

발간등록번호

11-1543000-001884-01

황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기개선 건강기능식품 원료 소재화

2017. 11. .

주관연구기관 / (주)새롭

협동연구기관 / (재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터

협동연구기관 / 전남대학교

농림축산식품부

2. 제출문

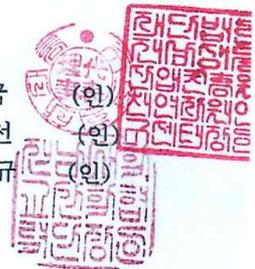
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 고부가가치 식품개발사업 " 황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 개선 건강 기능식품 원료 소재화"(개발기간 : 2014.8.1 ~ 2017.7.30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 8. .

주관연구기관명 : (주)새롭 (대표자) 박종국 (인)
협동연구기관명 : 천연자원연구센터 (대표자) 성락선 (인)
전남대학교 산학협력단 (대표자) 송진규 (인)



주관연구책임자 : 김기만
협동연구책임자 : 배동혁
참여기관책임자 : 김영란

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	114024-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.3.1.- 2017.7.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치 식품개발사업			
	사 업 명	황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 개선 건강기능식품 원료 소재화			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 개선 건강기능식품 원료 소재화			
연구책임자	김기만	해당단계 참 여 연구원 수	총: 18명 내부:18명 외부: 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:180,000원 민간:60,000천원 계:240,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 8명 내부:18명 외부:18명	총 연구개발비	정부:540,000천원 민간:180,000천원 계:720,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터 전남대학교 산학협력단			참여기업명 (주)새롭	
위탁연구					
요약	<ol style="list-style-type: none"> 1. 황칠잎의 성분 표준화 소재의 대량 양산화 추출 조건 및 공정표준화 확립 2. 건강지향식품 생산을 위한 표준화 발효 추출물 원료 생산 3. 황칠잎을 이용한 건강기능식품 및 건강지향식품 6종 개발 및 상품화 4. 황칠잎 추출물의 남성갱년기 및 면역활성 효능규명 5. 건강기능식품 개별인정을 위한 인체적용실험 완료 			보고서 면수 232P	

4. 국문 요약문

		D-01
<p>연구의 목적 및 내용</p>		<ol style="list-style-type: none"> 1. 과학적 기능성 규명 : 기 확립된 전임상 프로토콜을 기반으로 <i>in vitro/in vivo</i> 시험을 통해 선정 소재의 갱년기 남성건강 관련 효능 검증과 작용기전 규명 2. 기능성 원료 소재 확보 : 건강기능식품 원료소재화를 위한 최대 효능을 갖는 일일섭취량 결정시험과 소재의 표준화를 위한 지표성분 확립 3. 가공·제조 표준화 연구 : 지표성분 선정 및 지표성분 분석법 표준화를 통한 원료표준화 및 가공 및 대량 양산화 기술 공정의 표준화 4. 원료 소재화 및 제품화 연구 : 다양한 건강지향성 식품 원료 개발 및 다양한 제형 식품 제품화 5. 인체적용시험 : 기 착수한 인체적용시험의 사업기간 내 완료 (1건 인체적용시험 완료) 6. 건강기능식품 원료화 및 제품화 : 황칠나무 단일 추출물의 갱년기 남성건강 개별인정 획득을 통한 제품 개발 7. 수출 전략 수립 및 개별인정 원료의 글로벌화 : 중국, 홍콩, 대만, 베트남, 캄보디아, 인도를 중심으로 체계적인 수출 전략 수립과 개발 완료한 기능성원료 및 제품 수출계약 체결 추진
<p>연구개발성과</p>		<ol style="list-style-type: none"> 1. 성분 표준화 소재의 대량 양산화 추출 조건 및 공정표준화 확립 2. 개별인정 대상 황칠나무 추출물의 규격설정 3. 건강지향식품 생산을 위한 표준화 발효 추출물 원료 생산 4. 황칠나무와 발효 추출물을 이용하여 수출전용 제품 개발:1종 5. 황칠나무와 발효물을 이용한 국내 건강지향 일반식품 제품 개발 : 2종 6. 선행연구를 통해 선정된 황칠나무 지표성분 외 1종의 지표성분 추가 발굴 및 분석법 표준화 7. LC/MSMS를 통해 황칠나무 유효성분 후보물질 탐색과 최적 효능을 갖는 선정된 추출법으로 추출된 분획물의 유효성분 후보물질 검출 시험 : 2종 안정적 유효성분 선정 8. 최적 발효법으로 발효된 발효물을 대상으로 지표물질 후보 성분들의 검출 시험 : 최종 2종의 지표성분 확인 및 발효원료표준화 9. 마우스를 이용한 면역증강 생체효과 평가 및 선천성 면역 증가에 따른 감염성 질환 예방 효능 평가 10. 항원 특이적 후천적 면역 증가 효능 평가 11. 면역증강 효과 기전 연구: Pharmacological blockers 및 siRNA를 이용한 작용기전 심화연구 12. 황칠 원료를 이용한 일반식품(황칠티백차, 황칠단, 발효황칠환, 발효황칠 진액)등 제품개발하여 사업화 하였고 고시형 원료를 사용한 건강기능식품(파낙스-3, 천애명작)을 개발 및 상품화 2건 완료하여 사업화 13. 건강기능식품 원료화 및 제품화 : 황칠나무 단일 추출물의 갱년기 남성건강 개별인정 획득을 통한 제품 개발 - 인체적용시험 종료 향후 개별인정신청 예정임

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 음성화되어 있는 국내 남성갱년기 관련 제품 시장의 긍정적 양성화를 통한 국민건강 위험요소 해소 2. 과잉생산 우려 지역 특화작물의 신 수요처 창출 및 농촌 신규소득창출 특화작물로 농촌경제 활성화 3. 표준화 및 기능성 발굴 성공 가능성이 입증된 특화 작물의 조기 산업화 추진 가능 4. 특화 작물의 품질 경쟁력 확보 및 지역산업의 경쟁력 강화 5. 기능성 인정을 통한 관련 상품 매출 급증 및 기능성 원료 이용 다양한 고부가가치 제품 개발 가능 6. 기능성 인정을 통한 단순가공산업에서 고부가가치산업으로의 기업 구조전환 기회 제공 및 건강기능 식품제조 기업(GMP인증)의 신상품 개발과 고차가공기술 확보를 통한 경쟁력 확보 7. 갱년기 남성건강에 대한 신규 기능성 항목의 개척과 신규 건강기능식품 산업 확대 8. 건강기능식품 원료 및 기능성식품의 수입대체 효과 기대 및 수출을 통한 수익창출 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>황칠나무</p>	<p>남성 갱년기 장애</p>	<p>테스토스테론</p>	<p>인체적용시험</p>	<p>건강기능식품</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>		<p>D-02</p>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Scientific Functional Identification: Validation of menopausal health-related efficacy and mechanism of action of selected materials through in vitro / in vivo testing based on pre-established preclinical protocol 2. Securing Functional Raw Material: Establishment of indicator element for daily intake determination test and standardization of material with maximum efficacy for raw material of health functional food 3. Standardization of processing and manufacturing of selected materials: standardization of raw materials and standardization of processing and mass production technology process through standardization of index component selection and index component analysis 4. Research on materialization and commercialization of raw materials: Development of various health-oriented food ingredients and production of various food products 5. Human body application test: Completion of the applied human body test in the project period (1 case human body application test completed) 6. Raw materials for health functional foods and commercialization: Product development through individual approval of men's health in menopausal women's single extract 7. Establishment of export strategy and globalization of raw material for individual recognition: Establish systematic export strategy and conclude contract to export functional raw materials and products to China, Hong Kong, Taiwan, Vietnam, Cambodia and India 	

Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. Establishment of conditions for large-scale mass production of standardized materials and standardization of process 2. Establishment of standards for individual certified perilla leaf extract 3. Production of standardized fermented extract for health-oriented food production 4. Development of export-oriented products using Hwangchulchu and fermented extracts: 1 species 5. Development of general health food products using domestic seeds and fermented products: 2 species 6. Standardization and identification of additional index components and other standardized methods in selected species of yellowtail tree 7. Screening of active ingredient candidates of Hwangchujia tree through LC / MSMS and detection of candidate active ingredients of fractions extracted by selected extraction method with optimal efficacy: Selection of 2 kinds of stable active ingredients 8.1 Detection Tests of Candidate Substances in Fermented Substance Fermented by Optimum Fermentation Method Selected in the Next Year: Identification of the Last Two Indicators and Standardization of Fermentation Sources 9. Assessment of immune enhancement bioactivity using mouse and evaluation of efficacy against infectious disease according to congenital immunity increase 10. Evaluation of antigen-specific acquired immunity increase efficacy 11. Mechanism of immune enhancement effect: intensive mechanism of action using pharmacological blockers and siRNA 12. Development and commoditization of general foods (Huangchil teabag tea, Huangchildang, fermented Huangshilhuan, fermented Huangshilin juice) using Huangchil raw materials, development and commercialization of health functional foods (Panax-3, Completed and commercialized 13. Raw material for health functional foods and commercialization: Product development through acquisition of an individual health certificate for menopausal men's health in a single extract of Hwangchu-myeon. 				
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> 1. Resolve national risk factors by positively promoting the vocalized menopausal product market in Korea 2. Excessive production concerns Creation of new demand for localized crops and creation of new income in rural areas Activating rural economy with specialized crops 3. Standardization and Functionality Promotion of early industrialization of specialized crops with proven success 4. Securing quality competitiveness of specialized crops and strengthening competitiveness of local industry 5. Increased sales of related products through functional recognition and use of functional raw materials Various high value-added products can be developed 6. Provide opportunities to transform the company from simple processing industry to high value-added industry through functional recognition and develop new products of health functional food manufacturing company (GMP certified) and secure competitiveness by securing high-level processing technology 7. Pioneering New Functional Items for Menopausal Men's Health and Expansion of New Health Functional Food Industry 8. Expected effect of import substitution of health functional food raw material and functional food and making profit through export 				
Keywords	Dendropanax morbifera	Andropause	Testosterone	Clinical Trials	Functional health food

6. 영문목차

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	8
Chapter 2. Research and development status in domestic and abroad	37
Chapter 3. Research contents and results	43
Chapter 4. Achievement and contribution	213
Chapter 5. Plans for the use of the results	217
Chapter 6. International trend and scientific information	221
Chapter 7. Security rating of R&D achievement	222
Chapter 8. Research facility	222
Chapter 9. Implementation of safety measures	222
Chapter 10. Representative achievements	223
Chapter 11. Others	223
Chapter 12. References	224

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	8
2. 국내외 기술개발 현황	37
3. 연구수행 내용 및 결과	43
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	213
5. 연구결과의 활용계획 등	217
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	221
7. 연구개발성과의 보안등급	222
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	222
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	222
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	223
11. 기타사항	223
12. 참고문헌	224

<별첨> 자체평가의견서

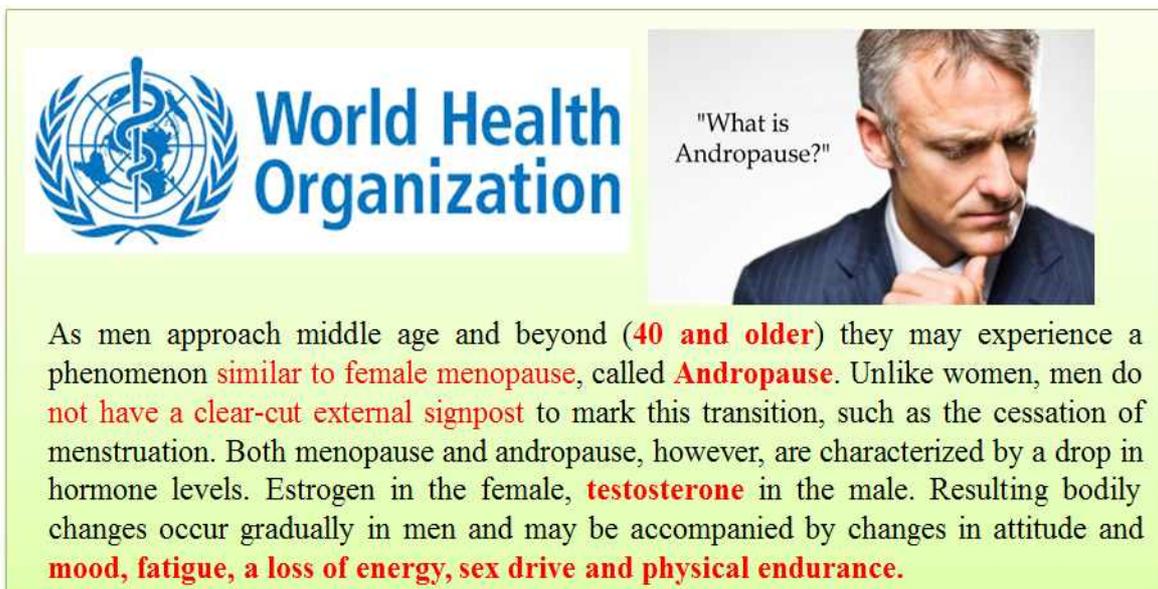
1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 필요성

D-03

■ “남성 갱년기 장애란 무엇인가?(정의)”

- 남성 갱년기 용어는 1939년 Werner에 의해 고환이 능동적 활동을 중지한 상태로 정의되면서 사용되기 시작함
- WHO에서 정의한 남성 갱년기 : 40대 이후 남성호르몬의 감소와 함께 이로 인한 신체능력, 정신건강, 근골격 약화, 면역력 감소 등의 증상을 남성 갱년기라 함
- 또한 WHO는 남성의 수명이 더 짧고 건강도 여성에 비해 열악해 지고 있음에 따라 남성 갱년기 증상에 대해 심각하게 받아들이고 사회적 대비마련의 필요성을 강조하며, 성별에 따른 건강의 접근의 필요함을 강조, 대책마련의 시급함을 촉구

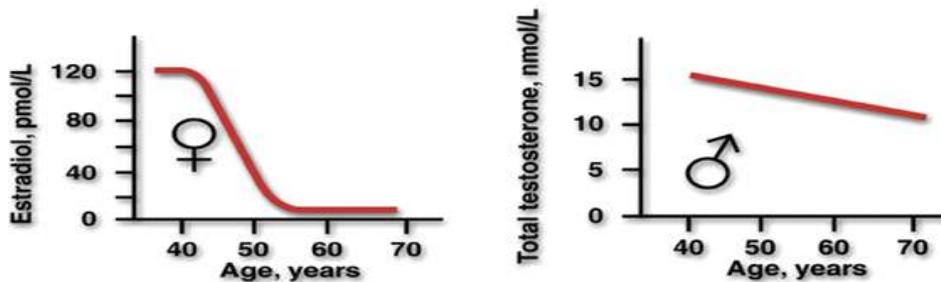


[그림. WHO의 남성갱년기 장애 정의]

- 남성갱년기 의학적 정의 : 남성에서 연령이 증가하면서 경험하게 되는 전형적인 증상들과 혈청 테스토스테론 결핍을 동반하는 임상적 생화학적 증후군이며 이 증후군은 삶의 질을 저하시키고, 여러 신체 기관의 기능에 부정적인 영향을 초래하는 질병으로 정의하며 의학적 진단명은 후기발현 남성 성선 기능 저하증(Late-onset hypogonadism, LOH)이라 불리움
- 국제성학회(ISSM)에서 정의한 남성갱년기 장애 증상 : 성욕 저하와 발기부전, 지적활동 · 인지기능 · 공간 지남력의 감소 · 피로 · 우울 · 성급함을 수반하는 기분 변화, 수면장애, 근육양과 근력 · 체지방 감소, 내장지방 증가, 체모의 감소 · 피부 변화, 골밀도 감소 (7가지 증상을 특징적으로 동반) 및 면역력 감소

■ “남성 갱년기 VS 여성 갱년기 공통점과 차이점은 무엇인가?”

- 남성과 여성 모두 성호르몬의 감소에 의해 갱년기 장애가 발생함
- 여성의 경우에는 여성호르몬인 에스트로젠(estradiol)이 40~50세에 집중적으로 급격하게 줄어들면서 모든 여성이 폐경을 경험하면서 여성갱년기를 맞이함
- 남성의 경우에는 40세부터 서서히 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)이 줄어들기 때문에 남성들이 갱년기를 자각하여 못하거나 다른 질병과 동반되는 증상 또는 단순한 노화의 한 증상으로 오해하는 특징이 있음



[그림. 여성과 남성의 연령별 성호르몬 감소 경향]

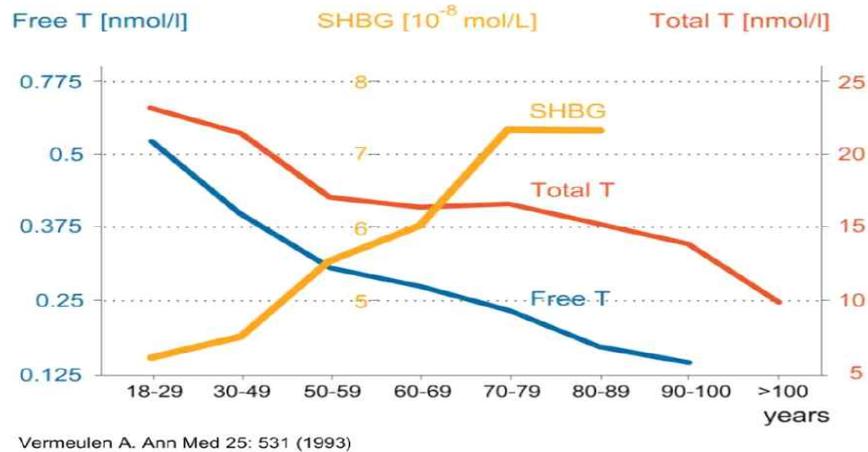
- 따라서 남성들은 남성 갱년기 증상을 특별한 치료나 예방에 무감각해져 힘든 노년의 생활을 당연하게 받아들이고 간과하기 쉬움(예방 및 관리가 더욱 중요함 시사)
- 남성과 여성 갱년기 증상 중 공통적인 증상은 감정기복, 우울, 두통, 도한(밤에 흘리는 식은땀), 수면장애, 체중 증가, 성욕 및 성기능 감소와 같은 증상이 남녀 공통으로 나타남
- 여성 특이적인 증상은 건망증, 안면 홍조, 두근거림, 폐경, 요실금, 질 건조증, 관절통증이 특이적으로 동반됨
- 남성 특이적인 증상은 집중력 및 의욕 저하, 면역력 저하, 신체적 무기력감, 근육 감소, 발기능력 감소, 골밀도 감소 증상이 특이적으로 동반됨



[그림. 여성과 남성의 갱년기 장애 증상의 공통점과 차이점]

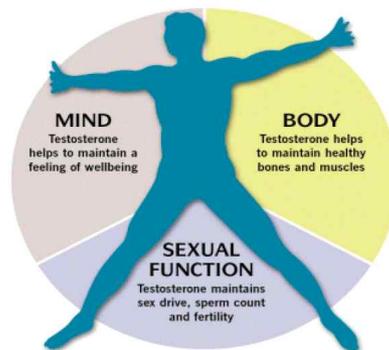
■ “남성 갱년기장애 발생 주요 원인은 무엇인가?”

- 남성호르몬은 사춘기에 급격하게 상승하고, 20대 초반에 최고치에 이른 후 매년 약 1%씩 감소하여 보통 40대 중반이 되면 남성호르몬 부족에 따른 현상이 표출됨
- 남성호르몬이 감소됨에 따라 다양한 연관호르몬이 동반 감소되며, 반면에 sex hormone binding globulin(SHBG) 같은 남성호르몬 생성 억제인자는 증가하게 됨



[그림. 연령별 남성 호르몬 변화 경향]

- 즉 남성 갱년기장애의 주요인은 남성호르몬인 테스토스테론을 주축으로 한 내분비계의 기능쇠퇴가 주요한 원인임
- 남성호르몬인 테스토스테론은 남성에 있어서 크게 다음과 같은 3가지 기능을 갖고 있으나, 남성호르몬 분비가 감소되면 동시다발적으로 그 기능이 손실됨
 - 감정(정신적) 조절 기능
 - 뼈와 근육의 건강 유지 및 면역력 유지 기능
 - 성기능 유지, 정자 생성 및 운동성 유지

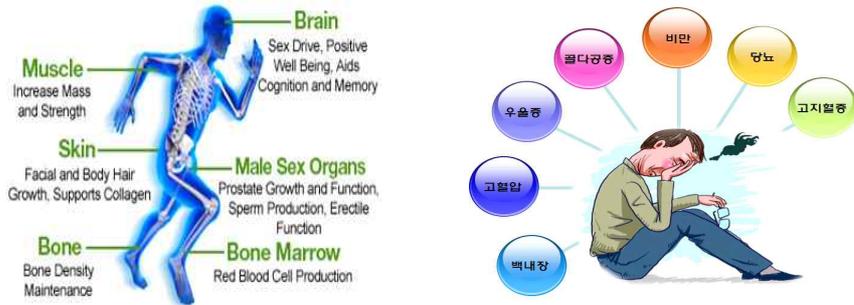


[그림. 남성 호르몬인 테스토스테론의 주요 기능]

- 따라서 남성호르몬인 테스토스테론의 감소현상을 억제시키기 위한 “예방”과 감소된 호르몬 양을 “증가·회복”시켜주는 예방과 관리차원의 중요성이 부각

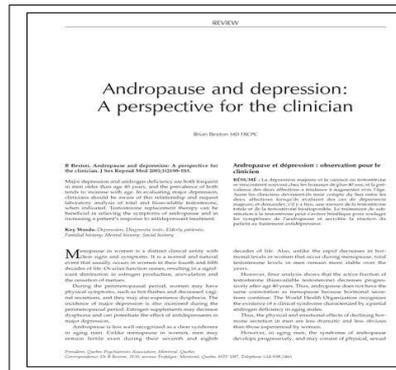
■ “남성 갱년기장애 발생을 예방하고 관리해야 하는 이유는 무엇인가?”

○ 남성호르몬인 테스토스테론의 불균형과 감소는 테스토스테론의 직접적인 감소요인에 따른 신체적 이상증상뿐만 아니라 최근 들어 다양한 사회적으로 심각한 질병의 위험요소로 작용함이 전임상 및 임상연구로 밝혀지고 있음으로 심각한 질환의 발생을 예방하는 차원에서 갱년기남성에 대한 예방 및 관리가 필수적임



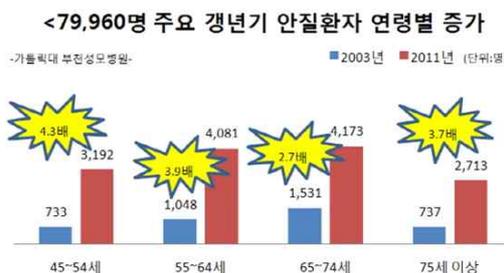
[그림. 남성 호르몬인 부족의 직접적 증상과 관련된 발생 위험 질환]

○ 또한 최근 들어 갱년기남성은 테스토스테론의 부족현상으로 인해 심각한 우울증이 발생될수 있음을 임상학적으로 증명하고 있듯이 단순한 남성갱년기 증상을 예방하는 차원에서 뿐만 아니라 다양한 심각한 질병을 예방하는 의미에서 남성갱년기 예방과 관리가 필요함



[그림. 남성갱년기 질환으로 인한 우울증 발생 위험 학술논문]

○ 국내 연구진에 의해서도 남성갱년기 환자를 대상으로 안과질환 발생률을 조사한 결과 갱년기증상이 있을수록 안과질환 발생이 증가되며, 또한 최근들어 그 수가 평균 3~4배 더 증가하고 있음을 볼수 있음



■ **정부가 인정한 남성 갱년기 건강 건강기능식품 개발이 꼭 필요한가?**

○ 여성갱년기 장애와 같이 외부로 증상인 폐경과 안면 홍조와 같은 증상들이 짧은 기간내에 발견이 되고, 여성호르몬이 40~50대 사이에 급격히 감소하는 증상들로 인해 신속한 대응이 가능하고, 지금까지 많은 예방적 차원의 건강기능식품 및 치료적인 차원의 의약품으로 인해 여성 갱년기 장애에 따른 심각한 질병 발생이 사회적으로 잘 제어가 되고 있음

○ 반면 남성갱년기 장애는 30대 후반부터 서서히 남성호르몬이 감소됨에 따라 자각 증상을 간과하기 쉽고, 남성 갱년기 장애를 성기능 장애로 한정시키는 사회적 인식으로 인해 그 증상을 숨기고 싶고, 음성적인 민간요법 및 발기부전치료제로 오직 성기능 강화에 대한 물리적 치료 및 약물 오남용, 심각한 부작용 발생, 무허가 불법 의약품 복용등으로 국민 건강이 심각한 위협을 받고 있을 뿐만 아니라 근본적인 남성호르몬 불균형에 대한 예방과 치료가 이루어지지 않고 있음



[그림. 현재 국내 남성갱년기 질환의 예방 및 치료에 사용되는 방법들]

○ 국내에서는 건강기능식품 기능성 인정범위에 갱년기남성 건강에 대한 정확한 규정이 확립되어 있지 않고, 무분별한 성기능 개선에 대한 약물오남용 등의 우려로 인해 갱년기남성 건강에 대한 건강기능식품은 허가가 되고 있지 않았음

○ 그러나 이러한 규제로 인해 음성적인 전문의약품의 오남용이 더욱 심화되고, 또한 기능성과 안전성이 입증되지 않는 무허가 제품들로 인해 국민건강에 악영향

■ 테스토스테론 과잉 투여 요법의 부작용의 실태는?

PNAS

Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination

David Furman^{1,2,3}, Boris P. Hejblum^{4,5}, Noah Simon⁶, Vladimir Jovic⁶, Cornelia L. Dekker⁷, Rodolphe Thiebaut⁸, Robert J. Tibshirani⁹, and Mark M. Davis^{1,3,9,10}

¹Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5323; ²INSERM-Epidemiologie-Biostatistique and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre INSERM U897, University of Bordeaux, and INRIA-Statistics in System Biology and Translational Medicine Team, F-33000 Bordeaux, France; ³Department of Statistics, Stanford University, Stanford, CA 94305-4065; ⁴Department of Computer Science, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599-3170; ⁵Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5208; ⁶Department of Health Research and Policy, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5405; ⁷Institute for Immunology, Transplantation and Infections, Stanford University, Stanford, CA 94305-5124; and ⁸Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305-5323

Contributed by Mark M. Davis, November 21, 2013 (sent for review September 23, 2013)

Females have generally more robust immune responses than males for reasons that are not well-understood. Here we used a systems analysis to investigate these differences by analyzing the neutralizing antibody response to a trivalent, inactivated seasonal influenza vaccine (TIV) and a large number of immune system components, including serum cytokines and chemokines, blood cell subset frequencies, genome-wide gene expression, and cellular responses to diverse *in vitro* stimuli, in 53 females and 34 males of different ages. We found elevated antibody responses to TIV and expression of inflammatory cytokines in the serum of females compared with males regardless of age. This inflammatory profile correlated with the levels of phosphorylated STAT3 proteins in monocytes but not with the serological response to the vaccine. In contrast, using a machine learning approach, we identified a cluster of genes involved in lipid biosynthesis and previously shown to be up-regulated by testosterone that correlated with poor virus-neutralizing activity in men. Moreover, men with elevated serum testosterone levels and associated gene signatures exhibited the lowest antibody responses to TIV. These results demonstrate a strong association between androgens and genes involved in lipid metabolism, suggesting that these could be important drivers of the differences in immune responses between males and females.

aging | gender | immuno-endocrine | sexual dimorphism | immunorescience

The variability in the biology of human populations poses significant challenges in understanding different disease outcomes and developing successful therapeutics. The sources of this variation are likely the consequence of genetics, epigenetics, and the history of antigenic exposure (1, 2). As therapies targeting immune function are developed to improve clinical outcomes in cancer, viral and bacterial infections, autoimmune diseases, and transplantation, identifying the sources of immunological variation and finding biomarkers for immune health and dysfunction are crucial for their success (3).

An important source of immunological variation is known to be the sex of the individual. Males experience a greater severity and prevalence of bacterial, viral, fungal and parasitic infections than females, who also exhibit a more robust response to antigenic challenges such as infection and vaccination (4, 5). This stronger immune response in females could also explain why they more frequently develop immune-mediated pathologies during influenza infection, such as an overproduction of cytokines (cytokine storm) that contribute to an increase in capillary permeability and lung failure (6). Furthermore, females are at a higher risk for developing autoimmune diseases. In this latter context, it is interesting to note that a recent study showed that females had, on average,

1.7 times the frequency of self-specific T cells as males (7). Despite the fact that initial observations relating the sex of the individual with the immune response were made many years ago (8), little is known about the mechanisms underlying these differences. Some sex-specific variations in the immune response can be directly attributed to sex hormones (9). In humans, sex steroids can bind to intracellular receptors located in immune cells such as monocytes, B cells, and T cells and activate hormone-responsive genes, suggesting that they can directly affect sex-related differences in both innate and adaptive immune responses (10). Whereas estrogens are associated with inflammation and can stimulate proliferation and differentiation of lymphocytes and monocytes, androgens suppress the activity of immune cells by increasing the synthesis of anti-inflammatory cytokines (11, 12).

To date, no clear associations have been found between biological and clinical differences in the immune response between

Significance

There are marked differences between the sexes in their immune response to infections and vaccination, with females often having significantly higher responses. However, the mechanisms underlying these differences are largely not understood. Using a systems immunology approach, we have identified a cluster of genes involved in lipid metabolism and likely modulated by testosterone that correlates with the higher antibody-neutralizing response to influenza vaccination observed in females. Moreover, males with the highest testosterone levels and expression of related gene signatures exhibited the lowest antibody responses to influenza vaccination. This study generates a number of hypotheses on the sex differences observed in the human immune system and their relationship to mechanisms involved in the antibody response to vaccination.

Author contributions: D.F., C.L.D., and M.M.D. designed research; D.F. performed research; N.S., V.J., R.T., and B.P.H. contributed new reagents/analytic tools; D.F., B.P.H., and V.J. analyzed data; and D.F. and M.M.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Relevancy available online through the PNAS open access option.

Data deposition: Probe level expression data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE41080).

D.F. and B.P.H. contributed equally to this work.

Present address: Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5164, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux, France.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: furmand@stanford.edu or medm@stanford.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1321060111/-DCSupplemental.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1321060111

PNAS | January 14, 2014 | vol. 111 | no. 2 | 869-874

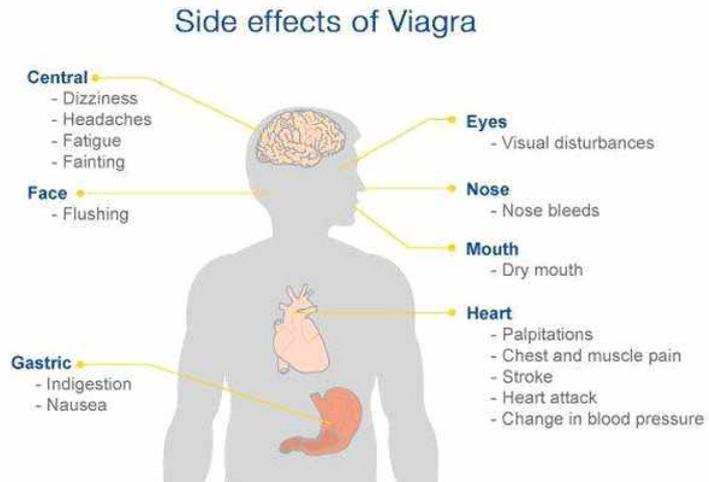
[그림. 테스토스테론에 의한 면역력 저하 현상에 대한 국제 저명학술지 발표논문]

- 최근 들어 남성 호르몬인 테스토스테론의 정상 이상으로 높은 혈중 테스토스테론 농도를 갖게 되면 항체생성을 억제하여 면역기능이 떨어진다는 논문을 세계적인 저명 학술지인 PNAS에 발표되었음
- 이 연구결과에 의하면, 남성갱년기 치료를 위해 과잉 테스토스테론을 투여하게 되면 테스토스테론의 면역억제(immunosuppressive) 작용에 의해 면역력이 약하게 되고, 특히 항체 생성을 억제한다는 연구결과임
- 이러한 부작용 때문에 남성갱년기 치료방법으로 테스토스테론을 과잉투여하게 되면, 각종 면역계 질환 및 감염성 질환에 쉽게 노출될 수 있는 신체 변화로 다양한 부작용이 발생할 수 있음
- 또한 다양한 혈중 테스토스테론 농도를 증강시켜주는 건강기능식품 및 의약품은 반드시 면역증강 효과가 있는 보조제를 같이 처방하거나, 테스토스테론 증가와 면역력 증강 효과가 동시에 있어, 면역억제 작용을 상쇄시키는 식품 및 의약품을 개발하기 위한 많은 노력을 기울이고 있음

■ **국내 갱년기남성 건강 건강기능식품 부재로 인한 의약품 오남용 실태는?**

○ 국내 갱년기남성 건강을 위한 건강기능식품의 부재로 인해 발기부전치료제를 통한 남성 갱년기 장애의 증상인 성욕감퇴 및 발기부전 증상을 개선하기 위해 비아그라와 같은 부작용이 심각하고 발기부전의 근본적인 치료인 호르몬 균형 및 분비량 증대에 전혀 효과가 없는 발기부전 전문의약품에 의존하고 있음

○ 더욱이 의사의 처방을 받아야 하는 번거로움과, 발기부전의 수치심에 의해 불법적인 경로를 통해 밀수입된 발기부전치료제를 구입하거나, 가짜 비아그라의 섭취를 통해 심각한 부작용들이 발생되고 있고, 이러한 사례는 국가적인 문제점임



[그림. 가짜 발기부전치료제의 수출입 적발 추이 및 비아그라 부작용]

○ 남성 갱년기장애에 대해 현재 국내에서 유일하게 사용되는 병원치료는 테스토스테론의 투여로 이루어지고 있으나, 많은 비용이 필요할 뿐만 아니라 그 부작용도 매우 심각한 수준으로 중증의 남성갱년기 증상을 갖는 경우를 제외하고는 테스토스테론 치료법은 매우 제한적으로 이루어지고 있음



[그림. 국내 처방되는 테스토스테론 주사제 및 패취제]

○ 테스토스테론 외부 주입법 부작용 : 전립선 비대 및 암, 면역저하, 심장질환 등

○ 이러한 사례를 종합하여 보면 국내에서는 갱년기남성의 증상을 예방하거나 개선하기 위해 허가되거나 효과적인 어떠한 방법도 최근까지 존재하고 있지 않고 있었음.

■ 국의 갱년기남성 건강 건강기능식품 제품 및 판매 현황은?

- 국외 갱년기남성 건강을 위한 건강기능식품 원료화 및 제품화는 매우 활발함
- 초기 국외에서 개발되고 판매가 되는 갱년기남성 건강기능식품은 비타민, 마그네슘 및 아연이 주성분으로 제조가 된 제품이 주력을 이루었으나, 차츰 일정량의 테스토스테론이 함유된 제품이 출시가 되었음
- 최근 들어 테스토스테론의 섭취에 따른 부작용 사례가 발생됨에 따라 천연물 및 기능성 식품 원료 추출물을 이용한 **테스토스테론 생성 촉진과 면역력 강화를 통한 갱년기남성을 위한 건강기능식품의 시장이 급속히 성장**하고 있음



[그림. 비타민, 마그네슘, 아연 등이 주성분인 1세대 갱년기 남성 제품]



[그림. 테스토스테론이 첨가된 2세대 갱년기 남성 제품]

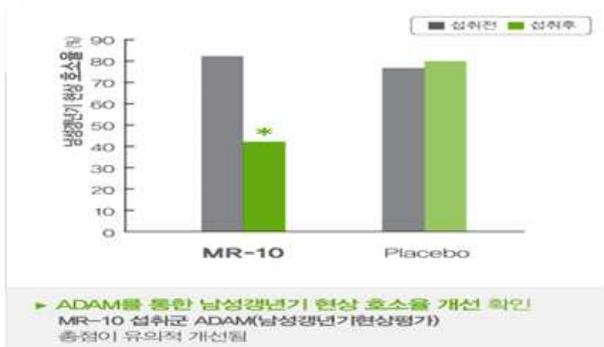
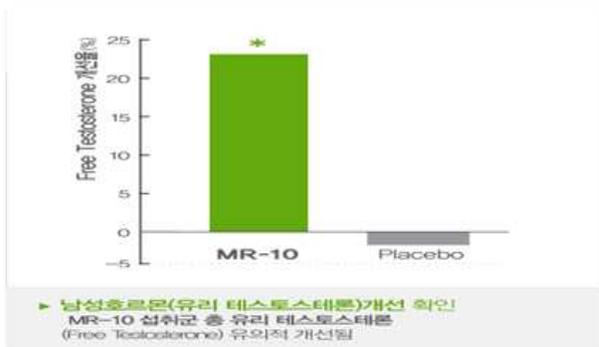


[그림. 천연물 및 식품원료 추출물이 주성분인 3세대 갱년기 남성 제품]

■ 국내 남성갱년기 건강 관련 건강기능식품 현황 및 전망은?

MR-10 민들레등복합추출물의 인체 시험으로 확인된
남성 갱년기 현상 개선 효과!

- 남성호르몬 개선 확인 (총 테스토스테론, 유리 테스토스테론)
- ADAM을 통한 남성 갱년기 현상 호소를 개선 확인(남성갱년기 현상평가 : ADAM)



- * Placebo : 효과가 없는 속임약
- * 출처 : Myung et al. (인체시험보고서) 천연복합추출물 MR-10의 남성 갱년기 개선 인체시험 [대한민국 40세 이상 일반인 남성 400mg 4주 섭취, 이중맹검법]
- * 인체시험결과가 모든 분들에게 동일하게 적용되지 않을 수 있습니다



[그림. 국내 최초 남성 갱년기 증상 개선을 위한 개별인정형 건강기능식품]

- 최근 들어 식약처에서 국내 최초로 민들레등 복합추출물의 남성갱년기 증상 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정 사례가 등장하였음
- 민들레와 루이보스 복합 추출물을 이용한 제품으로 한국야쿠르트에서 2014년 4월 1일 제품을 출시하였음
- 민들레등복합추출물은 남성호르몬인 테스토스테론의 양을 증가시켜주며, ADAM를 통한 남성갱년기현상평가를 인체적용시험을 통해 증명하였음
- 최근 들어 여성갱년기 증상에 도움을 주는 제품이 선풍적인 인기를 끌고 있고, 관련 제품 중 백수오 복합추출물을 국내에서 1,000억원 이상의 매출을 이끌고 있으며, 미국 등 해외 수출을 통해 추가적으로 1,000억원 이상의 매출이 발생하는 점으로 미루어 보아, 남성갱년기 건강기능식품 시장은 국내 경쟁대상이 작은 현재 시점에서 매우 큰 파급효과와 시장 선점효과가 발생될 것으로 예상되고 있음

■ 국내·외 유사 남성관련(전립선 건강) 건강기능식품 현황 및 전망은?

○ 세계 건강기능식품 시장의 35%이상을 차지하고 있는 국가인 미국의 경우 산수유를 주성분으로 한 L-Arginine, 토마토에서 추출한 라이코펜, 쏘팔메토 추출물 등을 활용한 남성 전립선 건강 소재로 하여 많은 제품이 개발되어 있음

○ 국내의 경우 중외제약에서 쏘팔메토와 옥타코사놀, 아연, 비타민B2, 셀렌 등의 복합 영양소가 포함된 남성 전립선 건강 중심으로 하는 제품들이 출시되었음

○ 국내에서 개별인정 받은 소재인 전립선 건강에 도움을 주는 쏘팔메토, 배뇨기능 개선에 도움을 주는 호박씨 추출물, 요로 건강에 도움을 주는 크랜베리를 활용한 제품이 출시되고 있으나 쏘팔메토가 대부분의 남성관련 제품 시장을 점유하고 있고, 또한 남성 갱년기 건강을 위해 개발되거나 출시된 제품은 전무한 실정임

			
동국제약	중외제약	동광제약	CJ뉴트라
남성 전립선 건강	남성 전립선 건강	피로회복, 근력강화	남성 전립선 건강

[그림. 국내 남성 타겟 건강기능식품 현황]

○ 국내 남성관련 건강기능식품 원료인 쏘팔메토 추출물의 경우 2007년부터 꾸준한 매출 상위5개 품목에 들고 있으며 이는 남성 소비자들이 전립선 건강 및 갱년기 증상 완화에 대한 요구도가 지속적으로 높게 유지되고 있음을 시사하고 있음

	2007년		2008년		2009년		2010년	
	품목명	금액	품목명	금액	품목명	금액	품목명	금액
1	공해리놀레산 (CLA)	12,617	공해리놀레산 (CLA)	15,676	헛개나무 과방추출분말	14,528	헛개나무 과방추출분말	44,191
2	코엔자임Q10	7,291	HCA	4,811	HCA	13,981	당귀혼합추출물	8,740
3	황금등불함물	1,600	코엔자임Q10	3,835	쏘팔메토 열매추출물	7,641	대두이소플라본	7,079
4	대나무잎추출물	1,306	대나무잎 추출물	3,748	코엔자임Q10	6,713	쏘팔메토 열매추출물	6,341
5	쏘팔메토 열매추출물	859	당귀혼합추출물	2,228	공해리놀레산 (CLA)	6,365	우대인	6,124

자료원 : 식품의약품안전청

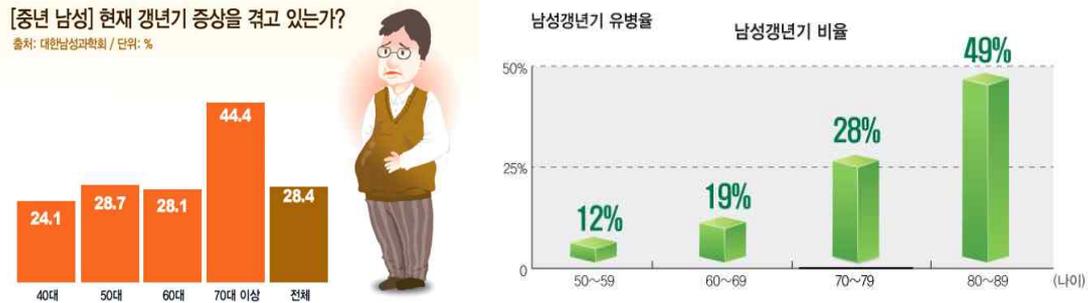
[그림. 연도별 생산실적 상위 5개 개별인정형 제품]

○ 그러나 현실적으로는 쏘팔메토 열매추출물 이후 남성 건강을 타겟으로 하는 소재의 발굴 및 기능성 연구의 빈도가 높지 않음

○ 그러한 가장 큰 이유는 현재까지 갱년기남성 건강에 관련한 원료의 인정이 정책적으로 배제되어 있었기 때문이었으나, **2014년 최근에 한국 식약처에서도 남성갱년기에 관여한 개별인정형 건강기능식품 원료를 인정한 사례가 발생**되었음

■ 남성갱년기에 대한 개인적 및 사회적인 관심도는?

○ 향 후 갱년기 남성 건강에 도움을 주는 건강기능식품이 개발되었을 경우 직접적인 소비자가 될 40~70세 이상의 남성을 대상으로 설문조사를 한 결과 평균 30% 이상의 남성이 현재 갱년기 증상을 겪고 있다고 응답



[그림. 남성 갱년기 증상 자각 정도 및 유병률 조사 결과]

○ 또한 남성갱년기 발생비율을 조사해본 결과 80세 이상은 무려 50%에 가까운 남성 갱년기 유병률을 보이고 있음

○ 이러한 결과에 따라 남성갱년기 증상 예방 및 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발은 제품 개발의 시급성 및 향 후 제품의 산업화 가능성을 충분히 뒷받침 해 주고 있음

○ 이렇게 개인적인 남성갱년기 관심도가 높아지고 있을 뿐만 아니라 사회적으로도 최근 들어 많은 언론매체를 통해 남성갱년기에 대한 관심도가 높아지고 있음



[그림. 신문 및 TV언론을 통해 관심을 끌고 있는 남성갱년기 증상]

■ 남성갱년기 건강을 위한 건강기능식품 허가 방향 및 현재 정책 동향?

○ 세계 WHO에 따르면 남성갱년기는 다양한 신체능력, 정신건강, 근골격 약화, 면역력 감소 등을 야기함에 따라 남성갱년기에 대해 심각하게 받아들이고 사회적 대책 마련의 필요성을 강조하고 있음

○ 국내 보건의료정책이 치료에서 예방·관리 중심으로 변화하면서 건강기능식품의 중요성 강조되고 있으며 특히 남성 갱년기는 증상과 경과의 특성상 건강기능식품이 가장 필요한 헬스클레임 영역인 만큼 기능성 인정 범위 확대가 필요함

○ 최근에 열린 보건산업정책포럼(2013.06. 20)에서 초청 강사로 초빙된 명순철 중앙의대 교수는 “중년남성 이후 신체와 정신적 건강 문제가 야기되는 남성갱년기는 예방과 관리가 중요하고 그 해결방법은 건강기능식품으로 해결해야 한다”며 과학적으로 검증된 갱년기남성 건강을 위한 건강기능식품이 필요하다고 강조함

○ 또한 갱년기 남성의 치료를 위해 사용되고 있는 테스토스테론의 부작용이 현실화됨에 따라 소비자들은 안전하고 효과적인 남성갱년기 예방 및 개선용 건강기능식품의 요구도가 증가될 것으로 판단됨

○ 이러한 결과 최근 들어 이러한 갱년기 남성 건강에 대한 관심과 정책적인 반영을 위해 다양한 모임과 정책세미나, 테스토스테론을 대체할 소재개발 연구들이 추진되고 있어 드디어 남성 건강을 위한 건강기능식품 허가가 시작되었음



Symposium Highlight

50

메디칼 업저버^Q

2013년 1월 23일 화요일 제11호

테스토스테론 보충요법의 주요 문제점과 해결책

최근 테스토스테론 보충요법의 주요 문제점과 해결책을 주제로 심포지엄이 개최되었다. 최중훈 이상원 교수(삼균외과)가 맡았으며 Serge Cormier (Canada)가 강연하였다. 이후 강연에 대한 질의응답 시간을 가졌다. 이에 본지에서는 이날 강연 및 질의응답 내용을 요약·정리하였다.

최장·이상원
삼균외과대 교수
삼성서울병원 비뇨기과



○ 식품의약품안전처에서도 숙면건강, 남성갱년기 등과 같이 여러 분야로 기능성 인정범위를 확대해 주어야 건강기능식품 산업이 건전하게 발전해 나갈 수 있을 것으로 판단하고 있음

○ 특히 보건산업적 측면에서 남성갱년기 건강에 대한 기능성의 인정범위를 확대해줌으로서 잘못 인식하고 있는 왜곡된 시장을 정확시키고 올바른 건강기능식품 시장형성의 필요성을 인정하고 과학적으로 기준이 명확하고 측정이 가능한 기능성이라면 제한할 필요가 없다는 의견

■ **성공적 갱년기남성 기능성식품소재 개발을 위한 문제 해결책 및 전략**

○ **갱년기남성 건강기능식품 개발 의지가 강한 산·학·연 발굴 및 연계 협력체계 지원**

- 연구기관은 산업화를 위한 연구를 지향하고, 갱년기남성 건강 소재 발굴 및 기능성 규명 시스템이 확보된 연구기관과 제품화 의지가 있는 기업은 상호 정보 공개 및 공유를 통해 산·연 협동 연계 연구개발 체계를 구축하여 정부의 지원을 유도하여야 함
- 국가는 정책적으로 갱년기남성 건강 기능성 소재 탐색 및 개발, 제품화 의지가 강한 산·연 체계를 발굴하여 갱년기남성 건강에 대한 소비자 요구도에 부응하는 연구개발성과를 도출하기 위한 연계 협력 체계를 지원하여야 함

○ **갱년기남성 건강 효능 규명을 위한 전문적 기술 보유기관, 인력 풀 확보 및 양성**

- 남성갱년기 학문분야, 남성 갱년기 전문 임상 병원 및 전문가의 DB를 확보하여 지속적인 지원과 성과유도를 통해 남성 갱년기 기능성식품 개발 분야의 학문적, 기술적, 산업적 발전을 유도하여 과학적 기준이체계화 되도록 지원하여야 함

기능성, 안정성이 확인된 소재의 적극적 활용을 통한 제품화 진입 장벽의 축소

- 갱년기남성 건강과 유사한 기능성(남성 성기능 개선, 정신적 건강)과 안전성이 확보된 소재인 황칠나무를 활용하여 남성갱년기 기능성의 신속한 발굴이 가능하며 자체 표준화가 완료된 황칠나무 소재를 바탕으로 빠른 제품화 유도, 건강기능식품 신규 기능성 항목(예;갱년기 남성 건강에 도움)의 인정 조기완료로 빠른 산업화

○ **갱년기남성 관련 건강기능식품 국내 시장 성공 제품화를 위한 소재선정 및 제품화**

- 스마트 소비자를 만족할 수 있는 제품을 통한 성공사례를 이끌어 내는데 가장 필요한 것은 소재 탐색, 과학적 검증 및 신뢰도, 고품질 제품, 공격적 마케팅 어느 하나 중요하지 않는 것이 없지만 기능성 식품분야에서는 소재선정과 마케팅(디자인 포함) 부분이 가장 중요함
- 소재선정과 마케팅은 서로 상호보완적임. 즉 선정한 소재에 대한 스토리텔링과 같은 마케팅 전략이 수립되고 디자인이 완성되어 상품의 고부가가치가 증가됨
- 따라서 소재선정은 그 시대의 소비자의 심리, 사회적 이슈, 소비자의 인지도 등 사회의견을 반영한 소재가 선정되어, 과학적 신뢰도를 더하여 개발되어야 함

따라서 본 과제에는 이러한 전략으로 신규 개발 자원으로서는 황칠 나무를 대상으로 남성 갱년기 개선 기능성 소재의 과학적 기전 검증 및 규명, 임상시험 및 가공기술개발 연구를 통해 건강기능성식품 시장에서 가장 필요하다고 생각되는 ‘헬스 클레임’ 인 남성 갱년기 분야에서 모범적인 첫번째 성공사례를 제시하고 남성 건강의 새로운 분야를 구축하고자 함

■ “연구개발 대상 자원의 개요”

황칠 나무



원재료명 : 황칠나무

학명 : *Dendropanax morbifera*

이명 : 노란웃나무, 풍하이(楓荷梨), Korean Dendropanax

주요성분 : 세스퀴테르펜류의 β -쿠베벤, γ -셀리넨, δ -카디넨 등

주요 산지 : 전남 남해안, 제주도 등

식용가능 여부 : 잎, 줄기, 뿌리 가능(식약처 제한적사용원료 공전 등재)

황칠(*Dendropanax morbiferus* H. Lev.)은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 아열대 및 난대성 상록활엽교목으로 한국이 원산지인 특산수종이다. 일본, 타이완에 분포하고 우리나라에서는 전남의 해남, 완도, 보길도 등의 서남해안 지역 및 제주도에서 자생하고 있다. 노목은 가늘고 얇으며, 잎은 난형 또는 마름모형의 타원형으로 3~5갈래로 깊게 갈라지며 광택이 있다.

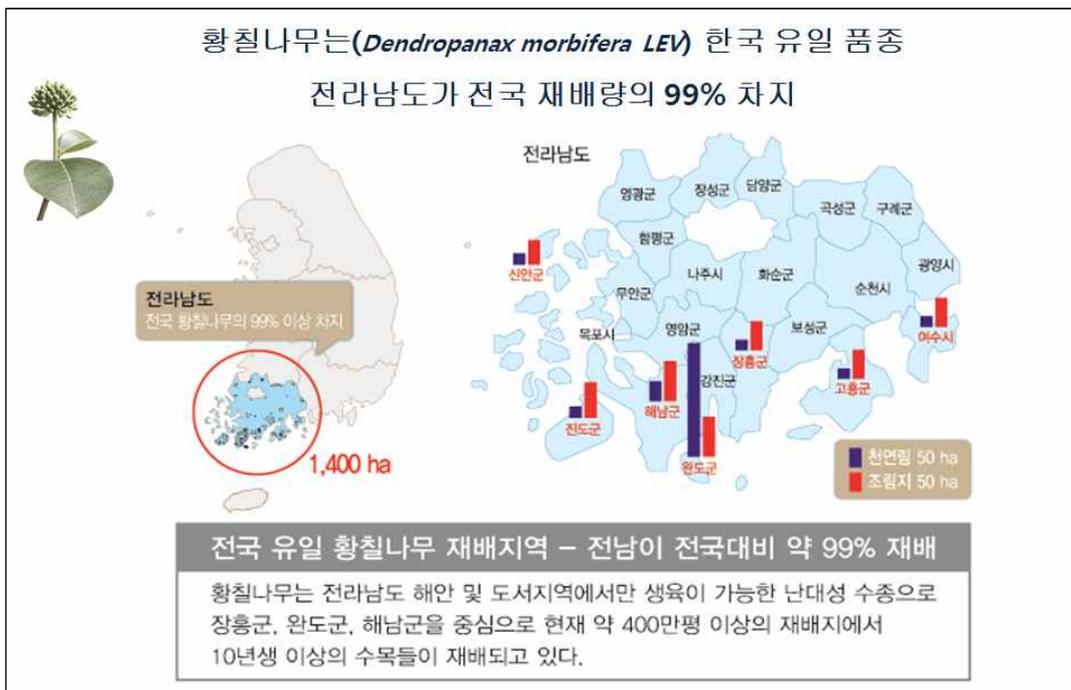
예로부터 황칠 수피의 유액은 천연도료로 이용되었으나, 현재는 인공합성도료에 밀려 황칠 공예가 미비해진 실정이다. 그러나 황칠나무에 관한 과학적인 연구가 진행됨으로써 약용식물로써의 새로운 가치부여와 경제적인 장점이 재조명되고 있다.

황칠의 주요물질은 sesquiterpene에 속하는 β -selinene이 가장 많이 함유되어 있고, capnellane-8-one가 다음으로 많이 함유되어 있는 성분이라고 보고되었다. 황칠 수액 중의 독특한 향을 내는 안식향산 (benzoic acid)은 마음을 진정시키는 효과가 있다.

[출처 : 천연자원연구원 헬스케어소재 연구정보 www.HIDB.re.kr]

■ “연구개발 대상 자원의 세부 개요 및 선정 이유 : 황칠나무”

- 황칠나무는 한국 유일 품종으로 특히 전라남도가 전국 재배량의 99%를 차지하고 있음
- 전라남도에 형성된 황칠나무 재배면적은 약 400만평(1,400ha)으로 장흥군, 완도군, 해남군을 중심으로 10년생 이상의 수목들이 대량 재배되고 있음
- 황칠나무(*Dendropanax morbiferus*)는 두릅나무과 상록 활엽수림으로 전남 서남해안 및 도서지역에서만 자생 및 재배되는 난대성 수종으로 수지(樹脂)는 황금색이고 내열, 내구, 내수성이 강하며 부착성 및 광택이 좋아 예로부터 전통공예품에 천연도료 및 민간의약품 소재로 쓰여 지고 있음
- 황칠나무 학명이 Dendro(그리스어원 '나무'), panax(그리스어원 '만병통치약'), morbi(라틴어원 '병'), ferus(라틴어원 '옮기는')로 병을 가져가는 만병통치약이라는 의미를 가지고 있고 인삼나무라 불리어지고 있음



- 황칠나무의 대량 재배화 인프라가 구축되었다는 것은 체계적인 제품화 및 대량 생산을 위한 원료 조달이 가능한 상황임을 의미함
- 황칠나무는 인간의 질병의 치유 및 예방에 유용한 성분을 다량 함유하고 있고, 최근 들어 다양한 기능성 연구결과가 보고되고 있어 전문적인 제품화기술 및 마케팅 지원을 통하여 충분히 건강기능식품 및 웰빙식품으로 고부가가치화 제품을 개발 할 수 있고 지역경제 활성화에 큰 영향을 줄 수 있을 것으로 판단됨

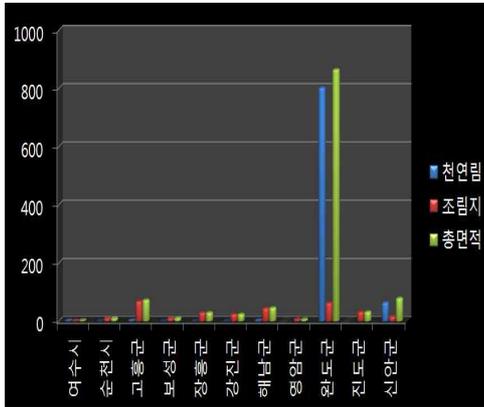


- 황칠나무 (*Dendropanax moribifera* Lev.)는 두릅나무과(오갈피나무과) 황칠나무속으로 동아시아, 말레이 반도, 중앙 및 남아메리카에 약 75종이 분포되어 있으며 우리나라에는 1종이 분포
- 전남 해안지방은 황칠나무 재배 최적의 자연환경으로, 전남 황칠은 전국적 브랜드 인지도 보유 및 과학적 재배단지의 모범지역임
- 황칠은 전남 난대성 특용자원으로 다양한 약리적 효과와 더불어 산업적 활용 등에 대한 연구가 이루어 졌지만 최적의 생육 재배환경이 무엇인지, 생리·생태적인 특징이 어떠한지, 어떠한 환경이 약리적인 성분을 최대로 할 수 있는지에 대한 연구 결과가 부족한 실정이며, 풍부한 생산량에 비해 산업적 응용에 따른 제품화가 이루어 지지 않고 있으므로 이에 대한 지원이 절대적으로 필요
- 지방정부와 지역 황칠 생산자, 지역업체, 지역 유관단체 및 수도권 대기업을 아우르는 전남 황칠 진흥사업은 농가 및 지역경제에 활력을 불어넣을 것으로 기대됨

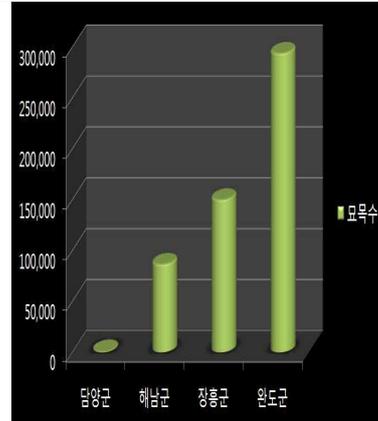


○ 황칠나무는 전라남도 해안 및 도서지역에서만 생육이 가능한 난대성 수종으로 장흥군, 완도군, 해남군을 중심으로 현재 약 400만평 이상의 재배지에서 10년생 이상의 수목들이 재배되고 있어 전남이 황칠나무 생산의 중심지임





황칠의 전남 각 시도 재배 면적



황칠 주요 재배지역의 총 묘목수

○ 황칠나무는 전라남도 남해안에 인접한 지역에서 현재 대량 번식 및 재배를 시도하고 있으며 임산학적 측면에서는 관상용으로서 관광자원화 및 원물판매도 가능하여 고부가가치가 예상되며 원료생산, 품질관리, 제제화 및 판매가 모두 국내에서 조달될 수 있으므로 선진기술에 의한 수입품과 달리 외국으로의 로열티 지출이 없을 뿐만 아니라 동일한 분야의 수입제품에 대하여 상당규모의 수입대체효과 및 세계시장으로의 수출도 가능한 소재로 지역경제 활성화에 중요한 역할을 하는 소재임



■ “기술정보수집 · 전문가 확보 · 타 기관과 협력의 필요성 및 추진전략”

1. 기술정보수집

- 참여기관인 천연자원연구은 현재 Web of Science 및 SienceDirect 등의 해외전문지 Database와의 계약을 통한 자체 정보수집 가능하고, 또한 생물자원에 대한 데이터베이스(DB) 체계를 구축(www.HIDB.re.kr)하여 헬스케어소재에 대한 기업으로 정보제공 서비스를 제공하고 있음



- 주관기관인 (주)새롭과 참여기관인 동신대학교는 천연자원연구원과 공동 DB활용 협약이 맺어져 있으므로 천연자원연구원의 기술정보를 자유롭게 공동으로 활용할 수 있음
- 미국 및 유럽의 society for neuroscience (SFN)학회와 society of biomolecular screening 학회 및 국내 대한남성갱년기학회 및 비노기과학회 등에 참가하여 최신 정보 입수
- 국내 · 외 건강기능식품 소재 및 제품 박람회에 년1회 이상 주관기관과 참여기관이 공동으로 참관하여 최근 제품화 동향 및 기술정보를 수집하여 본 연구개발 사업에 적극 반영
- 년2회 정기적인 학술세미나를 자체 개최하여 관련 산업 전문가 및 학계전문가를 초빙하여 최근 연구 및 제품 동향에 대한 정보 획득

2. 전문가확보

- 본 연구팀에서 다년간 쌓아온 전기생리학적, 실시간 형광이미징법, 최신 생명공학기법, proteomics, 천연물 분석, 천연물 분리정제, 고속생리활성검색(HTS)등 방법에 대한 전문 지식과 각종 최신 고가 연구장비가 구축되어 있을 뿐만 아니라 국내외 우수 대학에서 연수를 받은 내부인력 확보에 따라 추가적인 전문가 영입 없이도 본 연구수행이 충분히 가능함

2. 타 기관과의 협력 필요성 및 방안

○ 원료 및 제품 안정성 평가 및 인증 전문기관과 협력체계 구축

- 2세부 주관기관인 천연자원연구원은 원료 및 제품안정성 전문기관인 전남식품산업연구원과 동일한 전남생물산업진흥원내 소속기관으로, 현재 꾸준한 상호 협력적인 시험분석 및 인증사업을 추진하고 있기 때문에 본 연구과제에서 수행할 안정성 시험인증을 수행하는데 적극적으로 협력할 것임

○ 건강기능식품 임상시험 평가 전문기관과 협력체계 구축

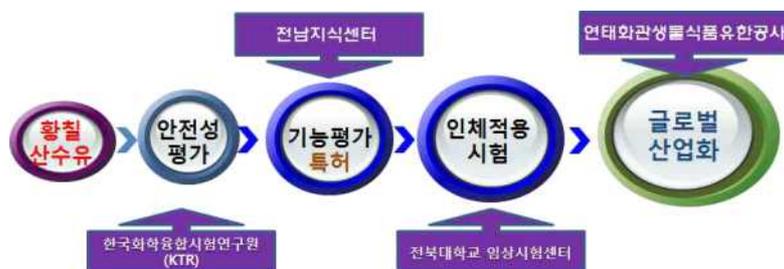
- 총괄주관기관인 (주)새롭 및 참여기관 천연자원연구원은 건강기능식품 임상시험 전문기관인 전북대학교 임상시험센터와 업무협력협약을 체결하였고, 현재 꾸준한 상호 협력적인 임상시험분석을 추진하고 있기 때문에 본 연구과제에서 수행하고 있는 임상시험의 성공을 수행하는데 적극적으로 협력할 것임

○ 연구개발 성과의 지식재산권 확보를 위한 특허 전문기관과 협력체계 구축

- (주)새롭은 개발한 기술의 신규성 및 진보성을 분석하고 새로운 지식재산권인 특허로 기술을 보호하고 보장받을 수 있도록 전남지식센터와 업무협력협약을 체결하였고, 현재 꾸준한 상호 협력적인 사업을 추진하고 있기 때문에 본 연구과제에서 도출한 새로운 기술 및 권리보호를 위한 특허 확보에 적극적으로 협력할 것임

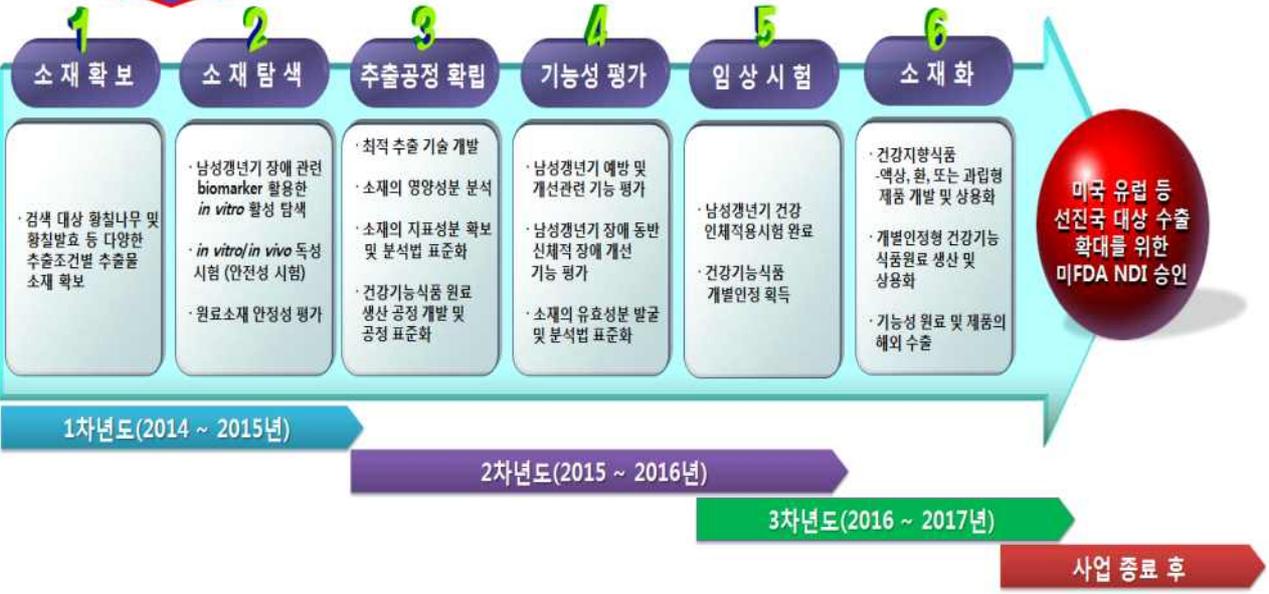
○ 중국 시장 확대 및 진출을 위한 중국 대형 식품제조 및 유통회사 협력체계 구축

- 총괄주관기관 (주)새롭과 참여기관인 천연자원연구원은 중국 대형 식품제조 및 유통회사인 연태화관생물식품유한공사와 3자 업무협력협약을 체결하여, 현재 꾸준한 상호 협력적인 사업을 추진하고 있기 때문에 본 과제에서 도출한 제품들의 중국시장 진출에 적극적으로 협력할 것임



“성공적 최종 목표 달성을 위한 단계별 연구개발방법”

선행연구 단계 완료



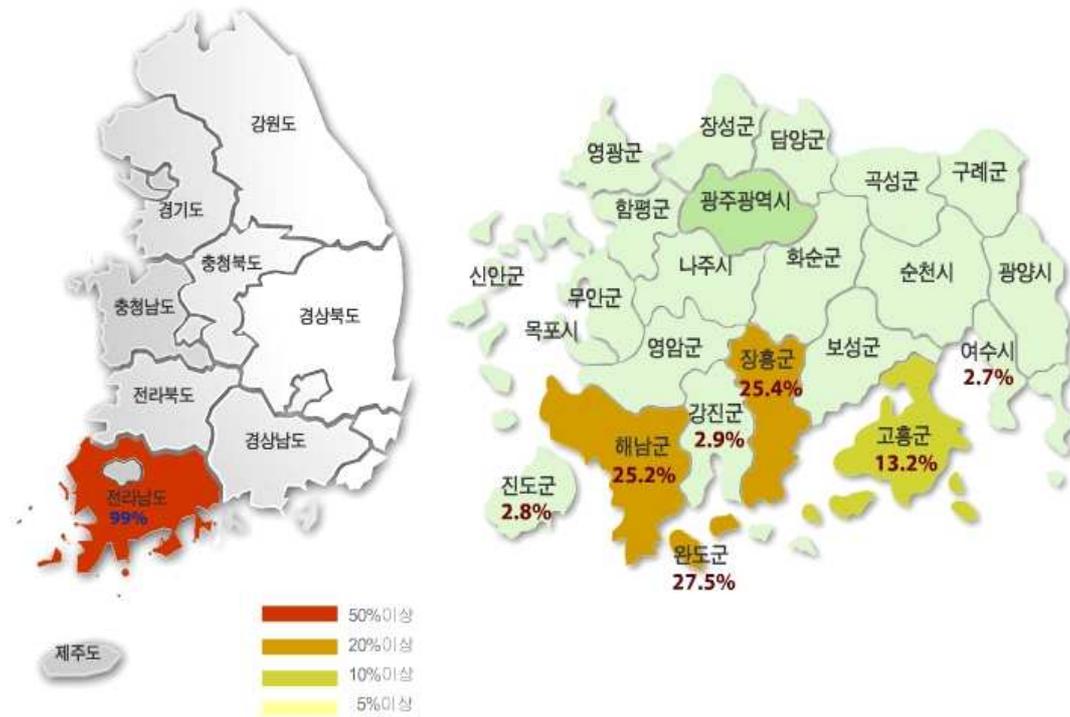
연구 개발 단계	연구 개발 방법
1. 소재 확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황칠나무 생산지별, 계절별 소재 및 추출물의 발효물 대량 확보 ○ 용매 극성을 달리한 추출 분획물 제조 ☞ 자원의 원료표준화 및 최고 기능성을 갖는 소재 선정을 위한 주요 생산지별 소재 확보
2. 소재 탐색	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 탐색 : 남성갱년기 장애 관련 biomarker를 활용한 신속한 소재 탐색 <ul style="list-style-type: none"> · 고환 간질세포주인 TM-3 세포주를 이용한 추출물별 testosterone 분비량 증가 효능 평가 · 고환 간질세포주인 TM-2세포주를 이용하여 H₂O₂ 처리에 의한 추출물별 세포손상 억제 효과 평가 · 추출물별 및 발효물별 선천성 및 후천성 면역 증진 효과 평가 · 최대 활성을 갖는 최적 용매 분획물 조건 확립 ○ 선정 소재의 추출물 원료에 대한 안정성 전문 평가기관을 통한 안정성 시험 2건 인증 획득 ☞ 효능 시험결과 및 안정성 시험결과를 종합적으로 분석하여 최고 성적이 도출된 소재 선정
3. 선정소재(3종) 표준화 및 추출공정 표준화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자원별 최적 효과를 갖는 추출방법에 의해 추출된 추출물 분석에 적합한 지표성분을 각 2종 선정 ○ 발효물 분석을 위해 최적화된 지표성분 2종 선정 ○ 선정된 지표성분을 활용하여 대량 양산화 추출공정의 표준화 완료 ☞ 선정된 최적 효능을 갖는 추출방법을 선정하여 추출공정 표준화 확립 및 성분 표준화
4. 기능성 평가 및 유효성분 발굴	<ul style="list-style-type: none"> ○ 남성 갱년기 장애의 직접적 원인이 되는 testosterone 분비 증대 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 노화 동물모델을 이용한 testosterone 분비 증대 기능성 평가 ○ 남성 갱년기 장애의 대표적인 증상들의 예방 및 개선 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> · 발기 부전, 우울증, 수면장애, 지구력 및 근력 감소의 개선 효과 검증 ○ 남성 갱년기 장애의 대표적인 원인인 면역력 약화에 대한 개선 효과 증명 및 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> · 추출물별 및 발효물별 감염성 질환에 대한 예방 효과 검증을 통한 면역증강 효과 검증 · 면역증강 효과에 대한 기전 규명 ○ 소재별 추출물의 용매 분획과 분획물의 <i>in vitro</i> 평가를 병행하여 최종 유효성분 2종 발굴 ☞ 최종 선정 소재의 유효성분 탐색과 기전규명을 위한 <i>in vivo/in vitro</i> 시험으로 유효성분 확보와 기능성 및 기전규명 완료

<p>5. 소재화 및 제품화</p>	<p>선정된 2종(추출물, 발효물)의 기능성 소재를 활용한 건강지향식품 시제품 개발 및 상용화 3건</p> <ul style="list-style-type: none"> • 기존제품 업그레이드 및 과립, 액상, 환 등의 건강지향식품 제형의 제품 생산 및 상용화 <p>○ 수출 지향적 제품 및 원료 개발을 통한 해외 수출 개척</p> <p>☞ 확인된 소재를 이용한 건강지향식품 개발 및 조기 산업화를 위한 원료화 및 제품화</p>
<p>6. 인체적용시험</p>	<p>○ 남성갱년기 건강 기능성을 입증하기 위한 인체적용시험 완료</p> <p>☞ 기능성원료 개별인정 획득을 위한 절차를 진행하기 위한 최종 결과 확보</p>

■ “1단계 : 소재 확보 단계 세부 추진 연구개발방법 및 목표”

1. 황칠나무 : 장흥군 및 해남군 원료 수매

● 전국 및 전남지역 황칠 재배량 비교 (2011년)



2. 추출 조건 : 열수추출, 주정20% 추출, 주정 50%추출, 주정 80%추출

☞ 자원의 원료표준화 및 최고 기능성을 갖는 소재 선정을 위한 주요 생산지별 소재확보

“2단계 : 소재 탐색 단계 세부 추진 연구개발방법 및 목표”

Journal Research and Practice (Vol. 06, No. 01) 2012, 669-672
 doi:10.1074/1477-40517-5009-6168

Improvement of andropause symptoms by dandelion and rootbos extract CRS-10 in aging male

Yoo-Hwa Noh^{1,2}, Do-Hee Kim^{1,2*}, Joon-Yub Kim¹, Jae-Park^{2,3}, Ch-Hyeon Kim¹, Dae-wook Hwang⁴, Won-Yong Kim¹, Sung-Su Kim¹, Moo-Yeol Lee¹, Seok-Hyun Heo¹, Minsook Kim¹, Won-Bok Youn⁵, Seung-Il Park⁶, and Seon-Chul Myung⁷

¹Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 226-736, Korea
²Korea Food Research Institute, Gyeongsang 485-740, Korea
³Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 226-736, Korea
⁴Department of Physiology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 226-736, Korea
⁵Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Science, Dankook University, 222 Jukhyang-dong, Gwangju 511-702, Korea
⁶Korea Health Science Research Institute, Gwangju 401-400, Korea
⁷Department of Urology, College of Medicine, Chung-Ang University, 222 Heukseok-dong, Dongdaegu, Seoul 151-747, Korea

Abstract
 Aging male suffer various andropause symptoms including loss of physical and mental activities. This study evaluated the effects of CRS-10 (dandelion and rootbos extract) on the symptoms of andropause. The normal rate of the cell number and both the number and activity of sperm in aging male (18 weeks) were measured. Furthermore, testosterone, LH, LH-RH, LH-RH receptor, androgen receptor, and androgen receptor coregulator were measured. CRS-10 protected the cell number and activity of sperm via activation of ERK and Akt pathways. The level of testosterone and activation of androgen receptors in aging male were significantly increased. Daily intake of 400 mg of CRS-10 improved the quality of sperm. According to a clinical survey using the ADL, the results suggest the potential of CRS-10 as a safe and effective for reducing the symptoms of andropause.

