1. 표지

(뒷면) (옆면) (앞면)

11-15
43000
-0014
28-01

곰보배추추출물을 이용한 체지방감소건강기능성식품 소재화기술개발 최종보고서

2016

농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

발 간 등 록 번 호
11-1543000-001428-01

곰보배추추출물을 이용한 체지방감소 건강기능식품 소재화 기술 개발 최종보고서

2016. 09. .

주관연구기관 / (주)와이디생명과학

농 림 축 산 식 품 부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곰보배추추출물을 이용한 체지방감소 건강기능식품 소재화 기술 개발”(개발기간 : 2014. 08. ~ 2016. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 09. 13.

주관연구기관명 : 이 진 우 (대표자) (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 이 대 견
협동연구책임자 :
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>114032-02</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2014.08.01 ~
2016.07.31</td><td>단 계 구 분</td><td>(총 단 계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발 사업</td></tr>
<tr><td>세부 사업명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">곰보배추추출물을 이용한 체지방감소 건강기능식품 소재화 기술 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">이대견</td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 명
내부: 명
외부: 명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부: 천원
민간: 천원
계: 천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 20 명
내부: 15 명
외부: 5 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:340,000천원
민간:120,000천원
계:460,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="2">(주)와이디생명과학
연구개발본부</td><td colspan="3">참여기업명
(주)와이디생명과학</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="2">연구기관명:
(주)파마크로</td><td colspan="3">연구책임자:
김남식</td></tr>
<tr><td colspan="3">○ in vitro에서 배암차즈기의 체지방감소 효과 및 작용기전 검증
○ 고지방식이 유도 비만 마우스 모델에서 배암차즈기추출물의 우수한 체중 증가 억제 및 지질 프로파일 개선 효과 확인
○ 체지방감소 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발에 있어 원료의 표준화를 위해 hispidulin의 분석법에 대한 유효성 검증 완료
○ 추출조건 확립 및 OEM 생산방식으로 대량 추출 공정의 최적화 및 표준화 완료
○ 원료에 대한 제제 및 제형연구를 통한 시제품제작 및 제품화
○ 비만 또는 과체중자를 대상으로 “YD-204B"의 체지방 감소 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험 실시
○ 배암차즈기 원재료의 대량생산 및 공급 방안 마련(농가와의 계약을 통한 국산배암차즈기 수급 및 단가 조설 가능)
○ 고소득 고기능 식물자원으로서 배암차즈기 농가의 소득 확대
○ 배암차즈기 추출물의 체지방개선 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발</td><td colspan="3">보고서 면수: 58</td></tr>
</table>

4. 국문 요약문

코드번호	D-01

연구의 목적 및 내용	연구개발목표; 체지방감소 효능을 갖는 곰보배추추출물의 기준 및 표준화 확립을 완료하고 인체적용시험을 실시하여 최종 건강기능식품 기능성 개별인정형 원료로서 개발하고자 함. 연구내용; <1 차년도> 1. 비만 예방 및 개선을 위한 제품의 표준화, 기준 및 시험법 설정 평가 2. 시제품 제작 3. 곰보배추추출물에 대한 비만 예방 및 개선 인체적용시험 (수탁시험) <2 차년도> 1. 곰보배추추출물 시제품에 대한 효능 검증 2. 곰보배추추출물 원료 및 시제품 안정성 평가 3. 곰보배추추출물에 대한 비만 예방 및 개선 인체적용시험 (수탁시험)				
연구개발성과	○ 곰보배추의 체지방감소 효과 및 작용기전 검증, 고지방식이 유도 비만 마우스 모델에서 체중 증가 억제 및 지질 프로파일 개선 효과 확인 - 논문게제 2편(한국약용작물학회지, Journal of Medicinal Food), 특허등록(1) ○ 체지방감소 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발에 있어 원료표준화, 추출조건 확립 및 OEM 생산방식으로 대량 추출 공정의 최적화 및 표준화 완료 - 논문게제 1편(한국약용작물학회지) ○ 원료에 대한 제제 및 제형연구를 통한 시제품 제작 및 제품화 ○ 비만 또는 과체중자를 대상으로 체지방 감소 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험 실시 ○ 곰보배추 원재료의 대량생산 및 공급루트확보(농가와의 계약을 통한 국산 곰보배추 수급 및 단가 조절 가능) ○ 곰보배추추출물의 체지방개선 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 곰보배추추출물을 이용한 건강기능식품 개별인정형 원료로서의 개발 - 대사성질환 개선 효능의 과학적 입증을 통한 원료의 최적화, 다양한 제형 설계를 통한 건강기능성식품 개발 - 항비만 유효성 및 작용기전 규명을 통한 우수한 후보 물질 도출 ○ 곰보배추추출물을 이용한 비만 질환 예방 제품개발 및 추가 기능성 확대 - 응용 기술 개발을 위한 제형화 연구, 응용 기술제품 규격 설정 및 표준화 - 맛, 향 등 관능테스트를 통한 최적 조성물 확보 ○ 자체개발을 위한 신뢰성 (Reliability) 인증 확보 계획 ○ 사업화를 위한 제품 양산(국내 GMP 공장에서 OEM 제조) 및 마케팅 ○ 대량 재배 및 생산을 통한 곰보배추 가격의 안정화 및 재배 활성화 ○ 곰보배추의 고부가가치 식품 소재 개발에 따른 계약재배 등 농가 소득 증대 및 지역농업 활성화				
중심어 (5개 이내)	곰보배추	비만	체지방 감소	건강기능식품	인체적용시험

5. 영문 요약문

〈 SUMMARY 〉

코드번호	D-02

Purpose& Contents	Purpose; Establishment of the specification and test procedure of *Salvia plebeia* R Br. extract which has the effect of decrease of body fat mass, and development of the extract as the functional ingredient for a health functional food Contents; <1st Year> 1. Validation of the specification and test procedure of products for the prevention and improvement of obesity 2. Production of prototype 3. Clinical trial for the prevention and improvement of obesity <2nd Year> 1. Verification of efficacy of the prototype 2. Stability test of the ingredient and prototype 3. Clinical trial for the prevention and improvement of obesity
Results	○ Completion of *in vitro* and *in vivo* efficacy verification for the decrease of body fat mass ○ Establishment of the specification and test procedure of *Salvia plebeia* R Br. extract, Completion of optimization and standardization of mass extraction process ○ Prototype product via formulation study ○ Clinical trial ○ Mass production and supply route of *Salvia plebeia* R Br. ○ Development of the extract as the functional ingredient for a health functional food
Expected Contribution	○ Development of the health functional food for the prevention and improvement of obesity ○ Expansion of additional functionality ○ Creation of high-value business as a health functional food

Keywords	*Salvia plebeia* R Br.	obesity	Decrease of fat mass	Health functional food	Clinical trial

6. 본문목차

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 ····· 1
2. 국내외 기술개발 현황 ····· 5
3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 52
5. 연구결과의 활용계획 등 ····· 54
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 55
7. 연구개발성과의 보안등급 ····· 56
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황 ····· 56
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 56
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 56
11. 기타사항 ····· 57
12. 참고문헌 ····· 57

<별첨> 자체평가의견서

7. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03

1-1. 연구개발 목적

○ **최종 목표:** 체지방감소 효능을 갖는 곰보배추추출물의 기준 및 표준화 확립을 완료하고 인체적용시험을 실시하여 최종 건강기능식품 기능성 개별인정형 원료로서 개발하고자 함. 이에 본 연구에서는 1) 곰보배추추출물의 기준 및 시험법 확립 및 제제화, 2) 시제품 제작, 3) 인체적용시험, 4) 시제품에 대한 효능 평가 완료를 통해 체지방감소 건강기능식품 소재로서의 활용 가능성을 평가 입증하고, 특용재배작물인 곰보배추를 이용한 다양한 제품화를 추진하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

1-2-1. 개발 연구과제에 대한 개요

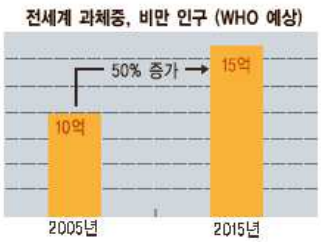
○ 현대사회는 운동부족 및 식생활의 서구화로 인하여 비만, 당뇨, 고지혈증, 고혈압, 당뇨병성 신증 및 간 질환 등과 같은 대사증후군(metabolic disease, syndrome X)의 발병률이 급속히 증가하고 있음.

○ **비만**은 렙틴저항성과 인슐린저항성으로 인해 에너지밸런스를 조절하는 기능에 장애가 생겨 발생하는 만성질환으로 만성스트레스, 탄수화물 과다섭취, 유해화학물질의 축적, 신체활동량 부족 등이 비만을 유발하는 원인으로 작용한다고 알려져 있음. 최근에는 비만으로 인한 만성염증과 산화스트레스가 비만을 더욱 악화시키는 요인으로 작용하는 것으로 밝혀지고 있음.

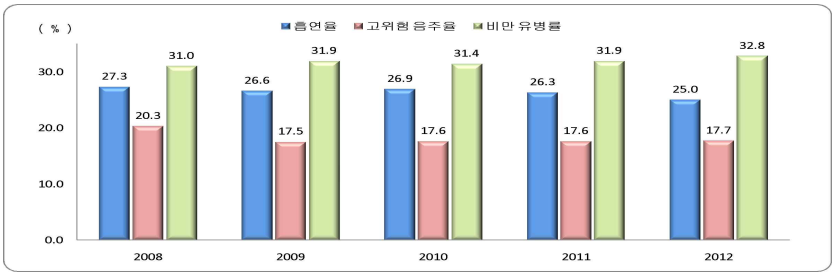
○ **전세계 비만인구의 증가 및 사회문제 대두:** 최근 국민 3명중에 1명이 비만증상을 나타내고 있을 정도로 비만에 대한 국민적 관심이 매우 높고 운동을 비롯한 개인적인 노력들에도 불구하고 환자 숫자는 더욱 늘어나는 추세임. 비만 인구는 전 세계적으로 현재 2억 5천만명으로, 2025년에 이르면 3억명 예상되고 있음. 2012년 19세 이상 인구의 비만 유병율 (체질량지수 25이상)은 32.8 %로 전년(31.9 %)에 비해 0.9 %p 증가하였으며, 성별로 보면 남녀 비만 유병율은 전년에 비해 각 0.9 %p, 1.1 %p 모두 증가하였음.

1-2-2. 국내외 현황 및 문제점과 전망

□ 세계 비민인구 및 비만율 현황



□ 우리나라 비만 유병률



출처: 2013 한국의 사회지표 보도자료 (통계청)

1-2-3. 연구개발의 필요성

(1) 경제적 중요성

○ **인구 노령화와 의료기 자기부담의 증가:** 전 세계적으로 인구의 고령화로 인하여 의료비의 자기부담이 증가함에 따라 국가 부담가중, 소비자의 'Self care 의식'이 증대되면서 건강식 및 기능성 식품 시장은 빠르게 성장하고 있음. 특히 5~10년간 건강에 대한 관심은 지속적으로 늘어났고, 특히 비만, 당뇨관련 질병과 노화가 초점이 되고 있음. 보건복지부 발표에 따르면 우리나라에서도 비만에 지출된 사회경제적 비용이 1998년 1조 17억 원에서 2005년 1조 8000억 원으로 증가했다고 보고함.

○ **비만 예방과 치료에 대한 국가적 관리 및 관련 산업 급성장:** 비만은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심혈관계 질환 등의 질병을 일으킬 뿐만 아니라 심리적 장애요소로까지 발전될 가능성도 있어서 비만의 예방과 치료는 국민건강의 1차적인 중심 문제로 관리되고 대책이 세워져야 할 것임. 최근 정부에서도 비만으로 인한 국가적 손실을 자각하고 서구화 식습관을 개선시키고 비만을 예방하기 위한 다양한 대책을 마련 중에 있는 만큼, 비만관리, 혈관관리, 혈당조절 등 성인병 관련 제품은 급성장을 할 것으로 전망됨.

○ **세계 비만치료제 시장규모의 성장:** 비만 인구의 증가와 함께 비만이 심각한 질병이라는 인식이 확대되면서, 비만치료제에 대한 관심은 날로 증가하고 있음. 2015년에는 전 세계적으로 약 69억 달러로 연평균 20%에 가까운 고성장으로 그 규모가 지속적으로 커질 것으로 전망되고 있음. 미국과 유럽에서는 비만 인구가 전체 인구의 50%를 넘어섰으며, 2011년 약 10억달러 (약 1조800억원) 규모였던 비만 치료제 시장은 2018년에는 열 배 이상인 105억 달러 (약 11조4000억원) 규모로 성장할 것이라는 보고서도 있음.

○ **국내 비만치료제 시장규모의 성장:** 국내 비만치료제 시장 규모는 ETC 2500억원, OTC 1조원, 건강기능식품 1조원 등 약 2조2500억원으로 추산됨. 비만 치료제는 크게 식욕억제제, 지방흡수저해제로 나뉘는데 식욕억제제의 경우 드림파마의 '푸링' 광동제약의 '아비텍스' 대웅제약의 '디에타민' 등이 가장 많이 팔리고 있고, 지방흡수저해제는 로슈의 '제니칼'이 처방 1위로 알려져 있음 (2014.01.22. 헤럴드경제).

(2) 산업적 중요성

○ **비만치료제 시장과 부작용:** 비만의 약물 치료를 위해 매년 많은 항비만 제제들이 개발되고 있지만 현재 사용 가능한 비만 치료 약물은 많지 않으며, 대부분 소화나 식욕을 억제시키는 제제에 국한되어 있음. 소화나 식욕을 조절하는 제제의 경우, 습관성 때문에 향정신성 약물로 분류되며, 소화억제제는 설사, 변비 등의 부작용을 나타내는 것으로 잘 알려져 있음. 현재 미국 FDA가 장기사용을 승인한 대표적 비만치료 약물은 노르에피네프린 (norepinephrine)과 세로토닌 (serotonin)의 재흡수를 억제하는 작용을 가진 시부트라민 (sibutramine; Reductil)과 췌장 및 소화기계에서 분비되는 리파제 (lipase)를 억제하여 효과를 나타내는 오르리스타트 (orlistat; Xenical)이 있음 (시부트라민은 퇴출됨).

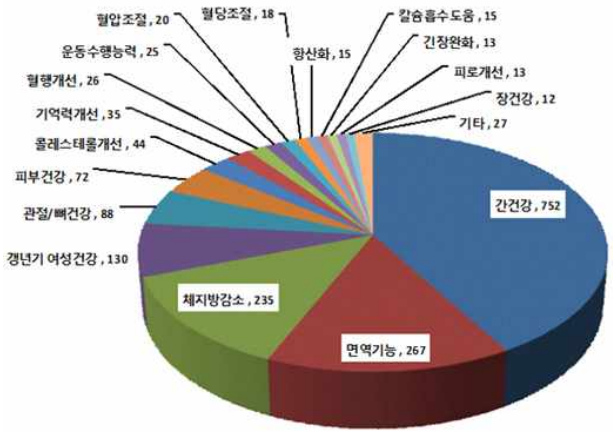
○ **비만치료제 시장에서의 천연물기능성 소재**: '시부트라민'의 안전성 문제로 인한 퇴출 이후 의료계에서 필요로 하는 마땅한 치료제가 부족한 실정임. 비만치료제의 안전성이 대두되면서 국내 천연물신약 개발에서의 항비만치료제 질환타겟의 연구 비중과 건강기능성 식품소재로서의 개발이 매우 활발히 이루어지고 있음.

(3) 국내 외 비만질환 건강기능성 식품 현황

○ **건강기능성 식품 원료로의 천연물 소재 개발 고조**: 비만 치료제 약물의 부작용과 함께 비만이 일반적으로 장기적인 약제복용이 요구되는 질병으로 인식되고 있어, 상대적으로 독성이 적고 안전한 천연물 소재로 한 비만의 예방 및 개선을 위한 기능성 식품 개발에 대한 관심이 고조되어, CLA, 가르시니아 캄보지아 추출물(기타 기능I: 체지방감소), 솔잎 추출물, 녹차 추출물, 한방약재 추출물(기타 기능 II: 체지방 감소를 도움) 등 국내외자생식물의 생물학적 활성과 약리학적 효과 및 의학적 이용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.

○ **국내외 비만 관련 건강기능성식품 개발 및 제품화 현황:** 2011년 식약처에서 인정한 기능성 원료는 총 42건이며, 그 중 12건은 국내에서 생산되는 재료를 사용하여 개발되고 있는데, 인증된 기능성 원료 중 국내 재료들을 활용한 개발 비율은 2008년 23%, 2009년 25%, 2010년 27%, 2011년 29%를 기록하며 꾸준히 증가하는 추세를 보임. 따라서 우리나라에서 자생하거나 재배되는 작물들의 기능성을 발굴 및 개발하여 만성질환의 예방을 목적으로 한 건강기능식품의 다양한 소재 개발이 절실히 필요함.

□ **개별인정형 건강기능식품 기능성 별 생산실적('12년/억원)**



출처: 2012. 12. 31. 기준, 식약처

표 1. 개별인정형 원료별 건강기능식품 생산실적(상위 10품목)

순위	구분	총 생산액					기능성 내용
		2008	2009	2010	2011	2012	
	총생산액(억원)	416	800	1,129	1,435	1,807	
1	헛개나무과병추출분말		145	441	349	502	간건강
2	당귀혼합추출물	22	62	87	140	245	면역기능
3	**그린마뎨추출물**		-	**6**	**4**	**147**	**체지방감소**
4	밀크씨슬추출물			50	138	135	간건강
5	복분자추출분말				31	104	간건강
6	백수오 등 복합추출물			14	40	100	갱년기여성건강
7	**대두배아열수추출물등 복합물**	-	-			**61**	**체지방감소**
8	히알우론산나트륨	-	3	11	71	41	피부건강
9	AP 콜라겐 효소분해 펩타이드			5	20	29	피부건간
10	초록입홍합추출오일 복합물		36	32	29	28	관절건강
소계		22	210	614	793	1,364	

출처: 2012. 12. 31. 기준, 식약처

○ 기능성별로는 간 건강 관련 제품이 전체 개별인정형 제품의 41.6%(752억 원) 가량을 차지해 가장 많았으며, 면역기능 제품이 14.8%(267억 원), 체지방감소 13%(235억 원), 갱년기 여성건강 7.2%(130억 원) 제품 순으로 이어졌음.

○ **향후 비만치료제 시장은 의약품과 기능성 식품에 이르기까지 다양한 제품들의 개발로 인해 지속적으로 커다란 식의약품산업으로 성장할 것으로 보임. 또한 비만치료제 약물 의존도는 점차 낮아지며 건강기능식품에의 비중은 꾸준히 증가될 것임.**

표 2. '체지방 감소에 도움' 기능성 원료 현황

No.	기능성 원료명	생리활성 등급
1	히비스커스등 복합추출물	2등급
2	Green Mate Extract EFLA® 920	3등급
3	깻잎추출물 (PF501)	3등급
4	APIC 대두배아추출물 등 복합물	2등급
5	레몬밤 추출물 혼합분말	2등급
6	중쇄지방산 (MCFA) 함유 유지	2등급
7	L-카르니틴 타르트레이트	2등급
8	콜레우스포스콜리 추출물	2등급
9	녹차추출물	2등급
10	가르시니아캄보지아 껍질 추출물	1등급
11	공액리놀레산 (유리지방산)	2등급
12	공액리놀레산 (트리글리세라이드)	2등급
13	키토 올리고당	

출처: 건강기능식품 기능성 평가 가이드. 2012.03. 식품의약품안전청

1-3. 연구개발 범위

1-3-1. 비만 예방 및 개선을 위한 제품의 표준화, 기준 및 시험법 설정 평가

1) 곰보배추 추출물의 대량 제조 최적화 조건 확립
   ① 생초 원료의 표준화
   ② 추출 표준 제조 공정 확립 (제품의 대량생산에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발)
   ③ 추출물의 기준 및 규격 표준화 확립
2) 추출물 원료의 표준화 및 validation 연구 구축
   ① 대량생산 원료에서의 지표성분 분석
   ② 원료에 대한 validation (특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위 등) 분석법 검증
   ③ 기준 및 시험법 설정 최적화

1-3-2. 시제품 제작

1) 인체적용시험용 제형 연구 및 시제품 제작 방안 모색
   ① 시제품에서의 지표함량 분석 및 validation
   ② 다양한 제형 가능성 타진을 위한 제형설계
   - 최종 제형 선택을 위해 나정, 당의정, 필름코팅정, 산제, 과립제, 캅셀제, 정제, 액제등 최종제품에 적합한 제형을 선정하고, 부형제, 붕해제, 활택제, 코딩제 등의 첨가제의 영향 평가.
2) 인체적용시험용 시제품 제작
   ① 시제품 제작

1-3-3. 곰보배추추출물 시제품에 대한 효능 검증

1) 비만 모델에서의 체중감소 효능 및 지방분해 효능 평가
   ① High fat diet (HFD) 유도 비만동물모델에서의 체중증가 억제 효능
2) 비만 모델에서의 곰보배추추출물의 효능 기전 연구
   ① RT-PCR를 이용한 mRNA 발현 측정

② Western blot을 통한 관련 protein 발현 측정

1-3-4. 제품의 표준화 및 안정성 평가

① 안정성 시험

- 가속시험: 단기간의 가속조건에서 물리·화학적 시험, 미생물학적 시험 및 내용물과 용기와의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 온도 조건에서 시험.
- 가혹시험: 온도, 광선, 습도 등 가혹조건에서 안정성을 예측하기 위한 시험. 일반적으로 개별 제품의 취약성, 예상되는 운반, 보관, 진열 및 사용.

1-3-5. 체지방감소 인체적용시험

- 연구목표: 최종 인체적용시험을 통한 곰보배추추출물의 체지방감소 효능 평가

① 인체적용시험 protocol 작성
② IRB 신청서 작성 및 승인
③ 피험자 모집 및 인체적용시험
④ 통계분석 및 보고서 작성

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

2-1. 국내외 관련 기술 현황

2-1-1. 국내 관련기술 현황

○ **항비만 효능 및 작용기전 연구 현황:** 국내에서는 지질대사와 관련한 항비만 효과의 기전연구는 아직도 초보 단계임. 따라서 항비만 효과의 분자·세포 생물학적 기전을 확립하기 위해서는 확보된 세포배양 방법을 이용하여 다양한 지방대사에 관련하는 유전자 및 단백질의 활성을 면역화학적 및 mRNA 증폭을 통한 분석이 이루어져야 할 것으로 보임.

○ **천연물 비만치료제 개발 동향:** 선진국들이 생명공학기술을 이용한 비만치료제개발에 관심을 기울이고 있는 반면 국내에서는 발달된 민간요법 및 전통의학을 바탕으로 천연물질을 이용한 비만치료제 개발 비중이 높아지고 있는 실정임. 현재 개발되고 있는 천연물 소재 비만 치료제의 경우 향정신성 제제의 심혈관계 및 중추신경계 부작용을 극소화한 것으로서 지방세포 분화에 관여하는 유전자 발현 억제, 중성지방 축적 억제, 복부지방 등 체내 지방조직 축적 감소, 지방산 산화와 열발생 촉진을 통한 지방연소, 지방세포 분화 억제 등의 약리 작용, 지방세포를 지방전구세포로 역분화 등의 비만 및 대사작용의 활성과 이의 기전방향으로 연구되고 있음.

○ **천연물 비만치료제의 작용기전별 출원동향:** 국내 특허출원된 천연물 비만치료제에 대한 연구 기전은 소화 흡수 억제(20%), 지방세포분화 저해(13%), 호르몬 조절제(11%), 열대사 촉진제(4%), 식욕 억제제(3%), 지방산 생성 억제제(2%), 혈관신생 억제제(2%), 동물 또는 임상실험(45%) 등으로 분석되고 있음.

