

최 종 보 고 서

발간등록번호

11-1543000-000834-01

사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발

(Development of health-functional food for improving
haemostasis using *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos*
Sieb and persimmon leaves)

CJ제일제당(주) 식품연구소

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 3월 10일

주관연구기관명 : CJ제일제당(주)

주관연구책임자 : 김혜진

세부연구책임자 : 김혜진

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 최명숙

협동연구기관명 : 대구한의대부속 한방병원

협동연구책임자 : 백경민

요 약 문

I. 제목

사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

(1) 연구개발의 목적

본 연구과제의 최종 목적은 사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행개선용 고부가가치 기능성 소재 개발 및 제품화임. 국내 식품관련 대기업, 대학, 병원이 공동으로 국내 농산자원을 활용한 고부가가치 기능성 식품 및 건강기능식품 개발을 목표로 하고 있음. 국내산 소재의 혈행장애 관련 질환의 예방 및 개선에 미치는 효능을 입증하고 산업화하여 이를 맞춤형 건강기능식품으로 개발 및 제품화하고자함.

(2) 연구개발의 필요성

현대사회에서는 식생활의 서구화, 산업화, 공업화 및 정신적 스트레스 등으로 인해 혈행장애를 동반하는 각종 대사성질환이 증가되고 있으며, 우리나라 대사증후군 유병률은 지난 10년간 급격히 증가하였음. 또한 국내 건강기능식품 시장 규모는 건강에 대한 관심 고조, 인구 고령화 등에 힘입어 매년 성장하고 있기 때문에 국내 소재 기반 대표 브랜드 발굴 및 육성이 시급함. 또한 FTA와 나고야 의정서 등 국제 협약 대응에 대한 국가 차원의 대응 방안 마련이 필요함. 혈행개선은 건강기능식품을 통해 해결하고자 하는 건강문제로 조사되기도 하였다. 따라서 소비자들에게 친숙하고 인지도가 높은 국내산 원료를 활용하여 다양한 효능 및 안전성의 검증을 통하여 식품 기능성을 확립하는 것은 국민건강보호, 증진 및 국제경쟁력 강화를 위하여 반드시 필요함. 이러한 환경에서 국내 자원을 이용하여 기능성 소재, 제품개발 및 산업화는 국내농업기반을 안정적으로 유지하는 주요한 돌파구로 판단됨. 이에 소비자들이 염려하는 건강문제인 혈행 및 대사성 질환을 개선할 수 있는 건강기능 소재 및 제품개발이 요구되는 상황임.

III. 연구개발 내용 및 범위

(1) 제1세부: 혈행 개선용 기능성 소재 및 제품 개발에 관한 연구

- 지표성분 선정 및 분석방법 개발
- 추출 공정 최적화 및 소재 표준화
- 소재의 안정성 분석 및 안전성 자료 확보

- 대량생산, 소재 및 제품의 산업화 연구

(2) 제1협동: 혈행 개선 건강기능소재인 사자발약쑥, 유자 및 감잎의 기능성과 작용기작 검증

- *In vitro* 시험관 실험을 통한 사자발약쑥, 유자 및 감잎의 혈소판 응집능 분석

- *In vivo* 동물실험을 통한 건강기능소재의 혈행 및 지질대사 개선 효능 검증 및 작용기작 규명

(3) 제2협동: 최종 선정된 혈행 개선 소재인 감잎유자 복합물의 인체적용시험을 통한 기능성 평가

- 혈행개선 임상 평가지표 개발

- 인체적용시험 **protocol** 개발

- 인체적용시험 수행을 통한 감잎유자 복합물의 혈행개선 효과 평가

IV. 연구개발 결과

(1) 제1세부: 혈행 개선 소재로서 국내산 농산물 중 사자발약쑥, 감잎, 유자를 선정하였고, 선정된 원물에서 지표(기능) 성분 함량이 극대화될 수 있는 추출방법을 확립하여 표준화하였음. 이를 기반으로 대량생산 공정을 확립하고 전처리 공정을 개발하였음. 또한 2번의 동물시험을 통해 최종선정된 감잎유자 복합물의 안전성 (중금속, 잔류농약, 식경험 등)에 대한 자료를 확보하였으며, 이를 토대로 혈행 및 지질대사 개선용 제품화를 계획하고 있음.

(2) 제1협동: *In vitro* 시험관 실험에서 약쑥 주정추출물, 감잎 주정추출물, 유자 주정추출물 및 이들의 대표 **flavonoid**들은 혈장 응고시간을 연장하고 **arachidonic acid**에 의해 유도된 혈소판 응집을 억제하였으며 혈소판 활성화의 바이오마커인 **serotonin, TXB₂, sP-selectin** 함량을 감소시켰음. *In vivo*에서는 총 2회의 동물실험을 통해 소재의 혈행 및 지질대사 개선 기능성 및 작용기작을 확인하였음. 또한, 감잎 및 유자 복합물의 시너지 효과를 확인하였음.

(3) 제2협동: 감잎유자복합물의 혈행개선 효과를 예비적으로 평가하기 위해 시행한 인체적용시험에서 **PT, aPTT, Total cholesterol, LDL-C, HDL-C, TG** 등의 평가 변수를 관찰한 결과, 각 변수의 변화 경향이 일관적이지 않고 또한 시험군과 대조군 간 변화값의 차이가 적었음. 또한 모든 측정값이 정상 범위 내에서의 변화를 반영하고 있어 시험용 식품 복용 전후에 임상적으로 의미있는 변화를 반영한 것으로 보기 어려워 감잎 유자 복합추출물의 혈행개선에 대한 효과를 평가하기 위하여 추가적인 연구, 관찰이 필요한 것으로 사료됨.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제는 국내 사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용하여 기능성소재 표준화, 대량 생산 뿐만 아니라 *in vitro* 실험, 동물실험 및 인체시험을 통해 혈행개선 기능성과 작용기작을 규명하였음. 이러한 효능 및 작용기작을 국제 저널과 학회에 발표하고, 특허를 출원함으로써 국내 농산물 유래 건강 기능성식품의 글로벌 경쟁력을 제시하였음. 또한 본 연구를 통해 국내 농산자원의 기능성 소재 개발로의 활용도가 높아짐으로써 농가 소득 증대와 수출 증대 효과가 기대되며 연구를 수행하면서 관련 산업의 발전에 필요한 인재 양성에도 기여하였음.

SUMMARY

I. The title

Development of health-functional food for improving haemostasis using *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves

II. Objectives and necessity of research

1. Research Objectives

The objectives of this research were not only to develop health-functional food for improving haemostasis using *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves but also to establish a mass production and safety assessment of functional ingredient. This research was performed to be acquired for individual health-functional food ingredients by proving the scientific evidence and efficacy evaluation of domestic agricultural resources, *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves. In addition, this research was intended for industrialization of personalized health-functional food.

2. Necessity of Research

In modern society, metabolic syndrome accompanied with blood circulation disorder is increasing due to westernization diet, industrialization and emotional stress. Also, the prevalence rate of metabolic syndrome increased dramatically over the past decade in Korea. Therefore, establishment of the efficacy and safety of a variety of health food is required in order to protect health of people and to strength national competitiveness. In addition, because abdominal obesity and obese children are growing as social problems, the development of health-functional food for improving blood circulation and lipid metabolism by the domestic agricultural resources is required.

III. Scope of the research project

1. 1st Sub-project: Development of functional ingredient and product for improving haemostasis

- Determination and analysis of active components
- Optimization of extraction process of functional ingredients

- Analysis of storage stability of *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves extract
- Assessment of safety of persimmon leaves and *Citrus junos* Sieb mixture

2. 2nd Sub-project: Investigation of efficacy and functional mechanism of *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves for improving haemostasis

- Platelet aggregation analysis of *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves *in vitro*.
- Investigation of efficacy and mechanism of functional ingredients for improving blood circulation and lipid metabolism *in vivo*.

3. 3rd Sub-project: Investigation of efficacy of composite powder of persimmon leaves and *Citrus junos* Sieb on blood circulation in human subjects: double-blinded, randomized, placebo-controlled pilot study

- Development of clinical assessment indicators of improving blood circulation
- Development of protocol for clinical trial
- Investigation of efficacy of composite powder of persimmon leaves and *Citrus junos* Sieb on blood circulation in human subjects

IV. Research project results

1. 1st Sub-project: *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb, persimmon leaves were selected for improving haemostasis, and those were extracted to maximize the selected active components. Based on these, we established mass production process and developed pre-treatment process. Also we performed the safety analysis and storage stability of *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves mixture, and we plan to commercialize them.

2. 2nd Sub-project: *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb, persimmon leaves ethanol extracts and their major flavonoids significantly prolonged blood coagulation time and reduced the arachidonic acid-induced platelet aggregation as well as platelet activation biomarkers. We performed beneficial effects of *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb, persimmon leaves ethanol extracts on blood circulation and lipid metabolism in twice animal study. Also, we investigated the synergy effect of persimmon leaves and *Citrus junos* Sieb mixture.

3. 3rd Sub-project: In clinical trial, we investigated changes of PT, aPTT, total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride as clinical indicators for improving blood circulation. In the result, changes in each level were not consistent and there were no statistically significant difference between experiment group and placebo group. All measured value and their changes were in normal range and it implicates no significant effect on improving blood circulation. Since this was a pilot study, further investigation to explore the effect of composite power of persimmon leaves and *Citrus junos* Sieb on blood circulation is necessary.

V. Research project achievements and plans for application

This research has established active components, standardized functional ingredients, mass production of functional materials, and also identified the functional mechanism of *Artemisia princeps* Pampanini, *Citrus junos* Sieb and persimmon leaves based on the *in vitro* study, animal study and human clinical trial. These findings suggested global competitiveness of health-functional food by presenting international journals and conferences, which has promoted the utilization and export possibility of functional foods made in Korea. Also, The research has contributed to industrial development by nurturing human resources for future growth.

CONTENTS

(영 문 목 차)

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	11
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development	17
Chapter 3. Contents and results of study	25
Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study.	184
Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results	190
Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying	195
Chapter 7. Current status of research installation	196
Chapter 8. References	197

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	25
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	184
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	190
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	195
제 7 장	연구시설·장비 현황	196
제 8 장	참고문헌	197

제 1 장 연구개발과제의 개요

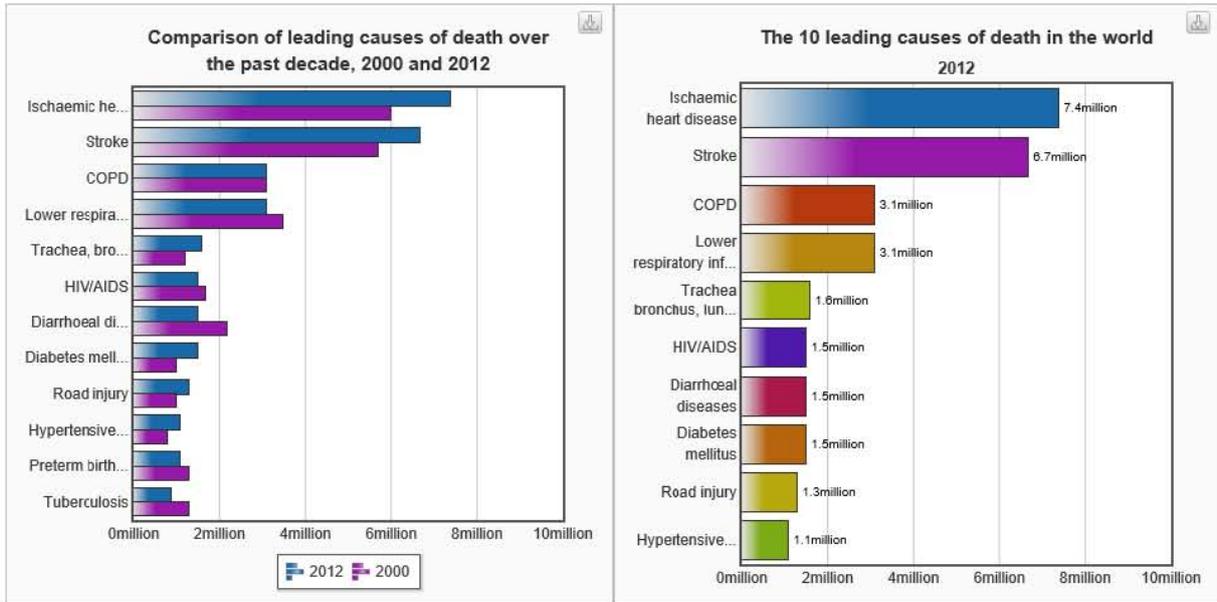
본 연구과제의 최종 목표는 사자발약썩, 유자 및 감잎을 이용한 혈행개선 건강기능소재 및 제품개발이며, 주요 연구 내용은 **i)** 사자발약썩, 유자 및 감잎의 건강기능 소재화를 위한 표준화 **ii)** 사자발약썩, 유자 및 감잎의 혈행 개선 기능에 대한 *in vitro, in vivo*, 인체적용시험을 통한 과학적 근거 및 작용기작 규명, **iii)** 기능성 식품 소재의 산업화 공정 개발, **iv)** 기능성 식품 소재의 제형 개발을 통한 관능 최적화 및 혈행 개선용 건강기능식품 개발임. 본 연구과제를 통해 식품소재를 혈행 개선 효능을 검증 후 제품화하여 혈행 장애 관련 질병 예방, 국민 보건 증진 및 의료비 절감에 기여하고자 함. 또한, 식품소재의 유용성을 높임으로써 농가소득 향상 및 부가가치 창출을 통한 관련기술의 산업화 증진에 기여할 것으로 판단됨.

○ 세계적으로 대사증후군 환자가 증가하였지만 사회적 인식의 변화로 대사증후군 관련 연구가 활발해지고 있음. 특히, 대사증후군 대응 기술관련 특허는 2000년대 이후 증가하고 있으나 주요 출원인의 80%가 미국국적으로 미국이 주도하고 있기 때문에 국내 자원과 국내기술을 이용한 연구가 필요함.

○ 1990년대에는 대사성 증후군 환자와 관련한 특허가 대부분이었으나 2000년대에는 예방과 관련한 특허 및 대사성 증후군의 원인이 되는 비만을 억제하기 위한 기술의 특허가 인용도가 높은 것으로 나타남. 또한, 대사 증후군 병인 규명 및 치료법 개발을 위한 새로운 천연물질 또는 기존 치료제와의 조합에 의한 신약과 관련한 기술이 주를 이루고 있음.

○ Framingham Heart Study Offspring 연구에 따르면 기저 대사증후군이 있는 대상자에서 당뇨병 위험도가 7배 정도 증가하는 것으로 보고되었음. 또한, 대사증후군의 진단은 심혈관질환의 위험도를 2배 정도 증가시키며 당뇨병의 위험도는 적어도 5배 이상 증가시키는 것으로 추정됨.

○ 국내 질병관리본부는 현재 심뇌혈관 질환이 한국인의 사망원인 중 암에 이어 두 번째로 높은 위치를 차지하고 있으며, 의료비 부담이 높으므로 국가적 차원의 극복 노력이 요구된다고 발표하였음. 심뇌혈관질환 극복을 위해 정부는 심뇌혈관질환 예방, 관리를 위한 노력을 해왔으나, 중장기 R&D 계획 수립을 통해 보다 체계적으로 적극적인 대책 마련이 필요하며, 국립보건연구원의 역할 정립이 필요하다고 보고함.



<The top 10 causes of death (WHO) >

○ 위 그림에서 보는 바와 같이 혈전 질환 및 동맥경화증 등의 혈행 장애로 발생하는 심혈관 질환은 전 세계 주요 사망 요인 10위 중 하나로 큰 사회 문제임.

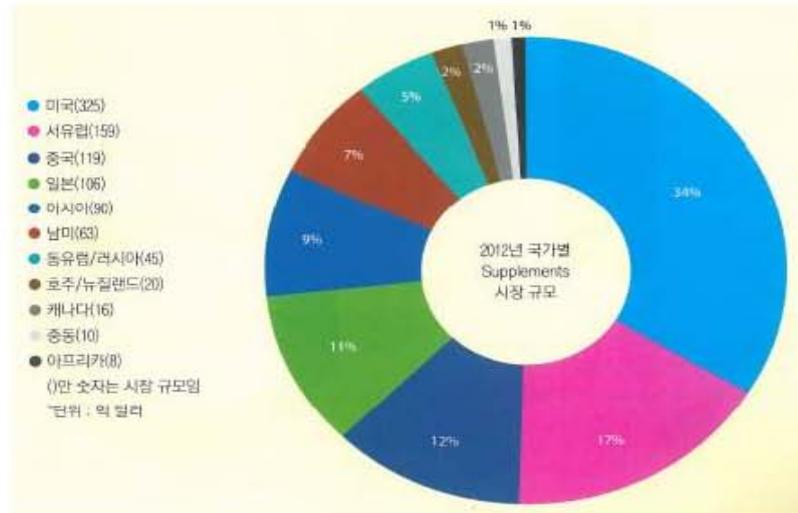
○ **Norvatis, Merck, Pfizer** 등이 북경, 상해 등에 각각 설립한 세계 수준의 생명공학 및 약물 연구센터에서는 심혈관질환을 비롯한 대사성질환과 신경변성 등에 대한 새로운 치료법 개발에 집중적으로 노력하고 있음. 이처럼 이들 질환은 전 세계적으로 큰 이슈로 국내자원을 이용한 기술력 강화 및 산업화 증진이 필요함.

○ 미국, 유럽 등의 선진국을 중심으로 지난 수십년간 혈행개선 치료제의 개발연구가 집중적으로 진행되어 왔고, 다양한 종류의 치료제가 출시되어 사용되고 있음. 이외에도 심근경색 환자에게 사용하는 와파린제제, 혈액 속의 나쁜 콜레스테롤이나 중성지방을 없애주는 고지혈증 치료제 (리피토, 심바스타틴, 수프라 등), 항혈전제 (플라빅스, 크리드, 트렌탈, 프레탈, 플루런트, 베셀듀, 엔테론 등)와 혈관확장제 (페르산친, 칼리크레인 등) 및 혈관탄력제 (엔테론 등) 등이 혈행개선 치료제로 이용되고 있으나 이러한 화합물들은 뇌출혈, 위장장애등 인체에 많은 부작용이 보고되었음. 이에 따라 일상생활에서 섭취 가능한 생리활성이 우수한 약용식물에 대한 관심과 연구가 증가하고 있으며 기능성식품의 개발과 확립이 부각되고 있음.

○ 최근 급속한 생명과학 발달은 인간수명 연장에 다소 기여하고 있으나, 근본적인 식생활 및 생활양식의 문제점으로 인해 여전히 많은 비만 및 성인병 환자를 양산하고 있어 이들의 건강 관리 및 치료문제가 사회적으로 심화되고 있음. 특히 복부비만과 관련하여 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 (이상지혈증)과 심뇌혈관질환 등이 눈에 띄게 증가하고 있음.

○ 세계 건강식품 시장 (**Global Nutrition Industry**) 규모는 **3,464**억 달러이며, 이 중 우리나라

건강기능식품과 유사한 **supplements** 시장은 **961억 달러**로 조사됨. 세계 **supplements** 시장의 국가별 현황은 미국 **325억 달러 (34%)**, 서유럽 **159억 달러 (17%)**, 중국 **119억 달러 (12%)**, 일본 **106억 달러 (11%)**, 기타 아시아 **90억 달러 (9%)** 등으로 시장을 형성하고 있음. 일본은 전체 아시아 시장에서 가장 큰 규모를 보였으나 지속적인 성장 침체로 인해 **2012년**을 기점으로 중국이 일본 시장을 넘어선 것으로 조사되며, 향후 중국의 가파른 성장세가 예측됨.



<건강기능식품 시장 현황>

○ 국내 건강기능식품 시장 규모는 조사 방법에 따라, **1조 8,674억원 (2013년 생산 및 수입실적 기준)**, **3조 4,847억원 (2013년 상위 23개사 매출액 조사 기준)**, **2조 889억원 (2014년 6대 도시 소비자 구입 비용 기준)**인 것으로 조사됨. 상위 **23개사** 매출액은 전체 건강기능식품 시장의 약 **75%**를 차지하는 것으로 추정되며 그 추산 결과는 **49,463억원** 규모를 형성할 것으로 예상됨. **2014년 6대 도시** 시장 규모의 경우 통상적인 식품 구매력은 **55~65%**를 차지하는 것으로 추정하며, 이를 토대로 전체 시장을 계산하면 약 **32,400~34,500억원** 정도인 것으로 추정됨.

○ 국내 건강기능식품 소비자 실태조사에 의하면, 주로 '건강기능식품 섭취'를 통해 관리하는 건강문제는 면역력 증진, 전반적 건강증진, 갱년기 건강, 콜레스테롤 개선, 혈행개선 등으로 나타남.

<염려하고 있는 건강관련 문제별 대처 방법>

(Base: 전체 응답자 1,511명, 단위: %)

염려 건강 문제 별 대처 방법	피로 회복	스트레스	면역력 증진	눈 건강	관절 건강	뼈 건강	전반적 건강 증진	체지방 감소	갱년기 건강	혈압 조절	간 건강	피부 건강	콜레스테롤 개선
(Base)	(358)	(283)	(239)	(230)	(186)	(150)	(140)	(140)	(139)	(138)	(137)	(118)	(109)
음식/건강관련 식품 섭취	47.2	11.0	73.2	31.7	40.9	48.0	65.0	23.6	56.1	60.9	35.0	33.9	53.2
건강 기능 식품을 섭취한다	27.1	4.6	38.9	12.2	15.1	20.0	41.4	10.0	25.9	4.3	12.4	15.3	22.0
건강 보조 식품을 섭취한다	11.5	3.9	16.3	7.4	11.3	12.0	13.6	5.7	18.7	1.4	8.8	14.4	8.3
약을 복용한다	4.7	1.4	10.0	7.4	13.4	11.3	2.9	2.9	6.5	50.7	9.5	1.7	16.5
해당 증상에 좋다는 보양식을 섭취한다	2.0	0.7	4.6	3.9	0.5	2.7	5.0	2.9	3.6	2.9	1.5	1.7	2.8
한약을 복용한다	1.1	0.4	2.5	0.4	0.5	2.0	2.1	1.4	1.4	-	0.7	0.8	-
녹즙을 마신다	0.8	-	0.8	0.4	-	-	-	0.7	-	1.4	2.2	-	3.7
휴식, 운동 등으로 관리	40.5	54.8	17.6	23.0	32.8	26.0	25.7	45.7	23.0	17.4	19.7	33.9	22.0
충분한 휴식을 취하려고 노력한다	32.7	39.2	8.4	17.8	6.5	4.7	12.1	0.7	10.1	5.1	16.1	26.3	4.6
꾸준히 운동을 한다	7.8	15.5	9.2	5.2	26.3	21.3	13.6	45.0	12.9	12.3	3.6	7.6	17.4
민간 요법을 한다	-	-	0.4	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-
음식을 조절한다	-	-	-	-	-	-	-	2.9	-	-	1.5	0.8	1.8
의료기 사용, 병원 검진 등 전문적인 관리	0.8	1.1	0.4	9.1	6.5	8.0	4.3	1.4	2.9	10.9	6.6	10.2	1.8
정기적으로 병원에서 검진을한다	0.6	0.4	0.4	8.3	2.2	6.0	3.6	1.4	2.2	10.1	5.1	0.8	0.9
대체의학을 이용한다	0.3	0.7	-	0.9	0.5	1.3	0.7	-	0.7	0.7	1.5	1.7	0.9
전문 관리실에서 정기적으로 시술/관리를 받는다	-	-	-	-	1.6	0.7	-	-	-	-	-	7.6	-
의료기를 사용한다	-	-	-	-	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-
크게 노력하는 점은 없다	11.5	32.9	8.4	35.7	19.9	18.0	5.0	26.4	17.3	10.9	37.2	20.3	21.1

염려 건강 문제 별 대처 방법	장 건강	영양 보충	기억력	혈행 개선	구강 건강	숙면	혈당 조절	체질 개선	배변 활동	알레 르기	전립선 건강	지구력 증진	기타
(Base)	(107)	(104)	(103)	(83)	(82)	(75)	(71)	(54)	(52)	(42)	(39)	(32)	(35)
음식/건강관련 식품 섭취	49.5	83.7	24.3	74.7	14.6	8.0	60.6	40.7	40.4	45.2	38.5	18.8	48.6
건강 기능 식품을 섭취한다	17.8	40.4	8.7	48.2	4.9	2.7	8.5	22.2	15.4	4.8	25.6	9.4	5.7
건강 보조 식품을 섭취한다	15.0	13.5	8.7	8.4	3.7	4.0	7.0	9.3	17.3	9.5	5.1	6.3	-
약을 복용한다	9.3	2.9	1.0	13.3	6.1	1.3	42.3	3.7	1.9	26.2	7.7	-	40.0
해당 증상에 좋다는 보양식을 섭취한다	5.6	25.0	2.9	4.8	-	-	2.8	5.6	-	-	-	-	2.9
한약을 복용한다	-	1.0	1.0	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-	-
녹즙을 마신다	1.9	1.0	1.9	-	-	-	-	-	5.8	2.4	-	3.1	-
휴식, 운동 등으로 관리	22.4	9.6	24.3	18.1	6.1	52.0	23.9	20.4	15.4	16.7	20.5	62.5	17.1
충분한 휴식을 취하려고 노력한다	7.5	4.8	13.6	6.0	2.4	44.0	7.0	3.7	-	9.5	5.1	15.6	2.9
꾸준히 운동을 한다	15.0	4.8	10.7	12.0	3.7	8.0	16.9	16.7	15.4	7.1	15.4	46.9	14.3
민간 요법을 한다	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
음식을 조절한다	-	-	-	-	-	-	-	-	3.8	-	-	-	-
의료기 사용, 병원 검진 등 전문적인 관리	3.7	-	1.9	-	37.8	-	7.0	-	1.9	11.9	12.8	-	8.6
정기적으로 병원에서 검진을한다	2.8	-	1.9	-	34.1	-	7.0	-	1.9	9.5	12.8	-	8.6
대체의학을 이용한다	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-	-
전문 관리실에서 정기적으로 시술/관리를 받는다	-	-	-	-	3.7	-	-	-	-	-	-	-	-
의료기를 사용한다	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
크게 노력하는 점은 없다	24.3	6.7	48.5	7.2	40.2	40.0	8.5	38.9	38.5	26.2	28.2	18.8	25.7

○ 2013년 인정된 기능성 내용은 총 16개이며, 이 중 체지방 감소 (7건)와 피부건강 (6건) 기능성이 가장 많이 인정됨. 동 기능성의 인정건수가 늘었는데는 사회 전반으로 아름다움과 건강에 대한 관심이 고조되며, 다이어트 및 피부건강 등과 관련한 기능성의 소비수요가 지속적으로 증가한 것으로 분석됨. 특히, 개별인정건수가 감소하는 상황에서도 돌외잎주정추출분말 (체지방 감소), 도라지추출물 (간건강), 들쭉열매추출물 (눈건강) 등 20종의 원료가 신규로 기능성을 인정 받았으며, 기능성 원료개발을 위한 산업계 끊임없는 연구가 이루어지고 있는 것으로 보임.

○ 현대사회의 도시화된 생활환경, 육체적 활동 감소 및 식생활 문제점 등으로 인해 많은 대사

성질환 환자가 증가하고 있다. 비만은 당뇨병, 심혈관 질환 등과 함께 대사성질환 중 하나로 이들 질환의 근본적인 원인으로 제시된다. 즉, 비만은 단순히 미용상의 문제일 뿐만 아니라 현대사회의 심각한 질환이므로 건강관리 및 치료가 절실히 요구됨.

○ 심혈관계 질환을 유발하는 원인 역시 식습관, 생활방식, 유전적 요인 등 여러 가지로 보고되고 있으며, 국민 생활수준의 증가 및 선진화가 진전 될수록 혈행장애 등의 발생률은 더욱 증가하는 경향을 보임.

○ 이와 같은 추세로 천연식물에서 유래한 기능성 식품의 연구가 증가되고 있으나 천연식물의 기능성에 대한 확실한 과학적 근거가 미비하고 이에 따른 치료효과와 부작용의 판별이 어려워 무분별하게 사용될 우려가 있으므로 체계적인 연구 수행이 요구되고 있음. 또한, 소재의 표준화가 반드시 필요하고 품질이 확보된 기능성 천연물 유래 제품이 공급되기 위해서 품질관리에 대한 개념을 도입함으로써 품질 저하로 인한 부작용 또는 기능성이 떨어지는 등의 문제를 해결해야 함.

○ 우리나라 고령화 속도는 세계 최고 수준으로 2000년에 65세 이상의 인구가 7.2%로 이미 고령화 사회에 접어들었고, 그 비율은 2020년에 15.7%, 2030년 24.3%, 2060년 40.1%에 이를 것으로 예측되어 향후 15년 정도 지나면 초고령 사회에 도달할 것으로 보임. 이러한 급속한 고령화에 따라 만성질환이 급속하게 증가하고 있음. 이로 인해 국민 의료비가 지속적으로 증가하는 추세임. 따라서 관련 질환 예방을 위한 해결책이 요구됨.

○ 중국도 2010년 1억 110만명이었던 노인인구가 2025년에는 2억명에 육박할 것으로 전망됨. 따라서 바이오, 헬스케어 산업이 커질 것으로 예상됨.

○ 건강에 대한 소비자의 관심과 질병예방 차원에서 건강식품 성분이나 기능성 식품섭취에 대한 관심이 증가하고 있기 때문에 국내 농림수산물 원료를 활용하여 건강기능식품 소재를 개발하는 것은 농수산물을 고부가가치화 함으로써 식품산업뿐만 아니라 타 산업 (제약, 한방, 화장품)과의 접목 가능성을 높여 미래 성장 동력으로 발전할 가능성이 높음.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

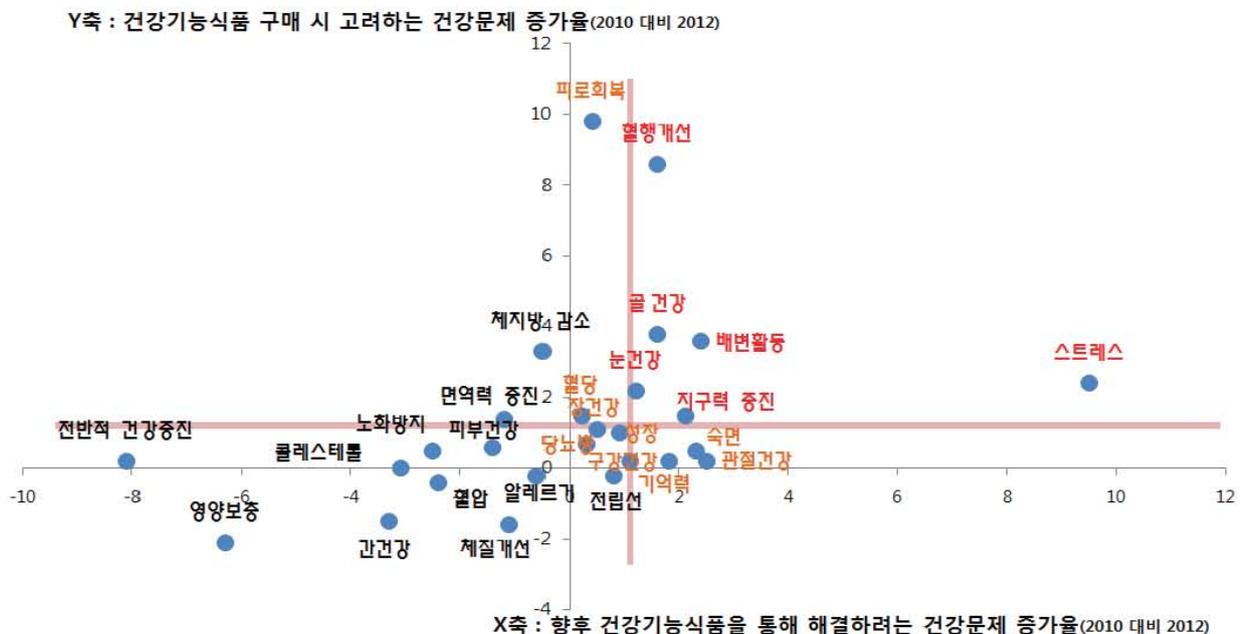
1. 국내 기술개발 및 제품현황

가. 기술개발 현황

○ 미국, 유럽, 일본에서는 국민의 건강을 최우선으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 분야로 기능성식품을 주목하고 이에 대한 연구가 활발히 진행 중임. 이에 비해 국내 기능성 식품산업은 90년대 시장 도입기에 진입, 2002년 건강기능식품법 제정으로 세계 속의 기능성 식품 시장에 진입하는 제도적 장치를 마련하여 2006년 초기 성숙기에 진입하였으나 타 국가에 비해 연구개발이 다양하거나 활발하지 않음. 현 시점은 안정적 성장시기로 발전해야하는 시기로 적극적인 국가의 산업 지원 및 육성을 통해 성숙기로 나아가야 함.

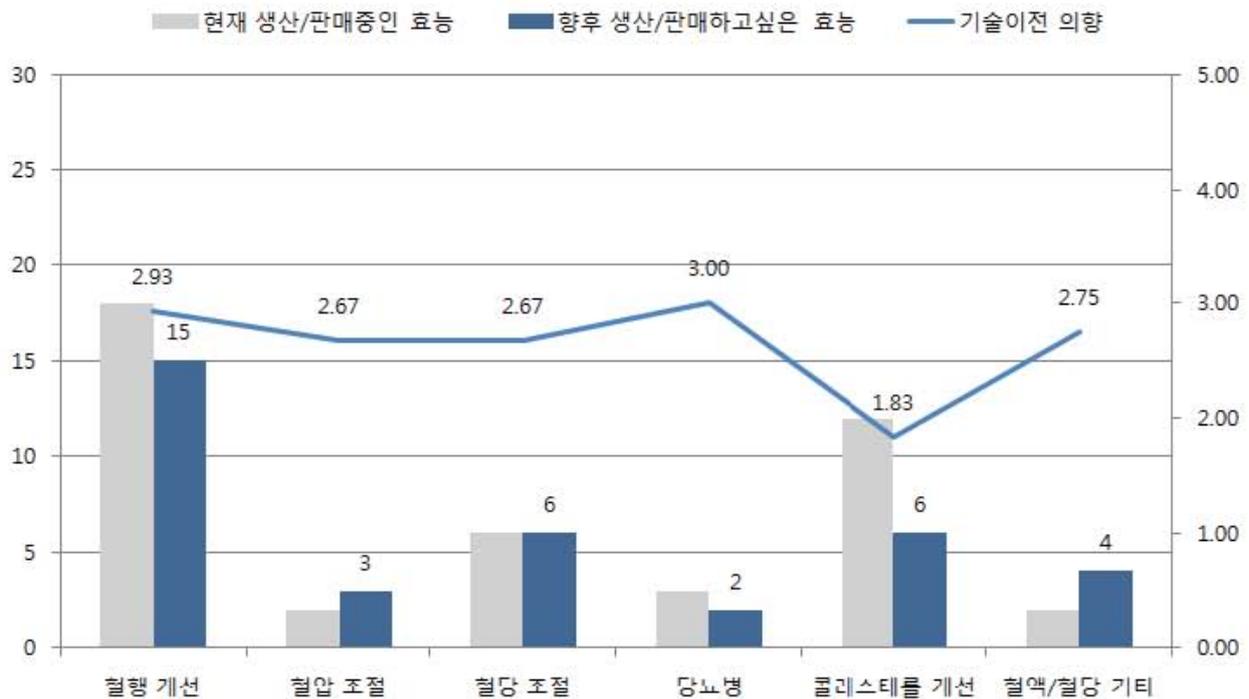
○ 혈액순환개선에 관한 관심과 수요가 매우 크며, 혈전 예방, 콜레스테롤 저하 및 고혈압 조절 등의 측면에서 시도되어 비교적 활발하게 진행되어 왔으나 활성탄색수준에 그친 경우가 대부분임.

○ “건강기능식품 산업동향 보고서” (2013)에 의하면, 기술 사업화 유망 효능 분야이면서 건강 기능식품을 통해 해결하려는 건강문제로 혈행개선이 높은 증가율을 나타냈음. 기술사업화의 경우, 연구개발이나 기술이전처럼 기술공급자와 기술수요자간의 관계보다는 소비자들의 니즈에 영향을 많이 받기 때문에 소비자들의 현재 및 미래니즈의 변화를 중심으로 매트릭스를 분석함.



<사업화 유망 분야 매트릭스 분석>

○ 혈행/혈당 분야 중 향후 생산/판매하고 싶은 효능으로 “혈행개선”이 15건으로 가장 높게 나타났으며, “혈당조절”, “콜레스테롤개선”이 각각 6건으로 그 뒤를 이었고, “기타”와 “혈압조절”이 각각 4건과 3건을 기록하였음. 기술이전 의향은 “당뇨병”이 3.00점으로 가장 높게 나타났으며, “혈행개선”이 2.93점 등으로 나타났음.



<혈행/혈당 분야 기술 니즈 및 기술이전 의향 현황>

○ 바이오푸드네트워크 (이하BFN)에서 주관하고 한국 건강기능식품협회와 대상(주)이 조사한 “2013 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사”보고서에 의하면 2010년 조사 결과 대비 높은 증가율을 보인 건강문제로는 피로회복 (9.8%p), 혈행개선 (8.6%p), 체지방감소 (3.3%p) 등 인 것으로 나타남.

○ 12년 건강기능식품 생산실적은 국내외 전반적 경기침체에 따른 건강기능식품 수요감소 및 중저가 제품 선호 등의 이유로 둔화세를 보였으나 개별인정형 건강기능식품은 성장세를 이어가고 있는 것으로 나타났다.

○ 건강기능식품 주요 원료별 시장규모 동향을 살펴보면, 생산품목 중에서 아직까지 홍삼이 주요 품목으로 나타나고 있지만, 최근에는 밀크씨슬, 백수오 등 개별인정형원료를 이용한 제품도 확대되고 있는 추세이다. 또한 일반식품 형태의 건강기능식품도 2009년부터 인정하기 시작하여 관련제품의 생산도 확대될 것으로 생각됨.

○ 이화여자대학교 권오란 연구팀은 오메가-3 지방산 함유유지의 혈행 개선 기능성을 건강기

능식품 재평가 기준에 맞추어 체계적 고찰을 실시하였음. 총 112건의 연구가 평가되었고, 그 결과 오메가-3 지방산 함유유지 섭취는 혈행 개선 기능성을 나타낼 수 있는 것으로 판단되나 일부 연구에서 개선 효과가 없는 것으로 보고되고 있으므로 향후 연구결과 추이를 지속적으로 지켜볼 필요가 있을 것이라고 보고하였으며, 이는 국내 저널 학술지 (**Journal of Nutrition and Health 46(3); 226-238, 2013**)에 게재됨.

○ 분당서울대학교병원 내분비내과 임수 교수는 대사증후군과 인슐린 저항성에서 염증반응은 핵심적인 역할을 하며, 치료의 목표가 될 수 있다고 발표하였는데, 다양한 **ATM (adipose tissue macrophage)**과 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병에서의 염증반응과의 관련성을 중심으로 연구하였으며, 비만 및 염증반응과 관련된 여러 질환들 사이 관계는 지방조직의 염증반응이 관련 질환을 악화시킬 수 있다고 보고하였음.

○ 고려인삼학회에서는 비만과 관련된 인삼의 효능을 밝혔음. 1) 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 및 기타 혈액 중의 지질성분에 미치는 효과, 2) 체중과다, 지방세포 과다 또는 지방간 등에 미치는 효과, 3) 지질대사 조절에 관련하는 신호전달 (**cell signaling**) 체계에 대한 효과 등을 세분하여 발표하였고, 결론적으로 인삼은 지질대사를 원활하게 하여 혈중 지질 성분의 비정상적 변동에 방어적 효과를 보이는 것으로 기대됨.

○ 전북 부안군의 오디가 혈관의 염증을 여러 측면에서 종합적으로 완화시켜 주는 등 혈행개선 효과에 탁월하다는 연구 결과가 발표되었음. 오디 추출물은 이부프로펜 (**Ibuprofen**, 소염진통제) 보다 낮은 농도에서 염증 및 통증유발효소인 리폭시지나아제 (**Lipoxygenase**)를 저해시켜 혈관 염증을 완화하는 효과가 있다고 보고 하였음.

○ 인제대학교 백병원 이선영 교수연구팀은 고밀도지단백 콜레스테롤의 혈중농도 저하는 다른 심혈관계 질환의 위험인자들과 독립적으로 심뇌혈관 질환의 발생빈도를 높이며, 최근에는 비만이 고밀도지단백 콜레스테롤의 혈중농도 저하뿐 아니라 그 기능에서 많은 영향을 줄 것으로 추정하고 있음. 그러나 아직까지 고밀도지단백 콜레스테롤의 인체 내 작용 기전은 명확히 규명되어 있지 않음. 이에 비만이 고밀도지단백 콜레스테롤의 작용에 관여하는 새로운 기전에 대한 실험적인 근거들에 대해 연구 중이며, 아울러 고밀도지단백 콜레스테롤의 기능 증강을 목표로 현재 꾸준히 연구 수행 중임.

○ 호두에 함유된 알파-리놀레산 (**ALA**: 오메가-3 지방산의 일종)이 심혈관 질환 위험을 낮춘다는 연구결과가 나와 관심을 끌고 있음. 이번연구 결과는 최근 미국임상영양저널 (**American Journal of Clinical Nutrition**)에 실렸음. 연구 결과에 의하면 **ALA**가 심장 건강에 미치는 잠재적인 이점을 뒷받침 하며, 일반 소비자들은 식단에 적정량의 **ALA**를 포함시킬 것을 권고하였음.

나. 제품개발 현황

○ 정부에서는 고에너지 식생활과 안락한 생활 습관으로 인한 에너지 대사의 불균형으로 인해 고지혈증, 비만, 동맥경화, 심혈관계 질환 등 대사증후군의 발병률이 증가하고 있고 이로 인해 사망률도 급격히 증가하고 있다고 발표하였음. 그러나 현재 시판되고 있는 대부분의 고지혈증 및 심혈관계 질환 치료제는 값이 비싸고 오랫동안 복용하면 부작용을 일으킬 수 있다고 알려져 있음. 따라서 오랫동안 식품으로 섭취해 오면서 안정성과 효능이 입증된 천연물질을 이용한 비만 예방 및 혈행 개선 건강기능식품 및 치료제를 개발하기 위하여 현재 관련분야 업체와 산업화를 위한 제반사항을 협의 중에 있음.

○ 또한, 정부 차원에서 연구 개발로 얻어진 기술이 사업화로 연계될 수 있도록 국가차원에서 기술사업화 지원사업이 추진되고 있음. 기능성 소재 및 건강기능식품 개발사업단, 생활습관병 개선 기능성 가공제품개발 및 산업화, 항비만 바이오 신소재 사업단 등 5개의 과제가 현재 진행 중임.

○ 천연원료 건강기능식품 기업 (주)씨스팜 측은 자사의 건강기능식품 '몸팔팔-PMF88 멜론 SOD'의 주원료인 PM88 멜론추출물이 지난 2014년 7월 2일 식품의약품안전처로부터 혈행개선에 대한 기능성을 추가로 인정받았음을 보고하였음. PM88은 혈관벽 두께가 두꺼워지지 않도록 혈관의 유연성을 유지해 심혈관 질환 및 당뇨로 인한 신장 섬유화 뿐만 아니라 심장세포피사 억제에 도움을 준다. 이처럼 두꺼워진 혈관벽 두께를 감소시키면 심뇌혈관 질환도 개선될 것으로 기대됨.

○ 국민들은 소득수준의 향상과 더불어 로하스 및 웰빙 추구를 통해 삶의 질을 높이려는 하프 로 건강기능식품에 대한 관심도 꾸준히 증가하고 있음. 소비계층의 다양화와 함께 전통적인 식품 기업 외에도 화장품 및 제약기업의 참여가 활발한 것으로 보아 건강기능식품 개발은 앞으로도 크게 성장할 것으로 기대됨.

○ 2012년도에는 기능성원료 시장에서 크게 관심을 받은 원료가 없었으나 식품의약품안전처는 현재 국내 천연생물자원을 활용한 다양한 소재가 기능성 원료로 신청이 증가하고 있어 향후 기능성 원료 인정은 증가할 것으로 전망하면서 조기 상용화 될 수 있도록 기술 상담 및 지원을 강화해 나가고 있음.

○ 농업기술실용화재단은 기업체의 기술을 발굴하기 위해 100여개 건강기능식품 업체를 대상으로 향후 개발기술 및 기술이전 의향 등을 조사한 결과 체지방 감소, 혈행 개선, 면역력 증진 등의 효능이 있는 건강기능식품 개발 수요가 많았다고 보고하였음. 또한 이들은 기술사업화 유망 분야인 것으로 보임.

○ 현재 혈행 개선 분야는 가장 역동성이 큰 것으로 평가되는 건강기능식품 분야이며 은행잎

추출물이 국내에서 ‘기억력 개선과 혈행 개선’ 기능성 식품으로 2010년부터 가장 많은 인정을 받았음. 또한 은행잎추출물을 이용한 혈액 순환제로 기넥신, 티나민, 씨큐란 등이 출시되었음.



<은행잎추출물을 이용한 혈액순환제>

○ 체지방 조절을 위한 제품의 경우 기존의 기능성식품을 복용 시 초기에는 효과를 보이는 부분은 있으나 장기 복용으로 생길 수 있는 부작용과 지속적인 효과에 대해 신뢰도가 떨어져 있는 상태임. 특히 많은 소비자들이 체지방 및 혈당 개선용 식품을 계속 복용 했을 경우 간 손상의 우려를 나타내고 있으며, 일부 제품은 빠른 효과를 통한 영입의 극대화를 피하기 위해 복용량을 늘려 소비자들이 2차적인 피해를 보고 있는 실정임.

○ 한미약품이 만성피로 개선과 노화방지에 효과가 있는 고함량 비타민 B 복합제인 '제텐-비'를 출시하였음. 제텐-비에는 피로 해소와 에너지 대사 활성화, 뇌기능 개선 등에 효과적인 비타민 B 군 10 종과 항산화 작용을 통해 노화를 방지하는 비타민 C, E가 함유되어 있는데, 이 제품에 함유된 미강유 (쌀겨 기름)에서 추출한 감마오리자놀 성분은 갱년기 증상 완화와 심혈관 질환 예방 등에 도움을 줄 것으로 기대함.

○ 동맥경화증의 원인이고 심혈관질환의 발생 가능성을 높이는 혈중 콜레스테롤의 개선에 도움을 주는 건강기능식품 기능성 원료로는 대나무잎추출물, 보리 베타글루칸 추출물, 보이차추출물, 사탕수수 왁스알코올, 스피루리나 등이 있고, 고시형 원료로는 레시틴, 글루코만난, 귀리, 대두단백질, 키토산, 이눌린 등이 있음. 또한 혈중 중성지방 개선에 도움을 주는 건강기능 식품 기능성 원료로는 글로빈가수분해물, 난소화성말토덱스트린, 대나무잎추출물 등이 있음.

○ 항혈전 및 고지혈증 개선 건강기능식품



2. 국외 기술개발 및 제품현황

가. 기술개발 현황

○ 해외에서는 비만, 대사증후군, 심혈관계 질환 관련 기술 동향은 유전자 정보를 활용하는 생명공학의 첨단 기술을 식품 분야와 연관시켜 식품 **Phytochemical**과 인간유전체간 관련성, 영양 관련 질병 제어 및 맞춤형 처방 분야로 응용하는 연구가 핵심 연구 분야로 부상 중임.

○ 2000년대 전부터 혈액 응고 시스템, 혈소판 활성화 및 응집 정도 등에 따른 혈행 장애 및 심혈관계 질환의 연구가 활발히 진행되고 있는데, 심혈관 질환과 관련 대사증후군 및 혈행 연구는 주로 독일, 프랑스, 벨기에 등의 유럽지역과 미국이 연구를 주도하여 왔으며, 일본도 많은 성과를 보임.

○ 미국의 Hua Cai 연구팀은 “**Role of Vascular Oxidative stress in Obesity and Metabolic Syndrome** (혈관의 산화적 스트레스가 비만 및 대사증후군에 미치는 역할)”을 발표하였으며, 결론적으로 혈관의 산화적 스트레스는 비만과 대사증후군을 동반하며, 혈관 염증과 지방합성에도 관여 한다 라고 보고 하였음. 이 논문은 2014년 국제저명학술지 **Diabetes**에 게재됨.

○ 미국 Swapan Kumar Dasgupta와 Perumal Thiagarajan D 박사팀의 연구보고에 의하면 **MFG-E8**은 당단백질의 세포성장인자로서 지방 상피조직 표면을 포함한 여러 조직의 세포막에 위치하며, 각종 조직의 전반에 걸쳐 다양하게 분포하는데 조직생성, 신생혈관 형성, 회복 등의 생리학적 기능이 있다. 이외에도 혈액응고 및 지혈에도 관여하는 것으로 최근 보고됨.

○ 독일의 안드레아스 자이오 그룹을 중심으로 약 1000명 이상의 대규모 심혈관계 질환 관련 임상연구를 계획하고 있음. 또한 프랑스 필립 페나쉬 박사 연구팀은 2000년 초반부터 심혈관계 질환 관련 임상연구를 실시 중임.

○ 일본은 청부차원에서 비만, 당뇨병, 심혈관계 질환을 포함한 생활습관병의 연구개발을 지원하고 있으며 2011년에는 그 지원액이 34억 엔이었다. 따라서 대사증후군 가족의 **genome** 해석 및 **exon** 시퀀스를 통한 유전자 연구 및 신규 바이오 마커 도출 연구가 진행 중임.

○ **JPPP** 연구에 따르면, 일본 고령자에서 저용량 아스피린에 의한 심혈관 질환 예방 효과는 없고 오히려 출혈 위험만 증가함. 또한, 고혈압이나 고지혈증 등의 위험인자가 있는 60세 이상 노인을 대상으로 한 대규모 연구 결과, 저용량 아스피린군에서 아스피린 비복용군에 비해 심혈관으로 인한 사망률과 비치명적인 심근경색 및 뇌졸중 위험이 감소하지 않았음.

나. 제품개발 현황

○ 웰빙추세에 따른 소비자의 만족도 조건 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되고 있음.

○ 건강기능식품의 분류기준에 따라 세계시장규모를 추정한 결과 큰 차이가 없음. 국내건강기능식품의 정의에 부합하는 제품의 생산실적을 비교하는데 어려움이 있으나 **Nutrition Business Journal (2012)**의 자료에 따르면 2010년 건강기능식품 세계시장 규모는 약 **845**달러로 추정됨. 세계건강기능식품 시장규모는 2009년에 비해 **5.4%** 성장을 기록하였음.

○ 대사증후군 예방 건강기능식품으로 가장 주목받고 있는 소재 중 하나는 공액리놀레산 (**Conjugated Linoleic acid-CLA**)임. **Fost & Sullivan**사에 따르면 세계 공액리놀레산 시장은 지역적으로 미국과 유럽이 **85%**를 차지하고 있으며 아시아 시장은 일본을 제외하고는 아직 규모가 작음.

○ 최근 일본과 유럽은 프로바이오틱스 (**Probiotics**) 연구가 활발히 진행되고 있으며, 낙농제품에 큰 매출을 시현하고 있음. 프로바이오틱스는 장에서 한가지 혹은 제한된 수량의 박테리아 성장과 활동에 자극을 주어서 숙주의 건강에 유익하게 영향을 미치는 난소화성 식품 성분으로 현재 비만 및 대사증후군 개선 효과에 영향을 미치는 것으로도 확인 되었음. 또한 유럽은 기능성 음료, 시리얼, 빵, 스프레이드의 시장이 증가하고 있음.

○ 미국은 현재 소아비만 및 성인병에 대한 경각심이 부각되면서 미국 소비자의 식품 소비 경향이 변화됨에 따라 미국의 기능성식품 시장은 꾸준히 매출 증가를 보이고 있음. 세부품목별로 멀티비타민의 매출이 가장 높으며 **Fish/Animal Oil**이 가장 높은 성장률을 보였고, 프로바이오틱스와 비타민B도 각각 **16.3%**와 **9.4%**로 전년대비 높은 성장을 했음. 이러한 점으로 미루어 볼 때 미국의 건강기능식품 시장은 매년 꾸준히 성장할 것으로 예측됨.

○ 미국의 **IGSB (Insttute for Genomics & Systems Biology)** 기관은 2006년부터 설립되었으며 생물학 관련 주요 연구를 **DNA** 시퀀스, 유전자 발현도 분석 등 유전체 연구에 초점을 맞춰 대사성질환, 당뇨병, 및 염증성 장 질환 등의 연구가 진행 중임. 대사 증후군 원인 규명과 치료법 개발을 위한 천연물질 및 기존 치료제의 조합에 관한 신약 제품 개발이 주를 이룸.

○ 일본기업 (**Takeda Chemical Industries**)과 미국기업 (**Eli Lilly and Company, XOMA Technology, Merck Sharp & Dohme**) 아일랜드기업 (**Amarin Pharmaceutical Ireland**)은 대사 증후군 병인규명 및 치료법 개발에 관련한 특허의 비중이 매우 높은 것으로 나타남.

○ 유럽의 경우, 기존에 있는 특정 성분을 더욱 보강하거나 새로운 성분을 첨가한 식품 개발이

최근 추세이며 예로, 스위스연구팀에 의해 개발된 비타민 A와 철분이 풍부한 황금쌀 (golden rice)이 대표적임.

○ 과거에는 비타민제 정도만이 건강기능식품으로 생각되었다면 최근에는 다양한 성분과 기능을 앞세운 새로운 제품들이 속속 등장하고 있다. 이러한 배경에는 고령화, 만성질환의 증가 등 수요측면의 변화 외에도 효능에 대한 과학적 근거 제시와 신기술 개발, 관련법규 마련 등이 큰 역할을 한 것으로 보인다.

○ 혈행 장애 및 비만 치료를 위해서 여러 종류의 많은 화학약제 약품이 시중에 유통되고 있음에도 불구하고 전통적으로 민간에서 사용해 온 천연물을 이용한 새로운 복합소재를 개발할 필요가 있다. 특히 이러한 소재는 식재료로 사용하는데 문제가 없으므로 동물실험 등을 통한 효능 검증이 선행되면 다양하게 이용될 수 있다.

○ 그러나 이러한 천연물 소재가 기능성식품으로 이용되는 것은 극히 일부이며 대부분이 약리 효과를 중심으로 한 연구가 주종을 이루고 있다. 실험실 규모의 연구 결과는 바로 산업화에 적용하기 어렵다. 따라서 천연물 성분 분석이나 추출 조건에 관한 실험실 규모의 연구 결과를 바탕으로 산업체에서 실용화가 가능까지의 연구에 대한 적극적이고, 지속적인 정부의 지원과 연구가 필요하다. 또한, 아직 많은 소비자들이 비싼 가격이나 효능에 대한 불확실로 인해 건강기능식품 복용을 주저하는 것으로 나타나고 있다. 따라서 건강기능식품의 효능에 대한 과학적 근거가 좀 더 뒷받침되고, 유통 구조가 보다 투명한 방향으로 개선된다면 건강기능식품이 소비자들의 신뢰를 얻고 이를 통해 시장이 보다 안정적으로 성장할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 제1세부과제

: 사자발약쑥, 유자 및 감잎의 혈행 개선 건강기능소재 및 제품화 기반기술 개발

1. 원료 표준화

가. 혈행개선 원료 소재 확보 및 지표성분 분석

(1) 사자발약쑥

- 약쑥은 전국적으로 자생하고 있으나 주로 인천, 강화, 옹진, 당진 등 서해안 지방과 전북과 강원도 일부지역에서 생산되고 있음.
- 강화군 특산물인 사자발약쑥은 타 지역에서 생산되는 약쑥에 비해 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높으며, 다양한 염증 억제작용으로 인해 예로부터 한방에서 널리 사용되어 왔음.
- 약쑥의 유효 성분은 flavonoid 화합물인 eupatilin으로 알려져 있기에 표 1-1과 같이 6월에 수확한 강화도 약쑥과 국내 유통중인 여러 약쑥을 추출하여 수율과 eupatilin 함량을 분석하였음.
- 분석결과 강화도 약쑥과 시중 유통중인 뜸쑥, 중국산 약쑥의 eupatilin 함량은 큰 차이가 없는 것으로 확인되었고, 인진쑥의 경우에만 eupatilin 함량이 매우 적은 것으로 확인되었음. 또한 뜸쑥의 경우 섬유질만을 분리하여 제조하므로 분말 손실로 인해 수율이 크게 저하되는 것을 확인하였음.

표 1-1. 약쑥 추출물의 수율 및 성분함량 분석

분류	Yield (%)	Jaceosidin 함량		Eupatilin 함량		Eupatilin /Jaceosidin 비율	
		(%)	(mg/100 g)	(%)	(mg/100 g)		
강화도 지역1	15.79	0.39	390	0.77	770	1.97	
강화도 지역2	16.49	0.36	360	0.73	730	2.02	
강화도 지역3	17.86	0.38	380	0.83	830	2.16	
시 중 유통	뜸쑥1	6.71	0.32	320	0.74	740	2.33
	뜸쑥2	7.41	0.37	370	0.84	840	2.27
	인진쑥	15.07	0.20	200	0.02	20	0.12
	중국산약쑥	14.64	0.33	330	0.81	810	2.44

(2) 유자

- 국내 주요 유자 산지로는 고흥, 완도, 거제, 남해 등이 있으며, 이 중 고흥 유자는 전국 생산량의 약 43%를 차지하고, 연 생산량이 약 5,700톤에 달함. 또한 고흥 유자는 지리적표시(제 14호)에 등록되어 소비자 인식이 높음 (표 1-2).
- 또한 고흥에는 전국 1, 2위 규모의 유자가공공장을 갖추고 연간 1만톤 이상의 유자차를 생산하는 업체 (한성푸드, 두원농협)가 있어, 추후 산업화를 위한 전략적 제휴와 함께 안정적인 원료의 공급이 가능함.
- 유자의 대표적 생리활성물질로는 naringin과 hesperidin이 알려져 있으며, 실제 산지별로 확보한 유자 추출물의 성분 분석 결과 두 물질이 검출되었음 (표 1-3).
- 다만 유자의 출하시기를 벗어나 1월에 확보한 과숙과인 관계로 유자의 품질 차이가 컸고, 이로 인해 수율 및 성분차이가 발생되었다고 여겨짐.

표 1-2. 유자 생산량 추이

구분 \ 연도	1985	2000	2008	2011
전국 생산량(M/T)	1,543	14,005	10,317	13,147
고흥 생산량(M/T)	260	3,960	43,00	57,00

(고흥군농업기술센터, 유자·하나봉 무농약 재배기술, 2012)

표 1-3. 유자 산지별·지역별 추출물 수율 및 성분 분석

분류	Yield (%)	Naringin 함량		Hesperidin 함량		Hesperidin /Naringin 비율
		(%)	(mg/100 g)	(%)	(mg/100 g)	
거제 지역1	41.80	0.40	400	0.67	670	1.68
거제 지역2	42.51	0.52	520	0.98	980	1.86
고흥 지역1	41.58	0.38	380	0.68	680	1.80
남해 지역1	43.51	0.40	400	0.81	810	2.00
남해 지역2	42.72	0.31	310	0.73	730	2.39
남해 지역3	48.66	0.36	360	0.71	710	1.98

(3) 감잎

- 식용 및 약용으로 재배적 가치가 있는 감나무의 품종은 크게 단감과 뽕은 감으로 분류 됨. 그 중 추위에 약한 단감은 남부 및 일본에서 많이 재배되고, 뽕은 감나무는 우리나라와 중국에서 일반적으로 재배됨.
- 우리나라에서 재배되고 있는 고유종인 뽕은 감나무는 감의 가치를 높이기 위해서 지속적으로 개량되어 왔는데, 그 종류는 청도반시, 동시, 사곡시, 단성시, 장등이, 월하시 및 갑주백목 등으로 지역의 기온 및 토양의 특성에 따라 재배되고 있음.
- 최근 들어 감말랭이, 아이스홍시 등 다양한 감가공품의 생산과 꾀감의 가격상승으로 뽕은 감의 10ha당 소득이 2003년 2,842천원(단감은 1,339천원)으로 높은 수익성을 나타내었고 재배면적이 급격히 증가되고 있음.
- 단감이나 뽕은감의 감잎을 모두 감잎차로 만들 수 있으며 5~6월 감잎이 비타민C 함량이 많다고 알려져 차용으로 이용되고 있음.
- 산업화를 위한 원료확보 측면에서 어린 감잎의 사용은 감의 주요 생육시기와 맞물려 감의 생산에 영향을 미칠 수 있으므로 혈행개선 소재로서의 감잎은 감 수확이후인 11월경 대량으로 확보하는 것이 좋을 것으로 판단됨(청도반시의 경우 청도지역에서 주로 재배되고 있으며, 단일품종으로 관리되어 표준화된 원료 확보가 용이한 장점이 있음) (표 1-4).
- 청도지역의 5개 나무에서 월별로 감잎의 주요 활성성분인 탄닌 (카테킨류)의 함량 변화를 살펴본 결과 9월 들어 감소하는 경향을 보임 (표 1-5, 그림 1-1).

