

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003503-01

강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화

2021.05.04

주관연구기관 / 농업회사법인(주)산들촌
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “강황,갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화”(개발기간 : 2018. 04. 20~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021.05.04

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)산들촌 (대표자) 차민석 (인)

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 김우식 (인)

주관연구책임자 : 차 민 석

협동연구책임자 : 이 정 민

농림축산식품 연구개발사업 운영규정 제31조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	118036-03	해당단계 연구기간	2018.04.30. ~2020.12.31	단계구분	3/3
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	세부 : 강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화 협동 1 : 강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 증상 완화 기능평가			
연구책임자	차민석	해당단계 참여연구원 수	총: 7명 내부: 7명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 227,000천원 민간: 56,750천원 계: 283,750천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	총연구개발비	정부: 679,000천원 민간: 167,750천원 계: 848,750천원
연구기관명 및 소속부서명	주관기관 : 농업회사법인(주)산들촌 협동기관 : 경희대학교 산학협력단			참여기업명 농업회사법인(주)산들촌	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 분류	보안	일반
	결정 사유	연구개발성과 등이 보완조치가 필요하지 않은 경우에 해당함	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	3	2	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 강황+ 갈근 복합추출물(이하 갈근강황추출물) 원료 가공기술 개발
 - 국내산 갈근과 강황의 추출방법을 개발하고 제조공정을 표준화하였음
 - 갈근강황추출물의 제조공정 표준화, 유통기한 설정, 시험법 벨리데이션을 완료하였음
- 시험관, 동물시험
 - 갈근강황추출물이 난소절제 동물모델에서 자궁 및 호르몬에 영향을 주지 않는 범위에서 여성갱년기(골다공증)억제효과가 있음을 확인
 - 갈근강황추출물은 파골세포의 분화기전에서 c-fms 및 RANK의 발현을 감소시켜 NFATc-1의 발현 및 MAPK pathway의 발현을 감소시키고, 조골세포의 ALP, OC 발현을 증가시키며, estrogen의 농도와 유전독성에 영향을 주지 않으면서 여성갱년기의 증상을 완화시키는 것을 확인
 - SD rat을 통한 갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 억제 기작 규명
- 인체시험
 - 만45~65세 여성 110명을 대상으로 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 비교 인체적용시험 완료
 - 시험군의 전후 비교로 보면 시험군의 1차 변수(쿠퍼만 지수) 및 대부분의 2차 평가변수에서 통계적인 유의성 확인
 - 2차 평가변수인 쿠퍼만 지수총점 변화율, 안면홍조 증상의 변화치 및 변화율 그리고 총 콜레스테롤 변화치 및 변화율도 FA, PP 분석 모두에서 전후 비교에서 통계적 유의한 차이를 보임
 - 그러나 일차 기능성 평가 변수에서 FA 및 PP 분석결과 군 간의 통계적 유의한 차이를 보이지 않음
- 제품화
 - 강황갈근농축분말_SDC001 1종 산업화 완료
 - 개발 원료(강황갈근농축분말_SDC001) + 여성갱년기 활성 원료 석류추출물 함유 식품 1종 산업화 완료
 - 개발원료(강황갈근농축분말_SDC001) + 히알루론산(건강기능식품 원료) 산업화 완료

보고서 면수

180p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><연구개발 목적></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 강황, 갈근을 이용한 고부가가치 식품 개발 ○ 갈근강황추출물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 여성갱년기 개선 활성 평가 ○ 갈근강황추출물의 인체적용시험 연구 ○ 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청 ○ 갈근강황추출물 함유 건강기능식품 산업화 <p><연구개발 내용></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 갈근/강황 추출 방법과 갈근강황추출물 제조공정 표준화 2건 ○ 갈근강황추출물 유통기한 설정 및 지표성분 벨리데이션 완료 ○ 갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 활성평가(<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>) 완료 ○ 갈근강황추출물의 갱년기 여성 건강 인체적용시험연구 만45~65세 여성 110명을 대상으로 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험 완료 ○ 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성 갈근강황추출물 제조공정 표준화, 시험법 개발, 시험관, 동물 연구, 인체적용 연구 결과를 취합하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성 완료 ○ 갈근강황추출물 함유 제품 산업화 3건 강황갈근농축분말_SDC001, 링케이드 그녀의 석류, 그녀의 뷰티 히알루론산 3종의 제품을 산업화 완료 				
<p>연구개발성과</p>	<p><연구개발 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 논문게재 및 학술발표 : SCI 1편, 비SCI 2편, 학술발표 5건 ○ 특허 : 출원 2건 ○ 고용창출 : 2명 ○ 산업화 : 3건(식품2건, 건강기능식품 1건) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 소재인 강황, 갈근의 여성갱년기 개선 활성의 학술적 가치를 입증하게 됨 ○ 농산물 고차가공 산업의 선도 모델로 활용이 기대됨 ○ 농촌 개발의 신산업군 표준 모델로 활용이 기대됨 ○ 지역 재배농가와 계약 재배로 안정적인 농가소득, 원료 확보 가능함 ○ 생물자원의 산업화를 통하여 경쟁력이 부족한 국내산 작물의 경쟁력 확보가 가능하며 고부가가치 창출에 따라 농가소득 증대에 기여할 것임 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>강황</p>	<p>갈근</p>	<p>여성갱년기</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>인체적용시험</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Curcuma longa</i> L.</p>	<p><i>Pueraria lobata</i> Ohwi</p>	<p>Menopause</p>	<p>Health functional food</p>	<p>Clinical Trial</p>

< 목 차 >

I. 연구개발과제의 개요	6
1절. 연구개발의 개요	6
2절. 연구개발의 필요성	6
3절. 연구개발의 범위	16
II. 연구수행 내용 및 결과	18
1절. 연구개발 전략·방법 및 추진체계	18
2절. 연구방법 및 내용	21
3절. 연구개발 성과	153
III. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	161
1절. 목표	161
2절. 목표 달성여부	161
IV. 연구결과의 활용 계획 등	169
붙임. 참고 문헌	181


제1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 개요

- 본 연구의 최종목표는 국내산 강황, 갈근을 대상으로 여성갱년기 개선 활성을 평가하여 개별인정형 건강기능식품 원료와 제품으로 개발하고자 하는 것임
- 주요 연구내용
 - i) 강황, 갈근의 건강기능식품 원료 개발을 위한 표준화
 - ii) 강황, 갈근의 *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험을 통한 기능성 및 기작 구명
 - iii) 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성
 - iv) 갈근강황추출물을 이용한 건강기능식품 산업화
- 본 사업을 통하여 국내에서 생산되는 식품소재의 기능을 검증하여 건강기능식품으로 산업화함으로써 국민 건강 증진과 의료비 절감을 꾀하고, 소재의 유용성을 높여 고부가가치화 함으로써 안정적인 농가소득 향상과 부가가치 창출이 가능하며 관련 산업의 발전이 기대됨

2절. 연구개발의 필요성

1. 연구소재 및 필요성

강황	
	<p>과명 : 생강과(Zingiberaceae) 학명 : <i>Curcuma longa</i> L. 주요성분 : 뿌리 노란 색소 0.4~0.65%, 정유 6~10% 커큐민과 유사물질 주요 산지 : 전남 진도(전국 80%), 해남, 화순, 전북 임실 약리작용 : 면역력증진, 항염, 간기능 장애 개선, 생리통을 완화, 항암, 항콜레스테롤, 항치매, 소염작용</p>

- 강황(*Curcuma longa* L)은 동의보감, 대한약전, PDR for Herbal Medicines, WHO monographs on selected medicinal plants(Vol.1) 등에 질병치료에 사용되었다는 기록이 있으며, 학술발표에 따르면 간보호, 면역조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있음
- 진도강황은 지리적표시농산물제95호로지정되어 있으며, 난대성 약용자원으로 20여년 전부터 국내재배가 본격화되어 현재 진도 강황 생산량은 3,100여톤/년임(전국 생산량 86%). 또한 진도군은 강황산업특구조성을 추진 중에 있음
- 현재, 강황을 이용한 건강기능식품 원료로 ‘발효율금’과 ‘강황 추출물’이 등록되어 있으나, ‘강황 추출물’은 수입 원료임. 본 연구는 지역자원인 강황을 이용하여 식품의약품안전처에서 요구하는 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 위한 연구를 완성 산업화하고자 함

갈근



과명 : 콩과(Leguminosae)

학명 : *Pueraria lobata* Ohwi

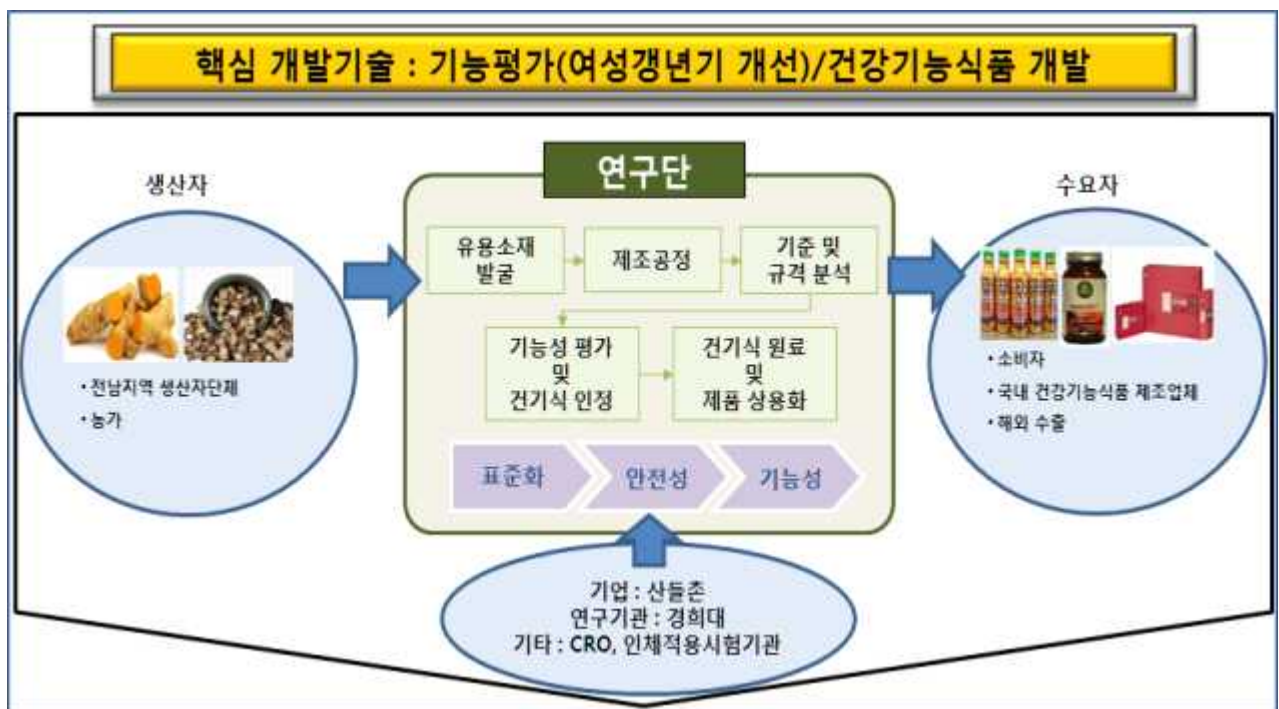
주요성분 : 푸에라린, 다이드진 등

주요 산지 : 경남, 경북, 전남 등, 동북아시아에 분포

약리작용 : 고열, 두통, 골다공증, 폐경기 질환 감소 등

- 갈근(*Pueraria lobata*)은 한방에서 피로회복, 숙취제거, 고혈압, 당뇨 등에 효능이 있고, 갈근에 함유된 이소플라본은 여성호르몬과 효능이 유사해 폐경으로 인한 갱년기 질환 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있음. 갈근은 신농본초경, 상한론, 본초강목에서 발열, 설사 및 구토를 완화한다고 기록되어 있음
- 갈근의 국내 생산량은 연간 약 2,000여 톤이며, 약 1만ha에 해당 부분이 산림과 농경지 피해를 줄이기 위한 제거 작업 및 도로 공사 현장에서 채취되고 있음
- 갈근은 식용 가능한 약용작물로 해열, 진경작용, 골다공증, 폐경기 질환 등 여러 약리작용이 알려져 있으나 상업적 이용을 위한 채취가 되지 못하고 제거 대상으로 인식되고 있으며, 주로 단순 가공식품인 칩으로 제품화 되어 판매되고 있음. 본 연구를 통하여 갈근의 여성갱년기 개선 기능을 규명하여 고부가가치 소재로의 개발이 필요함

2. 핵심 개발기술



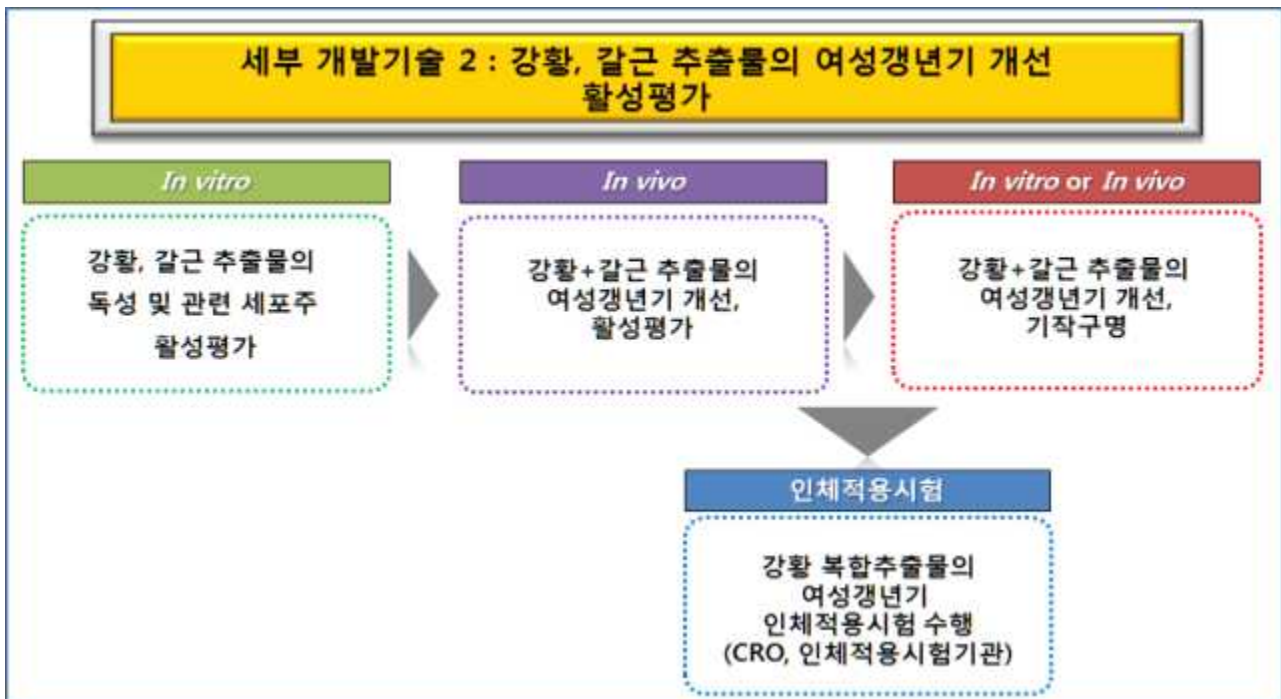
- 강황, 갈근을 대상으로 강황+갈근의 여성갱년기 개선 활성연구와 안전성연구를 수행하

여 고부가가치 식품 소재로 개발하고자 함

- 본 사업에서 수행한 여성갱년기 *in vivo* 연구결과를 바탕으로 개별인정형 건강기능식품 원료 후보 소재를 선정하여 인체적용시험을 실시하고, 사업기간 내 식품의약품안전처에 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 신청함으로써 향후 개별인정형 건강기능식품으로 산업화 하고자함
- 사업기간 내 기 개발된 건강기능식품 원료와 본 사업을 통해 개발된 여성갱년기 개선 소재를 혼합한 건강기능식품을 산업화함



- 고시형 건강기능식품 원료와 본 연구의 성과물인 여성갱년기 개선 활성소재를 혼합한 건강기능식품 제품 개발
- 기존 유통 중인 여성갱년기 개선 제품(원료)과 비교 활성평가를 통해 비교우위 활성을 확보하여 산업화하고자 함



- 강황과 갈근을 대상으로 물과 20% 주정을 용매로 한 각 추출물을 제작하여 여성갱년

기 개선 *in vitro* 활성을 확인 후, 복합추출물에 사용할 혼합 비율을 결정하고 결정된 복합추출물의 제조공정을 표준화한 추출물을 대상으로 *in vivo* 여성갱년기 개선 활성 확인

- 여성갱년기 개선 인체적용시험을 수행하여, 개별인정형 건강기능식품 원료 개발을 추진하고자 함

3. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

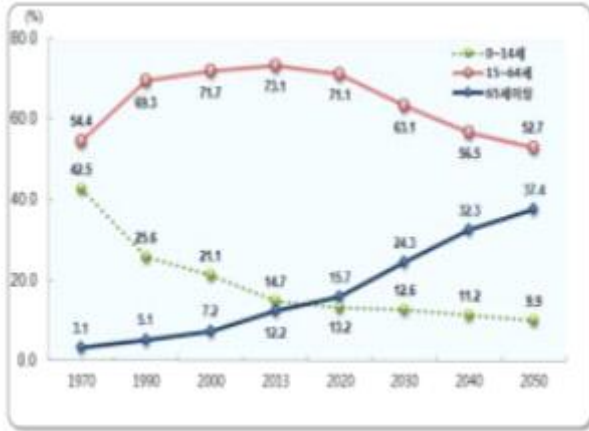
(1) 기술현황

- 2000년대 초·중반 건강기능식품은 기초 영양소 및 특정 성인병 위주의 기능 개선 선호 현상이 나타났지만 2000년대 후반으로 접어들면서 점차 질병 예방 및 건강관리 제품의 선호 현상이 나타남. 2010년 이후로는 여성 및 어린이 건강으로 소비자의 관심 대상이 확대되었으며 특히 여성의 건강관리와 관련된 기능성이 다양화되었음
- 최근 5년간 건강기능식품 인정형태별(고시형/개별인정형) 추이를 보면 건강기능식품 매출은 증가하는 가운데 개별인정형 제품의 성장이 감소하고 있음. 이는 일부 개별인정형 원료가 고시형으로 전환된 것에 기인한 것으로 보임

(매출액, 단위 : 억원)

구분	2012	2013	2014	2015	2016
전체	14,091	14,820	16,310	18,230	21,260
전년대비 성장률(%)	3.0	5.2	10.1	11.8	16.6
고시형	12,284	12,496	13,134	15,035	18,903
전년대비 성장률(%)	0.3	1.7	5.1	14.5	25.7
개별인정형	1,807	2,324	3,176	3,195	2,357
전년대비 성장률(%)	26.4	28.6	36.7	0.6	△26.2

(2) 시장현황



<고령화에 따른 인구 트렌드 및 고령자 성비현황(통계청 2013)>

- 앞으로 고령화 시대진입에 따라 고령인구의 건강 및 삶의 질에 대한 욕구 증대, 식의약품에 대한 다양성 및 수요가 증대하는 헬스케어 트렌드, 웰빙, 로하스와 같은 식품산업 트렌드 등 소비자의 니즈를 충족시키는 건강기능식품의 개발이 필요함
- 2016년 기준 건강기능식품 총 매출액은 61,147억 원으로 기능성별 매출에서 면역력 증진 제품이 1조 984억원으로 가장 높은 비중을 차지하였으며 이어 혈행 개선, 항산화 순이었음. 면역력 증진 제품의 경우 15년 대비 2,266억원 매출 증가하였으나, 여성갱년기 개선 제품의 경우 15년 429.6억원에서 16년 175.1억원으로 254억원 감소하였음
- 여성갱년기 개선 제품의 매출감소의 원인은 백수오 등 복합추출물의 원재료 혼입 파동에 의한 것으로, 이로 인해 건강기능식품의 원재료 표준화 등이 새로운 이슈가 되었음

[건강기능식품 기능성별 매출현황]				
기능성	매출액(억원,%)			
	2016년		2015년	
계	64,685.2	100	60,257.9	100
면역기능	10,983.5	17.0	8,717.2	17.4
혈행개선	10,884.0	16.8	7,716.4	15.4
항산화	10,642.7	16.5	8,955.6	17.9
·	·	·	·	·
·	·	·	·	·
여성갱년기	175.1	0.3	429.6	0.9

(2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원)

- 생활수준 향상과 의학기술의 발달로 노인인구의 비율이 전 세계적으로 매년 2.4%씩 증가되고 있으며, 우리나라도 2013년 총 인구 중 65세 이상 노인인구 비율이 12.2%로 2030년에는 24%를 넘어 고령화 사회가 될 것으로 전망됨. 특히, 여성 평균 수명이 80세 인데 반해 폐경 평균 연령이 48세 정도인 것을 감안할 때 약 30년 이상을 폐경기로 보내게 되므로 폐경 후 여성 건강과 영양관리의 중요성이 매우 높음(통계청, 2013년)

- 또한, 여성갱년기 개선 건강기능식품 원료는 현재 모두 개별인정형 원료로 새로운 소재를 선호하고 있어 본 연구에서 건강기능식품 원료 개발 시 시장진입에 경쟁력이 있을 것으로 생각됨



(3) 경쟁기관현황

- 국내 건강기능식품 소재화 기술 관련하여 Digital Biotech 사가 5개의 특허를 보유하고 있으며, 이 외에도 RNL Bio사, 한국한의학연구원, Lifetree Bio, Sun R&DB 등 국내 바이오 관련기업에서 특허 보유가 두드러지는 양상을 보이며 식품회사들도 특허를 보유하고 있음
- 건강기능식품 매출액이 가장 큰 업체는 (주)한국인삼공사가 최근 5년간 부동의 1위를 차지하고 있으며, 그 뒤를 이어 (주)한국야쿠르트, (주)서흥, 콜마비엔에이치, (주)노바렉스 순이었음. 한국인삼공사의 주 매출은 홍삼 제품이며, 홍삼의 경우 면역력 증진을 필두로 다기능성을 가진 원료로 인정되고, 소비자 인식에 면역력 하면 홍삼을 떠올릴 만큼 이미지화 되어 있는 것이 매출로 이어진 것으로 판단됨
- 여성 갱년기 건강기능식품 원료는 식류추출물, 피크노제놀-프랑스해안송껍질추출물, 백수오등 복합추출물이 유통되고 있으며, 백수오 파동 이후 여성 갱년기 시장은 정체기에 있음

(4) 지식재산권현황

등록/출원번호		발명의 명칭	출원인
등록	1016614020000	아스파라거스, 울금추출물, 미배아대두발효추출물을 포함하는 숙취해소용 조성물	주식회사 풀무원
등록	1013153190000	홍삼추출물과 울금추출물을 포함하는 피로회복용 식품조성물	(주)아모레퍼시픽
등록	1013549230000	울금 추출물과 비파 추출물을 유효성분으로 포함하는 구강 위생 증진용 조성물	동신대학교산학협력단
등록	1020110004763	울금 추출물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니테이즈 활성의 억제용 조성물	한국생명공학연구원
등록	1008922720000	홍삼추출물과 울금추출물을 함유하는 운동지속능력향상용식이 조성물	(주)아모레퍼시픽
등록	1008246150000	울금 추출물을 함유하는 동맥경화 및 고혈압의 예방 및 치료용 조성물	동국대학교 산학협력단
등록	1012292540000	녹용, 당귀, 산수유, 구기자, 울금, 산약, 진피, 배초향, 천마, 계피, 오미자, 홍삼, 맥문동 및 감귤분말의 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 증진 조성물	주식회사 케미메디 황성연
출원	1020150126147	한인진 및 울금의 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 그 제조방법	대전대학교 산학협력단
등록	1017977200000	울금 및 감초 추출물의 혼합물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 증상 예방 및 치료용 약학적 조성물	유한회사 농업회사법인 베네허브
등록	1014868570000	지황 및 갈근의 복합 추출물을 함유하는 갱년기 증상의 예방 또는 치료용 조성물	(주)뉴메드
등록	1016935730000	갱년기 증상의 예방 또는 치료 효과가 있는 약제학적 조성물 및 그 제조방법	경희대학교 산학협력단

- 국내 출원 기관에서 해외에 출원 및 등록된 건강기능식품 소재화 기술 관련 특허는 총 152건으로 1990년대에는 전체적으로 관련 특허의 출원 및 등록이 미미하다가, 2000년대 초반 이후 관련 특허가 빠르게 증가하는 양상을 보이며 이는 해외특허 연도별 출원 동향과 유사한 양상을 나타냄

(5) 표준화현황

- 본 사업에서 표준화는 식품의약품안전처에서 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 심사시 요구하는 표준화 과정을 수행할 예정으로서 제조공정 표준화와 원료의 지표성분 분석법 설정을 위한 Validation을 수행할 예정임

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 미국, 일본, 유럽 등에서의 식품산업 관련기술은 단순한 식량 확보 차원이 아닌 노화 억제, 장수, 안전, 건강수명 연장 등 관련 식품을 발전 가능성이 높은 분야로 보고 이들의 식품개발을 위한 식품 생명과학 기술 개발에 연구역량을 집중하고 있음
- 선진국 바이오 기업들은 기능성 유전체학(functional genomics), 단백질체학 및 생물정보학(bioinformatics)을 기반으로 새로운 작용기전을 갖는 면역력 증진제의 발견을 가속화하고 있으며, 이를 이용한 신규 면역력 증진제 탐색 및 개발에 주력하고 있음

(2) 기술현황

- 전세계 영양산업 시장규모는 약 4,347억 달러('15년)로 추정되며, 2015년 기준 최근 5년간 평균 7.9%의 성장률을 보였으며, 향후 성장이 지속되어 2020년에는 6,394억 달러의 규모에 이를 것으로 예상됨

<연도별 세계 영양산업 시장 규모> (단위: 억 달러)

Category		2009	2010	2011	2012	2013e	2014e	2015e	2020e
Supplements	매출액	803	846	902	961	1,034	1,100	1,179	1,677
	성장률	4.8%	5.4%	6.5%	7.0%	7.6%	6.4%	7.1%	7.3%
Natural/Organic Food	매출액	782	838	915	1,010	1,116	1,231	1,357	2,255
	성장률	3.8%	7.2%	9.2%	10.3%	10.5%	10.4%	10.2%	9.8%
N&OPC&HH Products	매출액	285	310	339	374	441	452	496	767
	성장률	5.2%	8.7%	9.4%	10.3%	9.9%	9.8%	9.7%	8.7%
Functional Food	매출액	964	1,009	1,061	1,119	1,180	1,247	1,315	1,696
	성장률	2.3%	4.7%	5.1%	5.5%	5.5%	5.7%	5.5%	5.2%
Total	매출액	2,834	3,004	3,217	3,464	3,741	4,029	4,347	6,394
	성장률	3.7%	6.0%	7.1%	7.7%	8.0%	7.7%	7.9%	7.8%

※ N : Natural, OPC : Organic Personal Care, HH : Household

※ 2013~2020년 매출액 및 성장률은 추정치임

<출처 : 2014 Nutrition Business Journal(New Hope Network)>

- 식품 분야에서 웰빙, 로하스 등 건강에 대한 관심이 증가하면서 바이오자원 소재를 이용한 기능성 식품에 대한 수요가 증가하고 있음. 미국은 건강한 삶에 대한 관심이 높아지면서 식품에 사용되는 재료 대체를 통하여 식품의 기능성을 증가시키고 있으며, 재료에 사용되는 기능성 소재 연구가 계속적 증가 추세를 보임
- 미국 건강기능식품 시장은 약 404억 달러(약 45조 원, 2015년) 규모로 연평균 7.1% 성장하여 약 568억 달러(약 63조 원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨
- 미국 소비자들의 81%는 건강유지나 증진에 도움을 주는 제품을, 영양소가 강화되는 식품을 75%는 구입하고 있음. 특히 면역력을 증가시킴으로써 발암을 예방하거나 암 치료시 보조 요법제로 사용할 수 있는 소재들에 많은 관심이 증가하고 있음. 현재 일부 제품이 시판되고 있으며 기술 개량과 복합화를 통해 현재로부터 미래까지의 시장 확산이 가능하고 제품군의 부가가치가 높아질 것으로 예측함

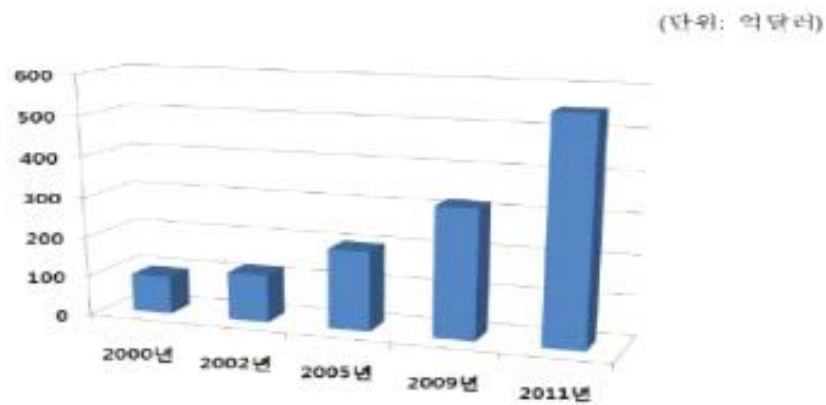
- 국가별 건강기능식품 시장규모(추정)를 살펴보면, 2015년 미국이 404억 달러(약 45조 원)로 1위를 차지하고 있으며, 서유럽이 168억 달러, 중국 163억 달러 순으로 나타났으나, 2020년에는 미국 568억 달러로 여전히 가장 큰 규모를 보유할 것으로 나타났으나, 2위는 중국이 267억 달러로 서유럽(190억 달러)을 뛰어 넘을 것으로 예측됨

<국가별 건강기능식품 시장규모(추정치)> (단위 : 억달러)

국가	2015e	2020e	점유율(%) (2015기준)	연평균 성장률(%)
미국	404	568	34.3	7.1
서유럽	168	190	14.2	2.5
중국	163	267	13.8	10.4
아시아 (중국, 일본 제외)	118	187	10.0	9.5
일본	109	122	9.2	2.3
남미	89	155	7.5	11.7
그 외	127	188	10.8	88.2
계	1,179	1,677	100.0	7.3

<출처 : 2014 Nutrition Business Journal(New Hope Network)>

(출처: 한국산업기술재단 ‘단백질제품 기술로드맵’)



<면역력 증진제의 세계 시장 규모>

- 중국 건강기능식품 시장은 약 163억 달러(약 18조 원, 2015년) 규모로 연평균 13.8% 성장하여 약 267억 달러(약 30조 원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨. 건강관리에 대한 인식 확산 및 인구 규모 등을 고려할 때 중국 시장은 더욱 성장할 것으로 예측됨
- 중국 보건식품 소비 품목은 주로 면역 조절, 항피로, 항노화, 혈중 지방 조절 등의 기능으로 집중되어 있으며 천연 보건식품의 끊임없는 요구로 천연 영양 보건식품 수요가 증가할 것으로 예측됨
- 일본 건강기능식품 시장은 약 109억 달러(약 12조 원, 2015년) 규모로 연평균 2.3% 성장하여 약 122억 달러(약 14조 원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨. 급속히 고령화되

는 사회, 라이프 스타일의 변화로 야기된 질병, 건강관리에 대한 관심 등이 꾸준하기 때문에 완만한 성장은 계속될 것으로 전망됨

(3) 경쟁기관현황

- 건강기능식품 소재화 기술 관련 특허를 첫 번째로 많이 보유한 회사는 미국의 Dupont사로 건강기능식품의 소재화 기술 특허를 34건 보유하고 있음. 그 다음이 스위스의 Nestec S.A이며, 32건을 보유하고 있음. 상위 10개 기관 중 미국기업 6개, 미국대학 1개 나머지는 인도, 유럽 기업으로 대체적으로 다양한 기업이 있었지만 미국이 많은 개발하고 있는 것을 알 수 있음
- 국외 업체의 동향을 살펴보면 미국의 Amgen, Genetech, IDEC, Abgenix, Chiron, Centocor 등과 영국 Cabrige antibody technology, Celltech 등의 핵심원천기술을 확보한 바이오 전문기업을 중심으로 개발이 이루어져 왔으나, 최근엔 대형 제약기업들이 바이오 기업과 전략적 제휴를 통하여 시장진출을 적극 추진하고 있음
- 2000년 통계에 따르면 GlaxoSmithKline, Aventis Pasteur, Merck 등 주요 5개 제약회사가 전세계 면역력 증진 백신시장의 90%이상을 차지하고 있으며, 성장 잠재력과 고부가가치가 예상됨에 따라 바이오 기업들과 함께 약 40여종의 면역력 증진백신을 개발하고 있음. 특히 DNA 백신의 경우 Epimmune, Powder Ject, Sequella, Valentis, Vical, Onyx Pharm 등 미국 바이오 기업들이 주도하고 있음
- 최근 건강기능식품산업에는 식품산업뿐만 아니라 제약산업에서도 많은 관심을 갖고 있어 노바티스컨슈머헬스(Novartis Consumer Health), 글락소스미스클라인(Glaxo Smith Kline), 존슨앤존슨(Johnson&Johnson) 등 세계적 다국적기업들이 참여하고 있음. 이들 회사의 참여 동기는 건강기능식품이 개발기간이 제약보다는 짧고, 개발비용이 적게 들기 때문임

(4) 지식재산권현황

- 건강기능식품 소재화 기술 관련 연구 및 이를 응용한 활용기술에 대한 해외특허는 1991년부터 최근까지 총 4,456건이며 2000년대 초반 이후 많은 특허가 출원되는 것으로 보아 꾸준하게 성장하고 있는 추세임. 건강기능식품 연구 및 활용기술 관련 특허는 1990년대 초반까지 드물게 나타나다가 2000년대 중반 이후 관련 특허가 빠르게 증가하는 양상을 보임

등록/출원번호		발명의 명칭	출원인	국가
출원	2015220913	Compositions containing extracts fo <i>Curcuma longa</i> and Echinacea angustifolia which are useful to reduce penipheral inflammation and pain	Indena S.p.A.	호주
출원	2874696	PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR ANTI-OBESITY COMPRISING EXTRACT OF A MIXTURE COMPRISING SAURURI CHINENSIS BAILL., CURCUMAE LONGAE RHIZOMA, AND POLYGALAE RADIX	KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE	캐나다
출원	200075253	Novel pharmacological activities of <i>curcuma longa</i> extracts	Asac Compania De Biotecnologia E Investigacion, S.A.	호주
출원	2701190	COMPOSITION FOR TREATING HEPATITIS CONTAINING AN EXTRACT OF CORDIA LUTEA FLOWERS, ANNONA MURICATA LEAVES, AND CURCUMA LONGA ROOTS	CORAL, JOSE GONZALO CABANILLAS SABELL CORPORATION	캐나다
등록	06841177	Pharmacological activities of <i>curcuma longa</i> extracts	ASAC compania de Biotecnologia e Investigacion S.A.	미국
등록	2008062969	DIETARY COMPOSITION CONTAINING EXTRACTS OF RED GINSENG AND CURCUMA LONGA L. AND THE USE FOR FATIGUE RECOVERY THEREOF	AMOREPACIFIC CORPORATION PARK, Chan-Woong YUN, Jun Won SEO, Dae Bang YEOM, Myeong Hoon RHA, Chan Su LEE, Sang Jun	세계

(5) 표준화현황

- 건강식품 관련 표준화는 각 국가마다 기준이 다르지만 안전성 확보를 위한 기준에 적합해야 하며 제조공정과 지표성분 분석을 요구하고 있음

3절. 연구개발의 범위

1. 갈근강황추출물 원료 가공기술 개발 및 표준화

- 국내산 갈근과 강황 원료와 제조공정 표준화
- 갈근강황추출물의 제조공정 표준화, 시험법 벨리데이션
- 갈근강황추출물의 유통기한 설정

2. 갈근강황추출물의 여성갱년기 증상 개선 기능평가

- 갈근,강황 추출물의 여성갱년기 개선 기능 *in vitro* 생리활성 평가
- 갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 기능 *in vitro* 생리활성 평가
- 갈근강황추출물의 *in vivo/ex vivo* 활성 평가
- 갈근강황추출물의 기전 규명

3. 갈근강황추출물의 갱년기 여성건강 인체적용 임상연구

- 만45~65세 여성 110명을 대상으로 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 비교 인체적용시험
- 1차 유효성 평가변수
 - 방문2(Baseline) 대비 12주 후 Kupperman index 총점 변화치
- 2차 유효성 평가변수
 - 시험식품과 대조식품 섭취 12주 후 Kupperman index 총점 변화율
 - Kupperman index 각 항목 변화치 및 변화율
 - MENQOL, E2, FSG, Alkaline phosphatase, Osteocalcin, Lipid profiles(Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride), 안면홍조 및 발한의 정도(Hot flush VAS, Sweating VAS), 안면홍조 점수, 안면홍조 1회 지속시간 변화치 및 변화율, BMI 변화치 및 변화율

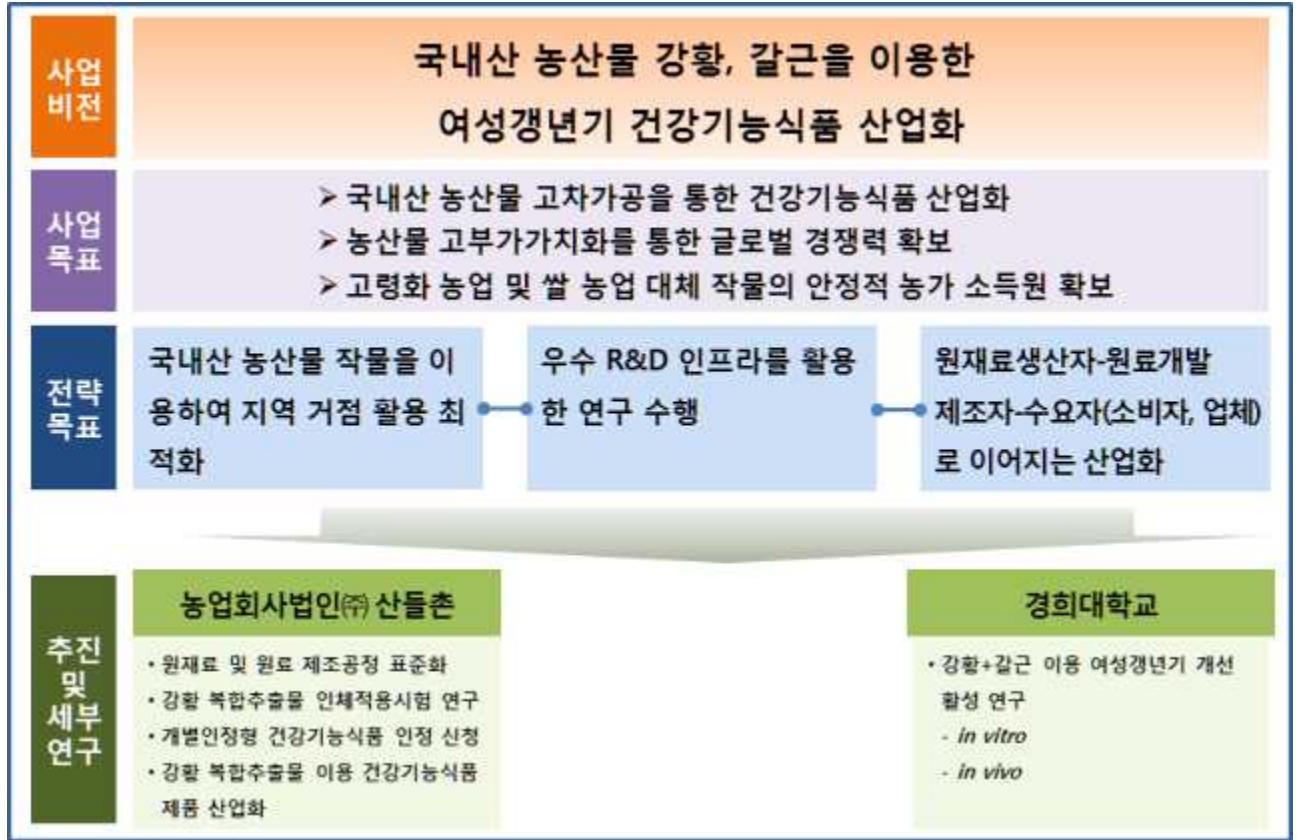
4. 갈근강황추출물 함유 제품 산업화

- 표준화된 갈근강황추출물을 함유하는 제품 산업화
- 기 유통 중인 건강기능식품 원료와 갈근강황추출물을 함유하는 제품 산업화

제2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 연구개발 전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발 추진전략·방법



가. 강황, 갈근 표준화된 원재료 확보 및 시료 제작(4종)(수행기관 : 산들촌)

- 원재료인 강황, 갈근의 지표성분 범위를 설정하여 표준화된 원료 확보
- 강황, 갈근, 물, 20% 주정추출물 총 4종의 연구시료 제작

나. 강황, 갈근 추출물의 여성갱년기 개선 활성평가(수행기관 : 경희대학교)

- 연구시료 4종(강황, 갈근 추출물)을 대상으로 여성갱년기 개선 활성평가
- 1차 *in vitro* 활성평가 결과, 강황+갈근 추출물 혼합비율 선정 후 복합물의 *in vitro* 및 *in vivo* 활성평가

다. 갈근강황추출물 제조공정 표준화(수행기관 : 산들촌)

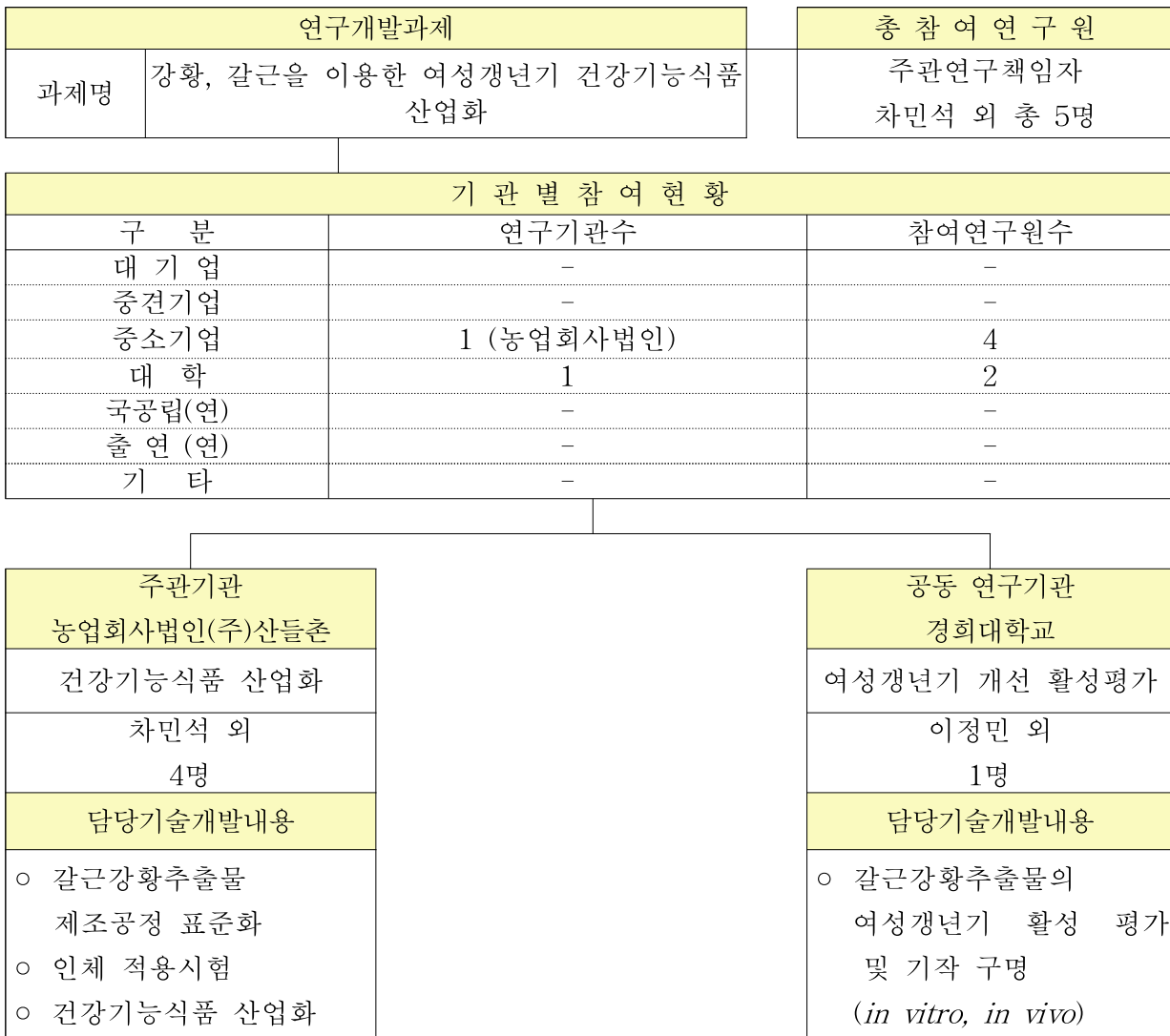
- 건강기능식품 원료로 사용될 갈근강황추출물의 제조공정 개발 및 표준화
- 갈근강황추출물의 지표성분 시험법 밸리데이션을 통한 추출물 표준화 확인
- 기준 및 규격 설정 및 공인성적기관 성적서 발행

라. 갈근강황추출물의 인체적용시험연구 1건(수행기관 : 산들촌)

- *In vitro*, *in vivo* 연구 결과를 토대로 여성갱년기 개선 인체적용시험 연구 수행
- CRO 기관과의 업무 계약을 통한 원활한 인체적용시험 수행 및 의견수렴

- 원료 표준화, 기능성, 안전성, 원료 기준 및 규격 자료를 정리하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성(식품의약품안전처 처리기간 180일)
 - 원료의 품목제조신고를 위한 유통기한 설정시험 수행
- 본 사업을 통해 개발된 갈근강황추출물 산업화
 - 고시형 건강기능식품 원료에 강황 복합추출물을 혼합한 건강기능식품 제품 개발
 - 여성갱년기 개선 건강기능식품 원료 + 갈근강황추출물(강황+갈근)
 - 품목제조신고 3건

2. 연구개발 협력 추진 체계



3. 추진일정

1차년도(2018)															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	연구시료 4종 제작				■	■	■							22,000	차민석 (산들촌)
2	갈근강황추출물 제조공정 표준화						■	■	■	■	■	■	■	54,000	차민석 (산들촌)
3	갈근강황추출물 지표성분 시험법 밸리테이션										■	■	■	32,600	차민석 (산들촌)
4	강황, 갈근의 여성갱년기 개선 활성평가(<i>in vitro</i>)					■	■	■	■	■	■	■	■	80,000	이정민 (경희대)
2차년도(2019)															
1	인체적용시험 IRB							■	■	■				30,000	차민석 (산들촌)
2	인체적용시험										■	■	■	140,700	차민석 (산들촌)
3	갈근강황추출물 지표성분 시험법 밸리테이션	■	■	■	■	■								10,000	차민석 (산들촌)
4	갈근강황추출물 기준 및 규격 설정					■	■	■	■	■	■	■	■	14,000	차민석 (산들촌)
5	갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 활성평가(<i>in vivo</i>)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	80,000	이정민 (경희대)
3차년도(2020)															
1	인체적용시험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	160,000	차민석 (산들촌)
2	개별인정형 건강기능식품 원료인정서 작성												■	2,700	차민석 (산들촌)
3	원료 유통기한 설정시험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	20,000	차민석 (산들촌)
4	건강기능식품 제품 산업화	■	■	■	■	■								32,000	차민석 (산들촌)
5	갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 기작구명	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	이정민 (경희대)

2절. 연구방법 및 내용

1. 국내산 강황, 갈근 원재료 표준화

가. 강황, 갈근 원료 수급

(1) 강황

강황은 12월에 전남 진도군 소재 진도강황영농조합법인(박시우)에서 재배한 강황(울금)을 세척, 절단, 건조하여 원료로 함

(2) 갈근

갈근은 11월~월 전북 남원시 일대 야산에서 전북 남원시 창홍물산(이기만)이 채취한 원료를 세척, 절단, 건조하여 원료를 함

원료명	사진	원산지
강황		전남 진도군
갈근		전북 남원시

나. 강황, 갈근 지표성분 설정

(1) 방법

강황, 갈근 원재료의 강황 중 Curcumin, 갈근 중 Puerarin을 정량분석 하였음

(가) Curcumin 정량

① 표준용액의 제조

표준품 Curcumin 10 mg을 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

② 시험용액의 제조

검체 원재료(건조물) 2 g을 정밀하게 달아 50 mL 용량플라스크에 취해 Methanol 50 mL로 정용하여 60분간 초음파 추출을 한 후 정용하여 0.45 μm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 함

③ 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 425 nm)
- 칼 럼 : ZORBAX Eclipse XDB 길이 250*4.6 mmI.D, 5 µm
- 온 도 : 35℃
- 유 속 : 1 mL/min
- 주입량 : 10 µl
- 이동상 : 2% Acetic acid (in 45% ACN)
- 분석시간: 20 min
- 계산식

$$\text{Curcumin 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Curcumin농도 } (\mu\text{g/mL}) * \text{검액의 최종부피 (mL)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 (\mu\text{g/mg})}$$