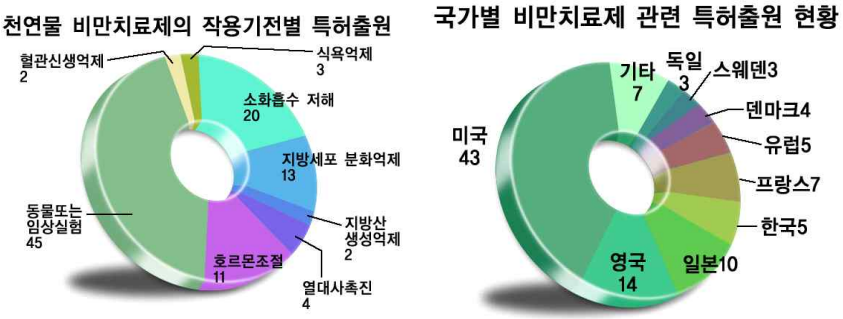
○ **지방세포 분화 억제에 의한 항비만 치료제 개발:** 지방 조직은 잉여 에너지를 저장하는 저장고이지만, adipokines (TNF-α, IL-6, leptin, adiponenctin, reseistin, visfatin, apelin 등) 이라는 여러 호르몬 유사물질을 분비하여 지방 대사와 당대사를 포함한 체내 에너지 대사를 총체적으로 조절함. 지방세포에서 여러 adipokine은 체내의 에너지 상태에 따라서 그 발현이 인감하게 조절되며 중추신경계와 주변 기관에 직접 또는 간접적으로 작용하여 인슐린 민감도, 지방산 산화와 당뇨대사, 식

욕조절 또는 염증반응 매개 작용 등을 수행함. 최근에는 비만과 함께 이상지혈증, 고혈압 및 고인슐린혈증과 같은 일련의 징후가 동시에 수반되는 대사증후군에서adipokines의 역할 및 질병 유발 기전에 대한 연구가 주목 받고 있음.

2-1-2. 국외 관련기술 현황

○ **생명공학기술을 이용한 개발:** 선진국들이 생명공학기술을 이용한 비만치료제개발에 관심을 기울이고 있음. 국내의 천연물신약보다 Chemical 약물 개발이 대부분임.

□ **천연물 비만치료제의 특허출원 현황 (2009)**



○ **새로운 비만치료제에 대한 요구가 증가:** 세계 각국의 다국적 제약기업이나 벤처회사들에서 신약들을 발굴하기 위해 많은 노력을 기울이고 있음. 기존의 비만억제제로는 스위스 로슈의 제니칼과 같은 지방흡수 억제제와 미국 애보트의 메리디아와 같은 식욕감퇴제(교감신경, 모노아민 섭취억제제)가 있음. 그러나 무엇보다 안전성과 약효성이 중시된 결과, 개발 2단계 이후에 있는 비만 억제 화합물들이 시장에 등장할 가능성이 높음.

○ **새로운 연구동향:** 비만 관련된 유전자에 대한 연구는 급속도로 진전되어 이들 유전자의 돌연변이를 가진 생쥐 동물모델을 중심으로 비만조절 기작을 알기위한 연구 또한 매우 빠른 속도로 진행되고 있음. 또한 신경전달 물질 연구에 관한 연구로서, down stream 신경전달 물질들은 새로운 비만치료 후보 물질 또는 식욕촉진제로서 크게 부목을 받고 국내외에서 집중적으로 연구가 수행되고 있음.

2-2. 국내외 생산 및 시장현황

2-2-1 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대 및 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간 · 학문간 · 시장 간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망하고 있음.

○ 2003년도 시장규모는 건국 이후 최고인 1조 3천억 원에서 2003년 말 건강기능 식품 법에 의한 품목 신고, 경기 침체와 단가 하락에 따른 매출 감소로 2004년도에는 1조 1천5백억 원으로 다소 감소한 것으로 나타났음. 이는 기존의 소위 건강식품과 건강 보조식품 시장의 재편을 의미하며, 소비자 보호적인 측면에서 고무적인 현상이며, 시장 규모는 차츰 커질 것으로 전망됨.

○ 국내 비만관련 시장은 연평균 26.4%의 성장률로 성장하여 2005년 500억 원에서 2015년 5,205억 원의 시장을 형성할 것으로 전망됨.

표1. 비만 관련 국내시장 전망분석 (단위: 억 원. %)

	2005년	2010년	2015년	연평균 성장률 (2005~2015)
비만 관련 시장	500	1,613	5,205	26.4

<자료원: 생명공학정책연구센터>

○ **체중 조절용 건강기능식품 시장은 전 세계적으로 기능성 식품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 2008년을 기준으로 시장 규모가 75억불이며, 연간 성장률은 6.8%로 추산.**

표 2. 2003년부터 2008년 까지의 개별 인정형 건강기능식품의 기능성 내용 중 1위가 체지방 감소

순위	기능성 내용	인정건수	농식품 원료 건수
1	**체지방 감소**	26	**가르시니캄보지아(3) 대두배아(1)**
2	항산화 효과	19	대나무잎(1) 복분자(1) 포도종자(1) 토마토(2)
3	관절 건강	14	로즈힙(2)
4	혈압 조절	14	
5	식후 혈당 조절	10	구아바잎(2) 달맞이꽃 종자(2)
6	눈 피로 개선	8	콩발효물(4)
7	눈 건강 (노화 기인)	8	빌베리(3)
8	배변활동 원활	7	
9	혈중 콜레스테롤 개선	7	목이버섯(1) 분말한천(1) 대두올리고당(1)
10	전립선 건강 유지	5	쏘팔메토 열매(5)
11		118	

○ **향후 우리나라 항비만 건강기능식품 시장 동향에 있어서는 제품의 가격, 신용도 및 기능성, 매체 등을 통한 접근의 용이성, 브랜드 인지도 등에 따라 제품 간의 경쟁이 보다 심화될 전망임.** 개인 및 중소기업들의 경우 특허에 기반 한 제품의 홍보 및 판매에 주력할 것이며, 대기업들은 자체의 연구를 통해 기능성이 증가된 노하우(know-how) 중심의 제품 개발 및 판매를 지속할 것으로 전망.**(출처 : 보건의료기술진흥사업. '미래 질환별 건강기능식품 융복합 핵심기술 연구개발 지원. 보건복지부)**

표 3. '체지방 감소' 기능성 원료 현황

히비스커스등 복합추출물	기능(지표)성분	① 키토산 ② (+)-allo-hydroxy citric acid lactone ③ L-carnitine
	일일섭취량	2,079 mg/일
	섭취 시 주의사항	체지방 감소는 반드시 식사조절과 운동이 병행되어야 효과적
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
Green Mate Extract EFLA® 920	기능(지표)성분	① Chlorogenic acid ② Triterpene saponin
	일일섭취량	3 g/일
	섭취 시 주의사항	-
	인정 등급	생리활성기능 3등급
깻잎추출물 (PF501)	기능(지표)성분	Ursolic acid
	일일섭취량	2.7 g/일
	섭취 시 주의사항	유·소아, 임산부 및 수유부 여성은 섭취에 주의
	인정 등급	생리활성기능 3등급

APIC 대두배아추출물 등 복합물	기능(지표)성분	① Daidzin + Glycitin + Genistin ② L-carnitine
	일일섭취량	700 mg/일
	섭취 시 주의사항	①알르레기성 비염, 천식, 우유 알레르기 반응을 나타내는 사람은 섭취에 주의 ②임산부, 수유기 여성 및 어린이는섭취에 주의
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
레몬밤 추출물 혼합분말	기능(지표)성분	① 레몬밤 (rosmarinic acid) ② 뽕나무잎 (1-Deoxynojirimycin) ③ 인진쑥 (6,7-Dimethylesculeti
	일일섭취량	1380 mg/일
	섭취 시 주의사항	①알레르기 반응이 나타날 경우에는 섭취를 중단 ②섭취 후 진정작용이 나타날 수 있으므로 주의 ③어린이 및 임산부와 수유부 여성은 섭취 주의
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
중쇄지방산 (MCFA) 함유 유지	기능(지표)성분	카프릴산(Caprylic acid) + 카프릭산(Capric acid)
	일일섭취량	일반 식용유 섭취방법과 동일
	섭취시 주의사항	-
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
L-카르니틴 타르트레이트	기능(지표)성분	L-카르니틴(L-carnitine)
	일일섭취량	L-카르니틴 으로서 2 g/일
	섭취 시 주의사항	-
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**

콜레우스포스콜리 추출물	기능(지표)성분	포스콜린(forskolin)
	일일섭취량	500 mg/일
	섭취 시 주의사항	① 항응고제 또는 혈압조절제를 복용하시거나 혈압이 낮으신 분은 섭취에 주의 ② 임산부, 수유여성, 어린이는 섭취에 주의
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
녹차추출물	기능(지표)성분	카테킨(Catechin
	일일섭취량	카테킨으로서 0.3~0.5 g/일
	섭취 시 주의사항	카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있으므로 주의
	인정 등급	생리활성기능 2등급
가르시니아캄보지아 껍질 추출물	기능(지표)성분	총 (-)-HCA
	일일섭취량	(-)-HCA 750~2,800 mg/일
	섭취 시 주의사항	① 임산부와 수유기 여성은 섭취를 피하는 것이 좋음 ② 간장, 신장, 심장 기능에 이상이 있는 경우 섭취에 주의
	인정 등급	**생리활성기능 1등급**
공액리놀레산 (유리지방산)	기능(지표)성분	① cis-9, trans-11CLA + trans-10, cis-12CLA + cis-9, cis-11CLA + trans-9, trans-11CLA ② cis-9, trans-11CLA ③ trans-10, cis-12CLA
	일일섭취량	cis-9,trans-11CLA + trans-10,cis-12CLA + cis-9,cis-11CLA + trans-9,trans-11CLA = 2~4 g/일 cis-9,trans-11CLA + trans-10,cis-12CLA + cis-9,cis-11CLA + trans-9,trans-11CLA = 1.4~4.2 g/일 (3.4 g/일)
	섭취 시 주의사항	① 위장 장애가 발생할 수 있음 ② 영유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 병행하는 것이 바람직함

	인정 등급	**생리활성기능 2등급**
공액리놀레산 (트리글리세라이드)	기능(지표)성분	① 총 공액리놀레산(cis-9,trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA, cis-9, cis-11 CLA, trans-9, trans-11 CLA) ② cis-9, trans-11 CLA, trans-10, cis-12 CLA
	일일섭취량	cis-9,trans-11CLA + trans-10,cis-12CLA + cis-9,cis-11CLA + trans-9,trans-11CLA = 1.4~4.2 g/일 (3.4 g/일)
	섭취 시 주의사항	① 위장장애가 발생 할 수 있으므로 주의 ② 영·유아, 임산부는 섭취를 삼가 ③ 식사조절, 운동을 같이 하는 것 이 바람직 함
	인정 등급	**생리활성기능 2등급**

출처: 건강기능식품 기능성 평가 가이드. 2012.03. 식품의약품안전청

2-2-2. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 기능성식품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되어지고 있음.

○ 세계 기능성식품 시장동향은 2000년 1,453억불 규모였고, 높은 성장률로 2008년에는 2,697억불의 시장규모를 형성하였다. 세계 기능성식품 시장은 지속적인 성장으로 2014년에는 3,973억불의 시장을 형성할 것으로 전망된다. 2008년 2,687억 세계기능성식품 시장 중 1,017억불에 달하는 총 38%는 미국이 차지하는 것으로 나타났으며, 유럽은 31%(824억불)를 차지하는 것으로 나타났다. 아시아 시장에서는 일본이 14%(382억불)로 가장 많은 비중을 차지하고 있는 것으로 나타났으며, 중국이 3%(119억불)로 그 뒤를 잇고 있다. 통계 자료들을 종합하여 볼 때, 미국, 유럽, 일본 등이 세계 시장의 87%를 차지함으로써 해외 기능성식품시장은 산업화된 선진 국가를 중심으로 발달되었음을 알 수 있다 (출처: Nutrition Business Journal, 2010)

표 4. 연도별 세계 기능성식품 시장규모 (단위: 억불, %)

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2014(e)
시장규모	1,330	1,435	1,541	1,668	1,818	1,967	2,134	2,308	2,499	2,698	3,973
성장률	8.7	7.9	7.3	8.3	8.6	8.6	8.5	8.1	8.4	8.0	47.3

○ 2008년 2,698억불을 형성한 세계 기능성식품 시장 중 국가별 점유율은 미국이 1,017억불로 가장 큰 시장을 형성하고 있고 유럽 (824억불), 일본 (383억불), 중국 (120억불)순이며, 미국, 유럽, 일본이 세계 시장의 87%를 차지함으로써 세계 시장이 선진국가를 중심으로 발달되어 있음을 알 수 있음.

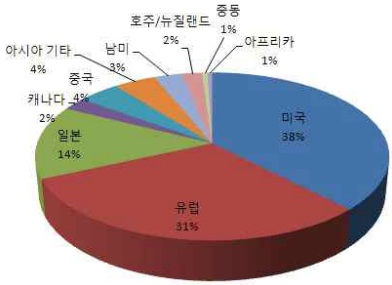


그림. 2008년 국가별 세계 기능성식품 시장 점유율

○ 2008년 세계 기능성식품 시장 규모 (2,698억불)중 국내 건강기능식품과 비슷한 개념인 Supplements 와 Functional Foods가 각각 765억 달러와 953억 달러로 전체 시장의 60% 이상을 차지하였음.

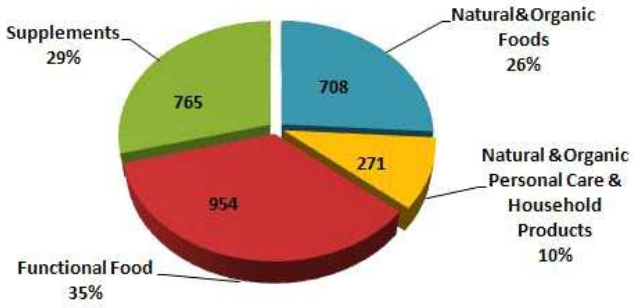


그림. 2008 품목별 세계 기능성식품 시장 규모 (단위: 억불)

<참고 자료>

1) 건강기능식품시장 현황은 미국의 건강식품 전문잡지인 Nutrition Business Journal 과 영국 통계보고 전문기관이 Euromonitor 의 발표자료를 중심으로 작성하였음.
Natural & Organic Foods - 자연 생산된 농수산물과 유기농 식품
Functional Foods - 특정성분을 강화하여 건강을 증진시키는 기능성을 함유한 식품
Natural & Organic Personal Care & Household Products - 천연 및 유기농 헬스 & 뷰티 제품

2-3. 연구개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

2-3-1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 선행연구 결과를 통하여 상기 질환에 대한 곰보배추추출물의 비만 예방 및 개선 효능을 확인하였으며, 향 후 분리된 유효성분을 기능성분으로 규명하여, 곰보배추추출물을 포함하는 다양한 형태의 시제품의 개발이 가능할 것으로 사료됨

- 곰보배추추출물로 체중조절용 예방 및 개선 제품 개발
- 곰보배추추출물로 고콜레스테롤혈증 개선 제품 개발
- 곰보배추추출물로 중성지방 저하 및 개선 제품 개발

○ 곰보배추의 새로운 이용 가능성을 제시하고, 이것을 바탕으로 고부가가치의 가능성이 강화된 제품의 개발은 새로운 수요창출과 시장형성이 기대되는 경쟁력 있는 사업으로 육성하여 국가 경제·산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있음

- 대사성질환 개선제에 대한 수요는 급증하고 있어 시장성과 창출이 기대됨
- 곰보배추 기능성 부가가치 상승으로 인한 농가 경제적 소득 증대 및 산업화 활성화 가능
- 지역 농가소득 증대를 위한 대규모의 특약작물의 활용화 가능함
- 순수 국내 기술력에 의한 소재 개발로 수입대체 및 세계시장 수출 창출 가능
- 국내 식품산업의 보호와 고부가가치산업인 건강기능식품의 국제경쟁력 확보

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05

3-1. 추진전략 · 방법

(1) 기술정보수집

○ 식품의약품안전성 개발 가이드라인 및 자료
○ 공인국제 논문 및 관련 문헌 조사
○ 관련 학회 참석을 통한 정보 수집

(2) 전문가확보

○ 비만 관련 기전 및 유효성 평가 기준에 대한 전문가 확보
○ 제품 개발 프로세스 확인 및 컨설팅

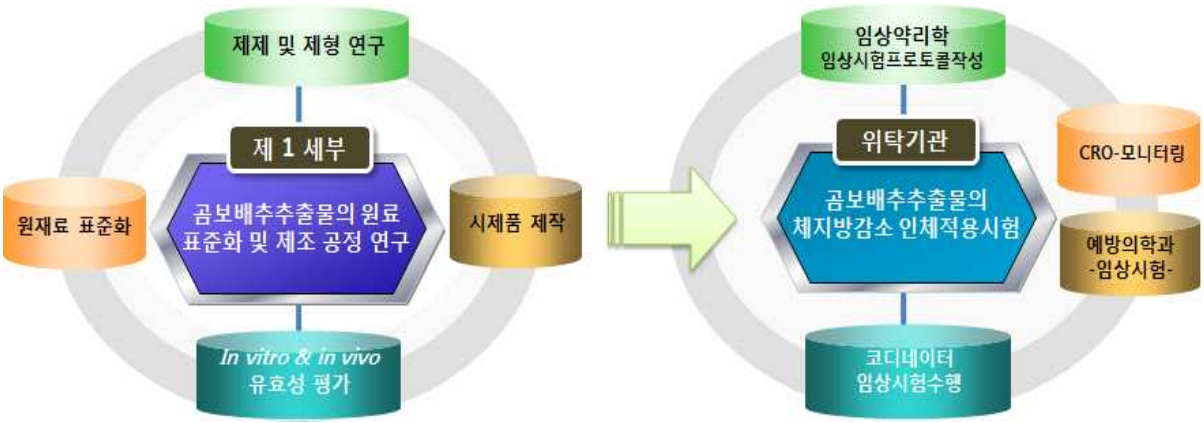
(3) 다른 기관과의 협조 방안

○ 인체적용시험: 수탁기관 (OO병원 임상시험센터) & CRO
○ 전문기관 활용 1: 외부 원료 대량생산 시설 용역위탁 제조
실제 제품 생산 관련된 규정 및 조건 검토
○ 전문기관 활용 2: 원료 제제 및 제형 등 시제품 제조 관련 시험 용역위탁 제조
실제 제품화를 위한 제제 및 제형 최적화 검토
○ 전문가 기관 활용 3: 동물 모델에서의 조직분석
- 유효성 평가 객관적 평가를 위한 외부임상병리조직분석전문가 분석 의뢰

(4) 연구개발방법론

○ 연구 설계: 건강기능식품 기능성원료 식품의약품안전청 허가를 위한 연구방향 설계
○ 비만예방 관련 시험 모델의 확립: 식품의약품안전청 효력시험 평가지침서 기준으로 확립
○ 객관적 평가 자료 획득: 자/타기관의 객관적 실험결과를 근거로 한 유효성 평가
○ 원료 및 시제품의 실제 생산 공정에 근접하도록 scale-up 설정에 초점을 둔 설계

3-2. 추진체계



3-3. 연구개발 방법

1. 원료 및 제품 표준화, 기준규격 설정 평가

1) 곰보배추 원재료 수급 및 표준화

① 곰보배추 원재료의 안정적 수급을 통한 표준화

- 곰보배추농장을 통한 계약재배 (만평 규모)를 통한 원활한 공급
- 품질 안정화
- 원재료 가격의 저렴화

2) 곰보배추추출물의 대량 제조 최적화 조건 확립

① 제조공정의 표준화 (제품의 대량생산에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발)

- 추출, 여과, 농축, 제조공정상의 Scale up시에 생약의 절도, 출방법(압력, 비압력), 추출용매의 양, 추출온도, 추출시간, 여과방법, 농축조건, 건조조건, 수득율 및 부형제 등에 대한 영향을 평가함

• Scale-up화를 위한 대량(파이롯트) 원료 추출 조건 탐색 연구

• Lab. Scale 원료추출물 성분분석 패턴을 따르는 대량 추출 조건 탐색 (1.5 ton 이상 추출 동)

• 파이롯트 (3 Lot) 추출 및 분획에 따른 원료엑스 시험 제조

- 최적화된 파이롯트 원료엑스 제조 조건에 따른 3반복 원료엑스 제조

• 파이롯트 단위 추출물 제조에 따른 성분분석 패턴 연구

② 최종 대량 추출 시 수율 확인

③ 추출 단계별 공정도 개선을 통한 최적화 시스템 구축

3) 추출물 원료의 표준화 및 분석법 검증(validation) 연구 구축

① 기설정된 지표성분 OOO 및 유효성분 OOOO에 대한 분석법 확인

② 대량생산 원재료 및 원료에서의 지표성분 분석

③ 지표성분에 대한 분석법 validation (특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위 등)

a. 특이성

b. 직선성

c. 범 위

d. 정확성

e. 정밀성

f. 검출한계(Detection limit)와 정량한계(Quantitation limit)

④ 순도시험: 정량시험과 한도시험이 있으며 각각 다른 밸리데이션 파라미터에 대한 검토 필요. 대부분의 순도시험은 시료 중의 극소량으로 들어 있는 성분을 분석하는 시험임

⑤ 검출한계의 평가: 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 반드시 정량 가능할 필요는 없음.

⑥ 기준 및 시험법 설정 최적화

2. 인체적용시험용 제형 연구 및 다양한 시제품 제작 제품화 방안 모색

1) 식품 유형에 따른 제제 연구

2) 다양한 제형 가능성 타진을 위한 제형설계: 산제/정제/캡슐제 및 액제 등 제조

3) 붕해도 실험

4) 원료물질과 식품첨가물간의 이화학적 시험 사용 가능성 여부 타진

3. 원료 기준 및 시험법 작성

1) 원료별첨 규격

- 성상, 함량, 확인시험, pH, 순도시험, 잔류용매, 건조함량 등.

2) 제품안정성 시험

- 성상, 확인시험, 균질성, 함량시험, 중금속, 미생물시험

4. 원료 및 제품의 안정성 평가

1) 가속 안정성 시험

- 단기간의 가속조건에서 물리·화학적 시험, 미생물학적 시험 및 내용물과 용기와의 적합성에 대하여 제형에 따른 적절한 기준 및 시험방법과 온도 조건에서 시험.

2) 가혹시험

- 온도, 광선, 습도 등 가혹조건에서 안정성을 예측하기 위한 시험. 일반적으로 개별 제품의 취약성, 예상되는 운반, 보관, 진열 및 사용.

