

발간등록번호

11-1543000-001946-01

머위의 부산물인 잎으로부터 개발
한 KP-1의 원료표준화와 지표성
분 설정을 통해 기억력 개선 건강
기능성 식품 개발

최종보고서

2017. 08. 19.

주관연구기관 / (주)네이처바이오

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발”(개발기간 : 2016.08.19~ 2017.08.18) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017.08.19.

주관연구기관명 : (주)네이처바이오 (대표자) 박상수 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 박상수
협동연구책임자 :
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116044-1	해당 단계 연구 기간	2016.08.19 - 2017.08.18	단 계 구 분	(1차년도)/ (1차년도)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 식품기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발			
연구 책임 자	박상수	해당단계 참 여 연구원 수	총: 2명 내부: 2명 외부: -명	해당단계 연구 개발 비	정부: 50,000천원 민간: 20,000천원 계: 70,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 2명 내부: 2명 외부: -명	총 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 20,000천원 계: 70,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	(주)네이처바이오			참여기업명	(해당 없음)
위 탁 연 구	연구기관명:	(해당 없음)		연구책임자:	(해당 없음)
<p>요약</p> <p>기술실시 1건, 사업화 1건, 특허출원 1건, 인력양성 5명, 해당 연구개발 완료</p> <p>머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) KP-1의 원료 표준화 2) KP-1의 유효성분 검출 지표성분 확인 3) KP-1의 지표성분 확인 시험법 개발 4) KP-1의 최종 시제품 개발 				보고서 면수	133 페이지

< 국문 요약문 >

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	머위의 부산물인 있으므로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발 1) KP-1의 원료 표준화 2) KP-1의 유효성분 검출 지표성분 확인 3) KP-1의 지표성분 확인 시험법 개발 4) KP-1의 최종 시제품 개발				
연구개발성과	기술실시 1건, 사업화 1건, 특허출원 1건, 인력양성 5명, 해당 연구개발 완료 1) 원료 표준화 <ul style="list-style-type: none"> • 제형 결정, 제제개발 및 제조방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 200mg의 KP-1이 함유된 500mg 캡슐 제형 • 제조법 Scale-up 실시 <ul style="list-style-type: none"> - KP-1의 각 배치별 지표성분 함량 변화 측정으로 Scale-up • 전체 공정도 완성 <ul style="list-style-type: none"> - 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건이 안정적인 공정도 완성 • 제조법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 대량생산 체제 구축 시 지표성분 함유량을 측정하여 제조공법 확립 • 기준 및 시험방법 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid를 이용한 full validation 완료 2) 유효 활성물질 분리 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 유효 활성성분 분리 추출 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid를 순도 97.37%로 분리 • 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid의 성적서 발급 및 전 공정도 특허출원 3) 지표성분 확인 시험법 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 유효성분 확인 시험법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid 함량 및 확인 시험법 개발 완료 • 유효성분 확인 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid를 NMR 장비를 이용한 성분 규명 • 기준 및 시험방법 설정 <ul style="list-style-type: none"> - Full validation으로 기준 및 시험방법 설정 완료 • LC/MS/MS condition 설정 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid의 분석 방법 및 기기조건 설정 완료 • HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 97.37%의 높은 순도 확인 • 분석법 검증은 ICH 및 FDA Guideline에 따라 시행 <ul style="list-style-type: none"> - 공인된 검증 방법으로 시행완료하고 식약처에 제공함 4) 시제품 제작 <ul style="list-style-type: none"> • KGMP 적격 업체 OEM 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 전체 500mg 캡슐에 KP-1이 200mg 함유된 시제품을 제작 - 인체적용시험(경희대학교 병원)에 활용 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1) 기억력 개선 개별 인정형 인허가 추진 2) 주요 매출처 계약 확대 및 국외 원료 소재 수출 3) 재배 농가 수익원 증가				
중심어(5개 이내)	기억력개선	알츠하이머	건강기능식품	치매예방	해마

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	Development of functional foods for memory-enhancing from butterbur leaf derived KP-1 by standardization and identification of constituents 1) Standardization of KP-1 2) Detection of active principle and identification of marker compound 3) Establishment of method for determination of marker compound 4) The development of prototype KP-1				
Results	License(1), commercialization(1), patent application(1), manpower training(5), completion of R&D project 1) Standardization of KP-1 <ul style="list-style-type: none"> • Decision of dosage form, formula and Establishment of manufacture process <ul style="list-style-type: none"> - 500 mg capsule form containing 200 mg of KP-1 • Establishment of manufacture method for scale-up <ul style="list-style-type: none"> - Scale-up was performed by measuring changes in the content of marker compound of each batch of KP-1 • Completion of the entire process <ul style="list-style-type: none"> - Completion of stable process for Material and reaction conditions used in process step • Establishment of manufacture method <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of manufacturing method by measuring the content of maker compound when constructing mass production system • A standard and the method setting <ul style="list-style-type: none"> - Completion of full validation using Fukinolic acid(marker compound) 2) Detection of active principle and identification of marker compound <ul style="list-style-type: none"> • Separation and extraction of active principle <ul style="list-style-type: none"> - Separation of fukinolic acid to 97.37 % purity • Establishment of separation process and analysis of active principle <ul style="list-style-type: none"> - Issuance of CoA for Fukinolic acid and patent application for the entire process 3) Establishment of method for determination of marker compound <ul style="list-style-type: none"> • Development of the method to identify the active principle <ul style="list-style-type: none"> - Development completion of the method for content of fukinolic acid • Identification of active principle <ul style="list-style-type: none"> - Identification of Fukinolic acid using NMR analysis • The standard and the method setting <ul style="list-style-type: none"> - Completion of setting the standard and the method through full validation • LC/MS/MS condition setting <ul style="list-style-type: none"> - Completion of Fukinolic acid analysis method and set analyzer condition up • Determination of Fukinolic acid purity using qNMR <ul style="list-style-type: none"> - Determination of high purity, 97.37 % • Method validation conducted in accordance with ICH and FDA Guidelines <ul style="list-style-type: none"> - After validation with an approved method, the method was provided to the Ministry of Food and Drug Safety 4) The development of prototype KP-1 <ul style="list-style-type: none"> • OEM Production in KGMP certificate holder <ul style="list-style-type: none"> -Production of prototype KP-1, 500 mg capsule form containing 200 mg of KP-1 -Using for clinical trial(Kyung Hee Hniversity Medical Center) 				
Expected Contribution	1) Progress of license for individually-approved functional food 2) Expanding contract of major customer and export 3) Increase of profit from farmhouse				
Keywords	Memory-enhancing	Alzheimer's disease	Functional food	Prevention of dementia	Hippocampus

< INDEX >

1. Outline of research	8
2. Current technique development trend in internal and external	14
3. Research content and results	28
4. Purpose achievement and level of contribution related field	101
5. Output and applicable plan	105
6. Foreign science technique information collected in research	109
7. Security level for results of research	121
8. Current condition research facility and equipment registered in NTIS	121
9. Results of safety action of laboratory	121
10. Representative results of research	121
11. Considerations	122
12. References	123

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	8
2. 국내외 기술개발 현황	14
3. 연구수행 내용 및 결과	28
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	101
5. 연구결과의 활용계획 등	105
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	109
7. 연구개발성과의 보안등급	121
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	121
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	121
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	121
11. 기타사항	122
12. 참고문헌	123

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

가. 사업화 대상 상품 (서비스) 개요

고령화로 인한 건강한 정신적 삶에 대한 국민적 욕구가 증진됨에 따라 주요 뇌질환 예방을 위한 건강기능식품의 관심도가 증가되고 있다. 이에 본 상품의 개발은 세계적으로 예상되는 2025년 대략 2200만 명 정도의 치매환자에게 예방효과를 제공하는 획기적인 기술개발이 될 수 있으며, 고도의 집중력이 요구되는 청소년의 집중력 향상에 도움을 줄 수 있다. 일반적인 기능성 식품소재의 제품화와는 다르게 기억력 개선 및 뇌기능 강화와 관련되어 기능성이 증명되고 소재화가 완료된 기능성 식품소재를 활용하면 다양한 산업으로 응용이 가능하다. 한 예로, 최근 뇌 인지기능 연구의 발전으로 뇌 기반 학습, 멀티미디어 교육, 뇌영상, 뇌과학 기반 컨설팅 등 새로운 개념의 산업이 태동하는 가운데 기능성소재를 접목할 수 있는 산업이 개발될 수 있다.

나. 사업화 목표 및 핵심 경쟁 요소 (경쟁우위를 점할 수 있는 차별화 요소)

현재, 기억력 개선에 대한 기능성을 인정받은 제품들이 기억력 개선에 있어 효과가 미약한 것으로 인정되어 있다. 물론, 그 기능성을 다양한 방법과 실험으로 인정받아 제품화되고 있지만, 단순한 인지능력 개선 기능성 실험을 바탕으로 상품화되고 있어 매우 아쉬운 실정이다.

본사는 기억력 개선 및 집중력 향상 관련 제품을 개발하기 위해 그동안 사전연구와 타사제품보다 획기적인 기능성을 실현하기 위한 다양한 논문탐색 및 기능성을 연구하였다. 그 결과, 국내 식품원료인 머위 추출물에서 뇌의 기억을 담당하는 해마에 직접적으로 신경관련 조직을 재생시키고 보호하는 기능을 확인하였다. 이에 대한 연구결과를 특허 출원하였기에 이를 정성, 정량화 통해 최적의 기능성을 갖춘 기억력 개선 및 집중력 향상 건강기능성 식품을 개발하고자 한다.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 인구 고령화로 인한 만성 퇴행성 뇌질환 증가 (치매인구 증가)

생활수준의 향상과 과학발전에 따른 인구 노령화는 만성퇴행성질환을 증가시키고 있으며, 이러한 노인의 만성퇴행성 질환 가운데 뇌기능과 관련된 치매의 예방과 치료는 매우 중요한 문제로 대두되고 있다. 이와 더불어 치열한 입시경쟁 속에 청소년은 물론 유/소아 교육이 과열되어 있는 우리나라의 현실에서 사교육의 열풍뿐만 아니라 학습 및 기억력 향상과 관련된 여러 프로그램이 등장하고 있다. 또한, 이중 학습 및 기억력향상과 관련된 건강기능성 식품은 최근 노인의 치매 예방과 청소년의 학습능력 향상 등을 표방하며 제 품화되고 있는 실정이다.

기억력 감퇴로 인한 치매 환자 급증으로 심각한 사회적 문제 발생



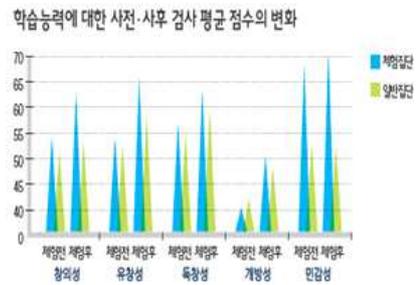
자료 : SBS 뉴스 2013.04.21

나. 청소년기의 집중력 향상이 매우 중요한 사회적 현상으로 대두

청소년 집중력 향상과 관련된 시장 급성장 추세



청소년의 집중력 저하 관련 이미지



청소년의 집중력 향상을 위한 다양한 제품 및 프로그램이 급성장 중

집중력 향상 및 기억력 개선 관련 제품들 가운데 가장 주목받는 제품은 건강기능성 식품이다. 이는 치매 예방과 청소년의 집중력 향상에 있어 다른 유형의 제품들이나 프로그램들과 비교하여 효과가 빠르고, 식품의약품안전처와 같은 기관으로 부터 검증된 제품들이기 때문에 소비자의 신뢰도가 높은 요인으로 인한 결과로 보인다.

이러한 시장요구로, 2013년 통계 조사 결과로 인정받은 건강기능식품의 기능성 중 기억력 개선 제품이 12건으로 가장 많았으며, 시장성도 높아 연간 150%이상의 성장률을 보이고 있다.

기억력 관련 건강기능성 식품이 급성장한 이유는 청소년기에 고도의 학습능력을 요구하고 있고, 특히, 노령 인구에게는 세계적으로 연간 1,000억 달러 이상의 막대한 돈을 치매 치료에 쏟아 붓고 있는 실정이지만 현재까지 사용되고 있는 치매 치료제의 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 독성으로 인해 아직 논란의 여지가 많은 상태이기 때문에 미연에 치매를 예방하고자 하는 소비자의 요구가 반영된 결과로 해석된다.

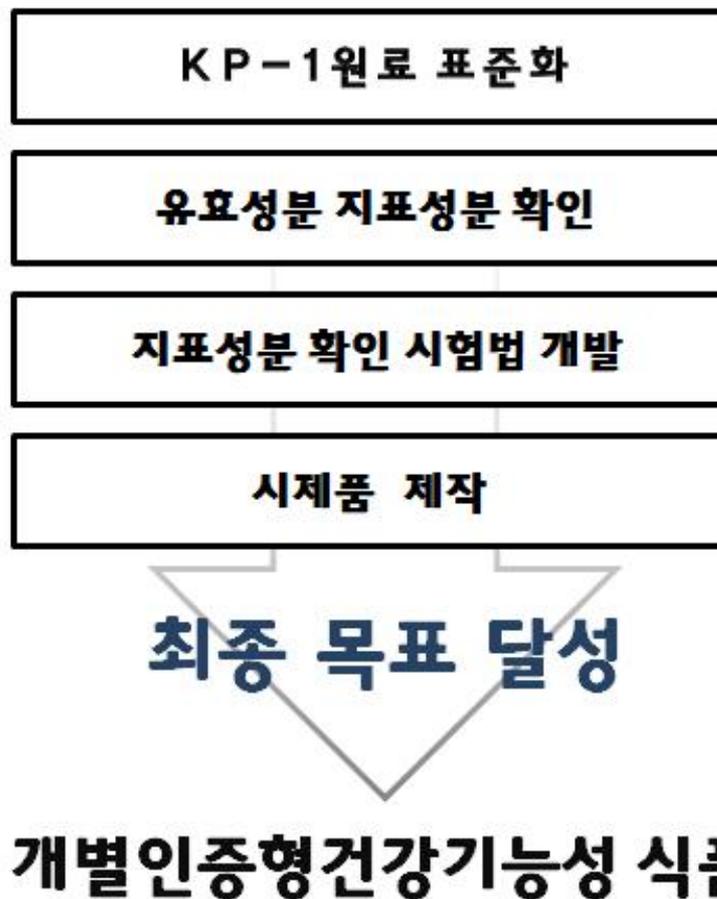
1-3. 연구개발 범위

가. 개발 목표

- (1) KP-1의 원료 표준화
- (2) KP-1의 유효성분 검출 지표성분 확인
- (3) KP-1의 지표성분 확인 시험법 개발
- (4) KP-1의 최종 시제품 개발

나. 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

개발 모식도



다. 세부 개발 내용

(1) 원료 표준화

- 제형 결정
- 제제개발 및 제조방법 확립
- 제조법 Scale-up 실시
- 전체 공정도 완성
 - 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건 연구
- 제조법 확립
 - 대량생산 체제 구축 시 지표성분 함유량을 측정하여 제조공법 확립
- 기준 및 시험방법 설정

(2) 유효 활성물질 분리 및 분석

- 유효 활성성분 분리 추출
 - 여러 용매를 사용하여 추출물 별 제조 및 분리
- 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석
 - 함량, 유효물질, 용출시험에 대해 해당 항목 검증

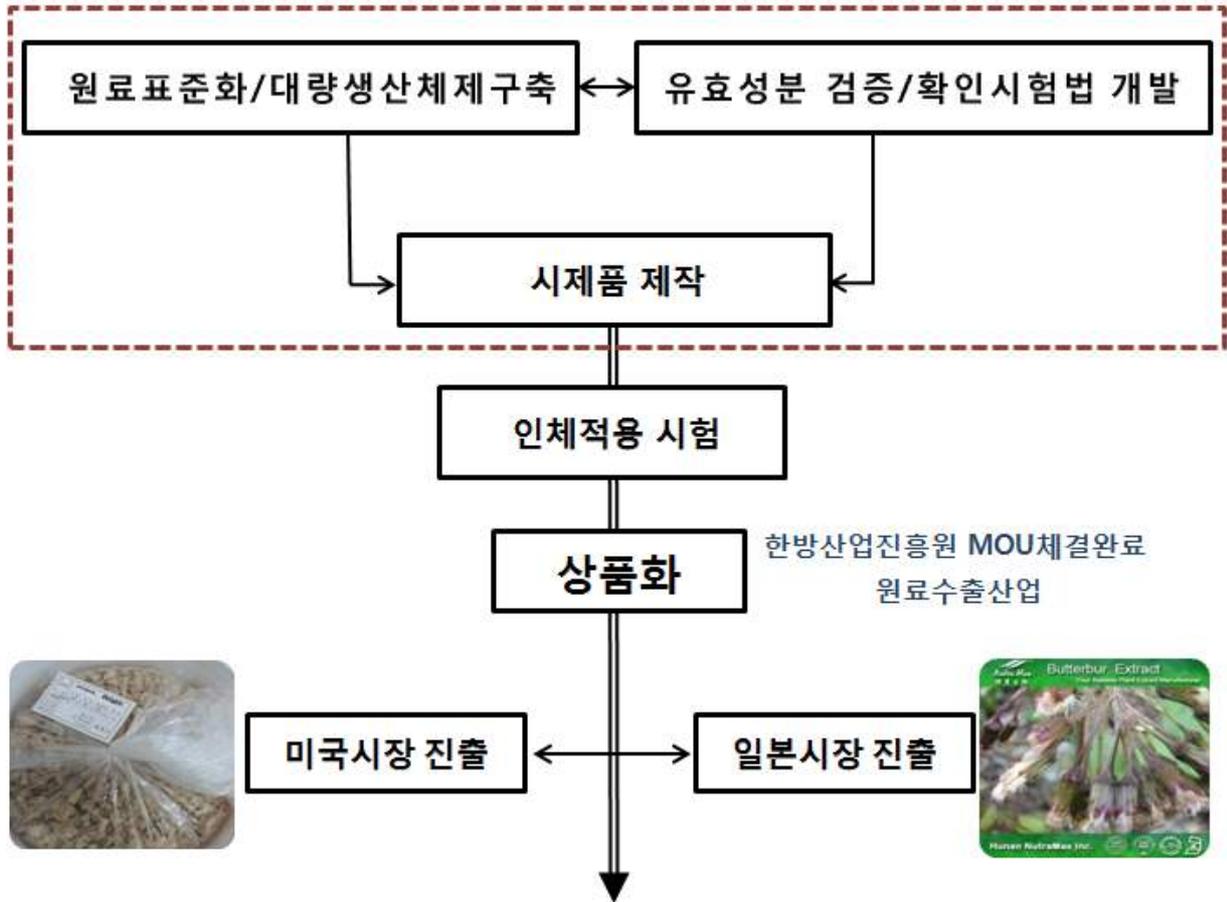
(3) 지표성분 확인 시험법 개발

- 유효성분 확인 시험법 개발
- 유효성분 확인
- 기준 및 시험방법 설정
- LC/MS/MS condition 설정
- HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인
- 분석법 검증은 ICH 및 FDA Guideline에 따라 시행

(4) 시제품 제작

- KGMP 적격 업체 OEM 제작

기억력 개선 개별인증형 건강기능성 식품개발



최종 목표 달성

개별인증형건강기능성 식품



2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 기억력 개선에 관련된 제품 수요가 지속적인 증가로 인한 관련 기술개발 증가

근본적으로 치매는 치료가 거의 불가능한 질병이며, 일시적으로 완화나 증상을 더디게 하는 대증요법이 개발되고 있지만 상대적으로 심각한 부작용을 야기한다. 그러한 이유로, 예방이 가장 중요한 이유이자 기억력 개선 및 집중력에 관련된 제품 수요가 지속적으로 증가하는 이유이다.

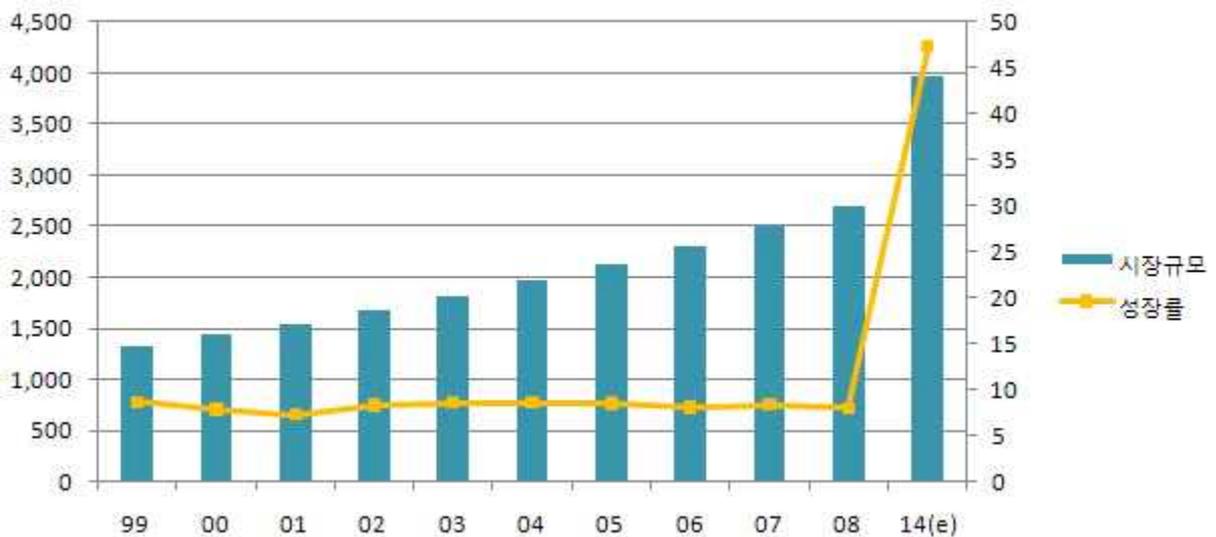
포스파티딜세린은 미국과 일본에서는 이미 오래 전부터 기억력 감퇴 예방과 치매개선에 효능이 있는 안전한 건강기능식품으로 널리 알려져 있으며, 특히 일본에서는 포스파티딜세린을 중심으로 한 브레인 푸드 시장이 형성되어 기억력 저하 예방과 함께 스트레스 및 우울증 개선 효과에 대한 연구개발도 활발히 진행되고 있다. 그러나, 그 기능성을 나타내기 위해서는 추출 및 정제해야 하는 양이 너무 많아 높은 가격대를 형성하고 있다.

현재 미국 및 유럽, 일본 등에서 포스파티딜세린은 건강기능식품으로 출시되고 있고 DHA, GABA, 은행잎 추출물 등의 원료와 함께 뇌 기능관련 제품으로 개발 중이다. 또한, 중국의 경우 소비자층 조사를 통해 건강기능식품의 기능성 요구도 조사를 실시한 결과 기억력 개선제가 5위로, 높은 소비자들의 기대가 나타났다.

2007년부터 두뇌 관련 건강식품의 붐이 일기 시작한 가운데 건강기능식품업계 역시 앞 다투어 수능생뿐만 아니라 두뇌활동이 많은 현대인들의 기억력 감퇴, 인지력학습 저하 등 근원적 문제를 위한 보다 구체적이고 특화된 기능성 소재를 활용한 제품들을 개발하고 있고 시장 또한 급성장하고 있다.

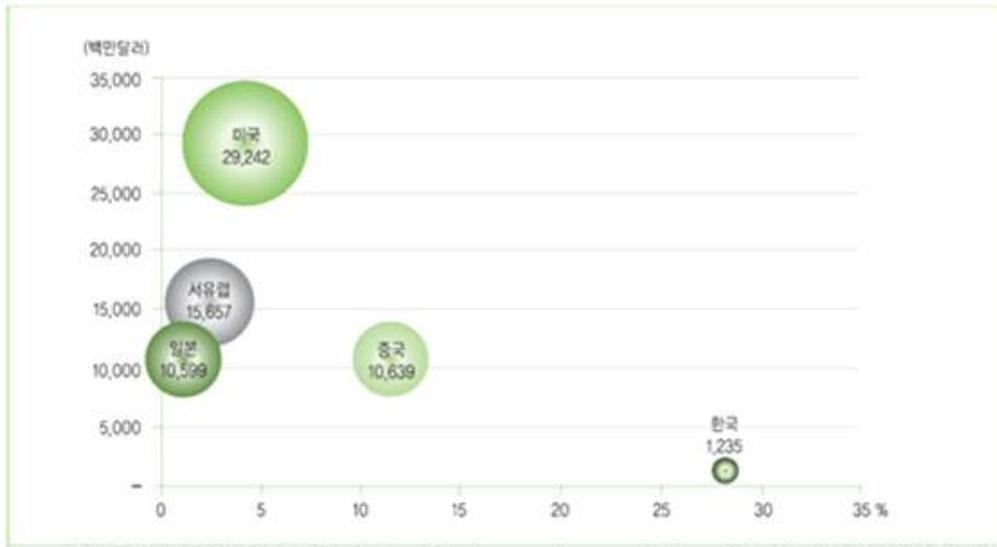
두뇌활동 개선에 대한 효과를 보이는 건강기능식품의 시장규모는 정확히 파악되고 있지 않지만, 그 중 EPA/DHA 함유 제품의 시장규모는 약 800억원 정도로 추정된다. 최근 차세대 건강기능식품으로 급부상하고 있는 포스타티딜세린(PS)의 경우, 국내에선 아직 걸음마 수준이지만 일본에서는 지난 2010년에는 7억 엔 이상 규모의 전망을 내놓기도 했다. 포스타티딜세린의 효능에 대해 입증할 필요가 있지만, 뇌질환 영역에 있어서는 아직 초기 단계이고 원재료에서의 수득률이 높지 않아 다양한 기억력관련 개선 제품 연구들이 활발히 진행되고 있다.

- 2008년 총 2,698억불의 시장을 형성한 세계기능성 식품시장은 2014년에는 2008년 대비 47.3%의 성장을 한 3,973억불의 규모를 형성할 것으로 전망됨
- 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면, 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되어,
- 향후 세계 건강기능식품 시장은 개발도상국에 의해 주도될 것으로 판단됨. 이러한 개발도상국과 선진국간의 성장률 차이는 GDP의 성장률이 상대적으로 높고 고령화가 진행되고 있는 개발도상국의 추세가 반영되었음.



[연도별 세계 기능성식품 시장규모, Nutrition Business Journal, Euromonitor]

2011년 매출액을 살펴보면 미국이 전년대비 4.2% 성장한 29,242백만 달러로 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지하고 있으며, 15,657백만 달러로 서유럽이 2위를 차지함. 아시아에서는 중국이 10,639백만 달러로 가장 큰 시장을 형성하고 있으며 전년대비 11.5%의 성장률로 급속한 성장세를 나타내고 있음.



[2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과, 현재 가장 큰 시장은 미국 및 유럽 등지 이지만, 국내 건강기능식품의 성장률이 30%에 달하는 것으로 보여 앞으로 성장가능성이 높은 것으로 예측]

참고: 식약청, 11년 건강기능식품 생산실적분석결과 발표(2012)

NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report, Netirition Bussiness Journal(2012)

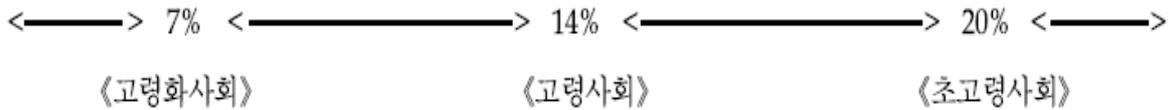
(2) 시장현황

• 초고령 사회의 진입으로 인한 연간 200% 이상 성장

우리나라의 노인은 법률적으로 1981년에 제정된 노인복지법이 정하는 65세 이상의 사람을 말하며, 2011년 기준 노인 인구는 전체 인구의 11.3%인 5,537,072명에 달한다. 국제연합(UN)에서는 한 국가의 총 인구 중 65세 이상의 인구가 차지하는 비율이 7% 이상이면 고령화 사회, 14% 이상이면 고령 사회, 20% 이상이면 초고령 사회로 규정하고 있다. 따라서 우리나라는 통계청에서 발표한 자료를 바탕으로 65세 이상 인구비율이 2000년에 이미 7.2%로 고령화 사회에 진입하였으며, 2018년 14.3%와 2026년 20.8%로 고령 사회, 초고령 사회에 도달할 것으로 전망되고 있다.

우리나라의 고령화 사회, 고령 사회, 초고령 사회 진입 시점별 예상인구

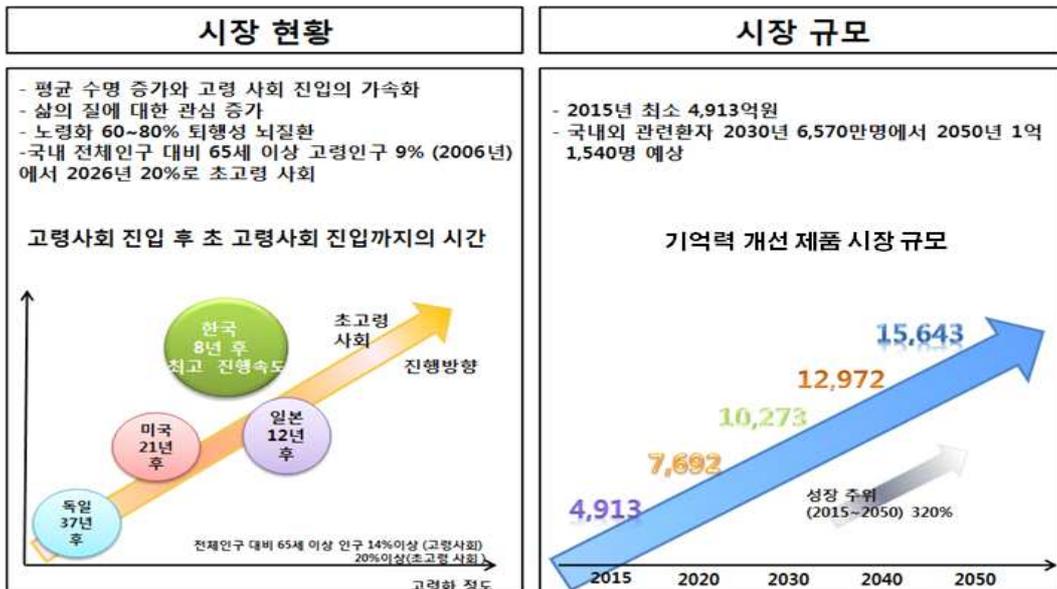
	2000년	2011년	2018년	2026년	2050년
총 인구(명)	47,008,111	48,988,833	49,340,350	49,038,710	42,342,769
65세 이상(명)	3,394,896	5,537,072	7,074,763	10,218,239	16,155,757
비율 (%)	7.2	11.3	14.3	20.8	38.2



자료: 장래인구추계, 통계청 2006

이에 따라 우리나라에서는 노인성 질환이 증가되고 있으며, 뇌졸중, 치매, 정신 및 행동장애와 같은 뇌 질환이 암 및 순환기계 질환 다음으로 높은 사망 원인으로 발생하고 있어 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 이러한 노인성 질환은 일단 발병하게 되면 난치성 질환으로 이어지기 때문에 예방적 차원의 수요가 급증하고 있고 다양한 건강기능식품과 인지능력 개선 프로그램, 민간요법 등에 의존하지만 효과적인 예방법은 없는 실정이다.