(나) Puerarin 정량

① 표준용액의 제조

표준품 Puerarin 10 mg을 취하여 10ml용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조함. 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

② 시험용액의 제조

검체 원재료(건조물) 2 g을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 취해 Methanol 100 mL로 정용하여 2시간 초음파 추출을 함. 이를 식힌 후 정용하여 0.45 µm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 함

③ 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 254 nm)
- 칼 럼 : Shiseido Capell pak MGII 길이 250*4.6 mmI.D, 5 µm
- 유 속 : 1 mL/min
- 주입량 : 10 µl
- 이동상 : A- ACN
B- DW
(A : B = 10 : 90)

- 계산식

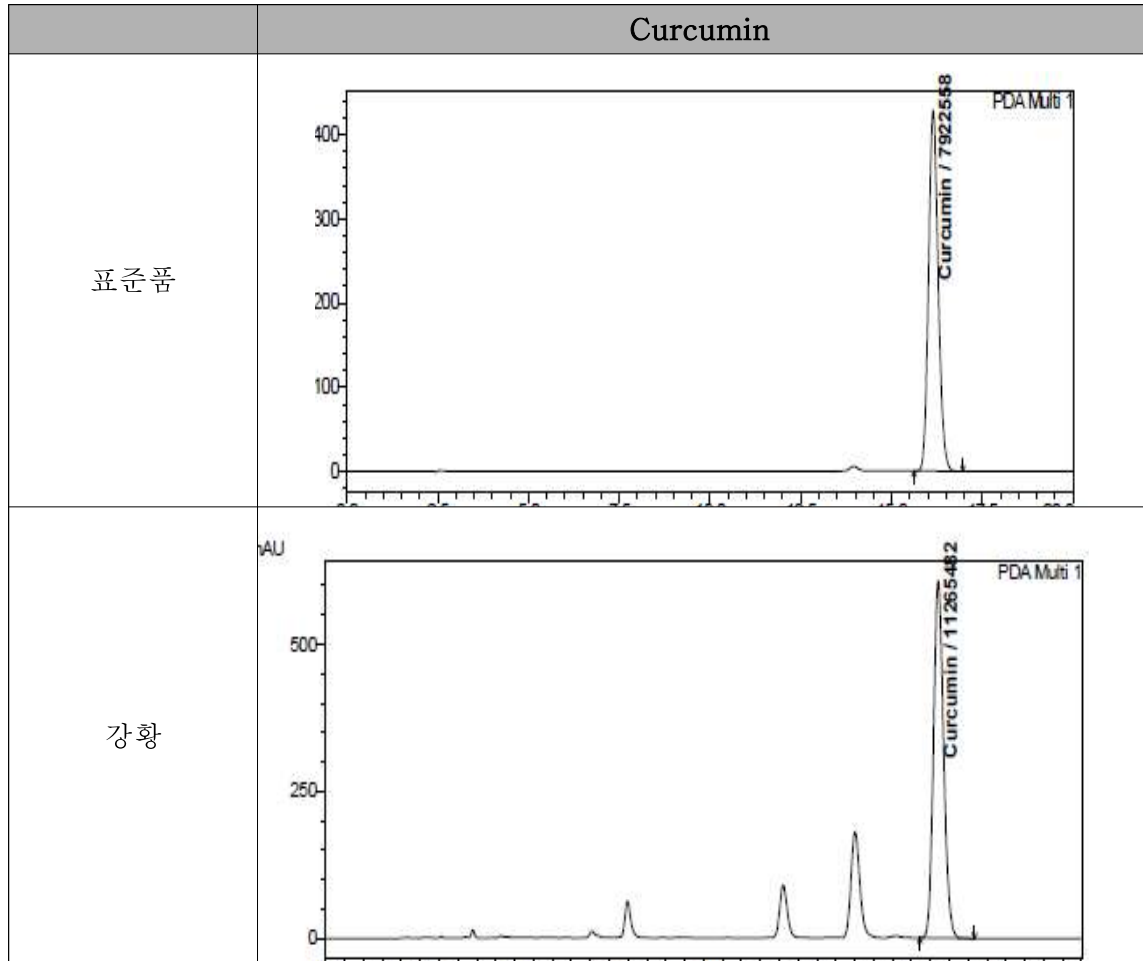
$$\text{Puerarin 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Puerarin 농도 } (\mu\text{g/mL}) * \text{검액의 최종부피 (mL)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 (\mu\text{g/mg})}$$

(2) 결과

(가) 강황 원재료 중 Curcumin 분석 결과

- 강황의 지표성분인 Curcumin을 정량한 결과 4.29 mg/g의 결과를 나타내었음

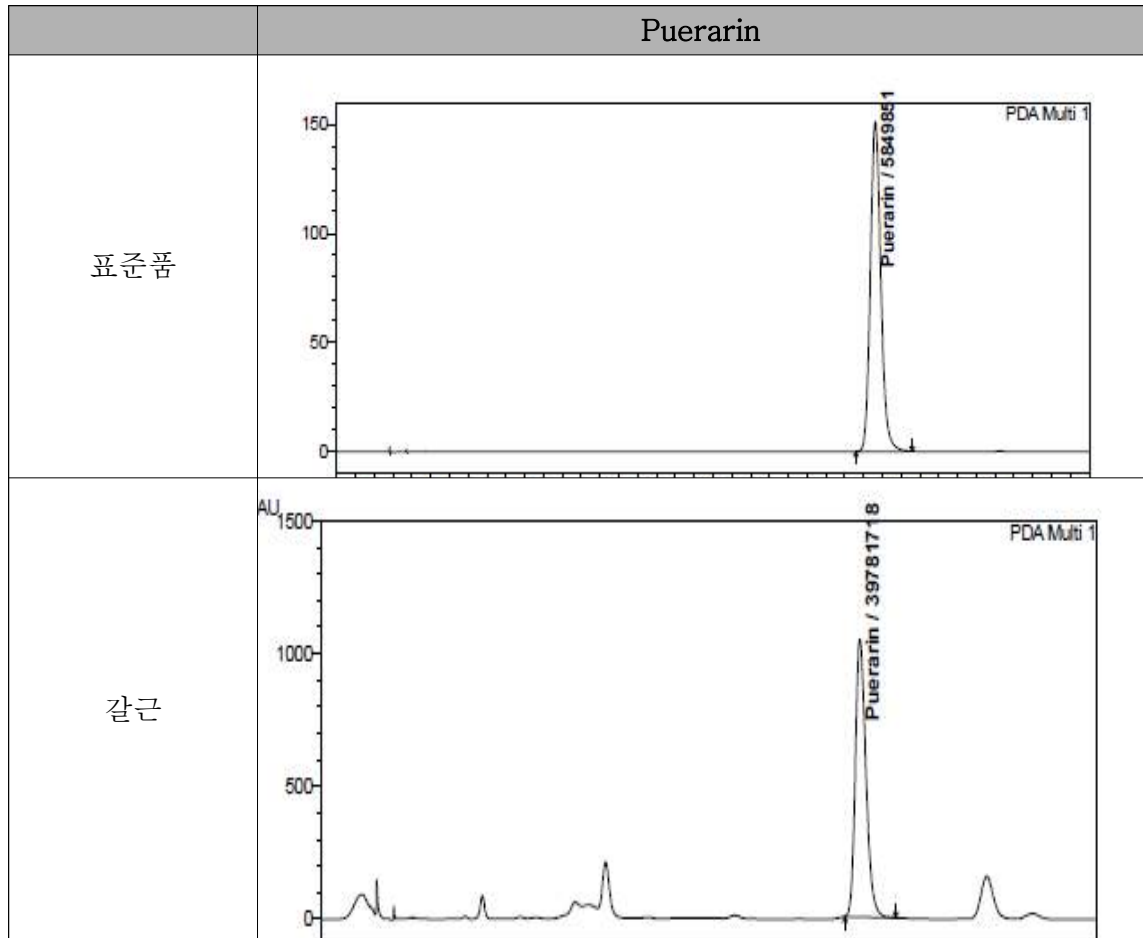
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
Curcumin 표준품	0.0124	100	7922558	-
강황	2.0399	50	11265482	4.29



(나) 갈근 원재료 중 Puerarin 분석 결과

- 갈근의 지표성분인 Puerarin을 정량한 결과 36.46 mg/g의 결과를 나타내었음

검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Puerarin 정량(mg/g)
Puerarin 표준품	0.0109	100	5849581	-
갈근	2.0146	100	39781718	36.46



2. 강황, 갈근 연구시료 제작

가. 강황, 갈근 추출물 연구시료 4종 제작

(1) 방법

- 추출, 농축 및 동결건조 공정은 강원도 춘천소재 (주)테코스에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95 v/v%를 사용하였음
- 강황, 갈근 각추출물 제조과정은 아래와 같이 (1) 원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

① 원료 평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 비율에 맞게 주정과 정제수를 투입하였음

② 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출하였음

용매	추출온도	추출시간
물	100℃	5시간
20%주정	95℃	

③ 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 농축하였음

④ 동결건조

농축액을 동결건조기를 이용하여 동결건조하고 수득률을 측정하였음

⑤ 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관하였음

(2) 결과

상기 기술한 방법을 통하여 추출을 실행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었음

코드명		강황		갈근	
용매		정제수	20% 주정	정제수	20% 주정
추출	원료량(g)	2,000	2,000	2,000	2,000
	용매량(L)	정제수 20	정제수 16 주정 4	정제수 20	정제수 16 주정 4
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70 cmHg	50℃/60~70 cmHg	50℃/60~70 cmHg	50℃/60~70 cmHg
	농축량(g)	2,560	2,720	2,820	2,320
	Brix	10.5	10.5	15.5	20.9
건조	건조량(g)	299.5	315.6	403.6	369.9
	수득률(%)	14.9	15.8	20.2	18.5

나. 연구시료 4종 지표성분 분석

(1) 방법

상기의 강황, 갈근 지표성분 설정 시험법에 따라 강황물추출물, 강황20%주정추출물, 갈근물추출물, 갈근20%추출물의 지표성분을 분석하였음

(2) 결과

(가) 강황

시료명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Curcumin 정량(mg/g)
강황물추출물	1.0094	50	495216	0.31
강황20%주정추출물	1.0285	50	3794083	2.46

(나) 갈근

시료명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Puerarin 정량(mg/g)
갈근물추출물	1.1721	100	41185184	86.86
갈근20%주정추출물	1.0954	100	43222984	98.01

(3) 결론

강황추출물(물, 20%주정)과 갈근추출물(물, 20%주정)을 대상으로 공동연구기관 경희대학교에서 수행한 시험관연구 결과 강황 20%주정추출물과 갈근 20%주정추출물을 1차 선정하였으며 두 추출물의 배합비를 결정하기 위한 시험관 연구에서 강황 : 갈근(3:7) 혼합물에서 가장 좋은 여성 갱년기 증상 완화 활성이 확인되어 향후 개발하고자 하는 소재 갈근강황추출물은(갈근 7 : 강황 3)의 비율로 선정하였음

3. 갈근강황추출물 제조공정 표준화

가. 갈근강황추출물 제조

(1) 갈근추출물 제조

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 건강기능식품 GMP 인증 업체인 (주)프롬바이오의 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95 v/v%를 사용하였음
- 갈근추출물 제조과정은 아래와 같이 (1) 원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

① 원료평량

추출에 사용할 갈근을 평량하고 주정과 정제수 혼합하여 추출용매(20%주정) 추출기에 투입

② 추출

추출기를 이용하여 원료의 12배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
20%주정	90℃	5시간

③ 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 건조감량 20±5%(20±5 Brix)으로 농축하였음

④ 부원료 혼합

덱스트린을 농축물의 고형분 대비 20% 혼합하였음

⑤ 분무건조

농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하고 수득률을 측정하였음

⑥ 지표성분 분석

갈근(Puerarin)을 분석법에 따라 정량분석

(2) 강황추출물 제조

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 건강기능식품 GMP 인증 업체인 (주)프롬바이오의 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95 v/v% 를 사용하였음

- 강황추출물 제조과정은 아래와 같이 (1) 원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

① 원료 평량

추출에 사용할 강황을 평량하고 주정과 정제수 혼합하여 추출용매(20%주정) 추출기에 투입

② 추출

추출기를 이용하여 원료의 12배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
20%주정	90℃	5시간

③ 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 건조감량 20±5%(20±5 Brix)으로 농축하였음

④ 부원료 혼합

덱스트린을 농축물의 고형분 대비 20% 혼합하였음

⑤ 분무건조

농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하고 수득률을 측정하였음

⑥ 지표성분 분석

강황(Curcumin)을 분석법에 따라 정량분석

(3) 갈근강황추출물 제조

① 원료평량

갈근추출물과 강황추출물을(7:3) 비율로 평량

② 혼합

혼합기를 이용하여 갈근추출물과 강황추출물을 혼합

③ 지표성분 분석

갈근(Puerarin)과 강황(Curcumin)을 분석법에 따라 정량분석



<갈근강황추출물 제조공정도>

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(mg/g)	수율(kg)
(강황추출물)				
원재료(강황)			Curcumin : 2.49	210
↓				
추출 및 여과	20% 주정	90℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축		20 Brix	Curcumin : 0.51	130
↓				
덱스트린	고형분 대비 20%			
↓				
살균		90℃, 30min		
↓				
분무건조		170℃, SD	Curcumin : 2.18	
↓				
강황 추출분말				30
(갈근추출물)				
원재료(갈근)			Puerarin : 33.67	312
↓				
추출 및 여과	20% 주정	90℃, 5시간 55 μm		
↓				
농축		20 Brix	Puerarin : 26.4	266
↓				
덱스트린	고형분 대비 20%			
↓				
살균		90℃, 30min		
↓				
분무건조		170℃, SD	Puerarin : 98	
↓				
갈근추출분말				70
(갈근강황추출물)				
혼합	갈근추출분말 강황추출분말 = 70:30		Puerarin : 69.6 Curcumin : 0.7	100
↓				
원료				

나. 갈근강황추출물 시험법 벨리데이션

본 연구의 소재인 강황과 갈근 추출물의 원료 표준화를 이루고자 시험법 벨리데이션을 실시하여, 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 범위를 검증하고자 함

(1) 방법

(가) 표준품

- Curcumin (제조사 : Sigma aldrich, 함량 : $\geq 98\%$)
- Puerarin (제조사 : Sigma aldrich, 함량 : $\geq 99\%$)

(나) 시험 검체

- 갈근강황추출물(제조번호 : CP001)
- 갈근강황추출물(제조번호 : CP002)
- 갈근강황추출물(제조번호 : CP003)

(다) 시약

- 메탄올(Methanol) (제조사 : Burdick&Jackson, Cat : AH090-4, Grade : HPLC)
- 아세토나이트릴(Acetonitrile) (제조사 : J.T. Baker, Cat : 9017-03, Grade : HPLC)
- 초산(Acetic acid) (제조사: J.T. Baker, Cat : 9515-03 Grade : HPLC)

(라) 기기 및 설비

기		기	명	제	조	사	모	델	명
H P L C		Pump		SHIMADZU		LC20A			
		Detector							
		Injector							
		Oven							
Column				Agilent		ZORBAX Eclipse XDB C18 (250*4.6 mm I.D, 5 μ m)			
전자저울				SHIMADZU		AUX 220			
초음파추출기				화신테크		POWERSONIC 410			

(마) 시험방법 타당성(벨리데이션) 검토항목 적용

기능성분		유해물질 (정량)
정량시험	확인시험	
■ 특이성	<input type="checkbox"/> 특이성	<input type="checkbox"/> 특이성
■ 직선성	<input type="checkbox"/> 직선성	<input type="checkbox"/> 직선성
■ 정밀성	<input type="checkbox"/> 정밀성	<input type="checkbox"/> 정밀성
■ 정확성	<input type="checkbox"/> 정확성	<input type="checkbox"/> 정확성
■ 범위	<input type="checkbox"/> 범위	<input type="checkbox"/> 범위
<input type="checkbox"/> 정량한계	<input type="checkbox"/> 정량한계	<input type="checkbox"/> 정량한계

(바) 분석조건

- Mobile phase : 2% Acetic acid in 45% ACN
- Injection Vol. : 10 μ l
- Column Oven Temp. : 35 $^{\circ}$ C
- Detector : Diode Array Detector (UV 425 nm)
- Column : Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)
- Flow Rate : 1 mL/min

(2) 결과

(가) 특이성

① Curcumin

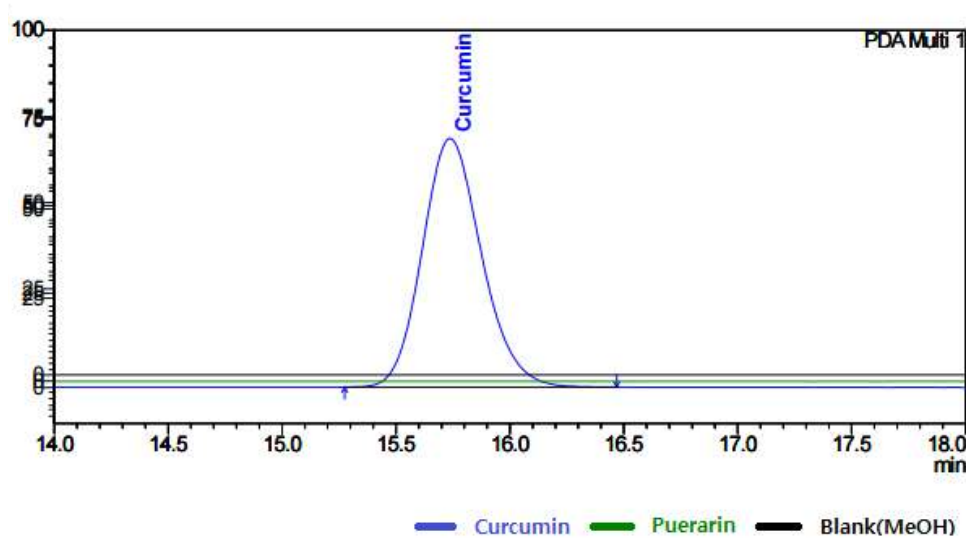


그림1. Blank, Curcumin표준용액, Puerarin표준용액 비교

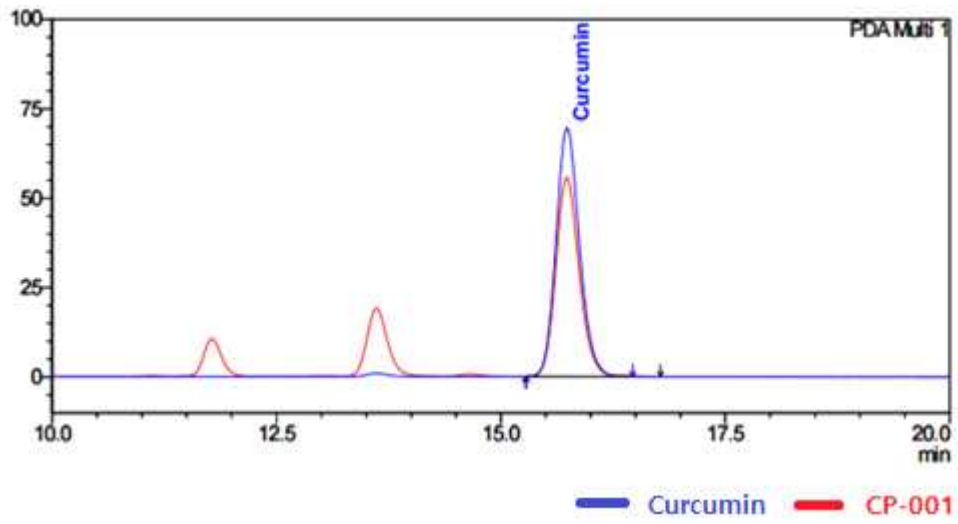


그림2. Curcumin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-001) 비교

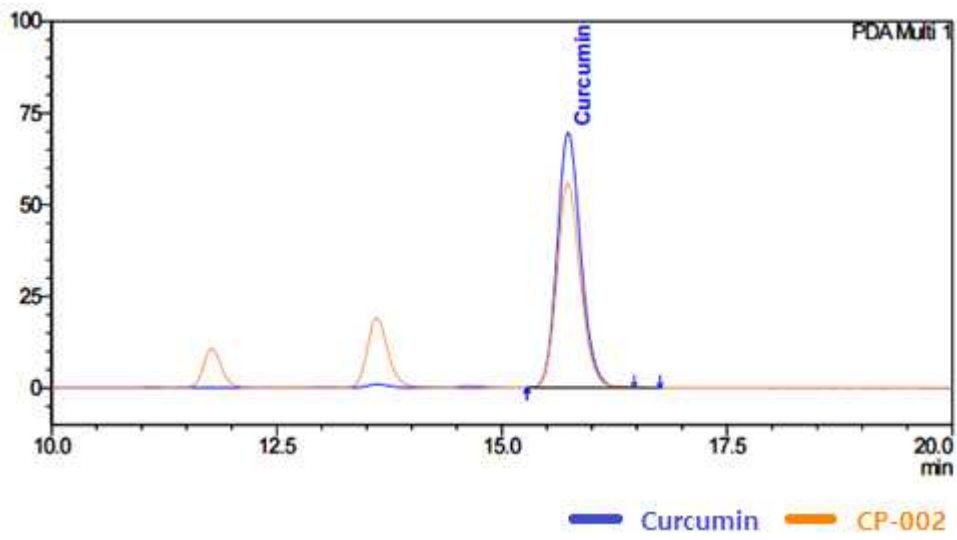


그림3. Curcumin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-002) 비교

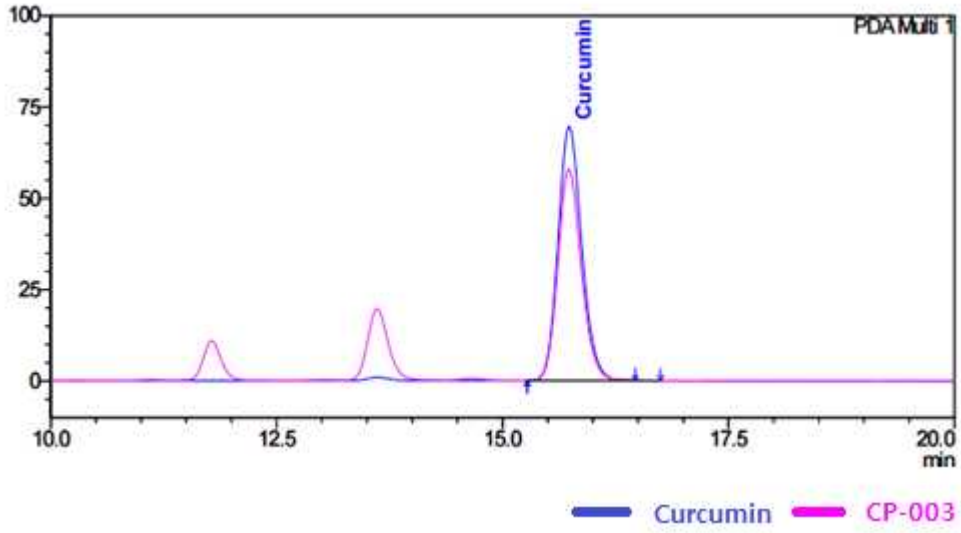


그림4. Curcumin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-003) 비교

② Puerarin

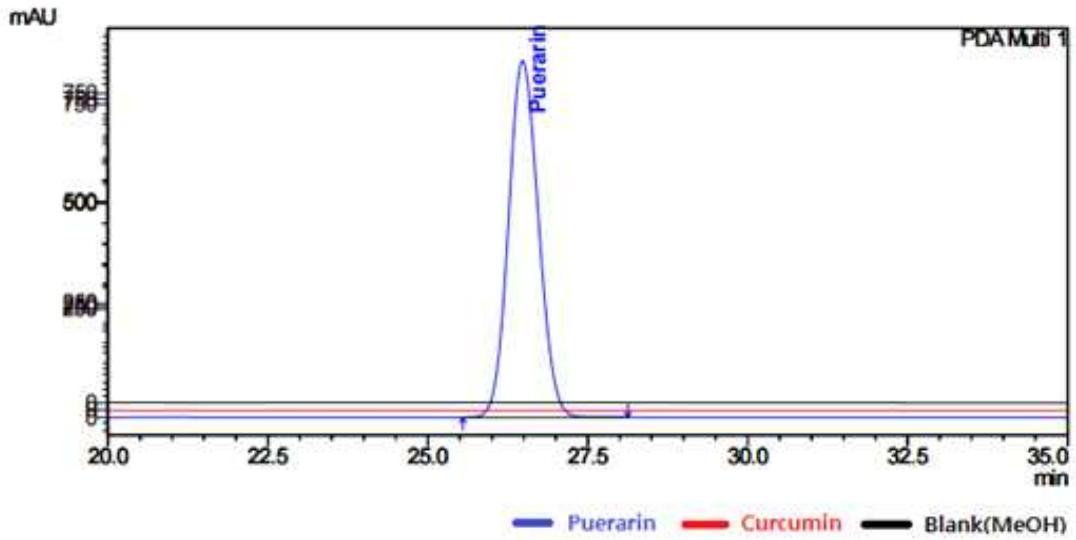


그림5. Blank, Puerarin표준용액, Curcumin표준용액 비교

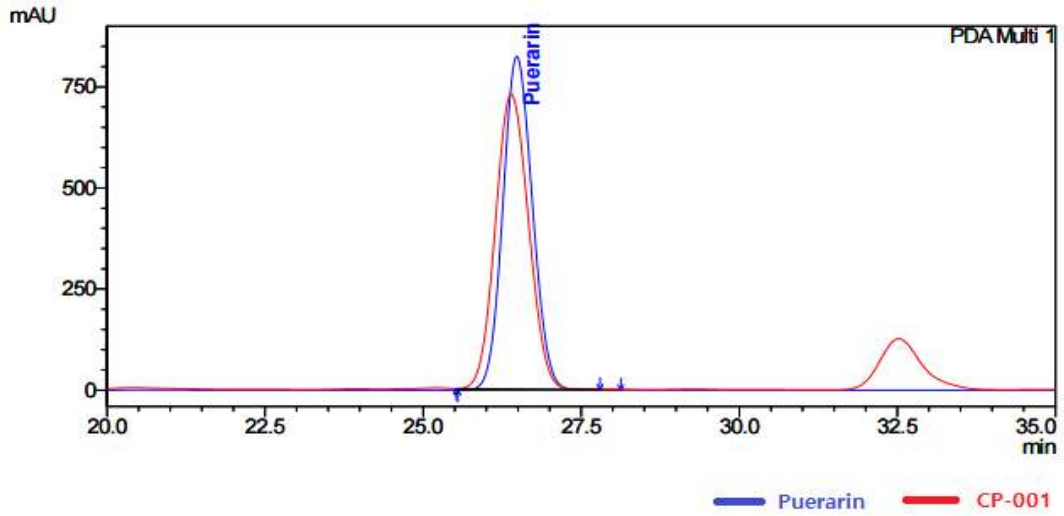


그림6. Puerarin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-001) 비교

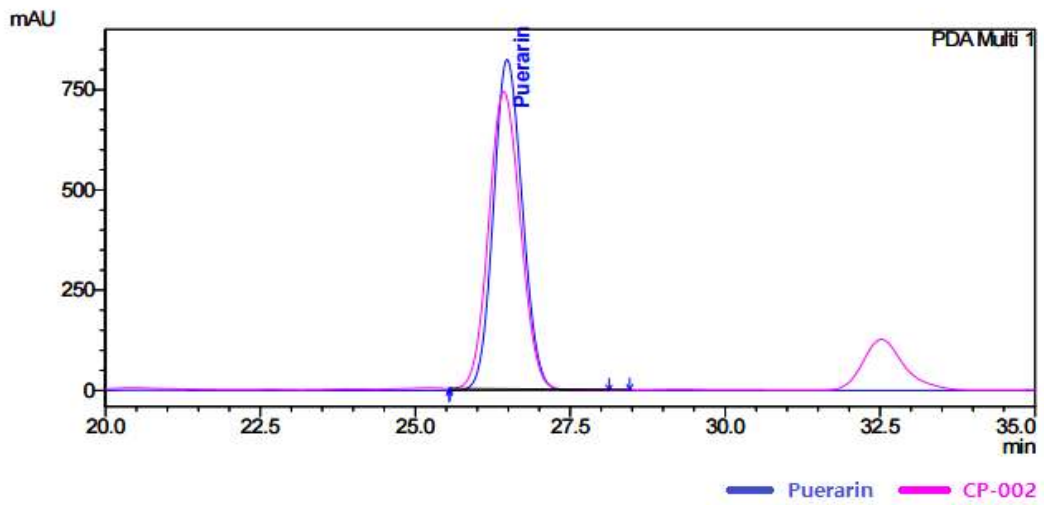


그림7. Puerarin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-002) 비교

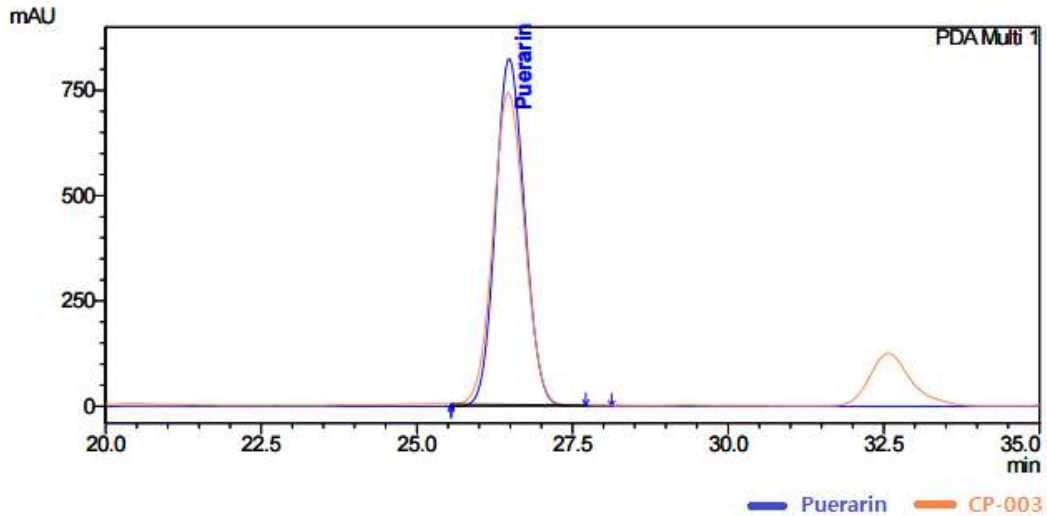


그림8. Puerarin 표준용액과 갈근강황추출물 검액 (CP-003) 비교

표1. 특이성 유지시간차이(Curcumin)

구 분	Sample Name	유지시간 (분)	Curcumin 표준용액과 유지시간의 차이 (분)
Blank	Blank	-	-
Puerarin 표준용액	Puerarin	-	-
Curcumin 표준용액	Curcumin	15.732	0.000
갈근강황추출물 (CP-001)	CP-001	15.729	0.003
갈근강황추출물 (CP-002)	CP-002	15.727	0.005
갈근강황추출물 (CP-003)	CP-003	15.728	0.004

표2. 특이성 유지시간차이(Puerarin)

구 분	Sample Name	유지시간 (분)	Puerarin 표준용액과 유지시간의 차이 (분)
Blank	Blank	-	-
Cucumin 표준용액	Curcumin	-	-
Puerarin 표준용액	Puerarin	26.477	0.000
갈근강황추출물 (CP-001)	CP-001	26.389	0.088
갈근강황추출물 (CP-002)	CP-002	26.424	0.053
갈근강황추출물 (CP-003)	CP-003	26.461	0.016

각 추출물의 Curcumin, Puerarin 피크는 각 표준품과 동일한 시간대에 분석되었고, 각 표준품의 분리도 및 피크의 Peak Purity를 피크시간과 피크높이 1/3, 2/3에서 유지시간에서 UV Spectrum으로 확인하여 분석조건에 검체의 다른 물질과 특이적으로 분석됨을 검증하였음

(나) 직선성

직선성 결과 분석조건에서 Curcumin 표준용액의 농도구간인 5~19 µg/mL과 Puerarin 표준용액의 농도구간인 277~971 µg/mL에서 각 표준품의 농도(x Data)와 피크면적(y Data)의 결정계수가 0.999 이상으로 농도와 피크면적이 선형적인 관계가 있음을 검증하였음

(다) 정밀성

- Curcumin : 분석일내 정밀성을 확인한 결과 상대표준편차(평균/표준편차*100, %RSD)의 범위는 1%이하, 분석일자간(Inter-day precicion)의 경우 1% 이하, 시험자간의 정밀성(Experiments precision)의 경우 1% 이하가 얻어졌음
- Puerarin : 분석일내 정밀성을 확인한 결과 상대표준편차(평균/표준편차*100, %RSD)의 범위는 1%이하, 분석일자간(Inter-day precicion)의 경우 1% 이하, 시험자간의 정밀성(Experimenters precision)의 경우 1% 이하가 얻어졌음

본 결과에 따라 분석조건에서 갈근강황추출물의 Curcumin, Puerarin의 농도가 재현성있게 얻어졌음

표3. 분석일내의 정밀성(Inter-day precision)-Curcumin

구분/제조번호	CP-001	CP-002	CP-003
검액 1 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5975	0.6044	0.6065
검액 2 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5980	0.6038	0.6075
검액 3 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5965	0.6034	0.6077
검액 4 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5960	0.6027	0.6081
검액 5 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5969	0.6050	0.6066
검액 6 유래 Curcumin 정량(mg/g)	0.5966	0.6030	0.6068
표준편차(mg/g) (A)	0.004		
평균(mg/g) (B)	0.603		
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.74		

표4. 분석일간의 정밀성(Intra-day precision)-Curcumin

구분/제조번호	CP-001	CP-002	CP-003
정밀성1의 Curcumin 정량(mg/g) 평균값	0.603	0.606	0.604
정밀성2의 Curcumin 정량(mg/g) 평균값	0.608	0.608	0.608
정밀성3의 Curcumin 정량(mg/g) 평균값	0.597	0.606	0.605
정밀성4의 Curcumin 정량(mg/g) 평균값	0.597	0.604	0.607
표준편차(mg/g) (A)	0.005	0.002	0.002
평균(mg/g) (B)	0.601	0.606	0.606
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.9	0.3	0.3

표5. 시험자간의 정밀성(Experimenters precision)-Curcumin

(시험자 1)		(시험자 2)	
구분	CP-18001~3	구분	CP-18001~3
P1-1	0.605	P2-1	0.608
P1-2	0.605	P2-2	0.607
P1-3	0.605	P2-3	0.608
P1-4	0.604	P2-4	0.608
P1-5	0.604	P2-5	0.608
P1-6	0.604	P2-6	0.607
P3-1	0.603	P4-1	0.603
P3-2	0.603	P4-2	0.603
P3-3	0.603	P4-3	0.603
P3-4	0.602	P4-4	0.602
P3-5	0.603	P4-5	0.603
P3-6	0.601	P4-6	0.602
평균	0.604	평균	0.605
표준편차(mg/g) (A)		0.002	
총 평균(mg/g) (B)		0.604	
%RSD		0.36	

표6. 분석일내의 정밀성(Inter-day precision)-Puerarin

구분/제조번호	CP-001	CP-002	CP-003
검액 1 유래 Puerarin 정량(mg/g)	68.7195	69.0720	69.7680
검액 2 유래 Puerarin 정량(mg/g)	69.1477	68.7941	69.8919
검액 3 유래 Puerarin 정량(mg/g)	69.1174	68.3744	69.3490
검액 4 유래 Puerarin 정량(mg/g)	68.0926	68.7322	69.4477
검액 5 유래 Puerarin 정량(mg/g)	68.3288	69.2937	69.1044
검액 6 유래 Puerarin 정량(mg/g)	68.3587	69.3796	69.4779
표준편차(mg/g) (A)	0.51		
평균(mg/g) (B)	69.02		
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.74		

표7. 분석일간의 정밀성(Intra-day precision)-Puerarin

구분/제조번호	CP-001	CP-002	CP-003
정밀성1의 Puerarin 정량(mg/g) 평균값	69.70	69.50	69.46
정밀성2의 Puerarin 정량(mg/g) 평균값	68.63	68.94	69.51
정밀성3의 Puerarin 정량(mg/g) 평균값	69.73	69.05	69.39
정밀성4의 Puerarin 정량(mg/g) 평균값	69.51	69.86	69.20
표준편차(mg/g) (A)	0.52	0.42	0.13
평균(mg/g) (B)	69.39	69.34	69.39
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.7	0.6	0.2

표8. 시험자간의 정밀성(Experimenters precision)-Puerarin

(시험자 1)		(시험자 2)	
구분	CP-18001~3	구분	CP-18001~3
P1-1	69.434	P3-1	69.156
P1-2	69.615	P3-2	69.446
P1-3	69.675	P3-3	69.561
P1-4	69.580	P3-4	69.376
P1-5	69.477	P3-5	69.344
P1-6	69.551	P3-6	69.453
P2-1	69.187	P4-1	69.607
P2-2	69.278	P4-2	69.790
P2-3	68.947	P4-3	69.534
P2-4	68.758	P4-4	69.126
P2-5	68.909	P4-5	69.646
P2-6	69.072	P4-6	69.450
평균	69.29	평균	69.46
표준편차(mg/g) (A)		0.267	
총 평균(mg/g) (B)		69.374	
%RSD		0.38	

(라) 정확성

- Curcumin : 분석용액에 일정량의 Curcumin을 첨가한 회수율[(실험농도-검체농도)/표준품농도*100] 평가에서 회수율이 87~96 %로 정확하게 얻어짐을 검증하였다.
- Puerarin : 분석용액에 일정량의 Puerarin을 첨가한 회수율[(실험농도-검체농도)/표준품농도*100] 평가에서 회수율이 96~105%로 정확하게 얻어짐을 검증하였다.

(마) 범위

갈근강황추출물의 범위는 직선성, 정밀성, 정확성이 만족되는 구간으로 Curcumin 농도로서 9.6~14.4 µg/mL(80~120 %)으로 정하며, Puerarin 농도로서 560~840 µg/mL(80~120%)을 선정하였음

(6) 분석조건에 각각의 Curcumin, Puerarin 함량을 0.6 mg/g, 69 mg/g갈근강황추출물을 분석결과 기준으로 정하였으며 Curcumin, Puerarin 정량은 검체 내 다른 성분에 간섭을 받지 않고, 정밀하고 정확한 결과가 얻어지므로 “갈근강황추출물의 정량분석법”은 갈근강황추출물 정량 시험법으로 타당한 분석법임을 검증하였음

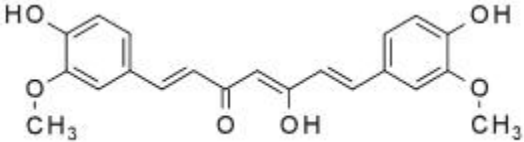
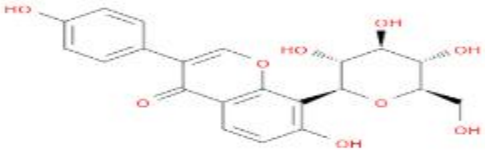
가. 갈근강황추출물 기준 및 규격 설정

(1) 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

- 건강기능식품협회에서 “강황” 지표성분 시험을 통해 분석법 확인(Curcumin), 대한약전 “갈근” 정량법에 따라 분석(Puerarin)
- 기능성분(또는 지표성분)의 규격
Puerarin 69.35 mg/g
Curcumin 0.60 mg/g
- 기능성분(또는 지표성분)의 설정 근거
갈근강황추출물 지표성분 분석결과 보고서(자체)

Lot No.	1 (Lot CP-001)		2 (Lot CP-002)		3 (Lot CP-003)		평균	
	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)
1반복	0.603	69.70	0.606	69.50	0.604	69.46		
2반복	0.608	68.63	0.608	69.94	0.608	69.51		
3반복	0.597	69.64	0.606	69.95	0.605	69.29		
4반복	0.597	69.51	0.604	69.86	0.607	69.20		
평균	0.601	69.37	0.606	69.31	0.606	69.37	0.604	69.35

(2) 기능성분(또는 지표성분)의 표준품 정보

일반명	쿠르쿠민 (Curcumin)
구조	
분자식	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
분자량	368.38 g/mol
CAS No.	458-37-7
일반명	푸에라린 (Puerarin)
구조	
분자식	C ₂₁ H ₂₀ O ₉
분자량	416.3781 g/mol
CAS No.	3681-99-0

(3) 갈근 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법

<input checked="" type="checkbox"/> 공인시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 대한약전 “갈근” 항에 따라 시험
<input type="checkbox"/> 자사시험방법	
<p>○ 지표성분명 : Puerarin</p> <p>○ 지표성분의 함량기준 : 70.0 mg/g</p> <p>○ 표준품 정보 : Puerarin (Sigma, P5555-100 mg, assay: ≥99.0%(HPLC))</p> <p>○ 분석법</p> <p>① 시험용액의 제조</p> <ul style="list-style-type: none"> - 검체 1 g을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 취해 Methanol 100 mL로 정용하여 2시간 초음파 추출을 한다. - 이를 식힌 후 정용하여 0.45 μm PTFE filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다. <p>② 표준용액의 제조</p> <ul style="list-style-type: none"> - 표준품 Puerarin 10 mg을 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조한다. - 표준원액을 희석하여 표준용액으로 한다. <p>③ 시험용액의 제조</p> <p>검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Puerarin의 피크면적 AT 및 AS를 측정한다.</p> <p>④ 기기조건</p> <ul style="list-style-type: none"> - 검출기 : PDA Detactor (측정파장 254 nm) - 칼럼 : Shiseido Capell pak MGII 길이 250*4.6 mmI.D, 5μm - 칼럼온도 : 30℃ - 유속 : 1 mL/min - 주입량 : 10 μl - 이동상 : A - ACN / B - DW (A : B = 10 : 90) <p>⑤ 계산식</p> $\text{Puerarin content (mg}\cdot\text{g}^{-1}) = S \times (A \times B) / \text{Sample(mg)} \times 100$ <p style="margin-left: 40px;">A : 시험용액의 전량 (mL)</p> <p style="margin-left: 40px;">B : 시료용액의 희석배수</p> <p style="margin-left: 40px;">S : 시험용액중의 Puerarin 검량선 농도 (μg/mL)</p>	

(4) 강황 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법

<input type="checkbox"/> 공인시험방법	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> 자사시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 시험법 밸리데이션 보고서
<p><시험방법></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 지표성분명 : Curcumin ○ 지표성분의 함량기준 : 0.6 mg/g ○ 표준품 정보 : Curcumin (Sigma, 08511-10 mg, assay: ≥98.0%(HPLC)) ○ 분석법 <p>① 시험용액의 제조</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시료 약 1 g을 취한 후 50 mL 부피플라스크에 넣는다.(20 mg/mL) - 50 mL의 MeOH을 가한다. - 초음파진탕기에서 충분히 녹인 후 상온에서 식힌다. - 상기용액을 부피플라스크에 넣고 MeOH로 표선까지 맞춘 후 0.45 μm PTFE filter로 여과하여 시험용액으로 한다. <p>② 표준용액의 제조</p> <ul style="list-style-type: none"> - 표준물질 적정량을 MeOH으로 용해하여 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다. - 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 증류수로 희석하여 표준용액으로 한다. <p>③ 시험용액의 제조</p> <p>검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 AT 및 AS를 측정한다.</p> <p>④ 기기조건</p> <ul style="list-style-type: none"> - 검출기 : UV detector / Diode array detector (측정파장 425 nm) - 칼럼 : Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것 - 칼럼온도 : 35℃ - 유속 : 1 ml/min - 주입량 : 10 μl - 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN) <p>⑤ 계산식</p> $\text{Curcumin content (mg}\cdot\text{g}^{-1}) = S \times (A \times B) / \text{Sample(mg)} \times 100$ <p style="margin-left: 40px;">A : 시험용액의 전량 (mL)</p> <p style="margin-left: 40px;">B : 시료용액의 희석배수</p> <p style="margin-left: 40px;">S : 시험용액중의 Curcumin 검량선 농도 (μg/mL)</p>	

(5) 미생물 및 유해물질(중금속 등) 분석 시험

(가) 방법

- 정상 및 대장균군

: 식품공전 제8. 일반시험법, 1.1 정상 및 4.7 대장균군시험에 따라 시험함

- 중금속 4종(카드뮴, 납, 총 비소, 총 수은)

: 식품공전 제 8. 일반시험법, 9.1 중금속시험에 따라 시험함

- 잔류농약

: 「농수산물 품질관리법」 제98조 및 같은법 시행규칙 제 126조에 따라 시험함


- 총 아플라톡신

: 식품공전 제 8. 일반시험법, 9.2 곰팡이독소시험에 따라 시험함

(나) 결과


갈근강황추출물에서 잔류농약 58종 검사 결과 모두 불검출되었으며, 중금속은 납 0.1600 mg/kg, 총 비소 0.0473 mg/kg, 카드뮴 0.2125 mg/kg 검출되었음. 총 수은은 불검출, 총 아플라톡신은 불검출 되었음

① 정상 및 대장균군(Lot1)

제 D2019091702 호 문서확인 JL23-AU56-SA55				시험·검사성적서										
제품명	감근강황추출물(SDC-CP001)		제조일자 (유통기한)	2019-04-26										
의뢰인	업체명	(주)삼들촌	성명	차민석										
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9												
제조번호	CP-001	접수년월일	2019-09-25											
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091702											
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰하신 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-04 시험·검사 책임자 : 이현영, 장정순 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>정상</td> <td>이미, 이취기 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말</td> <td>최지원</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음성</td> <td>양세원</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 분석적서는 참고용 실력서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 의 제출 용도로 활용될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 04일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khssi.re.kr 전화번호 (031)3628-0400-1</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	정상	이미, 이취기 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	최지원	대장균군	음성	양세원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원												
정상	이미, 이취기 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	최지원												
대장균군	음성	양세원												



② 성상 및 대장균군(Lot2)


제 D2019091703 호 문서확인 VZ11-EKRI-U03Z			
시험·검사성적서			
제품명	관근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9	
제조번호	CP-002	접수년월일	2019-09-25
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091703
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일 : 2019-10-04 시험·검사 책임자 : 이현영, 장정순 검사관련 총 책임자 : 김천희			
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	최지원
대장균군		음성	양재원
※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 실적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제3자 용도로 활용할 수 없습니다.			
2019년 10월 04일 한국기능식품연구원			
			
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1			



KHSI




③ 성상 및 대장균군(Lot3)

제 D2019091704 호 분서확인 K272-3FR6-558J				시험·검사성적서										
제품명	간근강황추출물(SDC-CP001)		제조일자 (유통기한)	2019-04-26										
의뢰인	업체명	(주)산들촌		성명	차민석									
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9												
제조번호	CP-003	접수년월일	2019-09-25											
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091704											
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-04 시험·검사 책임자 : 이현영, 장경순 검사관련 총 책임자 : 김찬희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성상</td> <td>이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말</td> <td>최지원</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음성</td> <td>양재원</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과관은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과를 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 경부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 04일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	최지원	대장균군	음성	양재원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원												
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	최지원												
대장균군	음성	양재원												




④ 중금속 4종(Lot1)

제 D2019091705 호 문서확인 MIZ7-QS9C-5Y44		<h2>시험·검사성적서</h2>																
제품명	갈근장황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-25															
의뢰인	업체명	(주)산돌촌	성명	차민석														
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9																
제조번호	CP-001	검수년월일	2019-09-25															
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091705															
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일: 2019-10-07 시험·검사 책임자: 이정구 검사관련 총 책임자: 김천희																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.1600 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>중비소(mg/kg)</td> <td>0.0473 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>노화영</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.2125 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> </tbody> </table>		시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	0.1600 mg/kg	정다운	중비소(mg/kg)	0.0473 mg/kg	정다운	카드뮴(mg/kg)	불검출	노화영	카드뮴(mg/kg)	0.2125 mg/kg	정다운		
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																
납(mg/kg)	0.1600 mg/kg	정다운																
중비소(mg/kg)	0.0473 mg/kg	정다운																
카드뮴(mg/kg)	불검출	노화영																
카드뮴(mg/kg)	0.2125 mg/kg	정다운																
※ 위 관청은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 필요용 성립서입니다. 시험·검사결과서 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 사가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용될 수 없습니다.																		
2019년 10월 07일 한국농식품연구원																		
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국농식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (0)31)628-0400-1																		



⑤ 중금속 4종(Lot2)

제 D2019091706 호 문서확인 43G8-43PV-C2PO		시험·검사성적서		
제품명	갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-25	
의뢰인	업체명	(주)산돌촌	성명	차민석
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9		
제조번호	CP-002	접수년월일	2019-09-25	
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091706	
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-07 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>				
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원	
납(mg/kg)		0.1533 mg/kg	정다운	
총비소(mg/kg)		0.0527 mg/kg	정다운	
총수은(mg/kg)		불검출	노화영	
카드뮴(mg/kg)		0.1988 mg/kg	정다운	
<p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 치면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과를 시험·검사무적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p>				
2019년 10월 07일				
한국기능식품연구원 				
(사)한국갈근강황식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031) 628-4101 FAX (031) 628-0400-1				

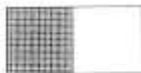


KHSI



⑥ 중금속 4종(Lot3)

제 D2019091707 호 문서확인 1U66-3122-485R		시험·검사성적서																
제품명	갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26															
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명															
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9																
제조번호	CP-003	접수년월일	2019-09-25															
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091707															
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-07 시험·검사 책임자 : 이정구 감사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>납(mg/kg)</td> <td>0.1609 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>총미소(mg/kg)</td> <td>0.0643 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>총수은(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>노화영</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.1823 mg/kg</td> <td>정다운</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본 성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사무적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 검무기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 07일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	납(mg/kg)	0.1609 mg/kg	정다운	총미소(mg/kg)	0.0643 mg/kg	정다운	총수은(mg/kg)	불검출	노화영	카드뮴(mg/kg)	0.1823 mg/kg	정다운
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																
납(mg/kg)	0.1609 mg/kg	정다운																
총미소(mg/kg)	0.0643 mg/kg	정다운																
총수은(mg/kg)	불검출	노화영																
카드뮴(mg/kg)	0.1823 mg/kg	정다운																
<p>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1</p>																		



KHSI



⑦ 잔류농약

제 D2019091711 호 문서확인 0710-HQUF-Q6PV				시험·검사성적서	
제품명		갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26	
외래인	업체명	(주)산들촌	성명	차민석	
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡리 11-9			
제조번호		CP-001	접수년월일	2019-09-25	
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2019091711	
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2019-10-02 시험·검사 책임자: 이경구 검사관련 총 책임자: 김전희</p>					
시험·검사항목		시험·검사 결과		시험·검사원	
Diazinon(mg/kg)		불검출		김용수	
DDT(mg/kg)		불검출		김용수	
Dicofol(mg/kg)		불검출		김용수	
Dichlorvos(mg/kg)		불검출		김용수	
Malathion(mg/kg)		불검출		김용수	
Methomyl(mg/kg)		불검출		이선미	
Methidathion(mg/kg)		불검출		김용수	
BHC(mg/kg)		불검출		김용수	
Bifenthrin(mg/kg)		불검출		김용수	
Cypermethrin(mg/kg)		불검출		김용수	
Cyprodinil(mg/kg)		불검출		김용수	
Boscalid(mg/kg)		불검출		이선미	
Methoxyfenozide(mg/kg)		불검출		이선미	
Cyhalothrin(mg/kg)		불검출		김용수	
Acetamiprid(mg/kg)		불검출		이선미	
Azoxystrobin(mg/kg)		불검출		이선미	
Atrazine(mg/kg)		불검출		김용수	
Ethion(mg/kg)		불검출		김용수	
Endosulfan(mg/kg)		불검출		김용수	
Imazalil(mg/kg)		불검출		김용수	



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Isoprothiolane(mg/kg)	불검출	김용수
Iprodione(mg/kg)	불검출	김용수
Carbaryl(mg/kg)	불검출	이선미
Carbofuran(mg/kg)	불검출	이선미
Captan(mg/kg)	불검출	김용수
Quintozene(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorothalonil(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorpyrifos(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorfenapyr(mg/kg)	불검출	김용수
Triadimefon(mg/kg)	불검출	김용수
Triazophos(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumizole(mg/kg)	불검출	김용수
Triflumuron(mg/kg)	불검출	김용수
Thiamethoxam(mg/kg)	불검출	이선미
Parathion-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Paclobutrazol(mg/kg)	불검출	김용수
Permethrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenitrothion(mg/kg)	불검출	김용수
Fenvalerate(mg/kg)	불검출	김용수
Phenthoate(mg/kg)	불검출	김용수
Fenprothrin(mg/kg)	불검출	김용수
Fenhexamid(mg/kg)	불검출	이선미
Phosmet(mg/kg)	불검출	김용수
Procymidone(mg/kg)	불검출	김용수
Prochloraz(mg/kg)	불검출	김용수
Profenofos(mg/kg)	불검출	김용수
Flubendiamide(mg/kg)	불검출	이선미
Pyraclostrobin(mg/kg)	불검출	이선미
Pyrimethanil(mg/kg)	불검출	이선미
Pirimiphos-methyl(mg/kg)	불검출	김용수
Fludioxonil(mg/kg)	불검출	김용수
Dimethoate(mg/kg)	불검출	김용수
Chlorantraniliprole(mg/kg)	불검출	이선미



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Chlorobenzuron(mg/kg)	불검출	이선미
Pipronil(mg/kg)	불검출	김용수
Lufenuron(mg/kg)	불검출	이선미
Tebuconazole(mg/kg)	불검출	김용수
2,6-Diisopropyl-naphthalene(mg/kg)	불검출	김용수

- * 위 내용은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- * 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
- * 본성적에는 광고용 성격이 있습니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제3측 용도로 활용할 수 없습니다.