5. 곰보배추 추출물의 *in vivo* 질환동물모델에서의 비만질환 증상 개선 효과 검정

1) Diet-induced obesity model에서의 효능 검정

① 고지방식이 (45% High fat 함유)를 8주 유도하여 비만 모델 확립함

② 체중은 매일 또는 1주일에 2회 일정한 시간에 체중계(animal balance)를 사용 측정함

③ 식이 섭취량은 매일 일정한 시간에 측량하여 1일 섭취한 식이의 양(g수)을 측정함

④ 식이 효율(feed efficiency ratio: FER)은 체중 증가량을 식이 섭취량으로 나누어서 계산함

⑤ 분석: ○ 체지방량 측정: 조직을 채취한 사체의 총 지방량을 carcass법을 사용하여 측정함

○ 혈중 중 생화학적 성분 분석: TG, Tcholesterol, Insulin, glucose 함량 측정

○ 조직학적 분석

: 간조직 및 지방조직 (부고환지방조직 및 후복강막조직)을 분리하여 분석

2) 효능 기전 검증

- 복부지방 및 간조직 중의 Lipogenesis와 Adipogenesis관련 효소 및 유전자 측정

: C/EBPα, PPARɣ, SREBP1c등

6. 인체적용시험

1) IRB 계획서 작성 및 승인

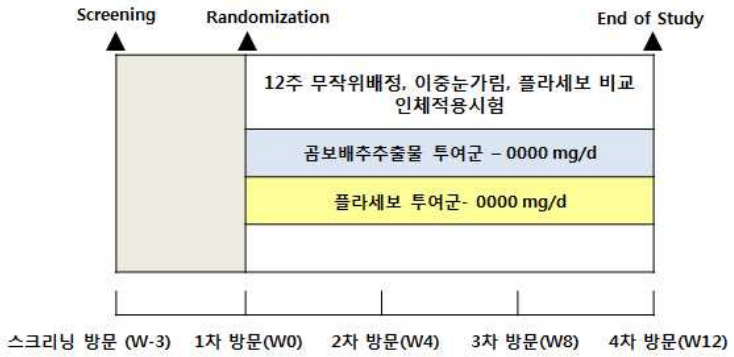
① 인체적용시험 protocol 작성

② IRB 계획서 작성 및 승인 완료

2) 선정/제외기준

본 연구의 선정기준은 만 19세 이상,65세 이하의 성인 남녀로 체질량지수(Body mass index, BMI)가 25kg/m^2 이상이고 (WHO, 2000), 허리-엉덩이 둘레 비율(Waist-hip circumference,WHR)이 남성 0.90,여성 0.85 이상을 만족하는 피험자를 대상으로 하며, 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자로 함. 제외기준으로는 아래 표와 같고, 기준 중 한 가지 이상에 해당할 경우 피험자 선정에서 제외시킴. (개요 표 참조)

3) 인체적용시험 디자인 및 진행 도표



4) 목표 대상자 수

본 인체적용시험에는 총 80명(추출물 및 플라시보 각 군당 40명)의 피험자가 무작위배정되어 시험을 실시함. 피험자 수 80명은 20%의 탈락률을 고려한 것임.

5) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 함

6) 인체시험용제품 선정

OO 식물에 속하는 곰보배추의 잎을 건조시킨 후 에탄올 추출하여 얻어진 상층액을 소정의 여과과정을 거쳐 이물질을 제거한 후 감압농축하여 분무건조를 하고 분말로 제조함(예정). 지표물질인 OOO는 원료 100 g중에 OOO%로 함유되어 있으며, 추출 및 열가공 제조공정을 거쳐 최종적으로 OOO 함량이 OOO% 이상으로 제조함.

7) 유효성 평가

① 신체계측

매 방문 시마다 신체계측으로 신장, 체중, 허리와 엉덩이 및 허벅지 두께를 측정하고, 체질량지수(bodymassindex,kg/m2), 체지방을 생체전기저항법을 이용한 inbody 3.0 (Biospace, Korea)으로 측정한다. 체중은 시험 기간 중 동일한 체중계를 사용하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정.

② Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA)

Baseline과 비교하여 0, 4, 8, 12 주째에 DEXA(Dual Energy X-Ray Absorptiometry)를 통한 체지방률(%) 감소 효과에 대한 시험식품과 대조식품의 유효성을 비교함.

③ 복부지방면적 (Computed tomography; CT)

복부지방면적은 컴퓨터 단층촬영 (Computed tomography;CT)을 이용하여 측정하며, 1차 방문과 4차 방문(종료방문 12주)시에 요추 4번 부위를 중심으로 -20~+20사이의 위치를 옮기며 다섯 부위를 촬영하여 내장지방(visceralfat)과 피하지방(subcutaneousfat)을 근거로 하여 측정함. 총 지방 면적과 내장지방의 면적을 구한 후, 총 지방 면적에서 내장지방의 면적을 빼서 피하지방의 면적을 산출함.

그림1. 내장지방형 비만 그림2. 피하지방형 비만

※(②, ③ 방법 중 선택하여 수행 예정임)

④ 피부두겹두께

피부두겹 두께는 매 방문 시마다 caliper를 이용하여 남자는 가슴, 복부, 허벅지에서 측정하고 여자는 상완위, 측 복부 및 허벅지에서 각각 측정함. 상완위 피부두겹 두께는 어깨와 팔꿈치 사이의 중간지점에서 세로로 잡은 피부두겹 두께를 측정하고, 복부 피부두겹 두께는 배꼽에서 2cm 바깥지점에서 세로로 잡은 피부두겹 두께로 측정함. 측 복부(옆구리)피부두겹 두께는 요골과 배꼽 중간지점을 측정함.

⑤ 혈중 지질 및 지단백 지표 변화도

혈중 지질 및 지단백 검사는 스크리닝, 3차, 4차 방문 시에 12시간 공복상태에서 채혈하여 측정하였고, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, free fatty acid, Apo A1, Apo B를 검사함.

⑥ 식이섭취 및 활동량 조사

인체적용시험용 제품 섭취 전과 섭취 동안의 영양소 섭취량의 변화를 알아보기 위하여 식이기록법에 의하여 피험자들의 식이섭취량을 확인함. 피험자들은 1차 방문 전(최소 일주일)과 인체적용시험 참여 기간 동안 매일 식이기록지를 작성하고, 1일 영양소섭취량 (Total Calorie Intake; TCI) 분석은 영양평가용 프로그램인 Can Program 3.0을 이용하여 분석함. 식이기록 분석은 피험자들이 작성한 식이기록지에서 3일(평일 2일, 주말 1일) 기록분을 추출하여 시행함.

8) 안전성 평가

① 이상반응

이상반응(Adverse Events; AE)은 인체적용시험용 제품을 투여 받은 연구 대상자에게 일어나는 모든 원하지 않은 의학적 사건임. 이상반응은 반드시 인체적용시험용 제품과 인과관계를 필요로 하지는 않음. 따라서 이상반응은 인체적용시험용 제품과 관련여부와 상관없이 인체시험용제품의 사용과 일시적으로 관련된 바람직하지 못하고 의도되지 않은 모든 징후 (비정상적인 결과 포함), 증상 또는 질환이 될 수 있음. 여기에는 새로 발생하거나 또는 기초평가일 상태와 비교하여 발현정도 또는 발현 횟수가 악화되는 것, 실험실적 검사이상을 포함한 비정상적 진단결과의 관찰도 포함됨.

② 혈액학 및 혈액생화학적 검사

혈액학 및 혈액생화학적 검사는 스크리닝, 3차, 4차 방문 시 수행하였으며, 12시간 공복상태에서 채혈, 채뇨하여 측정함. 검사항목으로 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 뇨검사 실시.

③ 활력징후

활력징후는 매 방문 시 수축기혈압 (Systolic Blood Pressure; SBP), 이완기혈압 (Diastolic Blood Pressure; DBP), 맥박 (Pulse)을 측정함. 측정 시에는 급격한 체위변동 없이 5분 이상 안정 상태를 유지시킨 후 측정함.

④ 심전도 검사

심전도 검사 (Electrocardiogram; ECG)는 스크리닝과 4차 방문에서 측정하며, 피험자가 5분 이상 안정을 취한 후 수행함. 심전계의 감도 1(10mm/Mv), 기록지 이동속도 25mm/sec, 휠터 off 등의 표준측정조건으로 측정함.

9) 통계 분석

통계분석은 SAS 9.0 (Statistic Analysis System 9.0 for Window system) program을 이용함. 인구학적 자료는 무작위배정 여부 및 이후 분석의 타당성을 확인하기 위하여 섭취군간 통계분석을 시행함. 유의성 검증은 linear mixed model을 이용하여 유의수준 0.05에서 통계분석함. 안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 양상을 피셔 검정법 (Fisher's exact test)을 이용하여 분석하며, 이를 제외한 모든 결과는 평균±표준오차로 표시함.

□ 인체적용시험 흐름도

(평가일 : 방문예정일 ± 5일)		스크리닝	투여기간			F/U
		- 14~0일	0주 (0일)	6주 (42일)	12주 (84일)	
방문 횟수		1	2	3	4	필요시
피험자 동의		○				
기초 조사		○				
활력징후		○	○	○	○	○
병력 및 동반질환		○				
선정/ 제외 기준 판정		○				
흡연/음주/식이/운동조사			○			
실험실적 검사		○	○	○	○	○
임신여부 검사 (가임기 여성)		○	○		○	
복부비만도 측정	W/H ratio		○		○	○
	DEXA		○		○	
식이상태점검표 배포 및 작성확인			○	○	○	
BMI (Body Mass Index)		○	○	○	○	○
선행/병용 약물		○	○	○	○	○
이상 반응				○	○	○
시험제품/대조제품 처방			○	○		
복용 순응도 평가				○	○	

3-4. 추진일정

년도	세부 개발내용	수행 기관	기술개발기간												비고
			7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
1차 년도 (2014. 7. - 2015. 6.)	**원료 표준화 및 대량 추출 엑스의 제조 공정 조건 확립**	주관													
	○SP 생초 원료의 표준화														
	○SPP 표준 대량 제조 공정 확립														
	○SPP 기준 및 규격 표준화 확립														
	○SPP 지표 (또는 유효) 성분 분석 -지표(유효)성분에 대한 validation														
	원료 항비만 유효성 확인 검증	주관													
	○HFD 동물모델시험														
	○추가 기전 연구														
	시제품 제작	주관													
	○제제 및 제형 연구														
	○인체적용시험용 시제품 제작														
	IRB 신청서 제출 및 승인	용역													
	○CRO 미팅 및 IRB 신청서 작성														
	인체적용시험 실시	용역													
	○임상시험 프로토콜개발														
	○피험자 모집 및 임상시험														
년도	**세부 개발내용**	**수행 기관**	**기술개발기간**												**비고**
			7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
2차 년도 (2015. 7. - 2016. 6.)	**기준 및 규격 표준화 확립**	주관													
	○3 Batch 추출														
	○SPP 기준 및 시험법 작성														
	○안정성 평가 시험														
	○원료 별첨 규격 설정시험														
	시제품 항비만 유효성 확인 검증	주관													
	○HFD 동물모델시험														
	인체적용시험 실시	용역													
	○피험자 모집 및 임상시험														
	○피험자 인체적용시험														
	결과 통계처리 및 보고서 작성														
	○CRO 결과 통계처리	용역													

	○ 최종보고서 작성 및 IRB 인증														
	최종보고서 작성														

3-5. 세부 연구결과

<CMC 및 제제연구>

Ⅰ. 곰보배추 추출물의 대량 제조 최적화 조건 확립

가. 곰보배추 생초 원료의 표준화

1) 원료생약 구입

본 연구에 사용되는 곰보배추는 동일한 품질과 규격의 원료가 공급될 수 있도록 원료를 공급하는 농가를 선정하여, 규격 곰보배추를 일괄적으로 구입하고, 최종적으로 기원, 성상 등 항목에 대하여 전문가의 감정을 받아 진위 여부를 감별하였다.

<Table 1. 곰보배추 원산지별 시료 구입>

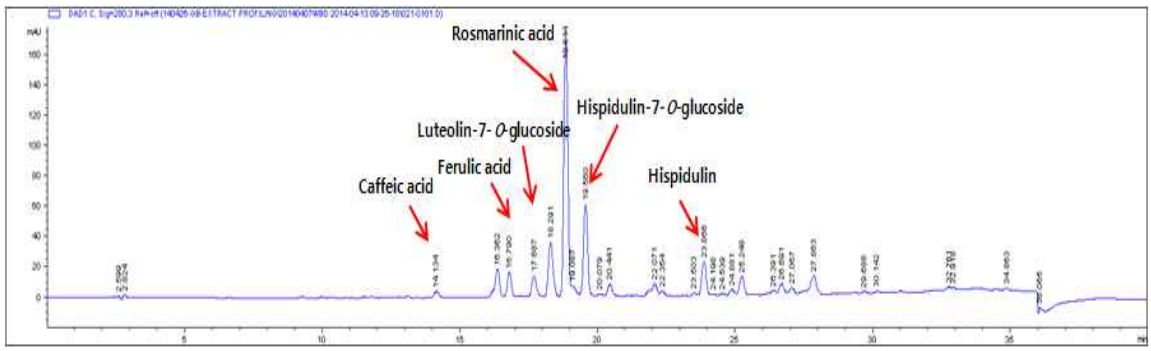
No.	기호	원산지 (재배지)	건조상태
-	Kor1	경기 여주	생초, 건초
1	Kor2	전북 고창	생초
2	Kor3	전북 고창	건초
3	Kor4	경북 대구	생초
4	Kor5	경북 영천	건초
5	Kor6	경남 의령	건초
6	Kor7	강원 원주	건초
7	Kor8	경남 진주	건초
8	Kor9	경남 진주	생초
9	Kor10	전북 부안	건초
10	Kor11	전북 부안	생초

2) 곰보배추 원재료 HPLC 패턴 분석

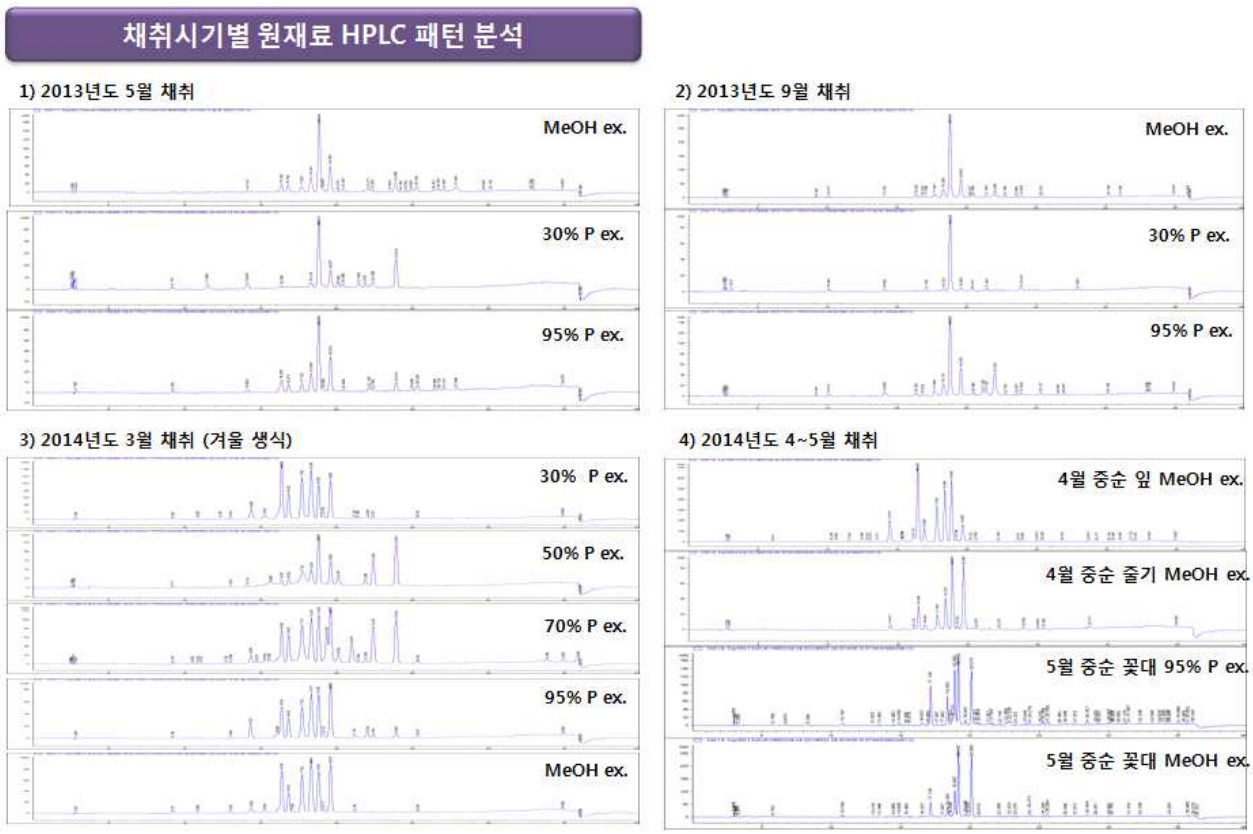
곰보배추 생초를 음건하여 얻은 건초 50g에 50% 주정 10배수를 가하여 추출한 후 HPLC 패턴을 확인하였다.

① 고속액체크로마토그래프의 측정 조건

- Equipment: Agilent Technology 1200 seires system
- Column: Agilent TC-C_{18},(150 mm x 4.6 mm, 5 um)
- Detector: Diode-Array detector (UV: 254 nm)
- Column temparature: 30 ℃
- Injection volume: 10 μL
- Mobile Phase: A: 0.1 % Formic acid/in H_2O / B: Methanol



<Fig. 1. 곰보배추 추출물 HPLC 크로마토그램>



<Fig. 2. 곰보배추의 채취시기, 부위 및 추출용매별 HPLC 크로마토그램>

4) 곰보배추 지역별 원재료 HPLC 패턴 분석

확립된 분석법을 이용하여 산지별 곰보배추 50 % 주정 추출물의 패턴분석을 비교하였다. 구입한 각 지역별 곰보배추 20 g에 50 % 주정 10배수를 가하여 추출한 결과, 지역별 곰보배추의 성분 패턴은 대부분 유사하였으며, 여주산 곰보배추와 가장 비슷한 지역은 영천에서 채취한 원료로 확인되었다.

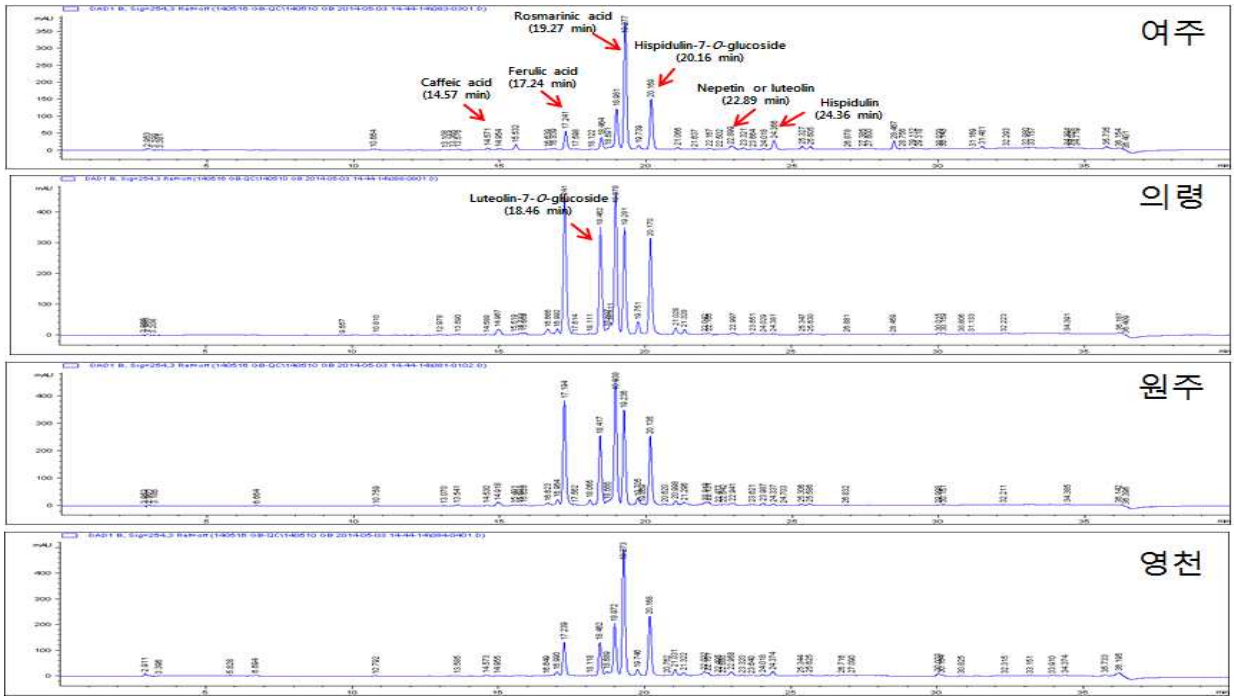
5) 지표성분 분석법 확립

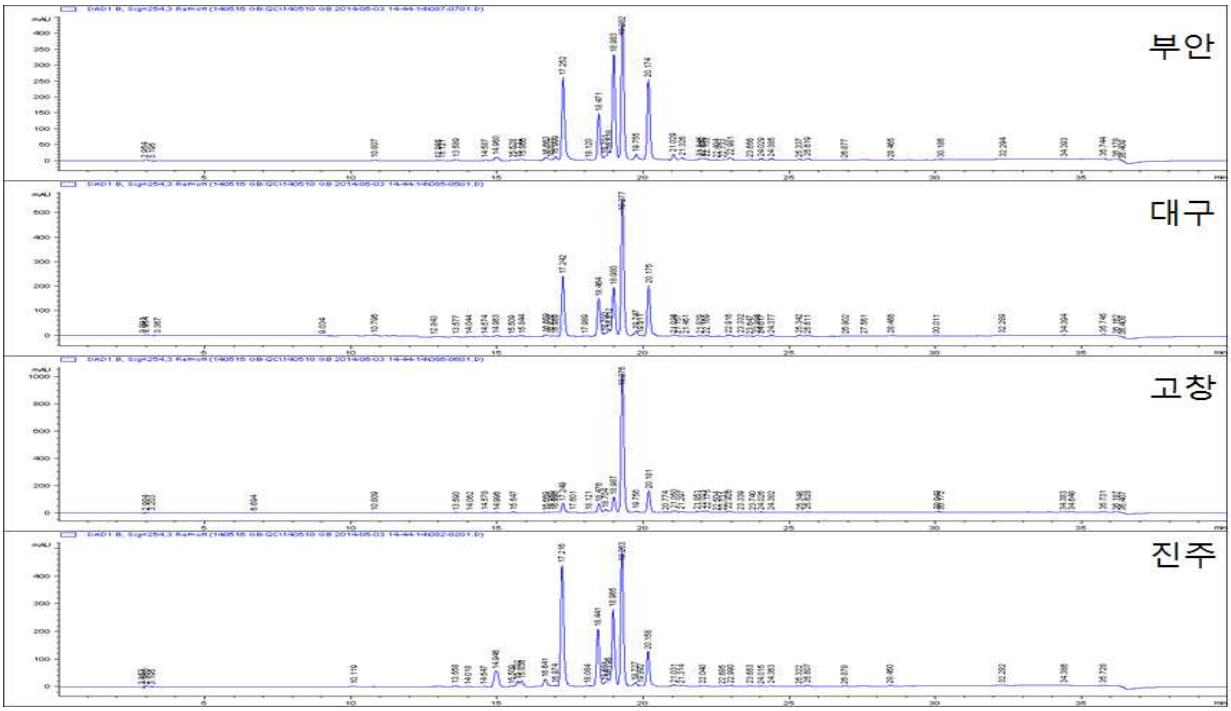
① 지표성분의 분리

지표성분을 분리하기 위해 50 % 주정추출물로부터 극성에 따른 용매분획(hexane, chloroform,

ethyl acetate, butanol)을 실시하였다. 선행연구로서 ethyl acetate의 용매 분획추출물로부터 항비만 관련 효능이 확인되어 지표(유효)성분을 분리하였다.

제조된 용매 분획물로부터 유효성분을 분리/확보하기 위해 Sephadex-LH20 오픈 컬럼크로마토그래피법을 이용하였다. 컬럼 (60 cm, 내경 2 cm)에 Sephadex-LH20 충진제를 로딩하여 H_2O와 Methanol을 95:5에서 50:50까지 순차적으로 이동시켜, 그 결과 Rosmarinic acid (RA), Hispidulin-7-*O*-glucoside (HOG), Hispidulin (HP) 등의 순수 물질을 획득하였고, 그 외의 물질들은 chemical profiling을 통해 물질을 비교・검토하였다.