Key Words: Leydig cell, testosterone, CRS-10, spermatozoa, andropause

Introduction
 Leydig cells in the interstitial of testis are the primary source of testosterone, which maintains the differentiation of the male phenotype and spermatogenesis in the testis [1,2]. Loss of Leydig cells significantly contributes to the age-related decline of testosterone [3-7]. Testosterone levels in certain testosterone may result in the reduction of spermogenesis, loss of muscle strength, as well as decline in muscle performance and physical function, which may decrease the quality of life (QoL) of aging males [8-11]. A potential proportion of aging and older men have reduced levels of testosterone, which is a major reason for andropause symptoms [12].

Several recent studies have shown that testosterone level improves mitochondrial energy of skeletal muscle, depressed insulin resistance, hypertension and osteoporosis [9-11]. However, if testosterone can significantly reduce body weight, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, and other diseases [13-17]. Therefore, administration of natural substances, which can protect Leydig cell, the continued production of testosterone, and thus reduce the symptoms of andropause. Dandelion and rootbos is a variety of...

This work was supported by a grant from the Korea Health Science Research Institute (KHSRI) funded by the Ministry of Health, Welfare and Family Affairs. The authors declared no conflict of interest in this work. © 2012, Chung-Ang University. All rights reserved. Email: yhn@cau.ac.kr

Received September 18, 2012; Revised October 16, 2012; Accepted October 20, 2012
 ©2012 The Authors. Journal compilation © 2012 Chung-Ang University
 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Group	Cell viability (% of control)
Control	100
Dandelion	~110
Rootbos	~115
CRS 10	~140

천연물을 이용한 남성 갱년기 장애 개선 관련 국제SCI급 논문

- 국제 SCI급 논문으로 시험방법 및 결과가 인정된 *in vitro* 평가법을 도입하여 자원별 추출 조건별 분류된 소재에 대하여 평가 실시
 - Immature Mouse Leydig cell line인 TM-3 고환간질세포주를 이용하여 추출물 시료를 처리하여 생성된 testosterone의 양을 ELISA 측정법을 통해 정량적 측정
 - 고환에서 testosterone 분비가 억제되는 주요한 원인은 활성산소에 의한 고환간질세포의 손상이 주요한 원인임, 따라서 TM-3세포에 H₂O₂ 처리에 의한 세포 손상을 추출물 처리에 따라 손상 억제 효과를 MTT 및 LDH 측정법을 통해 효능 평가
- 황칠나무와 발효물의 *in vitro* 선천성 면역 강화 효능 평가
 - TLRs signaling pathway에 대한 reporter 활성 효능 연구
 - TLRs를 발현하고 있는 Caco-2 cells 에서 TLR 관련 면역 증강 cytokine인 IL-8 분비증가 연구
 - 대식세포 세포주에서 선천성 면역증강 효과를 nitric oxide (NO) 생성능 평가 및 ELISA를 사용한 cytokine (IL-6, TNFα 등) 생성능 연구
- 황칠나무와 발효물의 *in vitro* 후천성 면역 강화 효능 평가
 - T 림프구와 B 림프구 세포주에서 증식능을 MTS를 사용하여 연구
 - 사이토카인 생성에 대한 효능을 ELISA로 연구
- 황칠나무와 발효물의 항산화 기능성 평가
 - DPPH를 이용한 항산화 활성 측정
 - Pyrogallol을 이용한 Super oxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정
- 선정 소재에 대한 안정성 전문 평가기관을 통한 안정성 시험 2건 인증 획득

☞ 효능 시험결과 및 안정성 시험결과를 종합적으로 분석하여 최고의 성적이 도출된 소재 선정

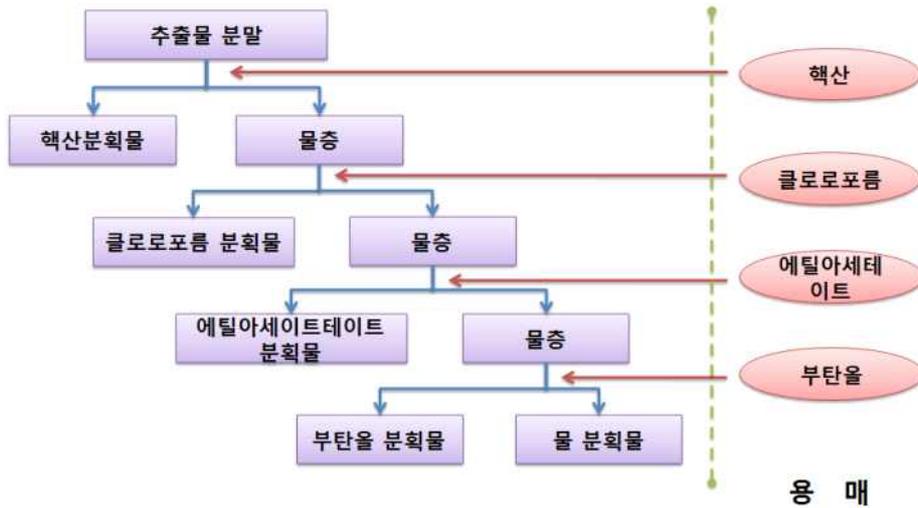
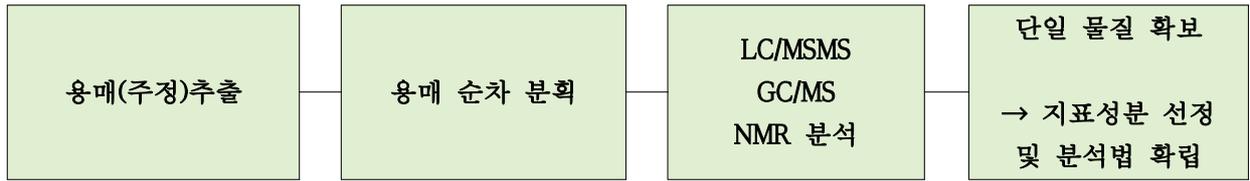
■ “3단계 : 인체적용시험 진행 단계 세부 추진 연구개발방법 및 목표”

- 남성갱년기증후군 : Morley (2000)이 개발한 Androgen Deficiency in Aging Males(ADAM)의한 한국어판을 사용 검토함. 이 도구는 총 10개 항목으로 문항의 내용은 성욕, 기력, 체력과 지구력, 키, 삶의 즐거움, 울적함과 짜증, 발기력, 운동 능력, 수면, 일의 수행능력으로 구성됨. 각 문항에대한 반응은 ‘예’, ‘아니요’로 답하는 이분척도로 되어있으며, 성욕 또는 발기력 문항이 ‘예’ 이거나 나머지 8개 항목 중 3개 문항 이상이 ‘예’ 이면 남성갱년기 증후군으로 추정함
- 성기능 : Rosen (1997)이 개발한 International Index of Erectile Function (IIEF)의 한국어번역판 IIEF를 사용검토 예정임. 이 도구는 총15개의 항목으로 문항의 내용은 발기능력, 성교만족도, 절정감, 성욕, 성생활에 대한 전반적 만족도로 구성됨. 1-10번 문항은 6점척도로 1점부터 5점으로 되어있으며, 11-15번 문항은 5점척도로 1점부터 5점으로 됨. 각 문항별 점수의 합계로 발기기능을 평가하여 점수가 낮을 수록 발기부전 정도가 높음을 의미함
- 우울 : Radloff(1977)가 개발한 Center for Epidemiologic Studies Depression Scale(CES-D)의 한국어번역판 CES-D를 사용검토 예정임. 이 도구는 총20개의 항목으로 각문항에 대한 반응은 극히 “드물게 0점”, “가끔 1점”, “자주 2점”, “거의 대부분 3점” 의 Likert식 4점 척도로 되어있음. 부정적 감정을 측정하는 문항을 역채점하여 점수가 높을수록 우울의 정도가 높음을 의미함
- 삶의 질 : 세계보건기구 (1998)가 개발한 삶의 질척도 World Health Organization Quality of Life assessment instrument (WHOQOL)-BREF의 한국어판을 사용검토 예정임. 이 도구는 총 26개 항목으로 신체적 영역, 심리적 영역, 사회관계적 영역, 환경적 영역으로 분류되어 있으며, 각 문항에 대한 반응은 “전혀 그렇지 않다 1점”, “그렇지 않다 2점”, “그저 그렇다 3점”, “그렇다 4점”, “매우 그렇다 5점” 의 Likert식 5점척도로 답하도록 구성됨. 총점은 영역점수의 합으로 계산하며, 점수가 높을수록 삶의 질이 높음을 의미함
- 기타 테스토스테론 (총 테스토스테론, 유리테스토스테론 및 단백질-결합 테스토스테론), 성장호르몬, 멜라토닌, 갑상선호르몬, 에스트라디올, 디히드로에피안드로스테론 등에 대해서 남성갱년기 증후군과 연관성이 높은 지표들의 타당성을 검토, 적절한 바이오마커들을 선정하여 인체적용시험을 추진중에 있음

☞ 선정된 biomarker를 토대로 연구대상자(피험자) 선정 기준 및 유의적인 결과 도출을 위한 인체적용시험 지속적 관리 및 추진

■ “4 : 선정소재 표준화 및 추출공정 확립단계 세부추진 연구개발방법 및 목표”

- *in vivo/in vitro* 시험에 사용되는 시험물질 제조(용매순차분획물) 및 지표물질 탐색 방법



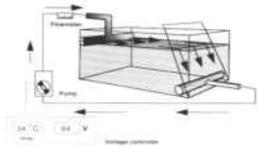
- 지표물질 탐색을 위해 주관기관 및 참여기관 연구책임자 보유 장비 및 기술

					
HPLC	GC	Prep-LC	MPLC	ICP	NMR

- 탐색한 지표물질 후보물질을 대상으로 대량 양산화 추출공정 제조 원료의 표준화 가능성 규명 및 최종 지표물질과 표준화 제조공정 확립
 - 대량 양산화 추출공정을 통해 제조된 원료를 대상으로 중금속, 잔류농약, 지표성분 평가를 통해 추출물 품질관리 기준 설정
 - 연속 3회 이상 시험 생산을 통하여 제조공정 및 품질관리 방법 표준화

■ “5 : 기능성 평가 및 유효성분 발굴 단계 세부 추진 연구개발방법 및 목표

○ 남성 갱년기장애로 동반되는 다양한 질환들의 기능성 평가를 위한 *in vivo* 동물모델

기능성 평가 동물 모델	모델 제작	특 징	주관기관 보유현황
① 남성 갱년기장애에 따른 지구적 운동 스트레스 동물 모델		지속적이고 강제적인 육체사용을 유도하여 육체적 피로 스트레스 유발	보유 및 제작 기술확립
② 남성 갱년기장애에 따른 수면축진 동물 모델		수면부족 스트레스 유도 모델 강력한 스트레스 자극으로 기억력 및 면역력 감퇴 숙면유도 기능성 평가 활용	보유 및 제작 기술확립
③ 남성 갱년기장애에 따른 성기능 (교미행동) 동물 모델		성기능 감퇴 모델 교미행동 분석에 따른 성기능 효과 측정	보유 및 제작 기술확립
④ 구속스트레스 동물 모델		남성갱년기장애 우울증 유사 모델 생존의지 박탈유도 기억력 감퇴	보유 및 제작 기술확립

○ *in vivo* 마우스를 이용한 면역증강 생체효과 평가

- *in vivo* 마우스 동물모델 평가, 백혈구 수, 흉선크기 등 측정 등

○ 선천성 면역 증가에 따른 감염성 질환 예방 효능 평가

- 선천성 면역 증가에 따른 감염성 질환에 대한 예방 효능을 패혈증비브리오균을 모델로 감염증상 억제 및 치사율 억제 연구
- 패혈증 세균의 모델로 비브리오패혈증 야생균을 사용하여 마우스에 LD₅₀ 의 10⁸cfu 에 해당하는 2x10⁶ cfu를 주사하고, 감염증상 억제 및 치사율 억제 연구

○ 항원 특이적 후천적 면역 증가 효능 검증

- 항원 특이적 후천적 면역증강 효과 연구: BALB/c 마우스에 항원과 추출물을 면역 화하고 항체와 cytokines을 ELISA로 측정
- 체액성면역반응 유형 연구 : 면역화시킨 마우스로부터 시료를 채취하여 ELISA 실시 후 항체 subtype 규명을 통하여 Th1과 Th2 방향으로의 면역반응 연구
- 세포성면역반응 유형 연구: 면역화된 마우스로부터 분리한 면역계 primary cells로부터 특이적인 사이토카인 규명을 통한 기전 연구

○ 면역증강 효과 기전 연구

- 면역증강작용 기전을 상용화된 cell signalling pathway에 작용하는 다양한 pharmacological blocker 들을 사용하여 reporter assay를 통한 신규 유효성분의 signalling pathway 연구

JNK specific antagonist:SP600125, p38 antagonist:SB203580, ERK antagonist:PD98058
NF-kB antagonist:Bay 11-7082, curcumin, sulfasalazine, Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) antagonist:Wattmannin, Protein tyrosins kinase (PTK) antagonist:Genistein , Protein kinase C (PKC) antagonist:GF109203X, Phospholipase C (PLC) antagonist:U-73122 등

○ 1-2차년도 발굴한 효능 biomarker를 대상으로 황칠나무와 발효물의 효능평가 및 기전분석 완료: 특허 등록 1건

○ 황칠나무 유효성분 및 지표성분들의 남성 갱년기 관련 면역활성 인자 발굴 및 노화관련 면역증강 효능/기전 규명 검증 완료: 논문 1편

☞ 최종 선정 소재의 유효성분 탐색과 기전규명을 위한 *in vivo/in vitro* 시험으로 유효성분 확보와 기능성 및 기전규명 완료

■ “6단계 : 인체적용시험 완료단계 세부 추진 연구개발방법 및 목표”

○ 인체적용시험 디자인

- ① 인체적용시험 디자인 : 12주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험
- ② 대상피험자 : 남성갱년기증후군이 의심되는 40~60세 남성 자원자
- ③ 기능성소재 섭취에 따른 유효성 평가 방법

ADAM, IIEF, CES-D, WHOQOL-BREF에 의한 남성갱년기 증상 설문조사를 실시하며, 테스토스테론, 성장호르몬, 멜라토닌, 갑상선호르몬, 여성호르몬 및 남성호르몬 전구체인 DHEA 등은 혈액생화학적 방법으로 평가함.

○ 안전성 평가

- 검사실 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사)
- 활력징후 및 신체검진

○ 유효성 평가

- Androgen Deficiency in Aging Males (ADAM)
- International Index of Erectile Function (IIEF)
- Center for Epidemiologic Studies Depression Scale(CES-D)
- World Health Organization Quality of Life assessment instrument (WHOQOL)-BREF
- 테스토스테론 (총 테스토스테론, 유리테스토스테론 및 단백질-결합 테스토스테론)
- 성장호르몬
- 멜라토닌
- 갑상선호르몬
- 에스트라디올
- 디히드로에피안드로스테론
- 진단검사의학검사 결과
- 자율신경기능검사 결과

○ 인체적용시험 모니터링

- 인체적용시험 착수 전, 모니터링 계획을 문서로 수립하며, 모니터요원은 프로토콜 및 CRF, 피험자 동의서, 피험자에게 제공되는 다른 서면정보, 사용되는시험용제품, 임상시험 관리기준 및 관련규정 및 본 연구를 위하여 수립된 모니터링 계획에 따라 모니터링을 실시

○ 제출자료를 바탕으로한 식약처 모듬토의 진행 및 컨설팅 추진

☞ 황칠을 첨가한 개별인정형 건강기능식품 인정을 위한 최종결과 확보

“7 : 고시형 건강기능식품 개발을 위한 세부 추진 연구개발방법 및 목표”

- 황칠나무 및 발효물의 기능성을 활용한 건강지향식품 제품 개발 및 상용화
 - 주관기관은 황칠나무 추출물과 고시형 건강기능식품 원료를 이용하여 황칠을 이용한 건강기능식품 완제품 개발



[그림. (주)새롬 개발 황칠 제품]

- 개발이 완료되어 상용화가 완료된 4개 제품 중 잠정적인 매출 확대가 예상되면서 보완이 필요한 제품을 대상으로 제형(기술적 차별화 : 발효 등) 및 디자인 업그레이드를 통해 황칠나무를 이용한 건강지향 일반식품 중에 스타제품으로 발전할 수 있도록 추진
- 또한 홍콩, 대만, 베트남, 캄보디아, 인도 및 중국을 대상으로 수출전용 황칠나무를 활용한 남성제품을 개발하여 해외 수출 추진
- 국내 판매용으로 황칠나무를 활용한 건강지향 일반식품을 새롭게 개발하여 남성 대상으로 판매가 되는 스타제품으로 마케팅 추진

○ 고시형 기능성 소재를 활용한 건강기능식품 원료 및 제품 개발

- 총괄주관기관은 건강기능식품 원료 및 제품화 시설을 보유하고 있으며 약 80여종의 생산장비를 활용하여 건강기능식품 원료 및 제품을 생산하고 상용화 추진

추출기, 과립기, 캡슐충진기 등 생산 기기 80여종 보유



2. 국내외 기술개발 현황

D-04

가. 국내외 기술개발현황

- 합성 개선 건강기능식품은 이미 국내의 시장에서 다국적 및 대기업이 완제품 생산-판매가 구축되어 있음
- 하지만 해외 시장의 경우, 천연물 유래 남성갱년기 건강기능식품 시장은 아직 활성화 전이며, 국내 시장의 경우, 선점 제품이 존재하나 해당 제품의 시장은 크지 않은 상황임
- 국내외 소비자들도 브랜드 인지도가 높은 기업의 판매제품을 선호하는 경향이 두드러지고 있어, 남성갱년기 건강기능식품 시장 또한, 원료 판매 보다는 완제품 개발 및 판매에 집중이 되어있는 상황임
- 황칠소재의 경우, 지난 5년간 가장 급속도로 성장한 식품소재 시장으로서 황칠나무 자체의 스토리텔링 또한 중요한 홍보 및 판매 전략으로 기대되어짐
- 개발된 건강기능식품을 활용하여 완제품 및 원료를 국내의 다국적 및 대기업에 납품 공급하는 형태로 제품 홍보 전략을 추진하고자 함

나. 국내 기술 및 핵심목표

(1) 타켓시장

- 소비자의 식탁과 책상위로 올라갈 수 있는 당당한 건강기능식품 이미지를 위한 건전한 이미지 메이킹
- 청정 전남의 황칠의 신비로운 스토리텔링을 접목한 천연물 유래 제품 강조
- 기존 제품의 생리활성에만 집중된 BM과 상반되게, 천연물 소재인 황칠의 스토리텔링과 항노화 산업을 접목한 집중적 BM 확립

(2) 핵심경쟁요인

- 기존 남성갱년기 제품의 경우, 구매 촉진을 위한 BM의 부재로 식탁과 책상에 꺼내놓고 소비하기에 남성갱년기 기능성의 특성상 꺼려지는 경향이 존재 하였음
- 자체 구매와 타인에게 선물로서 소매구입이 빈번하게 이뤄지기 위해서는 제품의 기능성이 부끄럽지 않고 당당하며 자연스럽다는 인식을 형성하는 것이 무엇보다 중요하다고 판단함
- 기존 국내 남성갱년기 제품의 경우 소재에 대한 스토리텔링과 소재에 대한 BM의 부재로 소재 자체에 대한 호기심과 기대감 형성이 부족하였다고 판단함
- 현재 황칠나무 소재에 대한 대중의 관심도를 본 제품과 연계하는 것이 무엇보다 중요할 것으로 BM 핵심 방향으로서 제시함

다. 국내 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황



[그림. 국내 최초 남성 갱년기 증상 개선을 위한 개별인정형 건강기능식품]

- 최근 들어 식약처에서 국내 최초로 민들레등 복합추출물의 남성갱년기 증상 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정 사례가 등장하였음
- 민들레와 루이보스 복합 추출물을 이용한 제품으로 한국야쿠르트에서 2014년 4월 1일 제품을 출시하였음
- 민들레등복합추출물은 남성호르몬인 테스토스테론의 양을 증가시켜주며, ADAM를 통한 남성갱년기현상평가를 인체적용시험을 통해 증명하였음
- 최근 들어 여성갱년기 증상에 도움을 주는 제품이 선풍적인 인기를 끌고 있고, 관련 제품 중 백수로 복합추출물을 국내에서 1,000억원 이상의 매출을 이끌고 있으며, 미국 등 해외 수출을 통해 추가적으로 1,000억원 이상의 매출이 발생하는 점으로 미루어 보아, 남성갱년기 건강기능식품 시장은 국내 경쟁대상이 작은 현재 시점에서 매우 큰 파급효과와 시장 선점효과가 발생할 것으로 예상되고 있음

(나) 경쟁구조

- 세계 건강기능식품 시장의 35%이상을 차지하고 있는 국가인 미국의 경우 산수유를 주성분으로 한 L-Arginine, 토마토에서 추출한 라이코펜, 쏘팔메토 추출물 등을 활용한 남성 전립선 건강 소재로 하여 많은 제품이 개발되어 있음
- 국내의 경우 중외제약에서 쏘팔메토와 옥타코사놀, 아연, 비타민B2, 셀렌 등의 복합 영양소가 포함된 남성 전립선 건강 중심으로 하는 제품들이 출시되었음

- 국내에서 개별인정 받은 소재인 전립선 건강에 도움을 주는 쏘팔메토, 배뇨기능 개선에 도움을 주는 호박씨 추출물, 요로 건강에 도움을 주는 크랜베리를 활용한 제품이 출시되고 있으나 쏘팔메토가 대부분의 남성관련 제품 시장을 점유하고 있고, 또한 남성 갱년기 건강을 위해 개발되거나 출시된 제품은 전무한 실정임

			
동국제약	중외제약	동광제약	CJ뉴트라
남성 전립선 건강	남성 전립선 건강	피로회복, 근력강화	남성 전립선 건강

[그림. 국내 남성 타겟 건강기능식품 현황]

	2007년		2008년		2009년		2010년	
	종목명	금액	종목명	금액	종목명	금액	종목명	금액
1	알라리놀레이트 (CLA)	12,617	알라리놀레이트 (CLA)	13,670	황기나뭇잎 추출물	14,526	황기나뭇잎 추출물	48,191
2	코엔자임Q10	7,281	18CA	4,810	18CA	13,988	당귀추출물	8,740
3	황금등하향초	1,601	코엔자임Q10	3,835	쏘팔메토 열매추출물	7,641	대두이소플라본	7,079
4	대나무잎추출물	1,306	대나무잎 추출물	3,746	코엔자임Q10	6,713	쏘팔메토 열매추출물	6,341
5	쏘팔메토 열매추출물	859	당귀추출물	2,226	알라리놀레이트 (CLA)	6,365	우레민	6,124

자료원 : 식품의약품안전청

[그림. 연도별 생산실적 상위 5개 개별인정형 제품]

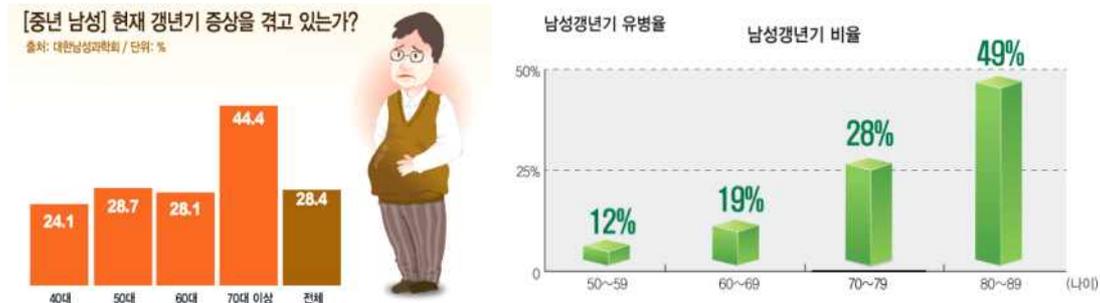
- 그러나 현실적으로는 쏘팔메토 열매추출물 이후 남성 건강을 타겟으로 하는 소재의 발굴 및 기능성 연구의 빈도가 높지 않음
- 그러한 가장 큰 이유는 현재까지 갱년기남성 건강에 관련한 원료의 인정이 정책적으로 배제되어 있었기 때문이었으나, 2014년 최근에 한국 식약처에서도 남성갱년기에 관여한 개별인정형 건강기능식품 원료를 인정한 사례가 발생되었음

(2) 시장진입 장벽

- 국내 시장진입 환경은 경쟁 건강기능식품의 경우, 1개사 1제품이 선점하고 있으나 그 시장의 규모와 장악력(35%)은 비교적 크지 않은 상황임
- 해외 시장의 경우, 세계 건강기능식품 시장의 35%이상을 차지하고 있는 국가인 미국의 경우 산수유를 주성분으로 한 L-Arginine, 토마토에서 추출한 라이코펜, 쏘팔메토 추출물 등을 활용한 남성 전립선 건강 소재로 하여 많은 제품이 개발되어 있으며 선점하고 있는 상황임
- 하지만 아시아 빅마켓인 중국 시장의 경우, 황칠소재에 대한 높은 호감도와 기존 선점하고 있는 남성갱년기 개선 천연물 소재는 리드제품이 부재중인 상황으로 가능성이 높은 상황임

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군



[그림. 남성 갱년기 증상 자각 정도 및 유병률 조사 결과]

- 향 후 갱년기 남성 건강에 도움을 주는 건강기능식품이 개발되었을 경우 직접적인 소비자가 될 40~70세 이상의 남성을 대상으로 설문조사를 한 결과 평균 30% 이상의 남성이 현재 갱년기 증상을 겪고 있다고 응답
- 또한 남성갱년기 발생비율을 조사해본 결과 80세 이상은 무려 50%에 가까운 남성 갱년기 유병율을 보이고 있음
- 이러한 결과에 따라 남성갱년기 증상 예방 및 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개발은 제품 개발의 시급성 및 향 후 제품의 산업화 가능성을 충분히 뒷받침해 주고 있음

(2) BM의 수익창출 방안

- 소비자의 식탁과 책상위로 올라갈 수 있는 당당한 건강기능식품 이미지를 위한 건전한 이미지 메이킹
 - : 자사가 확보한 국내/외 유통망을 활용한 홍보, 마케팅에 있어 남자의 성기능에만 치우치고 왜곡된 남성갱년기에 대한 기본 인식을 탈피하고 남성갱년기에 동반되는 여러 진찰들에 대한 개선 효과를 다각적으로 어필한 ‘남성중심 헬스케어’ 이미지를 강조 활용함
 - : 국내 시장의 경우, 이미지 메이킹과 자사 홍보를 병행 하며 매출을 극대화 할 수 있는 대기업 및 지역방송 ‘홈쇼핑’을 적극 활용할 계획임
- 기존 제품의 생리활성에만 집중된 BM과 상반되게, 천연물 소재인 황칠의 스토리텔링과 항노화 산업을 접목한 집중적 BM 확립
 - : 국내 황칠소재에 대한 호감도와 관심을 이어갈 수 있게 국내 및 국외 고전을 활용한 신비로운 황칠나무에 대한 스토리텔링을 적극 활용하여 광고 및 홍보 마케팅에 접목 시키고자 함

마. 국내연구논문 및 특허 현황

및 성분규명 연구논문	
목	
1	Antitherogenic activity of <i>Dendropanax morbifera</i> essential oil in rats」 - Chung IM, Kim MY, Park WH, Moon HI, 2009 : Pharmazie. 2009 Aug; 64(8):547-9
2	In vitro evaluation of the antiplasmodial activity of <i>Dendropanax morbifera</i> against chloroquine-sensitive strains of Plasmodium falciparum」 - Chung IM, Kim MY, Park SD, Park WH, Moon HI, 2009 : Phytother Res. 2009 Apr 15
3	「상록활엽수 정유성분의 GC/MS 분석」 - 임순성 이연실 김혜민 안영희 신국현 이상현, 2008 : 한국자원식물학회지 21(4) (2008) pp.237~248
4	「황칠나무 추출물의 항산화 기능성에 관한 연구」 - 문창근 석사논문(인제대 첨단산업기술대학원), 2007
5	「Isolation and anticomplement activity of compounds from <i>Dendropanax morbifera</i> 」 - Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH, Lee HK : 『J Ethnopharmacol. 2004 Feb;』 90(2-3):403-8
6	「한국 특산품 황칠의 생리활성 연구」 - 백운봉 박사논문(경희대), 2003
7	「황칠잎의 면역활성기능 증진」 - 이서호 석사논문(강원대), 2003
8	「황칠 성분의 분리 및 분석에 관한 연구」 - 최용환 석사논문(한밭대), 2003
9	「황칠수액 분비 우수개체 선발 및 방향성 정유성분 조사」 - 안준철 외, 2002 : 韓國藥用作物學會誌 제10권 제2호 (2002. 6) pp.126-131 : 韓國藥用作物學會
10	「황칠나무 잎의 면역활성증진 기능 탐색」 - 이서호 외, 2002 : 韓國藥用作物學會誌 10(2) : pp.109-115(2002) : 韓國藥用作物學會
11	「황칠나무 잎 및 종실의 화학적 특성」 - 김형량 정희중, 2000 : 한국농화학회지 43,1 (2000.2) pp.63-66 : 한국농화학회
12	「採取時期에 따른 黃漆나무 잎의 化學性分 變化」 - 金炯良 鄭熙鍾, 1999 : 韓國林學會誌 제88권 제4호 통권127호 (1999. 12) pp.562-567 : 한국임학회
13	「黃漆나무 잎의 化學成分 및 抗微生物 活性」 - 김형량(전남대), 1997
도료 활용 논문	
14	「황칠나무, 붉가시나무, 님나무의 염색조건에 따른 염색특성」 - 조현진, 2007 : 산림과학정보, vol. 195 (Jul. 2007), pp.6-7 : 국립산림과학원
15	「천연도료를 이용한 기능성 고분자의 합성 및 특성 연구」 - 백운창(한밭대 산업대학원), 2004
16	「제주산 참식나무와 황칠나무의 건조스캐폴드 개발」 - 김수원 외, 2003
17	「금속 산화물 센서를 이용한 황칠과 옷질의 패턴 분석」 - 임향주 김홍주 조성동, 2002 : 기초과학연구. 제25집 (2002), pp.49-54 : 조선대학교 기초과학연구소
18	「천연도료의 개발동향 : 옷칠, 황칠, 캐슈 천연도료를 중심으로」 - 김현중 이병후, 2002 : 공업화학전망 제5권 제5호 (2002. 10) pp.35-43 : 한국공업화학회
19	「황칠처리제의 도막 물성 및 내구성」 - 조종수 김종인, 2001 : 한국가공학회지 제12권 제1호 (2001.6)
20	「황칠나무의 생장특성과 산질량에 관한 연구」 - 임도형 석사논문(순천대 대학원), 2001
21	「전통 황칠도료의 경제 및 도막특성」 - 김부근 석사논문(전남대 산업대학원), 2000
22	「黃漆 塗裝處理 板材의 樹種別 塗膜性能」 - 조종수 외, 2000 : 農業技術研究所報 13호 (2000. 2) pp.237-245 : 晉州産業大學校農業技術研究所
23	「황칠(黃漆) : 금속재료를 중심으로 한 색상연구」 - 문구, 1998 : 21세기 48('98.6) pp.71-74 : 光州·全南21世紀發展協議會
24	「黃漆나무의 漆液 分泌 促進」 - 金世炫 外著, 1998 : 韓國林學會誌 제87권 제2호 통권121호 (1998. 6) pp.253-259 : 한국임학회
25	「Paraquat 및 Septobasidium 菌을 利用한 黃칠 樹脂液의 增收效果」 - 趙鍾洙 外, 1994 : 農漁村開發研究 13('94.12) pp.9-15 : 慶尙大學校附設農漁村開發研究所
재배 연구 논문	
26	「황칠나무의 부경근 유도 및 기내증식조건」 - 배기화 외, 2009 : 식물생명공학회지 제36권 제2호
27	「임업경영실태조사 : 옷·황칠 생산업」 - 김재성, 2005 : 산림과학정보, 제166호 (2005. 2), pp.20-21 : 국립산림과학원
28	「한라산 황칠나무 집단의 구조 및 생육동태」 - 김세현 정현관 장용석 김선창, 2004 : 한국자원식물학회지 제17권 제3호 (2004. 10) pp.248-256 : 한국자원식물학회
29	「원도군 황칠나무의 생육특성」 - 최성규, 2003 : 韓國作物學會誌 제48권 제6호 (2003. 12) pp.434-437 : 韓國作物學會
30	「황칠나무의 생장패턴 및 立地環境因子에 關한 研究」 - 朴南昌 外著, 2003 : 山林科學論文集 통권 제66호 (2003. 12) pp.132-144 : 山林廳林業研究院
31	「우리 나라 황칠나무 육종현황」 - 김세현, 2002 : 산림 통권438호 (2002. 7) pp.70-74 : 산림조합중앙회
32	「도양의 理化學的 性質이 暖帶地域의 구실갯나무와 黃칠나무生長에 미치는 影響」 - 姜眞澤 朴南昌 鄭永觀, 2002 : 韓國林學會誌 제91권 제6호 통권144호 (2002. 12) pp.679-686 : 한국임학회
33	「황칠나무(<i>Dendropanax morbifera</i> Lev.) 우수개체의 선발 및 증식에 관한 연구」 - 김민영(전남대 대학원), 2002
34	「황칠나무의 경정배양에 의한 기내번식」 - 최성규 윤경원, 2001 : 韓國作物學會誌 제46권 제6호 (2001. 12) pp.464-467 : 韓國作物學會
35	「TWINSPAN 및 DCCA에 의한 황칠나무림의 群落과 環境의 相關關係 分析」 - 申鉉誌 外著, 2001 : 山林科學論文集 통권 제64호 (2001. 12) pp.14-26 : 山林廳林業研究院
36	「남부 도서지역에서 황칠나무의 과중기에 따른 주요 형질변이」 - 최성규 윤경원, 2001 : 한국 자원식물학회지 제14권 제1호 (2001. 3) pp.60-64 : 한국자원식물학회
37	「해 리보솜 DNA ITS 염기서열 분석에 의한 황칠나무와 일본황칠나무의 계통유전학적 유연 관계」 - 한상현 외, 2000 : 한국유전학회지 22,3(2000.9) pp.257-264 : 한국유전학회
38	「황칠나무와 일본황칠나무에 관한 분자유전학적 연구」 - 한상현 석사논문(제주대 대학원), 2000
39	「황칠나무 分布 林地의 植生構造 및 立地環境」 - 金世炫 外著, 2000 : 韓國林學會誌 제89권 제1호 통권128호 (2000. 3) pp.93-104 : 한국임학회

40	「두릅나무과 식물의 SOD활성과 광계 II의 광화학적 효율에 미치는 온도 스트레스와 Paraquat의 영향」 - 오순자 외, 1999 : 환경생물학회지 「환경생물」 Vol.17 No.2
41	「전통도료자원 황칠나무의 특성과 증식」 - 金世炫, 1999 : 林業情報 94(99.2) pp.48-50 : 林業研究院
42	「황칠나무의 집단구조와 치수의 발생과 생육동태 및 공간분포」 - 정재민 김세현 김삼식, 1998 : 한국 자원식물학회지 제11권 제3호 (1998.8) pp.345-352 : 한국자원식물학회
43	「低溫 및 濕湯浸漬가 황칠나무 種子의 發芽에 미치는 影響」 - 최성규 外著, 1998 : 한국 자원식물학회지 제11권 제1호 (1998. 2) pp.101-105 : 한국자원식물학회
44	「황칠나무 삼목번식에 관한 연구」 - 최성규, 1998 : 韓國藥用作物學會誌 제6권 제4호 (1998. 12) pp.251-257 : 韓國藥用作物學會
45	「PCR-RAPD 분석에 의한 황칠나무(Dendropanax morbifera)와 일본 황칠나무(D.trifidus)유전학적 유연 관계」 - 한상현 外, 1998 : 한국유전학회지 20,3(98.9) pp.173-181 : 한국유전학회
46	「황칠나무의 挿木發根力 增進」 - 金世炫, 1998 : 한국 자원식물학회지 제11권 제2호 (1998. 6) pp.157-162 : 한국자원식물학회
47	「황칠나무의 분포 및 증식특성」 - 김세현, 1998 : 산림 394(98.11) pp.78-83 : 산림조합중앙회
48	「황칠나무(Dendropanax morbifera Lev.)의 생태와 우량개체 선발에 관한 연구」 - 金世炫 박사논문(慶尙大 大學院), 1998
49	「被覆과 庇陰處理가 황칠나무 苗木의 生育에 미치는 影響」 - 金世炫 金榮中, 1997 : 林木育種研究報告 33(97.12) pp.112-118 : 山林廳林木育種研究所
50	「남부 도서지역에서 황칠나무의 주요형질에 미치는 멀칭재료의 효과」 - 최성규, 1996 : 한국 자원식물학회지 제9권 제2호 (1996. 8) pp.177-181 : 한국자원식물학회
51	「남부 도서지역 황칠나무의 자생지 환경 및 생육특성」 - 최성규, 1996 : 韓國藥用作物學會誌 제4권 제1호 (1996. 3) pp.1-6 : 韓國藥用作物學會
52	「黃漆나무의 群落生態學的 研究」 - 김남희 석사논문(全南大 大學院), 1996
53	「황칠나무의 無性増植에 關한 研究」 - 鄭琬洙, 1995 : 建國大學校學術誌 39(95.2) pp.329-333 : 건국대학교
54	「황칠나무의 種子發芽 및 苗木의 生育密度에 關한 研究」 - 金世炫 外, 1995 : 林木育種研究報告 31(95.12) pp.112-118 : 山林廳林木育種研究所
55	「황칠나무 選拔集團의 葉形質 變異」 - 金世炫 外, 1994 : 林木育種研究報告 30(94.12) pp.75-84 : 山林廳林木育種研究所

보고서

56	「황칠의 안정적 생산기술개발 및 황칠나무 기원의 생리활성물질 탐색」 - 전남대 연구보고서(농림부 발행), 2003
57	「황칠나무 자원 이용 기술의 개선 및 활용 방안의 다양화 : 2차년도」 - 전남대 연구보고서(과학기술처 발행), 1996
58	「황칠나무 자원 이용 기술의 개선 및 활용 방안의 다양화 : 1차년도」 - 전남대 연구보고서(과학기술처 발행), 1995
59	「조선철의 한 특성에 관하여 : 문헌상의 황칠을 중심으로」 - 이종식, 1979 : 「고고미술」 143,144호 - 「한국의 전통공예」 에 수록
60	「문헌에 나타난 백제산업」 - 홍사준, 1972 : 「백제연구」 제3집, 충남대학교

황칠 관련 특허 분석

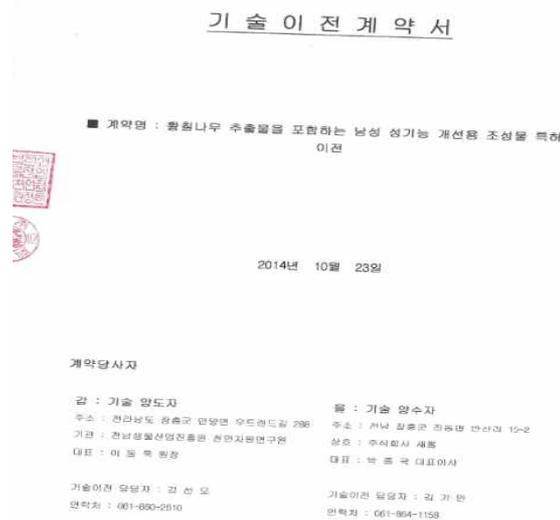
61	「황암활성을 가지는 황칠나무 추출물」 등록특허10-0318019-0000(2001.12.06)
62	「간세포 보호 효과를 갖는 황칠 추출물, 황칠 분획물 및 이들을 함유한 약학 조성물」 등록특허10-0494482-0000(2005.06.01)
63	「에탄올 유발 간손상을 억제하는 황칠 추출물」 공개특허10-2003-0038494(2003.06.14)
64	「경조직 재생 및 증식 효과를 가지는 황칠 추출물, 황칠 분획물 및 이들을 함유한 약학 조성물」 등록특허10-0457970-0000(2004.11.10)
65	「피부 미백 효과가 있는 황칠 추출물과 황칠 분획물」 공개특허10-2004-0107853(2004.12.23)
66	「생리활성이 뛰어난 황칠나무의 종실추출물」 등록특허10-0663284-0000(2006.12.22)
67	「황칠을 이용한 티백의 제조방법」 등록특허10-0405337-0000(2003.10.31)
68	「황칠 원액을 이용한 건강음료의 제조방법」 등록특허10-0441645-0000(2004.07.14)
69	「황칠덕우차 및 그 제조방법」 등록특허10-0835868-0000(2008.05.30)
70	「황칠나무 성분을 포함하는 김이나 김자반 및 그 제조방법」 공개특허10-2008-0086745(2008.09.26)
71	「살균 및 제독기능을 가지는 황칠회접시」 등록특허20-0432497-0000(2006.11.28)
72	「황칠의 다량채취 방법 및 채취하기 위한 이식판」 등록특허10-0199688-0000(1999.03.05)
73	「황칠이 함유된 합성 도료의 제조 방법」 등록특허10-0199689-0000(1999.03.05)
74	「은제품용 고온 경화형 천연 황칠도료의 제조방법」 등록특허10-0315096-0000(2001.11.06)
75	「황칠수지액으로부터 황칠 도료 및 정향 성분을 분리 정제하는 방법」 등록특허10-0614077-0000(2006.08.11)
76	「도료용 황칠의 분리 정제방법」 등록특허10-0186682-0000(1998.12.29)
77	「한지를 이용하여 제작된 경량 용기 및 그 제작방법」 공개특허10-2009-0022271(2009.03.04)
78	「황칠과 옷칠의 혼합 제조방법 및 옷황칠」 등록특허10-0801583(2008.01.30)

3. 연구수행 내용 및 결과

D-05

1. 선행연구(황칠성기능개선)특허 기술이전

- 황칠 성기능 개선 특허 기술이전 완료
 - 행사명 : 황칠 성기능 개선 특허 기술 이전식
 - 일시 : 2014년 10월 23
 - 장소 : 천연자원연구원 세미나실
 - 참석대상: (주)새롬 대표이사 외
- 행사사진



기술이전 계약서 및 사진

2. 구축된 “황칠 생산자 연합회” 와 연합 협의회 개최

가. 1차 황칠 생산자 연합회 개최

○ 개요

- 일시 : 2015. 01. 20.(수)
- 장소 : 장흥(천연자원 연구원 세미나실)
- 목적 : 황칠 생산자 연합회 개최를 통한 황칠 원물 판매/수급 동향 파악 및 지원
- 참석자 : 전남지역 황칠 생산자 및 기업

○ 주요내용

- 황칠 나무 재배농가들과 기업간의 정보교류 및 공유
- 황칠나무 원물의 안정적인 공급에 필요 설명
- 황칠나무 원물단가 적정선 협의 및 원물가격 표준화
- 제품의 공신력 향상 및 고품질 개발을 위한 황칠 재배의 중요성 강조
- 애로사항 점검



<황칠생산자 연합회와 협의회>

나. 2차 황칠 생산자 연합회 개최

○ 개요

- 일시 : 2016. 05. 20.(금)
- 장소 : 완도
- 목적 : 황칠 생산자 연합회 개최를 통한 황칠 원물 판매/수급 동향 파악 및 지원
- 참석자 : 완도군 생산농가 및 관련 공무원

○ 주요내용

- 황칠 원물의 활용 (제품개발, 생리활성, 표준화) 소개
- 황칠 농가 네트워크 구성 및 개발기업과 농가 연계를 위한 소매 현황 파악
- 황칠나무 원물단가 적정선 협의 및
- 제품의 공신력 향상 및 고품질 개발을 위한 황칠 재배의 중요성 강조
- 애로사항 점검



다. 3차 황칠 생산자 연합회 개최

○ 개요

- 일시 : 2017. 02. 09. (목)
- 장소 : 여수 디오션리조트
- 목적 : 황칠 생산자 연합회 초청 및 원물 판매/수급 동향, 산업구조 파악
황칠명품화육성 RIS사업단 사업기간 성과홍보
우수수혜기업 및 지자체 감사패 전달
- 참석자 : 장흥, 고흥, 진도 지역 생산농가 (14개),
수혜기업 20개 업체, 바이어 및 전문가 10여명

○ 주요내용

- 황칠 원물의 활용 (제품개발, 생리활성, 표준화) 소개
- 황칠 생산자 및 제품가공업체 실무자 연계 토론
- 제품의 공신력 향상 및 고품질 개발을 위한 황칠 재배의 중요성 강조
- 애로사항 점검



○ 황칠 생산자 연합회 구성

시·군	주소	재배자	면적(평)	수목 합계
장흥군	장흥군 관산읍 외동 1구 산 145번지	주재용	13,000	313,500
	장흥군 용산면	아침재		
	장흥군 관산읍 외동 2구 산 150번지	전명례		
	장흥군 대덕읍 연지리	김종필		
	장흥군 부산면 사거리 파출소 앞	이성진		
	장흥군 세진 신상리	이요숙		
	장흥군 용산면	주재용		
	장흥군 잔동면	이광섭		
	장흥군 화산면 석전리	박진우		
	장흥군 안양면 기산리	김재현		
	장흥군 안양면 회진면	김우현		
해남군	해남군 나산면 화내리 380	김종수	15,000	311,500
	해남군 북일면 만수리 543-1	정현오		
	해남군 삼산면 매정리	이기춘		
	해남군 현산면 구시리 138 해남읍 구교리 138-1	이천균		
	해남군 화산면 금풍리 365-4	양동환		
	해남군 화산면 방축리 469-1	손기환		
	해남군 화원면 근평리 243-3	명천식		
	해남군 화원면 영호리 526	신규철		
	해남군 해남읍 구교리 138-2 (제일농원)	고돈원		
	해남군 삼산면	지원형		
해남군 황산면	고은철			
완도군	완도군 노화읍 포전리 385-14	이명문	21,300	431,300
	완도군 보길면 부용리 462-1	박호섭		
	완도군 보길면 부항리	박온석		
	완도군 보길면 부항리	이정대		
	완도군 보길면 부항리 417-9	윤장하		
	완도군 완도읍	김형일		
	완도군 보길면 부항리 부용마을 438	박권재		
	완도군 신지면 입촌리 대봉리 392-8	김창석		
완도군 완도읍 죽도리 1328	박석용			
고흥군	고흥군 영남면 우두리	이선화	5,000	110,800
	고흥군 고흥읍 남계리 423-3	박양영		
	고흥군 두원면 용산리 와룡길 22-21번지	박상섭		
	고흥군 영남면 우두리	박양규		
고흥군 점암면 화계리 396	홍두표			
여수시	여수시 돌산읍 신복리 347-1	김용호	9,000	22,800
	여수시 소라면 관기리 47번지	김의경		
진도군	진도군 진도읍 동외리	이창석	7,000	54,200
	진도군 군내면 둔전리	곽재정		
	진도군 진도읍 해창리	우수영		
	진도군 진도읍 동외리	김성철		
	진도군 의신면 만길리 1106	허경옥		
	진도군 진도읍 동외리 1160-1	산림조합		
	진도군 진도읍 동외리 1160-1	허용범		
	진도군 진도읍 동외리 한국 A 101호	김성식		
	진도군 진도읍 해창리 543-3 (진도스케치)	이광준		
	진도군 진도읍 동외리	이광철		
	진도읍 동의리 122	이종연		
	진도군 고군면	우형철		
진도군 진도읍 동외리 1160-1	오상현			
강진군	강진군 군동 농고	고성정	1000	25,000
	강진군 군동 농고	임용택		

○ 황칠 생산자 연합회 구성

시·군	주소	재배자	면적(평)	수목 합계
장흥군	장흥군 관산읍 외동 1구 산 145번지	주재용	13,000	313,500
	장흥군 용산면	아침재		
	장흥군 관산읍 외동 2구 산 150번지	전명례		
	장흥군 대덕읍 연지리	김종필		
	장흥군 부산면 사거리 파출소 앞	이성전		
	장흥군 세진 신상리	이요숙		
	장흥군 용산면	주재용		
	장흥군 잔동면	이광섭		
	장흥군 화산면 석전리	박진우		
	장흥군 안양면 기산리	김재현		
	장흥군 안양면 회진면	김우현		
해남군	해남군 나산면 화내리 380	김종수	15,000	311,500
	해남군 북일면 만수리 543-1	정현오		
	해남군 삼산면 매정리	이기춘		
	해남군 현산면 구시리 138 해남읍 구교리 138-1	이천균		
	해남군 화산면 금풍리 365-4	양동환		
	해남군 화산면 방축리 469-1	손기환		
	해남군 화원면 근평리 243-3	명천식		
	해남군 화원면 영호리 526	신규철		
	해남군 해남읍 구교리 138-2 (제일농원)	고돈원		
	해남군 삼산면	지원형		
해남군 황산면	고은철			
완도군	완도군 노화읍 포전리 385-14	이명문	21,300	431,300
	완도군 보길면 부용리 462-1	박호섭		
	완도군 보길면 부항리	박온석		
	완도군 보길면 부항리	이정대		
	완도군 보길면 부항리 417-9	윤장하		
	완도군 완도읍	김형일		
	완도군 보길면 부항리 부용마을 438	박권재		
	완도군 신지면 입촌리 대봉리 392-8	김창석		
완도군 완도읍 죽도리 1328	박석용			
고흥군	고흥군 영남면 우두리	이선화	5,000	110,800
	고흥군 고흥읍 남계리 423-3	박양영		
	고흥군 두원면 용산리 와룡길 22-21번지	박상섭		
	고흥군 영남면 우두리	박양규		
	고흥군 점암면 화계리 396	홍두표		
여수시	여수시 돌산읍 신복리 347-1	김용호	9,000	22,800
	여수시 소라면 관기리 47번지	김의경		
진도군	진도군 진도읍 동외리	이창석	7,000	54,200
	진도군 군내면 둔전리	곽재정		
	진도군 진도읍 해창리	우수영		
	진도군 진도읍 동외리	김성철		
	진도군 의신면 만길리 1106	허경옥		
	진도군 진도읍 동외리 1160-1	산림조합		
	진도군 진도읍 동외리 1160-1	허용범		
	진도군 진도읍 동외리 한국 A 101호	김성식		
	진도군 진도읍 해창리 543-3 (진도스케치)	이광준		
	진도군 진도읍 동외리	이광철		
	진도읍 동의리 122	이종연		
	진도군 고군면	우형철		
진도군 진도읍 동외리 1160-1	오상현			
강진군	강진군 군동 농고	고성정	1000	25,000
	강진군 군동 농고	임용택		

라. 황칠나무 생산자-기업간 황칠나무 구매연계

○ 황칠나무 구매연계

- 2016년 황칠나무 생잎 기준 12.6톤 구매 연계
- 기업지원 수혜기업 6.1톤 및 전문 원물구매업체(산야초) 6.5톤, 총 12.6톤 구매 연계
- 사업단 연계 구매매출: 73,112,000원 발생
- 구매지역: 진도군 진도읍 동외리, 장흥군 용산면, 완도군 보길도 일원

○ 1차년도(2015년) 황칠나무 구매연계

일자	품명	규격명	단위	단가 (원)	수량	합계금액 (원)	구매업체	비고
2015.3.4	황칠건잎	국내산	kg	25,000	310	7,800,000	S2S홀딩스	구매전문업체
2015.3.6	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.3.12	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.4.27	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.6.22	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.8.27	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.9.3	황칠건잎	국내산	kg	25,000	100	2,500,000		
2015.10.7	건황칠나무 가지	국내산	kg	70,000	450	31,500,000		
2015.11.25	황칠건잎	국내산	kg	10,000	100	1,000,000		
2015.3.12	황칠건잎	국내산	kg	20,000	7	140,000		
합계			생잎기준 : 14,600 kg		55,440,000			

○ 2016년 황칠나무 수매연계

번호	품명	규격명	단위	단가 (원)	수량	합계금액 (원)	수매업체	비고
1	황칠목	국내산	kg	20,000	330	6,600,000	에이치푸드	
2	황칠건잎	국내산	kg	40,000	85	3,400,000	나무숲농원	
3	황칠건잎	국내산	kg	30,000	100	3,000,000	황칠과비파 이야기	잔가지포함
4	황칠건잎	국내산	kg	86,000	13	1,118,000	장흥농산물	20년생 이상
5	황칠건잎	국내산	kg	85,000	23	1,955,000	대신농원	20년생 이상
6	황칠생잎	국내산	kg	13,800	140	1,932,000	장흥농산물	20년생 이상
7	황칠건잎	국내산	kg	83,500	42	3,507,000	강원약초	20년생 이상
8	황칠생잎	국내산	kg	8,000	1,000	8,000,000	산야초	수매 전문업체
9	황칠생잎	국내산	kg	8,000	2,000	16,000,000	산야초	
10	황칠생잎	국내산	kg	8,000	1,500	12,000,000	산야초	
11	황칠생잎	국내산	kg	7,800	2,000	15,600,000	산야초	
합계			생잎기준 : 12,570 kg		73,112,000			

2. 황칠을 이용한 건강기능식품 개별인정 원료 생산 및 원료 판매를 위한 대량생산 표준화

○ 황칠의 제품표준화 및 건강기능식품으로 인정받기 위해서는 원물인 황칠의 추출공정 및 원료표준화가 필수적인 상황으로 (주)새롬에서는 황칠원료의 식품원료로서 사용을 위하여 원료 표준화하기 위하여 대량 추출 및 농축기술을 개발하여 원료소재화 및 수혜기업 공급하고 건강 기능 식품의 원료로 사용하고자 한다.

□ 원료소재 대량기술개발 방향 설정

○ 설정 방향

- 황칠 부위별(잎, 줄기) 최적 추출조건 탐색
- 열수 추출법과 농축기술을 이용한 제품 표준화
- 황칠 농축물을 진공건조기와 동결건조기를 사용하여 분말화 공정 개발

○ 설정 근거

- 황칠의 제품표준화가 안되어 시중 판매제품의 기능성 입증 및 발휘가 어려움
- 개별인정형 건강기능식품으로서 대기업 원료 공급

□ 황칠 열수 추출물 제조공정

○ 공정 순서

- 황칠나무 부위별(잎, 가지) 추출비율 설정 및 표준화
- 황칠 잎과 가지를 100%~30%까지 혼합 추출하여 수율 비교 및 지표성분 함량 측정
- 황칠 추출시 온도조건 표준화(50℃ ~ 100℃)
- 황칠 추출시 가수량 표준화(10배수 ~ 20배수)

□ 원료생산 및 제품화

- 황칠 추출액의 농축조건 설정(온도, 증발량등)
- 비율별 농축액의 지표성분 함량 측정하여 가장 효율적인 농축조건 설정
- 농축물 제조 표준화 및 제품화를 위한 품목신고
- 분말화 공정 수립(동결건조, 진공건조, SD)

가. 황칠나무 부위별(잎, 가지)추출비율 설정

- 황칠나무를 이용한 추출비율을 설정하기 위하여 황칠나무 잎과 가지를 비율별로 섞어서 열수 추출 실험하였다. 추출실험 결과 잎과 가지를 섞어서 사용한 시료군에 비하여 황칠잎만 100% 사용한 시료군이 원물 원료비용 대비 수율 및 지표성분 함량이 우수하여 황칠잎만 100%사용하는 것이 산업적으로 우수할 것으로 판단되었다.

- 황칠나무 부위별(잎, 가지)추출 결과

황칠 원물		원료투입량 (kg)	가수량 (L)	가열시간 (hour)	온도 (℃)	최종수율 (%)	Brix	원료가격
잎	가지							
20	80	5kg	95	8	90	80.21	0.5	22만원
50	50	5kg	95	8	90	80.10	1.0	32.5만원
80	20	5kg	95	8	90	80.13	1.3	43만원
100	0	5kg	95	8	90	80.50	1.6	50만원

※ 원료가격 : 황칠잎(kg당 100,000원, 가지 kg당 30,000원)예상

나. 황칠잎을 사용한 온도조건 설정

- 황칠잎을 사용한 황칠 추출에 사용할 온도조건 표준화를 위한 온도조건 설정실험결과 황칠은 90℃에서 추출했을 때 농도가 1.60으로 가장 높게 나와 90℃이상으로 추출하는것이 가장 효과적일 것으로 판단되었다.

- 황칠잎을 사용한 온도조건 설정

황칠 원물	원료투입량 (kg)	가수량 (L)	가열시간 (hour)	온도 (℃)	최종수율 (%)	Brix	비고
잎							
100%	5kg	95	8	70	80.10	1.40	
100%	5kg	95	8	80	80.14	1.54	
100%	5kg	95	8	90	80.20	1.60	

다. 황칠잎을 사용한 추출시간 설정

- 황칠잎을 사용한 추출시간 설정

황칠잎을 사용한 황칠 추출에 사용할 추출시간 표준화를 위한 추출조건 설정실험결과 황칠은 8시간에서 추출했을 때 농도가 1.62로 나왔으며 8시간이후 추출을 더 하게되면 농도는 높아지지만 시간대비 연료소비량이 높아져 경제성이 떨어지는 것으로 판단되었다. 따라서 황칠잎의 추출은 8시간정도가 적당한 것으로 판단된다.

황칠 원물 잎	원료투입량 (kg)	가수량 (L)	가열시간 (hour)	온도 (°C)	최종수율 (%)	Brix	비고
100%	5kg	95	5	90	79.80	1.40	
100%	5kg	95	8	90	80.01	1.62	
100%	5kg	95	10	90	80.30	1.65	
100%	5kg	95	15	90	80.15	1.68	

라. 황칠잎을 사용한 가수량 조건 표준화

- 황칠잎을 사용하여 열추출시 가수량을 표준화 하기 위하여 가수량 조건 표준화 설정실험을 한 결과 황칠잎이 충분히 잠기는 가수량은 황칠양의 20배수를 기본으로 하여 25배수, 30배수의 물을 첨가하여 추출하고 이를 30brix로 농축하여 각각의 수율을 비교하였다. 수율 비교 결과 아래와 같이 계산되어 추출양 및 에너지효율로 경제성을 비교하였을 때 물은 25배수 이상 첨가하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

- 1.잎 (100%) 황칠 5kg+물 100L 90°C0°C시간 추출
1.6brix 70L 30brix농축 = 3.7L
- 2.잎 (100%) 황칠 5kg+물 125L 90°C0°C시간 추출
1.2brix 95L 30brix농축 = 3.8L
- 3.잎 (100%) 황칠 5kg+물 150 L 90°C0°C시간 추출
1.0brix 120L 30brix농축 = 4.0L

마. 최적 추출방법을 이용한 황칠의 공정단계에서의 추출

(1).최적 추출방법을 사용한 시료별 pilot 단계 추출

- 최적의 추출방법을 사용하여 이를 공정 표준화 하기 위하여 시료별 pilot 단계에서 추출실험을 시행하였다. 300L 용량의 가압추출기를 사용하여 황칠을 최적조건으로 투입하고 최적시간 추출하여 추출물의 농도(brix) 함량을 측정하여 기존 데이터와 비교하여 공정표준화 하였다

(2) 최적 추출방법을 사용한 시료별 대용량(3ton) 추출

- pilot 실험의 결과를 바탕으로 (주)새롬에서 보유하고 있는 생산용 장비인 3ton 추출기를 사용하여 대용량 추출하였다. 황칠을 최적조건으로 투입하고 최적시간 추출하여 추출물의 농도(brix)를 측정하여 기존 데이터와 비교하여 공정표준화 하였다

o 최적 추출방법을 사용한 시료별 pilot 단계 추출

- 황칠 추출물 pilot 생산

제 조 공 정	제 조 방 법	공 정 도
입 고	① '발주서' 와 납품된 원료가 일치 하는지 확인 ② ①항을 오염이 되지 않도록 별도 공간에서 시행 ③ 검수된 원료 '시험대기' 라벨 부착 ④ 원료 '시험성적서' 확인	<pre> graph TD A[입고] --> B[검체 및 검사] B --> C[보관] C --> D[제조지시] D --> E[칭량] E --> F[추출] F --> G[반제품] </pre>
검 체 및 검 사	① 품질관리부서에 원료 시험의뢰 ('원료시험의뢰서' 작성) ② 품질관리 담당자 검체 채취 (크린벤치 에서 시행) ③ 원료에 '시험 중' 라벨 부착 ④ 적부판정 후 품질관리부서에서 제조관리부서에 통보 ⑤ 적합 시 '적합' 라벨 부적합시 '부적합' 라벨 부착	
보 관	① 기준규격에 적합한 원료는 원료보관창고에 보관 ② 부적합 발생시 반품	
칭 량	① '제조지시서' 에 의해 원료 불출(拂出) ② '원료입출고대장' 과 불출(拂出) 된 원료 확인 ③ '제조칭량지시서' 에 의하여 원료 칭량 ④ 칭량된 원료를 부직포 여과포에 넣어 추출기로 이송	
추 출 기 투 입	① 황칠 원료를 추출기에 투입하고, 가수한뒤 최적 온도에서 최적시간 추출	
제 품	① 최종제품에 대한 최종농도 확인후 출고 및 시험	

- 위와 같은 방법으로 황칠 추출물을 파일럿 생산하고 이의 최종수율 및 브릭스 농도는 아래 표와 같다. 10kg을 투입 후 약100℃에서 24시간 추출하였고 이에 최종수율은 가수량을 대비하여 표기하였다 황칠의 최종수율은 81.23% Brix는 1.54%, 나와 실험실에서 실험한 결과와 비슷한 결과를 보였으며 이같은 방법을 사용하여 대량추출실험 하였다.

- 황칠의 pilot 생산조건 과 최종수율 및 Birx 농도

	원료투입량 (kg)	가수량 (L)	가열시간 (hour)	온도(°C)	최종수율 (%)	Brix	비고
황칠	10	200	8	90	81.23	1.54	

o 최적 추출방법을 사용한 시료별 대용량 추출

- 황칠 추출물 대량 생산 공정

제조공정	제조방법	공정도
입 고	① ‘발주서’ 와 납품된 원료가 일치 하는지 확인 ② ①항을 오염이 되지 않도록 별도 공간에서 시행 ③ 검수된 원료 ‘시험대기’ 라벨 부착 ④ 원료 ‘시험성적서’ 확인	<pre> graph TD A[입고] --> B[검체 및 검사] B --> C[보관] C --> D[제조지시] D --> E[칭량] E --> F[추출] F --> G[반제품] </pre>
검체 및 검사	① 품질관리부서에 원료 시험의뢰 (‘원료시험의뢰서’ 작성) ② 품질관리 담당자 검체 채취 (크린벤치 에서 시행) ③ 원료에 ‘시험 중’ 라벨 부착 ④ 적부판정 후 품질관리부서에서 제조관리부서에 통보 ⑤ 적합 시 ‘적합’ 라벨 부적합시 ‘부적합’ 라벨 부착	
보 관	① 기준규격에 적합한 원료는 원료보관창고에 보관 ② 부적합 발생시 반품	
칭 량	① ‘제조지시서’ 에 의해 원료 불출(拂出) ② ‘원료입출고대장’ 과 불출(拂出) 된 원료 확인 ③ ‘제조칭량지시서’ 에 의하여 원료 칭량 ④ 칭량된 원료를 부직포 여과포에 넣어 추출기로 이송	
추출기 투입	① 황칠 원료를 추출기에 투입하고 가수한뒤 최적 온도에서 최적시간 추출	
제 품	① 최종제품에 대한 최종농도 확인후 출고 및 시험	

- 위와 같은 방법으로 황칠 추출물을 대량 생산하고 이의 최종수율 및 브릭스 농도는 아래 표와 같다. 100kg을 투입 후90℃에서 8시간 추출하였고 이에 최종수율은 가수량을 대비하여 표기하였다. 황칠잎의 최종수율이 80.02% Brix는 1.59%로 나와 파일럿 실험에서와 비슷한 결과를 보였으며 이 같은 방법을 사용하여 실제 생산시 표준화하고 제조공정에 사용하기로 결정하였다

- 황칠 추출물의 대량 생산조건 과 최종수율 및 Birx 농도

	원료투입량 (kg)	가수량 (L)	가열시간 (hour)	온도 (°C)	최종수율 (%)	Brix	비고
황칠	100	2000	8	90	80.02	1.59	



50L 실험실용 추출농축기



3000L 생산용 추출기

- 황칠 농축물 제조에 사용한 50L 추출기 및 3000L 추출기 및 농축기

바. 황칠 추출물의 원료소재를 위한 농축 및 건조

(1) 황칠 추출물 대량 농축 및 건조 공정

- 대용량(700L) 감압 농축기를 사용하여 농축

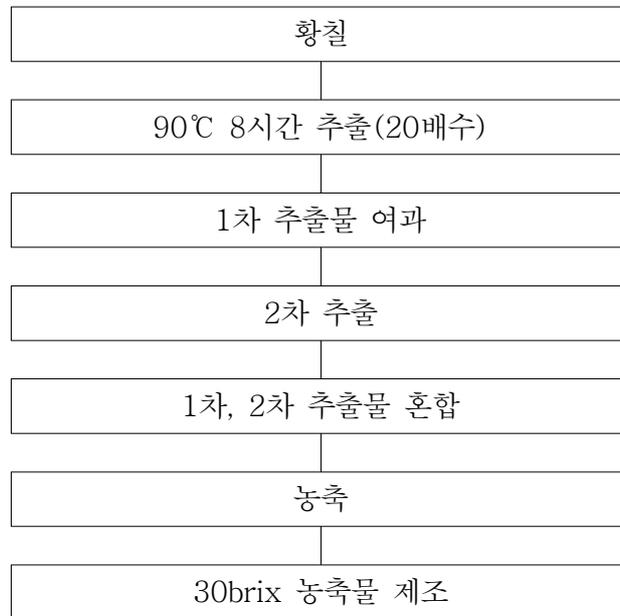
다양한 제형개발과 제품의 표준화를 위하여 실험실용 감압 농축기를 사용하여 실험한 결과를 바탕으로 황칠 추출물 500L를 대형 농축기로 농축한 결과 용량 25.5L, 농도 30.1brix의 결과를 보였다. 따라서 이와 같은 결과를 바탕으로 농축물을 제조하여 제형개발 및 제품을 표준화 하였다.

- 대용량 감압 농축기를 사용하여 농축한 황칠농축액의 수율 및 농도

	시료량(L)	온도	최종수율(L)	brix	비고
황칠추출물 1차	500	60.5	25.5(L)	30.1	
황칠추출물 2차	500	60.1	24.7(L)	30.1	
황칠추출물 3차	500	60.5	25.0(L)	30.2	

사. 시제품 제조를 위한 원료성 제품제조

- 황칠의 추출 그리고 농축실험 결과 황칠의 추출물은 30brix이상 농축되어 냉동유통을 통하여 원료유통을 할 수 있을것으로 판단되었으며 이를 바탕으로 황칠추출물을 식품 원료화 및 표준화 하기 위하여 황칠 추출물(농도 30brix)이상으로 농축하여 원료성 제품을 제조하고 품목신고 하였다



- 황칠 농축물 제조 공정도

※ 황칠 추출분말 제조 방법

- 황칠 추출분말은 (주세롬 에서 보유한 동결건조기, 진공건조기, 스프레이 드라이 건조기를 사용하여 추출물을 건조하여 획득하였다. 3가지 건조방법중 가장효과적인 방법은 진공건조였으며 SD 건조방식은 부형제가 20%정도 혼합되어야 하기 때문에 임상시험 섭취량인 1g을 초과하게 되는 문제가 발생되었다. 따라서 황칠분말제조는 진공건조방식을 사용하여 제조하는 것이 효과적일 것으로 판단되나 향후 원료소비량이 많이 지면 S/D방식도 검토하고 건조법을 그에따른 건조법을 확립하였다.

황칠 농축액
원심분리(연속식)
황칠+덱스트린(80:20) 혼합
SD(50℃, 30kg/day)
건조물 획득

- S/D 황칠 추출분말 제조공정도

황칠 농축액
진공건조기 투입(360kg)
60℃ 24h~48h 건조
분쇄
건조물 획득

- 진공건조 황칠 추출분말 제조공정도.



S/D



진공건조기

-분말제조에 사용한 S/D 및 진공건조기 장비사진

아. 황칠나무 추출물 제조기록서

PRODUCTION ADMINISTRATION RECORD
생산관리기록서

구분	기타가공식품	제품명	황칠나무추출물(국내산)	제조일자	2014.11.03	
제조번호	1141103	제조단위	160,000g	제조지시일	2014.11.03	
포장단위	20g*1봉	사용기간	2년			
생산	미공백작성					
구분	직접	공정	이론생산량(a)	생산량(b)	관리수율(%)	실제수율(b/a*100)
제조	수출	36,800,000g	36,800,000g	-	-	-
	판매	160,000g	-	-	-	-
포장비율	포장	20g*1봉	36,800,000g	-	-	99.99

특기사항
1. 이론생산량 및 생산량 표기시 총합계량은 "그램(g)"으로 표시하고 황칠 공백률 "참"으로 표시하여 포장공정은 포장되어진 숫자로 표시한다.
2. 공백률로 수출을 계산하였을때 생산수율(%)에 벗어남되는 공백률로 이체사항에 기록한다.

PRODUCTION ORDER
제조지시서

구분	기타가공식품	제품명	황칠나무추출물(국내산)	제조일자	2014.11.03		
제조번호	1141103	제조단위	160,000g	제조지시일	2014.11.03		
포장단위	20g*1봉	사용기간	2년				
생산	미공백작성						
종	원	양	규격	비율(%)	허용량(g)	기준량(g)	사용량(g)
황칠나무(일,가치)		10.00	200	100.000	1,600,000	1,600,000	
정제수		90.00	1,800	35,200.000	35,200,000	35,200,000	

2쪽

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (II)

직업실명	수출,농축실	제품명	황칠나무추출물(국내산)	제조번호	1141103
공정명	수출	제조단위	160,000g	직업일자	2014.11.03
생산	미공백작성			온도/습도	
공정명	직업명	공정	기척사항	직업자	확인자
1. 수출준비	1) 장량공정 기록이 끝나면 세척,선발 후 부차포에 넣고 라벨을 작성하여 용기 상단에 부착한다. 2) 수출기인 정결물 확인할 것. 3) 기개의 이상 여부를 확인할 것. 4) 자열을 반영 할 것. 5) 실내 온/습도를 점검 할 것. 6) 작업자의 복장용 깨끗이 할 것.		확인	김양현, 박민현	
2. 정제	1) 분리를 보정된 자열로 온도에 맞게 정제한다.		확인		
3. 수출	1) 수출 이력 기록을 수출기에 넣고 수출한 (2회) 황칠나무(일,가치) 890,000 g 정제수 17,600,000 g 수출수: 36,800,000g 수출입력: 36.8 수출온도: 100°C 수출시간: 2시간		확인	김양현, 박민현	
수출	이론생산량 (a) 36,800,000g	수출생산량 (b)	공정수율 (b/a*100)	생산수율 (b/a*100)	L O S - - -

4쪽

원료청량기록서 1

직업실명	원료청량실	제품명	황칠나무추출물(국내산)	제조번호	1141103				
공정명	원료청량	제조단위	160,000g	직업일자	2014.11.03				
생산	미공백작성			온도/습도					
시행번호	원	명	기준량	단위	사용량	비율(%)	허용량	확인자	확인자
	황칠나무(일,가치)		1,600,000	g	1,600,000	100.000	1,600,000	✓	✓
	정제수		35,200,000	g	35,200,000	100.000	35,200,000	✓	✓
	계		36,800,000	g	36,800,000	100.000	36,800,000		

특기사항
1. 불충족하는 청량률 한 * 사용량에 수치를 기입한 후 V를 표시한다.
2. 불충족하는 각 항목별로 청량률 중앙부 확인 한 후 V를 표시한다.