2019년 10월 02일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031) 311628-0400-1




⑧ 총 아플라톡신(Lot1)

제 D2019091708 호 문서확인 YOP7-NOQA-RQB2		시험·검사성적서																			
제품명	갈근장황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-25																		
의뢰인	업체명	(주)산돌촌	성명	차민석																	
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9																			
제조번호	CP-001	접수년월일	2019-09-25																		
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091708																		
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-10 시험·검사 책임자 : 이정규 검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>총아플라톡신(μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₁ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₂ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₁ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₂ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면에 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본 성적서는 참고용 성격서입니다. 시험·검사결과에 시험·검시목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 재가공결과 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 10일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	총아플라톡신(μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₁ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₂ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₁ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₂ (μg/kg)	불검출	권소원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																			
총아플라톡신(μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₁ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₂ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₁ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₂ (μg/kg)	불검출	권소원																			
<p>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsl.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1</p>																					



⑨ 총 아플라톡신(Lot2)

제 D2019091709 호 문서확인 MYE0-05G4-MF21																					
시험·검사성적서																					
제품명	갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26																		
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명																		
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9																			
제조번호	CP-002	접수년월일	2019-09-25																		
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091709																		
귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일 : 2019-10-10 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희																					
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>총아플라톡신(μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₁ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₂ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₁ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₂ (μg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> </tbody> </table>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	총아플라톡신(μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₁ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₂ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₁ (μg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₂ (μg/kg)	불검출	권소원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																			
총아플라톡신(μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₁ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₂ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₁ (μg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₂ (μg/kg)	불검출	권소원																			
※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.																					
2019년 10월 10일 한국기능식품연구원																					
																					
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (031)295-2100 FAX 0311628-0400-1																					



KHFI




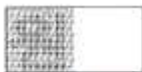
⑩ 총 아플라톡신(Lot3)

제 D2019091710 호 문서확인 9007-TV29-8228																					
시험·검사성적서																					
제품명	갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26																		
의뢰인	업체명	(주)산들촌	상명																		
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9																			
제조번호	CP-003	접수년월일	2019-09-25																		
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019091710																		
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-10 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 45%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 30%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 25%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>총아플라톡신(µg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₁ (µg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 B₂ (µg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₁ (µg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> <tr> <td>아플라톡신 G₂ (µg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> </tbody> </table> <p style="font-size: 0.8em; margin-top: 20px;"> ※ 위 관청은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사항목 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다. </p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">2019년 10월 10일</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; margin-top: 5px;">한국기능식품연구원</p> <div style="text-align: right; margin-top: 5px;"> </div>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	총아플라톡신(µg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₁ (µg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 B ₂ (µg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₁ (µg/kg)	불검출	권소원	아플라톡신 G ₂ (µg/kg)	불검출	권소원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원																			
총아플라톡신(µg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₁ (µg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 B ₂ (µg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₁ (µg/kg)	불검출	권소원																			
아플라톡신 G ₂ (µg/kg)	불검출	권소원																			
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400-1																					



① 오크라톡신(Lot1)


제 D2019101956 호 문서화인 VLXX-V0ZW-83LW		시험·검사성적서							
제품명	갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-25						
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명	차민식					
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9							
제조번호	CP-001	접수년월일	2019-10-22						
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2019101956						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-11-04 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 시험이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과를 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 11월 04일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-0400 FAX (031)628-0400-1</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소원							

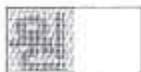


KHSI



⑫ 오크라톡신(Lot2)

제 D2019101957 호 문서확인 7EW9-11CP-67J1				시험·검사성적서							
제품명		갈근강황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26							
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명	차면석							
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예크길 11-9									
제조번호		CP-002	접수년월일	2019-10-22							
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2019101957							
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-11-04 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)</td> <td>불검출</td> <td>권소원</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 광고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 11월 04일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p style="font-size: small;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)828-2400/2401/2402/2403/2404/2405/2406/2407/2408/2409/2410/2411/2412/2413/2414/2415/2416/2417/2418/2419/2420/2421/2422/2423/2424/2425/2426/2427/2428/2429/2430/2431/828-0400-1</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소원
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소원									



KHSI



⑬ 오크라톡신(Lot3)

제 D2019101958 호 문서학인 9E38-52FW-8BAW				시험·검사성적서							
제품명		갈근장황추출물(SDC-CP001)	제조일자 (유통기한)	2019-04-26							
의뢰인	업체명	(주)산들촌	성명	차민식							
	주소	전라남도 담양군 담양읍 예곡길 11-9									
제조번호		CP-003	접수년월일	2019-10-22							
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2019101958							
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-11-04 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 30%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 30%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)</td> <td>불검출</td> <td>권소현</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 11월 04일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소현
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출	권소현									
(사)한국전장기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX (031)628-0400-1											



KHSI



4. 강황, 갈근 추출물의 여성갱년기 증상 완화 시험관연구

가. 강황, 갈근 물 및 주정 20% 추출물의 여성갱년기 생리활성 비교 평가

(1) 실험 및 방법

(가) 조골세포와 파골세포의 기본배양 및 분화

SaOs-2 조골전구세포와 RAW 264.7 파골전구세포는 ATCC (walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), sodium pyruvate (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였다. 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. SaOS-2 조골전구세포의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate 처리에 의해 유도하였다. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL 처리에 의해 유도함

(나) 세포 독성 실험(MTT assay)

본 실험에 사용한 추출물이 파골세포에 독성을 나타내는지 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. MTT solution(5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용함. 파골전구세포인 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1X10⁴ cells/well로 총 용적을 100 µL이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용함. 12시간 동안 배양한 후 추출물들을 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL로 처리하여 24시간동안 배양함. 그 후, MTT reagent 20 µL를 첨가하여 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고 4시간 동안 반응시킴. 배양액과 MTT reagent를 suction하고 PBS 용액으로 2회 세척한 후, 각 well 당 DMSO 200 µL를 첨가하여 배양기에서 용해 시켰으며, 20분 후 iMARK™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 optical density를 측정함

(다) Real-time polymerase chain reaction에 의한 조골세포에서 파골세포 분화 관련 인자 발현 측정

추출물을 처리하였을 때 조골세포 및 파골세포 분화 관련 인자 발현을 알아보기 위해 real time PCR을 실시함. 5X10³개의 SaOs-2 세포를 6 well plate에 분주하고 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 첨가하여 조골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하였고, 1X10⁵개의 RAW264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 10 ng/mL RANKL과 10 ng/mL M-CSF를 첨가하여 파골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시함. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성함. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green

Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 1에 나타냄. Real time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채움. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시함. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록됨. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시함. 결과의 분석은 BioRad에서 제공하는 CFX Maestro™ Analysis Software로 분석함

Table 1. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'
	R 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
ALP	F 5'-CCGCTTTAACCAGTGCAACA-3'
	R 5'-CCCGATTCATCACGGAGATG-3'
Osteocalcin	F 5'-CAGGAGGGCAGCGAGGTA-3'
	R 5'-GCTCCCAGCCATTGATACA-3'
NFATC1	F 5'-CCTGGAGATCCCGTTGCTT-3'
	R 5'-AGGATCCCAGCACAGTCGA-3'
c-fos	F 5'-GAGACCCCCTAAGATCCC AAA-3'
	R 5'-AACCCCCGTCTTGGCATA C-3'
MMP9	F 5'-ACGCCACGCATTTTCAA AAA-3'
	R 5'-GGCCCATTCCTCCACAT-3'

(라) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean±SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정함

(2) 실험결과

(가) 세포 독성평가(농도설정)

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay 검사법을 이용하여 실시함. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법임. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례함. 세포가 많이 살아 있을수록 MTT로 환원이 많이 되어 더 진한 보라색을 띠게 됨

Sample의 적정농도를 결정하기 위해 용해도 실험을 거친 후 RAW264.7 세포를 이용하여 세포의 생존율을 측정 한 결과는 Fig.1, Fig.2, Fig.3, Fig.4에 나타냄

같은 물 추출물을 0-1000 μ g/mL을 처리한 후 생존율을 측정 한 결과, 25-400 μ g/mL

농도에서는 생존율이 90%이상이었으나, 600 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 85.5%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 82.1%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 73.9%로 떨어진 것을 확인함

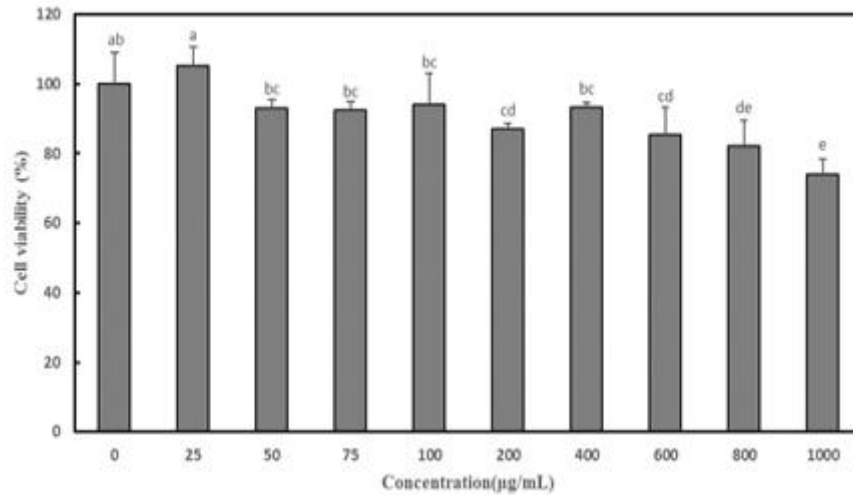


Fig. 1. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi water extracts on cell viability in RAW264.7 preosteoclasts

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 $\mu\text{g/mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

같은 20% 주정 추출물을 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 생존율이 90%이상이었으나, 600 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 87.8%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 79.1%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 67.4%로 떨어진 것을 확인함

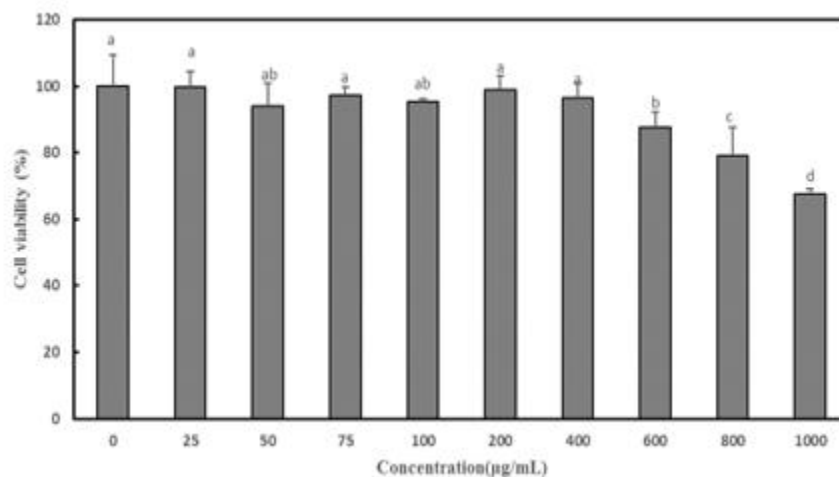


Fig.2. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts on cell viability in

RAW264.7 preosteoclasts

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 $\mu\text{g/mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

강황 물 추출물을 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 생존율이 90%이상이었으나, 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 84.8%, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 80.5%, 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 70.5%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 67.0%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 60.8%로 떨어진 것을 확인함

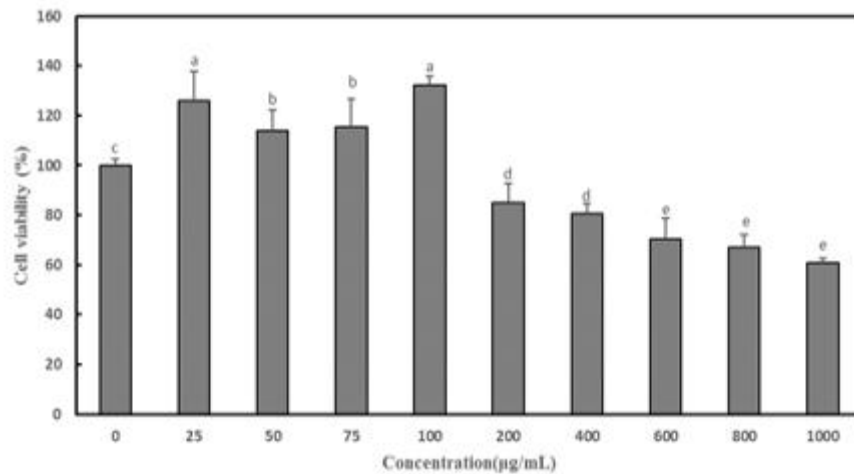


Fig.3. Effect of *Curcuma longa*. L water extracts on cell viability in RAW264.7 preosteoclasts

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 $\mu\text{g/mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

강황 20% 주정 추출물을 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 생존율이 90%이상이었으나, 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 66.9%, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 46.3%, 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 43.4%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 47.1%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 51.9%로 떨어진 것을 확인하였음. 800-1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서

생존율이 증가한 것은 실험적인 오류가 있었을 것으로 보여짐

MTT 실험 진행 결과에 따라 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 세포에 처리한 후 유전자 발현 실험을 진행함

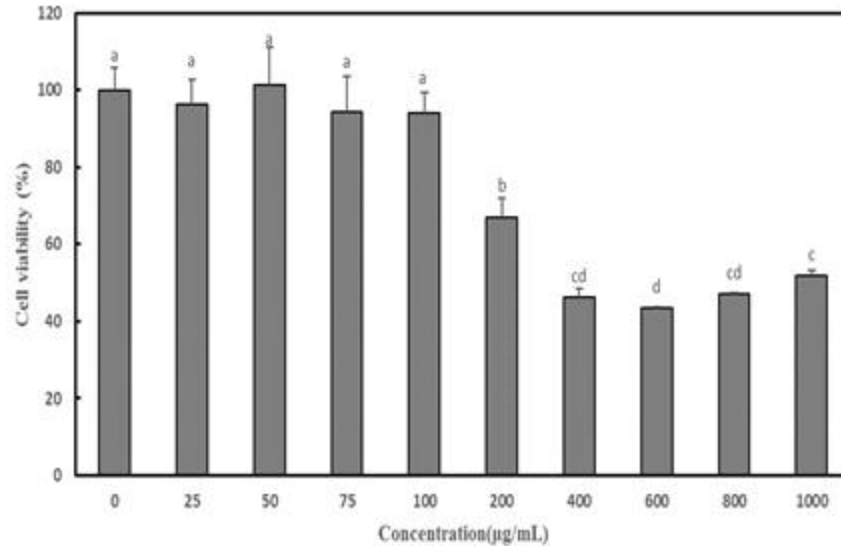


Fig.4. Effect of *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts on cell viability in RAW264.7 preosteoclasts

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

(나) Osteoblast 관련 유전자 발현량 측정

염기성 인산분해 효소(alkaline phosphatase; ALP)는 대부분의 조직에 존재하며, 골 조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있음

SaOs-2 세포에 갈근, 강황 추출물을 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 ALP mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.5에 나타내었음. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 2.9배 유의적으로 증가함을 확인하였고, 갈근 물추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 1.2배, 0.8배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 갈근 주정추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.9배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 강황 물 추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.8배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 또한 강황 주정 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 1.7배 유의적으로 증가하였고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 1.0배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 추출물

처리 후 ALP의 증가확인 결과 물 추출물보다는 주정 추출물에서 효과가 뛰어난 것으로 보여짐

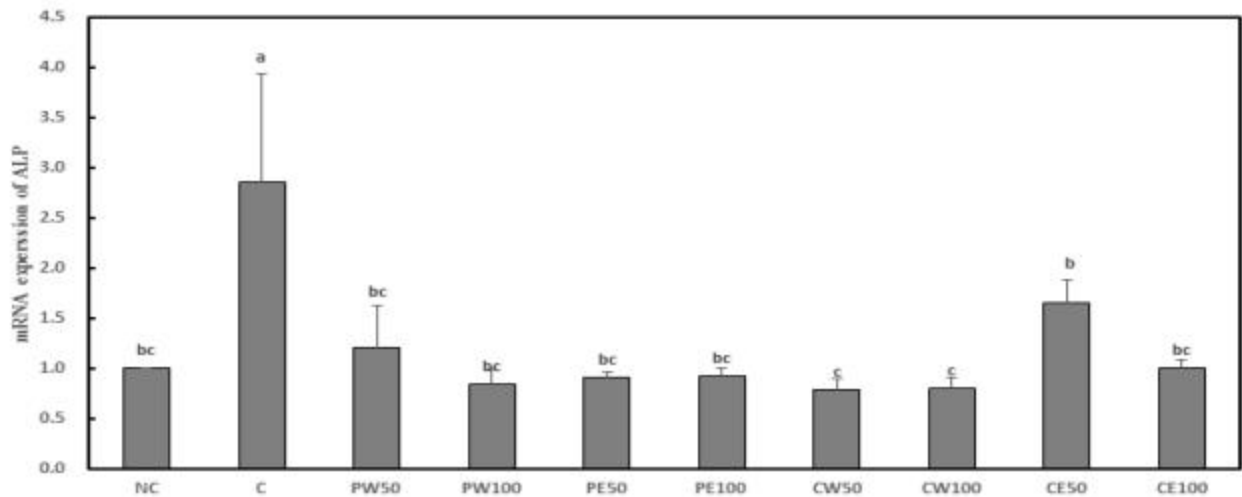


Fig.5. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of ALP expression in SaOs-2 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. PW50 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 µg/mL, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 µg/mL, PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 µg/mL, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 µg/mL, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 µg/mL, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 µg/mL, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 µg/mL, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 µg/mL

Osteocalcin은 calcium과 결합하는 vitamin K 의존성 α-carboxy glutamic acid 단백질 이고, 뼈의 대표적인 무기질인 수산화인회석과도 결합하며 뼈와 dentin에 매우 특이한 단백질임

SaOs-2 세포에 갈근, 강황 추출물을 50, 100µg/mL을 처리한 후 osteocalcin mRNA 발현을 측정 한 결과를 Fig.6에 나타내었음. Ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 2.0배 유의적으로 증가함을 확인하였고, 갈근 물추출물 50, 100 µg/mL 처리군은 normal control군에 비해 각각 1.0배, 1.1배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 갈근 20%주정추출물 50, 100 µg/mL 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.8배, 1.0배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 강황 물 추출물 50, 100 µg/mL 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.8배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 또한 강황 20% 주정 추출물 50 µg/mL 처리군은 normal control군에 비해 5.0배 유의적으로 증가하였고, 100 µg/mL 처리군은 0.5배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 추출물 처리 후 osteoclastin의 증가확인 결과 물 추출물보다는 20% 주정 추

출물에서 효과가 뛰어나는 것으로 보여짐

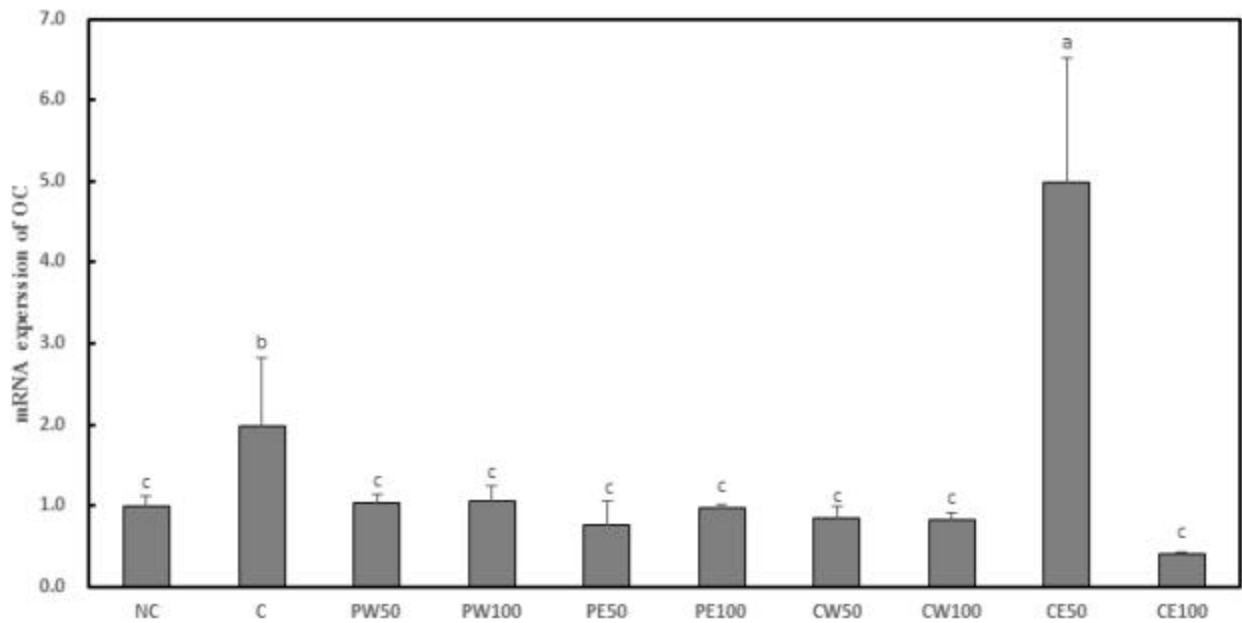


Fig.6. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of OC expression in SaOs-2 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. PW50 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 µg/mL, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 µg/mL, PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 µg/mL, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 µg/mL, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 µg/mL, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 µg/mL, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 µg/mL, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 µg/mL

(다) Osteoclast 관련 유전자 발현량 측정

NFATc1과 c-Fos는 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 갈근, 강황추출물을 50, 100 µg/mL을 처리한 후 NFATc1과 c-Fos mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.7, Fig.8에 나타내었음

NFATc1 유전자 발현량을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.7배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PW100, PE50, PE100 처리시 control군에 비해 NFATc1의 발현이 각각 0.4배, 0.5배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소하였고, CW50, CW100, CE50, CE100 처리시 각각 0.5배, 1.0배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소함

c-Fos 유전자 발현량을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.8배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PW100, PE50, PE100 처리시 control군에 비해 NFATc1의 발현이 각각

0.6배, 0.6배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소하였고, CW50, CW100, CE50, CE100 처리시 각각 0.6배, 1.0배, 0.6배, 0.6배 유의적으로 감소함

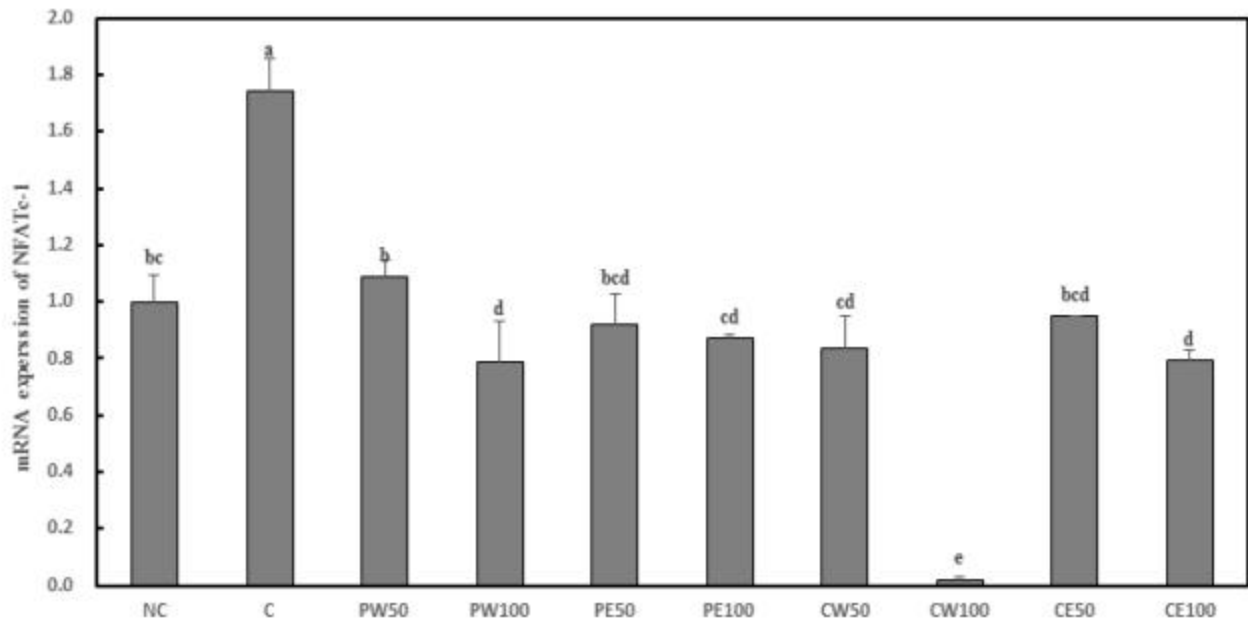


Fig.7. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of NFATc-1 expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. PW50 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 µg/mL, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 µg/mL, PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 µg/mL, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 µg/mL, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 µg/mL, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 µg/mL, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 µg/mL, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 µg/mL

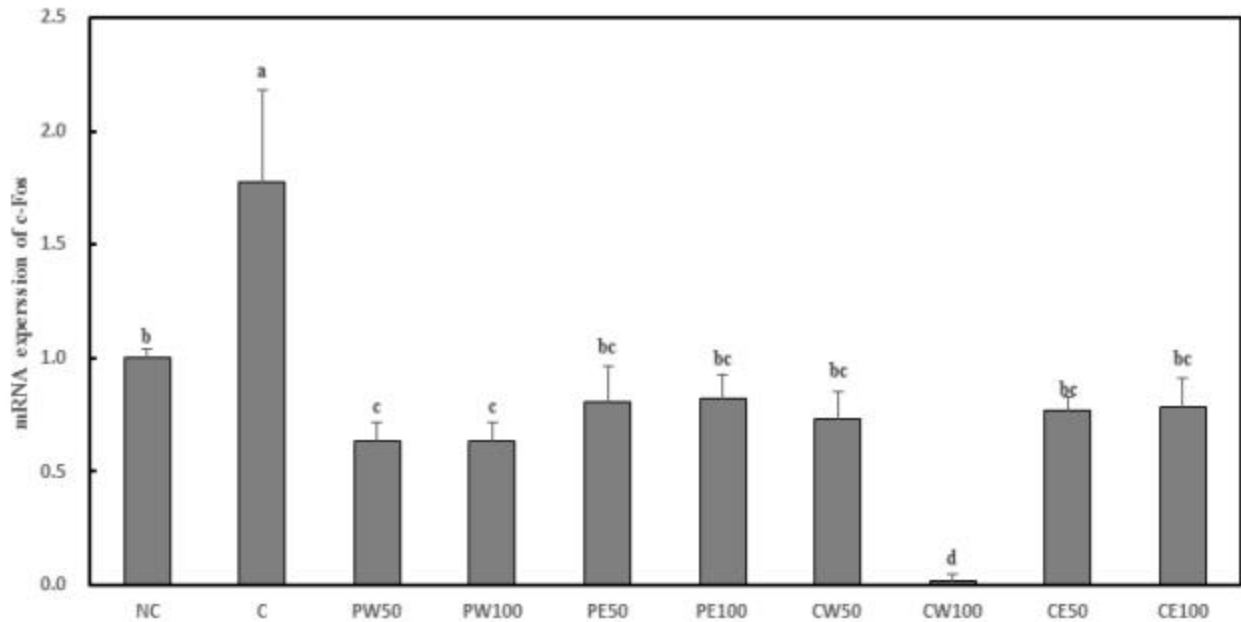


Fig.8. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of NFATc-1 expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. PW50 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 µg/mL, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 µg/mL, PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 µg/mL, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 µg/mL, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 µg/mL, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 µg/mL, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 µg/mL, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 µg/mL

MMP-9은 Type IV의 collagenase로 파골세포에서의 과발현은 cetracellular matrix을 분해하는 것으로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 갈근, 강황추출물을 50, 100µg/mL을 처리한 후 MMP9 mRNA 발현을 측정된 결과를 Fig.9에 나타내었음

MMP-9 유전자 발현량을 측정된 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 3.4배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PE50 처리시 control군에 비해 MMP-9의 발현이 각각 0.7배, 0.5배 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 또한 PW100, PE100 처리시 control군에 비해 MMP-9의 발현이 각각 1.2배, 1.5배 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었음. CW50, CW100, CE50, CE100 처리시 각각 2.9배, 9.3배, 2.4배, 2.7배 유의적으로 높게 나타남

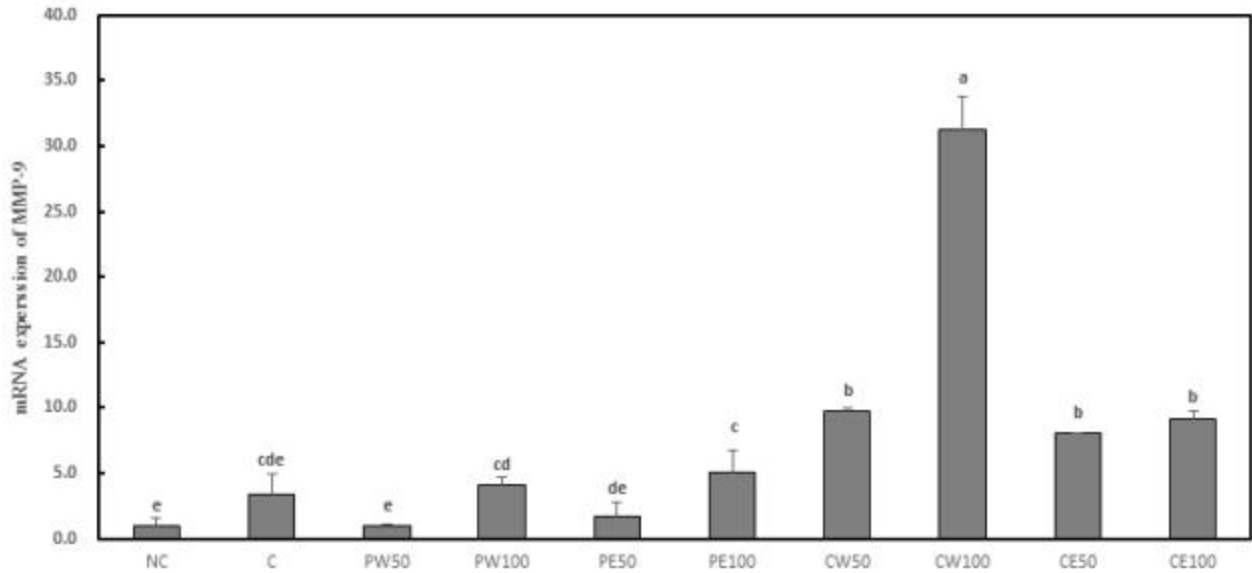


Fig.9. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of MMP9 expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. PW50 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 µg/mL, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 µg/mL, PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 µg/mL, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 µg/mL, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 µg/mL, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 µg/mL, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 µg/mL, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 µg/mL

이와 같은 결과를 토대로 하였을 때 갈근 및 강황의 물 추출물보다 20% 주정 추출물이 골에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되며, 20% 주정추출물을 이용하여 갈근 및 강황의 복합물 또는 복합 추출물이 골에 미치는 영향을 알아보기로 하였음

나. 강황, 갈근 20% 주정추출물의 복합물과 복합 추출물의 여성갱년기 생리활성 비교 평가

(1) 실험 및 방법

(가) 조골세포와 파골세포의 기본배양 및 분화

SaOs-2 조골전구세포와 RAW 264.7 파골전구세포는 ATCC (walkersville, MD, USA)에 서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), sodium pyruvate (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였음. 37°C, 5% CO₂에서 배

양하였다. SaOS-2 조골전구세포의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate 처리에 의해 유도하였다. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL 처리에 의해 유도하였음

(나) 세포 독성 실험(MTT assay)

본 실험에 사용한 추출물이 파골세포에 독성을 나타내는지 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였음. MTT solution(5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였음. 파골전구세포인 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 총 용적을 100 µL이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용하였음. 12시간 동안 배양한 후 추출물들을 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL로 처리하여 24시간동안 배양하였음. 그 후, MTT reagent 20 µL를 첨가하여 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고 4시간 동안 반응시켰음. 배양액과 MTT reagent를 suction하고 PBS 용액으로 2회 세척한 후, 각 well 당 DMSO 200 µL를 첨가하여 배양기에서 용해시켰으며, 20분 후 iMARK™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 optical density를 측정하였음

(다) Real-time polymerase chain reaction에 의한 조골세포에서 파골세포 분화 관련 인자 발현 측정

추출물을 처리하였을 때 조골세포 및 파골세포 분화 관련 인자 발현을 알아보기 위해 real time PCR을 실시하였음. 5×10^3 개의 SaOs-2 세포를 6 well plate에 분주하고 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 첨가하여 조골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48 시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하였고, 1×10^5 개의 RAW264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 10 ng/mL RANKL과 10 ng/mL M-CSF를 첨가하여 파골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였음. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였음. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였음. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었음. Real time PCR 반응은 총 20 µL 내에 cDNA 2 µL와 2X SYBR mix 10 µL, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/µL를 1 µL씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채워주었음. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였음. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였음. 결과의 분석은 BioRad에서 제공하는 CFX Maestro™ Analysis Software로 분석하였음

Table 2. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'
	R 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
ALP	F 5'-CCGCTTTAACCAGTGCAACA-3'
	R 5'-CCCGATTCATCACGGAGATG-3'
Osteocalcin	F 5'-CAGGAGGGCAGCGAGGTA-3'
	R 5'-GCTCCCAGCCATTGATACA-3'
NFATC1	F 5'-CCTGGAGATCCCGTTGCTT-3'
	R 5'-AGGATCCCAGCACAGTCGA-3'
c-fos	F 5'-GAGACCCCCTAAGATCCCAA-3'
	R 5'-AACCCCCGTCTTGGCATA-3'
MMP9	F 5'-ACGCCACGCATTTTCAAAA-3'
	R 5'-GGCCATTCCCTCCACAT-3'
Cathepsin K	F 5'-GATAATGTGAACCATGCAGTGTTG-3'
	R 5'-CCAGTGCTTGCTTCCCTTCT-3'

(라) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean±SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P<0.05$ 수준에서 검정하였음

(2) 실험결과

(가) 세포 독성 평가(농도설정)

Sample의 적정농도를 결정하기 위해 용해도 실험을 거친 후 RAW264.7 세포를 이용하여 세포의 생존율을 측정한 결과는 Fig.10, Fig.11에 나타내었음

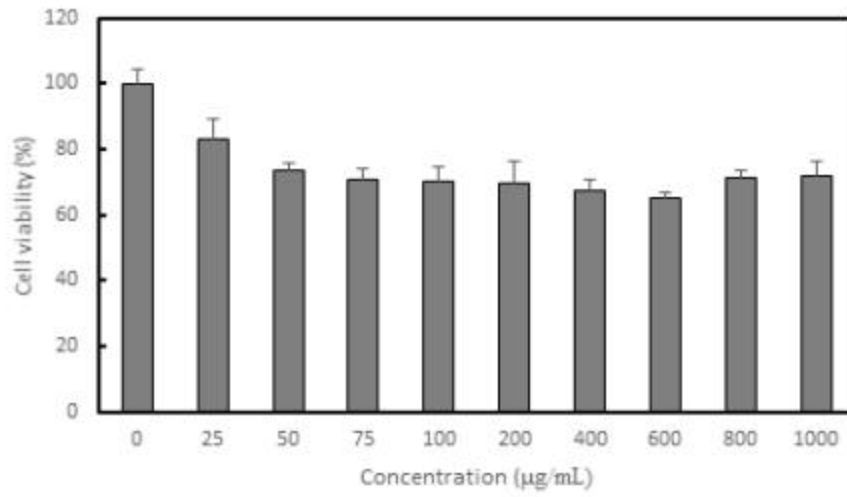
갈근 20%주정추출물과 강황 20% 주정추출물을 3:7, 5:5, 7:3 비율로 섞은 복합물 0-1000 µg/mL을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 3:7 비율 복합물의 경우 25 µg/mL 처리시 83.2% 생존율을 유지하고 있으나, 50 µg/mL 이상 처리시 약 70%로 감소하였고, 5:5 비율 복합물의 경우 25, 50 µg/mL 처리시 약 80% 생존율을 유지하고 있으나 75 µg/mL 이상 처리시 약 73-77% 생존율을 유지하는 것으로 나타났음. 또한 7:3 비율 복합물은 25 µg/mL 처리시 80.7% 생존율을 유지하고, 50 µg/mL 이상 처리시 약 68.0-76.6% 생존율을 유지하는 것으로 나타났음(Fig.10)

갈근과 강황을 3:7, 5:5, 7:3 비율로 섞은 후 20% 주정으로 추출한 추출물을 0-1000 µg/mL을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 3:7 복합 추출물의 경우 25 µg/mL 처리시 73.7% 생존율이 나타났고 50 µg/mL 이상 처리시 70% 미만의 생존율이 나타났음. 5:5 복합 추출물의 경우 25 µg/mL 처리 시 72.0% 생존율이 유지되었고, 50 µg/mL 이상 처리시 약 70%의 생존율이 유지 되었으나, 7:3 복합 추출물의 경우 25 µg/mL 처리시 78.0% 생존율이 유지되었고, 50 µg/mL 이상 처리시 약 75%의 세포 생존율이 나타났음(Fig.11)

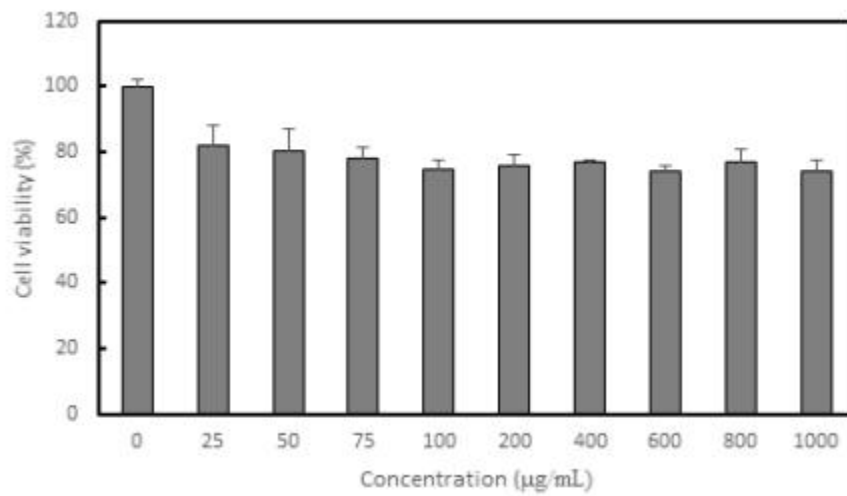
따라서, 복합물 및 추출물을 10, 25 µg/mL 의 농도로 세포에 처리한 후 유전자 발현 실험

험을 진행하였음

(A)



(B)



(C)

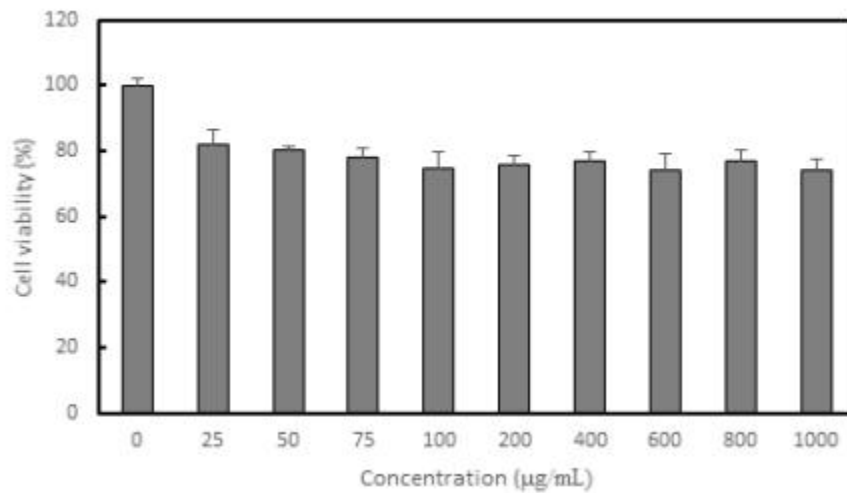


Fig. 10. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts complex on cell viability in RAW264.7 preosteoclasts

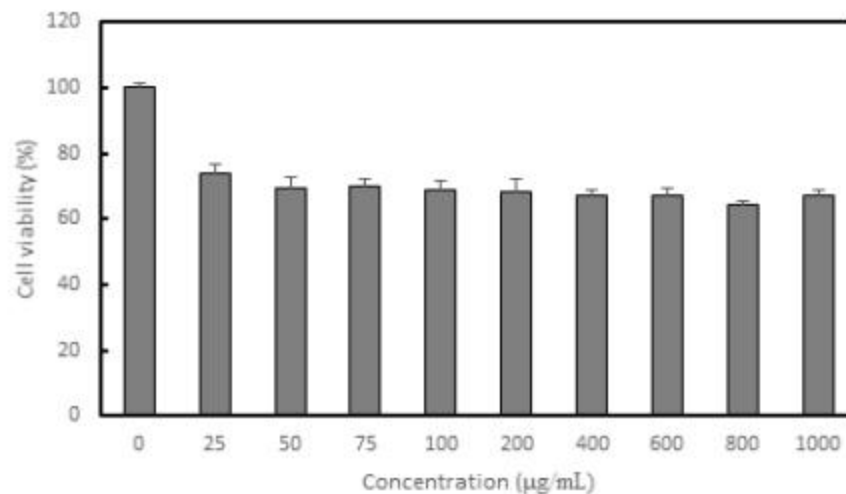
Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 $\mu\text{g/mL}$) cells, taken as 100%. All data are presented as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

(A) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7

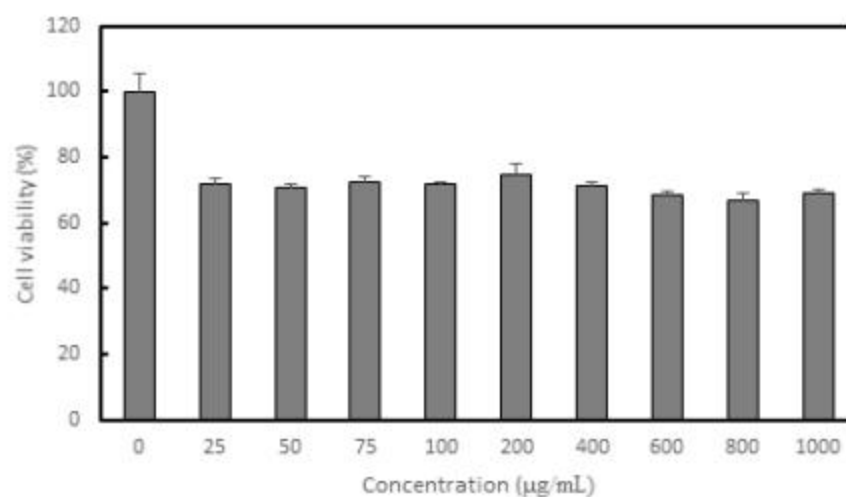
(B) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5

(C) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

(A)



(B)



(C)

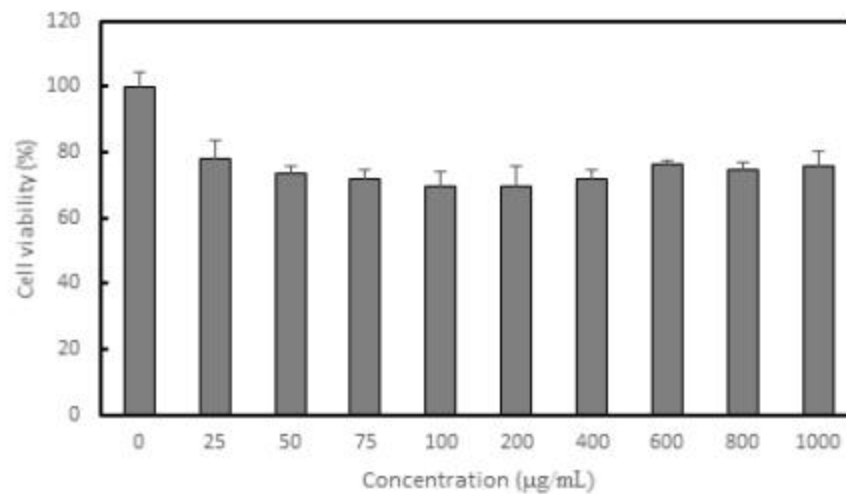


Fig. 11. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts on cell viability in RAW264.7 preosteoclasts

