품사진	

(10) 인체적용시험

(가) 인체적용시험을 통한 기관지 건강 유효성 평가

1) 인체적용시험 일정(안)

- 인체적용시험 일정(안)을 통한 스케줄 관리 및 진행사항 모니터링

2018.06.21 기종

	2018												2019											
	4	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
IRB 심의준비																								
- 동물실험 개월																								
- 중재기류시 개월																								
- 과불화 및 채물준비																								
IRB심의회 -의결일																								
계약IRB 심의 이후)																								
개시일																								
인체적용시험 준비																								
- 시험계획 일과																								
- 참가 일과																								
연구대상자 모집																								
입상연구 수집																								
- 중재기류측정/과불화측정																								
- 복용																								
- 연구대상자 설문조사																								
데이터분석																								
통계분석																								
결과보고서 작성																								
문서미완 및 과제완료																								

2) 전문 인력을 활용한 인체적용시험 검사항목 의견서 확인

검토자 및 소속	전북대학교병원 호흡기 · 알레르기내과 박성주 교수
기능성	기관지 건강(기관지의 과민면역개선)
검토 내용	유효성 평가 항목으로의 타당성에 대한 의견 <ul style="list-style-type: none"> • SGRQ (Saint George's Respiratory Questionnaire; 세인트조지 호흡기 설문) • CAT (Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test; 만성폐쇄성폐질환 평가검사)
검토 의견	SGRQ는 폐쇄성 기도 질환이 있는 환자에서 전체적인 증상, 활동성, 생활에 미치는 영향을 평가하는 질환 특이적 설문지로, 만성폐쇄성폐질환(COPD)이나 천식 등의 호흡기 질환에서 삶의 질을 평가하기 위해 전 세계적으로 가장 많이 사용하는 지표입니다. 건강인에서 호흡기 증상에 의한 삶의 질을 평가하기 위한 설문지가 통일되어 있지 않은 점을 고려시 호흡기 질환에서 가장 많이 사용되는 SGRQ를 사용하는 것이 가장 타당하리라 생각됩니다. CAT는 만성폐쇄성폐질환 환자의 증상을 전반적으로 평가하기 위해 전 세계에서 사용하는 증상 평가지표로, 기침, 가래, 호흡곤란, 활동성 등 환자가 호흡기 증상을 주관적으로 표현하여 이를 객관적으로 의사가 평가할 수 있는 대표적 점수화 검사입니다. 건강인에서 호흡기 증상에 대한 객관적 지표가 통일되어 있지 않은 점을 고려시, 대부분의 호흡기 증상을 평가할 수 있는 CAT으로 평가하는 것이 타당하리라 사료됩니다.

3) 인체적용시험 기관지건강 바이오마커 설정

- 식약처 고시된 바이오마커 및 검사의견서를 통해 전북대병원 임상지원센터와 협업하여 기관지건강 바이오마커 설정 및 인체적용시험을 위한 평가지표를 설정함
- 기관지건강의 임상적 측정방법으로는 침습적 방법과 비침습적 방법으로 구분됨

구분	바이오마커 (역할)	측정가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	human
① 기관지기능	세포상존중	○		
	장기유기 측정		○	
	MUC5AC의 양 (무신 발현양)	○		
	세포 내 mRNA 함량 (무신 발현양)	○		
	진해효능		○	○(설문)
	격담배출효능		○	○(설문)
	점액 pH (격담의 pH dependent한 패턴확인)		○	○(설문)
	기도개형 (조직학적 검사)		○	
② 면역기능	폐기능검사 FEV1, FVC (기관지 수축으로 인한 호흡량 평가 지표)			○
	면역글로불린(IgE) (발현시 알레르기 증상의 척도)	○	○	○
	FcεR1 및 FcγR1 아형 (감소시 IgE로 유도된 알레르기 증상 감소)	○	○	
	프로스타글란딘(알레르기시 비만세포에서 분비되어 염증부위를 축적)	○	○	○
	루코트리엔(비만세포를 활성화)	○	○	○
	히스타민(기관지 수축, 모세혈관 확장을 일으킴)	○	○	○
	사이토카인(TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13(알레르기 유발의 척도)	○	○	○
	NO(세포의 병용제들을 사멸시킴)	○		
	iNOS(L-citrulline과 NO를 생성)	○		
	COX2(염증이나 면역자극에 의해 발현)	○		
	비만세포 수(알러지를 유발하는세포 측정)		○	
	비만세포 활과립활(염증성 사이토카인, 히스타민 분비)		○	
	아나필락시스 쇼크 반응시험(항체-항원반응 측정)		○	
	ECP(호산구의 활성화 및 분비의 지표)		○	
	MHC class II(수지상세포)		○	
	호산구, 호중구, 총 백혈구, 단핵백혈구 및 림프구 수(염증반응 지표)		○	○

- 침습적 방법(생검)은 제한적으로 임상에 이루어지나 비침습적 방법은 측정이 간편하고 유용하여 임상에 널리 활용됨

4) 인체적용시험 기관지건강 평가지표 개발 및 마련

- 자사는 1차년 연구결과 3가지 항목(호기산화질소 측정, 혈액 내 표지자 측정, 기관지폐포 세척술)에 대한 기반연구 자료를 확보함
- 식약처에서 발간한 기관지 건강 관련된 가이드라인이 존재하지 않아, 전북대 임상지원센터와 협업하여 2가지 클레임(기관지건강, 기관지면역)에 대한 인체적용시험 프로토콜작성 공동연구 추진하였음. 이를 통해 SGRQ, CAT에 대한 설문을 인체적용시험에 적용 및 개발하였으며, 본 인체적용시험에 사용한 SGRQ, CAT 등은 2020년에 식약처에서 발간한 '호흡기(기관/기관지) 건강에 도움을 줄 수 있음'의 건강기능식품 기능성 평가 가이드에 반영되어 있어, 본 연구의 평가지표 마련 및 개발이 우수하였다고 판단됨

CUH CTCF2	연구번호 [Study No.]: [CTCF2_2018_CKD]	Subject ID
	국외 중·복합골의 기원지건강 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위 한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험	R <input type="text"/>

시행일 년 월 일

CAT [Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) assessment test]		
문항	내용	결과
1	나는 전혀 기침을 하지 않는다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
2	나는 가슴이 전혀 가쁘지 않다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
3	나는 전혀 가슴이 답답함을 느끼지 않는다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
4	나는 언덕이나 계단을 오를 때 전혀 숨이 차지 않다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
5	나는 심어서 활동하는데 전혀 걱정을 받지 않는다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
6	회상하더라도 불구하고 나는 외출하는데 관심이 있다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
7	나는 잠을 깊이 잔다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
8	나는 기분이 좋성하다.	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5
합 계		_____점

mMRC (Modified medical research council dyspnea scale)		
문항	점수	결과
최저 운동량 할 때 숨찬 것을 제외하면 숨차서 고생한 적이 없다.	0	<input type="checkbox"/>
평지를 걷는 것거나, 약간 오르막 길을 걸을 때 숨차서 힘들다.	1	<input type="checkbox"/>
숨차서 평지를 걷는 것보다 느리게 걷거나 평지를 가스의 속도로 걸을 때 숨차서 멈추어 쉰다.	2	<input type="checkbox"/>
평지를 약 100m 또는 몇 분 동안 걸고 나서 숨차서 멈추어 쉰다.	3	<input type="checkbox"/>
너무 숨차서 등 안장에 못 나가거나 옷을 입거나 면을 때 숨이 차다.	4	<input type="checkbox"/>