3쪽

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (II)

직업실명	수출,농축실	제품명	황칠나무추출물(국내산)	제조번호	1141103
공정명	수출	제조단위	160,000g	직업일자	2014.11.03
생산	미공백작성			온도/습도	
공정명	직업명	공정	기척사항	직업자	확인자
1. 원료사정	1) 작업장 및 기계기는 청결하며 관리상태가 되어 있는가? 2) 작업복 및 발의는 보충구는 청결한 상태로 착용하고 있는가? 3) 원료제품 시 본인이 호흡기용 용이하지 않도록 보충구 착용. 4) 방화복 상단부 0.1m 보충시 단속되지 않도록 상단부 덮어 보전. 5) 모든 발달 제품은 양이각은 경우 20mm이하로 피고려어 사용한다.		확인	김양현, 박민현	
1. 이송	1) 이송 수출된 수출액을 농축기로 이송한다.		확인	박민현	
2. 이송	1) 이송 수출된 수출액을 농축기로 이송한다.		확인	김양현	
2. 농축	1) 농축 황칠나무(일,가치)를 30bar로 농축한다. 농축온도: 100°C 농축압력: 3.0MPa ~ 1.0MPa 농축시간: 1시간		확인	김양현	
공정명	직업명	공정	기척사항	직업자	확인자
3. 출생	1. 기준수출량을 산출한다. 1) 일 PMS작업기 103*4회로 측정으로 평균 PMS작업기 일 PMS작업기 (1.140g) 2) 기준수출량(36.8 - 일 PMS작업기 무게 (1.140g)) 3) PMS작업기 기준량 (1.140g)		확인	김양현, 박민현	
수출	수출생산량 (a) 36,800,000g	수출생산량 (b)	공정수율 (b/a*100)	생산수율 (b/a*100)	L O S - - -

5쪽

3. 진공 건조

작업일	작업자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 설비 및 기구
2014. 11. 10	김우익	노원진	유재근	열풍 건조기

No	공정 중 주의 사항	확인자	작업자 확인		
1	건조기 청소상태 및 청결상태 확인		○		
2	건조내용				
	건조시작	건조종료	건조시간	실온온도(°C)	건조자
	2014. 11. 10. 08:00	2014. 11. 10. 20:00	1시간	66.0	김우익
3					
4					

공정 중 검사

평가 방법 : 양호(○) 불량(×) 중립(△)

가	준	평가	작업자 확인
건조실	청결상태 유지	○	김우익
건조기	청소상태 유지	○	
순환팬	정상작동여부	○	

특이사항 및 부적합 사유

4. 분쇄(분쇄, 조분쇄, 미분쇄)

작업일	작업자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 설비 및 기구
2014. 11. 11	이동혁	노원진	유재근	분쇄기

No	공정 중 주의 사항 (*확인방법- O, X)	확인자	작업자 확인
1	기계점검표 및 청소점검표확인		○
2	충원기백서양 설치 청결상태 및 일치여부확인		○
3	충원부압력측정 확인		○
4			

분쇄부압력 분쇄량 비고 작업자 점검자

4.5 kg 10.5 kg - 이동혁 노원진

공정 중 검사

평가 방법 : 양호(○) 불량(×) 중립(△)

가	준	평가	작업자 확인
분쇄실	청결상태 유지	○	이동혁
분쇄기	청결상태 유지	○	
분쇄기	가동	○	
자석봉	정상상태 유지	○	
체	청결상태 유지	○	

특이사항 및 부적합 사유

5. 제품 포장

작업일	작업자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 설비 및 기구
2014. 11. 11	이동혁	노원진	유재근	전자저울, 실용기

No	공정 중 주의 사항 (*확인방법- O, X)	확인자	작업자 확인
1	전자저울의 영점과 수평을 맞춘다.		○
2	포장용기의 피손 및 청결확인		○
3	포장지 밀봉확인		○
4	충원량(개수, 중량) 확인		○
5			
6			

충전단위 분할량 충전수량 잔량 비고 작업자 점검자

10,000g 13,000g 1개 (10kg) 3,000g - 이동혁 노원진

공정 중 검사

평가 방법 : 양호(○) 불량(×) 중립(△)

가	준	평가	작업자 확인
작업현	전자저울	청결상태 유지 되어 있다.	○
	내포용재	포장용기가 청결해야 하며 피손이 없어야 한다.	○
	분할기	청결상태 유지 및 작동확인한다.	○
작업중	포장상태	분할이 외부 유출되지 않도록 한다.	○
	분할기	분할기 온도가 200도까지 유지되는 확인한다.	○

특이사항 및 부적합 사유

 주식회사 세롬 / 경기도 남동, 평택군, 평택읍, 복곡리 산로 137 / 전화: 091-864-1158 / 팩스: 091-864-1159			
<h3>시험 성적서</h3>			
제 품 명 : 황칠나무수출분말		제조일자 : 2014년 11월 10일	
제품번호 : F14110			
시험 일자 : 2014년 11월 11일			
시험 항목	시험 기준	시험 결과	분석방법
1. 색상	미갈색의 분말	적 합	관능시험
2. 이물질	불고물	적 합	식육교란시험법
3. 수분	10% 이하	적 합	적외선수분측정
4. 세균수	1,000이하/1g	적 합	표준형시험법
5. 대장균군	음성	음성	유당산천배지법
비 고			
판정결과(Results)	승인일(Date)	품질관리인	
적 합	2014. 11. 13	유재근	

S/N: Q-003-C

제 품 표 준 서

Master Formula	
관리번호	MF5
식물의 유형	기본 및 규격의 일반가공식물/기타가공물
제 품 명	황칠나무추출분말
작성 년월일	2014.10
등록신고번호	-

구분	품질관리부서담당자	제조/취성관리부서책임자	품질관리부서책임자
재			

제 품 표 준 서				MF5
제품명 내 용	제품명	황칠나무추출분말		13의 1
	내 용	개장 내역		

개장차수	Volume	개장일자	개장내역
정정일	1	2014. 10. .	(신규정정) 식물취성법에 따른 기준서 작성
2차 개장			
3차 개장			

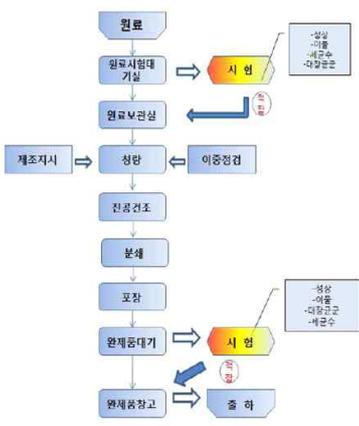
제 품 표 준 서				MF5
제품명 내 용	제품명	황칠나무추출분말		13의 2
	내 용	약 자		

일련번호	제 목	페이지
1	정제의 개요	13의 3
2	제조공정 및 제조방법과 공정중의 검사	13의 4~8
3	품질향상 및 취성요소 제거를 위한 중점관리대상 및 관리방법	13의 9
4	원부번호, 입재품, 원재료, 내외포장재의 기준 및 규격과 시험방법	13의 10~11
5	제조 및 품질관리에 필요한 시설 및 기구	13의 12
6	표시사항, 보존기준 및 유통기한	13의 13
7		
8		
9		
10		
11		

제 품 표 준 서				MF5
제품명 내 용	제품명	황칠나무추출분말		13의 3
	내 용	제형의 개요		

제품명	황칠나무추출분말			
제조자	노 일 전			
작성연월일	2014년 10월 일	작성자	유재광	
식물의 유형	기타가공물			
성상	갈색의 분말			
백자표정분량	황칠나무추출액 100%			
기 준 규 격	성상 : 갈색의 분말 이물 : 검출되어서는 안된다. 세균수 : 협합하여야 한다. 대장균 : 불검출			
사용용도	식품 및 건강기능식품의 원료로 사용한다.			
섭취시 주의사항	원산부는 의사와 상의 후 섭취한다. 알레르기 질환, 특이 체질의 경우는 성분물 확인 후 섭취한다.			
포장방법 및 단위	(폴리에틸렌(PE))			
보존 및 유통기준	직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관하십시오.			
유통기한	제조일로부터 24개월			

	제 품 표 준 서		MF5
	제 품 명	황침나우수출예방	13의 4
내 용	제조공정 및 제조방법과 품질통제 절차		



	제 품 표 준 서		MF5
	제 품 명	황침나우수출예방	13의 5
내 용	제조공정 및 제조방법과 품질통제 절차		

제 조 공 정	제 조 방 법	관련항서
원료	① 발주서와 납품된 원료가 일치 하는지 확인 ② ①항을 요인이 되지 않도록 별도 관리에서 시험 ③ 라우터 번호 '시험대기' 간별 부착 ④ 라오 '생산기'용량이나 '시험용량' 확인	-발주서 -원료시험용역서 -가량용역서 -원료 시험대기 간별
	① 발주서와 납품된 내요장치가 일치하는지 확인 ② 납품업체 시험용역서 확인 ③ 내요장치 각각 관리 대상 적정 ④ 표시사항 확인	-발주서 -시험용역서 -가량용역서 -가량관리대상
	① 발주서와 납품된 외요장치가 일치하는지 확인 ② 외요장치 각각 관리 대상 적정 ③ 표시사항 확인	-발주서 -시험용역서 -가량용역서 -가량관리대상
원재 및 원사	① 품질관리부서에 원료 시험회피 ('원료시험회피서' 작성) ② 품질관리 담당자 적정 절차 (확인필수) 에서 시험 ③ 라우터 시험 용 '간별' 부착 ④ 결과출력 후 품질관리부서에서 정교관리부서로 정보 ⑤ '정확 시' '정확 간별', '부착함시' '부착함' 간별 부착	-원료시험회피서 -원료시험대상 -원료시험날지
	원료 ① 기준규격에 적합한 원료는 원료보관고대에 보관 ② 부속품 부착 시 간별	-원료보관고대장 -간별날지
분쇄	내요장치 ① 기준규격에 적합한 내요장치 보관고대 이용 및 보관	
	외요장치 ① 기준규격에 적합한 외요장치 보관고대 이용 및 보관	
포장	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서

	제 품 표 준 서		MF5
	제 품 명	황침나우수출예방	13의 6
내 용	제조공정 및 제조방법과 품질통제 절차		

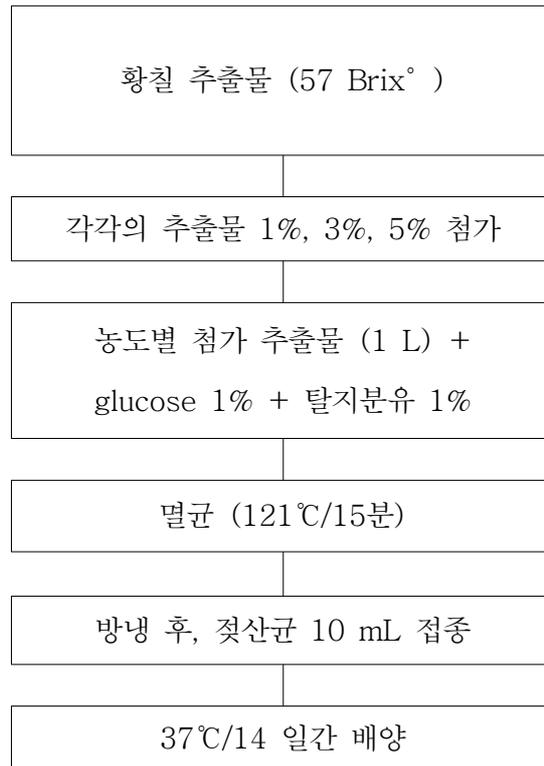
제 조 공 정	제 조 방 법	관련항서
원료	① 포장 전 정량과 부속품의 정량상태 등을 관리	
	① 발주서와 납품된 원료가 일치 하는지 확인, 출간 양형 확인	-제조기부서 -가량보관고대장
	① 발주서와 납품된 내요장치가 일치 하는지 확인 ② 품질관리부서에서 원료 시험회피 (확인필수) 에서 시험 ③ 라우터 시험 용 '간별' 부착 ④ 결과출력 후 품질관리부서에서 정교관리부서로 정보 ⑤ '정확 시' '정확 간별', '부착함시' '부착함' 간별 부착	-제조기부서 -원료시험회피서 -원료시험대상 -원료시험날지
원재 및 원사	① 내요장치 기준규격에 적합한 원료는 원료보관고대에 보관 ② 부속품 부착 시 간별	-원료보관고대장 -간별날지
	① 내요장치 기준규격에 적합한 내요장치 보관고대 이용 및 보관	
분쇄	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서
포장	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서

	제 품 표 준 서		MF5
	제 품 명	황침나우수출예방	13의 7
내 용	제조공정 및 제조방법과 품질통제 절차		

제 조 공 정	제 조 방 법	관련항서	주의 사항
원료	① 발주서와 납품된 원료가 일치 하는지 확인 ② ①항을 요인이 되지 않도록 별도 관리에서 시험 ③ 라우터 번호 '시험대기' 간별 부착 ④ 라오 '생산기'용량이나 '시험용량' 확인	-발주서 -원료시험용역서 -가량용역서 -원료 시험대기 간별	-원료 포장 상태 여부 확인 -이물 혼입 주의 -포장하기 전후 실 수형 확인 -원료정량상태 확인
	① 발주서와 납품된 내요장치가 일치하는지 확인 ② 납품업체 시험용역서 확인 ③ 내요장치 각각 관리 대상 적정 ④ 표시사항 확인	-발주서 -시험용역서 -가량용역서 -가량관리대상	-발주서와 납품된 원료 일치 여부 확인 -정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
	① 발주서와 납품된 외요장치가 일치하는지 확인 ② 외요장치 각각 관리 대상 적정 ③ 표시사항 확인	-발주서 -시험용역서 -가량용역서 -가량관리대상	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
원재 및 원사	① 품질관리부서에 원료 시험회피 ('원료시험회피서' 작성) ② 품질관리 담당자 적정 절차 (확인필수) 에서 시험 ③ 라우터 시험 용 '간별' 부착 ④ 결과출력 후 품질관리부서에서 정교관리부서로 정보 ⑤ '정확 시' '정확 간별', '부착함시' '부착함' 간별 부착	-원료시험회피서 -원료시험대상 -원료시험날지	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
	원료 ① 기준규격에 적합한 원료는 원료보관고대에 보관 ② 부속품 부착 시 간별	-원료보관고대장 -간별날지	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
분쇄	내요장치 ① 기준규격에 적합한 내요장치 보관고대 이용 및 보관		
	외요장치 ① 기준규격에 적합한 외요장치 보관고대 이용 및 보관		
포장	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
원재용대기	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
출하	① '제조기'에서 최종 원료 (물(水)) ② '제조용정교'에서 최종(최종) 원료 확인 ③ '제조용정교'에서 포장에 원료 포장 ④ '정확한' 원료를 '정확함' 부착 후 포장함으로 이동	-제조기부서 -원료보관고대장	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리
	정량 ① 정량한 원료를 정량고대에서 6시간 12시간 건조한다. ② 건조한 원료를 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	-제조기부서	-정량한 원료 이상관리 -정량한 원료 이상관리

3. 기능성 향상을 위한 표준화 발효 추출물 원료 생산

(1) 발효물 제조 방법



- 젖산 발효물 제조 공정



- 황칠 추출액 첨가 젖산 발효물

(2) 원료 및 추출물 성분분석

(가) 일반성분 함량

	수분	조회분	조단백질	조지방	조섬유	가용성 무질소물
황칠	5.64	3.25	15.84	3.25	8.57	63.45

(나) 유리당 함량

본 연구에서 검출된 유리당들은 유기체들의 생명유지활동에 관여하며, 특히 인체내에서 영양학적 및 기능적 중요 역할을 수행하고 있다.

글루코스(glucose), 흔히 포도당(葡萄糖)으로 부르는 물질은 알데하이드 기를 가지는 당의 일종으로 사슬 모양보다는 육각고리형 모양으로 흔히 존재한다. 분자식은 $C_6H_{12}O_6$, 분자량은 약 180이다. 다당류로 결합했을 때의 형태에 따라 알파(alpha) 형과 베타(beta) 형이 있다. 뇌, 신경, 폐 조직에 있어서 글루코스는 에너지원으로 필수적이며 혈중 글루코스 농도에 민감하게 반응하여 결핍증이 되면 즉각 경련을 일으키게 된다.

과당은 탄소 6개와 케톤(ketone)기를 가지는 대표적인 케토헥소오스(ketohexose)이며 분자식은 $C_6H_{12}O_6$ 로 포도당과 동일하다. 즉 포도당과 과당은 이성체(isomer) 관계에 있다. 과실과 벌꿀 속에 유리상태로 존재하며 여러 다당류와 배당체의 주성분이기도 하다. 과당은 수용액(20℃) 속에서 약 80%가 피라노스(pyranose)형이고 결합되었을 때는 퓨라노스(furanose)형의 구조상태로 존재한다. 프럭토스(Fructose) 또는 과당(果糖)은 글루코스와 갈락토스와 함께 혈액을 이루는 가장 중요한 3대 당 중의 하나이다. 과당은 글루코스와 프럭토스로 구성된 이당류인 수크로스를 분해해 소화 과정에서 얻을 수도 있다. 프럭토스는 수크로스보다 두 배 정도의 당도를 지니며, 천연적으로 생성되는 당 중 가장 단 당분이다. 과당은 당류 중에서 인체에서 가장 빨리 흡수·소화되며 당류 중에서 감미가 가장 강하다.

맥아당은 감주 또는 엿기름을 만들 때 사용하며, 농사용으로도 활용했다. 보리가 싹을 틔울 때는 씨 속에 들어있는 녹말을 아밀라아제로 분해시켜 맥아당이라 불리는 말토오스란 당을 만들어 에너지원으로 사용한다. 밥을 오래 씹으면 단맛이 나는 것도 사람 침 속에 들어있는 아밀라아제가 같은 작용을 해서다. 잘 알려져 있는 것이 소화효소(消化酵素)인데, 가령 침 속에 있는 프티알린(ptyalin)은 녹말만을 말토오스(일명 맥아당)로 분해하는 촉매작용을 가지고 있고, 또 위 속의 펩신(pepsin)은 단백질만을 부분 가수분해하는 기능을 가지고 있다

음식물을 먹으면 입에서 침에 의하여 녹말이 맥아당으로 분해되고 식도를 거쳐 위에 도달하여 위산과 섞여 단백질이 펩티드로 분해되는 등의 작용이 하나씩 일어나 결국에는 몸속으로 흡수된다. 자당은 사탕수수나 사탕무 따위에 들어 있는 이당류. 단사 정계의 결정으로, 흰 빛깔이 나고 냄새가 없으며 물에 잘 녹고 단맛이 난다. 화학식은 C₁₂H₂₂O₁₁이다. 최근 자당(설탕)은 인공적인 가공처리로 생산되는게 대부분으로 소비자들의 기피가 심한 상황이다.

본 연구에 사용된 시료들의 주요유리당은 포도당, 과당 및 맥아당으로 구성되어 있어 건강에 대한 소비자들에게 적합한 원료 선정으로 생각된다. 또한 발효과정을 거쳐 생성될 대사물들에도 긍정적인 영향을 줄것으로 보인다.

- 유리당 함량

(%)

	포도당	과당	자당	맥아당	총당함량
황칠	2.01	4.42	-	6.54	12.97
황칠추출물	0.77	0.73	-	1.03	2.54

(다) 유기산 함량

본 연구에서 유기산 함량은 낮게 나타났는데, 유기산은 과육 부위에 많이 존재하며, 섬유질이 많은 잎과 뿌리에는 함량이 적은 것으로 알려져 있다. 유기산은 pH가 낮으나 강산보다는 안전하여 식품에 주로 활용되고 있다. 유기산들 중 사과산(沙果酸) 또는 말릭산은 무색바늘 모양 결정의 이염기산으로 신맛이 나고 물이나 알코올에 잘 풀리며, 가열하면 물한 분자를 잃고 호박산으로 전환된다. 녹는점은 100℃이고 화학식은 $\text{HOOC-CH}_2\text{CH(OH)-COOH}$ 또는 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ 이다. 비대칭탄소원자를 1개 가지고 있으며 D-, L- 및 DL- 3종의 광학 이성질체가 존재한다. 좌회전성인 L-말릭산은 사과·포도 등 천연 과일에 함유되어 사과산이 거친 피부를 윤택하게 한다. 하리나 변비에는 사과가 좋다. 과실 중의 유기산 중 가장 대표적인 산으로서 사과산을 들고 있다.

아세트산(acetic acid) 또는 초산(醋酸)은 대표적인 카복실산 중 하나이다. 분자식은 CH_3COOH 이다. 식초의 주성분으로 3~5%정도 함유되어 있어 식초의 신맛을 내기 때문에 초산이라고도 한다. 아세트산은 체내에서 당, 아미노산, 지방 등의 대사의 결과 생성되기도 한다. 알코올성 음료를 마시면 체내에 에탄올이 들어오게 되는데, 이는 알코올 수소이탈효소에 의하여 아세트알데하이드가 된다. 아세트알데하이드는 다시 알데하이드 수소이탈효소 등에 의해 아세트산으로 바뀌게 된다. 이렇게 해서 생성된 아세트산은 아세틸CoA 등으로 바뀌어 TCA 회로에 투입되어 ATP 생산에 사용되거나 다른 대사과정에 사용된다.

젖산균 발효의 산물로 생성되는 젖산(라세미체)은 무색의 시럽상 액체로 식물이나 산패한 물질, 요구르트 등의 발효유, 젖산균 음료에 함유되어 있다. 젖산은 현재 모두 녹말질·당질류를 원료로 하여 발효법에 의해 제조되고 있다. 신맛이 나고 식용으로는 과실엑스·시럽·청량음료의 산미제(酸味劑)로 이용되며 주류(酒類)의 발효 초기에 가해서 부패균의 번식을 방지하는 데도 사용된다. 젖산을 마시면 장내에 있는 유해 세균의 발육을 억제하여 장의 기능을 좋게 한다.

- 유기산 함량

(mg%)

	사과산	젖산	초산	호박산	총량
황칠	0.14	0.11	0.34	-	0.59
황칠추출물	4.14	3.45	7.70	-	15.29

(라) 무기성분 함량

(mg%)

	K	Ca	Na	Mg
황칠	1,048.30	366.40	8.26	610.28
황칠추출물	233.76	31.99	8.32	117.49

(마) 구성아미노산 함량

(mg%)

구 분	황칠	황칠 추출물
Aspartic acid	713.95	94.27
Serine	1004.01	245.34
Glutamic acid	1116.19	342.64
Glycine	779.50	274.20
Histidine	558.37	32.99
Arginine	1,473.35	254.14
Threonine	987.45	278.21
Alanine	743.47	227.86
Proline	823.12	682.99
Tyrosine	335.24	74.61
Valine	1326.02	367.78
Methionine	128.95	13.85
Lysine	702.04	141.57
Isoleucine	966.73	233.67
Leucine	763.62	163.84
Phenylalanine	630.76	188.07
총 구성아미노산	13,052.78	3,616.02

(3) 젖산 발효물 성분분석

(가) 유리당 함량

(%)

			포도당	과당	자당	맥아당	총당합량
대 조 구		1%	5.01	35.35	3.18	16.82	60.37
	황칠	3%	9.42	22.75	7.42	10.34	49.94
		5%	10.97	16.92	7.69	5.66	41.24
젖 산 발 효		1%	-	4.23	2.79	15.69	22.78
	황칠	3%	4.63	11.96	6.02	9.71	32.32
		5%	7.76	10.48	7.18	5.37	30.78

(나) 유기산 함량

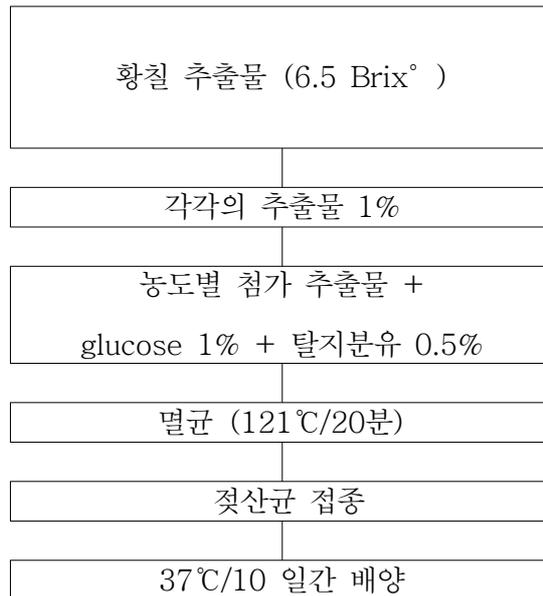
(mg%)

			사과산	젖산	초산	호박산	총량
대 조 구		1%	1.51	-	4.92	-	7.43
	황칠	3%	2.36	-	7.80	-	13.16
		5%	2.48	-	8.26	-	15.74
젖 산 발 효		1%	2.70	50.73	8.62	-	63.05
	황칠	3%	-	20.57	3.85	-	27.42
		5%	-	13.51	3.44	-	21.95

(4) 대량 발효물 및 발효분말 제조 방법

- 발효물 제조 방법 및 분말제조 방법

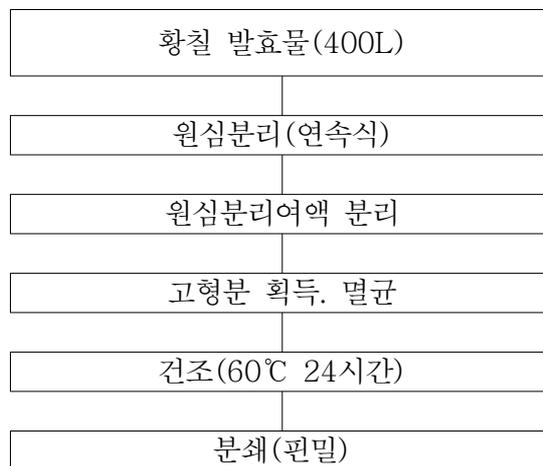
발효물 제조방법은 50L 발효기를 사용하여 Seed 배양하였고 500L 발효기를 사용하여 증대배양하였다.



- 발효물 제조 공정도

- 발효분말 제조 방법

발효분말 제조는 (주)세롬 에서 보유한 360kg 진공건조기를 사용하여 발효물을 건조하여 획득하였다



- 발효분말 제조공정도



50L 발효기



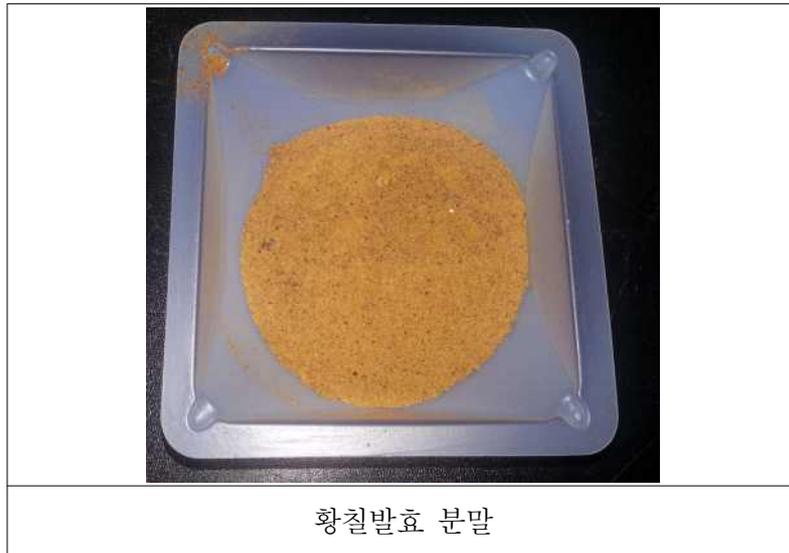
500L 발효기



연속식 원심분리기



- 발효분말 제조용 진공건조기



4. 개별인정 대상 황칠나무 추출물의 규격설정

1. 황칠나무 추출물의 인체적용 실험용 추출분말의 주요 규격 내용

항 목	주요 내용
1. 원료명	황칠나무추출물
2. 원재료	황칠 (학명: Dendropanax morbifera Nakai, 이명 : 노란꽃나무, 풍하이(楓荷梨), Korean Dendropanax, 사용부위 : 잎, 줄기, 뿌리)
3. 지표성분	지표성분 : Quercetin
4. 제조 공정	<ul style="list-style-type: none"> 황칠나무 잎을 파쇄하여 흐르는 물에 수세 후 45 ℃에서 48시간 동안 건조시킨 후, 1 ton 추출기를 이용하여 황칠 무게의 10배의 물을 사용하여 4 시간 동안 추출하여 16 brix에 맞추어 약 20 L의 농축물을 동결 건조
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 흑갈색의 분말 2) 지표성분 : Quercetin 0.075mg/g 3) 납(mg/kg) : 10 이하 4) 총비소(mg/kg) : 10 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 3 이하 6) 총수은(mg/kg) : 3 이하 7) 대장균군 : 음성
	지표성분 시험법 : Quercetin 분석법 주요 기기분석 조건 기재 (예 : HPLC UV 375nm, ZORBAX Eclipse XDB-C18 column: 4.6 x 250 mm (Waters 2695))
	규격외 (잔류농약) : 「식품의 기준 및 규격」에 따라 59종의 잔류농약 시험결과 '불검출'임을 확인함
6. 안전성	의사결정 : 섭취경험이 있는 황칠나무를 추출 건조/분말화한 것으로 의사결정도 '다'에 해당
	섭취 근거 : <사용현황> 국내 : 사용 현황 있음 - 신장원료 함유 제품 유통 식약처 식품원재료 검색결과 : 황칠나무 줄기는 식품원료로 사용이 가능(제한적 사용가능)
	안전성 여부 : 안전성 정보 DB : 알려진 부작용 없음 섭취시 주의사항 : 없음

신취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> 신장원료의 섭취량 : 신장원료로서 1.0 g/일 유통되고 있는 황칠제품 섭취량은 추출물로서 1.5-15g 중화분초 : 15-30g을 물에 달여 음용 강서민간사용초약 : 일일 섭취량은 20 - 40g 물에 달여 음용 비임상 연구(SD rats)에서 50 - 200mg/kg에서 개선효과 확인 (인체 섭취량으로 환산할 경우 0.5 ~ 2.0g/성인) 4주간의 사내 간이 임상연구에서 황칠추출물(1.0g/day)의 성기능 개선효능을 나타냄. 이 연구에서 확인된 특징적인 부작용은 없었다.
	임상시험 : 비알코올성지방간 비만대학생들을 대상으로 수행한 연구에서 황칠추출물은 간기능을 개선시킴.
7. 기능성	신청 기능성 : 남성갱년기 증상 개선
	신청 일일섭취량 : 황칠나무추출물로서 1.0 g/일
	[신청원료] 토끼 음경해면체를 분리하여 organ bath에 매달아 수축/이완능을 측정함 연구(Ex-vivo or In vitro)에서 황칠나무 열수추출물은 토끼 음경해면체를 유의적으로 이완시킴을 확인함.
	[신청원료] 황칠나무 열수추출물을 흰쥐 수컷에게 구강투여 후 알컷과 교미를 유도하여 교미 행동을 분석한 결과 황칠열수추출물을 투여한 군에서 교미를 하기 위해 알컷에게 올라타는 횟수, 삽입 횟수, 삽입 유지시간을 측정함 결과 모두 유의성 있게 교미행동이 증가됨을 확인함
	[신청원료] IRB승인후 실시된 인체적용시험 자료는 전무함. 황칠나무 열수추출물을 이용한 사내 간이임상시험을 실시하여 크게 5가지 항목에 대한 설문조사를 실시하였음 [Erectile function(발기능), Intercourse satisfaction(성교만족도), Organism function(질정감), Saxual desire(성적욕구), Overall satisfaction(전반적인성생활만족도)]. 그 결과 황칠나무 열수추출물을 복용 후 대체적으로 발기능력과 성적 욕구 및 성만족도 전반에 걸쳐 성기능이 향상됨을 확인함

2. 황칠나무 추출물의 남성갱년기 인체적용시험 완료

<p style="text-align: center;">JINR-MSC-DM Confidential October</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>계획서번호</td> <td>JINR-MSC-DM</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험제명</td> <td>황칠나무추출물 플라세보</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서</p> <p style="text-align: center;">황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <p style="text-align: center;">2015년 10월</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>CONFIDENTIAL</p> <p>본 인체적용시험은 Good Clinical Practice(GCP)를 준수하여 수행되었습니다. 이 성적서는 기밀사항이며, 의뢰자의 승인 없이 다시 작성되거나 공개될 수 없습니다</p> </div>	계획서번호	JINR-MSC-DM	인체적용시험제명	황칠나무추출물 플라세보	<p style="text-align: center;">JINR-MSC-DM Confidential October</p> <p>■ 인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서</p> <p>인체적용시험제목 : 황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</p> <p>단계 : 인체적용시험</p> <p>인체적용시험실시기관 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터</p> <p>시험책임자 : 전북대학교병원 비뇨기과 교수 김 영 군 MD, PHD</p> <p>공동시험책임자 : 전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수 채 수 완 MD, PHD 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최 은 경 MD 전북대학교병원 비뇨기과 전임의 박 준 군 MD</p> <p>시험담당자 : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 및 임상시험센터 소병욱, 정수진, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 오상아, 김순영, 김에리, 윤주환, 박미현, 이소영, 서현영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선아, 정혜연, 최민준</p> <p>의뢰자 : (재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터 원장 이 동 옥</p> <p>인체적용시험용제명 : 인체적용시험용제명 - 황칠나무추출물 대조제명 - 플라세보</p>								
계획서번호	JINR-MSC-DM												
인체적용시험제명	황칠나무추출물 플라세보												
<p style="text-align: center;">JINR-MSC-DM Confidential October</p> <p>시험방법 : 본 인체적용시험은 총 80명의 남성갱년기 증상이 있는 남성을 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다. 시험자는 시연동의서를 작성한 자원에 한하여 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로 적합하다고 판단 되는 자를 선정하고 1차 방문에 연구대상자 선정/제외기준 적합성 여부를 재평가한 후 황칠나무추출물군과 플라세보군에 1:1 무작위배정 하였다.</p> <p>연구대상자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 12주간 매일 1회 인체적용시험용제목을 섭취하여 일상생활을 수행 하였다. 연구대상자는 6주 마다 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 계획서에 명시한 평가(유효성 평가, 혈액징후, 약물투여력 및 의학적 상태변화, 이상반응 등)를 시행한 후 총 12주간의 인체적용시험 참여를 마쳤다.</p> <p>인체적용시험계획서번호 : JINR-MCS-DM</p> <p>인체적용시험 시작일 : 2014. 03. 20 (최초 연구대상자 등록일)</p> <p>인체적용시험 종료일 : 2015. 06. 24 (최종 연구대상자 방문일)</p> <p>결과보고서 작성일 : 2015. 10. 23</p>	<p style="text-align: center;">JINR-MCS-DM Confidential August 2015</p> <p>■ 요 약 (Synopsis)</p> <table border="1"> <tr> <td>인체적용시험계획서 번호</td> <td>JINR-MCS-DM</td> </tr> <tr> <td>인체적용시험제목</td> <td>황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험</td> </tr> <tr> <td>목적</td> <td>남성갱년기 증상을 보이는 자를 대상으로 황칠나무추출물을 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 1차 목적 남성갱년기 증상 설문지(AMS)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 2차 목적 남성갱년기(항우울 자기진단표(ADAM), 호르몬치표, 지질대사지표, 신체계측지표, 국제발기능지수(IEF)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다.</td> </tr> <tr> <td>시험책임자</td> <td>전북대학교병원 비뇨기과 교수 김 영 군 MD, PHD</td> </tr> <tr> <td>공동시험책임자</td> <td>전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수 채 수 완 MD, PHD 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최 은 경 MD 전북대학교병원 비뇨기과 전임의 박준 군 MD</td> </tr> <tr> <td>시험담당자</td> <td>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 및 임상시험센터 소병욱, 정수진, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 오상아, 김순영, 김에리, 윤주환, 박미현, 이소영, 서현영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선아, 정혜연, 최민준</td> </tr> </table>	인체적용시험계획서 번호	JINR-MCS-DM	인체적용시험제목	황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험	목적	남성갱년기 증상을 보이는 자를 대상으로 황칠나무추출물을 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 1차 목적 남성갱년기 증상 설문지(AMS)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 2차 목적 남성갱년기(항우울 자기진단표(ADAM), 호르몬치표, 지질대사지표, 신체계측지표, 국제발기능지수(IEF)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다.	시험책임자	전북대학교병원 비뇨기과 교수 김 영 군 MD, PHD	공동시험책임자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수 채 수 완 MD, PHD 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최 은 경 MD 전북대학교병원 비뇨기과 전임의 박준 군 MD	시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 및 임상시험센터 소병욱, 정수진, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 오상아, 김순영, 김에리, 윤주환, 박미현, 이소영, 서현영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선아, 정혜연, 최민준
인체적용시험계획서 번호	JINR-MCS-DM												
인체적용시험제목	황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험												
목적	남성갱년기 증상을 보이는 자를 대상으로 황칠나무추출물을 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 1차 목적 남성갱년기 증상 설문지(AMS)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. • 2차 목적 남성갱년기(항우울 자기진단표(ADAM), 호르몬치표, 지질대사지표, 신체계측지표, 국제발기능지수(IEF)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다.												
시험책임자	전북대학교병원 비뇨기과 교수 김 영 군 MD, PHD												
공동시험책임자	전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수 채 수 완 MD, PHD 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수 최 은 경 MD 전북대학교병원 비뇨기과 전임의 박준 군 MD												
시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 및 임상시험센터 소병욱, 정수진, 오미라, 박수현, 박은옥, 정은수, 오상아, 김순영, 김에리, 윤주환, 박미현, 이소영, 서현영, 김현숙, 노순옥, 최재순, 최영미, 김두겸, 박선아, 정혜연, 최민준												

선정기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 40세 이상 75세 이하인 성인 남녀 2) 남성경년기 증상을 보이는 자 <ul style="list-style-type: none"> ① AMS 설문 결과 27점 이상이고, ② ADAM 설문 결과 1 또는 7 문항에 '예'이거나 나머지 8개 항목 중 3개 문항 이상에 '예' 일 경우 3) 총 테스토스테론이 8.59 ng/ml 이하인 자 4) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 1) 혈청 전립선특이항원(PSA: Prostate specific antigen)이 4.0 ng/ml 이상인 자 2) 지난 6개월 이내에 뇌졸중, 심근경색증, 관상동맥우회수술의 과거력이 있는 자 3) 지난 6개월 이내에 심부전, 불안정형 협심증, 치명적인 부정맥의 병력이 있는 자 4) 현재 조절되지 않은 당뇨병(HbA1c > 9%)이 있는 자 5) 중식성 당뇨병성 망막증이 있는 자 6) 지난 6개월 이내에 중대한 저혈당증 병력이 있는 자 7) 지난 3년 이내에 당뇨병성 케톤산증의 병력이 있는 자 8) 혈장 손상, 루신병 또는 말단비대증에 기인한 2차성 당뇨병 병력이 있는 자 9) 척추 손상, 근직적 전립선 적출술 및 근직적 골반 수술을 받은 자 10) 90/50 mmHg 미만의 저혈압 또는 170/100 mmHg 초과의 조절되지 않는 고혈압이 있는 자 11) 음경이 해부학적으로 비정상인 자(예, 중증 음경성유증,

제외기준	<ol style="list-style-type: none"> 12) 고프로락틴 혈증이 동반된 자(고프로락틴 혈증: 혈중 프로락틴치가 참고범위 상한치의 3배 이상) 13) 검사적혈구증, 다발성 골수종, 백혈병 또는 출혈 이상이 있는 자 14) 금지된 기간에 자중 함유 음식을 섭취한 자 15) Testosterone 또는 anti-androgens를 복용하고 있는 자 16) Trazodone를 복용하고 있는 자 17) 시험 개시 전 2주 이내에 발기부전 치료를 위해 Viagra®, Levitra® 및 Cialis®, 자이데나, 엠백스 등의 PDE-5 억제제, 혈관확장제의 자가주사요법 또는 기타 다른 발기부전 치료법을 사용한 자 18) 약물 및 건강기능식품에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자 19) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계수술(단, 단순맹장수술이나 말장수술은 제외)을 받은 자 20) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정생혈 약물처리를 받은 경험이 있는 자 21) 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 자 22) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 23) 진단검사의학감사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 <ul style="list-style-type: none"> ⇒ AST, ALT > 정상범위 상한치의 2배 ⇒ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL 24) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 본 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
대상자 수	총 80 명(실험군 별 40명씩 총 80 명)

본 인체적용시험은 총 80명의 남성경년기 증상이 있는 남성을 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 연구이다. 시험자는 서면동의서를 작성한 자임자에 한하여 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로 적합하다고 판단 되는 자를 선정하고 1차 방문에 연구대상자 선정/제외기준 적합성 여부를 재평가한 후 황질나무추출물군과 플라세보군에 1:1 무작위배정 하였다.

연구대상자는 1차 방문일까지 기초평가(Baseline)를 완료한 후 12주간 매일 1회 인체적용시험용제품을 섭취하여 일상생활을 수행하였다. 연구대상자는 6주 마다 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원 센터에 방문하여 계획서에 명시한 평가(유효성 평가, 활력징후, 약물 투여력 및 의학적 상태변화, 이상반응 등)를 시행한 후 총 12주간의 인체적용시험 참여를 마쳤다

섭취방법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 황질나무추출물군 <ul style="list-style-type: none"> - 1일 1회, 1회 2정, 저녁 식사 이후 경구섭취(1.4 g/day, 황질나무추출물 1000mg 1g/day) ○ 플라세보군 <ul style="list-style-type: none"> - 1일 1회, 1회 2정, 저녁 식사 이후 경구섭취(1.4 g/day)
평가기준 및 방법	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효성 평가 <ol style="list-style-type: none"> 1) 1차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 남성경년기 증상 설문지(AMS: Aging Male Symptoms) 2) 2차 유효성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 남성경년기증후군 자가진단표(ADAM: Androgen Deficiency in Aging Males) • 호르몬검사: 총 테스토스테론(Total Testosterone), 유리 테스토스테론(Free Testosterone), 생체 활성 테스토스테론(Bioavailable Testosterone), 성호르몬결합 글로블린(SHBG, Sex Hormone Globulin) • 지질대사지표 검사: Total cholesterol, Triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol • 신체계측지표: 체중, 체질량지수(BMI), 체지방량, 체지방률, 체지방량 • 국제발기능지수(IEF, International Index of Erectile Function)-Erectile Function(EF) Domain ○ 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 자-타라 증상 등 이상반응 모니터링 - 진단검사의학 검사 - 활력징후, 신체검사, 심전도

3. 인체적용시험 결과

- 1차 유효성 평가 항목인 AMS의 변화에서 두 섭취군 간 유의한 차이가 없었으나, 황칠나무 추출물의 AMS 점수가 제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 개선됨.
- 2차 유효성 평가항목인 ADAM, 호르몬지표, 지질대사지표, 신체계측지표 및 IIEF-domain 점수 변화에서 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, 호르몬 지표 중 total testosterone 및 bioavailable testosterone 값이 황칠나무 추출물 군에서 제품 섭취 12주 후 유의하게 개선됨.

4. 인체적용시험 완료후 식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 신청

- 개별인정신청을 위한 1차 사전면담 진행 (2016.03.11.)
(원물중에 대한 기원식물 자료, 중 특이적 지표물질 요구함)
(식약처의 건강기능식품 개별인정 신청기준 변화 - 등급제 폐지 개정 예정)

기능성원료의 기능성 등급

현행

개선

구분	기능성 내용
질병위험감소기능	○발생위험 감소에 도움을 줌 △△에 도움을 줌
생리활성기능 (1~3등급)	△△ 에 도움을 줄 수 있음 △△ 에 도움을 줄 수 없으나 관련 인체적용시험 미함
	(개정 예정)







식품의약품안전평가원
NATIONAL INSTITUTE OF FOOD AND DRUG SAFETY EVALUATION

5. 황칠추출물 안정성을 위한 시험법 검토 보고서

시험법 검토 보고서

시험물 질 : Rutin-Quercetin **검 체 명 :** 황칠열수추출물
식 품 재 형 : 분말 **시 험 날 짜 :** 2014-12-16 ~ 2015-01-19
보 관 조 건 : 실온
시험법 근거 : 주식회사 새롬에서 제공한 시험법에 준함.

1. 시험검토 목적

본 시험법 검토는 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin을 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)으로 산 가수분해하여 C18 컬럼을 통하여 분리하는 방법으로 370nm에서 Rutin 및 Quercetin을 동시에 확인하고 표준물질의 검출선을 이용하여 시료 중의 Rutin 및 Quercetin 함량을 정량하는 것을 목적으로 한다.

2. 실험방법

2.1 실험개요

시료를 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)으로 산 가수분해하고 메탄올을 이용하여 정량한 후 시험용액 및 표준용액을 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 Rutin 및 Quercetin 함량을 산출한다.

2.2 실험과정

1) 시약 및 시액

- (1) 표준품 : Rutin 및 Quercetin
- (2) Ethanol
- (3) Methanol
- (4) 3차 중류수
- (5) Formic acid
- (6) Hydrochloric acid

2) 표준용액의 제조

Rutin 및 Quercetin 표준품을 각각 1mg/ml의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 것을 표준용액으로 한다.

- 1 -

3) 시험용액의 제조

- (1) 시료 약 300mg을 정량하여 50ml 메스플라스크에 취한 후 10ml 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가한다.
- (2) 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication 한다.
- (3) 위의 sonication한 메스플라스크를 표산까지 Methanol로 맞춘다.
- (4) 위의 시험용액을 0.45µm 멤브레인을 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4) 기기분석조건

Instrument	HPLC
Detector	UV detector (DAD)
wavelength	370nm
Column	Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250mm x 4.6mm, 5µm)

A : 0.1% Formic acid
B : Methanol

Mobile Phase

Time	A(%)	B(%)
0	65	35
8	65	35
38	50	50
40	0	100
50	65	35
51	65	35

Flow rate	1ml/min
Injection volume	10µl
Run Time	51min
Column temperature	40°C

5) 계산

$$\text{Rutin (mg/g)} = \frac{\text{검량선 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \text{시험용액 전량}(ml) \times \text{표준품 순도}}{\text{시료 채취량}(mg)}$$

$$\text{Quercetin (mg/g)} = \frac{\text{검량선 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \text{시험용액 전량}(ml) \times \text{표준품 순도}}{\text{시료 채취량}(mg)}$$

- 2 -

3. 실험결과

3.1 1차실험

3.1.1 Rutin 및 Quercetin의 분석여부 확인

표준용액과 시험용액에서 Rutin은 약 12분대, Quercetin은 약 28분대에 검출되었으며, 표준용액과 시험용액의 spectrum이 동일한 것으로 확인되었다. 시험용액의 경우 Rutin의 Peak분리도에 문제의 여지가 있을 것으로 판단된다 (Fig 1, Fig 2)

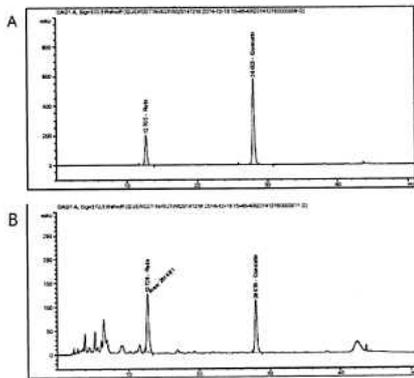


Fig 1. 표준용액과 시험용액에서의 Rutin과 Quercetin의 Chromatogram(370nm)
(A: 표준용액, B: 시험용액)

- 3 -

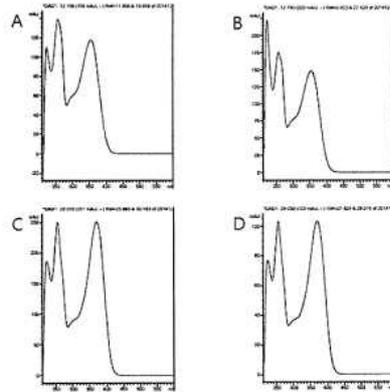


Fig 2. 표준용액과 시험용액에서의 Rutin과 Quercetin의 Spectrum
(A: Rutin STD Spectrum, B: Rutin Sample Spectrum, C: Quercetin STD Spectrum, D: Quercetin Sample Spectrum)

- 4 -

3.1.2 시료 중 Rutin 및 Quercetin의 함량

Rutin 및 Quercetin 표준용액 각각 1mg/ml의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 후, 희석하여 표준용액을 제조하였다. Rutin의 표준용액은 2.475~99ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였으며 ($R^2 = 0.99997$), Quercetin의 표준용액은 2.4825~99.3 ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였다. ($R^2 = 0.99998$)
 표준용액의 농도에 따른 면적값 및 검량선은 Table 1, Table 2와 같다.

Table 1. Rutin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area
1	2.475	103.77333
2	4.950	206.07718
3	24.750	1005.76593
4	49.500	1982.28955
5	99.000	3912.93359

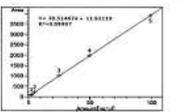
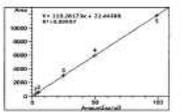


Table 2. Quercetin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area
1	2.4825	302.67422
2	4.9650	607.09595
3	24.8250	3016.29492
4	49.6500	5986.02881
5	99.3000	11839.10000



시료 약 300mg을 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45μm 멤브레인 필터로 여과하여 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin 함량을 산출하였다. <Table 3>.
 그 결과, Rutin 함량은 10.52±0.20mg/g, Quercetin 함량은 2.99±0.07mg/g을 나타냈다.

Table 3. 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량

	검량선 농도 (μg/ml)	희석용량 (ml)	시료무게 (mg)	표준용액 농도	희석배수	함량 (mg/g)	평균 (mg/g)
Rutin	63.33568	50	299.3	1	1	10.5806	10.52
	64.04285	50	300.1	1	1	10.6703	
	61.74378	50	299.3	1	1	10.3147	
Quercetin	18.29258	50	299.3	1	1	3.0559	2.99
	17.92124	50	300.1	1	1	2.9859	
	17.50498	50	299.3	1	1	2.9243	

3.2 2차실험

3.2.1 반복성 및 재현성 확인

Rutin 및 Quercetin 표준용액 1차실험에서 제조된 동일한 표준용액을 사용하였다. Rutin의 표준용액은 2.475~99ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였으며($R^2 = 0.99997$), Quercetin의 표준용액은 2.4825~99.3 ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였다. ($R^2 = 0.99997$)
 표준용액의 농도에 따른 면적값 및 검량선은 Table 4, Table 5와 같다.

Table 4. Rutin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area
1	2.475	101.61806
2	4.950	203.04922
3	24.750	1020.54242
4	49.500	2018.80200
5	99.000	3945.80737

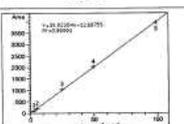
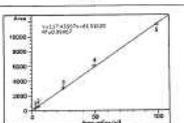


Table 5. Quercetin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area
1	2.4825	297.74203
2	4.9650	590.89514
3	24.8250	3067.42851
4	49.6500	6085.88525
5	99.3000	11607.30000



황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 정량에 있어서 실험의 반복성 및 재현성을 확인하기 위하여 시료 약 300mg의 취한 3개의 시료를 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45μm 멤브레인 필터로 여과하여 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin 함량을 산출하였다. <Table 6>.
 그 결과, Rutin 함량은 12.13±0.19mg/g, Quercetin 함량은 1.92±0.07mg/g을 나타냈으며, 1차실험에 산출된 함량보다 Rutin은 약 1.61mg/g 높은 함량을 Quercetin은 약 1.07mg/g 낮은 함량을 나타냈다.(1차실험 결과 : Rutin-10.52mg/g, Quercetin-2.99mg/g)

Table 6. 실험의 반복에 따른 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량

	검량선 농도 (μg/ml)	희석용량 (ml)	시료무게 (mg)	표준용액 농도	희석배수	함량 (mg/g)	평균 (mg/g)
Rutin-1	72.41636	50	303.1	1	1	11.9460	12.13
	75.81186	50	311.7	1	1	12.1610	
	72.88816	50	296.7	1	1	12.2831	
Quercetin-1	11.80813	50	303.1	1	1	1.9479	1.92
	12.21038	50	311.7	1	1	1.9587	
	10.99240	50	296.7	1	1	1.8524	

3.2.1 시료량에 따른 함량 확인

항질염수추출물 중 시료량에 따른 Rutin 및 Quercetin의 함량을 확인하기 위하여 시료 300mg을 기준으로 하여 100mg과 500mg을 위한 3개의 시료를 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(메탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication, 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45µm 멤브레인 필터로 여과하여 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin 함량을 산출하였으며 <Table 7>, 시료처위량에 의한 Rutin 및 Quercetin의 함량에 차이는 크게 보이지 않았다.

Table 7. 시료량에 따른 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량

	검량선 농도 (µg/ml)	희석용량 (ml)	시료무게 (mg)	표준품 순도	희석배수	함량 (mg/g)	평균 (mg/g)
Rutin -100mg	25.69084	50	108.4	1	1	11.8500	11.51
Rutin -300mg	70.80795	50	296.5	1	1	11.9406	
Rutin -500mg	53.96360	50	502.5	1	2	10.7390	
Quercetin -100mg	3.63973	50	108.4	1	1	1.6788	1.99
Quercetin -300mg	11.70744	50	296.5	1	1	1.9743	
Quercetin -500mg	11.60306	50	502.5	1	2	2.3091	

3.3 3차실험

3.3.1 재현성 확인

3차실험에서는 지금까지 나온 결과를 토대로 동일한 시료량에 대한 Rutin 및 Quercetin 함량의 재현성을 다시 한 번 확인하였다.

Rutin 및 Quercetin 표준품을 1차실험에서 제조된 동일한 표준용액을 사용하였다. Rutin의 표준용액은 2.475~99ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였으며($R^2 = 0.99992$), Quercetin의 표준용액은 2.4825~99.3ppm의 범위에서 직선성이 나타남을 확인하였다($R^2 = 0.99967$)
표준품의 농도에 따른 면적값 및 검량선은 Table 8, Table 9와 같다.

Table 8. Rutin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area	검량선
1	2.475	97.94917	
2	4.950	189.65112	
3	24.750	950.75311	
4	49.500	1917.92334	
5	99.000	3825.86696	

Table 9. Quercetin STD curve

STD Level	Concentration (ppm)	Area	검량선
1	2.4825	288.25418	
2	4.9650	564.29156	
3	24.8250	2893.19531	
4	49.6500	5835.17236	
5	99.3000	11707.60000	

항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량이 있어서 실험의 재현성을 확인하기 위하여 시료 약 300mg씩 위한 3개의 시료를 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(메탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication, 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45µm 멤브레인 필터로 여과하여 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin 함량을 산출하였다.<Table 10>.

그 결과, Rutin 함량은 12.58±0.40mg/g, Quercetin 함량은 2.16±0.30mg/g을 나타냈으며, 지금까지의 결과를 종합하여 보았을 때 Rutin의 상대표준편차(RSD)는 7.63, Quercetin의 상대표준편차는 21.75로 Quercetin의 상대표준편차가 큰 것으로 확인되었다.<Table 11>

Table 10. 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량의 재현성 확인

	검량선 농도 (µg/ml)	희석용량 (ml)	시료무게 (mg)	표준품 순도	희석배수	함량 (mg/g)	평균 (mg/g)
Rutin-1	76.71324	50	301.4	1	1	12.7262	12.58
Rutin-2	74.50297	50	305.8	1	1	12.1816	
Rutin-3	77.55289	50	301.9	1	1	12.8441	
Quercetin-1	12.76084	50	301.4	1	1	2.1169	2.16
Quercetin-2	15.04256	50	305.8	1	1	2.4595	
Quercetin-3	11.50220	50	301.9	1	1	1.9050	

Table 11. 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 함량

	1차실험	2차실험		3차실험	평균	표준편차 (SD)	상대표준 편차(RSD)
		반복성	직선성				
Rutin	10.52	12.13	11.51	12.58	11.69	0.89198	7.63
Quercetin	2.99	1.92	1.99	2.16	2.27	0.49373	21.75

3.4. 결과

본 시험법은 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 정량 분석 가능여부를 확인하기 위해 진행되었 다.

제공된 시험법에 따라 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 정량을 위해 시료를 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(메탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication, 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45µm 멤브레인 필터로 여과하고 UV(DAD)를 이용하여 370nm에서 분석하였다.

시료 중 Rutin 및 Quercetin의 분석가능여부를 확인한 결과, 표준용액과 시험용액에서 Rutin은 약 12분 대, Quercetin은 약 28분대에 검출되었으며, 표준용액과 시험용액의 spectrum이 동일한 것으로 확인되었으며, 이를 토대로 시료 중 Rutin 및 Quercetin의 함량을 정량한 결과 Rutin 함량은 10.52±0.20mg/g, Quercetin 함량은 2.99±0.07mg/g을 나타냈다.

반복성 및 직선성 실험을 위하여 1차실험과 다른 날하여 약 300mg씩 3개의 시료를 위하여 실험하였으며, Rutin 함량은 12.13±0.19mg/g, Quercetin 함량은 1.92±0.07mg/g을 나타냈으며, 반복간의 편차는 크게 나타나지 않았으나 1차실험에 산출된 함량보다 Rutin은 약 1.61mg/g 높은 함량을, Quercetin은 약 1.07mg/g 낮은 함량을 나타냈다.

시료량에 따른 직선성 실험을 위하여 시료 300mg을 기준으로 하여 100mg과 500mg을 위한 3개의 시료를 이용하여 실험을 진행하였으며, 시료처위량에 의한 Rutin 및 Quercetin의 함량에 차이는 크게 보이지는 않았다.

2차 실험의 결과, 개별 실험 간의 함량에 대한 편차는 크게 보이지 않았으나, 1차 실험을 통해 확인된 함량과의 차이가 발생하는 것을 확인하였으며, 이를 확인하기 위하여 다른 일자의 재현성 실험을 추가로 진행하였다. 그 결과, Rutin 함량은 12.58±0.40mg/g, Quercetin 함량은 2.16±0.30mg/g을 나타냈으며, 지금까지의 결과를 종합하여 보았을 때 Rutin의 평균 함량은 11.69mg/g, 상대표준편차(RSD)는 7.63으로 나타났으며, Quercetin의 평균 함량은 2.27mg/g, 상대표준편차는 21.75로 나타났다.

위 실험결과를 종합하여 볼 때, 본 시험법을 이용하여 항질염수추출물 중 Rutin 및 Quercetin을 분석할 때는 대는 문제가 없는 것으로 사료되며, 시험용액의 경우 Rutin의 Peak분리도를 좀 더 개선할 필요가 있다고 사료되며, Quercetin의 상대표준편차가 큰 것으로 보았을 때 분석방법에의 재현성이 문제가 있는 것으로 판단되므로, 분석방법을 좀 더 개발할 필요가 있다고 사료된다.

-식약처 사전면담 자료

3. 제조방법 및 그에 관한 자료

3.1 원료

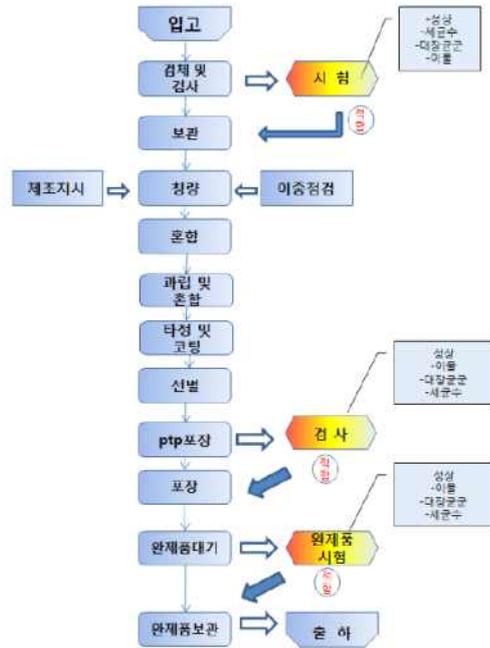
황칠나무 추출물

3.2 제조방법

황칠나무 잎을 파쇄하여 흐르는 물에 수세 후 물 45℃에서 48시간 동안 건조시킨 후, 1 ton 추출기를 이용 황칠 무게의 10배의 물을 사용하여 4 시간 동안 추출하여 16 brix에 맞추어 약 20 L의 농축물을 동결 건조 하였다.

3.3 제조 공법

(1) 제조공정	(2) 공정, 식량, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화	(4)수율(%)
원재료	황칠잎--200kg	Quercetin	
↓			
원료세척			
↓			
건조	45℃, 48시간 (온풍건조)--60kg		100
↓			
추출	100℃, X 10배, 4시간 (30kg)		
↓			
농축	16 brix (농축액 20L)		
↓			
동결건조/추출분말	5.47kg	0.075mg/g	18.2
↓			
제형제조	경제		



4. 원료 및 성분의 특성에 관한 자료

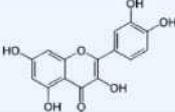
4.1 원료의 특성

축갈색 분말

4.2 기능성분(지표성분)

Quercetin

4.3 기능성분(지표성분)의 특성

○ 지표성분 :	Quercetin
구조	
IUPAC name	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one
분자식	: C ₁₅ H ₁₀ O ₇
분자량	: 302.24
CAS Number	: 117-39-5

● 황색의 분말로 특유의 냄새가 있으며 약간의 쓴맛이 있다. 금속이온과 질레이트 복합물을 만들고 특유의 색을 나타낸다. 플라보노이드계(flavonoid)이며 일반적으로 케르세틴의 배당체로서 채소와 과일 등에 널리 분포해있다. 루틴(추출물)을 산성수용액 또는 효소로 가수분해하여 얻어지는 것으로서 열에 강하다. 차광하여 냉장 보관한다. 토끼에 경역투여 시 LD50(열대50)은 100mg/kg 정도이다.

● 생합성(Biosynthesis) : 페닐알라닌(phenylalanine)은 phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate-4-hydroxylase와 4-coumaroyl-CoA-ligase를 이용하여 phenylpropanoid pathway를 거쳐 4-coumaroyl-CoA로 전환되며, 여기에 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol synthase를 이용하여 malonyl-CoA 3분

자를 붙여 tetrahydroxychalcone을 형성시킨다. Tetrahydroxychalcone은 다시 chalcone isomerase를 이용하여 naringenin으로 전환되고, naringenin은 flavanoid 3'-hydroxylase에 의해 eriodictyol로 전환, 이는 다시 flavanone 3-hydroxylase에 의해 dihydroquercetin으로, 최종적으로는 flavonol synthase에 의해 quercetin으로 전환되는 생합성 과정을 거친다.

● 생리활성

- [1] 항바이러스 활성 (antiviral activity)
- [2] 항염증활성 (anti-inflammatory activity)
- [3] 항암활성 (anti-cancer activity)
- [4] 항알러지 활성 (anti-allergic activity)
- [5] 섬유근육통 완화기능 (fibromyalgia attenuating effect)
- [6] 대사증후군 : 에너지소비를 증가시키고, 미토콘드리아에서의 에너지발생을 증가시켜 운동지구력을 개선시킬. 또한 지방세포 증식을 억제하며, 혈압과 지질도콜레스테롤을 감소시키는 것으로 보고됨.
- [7] 항산화 활성 (anti-oxidant activity)

● 약물 상호작용 (drug interaction) : fluoroquinolones과 같은 항생제, taxol/paclitaxel과 같은 CYP2C8 억제제와 상호작용하여 예측할 수 없는 부작용을 유발할 수 있음.

5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

5.1 실험방법

(1) 표준용액제조 및 standard curve작성

표준품 quercetin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 ethanol로 제조한 것을 표준용액으로 하였다. 이를 water : 5% acetic acid : acetonitrile(40:30:30, v/v)을 이용하여 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용액을 이용하여 작성한 표준검정으로부터 quercetin 함량을 구하였다.

(2) 표준용액의 순도

Quercetin 1000 ppm 농도에서 HPLC 분석을 2반복 수행하여 나타난 chromatogram의 면적비에 따른 백분율을 계산하였다.

(3) 시험용액의 조제

- 황칠나무 추출분말 1 g을 에탄올에 녹여 24시간 추출 후 Whatman No. 2 (Cat. No 1002-110)를 이용하여 여과하였다.
- 여과된 에탄올 추출분을 분석용 시료로 사용하였으며 5회 반복하여 분석하였다 (시험용액의 총량, 63.9 ml).

(4) HPLC분석 조건

5.2 실험결과

(1) Quercetin의 standard curve작성

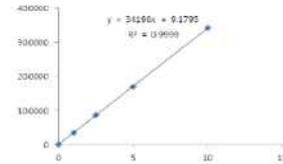
STD 1-5의 5개의 농도로 standard curve를 작성한 결과 99.9%의 상관계수(R²)를 나타내었다.

Method of HPLC- Quercetin

HPLC	Waters 2695
Column	Agilent – ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250×4.6 mm), 5 µm
Column Temperature	40 °C
Detector	UV 375nm
Mobile phase	0.1% Formic acid : MeOH = 65 : 35 → 65 : 35
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	10µl
Sonication	1 hr. (50 °C)

Quercetin

0	0
1	34438
2.5	86554
5	169008
10	342675



추출물	면적	시료량	희석배수	Quercetin(mg/g)
추출물 1-1	58251	2.1291	100	79.99513454
추출물 1-2	51386	1.9199	100	78.25521826
추출물 1-3	53156	2.0205	100	76.92068177
추출물 1-4	61093	2.2102	100	80.8200862
추출물 1-5	53716	2.0385	100	77.04481528

(2) 계산식

Quercetin 함량에 사용된 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Quercetin함량(mg/g)} = \frac{\text{STD농도} \times \text{TEST면적}}{\text{검체농도} / \text{ml} \times \text{STD면적}}$$

6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

6.1 식품의약품안전처 고시 제2008-72호 건강기능식품 기능성 원료인정에 관한 규정 제13조(제출자료의 내용 및 요건) 제7호 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 중 “가. 원재료 또는 제조과정 중에서 오염 또는 잔류의 가능성이 있는 유해물질로부터 안전성을 확보하기 위해 필요한 항목에 대한 규격과 시험방법을 설정한다. 나. 유해물질의 시험방법은 「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내외에서 공인된 방법을 사용하여 한다. 다만, 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 인정되는 경우 신청자가 제시하는 시험방법을 사용할 수 있다. 다. 국내 건강기능식품첨가기와 시험성적서를 제출하여야 한다.”에 따라 제출자료를 작성하였다.

****유해물질규격설정항목**

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	
규격항목	성상	촉각적분말	
	Quercetin (mg/g)	납	0.075
		중금속 (µg/g)	10
		수은	3
		카드뮴	3
		아연	3
미생물	대장균군	음성	
	세균수(cfu/g)	-	
	곰팡이독소	-	
	잔류분말	-	
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 : -	
	잔류농약	59종	불검출
		5종	-

6.2 시험방법

1) 비소

제 10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별시험 (1) 비소 ① 컷파이트법에 따라 시험한다.

2) 납, 카드뮴

제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 1) 시험용액의 조제 2) 측정 (1) 원자흡광광도법 또는 (2) ICP법에 따라 시험한다.

3) 총 수은

제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별시험 (5) 수은 분석법에 따라

7. 안전성에 관한 자료

<건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도>

- 의사결정도 : '다'
- <안전성에 관한 제출자료>
- 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도에 따른 제출 자료
- 1) 섭취 근거 자료
- 2) 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료
- 3) 섭취량평가자료
- 4) 영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료

7.1 섭취근거 정보

2.3 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4 국내·외 사용 현황과 같다.

7.2 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등)DB 검색 정보

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	중부반 호
Pubmed	(Dendropanax morbifera) And (safety or adverse or toxic)	X	X	-
	(Dendropanax trifidus) And (safety or adverse or toxic)	X	X	-
Toxline	(Dendropanax trifidus) And (safety or adverse or toxic)	X	X	-
	(Dendropanax morbifera) And (safety or adverse or toxic)	X	X	-
Natural Medicines	Dendropanax morbifera	X	X	-
	Dendropanax trifidus	X	X	-
PDR for Herbal Medicine	Dendropanax morbifera	X	X	-
	Dendropanax trifidus	X	X	-

○ Pubmed

첨부 1. 황칠과 같이 두릅과(Araliaceae)에 속하는 Dendropanax arboreus는 Hep-G2, A-431, H-4IIE 및 L-1210등과 같은 암 세포주에 대해 세포독성을 보였으나 정상적인 간 세포에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았음 (Planta Med. 1995 Oct;61(5):470-1)

7.3 섭취량 평가 정보 : 자료출처 [한글동의보감, <http://donguibogam.co.kr/>]

* 신장염료의 제안 섭취량
- 일일 섭취량 : 1.0 g/일

[1] 중국 <중국본초목록> : 백반홍하(白半楓荷)

- 기원: 오갈피나무과 (두릅나무과: Araliaceae) 식물인 변엽수삼 (變葉術參: *Dendropanax proteus* (Champ.) Benth.)의 뿌리이다.
- 채취 및 제법: 가을과 겨울철에 채취하여 햇볕에 말린다.
- 효능: 거풍제습(祛風除濕), 서근활혈(舒筋活血).
- 주치: 풍습비통(風濕痺痛), 반신불수(半身不遂), 열파상(熱瘧疾), 편두통(偏頭痛).
- 용량: 하루 15~30g을 물로 달여서 복용한다. 문헌: <광서약용식물명록, 331면>

[2] 약역문 <한국본초도감> : 봉하리(楓荷梨)

- 기원: 두릅나무과의 날부른리나무 흰칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)의 뿌리와 가지이다.
- 성미: 맛은 달고 성질은 따뜻하다.
- 효능: 거풍습(祛風濕), 활혈맥(活血脈) --- 해설: ① 풍습성으로 인한 반신불수, 사지마비등병에 유효하며, ② 생리불순에는 이 약 20그램에 물 500ml를 넣고 달여서 복용한다.
- 채취: 흰칠나무의 뿌리 및 줄기를 가을 또는 겨울에 채취한다.

[3] 기타

- 풍사(風邪)를 몰아내고 습사(濕邪)를 없애며 혈액을 잘 통하게 하는 효능이 있다. 풍습 비통, 반신 불수, 편두통, 월경 불순을 치료한다.
- <광서초약> : "풍사를 몰아내고 습사를 없애며 월경을 조절하고 혈액 순환을 촉진시키는 효능이 있다."
 - <활강민간상용초약> : "풍사를 몰아내고 습사를 없애며 근육과 힘줄을 풀고 혈액 순환을 촉진시키며 통증을 완화시키는 효능이 있다."
 - 용량: 하루 20~40그램을 물로 달여서 복용한다. 또는 술에 담가서 복용한다.

다.

- <광서초약> : 풍습비통(風濕痺痛)
흰칠나무뿌리, 구동근(狗脊根), 각 37.5그램, 우슬초뿌리, 계지(絳枝) 각 12그램, 홍당(紅糖), 미주(迷酒) 등을 섞어 달여서 차저첩 만들어 마신다. 연속 3일 복용하고 2일 중지한다. 이것을 1차로 기간으로 하여 5차로 기간을 계속한다.
- <광서민간상용초약> : 진상(陳傷), 풍습성 관절염
흰칠나무뿌리, 호장근(虎杖根), 홍홍목근(紅栲木根: 서향나무의 뿌리), 빌려근(蓆藜根: 청미래덩굴뿌리) 각 600그램, 목통(木通: 으름덩굴줄기) 300그램을 소주 3600그램에 달가 7일 동안 두면 풍습주(風濕酒)가 된다. 이것을 하루에 한 작은 술잔씩 복용한다.
- <광서민간상용초약> : 편단(偏癩) 사지마비, 중풍
흰칠나무뿌리 20~40그램을 물로 달여 3개월 동안 계속 복용한다.
- <광서초약> : 편두통
흰칠나무 줄기 75그램을 물로 달여서 피꺼기를 버린 후 계란 한 개를 넣고 끓여서 즙과 계란을 복용한다.
- <광서초약> : 월경 불순
흰칠나무 뿌리 19그램을 술로 볶은 후 달여서 1일 1번씩 반속에 복용한다.
- <중화본초(中華本草)> : 풍습비통(風濕痺痛), 편단(偏癩), 두통(頭痛), 월경부조(月經不調), 질타손상(跌打損傷), 장증(癩瘡).
15~30g를 물에 달여서 복용(水煎服)한다. 대제량(大劑量)은 45g까지 사용할 수 있으며, 혹은 술에 담가 복용한다(或浸酒). 외용(外用): 적당량(適量)을, 짓뭉어 붙이거나(搗敷), 혹은 달인 물에 씻는다(煎水洗).
- 또한 흰칠나무는 식품공정상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 제한적 사용 가능 원료로 등재(부리)되어 있다 (<http://fse.foodnara.go.kr/origin/>). 흰칠나무 제품으로 흰칠수액, 흰칠임자, 흰칠나무 농축액 및 효소산 등 다양한 형태로 판매 및 섭취하고 있는 것이고, 계속해서 섭취하는 원료로 이에 관한 부작용은 보고되지 않아 안전하다고 생각되어진다.
- 이에 본 인체적용시험에서 시험용제품의 일일섭취량을 하루 1.0g으로 설정하였다.