노인성 질환 중 기억력 관련 제품 시장 현황



자료: 보건산업진흥원 통계자료 참고 제작 2013

노령화 사회로 의해 뇌질환 환자수의 증가, 특히, **치매 환자의 급증현상으로 인해 국민들의 예방에 대한 증가된 관심이 급증하고 있다.** 치매는 뇌신경의 일시적 혹은 지속적인 손상에 의한 정신기능의 전반적인 장애를 특징으로 하는 퇴행성 질환으로, 국내 사망원인 중 4위를 차지하고 있으며 미국의 통계에 의하면 인구 천 명당 매년 2명의 새로운 환자가 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 환자의 수는 최근 노인 인구의 증가 추세에 비추어 볼 때 기하학적으로 증가하게 할 것으로 예상된다.

국내 치매 환자는 2000년 28만 명에서 2004년 34만 명으로 증가했으며, 2020년에는 62만 명에 이를 것으로 전망된다. 세계적으로는 2025년 대략 2200만 명 정도의 환자가 발생할 것으로 추정하고 있다. 그러나, 치매의 원인은 정확히 알려져 있지 않으며 다만 뇌세포의 손상과 관련이 있을 것으로 알려져 있다. 이러한 치매 치료를 위한 약물은 불행히도 아직까지 효과가 뚜렷하게 입증된 것은 없는 실정이다.

현재 식약처(FDA)의 승인을 받은 치매 치료제는 4가지로, 모두 병의 원인을 모른 채 주로 증상을 완화시키는 용도로 쓰이고 있으며, 치매는 유전자들의 복합작용에 의해 발병하는 것이기 때문에 완전한 예방 효과로 보기 어려울 뿐만 아니라 **과다복용에 따른 부작용이 있어 권장하지 않고 있다.** 그러나, 최근 웰빙(well-being)산업의 성장으로 건강한 정신적 삶에 대한 국민적 욕구가 증진됨에 따라 **주요 뇌질환 예방을 위한 건강기능식품의 관심도가 증가되고 있는 실정이다.**

또한, 현대 사회의 청소년들은 극심한 입시 경쟁으로 인해 스트레스가 매우 많고, 이는 **청소년들에게 가장 필요한 주의집중력을 떨어지게 만든다.**

실제로 여러 연구 논문이나 보고에서도 이러한 입시 스트레스가 정상적인 뇌의 활동을 방해하고 뇌의 기억력관련 세포의 사멸에 영향을 줄 수 있다고 보고하고 있다.

서울대학교 정시 경쟁률

[2014 서울대 정시 결과]



최근, 한 조사 결과에 따르면 고등학생들이 학교생활에서 가장 어렵고 힘든 대목으로 ‘입시경쟁 중심의 학습지도’ (38%)와 ‘획일화된 교육제도’ (28%)를 꼽았다. 교우관계나 학교폭력은 각각 4%, 1%에 그쳤다.

위의 결과에서도 알 수 있듯이 청소년기의 고도의 학습을 위한 기본적인 집중력 향상이 중요하게 대두되고 있으며, 다양한 프로그램과 관련 기능성제품 등이 시장성 커지고 있는 실정임에도 아직 효과적인 제품이 없는 실정이다.

과학적으로 검증되지 않고 막연한 주위의 체험사례와 권유에 의해 제품을 구매하거나 사용한 결과 오히려 중요한 학습기간에 효과를 내지 못해 피해를 보는 사례가 많은 것이 현실이다.

본사가 개발하고자 하는 기억력 개선 및 집중력 향상 기능성제품은 과도한 학업 스트레스로 인해 집중력이 저해되는 학습기의 청소년에게 효과적인 집중력 향상을 제공하여 관련시장에서 큰 기대효과를 나타낼 것으로 판단된다.

기억력 개선 건강기능성식품은 인구의 전 세계적 고령화로 인해 지속적으로 성장하고 있으며, 연 200% 이상 성장성을 나타내고 있음

국내외 시장규모 현황 및 전망

(단위: 억원)

구분	2016	2017	2018	성장률(%)
국내시장	2,563	5,898	10,484	200%
해외시장	5,688	18,746	39,004	200%
계	8,251	24,644	49,488	

*보건산업진흥원 고령친화식품산업 활성화 지원방안 보고서 (2013)

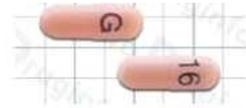
*보건복지부 미래 질환별 건강기능식품 융·복합 핵심기술 연구개발지원 (2011)

*고령화로 주목받는 유망 실버산업 제품 및 시장동향 (2015)

나. 경쟁기관현황

(1) 경쟁기업 현황 및 경쟁 구조

- 치매의 치료제로서 가장 진전되고 있는 것이 콜린계 약제임. 신경전달물질인 아세틸콜린(ACh)의 분해를 방지하여 뇌 내의 ACh량을 증가시키는 “acetylcholine esterase 저해제”가 주목받고 있음.
- 이러한 약물 중에 아세틸콜린의 분해효소인 아세틸콜린 에스테라제(ACh-E)의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 농도를 유지하여 인지기능을 증진시킬 수 있는 치료제로써 미국식품의약청(FDA)의 승인을 받아 국내에서도 시판 사용 중인 타크린(tacrin, 제품명: 코그넥스캡셀)과 도네페질(donepezil, 제품명: 아리셉트정)등이 판매되고 있음.



도네페질

리바스티그민

갈란타민

작용 기전	AChE inhibitor	AChE inhibitor + BuChE inhibitor	AChE inhibitor + nACh R modulator
혈중 반감기 → 용량	70hr → 5~10mg qd	10hr → 1.5~6mg bid patch	6~8hr → 8~12mg bid
FDA 승인	1996	2000	2001
S/E	오심, 설사	오심, 구토, 무력증, 소화불량	오심, 구토, 혼동, 발열

[FDA 승인을 받은 대표적인 치매치료 아세틸콜린 분해효소 억제제]

- 그러나, 타크린(tacrin)은 간독성, 현훈, 운동실조, 불면, 위장관장애, 착란, 혈압이상, 식욕부진, 열감 또는 신경과민 등의 부작용이 보고되었고, 도네페질(donepezil)은 근육 경련, 피로감, 불면증, 어지러움 등의 정신신경계의 장애와 수지진전, 운동장애 등의 추체외로 장애 또는 설사, 구역, 구토 등의 소화 기계의 장애가 나타나는 것으로 알려져 있음.
- 또 다른 치료제 종류인, 무스카린성 ACh 수용체 작용제는 감소한 ACh 대신에 ACh 수용체를 직접 자극하는 알츠하이머병 치료제임. ACh 수용체는 니코틴성 ACh 수용체와 무스카린성 ACh수용체로 나누는데 무스카린성 ACh 수용체는 인지 기능에 관련됨.
- M1(무스카린-1) 수용체는 중추신경에 많고 M2, M3(무스카린-2,3) 수용체는 말초신경계에 많으므로, M1 수용체 선택작용제가 부작용이 적음. 이러한 M1 수용체 작용제는 미국, 일본 등에서 많은 후보 치료제으로써 개발하고 있으나 아직까지 임상시험에서 성공된 사례가 없음.
- 이외에도 ACh 합성능을 증가시키는 약물, 치매 원인물질 중 하나인 베타아미로이드를 제거해 주는 약물, 유전자치료, 줄기세포를 이용한 약물이 개발중에 있으나 아직은 주목할 만한 결과가 나타나지 않고 있다.
- 위와 같은 약물의 약리작용 외의 심각한 부작용을 극복하기 위해 식품 및 천연물을 소재로 치매 예방 및 치료를 위한 건강기능식품과 천연물 신약 개발 연구가 최근 전 세계적으로 주목받고 있음.

집중력 향상 및 기억력 개선 관련 기능성식품 인정현황 (상위 10개)

NO	원료명	인정번호	인정내용
1	씨제이테아닌 등 복합추출물	제2004-3호 CJ(주)	기억력 개선에 도움을 줄 수도 있으나, 아직은 과학적 근거 부족. (기타기능 III)
2	INM176참당귀 주정추출물	제2004-6호 싸이제닉(주)	노인의 인지능력 저하 개선을 도움. (기타기능 II)
3	피브로인추출물	제2005-6호 (주)바이오그랜드	기억력 개선을 도움. (기타기능 II)
4	대두 포스파티딜세린	제2006-6호 (주)선경트레이딩	노인의 인지능력 개선을 도움. (기타기능 II)
5	원지추출물	제2009-12호 (주)브레인트로피아	성인의 기억력 개선을 도움. (기타기능 II)
6	홍삼농축액	제2009-29호 (주)한국인삼공사	기억력 개선을 도움. (기타기능 II)
7	인삼가시오갈피 등 혼합추출물	제2009-79호 (주)뉴메드	기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체 시험을 통한 확인 필요. (기타기능)
8	은행잎추출물	제2010-22호 (주)네추럴에프앤피	성인의 기억력 개선을 도움. (기타기능 II)
9	당귀 등 추출 복합물	제2011-3호 대웅바이오(주)	노인의 기억력 개선을 도움.(기타기능 II)
10	녹차추출물/테아닌 복합물	제2010-51호 (주)엘지생활건강	성인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체에서의 확인 필요. (기타기능III)

특히, 기억력 관련 건강기능성 식품이 급성장하는 이유는 청소년기는 고도의 학습능력을 요구하고 있고, 노령 인구에서는 세계적으로 연간 1,000억 달러 이상의 막대한 돈을 치매치료에 쏟아 붓고 있다. 그러나, 현재까지 개발된 치매 치료제들의 효과가 매우 일시적이고 미약하며 심각한 독성으로 인해 아직 논란의 여지가 많다. 이에 미연에 치매를 예방하고자 하는 소비자의 요구가 반영된 결과로 해석된다.

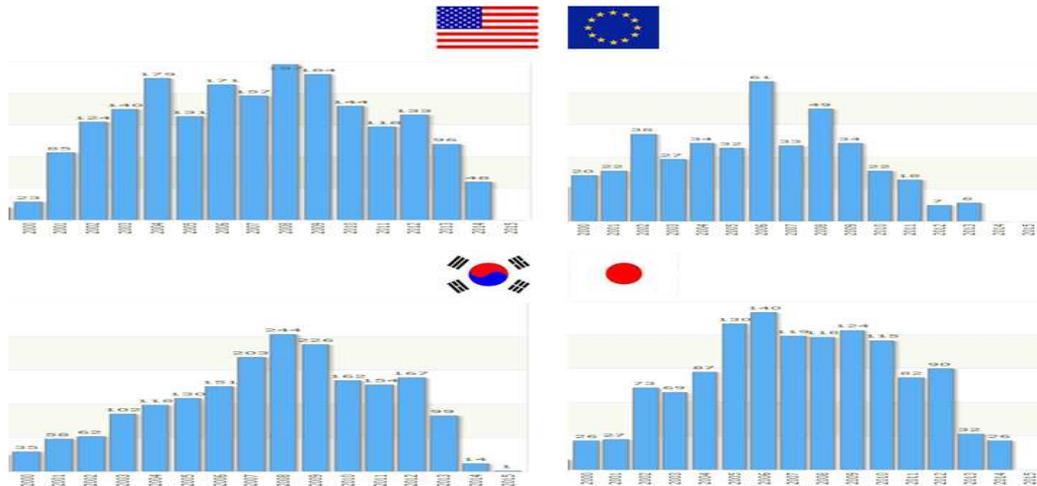
(2) 지식재산권현황

- 머위 추출물을 이용하여 퇴행성 뇌질환 및 기억력, 학습, 인지장애 예방 및 치료를 위한 식품과 약학적 조성물 관련 특허는 본사인 (주)네이처바이오 이외에 아래와 같이 충남대학교, 케이티앤지 등이 유사 특허를 보유하고 있으며,

국내외 관련지식재산권 현황

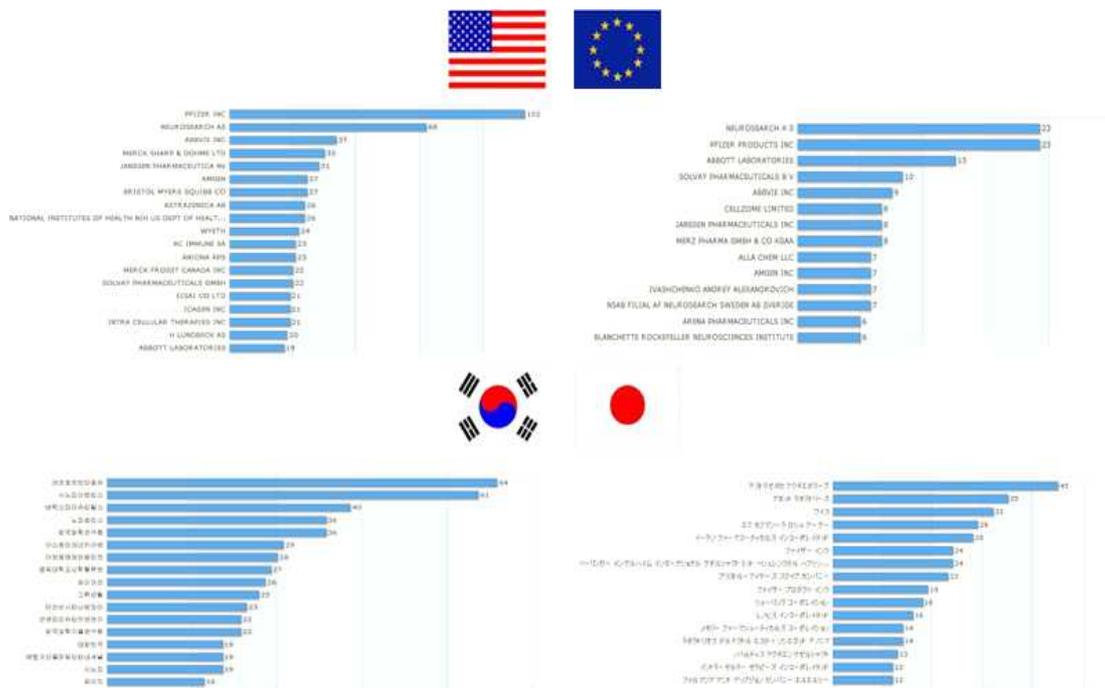
지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
① 천연물을 활용한 퇴행성 뇌질환 개선소재	주식회사 네이처바이오	한국 /1020140004783
② 머위 잎 추출물을 포함하는 기억력 개선용 조성물	주식회사 네이처바이오	한국 /10-1689656
③ 기억력 증진 또는 집중력 향상용 조성물	주식회사 엘지생활건강	한국 /1020080008829
④ 학습 장애, 기억력 장애 또는 치매의 예방 또는 치료용 두충 추출물	주식회사 유니베라	한국 /1020080102789
⑤ 머위 추출물 함유하는 기억력 증강을 위한 건강기능식품	주식회사 케이티앤지	한국 /1020040047683
⑥ 미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 학습능력 또는 기억력 장애 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	주식회사브레인트로피아	한국 /1020110090830
⑦ 베타아밀로이드에 의한 세포 독성 및 기억력 손상 억제용 약학적 조성물, 및 건강 기능식품	경북대학교 산학협력단	한국 /1020070056318
⑧ 신경세포 보호효과 및 항산화 활성을 갖는 머위 추출물	충남대학교	한국 /10-0535655

사전 특허동향 (각 국가별 특허출원 동향) 조사 결과



국가별 출원동향을 분석한 결과, 미국, 일본, 한국 모두 2000년대 이후 본 기술과제와 관련된 특허출원의 활동이 대폭 상승한 것으로 나타났다. 이는 위에서 살펴본 것과 같이 다국적 제약 회사가 많은 미국을 비롯하여, 퇴행성 뇌질환, 치매, 기억력 및 인지장애 질환에 대한 관심과 연구가 증대된 것으로부터 알 수 있으며, 관련 시장 규모도 미국과 일본을 중심으로 증가하고 있다. 이러한 시장 동향에 비추어 볼 때, 특허 활동 역시 미국과 일본 기업들이 활발히 하고 있는 것으로 분석된다.

사전 특허동향 (각 국가별多出원인) 조사 결과



특허출원 활동이 가장 많은 미국의 경우, 다국적 제약회사인 Pizer의 특허출원 활동이 가장 많은 것으로 나타났으며, Neurosearch, Abbie 등이 그 뒤를 이었다. 한국의 경우에 프호프만라로슈 및 사노피아벤티스가 가장 많은 특허출원을 하였으며, 국내기업 및 연구소로는 한국화학연구원, 경희대학교 산학협력단, 한국과학기술연구원, 대한민국(식약처 또는 농촌진흥청 등)의 특허출원 활동이 활발하였으나, 한국 시장에만 국한되어 특허 활동을 하고 있는 것으로 나타났다.

본사 특허



(3) 기타현황

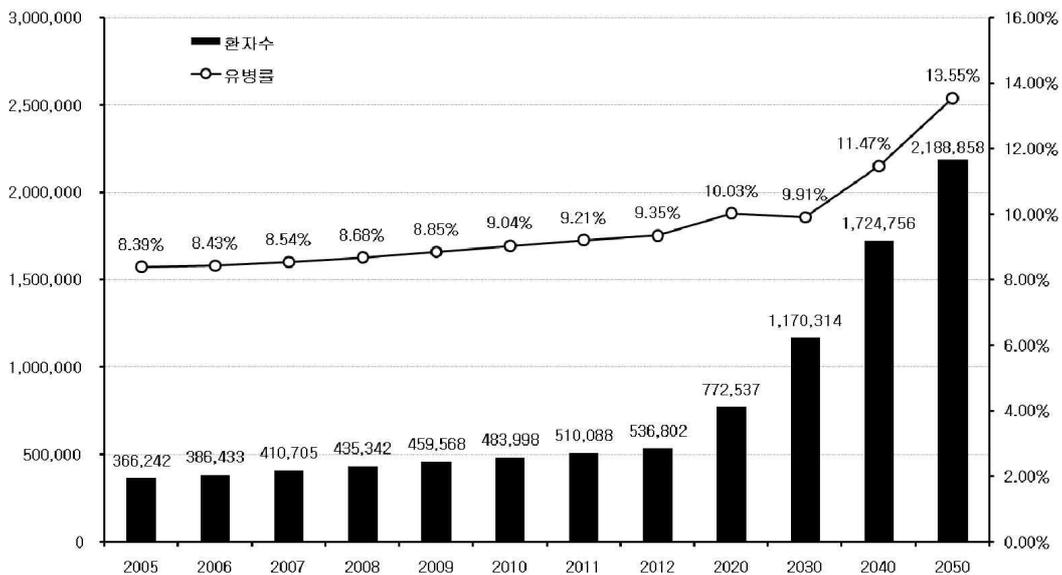
• 국내 치매 관련 시장

2008년 보건복지가족부에서 국가적 차원에서 처음으로 실시한 2008년 치매 유병률 조사 (조사연구기관: 서울대학교 병원, 조사대상: 전국 65세 이상 노인 8,199명) 결과에 따르면, 2008년 65세 이상 노인 중 치매환자는 8.4%로 42만 명에 이르고, 치매의 위험이 높은 경도인지장애는 65세 이상 노인의 1/4에 이를 것으로 추정되고 있다. 또한, 고령자일수록, 남성보다는 여성이, 고학력자보다는 저학력자일 경우에 치매 위험이 더 높을 것으로 보고됨.

(단위 : 천 명, %)

구분 \ 연도	2008	2009	2010	2020	2030	2040	2050
65세 이상 인구 수	5,016	5,193	5,357	7,701	11,811	15,041	16,156
65세 이상 치매노인 수	421	445	469	750	1,135	1,685	2,127
치매 유병률(%)	8.4	8.6	8.8	9.7	9.6	11.2	13.2

*자료: 「2008년 전국치매유병률 조사」 결과



[65세 이상 한국 노인의 치매 유병률 및 치매 환자수 추이. 보건복지가족부 2008]

현재까지 지역사회 거주 노인을 대상으로 시행된 국내 치매 유병률 연구는 모두 11건으로, 진단방법, 대상 특성 등 연구방법에 따라 국내 65세 이상 치매 유병률은 6.3~13.0%로 추정됨.

연구자	지역	연령	표본수	선별도구	진단기준	유병률			유형별 분률		
						남성	여성	전체	알츠하이머	혈관성치매	기타
주진형 등 (2008) ^{8†}	성남	65+	1118	-*	DSM-IV	2.6	8.8	6.3	75.7	18.9	5.4
김정순 등 (2003) ^{31†}	부산	65+	1230	MMSE-K	DSM-III-R	2.7	10.0	8.0	-	-	-
서국희 등 (2003) ^{34†}	연천	65+	1217	PAS-K	DSM-III-R	6.3	7.1	6.8	61.7	35.3	3.0
고금자 등 (2003) ¹¹⁴	제주	65+	590	MMSE-K	-	2.9	16.3	12.4	-	-	-
이동영 등 (2002) ^{9†}	서울	65+	953	MMSE-KC	DSM-IV	4.5	10.4	8.2	65.4	24.7	9.9
신일선 등 (2002) ¹¹⁵	광주	65+	1598	MMSE-K	DSM-IV	-	-	11.6	53.6	18.6	27.8
윤수진 등 (2002) ¹¹³	부천	65+	1015	MMSE-K	-	-	-	11.5	-	-	-
김동현 등 (1999) ¹¹⁶	광명	65+	946	K-MMSE	DSM-IV	7.5	15.9	13.0	39.8	37.5	22.5
우종인 등 (1998) ^{32†}	연천	65+	1674	MMSE-K	DSM-III-R	8.8	9.9	9.5	47.4	26.3	22.7
보건사회연구원 (1997)	전국	65+	27884	MMSE-K	-	-	-	8.3	-	-	-
박종한 등 (1994) ^{33†}	영일	65+	766	MMSE-K	DSM-III-R	7.2	14.5	10.8	60.0	12.0	38.0

*Single phase design - 선별검사를 시행하지 않고 CERAD-K 평가집을 이용해 전문의가 대상자 전체를 정밀검진함.

†SCI급 국제학술지에 등재된 논문

[국내치매 유병률 연구현황, 보건복지가족부 2008]

급속한 고령화로 치매 노인의 수도 빠르게 증가하여 매 20년마다 치매 노인의 수가 2배 증가될 것으로 예상된다. 2000년 27만 명에서 2004년 34만 명으로 증가했으며, 2020년에는 77만 명에 이를 것으로 전망됨. 2027년에는 치매노인이 100만 명을 넘을 것으로 예상된다.

우리나라의 치매 치료제 시장은 2000년 24억 원에서 2002년 125억 원으로 급성장 함 (보건복지부, 미래 질환별 건강기능식품 용·복합 핵심기술 연구).

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

가. 연구 수행 내용

(1) 연구개발 추진전략 및 방법

- 머위 부산물인 잎을 사용하여 기억력 개선에 효과를 가진 KP-1의 원료표준화, 지표성분 설정, 관련 시험법 개발을 통한 시제품제작

(가) 유효 활성성분 확보 및 분석

- ① KP-1의 유효성분 최적 추출 및 정제 조건 확립
- ② KP-1 제조를 위한 추출조건, 용매, 농도 등 기준 확립
- ③ 성상, 확인시험, 유연물질, 함량시험, 제제균일성, 용출시험법 등 분석법 개발
- ④ LS-MASS, NMR 등을 통한 유효성분 규명

(나) 지표성분 확인 시험법 개발

- ① KP-1에서 확인된 유효성분 외의 타성분 탐색 및 함량시험, 제제균일성, 기능성검증
- ② 가장 우수한 추출물 제조공법을 표준화 및 유효성분 확인
- ③ 제조공법 표준화

(다) KP-1의 preformulation 진행 및 제제 개발

- 캡슐, 정제 중 안정성 및 생산성 등을 고려하여 KP-1 에 적절한 제형 선정

(라) 대량생산 제조 공정 확립

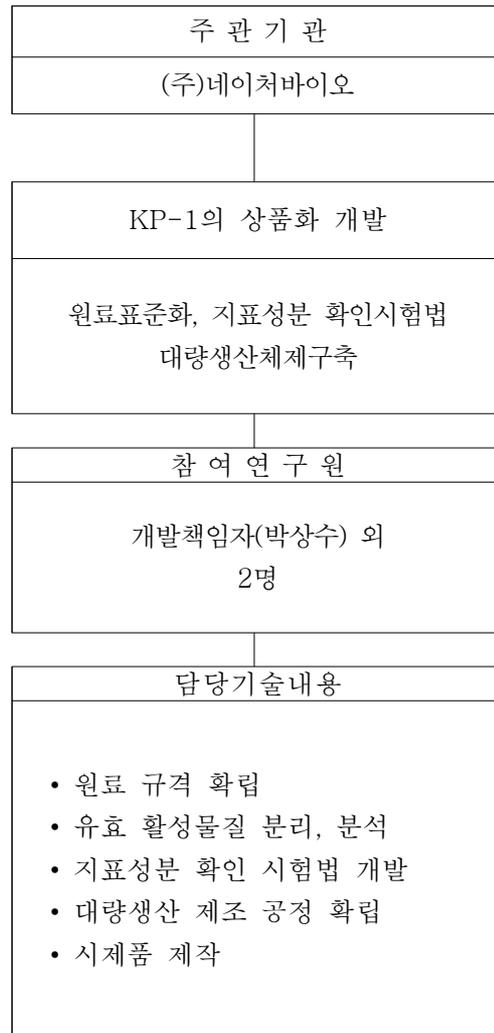
- ① 제조방법을 각 공정단계별로 사용되는 화학물질 및 사용량과 반응조건 등을 고려하여 공정 확립 후 전체 공정도 완성
- ② KP-1의 최종 시제품을 KGMP기준에 의거하여 제작

(마) 지식재산권의 확보

- 신규 출원 건 외의 국내/국외 특허 출원, 신규 성분에 대한 특허 출원

(2) 연구개발 추진체계

KP-1의 원료표준화, 지표성분 검증, 대량생산체제 구축을 통한 기억력 개선 건강기능성 제품 개발



(3) 연구개발 추진일정

1차년도																
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	원료 규격 확립	■	■	■											15,000	박상수
2	유효 활성물질 분리, 분석				■	■	■								20,000	박상수
3	지표성분 확인 시험법 개발							■	■	■					25,000	박상수
4	대량생산 제조 공정 확립										■	■			5,000	박상수
5	시제품 제작												■		5,000	박상수

나. 연구개발성과

(1) 특허성과

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.08.02
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0098111 (접수번호 1-1-2017-0746899-94)
출원인명칭 주식회사 네이처바이오(1-2013-033743-1)
대리인성명 김연권(9-2003-000399-0)
발명자성명 장대식 박상수 김해미 이자연 이진수
발명의명칭 머위 잎으로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 (주)네이처바이오

【연구기간】 2016.08.19 ~ 2017.08.18

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 김연권 (서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 15 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 4 항 319,000 원

【합계】 365,000 원

【감면사유】 소기업(70%감면)[1]

【감면후 수수료】 109,500 원

【첨부서류】 1.중소기업기본법 제2조의 규정에 따른 소기업에 해당함을

증명하는 서류_1통

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

머위 잎으로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법{METHOD OF SEPARATING FUKINOLIC ACID FROM PETASITES JAPONICUS}

【기술분야】

<0001> 본 발명은 머위 잎 추출물로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법에 관한 것이다.

<0002>

【발명의 배경이 되는 기술】

<0003> 푸키놀릭산(fukinolic acid)은 한약재 승마의 유효 성분으로 알려져 있고, 승마는 만성난소염, 자궁내막염, 월경불순, 월경통, 월경과다, 불임 등 부인과 증상 완화와 진통 효과에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 이에, 승마에 함유된 식물성 에스트로겐이 폐경여성의 에스트로겐 대체물로 효과를 나타낼 가능성이 있으나, 아직까지 그에 대한 구체적인 연구는 진행되고 있지 않다.

<0004> 머위(일반명: Butterbur 또는 학명: Petasites japonicus)는 유럽뿐만 아니라 아시아 일부 및 북미에서 발견되는 다년생 관목이다. 머위의 뿌리 및 잎으로부터 분리한 추출물은 2,000년 이상 동안 치료제의 용도로 사용되었다. 오늘날 머위 추출물은 근육을 이완하는데 주로 사용되고, 위장내 복통, 평활근의 경련과 같은 상태에 처치하며, 통증 완화 효과가 있고 또한 두통에도 사용될 수 있다고 보고되었다(Eaton J., Townsend Lett, 2000, 202, 104-106). 또한, 머위는 천식 및 알레

르기성 질환에 대해 치료 효과가 있다고 보고된 바 있다(Thomet OA, Simon HU, Int Arch Allergy Immunol, 2002, 129(2), 108-12).

<0005> 푸키놀릭산은 승마의 지표 성분으로 알려져 있으나 머위 잎에서 순도 높은 푸키놀릭산을 분리하여 상용화한 예는 없었다. 본 발명자들은 머위 잎 추출물에서 상용화되지 않은 푸키놀릭산을 분리하는 데 성공하였고 이를 상용화하여 표준 지표로 사용하거나 지표 성분을 확인하는 용도로 사용하고자 본 발명을 완성하였다.

<0006>

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

<0007> 본 발명의 목적은 (a) 머위 잎에 물을 첨가하여 추출하는 단계; (b) 상기 머위 잎 추출물을 동결 건조하는 단계; (c) 상기 머위 잎 추출물의 동결 건조물에 에탄올을 첨가한 후 침전시키는 단계; (d) 상기 침전물의 상층액을 제거하고 침전물을 동결 건조하는 단계를 포함하는 머위 잎 추출물을 수득하는 단계; (e) 상기 추출물을 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하는 단계; (f) 상기 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하는 단계; 및 (g) 상기 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 라이크로프렙 컬럼 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 푸키놀릭산을 수득하는 방법을 제공하는 것이다.

<0008>

【과제의 해결 수단】

<0009> 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, (a) 머위 잎에 물을 첨가하여 추출하는 단계; (b) 상기 머위 잎 추출물을 동결 건조하는 단계; (c) 상기 머위 잎 추출물의 동결 건조물에 에탄올을 첨가한 후 침전시키는 단계; (d) 상기 침전물의 상층액을 제거하고 침전물을 동결 건조하는 단계를 포함하는 머위 잎 추출물을 수득하는 단계; (e) 상기 추출물을 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하는 단계; (f) 상기 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하는 단계; 및 (g) 상기 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 라이크로프랩 컬럼 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 푸키놀릭산을 수득하는 방법을 제공한다.

<0010> 상기 (c) 단계에서 에탄올은 50% 내지 80% 에탄올인 것을 특징으로 하고, 상온에서 20 내지 30 시간 동안 침전시키는 것을 특징으로 한다.