표 1-4. 지역별 감 재배면적 순위

품종	1위	2위	3위	4위	5위	전체(단위:ha)
단감 (부유)	경남 창원 2,089.9	경남 김해 1,478.7	경남 진주 1,255.0	경남 밀양 1,243.9	경남 창녕 949.3	13,372.6
뽕은감 (청도반시)	경북 청도 1,615.9	경남 밀양 304.9	경북 경산 27.2	-	-	1,981.6
뽕은감 (갑주백목)	전남 영암 499.0	전남 광양 395.4	경남 하동 302.0	전남 장성 245.4	경남 진주 128.3	3,326.3

(농림부, 과수실태조사, 2007)

<표 5> 청도 지역별, 월별 감잎 추출물의 수율 및 성분 함량 비교

시기	지역	Yield (%)	Catechin 함량		Epicatechin 함량		Epicatechin gallate 함량		Catechin+Epicatechin+Epicatechin gallate 함량 (%)
			(%)	(mg/100 g)	(%)	(mg/100 g)	(%)	(mg/100 g)	
7월	1	17.02	0.17	170	0.13	130	0.14	140	0.44
	2	16.09	0.12	120	0.11	110	0.11	110	0.35
	3	18.68	0.23	230	0.13	130	0.20	200	0.55
	4	17.91	0.24	240	0.12	120	0.18	180	0.54
	5	15.94	0.17	170	0.11	110	0.14	140	0.42
8월	1	16.70	0.15	150	0.11	110	0.11	110	0.37
	2	15.71	0.15	150	0.10	100	0.10	100	0.36
	3	14.82	0.27	270	0.11	110	0.14	140	0.52
	4	16.03	0.20	200	0.12	120	0.12	120	0.44
	5	16.19	0.18	180	0.11	110	0.12	120	0.41
9월	1	13.98	0.13	130	0.13	130	0.10	100	0.35
	2	15.18	0.10	100	0.11	110	0.08	80	0.29
	3	13.23	0.29	290	0.15	150	0.13	130	0.57
	4	17.48	0.18	180	0.12	120	0.10	100	0.40
	5	17.61	0.13	130	0.10	100	0.11	110	0.35

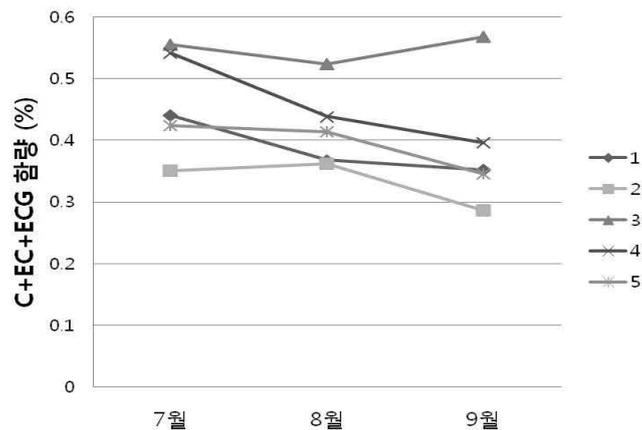


그림 1-1. 청도 지역별, 월별 감잎 추출물의 성분 함량 비교

나. 원료 추출조건 설정

(1) 사자발약쑥

- 약쑥의 추출조건 설정을 위해 열풍 건조된 강화도 약쑥 (2012. 6. 수확)을 이용하여 조건 설정 실험을 진행하였음.
- 조건 설정 실험은 주정함량, 온도, 추출 시간, 용매비율 및 반복횟수 순으로 진행하였음.
- 임가공비의 차이는 주정 (1,540원/kg) 함량 및 용매 비율이 큰 비중을 차지하므로 수율 및 지표함량과 함께 주정 함량에 따른 예산 단가를 함께 고려하였음.
- 수율 및 지표함량, 주정함량에 따른 예산 단가를 고려하여 약쑥의 최적 추출조건은 70% 주정, 70℃, 2시간, 1:15 (건조원물:용매), 1회 추출로 설정하였음 (표 1-6).

표 1-6. 약쑥의 추출 용매별, 온도별, 시간별, 용매비율 및 반복횟수별 수율 및 지표함량 비교

용매 조건	Yield (%)	Eupatilin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
0% 주정	14.61	0.00	0	194,416
30% 주정	13.98	0.62	620	203,155
50% 주정	14.83	0.61	610	191,467
70% 주정	12.27	0.92	920	281,674
100% 주정	7.67	1.39	1,390	571,206

온도 조건	Yield (%)	Eupatilin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
상온	7.12	1.37	1,370
50 ℃	11.98	1.04	1,040
70 ℃	14.62	0.94	940
90 ℃	13.98	0.90	900

추출 시간 조건	Yield (%)	Eupatilin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
1 h	14.25	1.20	1,200
2 h	15.49	1.10	1,100
3 h	15.35	1.06	1,060
4 h	15.58	1.04	1,040

5 h	15.65	1.07	1,070
6 h	16.75	1.00	1,000

용매비율 및 반복횟수	Yield (%)	Eupatilin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
1:10, 1회	8.69	1.06	1,200	239,225
1:10, 2회	6.88	0.93	1,100	301,899
1:15, 1회	13.24	1.15	1,060	197,667
1:15, 2회	6.60	0.85	1,040	245,078
1:20, 1회	14.64	1.15	1,070	215,534
1:20, 2회	5.10	0.77	1,000	422,496

(2) 유자

- 유자의 추출조건 설정을 위해 동결건조된 거제유자 (2012. 1. 확보)을 이용하여 조건 설정 실험을 진행하였음.
- 조건 설정 실험은 주정함량, 온도, 추출 시간, 용매비율 및 반복횟수 순으로 진행하였음.
- 추출조건 설정은 수율 및 지표함량과 예상 단가를 함께 고려하였음.
- 수율 및 지표함량, 주정함량에 따른 예상 단가를 고려하여 유자의 최적 추출조건은 50% 주정, 70℃, 2시간, 1:20(건조원물:용매), 1회 추출로 설정하였음 (표 1-7).

표 1-7. 유자의 추출 용매별, 온도별, 시간별, 용매비율 및 반복횟수별 수율 및 지표함량 비교

용매 조건	Yield (%)	Hesperidin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
0% 주정	42.67	0.84	840	46,871
30% 주정	43.83	0.93	930	66,714
50% 주정	46.50	0.97	970	76,131
70% 주정	45.33	1.00	1,000	91,686

온도 조건	Yield (%)	Hesperidin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
상온	40.67	0.94	940
50 ℃	41.00	0.88	880
70 ℃	42.50	0.91	910
90 ℃	46.67	0.85	850

추출 시간 조건	Yield (%)	Hesperidin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
1 h	41.83	0.87	870
2 h	39.33	0.94	940
3 h	41.67	0.89	890
4 h	39.67	0.91	910
5 h	41.67	0.91	910
6 h	41.50	0.88	880

용매비율	Yield (%)	Hesperidin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
1:10	35.18	1.01	1,010	79,144
1:20	41.12	0.98	980	76,131
1:30	44.23	0.94	940	97,958

반복횟수	Yield (%)	Hesperidin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
1회	41.12	0.98	980	76,131
2회	7.95	0.79	790	192,513
3회	2.52	0.46	460	611,151

(3) 감잎

- 감잎의 추출조건 설정을 위해 건조된 감잎(경동시장, 경북영천)을 이용하여 조건 설정 실험을 진행하였음.
- 조건 설정 실험은 주정함량, 온도, 추출 시간, 용매비율 및 반복횟수 순으로 진행하였음.
- 추출조건 설정은 수율 및 지표함량과 예상 단가를 함께 고려하였음.
- 수율 및 지표함량, 주정함량에 따른 예상 단가를 고려하여 감잎의 최적 추출조건은 50% 주정, 90℃, 2시간, 1:20 (건조원물:용매), 1회 추출로 설정하였음 (표 1-8).

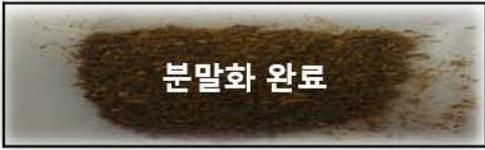
표 1-8. 감잎의 추출 용매별, 온도별, 시간별, 용매비율 및 반복횟수별 수율 및 지표함량 비교

용매 조건	Yield (%)	Catechin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
0% 주정	13.85	0.04	40	93,863
30% 주정	13.34	0.10	100	166,700
50% 주정	15.40	0.11	110	184,422
70% 주정	19.14	0.11	110	180,572
100% 주정	16.39	0.11	110	267,248

온도 조건	Yield (%)	Catechin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
상온	11.72	0.15	150
50 ℃	17.84	0.16	160
70 ℃	17.42	0.17	170
90 ℃	18.69	0.21	210

추출 시간 조건	Yield (%)	Catechin 함량	
		(%)	(mg/100 g)
1 h	21.27	0.09	90
2 h	20.48	0.11	110
3 h	21.21	0.11	110
4 h	22.86	0.11	110
5 h	22.88	0.13	130
6 h	22.75	0.12	120

용매비율 및 반복횟수	Yield (%)	Catechin 함량		단가 (원/kg)
		(%)	(mg/100 g)	
1:10, 1회	6.46	0.00	0	428,690
1:10, 2회	5.79	0.15	150	132,958
1:15, 1회	15.02	0.13	130	210,105
1:15, 2회	6.29	0.13	130	183,734
1:20, 1회	20.08	0.13	130	176,300
1:20, 2회	5.68	0.13	130	271,144

약썩	제조과정		표준화 조건
[Step 1]		지표 중 지역 부위 시기	Jaceosidin, Eupatilin Artemisia princeps Pomp. 인천 강화 잎 6월, 9월
↓	[Step 2] 잎 열풍건조		50°C, 72h
[Step 3]		용매 온도 시간 가수 횟수	70% 에탄올 70°C 2시간 원료:용매=1:15 1회
↓	[Step 4] 여과	Filter	25 μm Filter paper
↓	[Step 5] 농축	온도	Evaporator/50°C
↓	[Step 6] 동결건조	온도	Plate Temp. 30, 72h
↓	[Step 7] 분말		

유자	제조공정		표준화 조건
[Step 1]		지표 종 지역 부위 시기	Naringin, Hesperidin Citrus junos Siebold ex Tanaka 전남 고흥 원과 11~12월
↓			
[Step 2]	절단 후 동결건조		건조가능한 수준으로 절단, 5cm
↓			
[Step 3]	조분쇄	입도(중)	10mesh 수준
↓			
[Step 4]	추출	용매 온도 시간 가수 횟수	50% 에탄올 70℃ 2시간 원료:용매=1:20 1회
↓			
[Step 5]	여과	Centri Filter	3300rpm, 30min 20 mesh
↓			
[Step 6]	농축	온도	Evaporator/50℃
↓			
[Step 7]	동결건조	온도	Plate Temp. 30, 72h
↓			
[Step 8]	분말		

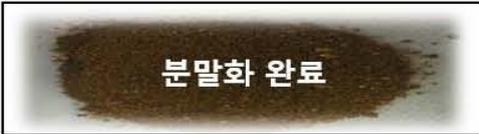
감잎	제조공정		표준화 조건
[Step 1]		지표 종 지역 부위 시기	Catechin Diospyros kaki 경북 청도 잎 11월
↓			
[Step 2]	잎 열풍건조		50°C, 72h
↓			
[Step 3]	조분쇄	입도(하)	0.5cm ²
↓			
[Step 4]	추출	용매 온도 시간 가수 횟수	50% 에탄올 90°C 2시간 원료:용매=1:20 1회
↓			
[Step 5]	여과	Filter paper	Whatman No.4 (25um)
↓			
[Step 6]	농축	온도	Evaporator/50°C
↓			
[Step 7]	동결건조	온도	Plate Temp. 30, 72h
↓			
[Step 8]	분말		

그림 1-2. 약썩, 유자, 감잎의 추출 공정

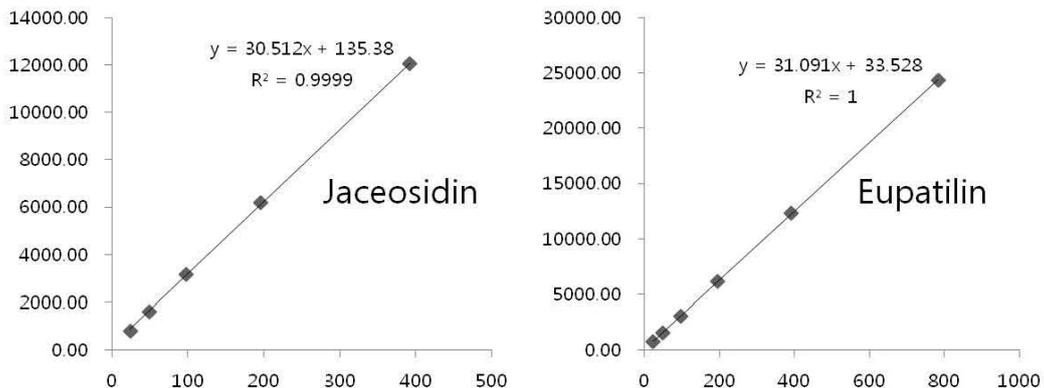
다. 원료 표준화 연구

(1) 약쑥 추출물 최적 표준화 연구

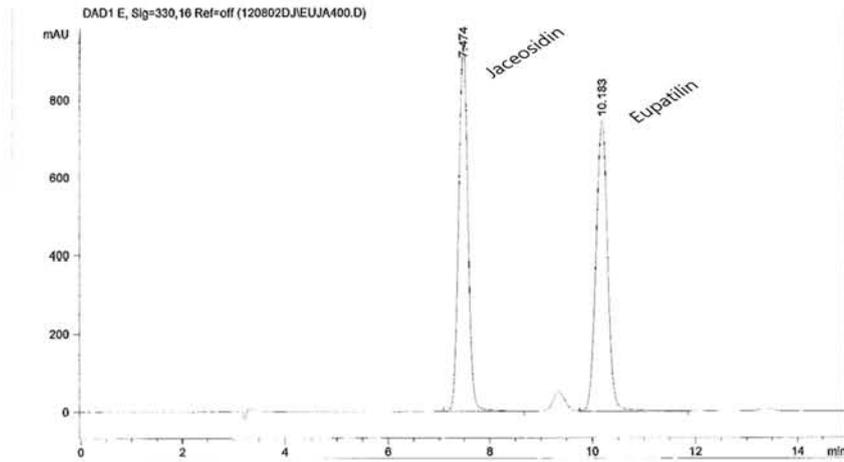
- 위의 결과를 종합하여 약쑥의 원료 최적 추출을 위한 표준화 조건을 설정하였음 (표 1-9, 그림 1-3).

표 1-9. 추출조건 및 HPLC 분석 조건

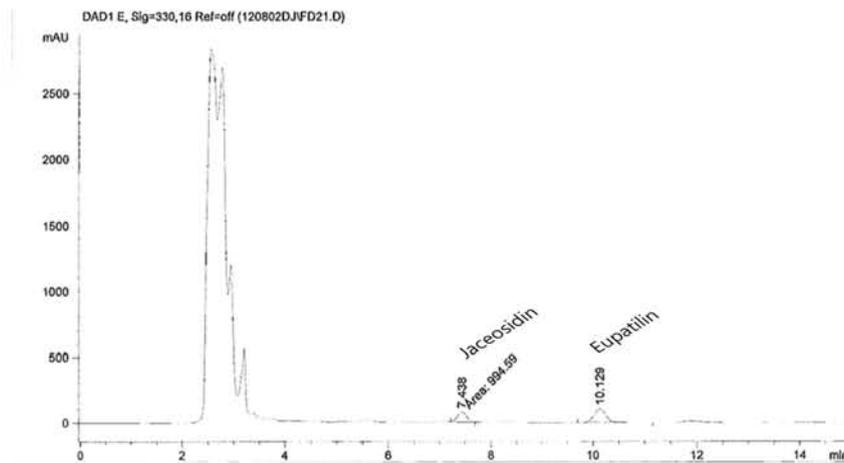
원료	약쑥 건조 잎 (수분함량 9~11%)
추출조건	70% ethanol/70℃/2시간/1:20/1회 추출
HPLC 분석 조건 (Agilent 1100)	
Oven temp.	30℃
Column	Luna 5u C18(2) (4.6×250 mm), phenomenex
Detector	UV detector 330 nm
Mobile phase	0.1% TFA : MeOH = 35:65
Flow rate	1 ml
Run time	15 min
Injection	10 μ l



- 정량분석을 위한 standard curve 작성 -



- Jaceosidin, Eupatilin 표준품 분석 chromatogram -



- 약썩 원료 추출물 분석 chromatogram -

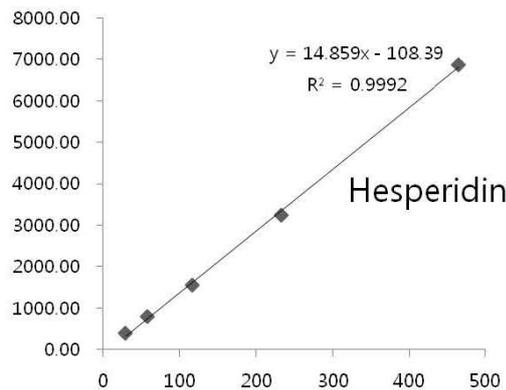
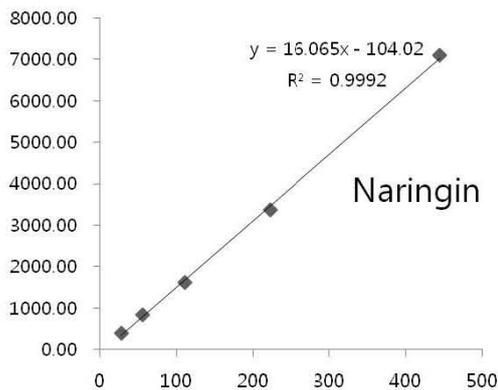
그림 1-3. 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

(2) 유자 추출물 최적 표준화 연구

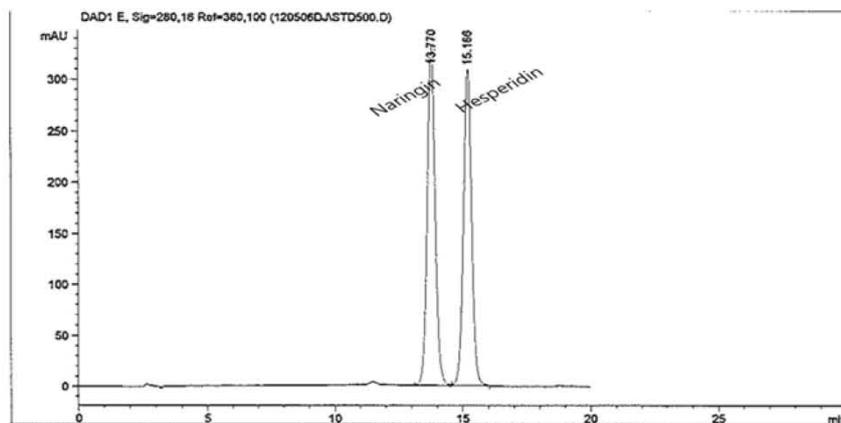
- 위의 결과를 종합하여 약썩의 원료 최적 추출을 위한 표준화 조건을 설정하였음 (표 1-10, 그림 1-4).

표 1-10. 추출조건 및 HPLC 분석 조건

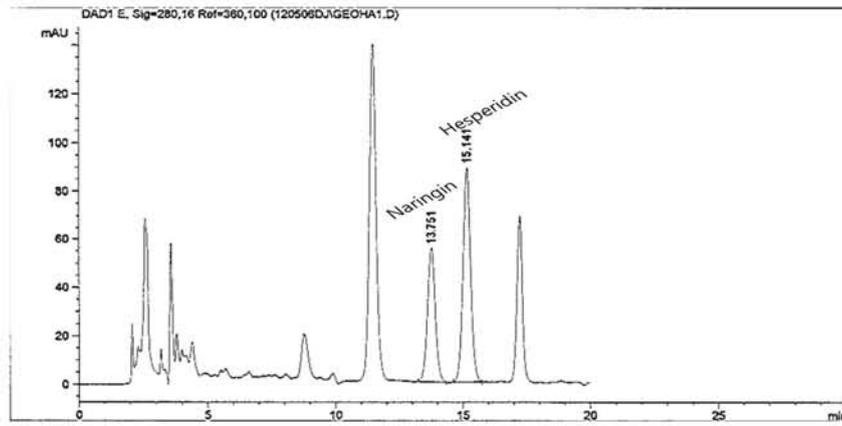
원료	유자 건조 분말
추출조건	50% ethanol/70℃/2시간/1:20/1회 추출
HPLC 분석 조건 (Agilent 1100)	
Oven temp.	25℃
Column	Luna 5u C18(2)(4.6×250 mm), phenomenex
Detector	UV detector 280 nm
Mobile phase	2% Acetic acid & 0.5% Acetic acid : ACN = 50 : 50 Gradient
Flow rate	1 ml
Run time	20 min
Injection	20 μ l



- 정량분석을 위한 standard curve 작성 -



- Naringin, Hesperidin 표준품 분석 chromatogram -



- 유자 원료 추출물 분석 chromatogram -

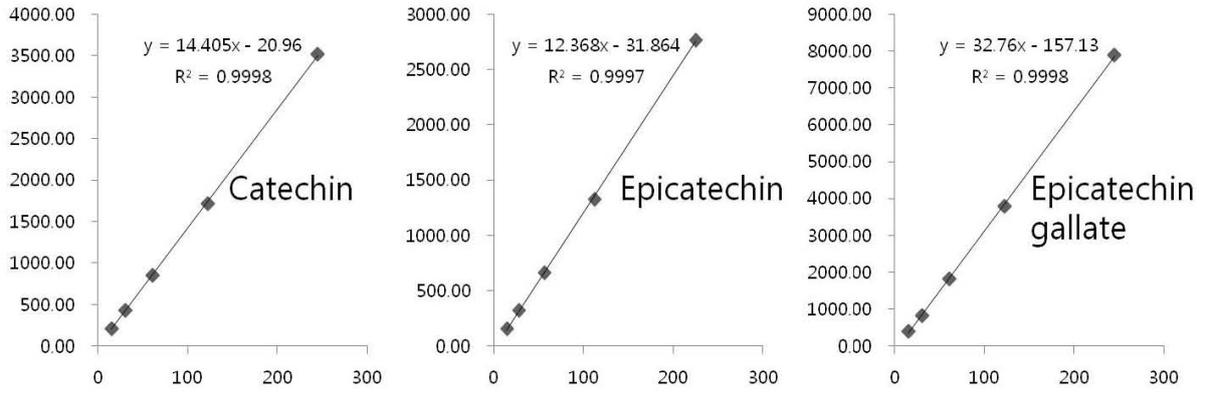
그림 1-4. 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

(3) 감잎 추출물 최적 표준화 연구

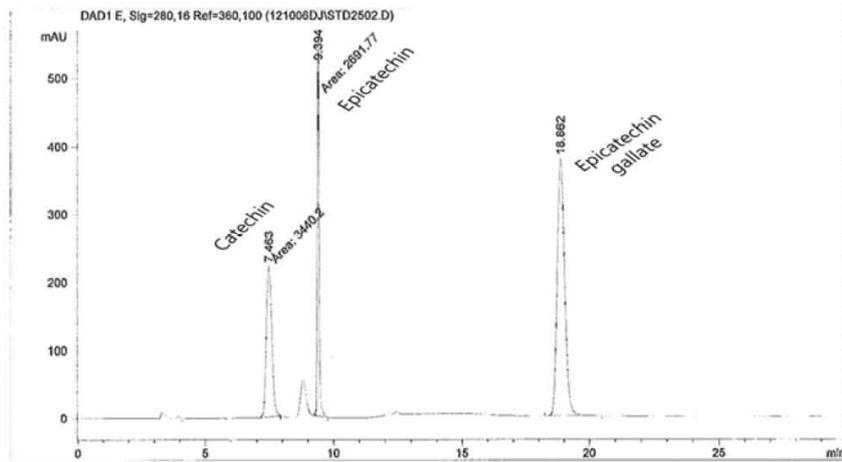
- 위의 결과를 종합하여 감잎의 원료 최적 추출을 위한 표준화 조건을 설정하였음 (표 1-11, 그림 1-5).

표 1-11. 추출조건 및 HPLC 분석 조건

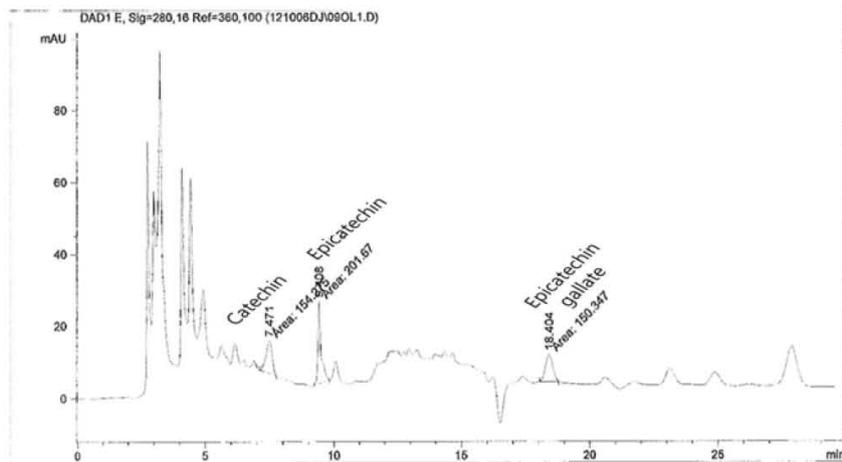
원료	감잎 건조 분쇄물
추출조건	50% ethanol/90℃/2시간/1:20/1회 추출
HPLC 분석 조건(Agilent 1100)	
Oven temp.	35℃
Column	5C18-AR-II (4.6×150 mm), COSMOSIL
Detector	UV detector 280 nm
Mobile phase	ACN : EtAC : 0.1% PA = 8.5 : 2 : 89.5 & 50% ACN Gradient
Flow rate	0.5 ml
Run time	25 min
Injection	10 μl



- 정량분석을 위한 standard curve 작성 -



- Catechin, Epicatechin, Epicatechin gallate 표준품 분석 chromatogram -



- 감잎 원료 추출물 분석 chromatogram -

그림 1-5. 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

2. 제조 공정 확립

- 건강기능식품 개발을 위한 제조방법에 관한 자료는 ‘건강기능식품의 기능성 원료 및 기준, 규격 인정에 관한 규정’에 의하여 포함되어야 할 내용과 요건이 명시되어 있음. 이에 해당하는 조건을 참고하여 제조 공정을 확립하였음.
 - 구체적인 제조공정에 관한 자료(단위 제조공정, 목적, 사용된 식품 또는 식품첨가물 등)
 - 단위공정별 기능성분(또는 지표성분)의 함량 변화 및 수율에 관한 자료
 - 수입 원료인 경우 제조회사가 발행한 제조공정도 원본
 - 두 가지 이상의 원재료를 혼합한 경우 각 원재료의 명칭, 함량 등에 관한 자료

- 1차년도에 진행된 **Lab scale** 표준화 공정을 적용하여 주정추출물을 제조할 수 있는 **GMP**시설의 생산처를 검토하였으며 (주)비트로시스와 (주)MSC를 선정하여 예상비용 등을 비교 산출하였음. 각 소재별 **Lab scale** 조건을 **scale up** 하는 과정에서 발생할 수 있는 여러 관리 **Point**를 설정하며 공정 개선을 진행 하였고, 대량생산에서 얻어진 추출물은 안정성시험, 동물시험 및 인체적용 시험을 위한 시험식품으로 사용될 예정임.

표 1-12. 추출물 상세 제조공정 내용

제조공정	공정내용	세부설명
원료	원료는 식품의 기준 및 규격에 적합한 것을 사용한다.	포도박 원료는 세척하여 건조 후 조분쇄한 것을 사용한다.
정수	지하수를 순수제조장치로 정수처리한 정제수를 사용한다.	먹는물 기준에 적합한 지하수를 사용하여 정제한 RO수를 사용한다.
칭량	원료를 칭량저울을 이용하여 필요한 양만큼 칭량한다.	추출망을 제외한 실중량을 소수점 첫째자리 기준으로 외부 칭량실에서 추출망에 PE비닐을 씌우고 칭량한다.
희석	정제수를 사용하여 주정을 50 또는 70%±3% 범위로 희석한다.	희석은 추출탱크의 해당volumn을 눈금으로 확인 후 먼저 정제수를190L 또는 105L 투입 후 주정으로 400L 눈금까지 맞추는 것으로 한다.(400L기준)
투입	칭량된 원료를 추출용매에 투입한다.	추출망에 넣은 원료를 투입 후 추출기 내부 추출망 뚜껑을 덮어 추출용매에 충분히 잠기도록 한다.
추출	투입된 원료를 70℃에서 2시간 동안 순환 추출한다.	추출기 온도 도달 후 2시간동안 추출하고, 추출액 이송후 슬러지를 정제수 또는 회수알콜을 사용하여 세척하며 스테인레스 재질의 내부추출망 뚜껑 2개를 사용하여 추출기 내부에서 약50cm의 높이로 슬러지가 눌러 남은여액을 회수할 수 있도록 한다.
여과	추출액을 5~10µm필터를 사용하여 여과한다.	여과기에 여과망 및 5~10µm필터를 사용하여 여과한다.
농축	여과된 추출액을 진공감압 농축기(가압 600~700 mmHg) 온도 60℃ 이하에서 고형분 30%이하로 농축한다.	최종원료의 동결건조에 따라 농축은 고형분 18%~30%범위로 한다.
살균	농축된 원료를 농축기에서 85℃, 30분간 살균한다.	시생산의 경우 volumn에따라 소량은 농축기를 사용하고 대량일 경우 증숙기를 사용하여 살균한다.
포장	살균된 농축액을 식품전용 용기에 밀봉포장한다.	살균된 농축액을 HDPE용기에 25KG단위로 포장한다.
검사	위의 밀봉포장된 원료를 일반식품 기준·규격에 따라 적부를 자가검사 한다.	포장된 농축액을 일부 개봉하여 샘플채취하고 미생물시험을 포함한 규격시험을 진행한다.
출하	자가품질검사 결과 적합한 경우 저온 보관소에서 제조번호 및 유통기한을 표시한 후 보관·출하한다.	검사결과 적합한 경우 표시사항을 부착하여 동결건조업체로 출하한다.

가. 추출물별 제조공정

(1) 사자발약쑥

- 약쑥을 원료로 Lab scale에서 설정된 조건을 GMP 대량생산시설에 적용하여 총 3번의 반복 생산을 진행하였음. 반복 생산을 통해 설정한 각각의 공정 및 기준규격은 다음과 같음.
- Lab scale 추출 조건과 다르게, 용매량을 건조원물대비 15배에서 20배로 조정하였음. (추출망에 넣은 원물이 추출용매에 완전히 잠기게 하기 위함)
- 건조과정에서 수율 및 지표성분의 감소는 주정에만 용출되는 지표성분의 특성에 기인함. (농축과정에서 주정이 증류되고 남은 고형분이 농축기 내벽에 침전되어 손실 발생함)



그림 1-6. 약쑥 추출물 제조 공정도

(2) 유자

○ 유자를 원료로 **Lab scale**에서 설정된 조건을 **GMP** 대량생산시설에 적용하여 총 3번의 반복 생산을 진행하였음. 반복 생산을 통해 설정한 각각의 공정 및 기준규격은 다음과 같음.

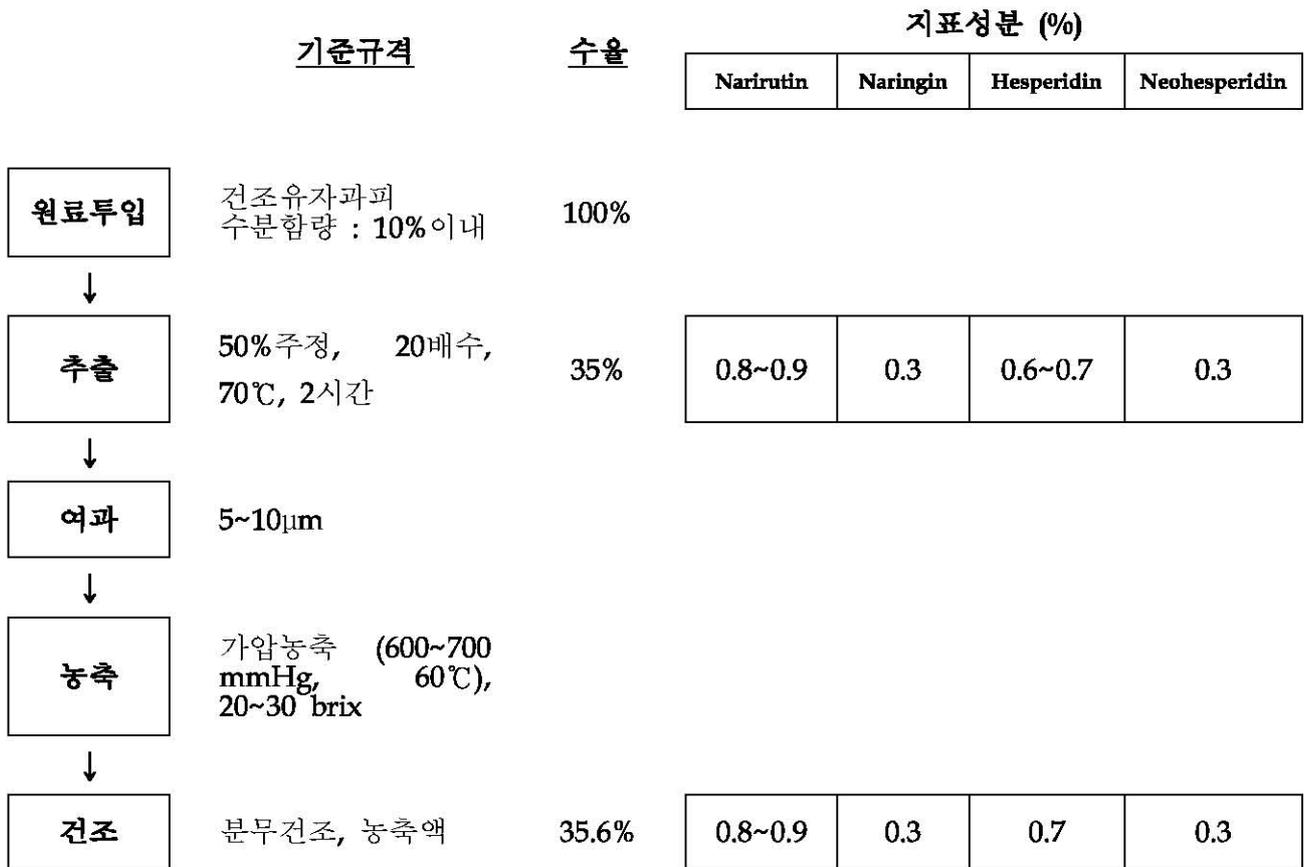


그림 1-7. 유자추출물 제조 공정도

(3) 감잎

- 감잎을 원료로 **Lab scale**에서 설정된 조건을 **GMP** 대량생산시설에 적용하여 총 **3번**의 반복 생산을 진행하였음. 반복 생산을 통해 설정한 각각의 공정 및 기준규격은 다음과 같음.
- **Lab scale** 추출 조건과 다르게, 추출온도 조건을 **80℃**에서 **70℃**로 조정하였음.(작업공간의 안전성 고려)

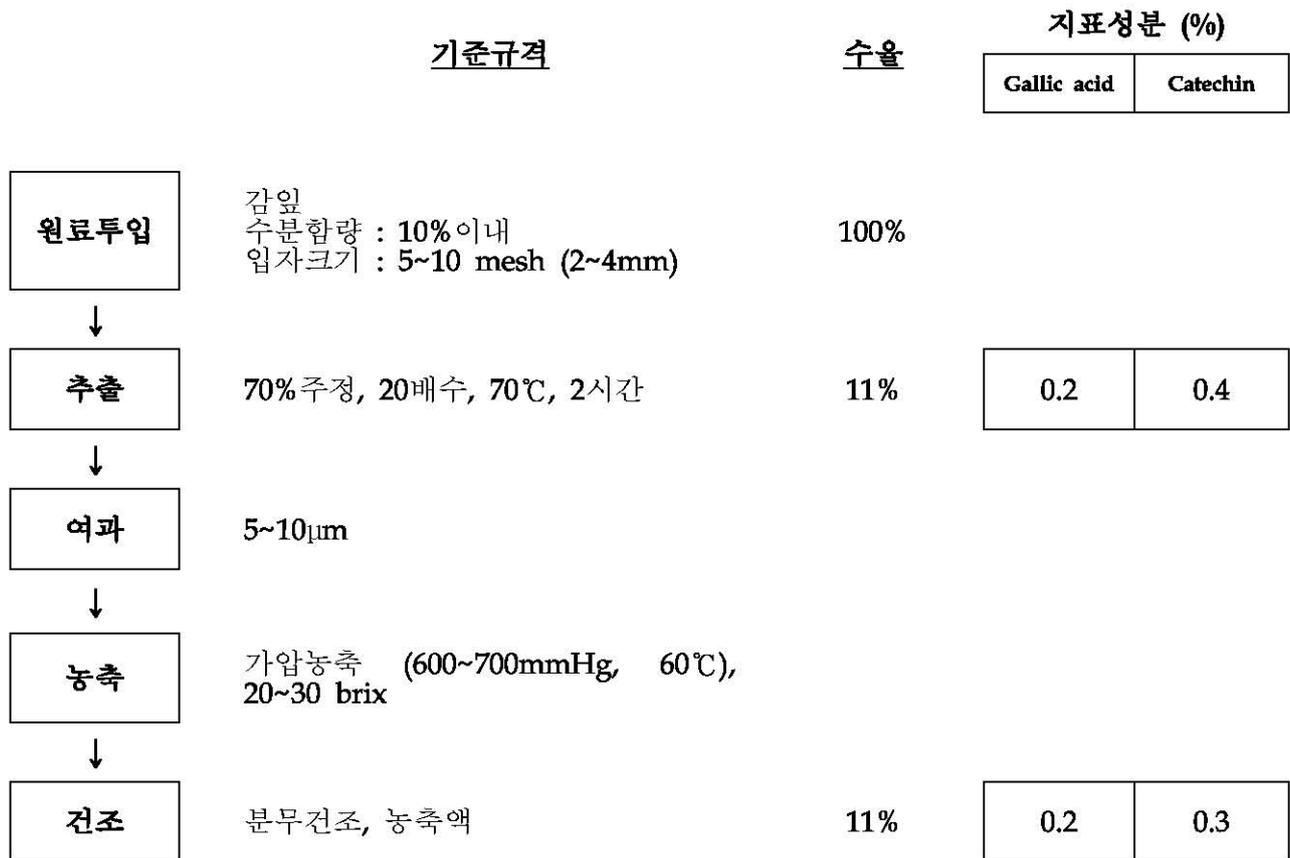


그림 1-8. 감잎추출물 제조 공정도

나. 농축액의 분말화 테스트

- 농축한 소재의 분말화는 저장성 향상과 수송의 편리함을 줄 수 있을 뿐만 아니라 다양한 식품 제형에 적용할 수 있어 그 가치를 향상시킴. 분무건조는 액상상태의 시료를 매우 짧은 시간에 일정한 입자크기로 건조시키며 열 접촉시간이 적어 변성이 적은 장점이 있어 산업적으로 많이 쓰이고 있음. 하지만 제품의 회수를 위한 별도의 장치가 필요하며 손실률이 큰 단점도 가지고 있음. 이에 반해 동결건조는 손실이 적고 비교적 낮은 온도에서 시료를 건조하지만, 공정시간이 길어 비용이 더 들고, 별도의 예비동결과정과 분쇄과정이 필요함.
- 각 소재별 특성에 맞는 분말화 방법을 선택하여 대량생산공정에 적용하였으며, 각 공정에 따른 지표안정성도 확인하였음.

표 1-13. 각 소재별 분말화 방법

소재	약썩농축액	유자농축액	감잎농축액
건조 방법	동결건조	분무건조	분무건조
건조 조건	<ol style="list-style-type: none"> 1. -70℃에서 18h 예비동결 2. 30℃ 동결건조 진행 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 유자추출물 분말의 고품분비율 60%무게 수준 텍스트린 첨가 2. 50℃가열로 텍스트린 녹인 후 50Brix 수준으로 희석 3. 180℃ chamber에서 분무건조 진행 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 180℃ chamber에서 분무건조 진행
조건 설정 근거	<ol style="list-style-type: none"> 1. 농축수준에 따른 작업 안정성을 위해 가열온도가 낮은 동결건조를 통한 분말화 진행 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 많은 당류가 포함되어 있어 동결건조나 고온의 분무건조시 분말화 불가하여, 고품분수준에 비례한 텍스트린 첨가를 통한 분말화 진행 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 잎유래 추출물의 특성상 별도의 부형제 첨가 없이 분무건조 가능

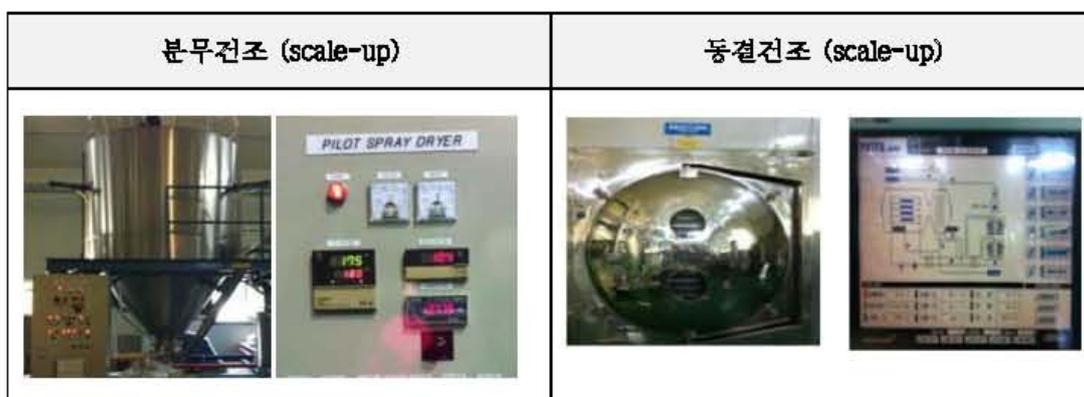


그림 1-9. 분무건조기 및 동결건조기

다. Pilot 생산 추출물 분석

(1) 수율 및 지표성분

- 소재 추출의 공정 표준화를 위해서 Pilot scale (20kg, 400L) 수준에서 반복생산을 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같음. 수율 및 지표함량 표준화를 위한 지속적인 공정 개선 작업을 진행할 예정임.

표 1-14. 약썩 추출물의 배치별 수율 및 지표함량 분석

분류	Yield (%)	Jaceosidin 함량 (%)	Eupatilin 함량 (%)
Lot-cjsj121228	17.62	0.68	0.86
Lot-cjsj130325	13.28	0.55	0.66
Lot-cjsj130507	13.55	0.31	0.39

표 1-15. 유자 추출물의 배치별 수율 및 지표함량 분석

분류	Yield (%)	Narirutin 함량(%)	Naringin 함량(%)	Hesperidin 함량(%)	Neohesperidin 함량(%)
Lot-cjcj121228	23.5	0.79	0.29	0.63	0.29
Lot-cjcj130325	35.6	0.83	0.31	0.67	0.31
Lot-cjcj130608	40.0	0.86	0.33	0.68	0.32

표 1-16. 감잎 추출물의 배치별 수율 및 지표함량 분석

분류	Yield (%)	Gallic acid 함량 (%)	Catechin 함량 (%)
Lot-cjpl121228	0.7	0.36	0.27
Lot-cjpl121228	11.9	0.28	0.30
Lot-cjpl130227	8.0	0.32	0.34

(2) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

(가) 총 폴리페놀 측정

- 총 폴리페놀 함량 측정은, 1% 추출액 0.1 ml과 2% sodium carbonate 0.8 ml을 혼합한 후 상온에서 약 5분간 방치하고, 위의 반응액에 5%의 2 N Folin-ciocalteu 0.4 ml을 다시 순차적으로 혼합하여 상온에서 1시간 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질로 gallic acid을 이용한 농도별 표준곡선을 작성하여

위에서 측정한 흡광도 값을 이용하여 약쑥, 유자, 감잎 추출물 내의 총 폴리페놀 함량을 정량하였음.

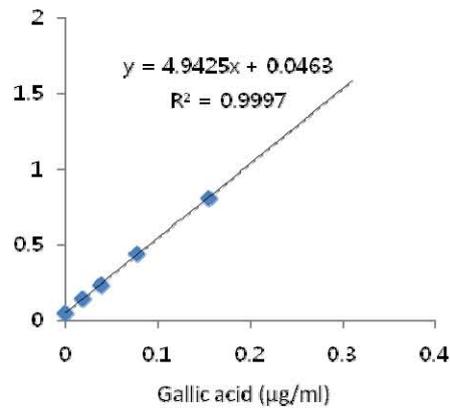


그림 1-13. Gallic acid의 표준 곡선

(나) 총 플라보노이드 측정

○ 총 플라보노이드 함량 측정은, 1% 추출액 0.1 ml과 diethylene glycol 0.9 ml을 혼합 한 후 상온에서 약 5분간 방치하고, 위의 반응액에 1 N NaOH 0.1 ml을 다시 순차적으로 혼합하여 37°C에서 1시간 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준물질로 naringin을 이용한 농도별 표준곡선을 작성하여 위에서 측정한 흡광도 값을 이용하여 약쑥, 유자, 감잎 추출물 내의 총 플라보노이드 함량을 정량하였음.

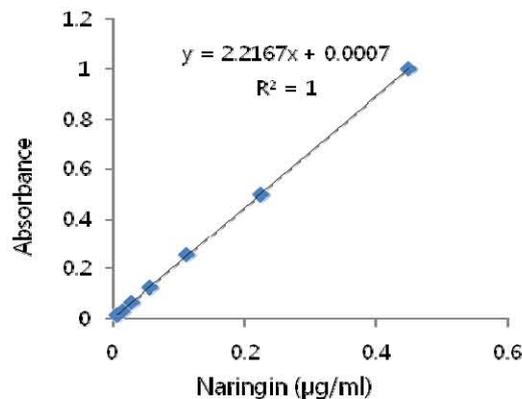


그림 1-12. Naringin의 표준 곡선

○ 과제 시작시점부터 현재까지 대량 시생산 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 분석한 결과는 다음과 같음. 유자에 비해 약쑥 및 감잎 추출물에 총 폴리페놀 함량이 많은 것으로 나타남. 또한 약쑥 추출물은 플라보노이드 함량이 월등히 높은 것으로 분석됨. 연

도별 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 차이는 매년 기후나 강수량 및 지역적 차이에 의해 달라질 수 있으므로, 매년 분석을 통해 연도별 추이변화를 통해 품질관리 범위를 설정하는 것이 필요함.

표 1-17. 대량시생산 추출물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 분석값

추출물		총폴리페놀 (%)	총플라보노이드 (%)
약썩 추출물	1차 시생산	11.45	10.62
	2차 시생산	11.48	10.19
	3차 시생산	12.08	10.68
	평균	11.67	10.50
유자 추출물	1차 시생산	1.79	2.60
	2차 시생산	2.15	2.80
	3차 시생산	1.58	2.76
	평균	1.84	2.72
감잎 추출물	1차 시생산	12.06	3.21
	2차 시생산	12.57	4.12
	3차 시생산	11.21	3.76
	평균	11.95	3.70

3. 추출물의 안정성

가. 저장온도별 유통기한 설정

- 대량생산된 소재를 농축액, 분말의 형태별로 각각 유통 온도별 저장기간을 설정하여, 물리 이화학적 특성 변화를 관찰하고 있음.
- 2013년 6월부터 현재(2013년 10월)까지 2개월차 시료가 분석 완료 되었으며 결과는 다음의 표와 같음.
- 약쭈지표함량은 Jaceosidin과 Eupatilin의 합으로, 유자는 Narirutin, Naringin, Hesperidin, Neohesperidin의 합으로, 감잎은 Gallic acid 와 Catechin의 합으로 나타내었음.

표 1-18. 약쭈 소재의 저장온도별 유통기한에 따른 지표함량 변화

약쭈 농축액	온도	0개월	1개월	2개월
	-20℃	0.050	0.050	0.050
	10℃	0.050	0.050	0.047
	20℃	0.050	0.050	0.047
약쭈 분말	온도	0개월	1개월	2개월
	4℃	0.740	0.817	0.760
	25℃	0.740	0.857	0.803
	35℃	0.740	0.873	0.833

표 1-19. 유자 소재의 저장온도별 유통기한에 따른 지표함량 변화

유자 농축액	온도	0개월	1개월	2개월
	-20℃	0.760	0.647	0.660
	10℃	0.760	0.657	0.655
	20℃	0.760	0.660	0.705
유자 분말	온도	0개월	1개월	2개월
	4℃	0.687	0.787	0.817
	25℃	0.687	0.820	0.817
	35℃	0.687	0.790	0.840

표 1-20. 감잎 소재의 저장온도별 유통기한에 따른 지표함량 변화

감잎 농축액	온도	0개월	1개월	2개월
	-20℃	0.037	0.035	0.036
	10℃	0.037	0.033	0.036
	20℃	0.037	0.032	0.031
감잎 분말	온도	0개월	1개월	2개월
	4℃	0.562	0.554	0.541
	25℃	0.562	0.558	0.519
	35℃	0.562	0.528	0.502

나. 약쭉, 유자, 감잎 소재의 지표성분 분석법 시험방법 타당성 검증 (Validation)

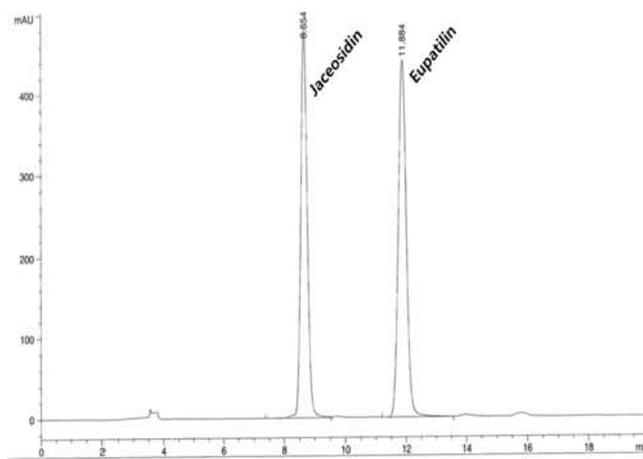
- 건강기능식품의 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정에 의하면 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법은 그 함량을 분석하는데 적합하여야 함. 건강기능식품의 기준 및 규격, 식품의 기준 및 규격(식품의약품안전청 고시), 식품첨가물의 기준 및 규격(식품의약품안전청 고시), 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내외에서 공인된 방법을 사용하여야 함. 다만, 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있음. 이 경우에는 제시한 시험방법의 타당성을 밝혀야 함. 또한 두 가지 이상의 당해 원료를 혼합한 경우 각 원료의 기능성분(또는 지표성분)의 시험방법을 설정하여야 함.

(1) 약쭉

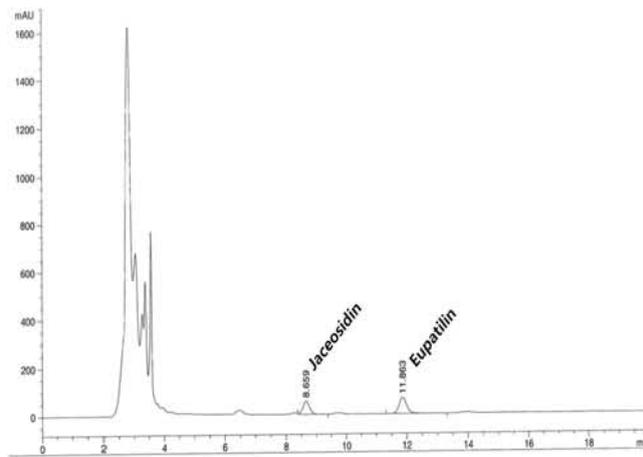
- 약쭉추출물의 지표성분 분석법 Validation을 위해 추출물의 eupatilin peak가 eupatilin 표준품과 동일한 시간대에 분석되며, 인접 peak의 분리도 및 eupatilin peak의 purity를 확인하여, 분석조건에 다른 물질과 특이적이므로 eupatilin이 분석됨을 검증하였음 (특이성). 분석조건에서 제조하는 eupatilin 표준용액의 농도구간에서 eupatilin 농도 (x data)와 eupatilin peak 면적 (y data)의 결정계수가 0.999 이상으로 농도와 peak 면적이 선형적인 관계가 있음을 검증하였음 (직선성). 동일 제조번호의 검체에 대해 분석일자내, 분석일자간 (intra-day precision)의 함량균일성을 확인하여 분석조건에서 제조번호에 따라 유의하고, 사자말쭉 추출분말의 eupatilin 농도를 재현성 있게 얻어짐을 검증하였음 (정밀성). 분석용액에서 일정량의 eupatilin을 첨가한 회수율 평가에서 회수율이 100~102%로 정확하게 얻어짐을 검증하였음 (정확성). 이들 결과를 바탕으로 범위(Range)를 설정하였음.

표 1-21. 약썩추출물의 지표성분 HPLC 분석 조건

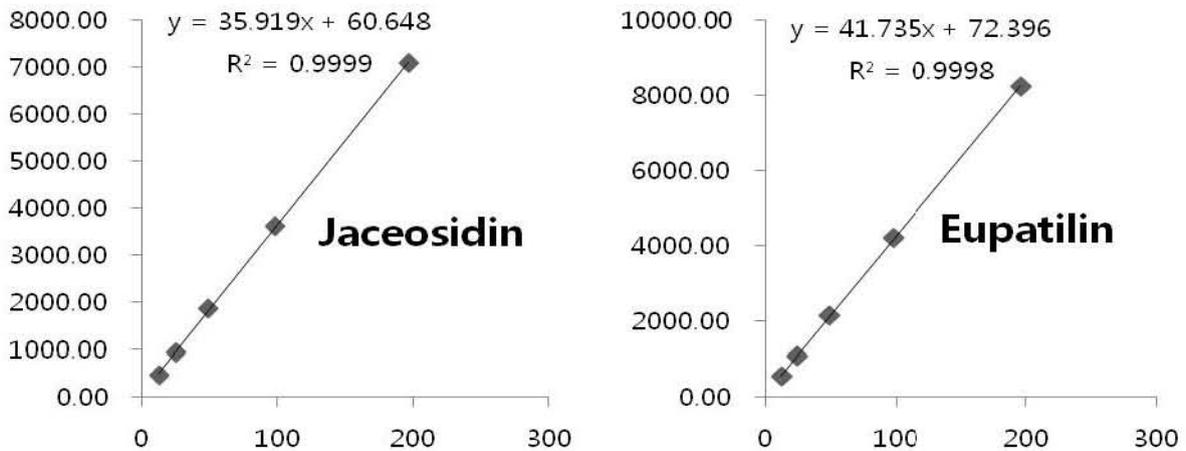
HPLC 분석 조건(Agilent 1100)	
Oven temp.	30℃
Column	Luna 5u C18(2)(4.6×250 mm), phenomenex
Detector	UV detector 330 nm
Mobile phase	0.1% TFA : MeOH = 35:65
Flow rate	1 ml
Run time	15 min
Injection	10 μ l



- Jacosidin, Eupatilin 표준품 분석 chromatogram -



- 약썩 추출물 분석 chromatogram -



- 정량분석을 위한 standard curve 작성 -

그림 1-10. 약썩 추출물의 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

(2) 유자

- 1차년도 지표물질 선정 과정에서 유자에 포함된 지표물질로 naringin 과 hesperidin을 선정한 바있음. 이와 더불어 Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species에 의하면 같은 Flavonoid 계열 중 narirutin과 neohesperidin이 기 설정된 지표물질과 비슷한 수준의 함량을 보이는 것을 확인하여 추가 지표로 설정하였음.

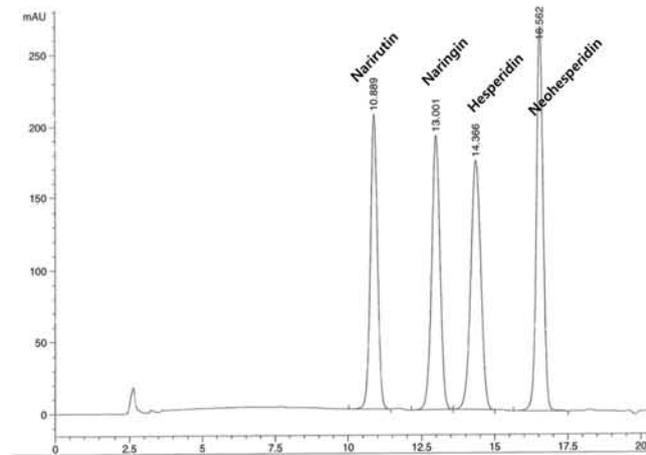
표 1-22. 유자추출물의 지표성분 HPLC 분석 조건

HPLC 분석 조건(Agilent 1100)	
Oven temp.	25℃
Column	Luna 5u C18(2) (4.6×250 mm), phenomenex
Detector	UV detector 280 nm
Mobile phase	2% Acetic acid & ACN Gradient
Flow rate	1 ml
Run time	20 min
Injection	10 μ l

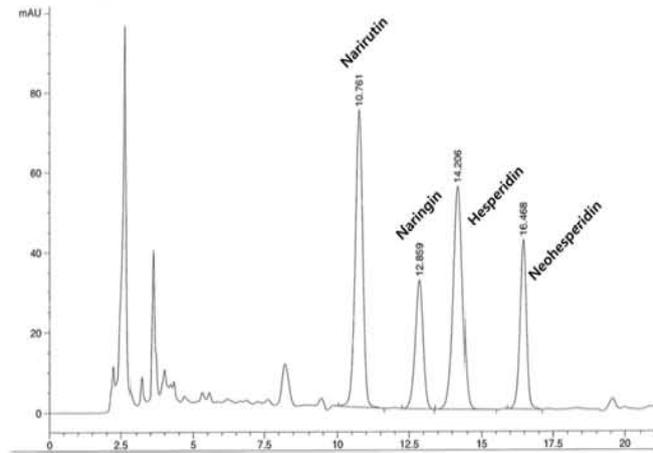
표 1-23. 감귤류 과일 껍질의 플라보노이드 함량

Category number	Ref.	Name	Flavanones								
			ERC	NER	NRT	NRG	HSP	NHP	NPO	PON	
I	1	Cabuyao	1.1	4.3	0.0	0.0	64.6	253	21.6	284	
II	2	Mexican lime	5.6	0.0	6.5	0.0	258	4.9	6.1	13.5	
	3	Tahiti lime	105	0.0	56.3	10.3	1210	0.0	7.7	36.7	
	4	Bergamot	6.6	331	11.1	456	1.2	450	2.0	458	
	5	Biroro	10.3	0.0	10.1	8.0	1310	0.0	6.0	2.5	
	6	Citron	2.9	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	
III	7	Eureka lemon	132	0.0	22.5	0.0	711	0.0	0.0	0.0	
	8	Sweet lemon	0.0	0.0	38.8	7.9	491	0.0	12.6	0.0	
	9	Lumie	146	0.0	1.9	0.0	468	0.0	0.0	0.0	
	10	Hirado buntan	0.0	4.4	1.0	976	0.0	9.0	4.7	0.0	
IV	11	Shaten yu	0.0	0.9	0.0	333	0.0	4.5	0.0	2.0	
	12	Marsh grapefruit	9.2	0.0	190	2100	0.0	20.3	8.4	462	
	13	Kinukawa	6.8	34.5	19.3	286	19.8	390	2.5	52.6	
	14	Hassaku	0.3	6.9	70.1	414	35.4	259	1.1	14.9	
	15	Natsudaikai	0.0	4.7	20.8	639	8.2	271	1.8	39.3	
V	16	Sanbokan	65.2	0.0	969	54.9	881	0.0	4.5	3.6	
	17	Sour orange	3.8	220	22.0	1470	0.0	1090	2.7	567	
	18	Valencia	5.9	0.0	66.5	0.0	1410	0.0	42.1	0.0	
	19	Morita navel	8.1	0.0	228	7.0	2070	0.0	78.0	0.0	
	20	Iyo	7.1	0.0	269	0.0	965	0.0	15.6	0.0	
	21	Hyuganatsu	4.5	0.0	184	0.0	347	0.0	53.7	0.0	
	22	Shunkokan	43.0	0.0	1160	0.0	1270	0.0	8.6	0.0	
	VI	23	Yuzu	0.9	6.9	147	100	192	103	3.3	24.4
	24	Sudachi	65.0	24.9	97.6	70.7	38.9	145	0.3	3.3	
	25	Kabosu	1.5	3.3	146	59.6	210	75.3	2.7	4.7	

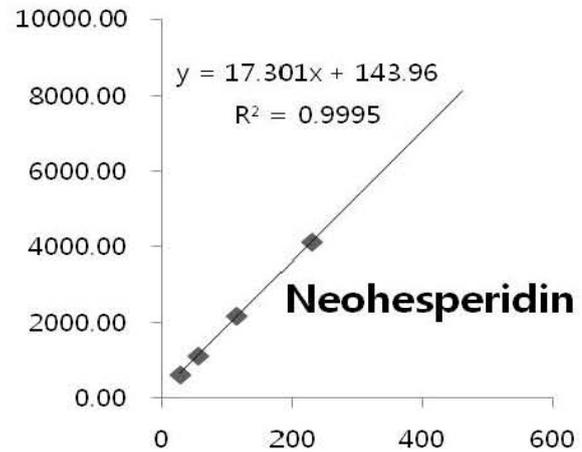
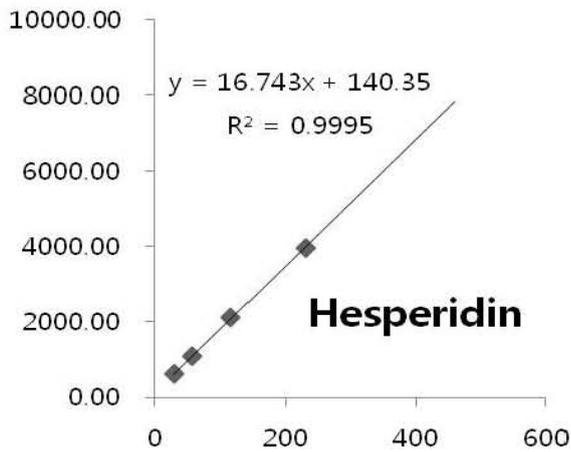
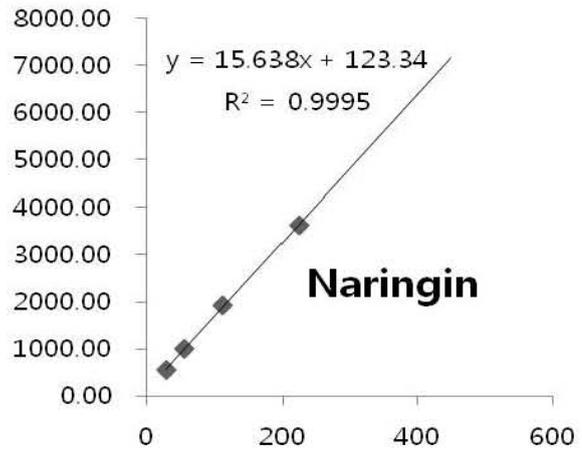
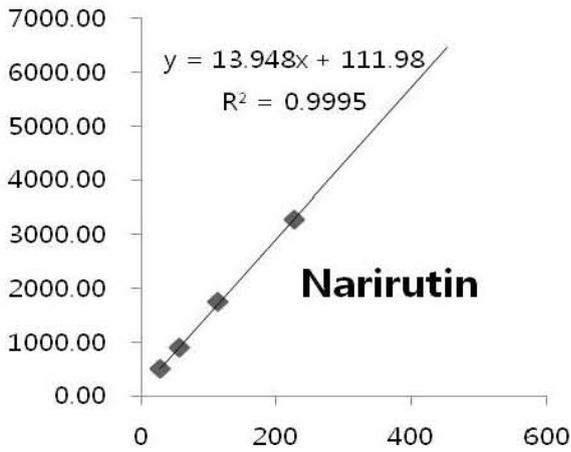
Each value is the average of four replications (mg/100 g fresh weight).