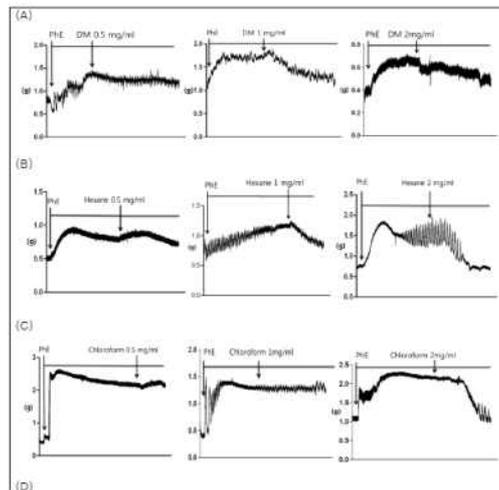
7.4 영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료

8. 기능성내용 및 그에 관한 자료

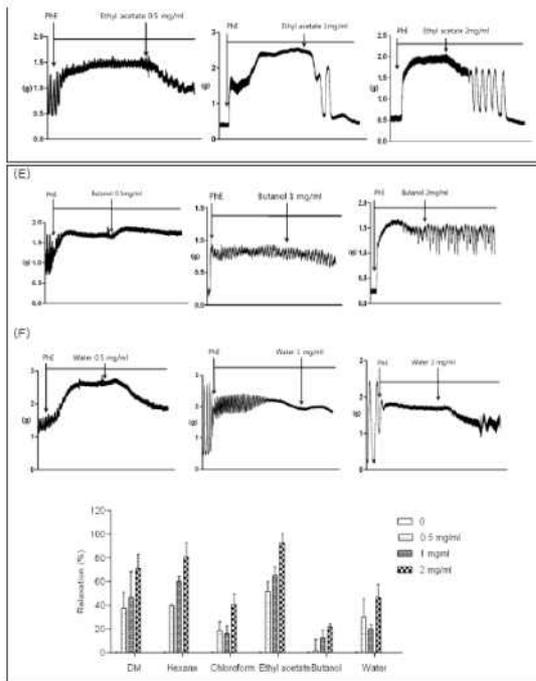
8.1 제안된 기능성내용 및 섭취량

- 기능성 내용 : 남성경년기 증상 개선에 도움을 줄 수 있음
- 일일 섭취량 : 1.0 g

1. 토끼 동경해면체 절편을 이용한 생체외 실험에서 흰칠추출물의 이완작용 확인



시험 종류	디자인	대상자	섭취량/섭취기간	바이오마커	결과	비고
흰칠나무 추출액	RCT, DB	• 비알콜성지방간 비만 대학생 • n = 20 • 2그룹= 흰칠나무추출액 무어군/ 플라세보무어군	60ml*2회/일/12주	• BMI • ALT/AST	• BMI • ALT/AST : 군간 유의적 개선효과 확인됨	• 한국영양학회 임명토스상업학회 논문지 제6권 3호, pp142~146



○ 황칠나무 열수추출물의 초기 농도에서 PDE5를 억제하는 효과가 우수하게 측정되었고 추후 실험 결과에 따라 농도별 최적 용량을 이용하여 이완능력 시험을 실시한 결과, 1mg/ml의 열수추출물과 에틸아세테이트 열수추출물이 PDE5의 억제 효과가 우수함을 증명함

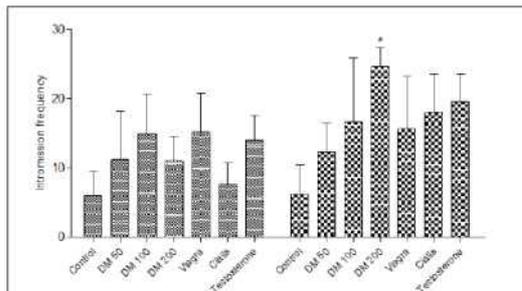
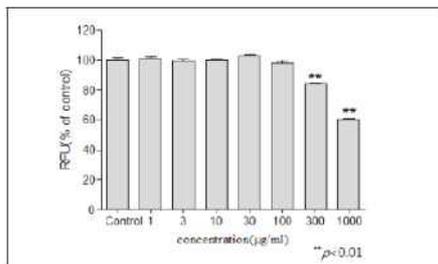


Fig 7. Effect of administration of aqueous extract of *Dendropanax morbiifera* on intrusion frequency of male rats. Values are means of five replicates±SD (* $p < 0.05$)

○ 황칠나무 열수추출물을 한피 수컷에게 구강투여 후 암컷과 교미를 유도하여 교미 행동의 빈도, 발기 능력, 황칠나무 열수추출물 투여한 면에서 교미를 하기 위해 암컷에게 올라가는 횟수, 삽입 횟수, 삽입 유지시간을 측정함 결과 모두 유의성 있게 교미행동이 증가됨을 증명함

3. PDE5 억제제를 통한 비아그라 활성 유사도 평가



2. 흰쥐에 황칠나무추출물 투여 후 고미행동 및 발기능 평가 능력 향상 확인

Group	Body weight		Organ weight			
	0 day(g)	30 day(g)	Testes weight(g)	Epididymis weight(g)	Prostat weight(g)	seminal vesicle weight(g)
Control	270.7±2.7	425.1±7.1	1.88±0.03	1.05±0.03	0.857±0.04	1.18±0.15
DM 50	270.6±2.9	416.2±10.2	1.95±0.06	0.99±0.04	0.66±0.03	1.29±0.10
DM 100	270.8±2.4	433.8±10.7	1.87±0.05	1.04±0.02	0.81±0.03	1.59±0.83
DM 200	270.7±2.4	414.7±10.9	1.67±0.03	1.04±0.04	0.91±0.03	1.49±0.12
Viagra	270.8±2.2	420.8±6.6	1.747±0.05	1.08±0.02	0.83±0.04	1.48±0.07
Cialis	270.6±2.2	425.7±8.7	1.61±0.02	0.99±0.02	0.60±0.03	1.40±0.09
Testosterone	270.6±1.3	423.2±5.2	1.73±0.03	1.00±0.04	0.63±0.03	1.57±0.05

Values are means of five replicates±SE (n=5)

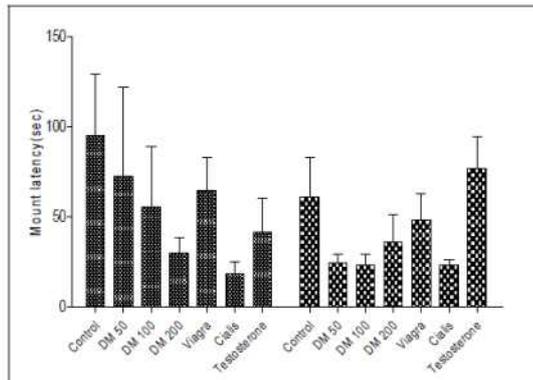


Fig 4. Effect of administration of aqueous extract of *Dendropanax morbiifera* on mount latency of male rats. Values are means of five replicates±SD

○ 황칠나무 추출물이 고농도에서 PDE5를 억제하는 영향도 증명하였으나 고농도에서 보이는 활성은 주요 발기 기전은 다른 기전에 의한 것으로 추정할 수 있음

8.2 임상적용시험

• 사내 간이 임상시험을 통해 발기능력 임상시험을 실시함

Domain(Questions)	복용 전 (n=10)	복용 후 (n=10)
Erectile function (1, 2, 3, 4, 5, and 15)	22.2	25.6
Intercourse satisfaction (6, 7 and 8)	7.7	8.4
Orgasmic function (9 and 10)	7.3	9.1
Sexual desire (11 and 12)	5.9	6.9
Overall satisfaction (13 and 14)	6.8	7.9

○ 황칠나무 열수추출물을 이용한 사내 간이임상시험을 실시하여 크게 5가지 항목에 대한 설문조사를 실시 [Erectile function(발기능), Intercourse satisfaction(성교만족도), Orgasmic function(절정감), Sexual desire(성적욕구), Overall satisfaction(전반적인성생활만족도)]한 결과 황칠나무 열수추출물 복용 후 대체적으로 발기능력과 성적 욕구 및 성만족도 전반에 걸쳐 성기능이 향상됨을 증명함

9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

9.1 섭취량 설정 근거 자료

[1] 중국 <중국본초도록>

- 용량: 하루 15~30g을 물로 달여서 복용한다. 문헌: <중서약용식물명록, 331면>

[2] 안역균 <한국본초도감>

- 약 20그램에 물 500ml를 넣고 달여서 복용한다.

[3] <홍강민간상용초약>

- 용량: 하루 20~40그램을 물로 달여서 복용한다. 또는 술에 달여서 복용한다.

[4] <강서초약>

황칠나무 줄기 75그램을 물로 달여서 찌꺼기를 버린 후 계란 한 개를 넣고 끓여서 즙과 계란을 복용한다.

[5] <중화본초(中華本草)>

15~30g를 물에 달여서 복용(水煎服)한다. 대재량(大劑量)은 45g까지 사용할 수 있으며, 혹은 술을 달가 복용한다(或酒酒).

[6] 또한 황칠나무는 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 제한적 사용 가능 원료로 등재되어 있다 (<http://fse.foodnara.go.kr/origin/>). 황칠나무 제품으로 황칠수액, 황칠잎차, 황칠나무 녹차와 및 효소한 등 다양한 형태로 판매 및 섭취하고 있는 것이고, 계속해서 섭취하는 원료로 이에 관한 부작용은 보고되지 않아 안전하다고 생각되어진다. 일반적으로 유통되고 있는 황칠제품의 섭취량은 추출물로서 약 1.5 ~ 15g으로 확인됨.

[7] 비알콜성 지방간 비만대학생을 대상으로 간 기능 임상시험을 수행한 결과에서 일일 2포(60ml/pk) 섭취한 군에서 유의적인 ALT 및 AST 상승을 확인하였음. 황칠추출물의 용량은 나와있지 않으나 일반적으로 고형분으로서 4 ~ 5%를 함유하고 있을 경우 고려할 때 추출물로서 약 4.8 ~ 6.0g으로 예측할 수 있음. 따라서 이들 제품 또는 시험물질보다 낮은 용량이라는 하지만 일일섭취량 1.0g/day는 임상에서의 경년기 증상을 개선시킬수 있을 것으로 기대됨.

[8] 특히 SD rats에서의 비임상연구에서 50 ~ 200mg/kg에서 생기능을 개선시킨 바 이를 인체로 외삽했을때의 섭취량은 약 0.5 - 2.0g으로 계산됨. 따라서, 본 인체적용시험에서 시험용제품의 일일섭취량을 하루 1.0g으로 설정하였다.

9.2 제안 섭취량

1일 섭취량: 1.0g/day

9.3 주의사항 등

황칠은 임상적으로 판매되고, 섭취하고 있는 것으로 식품공전에 등록 되어있으며, 이에 관한 부작용은 보고되지 않아 특이적인 부작용이 발생할 것으로 예측되지 않는다.

10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

‘건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정’(식품의약품안전청고시)에 따라 의약품 용도로 사용되는 원료에 해당하지 않으며 의약품과 유사한 건강기능식품이 아니다.

1. 제2조 “건강기능식품에 사용할 수 없는 원료” 해당 여부

제2조 1항의 “건강기능식품에 사용할 수 없는 원료로서 식물성원료, 동물성원료, 단일성분 등의 원료, 기타 원료”에 포함되지 않는 원료물질이다. 또한 제1항의 원료를 제외한 원료 중 “, 섭취방법 또는 섭취량에 대한 전문적인 지식이 필요로 하는 것, 원료의 특성상 심각한 독성이나 부작용이 있는 것으로 알려진 것, 인체의 구조 및 기능에 위해를 가할 우려가 있는 것”에 본 원료물질은 포함되지 않는다.

2. 제3조 “의약품과 같거나 유사한 건강기능식품” 해당 여부

「약사법」 제45조 제4항에 따른 “기성한약서에 대한 표준규정”에서 정한 기성한약서 [방약합편, 동의보감, 황악집성방, 광재비교, 제중신편, 약성가, 사상의학, 의학입문, 경약전서, 수세보현, 본초강목]와 “한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정”에서 정한한약조제지침서에서 수재되어 있는 목록으로 원료의 종류 및 함량이 동일한 것은 의약품과 같거나 유사한 것으로 판단하는데, 본 원료물질은 여기에 포함되지 않는다. 또한 허가된 의약품의 주성분[생약인 경우에는 원료의 제조방법, 용량 및 용도 등이 모두 동일한 경우에 한한다]은 건강기능식품에 사용할 수 없는데, 본 원료는 이에 포함되지 않는다.

따라서, 본 원료물질인 황칠나무추출물은 위의 각호 “의약품의 용도로만 사용되는 원료 및 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품”에 포함되지 않는 건강기능식품 원료에 해당된다.

6. 황칠나무 제품 개발(업그레이드 및 신제품)

○ 자사가 개발완료 시판중인 황칠나무 전문제품 4종 중 보완이 필요한 제품 1종 선정, 보완점 발굴

- 자체개발 황칠제품



○ 제품개발 품목-보완점 발굴

- 자체 상품개발하여 시장유통 및 판매결과 기존제품의 효능이나 포장인 좋지만 가격이 너무 고단가여서 소비자의 선택권이 제한됨
- 따라서 황칠의 소비자 접근성증대 및 대중화를 위하여 기존제품의 개선보다 황칠을 이용한 저가의 신제품 개발이 필요하다는 전문가의 의견수렴
- 황칠을 쉽게 접할수 있는 제품 중 티백형태의 차를 개발하여 황칠 대중화하고자 함
- 기존제품은 고가의 프리미엄제품으로 유지를 함과 동시에 소비자의 폭을 다양하게 확보할수 있는 티백차를 개발하여 상품화
- 미국지사인 새롬USA를 통하여 미국내 황칠차를 소개 및 판매 유통

가. 황칠 제품개발 (알파천애비방)

- 알파 천애비방 진액 제조 기록서

PRODUCTION RECORD

제 조 기 록 서

제품명	알파천애비방
------------	--------

분 류	기타가공품
제 조 번 호	J25001
제 조 단 위	33,000병
제 조 일 자	2016.03.28
포장 완료일자	2016.04.28



제 조 기 록 서

제품명	알파천애비방	제조번호	J25001
제조업체	기타가공품	제조단위	33,000병
제조과정	천한장사의 약성	제조일자	2016.03.28
		유통기한	제조일로부터 2년

No	원료명	사용량(g)	비율 (비율[%])	비고	No	비율명	사용량	비율비율
1	홍삼농축액	99,000	10	80a				
2	다주농축액	33,000	8	300a				
3	지시당귀액 농축액	198,400	18	40a				
4	홍삼농축액	297,000	33	40c				
5	엑스틴	297,000	33					
6	천궁농축액	19,800	2	650a				
7	당귀농축액	19,800	2	300a				
8	적지황농축액	19,800	2	650a				
9								
10								
합계		990,000g	100				0	0

1. 원료 출고 및 청량준비

작성일	작성자 (제조관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	사용 설명 및 기구
2016.03.28	서병수	노영진	원자차량, 청량용기, 수분측정기

No	공정 중 주의 사항	확인사항
1	청량 사용 기구 및 청량실의 청결 상태를 확인	○
2	원자차량의 열원과 수위를 점검	○
3	용량실의 용기상태를 확인	○
4	제조도시기계의 온도, 사용량, 사용빈도를 확인	○
5	해당 원료를 원료실로 보내 청량실로 투입 - 적량확인, 표시사항 확인	○

특이사항 및 부속품 사용

2. 원료 칭량

작성일	작성자 (제조관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	사용 설명 및 기구
2016.03.28	서병수	노영진	원자차량, 청량용기, 수분측정기

No	공정 중 주의 사항	확인사항
1	작성자는 원료를 청량실로 청량실은 작성자가 청량한 원료를 이중 점검하여 사용함을 기록한다.	○
2	작성자는 용량실-수분측정기-수분측정기-수분측정기	○ (2016.03.28)
3	지시당귀 액도량-각액도를 측정한다. (수분측정기)	○
3	작성자는-당귀농축액-수분측정기-측정한다.	X (작성중 오류)
4	청량 후 청량실 안에는 잔이 없어야 한다.	○
5	청량이 종료되면 청량기록표를 작성하여 용기를 부착한다.	○

지 시 량				사 용 량	
원재료명	총량	원재료명	총량	작성자	확인자
홍삼농축액	99,000			서병수 노영진	
다주농축액	33,000				
지시당귀액 농축액	198,400				
엑스틴	297,000				
천궁농축액	19,800				
당귀농축액	19,800				
적지황농축액	19,800				

결과 설명 : 양호(○) 불량(X) 불량(△)

결과 점검			평가	확인자
항목	내용	결과		
청량실	청량실의 위치	b		서병수
청량용기	청량실용 용기	○		
용기	기 용	○		
용기	고유액 세척과 청소를 가지고 있어, 오차가 없어야 한다.	○		
용기	오염이 없다.	○		
자량계	Zero point	○		
자량수분	분별되어 된 용액 위치	○		
특이사항	및 부속품 사용			

3. 추출

작성일	작성자 (제조관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	사용 설명 및 기구
2016.03.28	서병수	노영진	원자차량, 청량용기, 수분측정기

No	공정 중 주의 사항 (확인사항- 0, 1)	확인사항
1	원료의 양 및 온도 확인, 청량수 투입량 확인	○
2	원료의 상태를 확인 (가용액고형확인, 청량실, 작동상태)	○
3	추출기구의 상태를 확인	○
4	추출온도 (100°C) 확인	○
5	추출시간 (5N2) 확인	○
6	추출이 완료된 후 여과기를 통하여 잔류물 제거	○

추 출 조 건			확인사항
원료량	용량수	비 고	
200kg	4,000L		서병수

No	추출시작일시	추출 온도	추출 종료일시	추출시간	성상	추출여량
1	2016.03.28	99°C	2016.03.28	5hr	간혹이상	2,200L

결과 설명 : 양호(○) 불량(X) 불량(△)

기 준			평가	확인자
항목	내용	결과		
작성량	용액	안개 및 무진상태 여상 없어야 한다.	○	서병수
	분말과	분말과, 거품, 자물상대기 이상 없어야 한다.	○	
	추출기	원료상대기 이상 없어야 한다.	○	
	작동상태	스피드, 온도, 압력 등 작동상태가 정상이어야 한다.	○	
작성온도	온도	정확하다, 설정온도가 이상 없어야 한다.	○	
	추출온도	100°C가 유지되어야 한다.	○	
	추출시간	4시간 이상 추출하여야 한다.	○	
작성수분	비 율	10%에 적당	○	
	잔 량	0.5~0.6g/ml	○	
작성용기	추출기	추출시간에 부합된 차관 및 청소, 청결유지	○	

특이사항 및 부속품 사용

2016.03.28 서병수 노영진 : 3,200L 추출된

4. 농축

작성일	작성자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 형태 및 기구
2016.03.29	서민우	노일현	김희정	농축기

No	공정 중 주의 사항 (+확인항목- O, X)	확인항	작성자확인
1	냉각수 상태를 확인 (기온상대, 유해성대, 화물상대, 작동상대)	O	서민우
2	50℃에서 20분 이상 100% 이상 건조농축을 한다	O	
3	농축의 기를 발생으로 인한 농축의 오버를 체크 한다.	O	
4	냉각수 온도 시 0℃를 냉각수 정지로 전환하고, 냉각수를 배출한다.	O	
5			
6			

구분	농축시작일시	농축종료	농축종료일시	농축시간	병상	농축량	작성자확인
1차 농축	2016.03.29	12:00	2016.03.29	2시간	20L		서민우
2차 농축				시간			
3차 농축				시간			

공정 중 검사

평가 방법 : 양호 (O) | 불량 (X) | 점검 (△)

기준		평가	작성자확인
작성전	포일력	정확하며, 기온상대, 작동상대가 이상 없어야 한다.	O
	농축기	정확하며, 작동상대가 이상 없어야 한다.	O
	냉각수 양	정량주대, 냉각수확인	O
작성중 (수시)	농축기 발효	농축기 발효 확인	O
	농축온도	50℃를 유지한다.	O
	농축시간	고정된 100% 이상 농축하며, 시간을 체크한다.	O
작성후	냉각수	고온의 항염을 갖는 알칼리성 유해성 여부	O
	알칼리	-0.08 ~ -0.09 pH기온	O
작성후	농축기	냉각수 양 - 외부용 표본이 적혀있다.	O

특이사항 및 부적합 사유

※ 농축종료 후 고반시 즉시 냉동(-24℃) 상태로 보관한다.

※ 이물질 제거 후 Log My All

5. 교반

작성일	작성자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 형태 및 기구
2016.03.29	서민우	노일현	김희정	교반기

No	공정 중 주의 사항 (+확인항목- O, X)	확인항	작성자확인
1	작업장 및 기계기구 청소하여 청결상태 확인	O	서민우
2	작업복장 및 동일한 보호구는 청결한 상태로 착용 확인	O	
3	교반기 동전회 같은 여부 확인	O	
4	심내 온/습도를 점검 함 것.	O	
5			
6			

원료		사용량		작성자	품질자
종류명	수량 (kg)	종류명	수량 (kg)		
홍삼농축액	99,000	홍삼농축액	87	서민우 김희정	
당수농축액	79,200	당수농축액	87.2		
기시당구리	158,400	기시당구리	158.4		
농축액		농축액			
황동농축액	297,000	황동농축액	297		
엑스프린	297,000	엑스프린	297		
완성농축액	19,800	완성농축액	19.8		
당구농축액	19,800	당구농축액	19.8		
옥지황농축액	19,800	옥지황농축액	19.8		

공정 중 검사

평가 방법 : 양호 (O) | 불량 (X) | 점검 (△)

기준		평가	작성자확인
작성 전	작업장	정결상태 유지	O
	교반기	정수상태 유지	O
작성 중	기온	기온	O
	알칼리	알칼리 농도 및 pH가 적당여부 확인	O
작성 후	이물질	없어야 한다.	O

특이사항 및 부적합 사유

4. 충전

작성일	작성자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 형태 및 기구
2016.03.30	서민우	노일현	김희정	교반기

No	공정 중 주의 사항 (+확인항목- O, X)	확인항	작성자확인
1	장비의 불결 상태를 청소상태 점검 하고 확인.	O	서민우
2	포일력기의 청결 및 보수상태 확인	O	
3	충전율 확인(수시로)	O	
4	충전시 100℃ 유지 하여야 한다.	O	
5			
6			

충전 단위	충전 수량 (±5%)	확인항	작성자확인
30ml/1병	29,000	O	서민우

공정 중 검사

평가 방법 : 양호 (O) | 불량 (X) | 점검 (△)

기준		평가	작성자확인
작성전	포일력기	포일력기의 청결상태 여부, 파손이 없어야 한다.	O
	충전율	충전단위를 정정상태에 맞춰야 한다.	X
작성중 (수시)	포일력기	포일력기는 청결하며 건조된 상태여야 한다.	O
	모공	전체를 청결상태에 보관한다.	X
작성후	모공	전체를 청결상태에 보관한다.	X

특이사항 및 부적합 사유

※ 충전율 2% 부족으로 29ml 충전

5. 포장

작성일	작성자 (책임관리담당자)	확인자 (제조관리담당자)	승인자 (품질관리담당자)	사용 형태 및 기구
2016.03.30	김희정	노일현	김희정	교반기

No	공정 중 주의 사항 (+확인항목- O, X)	확인항	작성자확인
1	장비의 불결 상태를 청소상태 점검 한다.	O	김희정
2	포일력기의 청결 및 보수상태 확인	O	
3	충전율 확인(수시로)	O	
4			
5			
6			

포장 단위	포장량 수량	기준	비고	작성자확인
30ml/30병	890.6g	-	Log 100% 기안	김희정

공정 중 검사

평가 방법 : 양호 (O) | 불량 (X) | 점검 (△)

기준		평가	작성자확인
작성전	포일력기	포일력기 전후의 청결상태를 확인한다.	O
	내포장재	포일력기의 청결상태 유지, 파손이 없어야 한다.	O
작성중 [수시]	포일력기	포일력기 상에는 청결상태를 유지하여 청결상태를 유지하여야 한다.	O
	작성중	충전상태 유지 및 적정량에 이상이 없어야 한다.	X

특이사항 및 부적합 사유

※ 충전율 1% 부족으로 890.6g

나. 황칠 제품개발 (발효황칠환)

- 발효황칠환 제조 기록서

PRODUCTION RECORD
제조 기록서

제 품 명	발효황칠환
분 류	기타가공품
제조 번호	-
제조 단위	1,010포
제조 일자	2016.02.04
포장 완료 일자	2016.02.06

우수건강기능식품전문기업
serom
(주)세롬

1쪽

PRODUCTION ADMINISTRATION RECORD
생산 관리 기록서

구 분	기타가공품	제 품 명	발효황칠환	제조 일자	2016.02.04
제조 번호	0	제조 단위	1,010포	제조 일자	2016.02.04
포장 단위	150g*1포	시 율 기 간	2년		
성 성	알레르겐 표시				

구 분	단 위	원 재(%)	비 율(%)	비 율(%)	비 율(%)
원 재	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%

특 기 사 용

1. 이원재상의 및 용해용 제제시 유해물질은 "기타가공"으로 표시하고 원재의 원형과 "환"으로 표시하고
 2. 유해물질은 포함되어 있지 않음으로 표시함.

2쪽

PRODUCTION ORDER
제조 지시서

구 분	기타가공품	제 품 명	발효황칠환	제조 일자	2016.02.04
제조 번호	0	제조 단위	1,010포	제조 일자	2016.02.04
포장 단위	150g*1포	시 율 기 간	2년		
성 성	알레르겐 표시				

구 분	단 위	원 재(%)	비 율(%)	비 율(%)	비 율(%)
원 재	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%

3쪽

원료 징량 기록서 1

구 분	기타가공품	제 품 명	발효황칠환	제조 일자	2016.02.04
제조 번호	0	제조 단위	1,010포	제조 일자	2016.02.04
포장 단위	150g*1포	시 율 기 간	2년		
성 성	알레르겐 표시				

구 분	단 위	원 재(%)	비 율(%)	비 율(%)	비 율(%)
원 재	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%
비 율	g	151,500	100%	100%	100%

특 기 사 용

1. 원료징량은 원료 사용량에 수치를 기입함. * V 표시함.
 2. 특이징량은 이원재상의 원형과 원형 표시함.

4쪽

PACKING RECORD
포장 기록서 (II)

제품명	발효홍삼	제조번호	0	제조일자	1.010
모장번호	30*300*52	제조일	2016.02.04	이행모장번호	1.010 개
모장사자일	2016.02.06	제조일자	2016.02.06		1004 개

공정	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. 세척수준	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
2. 제어수준	1	4	4							
3. 조립차수준										

수율	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1. 인공물(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. 인공물(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. 인공물(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

INSPECTION REPORT of PACKING PROCESS
포장 공정 점검서

제품명	발효홍삼	제조번호	0	제조일자	2016.02.04	모장번호	1.010
1. 포장물 및 포장재는 완공후에 적정온도에서 적정시간 동안 숙성되었는지?							
2. 포장물 및 포장재는 다른 물질과 혼합되지 않았는지?							
3. 인공물 및 포장재는 포장물과 밀접한 접촉을 유지하였는지?							
4. 인공물과 포장재가 적정온도에서 적정시간 동안 숙성되었는지?							
5. 포장물의 상태가 적정온도인가?							
6. 포장물의 상태는 포장물과 포장재의 접촉을 저해하지 않았는지?							
7. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
8. 포장물(100%, 20%, 50%)는 완공후에 적정온도에서 숙성되었는지?							
9. 포장물과 포장재가 적정온도에서 숙성되었는지?							
10. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
11. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
12. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
13. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
14. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							
15. 포장물과 포장재는 적정온도에서 숙성되었는지?							

11쪽

DATAM

검사성적서

발주번호: 20150210-001 접수번호: 201602010101-001

제품명	발효홍삼	검사목적	30*300*52 발효홍삼(가공)	검사일자	2016-02-11
제품사자일	2016-02-06	검사처	한국농림수산식품검사원	검사번호	2016-02-11-001
제품명	발효홍삼	검사대상	30*300*52 발효홍삼(가공)	검사방법	30*300*52 발효홍삼(가공)
제품번호	0	검사일자	2016-02-11	검사장소	30*300*52 발효홍삼(가공)
제품사자일	2016-02-06	검사시간	2016-02-11	검사장소	30*300*52 발효홍삼(가공)

시험 항목 및 결과

시험항목	가중	결과	합격여부
중금속(납)	10.00(μg/g)	3.2	합격
비밀	중금속	합격	합격

비고: "식품위생법 제37조 제1항 관련 물질의 잔류농약허용기준치"에 관한 안전성, 유전자검사 등 시험을 실시함.

대한생명과학연구원

300-812 서울 강남구 테헤란로 134번길 118 TEL: 02-540-8000 FAX: 02-540-8001

품목제조보고대장

30*300*52

1. 품목제조보고사항 행정안전부 제 20080521045 호

품목제조번호	20080521045205	제품명	발효홍삼	업소명	주식회사 새봄
제품의 유형 (식품군)	가공식품 (가공)	보고일자	2015-11-15		
제품의 품명	발효홍삼(가공) 100%				
성상	갈색의 분말상 이며, 이취가 없어야 한다.				
포장량 (단위)	120g				
용도/용법	1일 1회, 1회 5g씩을 증병한 물과 함께 섭취				
유통기간	2년	품질 유지기간	2년		
유통처/소재	유사상용의 의거	기재처	특급 무기계약근로자 성명 박수진		
기타					

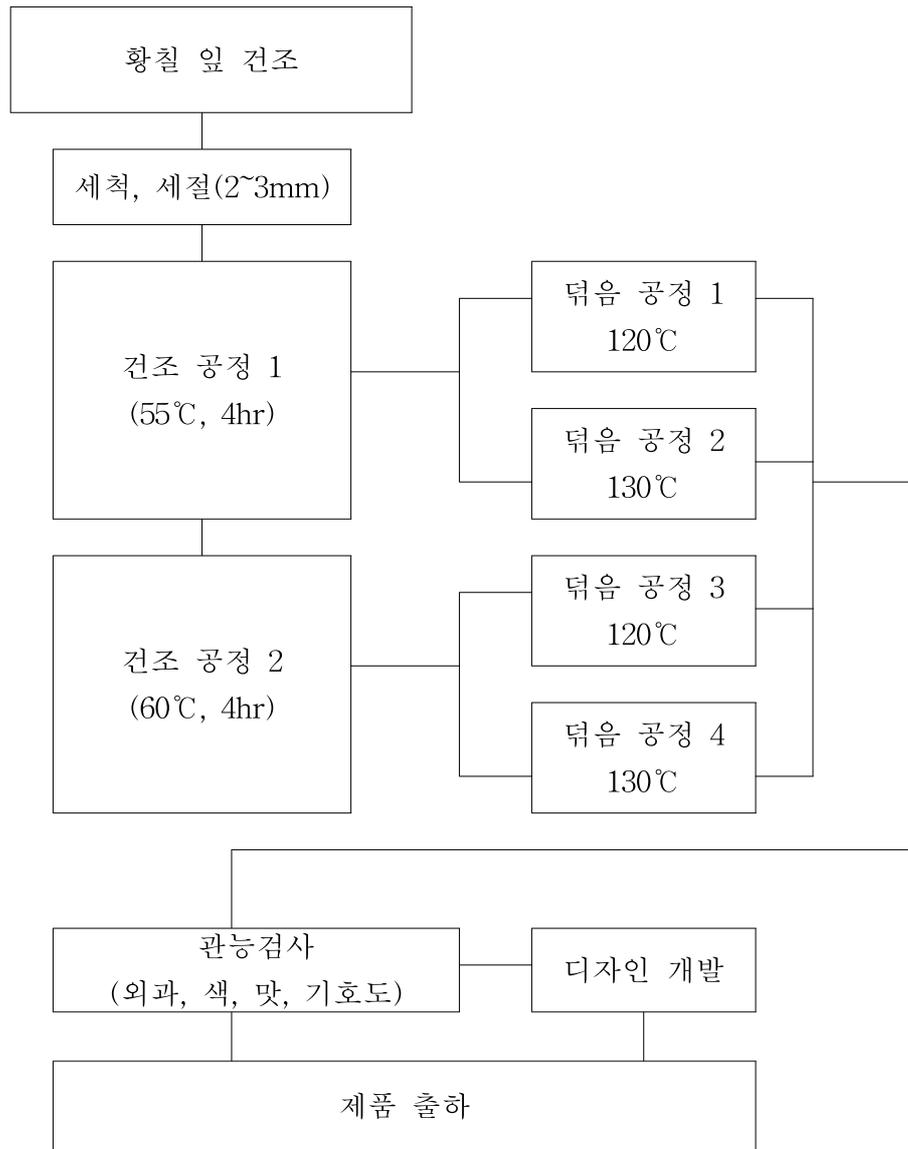
2. 보고서행태보고내용

년월일	제 목 명	기재자
	발효홍삼	



다. 황칠나무 제품개발(황칠티백차 제품 개발)

(1) 고급 황칠 티백차 제조공정



○황칠을 소재를 활용한 고급형 수제차는 상기의 제조 공정도를 기준으로 진행할 것이며, 건조 공정과 볶음 공정을 분류하여 4 종의 공정을 수립하여 제품 개발하여 가장 선호도가 우수한 제품을 관능검사를 진행하여 최종 제품을 생산하려함.

(2) 황칠티백차 제품 개발

가) 황칠 차 전처리 공정 실험

뒤움 온도설정	온도	시간(분)
	110°C	120
	120°C	120
	130°C	90
	140°C	90

각각 10~20회 이상 같은 방법으로 재다를 하여 시제품을 만들어서 전국 차 행사장과 박람회장을 통하여 시음회를 거쳐서 최종적으로 온도 설정을 뒤움 솥 온도 130° C 뒤는 시간 2시간 확정.



「이번 사업을 위하여 특별히 제작된 솥」
소 온도조정.



※ 황칠차 개발을 위한 뒤움

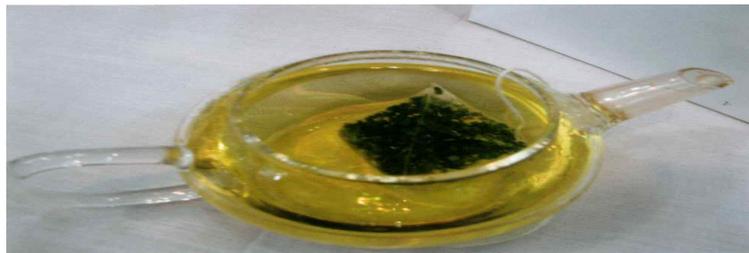
나) 황칠차 개발에 따른 관능검사

관능검사는 완성된 시제품을 전국행사장과 박람회를 통하여 시음회를 거쳐서 다음과같은 결론을 얻었다.

온도/ 시간	덕음솔온도 110°C				덕음솔온도 120°C				덕음솔온도 130°C				덕음솔온도 140°C			
	맛	색 깔	향 기	기 호												
110분	○	○○	△	△												
120분					○	○○	○	○								
130분									○○	○○	○○	○○				
140분													○	○○	○	△

※ 1 ○○(최상) 2 ○(좋음) 3 △(보통) 4 △△(최하)

도표에서 보신 것처럼 최상의 조건은 솔덕음온도 130° C 시간은 130분이었다.
(관능검사는 차인과 일반인을 통해 시음을 거쳐서 일반적인 맛과 향, 색깔,



(유리데칼데스Teabag 1개) -



(Teabag 1개로 4 잔을 따지고 시서 5번여)

○ 시음용 황칠차 개발 및 시음

다) 황칠 티백차 레시피 개선

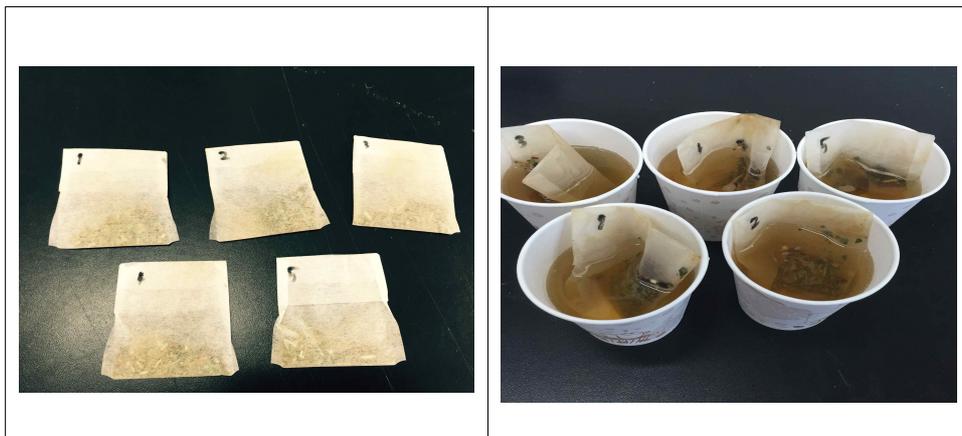
	1	2	3	4	5	6	7
황칠	100	30	30	50	40	50	60
우영		65	60	50			
퍼파민트		5					
귤피			10		60	50	40
합계	100	100	100	100	100	100	100

- 기존 제조되었던 황칠+귤피를 사용한 티백차를 해외 박람회를 참여하여 시장테스트한 결과 황칠과 귤피가 아닌 구수한 맛의 요구가 있어 우영을 첨가하여 황칠 티백차를 제조하였다.

온도/ 시간	황칠+귤피(40:60)				황칠+귤피(50:50)				황칠+귤피(60:40)			
	맛	색깔	향기	기호	맛	색깔	향기	기호	맛	색깔	향기	기호
황칠귤 피차	○○	○○	○	○	○○	○	○	△	○	○○	△	△△

※ 1 ○○(최상) 2 ○(중음) 3 △(보통) 4 △△(최하)

- 관능검사 결과 황칠과 귤피를 (40:60)으로 혼합한 티백차가 기호도가 가장 좋아서 황칠과 귤피를 혼합하여 사용하기로 결정하였다.



마) 황칠 티백차 제품 제품 개선 및 디자인 개선

(1) 황칠 티백차 레시피 개발

	1	2	3	4	5	6	7
황칠	100	30	40	30	40	50	60
우엉		60	60	50		50	20
피과민트							
귤피		10		20	60	0	20
합계	100	100	100	100	100	100	100

- 기존 제조되었던 황칠+귤피를 사용한 티백차를 해외 박람회 참여하여 시장테스트한 결과 황칠과 귤피가 아닌 구수한 맛의 요구가 있어 우엉을 첨가하여 황칠 티백차를 제조하였다. 여러 가지로 샘플을 제조하여 샘플테스트 하였는데 관능검사 결과 황칠30: 우엉60: 귤피10의 레시피가 가장 반응이 좋아 3:6:1 레시피를 확정하였다

온도/시간	황칠+우엉+귤피 (30:60:10)				황칠+귤피(50:50)				황칠+우엉(30:70)			
	맛	색깔	향기	기호	맛	색깔	향기	기호	맛	색깔	향기	기호
황칠티백차	○○	○	○	○○	○○	○	○	△△	○	○○	△	○

※ 1 ○○(최상) 2 ○(좋음) 3 △(보통) 4 △△(최하)

- 관능검사 결과 황칠과 귤피를 (30:60:10)으로 혼합한 티백차가 기호도가 가장 좋아서 황칠과 우엉과 귤피를 혼합하여 사용하기로 결정하였다.

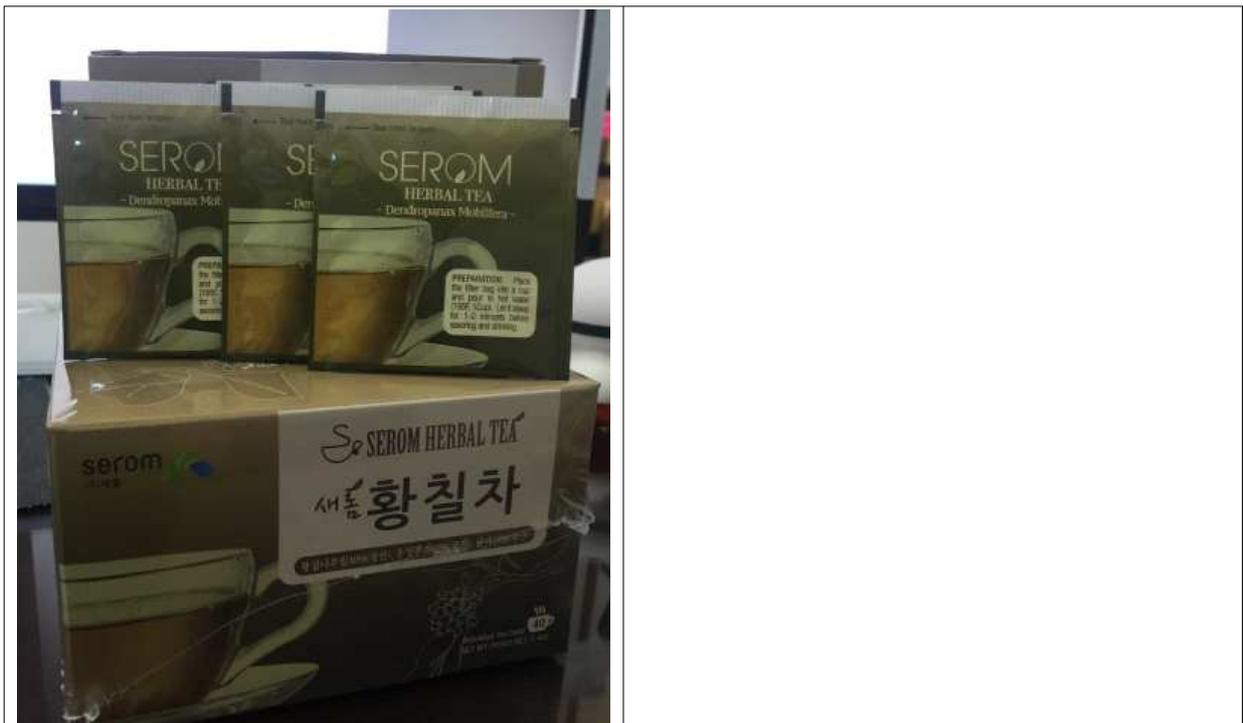


(2) 황칠 티백차 디자인

- 티백차 디자인완료(3개국어: 국문, 영어, 중국어)



- 티백차 생산완료 미국수출 선적 준비중



7. 고시형 건강기능식품 제품개발 및 수출지향성 제품개발

가. 황칠을 활용한 건강지향식품 수출지향성 제품개발

(1) 황칠발효진액개발(PET형태 진액)

○ 개요

- 목적 : 글로벌시장 타겟을 위한 수출지향성 글로벌 맞춤형 제형 및 제품개발
- 제형 : 액상제형
- 배경 : 발효황칠진액의 개발은 기존에 연구되었던 발효황칠 제조기술을 기초로 하여 황칠의 남성갱년기 개선효과가 증대된 물질을 이용하여 음료로 제조하고자 진행함. 발효황칠진액의 포장형태는 수출지향형으로 개발하기 위하여 미국, 태국 등 지사를 통하여 기존에 유통되고 있는 음료시장을 조사하였으며 그결과 PET형태의 음료로 개발하는 것이 적합하다고 판단하여 수출을 위한 PET포장형태의 음료로 개발하였음

○ 주요내용

- 황칠의 발효 표준화 공정을 개발하고 공정표준화
- 표준화된 공정을 통한 GMP생산시설을 활용한 액상제형 개발
- 표준화된 액상제형을 황칠제품개발을 위한 부원료로서 제조하여 기업지원 연계 추진
- 표준화 공정을 지역기업에서 요구하는 제품에 적용하여 제품생산하여 산업화 지원

※ 발효황칠진액 배합비 선정

원료명	1 (선정)	2	3
	합량(%)	합량(%)	합량(%)
황칠나무추출물	89.41	84.37	80.05
황칠나무 발효 추출물	5	10	15
영지농축액	2.46	2.50	2.10
대추농축액	1.54	1.54	1.40
감초농축액	1.54	1.54	1.40
자몽종자추출액	0.05	0.05	0.05
총계	100	100	100

○ 발효황칠 진액의 배합비 선정은 기존 (주)새롬에서 제조하고 판매중인 천애비방 진액을 기초로 하고자 하였다 이는 기존 제품의 시장에서 평가가 좋고 레시피 구성이 좋아 이를 이용하여 기존황칠추출물을 황칠발효추출물로 변경하고 경옥고를 베이스원료로 하여 원기회복과 황칠의 기능성을 더한 제품을 출시하고자 하였다. 이를 제조하기 위하여 새로운레시피를 3가지로 조정하였고 관능검사를 바탕으로 레시피를 결정하였다. 레시피는 총 3가지로 구성하여 (주)새롬이 직원과 (재)천연자원연구원의 관능검사를 통하여 최적의 배합비를 선택하였다. 발효황칠 진액의 배합비 선정은 황칠나무 발효 추출물의 함량을 기준으로 하여 5%, 10%, 15% 첨가구로 고정하고 다른 부원료의 함량을 조절하여 레시피를 개발하였고 이를 기반으로 관능검사를 진행하여 음료 시제품을 제작하였다.

○ 발효황칠진액 관능검사

발효황칠진액의 관능검사는 예비검사를 통과한 (주)새롬 직원과 (재)천연자원연구원 직원들을 panel로 구성하여 향, 색, 입안에서의 느낌 및 전체적인 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 채점 기준은 아주 좋다; 5점, 좋다; 4점, 보통이다; 3점, 나쁘다; 2점, 아주 나쁘다; 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며, 각 반복 시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS 프로그램을 이용한 Duncan 's multiple range test에 의하여 검증하였다.

관능평가의 결과 황칠나무 발효 추출물의 비율이 5%인 1번 시험구의 기호도가 가장 좋은 것으로 결과값도출되어 1번 배합비를 발효황칠진액의 제조배합비로 사용하였다.

— 발효황칠진액 관능평가

	1 (선정)	2	3
색	3.55 ± 0.52	3.40 ± 0.42	3.25 ± 0.24
향	3.41 ± 0.41	3.44 ± 0.32	3.20 ± 0.41
입안에서의 느낌	3.12 ± 0.40	3.25 ± 0.44	3.01 ± 0.23
전체적인 기호도	3.45 ± 0.31	3.20 ± 0.13	3.02 ± 0.31

○ '발효황칠진액' 완제품 사진



○ '발효황칠진액' 판매매출 실적

일시	제품명	단가	수량	금액
2016.10.04	발효황칠진액	9,000	5,000	49,500,000

○ '발효황칠진액' 판매매출 증빙자료 (세금계산서)

전자세금계산서				승인번호		20161004-10000000-47529108		
공급자	등록번호	415-81-26948	종사업장번호	등록번호	239-81-00193	종사업장번호		
	상호(법인명)	주식회사 새롬	성명	상호(법인명)	(주)바이오월드	성명	이현수	
	사업장	전라남도 장흥군 장동면 북교반산로 137		사업장	서울특별시 은평구 은평로98, 408호(응암동, 송원하이브)			
	업태	제조업	종목	건강기능식품	업태	도소매	종목	건강식품
	이메일	serom2014@daum.net		이메일	bioworld1@naver.com			
작성일자	공급가액		세액		수정사유			
2016/10/04	45,000,000		4,500,000					
비고								
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	04	발효황칠진액	1L	5,000	9,000	45,000,000	4,500,000	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함		
49,500,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다. 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급>전자세금계산서>제3차 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

나. 황칠을 활용한 고시형 건강기능식품 신제품 개발

가. 천애명작환 개발 (환형제품)

○ 개요

- 목적 : 인증형 건강기능식품(고시형) 제품개발 및 기존제품 업그레이드
- 제형 : 환(고형)
- 배경 : 천애명작환의 개발은 기존에 연구되었던 황칠의 남성갱년기 개선효과가 증대된 물질을 이용하여 건강기능식품인므로 제조하고자 진행하였다. 황칠나무관련 보유특허중 장기능개선을 보강하기 위하여 건강기능식품 원료인 차전자피를 주원료로 사용하였다 차전자피를 주원료로 하여 발효소맥분말, 다시마분말, 유근피분말, 칩가루, 락토바실러스 분해추출물, 효모추출물, 생강추출분말, 알파아밀라이제등을 첨가하여 장기능에 효과적인 제품을 출시하고자 하였다. 천애명작환은 기존 건강기능식품원료인 차전자피가 가지고 있는 효능에 시너지를 더할수 있는 황칠나무 추출분말이 첨가되어 있는 제품으로 개발하고자 하였다.

○ 주요내용

- 황칠을 활용한 고시형 건강기능식품 개발
- 표준화된 공정을 통한 GMP생산시설을 활용한 환형 개발
- 표준화된 환제형을 황칠제품개발을 위한 부원료로서 제조하여 기업지원 연계 추진
- 표준화 공정을 지역기업에서 요구하는 제품에 적용하여 제품생산하여 산업화 지원

※ 천애명작환 배합비 선정

원료명	1 (선정) 합량(%)	2 합량(%)	3 합량(%)
차전자피식이섬유	61.26	61.26	61.26
황칠나무추출물	1	2	3
발효소맥혼합분말	19.2	18.2	17.2
다시마분말	4.92	4.85	4.36
유근피분말	4.85	4.92	4.85
칩분말	4.36	4.37	4.92
락토바실러스 분해추출분말	1.77	1.76	1.97
효모추출분말	1.2	1.2	1.0
생강추출분말	0.9	0.9	0.9
HPMC	0.5	0.5	0.5
알파 아밀라아제	0.04	0.04	0.04
총계	100	100	100

○ 천애명작환 배합비 선정

천애명작환의 배합비 선정은 기존 (주)새롬에서 제조하고 판매중인 천애비방 환을 기초로 하고자 하였다. (주)새롬에서 기존에 출시한 제품중 시장에서 평가가 좋고 레시피 구성이 좋아 이를 개선하여 신 제품을 출시코자 기획하였다. 건강기능식품원료인 차전자피를 사용하여 건강기능식품으로 등록하고자 하였으며 특허물질인 황칠나무 잎 추출분말을 사용하였고 그 외 발효소맥혼합분말을 이용하였다. 발효소맥혼합분말은 유산균발효곡물분말, Bifidobacterium bifidum, 알로에분말등이 혼합된 복합원료로 장기능개선원료로 (주)새롬이 특허를 보유하고 있는 원료이다 이를 제조하기 위하여 새로운 레시피를 3가지로 조정하였고 관능검사 및 건강기능식품 규격적부시험을 바탕으로 레시피를 결정하였다. 건강기능식품의 규격기준이 되는 차전자피는 고정하고 다른 부원료를 선택적으로 수정하여 레시피는 총 3가지로 구성하여 (주)새롬이 직원과 (재)천연자원연구원의 관능검사를 통하여 최적의 배합비를 선택하였다.

○ 천애 명작환 관능검사

천애명작환의 관능검사는 예비검사를 통과한 (주)새롬 직원과 (재)천연자원연구원 직원들을 panel로 구성하여 향, 색, 입안에서의 느낌 및 전체적인 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 채점 기준은 아주 좋다; 5점, 좋다; 4점, 보통이다; 3점, 나쁘다; 2점, 아주 나쁘다; 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며, 각 반복 시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS 프로그램을 이용한 Duncan 's multiple range test에 의하여 검증하였다.

관능평가의 결과 황칠나무추출분말의 비율이 1%인 1번 시험구의 기호도가 가장 좋은 것으로 결과도출되어 1번 배합비를 천애명작환의 제조배합비로 사용하였다.

- 천애명작환 관능평가

	1 (선정)	2	3
색	3.55 ± 0.12	3.52 ± 0.30	3.45 ± 0.30
향	3.41 ± 0.22	3.40 ± 0.20	3.21 ± 0.40
입안에서의 느낌	3.44 ± 0.42	3.25 ± 0.44	3.01 ± 0.23
전체적인 기호도	3.47 ± 0.30	3.29 ± 0.13	3.01 ± 0.30

○ '천애명작환' 제조기록서

PRODUCTION RECORD
제조기록서

제 품 명	천애명작
-------	------

분 류	건강기능식품
제 조 번 호	FH65001
제 조 단 위	63,000 포
제 조 일 자	2016. 10. 25
포 장 안 료 일 자	2016. 10. 21



유수건강기능식품전문기업
serom
(주)새름

페이지 1

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (2)

3. 포장

포장공정	작업자
------	-----

1. 서면포 충전 : 서면포장기를 사용하여 코팅된 원료 5.5g 씩 서면포 충전한다.
 2. 포장 : 1. 서면포로 충전된 포를 소케이스에 15포(2포+7개+1개)씩 넣는다.
 2. 대케이스에 봉패드를 조합한 후, 소케이스 2개를 넣고 포장한다.
 3. 감시필스타카를 대케이스 양측 장기운대에 부착한다.
 4. 카본박스(15개입)에 봉합 후 제품고고에 입고한다.

주의 및 기록사항

4. 자재

No	자 재 명	단 위	수량	사용량	폐기량	잔량
1	일부미봉조일	롤	2	2.2	0.3	0.5
2	소케이스	개	1,200	4,020	188	4
3	대케이스	개	1,020	1,020	11	1
4	카본박스	개	68	69	-	1

5. 수율

이론생산량 (a)	실제생산량 (b)	관리수율	실적수율(%) (b/a*100)	포장 잔량	비고
1,050	1,002	-	95.42%	조차 사항	없음

6. 완제품 입고 및 보관생물

구 분	수 량 (개)	인수자 및 샘플링자	일 자	확 인
완제품입고	1,000	김영민	2016. 10. 21	노한성
보관생물	2	양승희	2016. 10. 21	노한성
총 수량	1,002	김영민	2016. 10. 21	노한성

7. 유통기한

유통기한 (제조일로부터 2년)	2018년 10월 24일 까지
특이사항	

페이지 3

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (1)

구 분	건강기능식품	재 품 명	천애명작	제 조 일 자	2016. 10. 25
제 조 번 호	FH65001	제 조 단 위	63,000 포	포 장 단 위	5.5g*15포*4개
성 상	광석의 환	작 업 일 자	2016. 10. 25 ~ 2016. 10. 21		

1. 칭량

원 료 명	비율(%)	허가량(g)	사용량(g)	칭량자	확인자
자전차피분말	61.26	3.3693	212.266		
발효소박추출분말	19.20	1.0660	66.529		
다시마분말	4.92	0.2706	17.049		
유근피분말	4.85	0.2669	16.805		
참깨분말	4.36	0.2398	15.107		
약도바실러스브레비스분해추출물	1.77	0.0974	6.133		
효모추출물분말	1.20	0.0660	4.158		
홍심나무추출분말	1.00	0.0550	3.465		
생강추출분말	0.90	0.0495	3.119		
하드텍스프로필라탈레올로오스	0.50	0.0275	1.733		
아말라야제	0.04	0.0022	0.139		
	100.00	5.5	346.500		

2. 제조

제 조 공 정	작업자
---------	-----

1. 원료칭량 : 제조지시서에 따라 원료를 칭량한다.
 2. 혼합 : 1) 배산 : 용매를 용매용기에 넣고 칭량 후 저동이송기를 이용하여 다량혼합기에 투입하여 5분간 혼합한다. (1회 혼합)
 2) 혼합 : 칭량한 원료를 다량혼합기에 투입하고, 15분간 혼합한다. (2회 혼합)
 3. 혼합 : 혼합한 원료들을 연용기에 넣고 15분간 혼합한다.
 4. 코팅 : 연용한 원료를 제형기에 투입하고 4mm 코팅, 양쪽, 장항, 환상 수치를 조절하여 코팅한다.
 5. 건조 : 코팅된 원료들을 건조기에 건조하여 성형 고형 및 수분함량을 조정한다.
 6. 칭량 : 3inch 체로 코팅한 뒤, 평일량표준 원료 비닐백에 포장한 후 중량을 확인하여 방재용 보관실에 보관한다.
 7. 코팅 : 발효추출에 HPMC이 녹화된 코팅액을 사용하여 양의편을 사용하여 코팅한다.

페이지 2

○ ‘천애명작환’ 완제품 사진



○ ‘천애명작환’ 판매매출 실적

일시	제품명	단가	수량	금액
2017.02.01.	천애명작	27,000	2,000	59,400,000

○ ‘천애명작환’ 판매매출 증빙자료 (세금계산서)

전자세금계산서				승인번호	20170201-10000000-27809082				
공급자	등록번호	415-81-26948	종사업장번호	공급받는자	등록번호	532-87-00231	종사업장번호		
	상호(법인명)	주식회사 새름	성명		박종국	상호(법인명)	엠엔스바이오(주)	성명	김재원
	사업장	전라남도 장흥군 장동면 북교반산로 137	사업장		부산광역시 북구 효열로7,101호(금곡동,대영인더스빌)				
	업태	제조업	종목		건강기능식품	업태	제조업외	종목	천연비누외
	이메일	serom2014@daum.net	이메일		nodaji5969@gmail.com				
작성일자	2017/02/01	공급가액	54,000,000	세액	5,400,000	수정사유			
비고									
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
02	01	천애명작	60포	2,000	27,000	54,000,000	5,400,000		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
59,400,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다. 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급>전자세금계산서>제3차 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

다. 파낙스-3 개발 (정제형 제품)

○ 개요

- 목적 : 인증형 건강기능식품(고시형) 제품개발 및 기존제품 업그레이드
- 제형 : 정제(고형)
- 배경 : 파낙스-3 개발은 파낙스계열의 학명을 가진 3가지 식물(홍삼, 가시오가피, 황칠)을 최적의 배합비로 배합하고 황칠로 부여할수 없는 기능성을 홍삼의 도움을 받아 건강기능식품으로 제조코자 진행하였다황칠나무관련 보유특허중 남성갱년기 개선에 도움을 주는 것을 활용하여 황칠나무추출분말과 더불어 홍삼의 5가지 기능성(면역력개선, 피로개선, 혈소판응집억제를 통한 혈행개선, 기억력개선, 항산화에 도움)과 함께 시너지 역할을 줄 수있는 산수유분말, 복분자, 생강가루, L-아르기닌, 옥타코사놀을 함께 배합하여 남성갱년기에도 효과가 충분히 나올수 있도록 정제를 가공함

○ 주요내용

- 황칠, 홍삼, 가시오가피를 활용한 고시형 건강기능식품 개발
- 표준화된 공정을 통한 GMP생산시설을 활용한 환형 개발
- 표준화된 정제형을 황칠제품개발을 위한 부원료로서 제조하여 기업지원 연계 추진
- 표준화 공정을 지역기업에서 요구하는 제품에 적용하여 제품생산하여 산업화 지원

※ 파낙스-3 배합비 선정

원료명	1 (선정)	2	3
	함량(%)	함량(%)	함량(%)
홍삼(고시형)	17.19	17.19	17.19
황칠나무추출분말	1.0	2.0	3.0
생강분말	11.16	12.12	13.12
산수유분말	13.12	11.16	10.16
복분자분말	12	12.0	11.0
옥타코사놀	1.25	2.25	2.25
L-아르기닌	3.90	2.90	2.90
이산화규소	1.80	1.80	1.80
스테아린산마그네슘	1.08	1.08	1.08
HPMC	0.57	0.57	0.57
산화아연	0.15	0.15	0.15
결정셀룰로오스	36.78	36.78	36.78
총계	100	100	100

○파낙스-3 배합비 선정

파낙스-3의 배합비 선정은 (주)새롬에서 기존에 출시한 제품중 시장에서 평가가 좋고 레시피 구성이 좋아 이를 개선하여 신제품을 출시코자 기획하였다. 기존제품중 홍삼을 이용한 건강기능식품인 신기소를 참조하여 개발하였으며. 홍삼의 기능성과 남성갱년기에 도움을 줄수 있는원료를 효과적으로 배합하여 제조하였다. 건강기능식품원료인 홍삼을 사용하여 건강기능식품으로 등록하고자 하였으며 특허물질인 황칠나무 잎 추출분말을 사용하였고 그 외 산수유분말, 복분자분말, 옥타코사놀, 산화아연 등을 함유시켜 파낙스 -3를 제조하기 하였고 새로운 레시피를 구성은 3가지로 조정하였으며 관능검사 및 건강기능식품 규격적부시험을 바탕으로 레시피를 결정하였다. 건강기능식품의 규격기준이 되는 홍삼함량은 고정하고 다른 부원료를 선택적으로 수정하여 레시피는 총 3가지로 구성하여 (주)새롬이 직원과 (재)천연자원연구원의 관능검사를 통하여 최적의 배합비를 선택하였다.

○파낙스-3 관능검사

파낙스-3 의 관능검사는 예비검사를 통과한 (주)새롬 직원과 (재)천연자원연구원 직원들을 panel로 구성하여 향, 색, 입안에서의 느낌 및 전체적인 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 채점 기준은 아주 좋다; 5점, 좋다; 4점, 보통이다; 3점, 나쁘다; 2점. 아주 나쁘다; 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며, 각 반복 시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS 프로그램을 이용한 Duncan 's multiple range test에 의하여 검증하였다.

관능평가의 결과 황칠나무추출분말의 비율이 1%인 1번 시험구의 기호도가 가장 좋은 것으로 결과도출되어 1번 배합비를 파낙스-3 제조배합비로 사용하였다.

○ 파낙스-3 관능평가

	1 (선정)	2	3
색	3.84±0.30	3.72±0.32	3.67±0.32
향	3.20±0.14	3.22±0.13	3.27±0.22
입안에서의 느낌	3.40±0.37	3.24±0.40	3.24±0.27
전체적인 기호도	3.67±0.12	3.44±0.20	3.35±0.11

○ ‘파낙스-3’ 완제품 사진



○ ‘파낙스-3’ 판매매출 실적

일시	제품명	단가	수량	금액
2017.02.09	파낙스3	28,000	3,000	92,400,000

○ ‘파낙스-3’ 판매매출 증빙자료 (세금계산서)

전자세금계산서				승인번호	20170209-10000000-35659164				
발급자	등록번호	415-81-26948	종사업장번호	수령자	등록번호	129-81-71052	종사업장번호		
	상호(법인명)	주식회사 새롬	성명		박종국	상호(법인명)	(주)아로마에프아이	성명	박형권
	사업장	전라남도 장흥군 장동면 북교반산로 137			사업장	경기 성남시 중원구 상대원동 190-1 SKN 테크노파크 비즈센타 613호			
	업태	제조업	종목		건강기능식품	업태	제조, 도.소매업	종목	식품첨가물(무역)
	이메일	serom2014@daum.net			이메일	aroma600@paran.com			
작성일자	공급가액		세액		수정사유				
2017/02/09	84,000,000		8,400,000						
비고									
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
02	09	파낙스 3	60정	3,000	28,000	84,000,000	8,400,000		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
92,400,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다. 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급>전자세금계산서>제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

○ '파낙스-3' 제조기록서

PRODUCTION RECORD	
제조기록서	

제품명	파낙스-3
-----	-------

분류	건강기능식품
제조번호	FH4001
제조단위	61,800 점
제조일자	2016. 10. 27
포장완료일자	2016. 11. 02



우수건강기능식품전문기업
serom
(주)새롬

페이지 1

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (2)

3. 포장

포장공정 1. PTP 충전 : 광면 PTP 포장기를 사용하여 교반된 정제를 PTP 충전한다. 2. 포장 : 1. 광면 PTP로 충전된 정제를 M자봉투에 5만개 담는다. 2. M자봉투에 담은 PTP를 케이스에 하나씩 담는다. 3. 케이스 앞면 정중앙에 검사실 스티커를 부착한다.	작업자 Dec 최 4명
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------

주의 및 기록사항

4. 자재

No	자재명	단위	수량	사용량	폐기량	잔량
1	M자봉투	개	2040	2004	36	2
2	호 케이스	개	2100	2004	94	2
3	대 케이스	개	1,020	1,002	18	1

5. 수율

이론생산량 (개) (a)	실제생산량(개) (b)	관리수율	실제수율(%) (b/a*100)	포장 잔량	비고
1,030	1,002	-	97.28	조치 사항	없음.

6. 원재료 입고 및 보관생품

구분	수량 (개)	인수자 및 생품명자	일자	확인
원재료 입고	1,000	김 준 영		조민성
보관생품	2	박 초 역		노민성
총수량	1,002	김 준 영		노민성

7. 유통기한

유통기한	(제조일로부터 2년) 2018. 10. 26	재지
	특이사항	

페이지 3

PRODUCTION RECORD
제조기록서 (1)

구분	건강기능식품	제품명	파낙스-3	제조일자	2016. 10. 27
제조번호	FH4001	제조단위	61,800 점	포장단위	800mg*60점
성상	황갈색 정제	작업일자	2016. 10. 27 ~ 2016. 11. 02		

1. 원료

원재료명 또는 성분 및 사용량	비율(%)	허가량(mg)	사용량(g)	첨량자	확인자
홍삼(고시형)	17.19	137.52	849.874	김호영	
생강분말	11.15	89.28	551.750		
산수유분말	13.12	104.95	646.653		
복분자분말	12.00	96.00	593.280		
옥타코사놀(고시형)	1.25	10.00	61.800	조민성	
L-아르기닌	3.90	31.20	192.816		
이산화규소	1.80	14.40	89.992		
스타이렌산(그네슘)	1.08	8.64	53.395		
히드록시프로필베타글루코오스	0.57	4.56	28.181		
산화아연	0.15	1.20	7.416		
결정셀룰로오스	36.78	294.24	1,818.403		
황철나무추출물	1.00	8.00	49.440		
	100.00	800	4,344.000		

2. 제조

제조공정	작업자
1. 원료칭량 : 제조지시서에 따라 원료를 칭량한다.	김호영
2. 혼합 : 1) 폐산 : 원료를 오실레이터로 체교한 후 자동이송기를 이용하여 더블콘 혼합기에 투입하여 20분간 혼합한다. (2회 혼합) 2) 혼합 : 체교한 원료를 더블콘 혼합기에 투입하고, 30분간 혼합한다. (1회 혼합)	윤경우
3. 연압 : 혼합한 원료를 연압기의 날고 15만간 연압한다. 총합량 : 49,000 [g] 연압율 : 18,000 [g]	서정민
4. 과립 : 연압한 원료를 과립기에 투입하고 10rpm 속도로 맞춰 과립한다.	
5. 건조 : 과립된 원료를 아래의 조건에서 건조하여 수분 함량 5% 이하로 조절한다. 건조시간 : 6시간 건조온도 : 65 ℃ 수분함량 : 5% 이하	조민성
6. 포장 : 14mesh 체로 걸러낸 후, 중량연표로 과립분할을 비닐팩에 포장한 후 중량을 확인하여 무게를 보정함에 보류한다.	
7. 타겟 : 로타리타겟기를 이용하여 타겟한다.	
8. 코팅 : 발효주정액 HPMC 농화된 코팅액을 사용하여 양의관용을 사용하여 코팅한다.	

페이지 2

○ 제제 레시피 변경을 통한 황칠잎의 1일 섭취량 기준에 맞는 제품개발

- 파낙스 3 레시피

원료명	1 (선정) 합량(%)
홍삼(고시형)	20.72
황칠나무추출분말	35.0
L-아르기닌	3.90
이산화규소	1.80
스테아린산마그네슘	1.08
HPMC	0.57
산화아연	0.15
결정셀룰로오스	36.78
총계	100

-천애명작환 레시피

원료명	1 (선정) 합량(%)
차전자피식이섬유	61.26
황칠나무추출물	10
발효소맥혼합분말	10.2
다시마분말	4.92
유근피분말	4.85
킵분말	4.36
락토바실러스분해추출분말	1.77
효모추출분말	1.2
생강추출분말	0.9
HPMC	0.5
알파 아밀라아제	0.04
총계	100

- 고시형 건강기능식품으로 개발한 파낙스-3 과 천애명작환의 레시피를 개선하여 기능성을 부여할수 있는 황칠잎 추출분말 첨가기준인 1g을 충족하도록 레시피를 변경하고 제제실험함
- 일일섭취량이 파낙스 3는 800mg×4정= 3.2g으로 황칠잎 추출분말을 1일 1g 섭취하게 하면 황칠잎이 35%이상 첨가되게 레시피를 설정하였으며 황칠나무 추출분말 첨가에 따른 기타 부재료를 삭제하였다
- 일일섭취량이 5.5g× 2포 = 11g인 천애명작의 경우 황칠추출분말을 1일 1g섭취하여 변경하면 황칠 잎 추출분말을 10%첨가하면 되기 때문에 황칠잎 추출분말을 10%로 레시피를 변경수정하여 차후 제품 개발에 사용하고자 하였다.
- 또한 제품 생산시 황칠잎의 지표성분 및 함유량을 시험성적서에 기재하여 연구결과에 효능이 부여된 제품을 생산하여 판매할 예정에 있다.

○ 추가로 진행중인 황칠잎 남성갱년기 개선 인체적용실험 계획서

Confidential

인체적용시험계획서 (Clinical Trial Protocol)

황칠나무추출물의 남성 갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한
12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험
(ver. 1.0 / 2017.09.15.)

인체적용시험 실시기관 :

연 구 책 임 자 :

인체적용시험 의뢰자 : (주)새롬

인 체 적 용 시 험 기 간 : IRB 승인일로부터 ~ 2018년 09월 30일

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 연구책임자 및 공동연구자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험에 사용되는 원료를 투여받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 의뢰자의 사전 서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

Confidential

(주)새롬

인체적용시험 개요

인체적용시험의 개요				
시험제목	황칠나무추출물의 남성 갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조인체적용시험			
시험목적	<p>남성 갱년기 증상을 보이는 자를 대상으로 황칠나무 추출물을 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 플라세보와비교하여 살펴보고자 한다.</p> <p>□1 차 목적 남성 갱년기 증상 설문지(AMS)로 평가되는 황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성을 비교 평가하고자 한다.</p> <p>□2 차 목적 호르몬지표 검사, 남성갱년기증후군 자가진단표(ADAM),국제발기능지수 (IIEF), 신체계측지표로 평가되는황칠나무추출물의 남성 갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을비교 평가하고자 한다.</p>			
구분	<input checked="" type="checkbox"/> Local		<input type="checkbox"/> Multi (<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외)	
연구책임자				
시험종류	건강기능식품 기능성원료 / 국내(MFDS) 허가용			
의뢰자	(주)새롬			
시험기간	IRB 승인일로부터 ~ 2018년 9월 30일까지			
인체적용시험의 설계				
시험디자인	무작위 배정, 이중눈가림, 위약 대조군 비교, 병행			
시험용 식품	시험군	황칠나무잎 추출물	대조식품	전분
	제형	정제		
	복용량	1,000mg/일 (1일 2회, 각 500mg), 총 12주		
대상자	만 55세 ~ 75세 성인 남녀			
목표 연구대상자 수	총 78명 (시험군; 39명, 대조군; 39명)			
유효성 평가변수	1차	남성 갱년기 증상 설문지(AMS: Aging Male Symptoms)		
	2차	<p>-호르몬검사: 총 테스토스테론 (Total Testosterone), 유리테스토스테론 (Free Testosterone), 생체 활성 테스토스테론(Bioavailable Testosterone), 전립선 특이항원 (PSA;prostate specific antigen), 성호르몬결합 글로블린 (SHBG;Sex Hormone Binding Globulin), 난포자극호르몬 (FSH;Follicle Stimulating Hormone), 황체형성호르몬 (LH;Luteinizing Hormone), 프로락틴 (prolactin)</p> <p>-남성갱년기증후군 자가진단표(ADAM: Androgen Deficiency inAging Males)</p> <p>-국제발기능지수 (IIEF; International Index of ErectileFunction)</p> <p>-신체계측지표: 체중, 체질량지수(BMI), 체지방량, 체지방률,제지방량, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비(WHR)</p>		
안전성 평가변수	<p>자·타각증상 등 이상반응 모니터링</p> <p>-진단검사의학 검사</p> <p>-활력징후, 신체검진, 심전도</p>			

임상연구비실행예산서

연구책임자	소속	성명	과제번호
연구과제명	황질나무추출물의 남성 갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험		
지원기관		본원 목표수	78
연구기간	IRB 승인 ~ 2018년 9월 30일		총연구비 (총계+약제관리비) 108,830,000
실행예산편성내역 (단위 : 원)			
항목	금액	산출근거	백분율
인건비	시험책임자	5,000,000	
	시험담당자	10,000,000	
	센터코디네이터	11,000,000	
직접비	검사,진료비	44,658,000	스크리닝 90명× 200,000원 = 18,000,000 방문검사 78명× 96,000원 = 7,488,000 초진 90명× 18,000원 = 1,620,000 유효성검사 78명× 75,000원 × 3회 = 17,550,000
	피험자 교통비	15,000,000	80명× 100,000원
	시험재료비	5,000,000	
	회의비	3,000,000	
	인쇄비		
	수용비 및 수수료		
	기타	1,500,000	
계	95,158,000		
병원관리비	3,797,789		5%
소계(연구비)	98,955,789		100%
간접비(연구비의13%)	9,874,253		
총계	108,830,042	*천원단위 절삭	
약제 관리비		연구비의 3%~5% (약제국 확인)	
타기관연구비			

* 산출근거란이 부족시 별지 작성가능

위와 같이 연구비 실행예산서를 제출합니다.

2017년 9월 26일

연구책임자 : 한성호(서명)

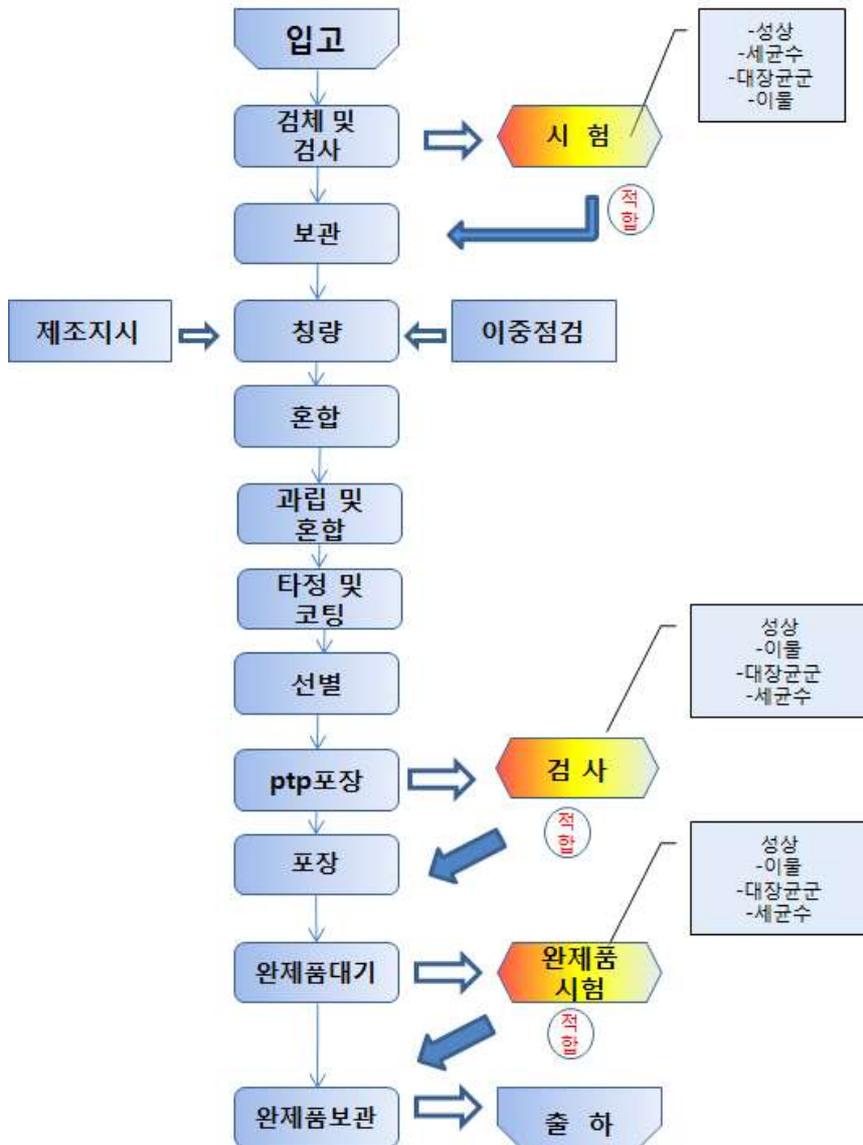
동아대학교병원임상시험연구센터 소장 귀하

동아대학교병원 연구비집행내역서 Ver2.1

1절. 황칠나무 추출물의 남성갱년기 개선 인체적용시험

1. 황칠 정제 제조 공정도

황칠 임상정제 제조공정도



2. 황칠나무잎 추출물의 제조공정 표준화

나. 표준용액제조 및 standard curve 작성

표준품 Quercetin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으

로 회석하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용액을 이용하여 작성한 표준 검량선으로 부터 Quercetin 함량을 구하였다.