<0011> 본 발명에서 수득한 푸키놀릭산은 순도 95% 내지 98%인 것을 특징으로 할 수 있다.

<0012> 본 발명에 있어서, 에탄올은 50% 내지 80% 에탄올인 경우에 불필요한 성분이 잘 녹아나게 되고 특히 에탄올 70%에서 머위 잎 물 추출 동결건조품의 불필요한 성분이 잘 녹아나게 되어, 불필요한 성분이 녹아 있는 상층부를 제거하고 침전물만 회수하여 유용한 머위 잎 추출물을 획득할 수 있다. 본 발명에 따르면, 머위 잎을 물 추출하는 단계, 동결 건조하는 단계, 에탄올 추출하는 단계를 순차적으로 거침으로써, 머위 잎의 불필요한 성분을 효과적으로 제거하고 유용한 성분만을 수득할 수 있게 된다.

<0013> 본 발명에 따르면 머위 잎 추출물을 다이아이온 컬럼 크로마토그래피(7.0 × 44.8 cm, Acetone/H₂O=0/10 → 2/8 → 4/6 → 6/4 → 8/2 → 10/0), 세파텍스 컬럼 크로마토그래피(4.5 × 56.2 cm, Acetone/H₂O=2/8), 라이크로프랩 컬럼 크로마토그래피(4.9 × 45.0 cm, Acetone/H₂O=2/8)를 순차적으로 실시함으로써 분리 단계를 줄이고 이를 통해 푸키놀릭산을 수득할 수 있다.

<0014>

【발명의 효과】

<0015> 본 발명에 따르면 머위 잎 추출물로부터 순도 높은 푸키놀릭산을 대량 수득할 수 있고, 이를 상용화된 표준품으로 사용할 수 있다.

<0016>

【도면의 간단한 설명】

<0017> 도 1은 본 발명에 따라 수득한 푸키놀릭산의 NMR 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따라 수득한 푸키놀릭산의 HPLC 크로마토그램 결과를 나타낸 것이다.

도 3 및 4는 본 발명에 따라 수득한 푸키놀릭산의 qNMR 실험 결과를 나타낸 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<0018> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시

에는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<0019>

<0020> **시약 및 기기**

<0021> 다이아이온(Diaion HP-20), 세파덱스(Sephadex LH-20; Amersham Pharmacia Biotech) 및 라이크로프렘(LiChroprep RP-18; Merck, 40-63 m)을 컬럼크로마토그래피에 사용하였다. TLC 분석은 Silica gel 60 glass plates (Merck), Silica gel 60 RP 18 F_{254s}glassplates(Merck)를 이용하였으며, 20% (v/v) H₂SO₄시약 (Aldrich)에 담근 후 110℃에 10분간 발색시켰다. 실험에 사용된 모든 유기용매는 증류한 후 사용하였다. NMR 실험은 JEOL 500 MHz NMR spectrometer로 수행하였으며, 화학식 이동값(chemical shifts)은 잔류 NMR 용매나 TMS를 기준으로 측정하였다.

<0022>

<0023> **실험 재료**

<0024> 분리에 사용된 머위 잎(*Petasites japonicus*)은 물을 첨가하여 환류 추출하고 동결 건조 한 뒤 생기는 파우더를 70% 에탄올에 녹여서 생기는 침전물을 KP-1라 명칭하고 사용하였다.

<0025>

【실시예 1】

<0026> **머위 잎 추출물(KP-1)의 제조 및 성분 분리**

<0027> 4 배수의 물을 첨가하여 4시간 동안 100℃ 에서 추출한 뒤 추출물을 동결 건조시켜 동결 건조품(250 g)을 수득하였다(머위 잎 대비 25%). 그 다음, 파우더 형태의 머위 잎 추출물 동결 건조품에 70% 에탄올을 첨가하여 24 시간 동안 상온에서 용출시켰다. 불필요한 물질이 녹아있는 상층부를 제거하고 머위 잎 추출물만 남아 있는 침전물을 회수하여 동결 건조하여 동결건조품(200g)을 수득하였다(물 추출 동결건조품 대비 80%). 침전물(KP-1) 100g에 대하여 Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피(7.0 × 44.8 cm, Acetone/H₂O=0/10→ 2/8 → 4/6 → 6/4 → 8/2 → 10/0)를 실시하여 15개의 분획물(F1-F15)로 분리하였다. 이 중 분획물 F6(6.9 g)에 대하여 세파텍스 컬럼크로마토그래피(4.5 × 56.2 cm, Acetone/H₂O=2/8)를 실시하여 9개의 소분획물(F6-1-F6-9)로 나누었다. 소분획물 F6-5(1.7 g)을 라이크로프렙 컬럼크로마토그래피(4.9 × 45.0 cm, Acetone/H₂O=2/8)를 실시하여 화합물 1(510 mg)을 분리하였다.

<0028>

【실시예 2】

<0029> **NMR 실험을 통한 화합물 1의 구조 확인**

<0030> 화합물 1을 NMR(Varian 500 MHz)을 통해 화합물 1의 구조를 확인하였다(도 1).

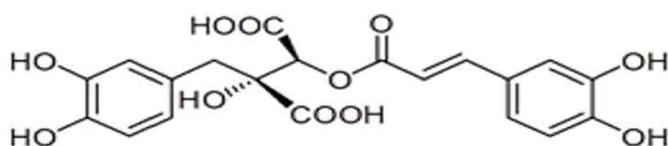
<0031> 푸키놀릭산(Fukinolic acid)- Brownish yellow powder;

<0032> $^1\text{H-NMR}(500\text{MHz}, \text{D}_2\text{O}) \delta$ 2.84/2.88 (2H, d, $J = 14.0$ Hz, H-3), 3.36 (1H, s, H-2), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$, H-2'), 6.62 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5' ' '), 6.93 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6' ' '), 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2' ' '), 7.53 (1H, d, $J = 16.0$, H-3' ' ');

<0033> $^{13}\text{C-NMR}(125\text{MHz}, \text{D}_2\text{O}) \delta$ 40.3 (C-4), 79.3 (C-2), 80.4 (C-3), 114.1 (C-2'), 115.0 (C-2' ' '), 115.7 (C-5'), 116.0 (C-5' ' '), 118.2 (C-2'), 122.7 (C-6' ' '), 122.8 (C-6'), 126.9 (C-1' ' '), 129.1 (C-1'), 142.5 (C-4'), 143.2 (C-3'), 144.1 (C-3' ' '), 146.4 (C-3' ' '), 147.0 (C-4' ' '), 168.9 (C-1' ' '), 174.0 (C-1), 177.3 (C-5).

<0034>

<0035> [화합물 1]



<0036>

<0037>

【실시예 3】

<0038> **HPLC 실험**

<0039> 표준물질 5mg을 정밀하게 달아 25mL 정용 플라스크에 증류수를 넣어 용해한

후 적정 농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 시험용액의 체조를 위해 시료를 적절히 취한 후 100mL 정용 플라스크에 넣고 증류수를 넣은 후 30분 동안 초음파 추출하였다. 초음파 추출물을 방냉한 후 증류수로 표선까지 맞추고 0.45um PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 기기분석 조건은 다음과 같다:

<0040> 【표 1】

기기(Instrument)	HPLC																																	
검출기(Detector)	UV (DAD)																																	
파장(Wavelength)	330nm																																	
컬럼(Column)	Supelco C18 (5um, 4.6*250mm)																																	
이동상(Mobile Phase)	A: 0.1% Formic acid in DW B: 0.1% Formic acid in Acetonitrile																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>A용액(%)</th> <th>B용액(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>10</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>15</td><td>85</td><td>15</td></tr> <tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>25</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>35</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>45</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>47</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>53</td><td>95</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	시간(분)	A용액(%)	B용액(%)	0	95	5	10	95	5	15	85	15	20	80	20	25	75	25	30	60	40	35	5	95	45	5	95	47	95	5	53	95	5
시간(분)	A용액(%)	B용액(%)																																
0	95	5																																
10	95	5																																
15	85	15																																
20	80	20																																
25	75	25																																
30	60	40																																
35	5	95																																
45	5	95																																
47	95	5																																
53	95	5																																
유량(Flow rate)	0.8mL/min																																	
주입용량(Injection volume)	10µL																																	
실행 시간(Run Time)	53min																																	
컬럼 온도(Column temperature)	25℃																																	

<0041> 계산식:

$$\text{푸키놀릭산(Fukinolic acid)(mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/mL)} \times \text{시험용액전량(mL)} \times \text{표준품 순도} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

<0042>

<0043> 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 피크(peak)가 1개로 검출되는 것으로 보아, 불순물이 함유되지 않은 채로 푸키놀릭산이 순수하게 분리된 것을 확인할 수

있었다.

<0044>

<0045> [실시예 4]

<0046> **qNMR 실험**

<0047> 푸키놀릭산의 순도를 확인하기 위하여 qNMR(Varian NMR system 500MHz, VnmrJ 2.2 for acquisition, mNova 9.0 for processing) 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이 순도(97.37%) 높은 푸키놀릭산을 수득할 수 있었다.

<0048>

【청구범위】

【청구항 1】

- (a) 머위 잎에 물을 첨가하여 추출하는 단계;
- (b) 상기 머위 잎 추출물을 동결 건조하는 단계;
- (c) 상기 머위 잎 추출물의 동결 건조물에 에탄올을 첨가한 후 침전시키는 단계;
- (d) 상기 침전물의 상층액을 제거하고 침전물을 동결 건조하는 단계를 포함하는 머위 잎 추출물을 수득하는 단계;
- (e) 상기 추출물을 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하는 단계;
- (f) 상기 다이아이온 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하는 단계; 및
- (g) 상기 세파텍스 컬럼 크로마토그래피하여 얻은 용출액을 라이크로프랩 컬럼 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 푸키놀릭산을 수득하는 방법.

【청구항 2】

- 제 1항에 있어서,
상기 에탄올은 50% 내지 80% 에탄올인 것을 특징으로 하는 머위 잎 추출물로 부터 푸키놀릭산을 수득하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

상기 (c) 단계는 상온에서 20 시간 내지 30 시간 동안 침전시키는 것을 특징으로 하는 머위 잎 추출물로부터 푸키놀릭산을 수득하는 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

상기 수득한 푸키놀릭산은 순도 95% 내지 98%인 것을 특징으로 하는 머위 잎 추출물로부터 푸키놀릭산을 수득하는 방법.

【요약서】

【요약】

본 발명은 머위 잎 추출물로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 머위 잎 추출물로부터 순도 높은 푸키놀릭산을 대량 수득할 수 있고, 이를 상용화된 표준품으로 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【요약서】

【요약】

본 발명은 머위 잎 추출물로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 머위 잎 추출물로부터 순도 높은 푸키놀릭산을 대량 수득할 수 있고, 이를 상용화된 표준품으로 사용할 수 있다.

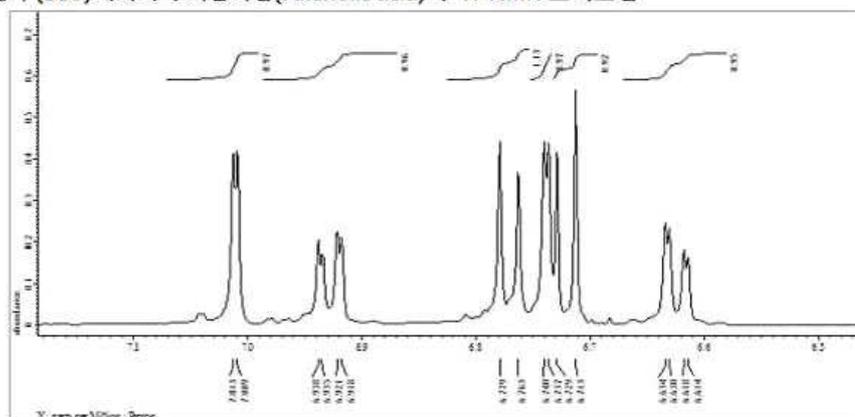
【대표도】

도 1

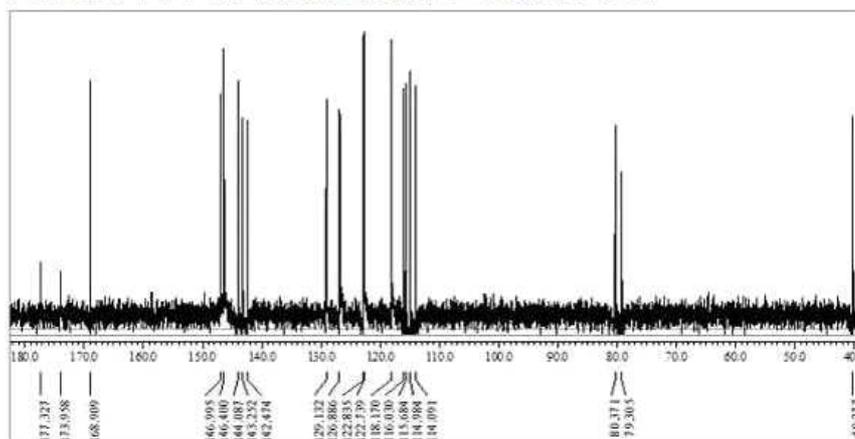
【도면】

【도 1】

중수(D₂O)에서의 푸키놀릭산(Fukinolic acid)의 ¹H-NMR 스펙트럼

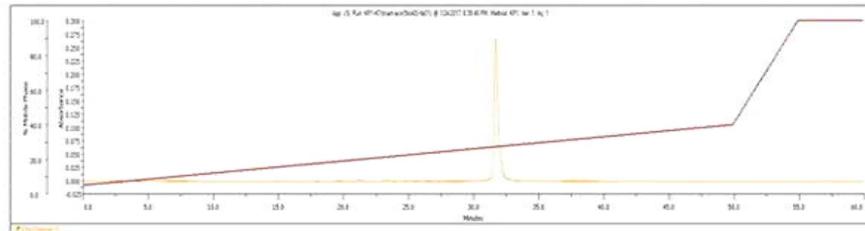


중수(D₂O)에서의 푸키놀릭산(Fukinolic acid)의 ¹³C-NMR 스펙트럼



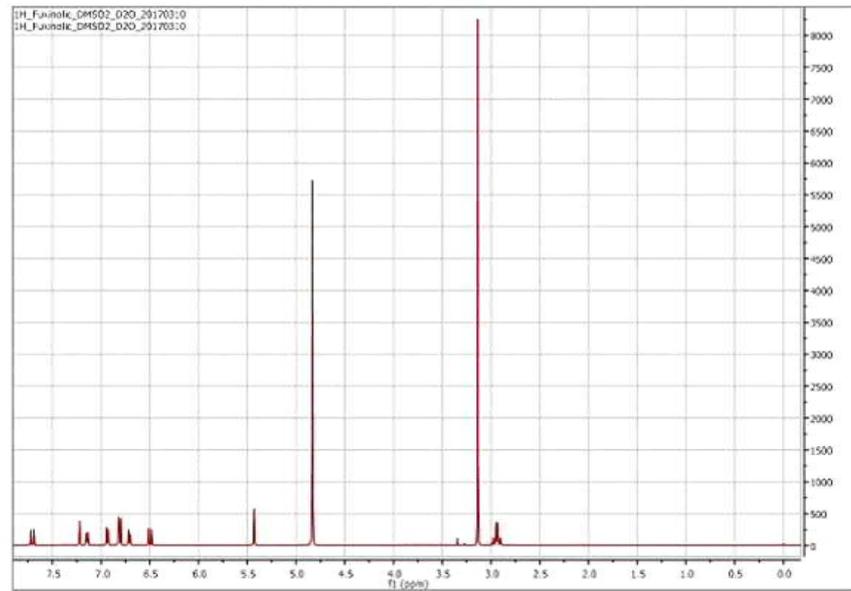
【도 2】

푸키놀릭산(Fukinolic acid)의 HPLC 크로마토그램



【도 3】

중수(D₂O)에서의 푸키놀릭산(Fukinolic acid)의 qNMR 스펙트럼
푸키놀릭산(Fukinolic acid)(3.4 mg)+DMSO₂(1.1mg)



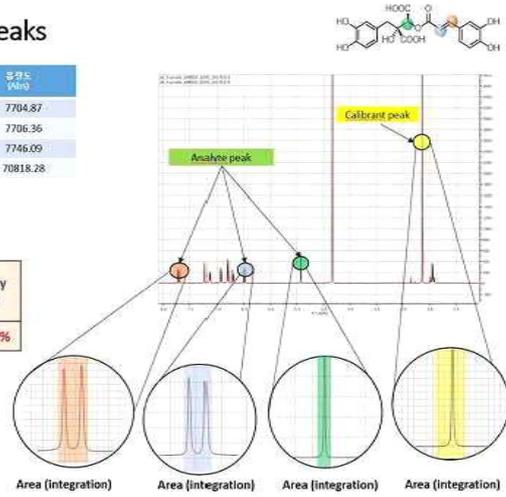
【도 4】

qNMR_Combine 3 selected peaks

푸기놀릭산 (Fukinolic acid)	화학식 비중량 (ppm)	중량도 (Wt%)
푸기놀릭산 (fukinolic acid)	5.43	7704.87
	6.52	7706.36
	7.73	7746.09
DMSO ₂	3.14	70818.28

$$Content[\%] = \frac{n_c \times Int_c \times MW_f \times m_c}{n_f \times Int_f \times MW_c \times m_f} \times P_c$$

DMSO ₂ (mg)	Fukinolic acid (mg)	Gravimetric Molar Ratio	qHNMR Molar Ratio	Purity (%)
1.1	3.4	1.4929	0.6540	97.37%



(2) 기술요약정보

[별지 13의2]

기술실시보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	고부가가치 식품기술개발사업		연구과제번호	116044-1	
	연구과제명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품개발				
	연구기관명	(주)네이처바이오	연구책임자	박상수	참여기업명	
	연구협약일	2016.08.19	연구기간	2016.08.19.~2017.08.18		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계	
	50,000	2,000		70,000		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	머위 잎 추출 분말				
	계약(활용)일	2017.03.20	실시(활용)기간	2017.03.20.~2020.03.19		
	지재권 종류	-	실시권 유형	직접실시		
	* 지재권이 특히(출원,등록) 인 경우	명 칭	-			
		번호	-	일 자	-	
	실시(활용)기관	기관명	(주)네이처바이오		기관유형	중소기업
		주 소	서울동대문구 경희대로 26 경희대학교 푸른솔문화관 132호		대 표 자	박상수
		사업자번호	416-81-81755		전화번호	02-965-0122
부서(담당자)		박상수		e-mail	x-zara@nate.com	
기술료산정내역	정부출연금의 10%에서 농림수산식품과학기술 육성법 시행령 제 14조 3항에 의한 직접실시에 의한 80% 감면					
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	착수기분료	정수(납부)예정일 정수(납부)금액		
	2017.12.31	1,000,000	매출에 따른 기술료	정수(납부)시작일	결산월	
				정수(납부)종료일	정수율	
	계	1,000,000			매출액의 ()%	
기타특기사항						
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시), 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시), 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p>2017년 03월 17일 주관연구기관 (주)네이처바이오 의 대표 [] 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>						

[별지 12]

실시기업 의견서

실 시 기 업	(주)네이처바이오		대표자	박상수
사업자등록번호	416-81-81755		과학기술인 등록번호	1110 2990
기 업 유 형	<input type="checkbox"/> 대기업 <input checked="" type="checkbox"/> 중소기업 <input type="checkbox"/> 농업인(단체) <input type="checkbox"/> 기타()		업 태	서비스, 제조
			종 목	연구개발, 건강식품
창 업 일 시	2012.01.31	조직 및 인원	기업부설연구소/3명	
사업장주소	서울 동대문구 경희대로 26 경희대학교 푸른솔문화관 132호		담당자	박상수
			연락처/팩스	02-965-0122/02-966-0122
자 본 금	60백만원	연간매출액	449백만원	
주생산제품	건강기능성소재			
이전희망기술	머위추출분말			
기 술 료 감 면 사 유	제14조(기술료의 감면) ① 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 법 제7조제1항 단서에 따라 다음 각 호와 같이 기술료를 감면한다. <개정 2013.3.23., 2013.12.11.> 3. 「중소기업기본법」 제2조에 따른 중소기업: 70퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업의 경우 80퍼센트)			
이 전 기 술 활 용 계 획	머위 잎 추출분말 원료 공급			
<p>귀 기관에서 수행한 과제의 기술에 대해 기술료 감면을 통한 기술이전을 받고자 상기와 같이 의견을 제출합니다.</p> <p>첨 부 1. 사업자등록증 사본 1부 2. 중소기업임을 증명할 수 있는 서류 1부. 끝.</p> <p style="text-align: center;">2017년 03월 17일</p> <p style="text-align: right;">실시기업의 대표자 : 박상수 </p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 귀하</p>				

기술료 감면 신청서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사 업 명	고부가가치 식품기술개발사업		연구과제번호	116044-1		
	연구과제명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품개발					
	연구기관명	(주)네이처바이오	연구책임자	박상수	참여기업명		
	연구협약일	2016.08.19	연구기간	2016.08.19.~2017.08.18			
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ()	계		
	50,000	2,000		70,000			
기술실시내용	성과활용명	머위잎 추출분말		실시(활용)기간	(주)네이처바이오		
	지재권 종류			실시권 유형	직접 실시		
	* 지재권이 출원(등록)인 경우	명 칭	없음				
		번호	-		일 자	-	
	실시기관	기관명	(주)네이처바이오		기관유형	중소기업	
		주 소	서울 동대문구 경희대로 26 경희대학교 푸른솔문화관 132호		대 표 자	박상수	
		사업자번호	416-81-81755		전화번호	02-965-0122	
부서(담당자)		박상수		e-mail	x-zara@nate.com		
기술료 감면	감면근거	농림수산물식품과학기술 육성법 시행령 제 14조 3항		기술료 납부예정일	2017.12.31		
	감면사유 및 내용	제14조(기술료의 감면) ① 농림축산식품부장관 또는 해양수산부장관은 법 제7조제1항 단서에 따라 다음 각 호와 같이 기술료를 감면한다. <개정 2013.3.23., 2013.12.11.> 3. 「중소기업기본법」 제2조에 따른 중소기업: 70퍼센트(해당 연구과제에 참여한 기업의 경우 80퍼센트)					
	감면금액 산출내역	정부출연금 10% = 5,000,000원 의 감면 80%, 1,000,000원					
<p>농림축산식품부 소관 연구개발사업 운영규정 제35조 제9항에 따라 위와 같이 기술료 감면신청서를 제출합니다.</p> <p>붙임 1. 연구개발과제 개요 1부. 2. 연구계획서 또는 연구결과보고서 등 1부. 3. 지식재산권을 포함하는 기술실시인 경우 해당 증빙자료(특히 등록증, 출원증 등) 1부.</p> <p style="text-align: center;">2017년 03월 17일</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관 (주)네이처바이오 의 대표 농림수산물식품기술기획평가원장 귀하</p>							

[양식 해설]

다. 연구결과

(1) 세부 연구결과

(가) 원료 표준화

① 제형 결정, 제제개발 및 제조방법 확립

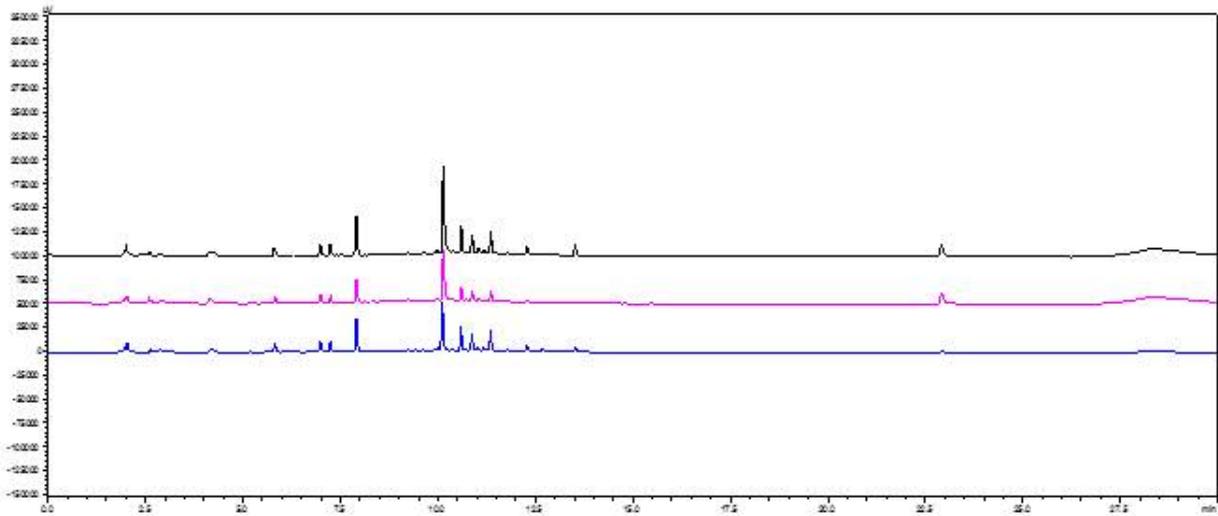
- 200 mg의 KP-1이 함유된 500 mg 캡슐 제형
- 주성분: 머위 잎 추출물
- 제형: 베이지색 캡슐
- 중량: 500 mg/캡슐
- 보관방법: 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피하고 건조한 곳에 실온보관
- 섭취방법: 1일 1회, 1회 1캡슐 섭취
- 성분 배합비



구분	원료명	배합비율 (%)	함량 (mg)
주 원료	머위 잎 추출분말	50.00	200.00
부 원료	유당	48.00	192.00
	이산화규소	1.0	4.0
	스테아린산 마그네슘	1.0	4.0
합 계		100.00	400.0

- ② 제조법 Scale-up 실시
 - KP-1의 각 배치별 성분 함량 변화 측정으로 Scale-up

UPLC Chromatogram (각 배치 별 성분 변화 측정으로 제조법 확립)

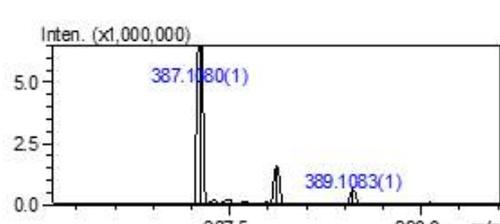
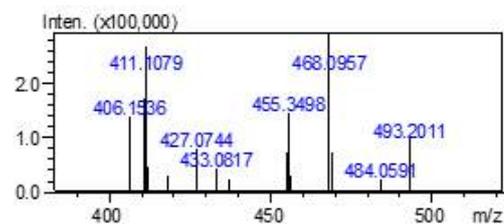
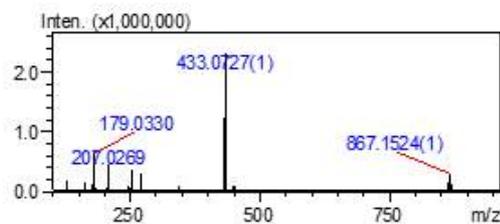
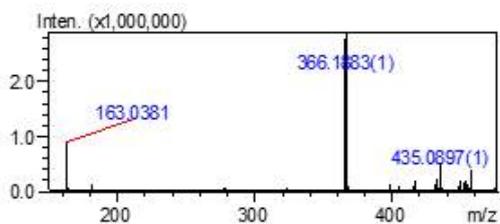
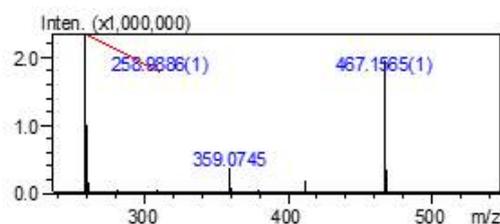
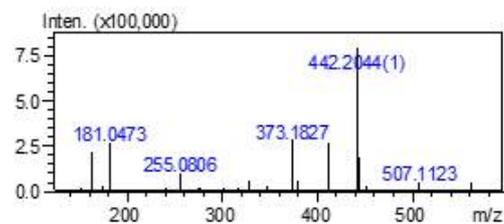
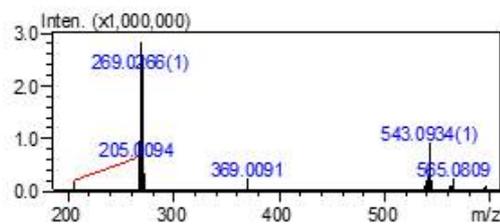
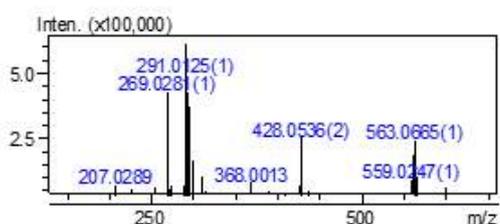
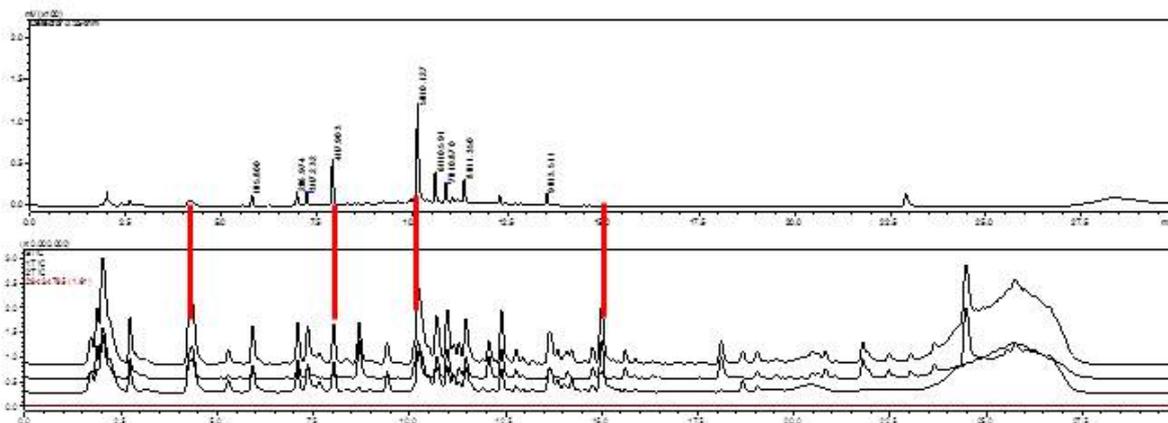


UPLC condition
 Solvent B = 0.1% formic acid in water
 Solvent A = Acetonitrile
 Mobile phase