- Narirutin, Naringin, Hesperidin, Neohesperidin 표준품 분석 chromatogram -



- 유자 추출물 분석 chromatogram -



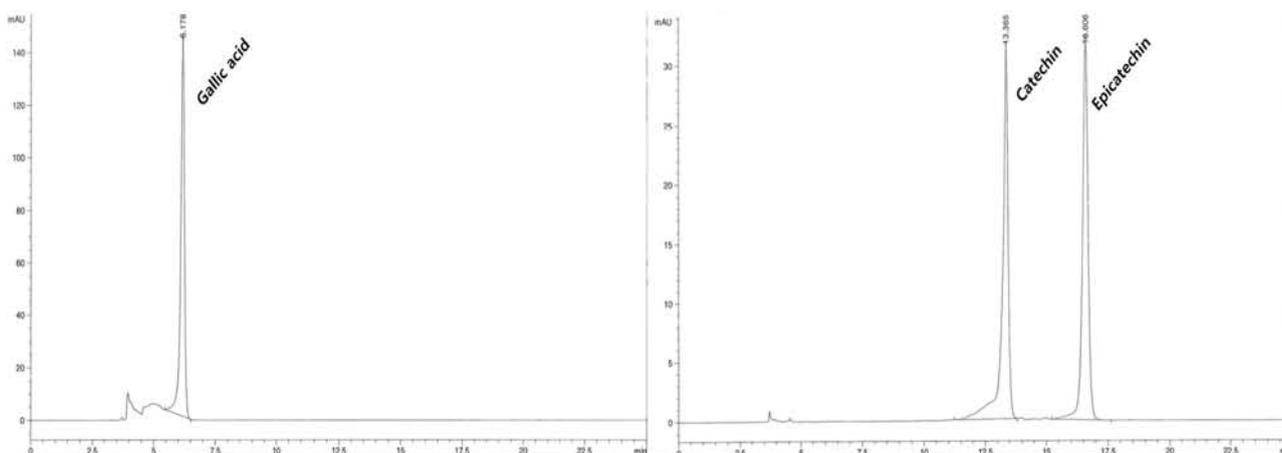
- 정량분석을 위한 standard curve 작성 -

그림 1-11. 유자 추출물의 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

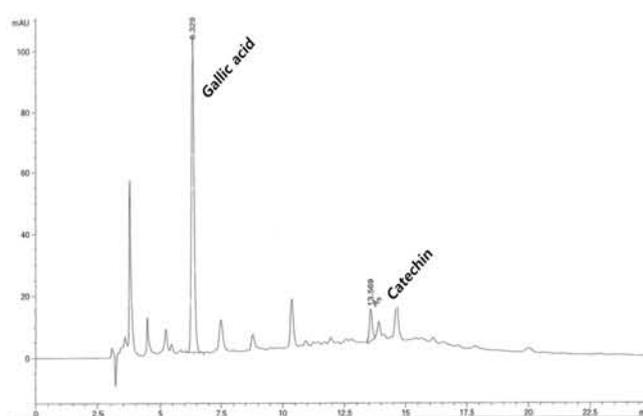
○ 1차년도에 선정된 지표물질과 달리 잎류에 많이 포함되어 있다고 알려진 **Gallic acid**를 추가로 선정하였음.

표 1-24. 감잎 추출물의 지표성분 HPLC 분석 조건

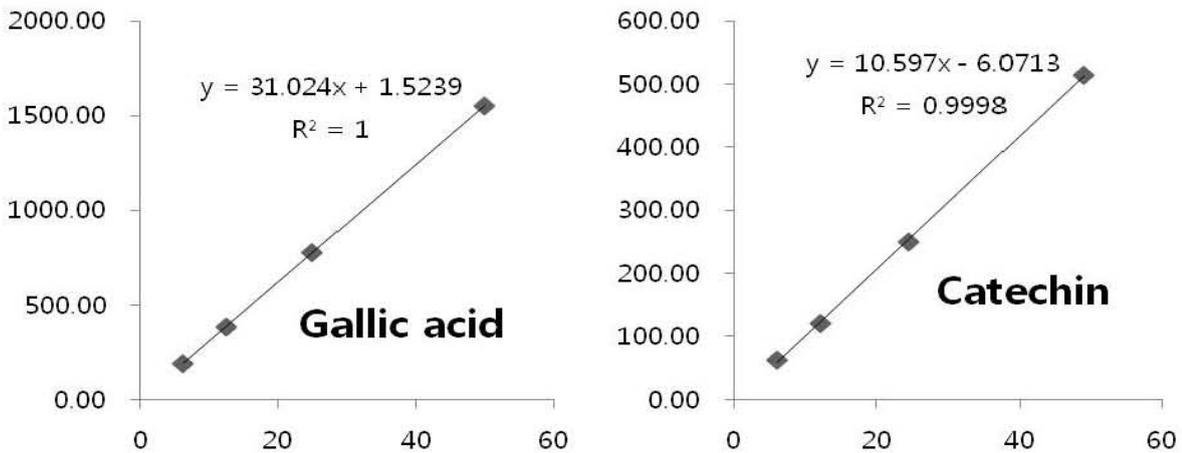
HPLC 분석 조건(Agilent 1100)	
Oven temp.	25°C
Column	Eclipse XDB-C18 (4.6×250 mm), ZORBAX
Detector	UV detector 280 nm
Mobile phase	2% Acetic acid & ACN Gradient
Flow rate	0.8 ml
Run time	45 min
Injection	10 µl



- Gallic acid, Catechin 표준품 분석 chromatogram -



-감잎 추출물 분석 chromatogram -



- 정량분석을 위한 **standard curve** 작성 -

그림 1-12. 감잎 추출물의 정량화 표준곡선 작성 및 HPLC Peak 비교

다. 원료수급처 확보

- 건강기능식품에서의 표준화를 위해서는 천연물질에 함유되어 있는 고유한 성분을 기능성 분(또는 지표성분)으로 설정하여, 그것의 변동을 최소화하여 생산되는 배치(batch)에 상관 없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조과정 전반에 걸쳐 관리 되어야 함.
- 상기 제시한 제조공정 및 분석법 설정과 더불어 일정한 품질의 원재료를 확보하는 일련의 작업들이 연도별로 반복되어야 함. 특히, 종 (species), 사용부위, 원산지, 채취시기별로 원재료의 성분이 달라질 수 있음.

표 1-25. 약쑥, 유자, 감잎의 원료 확보를 위한 주요정보

	약쑥	유자	감잎
원산지(지역)	인천 강화 (국내 최대산지)	전남 고흥 (국내 최대산지)	경남 창원, 경북 청도
학명	<i>Artemisia princeps</i> Pomp.	<i>Citrus junos</i> Siebold ex Tanaka	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.
품종	사자발약쑥	남해유자	부유, 청도반시
세계적 재배지	대한민국 (주산지), 일본	대한민국 (주산지), 일본, 중국	대한민국 (주산지), 일본, 중국
이용부위	잎	열매, 씨	잎, 열매
가격 (2013년)	건조잎: 40,000원/kg	건조유자과피: 30000원/kg	건조잎: 8000원/kg
재배 면적	30ha (강화약쑥)	434ha(고흥유자)	13,372ha(부유), 1,981ha(청도반시)
연간 생산량	128톤	5,700톤	-
수확시기	단오(5~6월), 9월(2차수확)	11월 생유자	5월(어린잎), 11월
국내 가공업체	강화영농조합, 강화마니, 산에들에 등 지역 업체	고흥 한성푸드, 두원 농협	각 지역 약용작물조합
주요 지표성분	eupatilin, jaceosidin	narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin	gallic acid, catechin류
원물수급처	강화도 영농조합 및 경동시장	고흥 한성푸드	경남 지역 약용작물 업체 및 청도감클러스터 사업단
특징	<ul style="list-style-type: none"> 약쑥은 전국적으로 자생하고 있으나 주로 인천, 강화 등 서해안 지방과 강원도 일부 지역에서 생산되고 있음. 약쑥의 유효 성분은 flavonoid 화합물인 eupatilin으로 알려져 있음 	<ul style="list-style-type: none"> 유자의 주요 산지로는 고흥, 완도, 남해 등이 있으며 이중 고흥 유자는 전국 생산량의 43%를 차지함. 유자의 대표적인 생리활성물질로는 naringin과 hesperidin이 있으며, 그 외에도 citrus 특유의 향과 정유성분이 다량 함유되어 있음. 	<ul style="list-style-type: none"> 감나무의 품종은 크게 단감과 뽕은 감으로 분류되는데, 경남의 단감(부유) 정부의 뽕은감(청도반시)가 주산지임. 단감이나 뽕은감의 감잎 모두 감잎차로 만들 수 있으며, 5~6월의 감잎이 비타민C 함량이 많다고 알려져 있으나, 건강기능식품소재로서는 감의 상업적가치는 떨어뜨리지 않는 11월 이후의 감잎을 사용함.

(자료출처: 강화군 특화작목 홍보관, 농림부 과수실태조사, 고흥군농업기술센터, 통계청, 식약처)

라. 약썩, 감잎, 유자 추출물의 연간 수율 및 지표성분 변화

- 과제 시작시점인 2011년부터 현재까지 매년 원물에 의한 추출물의 수율 및 지표성분 변화를 모니터링하였음. 모든 추출물이 매년 원물의 변화에 따른 약간의 변동폭은 있는 것으로 나타났으며 이를 고려하여 각 추출물의 수율 및 지표성분 기준, 규격 설정에 이용하였음. 앞으로도 연간 변화량을 계속 분석하여 원물 규격 설정에 활용할 계획임.

표 1-26. 약썩, 감잎, 유자 추출물의 연간 수율 및 지표성분 변화

(단위: %)

	약썩 추출물			감잎 추출물			유자 추출물		
	수율	지표성분		수율	지표성분		수율	지표성분	
		Eupatilin	Jaceosidin		Epicatechin	Catechin		Naringin	Hesperidin
2011	15.5	0.6919	0.4134	14.3	0.2888	0.1031	41.6	0.3752	0.6759
2012	17.7	1.1205	0.7503	20.1	0.2103	0.1466	35.6	0.9317	1.7658
2013	-	-	-	26.6	0.1035 (gallic acid)	0.1904	46.9	0.3127	0.6659
2014	-	-	-	19.6	0.1518 (gallic acid)	0.1050	42.8	0.2230	0.6833

마. 감잎 및 유자 추출물의 혼합에 의한 지표성분 함량 변화

- 감잎 및 유자를 각각 추출·농축하여 동결건조시 고형분 함량을 고려하여 혼합하였을 때에는 지표성분 함량이 각각 건조하였을 때와 차이가 없었음.
- 그러나 감잎 및 유자를 혼합하여 추출·농축하였을 때에는 수율에는 변동이 없었으나, 지표성분 함량이 낮게 분석되었음. 4가지 지표성분 (gallic acid, catechin, naringin, hesperidin)이 모두 단독 추출했을 때에 비해 10%이하로 분석됨.
- 따라서 복합추출보다는 각각을 단독으로 추출농축 후 고형분 함량에 맞춰 혼합하여 복합 농축액을 제조하거나, 건조 후 복합분말로 이용하는 것이 적절할 것으로 판단됨.

표 1-27. 감잎 및 유자 추출물의 복합에 의한 지표성분 함량 변화

감잎유자복합물	수율	지표성분			
		Gallic acid	Catechin	Naringin	Hesperidin
단독추출 후 혼합건조	30.2	3.8031	0.8697	0.4912	0.9915
복합추출 후 건조	23.4	0.0695	0.0761	-	0.0968

4. 추출물의 안전성

가. 식품 원재료 검색

(1) 사자발약쑥

- 본 연구에서 선정된 사자발약쑥은 강화도에 자생하는 대표적인 품종 중에 하나임.
- 사자발약쑥은 식품공전에 등재된 원료로 오랜 식경험을 가진 식물로서 식약청 식품원재료 검색 결과, 공전에 등재되어 있으며, 식용가능 원료인 것으로 나타남. 본 연구에서 최종 선정된 사자발약쑥은 식용가능한 잎만을 주정으로 추출하여 사용하였음.

원재료명(영문명)	약쑥
미명	강화쑥, 사제발쑥, 獅子足艾, 싸주아리쑥, Artemisia Herb, 의초(醫草), 구초(灸草), 황초(黃草), 첨애(晝艾), 애(艾), 사제발쑥, 약쑥, 뜰쑥, 참쑥, 빙대
학명	<i>Artemisia argy</i> (활해쑥) <i>Artemisia princeps</i> Pamp. Hara(쑥) <i>Artemisia montana</i> (산쑥)
생약명	애엽 (艾葉, <i>Artemisiae Asiaticae Herba</i>)
기원	애엽: 활해쑥 <i>Artemisia argyi</i> Lev. Et Vant., 쑥 <i>Artemisia princeps</i> Pamp. 또는 산쑥 <i>Artemisia montana</i> Pampani (국화과 Compositae)의 잎 및 어린줄기
식용가능여부	가능
공전등재여부	사용가능원료
용도(이용부위)	식용(어린잎), 약용(잎, 줄기잎꼭지)
동·식물 분류	식물



(2) 유자

- 본 연구에 사용된 유자는 식약청 식품원재료 검색 결과, 식용가능한 원료로 식품공전 원재료분류에 과실류로 분류되어 있음.
- 이용가능한 부위는 열매 및 씨앗이며 본 연구에서는 식용가능한 유자 열매만을 이용하여 추출하였음.
- 기능성 평가를 위한 동물실험과 인체적용시험을 통해 안전성 관련 지표들의 분석도 진행할 예정임.

원재료명(영문명)	유자
미명	유자(柚子), Citron
학명	<i>Citrus junos</i> Siebold ex Tanaka
생약명	
기원	
식용가능여부	가능
공전등재여부	등재안됨
용도(이용부위)	식용(열매, 씨앗), 약용(열매)
동·식물 분류	식물



(3) 감잎

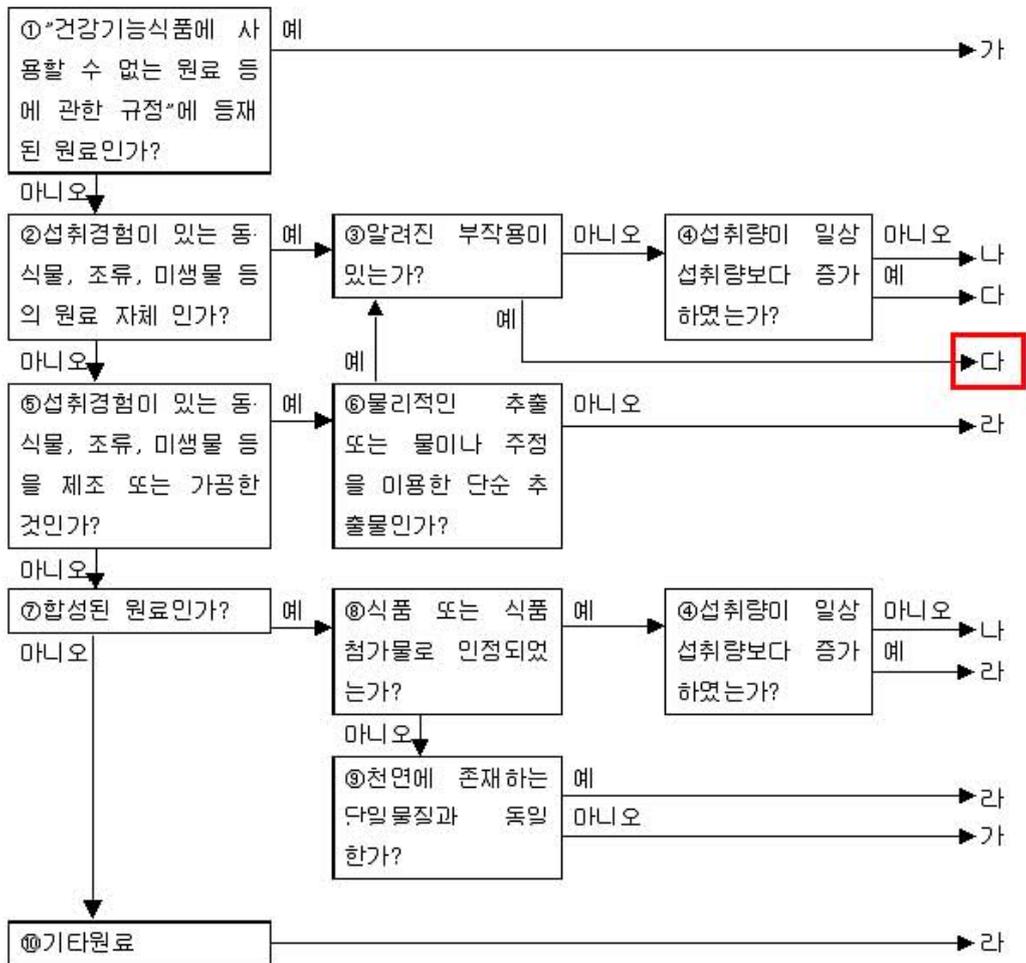
- 본 연구에 사용된 감잎은 식약청 식품원재료 검색 결과, 식용가능한 원료로 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재되어 있음.
- 식용가능한 부위는 잎이며 본 연구에서도 잎만을 이용하여 추출하였음.
- 기능성 평가를 위한 동물실험과 인체적용시험을 통해 안전성 관련 지표들의 분석도 진행할 예정임.

원재료명(영문명)	감나무
미명	홀시, 백지, 오시, 홀시감, persimmon, kaki
학명	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.
생약명	시(柿)
기원	
식용가능여부	가능
공전등재여부	사용가능원료
용도(이용부위)	식용[열매, 잎], 공업용, 관상용, 약용(열매)
동식물 분류	식물



나. 약썩, 유자 및 감잎 주정 추출물의 안전성 평가

- 본 과제에 사용될 예정인 사자발약썩, 유자 및 감잎의 사용부위는 모두 식용가능한 식품 원료로 등재되어 있음. 동물실험이나 인체적용시험에 적용될 섭취량을 고려하여, 필요시 추가 독성평가를 실시할 계획이며, 현재는 식경험이나 사용근기 자료 축적으로 통한 안전성평가를 우선으로 실시하고 있음.
- 사자발약썩, 유자 및 감잎 추출물의 사용부위나 추출방법을 고려할 때, 위 의사결정도에 따르면 “나”에 해당됨.
- 사자발약썩, 유자 및 감잎 오랜 식경험이 있으며, 섭취량 평가자료는 기능성평가를 위해 진행되고 있는 동물실험과 인체적용시험을 통해 계속적으로 수행할 예정임.
- 데이터베이스 검색을 통한 안전성 정보 자료 수집도 진행 중임.
- 안전성 관련 근기자료 축적 후 필요시에는 독성시험을 통한 안전성평가도 고려할 수 있음.



제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	✓			
섭취 근거 자료 ¹⁾		✓	✓	✓
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 ²⁾		✓	✓	✓
섭취량평가자료 ³⁾		✓	✓	✓
영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료 ⁴⁾			✓	✓
독성시험자료 ⁵⁾				✓

그림 1-13. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도(제13조제8호관련)

- 1) 섭취경험이 있음을 증명하는 근거자료로서 건강기능식품공전, 식품공전, 식품첨가물공전 자료; 전통적 사용이 기록되어 있는 과학적 자료 또는 역사적 사용 기록; 국외 정부기관의 인정 자료 등
- 2) 데이터베이스에서 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 독성 또는 안전성 자료를 검색한 자료
- 3) 국민영양조사결과, 섭취량 실태조사결과 등을 근거로 평균 섭취량과 제안된 섭취량을 비교·분석한 자료
- 4) 원료의 섭취로 인하여 다른 영양성분의 흡수·분포·대사·배설 등에 영향을 미치는 지를 평가한 자료; 생물학적유효성자료; 중계시험, 역학조사의 인체시험자료
- 5) 독성시험자료는 단위부여독성시험(설치류, 비설치류), 3개월 반복부여독성자료(설치류), 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체 이상시험, 소핵시험)을 기본으로 하며, 원료의 특성에 따라 생식독성, 항원성, 면역독성, 발암성시험을 추가로 시험하여야 함. 단, 기타 안전성 자료로 안전성이 확보되었음을 입증할 수 있는 경우에는 예외 적용 가능함

- 약쑥, 유자, 감잎 추출물은 건강기능성식품 기능성 원료 및 기준규격인정에 인정에 관한 규정 (제2013 10호) 중 [별표3. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도]의 [다: “건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정”에 등재된 원료인가? (아니오) → 섭취경험이 있는 동식물, 조류, 미생물 등의 원료 자체인가? (아니오) → 섭취경험이 있는 동식물, 조류, 미생물 등을 제조 또는 가공한 것인가? (네) → 물리적인 추출 또는 물이나 주정을 이용한 단순 추출물인가? (네) → 알려진 부작용이 있는가? (아니오) 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하였는가? (네)]에 해당함을 알 수 있음.
- 이에 각 추출물의 안전성을 검증하기 위해 섭취근거 자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보자료, 섭취량 평가자료, 생물학적 유용성 자료, 인체적용시험 자료 등을 다음과 같이 확보함.

(1) 약쑥

(가) 섭취 근거 자료

1) 식품으로서 사용되어 온 역사

- 쑥은 우리 민족과 관계가 깊어 단군신화에도 등장한다. 어린 쑥은 떡에 넣어서 먹거나 된장국을 끓여 먹음. 쑥은 마늘과 더불어 단군 신화에 나올 만큼 역사가 아주 오래된 약초이자 인체에 매우 이로운 식품임. 제민요술 (齊民要術, AD 530~550)에서는 식용 야생초로 기록하였고 누룩 중 신국 (神麴)의 제조시 쑥 달인 물로 반죽한다고 기록하여 다양한 용도로 발전된 것을 알 수 있음. 지봉유설(芝峯類說, 1614년)에서는 떡 제조시 쑥을 첨가한 기록이 있고 3월 3일 상사일에는 쑥떡이나 쑥설기를 먹었다는 기록도 전함. 즉, 약쑥은 전통적으로 섭취해왔으며 그 식경험은 역사가 길다고 할 수 있음.

2) FDA의 EAFUS

- 데이터베이스에서 쑥 추출물 (Artemisia extract)은 EAFUS (Everything Added to Food in the United States)로 등재되어 있음 (Doc No. 1718). EAFUS는 식품에 직접적으로 첨가될 수 있는 원료로서, 미국 FDA에서 식품 첨가물 혹은 GRAS로 인정된 것을 의미함.

(나) 약쑥 안전성 정보자료 (검색자료 일람)

1) 원문 검색

- 키워드로 [(Artemisia princeps Pampanini or 약쑥) and (adverse or risk or toxic)]를 적용하여 독성과 관련된 원문검색을 실시하였음 (2009.10.14). 그 결과 약쑥 혹은 약쑥 추출물 섭취로 인한 독성 자료는 없었음.

Pubmed	Toxline	FDA poisonous plant DB	NAPRALERT	KISS
자료없음	자료없음	자료없음	자료없음	자료없음

2) Review 데이터베이스

- 키워드로 **Artemisia princeps Pampanini**를 적용하여 독성 관련 **review** 데이터베이스 검색을 실시하였음. 그 결과 **Artemisia princeps Pampanini**와 관련된 **monograph**는 검색되지 않았음.

AHRQ monograph	Natural Medicine DB	Commission E	Expanded Commission E
자료없음	자료없음	자료없음	자료없음
American Herbal Pharmacopoeia	PDR for health	WHO monograph	ESCOP monograph
자료없음	자료없음	자료없음	자료없음

(다) 약쭈 섭취량 평가 자료

- 약쭈 추출물의 일일 섭취량은 **3g**으로, 추출 수율이 **9~10%**이므로 약쭈잎 기준으로 환산했을 때 약쭈 잎 **30g**을 섭취하는 것과 같음. **2005년** 국민건강영양조사 결과에서도 우리나라 국민들이 연령대별로 차이는 있지만, 평균 **1일 2.1g**의 쭈를 섭취하는 것으로 나타남. 이는 쭈의 섭취가 주로 봄철에 집중되어 있기 때문으로 생각됨. 우리나라에서는 예부터 쭈를 이용한 요리인 쭈국, 쭈떡, 쭈밥, 쭈부침개 등을 섭취해왔고, 이 요리들 **1회1인** 분량에 이용되는 쭈의 양은 쭈국의 경우 **30g**, 쭈떡은 **100g**, 쭈밥은 **50g**, 쭈부침개는 **150g** 정도임. 따라서 약쭈 추출물 **3g**은 이미 쭈를 이용한 요리로 그 이상의 양을 섭취해왔으므로 생활 속에서 섭취가능한 양으로 사료됨.

(2) 유자

(가) 섭취 근거 자료

1) 식품으로서 사용되어 온 역사

- 분류학상으로 운향과, 감귤속, 후생감귤아속에 속하는 유자는 중국 양자강상류로부터 도래하였으며, 기후환경 등의 제한으로 우리나라에서 제주를 포함해 고흥, 거창, 완도, 남해 등 남해안 일대에서만 자생해왔음. 우리나라에서 유자의 대부분 과피를 당절임하여 유자차로 이용되고 있음. 또한 여러 한의서에도 유자의 안전성을 서술하고 있음.

<허준의 동의보감>

“유자의 껍질은 두텁고 맛이 달며[甘] 독이 없다. 위(胃) 속의 나쁜 기를 없애고 술독을 풀며 술을 마시는 사람의 입에서 나는 냄새를 없앤다.”

<일화자제가본초>

“독이 없다.”

<본초품휘정요>

“맛은 달고 시며 성질은 차고 독이 없다.”

<사천중약자>

“성질은 따뜻하고 맛은 맵고 쓰고 달며 독이 없다.”

<영남재약록>

“맛은 쓰고 매우며 성질은 따뜻하고 평하며 독이 없다.”

2) 식품공전상의 분류

- 식품원재료 분류에 유자는 과실류의 하나로 분류되어 있음.

표 1-28. 식품공전 식품원재료 분류 중 과실류

과실류	인과류	사과, 배, 모과, 감, 석류 등
	감귤류	감귤, 오렌지, 자몽, 레몬, 유자 , 라임, 금귤, 탕자, 시트론 등
	핵과류	복숭아, 대추, 살구, 자두, 매실, 체리, 넥타린, 앵두, 산수유, 오미자 등
	장과류	포도, 딸기, 무화과, 오디, 월귤, 커런트, 베리, 구기자, 머루, 복분자(산딸기, 나무딸기 포함), 으름 등
	열대과일류	바나나, 파인애플, 키위(참다래), 아보카도, 파파야, 대추야자, 망고, 구아바, 코코넛, 리치, 패션 프루트, 두리안, 망고스틴 등

3) FDA의 EAFUS

- 데이터베이스에서 감귤류 과피 추출물 (CITRUS PEELS, EXTRACT)은 EAFUS (Everything Added to Food in the United States)로 등재되어 있음 (Doc No. 1939). EAFUS는 식품에 직접적으로 첨가될 수 있는 원료로서, 미국 FDA에서 식품 첨가물 혹은 GRAS로 인정된 것을 의미함.

(나) 유자의 안전성 정보자료 (검색자료 일람)

1) 원문 검색

- 키워드로 [(Citrus Junos Sieb or 유자) and (adverse or risk or toxic)]를 적용하여 독성과 관련된 원문검색을 실시하였음 (2013.9.9). 그 결과 약쭈 혹은 약쭈 추출물 섭취로 인한 독성 자료는 없었음.

Pubmed	Toxline	FDA poisonous plant DB	KISS
자료없음	자료없음	자료없음	자료없음

2) Review 데이터베이스

- 키워드로 *Citrus Junos Sieb*를 적용하여 독성 관련 review 데이터베이스 검색을 실시하였음 (2013.9.9.). 그 결과 *Citrus Junos Sieb*와 관련된 monograph는 검색되지 않았음.

AHRQ monograph	Natural Medicine DB	Commission E
자료없음	자료없음	자료없음

PDR for health	WHO monograph	ESCOP monograph
자료없음	자료없음	자료없음

(다) 유자 추출물의 섭취량 평가 자료

- 유자 추출물의 일일 섭취량은 1g 으로, 추출 수율이 35~40%이므로 유자 기준으로 환산했을 때 유자 2.5g을 섭취하는 것과 같음. 2010년 국민건강영양조사 결과에서 우리나라 국민들이 연령대별로 차이는 있지만, 평균 섭취자를 기준으로 1일 30g의 유자를 섭취하는 것으로 나타났음. 이는 일반적인 크기의 유자(80~100g)에서 씨와 과즙을 제거한 한 개 분량정도임. 따라서 유자 추출물 1g은 이미 유자로 그 이상을 섭취해왔으므로 생활속에서 섭취가능한 양으로 사료됨.

(3) 감잎

(가) 섭취 근거 자료

1) 식품으로서 사용되어 온 역사

- 분류학상으로 감나무과 (Ebenaceae)의 낙엽 교목 (*Diospyros kaki*)에 속하는 감나무는 한국의 중부 이남, 일본, 중국 등지에 분포함. 우리나라에서 감나무잎은 감잎차의 원료로서 오래전부터 민간에서 이용되고 있음. 또한 시엽(柿葉)이라하여 여러 한의서에도 감잎의 안전성을 서술하고 있음. 감잎에는 catechin, isoquercitrin, astragalin 등의 flavonoid류의 성분이 함유되어 항산화뿐만 아니라 항암작용에도 뛰어난 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있으며, 중금속의 해독작용에도 탁월한 효과가 있다고 알려져 있음.

<허준의 동의보감>

“성질이 차고, 맛이 달며, 독이 없고, 심폐를 부드럽게 하고 갈증을 멎게 하며, 폐위와 심열을 낮게 하고, 위를 열며, 술의 열독을 풀고, 위 사이의 열을 억제하고 구건과 구혈을 그치게 한다.”

<한국본초도감>

“성질은 차고 맛은 쓰며 독이 없다. 시엽은 潤肺, 止血의 효과가 있어 토혈, 폐결핵출혈, 각혈, 자궁출혈, 안저출혈, 월경과다 등에 지혈반응을 보인다.”

2) 식품공전상의 분류

- 식품원재료 분류에 감잎은 식용가능한 식물성 원료로 등재되어 있음.

라. 추출물의 유해물질 (잔류농약, 중금속, 미생물 등) 및 영양성분

(1) 영양성분

- 공인 분석기관인 (주)에스푸드가디언스를 통해 감잎유자 복합추출물물의 영양성분을 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같음.

표 1-29. 감잎유자 복합 추출물의 공인기관 영양성분 분석결과

시험항목	분석 결과	단위
회분	5.92	%
열량	377.86	kcal/100g
탄수화물	79.18	g/100g
조지방	5.17	g/100g
식이섬유	1.14	g/100g

(2) 중금속

- **설정기준:** <건강기능식품의 기능성 원료 인정에 관한 규정>에서 제시하는 허용기준에 따르면, 성인평균체중 60kg을 기준으로 중금속의 하루 허용량은 납 11 μ g, 비소 150 μ g, 카드뮴 3 μ g, 총수은 2 μ g 임. 감잎유자 복합추출물의 일일 섭취량을 최대 2g이라고 했을 때, 이 섭취량을 기준으로 계산하면, 납 5.4ppm (10.8 μ g/2g= 5.4 μ g/g), 비소 75ppm (150 μ g/2g=75 μ g/g), 카드뮴 1.5ppm (3 μ g/2g=1.5 μ g/g), 총수은 1.5ppm (2.1 μ g/2g=1.05 μ g/g) 미만의 범위에서 설정되어야 함. 감잎유자 복합추출물을 분석한 결과, 납, 비소, 카드뮴, 수은 모두 기준에 크게 못 미치는 양으로 안전하다고 사료됨.
- **시험방법:** 건강기능식품공전 제5. 일반시험법 5. 유해성금속시험법 1) 시험용액의 조제에 따라 시험용액을 조제하여 2) 측정 (1) 원자흡광도법 또는 (2) ICP법에 따라 시험을 실시함.
- **분석결과:** 감잎유자 복합추출물을 분석한 결과, 납, 총비소, 카드뮴, 총수은 모두 규격에 적합함을 확인함.

표 1-30. 감잎유자 복합 추출물의 중금속 설정항목 / 규격값

시험항목	식약처 허용기준	설정규격	2013년		2014년
			감잎추출물	유자추출물	감잎유자복합 추출물
총수은	< 2.1 μ g/일	1ppm 이하	0.00 mg/kg	불검출	불검출
비소	< 150 μ g/일	1ppm 이하	0.13 mg/kg	불검출	불검출
납	< 10.8 μ g/일	1ppm 이하	0.21 mg/kg	불검출	불검출
카드뮴	< 3.0 μ g/일	1ppm 이하	불검출	불검출	불검출

검 사 성 적 서

발급 번호	제 R-11311-0051 호	접수 번호	R-11311-0051	
제 품 명	CJCJ	제조일자 (LOT번호)	-	
		유통기한		
의뢰인	업소명	씨제이제일제당(주)식품연구소	성 명	김철하, 손경식, 이재현
	소재지	서울특별시 구로구 구로동 636		
접수일자	2013-11-01	검사완료일	2013-11-15	
유 형	Sample			
검사목적	참고용			

시험항목 및 결과

시험항목	기준 규격	결과	단위	항목 판정
총수은	-	0.00	mg/kg	-
비소	-	불검출	mg/kg	-
납	-	불검출	mg/kg	-
카드뮴	-	불검출	mg/kg	-
= 이하여백 =				

검 사 성 적 서

발급 번호	제 R-11311-0049 호	접수 번호	R-11311-0049	
제 품 명	CJPL	제조일자 (LOT번호)	-	
		유통기한		
의뢰인	업소명	씨제이제일제당(주)식품연구소	성 명	김철하, 손경식, 이재현
	소재지	서울특별시 구로구 구로동 636		
접수일자	2013-11-01	검사완료일	2013-11-15	
유 형	Sample			
검사목적	참고용			

시험항목 및 결과

시험항목	기준 규격	결과	단위	항목 판정
총수은	-	0.00	mg/kg	-
비소	-	0.13	mg/kg	-
납	-	0.21	mg/kg	-
카드뮴	-	불검출	mg/kg	-
= 이하여백 =				

그림 1-14. 감염유자 복합 추출물의 중금속 공인기관 분석 결과

(3) 잔류농약

- **설정기준:** 「식품의 기준 및 규격」의 농약 잔류허용기준에 따르면 건조유자와 감잎에는 별도 잔류농약 기준이 설정되어 있지 않음. 그러나 감잎은 감과 같이 적용할 수 있다는 식품의약품안전처의 답변에 따라 감의 기준을 적용하고, 건조유자는 유자의 기준을 적용하되, 감잎 및 유자 모두 수분함량 및 복합비율을 고려하여야 함. 유자는 14종이 설정되어 있으며, 감은 63종이 설정되어 있음.
- **분석결과:** 감잎유자 복합추출물을 공인기관에 의뢰하여 농약 245종을 분석하였음. 그 결과, 241항목이 불검출되었으며, 4항목이 검출되었음. 비펜스린 (Bifenthrin) 1.014 mg/kg, 카벤다짐 (Carbendazim) 18.782 mg/kg, 페니트로치온 (Fenitrothion) 0.219 mg/kg, L-싸이할로쓰린 (Cyhalothrin) 0.6246 mg/kg으로 분석됨. 이 중 카벤다짐 (3.0 mg/kg) 유자에 설정되어 있으며, 싸이할로쓰린 (0.5 mg/kg)이 감에 설정되어 있는 잔류농약임. 유자와 감의 수분함량, 농축비율, 복합물의 배합비율 등을 고려하고, 추가적으로 회사 내부 기준인 80%를 고려하여 잔류농약별 허용기준을 별도 설정하였음. 그 기준에 의하면 분석된 농약 모두 미달된 수준이나, 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 생각됨.
- **분석방법:** 식품공전 제 10. 일반시험법 9. 식품 중 농약 잔류시험법

표 1-31. 감잎유자 복합 추출물의 중금속 설정항목 / 규격값

검출항목	분석결과	잔류농약 허용기준	내부 설정기준
비펜스린 (Bifenthrin)	1.014 mg/kg	-	-
카벤다짐 (Carbendazim)	18.782 mg/kg	3.0 mg/kg (유자)	144 mg/kg
페니트로치온 (Fenitrothion)	0.219 mg/kg	-	-
L-싸이할로쓰린 (Cyhalothrin)	0.6246 mg/kg	0.5 mg/kg (감)	6.246 mg/kg



검 사 성 적 서

발급번호	제 R-41411-0264-1 호	접수번호	R-41411-0264
제 품 명	감염유자복합분말	제조일자 (LOT번호)	2013-02-05
		유통기한	
의 회 인	업소명	씨제이제일제당(주)영등포공장	성 명
	소재지	서울특별시 구로구 경인로 518	
접수일자	2014-11-21	검사완료일	2014-12-09
검사목적	참고용		

시험항목 및 결과

시 험 항 목	<p>나프토포아미드, 노함푸론, 누아리롤, 다이아지논, 델타메쓰린, 디니코나졸, 디디티, 디메칠벤포스, 디메티아미드, 디메토모르프, 디메토에이트, 디메피퍼레이트, 디설포논, 디에트렌카브, 디엘드린, 디우론, 디치오피르, 디코폴, 디크로보스, 디크로프로아니드, 디칼로란, 디클로포프-메칠, 디페노코나졸, 디페닐아민, 디펜아미드, 디프루벤주론, 두페누론, 마이클로부타닐, 만디프로파미드, 말라치온, 메벤포스, 메스틸, 메치오카브, 메카밤, 메타락살, 메타인포프, 메타벤즈티아주론, 메트라클로르, 메트로부루론, 메톡시클로르, 메톡시페노자이드, 메틀카브, 메트리부진, 메트코나졸, 메티다치온, 메파니피딜, 메페나셀, 메프로닐, 몰리네이트, 베노딜, 벤디오카브, 벤족시메이트, 벤티아발리카브아이스프로필, 보스칼리드, 부타클로르, 부프로페진, 브로모부타이드, 브로모프로필레이트, 비에치시, 비타탈, 비페녹스, 비펜스린, 빈클로졸린, 사이플루페나미드, 스피로디크로렌, 스피로메시켄, 시마진, 시메코나졸, 시아조파미드, 실라플루오렌, 싸이록사닐, 싸이피메스린, 싸이프로디닐, 싸이프로코나졸, 싸이플루스린, 싸이알로포프-부틸, 씨메트린, 아날로포스, 아라클로르, 아미셀브롬, 아세타미프리트, 아족시스트로빈, 아진포스메칠, 아크리나스린, 알드린, 알디카브, 에디펜포스, 에스프로카브, 에치오펜카브, 에치온, 에타복삼, 에탈플루라린, 에토펜프록스, 에토프로포스, 에톡사졸, 에트리디아졸, 에트뎀포스, 엔도실판, 엔드린, 오푸레이스, 옥사디아존, 옥사일, 옥사지크로메폰, 옥시플루오렌, 이마자릴, 이미다크로프리트, 이미벤코나졸, 이소펜포스, 이소프로치오란, 이소프로카브, 이프로다온, 이프로발리카브, 이프로벤포스, 이피엔, 인다논, 인독사카브, 죽사마이드, 치노메치오네이트, 치오파네이트메틸, 카두사포스, 카바릴, 카벤다짐, 카보페노치온, 카보우란, 캄판, 퀴노클라마이인, 퀴노젠, 크레속심-메칠, 크로마페노자이드, 크로치아니던, 크로켄테진, 클로란트라닐리프롤, 클로로벤질레이트, 클로로타로닐, 클로르단, 클로르펜빈포스, 클로르프로팜, 할로르플루아주론, 할로르피리포스, 할로르피리포스-메틸, 할로르헨나피르, 테부코나졸, 테부트린, 테부틸라진, 테브포스, 테부페노자이드, 테부펜피라드, 테부피럼포스, 테트라디론, 테트라코나졸, 테프루벤주론, 테플루스린, 토릴플루아니드, 톨크로포스-메칠, 트라로메스린, 트리싸이클라졸, 트리아디메닐, 트리아디메폰, 트리아조포스, 트리플루라린, 트리플루부론, 트리프록시스트로빈, 트리프루미졸, 티아디릴, 티아메복삼, 티아벤다졸, 티아조피르, 티아클로프리트, 티오디카브, 티오벤카브, 티프루자마이드, 파라치온, 파라티온-메칠, 파클로부트랄람, 피메스린, 페나리롤, 페나미돈, 페나미포스, 페나자렌, 페녹사닐, 페니트로치온, 페뎀존, 펜디메타린, 펜발라레이트, 펜부코나졸, 펜시루론, 펜치온, 펜치온, 펜코나졸, 펜티에이트, 펜복사존, 펜프로파스린, 펜피록시메이트, 포레이트, 포사론, 포스치아제이트, 포스파미돈, 포클로르페누론, 풀렛, 푸라치오카브, 푸루실라졸, 푸르시트리네이트, 프로메트린, 프로메나졸, 프로시미돈, 프로치오포스, 프로클로라즈, 프로파닐, 프로페노포스, 프로록서, 프로피코나졸, 프탈리드, 플로렌코나졸, 플루미옥사진, 플루벤디아미드, 플루아크리피림, 플루오피콜라이드, 플루토라닐, 플루페녹수론, 피라조포스, 피라크로스트로빈, 피라크로포스, 피로릴론, 피리다벤, 피리다벤치온, 피리달린, 피리메탈린, 피리미노박-메칠, 피리미디퀸, 피리미카브, 피리미포스-메틸, 피리미포스-에틸, 피리벤족심, 피리부티카브, 피리프록시켄, 피페포포스, 피프로닐, 할펜프록스, 핵사코나졸, 핵사프루부론, 핵시치아족스, 헬타크로, 후루디옥소닐, 웨노부카브, 웨노치오카브, L-싸이알로쓰린</p>	
시 험 결 과	<p>상기 잔류농약 241항목 불검출, 4항목 검출</p> <p>검출된 항목 (단위 mg/kg) 비펜스린 : 1.014 , 카벤다짐 : 18.782 , 페니트로치온 : 0.219 , L-싸이알로쓰린 : 0.6246</p>	

그림 1-15. 감염유자 복합 추출물의 잔류농약 공인기관 분석 결과

5. 약쑥, 유자 및 감잎 주정 추출물의 혈행개선 특허 등록가능성 조사 (CJ제일제당 법무팀)

- 약쑥, 유자, 감잎 추출물을 이용한 혈행개선 건강식품 개발과제의 진행에 따라, 현재까지의 연구결과를 토대로 특허등록 가능여부 조사의뢰됨.

가. 조사내용

(1) 혈행개선용 약쑥 추출물

1) 특허 등록 가능성

- 약학회지 28(2), pp69-77(1984) : 애엽 물 추출물의 강력한 항응고억제효과 연구논문
- KR등록0900725, 0181751, 1000951 : 주요 성분으로 유파틸린, 자세오시딘 등을 함유한 쑥(애엽)의 추출물을 언급하고 있으며, 다만 혈액응고억제 특성을 갖지 않음 (ex. 디쿠마롤 제거).
- 상기 선행문헌에 따르면 쑥 추출물의 항응고 억제 효과가 이미 오래전부터 공지되어 있었고, 쑥의 성분으로 유파틸린과 자세오시딘 또한 널리 알려진 내용이어서, 단순히 쑥 추출물 자체로의 혈행개선 용도로의 등록은 어려울 것으로 판단됨. 다만, 상기 선행문헌에는 유파틸린 및 자세오시딘 자체의 항응고 억제 효과를 개시하고 있지 않으므로, 유파틸린 및 자세오시딘 각 분획물의 명백한 항응고억제 효과를 보여줄 수 있다면 유파틸린 및 자세오시딘의 항응고 억제 용도를 특징으로 출원 진행하는 것이 바람직함.

2) 침해 검토

- KR등록 1000951: 디쿠마롤을 포함하는 경우 침해회피 가능.
(권리범위) 유파틸린, 자세오시딘 및 아테미카핀 C를 포함하고 혈액응고 억제작용을 나타내는 혈액응고 억제성분인 디쿠마롤만이 선택적으로 제거된 애엽 추출물.
- KR등록 0900725: 추출용매를 프로판올로 사용하지 않을 경우 침해회피 가능.
(권리범위) 쑥의 프로판올 추출물을 제조하는 방법으로서, 쑥을 프로판올로 추출하는 공정; 및 상기 추출액을 감압, 농축하는 공정을 포함하며, 별도의 디쿠마롤 제거 공정을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 쑥 프로판올 추출물의 제조방법.

(2) 혈행개선용 유자 추출물

1) 특허 등록 가능성

- KR등록0782023에 당유자 유래 나란진, 네오헤스페리딘 분획조성물을 포함하는 항염조성물 기재
- J. FdHyg. Safety Vol.23, No.4, pp.297~303 (2008): 감귤유래 성분 중 하나인 나란진의 항혈전 및 항혈소판 효과 개시
- Phytother. Res. 15, 655 - 669 (2001): 감귤유래 헤스페리딘의 항혈소판 응집 효과 개시
- 선행문헌에 유자의 주요성분지표가 이미 알려져 있으며, 각 성분에 대한 항혈소판 효과

또한 개시되어 있으므로 특허등록 어려움. 만약, 유자의 성분분획물(나란진, 헤스페리딘)의 특정 조성비에 따른 임계적인 현저한 혈액응고억제효과를 보여준다면 조성비를 특징으로 출원진행 가능함.

2) 침해 검토

○ KR등록 1109771 : 혈행개선과 심근경색치료는 직접적으로 대응되지 않으므로 침해되지 않음.

(권리범위) 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 심근경색의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

○ KR등록 1109174 : 혈행개선과 뇌경색치료는 직접적으로 대응되지 않으므로 침해되지 않음.

(권리범위) 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌경색의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

(3) 혈행개선용 감잎 추출물

1) 특허등록가능성

○ J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(8), 1323-1327(2003): 단감꼭지로부터 혈액응고저해 특성을 갖는 성분존재를 확인하였으며, 해당 효과확인 실험방법이 당사 방법과 동일함.

○ KR등록 0531947: 녹차카테킨의 혈소판응집저해 특성을 갖는 항혈전체에 대한 내용으로 에피카테킨, 에피카테킨갈레이트 등 다양한 카테킨 성분을 갖는 조성물을 언급함.

○ 상기 선행논문은 감꼭지 (stem)에 포함된 성분에 혈액응고저해효과가 있음을 연구한 내용으로, 감잎 추출물의 혈행 개선 (혈액응고저해) 효과의 등록으로는 어려울 것으로 판단됨. 또한, 상기 논문에는 감꼭지의 성분 중 해당 혈액응고저해 특성을 갖는 성분이 명확히 규정되지는 않았으나 녹차카테킨 선행 특허 문헌에 항응집 효과를 갖는 카테킨 종류들이 개시되어 있으므로 감잎 성분 중 혈행 개선 효과를 갖는 성분을 카테킨으로 특정하더라도 녹차카테킨과의 명백한 효과차이를 보이지 않는 한 진보성이슈로 특허 거절될 가능성 높음.

○ 혈행개선용 감잎추출물의 사업화 적용시 침해이슈가 될 만한 특허는 검색되지 않음.

(4) 추가의견

○ 상기 검토한 바와 같이, 쑥, 유자, 감잎의 각 추출물 자체로의 혈행개선 효과로의 특허등록가능성은 매우 낮을 것으로 판단되나, 쑥 및 유자의 경우 추출 성분분획물의 우수한 혈행개선효과를 명백히 보여줄 수 있는 경우에는 해당 분획물, 또는 분획물의 농도/조성비/용량범위 등을 특징으로 하여 각 출원을 진행해 볼 수 있을 것으로 생각됨. (단, 분획물 자체의 특허는 추출물 형태를 권리범위로 커버하지 않음을 참고하시기 바람)

○ 별도로 약쑥, 유자, 감잎 추출물 중 적어도 2개의 성분 (ex. 쑥+유자, 감잎+쑥, 쑥+유자+감잎)이 혼합된 혈행개선 용도에 대한 문헌을 찾을 수 없었으므로, 단독 추출물로 사용하는 경우보다 2개의 이상의 추출물의 조합에서 우수한 효과를 보여준다면 '복합 추출물의 혈행개선용도' 형태로서 특허등록 가능성이 높다 판단됨.

- 법무팀의 의견에 따라 인체적용시험에 적용된 감잎추출물 및 유자복합물의 혈행개선 용도로 출원 완료하였음.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2014.12.18

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2014-0183454 (접수번호 1-1-2014-1233474-25)

출원인명칭 씨제이제일제당 (주)(1-2007-037435-2)

대리인성명 손민(9-1999-000420-6)

발명자성명 김혜진 문명이 신동주 문병석 최명숙 류리 김애향

발명의명칭 감잎 추출물을 포함하는 혈액순환 장애 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

특 허 청 장

6. 감잎 및 유자 복합물을 이용한 제품화

가. 인체적용시험 피험자를 대상으로 한 간이 설문조사

감잎/유자 소비자 간이 설문조사 결과

섭취 전 혈관 건강 이상(혈액순환 이상)으로 느껴지는 증상에 대해 체중 증가와 피로와 무력감, 목/어깨의 통증을 꼽았으며, 그 중 가장 개선되기를 원하는 증상으로 체중 증가(26%)을 선택함

<혈관 건강 이상으로 느껴지는 증상/5점 척도>

혈관 건강 이상으로 느껴지는 증상	전 체	비율 (%)
증상 빈도 (5점 척도 점수 합계)	(678)	100
손/발 저림	79	12
배에 가스차고 소화 안됨	64	9
목/어깨 통증	112	17
가슴(맥박/박동) 두근거림, 답답함	68	10
두통, 뒷목 뻣김, 현기증 등	96	14
피로와 무력감	117	17
체중 증가(혹은 배가 나옴)	136	20
기타	6	1

(1) 섭취 전

<혈관 건강 이상 중 가장 개선되었으면 하는 것/중복응답>

혈관 건강 이상 중 개선 원하는 증상 3가지	전 체	비율 (%)
응답 수 (3개 이내 중복 응답)	121	100
손/발 저림	12	10
배에 가스차고 소화 안됨	14	12
목/어깨 통증	20	16
가슴(맥박/박동) 두근거림, 답답함	4	3
두통, 뒷목 뻣김, 현기증 등	13	11
피로와 무력감	26	21
체중 증가(혹은 배가 나옴)	31	26
기타	1	1

주) 유자/감잎 인체시험 대상자 총 51명(XX세 이상 성인 남녀) 대상 간이설문조사 결과(2015년 1월)

감염/유자 소비자 간이 설문조사 결과

(2) 섭취 후

섭취 전 혈관 건강 이상(혈액순환 이상)으로 느껴지는 증상에 대해 섭취 전 대비 23% 감소하였으며, 여전히 체중 증가와 피로와 무력감, 목/어깨의 통증을 꼽았음
가장 개선되기를 원하는 증상으로 체중 증가(25%)을 선택함

<혈관 건강 이상으로 느껴지는 증상/5점척도>

혈관 건강 이상으로 느껴지는 증상	전 체	비율 (%)
증상 빈도 (5점 척도 점수 합계)	(591)	100
손/발 저림	76	13
배에 가스차고 소화 안됨	76	13
목/어깨 통증	90	15
가슴(맥박/박동) 두근거림, 답답함	67	12
두통, 뒷목 뻣김, 현기증 등	78	13
피로와 무력감	95	16
체중 증가(혹은 배가 나옴)	108	18
기타	1	0

<혈관 건강 이상 중 가장 개선되었으면 하는 것/중복응답>

혈관 건강 이상 중 개선 원하는 증상 3가지	전 체	비율 (%)
응답 수 (3개 이내 중복 응답)	99	100
손/발 저림	8	8
배에 가스차고 소화 안됨	14	14
목/어깨 통증	17	17
가슴(맥박/박동) 두근거림, 답답함	2	2
두통, 뒷목 뻣김, 현기증 등	14	14
피로와 무력감	19	19
체중 증가(혹은 배가 나옴)	24	25
기타	1	1

주) 유자/감염 인체시험 대상자 총 51명(XX세 이상 성인 남녀) 대상 간이설문조사 결과(2015년 1월)

감염/유자 소비자 간이 설문조사 결과

(2) 섭취 후

혈관 건강 이상이 생기는 원인은 주로 운동부족이라고 생각하며
일반적으로 피로, 두통 등 몸의 이상증상을 느끼거나 의사/주변의 권유에 의해 관리하는 편임

<혈관 건강 이상이 생기는 원인>

혈관 건강 이상의 원인	전 체	비율 (%)
사례 수	45	100
유전, 가족력	2	5
흡연/술주 습관	10	22
운동부족	18	40
영양불균형, 불규칙적 식사패턴	9	20
급격한 신체/체중 변화	2	4
노화	0	0
수면부족	1	2
정신적 스트레스	3	7
기타	0	0

<혈관 건강이상을 관리하게 된 계기>

혈행 건강을 관리한 계기	전체	비율 (%)
사례 수	43	100
건강검진 결과를 보고	8	18
유전, 가족력 등으로 질병 예방	3	7
의사/약사 등이 권해서	8	19
가족/친지 등 주변에서 권해서	8	19
피로, 두통 등 이상증상을 느껴서	13	30
기타	3	7

주) 유자/감염 인체시험 대상자 총 51명(XX세 이상 성인 남녀) 대상 간이설문조사 결과(2015년 1월)

감염/유자 소비자 간이 설문조사 결과

(2) 섭취 후

- 평소 혈관 건강 이상에 대해 특별한 관리를 하지 않은 경우가 제일 높았으며 규칙적인 운동을 하거나 식단을 조절하는 것으로 나타남
- 감염/유자 만족도는 평균 7.3 (10점 척도)로 높은 편은 아니며, 4주차에 효능을 처음 느낌

<평소 혈관 건강 이상을 관리하던 방법>

혈관 건강 이상으로 느껴지는 증상	관객 (중복응답)	비율 (%)	효과 (1가지)	비율 (%)
사례 수	73	100	25	100
규칙적인 운동	14	19	16	64
영양균형 위한 식단조절	9	12	5	20
다이어트/체중조절 식단	14	19	2	8
금주/금연(또는 자제)	7	10	1	4
병원 처방/약물 치료	1	1	0	0
건강(기능)식품 섭취	7	10	1	4
한약/보약 섭취	1	1	0	0
이전에 애본 관리방법 없음	20	28		
기타	0	0	0	0

주) 유자/감염 인체시험 대상자 총 51명(XX세 이상 성인 남녀) 대상
간이설문조사 결과(2015년 1월)

그림 1-16. 감염 및 유자 복합물 설문조사 결과 분석

- 인체적용시험 대상자 선정기준인 **BMI**에 근거하여 등록된 피험자를 대상으로 한 설문조사에서 체중증가와 체중관리에 대한 니즈가 큰 것으로 분석됨.
- 명확한 증상이 없고 그에 따른 체감 효능이 부족한 부분이 **bottleneck**이 될 수 있으므로 주체감효능 파악과 그에 맞는 포물러 개발 필요 (예, 체중 감소, 피로회복 등)
- 카테고리 형성 측면에서 기본 전문가 신뢰도 확보를 위한 메커니즘 기반 (혈소판 응집억제)의 효능 확보가 필요하며, 이를 이용하여 전문가 **reference**나 **MPR** 활용이 필요할 것으로 판단됨.

나. 제품 **prototype** 개발

- CJ제일제당 건강식품사업부에서 신제품으로 개발중인 스틱젤리 형태와 고기능성임을 강조하기 위한 액상고 타입의 제형으로 **prototype**을 개발함.
- 개발중인 2개의 제형 외에도, 추가적인 소비자 조사와 컨셉 개발에 따라 다른 제형의 **prototype** 개발도 계속할 예정임.
- 감염, 유자, 혈행 개선이라는 컨셉에 어울리도록 한방소재를 활용한 부원료의 배합으로 개발중임.



(A) 스틱젤리 타입



(B) 액상고 타입

그림 1-17. 개발 중인 prototype

제 2 절 제1협동과제

: 혈행 개선 건강기능소재인 사자발약쑥, 유자 및 감잎의 기능성과 작용기작 검증

1. 연구수행 방법

가. *In vitro* 실험

(1) 혈소판 응고시간 측정

건강한 사람의 정맥혈을 채취하여 혈액응고능 측정의 기질로 사용하였으며 혈액응고가 일어나지 않도록 3.2% sodium citrate 항응고제가 들어있는 vacutainer (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 혈액을 채취한 후 잘 혼합하였음. 채혈된 혈액은 3000rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 분리하였음. Activated partial thromboplastin time (aPTT)과 prothrombin time (PT) 분석은 Thrombotimer (Behnk Elektronik, Germany)를 사용하여 측정하였음. aPTT 측정시엔 citrate를 함유한 혈장 (100 μ L)에 시험물질 (각 주정추출물 및 지표화합물)을 농도별로 10 μ L을 넣은 후 aPTT reagent (100 μ L)를 가하였으며 37°C에서 3분 동안 반응시킨 후, 염화칼슘 (CaCl₂) 생성에 걸리는 시간을 혈장응고시간으로 제시하였음. PT분석은 aPTT 분석과 동일하게 citrate를 함유한 혈장 (100 μ L)에 시험물질인 식물주정 추출물 및 그 지표물질을 농도별로 10 μ L 넣고 3분간 반응시킨 후, PT reagent를 가하고 혈장응고에 걸리는 시간을 측정하였음.