→ STD 1~5의 5개의 농도로 standrd curve를 작성한 결과 99.9%의 상관계수(R²)를 나타내었다. quercetin 정량에 사용된 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Rutin (mg/g)} = \frac{\text{STD 농도} \times \text{TEST 면적}}{\text{검체무게 g/ml} \times \text{STD 면적}}$$

Method of HPLC- Rutin

HPLC	Waters 2695
Column	Agilent – ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250×4.6 mm), 5 μm
Column Temperature	40 °C
Detector	UV 375nm
Mobile phase	0.1% Formic acid : MeOH = 65 : 35 → 65 : 35
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volumn	10μl
Sonication	1 hr. (50 °C)

다. 표준용액의 순도

Rutin 1000 ppm 농도에서 HPLC 분석을 2반복 수행하여 나타난 chromatogram의 면적비에 따른 백분율을 계산하였다.

라. 시험용액의 조제

회석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣었다. 황칠 열수 추출물을 약 300mg을 칭량하여 50 ml 메스플라스크에 취한 후 10ml 회석용액을 가해 50°C 수용상에서 1시간 동안 sonication 하였다. 위의 sonication한 메스플라스크를 표선까지 메탄올로 맞춘다음 위의 시험용액을 0.45 um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

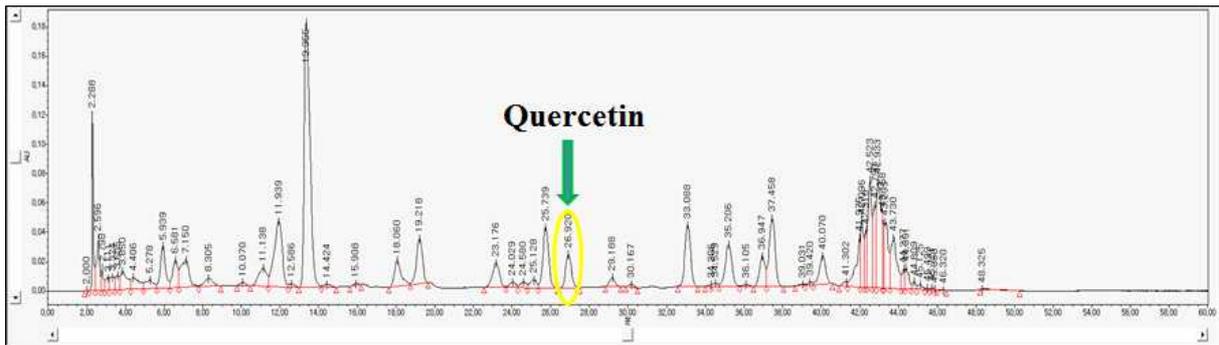
마. HPLC 분석 조건

항목	조건
주입량	10 μ L
검출기 파장	370\5 nm
컬럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	A : 메탄올, B : 0.1% Formic acid
유속	1.0 mL/분

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건

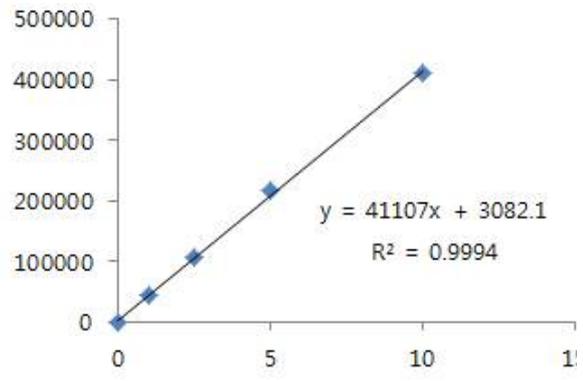
시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	35	65
8	35	65
38	50	50
40	100	0
50	35	65
51	35	65

(1) HPLC 분석



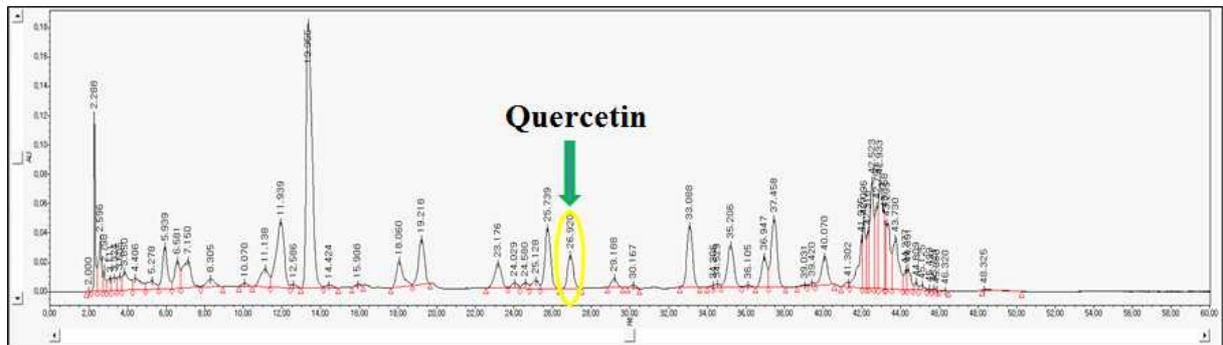
위 실험 방법을 이용하여 황칠 추출물의 quercetin 정량 결과 79.89 mg/kg 정량 되었다.

Quercetin	
0	0
1	43645
2.5	106089
5	215406
10	410758



	면적	시료량	희석배수	Quercetin(mg/kg)
추출물 1-1	139483	4.2498	100	81.48123658
추출물 1-2	142483	4.4119	100	80.18871426
추출물 1-3	123569	3.774	100	81.20405354
추출물 1-4	103425	3.2841	100	77.97152941
추출물 1-5	51611	1.6081	100	78.62326693

(나) Quercetin



위 실험 방법을 이용하여 황칠 물추출물의 quercetin 정량 결과 79.89 mg/kg 정량 되었다.

2. 황칠 임상시료 조성

황칠 active	
황칠 분말	98.1
인삼향분말	0.89
활성탄	1.01
합계	100

황칠 placebo	
쌀가루	95
활성탄	0.1
오징어먹물색소	4.0
인삼향분말	0.9
합계	100

3. 황칠 box 포장



4. 인체적용시험 평가방법

제 목	황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험
목 적	남성갱년기 증상을 보이는 자를 대상으로 황칠나무추출물을 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 플라세보와 비교하여 살펴보고자 한다. -1차 목적 남성갱년기 증상 설문지(AMS)로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다. -2차 목적 남성갱년기증후군 자가진단표(ADAM), 호르몬지표, 지질대사지표, 신체계측지표, 국제발기능지수(IEF) 로 평가되는 남성갱년기 증상에 대한 황칠나무추출물의 유효성 및 안전성을 플라세보 섭취와 비교 평가하고자 한다.
시험단계	인체적용시험
시험기간	IRB 승인일로부터 12개월
시험디자인	12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험
실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
연구대상자수	총 80명(시험군 40명, 플라세보군 40명)

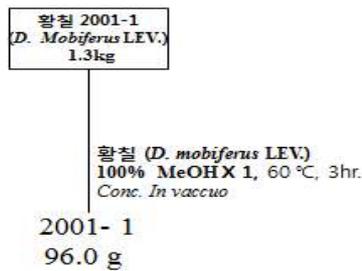
<p>연구대상자 선정기준</p>	<p>1)스크리닝 검사 당시 연령이 만 40세 이상 75세 이하인 성인 남성 2)남성갱년기 증상을 보이는 자 ①AMS 설문 결과 27점 이상이고, ②ADAM 설문 결과 1또는 7문항이 '예'이거나 나머지 8개 항목 중 3개 문항 이상이 '예'일 경우 3)총 테스토스테론이 6.56ng/ml 이하인 자 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</p>
<p>섭취방법 및 용량</p>	<p>대상자는 다음 두 군 중 하나에 무작위배정 되어 12주 동안 인체적용시험용제품을 1일 1회 식후 경구 섭취하게 된다. 황칠나무추출물군: 1일 1회, 1회 2정, 저녁 식사 이후 경구섭취(1.4g/day, 황칠나무추출물로써 1g/day) 플라세보군: 1일 1회, 1회 2정, 저녁 식사 이후 경구섭취(1.4g/day)</p>
<p>섭취기간</p>	<p>12주</p>
<p>시험방법</p>	<p style="text-align: center;">Screening Randomization End of Study</p> <p style="text-align: center;">12주 무작위배정. 이중눈가림. 플라세보 대조 인체적용시험</p> <p style="text-align: center;">황칠나무추출물군(40명)</p> <p style="text-align: center;">플라세보군(40명)</p> <p style="text-align: center;">screening visit (-3주 이내) Run-in-Period (6주 간격, 3회방문)</p> <p style="text-align: center;">스크리닝 방문(W-3) 1차방문(W0) 3차방문(W5) 3차방문(W12)</p>

<p>유효성 평가</p>	<p>1차 유효성 평가 남성갱년기 증상 설문지(AMS: Aging Male Symptoms) 2차 유효성 평가 남성갱년기증후군 자가진단표(ADAM: Androgen Deficiency in Aging Males) 호르몬검사: 총 테스토스테론 (Total Testosterone), 유리 테스토스테론 (Free Testosterone), 생체 활성 테스토스테론 (Bioavailable Testosterone), 성호르몬결합 글로블린 (SHBG; Sex Hormone Binding Globulin) 지질대사지표 검사: Total cholesterol, Triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 신체측지지표: 체중, 체질량지수(BMI), 체지방량, 체지방률, 제지방량 국제발기능지수 (IIEF; International Index of Erectile Function)-Erectile Function(EF) Domain</p>
<p>안전성 평가</p>	<p>자·타각 증상 등 이상반응 모니터링 진단검사의학 검사 활력징후, 신체검진, 심전도</p>
<p>통계분석</p>	<p>분석에 사용할 프로그램은 Window용 SAS 9.3를 이용하고, 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 설정한다. 집단간 동질성 검정과 baseline의 동질성 검정은 Chi-Square test or Fisher's exact test와 Independent t-test를 이용한다. 유효성 분석/안전성 분석 평가 항목의 검사결과를 전 후 비교 시 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test등을 적용하여 검정한다. 단, 동질하지 않은 항목은covariate로 보정하여 ANCOVA를 실시한다. 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용한다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA를 실시한다. 시점간 차이는 Contrast test로 분석한다. 연구기간 중 인체적용시험용제품 관련 이상반응 연구대상자의 비율은 각 섭취군에 따라 요약제시하며, Fisher's exact test 를 적용하여 분석한다. 단, 정규성검정을 통하여 정규성 만족을 하지 못할 경우, 비모수적 분석방법을 이용한다(각 섭취군 내, 군간의 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney test 등).</p>

2절. 황칠나무 추출물의 2종 유효성분 확보

1. 황칠나무 잎 추출물의 Open column chromatography

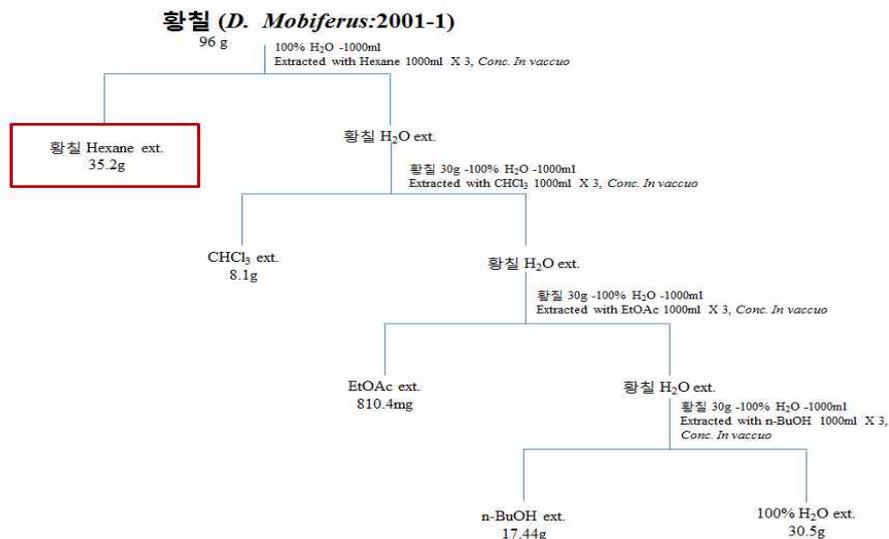
황칠 건잎 1.3kg을 100% MeOH 이용하여 추출기를 이용 60 °C에서 온도가 올라간 후 3 시간동안 용매 추출을 하였다. 추출 되어진 추출물을 감압 농축하여 96.0g의 농축액을 얻었다. (scheme 1.)



Scheme 1. Extraction of *D. Mobiferus* LEV.

이 농축액을 물로 충분히 현탁하여 2배 부피의 Hexane 로 1차 용매이행을 3회 수행하여 물 층 과 Hexane ext.(35.2 g)로 분리하였다. 물 층을 다시 2배 부피의 chloroform로 2차 용매이행을 3회 수행하여 CHCl₃ ext. 8.1g를 확보하였다. 3차 용매이행을 3회 수행하여 EtOAc ext. 810.4 mg를 확보하였다. 마지막으로 n-butanol로 3차 용매이행을 3회 수행하여 n-BuOH ext. 17.44g를 확보하였다. (scheme 2.)

Hexane ext. 35.2g에서 18g 덜어내어 open column chromatography를 실시하였다. open column에 사용되어진 레진은 silica gel 이며 용매조건은 Hexane: Acetone 사용하여 진행하였다.



Scheme 2. Fractionation procedure of *D. Mobiferus* LEV.

→ open column 결과 모두 7개의 sub fract.을 얻었다. sub fract-6번째 (847.7mg) 이용 silica gel open column 실시하여 모두 4개의 sub-fract. 얻었다. 얻어진 분획 중 sub fract-1 (98.6mg) 다시 silica gel open column 실시한 결과 sub-fract. 5 (Compound 5, β -sitosterol), sub-fract. 6 (Compound 6) 2개의 물질을 얻을 수 있었다. GC-MS (shimaduz - 5000) 이용하여 compound 5에 대해 다시 한번 확인을 하였다(Fig. 3). 물질 구조 분석은 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (Agilent-400Mhz) 1D data 분석을 통해 β -sitosterol 구조 동정 되어 졌다(scheme 3. Fig.1, Fig.2).

GC-MS 건잎 추출물 + β -sitosterol (HP-1)

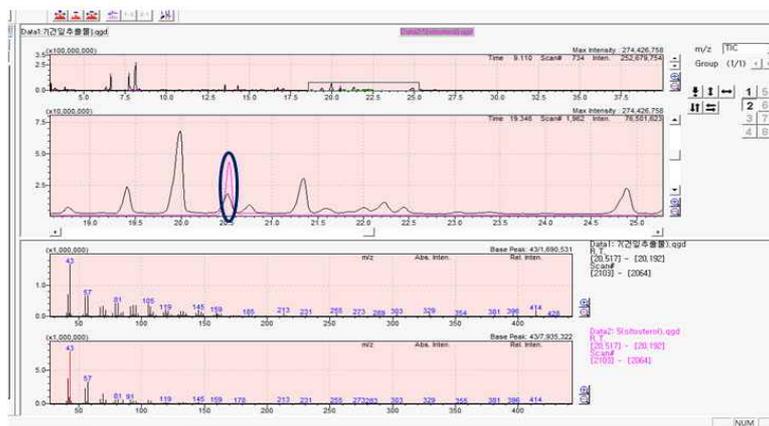
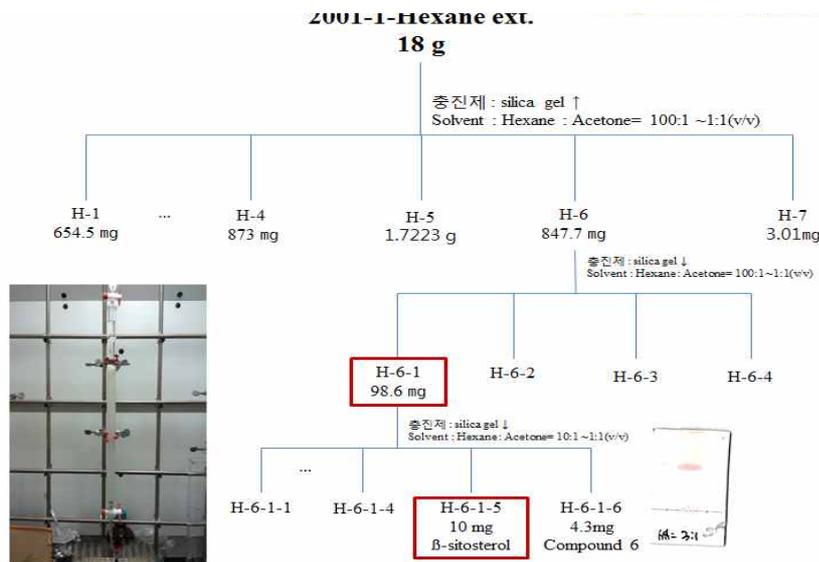


Fig 3. GC-MS spectrum of β -sitosterol std. & 2001-1 추출물



Scheme 3. Open column chromatography of Hexane ext.

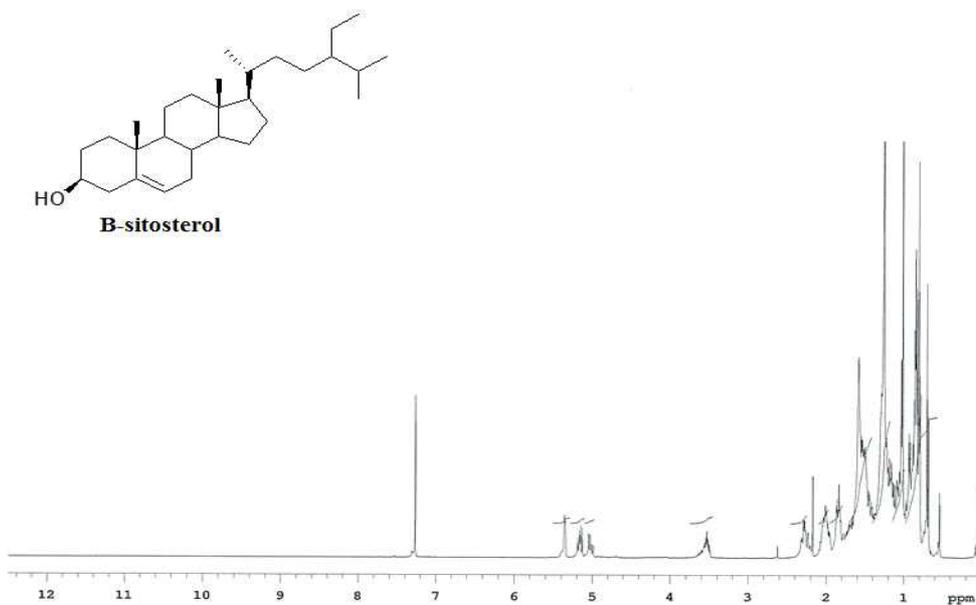


Fig 1. ^1H -NMR spectrum of compound 1 (400MHz, CDCl_3)

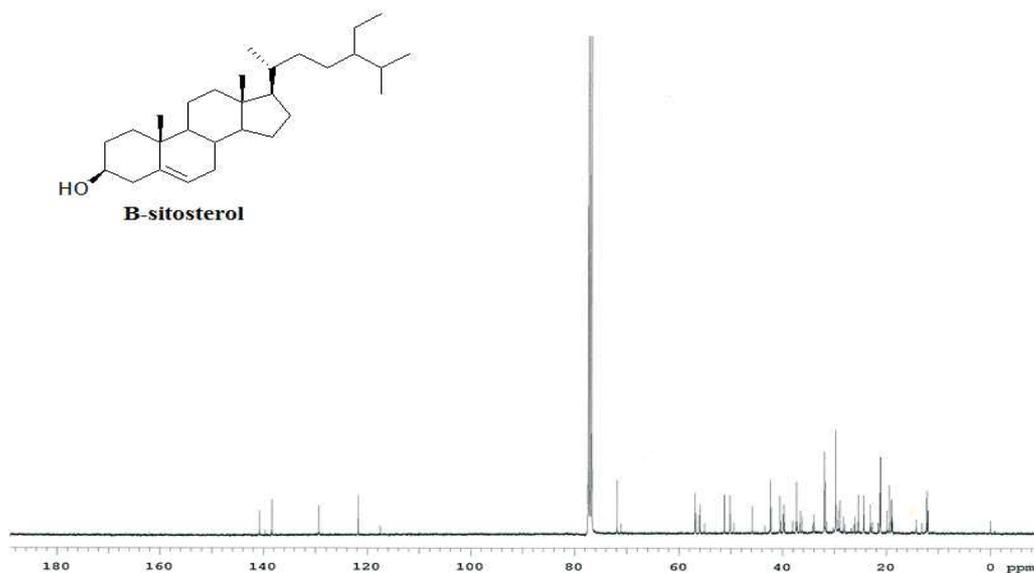
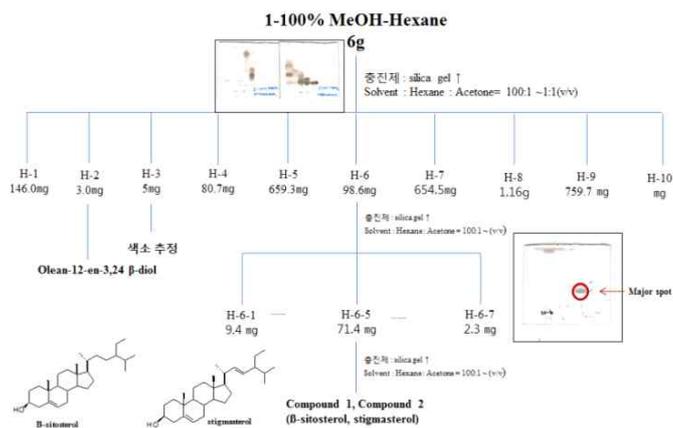


Fig 2. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (100MHz, CDCl_3)

황칠나무 건조 잎 1.3 kg을 100% 메탄올을 이용하여 60 °C에서 3 h 동안 용매 추출을 하였다. 추출물은 감압 농축하여 동결건조 하여 얻은 96.0 g의 powder를 멸균 증류수 1 L를 이용하여 녹이고 n-hexane을 가한 다음 잘 흔들고 방치하여 수용액층과 n-hexane 층을 얻었고 용매 분획물을 감압 농축하여 최종 n-hexane분획물 35.2 g을 얻었다. n-Hexane 분획물 35.2 g에서 18 g을 이용하여 open column chromatography를 실시하

였다. open column에 사용되어진 resin은 silica gel이며 용매조건은 hexane acetone을 사용하여 진행하였다. Open column 결과 모두 7개의 fraction을 얻었고 그 중에 5번째 fraction (1.7223 g)을 이용하여 open column을 진행하여 최종적으로 9개의 sub-fraction을 얻었다. 그 중 major spot이 있는 4번째 분획을 (30 mg) acetone을 사용하여 칩전시켜 1-tetradecanol을 얻었고(Figure 1A), 6번째 fraction (98.6 mg)을 이용하여 open column을 진행하여 얻어진 Sub-fraction에서 β -sitosterol (10 mg), stigmasterol을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Purification procedure of *Dendropanax morbifera* LEV.

→ 표 1에서와과 같이 베타시토스테롤과 스티그마스테롤을 참고문헌 비교 동결 결과 compound 1은 베타시토스테롤, compound 2은 스티그마스테롤 추정 되었다. (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4.)

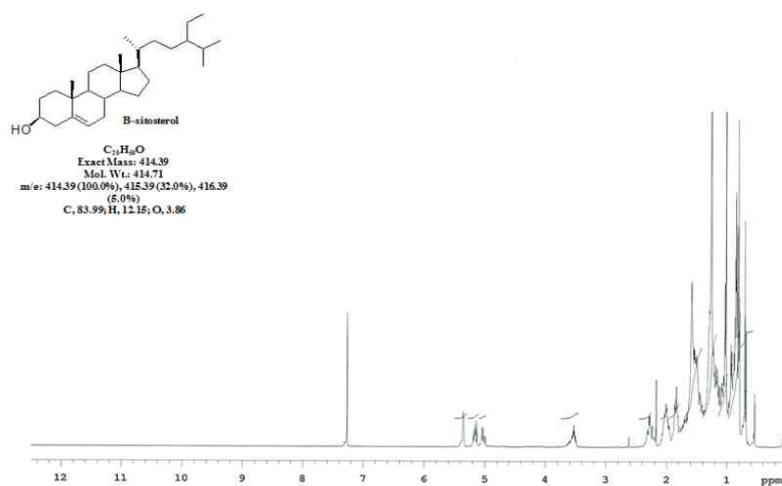


Fig 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 1 (400MHz, CDCl_3)

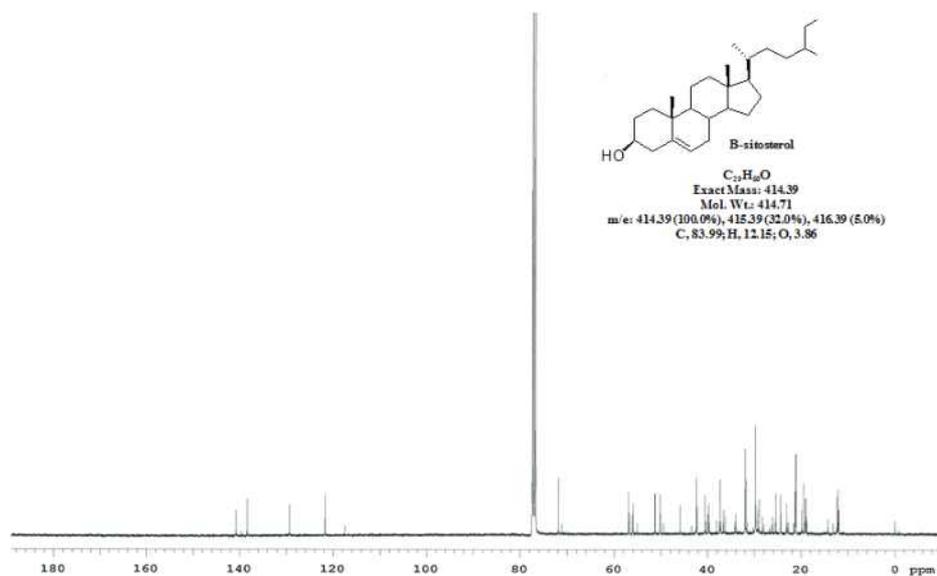


Fig 2. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (100MHz, $CDCl_3$)

→ B-sotisterol (1) : White powder (10 mg) ; mp : 134-135 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400Mhz): δ 1; ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 Mhz) δ 1; MS (m/z) : 414[M+], 396, 325, 310, 298, 257, 227, 140, 139, 125, 97, 71, 57.

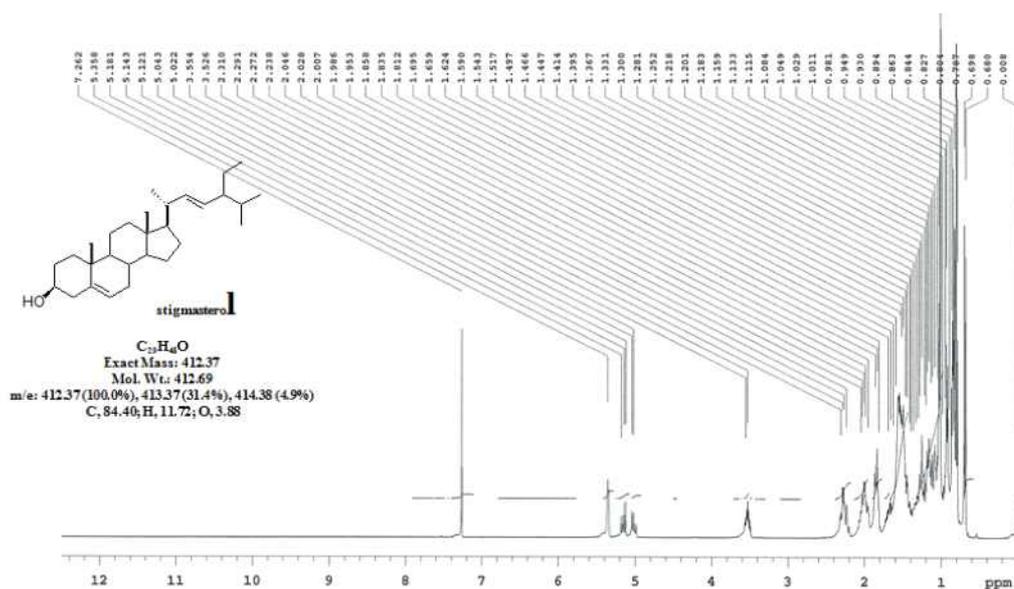


Fig 3. 1H -NMR spectrum of compound 2 (400MHz, $CDCl_3$)

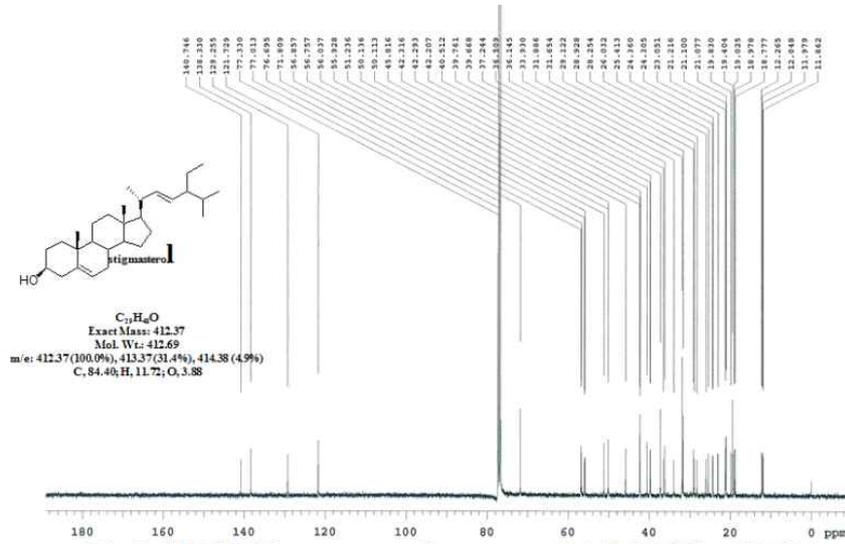


Fig 4. ¹³C-NMR spectrum of compound 4 (100MHz, CDCl₃)

→ Stigmasterol (2) : White powder (10 mg) ; mp: 174 - 176 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400Mhz): 표1; ¹³C NMR (CDCl₃, 100 Mhz) 표1; MS (m/z) : 412[M+], 394, 351, 314, 300, 271, 229, 213, 55.

황칠의 핵산층으로부터 분리한 두 개의 물질 Compound 1, Compound 2의 구조 동정을 위해 ¹H NMR, ¹³C NMR 분석 및 참고문헌을 분석을 확인한 결과 compound 1은 분자식 C₂₉H₅₀O이며, 분자량은 414의 베타시토스테롤로 구조 동정 되었다. compound 2의 분자식은 C₂₉H₄₈O이고, 분자량은 412의 스티그마스테롤로 동정 되었다.

3절. 황칠나무 잎 용매분획물의 효능평가

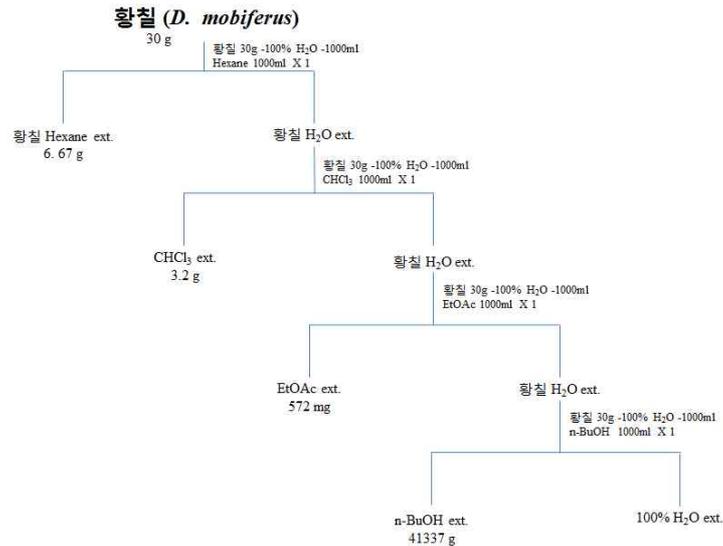
1. 황칠나무잎 추출물 및 분획물 제조

황칠 건잎 60kg을 생산동 추출기를 이용하여 100 °C에서 온도가 올라간 후 3시간동안 용매 추출을 하였다. 추출 되어진 추출물을 감압 농축 후 동결 건조하여 10 kg의 건조물을 얻었다(scheme 1).



Scheme 1. Extraction of *D. Mobiferus* LEV.

위 동결건조물을 물로 충분히 현탁하여 2배 부피의 Hexane 로 1차 용매이행을 3회 수행하여 물 층 과 Hexane ext.(6.67 g)로 분리하였다. 물 층을 다시 2배 부피의 chloroform로 2차 용매이행을 3회 수행하여 CHCl₃ ext. 3.27g를 확보하였다. 3차 용매이행을 3회 수행하여 EtOAc ext. 572.0 mg를 확보하였다. 마지막으로 n-butanol로 3차 용매이행을 3회 수행하여 n-BuOH ext. 4.13 g를 확보하였다(scheme 2).



Scheme 2. Fractionation proceduer of *D. Mobiferus* LEV.

2. in vitro 실험을 위한 유효범위 검토

시료의 분획물을 대상으로 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 헥산과 클로로포름 30 μ g/mL에서 cell viability가 62.2%, 70.7% 떨어져 최대농도를 10 μ g/mL까지 다음 실험을 진행하였다(Fig 1).

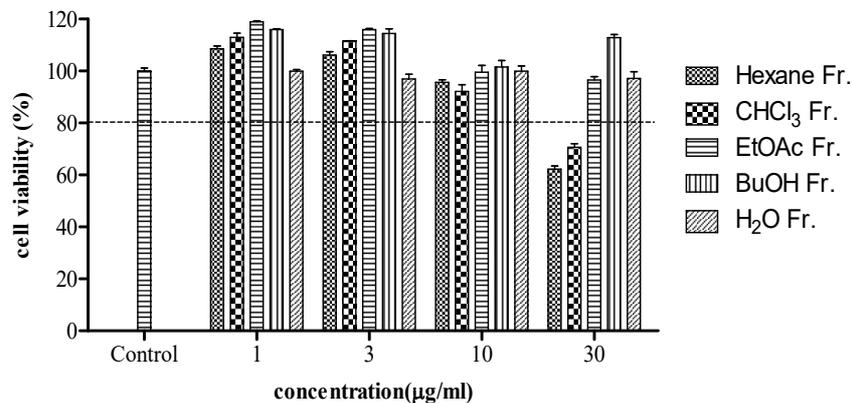


Figure 1. Protective effect of DM(*Dendropanax morbifera*) solvent fraction on TM 3 Leydig cells. Values represent the mean \pm SE(n=4).

3. TM3세포의 Testosterone levels 측정

황칠잎 열수, 5%, 30% 및 80% 주정 추출물의 testosterone 수준 비교 측정을 실시하였으며, 열수추출물의 테스토스테론 분비활성이 가장 높게 확인되어 용매별 추출물은 열수추출물로 선정하여 차후 실험을 진행하게 되었음. 시료의 분획물을 대상으로 테스토스테론 함량을 측정한 결과 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올층에서 유의성있게 증가한 것을 확인하였다(Fig. 2).

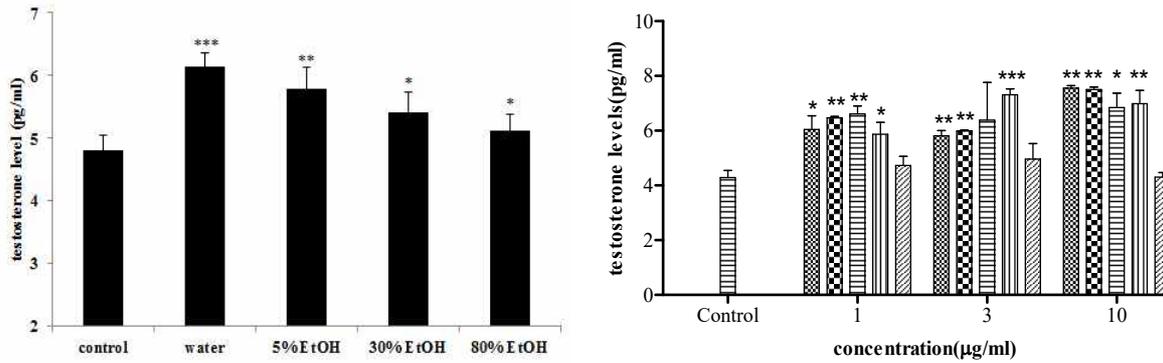


Figure 2. Effect of DM(*Dendropanax morbifera*) extracts and solvent fractions on testosterone levels. Values represent the mean±SE(n=4). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with the control group.

4. H₂O₂ 유도에 의한 Testosterone levels 측정

H₂O₂를 유도하여 TM-3 세포를 손상시킨 후 테스토스테론 함량을 측정한 결과 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올층에서 유의성있게 증가한 것을 확인하였고, 10µg/mL 농도에서는 에틸아세테이트층에서 가장 큰 테스토스테론 함량을 보였다(Fig. 3).

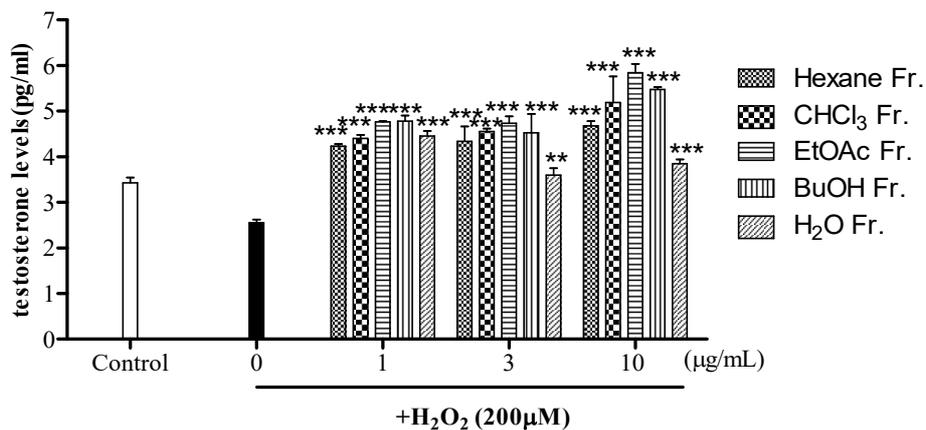


Figure 3. Effect of DM(*Dendropanax morbifera*) solvent fraction on H₂O₂-induced testosterone levels. Values represent the mean±SE(n=4). **p<0.01 and ***p<0.001 compared with the H₂O₂-induced control group.

4절 황칠나무잎 발효 추출물의 효능평가

1. 황칠 발효물 제조 방법

Lactobacillus plantarum, lactic acid bacteria를 배양하여 아래와 같은 방법으로 추출하였다. 발효 완료후 시료를 대형회전농축기로 감압농축하고 각 농축물은 동결건조 하여 분말하였다. 제조된 분말은 4°C에서 냉장보관하여 실험 시 사용하였다.



2. in vitro 실험을 위한 유효범위 검토

황칠나무잎 발효 추출물을 대상으로 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 젖산 발효에 사용된 젖산균 lactobacillus brevis(DMB), lactobacillus plantarum(DMP) 모두 100 µg/mL까지 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig 1).

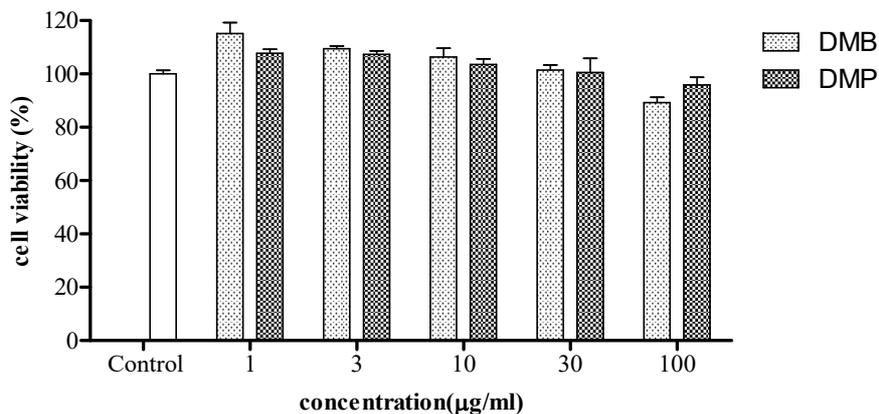


Figure 1. Protective effect of fermentation of Dendropanax morbifera (DMB, DMP) on TM 3 Leydig cells. Values represent the mean±SE(n=3).

3, TM3세포의 Testosterone levels 측정

황칠나무잎 발효 추출물을 대상으로 테스토스테론 함량을 측정한 결과 DMB, DMP 모두 control에 비해 testosterone 분비량이 농도별로 증가하였고, 특히 DMP 100 µg/mL에서 유의적인 증가를 보였다(Fig. 2).

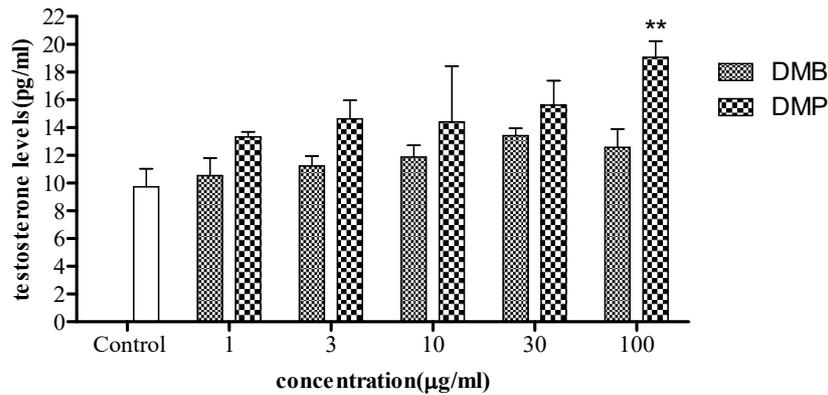


Figure 2. Effect of fermentation of *Dendropanax morbifera* (DMB, DMP) on testosterone levels. Values represent the mean±SE(n=3). **p<0.01 compared with the control group.

5절. 지표성분 추가 발굴 및 분석법 표준화

1. 황칠나무 잎 추출 및 농축

본 실험에서 사용한 황칠나무 잎은 전라남도 장흥군 천연자연연구센터에서 재배되고 있는 황칠잎을 사용하였다. 황칠나무 잎 4계절 지표성분 함량을 측정하기 위해 봄(4월), 여름(8월), 가을(10월), 겨울(1월) 황칠잎을 수확하여 사용하였다. 수확된 황칠잎은 계절 후 열풍건조기에서 건조 후 사용하였다.

→ 각 계절별 수확된 황칠 생잎 420g을 온풍건조기에 45℃에서 24시간동안 건조 하여 200g의 건잎을 얻었다 (Fig. 1). 황칠 건잎 200g을 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 추출 되어진 추출물을 감압 농축기를 이용하여 농축 후 동결 건조 하여 황칠 열수 추출물 건조 파우더를 얻었다.

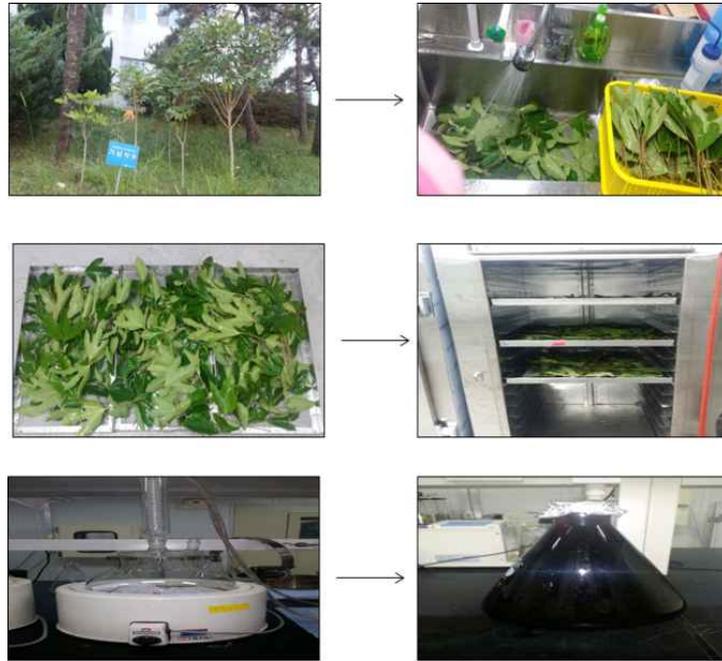


Fig.1 황칠 채취 및 건조 추출 과정

2. 황칠나무잎 추출물의 제조공정 표준화

가. 황칠나무잎 추출물 및 분획물



Scheme 1. Extraction of *D. Mobiferus* LEV.

황칠 건잎 200g을 실험실 추출기를 이용하여 온도가 올라간 후 100℃에서 3시간동안 열수 추출을 하였다. 추출 되어진 추출물을 감압 농축 후 동결 건조하여 건조물을 얻었다(Scheme. 1).

나. 표준용액제조 및 standard curve 작성

표준품 Rutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용액을 이용하여 작성한 표준 검량선으로 부터 Rutin 함량을 구하였다.

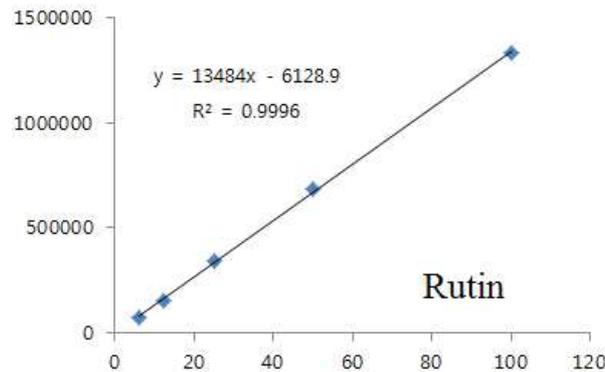


Fig. 2. Rutin standard curve

표준용액의 순도 Rutin 1000 ppm 농도에서 HPLC 분석을 2반복 수행하여 나타난 chromatogram의 면적비에 따른 백분율을 계산하였다.

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건

항목	조건
주입량	10 µL
검출기 파장	370\5 nm
컬럼온도	40°C
이동상	A : 메탄올, B : 0.1% Formic acid
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	35	65
8	35	65
38	50	50
40	100	0
50	35	65
51	35	65

다. 시험용액의 조제

희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100

mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣었다. 황칠 열수 추출물을 약 300mg을 칭량하여 50 ml 메스플라스크에 취한 후 10ml 희석용액을 가해 5 0°C 수용상에서 1시간 동안 sonication 하였다. 위의 sonication한 메스플라스크를 표선 까지 메탄올로 맞춘다음 위의 시험용액을 0.45 um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액 으로 하였다.

→ 표준품 Rutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용 액을 이용하여 작성한 표준 검량선으로 부터 Rutin 함량을 구하였다. (Fig 2, 3)

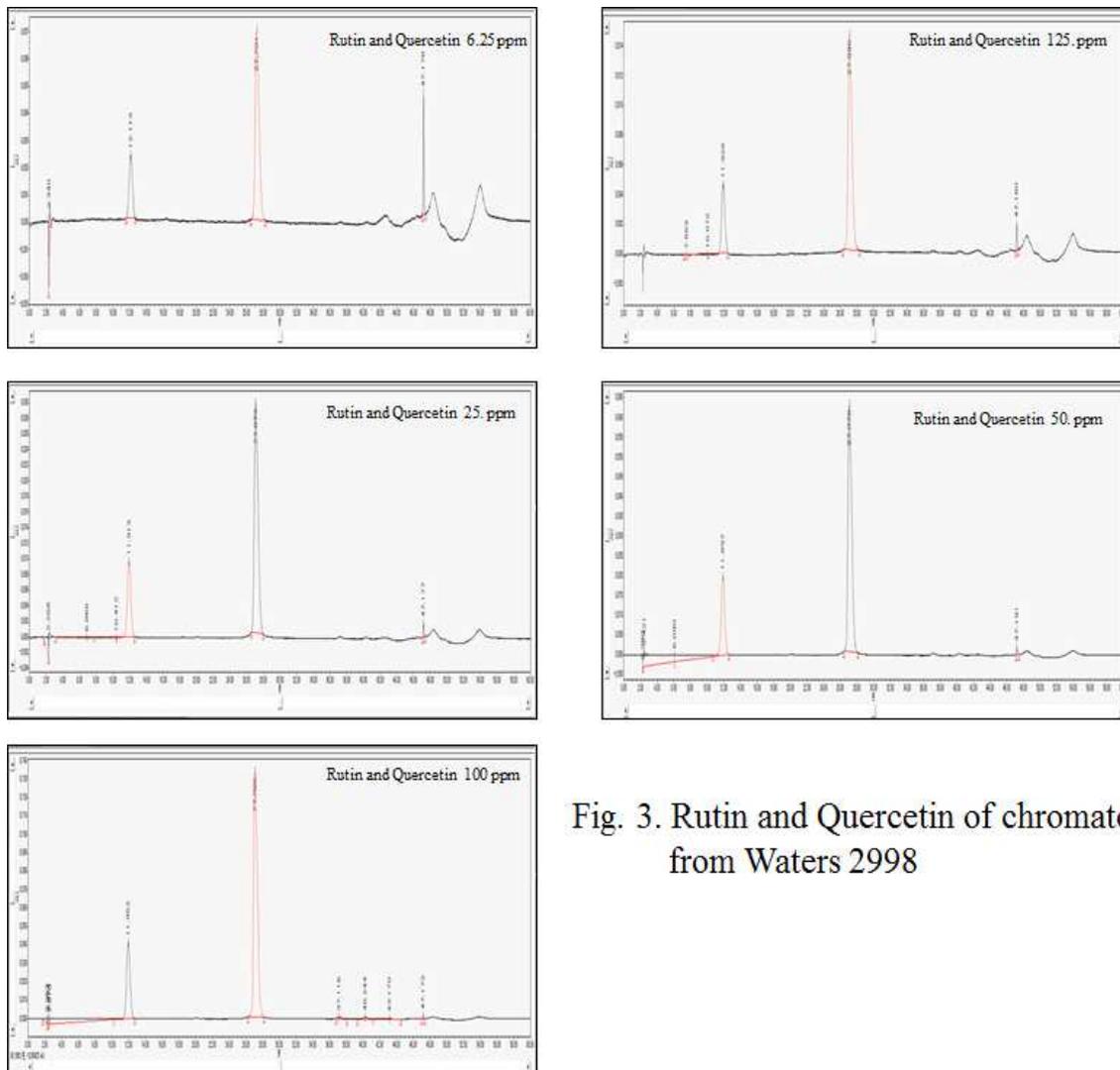


Fig. 3. Rutin and Quercetin of chromatogram from Waters 2998

→ 황칠 계절별 지표성분 측정을 위해 위 조건이용하여 rutin 분석법을 확립을 실시하였

다. 1% formic acid가 첨가된 water와 Methanol을 이동상으로 하고 agilent-C 18 (4.6 × 250 mm. I.D, 5 μm) column을 사용하여 gradient elution 방법으로 분석하였다. Rutin의 검량선은 R²=0.9996, 으로 좋은 선형성을 보였다. 표준액의 머무름 시간(R.T) 11.926분으로 피크 유지 시간이 나타났다. 그러므로 HPLC 이용 Rutin의 분석법이 적합한 시험법임이 검증 되었다. 본 시험법에 따라 분석한 황칠 열수 추출물 내의 rutin의 함량은 세 lot를 3번씩 분석하였다. 표준 용액과 같이 시료 전처리한 황칠 열수 추출물의 크로마토 그래피를 비교하여 Rutin의 피크가 분리 되는지 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리 되었다. (Fig. 4)

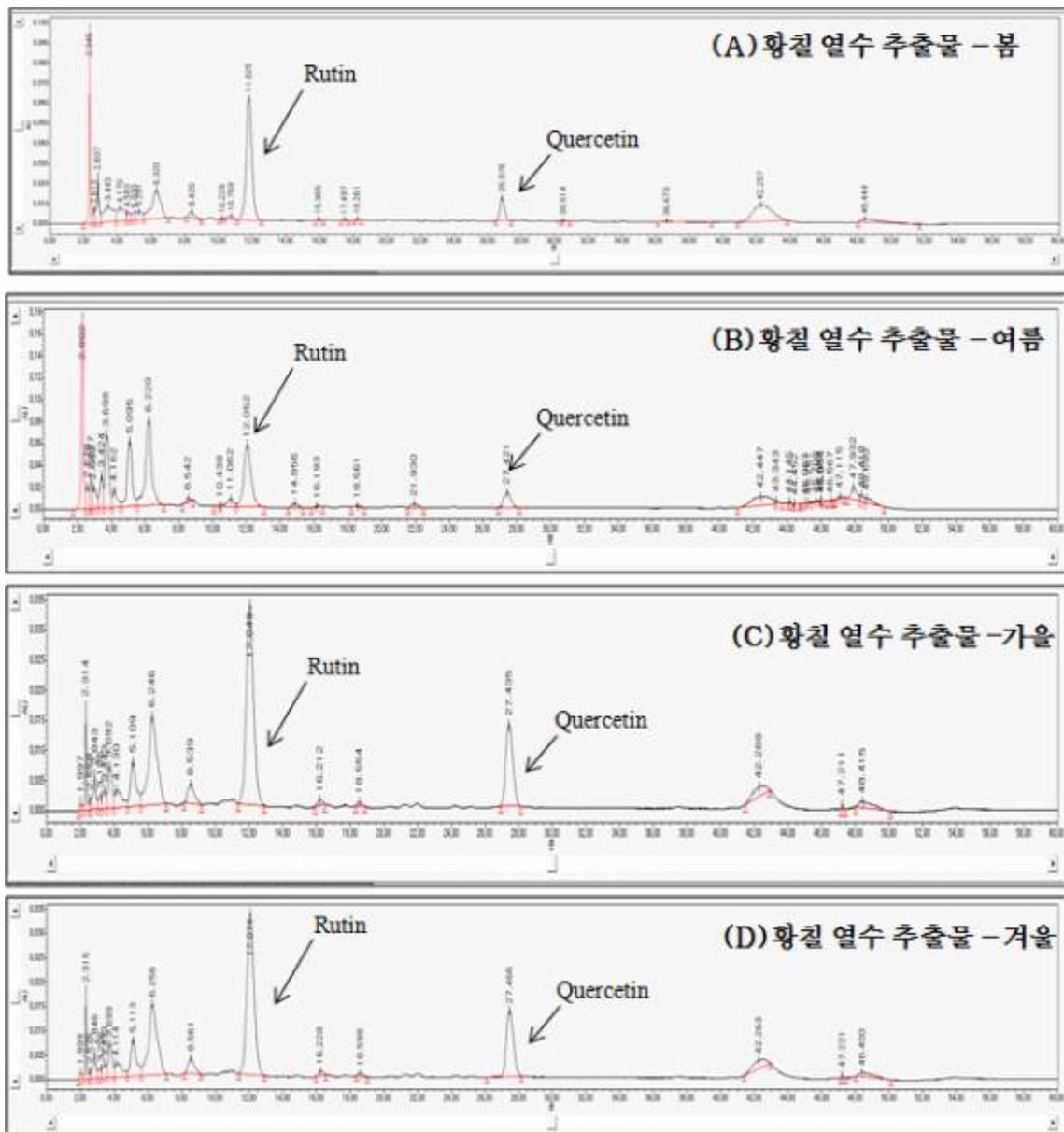


Fig.4. Chromatogram of (A) 봄, (B) 여름, (C) 가을, (D) 겨울 *dendropanax moribifura* LEV. Extract.

→ 표준용액의 머무름 시간은 11.926분이고, 황칠 열수 추출물의 머무름 시간은 여름

12.148분, 가을 11.947분, 11.995분으로 표준용액의 피크유지시간과 황칠열수추출물의 피크 유지시간이 일치 하였다. 측정 결과 황칠 열수 추출물 Rutin의 계절별 함량 분석 결과 봄 20437.84 mg/kg 여름 17565.55 mg/kg , 가을 24510.55 mg/kg, 겨울 24673.22 mg/kg으로 분석 되었다. 함량이 최고 높은 계절은 겨울이 최고 높은 결과를 나타냈으면, 여름은 함량이 제일 낮은 계절로 분석 되었다. 그리고 가을 , 겨울의 함량 차이가 나타나지만 높지 않은 것으로 분석되었다. Rutin의 평균 함량은 37598.30 mg/kg으로 분석되어졌다 (표3).

계절 (Rutin)	Mean (mg/kg)	비고
봄	20437.84	
여름	17565.55	
가을	24510.55	
겨울	24673.22	

표 3. Rutin 계절별 함량

* 황칠열수추출물 중 Rutin, Quercetin 시험법 검토 결과 보고서 (validation 완료)



한국기능식품연구원

수신 (주)세콤
김기만 선생님

제목 황칠열수추출물 중 Rutin-Quercetin 시험법 검토 결과보고서

1. 「황칠열수추출물 중 Rutin-Quercetin 시험법 검토(2014.11.17,시14-023호)」 관련 사항입니다.

2. 위호와 관련 「황칠열수추출물 중 Rutin-Quercetin」 가 완료되어 결과보고서를 제출하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.

분림 : 1. 황칠열수추출물 중 Rutin-Quercetin 시험법검토 결과보고서 1부, 글.

3.4. 결과

본 시험법은 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 정량 가능여부를 확인하기 위해 진행되었다.

제공된 시험법에 따라 황칠열수추출물 중 Rutin 및 Quercetin의 정량을 위해 시료를 50ml 메스플라스크에 취하여 10ml 추출용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v)을 가하여 50°C 수욕상에서 1시간 동안 sonication 후 Methanol을 이용하여 정용한 후 0.45µm 멤브레인 필터로 여과하고 UV(DAD)를 이용하여 370nm에서 분석하였다.

시료 중 Rutin 및 Quercetin의 분석가능여부를 확인한 결과, 표준용액과 시험용액에서 Rutin은 약 12분대, Quercetin은 약 28분대에 검출되었으며, 표준용액과 시험용액의 spectrum이 동일한 것으로 확인되었으며, 이를 토대로 시료 중 Rutin 및 Quercetin의 함량을 정량한 결과 Rutin 함량은 10.52±0.20mg/g, Quercetin 함량은 2.99±0.07mg/g을 나타냈다.

반복성 및 재현성 실험을 위하여 1차실험과 다른 날짜에 약 300mg씩 3개의 시료를 취하여 실험하였으며, Rutin 함량은 12.13±0.19mg/g, Quercetin 함량은 1.92±0.07mg/g을 나타냈으며, 반복간에 편차는 크게 나타나지 않았으나 1차실험에 산출된 함량보다 Rutin은 약 1.61mg/g 높은 함량을 Quercetin은 약 1.07mg/g 낮은 함량을 나타냈다.

시료량에 따른 직선성 실험을 위하여 시료 300mg을 기준으로 하여 100mg과 500mg을 취한 3개의 시료를 이용하여 실험을 진행하였으며, 시료채취량에 의한 Rutin 및 Quercetin의 함량에 차이는 크게 보이지는 않았다.

2차 실험의 결과, 개별 실험 간의 함량에 대한 편차는 크게 보이지 않았으나, 1차 실험을 통해 확인된 함량과의 차이가 발생하는 것을 확인하였으며, 이를 확인하기 위하여 다른 일자에 재현성 실험을 추가로 진행하였다. 그 결과, Rutin 함량은 12.58±0.40mg/g, Quercetin 함량은 2.16±0.30mg/g을 나타냈으며, 지금까지의 결과를 종합하여 보았을 때 Rutin의 평균 함량은 11.69mg/g, 상대표준편차(RSD)는 7.63으로 나타났으며, Quercetin의 평균 함량은 2.27mg/g, 상대표준편차는 21.75로 나타났다.

한국기능식품연구원장

수신처: (주)세콤

문서번호: 기석연07-0011 발송일자: 2015년 5월 29일
 우 463-400 경기도 성남시 대안판교로 700 코리야바이오파크 B동 101호
 전화 031-628-2400(대표) 전 송 031-628-0400,0401 www.hfood.or.kr

6절. 황칠 발효추출물 표준화를 위한 최종 지표성분 2종 발굴 확보

1. 표준용액제조 및 standard curve

표준품 Rutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 Methanol로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준액으로 사용하였다. 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용액을 이용하여 작성한 표준 검량선으로 부터 Rutin 함량을 구하였다.

2. 표준용액의 순도Rutin 1000 ppm 농도에서 HPLC 분석을 2반복 수행하여 나타난 chromatogram의 면적비에 따른 백분율을 계산하였다.

3. 시험용액의 조제

희석용액(에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣었다. 황칠 열수 추출물을 약 300 mg을 칭량하여 50 ml 메스플라스크에 취한 후 10 ml 희석용액을 가해 50 °C 수용상에서 1시간 동안 sonication 하였다. 위의 sonication한 메스플라스크를 표 선까지 메탄올로 맞춘 다음 위의 시험용액을 0.45 um 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

4. HPLC 분석 조건

항목	조건
주입량	10 µL
검출기 파장	370\5 nm
컬럼온도	40°C
이동상	A : 메탄올, B : 0.1% Formic acid
유속	1.0 mL/분

표 1. 고속액체크로마토그래피 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0	35	65
8	35	65
38	50	50
40	100	0
50	35	65
51	35	65

표 2. 이동상 조건

→ 황칠 발효 추출물 지표성분 측정을 위해 위 조건이용하여 rutin 분석법을 확립을 실시하였다. 1% formic acid가 첨가된 water와 Methanol을 이동상으로 하고 agilent-C 18 (4.6 × 250 mm. I.D, 5 μm) column을 사용하여 gradient elution 방법으로 분석하였다. Rutin의 검량선은 R²=0.9996, 으로 좋은 선형성을 보였다. 표준액의 머무름 시간(R.T) 11.926분으로 피크 유지 시간이 나타났다. 그러므로 HPLC 이용 Rutin의 분석법이 적합한 시험법임이 검증 되었다.(Fig. 1.)

본 시험법에 따라 분석한 황칠 발효 추출물 내의 rutin의 함량은 세 lot를 3번씩 분석하였다. 표준 용액과 같이 시료 전처리한 황칠 발효 추출물의 크로마토그래피를 비교하여 Rutin의 피크가 분리 되는지 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리 되었다.

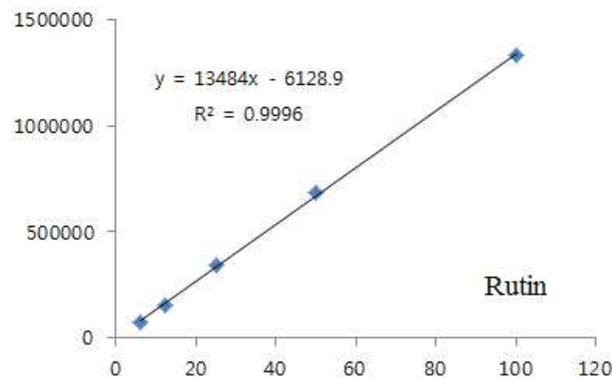


Fig. 1. Rutin standard curve

→ 본 시험법에 따라 분석한 황칠 발효 추출물 내의 rutin의 함량은 세 lot를 3번씩 분석하였다. 표준 용액과 같이 시료 전처리한 황칠 발효 추출물의 크로마토그래피를 비교하여 Rutin의 피크가 분리 되는지 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리 되었다. (Fig.1) 표준용액의 머무름 시간은 11.926분이고, 황칠 발효 추출물의 머무름 시간은 12.091분으로 표준용액의 피크유지시간과 황칠발효추출물의 피크 유지시간이 1분 이상 늦은 결과를 나타내었다. 황칠 발효 추출물의 지표 성분인 rutin의 검증의 적합한 시험법임이 검증되었다. (Fig.2.)

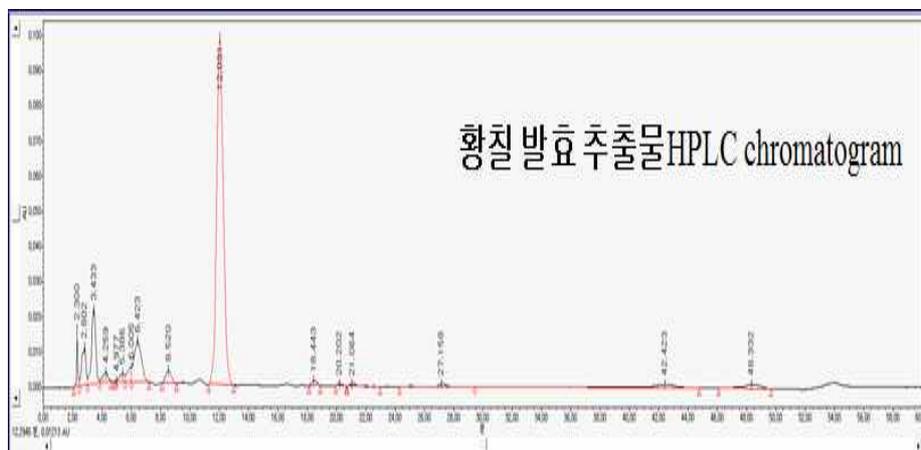


Fig.2. Chromatogram of dendropanax morbifera LEV. fermentation of Extract.

→ 황칠 발효 추출물의 함량 분석 결과 18389.99 mg/kg으로 분석 되었다. 그리고 황칠 발효 추출물의 chromatogram 분석 결과 retention time 1~10 사이의 peak 이 황칠 열수 추출물의 비해 현저히 면적이 낮아진 것을 확인 할 수 있었다.

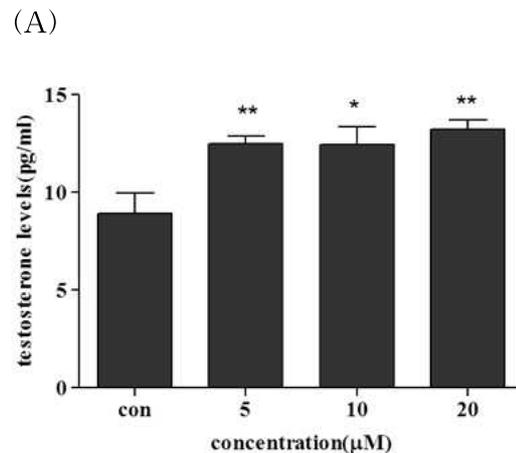
7절. 황칠 추출물 단일성분 및 발효추출물의 in vitro 효능평가

1. 황칠 단일성분의 in vitro 평가

1) TM3세포의 Testosterone levels 측정

TM3 cell을 24-well palte에 2×10^5 cells/mL 농도로 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 stigmasterol(5, 10, 20 μ M)과 β -sitosterol(5, 10, 20 μ M)를 처리하고 24시간 배양 하였다. 상층액을 취한 후 Testosterone EIA kit(ADI-900-065, ENZO Life science, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하였다.

→ 단일성분을 대상으로 테스토스테론 함량을 측정한 결과 stigmasterol에서 농도의존적으로 테스토스테론 함량이 증가한 것을 확인하였다($p < 0.05$ and $p < 0.01$). β -sitosterol에서는 대조군과 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).



(B)

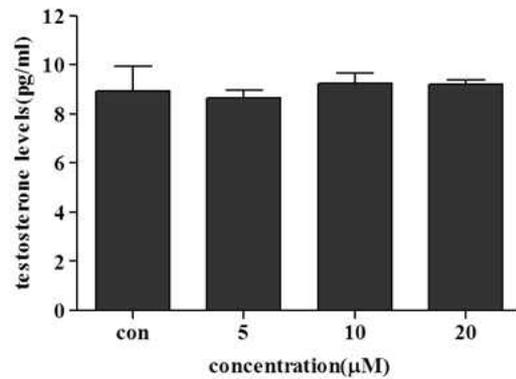
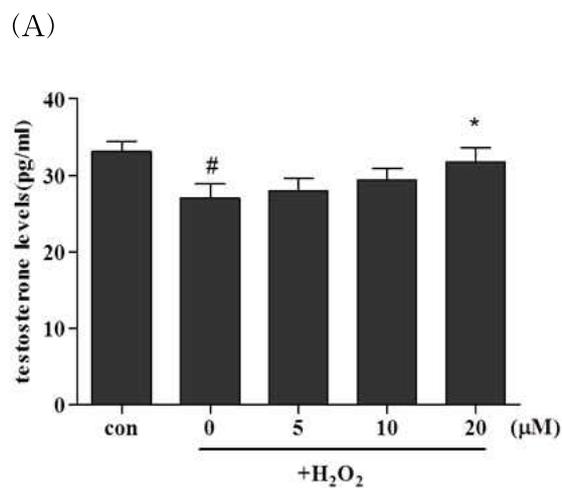


Figure 3. Effect of stigmasterol and β -sitosterol on testosterone levels. Values represent the mean \pm SE(n=4). *p<0.05 and **p<0.01 compared with the control group.

2) H₂O₂ 유도에 의한 Testosterone levels 측정

TM3 cell을 24-well palte에 2 \times 10⁵ cells/mL 농도로 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 황stigmasterol(5, 10, 20 μ M)과 β -sitosterol(5, 10, 20 μ M)과 H₂O₂(200 μ M)를 처리하고 24시간동안 배양하였다. 상층액을 취한 후 Testosterone EIA kit(ADI-900-065, ENZO Life science, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하였다.

→ H₂O₂를 유도하여 TM-3 세포를 손상시킨 후 테스토스테론 함량을 측정한 결과 stigmasterol에서는 농도별로 증가한 것을 확인하였다(p<0.05). β -sitosterol에서는 H₂O₂ 처리군과 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).



(B)

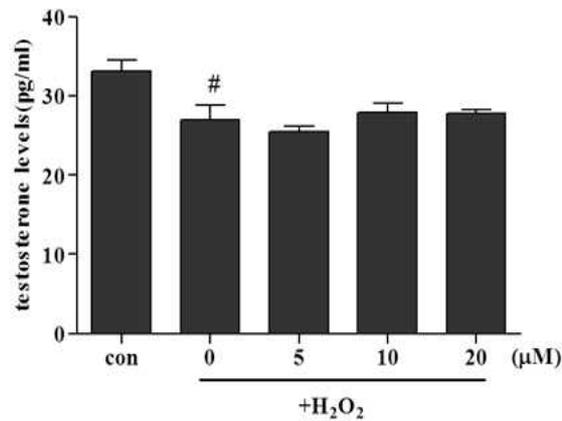


Figure 3. Effect of stigmasterol and β -sitosterol on H₂O₂-induced testosterone levels. Values represent the mean \pm SE(n=4). #p<0.05, significantly different from the con group. **p<0.01 and ***p<0.001 compared with the H₂O₂-induced con group.

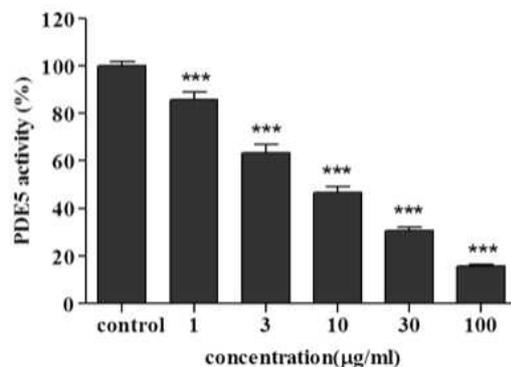
2. 황칠 발효 추출물의 in vitro 평가

1) PDE5 inhibitor assay

PDE5 assay kit는 BPS Bioscience사로부터 구입하였다. 96well plate의 각 well에 25 μ L FAM-Cyclic-3',5'-GMP 넣고, substrate control well에 25 μ L PDE assay buffer, sample well에 발효추출물 시료 2종을 25 μ L를 넣고 반응시켰다. 각 well에 5 μ L inhibitor solution, 20 μ L PDE5A를 넣어 실온에서 1시간 동안 incubation하였다. 형광강도는 여기 파장 475nm, 측정파장 518nm로 측정하였다.

→ PDE5 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 1에서 보듯이 황칠나무 발효 추출물 2종을 농도 별로 처리하였을 때 2종 모두 농도의존적으로 유의한 저해효과가 나타났으며(p<0.05 and p<0.001), DMB에 비해 DMP에서 더 큰 저해효과를 보였다(Fig. 2).

(A)



(B)

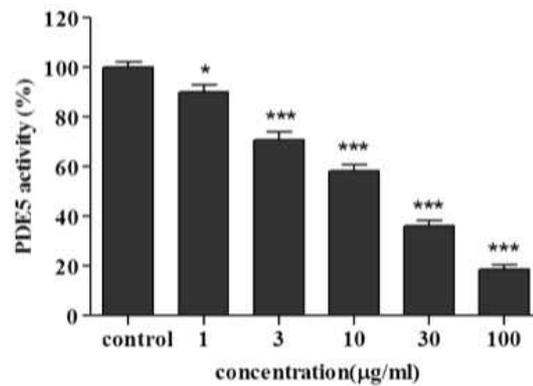


Figure 1. Effect of (A) DMP (Dendropanax morbifera with fermented Lactobacillus plantarum) and (B) DMB (Dendropanax morbifera with fermented Lactobacillus brevis) extract on phosphodiesterase 5(PDE5) levels. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

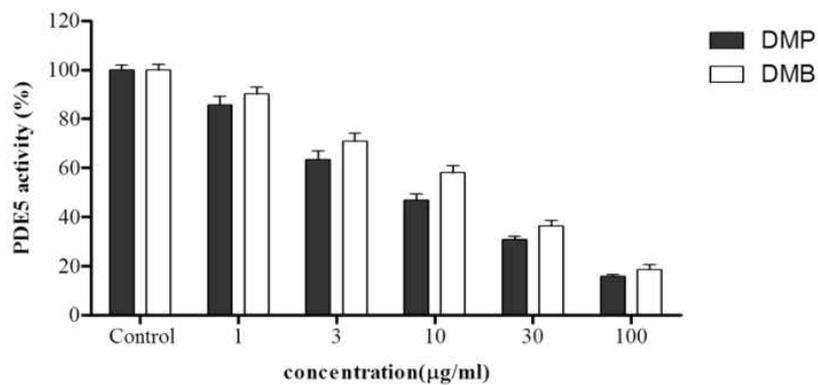


Figure 2. Effect of DMP (Dendropanax morbifera with fermented Lactobacillus plantarum) and DMB (Dendropanax morbifera with fermented Lactobacillus brevis) extract on phosphodiesterase 5(PDE5) levels. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared with the control group.