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 µg/mL) cells, taken as 100%. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$

(A) : 3:7 *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts

(B) : 5:5 *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts

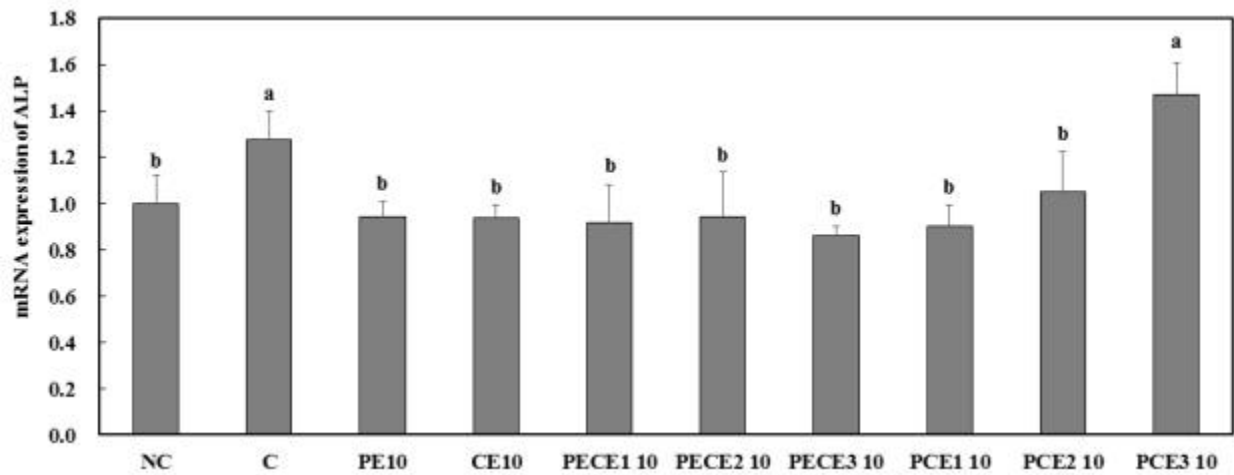
(C) : 7:3 *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts

(나) Osteoblast 관련 유전자 발현량 측정

SaOS-2 세포에 갈근, 강황 20%주정추출 복합물 및 복합 20%주정추출물을 10, 25 µg/mL을 처리한 후 ALP mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.12에 나타내었음. Ascorbic acid 와 β-glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 1.3배 유의적으로 높아졌음을 확인하였음. PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 10 µg/mL 처리시 normal control군에 비해 각각 0.9배, 0.9배, 0.9배, 0.9배, 1.0배, 1.5배 증가함을 확인하였음. 특히 PCE3는 normal control군과 유의적인 차이가 나타났음을 확인하였음. 또한, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3

(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 normal control군에 비해 각각 1.5배, 1.2배 1.4배, 1.6배, 1.4배, 1.0배 증가함을 확인하였고, PECE1, PECE3, PCE1, PCE2군은 normal control군과 유의적인 차이가 나타났음. 특이점은 PCE3군의 경우 저농도(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리시에는 ALP의 유전자 발현이 가장 높았으나, 고농도(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리시 유전자 발현이 오히려 감소함을 확인하였음

(A)



(B)

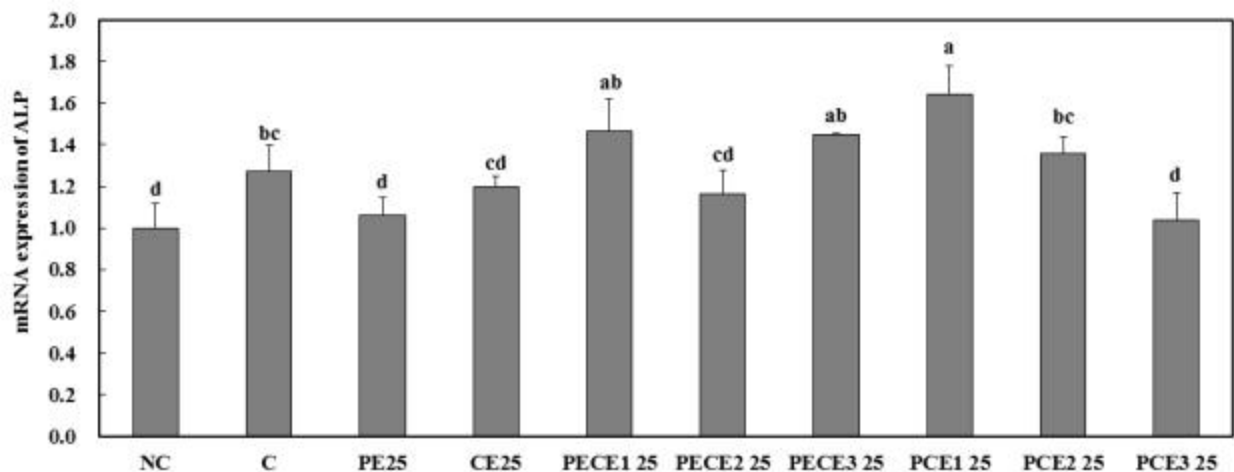


Fig.12. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of ALP expression in SaOs-2 cells

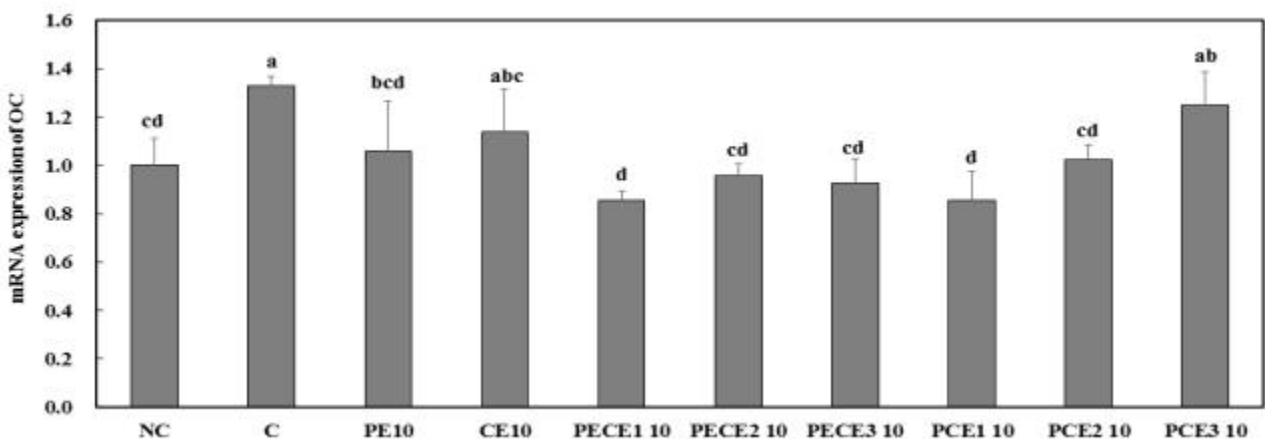
The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (B) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata*

Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata*
 Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

SaOS-2 세포에 갈근, 강황 20%주정추출 복합물 및 복합 20%주정추출물을 10, 25 μ g/mL을 처리한 후 OC mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.13에 나타내었음. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 1.3배 유의적으로 높아졌음을 확인하였음. PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 10 μ g/mL 처리시 normal control군에 비해 각각 0.9배, 1.0배, 0.9배, 0.9배, 1.0배, 1.2배 증가함을 확인하였음. 특히 PCE3는 normal control군과 유의적인 차이가 나타났음을 확인하였음. 또한, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 25 μ g/mL 처리시 normal control군에 비해 각각 1.5배, 1.1배 1.1배, 1.2배, 1.2배, 0.9배 증가함을 확인하였고, PECE1, PECE3, PCE1, PCE2군은 normal control군과 유의적인 차이가 나타났음. 특이점은 PCE3군의 경우 저농도(10 μ g/mL) 처리시에는 OC의 유전자 발현이 가장 높았으나, 고농도(25 μ g/mL) 처리시 유전자 발현이 오히려 감소함을 확인하였음

(A)



(B)

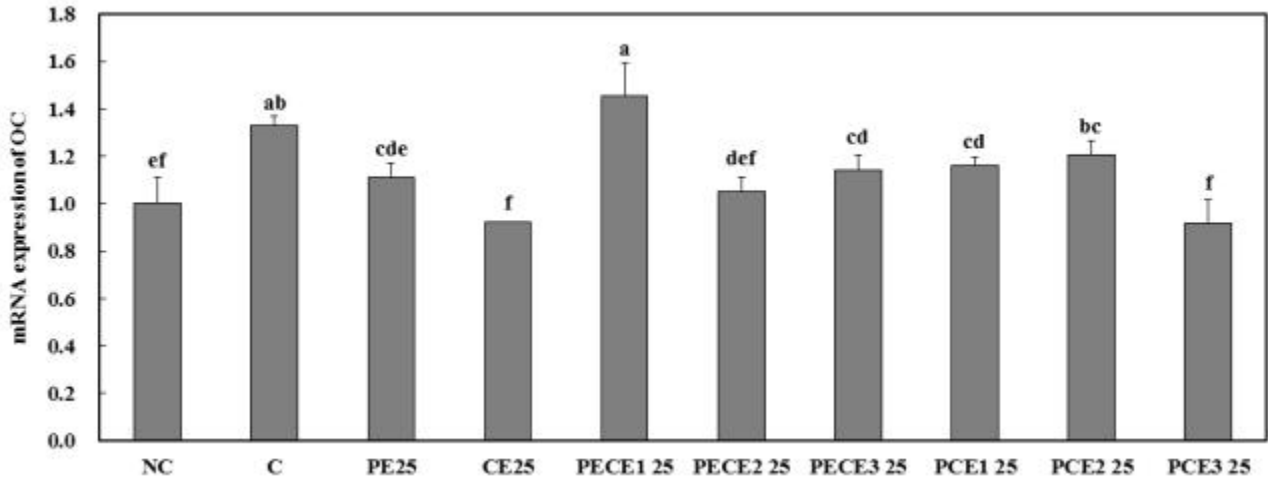


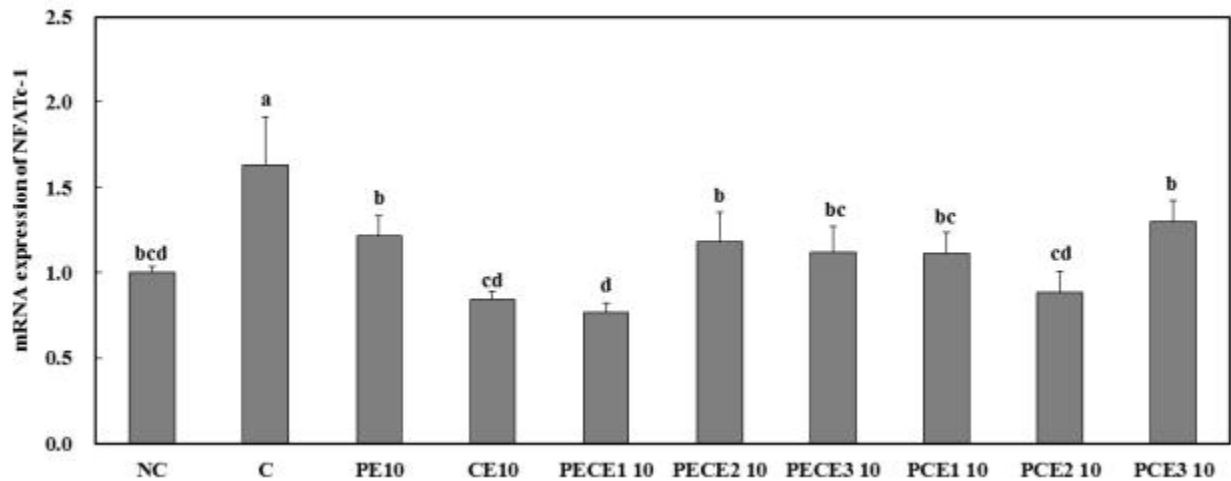
Fig.13. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of OC expression in SaOs-2 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (B) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

(다) Osteoclast 관련 유전자 발현량 측정

NFATc1 유전자 발현량을 측정한 결과(Fig.14), RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.6배 높게 발현되었음을 확인하였고, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control군에 비해 각각 0.5배, 0.3배, 0.3배, 0.3배, 0.7배, 0.2배 유의적으로 감소함을 확인하였음. PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control 군에 비해 각각 0.7배, 0.5배, 0.6배, 0.4배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소함을 확인하였음

(A)



(B)

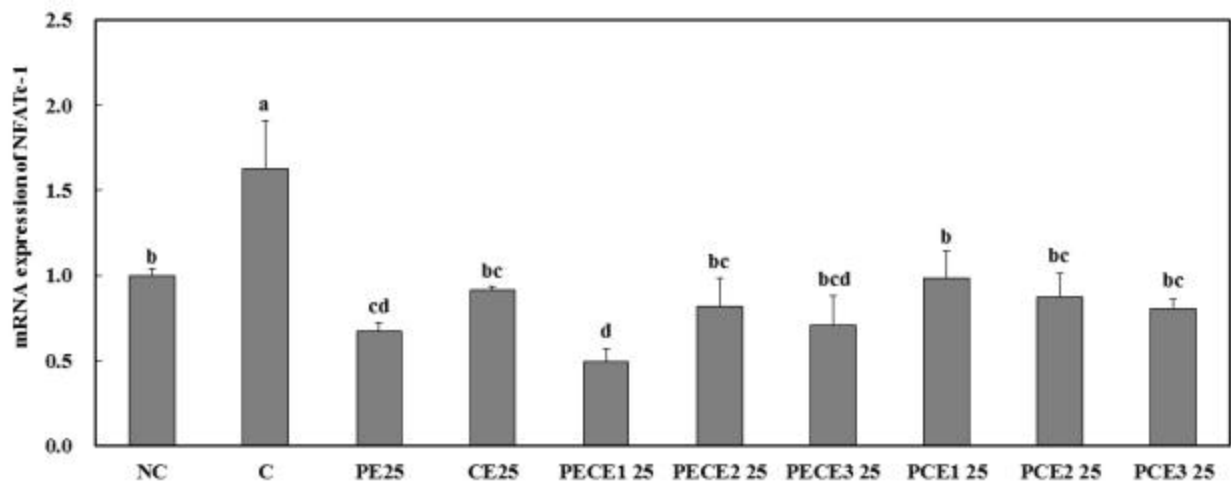


Fig.14. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of NFATc-1 expression in RAW264.7 cells

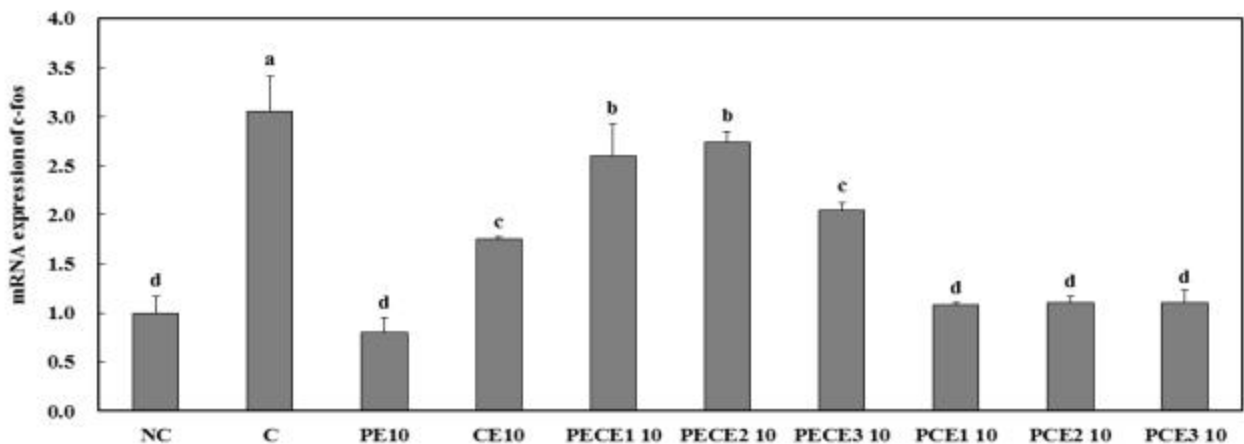
The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 μ g/mL, (B) 25 μ g/mL

PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

c-Fos 유전자 발현량을 측정한 결과(Fig.15), RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.6배 높게 발현되었

음을 확인하였고, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 10 µg/mL 처리시 control군에 비해 각각 0.1배, 0.1배, 0.3배, 0.6배, 0.6배, 0.6배 유의적으로 감소함을 확인하였음. PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5)을 25µg/mL 처리시 control 군에 비해 각각 0.5배, 0.3배, 0.5배, 0.3배, 유의적으로 감소함을 확인하였음. PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 25 µg/mL 처리시 control 군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 혼합된 강황의 비율이 높아서 이러한 결과가 나타난 것으로 사료됨

(A)



(B)

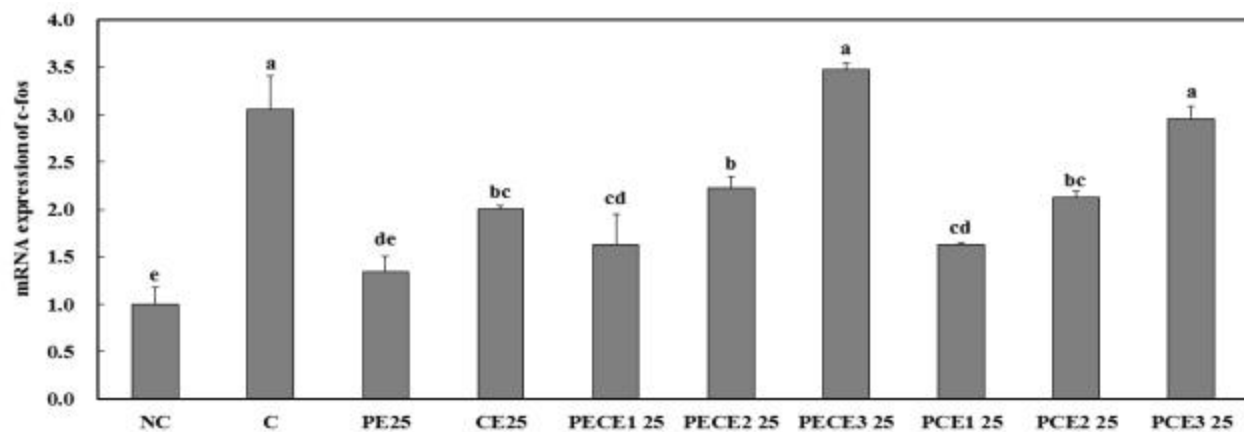
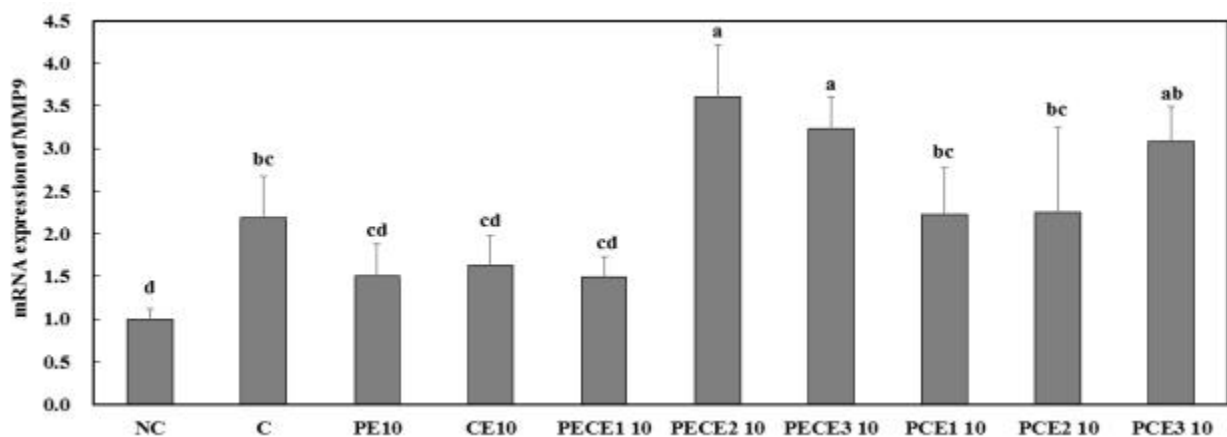


Fig.15. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of c-Fos expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (B) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

MMP-9 유전자 발현량을 측정된 결과(Fig.16), RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 2.2배 높게 발현되었음을 확인하였고, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5)을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control군에 비해 각각 0.3배, 1.0배, 1.0배 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았음. PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control 군에 비해 각각 1.0배, 0.2배, 0.2배, 0.3배, 0.4배 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았음

(A)



(B)

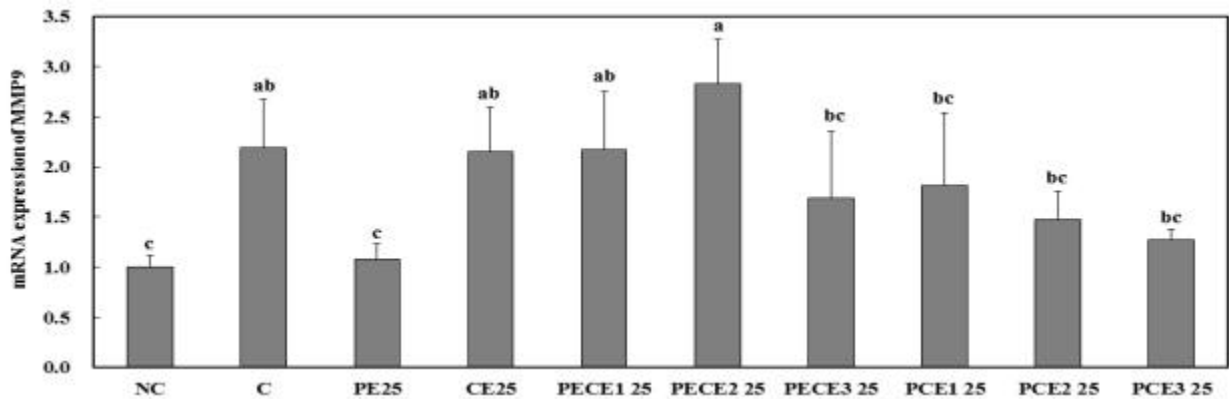


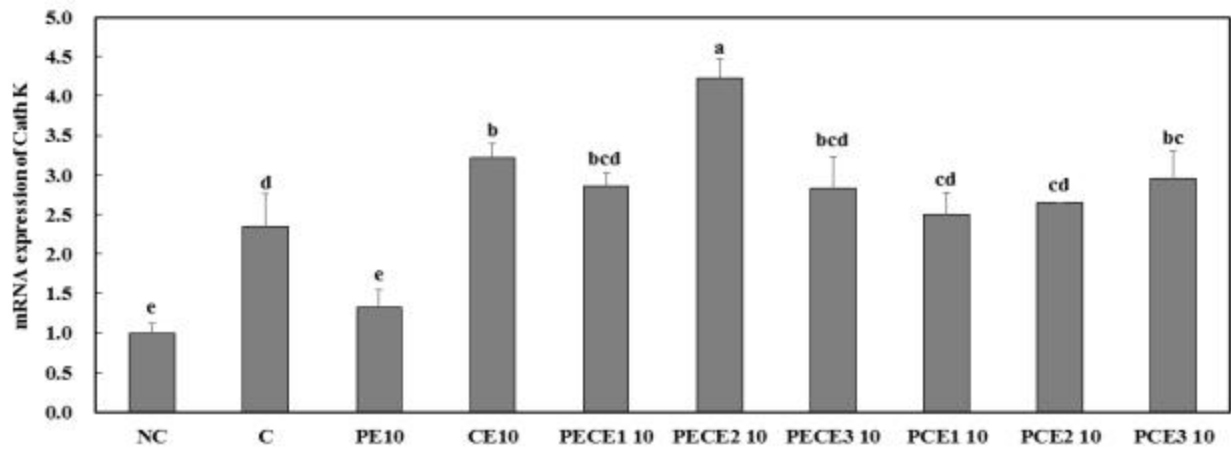
Fig.16. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of MMP-9 expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (B) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

Cathepsin K 유전자 발현량을 측정된 결과(Fig.17), RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 2.6배 높게 발현되었음을 확인하였고, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PECE3(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5), PCE3(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 7:5)을 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control군에 비해 각각 1.2배, 1.8배, 1.2배, 1.1배, 1.1배, 1.3배 유의적으로 증가하였고, PECE1(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=3:7), PECE2(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=5:5), PCE1(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 3:7), PCE2(갈근, 강황 복합 20% 주정추출물 ; 5:5)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 control 군에 비해 각각 0.4배, 0.2배, 0.3배, 0.6배, 0.5배, 0.3배 유의적으로 감소함을 확인하였음

(A)



(B)

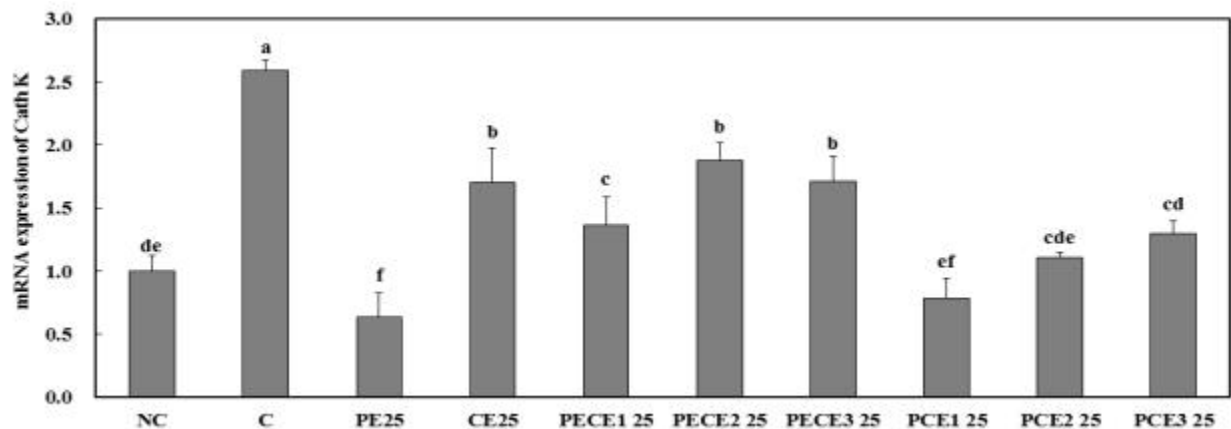


Fig.17. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of Cath K expression in RAW264.7 cells

The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. (A) 10 µg/mL, (B) 25 µg/mL

PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3

같은 물 추출물과 20% 주정 추출물의 조골세포 및 파골세포에서의 생리활성 비교를 살펴본 결과, 추출용매에 따른 차이는 크게 나타나지 않았고, 강황 물 추출물과 20% 주정 추출물

의 조골세포 및 파골세포에서의 생리활성 비교를 살펴본 결과 20% 주정 추출물이 더욱더 긍정적인 효과가 있었음을 확인하였음. 따라서 20% 주정을 이용하여 추출한 강황 및 갈근의 생리활성을 비교하고자 함. 실험에 사용된 추출 방법 중에서 갈근 및 강황 5:5 복합 20% 주정 추출물이 고농도에서 ALP, OC 유전자 발현에 있어서 유의적인 차이가 나타났고, NFATc-1, MMP9 유전자 발현에서도 유의적인 차이가 나타남을 확인하였음. 따라서 경제적이면서도 조골세포 및 파골세포에서 긍정적인 효과를 나타내는 갈근 및 강황 5:5 복합 20% 주정 추출물을 이용하여 동물실험을 통해 골다공증 생리활성 평가를 진행하고자 함

다. 갈근강황추출물 배합비 결정을 위한 세포실험

(1) 실험방법

(가) 조골세포와 파골세포의 기본배양 및 분화

SaOs-2 조골전구세포와 RAW 264.7 파골전구세포는 ATCC (walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), sodium pyruvate (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였다. 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. SaOS-2 조골전구세포의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate 처리에 의해 유도함. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL 처리에 의해 유도함

(나) Real-time polymerase chain reaction에 의한 조골세포에서 파골세포 분화 관련 인자 발현 측정

추출물을 처리하였을 때 조골세포 및 파골세포 분화 관련 인자 발현을 알아보기 위해 real time PCR을 실시하였다. 5X10³개의 SaOs-2 세포를 6 well plate에 분주하고 50 µg/mL ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 첨가하여 조골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48 시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하였고, 1X10⁵개의 RAW264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 10 ng/mL RANKL과 10 ng/mL M-CSF를 첨가하여 파골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였음. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 3에 나타내었음. Real time PCR 반응은 총

20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채워주었음. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였음. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었음. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였음. 결과의 분석은 BioRad에서 제공하는 CFX Maestro™ Analysis Software로 분석하였음

Table 3. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'
	R 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
ALP	F 5'-CCGCTTTAACCAGTGCAACA-3'
	R 5'-CCCGATTCATCACGGAGATG-3'
Osteocalcin	F 5'-CAGGAGGGCAGCGAGGTA-3'
	R 5'-GCTCCCAGCCATTGATACA-3'
Cathepsin K	F 5'-GATAATGTGAACCATGCAGTGTTG-3'
	R 5'-CCAGTGCTTGCTTCCCTTCT-3'
c-fos	F 5'-GAGACCCCCTAAGATCCCAA-3'
	R 5'-AACCCCCGTCTTGGCATA-3'
MMP9	F 5'-ACGCCACGCATTTTCAAAA-3'
	R 5'-GGCCCATTCCTCCACAT-3'

(다) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean±SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였음

(2) 실험결과

(가) Osteoblast 관련 유전자 발현량 측정

SaOS-2 세포에 갈근, 강황 20%주정추출물을 각 비율대로 혼합한 후 10, 25 μ g/mL을 처리한 후 ALP mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.18에 나타내었음. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 1.7배 유의적으로 높아졌음을 확인하였다. NC군에 비해 PE10에서 1.6배 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. CE10, PECE1 10, PECE2 10, PECE3 10은 NC 군에 비해 각각 1.1배, 1.3배, 1.3배, 1.3배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 그리고 PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25에서 ALP 유전자 발현은 군에 비해 각각 1.2배, 1.1배, 1.3배, 1.0배, 1.2배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음

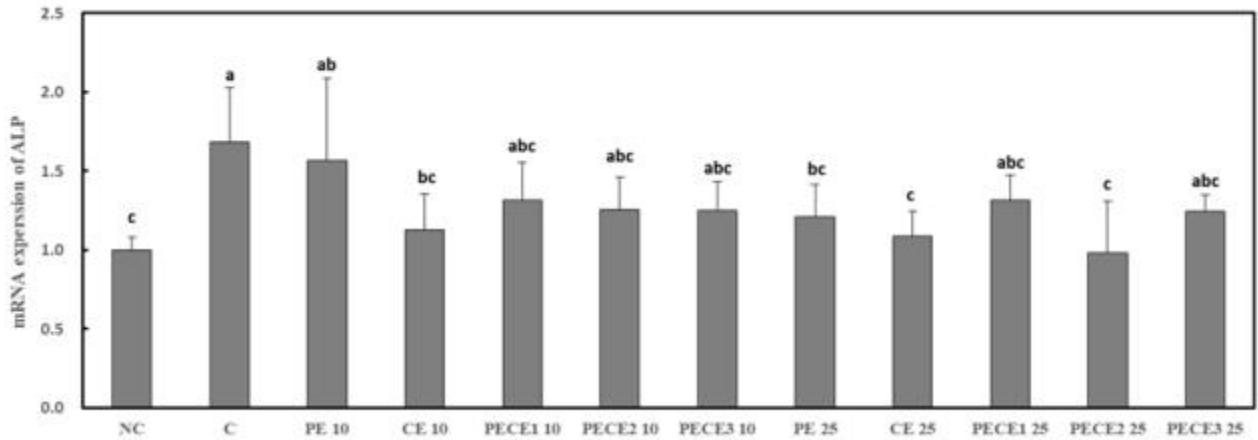


Fig.18. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of ALP expression in SaOs-2 cells

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : normal control, C : Control (Ascorbic acid+β-glycerophosphate) PE :Ascorbic acid+β-glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : Ascorbic acid+β-glycerophosphate+*Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : Ascorbic acid+β-glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : Ascorbic acid+β-glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: Ascorbic acid+β-glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

Osteocalcin(OC)은 calcium과 결합하는 vitamin K 의존성 α-carboxy glutamic acid 단백질이고, 뼈의 대표적인 무기질인 수산화인회석과도 결합하며 뼈와 dentin에 매우 특이한 단백질임

SaOS-2 세포에 갈근, 강황 20%주정추출물을 각 비율대로 혼합하여 10, 25 μg/mL을 처리한 후 OC mRNA 발현을 측정된 결과를 Fig.19에 나타내었음. Ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 2.3배 증가하였음을 확인하였음. PE10, CE10, PECE1 10, PECE2 10, PECE3 10군은 NC군에 비해 각각 1.2배, 2.4배, 4.2배, 1.9배, 5.3배 증가하였고, 특히, CE10, PECE1 10, PECE3 10은 NC군과 유의적인 차이가 나타남. 또한 PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25군은 NC군에 비해 OC 유전자 발현이 각각 2.7배, 1.2배, 1.3배, 0.8배, 1.4배 증가하였고, PE25군에서는 NC군에 비해 유의적인 차이가 나타남

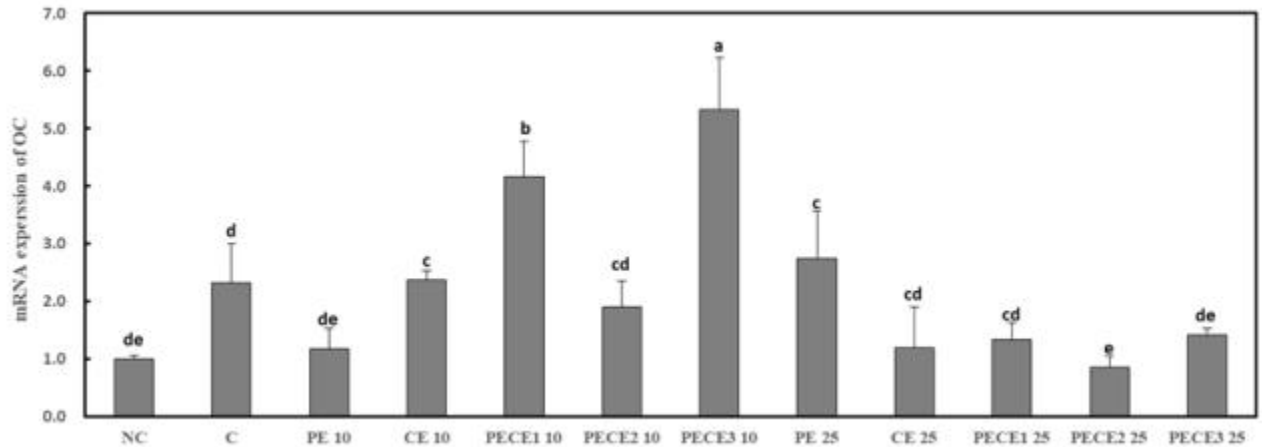


Fig.19. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of osteocalcin expression in SaOs-2 cells

NC : normal control, C : Control (Ascorbic acid+ β -glycerophosphate) PE :Ascorbic acid+ β -glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : Ascorbic acid+ β -glycerophosphate+*Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : Ascorbic acid+ β -glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : Ascorbic acid+ β -glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: Ascorbic acid+ β -glycerophosphate+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

(나) Osteoclast 관련 유전자 발현량 측정

Cathepsin K와 c-Fos는 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 같근, 강황 20%주정추출물을 각 비율대로 혼합하여 10, 25 μ g/mL을 처리한 후 cathepsin K와 c-Fos mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.20, Fig.21에 나타내었음

Cathepsin K 유전자 발현을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.8배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 Cathepsin K의 발현이 각각 0.9배, 1.7배, 3.0배, 1.0배 차이가 나타났고, PE10군에서만 감소하였고, 다른 군에서는 증가하거나 차이가 없었음. 또한 PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 Cathepsin K 발현이 1.4배, 0.5배, 0.7배, 0.7배, 0.6배 차이가 나타났고, PE25군에서만 증가하였고, 다른 군에서는 감소하였음

c-fos 유전자 발현을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 2.0배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE1 10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 c-fos의 발현이 각각 0.9배, 1.1배, 0.5배, 2.2배, 0.7배 차이가 나타났고, PECE1 10군과 PECE3 10군

에서 유의적으로 감소하였고 다른 군에서는 차이가 없거나 증가하였음. PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 c-fos 발현이 1.7배, 0.2배, 0.5배, 0.4배, 0.5배 차이가 나타났고, PE25군에서만 증가하였고, 다른 군에서는 감소하였음

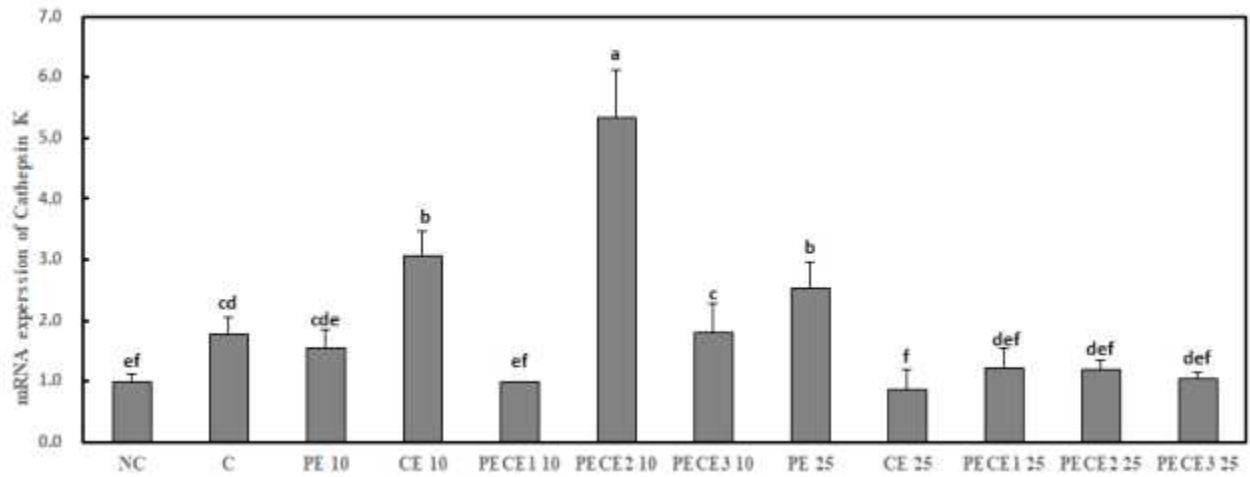


Fig.20. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of cathepsin K expression in SaOs-2 cells

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : normal control, C : Control (RANKL+M-CSF) PE :RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : RANKL+M-CSF+*Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

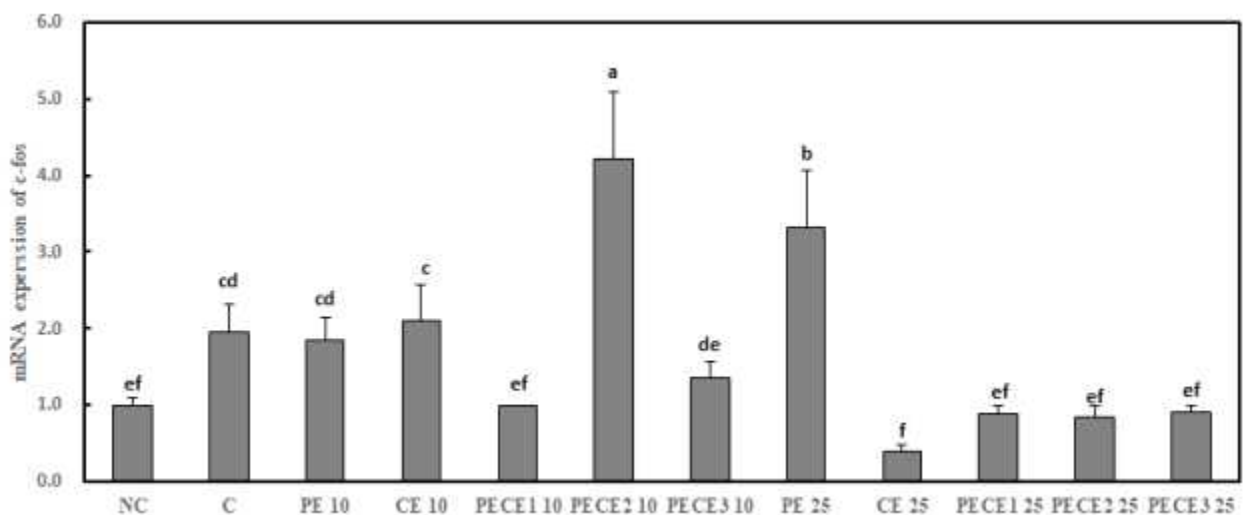


Fig.21. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA

of c-fos expression in SaOs-2 cells

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : normal control, C : Control (RANKL+M-CSF) PE :RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : RANKL+M-CSF+*Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

MMP-9은 Type IV의 collagenase로 파골세포에서의 과발현은 cetracellular matrix을 분해하는 것으로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 같은, 강황 20%주정추출물을 각 비율대로 혼합하여 10, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 MMP9 mRNA 발현을 측정된 결과를 Fig.22에 나타내었음. MMP- 9유전자 발현을 측정된 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 3.4 배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 c-fos 의 발현이 각각 1.0배, 0.2배, 0.4배, 0.2배 차이가 나타났고, PE10군에서만 증가하였고 다른 군에서는 감소하였음. PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 c-fos 발현이 0.6배, 0.1배, 0.2배, 0.2배, 0.2배 유의적으로 감소하였음

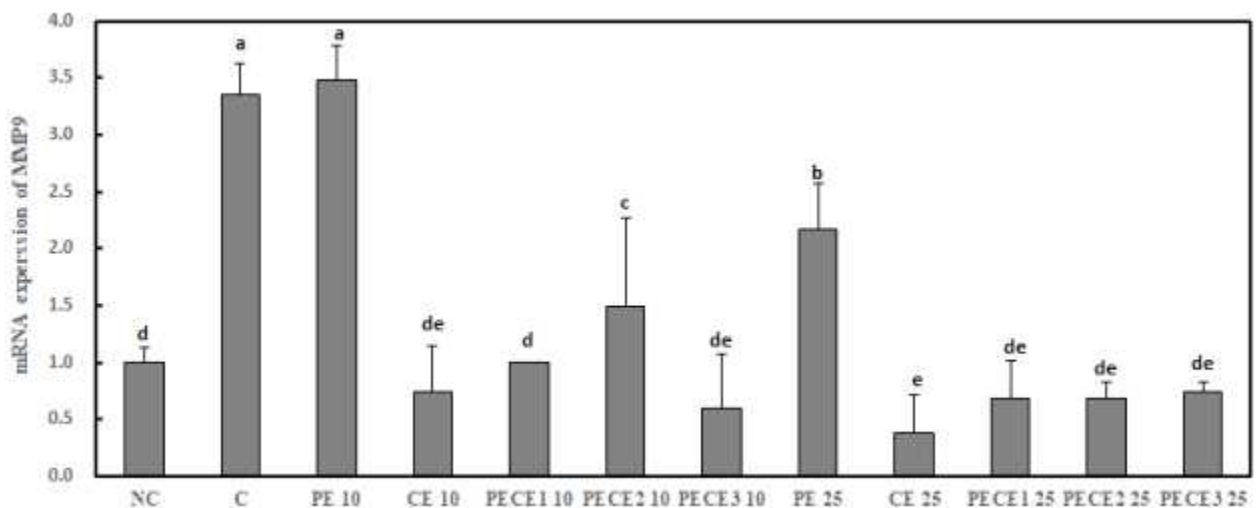


Fig.22. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi and *Curcuma longa*. L extracts on mRNA of MMP9 expression in SaOs-2 cells

Values are presented as means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

NC : normal control, C : Control (RANKL+M-CSF) PE :RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : RANKL+M-CSF+*Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: RANKL+M-CSF+*Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts 7:3

갈근 20% 주정추출물과 강황 20% 주정추출물의 혼합 비율에 따른 조골세포 및 파골세포에서의 생리활성 비교를 살펴본 결과, 갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물 =7:3 비율에서 ALP, OC 유전자의 발현이 증가함을 확인하였고, 특히 파골세포분화 관련 유전자인 catehpsin K, c-fos, MMP-9의 유전자 발현이 눈에 띄게 감소하는 것을 확인하였음. 따라서 갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3을 이용하여 동물실험을 통해 골다공증 생리활성 평가를 진행하였음

5. 갈근강황추출물의 여성갱년기 증상 완화 동물 연구

가. 식이농도 설정평가(독성평가)

(1) 실험동물 관리 및 실험 진행 방법

본 실험에서는 5주령 수컷 ICR 마우스(n=5), 암컷 ICR 마우스(n=5)를 (주)새론바이오에서 구입하였다. 이용된 ICR 마우스는 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 기초 자료가 있어 선택하게 되었음. 실험기간 동안 AIN-93G 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 명암은 12시간 (light/dark cycle), 온도는 23±2℃, 상대습도는 50±5%인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용함. 동물실의 환경에서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않아 단회투여 독성검사와 반복투여 독성검사를 실시함

(2) 단회 및 반복 투여 독성 시험

PECE(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3) 1 g/kg b.w.용량으로 하여 약 18시간 절식 시킨 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 1회 강제투여함. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상 관찰을 실시하였으며 체중은 도입 시, 투여후 7일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하였음. 투여 후 7일째 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시한 후 이상이 없는 것으로 보여 PECE(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물 =7:3) 1 g/kg b.w.용량으로 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위내에 14일 동안 동일한 시간에 반복적으로 강제투여를 하였음. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상관찰을 실시하였으며 체중은 투여 후 14일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하였음. 투여 후 14일 짜 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시한 후, 안와동맥을 통해 채혈한 뒤 부검을 하여 육안으로 장기를 검사하였음. 혈액은 원심분리 하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -

70°C에 보관하였음. 분리한 혈청으로 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), glucose, creatine, urea를 enzyme assay kit(Biovision Inc. Mountain view, CA, USA)로 분석하였음

(3) 실험결과

PECE(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3)의 안전성 평가를 위해 1 g/kg b.w.의 농도로 14일 동안 반복적으로 경구투여하여 사망률 및 일반 증상 관찰 결과는 Table 4에 나타내었음. 실험기간 중 PECE 투여에 의한 사망동물과 이상소견은 관찰되지 않았으며 암수 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었음

Table 4. Mortality and Clinical signs (n=5/group)

Sample	Sex	Mortality	clinical signs
PECE 1g/kg b.w.	Male	0%(0/5)	Normal
	Female	0%(0/5)	Normal

혈액 분석 결과는 Table 5에 나타내었으며 생존동물의 부검 소견결과는 Fig.23에 나타내었으며 PECE를 투여한 암수 모두 이상소견은 관찰되지 않았음. 따라서 반복투여 시 독성 반응은 나타나지 않았음



Fig. 23. Repeate toxicity of *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts in ICR mice

Table5. Repeate toxicity of *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L

extracts on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice (n=5/group)

PECE 1 g/kg b.w.	Female	Male
AST (mU/mL)	0.008±0.001	0.008±0.001
ALT (mU/mL)	0.001±0.000	0.001±0.000
Glucose (μM/μL)	0.316±0.039	0.296±0.110
Creatine (μM/μL)	2.221±0.213	2.247±0.299
Urea (μM/μL)	1.386±0.039	1.146±0.015

나. *In vivo*를 통한 여성갱년기 개선 억제 생리 활성평가

<식약처 가이드라인 biomarker - 골 건강>

구분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		시험관	동물	인체
에스트로겐 수용체 활성	에스트로겐 수용체-α, β 활성화 및 단백질 발현(Estrogen receptor-α, β activation/ protein expression)	0	0	
	ESR1, pS2 mRNA expression	0		
	AKT, Extracellular signal-regulated kinase(ERK) 단백질 발현		0	
	Ligand-binding	0		
골대사	골흡수(Dexypyridinoline, pyridinoline, type 1 collagen cross-linked tetrapeptide (NTX, CTX 등)		0	0
	골형성(Osteocalcin, alkaline phosphatase 등)	0	0	0

(1) 실험방법

(가) 실험동물 관리 및 실험 진행 방법

실험동물은 암컷 8주령의 Sprague Dawley을 받아 동일한 수술 stress를 유도한 Sham군을 제외한 모든 군은 난소절제술을 시행하고, 일주일 회복기간을 주고 실험 수행하였음. 마취제를 이용하여 마취 한 후 난소 수술부위를 제모하고 소독하여 1 cm가량 절개하고 다른 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의하여 자궁을 따라 난소를 확인하여 봉합용 실로 난소를 결찰한 뒤 양측의 난소를 모두 절제한 후 봉합하였다. 수술은 CRO기관인 (주)노터스에서 진행하였음