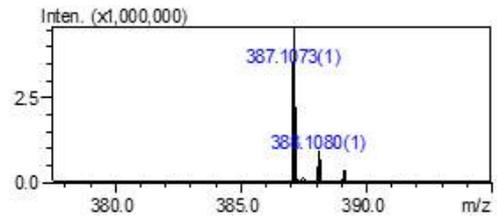
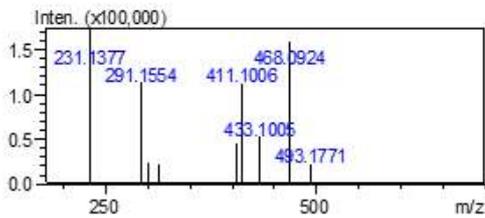
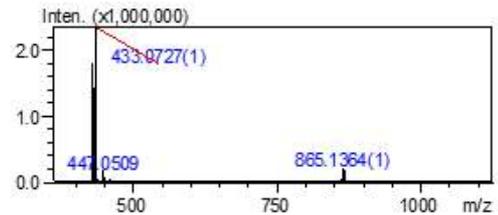
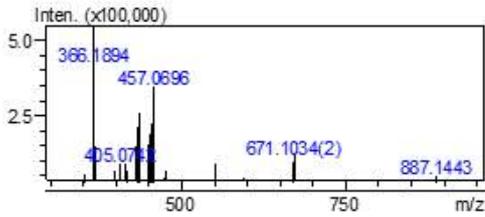
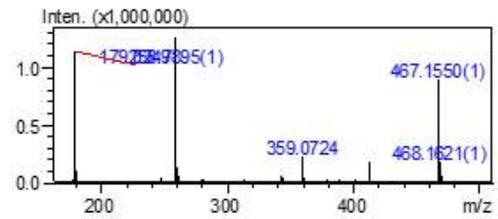
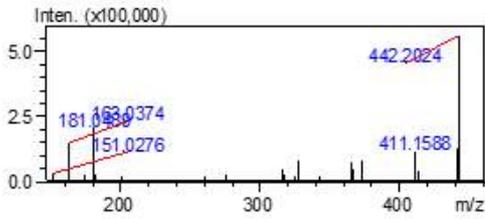
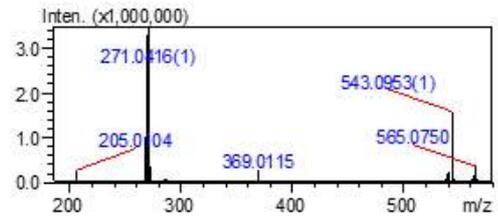
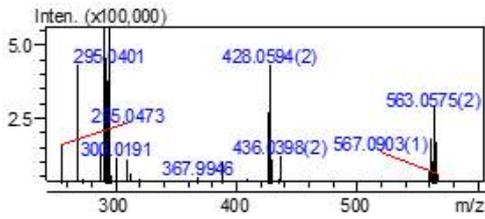
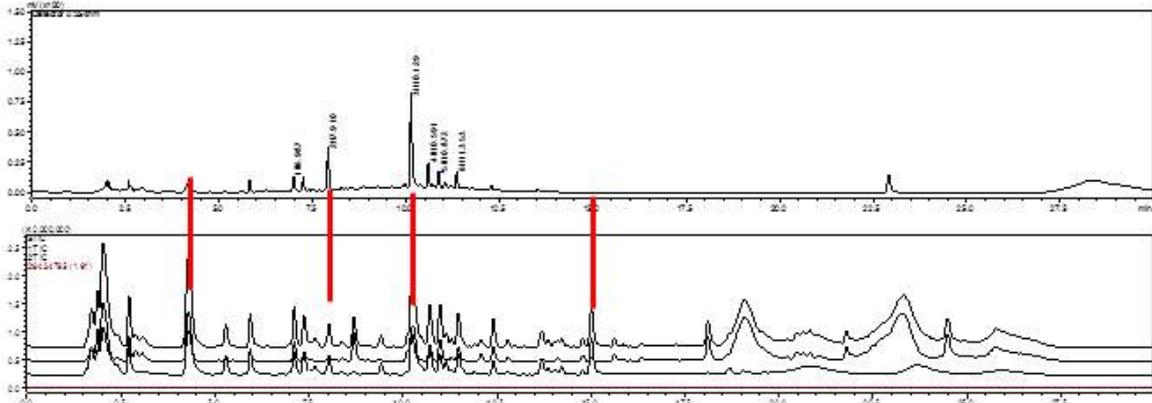
Time (min)	A (%)	B (%)
0	5	95
20	60	60
24	60	60
25	5	95
30	5	95

Column :
 Column oven : 40°C
 Wave length : 254nm
 Ionization module : ESI

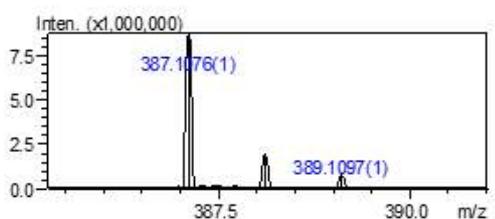
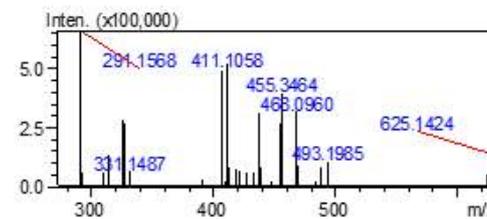
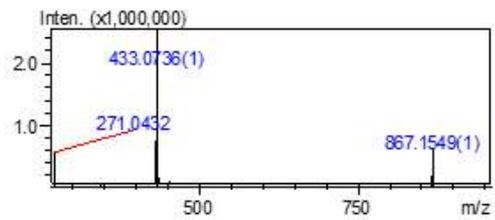
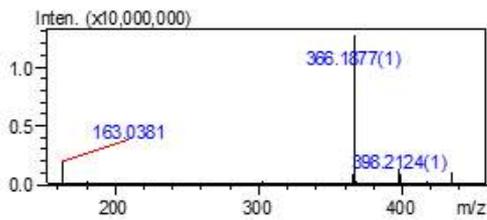
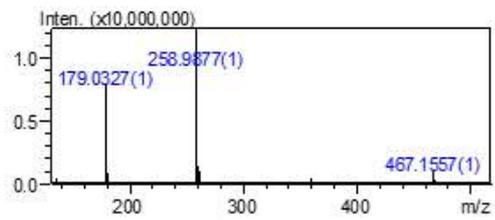
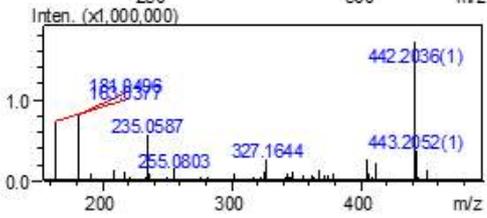
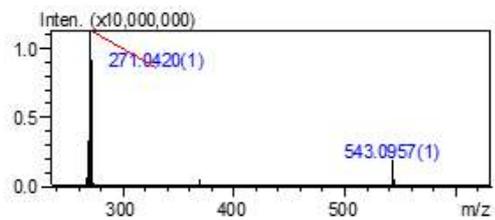
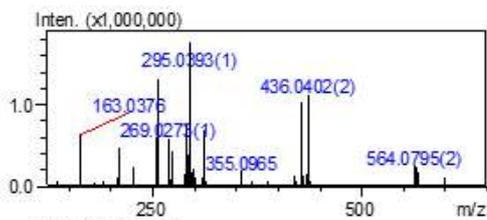
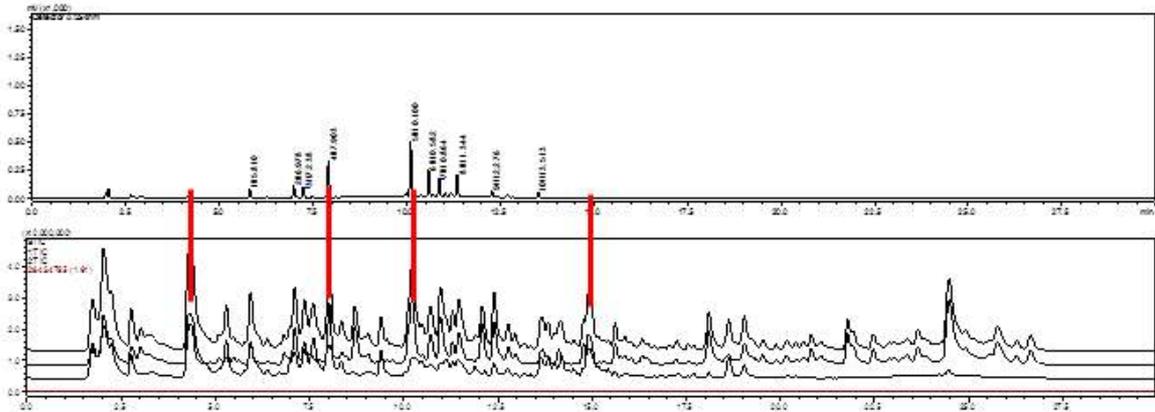
1차 MS data



2차 MS data



3차 MS data



③ 전체 공정도 완성

- 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건이 안정적인 공정도 완성

Yield of samples by using various treatments. (Sample 4 = 머위 잎 추출물 KP-1)

Sample #	Yield (%)	Treatment		
		Extraction	Separation method	Separation
Sample 1	0.3	Ethanol	Separatory Funnel	Butanol - eluted fraction
Sample 2	5.4	Water	Precipitation in ethanol at -25°C	Supernatant
Sample 3	6.2	Water	Precipitation in ethanol at room temperature	Supernatant
Sample 4	12.7	Water	Precipitation in ethanol at room temperature	Sediment
Sample 5	79.1	Water	Hp-20 resin column	Water- eluted fraction
Sample 6	18.3	Water	Hp-20 resin column	Ethanol- eluted fraction

*KP-1은 샘플 4의 제조공법으로 개발되었으며, 신경세포보호효과에서 가장 우수한 활성을 보임.

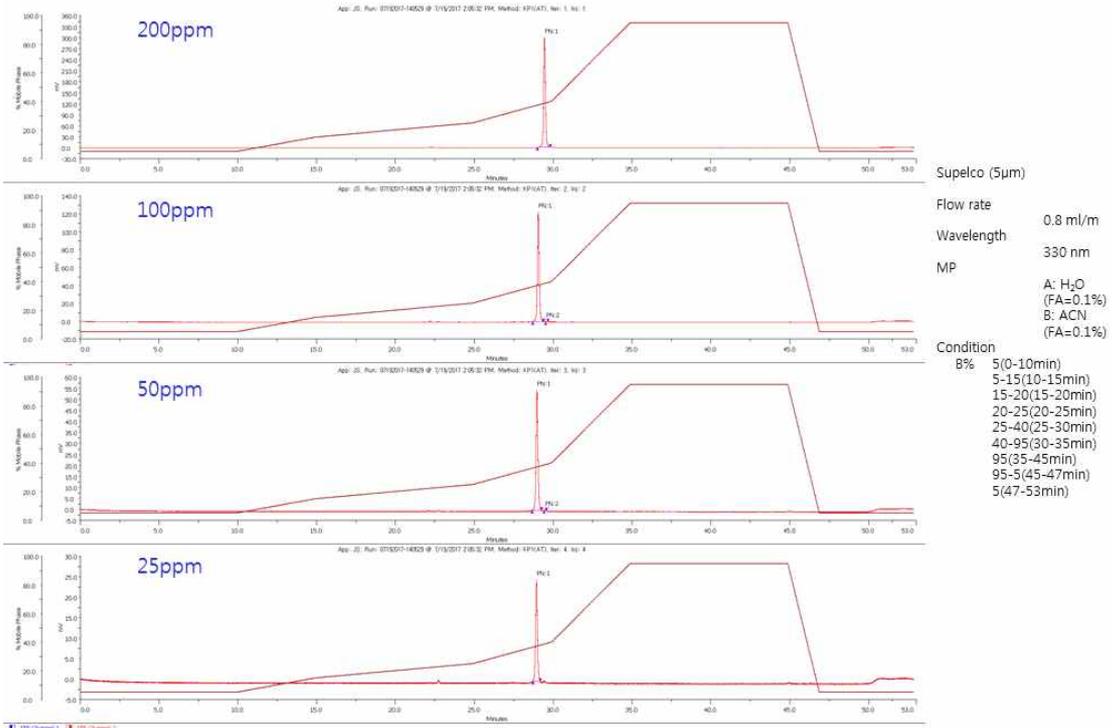
• 머위 잎 추출물(KP-1) 전체 공정도



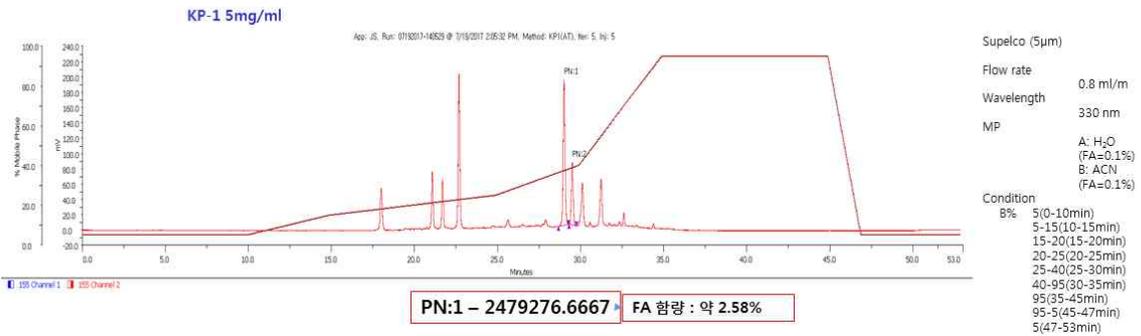
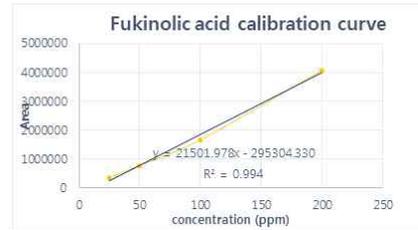
④ 제조법 확립

- 대량생산 체제 구축 시 지표성분 함유량을 측정하여 제조공법 확립

지표성분인 Fukinolic acid 의 농도별 분석



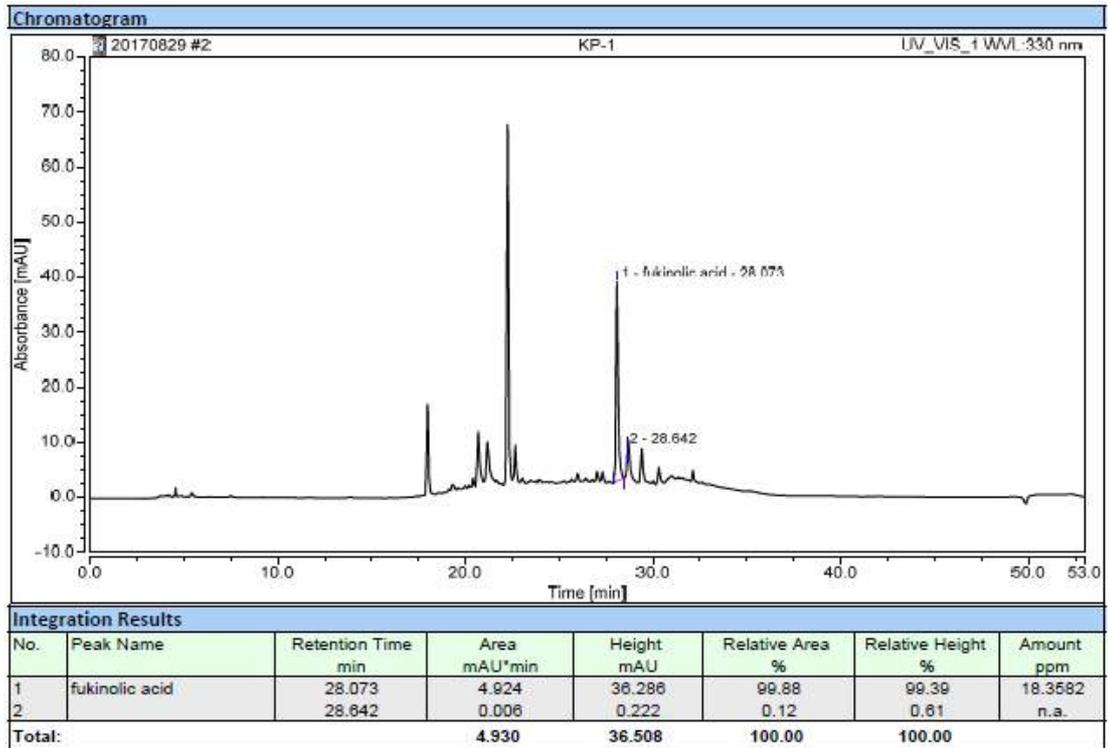
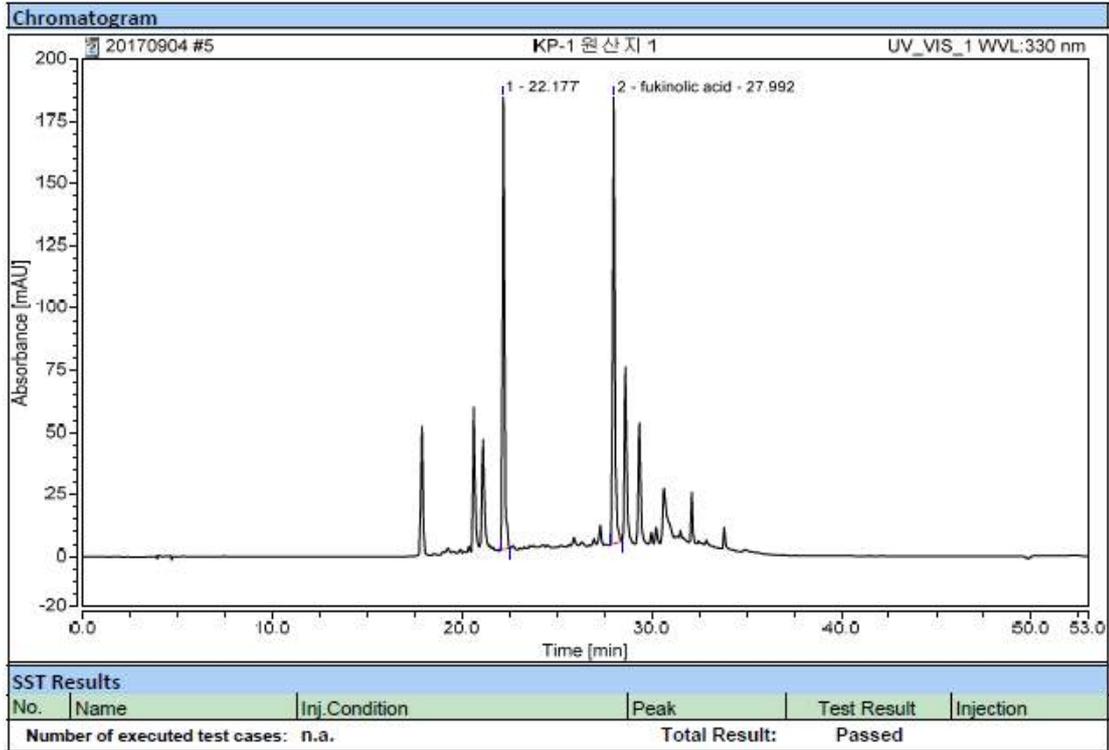
Fukinolic acid				
농도(ppm)	200	100	50	25
Area				
experimental	4082401.6667	1674605.4167	779486.6667	346630.8333

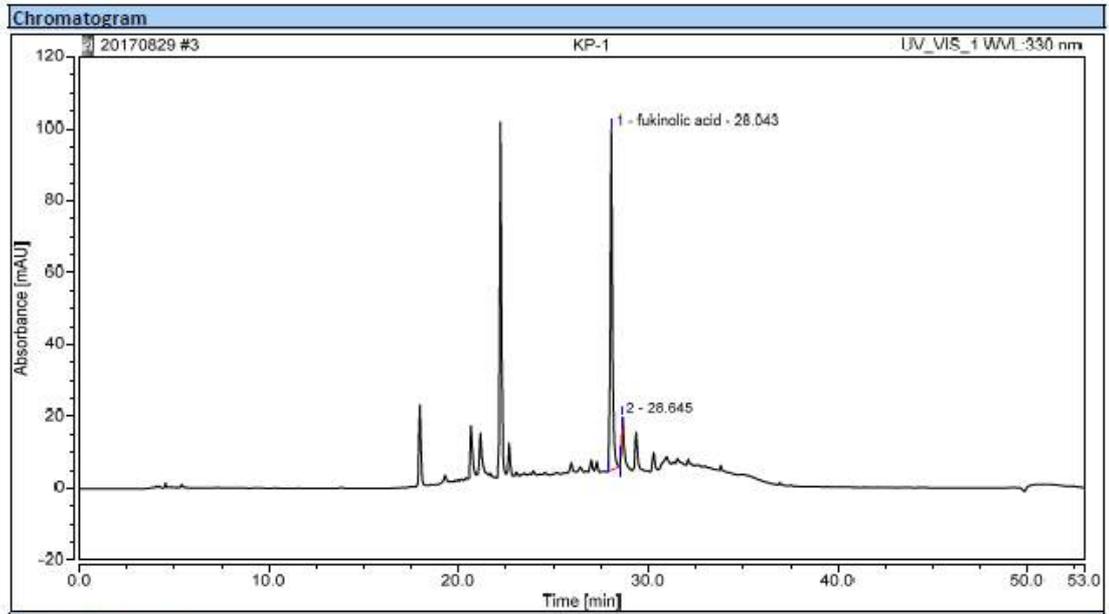


PN:1 - 2479276.6667 ▶ FA 함량 : 약 2.58%

⑤ 산지별, 시기별 지표성분 함량 연구로 원료 표준화

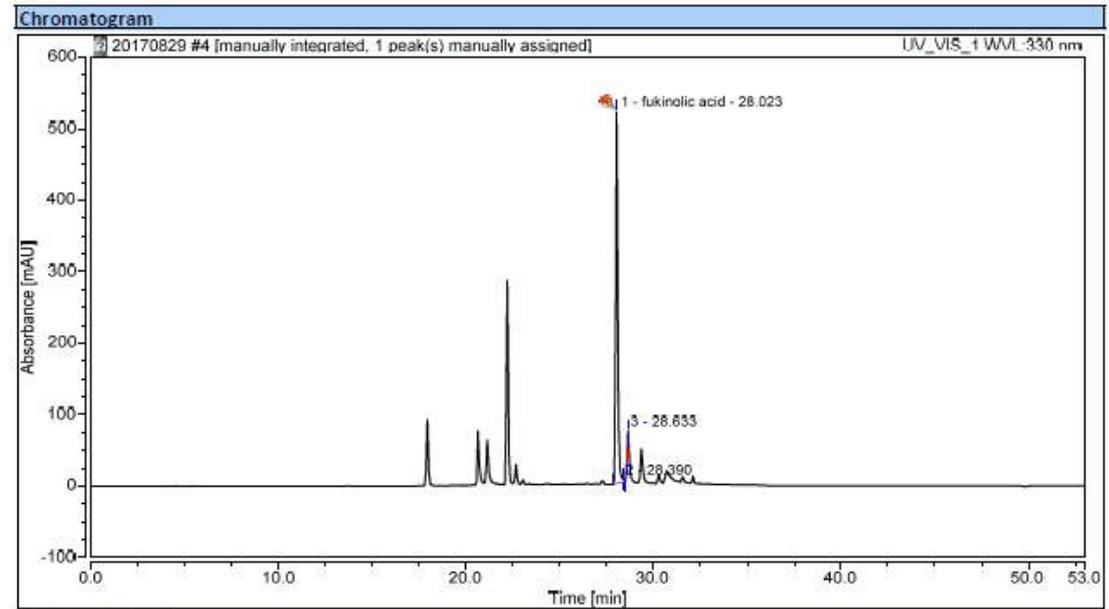
-전남 여수 산 노지재배를 KP-1으로 제작하고, 산지별, 시기별로 정량 분석하여 원료 표준화 데이터를 확보함





Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	fukinolic acid	28.043	12.294	94.772	98.82	98.33	38.1546
2		28.645	0.146	1.608	1.18	1.67	n.a.
Total:			12.441	96.380	100.00	100.00	



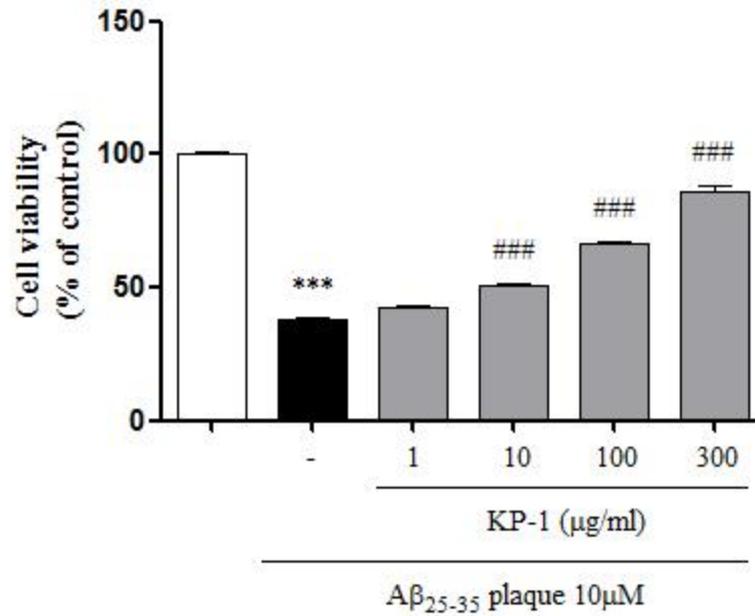
Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	fukinolic acid	28.023	62.552	521.809	97.57	98.05	173.1542
2		28.390	0.223	2.703	0.35	0.50	n.a.
3		28.633	1.337	18.789	2.09	3.46	n.a.
Total:			64.112	543.081	100.00	100.00	

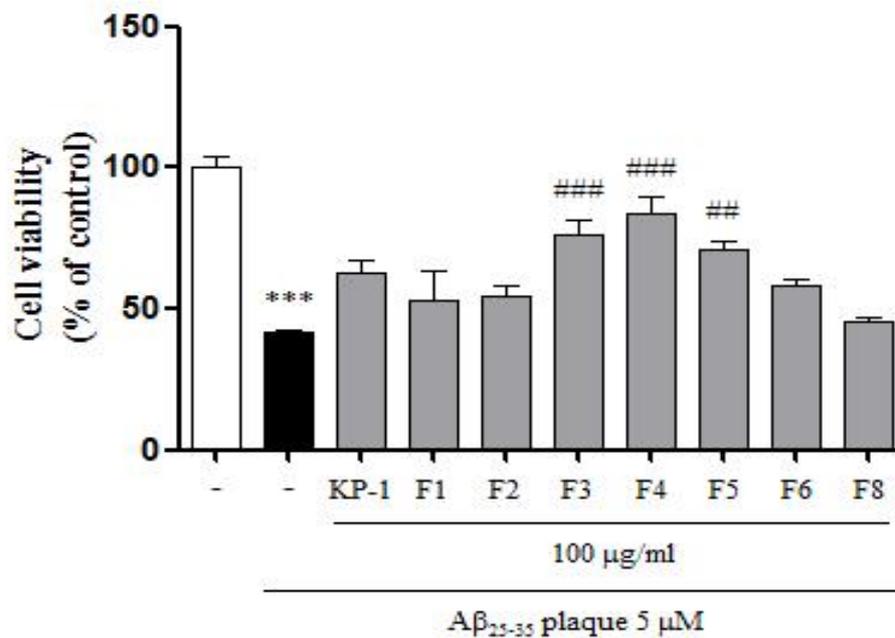
(나) 유효 활성물질 분리 및 분석

① KP-1의 유효성분 확인 및 기능성 탐색

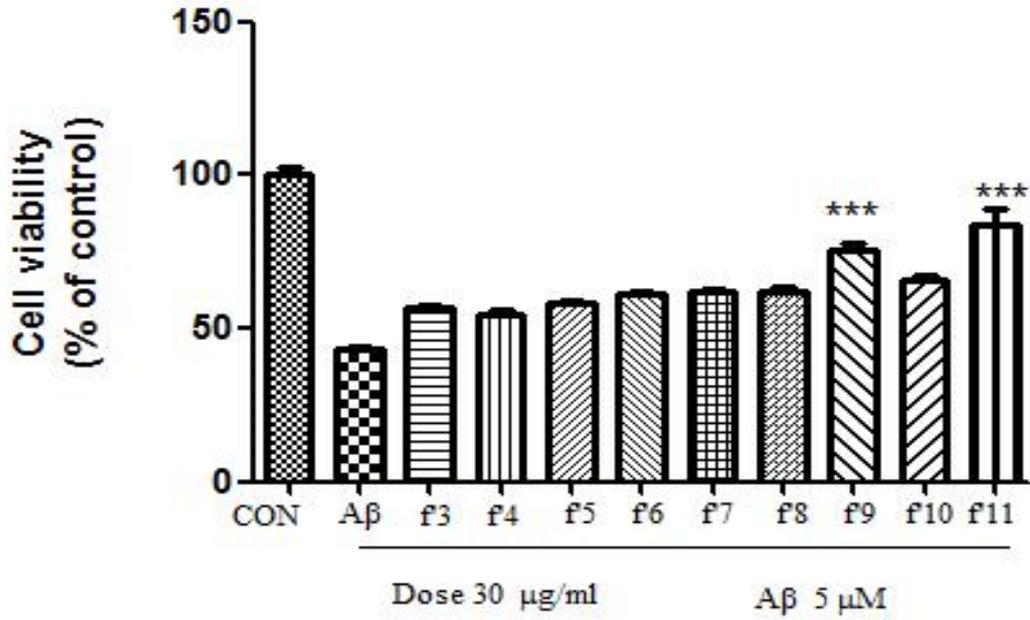
- KP-1의 농도별 신경세포 보호효과 확인 결과 80%이상 보호 효과가 확인됨



- KP-1의 유효성분 탐색을 위해 DIAION HP-20으로 분리 후 신경보호효과 탐색

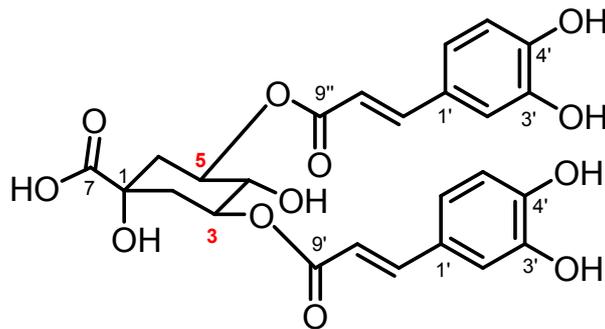


- 가장 활성이 좋은 분획을 KP-1F4 명명

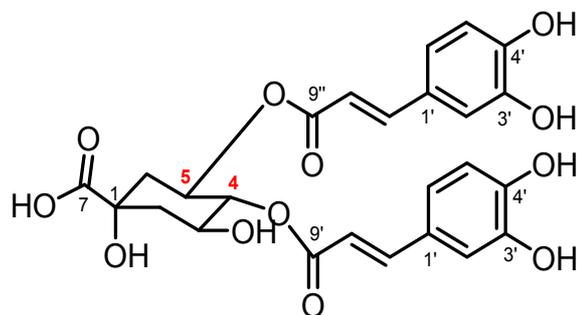


- KP-1F4f9, KP-1F4f11에서 가장 우수한 활성이 확인되어 유효성분 정제

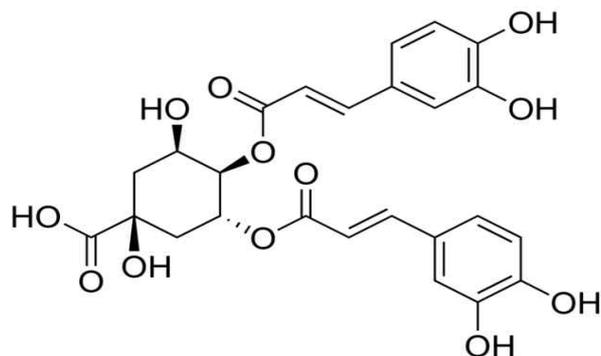
3,5-di-O-caffeoylquinic acid



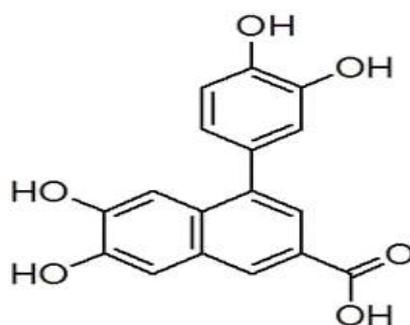
4,5-di-O-caffeoylquinic acid



3,4-di-O-caffeoylquinic acid



6,7-dihydroxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)naphthalene-2-carboxylic acid



② 지표성분인 Fukinolic acid의 안정성 테스트 진행 중

- fukinolic acid의 안정성 시험 - 안정성 시험 결과표 (표준품 유통기간설정)

Temp.	Conc. (mg/mL)	Observed conc. (µg/mL)												Average	SD	Accuracy (%)	
		0 day	1 day	3 day	5 day	7 day	2 week	3 week	4 week	2 month	3 month	4 month	5 month				6 month
25 °C	1																
37 °C																	

- Fukinolic acid (표준품)

* SD:표준편차(Standard Deviation)

-> 분석 할 때마다 1mg씩 취해서 분석

- KP-1(원료, 비교대상)

Temp.	Conc. (mg/mL)	Observed conc. (µg/mL)												Average	SD	Accuracy (%)	
		1 day	3 day	5 day	7 day	2 week	3 week	4 week	2 month	3 month	4 month	5 month	6 month				
4 °C	5																

-> 분석 할 때마다 5mg씩 취해서 분석

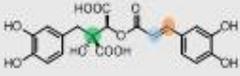
-> Fukinolic acid와 KP-1을 한 cycle로 분석

-> HPLC하여(기존에 분석했던 조건) 함량변화 확인(위의 표)

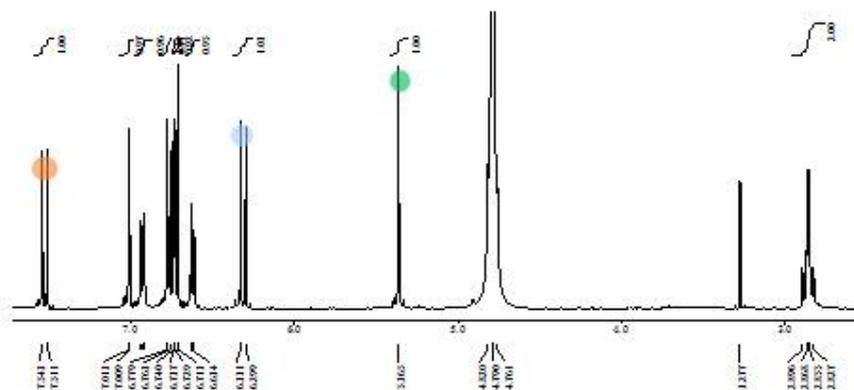
-> 온도당 검체수 : n=3

- ③ 유효 활성성분 분리 및 특징
 - 지표 성분인 Fukinolic acid를 순도 97.37%로 분리

Fukinolic acid

Structure	Name	Fukinolic acid
	CAS no.	30982-40-6
	Empirical formula (MW)	C ₁₂ H ₁₄ O ₁₁ (MW 434.35)
	Solvent	D ₂ O
	Property	Yellow powder

Peak selection



Reference: Takahira Masayuki et al., Three new fukic acid esters, cimicifugic acids A, B and C from Cimicifuga simplex (WRWISK), Chem. Pharm. Bull., 1992, 40, 262-265.