2) Western blot Analysis

TM3 cell을 PBS로 워싱 후 RIPA lysis buffer로 용해시키고, 세포를 끊은 후 4°C에서 20분동안 13,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리하였다. BCA 방법으로 단백질을 정량한 다음 동량의 단백질을 12% gel을 이용하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. SDS-PAGE가 끝난 후 300mA, 4°C, 90분동안 transfer하여 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane으로 전이시켰다. membrane을 5% skim milk로 blocking 한 뒤 membrane을 TBST로 씻고 1차 antibody (ERK, pERK, Akt, pAKT)에 반응시켰다. 2차 antibody(horseradish peroxidase (HRP)-conjugated affinipure Goat anti-rabbit IgG)를 1시간동안 반응시킨

후, ECL detection kit를 사용하여 단백질 발현 양을 분석하였다.

→ Mitogen-associated protein kinases(MAPKs)는 serine/threonine kinase로 세포의 증식 및 분화 등 다양한 세포반응의 조절에 관여하고 있다. ERK는 주로 mitogen, growth factor에 의해서 조절되며 세포의 성장, 생존 및 분화에 중요한 역할을 담당하고 있다. PI3K/AKT 경로는 세포 생존과 사멸을 결정짓는 신호전달과 관련이 있다. DMP 추출물에서는 ERK, AKT 인산화가 H₂O₂ 처리한군에 비해 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 4). DMB의 세포증식 효과는 ERK 경로를 통하여 세포의 사멸을 억제하고 생존기간을 연장시키는 관여하는 것으로 보인다. DMP 추출물에서는 ERK, AKT 인산화의 특이적 변화는 나타나지 않았다.

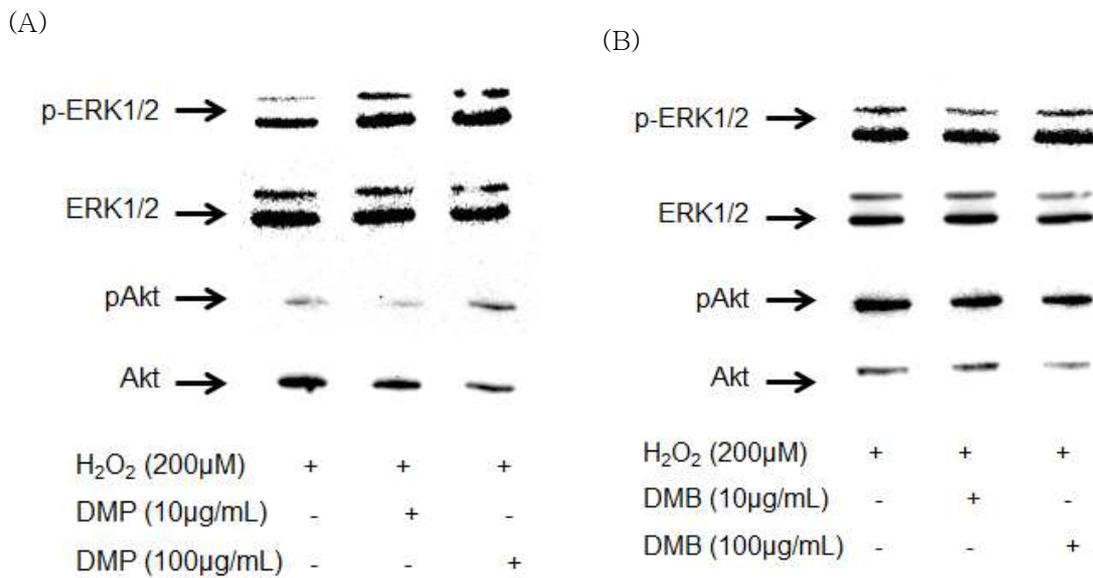


Figure 4. Effects of DMP and DMB on p-ERK 1/2 and pAkt expression in the TM3 Ledig cells against H₂O₂.

8절. 단일 원료 및 발효물의 효능 평가

1. 실험동물

실험동물은 SD rat 6개월령 수컷을 사용하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취시키면서 공급하였고, 동물실험실의 사육조건은 온도 23±1 °C, 습도 45±5%, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절되었다. 1주일간 적응시킨 뒤 실험동물은 정상군(control), 황칠 단일 추출물 200mg/kg/day 경구투여군(DM), lactobacillus brevis를 접종한 황칠 발효 추출물 200 mg/kg/day 경구투여군 (DMB), lactobacillus plantarum을 접종한 황칠 발효 추출물

200 mg/kg/day 경구투여군 (DMP)으로 총 4군으로 나누어 실시하였으며, 1주간 경구투여 하였다.

2. Testosterone 측정

마지막 경구 투여 후 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 후, 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 분리된 혈청을 대상으로 Testosterone ELISA kit (ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 Testosterone 함량을 측정하였다.

→ 노령 수컷쥐에서 Testosterone 분비량을 측정한 결과 대조군 (193.36 ± 76.58 pg/mL)에 비해 DM군, DMP군, DMB군에서 각각 841.84 ± 193.89 pg/mL, 476.72 ± 318.85 pg/mL, 320.77 ± 118.61 pg/mL로 증가하였으며, DM군에서 테스토스테론 양이 가장 많이 증가한 것을 확인하였다 (Figure. 2). 단일 원료 및 발효물의 효능 평가 결과 황칠 단일 추출물이 남성호르몬 개선에 가장 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 황칠 단일 추출물을 이용하여 biomarker를 대상으로 효용성을 평가하였다.

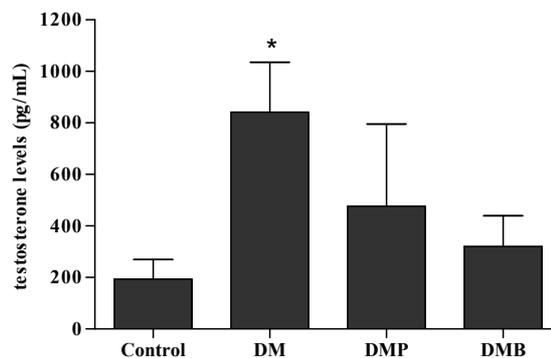


Figure 2. Effect of DM, DMP and DMB on testosterone levels. Values represent the mean \pm SE(n=4). *p<0.05 compared with the control group.

9절 다양한 효능 biomarker를 대상으로 황칠 단일 추출물의 효능 평가 및 기전분석

1. 노령쥐 모델에서 황칠 단일 추출물의 남성 갱년기 개선에 관한 연구

가. 서론

고령인구의 비율이 증가하면서 노인건강에 관한 인식이 급격하게 바뀌어 가고 있다. 생명에 위협적인 질환에 대해 관심뿐만 아니라 삶의 질에 영향을 미치는 질환에 대한 인식도 증가하고 있다. 남성의 나이가 들어감에 따라 남성호르몬을 생산하는 뇌하수체-시상하부-고환 축의 기능 장애로 호르몬 수치가 감소하게 되며 이를 “후기발현 남성 성선

기능 저하증 (late-onset-hypogonadism, LOH)”으로 명명하고 있다. 일반적으로 갱년기 남성에게서 나타날 수 있는 건강문제 Table 1 과 같다. 이러한 건강문제는 항상 동시에 수반되는 것이 아니며, 테스토스테론 저하를 함께 동반하는 것이 일반적이다.

Table 1. Clinical manifestations of late-onset hypogonadism

- Reduced lean body mass, muscle strength and volume **Body**
- Loss of body hair **Body**
- Visceral obesity **Body**
- Osteoporosis and stress fractures **Body**
- Reduced sexual desire and activity **Sexual function**
- Erectile dysfunction **Sexual function**
- Reduced frequency and duration of erections **Sexual function**
- Sudden mood changes, fatigue, anxiety, and a tendency toward depression **Mind**
 - Disminucion de las funciones cognitivas
- Sleep disorders **Mind**

[international society for the study of the aging male, 2002]

젊은 남성에서의 연구결과를 근거로 혈청 총 테스토스테론의 정상 하한치는 12nmol/L로 기준을 정하고 있으며 국내에서 남성갱년기 증상의 유병률은 아래 그림과 같이 연령증가에 따라 호르몬이 낮은 남성의 비율이 점차 증가하고 있다 (Figure. 1).

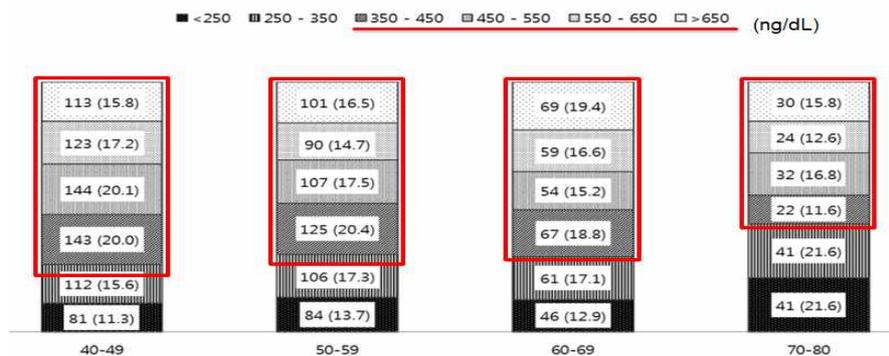


Figure 1. Serum testosterone by age group. Journal of Sexual Medicine (2014), 11, 583-94.

테스토스테론 저하는 갱년기 남성에게서 나타나는 가장 중요한 지표이다. DHEA는 스테로이드의 안드로겐 합성에서 처음 발생하는 호르몬으로 테스토스테론의 합성의 지표로 활용될 수 있다. DHEA는 20~30대에 정점에 달해 70세에 이르면 젊었을때의 20% 이하로 감소한다. 시상하부는 성선호르몬의 분비를 총괄하는 곳으로 중추 신경계로부터의 신경성 자극과 고환으로부터의 호르몬성 자극에 의해 GnRH의 분비를 조절한다. 성선호르몬인 LH와 FSH는 남성호르몬 생산에 매우 중요한 역할을 하는 호르몬이며 특히 LH는 Leydig 세포 내 LH 수용체에 작용하므로써 고환내 스테로이드 합성을 자극한다.

이미 유럽 및 다른 국가에서는 남성용 건강식품이 시중에 널리 판매되고 있으나, 아직

국내에서는 남성의 건강을 위한 기능성 소재가 미비한 실적이다. 식약처에서 국내최초로 민들레 등 복합추출물의 남성갱년기 증상 개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정 사례가 등장하였다. 최근들어 남성의 갱년기 증상을 개선시킬 수 있는 소재개발에 대한 요구가 늘고 있음에 따라 본 연구에서는 황칠 단일 추출물의 투여가 실험동물에서 테스토스테론 등 바이오마커를 측정하여 남성갱년기 개선용 식품원료로서의 효용성을 평가하고자 하였다.

나. 연구내용 및 결과

(1) 실험동물

실험동물은 SD rat 6개월령 수컷을 사용하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취시키면서 공급하였고, 동물실험실의 사육조건은 온도 23 ± 1 °C, 습도 $45\pm 5\%$, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절되었다. 1주일간 적응시킨 뒤 실험동물은 정상군(control), 황칠 추출물 50 mg/kg/day 경구투여군(DM 50), 황칠 추출물 100 mg/kg/day 경구투여군(DM 100), 접종한 황칠 발효 추출물 200 mg/kg/day 경구투여군 (DMP), 양성대조군은 민들레등 복합추출물 투여군 (PC)으로 총 5군으로 나누어 실시하였으며, 4주간 경구투여 하였다.

(2) 체중, 장기무게 및 생식기관

실험 종료 후 몸무게를 측정하고 고환, 부고환, 전립선, 간, 비장 및 신장을 적출하여 무게를 측정하였다.

→실험 시작 전과 황칠 단일 추출물을 4주간 경구투여 후의 체중변화량을 측정한 결과 각 군간의 유의적 변화는 없었다 (Figure. 3). 장기무게 및 생식기관의 무게도 황칠 단일 추출물과 대조군 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Table. 2).

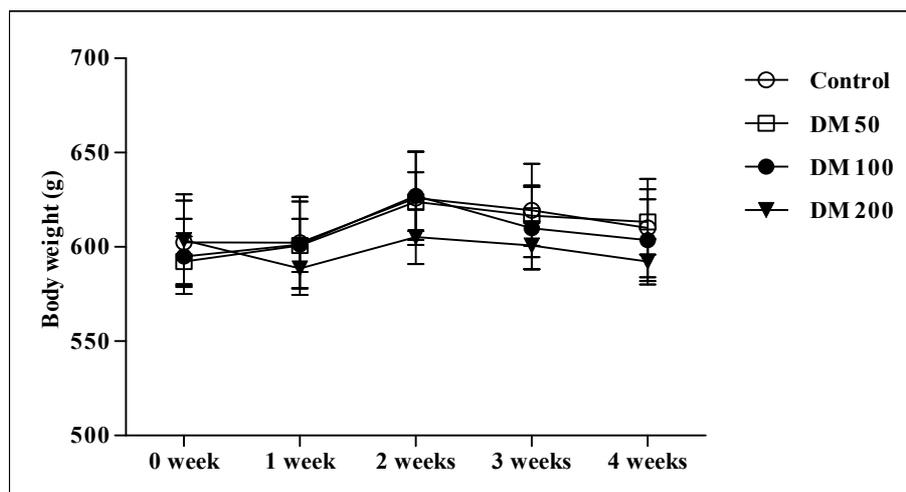


Figure 3. Effect of DM on body weight in aging male rats. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. PC; mixture of dandelion and rooibos administered groups. The values are expressed as the mean \pm SE.

Table 2. Organ weights in aging male rats

Groups	Testes(g)	Epididymis(g)	Seminal vesicle(g)	prostate(g)	Liver(g)	Kidney(g)	Spleen(g)
Control	4.34±0.17	0.76±0.01	1.96±0.19	1.27±0.08	18.29±0.63	3.86±0.23	1.04±0.07
DM 50	4.32±0.14	0.73±0.04	1.98±0.10	1.23±0.08	19.18±0.75	3.96±0.16	1.09±0.06
DM 100	4.44±0.05	0.77±0.02	2.07±0.25	1.11±0.05	18.37±1.85	3.82±0.19	0.98±0.02
DM 200	4.37±0.20	0.73±0.03	1.92±0.22	1.25±0.14	18.17±0.58	3.79±0.12	1.01±0.08

Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean ± SE.

(3) 로타로드 테스트

회전가능한 원통형의 로타로드 (rotarod)를 이용하여 운동을 적용하였다. 경구투여 마지막 날에 로타로드 운동을 20 rpm의 회전속도로 원통위에 강제로 걸게하여 적응훈련을 시켰다. 24시간 후, 동일한 조건의 회전하는 원통위에 랫을 올려 균형을 잃고 떨어지는 시간을 측정하였다.

→ 운동수행능력의 향상이 있는지를 평가하기 위하여 로타로드 테스트를 시행하였다. 매주 측정된 결과 대조군과 비교했을 때 DM 투여군이 유의하게 증가한 것을 확인하였다.

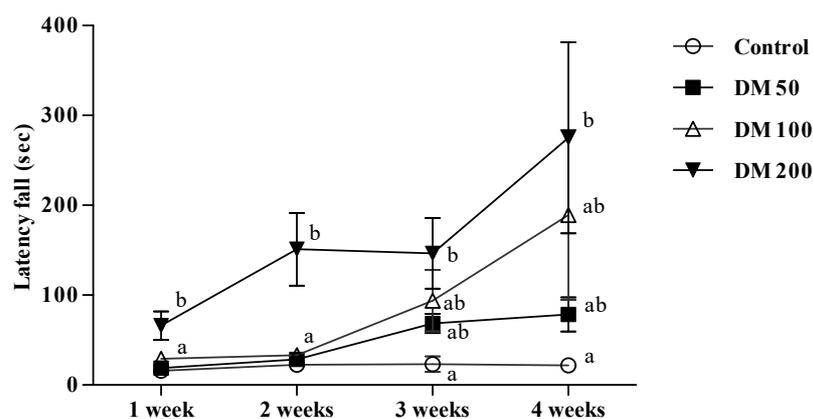


Figure 4. Effects of DM on Rotarod test in aging male rats. The rats were tested twice on the rotating rod at an accelerating speed of 20 rpm until they fell off. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean ± SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

(4) 트레드밀 테스트

운동장치는 탄소고무 재질의 회전롤을 회전시켰으며 회전롤의 각도는 지상과 20도의 각도로 기울게 하였다. 실험식이를 섭취하는 동안 트레드밀 (Treadmill)을 이용하여 강제 지구력 운동부하 훈련을 실시하였다. 운동훈련을 실시하기 위해 매주 1회 10분간 적응훈련을 실시하였다. 지구력운동 수행능력을 평가하기 위해 6m/min에서 3분간 운동을 시간하게 한 후, 매 3분마다 3m/min의 속도로 운동강도를 증가시켜 나가면서 탈진 시까지의 운동 지속시간을 측정하였다. 탈진상태는 랫이 10초 이상 달릴수 없는 시점으로 판정하였다.

→ 황칠 단일 추출물을 4주간 투여 한 후 탈진할때까지의 운동 지속시간을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 DM 군에서 유의성 있게 증가한 것을 확인하였다.

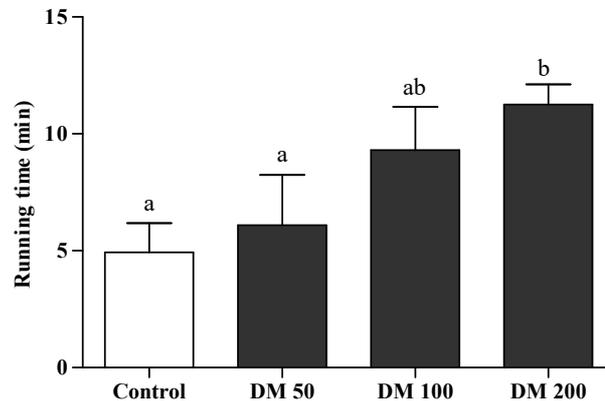


Figure 5. Effects of DM on Rotarod test in aging male rats. The rats were tested twice on the rotating rod at an accelerating speed of 20 rpm until they fell off. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

(5) 바이오 마커 분석

마지막 경구 투여 후 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 후, 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 분리된 혈청을 대상으로 Testosterone ELISA kit, LH ELISA kit (ENZO Life Sciences, U.S.A), SHBG ELISA kit (Cloud-Clone Corp, Wuhan, Hubei), DEHAs, FSH, GnRH, inhibin (FineTest., Wuhan, Hubei), PSA ELISA kit (CUSABIO, USA)를 이용하여 바이오마커를 측정하였다.

→ 노령 수컷 랫에서 Testosterone 분비량을 측정한 결과 경구 투여 전에는 모든 군에서 비슷한 수준을 나타냈다. 황칠 추출물을 4주간 경구투여한 결과 Testosterone 함량이 유의성 있게 증가한 것을 확인하였다. 양성대조군에서도 유의성있게 증가한 것을 확인하

였다 (Figure. 5).

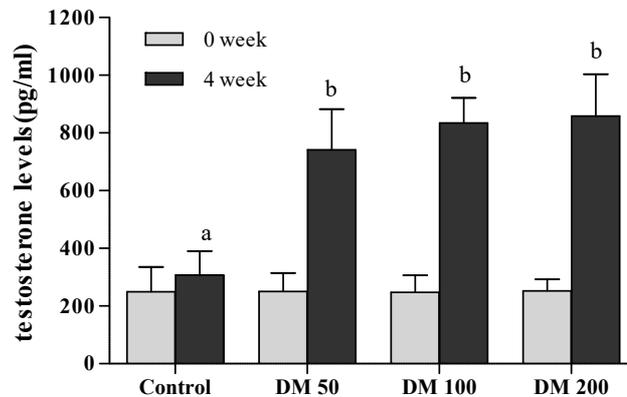


Figure 5. Effect of DM on testosterone levels in aging male rats. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. PC; mixture of dandelion and rooibos administered groups. The values are expressed as the mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

→ 성호르몬 결합 글로블린이 SHBG를 측정 한 결과 대조군에 비해 DM군에서 유의성 있게 감소한 것을 확인하였다. DM 투여로 SHBG가 감소하여 이는 활성화된 testosterone의 수준을 증가시킬수 있음을 알수 있다 (Figure. 6).

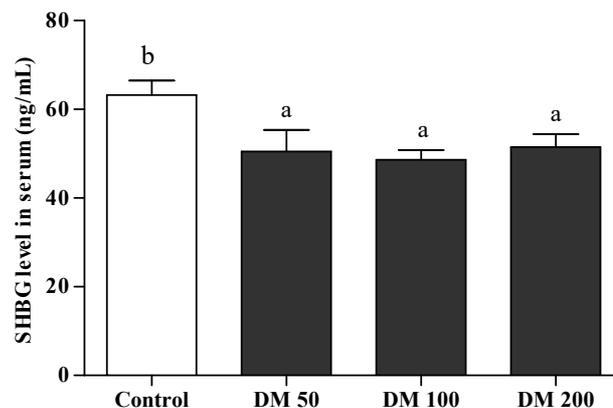


Figure 6. Effect of DM on SHBG levels in aging male rats. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

→ DHEAs를 측정 한 결과 대조군에 비해 DM 200군에서 유의성 있게 증가한 것을 확인

하였다 (Figure. 7).

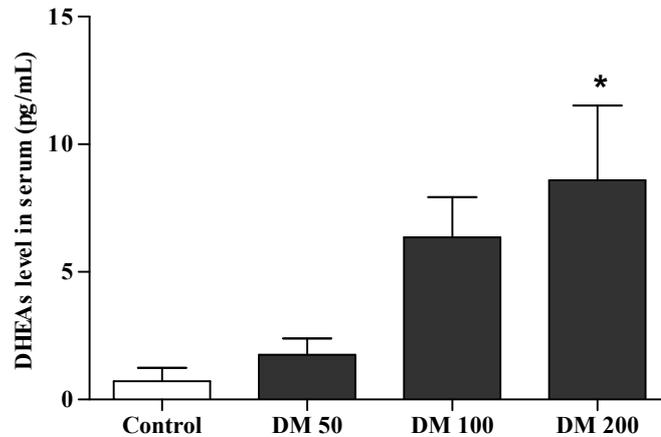
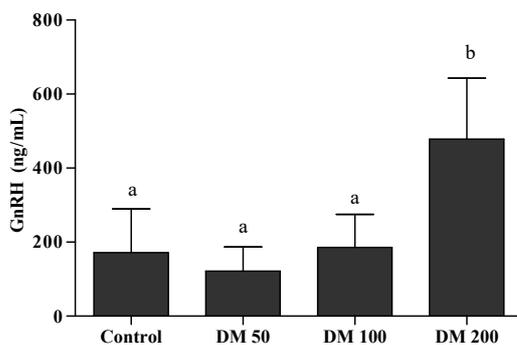


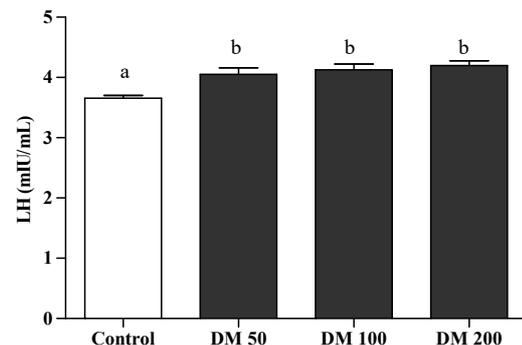
Figure 7. Effect of DM on DHEAs levels in aging male rats. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

→ 인체에서 남성호르몬의 분비 조절은 시상하부-뇌하수체-고환 축의 메커니즘을 통하여 자동적으로 조절됨. 시상하부에서는 성선자극호르몬분비호르몬인 GnRH를 분비하여 뇌하수체를 자극하고 뇌하수체는 GnRH에 의해 LH 분비를 증가하게 하고 이 증가된 LH는 고환의 Leydig cell을 자극하여 테스토스테론 합성을 촉진시킨다. 신경계 관련 호르몬 측정 결과, GnRH가 DM 200군에서 유의성있게 증가하였고 GnRH 증가에 의해 LH 및 FSH도 증가한 것을 확인하였다 (Figure. 8).

a)



b)



c)

d)

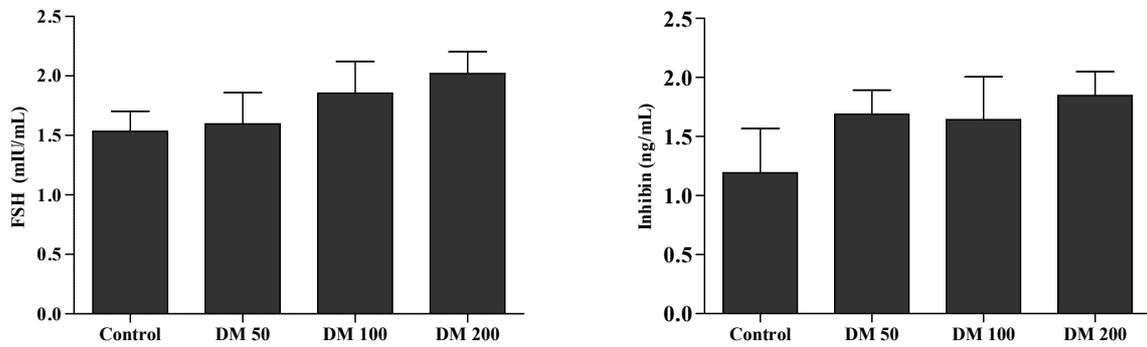


Figure 8. Effect of DM on neuronal hormones in aging male rats. (A) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) levels, (B) Luteinizing hormone (LH) levels, (C) Follicle-stimulating hormone (FSH) levels. (D) Inhibin levels. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < 0.05$).

→ PSA는 전립선암의 선별에 유용한 종양표지자로 전립선염, 전립선비대증에서도 증가할 수 있다. 일부 연구에서는 Testosterone 보충요법이 전립선암 발생의 증가에 영향이 있는 것으로 보고하고 있으므로 PSA를 포함하는 추적조사가 필요하다. 따라서 본 실험에서 PSA를 측정된 결과 대조군과 DM 군간의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (Figure. 9).

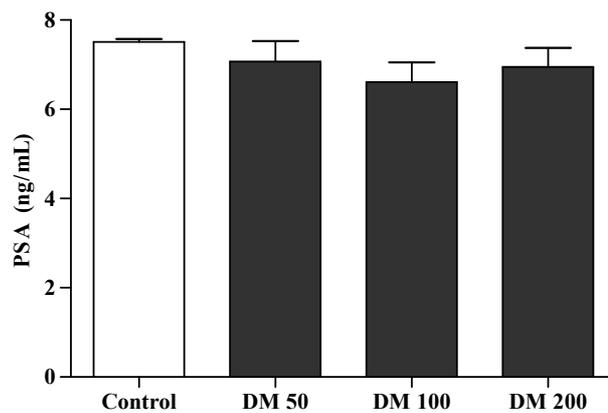


Figure 9. Effect of DM on PSA levels in aging male rats. Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. The values are expressed as the mean \pm SE.

(6) 지질 분석

혈청의 Total cholesterol (TC), triglycerid (TG), high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and glutamic pyruvic transaminase (GPT)를 자동 혈액 분석기(FUGIFILM DRI-CHEM 4000i, Minato-ku, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

$$\text{LDL cholesterol} = \text{TC} - (\text{HDL cholesterol} + \text{TG}/5)$$

Atherogenic Index (AI) was calculated as follows:

$$\text{AI} = (\text{TC} - \text{HDL cholesterol}) / \text{HDL cholesterol}$$

Cardiac risk factor (CRF) was calculated as follows:

$$\text{CRF} = \text{TC}/\text{HDL cholesterol}$$

→ 비만, 고혈압, 당뇨 등 대사증후군은 testosterone의 감소에서 동반 될 수 있다. 본 실험에서 DM 투여로 인한 혈중 지질의 감소효과를 보기 위해 측정한 결과 triglyceride와 LDL-cholesterol이 DM 200군에서 유의성있게 감소하였다 (Table 3.). 심혈관 지수와 동맥경화 지수인 CFR와 AI는 대조군 간의 유의적 변화는 나타나지 않았다. 간독성 평가 결과 4주간의 DM 투여가 간독성을 나타내지 않았다.

Table 3. Effect of DM on lipid profile and safety markers in aging male rats

Groups	Control	DM 50	DM 100	DM 200
Total cholesterol (mg/dL)	124.75±14.00 ^a	106.25±6.05 ^a	105.00±8.17 ^a	99.6±6.51 ^a
Triglyceride (mg/dL)	159.20±27.2 ^b	132.40±17.45 ^b	117.00±11.58 ^{ab}	92.20±13.54 ^a
HDL-cholesterol (mg/dL)	55.25±5.42 ^a	61.50±3.33 ^a	62.40±2.08 ^a	65.24±3.71 ^a
LDL-cholesterol (mg/dL)	25.18±2.66 ^b	20.63±2.25 ^{ab}	19.10±1.65 ^{ab}	16.75±1.25 ^a
CRF	0.83±0.05 ^a	0.73±0.13 ^a	0.72±0.11 ^a	0.74±0.09 ^a
AI	1.83±0.05 ^a	1.73±0.12 ^a	1.72±0.11 ^a	1.74±0.09 ^a
GOT	66.20±2.75 ^a	60.60±3.11 ^a	60.40±4.06 ^a	60.00±3.83 ^a
GPT	25.40±1.86 ^a	24.80±1.85 ^a	23.40±1.44 ^a	23.20±0.58 ^a

Control; no administration of DM, DM 50; 50 mg/kg of DM administered group, DM 100; 100 mg/kg of DM administered group, DM 200; 200 mg/kg of DM administered group. CRF, cardiac risk factor; AI, atherogenic index; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase. The values are expressed as the mean ± SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests (P < 0.05).

다. 결론

본 연구에서는 황칠 단일추출물이 남성갱년기 증상의 완화에 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 노령 수컷쥐 모델에게 황칠 단일 추출물을 4주간 경구투여하였다. 그 결과 Serum testosterone과 Dehydroepiandrosterone (DHEA)와 같은 남성호르몬 바이오마커 수치가 유의적으로 증가하였다. 또한 testosterone과 결합하여 기능을 저하시키는 sex hormone binding globulin (SHBG) 의 농도가 유의적으로 감소하였다. 게다가 시상하부-뇌하수체-고환축 활성화에 관여하는 신경계관련 호르몬인 gonadotropin-releasing hormone (GnRH), Luteinizing hormone (LH) 그리고 Follicle Stimulating Hormone (FSH) 분비가 증가하였다. 황칠 잎 열수추출물 투여에 따른 간독성 지표인 GOT/GPT 수치에는 유의적 차이는 없었다. 남성호르몬 치료요법에 대한 안전성 지표인 전립선특이항원인 PSA 수치도 대조군과 차이는 나타나지 않았다. 혈중지질농도에 있어서도 황칠 투여군이 대조군에 비해 총콜레스테롤, 중성지방과 LDL 콜레스테롤은 감소하였고 고밀도 콜레스테롤은 증가하였다. 또한 운동수행능력을 평가하기위해 로타로드, 트레드밀을 측정한 결과 대조군에 비하여 운동수행능력이 향상되었다. 총 정자수를 측정한 결과 황칠 투여군이 유의적으로 증가하였고, 고환 조직 염색 결과 황칠 투여군에서 정세관 사이즈와 모양이 균일하고 정자형성세포가 규칙적으로 배열되는 경향을 나타냈다이를 활용하여 남성갱년기 개선에 도움을 줄 수 있는 고시형 원료로 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 황칠 단일 추출물이 교미행동에 미치는 영향

가. 서론

남성갱년기(테스토스테론 결핍 증후군)는 성기능 장애 (sexual dysfunction), 기분의 변화 (mood changes) 및 신체적 변화 (body changes) 증상을 나타낸다. 성기능 저하는 남성갱년기의 가장 대표적인 증상이다. 따라서 본 연구에서는 성기능을 평가하는 방법으로 황칠 단일 추출물의 교미행동 분석을 수행하였다.

나. 연구내용 및 결과

(1) 실험동물

실험동물은 Wistar rat 5주령 수컷, 5주령 암컷을 사용하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취시키면서 공급하였고, 동물실험실의 사육조건은 온도 23 ± 1 °C, 습도 $45\pm 5\%$, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절되었다. 1주일간 적응시킨 뒤 실험동물은 정상군(control), 황칠추출물 50mg/kg/day 경구투여군(DM 50), 100mg/kg/day 경구투여군(DM 100), 200mg/kg/day 경구투여군(DM 200), 총 5군으로 나누어 실시하였으며, 4주간 경구투여하였다.

(2) 교미행동 관찰

경구투여 28일째, 샘플 워시아웃 14일 후에 암컷과 수컷을 1대 1로 투명한 cage에 넣고 30분간 성행동을 비디오카메라로 관찰하였다. 암컷은 성교행동의 수동적 유발을 위해 실험 48시간 전에 estradiol, 실험 4시간 전에 progesterone을 피하주사하였다. 교미행동 측

정인자로 수교미행동 평가는 수컷이 암컷의 등위에 올라타는 행동의 개시까지의 시간 (mounting latency, ML), mounting 횟수 (mounting frequency, MF), 수컷이 암컷의 등위에 삽입까지의 시간 (intromission latency, IL), intromission 횟수 (intromission frequency, IF)와 최초 intromission에서 두 번째 intromission까지의 걸리는 시간 (post-ejaculatory interval, PEI)을 비디오 분석하였다. (Figure. 1).

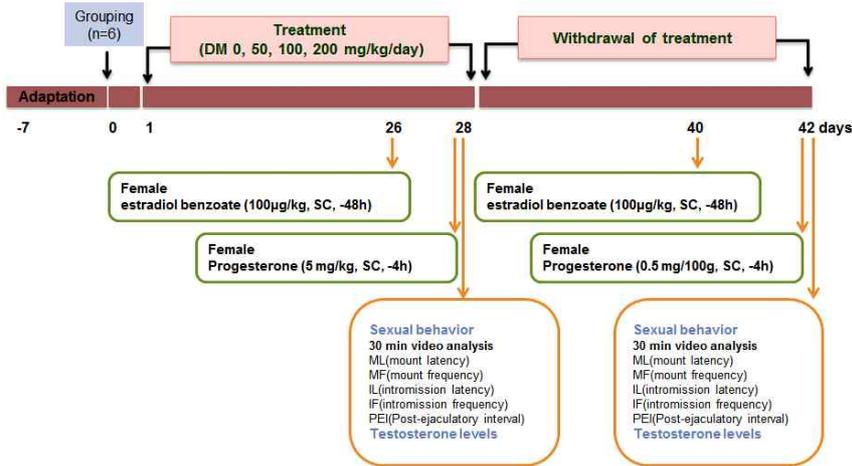


Figure 1. Schemic Experimental Design

→ 수컷 쥐가 암컷 쥐의 등위에 올라타기까지의 시간을 측정 한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 경구투여 28일째에 대조군에 비해 황칠 투여군에서 유의성있게 감소하였다.

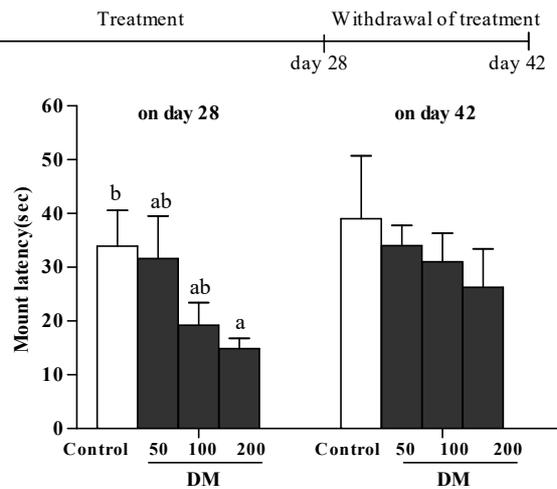


Figure 2. Effects of DM on Mount Latency in Male Rats. On day 28 (final day of sample treated period) and day 42 (2 weeks of sample withdrawal period after 28 days of sample feeding), sexual behavior was observed. The values are expressed as mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < .05$).

→ Fig. 3 에서와 같이 수컷쥐가 암컷쥐의 등 위에 올라타는 횟수를 측정 한 결과 경구투

여 28일째에 대조군에 비해 황칠 단일 추출물에서 유의성있게 증가하였다.

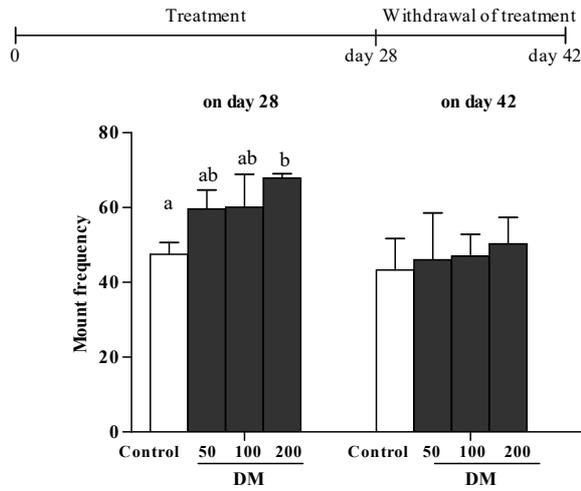


Figure 3. Effects of DM on Mount Frequency in Male Rats. On day 28 (final day of sample treated period) and day 42 (2 weeks of sample withdrawal period after 28 days of sample feeding), sexual behavior was observed. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < .05$).

→ 수컷 쥐가 암컷쥐에게 삽입하기까지의 시간을 측정한 결과 Fig. 4에서 보듯이 42일째에 대조군에 비해 황칠 단일 추출물 투여군에서 유의성있게 감소하였다.

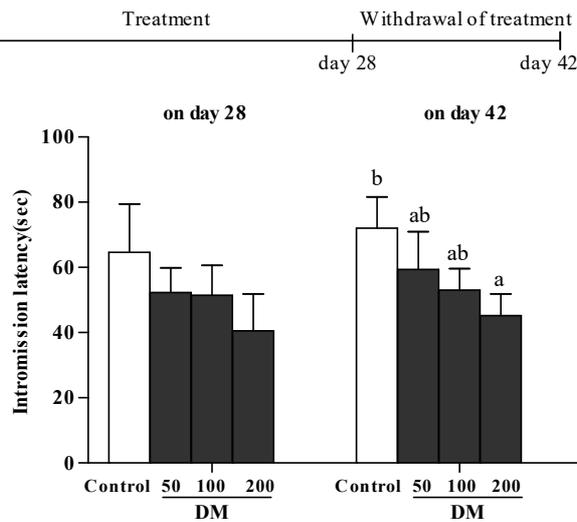


Figure 4. Effects of DM on Intromission Latency in Male Rats. On day 28 (final day of sample treated period) and day 42 (2 weeks of sample withdrawal period after 28 days of sample feeding), sexual behavior was observed. The values are expressed as mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < .05$).

→ 수컷 쥐가 암컷쥐에게 삽입하기까지의 횟수를 측정한 결과 대조군에 비해 황칠 단일 추출물 경구투여군에서 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 5)..

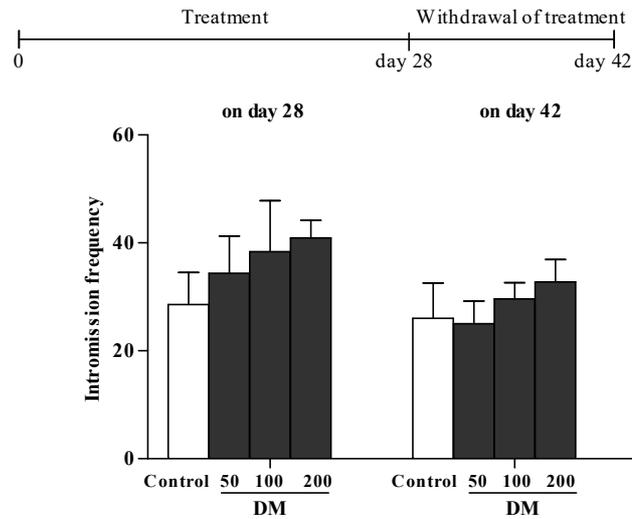


Figure 5. Effects of DM on Intromission Frequency in Male Rats. On day 28 (final day of sample treated period) and day 42 (2 weeks of sample withdrawal period after 28 days of sample feeding), sexual behavior was observed.

→ 첫 번째 intromission 후 두 번째 intromission 하기까지의 시간을 측정한 결과 28일째에 대조군에 비해 황칠 단일 추출물 투여군에서 유의성있게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6).

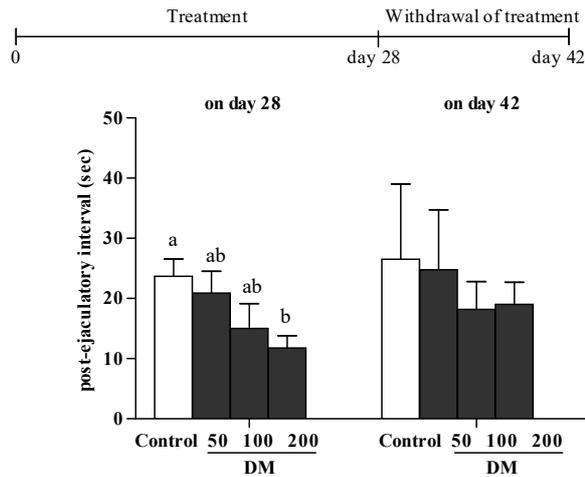


Figure 6. Effects of DM on Post-ejaculatory Interval in Male Rats. The values are expressed as mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < .05$).

(3) Testosterone 측정

28일째와 42일째에 꼬리채혈로 혈액을 채취한 후, 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 분리된 혈청을 대상으로 Testosterone ELISA kit, LH ELISA kit (ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 Testosterone 함량을 측정하였다.

→ 수컷 쥐에서 Testosterone 분비량을 측정한 결과 28일째에 대조군에 비해 황칠 단일 추출물 경구투여군에서 유의성있게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7).

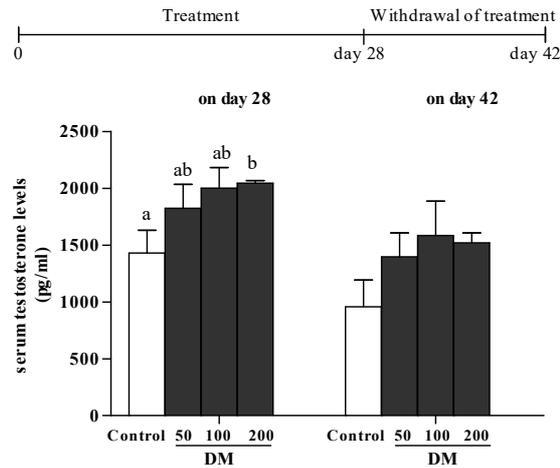


Figure 7. Effects of DM on Testosterone Levels in Male Rats. On day 28 (final day of sample treated period) and day 42 (2 weeks of sample withdrawal period after 28 days of sample feeding), sexual behavior was observed. The values are expressed as mean \pm SE. Different letters above bar are significantly different by Duncan's multi comparison tests ($P < .05$).

다. 결론

황칠 단일 추출물을 투여한 군에서 MF와 IF 횟수는 증가한 반면, ML, IL 및 PEI는 감소하는 경향을 보였다. 샘플 위시아웃 14일후에도 교미행동 분석을 수행한 결과 ML, IL 및 PEI는 감소하였다. 이러한 결과는 이상의 결과로 보아 황칠이 성기능 강화에 관여하는 것으로 사료된다.

* 황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험

계획서번호	JINR-MSC-DM
인체적용시험제출명	황칠나무추출물 플라세보

인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

황칠나무추출물의 남성갱년기 증상에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험

2015년 10월

CONFIDENTIAL

본 인체적용시험은 Good Clinical Practice(GCP)를 준수하여 수행되었습니다. 이 성적서는 기밀사항이며, 의뢰자의 승인 없이 다시 작성되거나 공개될 수 없습니다

13. 결론 및 고찰

본 연구는 갱년기 증상을 보이는 남성을 대상으로 12주간 황칠나무추출물 섭취 시 갱년기 증상 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보-대조 인체적용시험이다.

본 인체적용시험의 등록 목록 연구대상자 수는 총 80명으로, 총 103명의 자원이자 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 80명이 최종 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 참여하였다. 인체적용시험 진행 중 총 3명의 연구대상자가 인체적용시험 참여 동의절차로 중도탈락 하고, 총 77명(황칠나무추출물군 39명, 플라세보군 38명)의 연구대상자가 시험계획서에 명시된 바에 따라 정상적으로 시험을 수행 완료하였다.

유효성 평가를 위한 주분석군은 계획서승용연구대상자군(Per protocol Set), 즉 '인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자' 77명이며, 안전성 평가는 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자(Safety군) 80명을 대상으로 하였다. 시험자는 모든 대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, AMS (남성갱년기 증상 설문지), ADAM (남성갱년기증후군 자가진단표), 호르몬검사, 지질대사지표 검사, 신체계측지표, BEEF domain (국제발기능지수) 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다.

1차 유효성 평가 항목인 AMS의 변화에서 두 섭취군 간 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$), 황칠나무추출물 및 플라세보 두 섭취군의 AMS 점수가 제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 개선되었다($p=0.004, 0.007$). 2차 유효성 평가항목인 ADAM, 호르몬지표, 지질대사지표, 신체계측지표 및 BEEF-domain 점수 변화에서 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$), 호르몬 지표 중 total testosterone 및 bioavailable testosterone 값이 황칠나무추출물군에서 제품 섭취 12주 후 유의하게 개선되었다($p=0.041, 0.019$).

본 연구기간 동안 전체 연구대상자 80명 중 15명의 대상자(황칠나무추출물군 8명, 플라세보군 7명)에서 총 22건의 이상반응이 발생하였다. 두 섭취군 간 이상반응 발생에 차이가 없었으며,

9.4. 2차 유효성 평가 결과: 호르몬지표 검사

2차 유효성 평가지표인 호르몬지표 (Total testosterone, Free testosterone, Bioavailable testosterone, SHBG (Sex hormone binding globulin))를 섭취 전(스크리닝 방문), 섭취 12주 후(3차 방문)에 측정하였으며, 분석 결과를 Table 8에 요약하였다. 섭취 전 - 섭취 12주 후에 측정된 호르몬지표 변화를 비교한 결과 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었으나($p>0.05$), 황칠나무추출물군의 total testosterone 및 bioavailable testosterone 호르몬 지표가 섭취 후 유의하게 변화하였다($p=0.041, 0.019$).

Table 8. 섭취 전 - 섭취 12주 후 호르몬지표 변화

	황칠나무추출물군 (n=39)			플라세보군 (n=38)			p-value ²⁾
	0주	12주	p-value ¹⁾	0주	12주	p-value ¹⁾	
Total testosterone (ng/mL)	4.12± 1.37	4.82± 1.62	0.041	4.09± 1.27	4.50± 1.32	0.129	0.490
Free testosterone (ng/mL)	0.07± 0.10	0.07± 0.03	0.945	0.06± 0.02	0.07± 0.02	0.026	0.469
Bioavailable testosterone (ng/mL)	1.39± 0.58	1.70± 0.75	0.019	1.41± 0.58	1.64± 0.57	0.056	0.613
SHBG (nmol/L)	62.38± 23.70	59.15± 21.34	0.269	61.29± 23.34	55.45± 23.42	0.046	0.512

Values are presented as mean ± SD
SHBG, Sex hormone binding globulin
¹⁾ Analyzed by Paired t-test
²⁾ Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

Table 21. 연행별 섭취 전 - 섭취 12주 후 호르몬지표 변화, 50대

	황칠나무추출물군(n=13)			플라세보군(n=13)			p-value ²⁾
	0주	12주	p-value ¹⁾	0주	12주	p-value ¹⁾	
Total testosterone (ng/mL)	4.47± 1.77	4.89± 1.84	0.540	4.02± 1.54	4.25± 1.26	0.603	0.815
Free testosterone (ng/mL)	0.12± 0.16	0.09± 0.04	0.521	0.07± 0.03	0.08± 0.03	0.178	0.355
Bioavailable testosterone (ng/mL)	1.73± 0.68	2.02± 0.90	0.363	1.68± 0.66	1.94± 0.63	0.268	0.953
SHBG (nmol/L)	50.08± 23.10	46.31± 17.59	0.404	45.31± 18.54	37.46± 15.87	0.084	0.505

Table 22. 연행별 섭취 전 - 섭취 12주 후 호르몬지표 변화, 60대

	황칠나무추출물군(n=21)			플라세보군(n=23)			p-value ²⁾
	0주	12주	p-value ¹⁾	0주	12주	p-value ¹⁾	
Total testosterone (ng/mL)	4.04± 1.23	4.70± 1.65	0.154	4.15± 1.19	4.62± 1.41	0.207	0.738
Free testosterone (ng/mL)	0.05± 0.02	0.06± 0.02	0.048	0.05± 0.02	0.06± 0.02	0.134	0.741
Bioavailable testosterone (ng/mL)	1.21± 0.48	1.47± 0.58	0.053	1.29± 0.52	1.47± 0.47	0.194	0.661
SHBG (nmol/L)	71.05± 20.65	66.24± 19.23	0.308	69.74± 21.81	65.43± 22.11	0.284	0.933

Table 23. 연행별 섭취 전 - 섭취 12주 후 호르몬지표 변화, 70대

	황칠나무추출물군(n=5)			플라세보군(n=2)			p-value ²⁾
	0주	12주	p-value ¹⁾	0주	12주	p-value ¹⁾	
Total testosterone (ng/mL)	3.56± 0.37	5.17± 0.91	0.042	3.92± 0.12	4.76± 0.96	0.391	0.465
Free testosterone (ng/mL)	0.05± 0.01	0.08± 0.03	0.105	0.05± 0.01	0.07± 0.02	0.507	0.820
Bioavailable testosterone (ng/mL)	1.27± 0.33	1.83± 0.73	0.115	1.18± 0.22	1.61± 0.49	0.547	0.829
SHBG (nmol/L)	58.00± 26.32	62.80± 27.11	0.040	68.00± 22.63	57.50± 2.12	0.656	0.173

Values are presented as mean ± SD
¹⁾ Analyzed by Paired t-test
²⁾ Analyzed by Linear effect model for repeated measure data

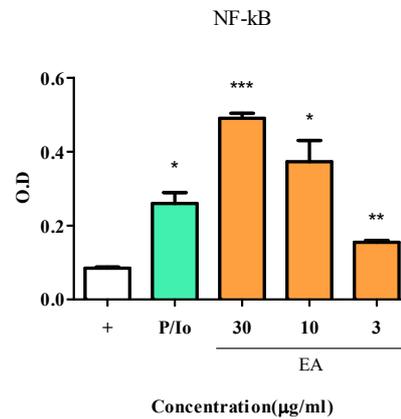
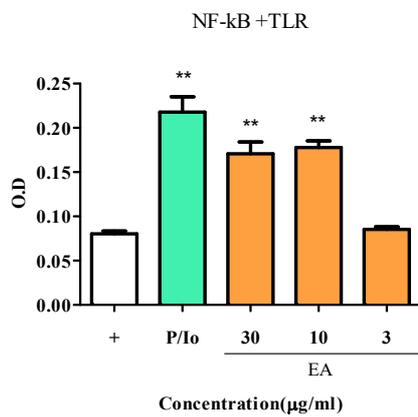
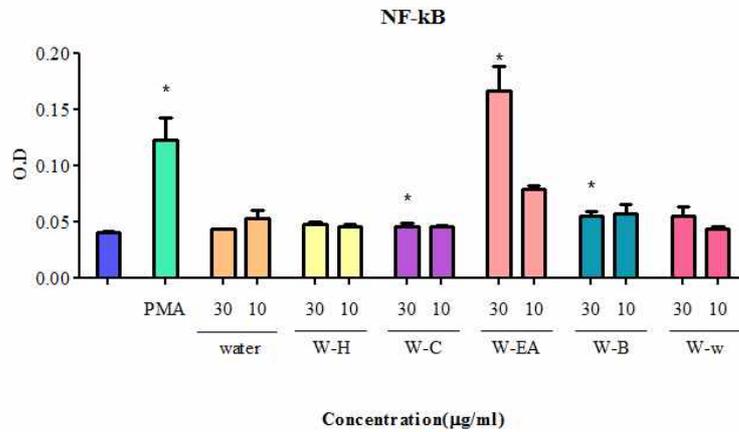
황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 효능연구를 위한 면역강화 기능성 연구

가. 1차년도

황칠나무와 발효물의 추출 시료들의 효능 비교 평가를 통하여 최대 활성 추출물 및 분획물을 결정하는 항산화, 항암, 항염증, 선천면역, 후천면역 관련 실험을 진행하여 황칠 물 추출물과 황칠 분획물 에칠아세테이트층(W-EA)이 면역 강화 효능이 상당히 좋다는 것을 확인하였고 이 두 가지 물질을 선택하여 면역강화 기능성 연구를 진행하였다.

2. 황칠나무와 발효물의 *in vitro* 선천성 면역 강화 효능 평가

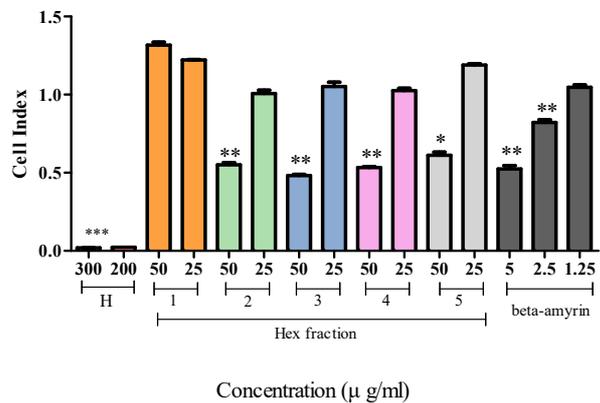
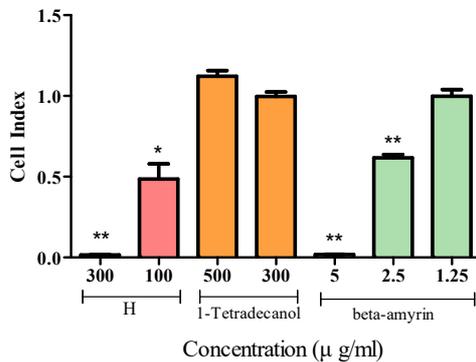
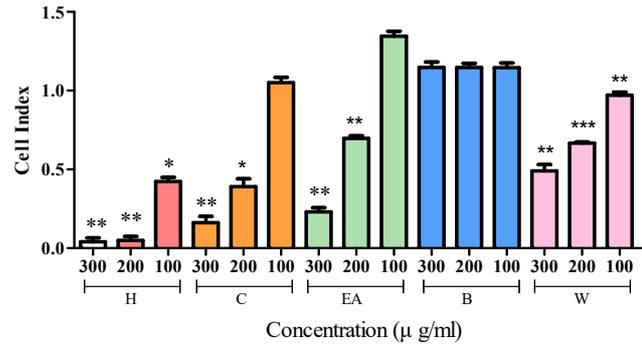
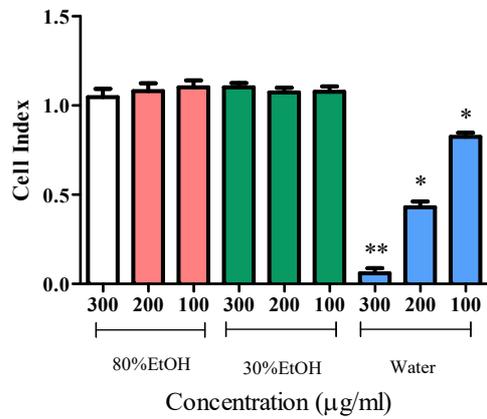
(1) Effect of *Dendropanax morbifera* on innate immunity (293Tcells)



293 T cell을 96-well palte에 1×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 NF-kB-luc, TLR vector를 0.5ug/well로 transfection한 후 24시간 동안 배양하고, 다음날 황칠 에칠아세테이트 분획물 (W-EA)를 30, 10, 3 μ g/ml를 처리하고 4시간 뒤에 PMA/lo을 처리하고 24시간 배양 하였다. 24시간 후에 cell lysis 후, lysis와 luciferase 기질을 반응시켜 luminometer를 통하여 측정하였다.

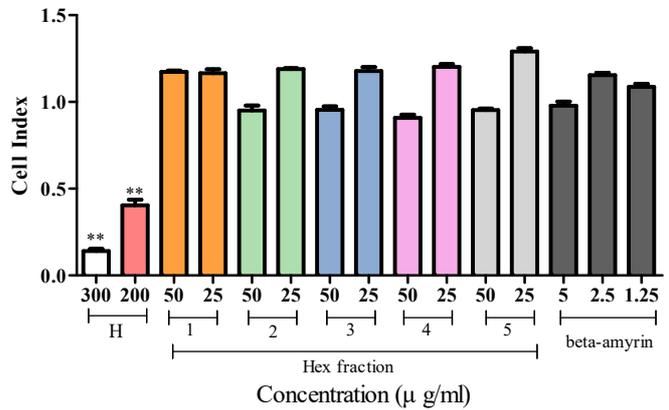
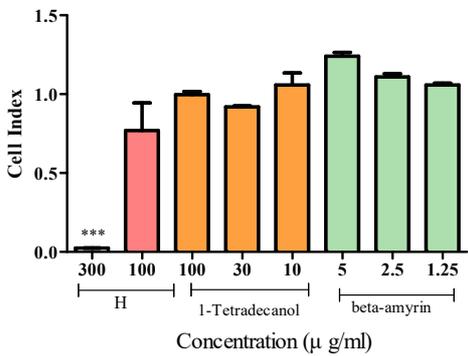
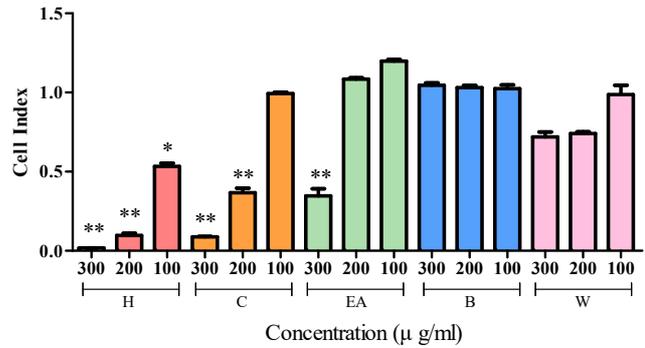
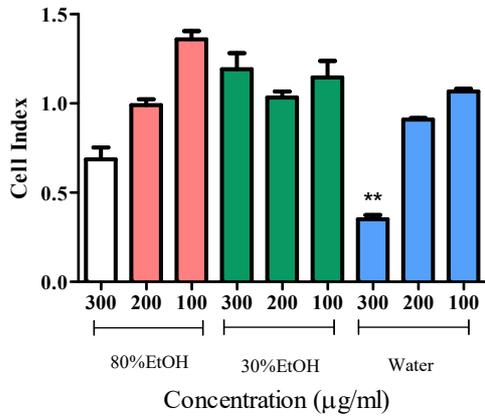
그 결과 물추출물과 5가지 분획물을 비교하였을 때, 황칠 에칠아세테이트 분획물 (W-EA)가 가장 NF-kB를 증가 시켰다. 그러나 오히려 TLR+NF-kB에서는 억제하는 효과가 나타났으며 선천면역에는 큰 증강효과가 나타나지는 않았다.

(2) Anti-proliferative effect of *D. morbifera* on SNUC5 cells (대장암)



SNUC5 cell을 96-well palte에 2×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 황칠 80%, 30% EtOH 추출물, 물추출물, 황칠 분획물 (헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올), 1-tetradecanol, beta-amyrin을 농도별로 처리한 후 24시간 처리하였다. MTS시약을 처리 후 490nm흡광도에서 측정 하였다. 그 결과, 황칠 물 추출물의 항암효과가 가장 좋았으며 분획물 중에는 헥산층의 항암효과가 상당히 좋았다.

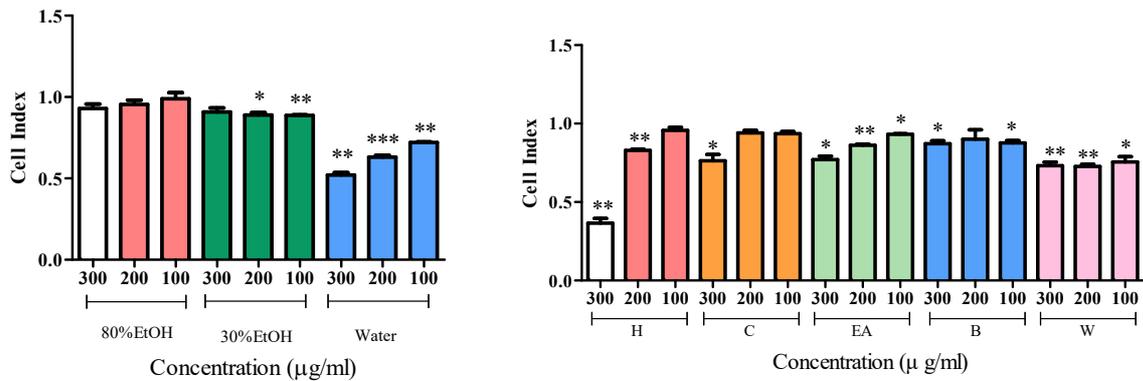
(2)-1 Anti-proliferative effect of *D. morbifera* on HCT116 cells (결장암)



HCT116 cell을 96-well palte에 2×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 황칠 80%, 30% EtOH 추출물, 물추출물, 황칠 분획물 (헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올), 1-tetradecanol, beta-amyrin을 농도별로 처리한 후 24시간 처리하였다. MTS시약을 처리 후 490nm 흡광도에서 측정하였다.

그 결과, 황칠 추출물에서는 큰 효과가 없었으며, 분획물 중에는 헥산층의 항암효과가 상당히 좋았다.

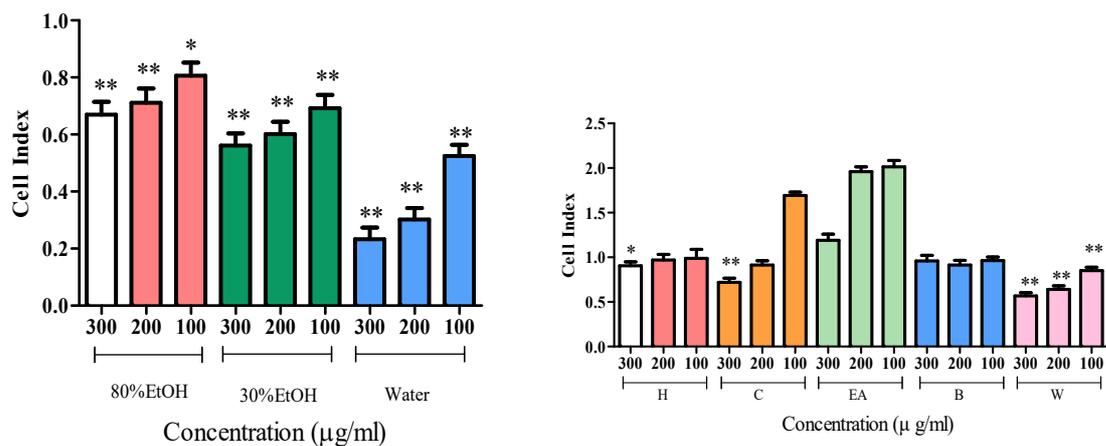
(2)-2 Anti-proliferative effect of *D. morbifera* on HepG2 cells (간암)



HepG2 cell을 96-well palte에 2×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 황칠 80%, 30% EtOH 추출물, 물추출물, 황칠 분획물 (헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올), 1-tetradecanol, beta-amyrin을 농도별로 처리한 후 24시간 처리하였다. MTS시약을 처리 후 490nm 흡광도에서 측정하였다.

그 결과, 황칠 물 추출물에서는 세포 성장을 억제하는 효과가 있었으며 분획물 중에는 헥산층의 항암효과가 상당히 좋았다.

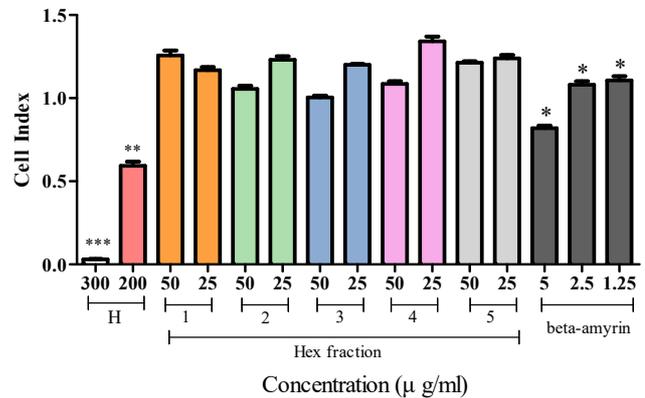
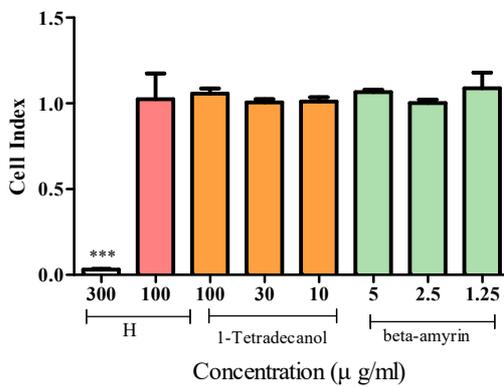
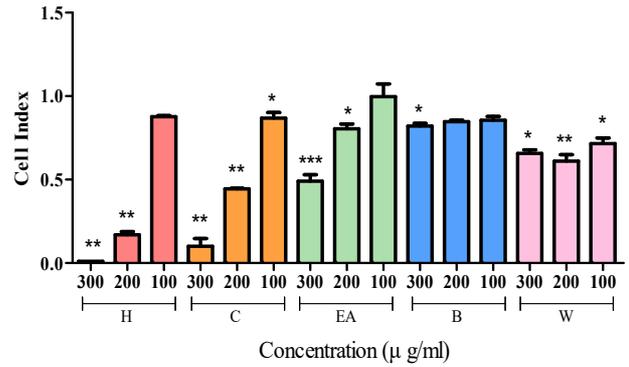
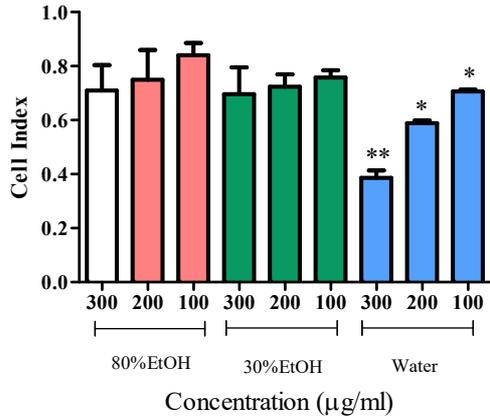
(2)-3 Anti-proliferative effect of *D. morbifera* on SKmel28 cell (피부암)



SKmel28 cell을 96-well palte에 2×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 황칠 80%, 30% EtOH 추출물, 물추출물, 황칠 분획물 (헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올)을 농도별로 처리한 후 24시간 처리하였다. MTS시약을 처리 후 490nm 흡광도에서 측정하였다.

그 결과, 황칠 물 추출물에서는 세포 성장을 억제하는 효과가 가장 좋았다.

(2)-4 Anti-proliferative effect of *D. morbifera* on SKBR3 cells (유방암)



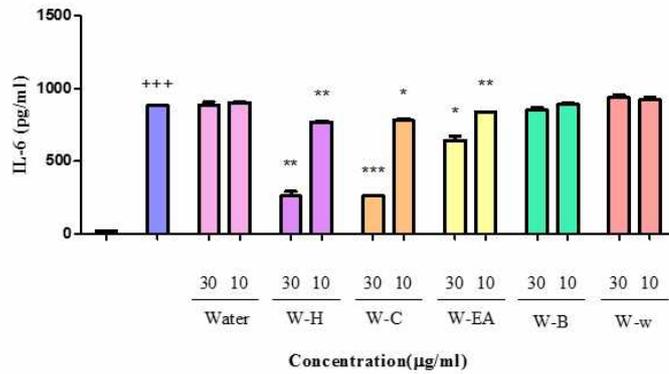
SKBR3 cell을 96-well palte에 2×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 황칠 80%, 30% EtOH 추출물, 물추출물, 황칠 분획물 (헥산, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올), 1-tetradecanol, beta-amyrin, 분획물 헥산층의 open column 샘플을 농도별로 처리한 후 24시간 처리하였다.

MTS시약을 처리 후 490nm 흡광도에서 측정 하였다.

그 결과, 황칠 물 추출물에서는 세포 성장을 억제하는 효과가 있었으며 분획물 중에는 헥산층의 항암효과가 상당히 좋았다.

황칠 추출물 중에서는 항암효과가 뛰어났으며, 분획물 중에서는 황칠 헥산 분획물 (W-Hex) 대장암, 결장암, 유방암 > 간암 > 피부암 순으로 항암효과가 가장 좋았다.

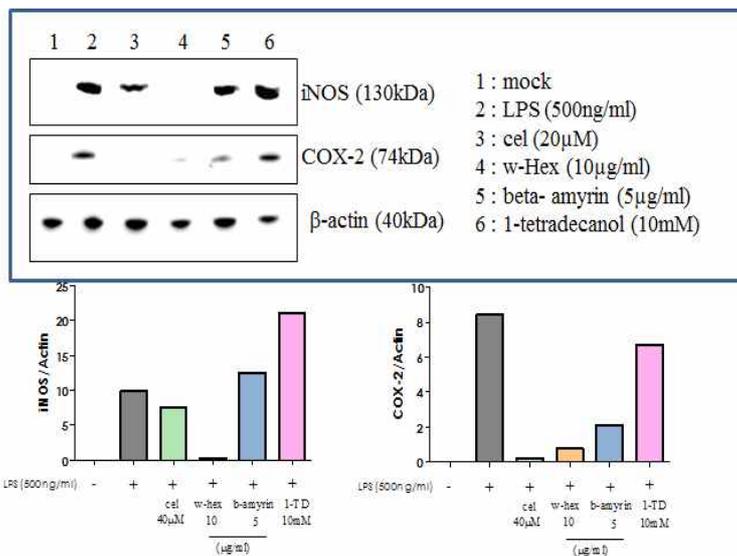
(3) Effect of *D. morbifera* on IL-6 production in RAW264.7 cells



RAW264.7 cell을 48 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 다음날 약물 전처리 2시간 후에 LPS로 자극을 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상등액을 회수하여 biolegend IL-6 ELISA를 사용하여 실험 후 450nm 흡광도에서 확인하였다.

그 결과, 황칠 물 추출물은 IL-6억제에 대한 큰 효과는 없었고 헥산층 분획물 (w-hex), 클로로포름층 분획물 (w-c)의 IL-6 억제효과가 매우 뛰어났다.

(4) Effect of *D. morbifera* on COX2 and iNOS in RAW264.7 cells

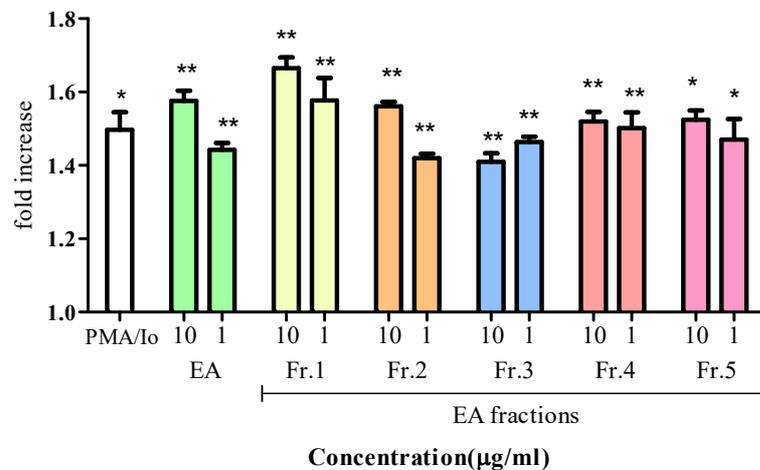
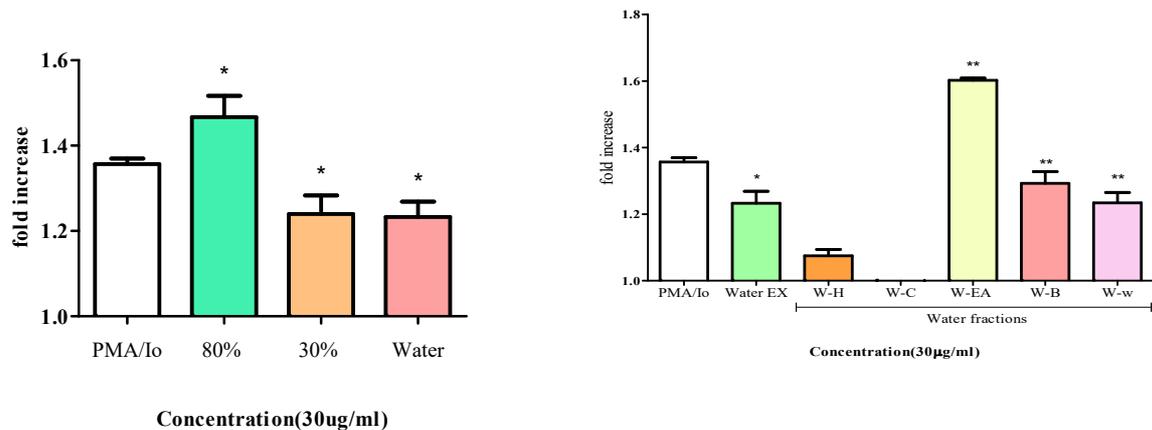


RAW264.7 cell을 6 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 다음날 약물 전처리 2시간 후에 LPS로 자극을 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. cell을 회수하여 lysis하고 동량의 단백질을 10% SDS에 전기영동하여 COX-2, iNOS를 확인하였다. 이때 control protein으로 b-actin을 처리하였고 positive control은 celecoxib를 사용하였다.