<Fig. 3. 곰보배추의 채취 지역별 원재료 HPLC 크로마토그램>

<Table 2. 지역별 구성성분 함량비교 (단위: 시료 면적 값, 측정횟수: n=1)>

		지역							
		여주	의령	원주	영천	부안	대구	고창	진주
화합물	CA[1)]	43.8	18.3	15.4	26.3	14.7	28.1	31.8	8.6
	FA[2)]	378.2	3294.4	2664.8	87.4	1844.1	1706.8	477.6	3199.5
	L-*O*-gl[3)]	219.6	2235.5	1615	801.4	918.3	1029.0	44.6	1369.9
	Ros[4)]	2431.4	3023.4	2188.7	3217.8	2742.4	3656.2	6831.9	3163.9
	H-*O*-gl[5)]	1017.2	2196.3	1703.8	1622.6	1750.2	1463.7	1128.9	877.2
	NP[6)] (or Lu)	122.4	71.9	88.2	129.0	83.4	29.8	108.1	45.3
	His[7)]	207.8	29.6	36.4	122.0	38.2	44.9	27.0	20.9

[1)]CA: Caffeic acid

[2)]FA: Ferulic acid

[3)]L-*O*-gl: Luteolin-7-*O*-glucoside

[4)]Ros: Rosmarinic acid (Major)

[5)]H-*O*-gl: Hispidulin-7-*O*-glucoside

[6)]Np: Nepetin (or Luteolin)

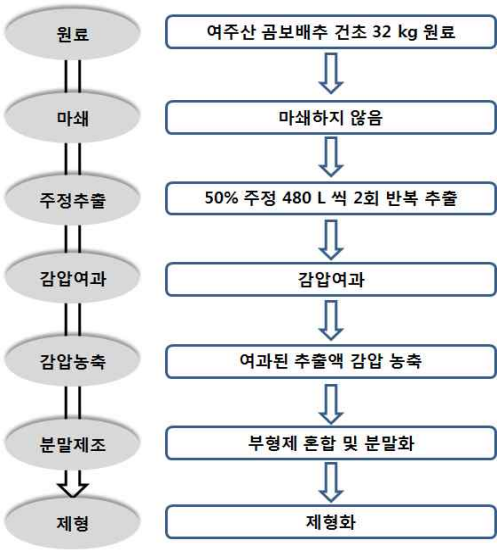
[7)]His: Hispidulin

나. 곰보배추건조엑스 표준 대량 제조 공정 확립

(제품의 대량생산에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발)

1) 대량 제조 공정 설정

곰보배추 추출에 대한 표준 제조 공정을 확립하기 위하여 선행연구로부터 유효성이 확인된 50% 주정 용매로 선정하였으며, 추출시간, 횟수, 용매량을 동시에 고려하여 수율 증대 최적조건을 수립하였다.



<Fig. 4. 곰보배추건조엑스 대량 제조공정>

Ⅱ. 추출물 원료의 표준화 및 Validation

가. 대량 생산 원료에서의 지표성분의 함량 분석

(재)춘천바이오진흥원으로부터 대량 제조된 YD-204B 엑스의 지표성분 (hispidulin) 함량을 조사하였다. 정량시험의 경우 표준용액과 시험용액을 각각 10 μL씩 주입하여 앞의 조건에서 시험하여 지표성분 함량(%)을 구하였다.

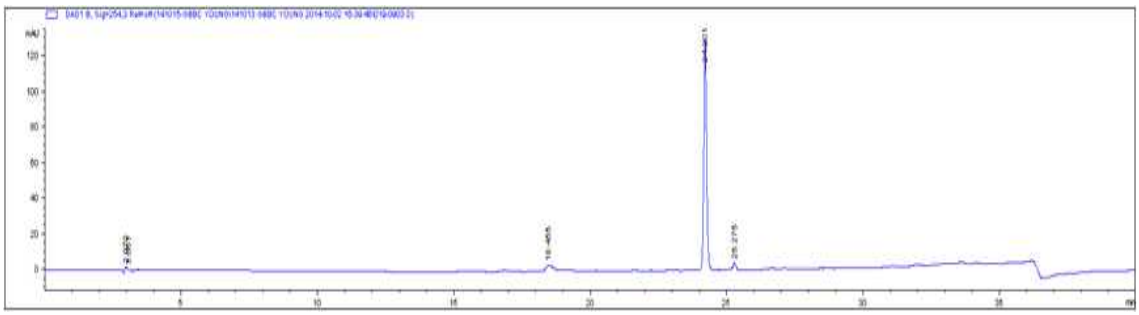
1) 시험용액의 조제

동결건조 된 곰보배추 추출분말 100 mg을 정밀하게 달아 50 mL 용량플라스크에 넣고 50 % 주정 25 ml을 넣어 초음파 용매 한 후, 다시 50 % 주정으로 정확히 50 mL로 하고 0.2 μm syringe filter로 여과하여 검액으로 한다.

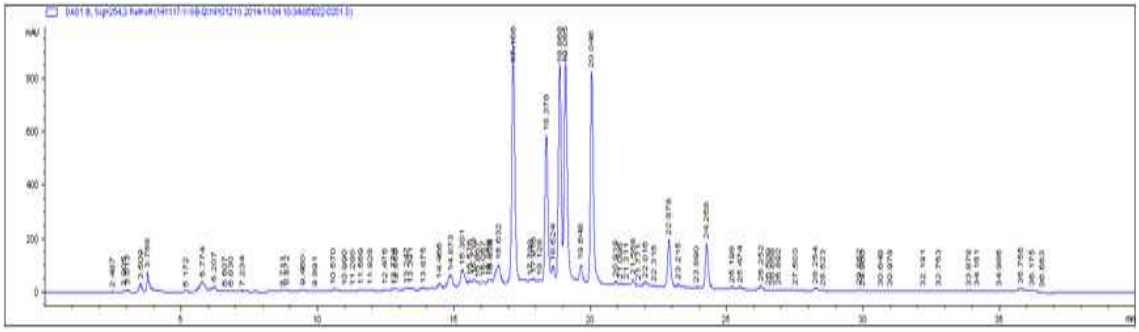
2) 표준용액의 조제

Hispidulin 표준품은 시그마알드리치로부터 구입하였으며, 표준품 5 mg을 정밀하게 달아 50% 주정에 녹여 정확하게 50 mL로 하고 0.2 μm syringe filter로 여과하여 표준액으로 한다.

[표준물질 분석 크로마토그램]: Hispidulin]



[검액의 분석 크로마토그램]: YD-204B]



<Fig. 5. Hispidurin 과 YD-204B의 크로마토그램 비교>

분석 결과, 곰보배추엑스로부터 지표성분(Hispidulin)의 함량은 0.39 % 로 최종 확인되었다.

<Table 3. 곰보배추건조엑스 (YD-204B)의 Hispidulin 함량>

Sample name	sample (YD-204B)	solvent (50% MeOH)	Nominal conc.	RT	Analyte area	함량 (%)
	mg	mL	mg/mL			
SAM_1	101.0	50	2.0	24.938	222.6	0.39
SAM_2	101.0	50	2.0	24.935	221.8	0.39
SAM_3	100.1	50	2.0	24.937	218.0	0.39
Average						0.39

나. 곰보배추건조엑스(YD-204B)의 동등성 확인

대량 제조공정을 통해 생산된 곰보배추건조엑스의 지표 성분 및 유효 성분들을 확인하기 위하여 실험실에서 물질 규명 및 패턴 분석에 사용된 소량 제조 곰보배추건조엑스와의 동등성을 확인하였다.

<Table 4. 실험실 제조 시료 및 대량 제조 시료간 동등성 확인>

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (Hispidurin)	동등 상관계수
Lab (area)	730	727	8394	4740	7062	5970	8012	1724	1110	0.9998
Pilot (area)	591	708	7947	4519	6611	5655	7515	1700	1125	

III. 곰보배추 추출물(YD-204B)의 Hispidulin 분석 시험방법 검증(Method Validation)

가. 결과 요약표

항 목	내 용	기 준	결 과	판 정
특이성	분리도(Rs)	> 1.5	9.04	■ 적 합
	스펙트럼 비교	overay 일치	overay 일치	□ 부적합
정확성	평균회수율	100 ± 2 %	99.82~101.52 %	■ 적 합
	상대표준편차 (RSD)	≤ 2.0 %	0.32~0.42 %	□ 부적합
정 밀 성	일내반복(RSD)	≤ 2.0 %	0.05~0.22 %	■ 적 합
	일간반복(RSD)	≤ 4.0 %	0.32~0.42 %	□ 부적합
정량한계	10σ/S (σ : 반응의 표준편차, S : 표준검량선의 기울기)		0.27 $\mu g \cdot m\ell^{-1}$	■ 적 합 □ 부적합
직 선 성	직선식, R^2	$R^2 \geq 0.99$	R^2 = 0.999995 (y=21.90x+2.611)	■ 적 합 □ 부적합
범 위	직선성이 유지되는 일정 함량범위		기준 농도의 20~507%	■ 적 합 □ 부적합

나. 곰보배추추출물의 Hispidulin 함량

1) 시험자료

구분	전처리			면적(Area)		함량(%)	평균 함량(%)
	취한량		희석량				
표준용액 (Hispidulin)	4.75 mg		50 mL	1882.917 1843.9688 1843.8461	1856.91060		
시험용액	1회	41.7 mg	20 mL	159.23790 159.93521 159.66512	159.61274	0.3916	0.3945
	2회	41.0 mg	20 mL	158.17059 158.77214 158.53516	158.49263	0.3955	
	3회	40.8 mg	20 mL	157.83595 158.15239 157.93823	157.97552	0.3962	

2) 계산

Hispidulin (%)

$$= \text{표준용액의 농도(mg/ml)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{\text{시험용액의 전량(ml)}}{\text{검체량(mg)}} \times 100$$

3) 시험결과

구분	Hispidulin 함량 (%)	평균함량(%)	SD	RSD (%)
1회	0.3916	0.3945	0.0025	0.6219
2회	0.3955			
3회	0.3962			

- 의약품 등 기준 및 시험방법 심사의뢰서 심사규정(식품의약품안전청고시 제2007-47호) 제3조(의약품의 일반적 사항) 5호 “기준 및 시험방법에 기재되는 시험방법은 식약청의 “의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인” 또는 공인된 방법(예: ICH Guideline, 공정서)에 따라 검증되어야 한다. 단 약전, 공정

서 및 식약청고시 등에 수재된 시험방법은 이 규정에서 제외된다"의 규정에 따라 배암차즈기 추출물의 지표물질로 선정한 히스피둘린(Hispidulin)의 시험방법 검증(Validation)을 실시하였다.

시험은 식약청의 "의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인"에 따라 특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직선성 및 범위 평가항목에 적합한가를 확인하고 이를 검증하였다.

배암차즈기의 지표성분인 hispidulin의 분석법을 확립하고 분석법에 대한 유효성 검증 (validation)을 실시하였다. 0.1% phosphoric acid가 첨가된 water와 methanol을 이동상으로 YMC Hydrosphere C18 (150 × 4.6 ㎜, 5.0 ㎛) 컬럼을 사용하여 기울기 용리 방법으로 분석한 결과, 본 시험법에서 표준용액의 피크유지시간과 곰보배추추출물의 hispidulin 피크의 유지시간이 일치하고 9.04의 높은 분리도 (Rs)를 나타내었으며, UV spectrum이 일치하는 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수 (r^2)는 0.999995로 높은 직선성을 나타냈으며, 검출한계 (LOD)는 0.09 ㎍·㎖$^{-1}$, 정량한계 (LOQ)는 0.27 ㎍·㎖$^{-1}$로 확인하였다. 분석법의 재현성을 검증하기 위한 일내 및 일간 분석에서 정밀도 (RSD)는 각각 0.05~0.22%와 0.32~0.42%로 나타났으며, 정확도 (accuracy)는 각각 99.5~102.3%와 98.8~101.5%로 나타내어 본 분석법이 지표성분의 함량분석을 위한 적합한 시험법임을 검증하였다. 본 시험법에 따라 분석한 곰보배추추출물 내의 hispidulin의 평균 함량은 약 3.945 ㎎·g^{-1} (0.39%)로 상대표준편차는 0.5%이하였다. 따라서 이상의 분석결과를 통해 HPLC를 이용한 배암차즈기 추출물 (YD-204B)의 지표성분으로서 hispidulin의 분석법이 적합한 시험법임이 검증되었다.

IV. 곰보배추추출물(YD-204B) 원료 별첨 규격 시험

가. 결과 요약표

항목		기준	결과
함량	Hispidulin	0.39±0.08 % (3.9mg/g)	0.42 %
			0.42 %
			0.42 %
중금속	납	5 mg/kg 이하	0.0840 mg/kg
	카드뮴	0.3 mg/kg 이하	0.0112 mg/kg
	총비소	3 mg/kg 이하	0.1716 mg/kg
	총수은	0.2 mg/kg 이하	0.001 mg/kg
미생물	대장균군	음성	음성
	세균수	20,000/ g 이하	불검출
잔류농약	BHC	0.20 mg/kg 이하	불검출
	DDT	0.10 mg/kg 이하	불검출
	Aldrin	0.01 mg/kg 이하	불검출
	Endrin	0.01 mg/kg 이하	불검출
	Dieldrin	0.01 mg/kg 이하	불검출
영양성분	열량		265.40 Kcal/100g
	탄수화물		50.02 %
	조단백질		9.31 %
	조지방		3.12 %
수분			23.31 %
회분			14.24 %
나트륨		2,000 mg	258.99 mg/ 100g

- 곰보배추추출물(YD-204B)의 지표성분 함량, 중금속, 미생물, 잔류농약, 영양성분, 수분, 회분, 나트륨 함량 등 원료 별첨 규격 시험을 진행한 결과 기준 규격에 적합하며, 이를 바탕으로 원료의 기준 규격을 설정하였다.

V. 제제 및 제형 연구를 통한 인체적용시험 시제품 제작

가. 제형 선정

1) 제제 및 제형 연구를 통한 인체적용시험 시험약 제조

- 최종 안정성 및 적합성 고려 캡슐 제형으로 선정
- 인체적용시험 시험약으로 위약군과 본약 설정 / 제조
- 제품 1캅셀 (550 mg) 중 YD-204B (배암차즈기 추출물) 480 mg 함유

<Fig. 7. 곰보배추추출분말을 함유한 제형>

나. 시제품 제작

1) 곰보배추추출물 인체적용시험용 시제품 - 본약 제조

제품명	곰보배추동결건조분말-본약				
내용량	550 mg			제분류	임상용
제형	550mg 적갈색 0호 경질캡슐			포장수량	미정
1일 섭취량	1일 4정을 물과 함께 섭취			배합량	Set 1300 g 제조
붕해	분(나정, 코팅)	경도		두께	mm

시험번호 : 배합비결정일 :

품번	배합 순서	코드 번호	성분명	배합비 (%)	제품 함량 (mg)	필요량 (g)		일섭취량(mg)	요청량대비(%)	요청량(mg)
1		업체 공급	곰보배추동결건조분말	87.278	480.002	1,134.649		1920.006	100%	1,920.00
2		00245	결정셀룰로오스101	10.727	58.999	139.461				
3		00081	스테아린산마그네슘	1.000	5.500	13.000				
4		01611	이산화규소	1.000	5.500	13.000				
5										
6										
7										
8										
합 계				100.000	550.000	1,300.000				

(주)네추럴F&P

2) 인체적용시허용 시제품 - 위약 제조

제품명	곰보배추동결건조분말-위약				
내용량	550 mg			제분류	임상용
제형	550mg 적갈색 0호 경질캡슐			포장수량	미정
1일 섭취량	1일 4정을 물과 함께 섭취			배합량	Set 1300 g 제조
통해	분(나정, 코팅)	경도		두께	mm

시험번호 :

배합비결정일 :

품번	배합 순서	코드 번호	성분명	배합비 (%)	제품 함량 (mg)	필요량 (g)	1	2	3	4	5	6
1	조립	4988	유당혼합분말	92.300	507.650	1,199.900						
2	조립	00245	결정셀룰로오스101	4.770	26.235	62.010						
3	후혼합	00031	스테아린산마그네슘	1.000	5.500	13.000						
4	후혼합	01611	이산화규소	1.000	5.500	13.000						
5												
6	바인더	03051	식용색소황색4호	0.700	3.850	9.100						
7	바인더	02955	식용색소적색40호	0.200	1.100	2.600						
8	바인더	02958	식용색소청색1호	0.030	0.165	0.390						
9												
10												
합 계				100.000	550.000	1,300.000						

* 조립액

조립	01977	정제수	20.000	110.000	260.000

580mg, 578mg, 583mg

(주)네추럴F&P

VI. 곰보배추추출물(YD-204B) 시제품의 안정성 평가

가. 결과 요약표

1) 장기보존시험 결과표

품명 : YD-204B		포장상태 : 경질캡슐, PTP포장			보관조건 : 30±2℃, 60±5%	
시험 항목	시험기준	시험일자				
		Initial (15.04.13)	3개월 (15.07.13)	6개월 (15.10.13)	9개월 (16.01.13)	12개월 (16.04.12)
성상	녹갈색 분말	적합	적합	적합	적합	적합
확인	표준품과 검체의 Rf 값 일치	적합 (0.53)	적합 (0.63)	적합 (0.6)	적합 (0.63)	적합 (0.6)
함량	Hispidulin (0.39±0.08%)	적합 (0.38%)	적합 (0.38%)	적합 (0.37)	적합 (0.37)	적합 (0.37)
균질성 (제제균일성)	판정값 ≤ 15.0	적합 (1.2)	적합 (1.2)	적합 (1.3)	적합 (1.9)	적합 (0.6)

2) 가속시험 결과표

품명 : YD-204B		포장상태 : 경질캡슐, PTP포장		보관조건 : 40±2℃, 75±5%		
시험 항목	시험기준	시험일자				
		Initial (15.04.13)	3개월 (15.07.13)	6개월 (15.10.14)		
성상	녹갈색 분말	적합	적합	적합		
확인	표준품과 검체의 Rf 값 일치	적합(일치) (0.53)	적합 (0.54)	적합 (0.56)		
함량	Hispidulin (0.39±0.08%)	적합 (0.38)	적합 (0.37)	적합 (0.35)		
균질성 (제제균일성)	판정값 ≤ 15.0	적합 (1.2)	적합 (1.7)	적합 (1.6)		

3) 중금속시험 및 미생물시험 결과표

품명 : YD-204B			포장상태 : 경질캡슐, PTP포장
시험항목		시험기준	시험결과
중금속	납	< 2.0 ppm	0.0163 mg/kg(ppm)
	카드뮴	< 0.3 ppm	0.0054 mg/kg
	총비소	< 3.0 ppm	0.0075 mg/kg
	총수은	< 0.2 ppm	불검출
미생물	대장균군	음성	음성
	세균수	< 20,000/g	190/g

- 곰보배추추출물(YD-204B)의 시제품을 가지고 장기보존시험 12개월 및 가속시험 조건 6개월 동안 “의약품등의 안정성 시험 기준”에 따라 안정성 시험을 내부와 외부기관 의뢰하여 실험을 실시한 결과 성상, 확인, 함량, 제제균일성과 중금속 및 미생물 항목에서 기준에 적합하였으므로 본 제품은 사용기간 12 개월 동안 품질이 안정한 제품이라고 사료된다.

VII. 곰보배추추출물(YD-204B)의 제제연구

가. 결과 요약

1) Formulation 및 제조 Key Point

(1) 제조방법 : 직타법

(2) 정당 주성분 함유량 500mg 용량 설정

→제품 일일섭취량 2,000mg 으로 제형 설계(1일 2회, 1회 2정 섭취)
→지표물질 히스피둘린 제품 표시량 협의 필요
(3) 사용된 첨가물은 건강기능식품 제조에 사용가능한 첨가물 사용
(건강기능식품공전 및 식품첨가물공전 근거)
(4) 주성분의 흡습성으로 인한 갈변 및 Caking 문제
→공기 중 노출되어 방치되는 시간 최소화 필요
→주성분 사과 시 부형제와 함께 사과하여 인습 정도를 최소화
→혼합물 및 타정물 보관 시 실리카겔 투입 후 기밀 보관유지(∵함습방지)
→코팅공정까지 작업 공정 대기 시간 단축이 갈변 방지에 유리
2) 안정성 시험 결과
- 안정성 시험 진행 중
3) 기타
(1) 완제 Color matching 중(천연색소 사용)
→성상 목표: 적갈색의 장방형 필름코팅정

나. 연구제제 일반사항

1) 제품명 : YD-204B 필름코팅정
2) 원료약품 및 그 분량 : 원료약품 및 분량 참조
3) 성상 : 적갈색의 장방형 필름코팅정
4) 제조방법 : 제조방법 참조

다. 원료약품 및 분량

이 약 1 정 (1,166mg) 중,

배합목적	성분명	규격	분량	단위
주성분	곰보배추추출물	별규	500.0	mg
부형제	미결정셀룰로오스(Vivapur 12)	KP	100.0	mg
부형제	D-만니톨(200SD)	KP	350.0	mg
부형제	Starch 1500	NF	100.0	mg
붕해제	카르복시메틸셀룰로오스칼슘	KP	20.0	mg
활택제	함수이산화규소	NF	10.0	mg
활택제	스테아르산마그네슘	KP	20.0	mg
코팅기제	오파드라이 NS WHITE 120K580000	별규	22.0	mg
코팅기제	오파드라이 NS RED 120K	별규	44.0	mg

※오파드라이 NS RED 120K 는 현재 조색 중으로, 코드명 미정임

라. 제조방법

- 건강기능식품공전 공통제조기준 중 정제제법의 기준에 맞도록 제조할 때 코팅액 조제 시 에탄올은 1 정당 158.2 밀리그램, 정제수는 1 정당 288.65 밀리그램이 사용된다.