MATERIALS

- Machine and Program
 - Varian NMR systems 500 MHz, VnmrJ 2.2 (for acquisition)
 - mNova 9.0 for data processing
- Calibrant and and target analyte
 - Calibrant: DMSO₂(99.73%)
 - Target analyte: Fukinolic acid
 - Solvent: D₂O

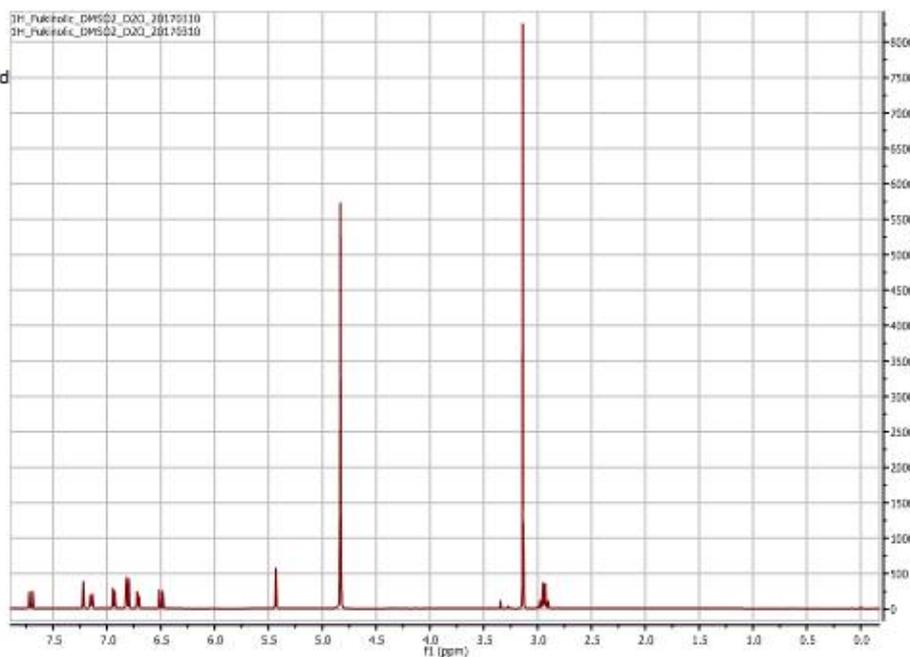
PARAMETER

☐ Proton NMR

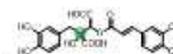
- Relaxation delay (D1): 60s
- Acquisition time: 2.049 sec
- Receiver gain: Automatic
- Number of scan(NS): 64
- Observe Pulse: 45°
- Spin: No spin
- Temperature: 20°C
- D₂O was selected as NMR solvent

qNMR

□ Sample: 3.4 mg Fukinolic acid + 1.1 mg DMSO₂



qNMR_Select peak 5.43 ppm

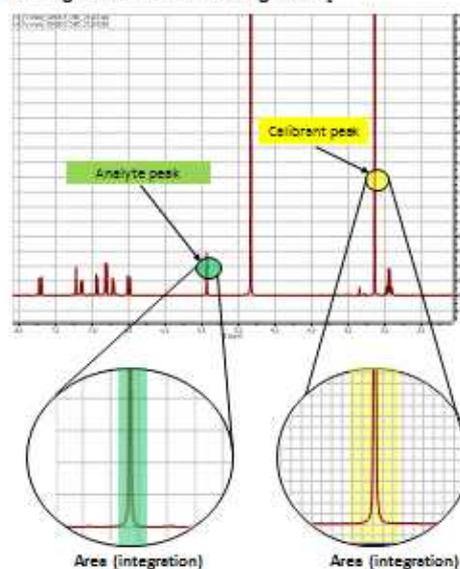


□ Sample: 3.4 mg Fukinolic acid + 1.1 mg DMSO₂

	Chemical shift (ppm)	Abt
Fukinolic acid	5.43	7704.87
DMSO ₂	3.14	70818.28

$$\text{Content [\%]} = \frac{n_C \times \text{Int}_i \times MW_i \times m_C}{n_i \times \text{Int}_C \times MW_C \times m_i} \times P_C$$

DMSO ₂ (mg)	Fukinolic acid (mg)	Gravimetric Molar Ratio	qHNMR Molar Ratio	Purity (%)
1.1	3.4	1.4929	0.6528	97.19%



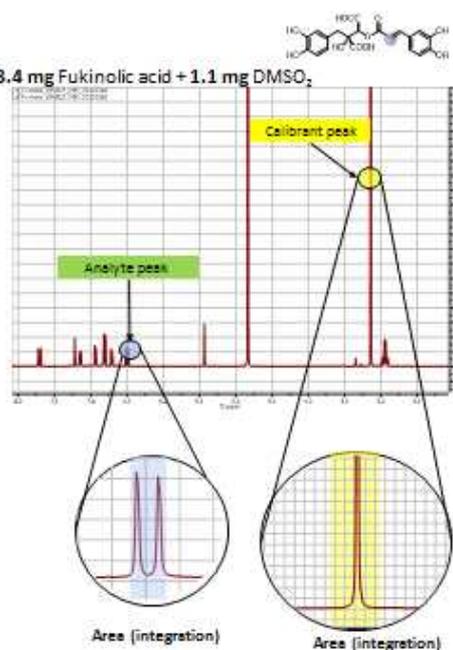
qNMR_Select peak 6.52 ppm

	Chemical shift (ppm)	Abs
Fukinolic acid	6.52	7706.36
DMSO ₂	3.14	70818.28

$$\text{Content [\%]} = \frac{n_C \times \text{Int}_t \times MW_t \times m_C}{n_t \times \text{Int}_C \times MW_C \times m_s} \times P_C$$

DMSO ₂ (mg)	Fukinolic acid (mg)	Gravimetric Molar Ratio	qHNMR Molar Ratio	Purity (%)
1.1	3.4	1.4929	0.6529	97.21%

□ Sample: 3.4 mg Fukinolic acid + 1.1 mg DMSO₂



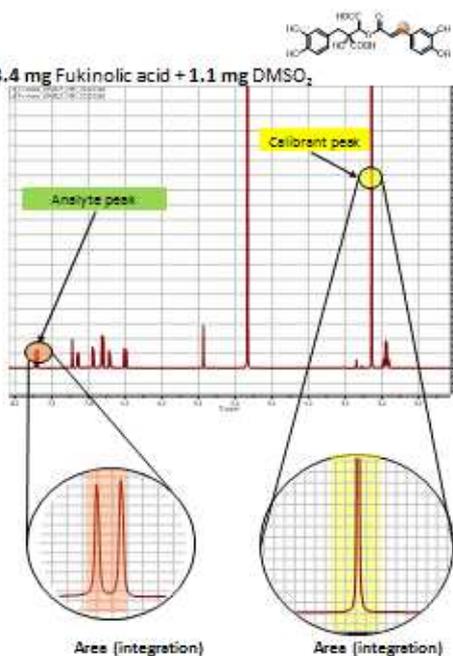
qNMR_Select peak 7.73 ppm

	Chemical shift (ppm)	Abs
Fukinolic acid	7.73	7748.09
DMSO ₂	3.14	70818.28

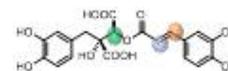
$$\text{Content [\%]} = \frac{n_C \times \text{Int}_t \times MW_t \times m_C}{n_t \times \text{Int}_C \times MW_C \times m_s} \times P_C$$

DMSO ₂ (mg)	Fukinolic acid (mg)	Gravimetric Molar Ratio	qHNMR Molar Ratio	Purity (%)
1.1	3.4	1.4929	0.6563	97.71%

□ Sample: 3.4 mg Fukinolic acid + 1.1 mg DMSO₂



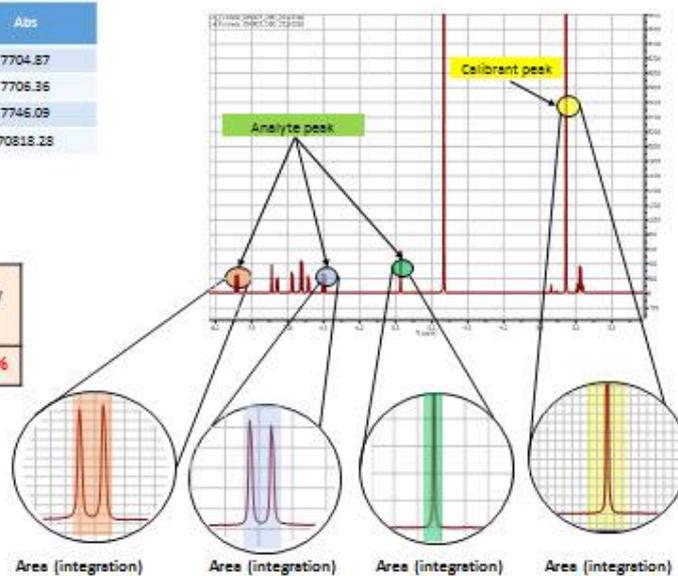
qNMR_Combine 3 selected peaks



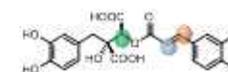
Fukinolic acid	Chemical shift (ppm)	Abs
	5.43	7704.87
Fukinolic acid	6.52	7706.36
	7.73	7746.09
DMSO ₂	3.14	70818.28

$$\text{Content}(\%) = \frac{n_C \times \text{Int}_t \times MW_t \times m_C}{n_t \times \text{Int}_C \times MW_C \times m_s} \times P_C$$

DMSO ₂ (mg)	Fukinolic acid (mg)	Gravimetric Molar Ratio	qHNMR Molar Ratio	Purity (%)
1.1	3.4	1.4929	0.6540	97.37%

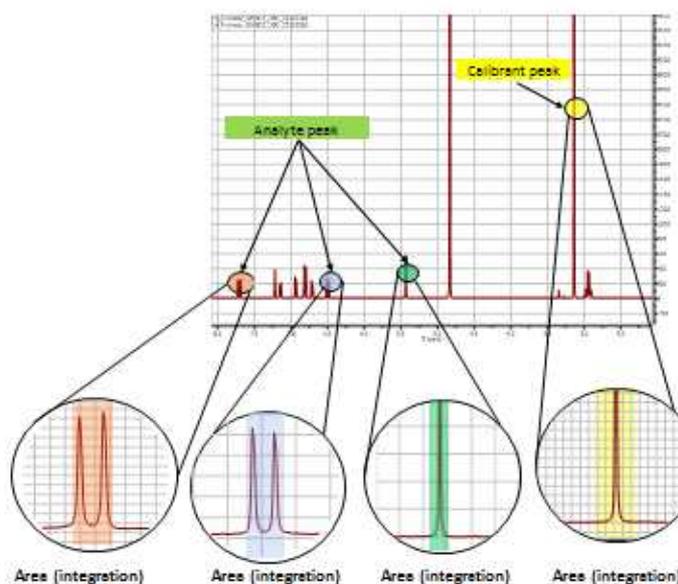


Result



Fukinolic acid

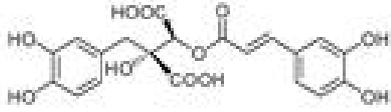
Chemical shift (ppm)	Purity (%)
5.43	97.19
6.52	97.21
7.73	97.71
Combine 3 selected peaks	97.37%



- ② 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석
 - 지표 성분인 Fukinolic acid의 성적서 발급 및 전 공정도 특허출원



Certificate of Analysis

PRODUCT NAME	Fukinolic acid	STRUCTURE 
LOT NUMBER	00170301	
REPORT NUMBER	NA BC-01-01	
SAMPLE NUMBER	NA BC-01	
DATE OF SAMPLE	01/13/2017	
DATE OF REPORT	03/20/2017	

CHEMICAL NAMES	(2R,3S)-2-[(3,4-dihydroxy phenyl)methyl]-3-[E]-3-(3,4-dihydroxy phenyl) prop-2-enoyl oxy-2-hydroxybutanedioic acid
CHEMICAL FORMULA	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁
MOLECULAR WEIGHT (MW)	434.353
PUBLISHED MELTING POINT	NA
CHEMICAL FAMILY	Poly phenol
CAS NUMBER	[30982-40-6]
EINECS	NA
RECS	NA
UNII	OLL8DU3J30

ANALYTICAL RESULTS

TEST	METHOD	RESULT
Purity	qNMR	97.37%
HPLC	Analytical condition (page 2)	conforms
NMR	Varian 300 MHz	Conforms to structure
Appearance	NA	Light brown powder



TEL : 02-968-0122 | www.naturebio.co.kr | Fax : 02-968-0122

Page 1 of 1

ANALYTICAL CONDITION

INSTRUMENT HPLC : Gibon 3.21 pump, Gibon 139 UV-VIS detector
 1H-NMR, 13C-NMR : Varian 500 MHz
 qNMR : Varian NMRsystems 500 MHz, Vnmr2.2

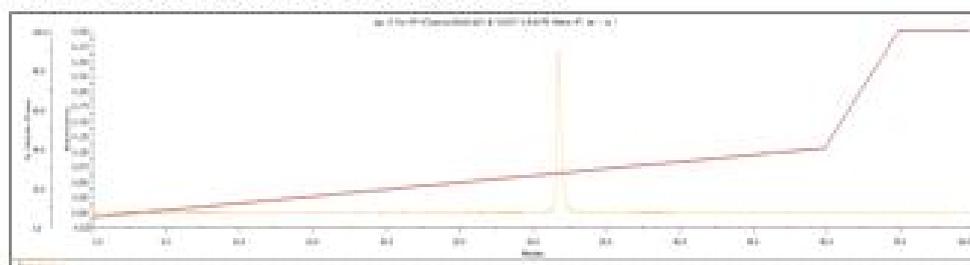
COLUMN YMC-Triart C18(5 μ m, 120 \AA , 4.6 x 120mm)

MOBILE PHASE

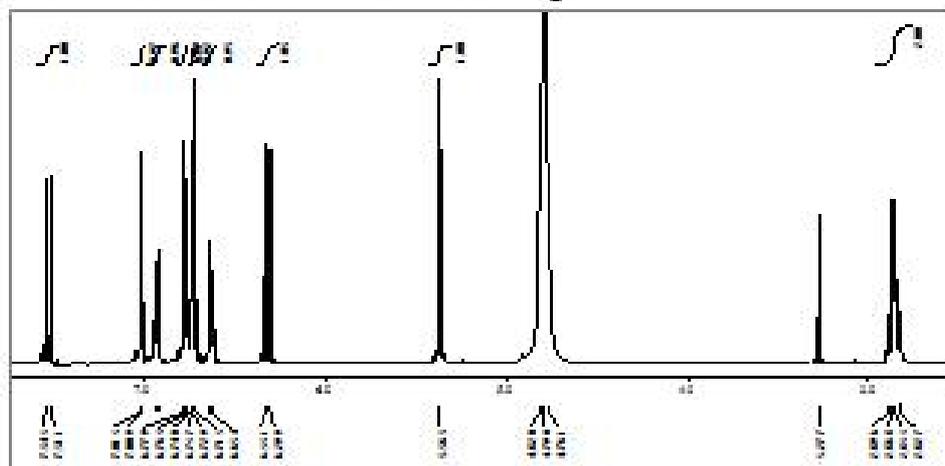
T (min)	A (%)	B (%)
0	83	17
30	70	30
35	0	100
60	0	100

COLUMN TEMP. 25 °C
FLOW RATE 1.0 mL/min
INJECTION VOL. 10 μ L
INJECTION CONC. 1 mg/mL in water
DETECTION 330 nm

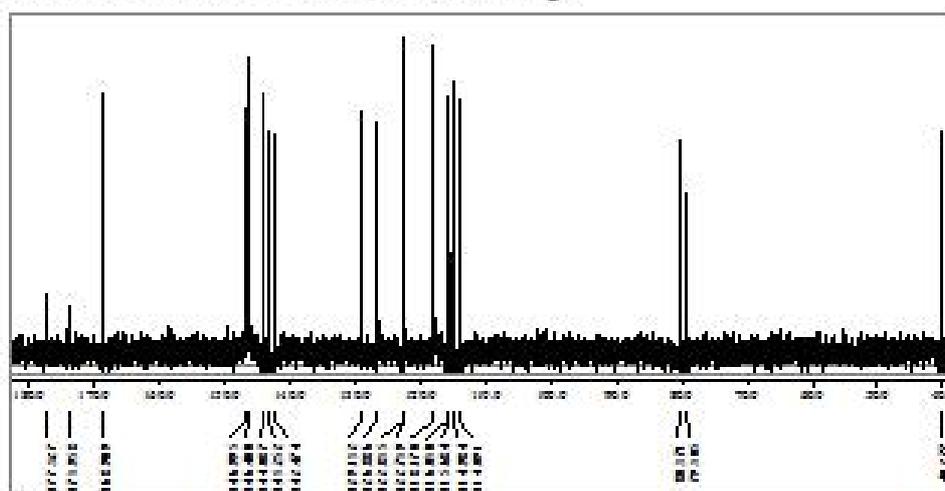
HPLC CHROMATOGRAM OF FUCKINOLIC ACID



¹H-NMR SPECTRUM OF FUMINOLIC ACID IN D₂O

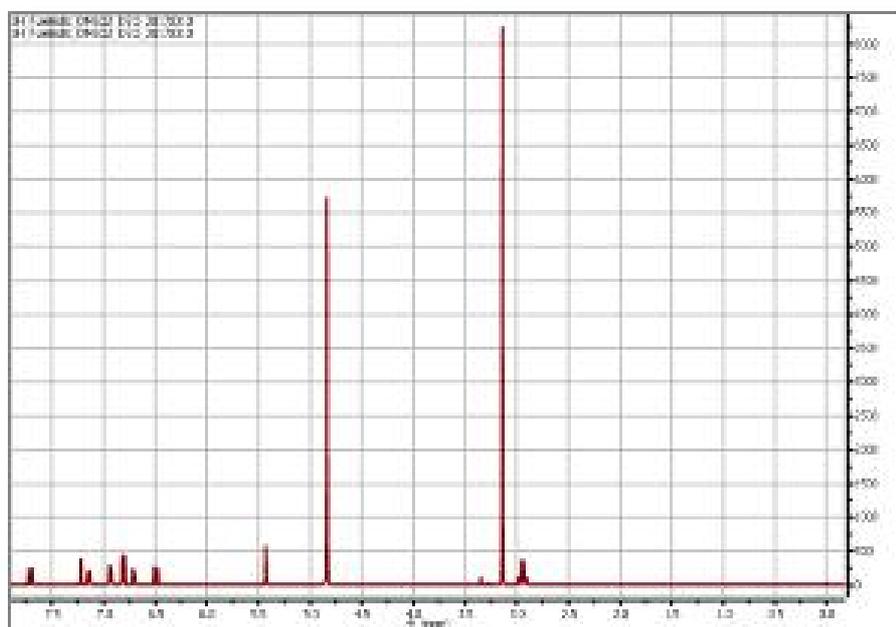


¹³C-NMR SPECTRUM OF FUMINOLIC ACID IN D₂O



qNMR SPECTRUM OF FUKINOLIC ACID IN D₂O

Fukinolic acid (3.4 mg) + DMSO₂ (1.1 mg)



(다) 지표성분 확인 시험법 개발

① 유효성분 확인 시험법 개발

- Fukinolic acid 함량 및 확인 시험법 개발 완료

㉠ 표준용액의 제조

표준물질 약 5mg을 정밀하게 달아 25mL 정용플라스크에 증류수를 넣어 용해 후 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

㉡ 시험용액의 제조

1단계: 시료를 적절히 취한 후 100mL 정용플라스크에 넣는다.

2단계: 증류수를 넣은 후 30분 동안 초음파 추출한다.

3단계: (2)를 방냉 한 후, 증류수로 표선까지 맞춘다.

4단계: 0.45um PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

㉢ 기기분석조건

Instrument	HPLC																																	
Detector	UV (DAD)																																	
wavelength	330nm																																	
Column	Supelco C18 (5um, 4.6*250mm)																																	
	A: 0.1% Formic acid in DW																																	
	B: 0.1% Formic acid in Acetonitrile																																	
Mobile Phase	<table border="1"><thead><tr><th>시간(분)</th><th>A용액(%)</th><th>B용액(%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>10</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>15</td><td>85</td><td>15</td></tr><tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>25</td><td>75</td><td>25</td></tr><tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>35</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>45</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>47</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>53</td><td>95</td><td>5</td></tr></tbody></table>	시간(분)	A용액(%)	B용액(%)	0	95	5	10	95	5	15	85	15	20	80	20	25	75	25	30	60	40	35	5	95	45	5	95	47	95	5	53	95	5
시간(분)	A용액(%)	B용액(%)																																
0	95	5																																
10	95	5																																
15	85	15																																
20	80	20																																
25	75	25																																
30	60	40																																
35	5	95																																
45	5	95																																
47	95	5																																
53	95	5																																
Flow rate	0.8mL/min																																	
Injection volume	10 μ l																																	
Run Time	53min																																	
Column temperature	25°C																																	

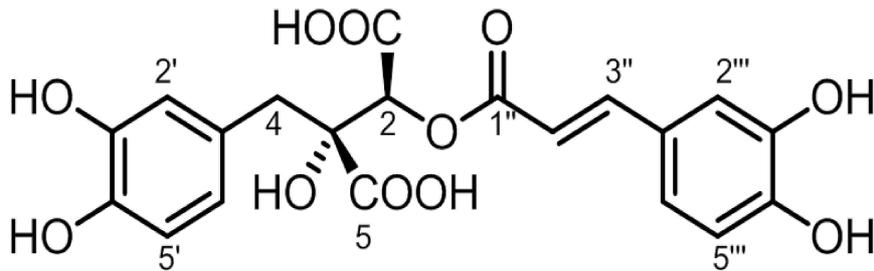
라) 계산식

$$\text{Fukinolic acid (mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/mL)} \times \text{시험용액전량(mL)} \times \text{표준품 순도} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

② 유효성분 확인

- Fukinolic acid를 NMR 장비를 이용한 성분 규명

◆Fukinolic acid (화합물 1) - Brownish yellow powder; ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ= 2.84/2.88 (2H, d, *J* = 14.0 Hz, H-3), 3.36 (1H, s, H-2), 6.22 (1H, d, *J* = 16.0, H-2' ' '), 6.62 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6' '), 6.72 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5' '), 6.74 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2' '), 6.77 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5' ' ' '), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-6' ' ' '), 7.01 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2' ' ' '), 7.53 (1H, d, *J* = 16.0, H-3' ' '); ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ=40.3 (C-4), 79.3 (C-2), 80.4 (C-3), 114.1 (C-2' ' '), 115.0 (C-2' ' ' '), 115.7 (C-5' '), 116.0 (C-5' ' ' '), 118.2 (C-2' '), 122.7 (C-6' ' ' '), 122.8 (C-6' '), 126.9 (C-1' ' ' '), 129.1 (C-1' '), 142.5 (C-4' '), 143.2 (C-3' '), 144.1 (C-3' ' ' '), 146.4 (C-3' ' ' '), 147.0 (C-4' ' ' '), 168.9 (C-1' ' '), 174.0 (C-1), 177.3 (C-5)



화합물 1

③ 기준 및 시험방법 설정

- Full validation으로 기준 및 시험방법 설정 완료

**머위잎추출물(KP-1)의 기능/지표성분
시험법 검증 연구**

제 출 일 : 2017년 8월 16일



463-400 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 코리아바이오파크 B-101
(Tel.) 031-628-2400/ (Fax) 02-628-0400~1

I. 시험법검증

Fukinolic acid 시험법 검증(method validation)

본 보고서는 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid을 정해진 방법으로 처리하여 분리, 정량하는 분석법의 유효성을 검증하는데 그 목적이 있다. 분석법의 유효성을 검증하기 위해서 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 시료의 직선성(Sample Linearity) 등의 항목을 검토하였다.

<요약>

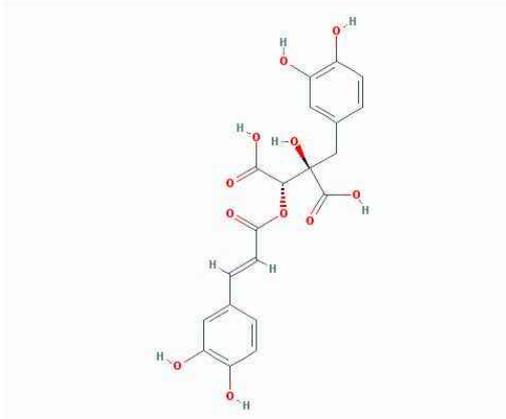
항목	평가방법	설정값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석시 검출시간 (Retention time으로 검토)	o Fukinolic acid 검출시간: : 28분대에 peak 검출
직선성 (Linearity)	표준용액	6개 농도로 3반복 직선성 확인 o 약 6.653125~249.6ug/mL R ² =0.999 이상
	시료	6개 농도로 3반복 직선성 확인 o 목적농도의 50~200%에서 확인 o R ² =0.999
정확성 (Accuracy)	3개 농도로 표준물질을 첨 가하여 회수율 검토	o 66.188~112.021ug/mL 범위에서 회수율 : 100.27~102.43% RSD : 0.11~1.07%
정밀성 (Precision)	4일간 2명의 시험자가 2종 의 기기로 반복재현성, 일 간, 기기간, 시험자간 정밀 성 평가	o 함량 평균 27.2869mg/g, SD 0.42, RSD 1.53%

1. 개요

1) 분석물질

시 료 : 머위잎추출물(KP-1)

분석물질: Fukinolic acid



CAS Number : 50982-40-6
Molecular formula : C₂₀H₁₈O₁₁
Molecular weight : 434.353 g/mol

2) 분석방법

(1) 고속액체크로마토그래피법

가. 장비

HPLC System Agilent 1260 Infinity, USA
G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS
G1316A 1260 TCC,
G1315D 1260 DAD

Shimadzu 20A Series, Shimadzu, JAPAN
DGU-20A5R Degassing unit,
LC-20AD Prominence Liquid chromatograph,
SIL-20AC Prominence Auto sampler,
CBM-20A Communications bus module,
SPD-M20A Prominence Diode array detector,
CTO-20A Prominence Column oven

Analytical Column Supelco C18 (250mm × 4.6mm, 5µm)

나. 시약

- (1) 표준품 : Fukinolic acid, NatureBio, Cat# NABIO-0131, Lot# 00170301, 97.37%
- (2) Methanol : Duksan, HPLC grade
- (3) Acetonitrile : J.T Baker, HPLC Grade
- (4) Formic acid : Sigma
- (5) 3차 증류수(DW)

다. 표준용액 조제

- (1) 표준품을 일정량 취해 50% Methanol(pH 3.0)에 넣어 용해, 용량플라스크에 정용한다.
- (2) Stock solution을 50% Methanol(pH 3.0)로 적절히 희석하여 표준용액으로 사용한다.