호기산화질소			
연구대상자에게 호기산화질소 검사를 실시하였습니까?		<input type="checkbox"/> 실시 <input type="checkbox"/> 미실시 <input type="checkbox"/> NA	
항목	단위	결과	비고
FENO	ppb		

<인체적용시험 CAT 설문지>

5) 인체적용시험 프로토콜 요약

제목	국화 등 복합물의 기관지건강 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험
의뢰자	종근당건강(주)
시험책임자	전북대학교병원 호흡기알레르기내과 교수 박성주 M.D., Ph.D.
공동연구자	전북대학교 의과대학 약리학교실 교수 채수완 M.D., Ph.D. 전북대학교 의과대학 비뇨기과학교실 교수 김영곤 M.D., Ph.D. 전북대학교 의과대학 생화학교실 교수 박병현 M.D., Ph.D. 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최은경 M.D., Ph.D. 전북대학교 의과대학 내과학(소화기학)교실 교수 이승옥 M.D., Ph.D.
시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 박수현, 정은수, 황지현, 장희연, 윤주랑, 장경아, 박태영, 노순옥, 최재순, 이수진, 박미현
실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
시험기간	2019. 2.13~ 2019.12. 20 (스크리닝 시작일~ 마지막 연구대상자 최종 방문일)
결과보고서 제출일	2020.04.29
인체적용시험용 제품명	국화 등 복합물(국화황금추출복합물), 플라세보
시험목적	기관지 불편 증상이 있는 자를 대상으로 국화 등 복합물을 섭취하였을 때 나타나는 평가항목의 변화를 플라세보 섭취와 비교하여 관찰함으로써 기관지 건강 개선에 대한 유효성과 안전성을 평가하고자 한다. 1) 1차 목적 국화 등 복합물 섭취에 의한 SGRQ (Saint George's respiratory questionnaire; 세인트조지 호흡기 설문)와 CAT (chronic obstructive pulmonary disease assessment test; 만성폐쇄성폐질환 평가검사)로 평가되는 기관지 불편 증상 개선 효과를 플라세보 섭취 시와 비교 평가하고자 한다. 2) 2차 목적 국화 등 복합물 섭취에 의한 폐기능 검사, 호기산화질소, mMRC (modified Medical Research Council dyspnea scale; 호흡곤란점수), 염증지표로 평가되는 기관지 불편 증상 개선 효과와 안전성을 플라세보 섭취 시와 비교 평가하고자 한다.
연구대상자 상태	지속적인 기관지 불편 증상이 있는 성인
연구대상자 수	100명(국화 등 복합물군 50명, 플라세보군 50명)
선정 및 제외기준	1) 선정기준 (1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 19세 이상, 70세 이하의 성인 남녀 (2) 기관지 불편 증상(기침, 가래, 목이물감 또는 통증, 답답함, 호흡곤란 등)이 1개월 이상 지속되는 자

	<p>3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p> <p>2) 제외기준</p> <p>(1) 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 결핵 등 만성호흡기질환을 진단을 받았거나 의심되는 자</p> <p>(2) 폐기능검사에서 기관지확장제 사용 후 FEV1/FVC가 70% 미만 또는 FVC가 80% 미만인 자</p> <p>(3) 폐기능검사에서 기관지확장제 사용 후 FEV1이 12% 이상 증가 그리고 200 ml 이상 증가한 자</p> <p>(4) 단순흉부촬영에서 임상적으로 유의한 폐질환 소견이 있는 자</p> <p>(5) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등 급성 중증 심뇌혈관계 질환이 있는 자</p> <p>(6) 치료를 요하는 임상적으로 유의한 신경계 질환, 정신계 질환, 간담도계 질환, 내분비계 질환, 알레르기 및 면역계 질환, 신장계 질환, 악성종양, 자가면역질환 등을 앓거나 과거력이 있는 자</p> <p>(7) 폐기능검사 금기증 (3개월 내 수술, 호흡기감염, 객혈 등)에 해당하는 자</p> <p>(8) 수축기 혈압 160 mmHg, 이완기 혈압 100 mmHg 이상인 자(단, 약물치료 등으로 혈압을 안정적으로 조절 중인 자는 참여 가능)</p> <p>(9) 스크리닝 검사일로부터 2주 이내에 시험결과에 영향을 줄 수 있는 전문의약품, 한약, 일반의약품(OTC: over-the-counter) 또는 건강기능식품을 복용한 자</p> <p>(10) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨 병)이 있거나 위장관계 수술(단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술은 제외) 과거력이 있는 자</p> <p>(11) 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ AST, ALT > 정상범위 상한치의 3배 ☞ Serum creatinine > 2.0 mg/dl <p>(12) 알코올 중독 또는 약물 남용 병력이 있거나 의심되는 자</p> <p>(13) 약물 및 인체적용시험용 제품에 대한 과민반응 혹은 임상적으로 유의한 과민반응 병력이 있는 자</p> <p>(14) 임신부, 수유부 또는 적절한 피임방법을 사용하지 않는 가임기 여성</p> <p>(15) 스크리닝 전 2개월 이내에 다른 인체적용시험에 참여한 자</p> <p>(16) 그 외 시험자 판단에 따라 인체적용시험 참여가 불가능할 것으로 판단된 자</p>
<p>시험방법</p>	<p>12주, 무작위배정, 이중눈가림, 평행군, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <p>[스크리닝, 제-21일~ 제-1일]</p> <p>자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(0주)로부터 3주 이내(제-21일~-1일)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였다.</p> <p>[1차방문, 제1일]</p>

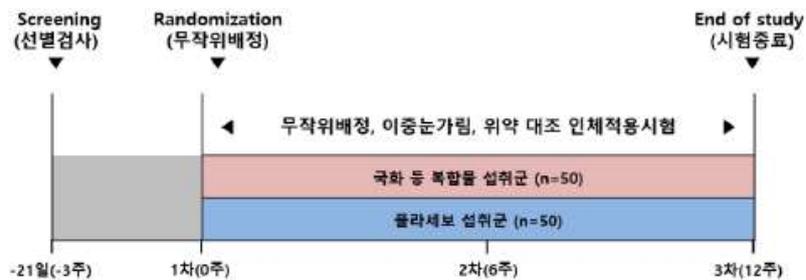
연구대상자는 제1일(0주) 시험기관에 방문하여 정해진 검사를 수행하였다. 연구대상자는 시험군 또는 플라세보 섭취군에 1:1 무작위배정 되었으며, 6주 분량의 인체적용시험용제품을 제공받았다. 이후 6주간 매일 인체적용시험용 제품을 섭취하며 일상생활을 하였다.

[2차방문, 제43일]

연구대상자는 제 43일(6주)에 시험기관에 방문하여 정해진 검사를 수행하였으며, 지난 6주간 섭취하고 남은 제품을 반납하고, 다시 6주 분량의 제품을 제공 받았다. 이후 6주간 매일 인체적용시험용 제품을 섭취하며 일상생활을 하였다.