공정명	사용원료	비고
1. 원료칭량	주 성 분 : 공보배추추출물 부 형 제 : 미결정셀룰로오스 부 형 제 : D-만니톨 부 형 제 : Starch1500 붕 해 제 : 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 활 택 제 : 함수이산화규소 활 택 제 : 스테아르산마그네슘 코팅기제 : 오파드라이 NS WHITE 120K580000 코팅기제 : 오파드라이 NS RED 120K	<주성분 제조원> ㈜와이디생명과학
2. 1 차 혼합	주 성 분 : 공보배추추출물 부 형 제 : 미결정셀룰로오스 부 형 제 : D-만니톨 부 형 제 : Starch1500	사과(25mesh)
3. 최종혼합	공정 2 의 혼합물 붕 해 제 : 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 활 택 제 : 함수이산화규소 활 택 제 : 스테아르산마그네슘	사과(25mesh)
4. 타정	공정 3 의 혼합물	붕해: 20 분 이내
5. 코팅액 조제	코팅기제 : 오파드라이 NS WHITE 120K580000 용 제 : 정제수 용 제 : 에탄올	
6. 코팅	공정 4 의 타정물 공정 5 의 코팅액	
5. 코팅액 조제	코팅기제 : 오파드라이 NS RED 120K 용 제 : 정제수	
6. 코팅	공정 4 의 코팅물 공정 5 의 코팅액	붕해: 60 분 이내

마. 제제검토결과

1) 제제학적 파라미터

항목	법적기준	관리기준	평가 결과
경도	N/A	5kp 이상	약 10kp
붕해(나정)	30 분 이내	20 분 이내	15 분 이내
붕해(코팅정)	60 분 이내	30 분 이내	20 분 이내
마손도	N/A	0.5% 이하	약 0.2% 이하

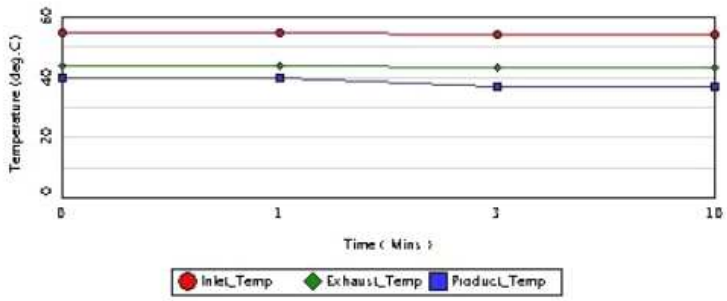
2) 제품사진

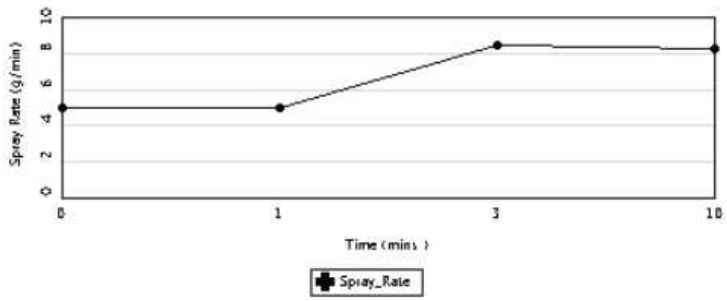
나정	코팅정
검은색의 반점이 있는 연한 녹색의 장방형 정제	적갈색의 장방형 필름코팅정
장경(약 19.5 mm), 단경(약 8.5 mm)	장경(약 19.7 mm), 단경(약 8.7 mm)

3) 코팅공정 **Profile**

(1) First Layer Coating profile

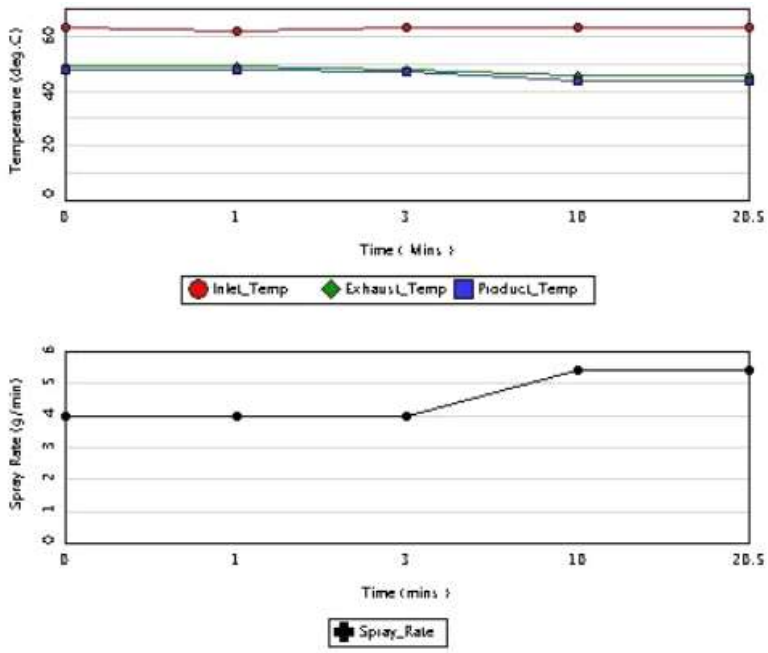
Time	Inlet Temp	Exhaust Temp	Product Temp	Spray Rate	Atomizing Air Pressure	Pattern Air Pressure	Pan Speed	Airflow	Balance Reading	Theoretical Weight Gain	Coating Weight Gain	Dosage Weight
Mins	deg. C	deg. C	deg.C	g/min	Bar	Bar	RPM	m3/hr	g	%	%	mg
0	55.0	44.0	40.0	5.0	1.2	1.2	15.0	150.0	0.0	0.00		
1	55.0	44.0	40.0	5.0	1.2	1.2	15.0	150.0	5.0	0.13		
3	54.0	43.0	37.0	8.5	1.2	1.2	17.0	150.0	22.0	0.55		
10	54.0	43.0	37.0	8.3	1.2	1.2	17.0	150.0	80.0	2.00		





(2) Second Layer Coating profile

Time	Inlet Temp	Exhaust Temp	Product Temp	Spray Rate	Atomizing Air Pressure	Pattern Air Pressure	Pan Speed	Airflow	Balance Reading	Theoretical Weight Gain	Coating Weight Gain	Dosage Weight
Mins	deg. C	deg. C	deg.C	g/min	Bar	Bar	RPM	m3/hr	g	%	%	mg
0	63.0	49.0	48.0	4.0	1.4	1.4	21.0	150.0	0.0	0.00		
1	62.0	49.0	48.0	4.0	1.4	1.4	21.0	150.0	4.0	0.15		
3	63.0	48.0	47.0	4.0	1.4	1.4	27.0	150.0	12.0	0.45		
10	63.0	46.0	44.0	5.4	1.4	1.4	30.0	150.0	50.0	1.88		
20.5	63.0	46.0	44.0	5.4	1.4	1.4	30.0	150.0	107.0	4.01		



→ 제품 코팅 시 TiO2 함유비율 증량으로 색상편차 완화

→ Second Layer Coating 실시로 제품 전체적인 불투명도 상승으로 색상편차 완화

바. 안정성 검토 결과

- 가속조건 2 개월 진행 중

장기보관조건(25℃/60%RH)	가속조건(40℃/75%RH)
가속조건 2 개월까지 시험약 성상 변화 없음	

<*in vitro*/ *in vivo* 효력 및 독성연구>

가. *in vitro* 효력시험

(1) 3T3-L1 pre-adipocyte 세포주의 생존율에 미치는 효과 평가

YD-204 30, 50% 주정추출물의 경우 100, 200 ug/mL 농도 모두 3T3-L1 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으나, 95% 추출물 (200 ug/mL)에서는 생존율이 감소하였다 **(Fig. 1).**

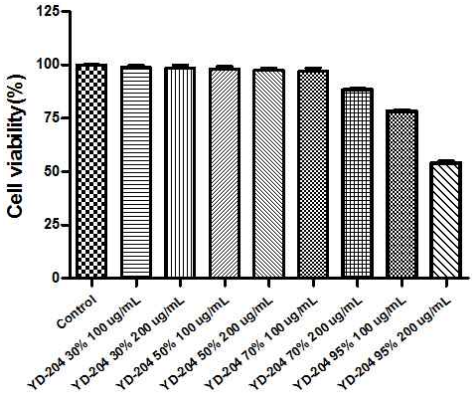


Fig. 1. Effects of various *Salvia plebeia* extract on the cell viability of 3T3-L1 cells.

(2) 3T3-L1 pre-adipocyte 세포주에서의 지방생성 억제 효과 평가

아지방세포의 분화유도 중에 형성된 지방의 함량을 Oil-Red O staining을 이용하여 측정한 결과, 추출 농도와 관계없이 약 35% 이상의 지방 축적 억제 효과를 보였으며, YD-204 (50% 주정추출물)이 지방세포의 분화 시 형성되는 지방의 함량을 약 50% 이상 감소시킴을 확인하였다 **(Fig. 2).**

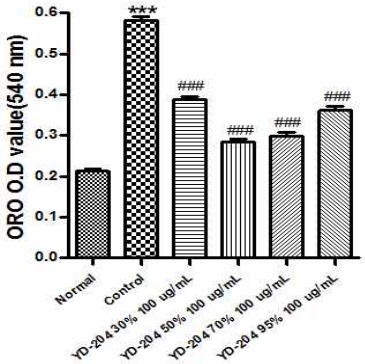


Fig. 2. Effect of various *Salvia plebeia* extract on differentiation of 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes.

(3) 3T3-L1 pre-adipocyte 세포주에서의 중성지방(TG) 생성 억제 효과 평가

분화된 지방세포 (control)과 비교해 볼 때, 추출 용매의 알콜 함량과 상관없이 약 25% 이상의 중성지방 축적 억제 효과를 확인하였으며, YD-204 50% 주정추출물 100 ug/mL에서 약 40%의 감소, 70% 추출물에서 약 33%의 지방세포 내 축적된 중성지방의 함량이 감소하였다 **(Fig. 3).**

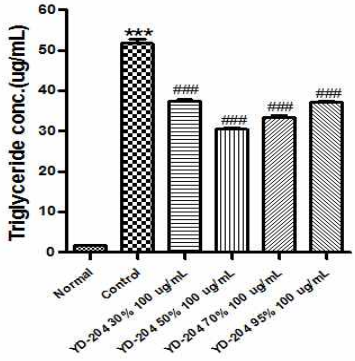


Fig. 3. Effect of various *Salvia plebeia* extract on **triglyceride production**

나. *in vivo* 시험 자료

(1) 고지방식이로 비만을 유도한 C57BL/6N 마우스에서 YD-204B의 비만 예방 효과

① 체중증가량

8주 실험 후 체중을 확인 한 결과, 시료 투여 전 체중은 그룹 간 유의적인 차이는 없었으나, 8주간 고지방 식이를 섭취한 후 최종 절대 체중은 정상대조군보다 대조군이 더 체중이 높았고, 실험군 중에서는 YD-204B 400 mg/kg군만 대조군과 비교하여 유의적인 체중감소를 보였다 **(Fig. 4).**

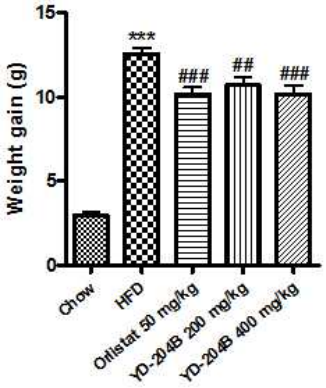


Fig. 4. Inhibitory effects of YD-204B on **weight gain** in mice fed high-fat diet for 8 weeks.

② 식이 섭취량 및 식이효율

식이섭취량은 1일 1마리가 섭취한 식이의 양 (g)으로 계산하였다. 8주 동안의 실험에서 고지방 식이 대조군이 정상군보다 적은 양의 식이 섭취량을 나타냈으나 유의하지 않았으며, 각 실험군 간의 식이 섭취량 또한 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

식이효율 (feed efficiency ratio: FER)은 식이 섭취 대비 체중 증가량을 나타내었다. 고지방식이 대조군이 정상군에 비하여 식이 효율이 매주 유의적인 값으로 높았고, 그에 비해 양성대조군 및 실험군은 적은 식이 효율 값을 나타냈지만 유의하지 않았다.

③ 간 및 지방 조직 무게

실험 종료 후 적출한 간의 무게를 측정한 결과, 정상군의 간 무게보다 대조군의 간 무게가 유의적으로 증가되었고 ($p<0.001$). YD-204B 200 mg/kg 실험군 (0.97±0.07 g), 400 mg/kg 실험군 (0.96±0.09 g)으로 유의적으로 간 무게가 감소하여 간 조직에 지방이 축적되는 것을 억제하였다.

실험 종료 후 적출한 각 지방 조직의 중량 측정 결과 (부고환 지방, 피하 지방, 장간막 지방, 신장 주변 지방 및 후복강 지방 등을 각각 적출하여 비교한 결과)를 Table 1과 Fig. 5.에 나타내었다.

Table 1. Inhibitory effects of YD-204B on various adipose tissue weight in mice fed high-fat diet for 8 weeks.

Tissue / Group	간 (Liver)	부고환지방 (Epididymis)	피하지방 (Subcutaneous)	신장지방 (Kidney)	후복강지방 (Retroperitoneal)	장간막지방 (Mesenteric)	총 지방 (Total Adipose)
Chow	0.99±0.06	0.52±0.17	0.28±0.08	0.05±0.01	0.18±0.03	0.19±0.03	2.27±0.15
HFD	1.15±0.05*	2.44±0.21***	1.38±0.14***	0.23±0.06***	0.72±0.13***	0.69±0.10***	6.54±0.49***
Orlistat (50 mg/kg)	1.01±0.12$^{\#\#}$	2.14±0.37$^{\#}$	1.01±0.25$^{\#\#\#}$	0.21±0.05	0.68±0.09	0.60±0.17	5.66±0.91$^{\#\#}$
YD-204B (200 mg/kg)	0.97±0.07$^{\#\#\#}$	2.09±0.24$^{\#}$	1.27±0.22	0.19±0.02	0.68±0.04	0.61±0.19	5.86±0.66
YD-204B (400 mg/kg)	0.96±0.09$^{\#\#\#}$	1.92±0.18$^{\#\#\#}$	1.03±0.28$^{\#\#}$	0.18±0.04$^{\#}$	0.68±0.12	0.52±0.11$^{\#}$	5.21±0.44$^{\#\#\#}$

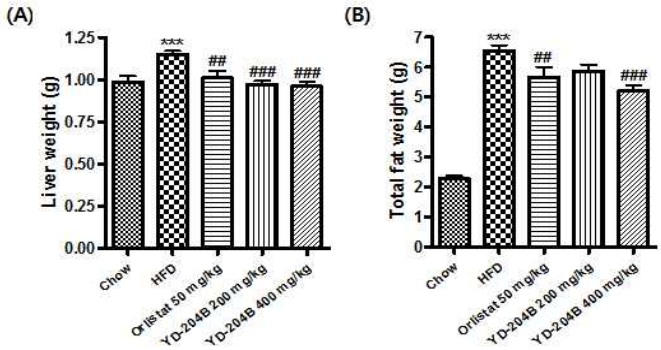


Fig. 5. Inhibitory effects of YD-204B on various adipose tissue weight in mice fed high-fat diet for 8 weeks. (A) Liver weight, (B) Total Fat weight.

▶ (A) 간의 체내 비율

간의 체내 비율은 실험 종료 후 최종 몸무게 (g)를 간 조직의 무게 (g)로 나누어 계산하였으며, 간이 체중에서 차지하는 비율을 나타냄. 본 실험에서는 반대로 고지방식이 대조군에서 그 비율이 정상군보다 감소하였음. 반면 대조군에 비교할 때 양성대조군 및 실험군 모두 간의 체내 비율을 수치적으로 유의하게 감소시켰다 **(Fig. 6(A))**.

▶ (B), (C) 지방 조직의 체내 비율

지방 조직의 체내 비율은 실험 종료 후 최종 몸무게 (g)를 지방 조직의 무게 (g)로 나누어 산출한 값으로 체지방 비율을 나타내었다 **(Fig. 6(B), (C))**.

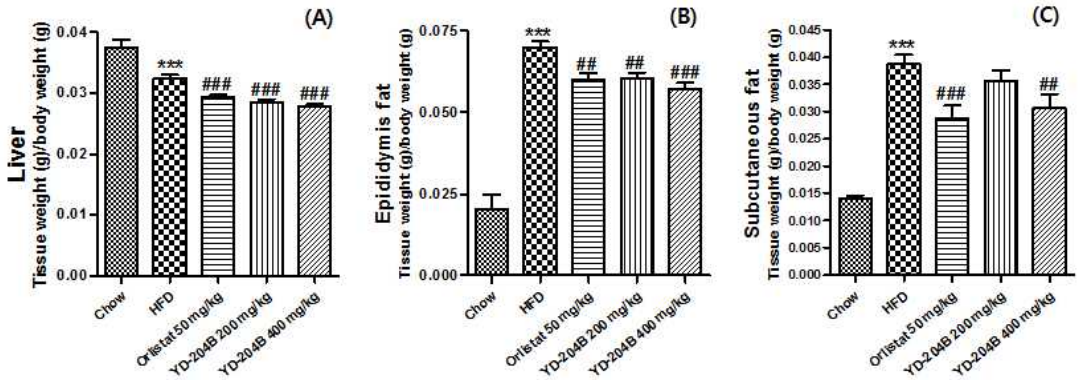


Fig. 6. Inhibitory effects of YD-204B on body **fat percentage in mice** fed high-fat diet for 8 weeks.

⑤ 혈청 내 생화학인자 수치

Biochemical / Group	GOT/AST (IU/L)	GPT/ALT (IU/L)	TG (mg/dL)	T-cho (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	vLDL-c (mg/dL)	Glu (mg/dL)
Chow	71.0±7.0	22.3±3.4	94.8±5.6	131.8±2.1	65.3±2.6	66.5±11.5	162.3±2.1
HFD	164.0±28.3***	59.0±14.9***	103.7±10.7	218.7±15.8***	83.5±5.6***	141.0±26.7***	220.9±10.3***
Orlistat (50 mg/kg)	159.4±44.7	71.4±18.5	114.5±6.5$^{\#}$	238.3±14.0$^{\#\#}$	75.0±12.7	159.5±15.3$^{\#\#}$	156.1±15.0$^{\#\#\#}$
YD-204B (200 mg/kg)	139.0±38.4	43.6±9.8	109.1±6.6	217.8±5.9	55.8±3.5$^{\#\#\#}$	160.4±13.0$^{\#\#\#}$	165.0±3.2$^{\#\#\#}$
YD-204B (400 mg/kg)	124.0±45.0	30.1±13.8$^{\#\#\#}$	102.7±10.8	198.8±16.8$^{\#\#}$	47.2±7.2$^{\#\#\#}$	146.1±24.4	143.3±14.7$^{\#\#\#}$

The values are shown as mean±S.T.D. Results were statistically analysed using Tukey's multiple comparison test, significantly different $^{***}p<0.001$ compare with chow, $^{\#}p<0.05$ $^{\#\#}p<0.01$ $^{\#\#\#}p<0.001$ compare with HFD.

▶ GOT/AST, GPT/ALT

GOT/AST, GPT/ALT는 간세포에 다량 존재하며, 급성, 만성간염, 지방간, 알코올성 간염, 간암 등이 있을 때 혈중으로 유출되므로 혈중 AST, ALT 수준은 주로 간세포의 변성 또는 괴사상태를 반영하는 지표다. 실험 결과, 정상군에 비하여 대조군의 GOT/AST, GPT/ALT 수치가 현저히 증가하였으며 ($p<0.001$), YD-204B 400 mg/kg를 투여한 실험군에서 각각의 수치가 감소하였고, 특히 GPT/ALT 수치가 유의적으로 감소 ($p<0.001$)하여 고지방 식이로 유도된 간 손상에 대한 보호 효과를 나타냈다.

▶ 혈청 내 지방 함량

고지방 식이를 급여했을 경우, 혈청 내 중성지방은 정상군에 비해 증가함. 본 실험에서는 대조군의 중성지방 수치가 증가하였지만 유의적이진 않았다. 각 실험군은 혈청 내 중성지방 함량에 영향을 미치지 않았다.

▶ 혈청 내 콜레스테롤 함량

혈청 내 총 콜레스테롤은 함량이 증가할수록 비만지수도 상승하여 비만의 수준과 밀접한 관련이 있다. 측정 결과, 정상군 (131.8±2.1 mg/dl)에 비해 대조군 (218.7±15.8 mg/dl)의 총 콜레스테롤 값이 유의적으로 증가하였다. ($p<0.001$). 대조군 (218.7±15.8 mg/dl)과 비교하였을 때, 양성대조군인 orlistat 군 (238.3±14.0 mg/dl)은 오히려 그 값이 유의적으로 상승한 반면, YD-204B 400 mg/kg를 투여군 (198.8±16.8 mg/dl)은 유의적으로 그 수치가 감소하였다 ($p<0.001$). LDL 콜레스테롤은 비만유도 시 혈청 내 상승하는 인자로, 정상군 (66.5±11.5 mg/dl)에 비해 고지방 식이 대조군 (141.0±26.7 mg/dl)이 유의적인 높은 수치를 나타내었다 ($p<0.001$). 반면 시료 투여군들의 LDL 콜레스테롤 감소 효과는 나타나지 않았다.

▶ 혈당 측정

혈청 내 leptin의 함량을 ELISA assay로 분석한 결과, leptin 함량은 정상군 (7.71±0.56 ng/ml)과 비교하여 고지방식이 대조군의 (47.29±9.24 ng/ml) leptin 농도가 유의적으로 증가하였다 ($p<0.001$). 실험군 YD-204B 400 mg/kg의 leptin 함량은 32.08±11.73 ng/ml수준으로 현저히 감소하였다 **(Fig. 7)**.

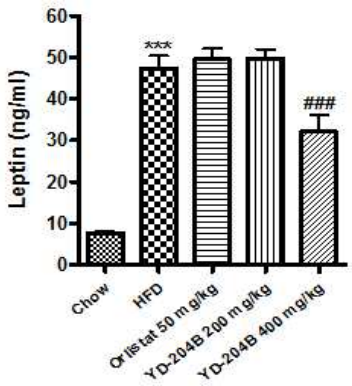


Fig. 7. Effects of YD-204B on **serum leptin** in mice fed high-fat diet for 8 weeks.

⑥ 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

8주간의 비만 유도를 위한 고지방 식이 급여와 동시에 각 실험군에 해당하는 시료를 8주간 경구투여 한 후 각 군의 개체로부터 피하지방조직 (SubQ) 및 부고환지방조직 (Epi)을 분리하였다. RT-PCR을 수행하여 비만 유도 관련 transcription factor 및 target gene의 발현 변화를 확인하였다.

▶ 피하지방조직 (SubQ) 내 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

YD-204B가 피하지방 조직 내 비만 유도 관련 target gene 및 transcription factor의 발현 변화에 미치는 영향을 확인한 결과, YD-204B를 투여한 경우, PPARɣ와 C/EBPα에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 200 mg/kg에서 억제되었고, 표적유전자인 aP2, LPL, FAS, SREBP-1c 와 HSL 유전자에 대한 발현 억제율은 200 mg/kg에서 발현억제효과를 효과적으로 나타내었다 **(Fig. 8)**.

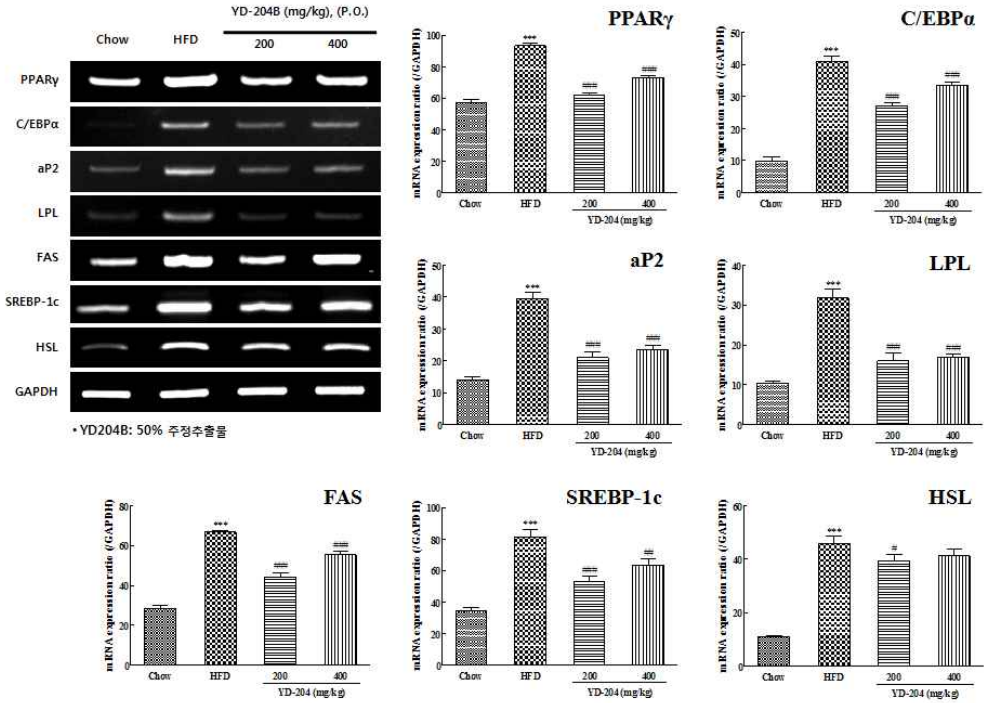


Fig. 8. Effects of YD-204B on the **mRNA expression** of transcriptional factors and adipocytes-specific genes in **subcutaneous adipose** tissue of hight-fat diet mice.