(2) 혈소판 응집률 측정

혈소판 응집능은 lumi-aggregometer (Chrono Log Co., USA)를 이용하여 탁도 (turbidity) 변화정도로 측정함. Platelet-rich plasma (PRP)의 광투과도 (light transmission)를 0%로, platelet poor plasma (PPP)와 suspension buffer의 광투과도를 100%로 각각 맞춘 후, 37°C에서 혈소판의 응집정도에 따른 광투과도를 측정함. 측정 용기로는 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용하며 PRP를 aggregometer안에 1분 간 안정화시킴. 그리고 PRP와 시험물질인 식물주정 추출물 및 그 지표물질을 농도별로 가하고 10분간 반응 시킨 후, ADP, arachidonic acid (AA) 또는 collagen을 즉시 첨가하여 광투과도를 측정함.

(3) 혈소판활성화 바이오마커 분석 (Serotonin, TXB2, P-selectin)

혈소판 응집에 의한 혈관수축을 매개하는 혈관조절물질로는 serotonin과 TXB2가 가장 대표적인 물질로 알려져 있음. Serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT)은 간, 뇌, 혈관내피세포 등의 조직에서 흡수되며 혈액 중에서는 대부분이 혈소판에 의해 흡수되어 저장되었다가 혈소판이 활성화되면 유리되어 다시 혈소판의 5-HT receptor에 작용하여 응집을 촉진시키기 때문에 혈

소판 활성화의 바이오마커로 사용됨. Serotonin뿐만 아니라 TXA₂는 혈소판 dense granule에 저장되어 있다가 혈소판이 활성화되면 유리되어 응집을 촉진시킴. Adhesion molecule인 P-selectin은 혈소판의 α-granule에 저장되어 있다가 혈소판이 활성화될 때 혈소판 표면에 노출되고 혈소판과 leukocyte와의 부착을 매개함. 대사증후군 상태에서 arachidonic acid의 증가로 인한 TXA₂ 발현 증가 및 P-selectin의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있어 이들의 함량을 측정함. 혈장 serotonin, TXB₂ 및 sP-selectin의 함량 측정은 ELISA kit (MyBioSource, San Diego, USA)를 사용하였고, 혈장과 후보 소재를 9:1의 비율로 섞은 후 측정하였음.

(4) Bleeding time 측정

1차 동물 실험 전 예비실험으로서 추출물과 추출물의 지표물질에 의한 혈소판과 혈액응고 상태를 알아보기 위하여 bleeding time을 실시함. Bleeding time 측정을 위해 Dejana 등 (1979)이 실시한 방법을 일부 수정하여 적용하였음. 각 군당 5마리의 수컷 ICR mice (6주령)가 실험에 사용되었으며 1주간 적응 기간을 거쳐 실험 전날 12시간 절식시킴. 강화약썩, 감잎 및 유자 40 mg/kg와 후보 소재의 대표 flavonoids (eutilin, jaceosidin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, naringin 및 hesperidin) 10 mg/kg를 경구 투여하였으며 양성대조군은 aspirin 30 mg/kg을 사용하였음. 경구 투여 2시간 후, ICR mice의 꼬리 끝 3mm를 자른 후 filter paper에 5초마다 찍어 피가 멈추는 시간을 측정하였음.

나. 동물실험 설계 및 사육시험 실시

(1) 동물실험 설계 및 시료수집

(가) 2차례의 동물실험 설계

○ 제1차 동물시험 (혈행개선용 유효물질 테스트)에 적용되는 유효소재는 *in vitro* 실험 결과에 근거하여 감잎 주정추출물 (PL), 유자 주정추출물 (CJS), 약썩 주정추출물 저용량 (SJL) 그리고 약썩 주정추출물 고용량 (SJH)로 선정하였음. 식이군은 음성대조군 (HFD), 양성대조군인 은행잎추출물군(GB)과 오메가-3군 (N-3) 그리고 실험물질보충군인 PL, CJS, SJL 및 SJH군으로 최종 설정하였음 (그림 2-1).

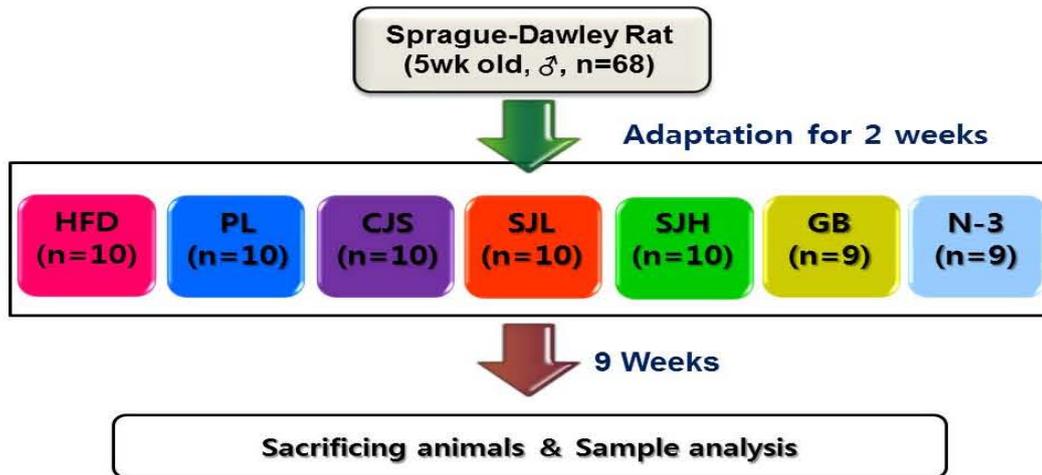


그림 2-1. Experimental design I for functional evaluation of samples for test of improvement of blood circulation and lipid metabolism.

HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3).

○ 실험동물 모델로 Sprague Dawely (♂, 5주령)를 선정하였고 Lab-chow 식이를 제공하면서 2주간 안정화 시킨 후 식이군당 실험동물 10마리씩을 무작위로 배정하였음. 모든 실험군은 고지방식이(high-fat diet)를 기본으로 하고 물질보충군은 CJ제일제당(주)에서 감잎주정추출물, 유자주정추출물, 약쭉주정추출물, 은행잎추출물 및 오메가-3를 제공받아 식이에 보충하였음.

○ 전체 실험군은 다음과 같이 설정하여 표 2-1 식이조성표에 근거한 실험식이를 급여.

제1군, 음성대조군, HFD : high-fat diet

제2군, PL군 : HFD + 감잎 주정추출물 0.5% (w/w)

제3군, CJS군 : HFD + 유자 주정추출물 0.5% (w/w)

제4군, SJL군 : HFD + 약쭉 주정추출물 0.05% (w/w)

제5군, SJH군 : HFD + 약쭉 주정추출물 0.15% (w/w)

제6군, GB군 : 양성대조군; HFD + 은행잎추출물 0.5% (w/w)

제7군, N-3군 : 양성대조군; HFD + 오메가-3 0.5% (w/w)

○ 실험동물은 항온(25℃)과 항습(50%) 그리고 6시부터 18시까지의 light cycle을 유지하게 했고 개개의 stainless cage 안에서 사육하였으며, 식이와 식수는 자유식 (ad libitum)으로 공급하였음. 식이는 4℃에 냉장보관 하였고 매주 체중과 식이섭취량을 측정하였음.

○ 제2차 동물실험에 적용되는 유효소재는 *in vitro* 실험 결과에 근거하여 감잎 주정추출물 (PL), 유자 주정추출물 (CJS), 약쭉 주정추출물 (SJ), 감잎 및 유자 주정 추출물 복합군1 (MO), 그리고 감잎 및 유자 주정 추출물 복합군2 (MT)로 선정하였음. 식이군은 음성대조군 (HFD), 양성대조군 (ND), PL, CJS, SJ, MO 그리고 MT군으로 최종 설정하였음 (그림 2-2).

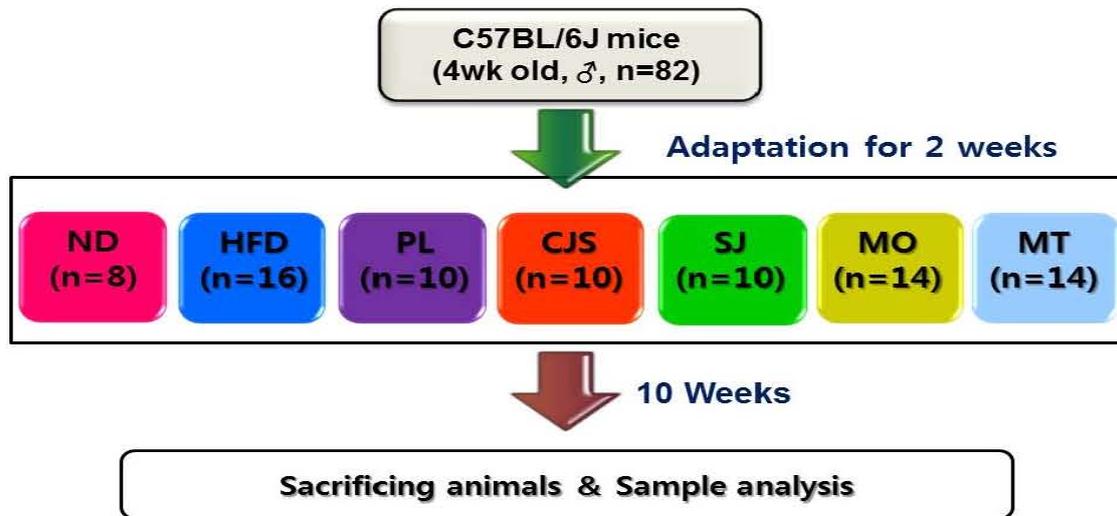


그림 2-2. Experimental design II for functional evaluation of samples for test of improvement of blood circulation and lipid metabolism.

ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT,(HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb).

○ 실험동물 모델로 4주령의 수컷 C57BL/6J mice를 선정하였고 Lab-chow 식이를 제공하면서 2주간 안정화 시킨 후 식이군을 무작위로 배정하였음. ND군 외 모든 실험군은 고지방식이 (high-fat diet)를 기본으로 하였고 물질보충군은 CJ제일제당(주)에서 감잎주정추출물, 유자주정추출물 및 약썩주정추출물을 제공받아 식이에 보충하였음.

○ 전체 실험군은 다음과 같이 설정하여 표 2-2 식이조성표에 근거한 실험식이를 급여.

제1군 ND군 : normal diet (ND)

제2군, HFD군 : high-fat diet (HFD)

제3군, PL군 : HFD + 감잎 주정추출물 0.5% (w/w)

제4군, CJS군 : HFD + 유자 주정추출물 0.1% (w/w)

제5군, SJ군 : HFD + 약썩 주정추출물 0.05% (w/w)

제6군, MO군 : HFD + 감잎 0.5% (w/w) 및 유자 주정추출물 0.1% (w/w)

제7군, MT군 : HFD + 감잎 0.3% (w/w) 및 유자 주정추출물 0.1% (w/w)

○ 실험동물환경은 1차 동물실험과 동일.

(나) 시료수집

○ 각 실험동물에 대하여 행동이상 유무 등과 같은 기초적인 임상증상을 관찰하면서 체중 및 식이섭취량을 비교하였고 실험식이 급여 12주 후 마우스들은 12시간 절식 후 에테르 흡입을

통해 마취시킴. 마취 후 복부 하대 정맥 (*inferior venacava*)으로부터 공복 혈액을 채취하였음. 채취된 혈액은 heparin으로 처리된 시험관에 바로 수집하여 혈장을 분리하였고 시료 분석시까지 -70°C 에 보관하였음.

○ 각 실험동물의 장기조직은 PBS (*phosphate buffered saline*) 용액에 수차례 헹군 후 물기를 제거하여 칭량하였음. 간조직은 각종 효소활성도 측정 및 유전자 발현분석, 조직지질 정량용으로 분리 수집하여 액체질소에 급냉 시킨 후 시료 분석시까지 -70°C 에서 보관하였음.

표 2-1. Composition of experimental diets (unit: % of diet)

Ingredient (g)	HFD	PL	CJ	SJL	SJH	GB	N-3
Casein	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
D,L-methionine	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Corn starch	111.00	111.00	111.00	111.00	111.00	111.00	111.00
Sucrose	370.00	365.00	365.00	369.50	368.50	368.00	370.00
Cellulose powder	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Corn oil	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Lard	170.00	170.00	170.00	170.00	170.00	170.00	145.00
Mineral mixture (AIN-76)	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
Vitamin mix (AIN-76)	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Choline bitartrate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cholesterol	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
tert-Butylhydroquinone ¹	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Bioactive compound	-	5.00	5.00	0.50	1.50	2.00	25.00
Total (g)	1000.0						

HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3)¹ Weight (g) of tert-Butylhydroquinone and bioactive compounds was not included the total weight 100g.

표 2-2. Composition of experimental diets

(unit: % of diet)

Ingredient (g)	ND	HFD	PL	CJS	SJ	MO	MT
Casein	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00
D,L-methionine	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Corn starch	150.00	108.50	108.50	108.50	108.50	108.50	108.50
Sucrose	500.00	370.00	365.00	369.00	369.50	364.00	366.00
Cellulose powder	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Corn oil	50.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Lard	-	170.00	170.00	170.00	170.00	170.00	145.00
Mineral mixture (AIN-76)	35.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
Vitamin mix (AIN-76)	10.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Choline bitartrate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Cholesterol	-	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
tert-Butylhydroquinone ¹	-	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Bioactive compound	0.01	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Total (g)	-	-	5.00	1.00	0.50	6.00	4.00

ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT,(HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb).

다. 실험방법

(1) 혈행개선 관련 바이오마커 분석

(가) Serotonin, TXB₂ 및 sP-selectin 함량 측정

○ 혈장 serotonin, TXB₂ 및 sP-selectin의 함량 측정은 ELISA kit (MyBioSource, San Diego, USA)를 사용하여 측정하였음.

(나) 혈장응고시간 (PT 및 aPTT) 측정

○ 혈장 prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)은 Thrombotimer (Behnk Elektronik, Germany)을 사용하였음. PT는 100 μL를 37℃에서 3분간 반응시킨 후 PT시약 200 μL를 첨가한 후 응고시간을 측정하였음. aPTT는 혈장 100 μL에 aPTT 시약 100 μL를 37℃에서 3분간 반응시킨 후 20 μM CaCl₂ 시약 100 μL를 첨가하여 응고시간을 측정하였음.

(2) 혈장 지질 분석

(가) 총 콜레스테롤 정량

○ 혈장 총 콜레스테롤 정량은 Allain 등 (1974)의 효소법을 응용한 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하였음. 혈장 콜레스테롤은 cholesteryl ester (CE) 및 유리콜레스테롤 두 형태로 존재하므로, 이들 전체를 정량하기 위하여 CE를 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리 콜레스테롤로 전환시켰음. 이렇게 전환된 유리콜레스테롤은 cholesterol oxidase에 의해 H₂O₂와 Δ^4 -cholestenon으로 전환시키고, 이 중 H₂O₂를 peroxidase 및 phenol, 4-amino-antipyrine과 혼합하여 적색으로 발색시킨 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준용액 (300 mg/dL)과 비교하여 정량하였음.

(나) 중성지질 정량

○ 혈장 중성지질은 McGowan 등 (1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지방 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 내 중성지질은 lipoprotein lipase (LPL)에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해됨. 이 중 글리세롤은 ATP와 glycerol kinase (GK)의 작용으로 L- α -glycerophosphate를 형성하며, 이것은 O₂ 및 glycerophosphoxidase (GPO)와 반응하여 H₂O₂를 발생시켰음. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였음.

(다) HDL-cholesterol 정량

○ 혈장 HDL-cholesterol (HDL-C)은 HDL-C 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였음. 혈장 100 μ L를 취하여 인텅스텐 나트륨 500 μ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면 인텅스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백 중 apo B를 포함하는 LDL 및 VLDL이 침전됨 (Warnick, 1982). 이를 원심분리한 후 상층액에 남은 HDL 중의 총콜레스테롤과 같은 방법으로 발색반응 시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액 (50 mg/dL)과 비교하여 정량하였음.

(라) 유리지방산 정량

○ 혈장 유리지방산은 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 시액 (Non-esterified fatty acid, NEFA kit, Wako, Osaka, Japan)을 사용하여 측정하였음. 우선 혈장 유리지방산에 acyl coenzyme A synthetase를 작용시켜 Acyl-CoA, AMP 및 pyrophosphoric acid를 생성시킨 후, 여기에 acyl coenzyme A oxidase를 첨가하여 2,3-Trans-enoyl-CoA 및 과산화수소를 생성시켰음. 이를 peroxidase와 4-아미노안티피린 및 N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-toruidine 으로 처리하여 적색으로 발색시킨 후 555 nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였음.

(마) HTR 및 AI(동맥경화지수) 계산

○ HTR은 다음 공식에 의해 계산되었다

$$HTR = ([HDL-C]/[Total-C]) \times 100$$

(바) Phospholipid (PL)

○ 혈장 인지질은 가수분해되어 유리된 **choline**이 **oxidase**에 의해 생성된 과산화수소수를 산화 촉합하여 생긴 키논색소의 흡광도를 측정하였음.

(사) Apolipoprotein A-1 (Apo A-1)

○ 혈장 **Apo A-1** 농도는 **lipoprotein**에 특이적으로 반응하는 **anti-Human Apo A-1** 혈청을 사용하여 면역비탁법 원리로 정량하였음 (日東紡株式會社, JAPAN).

(아) Apolipoprotein B (ApoB)

○ 혈장 **Apo B** 농도는 **lipoprotein**에 특이적으로 반응하는 **anti-Human Apo B** 혈청을 사용하여 면역비탁법 원리로 정량하였음 (日東紡株式會社, JAPAN).

(3) 간 조직 중성지질 및 콜레스테롤 함량 측정

○ 간 조직 지질은 **Folch** 등 (1957)의 방법으로 추출하였고, 간조직 중성지질 및 콜레스테롤 함량은 **Sale** 등 (1983)에 의해 수정 및 보완된 방법을 이용하였음. 간조직 **0.5 g**을 잘게 자른 후 **5 mL chloroform:methanol (2:1)** 용액으로 균질화시켜 조직 지질을 추출하였음. 추출액은 **Whatman** 여과지 (No. 2)로 걸러내고 질소 가스로 건조시킨 후 동일 추출용매 **1 mL**에 다시 녹였음. 이 중 중성지질과 총 콜레스테롤 측정용으로 각각 **100 μL**를 취하여 다시 질소 가스로 건조시키고 **5 mL**의 에탄올로 용해시킨 후, 혈장 지질정량법과 동일한 효소반응법으로 조직 지질 (**cholesterol, triglyceride, free fatty acid**)을 정량하였음. 이 때 유화액은 **0.5% Triton X-100**와 **3 mM sodium cholate**를 혼합하여 사용하였음.

(4) 분변 중성지질 및 콜레스테롤 함량 측정

○ 분변의 중성지질과 콜레스테롤은 **Folch** 등 (1957)의 방법을 수정, 보완하여 추출하였음. 즉, 건조된 분변을 막자사발에 갈아 **0.5 g**을 취한 후 **5 mL chloroform: methanol (2:1)** 용액을 첨가하여 **4℃**에서 **24시간** 추출하였음. 추출액은 **900×g, 4℃**에서 **10분간** 원심분리한 후 상층액을 취해 **37℃**에서 질소 가스로 건조시킨 후 동일 추출용매 **1 mL**에서 다시 녹였음. 이 중 콜레스테롤과 중성지질 측정용으로 각각 **100 μL**를 취하여 다시 질소 가스로 건조시키고 **5 mL**의 에탄올로 용해시켰음. 중성지질과 콜레스테롤 함량은 혈장 지질 정량법과 동일한 효소 반응법으로 정량하였음.

(5) 간 조직 효소원 분리

○ 간 조직 내 효소원 분리를 위해 **Hulher** 등(1973)의 방법을 수정하여 적용하였음. 각 동물의 동일 간엽에서 **0.5 g**을 취하여 **0.1 M triethanolamine, 0.02 M EDTA, 0.02 M DTT**가 포함된 **buffer**로 균질화 시킨 후 **600×g**에서 **10분간** 원심분리 후 상층액을 취하고, **10,000×g**에서 **20분간** 원심분리하여 **mitochondria** 분획을 얻고, 상층액은 다시 **105,000×g**에서 **1시간** 동안 초원심분리하여 **cytosol** 분획을 분리하였음. **Mitochondria** 분획은 **catalase** 활성도 측정에, **cytosol** 분획은

GSH-Px 및 SOD 활성도 측정에 사용하였음.

(6) 간조직 항산화 효소계 생화학지표 측정

(가) Superoxide Dismutase (SOD) assay

○ SOD 활성도는 알칼리 상태에서 **pyrogallol**의 자동산화에 의한 발색을 이용한 **Marklund**의 방법 (1974)으로 측정하였음. 즉, 50 mM Tris-HCl buffer와 15 mM의 **pyrogallol**을 혼합하여 5°C에서 5분간 전반응시킨 후 **cytosol** 분획을 가하여 25°C에서 10분간 반응시키고, 1 N HCl을 가하여 반응을 종료시킨 후 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하였음. 효소활성 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 15 mM **pyrogallol** 용액의 자동산화를 50% 억제하는 단백질의 양으로 정하였음.

(나) Catalase (CAT) assay

○ **Abei** (1974)의 방법으로 측정하였음. 즉, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 기질인 30 mM H_2O_2 를 넣어 25°C에서 5분간 반응시켰음. 여기에 **mitochondria** 분획을 가하여 25°C로 조절된 spectrophotometer를 이용하여 240 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였음. H_2O_2 의 흡광도 변화와 몰흡광계수로 H_2O_2 의 농도를 구한 다음 감소된 H_2O_2 mol/min/mg protein으로 효소활성도를 계산하였음.

(다) Glutathione Peroxidase (GSH-Px) assay

○ **Paglia**와 **Valentine**의 방법 (1967)으로 산화형 glutathione (GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의하여 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 정도를 측정하였음. 즉, 0.1M Tris-HCl (pH 7.2) buffer와 30 mM 환원형 glutathione을 넣고 6 mM NADPH 용액에 6.25 μ M H_2O_2 를 넣은 뒤 전반응시키고, 여기에 0.1 mL의 시료를 혼합하여 25°C에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였음. 효소활성 단위는 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었음.

(라) Glutathione Reductase (GR) assay

○ GR 활성도는 GSSG가 NADPH와 GR의 작용으로 GSH로 환원될 때 NADPH가 감소되는 정도를 **Pinto** 등 (1969)의 방법을 수정·보완하여 측정하였음. 1 M potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 : K_2HPO_4 , pH 7.4) 0.1 mL에 증류수 780 μ L를 첨가한 후 0.1 M EDTA 10 μ L, 10 mM GSSG 100 μ L, 효소원인 cytosol 및 적혈구 10 μ L, 그리고 NADPH 10 μ L를 순서대로 첨가한 후 340 nm (25°C)에서 2분 동안의 흡광도 감소량을 측정하였음. GR 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg 및 적혈구 hemoglobin 1 mg 당 1분간 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었음.

(마) Paraoxonase (PON) assay

○ PON 활성도는 **Mackness** 등 (1991)의 방법을 수정·보완하여 측정하였음. 반응액으로는 2 mM $CaCl_2$ 를 포함한 0.1 M Tris-HCL buffer (pH 8.0) 940 μ L에 효소원인 혈장 및 간조직 마이

크로솜 분획 30 μL 를 첨가하고 기질인 100 mM paraoxon (O,O-diethyl-O- ρ -nitrophenylphosphate, Sigma Chemical Co.)을 30 μL 가하여 25°C, 405 nm에서 90초간 ρ -nitrophenol (extinction coefficient: 17,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 흡광도 증가를 측정하였음.

(마) Hydrogen peroxide 측정

○ 생체내 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2)는 ferrous (Fe^{2+}) 이온을 ferric (Fe^{3+})이온으로 산화시키는데 xylenol orange를 이용하여 560 nm에서의 H_2O_2 생성 정도를 흡광도 증가로 측정하였음. 앞에서 분리한 적혈구 50 μL 에 FOX 용액 950 μL (0.1 M xylenol orange 50 mL, 0.25 mM ammonium ferrous sulfate 50 mL, 100 mM sorbitol 50 mL, 25 mM H_2SO_4 50 mL, dd H_2O 300 mL)를 섞어 상온에서 30분간 반응시키고 25°C, 560 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준용액 0~50 μM 범위의 H_2O_2 흡광도를 측정하여 H_2O_2 표준곡선으로 하였음 (Wolff, 1994).

(사) 간조직 TBARS 함량 측정

○ 간조직 TBARS 함량은 Ohkawa 등 (1979)의 방법을 이용하여 일정량의 조직에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 빙냉상태에서 glass teflon homogenizer (Glascol, 099C K44, USA)로 마쇄하였음. 마쇄물 0.2 ml, 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액 0.2 mL, 그리고 증류수 0.6 mL를 섞어 실온에서 5분간 방치한 후 20% acetate (pH 3.5) buffer 1.5 mL와 0.8% TBA 1.5 mL를 첨가하여 95°C에서 1시간 동안 반응시켰음. 반응 후 시료를 실온으로 냉각시켜 증류수 1 mL와 n-butanol : pyridine (15:1) 용액 5 mL를 첨가하였고 3,000 rpm 에서 15분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였음. MDA 표준 용액은 TMP를 가수분해하여 267 nm에서 나온 TBA 반응 물질의 양을 MDA equivalent로 산출하였음.

(7) 혈장 adipokine 및 cytokines 함량 측정

○ 혈장 adipokine (leptin, ghrelin, adiponectin) 및 혈장 cytokine (TNF- α , MCP-1, IL-1 β , IL-10)의 함량 측정은 Multiple detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 데이터 분석은 Bio-Plex manager software version 5.0 (Bio-rad)를 이용하여 수행하였음.

(8) 혈장 insulin 및 glucagon 측정

○ 혈장 Insulin은 Insulin ELISA kit (Shibayagi, Japan)를 사용하였고, glucagon은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였음.

(9) 간조직 및 지방조직 지질대사 효소 활성도 측정

(가) Carnitine palmitoyl transferase (CPT) 활성도 측정

○ CPT 활성도 측정은 Bieber (1972)의 방법에 따라 DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)를 사용하여 palmitoyl-CoA로부터 생성되는 CoASH를 측정하였음. 116 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.1 mM EDTA, 2.50 mM L-carnitine, 0.5 mM DTNB, 75 mM palmitoyl-CoA, 0.2% Triton X-100 반응액에 미토콘드리아 분획을 50 μ L를 넣어 반응을 개시한 후 25 $^{\circ}$ C, 412 nm에서 2분 동안 흡광도 변화를 측정하였음.

(나) Fatty acid synthase (FAS) 활성도 측정

○ FAS 활성도는 Carl 등 (1975)이 실시한 방법을 수정·보완하여 측정하였음. 625 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 200 μ L, 20 mM EDTA 50 μ L, 20 mM β -mercaptoethanol 50 μ L, 165 μ M acetyl-CoA 200 μ L, 500 μ M malonyl-CoA 200 μ L, 500 μ M NADPH 200 μ L를 첨가하고 세포질 분획 (50~100 μ g) 100 μ L를 섞어 30 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시킨 후 흡광도 감소량 측정하였음. FAS 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg 당 1 분간 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었음.

(다) Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PD) 활성도 측정

○ G6PD 활성도는 NADP⁺가 NADPH로 환원되는 정도를 측정하였음 (Pikainen, 1997). 3.3 mM MgCl₂를 함유하는 55 mM Tris-HCl (pH 7.8) 900 μ L에 6 mM NADP⁺ 40 μ L, 0.1 M glucose-6-phosphate 40 μ L, 그리고 세포질 분획 20 μ L (50~137 μ g의 단백질)를 순서대로 첨가한 후 340 nm (25 $^{\circ}$ C)에서 90초 동안 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였음. G6PD 활성도 단위는 cytosolic protein 1 mg당 1분간 생성된 NADPH의 nmol로 나타내었음.

(라) Malic enzyme (ME) 활성도 측정

○ ME (EC 1.1.1.40) 활성 측정은 Ochoa (1955)의 방법에 준하여 측정하였음. 즉, 0.4 M triethanolamine (pH 7.4), 30 mM malic acid, 0.12 M MgCl₂, 3.4 mM NADP를 함유한 반응액 1 mL에 2 mL의 cytosol 분획을 가하여 반응을 개시하였음. 27 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시킨 후 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하였고, 효소 활성은 1분간 생성된 NADPH의 양으로 나타내었음.

(마) Phosphatidate phosphohydrolase (PAP) 활성도 측정

○ PAP (EC 3.1.3.4) 활성 측정은 Walton 등 (1996)의 방법에 준하여 측정하였음. 즉, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0), 1.25 mM Na₂-EDTA, 1.0 mM MgCl₂의 첨가와 무첨가 반응액 50 μ L에 0.9% NaCl 용액에 용해시켜 1 mM phosphatidate 및 phosphatidylcholine을 함유한 기질 50 μ L를 가한 다음 microsome 분획 0.1 mL을 가하여 반응을 개시하였음. 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 1.8 M H₂SO₄ 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 1.25% ascorbic acid, 0.32% ammonium molybdate를 각각 0.25 mL와 0.13% sodium dodecyl sulfate 용액 0.1 mL 가하고, 45 $^{\circ}$ C에서 20분간 가온 발색시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(10) 조직세포의 형태학적 · 면역조직화학적 분석

○ 조직의 형태학적 관찰을 위해 동물 희생 시 적출한 간조직 및 지방조직 일부를 10% formaldehyde 용액에 24시간 고정한 다음, 같은 용액으로 2회 교환하고, 2배수 ethanol로 탈수하여 paraffin에 포매과정을 거쳐, poly-L-lysine으로 처리된 5 μ m 두께의 조직절편을 제작한 다음 hematoxylin-eosin (H-E) 염색하여 광학현미경으로 간조직은 200배 배율, 지방조직은 400배 배율로 관찰하였음.

(11) 혈중 GOT 및 GPT 활성도 측정

○ 간독성 지표이자 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성도는 Reitman-Frankel (1957) 등의 효소법을 이용한 GOT 및 GPT 측정용 시액(Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였음. GOT의 경우 L-aspartate와 α -ketoglutarate, GPT의 경우 D,L-alanine과 α -ketoglutarate 기질을 37°C, 5분간 preincubation시키고, 혈장 10 μ L를 첨가하여 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분 반응시키면 혈장의 효소에 의해 기질이 pyruvate로 전환되며, 이 pyruvate를 2,4-dinitrophenylhydrazine과 20분간 실온에 반응시켜 0.4N NaOH를 가하면 비색으로 발색되며, 이를 피루브산 리튬의 표준 곡선과 비교하여 505nm에서 활성도를 측정하였음.

(12) 간조직 및 동맥조직의 유전자 발현분석

(가) RNA QC 및 Total cRNA 합성

○ cRNA 합성은 Illumina Total Prep RNA Amplification Kit(Ambion, Austin, TX)을 사용하여 제조사가 제시한 방법에 의해 biotin labeled cRNA 형태로 만들어졌음. First strand cDNA는 500 ng의 RNA에 T7 oligo(dT) primer를 사용하여 reverse transcription 과정을 거쳐 합성되었으며, second strand cDNA는 DNA polymerase와 RNase H의 반응으로 single-strand cDNA를 double-strand DNA로 변환하는 과정에서 생성되었음.

○ 상기 얻어진 cDNA는 purification을 거쳐 *in vitro* transcription cRNA 합성 단계에서 biotin-NTP로 표지화된 cRNA로 전환되고 이는 ND-1000 분광 측정기(NanoDrop, Wilmington, DE)로 정량되었음. RNA의 quality 판정은 Agarose gel image에서 Agilent의 Bioanalyzer 2100을 이용하여 진행되었음.

(나) 주요 핵심 유전자의 정량적 검증

○ cDNA는 제조사가 제시한 방법으로 QuantiTect® reverse transcription kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 합성하였음. 수득한 cDNA와 SYBR green PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 real-time quantitative PCR법으로 표적 유전자의 발현을 정량/비교하였음. Real time PCR로 증폭된 산물은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method을 이용하여 정량하였으며 각 시료는 GAPDH의 발현량으로 보정하였음. 1차 동물실험과 2차 동물실험의 Real time PCR을 수행하기 위한 primer의 서열조건은 각 표 2-3, 2-4에 나타내었음.

표 2-3. Primer sequences for Real time RT-PCR

Gene		Sequences of forward and reverse primer
SERT	Forward	5' -GCGGAGATTGGGAACCAGCTGTA-3'
	Reverse	5' -GACGCGCCTGTGTACACCCACA-3'
COX-2	Forward	5' -AGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGAC-3'
	Reverse	5' -TGAGTCGGTCACCCTTCTCCAG-3'
SELP	Forward	5' -CCAGCTACGAATCTCGGACCACC-3'
	Reverse	5' -TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGT-3'
GADPH	Forward	5' -GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
	Reverse	5' -AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

표 2-4. Primer sequences for Real time RT-PCR

Gene		Sequences of forward and reverse primer
SERT	Forward	5'-GGCAACATCTGGCGTTTTCC-3'
	Reverse	5'-ATTTCCGGTGGTACTGGCCCA-3'
COX-2	Forward	5'-TTCAAAGAAGTGCTGGAAAAGGT-3'
	Reverse	5'-CAGTGGCTTCTACAACAGGC-3'
SELP	Forward	5'-TGGGTCATATGCAGCGTT-3'
	Reverse	5'-TGGGTCATATGCAGCGTTA-3'
HMG-CoA reductase	Forward	5'-GAGGCCTTTGATAGCACCAG-3'
	Reverse	5'-AGCAGTGCTTTCTCCGTACC-3'
ACAT	Forward	5'-TACGCTTTGGTGACAGGATG-3'
	Reverse	5'-GGCAGATTTGAACCTCTTCG-3'
PPAR γ	Forward	5'-ACCAACTTCFFAATCAFTC-3'
	Reverse	5'-AACCATTGGGTCAGCTCTTG-3'
SREBP-1c	Forward	5'-ACAGATGTGTCTATGGAGGG-3'
	Reverse	5'-AAAAGACAAGGGGCTACTCT-3'
GAPDH	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';
	Reverse	5'-TCCACCACCCGTGCTGTA-3'

(13) 통계처리

○ 본 연구의 모든 실험 결과는 컴퓨터 통계 프로그램 중의 하나인 SPSS package program (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc, Chicago)을 사용하여 산출되었음. 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였고 다구간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 사후 검정을 실시하였으며, 또한 각 ND군과 HFD군간의 유의성 검정을 위해 Student's t-test를 실시하였다. 모든 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ (standard error)로 표시하였음 (Steel & Torrie, 1960).

2. 시험관 시험 연구결과

가. 약쑥주정추출물 및 관련 지표물질의 PT 및 aPTT 분석결과

(1) 약쑥 주정추출물

- 약쑥 주정추출물의 혈장 응고시간 마커로 PT 및 aPTT 분석을 실시하였음. 약쑥 주정추출물의 혈장에 대한 PT를 측정한 결과, 약쑥 추출물의 PT는 농도 0.1~20 mg/mL에서 대조군인 PBS 처리군에 비해 유의적으로 높은 수준을 나타내었으며 이러한 약쑥 추출물에 의한 혈류속도의 증가는 전반적으로 농도의존적인 것으로 관찰되었음 (표2-5). 또한 강화도의 각기 다른 농장에서 생산된 region 1, 2, 3 모두 비슷한 효능을 보여 강화도 약쑥 주정추출물이 혈행개선에 유효한 후보소재로 유추됨.
- aPTT는 PT 측정 결과와 유사하게 region 1, 2, 3 모두 (농도 0.1~20 mg/mL)에서 PBS 대조군에 비해 유의적으로 증가되었음. 한편 약쑥 추출물 간의 유의성 있는 혈행개선 효능 차이는 관찰되지 않았음 (표 2-6). 또한 region 3을 제외한 region 1과 2는 전반적으로 농도의존적으로 혈장 응고시간인 PT를 지연시켰음.

표 2-5. Anticoagulant activity of *Artemisia Princeps* Pampanini cv. Sajabal ethanol extracts from Ganghwa island region 1, 2, 3 based on prothrombin time (PT).

Sample	Concentration	Region 1	Region 2	Region 3
Prothrombin time, PT (sec)				
Control	PBS	11.2±0.00 ^b	11.2±0.00 ^d	11.2±0.00 ^d
SJ ethanol extract	0.1 mg/ml	13.2±0.25 ^a	12.8±0.06 ^c	13.6±0.15 ^{bc}
	1 mg/ml	13.0±0.20 ^a	13.4±0.06 ^{bc}	13.3±0.30 ^c
	2.5 mg/ml	13.2±0.06 ^a	13.4±0.35 ^{bc}	13.6±0.20 ^{bc}
	5 mg/ml	13.4±0.15 ^a	13.9±0.00 ^b	13.4±0.10 ^c
	10 mg/ml	13.4±0.25 ^a	14.2±0.60 ^b	14.1±0.90 ^b
	20 mg/ml	14.1±1.00 ^a	14.8±0.00 ^a	15.1±0.00 ^a

Mean±SE. ^{abcd}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05.

SJ: *Artemisia princeps* Pampanini cv. sajabal, PBS is used as blank sample.

표 2-6. Anticoagulant activity of *Artemisia Princeps* Pampanini cv. Sajabal ethanol extracts from Ganghwa island region 1, 2, 3 based on activated partial thromboplastin time (aPTT).

Sample	Concentration	Region 1	Region 2	Region 3
Activated partial thromboplastin, aPTT (sec)				
Control	PBS	26.3±1.6 ^b	26.3±1.6 ^b	26.3±1.6 ^b
SJ ethanol extract	0.1 mg/ml	36.5±3.05 ^a	38.2±1.95 ^a	36.4±2.41 ^a
	1 mg/ml	36.1±2.75 ^a	36.2±2.46 ^a	37.1±2.29 ^a
	2.5 mg/ml	36.3±2.4 ^a	36.5±2.13 ^a	35.0±2.24 ^a
	5 mg/ml	37.2±2.0 ^a	37.9±1.63 ^a	36.7±1.92 ^a
	10 mg/ml	38.3±2.8 ^a	38.4±1.03 ^a	37.1±1.27 ^a
	20 mg/ml	41.3±2.2 ^a	40.5±1.74 ^a	39.1±1.59 ^a

Mean±SE. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05. SJ: *Artemisia princeps* Pampanini cv. sajabal, PBS is used as blank sample.

(2) 약쭉 주정추출물의 지표물질 (Jacesosidin 및 Eupatilin)

- 약쭉주정추출물의 지표물질에 대한 혈장 응고시간을 비교하기 위해 PT 및 aPTT를 실시하였음. aPTT와 PT의 분석 결과, 약쭉주정추출물의 지표물질 중 jacesosidin은 PBS 대비 PT와 aPTT 증가를 보이지 않았음 (표 2-7). 반면, eupatilin은 모든 농도 (5~300 μM)에서 aPTT가 유의적으로 증가되었으며, aPTT는 300 μM에서 가장 높은 증가를 보였음

표 2-7. Anticoagulant activity of major flavonoids in *Artemisia princeps* pampanini cv. sajabal.

(A)

<i>In vitro</i> coagulant assay			
Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	12.7±0.05	30.7±0.90 ^{ab}
	5 μM	13.0±0.00	31.5±0.17 ^a
	10 μM	13.4±0.37	31.0±0.72 ^{ab}
Jacesosidin	50 μM	13.0±0.34	29.3±1.24 ^{ab}
	100 μM	12.8±0.34	30.1±0.58 ^{ab}
	300 μM	13.2±0.26	29.9±0.15 ^{ab}

(B)

Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	12.7±0.05	31.7±1.54 ^d
	5 µM	13.3±0.46	34.2±0.17 ^f
	10 µM	13.5±0.26	34.4±0.05 ^c
Eupatilin	50 µM	13.6±0.32	36.4±0.11 ^{ab}
	100 µM	13.6±0.29	37.6±0.15 ^b
	300 µM	13.7±0.23	38.8±0.10 ^a

Mean±SE. ^{abcd}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05. PBS is used as blank sample.

나. 감잎 주정추출물 및 관련 지표물질의 PT 및 aPTT 분석결과

(1) 감잎 주정추출물

○ 감잎 주정 추출물의 혈장 응고시간을 비교하기 위해 PT 및 aPTT를 실시하였음. PT의 분석 결과, 감잎 주정 추출물 중 국내 생산지역별로 region 2, region 3, region 4는 1~20 mg/mL 농도에서 PBS에 비해 응고시간을 전반적으로 연장시켰음 (표 2-8). Region 1과 region 5 감잎 주정추출물은 최저농도인 1mg/mL에 비해 최고농도인 20 mg/mL에서 PT를 각각 9%와 10% 정도 증가시켰으나 통계적으로 유의적이지는 않았음. 이에 반해 모든 감잎 주정추출물의 aPTT는 농도 0.1mg/mL부터 20 mg/mL까지 PBS에 비해 유의적으로 높았으며 이러한 감잎 주정추출물의 혈장 응고 시간 지연 효능은 농도 의존적인 패턴을 나타내었음 (표 2-9).

표 2-8. Anticoagulant activity of Persimmon leaf ethanol extracts from Chungdo region 1, 2, 3, 4, 5 based on prothrombin time (PT).

Sample	Concentration	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
Prothrombin time, PT (sec)						
Control	PBS	11.6±0.20 ^a	11.6±0.20 ^c	11.6±0.20 ^c	11.3±0.40 ^b	11.3±0.40 ^a
	1 mg/ml	12.6±1.10 ^a	13.4±0.20 ^b	12.6±0.55 ^{bc}	13.2±0.35 ^{ab}	11.5±0.15 ^a
PL ethanol extract	2.5 mg/ml	12.5±0.95 ^a	13.6±0.06 ^b	12.9±0.20 ^{ab}	13.3±0.35 ^{ab}	11.8±0.25 ^a
	5 mg/ml	12.4±1.30 ^a	13.4±0.10 ^b	13.3±0.30 ^{ab}	14.3±0.85 ^a	11.7±0.06 ^a
	10 mg/ml	13.5±1.50 ^a	13.5±0.45 ^b	13.5±0.20 ^a	12.4±1.35 ^{ab}	11.7±0.00 ^a
	20 mg/ml	13.7±0.40 ^a	15.2±0.15 ^a	13.7±0.35 ^a	13.2±0.30 ^{ab}	12.7±1.65 ^a

Mean±SE. ^{abc}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05.

PL: Persimmon leaf, PBS is used as blank sample.

표 2-9. Anticoagulant activity of Persimmon leaf ethanol extracts from Chungdo region 1, 2, 3, 4, 5 based on activated partial thromboplastin time (aPTT).

Sample	Concentration	Region 1	Region 2	Region 3	Region 4	Region 5
Activated partial thromboplastin time, aPTT (sec)						
Control	PBS	33.4±2.25 ^d	33.4±2.25 ^b	31.9±1.00 ^d	31.9±1.00 ^d	31.9±1.05 ^c
PL ethanol extract	1 mg/ml	44.2±0.50 ^c	45.2±0.02 ^a	45.4±0.00 ^c	46.4±0.60 ^c	44.3±1.10 ^b
	2.5 mg/ml	46.3±1.40 ^{bc}	45.8±1.70 ^a	45.9±0.40 ^c	46.7±0.10 ^c	44.8±0.70 ^b
	5 mg/ml	47.6±1.70 ^{bc}	46.3±1.70 ^a	47.2±0.55 ^c	48.1±0.25 ^{bc}	45.7±0.35 ^b
	10 mg/ml	50.1±1.44 ^b	46.8±1.35 ^a	49.6±0.50 ^b	49.4±0.85 ^b	46.5±0.25 ^b
	20 mg/ml	57.3±1.40 ^a	47.9±1.10 ^a	53.97±0.75 ^a	52.8±0.65 ^a	51.9±2.20 ^a

Mean±SE. ^{abcd}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05.

PL: Persimmon leaf, PBS is used as blank sample.

(2) 감잎 주정추출물의 지표물질 (Catechin, Epicatechin 및 Epicatechin gallate)

- 감잎주정 추출물에 포함된 지표물질의 혈장 응고시간을 비교하기 위해 PT 및 aPTT를 실시하였음. PT의 측정 결과, 감잎주정추출물의 지표물질 중 catechin과 epicatechin은 5 μM~300 μM 농도에서 대조군인 PBS 처리군과 유사한 PT 값을 나타낸 반면, epicatechin gallate는 농도 의존적으로 혈장 응고 시간을 지연시켰으며 300 μM epicatechin gallate 처리군의 PT 값은 PBS 대조군에 비해 유의적으로 높은 수준이었음 (표 2-10).
- 이와는 대조적으로, catechin과 epicatechin 처리로 PT의 유의적 증가는 없었지만 aPTT는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었음. 또한 PT의 유의적인 증가를 보였던 epicatechin gallate는 10 μM부터 aPTT를 유의적으로 증가시키는 것으로 관찰되었음.

표 2-10. Anticoagulant activity of major flavonoids in Persimmon leaf based on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT)

(A)

<i>In vitro</i> coagulant assay			
Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	13.4±0.17	33.5±2.40 ^b
	5μM	13.6±0.06	35.4±0.62 ^{ab}
	10μM	13.5±0.32	35.5±0.59 ^{ab}
Catechin	50μM	13.8±0.42	35.5±0.40 ^{ab}
	100μM	13.8±0.32	35.4±0.17 ^{ab}
	300μM	13.8±0.29	36.0±1.03 ^a

(B)

Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	13.4±0.17	30.8±0.21 ^d
	5µM	13.4±0.32	33.7±0.06 ^c
Epicatechin	10µM	13.4±0.40	34.2±0.21 ^{bc}
	50µM	13.7±0.46	34.3±0.36 ^{abc}
	100µM	13.7±0.35	34.9±0.31 ^{ab}
	300µM	13.8±0.40	35.1±0.20 ^a

(C)

Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	13.4±0.17 ^b	30.8±0.21 ^c
	5µM	13.5±0.06 ^{ab}	30.8±0.31 ^c
	10µM	13.5±0.29 ^{ab}	31.9±0.72 ^b
Epicatechin gallate	50µM	13.6±0.06 ^{ab}	33.5±0.20 ^a
	100µM	13.8±0.15 ^{ab}	34.1±0.00 ^a
	300µM	14.0±0.06 ^a	34.4±0.40 ^a

Mean±SE. ^{abcd}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05. PBS is used as blank sample.

다. 유자 주정추출물 및 관련 지표물질의 PT 및 aPTT 분석결과

(1) 유자 주정추출물

- 유자 주정추출물의 혈장 응고시간을 비교하기 위해 PT 및 aPTT를 실시하였음. PT의 측정 결과, 다양한 산지에서 구입한 유자 주정추출물은 모두 농도 의존적으로 혈장 응고시간을 연장시켰음 (표 2-11).
- aPTT는 PT의 측정 결과와 동일하게 거제, 남해 및 고흥의 유자 주정추출물은 산지에 상관 없이 PBS 처리군에 비해 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 관찰되었음 (표 2-12). 특히 남해에서 생산된 region 6을 제외한 다른 지역의 유자 주정추출물은 175 mg/mL 이상의 농도에서 유의적으로 PT를 증가시키는 반면, region 6 추출물은 125 mg/mL의 낮은 농도에서도 PT를 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 관찰되었음

Æ 2-11. Anticoagulant activity of *Citrus junos* Sieb ethanol extracts based on prothrombin time (PT)

(A)

Sample	Concentration	Gujae region 1		Gujae region 2	
		Prothrombin time, PT (sec)			
Control	PBS	17.3±0.10 ^c		17.3±0.10 ^d	
CJS ethanol extract	100 mg/ml	16.9±0.90 ^c		13.9±0.35 ^e	
	125 mg/ml	18.7±1.25 ^c		20.7±1.55 ^d	
	150 mg/ml	20.5±0.40 ^c		22.7±0.90 ^d	
	175 mg/ml	20.5±0.15 ^c		34.8±1.10 ^c	
	200 mg/ml	33.7±3.20 ^b		44.5±1.75 ^b	
	250 mg/ml	79.1±5.80 ^a		74.0±3.25 ^a	

(B)

Sample	Concentration	Goheung region 1	
		Prothrombin time, PT (sec)	
Control	PBS	17.3±0.10 ^c	
CJS ethanol extract	100 mg/ml	9.00±0.00 ^d	
	125 mg/ml	8.70±1.70 ^d	
	150 mg/ml	11.6±0.50 ^d	
	175 mg/ml	16.2±1.40 ^c	
	200 mg/ml	33.1±1.75 ^b	
	250 mg/ml	94.6±1.10 ^a	

(C)

Sample	Concentration	Namhae region 1			Namhae region 2			Namhae region 3		
		Prothrombin time, PT (sec)								
Control	PBS	17.1±0.15 ^d		17.1±0.15 ^b		17.1±0.15 ^f				
CJS ethanol extract	100 mg/ml	13.9±0.85 ^e		10.6±1.35 ^d		16.7±0.25 ^f				
	125 mg/ml	18.9±0.35 ^d		12.6±0.40 ^{cd}		19.0±0.60 ^e				
	150 mg/ml	18.3±0.70 ^d		15.5±0.85 ^{bc}		28.5±0.70 ^d				
	175 mg/ml	26.5±0.65 ^c		16.7±0.30 ^b		31.2±0.95 ^c				
	200 mg/ml	32.0±1.40 ^b		17.0±0.25 ^b		56.9±0.20 ^b				
	250 mg/ml	46.2±0.60 ^a		22.1±1.55 ^a		73.0±0.55 ^a				

Mean±SE. ^{abcdef}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05.

CJS: *Citrus junos* Sieb, PBS is used as blank sample.

표 2-12. Anticoagulant activity of *Citrus junos* Sieb ethanol extracts based on activated partial thromboplastin time (aPTT)

(A)

Sample	Concentration	Gujae region 1	Gujae region 2
		Activated partial thromboplastin time, aPTT (sec)	
Control	PBS	46.9±1.25 ^d	46.9±1.25 ^d
CJS ethanol extract	100 mg/ml	56.0±2.10 ^c	53.5±0.95 ^c
	125 mg/ml	74.6±2.20 ^b	60.9±1.25 ^b
	150 mg/ml	98.2±1.65 ^a	70.8±1.45 ^a

(B)

Sample	Concentration	Goheung region 1
		Activated partial thromboplastin time, aPTT (sec)
Control	PBS	46.9±1.25 ^d
CJS ethanol extract	100 mg/ml	59.1±1.70 ^c
	125 mg/ml	86.5±1.60 ^b
	150 mg/ml	127.8±0.05 ^a

(C)

Sample	Concentration	Namhae region 1	Namhae region 2	Namhae region 3
		Activated partial thromboplastin time, aPTT (sec)		
Control	PBS	48.8±1.15 ^c	48.8±1.15 ^c	48.8±1.15 ^c
CJS ethanol extract	100 mg/ml	52.5±3.85 ^c	68.8±1.40 ^c	55.6±2.30 ^c
	125 mg/ml	83.6±2.15 ^b	92.9±1.90 ^b	83.0±0.30 ^b
	150 mg/ml	124±4.10 ^a	125.6±2.60 ^a	110.0±1.10 ^a

Mean±SE. ^{abcd}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05

CJS: *Citrus junos* Sieb, PBS is used as blank sample

(2) 유자 주정추출물의 지표물질 (Naringin 및 Hesperidin)

- 유자 주정추출물에 포함된 관련 지표물질의 혈장 응고시간을 비교하기 위해 PT 및 aPTT를 측정하였음. PT와 aPTT 측정 결과, 유자주정 추출물에 포함된 관련 지표물질인 naringin과 hesperidin은 5 μM 농도에서부터 aPTT를 PBS 대조군에 비해 유의적으로 연장시켰음 (표 2-13). PT의 경우 5 μM~300 μM 농도에서 naringin과 hesperidin의 처리에 의해 유의적으로 증가하지 않았지만 전반적으로 이들 유자 주정추출물 지표물질의 농도가 증가할수록 PT도 증가하는 것으로 나타남.

표 2-13. Anticoagulant activity of major flavonoids in *Citrus junos* Sieb based on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT).

(A)

<i>In vitro</i> coagulant assay			
Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	12.6±0.00 ^{ab}	30.8±0.21 ^b
	5µM	12.3±0.15 ^b	33.9±0.15 ^a
Hesperidin	10µM	12.4±0.40 ^b	33.7±0.52 ^a
	50µM	12.7±0.25 ^{ab}	34.1±0.52 ^a
	100µM	12.7±0.06 ^{ab}	34.3±0.30 ^a
	300µM	13.2±0.20 ^a	34.5±0.38 ^a

(B)

Sample	Concentration	PT (sec)	aPTT (sec)
Control	PBS	12.6±0.00 ^{ab}	30.8±0.21 ^b
	5µM	12.3±0.17 ^b	34.4±0.26 ^a
Naringin	10µM	12.3±0.21 ^b	34.4±0.32 ^a
	50µM	12.4±0.15 ^{ab}	34.5±0.38 ^a
	100µM	12.8±0.26 ^{ab}	34.4±0.07 ^a
	300µM	13.0±0.20 ^a	34.3±0.07 ^a

Mean±SE. ^{abc}Means not sharing a common superscript are significantly different between groups at p<0.05. PBS is used as blank sample.

라. 혈소판 응집률 비교

○ 혈소판 응집의 agonist인 arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP) 및 Collagen에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 약쑥주정추출물 (EAP), 감잎주정추출물 (EPL), 유자주정추출물 (ECJ) 그리고 이 소재들의 대표 flavonoids인 eupatilin, jaceosidin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, naringin 및 hesperidin의 영향은 표 2-14와 같음. EAP과 EAP의 대표 flavonoids인 eupatilin 및 jaceosidin의 혈소판 응집률은 AA에 의해 유도된 혈소판 응집에서 유의적으로 낮아졌음. 반면, 이들은 ADP 및 Collagen에 의해 유도된 혈소판 응집률에는 영향을 미치지 않았음. 다음 표에 제시된 바와 같이 EPL과 EPL의 대표 flavonoids인 catechin, epicatechin 및 epigallocatechin gallate와 마찬가지로 ECJ와 ECJ 대표 flavonoids인 naringin 및 hesperidin 군에서는 AA에 의해 유도된 혈소판 응집에서 유의적인 혈소판 응집 억제를 나타내었음 (표 2-14).

표 2-14. Effects of EAP and its major flavonoids on AA-, ADP- and collagen-induced platelet aggregation.

Samples ^a	Agonist-induced platelet aggregation (%) ^b		
	AA	ADP	Collagen
Control	86.5 ± 5.80	81.5 ± 0.50	87.0 ± 1.73
EAP	1.0 ± 0.00***	74.5 ± 6.50	85.7 ± 2.08
Eupatilin	0.7 ± 0.58***	78.0 ± 12.00	83.0 ± 1.00
Jaceosidin	1.0 ± 0.00***	85.5 ± 0.50	83.7 ± 0.58
EPL	1.0 ± 0.82***	76.5 ± 0.50	82.3 ± 8.62
Catechin	1.0 ± 0.00***	74.0 ± 4.00	86.7 ± 0.58
Epicatechin	1.3 ± 0.58***	61.5 ± 7.50	82.7 ± 1.53
Epigallocatechin gallate	1.0 ± 1.00***	81.5 ± 1.50	85.0 ± 1.00
ECJ	1.0 ± 0.58***	68.5 ± 7.50	81.0 ± 8.66
Naringin	1.0 ± 0.00***	77.0 ± 1.00	81.7 ± 0.58
Hesperidin	1.3 ± 0.58***	78.0 ± 6.00	83.7 ± 0.58

Data represent the mean±S.E.M. *** p <0.001 vs control, DMSO was used as the control. ^aEAP (ethanol extract of *Artemisia Princeps* Pampanini), EPL (ethanol extract of persimmon leaves), ECJ (ethanol extract of *Citrus junos* Tanaka), 1.0 mg/mL; eupatilin, 10 μ M; jaceosidin, 10 μ M. Concentration of agonists: AA (0.5mM), ADP (5 μ M), collagen (10 μ g/mL).

^bNormal range of agonist-induced platelet aggregation (%): AA (74-99), ADP (69-88), Collagen (70-94). AA, arachidonic acid; ADP, adenosine diphosphate.

마. 혈소판 활성 관련 biomarker 농도 비교

(1) TXB₂ 농도에 미치는 영향

○ 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 유발하는 대표적인 물질인 thromboxane A₂ (TXA₂)를 측정하기 위해 안정한 thromboxane B₂ (TXB₂) 농도를 측정하였음.

○ EAP는 0.01 mg/mL부터 농도 의존적으로 TXB₂ 농도를 감소시켰으며, EAP의 대표 flavonoids인 eupatilin과 jaceosidin은 0.5 μ M부터 유의적으로 TXB₂ 농도를 감소시켰음. 그리고, EPL은 0.5 mg/mL부터 유의적으로 TXB₂ 농도를 감소시켰으며, EPL의 대표 flavonoids인 catechin 및 epigallocatechin gallate은 1 μ M부터, epicatechin는 5 μ M부터 유의적으로 TXB₂ 농도를 감소시켰음. 이에 비해 ECJ는 0.01 mg/mL부터 유의적으로 TXB₂ 농도를 감소시켰고 ECJ의 대표 flavonoids인 hesperidin 및 naringin은 모두 0.5 μ M부터 유의적으로 TXB₂ 농도를 감소시킨 것으로 제시되었음 (그림 2-3).

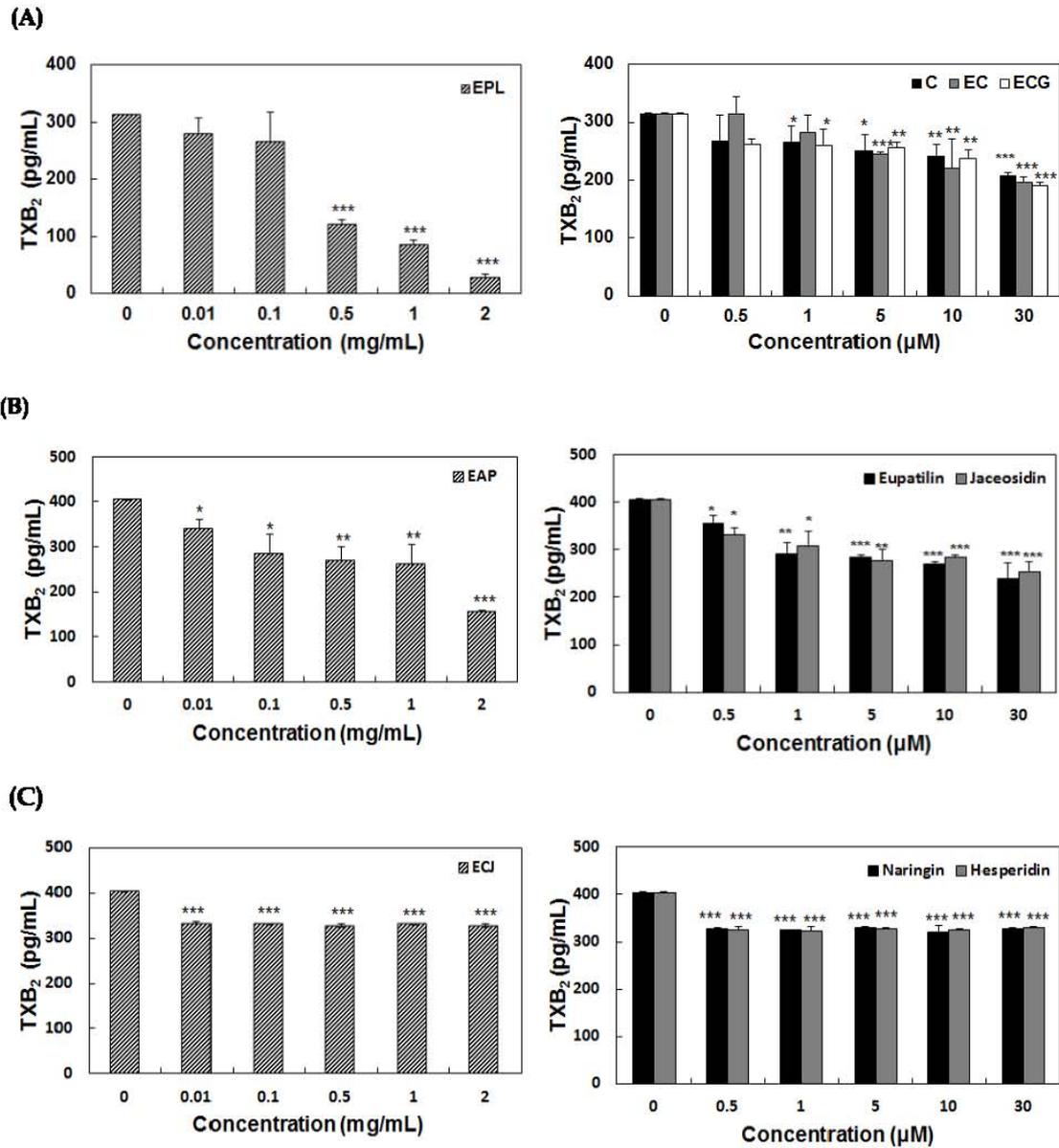


그림 2-3. Effect of EAP, EPL, ECJ and their major flavonoids on TXB₂ generation.