[3차방문, 제85일]

연구대상자는 제 85일(12주)에 시험기관에 방문하여 정해진 검사를 수행하였으며, 지난 6주간 섭취하고 남은 제품을 반납하였다. 이로써 총 12주간의 인체적용시험 참여를 마쳤다.



평가기준

- 1) 유효성 평가
 - SGRQ 점수
 - CAT 점수
 - 폐기능 검사
 - 호기산화질소(FeNO)
 - mMRC 점수
 - 싸이토카인
 - IgE
 - PGE2
 - hs-CRO
 - ESR
 - 백혈구, 호산구, 호중구 수
- 2) 안전성 평가
 - 자/타각 증상 등 이상반응 모니터링
 - 진단검사의학검사
 - 활력징후
 - 신체검진
 - 신전도

(11) 공인분석기관 분석의뢰 및 결과

- 식품의약품안전처의 기능성 원료 인정을 위한 제출자료를 백업하기 위한 기초 원료 규격 검사를 수행함.
- 규격검사를 통하여, 원료 자체의 안전성을 확보하고 기능성 원료 인정을 위한 기초 자료로 활용할 수 있음.
- 해당 원료의 기능성 입증도 중요한 문제지만, 안전성 입증이 가장 중요함. 해당원료의 기원, 개발경위, 제조방법, 원료의 특성, 전통적 사용, 섭취량 평가, 영양평가 결과, 독성시험 결과 등 모든 자료를 종합적으로 사용하여 안전성이 확보되어 있는지 입증하는 과정이 중요하게 여겨지고 있음. 따라서, 식약처에서 요구하는 자료를 토대로 감국(국화)과 황금 복합추출물 자체의 원료로서의 규격 검사를 수행함

(가) 영양성분정보자료

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 영양성분을 한국기능식품연구원에서 분석한 결과 아래와 같이 분석됨

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100 g)	357	수분(%)	6.6
탄수화물(%)	81	화분(%)	4.8
조지방(%)	1	나트륨(mg/100 g)	50.6
조단백질(%)	7	-	-

(나) 성상

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 성상을 검사한 결과, 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말로 확인됨

(다) 곰팡이독소

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 곰팡이독소(총아플라톡신)를 검사한 결과, 불검출로 확인되어 곰팡이 독소에 대한 안전성이 확인됨

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

시험항목		실측치 (시험성적서)		
곰팡이 독소 (µg/kg)	총아플라톡신	불검출	불검출	불검출

(라) 중금속 및 대장균군

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 중금속과 대장균군을 한국기능식품연구원에서 분석한 결과 아래와 같이 분석됨
- 납, 카드뮴, 총비소, 총수은에 대한 중금속 검사 결과, 1ppm 미만으로 검출됨을 확인함
- 미생물(대장균군) 검사 결과, 음성으로 나타남

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

시험항목		실측치 (시험성적서)		
중금속 (mg/kg)	납	0.0161	0.0116	0.0142
	총비소	0.0206	0.0141	0.0148
	카드뮴	0.0113	0.0104	0.0057
	총수은	0.0011	0.0009	0.0001
미생물	대장균군	음성	음성	음성

제 D2020062774 호
문서확인 4359-6977-8589

시험·검사성적서

제품명	국화황금추출복합물3	제조일자 (유통기한)	
시험인	업체명: 홍남당건강(주) 주소: 충남 당진시 송악읍 복운1길 30	생년월일	김호근
제조번호		검수년월일	2020-09-24
검사뢰뢰일자	황고음	검수번호	D0000062774

귀하가 우리 연구원에 시험·검사를 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2020-09-24
 시험·검사 책임자: 김영정, 이경규, 이현영, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김진희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0161 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0148 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0057 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0001 mg/kg	박정민
대장균군	음성	강민선
Baicalein(mg/g)	2.11 mg/g(2.18, 2.11, 2.05)	정은숙
Luteolin 7-glucoside(mg/g)	3.67 mg/g(3.55, 3.72, 3.79)	정은숙
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	전주혜

분석법 - [Baicalein, Luteolin 7-glucoside]접체세망

※ 위 내용은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 분석목적은 참고용 성적이 됩니다. 시험·검사 결과는 시험·검사목적 이외의 용도 및 홍보 등에 사용할 수 없습니다.
 ※ 국가유지관리 또는 정부기관 외 제품 용도도 활용할 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증의 범위 내입니다.
 ※ 시험의 무효는 일부 시험·결과 및 결과판은 별지로 처리 가능합니다.

2020년 07월 13일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 품질 관리부 한국기능식품연구원 http://www.khsti.re.kr | 전화번호 02-919029-0400-1

제 D2020062771 호
문서확인 6818-2945-8671

시험·검사성적서

제품명	국화황금추출복합물3	제조일자 (유통기한)	
시험인	업체명: 홍남당건강(주) 주소: 충남 당진시 송악읍 복운1길 30	생년월일	김호근
제조번호		검수년월일	2020-09-24
검사뢰뢰일자	황고음	검수번호	D0000062771

귀하가 우리 연구원에 시험·검사를 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일: 2020-09-24
 시험·검사 책임자: 김영정, 이경규, 이현영, 장정순
 검사관련 총 책임자: 김진희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
납(mg/kg)	0.0116 mg/kg	정다운
비소(mg/kg)	0.0141 mg/kg	정다운
카드뮴(mg/kg)	0.0104 mg/kg	정다운
수은(mg/kg)	0.0009 mg/kg	박정민
대장균군	음성	강민선
Baicalein(mg/g)	2.05 mg/g(2.04, 2.06, 2.05)	정은숙
Luteolin 7-glucoside(mg/g)	4.50 mg/g(4.48, 4.46, 4.50)	정은숙
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	전주혜

분석법 - [Baicalein, Luteolin 7-glucoside]접체세망

※ 위 내용은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 분석목적은 참고용 성적이 됩니다. 시험·검사 결과는 시험·검사목적 이외의 용도 및 홍보 등에 사용할 수 없습니다.
 ※ 국가유지관리 또는 정부기관 외 제품 용도도 활용할 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증의 범위 내입니다.
 ※ 시험의 무효는 일부 시험·결과 및 결과판은 별지로 처리 가능합니다.

2020년 07월 10일

한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 품질 관리부 한국기능식품연구원 http://www.khsti.re.kr | 전화번호 02-919029-0400-1