▶ 부고환지방 (Epi) 내 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

YD-204B가 부고환지방조직 내 비만 유도 관련 target gene 및 transcription factor의 발현 변화에 미치는 영향을 확인한 결과, YD-204B를 투여한 경우, PPARɣ와 C/EBPα에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 200 mg/kg에서 발현억제효과를 효과적으로 나타내었다 **(Fig. 9).**

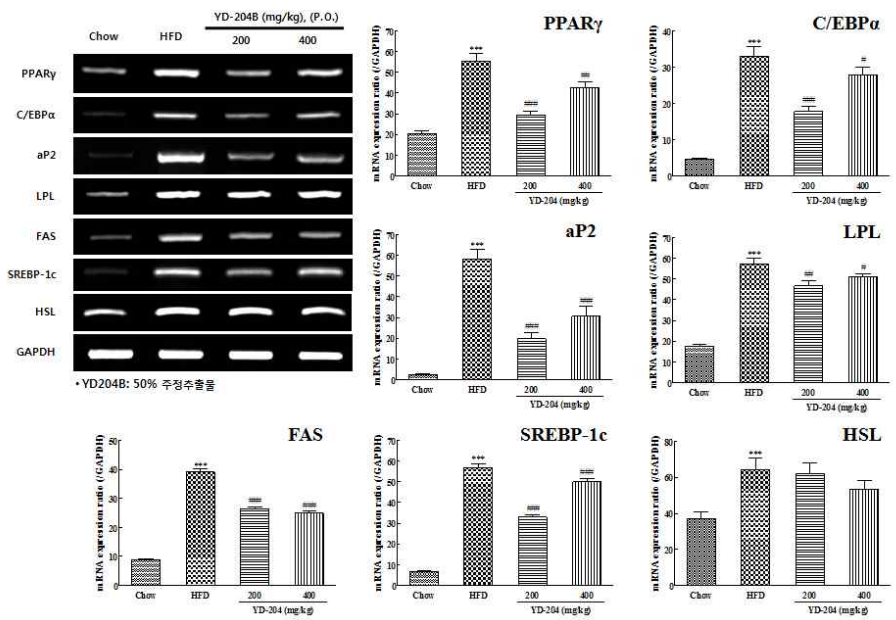


Fig. 9. Effects of YD-204B on the **mRNA expression** of transcriptional factors and adipocytes-specific genes in **epididymal adipose** tissue of hight-fat diet mice.

⑦ 비만 관련 유전자의 protein 발현 측정

8주간의 비만 유도를 위한 고지방 식이 급여와 동시에 각 실험군에 해당하는 시료를 8주간 경구투여 한 후 각 군의 개체로부터 피하지방조직 (SubQ) 및 부고환지방조직 (Epi)을 분리하였다. Western blot을 수행하여 비만 유도 관련 target gene의 발현 변화를 확인하였다.

▶ 피하지방조직 (SubQ) 내 비만 관련 유전자의 protein 발현 측정

8주간 고지방식이로 비만이 유발된 C57BL/6N 마우스의 지방조직을 분리한 후, Western blot 방법으로 SPE가 C/EBPα 및 PPARγ의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 지방세포의 분화가 진행되면서 발현과 활성이 증가하는 대표적인 항비만의 바이오 마커로 사용되는 C/EBPα 및 PPARγ의 단백질 발현량을 측정하는 결과, 대조군의 피하조직 내의 C/EBPα 및 PPARγ의 단백질 발현양이 유의적으로 증가하였으며, 반면 YD-204B 400 mg/kg 실험군에서 모두 유의적으로 감소되는 것으로 확인되었다. (Fig. 10).

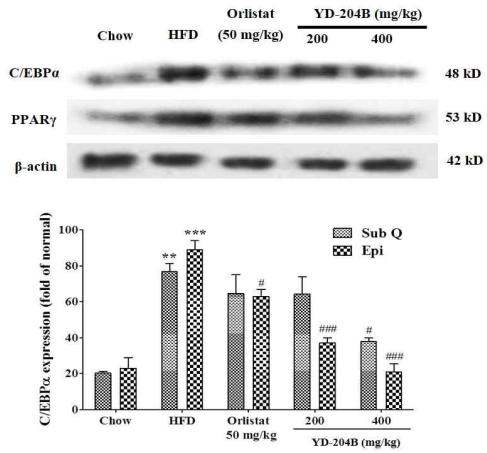


Fig. 10. Effects of YD-204B on the **protein expression** in **subcutaneous adipose** tissue of hight-fat diet mice.

▶ **부고환지방 (Epi) 내 비만 관련 유전자의 protein 발현 측정**

부고환지방조직 내 비만 관련 단백질의 발현 변화는 HFD 대조군에서 C/EBP, PPARɣ 단백질 발현이 유의적으로 증가되었으며, 반면 SPE를 투여한 경우 단백질 발현이 400 mg/kg에서 가장 많이 억제되었다 **(Fig. 11).** 따라서 SPE는 지방세포 비대의 key regulaotr인 PPARɣ, C/EBPα와 같은 단백질의 발현을 유의적으로 억제함으로써 조직내 지방 축적을 감소시키는 것으로 사료된다.

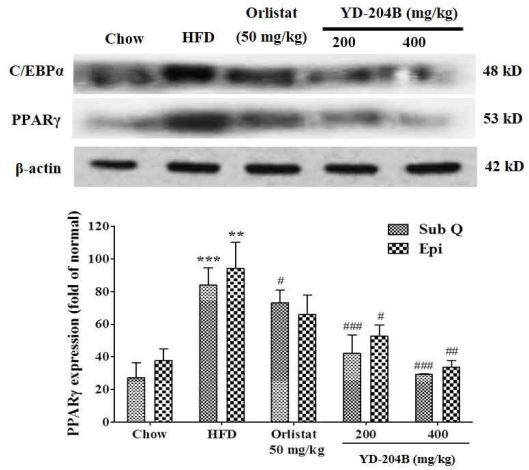


Fig. 11. Effects of YD-204B on the **protein expression** in **epididymal adipose** tissue of hight-fat diet mice.

⑦ 조직병리검사

고지방 식이를 급여한 C57BL/6N 마우스에서 YD-204A 및 YD-204B의 지방간 및 비만개선효과를 조직병리검사와 image analysis로 확인하였다.

▶ **간 조직**

간조직을 검경한 결과, G1(Normal)에 비하여 G2(HFD)의 지방 침윤 정도와 염증세포 침윤 정도가 크게 증가하였음이 확인되었다(p<0.001). 시험군에서는 지방 침윤 정도에 대하여 G5(YD-204B, 400 mg/kg)은 p<0.01 수준으로 대조군(G2)과 유의적인 차이를 보였다. 염증세포 침윤정도에 대해서는 G5(YD-204B, 400 mg/kg)이 대조군(G2)과의 비교에서 유의성이 관찰되었다(p<0.05) **(Fig. 12).**

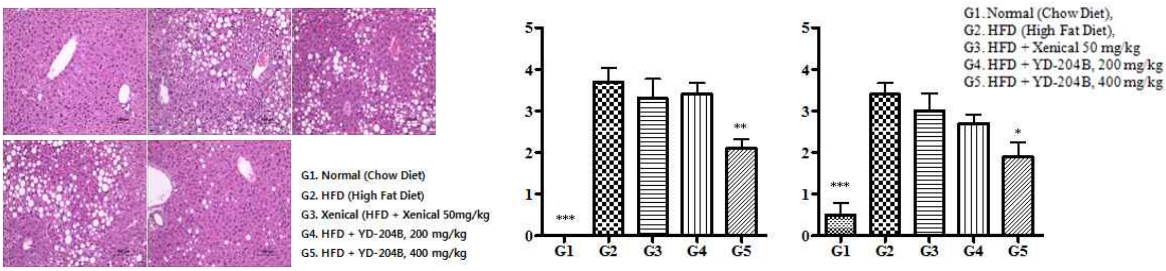


Fig. 12. Histopathological Findings of **Liver**, x100 magnification

▶ **부고환주변 지방조직**

지방세포를 이미지 분석한 결과, G2(HFD)의 지방세포 평균직경은 G1(Normal) 지방세포와 부고환주변 지방조직에서 약 34%, 피하지방조직에서 약 36%의 직경차이가 있는 것으로 측정되었다 (p<0.001). 대조군과 시험군의 비교에서 부고환주변 지방조직에서는 시험군인 G4(YD-204B, 200

mg/kg), G5(YD-204B, 400 mg/kg) 모두 평균 지방세포 직경이 대조군(G2)과 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었고(p<0.001), 양성대조군인 G3(Xenical)은 대조군(G2)과의 차이에서 p<0.05 수준의 유의성이 확인되었다. 피하지방조직에서는 G5(YD-204B, 400 mg/kg)이 대조군(G2)과 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었다(p<0.05) **(Fig. 13).**

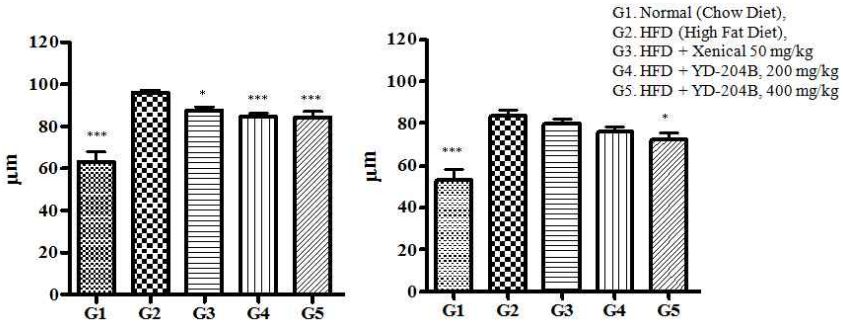


Fig. 13. Histopathological findings of **epididymal adipose tissue**, x100 magnification. (A); Chow, (B); HFD, (C); Orlistat 50 mg/kg, (D); YD-204B (200mg/kg), (E) YD-204B (400 mg/kg).

(2) 고지방식이로 비만 유발된 C57BL/6N 마우스에서 YD-204B의 비만 치료 효과

① 체중변화 및 체중 증가량

시료 투여 전 체중은 그룹 간 유의한 차이는 없었으나, 8주의 비만 유도 기간 후 체중은 정상군(29.1±1.3 g)에 비해 고지방식이 대조군 (41.6±2.9 g)이 유의적인 차이 (p<0.001)로 체중이 증가하여 비만 유도가 완료되었다. 이후 8주간 고지방 식이 섭취와 시료 투여를 병행한 후 최종 절대 체중에는 큰 영향이 없었다.

실험 종료 시 체중에서 시료 투여 시작 시 체중을 감하여 체중 증가량을 산출하였다 **(Table 2).**

HFD대조군(7.8±0.8 g)이 정상군(3.6±0.4 g)에 비해 유의적으로 체중이 증가하였으며 (p<0.001), 이에 비해 양성 대조군(orlistat), YD-204A 실험군, YD-204B 실험군으로 대조군에 비해 모두 체중 증가가 억제된 것으로 나타났다. 특히 YD-204B 400 mg/kg에서 유의적으로 체중 증가가 억제되었다 (p<0.001).

Table 2. Effects of YD-204B on **body weight** gain in obese mice fed high-fat diet for 16 weeks.

	Chow	HFD	Orlistat	YD-204A	YD-204B
			50 mg/kg	400 mg/kg	400 mg/kg
Weight gain (g)	3.6±0.4	7.8±0.8***	3.3±1.0$^{\#\#\#}$	6.8±1.1	5.7±1.2$^{\#\#\#}$

② 식이 섭취량 및 식이효율

식이섭취량은 1주일에 2회 같은 시간에 측량한 값을 바탕으로 1일 1마리가 섭취한 식이의 양(g)으로 계산하였다. 시료 투여 기간 동안 고지방식이 대조군과 비교하여 각 실험군은 식이섭취량에 큰 변화가 없었다.

식이효율 (feed efficiency ratio: FER)은 1주간 체중 증가량을 식이섭취량으로 나누어 계산하여 식이 섭취량 대비 증가한 체중을 나타냄. 8주 동안의 시료 투여 기간 동안 고지방식이 대조군이 정상군보다 식이효율이 높았다. 시료 투여 직후 양성 대조군인 orlistat군은 식이효율이 유의적으로 감소하였으나 8주 후 낮았던 식이효율이 증가하였으며, 실험 기간 전반의 실험군 식이효율은 유의성

있는 차이를 보이지 않았다.

③ 간 및 지방 조직 무게

▶ 간 무게 측정

정상군의 간 무게보다 대조군의 간 무게가 유의적으로 증가되었다 (p<0.001). 이는 고지방 식이 섭취로 인해 간에 지방이 축적되어 무게가 증가한 것으로 사료되며, 실험군의 경우 orlistat군, YD-204B 400 mg/kg 실험군이 유의적으로 간 무게가 감소하였고, YD-204A 400 mg/kg 실험군은 간 무게가 감소하였으나 유의적이지 않았다. 따라서 YD-204B가 간 조직에 지방이 축적되는 것을 억제하는 효과가 있다고 사료된다.

▶ 지방 조직의 중량

부고환 지방, 피하 지방, 장간막 지방, 신장 주변 지방 및 후복강 지방 등을 각각 적출하여 비교한 결과, 정상군에 비해 대조군의 지방 무게가 유의적으로 증가되었다 (p<0.001). 반면 고지방식이를 섭취한 대조군에 비하여 YD-204B를 400 mg/kg 경구투여 한 실험군에서 부고환 지방, 피하 지방, 장간막 지방 및 총 지방의 무게가 유의적으로 감소하여 체내 지방 축적을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다 **(Table 3).**

Table 3. Effects of YD-204B on various adipose tissue weight in obese mice fed high-fat diet for 16 weeks.

Group	간 (Liver)	부고환지방 (Epididymis)	피하지방 (Subcutaneous)	신장지방 (Kidney)	후복강지방 (Retroperitoneal)	장간막지방 (Mesenteric)	총 지방 (Total Adipose)
Chow	1.07±0.07	1.36±0.18	0.74±0.16	0.12±0.04	0.51±0.18	0.38±0.07	3.13±0.63
HFD	1.98±0.18***	2.38±0.33***	2.85±0.32***	0.65±0.13***	0.88±0.07***	1.71±0.23***	8.60±0.79***
Orlistat 50 mg/kg	1.32±0.17$^{\#\#\#}$	2.58±0.23	2.18±0.15$^{\#\#\#}$	0.36±0.07$^{\#\#\#}$	0.89±0.06	1.08±0.14$^{\#\#\#}$	6.87±0.71$^{\#\#}$
YD-204A 400 mg/kg	1.82±0.33	2.44±0.24	2.33±0.35$^{\#\#\#}$	0.53±0.14$^{\#}$	0.92±0.09	1.18±0.28$^{\#\#\#}$	7.25±0.93$^{\#}$
YD-204B 400 mg/kg	1.56±0.22$^{\#\#\#}$	1.96±0.55$^{\#\#}$	2.21±0.21$^{\#\#\#}$	0.57±0.05	0.85±0.12	1.24±0.13$^{\#\#\#}$	5.90±2.61$^{\#\#}$

▶ 지방 조직의 체내 비율

지방 조직의 체내 비율은 실험 종료 후 최종 몸무게 (g)를 지방 조직의 무게 (g)로 나누어 산출한 값으로 체지방 비율을 나타내었으며, 그 결과 정상군에 비해 대조군의 지방 비율이 유의적으로 증가되었다 (p<0.001). 반면 대조군에 비하여 양성대조군 orlistat군과 YD-204A, YD-204B 400 mg/kg을 경구 투여한 실험군은 피하지방, 장간막 지방, 총 지방에서 유의적으로 그 비율을 감소시켜 (p<0.001) 체지방 비율 증가를 억제하는 효과를 나타내었다. 따라서 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스에서 YD-204B 400 mg/kg 투여는 간의 지방 축적과 체지방 축적을 억제하는 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

④ 혈청 내 생화학인자 수치

혈청 내 생화학 수치 측정을 위해 심장채혈을 통해 전혈을 채취하였음. 혈청 내 GOT/AST, GPT/ALT, 중성지방 (Triglyceride, TG), 총 콜레스테롤 (Total cholesterol, T-cho), 고밀도 리포단백질 콜레스테롤 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-c), 포도당 (Glucose)을 SPOTCHEM Ⅱ

기기를 이용하여 측정하였다. **(Fig. 14).**

▶ GOT/AST, GPT/ALT

GOT/AST, GPT/ALT는 간세포에 다량 존재하며, 주로 간세포의 변성 또는 괴사상태를 반영하는 지표이다. 이를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군의 GOT/AST, GPT/ALT 수치가 현저히 증가하였으며 (p<0.001), 실험군에서는 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 찾을 수 없었다.

▶ 혈청 내 지방 함량

고지방 식이를 급여했을 경우, 체내 지방 조직이 증가하여 혈청 내 중성지방 함량이 증가함. 본 실험에서 또한 대조군의 중성지방 수치 (110.9±13.1 mg/dl)가 정상군 (82.4±16.8 mg/dl)에 비교하여 유의적으로 증가하였다 (p<0.001). 양성 대조군 orlistat 군 (95.2±5.3 mg/dl) 및 실험군 YD-204A (84.3±7.1 mg/dl), YD-204B (87.2±8.5 mg/dl)의 중성지방 수치는 대조군에 비하여 유의적인 수치로 감소하여 체내 중성지방의 농도를 감소시키는 작용이 있는 것으로 사료된다. 특히 양성 대조군인 orlistat (p<0.01)에 비해 YD-204A, YD-204B 400 mg/kg 투여군의 중성지방 함량이 더 유의적인 감소 수치를 보였다. (p<0.001).

▶ 혈청 내 콜레스테롤 함량

정상군 (132.6±2.1 mg/dl)에 비해 대조군 (252.2±34.6 mg/dl)의 총 콜레스테롤 값이 유의적으로 증가하였으나 (p<0.001), 대조군과 비교하였을 때 양성대조군 및 실험군의 총 콜레스테롤 함량은 큰 변화가 없었다. LDL 콜레스테롤은 비만 유도 시 혈청 내 상승하는 인자로, 정상군 (66.4±3.0 mg/dl)에 비해 고지방 식이 대조군 (178.4±29.2 mg/dl)이 유의적인 높은 수치를 나타냄 (p<0.001). 실험군 중 YD-204A 400 mg/kg 투여군 (158.1±11.3 mg/dl)이 유의적인 감소 수치를 보였고 (p<0.05), 다른 실험군들의 LDL 콜레스테롤 감소 효과는 미비하였다.

▶ 혈당 측정

정상군 (172.0±29.0 mg/dl)에 비해 유의적으로 증가된 (p<0.001) 고지방식이 대조군의 혈당 (243.8±26.2 mg/dl)이 실험군 YD-204B 투여군 (189.6±42.4 mg/dl)에서 정상군 수준의 혈당감소를 보였다 (p<0.001). 반면 양성 대조 약물인 orlistat은 혈당 감소에 영향을 미치지 않았다.

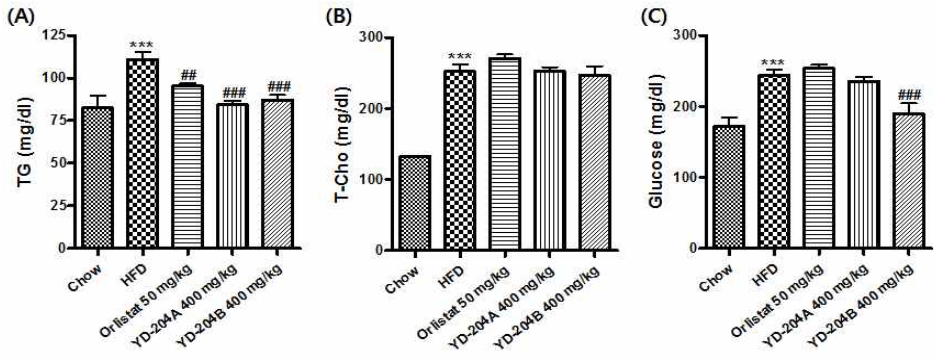


Fig. 14. Effects of YD-204B on serum **biochemical levels** in obese mice fed high-fat diet for 16 weeks.

▶ 혈청 내 Leptin 함량

혈청 내 leptin의 함량을 ELISA assay로 분석한 결과, leptin 함량은 정상군 (49.1±3.7 ng/ml)과 비교하여 고지방식이 대조군 (184.5±6.5 ng/ml)이 유의성 있게 증가하였다 (p<0.001). 양성 대조 약물

인 orlistat (132.5±11.2 ng/ml) 및 실험군 YD-204B 400 mg/kg (149.3±19.9 ng/ml)에서 그 수치가 감소하였음 (p<0.001). 대조군과 비교하여 Adiponectin에 대한 함량 변화는 없었다 **(Fig. 15).**

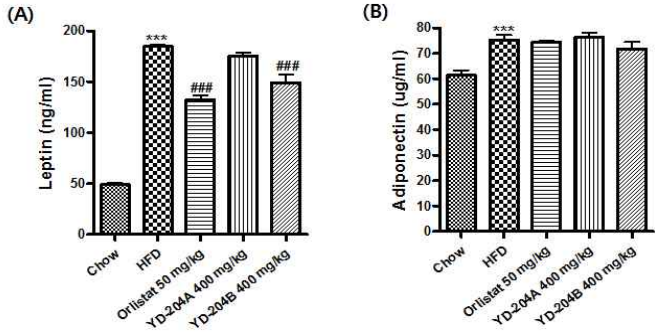


Fig. 15. Effects of YD-204B on serum **leptin** and **adiponectin** levels in obese mice fed high-fat diet for 16 weeks.

⑥ 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

▶ 피하지방조직 (SubQ) 내 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

YD-204A 및 YD-204B가 피하지방 조직 내 비만 유도 관련 target gene 과 transcription factor의 발현 변화에 미치는 영향을 확인한 결과, HFD 대조군에서 전사인자 및 유전자의 발현이 유의적으로 (p<0.001) 증가되는 양상을 나타내었다.

YD-204B를 투여한 경우, PPARγ와 C/EBPα에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 33.6% (p<0.001) 및 45.6% (p<0.001)로 나타났으며, 표적유전자인 aP2, LPL, FAS, SREBP-1c 와 HSL 유전자에 대한 발현 억제율은 각각 64.5% (p<0.001), 47.6% (p<0.001), 54.1% (p<0.001), 66.1% (p<0.001) 및 25.5% (p<0.01)로 상대적으로 YD-204A보다 높은 발현 억제율을 나타내었음. 특히, aP2와 SREBP-1c에 대한 발현억제효과가 가장 높았다 **(Fig 16).**

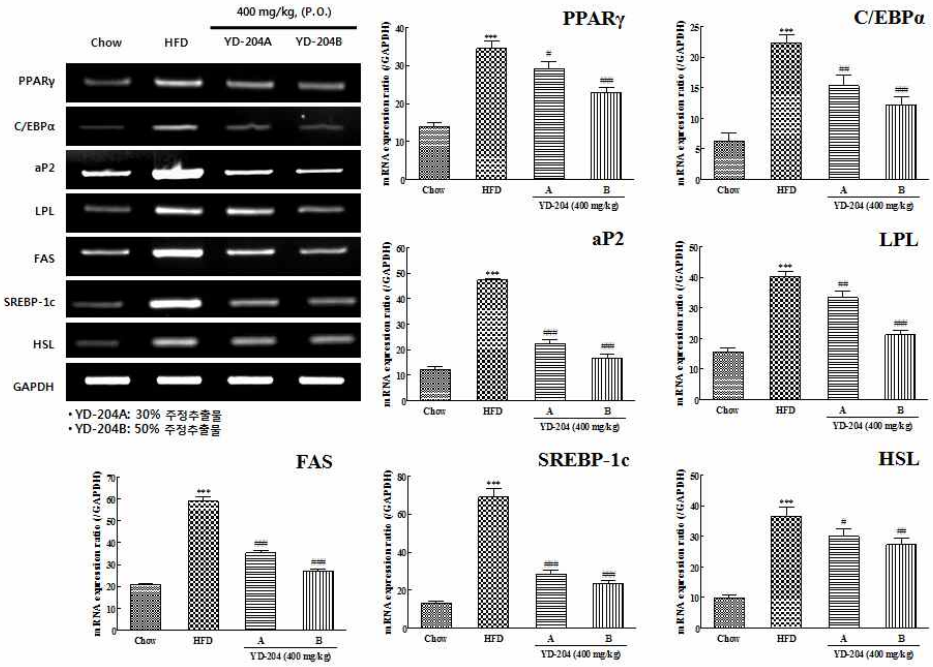


Fig. 16. Effects of YD-204B on the **mRNA expression** of transcriptional factors and adipocytes-specific genes in *subcutaneous adipose tissue* of hight-fat diet mice.