실험동물은 1주일간 안정화를 거친 후 암컷 9주령의 Sham(수술 Stress유도),

Ovariectomy(난소절제) rat을 (주세론바이오에서 공급 받아 동물 사육실에서 일정한 조건(온도:23±2°C, 상대습도:50±5%, 명암:12시간 light/dark cycle)으로 1주일 동안 주위 환경에 적응 시킨 후 사용하였음. 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 rat을 이용하여 군을 분리하였음. 난소비절제대조군(Sham Control; Sham), 난소절제대조군(Ovaiectomy control; OVX), 양성대조군1(Positive control; OVX+PC1, Estradiol 1 mg/kg b.w. 다림바이오텍), 양성대조군2(Positive control; OVX+PC2, 석류추출건강기능식품 200 mg/kg b.w.) Dextrin(OVX+DEX), PECE 50 mg/kg b.w.(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3; OVX+Low), PECE 200 mg/kg b.w.(갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3; OVX+High)으로 분리하여 PC1은 경구로 투여하고 나머지 군들은 식이로 투여하였음. 모든 식이는 AIN93M를 기본으로 제작하였으며 식이와 음수는 8주간 자유로 공급 하고 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매주 일정한 시간에 측정하였으며, 동물실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 관리지침에 따라 수행하였음(KHUASP(GC)-18- 035). 체중 및 식이섭취량 측정은 실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량은 주 2회씩 일정 시간 전에 실험기간 동안 측정하였고 실험개시일의 체중을 최종 체중을 감하여 체중 변화량을 산출하였음. 식이섭취량은 주 2회씩 측정하였고 측정된 식이는 새로운 식이로 교체하여 실험을 진행하였음. 사육이 끝난 실험동물은 12시간 절식 후 Isoflurane으로 흡입 마취한 상태에서 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액 채취하였으며 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 혈액분석 전까지 -80°C에서 보관하였고, 채혈을 마친 동물에서 간조직, 신장조직, 비장조직, 자궁조직을 적출하여 무게를 측정하였음

(나) 혈중 지질 측정(TC, TG, LDL, HDL)

실험동물을 희생시켜 혈액을 채취한 후 원심분리 한 Serum을 이용하여 Enzyme assay kit (Biovision Inc, Mountainview, CA, USA) 를 사용하여 TC, TG, HDL, LDL의 농도 측정하였음

(다) 혈중 Estrogen, Osteocalcin, ALP, M-CSF, RANKL, OPG 농도 측정

실험동물을 희생시켜 혈액을 채취한 후 원심분리 한 Serum을 이용하여 Enzyme assay kit (Mybiosource, San Diego, CA, USA) 를 사용하여 Estrogen, Osteocalcin(OS), Alkaline phosphatase(ALP), Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF), Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand(RANKL), Osteoprotegrin(OPG)의 농도를 측정하였음

(라) Micro-CT 측정

Fumur Distal epiphysis 부근의 Growth plate로부터 Proximal epiphysis 방향으로 1.5 mm 떨어진 지점의 2 mm를 ROI(관심영역) 범위로 설정하여 분석을 실시하였음. Scano Medical AG (Viva CT 80, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며 Voxel size는 18 µm, Energy는 70 kvp, Intensity는 114 µA로 FOV/Diameter는 31.9 mm, Intergration time은

200 ms 조건으로 측정하였음. 분석은 BMD, Trabecular number, Bone volume/Total volume, Trabecular thickness, Trabecular separation을 하였음

(마) mRNA expression

동물의 골 조직에서 골다공증 관련 유전자 발현을 알아보기 위해 정강이뼈를 Trizol에 담가 분쇄한 후 원심분리한 상층액을 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 Protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였음. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였고 유전자들의 발현 측정을 위해 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였음. 기기는 CFX Connect™ real-time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)을 사용하였고, Real time PCR 반응은 총 20 µL 내에 cDNA 2 µL와 2X SYBR mix 10 µL, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/µL를 1 µL씩 첨가하고 나머지는 증류수로 채웠으며 PCR 반응은 Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초로 반응시키며 cycle은 40 cycle을 반복하였음. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 Melting curve 분석을 실시하였고, 결과는 Bio-rad에서 제공하는 CFX Manager™ software(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA), 로 분석하였다. 측정된 primer는 Table 6에 나타내었음

Table 6. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC -3'
	R 5'-CAGCAACTGAGGGCCTCTCT -3'
OC	F 5'-GCTGGCCCTGACTGCATT -3'
	R 5'-TCAGAGTCGCTGGGCTTTG -3'
RANKL	F 5'-CATCCCATCTGGTTCCCATAA-3'
	R 5'-GCCCAACCCCGATCATG-3'
Cathepsin K	F 5'-GAAGACCCACGGGAAGCA-3'
	R 5'-CCAAATTAAACGCCGAGAGATT-3'
MMP-9	F 5'-TCGAAGGCGACCTCAAGTG-3'
	R 5'-TTCGGTGTAGCTTTGGATCCA-3'

(바) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean±SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

(2) 실험결과

(가) 실험동물의 체중변화와 식이효율에 미치는 영향

PECE의 섭취가 실험동물의 체중 변화와 식이효율에 미치는 영향은 Table 7에 나타내었음
 체중 증가량을 확인한 결과, Sham 군에 비해 OVX 군에서 약 84 g 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, 이는 Estrogen의 감소로 인해 지방 대사의 조절이 어려워지게 됨에 따라 지방의 축적으로 체중이 증가한 것으로 사료됨. Estradiol을 섭취한 PC1군은 OVX 군에 비해 유의적으로 감소하였고, 이는 Sham 군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음. 그러나 석류추출건강기능식품을 섭취한 PC2, PECE 섭취군은 OVX 군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 식이효율을 확인한 결과, Sham군과 OVX 군에서 유의적인 차이가 나타남을 확인하였고, PC1군은 OVX와 유의적인 차이가 나타났으나 Sham 군과는 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음. 또한 PC2, PECE 섭취군은 Sham군과 유의적인 차이가 나타났음을 확인하였음. 이러한 결과는 식이 섭취량은 비슷하나, Estrogen의 감소로 인해 지방축적을 위한 체중 증가에 따른 결과로 보여짐

Table 7. Weight gain, and FER of experimental animals for 8 weeks

(n=8)

Group ¹⁾	Weight gain ²⁾ (g)	FER (Food efficiency rate) ³⁾
Sham	71.43±11.14 ^b	11.69±1.60 ^b
OVX	156.11±22.11 ^a	18.61±1.30 ^a
OVX+PC1	57.00±15.67 ^b	9.82±2.63 ^b
OVX+PC2	133.57±15.9 ^a	17.46±1.73 ^a
OVX+Dex	152.78±14.34 ^a	18.04±1.10 ^a
OVX+Low	157.72±8.31 ^a	18.44±1.13 ^a
OVX+High	156.65±48.31 ^a	20.15±5.62 ^a

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

²⁾Weight gain (g/12weeks) = final body weight (g) - initial body weight (g)

³⁾FER (Food efficiency rate) = {weight (g) / food intake (g)} * 100

(나) 실험동물의 자궁 무게 변화 측정 결과

자궁의 무게변화는 여성갱년기 개별인정형 인정 과정에서 시료의 독성 여부를 판단하는

중요한 지표로 설정되어 있음. PECE의 섭취에 따른 장기무게에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 8에 나타내었으며 모습은 Fig.24와 같음

Sham군에 비해 OVX군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 자궁 무게가 유의적으로 증가함을 확인하였음. PECE 섭취군은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였고, 이는 시료가 자궁에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미하는 바임

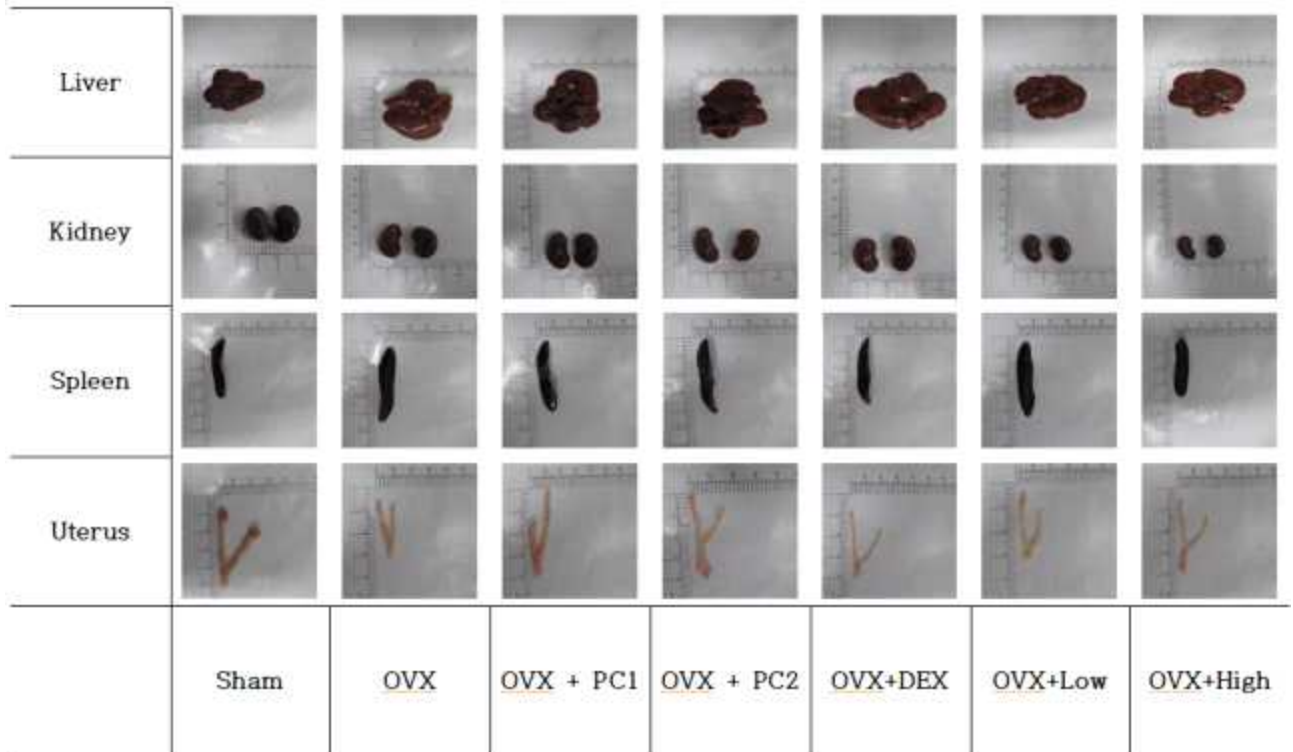


Fig. 24. Picture of rat organs to represent the size and shapes

Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

Table 8. Weight of organs extracted from experimental animals

Group	Liver (g/100g b.w.)	Kidney (g/100g b.w.)	Spleen (g/100g b.w.)	Uterus (g/100g b.w.)
Sham	2.44±0.32 ^a	0.60±0.04 ^a	0.22±0.02 ^{ns}	0.34±0.15 ^a
OVX	2.05±0.24 ^b	0.46±0.04 ^{cd}	0.22±.03	0.04±0.00 ^c
OVX+PC1	2.38±0.22 ^a	0.54±0.02 ^b	0.22±0.02	0.14±0.04 ^b
OVX+PC2	2.07±0.16 ^b	0.48±0.05 ^c	0.24±0.03	0.04±0.01 ^c
OVX+Dex	2.02±0.13 ^b	0.44±0.04 ^{cd}	0.23±0.04	0.04±0.01 ^c
OVX+Low	1.08±0.10 ^b	0.42±0.04 ^d	0.20±0.02	0.03±0.00 ^c
OVX+High	2.02±0.99 ^b	0.45±0.01 ^{cd}	0.22±0.04	0.03±0.01 ^c

Values are presented as means ± SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa* L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa* L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(다) 혈액 Lipid profiles에 미치는 영향

난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 지질 변화는 Fig.25에 나타내었음. 혈중 Total cholestrol(TC) 농도를 측정된 결과, 난소절제군인 OVX군의 TC가 Sham군에 비해 125.69% 유의적으로 증가하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+Low군, OVX+High군의 TC가 OVX군에 비해 49.24%, 29.63%, 5.38%, 18.16%, 34.27% 감소함을 확인하였고, 이러한 감소는 OVX+Dex군을 제외한 나머지 군에서 OVX군과 유의적인 차이가 있었음을 확인하였음. 혈중 Triglyceride(TG) 농도를 측정된 결과, Sham 군에 비해 OVX군에서 356.46% 유의적으로 증가한 것을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+Low군, OVX+High군의 TG 농도는 OVX군에 비해 각각 80.76% 79.75%, 7.86%, 73.06% 73.06% 감소하였음. TG 농도 역시 TC 농도와 동일하게 OVX+Dex 군을 제외한 나머지 군에서 OVX군과 유의적인 차이가 있었음을 확인하였음. 혈중 HDL 콜레스테롤 농도 (HDL-Chol)을 측정된 결과, OVX+PC1군에서 가장 높게 나타났고, OVX+PC2군에서 가장 낮은 농도를 보였으며, 나머지 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 혈중 LDL 콜레스테롤 농도(LDL-chol)을 측정된 결과, OVX군에 비해 OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+High군에서 각각 22.00%, 19.22%, 19.01% 유의적으로 감소함을 확인하였음

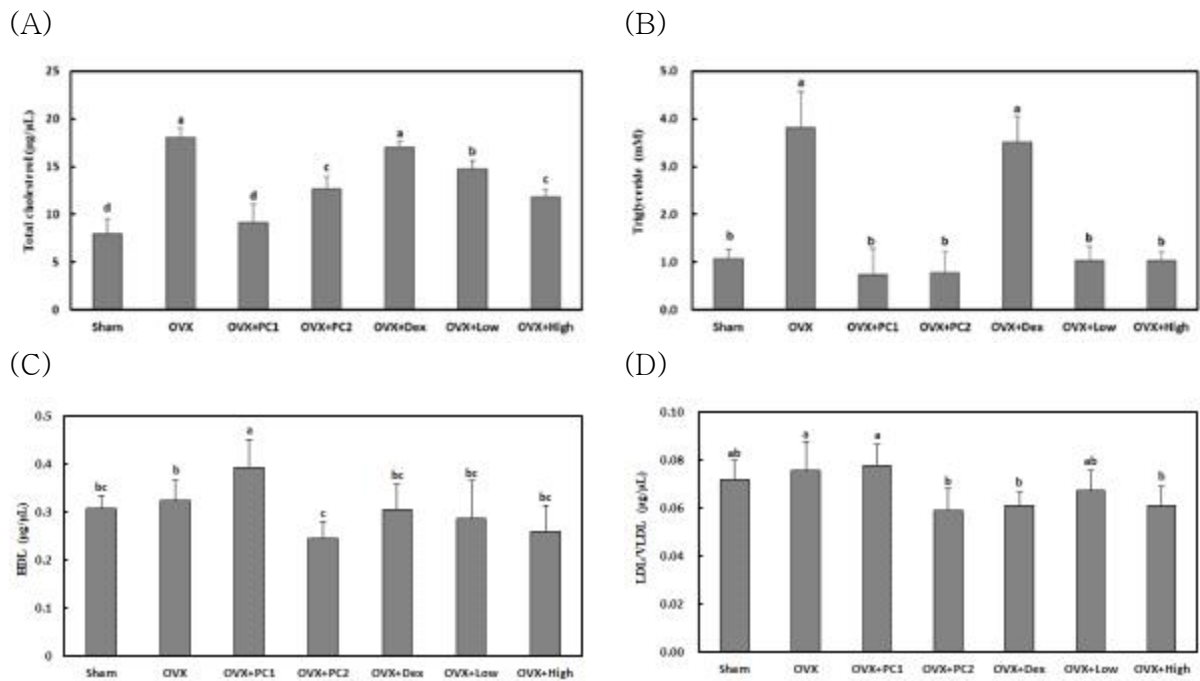


Fig.25. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on serum levels of TC, TG, HDL-Chol, and LDL/VLDL-Chol in OVX induced rats

(A) total cholesterol, (B) triglyceride, (C) HDL-Chol, (D) LDL/VLDL-Chol.

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(라) 혈청 Estrogen 농도에 미치는 영향

난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 Estrogen 변화는 Fig.26에 나타내었음. 난소절제 군인 OVX군의 혈중 Estrogen농도는 Sham군에 비해 18.82% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군의 Estrogen농도는 OVX군에 비해 127.16%, 114.11% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. PECE 섭취군인 OVX+Low군과 OVX+High군은 OVX군에 비해 각각 102.71%, 103.60% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음

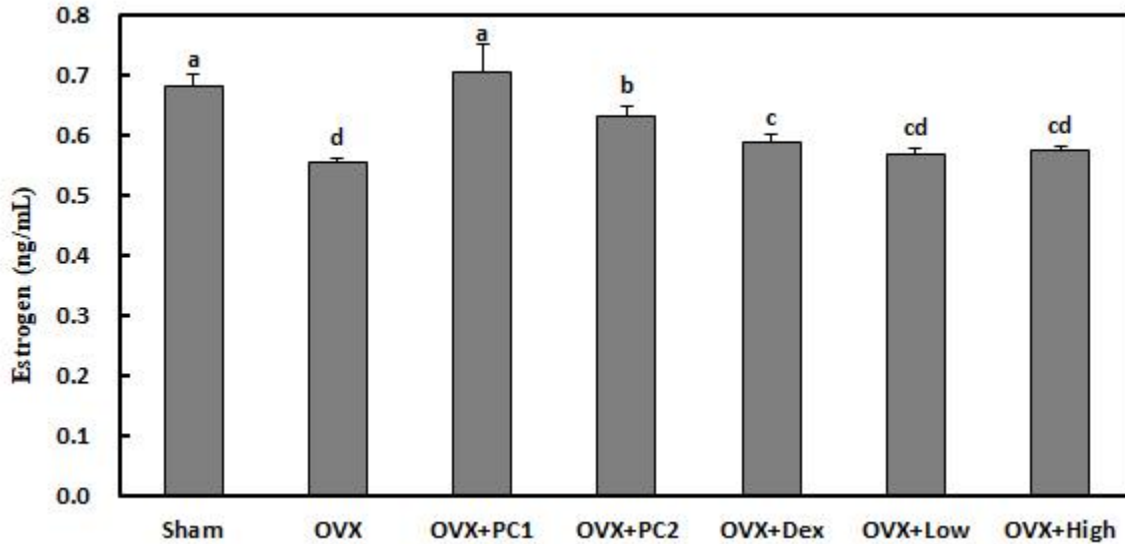


Fig.26. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on serum levels of estradiol in OVX induced rats

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(마) 혈청 ALP, OC, OPG, RANKL, M-CSF에 미치는 영향

난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 ALP, Osteocalcin, OPG, RANKL, M-CSF 변화는 Fig.27에 나타내었음

혈중 Alkaline phosphatase(ALP) 농도를 측정된 결과, 난소절제군인 OVX군의 혈중 ALP는 Sham군에 비해 35.35% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군의 ALP농도는 OVX군에 비해 각각 104.77%, 77.90% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. PECE 투여군인 OVX+Low군과 OVX+High군의 ALP 농도는 OVX군에 비해 각각 29.68%, 48.36% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음

혈중 Osteocalcin(OC) 농도를 측정된 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 41.74% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군,

OVX+High군의 혈중 OC 농도는 OVX군에 비해 각각 70.98%, 29.63%, 38.09%, 48.74% 유의적으로 증가하였고, PECE 섭취 농도별 유의성은 나타나지 않았음

혈중 Osteoprotegrin(OPG) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 26.33% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 OPG 농도는 OVX군에 비해 각각 28.05%, 40.53%, 33.80%, 33.74% 유의적으로 증가하였고 그 수준은 Sham군과 유사하였음

혈중 Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand(RANKL) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 138.67% 유의적으로 증가함을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 RANKL 농도는 OVX군에 비해 각각 59.28%, 51.31%, 45.42%, 62.13% 유의적으로 증가하였고 그 수준은 Sham군과 유사하였음

혈중 Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 103.52% 유의적으로 증가함을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 RANKL 농도는 OVX군에 비해 각각 32.05%, 31.58%, 27.91%, 50.09% 유의적으로 증가하였음

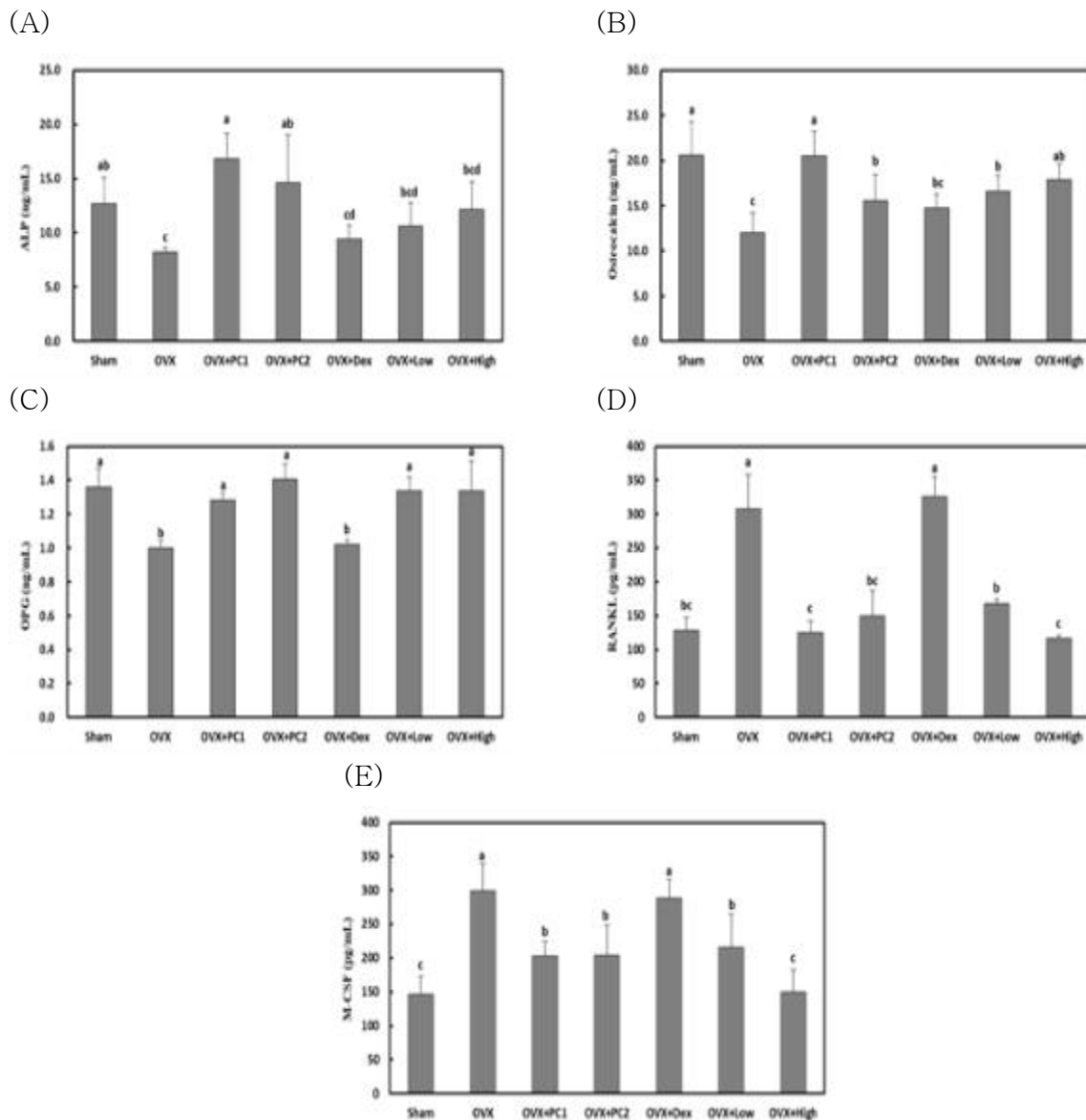


Fig.27. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on serum levels of ALP, Osteocalcin, OPG, RANKL, M-CSF in OVX induced rats

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(바) 골밀도에 미치는 영향

난소절제 및 PECE 섭취에 따른 Femur의 골 중단면과 횡단면 촬영사진과 골밀도 변화는 Fig.28에 나타내었다. Sham군은 난소절제를 하지 않음으로써 해면골의 밀도가 높아 보이고, 난소절제군인 OVX군은 해면골의 밀도가 낮고 빈공간이 많은 것이 육안으로 확인되었으며, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2, PECE을 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 난소절제로 인해 감소하였던 해면골의 밀도가 증가한 것을 육안으로 확인하였음. 골밀도(BMD)의 분석 결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 78.58% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BMD는 OVX군에 비해 145.91% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군과 PECE 저농도 섭취군인 OVX+Low군의 BMD는 OVX군에 비해 각각 34.87%, 51.33% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았고, PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군의 BMD는 OVX군에 비해 67.46% 유의적으로 증가함을 확인하였음

골부피(Bone volume; BV)와 총부피(Total volume; TV)의 비율 측정결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 79.42% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BV/TV는 OVX군에 비해 130.62% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군의 BV/TV는 OVX군에 비해 72.21% 유의적으로 증가함을 확인하였음

Trabecular thickness(Tb.T) 측정된 결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 34.15% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BMD는 OVX군에 비해 21.45% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군과 PECE 섭취군인 OVX+Low군, OVX+High군의 Tb.T는 OVX군에 비해 각각 2.53%, 7.99%, 10.32% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음

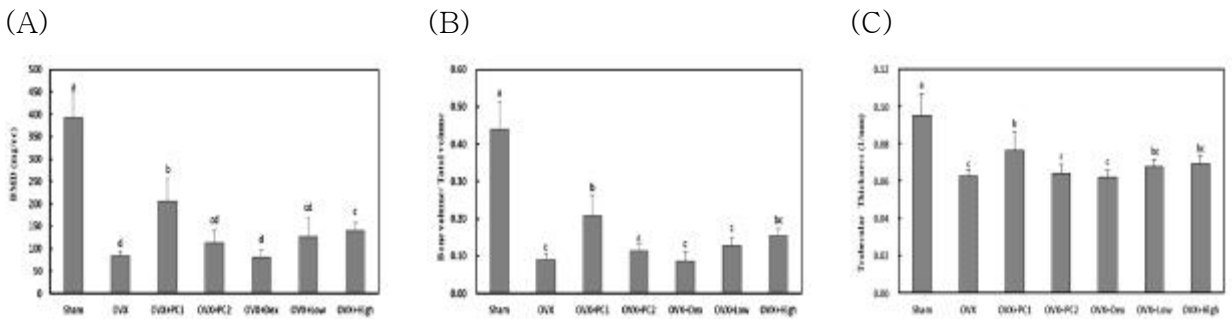
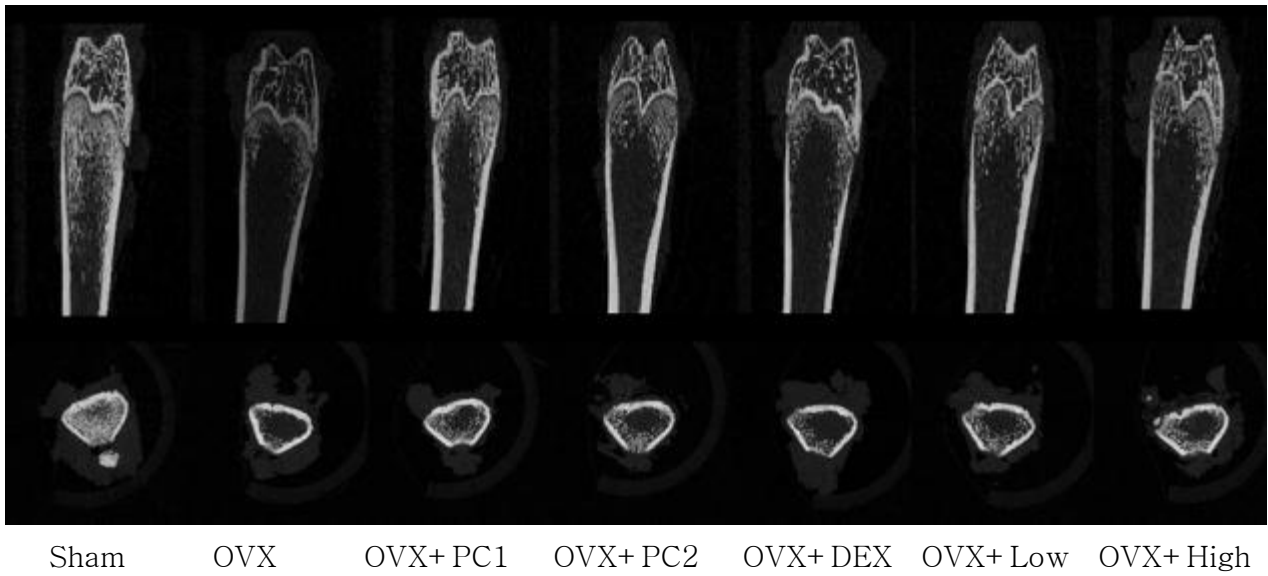


Fig.28. Micro-CT analysis of the tibia of OVX induced rats with (2D image) and effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on values of architectural and mineralization parameters in femur bone in OVX induced rats (A) BMD, (B) BV/TV, (C) Tb.T.

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(사) 골다공증 관련 유전자 발현에 미치는 영향

난소절제 및 PECE 섭취에 따른 골다공증 관련 유전자 발현 변화는 Fig.29에 나타내었음.

OC 유전자 발현 변화를 측정된 결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 48.1% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 OC 유전자 발현량은 OVX군에 비해 557.83% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음. PECE 섭취군인 OVX+Low군과 OVX+High군의 OC 유전자 발현량은 OVX군에 비해 각각 262.31%, 453.77% 유의적으로 증가하였고, 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였음

RANKL 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제군인 OVX에서 Sham군에 비해 92.55% 유의적으로 증가하는 것을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 27.35% 유의적으로 감소하였음. 그러나 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex군은 OVX군에 비해 RANKL 유전자 발현량이 유의적인 차이가 없었음. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군은 OVX군에 비해 RANKL 유전자 발현량이 각각 21.52% 35.53% 유의적으로 감소하였으나 농도에 따른 변화는 없었음

Cathepsin K 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제군인 OVX군에서 Sham군에 비해 85.87% 유의적으로 증가하였고, estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군은 OVX군에 비해 각각 45.49%, 21.92% 유의적으로 감소한 것을 확인하였음. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군의 cathepsin K 유전자 발현은 OVX군에 비해 각각 19.15%, 32.85% 유의적으로 감소하였으나 농도간의 차이는 없었음

MMP-9 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제군인 OVX군에서 Sham군에 비해 128.44% 유의적으로 증가하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 31.25% 유의적으로 감소한 것을 확인하였음. 석류추출건강기능식품을 섭취한 OVX+PC2군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex군의 MMP-9 유전자 발현은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음. 또한 PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군의 MMP-9 유전자 발현은 OVX군에 비해 각각 17.03%, 27.83% 농도 의존적으로 감소함을 확인하였음

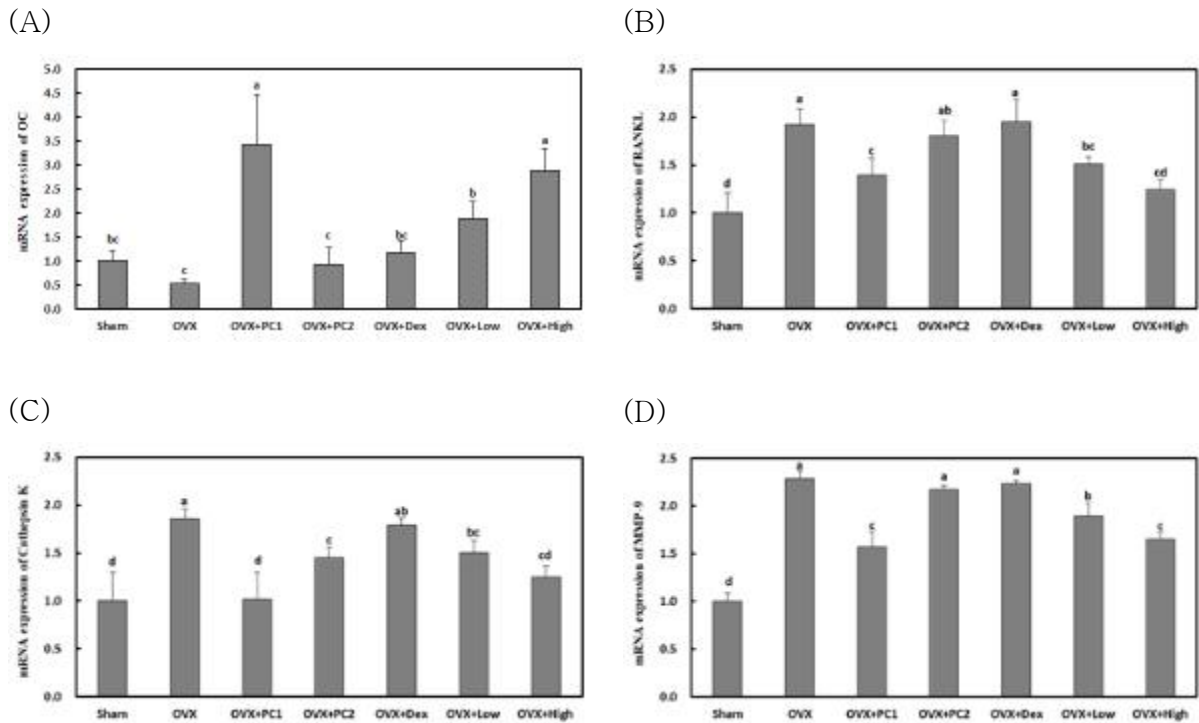


Fig. 29. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on OC, RANKL, Cathepsin K and MMP-9 mRNA expression in OVX induced rats. (A) OC, (B) RANKL, (C) Cathepsin K, (D) MMP-9

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

1) Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

다. 결론

골의 미세구조 이상과 골량의 감소를 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환인 골다공증은 여성에서 발병률이 높는데 이는 골 손실이 빨리 시작되고 최대 골 질량이 낮기 때문인 것으로 알려져 있다. 특히 폐경기 여성의 골다공증은 에스트로겐의 감소와 칼슘 섭취의 부족이 원인으로 알려져 있음

난소절제동물을 이용한 여성갱년기 모델에서 갈근강황추출물(PECE)를 섭취에 따른 변화를 알아본 결과,

- 1) 난소절제 동물인 OVX군과 PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 차이가 없었고, 가장 중요한 자궁 무게 변화 역시 차이가 없었음을 확인하였음
- 2) 혈중 Lipd profiles을 측정한 결과, TC, TG 농도가 난소절제 동물인 OVX군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex에서 가장 높게 나타났고, PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 OVX군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였음
- 3) 혈중 Estrogen은 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 낮았으며, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군에서 혈중 estrogen 농도가 가장 높게 나타났음. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않아 호르몬에 영향을 주지 않았음을 확인하였음
- 4) 혈중 ALP 농도는 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 혈중 OC 농도 역시 OVX군에서 가장 낮게 나타났음. PECE 고농도 섭취군(OVX+High)의 혈중 OC 농도는 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였음
- 5) 혈중 OPG 농도는 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였음
- 6) 혈중 RANKL, M-CSF 농도는 OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 농도의존적으로 감소함을 확인하였음
- 7) Femur distal epiphysis부근의 종단면 및 횡단면을 촬영하고 골밀도(BMD)을 측정한 결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군에서 OVX군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였음
- 8) 골부피(Bone volume; BV)와 총부피(Total volume; TV)의 비율과 Trabecular thickness(Tb.T)을 측정결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 OVX군에 비해 증가하는 경향은 나타났으나 유의적인 차이는 없었음
- 9) OC 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 농도의존적으로 증가하였음을 확인하였음
- 10) RANKL, Cathepsin K 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 농도에 따른 차이는 나타나지 않았음
- 11) MMP-9 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 농도의존적으로 감소하였음을 확인하였음

이상의 결과를 토대로 실험에 사용된 PECE가 난소절제 동물 모델에서 자궁 및 호르몬에 영향을 주지 않는 범위에서 여성갱년기(골다공증)억제효과가 있음을 확인하였음. 따라서 PECE를 이용하여 여성갱년기 억제 기전 연구를 진행하고자 함

6. 갈근강황추출물 여성갱년기 증상 완화 기작 규명

가. 동물실험을 통해 얻은 조직 내 estrogen receptor, ALP 및 유전독성 확인

(1) 실험방법

(가) mRNA expression

동물실험을 통해 얻은 골 조직에서 estrogen receptor, ALP 유전자 발현을 알아보기 위해 정강이뼈를 trizol에 담가 분쇄한 후 원심분리한 상층액을 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 Protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였음. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였고 유전자들의 발현 측정을 위해 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였음. 기기는 CFX Connect™ real-time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)을 사용하였고, Real time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하고 나머지는 증류수로 채웠으며 PCR 반응은 Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초로 반응시키며 cycle은 40 cycle을 반복하였음. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 Melting curve 분석을 실시하였고, 결과는 Bio-rad에서 제공하는 CFX Manager™ software(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA), 로 분석하였다. 측정된 primer는 Table 10에 나타내었음

Table 10. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH	F 5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC -3'
	R 5'-CAGCAACTGAGGGCCTCTCT -3'
ER1	F 5'-GAAAGGCGGGATACGAAAAGA-3'
	R 5'-TCTGACGCTTGTGCTTCAACA-3'
ER2	F 5'-TCAGGAAAAGGAATATGGCATGT-3'
	R 5'-TTTTATGGCCACACAGTCCTACA-3'
ALP	F 5'-CCCTCCGGATCCTGACAAA-3'
	R 5'-CCTGCCTCCTTCCACTAGCA-3'

(나) Western blot

동물실험을 통해 얻은 자궁 조직에서 유전독성을 확인하기 위해서 western blot을 실시하였다. 자궁조직을 protease inhibitor 첨가된 lysis buffer를 넣어 조직을 균질화하여 ice에 두어 일정시간 유지 후 원심분리(12000rpm, 20분, 4°C)하여 단백질을 분리하였음. 단백질 정량은 BSA와 Bio-rad protein assay Dye Reagent Concentrate(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 Bradford법으로 정량하였다. Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 10%)을 이용하여 각 샘플당 20 μ L씩 loading하여 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이하였음. 그 후, TBST buffer에 용해시킨 5%

skim milk (TBS containing 0.5% Tween 20)로 1시간 동안 blocking을 하였고, 1차 항체 c-fos 및 c-jun (Abcam, UK)과 beta-actin (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 상온에서 3시간 반응시킨 후 membrane을 HRP가 중합된 2차 항체 (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 에 60분간 반응시켰고, enhanced chemiluminescent (ECL, Amershampharmacia Biotech, UK)를 이용해 발색한 후 Easy photo를 사용하여 촬영하였다. 촬영된 Western blot band 이미지들은 Image J software (NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 band의 밀도를 측정하였음

(다) 통계처리

동물실험을 통해 얻은 자궁 조직에서 유전독성을 확인하기 위해서 western blot을 실시하였다. 자궁조직을 protease inhibitor 첨가된 lysis buffer를 넣어 조직을 균질화하여 ice에 두어 일정시간 유지 후 원심분리(12,000rpm, 20분, 4°C)하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 BSA와 Bio-rad protein assay Dye Reagent Concentrate(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 Bradford법으로 정량하였음. Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 10%)을 이용하여 각 샘플당 20 µL씩 loading하여 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이하였다. 그후, TBST buffer에 용해시킨 5% skim milk (TBS containing 0.5% Tween 20)로 1시간 동안 blocking을 하였고, 1차 항체 c-fos 및 c-jun (Abcam, UK)과 beta-actin (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 상온에서 3시간 반응시킨 후 membrane을 HRP가 중합된 2차 항체 (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 에 60분간 반응시켰고, enhanced chemiluminescent (ECL, Amershampharmacia Biotech, UK)를 이용해 발색한 후 Easy photo를 사용하여 촬영하였다. 촬영된 Western blot band 이미지들은 Image J software (NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 band의 밀도를 측정하였음

(2) 실험결과

(가) 골 내 estrogen receptor 유전자 발현 변화에 미치는 영향

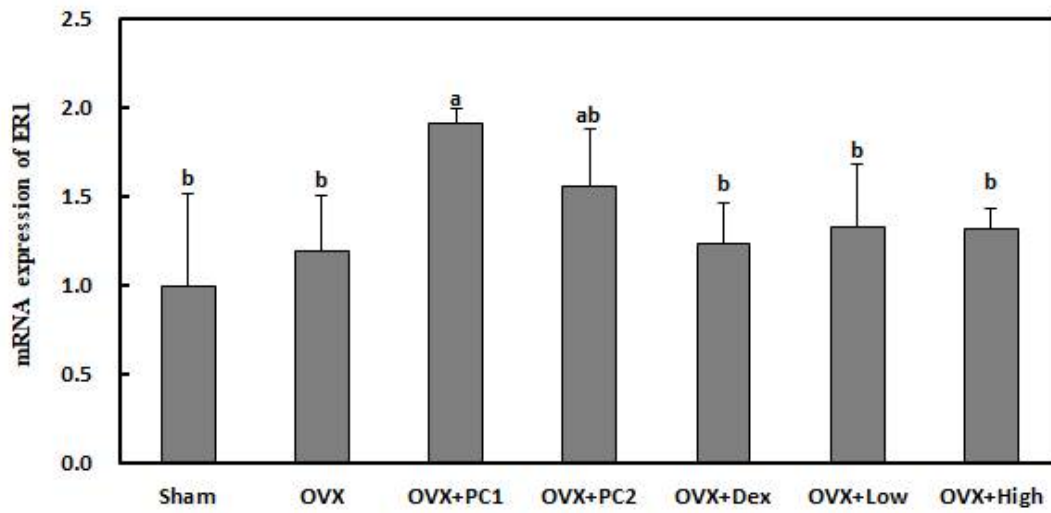
난소 절제 및 갈근강황추출물(PECE) 투여가 ER1, ER2, ALP 유전자 발현에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig.30에 나타내었음. 에스트로겐 수용체(Estrogen receptor;ER)는 핵막에 존재하고 에스트로겐과 결합한 후 핵속의 DNA에 결합하여 여러 유전자의 발현에 관여하며 조직의 성장과 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음. ER은 ER alpha로 알려진 ER1과 ER beta로 알려진 ER2가 존재하며, ER1은 자궁, 난자 등과 같은 주요 여성 생식기관에서 발현되는 반면, ER2는 전립선이나 고환과 같은 남성 생식기관과 난소에서 발현되는 것으로 알려져 있음. ER1은 혈중 에스트로겐 농도와 연관이 되어 있다고 알려져 있으며, 최근 연구결과에 따르면 연골이나 뼈에 주된 영향을 미치는 것은 ER1보다는 ER2인 것으로 보고되었음

ER1 유전자 발현을 측정한 결과, 수술 stress만 유도한 Sham군에 비해 난소 절제군인 OVX 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았고, estradiol을 투여한 OVX+PC1 군은 OVX 군에 비해 유의적으로 증가하였음. 석류추출물을 투여한 OVX+PC2 군은 OVX군에 비해 증

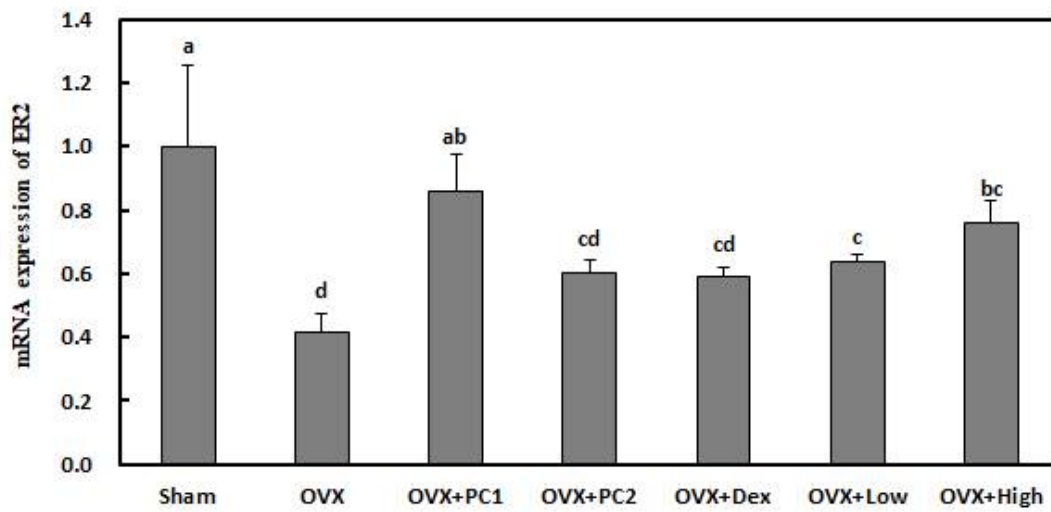
가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 그리고 dextrin, PECE 투여군인 OVX+Dex, OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음. ER2 유전자 발현을 측정된 결과, 수술 stress만 유도한 Sham군에 비해 난소 절제군인 OVX군에서 유의적으로 감소함을 확인하였고, estradiol을 투여한 OVX+PC1 군은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였고 이는 Sham군과는 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 석류추출물을 투여한 OVX+PC2 군은 OVX군에 비해 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 그리고 dextrin, PECE 투여군인 OVX+Dex, OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군에 비해 증가하였고, PECE 투여군인 OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군에 비해 유의적인 차이가 나타났음

ALP 유전자 발현을 측정된 결과, 수술 stress만 유도한 Sham군에 비해 난소 절제군인 OVX 군에서 유의적으로 감소하였고, estradiol을 투여한 OVX+PC1 군은 OVX에 비해 유의적으로 증가하였고, Sham군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 석류추출물을 투여한 OVX+PC2 군은 OVX에 비해 유의적으로 증가하였고, dextrin을 투여한 OVX+Dex군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. PECE 투여군인 OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였고, 농도 의존적으로 증가함을 확인하였음

(A)



(B)



(C)

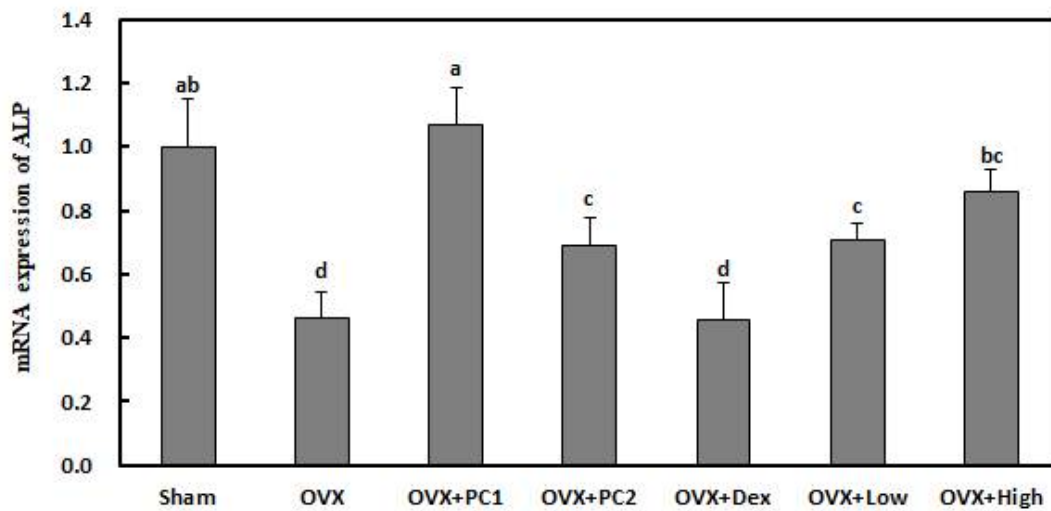


Fig.30. Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract on

ER1 and ER2 mRNA expression in OVX induced rats. (A) ER1, (B) ER2, (C) ALP

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

(나) 자궁 내 유전 독성 발현 변화에 미치는 영향

난소 절제 및 갈근강황추출물(PECE) 투여가 자궁 내 유전독성 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과는 Fig.31에 나타내었음

c-fos와 c-jun은 v-fos, v-jun 유사체로서 proto-oncogene으로 알려져 있으며 그 발현 산물은 AP-1의 주요 구성성분으로 인체 세포의 성장, 분화에 관여함. c-fos와 c-jun의 과발현은 AP-1 complex 형성하여 암의 생성과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있음. 에스트로젠은 자궁내막에서 수용체와 결합한 후 c-fos의 promoter에 결합하여 c-fos의 발현을 유도하여 세포분열이나 세포분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있음

c-fos 단백질 발현량을 측정한 결과, 수술 stress만 유도한 Sham군에 비해 난소 절제군인 OVX 군에서 유의적으로 차이가 없었고, estradiol을 투여한 OVX+PC1 군은 OVX에 비해 유의적으로 증가하였고, 석류추출물을 투여한 OVX+PC2 군, dextrin을 투여한 OVX+Dex 군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. PECE 투여군인 OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음

c-jun 단백질 발현량을 측정한 결과, stress만 유도한 Sham군에 비해 난소 절제군인 OVX 군에서 유의적으로 차이가 없었고, estradiol을 투여한 OVX+PC1 군은 OVX에 비해 유의적으로 증가하였고, 석류추출물을 투여한 OVX+PC2 군, dextrin을 투여한 OVX+Dex 군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. PECE 투여군인 OVX+Low, OVX+High 군은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음

이상의 결과를 토대로, 갈근강황추출물의 섭취가 호르몬에는 영향을 주지 않으며, 자궁의 유전독성에 영향을 주지 않고 여성갱년기 개선에 효과가 있음을 확인하였음

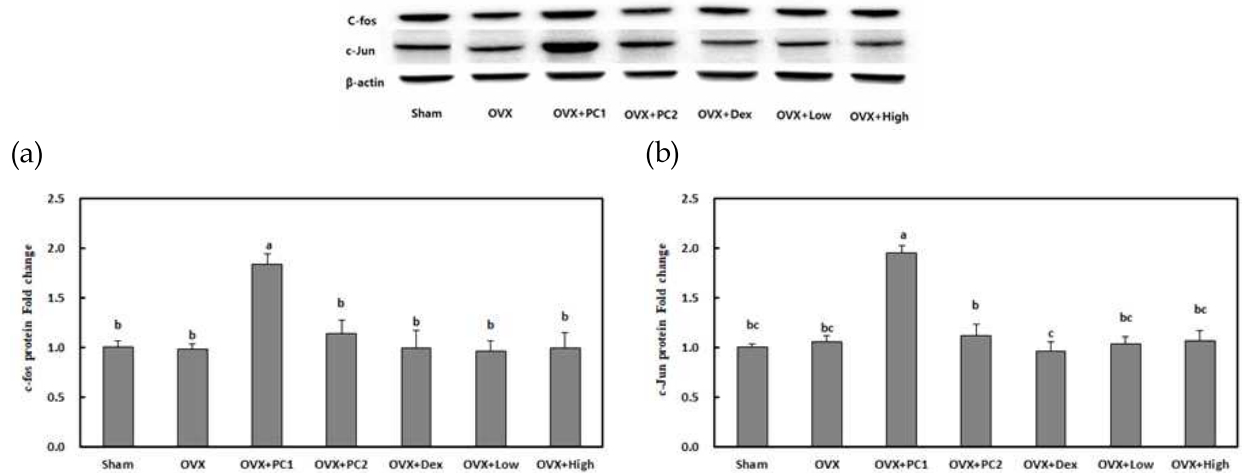


Fig.31 Effect of *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts on c-fos and c-jun protein levels in OVX induced rats (A) c-fos, (B) c-jun

Values are presented as means \pm SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented Punica Granatum Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.