Data are the mean±S.E.M. ***p*<0.01 vs concentration of 0 μM. EAP, ethanol extract of *Artemisia Princeps* Pampanini; EPL, ethanol extract of persimmon leaves; C, catechin; EC, epicatechin; ECG, epigallocatechin gallate; ECJ, ethanol extract of *Citrus junos*

(2) sP-selectin 농도에 미치는 영향

○ EAP은 1 mg/mL부터 유의적으로 sP-selectin 농도를 감소시켰으며, EAP의 대표 flavonoids 인 eupatilin는 1 μM부터, jaceosidine은 5 μM부터 유의적으로 sP-selectin 농도를 감소시켰음. 이에 비해 EPL은 0.5 mg/mL부터 유의적으로 sP-selectin 농도를 감소시켰으며, EPL의 대표

flavonoids 중 catechin은 0.5 μM 부터 농도 의존적으로 sP-selectin 농도를 감소시켰으며, epicatechin은 10 μM 에서, epigallocatechin gallate는 30 μM 에서 sP-selectin 농도를 유의적으로 저하시켰음. 또한, ECJ는 0.1 mg/mL부터 유의적으로 sP-selectin 농도를 감소시켰으며, ECJ의 대표 flavonoids인 naringin은 0.5 μM 부터, hesperidin은 1 μM 부터 sP-selectin 농도를 유의적으로 감소시켜 이들 대표 화합물들이 sP-selectin 생성을 보다 강하게 억제한 것으로 제시되었음 (그림 2-4).

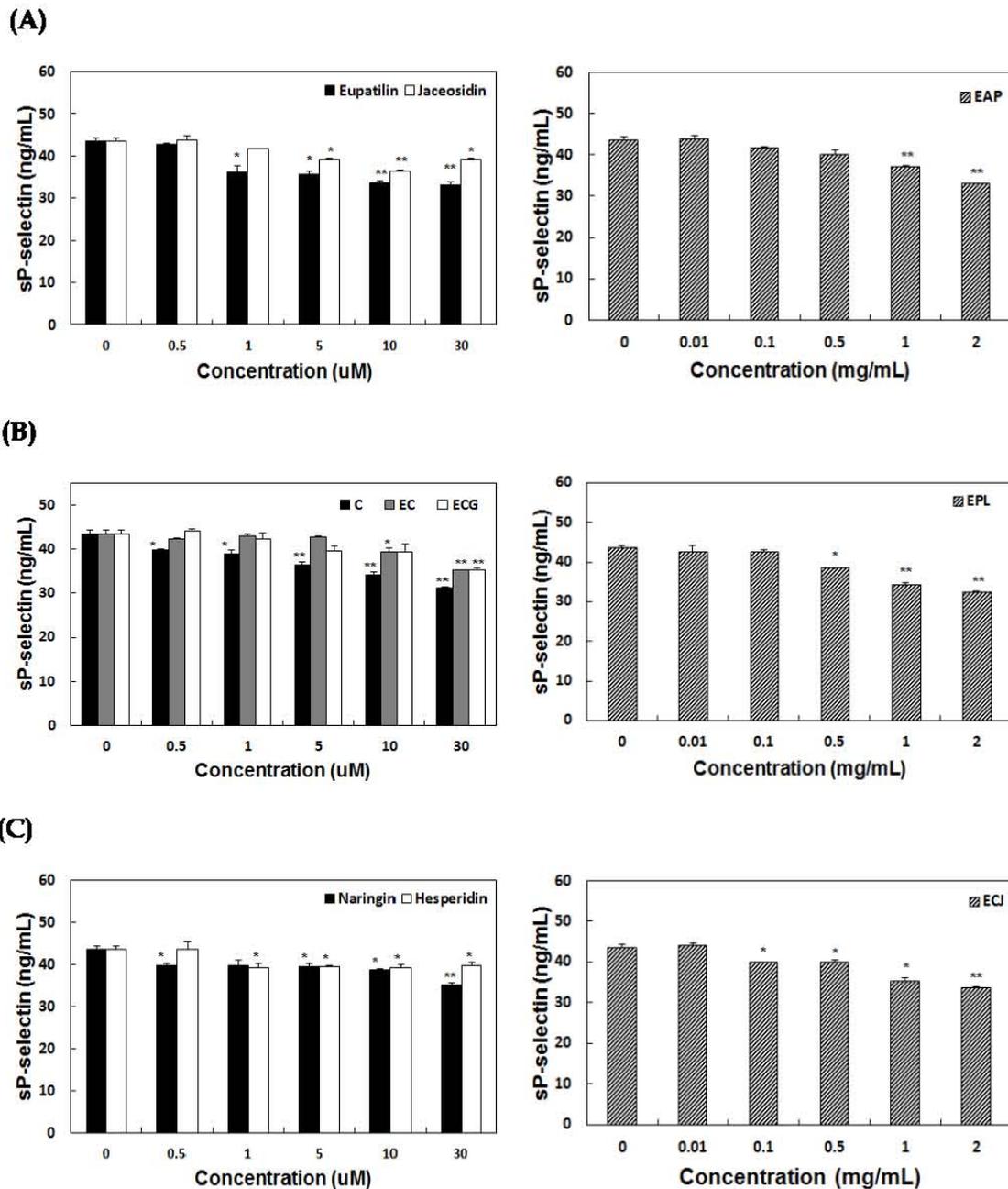


그림 2-4. Effect of EAP, EPL, ECJ and their major flavonoids on sP-selectin generation.

Data are the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs concentration of 0 μM . EAP, ethanol extract of *Artemisia Princeps* Pampanini; EPL, ethanol extract of persimmon leaves; C, catechin; EC, epicatechin; ECC, epigallocatechin gallate; ECJ, ethanol extract of *Citrus junos*.

바. Bleeding time 비교

○ EAP, EPL 및 ECJ와 이들의 대표 flavonoids 화합물은 control (PBS)군에 비해 bleeding time을 유의적으로 증가시켰음. 특히, EAP, EPL 및 ECJ 중 EAP군의 bleeding time이 가장 증가되었음 (표 2-15).

표 2-15. Effects of EAP, EPL, ECJ and their major flavonoids on Bleeding time

Sample	Concentration	Bleeding time (s)
PBS ^a		80.67 ± 4.33
EAP	40mg/kg	151.40 ± 15.50**
Eupatilin	10mg/kg	141.33 ± 10.86**
Jaceosidin	10mg/kg	136.75 ± 14.56*
EPL	40mg/kg	124.00 ± 11.95*
catechin	10mg/kg	133.00 ± 13.55*
epicatechin	10mg/kg	132.75 ± 10.95**
epicatechin gallate	10mg/kg	140.80 ± 12.20**
ECJ	40mg/kg	139.40 ± 13.42*
Naringin	10mg/kg	121.60 ± 12.09*
Hesperidin	10mg/kg	133.75 ± 14.70*
Asprin	30mg/kg	222.60 ± 6.04***

Data represent mean±S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control. EAP, ethanol extract of *Artemisia Princeps* Pampanini; EPL, ethanol extract of persimmon leaves; ECJ, ethanol extract of *Citrus junos* Tanaka. ^aPhosphate buffered saline (PBS) is used as control. ^bAspirin was used as positive control.

3. 제1차 동물실험 연구수행 결과

(1) 혈장 응고 시간 비교

- 실험 식이를 급여한 9주 후, PL, CJS, SJL 및 SJH의 내인성 및 외인성 응고 시스템에 미치는 영향을 측정하기 위해 PT와 aPTT 실험을 진행하였음.
- PT와 aPTT는 HFD군에 비해 PL 및 N-3군에서만 유의적으로 증가되었음. 반면 GB군은 HFD군에 비해 aPTT만 유의적으로 증가시켰음 (표 2-16).

표 2-16. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on anticoagulant activity based on PT and aPTT in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

	PT	aPTT
HFD	12.98 ± 0.16	11.92 ± 0.58
PL	13.80 ± 0.36*	16.33 ± 0.42*
CJS	12.94 ± 0.19	13.01 ± 0.25
SJL	13.64 ± 0.28	13.04 ± 0.32
SJH	13.52 ± 0.54	12.69 ± 0.56
GB	12.96 ± 0.32	14.05 ± 0.36*
N-3	14.70 ± 0.85*	14.78 ± 0.86*

Data represent the mean±S.E.M. * $p < 0.05$ vs control. HFD was used as the control. PT, prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time. HFD, high-fat diet (20% fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3).

(2) 혈소판 활성 관련 바이오마커에 미치는 영향

(가) Serotonin 농도 비교

- 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 매개하는 혈관조절물질인 serotonin의 혈장 농도를 비교한 결과, 4종 후보소재 보충군의 혈장 serotonin 농도는 HFD군에 비해 유의적인 차이가 없었으나, PL군은 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였음 (그림 2-5).

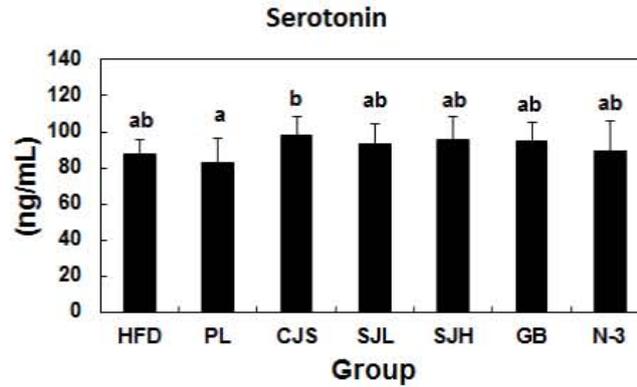


그림 2-5. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on serotonin generation in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet-fed groups at $p < 0.05$. HFD, high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3)

(나) TXB₂ 농도 비교

○ 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 유발하는 대표적인 물질인 Thromboxane A₂ (TXA₂)를 측정하기 위해 안정한 상태인 Thromboxane B₂ (TXB₂) 농도를 측정하였음.

○ TXB₂의 혈장 농도를 비교한 결과는 다음과 같음 (그림 2-6). PL, CJS 및 SJH군의 혈장 TXB₂ 농도는 HFD 군에 비해 유의적으로 낮아졌음. 아울러, 양성대조군 GB 및 N-3군도 HFD 군에 비해 TXB₂ 농도가 저하되었음.

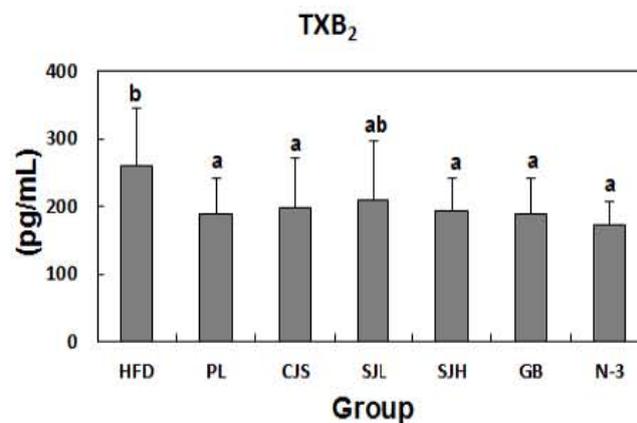


그림 2-6. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on TXB₂ generation in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. TXB₂ thromboxane B₂, HFD, high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3).

(다) sP-selectin 농도 비교

○ 혈소판과 leukocyte와의 adhesion을 매개하는 soluble P-selectin (sP-selectin)의 혈장 농도를 분석한 결과, 혈장 sP-selectin의 농도는 양성대조군인 N-3군에서만 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음 (그림 2-7).

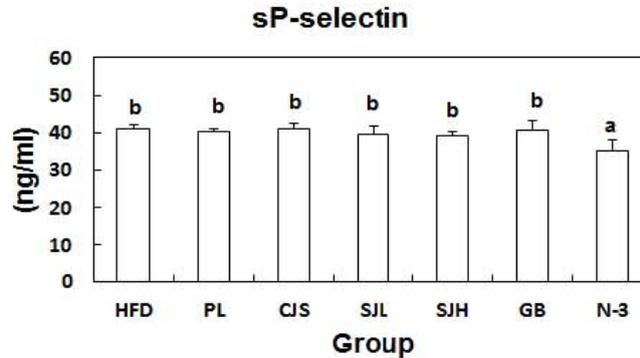


그림 2-7. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on sP-selectin generation in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. sP-selectin, soluble P-selectin; HFD, high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3).

(3) 체중, 체중 증가량 및 식이 섭취량 비교

○ 실험 2주째부터 PL, CJS, SJL, SJH, GB 및 N-3 모든 군의 체중이 증가하기 시작하였으나 실험 기간 동안의 체중은 모든 후보소재 보충군에서 HFD군에 비해 유의성은 관찰되지 않았음.

○ 체중 증가량 및 식이 섭취량 또한 모든 후보소재 보충군에서 HFD군에 비해 유의성은 나타나지 않았음 (표 2-17).

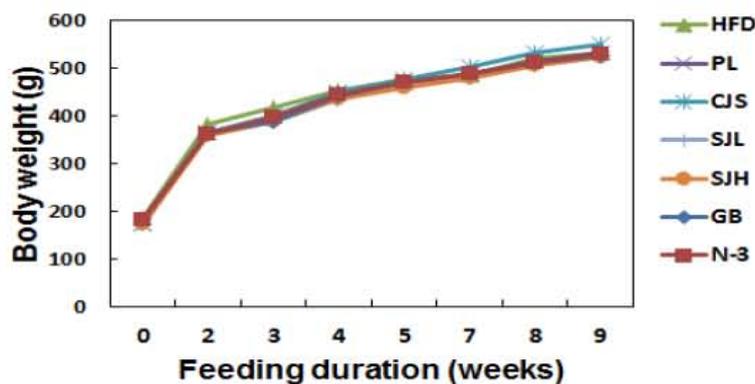


그림 2-8. Change of the body weight for 9 weeks in SD rats fed high-fat diet with PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 supplement.

HFD, high-fat diet (20% fat,1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3).

Æ 2-17. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on body weight, body weight gain and food intakes in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

	HFD	PL	CJS	SJL	SJH	GB	N-3
Initial Body Weight (g)	185.67 ± 2.63	172.93 ± 10.61	172.99 ± 10.26	173.88 ± 10.70	174.36 ± 10.91	182.05 ± 4.24	181.85 ± 4.49
Final Body Weight (g)	531.93 ± 12.39	532.34 ± 12.14	549.58 ± 9.80	525.22 ± 20.12	523.85 ± 13.41	526.34 ± 17.49	529.01 ± 14.21
B.W. gain (g/day)	5.78 ± 0.23	6.03 ± 0.19	6.34 ± 0.28	5.64 ± 0.37	5.81 ± 0.23	5.58 ± 0.29	5.93 ± 0.21
Food Intake (g/day)	19.15 ± 0.64	19.24 ± 0.73	19.74 ± 0.51	20.54 ± 0.59	18.89 ± 0.94	17.85 ± 0.42	20.01 ± 0.88

HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3).

(4) 단위 체중당 장기 무게 비교

○ 간조직은 HFD군에 비해 SJL, GB군에서 유의적으로 낮게 나타났음. 피하 백색지방 조직 무게는 PL군과 N-3군에서 유의적으로 낮아졌으며, 부고환 백색지방 조직 무게는 SJL, SJH GB 및 N-3군에서 유의적으로 감소하였음.

○ 내장 지방 (visceral fat)의 무게는 SJL군에서 유의적으로 낮게 나타났음. 견갑골 백색지방, 내장 지방 그리고 피하지방을 더한 총 백색지방의 무게는 HFD군에 비해 SJL, SJH 및 GB군에서 유의적으로 낮게 관찰되었음. 그러나 신주위 지방 조직, 장간막 백색지방 조직 및 피하지방 조직의 무게는 시험군간 차이가 없었음 (표 2-18).

Æ 2-18. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on the organ and adipose tissue weights in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

	HFD	PL	CJS	SJL	SJH	GB	N-3
	(g/100g body weight)						
Liver	4.39 ± 0.15 ^b	4.11 ± 0.08 ^{ab}	4.20 ± 0.11 ^{ab}	4.01 ± 0.12 ^a	4.39 ± 0.14 ^b	3.97 ± 0.10 ^a	4.06 ± 0.09 ^{ab}
kidney	0.53 ± 0.01 ^{ab}	0.49 ± 0.00 ^a	0.51 ± 0.00 ^{ab}	0.53 ± 0.00 ^{ab}	0.53 ± 0.01 ^b	0.54 ± 0.00 ^b	0.51 ± 0.00 ^{ab}
Interscapular BAT	0.07 ± 0.08	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.14	0.07 ± 0.14	0.07 ± 0.25	0.08 ± 0.18	0.07 ± 0.13
Interscapular WAT	0.46 ± 0.04 ^b	0.35 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.03 ^{ab}	0.41 ± 0.02 ^{ab}	0.40 ± 0.02 ^{ab}	0.42 ± 0.02 ^{ab}	0.36 ± 0.03 ^a
Epididymal fat	3.26 ± 0.18 ^b	2.92 ± 0.12 ^{ab}	2.88 ± 0.10 ^{ab}	2.62 ± 0.19 ^a	2.59 ± 0.19 ^a	2.75 ± 0.17 ^a	2.72 ± 0.12 ^a
Perirenal fat	0.92 ± 0.06	0.89 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.82 ± 0.10	0.81 ± 0.07	0.80 ± 0.07	0.86 ± 0.05
Mesentric fat	1.44 ± 0.12	1.38 ± 0.08	1.29 ± 0.05	1.23 ± 0.14	1.24 ± 0.11	1.20 ± 0.08	1.40 ± 0.09
Retroperitoneum fat	2.82 ± 0.15	2.89 ± 0.17	3.02 ± 0.17	2.72 ± 0.19	2.82 ± 0.13	2.67 ± 0.14	2.74 ± 0.17
Subcutaneous fat	3.16 ± 0.21 ^b	2.80 ± 0.19 ^{ab}	2.75 ± 0.21 ^{ab}	2.39 ± 0.22 ^a	2.54 ± 0.17 ^{ab}	2.32 ± 0.11 ^a	2.96 ± 0.29 ^{ab}
Visceral fat	8.62 ± 0.37 ^b	8.08 ± 0.33 ^{ab}	7.99 ± 0.34 ^{ab}	7.03 ± 0.53 ^a	7.24 ± 0.39 ^{ab}	7.42 ± 0.41 ^{ab}	7.71 ± 0.36 ^{ab}
Total WAT	12.25 ± 0.51 ^b	11.29 ± 0.51 ^{ab}	11.16 ± 0.53 ^{ab}	9.73 ± 0.75 ^a	10.00 ± 0.54 ^a	10.10 ± 1.55 ^a	11.09 ± 1.98 ^{ab}

Data are mean±S.E. ^{ab}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. HFD,high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3)

(5) 혈장 지질 농도 비교

○ 4종 후보소재 보충군의 중성지질 농도는 HFD군에 비해 차이가 없었으며, 혈장 총콜레스테롤 농도는 PL, SJL, SJH 및 N-3군에서 유의적으로 낮은 수준을 나타내었음. LDL의 혈중 농도는 모든 군에서 HFD군에 비해 유의적으로 낮아졌으며 이는 Non-HDL-콜레스테롤의 저하 결과로 이어져 유사한 경향을 보였음. 혈중 유리지방산의 농도는 CJS군과 N-3군에서 유의적으로 낮게 측정되었음 (표 2-19).

○ PL, SJL군과 N-3군의 경우 혈장 아포지단백 B 농도 저하를 보였으며, PL군은 동시에 아포지단백 AI 농도의 증가 효과를 보였음. 동맥경화의 위험인자인 Apo-A I/apo B 비율 역시 모든 군에서 HFD군에 비해 낮아지는 경향을 보였음. 4종 후보소재 중 PL 군의 혈장지질 저하 효능이 전반적으로 가장 우수한 것으로 제시할 수 있음 (표 2-19).

Æ 2-19. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on plasma lipid profiles in rats fed high-fat diet for 9 weeks

	HFD	PL	CJS	SJL	SJH	GB	N-3
Triglyceride (mmol/L)	1.20 ± 0.23 ^{ab}	1.01 ± 0.21 ^a	1.28 ± 0.25 ^{ab}	1.09 ± 0.20 ^{ab}	1.14 ± 0.29 ^{ab}	1.34 ± 0.17 ^{ab}	0.95 ± 0.25 ^a
Total-C (mmol/L)	2.88 ± 0.73 ^c	2.26 ± 0.22 ^{ab}	2.57 ± 0.36 ^{bc}	2.21 ± 0.62 ^{ab}	2.15 ± 0.57 ^{ab}	2.43 ± 0.50 ^{abc}	1.89 ± 0.45 ^a
HDL-C (mmol/L)	0.37 ± 0.05 ^{ab}	0.38 ± 0.07 ^{ab}	0.36 ± 0.06 ^{ab}	0.32 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.10 ^{ab}	0.43 ± 0.14 ^b	0.37 ± 0.03 ^{ab}
Non HDL-C (mmol/L)	2.70 ± 1.03 ^b	1.96 ± 0.08 ^{ab}	2.04 ± 0.40 ^{ab}	1.63 ± 0.35 ^a	1.81 ± 0.65 ^a	2.00 ± 0.47 ^{ab}	1.55 ± 1.05 ^a
LDL-C (mmol/L)	2.29 ± 0.97 ^b	1.45 ± 0.23 ^a	1.46 ± 0.35 ^a	1.14 ± 0.31 ^a	1.29 ± 0.55 ^a	1.41 ± 0.38 ^a	1.11 ± 0.30 ^a
Free fatty acid (mmol/L)	0.78 ± 0.10 ^c	0.75 ± 0.10 ^c	0.52 ± 0.16 ^a	0.68 ± 0.10 ^{bc}	0.76 ± 0.14 ^c	0.70 ± 0.14 ^{bc}	0.57 ± 0.16 ^{ab}
Phospholipid (mmol/L)	1.52 ± 0.36 ^b	1.43 ± 0.10 ^{ab}	1.42 ± 0.20 ^{ab}	1.28 ± 0.25 ^{ab}	1.39 ± 0.20 ^{ab}	1.45 ± 0.30 ^{ab}	1.19 ± 0.17 ^a
Apolipoprotein-A I (mg/dL)	8.37 ± 1.07 ^{ab}	8.02 ± 0.92 ^{ab}	8.54 ± 1.30 ^{ab}	8.67 ± 1.00 ^b	8.53 ± 0.88 ^{ab}	8.67 ± 1.00 ^{ab}	7.48 ± 0.88 ^a
Apolipoprotein B (mg/dL)	10.34 ± 0.99 ^{bc}	8.39 ± 1.21 ^a	9.72 ± 0.67 ^{abc}	8.47 ± 2.92 ^a	11.34 ± 1.61 ^c	9.47 ± 1.56 ^{ab}	8.20 ± 1.09 ^a
HTR (%)	13.93 ± 3.78	14.92 ± 0.83	15.27 ± 4.19	16.41 ± 3.90	17.95 ± 6.70	16.87 ± 3.85	20.15 ± 3.00
AI	6.61 ± 2.38	5.72 ± 0.37	5.99 ± 1.99	5.33 ± 1.30	5.28 ± 2.45	5.24 ± 1.75	4.02 ± 0.73
Apo-A I / Apo B	0.84 ± 0.10	1.01 ± 0.10	0.89 ± 0.20	1.07 ± 0.34	0.74 ± 0.13	0.90 ± 0.14	0.94 ± 0.18

Data are mean±S.E. ^{abc}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. HFD, high-fat diet (20%fat,1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5%Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba);N-3,(HFD+2.5% Omega-3). C, cholesterol; Non HDL-C=(Total-C)-(HDL-C); LDL-C, (Total-C)-(HDL-C)-(triglyceride/5); HTR, (HDL-C/Total-C)×100; AI, atherogenic index, (Total-C)-(HDL-C)/(HDL-C).

(6) 간조직의 지질함량 비교

○ 4종 후보소재 보충군에 의한 간조직 중성지질, 콜레스테롤 및 유리지방산 함량은 HFD군에 비해 유의적인 감소를 나타내지 않았음. 간조직의 중성지질의 함량은 N-3군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였으며 4종 후보소재 보충군에서는 전체적으로 감소하는 경향을 보였음 (그림 2-9).

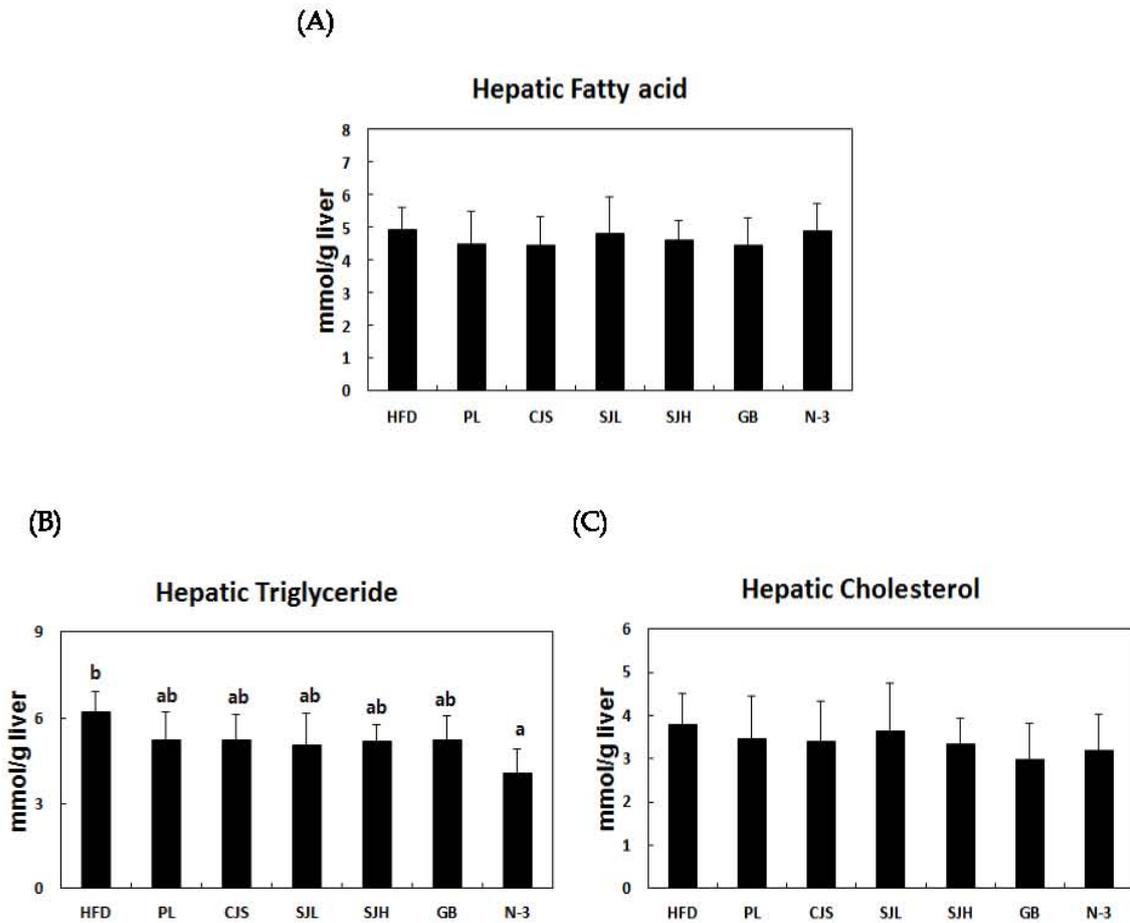


그림 2-9. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on the hepatic lipid levels in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. HFD, high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3).

(7) 혈장 cytokine 농도 비교

○ 동맥경화 병변을 유도하는 MCP-1 농도는 4종 후보소재 보충군 중 SJH군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음. Interleukin 10 농도는 SJL군에서 HFD군에 비해 유의적으로 높아졌음. 혈장 interleukin-1 β 및 TNF- α 농도는 유의성은 나타나지 않지만, 후보소재 보충군에 의해서 HFD군에 비해 낮아지는 경향을 나타내었음 (그림 2-10).

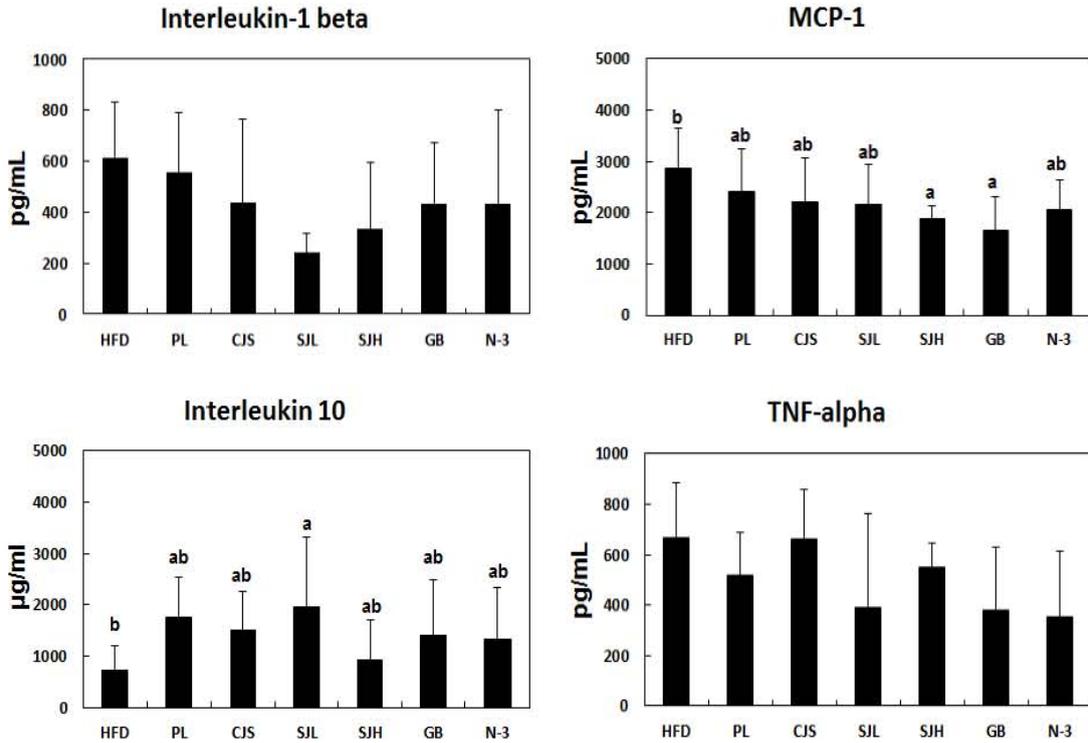


그림 2-10. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on other cytokines in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean \pm S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. HFD, high-fat diet (20% fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3).

(8) Leptin, resistin, adiponectin 농도 및 Leptin:Adiponectin (L:A) ratio 비교

○ 혈장 leptin 농도는 SJL군 및 N-3군에서 HFD군에 비해 유의적으로 낮아졌으며 다른 후보 소재 또한 유의성은 없었지만 낮아지는 경향을 보임. 혈장 ghrelin 농도는 PL 보충군에서만 유의적으로 증가하였으며 CJS군과 SJH군도 HFD군에 비해 증가하는 경향만 보였음. 한편, adiponectin 혈장 농도는 모든 군에서 유의적 차이가 없었으나 leptin:adiponectin ratio는 PL, SJL, SJH 및 N-3군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮게 제시되었음 (그림 2-11).

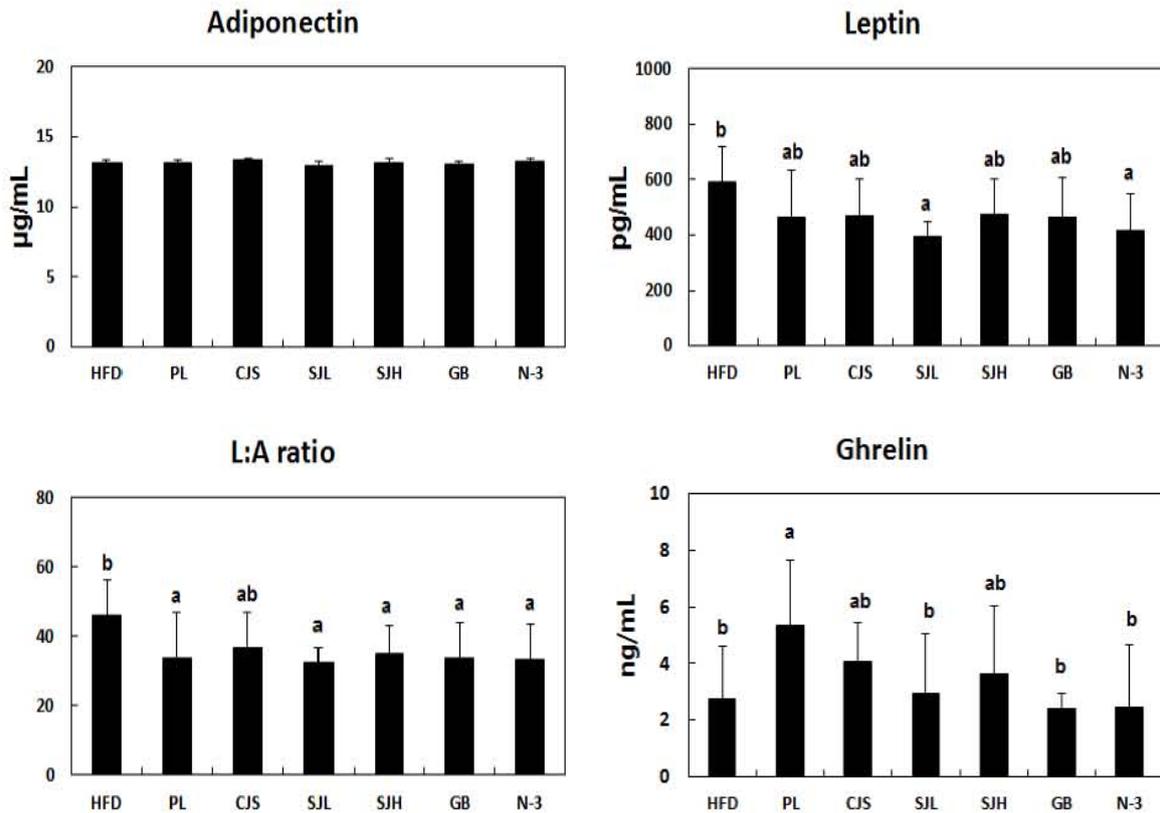


그림 2-11. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on leptin, ghrelin, adiponectin and L:A ratio in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. HFD,high-fat diet (20%fat, 1%cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginkobiloba); N-3,(HFD+2.5% Omega-3).

(9) 간조직의 형태학적 비교

○ 간조직의 간문맥을 중심으로 비교한 결과, HFD군에서 가장 많은 지방구의 축적이 관찰되었음. 또한 지방구의 크기도 다른 군들에 비해 큰 것으로 나타났음. 한편, 4종 후보소재 중 PL군에서 지방구 크기가 가장 감소된 것으로 나타남 (그림 2-12). 이러한 간조직의 형태학적 비교 결과는 간조직의 중성지방 함량 결과와 유사한 경향으로 제시되었음.

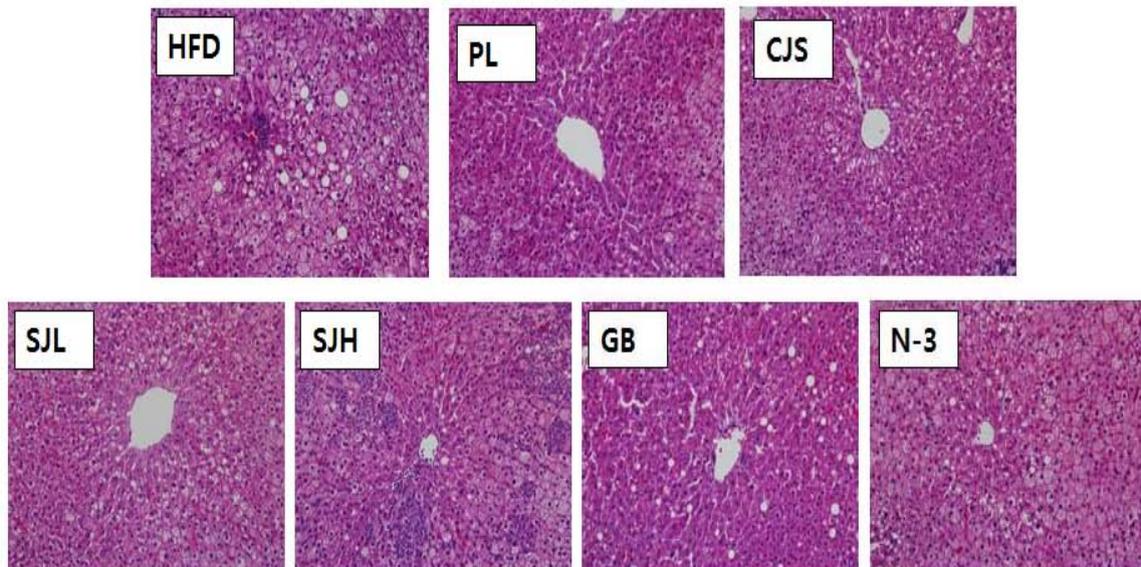


그림 2-12. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on hepatic morphology in rats high-fat diet for 9 weeks.

HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3)

Representative photomicrographs of liver are shown at x200 magnification.

(10) 지방조직의 형태학적 비교

○ 4종 후보소재 모든 군의 지방세포의 크기가 HFD군에 비해 작은 것으로 관찰되었음. 특히, SJH군의 지방세포 크기가 가장 작은 것으로 관찰되었음 (그림 2-13). 이러한 결과는 총 백색지방 조직 중량 결과와 유사하였음.

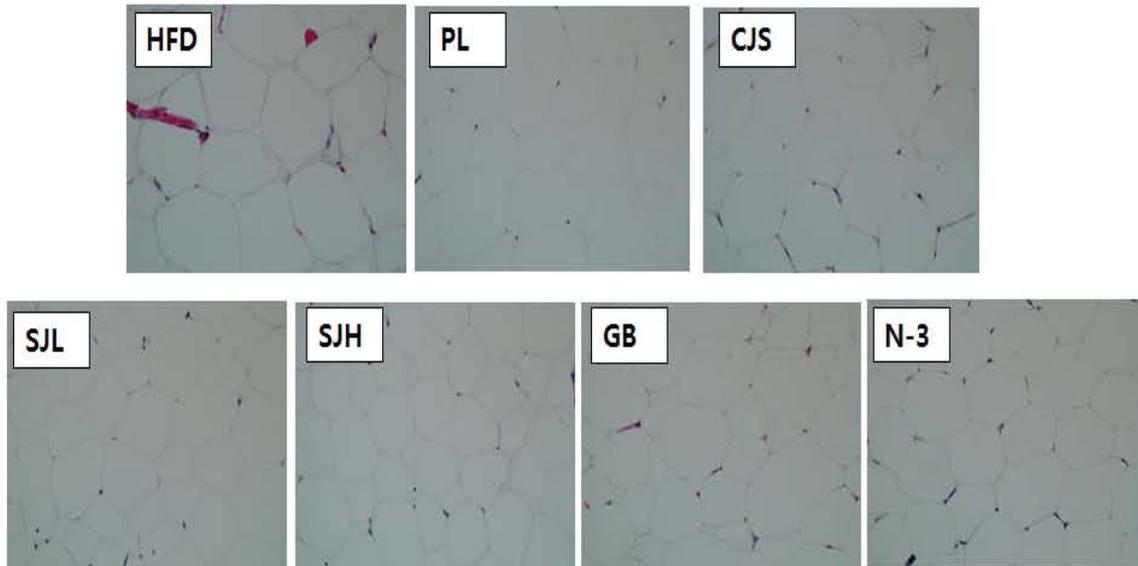


그림 2-13. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on white adipose tissue morphology in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH(HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3)

Representative photomicrographs of epididymal WAT are shown at x400 magnification.

(11) 간조직의 지질대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

○ 간조직의 지방산 합성 관련 효소 활성도 비교 결과는 표 2-20와 같음. 간조직의 합성 효소인 Fatty acid synthase(FAS), Malic enzyme(ME) 및 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)의 효소 활성도 측정 결과, FAS 활성도는 HFD군에 비해 4종의 후보소재 보충군에서 유의적으로 낮아졌음.

○ ME 활성도도 4종 보충군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었음.

○ G6PD 활성도는 ME 활성도와 유사하게 HFD군에 비해 모든 보충군에서 유의적으로 낮아졌음.

○ 간조직의 지방산 산화 관련 효소인 carnitine palmitoyl-CoA transferase (CPT)의 효소 활성도 비교 결과는 표와 같음. CPT 활성도는 CJS군 및 SJL군에서 유의적으로 낮았음. 또한 PL군 및 SJH군의 CPT 활성도는 HFD군에 비해 유의적인 차이는 없었지만, 낮은 경향으로 관찰되었음.

○ 간조직의 중성지질 합성에 관여하는 효소인 phosphatidate phosphohydrolase (PAP) 활성도 비교 결과는 표 2-20와 같음. PAP 활성도는 4종 후보소재 보충군 중 SJH군에서 유의적으로 낮아졌으며, 다른 후보소재 보충군에서는 낮아지는 경향만 관찰되었음.

Æ 2-20. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on the hepatic lipid-regulating enzyme activities in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

	HFD	PL	CJS	SJL	SJH	GB	N-3
Fatty acid synthase ($\mu\text{mol oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$)	81.22 \pm 17.05 ^c	46.27 \pm 8.59	31.39 \pm 3.55 ^{ab}	31.44 \pm 2.81 ^{ab}	37.24 \pm 6.72 ^{ab}	44.72 \pm 4.28 ^{ab}	26.00 \pm 3.40 ^a
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (nmol/min/mg protein)	145.06 \pm 13.04 ^c	112.07 \pm 10.35 ^b	60.74 \pm 5.56 ^a	86.73 \pm 8.25 ^{ab}	88.78 \pm 10.44 ^{ab}	80.01 \pm 12.87 ^{ab}	81.05 \pm 12.13 ^{ab}
Malic enzyme (nmol/min/mg protein)	167.44 \pm 33.44 ^d	99.80 \pm 5.04 ^{bc}	75.19 \pm 3.83 ^{ab}	68.03 \pm 4.73 ^a	78.20 \pm 4.70 ^{ab}	119.55 \pm 13.57 ^c	99.05 \pm 7.87 ^{bc}
Carnitine palmitoyl-CoA transferase (nmol/min/mg protein)	20.61 \pm 3.24 ^{cd}	10.49 \pm 2.40 ^a	9.25 \pm 1.83 ^a	9.00 \pm 1.60 ^a	12.01 \pm 2.17 ^{ab}	17.47 \pm 1.36 ^{bc}	24.24 \pm 2.02 ^d
Phosphatidate phosphohydrolase ($\mu\text{mol oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$)	0.51 \pm 0.02 ^b	0.40 \pm 0.02 ^a	0.42 \pm 0.02 ^a	0.49 \pm 0.02 ^b	0.49 \pm 0.02 ^b	0.50 \pm 0.03 ^b	0.49 \pm 0.01 ^b

Data are mean \pm S.E. ^{abcd}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. HFD, high-fat diet (20%fat,1%cholesterol); PL, (HFD+0.5%Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5%Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05%Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15%Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5%Ginko biloba); N-3,(HFD+2.5%Omega-3).

(12) 지방조직의 지질대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

- 지방 조직의 지방산 합성 관련 효소 활성도 비교 결과는 표 2-21과 같음. 지방 조직의 합성 효소인 FAS, ME 및 G6PD의 효소 활성도 측정 결과, FAS 활성도는 HFD군에 비해 SJL군 및 SJH군에서 유의적으로 낮아졌음.
- ME 활성도는 PL군 및 CJS군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었음.
- G6PD 활성도는 CJS군, SJL군 및 SJH군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타났음. CJS군은 일관성 있게 ME 및 G6PD 활성도 모두를 HFD군에 비해 유의적으로 낮추었음.
- CPT 활성도는 CJS군 및 SJH군에서 유의적인 증가를 나타냈으며, PL군 및 SJL군의 CPT 활성도는 HFD군에 비해 유의적인 차이는 없었지만, 증가하는 경향을 보였음.
- PAP 활성도는 4종 후보소재 보충군 중 SJH군에서 유의적으로 낮아졌으며, 이는 간조직의 PAP 활성도와 일관성 있는 것으로 제시되었음.

Æ 2-21. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on the Epididymal lipid-regulating enzyme activities in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

HFD	PL	CJS	SJL	SJH	GB	N-3
Fatty acid synthase ($\mu\text{mol oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$)						
321.20 \pm 39.15 ^b	267.48 \pm 17.74 ^{ab}	282.20 \pm 39.42 ^{ab}	229.23 \pm 22.87 ^a	224.47 \pm 28.29 ^a	238.86 \pm 22.71 ^{ab}	220.32 \pm 23.49 ^a
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (nmol/min/mg protein)						
28.65 \pm 4.94 ^b	19.90 \pm 3.99 ^{ab}	15.46 \pm 5.07 ^a	14.00 \pm 4.23 ^a	10.63 \pm 1.62 ^a	21.58 \pm 2.15 ^{ab}	16.34 \pm 3.65 ^{ab}
Malic enzyme (nmol/min/mg protein)						
0.84 \pm 0.11 ^{ab}	0.64 \pm 0.08 ^a	0.55 \pm 0.06 ^a	0.73 \pm 0.17 ^{ab}	1.01 \pm 0.13 ^b	0.81 \pm 0.13 ^{ab}	0.56 \pm 0.06 ^a
Carnitine palmitoyl-CoA transferase (nmol/min/mg protein)						
9.20 \pm 2.56 ^a	15.41 \pm 3.41 ^{ab}	24.40 \pm 4.92 ^b	19.91 \pm 3.06 ^{ab}	22.42 \pm 3.58 ^b	18.13 \pm 4.26 ^{ab}	16.90 \pm 4.40 ^{ab}
Phosphatidate phosphohydrolase ($\mu\text{mol oxidized}/\text{min}/\text{mg protein}$)						
78.09 \pm 9.57	71.98 \pm 6.06 ^{ab}	59.74 \pm 10.64 ^{ab}	56.70 \pm 7.26 ^{ab}	49.63 \pm 2.81 ^a	58.48 \pm 5.63 ^{ab}	62.10 \pm 2.85 ^{ab}

Data are mean \pm S.E. ^{ab}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. HFD, high-fat diet (20%fat,1%cholesterol); PL, (HFD+0.5%Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5%Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05%Sajabalssuk low); SJH, (HFD+0.15%Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5%Ginko biloba); N-3,(HFD+2.5%Omega-3).

(13) 혈장 GOT 및 GPT 효소 활성도를 통한 간조직 독성에 미치는 영향

○ 간독성 지표로서 glutamic oxaloacetate transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvate transaminase (GPT)를 측정된 결과는 그림 2-14와 같음. 혈장 GOT 활성도는 HFD군에 비해 CJS, GB군 및 N-3군에서 유의적으로 낮았으며, GPT 활성도는 HFD군에 비해 SJH군에서만 유의적으로 낮았음.

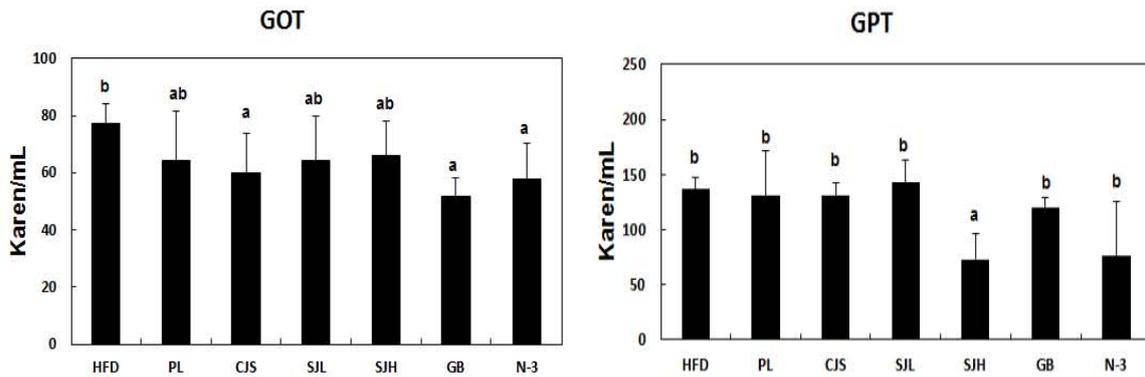


그림 2-14. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on plasma GOT and GPT activities in rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{ab}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3). GOT, glutamic oxaloacetate transaminase; GPT, glutamic pyruvate transaminase.

(14) PL, CJS, SJL 및 SJH의 식이 보충이 동맥의 유전자 발현 변화에 미치는 영향 분석

○ TXA₂를 생성하는 효소인 COX2의 발현은 SJL군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소되었고, serotonin transporter (SERT) 발현은 HFD군에 비해 PL군에서 유의적으로 낮아졌음. Selectin-P (SELP)는 HFD군에 비해 N-3군에서만 유의적 차이를 보였음 (그림 2-15).

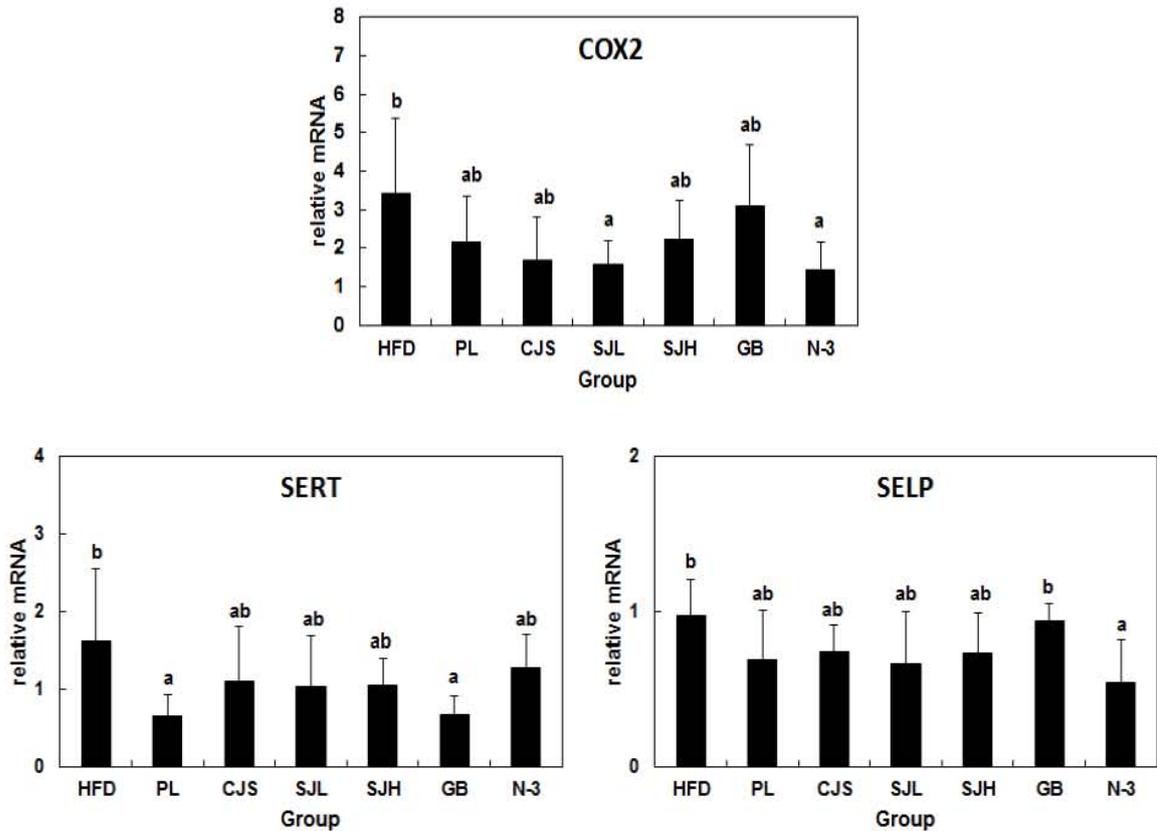


그림 2-15. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJL, SJH, GB and N-3 on aorta mRNA expression related to rats fed high-fat diet for 9 weeks.

Data are mean±S.E. ^{a,b}Means not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. HFD, high-fat diet (20%fat, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJL, (HFD+0.05% Sajabalssuk low); SJH (HFD+0.15% Sajabalssuk high); GB, (HFD+0.5% Ginko biloba); N-3, (HFD+2.5% Omega-3). COX2, cyclooxygenase-2; SERT, serotonin Transporter; SELP, selectin P.

4. 제2차 동물실험 연구수행 결과

(1) 혈장 응고시간 비교

○ 실험 식이를 급여한 10주 후, PL, CJS, SJ, MO 및 MT군의 내인성 및 외인성 응고 시스템에 미치는 영향을 측정하기 위해 aPTT와 PT 실험을 진행하였음. PT는 MO군만이 HFD군에 비해 유의적으로 증가되었음. aPTT는 PL군과 MO군에서 HFD보다 유의적으로 연장되었음 (표 2-22).

표 2-22. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on anticoagulant activity based on PT and aPTT in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	PT	aPTT
ND	10.27 ± 0.36	53.77 ± 1.51
HFD	8.37 ± 0.58 ^{ab}	40.90 ± 2.90 ^{ab}
PL	9.17 ± 0.33 ^{ab}	51.15 ± 1.52 ^a
CJS	9.18 ± 0.27 ^{ab}	41.27 ± 0.47 ^b
SJ	9.25 ± 0.18 ^{ab}	45.55 ± 3.11 ^{ab}
MO	10.08 ± 0.58 ^a	49.75 ± 3.15 ^a
MT	9.20 ± 0.07 ^{ab}	44.38 ± 1.82 ^{ab}

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05. ^{ab}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); PT, Prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time.

(2) 혈소판 활성화 관련 바이오마커에 미치는 영향

1) Serotonin 농도 비교

○ 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 매개하는 혈관 조절 물질인 serotonin의 혈장 농도를 비교한 결과, SJ, MT군만이 HFD군에 비해 유의적으로 농도가 낮아졌음. 나머지 3종 후보소재 보충군의 혈장 serotonin 농도는 HFD군에 비해 유의적 차이는 없었으나, 감소하는 경향을 보였음 (그림 2-16).

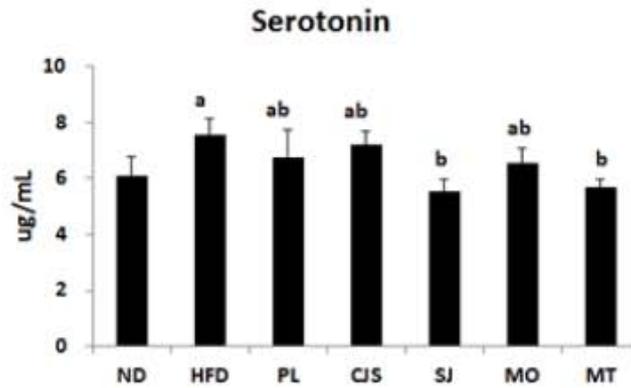


그림 2-16. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on Serotonin in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

^{ab}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalasuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); PT, Prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time.

2) TXB₂농도 비교

○ 혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 유발하는 대표적인 물질인 **Thromboxane A₂ (TXA₂)**를 측정하기 위해 안정한 상태인 **Thromboxane B₂ (TXB₂)**농도를 측정하였음.

○ TXB₂의 혈장 농도를 비교한 결과는 그림 2-17과 같음. HFD군은 ND군에 비해 유의적으로 증가하였으나, 실험 보충군간 농도 차이는 보이지 않았음.

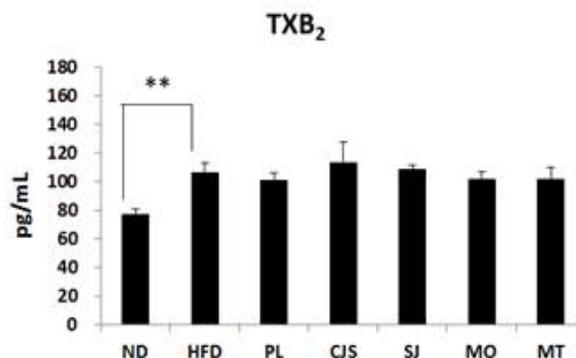


그림 2-17. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on TXB₂ in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; ** $p < 0.01$. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalasuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); TXB₂, Thromboxane B₂

3) sP-selectin 농도 비교

○ 혈소판과 leukocyte와의 adhesion을 매개하는 soluble P-selectin (sP-selectin)의 혈장 농도를 분석한 결과, 혈장 sP-selectin의 농도는 PL과 MT군만 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였고, 나머지 실험물질 보충군은 HFD군보다 감소하는 경향을 보였음 (그림 2-18).

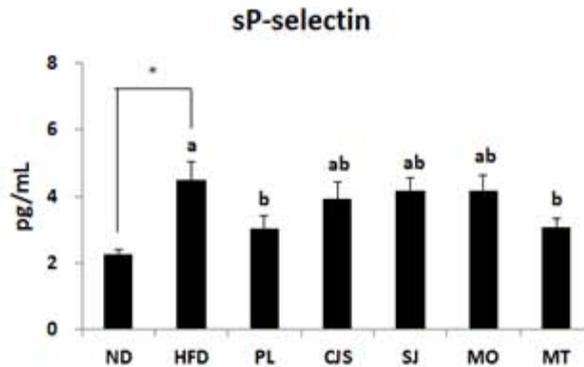


그림 2-18. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on sP-selectin in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; * $p < 0.05$. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); sP-selectin, soluble P-selectin.

(3) 체중, 체중 증가량 및 식이 섭취량 비교

○ 실험 식이를 급여한 10주의 체중 및 식이 섭취량 비교 변화는 표 4과 같음. 마지막 10주차 체중, 체중 증가량, 식이 섭취량 그리고 식이효율에서 ND군과 HFD군은 유의적 차이가 나타났음. 마지막 10주차 체중은 MT군만이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였고, 체중 차이는 PL군과 MT군이 HFD군보다 유의적으로 낮게 나타남. 식이 섭취량은 PL, SJ군에서 유의적으로 높게 나타났음. 식이 효율은 HFD군에 비해 PL군과 MT군에서 유의적으로 낮게 나타났음 (표 2-23).

표 2-23. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on body weight, body weight gain and food intakes in C57BL/6J fed high-fat diet for 10 weeks

	Initial Body Weight(g)	Final Body Weight(g)	BWG (g/days)	Food Intake(g/day)	FER
ND	21.87±0.32	28.65±0.75	0.09±0.01	3.94±0.17	0.02±0.00
HFD	22.91±0.39	32.32±0.96 ^{***a}	0.14±0.01 ^{***a}	2.95±0.11 ^{***a}	0.05±0.00 ^{***a}
PL	21.99±0.37	29.15±1.15 ^{ab}	0.10±0.01 ^b	3.21±0.10 ^c	0.03±0.00 ^b
CJS	21.81±0.35	30.63±1.14 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}	3.01±0.09 ^{ab}	0.04±0.00 ^{ab}
SJ	22.14±0.36	30.72±1.12 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}	3.11±0.15 ^{bc}	0.04±0.00 ^{abc}
MO	22.52±0.36	30.40±1.05 ^{ab}	0.11±0.01 ^{ab}	3.11±0.09 ^{ab}	0.04±0.00 ^{abc}
MT	22.57±0.37	28.38±0.80 ^b	0.10±0.01 ^b	3.01±0.05 ^{ab}	0.04±0.00 ^{bc}

Data are mean±S.E. Significantly differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ^{abc}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% *Citrus junos* Sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajablassuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); BWG, body weight gains per day; FER, body weight gain/Food intakes per day.