그 결과, 황칠 헥산층 분획물 (w-hex)의 COX-2, iNOS 억제효과가 매우 뛰어났다.

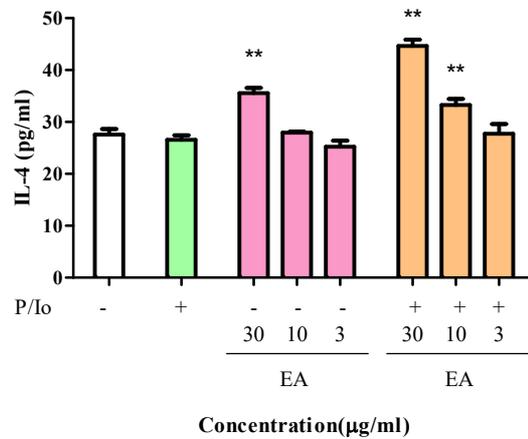
가.-2 황칠나무와 발효물의 *in vitro* 후천성 면역 강화 효능 평가

(1) Effect of *Dendropanax morbifera* on T cell growth (EL4 cells)



EL4 lymphocyte cells을 96 well plate에 7×10^3 cells/well로 분주한 후 황칠 추출물 및 분획물, open column sample을 농도별로 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 48h 배양한다. CCK-8을 처리한후 450nm 흡광도에서 측정한다. 그 결과 황칠 추출물 중에서는 80%추출물이 가장 좋았으며, 황칠 분획물 중에 w-EA층에 T cell growth에 가장 효과가 좋았고 w-EA층의 fraction 중에서는 fraction 1.이 가장 효과가 좋았다.

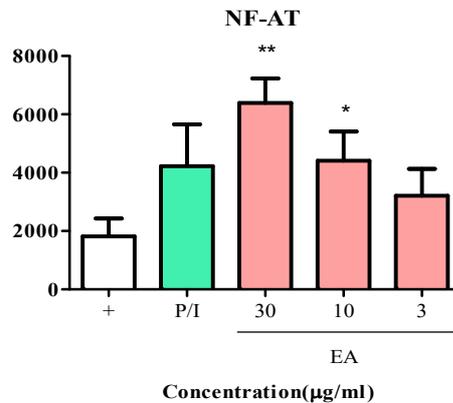
(2) Effect of *Dendropanax morbifera* on IL-4 production (EL4 cells)



EL4 lymphocyte cells을 48 well plate에 10^5 cells/well로 분주한 후 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 48h 배양하고, 그 후 상등액만 얻어서 R&D system IL-4 ELISA kit를 이용하여 cytokine을 450nm 흡광도에서 측정하였다.

- 황칠 분획물 중에서 EA층이 Tcell activation 시키는 IL-4 cytokine production을 증가시킨다.

(3) Effect of Dendropanax morbifera on T cell activation (EL4 cells)

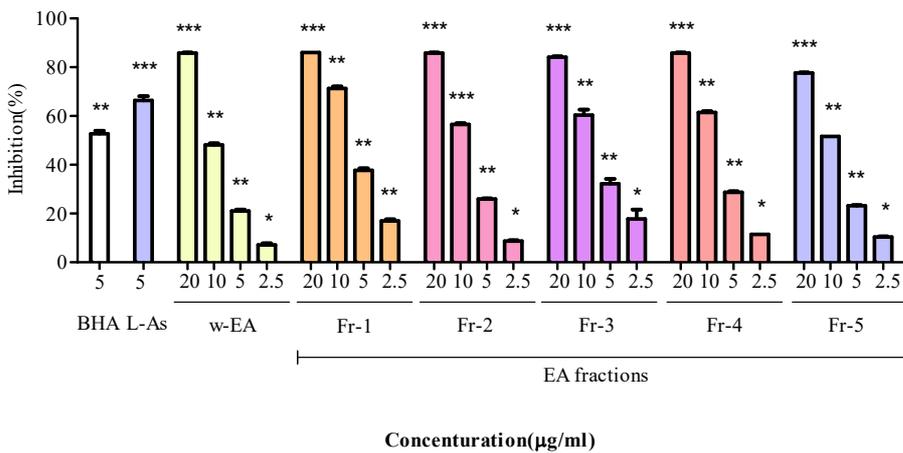
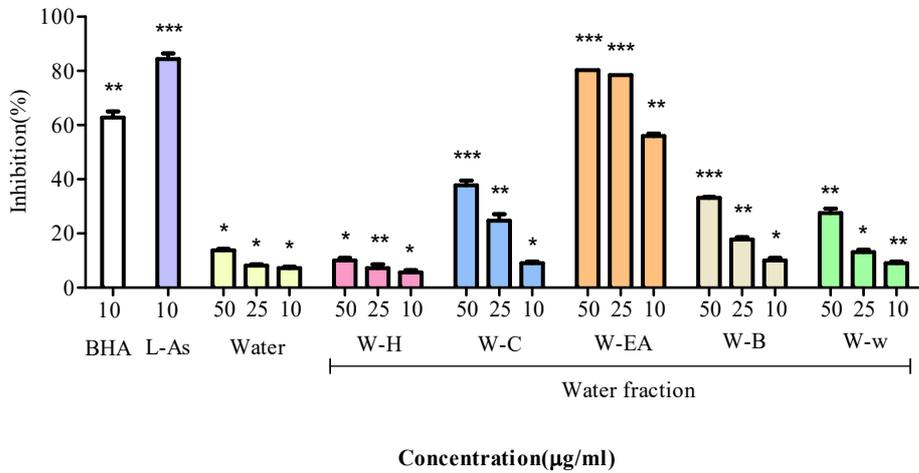
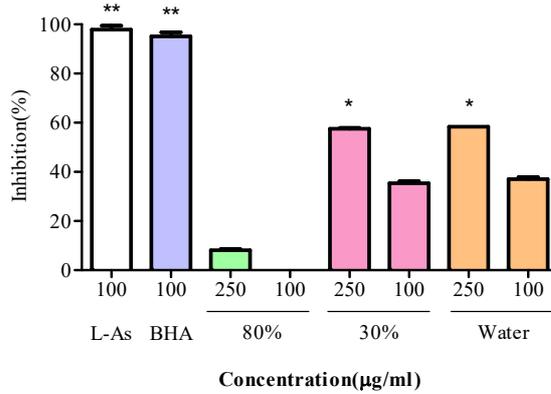


EL4 lymphocyte cells을 6 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주한 후 DNA (3-5 mg)를 36-48h transfection한 후, cell을 다시 회수하여 centrifuge하여 96well에 다시 분주하여 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 24h 배양한다. cell을 lysis 한 후, luciferase 기질과 반응시켜 luminometer로 측정하였다.

- 황칠 분획물 중에서 EA층이 NF-AT promoter 을 증가시킨다.

가.-3 황칠나무와 발효물의 항산화 기능성 평가

(1) Anti-oxidant Effect of *Dendropanax morbifera*



약물을 농도별로 DPPH 0.2mM과 1:1로 상온에서 30분간 반응 시킨 후, 흡광도 490nm에서 측정한다.

- 황칠 추출물에서는 30%, water 추출물이 가장 Anti-oxidant Effect 효과가 있다.
- water 분획물 중에서 W-EA층이 Anti-oxidant Effect 효과가 가장 좋다.
- EA층의 fraction 중에서 fraction-1이 Anti-oxidant Effect 효과가 가장 좋다.

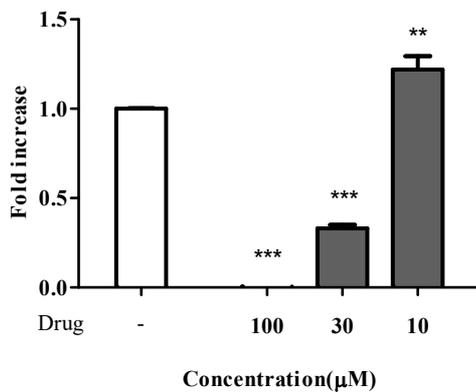
나. 2차 년도

1차 년도에서 골라낸 황칠 추출물과 황칠 분획물인 에칠아세테이트층 2가지 물질을 이용하여 황칠나무 잎 추출물의 남성갱년기 효능연구를 위한 면역강화 기능성연구를 진행하였다. 1차 년도에서 면역 증강 물질 스크리닝 중에 찾은 단일성분 1-tetradecanol을 이용하여 면역억제 연구도 진행하였으며 그 결과 1-tetradecanol은 T세포 면역반응을 억제함으로써 이식거부 반응 등 면역반응 저해제로 사용할 가능성이 보였다.

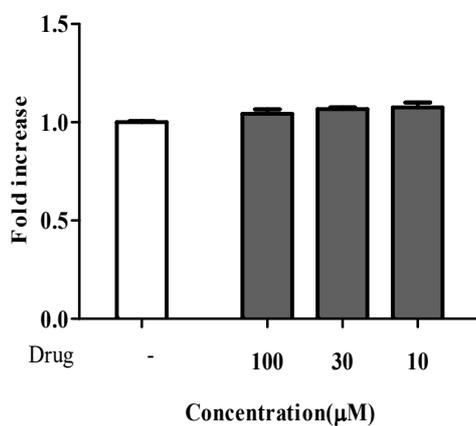
나.-1 황칠나무 단일성분의 *in vitro* 선천성, 후천성 면역 억제 효능 평가

(1) Effects of 1-tetradecanol on the proliferation of EL4 lymphocyte cells.

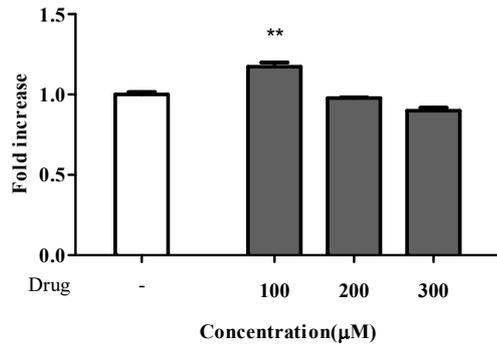
(A)



(B)



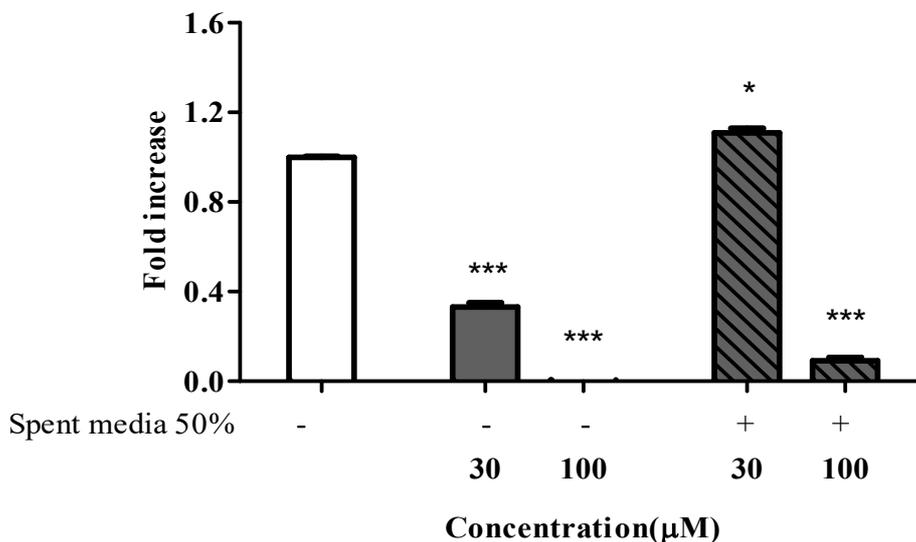
(C)



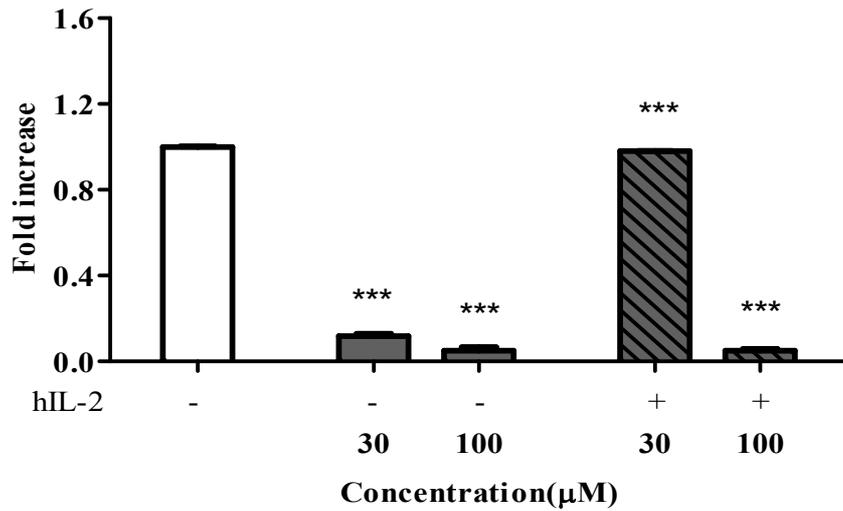
- (A) EL4 lymphocyte cells을 96 well plate에 10^4 cells/well로 분주한 후 약물 treat 후 2 일 배양 하고 CCK-8 assay하여 450nm에서 측정하였다.
- (B) BALB/c Female 8주령에서 spleen을 분리한 뒤, RBC buffer를 사용하여 red blood cells을 제거한 후 Murine spleen macrophages cell은 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 약물 treat 후 3일 배양 하고 MTT assay하여 630-490nm에서 측정하였다.
- (C) RAW264.7 cell은 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주한 후 약물 treat 후 1일 배양 하고 MTS처리 후, 490nm에서 측정하였다.
- 그 결과, 1-tetradecanol을 100, 30, $10 \mu\text{M}$ 처리하였을 때 , (A) EL4 lymphocyte cells growth를 억제하나, (B), (C) murine spleen macrophages cells, RAW264.7 macrophage cells 에서는 growth 억제 효과는 나타나지 않는다.

(2) Effects of 1-tetradecanol on the cell proliferation of EL4 lymphocyte cells.

(A)



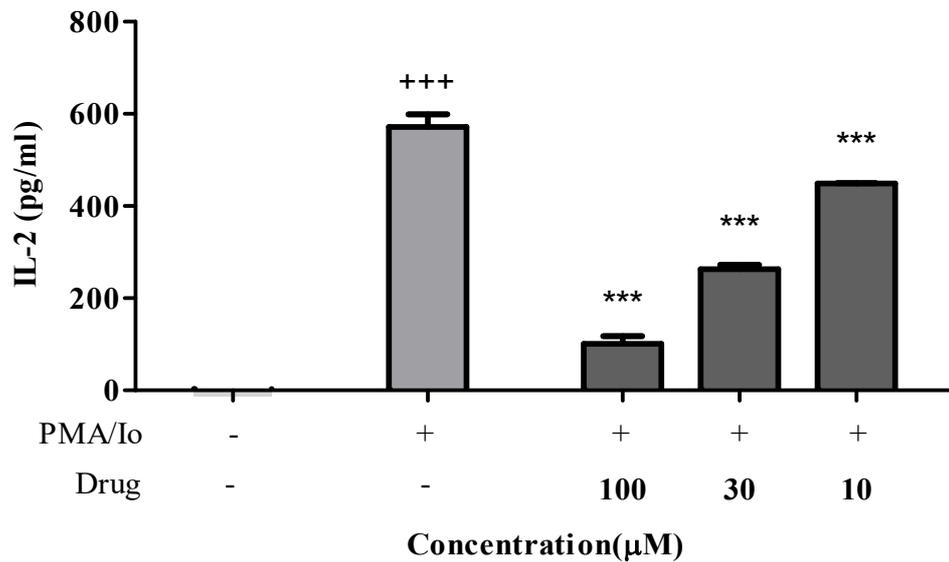
(B)



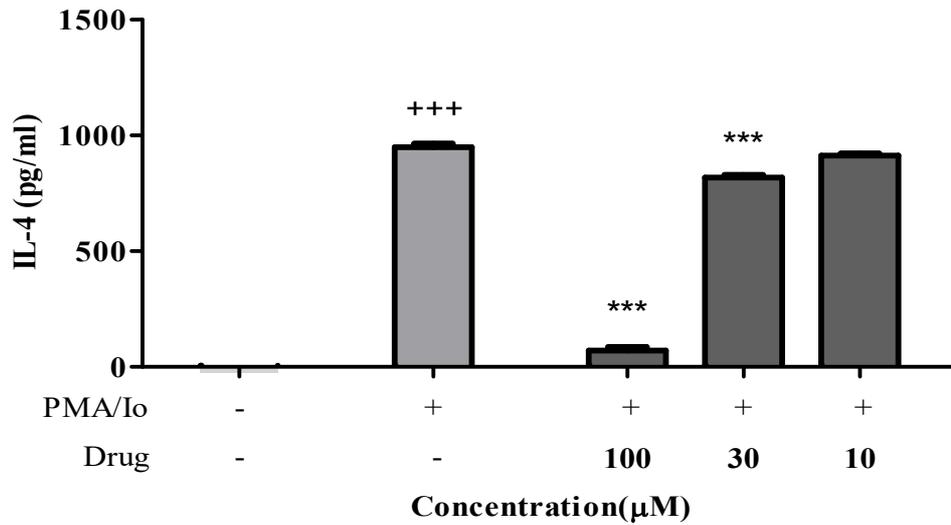
EL4 lymphocyte cells을 96 well plate에 10^4 cells/well로 분주하며 이때 media에 spentmedia 50% recombinant hIL-2를 같이 처리하고 약물 treat 후 2일 배양 하고 CCK-8 assay하여 450nm에서 측정하였다. Tetradecanol의 EL4 cell growth 억제효과는 spentmedia 50% 처리(A), recombinant hIL-2 (B) 후, 1-tetradecanol을 100, 30 μ M 처리하였을 때, EL4 lymphocyte cells growth를 회복시켰다.

(3) Effects of 1-tetradecanol on IL-2 and IL-4 cytokine production in PMA/Io induced EL4 lymphocyte cells

(A)



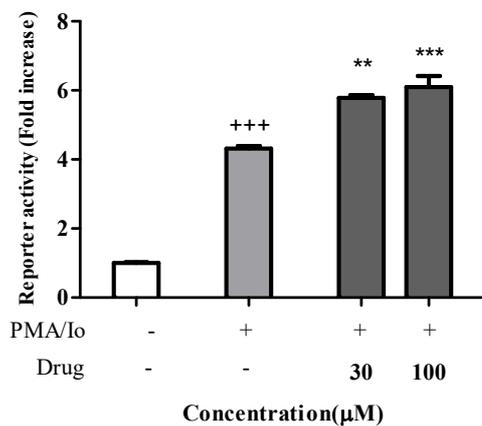
(B)



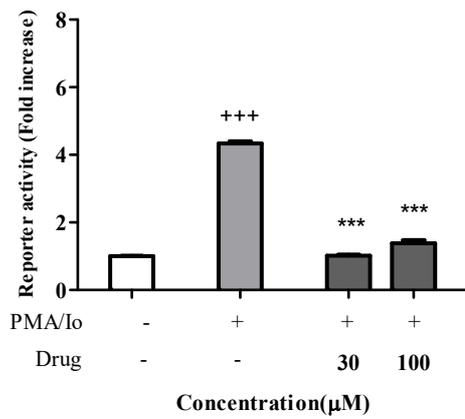
EL4 lymphocyte cells을 48 well plate에 10^5 cells/well로 분주한 후 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 48h 배양하고, 그 후 상등액만 얻어서 R&D system IL-2, IL-4 ELISA kit를 이용하여 cytokine을 450nm 흡광도에서 측정하였다. EL4 lymphocyte cells에 1-tetradecanol을 하였을 때, 10~100 μ M 농도에서 IL-2 cytokine 생성을 현저히 억제하였으며, IL-4 cytokine은 100 μ M 농도에서 억제하였다.

(4) Effects of 1-tetradecanol on promoter activity of NF- κ B, NF-AT and AP-1 in PMA/Io-induced EL4 lymphocyte cells.

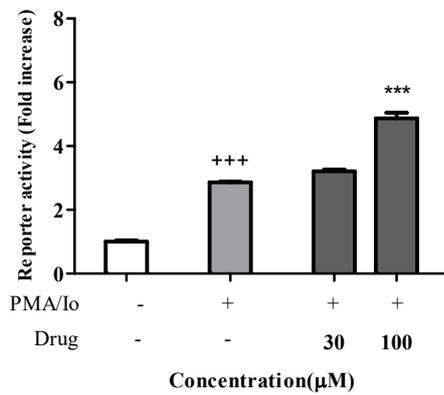
(A)



(B)



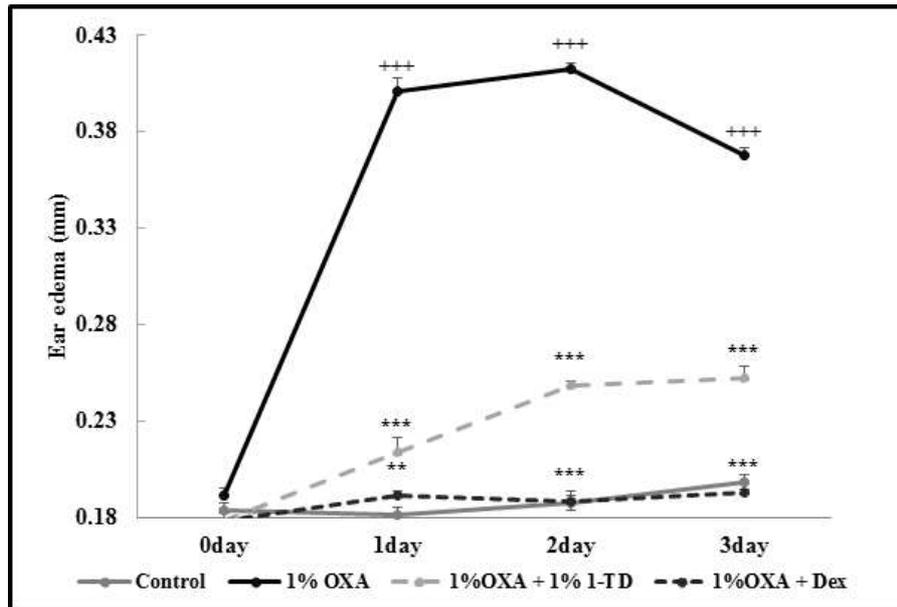
(C)



EL4 lymphocyte cells을 6 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주한 후 DNA (3-5 mg)를 36-48h transfection한 후, cell을 다시 회수하여 centrifuge하여 96well에 다시 분주하여 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 24h 배양한다. cell을 lysis 한후, luciferase 기질과 반응시켜 luminometer로 측정하였다. EL4 lymphocyte cells에 (A) NF-AT (B) NF-kB (C) AP-1 transfection 후 , 1-tetradecanol 약물효과를 확인하였더니, 1-tetradecanol이 NF-kB reporter를 억제하였다.

나.-2 *in vivo* 마우스를 이용한 면역증강 생체효과 평가

(1) Effects of 1-Tetradecanol on the change in ear thickness of mouse ear induced by repeated application of oxazolone



Female BALB/c 8주령 mice에서 복부에 2% Oxazolone을 도포하여 sensitization 한 후일 일 뒤에 양쪽 귀에 1% Oxazolone 1회 재 감각 후, 1% 1-tetradecanol을 매일 처리하여 귀두께의 변화를 측정하였다. ear edema 실험을 통하여 1-tetradecanol의 약물효과를 확인한 결과, 1% 1-tetradecanol이 귀 부종 억제효과가 나타났다.

dexamethasone은 control drug로 사용하였다.

나.-3 감염성 질환 예방 효능 평가

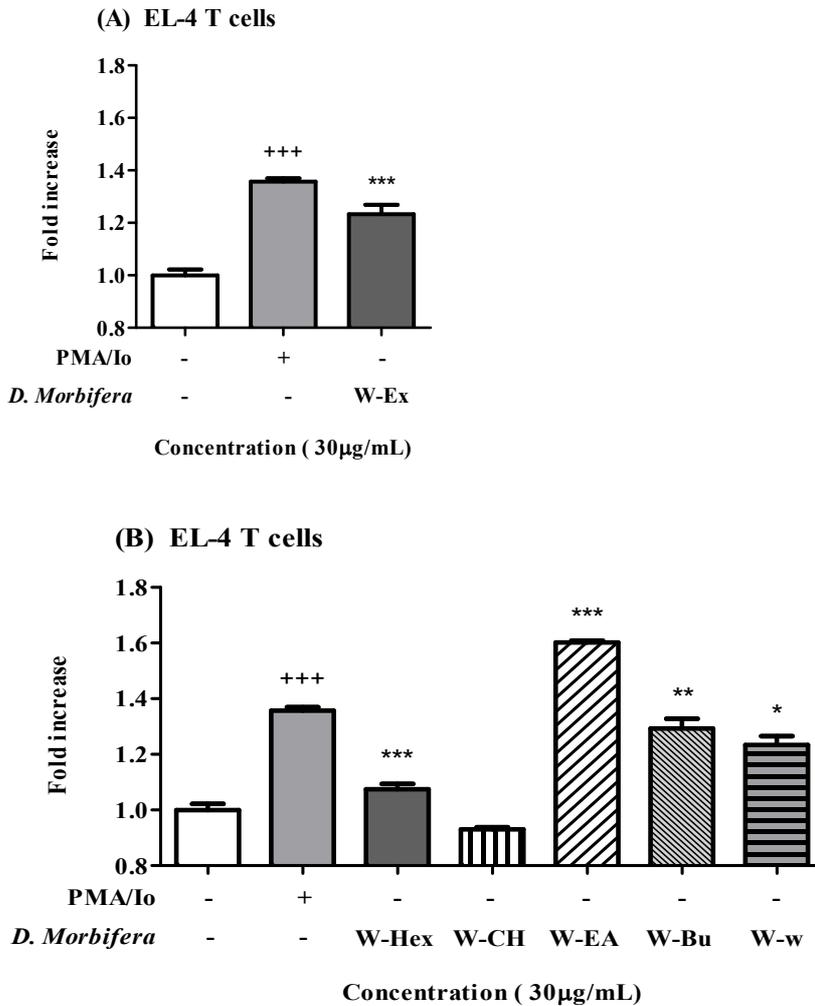
- 급성 패혈증 모델인 비브리오패혈증균의 마우스 치사율 억제효과 연구를 진행하였으며, 황칠 추출물은 억제효과를 나타내지 않았음.

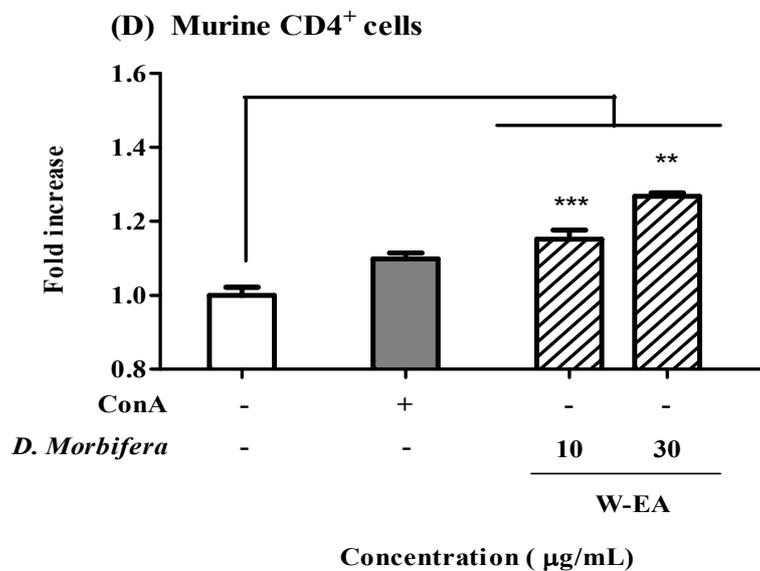
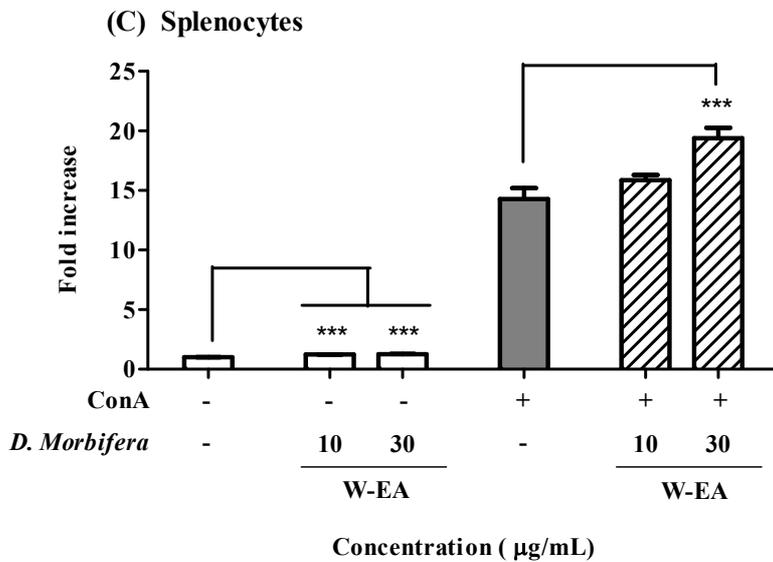
. 3차 년도

최종적으로 1-2차 년도에 면역 강화 효과가 있었던 황칠 분획물 에칠아세테이트층의 유효성분의 효능평가 및 기전분석 완료하였고 황칠 잎 물 추출물의 노화관련 면역증강 효능/기전 규명 검증하였다.

다.-1 황칠 추출물 및 단일성분들의 in vitro 면역 조절 효능 평가 및 기전 연구

(1) Effects of W-EA on EL-4 T cell proliferation

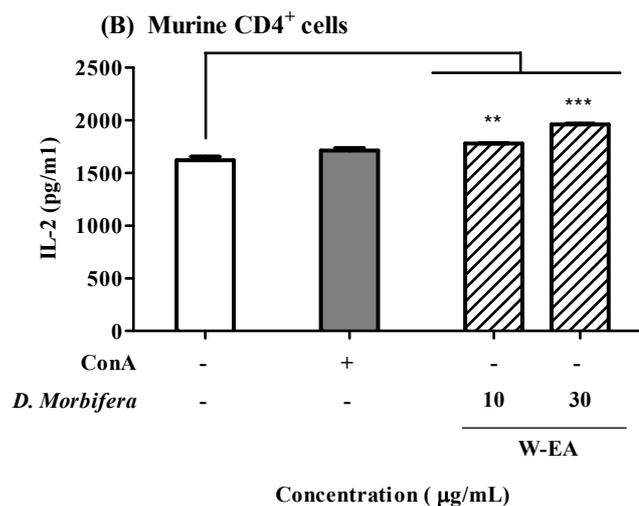
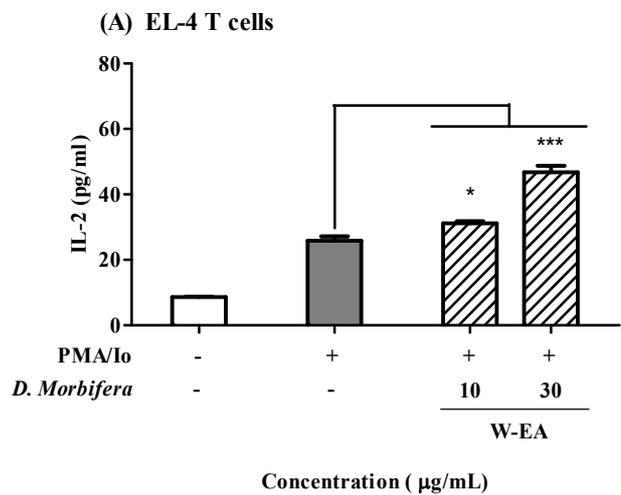


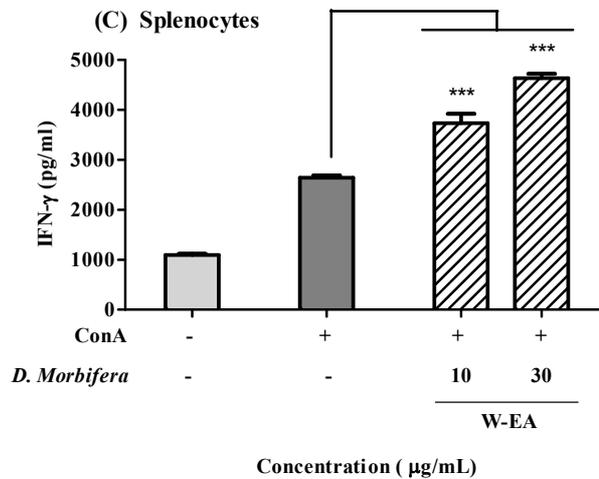


- EL4 lymphocyte cells을 96 well plate에 10^4 cells/well로 분주한 후 약물 treat 후 2일 배양 하고 CCK-8 assay하여 450nm에서 측정하였다.
- BALB/c Female 8주령에서 spleen을 분리한 뒤, RBC buffer를 사용하여 red blood cells을 제거한 후 Murine spleen macrophages cell은 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 ConA (T cell metogen, $1 \mu\text{g/ml}$)과 약물을 treat 후 2일 배양 하고 MTT assay하여 630-490nm에서 측정하였다.
- BALB/c Female 7주령 spleen과 lymph node를 모두 분리한 뒤, RBC buffer를 사용하여 red blood cells을 제거하였다. 그 다음에 micro bead를 이용하여 column에 세포를 통과시켜 positive CD4⁺ T cells을 분리하였다. CD4⁺ T cells 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 후 약물 treat 후 2일 배양 하고 MTS처리 후, 490nm에서 측정하였다.

황칠 잎 물 추출물을 30 μ g/ml 처리하였을 때, (A) EL4 lymphocyte cells growth를 증가시키는 것을 확인하였다. 그 추출물을 hexan, chloroform, acetylacetate, 부탄올로 분획하여 총5가지 물질의 EL4 lymphocyte cells growth를 확인한 결과, (B)황칠 분획물 W-EA (에칠아세테이트 층)을 30 μ g/ml 처리하였을 때 가장 T세포 증식 효과가 좋았다. 또한 마우스에서 분리한 (C), (D) murine spleen macrophages cells, CD4⁺ T cells에서 또한 크게 T세포를 증식시켰다.

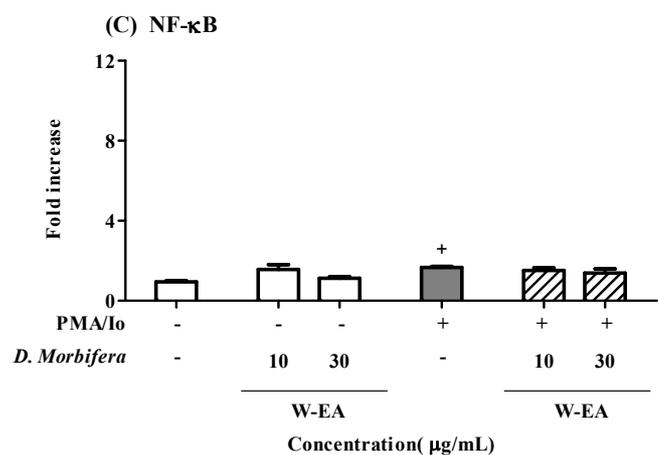
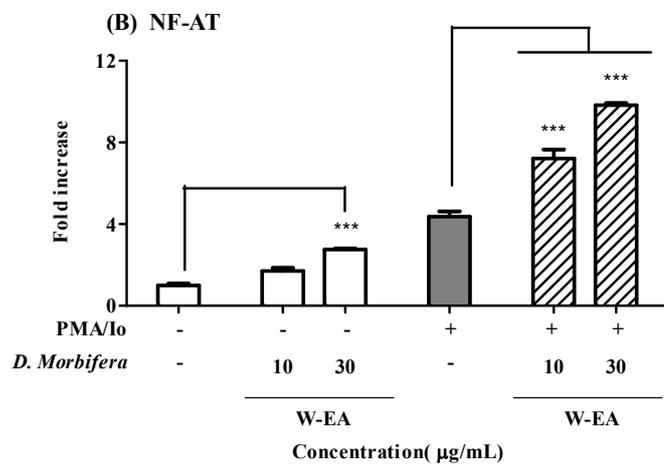
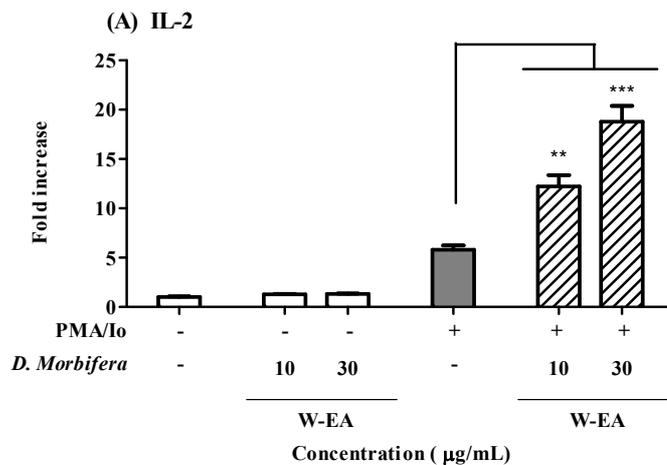
(2) Effect of W-EA on IL-2 and IFN- γ production by EL-4 T cells, murine CD4⁺ T cells, and splenocytes

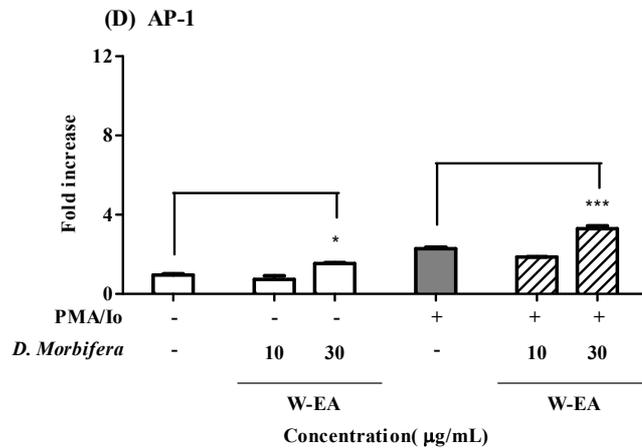




- EL4 lymphocyte cells을 48 well plate에 10^5 cells/well로 분주한 후 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 48h 배양하였다.
- BALB/c Female 8주령에서 spleen을 분리한 뒤, RBC buffer를 사용하여 red blood cells을 제거한 후 Murine spleen macrophages cell은 48 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고 ConA (T cell metogen, $1 \mu\text{g/ml}$)과 약물을 treat 후 2일 배양하였다.
- BALB/c Female 7주령 spleen과 lymph node를 모두 분리한 뒤, RBC buffer를 사용하여 red blood cells을 제거하였다. 그 다음에 micro bead를 이용하여 column에 세포를 통과시켜 positive CD4+ T cells을 분리하였다. CD4+ T cells는 48 well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후 EL4 T cells 과 동일한 조건으로 약물 처리를 하였다. 그 후 상등액만 얻어서 R&D system IL-2, Biolegend IFN-r ELISA kit를 이용하여 cytokine을 450nm 흡광도에서 측정하였다.
- EL4 lymphocyte cells, murine spleen macrophages cells, CD4+ T cells에 황칠 분획물 W-EA (에칠아세테이트 층)을 30, $10 \mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 농도 의존적으로 IL-2, IFN-r cytokine 생성이 현저히 증가하였다.

(3) Effect of W-EA on IL-2, NF-AT, NF- κ B, and AP-1 promoter activity in A/Io-induced EL-4 T cells

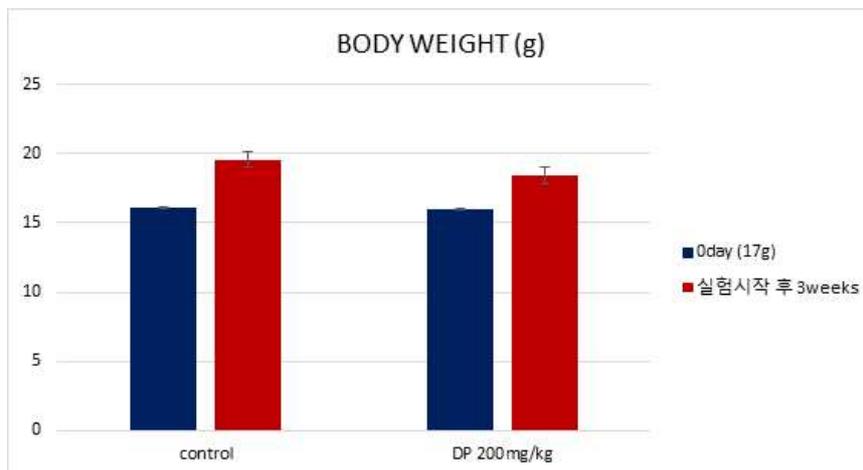


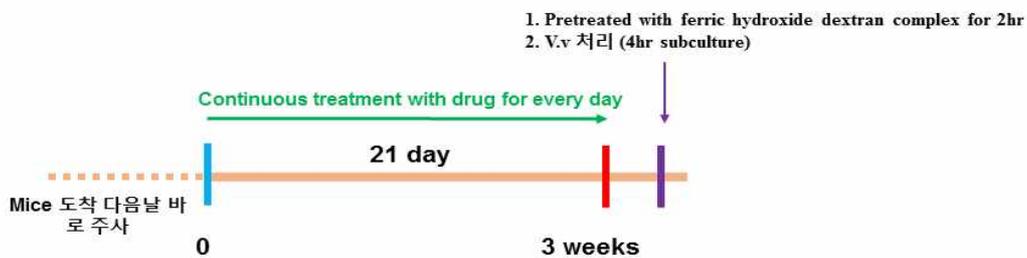
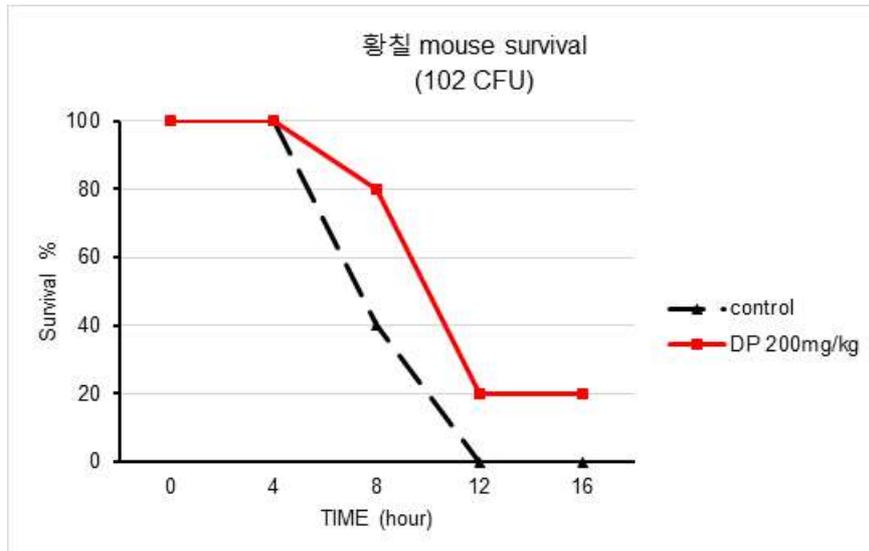


EL4 lymphocyte cells을 6 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주한 후 DNA (3-5 mg)를 36-48h transfection한 후, cell을 다시 회수하여 centrifuge하여 96well에 다시 분주하여 약물 전처리 4시간 후 PMA/Io을 처리하여 24h 배양한다. cell을 lysis 한후, luciferase 기질과 반응시켜 luminomiter로 측정하였다.

EL4 lymphocyte cells에 (A) IL-2 (B) NF-AT (C) NF-kB (D) AP-1 transfection 후 황칠 분획물 W-EA (에칠아세테이트 층) 약물효과를 확인하였더니, W-EA이 IL-2, NF-AT reporter를 크게 증가 시켰다.

다.-2 황칠 추출물 및 단일성분들의 in vivo 면역 조절 효능 평가
 (1) 황칠 및 추출물의 iron-overload mice model에서 survival 확인



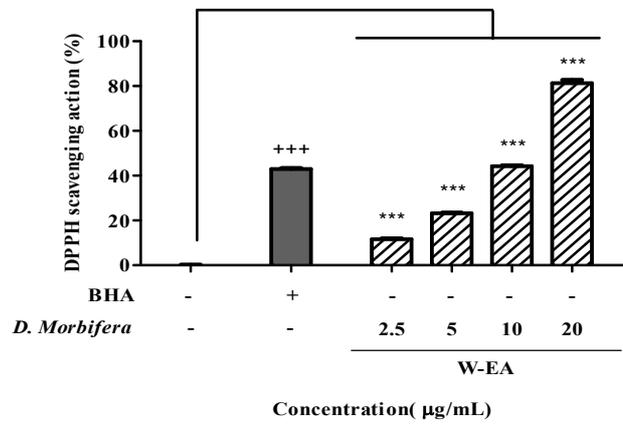


Female BALB/c 5주령 mice에서 3주 동안 황철 및 추출물을 매일 복강주사를 하였고, ferric hydroxide dextran complex를 2시간 동안 전 처리하여 iron-overload mice model을 만들고 비브리오 패혈증 균을 10^2 CFU로 복강 주사하여 mice survival을 확인 하였다.

그 결과 황철 추출물 200 mg/kg 처리 군이 control 군보다 더 늦게 죽는 것으로 보아 황철이 면역 조절 효과가 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

다.-3 황철 추출물 및 단일성분들의 항산화 효능 평가 및 응용 연구

(1) Antioxidant activity of W-EA

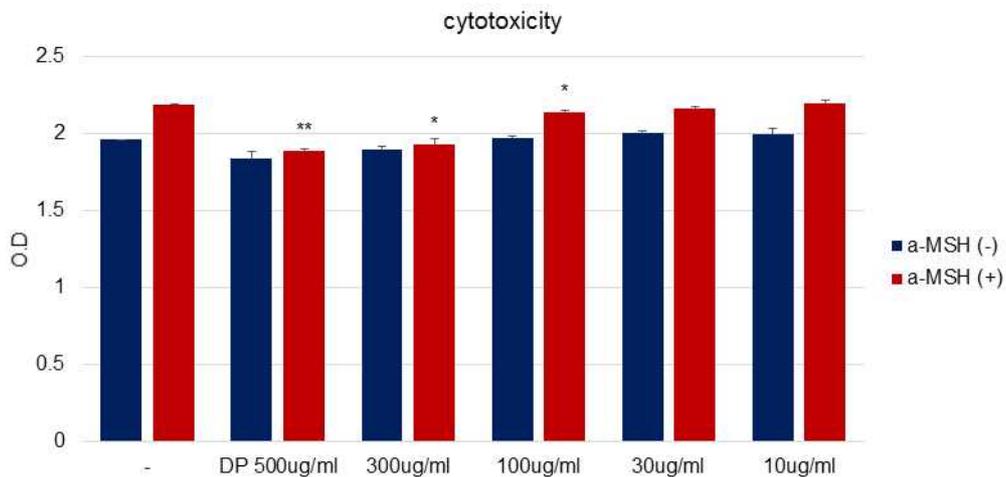


약물 (20, 10, 5, 2.5 µg/ml) 과 DPPH 0.2mM을 1:1로 상온에서 30분간 반응 시킨 후, 흡광도 490nm에서 측정한다. 질 분획물 W-EA (에칠아세테이트 층)의 항산화 효과를 확인한 결과, W-EA이 농도 의존적으로 항산화 효과가 현저히 좋았다.

다.-4 황칠 추출물 및 단일성분들의 노화관련 질병모델에서 효능 평가

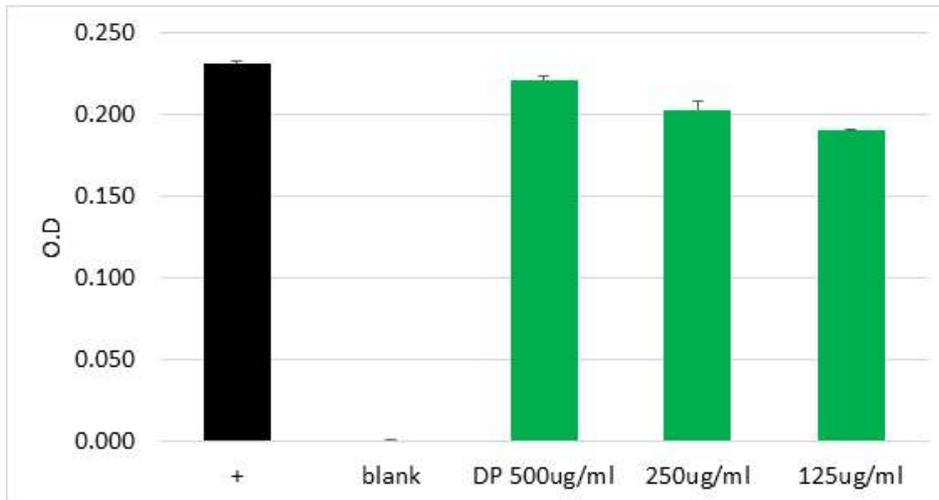
20세 중반부터 서서히 피부노화가 시작되는데 30세 후반부터는 급격히 노화가 진행이 된다. 이러한 몸속의 생체 호르몬이 부족해지면 진피층 결합섬유의 노화를 촉진하고 유연성과 탄력을 잃고 주름살이 빨리 생기게 된다. 또한 피부표면이 얇아지고 혈액순환이 되지 않아 자극이나 약물에 쉽게 반응하고 자외선에 대한 방어력이 떨어져 색소침착이 쉽게 일어나 기미도 잘 발생한다. 이러한 노화 현상에 의해 얼굴에는 주름이 생기고 건조해지며 피부가 이완 되고 피부색이 회색으로 변하면서 특히 햇빛에 장기간 노출된 피부에 노화가 더욱 일찍 찾아오며 증상은 더욱 심하게 나타난다. 이러한 노화관련 질병 중에 하나인 색소 침착에 대한 미백효과를 확인하기 위해 in vitro에서 효능 평가를 진행하였다.

(1) Cytotoxicity of *Dendropanax morbifera* extracts on B16F10 cells



B16F10 cell을 96-well palte에 3×10^4 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 황칠 물 추출물을 500, 300, 100, 30, 10 μ g/ml를 처리하고 72시간 배양 하였다. α -MSH 유무에 따라 확인해야하기 때문에 α -MSH는 약물 전처리 2시간 후에 100nM로 처리하였다.MTS시약을 처리하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다.그 결과, 황칠 잎 추출물은 크게 독성이 나타나지 않았다.

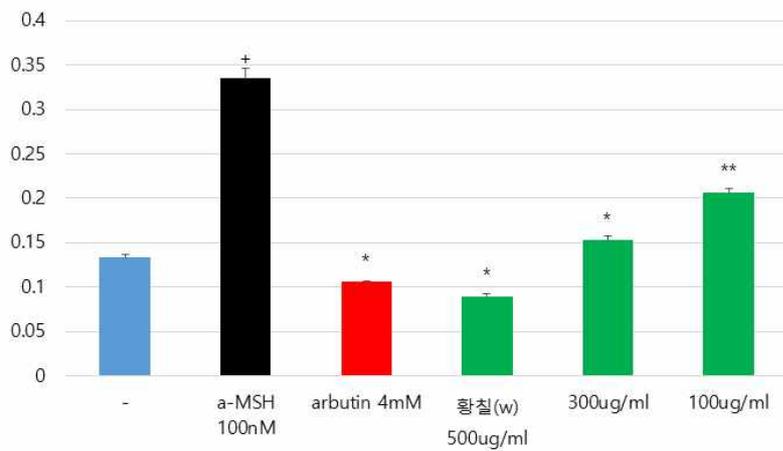
(2) Mushroom tyrosinase activity of *Dendropanax morbifera* extracts



L-Dopa (10 mM)과 황칠 잎 추출물 500, 250, 125 μ g/ml을 1:1로 먼저 반응 시킨 후, Mushroom tyrosinase (200U/ml) 처리하여 37°C 10분 동안 반응하고, ELISA reader 490nm 흡광도 측정한다.

Mushroom tyrosinase를 사용하여 황칠 물 추출물의 tyrosinase 저해효과를 확인 한 결과, 500, 250, 125 μ g/ml로 처리하였을 때 Mushroom tyrosinase activity는 크게 효과가 없었다.

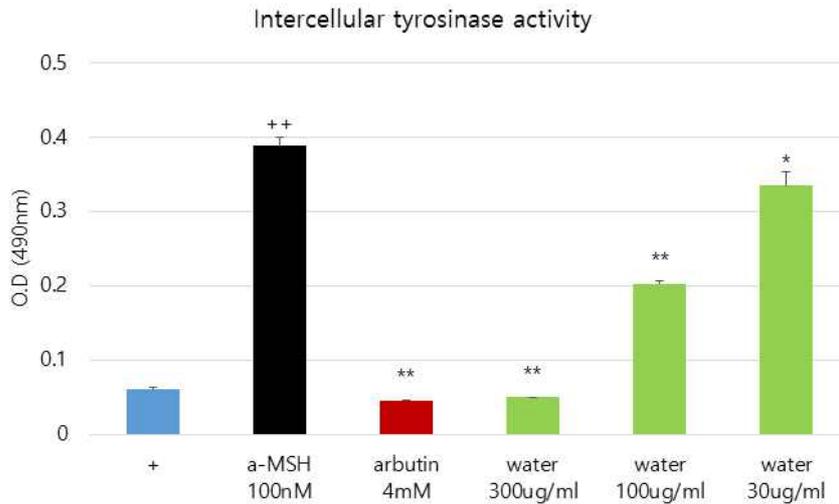
(3) Melanin contents of *Dendropanax morbifera* extracts on B16F10 cells



B16F10 cell을 6-well palte에 1×10^5 cells/well로 seeding한 후에 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 media change 후, 각 well에 황칠 물 추출물을 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간동안 전처리한 후, a-MSH 100nM로 처리하고 72h동안 배양하였다. B16F10 세포 약물 처리 후 배양이 끝나면 lysis 후 cell pellet에 1 N NaOH 200 μl 를 가하고 80°C 에서 1시간 방치하여 melanin을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200 μl 를 옮긴 후 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

황칠 물 추출물을 B16F10 melanoma cells에 500, 300, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 농도 별로 처리하여 a-MSH 유무에 따른 독성을 확인한 결과 크게 독성은 나타나지 않았다.

(4) Intracellular tyrosinase activity of *Dendropanax morbifera* extracts on B16F10 cells



B16F10 cell을 6-well palte에 1×10^5 cells/well로 seeding한 후에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 media change 후, 각 well에 황칠 물 추출물을 300, 100, 30 μ g/ml을 2시간동안 전 처리한 후, a-MSH 100nM로 처리하고 72h동안 배양하였다. B16F10 세포 약물 처치 후 배양이 끝나면 lysis 후 상등액을 정량하고 동량의 상등액과 L-Dopa (1mg/ml)을 37°C에서 1시간 동안 incubation 한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정한다. In vitro에서 세포 내에 존재하는 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정하여 melanin 생성 억제 물질로서의 가능성을 확인한다. 황칠 물 추출물을 300, 100, 30 μ g/ml로 처리하였을 때 농도 의존적으로 Intracellular tyrosinase activity 크게 억제하였다.

마. 수행성과

1) 특허출원 및 등록

- 특허명 : 황칠나무 발효 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물
- 출원연도 : 2015. 07. 09
- 등록번호 : 10-2015-0097987
- 발명자 : 김선오, 정명아, 이소연, 이동욱, 김기만, 박종국

출원번호통지서

페이지 1 / 3

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2015.07.09
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2015-0097987 (접수번호 1-1-2015-0667362-33)
 출원인명칭 재단법인 전남생물산업진흥원(2-2006-038590-8) 외 1명
 대리인성명 특허법인 유아이피(9-2008-100141-2)
 발명자성명 김선오 정명아 이소연 이동욱 김기만 박종국
 발명의명칭 황칠나무 발효 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/appNoOffcAct.so>

2015-07-10

- 특허명 : 황칠나무 발효 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물
- 등록연도 : 2017. 04. 06
- 등록번호 : 제10-1726410호
- 발명자 : 김선오, 정명아, 이소연, 이동욱, 김기만, 박종국



특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 Patent Number	제 10-1726410 호
출원번호 Application Number	제 10-2015-0097987 호
출원일 Filing Date	2015년 07월 09일
등록일 Registration Date	2017년 04월 06일

발명의 명칭 Title of the Invention
황칠나무 발효 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물

특허권자 Patentee
등록사항란에 기재

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



2017년 04월 06일

특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최 동 규

- 특 허 명 : 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증상의 예방 및 개선용 기능성 식품 조성물
- 출원연도 : 2016. 11. 30
- 출원번호 : 제10-2016-0161674호
- 발 명 자 : 정명아, 오교녀, 최은진, 배동혁, 오둘리, 김유진, 홍지애, 최철웅, 성락선, 김기만, 박종국

출원번호통지서

페이지 1 / 4

관 인 생 략 출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2016.11.30
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출 원 번 호 10-2016-0161674 (접수번호 1-1-2016-1175807-66)
 출 원 인 명 칭 재단법인 전남생물산업진흥원(2-2006-038590-8) 외 1명
 대 리 인 성 명 특허법인 유아이피(9-2008-100141-2)
 발 명 자 성 명 정명아 오교녀 최은진 배동혁 오둘리 김유진 홍지애 최철웅
 성락선 김기만 박종국
 발 명 의 명 칭 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 남성 갱년기 증
 상의 예방 및 개선용 기능성 식품 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOffeAct.so>

2016-12-01

- 특 허 명 : 남성 갱년기로 인한 피로감, 근력저하 및 운동능력 저하를 개선하는
황칠나무 추출물을 함유하는 기능성 식품 조성물
- 출원연도 : 2017.07.24
- 출원번호 : 제10-2017-0093513호
- 발 명 자 : 정명아, 오교녀, 최은진, 배동혁, 오둘리, 김유진, 홍지애, 최철용,
성락선, 김기만, 박종국

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2017.07.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0093513 (접수번호 1-1-2017-0708882-38)
출원인명칭 재단법인 전남생물산업진흥원(2-2006-038590-8) 외 1명
대리인성명 특허법인 유아이피(9-2008-100141-2)
발명자성명 정명아 오고녀 최은진 배동혁 오둘리 김유진 홍지에 최철웅
성락선 김기만 박종국
발명의명칭 남성 갱년기로 인한 피로감, 근력저하 및 운동능력 저하를 개선하는 황칠나무 추출물을 함유하는 기능성 식품 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

- 특허명 : 테트라데칸올을 포함하는 면역 억제 조성물
- 출원연도 : 2016.07.14
- 출원번호 : 제10-2016-0089434호
- 발명자 : 김영란, 박정엽, 김선오, 배동혁

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2017.07.24
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0093513 (접수번호 1-1-2017-0708882-38)
출원인명칭 재단법인 전남생물산업진흥원(2-2006-038590-8) 외 1명
대리인성명 특허법인 유아이피(9-2008-100141-2)
발명자성명 정명아 오고녀 최은진 배동혁 오둘리 김유진 홍지에 최철웅
성락선 김기만 박종국
발명의명칭 남성 갱년기로 인한 피로감, 근력저하 및 운동능력 저하를 개
선하는 황칠나무 추출물을 함유하는 기능성 식품 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

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

- 특 허 명 : 테트라테칸올을 포함하는 면역 억제 조성물
- 등록연도 : 2017.07.27
- 출원번호 :
- 발 명 자 : 김영란, 박정엽, 김선오, 배동혁

발송번호: 9-5-2017-052578371
발송일자: 2017.07.27.

수신 서울특별시 관악구 남부순환로 1922 301호
(봉천동, 청동빌딩)(제니스국제특허법률사무소)

윤대웅

08793

YOUR INVENTION PARTNER

특 허 청 특허결정서

출원인	성명	전남대학교산학협력단 (특허고객번호: 220040365775)
	주소	광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
대리인	성명	윤대웅 외 1명
	주소	서울특별시 관악구 남부순환로 1922 301호 (봉천동, 청동빌딩)(제니스국제특허법률사무소)
발명자	성명	김영란
	주소	광주광역시 남구 봉선동 22-2 골든프레빌 102동 202호
발명자	성명	박정업
	주소	광주광역시 북구 연제동 양산제로 110 양산주공APT 104동 208호
발명자	성명	김선오
	주소	광주광역시 북구 연제동 양일로 52 대주피오레 2차 201동 1003호
발명자	성명	배동혁
	주소	전라남도 화순군 화순읍 대리 102 104동 401호(대성베르힐)
출원번호	번호	10-2016-0089434
발명명의	명칭	1-테트라데칸올을 포함하는 면역 억제 조성물
청구항	항수	6

이 출원에 대하여 특허법 제66조에 따라 특허결정합니다.
(특허권은 특허료를 납부하여 특허법 제87조에 따라 설정등록을 받음으로써 발생하게 됩니다.) 끝.

[참고문헌]

1. KR1020030096312 A
2. KR101367306 B1

2) 학술대회 발표

Creative Food Science for the Future

Monday, August 25

3rd Floor

Regional Symposium “Jeonnam Bioindustry Foundation”

Development of Functional Foods Using Local Resources in Jeonnam Region

Chair: **Jong-Bang Eun** (Chonnam National University, Korea)

- RSJB-1** 10:00-10:25
Introduction of Jeonnam Bioindustry Foundation and Affiliated Research Institutes
Hyun Kyung Shin (Jeonnam Bioindustry Foundation, Korea)
- RSJB-2** 10:25-10:50
Effect of Purple Sweet Potato Extracts on Antiobesity *In vitro* and *In vivo*
Ji-Hyang Wee (Jeonnam Bioindustry Foundation, Food Research Institute, Korea)
- RSJB-3** 10:50-11:15
In vitro and *In vivo* Effects of *Oenanthe javanica* Extract on Memory Impairment
Eun Ju Yang (Jeonnam Bioindustry Foundation, Food Research Institute, Korea)
- RSJB-4** 11:25-11:50
Effect of *Dendropanax morbifera* Extract and Its Fractions on the Relaxation of the Rabbit Corpus Cavemosum Smooth Muscle
Sunoh Kim (Jeonnam Bioindustry Foundation, Institute of Natural Resources Research, Korea)
- RSJB-5** 11:50-12:15
The Protective Effect of Aqueous Extract from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo Acute Alcohol-induced Liver Injury in Mice
Chulyung Choi (Jeonnam Bioindustry Foundation, Institute of Natural Resources Research, Korea)

Myung-A Jung*, Eun-Jin Choi, Dong-Wook Lee, Sunoh Kim

Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research, Korea

ABSTRACT

Erectile dysfunction(ED) is sexual dysfunction characterized by the inability to attain or maintain an penile erection of the penis during sexual performance. The objective of this study was to examine the relaxing effect of *Dendropanax morbifera* (DM) extract and its fractions on the sexual function in rabbit corpus cavernosum (RbCC) smooth muscle. Aqueous extracts of DM was fractionated in hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and aqueous fraction. We studied the confirmation of quercetin as a marker compound in DM. It showed a high linearity in the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) of 0.99. Quercetin was found in water extracts of DM (1451.96 ug/g, Quercetin). The efficacy of DM was evaluated using cascade system and superfused with warmed and oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution. RbCC were precontracted with phenylephrine (1×10⁻⁶ M) to increase the basal tone, DM (0.5, 1, 2 mg/ml) or fractions (0.5, 1, 2 mg/ml) caused a concentration-dependent relaxation. The lowest relaxation was showed at butanol fraction and highest relaxation was showed at ethyl acetate fraction on RbCC smooth muscle. These results suggest that DM and its fractions enhance phenylephrine-induced relaxation of corpus cavernosum smooth muscle in rabbit.

INTRODUCTION

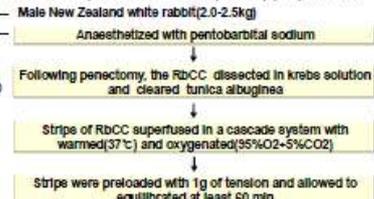
Penile erection is a hemodynamic process involving relaxation of smooth muscle of the corpus cavernosum and its associated arterioles. This relaxation process results in an increased flow of blood into the trabecular spaces of the corpora cavernosa and could further cause the erection of penis. Erectile dysfunction(ED) is defined as the inability to achieve and maintain an erection sufficient for satisfactory sexual performance. ED is a common problem of approximately 60% of men aged 40-70 years. Current pharmacological treatment for ED includes the oral, intraoavernosal and intraurethral administration of erectogenic drugs. Oral pharmacotherapy is the most effective therapy for ED with the highest patient preference. Oral phosphodiesterase type 5 (PDE5)-inhibitor(sildenafil, tadalafil and vardenafil) are superior in effectiveness to centrally acting drugs (apomorphine and yohimbine). *Dendropanax morbifera* Leveille (araliaceae) is used in Korea for a variety of disease. In the course of our studies on treatment of ED, we found that *Dendropanax morbifera*(DM) extract and its fraction induced relaxation on the phenylephrine(PHE)-precontracted corpus cavernosum. In this study, we have characterized the effect of DM extract and its fractions on rabbit corpus cavernosum by using organ bath experiments.

METHODS

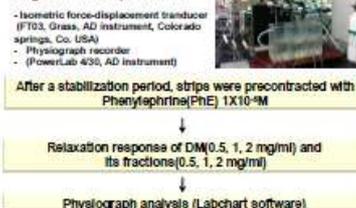
HPLC condition for Quercetin

Instrument	Condition
Column	Agilent-C18 (4.6 X 250 mm, I. D. 5 μm particle size)
Mobile phase	A : MeOH, B : 0.1 % formic acid
Gradient Condition	0-8 min (35%), 8-38 min (35-50%), 38-40 min (50-100%), 40-50min (100-35%), 50-51min (35%), 51-55min(35%)
Flow rate	1ml/min
Injection volume	10 ul
UV-Detector	375 nm
Column temperature	40 °C

Rabbit corpus cavernosum(RbCC) preparation



Organ bath experiment



RESULTS & DISCUSSION

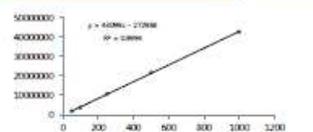


Fig 1. Calibration curve of Quercetin standard solution

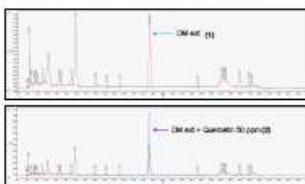


Fig 2. Spectrum of *Dendropanax morbifera* LEV. (1), DM-Quercetin std. (2)

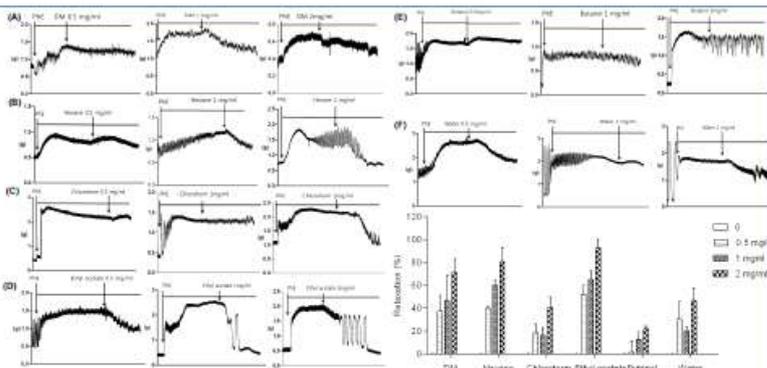


Fig 3. Relaxation effect of DM(*Dendropanax morbifera*) aqueous extracts and solvent fractions on PHE(phenylephrine)-precontracted Rabbit corpus cavernosum strips in vitro. (A) DM aqueous extracts, (B) Hexane layer, (C) Chloroform layer, (D) Ethyl acetate layer, (E) Butanol layer, (F) Water layer

REFERENCE

1. Korean J. Medicinal Crop Sci, 22 (2) : 147-153 (2014),
2. J. Korean Soc Food Sci Nutr, 42 (2), 244-248 (2013)
3. Phytotherapy research, 15, 416-421 (2001)
4. Toxicon 39,633-639 (2001)

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Korea of Planning and Evaluation for Tehnology in Food, Agriculture Forestry and Fisheries and Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (JINR) Core-Competence Program

- 행사명 : The 4TM CHANGBAI MOUNTAIN FORUM
- 일 시 : 2015 08. 05 (수) ~ 2015. 08. 08. (토)
- 장 소 : Lecture hall of Sci-tech Library, Yanbian University (연변대)



Special Session I Ginseng session

Thursday, August 6 / 8th floor, 2nd Lecture Hall, Sci-tech Library

Chairman: Jongguk Park
(President of Seon, Koo Kuk University, Korea)

13:30-14:00	Mass Production and Industrialization of Dendropanax using Bioreactive Dendroin Yang (Professor, Kyung Hee University, Korea)
14:00-14:30	Baccant Triterp in R&DB of Dendropanax methylene Levellite in Korea Dendropanax (Institute, Cheongju University, Korea)
14:30-15:00	Dendropanax methylene Improves Hyperglycemia and Memory Impairments in a Rat Model of Streptozotocin-induced Diabetes (Seoul Nat. Univ. Institute of Natural Biomaterials Research, Korea)
15:00-15:10	Tea Break

Chairman: Jongguk Park
(President of Seon, Koo Kuk University, Korea)

15:10-15:40	Intramodulatory Effect of Dendropanax methylene Levellite (Seonjoon Kim, Professor, Chosun University, Korea)
15:40-16:10	The Study on Quality Standard of Feces of Panax Ginseng C. A. Mey and Comparison of Feces of P. ginseng C. A. Mey, P. ginsengoides L. and P. japonicus (Professor, Seunggyeung Pharmaceutical University, China)
16:10-16:40	Mass Production of New Ginsenoside and the Biological Activity of Panax ginseng by Industrialization (Dohyeon Yang, Professor, Kyung Hee University, Korea)



- 행사명 : 2015년도 한국식품영양과학회 정기학술대회
- 일 시 : 2016. 08. 24 (월) ~ 2016. 08. 25. (화)
- 장 소 : 평창, 알펜시아 리조트 컨벤션 센터 포스터 발표

ABSTRACT

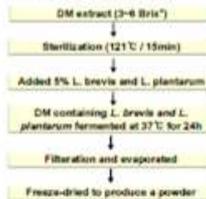
Andropause is associated with a decline in several important health factors in middle-aged men, such as decreased muscle mass, loss of muscle strength, physical performance, lack of sex and cardiovascular risk. Serum testosterone concentrations also decrease with age. Leydig cells are the primary source of testosterone and regulation of spermatogenesis. *Dendropanax morifera* is widely used as folk medicine for the treatment of analgesic, sedative, diuretic in Korea, Japan and China. To objective of this study was examine the effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus brevis*(DMB) and *Lactobacillus plantarum*(DMP) on testosterone secretion from TM3 cells, a kind of Leydig cell line. The in vitro assays were carried out using TM3 cells to evaluate the effect of DMB and DMP, cell viability, testosterone levels and hydrogen peroxide-induced testosterone level. To performed, Cell viability of TM3 cell was carried out by following MTT assay. To evaluate the testosterone levels in TM3 cell were measured using the testosterone ELISA kit. The treatment of DMB and DMP did not affect the cell viability at concentration of 300µg/ml. In TM3 cell. The treatment of DMB and DMP dose dependently increased the testosterone levels in TM3 cell. Thus, the result of this study indicate that the DMB and DMP increased testosterone levels.

INTRODUCTION

Andropause is associated with a decline in several important health factors in middle-aged men, such as decreased muscle mass, loss of muscle strength, physical performance, lack of sex and cardiovascular risk. Testicular Leydig cells are the primary source of testosterone and regulation of spermatogenesis. Reactive oxygen species (ROS) include oxygen radicals, such as superoxide(O₂⁻) or hydrogen peroxide(H₂O₂) to strengthen the cell wall. ROS might be important to the senescence of Leydig cell function during a aging. *Dendropanax morifera* Lev. (DM) is subtropical, broad leaf evergreen tree belonging to the Araliaceae family, DM widely used as folk medicine for the treatment of analgesic, sedative, diuretic in Korea, Japan. There is no report on the protective of DM on testicular Leydig cells or Leydig cell line. To objective of this study was examine the effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus brevis*(DMB) and *Lactobacillus plantarum*(DMP) on testosterone secretion from TM3 cells, a kind of Leydig cell line. Therefore, We investigated the in vitro effects of DMB and DMP on not induced and H₂O₂-induced oxidative stress in the mouse TM3 Leydig cells.

METHODS

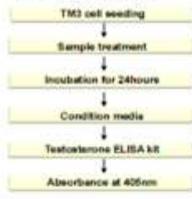
Fermentation of sample



Cell viability assay



Testosterone levels



H₂O₂-induce Testosterone levels



RESULTS

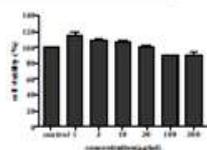


Figure 1. Effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus brevis* (DMB) on cell viability in TM3 cells. Cell viability was determined by MTT assay. TM3 cells were treated with DMB for 24h. Data express the mean ± S.D. (n=6).