라. 시험용액 조제

- (1) 시료를 100mL 부피플라스크에 정밀히 달아 50% Methanol(pH 3.0)을 가하고 30분동안 초음파 추출한다.
- (2) 정용 후 PTFE syringe filter (0.45 um)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용한다.

마. 분석조건

Instrument	Agilent 1260 Infinity																																			
Detector	UV (DAD)																																			
Wavelength	330 nm																																			
Column	Supelco C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)																																			
	A : 0.1% Formic acid in DW																																			
	B : 0.1% Formic acid in Acetonitrile																																			
Mobile Phase	<table border="1"> <thead> <tr><th>Time</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>10</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>15</td><td>85</td><td>15</td></tr> <tr><td>20</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>25</td><td>75</td><td>25</td></tr> <tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>35</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>45</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>47</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>53</td><td>95</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	Time	A(%)	B(%)	0	95	5	10	95	5	15	85	15	20	80	20	25	75	25	30	60	40	35	5	95	45	5	95	47	95	5	53	95	5		
	Time	A(%)	B(%)																																	
	0	95	5																																	
	10	95	5																																	
	15	85	15																																	
	20	80	20																																	
	25	75	25																																	
	30	60	40																																	
	35	5	95																																	
	45	5	95																																	
	47	95	5																																	
53	95	5																																		
Flow rate	0.8 ml/min																																			
Injection volume	10 μl																																			
Oven Temperature	25 °C																																			

바. 계산

$$\text{Fukinolic acid (mg/g)} = \frac{\text{검량선농도(ug/mL)} \times \text{시험용액전량(mL)} \times \text{표준품 순도} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량(mg)}}$$

2. 시험법 유효성 검증 결과

1) 특이성 (Specificity)

① 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid의 Chromatogram

Fukinolic acid의 표준물질과 원료를 같은 분석법으로 분석하여 검출된 Peak를 확인하여 동일 물질임을 확인하였다. 표준용액은 약 28.207분에 검출되었고, 시험용액은 28.193분에 검출되었다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램은 다음과 같다(Fig. 1).

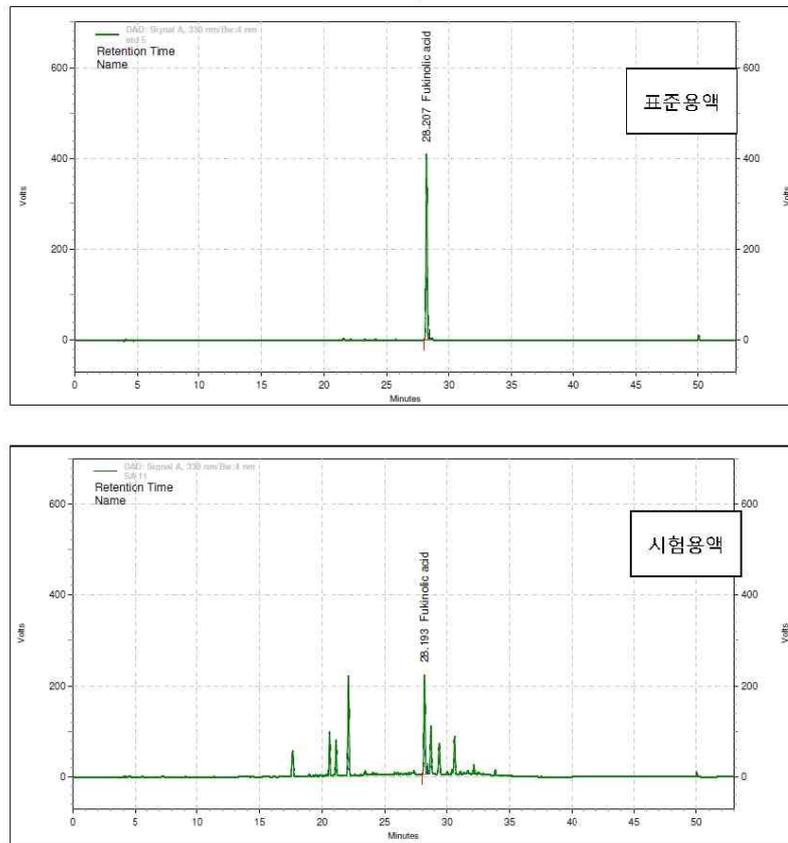


Fig. 1. 표준용액과 시험용액 중 Fukinolic acid의 Chromatogram

② 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid의 spectrum 확인

시험용액 중 검출된 크로마토그램이 표준용액인 Fukinolic acid과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 29분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2~3).

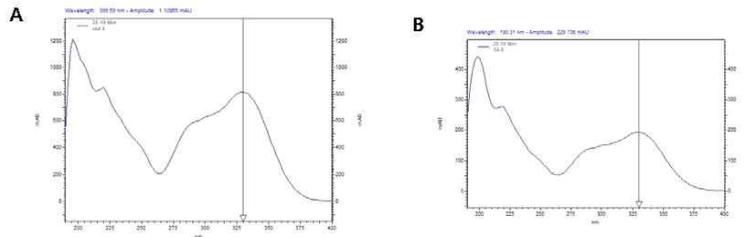


Fig. 2. Fukinolic acid spectrum A: 표준용액 B : 시험용액

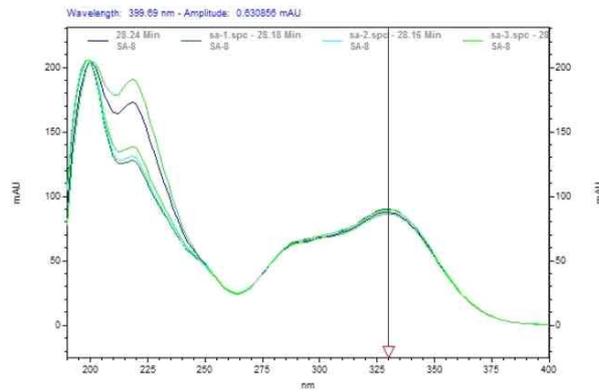


Fig. 3. Peak purity test : 시험용액 중 Fukinolic acid acid peak 각 5점의 spectrum분석

2) 직선성 (Linearity)

① 표준용액의 직선성

표준용액은 표준물질 약 5mg을 25mL의 정용플라스크에 50% Methanol(pH 3.0)으로 녹인 후 정용한 것을 적절히 희석하여 기기분석 하였다. 그 결과 Fukinolic acid은 약 6.653125~249.6ug/mL에서 직선성이 확인되었고, 이때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 $R^2=0.999$ 이상으로 나타났다(Table. 1~3).

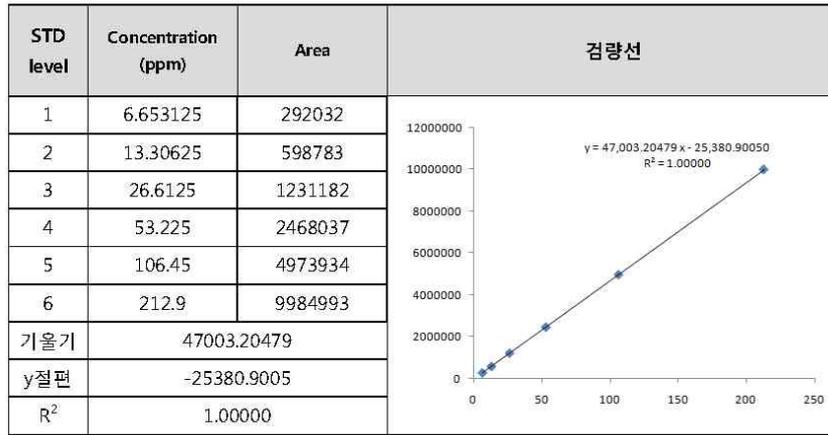
Table 1. Fukinolic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회실험)

STD level	Concentration (ppm)	Area	검량선
1	7.8	362690	
2	15.6	729361	
3	31.2	1465316	
4	62.4	2921388	
5	124.8	5878648	
6	249.6	11815857	
기울기	47363.97536		
y절편	-16899.58209		
R^2	0.99999		

Table 2. Fukinolic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회실험)

STD level	Concentration (ppm)	Area	검량선
1	7.2625	339346	
2	14.525	683900	
3	29.05	1379307	
4	58.1	2779490	
5	116.2	5539652	
6	232.4	11142772	
기울기	47969.94159		
y절편	-13930.02488		
R^2	0.99999		

Table 3. Fukinolic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회실험)



② 시료 직선성 (Sample Linearity)

시료를 농도별로 제조하여 3회 분석한 결과로 직선성을 평가하였다. 시험용액 약 60ug/mL(샘플량 200mg)의 농도를 목적농도 100%로 설정하여 50% ~ 200% 범위에서 평가한 결과 Fukinolic acid의 시료는 약 100mg ~ 400mg(시험용액 농도 약 30~120ug/mL) 에서 시료의 직선성이 확인되었고, 이 때 직선의 상관계수는 해당농도범위에서 $R^2=0.99983\sim0.99994$ 로 나타났다(Table. 4~6).

Table 4. 시료 Fukinolic acid에 대한 검량선 작성 (1회실험)

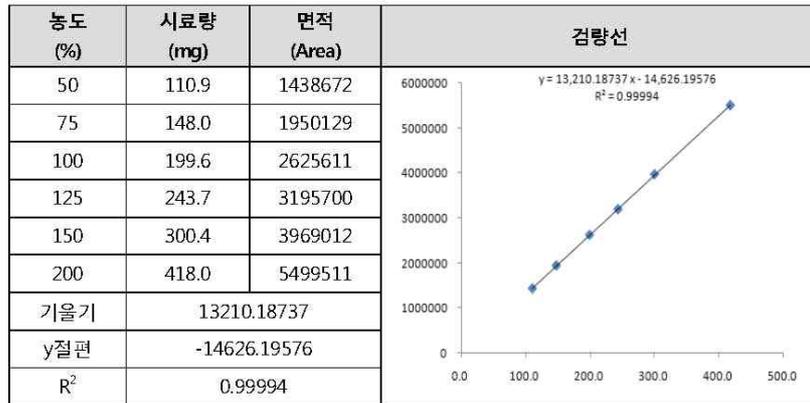


Table 5. 시료 Fukinolic acid에 대한 검량선 작성 (2회실험)

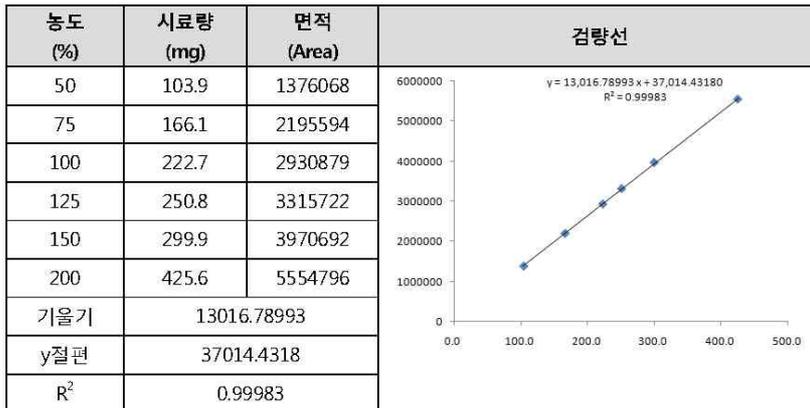
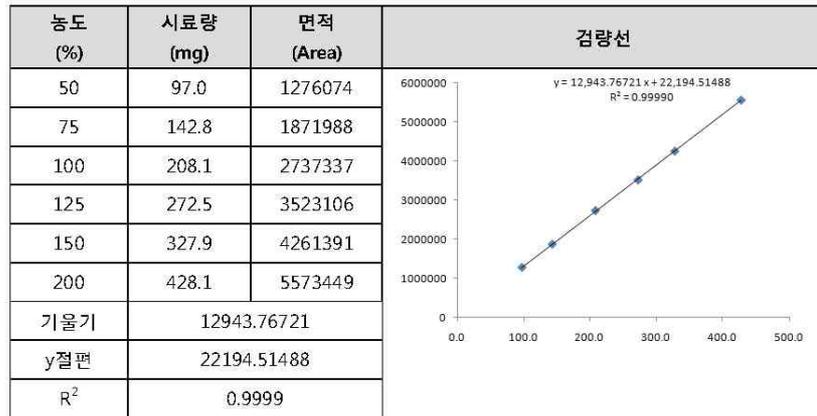


Table 6. 시료 Fukinolic acid에 대한 검량선 작성 (3회실험)



3) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid의 정확성을 측정하기 위하여 시료 200mg에 이미 농도를 알고 있는 표준용액 약 10, 20, 20 ug/mL 농도를 가하여 100mL로 정용 한 것을 시험용액으로 하여 검출 농도로 4수율을 측정하였다. Fukinolic acid은 66.188~112.021 ug/mL 범위에서 회수율이 100.27~102.43 %이며, RSD는 0.11~1.07%로 나타났다(Table 7).

Table 7. Fukinolic acid의 농도별 정확도, 회수율 확인

표준물질 (ug/mL)	원료 + 표준물질 (ug/mL)	시료 채취량(mg)	시험용액 검출농도 (ug/mL)	시료 1g당 시험용액의 농도		회수율 평균(%)	SD (%)	RSD (%)
				농도(ug/mL)	평균농도 (ug/mL)			
0	-	224.0	62.617	279.54	276.98	100.35	0.11	0.11
		213.2	58.543	274.59				
		233.0	64.497	276.81				
원료 + 표준물질 (ug/mL)	시료 채취량 (mg)	채취량 대비 계산농도 (ug/mL)	이론농도 (ug/mL)	검출농도 (ug/mL)	회수율 (%)	회수율 평균(%)	SD (%)	RSD (%)
시료 + 10.645	225.6	62.49	73.13	73.330	100.27	100.35	0.11	0.11
	201.0	55.67	66.32	66.523	100.31			
	199.4	55.23	65.88	66.188	100.48			
시료 + 21.29	217.0	60.10	81.39	81.961	100.70	100.77	0.11	0.11
	228.8	63.37	84.66	85.423	100.90			
	222.2	61.55	82.84	83.441	100.73			
시료 + 42.58	238.8	66.14	108.72	111.366	102.43	101.53	1.08	1.07
	241.8	66.97	109.55	111.552	101.82			
	249.4	69.08	111.66	112.021	100.32			

4) 정밀성

① 실험실 내 정밀성

머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid 함량의 분석 재현성 시험을 위해 분석장비 및 분석자, 분석일자를 달리하여 분석을 진행하였다. 결과(Table 8)는 60ug/mL의 농도를 6회 반복 실험하여 측정치를 비교하였고, 사용한 실험 장비는 Agilent HPLC 1260 series와 Shimadzu HPLC 20A Series 두 장비, 4일간, 두 명의 시험자가 분석하였다. 실험 간의 분석 결과 Fukinolic acid의 함량은 평균 27.2869mg/g으로 분석되었고, 이때 표준편차 0.42mg/g 상대표준편차 1.53% 이었다. 검출시간은 Agilent HPLC 1260에서 약 28분대에서 검출되었고, Shimadzu HPLC 20A Series에서 약 31분대에서 검출되었다.

Table 8. Fukinolic acid 분석재현성

	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1차(2017-06-16)	27.8010	27.2869	0.42	1.53
2차(2017-07-20)	27.1700			
3차(2017-07-21)	26.8010			
4차(2017-07-22)	27.3757			

② 반복 정밀성

각 일자별 반복성은 26.4987~27.8371mg/g(평균 26.8010~27.8010mg/g), 표준편차(SD) 0.03~0.16, 상대표준편차(RSD) 0.11~0.61%로 나타났다(Table 9~12).

Table 9. 분석일 6월 16일, 분석자 A, Shimadzu HPLC 20A Series

	Area	Concentration (ug/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	1720122	79.856	276.3	27.7661	27.8010	0.03	0.11
2	1600639	74.380	257.2	27.7826			
3	1548175	71.976	248.4	27.8371			
4	1404057	65.370	225.8	27.8126			
5	1598940	74.302	257.0	27.7751			
6	1412029	65.736	226.9	27.8328			

Table 10. 분석일 7월 20일, 분석자 B, Agilent HPLC 1260

	Area	Concentration (ug/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	2766859	58.774	211.3	27.0839	27.1700	0.11	0.40
2	2823673	59.973	214.3	27.2495			
3	2736430	58.131	209.7	26.9920			
4	2851882	60.569	216.9	27.1904			
5	3165419	67.189	239.9	27.2705			
6	3395610	72.049	257.6	27.2337			

Table 11. 분석일 7월 21일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260

	Area	Concentration (ug/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	2729252	57.185	207.8	26.7955	26.8010	0.16	0.61
2	2667484	55.898	202.5	26.8780			
3	2571624	53.899	194.5	26.9828			
4	2823944	59.159	214.6	26.8421			
5	2902520	60.797	223.4	26.4987			
6	2624944	55.011	199.8	26.8089			

Table 12. 분석일 7월 22일, 분석자 A, Agilent HPLC 1260

	Area	Concentration (ug/mL)	시료량 (mg)	Amount (mg/g)	Average (mg/g)	SD (mg/g)	RSD (%)
1	2660253	57.137	202.6	27.4602	27.3757	0.16	0.58
2	3156365	67.692	243.1	27.1130			
3	2719972	58.408	207.2	27.4478			
4	3064823	65.745	233.2	27.4511			
5	2980660	63.954	228.5	27.2525			
6	3290273	70.541	249.5	27.5294			

3. 결과

본 시험법은 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid 정량을 위해 표준물질과 시료를 50% Methanol(pH 3.0)에 용해하여 30분 동안 초음파추출하여 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid을 UV(DAD)를 이용하여 330nm에서 분석하였다.

특이성 확인을 위해 HPLC로 분석시 검출시간이 표준용액과 시료 모두 28분대에 peak 가 검출되었으며, spectrum도 일치하였다.

표준용액은 6.653125~249.6ug/mL 범위에서 $R^2=0.999$ 이상, 시료는 목적농도의 50~200% 범위내에서 $R^2=0.999$ 이상 나와 직선성이 확인되었다.

표준물질을 첨가하여 회수율을 검토한 결과 66.188~112.021ug/mL 범위에서 회수율 100.27~102.43%, RSD 0.11~1.07%로 정확성을 확인할 수 있었다.

4일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일자간, 기기간, 시험자간 정밀성을 확인한 결과, Fukinolic acid 함량 평균 27.2869mg/g, SD 0.42, RSD 1.53%로 정밀도를 확인하였다.

본 시험법 검증은 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid 분석법의 적정성을 검토하기 위해 실행하고, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀도를 분석한 결과 머위잎추출물(KP-1) 중 Fukinolic acid 분석을 하기에 적합하다고 판단된다.

(라) 시제품 제작

① 전체 500 mg 캡슐에 KP-1이 200 mg 함유된 시제품을 제작



② 인체적용시험(경희대학교 병원)에 활용

KP-1_지원자모집공고 Version2.0

기억력 개선 인체적용 시험 지원자 모집



경도인지장애 시험대상자에서 머위일 추출물 KP-1의 인지기능 개선 등 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험에 참여할 대상자를 모집합니다.

. 지원자 모집 .

<p>1. 임상시험 기관/책임자</p> <ul style="list-style-type: none"> • 경희대학교병원 임상약리학과 임성빈 교수 • 공동연구자: 정신건강의학과 김종우 교수 정신건강의학과 강원섭 교수 <p>2. 참여대상</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 만 50세 이상 만 80세 미만의 성인 남녀 2) 경도의 인지장애(견당증)를 가진 자 <p>3. 제외대상</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 글을 읽지 못하는 자 2) 치매를 진단 받은 자 3) 임신부, 수유부, 임신계획을 가진 여성 <p>4. 시험식품 정보</p> <ul style="list-style-type: none"> • 기억력 개선을 평가하기 위한 머위일 추출물 • 대조식품 (위약) 	<p>5. 참여일정 및 복용법</p> <ul style="list-style-type: none"> • 참여기간: 약 20주 (4회 방문예정) • 방문시 소요시간: 약 1시간 30분 • 복용일정: 1일 1회, 총 18주간 복용 <p>6. 참여 시 제공사항</p> <ul style="list-style-type: none"> • 진료과 교수님의 진찰과 상담 • 검사비와 진료비를 연구비에서 지급 • 검사항목: 혈액검사, 뇨검사, 인지기능검사 • 교통비 지급 <p>7. 문의전화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 경희대학교병원 임상약리학과 <p style="text-align: center;">연구간호사 ☎ 02-958-9765 (서울시 동대문구 경희대로 23)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 윤리적인 문제나 귀하의 권리에 대한 문의 연구윤리담당자☎ 경재희 02-958-8045)
---	---

(2) 기술적 성과

- 치매 예방이 사회적 문제로 대두되고 현 정부의 핵심 정책 사항임
- 본사는 치매예방에 기대되는 기억력 개선 건강기능성 식품 소재를 개발함
- 식품의약품 안전처의 가이드라인, 식약청 모듈토의 등을 거쳐 기술개발 중
- 세계 1등급 수준의 기술을 이용한 기능성확보 (동물실험 확인)
- 기존 제품 대비 기능성 50% 향상, 원가절감 200%
- IRB 승인을 받고 인체적용 시험을 진행 중 (경희대학교 병원)
- 국내 건강기능성 식품 시장 3위, 2015년 7,751억원 규모 지속적 성장 가능성
- 기존 유사 기술 대비 차별성, 기술성이 우수함
- 국내 특허 등록 및 해외 출원을 위한 PCT 출원 완료
- 해외 수출 시장 개척을 위한 현지 방문 및 박람회 참가
- IOS 9001, 14001 인증을 획득함
- 기억력개선 관련 특허 등록 (2016년 12월, 관련 유사특허 중 가장 최근 등록)
- 해외 수출 개척을 위한 개별국 특허 출원 진행 중 (미국, 일본, 중국)
- 특허 출원 시 유사 특허 선행조사 결과 차별성, 우수성 확보

개발대상 기술 (제품, 서비스 등) 관련 지식재산권

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
① 머위 잎 추출물을 포함하는 기억력 개선용 조성물	우리회사	한국/10-1689656호
② 머위 잎으로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법	우리회사	한국/1020170098111
③ 기억력 증진 또는 집중력 향상용 조성물	(주)엘지생활건강	한국/1020080008829
④ 학습 장애, 기억력 장애 또는 치매의 예방 또는 치료용 두충 추출물	(주)유니베라	한국/1020080102789
⑤ 머위 추출물 함유하는 기억력 증강을 위한 건강기능식품	(주)케이티앤지	한국/1020040047683
⑥ 미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 학습능력 또는 기억력 장애 예방 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	(주)브레인트로피아	한국/1020110090830
⑦ 베타아밀로이드에 의한 세포 독성 및 기억력 손상 억제용 약학적 조성물, 및 건강 기능식품	경북대학교 산학협력단	한국/1020070056318
⑧ 신경세포 보호효과 및 항산화 활성을 갖는 머위 추출물	충남대학교	한국/10-0535655

기억력 개선 제품 관련 ISO 9001, 14001 획득



- IRB 승인을 받고 인체적용 시험 진행 중 (경희대학교 병원)
- 기존 제품들은 대부분 인체적용시험을 실시하지 않음
- 세포실험, 동물실험, 인체적용 시험까지의 전 단계 수행을 통한 제품 검증

기억력 개선 소재 KP-1 인체적용시험 모집 광고



- 세계 1위 제품인 포스파티딜세린이 약 17억 달러 정도 판매됨
- 포스파티딜세린이 국내 약 500억정도 시장 형성 (업계 추정치)
- 포스파티딜세린은 신경전달물질의 양을 늘려주는 기전으로 근본적인 해결이 아님
- 약 10여개 상품이 판매되고 있으며, 시장성이 점차 증가하고 있음
- 2015년 전체 7,751억원의 기억력 개선 기능성제품 시장판매 됨 (통계인용)
- 2016년 추가로 비과업에서 16~19세 학생들을 대상으로 한 제품 인허가
- 대부분 제품들이 높은 원가를 형성하고 있어 대중성이 떨어지는 단점
- 하수오, 속단 사태로 인해 기능성 재검토가 실시됨, **실제 기능성 미약함**
- 본사제품은 해마의 조직재생을 통해 원칙적인 문제 해결로 기능성 확보
- 식품의약품 안전처의 가이드라인을 준수 한 기술개발 (2016년 12월 개정)
- IRB 승인을 받고 인체적용 시험 중인 제품

KP-1과 기존 제품 기술성 비교

구분	제품가 격(%)	시장점유율		기술적 차이			
		국내	국외	추출공법	신경조직보호	기억력개선 기능	대사과정
네이처바이오(KP-1)	30	1	0	침전공법특허	70	80	경구
선경트레이딩(대두포스타티릴셀린)	85	20	15	물 추출	신경전달물질 늘려줌	30	경구
CJ(씨제이)테아닌 등 복합추출물)	70	5	4	물 추출	20	20	경구
(주)바이오랜드(피브로인추출물 BF-7)	70	5	4	주정추출	30	30	경구
(주)뉴메드인삼(가시오갈피 등 혼합추출물)	80	20	20	물 추출	신경전달물질 늘려줌	20	경구
(주)한국인삼공사(홍삼농축액)	70	25	35	물 추출	염증완화	20	경구
(주)브레인트로피아(천지추출물)	60	3	3	주정추출	신경전달물질 늘려줌	30	경구
(주)네추럴에프앤피(은행잎추출물)	60	3	3	주정추출	신경전달물질 늘려줌	20	경구
대웅바이오(주)(당귀 등 추출복합물)	60	3	3	물 추출	염증완화	20	경구
(주)엘지생활건강(녹차추출물/테아닌복합물)	60	3	3	물 추출	염증완화	20	경구
싸이제닉(참당귀 추출분말)	100	10	10	물 추출	20	20	경구

기억력 개선 제품 KP-1의 SWOT 분석

강점(Strength)	약점(Weakness)
<ul style="list-style-type: none"> • 2016년 12월 등록 특허의 차별성이 있는 기술력 • 기존 기술 대비 해마의 조직 재생 관련 기반기술로 개발되어 근본적인 문제해결 (조직재생 80%, 기존대비 50%) • 2016년 12월에 개정된 식품의약품안전처의 가이드대로 개발되어 인허가 사항을 준수함 • 타사 대비 원가경쟁력을 확보함 	<ul style="list-style-type: none"> • 낮은 제품 인지도 • 대량 유통망이 부재함 • 대기업과의 경쟁력이 약함
기회요인(Opportunity)	위협요인(Threat)
<ul style="list-style-type: none"> • 국내외적으로 치매예방에 대한 수요증가 • 정부의 핵심 정책으로 부상하여 이슈화 • 노령화로 인한 관련 수요가 증가 • 치료형에서 예방형으로 변화하는 인식 • 기존 제품들에 대해 식약처가 재검증을 실시 예정, 이로 인해 개별인정이 취소될 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> • 대기업이 시장을 주도함 • 수출 시장 내에서의 관련 규제가 심해짐 • 세계 CRO, CMO 기업들이 현재 시장을 선도 • 허가 당국의 경직성 (하수오, 속단 사태 등)

국내·외 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	판매가격(천원)	연 판매액(천원)
① 싸이제닉(주)	참당귀추출분말	200~300	9,000,000
② (주)뉴메드	인삼가시오갈피 등혼합추출물	150~300	10,000,000
③ 선경트레이딩(주)	대두포스타티릴세린	170~200	10,000,000
④ (주)바이오랜드	피브로인추출물 BF-7	100~130	10,000,000
⑤ CJ(주)	씨제이테아닌등복합추출물	120~150	10,000,000
⑥ (주)브레인트로피아	원지추출물	120~130	5,000,000
⑦ (주)네추럴에프앤피	은행잎추출물	90~100	5,000,000
⑧ 대응바이오(주)	당귀 등 추출복합물	160~200	5,000,000
⑨ (주)엘지생활건강	녹차추출물/테아닌복합물	50~100	5,000,000
⑩ (주)한국인삼공사	홍삼농축액	200~270	5,000,000

- 제품 생산을 위한 KGMP 공장인 (주)새뜸제약 계약 체결
- 기존 본사 거래처인 동원산업, 제니코식품 등을 통한 유통라인 확대
- 국내 제약회사를 통한 B2B 전략 추진 (라이선스 아웃)
- 2016년부터 발굴중인 중국 유통망을 통한 원료 및 식품 수출
- 관련 인증 준비 중 (국내 ISO 9001, 14001 인증완료, 중국 CCIC 인증)
- 대기업의 구매 수요도 높게 나와서 관련 기업에 판매 계획

대기업 수요조사 의뢰 결과

'기억력 개선 건강기능식품 KP-1'의 수용도



머위추출물의 공신력 있는 인증 및 가격경쟁력이 있다면, 구입의향 있다는 반응



인지도 높은 원료들과 합성하는 것이 바람직하다는 의견
→ 기억력 뿐만 아니라 그 외 40-50대 이상의 중장년층을 대상으로 하는 추가 기능을 어필



청소년 대상 건강기능식품 시장은 크지 않아, 본 아이템의 target으로는 시장성이 낮다는 반응

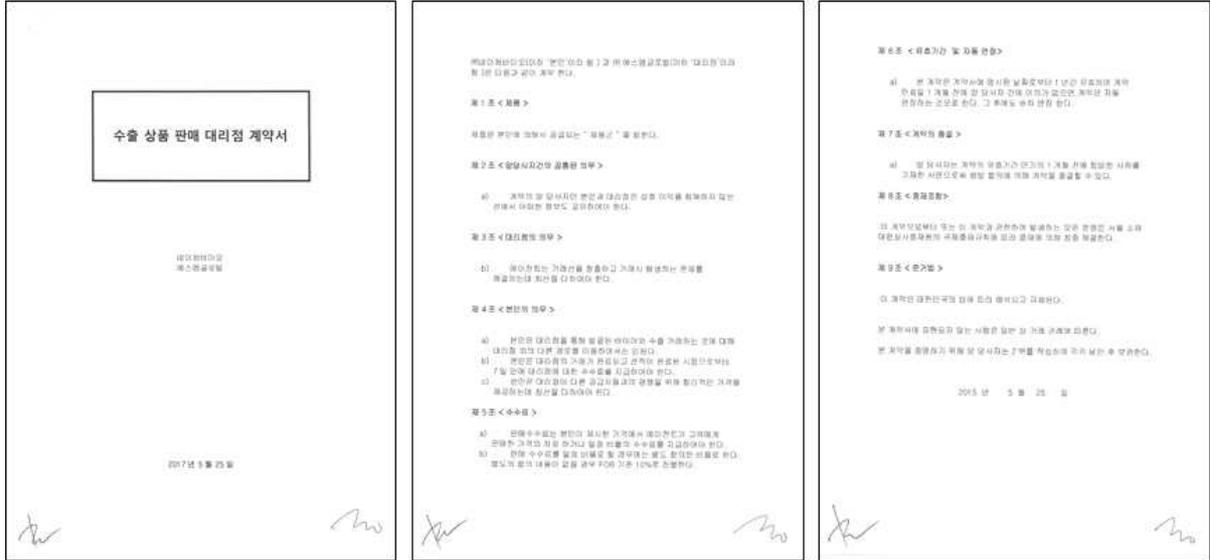
2016 마케팅기업 INI의뢰 조사분석결과



회사명	대화제약 (1984년)	회사명	일동제약 (1941년)	회사명	동아ST (2013년)
매출액	1,390억 3,063만원 (2015년 기준)	매출액	약 4,800억원 (2016년 기준)	매출액	약 5,679억원 (2015년 기준)
영업 이익	55억 8,967만 4,348만원 (2015년 기준)	영업 이익	약 346억원 (2016년 기준)	영업 이익	약 543억원 (2015년 기준)
주요 제품	약효군별 의약품, 일반의약품, 전문의약품 등	주요 제품	일반의약품, 전문의약품 의약품 등	주요 제품	약효군별 의약품, 일반의약품, 전문의약품 등
R&D	퍼스트 제네릭연구(항암제), 바이오/합성 연구, DDS 연구 등	R&D	내성균, 약성종양, 알츠하이머, 비만, 노화 등을 표적으로 하는 다양한 신약 개발	R&D	항암제, 퇴행성뇌질환 치료제 연구, 글로벌브랜드 신약개발 DDS개량 신약 및 천연물신약 등을 연구개발