<중금속, 대장균군, 곰팡이독소 한국기능식품연구원 성적서>

(12) 지식재산권 현황

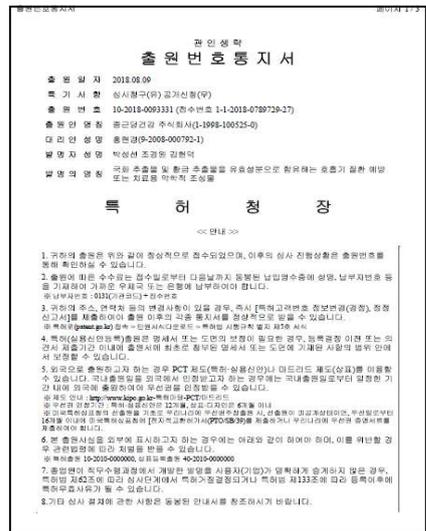
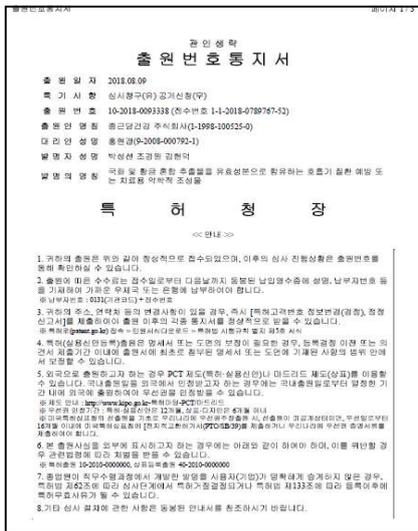
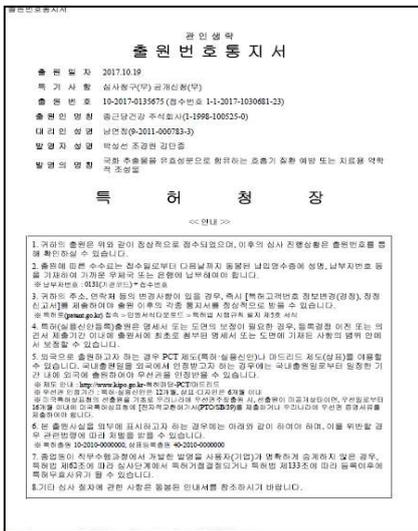
■ 지식재산권 3건 출원 완료

■ 주원료인 국화(감국)에 대한 지적재산권을 획득하기 위해 지적재산권 1건(출원번호: 10-2017-0135675)을 출원하였음. 그러나 특허 출원 후 해당 특허의 등록 가능성이 희박하다는 변리사의 의견을 전달받았으며, 변리사의 의견에 따라 심사를 진행하지 않음. 그 후 감국(국화)과 황금의 복합물 형태로 지적재산권 2건(출원번호: 10-2018-0093331 및 10-2018-0093338)을 출원함

■ 국화황금추출복합물 등의 형태로 출원한 지식재산권 2건(출원번호: 10-2018-0093331 및 10-2018-0093338)은 현재 심사 청구중에 있으며, 추가적인 보완내용 대응을 종근당건강에서 진행하고 있음

지식재산권 출원 현황

순번	특허명
1.	국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
2.	국화 및 황금 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
3.	국화 추출물 및 황금 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물



<특허출원 통지서>

(13) 개별인정형 허가 서류 신청

- * 서류 작성 95% 완료
- * 동물논문의 게재가 완료되면 신청 예정

(가) 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

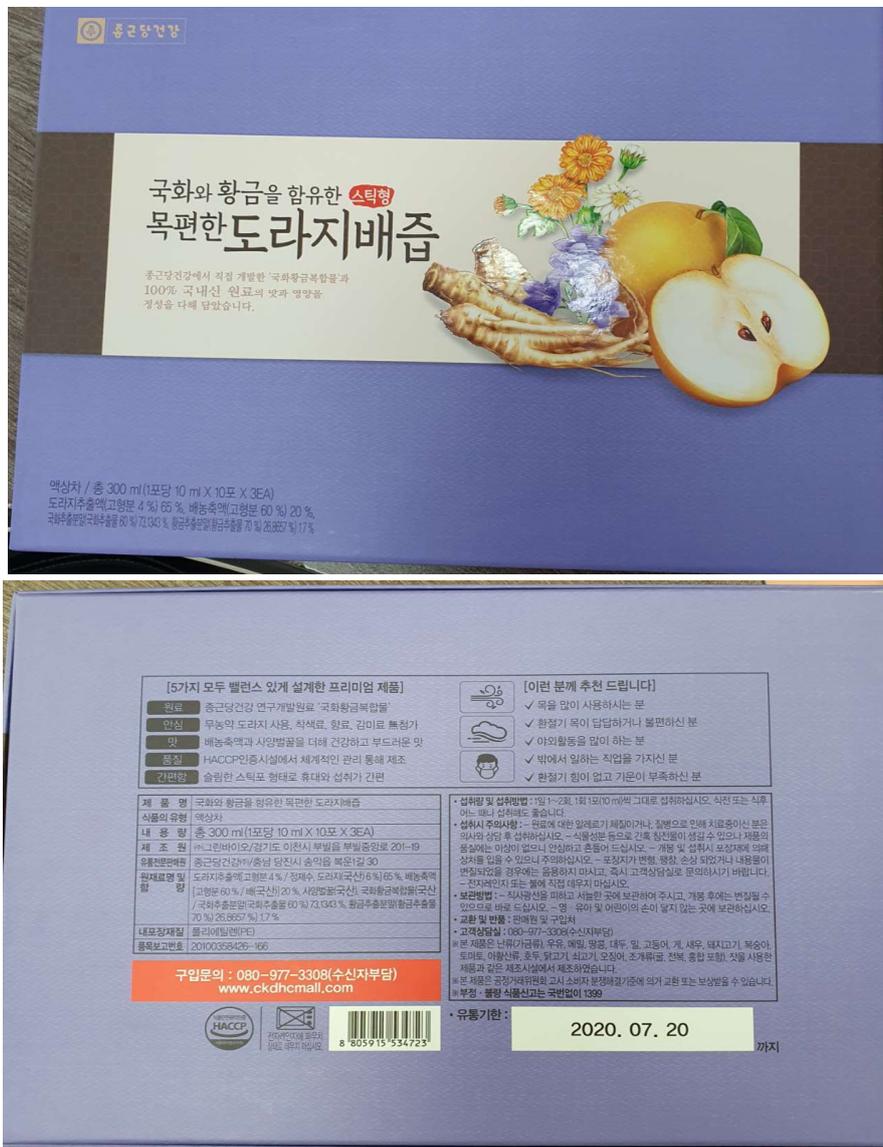
(☑최초, □변경)

업 체 명(기관명)		중근양건강(주) (대표자 : 김호근)			
업종의 종류		건강기능식품 제조업	허가/신고/등록번호	134-81-29992	
주소 및 연락처		* 출항날드 당진시 송악읍 000 등			
		* (연락처) 02-0000-0000 (팩스) 02-0000-0000			
		담당자	(이름) 진오철	(연락처) 010-0000-0000	
신청 원료명		국형홍금추출물분말			
심사 대상 종류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신질 기능성	효능기 건강에 도움	
			신질 섭취량	국형홍금추출물분말 800mg/일	
		·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)		
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)		
		·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>			
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>				
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>				
	·기타 변경 <input type="checkbox"/>				
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)		
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)		
·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>					
·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>					
·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>					
국내제조 수입	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국
			제조회사		
			소재지		
모듈트의	<input checked="" type="checkbox"/>	실시 날짜 : 2018.05.14			
국가지원 과제	<input checked="" type="checkbox"/>	지원 기관 : 농림식품기술기획평가원			

- * (최초) 고시되지 않고 새롭게 개별인정 신청하는 원료
- (변경) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 배합비율 또는 시험방법)

(14) 제품화 및 매출액

- 본 연구를 통해 생산된 감국(국화)과 황금 복합추출물의 부원료 처방을 통해 제품을 생산하고 있음
- 감국(국화)과 황금 복합추출물을 1.7%를 함유한 ‘국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙’ 제품은 2018년도에 출시되어 매년 매출 성장을 일으키고 있음
- ‘국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙’은 2018년에 370,441원의 매출을 일으켰으며, 2019년에 312,001,306원, 2020년(1월~8월)에 249,857,724원의 매출을 일으켰고, 지속적으로 매출이 증가하고 있음
- ‘국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙’은 2018년부터 2020년 현재까지 총 매출액은 562,229,471원임
- 본 과제를 통해 생산된 감국(국화)과 황금 복합추출물을 사용하기 위하여 출원특허의 기술실시를 하였으며 2019도에 농총진흥청에 8,400,000의 금액에 해당하는 기술료를 납부하였음