(4) 단위 체중당 장기 무게 비교

○ 간 조직 무게는 HFD군에 비해 PL, MO 그리고 MT군에서 유의적으로 낮게 나타났음.
 ○ 식이에 의한 지방조직 축적 분포를 살펴보면, HFD군은 견갑골 갈색지방과 견갑골 백색지방을 제외한 모든 부위별 백색지방 조직 무게 (Epididymal fat, Perirenal fat, Mesentric fat, Retroperitoneum fat, Subcutaneous fat)를 ND군에 비해 유의적으로 증가시켰고, 후보소재 물질군 중 PL, MT군은 견갑골 갈색지방과 백색지방을 제외한 모든 부위별 백색지방 조직 무게를 HFD군에 유의적으로 감소시켰음. 내장지방 무게는 PL, CJS, SJ, MO 그리고 MT군 모두에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였고, 총 백색지방 조직 무게는 PL, MO 및 MT군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음 (표 2-24).

Æ 2-24. Effect of dietary supplementation of PL, CSJ, SJ, MO, and, MT on the organ and adipose tissue weights in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	ND	HFD	PL	CJS	SJ	MO	MT
	(g/100g body weight)						
Liver	3.49±0.08	5.11±0.25 ^{***a}	3.97±0.08 ^c	4.71±0.14 ^{ab}	4.86±0.15 ^a	3.87±0.07 ^c	4.43±0.09 ^b
kidney	1.00±0.03	0.98±0.03	1.05±0.02	1.01±0.03	0.99±0.04	1.03±0.03	1.02±0.03
Interscapular BAT	0.31±0.01	0.32±0.02	0.29±0.02	0.31±0.02	0.33±0.02	0.29±0.02	0.31±0.02
Interscapular WAT	1.30±0.08	2.29±0.18 ^{**a}	1.57±0.19 ^{bc}	1.82±0.14 ^{ab}	1.87±0.18 ^{ab}	1.50±0.17 ^{bc}	1.22±0.06 ^c
Epididymal fat	3.04±0.29	5.04±0.40 ^{**a}	3.23±0.25 ^{bc}	4.24±0.43 ^a	4.24±0.37 ^{ab}	3.69±0.28 ^{abc}	2.89±0.19 ^c
Perirenal fat	0.32±0.02	0.48±0.03 ^{**a}	0.32±0.03 ^b	0.39±0.04 ^{ab}	0.37±0.05 ^{ab}	0.46±0.03 ^{ab}	0.32±0.03 ^b
Mesentric fat	1.07±0.09	1.34±0.12 ^{*a}	0.98±0.05 ^{cd}	1.27±0.11 ^{ab}	1.18±0.08 ^{bc}	1.12±0.08 ^{bcd}	0.88±0.05 ^d
Retroperitoneum fat	0.88±0.10	1.47±0.10 ^{**a}	0.88±0.07 ^c	1.12±0.11 ^b	1.20±0.09 ^{ab}	1.19±0.10 ^b	0.88±0.07 ^c
Subcutaneous fat	1.33±0.12	2.32±0.17 ^{***a}	1.61±0.15 ^{bc}	2.22±0.23 ^a	2.07±0.25 ^{ab}	1.80±0.17 ^{abc}	1.27±0.09 ^c
Visceral fat	5.36±0.48	8.45±0.59 ^{**a}	5.39±0.36 ^c	7.02±0.60 ^b	7.00±0.51 ^b	6.31±0.46 ^{bc}	4.97±0.31 ^c
Total WAT	7.98±0.63	13.05±0.92 ^{**a}	8.58±0.64 ^c	11.06±0.91 ^{ab}	10.94±0.91 ^{ab}	9.61±0.77 ^{bc}	7.47±0.44 ^c

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ^{abc}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos Sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajablassuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos Sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos Sieb).

(5) 혈장 지질 농도 비교

○ 실험식이 종료 후 희생하여 얻은 혈장에서 측정된 총 콜레스테롤 및 그 외의 지질 농도는 표 2-25와 같음. 5종 후보소재 보충군의 중성지질 농도는 HFD군에 비해 유의적 차이가 없었으며, 혈장 총 콜레스테롤 농도는 PL, SJ 및 MO군이 HFD군 보다 유의적으로 낮아졌음. Non HDL-콜레스테롤 농도는 PL, MO군에서 유의적으로 감소하였음. 동맥경화 지수를 나타내는 AI는 PL, MO군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음 (표 2-25).

Æ 2-25. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on plasma lipid profiles C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	ND	HFD	PL	CJS	SJ	MO	MT
Triglyceride (mmol/L)	0.85±0.07	1.06±0.14*	1.08±0.05	0.98±0.09	1.07±0.08	1.14±0.08	0.90±0.08
Total-C (mmol/L)	2.89±0.09	3.30±0.10 ^{*a}	2.57±0.13 ^c	3.01±0.14 ^{ab}	2.73±0.17 ^{bc}	2.73±0.17 ^{bc}	3.17±0.11 ^a
HDL-C (mmol/L)	1.20±0.20	1.10±0.07 ^{ab}	1.03±0.07 ^{ab}	1.00±0.12 ^{ab}	1.00±0.12 ^{ab}	1.22±0.11 ^a	1.17±0.06 ^{ab}
Non HDL-C (mmol/L)	1.69±0.11	2.44±0.08 ^{***a}	1.66±0.21 ^b	2.54±0.43 ^a	2.13±0.13 ^{ab}	1.65±0.12 ^b	2.22±0.05 ^a
Free fatty acid (mmol/L)	0.54±0.10	0.56±0.04	0.68±0.05	0.57±0.07	0.67±0.08	0.49±0.10	0.57±0.06
Phospholipid (mmol/L)	0.56±0.03	0.53±0.07	0.74±0.04	0.68±0.10	0.62±0.08	0.55±0.11	0.63±0.06
Apolipoprotein-A I (mg/dL)	33.72±2.51	32.47±0.65 ^a	32.02±1.09 ^a	28.57±0.85 ^b	30.51±1.35 ^{ab}	31.10±0.73 ^{ab}	30.30±0.63 ^{ab}
Apolipoprotein B (mg/dL)	8.05±0.28	10.23±0.28	9.88±0.57	10.31±0.83	9.91±0.41	9.57±0.31	9.88±0.41
HTR (%)	36.41±3.55	31.92±1.72	35.83±2.79	29.56±4.93	30.95±4.08	33.78±1.95	34.68±2.46
AI	1.32±0.20	2.60±0.42 ^{*ab}	1.69±0.27 ^{bc}	2.76±0.78 ^a	2.37±0.18 ^{abc}	1.41±0.14 ^c	1.94±0.15 ^{abc}
Apo-A I / Apo B	3.96±0.25	3.03±0.14	2.86±0.29	3.10±0.19	3.16±0.19	3.16±0.18	3.15±0.16

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. ^{abc}Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% *Citrus junos* Sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajablassuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); C, cholesterol; Non HDL-C=(Total-C)-(HDL-C); LDL-C, (Total-C)-(HDL-C)-(triglyceride/5); HTR, (HDL-C/Total-C)×100; AI, atherogenic index, (Total-C)-(HDL-C)/(HDL-C).

(6) 간조직의 지질함량 비교

○ 간조직 단위 무게 당 중성지질, 총 콜레스테롤 및 유리지방산의 함량을 비교한 결과는 다음 그림 2-19와 같음. PL과 MO군의 콜레스테롤 함량은 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였고, 유리지방산은 MO군만 HFD군에 비해 유의적으로 낮게 나타났음. 간조직의 중성지질 함량은 군간 차이가 나타나지 않았음 (그림 2-19).

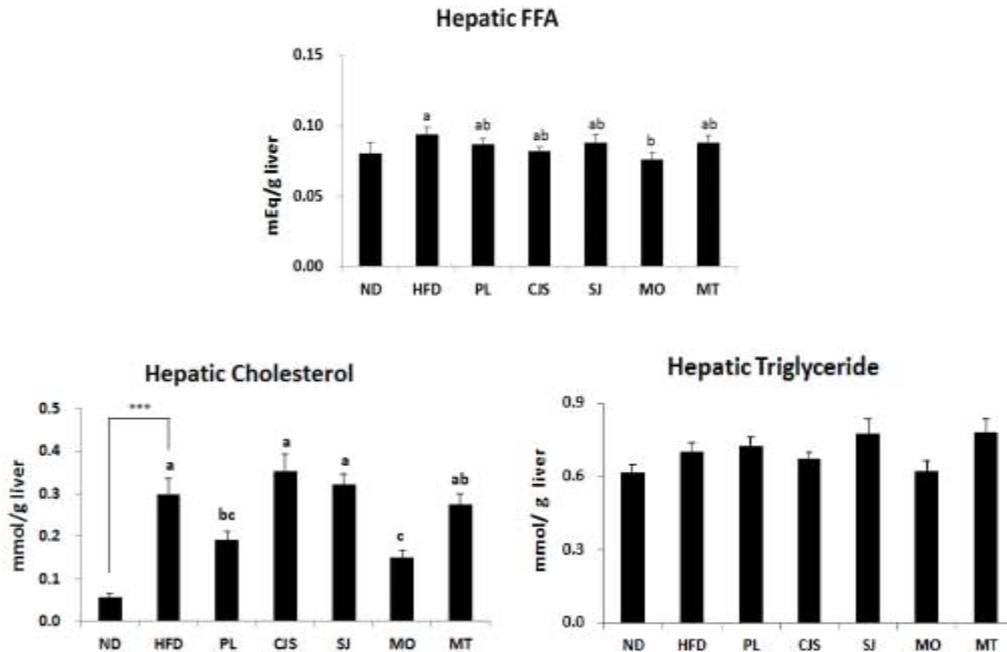


그림 2-19. Change of the Hepatic fatty acid, Hepatic Triglyceride and Cholesterol concentration for 10 weeks in C57BL/6J mice fed high-fat diet with PL, CJS, SJ, MO and MT supplement

Data are mean±S.E. Significantly differences between HFD versus ND are indicated; *** $p < 0.001$. ^{abc}Means in the same a common superscript are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% *Citrus junos* Sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajablassuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% *Citrus junos* Sieb); FFA, free fatty acid.

(7) 혈장 adipokine 및 호르몬 농도 비교

○ 지방조직에서 합성되어 혈중으로 분비되는 에너지와 혈당 항상성에 관여하는 leptin, adiponectin의 혈장 농도를 살펴보면 그림 2-20와 같음. 혈장 leptin 농도는 MT군에서 HFD군 보다 유의적으로 낮게 나타났음. 한편, 고지방식이에 의해 분비가 저하되는 항염증성 adipokine인 adiponectin 농도는 CJS군이 HFD군 보다 유의적으로 높게 나타났으며, MO 및 MT군이 증가 경향을 보였음. leptin:adiponectin ratio는 PL, MT군에서 HFD군 보다 현저히 감소되었음. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)은 PL, SJ 및 MO군이 HFD군 보다 유의적으로 낮게 나타났음. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 농도는 PL, MO군이 HFD군 보다 유의적으로 낮게 나타났음. Interleukin-6 (IL-6)의 농도는 PL을 제외한 나머지 후보소재

보충군 4종에서 HFD군에 비해 유의적으로 낮게 나타났음. Ghrelin의 농도는 CJS를 제외하고 4종의 후보소재 보충군에서 HFD군에 비해 증가하는 경향이 나타났으며, Insulin의 농도는 CJS, MO 및 MT군이 HFD군 보다 유의적으로 감소하였음 (그림 2-20).

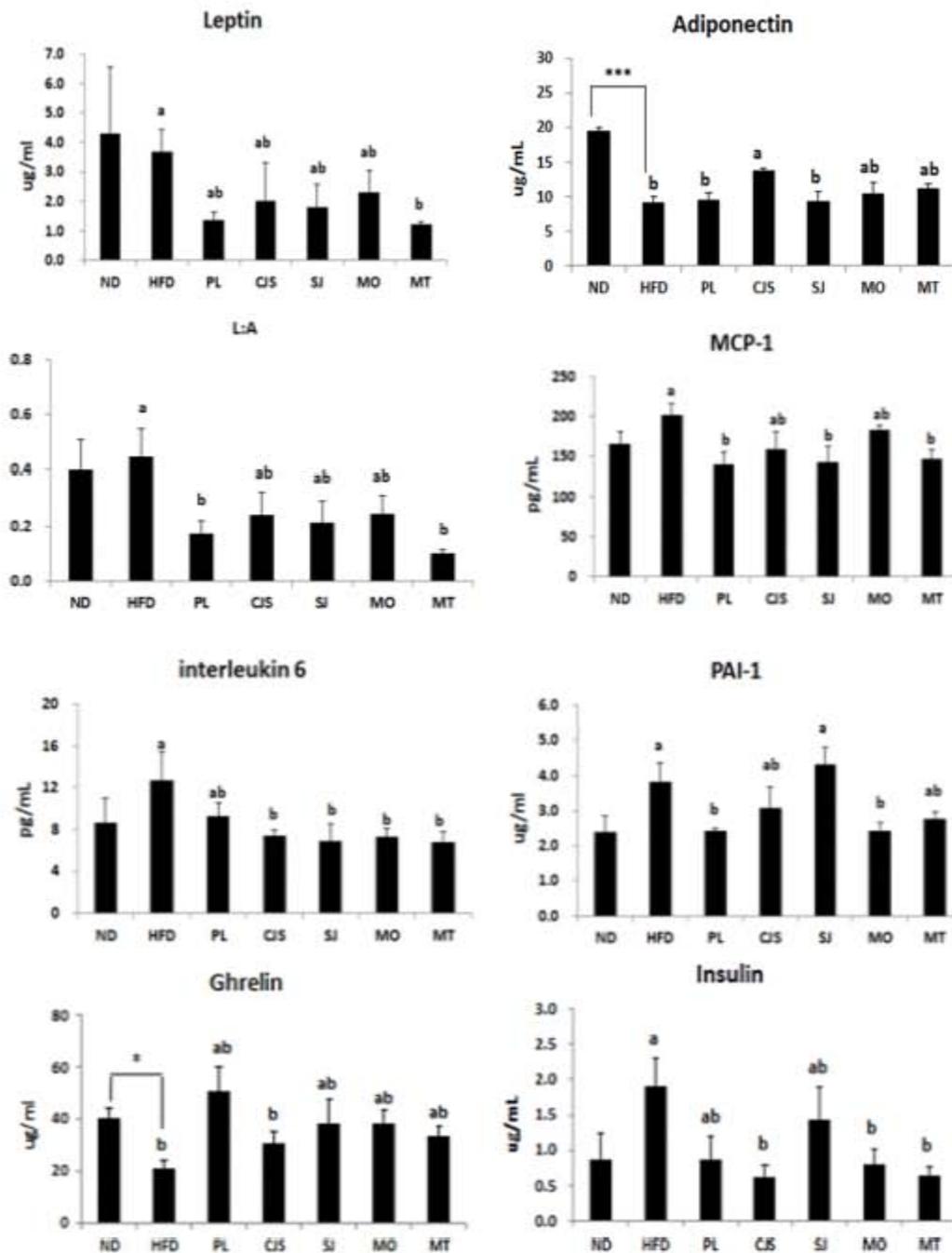


그림 2-20. Change of the adipocytokines and hormone concentration for 10 weeks in C57BL/6J mice fed high-fat diet with PL, CJS, SJ, MO and MT supplement

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, ***p<0.001. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalaseuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); L:A, Leptin:Adiponectin; MCP-1, Monocyte chemotatic protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

(8) 위장관 호르몬 GIP와 GLP-1 농도에 미치는 영향

○ Incretin시스템의 위장관 호르몬 중 인슐린 분비 호르몬인 **glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)** 와 **glucagon like peptide-1 (GLP-1)**의 혈장 농도를 비교한 결과는 그림 2-21과 같음. 혈장 GIP 농도는 PL, CJS 및 MO군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, GLP-1 농도는 5종의 후보소재 보충군 모두에서 유의적으로 낮게 나타났음 (그림 2-21).

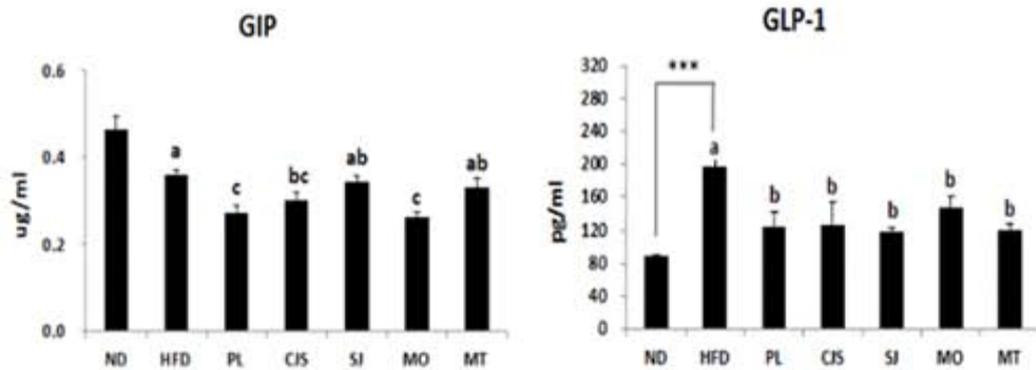


그림 2-21. Change of the GIP and GLP-1 concentrations for 10 weeks in C57BL/6J mice fed high-fat diet with PL, CJS, SJ, MO and MT supplement

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **Means not sharing a common letter are significantly different among the high-fat diet fed groups at $p < 0.05$. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sleb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalsak); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sleb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sleb); GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP-1, glucagon like peptide-1.

(9) 간조직의 형태학적 비교

○ 5종 후보소재의 식이보충에 의한 간조직의 형태학적 비교 결과는 다음 그림 2-22와 같음. 간조직의 간문맥을 중심으로 비교한 결과, HFD군에서 가장 많은 지방구의 축적이 관찰되었음. 5종의 후보소재 중 PL, MO군의 지방구 크기가 HFD군에 비해 가장 감소하였음. 이러한 간조직의 형태학적 비교 결과는 간조직 콜레스테롤 함량 결과와 일관성 있는 패턴을 보였음 (그림 2-22).

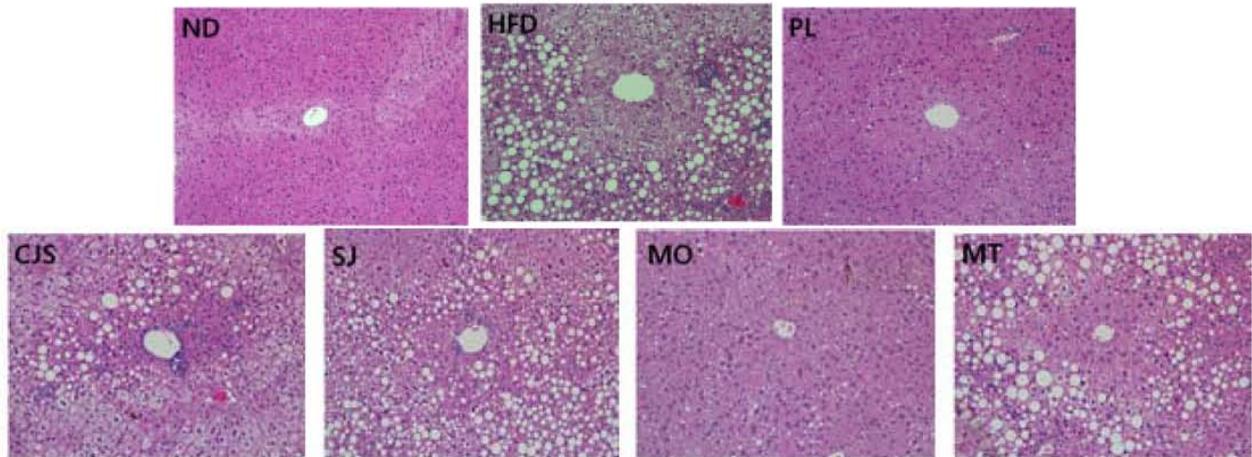


그림 2-22. Change of the Hepatic morphology for 10 weeks in C57BL/6J mice fed high-fat diet with PL, CJS, SJ, MO and MT supplement

ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb).

(10) 혈장 GOT 및 GPT 효소 활성도

○ 간 독성 지표로서 glutamic oxaloacetate transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvate transaminase (GPT)를 측정된 결과, 혈장 GOT 활성도는 실험군간 차이를 보이지 않았음. 혈장 GPT 활성도는 ND와 HFD군간 차이는 나타났지만 5종의 후보소재 보충군에서 유의적인 차이가 나지 않았음 (그림 2-23).

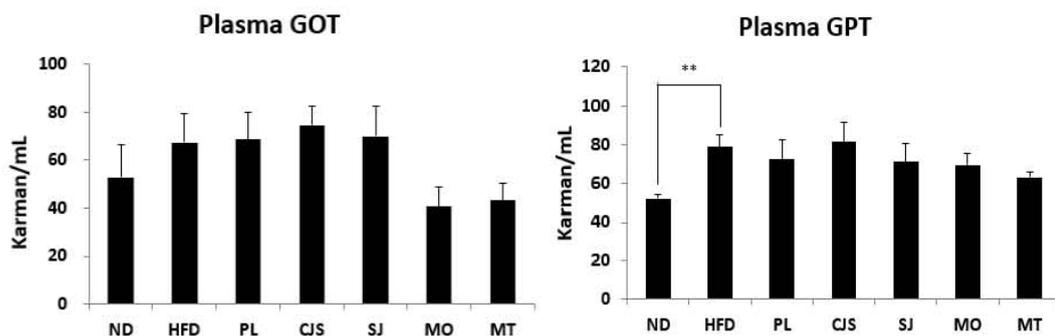


그림 2-23. Change of the Plasma GOT and GPT for 10 weeks in C57BL/6J mice fed high-fat diet with PL, CJS, SJ, MO and MT supplement

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; **p<0.01. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); GOT, glutamic oxaloacetate transaminase; GPT, glutamic pyruvate transaminase.

(11) 간조직의 지질대사 관련 효소 활성도에 미치는 영향

- 간조직의 지방산 합성 관련 효소 활성도 비교 결과는 표 2-26과 같음. 간조직의 지방산 합성 효소 중 **Fatty acid synthase (FAS)** 활성도는 HFD군에 비해 5종의 후보소재 보충군에서 유의적으로 낮아졌음.
- 반면 **Malic enzyme (ME)** 활성도는 MO군에서 HFD군에 비해 유의적으로 높아졌으며, 나머지 4종의 후보소재 보충군에서도 증가하는 경향을 보였음.
- **Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)**와 함께 간조직의 중성지질 합성에 관여하는 효소인 **phosphatidate phosphohydrolase (PAP)** 활성도는 실험군간 차이가 나타나지 않았음.
- 간조직의 지방산 산화 관련 효소인 **carnitine palmitoyl-CoA transferase (CPT)**의 효소 활성도 비교 결과는 표 2-27와 같음. PL군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮아졌으며, 나머지 5종의 후보소재 보충군에서는 감소하는 경향이 관찰되었음.
- β -oxidation는 MT군만이 HFD군에 비해 유의적으로 증가하였고, PL, CJS 및 MO군은 HFD군보다 증가하는 경향을 보였음.

표 2-26. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on Hepatic lipogenic enzyme C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	ME	G6PD	FAS	PAP
	(mmol/min/mg protein)		(nmol/min/mg protein)	
ND	72.10±4.83	15.13±2.04	6.93±0.26	198.45±9.29
HFD	14.43±0.91 ^{***b}	8.31±0.33 [*]	7.66±0.19 ^{*a}	224.44±5.75
PL	17.0±1.17 ^{ab}	7.65±0.31	5.64±0.47 ^b	229.31±7.20
CJS	15.37±1.67 ^{ab}	7.63±0.54	6.29±0.26 ^b	219.93±3.07
SJ	17.54±2.00 ^{ab}	7.93±0.31	6.39±0.31 ^b	226.75±4.71
MO	19.40±1.27 ^a	7.13±0.48	5.70±0.26 ^b	228.50±5.35
MT	15.17±0.93 ^{ab}	7.67±0.37	5.57±0.28 ^b	234.53±6.76

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, ***p<0.001. ^{ab}Means in the same column are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); ME, malic enzyme; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; FAS, fatty acid synthase; PAP, phosphatidate phosphohydrolase.

표 2-27. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on Hepatic lipolytic enzyme C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	CPT (mmol/min/mg protein)	β -oxidation (mmol/min/mg protein)
ND	12.99 \pm 1.25	38.15 \pm 3.76
HFD	17.25 \pm 1.45 ^{*a}	17.23 \pm 1.51 ^{*b}
PL	13.13 \pm 0.94 ^b	20.28 \pm 1.18 ^{ab}
CJS	15.07 \pm 0.87 ^{ab}	21.41 \pm 1.50 ^{ab}
SJ	13.14 \pm 1.28 ^{ab}	17.61 \pm 2.24 ^b
MO	13.73 \pm 0.39 ^{ab}	20.69 \pm 2.14 ^{ab}
MT	15.46 \pm 1.11 ^{ab}	25.51 \pm 1.97 ^a

Data are mean \pm S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; * p <0.05. ^{abc}Means in the same column are significantly different among the high-fat diet fed groups at p <0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); CPT , carnitine palmitoyl transferase.

(12) 적혈구 및 간조직의 과산화물 생성량 비교

○ TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)로 측정된 적혈구 과산화 지질 수준은 HFD 군에서 가장 증가하였고, PL군과 SJ군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 나머지 3종의 후보소재 보충군에서는 HFD군보다 감소하는 경향을 보였음. 한편, 간조직의 과산화지질 수준은 실험군간 차이를 보이지 않았음 (표 2-28).

○ 미토콘드리아의 H₂O₂의 함량은 5종의 후보소재 보충군 모두 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음 (표 2-29).

Æ 2-28. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on erythrocyte and hepatic TBARS levels in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	TBARS (Erythrocyte) (nmol/mL)	TBARS (Liver) (nmol/g liver)
ND	3.33±0.19	14.81±1.83
HFD	3.42±0.17 ^a	13.24±0.76
PL	2.80±0.18 ^b	13.36±0.88
CJS	3.17±0.23 ^{ab}	14.23±0.37
SJ	2.83±0.20 ^b	13.17±0.46
MO	2.26±0.15 ^{ab}	13.60±1.36
MT	3.28±0.15 ^{ab}	13.71±1.17

^{ab}Means in the same column are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20%fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); TBARS, thiobarbituric acid reactive substance.

Æ 2-29. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on erythrocyte and hepatic H₂O₂ levels in C57BL/6J mice fed high-fat diet for 10 weeks

	H ₂ O ₂ (Erythrocyte) (nmol/mL)	H ₂ O ₂ (Mitochondria) (nmol/mg protein)
ND	5.28±0.10	3.03±0.46
HFD	5.67±0.35	3.96±0.56 ^a
PL	5.44±0.28	2.33±0.28 ^b
CJS	5.45±0.38	2.41±0.31 ^b
SJ	6.13±0.34	1.72±0.21 ^b
MO	5.42±0.17	1.72±0.20 ^b
MT	5.44±0.18	1.96±0.24 ^b

^{ab}Means in the same column are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.1% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); H₂O₂,hydrogen peroxide.

(13) 간조직의 항산화관련 바이오마커 변화에 미치는 영향

- 간조직의 catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) 및 glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성도 비교 결과는 그림 2-23과 같음.
- 간조직의 CAT 활성도는 MO군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 4종의 후보 소재 보충군은 감소 경향을 보였음. SOD 활성도는 HFD군에 비해 PL군이 유의적으로 낮았으며, MO군은 감소 경향을 보였음.
- GR 및 GSH-Px는 PL, MO 및 MT군이 HFD군에 비해 유의적으로 낮은 활성도를 나타내었음 (그림 2-24).

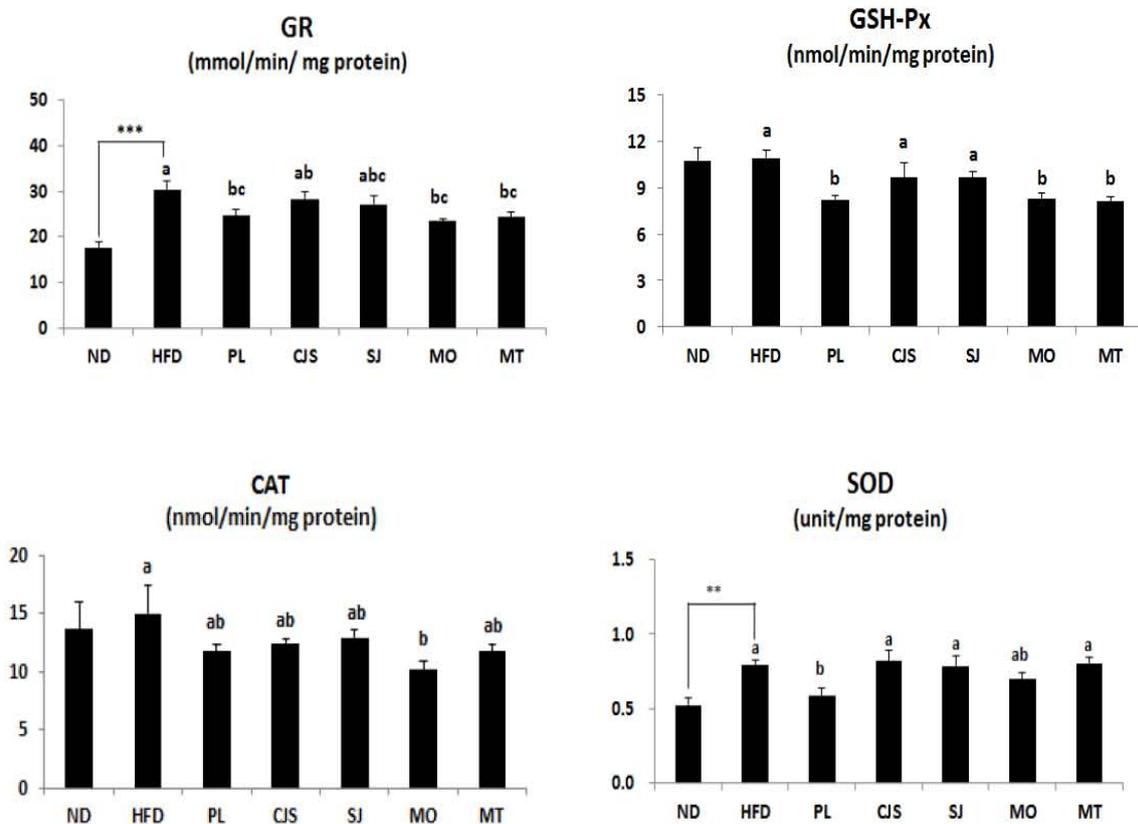


그림 2-24. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on hepatic antioxidant enzyme activities in C57BL/6J mice high-fat diet for 10 weeks

Data are mean±S.E. Significant differences between HFD versus ND are indicated; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. abCMean in the same column are significantly different among the high-fat diet fed groups at p<0.05. ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; GR, glutathione reductase; GSH-Px, glutathione peroxidase.

(14) 식이 보충이 동맥의 유전자 발현 변화에 미치는 영향 분석

○ **Thromboxane** 등의 합성에 관여하며, 염증반응 및 혈액응고에 영향을 미치는 **Cyclooxygenase-2 (COX-2)**는 군간 유의적 차이가 보이지 않았지만 하향 조절되는 경향이 관찰되었음.

○ **Serotonin transporter (SERT)**은 ND와 HFD군간 유의적 차이는 보였지만 실험군간 차이는 보이지 않았음. 또한, **Selectin-P (SELP)**의 군간 유의적 차이도 보이지 않음 (그림 2-25).

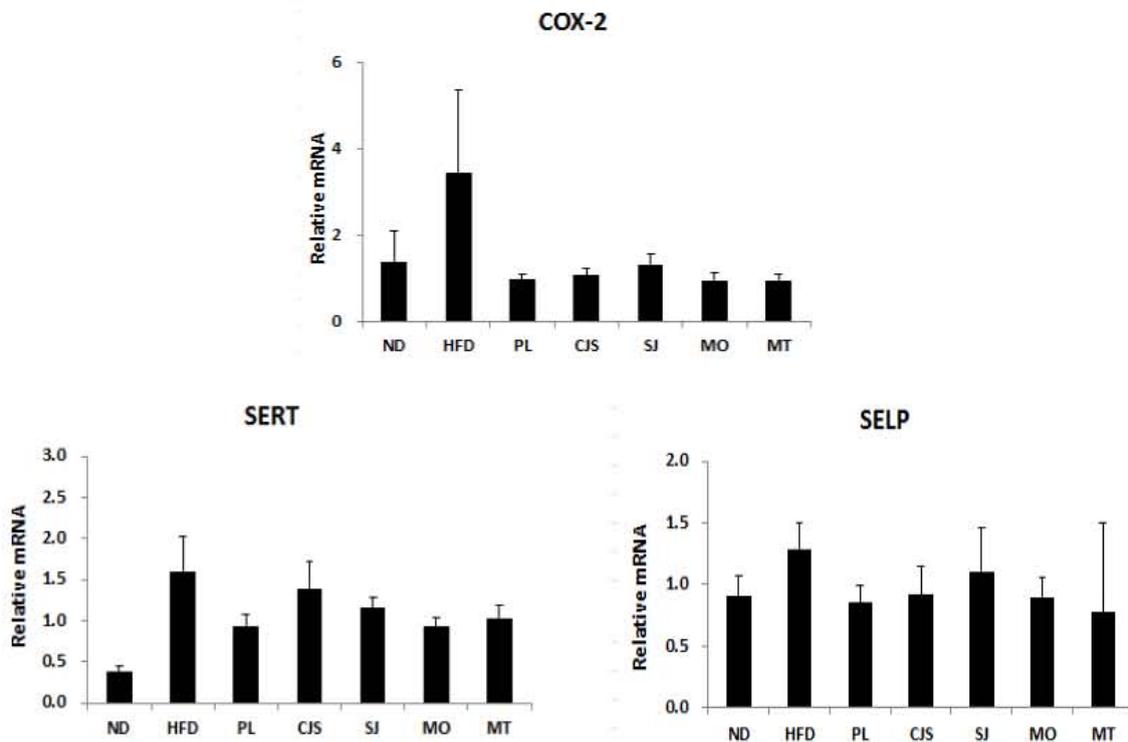


그림 2-25. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on aorta mRNA expression related to C57BL/6J mice high-fat diet for 10 weeks

ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); COX-2, cyclooxygenase-2; SERT:serotonin Transporter; SELP, selectin P.

(15) 식이 보충이 간조직의 유전자 발현 변화에 미치는 영향 분석

○ 콜레스테롤 합성 효소인 **HMG-CoA reductase**는 ND군에 비해 HFD군에서 유의적으로 증가하였으며, **MO**군만이 HFD군에 비해 유의적으로 하향 조절하였음. **ACAT**는 군간 유의적 차이가 나타나지 않았음.

○ 중성지질 및 인지질의 형성을 유도하는 **SREBP-1c**는 HFD 보충에 의해 유의적으로 증가하였으며, PL, CJS, SJ, MO 그리고 MT 모두에 의해 하향조절 되었음. PPAR γ 은 ND군과 HFD군 사이에 유의적 차이가 나타났지만, 5종의 유효소재 보충군과 HFD군에서는 유의적 차이가 나타나지 않았음 (그림 2-26).

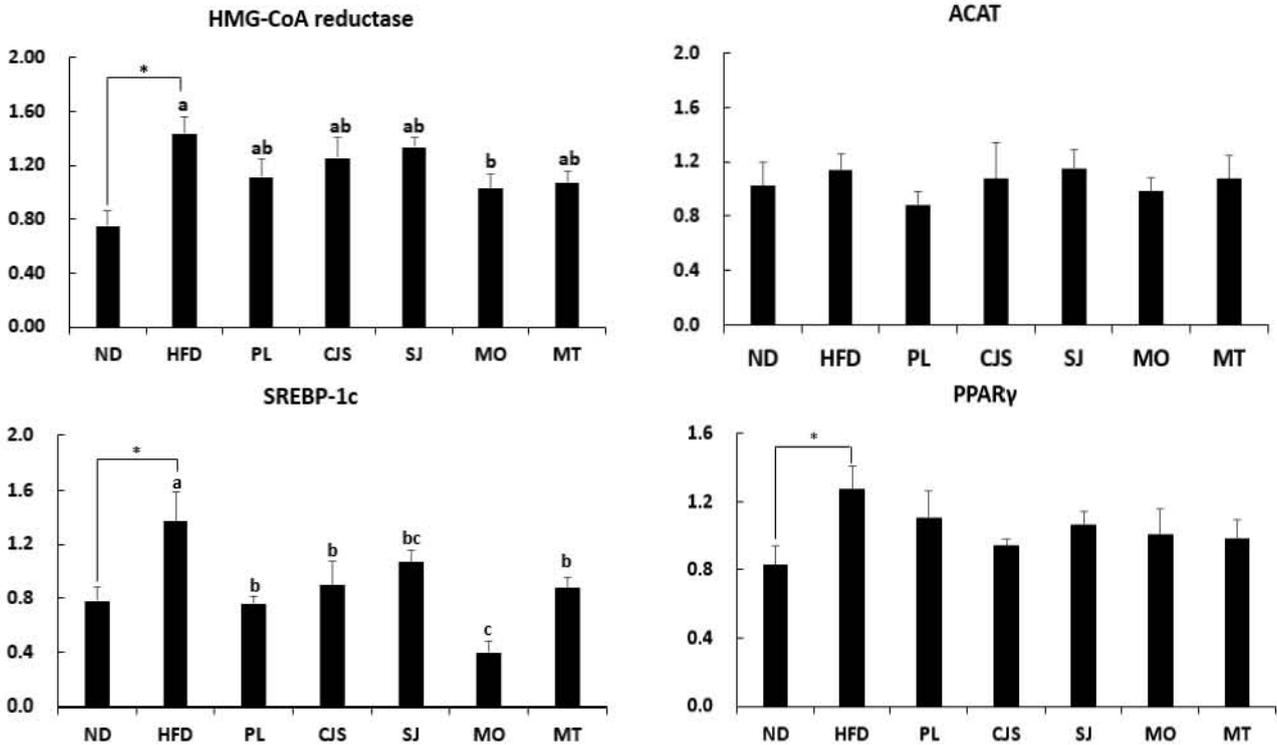


그림 2-26. Effect of dietary supplementation of PL, CJS, SJ, MO and MT on hepatic mRNA expression related to C57BL/6J mice high-fat diet for 10 weeks

ND, normal diet; HFD, high-fat diet (20% fat, 0.25% cholate, 1% cholesterol); PL, (HFD+0.5% Persimmon leaf); CJS, (HFD+0.5% Citrus junos sieb); SJ, (HFD+0.05% Sajabalssuk); MO, (HFD+0.5% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); MT, (HFD+0.3% Persimmon leaf+0.1% Citrus junos sieb); ACAT, acyl-CoA:cholesterolacyltransferase; SREBP-1c, sterol regulatory element bindings protein-1c; PPAR γ , peroxisome proliferator activated receptor γ .

5. 최종선정된 소재의 작용기작

○ 감잎 및 유자 복합물 섭취군은 내인성과 외인성 응고시스템인 aPTT와 PT에서 고지방 식이 대조군에 비해 혈장 응고 시간을 연장함. 혈장에서는 TC, non HDL-C 농도 그리고 동맥경화 지수를 나타내는 AI를 고지방 식이군에 비해 유의적으로 감소시킴. 또한 염증 관련 마커인 IL-6, PAI-1, insulin 농도를 감소시킴. 간조직에서 감잎 및 유자 복합물 섭취군은 유리지방산, 콜레스테롤을 감소시켰고, 이는 간조직 지방구 감소에 영향을 미침. 지질합성효소인 FAS를 감소시키고, 중성지질 및 인지질 합성 관련 전사 인자인 SREBP-1c, 콜레스테롤 합성에 관여하는

HMG-CoA reductase 유전자 발현 정도를 감소시킴. 또한 지질산화 농도를 감소시키고, 이는 CAT, GR, GSH-Px 의 효소활성도 감소에 영향을 미침. 인슐린 분비에 영향을 미치는 GIP, GLP-1 농도를 감소시킴. 결과적으로 감압 및 유자 복합물 섭취군은 혈행개선, 이상지질혈증, 항염증 및 혈당개선의 작용에 영향을 미쳤으며, 이는 더 나아가 동맥경화 및 심혈관 질환에 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료됨.

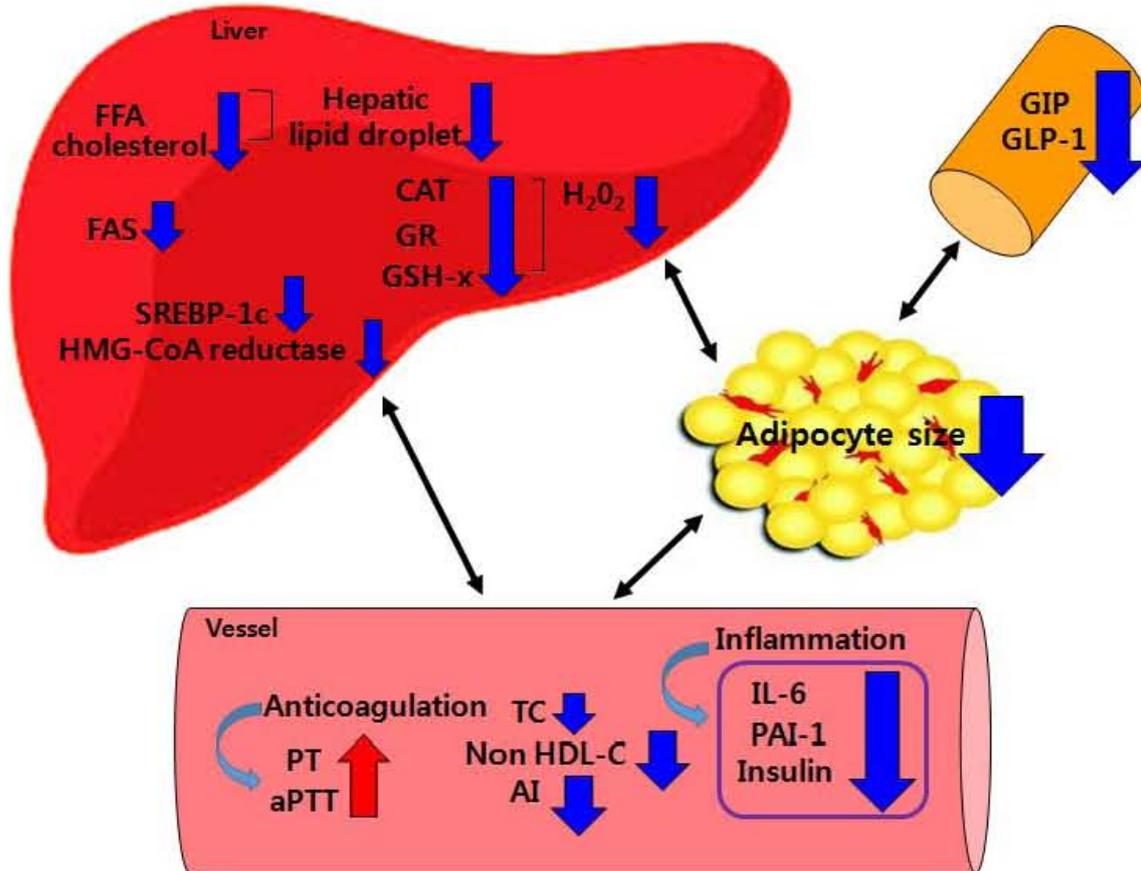


그림 2-27. Schematic of the proposed mechanism underlying the protective effect of MPC on blood circulation and lipid metabolism in the liver, WAT adipose tissue, vessel and intestine of HFD-fed mice.

FFA, free fatty acid; FAS, fatty acid synthase; TC, total cholesterol; SREBP-1c, sterol regulatory binding protein-1c; CAT, catalase; GR, glutathione reductase; GSH-Px, glutathione peroxidase, GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP-1, glucagon like peptide-1; PT, prothrombin time; aPTT, activated partial thromboplastin time; AI, atherogenic index; IL-6, interleukin-6; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1.

제 3 절 제2협동과제

: 최종 선정된 혈행 개선 건강기능소재의 인체적용시험을 통한 기능성 검증

1. 소재의 혈행개선 기능성 근거를 위한 자료수집

가. 약쑥, 유자, 감잎의 혈행개선 관련 임상연구 자료수집

- 약쑥, 유자, 감잎에 대한 인체적용시험 진행시 필요한 안전성 정보와 피험자 선정 및 제외 기준 마련을 위한 자료수집을 위해 국내 총 9개, 국외 1개의 데이터베이스를 검색
- 국내 임상연구자료 데이터베이스: 한국학술정보(KISS, kiss.kstudy.com), 누리미디어 (DBPIA, www.dbpia.co.kr), 학술교육원 (E-article, www.earticle.net), 교보문고 (Scholar, scholar.dkyobobook.co.kr), 학지사뉴논문 (newnonmun.com), 과학기술학회마을(KISTI, society.kisti.re.kr), 학술연구정보서비스 (RISS, www.riss.kr), NDSL (www.ndsl.kr), OASIS 전통의학정보포털 (oasis.kiom.re.kr)에서 주요 검색어를 '사자발약쑥', '약쑥', '유자', '감잎', '임상연구', '인체시험', '혈행개선', '고지혈증', '항산화', '항응고', '건강기능'으로 함
- 국외 임상연구자료 데이터베이스: PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)에서 주요검색어를 'Artemisia princeps Pampanini, Citrus junos Sieb', 'Persimmon leaves', 'clinical study', 'antithrombotic', 'antiplatelet', 'antilipidemic'으로 함

나. 소재 관련 자료 검색 결과

- 10개의 국내외 데이터베이스를 검색한 결과 대부분 약쑥, 유자, 감잎의 항고지혈 효과 및 항산화효과에 대한 동물실험연구에 그치며, 약쑥은 항당뇨 효능에 대한 임상연구가 있고, 혈행개선 관련 임상연구는 없음. 또한 약쑥, 유자, 감잎 소재에 대한 연구 중 감잎의 항산화 및 항고지혈 효과에 대한 연구가 가장 많은 것으로 나타났음. 대표적 연구를 요약하면 다음과 같음.

(1) 「Randomized controlled Trial of Sajabalssuk (Artemisia princeps Pampanini) to treat pre-diabetes」 *European Journal of Integrative Medicine* 4 (2012) e299-e308

- 내당능장애 및 초기 당뇨병 환자를 대상으로 강화약쑥 추출물의 용량별 당뇨개선 효과를 검증한 연구로 총 80명을 음성대조군 (placebo, starch, 2000mg/day, 20명), 양성대조군 (Pinitol, 1140mg/day, 20명), 강화약쑥 저용량군 (사자발약쑥 에탄올추출물, 2000mg/day, 20명), 강화약쑥 고용량군 (사자발약쑥 에탄올추출물, 4000mg/day, 20명)의 4개 군으로 나누어 8주간 복용하여 실험전후 공복혈액을 채취하여 혈당 및 혈중 지질농도를 측정하였다. 공복혈당 농도는 8주 후 강화약쑥 고용량군에서만 유의한 감소를 나타내었고 혈중 중성지방 농도 또한 강화약쑥 고용량군에서만 유의하게 감소하였다. 따라서 내당능장애 및 당뇨병 환자에게 강화약

썩 에탄올 추출물 고용량을 보충한 결과 가장 높은 혈당 및 혈중 중성지방 저하효과를 확인할 수 있었다.

(2) 「Anti-platelet effects of yuzu extract and its component」 *Food and Chemical Toxicology* 49(12), 3018-3024 (2011)

○ 유자 메탄올추출물과 유자의 구성성분 중 hesperidin, naringin의 항혈소판응집 효과에 대한 연구로 유자 메탄올추출물과 hesperidin이 collagen-, arachidonic acid-, ADP-, thrombin-induced platelet aggregation을 억제시키는 효과가 있으며, naringin 또한 collagen-, arachidonic acid-, thrombin-induced platelet aggregation을 억제하는 효과가 있어 심혈관질환 치료제의 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

(3) 「Anticoagulating Activity of Persimmon and Its Processed Foods」 *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(5), 949-953 (2001)

○ 단감에서 고혈압, 동맥경화를 완화시키는데 관여할 수 있는 항응고물질을 사람의 혈장을 thrombin에 의해 응고를 유도시키는 assay에 의해 검출하고 이것을 감의 계절별, 품종별, 감가 공식품에서 농도를 측정했다. 사람의 plasma에서 thrombin time(TT)을 사용한 항응고활성을 측정하면 감속, 감잎, 감꼭지에서 높은 농도로 발견되었으며, 11월 수확한 것이 항응고활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 감을 이용한 가공식품의 경우 생과실에 비해 항응고활성이 56-260 배 정도로 크게 저하된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 감의 항응고활성 효과로 혈행개선 효과가 있는 것으로 나타났으나 감을 이용한 가공식품 제조할 경우 항응고활성을 저해하는 인자를 초기에 불활성화시키는 방법적 연구가 필요함을 확인할 수 있었다.

다. 국내외 혈행개선 관련 임상연구 자료 및 평가지표 검색 결과

○ 혈행개선 인체시험디자인 및 평가지표 참고를 위해 10개의 국내외 데이터베이스를 검색한 결과 기능성 효과 검증을 위한 인체시험 연구보고가 드물었음.

(1) 「Effect of Onion Peel Extracts on Blood Circulation in Male Smokers」 *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39(12), 1790-1799 (2010)

○ 흡연하는 남성을 대상으로 양파껍질추출물 캡슐(0.25g/capsule)의 섭취가 항혈액응고, 항혈전 체계에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 양파껍질추출물캡슐군 49명과 위약캡슐군 43명으로 하루 4캡슐씩 10주간 섭취시킨 후 RBC, WBC, Hb, platelet, MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV, HCT와 PT, aPTT를 측정하였다. 연구 결과 별도의 식생활 변화 없이 본 시료 섭취만으로 혈액응고시간을 유의적으로 지연시켜 혈관계 질환에의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

(2) 「Effect of Korean Red Ginseng Extract on Blood Circulation in Healthy Volunteers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trail」 J. Ginseng Res. 31(2):109-116 (2007)

○ 건강한 사람에서 홍삼농축액 복용 전후의 혈행개선 효과를 확인하기 위하여 시험군 2군 (저농도 및 고농도)과 위약대조군 1군으로 나누어 이중맹검 및 무작위 배정하고, 8주간 홍삼농축액을 투여하였다. 측정항목은 혈행 관련지표 (ADP-induced platelet aggregation test, collagen-induced platelet aggregation test, PT, aPTT), 지질관련지표 (total cholesterol, LDL, HDL, triglyceride) 및 혈액학 및 혈액생화학적 지표 (WBC, RBC, HCT, Hb, PLT, BUN, AST, ALT, Creatinine)을 측정하였다. 그 결과 홍삼농축액 저농도 및 고농도 투여군에서 유의하게 혈소판 응집 반응을 저해하고 지질수치를 개선시켜 혈행개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 확인할 수 있었다.

2. 인체적용시험을 위한 연구계획서 작성

가. 동물실험결과에 근거한 시험식품 확정

○ 1차, 2차 동물실험 분석결과를 바탕으로 시험식품 (감잎추출물 1.0g/day + 유자추출물 0.2g/day)와 대조식품으로 무작위배정, 1일 2회, 1회당 3캡슐 복용하는 것으로 함. 기간은 8주, 대상자 선정 및 제외기준 등 확정

1) 시험용 식품의 개요

○ 시험식품은 감잎·유자복합분말을 포함하는 식품이며, 대조식품은 감잎·유자복합분말 대신 말토덱스트린을 포함함.

항목	시험식품		대조식품	
유효성분	감잎·유자복합분말		없음	
성분 및 함량 (1캡슐당)	감잎·유자복합분말	200.0 mg	감잎·유자복합분말	0.0 mg
	말토덱스트린	116.8 mg	말토덱스트린	316.8 mg
	스테아린산마그네슘	3.2 mg	스테아린산마그네슘	3.2 mg
	계	320.0 mg	계	320.0 mg
제형	미황색 하드캡슐			

	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>시험식품 (감잎·유자복합분말)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>대조식품</p>  </div> </div>
복용방법	1일 2회, 1회당 3캡슐씩 아침, 저녁 식후 30분경에 충분한 물과 함께 복용
포장단위	1병 192캡슐(28일+4일분), 피험자 당 2병 제공
저장방법	기밀용기, 실온보관
유효기간	2015년 4월

2) 식품의 복용방법

○ 복용량, 복용방법, 복용기간

• 복용량

시험식품 : CJ감잎유자복합분말 1.2g/day

(감잎추출물 분말 1.0g/day, 유자추출물 분말 0.2g/day)

대조식품 : 말토덱스트린 1.2g/day

• 복용방법 : 1일 2회, 1회당 3캡슐(200mg/캡슐)씩을 아침, 저녁 식후 30분경에 충분한 양의 물과 함께 복용한다.

• 복용 기간 : 8주

○ 시험식품 복용량 설정 근거

• 시험식품의 복용량은 의뢰자가 제공한 사전 연구자료를 근거로 제안되었다.

• 동물실험에서 감잎 추출물은 0.3~0.5%, 유자추출물은 0.1~0.5% 범위로 투여한 시험군에서 지질대사 및 혈행 개선능이 있을 것으로 추정되었다. 실험에 사용된 마우스와 랫드의 시험종료 시점에서의 체중과 사료섭취량으로부터 구한 투여용량은 감잎추출물은 0.18~0.52g/kg BW/day였으며, 유자추출물은 0.1~0.18g/kg BW/day였다.

• 사전 동물실험에서 구한 감잎추출물과 유자추출물의 투여용량 결과를 MRSD (Maximum Recommended Starting Dose, 최대추천초기용량) 설정에 관한 FDA 가이드라인(참고문헌)과 Reagan-Show⁽¹⁹⁾가 제시한 체표면적 표준화법(body surface area normalization method)에 적용하여 추정한 Human Equivalent Dose(HED)는 0.5% 감잎추출물이 2.23~2.85g/day,

0.1% 유자추출물이 0.45~0.55g/day로 본 시험에서 설정된 용량(감잎추출물 1g/day, 유자추출물 0.2g/day)이 타당한 것으로 간주된다.

나. 혈행개선 유효성 평가지표 설정

표 3-3. 혈행개선 유효성 평가지표 항목

구분	세부 검사항목
혈액학적 검사	RBC, WBC (Differential count), Hemoglobin, Hematocrit, Platelet
혈액생화학 검사	GOT, GPT, Total protein, Albumin, Bilirubin, ALP, BUN, Creatinine, TG, Glucose, Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol
뇨검사	Protein, Glucose, Occult blood, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, RBC, WBC
혈액응고검사	PT, aPTT
기타검사	적외선체열검사, 적혈구 변형능, 임계응력 및 응집능 검사

1) 관찰항목 및 검사방법

○ 방문일정

방문날짜는 정해진 방문 기준일±3일을 허용한다. 시험참여자가 피험자로 선정된 경우 기초평가일(선정검사일)로부터 14일 이내에 시험용 제품을 수령, 복용을 개시함을 원칙으로 한다.

○ 피험자 기초정보

피험자의 이니셜, 연령, 성별, 생년월일, 체중, 신장 등 인구통계적 자료와 과거병력, 투약력, 병용치료, 병용약물, 흡연, 음주, 운동습관 등 피험자 기초정보를 자세하게 기록한다.

과거 병력 및 투약력은 최근 3년 이내의 내용을 기록한다.

운동과 음주의 조사는 11-4항의 내용에 따라 조사하며, 음주는 1주일 평균 음주량을 알코올 gram수로 환산하여 기록하고 식이는 기초평가일에 조사한 식이와 비교하여 중요한 식습관의 변화가 있는지 여부를 기록한다.

○ 체중후 및 비만도

혈압, 체온, 맥박을 측정하여 기록한다. 비만도는 BMI, 체지방율, Waist-Hip Ratio를 기록한다. 비만도는 체지방측정기 (Inbody 3.0, Biospace, Korea)를 활용하여 측정한다.

○ 임상실험실 검사

실험실적 검사를 실시하여 피험자의 전신적인 건강상태를 평가한다. 검체 채취는 정확한 검진결과를 위하여 공복상태에서 이루어지도록 한다. 검사 항목은 다음 표와 같다.

2) 적외선체열검사

- 적외선체열검사는 적외선체열진단기(IRIS-XP, Medcore, Korea)를 사용하여 측정한다. 검사실은 외부로부터 빛과 열이 차단되고 습도가 낮으며 실내기류가 일정하고 22~25℃의 항온상태를 유지하도록 한다. 피험자는 체표온도의 적응을 위하여 검사실 내에서 15~20분 간 휴식을 취한다. 검사 전날의 음주를 금하며, 검사 2시간 전까지의 흡연, 카페인 음료섭취는 피한다.
- 체표 온도는 상지에서 전상완 중심부의 협백혈(LU4)과 수장부위인 노궁혈(PC8)의 온도차이($\Delta T_{LU4-PC8}$)를 기록하며, 하지에서는 전대퇴 중심부의 복토혈(ST32)과 족배부 전면의 태충혈(LR3)의 온도차이($\Delta T_{ST32-LR3}$)를 기록한다. 상지와 하지의 온도차이는 좌측과 우측의 온도차이의 평균값을 평가값으로 한다. 또한 계절적 요인 등의 외부인자에 의한 간섭을 배제할 수 있는 복부(중완(CV12))와 얼굴(권료(SH18))의 온도차이($\Delta T_{CV12-SH18}$)를 기록한다.
- 적외선체열검사는 냉증의 진단 및 평가에서 임상에서 유용하게 사용되고 있는 진단 방법으로 인체에서 자연적으로 방출되는 눈에 보이지 않는 적외선을 촬영하여 통증부위나 질병부위의 미세한 체열변화를 컴퓨터를 이용해 천연색 영상으로 표현하여 신체의 이상을 진단하는 방법으로 팔초혈액순환을 평가할 수 있는 검사이다.

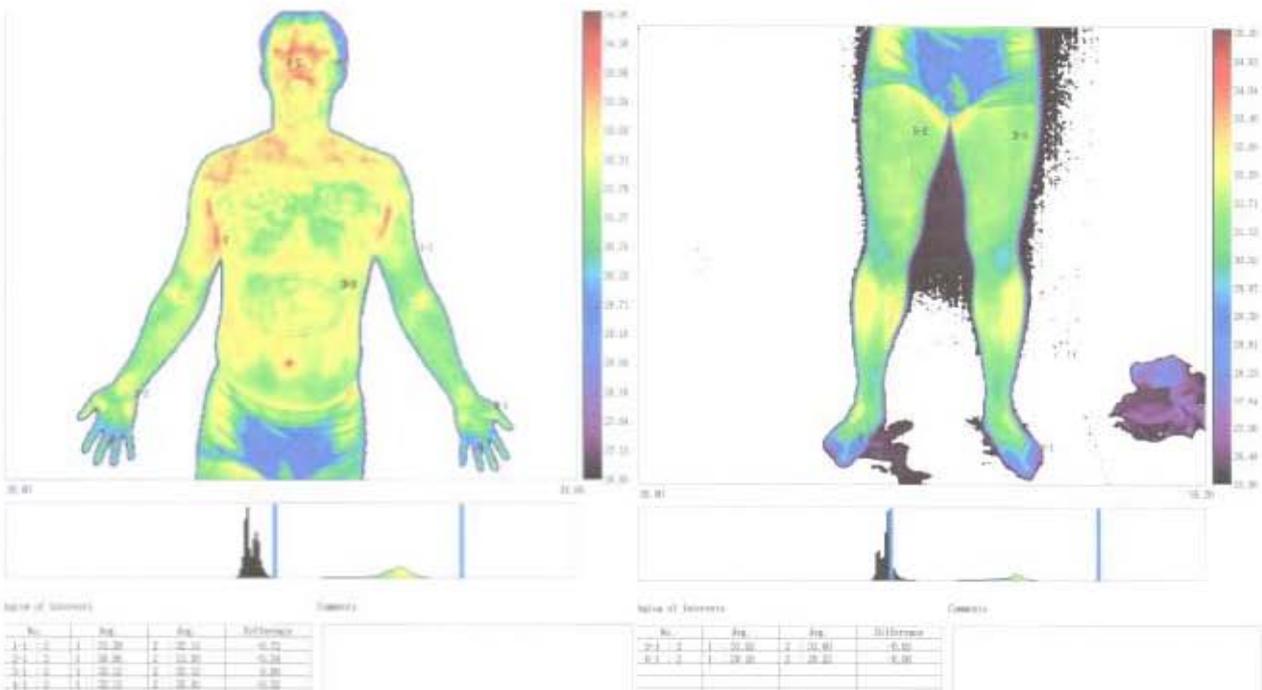


그림 3-1 적외선 체열검사지

3) 적혈구 변형능, 임계능력 및 응집능 검사

○ 적혈구 변형능 검사는 **RheoScan-D Plus(Rheo Meditech, Seoul, Korea)**를 사용하여 측정한다. 적혈구 변형능의 측정값은 적혈구 최대 변형성을 의미하는 **EI_{max}**, 적혈구 최대 변형성의 절반을 변형시키는데 소요되는 힘인 **SS_{1/2}**을 기록하고, 혈액임계응력의 측정값은 혈구들의 응집응력을 버티지 못한 최초 **AU**값인 **critical time(sec)**와 **critical shear stress(mPa)**을 기록하며, 적혈구 응집능의 측정값은 적혈구 응집성 지수(**AI**)와 처음 10초 동안의 응집성 지수의 절반값인 **T_{1/2}**를 기록한다.