- 별도의 수출 계약을 체결하여 수출시장 개척하여 판매

수출 대리점 계약서



기술개발 후 국내외 주요 판매처 현황

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량(개)	예상 판매기간(년)	예상 총판매금 (천원)	관련제품
(주)옴니허브	한국	20	10,000	10	2,000,000	건강기능성 식품
제니코(주)	한국	20	30,000	10	6,000,000	건강기능성 식품
동원산업	한국	20	50,000	10	10,000,000	건강기능성 식품
공영홈쇼핑	한국	20	70,000	10	14,000,000	건강기능성 식품
대화계약	한국	15	100,000	10	15,000,000	건강기능성 식품
일동계약	한국	15	100,000	10	15,000,000	건강기능성 식품
동아 ST	한국	15	100,000	10	15,000,000	건강기능성 식품
YANHUA SMARTECH	중국	1,000	3,000T	10	30,000,000	kp-1 원료
SCTV	중국	1,000	3,000T	10	30,000,000	식품

- B2B 전략을 통한 국내시장 KP-1 판매 확대
- 해외 시장은 인허가가 어렵기 때문에 원료 산업 중심으로 사업화
- 이후 직접 완제품 수출을 위한 제품 인허가 진행
- 본사 매출이 2015년 298백만원, 2016년도 451백만원으로 지속적으로 성장

사업화 계획 및 기대효과

구 분		(2016)년 (기술개발 전년)	(2017)년 (개발종료 해당년)	(2018)년 (개발종료 후 1년)	(2019)년 (개발종료 후 2년)
사업화 제품		마디찬, kp-1	kp-1	kp-1	kp-1
투자계획(백만원)		40	100	500	1,000
판매 계획 (백만원)	내 수	451	1,000	3,000	10,000
	직접수출	-	5,000	10,000	30,000
	간접수출	-	10,000	20,000	50,000
	계	451	16,000	33,000	90,000
비용절감(백만원)		100	300	10,000	20,000
수입대체(백만원)		100	500	15,000	30,000

- 기업부설연구소를 보유하고 있으며, 인력 충원을 계속하고 있음
- 2017년 6월 현재 대표자 외 석사연구원 3명 근무 중
- 이후 지속적으로 연구인력 및 마케팅 인력을 보강 계획 중 임

고용 현황 및 기대효과

구 분	(2016)년 (기술개발 전년)	(2017)년 (개발종료 해당년)	(2018)년 (개발종료 후 1년)	(2019)년 (개발종료 후 2년)
신규고용(명)	2	2	3	5
상시고용(명)	2	4	7	13

(3) 사업화성과 및 매출실적

(가) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	9백만원	
			향후 3년간 매출	100억원	
		관련제품	개발후 현재까지	9백만원	
			향후 3년간 매출	150억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.3 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 3 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0.3 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 3 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			30위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			10위

(나) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간 (년)		1년		
	소요예산 (백만원)		10억원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.09	100	300
	시장 점유율	단위 (%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.3	20	30
		국외	0	3	10
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		기억력 개선 천연물 신약 소재, 관련 원료 소재 건강기능성 식품 원료소재			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체 (내수)		0	10	15
	수 출		0	1.5	5

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

가. 정량 평가

- 기술실시 1건, 사업화 1건, 특허출원 1건, 인력양성 5명, 해당 연구개발 완료

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 및 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	1			1		1						1				2			
달성도 %	20			20		20						0				20			
합계	80%																		

나. 정성 평가

(1) 원료 표준화

- 제형 결정, 제제개발 및 제조방법 확립
 - 200 mg의 KP-1이 함유된 500 mg 캡슐 제형
- 제조법 Scale-up 실시
 - KP-1의 각 배치별 지표성분 함량 변화 측정으로 Scale-up
- 전체 공정도 완성
 - 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건이 안정적인 공정도 완성
- 제조법 확립
 - 대량생산 체제 구축 시 지표성분 함유량을 측정하여 제조공법 확립
- 기준 및 시험방법 설정
 - 지표 성분인 Fukinolic acid를 이용한 full validation 완료

(2) 유효 활성물질 분리 및 분석

- 유효 활성성분 분리 추출
 - 지표 성분인 Fukinolic acid를 순도 97.37 %로 분리
- 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석
 - 지표 성분인 Fukinolic acid의 성적서 발급 및 전 공정도 특허출원

(3) 지표성분 확인 시험법 개발

- 유효성분 확인 시험법 개발
 - Fukinolic acid 함량 및 확인 시험법 개발 완료
- 유효성분 확인
 - Fukinolic acid를 NMR 장비를 이용한 성분 규명
- 기준 및 시험방법 설정
 - Full validation으로 기준 및 시험방법 설정 완료
- LC/MS/MS condition 설정
 - Fukinolic acid의 분석 방법 및 기기조건 설정 완료
- HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인
 - 97.37 %의 높은 순도 확인
- 분석법 검증은 ICH 및 FDA Guideline에 따라 시행
 - 공인된 검증 방법으로 시행완료하고 식약처에 제공함

(4) 시제품 제작

- KGMP 적격 업체 OEM 제작
 - 전체 500 mg 캡슐에 KP-1이 200 mg 함유된 시제품을 제작
 - 인체적용시험(경희대학교 병원)에 활용

일련 번호	연구내용	달성도 (%)	합계
1	원료 규격 확립	20	100%
2	유효 활성물질 분리, 분석	20	
3	지표성분 확인 시험법 개발	20	
4	대량생산 제조 공정 확립	20	
5	시제품 제작	20	

4-2. 관련분야 기여도

가. 기술 개발 완료 후 연구 개발 성과의 관련 기여도

(1) 인력양성 5명

- 충북대학교, 경희대학교 학점 이수 및 취업연계 국가 근로 장학생 배출

(2) 특허출원 1건

- 신규 기억력 개선 기능성 특허
- 신규 유효성분 추출공법에 대한 특허

(3) 시제품 제작으로 인체적용시험

- 신규 시장 진출 후 기술 집약형 제품 군 출시
- 한방산업진흥원 및 경희대학교 협력하여 기술 집약형 개발 (MOU체결)

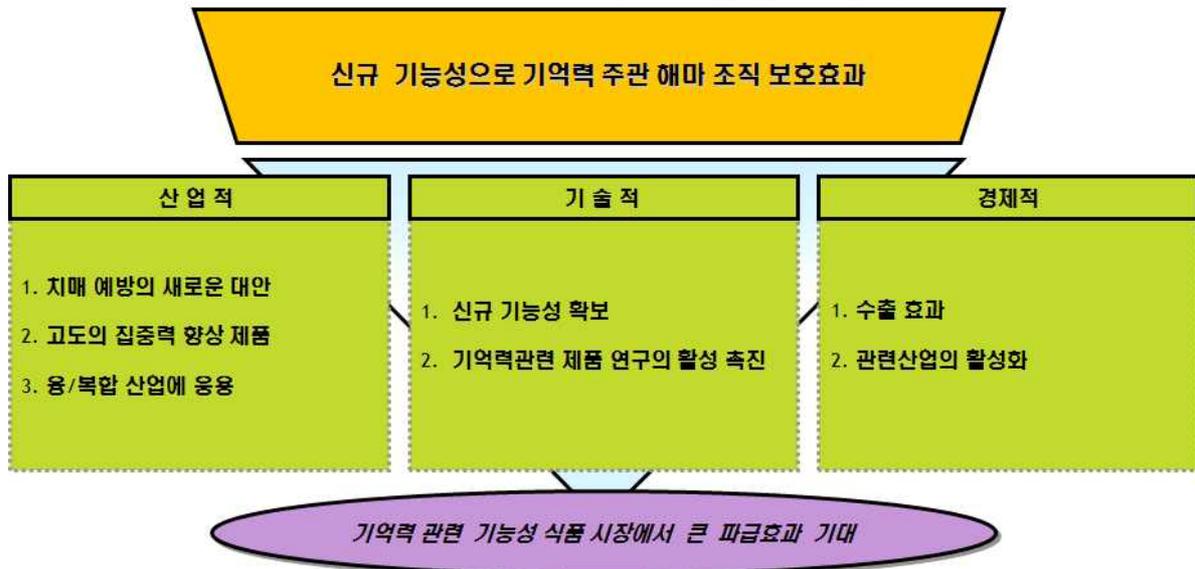
(4) 사업화로 인한 매출 기여

- 국산 잉여 농산물을 사용한 원료
- 낮은 제조 원가로 대중성 확보

(5) 융·복합 산업 육성

- 인지기능 연구의 발전으로 뇌기반 학습, 멀티미디어 교육 응용
- 뇌영상, 뇌과학 기반 컨설팅 등의 융합

“본사 개발 기억력개선/ 집중력 향상 기능성 식품”



나. 국내외 기술 및 제품에 대한 기여도

구분	싸이제닉	선경트레이딩(주)	CJ(주)	(주)바이오랜드	(주)뉴메드인삼	(주)한국인삼공사	(주)브레인트로피아	(주)네추럴에프앤피	대용바이오(주)	(주)엘지생활건강	네이처바이오	
	(참당귀 추출분말)	(대두포스타티릴세린)	(씨제이테아닌등복합추출물)	(피브로인추출물 BF-7)	(가시오갈피등혼합추출물)	(홍삼농축액)	(원지추출물)	(은행잎추출물)	(당귀등추출복합물)	(녹차추출물/테아닌복합물강)	(KP-1)	
제품가격	100%	85%	70%	70%	80%	70%	60%	60%	60%	60%	30%	
시장점유율	국내	10	20	5	5	20	25	3	3	3	5	1
	해외	10	15	4	4	20	35	3	3	3	3	0
기술적 차이	추출공법	물추출	물추출	물추출	주정추출	물추출	물추출	주정추출	주정추출	물추출	물추출	침전공법
	기억력 신경조직 보호	20%	-	20%	30%	-	-	-	-	-	-	70%
	기억력 개선 기능		30%			20%	20%	30%	20%	20%	20%	50%
	대사과정	경구	경구	경구	경구	경구	경구	경구	경구	경구	경구	경구

*보건산업진흥원 고령친화식품산업 활성화 지원방안 보고서 (2013)

*보건복지부 미래 질환별 건강기능식품 용·복합 핵심기술 연구 개발지원 (2011)

*고령화로 주목받는 유망실버산업 제품 및 시장동향 (2015)

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

가. 세계최고 수준의 기억력 개선 건강기능성 식품으로 시장 확대

- 본 제품을 치매 등 대표적인 퇴행성 뇌질환을 예방하고 개선할 수 있으며 청소년기의 집중력 향상에 도움을 주는 건강기능성 식품으로 활용 계획

국내·외 시장 규모

(단위 : 억원)

구 분	현재의 시장규모(2016년)	예상 시장규모(2025년)
세계 시장규모	5,688	10,976
국내 시장규모	2,563	5,129
산출 근거	1.보건산업진흥원 고령친화식품산업 활성화 지원방안 보고서(2013.12) 2.보건복지부 미래 질환별 건강기능식품 융·복합 핵심기술 연구개발지원(2011.07)	

나. 해외시장 진출로 인한 국가 성장 및 신규고용 창출, 생산농가 소득증가

(1) 일본시장 원료소재

- 관련 기능성 식품 제조 회사 등에 원료 공급
- 일본 내 머위관련 제품 (식품, 음료, 기능성 제품) 시장이 형성 있음
- 최적의 기능성을 갖춘 소재를 개발하고 이를 추출 가공하여 수출

(2) 개발기술에 대한 신규 특허 획득

- 신규 기억력 개선 및 집중력 향상 기능성 특허
- 해외 제조업체 기술 라이선스 수출

(3) 개발기술의 기술 집약형 제품 개발

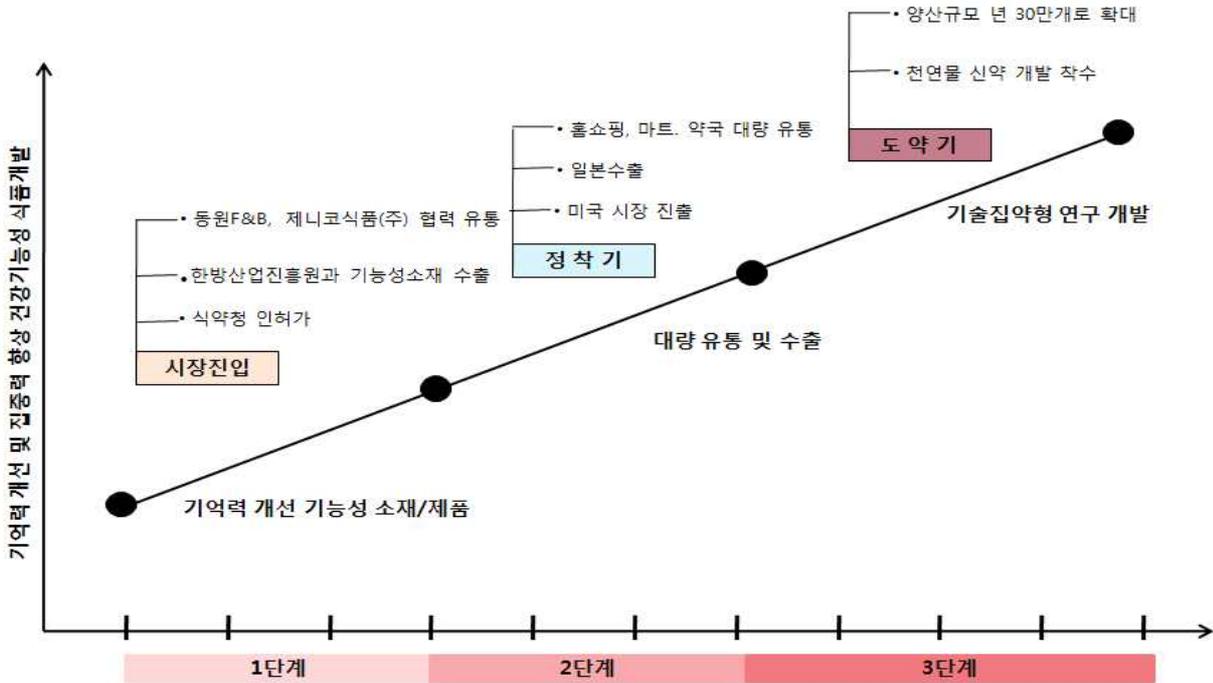
- 신규 시장 진출 후 기술 집약형 제품 군 출시
- 천연물 의약품 개발로 인한 해외 시장 진출

(4) 타 시장·제품에 대한 확대가능성 및 파급효과

< 수익 모델 >



< 주요 고객군 >



- * 65세 이상의 고령인구 정도인지 장애 인구 및 치매 예방 수요자
- * 고도의 학습 집중력이 요구되는 청소년
- * 해외 수요처

< 주요 판매처 현황 >

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량 (개)	예상 판매기간 (년)	예상 총 판매금 (천원)	관련제품
(주)윌니허브	한국	50	10,000	10	5,000,000	건강기능성 식품
동원산업	한국	50	100,000	10	50,000,000	건강기능성식품
제니코(주)	한국	50	100,000	10	50,000,000	건강기능성식품
국내 홈쇼핑업체	한국	50	10,000	10	5,000,000	건강기능성 식품
일본 식품회사	일본	58	100,000	10	58,000,000	기능성 원료 (한방산업진흥원 공동 마케팅)
현지 바이어	미국	60	100,000	10	60,000,000	기능성 식품

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

가. Fukinolic acid의 bioactivity

(1) Estrogenic effect

(가) 갱년기 (Menopause)

- 전세계적인 여성 질환.
- 홍조, 식은 땀, 질 건조증, 화를 잘 내는 등의 증상.
- 갱년기 후, 만성질환의 발생 정도 증가. (ex. 치매, 골다공증, 심장 혈관계 질환 등)

(나) Gold standard : 호르몬 치료 (에스트로겐 and/or 테스토스테론)

(다) 대체 치료법

- 약초 치료 → 승마가 가장 대표적 (Active ingredient : Fukinolic acid)

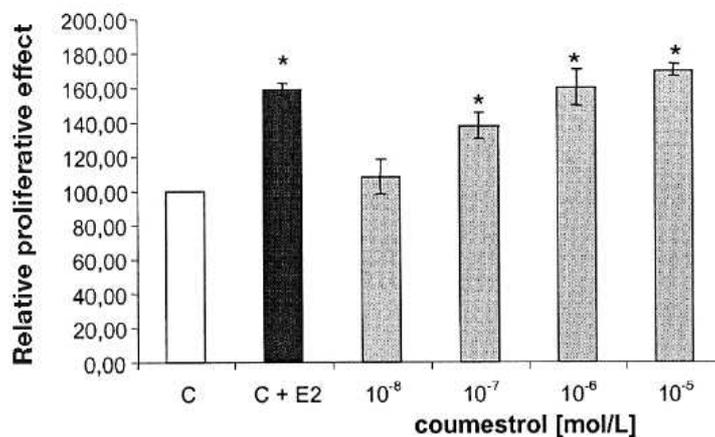
(라) Data

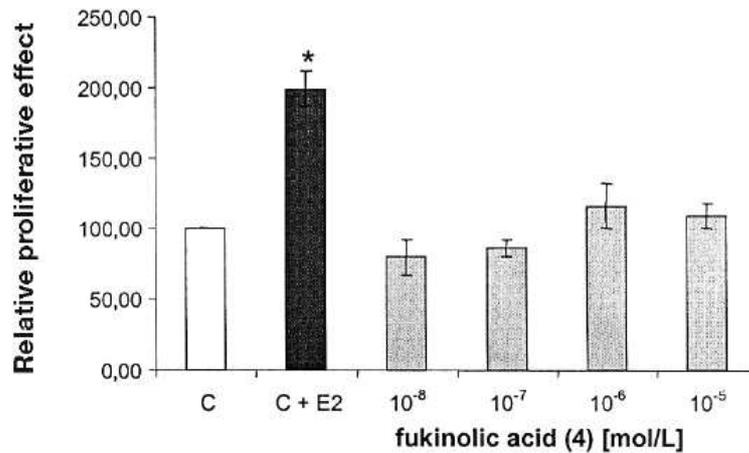
[the effect of Fukinolic acid on estrogen dependent MCF-7 cell proliferation as a test system]

	Dose (M)	The increased cell proliferation
Estradiol reference	10^{-10}	119.7 % ± 8.9 (p < 0.01)
Fukinolic acid	5×10^{-7}	119.7 % ± 5.8 (p < 0.05)
Fukinolic acid	5×10^{-8}	126.3 % ± 5.1 (p < 0.001)
Fukinolic acid	5×10^{-9}	1.1 % ± 6.6

* Fukinolic acid는 estrogen activity를 갖는다.

[Relative proliferation effects of selected compounds]





C = control, C+E2 = control + 17β-estradiol at 10⁻¹¹M,*p=0.05 to control.

*Fukinolic acid는 estrogen activity를 갖지 않는다.

*서로 상반되는 결과로, Fukinolic acid의 estrogenic activity에 대한 논쟁 진행 중

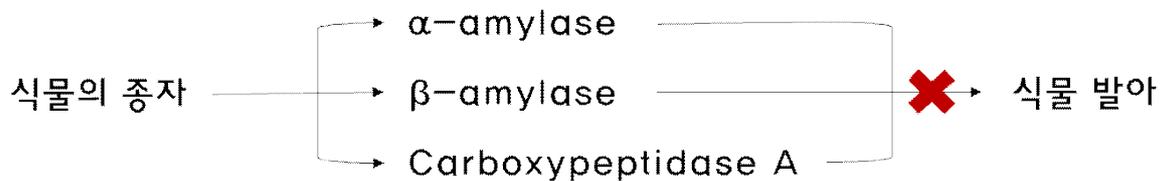
[Reference]

a. Kruse, S. O.; Lohning, A. Pauli, G. F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A. Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of cimicifuga racemosa and the *un vitro* estrogenic activity of Fukinolic acid. *Planta Med.* 1999. 65. 763-764.

b. Stromeier, S.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Phenolic esters from the rhizome of cimicifuga racemosa do not cause proliferation effects in MCF-7. *Planta Med.* 2005. 71. 495-500.

나. Inhibitory activity on seed germination

(1) 식물 종자의 발아



*α, β-amylase: 식물 종자의 발아 시, 대량 합성되어 저장 녹말 분해

*Carboxypeptidase A: 식물 종자의 발사 시, 저장된 단백질을 사용하여 자라는 cell 순환

(2) Data

[Inhibitory activity of Fukinolic acid in α -amylase]

Compounds	Concentration (M)	Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (M)
Fukinolic acid	1.0×10^{-3}	92.7	4.00×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	87.8	
	1.0×10^{-4}	74.0	
	5.0×10^{-5}	61.9	
	1.0×10^{-5}	0.6	
Control Acarbose	1.0×10^{-3}	88.5	9.20×10^{-5}
	5.0×10^{-4}	66.7	
	1.0×10^{-4}	51.4	
	5.0×10^{-5}	37.1	

α -amylase: from barley malt. In standard assay at pH 5.0 mean for duplicate assays on each sample.

[Inhibitory activity of fukinolic acid on carboxypeptidase A]

Compounds	Concentration (M)	Inhibition rate (%) ^{a)}	IC ₅₀ (M)
Fukinolic acid	1.0×10^{-3}	89.3	1.73×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	76.3	
	1.0×10^{-4}	38.1	
Control 1,10-Phnanthro	1.0×10^{-3}	73.1	4.21×10^{-4}
	5.0×10^{-4}	57.5	
	1.0×10^{-4}	12.8	

Carboxypeptidase A: from bovine pancreas. ^{a)}In standard assay at pH 7.5 mean for duplicate assays on each sample.

*Fukinolic acid는 α -amylase와 carboxypeptidase A를 저해하여 식물의 발아를 저해한다.

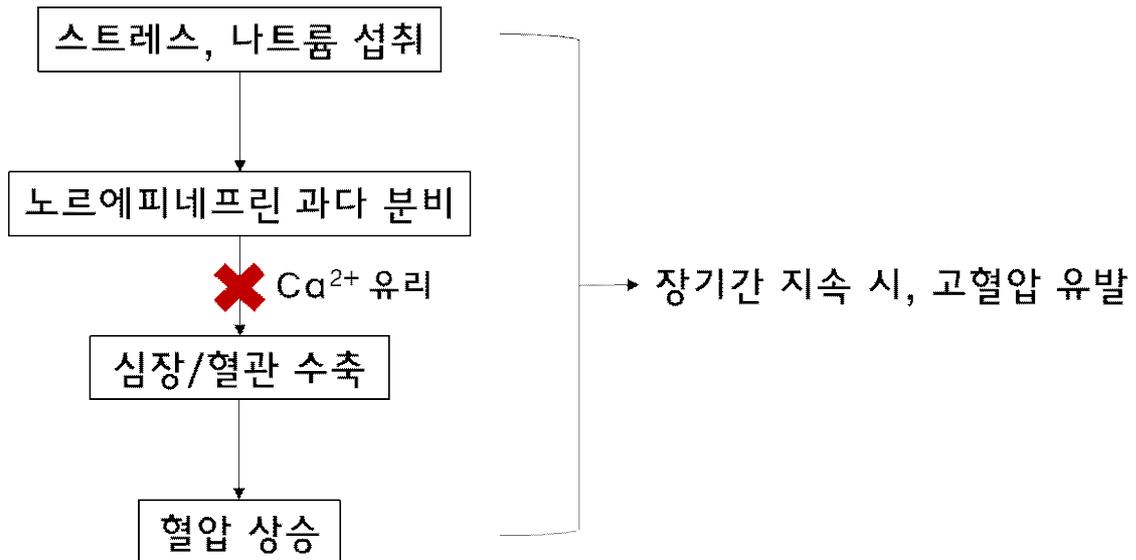
[Reference]

a. Kruse, S. O.; Lohning, A. Pauli, G. F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A. Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *cimicifuga racemosa* and the *un vitro* estrogenic activity of Fukinolic acid. *Planta Med.* **1999**. *65*. 763-764.

b. Stromeier, S.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Phenolic esters from the rhizome of *cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7. *Planta Med.* **2005**. *71*. 495-500.

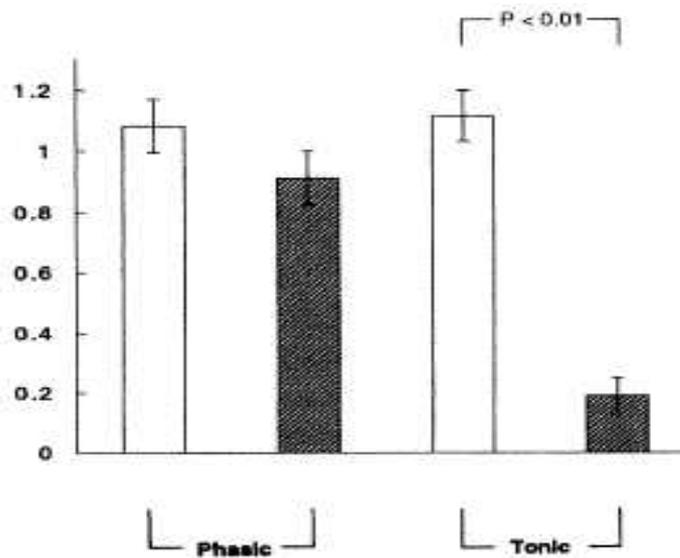
다. Vasoactive effect

(1) 혈압 상승 작용



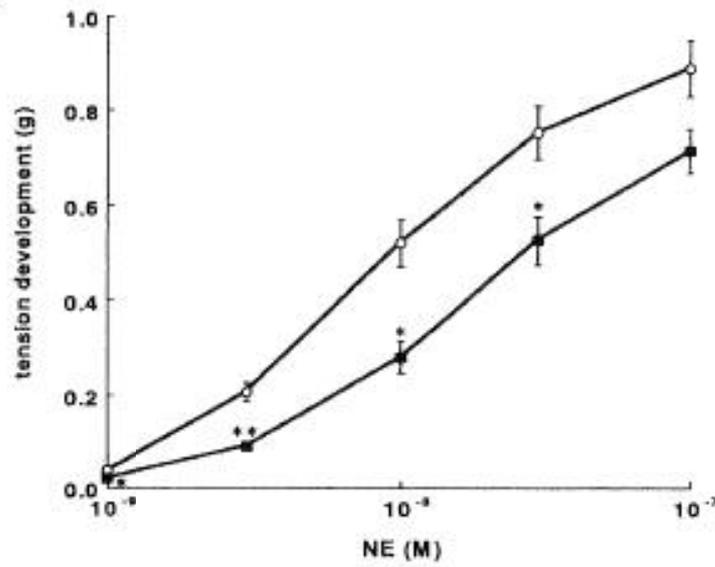
(2) Data

[Effect of fukinolic acid on the norepinephrine (NE)-induced phasic and tonic concentration of rat aortic strips]



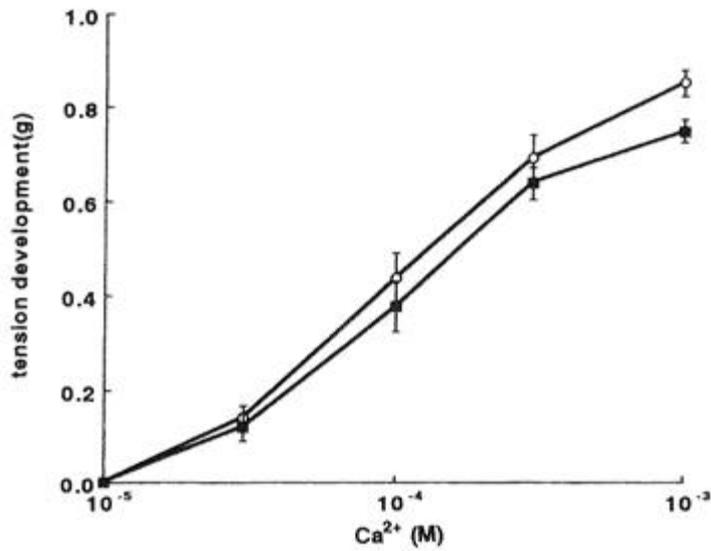
Control (□) and presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (▨). Values are the means \pm S.E. of 3 determinations.

[Effects of fukinolic acid on concentration response curves for NE-induced concentration of rat aortic strips]



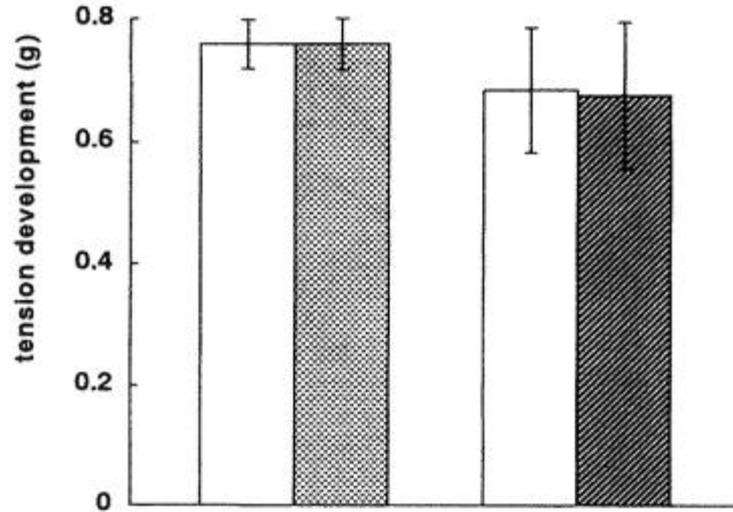
Control (○) and presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (■). Values are the means ± S.E. of 4 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[Concentration response curves for contractile responses of the aortic strips to Ca²⁺ in the absence (○) and the presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (■) in a Ca²⁺-free medium preincubated with high potassium (60 mM).]