<국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지배즙 제품 사진>

발급번호 : 11K7-URP-01UT-863R-F164

품목제조보고사항 변경보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	주소 경기도 이천시	전화번호	휴대전화
영업소	명칭(상호) (주)그린바이오		
	소재지 경기도 이천시		
제품명	국화와 황금을 함유한 목편한 도라지 배음	품목보고번호	20100358426166

영업의 종류	식품제조가공업
고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음
영업신고 번호	20100358426

변경사항	변경 전	변경 후	변경사유
제품명	-	-	해당없음
원재료 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재		
유통기한	-	-	해당없음

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제46제1항에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 보고사항을 변경하기 위하여 보고합니다.

2020년 02월 17일
보고인

경기도 이천시장 귀하

품목보고번호	20100358426-166
처리부서	보건소 보건위생과
처리자성명	이연우
처리일자	2020년 02월 18일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 11K7-URP-01UT-863R-F164

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	주소 경기도 이천시	전화번호	휴대전화
영업소	명칭(상호) (주)그린바이오		
	소재지 경기도 이천시		

제품정보	식품의 유형	역상차	영양등록번호	20100358426
	제품명	국화와 황금을 함유한 목편한 도라지배음		
	유통기한	18개월		
	불필유지기한			
	원재료 또는 성분명 및 배합 비율	맛장에 기재		
	용도 용법	맛장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	원장에 기재		
품목의 특성	고열량·저영양 식품 해당 여부	[]예 []아니오 [O]해당 없음		
	영·유아를 섭취대상으로 표시 관리하는 식품 해당 여부	[]예 []아니오		
	살균·멸균 제품의 해당 여부	[]비살균 []살균 []멸균		
기타	유통전문매원 : 중근당건강/ 충남 당진시 송악읍 복은1길 30			

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 12월 04일
보고인

경기도 이천시장 귀하

품목보고번호	20100358426-166
처리부서	보건소 보건위생과
처리자성명	이연우
처리일자	2020년 02월 18일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 11K7-URP-01UT-863R-F164

변경사항	변경 전	변경 후	변경사유
원재료 또는 성분명 및 배합비율	도라지추출액(65%), 도라지(6%), 정제수(94%), 배농축액(20%), 사일발효(13.3%), 기타가공품(1.7%), 기타가공품(73.1343%), 기타가공품(60%), 엑스트린(40%), 기타가공품(26.8657%), 기타가공품(70%), 엑스트린(30%)	도라지추출액(65%), 도라지(6%), 정제수(94%), 배농축액(20%), 사일발효(13.3%), 기타가공품(1.7%), 기타가공품(73.1343%), 기타가공품(60%), 엑스트린(40%), 기타가공품(26.8657%), 기타가공품(70%), 엑스트린(30%)	

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	도라지추출액	65%
2	도라지	6%
3	정제수	94%
4	배농축액	20%
5	사일발효	13.3%
6	기타가공품 [국화추출분말]	1.7%
7	기타가공품 [국화추출분말]	73.1343%
8	기타가공품 [국화추출물]	60%
9	엑스트린	40%
10	기타가공품 [황금추출분말]	26.8657%
11	기타가공품 [황금추출물]	70%
12	엑스트린	30%
용도용법	1일 1~2회, 1회 1포를 그대로 섭취하십시오.	
보관방법 및 포장재질	실온보관, 직사광선을 피하여 보관. 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌	

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

<국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙 품목제조보고서>

<국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙 연도별 매출액>

연도	국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙 매출액(원)
2018년	370,441
2019년	312,001,306
2020년 (1~8월)	249,857,724
합계	562,229,471원

(15) 홍보전시

- 코로나 발병으로 호흡기 질환에 대한 관심이 증가하고 있으며, 호흡기 건강에 대한 관심이 어느 때보다 높은 시기임
- 자사는 본 연구를 통해 개발된 감국(국화)과 황금 복합추출물의 우수성 및 효과성을 2019년도 부터 홍보전시 하고 있으며, 이에 관련 내용이 기사화되어 보도되었으며 현재까지 유지되고 있음

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 감국(국화)과 황금 복합추출물의 지표 성분 확인 및 표준화된 기능성 원료 개발
- 개발 원료를 이용한 기관지와 호흡기 기능 개선 효능 평가 및 개별인정 획득

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	가중치 (%)	구체적 목표내용	목표 달성 내용
1차 년도 (2017)	천연물을 이용한 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발	국내외 기술, 제품시장 동향 연구	3	○ 트렌드분석 완료	○ 경쟁제품 특징점 분석 완료 ○ 국내 천연물 생산실적 조사완료
		원료 표준화	5	○ 원료 표준화 (원료스크리닝) ○ 원료 표준화 (복합소재, 복합비 선정)	○ 원료스크리닝(16종) 완료 ○ 생리활성평가를 통한 복합비를 선정 (항산화, 세포 활성평가 완료)
		복합소재 분석법확립	5	○ HPLC 분석	○ 감국(국화), 황금 기능(지표) 물질 선정
		복합소재 제제 검토	5	○ 예비 QC항목설정	○ 기준설정(함량, 미생물, 중금속 등)
		최적 추출기술 및 공정 표준 설정	5	○ 추출기술 확립	○ 용매별 추출실험 완료 (물, 70% 주정) ○ 추출시간별 함량추정 완료 (6h, 12h, 24h) ○ 원산지별 추출실험 완료 (감국(국화): 의성, 안동, 제천) (황금: 구례, 화순)
		원료 유전자 분석	4	○ 감국(국화), 황금 유전자 분석	○ 감국(국화), 황금 원물을 이용하여 유전자 분석 완료 및 동등성 99% 확인
2차 년도 (2018)	천연물을 이용한 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발	인체적용시험 프로토콜 작성	6	○ 인체적용시험 CRO기관 선정	○ 프로토콜 작성 계약 진행 완료 (전북대 임상지원센터 연구팀)
		세포 활성평가	6	○ 기관지세포주 세포평가 (NCI-292, A549 Cell)	○ MTT assay ○ NO inhibition 측정 완료 ○ MUC5AC gene 발현양 측정 완료
		항염증 검증	4	○ 대식세포주 세포평가 ○ 기관지세포주 세포평가	○ Cytokine IL-6, IL-12 등 측정
		OVA유도 등 동물활성평가를 통한 효과 검증	5	○ 동물활성평가 모델 확립	○ 동물시험 모델에서 분리한 폐포세척액에서 IL-4, IL-5, IL-6, IL-1β, IFN-γ, TNF-α 와 혈청에서 IgE, IgG 양 측정 완료
		복합소재의 기준 및 시험방법 확립	5	○ 복합소재의 지표물질 밸리데이션 시험법 확립	○ 기관 의뢰용 밸리데이션 시험법 확립
		제형 연구	4	○ 복합소재를 이용한 여러 제형 가능성 연구	○ 복합소재를 이용한 여러 제형 가능성 연구 ○ 시험 sample을 이용한 관능평가 수행
		IRB진입 및 인체적용시험	5	○ 시험검사 의뢰서 작성 ○ IRB 심의 의뢰 서류 작성	○ 호흡기 내과 의사의 검사항목 의견서를 통한 유효성 평가항목 설정 ○ IRB 심의 통과 인체적용시험 준비
3차 년도 (2019)	천연물을 이용한 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발	인체적용시험 완료	10	○ 인체적용시험 계획서를 바탕으로 인체적용시험 완료	○ 인체적용시험 완료 ○ 최종결과보고서 수령
		공인분석 기관 분석의뢰	5	○ 개별인정 신청을 위한 공인분석기관 분석의뢰	○ 대장균군, 중금속(납, 비소, 카드뮴, 수은), 잔류농약(65종), 곰팡이독소, 영양성분 및 지표성분 분석의뢰 완료 ○ 공인시험성적서 확보
		지식재산권 확보	6	○ 지식재산권 출원	○ 지식재산권 3건 출원 완료
		허가서류 작성	7	○ 개별인정 신청을 위한 신청서 작성	○ 제출자료 구비 완료 ○ 세포, 동물, 임상을 근거로 개별인정 신청서 작성 완료
		허가신청	10	○ 개별인정 신청서를 바탕으로 식약처 신청 완료	○ 개별인정 신청서 작성 중
	합계		100		