○ 이 검사는 레이저 회절 방식을 이용한 장비로 지름이 **6-8 μ m** 정도인 적혈구가 **3-5 μ m** 직경의 모세혈관을 통과하기 위해 모양을 적응시키는 것을 관찰하며 이러한 변형능이 저하되거나 임계능력이 저하되고 응집능이 강해지면 혈액의 점도가 증가되고 유동성이 감소되어 미세혈류 순환장애를 나타낸다고 봄.

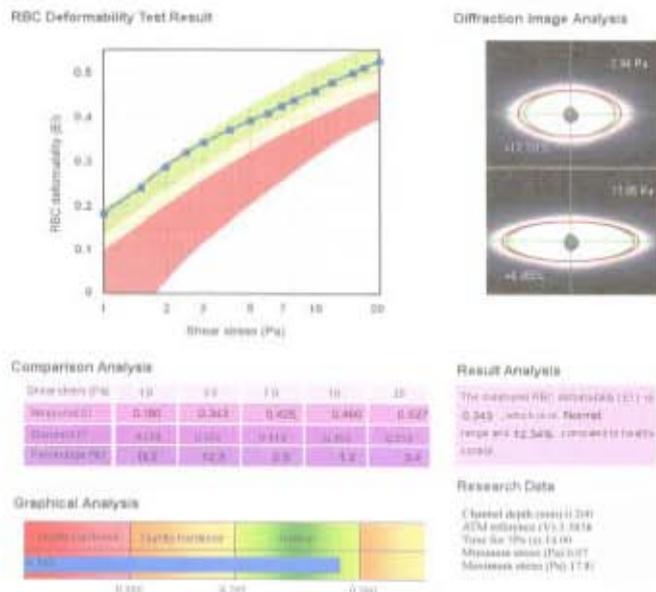
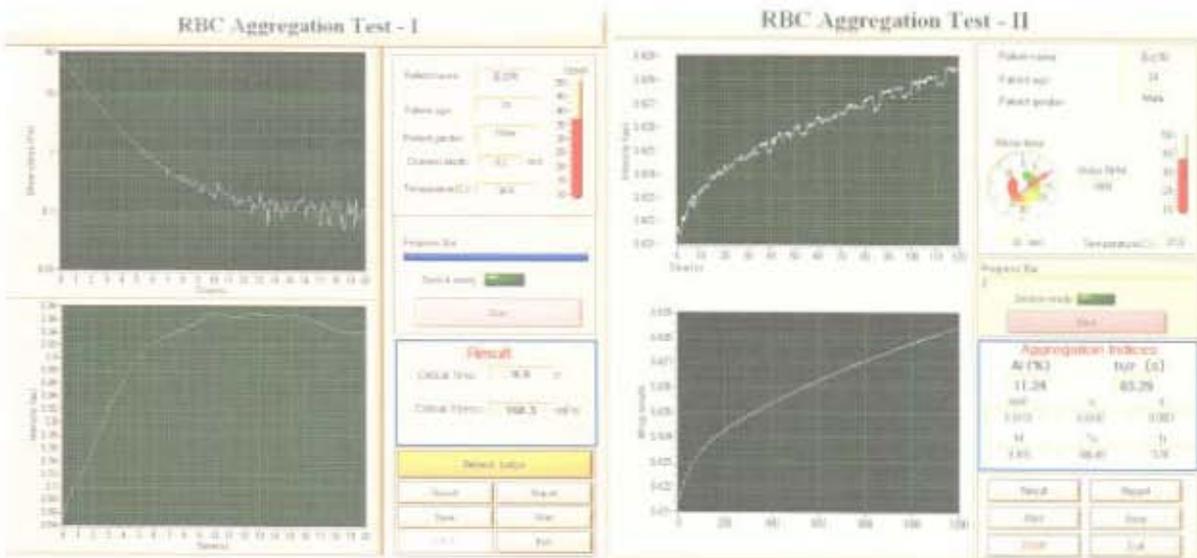


그림 3-2. 적혈구 변형능, 임계능력 및 응집능 검사지

4) 관찰일정 및 관찰항목

확인/평가항목	방문일	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4
	Screening 기초평가	제품제공	전화방문	시험종료 최종평가	
	-14일~0일	0일	28일±3일	56일±3일	
피험자 동의서	○				
인구학적 조사	○				
병력/약물투여력 조사	○				
활력징후검사 ⁶⁾	○			○	
체성분검사	○			○	
선정/제외기준 검토	○				
임신반응검사	○				
갑상선호르몬검사	○				
임상실험실 검사 ⁷⁾	○			○	
뇨검사	○			○	
혈액응고검사	○			○	
기타검사	○			○	
설문지 작성		○		○	
시험용 식품 제공		○			
시험제품 사용일지 제공		○			
이상반응 모니터링		○	○	○	
병용약물 체크	○	○	○	○	
순응도 조사			○	○	

※ 피험자가 동의서에 서명한 후에 본 인체적용시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

6) 활력징후 검사 : 체온, 혈압, 맥박

7) 임상실험실 검사 : RBC, WBC(Differential count), Hemoglobin, Hematocrit, Platelet, GOT, GPT, Total protein, Albumin, Bilirubin, ALP, BUN, Creatinine, TG, Glucose, Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

뇨검사 : Protein, Glucose, Occult blood, Ketone, Bilirubin, Urobilinogen, RBC, WBC

혈액응고검사 : PT, aPTT

기타검사 : 적외선체열검사(DITI), 적혈구 변형능, 임계응력 및 응집능 검사

5) 유효성 평가

○ 유효성 평가 기준

- 1차 유효성 평가 변수 : PT, aPTT
- 2차 유효성 평가 변수 : T-Chol, HDL-C, LDL-C, TG

○ 분석대상군

본 시험의 피험자로부터 얻어지는 자료분석 대상군(Analysis sets)은 크게 ITT군(intent-to-treat group, 처리의향 분석군)과 PP군(per protocol group, 계획서 순응 피험자군)으로 구성된다. 유효성 평가에 대한 자료는 ITT군을 주 분석대상으로 하고, PP군을 추가적으로 분석하여 유효성을 평가한다.

- ITT군은 시험용 제품을 복용하고, 방문1을 포함하여 최소한 1회 이상 평가변수에 대한 측정이 이루어진 피험자를 대상으로 한다.
- PP군은 ITT군에 포함되는 피험자 중 인체시험계획서에 따라 시험을 종료한 피험자를 대상으로 한다.

○ 통계분석방법

본시험에서 시험기기의 유효성 평가를 위한 통계분석은 「임상시험 통계지침(KFDA, 2002)」⁽²³⁾에 근거하며, 이용되는 통계패키지는 SPSS Ver. 21.0이다. 통계적 유의성을 위해 유의수준은 5%로 설정(즉 p -값 <0.05 이면 통계적으로 유의)하고 아래 방법에 의거, 분석한다.

• 사전 동질성 검정

시험용 제품 복용 전의 각 그룹의 동질성을 확보하기 위하여 성별과 같은 범주형 변수의 기초평가값은 카이제곱 검정(Chi-square test)을 실시한다. 카이제곱 검정의 가정 검토를 실시하여 기대빈도가 5보다 작은 셀이 25% 이상인 경우 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)으로 검정한다. 연령과 같은 연속형 변수의 동질성 검정은 independent t-test를 이용한다.

• 효과검정

시험식품의 유효성 평가를 위하여 1차 및 2차 유효성평가 변수는 연속형 변수이므로 사전과 사후의 평균(mean)을 평가함을 원칙으로 하며, 식품 복용 전후의 평가값에 대하여 정규성 여부를 검정하여 정규성을 만족하면 모수적 방법인 대응표본 T-검정 (Two sample T-test)을, 정규성을 만족하지 않는 경우는 비모수적 방법인 Wilcoxon rank sum test를 선택한다.

각 평가값의 사전 동질성 검정에서 동질하지 않게 나타난 항목은 공변량(covariate)으로 보정하여 동질하지 않은 항목의 효과를 제외하는 Repeated Measure ANCOVA를 실시한다.

• 결측치의 분석

ITT분석을 위해 최종 유효성 평가 자료가 결측된 경우, MLE (Maximum Likelihood

Estimation)법인 EM (Expectation & Maximization) 방법을 이용하여 결측값을 대체한다⁽²⁴⁾.

6) 안전성 평가

○ 평가대상군

인체적용시험에 사용되는 식품을 한번이라도 복용하고, 이후 적어도 한번 이상 방문하여 이상반응이나 생체 징후값 또는 임상검사 결과치의 변화 등의 안전성 자료를 평가할 수 있는 피험자를 안전성 평가대상으로 한다.

○ 평가항목

- 예측되는 부작용
- 이상반응 및 이상약물반응
- 임상검사 결과치의 비정상적인 변화
- 생체징후

다. 피험자 선정 및 제외기준 확정

- 피험자 선정 및 제외기준 확정
- 인체적용시험 protocol 및 CRF 작성
- 혈행개선 평가 도구로서 적혈구의 **critical stress test, deformability test, aggregation test** 등 객관적 평가를 위한 연구용장비 구입 및 CRF 작성을 위한 SOP교육
- 시험제품 복용 전후 설문지 작성

1) 피험자(Subject)

○ 대상자

적극적인 치료가 필요한 질환이 없고, BMI 25kg/m²이상~30kg/m²미만의 범위에 속하는 성인

○ 선정기준

대상 피험자는 아래의 기준에 적합해야 한다.

- 만 20~65세인 성인
- BMI 25kg/m²이상~30kg/m²미만의 범위에 속하는 자
- 연구의 목적, 내용 등에 관하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 인체시험 참여동의서에 서명한 자

○ 제외기준

다음 사항에 해당하는 피험자는 본 시험에서 제외된다.

- 조절되지 않는 당뇨 및 고혈압이 있는 자(무작위혈당 200mg/dL, 수축기혈압 140mmHg 또는 이완기혈압 90mmHg이상인 자)
- Total Cholesterol 250mg/dL이상, LDL-C 160mg/dL 이상 또는 TG 500mg/dL이상인 자
- 갑상선 호르몬 수치가 정상범위를 벗어난 자
- 임신 또는 수유중인 여성
- 효과판정에 영향을 줄 수 있는 약제(고지혈증약, 혈액순환개선제, 항응고제, 혈소판응집 억제제, 스테로이드제, 호르몬제 등)을 지속적으로 사용해야 하는 자
- 기타 내분비계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 자
- 거식증, 우울증, 조울증, 정신과 질환 등으로 지속적인 치료가 필요한 자
- 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는 자

○ 피험자수

- 최소 유효성 분석 가능 피험자수 : 군당 각 20명 (전체 40명)
- 피험자 배정인원(20% 탈락률 고려) : 군당 각 25명 (전체 50명)

○ 피험자수 산출 근거

- 본 연구에서는 혈액응고시간 관련 항목인 PT, aPTT 및 혈중 지질대사 관련 항목인 total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol을 biomarker로 정하였고, 감잎유자복합분말의 효과검정을 위한 연구가설은 아래와 같이 설정하였다.

연구가설 :

감잎유자복합분말을 복용한 시험군의 평가지표의 변화는 위제품을 복용한 대조군의 증가 또는 감소보다 크다 (우월성 검정, positive one-tail test).

귀무가설 $H_0 : \alpha_i = 0$

대립가설 $H_1 : \alpha_i \neq 0$

- 의뢰기관이 제공한 사전연구결과에서 시험제품과 동일한 배합비인 감잎과 유자추출물을 각각 0.5%, 0.1% 포함하는 복합분말을 투여한 마우스 MO군과 감잎추출물 0.5% 혼합사료를 투여한 랫드 PL군에서 Placebo군과 유의한 차이를 보였던 PT, aPTT, total cholesterol, LDL cholesterol 측정값에 대한 결과가 포함되어 있는 신경섭 등의 홍삼농축액의 혈행개선 효과에 관한 논문 및 김정미의 양파껍질 추출물의 혈행개선에 관한 임상연구결과를 피험자 수를 산출하기 위한 자료로 활용하였다.

표 3-1. 피험자수 산출 근거

신경섬		Test Group(n=29)		Placebo Group(n=29)	
		Before	After	Before	After
PT	LD군	10.72±0.71	10.47±0.49	10.44±0.90	10.52±0.52
	HD군	10.66±0.69	10.57±0.46		
aPTT	LD군	29.04±3.88	27.76±2.58	27.96±3.42	27.68±2.47
	HD군	28.83±4.07	28.37±2.83		
Total-C	LD군	192.17±23.35	190.66±25.53	202.45±24.35	198.62±24.05
	HD군	206.31±22.09	207.14±28.47		
HDL-C	LD군	57.55±13.20	58.90±13.92	57.76±12.69	61.31±13.59
	HD군	53.86±10.97	53.90±10.90		
LDL-C	LD군	116.03±22.95	111.66±27.51	125.62±23.96	120.86±20.22
	HD군	134.03±21.48	133.69±27.84		

검정미	Test Group(n=21)		Placebo Group(n=23)	
	Before	After	Before	After
HDL-C	42.0±1.3	49.8±1.5	44.3±1.2	47.1±1.4

- 각 **biomarker**의 효과크기는 다음 계산식과 시험군과 대조군의 평균의 차이와 통합표준 편차를 이용하여 구하였다.

$$ES = \frac{\bar{X}_e - \bar{X}_c}{s_{pooled}}$$

단, $s_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_e - 1)s_e^2 + (n_c - 1)s_c^2}{n_e + n_c - 2}}$

\bar{X}_e : 시험군의 평균, \bar{X}_c : 대조군의 평균, n_e : 시험군의 표본 수
 n_c : 대조군의 표본 수, s_e : 시험군의 표준편차, s_c : 대조군의 표준편차

- 표본크기는 **G*Power 3.1.5** 를 이용하여 계산하였으며, 유의수준 **0.05**, 통계적 검정력은 **0.8**로 설정하였으며, **2회** 반복 측정하였을 때 시험군 당 피험자 수와 탈락률 **20%**를 고려한 모집 예상 피험자 수는 다음과 같았다.

표 3-2. 예상 피험자수 산출 근거

신경섭		효과크기	시험군 당 피험자수	시험군 당 피험자수 (달라볼 고려)
PT	LD군	.099	102	128
	HD군	.102	96	120
aPTT	LD군	.032	960	1200
	HD군	.260	16	20
Total-C	LD군	.321	11	14
	HD군	.323	11	14
HDL-C	LD군	.175	34	43
	HD군	.602	4	5
LDL-C	LD군	.381	8	10
	HD군	.527	5	7
김정미		효과크기	시험군 당 피험자수	시험군 당 피험자수 (달라볼 고려)
HDL-C		1.864	3	5

- 본 연구의 1차 평가변수인 PT는 랫드 감염투여군과 마우스 감염유자복합투여군의 2개 시험군에서 긍정적이고 일관성 있는 변화 경향을 보인 반면, aPTT는 랫드 감염투여군, 유자투여군, 마우스 감염투여군, 감염유자복합투여군의 4개 시험군에서 긍정적이고 일관성 있는 변화 경향을 보여 혈행개선 기능성을 평가하는 근거로는 PT보다 aPTT가 더 적합한 것으로 사료되었다.
- 2차 평가변수인 TG, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 중에서는 총 콜레스테롤이 5개 시험군에서, LDL-콜레스테롤이 6개 시험군에서 모두 긍정적이고 일관성 있는 변화 변화의 경향을 보여 이 2개 항목이 시험제품의 기능성을 평가하기에 적합할 것으로 사료되었다.
- 따라서 피험자수 산출을 위한 항목으로는 aPTT, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤에 대한 자료를 참고하였고, 본 연구의 예산을 고려하여 최소 유효성 평가 인원을 20명으로 정하였다.

라. 시험 디자인

1) 인체시험 디자인 요약

방문 1 Screening 방문 기초평가	방문 2 시험용 식품 제공	방문 3 전화방문	방문 4 8주후 방문 최종평가
	시험식품 사용기간 (사용기간 56±3일)		
	대조식품 사용기간 (사용기간 56±3일)		
-14일~0일	0일		56±3일

- 본 시험은 감잎유자복합분말 함유 식품의 혈행개선 효과에 대한 신뢰성 있는 평가자료를 확보하기 위하여 감잎유자복합분말을 복용하는 시험군과 유효성분이 함유되지 않은 위제품을 복용하는 대조군의 식품 복용 전후의 검사결과를 비교하는 병행 설계 디자인의 예비인체 적용시험이다.

본 시험은 이중맹검, 무작위배정, 대조식품 비교, 단일기관 인체적용시험으로 실시한다.

3. 인체적용시험 수행

가. 인체적용시험을 위한 임상시험윤리위원회의 승인 획득

- 임상시험윤리위원회 심의 신청 및 승인 획득

4. 인체적용시험 결과

4-1. 참여자 정보

자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 58명을 대상으로 스크리닝 검사를 진행하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 51명을 참여자로 선정하였고, 시험군 25명, 대조군 26명이 각각 배정되었다.

시험군은 남성 18명, 여성 7명, 대조군은 남성 14명, 여성 12명으로 구성되었으며, 군별 평균 연령은 시험군 42.07±8.56세, 대조군 46.62±8.18세였다.

표 3-3. 참여자 성별의 기초통계량(빈도수, %)

Group		남성		여성		전체	
ITT	시험군	18	35.3	7	13.7	25	49.0
	대조군	14	27.5	12	23.5	26	51.0
	전체	32	62.8	19	37.2	51	100.0
PP	시험군	15	36.6	6	14.6	21	51.2
	대조군	12	29.3	8	19.5	20	48.8
	전체	27	65.9	14	34.1	41	100.0

표 3-4. 참여자 연령의 기초통계량

Group		평균	표준편차	최대값	최소값
ITT	시험군	35.6	11.23	62	24
	대조군	41.3	10.59	63	24
PP	시험군	34.6	9.58	55	24
	대조군	41.7	9.19	60	28

4-2. 참여자의 흡연, 운동, 음주 및 식이

ITT군을 기준으로 방문 1에서 각 참여자의 흡연과 운동에 관하여 조사한 결과, 51명의 참여자 중 시험군 5명, 대조군 8명이 흡연자였으며, 규칙적으로 운동을 하는 참여자 수는 시험군 12명, 대조군 9명이었다. 시험 종료 시점에서 흡연을 하는 참여자 수의 변화는 없었으나 규칙적으로 운동을 하는 참여자 수는 시험군에서는 2명이 감소하였고, 대조군에서는 3명이 증가하였다.

PP군에서는 방문 1에서 흡연을 하는 피험자는 시험군 4명, 대조군 8명이었으며, 시험 종료 시점에서는 시험군 5명, 대조군 8명으로 시험군의 흡연자 수가 1명 증가하였다.

방문 1에서 규칙적으로 운동을 하는 피험자 수는 시험군 9명, 대조군 6명이었으나, 방문 4에서는 시험군의 운동을 하는 피험자 수는 변화가 없었으나 대조군은 6명에서 12명으로 증가한 것을 나타냈다.

음주에 관해서는 방문 1에서 평소의 음주 여부와 시험참여 직전 1주일간의 평균 음주량을 조사하였고, 시험기간 동안 각 참여자가 작성한 제품 사용/복용일지를 근거로 시험기간 동안의 1주일 평균 음주량을 구하여 시험 참여 전과 비교하여 중대한 변화가 있는지 여부를 검토하였다.

ITT군에서 시험용 제품 복용 전 음주를 하는 참여자는 시험군 18명, 대조군 14명이었으며, 시험 종료 시점에서 시험군의 음주를 하는 참여자 수는 변화가 없었으나 대조군은 1명이 감소하였다.

PP군에서 시험용 제품 복용 전 음주를 하는 참여자는 시험군 15명, 대조군 11명이었으며, 시험 종료 시점에서 음주를 하는 참여자 수는 시험군과 대조군 모두 1명씩 증가하여 시험군 16명, 대조군 11명이었다.

ITT군에서의 평균 음주량은 시험 참여 전 90.7 ± 58.23 , 시험 종료 시점에서 86.3 ± 106.68 g이었으며, 대조군은 시험 참여 전 96.7 ± 84.19 , 시험 종료 시점에서 99.2 ± 85.97 로 시험 참여 전과 비교하여 시험군은 4.9% 감소하였고, 대조군은 2.6% 증가하여 두 군 모두 5% 이내의 변화를 보였다.

PP군에서의 평균 음주량은 시험 참여 전 85.4 ± 57.12 , 시험 종료 시점에서 68.1 ± 51.5 g이었으며, 대조군은 시험 참여 전 100.0 ± 93.72 , 시험 종료 시점에서 98.8 ± 89.78 로 대조군은 시험 참여 전과 비교하여 1.2% 감소하였으나 시험군은 20.3% 감소한 것으로 나타났다.

표 3-5. 흡연 여부의 기초통계량

Variable		Group	빈도수(명)		%	
			예	아니오	예	아니오
ITT군	방문 1	시험군	5	20	9.8	39.2
		대조군	8	18	15.7	35.3
	방문 4	시험군	5	20	9.8	39.2
		대조군	8	18	15.7	35.3
PP군	방문 1	시험군	4	17	9.8	41.5
		대조군	8	12	19.5	29.3
	방문 4	시험군	5	16	12.2	39.0
		대조군	8	12	19.5	29.3

표 3-6. 규칙적 운동 여부의 기초통계량

Variable		Group	빈도수(명)		%	
			예	아니오	예	아니오
ITT군	방문 1	시험군	12	13	23.5	25.5
		대조군	9	17	17.6	33.3
	방문 4	시험군	10	15	19.6	29.4
		대조군	12	14	23.5	27.5
PP군	방문 1	시험군	9	12	22.0	29.3
		대조군	6	14	14.6	34.1
	방문 4	시험군	9	12	22.0	29.3
		대조군	12	8	29.3	19.5

표 3-7. 음주여부의 기초통계량

Variable		Group	빈도수(명)		%	
			예	아니오	예	아니오
ITT군	방문 1	시험군	18	7	35.3	13.7
		대조군	14	12	27.5	23.5
	방문 4	시험군	18	7	35.3	13.7
		대조군	13	13	25.5	25.5
PP군	방문 1	시험군	15	6	36.6	14.6
		대조군	11	9	26.8	22.0
	방문 4	시험군	16	5	39.0	12.2
		대조군	12	8	29.3	19.5

표 3-8. 일주일 평균 음주량(gram alcohol)의 기초통계량

Variable		Group	평균	표준편차	최대값	최소값	
음주량	ITT	방문 1	시험군	90.7	58.23	205.9	3.2
			대조군	96.7	84.19	343.0	13.7
		방문 4	시험군	86.3	106.68	462.2	2.0
			대조군	99.2	85.97	333.3	2.0
	PP	방문 1	시험군	85.4	57.12	205.9	3.2
			대조군	100.0	93.72	343.0	13.7
		방문 4	시험군	68.1	51.50	172.1	12.9
			대조군	98.8	89.78	333.3	2.0

4.3. 시험용 식품 복용의 순응도 및 중도탈락자 현황

본 시험의 참여자로 선정된 51명 중 시험군에서 4명, 대조군에서 6명이 중도 탈락하고, 41명의 참여자는 계획서를 준수하여 시험을 종료하였다.

중도탈락자 10명의 탈락사유는 동의철회 2명, 참여자 추적 실패 5명, 순응도 미달 2명, 시험계획서 미준수 1명이었다.

시험을 종료한 41명은 시험군 21명, 대조군 20명이었으며, 각 군의 평균 순응도는 시험군 90.4±11.17%, 대조군 94.4±4.76%였다.

표 3-9. 중도탈락자 현황

Group	배정번호	성별	탈락사유	비고
시험군	E06	남	추적실패	
	E12	여	순응도 미달	
	E13	남	순응도 미달	
	E27	남	추적실패	
대조군	E07	남	동의철회	이상반응
	E19	여	추적실패	
	E25	여	추적실패	
	E26	여	추적실패	
	E36	남	계획서 미준수	병용금지약물 복용
	E42	여	계획서 미준수	병용금지약물 복용

표 3-10. 시험용 식품 복용 순응도(%)의 기초통계량 및 동질성 검정

	Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT	시험군	90.4	11.17	100.0	49.1
	대조군	94.4	4.76	100.0	83.0
PP	시험군	93.1	5.69	100.0	81.8
	대조군	95.0	4.08	100.0	88.6

4.4. 유효성평가 변수 분석 결과: PT

(1) ITT군

ITT군의 prothrombin time(PT)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 12.74±0.67, 복용 8주 후 12.78±0.61, 변화량의 평균은 0.04±0.41였으며, 대조군은 식품 복용 전 12.64±0.61, 복용 8주 후 12.66±0.82, 변화량의 평균은 0.02±0.52로 시험군과 대조군 모두 증가하였다.

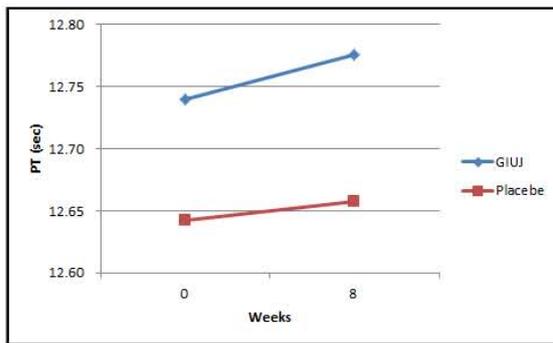
(2) PP군

PP군의 **prothrombin time** 분석에서 시험군은 식품 복용 전 12.60 ± 0.58 , 복용 8주 후 12.60 ± 0.47 , 변화량의 평균은 0.00 ± 0.43 으로 변화가 없었으며, 대조군은 식품 복용 전 12.50 ± 0.56 , 복용 8주 후 12.51 ± 0.82 , 변화량의 평균은 0.01 ± 0.59 로 증가하였다.

표 3-11. PT의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	12.74	0.67	14.30	11.70
		방문 4	12.78	0.61	14.30	11.90
		변화량	0.04	0.41	0.90	-1.10
	대조군	방문 1	12.64	0.61	13.80	11.50
		방문 4	12.66	0.82	15.50	11.70
		변화량	0.02	0.52	2.10	-0.80
PP군	시험군	방문 1	12.60	0.58	14.00	11.70
		방문 4	12.60	0.47	13.50	11.90
		변화량	0.00	0.43	0.90	-1.10
	대조군	방문 1	12.50	0.56	13.40	11.50
		방문 4	12.51	0.82	15.50	11.70
		변화량	0.01	0.59	2.10	-0.80

(A) ITT



(B) PP

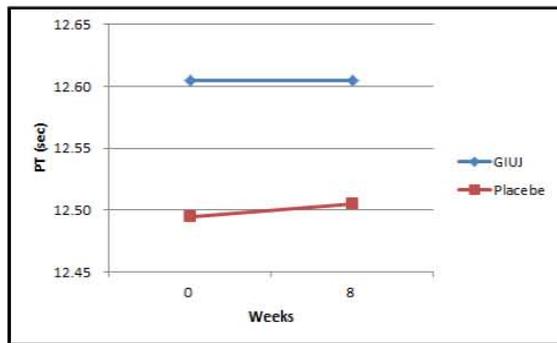


그림 3-4. 시험용 식품 복용에 따른 PT 변화

4-5. 유효성평가 변수 분석 결과: aPTT

(1) ITT군

ITT군의 activated partial thromboplastin time(aPTT)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 35.55±3.23, 복용 8주 후 35.54±3.51, 변화량의 평균은 -0.01±1.69였으며, 대조군은 식품 복용 전 35.97±3.79, 복용 8주 후 36.14±3.71, 변화량의 평균은 0.17±2.69로 시험군에서는 평균이 감소하였으나 대조군에서는 평균이 증가하였다.

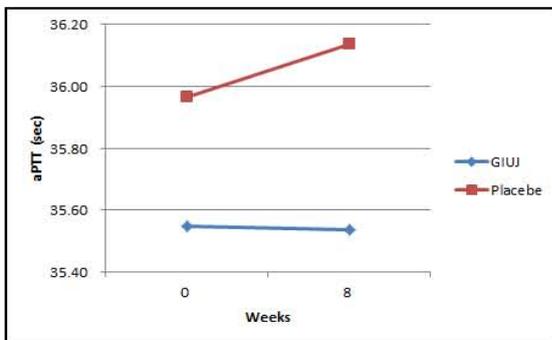
(2) PP군

PP군의 aPTT 분석에서 시험군은 식품 복용 전 35.78±3.16, 복용 8주 후 35.63±3.67, 변화량의 평균은 -0.15±1.78로 감소하였으며, 대조군은 식품 복용 전 35.89±3.93, 복용 8주 후 36.23±3.71, 변화량의 평균은 0.34±3.02로 증가하였다.

표 3-12. aPTT의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	35.55	3.23	41.80	28.70
		방문 4	35.54	3.51	45.50	29.20
		변화량	-0.01	1.69	3.70	-3.60
	대조군	방문 1	35.97	3.79	42.80	29.30
		방문 4	36.14	3.71	44.90	29.70
		변화량	0.17	2.69	11.60	-2.80
PP군	시험군	방문 1	35.78	3.16	41.80	28.70
		방문 4	35.63	3.67	45.50	29.20
		변화량	-0.15	1.78	3.70	-3.60
	대조군	방문 1	35.89	3.93	42.50	29.30
		방문 4	36.23	3.71	44.90	29.70
		변화량	0.34	3.02	11.60	-2.80

(A) ITT



(B) PP

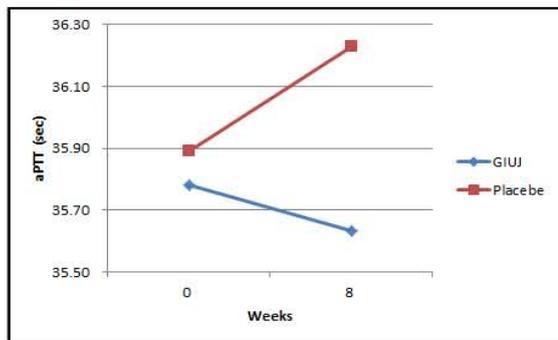


그림 3-5. 시험용 식품 복용에 따른 aPTT 수치 변화

4-5. 유효성평가 변수 분석 결과: Total Cholesterol

(1) ITT군

ITT군의 total cholesterol(TC)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 185.96 ± 29.77 , 복용 8주 후 188.88 ± 38.63 , 변화량의 평균은 2.92 ± 16.44 였으며, 대조군은 식품 복용 전 189.62 ± 36.74 , 복용 8주 후 189.62 ± 37.15 , 변화량의 평균은 0.00 ± 20.14 로 시험군에서는 평균이 증가하였으나 대조군에서는 변화가 없었다.

(2) PP군

PP군의 TC 분석에서 시험군은 식품 복용 전 189.95 ± 29.85 , 복용 8주 후 194.05 ± 39.27 , 변화량의 평균은 4.10 ± 17.00 으로 증가하였으며, 대조군은 식품 복용 전 186.50 ± 38.83 , 복용 8주 후 186.60 ± 39.26 , 변화량의 평균은 0.10 ± 23.09 로 거의 변화하지 않았다.

표 3-13. Total Cholesterol의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	185.96	29.77	242.00	130.00
		방문 4	188.88	38.63	293.00	119.00
		변화량	2.92	16.44	51.00	-22.00
	대조군	방문 1	189.62	36.74	247.00	114.00
		방문 4	189.62	37.15	257.00	118.00
		변화량	0.00	20.14	43.00	-44.00
PP군	시험군	방문 1	189.95	29.85	242.00	130.00
		방문 4	194.05	39.27	293.00	119.00
		변화량	4.10	17.00	51.00	-20.00
	대조군	방문 1	186.50	38.83	247.00	114.00
		방문 4	186.60	39.26	257.00	118.00
		변화량	0.10	23.09	43.00	-44.00

(A) ITT

(B) PP

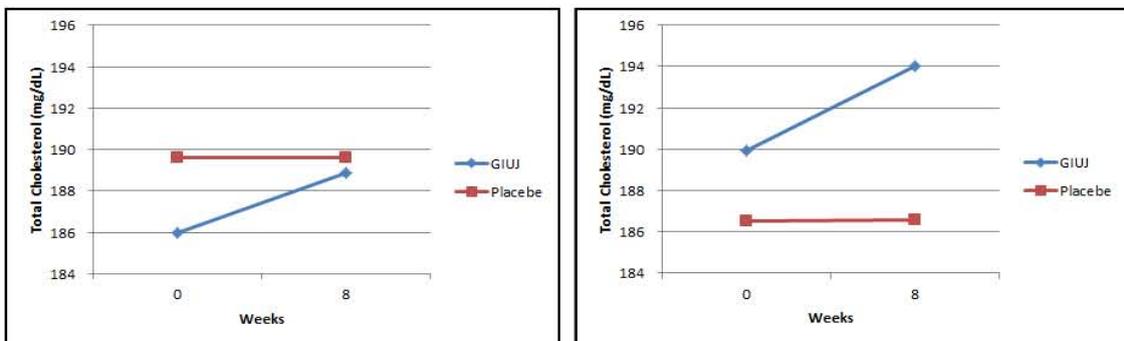


그림 3-6. 시험용 식품 복용에 따른 Total Cholesterol 수치 변화

4-6. 유효성 평가 변수 분석 결과: LDL-Cholesterol

(1) ITT군

ITT군의 LDL-cholesterol(LDL-C)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 106.00 ± 26.71 , 복용 8주 후 113.39 ± 35.11 , 변화량의 평균은 7.39 ± 19.56 이었으며, 대조군은 식품 복용 전 104.35 ± 32.21 , 복용 8주 후 106.56 ± 32.72 , 변화량의 평균은 2.22 ± 23.62 로 시험군과 대조군 모두 평균이 증가하였다.

(2) PP군

PP군의 LDL-C 분석에서 시험군은 식품 복용 전 109.86 ± 26.15 , 복용 8주 후 118.67 ± 34.99 , 변화량의 평균은 8.81 ± 19.77 이었으며, 대조군은 식품 복용 전 103.21 ± 33.40 , 복용 8주 후 105.57 ± 34.62 , 변화량의 평균은 2.36 ± 26.99 로 시험군과 대조군 모두 평균이 증가하였다.

표 3-14. LDL-Cholesterol의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	106.00	26.71	159.20	52.80
		방문 4	113.39	35.11	218.00	57.00
		변화량	7.39	19.56	60.80	-23.80
	대조군	방문 1	104.35	32.21	156.40	52.00
		방문 4	106.56	32.72	176.60	59.80
		변화량	2.22	23.62	44.20	-53.60
PP군	시험군	방문 1	109.86	26.15	159.20	52.80
		방문 4	118.67	34.99	218.00	61.00
		변화량	8.81	19.77	60.80	-20.00
	대조군	방문 1	103.21	33.40	156.40	52.00
		방문 4	105.57	34.62	176.60	59.80
		변화량	2.36	26.99	44.20	-53.60

(A) ITT

(B) PP

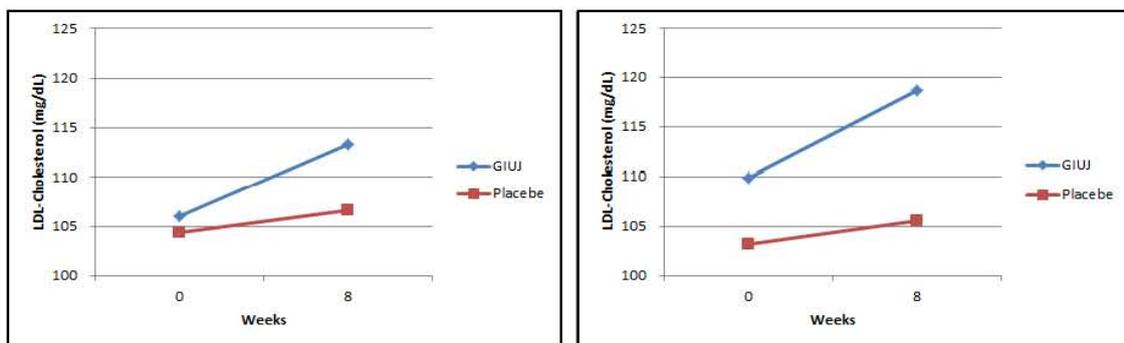


그림 3-7. 시험용 식품 복용에 따른 LDL-Cholesterol 수치 변화

4-7. 유효성평가 변수 분석 결과: HDL-Cholesterol

(1) ITT군

ITT군의 HDL-cholesterol(HDL-C)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 52.28 ± 9.06 , 복용 8주 후 50.76 ± 9.84 , 변화량의 평균은 -1.52 ± 7.78 이었으며, 대조군은 식품 복용 전 54.08 ± 14.48 , 복용 8주 후 51.92 ± 13.08 , 변화량의 평균은 -2.15 ± 6.75 로 시험군과 대조군 모두 평균이 감소하였다.

(2) PP군

PP군의 HDL-C 분석에서 시험군은 식품 복용 전 52.43 ± 9.44 , 복용 8주 후 50.29 ± 10.46 , 변화량의 평균은 -2.14 ± 8.33 으로 감소하였으며, 대조군은 식품 복용 전 52.35 ± 15.56 , 복용 8주 후 50.05 ± 14.06 , 변화량의 평균은 -2.30 ± 7.44 로 감소하였다.

표 3-15. HDL-Cholesterol의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	52.28	9.06	72.00	39.00
		방문 4	50.76	9.84	76.00	36.00
		변화량	-1.52	7.78	14.00	-23.00
	대조군	방문 1	54.08	14.48	88.00	33.00
		방문 4	51.92	13.08	78.00	33.00
		변화량	-2.15	6.75	13.00	-19.00
PP군	시험군	방문 1	52.43	9.44	72.00	39.00
		방문 4	50.29	10.46	76.00	36.00
		변화량	-2.14	8.33	14.00	-23.00
	대조군	방문 1	52.35	15.56	88.00	33.00
		방문 4	50.05	14.06	78.00	33.00
		변화량	-2.30	7.44	13.00	-19.00

(A) ITT

(B) PP

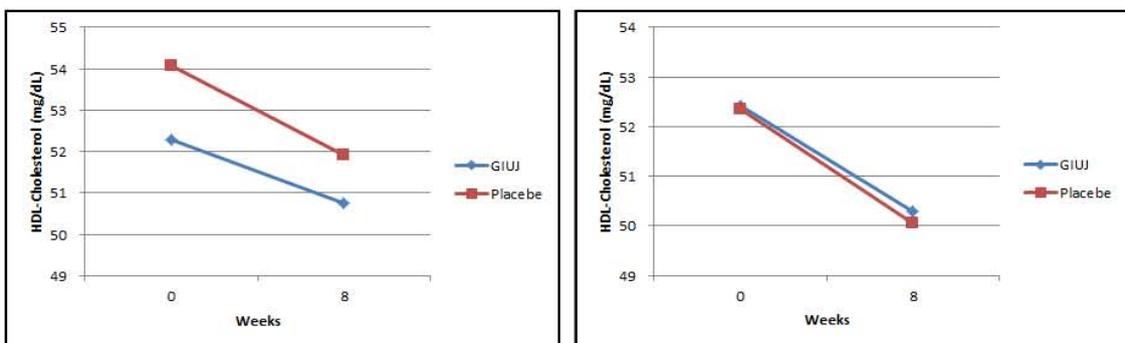


그림 3-8. 시험용 식품 복용에 따른 HDL-Cholesterol 수치 변화

4-8. 유효성평가 변수 분석 결과: Triglyceride

(1) ITT군

ITT군의 triglyceride(TG)의 분석 결과 시험군은 식품 복용 전 138.40 ± 68.92 , 복용 8주 후 125.88 ± 49.68 , 변화량의 평균은 -12.52 ± 58.00 이었으며, 대조군은 식품 복용 전 158.96 ± 95.74 , 복용 8주 후 147.04 ± 68.49 , 변화량의 평균은 -11.92 ± 76.35 로 시험군과 대조군 모두 평균이 감소하였다.

(2) PP군

PP군의 TG 분석에서 시험군은 식품 복용 전 138.33 ± 68.61 , 복용 8주 후 128.05 ± 51.81 , 변화량의 평균은 -10.29 ± 60.50 이었으며, 대조군은 식품 복용 전 169.60 ± 104.26 , 복용 8주 후 154.90 ± 71.68 , 변화량의 평균은 -14.70 ± 87.32 로 시험군과 대조군 모두 평균이 감소하였다.

표 3-16. Triglyceride의 기초통계량

Group		Group	평균	표준편차	최대값	최소값
ITT군	시험군	방문 1	138.40	68.92	354.00	57.00
		방문 4	125.88	49.68	217.00	44.00
		변화량	-12.52	58.00	101.00	-211.00
	대조군	방문 1	158.96	95.74	494.00	62.00
		방문 4	147.04	68.49	279.00	63.00
		변화량	-11.92	76.35	123.00	-224.00
PP군	시험군	방문 1	138.33	68.61	354.00	57.00
		방문 4	128.05	51.81	217.00	44.00
		변화량	-10.29	60.50	101.00	-211.00
	대조군	방문 1	169.60	104.26	494.00	62.00
		방문 4	154.90	71.68	279.00	63.00
		변화량	-14.70	87.32	123.00	-224.00

(A) ITT

(B) PP

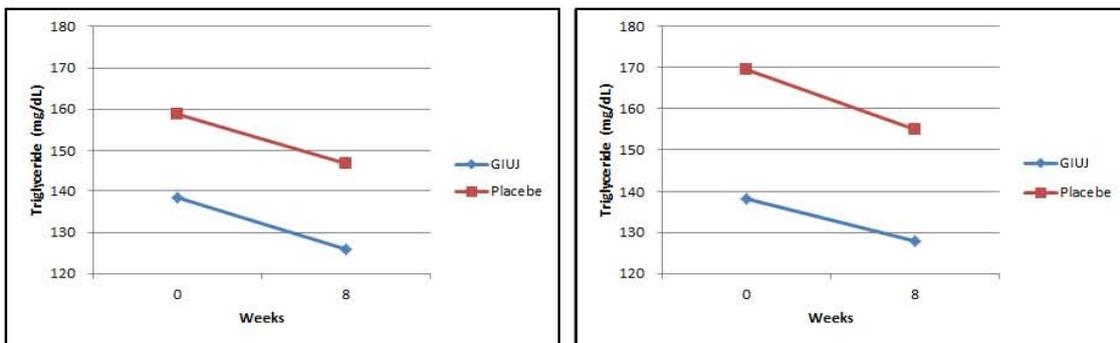


그림 3-9. 시험용 식품 복용에 따른 Triglyceride 수치 변화

4-9. 총괄 유효성 평가

주 분석 대상군인 ITT군에 대하여 1차 유효성 평가 변수인 PT의 평균은 시험군과 대조군 모두 식품 복용 전보다 복용 후 증가하였으며, 시험군의 PT 변화정도가 대조군보다 더 크게 나타났다. PP군에서의 PT 변화는 시험군은 평균의 변화가 없었으나 대조군은 증가하였다.

ITT군에서 aPTT는 시험군에서는 제품 복용 전보다 복용 후 감소하였으나 대조군에서는 증가하였다. PP군에서의 aPTT의 변화는 ITT군과 유사하였다.

ITT군에서 2차 유효성평가 변수인 total cholesterol 수치는 시험군에서는 증가하였으나 대조군에서는 변화가 없었다. PP군에서의 total cholesterol 수치 변화는 시험군과 대조군 모두 증가하는 것으로 관찰되었으며, 시험군의 변화가 대조군보다 더 크게 나타났다.

LDL-cholesterol 수치는 ITT군에서 시험군과 대조군 모두 증가하였으며, 시험군의 증가가 대조군보다 더 크게 나타났다. PP군에서의 LDL-cholesterol 수치 변화는 ITT군과 유사하였다.

HDL-cholesterol 수치는 ITT군에서 시험군과 대조군 모두 감소하였으며, 대조군의 감소가 시험군보다 더 크게 나타났다. PP군에서의 HDL-cholesterol 수치 변화는 ITT군과 유사하였다.

Triglyceride는 ITT군에서 시험군과 대조군 모두 감소하였으며, 시험군의 감소가 대조군보다 더 크게 나타났다. PP군에서의 Triglyceride는 시험군과 대조군 모두 감소하였으나, 대조군의 감소가 시험군보다 더 크게 나타났다.

1차 및 2차 유효성 평가 변수의 시험용 식품 복용 전후의 변화를 시험군과 대조군에서 관찰한 결과, 각 변수의 변화 경향이 일관적이지 않고 또한 시험군과 대조군 간 변화값의 차이가 적었다. 또한 모든 측정값이 정상 범위 내에서의 변화를 반영하고 있어 시험용 식품 복용 전후에 임상적으로 의미있는 변화를 반영한 것으로 보기 어려워 감잎 유자 복합추출물의 혈행개선에 대한 효과를 평가하기 위하여 추가적인 연구, 관찰이 필요한 것으로 사료되었다.

4-10. 안전성 평가 결과

(1) 이상반응

8주간의 시험용 제품 복용기간 동안 시험군에서는 이상반응이 보고되지 않았으며, 대조군에서는 2명의 참여자에서 불면, 피로감, 두중감을 이상반응으로 보고되었다.

대조군 E07 참여자는 불면, 피로감, 두중감을 이상반응으로 보고하였다. E07 참여자는 7일간 대조식품을 복용하고 8일째 이후 자의적으로 제품 복용을 중지하였고, 제품 복용 개시 일로부터 16일째에 연구자에게 이상반응에 관하여 보고하였다. E07 참여자가 보고한 불면, 피로감, 두중감은 식품 복용기간 중에 간헐적으로 나타났으며, 제품 복용을 중지한 이후에도 증상이 간헐적으로 지속되었다.

이상반응에 관하여 시험용 제품 복용 관련 조치는 없었으며, 이상반응을 교정하기 위한 치료 또한 없었다. E07 참여자에서 나타난 불면, 피로감, 두중감은 제품 복용을 중지하여도 간헐적으로 나타난 증상이었으므로 제품과의 인과관계는 '관련없음'으로 판정하였다.

대조군 E36 참여자는 제품 복용 후 26일째부터 구순염이 나타나 증상을 치료하기 위한 의 약품을 자의로 복용하였으며, 이에 관하여 최종방문일인 52일째에 연구자에게 통보하였다. 구순염 증상은 최초 발생 이후 최종방문 시점까지 간헐적으로 발생하였으며, 시험용 제품 복용 종료 4주 이후에도 간헐적으로 지속되는 상태를 유지하고 있었다. E36 참여자가 보고한 구순염은 이상반응 발생 후 시험용 제품 복용 또는 중지와 무관하게 증상이 간헐적으로 발생하는 상태가 관찰되었으므로 제품과의 인과관계는 '관련없음'으로 판정하였다.

(2) 임상 검사치의 비정상적인 변화

시험용 제품 복용 후 8주째에 실시된 임상검사 결과 시험군과 대조군에서 치료가 필요한 임상 검사치의 비정상적인 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 생체징후의 비정상적인 변화

모든 참여자에서 전체 시험기간 동안 비정상적인 생체징후는 관찰되지 않았다.

(4) 총괄안전도

시험군에서 확인된 이상반응이 없었으며, 치료가 필요한 임상 검사치의 비정상적 변화 및 비정상적 생체징후가 확인되지 않았으므로 시험용 식품인 감잎·유자 복합추출물은 본 시험의 범위에서 안전한 것으로 평가되었다.

5. 결론

본 인체적용시험에서는 감잎·유자 복합분말의 혈행개선에 대한 효과를 예비적으로 평가하기 위하여 BMI가 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 이상, $30\text{kg}/\text{m}^2$ 미만의 과체중 범위에 속하는 20~65세의 성인을 대상으로 시험군은 감잎·유자 복합분말 함유 식품을, 대조군은 말토덱스트린 함유 식품을 각각 8주간 복용하고, 시험용 식품 복용 전후의 검사결과로부터 혈액응고와 관련하여 PT, aPTT와 혈중 Total Cholesterol(TC), HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol 및 Triglyceride의 개선 정도를 주 분석 대상군인 ITT군에 대하여 비교하였다.

1차 유효성 평가 변수인 PT의 평균은 시험군과 대조군 모두 식품 복용 전보다 복용 후 증가하였으며, 시험군의 PT 변화정도가 대조군보다 더 크게 나타났으며, aPTT는 시험군에서는 제품 복용 전보다 복용 후 감소하였으나 대조군에서는 증가하였다.

2차 유효성평가 변수인 total cholesterol 수치는 시험군에서는 증가하였으나 대조군에서는 변화가 없었다. LDL-cholesterol 수치는 시험군과 대조군 모두 증가하였으며, 시험군의 증가가 대조군보다 더 크게 나타났다. HDL-cholesterol 수치는 시험군과 대조군 모두 감소하였으며, 대조군의 감소가 시험군보다 더 크게 나타났다. Triglyceride는 시험군과 대조군 모두 감소하였으며, 시험군의 감소가 대조군보다 더 크게 나타났다.

1차 및 2차 유효성 평가 변수의 시험용 식품 복용 전후의 변화를 시험군과 대조군에서 관찰한 결과, 각 변수의 변화 경향이 일관적이지 않고 또한 시험군과 대조군 간 변화값의 차

이가 적었다. 또한 모든 측정값이 정상 범위 내에서의 변화를 반영하고 있어 시험용 식품 복용 전후에 임상적으로 의미있는 변화를 반영한 것으로 보기 어려워 감잎 유자 복합추출물의 혈행개선에 대한 효과를 평가하기 위하여 추가적인 연구, 관찰이 필요한 것으로 사료되었다.

시험용 식품 복용 중 중대한 이상반응은 발생하지 않았고, 시험군에서 확인된 이상반응이 없었으며, 치료가 필요한 임상 검사치의 비정상적 변화 및 비정상적 생체징후가 확인되지 않았으므로 시험용 식품인 감잎·유자 복합추출물은 본 시험의 범위에서 안전한 것으로 평가되었다.

Appendix 1. 인구학적 정보 : 시험군

배정	일련번호	스크리닝번호	배정번호	이니셜	성별	연령 (세)	신장 (cm)	종료여부
	1	S01	E02	ㄱㅇㅎ	여	39	159	종료
	2	S04	E01	ㄱㅎㅈ	여	48	160	종료
	3	S05	E03	ㅈㅈㅇ	여	40	161	종료
	4	S07	E05	ㅈㅈㅇ	남	25	172	종료
	5	S08	E06	ㅈㅈㅇ	남	26	170	중지
	6	S09	E09	ㅂㅇㅈ	남	25	169	종료
	7	S10	E08	ㄱㅈㅎ	남	24	178	종료
	8	S12	E10	ㅂㅈㄱ	남	44	172	종료
	9	S13	E13	ㅇㅇㅎ	남	52	173	중지
	10	S14	E12	ㄱㅇㅎ	여	62	152	중지
	11	S15	E11	ㅈㅎㅈ	여	31	155	종료
	12	S20	E17	ㄱㅎㅈ	여	42	154	종료
시험군	13	S25	E21	ㄷㄱㅎ	남	41	170	종료
	14	S27	E23	ㅈㅈㅌ	남	43	176	종료
	15	S29	E28	ㄱㄱㅎ	남	44	181	종료
	16	S30	E27	ㅈㅇㅈ	남	25	180	중지
	17	S35	E30	ㅇㅈㅇ	남	25	170	종료
	18	S36	E31	ㅇㅇㅎ	남	24	165	종료
	19	S37	E33	ㅇㅇㄹ	여	55	149	종료
	20	S41	E35	ㄷㅇㅈ	남	25	191	종료
	21	S46	E40	ㄱㅇㅈ	남	26	182	종료
	22	S47	E41	ㄱㅈㅈ	남	26	165	종료
	23	S50	E44	ㅎㅈㅈ	남	40	163	종료
	24	S55	E48	ㅇㅂㄱ	남	27	180	종료
	25	S58	E51	ㅎ - ㅇ	남	32	168	종료

Appendix 1. 인구학적 정보 : 대조군

배정	일련번호	스크리닝 번호	배정번호	이니셜	성별	연령 (세)	신장 (cm)	종료여부
대조군	1	S03	E07	ㅈㅇㅇ	남	32	169	중지
	2	S06	E04	ㅂㄱㅎ	남	44	170	종료
	3	S16	E14	ㅇㅇㅈ	여	31	164	종료
	4	S17	E15	ㅈㅈㅈ	여	47	162	종료
	5	S18	E18	ㅈㄱㅎ	여	53	161	종료
	6	S19	E16	ㅈㅇㄱ	남	32	178	종료
	7	S23	E19	ㅇㅈㅇ	여	44	158	중지
	8	S24	E20	ㅈㅎㄷ	남	43	170	종료
	9	S26	E22	ㄷㅇㅈ	남	38	183	종료
	10	S28	E24	ㅈㅈㅈ	남	39	165	종료
	11	S31	E25	ㄱㅇㅈ	여	51	163	중지
	12	S32	E26	ㅎㅈㅇ	여	63	158	중지
	13	S33	E29	ㄱㅈㅇ	남	41	172	종료
	14	S34	E32	ㅇㅎㅎ	여	60	159	종료
	15	S38	E34	ㅇㅇㅇ	여	41	153	종료
	16	S39	E39	ㄱㅈㅎ	남	33	171	종료
	17	S42	E37	ㄱㅂㅈ	남	40	185	종료
	18	S43	E38	ㅇㅈㅎ	남	39	183	종료
	19	S45	E36	ㄹㅈㅎ	남	24	167	중지
	20	S48	E42	ㄱㄴㅇ	여	26	160	중지
	21	S49	E43	ㄱㅎㄹ	여	54	156	종료
	22	S52	E47	ㅎㅂㄷ	남	35	167	종료
	23	S53	E45	ㅂㅈㅌ	남	47	173	종료
	24	S54	E46	ㅈㅎㄱ	남	28	183	종료
	25	S56	E49	ㅈㅈㅈ	여	58	149	종료
	26	S57	E50	ㅇㅈㅇ	여	31	165	종료

Appendix 2. 병력, 약물 투여력, 병용약물

배정	일련번호	배정번호	병력 ^{*1}	약물투여력 ^{*2}	병용 약물명	적용증	투여 경로	1일 복용량 ^{*3}	투여개시일
	1	E02	N/A	없음	N/A				
	2	E01	자근근종	없음	N/A				2012.00
	3	E03	주관절 골절	없음	N/A				2013.00
	4	E05	N/A	없음	N/A				
	5	E06	N/A	없음	N/A				
	6	E09	N/A	없음	N/A				
	7	E08	N/A	없음	N/A				
	8	E10	N/A	없음	N/A				
	9	E13	탈모	있음	프로페시아	탈모	PO	1	2013.06
	10	E12	N/A	없음	N/A				
	11	E11	N/A	없음	N/A				
	12	E17	N/A	없음	N/A				
시험군	13	E21	N/A	없음	N/A				
	14	E23	수지부 외상후 연골감염	없음	N/A				2013.00
	15	E28	N/A	없음	N/A				
	16	E27	N/A	없음	N/A				
	17	E30	N/A	없음	N/A				
	18	E31	N/A	없음	N/A				
	19	E33	당뇨	있음	다이아벡스	당뇨병	PO	1,000	2012.00
	20	E35	N/A	없음	N/A				
	21	E40	N/A	없음	N/A				
	22	E41	N/A	있음	N/A				
	23	E44	고혈압	없음	엑스포지	고혈압	PO	5/80	2010.00
	24	E48	N/A	없음	N/A				
	25	E51	N/A	없음	N/A				

*1 : 최근 3년 이내의 병력 2 : 최근 4주 이내의 약물 투여력 3 : 단위 : mg

Appendix 2. 병력, 약물 투여력, 병용약물 (계속)

배정 번호	일련 번호	배정 번호	병력 ^{*1}	약물투여력 ^{*2}	병용 약물명	적용증	투여경 로	1일 복용량 ^{*3}	투여개시일
	1	E07	N/A	없음	N/A				
	2	E04	N/A	있음	루코졸캡슐				
	3	E14	N/A	없음	N/A				
	4	E15	자궁내막증	없음	N/A				(2014년 5월)
	5	E18	N/A	없음	N/A				
	6	E16	N/A	있음	프로페시아				
	7	E19	치질	없음	N/A				(2013)
	8	E20	N/A	없음	N/A				
	9	E22	N/A	없음	N/A				
	10	E24	N/A	없음	N/A				
	11	E25	N/A	없음	N/A				
대 조 근	12	E26	퇴행성관절염	없음	N/A				(2014)
	13	E29	N/A	없음	N/A				
	14	E32	백내장수술	없음	N/A				(2014.8.11)
	15	E34	N/A	없음	N/A				
	16	E39	N/A	없음	N/A				
	17	E37	고혈압	있음	박사르정				(2014.6)
	18	E38	N/A	없음	N/A				
	19	E36	N/A	없음	N/A				
	20	E42	N/A	없음	N/A				
	21	E43	N/A	없음	N/A				
	22	E47	N/A	없음	N/A				
	23	E45	고혈압	있음	혈압약				(2014)
	24	E46	N/A	없음	N/A				
	25	E49	N/A	없음	N/A				

*1 최근 3년 이내의 병력 *2 최근 4주 이내의 약물 투여력 *3 단위 : mg

Appendix 3. 흡연, 운동 및 음주

배정	일련 번호	배정번호	흡연여부		운동 ^{*1}		음주여부		음주량 ^{*2}	
			방문1	방문4	방문1	방문4	방문1	방문4	방문1	방문4
시험군	1	E02			Y	Y	Y	Y	12	29.7
	2	E01								
	3	E03			Y	Y	Y	Y	12	12.9
	4	E05	Y	Y			Y	Y	110	143.8
	5	E06					Y		38	
	6	E09					Y	Y	160	14.25
	7	E08					Y	Y	108	88.7
	8	E10					Y	Y	110	56.2
	9	E13			Y		Y	Y	150	462.2
	10	E12			Y	Y		Y		2
	11	E11			Y	Y		Y		42.1
	12	E17		Y						
	13	E21	Y	Y			Y	Y	123	98.6
	14	E23				Y	Y		3	
	15	E28			Y	Y				
	16	E27	Y		Y		Y		163	
	17	E30			Y		Y	Y	55	16.9
	18	E31			Y	Y	Y	Y	55	22
	19	E33								
	20	E35	Y	Y	Y	Y	Y	Y	109	172.1
	21	E40				Y	Y	Y	55	73.4
	22	E41						Y		26.1
	23	E44	Y	Y	Y		Y	Y	206	142
	24	E48				Y	Y	Y	109	103.2
	25	E51			Y		Y	Y	55	48

*1 규칙적 운동 여부 2 음주여부 및 일주일 평균 음주량 (g Alcohol)

Appendix 3. 흡연, 운동 및 음주 (계속)

대상	일련번호	배정번호	흡연여부		운동 ^{*1}		음주 ^{*2}				
			방문1	방문4	방문1	방문4	음주여부		음주량		
							방문1	방문4	방문1	방문4	
대조군	1	E07			N/A			Y			34.7
	2	E04	Y		N/A			Y			138.8
	3	E14			등산(주 1-2회)			N/A			
	4	E15			N/A			N/A			
	5	E18			N/A			N/A			
	6	E16	Y		복싱(주 4-5회)			Y			120.0
	7	E19			N/A			Y			110.0
	8	E20			N/A			N/A			
	9	E22			N/A			Y			28.0
	10	E24	Y		N/A			Y			109.8
	11	E25			N/A			N/A			
	12	E26			걷기(주 3-4회)			N/A			
	13	E29			걷기(주 3회)			Y			27.0
	14	E32			N/A			N/A			
	15	E34			N/A			N/A			
	16	E39			테니스(주 2-3회)			Y			343.0
	17	E37	Y		자전거(주 7회)			Y			133.5
	18	E38	Y		N/A			Y			41.2
	19	E36			조깅(주 2-3회)			Y			109.0
	20	E42			수영(주 2-3회)			N/A			
	21	E43			N/A			N/A			
	22	E47	Y		N/A			Y			13.7
	23	E45	Y		N/A			Y			110.0
	24	E46	Y		헬스(주 3회)			Y			35.6
	25	E49			N/A			N/A			54.9
	26	E50			N/A			N/A			71.2