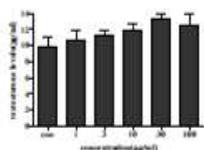


Figure 2. Effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus brevis* (DMB) on testosterone levels. TM3 cells were treated with DMB for 24h. The levels of testosterone was measured using testosterone ELISA kit. Data express the mean ± S.D. (n=6).

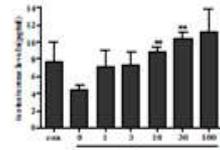


Figure 3. Protective effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus brevis* (DMB) on H₂O₂-induced testosterone levels. TM3 cells treated with DMB were incubated in the presence or absence of 200 µM H₂O₂ at 37°C for 24h. The levels of testosterone was measured using testosterone ELISA kit. Data express the mean ± S.D. (n=6). *p<0.05, significantly different from the H₂O₂ alone.

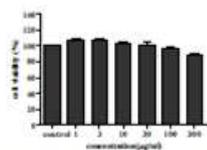


Figure 4. Effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus plantarum* (DMP) on cell viability in TM3 cells. Cell viability was determined by MTT assay. TM3 cells were treated with DMP for 24h. Data express the mean ± S.D. (n=6).

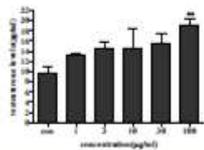


Figure 5. Effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus plantarum* (DMP) on testosterone levels. TM3 cells were treated with DMP for 24h. The levels of testosterone was measured using testosterone ELISA kit. Data express the mean ± S.D. (n=6). *p<0.05, significantly different from the control group.

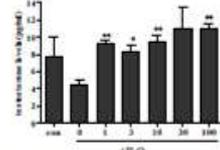


Figure 6. Protective effect of fermented *Dendropanax morifera* extract by *Lactobacillus plantarum* (DMP) on H₂O₂-induced testosterone levels. TM3 cells treated with DMP were incubated in the presence or absence of 200 µM H₂O₂ at 37°C for 24h. The levels of testosterone was measured using testosterone ELISA kit. Data express the mean ± S.D. (n=6). *p<0.05 and **p<0.01, significantly different from the H₂O₂ alone.

CONCLUSION

In conclusion, our results suggested that DMB and DMP did not affect the cell viability at concentration of 300µg/ml. In TM3 cell. The treatment of DMB and DMP dose dependently increased the testosterone levels in Leydig/TM3 cell. The treatment of DMB and DMP protected the cells from H₂O₂-induced cytotoxicity. Thus, the result of this study indicate that the DMB and DMP increased testosterone levels in oxidative stress conditions.

ACKNOWLEDGEMENT

This Research was financially supported by Korea Institute of Planning & Evaluation for Technology in Food, Agriculture Forestry & Fisheries (PET) through the High Value-added Food Technology Development Program (110424-03-1-H020).



- 행사명 : 한국식품영양과학회 정기학술대회
- 일 시 : 2016. 10. 31. (월) ~ 11. 02. (수)
- 장 소 : 제주특별자치도 제주국제컨벤션센터

Myung-A Jung^{1*}, Koynyeo Oh¹, Dool-Ri Oh¹, Yujin Kim¹, Donghyuck Bae¹, Ji-Ae Hong¹, Rack Seon Seong¹, Sunoh Kim², Chul-yung Choi²

¹ Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research, Jeollanamdo 59338, Republic of Korea. ²B&Tech Co., R&D Center, Gwangju 61239, Republic of Korea

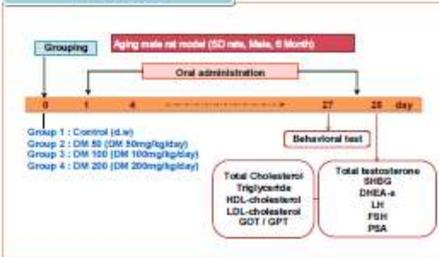
ABSTRACT

Testosterone Deficiency syndrome (TDS) is less well-recognized as a clear syndrome in aging men. Between the ages of 40 and 70 years, serum testosterone decreased at rate of approximately between 0.4 and 2.6% per year. *Dendropanax morvifera* Lx. (DM) is subtropical, broad leaf of evergreen tree widely found in south western part of South Korea. The parts of DM including roots and stems has been therapeutic effects. However, the possible therapeutic value of DM for improving TDS has not been studied. The present study was designed to investigate the effects of DM on TDS in aging male rats. The rats were divided into four groups: Control, DM 50 (50mg/kg/day), DM 100 (100mg/kg/day), DM 200 (200mg/kg/day). After 4 weeks of oral administration of DM, the serum testosterone levels were significantly increased in DM group to the control group. The running time on treadmill test was increased in DM group. The serum sex hormone globulin (SHBG), prostate specific antigen (PSA), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) levels were decreased in the DM groups. These results suggest that DM may be a useful resource in management of TDS.

INTRODUCTION

Testosterone Deficiency syndrome (TDS) is less well-recognized as a clear syndrome in aging men. Testosterone decreases progressively after age 40 years. This results from the age-related increase of about 1.2%~2.2% per year in circulating sex-hormone binding globulin (SHBG) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S). FSH stimulates spermatogenesis in the Sertoli cells and LH stimulates synthesis and release of testosterone in the Leydig cells. TDS is a clinical and adversely affect multiple organ functions and quality of life. The presence of symptoms alone does not constitute testosterone deficiency. *Dendropanax morvifera* Leveille (Araliaceae) is subtropical, broad leaf evergreen tree widely found in south western part of South Korea. The parts of DM including roots and stems of this migraine headache, dysmenorrheal, and skin disease. DM has been reported to have beneficial effects in the treatment of medical conditions, such as antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities, antiatherogenic, anticancer, and antioxidant and anticancer. However, the possible therapeutic value of DM for improving TDS has not been studied. Therefore, This study investigated the effect of DM on TDS in aging male rats.

METHODS



RESULTS

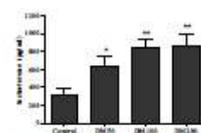


Figure 1. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on prostate specific antigen (PSA) in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

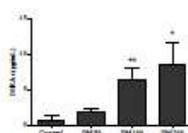


Figure 2. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-s) in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

Group	Testis (mg)	Prostate (mg)	Seminal vesicle (mg)	Utricle (mg)	Liver (mg)	Spleen (mg)	Spleen (g)
Control	0.3462±0.17	0.7892±0.21	1.3692±0.18	1.2792±0.28	18.2362±0.42	0.8662±0.23	1.2692±0.07
DM 50	0.2262±0.14	0.7262±0.24	1.2692±0.12	1.2362±0.28	18.1862±0.71	0.8662±0.14	1.2362±0.08
DM 100	0.4462±0.05	0.7762±0.22	0.2762±0.22	1.1162±0.22	18.1762±0.88	0.8662±0.18	0.8662±0.02
DM 200	0.3762±0.22	0.7262±0.22	1.8262±0.14	1.2262±0.14	18.1762±0.58	0.7662±0.12	1.2162±0.08

Table 1. Organ weight in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE.

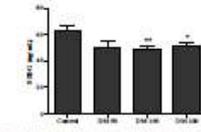


Figure 3. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on Sex hormone binding globulin (SHBG) in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

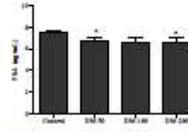


Figure 4. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on prostate specific antigen (PSA) in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

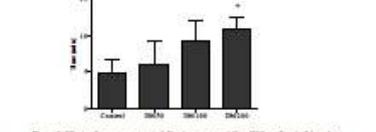


Figure 5. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on treadmill in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

Group	PSA (ng/mL)	LH (mIU/mL)
Control	1.2862±0.08	0.7162±0.07
DM 50	1.4462±0.28	0.1762±0.18
DM 100	1.4162±0.05	0.2262±0.12
DM 200	1.8162±0.17	0.2762±0.07

Table 2. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on serum parameter in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

Group	Total cholesterol	Triglyceride	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
Control	124.7562±4.20	186.2262±7.21	55.2262±0.42	25.1862±0.88
DM 50	106.2362±0.28	152.4262±7.45	67.2262±0.32	20.6262±0.28
DM 100	105.2262±0.17	117.2262±11.36	62.4262±0.28	19.1862±0.42
DM 200	86.6662±0.31	32.2262±12.36	62.2262±0.71	16.7562±0.27

Table 3. Effects of aqueous extract of *Dendropanax morvifera* (DM) on serum parameter in aging male rats. The values are expressed as the mean ± SE. (*p<0.05 and **p<0.01 significantly different from the control group). Statistical significance was tested with an unpaired Student's t-test.

CONCLUSION

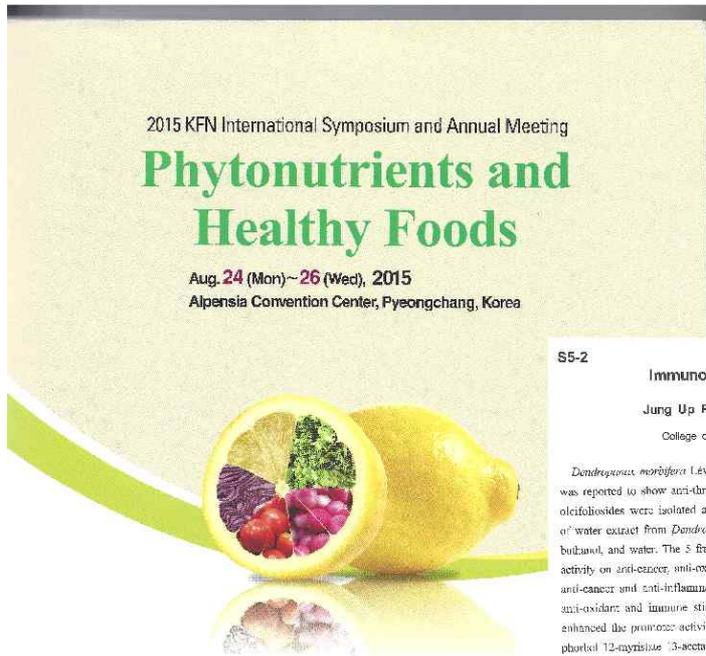
In conclusion, our results suggested that administration of DM has significantly decreased the PSA, TG, LDL, and SHBG levels. Administration of DM significantly increased the levels of total testosterone, PSA, LH and DHEA-s. The running time on treadmill test was increased in DM group. The results suggests that DM may be useful resources in the management of TDS.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was financially supported by Korea Institute of Planning & Evaluation for Technology in Food, Agriculture Forestry & Fisheries (PET) through the High Value-added Food Technology Development Program (110424-03-1-HD020).



● 2015년도 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회 발표 (2015. 08. 25)



S5-2

Immunomodulatory Effects of *Dendropanax moribifera*

Jung Up Park, Bok Yun Kang, Juyoung Lim, and Young Ran Kim*

College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Dendropanax moribifera Léveillé is an herbal medicine for the treatment of various diseases. *Dendropanax moribifera* was reported to show anti-thrombotic, anti-diabetic, anti-oxidant, and anti-cancer effects. Rutin, dendropanoside, and oleifoliosides were isolated as its active components. In this study, we investigated the immunomodulatory effect of water extract from *Dendropanax moribifera* and its 5 fractions separated with n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, and water. The 5 fractions of the water extract from *Dendropanax moribifera* showed distinct pharmacological activity on anti-cancer, anti-oxidant, and immune regulation. The hexane fraction from *Dendropanax moribifera* showed anti-cancer and anti-inflammatory effects. The ethylacetate fraction from *Dendropanax moribifera* (DPEA) showed anti-oxidant and immune stimulating effects. Interestingly, DPEA increased mouse BL-4 T cell growth and also enhanced the promoter activity of interleukin-2 (IL-2), a potent T cell growth factor in BL-4 T cells activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in a dose-dependent manner. To further characterize its regulatory mechanism, the effects of DPEA on the activity of several transcription factors modulating IL-2 expression were analyzed. DPEA with or without PMA stimulation enhanced the activity of nuclear factor of activated T cells (NF-AT) in BL-4 T cells. These results suggest that DPEA increased IL-2 production at the transcriptional levels via the up-regulation of NF-AT in BL-4 T cells.

Gold Sponsors

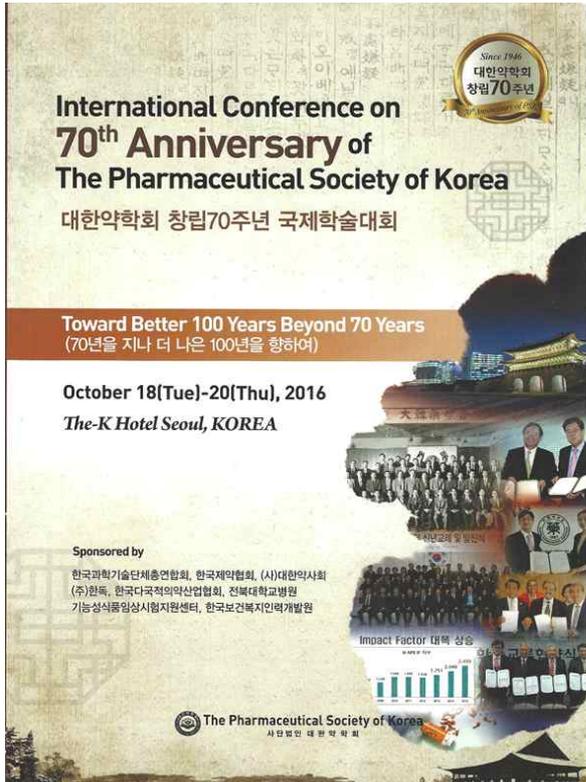


Sponsors



KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition

● 추계 대한 약학회 학회 포스터 발표 (2016. 10. 20)



P7-56 Tetradecanol purified from *Dendropanax morbifera* leaves reduced EL-4 T cell growth by down regulation of NF- κ B mediated IL-2 secretion
 PARK Jung Up¹, KANG Bok Yun¹, LEE Hwa Jeong², KIM Young Ran^{1*}
¹College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwangju, 61186, Republic of Korea¹
²Department of Biomedical Science, Chonnam National University Medical School, Gwangju, 509-757, Republic of Korea²

● 춘계 대한 미생물 학회 포스터 발표 (2017. 4. 27)



H030

An Ethyl Acetate Fraction from *Dendropanax morbifera* Leaves Increases EL-4 T Cell Growth by Upregulating NF-AT-mediated IL-2 Secretion

Jung Up Park¹, Hwa-Jeong Lee², Bok Yun Kang¹, and Young Ran Kim^{1*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, ²Department of Biomedical Sciences, BK21 PLUS Center for Creative Biomedical Scientists at Chonnam National University, Research Institute of Medical Sciences, Chonnam National University Medical School

Hepatoprotective Effects of Aqueous Extracts from Leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille against Alcohol-induced Hepatotoxicity in Rats and *In vitro* Anti-oxidant Effects

Donghyuck Bae, Jihye Kim, Sun-young Lee, Eun-jin Choi, Myung-A Jung, Chang sik Jeong, Ju-ryun Na, Jae-jin Kim, and Sunoh Kim

Received October 27, 2014; revised February 9, 2015; accepted February 9, 2015;
© KoSFoST and Springer 2015

Abstract Protective effects of *Dendropanax morbifera* Lev. leaves (DM) against alcohol-induced liver injury in rat hepatocytes and rats were investigated. Cell viability increased and normally elevated intracellular ROS levels were reduced in cells treated with extracts of DM (DMW) before ethanol treatment, compared with cells treated with 200 mM ethanol. DMW administration with ethanol resulted in prevention of ethanol-induced hepatotoxicity due to reductions of serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels. DMW supplementation reduced formation of malondialdehyde, and inhibited reductions of hepatic glutathione, catalase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase levels, compared with rats administered ethanol, and suppressed expression of cytochrome P-450 2E1 that was elevated by ethanol administration. DMW reduced blood ethanol concentrations, and enhanced alcohol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities that are typically decreased by ethanol administration, compared with ethanol-administered rats. DM exerted hepatoprotective effects against alcohol-induced hepatocyte injury.

Keywords: *Dendropanax morbifera* Lev., alcoholic liver damage, oxidative stress, alcohol, hepatoprotective effect

Introduction

Alcoholic liver disease (ALD) is a common consequence of long-term alcohol abuse and is a major cause of morbidity and mortality worldwide. ALD encompasses a broad spectrum of morphological features, ranging from steatosis with minimal injury to more advanced liver damage, including steatohepatitis and fibrosis/cirrhosis (1). Alcohol is mostly metabolized in the liver by alcohol dehydrogenase (ADH) that is present in the cytosol, cytochrome P450, subfamily e, and polypeptide 1 (CYP2E1) in the endoplasmic reticulum, and catalase (CAT) in peroxisomes, to form acetaldehyde, then catabolized into acetic acid by aldehyde dehydrogenase (ALDH) (2). Among the mechanisms implicated in the pathogenesis of ALD, free radical-mediated oxidative stress has received increasing interest. Alcohol dehydrogenase is the major enzymatic pathway for oxidizing ethanol to acetaldehyde. However, after chronic heavy alcohol consumption, the microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) pathway of alcohol metabolism becomes more important. Notably, the activity of the MEOS pathway is enhanced after chronic ethanol exposure, partly due to an increased total P450 content, specifically, induction of CYP2E1, a member of the P450 family that exhibits a high catalytic activity for ethanol (3,4). CYP2E1-induced oxidative stress is the result of increased amounts of intracellular pro-oxidant species, such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxy radicals (OH[•]), and superoxide anion radicals (O₂^{•-}). High intracellular levels of these molecules, collectively called reactive oxygen species (ROS), can lead to mitochondrial damage, DNA modification, lipid peroxidation, elevated cytokine production, and even cell death. In mammals, ROS can result in a number of pathological conditions,

Donghyuck Bae, Jihye Kim, Sun-young Lee, Eun-jin Choi, Myung-A Jung, Chang sik Jeong, Ju-ryun Na, Jae-jin Kim, Sunoh Kim (✉)
Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research, Jangheung,
Jeonnam 529-851, Korea
Tel: +82-61-860-2610; Fax: +82-61-864-7105
E-mail: sunoh@korena.ac.kr

Effect of Aqueous Extract of *Dendropanax morbifera* Leaf on Sexual Behavior in Male Rats

Myung-A Jung^{1,2}, Kyo-nyeo Oh¹, Eun Jin Choi¹, Yu jin Kim¹, Donghyuck Bae¹, Dool-Ri Oh¹, Ki man Kim³, Dong-Wook Kim², Chul-yung Choi^{1,*}

¹Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute on Natural Resources Research, Jeollanamdo, South Korea

²Department of Oriental Medicine Resources, College of Natural Science, Mokpo National University, Jeollanamdo, South Korea

³Serom Co., Ltd., Jeollanamdo, South Korea

*Corresponding author: blockstar@hanmail.net

Abstract Sexual function is an important of the quality of life and subjective well-being in humans. Successful treatment of sexual dysfunction may improve not only sexual relationships, but also overall quality of life. The objective of this study was to determine the effects of *Dendropanax morbifera* (DM) Lev. leaf extracts on sexual behavior and testosterone levels in male rats. Three different doses of DM (50, 100, and 200 mg/kg/day) were administered orally for 28 days. On day 28 (final day of the sample treatment period) and day 42 (after 2 weeks of sample withdrawal period following 28 days of sample treatment), serum testosterone levels and sexual behavior of rats were determined, including mount frequency (MF), intromission frequency, mount latency (ML, the time from introduction of the female to the male to the first mount), intromission latency (IL), and post-ejaculatory interval (PEI). ML significantly reduced, whereas MF increased in the DM group. The DM group also had a reduced PEI. The oral administration of DM significantly increased serum testosterone levels compared with those in the control group. The results of this study demonstrate that an aqueous extract of DM represents a useful natural resource for the management of sexual function.

Keywords: sexual behavior, testosterone, erectile dysfunction, *Dendropanax morbifera*

Cite This Article: Myung-A Jung, Kyo-nyeo Oh, Eun Jin Choi, Yu jin Kim, Donghyuck Bae, Dool-Ri Oh, Ki man Kim, Dong-Wook Kim, and Chul-yung Choi, "Effect of Aqueous Extract of *Dendropanax morbifera* Leaf on Sexual Behavior in Male Rats." *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 5, no. 7 (2017): 518-521. doi: 10.12691/jfnr-5-7-10.

1. Introduction

Sexual function is an important component of quality of life and subjective well-being in humans. Erectile dysfunction (ED) is one of the most common sexual dysfunctions in men [1]. The association between androgens and erectile function at the peripheral level has been established [2,3], with androgens acting on the central nervous system to serve as important modulators of male sexual behavior, including libido. The frequency of ejaculation and sexual intercourse correlate with serum testosterone levels in the normal to subnormal range [4]. Sexual problems are widespread, and can adversely affect mood and interpersonal functioning [5]. Male sexual dysfunction (MSD) has various etiologies, including personal lifestyle, androgen deficiency, aging, psychological disorders; as a side effect of antihypertensive, psychiatric, or antiulcer medications, antidepressants, or antiandrogens; as well as chronic medical conditions such as diabetes, hypertension, and pulmonary cancer [6]. In general, the mechanisms leading to normal erectile function imply inter-connections among neurons, striated perineal muscles, and androgens, which are responsible for maintaining sexual behavior in adults. or several hundred years, men have used locally grown

plants as supplements to energize, vitalize, and ultimately improve sexual function.

Dendropanax morbifera is a subtropical, broad-leaved evergreen tree belonging to the family Araliaceae. Lacquer from DM has a golden color and is used as a varnish in woodworking and metalworking [7]. DM is an endemic species in South Korea, found naturally only in southern regions [8]. It has also been cultivated on Jindo Island, Suncheon City, and Wando Island in South Korea. Several parts of DM are used in folk medicine for the treatment of migraines and dysmenorrhea [9]. DM Levell extracts have been reported to exert various effects, including immune activation against cancer cells, antioxidant effects [10,11] anti-diabetic [12] and insecticidal effects [13]. In addition, its anti-complement [14] and antibiotic effects on liver diseases have been studied. This study therefore evaluated the effect of DM on sexual behavior and serum testosterone levels in male rats.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Extracts from DM

DM was obtained from Jindo, Jeollanamdo, South Korea, and was washed with water three times and dried



Full length article

Tetradecanol reduces EL-4 T cell growth by the down regulation of NF- κ B mediated IL-2 secretion



Jung Up Park^{a,1}, Bok Yun Kang^{a,1}, Hwa-Jeong Lee^b, Sunoh Kim^c, Donghyuck Bae^c, Jong-Hwan Park^d, Young Ran Kim^{a,*}

^a College of Pharmacy and Research Institute of Drug Development, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

^b Department of Biomedical Science, Chonnam National University Medical School, Gwangju 500-757, Republic of Korea

^c Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (JINR), Jeollanamdo 529-851, Republic of Korea

^d Laboratory Animal Medicine and Brain Korea 21 PLUS Project, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 529-851, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

Contact dermatitis
IL-2
NF- κ B
T cell
Tetradecanol

ABSTRACT

Tetradecanol is a straight-chain saturated fatty alcohol purified from *Dendropanax moribifera* leaves. We found that tetradecanol (30 μ M) reduced specifically the growth of T cells such as EL-4 T cell and isolated murine CD4⁺ T cells. In this study, we investigated the effects of tetradecanol on the regulation of interleukin-2 (IL-2), a potent T cell growth factor. Tetradecanol significantly inhibited IL-2 secretion in EL-4 T cells activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin (Io) and also in isolated murine CD4⁺ T cells activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Next, we examined the effect of tetradecanol on the transcriptional activity related to IL-2 production in T cells. Tetradecanol decreased PMA/Io-induced promoter activity of NF- κ B in EL-4 T cells, but did not show any significant effects on the promoters of activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor of activated T cells (NF-AT). Tetradecanol inhibited I κ B degradation and nuclear translocation of NF- κ B subunit, p65 in PMA/Io-activated EL-4 T cells. These results suggest that tetradecanol might have immunosuppressive effects on T cell mediated disorders. Using a chronic allergic contact dermatitis model induced by repeated application of oxazolone, we showed that tetradecanol reduced ear thickness induced by oxazolone.

1. Introduction

Immune-related diseases are increased these days and T lymphocytes have important roles on immunomodulation. When naïve T cells encounter antigens presented by antigen-presenting cells, interleukin-2 (IL-2) is synthesized and secreted by the stimulation of the T-cell receptor (TCR)/CD3 complex with the CD28 costimulatory signal. IL-2 drives clonal expansion of the activated T cells and prompts cell differentiation to acquire effector functions (Smith, 1992). Hence, the appropriate production of IL-2 is an important determinant of the magnitude of T cell-dependent immune responses. The production of IL-2 is mainly regulated at the transcriptional level through multiple transcription factors. The nuclear factor of activated T cells (NF-AT) associated with activator protein-1 (AP-1) has been reported to bind several motifs within the IL-2 promoter (Rooney et al., 1995). The binding of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) in the IL-2 promoter activates a canonical site for NF- κ B

and transcription of the CD28 response element (Hoyos et al., 1989). Cyclosporine A and tacrolimus inhibit IL-2 production and represent the mainstay of immunosuppressive therapy in transplantation (Kalli et al., 1998; Marienfeld et al., 1997). The mechanism of action is the inactivation of the Ca/calmodulin-dependent serine-threonine phosphatase, calcineurin, leading to the inactivation of NF-AT, a transcription factor that is required for the expression of IL-2, interferon- γ (IFN- γ), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) genes (Ferraccioli et al., 2005).

Immunomodulatory herb plants have been studied to treat inflammation and immune-related diseases. *Dendropanax moribifera* Leveille (Araliaceae) is an endemic species growing in the southern part of Korea (Han et al., 1998). Several studies have revealed *Dendropanax moribifera* to have diverse therapeutic potential such as anti-cancer, anti-thrombotic, anti-diabetic, anti-oxidant, and anti-inflammatory activities (Akram et al., 2016; Hyun et al., 2013; Kim et al., 2015, 2014; Lee et al., 2013; Moon, 2011; Yu et al., 2012a). Active

* Corresponding author.

E-mail address: kimyr@chonnam.ac.kr (Y.R. Kim).

¹ These authors equally contributed.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.002>

Received 13 October 2016; Received in revised form 5 January 2017; Accepted 2 February 2017

Available online 03 February 2017

0014-2999/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

The American Journal of Chinese Medicine
Ethyl acetate fraction from Dendropanax morbifera leaves increases T cell growth by upregulating NF-AT-mediated IL-2 secretion
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AJCM-D-17-00056
Full Title:	Ethyl acetate fraction from Dendropanax morbifera leaves increases T cell growth by upregulating NF-AT-mediated IL-2 secretion
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Dendropanax morbifera; IL-2; immune; NF-AT; T cell
Corresponding Author:	Young Ran Kim, Ph.D. Chonnam National University Gwangju, KOREA, REPUBLIC OF
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Chonnam National University
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jung Up Park, MS
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jung Up Park, MS Bok Yun Kang, Ph.D. Young Ran Kim, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Dendropanax morbifera Leveille (Araliaceae) is an endemic species that grows in southwestern Korea and has been used as a folk medicine. Several studies reported that D. morbifera leaves have diverse therapeutic potentials. We found that the water extract of D. morbifera leaves increased the growth of EL-4 T cells. The water extract was divided into five fractions: -hexane, chloroform, ethyl acetate, -butanol, and water layers. The ethyl acetate (W-EA) fraction showed a more significant effect than the other fractions on the growth of EL-4 T cells, splenocytes, and isolated murine CD4+ T cells. In the study, we evaluated the W-EA fraction for its immunomodulatory effects focusing on T cell functions. First, we tested the effect of the W-EA fraction on the regulation of interleukin-2 (IL-2), a potent T cell growth factor. The W-EA fraction significantly increased IL-2 secretion in EL-4 T cells activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin (Io). In addition, the W-EA fraction increased interferon-gamma (IFN- γ) production in isolated splenocytes activated with Concanavalin A (ConA, 1 μ g/mL). Next, we examined the effect of the W-EA fraction on the transcriptional activities related to IL-2 production in T cells. The W-EA fraction significantly increased PMA/Io-induced promoter activity of nuclear factor of activated T cells (NF-AT) in EL-4 T cells, but did not show any significant effects on the promoters of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). These results indicate that the W-EA fraction from water extract of D. morbifera leaves enhances IL-2 production at the transcriptional levels via the up-regulation of NF-AT in PMA/Io-activated EL-4 T cells. These results suggest that D. morbifera leaf extracts have T cell-mediated immune potentiating activity, indicating the potential for a treatment as a cure for immune diseases.
Suggested Reviewers:	

4. 홍보 및 마케팅

가. 황칠제품 수출 및 국내 유통 설명회 참가

1. 아시아 시장개척단 설명회 및 수출 2015년 12월 16일-17일



2. 세트너 홍보 기획전 참가(2015.8.18)



3. NRC코리아 황칠제품 홍보기획전 참가(2016.3.18)



나. 국내외 박람회 참가

1. 북중미 종합 시장개척단 참가(2016.4.27)



2. 할랄식품 박람회 참가(2015.9.3)

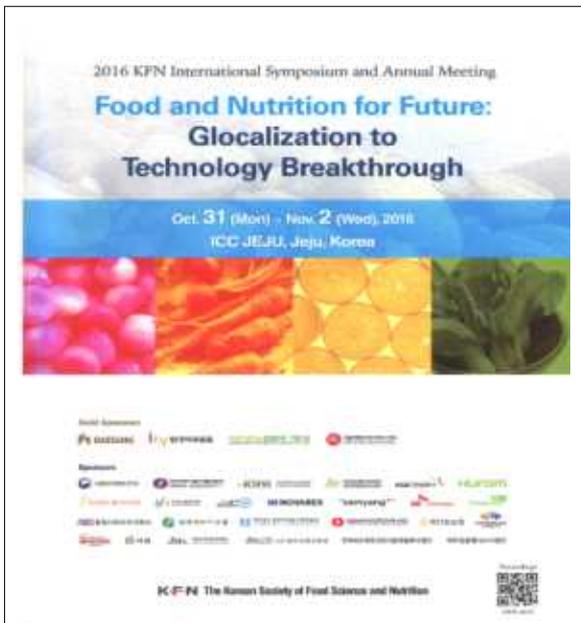


3. 중국 훈춘 중소기업 박람회 참가(2015.9.18-20)



다. 학술 마케팅 지원

- 행사명 : 제5회 “한국황칠나무 산업과 연구” 연구회 심포지움
- 일 시 : 2016. 10. 31. (월) ~ 11. 02. (수)
- 장 소 : 제주특별자치도 제주국제컨벤션센터
- 황칠나무 생리활성 최신 연구 트렌드 및 산업화 전략 공유 학회지 발간



5. 교육

○ 황칠 창업 아카데미(요식산업연계산업포함) 교육

○ 개요

- 일시 : 2016년 1월 5일 (화)
- 장소 : (주)새롭 세미나실
- 강의명 : 황칠의 역사 및 산업과 응용
- 강사 : 정병석황칠연구소 정병석 국장님
- 참석자 : 전남 지역 식품 관련 기업 종사자 및 창업 희망자

○ 주요내용

- 황칠의 역사 이해
- 황칠 추출물을 이용한 산업화의 다양성
- 여러 가지 황칠 관련 제품들의 이해도 향상으로 제품 업그레이드 효과 기대
- 황칠의 독성 및 알레르기 반응 이해로 제조 공정 심화
- 강의시간 및 교육자 수 : 4시간 / 13명



- 황칠 창업 아카데미(요식산업연계산업포함) 교육
- 개요

- 일시 : 2016년 1월 5일 (화)
- 장소 : ㈜새롭 세미나실
- 강의명 : 건강기능식품 및 고부가가치 식품개발 트렌드
- 강사 : 전남대학교 식품영양과학부 유양희 박사님
- 참석자 : 전남 지역 식품 관련 기업 종사자 및 창업 희망자

○ 주요내용

- 세계식품시장현황 및 국내식품시장현황
- 농축산업과 식품산업
- 고부가가치식품 개발동향
- 건강기능식품 개발동향
- 강의시간 및 교육자 수 : 4시간 / 13명



6. 정책활용

- 전남도는 2024년까지 장흥, 해남, 완도 등에 황칠나무를 심어 5천여 ha의 대규모 재배 단지를 조성할 계획
- 산지종합유통센터 건립과 황칠제품의 지속적 개발과 기능성 연구, 지역 관광자원과 연계한 체험·관광시설 조성 등 6차 산업으로 확대한다는 방침
- 본 과제에서 확립된 기술 및 인프라를 이용하여 전라남도에서 직·간접적으로 황칠을 정책적으로 육성

종합 전남도, '황칠 소득숲'...6차 산업으로 확대

사회

노도배 기자 기사입력 2016-02-18 15:45 최홍우 기자 2016-02-18 15:45



18일 이낙연 지사, 장흥 묘목 생산·가공 현장 방문해 새 가공품 개발 등 당부



이낙연 전남지사가 18일 오전 나무에 대해 설명을 듣고 있다

건강기능성 등 황칠 제품 국내외에 인기

입력시간 : 2015. 12.21. 00:00

전남지역에서 생산된 황칠

전남비교우위 자원 '황칠' 6차산업화 확대

입력시간 : 2016. 02. 19. 00:00

20일 전남도에 따르면 (자
내외 바이어를 11개사를
출입무협약을 체결했다.

이 자리에서는 천연자원연
해외 3개사를 포함한 11개
에서 수도권에서는 보지 못
다.

이낙연, 장흥 소득숲 방문 가공품 개발 등 당부

전남도는 오는 2024년까지 5천여ha의 대규모 재배단지를 조성하고 6차산업화에 적극 나선다는 계획이
다.

전남은 장흥, 완도, 해남을 중심으로 현재 1천680ha에 10년생 이상 수목들이 자라는 등 전국 재배 면적
의 99%를 차지할 만큼 전남의 비교우위 자원으로 꼽힌다.

이낙연 전남지사가 18일
나무 산업화를 위해 황칠
을 둘러보고, 6차산업화

특히 홍콩의 글로벌 유통
수출할 수 있도록 적극적인

18일 전남도에 따르면 도는 2024년까지 장흥, 해남, 완도 등에 황칠나무를 심어 5천여ha의 대규모 재배
단지를 조성할 계획이다

이동욱 센터장은 "앞으로
평화에서 협약된 구매의향
들과 지속적으로 협의해 나

특히 산지종합유통센터 건립과 황칠 소재 제품의 지속적 개발, 기능성 연구, 지역 관광자원과 연계한 체
험·관광시설 조성 등 6차산업으로 확대한다는 방침이다.

김록경기자 zmd@chol.com

또한 장흥에 위치한 천연자원연구원에 황칠명품화육성 RIS사업단을 운영하고 있으며, 황칠 소재 제품화
와 관련된 전반적인 정보 및 기술 제공을 통해 전문인력을 양성

<전남 지자체 연계>

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	3.5억원	
			향후 3년간 매출	10억원	
		관련제품	개발후 현재까지	5.5억원	
			향후 3년간 매출	30억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 20% 국외 : 10%	
			향후 3년간 매출	국내 : 30% 국외 : 20%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 30% 국외 : 30%	
			향후 3년간 매출	국내 : 30% 국외 : 30%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			4위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			2 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	개별인정형 건강기능식품 등록예정(3년이내)			
	소요예산(백만원)	500			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		5.5	30	50	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	10	30	50
		국외	10	30	30
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	개별인정형 건강기능식품 완제품 개발 및 상품화			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

					D-06	
4-1. 목표달성도						
구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성 도	기여 도	
1차년도 (2014- 2015)	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 개 선 건강기능 식품 원료 소재화	<ul style="list-style-type: none"> 2세부 선행연구(황칠성기능개선)특허 기술이전 대량 생산된 원료의 안정적인 공급 이행/생산자·가공자 네트워크(MOU체결) 확립 황칠나무 잎의 건강기능식품 기능성원료 상용화를 위한 대량 생산 공정 확립 자사가 개발완료 시판중인 황칠나무 전문 제품 4종 중 보완이 필요한 제품 1종 선정, 보완점 발굴 선택된 제품의 업그레이드형 고품질 신제품 생산 및 시장 출시 황칠 추출물의 안정성 시험 인증 획득 : 2건 	<ul style="list-style-type: none"> 기술이전 완료 농가확보 및 계약체결 완료 황칠나무 잎을 사용한 최적 추출물 생산에 필요한 온도 및 시간, 가수량 표준화 및 대량 생산 표준화 공정 수립완료 및 부원료 품목 신고 완료 소비자조사를 통한 자사제품의 문제점 파악 완료 및 보완사항 및 신제품 개발 황칠나무 티백차(디자인 및 시제품 개발 지표물질 분석법 검증 완료 1건 미생물 실험 완료 	100%	40%	
	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 건 강 기능식품 원료 표준화 및 남성 성 기능 개선 효능 규명	<ul style="list-style-type: none"> 기 착수한 황칠나무 추출물의 남성갱년기 개선 인체적용시험 성공 완료 추진 효능평가 대상 황칠나무와 황칠나무 발효 추출물별 활성검색을 통하여 기술차별화 제품개발을 위한 최적 발효 조건의 건강 지향식품 산업화 가능 소재 확보 : 2종 유효성분 발굴 및 확립을 위하여 황칠나무 잎 추출물을 대상으로 최대 활성을 갖는 용매분획물 제조 및 최대 활성 분획물 결정 	<ul style="list-style-type: none"> 황칠나무 추출물의 남성갱년기 개선 인체적용시험 피험자 (총 80명) 모집 완료 및 중간진도 보고회 완료 선정 자원을 대상으로 2종의 발효 균주를 이용하여 발효 방법최적화 완료 및 기능성 시험용 발효 시료 제조 발효 조건을 달리한 시료를 대상으로 고환간질세포주(TM-3)를 이용하여 in vitro 세포독성 시험을 통한 최적 시험 농도 범위 결정 TM-3 세포주를 이용하여 단일 소재 및 다양한 조건으로 발효한 소재를 대상으로 testosterone 분비 증가량과 H2O2 처리에 의한 고환세포 손상억제 효과를 분석하여 최대 활성을 나타내는 혼합비를 탐색하여 혼합비 결정 	100%	40%	
	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 효 능연구를 위 한 면역강화 기능성 연구	<ul style="list-style-type: none"> in vitro 선천성 면역 강화 효능 평가: 대표적인 선천면역 활성 수용체인 TLRs signaling 및 대식세포 면역 기능 활성 효능 평가 in vitro 후천성 면역 강화 효능 평가: B cell과 T cell의 증식 및 cytokine 분비 활성 평가 항산화 기능성 평가 다양한 추출시료들의 효능비교 평가로 최대 활성 분획물 결정 	<ul style="list-style-type: none"> 세포배양 모델에서 TLR signaling pathway에 대한 reporter 활성 효능 평가 TLRs을 발현하고 있는 Caco-2 cells 세포주에서 TLR 관련 면역 증강 cytokine인 IL-8 분비 증가 연구 대식세포 세포주에서 선천성 면역증강 효과를 cytokines 분비 측정으로 연구 T 림프구와 B 림프구 세포주에서 증식능 평가 및 사이토카인 생성에 대한 효능 평가 Pyrogallol을 이용한 Super oxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정 다양한 추출시료들의 효능비교 평가로 최적 혼합비 결정 	100%	20%	

구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성 도	기여 도
2차년도 (2015- 2016)	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 개 선 건강기능 식품 원료 소재화	성분 표준화 소재의 대량 양산화 추출 조건 및 공정표준화 확립 개별인정 대상 황칠나무 추출물의 규격설정 및 건강지향식품 생산을 위한 표준화 발효 추출물 원료 생산 황칠나무와 발효 소재를 활용 하여 건강기능식 품 시제품 제작 및 마케팅 황칠나무와 발효 추출물을 이용하여 수출전용 제품 개발:1종 황칠나무와 발효물을 이용한 국내 건강지향 일 반식품 제품 개발 : 2종 기 추진한 황칠나무 추출물의 남성갱년기 인체 적용시험 완료에 따른 기술이전 완료 및 개별 인정 획득	개별인정 원료의 대량생산을 위한 추출조건 확립 건강지향식품 및 건강기능식품 제형 연구를 위한 부원료 품목신고 -개별인정 원료소재의 규격설정 및 규격 확인(- 안정성 자료 확보 - 건강지향식품을위한 발효공정 확립 -남성건강에 좋은 황칠나무의 활성에 대한 마케팅 -규명된 남성 갱년기 장애 개선 효과를 가진 황칠 나무의 마케팅 - 황칠 티백차 디자인개발 및 레시피 개선하여 시 제품생산 -발효공정을 적용한 제품개발 1종 - 발효황칠을 이용한 환제형 제품개발 1종 -인체적용실험원료	100%	40%
	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 건 강 기능 식품 원료 표준화 및 남성 성 기능 개선 효능 규명	선행연구를 통해 선정된 황칠나무 지표성분 의 1종의 지표성분 추가 발굴 및 분석법 표준화 LC/MSMS를 통해 황칠나무 유효성분 후보물 질 탐색과 최적 효능을 갖는 선정된 추출법으 로 추출된 분획물의 유효성분 후보물질 검출 시험 : 2종 안정적 유효성분 선정 1차년도 선정된 최적 발효법으로 발효된 발 효물을 대상으로 지표물질 후보 성분들의 검출 시험 : 최종 2종의 지표성분 확인 및 발효원 료표준화 다양한 효능 biomarker를 대상으로 단일성분 의 효능평가 및 기전분석으로 유효성분 효능 검증	-황칠나무 잎은 4계절 수확이 가능한 원료로서 계 절별로 지표성분의 함량이 일정하게 분석되는 지 표성분 확보가 중요하므로 선행연구로 발굴한 지 표성분의 오차범위를 보정할 수 있는 신규 지표성 분 1종 추가 발굴 확보 -황칠나무 분획물을 LC/ MSMS를 통해 5종 이상 의 후보 유효성분을 선정하고 최적 효능을 갖는 추출법으로 추출된 추출물의 후보 유효성분 검출 및 함량 조사를 통해 2종의 안정적 유효성분 확보 -각각 개별로 선정된 지표성분을 이용하여 발효물 의 표준화를 위한 지표성분검량 시험 실시, 발효 물 표준화를 위한 최종 지표성분 2종 발굴 확보 -유효성분 발굴을 위해 단일성분의 testosterone 증가량과 H2O2처리에 의한 testosterone 분비 증 가량 평가(in vitro) -발효시료의 PDE5 저해 활성 측정 -발효시료에 대해 H2O2 처리에 의한 TM-3 세포 손상 후 세포의 생존과 증식에 관여한 세포 내 단 백질 ERK, Akt 활성 측정	100%	40%
	황칠나무 잎 추출물의 남 성갱년기 효 능연구를 위 한 면역강화 기능성 연구	in vivo 마우스를 이용한 면역증강 생체효과 평가 선천성 면역 증가에 따른 감염성 질환 예방 효 능 평가 항원 특이적 후천적 면역 증가 효능 평가 면역증강 효과 기전 연구: Pharmacological blockers 및 siRNA를 이용한 작용기전 심화연구	- ELA T cells에서 황칠 성분의 면역조절효과 연구 - in vivo 마우스를 이용한 면역조절 생체효과 검증 in vivo mouse ear edema 억제효과 연구 - 선천성 면역 증가에 따른 감염성 질환에 대한 예방 효능을 패혈증비브리오균을 모델로 감염증상 억제 및 치사율 억제 연구 - 면역증강 효과 기전 연구: Pharmacological blockers 및 siRNA를 이용한 작용기전 심화연구 - SCI 논문 작성	100%	20%

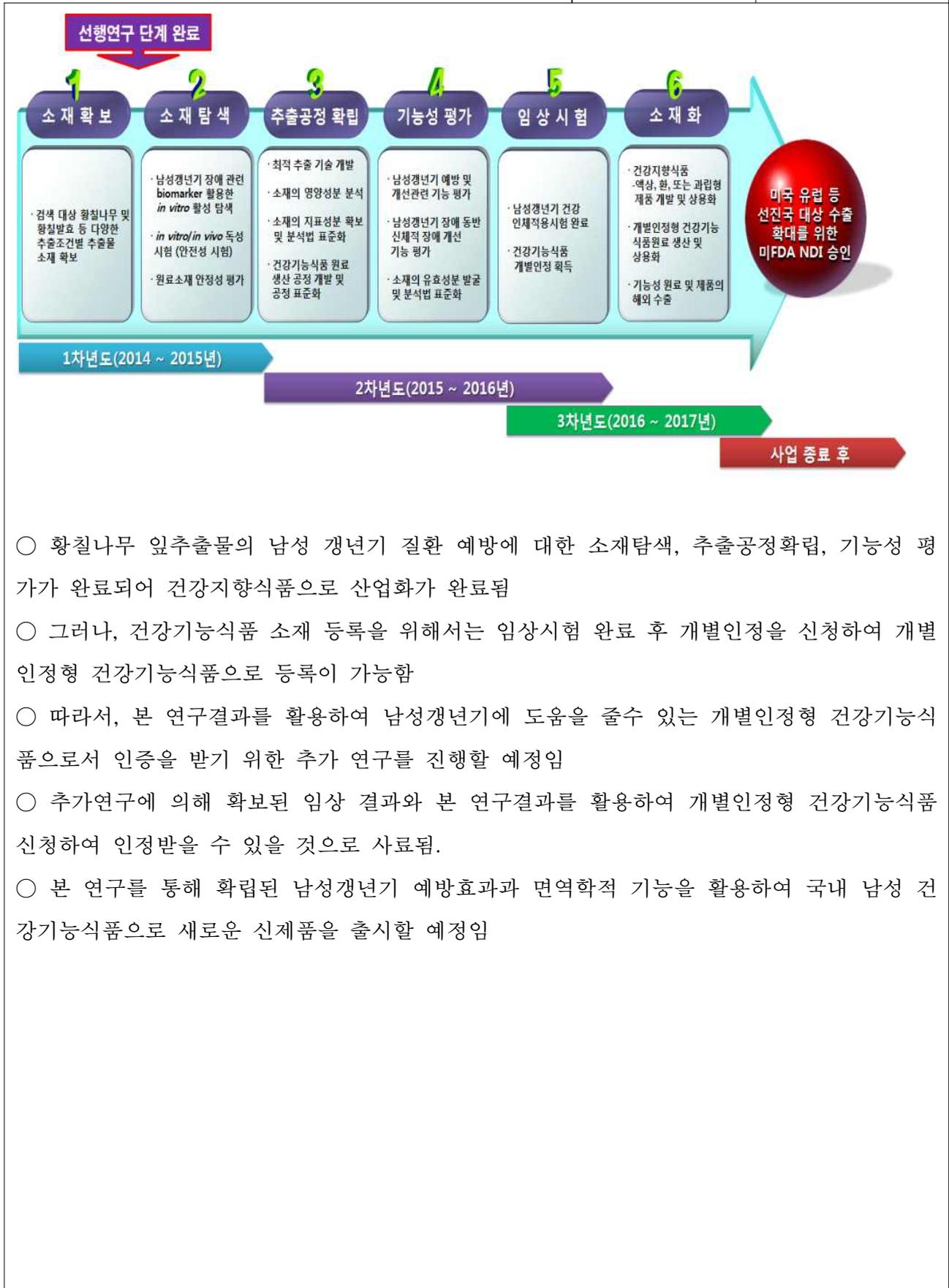
구분 (연도)	세부과제 명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성 도	기여 도
	황칠나무 추출물의 성경년기 선 건강기능 식품 원료 소재화	황칠나무 추출물을 포함하는 고시형 건강 기능식품 생산 및 제품 등록 황칠나무 추출물을 포함하는 원료 소재의 국내 산업화 황칠나무 및 발효추출물의 건강기능식품 제품 제작 및 산업화 수출 맞춤형 건강기능식품의 중국 및 동 남아 지역 국가 대상 해외 수출 추진 개발 제조된 제품들의 국내 판매 촉진을 위한 공격적 맞춤형 마케팅 추진을 통한 매출 증대	- 황칠을 첨가한 고시형 건강기능식품 2종 개 발 및 출시완료 - 천애명작, 파낙스-3 황칠나무잎 추출분말 품목신고완료 및 건강 식품원료로 납품 황칠나무 발효 추출물을 이용한 황칠발효진 액 개발 3차년도 개발된 파낙스 -3 태국 알파라이프 납품계약 완료 개발제품에 대한 판매 마케팅을 위하여 국내 의 박람회 참석 및 네트워크	100%	40%
3차년도 (2016- 2017)	황칠나무 추출물의 성경년기 건강기능 식품 원료 표준화 및 남성 기능 개선 효능 규명	황칠나무 추출물 및 발효 추출물의 in vivo 효능 평가 : 남성호르몬 측정, : 신경계 관련 호르몬 측정, : 안전성 지표 측정 마케팅 지원을 위한 기능성 및 표준화 근 거자료 제시를 위한 SCI 논문 1편	- 황칠나무 추출물 및 발효 추출물 비교 실 험 : 노령쥐 모델에서 남성 호르몬 측정 완 료 - 노령쥐 모델에서 황칠나무 추출물의 효능 평가 및 기전분석 완료 : 남성호르몬 측정 완료 (Testosterone, SHBG, 3beta-HSD, DHEA-s), 신경계 관련 호르몬 측정 완료 (GnRH, LH, FSH, inhibin), 안전성 지표 측 정 완료 (GOT, GPT, PSA), 지질대사 측정 완료 (TC, TG, HDL, LDL, AI, CRF) - 포스터 발표 1건 완료 - 특허 등록 1건 완료 - 특허 출원 2건 완료 - 논문 게재 1건 완료	100%	40%
	황칠나무 추출물의 성경년기 효능연구를 위한 면역강화 기능성 연구	◦ 황칠 추출물 및 단일성분들의 in vitro 면역 조절 효능 평가 및 기전 연구 ◦ 황칠 추출물 및 단일성분들의 in vivo 면역 조절 효능 평가 ◦ 황칠 추출물 및 단일성분들의 항산화 효 능 평가 및 응용 연구 ◦ 황칠 추출물 및 단일성분들의 노화관련 질병모델에서 효능 평가	1. - EL-4 T cells에서 황칠 추출물 및 분획물의 면역조절 효과 연구 2. - BALB/c mice에 황칠 추출물을 투여 하고, 마우스에서 분리한 splenocytes, CD4+ T cells에서 황칠 추출물 및 분 획물의 면역조절 효과 연구 3. - DPPH를 이용한 4. 항산화 활성 측정 5. - Female, BALB/c mice에 황칠 추 출물 및 분획물을 한달 동안 처리하여 노화관련 염증 사이토카인 및 면역 조 절제 측정	100%	20%

4-2. 관련분야 기여도

- 황칠나무 잎의 남성갱년기 장애 개선 소재를 개발하여 건강기능식품 소재로 활용이 가능함에 따라 다양한 황칠나무 잎 소재 개발의 가능성을 높였음
- 황칠나무 잎의 남성갱년기 장애 개선에 대한 인체적용시험을 완료하였고 개별인정형 건강기능식품 진행을 준비중 이며 국내 개별인정형 건강기능식품 등록전 고시형 원료를 사용한 건강기능식품 개발로 매출 증대 향후 개별인정형 건강기능식품 개발 가능성을 높였음
- 황칠나무 잎의 남성갱년기 장애 개선 연구를 통하여 축적된 남성성기능 개선효과 및 발효황칠을 이용한 효율증대 연구 및 면역강화 기능성 연구 등의 정량적 방법 등을 제시하여 건강기능식품 및 의약품 소재개발의 기초자료로 활용 가치가 높음.
- 황칠나무 잎의 건강기능식품의 소재화가 진행, 가능성이 증명되어 건강기능식품의 개발을 위한 대규모의 소재 확보와 가공이 증가 할 것이며, 더불어 본 소재를 함유한 건강지향식품의 다양한 개발로 이어져 자원 소재지에서의 농산물 재배 및 농식품가공의 규모 증대에 기여함
- 황칠나무의 경우 우리나라 농산물 지역자원으로 건강기능식품으로 개발될 경우 지역적으로 농가의 신소득 및 지역 생산기업의 고부가가치화를 예상할 수 있으며, 그 기능이 과학적 근거에 의해 검증되었을 경우 global 제품으로 활용될 수 있도록 함
- 남성 갱년기 개선 건강기능식품의 경우 각 기업에서 현재 외국의 건강기능식품 소재를 사용한 제품을 생산하고 있으나, 본 과제결과를 활용하여 이를 대체할 소재를 이용한 제품생산에 활용될 수 있도록 함
- 황칠나무 잎의 남성갱년기 장애 개선 소재 개발에서 확립된 기술 및 인프라를 이용하여 다른 농산물의 소재화 연구에 활용할 수 있는 시너지 효과가 예상되며, 이를 산업화하는데 있어 시간과 노력의 단축되어 산업 발전 에 기여함

5. 연구결과의 활용계획

D-07



- 황칠나무 잎추출물의 남성 갱년기 질환 예방에 대한 소재탐색, 추출공정확립, 기능성 평가가 완료되어 건강지향식품으로 산업화가 완료됨
- 그러나, 건강기능식품 소재 등록을 위해서는 임상시험 완료 후 개별인정을 신청하여 개별 인정형 건강기능식품으로 등록이 가능함
- 따라서, 본 연구결과를 활용하여 남성갱년기에 도움을 줄수 있는 개별인정형 건강기능식품으로서 인증을 받기 위한 추가 연구를 진행할 예정임
- 추가연구에 의해 확보된 임상 결과와 본 연구결과를 활용하여 개별인정형 건강기능식품 신청하여 인정받을 수 있을 것으로 사료됨.
- 본 연구를 통해 확립된 남성갱년기 예방효과와 면역학적 기능을 활용하여 국내 남성 건강기능식품으로 새로운 신제품을 출시할 예정임

■ 황칠소재 건강기능식품 개별인정 추진 계속 수행

- 사업기간내 건강기능식품 개별인정 신청을 추진하였으나 아래와 같은 사유로 개별인정 신청 보류 상태였으나 인체적용시험 재추진 결정

- 개 요

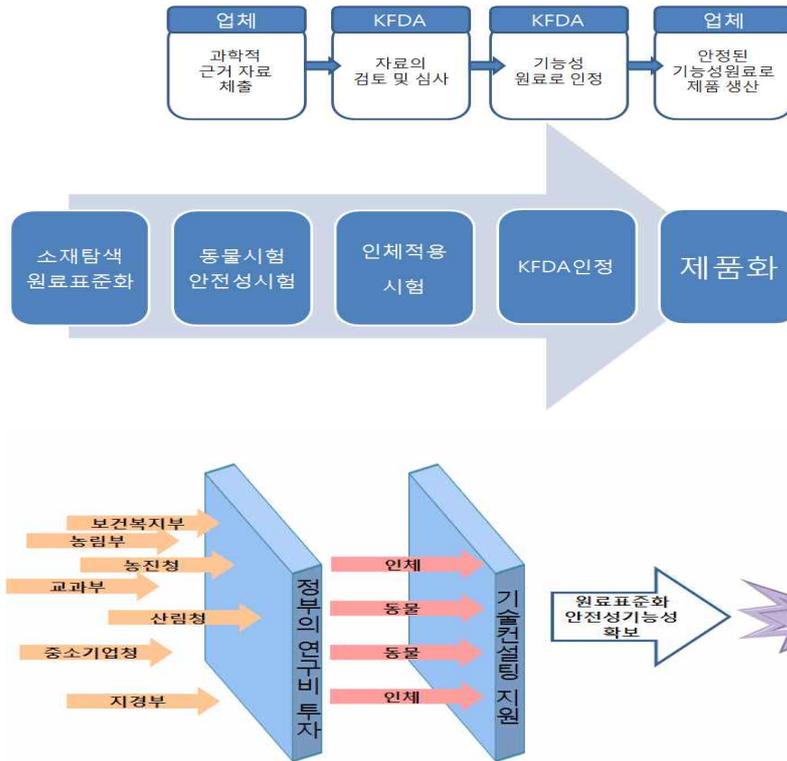
- 진행목적 : 인체적용시험 완료(황칠나무 남성갱년기 개선, 장기능개선 효과) 및 건강기능식품 개별인정신청
- 진행상황 : 인체적용시험 완료 및 개별인정 3등급 신청 가능한 결과 확보 하였으나, (소재의 전후차이는 있으나, 위약군 대비 효과는 유의적 차이 없음) 식품의약품안전처 규정개정으로 인한 3등급 소멸로 개별인정신청 보류. 차 선택으로 고시형 건강기능식품 2종 개발 및 산업화 완료함

○ 건강기능식품 개별인정 신청 추진 계획 (주관기관 자체 예산 추진)

- ① 기존 인체적용시험 기능성의 재시험 또는 새로운 기능성 인체적용시험 추진여부 결정
 - 기존 기능성 인체적용시험 프로토콜 및 dose 변화를 통한 재시험 여부
 - 전임상 데이터 검토를 통한 신규기능성 (대사성질환, 숙취 및 간보호 등) 진행 여부
- ② CRO 선정 및 IRB 신청 추진 (성과활용기간 1차년도)
 - 신규 CRO 선정 및 IRB 심사 승인 추진
- ③ 인체적용시험 추진 및 종료 (성과활용기간 2차년도)
 - 1 및 2차 유효성 평가 결과에 따른 개별인정신청 여부 결정
- ④ 개별인정신청서 작성 및 인정신청 (성과활용기간 3차년도)
 - 전임상 및 신청원료 표준화, 인체적용시험 데이터를 바탕으로 개별인정신청서 작성 및 신청 추진

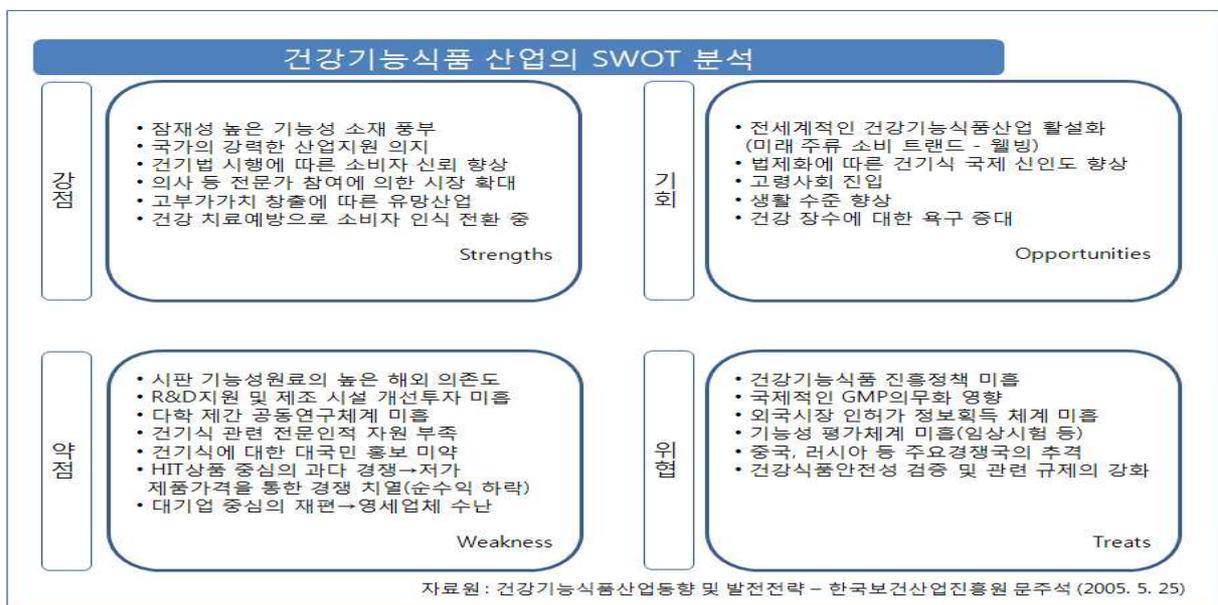


○ 건강기능식품 제품화 단계



< 개별인정 단계>

- 기술컨설팅 협의체 네트워크 확보 및 구축
- 기술컨설팅 신청접수 공고 및 홍보
- 건강기능식품 인·허가를 위한 핵심기술컨설팅 실시



□ 건강기능식품의 개발 방법 (부분 투자 방법)



○ , 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안

- 연구개발의 특징 및 장점은 연구전문 기관인 전남대학교의 산·학·연 네트워크를 이용하여 체계적인 연구장비 활용을 위한 체계를 구축하고 연구 기술개발을 진행함으로써 최단기간, 최저비용, 고효율성을 추구하면서, 건강기능성 식품의 효능을 최대화 할 수 있는 연구를 진행할 수 있다.

- 또한 주변의 연구기관인 전라남도 생물산업진흥재단은 현재 천연자원연구원을 포함한 7개 재단으로 구성되어있는데, 전남의 풍부한 천연·생물자원을 바탕으로 생물산업을 육성하기위한 체계적인 시스템을 갖추고 있다.

- 전라남도 생물산업진흥재단은 현재 천연자원연구원을 포함한 7개 재단으로 구성되어있는데, 전남의 풍부한 천연·생물자원을 바탕으로 생물산업을 육성하기위한 체계적인 시스템을 갖추고 있다.

센터 명칭	주요 기능
(장흥)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 웰빙 소재/생약 소재 개발 및 산업화 지원 - 지역특산자원의 체계적 관리 및 추출물 은행 운영 - 웰빙 소재/생약 소재 탐색/분리, 성분의 구조 규명, 응용 산업화 연구, 안전성 연구 - 산업화 기술/공정개발/시제품 생산 지원 - R&D 기술의 기업이전, 특허관리 및 기술이전
식품산업연구센터 (나주)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 생물식품 개발 및 제품화 지원 - 우수생산기준(GMP)의 식품 생산시설 지원 - 생물식품 창업 지원 - 전남지역 식품자원 상업화 지원 및 식품 클러스터 조성
생물의약품연구센터 (화순)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생물농업(동물 의약품) 및 의약분야(백신) 산업육성 ○ 기업체 유치를 통한 산업단지 조성 - CRO : 기술자문 및 상용화, 의약품 공동개발 - CMO : 비임상/임상 시료생산, GMP 분야의 제조 및 허가등록 지원, 상품화를 위한 공동사업
나노바이오연구센터, 생물방제센터 (장성, 곡성)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농생명산업 분야에 나노기술 접목을 통한 전통산업 첨단화 및 신산업 창출 - 나노바이오클러스터 구축(농생명산업과 IT 및 광산업과 연계) ○ 친환경 농생명단지 구축(교육, 훈련, 연구, 개발, 생산, 유통 등이 집적된 시범 단지 구축)

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

○ 황칠나무 효능·효과와 관련된 국제학술논문 자료

번호	논문명	학술지	게재연도	주요효능
1	Antiatherogenic activity of Dendropanax morbifera essential oil rats	Pharmazie	2009	항동맥경화
2	Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Dendropanax morbifera Leveille extract for mouthwash and denture cleaning solution	Journal of Advanced Prosthodontics	2016	항균, 항산화
3	Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of Dendropanax morbifera Leveille	Food chemistry	2013	항산화, 항암
4	Isolation and anticomplement activity of compounds from Dendropanax morbifera	Journal of ethnopharmacology	2004	항보체활성
5	Dendropanoscid Induce Autophagy through ERK1/2 Activation in MG-63 human Osteosarcoma Cells and Autophagy Inhibition Enhances Dendropanaxide-induced Apoptosis	PLOS one	2013	항암

○ 황칠나무 주요성분과 관련된 국제학술논문 자료

번호	논문명	학술지	게재연도	주요효능
1	Oleifolioside B-mediated autophagy promotes apoptosis in A549 human non-small cell lung cancers cells	International Journal of Oncology	1943	Oleifolioside B
2	Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves Dendropanax morbifera Leveille in normal and streptozotic-induced diabetic rats	Human & Experimental Toxicology	2011	Dendropanoxide
3	Rutin from Dendropanax morbifera Leveille Protects Human Dopaminergic Cells Against Rotenone Induced Cell Injury Through Inhibiting JNK and p38 MAPK Signalling	Neurochemical Research	2014	Rutin
4	Oleifolioside A, a New Active Compound, Attenuates LPS-Stimulated iNOS and COX-2 Expression through the Downregulation of NF-κB and MAPK Activation in RAW 264.7 Macrophages	Evidence-Based Complementary Alternative Medicine	2012	Oleifolioside A
5	Oleifolioside A Mediates Caspase-Independent Human Cervical Carcinoma HeLa Cell Apoptosis Involving Nuclear Relocation of Mitochondrial Apoptogenic Factors AIF and EndoG	Journal of Agricultural and Food Chemistry	2012	Oleifolioside A

7. 연구개발결과의 보안등급

	D-09
○해당사항없음	

8. 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	황칠나무 발효 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물	(재)전남생물 산업진흥원 천연자원연구센터		대한민국		2017.04.06		
2	특허	테트라데칸올을 포함하는 면역억제 조성물	전남대학교 산학협력단		대한민국		2016.7.14		
3	논문	Effect of Aqueous Extract of Dendropanax morbifera Leaf on Sexual Behavior in Male Rats	(재)전남생물 산업진흥원 천연자원연구센터	제저자	Journal of Food and Nutrition Research	1.95	2017 (5,(7), 518-521)	단독	SCIE
4	논문	Tetradecanol reduces EL-4 T cell growth by the down regulation of NF- κ B mediated IL-2 secretion	전남대학교 산학협력단		European Journal of Pharmacology	2.73	2017 (799, 2017, 135-142)	단독	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

12. 참고문헌

D-14

- 식약청 고시 제 2007-66호 식품의 유통기한 설정기준 및 개정고시(제2008-72호)
- 건강기능식품의 유통기간 설정 모델 연구, 2008, 식품의약품안전청
- 식품공전(2010)
- 건강기능식품 기능성 원료 인정서(제2008-55호)
- 관능검사 방법 및 응용. 김광옥, 김상숙, 성내경, 이영춘 신광출판사 1993
- Rúbia Casagrande, Sandra R. Georgettil Waldiceu A. 2006. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *AAPS PharmSciTech* ; 7
- Chang-Jo Jeong and Ki-Hwan Shim, Korean J. 1999. Chemical components in leaf and fruit stalk of *Hovenia dulcis* Thunb. *Postharvest SCI. Technol.* Vol. 6. No 4. 469~471p
- Korean J. 2007. Quality characteristics and storage properties of sikhe prepared with extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. *Food Cookery SCI*, Vol. 23. No 6. 848~857p
- Korean J. 2007. Quality characteristics of Haikseolgi made with *Hovenia dulcis*. *Food Engineering Progress* Vol. 11. No 3. 161~166p
- 2003. Stability testing of new drug substances and products. *ICH Guideline*
- 기상청 홈페이지 www.kma.go.kr
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol.* 105: 121-126.
- Aguilo A, Tauler , Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. 2005. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 84:1-7.
- Alessio HM and AH Goldfrab. 1988. Lipid peroxidation and scavenging enzymes during exercise: Adaptive response of training. *J. Applied Physiol.* 64:1333-1336.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77: 373-382.
- Anand T, Phani Kumar G, Pandareesh MD, Swamy MS, Khanum F, Bawa AS. 2012. Effect of bacoside extract from *Bacopa monniera* on physical fatigue induced by forced swimming. *Phytother Res.* 26:587-893.
- Baum M, Weiss M. 2001. The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids.* 20: 75-82.

- Bonen A. 2000. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32:778-789.
- Beaudeau JL, Gardes-Albert M, Delattre J, Legrand A, Rousselet F, Peynet J. 1996. Resistance of lipoprotein(a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 314: 277-284.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:1079-1989.
- Bradford MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brooks G A. 2000. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc.* 32:790-799.
- Calberg T, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 5475-5480.
- Davies CT, White MJ. 1982. Muscle weakness following dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 53:236-241.
- Dawson R Jr, Biasetti M, Messina S, Dominy J. 2002. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids.* 22:309-324.
- Ding JF, Li YY, Xu JJ, Su XR, Gao X, Yue FP. 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocol.* 25:1350-1353.
- Echeverry C, Blasina F, Arredondo F, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Vasquez L, et al. 2004. Cytoprotection by neutral fraction of tannat red wine against oxidative stress-induced cell death. *J Agric Food Chem.* 52:7395-7399.
- Ganju L, Padwad Y, Singh R, Karan D, Chanda S, Chopra MK, Bhatnagar P, Kashyap R, Sawhney RC. 2005. Anti-inflammatory activity of seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides*) leaves. *Int Immunopharmacol.* 5:1675-1684.
- Gao JM, Zhang AL, Zhang YS and Wang L. 1998. Advancements of flavonoids research in *Hippophae rhamnoides* L. *Hippophae.* 11: 34-40.

- Geetha S, Sai RM, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. 2003. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 87:247-251.
- Hall L, Williams K, Perry AF, Frayne J, Jury JA. 1998. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem. J.* 333: 5-9.
- Han D. 2006. Mechanisms of Liver Injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 291: 1-7.
- Janisch KM, Williammson G, Needs P, Plumb GW. 2004. Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. *Free Radic Res.* 38:877-884.
- Jankowska R, Passowicz-Muszyńska E, Banaś T, Marcinkowska A. 1994. The influence of vitamin A on production of oxygen free radicals and activity of granulocyte catalase in patients with chronic bronchitis. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 62: 628-633.
- Jung K, Kim IH, Han D. 2004. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *J. Ethnopharmacol.* 93:75-81.
- Kallio H, Yang B, Peippo P. 2002. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols and tocotrienols in seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides* L.) berries. *J Agric Food Chem.* 50:6136-6142.
- Kuti JO. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.* 85:527-533.
- Lapenna D, De Gioia S, Ciofani G, Bruno C, Porreca E, Pierdomenico SD, Cucurullo F. 1998. Antioxidant properties of ticlopidine on human low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* 436: 357-360.
- Lee SM, You YH, Yoon HG, Kim KM, Park JJ, Kim SO, Ho JN, Lee, JM, Shim SI, Jun WJ. 2011. Fatigue-Alleviating Effect on Mice of an Ethanolic Extract from *Rubuscoreanus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75(2): 349-351.
- LiochevSI, FridovichI. 2010. Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Free. Radic. Biol. Med.* 48: 1565-1569.

- Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, Inoue K, Fushiki T. 1996. An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J Appl Physiol.* 81:1843-1849.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Miyazaki T, Matsuzaki Y, Ikegami T, Miyakawa S, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. 2004. Optimal and effective oral dose of taurine to prolong exercise performance in rat, *Amino Acids.* 27: 291-298.
- Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. 2006. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290:1550-1556.
- Paglia DE, Valentine WNJ. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Passarella S, L de Bari, D Valenti, R Pizzuto, G Paventil, A. Atlante. 2008. Mitochondria and L-lactate metabolism. *FENE Lett.* 582:3569-3576.
- Rochem NW, Rodger GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XT. *J. Immunol. Methods.* 142: 257-265.
- Rousi, A., 1971. The genus Hippophae L., a taxonomic study. *Ann. Bot.* 8, 177-227.
- Shang H, Cao S, Wang J, Zheng H, Putheti R. 2009. Glabridin from Chinese herb licorice inhibits fatigue in mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 7:17-23.
- Sid B, Verrax J, Calderon PB. 2013. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic. Res.* 47: 894-904.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.
- Stahl W, Junghans A, de Boer B, Driomina ES, Brivida K, Sies H. 1998. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS. Lett.* 427: 305-308.
- Stait SE, Leake DS. 1996. The effects of ascorbate and dehydro ascorbate on the oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 320: 373-381.

- Tanaka M, Baba Y, Kataoka Y, Kinbara N, Sagesaka Y M, Kakuda T. 2008. Effects of epigallocatechingallate in liver of an animal model of combined (physical and mental) fatigue. *Nutrition*. 24:599–603.
- Tan W, Yu KQ, Liu YY, Ouyang MZ, Yan MH, Luo R, Zhao XS. 2012. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix rehmanniae preparata*. *Int J Biol Macromol*. 50:59–62.
- Tang W, Zhang Y, Gao J, Ding X, Gao S, 2008. The anti-fatigue effect of 20(R)-ginsenoside Rg3 in mice by intranasally administration. *Biol Pharm Bull*. 31: 2024–2027.
- Tesch P, Sjödin B, Thorstensson A, Karlsson J. 1978. Muscle fatigue and its relation to lactate accumulation and LDH activity in man. *Acta Physiol Scand*. 103:413–20.
- Venu Prasad MP and Khanum Farhath. 2012. Antifatigue Activity of Ethanolic Extract of *Ocimum sanctum* in Rats. *J. Med. Plants*. 6:37–46
- Wang J, Li S, Fan Y, Chen Y, Liu D, Cheng H, Gao X, Zhou Y. 2010. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J Ethnopharmacol*. 130:421–423.
- Wang L, Zhang HL, Lu R, Zhou YJ, Ma R, Lv JQ, Li XL, Chen LJ, Yao Z. 2008. The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. *Peptides*. 29:1176–1182.
- Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA, Neto CC. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J Agric Food Chem*. 50:5844–5849.
- Yao L, Li F. 2010. *Lycium barbarum* polysaccharides ameliorates physical fatigue. *Afr J Agric Res*. 5:2153–2157.
- Yatabe Y, Miyakawa S, Miyazaki T, Matsuzaki Y, Ochiai N. 2003. The effects of taurine administration in rat skeletal muscles on exercise. *J OrthopSci*. 8:415–419.
- You L, Ren J, Yang B, Regenstein J, Zhao M. 2012. Antifatigue activities of loach protein hydrolysates with different antioxidant activities. *J Agric Food Chem*. 60:12324–12331.
- You Y, Kim K, Yoon HG, Lee KW, Lee J, Chun J, Shin DH, Park J, Jun W. 2010. Chronic effect of ferulic acid from *Pseudosasa japonica* leaves on enhancing exercise activity in mice. *Phytother Res*. 24:1508–1513

- Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B. 2004. Role of taurine supplementation to prevent exerciseinduced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids*. 26:203-207
- Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B. 2004. Role of taurine supplementation to prevent exerciseinduced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids*. 26:203-207
- Zhang Y, Wang B. 2012. Effects of polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium on physical fatigue in mice. *Bangladesh J Pharmacol*. 7:217-221.
- Zhang Y, Yao X, Bao B, Zhang Y. 2006. Anti-fatigue activity of a triterpenoid-rich extract from Chinese bamboo shavings (*Caulis bambusae in Taeniam*). *Phytother Res*. 20:872-876.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.