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

(1) 품종등록 미달성 원인 및 해결방안

- 본 연구개발 과제는 당초 신규 품종을 발굴하여 품종등록을 진행할 계획이었음
- 국내 농가의 소득증대 및 안정적인 소재 확보를 위해, 기존의 품종을 활용하여 소재 개발을 진행함
- 국내 기존 품종을 활용하여 소재 개발을 진행하였기에, 새로운 품종등록이 불필요함

(2) In vivo test(단회투여독성, 반복투여독성)

- 원료 스크리닝 시에는 식품 원료로 인정되지 않은 원료가 존재하여, 안전성 평가인 In vivo test(단회투여독성, 반복투여독성)를 연구개발 최종목표 및 세부목표에 추가하였음
- 원료 스크리닝 결과, 식품원료로 인정되어 있는 감국(국화)과 황금을 최종 원료로 선정하여 안전성 평가를 수행할 필요가 없었음
- 개별인정 신청 후, 식약처에서 단회투여독성 시험을 요청할 경우 내부 연구비로 해당 실험을 수행할 예정임

(3) 비SCI 논문 성과 부족 원인 및 해결방안

- 본 연구개발 과제를 위하여 세포실험 및 동물실험의 학술연구가 수행되었으나, 수행기간 동안 세포실험 결과만이 SCI 논문으로 게재됨
- 동물논문 결과는 비SCI 논문으로 게재할 예정이었으나, 기존보다 목표를 상향하여 SCI 논문으로 게재하기로 결정하였음. SCI 논문을 위해 준비하는 과정에서 영문교정 및 투고가 지연되어 과제 기간 내에 게재를 완료하지 못한 상황이 발생함
- 현재 동물논문 결과는 SCI 논문으로 투고 중이며, 당해연도 내에 게재 승인(Accept)을 목표로 준비하고 있음(투고 중인 저널 : European Journal of Integrative Medicine)

(4) 개별인정 신청 미달성 원인 및 해결방안

- 본 연구개발 과제를 위한 개별인정 신청을 위해서는 세포논문, 동물논문, 인체적용시험보고서가 필수적으로 필요하며, 서류의 구비 없이 식약처에서 건강기능식품 원료 신청 접수가 불가함.
- 현재 본 과제를 통해 세포논문 및 인체적용시험은 확보하였으나, 동물논문 게재 미완료로 개별인정 신청을 수행할 수 없었음
- 동물논문을 제외하고 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출서류 구비 및 신청서 작성을 완료한 상태임
- 동물논문은 현재 투고를 진행 중이며, 당해연도 안에 게재 승인을 목표로 하고 있음
- 개별인정 신청의 경우, 2021년 1분기까지 개별인정 신청을 완료할 예정임

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 산업화 방향

- (1) 건강기능식품 시장진입을 위한 단계적 지원전략(시장진입 시기, 현지화 전략 등)
- ON/OFF LINE을 망라한 입체적인 제품 홍보
 - 확산 판매를 통한 다양한 루트를 이용한 시장 개척
 - 일반식품 및 건강기능식품 시장 전반에 판로 확보
 - 마케팅팀과 영업팀을 연계한 시장 추진전략 확보
 - 중앙일보와 업무 협약 중인 헬스벨 네트워크를 통한 제품의 우수성을 알려 제품의 판매를 증진
 - 유통경로: 대리점, 코스트코, 이마트 트레이더스, 홈쇼핑, 소셜커머스 등

구분	구체적인 내용
양산 및 보급 계획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 우수제조관리기준에 적합한 자사 공장을 통해 생산 및 품질관리 가능 ○ 연구소와 공장이 동일 시설에 위치하여 자체 제품개발이 가능하며 미비점 발견 시 즉시 대처할 수 있는 단일화된 연구생산시스템이 확보됨 ○ 제품 개발 완료 후 기존 거래처인 코스트코, 이마트 트레이더스와의 비즈니스가 가능하여 원활한 판매가 이루어질 것으로 판단됨
판로확보 계획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 개별인정원료, 건강기능식품 ○ 수요처 : 코스트코, 이마트 트레이더스, 홈쇼핑, 온라인쇼핑몰 (health bell) ○ 예상 단가 : 기존 시장 유사제품과의 경쟁력을 비교해 책정할 예정 ○ 개발 투입인력 및 기간 : 개발종료 후 투입 예정

- (2) 국내외 협력 네트워크를 활용한 시장진출 지원전략
- 종근당건강 중국법인과 다국적 유통업체인 트레이더스, 코스트코 코리아를 이용한 해외 수출로 이익을 창출할 예정임
 - 중국에서는 원재료 황금이 의약품 원료로 구분되어 있어, 국화황금추출복합물의 형태로 수출이 어려움. 국화황금추출복합물 중, 기관지 건강에 도움을 주는 주요 원료는 감국(국화)임[국화황금추출복합물 중, 국화(감국) 비율 70%]. 따라서 중국 시장에는 황금이 함유되지 않은 제품[감국(국화)만 함유]을 판매할 예정임. 중국 이외의 국가에는 국화황금추출복합물을 함유한 제품을 수출하여 이익을 창출할 예정임
 - 안전하고 효능이 검증된 식품소재를 개발하여 시장의 니즈에 부합되는 요건을 갖 추게 된다면 국내뿐만 아니라 일본, 미국 등 시장규모가 큰 해외 시장에서도 성공 가능성이 높을 것으로 판단됨

(3) 마케팅 추진전략

년도	구분	추진계획
2021	일반식품	‘국화와 황금을 함유한 목편한 배도라지즙’ 제품에 사용하여 기관지 관련 원료로 소비자 인식 강화
2022	건강기능식품	개별인정형 획득 후, ‘감국(국화)과 황금 복합추출물’을 주원료로 하는 건강기능식품 제품 개발 TV 광고, 블로그, SNS 등의 활동하여 홍보 진행 예정