*1 규칙적 운동 여부

*2 음주여부 및 일주일 평균 음주량 (g Alcohol)

Appendix 4. 생체징후 : 시험용 식품 복용 전후 (방문 1)

배정 일련번호	배정번호	체온(℃)		맥박 (회/분)		혈압(mmHg)				체중(kg)		BMI ₂ (kg/m ²)		체지방율 (%)		WHR	
		방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	수축기		이완기		방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4
						방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4
1	E02	36.9	37.2	80	80	138	130	88	80	74	72.7	29	28.8	39.1	37.9	0.94	0.94
2	E01	36.9	37.3	73	79	113	114	73	69	68	67.6	27	26.4	34.7	34.4	0.92	0.92
3	E03	37.1	37.2	60	60	99	120	67	70	72	72.7	28	28.0	34.8	34.5	0.90	0.89
4	E05	36.5	36.8	80	86	132	132	84	86	86	85.2	29	28.8	32.0	31.2	0.91	0.91
5	E06	37.0	36.9	76	82	125	129	81	81	75		26		22.4		0.86	
6	E09	36.7	37.0	69	71	125	126	71	83	82	82.2	29	28.8	27.4	28.2	0.90	0.90
7	E08	36.2	37.0	72	80	138	138	88	88	91	88.4	29	27.9	24.7	24.7	0.90	0.88
8	E10	36.7	36.7	74	67	134	137	96	87	87	85.9	29	29.1	30.3	30.3	0.95	0.94
9	E13	36.2	35.9	61	61	119	112	79	75	83	82.0	28	27.4	23.2	22.4	0.93	0.92
10	E12	36.5	36.3	65	74	111	101	74	65	65	65.0	28	28.1	41.2	40.9	0.98	0.98
11	E11	36.5	36.8	72	70	117	117	79	86	61	62.4	25	26.0	31.1	32.2	0.86	0.88
12	E17	36.9	36.8	65	70	106	97	74	70	62	63.5	26	26.8	37.4	39.0	0.90	0.91
13	E21	36.8	37.0	80	75	127	130	91	88	83	82.4	29	28.5	31.9	32.1	0.95	0.95
14	E23	36.3	36.9	65	75	124	124	81	76	89	86.3	29	27.9	28.3	28.5	0.95	0.94
15	E28	36.4	36.7	71	80	126	132	77	83	94	93.9	29	28.7	20.5	22.2	0.89	0.90
16	E27	36.4	36.5	75	76	113	128	79	75	83		26		25.4		0.86	
17	E30	36.4	36.4	59	64	134	125	83	82	75	74.9	26	25.9	25.9	27.3	0.88	0.88
18	E31	36.8	36.9	51	70	123	125	93	79	72	70.5	27	25.9	26.5	26.5	0.90	0.89
19	E33	36.9	36.7	60	65	135	136	80	85	59	59.7	27	26.9	30.5	32.1	0.91	0.93
20	E35	36.4	36.8	72	85	135	133	85	83	99	101. 7	27	27.9	21.3	22.4	0.86	0.88
21	E40	36.3	36.4	65	80	130	135	85	90	91	94.4	28	28.5	30.0	31.9	0.91	0.93
22	E41	36.8	36.1	86	80	135	130	85	86	70	71.1	26	26.1	32.5	31.5	0.92	0.92
23	E44	36.1	36.8	75	85	125	125	88	87	72	73.1	27	27.5	22.6	23.4	0.91	0.91
24	E48	36.5	36.1	78	76	118	130	86	85	90	88.2	28	27.2	30.4	31.0	0.91	0.91
25	E51	36.6	36.7	76	74	125	123	86	82	82	81.4	29	28.8	25.9	26.1	0.92	0.92

시험
군

Appendix 4. 생체징후 : 시험용 식품 복용 전후 (계속)

배정	일련 번호	배정 번호	체온(℃)		맥박 (회/분)		혈압(mmHg)				체중(kg)		BMI ₂ (kg/m ²)		체지방율 (%)		WHR			
			방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	수축기		이완기		방문1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4
							방문 1	방문 4	방문 1	방문 4										
	1	E07	36.5		69		111		73		남		남		27.2		0.91			
	2	E04	36.5	36.8	76	74	125	137	91	88	고혈압 (2014.6)	79.7	N/A	27.6	26.0	26.8	0.93	0.92		
	3	E14	36.9	36.1	61	65	107	103	74	76	41970.0	69.2	41970.0	25.7	32.8	32.5	0.86	0.86		
	4	E15	37.1	36.9	77	76	127	137	85	88	41997.0	66.9	41997.0	25.5	34.8	34.8	0.91	0.91		
	5	E18	37.1	36.5	77	75	132	125	83	80	1.0	77.4	1.0	29.9	37.9	39.3	0.96	0.95		
	6	E16	36.7	36.3	82	75	138	120	88	80	1.0	86.7	1.0	27.4	23.1	21.9	0.91	0.91		
	7	E19	36.9		78		125		91		4.0		4.0		35.0		0.90			
	8	E20	36.4	36.5	71	68	117	120	89	80	4.0	77.4	4.0	26.8	25.9	27.4	0.90	0.91		
	9	E22	36.8	36.3	76	75	139	123	88	84	0.0	86.9	0.0	25.9	21.6	21.8	0.87	0.87		
	10	E24	36.4	36.3	76	95	139	124	78	85	330.0	77.1	330.0	28.3	24.0	24.6	0.92	0.91		
	11	E25	37.0		67		110		74		0.0		0.0		26.2		0.91			
	12	E26	36.6		65		120		79		135.0		130.0		33.7		0.91			
대조군	13	E29	36.5	36.4	61	62	128	130	74	80	85.0	74.6	80.0	25.2	26.1	27.4	0.91	0.92		
	14	E32	36.7	36.1	69	70	111	110	78	70	72.0	65.6	76.0	25.9	31.0	28.4	0.90	0.88		
	15	E34	36.2	36.8	65	64	130	125	87	78	78.0	64.3	77.0	27.5	38.4	36.9	0.94	0.95		
	16	E39	36.4	36.0	72	72	136	134	88	81	20.9	74.4	22.7	25.4	24.3	23.6	0.88	0.89		
	17	E37	36.2	36.2	72	76	135	132	85	89	82.0	94.5	85.0	27.6	20.9	21.8	0.87	0.87		
	18	E38	36.2	36.3	76	78	130	136	80	88	78.0	86.5	77.0	25.8	22.7	23.2	0.89	0.87		
	19	E36	36.3	36.2	68	90	133	130	81	86	132.0	74.8	136.0	26.8	27.7	28.4	0.89	0.89		
	20	E42	36.1		58		130		80		36.2		36.3		38.5		0.90			
	21	E43	36.3	36.4	73	84	120	136	85	90	185.0	73.4	183.0	30.2	25.8	34.9	0.96	0.95		
	22	E47	36.5	36.8	79	71	124	135	88	93	21.8	68.9	23.2	24.7	30.5	28.8	0.92	0.91		
	23	E45	36.6	36.1	59	52	123	137	78	91	0.9	90.7	0.9	30.3	25.2	25.9	0.94	0.96		
	24	E46	36.9	36.2	76	85	127	141	87	94	0.0	99.2	0.0	29.6	21.1	24.1	0.88	0.90		
	25	E49	36.2	36.0	65	61	135	141	85	87	2.0	66.6	0.0	30.0	39.8	39.5	0.99	0.98		
	26	E50	36.4	36.4	77	70	117	130	80	76	2.0	77.3	4.0	28.4	35.3	36.7	0.90	0.92		

Appendix 5. 순응도

배정	일련번호	배정번호	복용할 갯수	복용한 갯수	순응도 (%)
	1	E02	348	300	86
	2	E01	342	330	96
	3	E03	330	279	85
	4	E05	336	306	91
	5	E06			
	6	E09	330	270	82
	7	E08	324	306	94
	8	E10	324	315	97
	9	E13	316	237	75
	10	E12	330	162	49
	11	E11	330	318	96
	12	E17	336	318	95
시험군	13	E21	336	312	93
	14	E23	345	345	100
	15	E28	342	342	100
	16	E27			
	17	E30	324	318	98
	18	E31	324	324	100
	19	E33	336	300	89
	20	E35	336	303	90
	21	E40	327	297	91
	22	E41	327	327	100
	23	E44	342	288	84
	24	E48	321	312	97
	25	E51	315	282	90

배정	일련번호	배정번호	복용할 갯수	복용한 갯수	순응도 (%)
	1	E07			
	2	E04	342	309	90
	3	E14	315	279	89
	4	E15	348	333	96
	5	E18	354	342	97
	6	E16	342	327	96
	7	E19			
	8	E20	351	342	97
	9	E22	336	324	96
	10	E24	348	309	89
	11	E25			
	12	E26			
대조군	13	E29	336	318	95
	14	E32	324	297	92
	15	E34	318	288	91
	16	E39	342	336	98
	17	E37	330	306	93
	18	E38	330	330	100
	19	E36	318	264	83
	20	E42			
	21	E43	336	336	100
	22	E47	330	330	100
	23	E45	336	333	99
	24	E46	318	282	89
	25	E49	348	330	95
	26	E50	330	330	100

Appendix 6. 임상실험실 검사 결과 : PT, aPTT, Total Cholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyceride

배정 번호	일련 번호	배정 번호	PT		aPTT		Total Cholesterol		LDL- Cholesterol		HDL- Cholesterol		Triglyceride	
			방문 1	방문4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4
1	E02		11.7	12.2	28.7	29.2	216	234	125	128	68	63	116	217
2	E01		13.2	13.0	37.0	38.8	202	213	118	132	39	41	227	201
3	E03		13.3	13.3	40.4	40.8	182	188	104	102	62	64	78	108
4	E05		13.3	12.2	36.0	33.8	207	187	122	106	43	39	210	208
5	E06		14.3	14.3	38.2	38.2	168	168	88	88	53	53	135	135
6	E09		14.0	13.5	32.6	34.2	217	228	141	154	46	48	151	130
7	E08		12.1	11.9	32.4	34.0	168	159	89	92	55	53	122	69
8	E10		12.5	12.1	38.4	37.7	196	226	119	136	42	47	174	217
9	E13		12.5	13.2	33.2	34.1	178	187	87	111	40	45	253	157
10	E12		13.2	13.4	29.5	31.4	180	158	111	87	56	58	65	64
11	E11		13.1	13.0	33.4	34.8	190	191	116	115	63	61	57	77
12	E17		12.9	12.8	36.6	36.3	198	190	119	105	62	76	87	44
13	E21		12.0	12.2	41.8	45.5	235	237	159	168	41	36	174	164
14	E23		12.4	12.9	36.0	34.7	242	293	157	218	57	64	139	114
15	E28		12.3	12.3	33.1	32.2	183	163	95	98	59	47	147	92
16	E27		13.8	13.8	36.4	36.4	134	134	57	57	57	57	102	102
17	E30		12.6	12.4	35.8	35.5	149	162	87	95	46	55	79	62
18	E31		12.8	13.3	34.1	35.6	158	150	94	88	49	46	74	79
19	E33		13.0	13.2	37.3	35.5	173	167	108	88	49	48	80	155
20	E35		12.4	12.2	34.7	31.1	165	156	96	93	45	42	121	104
21	E40		12.0	12.2	33.2	33.3	211	220	134	155	56	41	107	116
22	E41		12.7	12.5	38.4	38.8	199	205	104	126	55	47	198	159
23	E44		12.3	12.2	33.3	31.3	147	169	53	96	72	49	111	120
24	E48		12.3	12.6	39.2	39.2	130	119	67	61	43	36	99	110
25	E51		11.8	12.7	39.0	36.0	221	218	101	136	49	53	354	143

시험군

Appendix 6. 임상실험실 검사 결과 : PT, aPTT, Total Cholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyceride (계속)

배정 번호	일련 번호	배정 번호	PT		aPTT		Total Cholesterol		LDL- Cholesterol		HDL- Cholesterol		Triglyceride	
			방문 1	방문4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4	방문 1	방문 4
	1	E07	13.7	13.7	36.9	36.9	200	200	114	114	55	55	153	153
	2	E04	12.8	12.0	39.8	38.9	192	169	109	86	34	39	244	221
	3	E14	13.1	13.0	40.3	39.7	196	226	128	150	52	55	82	106
	4	E15	13.3	13.0	35.5	35.4	164	147	99	60	38	36	133	256
	5	E18	12.0	12.3	34.9	37.1	232	188	155	101	53	43	121	219
	6	E16	12.9	12.9	34.3	36.6	247	249	136	154	72	66	193	146
	7	E19	13.2	13.2	36.6	36.6	170	170	91	91	61	61	88	88
	8	E20	12.7	12.8	42.5	41.4	138	143	68	82	50	48	101	63
	9	E22	13.1	12.8	33.3	44.9	236	228	137	133	67	48	160	236
	10	E24	12.1	12.2	38.7	38.6	151	163	58	72	34	35	494	279
	11	E25	13.0	13.0	32.8	32.8	218	218	126	126	56	56	181	181
	12	E26	12.4	12.4	34.7	34.7	215	215	89	89	48	48	171	171
대 조 군	13	E29	12.0	11.7	30.7	29.7	212	172	124	75	74	77	72	98
	14	E32	13.0	12.6	39.2	36.4	158	134	90	63	56	55	62	81
	15	E34	12.5	12.7	36.5	36.2	176	219	92	136	47	60	187	116
	16	E39	12.8	12.2	32.7	33.0	171	178	81	83	66	62	118	165
	17	E37	11.7	11.7	33.6	34.4	236	222	152	148	44	48	200	132
	18	E38	12.2	12.4	41.0	38.3	176	159	94	103	38	37	319	95
	19	E36	13.8	14.0	33.5	31.2	161	159	72	83	72	62	85	69
	20	E42	12.7	12.7	42.8	42.8	236	236	156	156	67	67	63	63
	21	E43	11.5	11.8	29.3	31.0	245	257	156	177	68	64	103	82
	22	E47	12.5	12.4	37.2	36.0	138	160	62	89	33	39	216	162
	23	E45	11.7	12.2	31.1	32.2	160	180	70	92	38	33	262	274
	24	E46	12.3	11.9	33.9	33.9	114	118	52	69	48	33	70	79
	25	E49	12.3	12.0	32.0	32.1	193	201	87	105	88	78	88	89
	26	E50	13.4	15.5	41.3	38.8	195	219	114	134	47	45	167	199

Appendix 7. 적외선 체열검사 결과

배정 일련 번호	배정 번호	협택좌		협택우		노궁좌		노궁우		복토좌		복토우	
		방문1	방문4										
1	E02	31.78	31.69	31.42	31.57	31.88	32.92	31.94	32.63	30.63	30.25	30.88	30.44
2	E01	31.32	31.49	31.68	31.22	30.54	32.50	30.60	32.85	30.52	31.49	30.85	31.29
3	E03	30.92	30.25	30.94	30.83	29.89	32.61	30.54	32.68	30.38	30.61	30.64	30.35
4	E05	32.32	31.02	32.35	31.21	32.86	31.81	32.96	32.23	32.45	31.33	32.60	31.55
5	E06	33.52		33.53		33.49		33.58		33.16		32.88	
6	E09	31.90	31.01	31.75	30.57	33.02	32.02	33.19	32.32	31.62	30.93	31.55	30.89
7	E08	31.47	31.39	31.60	32.11	32.01	30.96	32.60	31.30	31.75	31.55	32.26	31.60
8	E10	32.15	30.29	32.32	30.62	32.00	31.71	32.28	32.25	32.04	30.91	32.15	31.03
9	E13	31.50	31.94	31.50	31.94	31.93	32.09	32.10	32.16	31.63	32.02	31.61	31.93
10	E12	32.53	33.05	32.70	32.84	32.70	32.96	33.19	32.84	31.01	32.82	31.16	32.99
11	E11	30.99	31.34	31.37	31.55	31.39	33.07	31.44	32.38	30.71	30.65	30.65	30.68
12	E17	31.93	30.31	32.31	30.04	31.67	29.72	32.23	30.02	31.01	30.62	31.37	30.96
13	E21	32.10	31.05	32.39	30.81	32.48	29.05	32.65	29.64	32.59	31.35	32.32	31.11
14	E23	32.35	31.48	32.52	31.68	32.70	33.43	32.94	33.58	32.27	30.73	32.22	30.66
15	E28	31.39	31.23	31.37	31.18	30.45	27.80	30.43	27.66	31.45	29.57	31.71	29.95
16	E27	31.92		32.22		31.42		32.32		33.07		32.56	
17	E30	32.62	33.00	32.79	32.84	28.26	31.58	28.93	31.37	30.64	31.42	30.67	31.24
18	E31	32.30	33.65	32.18	33.24	27.34	30.78	28.41	30.99	29.98	29.24	29.61	28.87
19	E33	32.15	28.23	32.29	28.37	31.26	25.95	31.62	25.83	30.37	24.46	30.62	24.52
20	E35	32.55	33.62	32.20	33.33	31.61	31.63	31.48	31.42	30.54	31.03	30.81	30.83
21	E40	32.13	32.71	32.16	32.69	32.13	31.46	32.01	31.72	31.03	29.29	31.42	29.69
22	E41	32.53	32.86	32.84	33.18	31.42	32.84	31.85	33.25	29.74	29.32	29.69	28.86
23	E44	32.07	32.54	32.90	32.33	28.71	29.27	28.98	29.86	28.96	28.30	29.47	28.63
24	E48	31.56	28.83	31.13	26.88	29.22	24.74	29.22	24.26	28.39	27.90	28.14	27.98
25	E51	31.76	32.45	31.66	32.11	27.58	28.94	29.01	29.06	29.85	29.45	29.41	29.38

시험군

Appendix 7. 적외선 체열검사 결과 (계속)

배정 일련 번호	배정 번호	태증좌		태증우		증완		권료좌		권료우	
		방문1	방문4								
1	E02	29.03	28.89	29.22	28.99	31.55	31.92	32.27	32.08	32.55	32.41
2	E01	26.99	30.34	27.32	30.02	32.41	31.95	32.62	32.16	33.23	32.29
3	E03	29.15	32.25	29.70	32.63	32.72	32.33	31.01	31.21	31.26	30.85
4	E05	33.48	32.30	33.54	32.57	32.62	32.26	33.01	32.01	33.47	32.53
5	E06	32.36		32.40		33.67		33.68		33.74	
6	E09	33.02	32.26	33.33	32.25	31.97	30.98	32.30	31.49	32.45	31.86
7	E08	31.49	29.16	31.60	29.22	32.13	32.12	32.43	32.13	32.66	32.45
8	E10	31.31	31.57	31.42	31.93	31.90	29.94	32.47	31.13	32.76	31.20
9	E13	30.21	29.96	30.29	29.60	31.72	32.37	31.13	31.10	31.20	31.10
10	E12	29.59	29.50	29.51	30.90	32.80	34.09	30.77	31.95	30.65	32.14
11	E11	29.89	31.17	31.25	31.18	31.54	32.36	32.65	33.59	33.08	32.95
12	E17	31.92	30.63	32.39	30.82	32.60	32.24	32.22	31.13	32.09	31.39
13	E21	30.85	27.32	30.80	27.23	31.96	30.71	33.54	32.22	34.24	32.16
14	E23	31.45	30.12	31.34	29.15	32.14	31.68	32.83	32.56	33.06	32.82
15	E28	26.94	23.94	27.27	24.42	30.25	28.91	32.59	29.70	32.67	29.92
16	E27	31.45		32.09		34.07		34.11		33.94	
17	E30	25.35	28.97	25.96	28.79	32.83	33.19	31.22	32.78	31.51	33.87
18	E31	26.58	26.72	26.79	26.03	30.87	32.55	31.80	32.82	32.20	33.11
19	E33	25.87	19.57	26.05	20.14	31.50	26.41	31.97	25.78	31.63	25.97
20	E35	27.16	27.66	26.69	27.10	32.94	33.15	33.03	34.66	32.98	34.63
21	E40	25.60	27.31	26.21	27.18	33.39	33.18	31.86	33.04	32.16	33.20
22	E41	25.92	25.02	25.28	24.92	31.59	31.87	33.52	33.52	33.50	33.35
23	E44	21.92	22.14	21.78	22.12	28.74	32.55	33.20	33.65	33.16	33.56
24	E48	21.64	21.98	21.31	22.34	32.74	30.90	31.12	25.86	32.02	26.51
25	E51	24.70	24.67	24.20	24.17	32.97	31.56	30.73	29.57	31.18	30.25

시험군

Appendix 7. 적외선 체열검사 결과

배정	일련 번호	배정 번호	협택좌		협택우		노궁좌		노궁우		복토좌		복토우		
			방문1	방문4											
	1	E07	30.17		30.14		28.29		28.59		29.55		29.45		
	2	E04	32.23	32.13	32.26	32.18	32.21	33.41	32.08	33.29	31.51	32.31	31.57	31.98	
	3	E14	31.79	31.00	32.11	30.97	31.57	31.32	31.92	31.61	31.47	30.05	31.44	30.60	
	4	E15	30.99	31.54	30.77	31.39	33.40	30.78	33.91	31.15	30.91	31.14	31.17	31.12	
	5	E18	31.96	31.71	31.80	31.46	32.02	31.60	32.46	32.17	31.24	31.05	31.33	31.09	
	6	E16	32.01	30.50	32.09	31.28	31.96	29.93	33.12	29.85	32.26	31.84	32.22	31.48	
	7	E19	32.66		32.61		31.35		32.24		32.10		32.08		
	8	E20	32.96	31.29	32.95	31.10	32.50	31.74	32.37	31.90	32.81	30.87	32.87	30.98	
	9	E22	32.29	27.10	32.27	26.50	32.87	29.30	32.83	29.10	32.35	27.70	32.30	27.20	
	10	E24	32.14	33.63	32.26	33.77	30.52	32.05	31.27	32.68	32.54	32.84	32.60	32.96	
	11	E25	31.96		32.30		31.89		32.49		32.20		31.78		
	12	E26	31.73		31.74		31.88		32.20		31.70		31.78		
대조 군	13	E29	32.00	30.34	32.46	29.84	30.01	25.92	30.51	26.14	32.35	29.13	32.38	29.32	
	14	E32	32.21	30.82	32.28	29.89	30.54	27.50	31.34	27.80	30.22	28.04	30.30	28.44	
	15	E34	32.16	30.61	31.55	29.44	31.01	27.26	30.59	26.25	30.06	26.03	29.88	25.67	
	16	E39	32.54	29.88	33.22	29.82	29.56	22.86	29.84	22.63	30.55	26.15	30.55	26.47	
	17	E37	32.29	32.72	33.07	32.51	29.57	29.56	29.96	28.87	30.75	30.78	30.74	30.66	
	18	E38	31.93	32.57	31.75	32.24	27.26	27.35	26.49	25.67	30.21	29.71	30.53	29.97	
	19	E36	31.82	32.09	31.87	31.79	30.57	32.23	30.89	32.00	30.78	29.08	30.36	28.66	
	20	E42	32.38		32.04		27.11		27.33		29.16		29.13		
	21	E43	31.15	31.89	31.11	31.78	31.07	30.61	30.99	29.61	30.07	28.75	29.93	28.51	
	22	E47	31.35	32.37	31.53	32.17	32.10	31.17	31.55	31.23	29.49	29.45	29.91	30.00	
	23	E45	32.71	32.48	32.17	32.07	30.60	26.20	30.70	26.75	32.01	28.77	31.72	28.66	
	24	E46	31.14	32.98	30.83	32.61	28.92	30.07	29.35	30.30	28.44	30.06	28.28	29.96	
	25	E49	29.32	30.81	28.60	30.41	24.14	29.95	24.08	29.05	27.05	28.00	26.55	27.40	
	26	E50	32.32	31.02	31.71	30.99	29.38	27.31	29.20	27.13	28.85	27.60	28.46	27.49	

Appendix 7. 적외선 체열검사 결과 (계속)

배정	일련 번호	배정 번호	태층좌		태층우		증완		권료좌		권료우	
			방문1	방문4								
	1	E07	27.68		28.27		28.93		30.05		30.40	
	2	E04	31.25	31.59	30.79	31.62	32.65	32.05	32.71	33.35	32.99	33.58
	3	E14	30.07	30.44	29.51	29.96	32.71	32.34	32.61	30.68	33.18	31.05
	4	E15	32.14	27.76	31.80	27.88	31.11	32.02	31.47	32.34	31.83	32.37
	5	E18	29.86	31.49	29.85	31.92	32.33	32.43	33.65	31.72	32.58	31.76
	6	E16	29.02	27.04	29.63	27.60	33.59	32.75	33.66	31.45	33.51	32.19
	7	E19	31.34		32.08		32.88		33.46		33.90	
	8	E20	31.78	30.69	32.04	30.57	33.47	31.86	33.74	31.33	33.70	31.86
	9	E22	28.98	27.50	29.40	27.30	32.19	28.50	32.51	26.50	32.25	27.10
	10	E24	31.12	31.35	31.26	31.36	32.38	33.36	32.49	33.94	32.52	34.14
	11	E25	29.23		29.87		33.10		32.72		33.26	
	12	E26	31.44		31.45		32.82		32.13		31.88	
대 조 군	13	E29	29.83	26.04	30.45	25.87	33.35	30.84	32.34	29.11	32.70	30.68
	14	E32	25.84	21.93	25.38	21.77	32.83	33.05	31.62	29.73	31.77	29.25
	15	E34	24.22	19.74	24.33	19.54	29.64	28.62	31.39	27.33	31.78	27.57
	16	E39	25.69	20.57	24.86	20.11	30.81	27.87	31.86	26.11	32.70	26.50
	17	E37	24.43	25.42	23.47	24.88	33.32	32.99	33.79	33.42	33.84	33.27
	18	E38	23.11	22.09	23.41	23.09	30.14	31.72	32.82	32.64	32.35	32.56
	19	E36	25.83	28.18	25.35	27.75	31.53	31.70	32.78	31.95	32.95	32.26
	20	E42	22.63		22.39		32.67		32.06		32.38	
	21	E43	27.87	21.73	27.98	21.97	32.68	32.43	32.78	32.63	32.74	33.38
	22	E47	31.66	23.30	31.90	23.62	31.92	32.74	32.62	33.38	32.83	33.49
	23	E45	25.74	22.39	25.39	22.03	33.15	30.55	32.59	30.05	32.78	30.23
	24	E46	21.58	25.45	20.99	27.96	29.36	32.40	31.26	33.53	31.13	33.50
	25	E49	17.45	20.75	17.13	19.11	27.95	29.31	27.93	29.12	27.94	29.29
	26	E50	25.25	23.12	25.04	22.39	31.57	30.53	32.99	28.83	32.79	30.13

Appendix 8. 적혈구 변형능 검사 결과 (방문 1, 4)

배정	일련 번호	배정 번호	V1-복용전	V1-복용전	V4-복용후	V4-복용후
			Elmax	SS1/2	Elmax	SS1/2
	1	E02	0.556	2.373	0.555	2.090
	2	E01	0.566	2.345	0.539	2.051
	3	E03	0.550	2.518	0.552	2.119
	4	E05	0.568	2.411	0.559	2.620
	5	E06	0.572	2.380		
	6	E09	0.567	2.625	0.561	2.738
	7	E08	0.553	2.463	0.558	2.002
	8	E10	0.570	2.409	0.556	2.409
	9	E13	0.542	2.732	0.529	2.972
	10	E12	0.555	2.159	0.547	2.051
	11	E11	0.551	2.277	0.551	2.174
	12	E17	0.572	2.257	0.548	2.405
시험군	13	E21	0.539	2.042	0.526	2.225
	14	E23	0.539	3.074	0.529	3.254
	15	E28	0.526	2.235	0.551	2.264
	16	E27	0.549	2.127		
	17	E30	0.524	2.078	0.549	2.019
	18	E31	0.515	2.338	0.550	2.176
	19	E33	0.545	2.509	0.567	2.002
	20	E35	0.540	2.320	0.560	2.227
	21	E40	0.538	2.908	0.550	2.547
	22	E41	0.561	2.767	0.562	2.467
	23	E44	0.546	2.002	0.533	2.031
	24	E48	0.561	2.053	0.559	2.089
	25	E51	0.562	2.634	0.565	2.437

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표의 달성도

1. 1차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
제1세부: 소재 표준화 작업 및 제품 화를 위한 기 반기술 개발	10%	원물 확보 및 추출물 제조	100%	- 유통되는 소재들의 동향 파악 및 소비 자 인지도를 기반으로 한 원물 수 급 지역 선정 - 산지별, 시기별 지표성분 함량 변화 분석 - 원물수급가능여부 확인 및 전처리 가능 업체 검색 - 지표물질 분석 조건 설정 및 시험관 시험을 위한 추출물 제조
	20%	유자 및 감잎의 지표성분 설정 여부	100%	- 사자발약쑥, 유자, 감잎 각각의 지표 (기능)성분 선정 - 선정된 지표성분의 HPLC 분석을 통 한 분석법 validation
	20%	유자 및 감잎의 원료 표준화	100%	- 원물의 추출 조건별 수율 및 지표성 분 함량 비교 - 최적 Lab-scale 추출 공정 확립 - 대량생산 조건적용을 통한 테스트
제1협동: 시험관 실험 및 동물실험 을 통한 소재 의 혈행 개선 기능성 검증	20%	<i>in vivo</i> 효능 실험에 응용될 질환동물모델 및 바이오마커 설정 여부	100%	- 식이유도 혈행장애 동물 모델을 이 용하여 사자발약쑥, 감잎 및 유자의 <i>in vivo</i> 효능 평가 - 혈장 응고시간 측정 - 혈중 지질 저하 효능 평가 - 다양한 혈장 adipokine 및 cytokine 측정 - 간조직과 지방조직의 지질대사 관련 효소 활성화도 분석 - 간조직과 지방조직의 형태학적 관찰
	20%	혈행 및 지질대사 개선용 후보 소재 활성 검색 여부	100%	- 시험관 실험과 예비동물실험을 통해 혈행개선 후보 기능성 소재의 활성 검색
	10%	<i>in vitro</i> 혈소판 응집능 분석 여부	100%	- Arachidonic acid, ADP, collagen 유 도에 의한 혈소판 응집능 측정 - 혈소판 활성화를 통해 혈소판 응집 에 관여하는 바이오마커 (serotonin, TXB ₂ , P-selecitin)의 함량 측정

2. 2차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
제1세부: 유자 및 감잎 추출물의 대량생산 및 안전성 평가	15%	유자 및 감잎 추출물의 대량생산 공정 확립 및 시제품 생산 여부	100%	- 대량생산에 필요한 전처리 공정확립 - 약썩, 유자, 감잎 각각 추출물의 반복 시생산을 통해 수율 및 공정에 대한 규격 설정
	15%	농축액의 건조 테스트 및 안정성 확인	100%	- 인체적용시험을 위한 추출농축액의 분말화 완료, 시험식품 제조 - 농축액의 용해도, 흡습성, 안정성 분석 및 건조방법에 대한 규격 확립
	10%	안전성 자료 검색 및 근거 작성	100%	- 소재의 안전성 자료 검색 - 식경험 및 섭취근거, 섭취량에 대한 자료 검색 및 근거 작성
제1협동: 동물실험을 통한 소재의 혈행개선 기능성 검증	30%	약썩, 유자 및 감잎의 혈행 개선용 바이오마커 분석 여부	100	- 총 2차례의 동물실험을 통해 사자말약썩, 감잎 및 유자의 <i>in vivo</i> 효능 평가 - 혈장 응고시간 (aPTT, PT) 측정 - 혈소판 활성화 바이오마커 측정 - 혈중 지질 저하 효능 분석 - 다양한 혈장 adipokine 및 cytokine 측정 - 간조직과 지방조직의 지질대사 관련 효소 활성화도 분석 - 간조직과 지방조직의 형태학적 관찰 - 동맥조직에서 혈행 관련 유전자 발현도 변화 측정
제2협동: 소재의 혈행 개선 기능성 근거를 위한 자료수집	15%	약썩, 유자, 감잎에 대한 임상연구 자료 수집	100	- 국내 임상연구자료 데이터베이스에서 주요 검색어를 '사자말약썩', '약썩', '유자', '감잎', '임상연구', '인체시험', '혈행개선', '고지혈증', '항산화', '항응고', '건강기능'으로 하였음. - 국외 임상연구자료 데이터베이스에서 주요검색어를 ' Artemisia princeps Pampanini , Citrus junos Sieb ', ' Persimmon leaves ', ' clinical study ', ' antithrombotic ', ' antiplatelet ', ' antilipidemic '으로 하였음.
	15%	혈행개선 관련 임상연구 자료 수집	100	- 혈행개선 biomarker 자료수집을 근거로 관찰지표 설정 - 피험자 선정 및 제외기준 확정 - 인체적용시험 protocol 및 CRF 작성 - 시험제품 복용 전 후 설문지 작성

3. 3차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
제1세부: 최종선정된 감잎유자복합물의 대량생산기술 확립 및 제품화연구	10%	반복 대량생산을 통한 소재 표준화 완료	100%	- 반복 대량생산을 통한 각 공정별 규격 설정 - 원료 수급처 확보 및 연도별 변화 분석 - 중금속, 잔류농약, 영양성분 공인기관 성적서 확보 및 규격 설정
	15%	제품화를 위한 연구 진행 여부	100%	- 대량생산된 소재를 활용한 prototype 제품 제조 - 인체적용시험 대상자를 통한 소비자 설문 조사
	5%	복용기간 중 인체시험 대상자 모니터링 여부	100%	- 3차에 걸쳐 인체적용시험 모니터링 실시 - 검사기록지 및 CRF 등 검토하여 수행기관에 모니터링 보고서 발송
	제1협동: 동물실험을 통한 소재의 혈행개선 기능성 검증	15%	복합 추출물 섭취에 의한 혈행개선 동물시험 분석 완료	100
제2협동: 인체적용시험을 통한 소재의 혈행 개선 기능성 검증		15%	유자 및 감잎의 Mode of action 을 유전자 네트워크 수준에서 규명 여부	100

	40%	인체적용시험을 통한 소재의 혈행 개선 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 시험제품 및 대조식품 용량 및 용법 확정 - 인체적용시험 protocol 최종검토 - 임상시험윤리위원회 심의 신청 및 획득 - 대상자 모집 및 인체적용시험 수행 - 이상반응 조사 - 모니터링 시행 - 인체적용시험 결과 통계분석 및 보고서 작성
--	-----	-----------------------------	--

4. 최종

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
제1세부: 사자발약쑥 추출물 혹은 최종선정 소재의 개별인정 획득 및 제품화 연구	15%	기능성소재의 표준화 완료 여부	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 원물 및 전처리 공정, 업체 확보 - 소재의 안정성, 안전성 분석 완료 - 지표성분 설정 및 분석법 확립
	15%	대량 생산기술 확립 및 시제품 생산 여부	100%	<ul style="list-style-type: none"> - GMP시설에서 반복 대량생산을 통한 제조공정 및 공정별 규격 설정 - 분말 및 농축액 형태의 소재 생산 완료
제1협동: 동물실험을 통한 소재의 혈행개선 기능성 검증	20%	제품화 연구 진행 여부	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 대량생산된 소재를 활용한 prototype 제조 완료 및 소비자조사 진행
	20%	기능성과 작용기작 규명 여부	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 혈행개선 및 지질대사 개선능 평가를 통한 소재의 유효성 및 작용기작 규명
제2협동: 인체적용시험을 통한 소재의 혈행 개선 기능성 검증	10%	논문출판 및 특허 출원여부	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 논문 출판 (2건) 및 논문 투고 (1건) 완료 - 특허출원 완료 (1건)
	20%	인체적용시험을 통한 혈행 개선 기능성 검증	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 혈행개선 관련 건강기능소재의 인체적용시험 protocol 개발 - 인체적용시험을 통한 감잎유자 복합물의 혈행개선 기능 검증

제 2 절 관련분야에의 기여도

- 사자발약쑥, 감잎 및 유자 등 국내 농산자원의 혈행 및 지질대사 개선 가능성을 *in vitro* 실험 및 동물모델을 이용한 *in vivo* 실험과 인체적용시험에서 확인함으로써 국내 자생식물을 기반으로 한 기능성 식품 개발의 가능성을 제시하였으며 농가 소득 증대를 꾀할 수 있는 계기를 마련하였음.
- 약쑥, 감잎, 유자 등 국내산 농산물의 생리활성 성분을 규명하고, 특정 성분을 표준화하여 제조하는 원료 제조방법 연구를 수행하여 원료 표준화를 확립하였음. 이렇게 제조된 원료의 품질 관리를 위한 기준규격을 설정하여 기능성 소재의 품질 관리에 중요한 지표로서 활용이 가능하도록 하였음.
- 원물소재의 특정 성분 함량을 강화하기 위하여 추출조건을 최적화하고, **scale-up** 생산 과정을 확립함으로써 국내 자생식물의 표준화된 원료 그 자체로서의 상품성을 높였음.
- 감 수확 후 부산물로 사용되지 않는 감잎을 이용하여 지표성분 함량을 표준화하고 고부가가치 기능성 소재로 개발함으로써 감잎의 산업적 가치를 증대시킴.
- 지리적표시체가 등록되어 있는 인지도 높은 지역 (고흥 유자, 강화 약쑥)의 원료를 사용함으로써 소비자의 수용도 및 신뢰를 높이고 국내산 소재를 주원료로 하는 과학적 근거를 갖춘 고품질의 건강식품으로의 개발 가능성을 높임.
- 국내산 천연물로부터 도출된 사자발약쑥, 감잎 및 유자 소재의 혈행 개선 가능성을 입증함으로써 대한민국 30대 이상 성인 10명 중 3명이 겪고 있는 대사증후군에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련 질환의 발병률 감소와 국민건강 증진에 기여할 것임.
- 국내산 원료를 이용한 혈행 및 지질대사 개선능을 국제 저널에 게재하고 발표함으로써 국내산 기능성 소재의 가능성을 제시하고 기능성 원료개발을 통해 국내 식품관련 기술력을 인정받을 수 있는 계기를 마련하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	제품명 명칭등록	제품생산 수입판매 신고	제품보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표										
	달성										
2차년도	목표	1						1			
	달성								1		
3차년도	목표	1						2			
	달성	1						2			
계	목표	2						3			
	달성	1						2	1		

(단위 : 건수)

가. 특허

당초 목표는 특허 출원 2건이었으나, 과제 시작시점인 2012년 이후 발표된 약쑥, 유자의 대사성질환 개선 논문 및 특허들이 검색되면서 본 과제의 기능성 원료의 등록 가능성이 낮아지면서, 최종 선정된 복합물의 혈행개선능 위주로 발명기술서를 작성하였으며, 2014년에 씨제이제일제당 주식회사를 출원인으로 출원을 완료하였음.

특허명: 감잎추출물을 포함하는 혈액순환 장애 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2014.12.18

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2014-0183454 (접수번호 1-1-2014-1233474-25)

출원인명칭 씨제이제일제당 (주)(1-2007-037435-2)

대리인성명 손민(9-1999-000420-6)

발명자성명 김혜진 문영이 신동주 문명석 최명숙 류리 김애향

발명의명칭 감잎 추출물을 포함하는 혈액순환 장애 또는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

특 허 청 장

나. 논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Anticoagulant and antiplatelet activities of <i>Artemisia princeps</i> Pampanini and its bioactive components	류리	최명숙	정운주 김혜진 이원화 배종섭	Preventive Nutrition and Food Science	18(3)	국내	비 SCI
2015	Beneficial effect of persimmon leaves and bioactive compounds on Thrombosis	류리	최명숙	정운주 서유리 김혜진 문병석 배종섭 이동근	Food science and Biotechnology	24(1)	국외	SCIE
2015	Ethanol extract of persimmon tree leaves improves blood circulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet	류리	최명숙	류리 김혜진 문병석 정운주 이미정 이동진 류재용 최명숙	Journal of Medicinal Food	Accept	국외	SCI

당초 SCI급 저널에 논문 3편을 게재하기로 목표를 설정하였으며, 현재 2편의 논문이 SCI(E) 저널에 게재되었음. 감잎 및 유자 복합물의 혈행개선 효능이 (동물시험 결과) SCI 저널에 2016년 3월경 투고예정임. 종료 1년 이내에 3편이 모두 게재되어 목표를 달성할 예정임.

(1) *Anticoagulant and antiplatelet activities of Artemisia princeps Pampanini and its bioactive components*

Prev. Nutr. Food Sci. 2013;18(3):181-187
<http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2013.18.3.181>
 pISSN 2287-1098 · eISSN 2287-8602

Anticoagulant and Antiplatelet Activities of *Artemisia princeps* Pampanini and Its Bioactive Components

Ri Ryu¹, Un Ju Jung², Hye-jin Kim³, Wonhwa Lee^{4,5}, Jong-Sup Bae⁴, Yong Bok Park⁶, and Myung-Sook Choi^{1,2}

¹Department of Food Science and Nutrition, ²Center for Food and Nutritional Genomics Research, ⁴College of Pharmacy, CMRI, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, ⁵Department of Biochemistry and Cell Biology, School of Medicine, ⁶Department of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³Foods R&D, CJ Cheil Jedang Corporation, Seoul 152-051, Korea

(2) *Beneficial effect of persimmon leaves and bioactive compounds on Thrombosis*

Food Sci. Biotechnol.
DOI 10.1007/s10068-014-0

RESEARCH ARTICLE

Beneficial Effect of Persimmon Leaves and Bioactive Compounds on Thrombosis

Ri Ryu, Un Ju Jung, Yu-Ri Seo, Hye-Jin Kim, Byoung Seok Moon, Jong-Sup Bae, Dong Gun Lee, and Myung-Sook Choi

Received February 25, 2014; revised July 22, 2014; accepted September 18, 2014; published online April 30, 2015
© KoSFoST and Springer 2015

(3) *Ethanol extract of persimmon tree leaves improves blood circulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet*

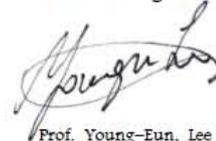
Journal of
MEDICINAL FOOD
KFN Hang An United, Inc. is publisher

Certificate of Publication

This is to certify that our Editorial Board Accepted Paper of Ri Ryu, Hye-Jin Kim, Byeongseok Moon, Un Ju Jung, Mi-Kyung Lee, Dong Gun Lee, ZaeYoung Ryoo, Yong Bok Park, Myung-Sook Choi
Title: Ethanol Extract of Persimmon Tree Leaves Improves Blood Circulation and Lipid Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet

This Paper is Original & Informative and it is Done Peer Review.
Your Article will be published in Journal of Medicinal Food.

Authorized Signature



Prof. Young-Eun, Lee
Editor-in-Chief

The Korean Society of Food Science and Nutrition
103-1307, 1130, Jungang-daero, Yeonje-gu, Busan 611-820, Korea
TEL: +82-51-866-3693,4 FAX: +82-51-866-3695
Website: www.kfn.or.kr E-mail: kfn@kfn.or.kr

다. 학술대회/심포지엄 발표

구분	학회명	학회기간	장소	발표제목
국제 학회 발표	APNC 2012, The 5th Asia-Pacific Nutrigenomics Conference	2012.10.11. ~2012.10.1 3	대구, 대한민국	Anti-coagulation property of <i>Artemisia Princeps pampanini</i> cv. sajabal extract
국제 학회 발표	2012 KFN International Symposium and Annual Meeting	2012.10.31. ~ 2012.11.02	제주, 대한민국	Potential beneficial effects of Persimmon leaves extract on anticoagulation
국제 학회 발표	2013 Annual Conference & Exhibition	2013.11.5.~ 2013.11.09	타이베이, 대만	Persimmon leaves extracts have on anticoagulant and antiplatelet activities in rats fed a high fat diet
국제 학회 발표	ISNN 2014, International Society Nutrigenetics/Nutri genomics	2014.5.2.~ 2014.5.3	퀸즈랜드, 호주	Effect of <i>Artemisia princeps pampanini</i> extract on plasma makers and gene expression of platelet activation as well as lipids profiles in rats fed a high-fed diet
국제 학회 발표	2014.KFN International Symposium and Annual Meeting	2014.10.27~ 2014.10.29	대전, 대한민국	Effect of ethanol extracts of persimmon leaf <i>Citrus junos sieb</i> mixture on blood coagulation and lipid profiles in C57BL/6J mice fed high fat diet

라. 인력양성

인력양성명	인력양성년도	성과발생년도	인력양성내용	학위	성별
박사 인력양성	2012.8	2013	조윤영	박사 (이학)	여
박사 인력양성	2013.2	2013	신수경	박사 (이학)	여
박사 인력양성	2013.2	2013	권은영	박사 (이학)	여
석사 인력양성	2014.2	2014	류리	석사 (이학)	여
석사 인력양성	2014.2	2014	서유리	석사 (이학)	여

2. 연구성과 활용

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
목표	1	1			1	
성과	2015년 예정	2017년 예정			2016년 예정	

- 현재 CJ제일제당(주) 건강식품사업부는 **2017년에 감잎/유자 복합물을 이용한 신제품 출시**를 계획하고 있음. 인체적용시험에서 혈행개선 혹은 지질대사 개선 가능성이 확인되면, 건강기능식품 개발을 위한 기능성 원료 개발인정을 **2015년에 신청** 예정임. 식약처로부터 감잎/유자 복합물이 기능성 원료로 인정이 되면 정제 (혹은 캡슐) 및 음료 형태로의 건강기능식품 개발을 **2016년에** 진행하고 **2017년에** 출시할 계획임.
- 인체적용시험 결과 추가 연구가 필요하다면 추가 인체적용시험을 수행할 예정이며, 이를 통해 식약처로부터 **2개이상의 health claim**을 획득하는 것이 목표임. 식약처에 개별인정 신청 전에 연구에 대한 기술실시(이전)을 완료할 예정임.
- 과제가 종료된 후에도, 연도별 원물 변화 및 제품적용성을 증대시키기 위한 소재연구를 계속 진행할 예정이며, 소비자 조사 등을 통해 제형 및 제품 컨셉을 확정짓고 제품 개발을 지속적으로 수행할 것임 (내부적으로 **2015년** 과제 계획에 기반영되어 있음).
- CJ제일제당은 국내 전통소재 브랜드를 런칭할 예정이며, 브랜드 전략에 따라 필요시 국내산 자체소재 홍보를 위한 언론기사 등을 홍보팀에서 계획중임.
- 또한 국내산 기능성 소재의 우수한 결과를 해외저널에 지속적으로 게재함으로써, 소재의 우수성을 해외에 알리고 이를 글로벌 소재로의 도약을 계획하고 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 세계적으로 여러 가지 종류의 썩이 존재하며, 미국의 **Randall Mynatt** 연구팀의 보고에 의하면, 비만일 경우, **Mcp1, Tnf α , Cxcl5, Cxcl10 and Tnfr1, Tnfr2** 유전자 발현도가 증가함. 하지만 썩을 섭취할 경우 염증 **Mcp1, Tnf α** 그리고 **NF-kB**의 유전자 발현이 감소한다고 보고됨.
- 미국의 **Ilya Raskin** 박사 연구팀은 **C57BL/6J** 마우스에 썩과 콩 단백질을 함께 섭취 시켰을 때 생물학적 이용도가 향상되고 혈당이 개선된다고 보고함.
- 중국의 **Chun-ni Zhang** 연구팀은 감잎에 함유되어 있는 플라보노이드의 글리코시드와 아글리콘이 인체의 장내 박테리아 대사에 중요한 역할을 한다고 보고 하였음.
- 일본의 **Norihiko Nishimura** 연구팀은 유자의 껍질을 비만이 유도된 **zebrafish**에 공급한 결과, **zebrafish**의 비만이 개선된다고 발표하였다. 즉, 유자 껍질은 혈중 및 간조직의 중성지방 축적을 억제하였고, 간조직의 **PPAR γ** 유전자 발현도를 감소시켰음. 반면 지방 산화는 유자 껍질에 의해 증가되었음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

2013 생명공학백서. 생명공학정책연구센터. 2013.

BT 기술동향 보고서, “건강기능식품 연구 및 기술개발 역량” (2012), 생명공학정책연구센터

건강기능식품 산업동향 보고서 (2013), 농업기술실용화재단

건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사 (2014), 한국건강기능식품협회

글로벌 선도산업 창출을 위한 항노화산업 실태 조사·분석 및 활성화방안 연구 (2014), 한국보건산업진흥원

김미경 외, 건강기능식품, 149-159, 2010. 교문사.

류리, 강화약썩, 감잎 및 유자 주정추출물이 혈행개선 및 지질대사 조절에 미치는 영향; *in vitro and in vivo system*, 경북대학교 이학석사 학위논문, 2013.

보건복지부 보건의료기술연구개발사업(1차) 대사성 증후군 대응 R&D 기획 연구 특허동향조사 보고서. 특허청. 2013.

사망원인별 사망률 추이, e-나라지표.

유-헬스케어(u-healthcare)의 현황 및 과제. 국회입법조사처. 2014.

임상시험 통계지침. 2000년 12월. KFDA, 의약품안전국, 식품의약품안전청.

정진호, 건강기능성식품의 혈행개선 효능평가법, 한국식품영양과학회 2003년도 정기총회 및 54차 학술발표회, 2003.

정진호, 혈행 관련 기능성 시험, 건강기능식품 기능성 시험 가이드, 식약처

허명희, SPSS Statistics 결측값 분석과 다중대체, ㈜데이터솔루션, 2012.

Aebi H. Catalases. *Methods of enzymatic analysis* 2(673-684, 1974.

Alessi M, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Junhan-Vague I. Production of plasminogen activator 1 by human adipose tissue. *Diabetes*. 46:860-867, 1997.

Anfossi G, Russo I and Trovati M. Platelet Dysfunction in Central Obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 19(6):440-449, 2009.

Anfossi G, Russo I, Trovati M. Platelet dysfunction in central obesity 2009. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 19:440-449, 2009.

Barceló-Batlloiri S and Gomis R. Proteomics in Obesity Research. *PROTEOMICS-Clinical Applications* 3(2):263-278, 2009.

Bieber L, Abraham T and Helmrath T. A Rapid Spectrophotometric Assay for Carnitine Palmitoyltransferase. *Analytical biochemistry* 50(2):509-518, 1972.

- Blann AD, Nadar SK and Lip GY. The Adhesion Molecule P-Selectin and Cardiovascular Disease. *European heart journal* 24(24):2166-2179, 2003.
- Bocan T, Bak Mueller S, Quenby Brown E, Lee P, Bocan MJ, Rea T and Pape ME. Hmg-Coa Reductase and Acat Inhibitors Act Synergistically to Lower Plasma Cholesterol and Limit Atherosclerotic Lesion Development in the Cholesterol-Fed Rabbit. *Atherosclerosis* 139(1):21-30, 1998.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* 72(1):248-254, 1976.
- Cho HJ, Kittaka R, Abdou AM, Kim Mujo, Kim HS, Lee D.-H, Park H.-J: Inhibitory Effects of Oligopeptides from Hen Egg White on Both Human Platelet Aggregation and Blood Coagulation. *Arch Pharm Res.* 32: 945-953, 2005.
- Clutton P, Folts JD and Freedman JE. Pharmacological Control of Platelet Function. *Pharmacological Research* 44(4):255-264, 2001.1) Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 20(4):470-5, 1974.
- Duttaroy AK. Postprandial activation of hemostatic factors: Role of dietary fatty acids. *PLEFA.* 72:381-391, 2005.
- Eckel R, Barouch W, Ershow A. Report of national heart, lung, and blood institute-national institute of diabetes and digestive and kidney diseases working group on pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation.* 105: 2923-2928, 2002.
- Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) July 2005
- Faber DR, de Groot PG, Visseren FL. Role of adipose tissue in haemostasis, and fibrinolysis. *obesity.* 10:554-563, 2009.
- Folch J, Lees M and Sloane-Stanley G. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. biol. Chem* 226(1):497-509, 1957.
- Furie B, Furie BC: Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 115: 3355-3362, 2005.
- Han J-M, Kim M-J, Baek S-H, An S, Jin Y-Y, Chung H-G, Baek N-I, Choi M-S, Lee K-T and Jeong T-S. Antiatherosclerotic Effects of *Artemisia Princeps Pampanini* Cv. Sajabal in Ldl Receptor Deficient Mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(4):1267-1274, 2009.

- Havel PJ. Role of Adipose Tissue in Body-Weight Regulation: Mechanisms Regulating Leptin Production and Energy Balance. *Proceedings of the Nutrition Society* 59(03):359-371, 2000.
- Juhan-Vague I, Vague P. Interrelations between carbohydrates, lipids, and the haemostatic system in relation to the risk of thrombotic and cardiovascular disease. *Am J Obstet Gynecol.* 163:313-315, 1990.
- Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS. The Hypoglycemic Effects of Hesperidin and Naringin Are Partly Mediated by Hepatic Glucose-Regulating Enzymes in C57BL/KsJ-db/db Mice. *J. Nutr.* 134: 2499-2503, 2004.
- Jung UJ, Park YB, Kim SR, Choi MS. Supplementation of persimmon leaf ameliorates hyperglycemia, dyslipidemia and hepatic fat accumulation in type 2 diabetic mice. *PLoS ONE* 7(11): e49030, 2012.
- Kim KY, Lim KM, Kim CW, Shin HY, Seo DB, Lee SJ, Noh JY, Bae ON, Sin S, Chung JH: Black soybean extract can attenuate thrombosis through inhibition of collagen-induced platelet activation. *J Nutri Biochem.* 22: 964-970, 2011.
- Lazarow PB. [19] Assay of Peroxisomal *B*-Oxidation of Fatty Acids. *Methods in enzymology* 72(315-319), 1981.
- Loskutoff DJ, Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1-6, 1998.
- Lundgren C, Brown S, Nordt T, Sobel B, Fujii S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. *Circulation.* 93:106-110, 1996.
- Marklund S and Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47(3):469-474, 1974.
- McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem.* 29(3):538-542, 1983.
- McNicol A and Israels SJ. Platelets and Anti-Platelet Therapy. *Journal of pharmacological sciences* 93(4):381-396, 2003.
- Mertens I and Van Gaal L. Obesity, Haemostasis and the Fibrinolytic System. *Obesity reviews* 3(2):85-101, 2002.
- Militão GC, Prado MP, Pessoa C, de Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Veloso PA, Costa-Lotufo LV, Machado-Santelli GM. Pterocarpanes induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. *Biochimie.* 104:174-55. 2014

- Morel I , Lescoat G , Cogrel P , Sergent O , Padeloup N , Brissot P , Cillard P , Cillard J: Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*. 45: 13-19, 1993.
- Nofer JR, Tepel M, Assmann G. Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺ /K⁺ antiport in human platelets. A novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia, *Circulation*. 95:1370-1377, 1997.
- Ochoa S. [123] Malic Dehydrogenase from Pig Heart: L-Malate+ Dpn⁺ ⇌ Oxalacetate+ Dpn⁺ H⁺. *Methods in enzymology* 1(735-739, 1955.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical biochemistry* 95(2):351-358, 1979.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 22: 659-661,
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 28(1):56-63, 1957.
- Steel RGD and Torrie JH. Principles and procedures of statistics. McGraw Hill, New York. 1960.
- Strategic plan for NIH Obesity Research. 2011.
- Walton PA and Possmayer F. Mg²⁺-Dependent Phosphatidate Phosphohydrolase of Rat Lung: Development of an Assay Employing a Defined Chemical Substrate Which Reflects the Phosphohydrolase Activity Measured Using Membrane-Bound Substrate. *Analytical biochemistry* 151(2):479-486, 1985.
- Warnick GR, Mayfield C, Benderson J, Chen JS, Albers JJ. HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg²⁺ and by dextran sulfate-Mn²⁺-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method. *Am J Clin Pathol*. 78(5):718-723, 1982.

본문 작성 요령

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

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

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 마탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표지
2. 제출문
3. 요약문
4. 영문 요약서(Summary)
5. 영문 목차(Contents)
6. 목차
7. 본문
8. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄 시에는 이에 준한다.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발				
	(영문) Development of health-functional food for improving haemostasis using <i>Artemisia princeps</i> Pampanini, <i>Citrus junos</i> Sieb and persimmon leaves				
주관연구기관	CJ제일제당(주)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) CJ제일제당(주) 식품연구소	
참 여 기 업	CJ제일제당(주)			(성명) 김 혜 진	
총연구개발비 (860,000천원)	계	860,000천원	총 연구 기간	2011. 12. 26. ~ 2014. 12. 25. (3년)	
	정부출연 연구개발비	430,000천원	총 연 구 원 수	총 인원	43
	기업부담금	430,000천원		내부인원	31
	연구기관부담금			외부인원	12
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사자발약쑥, 감잎, 유자의 표준화를 위한 국내산지 선정, 지표성분 개발 및 추출법의 표준화 - 건강기능소재 조성물의 안전성 자료 확보 - 기능성 소재의 혈행개선 기능에 대한 과학적 근거와 작용기작 도출 - 고부가가치 식품소재의 산업화 공정 개발 - 시제품 제조와 제품화를 위한 최적화 공정조건 설정 <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 사자발약쑥, 유자 및 감잎 주정 추출물의 원료 표준화 (원물수급, 산지, 추출법, 지표성분 설정 및 분석법, 잔류농약, 중금속, 식경험 자료 확보 및 저장안정성 분석 등) - 사자발약쑥, 유자 및 감잎의 혈행 개선 기능성 규명 (시험관실험, 동물실험, 인체적용시험) - 소재의 대량생산 공정 확립 및 제품화 기술 개발 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>연구 결과를 토대로 현재까지 2편의 논문이 출판되었으며, 1편의 논문은 투고중임. 또한 특허 1건이 출원 완료되었으며 2015년에 개별인정 신청하여 2016년에 자체사업화가 예정되어 있음. 국내 농산자원을 이용한 혈행 개선 기능성 소재를 개발한 노하우는 추후 개발될 기능성 소재 및 제품 개발에도 사용될 것이며, 고부가가치화를 실현할 것임. 또한 본 과제를 통해 출판된 국제 논문이나 특허를 통해 국내산 기능성 소재의 글로벌화에도 기여할 것임.</p>					

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	기능성 식품	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	111125-3
연구과제명	사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발				
주관연구기관	CJ제일제당(주)				
연구담당자	주관연구책임자	김 혜 진			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	CJ제일제당(주) 식품연구소	성 명	김 혜 진
		기관(부서)	경북대학교 식품영양학과	성 명	최 명 숙
		기관(부서)	대구한의대부속 한방병원	성 명	백 경 민
		기관(부서)		성 명	
연구기간	총 기 간	2011.12.26. ~ 2014.12.25	당해년도기간	2013.12.26.~ 2014.12.25	
연구비(천원)	총 규 모	860,000	당해년도규모	340,000	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행
 계획대로 진행
 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음
 어느 정도 얻음
 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : 제품화에 필요한 많은 연구들을 본 과제를 통해 수행할 수 있었음)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	CJ제일제당(주)	수석연구원	김 혜 진 (인)
참여기업대표	CJ제일제당(주)	대표이사	김 철 하 (인)

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기능성 식품	
연구 과제 명	사자발약쑥, 유자 및 감잎을 이용한 혈행 개선 건강기능소재 및 제품개발			
주관연구기관	CJ제일제당(주)	주관연구책임자	김 혜 진	
연구 개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	430,000천원	430,000 천원		860,000천원
연구개발기간	2011.12.26. ~ 2014.12.25			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 사자발약쑥, 유자, 감잎의 건강기능소재화를 위한 표준화	원물 산지 선정, 공급처 선정, 추출조건 설정, 지표성분 선정, 분석방법 확립, 규격 설정 등 기능성 소재로의 개발을 위한 표준화 수행
② 관련소재의 혈행 개선 기능에 대한 과학적 근거와 작용기작 도출	사자발약쑥, 감잎, 유자의 혈행개선 (혈소판응집억제) 및 지질대사 개선 (체지방 감소, 콜레스테롤 감소 및 관련효소 활성 개선)을 동물시험을 통해 규명하였으며, 작용기작을 확인하였음.
③ 고부가가치 식품소재의 산업화 공정 개발	기능성평가를 통해 최종선정된 소재인 감잎 및 유자추출물을 산업화가 가능한 전처리 및 추출 공정으로 반복 대량시생산을 실시하였으며, 이를 통해 공정별 기준규격을 설정하였음
④ 시제품 제조 및 혈행개선 제품 개발	추출물을 농축액 및 분말 형태로 소재의 안정성을 확보하였으며, 제품화를 위한 prototype 개발중임
⑤ 건강기능성 원료 개별인정 신청	인체적용시험 결과를 토대로 혈행 개선 혹은 지질대사 개선 기능성소재 개별인정을 신청할 계획임

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	국내산 약썩, 유자, 감잎의 소재 표준화 및 혈행 개선능 확인 기술

4. 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)	현장에 로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v				v(자체사업화)

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내산 농산자원을 이용한 혈행 개선용 기능성 소재 인정 (식약처) 및 건강기능식품 제품화

6. 연구결과물의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

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

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