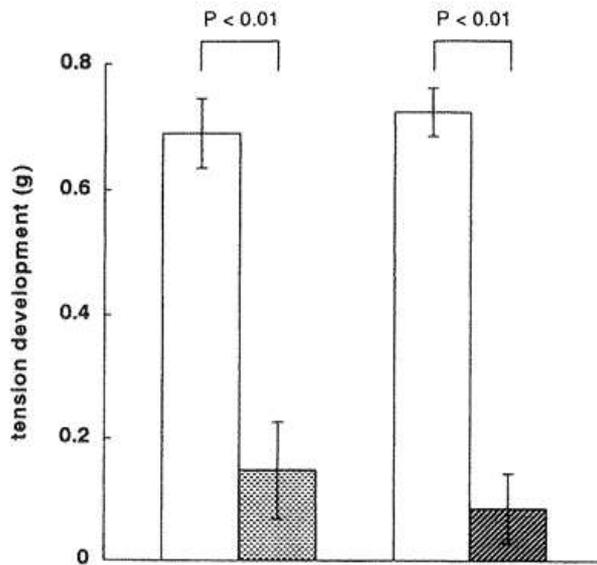
Values are the means ± S.E. of 4 determinations.

[High potassium (40 mM)-induced contraction on the aortic strips in the absence (○) and the presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (■) in a medium preincubated with prazosin (10^{-6} M)]



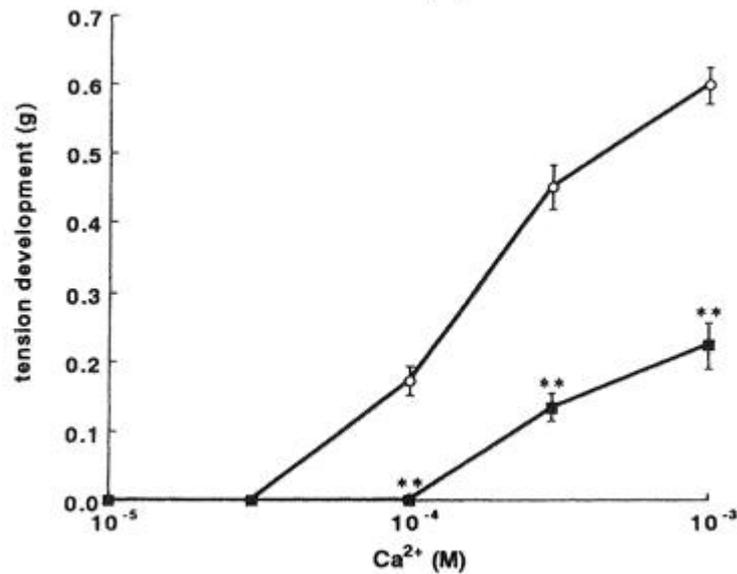
Values are the means \pm S.E. of 4 determinations.

[Effects of fukinolic acid against the 10^{-7} M NE-induced contraction on the aortic strips in a medium preincubated with nicardipine (10^{-6} M)]



Control (□) and presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (▨). Values are the means \pm S.E. of 3 determinations.

[Concentration response curves for contractile responses of the aortic strips to Ca^{2+} in the absence(\circ) and the presence of 3×10^{-4} M fukinolic acid (\blacksquare) in a Ca^{2+} -free medium preincubated with norepinephrine (10^{-6} M) and nifedipine (10^{-6} M)]



Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. ** $p < 0.01$.

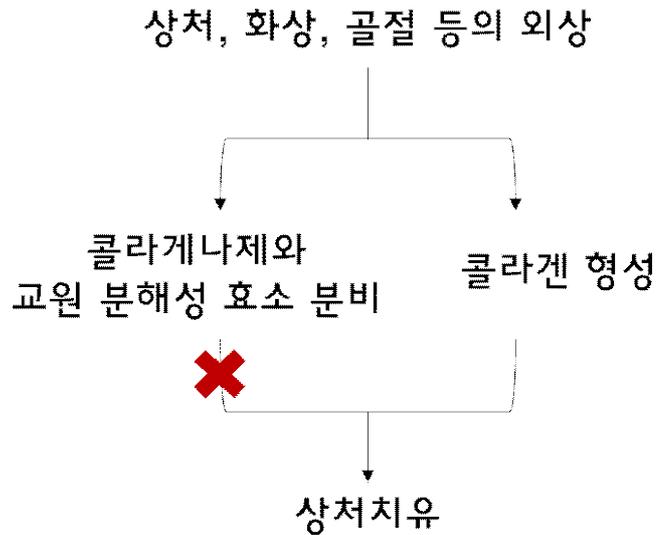
*Fukinolic acid는 노르에피네프렌에 의해 확장된 외부 공간으로부터 Ca^{2+} 의 유입을 억제하여 혈관 수축을 저해한다.

[Reference]

Noguchi, M.; Nagai, M.; Koeda, M.; Nakayama, S.; Sakurai, N.; Takahira, M.; Genjiro, K. Vasoactive effect of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in cimicifuga rhizome. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**. *21*. 1163-1168.

라. Collagenolytic activity

(1) 상처 치유 과정



(2) Data

[Inhibitory Effect of fukinolic acid on collagenolytic activities with collagenase (1 µg)(%)]

Compound	Inhibition (%)			
	100 µg	50 µg	10 µg	5 µg
Fukinolic acid	51	23	8	0

10 µg = 22 nM, 50 µg = 0.11 µM, 100 µg = 0.22 µM

[Inhibitory effect of fukinolic acid on collagenolytic activities of trypsin and pronase E]

		Collagenolytic activity	Inhibition (%)
1	Collagenase 1 µg	100	
2	Trypsin 10 µg	70	
3	2+ Fukinolic acid 10 µg	62	12
4	2+ Fukinolic acid 50 µg	49	30
5	2+ Fukinolic acid 100 µg	42	40
6	Pronase E 10 µg	188	
7	6+ Fukinolic acid 10 µg	168	22
8	6+ Fukinolic acid 50 µg	144	23
9	6+ Fukinolic acid 100 µg	130	31

*Fukinolic acid는 collagenolytic enzyme이나 collagenase를 저해하여 콜라겐의 분해를 막는다.

[Reference]

Kusano, A.; Seyama, Y.; Nagai, M.; Shibano, M.; Kusano, G. Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from cimicifuga species on collagenolytic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 2001. 24. 1198—1201.

마. Inhibition of neutrophil elastase activity

(1) 호중구 (Neutrophil)

- 과립 백혈구의 일종
- 체내 침입한 세균과 같은 유해 자극원을 식작용하여 흡수

(2) 호중구 엘라스타제 (Neutrophil elastase; ELA2)

- 단백질 분해 효소 (ex. 엘라스틴)
- 조직의 신진대사, 생체 방어에 사용되지만, 염증성 질환에서는 조직 파괴의 원인으로 작용

(3) Data

[Phenolic compounds from *Cimifuga racemose*
and their inhibitory activity towards neutrophil elastase]

Phenolic compound	IC ₅₀ (μ M)
Caffeic acid	93
Isoferulic acid	>50
Fukinolic acid	0.23
Cimicifugic A	2.2
Cimicifugic B	11.4
Cimicifugic F	18
Cimicifugic E	>50

Fukinolic acid IC₅₀ = 0.1 μ g/ml (0.23 μ M)

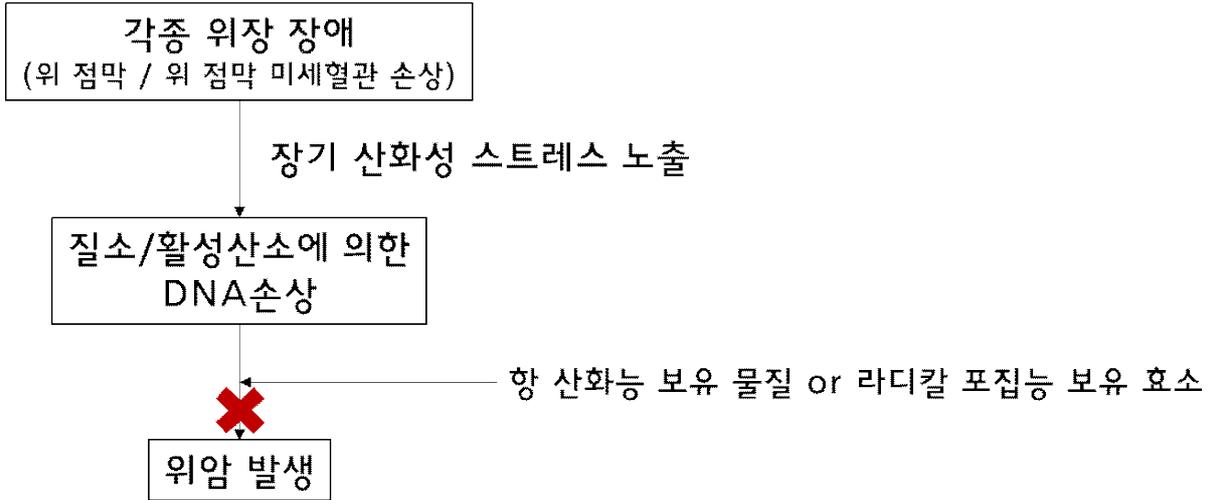
*Fukinolic acid는 호중구 엘라스타제를 저해한다.

[Reference]

Loser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A. Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from cimicifura racemose. *Planta. Med.* 2000. 66. 751-753.

바. Anti-oxidant activity

(1) 산화 작용



(2) Oxygen free radical

- 생체 내 친핵성 물질 공격 → 동맥경화, 당뇨, 암, 염증 등 유발
- 스트레스나 NSAID, Helicobacter pylori에 의한 위 점막 상해요인으로 관여할 것이라 추측됨
⇒ Radical scavenging activity 필요

(3) Data

[Summary of radical scavenging activity of fukinolic acid (FA), in comparison with that of epigallocatechin gallate (EGCG), gallic acid (GA) and chlorogenic acid (CGA)]

	Radical scavenging activity against				
	O_2^- (SOD unit/nmol)	$OH\cdot$ (IC_{50} :mM)	NO (IC_{50} : μ M)	DPPH (% of inhibition at 25 μ M)	DPPH (OD method)
FA	1.03	1.01	≥ 20	58.2	2.35
CGA	0.66	<1.00	>20	50.2	1.00
EGCG	3.19	<<1.00	<20	100.0	2.63
GA	2.40	1.31	10.1	74.4	N.D.
Order of potency	EGCG>GA >FA>CGA	EGCG>CGA >FA>GA	EGCG, GA >FA>CGA	EGCG>GA >FA>CGA	EGCG>FA >CGA

N.D., not determined. Three popular antioxidants : epigallocatechin gallate (EGCG), gallic acid (GA), chlorogenic acid (CGA)

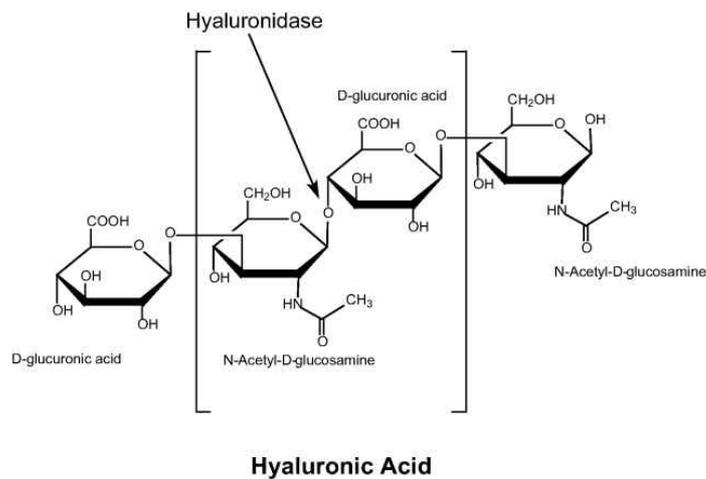
* Fukinolic acid는 대식세포 내의 일산화질소(NO)의 생성을 저해하고 Radical Scavenging Activity를 갖는다.

[Reference]

- a. Watanabe, S.; Hashimoto, K.; Tazaki, H.; Iwamoto, Y.; Shinohara, N.; Satoh, K.; Sakagami, H. *Food Sci. Technol. Res.* **2007**, *13*, 366–371.
- b. Burdette, J. E.; Chen, S.-N.; Lu, Z.-Z.; Xu, H.; White, B. E. P.; Fabricant, D. S.; Liu, J.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Constantinou, A. I.; Breemen, R. B. V.; Pezzuto, J. M.; Bolton, J. L. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7022–7028.
- c. Nuntanakorn, P.; Jiang, B.; Yang, H.; Cervantescervantes, M.; Kronenberg, F.; Kennelly, E. J. *Phytochem Anal.* **2007**, *18*, 219–228.

사. Anti-inflammatory activity

- (1) 염증과 조직 손상 시, 히알루로니다제는 염증을 더 악화시키는 전염증성 면역반응 (pro-inflammatory immune responses)를 도입하기 위해 고분자의 히알루론산을 저분자 조각으로 분해



- (2) Data

[Hyaluronidase inhibitory activities (IC₅₀) of fukinolic acid]

Compound	IC ₅₀ (μM)
Fukinolic acid	144
Rosmarinic acid	545

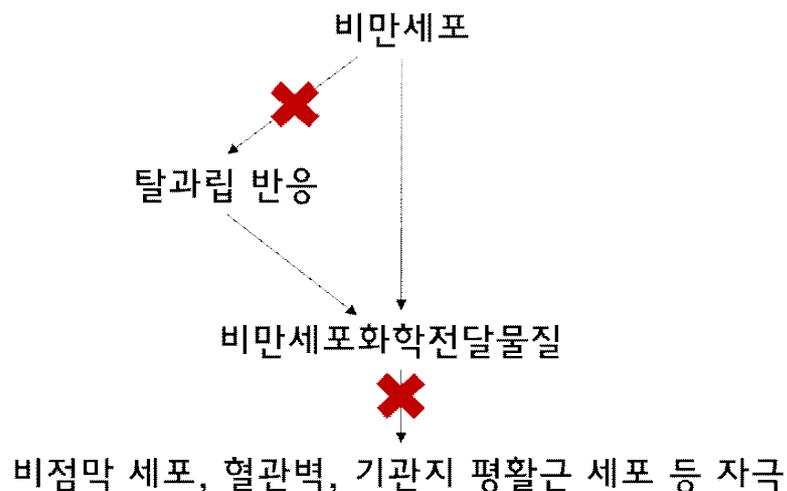
* Fukinolic acid는 히알루로니다제를 억제하여 항 염증 효과를 낸다.

[Reference]

- Iwanaga, A.; Kusano, G.; Warashina, T.; Miyase, T. Hyaluronidase inhibitors from “cimicifugae rhizoma” (a mixture of the rhizomes of cimicifuga dahurica and c. heracleifolia). *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 573–578.

아. Anti-allergic activity

(1) I형 알레르기 반응 - 일반적인 알레르기 증상



(2) Data

[Effect of constituents isolated from *Japanese Butterbur* extract (JBE) on degranulation in RBL-2H3 induced by antigen-antibody reaction]

Compound	IC ₅₀ [μg/ml (μM)]
JBE	5.8
(+)-fukinone (1)	4.2 (19.1)
Caffeic acid (2)	8.6 (47.8)
2β-hydroxyfukinone (3)	4.0 (16.9)
Chlorogenic acid (4)	9.5 (26.8)
Fukinolic acid (5)	2.1 (4.8)
4,5-dicaffeoylquinic acid (6)	3.3 (6.4)
3,5-dicaffeoylquinic acid (7)	2.9 (5.6)
4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester (8)	4.0 (7.5)
Dotorioside II (9)	4.0 (6.0)
Mussaendoside R (10)	>100 (>126)
luteolin	1.0 (3.5)

Sensitized RBL-2H3 cells were incubated with samples for 10 min followed by stimulation by DNP-BSA for 10 min. Released β-hexosaminidase activity in supernatant was determined enzymatically.

*Fukinolic acid는 비만 세포의 탈과립 반응을 억제하여 항 알레르기 효과를 낸다.

[Reference]

Shimoda, H.; Tanaka, J.; Yamada, E.; Morikawa, T.; Kasajima, N.; Yoshikawa, M. Anti-type I allergic property of Japanese butterbur extract and its mast cell degranulation inhibitory ingredients. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2915-2920.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
- 해당 없음 -	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호	
				-해당없음-					

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>○ 안전조치 이행실적</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 화재경보기 기 설치, 소화기 구비 ● 외부 환기 시설 구축 및 실험실 마스크 착용, 안전 교육 주 1회 실시 ● 장비 사용에 대한 교육 주 1회 실시 ● 액화질소 사용 시 안전교육 주 1회 실시 및 보호 장구 착용 강화 ● 건강검진 경희대 병원 년 1회 실시 ● 산재보험 가입 	

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호	D-12			
번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)	
1	특허	머위 잎으로부터 푸키놀릭산을 분리하는 방법	(주)네이 처바이오	출원인	대한민국	-	2017.08.02	단독사사	-	

11. 기타사항

코드번호

D-13

개별인정형 건강기능성식품 인증을 식품의약품안전처 모뎀토의 결과

장소 : 식품의약품안전처 연구심사동 210호

일시 : 2017.05.02 화요일 14:00

참석자 : 식품의약품안전처 영양기능연구팀 - 서일원, 문명희, 정태용, 이화정, 배민주, 권용관
(주)네이처바이오 - 박상수, 김해미

내용 :

* 원료

- 가. 원재료로 머위 잎을 선정한 이유에 대해 명시(선정하게 된 스토리 필요)
 - 식물형태학적인 부분, 수용성, 등등

* 제조방법

- 나. 각 제조방법에 대한 기술적 풀이

* 규격

- 다. Fukinolic acid의 기능적인 부분에 대해서 안전성 고려 및 타당성 필요
 - 기억력 개선, 혈당 수치 저하, 에스트로젠 유사 작용 효과 등
 - 실제 연구된 Fukinolic acid 함량과 함유되어 있는 함량 비교
- 라. Fukinolic acid 합성 제안
- 마. Fukinolic acid 안정성 실험 디자인
 - 의약품 ICH 가이드라인의 안정성 Test 참고

* 안전성

- 바. 독성시험 필요
 - 제조방법이 단순 추출로 보기 어려워 원료의 독성시험 필요
 - 일성 섭취량보다 증가 유무를 알 수 없어 의사결정도 '다'에 해당
- 사. 인체적용시험 사례 보안

* 기능성

- 아. 기억력 개선 작용에 대한 명확한 기전 설명 필요 (In vitro, in vivo)
- 자. 동물실험 내용에 마우스 숫자 명시
- 차. 실험결과에 대한 해석 기재
- 타. 인체적용시험 대조식품의 치자그린색소의 기억력 개선 기능 확인
- 파. 인체적용시험의 통계처리 2가지 방법 모두 실시 (ITT, PP)

12. 참고문헌

코드번호	D-14
1. Nutrition Business Journal, Euromonitor 2014	
2. NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report, Netirition Bussness Journal 2012	
3. 장래인구추계, 통계청 2006	
4. 보건산업진흥원 고령친화식품산업 활성화 지원방안 보고서 2013	
5. 보건복지부 미래 질환별 건강기능식품 융·복합 핵심기술 연구개발지원 2011	
6. 고령화로 주목받는 유망실변산업 제품 및 시장동향 2015	
7. 국내치매 유병률 연구현황, 보건복지가족부 2008	
8. Kruse, S. O.; Lohning, A. Pauli, G. F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A. Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of cimicifuga racemosa and the <i>un vitro</i> estrogenic activity of Fukinolic acid. <i>Planta Med.</i> 1999. <i>65.</i> 763-764.	
9. Stromeier, S.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Phenolic esters from the rhizome of cimicifuga racemosa do not cause proliferation effects in MCF-7. <i>Planta Med.</i> 2005. <i>71.</i> 495-500.	
10. Kruse, S. O.; Lohning, A. Pauli, G. F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A. Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of cimicifuga racemosa and the <i>un vitro</i> estrogenic activity of Fukinolic acid. <i>Planta Med.</i> 1999. <i>65.</i> 763-764.	
11. Stromeier, S.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. Phenolic esters from the rhizome of cimicifuga racemosa do not cause proliferation effects in MCF-7. <i>Planta Med.</i> 2005. <i>71.</i> 495-500.	
12. Noguchi, M.; Nagai, M.; Koeda, M.; Nakayama, S.; Sakurai, N.; Takahira, M.; Genjiro, K. Vasoactive effect of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in cimicifuga rhizome. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 1998. <i>21.</i> 1163-1168.	
13. Kusano, A.; Seyama, Y.; Nagai, M.; Shibano, M.; Kusano, G. Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from cimicifuga species on collagenolytic activity. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 2001. <i>24.</i> 1198-1201.	
14. Loser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A. Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from cimicifura racemose. <i>Planta. Med.</i> 2000. <i>66.</i> 751-753.	
15. a. Watanabe, S.; Hashimoto, K.; Tazaki, H.; Iwamoto, Y.; Shinohara, N.; Satoh, K.; Sakagami, H. <i>Food Sci. Technol. Res.</i> 2007, <i>13,</i> 366-371.	
16. Burdette, J. E.; Chen, S.-N.; Lu, Z.-Z.; Xu, H.; White, B. E. P.; Fabricant, D. S.; Liu, J.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Constantinou, A. I.; Breemen, R. B. V.; Pezzuto, J. M.; Bolton, J. L. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2002, <i>50,</i> 7022-7028.	
17. Nuntanakorn, P.; Jiang, B.; Yang, H.; Cervantescervantes, M.; Kronenberg, F.; Kennelly, E. J. <i>Phytochem Anal.</i> 2007, <i>18,</i> 219-228.	
18. Iwanaga, A.; Kusano, G.; Warashina, T.; Miyase, T. Hyaluronidase inhibitors from "cimicifugae rhizoma" (a mixture of the rhizomes of cimicifuga dahurica and c.	

heracleifolia). *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 573–578.

19. Shimoda, H.; Tanaka, J.; Yamada, E.; Morikawa, T.; Kasajima, N.; Yoshikawa, M. Anti-type I allergic property of japanese butterbur extract and its mast cell degranulation inhibitory ingredients. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2915–2920.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발				
	Development of functional foods for memory-enhancing from butterbur leaf derived KP-1 by standardization and identification of constituents				
주관연구기관	(주)네이처바이오		주 관 연 구 책 임 자	(소속)(주)네이처바이오	
참 여 기 업				(성명) 박상수	
총연구개발비 (70,000천원)	계	70,000	총 연 구 기 간	2016.08.19~2017.08.18(1년0월)	
	정부출연 연구개발비	50,000	총 연 구 원 수	총 인 원	3
	기업부담금	20,000		내부인원	3
	연구기관부담금	0		외부인원	0

- 연구개발 목표 및 성과
 - KP-1의 원료 표준화
 - KP-1의 유효성분 검출 지표성분 확인
 - KP-1의 지표성분 확인 시험법 개발
 - KP-1의 최종 시제품 개발

- 연구내용 및 결과
 - 제형 결정, 제제개발 및 제조방법 확립
 - 제조법 Scale-up 실시
 - 전체 공정도 완성
 - 기준 및 시험방법 설정
 - 유효 활성성분 분리 추출
 - 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석
 - 유효성분 확인 시험법 개발
 - 기준 및 시험방법 설정
 - LC/MS/MS condition 설정
 - HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인
 - 시제품 제작

- 연구성과 활용실적 및 계획
 - 기술실시 1건, 특허출원 1건, 사업화 1건, 인력양성 5명
 - 기억력 개선 개별 인정형 인허가 추진
 - 주요 매출처 계약 확대 및 국외 원료 소재 수출
 - 재배 농가 수익원 증가

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	116044-1	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	기능성 식품소재 개발			과제구분	단위
사업명	고부가가치 식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발			과제유형	(개발)
연구기관	(주)네이처바이오			연구책임자	박상수
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.08.19 ~ 2017.08.18	50,000	20,000	70,000
	2차년도		-해 당 없 음-		
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계				
참여기업	-해 당 없 음-				
상대국	-해 당 없 음-	상대국연구기관	-해 당 없 음-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017. 08.19

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)네이처바이오	대표이사	박상수

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

기억력 개선 건강기능성 식품 개발에 활용될 수 있는 기술개발로 그 결과물이 식품의약품 안전처의 개별인정형 가이드라인에 의한 개발되어져 향후 관련 인허가를 득 할 수 있는 개발 결과임.
기존 관련 기술대비 우수한 기술적 성과를 이루었음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

기억력 개선에 관련된 천연물 연구개발을 통해 개발된 기술로 관련 기능성 제품이나 천연물 신약에 많은 기술적 파급효과를 가져올 수 있으며, 원료표준화를 통해 원료에 대한 신뢰도, 기능성에 대한 표준화가 이루어져 있어 관련 산업이나 연구개발에도 많은 영향을 가져올 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

국내 노령인구 및 전 세계적인 고령화 추세로 인한 퇴행성 뇌질환이 증가하고 있고, 그 중에서도 가장 심각한 문제인 치매를 사전에 예방할 수 있는 제품을 개발함에 국내외적으로 많은 고부가가치를 창출할 수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

기술개발에 있어 목표했던 기술개발을 이루기 위해서는 많은 연구비와 노력이 동반되어야하는데, 다소 부족한 연구비를 가지고도 목표했던 기술개발을 이루었고 이는 많은 노력을 통해 이루어짐.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

목표했던 특허 출원을 완료하였으나, 다소 아쉽게 SCI급 논문을 5회 투고하였으나 연구개발 기간 안에 등재되지 못함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원료 규격 확립	20	100	원료 규격 확립
유효 활성물질 분리, 분석	20	100	Fukinolic acid 분리 및 분석 완료
지표성분 확인 시험법 개발	20	100	Fukinolic acid 함량 분석 시험법 개발 완료
대량생산 제조 공정 확립	20	100	각 생산 원료별 지표성분 함량 분석으로 대량 생산체제 구축완료
시제품 제작	20	100	KP-1 캡슐제형 시제품 제작 완료
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

기억력 개선 관련 소재인 KP-1의 원료표준화, 지표성분 설정, 관련 생산별 지표성분함량 분석으로 대량생산 체제를 구축함.
지표성분 함량 시험법은 자체 개발하여 공인된 기관에 최종적으로 시험법 검토 및 성적서를 발급함. 특히, 가장 적합한 제형으로 시제품을 생산하여 인체적용 시험에 활용할 예정임.
기술실시 1건, 특허 출원 1건, 인력양성 5명, 사업화 1건을 달성하여 기술개발을 훌륭하게 수행함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

기억력 개선 관련 소재 기술개발의 완성도 및 공인기관 성적서를 최종적으로 발급받은 우수한 기술력을 평가시에 확인 요청.
정량달성 지표 중 SCI급 논문을 등재하지 못하였으나 1년 기술개발 기간 내에 5회를 투고하였음.
관련 사항을 고려요청.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

기억력 개선 관련 원료 판매 중에 있으며, 인체적용 시험이 완료 됨과 동시에 개별인정형 기억력 개선 건강기능성 원료를 인허가를 추진 예정임.
국내 시장을 1차적으로 B2B 전략으로 진출하고, 해외 시장에 원료 및 완제품으로 진출할 예정임.

IV. 보안성 검토

-해당없음-

1. 연구책임자의 의견

-해당없음-

2. 연구기관 자체의 검토결과

-해당없음-

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	고부가가치식품	
연구과제명	머위의 부산물인 잎으로부터 개발한 KP-1의 원료표준화와 지표성분 설정을 통해 기억력 개선 건강기능성 식품 개발			
주관연구기관	(주)네이처바이오	주관연구책임자	박상수	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	50,000,000	20,000,000	-	70,000,000
연구개발기간	2016.08.19. ~ 2017.08.18			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(직접 실시) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① KP-1의 원료 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 제형 결정, 제제개발 및 제조방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 200 mg의 KP-1이 함유된 500 mg 캡슐 제형 • 제조법 Scale-up 실시 <ul style="list-style-type: none"> - KP-1의 각 배치별 지표성분 함량 변화 측정으로 Scale-up • 전체 공정도 완성 <ul style="list-style-type: none"> - 공정단계별 사용되는 물질 및 반응조건이 안정적인 공정도 완성 • 제조법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 대량생산 체제 구축 시 지표성분 함유량을 측정하여 제조공법 확립 • 기준 및 시험방법 설정 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid를 이용한 full validation 완료
② KP-1의 유효성분 검출 지표성분 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 유효 활성성분 분리 추출 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid를 순도 97.37 %로 분리 • 분리 공정 확립 및 유효 활성성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 지표 성분인 Fukinolic acid의 성적서 발급 및 전 공정도 특허출원

<p>③ KP-1의 지표성분 확인 시험법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 유효성분 확인 시험법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid 함량 및 확인시험법 개발완료 유효성분 확인 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid를 NMR 장비를 이용한 성분 규명 기준 및 시험방법 설정 <ul style="list-style-type: none"> - Full validation으로 기준 및 시험방법 설정 완료 LC/MS/MS condition 설정 <ul style="list-style-type: none"> - Fukinolic acid의 분석 방법 및 기기조건 설정 완료 HPLC를 이용한 분리된 물질의 순도 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 97.37 %의 높은 순도 확인 분석법 검증은 ICH 및 FDA Guideline에 따라 시행 <ul style="list-style-type: none"> - 공인된 검증 방법으로 시행완료하고 식약처에 제공예정
<p>④ KP-1의 최종 시제품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> KGMP 적격업체 OEM 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 전체 500 mg 캡슐에 KP-1이 200 mg 함유된 시제품을 제작 - 인체적용시험(경희대학교 병원)에 활용

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						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	1			1		1						1					2			
연구기간 내 달성실적	1			1		1						0					5			
달성율 (%)	100%			100%		100%						0%					100%			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Fukinolic acid 대량분리
②	KP-1 제형개발
③	Fukinolic acid의 확인 및 함량분석법 개발

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	✓						✓			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	KP-1의 원료의 품질 검사용 활용, 해외 표준물질 공급원에 성분등록 및 판매
②의 기술	기억력 개선 개별인정형 제품으로 활용
③의 기술	원료산업을 통한 국내외 진출 시에 활용 및 자사 제품 원료확인 시험에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SC I	비 SC I	논문 평균 IF	학술발표			정책 활용	홍보 전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표	1			1		1					1				2					
연구기간내 달성실적	1			1		1					0				5					
연구종료 후 성과창출 계획	3	4		1		3	0	0	266	0	0	6		5	50	52	25	25	5	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	머위 잎 추출분말 제조 공법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	700천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체 실시)		
이전소요기간	2017. 03. 17	실용화예상시기 ³⁾	2017. 03. 17
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	자체실시		

- 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) 기술 이전 시 선행요건: 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항 (기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)