(4) 제품 개발 계획

- 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 건강기능식품 1종(감국(국화)과 황금 복합물)
 - 대량생산공정 확립과 포장디자인의 개발을 통하여 상기 1종의 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 건강기능식품(시제품) 제작 및 상품화로 완제품을 개발종료 후 생산할 계획임

4-2. 산업화를 통한 기대효과

- 신규 기능성인 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 고기능성 건강기능식품 소재를 개발하고 시장의 니즈에 부합되는 요건을 갖추게 된다면 국내뿐만 아니라 일본, 미국 등 시장규모가 큰 해외시장에서도 성공 가능성이 높을 것으로 판단됨

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발				
	(영문) Research and development of health functional food using the Chrysanthemum and the Licorice for improvement of bronchial health for fine dusts				
주관연구기관	종근당건강(주)		주 관 연 구 자 책 임 자	(소속) 종근당건강(주)	
참 여 기 업				(성명) 박성선	
총연구개발비 (천원)	계	801,000	총 연구 기간	2016.12.23.~2020.08.22.(44개월)	
	정부출연 연구개발비	600,000	총 연 구 원 수	총 인원	13명
	기업부담금	201,000		내부인원	13명
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p><연구목적></p> <ul style="list-style-type: none"> • 감국(국화)과 황금 복합추출물의 지표 성분 확인 및 표준화된 기능성 원료 개발 • 개발 원료를 이용한 기관지와 호흡기 기능 개선 효능 평가 및 개별인정 획득 <p><연구개발 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> • 국내외 기술, 제품시장 동향 연구 • 원료표준화 완료 • 복합소재 분석법확립 완료 • 복합소재 제제검토 실시 • 최적추출기술 및 공정 표준 설정 • 세포활성평가 완료 • 항염증 검증 완료 • 동물이용 효과 검증 완료 • 인체적용시험 프로토콜 작성 및 인체적용시험 완료 • 공인분석 기관 분석의뢰 및 공인성적서 확보 완료 • 지식재산권 3건 확보 완료 • 개별인정 허가서류 작성 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 국내외 기술, 제품시장 동향 연구 					

- 국내외 제품개발방향 조사 완료
 - 원료표준화
 - 국내자생소재 16종의 항산화활성 및 세포활성평가 측정
 - 복합비율별 항산화활성평가 및 세포활성평가 측정하여 최종복합비율 선정
 - 복합소재 분석법확립
 - HPLC를 이용한 효율적인 Baicalein 및 Luteolin의 분석방법 정립
 - 최적추출기술 및 공정 표준 설정
 - 용매별(열수, 70%주정) 추출수율 확인
 - 감국(국화) 및 황금 원산지 크로마토그램 차별성 확인
 - 추출시간별 chromatogram 차별성 확인
 - 원료 유전자 분석
 - 감국(국화), 황금 원재료의 유전자 분석
 - 세포활성평가
 - 독성평가: MTT assay
 - 활성측정: NO inhibition 및 MUC5AC 발현량 측정
 - 항염증 검증
 - Cytokine IL-6, 12 측정
 - NF-kB, MAPK Pathway 등 측정
 - 동물이용 효과 검증
 - 실험프로토콜 확립(기관지천식, 미세먼지)
 - 실험결과 확보
 - 제형연구
 - 복합소재를 이용한 다양한 제형 가능성 연구
 - 시험 sample을 이용한 관능평가 수행
 - 인체적용시험 프로토콜 작성 및 인체적용시험 완료
 - 프로토콜 작성 계약 완료(전북대 임상지원센터 연구팀)
 - 인체적용시험 완료
 - 최종결과보고서 수령
 - 공인분석 기관 분석의뢰
 - 대장균군, 중금속, 잔류농약, 곰팡이독소, 영양성분 및 지표성분 분석의뢰 완료
 - 공인시험성적서 확보
 - 지식재산권 확보
 - 지적재산권 3건 출원 완료
 - 개별인정 허가서류 작성 및 개별인정 신청
 - 제출자료 구비 완료
 - 세포, 동물, 임상을 근거로 개별인정 신청서 작성 완료
- 연구성과 활용실적 및 계획
- 감국(국화)과 황금을 혼합하여 기관지 및 호흡기 건강에 도움이 되는 건강기능식품 개발
 - 감국(국화)과 황금을 주원료로 사용하는 제품 개발, 건강기능식품 소재 판로 확보
 - 기관지 및 호흡기 질환 개선에 도움이 되는 새로운 고기능성 식품 소재를 개발 및 국내외 시장 진출

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제 현황

		과제번호	116171-03		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	기능성 식품소재		과제구분	단위	
사업명	농식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발		과제유형	개발	
연구기관	종근당건강(주)		연구책임자	박성선	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016-12-23~ 2017-12-22	50,000	16,700	66,700
	2차연도	2017-12-23~ 2018-10-22	250,000	83,400	333,400
	3차연도	2018-10-23~ 2020-08-22	300,000	100,000	400,000
	계	2016-12-23~ 2020-08-22	600,000	200,100	800,100
참여기업					
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.10.06

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
종근당건강(주)	전무	박성선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

화 약	
-----	---

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

본 연구의 가장 대표적인 성과는 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물이 기관지 건강에 미치는 구체적인 과학적 근거를 확보하는 것이다. 세계보건기구 산하의 국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서는 미세먼지를 사람에게 발암이 확인된 1군 발암물질(Group 1)로 지정하였으며, 미세먼지 수치는 점점 악화되지만, 미세먼지로 인해 악화된 기관지 건강을 증진시키는 연구는 미비하다. 이에 세포실험과 동물실험을 통한 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물에서 기관지 건강 증진 효과 검증은 통해 기능성을 발굴하여 논문 1편(추가 1편 진행 중)을 게재하였다. 본 연구의 독창적인 연구성과를 기반으로 감국(국화)과 황금 복합추출물에 대한 국내 총 3건의 특허출원을 완료하였다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

본 연구를 통해 발굴한 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물의 기관지 건강개선 연구결과를 이용한 산업적 활용 범위는 식품에 국한되지 않고, 건강기능식품, 메디컬 푸드 등으로 그 활용성을 확대할 수 있다. 특히 기관지 건강은 아직 건강기능식품의 기능성으로 인정되어 있지 않아, 본 과제를 통해 기능성을 인정할 수 있다. 따라서 감국(국화)과 황금 복합추출물은 앞으로 기관지 건강 기능성 제품에 선두주자로 나설 수 있으며, 추후 다른 제품들의 롤모델이 될 가능성이 크다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

본 연구에서 제시된 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물에 대한 기능성, 기능성분 명확화, 원료의 안전성, 원료의 산업화 등을 종합적으로 고려해 볼 때, 기능성 식품을 포함한 식품 분야에서의 적용 가능성이 매우 높다. 특히, 국내에서는 미세먼지, 초미세먼지 상태에 대한 관심이 증가하고 있어, 기관지 건강개선 제품이 더욱 부각되어 활용될 수 있다. 추가적으로, 국내뿐만 아니라 중국 등 해외에서도 미세먼지에 관한 관심과 시장이 성장하고 있어, 전 세계적인 시장 트렌드에 적합하다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