나. 파골세포의 분화기전에 강황 및 갈근 주정추출복합물이 미치는 영향

(1) 실험방법

(가) 파골세포의 기본 배양 및 분화

RAW 264.7 파골전구세포는 ATCC (walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), sodium pyruvate (Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였음. 37°C, 5% CO₂에서 배양하였음. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL 처리에 의해 유도하였음

(나) Western blot

RANKL에 의한 신호전달과정을 관찰하기 위해 RANKL을 24시간 처리한 세포를 protease inhibitor 첨가된 lysis buffer를 넣어 조직을 균질화하여 ice에 두어 일정시간 유지 후 원심분리(12000rpm, 20분, 4°C)하여 단백질을 분리하였음. 단백질 정량은 BSA와 Bio-rad protein assay Dye Reagent Concentrate(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 Bradford법으로 정량하였음. Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 10%)을 이용하여 각 샘플당 20 µL씩 loading하여 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이하였음. 그 후, TBST buffer에 용해시킨 5% skim milk (TBS containing 0.5% Tween 20)로 1시간 동안 blocking을 하였고, 1차 항체 c-fos (Abcam, UK), ERK, p-ERK, c-fms, p38, p65, RANK (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)과 beta-actin (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 상온에서 3시간 반응시킨 후 membrane을 HRP가 중합된 2차 항체 (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)에 60분간 반응시켰고, enhanced chemiluminescent (ECL, Amershampharmacia Biotech, UK)를 이용해 발색한 후 Easy photo를 사용하여 촬영하였음. 촬영된 Western blot band 이미지들은 Image J software (NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 band의 밀도를 측정하였음

(다) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean±SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였음

(2) 실험결과

관절질환에서 RANKL과 RANK가 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 조골세포에서 분비되는 RANKL은 파골세포에 존재하는 RANK와 결합을 하면 RANK는 c-fos의 induction을 통해 AP-1(activating protein-1)을 활성화하고 활성화된 AP-1은 파골세포 분화의 결정적인 조절인자인 NFATc-1의 초기발현을 조절하고, RANKL은 adapter molecule을 recruit하여 MAPKs(mitogen-activated kinase)를 활성화시킴

RAW264.7 세포에 RANKL을 처리한 후 갈근강황추출물(PECE)을 처리한 후 단백질을 추출하여 파골세포 분화와 관련된 단백질 발현 변화를 확인하였음. c-fms 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, estradiol을 처리한 양성대조군(PC)은 control군에 비해 유의적으로 감소하였음. 그리고 PECE 추출물을 1, 5, 10 µg/mL을 처리한 군은 control군에 비해 각각 3.05%, 20.07%, 36.68% 감소하였음. 특히 PECE 추출물 5, 10 µg/mL을 처리한 군은 control군에 비해 유의적으로 감소하였음

p-ERK/ERK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, estradiol을 처리한 양성대조군(PC)은 control군에 비해 유의적으로 감소하였고, PECE 추출물을 1, 5, 10 µg/mL을 처리한 군은

control군에 비해 각각 11.41%, 19.69%, 57.83% 유의적으로 감소하였음. PECE 처리 농도의존적으로 p-ERK/ERK 단백질 발현이 감소함을 확인하였음

c-fos 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, estradiol을 처리한 양성대조군(PC)은 control군에 비해 유의적으로 감소하였고, PECE 추출물을 1, 5, 10 µg/mL을 처리한 군은 control군에 비해 각각 25.27%, 30.30%, 49.81% 유의적으로 감소하였음. PECE 처리 농도의존적으로 c-fos 단백질 발현이 감소함을 확인하였음

RANK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, estradiol을 처리한 양성대조군(PC)은 control군에 비해 유의적으로 감소하였고, PECE 추출물을 1, 5, 10 µg/mL을 처리한 군은 control군에 비해 각각 67.66%, 77.10%, 75.85% 유의적으로 감소하였음. 그러나 PECE 처리 농도에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았음

p38 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, estradiol을 처리한 양성대조군(PC)은 control군에 비해 유의적으로 감소하였고, PECE 추출물을 1, 5, 10 µg/mL을 처리한 군은 control군에 비해 각각 15.51%, 7.25%, 76.02% 유의적으로 감소하였다. PECE 추출물 5 µg/mL 처리시 1 µg/mL 처리군에 비해 유의적으로 증가를 하였으나 실험적인 오차가 있는 것으로 판단됨

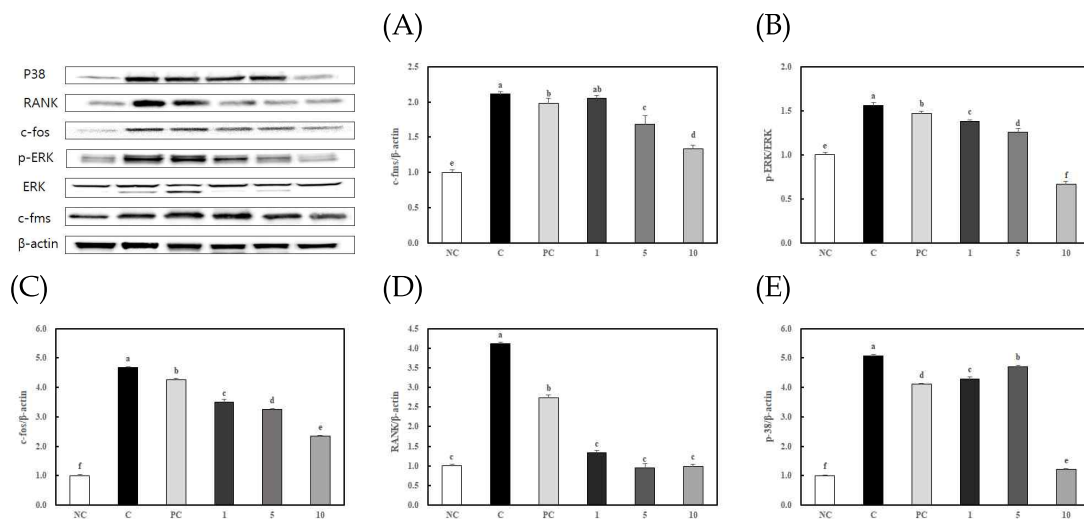


Fig.32. Mechanism of inhibitory effects of extract on osteoclastogenesis (A) c-fms, (B) p-ERK/ERK, (C) c-fos, (D) RANK, (E) p-38

Values are presented as means ± SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

(3) 결론

여성갱년기는 폐경을 전후로 하여 난소의 기능이 점차적으로 소실되어 가는 기간으로 노

화로 일어나는 자연스러운 현상이지만 대부분의 여성은 삶의 1/3 이상을 폐경상태로 살아감. 갱년기로 인한 estrogen 결핍은 bone turnover 증가 및 파골세포의 활성 증가, 골재흡수의 증가로 골 손실이 급격하게 나타나게 되고 이로 인해 폐경기 여성에서 골다공증을 유발시킴. 갱년기 증상 개선을 위해 일반적으로 호르몬 대체요법이 권장되고 있으나, 이는 에스트로겐 투여로 인해 생식기관의 암 발생 가능성이 증가한다는 보고가 있어서 천연물의 기능성 연구가 활발히 이루어지고 있음

갈근강황추출물(PECE)을 섭취한 동물에서 골 내 estrogen receptor 유전자 발현 및 자궁 내 유전독성을 확인하였음

(가) 정강이뼈에서 ER1 유전자 발현을 측정된 결과, estradiol을 섭취한 OVX+PC1군에서 가장 높게 나타났고, 난소절제 동물인 OVX군과 PECE섭취군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았음

(나) 정강이뼈에서 ER2 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제동물인 OVX군이 sham군에 비해 유의적으로 감소하였고, estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였으며, PECE섭취군 역시 OVX 군에 비해 유의적으로 증가하였음

(다) 정강이뼈에서 ALP 유전자 발현을 측정된 결과, 소절제동물인 OVX군이 sham군에 비해 유의적으로 감소하였고, estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였으며, PECE섭취군 역시 OVX 군에 비해 유의적으로 증가하였음

(라) 자궁 조직 내 유전독성을 확인하기 위해 c-fos, c-jun 단백질 발현을 측정된 결과, c-fos, c-jun 단백질 모두 estradiol을 섭취한 OVX+PC1군에서 가장 높았고, 난소절제동물인 OVX군과 PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)군은 sham군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음

파골세포의 분화기전에서 강황 및 갈근 주정추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW264.7 세포를 이용하여 c-fms, RANK, ERK, c-fos, p38 단백질 발현을 측정하였음

(가) RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하여 분화를 유발하고 PECE를 1, 5 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 c-fms 단백질 발현을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, PECE 추출물을 처리한 군은 control군에 비해 감소함을 확인하였음

(나) RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하여 분화를 유발하고 PECE를 1, 5 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 p-ERK/ERK 단백질 발현을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, PECE 추출물을 처리한 군은 control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였음

(다) RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하여 분화를 유발하고 PECE를 1, 5 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 c-fos 단백질 발현을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, PECE 추출물을 처리한 군은 control군에 비해 농도의존적으로 감소함을 확인하였음

(라) RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하여 분화를 유발하고 PECE를 1, 5 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 RANK 단백질 발현을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, PECE 추출물을 처리한 군은 control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였음

(마) RAW264.7 세포에 RANKL을 처리하여 분화를 유발하고 PECE를 1, 5 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 후 p-38 단백질 발현을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 RANKL만을 처리한 control군에서 유의적으로 증가함을 확인하였고, PECE 추출물을 처리한 군은 control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였음

다. 갈근강황추출물 여성갱년기 증상 완화 시험관, 동물 연구 결론

본 연구에서는 갈근강황추출물이 여성갱년기 개선에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 진행하였음. *in vitro* 실험을 통해 갈근 주정 20% 주정 추출물과 강황 20% 주정추출물의 혼합 비율에 따른 조골세포 및 파골세포에서의 생리활성 비교를 살펴본 결과, 갈근 20% 주정추출물 : 강황 20% 주정추출물 =7:3 비율에서 ALP, OC 유전자의 발현이 증가함을 확인하였고, 특히 파골세포분화 관련 유전자인 catehpsin K, c-fos, MMP-9의 유전자 발현이 눈에 띄게 감소하는 것을 확인하였음. 따라서 갈근 20% 주정 추출물 : 강황 20% 주정추출물=7:3(PECE)을 이용하여 난소를 절제한 갱년기 장애 모델에서 혈중 estrogen 농도, 골 형성 및 자궁 내 유전독성에 미치는 영향을 알아보았음. 난소절제동물인 OVX군에서 혈중 estrogen 농도가 sham군에 비해 낮아졌으며 PECE를 섭취한 동물군에서는 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않아 호르몬에 영향을 주지 않았음을 확인하였음. 또한 혈중 ALP, OPG 농도는 난소절제 동물인 OVX 군에서 가장 낮게 나타났고, PECE를 섭취한 동물군에서는 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 혈중 RANKL, M-CSF 농도는 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE 섭취군에서는 OVX군에 비해 농도 의존적으로 감소하였음. Micro-CT 촬영을 통해 동물의 골밀도를 측정된 결과, 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 고농도군에서 OVX군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였음. 골 내 ALP, OC 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였고, RANKL, Catehpsin K, MMP9 유전자 발현을 측정된 결과, 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 높았고, PECE 섭취군은 OVX군에 비해 유의적으로 감소하였음. 자궁 조직 내 유전독성을 확인한 결과, OVX군과 PECE군간의 유의적인 차이가 나타나지 않아 PECE의 섭취가 유전독성을 일으키지 않음을 확인하였음. 파골세포 분화에 있어서 PECE의 처리가 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 c-fms, p-ERK/ERK, c-fos, RANK, p38 단백질 발현을 측정된 결과, RAW264.7 세포에 RANKL만을 처리한 control군에서 단백질 발현이 가장 높게 나타났고, PECE 처리시 control군에 비해 감소함을 확인하였음

이상의 결과를 토대로, 갈근강황추출물은 파골세포의 분화기전에서 c-fms 및 RANK의 발

현을 감소시켜 NFATc-1의 발현 및 MAPK pathway의 발현을 감소시키고, 조골세포의 ALP, OC 발현을 증가시키며, estrogen의 농도와 유전독성에 영향을 주지 않으면서 여성갱년기의 증상을 완화시키는 것을 확인하였음. 따라서 갈근강황추출물이 에스트로겐 결핍으로 인한 갱년기 증상 개선에 긍정적인 영향을 주는 것을 확인하였고, 이를 활용한 기능성 소재 개발이 가능할 것으로 기대됨

7. 갈근강황추출물의 갱년기 여성 건강 인체적용 임상연구

가. 연구시료 제작

(1) 제형개발

갈근강황추출물의 여성갱년기 개선에 대한 인체적용시험에 사용될 시료는 표준화된 갈근강황추출분말을 사용하였으며, 본약 및 위약을 복용량 및 피험자의 선호도를 고려하여 소형환 형태로 건강기능식품 GMP 인증 업체인 전남 화순군 소재 (주) 메가바이오숲에서 제형 개발함

(2) 시료 원료 배합비

인체적용시험 시료(본약/위약)의 1포 중 원료 배합비는 아래와 같음

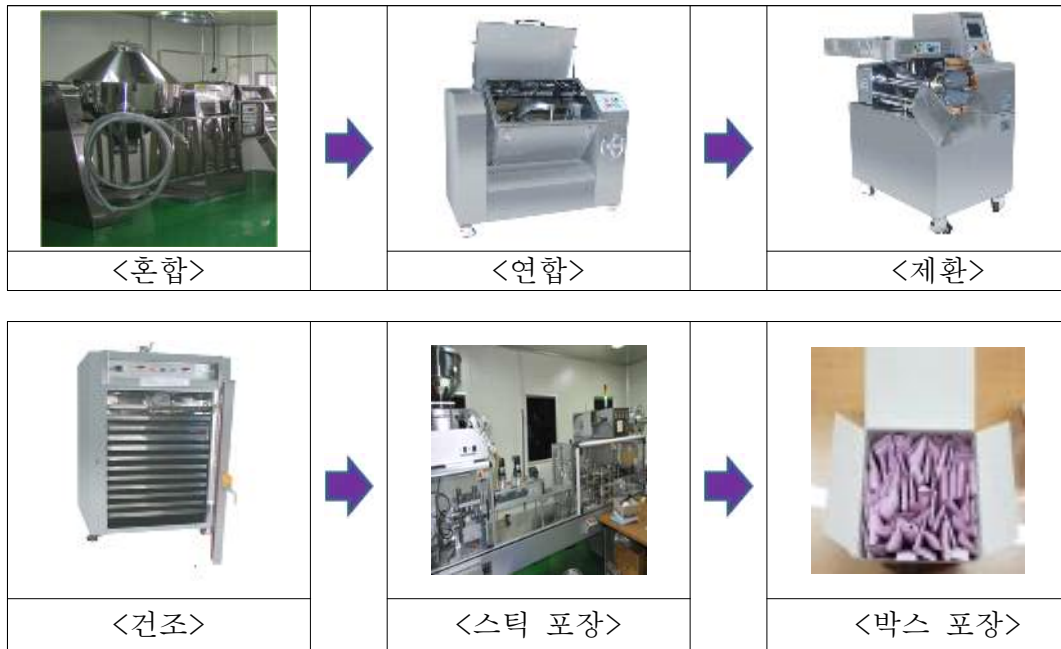
(가) 시험군 : 이 식품 1포(4g) 중

성분	배합비율(%)	제품함량(mg)
갈근강황추출물	25	1,000
결정셀룰로오스	34	1,360
옥수수전분	40	1,600
카라멜색소	1	40
합계	100	4,000

(나) 대조군 : 이 식품 1포(4g) 중

성분	배합비율(%)	제품함량(mg)
결정셀룰로오스	64.25	2,570
옥수수전분	28.75	1,150
카라멜색소	2	80
덱스트린	5	200
합계	100	4,000

(3) 제조 공정



(4) 인체적용시험 제품 라벨

인체적용시험용 제품입니다.	
Protocol No.	SDC-CP001
제품의 코드명	CP001 또는 위약
대상자 번호	R1001
방문	Visit 2
유효기한	2021. 10. 06
복용방법	식후 30분 1포씩 1일 1회 복용
제조번호	SDC-01 또는 SDC-02
저장방법	직사광선 및 고온 다습한 곳을 피해 서늘한 곳에서 상온 보관 (어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관한다.)
인체적용시험 승인업자상호	농업회사법인(주)산들촌 전남 담양군 담양읍 에코길 11-9, 061)381-8912
“인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다.”	

(5) 인체적용시험 제품 포장

인체적용시험 제품은 시험제품별 1박스 당 47포로 포장하였으며, 생산된 제품은 피험자가 0주, 6주 방문시 인체적용시험 시료로 피험자에게 1인당 1박스씩 제공하도록 포장하였음



<인체적용시험 제품>

나. 인체적용 임상연구 계획

- 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 “갈근강황추출물 CP001”의 갱년기 증상의 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

(1) 인체적용시험 목적

(가) 1차 목적

본 시험의 주목적은 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 12주간 시험식품인 “갈근강황추출물 CP001” 1포씩 1일 1회, 하루 총 1포(갈근강황추출물로서 하루 약 1 g)12주간 복용하였을 때의 갱년기 증상의 개선 등의 기능성을 평가하고자 한다.

(나) 이차 목적

활력징후, 신체검사 및 이학적 검사 결과, 임상실험실적 검사 결과들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서 “갈근강황추출물(CP001)”의 안전성을 평가하고자 한다.

(2) 인체적용시험 방법

(가) 본 연구의 목적과 연구방법 등에 대한 상세한 설명을 듣고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시한 후 선정/제외 기준에 적합한 자를 선정하였음

(나) 스크리닝을 통해 대상자로 선정된 자를 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하였음. 시험군의 경우 갈근강황추출물 CP001을 1 g 섭취, 대조군의 경우 갈근강황추출물 CP001을 0 g 섭취하였음

(다) Baseline(0 주)부터 12주간 섭취하도록 하였고, 대상자들에게 복용하는 방법과 횟수 등을 알려주었고, 방문 3, 방문 4(시험 종료시)에는 복용하고 남은 식품과 포장용기(Box)를 반납하였음

(라) 무작위 배정일에 여성갱년기 증상 측정 등 유효성 평가 항목 및 안전성 평가 항목들을 실시하였으며, 인체적용시험용 제품 섭취 시작 시점을 기준으로 6주와 12주에 외래방문을 통하여 해당 방문에 대한 평가 항목들을 실시하였음

① 대상자수

만 45세 이상 만 65세 미만의 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성 110명(시험군 : 55명, 대조군 55명)

② 선정기준

- ㉠ 만 45세 이상 만 65세 미만의 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성
- ㉡ 6개월 이상 무월경인 자
- ㉢ FSH 40 mIU/ml이상, E2 50 pg/ml이하인 자
- ㉣ Kupperman index 총점 10 이상인 자
- ㉤ 인체적용시험 동의서에 자발적으로 서면 동의한 자

③ 제외 기준

- ㉠ 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자
- ㉡ 체질량지수(BMI : Body Mass Index)가 30 kg/m² 초과인 여성
- ㉢ 3개월 이내에 여성 호르몬 등의 호르몬 제제 또는 유사 호르몬제제(식물추출물 등)를 복용 또는 투여한 자
- ㉣ 스크리닝 이전 5년 이내 악성 종양 병력이 있는 자
- ㉤ 자궁내막증식증, 자궁암, 자궁내막암, 유방암, 유방질환의증, 양측 난소절제술, 자궁절제술, 항암 화학요법, 골반 방사선 치료의 병력이 있는 자
- ㉥ 최근 1년 이내 심한 편두통이 있거나, 혈전색전증, 뇌혈관질환, 심근경색, 불안정형 협심증을 진단 받았거나 관상동맥 성형술을 시행한 과거력이 있는 자
- ㉦ 간 기능 혹은 신기능 저하(ALT 또는 AST가 정상의 상한치의 2.5배 이상, Creatinine 2.0 mg/dl 이상), 조절되지 않는 고혈압(SBP > 160 mmHg 또는 DBP > 100 mmHg), 당뇨(공복혈당 > 180 mg/dL), 고지혈증 환자로서 지질변화에 영향을 줄 수 있는 약물을 중단할 수 없는 자
- ㉧ 비정상적 자궁출혈의 병력이 있는 자
- ㉨ 갑상선 기능 항진증 또는 저하증으로 진단된 자(0.1 μU/mL 이상) 및 해당 질환으로 갱년기 장애증상과 혼동된다고 판단되는 자
- ㉩ 심한 정신질환이 있거나, 현재 우울증, 불안장애의 치료목적으로 항우울제 등 정신신경계 약물을 복용중인 자
- ㉪ 본 제품을 사용하기 전 과거 4주 이내 다른 임상 시험용 의약품 혹은 다른 건강기능식품을 복용 및 투여 받은 경험이 있는 자
- ㉫ 최근 3개월 내에 갑상선 호르몬 제제, Clonidine, 항응고제(예 : Naproxen, Dalteparin, Warfarin 등)를 복용 또는 투여하고 있거나 Bisphosphonate 제제(예 : Alendronate, Etidronate, Zoledronic Acid) 등 골다공증 치료제를 복용 또는 투여하고 있는 대상자
- ㉬ 식품의 흡수·대사·배설에 영향을 미칠 수 있는 위장장애(위궤양, 만성소화장애 등)질환으로 지속적인 치료나 약물복용이 진행 중인 대상자
- ㉭ 시험 담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 자

④ 시험 방법 : 1일 1회 1포 경구 섭취

⑤ 투약기간 : 12주

⑥ 유효성 평가기준

㉠ 1차 유효성 평가변수

- 방문2(Baseline) 대비 12주 후 Kupperman index 총점 변화치

㉡ 2차 유효성 평가변수

㉢ 시험식품과 대조식품 섭취 12주 후 Kupperman index 총점 변화율

㉣ Kupperman index 각 항목 변화치 및 변화율

㉤ MENQOL 변화치 및 변화율

㉥ E2 변화치 및 변화율

㉦ FSG 변화치 및 변화율

㉧ Alkaline phosphatase 변화치 및 변화율

㉨ Osteocalcin 변화치 및 변화율

㉩ Lipid profiles(Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 변화치 및 변화율

㉪ 안면홍조 및 발한의 정도(Hot flush VAS, Sweating VAS), 안면홍조 점수, 안면홍조 1회 지속시간 변화치 및 변화율

㉫ BMI 변화치 및 변화율

⑦ 통계분석 방법

㉠ 유효성 평가

㉡ 1차 기능성 평가변수

인체시험용 식품 투여 전 Baseline(0 일)대비 종료 시점(12 주)의 Kupperman index 총점 변화치에 대해 기술통계량으로 시험 대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 Independent two-sample t-test 또는 Mann-Whitney U test로 검정함. 또한 각 군 내 Kupperman index 총점 변화치의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용해 검정함

㉢ 2차 기능성 평가변수

인체시험용 식품 투여 전 Baseline(0 일)대비 종료 시점(12 주)의 모든 2차 기능성 평가 변수 변화치와 변화율에 대해 기술통계량으로 시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값을 제시하고 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 연속형 변수의 경우에는 Independent two-sample t-test 또는 Mann-Whitney U test로 검정하고, 범주형 변수의 경우에는 Pearson's chi-square test 또는 Fisher's exact test 로 검정함. 또한 모든 2차 기능성 평가변수의 각 군 내 변화치와 변화율에 대한 통계적 유의성은 연속형 변수의 경우에는 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 로 검정하고, 범주형 변수의 경우에는 McNemar's test 또는 McNemar's exact test로 검정함

㉣ 안전성 평가

㉑ 이상반응

전체, 중대한 그리고 중도 탈락의 원인이 된 이상반응과 인체적용시험용 식품과 관련 있는 이상반응에 대해 시험대상자 수와 비율을 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용해 군 간 차이에 대한 유의성을 검정함

㉒ 실험실적 검사

혈액학 및 혈액화학 검사와 같은 연속형 자료의 경우 Baseline 대비 12주 시점의 변화에 대해 기술통계량(시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값)을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 Independent two-sample t-test 또는 Mann-Whitney U test, 각 군 내 변화에 대한 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정함

또한, 실험실적 검사 결과는 Baseline 대비 12주 시점의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 Pearson's Chi-square test 또는 Fisher's exact test, 각 군내 변화에 대한 통계적 유의성은 McNemar's test 또는 McNemar's exact test로 검정함

㉓ 이학적 검사

이학적 검사는 연속형 자료의 경우 Baseline 대비 12주 시점의 변화량에 대해 기술통계량(시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값)을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Mann-Whitney U test, 각 군 내 변화량의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정함

또한, 이학적 검사 결과는 Baseline 대비 12주 시점의 정상/비정상 변화에 대해 분할표를 이용해 빈도와 비율을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 Pearson's Chi-square test 또는 Fisher's exact test, 각 군내 변화에 대한 통계적 유의성은 McNemar's test 또는 McNemar's exact test로 검정함

㉔ 활력징후

활력징후는 Baseline 대비 12주 시점의 변화량에 대해 기술통계량(시험대상자 수, 평균, 표준편차, 중앙값, 최소값 및 최대값)을 제시하고, 군 간 차이에 대한 통계적 유의성은 independent two-sample t-test 또는 Mann-Whitney U test, 각 군 내 변화량의 통계적 유의성은 paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test로 검정함

인 체 적 용 시 험 계 획 서

갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 “갈근강황추출물 CP001”의 갱년기 증상의 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Intervention Study to evaluate Efficacy and Safety of “Pueraria lobata and Curcuma longa extract (CP001)” in subject with Menopause syndrome

시험계획서번호	SDC-CP001
버전(작성일)	1.1 (2019.10.10)
인체적용시험의뢰자	농업회사법인㈜산들촌
인체적용시험수탁기관	㈜파마크로(PharmaCRO)

기밀문서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험 책임자 및 인체적용시험 담당자, 기관윤리심의위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식물을 복용하는 대상자에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 농업회사법인㈜산들촌 및 ㈜파마크로(PharmaCRO)의 사전 서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

❖ 인체적용시험 흐름도

시험항목	스크리닝	복용기간			Follow up ⁸
	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4	추가 방문
	-2 주 ~0 주	0 주	6 주(±5 일)	12 주(±5 일)	필요 시
대상자 동의서 취득	○				
인구학적 조사	○				
신체검사 ¹	○			○	
활력징후 ²	○	○	○	○	○
생혈압률 조사		○		○	
이학적 검사	○			○	○
병력 및 동반질환	○				
임상실험실 검사 ³	○	○	○	○	○
호르몬 검사 ⁴	○			○	
대상자 적합성 평가 ⁵	○				
경년기 증상 측정 ⁶	안면홍조 증상 및 MENQOL	○		○	
	Kupperman index	○	○	○	
선행/병용약물 조사	○	○	○	○	○
무작위배정		○			
인체적용시험용 식품 저장 및 고부		○	○		
인체적용시험용 식품 반납/복용순용도			○	○	
이상반응 확인		○	○	○	○

1) 신체검사(신장, 체중): 신체검사는 신장, 체중을 측정하며, 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하여 하고, 신장은 신을 벗고 cm단위로 측정하며 이를 BMI 계산에 사용한다. 신장은 처음 측정 값을 사용하고 방문 4에서는 체중만 측정한다.

2) 활력징후(혈압, 맥박수, 체온): 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.

3) 임상실험실 검사: 방문 1 이전 2 주 내에 본원에서 실시한 임상실험실 검사 결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 1 에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다. 또한 방문 1 이후 14 일 이내에 방문 2 를 진행하는 경우 방문 1 의 결과를 사용 가능하며 방문 2 에서 검사를 별도로 시행하지 않고, 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 진행한다.

- 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
- 혈액생화학적 검사: BUN, Creatinine, Uric acid, Total protein, Creatine kinase, ALT, AST, r-GT, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol 검사는 정해진 일정대로 수행한다.
- 골대사 마커(osteocalcin, Alkaline phosphatase)는 혈액생화학 검사의 일환으로 방문 2와 4 에만 실시한다.
- 소변검사: Specific gravity, pH, Protein, Glucose, Blood(RBC)

4) 호르몬 검사: 임상실험실 검사의 일환으로 E2, FSH, TSH 를 측정한다. 단 TSH 는 스크리닝 방문시에만 시행한다.

5) 대상자 적합성 평가: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 방문1에 실시한다.

6) 경년기증상 측정: 방문2, 4에 안면홍조 증상(안면홍조 점수, 안면홍조 및 발한의 정도, 안면홍조 1회 지속시간), MENQOL를 측정한다. Kupperman index는 선정기준의 일환으로 스크리닝 시점과 방문2와 4에 시행한다.

7) Follow up 방문: 이상반응이 있거나 임상실험실 검사 이상으로 연구자 판단에 따라 follow up이 필요하다고 여겨지는 경우 4주 이내 실시한다.

세명대학교부속제천한방병원 기관생명윤리위원회

우 27136 충청북도 제천시 세명로 66 / Tel.043-645-1010 / Fax.043-645-1382

심의결과 통보서

수신	연구책임자	김 형 준	소 속	세명대부속한방병원	직 위	교 수
	의뢰기관	농업회사법인(주)산들촌				
IRB File No.	SMJOH-2019-11			관련 근거	심사 회의록	
연구과제명	갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 "갈근강황추출물 CP001"의 갱년기 증상의 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험					
연구 분류	분류1	<input type="checkbox"/> 약물(<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의약외품)		<input type="checkbox"/> 의료기기(<input type="checkbox"/> 1등급 <input type="checkbox"/> 2등급 <input type="checkbox"/> 3등급 <input type="checkbox"/> 4등급)		
		<input type="checkbox"/> 의료시술	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품	<input type="checkbox"/> 화장품	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음	
	분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	<input type="checkbox"/> 기타()	
	분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 전향적 연구	<input type="checkbox"/> 후향적 연구	<input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구		
분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구		<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구		<input type="checkbox"/> 기타()
	<input type="checkbox"/> 관찰연구(<input type="checkbox"/> 단면연구 <input type="checkbox"/> 한자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)					
심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서		<input type="checkbox"/> 시정계획서	<input type="checkbox"/> 보완계획서		<input type="checkbox"/> 변경계획서
	<input type="checkbox"/> 이상반응 보고서		<input type="checkbox"/> 위반/이탈사례 보고서		<input type="checkbox"/> 지속심의/중간보고	
	<input type="checkbox"/> ((조기)종료보고서		<input type="checkbox"/> 결과보고서		<input type="checkbox"/> 기타()	
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심사		<input type="checkbox"/> 신속심사	<input type="checkbox"/> 지속심사	<input type="checkbox"/> 심사면제	
심의일자	2019년 10월 02일		심의 장소		한방병원 세미나실	
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인		<input type="checkbox"/> 시정승인	<input type="checkbox"/> 보완	<input type="checkbox"/> 반려	<input type="checkbox"/> 중지/보류
승인일자	2019년 10월 05일		연구 승인기간		2019년 10월 05일 ~ 2020년 10월 04일	
정기보고주기	<input type="checkbox"/> 3개월		<input type="checkbox"/> 6개월		<input checked="" type="checkbox"/> 1년 <input type="checkbox"/> 기타(개월)	
제출서류 목록	1. 연구심의 신청서 2. 이해상충서약서 3. 연구책임자 CV 4. 시험계획서 5. 증례기록지			6. 시험자 자료집 7. 교육수료증 8. 별첨1~5		
심의의견	1. 본 위원회에서는 연구자가 제출한 연구계획서를 심의한 결과 승인하기로 결정하였습니다. 2. 승인된 연구계획의 변경, 예상하지 못한 문제의 발생, 동의서 등 연구대상자에게 제공되는 정보의 변경 등이 있을 경우 본 위원회에 보고하여 주시기 바랍니다. 3. 연구를 1년 이상 지속하고자 하는 경우에는 지속심의 신청서를 제출하여 주시고, 승인 유효기간내에 연구가 종료된 경우에는 종료보고서를 제출해 주시기 바랍니다.					

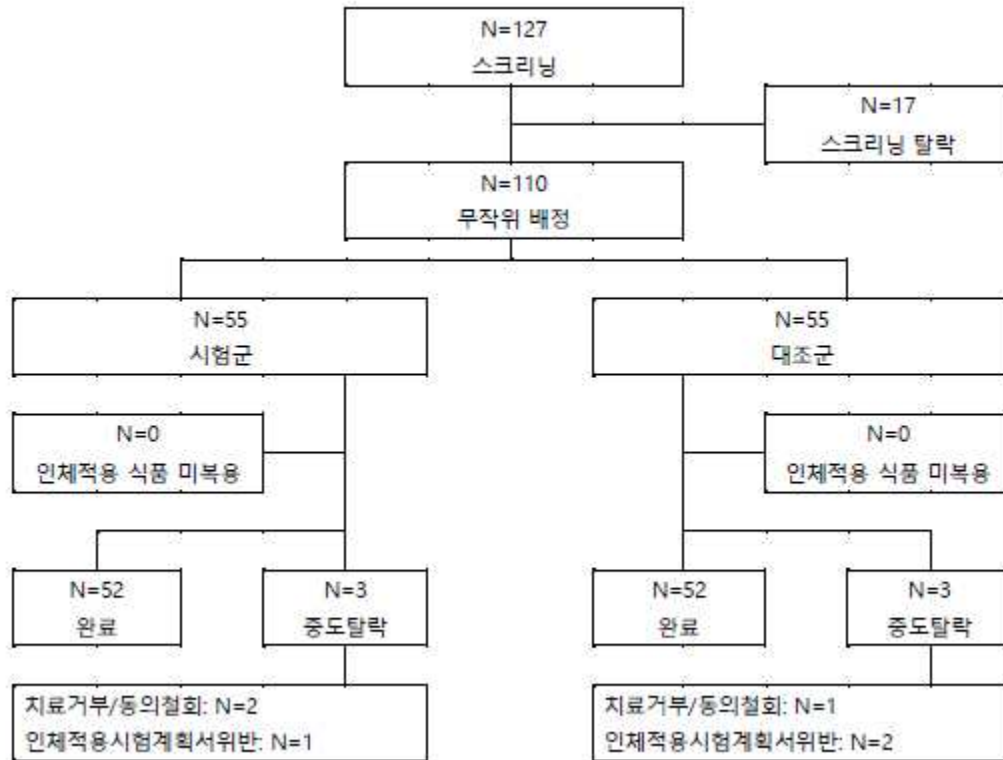
- 본 기관생명윤리위원회는 ICH-GCP, 생명윤리 및 안전에 관한 법률, 의약품임상시험, 의료기기임상시험 관리 기준 등 관련 법규를 준수합니다.
- 본 통보서에 기재된 사항은 세명대학교부속제천한방병원 기관생명윤리위원회에 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.
- 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 위원은 심사결정 과정에 참여하지 않았습니다.

**세명대학교부속제천한방병원
기관생명윤리위원회**



다. 인체적용 임상연구 결과

- 본 인체적용시험에 등록되어 스크리닝 받은 대상자는 127명으로 그 중 스크리닝 탈락된 17명을 제외한 총110명이 무작위 배정되었고, 중도탈락 6명을 제외한 총 104명이 인체적용시험을 완료하였음



<인체적용시험 대상자 참여 현황>

(1) 인구학적 조사 : Baseline characteristics

본 인체적용시험에 참여한 시험 대상자의 평균 나이는 시험군의 경우 55.61 ± 2.76 세, 대조군의 경우 55.67 ± 3.59 세로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었음(나이 : p -value = 0.9284)

평균 신장은 시험군의 경우 156.47 ± 5.31 cm, 대조군의 경우 156.25 ± 6.45 cm로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었음(p -value = 0.8505)

평균 체중은 시험군의 경우 57.98 ± 6.59 kg, 대조군의 경우 58.73 ± 7.25 kg으로, 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었음(체중 : p -value = 0.5771)

현재 흡주여부는 시험군의 경우 예 24명, 대조군의 경우 예 25명으로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었음(흡주여부 : p -value = 0.8427)

(2) 1차 유효성 평가

본 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수는 방문2(Baseline)대비 12주 후 시점에서의 Kupperman index 총점 변화치이며, 대조식품에 비해 시험식품이 우월한지를 입증하는 것임

FAS의 인체적용시험용 방문2(Baseline)대비 12주 후 분석 결과를 살펴보면, 방문2(Baseli

ne) Kupperman index 총점은 시험군의 경우 28.76 ± 7.91 , 대조군의 경우 28.94 ± 6.95 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 12주 후 Kupperman index 총점은 시험군의 경우 20.28 ± 8.93 , 대조군의 경우 19.63 ± 8.57 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었음(Baseline: p -value = 0.8974, 12 weeks: p -value = 0.7012)

각 군내 Kupperman index 총점 변화치는 시험군의 경우 -8.48 ± 7.30 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -9.31 ± 8.93 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었음. (시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Kupperman index 총점 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.7607)

(3) 2차 기능성 평가

2차 평가 변수로 측정한 Kupperman index 총점 변화율에서는 FAS 분석 결과 baseline에서 차이가 없었고 12주 후 각 군 내 Kupperman index 총점 변화율은 시험군의 경우 -29.76 ± 25.21 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -31.17 ± 27.44 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)총점 변화율의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.7804). PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았음

방문2(Baseline)대비 12주 후 시점에서의 홍조, 얼굴 화끈거림 변화에서는 FAS 분석결과 각 군 내 홍조, 얼굴 화끈거림 변화치는 시험군의 경우 -2.07 ± 2.98 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -2.59 ± 3.57 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음. (시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline) 대비 12주 후 홍조, 얼굴 화끈거림 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.4845) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군 간 차이를 보여주지 않았음. 홍조, 얼굴 화끈거림 변화율도 마찬가지로 패턴으로 변화됨을 보였음

발한 변화치 FAS 분석에서 시험군의 경우 -0.93 ± 1.33 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -1.37 ± 1.39 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline) 그러나 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.1268) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았고 변화율도 같은 변화를 보여주었음

불면증에서도 FAS 분석 결과 시험군의 경우 -1.04 ± 1.54 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -1.26 ± 1.71 로 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 (시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline) 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.4527) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았고 변화율도 같은 변화를 보여주었음

신경질 증상의 변화에서 FAS 분석 결과 각 군 내 신경질 변화치는 시험군의 경우 -0.85 ± 1.27 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.56 ± 1.71 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)

군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었고(p -value = 0.4170), PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

우울증 증상 변화를 보면 FAS 분석에서 각 군 내 우울증 변화치는 시험군의 경우 -0.37 ± 0.65 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.48 ± 0.93 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0002) 방문2(Baseline) 대비 12주 후 우울증 변화치의 군간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.5517) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았고 변화율도 같은 변화를 보여주었음

현기증 즉 어지럼증의 변화는 FAS 분석에서 시험군의 경우 -0.48 ± 0.82 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.46 ± 0.95 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0007) 방문2(Baseline) 대비 12주 후 현기증(어지럼증) 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 (p -value = 0.8750) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

피로감 FAS 분석에서 시험군의 경우 -0.65 ± 0.89 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.61 ± 0.81 로 통계적으로 유의한 차이가 있었지만 (시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 군 간 차이는 통계적으로 차이가 없었고 (p -value = 0.8005) PP 분석도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

방문2(Baseline) 대비 12주 후 시점에서의 관절통, 근육통 변화에서 FAS 분석 결과 각 군 내 관절통, 근육통 변화치는 시험군의 경우 -0.43 ± 1.00 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.39 ± 0.83 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었음. (시험군: p -value = 0.0019, 대조군: p -value = 0.0005) 그러나 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이를 보여주지 않았음.(p -value = 0.3241) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

각 군 내 두통 변화치는 시험군의 경우 -0.35 ± 0.95 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.39 ± 0.86 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0099, 대조군: p -value = 0.0016) 방문2(Baseline)대비 12주 후 두통 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.7897)PP 분석 및 변화율도 FAS 분석과 같은 변화를 보여주었음

각 군 내 가슴 두근거림 변화치는 시험군의 경우 -0.61 ± 0.79 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.72 ± 1.05 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 가슴 두근거림 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.5281) PP분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

각 군 내 질 건조, 분비물 감소 변화치는 시험군의 경우 -0.70 ± 0.86 으로 통계적으로

유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -0.48 ± 0.77 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음. (시험군: p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 질 건조, 분비물 감소 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.1176) PP 분석 및 변화율도 FAS 분석과 같은 변화를 보여주었음

각 군 내 MENQOL 변화치는 시험군의 경우 -19.93 ± 22.81 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -21.22 ± 27.60 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 MENQOL 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.(p -value = 0.7215) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

각 군 내 E2 변화치는 시험군의 경우 3.75 ± 25.68 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 5.38 ± 25.70 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.2163, 대조군: p -value = 0.0984)

방문2(Baseline)대비 12주 후 E2 변화치의 군간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.6715) E2변화율에서는 FAS 분석에서 두 군내에서 통계적인 차이를 보여주었고 PP 분석에서는 대조군만 통계적인 군내 변화를 보여주었으나 군간 변화는 보이지 않았음

FSH변화치는 시험군의 경우 -1.59 ± 13.21 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 -3.09 ± 14.11 로 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.6678, 대조군: p -value = 0.2614) 방문2(Baseline)대비 12주 후 FSH 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.2768)변화율에서도 군내 군간 변화는 없었음

Alkaline phosphatase 변화에서 12주 후 Alkaline phosphatase 점수의 평균은 시험군의 경우 75.00 ± 22.48 , 대조군의 경우 86.37 ± 28.45 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었으나 군내 변화치는 시험군의 경우 -2.65 ± 10.71 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 1.65 ± 17.48 로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.0750, 대조군: p -value = 0.6407) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Alkaline phosphatase 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.(p -value = 0.1977) PP 분석에서도 각 군내 유의하나 군간 차이를 보여주지 않았으며 변화율도 같은 변화를 보여주었음

Osteocalcin 변화치는 시험군의 경우 0.16 ± 4.44 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 0.22 ± 4.03 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.7027, 대조군: p -value = 0.6838) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Osteocalcin 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.9095) PP 분석과 변화율도 차이가 없었음. 각 군내 Total cholesterol변화치는 시험군의 경우 2.91 ± 19.79 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 4.00 ± 23.48 로 통계적으로 유의한 차이가 없었음(시험군 : p -value = 0.2853, 대조군: p -value = 0.2162)

방문2(Baseline)대비 12주 후 Total cholesterol 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의

한 차이가 없었음.(p -value = 0.7943) PP 분석과 변화율도 차이가 없었음

HDL cholesterol 변화치는 시험군의 경우 0.72 ± 6.63 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 1.50 ± 6.64 로 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.4269, 대조군: p -value = 0.1026) 방문2(Baseline)대비 12주 후 HDL cholesterol 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.5436) 변화율에서 대조군에서만 군내 변화를 보여주었고, 군간 변화는 보여주지 않았음

LDL cholesterol 변화치는 시험군의 경우 3.00 ± 12.61 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 5.74 ± 18.78 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.863, 대조군: p -value = 0.0226) 방문2(Baseline)대비 12주 후 LDL cholesterol 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.4701)

Triglyceride 변화치는 시험군의 경우 0.41 ± 64.20 으로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 -11.06 ± 59.07 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.6493, 대조군: p -value = 0.0463) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Triglyceride 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.3377)

Hot flush VAS 변화치는 시험군의 경우 -17.11 ± 20.67 로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -17.74 ± 20.43 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Hot flush VAS 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(p -value = 0.8738) PP 분석과 변화율도 군내에서 차이가 있었으나 군간 차이가 없었음

Sweating VAS 변화치는 시험군의 경우 -15.74 ± 18.63 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -20.17 ± 22.87 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 Sweating VAS 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.6603)

각 군 내 안면홍조 변화치는 시험군의 경우 -4.61 ± 7.03 으로 통계적으로 유의한 차이가 있었고, 대조군의 경우 -4.57 ± 7.49 로 통계적으로 유의한 차이가 있었음.(시험군 : p -value = 0.0001, 대조군: p -value = 0.0001) 방문2(Baseline)대비 12주 후 안면홍조 점수 변화치의 군간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.5026)

각 군 내 BMI 변화치는 시험군의 경우 -0.03 ± 0.76 로 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 대조군의 경우 0.08 ± 0.45 로 통계적으로 유의한 차이가 없었음.(시험군 : p -value = 0.2876, 대조군: p -value = 0.1802) 방문2(Baseline)대비 12주 후 BMI 변화치의 군 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었음(p -value = 0.7513)

라. 고찰

결과적으로 시험군의 전후 비교로 보면 시험군의 1차 변수 및 대부분의 2차 평가변수에서 군 간 통계적인 차이를 보여 주었음. 그러나 인체적용시험의 일차 기능성 평가 변수에서 FAS 및 PPS 분석 결과 군 간의 통계적 유의한 차이를 보이지 않았고 이차평가 변수인 쿠퍼만 지수

총점 변화율, 안면홍조 증상의 변화치 및 변화율 그리고 총 콜레스테롤 변화치 및 변화율도 FAS, PPS 분석 모두에서 군간 통계적 유의한 차이를 보여주지 않았음. 시험군의 전후 비교로 보면 시험군의 대부분 평가변수에서 군내 통계적인 차이를 보여주었음. 그러나 대조군도 같은 변화의 양상을 보여 주었음. 대조군에 사용한 cellulose의 경우 종류와 복용량에 따라 다르나 여러 연구에서 셀룰로오스는 지질을 잘 소화시키지 않아 콜레스테롤 흡수를 저해하고 배설하게 하여 혈중지질 수치를 낮출 수 있으며 일종의 식이섬유이므로 소화 및 배설을 도와준다는 논문들이 있어 대조식품 성분의 영향이 클 것으로 추정됨

Clinical Study Report

인체적용시험결과보고서

갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 “갈근강황추출물 CP001”의 갱년기 증상의 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Intervention Study to evaluate Efficacy and Safety of “Pueraria lobata and Curcuma longa extract (CP001)” in subject with Menopause syndrome

General Information

Protocol No./ Final Version	: SDC-CP001 / V1.2
Investigational Product	: 갈근강황추출물(CP001) 또는 대조식품(위약)
Phase of Trial	: 건강기능식품 인체적용시험
CSR Version /Version Date	: V1.0 / 2020.09.25
Date of First Patient Screened	: 2019.11.26
Date of Last Patient Completed	: 2020.05.30

Investigator and Sponsor

Coordinate Investigator	김형준 교수 / 세명대학교 부속 제천한방병원 부인과
Sponsor	농업회사법인 ㈜산들촌

Confidential

본 인체적용시험 결과보고서에 포함된 사항은 의약품 임상시험관련규정을 준수하여 진행하였으며, 농업회사법인(㈜산들촌과 ㈜파마크로의 독점 자산으로, 위 회사의 허락 없이 권한 외의 발표 또는 출판의 목적으로 사용될 수 없음을 알려드립니다. 본 인체적용시험 결과보고서를 제공 받은 분은 문서의 기밀 사항을 보장해 주시기 바랍니다.