▶ 부고환지방 (Epi) 내 비만 관련 유전자의 mRNA 발현 측정

YD-204A 및 YD-204B가 피하지방 조직 내 비만 유도 관련 target gene 과 transcription factor의 발현 변화에 미치는 영향을 확인한 결과, HFD 대조군에서 전사인자 및 유전자의 발현이 유의적으로 (p<0.001) 증가되는 양상을 나타내었다.

반면 YD-204B를 투여한 경우, PPARɣ와 C/EBPα에 대한 mRNA 발현 억제율은 각각 40.5% (p<0.001) 및 38.0% (p<0.001)로 나타났으며, 표적유전자인 aP2, LPL, FAS, SREBP-1c 와 HSL 유전자에 대한 발현 억제율은 각각 21.8% (p<0.001), 57.0% (p<0.001), 50.9% (p<0.001), 49.9% (p<0.001) 및 29.8% (p<0.01)로 LPL과 FAS에 대한 발현억제효과가 가장 높았다 **(Fig. 17).**

따라서 YD-204B는 transcription factore인 C/EBPα 및 PPARɣ와 표적유전자인 aP2, LPL, FAS, SREBP-1c 및 HSL의 mRNA 발현을 유의적으로 억제함으로써 중성지방 축적을 감소시키는 것으로 사료된다.

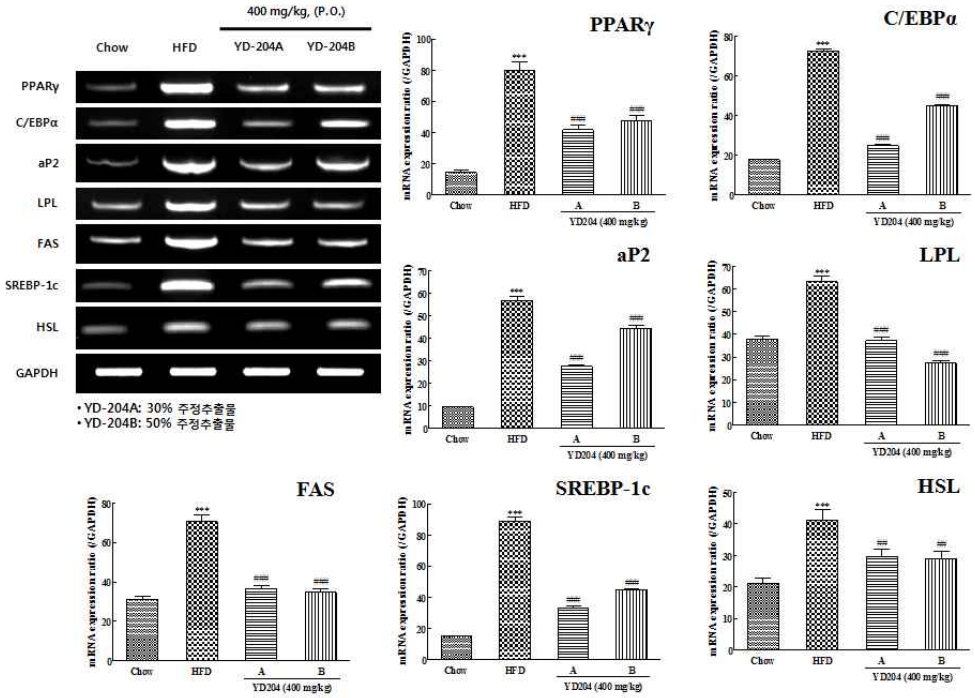


Fig. 17. Effects of YD-204B on the **mRNA expression** of transcriptional factors and adipocytes-specific genes in **epididymal adipose tissue** of hight-fat diet mice.

⑦ 조직병리검사

고지방 식이를 급여한 C57BL/6N 마우스에서 YD-204A 및 YD-204B의 지방간 및 비만개선효과를 조직병리검사와 image analysis로 확인하였다.

▶ 간 조직

HFD 대조군의 지방 침윤 정도와 염증세포 침윤 정도가 크게 증가하였음을 확인하였음. 대조군과 시험군 비교에서는 지방 침윤 정도 및 염증세포의 침윤정도가 YD-204B처리군에서 유의적 차이가 크게 나타나지는 않았다.

▶ 부고환주변 지방조직

HFD 대조군의 부고환주변 지방조직에서 지방세포 평균직경은 Chow군 약 18% 이상 (p<0.01), 피하지방조직에서 약 32% (p<0.01)의 직경차이가 있는 것으로 측정되었다 **(Fig. 16).** 대조

군과 시험군의 비교에서는 부고환주변 지방조직에서 YD-204B의 평균 지방세포 직경이 HFD대조군과 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었고(p<0.01), 이외의 시험군의 평균직경은 HFD대조군과 유사하게 관찰되었다.

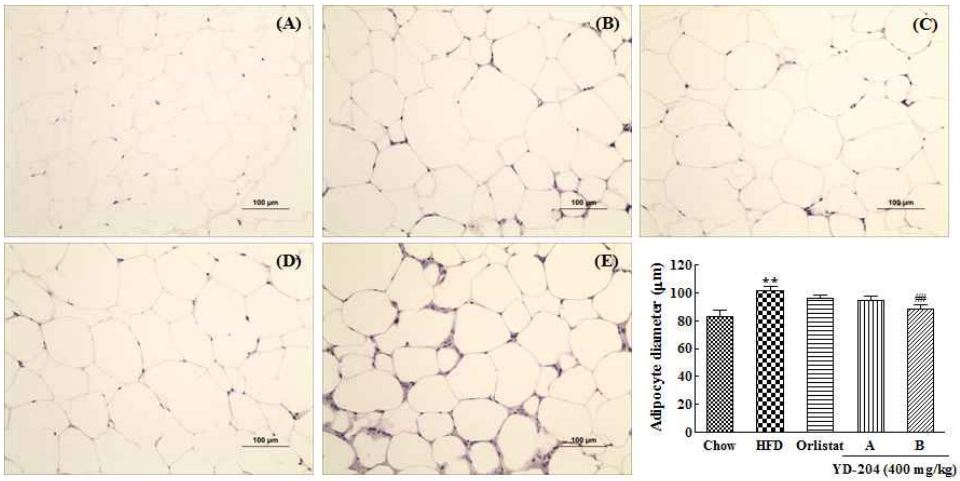


Fig. 16. Histopathological findings of **epididymal adipose tissue**, x100 magnification. (A); chow, (B); HFD, (C); Orlistat 50 mg/kg, (D); YD-204A, (E) YD-204B.

다. 단회투여독성시험 평가 (No. 14-RA-519)

1) 시험 제목: YD-204B의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험
2) 시험 목적: 본 시험은 시험물질 YD-204B를 Sprague-Dawley 랫드DP 대한 경구투여 였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다.
3) 시험 방법: YD-204B를 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg의 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균 주사용수만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여 군당 10마리 (암수 각5마리)에 경구 투여하였다. 일반증상, 체중변화, 부검소견을 관찰하여 부형제대조군과 비교하였다.
4) 시험 결과: ① 사망동물은 관찰되지 않았다.
② 일반증상 관찰 결과, 노란색을 띄는 착색뇨 및 시험물질색변이 1,250 mg/kg 이상 투여군에서 관찰되었고, 연변, 설사, 하복부오염이 2,500 mg/kg 이상 투여군에서 관찰되었다. 모든 증상은 Day1부터 Day 2 또는 3까지 관찰되었고, 이후에는 특이 증상이 관찰되지 않았다.
③ 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
④ 부검소견 관찰 결과, 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 YD-204B를 Sprague-Dawley 랫드에 5,000 mg/kg 이하의 용량으로 단회 경구투여하였을 때 사망동물은 관찰되지 않았기에 개략의 치사량 (Approximate Lethanol Dose, ALD)은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 확인되었다.

<인체적용 시험>

(1) 인체적용시험 시험약 제조 / 포장 및 Labeling

- 시험약: 본약, 위약 포장단위 및 수량 확인
- 인체적용시험 관련 Labeling 완료

"인 체 적 용 시 험 용"

- 대상자 번호:
- 제품코드명: YD-204B 또는 위약
- 제조번호:
- 유효기간:
- 복용방법: 아침, 저녁 식전 각 2캡셀씩 1일 2회 복용
- 저장방법: 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관
- 인체적용시험 승인을 받은 자: ㈜와이디생명과학
  (경기도 성남시 중원구 사기막골로 148 중앙이노테크 909호)
- 제조원: ㈜네추럴에프앤피
  (충청북도 청주시 청원군 오창면 양청송대길 39)

"인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"

<Fig. 1. 인체적용시험약 포장 및 라벨>

(2) 인체적용시험 개요

- **시험명: 곰보배추추출물 (YD-204B)의 체지방감소에 관한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험**
- 병원 및 연구자 선정 : 경희대 병원 가정의학과 원장원 교수
- 체지방감소 관련 인체적용시험 계획서(protocol) 작성 및 증례기록지(case report form) 작성
- Statistic Analysis Plan(SAP) 및 Data management plan(DMP) 작성 완료
- 연구자자료집(investigator's brochure) 작성 및 IRB 서류 작성
- IRB서류 접수 및 승인 ==>인제대학교 서울백병원 IRB접수 후 심의 완료 (2015년 4월) 및 결과 통보 2015년 5월
- 인제대학교 서울백병원에서 경희대학교병원으로 병원 및 연구자 변경하여 경희대학교병원에 5월말 IRB접수

❖ 인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 제목	비만 또는 과체중 대상자에서 "YD-204B"의 체지방 감소 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책임자	경희대학교병원 가정의학과 원장원 교수
인체적용시험 의뢰자	㈜와이디생명과학
인체적용시험 기간	IRB 최초 승인일로부터 2016 년 5 월(약 12 개월 예정)
인체적용시험 대상	만 19 세 이상 만 60 세 미만의 BMI 25kg/m^2 이상 29.9kg/m^2 이하의 남성 또는 여성
인체적용시험 목적	비만 또는 과체중 대상자에서 YD-204B 를 복용했을 때 체지방 감소 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
인체적용시험 디자인	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용 제품	• 시험군: YD-204B • 위약군: 대조제품(위약)
용법·용량 및 복용방법	아침, 저녁 식전 30분에 각 2캡슐씩 1일 2회, 총 4캡슐 복용
복용기간	12 주 복용
대상자수	총 60 예 [2 군, 최종 평가가능 예수 군당 30 예, 30% 내외 탈락을 고려 시]

시험방법

스크리닝 방문	중간 방문		종료 방문	Follow up
방문1	방문2	방문3	방문4	추가방문
-2주~0주	0주(0일)	6주(±5일)	12주(±5일)	필요시

방문 2 에서 대상자 적합성 평가에 적합한 대상자는 시험군 또는 위약군에 각각 1:1 로 무작위 배정되어 해당하는 인체적용시험용제품을 교부 받는다. 이후 12 주간 시험제품 혹은 대조제품을 복용하게 되며, 12 주간 복용 후 방문하여 기능성과 안전성을 평가하고 인체적용시험을 종료한다.

기능성평가

① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):
- 체중 변화치

② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):
- DEXA를 통한 체지방 변화치
- DEXA를 통한 체지방 변화율
- 체질량지수(BMI) 변화치
- 체질량지수(BMI) 변화율
- 허리/엉덩이 둘레 비율(WHR) 변화치
- CT를 통한 총 복부 지방의 변화치
- CT를 통한 총 복부 피하지방의 변화치
- CT를 통한 총 복부 내장지방의 변화치
- 혈중 leptin 농도 변화치
- 혈청지질(Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 변화치
- 혈청지질(Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, Triglyceride) 변화율

- 인체적용시험 보험증권 가입 완료 :

20649272015042315214 2

No Fault Compensation Insurance

ORIGINAL

[1/1 페이지]

● **Policyholder** YD LIFE SCIENCE CO.,LTD. (217-81-27606)

● **Named Insured** YD LIFE SCIENCE CO.,LTD. (217-81-27606)

● **Policy Number** 2015-1882307 (000)

● **Policy Period** 2015-05-01 (00:00) ~ 2016-04-30 (24:00) (366 Days)

● **Covered Business/Items** No(1) 비만 또는 과체중 대상자에서 "YD-2048"의 체지방 감소 가능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

● **Premium Basis** No(1) Persons 60 명

● **Location** No(1) , 148, Sagimakgol-ro, Seongnam-si Jungwon-gu, Gyeonggi-do, Korea.

● **Terms & Conditions** No(1) Human Clinical Trial

1) No Fault Compensation Policy
2) Legal Liability Extension
3) A.I.D.S. and HEPATITIS Exclusion Clause
4) Extended Discovery Period Extension for 2months
5) Costs & Expenses Endorsement
6) Sanction Limitation and Exclusion Clause
7) Retroactive Date : 2015-05-10
8) Policy Territory : KOREA
9) 3세미만 영아 대상시험여부 : 아니오

● **Premium** WON 2,433,000

● **L.O.L & Ded**

No(1) Human Clinical Trial

	Limit	Cur	L.O.L			DED
			a.o.p	a.o.c	agg	a.o.c
No Fault Compensation Policy	Limit	WON	100,000,000	300,000,000	300,000,000	1,000,000
Policy Aggregate	WON 300,000,000					

● **Premium Installments**

	Due Date	Portion	Installment Premium			Due Date	Portion	Installment Premium	
1	2015-05-01	100 %	WON	2,433,000					

● **Co-insurance [Leader : LIG]**

LIG												
100.00%												

IN WITNESS WHERE OF LIG Insurance Co., Ltd. SEOUL, KOREA has caused this policy to be signed by its President or authorized representative, and countersigned on the Declarations page by a duly authorized representative.

LIG Insurance Co., Ltd.

Yours Faithfully,

President & CEO

(3) 인체적용시험 실시

① 인체적용시험 개시모임 실시 :

· 개시모임 일시 : 2015. 07. 13. 월

· 장소 : 경희대학교 치과 병원 5층 회의실

· 논의사항 : 연구계획서, 인체적용시섬 진행 시 논의사항, CRF 및 관련 근거 문서관리, Q&A

· 참석자 : ① 경희대병원 원장원, 임성빈, 김선영, 최고야, 윤경원, 두진경, 정채영
② YD생명과학 최수임, 이조운이, 한세희
③ 파마크로CRO 김남식, 박은영

시험개시모임 보고서

Protocol No.	YD-FL-SPRB	Principal Investigator	원 장 원
Site/Site No.	경희대학교병원	Investigational Product	YD-204B 또는 위약
		Visit Date	2015. 07. 13

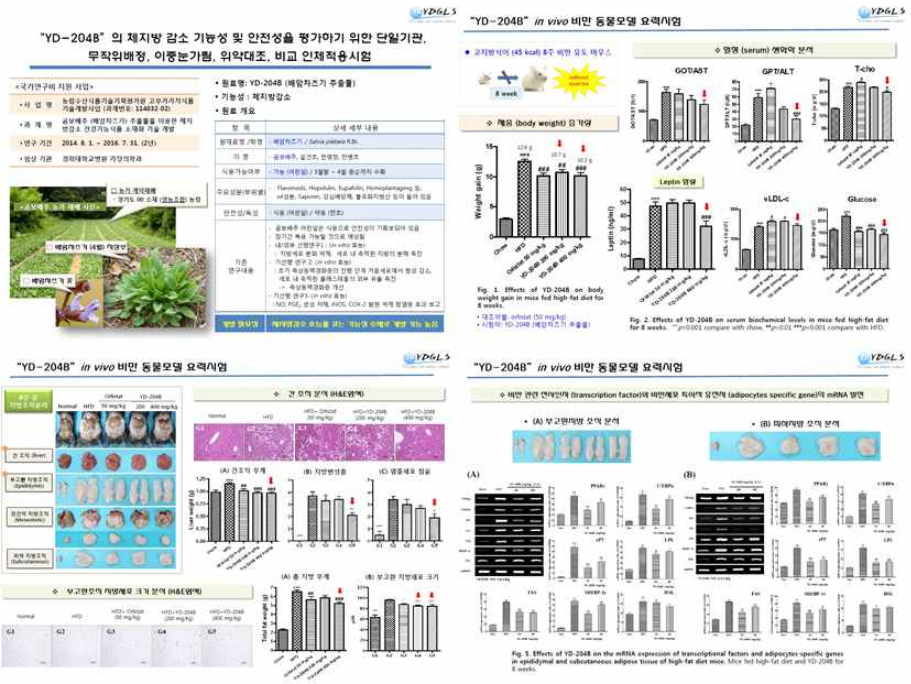
방문 시 만난 사람의 이름과 직무	
Site	원장원(시험책임자), 김선영(공동연구자), 최고야(연구간호사), 윤경원, 두진경(관리약사)
Sponsor	최수임, 이조운이, 한세희(㈜와이디생명과학)
CRO	김남식, 박은영(㈜파마크로)

***Site Initiation Visit** 전까지 시험자/시험기관에 전달되어야 할 문서 및 물품목록*		***Site Initiation Visit** 전까지 시험자/시험기관으로부터 수령해야 할 문서목록*	
■	인체적용시험자자료집	■	시험자 및 site staff의 CV
■	인체적용시험계획서/변경계획서	■	인체적용시험계획서/변경계획서에 대한서명 (Signature page of protocol)
■	증례기록서/증례기록서 작성지침서	■	IRB 승인 통보서
■	대상자설명문 및 동의서	■	광고문에 대한 IRB 승인통보서
■	계약서 등 인체적용시험 재정에 관한 문서	■	ICF에 대한 IRB 승인통보서
■	대상자 보상 규약(보험에 관한 정보 포함)	■	IRB 위원명단
□	MFDS의 계획서 승인통보서	■	임상실험실검사의 정상범위
■	SAE 보고 지침서	■	임상실험실의 인증서
■	인체적용시험용 제품	■	서명된 계약서
□	임상실험실검사를 위한 Kits 및 매뉴얼	□	재정정보 공개에 대한 서명문서 (Financial disclosure)
■	인체적용시험자 파일(Investigator Study File)		
■	기타 인체적용시험 진행을 위해 필요한 기본문서 양식 – Screening/enrollment log – Accountability log – Study Drug dispensing log		

② 인체적용시험 대상자 설명 가이드라인 작성 및 병원 전달 완료 :

· 인체적용시험에 대한 일반인 피험자의 이해를 돕기 위한 가이드라인 작성

· 담당 연구 간호사 (CRC) 및 연구자 (CI)의 설명 진행



③ 피험자 모집 광고 실시 :

1) 경희대 병원 내 원외광고 실시

<원외광고 _V1.1>

비만 또는 과체중 대상자에서 체지방 감소 인체적용시험 참여자 모집

비만 또는 과체중 대상자에서 체지방 감소 건강기능식품 개발을 위한 인체적용시험에 참여할 지원자를 모집합니다.

1. 참여 대상

- 만 19세 이상 만 60세 미만의 남성 또는 여성
- BMI 25 kg/m^2 이상 29.9 kg/m^2 이하인 대상자
- 열량제한, 운동 등의 체중감량 프로그램 등 관리에 실패한 대상자

* 대상자에 적합한지 알아보기 위해 추가로 검사를 실시합니다.

2. 참여 기간

약 14주 (총 4회 방문)

3. 참여시 제공사항

인체적용시험용 제품, 진료비 및 검사비, 소정의 교통비

4. 실시 기관

경희대학교병원 가정의학과

상담전화 : 02-958-9575

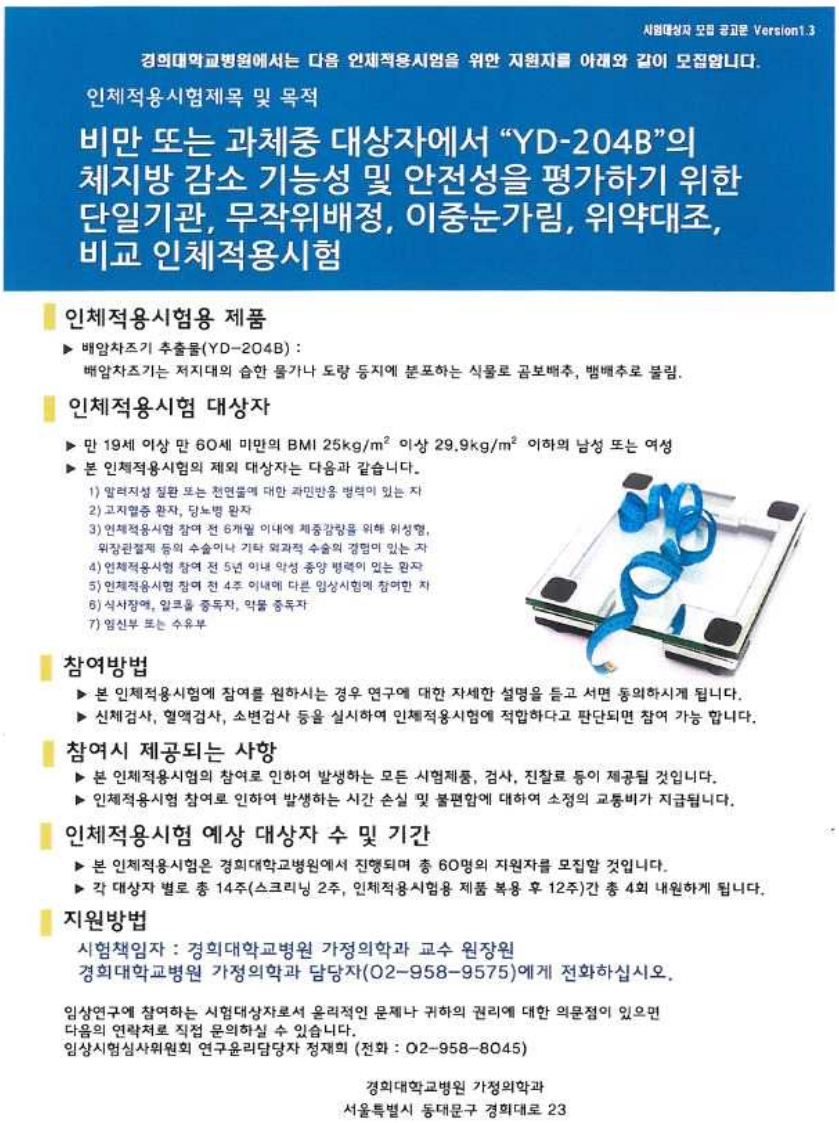
연구윤리담당자 정재희(02-958-8045)
(임상연구의 윤리적인 문제 및 임상시험대상자 권리에 관해 문의하실 수 있습니다)

2) 경희대 병원 외 포스터 부착 광고 실시 :

· 목적 : 피험자 모집을 위한 광고 추가 사항

· 부착 장소 : 경희대 병원 근처 지역 학교 및 아파트 지역

ⓐ 부착 포스터 내용 (IRB 심의 완료)



시험대상자 모집 공고문 Version1.3

경희대학교병원에서는 다음 인체적용시험을 위한 지원자를 아래와 같이 모집합니다.