본 연구진은 총 3년 6개월의 연구기간 동안 당초 계획한 모든 연구수행을 완료하여 연구목표를 달성하였다. 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물에 대한 항산화능 측정 완료, 세포실험과 동물실험(천식, 미세먼지 모델) 및 인체적용시험을 통하여 체계적이고 구체적인 연구결과를 도출하였다. 또한, 지표성분 함량 범위 설정, 원료 표준화 및 최적 추출공정 확립, 지표성분 분석방법 확립 등 산업화에 필요한 기반 기술을 구축하였다. 이러한 연구결과는 감국(국화)과 황금 복합추출물을 산업화 및 제품화하는데 효율적으로 사용되었으며, 개별인정 허가 획득에 유효한 결과로 사용될 것이다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

총 3년 6개월의 연구기간 동안 도출된 연구결과를 기반으로 독자적 산업기반을 구축하기 위하여 국내 특허출원 3건의 지식재산권을 확보하였다. 본 과제를 통해 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물에 대한 전문 인력을 2명(박사)을 배출하고, 5명을 고용하는 등의 일자리를 창출하였다. 연구결과를 토대로 학술발표 총 2건(포스터, 초록), SCI 논문 1편, 교육지도 2건, 기술이전 1건의 연구성과를 달성하였다. 또한, 과제 종료 후의 목표였던 제품화 1건을 조기에 달성하였고 매출액 562,229,471원을 창출하였으며, 과제 종료 후의 목표였던 홍보전시 1건도 조기에 완료하였다. 연구기간 종료 후에도 지속적인 연구개발을 통하여 특허등록 2건, SCI 논문 1편 이상과 추가 매출액 10 억원의 성과를 달성할 계획이다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 2건	15	100	국내 특허 출원 3건으로, 1건 초과달성
품종등록 1건	5	0	개발 소재가 신규 품종등록이 아닌 문제로 미달성
고용창출 4건	20	100	신규 고용창출 5명으로, 1건 초과달성
논문(SCI) 1건	10	100	SCI 논문 1건으로 달성 (1건 추가 진행 중)
논문(비SCI) 2건	5	0	현재 논문 작성 중인 단계로 미달성
학술발표 2건	15	100	학술발표 2건으로 달성
교육지도 2건	15	100	교육지도 2건으로 달성
인력양성 2명	15	100	인력양성 2명으로 달성
합계	100	75	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구를 통하여 국내에서 자생하는 자원을 이용한 감국(국화)과 황금 복합추출물에 대한 기관지 건강개선에 대한 구체적인 과학적 근거를 기반으로 미세먼지로 인한 기관지 건강개선에 대한 산업기반을 구축하였다. 또한, 해외에 의존하고 있는 국내 바이오 업체들에게 현 연구개발을 통해 국내 자원도 산·학·연·지들 간의 네트워크를 통해 한가지 목표를 갖고 추진한다면 충분히 글로벌 스타 제품은 가능하다는 메시지를 제공하는 것이 가능하였다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구의 목적은 국내산 감국(국화)과 황금을 이용한 기관지 건강개선 건강기능식품 개발에 관한 것이다. 건강기능식품 개발의 목적에 맞게 세포실험과 동물실험(천식, 미세먼지 모델) 및 인체적용시험을 통하여 국내산 감국(국화) 및 황금의 기관지 건강개선 효과를 확인하였다. 또한, 지표성분 확립 및 함량 범위 설정, 원료 표준화, 최적 추출공정 확립, 지표성분 분석방법 확립 등 산업화 생산 기술을 구축하고자 하였다. 본 과제 평가 시 국내산 감국(국화)과 황금의 산업적 기반 기술과 기관지 건강개선에 대한 연구내용의 이행도와 국내산 감국(국화)과 황금 산업화 가능성을 높인 것에 대한 평가가 요망된다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 1) 본 연구의 연구결과에 대한 추가 논문 게재를 완료함으로써, 국내산 감국(국화)과 황금 복합추출물의 기관지 건강에 대한 과학적 근거자료를 제공하고자 한다.
- 2) 본 연구의 연구결과를 이용하여 개별인정 신청 및 허가를 획득하여, 기관지 개선 건강기능식품 및 이와 관련시장 제품의 선두주자가 되고자 한다.

IV. 보안성 검토

- 해당사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	기능성 식품소재
연구과제명	감국, 감초 등을 이용한 미세먼지 대응 기관지 건강개선 건강기능식품 연구개발			
주관연구기관	종근당건강(주)		주관연구책임자	박성선
연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	600,000	201,000		801,000
연구개발기간	2016.12~2020.08			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(산업화, 제품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 특허출원 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 10-2017-0135675 - 국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 • 10-2018-0093338 - 국화 및 황금 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 • 10-2018-0093331 - 국화 추출물 및 황금 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
② 품종등록 1건	국내 기존 품종을 활용하여 소재 개발에 따른 품종등록 불필요
③ 고용창출 4건	신규인력 5명 고용창출 <ul style="list-style-type: none"> • 김상민, 우미선, 임세미, 배수현, 진유정
④ 논문(SCI) 1건	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflammatory action of herbal medicine comprised of <i>Scutellaria baicalensis</i> and <i>Chrysanthemum morifolium</i>. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2020
⑤ 논문(비SCI) 2건	현재 논문 작성 중인 관계로 미달
⑥ 학술발표 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 2020 한국자원식물학회 출계학술대회 포스터 발표 및 초록 등록 "Anti-inflammatory Action of Herbal Medicine Comprised of <i>Scutellaria baicalensis</i> and <i>Chrysanthemum morifolium</i>" • 2020 한국자원식물학회 출계학술대회 포스터 발표 및 초록 등록 "Improvement of Bronchial Immune Hypersensitivity Reaction by Extracts from <i>Chrysanthemum morifolium</i> and <i>Scutellaria baicalensis</i>"
⑦ 교육지도 2건	<ul style="list-style-type: none"> • 천연약물연구회제63회정기세미나 교육발표 "국내자생천연물활용건강기능식품개발연구 박성선 전무이사(종근당건강주식회사)" • 2019 한국영양학회 국제학술대회 및 제 54차 정기총회 교육발표 "The nutritional role and importance of omega-3 to prevent cardiovascular disease of Korean 박성선 전무(종근당건강)"
⑧ 인력양성 2명	박사 2명 배출 <ul style="list-style-type: none"> • 조경원, 고은정

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	16.7		16.7						16.7				16.7	16.7	16.7				
최종목표	2		1						4		1	2		2	2	2			
연구기간내 달성실적	3		0	1	8.4	1	562		5		1	0	1.516	2	2	2		1	
달성율(%)	100		0						100		100	0		100	100	100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	표준화된 국화황금추출물의 대량 생산공정 확립
②	국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
③	국화 및 황금 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물
④	국화 추출물 및 황금 추출물을 유효성분으로 함유하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√								
②의 기술		√				√				
③의 기술		√				√				
④의 기술		√				√				

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	호흡기 건강 개별인정형 건강기능식품 개발 및 상품화
②의 기술	국화추출물의 특허 등록을 기반으로 건강기능식품 제품개발
③의 기술	국화황금추출물 특허 등록을 기반으로 건강기능식품 제품개발 및 국내외 판매
④의 기술	건강기능식품 소재로 매출 증대에 기여

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표		2				1	900											1	
연구기간내 달성실적	3		0	1	8.4	1	562		5			1	0	1.516	2	2	2	1	
연구종료후 성과창출 계획		2					1,000					1							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.