CONFIDENTIAL

1 / 182


8. 갈근강황추출물 유통기한 설정 시험

가. 방법

(1) 시험기간 : 2019.10.01.~2020.04.30.

(2) 시험기준 : 안정성시험(가속시험)

(3) 시험조건 : 갈근강황추출물 원료의 제품화(안정성)을 위하여 식품의약품안전처의 “ “식품, 축산물 및 건강기능식품의 유통기간 설정실험 가이드라인, 2018.8”에 따라 설정 가속시험을 수행

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	이미,이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말
사용원료	갈근, 강황
제조 • 가공공정	1) 강황추출물 : 원료(강황)→추출 및 여과→농축→텍스트린→살균→분무건조→강황 추출분말 2) 갈근추출물 : 원료(갈근)→추출 및 여과→농축→텍스트린→살균→분무건조→갈근 추출분말 3) 갈근강황추출물 : 혼합(강황추출분말 30: 갈근추출분말 70)→원료
포장재질	PE
포장방법	PE 및 지합
포장단위	25 g
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

(4) 유통기한설정시험 방법

품질지표		기준 및 규격	시험방법
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말	—
지표 성분 (mg/4g)	Curcumin	0.6 mg/g	검체 1 g을 50 mL 용량플라스크에 취함. MeOH 50 mL을 넣고, 1시간 초음파 추출. 용량플라스크의 표선까지 MeOH로 정용. 0.45 µm PTFE 필터로 여과. HPLC 분석
	Puerarin	70 mg/g	검체 1 g을 50 mL 용량플라스크에 취함. MeOH 100 mL을 넣고, 2시간 초음파 추출. 용량플라스크의 표선까지 MeOH로 정용. 0.45 µm 실린지 필터로 여과. HPLC 분석
Aflatoxin		15 이하 (B1은 10.0 이하)	제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 시험법 9.2 곰팡이독소 9.2.2 아플라톡신(B1,B2 및 G2) 9.2.2.2 액체크로마토그래피에 의한 시험
Ochratoxin A		15.0 이하	제8. 일반시험법 9. 식품 중 유해물질 시험법 9.2 곰팡이독소 9.2.6 오크라톡신 A(Ochratoxin A)
대장균군		음성	제8. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군
중금속		납(Pb) : 0.5 mg/kg이하 카드뮴(Cd):0.1 mg/kg이하 비소(As) : 0.1 mg/kg이하 수은(Hg) : 0.5 mg/kg이하	제8. 일반시험법> 9. 식품 중 유해물질시험법> 9.1.2 금속별 시험> 9.1.2.납(Pb), 9.1.3카드뮴(Cd), 9.1.4비소(As), 9.1.6 수은(Hg) 1)시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가) 원자흡광광도법(AAs)로 측정

나. 결과

(1) 안정성시험(6개월 가속시험)결과 평가

- ① 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말
- ② 지표성분 : 시험 시 갈근강황추출물의 Curcumin 최저값 0.6105 mg/g, Puerarin 최저값 70.5910mg/g, 이었으며, 각 원료의 최저 기준인 80%(각 원료의 80% 해당 값 : Curcumin 0.48 mg/g, Puerarin 56 mg/g) 보다 높아 기준에 적합함
- ③ 대장균군 : 음성으로 적합함
- ④ Aflatoxin : 음성으로 적합함
- ⑤ Ochratoxin A : 음성으로 적합함
- ⑥ 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합하였음
- ⑦ 주원료별 유통기한 결과

주원료	산출개월 수	안전계수를 적용한 개월 수
갈근	34.31	24.01
강황	48.05	33.63

(2) 저장온도별 품질변화

① 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격		시험기간 (개월)						
			0	1	2	3	4	5	6
지표성분	Curcumin	0.6 mg (80~120%)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.63
	Puerarin	70mg (80~120%)	71.01	70.98	70.94	70.92	70.84	70.84	70.80
Aflatoxin	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
Ochratoxin A	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
성상	이미, 이취가 없고 고유 의 향미가 있는 연한 황 갈색의 분말		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하 카드뮴(Cd) : 1.0이하 비소(As) : 1.0이하 수은(Hg) : 0.5이하		0.1600 0.2125 0.0473 -	-	-	-	-	-	0.1052 0.0767 0.0242 0.0023

② 품질지표별 35℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격		시험기간 (개월)						
			0	1	2	3	4	5	6
지표성분	Curcumin	0.6 mg (80~120%)	0.64	0.64	0.63	0.63	0.63	0.62	0.62
	Puerarin	70mg (80~120%)	71.01	70.96	70.94	70.91	70.83	70.79	70.71
Aflatoxin	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
Ochratoxin A	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
성상	이미, 이취가 없고 고유 의 향미가 있는 연한 황 갈색의 분말		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하 카드뮴(Cd) : 1.0이하 비소(As) : 1.0이하 수은(Hg) : 0.5이하		0.1600 0.2125 0.0473 -	-	-	-	-	-	0.1052 0.0767 0.0242 0.0023

③ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격		시험기간 (개월)						
			0	1	2	3	4	5	6
지표성분	Curcumin	0.6 mg (80~120%)	0.64	0.63	0.63	0.63	0.62	0.62	0.61
	Puerarin	70mg (80~120%)	71.01	70.92	70.83	70.79	70.71	70.69	70.60
Aflatoxin	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
Ochratoxin A	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말		적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성		음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하		0.1600						0.1052
	카드뮴(Cd) : 1.0이하		0.2125	-	-	-	-	-	0.0767
	비소(As) : 1.0이하		0.0473						0.0242
	수은(Hg) : 0.5이하		-						0.0023

(3) 유통기한 설정시험 결과

갈근강황추출물을 가속시험(25, 35, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 대장균군, 지표성분(Curcumin, Puerarin), Aflatoxin, Ochratoxin A, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 가장 짧은 유통기한을 보인 지표성분 Puerarin의 0차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온 유통 시 유통기한은 34.31개월로 산출되었음. 산출된 유통기한에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.7을 곱하였을 때 24.01개월이 도출되어 최종 유통기한은 24개월로 결정하였음

9. 갈근강황추출물 함유 제품 산업화

가. 갈근강황추출물 함유 그녀의 뷰티 히알루론산 개발

- 제품명 : 그녀의 뷰티 히알루론산
- 유형 : 히알루론산, 비타민 A, 비타민 E
- 섭취방법 : 1일 2회, 1회 1캡슐을 물과 함께 섭취
- 성상 : 고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 호린 노란색의 내용물을 함유한 흰노란색 타원형 연질캡슐
- 기능성내용
[히알루론산] 피부건강에 도움을 줄 수 있음
[비타민 A] ① 어두운 곳에서 시각 적응을 위해 필요 ② 피부와 점막을 형성하고 기능을 유지하는데 필요 ③ 상피세포의 성장과 발달에 필요
[비타민 E] 유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요
- 제조공정
 - ① 원료 : 자체규격 검사를 거쳐 적합품에 한하여 원료로 사용
 - ② 칭량 : 위 원료를 배합비율에 따라 전자저울로 칭량
 - ③ 사별 : 칭량한 원료를 메쉬망을 이용 수동으로 사별
 - ④ 젤라틴 용해 : 피막원료, 정제수를 배합탱크에 투입하고 일정온도를 유지, 위 원료에 젤라틴을 투입 교반 후 진공상태에서 농축 및 탈기를 실시
 - ⑤ 혼합 : 사별한 원료를 콜로이드 밀 혼합기에 투입, 교반하여 혼합
 - ⑥ 충전 : 캡슐기체를 이용, 일정량(1캡슐 : 500 mg)을 충전·성형
 - ⑦ 건조 : 텀블러 건조기를 이용하여 건조
 - ⑧ 제습건조 : 성형된 캡슐을 제습건조실에서 건조
 - ⑨ 중간검사 : 건조가 완료된 제품을 중간검사를 실시(성상, 중량)
 - ⑩ 포장 : 중간검사 결과 적합한 제품을 포장기를 이용하여 포장한 후 외포장에 유통기한 등을 표시
 - ⑪ 최종검사 : 포장이 완료된 제품을 건강기능식품 규격에 의한 검사를 실시
 - ⑫ 보관출하 : 검사결과 적합한 제품에 한하여 보관출하
- 배합비
 - ① 기능성원료 : 히알루론산 13.334%, 레티닐 팔미트산염 혼합제 0.091%, D-알파-토코페롤 0.641%,
 - ② 기타원료 : 콩기름(대두유) 69.834%, 포도씨앗유 10.0%, 밀납 3%, 대두레시틴 2.5%, 생선콜라겐분말 0.4%, 강황갈근농축분말_SDC001 0.1%(춰뿌리 70%, 강황뿌리줄기 30%), 석류농축분말 0.1%,
 - ③ 캡슐원료 : 젤라틴 66%, 글리세린 33%, 이산화티타늄 1%
- 기준규격

- ① 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 노란색의 내용물을 함유한 흰노란색 연질캡슐
 - ② 히알루론산 : 표시량(120 mg/1,000 mg)의 80% 이상 120% 이하
 - ③ 비타민A : 표시량(210 µg RE/1,000 mg)의 80 이상 150% 이하
 - ④ 비타민E : 표시량(3.3 mg α-TE/1,000 mg)의 80% 이상 150% 이하
 - ⑤ 납(mg/kg) : 2.0 이하
 - ⑥ 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하
 - ⑦ 수은(mg/kg) : 0.5 이하
 - ⑧ 비소(mg/kg) : 1.0 이하
 - ⑨ 대장균군 : 음성
 - ⑩ 봉해시험 : 20분 이내
- 유통기한 : 제조일로부터 24개월까지

품목제조보고서	제품 사진
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;">  </div> <p>발급번호 : 1A0Y-UCJF-W00C-3N08-11H</p> <p>제 201728600811 호</p> <p style="text-align: center;">건강기능식품 품목제조신고증</p> <p>○ 영업허가(번호) : 제 20172860081 호</p> <p>○ 업 소 명 : 농업회사법인 주식회사 에스디씨</p> <p>○ 소 재 지 : 전라남도 담양군 예곡길 11-9</p> <p>○ 영업의 종류 : 건강기능식품벤처제조업</p> <p>○ 제 품 명 : 그녀의 뷰티 히알루론산 (유형: 히알루론산, 비타민 A, 비) 다민 E</p> <p>제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 : (뒤쪽 작성) 「건강기능식품에 관한 법률」 제7조와 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.</p> <p style="text-align: right;">2020년 12월 07일</p> <p style="text-align: center;">광주지방식품의약품안전청장</p> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div> <p style="font-size: small; text-align: center;">본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.</p>	



문서확인번호 : X4GV-IBSU-FBQQ-FPPI

시험 · 검사성적서

식품의약품안전처 지정번호 : 식품 제038호

발행번호	R20201119-0048		접수번호	200125510-001	
검사완료일	2020-11-19		접수연월일	2020-11-13	
제품명	그녀의부피하알루론산				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	히알루론산,비타민 A,비타민 E				
제조(수입)일	2020-11-07		유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명	차민석		업체명	(주)산들촌
	소재지	(57309)전라남도 담양군 담양읍 여곡길 11-9 전화번호: 061-381-8912 팩스번호: 061-381-8914 전자우편: shjeon@sdcfood.com			
제조원	업체명				제조국
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 품목제조.가공검사				

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	단서조항	비고
성상	고유의 색택과 향미 를 가지고 이미, 이취 가 없어야 한다.	고유의 향미가 있고 이미, 이취가 없는 호 린 노란색의 내용물을 함유한 흰노란색 타원 형 면질겉술	적합		
비타민A(%)	표시량의 80% ~ 150%	90% (190 µg RE/1000mg)	적합		210 µg RE/1000mg
비타민E(%)	표시량의 80% ~ 150%	143% (4.71 mgα- TE/1000mg)	적합		3.3 mgα- TE/1000mg
히알루론산(%)	표시량의 80% ~ 120%	108% (130 mg/1000mg)	적합	최종제품	120 mg/1000mg
납(mg/kg)	2.0 이하	0.0	적합		
카드뮴(mg/kg)	0.5 이하	0.0	적합		
대장균군	음성	음성	적합		
비소(mg/kg)	1.0 이하	0.0	적합		
수은(mg/kg)	0.5 이하	불검출	적합		
봉쇄시험	적합	적합(겉술 : 20분 이내 분해)	적합		



* 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너를 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

Page 1 of 2

나. 갈근강황추출물 함유 링케이드 그녀의 석류 개발

- 제품명 : 링케이드 그녀의 석류
- 식품의 유형 : 액상차

- 유통기한 : 제조일로부터 24개월
- 성상 : 적색의 액상으로 고유한 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.
- 포장 방법 및 포장단위 : 밀봉포장, 45 mL/포
- 원재료 또는 성분명 및 배합비 : 정제수 68.07%, 석류농축액[고형분 60% 이상] 20.6%, 프락토올리고당 7%, 자일리톨 2%, 식품혼합농축액[검은콩혼합추출농축액] 1.8%, 강황추출물혼합분말[강황갈근농축분말_SDC001] 0.53%
- 품질평가 : 성상, 이물, 대장균

품목제조보고서	제품 사진																																																												
<p>발급번호 : NHM-BJH1-2FA4-FRIS-FC0J</p> <p style="text-align: center;">식품(식품첨가물) 품목제조보고서</p> <table border="1"> <tr> <td>성명(법인명)</td> <td colspan="3">상년달일(법인번호)</td> </tr> <tr> <td>대표인</td> <td colspan="3">1973년 04월 23일</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td>전화번호</td> <td colspan="2">504</td> </tr> <tr> <td>전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬바이오 익산공장 1동 1층)</td> <td>팩스번호</td> <td colspan="2">031 695 8200</td> </tr> </table> <p>영업소 (주)프롬바이오 익산공장 소재지 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬바이오 익산공장 1동 1층)</p> <table border="1"> <tr> <td>식품의 유형</td> <td>액상차</td> <td>영업등록번호</td> <td>20190491135</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">링케이드 그녀의석류</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">제조일로부터24개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료 또는 성분명 및 배합 비율</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>용도 용법</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>보관방법 및 포장재질</td> <td colspan="3">맛장애 기재</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장단위</td> <td colspan="3">말봉요장/1ml, 10ml, 15ml, 20ml, 30ml, 45ml, 50ml, 100ml, 200ml, 300ml, 500ml, 945ml, 1L, 1.890ml, 2L, 3L, 3.780ml, 5L, 5.670ml, 10L, 15L, 20L, 25L, 100L, 200L, 250L</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">적색의 액상으로 고유한 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.</td> </tr> </table> <p>품목의 특성 <input type="checkbox"/> 고열량 - 저열량 식품 해당 여부 []해 []아니오 [O]해당 없음 <input type="checkbox"/> 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []예 [O]아니오 <input type="checkbox"/> 알관 - 알관 제품의 해당 여부 []비알관 [O]알관 []알관</p> <p>기타 * 유통전문판매원 - 농업회사법인(주)산들촌, 소재지 : 전남 담양군 예곡길 11-9</p> <p>「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 시험을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2020년 11월 10일 보고인 심태린</p> <p style="text-align: center;">전라북도 익산시장 귀하</p> <table border="1"> <tr> <td>품목보고번호</td> <td>20190491135-61</td> </tr> <tr> <td>처리부서</td> <td>환경안전국 위생과</td> </tr> <tr> <td>처리자성명</td> <td>최수빈</td> </tr> <tr> <td>처리일자</td> <td>2020년 11월 12일</td> </tr> </table> <p style="font-size: small;">본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.</p>	성명(법인명)	상년달일(법인번호)			대표인	1973년 04월 23일			주소	전화번호	504		전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬바이오 익산공장 1동 1층)	팩스번호	031 695 8200		식품의 유형	액상차	영업등록번호	20190491135	제품명	링케이드 그녀의석류			유통기한	제조일로부터24개월			품질유지기한				원재료 또는 성분명 및 배합 비율	맛장애 기재			용도 용법	맛장애 기재			보관방법 및 포장재질	맛장애 기재			포장방법 및 포장단위	말봉요장/1ml, 10ml, 15ml, 20ml, 30ml, 45ml, 50ml, 100ml, 200ml, 300ml, 500ml, 945ml, 1L, 1.890ml, 2L, 3L, 3.780ml, 5L, 5.670ml, 10L, 15L, 20L, 25L, 100L, 200L, 250L			성상	적색의 액상으로 고유한 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.			품목보고번호	20190491135-61	처리부서	환경안전국 위생과	처리자성명	최수빈	처리일자	2020년 11월 12일	
성명(법인명)	상년달일(법인번호)																																																												
대표인	1973년 04월 23일																																																												
주소	전화번호	504																																																											
전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬바이오 익산공장 1동 1층)	팩스번호	031 695 8200																																																											
식품의 유형	액상차	영업등록번호	20190491135																																																										
제품명	링케이드 그녀의석류																																																												
유통기한	제조일로부터24개월																																																												
품질유지기한																																																													
원재료 또는 성분명 및 배합 비율	맛장애 기재																																																												
용도 용법	맛장애 기재																																																												
보관방법 및 포장재질	맛장애 기재																																																												
포장방법 및 포장단위	말봉요장/1ml, 10ml, 15ml, 20ml, 30ml, 45ml, 50ml, 100ml, 200ml, 300ml, 500ml, 945ml, 1L, 1.890ml, 2L, 3L, 3.780ml, 5L, 5.670ml, 10L, 15L, 20L, 25L, 100L, 200L, 250L																																																												
성상	적색의 액상으로 고유한 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.																																																												
품목보고번호	20190491135-61																																																												
처리부서	환경안전국 위생과																																																												
처리자성명	최수빈																																																												
처리일자	2020년 11월 12일																																																												

다. 강황갈근농축분말_SDC001 개발

- 제품명 : 강황갈근농축분말_SDC001
- 식품의 유형 : 기타농산가공품
- 유통기한 : 제조일로부터 24개월
- 성상 : 노란색의 분말로 고유의 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.
- 포장 방법 및 포장단위 : 밀봉포장
- 원재료 또는 성분명 및 배합비 : 강황추출물혼합분말 100%[썩뿌리 70%(갈근, 국내산) 강황뿌리줄기 30%(강황, 국내산)]

- 품질평가 : 성상, 이물, 대장균

품목제조보고서	제품 사진																																																																		
<p>발급번호 : 04H1-TJ41-4FZA-YISS-EUF7</p> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> </div> <p style="text-align: center;">식품(식품첨가물) 품목제조보고서</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td rowspan="3" style="width: 10%; text-align: center;">보고인</td> <td style="width: 30%;">성명(법인명) 심태진</td> <td colspan="2">생년월일(법인번호) 1973년 04월 23일</td> </tr> <tr> <td>주소 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)</td> <td>전화번호 504</td> <td>휴대전화 031 695 8200</td> </tr> <tr> <td colspan="3">영장(상호) (주)프롬베이오 익산공장</td> </tr> <tr> <td rowspan="2" style="text-align: center;">영업소</td> <td colspan="2">영입등록번호 20190491135</td> <td>소재지 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">식품의 유형</td> <td style="width: 35%;">기타 농산가공품</td> <td style="width: 20%;">요청하는 품목제조 보고번호</td> <td style="width: 30%;">2019049113560</td> </tr> <tr> <td>제품명</td> <td colspan="3">강황갈근농축분말_SDC001</td> </tr> <tr> <td>유통기한</td> <td colspan="3">제조일로부터24개월</td> </tr> <tr> <td>품질유지기한</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>원재료 또는 성분명, 첨가제명</td> <td colspan="3">맛장에 기재</td> </tr> <tr> <td>용도 용법</td> <td colspan="3">맛장에 기재</td> </tr> <tr> <td>보관방법 및 포장재질</td> <td colspan="3">맛장에 기재</td> </tr> <tr> <td>포장방법 및 포장단위</td> <td colspan="3">원료포장(1g, 10g, 15g, 20g, 30g, 50g, 100g, 150g, 200g, 300g, 500g, 1kg, 2kg, 3kg, 5kg, 10kg, 15kg, 20kg, 25kg, 100kg, 150kg, 180kg, 190kg, 200kg, 218kg, 220kg, 230kg, 240kg, 250kg)</td> </tr> <tr> <td>성상</td> <td colspan="3">노란색의 분말로 고유의 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.</td> </tr> <tr> <td>품목의 특성</td> <td colspan="3"> ■ 고열량, 저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/>예 <input type="checkbox"/>아니오 <input type="checkbox"/>해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/>예 <input type="checkbox"/>아니오 ■ 알러지 유발 식품의 해당 여부 <input type="checkbox"/>바나나 <input type="checkbox"/>달걀 <input type="checkbox"/>밀 </td> </tr> </table> <p>기타 • 위탁생산내역 - 수탁자 : (주)화인에프티, 소재지 : 충남 공주시 정안면 차청로 3524, 위탁제조공정 : 건조 (본무건조) 공정* 유통관리번호 - 산출물, 소재지 : 전남 담양군 예곡길 11-9</p> <p>「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2020년 11월 05일 보고인 심태진</p> <p style="text-align: center;">전라북도 익산시장 귀하</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">품목보고번호</td> <td style="width: 35%;">20190491135-60</td> <td style="width: 15%;">처리부서명</td> <td style="width: 15%;">최수빈</td> <td style="width: 20%;">처리일자</td> <td style="width: 20%;">2020년 11월 10일</td> </tr> <tr> <td>처리부서</td> <td>환경안전국 위생과</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> </div> <p style="font-size: small; text-align: center;">본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.</p>	보고인	성명(법인명) 심태진	생년월일(법인번호) 1973년 04월 23일		주소 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)	전화번호 504	휴대전화 031 695 8200	영장(상호) (주)프롬베이오 익산공장			영업소	영입등록번호 20190491135		소재지 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)	식품의 유형	기타 농산가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2019049113560	제품명	강황갈근농축분말_SDC001			유통기한	제조일로부터24개월			품질유지기한				원재료 또는 성분명, 첨가제명	맛장에 기재			용도 용법	맛장에 기재			보관방법 및 포장재질	맛장에 기재			포장방법 및 포장단위	원료포장(1g, 10g, 15g, 20g, 30g, 50g, 100g, 150g, 200g, 300g, 500g, 1kg, 2kg, 3kg, 5kg, 10kg, 15kg, 20kg, 25kg, 100kg, 150kg, 180kg, 190kg, 200kg, 218kg, 220kg, 230kg, 240kg, 250kg)			성상	노란색의 분말로 고유의 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.			품목의 특성	■ 고열량, 저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 ■ 알러지 유발 식품의 해당 여부 <input type="checkbox"/> 바나나 <input type="checkbox"/> 달걀 <input type="checkbox"/> 밀			품목보고번호	20190491135-60	처리부서명	최수빈	처리일자	2020년 11월 10일	처리부서	환경안전국 위생과					
보고인		성명(법인명) 심태진	생년월일(법인번호) 1973년 04월 23일																																																																
		주소 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)	전화번호 504	휴대전화 031 695 8200																																																															
	영장(상호) (주)프롬베이오 익산공장																																																																		
영업소	영입등록번호 20190491135		소재지 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72(주프롬베이오 익산공장 1동 1층)																																																																
	식품의 유형	기타 농산가공품	요청하는 품목제조 보고번호	2019049113560																																																															
제품명	강황갈근농축분말_SDC001																																																																		
유통기한	제조일로부터24개월																																																																		
품질유지기한																																																																			
원재료 또는 성분명, 첨가제명	맛장에 기재																																																																		
용도 용법	맛장에 기재																																																																		
보관방법 및 포장재질	맛장에 기재																																																																		
포장방법 및 포장단위	원료포장(1g, 10g, 15g, 20g, 30g, 50g, 100g, 150g, 200g, 300g, 500g, 1kg, 2kg, 3kg, 5kg, 10kg, 15kg, 20kg, 25kg, 100kg, 150kg, 180kg, 190kg, 200kg, 218kg, 220kg, 230kg, 240kg, 250kg)																																																																		
성상	노란색의 분말로 고유의 향, 맛을 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.																																																																		
품목의 특성	■ 고열량, 저영양 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 ■ 영·유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 ■ 알러지 유발 식품의 해당 여부 <input type="checkbox"/> 바나나 <input type="checkbox"/> 달걀 <input type="checkbox"/> 밀																																																																		
품목보고번호	20190491135-60	처리부서명	최수빈	처리일자	2020년 11월 10일																																																														
처리부서	환경안전국 위생과																																																																		

10. 건강기능식품 개별인정형 원료 신청 자료 준비

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서		처리기간	
		120일	60일
신청인	대표자	차민석	
	업체명(기관명)	농업회사법인(주)에스디씨	영업의 종류 건강기능식품벤처제조업
		허가/신고/등록번호	20172860081
	소재지	(주소) 전남 담양군 담양읍 예코길 11-9 (전화번호) 061)381-8912 (Fax) 061)381-8914	
	수입건강기능식품	수리번호	
수출국			
제조회사			
소재지			
원료명	갈근강황추출물		
<p>「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.</p> <p style="text-align: center;">2020 년 12 월 일</p> <p style="text-align: center;">신청인 농업회사법인(주)에스디씨 (인)</p> <p style="text-align: center;">식품의약품안전처장 귀하</p>			
<p>※ 구비서류</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제출자료 1부 2. 제출자료 수록 저장매체(CD 등) 1개 3. 원료, 제품 또는 시제품 4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 5. 국내·외 시험·검사기관이 발행한 시험성적서 		<p>수수료</p> <p>신규 1,900,000원</p> <p>변경 800,000원</p>	
<p>※ 제출자료</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성에 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 내용에 관한 자료 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 			

210mm×297mm[일반용지 60g/㎡(재활용품)]

**기능성원료 인정 신청을 위한
제 출 자 료**

1. 제출자료의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(■최초, □변경*)

업 체 명(기관명)	농업회사법인(주)에스디씨 (대표자 : 차민석)				
영업의 종류	건강기능식품벤처제조업	허가/신고/등록번호	제20172860081호		
주소 및 연락처	* 전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9 * (연락처) 061-381-8912 (팩스) 061-381-8914				
	담당자	(이름) 전 수 화 (연락처) 061-381-8912			
신청 원료명	갈근강황추출물				
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	경년기 여성건강 개선에 도움을 줄 수 있음	
			신청 섭취량	갈근강황추출물로서 1.0g/일	
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)		
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)		
·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>					
·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>					
고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
	·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
	·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>				
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>				
국내제조 <input checked="" type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국	
		제조회사			
		소재지			
모동토의 <input type="checkbox"/>	실시 날짜 :				

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

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분 호	비고
1. 제출자료 전체의 종합 요약본		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용연황 등에 관한 자료				
2.1	기원	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.2	개발경위	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.4	국내·외 사용 현황	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input checked="" type="checkbox"/> 국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 (모두, 일부) <input type="checkbox"/> 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 기능성분 <input checked="" type="checkbox"/> 지표성분		
4.3	영양성분정보자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
5. 기능성분 또는 지표성분 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 시판 표준품 <input type="checkbox"/> 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 공인 시험방법 <input checked="" type="checkbox"/> 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 벨리데이션 자료 추가)			

연번	제출자료	제출여부	첨부분호
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	* 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
	* 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : 나)			
7.1	섭취근거 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.4	인체적용시험 정보	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		3개월 반복투여독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		유전독성시험	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (논문 1 편) * 시험기관 : 경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.2	동물시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (논문 1 편) * 시험기관 : 경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)	
8.3	인체적용시험	<input checked="" type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 1편, 논문 1편) * 인체적용시험기관 : 세명대학교 한방병원	
		<input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	

□ 전체 내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	갈근강황추출물	
2. 원재료	갈근(학명 : <i>Pueraria lobata</i> Ohwi 사용부위 : 뿌리) 강황(학명 : <i>Curcuma longa</i> L. 사용부위 : 뿌리줄기)	
3.기능 (지표)성분	지표성분 : 갈근 Puerarin, 강황 Curcumin	
4. 제조 공정	1) 갈근(<i>Pueraria lobata</i> Ohwi)→추출→여과→농축→덱스트린배합→분무건조→갈근추출분말 2) 강황(<i>Curcuma longa</i> L.)→추출→여과→농축→덱스트린배합→분무건조→강황추출분말 3) 혼합(갈근추출분말+강황추출분말 = 7:3) → 갈근강황추출물(신청원료)	
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말 2) Curcumin (지표성분) : 0.6 mg/g / Puerarin (지표성분) : 69.3 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1.0 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1.0 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하 7) 대장균군 : 음성 8) 총아플라톡신(B1) : 10(6) µg/kg 이하	
	기능(지표) 성분 시험법	자사시험방법(시험법 밸리데이션 완료) - Puerarin : HPLC UV 254nm, C ₁₈ column (250*4.6mm, 5µm) - Curcumin : HPLC UV 425nm, C ₁₈ column (250*4.6mm, 5µm)
	규격 외 (잔류농약)	「수입식품등 검사에 관한 규정」에 따라 잔류농약에 대하여 국내 식품위생 검사기관(한국건강기능식품연구원)시험결과 58종 중 58종 모두 불검출을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취 경험이 있는 갈근(학명 : <i>Pueraria lobata</i> Ohwi 사용부위 : 뿌리)와 강 황(학명: <i>Curcuma longa</i> L. 사용부위 : 뿌리줄기)을 20%주정으로 추출한 것으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았 으므로 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거	<인정현황> • 국내 : 갈근, 강황, 동의보감, 대한민국 약전, 식품공전 등재 • 미국 : GRAS, FAO, 미국약전 등재 • 일본 : 일본약국방 등재 <사용현황> • 국내 : 갈근과 강황은 식품 및 건강기능식품 대량 유통중 • 미국, 일본, 중국 등 : 갈근과 강황 함유 제품이 대량유통
	안전성 정보	• 섭취시 주의사항으로 "어린이, 임산부와 수유부의 섭취주의", "의약품(혈액 항응고제) 복용 시 섭취주의"

	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 갈근추출분말의 섭취량 : 갈근추출분말로서 0.7g/일(갈근으로서 3.1g/일) - 미국 등 갈근 제품에서 갈근으로서 일일 섭취량 : 2~25 g/일 • 문헌에 의한 통상섭취량: 0.02~10g/일 ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고 최대안전 섭취량, 일일허용섭취량 이내임 ○ 강황추출분말의 섭취량 : 강황추출분말로서 0.3g/일(강황으로서 2.1g/일) - 미국, 일본 등 강황 제품에서 강황으로서 일일 섭취량 : 1~10 g/일 • 유사원료(발효율금, 제2013-4호) 1일섭취량 : 3 g/일 • 유사원료(강황추출물, 제2014-2호) 1일섭취량 : 1 g/일 • 유사원료의 사용량 (혼합음료, 기타가공품) : 3 g/일 • 문헌에 의한 통상섭취량 : 3~9g/일 ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고 최대안전 섭취량, 일일허용섭취량 이내임
	인체적용시험	시험물질에 의한 이상반응은 확인되지 않음 (1.0 g/일 섭취 기준)
	독성 시험	의사결정도 판단결과 "나"에 해당하여 독성시험을 생략하였음
	기타 사항	- 특이사항 없음
	섭취 시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> - 어린이, 임산부와 수유부의 섭취주의 : Medlineplus, Drugdigest, PDR for Herbal Medicines, WHO monograph - 의약품(혈액항응고제) 복용 시 섭취주의 : Medline Plus, NCCAM, DrugDigest, PDR for Herbal Medicines, Health Canada
7. 기능성	신청 기능성	경년기 여성건강 개선에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	갈근강황추출물로서 1g/일
	시험관시험	<p>[신청원료]</p> <p>◆ RAW264.7, 시험물질(1,5,10 µg/mL) 72시간 처리</p> <ul style="list-style-type: none"> - 5, 10 µg/mL에서 c-fms 단백질 발현 유의적으로 감소 - 1, 5, 10 µg/mL에서 ERK, c-fos, p38, p65 단백질 발현 유의적으로 감소 <p style="text-align: right;">(대조군 대비, p<0.05)</p> <p>※ 시험물질 : 갈근강황추출물</p>
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <p>◆ 난소절제 SD Rats(8주령),8주, 경구투여</p> <ul style="list-style-type: none"> - 혈중 ALP, OC, OPG 농도 유의적으로 증가 - 혈중 RANKL, M-CSF 농도 유의적으로 감소 - 골밀도 유의적으로 증가 - RANKL, Cathepsin K, MMP9 mRNA발현 유의적으로 감소 <p style="text-align: right;">(대조군 대비, p<0.05)</p> <p>※ 시험물질 : 갈근강황추출물</p>

인체적용시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kupperman index 총점의 변화치 - 12주 후 각 군내에서 통계적으로 유의적 차이가 있었으나, 군간 유의적 차이는 없었음(p-value=0.7012) • MENQOL, E2, Hot flush VAS, Sweating VAS, 안면홍조 점수, 안면홍조 1회 지속 시간 - 시험군과 대조군내에서 통계적으로 유의적 차이가 있었으나(시험군 : p-value=0.0001, 대조군 : p-value=0.0001), 군간 유의적 차이는 없었음 <p>※ 인체적용시험기관 : 세명대학교 부속 제천한방병원(2019), 시험책임자 : 김형준</p>
기타 사항	

가. 기원

- 갈근(葛根, 칩 : *Pueraria lobata* Ohwi)은 콩과(Leguminosae) 칩속(*Pueraria* genus)에 속하는 칩의 뿌리로서 한방에서 피로회복, 숙취제거, 고혈압, 당뇨 등에 효능이 있고, 갈근에 함유된 이소플라본은 여성호르몬과 효능이 유사해 폐경으로 인한 갱년기 질환 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있음. 갈근은 신농본초경, 상한론, 본초강목에서 발열, 설사 및 구토를 완화한다고 기록되어 있음
- 강황(薑黃 : *Curcuma longa* Linne)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 열대작물로서 다년생 숙근성(宿根性) 초본 식물로 동인도지방에서 기원전 970년경 재배가 시작되었으며, 향신료로 사용되어 왔으며 우리나라를 비롯한 동남아시아에서 재배되고 있음, 동의보감, 대한약전, PDR for Herbal Medicines, WHO monographs on selected medicinal plants(Vol.1) 등에 질병치료에 사용되었다는 기록이 있음

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	강황	칩(갈근)	비고(참고)
학명	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Pueraria lobata</i> O.	https://www.foodsafetykorea.go.kr
원산지	전남 진도	전북 남원	
사용 부위	뿌리	뿌리	

나. 개발경위

- 당사는 갈근강황추출물을 이용하여 갱년기 여성건강 개선 도움을 주는 기능을 확인하기 위하여 칩(갈근)과 강황을 각각 추출하여 혼합하여 원료로 하였다. 그 추출물을 대상으로 *in vitro*, *in vivo* 활성평가를 통하여 갈근강황추출물의 활성을 확인하였고, 인체적용시험을 수행하여 갱년기 여성건강 개선 기능을 확인하고자 하였음
- 갈근강황추출물의 갱년기 여성건강 개선 정부지원 연구 수행 실적
 - ▷ 강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화
 - 지원사업명 : 고부가가치식품기술개발사업
 - 주관기관 : 농업회사법인(주)산들촌
 - 개발기간 : 2018. 04. 30 ~ 2020. 12. 31.
 - 사업내용 : 갈근강황추출물 제조공정 표준화연구, *in vitro*, *in vivo* 활성평가, 인체적용시험 1건

다. 국내·외 인정·허가 현황

(1) 국내

- 신청원료 : 갈근강황추출물

1) 갈근

- 「식품공전」: 식품에 사용가능한 원료의 목록에 “칩”(품목번호 A가158500)등재
- 「대한민국약전」: 식품의약품안전처고시 고시 제2019-11호, 의약품 각조 제2부 “갈근(葛根, Pueraria Root)”가 등재

2) 강황

- 「식품공전」: 식품에 제한적으로 사용가능한 원료의 목록에 “강황”(품목번호 B가000500)등재
- 「식품공전」: 제4. 식품별 기준 및 규격, “12-3. 카레”가 등재
- 「대한민국약전」: 고시 제2018-16호, 의약품 각조 제2부 “강황(薑黃, Curcuma Longa Rhizome)”가 등재

- 유사원료(강황)가 건강기능식품 기능성 원료로 인정: 강황추출물, 발효울금
 - 제2013-4호, 발효울금, 한국인스팜(주)
 - 제2014-2호, 강황추출물, (주)세광에스티코퍼레이션

인정 번호	원료명	제조방법	지표성분	기능성내용	일일섭취 량
2013-4	발효울금	황국을 이용하여 울금을 발효함	CURCUMIN	간건강에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용이 미흡함	3g
2014-2	강황 추출물	강황을 물을 이용하여 추출	p-coumaric acid	관절건강에 도움을 줄 수 있음	1g

(2) 국외

(가) 갈근

- ① 일본약국방 : 제17개정 Pueraria Root로 등재
- ② 중국약전 : 2015년판 PUERARIAE LOBATAE RADIX로 등재

(나) 강황

- ① GRAS : BCM-95(*Curcuma long* L.) 등재
- ② FAO : Turmeric (*Curcuma long* L.) 등재
- ③ USP 41 : Turmeric, Powdered Turmeric, Powdered Turmeric extract으로 등재
- ④ 일본약국방 : 제 17개정, Turmeric으로 등재
- ⑤ JECFA : Turmeric Oleoresin(심황색소), 및 강황에서 분리한 Curcumin을 식품첨가물로 인정하고 있음
- ⑥ Traditional Chinese Medicine : 달여 먹었을 시, 1일 3~9g 복용 가능

라. 국내·외 사용 현황

(1) 갈근(취)

(가) 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의 사항	섭취 용도	유통량	기 타
	칩분말	맑은들	하루 3번 1회, 3~5g	칩뿌리(국산) 100%	없음	기타 가공품		
	우리엄마 칩100	(주)엔존 비엔에프	1일 2회, 10~15환씩 물과 함께 섭취	칩뿌리분말 (국산100%)	없음	기타 가공품		
	비락생칩즙	(주)팔도		칩추출액(고형 분7.5%,국산, 정제수)100%	없음	액상차		
	칩환	환이랑	하루 3번 1회 20~30환	칩뿌리(국산)90 %	없음	기타 가공품		

(나) 국외

<유통 판매 현황 표>




제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의 사항	섭취 용도	유통량	기타
	KUDZU ROOT	NATURES WAY	1일 3회, 1회 2캡슐	2cap당 1,226 mg proprietary blend(Kudzu(root), Kudzu Extract(root))		Dietary supplement		
	Full Spectrum KUDZU	Planetary Herbals	1일 2회, 1회 2캡슐	2cap당 칩뿌리추출물 400 mg과 칩꽃 100 mg	항알코올 효과	Herbal supplement		
	KUDZU Root Standardized Extract	Naturetion	3캡슐	3cap당 1,000 mg Kudzu extract		Dietary supplement		
	KUDZU Root	PipingRock	1일 1~2회, 1회 1캡슐	1cap 당 800 mg		Herbal supplement		
	Kudzu Root 10:1 Extract 4500 mg	Terraviva	티스푼 1/4을 물 한컵에 저어 하루에 3번 식사와 함께 섭취			Dietary supplement		
	Kudzu Root	Swanson premium	1일 1회 1회 1캡슐	1cap 당 500 mg	심혈관 및 간 보호 효과	Herbal supplement		

(2) 강황(울금)

(가) 국내



<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취시 주의사 항	섭취 용도	유통 량	기타
	속이편한 발효울금	진도강황 영농조합 법인	2~3 g	-발효울금분말 100% -1일 2~3회, 식후1회 1g을 음용수와 함께 음용함.	없음	기타 가공품	1.5 ton	
	3분 백세카레	오뚜기	2.79 g	-카레분1.2% (강황31.9%(인도산)) -카레페이스트1% (카레분2.3%)	없음	식품		
	자연드림 우리카레	쿠팡푸드시스 템(주)	1.769 g	-생협카레분10.26% (울금23%(국산))	없음	식품		
	백세발효 강황카레	오뚜기	2.541 g	-발효강황분1.25% (강황 83.264%(인도 산)) -카레분10% (강황 31.95%(인도 산))	없음	식품		
	왕실 울금분말	진도강황 영농조합 법인	3 g	-진도산울금분말 100% -1일 3회, 식후 1g 복용	없음	기타 가공품	2 ton	
	진도 울금의 힘	진도강황 영농조합 법인	80 mL	-울금 외 식물 추출액 93.06% <울금 53.3%, 생강18.7%, 대추, 구 기자, 감초>	없음	울금 함유 가공 식품	5 ton	
	진도울금 100과립	진도강황 영농조합 법인	1.5 g	- 울금 100%	없음	울금 함유 가공 식품		

	테라큐민 플러스90	(주)서흥	2 g	- 커큐민 180 mg	없음	울금 함유 가공 식품		
	인스팜 발효울금	한국 인스팜(주)	3 g	- 국내산 진도 울금 발효 - 1일 3회, 1회 2캡슐 복용	간기능 개선에 도움을 줌	건강 기능 식품		
	관절엔 강황	(주)뉴트리바 이오텍	1 g	- 1일 1회, 1회 2정 복용 - 강황추출물(인도산), 건조효모, 비타민 D3혼합제제, 말토 텍스트린 등	관절건 강에 도움을 줄수 있음	건강 기능 식품		





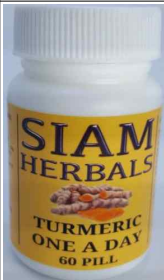
(나) 국외

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일 섭취량	표시내용	섭취 시 주의 사항	섭취 용도	유통 량	기타
	발효울금 정	(주)류큐 바이오 리스개발	3 g	- 100 g당 생울 금 97 g 함유, 쿠르쿠민 2.0 g~3.5 g 함유	없음	울금 함유 가공 식품		
	발효울금차	오리히로 주식회사	3 g	- 1포를 물 1L에 넣어 끓임	없음	다류		

	발효울금차	OKINAW AKENNB USSANN KOUSHA	2 g	- 1.5ℓ의 물에 2 팩의 차를 넣고 끓임	없음	다류		
	울금농축 액기스 (과립)	오리히로 주식회사	4.8 g	- 1포(1.5g)중 쿠르쿠민 70 mg 발효울금분말 (유산균발효)200 mg - 1포당 쿠르쿠 민 70 mg 함유	없음	울금 함유 가공 식품		
	Maximum Strength Fermented Turmeric	Swanson	0.76 g	1cap 당 - Fermented Turmeric (rhizome) 760 mg	-위와 간 보호	dietary supple ment		
	Chlorella & Fermented Turmeric	Swanson	0.99 g	1 tablet 당 - Japanese Chlorella 495 mg - Fermented Turmeric(rhizom e) 495 mg		dietary supple ment		
	울금의 힘	하우스 식품 주식회사	2 g	- 울금엑기스드링크 (생울금 환산 약 10 g) - 1병 쿠르쿠민 30 mg	없음	식품 (청량 음료)		
	울금의 힘 (오렌지맛)	하우스 식품 주식회사	2 g	- 울금엑기스드링 크 (생울금 환산 약 10 g) - 1병 쿠르쿠민 30 mg	없음	식품 (청량 음료)		
	울금의 힘 (SUPER)	하우스 식품 주식회사	2.4 g	- 보라색울금엑 기스(가을울금이 약 12 g, 보라색 울금 약15g) - 1병 쿠르쿠민 40mg	없음	식품 (청량 음료)		

	울금의 힘 (과립)	하우스 식품 주식회사	2 g	- 1포당 쿠르쿠 민 30 mg 함유	없음	울금 함유 가공 식품		
	울금	주식회사 황켈	2 g	- 1일 4정 (1,012 mg)당 울금엑기스 400 mg 쿠르쿠민 30 mg	없음	울금 함유 가공 식품		
	가을울금 100%분말	오리히로 주식회사	하루 1~3 g	- 하루 1~3 g을 물과 함께 섭취	없음	식품용 분말		
	말망 울금 100%분말	말망 주식회사	없음	- 제품 200 g당 쿠 르쿠민 7,000 mg 함유 - 물 또는 온수에 녹 여 1/2~1잔 정도 하루에 2~3번 섭취	없음	식품용 분말		
	고농도 가을울금 엑기스 정	이토 한방제약 주식회사	3.284 g	- 1일 5정(1.3g)당 쿠르쿠민 70 mg - 가을 울금 분말 3,284 mg 함유	없음	울금 함유 가공 식품		
	고농도 가을울금	YUWA	2.5 g	1캡슐 당 - 함유량 : 울금 추출물 (쿠르쿠 민 90%)100 mg (가을울금으로 서 2.5 g)	없음	울금 함유 가공 식품		

	Turmeric extract 5102	Vitamin Research Products	2.5 g ~ 7.5 g	2cap 당 -Turmeric(<i>Curcuma longa</i>)root and rhizomes extract 1,000 mg	-위장장애와 가슴통증 감소 -면역기능 증진	dietary supplement		
	Turmeric sw1075	Swanson	1.44 g	2cap 당 -Turmeric(<i>Curcuma longa</i>)(rhizome) 1.44 g	-간과 소화기계에 도움	dietary supplement		
	Turmeric supreme	Gaia herbs	2.5 g	1cap 당 - Turmeric Root EtOH Extract 330 mg (<i>Curcuma longa</i>) - Turmeric Root Supercritical Extract(<i>Curcuma longa</i>) 60 mg * Each 1 capsule contain 2500 mg crude herb equivalent	-심장 심혈관기능 유지	dietary supplement		
	Turmeric /Curcumin 5417	Nature's Bounty	0.7g	1cap 당 - Turmeric (<i>Curcuma longa</i> root) 450 mg -Turmeric Extract (<i>Curcuma longa</i> root) 50 mg	-항산화효과	herbal supplement		
	Turmeric	SIAM HERBALS	5g	1cap 당 - Turmeric Extract (<i>Curcuma longa</i> root)500 mg		herbal supplement		

	Turmeric Extract Curcumin C3 Complex	VitaCost	5.8 g	2cap 당 -Turmeric Extract (<i>Curcuma longa</i>) (standardized to 95% curcuminoids) (rhizome) 1160 mg - Curcuminoids 1100 mg - Black Pepper Extract (piper nigrum) 5 mg	-항산화 효과 -항염증 효과 -뇌세포 보호 -간보호 효과	herbal supplement		
	Curcumin C3 Complex	Doctors Best	2 g	1cap 당 - Turmeric root (<i>Curcuma longa</i>) 1000 mg - Standardized to 95% Curcuminoids 950 mg - Black pepper fruit extract 5 mg		dietary supplement		
	Turmeric Extract	Source Naturals	5.25 g	1cap 당 - Turmeric Rhizome Extract(333mg) 350 mg - Bromelain (extracted from pineapple) 50mg -Black Pepper Fruit Extract 3.5 mg	-항산화 효과 -간보호	dietary supplement		
	Turmeric Tablets 10,000mg	nature's best	10 g	1 cap 당 -Turmeric Root extract 500 mg Providing 95% curcumins, equivalent to 10,000 mg of turmeric spice		food supplement		
	Turmeric 10,000mg	Lambert	10 g	1 tablet 당 - 10,000 mg Turmeric Spice (500mg of turmeric root extract) 95% Curcumins	-항염증 효과	food supplement		

3절.연구개발성과

1.국내외논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	갈근강황추출물의 갱년기 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가	대한한방부인과학회지	안하영, 허다희, 김용재, 차민석, 이동녕, 김형준	33(4)	대한민국	대한한방부인과학회	비SCI	2020.11.27	1229-4992
2	강황과 갈근 주정추출 혼합물의 조골세포와 파골세포 분화에 미치는 영향	한국식품영양과학회지	이민희, 박수정, 윤정문, 김다경			한국식품영양과학회	비SCI	게재예정	
3	Combination of <i>Pueraria lobata</i> Ohwi and <i>Curcuma longa</i> L ethanol extracts alleviates postmenopausal symptoms in ovariectomized rats	applied science	Minhee Lee			MDPI	SCI	게재예정	

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Food,Nutrition and Health: Human microbiome	전수화	2018.11.02	BEXCO, 부산	한국
2	Food,Nutrition and Health: Human microbiome	이민희	2018.11.02	BEXCO, 부산	한국
3	The Fourth Industrial Revolution: The Role of Food & Nutritional Sciences	이민희	2019.10.24	제주국제컨벤션센터, 제주	한국
4	The Fourth Industrial Revolution: The Role of Food & Nutritional Sciences	김용재	2019.10.24.	제주국제컨벤션센터, 제주	한국
5	Healthy Aging & Sustainable Life	이민희	2020.10.22	제주국제컨벤션센터, 제주	한국

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	복합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절 이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물	대한민국	농업회사 법인(주) 산들촌 외 1명	2019.10.23	10-2019- 0132264				
2	강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절 이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물	대한민국	농업회사 법인(주) 산들촌 외 1명	2019.10.23	10-2019- 0132265				

4. 사업화 성과 및 매출실적

가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	5 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	10 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.1% 국외 : 0.001%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.2% 국외 : 0.002%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			0위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			500위

나. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1년			
	소요예산(백만원)	50			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	5	10	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0.1	1
		국외	0	0.01	0.02
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	여성관련 건강기능식품, 기능성 표시식품 개발 예정				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	1	2	
	수 출	0	1	2	

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표

- 국내산 강황, 갈근을 이용한 고부가가치 식품 개발
- 갈근강황추출물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 여성갱년기 개선 활성 평가
- 갈근강황추출물의 인체적용시험 연구
- 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청
- 갈근강황추출물 함유 건강기능식품 산업화