인체적용시험제목 및 목적

비만 또는 과체중 대상자에서 "YD-204B"의 체지방 감소 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

인체적용시험용 제품

▶ 배암차즈기 추출물(YD-204B) :
배암차즈기는 저지대의 습한 물가나 도랑 등지에 분포하는 식물로 곰보배추, 뱀배추로 불림.

인체적용시험 대상자

▶ 만 19세 이상 만 60세 미만의 BMI 25kg/m^2 이상 29.9kg/m^2 이하의 남성 또는 여성
▶ 본 인체적용시험의 제외 대상자는 다음과 같습니다.
1) 알러지성 질환 또는 천연물에 대한 과민반응 병력이 있는 자
2) 고지혈증 환자, 당뇨병 환자
3) 인체적용시험 참여 전 6개월 이내에 체중감량을 위해 위성형, 위장관절제 등의 수술이나 기타 외과적 수술의 경험이 있는 자
4) 인체적용시험 참여 전 5년 이내 악성 종양 병력이 있는 환자
5) 인체적용시험 참여 전 4주 이내에 다른 임상시험에 참여한 자
6) 식사장애, 알코올 중독자, 약물 중독자
7) 임신부 또는 수유부

참여방법

▶ 본 인체적용시험에 참여를 원하시는 경우 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 서면 동의하시게 됩니다.
▶ 신체검사, 혈액검사, 소변검사 등을 실시하여 인체적용시험에 적합하다고 판단되면 참여 가능 합니다.

참여시 제공되는 사항

▶ 본 인체적용시험의 참여로 인하여 발생하는 모든 시험제품, 검사, 진찰료 등이 제공될 것입니다.
▶ 인체적용시험 참여로 인하여 발생하는 시간 손실 및 불편함에 대하여 소정의 교통비가 지급됩니다.

인체적용시험 예상 대상자 수 및 기간

▶ 본 인체적용시험은 경희대학교병원에서 진행되며 총 60명의 지원자를 모집할 것입니다.
▶ 각 대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 인체적용시험용 제품 복용 후 12주)간 총 4회 내원하게 됩니다.

지원방법

시험책임자 : 경희대학교병원 가정의학과 교수 원장원
경희대학교병원 가정의학과 담당자(02-958-9575)에게 전화하십시오.

임상연구에 참여하는 시험대상자로서 윤리적인 문제나 귀하의 권리에 대한 의문점이 있으면 다음의 연락처로 직접 문의하실 수 있습니다.
임상시험심사위원회 연구윤리담당자 정재희 (전화 : 02-958-8045)

경희대학교병원 가정의학과
서울특별시 동대문구 경희대로 23

3) 경희대 병원 순환 마을버스 광고 실시

ⓐ 광고 디자인 작업 : 카피큐 24

ⓑ 광고 개첨 작업 : 지상기획

· 노선 번호 : 동대문 01, 동대문 02

· 차량 대수 : 동대문 01 (6117, 6119, 6133) 총 3대,
동대문 02 (6105, 6106, 6109) 총 3대

광고 게첨 현황

노선번호	수량	차량번호	비고
동대문01	3	6117,6119,6133	본광고
동대문02	3	6105,6106,6109	본광고
동대문01	5	6117,6118,6119,6120,6133	전장
동대문02	5	6105,6109,6106,6134,6109	전장
동대문01	5	6117,6118,6119,6120,6133	중앙창

④ 인체적용시험 보험기간 연장 :

· 인체적용시험 기간 연장으로 인한, 보험증권 6개월 연장 가입 완료

일반보험 배서증권

상품명	No Fault Compensation Insurance(14144)		
증권번호	2015-1882307(002)	보험기간	2015년 05월 01일 00:00 부터 2016년 10월 31일 24:00 까지 (550일간)
계약자	(주)와이디생명과학	주민/사업자번호	217-81-27606
피보험자	(주)와이디생명과학	주민/사업자번호	217-81-27606

우리 회사는 보험계약자의 요청에 의거하여 아래와 같이 일부 계약사항을 변경하여 보장합니다.

-아 래-

1. 변 경 일 자 : 2016년 04월 30일
2. 변 경 제 목 : 보험기간변경
3. 변 경 내 용 :

변경 전: 2016년 4월 30일 종기

변경 후: 2016년 10월 31일까지 연장

6개월 연장시 추가 보험료 : 48,000원

* 2016년 05월 01일부터 보험료 입금 전까지의 사고는 보상되지 않습니다.

4. 보험료 사항 : WON 48,000
5. 기타 보장조건은 원증권과 동일합니다.

※ 이 보험계약은 예금자보호법에 따라 예금보험공사가 보호하되, 보호 한도는 본 보험회사에 있는 귀하의 모든 예금보호대상 금융상품의 해약환급금 (또는 만기시 보험금이나 사고보험금)에 기타지급금을 합하여 1인당 "최고 5천만원"이며, 5천만원을 초과하는 나머지 금액은 보호하지 않습니다. 다만, 보험계약자 및 보험료 납부자가 법인이면 보호되지 않습니다.

담당부서 CRC영업부
담당지점/팀 CRC3지점
담당자 (주)세이프앤썸 보험대리점(이상선)

주식회사 KB손해보험
대표이사 사 장 양종희

④ 인체적용시험 향 후 일정 :

· 현재 등록 대상자 수 : 60명 (100 % 완료)

YD-FL-SPRB 인체적용시험 진행 상황표 (2016.09.01기준)										
Center	Planned	Screening	Screening Failure	Screening Ongoing	Enrollment	V2~V4 Drop-out	Ongoing	Study-End	등록률(%)	탈락률(%)
경희대학교병원	60	74	14	0	60	10	12	38	100.0	16.7

진행중인 대상자(명)			Total
V1-V2 (Screening Ongoing)	V2-V3	V3-V4	
0	3	9	12

· 현재 진행 중인 대상자 수 : 12명 (2016. 09. 01일 기준)
· 마지막 피험자 시험 완료일 : 2016. 11. 10 예정 (일정 변경 조절 진행 중)
· Close out visit (CoV) 예정일 : 11월 초
· Data management (DM) 예정일 : 11월 중
(data entry, query & resolution, data lock 등)
· 통계 분석 예정일 : 11월 말 - 12월 초
· 최종보고서 (CSR) 초안 : 12월 초 - 중순 예정

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06

4-1. 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2014 -2015)	원료 표준화 및 대량 추출 엑스의 제조 공정 조건 확립	○ 원재료 표준화	100	- 원재료의 표준화
		○ 표준 대량 제조 공정 확립	100	- 원료 표준 대량 제조 공정 확립
		○ 기준 및 규격 표준화 확립	90	- 원료 기준 및 규격 표준화 확립
		○ 지표 (유효) 성분 분석	100	- 원료 지표 (또는 유효) 성분 분석
	원료 항비만 유효성 확인 검증	○ HFD 동물모델시험	100	- HFD 동물모델시험
		○ 기전 연구	80	- 기전 연구
	원료 안전성 평가	○ 단회투여독성시험	100	- 단회투여독성시험 (GLP)
	시제품 제작	○ 제제 및 제형 연구	80	- 제제 및 제형 연구
		○ 인체적용시험 시제품 제작	100	- 본약, 위약(플라시보) 제조
	IRB 신청서 제출 및 승인 & 인체적용시험 실시	○ 임상시험 프로토콜 개발	90	- 임상시험 프로토콜 개발
		○ IRB 신청서 작성		- IRB 승인
		○ 피험자 모집 및 임상시험		- 피험자 모집 및 임상시험
2차 년도 (2015 -2016)	제형 연구 및 다양한 시제품 제작 제품화 방안 모색	○ 다양한 제형 가능성 타진을 위한 제형설계	100	- 캡슐 (550mg/캡슐) - 코팅정제 (1100 mg/정)
		○ 식품 유형에 따른 제제연구	80	- 인체적용시험 결과보고서 수신 후 진행 예정
	원료 별첨 규격 시험	○ 중금속 분석	100	- 한국기능식품연구원 분석완료
		○ 미생물 분석	100	- 한국기능식품연구원 분석완료
		○ 영양성분 분석 등	100	- 한국기능식품연구원 분석완료
	제품의 안정성 평가	○ 가속 안정성 시험	100	- 가속 안정성 (6개월) 완료
		○ 장기보존 안정성 시험	100	- 장기보존 안정성(12개월) 완료
	비만 예방 및 개선 인체적용시험	○ 인체적용시험	90	- 피험자 모집 100% 완료 - 시험 진행 중(마지막 피험자 시험 11월 초 완료예정)
		○ 통계분석 및 보고서 작성	50	- Close out visit 11월 초 - Data management 11월 중 - 통계 분석 11월 말-12월 초 - Clinical Study report 12월 초

	시제품 생산 및 판매 전략 수립	○ 농가 협의를 통한 단가 조절 및 수급지역 확보	100	- 여주 곰배배추 농장 방문 및 농장 단가 조절 진행
		○ 판매전략/마케팅 전략 수립	100	- 인체적용시험 결과보고서 수신 후 진행 예정

4-2. 관련분야 기여도

1) 곰보배추 개발

○ 식품원재료 자료 조사

사진		이름 (생약명)	곰보배추 (곰보배추)
		학명	*Salvia plebeia*
		식용 여부	**어린 잎을 나물로 먹음**
		생약 용도	포기 전체를 약으로 씀
기존 효능	감기·기관지염·천식 등에 효과		효능 근거 자료
함유 성분	플라보노이드와 페놀성 물질, 정유, 사포닌, 강심배당체, 불포화스테롤 등		
특성/분포	줄기는 높이 30-70cm, 4개의 능선이 있고 아래를 향한 가는 털이 있다. 줄기에 있는 잎은 길이 3-6cm, 폭 1-2cm로 짧은 자루가 있다. 가지 끝에 화수를 내어 5mm 전후의 작은 꽃을 많이 피운다. 월년초. 꽃 피는 시기는 5-6월이다. 논둑이나 습한 농로, 하천 제방 등에 생육하고 때로는 휴경논에서 대군락을 만드는 것이 있따. 주름이 있는 특유의 근생엽으로 월동을 한다. 근생엽은 꽃이 필 때에도 보통 말라 죽는다. 한국(전국), 일본, 중국, 만주, 우수리, 인도, 말레이시아, 호주에서 분포한다.[1]		

출처: 식약처 식품원재료 검색 활용

○ 동계 시설재배 시 가온이 필요 없고 최저 발아온도 15℃로 뿌리 안착 후 본엽 전개 후에는 월동 가능하며 시설 재배 시 따스한 한낮 기온에 동계에도 생장과 휴면을 반복하며 생장 가능함.

○ 전국에 고루 퍼져 서식하고 있는 자생식물로 생육 범위가 넓음. 시설재배와 노지재배 모두가 가능하며 국내 전국재배가 가능함 (중북부 이상 시설재배, 남부지역 시설 및 노지재배 권장)

○ 파주 농림기술센터 표준 재배기술 배포 (2009)되어 재배 및 수급 용이해짐

○ 사계절이 뚜렷한 한국의 입지조건은 고품질의 특산물의 만들어내는 특징이 있어 일본, 미국, 유럽 등에 기능성 고급 생채소 및 고급차로 수출될 가능성이 높음

○ 자생 약용식물로 천연항생, 항염, 항산화, 항암, 항알레르기, 세포회복, 중금속해독 등 효과 강함

○ 항생효과는 내성과 독성이 없어 소비층이 남, 녀, 노, 소, 축산 등 다양하며 지속적으로 꾸준히 활용해도 부작용이 없는 것으로 알려져 있음.

2) 체지방감소 건강기능성식품 개발

○ 곰보배추추출물의 항비만 기능성

- 본 연구는 다양한 자생식물 및 생약재추출물에 대한 항비만 효과를 스크리닝하는 과정에서, 곰보배추추출물을 포함한 일부 소재에서 항비만 활성을 갖는 천연 소재로서의 개발가능성을 확인하여 시작되었음.
- 아직까지 곰보배추추출물 또는 이로부터 분리된 성분에 대한 항비만 효과 및 기전에 관해 보고된 바가 없음. 따라서, 이들 성분들에 대한 항비만 유효성 평가 및 기전 연구는 연구할 충분한 가치를 지님.
- in vitro와 in vivo 유효성 평가를 통해서 곰보배추추출물의 뚜렷한 항비만 효과를 관찰하였고,

더불어 독성시험에서도 독성에 의한 이상표현형이 관찰되지 않음. 또한, 재배 및 채취시기별/지역별 원재료 성분 패턴분석을 통한 표준화를 완료하였고, 대량 재배를 통한 원재료 수급의 문제가 없음. 이를 바탕으로 곰보배추추출물을 기반으로 한 항비만 기능성 식품으로의 개발 가능성이 높으며, 향후 추출물의 유효성분에 대한 개별적 연구를 통해 단일 화합물에 기반 한 비만치료제 개발의 가능성도 매우 높음.

○ 신규특허출원을 통한 기술권리 확보

- 여지초 추출물(곰보배추추출물) 및 이로부터 분리된 화합물들을 유효성분으로 포함하는 비만증의 예방 및 치료용 조성물에 대한 신규특허 등록완료 (2015. 05.11)
- 인체적용 시험 완료 후, 곰보배추추출물을 이용한 건강기능식품 개별인정형 원료로 개발함.

3) 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치, 우월성, 기여한 점

○ 곰보배추는 식품원료로서 안전성이 이미 확보되어 있으나 아직까지 가치에 대한 연구가 미비한 상황임. 따라서 다양한 기능성 스크리닝을 통한 효능평가를 바탕으로 개발 가능성이 매우 높음. 본 연구에서는 비만 예방 및 개선 효과를 확인하였고 체지방감소 기능성식품 소재로 개발 가능성을 과학적으로 입증하였음.

○ 곰보배추에 대한 재배기술법이 확립되어 대량 재배를 통한 원료 공급 용이하나, 아직까지 원료성분에 대한 연구는 부족하였음. 본 연구에서 배암차즈기추출물의 주요 성분과 이들의 분석법을 validation하여, 원료의 표준화 규격을 설정하여 제시하였음.

○ 대량 재배 및 생산을 통한 곰보배추 가격의 안정화 및 재배 활성화 가능할 것으로 사료됨.

○ 곰보배추의 고부가가치 식품 소재 개발에 따른 계약재배 등 농가 소득 증대 및 지역농업 활성화

○ 인체적용시험을 통한 체중조절 개별인정형 원료로 개발 가능함

○ 인체적용시험 후 자체 사업화 및 상품화하고 이후 추가 기능성을 확대할 예정임.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07

5-1. 배암차츠기 추출물을 이용한 건강기능식품 개별인정형 원료로서의 개발

- 대사성질환 개선 효능의 과학적 입증을 통한 원료의 최적화 제조
- 개별인정형 원료로서의 소재 개발
- 다양한 제형 설계를 통한 건강기능성식품 개발
- 항비만 유효성 및 작용기전 규명을 통한 우수한 후보 물질 도출
- in vitro 및 in vivo 효능 등 다양한 시험법을 통한 항비만 효능 검증
- 작용기전의 규명을 통한 과학적 근거 도출
- 선정엑스 원료의 성상 및 물성 확인 시험을 통한 원료 표준화
- 선정엑스의 확인 시험 및 함량 분석
- 일정한 함량 및 용량을 얻을 수 있는 선정엑스 추출조건 확립
- 선정엑스의 이화학적 특성 분석을 통한 최적 수율 조건 확립
- 원·부재료의 첨가에 따른 제형의 최적 조건 확립

5-2. 곰보배추 추출물을 이용한 비만 질환 예방 제품개발

- 선정엑스의 응용 기술 개발을 위한 제형화 연구
- 응용 기술제품 규격 설정 및 표준화

- 응용 기술제품의 안정성 확인
- 맛, 향 등 관능테스트를 통한 최적 조성물 확보
- 비만 예방의 고기능성 제품 개발

5-3. 자체개발을 위한 신뢰성(Reliability) 인증 확보 계획

○ 원생약재의 규격 시험성적서 확보
- 공인인증기관 (한국의약품시험연구소)의 시험성적서 확보

○ 지표(유효성분)의 시험성적서 확보
- 지표성분의 정량화와 표준화를 위해 표준품의 공인 시험방법을 통해 HPLC 기기를 이용하여 일정한 수율, 일정한 원료 함량, 일정한 성상 등을 도출

○ 안정성시험 결과 자료 제출

○ 유효성에 대한 국제 논문투고를 통한 공인인증 확보

○ 시제품 제조
- 기능성 원료 제조 전문기관에서의 제제 및 제형 조건 확보
- 시제품 제조 의뢰/ 제형 조건 및 기준 규격 수립

5-4. 제품 양산계획

○ 국내 GMP 공장에서 OEM 제조을 통한 시제품 제조
- 개별인정형 기능성 원료로 제조
- 제제 및 제형화 연구를 통한 시제품 제조

○ 과학적 근거에 의한 유효성 평가 후 인체적용시험 진행 방향을 모색함

○ 식품의약품안전청 건강기능식품 개별인정형 원료 허가를 위한 서류 작성

○ 선정 엑스의 응용 기술개발을 통한 기능성 식품 개발
- 선정된 엑스의 응용 기술 개발을 위한 제형화 연구
- 응용 기술제품 규격 설정 및 표준화
- 응용 기술제품의 안전성 확인
- 맛, 향 등 관능테스트를 통한 최적 조성물 확보

5-5. 판로확보 및 마케팅 계획

○ 연구결과의 마케팅 활용
- 근거에 기반한 마케팅 활용으로 제품의 개발에 있어서 지표성분의 정량화와 표준화를 도입하고 선정된 엑스의 효능이 다양한 in vitro 및 in vivo 상에서 규명되면 이를 적극 활용할 예정임
- 인체적용시험을 통한 기능성 확보하여 마케팅 활용
- 추가 특허 및 연구논문 제출을 통한 연구 결과의 객관화 및 마케팅 자료로서 활용함

○ 주문자생산방식을 통하여 생산된 제품을 자사의 영업망을 이용하여 직접 판매를 진행

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08

○ 해당사항 없음.

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09

○ 해당사항 없음.

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11

○ 위험도 저감 및 참여 연구원의 안전확보를 위한 대책
① 연구실 안전시설·장비 구비 및 구축
② 연구종사자 정기적인 안전교육 및 윤리교육 강화
③ 정기적인 연구실 정비 및 관리
④ 산업 화학적 폐기물의 전문업체 위탁 안전 처리 및 관리

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

코드번호	D-12

번호	구분 (논문 /특허 /기타	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용횟수 등)
1	논문	추출조건에 따른 배암차즈기 추출물의 지방세포 분화 및 지방축적 억제 효과	(주)와이디생명과학	제1저자	한국약용작물학회지		2015.06.30		비SCI
2	특허	여지초 추출물 및 이로부터 분리된 화	(주)와이디생명과	발명자	대한민국		2015.05.11		등록번호 10-1520886

		합물들을 유효성분으로 포함하는 비만증의 예방 및 치료용 조성물	학						
3	논문	배암차즈기 추출물의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분으로서 Hispidulin의 분석법 평가	(주)와이디생명과학	교신저자	한국약용작물학회		2016.08.30		비SCI
4	논문	Anti-Obesity Effects of Salvia plebeian R. Br. Extract in High-Fat Diet-induced Obese Mice	(주)와이디생명과학	제1저자	Journal of Medicinal Food	1.699	2016		SCI/ 게재확정

11. 기타사항

코드번호	D-13

○ 해당사항 없음.

12. 참고문헌

코드번호	D-14

1. Choi JK, Oh HM, Park JH, Choi JH, Sa KH, Kang YM, Park PH, Shin TY, Rho MC and Kim SH. (2015a). *Salvia plebeia* extract inhibits the inflammatory response in human rheumatoid synovial fibroblasts and a murine model of arthritis. Phytomedicine. 22:415-422.

2. Choi SI, Kwak H, Kim JY, Choi JG and Lee JH. (2015b). Antiadipogenic effects of *Salvia plebeia* R. Br. extracts by extraction conditions in 3T3-L1 preadipocytes. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:245-252.

3. Gu L and Weng X. (2001). Antioxidant activity and components of *Salvia plebeia* R. Br.- a Chinese herb. Food Chemistry. 73:299-305.

4. Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM and Lee JS. (2012). Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 41:888-894.

5. Jin XF, Lu YH, Wei DZ and Wang ZT. (2008). Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R. Br. by high-performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48:100-104.

6. Jo SY, Lee UY, Kim EY, Lee SJ, Her JW and Yoon TJ. (2010). A study on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. Br. extracts. Korean Journal of Pharmacognosy. 41:31-37.

7. Korea Food and Drug Administration(KFDA). (2008). Guideline for standard of health

functional food. Korea Food & Drug Administration. Seoul, Korea. p.1-5.
8. Lim JA, Yun BW and Baek SH. (2007). Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:183-188.
9. Lin YC, Hung CM, Tsai JC, Lee JC, Chen YL, Wei CW, Kao JY and Way TD. (2010). Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase(AMPK). Journal of Agricultural Food Chemistry. 58: 9511-9517.
10. Ministry of Food and Drug Safety(MFDS). (2014). Gas and Liquid chromatography in General test method. Korean Pharmacopoeia the 11th edition. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p.4-8.
11. Oliveira BH, Nakashima T, Filho JD, Frehse FL. (2012). HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale.* Journal of the Brazilian Chemical Society. 12:243-246.
12. Park SH, Kim JL, Kang MK, Gong JH, Han SY, Shim JH, Lim SS and Kang YH. (2012). Sage weed(*Salvia plebeia*) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages. International Journal of Molecular Medicine. 30:1105-1112.
13. Ren DB, Qin YH, Yun YH, Lu HM, Chen XQ, Liang YZ. (2014). Separation of nine compounds from *Salvia plebeia* R.Br. using two-step high-speed counter-current chromatography with different elution modes. Journal of Separation Science. 37:2118-2125.
14. Shin MK, Kim SK, Lee SK, Yang EY, Lee HO and Baek SH. (2001). Cytotoxicity and antimicrobial effect of the extract of *Salvia plebeia*. Korean Journal of Pharmacognosy. 32:55-60.
15. Shirsat RP, Suradkar SS and Koche DK. (2015). Phytochemical composition and Pharmacological aspects of *Salvia plebeia* R. Br.: A mini review. Indian Journal of Applied Research. 5:362-364.
16. Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, Lin CL, Kao JY and Way TD. (2010). Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activation leading to Mcl-1 block in translation. Journal of Agricultural Food Chemistry. 58:10020-10026.
17. 건강기능식품시장 현황은 미국의 건강식품 전문잡지인 Nutrition Business Journal 과 영국 통계 보고 전문기관이 Euromonitor 의 발표자료를 중심으로 작성하였음.
18. Natural & Organic Foods - 자연 생산된 농수산물과 유기농 식품
19. Functional Foods - 특정성분을 강화하여 건강을 증진시키는 기능성을 함유한 식품
20. Natural & Organic Personal Care & Household Products - 천연 및 유기농 헬스 & 뷰티 제품
21. 정금나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물, 대한민국 특허 1010184050000.
22. MeJA 처리된 메밀새싹을 함유하는 항비만 또는 체지방감소용 조성물, 대한민국 특허 1012827080000.