2절. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	척도 (점수)	달성도 (%)
1차 년도 (2018)	연구시료 4 종 제작	국내산 강황, 갈근을 수 급하여 관능평가 및 지 표성분 분석 후 연구시 료로 선정	전남 진도산 강황과 전북 남 원산 갈근을 수급하여 관능평 가를 실시하였으며, 강황의 지 표성분 Curcumin과 갈근의 지표성분 Puerarin을 정량분 석 함	5	100
		강황, 갈근을 물, 20%주 정으로 추출	추출, 농축, 동결건조 방법으 로 연구시료 제작	5	100
	강황등 복합 추출물 제조 공정 표준화	강황과 갈근 3:7, 5:5, 7:3 추출물 혼합물과 3:7, 5:5, 7:3 복합추출물으로 대상으로 선정	협동연구기관에서 강황+갈근 추출물 in vitro 평가후 대상 소재 선정	10	100
		강황+갈근(5:5)복합추출 물 연속 3LOT 생산	FGMP 인증기관에서 연속 3LOT 생산	5	100
	강황등 복합 추출물 지표 성분 시험법 밸리데이션	강황(Curcumin), 갈근 (Puerarin) 지표성분 분 석	제조공정 표준화를 생산된 3LOT를 대상으로 지표성분 분석	20	100
		지표성분의 정밀성, 특이 성, 직선성, 정확성 분석	HPLC를 이용하여 분석	20	100
	강황, 갈근의 여성 갱년기 개선 활성평 가(in vitro)	세포실험을 통한 강황, 갈근 추출물의 여성갱년 기 개선 생리활성 평가	세포독성 평가 ALP 활성 측정 유전자 발현측정	20	100
		난소절제를 통한 골다공 증 동물 모델 및 식이 제조	2차년도 동물 실험을 위한 식 이제조 normal control과 sham을 제 외한 모든 군은 9주령에 난소 절제술을 시행하고, 일주일 회 복기간을 주고 실험을 수행함	15	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	척도 (점수)	달성도 (%)
2차 년도 (2019)	인 체 적 용 임 상 연구	임상연구 자료집(IB) 작성	IB 작성 완료	10	100
		인체적용시험계획서 작 성 및 IRB승인	세명대학교부속제천한방병원 IRB승인 완료	10	100
		피험자 모집	피험자 모집 중 (3차년도 계속)	15	100
	복합추출물 시험 법 벨리데이션	갈근강황추출물 시험법 벨리데이션	갈근강황추출물 지표성분 시 험법 벨리데이션 완료	10	100
	개 별 인 정 형 건 강 기능 식품 예 상 원 료 기 준 및 규 격 설 정	식품의약품안전처의 기 준에 따라 갈근강황추 출물의 기준규격 설정	식품의약품안전처의 기 준에 적합한 기준규격 설정 완료	10	100
		전문시험기관(GLP) 시 험 의뢰	한국건강기능식품연구원 에서 평가완료(적합)	5	100
	강 황, 갈 근 의 여 성 갱 년 기 개 선 활 성 평 가 (<i>in vivo</i>)	갈근강황추출물 배합비 결정을 위한 세포실험	최대 활성을 가지는 갈근추 출물과 강황추출물의 배합비 결정 완료(7:3)	10	100
		갈근강황추출물 동물실험	양성대조군(의약품, 건강기능 식품), 시험물질(저/고농도)를 대상으로 동물실험 완료 갈근강황추출물의 여성갱년 기 활성 확인	30	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	척도 (점수)	달성도 (%)
3차 년도 (2020)	인체적용 임상 시험	피험자 110명 완료	만 45~65세미만 여성 110명 완료	10	100
		1, 2차 기능평가	12주 섭취 후 Kupperman Index 등 기능 평가 완료	10	100
		결과보고서 작성	연구결과 통계처리 후 결과 보고서 작성 완료	10	100
	개별인정형 건강기능식품 원료인정서 작성	식약처고시에 따라 개별인정 원료인정 신청서 작성	식약처고시에 따라 개별인정 원료인정 신청서 작성 완료	10	100
	개별인정형 건강기능식품 원료 유통기간 설정시험	식약처 가이드라인에 따라 유통기한 설정 시험	25℃, 35℃, 45℃에서 6개월 간 가속시험 완료	15	100
	건강기능식품 제품 산업화(고시형 원료+개발원료)	기 산업화된 건강기능식품 원료와 갈근강황추출물 혼합하여 산업화	건강기능식품 원료 히알루론산과 갈근강황추출물을 혼합하여 건강기능식품 산업화 완료	20	100
갈근강황추출물의 여성갱년기 개선 기작 규명	에스크로젠, 골대사, 유전독성 등 평가를 통하여 여성갱년기 기작 규명	2차년도 동물실험에서 적출한 자궁조직 등을 이용하여 기작규명 완료	25	100	

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

- 시험관, 동물모델 연구에서 갈근강황추출물의 여성갱년기 증상 개선이 확인되었으나 인체적용 임상연구의 기간 비교에서 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못하였음, 임상연구 결과 미비로 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청을 하지 못하였음
- 인체적용 임상연구 결과 갈근강황추출물 섭취군의 섭취 전후 비교에서 1, 2차 기능평가 지표가 통계적으로 유의성 있음을 확인하였음, 위약 제조시 사용한 부원료 중 장건강에 도움이 될 것으로 예상되는 결정셀룰로오스를 배제하고, 섭취용량을 재검토하여 임상시료를 제작하고, 바이오마커로 객관성을 높이기 위하여 유방밀도, 자궁내박 두께 등을 추가하여 임상 재시험을 추진할 것임

<인체적용 임상연구에서 유효성 자료 확보하지 못한 사유>

- 문헌조사에서 갱년기 여성건강에 도움이 되는 것으로 알려진 갈근과 강황을 추출하여 시험관 연구와 동물모델연구에서 갱년기 관련 지표를 확인하였고 이를 근거로 안전성과 경제성을 검토하여 인체적용 임상연구에서 섭취용량을 갈근강황추출물로서 1.0 g/일로 설정

하였음, 그러나 섭취용량이 낮았던 것으로 판단됨

- 만 45~65세 피험자(110명)를 대상으로 시험군을 무작위 배정하여 임상연구를 수행하였음, 그 결과 갈근강황추출물 투여군의 평균 연령은 55.6세로 높았음
- 피험자 선정시 쿠퍼만인덱스 총점이 10이상인자, 6개월 이상 무월경인자, FSH 30 mIU/mL 이상인자를 피험자로 선정하다 보니 양질의 피험자 모집이 이루어지지 못하였음

<극복 계획>

- 인체적용 임상연구시 양성대조군으로 홍삼(갱년기 여성건강 도움 건강기능식품 원료) 투여군을 설정 3개 투여군(갈근강황추출물군, 홍삼군, 대조군)으로 총 피험자 120명(각 40명) 대상 갈근강황추출물의 갱년기 여성 건강 확인
- 갈근강황추출물의 섭취용량을 1.5 g으로 상향 조정
- 피험자 선정시 양질의 피험자 모집하기 위하여 선정기준 상향 조정
 - 만 45세 이상, 60세 미만 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성
 - 3개월 이상 무월경인 자
 - FSH 30 mIU/mL 이상, E2 50 pg/mL이하인 자
 - 쿠퍼만인덱스 총점 25이상 인자

<제품화 개발 및 기술 확보 대안>

- 추가 인체적용 임상연구를 수행하여 갈근강황추출물의 갱년기 여성 건강 유효성을 확인하고 본 사업을 통해 확보한 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청 자료에 연구 결과를 반영하여 원료 인정 심의 진행, 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 획득 후 갈근강황추출물 함유 제품 개발
- 또한, 기술 확보 방안으로 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 획득에 가장 큰 비중을 차지하는 인체적용 임상연구에서 유효성 있는 결과를 도출하기 위해 피험자 선정기준을 강화하고 갈근강황추출물의 섭취용량을 경제성을 검토하여 1.5 g/일로 상향 조정

<개발제품의 유사한 기능성 시중제품과 비교>

구분	시중제품	개발제품(현재)	개발제품(변경 후)
제품명	홍삼농축액	갈근강황추출물	갈근강황추출물
기능성분 함량	진세노이드 Rg1, Rb1 및 Rg3로서 10 mg/g	Curcumin : 0.7 mg/g Puerarin : 69.6 mg/g	Curcumin : 1 mg/g Puerarin : 104.4 mg/g
일일 섭취량	진세노이드 Rg1, Rb1 및 Rg3로서 25~80 mg/일 (홍삼농축액으로서 2.5 g ~ 8 g/일)	갈근강황추출물로서 1 g/일	갈근강황추출물로서 1.5 g/일
판매가 (VAT 별도, 단위: 원)	180,000/kg	400,000/kg	400,000/kg
1일 섭취량 단가 (VAT 별도, 단위: 원)	450~1,440	400	600

<후속 인체적용 임상연구 준비>

- 임상연구 계획서 작성

인체적용시험 제목	갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성에서 갈근강황추출물의 갱년기 증상의 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약 및 양성대조군 비교 인체적용시험
인체적용시험 대상	만 45세이상, 60세 미만의 폐경 전 또는 후의 갱년기 증상을 느끼는 여성
인체적용시험 디자인	단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약 및 양성 대조군 비교 인체적용시험
인체적용시험 식품	<ul style="list-style-type: none"> • 시험군 : 갈근강황추출물로서 1.5 g/일, 40명 • 위약군 : 대조식품, 40명 • 양성대조군 : 홍삼농축액(건강기능식품 원료)로서 진세노사이드 Rg1+Rb1+Rg3의 합이 25 mg~80 mg/일, 40명
용법 · 용량 및 복용 방법	1일 1포(4.0g)을 섭취
피험자 선정 기준	<ul style="list-style-type: none"> • 만 45세 이상, 60세 미만 갱년기 증상을 느끼는 폐경 전 또는 후의 여성 • 3개월 이상 무월경인 자 • FSH 30m IU/mL 이상, E2 50 pg/mL 이하인 자 • 쿠파만인텍스 총점 25이상 인자 • 인체적용시험 동의서에 자발적으로 서면 동의한 대상자
피험자 제외 기준	<p>다음의 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 제외</p> <ul style="list-style-type: none"> • 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 자 • 3개월 이내에 여성호르몬 등의 호르몬 제제 또는 유사 호르몬제제(식물추출물 등)를 복용 또는 투여한 자 • 체질량지수(BMI) 30 kg/m² 이상인 자 • 과거 5년 이내의 악성종양 과거력을 가지고 있는 자(단, 5년 이내의 완치 판정을 받은 경우 가능) • 양측 난소절제술, 자궁절제술, 유방암, 항암 화학요법, 골반 방사선 치료의 병력이 있거나 자궁 내막증, 유방질환의증, 성호르몬 질환 또는 비정상적 자궁출혈의 병력이 있는 자 • 질 초음파로 두께가 7 mm 이상이거나 Bisposphonate 약물로 골다공증 치료중인 자 • 6개월 이내 약물로서 조절되지 않는 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장, 고혈압, 폐질환자 • 간기능 혹은 신기능 저하가 있는 자




<p>피험자 제외 기준</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 심한 정신질환이 있거나, 현재 우울증, 불안장애의 치료목적으로 항우울제 등 정신신경계 약물을 복용중인 자 • 갑상선 기능 항진증 혹은 저하증으로 진단된 자 및 해당질환으로 갱년기 장애증상과 혼동된다고 판단되는 자 • 본 제품을 사용하기 전 과거 4주 이내 다른 임상 시험용 의약품 혹은 다른 건강기능식품을 복용 및 투여 받은 경험이 있는 자 • 시험 담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 자 															
<p>시험방법</p>	<table border="1" data-bbox="475 577 1337 741"> <thead> <tr> <th>스크리닝 방문</th> <th>Baseline</th> <th>중간 방문</th> <th>종료 방문</th> <th>Follow up</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>방문1</td> <td>방문2</td> <td>방문3</td> <td>방문4</td> <td>추가방문</td> </tr> <tr> <td>-2주~0주</td> <td>0주(0일)</td> <td>6주(±5일)</td> <td>12주(±5일)</td> <td>필요 시</td> </tr> </tbody> </table> <p>방문 1에서 대상자 적합성 평가에 적합한 대상자는 방문 2를 진행하며, 적합한 대상자에 한하여 시험군, 위약군 또는 양성대조군에 1:1:1로 무작위 배정되어 해당하는 인체적용시험용 식품을 교부 받음. 이후 12주간 섭취하게 되며, 12주간 섭취 후 방문하여 기능성과 안전성을 평가하고 인체적용시험을 종료함</p>	스크리닝 방문	Baseline	중간 방문	종료 방문	Follow up	방문1	방문2	방문3	방문4	추가방문	-2주~0주	0주(0일)	6주(±5일)	12주(±5일)	필요 시
스크리닝 방문	Baseline	중간 방문	종료 방문	Follow up												
방문1	방문2	방문3	방문4	추가방문												
-2주~0주	0주(0일)	6주(±5일)	12주(±5일)	필요 시												
<p>기능성평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1차 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 시험식품과 대조식품 섭취 12 주 후 쿠퍼만 지수 총점 변화치 - 2차 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 시험식품 대조식품 섭취 12 주 후 쿠퍼만 지수 총점 변화율 • 쿠퍼만 지수 각 항목 변화치 및 변화율 • MENQOL 변화치 및 변화율 • E2 변화치 및 변화율 • FSH 변화치 및 변화율 • TEWL 경피수분 손실량 변화치 및 변화율 • Alkaline phosphatase 변화치 및 변화율 • Osteocalcin 변화치 및 변화율 • Lipid profiles 변화치 및 변화율 • 안면홍조 정도 및 안면홍조 점수, 지속시간 변화치 및 변화율 															
<p>안전성 평가</p>	<p>시험식품 복용 전과 복용 중, 복용 12주 후에 다음을 평가함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 유방 X선을 통한 유방 밀도, 질초음파를 통한 자궁내막의 두께, 혈액학적 Estradiol, FSH, LH • 임상실험실 검사, 활력 징후 • 이상반응 															
<p>병용금지 약물 및 식품</p>	<p>다음 약물 및 식품의 사용은 시험식품의 안전성 또는 기능성의 평가를 방해할 수 있음. 따라서, 이러한 약물 및 식품은 인체적용시험 종료시까지 금지함</p> <ul style="list-style-type: none"> • 에스트라디올 등의 에스트로겐과 메드록시프로게스테론 등의 프로게스테론 등의 호르몬 제제 															

<p>병용금지 약물 및 식품</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 이소플라본, 승마, 석류, 당귀, 달맞이꽃 종자류, 인삼, 홍삼, 아마씨 등과 같은 식물성 에스트로겐이 포함된 약물 및 건강기능식품 • 최면진정제, 항불안제, 항전간제, 정신신경용제 등 항정신성 약물 • 혈관수축제 및 혈관확장제와 같은 혈압에 영향을 끼치는 약물 • 백수오, 석류, 회화나무열매추출액 등 갱년기 여성건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품
-------------------------	--

제4장. 연구결과의 활용 계획 등

- 시험관, 동물모델 연구와 인체적용 임상연구 결과를 논문으로 게재하여 '20년 12월 고시된 기능성표시식품으로 생산예정인 제품의 제품정보에 활용할 예정임
- 또한 시제품으로 생산한 그녀의 뷰티 히알루론산과 그녀의 석류 제품 쇼핑몰에 상세정보로 제공하여 기존 제품과의 차별화를 꾀할 예정임
- 갈근강황추출물을 이용하여 주관기관에서 생산하고 있는 식품에 부원료로 활용하여 여성용 관련 업그레이드 제품으로 산업화 예정임
- 본 사업으로 수행된 갱년기 여성 관련 시험관, 동물, 임상연구는 관련 연구에 활용 가능함
- 산업화 실적으로 제시한 식품 2건과 농축분말 1건의 매출성과가 발생할 수 있는 계획 수립하였음

1. 판매가 설정

제품명	제품사진	규격	예상판매가(원)
강황갈근농축분말_SDC001		식품 기타농산가공품 Kg	190,000원
링케이드 그녀의 석류		식품 액상차 45ml*21포	18,000원
링케이드 그녀의 뷰티 히알루론산		건강기능식품 500mg*60캡슐	13,000원

2. 판매처

- 현대홈쇼핑 등 홈쇼핑 판매 준비
- 바이럴 마케팅 준비(제품 상세페이지 작성)

Health

당사 원료 - 갈근강황 추출물 논문 발췌

대한한방부인과학회지 pISSN 1229-4292 / eISSN 2508-3619
J Korean Obstet Gynecol. VOL.33 NO.4 : 075-092 (2020)

Table 2. Change of Kupperman Index Total Score

	Treatment group (n [*] =54)		Control group (n [*] =54)		p-value
	Mean±SD [†]	p-value	Mean±SD [†]	p-value	
V ²	28.76±7.91		28.94±6.95		
V ⁴	20.28±8.93		19.63±8.57		
Change ^{**}	-8.48±7.30	0.0001 ^{††}	-9.31±8.93	0.0001 ^{††}	0.7607 [†]

*Kupperman Index(쿠퍼만 지수):
여성갱년기 판단 평가 지표, 15점 이상은 심각한 상태
의 갱년기로 적극적인 관리 필요

갈근강황추출물의 갱년기 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가

쿠퍼만 갱년기 지수(KI) 변화



- 45~65세 여성 54명을 대상
- 섭취 전과 섭취 12주 후
- 쿠퍼만 갱년기 지수(KI)의 총점 변화치
[-8.48±7.30으로 낮아져 여성갱년기 증상 완화에 효과]

Health

제안 1 : 링케이드 그녀의 석류

Key Point

석류농축액	✓ 여성갱년기에 좋은 터키산 석류농축액
★ 특화된 부원료	✓ 강황갈근농축분말 - 여성관련 효능(당사연구_세포/동물실험 완료)
식물혼합농축액	✓ 여성에게 좋은 약재 혼합 농축 및 석류신맛 마스크링
제조사	✓ 믿을 수 있는 제조사(HACCP_프롬바이오)

건강식품



구성

규격(1)	✓ 45mL x 21포 x 2box (42포)
판매가	✓ 36,000원 / 852원(포당)
규격(2)	✓ 45mL x 21포 x 6box (126포)
판매가	✓ 98,000원 / 778원(포당)





1

[이벤트 특가]

링케이드 그녀의 석류

터키산 석류를 냉압착, 농축하여 만든 그녀의 석류즙

가격 29,000원

적립 250원 (회원 기준 / 회원 등급별 상이)

배송 서울·경기 새벽배송 / 전국택배 (제주 및 도서산간 불가)

생산자 주에스디씨

규격 45mL*21EA*2카톤

수량 - + 2



합계금액 1개 원

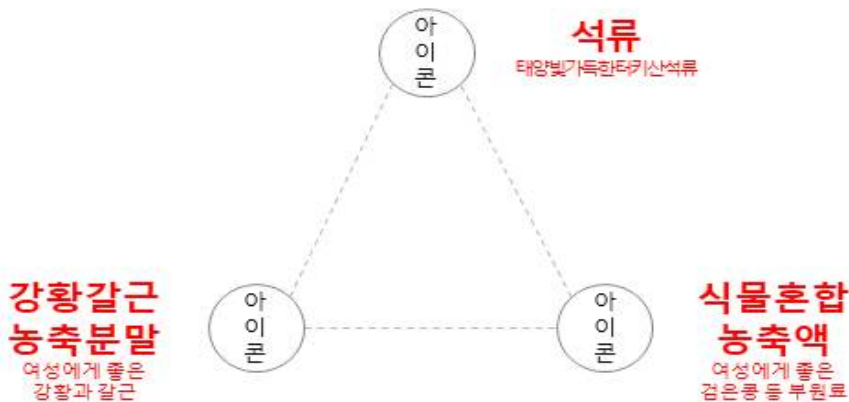
3 상바구니 4 주문하기 5 관심상품

6 이 상품을 본 고객이 많이 구매하는 상품

			
히알루론산 26,000원	석류즙 16,000원	미과 선물세트 29,000원	체중조절용스낵 21,000원

7 상세정보 | 상품평 | 상품 Q/A | 배송/교환/반품

[링케이드의 Key Point]



N	내용
*	
1	메인사진
2	구매수량 Up Down
3	장바구니(택배 아낌 포함)
4	결제창 연동
5	연동 내용 Check
6	히알루론산만 추가(1종)
7	상세 페이지



제안 2 : 링케이드 그녀의 뷰티 히알루론산

Key Point

히알루론산	✓ 피부보습에 도움을 줄 수 있음
★ 특화된 부원료	✓ 강황갈근농축분말 - 여성관련 효능(당사연구_세포/동물실험 완료)
비타민A 비타민E	✓ 피부와 점막 형성하고 기능 유지 상피세포의 성장과 발달에 필요 ✓ 유해산소부터 세포를 보호
제조사	✓ 믿을 수 있는 제조사(GMP_한미양행)

건강기능식품



구성

규격	✓ 500mg x 60ea (30일분)
판매가	✓ 13,000원 / 35,000원(90일분)

5 이런 분들에게

“당신의 선택이 탁월합니다.”

- ✓ 원활한 신체의 생리조절을 원하시는 분
- ✓ 아름다움과 활력의 생체리듬을 유지하고 싶으신 분
- ✓ 여성건강을 위한 밸런스를 유지하고 싶으신 분
- ✓ 여성 호르몬 감소로 인한 갱년기관리가 필요한 분
- ✓ 갱년기 건강을 미리미리 관리하고 싶은 분
- ✓ 여성을 위한 맞춤 건강관리를 원하시는 분
- ✓ 행복한 부부생활을 원하시는 분
- ✓ 피부가 고민이신 분
- ✓ 피부가 거칠은 분
- ✓ 피부 건조함이 심하신 분
- ✓ 피부 미용에 관심이 많은 분
- ✓ 촉촉한 꿀 피부를 원하시는 분



1 터키산 석류

1. 피부미용과 여성 질환에 탁월

: 석류는 에스트로겐과 다양한 비타민이 풍부해 여성들의 탄력있는 피부, 갱년기 증상 완화에 탁월하다.

2. 다이어트 효과로 건강한 몸 만들기에 탁월

: 석류의 항산화 성분들이 체지방을 분해 제거하여 다이어트에 효과

3. 면역력 향상과 노화방지

: 폴리페놀, 엘리지탄닌, 칼로탄닌, 푸니칼라진, 엘라직산, 안토시아닌 등의 항산화 물질이 풍부하여 면역력을 높여준다.

4. 피로회복

: 혈액 속의 노폐물을 제거하여 동속의 피로물질을 제거해 준다.

5. 탈모 예방

: 에스트로겐은 머리카락 속 콜라겐의 합성을 도와 모근을 건강하게 하여 탈모예방에 도움을 준다

* 캘리포니아 대학연구에 의한 석류의 항암효과

: 전립선암과 유방암을 예방하는데 효과적이며 동맥경화 예방과 콜레스테롤과 혈당 균형 등 다양한 면역계통에 효과가 높으로 평가되고 있다.



N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

2 그녀에게 좋은 한약재

여성에게 좋은 한약재를 사용하여 석류의 신맛을 줄여주는 맛의 마스킹과 기능을 포함하여.....



콩의 주요 안토시아닌인 '델피니딘-3-글루코사이드' 성분은 식품 부패균인 사카로미세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균에 대한 항균작용 및 유방암 억제 효과 등이 있다고 알려져 있다. '시아니딘-3-글루코사이드' 성분은 다른 안토시아닌에 비해 가장 연구가 많이 이루어진 색소로 각종 항암작용, 위장보호, 염증억제, 항산화 작용 및 궤양 예방 등의 효과가 있다



당귀는 따뜻한 성질을 가지고 있어서 여성질환에 도움
1. 당귀잎에 들어있는 엽록소와 데커신 성분이 혈액에 부족한 산소를 공급하게 해주고 혈액순환뿐만 아니라 생리불순 생리통 부인병에 효과
2. 당귀잎에 들어 있는 비타민 성분은 콜라겐 생성을 도와준다. 하여 피부가 색소침착되는 것을 막아주어 애기 피부처럼 만드는데 도움. 뿐만 아니라 비타민 성분이 활성산소를 제거해 줌으로 주름 개선에 도움
3. 혈액 생성을 촉진하여 보혈제 역할, 당귀잎에 들어 있는 엽산 성분 성분이 적혈구의 생성을 도와 주어 산소를 공급해줌



대추에는 크게 6~7가지의 효능이 있다
불면증, 노화방지 항암효과, 간기능활성화, 이뇨작용을 촉진, 강장 해독효과, 근육의 긴장 완화 및 관절염이나 류머티즘, 냉증치료, 스트레스 효과 등이 있다 그중 여성 관련하여 냉증치료가 있다
대추의 따뜻한 성질이 몸을 따뜻하게 해줘 혈액순환이 되고 여성의 냉증을 치료해주며 피부도 글게 해준다



1. 골절을 치료하는데 좋은 약재로 예로부터 부러진 뼈를 이어주는 데 특효
2. 근육과 뼈를 튼튼하게 해주므로 관절염, 관절 피로로 인한 통증, 골다공증, 무릎이 시린 증상에 좋다
3. 혈액순환을 좋게 해 빈혈, 월경과다를 치료하는 등 여성의 출혈병에 좋고 냉대하증과 혈뇨, 생일도 아닌데 갑자기 많은 피를 쏟는 증상의 치료에도 좋음
4. 임산부의 임신 중 산후 통증을 줄이고 자궁의 근육을 튼튼히 해서 태아를 안정시키고 유산을 방지



건강은 생강의 뿌리를 껍질째로 찌서 건조시킨 생약을 말함
몸을 따뜻하게 하여 신진 대사를 높이는 효능이 있고 주 성분인 진지베롤은 혈소판의 응집을 방해하여 연골을 파괴하는 효소의 생성을 억제하는 효과가 있음

그외 진저올이나 진저론, 시네올과 피넨 등의 매운맛 성분과 엘란드렌, 진지베렌, 시트랄 등의 성분이 포함되어 있으며, 이들 성분은 혈액순환을 촉진하고, 구토를 억제하거나 기침을 진정시켜 위장 기능 저하를 예방

N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

3 강황 갈근 농축분말

갈근 20% 주정 추출물과 강황 20% 주정추출물의 복합물이 여성갱년기 동물 모델에 미치는 영향

대한한방부인과학회지 pISSN 1229-4292 / eISSN 2508-3619
J Korean Obstet Gynecol. VOL.33 NO.4 : 075-092 (2020)

Table 2. Change of Kupperman Index Total Score

	Treatment group (n*=54)		Control group (n*=54)		p-value
	Mean±SD [†]	p-value	Mean±SD [†]	p-value	
V2 [†]	28.76±7.91		28.94±6.95		
V4 [†]	20.28±8.93		19.63±8.57		
Change**	-8.48±7.30	0.0001 ^{***}	-9.31±8.93	0.0001 ^{***}	0.7607 [†]

*Kupperman Index(쿠퍼만 지수):
여성갱년기 판단 평가 지표, 15점 이상은 심각한 상태
의 갱년기로 적극적인 관리 필요

갈근강황추출물의 갱년기 증상 개선에 대한
유효성 및 안전성 평가

쿠퍼만 갱년기 지수(KI)변화



- 45~65세 여성 54명을 대상
- 섭취 전과 섭취 12주 후
- 쿠퍼만 갱년기 지수(KI)의 총점 변화치
[-8.48±7.30으로 낮아져 여성갱년기 증상 완화에 효과]

N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

4 믿을 수 있는 제조사

의사의 아버지 히포크라테스가 '위대한 치료제'라 찬양했던 올리브오일!
 올리브오일에는 불포화지방산과 항산화성분인 비타민 E, 폴리페놀이 풍부합니다.
 그래서, 올리브오일을 아낌없이 넣어 만든 지중해식 요리는 대표적인 건강식단으로 손꼽히기도 합니다.
 오늘 소개할 올리브유는 최상의 품질과 풍격을 갖춘 스페인산 유기농 엑스트라 버진 올리브유입니다.
 다양한 요리에 활용하기에도, 그냥 드시기에도 좋은 최고급 올리브유를 합리적인 가격에 만나보세요.



N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

이렇게 배송됩니다.



N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

상품명	링케이드 그녀의 석류	식품 유형	액상차
포장 단위	45mL * 21포 * 2박스	원재료명 및 함량	정제수, 석류농축액(고형분 60%, 락타아제 20.6%, 포락토올리고당, 자일리톨, 검은콩농축액(검은콩(국내산), 갈근(국내산), 참당귀(국내산), 감초(우즈베키스탄산), 대추(국내산), 속단(중국산), 건강(국내산), 강황갈근농축분말, SDC001[갈근(국내산), 강황(국내산)])
상산자	쥬에스티바이오 익산공장 전라북도 익산시 왕궁면 국가식품로 72		
유통전문 판매원	쥬에스티씨 전라남도 담양군 담양군 예코길 11-9		
원산지	국내산	유통기한	제조일로부터 2년
포장재질	내포장재질: 폴리프로필렌(PP)	보관방법 및 취급방법 교환 및 반품	<ul style="list-style-type: none"> 직사광선을 피하여 습기가 적은 서늘한 곳에 보관하여 주시기 바랍니다. 개봉 후 변질될 수 있으므로 바로 섭취하십시오.
소비자 상담실	080-618-9990(수신자 부담)		
교환 및 반품	구입처 및 소비자 상담실		
섭취시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> 제품 개봉 또는 섭취시 포장재에 의한 상처에 주의하십시오. 제품개봉 또는 섭취시 내용물이 될 수 있으므로 주의하여 전전히 개봉하십시오. 특이체질 등 알러지 체질의 경우 성분을 확인 하신 후 섭취하십시오. 원료성분에 의해 간혹 질천물이 발생할 수 있으나 원료 고유의 성분이 오히려 안심하고 흡수되어 드실 수 있습니다. 포장이 변형, 팽창, 손상되었을 경우에는 음용하지 마십시오. 파우치 포장 그대로 전자레인지에 가열하지 마십시오. 본 제품은 난류, 우유, 땅콩, 밀, 메밀, 대두, 복숭아, 토마토를 사용한 제품과 같은 제조 시설에서 제조하고 있습니다. 		

건강정보

* 본 정보는 제품정보와 관련없는 내용임

“여성건강! 정확한 정보가 필요합니다.”

나의 갱년기 지수는? (쿠퍼만 지수)

※ 계산방법(05점 이상이면 관리가 필요함)
각 상태 정도(점수)를 모두 더한 점수가 본인의 갱년기 점수

• 5-10점(Mild) : 경미한 갱년기 상태
• 10-15점(Moderate) : 중등도의 갱년기 상태
• 15점(Severe) : 심한 갱년기 상태

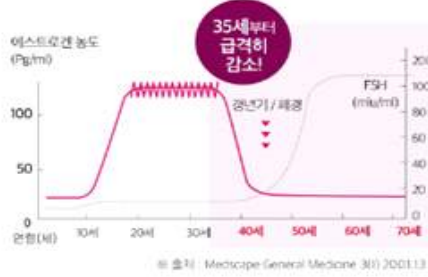
번호	증상	상대강도			
		없음	약간	보통	심함
01	안면홍조	0	4	8	12
02	방한	0	2	4	6
03	불면증	0	2	4	6
04	신경질	0	2	4	6
05	우울증	0	1	2	3
06	정기증	0	1	2	3
07	피로감	0	1	2	3
08	관상동맥질환	0	1	2	3
09	두통	0	1	2	3
10	가슴유방질환	0	1	2	3
11	질염/피지선분비불균형	0	1	2	3

※ 본 정보는 제품정보와 관련없는 정보임

합 계

갱년기 장애원인 여성호르몬

갱년기 장애는 폐경을 전후하여 10년 정도의 기간에 걸쳐 나타나며, 폐경기 여성은 인생의 1/3에 해당하는 긴 시간을 대부분의 여성이 갱년기 장애를 갖고 살아갑니다.



※ 출처 | Medscape-General Medicine 3(4) 2001.13 >

여성호르몬을 분비하는 난소는 다른 장기와는 달리 35세부터 노화가 시작이 되어, 여성호르몬의 분비량도 35세부터 급격히 감소하기 시작한다.

갱년기란?



WHO(World Health Organization / 세계보건기구)는

여성의 난소기능이 상실되어 여성호르몬의 분비가 없어지는 시기를 갱년기라 칭하며, 45-55세 전후 발생하여 여성은 호르몬의 변화 속에 다양한 갱년기 장애를 함께 겪는다고 하였습니다.



100세 시대
인생의 1/2 갱년기·폐경기 장애

79.8%
갱년기 현상 치료 필요!

※ 출처 | 호르몬 치료에 대한 한국 폐경여성의 인식도 변화/2002년/2019년 국내 폐경여성 설문조사

N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

여성호르몬이란?



여성의 난소에서 분비

자궁과 유선의 발육, 여성의 2차 성징발현, 생리상태, 성주기의 조절, 임신유지에 작용

여성은 급격한 활력의 감소, 세포의 노화로 인해 육체적, 정신적으로 여러가지 변화를 맞게 된다.
그 대표적인 것이 여성들이 겪는 갱년기이다.

※ 자료출처: 대한내과학회

호르몬 관리의 중요성

호르몬은 노화와 함께 자연스럽게 분비량이 줄어들어 우리 몸의 여러 가지 변화를 일으킨다.
여성호르몬은 난소에서 분비되는 것으로 생리주기를 조절하고 2차 성징의 발달에 필수적인 호르몬이다.
머리부터 심혈관, 생식기, 뼈에 이르기까지 여성의 거의 모든 생체기능을 조절하는 역할을 담당하고 있다.
여자들은 여성호르몬으로 인해 머리부터 발끝까지 모든 생체기능이 조절되고 있다.

하지만 35세부터 급격히 감소하기 시작한다.

※ 자료출처: 대한내과학회

N	내용
+	
1	
2	
3	
4	
5	

상세정보	상품평	상품 Q/A	배송/교환/환불
------	-----	--------	----------

상품 Q/A

상품에 대한 질문을 남기는 게시판입니다.
 상품 Q/A 게시판의 성격과 다른 글은 사전 동의 없이 관리자 게시²으로 이동될 수 있습니다.
 배송 또는 주문(취소, 교환, 환불)관련 문의 및 요청사항은 고객센터^{1:1}문의하기에 남겨주세요
 *해당 질문 게시 글은 '고객센터 - 1:1 문의' 게시판에서도 확인 가능합니다.

1

번호	카테고리	제목	작성자	답변유무	작성일
공지	공지	판매 일시중단 안내	관리자		2017.09.02
공지	공지	성분 안전성	관리자		2017.09.02
5	성분	000님의 소중한 질문입니다. <input type="button" value="△"/>	Asdsad4	답변완료	2017.09.02

3

질문 : 합성첨가물이 함유되어 있나요?
 답변 : 그녀의 석류 제품은 무화합첨가물 제품입니다.

2	배송	000님의 소중한 질문입니다. <input type="button" value="△"/>	Fdgdg7	답변완료	2017.09.02
1	성분	000님의 소중한 질문입니다. <input type="button" value="△"/>	Sdfdsf2	답변완료	2017.09.02

4

상품 문의하기

상세정보	상품평	상품 Q/A	배송/교환/환불
------	-----	--------	----------

배송관련 안내

배송비 안내	4만원 이상 주문 시 4만원 미만 주문 시	- 무료배송 - 2,500원
주문여감시간 및 배송일 안내	취급배송 (생선지 직거래 상품들 소포장 단위로 묶음 배송) 한국 전 지역 - 주문(월~리) 지정까지 결제 시 다음날 배송 완료 - 주말(토,일) 결제 시 월요일 배송 완료 * 근무일의 경우, 지정마감 지역 중 경기와 인천 은 토요일 도착 주문마감시간이 지정되지 않으며, 그 외 지역의 주문마감시간은 모두 4시까지입니다. 일부 제한 지역 - 주문(월~리) 이후 4시까지 결제 시 다음날 배송 완료 - 근무일 이후 4시~주말(토,일) 결제 시 화요일 배송 완료 ※ 제한 지역 확인하러가기 개장배송 (생선지 직접 배송) 오전5시 이전 결제 시 당일 수확 후 발송(1일~2일 소요 예정) 단, 정체의 배송일은 상품 상세 설명의 '발송일'항목 필수 확인	

교환/환불 안내

신선식품 일부 이상 시	문제가 생긴만큼 환불해 드립니다.
신선식품 전체 이상 시	100%환불해 드리거나 재배송을 해드립니다.
고객센터 안내	1644-4339 평일 - 10:00 - 18:00 점심시간 12:30 - 13:30 토요일 - 10:00 - 13:00 * 상품 문제가 없다면 신선식품의 특성상 반드시 1-2일 이내 연락을 부탁드립니다. * 문제가 있는 상품의 사진을 찍어 주시면 재제가 상품 상태를 쉽게 확인하여 빠른 처리 도와드립니다. * 단순 번상에 의한 교환/ 환불 배송비 안내 - 교환 : 왕복배송비(5,000원) 역스 발송 후 발송 - 환불 : 환불 상품 및 수송 비용 금액 제외한 금액 기준으로 차등처리 4만원 이상 : 3,000원 4만원 미만 : 5,000원

회사소개 이용약관 이용안내 개인정보 취급방침

법인명(상호): ㈜에스디씨 | 대표자명(성명): 차민석 | 사업자등록번호(409-81-85980) 통신판매업 신고: 00000000000000
 전화: 080-618-9990 | 팩스 | 주소: 전라남도 담양군 담양군 에코길 11-9
 개인정보관리책임자: 이준 (lee@sdcfood.com)
 Contact for more information
 Copyright @ 2021 링크이드 All right reserved

N	내용
*	
1	
2	
3	
4	
5	

붙임. 참고문헌

1. 식품공전, 식품의약품안전처
2. 건강기능식품 생산실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016
3. 한국의 사회지표, 통계청, 2013
4. 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석, 한국식품안전관리인증원, 2016
5. 식품 및 축산물의 유통기한 설정시험 가이드라인, 식품의약품안전처, 2015
6. NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014
7. Andersen CY, Kristensen SG. Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. *Reprod Biomed Online*. 2015. 31:128-131
8. Broskey AL. Non-collagen matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner*. 1992. 6:111-123
9. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, et al. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*. 1996. 61: 609-618
10. Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden MA, Nappi RE, Shah D, et al. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric*. 2012. 15:419-429
11. Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factor in fruits and vegetables. Biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol*. 1993. 72:116-135
12. Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 1999. 20: 788-804
13. Ettinger B, Quesenberry C, Schroeder DA, Friedman G. Long-term postmenopausal estrogen therapy may be associated with increased risk of breast cancer: a cohort study. *Menopause*. 2018. 25: 1191-1194
14. Johnston CC Jr, Hui SI, Witt RM, Appledorn R, Baker RS, Longcope C. Easex steroid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985. 61: 905-911
15. Kavitha CV, Deep G, Gangar SC, Jain AK, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits prostate cancer cells- and RANKL-induced osteoclastogenesis by targeting NFATc1, NF- κ B, and AP-1 activation in RAW264.7 cells. *Mol Carcinog*. 2014. 53: 169-180
16. Kim C, Ha H, Kim H, Lee JH, Song KY. Pueraria lobata Ohwi as an osteoporosis therapeutics. *Korean J Food Sci Technol*. 2002. 34: 710-718
17. Kim JH, Kim JS. Effect of Lycii Fructus and Lycii Folium extracts on osteoporosis in ovariectomized Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014. 43: 24-29
18. Kim JH, Kim OK, Yoon HG, Park J, You Y, Kim K, et al. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Food Nutr Res*. 2016. 60: 30428
19. Kim Y, You Y, Yoon HG, Lee YH, Kim K, Lee J, et al. Hepatoprotective effects of

- fermented *Curcuma longa* L. on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chem.* 2014. 151: 148-153
20. Kum CJ, Kim EY, Kim JH, Lee B, Min JH, Heo J, et al. *Cyperus Rotundus* L. extract suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through NFATc1/c-fos downregulation and prevent bone loss in OVX-induced osteoporosis rat. *J Ethnopharmacol.* 2017. 205:186-194
 21. Kurihara T, Kikuchi M. Studies on the constituents of flowers. IV. On the components fo the flower of *Pueraria thubergiana* Benth. *Yakugaku Zassi.* 1976. 96: 1486-1488
 22. Lee KT, Sohn IC, Kong EA, Kim DH, Choi SK, Choi JW, et al. Antioxidantive and cytoprotective effect of isoflavones isolated from *Pueraria thubergiana* flowers. *Yakhak Hoeji.* 1999. 43: 736-742
 23. Lim S, Leem JY, Lee CS, Jang YJ, Park JW, Yoon S. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J Food Sci Technol.* 2007. 39: 694-700
 24. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, YUanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 2004. 92: 458-471
 25. Manolagas SC. Cell number bersus cell viogor-what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology.* 1999. 140: 4377-4381
 26. Manaolas SC. Birth and death of bone cell: basis regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews.* 2000. 21: 115-137
 27. Nelson ER, Wardell SE, McDonnel DP. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone.* 2013. 53:42-50
 28. Newmark HL. Plant phemolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol.* 1996. 401:25-34
 29. Oh HJ. Therapy of osteoporosis in climacteric. *J Korean Acad Fam Med.* 2005. 21: 20-27
 30. Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp Ther Med.* 2015. 10:1615-1623
 31. Soysa NS, Alles N, Aoki K, Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci.* 2012; 59: 65-74
 32. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ. Montechino M. Transcriptionalk control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 1996. 76: 593-629

33. Taira M, Nakao H, Takahashi J, Araki Y. Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Oral Rehabil.* 2003. 30:697-701
34. Wang C, Yu C, Gu Y, Zhang L. Research progress of drugs for osteoporosis treatment. *Chinese Sci Bull.* 2014. 59:1209-1214
35. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop.* 2012. 3:175-181

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 강황,갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화				
	(영문) Industrialization of Health Functional Food of Women's Menopause				
주관연구기관	농업회사법인(주)산들촌		주 관 연 구	(소속)	
참 여 기 업	경희대학교 산학협력단		책 임 자	(성명) 차 민 석	
총연구개발비 (848,750천원)	계	848,750	총 연 구 기 간	2018.04.30. ~ 2020.12.31.(2년9월)	
	정부출연 연구개발비	679,000	총 참 여 수	총 인 원	9명
	기업부담금	169,750		내부인원	9명
	연구기관부담금	0		외부인원	0명

○ 연구개발 목표 및 성과

- 국내산 강황, 갈근을 이용한 고부가가치 식품 개발
- 갈근강황추출물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 여성갱년기 개선 활성 평가
- 갈근강황추출물의 인체적용시험 연구
- 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성
- 갈근강황추출물 함유 건강기능식품 산업화

○ 연구내용 및 결과

- 국내산 강황과 갈근을 추출하여 갈근강황추출물 생산 완료
- 갈근강황추출물의 여성갱년기 증상 개선 시험관, 동물모델연구 완료
- 45~65세 여성을 대상으로 갈근강황추출물의 갱년기 증상 완화 인체적용 임상연구 완료
- 식약처 규정에 따라 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청서 작성 완료
- 갈근강황추출물을 함유하는 건강기능식품 생산 완료

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 갈근강황추출물의 시험관, 동물모델 연구결과와 인체적용 임상연구 결과 논문으로 게재하여 마케팅 자료로 활용
- 시험관, 동물모델 연구와 인체적용 임상연구 결과를 논문으로 게재하여 '20년 12월 고시된 기능성표시식품으로 생산예정인 제품의 제품정보에 활용할 예정임
- 또한 시제품으로 생산한 그녀의 뷰티 히알루론산과 그녀의 석류 제품 쇼핑몰에 상세정보로 제공하여 기존 제품과의 차별화를 꾀할 예정임
- 갈근강황추출물을 이용하여 주관기관에서 생산하고 있는 식품에 부원료로 활용하여 여성용 관련 업그레이드 제품으로 산업화 예정임
- 본 사업으로 수행된 갱년기 여성 관련 시험관, 동물, 임상연구는 관련 연구에 활용 가능함

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118036-03		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	강황,갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화			과제유형	개발
연구기관	농업회사법인(주)산들촌, 경희대학교 산학협력단			연구책임자	차 민 석
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.04.30.~2018.12.31	184,000	46,000	230,000
	2차년도	2019.01.01.~2019.12.31	268,000	67,000	335,000
	3차년도	2020.01.01.~2020.12.31	227,000	56,750	283,750
	계	2018.04.30.~2020.12.31	679,000	169,750	848,750
참여기업	농업회사법인(주)산들촌				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.01.

3. 평가자(연구책임자) : 차 민 석

소속	직위	성명
	대표이사	차 민 석

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

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

국내산 강황과 갈근을 소재로 하는 여성갱년기 건강기능식품 개발은 국내 최초로 시도되는 사업이며, 원료 가공방법 표준화, 기능평가를 위한 시험관, 동물, 인체적용 임상연구가 전체적으로 우수하게 진행되었음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

국내산 농산물 강황과 갈근의 여성갱년기 활성을 확인한 본 사업의 연구 결과물은 강황과 갈근을 원료로 하는 제품에 마케팅 자료로 활용 가능함으로서 관련 제품의 인지도 상승이 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

본 사업의 결과물인 갈근강황추출물의 제조공정 표준화 결과와 기능평가 결과 논문은 개별인정형 건강기능식품 원료 인정시 활용 가능함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

주관기관과 공동연구기관의 협업으로 본 사업이 원활하게 진행되었음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

논문 3편, 특허출원 2건이 완료 되었으며 연구 결과물은 한국식품영양과학회 학술대회에서 발표하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 2건	10	100	목표달성
기술실시(이전)	5	100	목표달성
제품화 2건	50	150	목표 초과 달성
매출	10	0	제품 생산 완료되어 '21년 판매시작
고용창출	10	100	목표달성
학술발표 4건	10	125	목표 초과 달성
교육지도 2건	5	100	목표 달성
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

주관기관과 공동연구기관 연구원들의 열성적인 참여로 최초 계획한 대부분의 성과를 이루었으며 연구 결과물은 제품으로 산업화되었음
 본 사업 수행의 경험은 주관기관에서 추진 중인 건강기능식품 사업의 발판으로 활용될 것임
 본 사업은 성공적으로 완료 되었다고 판단됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3차년도 연구비가 일부 삭감(국비 41,000천원)되어 어려움이 있었으나 주관기관에서 추가 연구비(약 3천만원)를 부담하여 사업을 수행하였음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구결과물은 건강기능식품 뿐만 아니라 기능성표시식품의 근거 자료로 활용할 예정임

IV. 보안성 검토

○ 보안성 필요하지 않음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	강황,갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화			
주관연구기관	농업회사법인(주)산들촌		주관연구책임자	차 민 석
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	679,000	169,750	0	848,750
연구개발기간	2018.04.30.~2020.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 갈근강황추출물의 시험관, 동물모델 연구를 통한 여성갱년기 개선 활성 평가	갈근강황추출물의 시험관, 동물모델연구를 완료하였음
② 갈근강황추출물의 인체적용시험 연구	갈근강황추출물의 인체적용 임상연구를 완료하였음
③ 갈근강황추출물의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청	갈근강황추출물의 개별인정서 작성을 완료하였음
④ 갈근강황추출물 함유 건강기능식품 산업화	갈근강황추출물을 함유하는 건강기능식품을 산업화 하였음

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연구 활용 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		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	

단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건	건
가중치	10	-	5	-	50	10	-	10	-	-				10	5	-	-	-
최종목표	2	2	-	2	0	2	100	-	2	-	-	1	1	1.955	4	2	-	-
연구기간내 달성실적	2	0	-	2	0	3	0	-	2	-	-	1	2	2.474	5	2	-	-
달성율(%)	100	0	-	100	0	150	0	-	100	-	-	100	200	100	125	100	-	-

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	갈근, 강황추출물 가공 방법 개발
②	갈근강황추출물 제조공정 표준화 및 지표성분 정립
③	갈근강황추출물의 갱년기 여성건강 개선에 도움 기능 확인

5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	강황과 갈근의 추출 기술을 개발하여 갈근강황추출물 개발에 활용하였음
②의 기술	갈근강황추출물의 제조공정으로 표준화하여 건강기능식품 원료 개발에 활용하였음
③의 기술	기능평가 결과를 활용하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정에 활용하였음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식	기술실	사업화	기	학술성과	교	인	정책	기

	재산권			시 (이전)							술인증	논문		논문 평균 IF	학술 발표	육지도	력양성	활용-홍보		타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		SC I	비 SC I					정책 활용	홍보 전시	
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명					
가중치	10		-	5	-	50	10	-	10	-	-	-	-	10	5	-	-	-	-	
최종목표	2	2	-	2	0	2	100	-	2	-	-	1	1	1.955	4	2	-	-	-	
연구기간내 달성실적	2	0	-	2	0	3	0	-	2	-	-	1	2	2.474	5	2	-	-	-	
연구 종료 후 성과 창출 계획	-	-	-	-	-	-	4,000	1,100	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	갈근, 강황추출물 가공 방법 개발			
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액		천원
이전방식 ²⁾	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()			
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾		2018년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	없음			

핵심기술명 ¹⁾	갈근강황추출물 제조공정 표준화 및 지표성분 정립			
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액		천원
이전방식 ²⁾	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()			
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾		2019년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	없음			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술 개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.